



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104988187 B

(45) 授权公告日 2021.02.05

(21) 申请号 201510468525.2

(22) 申请日 2008.06.20

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 104988187 A

(43) 申请公布日 2015.10.21

(30) 优先权数据
11/943872 2007.11.21 US

(62) 分案原申请数据
200880125260.4 2008.06.20

(73) 专利权人 纳幕尔杜邦公司
地址 美国特拉华州·威尔明顿

(72) 发明人 R.迪科西莫 J.E.加瓦根 M.佩恩
F.B.库林三世

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司 72001
代理人 李波 李炳爱

(51) Int.Cl.

C12P 7/40 (2006.01)

A61L 2/18 (2006.01)

A01N 37/16 (2006.01)

A01N 37/36 (2006.01)

A01P 1/00 (2006.01)

A23L 5/20 (2016.01)

(56) 对比文件

W0 2007/070609 A2,2007.06.21

W0 2008/073139 A1,2008.06.19

US 5296161 A,1994.03.22

Vincent F et al.Multifunctional
xylooligosaccharide/cephalosporin C
deacetylase revealed by the hexameric
structure of the Bacillus subtilis enzyme
at 1.9 angstrom resolution.《Journal of
Molecular Biology》.2003,593-606.

审查员 李影

权利要求书4页 说明书80页

序列表86页 附图3页

(54) 发明名称

使用具有过水解活性的酶生产过酸

(57) 摘要

本发明涉及使用具有过水解活性的酶生产过酸。提供了用于由羧酸酯生产过氧羧酸的方法。更具体地讲,在具有过水解活性的酶催化剂存在下使羧酸酯与无机过氧化氢例如过氧化氢反应。基于保守结构特征,本发明过水解酶催化剂被归类为糖酯酶家族7(CE-7)的成员。此外,还提供了包含通过本发明所述方法产生的过酸的消毒制剂。

1. 生产过氧羧酸的方法, 所述方法包括:

a) 提供一组反应成分, 所述成分包括:

1) 至少一种选自下组的底物:

i) 具有以下结构的酯



其中X=式R₆-C(=O)O的酯基团

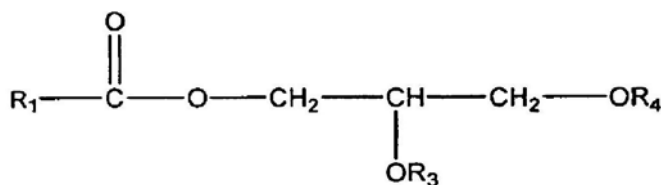
R₆=C1-C7线性、支链或环状烃基部分, 其任选被羟基或C1-C4烷氧基取代, 其中对于R₆=C2-C7, R₆任选包含一个或多个醚键;

R₅=C1-C6线性、支链或环状烃基部分, 其任选被羟基取代; 其中R₅中的每个碳原子各自包含不超过一个羟基或不超过一个酯基团; 其中R₅任选包含一个或多个醚键;

m=1至R₅中的碳原子数; 并且

其中所述酯在25℃下在水中具有至少5ppm的溶解度;

ii) 具有以下结构的甘油酯



其中R₁=任选被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基, 并且R₃和R₄各自为H或R₁C(=O); 以及

iii) 选自乙酰化单糖、乙酰化二糖和乙酰化多糖的乙酰化糖;

2) 过氧源; 以及

3) 具有过水解活性的酶催化剂, 其中所述酶催化剂由选自SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:106的氨基酸序列所示; 以及

b) 在合适的含水反应条件下将所述反应成分组合, 由此产生过氧羧酸。

2. 权利要求1的方法, 其中所述底物选自: 甘油一乙酸酯; 甘油二乙酸酯; 甘油三乙酸酯; 甘油一丙酸酯; 甘油二丙酸酯; 甘油三丙酸酯; 甘油一丁酸酯; 甘油二丁酸酯; 甘油三丁酸酯; 葡萄糖五乙酸酯; 木糖四乙酸酯; 乙酰化木聚糖; 乙酰化木聚糖片段; β-D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯; 三-O-乙酰基-D-半乳糖; 三-O-乙酰基-己烯糖; 1,2-乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、2,3-丁二醇、1,4-丁二醇、1,2-戊二醇、2,5-戊二醇、1,6-戊二醇、1,2-己二醇、2,5-己二醇、1,6-己二醇的一酯或二酯; 及其混合物。

3. 权利要求1的方法, 其中所述酶催化剂由选自下组的核酸分子编码: SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:88, SEQ ID NO:89, SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:96, SEQ ID NO:97, SEQ ID NO:101, SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:105。

4. 权利要求1的方法, 其中在将反应成分组合后5分钟至2小时内以至少20ppm的浓度产生过氧羧酸。

5. 权利要求1的方法, 其中所产生的过氧羧酸是过乙酸、过丙酸、过丁酸、过乳酸、过乙醇酸、过甲氧基乙酸、过-β-羟基丁酸或其混合物。

6. 权利要求5的方法, 其中所产生的过氧羧酸是过乙酸。

7. 权利要求1的方法, 其中所述酶催化剂是微生物细胞、透化的微生物细胞、微生物细

胞提取物、部分纯化的酶或纯化的酶的形式。

8. 权利要求1的方法,其中所述酶催化剂缺乏过氧化氢酶活性。

9. 使用酶促产生的过氧羧酸组合物消毒硬质表面或无生命物体的方法,所述方法包括:

提供一组反应成分,所述成分包括:

1) 至少一种选自下组的底物:

i) 具有以下结构的酯



其中X=式R₆-C(O)O的酯基团

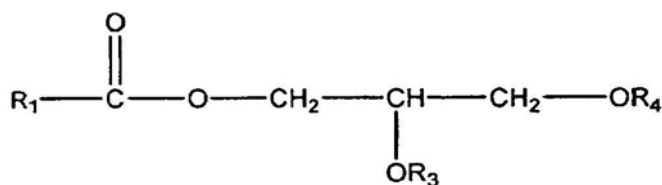
R₆=C1-C7线性、支链或环状烃基部分,其任选被羟基或C1-C4烷氧基取代,其中对于R₆=C2-C7,R₆任选包含一个或多个醚键;

R₅=C1-C6线性、支链或环状烃基部分,其任选被羟基取代;其中R₅中的每个碳原子各自包含不超过一个羟基或不超过一个酯基团;其中R₅任选包含一个或多个醚键;

m=1至R₅中的碳原子数;并且

其中所述酯在25℃下在水中具有至少5ppm的溶解度;

ii) 具有以下结构的甘油酯



其中R₁=任选被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基,并且R₃和R₄各自为H或R₁C(O);以及

iii) 选自乙酰化单糖、乙酰化二糖和乙酰化多糖的乙酰化糖;

2) 过氧源;以及

3) 具有过水解活性的酶催化剂,其中所述酶催化剂由选自SEQ ID NO:82,SEQ ID NO:90,SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:106的氨基酸序列所示;以及

在合适的含水反应条件下将所述反应成分组合,由此产生过氧羧酸;以及

使所述硬质表面或无生命物体与过氧羧酸接触,由此将所述表面或所述无生命物体消毒。

10. 权利要求9的方法,进一步包括稀释通过组合所述反应成分产生的所述过氧羧酸。

11. 权利要求9的方法,其中所述酶催化剂由选自下组的核酸分子编码:SEQ ID NO:77,SEQ ID NO:80,SEQ ID NO:81,SEQ ID NO:85,SEQ ID NO:88,SEQ ID NO:89,SEQ ID NO:93,SEQ ID NO:96,SEQ ID NO:97,SEQ ID NO:101,SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:105。

12. 权利要求9的方法,其中在将反应成分组合后5分钟至2小时内以至少20ppm的浓度产生过氧羧酸。

13. 权利要求9的方法,其中所述底物是甘油一乙酸酯;甘油二乙酸酯;甘油三乙酸酯;甘油一丙酸酯;甘油二丙酸酯;甘油三丙酸酯;甘油一丁酸酯;甘油二丁酸酯;甘油三丁酸酯;葡萄糖五乙酸酯;木糖四乙酸酯;乙酰化木聚糖;乙酰化木聚糖片段;β-D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯;三-O-乙酰基-D-半乳糖;三-O-乙酰基-己烯糖;1,2-乙二醇、1,2-丙二醇、

1,3-丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、2,3-丁二醇、1,4-丁二醇、1,2-戊二醇、2,5-戊二醇、1,6-戊二醇、1,2-己二醇、2,5-己二醇、1,6-己二醇的一酯或二酯;或其混合物。

14. 权利要求9的方法,其中所产生的过氧羧酸是过乙酸、过丙酸、过丁酸、过乳酸、过乙醇酸、过甲氧基乙酸、过-β-羟基丁酸或其混合物。

15. 权利要求9的方法,其中所产生的过氧羧酸是过乙酸。

16. 权利要求9的方法,其中使所述硬质表面或无生命物体在组合所述反应成分后5分钟至168小时内与过氧羧酸接触。

17. 权利要求9的方法,其中使所述硬质表面或无生命物体在组合所述反应成分后5分钟至48小时内与过氧羧酸接触。

18. 权利要求9的方法,其中使所述硬质表面或无生命物体在组合所述反应成分后5分钟至2小时内与过氧羧酸接触。

19. 权利要求9的方法,其中所述硬质表面或无生命物体上的存活生物污染物的浓度降低至少3-log。

20. 权利要求9的方法,其中所述硬质表面或无生命物体上的存活生物污染物的浓度降低至少5-log。

21. 权利要求9的方法,其中所述酶催化剂是微生物细胞、透化的微生物细胞、微生物细胞提取物、部分纯化的酶或纯化的酶的形式。

22. 权利要求9的方法,其中所述酶催化剂缺乏过氧化氢酶活性。

23. 用酶促产生的过氧羧酸组合物消毒硬质表面或无生命物体的方法,所述方法包括在合适的含水反应条件下在所述硬质表面或无生命物体上将一组反应成分组合,所述反应成分包括:

1) 至少一种选自下组的底物:

i) 具有以下结构的酯



其中X=式R₆-C(O)O的酯基团

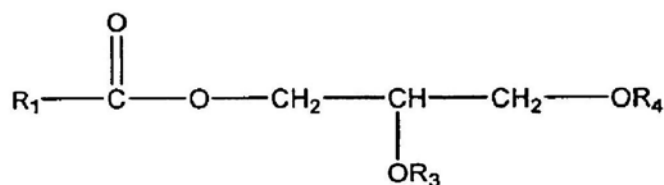
R₆=C1-C7线性、支链或环状烃基部分,其任选被羟基或C1-C4烷氧基取代,其中对于R₆=C2-C7, R₆任选包含一个或多个醚键;

R₅=C1-C6线性、支链或环状烃基部分,其任选被羟基取代;其中R₅中的每个碳原子各自包含不超过一个羟基或不超过一个酯基团;其中R₅任选包含一个或多个醚键;

m=1至R₅中的碳原子数;并且

其中所述酯在25℃下在水中具有至少5ppm的溶解度;

ii) 具有以下结构的甘油酯



其中R₁=任选被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基,并且R₃和R₄各自为H或R₁C(O);以及

iii) 选自乙酰化单糖、乙酰化二糖和乙酰化多糖的乙酰化糖;

2) 过氧源;以及

3) 具有过水解活性的酶催化剂,其中所述酶催化剂由选自SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:106的氨基酸序列所示,

由此产生过氧羧酸,从而消毒所述硬质表面或无生命物体。

24. 权利要求23的方法,其中所述过氧羧酸是稀释的。

25. 权利要求23的方法,其中所述酶催化剂由选自下组的核酸分子编码:SEQ ID NO:77,SEQ ID NO:80,SEQ ID NO:81,SEQ ID NO:85,SEQ ID NO:88,SEQ ID NO:89,SEQ ID NO:93,SEQ ID NO:96,SEQ ID NO:97,SEQ ID NO:101,SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:105。

26. 权利要求23的方法,其中在将反应成分组合后5分钟至2小时内以至少20ppm的浓度产生过氧羧酸。

27. 权利要求23的方法,其中所述底物是甘油一乙酸酯;甘油二乙酸酯;甘油三乙酸酯;甘油一丙酸酯;甘油二丙酸酯;甘油三丙酸酯;甘油一丁酸酯;甘油二丁酸酯;甘油三丁酸酯;葡萄糖五乙酸酯;木糖四乙酸酯;乙酰化木聚糖;乙酰化木聚糖片段; β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯;三-O-乙酰基-D-半乳糖;三-O-乙酰基-己烯糖;1,2-乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、2,3-丁二醇、1,4-丁二醇、1,2-戊二醇、2,5-戊二醇、1,6-戊二醇、1,2-己二醇、2,5-己二醇、1,6-己二醇的一酯或二酯;或其混合物。

28. 权利要求23的方法,其中所产生的过氧羧酸是过乙酸、过丙酸、过丁酸、过乳酸、过乙醇酸、过甲氧基乙酸、过 β -羟基丁酸或其混合物。

29. 权利要求23的方法,其中所产生的过氧羧酸是过乙酸。

30. 权利要求23的方法,其中所述硬质表面或无生命物体上的存活生物污染物的浓度降低至少3-log。

31. 权利要求23的方法,其中所述硬质表面或无生命物体上的存活生物污染物的浓度降低至少5-log。

32. 权利要求23的方法,其中所述酶催化剂是微生物细胞、透化的微生物细胞、微生物细胞提取物、部分纯化的酶或纯化的酶的形式。

33. 权利要求23的方法,其中所述酶催化剂缺乏过氧化氢酶活性。

使用具有过水解活性的酶生产过酸

[0001] 本申请是申请日为2008年6月20日的中国专利申请200880125260.4“使用具有过水解活性的酶生产过酸”的分案申请。

[0002] 对相关申请的交叉引用

[0003] 本申请是2007年11月21日提交的美国专利申请号11/943872的部分继续申请,其全部内容通过引用的方式并入本文。本申请与2007年5月2日提交的美国专利申请号11/743354、2006年12月12日提交的美国专利申请号11/638,635、2005年12月13日提交的美国临时申请号60/750,092,和2006年10月20日提交的美国临时申请号60/853,065相关,上述每个申请的全部内容通过引用的方式并入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及过酸生物合成和原位酶催化领域。具体而言,本发明提供了使用酶的过水解(perhydrolysis)活性产生过酸的方法,所述酶在结构上被鉴定为属于糖酯酶的CE-7家族,包括头孢菌素乙酰水解酶(CAHs;E.C.3.1.1.41)和乙酰木聚糖酯酶(AXEs;E.C.3.1.1.72)。该酶促方法由羧酸酯底物产生过羧酸。此外,本发明还提供了包含通过本文所述方法产生的过酸的消毒制剂。

背景技术

[0005] 过酸组合物已报道是有效的抗微生物剂。对硬质表面、肉制品、活植物组织和医疗器材进行抗微生物生长的清洁、消毒和/或卫生处理的方法已得到描述(美国专利6,545,047;美国专利6,183,807;美国专利6,518,307;美国专利申请公布20030026846;和美国专利5,683,724)。也已报道过酸在制备用于衣物洗涤剂应用的漂白组合物中是有用的(美国专利3,974,082;美国专利5,296,161;和美国专利5,364,554)。

[0006] 过酸可以通过羧酸和过氧化氢的化学反应进行制备(参见“Organic Peroxides”, Daniel Swern编辑,第1卷,第313-516页;Wiley Interscience, New York, 1971)。该反应通常由强无机酸例如浓硫酸催化。过氧化氢与羧酸的反应是平衡反应,并且过酸的产生通过使用过量浓度的过氧化物和/或羧酸,或通过去除水而得到促进。关于用于过酸产生的化学反应存在几个缺点:a)用于促进过酸产生的高浓度羧酸在使用含过酸溶液时可以导致不希望有的气味,2)过酸随着时间的过去在溶液中时常是不稳定的,并且溶液中的过酸浓度在使用前的保存期间降低,和3)由于使用浓硫酸作为催化剂该制剂通常是强酸性的。

[0007] 克服过酸化学生产的缺点的一种方法是使用酶催化剂代替强酸催化剂。酶催化剂的使用允许在使用和/或应用时快速产生过酸,从而避免了与过酸溶液保存和随着时间的过去过酸浓度变化相关的问题。一般用于经由与过氧化氢的直接化学反应来产生过酸的高浓度的羧酸不是过酸的酶促生产所需的,其中酶催化的反应可以使用浓度比化学反应中一般使用的浓度低得多的羧酸酯作为底物。酶反应可以跨越广泛范围的pH来进行,取决于在给定pH下的酶活性和稳定性,并且取决于在给定pH下对于过水解的底物特异性。

[0008] 酯酶、脂肪酶和一些蛋白酶具有催化烷基酯水解以生成相应的羧酸的能力(式1):

[0009] 式1

[0010] 脂肪酶、酯酶或

[0011] 蛋白酶

[0012] $R_1COOR_2 + H_2O \rightarrow R_1COOH + HOR_2$

[0013] 某些酯酶、蛋白酶和脂肪酶还显示出过水解活性,催化从烷基酯合成过酸(式2):

[0014] 式2

[0015] 脂肪酶、酯酶或

[0016] 蛋白酶

[0017] $R_1COOR_2 + H_2O_2 \rightarrow R_1COOOH + HOR_2$

[0018] O.Kirk等人(Biocatalysis,11:65-77 (1994))研究了水解酶(脂肪酶、酯酶和蛋白酶)催化酰基底物与过氧化氢的过水解以形成过氧羧酸,并且报道过水解在含水系统中以非常低的效率进行。此外,他们发现脂肪酶和酯酶使过羧酸降解成相应的羧酸和过氧化氢。他们还发现蛋白酶在水中既不降解羧酸酯也不催化羧酸酯的过水解。作者得出结论,酯酶、脂肪酶和蛋白酶一般不适于在含水环境中催化简单酯类例如辛酸甲酯和三辛酸甘油酯(trioctanoin)的过水解。

[0019] 美国专利3,974,082描述了通过使待漂白的材料与水溶液接触来生产用于衣物洗涤剂应用的漂白组合物,所述水溶液包含释放氧的无机过氧化合物、酰基烷基酯和能够使该酯水解的酯酶或脂肪酶。

[0020] 美国专利5,364,554描述了用于使用蛋白酶、过氧化氢来源和优选地在化学上不能过水解的酯底物在水溶液中原位生成过酸的活化氧化剂系统。还公开了漂白方法和形成过酸的方法。

[0021] 美国专利5,296,161描述了在包含一种或多种特异性酯酶和脂肪酶、过氧化氢来源和适于在漂白组合物中使用的官能化酯底物的水溶液中生产过酸。然而,产生的过酸浓度一般不足以用于在许多商业消毒应用中使用。

[0022] 用于使用酶催化剂由相应的羧酸酯制备过酸的大部分已知方法不能产生和积聚浓度高至足以在各种应用中有效消毒的过酸。近期已报道,几种蛋白酶和脂肪酶组合原位产生浓度适于用作消毒剂和/或商业漂白剂的过酸(例如过乙酸)(参见共同拥有的美国专利申请11/413,246和11/588,523;引入本文作为参考)。然而,仍需要鉴定能够原位产生过酸的另外的过水解酶(perhydrolase)。

[0023] 美国专利4,444,886描述了具有酯水解酶活性(描述为“甘油二乙酸酯酶(acetinase)”)的枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)菌株(ATCC31954TM),其具有用于水解具有含2-8个碳原子的酰基的甘油酯的高特异性。美国专利4,444,886没有描述、讨论或预测这种菌株的酯水解酶活性具有对于羧酸酯(包括甘油酯)的过水解酶活性。

[0024] 待解决的问题是提供原位酶促生成浓度适于在各种消毒应用和/或漂白应用中使用的过酸的方法。优选地,用于生成过酸组合物的底物应当是相对无毒和价廉的,例如羧酸酯,特别是单酰基甘油、二酰基甘油和三酰基甘油,其中酰基具有1-8个碳原子,以及乙酰化糖,和C1-C6多元醇酯。

发明内容

[0025] 所述问题已通过下述发现得到解决：属于CE-7酯酶结构家族的酶（例如头孢菌素C脱乙酰酶[CAHs]和乙酰木聚糖酯酶[AXEs]）表现出用于将存在的羧酸酯（在过氧的无机来源例如过氧化氢存在下）转化成浓度足以用作消毒剂和/或漂白剂的过酸的显著过水解活性。该系统通过产生高浓度过酸而又不需要高浓度过氧而实现效率。

[0026] 过水解酶的具体实例例如来自枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) (ATCC 31954TM)，枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*) BE1010 (Payne and Jackson, J. Bacteriol. 173: 2278-2282 (1991))，枯草芽孢杆菌 ATCC6633TM (U.S. 6,465,233)，枯草芽孢杆菌 ATCC 29233TM；地衣芽孢杆菌 (*B. licheniformis*) ATCC 14580TM (Rey等人, genome Biol., 5(10): article77 (2004))，热纤维梭菌 (*Clostridium thermocellum*) ATCC27405TM (Copeland等人, GENBANK[®] ZP_00504991)，短小芽孢杆菌 (*B. pumilus*) PS213 (Degrassi等人, Microbiology, 146:1585-1591 (2000))，那不勒斯栖热袍菌 (*Thermotoga neapolitana*) (GENBANK[®] AAB70869.1)、克劳氏芽孢杆菌 (*Bacillus clausii*) KSM-K16 (GENBANK[®] YP_175265)，海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) MSB8 (GENBANK[®] NP_227893.1)，解糖热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacterium saccharolyticum*) (GENBANK[®] S41858)，*Thermotoga lettingae* (GENBANK[®] CP000812)，*Thermotoga petrophila* (GENBANK[®] CP000702)，和栖热袍菌属物种 (*Thermotoga* sp.) RQ2 (GENBANK[®] CP000969)。

[0027] 本文所描述的每一本发明过水解酶共有保守结构特征（即保守特征基序 (signature Motif)）以及与其他 α/β -水解酶（例如可商购获得的脂肪酶；参见比较实施例26和28）相比具有优异的过水解活性，使得该独特的酶家族特别适于原位生成浓度足以用作消毒剂和/或漂白剂的过酸。适用于本发明方法的过水解酶可通过在糖酯酶CE-7家族内发现的保守特征基序来鉴定。

[0028] 在本发明的一个方面，提供了用于由羧酸酯生产过氧羧酸的方法，所述方法包括：

[0029] a) 提供一组反应成分，所述成分包括：

[0030] 1) 至少一种选自下组的底物：

[0031] i) 具有以下结构的酯

[0032] $[X]_m R_5$

[0033] 其中X=式R₆-C(O)O的酯基团

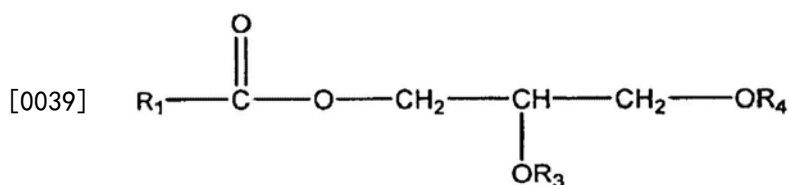
[0034] R₆=C1-C7线性、支链或环状烃基部分，其任选被羟基或C1-C4烷氧基取代，其中对于R₆=C2-C7，R₆任选包含一个或多个醚键；

[0035] R₅=C1-C6线性、支链或环状烃基部分，其任选被羟基取代；其中R₅中的每个碳原子各自包含不超过一个羟基或不超过一个酯基团；其中R₅任选包含一个或多个醚键；

[0036] m=1至R₅中的碳原子数；并且

[0037] 其中所述酯在25℃下在水中具有至少5ppm的溶解度；

[0038] ii) 具有以下结构的甘油酯



[0040] 其中 R_1 =任选被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基,并且 R_3 和 R_4 各自为H或 $\text{R}_1\text{C}(\text{O})$;以及

[0041] iii) 选自乙酰化单糖、乙酰化二糖和乙酰化多糖的乙酰化糖;

[0042] 2) 过氧源;以及

[0043] 3) 具有过水解活性的酶催化剂,其中所述酶催化剂包括具有CE-7特征基序的酶,当使用CLUSTALW与参照序列SEQ ID NO:2比对时,所述特征基序包含:

[0044] i) 在SEQ ID NO:2的氨基酸位置118-120的RGQ基序;

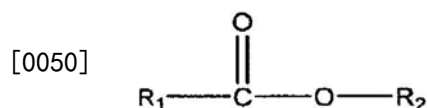
[0045] ii) 在SEQ ID NO:2的氨基酸位置179-183的GXSQG基序;和

[0046] iii) 在SEQ ID NO:2的氨基酸位置298-299的HE基序;并且

[0047] 其中所述酶包含与SEQ ID NO:2的至少30%的氨基酸同一性;以及

[0048] b) 在合适的含水反应条件下将所述反应成分组合,由此产生过氧羧酸。

[0049] 在另一实施方案中,合适的底物也包括下式的酯:



[0051] 其中 R_1 =任选被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基,并且 R_2 =C1-C10直链或支链烷基、链烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂芳基、 $(\text{CH}_2\text{CH}_2-\text{O})_n\text{H}$ 或 $(\text{CH}_2\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{O})_n\text{H}$,并且 $n=1-10$ 。

[0052] 在另一方面,提供了消毒表面或无生命物体的方法,除了上文的方法,所述方法包括以下步骤:

[0053] c) 使表面或无生命物体与步骤(b)产生的过氧羧酸接触,从而消毒所述表面或所述无生命物体。

[0054] 另一方面,提供了用酶促产生的过氧羧酸组合物消毒硬质表面或无生命物体的方法,所述方法包括:

[0055] a) 在合适的含水反应条件下在所述硬质表面或无生命物体上将一组反应成分组合,所述反应成分包括:

[0056] 1) 至少一种选自下组的底物:

[0057] i) 具有以下结构的酯

[0058] $[\text{X}]_m\text{R}_5$

[0059] 其中 X =式 $\text{R}_6-\text{C}(\text{O})\text{O}$ 的酯基团

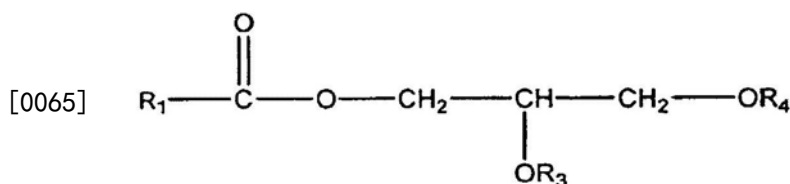
[0060] R_6 =C1-C7线性、支链或环状烃基部分,其任选被羟基或C1-C4烷氧基取代,其中对于 R_6 =C2-C7, R_6 任选包含一个或多个醚键;

[0061] R_5 =C1-C6线性、支链或环状烃基部分,其任选被羟基取代;其中 R_5 中的每个碳原子各自包含不超过一个羟基或不超过一个酯基团;其中 R_5 任选包含一个或多个醚键;

[0062] $m=1$ 至 R_5 中的碳原子数;并且

[0063] 其中所述酯在25℃下在水中具有至少5ppm的溶解度；

[0064] ii) 具有以下结构的甘油酯



[0066] 其中R₁=任选被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基,并且R₃和R₄各自为H或R₁C(O);以及

[0067] iii) 选自乙酰化单糖、乙酰化二糖和乙酰化多糖的乙酰化糖;

[0068] 2) 过氧源;以及

[0069] 3) 具有过水解活性的酶催化剂,其中所述酶催化剂包含选自SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:106的氨基酸序列,或通过对所述氨基酸序列取代、去除或添加一个或多个氨基酸而衍生的具有过水解酶活性的基本上相似的酶,

[0070] 由此产生过氧羧酸,从而消毒所述硬质表面或无生命物体。

[0071] 在一些实施方案中,产生的过氧羧酸是稀释的。

[0072] 在另一实施方案中,上述方法包括含有选自SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:106的氨基酸序列的酶催化剂,或通过对所述氨基酸序列取代、去除或添加一个或多个氨基酸而衍生的具有过水解酶活性的基本上相似的酶。

[0073] 在另一实施方案中,具有过水解酶活性的基本上相似的酶与选自SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:106的一个或多个氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性。

[0074] 在一个优选实施方案中,底物选自:甘油一乙酸酯;甘油二乙酸酯;甘油三乙酸酯;甘油一丙酸酯;甘油二丙酸酯;甘油三丙酸酯;甘油一丁酸酯;甘油二丁酸酯;甘油三丁酸酯;葡萄糖五乙酸酯;木糖四乙酸酯;乙酰化木聚糖;乙酰化木聚糖片段;β-D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯;三-O-乙酰基-D-半乳糖;三-O-乙酰基-己烯糖;1,2-乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、2,3-丁二醇、1,4-丁二醇、1,2-戊二醇、2,5-戊二醇、1,6-戊二醇、1,2-己二醇、2,5-己二醇、1,6-己二醇的一酯或二酯;及其混合物。

附图说明

[0075] 图1(图片a-c)是本发明过水解酶的CLUSTALW比对。每一种过水解酶在结构上被归类为糖酯酶家族7(CE-7)的成员,并且共有一些保守域。已经鉴定了几个保守基序(加下划线),它们一起形成CE-7糖酯酶的特征基序。另外的基序(LXD;SEQ ID NO:2的氨基酸残基267-269)也加了下划线,并且可用于进一步表征特征基序。

[0076] 生物序列简述

[0077] 下面的序列遵照37C.F.R.1.821-1.825(“对含有核酸序列和/或氨基酸序列公开的专利申请的要求-序列规则”),并且符合世界知识产权组织(WIPO)ST.25标准(1998)以及欧洲专利公约(EPC)和专利合作条约(PCT)的序列表要求(规则5.2和49.5(a-bis))以及行政指令的第208节和附录C。用于核苷酸和氨基酸序列数据的符号和格式均遵照37C.F.R.§

1.822中列出的规则。

[0078] SEQ ID NO:1是来自枯草芽孢杆菌ATCC 31954™的头孢菌素C脱乙酰酶 (cah) 编码区的核酸序列。

[0079] SEQ ID NO:2是来自枯草芽孢杆菌ATCC 31954™的头孢菌素C脱乙酰酶的推导氨基酸序列。

[0080] SEQ ID NO:3和4是用于PCR扩增来自枯草芽孢杆菌物种的过水解酶基因以构建pSW186、pSW187、pSW188和pSW190的引物。

[0081] SEQ ID NO:5是来自枯草芽孢杆菌枯草亚种菌株168 (*B. subtilis* subsp. *subtilis* str.168) 的头孢菌素C脱乙酰酶编码区的核酸序列。

[0082] SEQ ID NO:6是来自枯草芽孢杆菌枯草亚种菌株168 (*B. subtilis* subsp. *subtilis* str.168) 的头孢菌素C脱乙酰酶的推导氨基酸序列,并且与来自枯草芽孢杆菌BE1010的头孢菌素C脱乙酰酶的推导氨基酸序列相同。

[0083] SEQ ID NO:7是来自枯草芽孢杆菌ATCC 6633™的头孢菌素乙酰酯酶编码区的核酸序列。

[0084] SEQ ID NO:8是来自枯草芽孢杆菌ATCC 6633™的头孢菌素乙酰酯酶的推导氨基酸序列。

[0085] SEQ ID NO:9是来自地衣芽孢杆菌ATCC 14580™的头孢菌素C脱乙酰酶编码区的核酸序列。

[0086] SEQ ID NO:10是来自地衣芽孢杆菌ATCC 14580™的头孢菌素C脱乙酰酶的推导氨基酸序列。

[0087] SEQ ID NO:11是来自短小芽孢杆菌PS213的乙酰木聚糖酯酶编码区的核酸序列。

[0088] SEQ ID NO:12是来自短小芽孢杆菌PS213的乙酰木聚糖酯酶的推导氨基酸序列。

[0089] SEQ ID NO:13是来自热纤维梭菌 (*Clostridium thermocellum*) ATCC27405™的乙酰木聚糖酯酶编码区的核酸序列。

[0090] SEQ ID NO:14是来自热纤维梭菌ATCC 27405™的乙酰木聚糖酯酶的推导氨基酸序列。

[0091] SEQ ID NO:15是来自那不勒斯栖热袍菌的乙酰木聚糖酯酶编码区的核酸序列。

[0092] SEQ ID NO:16是来自那不勒斯栖热袍菌的乙酰木聚糖酯酶的推导氨基酸序列。

[0093] SEQ ID NO:17是来自海栖热袍菌MSB8的乙酰木聚糖酯酶编码区的核酸序列。

[0094] SEQ ID NO:18是来自海栖热袍菌MSB8的乙酰木聚糖酯酶的推导氨基酸序列。

[0095] SEQ ID NO:19是来自热厌氧芽孢杆菌属物种JW/SL YS485的乙酰木聚糖酯酶编码区的核酸序列。

[0096] SEQ ID NO:20是来自热厌氧芽孢杆菌属物种JW/SL YS485的乙酰木聚糖酯酶的推导氨基酸序列。

[0097] SEQ ID NO:21是来自芽孢杆菌属物种NRRL B-14911的头孢菌素C脱乙酰酶编码区的核酸序列。

[0098] SEQ ID NO:22是来自芽孢杆菌属物种NRRL B-14911的头孢菌素C脱乙酰酶的推导氨基酸序列。

[0099] SEQ ID NO:23是来自喜盐芽孢杆菌 (*Bacillus halodurans*) C-125的头孢菌素C脱

乙酰酶编码区的核酸序列。

[0100] SEQ ID NO:24是来自喜盐芽孢杆菌C-125的头孢菌素C脱乙酰酶的推导氨基酸序列。

[0101] SEQ ID NO:25是来自克劳氏芽孢杆菌 (*Bacillus clausii*) KSM-K16的头孢菌素C脱乙酰酶编码区的核酸序列。

[0102] SEQ ID NO:26是来自克劳氏芽孢杆菌KSM-K16的头孢菌素C脱乙酰酶的推导氨基酸序列。

[0103] SEQ ID NO:27和28是用于PCR扩增来自枯草芽孢杆菌物种的过水解酶基因以构建pSW194和pSW189的引物。

[0104] SEQ ID NO:29是克隆到pSW194内的PCR产物的核酸序列。

[0105] SEQ ID NO:30是克隆到pSW189内的PCR产物的核酸序列。

[0106] SEQ ID NO:31是克隆到pSW190内的枯草芽孢杆菌ATCC 29233TM头孢菌素C脱乙酰酶 (cah) 基因的核酸序列。

[0107] SEQ ID NO:32是枯草芽孢杆菌ATCC 29233TM头孢菌素C脱乙酰酶 (CAH) 的推导氨基酸序列。

[0108] SEQ ID NO:33和34是用于PCR扩增地衣芽孢杆菌ATCC 14580TM头孢菌素C脱乙酰酶基因以构建pSW191的引物，

[0109] SEQ ID NO:35和36是用于PCR扩增热纤维梭菌ATCC 27405TM乙酰木聚糖酯酶基因以构建pSW193的引物。

[0110] SEQ ID NO:37和38是用于PCR扩增短小芽孢杆菌PS213乙酰木聚糖酯酶编码序列 (GENBANK[®] AJ249957) 以构建pSW195的引物。

[0111] SEQ ID NO:39和40是用于PCR扩增那不勒斯栖热袍菌乙酰木聚糖酯酶基因 (GENBANK[®] 58632) 以构建pSW196的引物。

[0112] SEQ ID NO:41是在质粒pSW196中的那不勒斯栖热袍菌乙酰木聚糖酯酶基因的密码子最优化形式的核酸序列。

[0113] SEQ ID NO:42是卡那霉素抗性基因的核酸序列。

[0114] SEQ ID NO:43是质粒pKD13的核酸序列。

[0115] SEQ ID NO:44和45是用于产生编码卡那霉素基因的PCR产物的引物，所述卡那霉素基因的侧翼是与大肠杆菌 (*E. coli*) MG1655中的katG过氧化氢酶基因具有同源性的区域。所述产物用于破坏内源性katG基因。

[0116] SEQ ID NO:46是编码卡那霉素抗性基因的PCR产物的核酸序列，所述卡那霉素抗性基因的侧翼是与大肠杆菌MG1655中的katG过氧化氢酶基因具有同源性的区域。所述产物用于破坏内源性katG基因。

[0117] SEQ ID NO:47是大肠杆菌MG1655中的katG过氧化氢酶基因的核酸序列。

[0118] SEQ ID NO:48是大肠杆菌MG1655中的katG过氧化氢酶的推导氨基酸序列。

[0119] SEQ ID NO:49是质粒pKD46的核酸序列。

[0120] SEQ ID NO:50和51是用于证实katG基因破坏的引物。

[0121] SEQ ID NO:52是质粒pCP20的核酸序列。

[0122] SEQ ID NO:53和54是用于产生编码卡那霉素基因的PCR产物的引物,所述卡那霉素基因的侧翼是与大肠杆菌MG1655中的katE过氧化氢酶基因具有同源性的区域。所述产物用于破坏内源性katE基因。

[0123] SEQ ID NO:55是编码卡那霉素抗性基因的PCR产物的核酸序列,所述卡那霉素抗性基因的侧翼是与大肠杆菌MG1655中的katE过氧化氢酶基因具有同源性的区域。所述产物用于破坏内源性katE基因。

[0124] SEQ ID NO:56是大肠杆菌MG1655中的katE过氧化氢酶基因的核酸序列。

[0125] SEQ ID NO:57是大肠杆菌MG1655中的katE过氧化氢酶的推导氨基酸序列。

[0126] SEQ ID NO:58和59是用于证实以下菌株中的katE基因破坏的引物:单敲除菌株大肠杆菌MG1655 Δ katE,和双敲除菌株大肠杆菌MG1655 Δ katG Δ katE,其在本文中称为大肠杆菌KLP18。

[0127] SEQ ID NO:60是编码氨基酸序列SEQ ID NO:12的短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) PS213的密码子最优化形式的核酸序列。

[0128] SEQ ID NO:61是包含SEQ ID NO:2的氨基酸残基118-299的区域的氨基酸序列。

[0129] SEQ ID NOs:62和63是用于PCR扩增克劳氏芽孢杆菌KSM-K16头孢菌素-C脱乙酰酶的密码子最优化形式的引物的核酸序列。

[0130] SEQ ID NO:64是编码克劳氏芽孢杆菌KSM-K16头孢菌素-C脱乙酰酶编码序列的密码子最优化形式的PCR产物的核酸序列。

[0131] SEQ ID NO:65是密码子最优化的克劳氏芽孢杆菌KSM-K16头孢菌素-C脱乙酰酶编码序列的核酸序列。

[0132] SEQ ID NOs:66和67是用于PCR扩增解糖热厌氧杆菌乙酰木聚糖酯酶编码区 (GENBANK® 登录号S41858) 的密码子最优化形式的引物的核酸核酸。

[0133] SEQ ID NO:68是编码解糖热厌氧杆菌乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的PCR产物的核酸序列。

[0134] SEQ ID NO:69是解糖热厌氧杆菌乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的核酸序列。

[0135] SEQ ID NO:70是来自解糖热厌氧杆菌的乙酰木聚糖酯酶 (GENBANK® 登录号S41858) 的推导氨基酸序列。

[0136] SEQ ID NOs:71和72是用于PCR扩增海栖热袍菌MSB8 (GENBANK® 登录号NP_227893.1) 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的引物的核酸序列。

[0137] SEQ ID NO:73是编码海栖热袍菌MSB8乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的PCR产物的核酸序列。

[0138] SEQ ID NO:74是海栖热袍菌MSB8乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的核酸序列。

[0139] SEQ ID NOs:75和76是用于PCR扩增*Thermotoga lettingae* (GENBANK® 登录号CP000812) 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的引物的核酸序列。

[0140] SEQ ID NO:77是编码*Thermotoga lettingae*乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的PCR产物的核酸序列。

[0141] SEQ ID N0s:78和79是用于PCR扩增*Thermotoga lettingae* (GENBANK® 登录号CP000812) 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的引物的核酸序列。

[0142] SEQ ID N0:80是编码*Thermotoga lettingae* 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的PCR产物的核酸序列。

[0143] SEQ ID N0:81是来自*Thermotoga lettingae*的乙酰木聚糖酯酶编码区的核酸序列。

[0144] SEQ ID N0:82是来自*Thermotoga lettingae*的乙酰木聚糖酯酶的推导氨基酸序列。

[0145] SEQ ID N0s:83和84是用于PCR扩增*Thermotoga petrophila* (GENBANK® 登录号CP000702) 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的引物的核酸序列。

[0146] SEQ ID N0:85是编码*Thermotoga petrophila* 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的PCR产物的核酸序列。

[0147] SEQ ID N0s:86和87是用于PCR扩增*Thermotoga petrophila* (GENBANK® 登录号CP000702) 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的引物的核酸序列。

[0148] SEQ ID N0:88是编码*Thermotoga petrophila* 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的PCR产物的核酸序列。

[0149] SEQ ID N0:89是来自*Thermotoga petrophila*的乙酰木聚糖酯酶编码区的核酸序列。

[0150] SEQ ID N0:90是来自*Thermotoga petrophila*的乙酰木聚糖酯酶的推导氨基酸序列。

[0151] SEQ ID N0s:91和92是用于PCR扩增热袍菌属物种RQ2“RQ2 (a)” (GENBANK® 登录号CP000969) 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的引物的核酸序列。

[0152] SEQ ID N0:93是编码热袍菌属物种RQ2“RQ2 (a)” 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的PCR产物的核酸序列。

[0153] SEQ ID N0s:94和95是用于PCR扩增热袍菌属物种RQ2“RQ2 (a)” (GENBANK® 登录号CP000969) 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的引物的核酸序列。

[0154] SEQ ID N0:96是编码热袍菌属物种RQ2“RQ2 (a)” 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的PCR产物的核酸序列。

[0155] SEQ ID N0:97是本文确定为“RQ2 (a)”的来自热袍菌属物种RQ2的乙酰木聚糖酯酶编码区的核酸序列。

[0156] SEQ ID N0:98是本文确定为“RQ2 (a)”的来自热袍菌属物种RQ2的乙酰木聚糖酯酶 (GENBANK® 登录号ACB09222) 的推导氨基酸序列。

[0157] SEQ ID N0s:99和100是用于PCR扩增热袍菌属物种RQ2“RQ2 (b)” (GENBANK® 登录号CP000969) 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的引物的核酸序列。

[0158] SEQ ID N0:101是编码热袍菌属物种RQ2“RQ2 (b)” 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的PCR产物的核酸序列。

[0159] SEQ ID N0s:102和103是用于PCR扩增热袍菌属物种RQ2“RQ2 (b)” (

GENBANK® 登录号CP000969) 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的引物的核酸序列。

[0160] SEQ ID NO:104是编码热袍菌属物种RQ2“RQ2 (b)” 乙酰木聚糖酯酶编码序列的密码子最优化形式的PCR产物的核酸序列。

[0161] SEQ ID NO:105是本文确定为“RQ2 (b)” 的来自热袍菌属物种RQ2的乙酰木聚糖酯酶编码区的核酸序列。

[0162] SEQ ID NO:106是本文确定为“RQ2 (b)” 的来自热袍菌属物种RQ2的乙酰木聚糖酯酶 (GENBANK® 登录号ACB08860) 的氨基酸序列。

具体实施方式

[0163] 所述问题已通过下述发现得到解决：属于CE-7糖酯酶家族的酶表现出用于将羧酸酯底物转化成过酸的显著过水解活性。该家族的在结构上相关的酶可用于产生具有用于消毒和/或漂白应用的高效率的过酸浓度。

[0164] 在本公开中，使用了大量术语和缩写。除非另有具体说明，应用下述定义。

[0165] 如本文所使用，术语“包含”意指如权利要求中提及的所述特征、整数、步骤或成分的存在，但它不预先排除一种或多种其他特征、整数、步骤、成分或其组的存在或添加。

[0166] 如本文所使用，修饰使用的成分或反应物的量的术语“约”是指可以通过例如以下方式而发生的用数字表示的量的变化：在真实世界中用于制备浓缩物或使用溶液的一般测量和液体处理操作；这些操作中非故意的误差；用于制备组合物或执行方法的成分的制造、来源或纯度的差异；等等。术语“约”还包括由于对于起因于特定起始混合物的组合物的不同平衡条件而不同的量。无论是否通过术语“约”来修饰，权利要求包括量的等同量。

[0167] 如本文所使用，术语“过酸”与过氧酸 (peroxyacid)、过氧羧酸 (peroxycarboxylic acid)、过氧酸 (peroxy acid)、过羧酸 (percarboxylic acid) 和过氧酸 (peroxoic acid) 同义。

[0168] 如本文所使用，术语“过乙酸”缩写为“PAA”，并且与过氧乙酸、乙过氧酸 (ethaneperoxoic acid) 以及CAS登记号79-21-0的所有其他同义词同义。

[0169] 如本文所使用，术语“甘油一乙酸酯”与甘油单乙酸酯、甘油一醋酸酯和甘油单醋酸酯同义。

[0170] 如本文所使用，术语“甘油二乙酸酯”与二乙酸甘油酯；甘油二醋酸酯、二醋酸甘油酯以及CAS登记号25395-31-7的所有其他同义词同义。

[0171] 如本文所使用，术语“甘油三乙酸酯”与三乙酸甘油酯；三醋酸甘油酯；甘油三醋酸酯；1,2,3-三乙酰氧基丙烷、1,2,3-丙三醇三乙酸酯以及CAS登记号102-76-1的所有其他同义词同义。

[0172] 如本文所使用，术语“甘油一丁酸酯”与一丁酸甘油酯、甘油单丁酸酯和一丁酸甘油基酯同义。

[0173] 如本文所使用，术语“甘油二丁酸酯”与二丁酸甘油酯和二丁酸甘油基酯同义。

[0174] 如本文所使用，术语“甘油三丁酸酯”与三丁酸甘油酯、1,2,3-三丁酰基甘油以及CAS登记号60-01-5的所有其他同义词同义。

[0175] 如本文所使用,术语“甘油一丙酸酯”与一丙酸甘油酯、甘油单丙酸酯和一丙酸甘油基酯同义。

[0176] 如本文所使用,术语“甘油二丙酸酯”与二丙酸甘油酯和二丙酸甘油基酯同义。

[0177] 如本文所使用,术语“甘油三丙酸酯”与三丙酸甘油基酯、三丙酸甘油酯、1,2,3-三丙酰基甘油以及CAS登记号139-45-7的所有其他同义词同义。

[0178] 如本文所使用,术语“乙酸乙酯”与醋酸乙酯、乙酰氧基乙烷、乙酸乙基酯、醋酸乙基酯、乙基乙酸酯以及CAS登记号141-78-6的所有其他同义词同义。

[0179] 如本文所使用,术语“乳酸乙酯”与乳酸乙基酯以及CAS登记号97-64-3的所有其他同义词同义。

[0180] 如本文所使用,术语“乙酰化糖”和“乙酰化多糖”是指包含至少一个乙酰基的单糖、二糖和多糖。实例包括但不限于葡萄糖五乙酸酯、木糖四乙酸酯、乙酰化木聚糖、乙酰化木聚糖片段、 β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯、三-O-乙酰基-D-半乳糖和三-O-乙酰基-己烯糖。

[0181] 如本文所使用,术语“烃基”、“烃基基团”或“烃基部分”表示通过单个、两个或三个碳-碳键和/或通过醚键连接的,并且因此用氢原子取代的直链、支链或环状排列的碳原子。所述烃基基团可以是脂族和/或芳族。烃基基团的实例包括甲基、乙基、丙基、异丙基、丁基、异丁基、叔丁基、环丙基、环丁基、戊基、环戊基、甲基环戊基、己基、环己基、苄基和苯基。在一个优实施方案中,烃基部分是通过单个碳-碳键和/或通过醚键连接,并且因此被氢原子取代的直链、支链或环状排列的碳原子。

[0182] 如本文所使用,术语1,2-乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、2,3-丁二醇、1,4-丁二醇、1,2-戊二醇、2,5-戊二醇、1,6-戊二醇、1,2-己二醇、2,5-己二醇、1,6-己二醇的“一酯”和“二酯”是指包含至少一个式RC(O)O的酯基团的所述化合物,其中R是C1-C7线性烃基部分。

[0183] 如本文所使用,术语“合适的酶促反应混合物”、“适于原位生产过酸的成分”、“合适的反应成分”和“合适的含水反应混合物”是指其中反应物和酶催化剂发生接触的材料和水。本文提供了合适的含水反应混合物的成分,并且本领域技术人员理解适于这种方法的成分变化范围。在一个实施方案中,合适的酶促反应混合物在反应成分组合后原位生产过酸。像这样,反应成分可以作为其中一种或多种反应成分保持分离直至使用的多成分系统提供。用于使多种活性成分分离和组合的系统和装置的设计是本领域已知的,并且一般将取决于单个反应成分的物理形式。例如,多重活性流体(液体-液体)系统一般使用多室分配瓶或二相系统(美国专利申请公开号2005/0139608;美国专利5,398,846;美国专利5,624,634;美国专利6,391,840;欧洲专利0807156B1;美国专利申请公开号2005/0008526;和PCT公开号W0 00/11713A1),例如在其中所需漂白剂在使反应性流体混合后产生的某些漂白应用中发现的。用于产生过酸的其他形式的多成分系统可以包括但不限于,设计用于一种或多种固体成分或固体-液体成分组合的那些,例如粉剂(例如,许多商购可得的漂白组合物,美国专利5,116,575)、多层片(美国专利6,210,639)、具有多个隔室的水溶性包(美国专利6,995,125)和在水添加后反应的固体凝聚物(美国专利6,319,888)。

[0184] 在一个实施方案中,制剂是作为两个单独混合物提供,由此在将两个混合物组合后产生过氧羧酸消毒剂。

[0185] 在另一个实施方案中,提供了制剂,所述制剂包含:

[0186] a) 第一混合物,所述第一混合物包含:

[0187] i) 具有过水解酶活性的酶催化剂,所述酶催化剂包含具有CE-7特征基序的酶;以及

[0188] ii) 羧酸酯底物,所述第一混合物任选包含选自下组的成分:无机或有机缓冲剂、腐蚀抑制剂、润湿剂、以及它们的组合;以及

[0189] b) 包含过氧源和水的第二混合物,所述第二混合物任选包含螯合剂。

[0190] 在另一个相关实施方案中,制剂的第一混合物中的羧酸酯底物选自:

[0191] i) 具有以下结构的酯

[0192] $[X]_m R_5$

[0193] 其中X=式R₆-C(O)O的酯基团

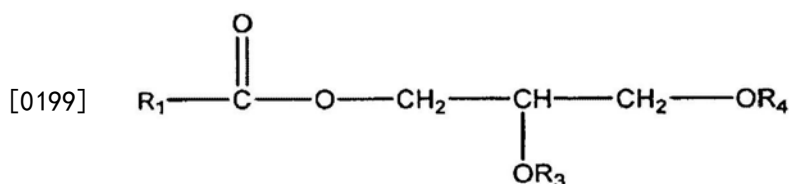
[0194] R₆=C1-C7线性、支链或环状烃基部分,其任选被羟基或C1-C4烷氧基取代,其中对于R₆=C2-C7,R₆任选包含一个或多个醚键;

[0195] R₅=C1-C6线性、支链或环状烃基部分,其任选被羟基取代;其中R₅中的每个碳原子各自包含不超过一个羟基或不超过一个酯基团;其中R₅任选包含一个或多个醚键;

[0196] m=1至R₅中的碳原子数;并且

[0197] 其中所述酯在25℃下在水中具有至少5ppm的溶解度;

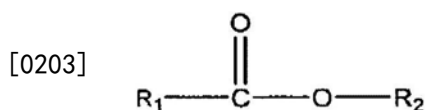
[0198] ii) 具有以下结构的甘油酯



[0200] 其中R₁=任选被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基,并且R₃和R₄各自为H或R₁C(O);以及

[0201] iii) 选自乙酰化单糖、乙酰化二糖和乙酰化多糖的乙酰化糖;

[0202] 在另一个实施方案中,制剂的第一混合物中的羧酸酯底物由下式定义:



[0204] 其中R₁=任选被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基,并且R₂=C1-C10直链或支链烷基、链烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂芳基、(CH₂CH₂-O)_nH或(CH₂CH(CH₃)-O)_nH,并且n=1-10。

[0205] 在一个优选实施方案中,R₆是任选被羟基或C1-C4烷氧基取代、任选包含一个或多个醚键的C1-C7线性烃基部分。在另一优选实施方案中,R₆是任选被羟基取代和/或任选包含一个或多个醚键的C2-C7线性烃基部分。

[0206] 在另一个实施方案中,羧酸酯底物选自甘油一乙酸酯;甘油二乙酸酯;甘油三乙酸酯;甘油一丙酸酯;甘油二丙酸酯;甘油三丙酸酯;甘油一丁酸酯;甘油二丁酸酯;甘油三丁酸酯;葡萄糖五乙酸酯;木糖四乙酸酯;乙酰化木聚糖;乙酰化木聚糖片段;β-D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯;三-O-乙酰基-D-半乳糖;三-O-乙酰基-己烯糖;1,2-乙二醇、1,2-丙二

醇、1,3-丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、2,3-丁二醇、1,4-丁二醇、1,2-戊二醇、2,5-戊二醇、1,6-戊二醇、1,2-己二醇、2,5-己二醇、1,6-己二醇的一酯或二酯;及其混合物。

[0207] 在另一个实施方案中,羧酸酯选自甘油一乙酸酯、甘油二乙酸酯、甘油三乙酸酯以及它们的组合。在另一个实施方案中,羧酸酯是乙酰化糖。在另一个实施方案中,底物是包含一个或多个酯基团的C1-C6多元醇。在一个优选实施方案中,C1-C6多元醇上的一个或多个羟基被一个或多个乙酰氧基取代(如1,3-丙二醇二乙酸酯、1,4-丁二醇二乙酸酯等)。在另一个实施方案中,酶催化剂是固体颗粒。在另一个实施方案中,上述第一混合物是固体片或粉末。

[0208] 如本文所使用,术语“过水解”定义为所选底物与过氧化物形成过酸的反应。一般地,无机过氧化物与所选底物在催化剂存在下反应以生成过酸。如本文所使用,术语“化学过水解”包括其中底物(过酸前体)与过氧化氢来源组合的过水解反应,其中过酸在不存在酶催化剂的情况下形成。

[0209] 如本文所使用,术语“过水解酶活性”是指每单位质量(例如毫克)蛋白、干细胞重量或固定的催化剂重量的催化剂活性。

[0210] 如本文所使用,“一个酶活性单位”或“一个活性单位”或“U”定义为,在指定温度每分钟产生1 μ mol过酸产物所需的过水解酶活性的量。

[0211] 如本文所使用,术语“酶催化剂”和“过水解酶催化剂”是指包含具有过水解活性的酶的催化剂,并且可以是完整微生物细胞、透化的微生物细胞、微生物细胞提取物的一种或多种细胞成分、部分纯化的酶或纯化的酶的形式。酶催化剂还可以是化学修饰的(例如通过聚乙二醇化或者通过与交联试剂反应来修饰)。还可以使用本领域技术人员众所周知的方法将过水解酶催化剂固定在可溶性或不溶性载体上;参见例如“Immobilization of Enzymes and Cells”;Gordon F.Bickerstaff,Editor;Humana Press,Totowa,NJ,USA;1997。如本文所述,具有过水解活性的所有本发明酶在结构上都是酶的糖家族酯酶家族7(CE-7家族)的成员(参见Coutinho,P.M.,Henrissat,B.“Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach”,“Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering”,H.J.gilbert,g.Davies,B.Henrissat and B.Svensson eds.,(1999) The Royal Society of Chemistry,Cambridge,第3-12页)。

[0212] CE-7家族的成员包括头孢菌素C脱乙酰酶(CAHs;E.C.3.1.1.41)和乙酰木聚糖酯酶(AXEs;E.C.3.1.1.72)。CE-7酯酶家族的成员共有保守特征基序(Vincent等人,J.Mol.Biol.,330:593-606(2003))。包含CE-7特征基序和/或基本上相似结构的过水解酶都适用于本发明。用于鉴定基本上相似的生物分子的方法是本领域众所周知的(例如序列比对方案、核酸杂交、保守特征基序的存在等)。在一个方面,本发明方法中的酶催化剂包含与本文提供的序列具有至少30%、优选至少33%、更优选至少40%、更优选至少50%、甚至更优选至少60%,甚至更优选至少70%,甚至更优选至少80%,甚至更优选至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%氨基酸同一性的基本上相似的酶。本发明还提供了编码本发明CE-7糖酯酶的核酸分子。在另一个实施方案中,用于本发明方法的过水解酶催化剂由在严格条件下与本发明核酸分子之一杂交的核酸分子编码。

[0213] 如本文所使用,术语“头孢菌素C脱乙酰酶”和“头孢菌素C乙酰基水解酶”是指催化头孢菌素例如头孢菌素C和7-氨基头孢烷酸(7-aminocephalosporanic acid)的脱乙酰作

用的酶(E.C.3.1.1.41)(Mitsushima等人,同上)。如本文所述,提供了具有显著过水解活性的几种头孢菌素C脱乙酰酶。

[0214] 如本文所使用,“乙酰木聚糖酯酶”是指催化乙酰化木聚糖以及其他乙酰化糖的脱乙酰作用的酶(E.C.3.1.1.72;AXEs)。如本文所述,提供了具有显著过水解酶活性的归类为乙酰木聚糖酯酶的几种酶。

[0215] 如本文所使用,术语“枯草芽孢杆菌(ATCC 31954TM)”是指具有国际保藏登记号ATCC 31954TM的保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)的细菌细胞。已报道枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM具有能够水解具有2-8个碳酰基的甘油酯,特别是甘油二乙酸酯的酯水解酶(“甘油二乙酸酯酶”)活性(美国专利4,444,886;全文引入本文以供参考)。如本文所描述的,已从枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM中分离出具有显著过水解酶活性的酶,并且作为SEQ ID NO:2提供。分离的酶的氨基酸序列与由GenBank[®] 登记号BAA01729.1提供的头孢菌素C脱乙酰酶具有100%的氨基酸同一性。

[0216] 如本文所使用,术语“枯草芽孢杆菌BE1010”是指如由Payne和Jackson(J.Bacteriol.173:2278-2282(1991))报道的枯草芽孢杆菌菌株。枯草芽孢杆菌BE1010是在编码枯草杆菌蛋白酶和中性蛋白酶的基因中具有染色体缺失的衍生枯草芽孢杆菌枯草亚种菌株BR151(ATCC33677TM)。如本文所述,已从枯草芽孢杆菌BE1010中分离出了具有显著过水解酶活性的酶,并且作为SEQ ID NO:6提供。分离的酶的氨基酸序列与由枯草芽孢杆菌枯草亚种菌株168中报道的头孢菌素C脱乙酰酶(Kunst等人,Nature 390:249-256(1997))具有100%的氨基酸同一性。

[0217] 如本文所使用,术语“枯草芽孢杆菌ATCC 29233TM”是指具有国际保藏登记号ATCC 29233TM的保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)的枯草芽孢杆菌菌株。如本文所描述,已从枯草芽孢杆菌ATCC 29233TM中分离出和测序了具有显著过水解酶活性的酶,并且作为SEQ ID NO:32提供。

[0218] 如本文所使用,术语“热纤维梭菌ATCC 27405TM”是指具有国际保藏登记号ATCC 27405TM的保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)的热纤维梭菌菌株。来自热纤维梭菌ATCC 27405TM的具有过水解酶活性的酶的氨基酸序列作为SEQ ID NO:14提供。

[0219] 如本文所使用,术语“枯草芽孢杆菌ATCC 6633TM”是指具有国际保藏登记号ATCC 6633TM的保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)的细菌细胞。已有报道枯草芽孢杆菌ATCC 6633TM具有头孢菌素乙酰水解酶活性(美国专利6,465,233)。来自枯草芽孢杆菌ATCC 6633TM的具有过水解酶活性的酶的氨基酸序列作为SEQ ID NO:8提供。

[0220] 如本文所使用,术语“地衣芽孢杆菌ATCC 14580TM”是指具有国际保藏登记号ATCC 14580TM的保藏于美国典型培养物保藏中心(ATCC)的细菌细胞。已有报道地衣芽孢杆菌ATCC 14580TM具有头孢菌素乙酰水解酶活性(GENBANK[®] YP_077621)。来自地衣芽孢杆菌ATCC 14580TM的具有过水解酶活性的酶的氨基酸序列作为SEQ ID NO:10提供。

[0221] 如本文所使用,术语“短小芽孢杆菌PS213”是指据报道具有乙酰木聚糖酯酶活性的细菌细胞(GENBANK[®] AJ249957)。来自短小芽孢杆菌PS213的具有过水解酶活性的酶的氨基酸序列作为SEQ ID NO:12提供。

[0222] 如本文所使用,术语“那不勒斯栖热袍菌”是指据报道具有乙酰木聚糖酯酶活性的

那不勒斯栖热袍菌菌株 (GENBANK® AAB70869)。来自那不勒斯栖热袍菌的具有过水解酶活性的酶的氨基酸序列作为SEQ ID NO:16提供。

[0223] 如本文所使用,术语“海栖热袍菌MSB8”是指据报道具有乙酰木聚糖酯酶活性的细菌细胞 (GENBANK® NP_227893.1)。来自海栖热袍菌MSB8的具有过水解酶活性的酶的氨基酸序列作为SEQ ID NO:18提供。

[0224] 如本文所使用,术语“克劳氏芽孢杆菌KSM-K16”是指据报道具有头孢菌素-C脱乙酰酶活性的细菌细胞 (GENBANK® YP_175265)。来自克劳氏芽孢杆菌KSM-K16的具有过水解酶活性的酶的氨基酸序列作为SEQ ID NO:26提供。

[0225] 如本文所使用,术语“解糖热厌氧杆菌”是指据报道具有乙酰木聚糖酯酶活性的细菌菌株 (GENBANK® S41858)。来自解糖热厌氧杆菌的具有过水解酶活性的酶的氨基酸序列作为SEQ ID NO:70提供。

[0226] 如本文所使用,术语“*Thermotoga lettingae*”是指据报道具有乙酰木聚糖酯酶活性的细菌细胞 (GENBANK® CP000812)。来自*Thermotoga lettingae*的具有过水解酶活性的酶的推导的氨基酸序列作为SEQ ID NO:82提供。

[0227] 如本文所使用,术语“*Thermotoga petrophila*”是指据报道具有乙酰木聚糖酯酶活性的细菌细胞 (GENBANK® CP000702)。来自*Thermotoga lettingae*的具有过水解酶活性的酶的推导的氨基酸序列作为SEQ ID NO:90提供。

[0228] 如本文所使用,术语“热袍菌属物种RQ2”是指据报道具有乙酰木聚糖酯酶活性的细菌细胞 (GENBANK® CP000969)。从热袍菌属物种RQ2鉴定了两种不同的乙酰木聚糖酯酶,并且在本文中称作“RQ2 (a)” (推导的氨基酸序列作为SEQ ID NO:98提供) 和“RQ2 (b)” (推导的氨基酸序列作为SEQ ID NO:106提供)。

[0229] 如本文所使用,“分离的核酸分子”和“分离的核酸片段”将可互换使用,并且是指单链或双链的,任选含有合成的、非天然的或改变了的核苷酸碱基的RNA或DNA聚合物。DNA聚合物形式的分离的核酸分子可由cDNA、基因组DNA或合成DNA的一个或多个区段构成。

[0230] 术语“氨基酸”是指蛋白质或多肽的基本化学结构单位。在本文中使用下列缩写来表示具体氨基酸:

	三字母	单字母
<u>氨基酸</u>	<u>缩写</u>	<u>缩写</u>
丙氨酸	Ala	A
精氨酸	Arg	R
天冬酰胺	Asn	N
天冬氨酸	Asp	D
半胱氨酸	Cys	C
谷氨酰胺	Gln	Q
谷氨酸	Glu	E
甘氨酸	Gly	G
组氨酸	His	H
[0231] 异亮氨酸	Ile	I
亮氨酸	Leu	L
赖氨酸	Lys	K
甲硫氨酸	Met	M
苯基丙氨酸	Phe	F
脯氨酸	Pro	P
丝氨酸	Ser	S
苏氨酸	Thr	T
色氨酸	Trp	W
酪氨酸	Tyr	Y
缬氨酸	Val	V
任何氨基酸（或如本文中所定义）	Xaa	X

[0232] 如本文所使用，“基本上相似的”是指其中一个或多个核苷酸碱基的改变导致一个或多个氨基酸的添加、取代或缺失，但不影响由DNA序列编码的蛋白质的功能性质（即过水解活性）的核酸分子。如本文所使用，“基本上相似的”还指具有与本文报道的序列有至少30%、优选至少33%、更优选至少40%、更优选至少50%、甚至更优选至少60%，甚至更优选至少70%，甚至更优选至少80%，甚至更优选至少90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%或99%同一性的氨基酸序列的酶，其中所得到的酶保留本发明的功能性质（即，过水解活性）。“基本上相似”还可以指由在严格条件下与本文报道的核酸分子杂交的核酸分子编码的具有过水解活性的酶。因此应当理解，本发明包含了超过具体的示例性序列。

[0233] 例如，本领域众所周知的是，在给定位点处导致产生化学上等价的氨基酸但不影响编码蛋白质的功能性质的基因中的改变是常见的。为了本发明的目的，取代定义为在下

述5组之一内的交换：

[0234] 1. 小的脂族非极性残基或稍微极性的残基：Ala、Ser、Thr (Pro、Gly)；

[0235] 2. 极性的、带负电荷的残基和它们的酰胺：Asp、Asn、Glu、Gln；

[0236] 3. 极性的、带正电荷的残基：His、Arg、Lys；

[0237] 4. 大的脂族非极性残基：Met、Leu、Ile、Val (Cys)；以及

[0238] 5. 大的芳族残基：Phe、Tyr、Trp。

[0239] 因此，氨基酸丙氨酸，即一种疏水性氨基酸的密码子，可以被编码另一个疏水性更弱的残基（例如甘氨酸）或疏水性更强的残基（例如缬氨酸、亮氨酸或异亮氨酸）的密码子取代。相似地，导致用一个带负电荷的残基替换另一个带负电荷的残基（例如天冬氨酸替代谷氨酸）或者一个带正电荷的残基替换另一个带正电荷的残基（例如赖氨酸替换精氨酸）的改变也可以预期产生功能上等价的产物。在许多情况下，导致蛋白质分子的N-末端和C-末端部分改变的核苷酸变化也预期不改变蛋白质的活性。

[0240] 所提议的修饰中的每一种完全在本领域常规技术内，编码产物的生物活性保留的测定也在本领域常规技术内。此外，技术人员认识到本发明包括基本上相似的序列。在一个实施方案中，基本上相似的序列由其在严格条件下（ $0.1 \times \text{SSC}$ ， $0.1\% \text{SDS}$ ， 65°C 且用 $2 \times \text{SSC}$ ， $0.1\% \text{SDS}$ ，随后为 $0.1 \times \text{SSC}$ ， $0.1\% \text{SDS}$ ， 65°C 洗涤）与本文例示的序列杂交的能力限定。在一个实施方案中，本发明包括由在严格条件下与本文报道的核酸分子杂交的分离核酸分子编码的具有过水解酶活性的酶。在优选的实施方案中，本发明包括由在严格条件下与具有选自下组的核酸序列的核酸分子杂交的分离核酸分子编码的具有过水解酶活性的酶：SEQ ID NO:17；SEQ ID NO:25；SEQ ID NO:69；SEQ ID NO:74；SEQ ID NO:77；SEQ ID NO:80；SEQ ID NO:81；SEQ ID NO:85；SEQ ID NO:88；SEQ ID NO:89；SEQ ID NO:93；SEQ ID NO:96；SEQ ID NO:97；SEQ ID NO:101；SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:105。

[0241] 如本文所用，当在合适的温度和溶液离子强度条件下第一个分子的单链可以退火至另一分子时，核酸分子“可杂交”至另一核酸分子，例如cDNA、基因组DNA或RNA。杂交和洗涤条件是众所周知的，并且在Sambrook, J. 和Russell, D., T. “Molecular Cloning: A Laboratory Manual”，第三版，Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (2001) 中举例说明。温度和离子强度条件确定了杂交的“严格性”。可以调节严格条件以筛选中度相似的分子（例如来自远缘生物的同源序列）到高度相似的分子（例如从近缘生物复制功能性酶的基因）。杂交后洗涤通常决定严格性条件。一组优选的条件采用一系列如下洗涤：开始采用 $6 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 在室温下持续洗涤15分钟，然后再使用 $2 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 在 45°C 下洗涤30分钟，然后使用 $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 在 50°C 下重复洗涤30分钟两次。更优选的一组条件采用更高的温度，其中洗涤与上述洗涤相同，不同的是最后两次在 $0.2 \times \text{SSC}$ 、 $0.5\% \text{SDS}$ 中洗涤30分钟时的温度被增加到 60°C 。另一组优选的严格杂交条件为 $0.1 \times \text{SSC}$ ， $0.1\% \text{SDS}$ ， 65°C 且用 $2 \times \text{SSC}$ ， $0.1\% \text{SDS}$ 洗涤，随后为与本文例示序列的 $0.1 \times \text{SSC}$ ， $0.1\% \text{SDS}$ ， 65°C 的最终洗涤。

[0242] 杂交需要两种核酸含有互补序列，但是取决于杂交的严格性，碱基之间可能会发生错配。用于使核酸杂交的合适严格性取决于核酸的长度和互补的程度，所述长度和互补程度是本领域内所熟知的变量。两条核苷酸序列之间的相似性或同源性程度越高，具有那些序列的核酸的杂交体的 T_m 值就越大。核酸杂交的相对稳定性（对应较高的 T_m ）按以下顺序

依次降低:RNA:RNA、DNA:RNA、DNA:DNA。对于长度超过100个核苷酸的杂交体,已经推导出了用于计算 T_m 的公式(请参见Sambrook和Russell,同上)。对于较短核酸(即寡核苷酸)的杂交,错配的位置变得更重要,而且寡核苷酸的长度决定了其特异性(参见Sambrook和Russell,同上)。在一个方面,可杂交核酸的长度为至少约10个核苷酸。优选地,关于可杂交核酸的最低长度为长度至少约15个核苷酸,更优选长度至少约20个核苷酸,更加优选长度至少30个核苷酸,更加优选长度至少300个核苷酸,最优选长度至少800个核苷酸。此外,技术人员将认识到,可根据需要根据诸如探针长度之类的因素来调节温度和洗涤溶液盐浓度。

[0243] 如本文所使用,术语“同一性百分比”是两条或更多条多肽序列之间或两条或更多条多核苷酸序列之间的关系,该关系通过对序列进行比较而确定。在本领域中,“同一性”还表示多肽或多核苷酸序列之间序列关联的程度。根据具体情况,它由这些序列的序列串之间的匹配程度确定。“同一性”和“相似性”可容易地通过已知方法计算出来,所述的方法包括但不限于以下文献中所描述的那些:“Computational Molecular Biology”(Lesk,A.M., ed.) Oxford University Press, NY (1988); “Biocomputing: Informatics and genome Projects”(Smith,D.W., ed.) Academic Press, NY (1993); “Computer Analysis of Sequence Data, Part I”(Griffin,A.M., 和Griffin,H.g., eds.) Humana Press, NJ (1994); “Sequence Analysis in Molecular Biology”(von Heinje,g., ed.) Academic Press (1987); and “Sequence Analysis Primer”(Gribskov,M. 和Devereux,J., eds.) Stockton Press, NY (1991)。确定同一性和相似性的方法在可公开获得的计算机程序中编成了代码。序列比对和同一性百分比计算可以使用LASERGENE生物信息学计算套件(DNASTAR Inc., Madison,WI)的Megalign程序,Vector NTI v.7.0(Informax, Inc., Bethesda, MD)的AlignX程序,或EMBOSS Open Software Suite(EMBL-EBI; Rice等人, Trends in genetics 16, (6) pp276-277 (2000))来进行。序列的多重比对可以使用Clustal比对法(即CLUSTALW; 例如1.83版本)(Higgins和Sharp, CABIOS, 5:151-153 (1989); Higgins等人, Nucleic Acids Res. 22:4673-4680 (1994); 和Chenna等人, Nucleic Acids Res 31(13):3497-500 (2003), 可经欧洲生物信息学院得自欧洲分子生物实验室)使用缺省参数来进行。有关CLUSTALW蛋白比对的合适参数包括缺口存在罚分(GAP Existence penalty)=15, 缺口延长(GAP extension)=0.2, 矩阵(matrix)=gonnet(例如Gonnet250), 蛋白ENDGAP=-1, 蛋白GAPDIST=4, 和KTUPLE=1。在一个实施方案中, 采取缺省设定使用快速或缓慢比对, 其中缓慢比对是优选的。或者, 使用CLUSTALW方法(1.83版本)的参数还可以进行改进, 以还使用KTUPLE=1, 缺口罚分(GAP PENALTY)=10, 缺口延长(GAP extension)=1, 矩阵(matrix)=BLOSUM(例如BLOSUM64), 窗口(WINDOW)=5, 以及TOP DIAGONALS SAVED=5。

[0244] 在本发明的一个方面, 合适的分离核酸分子(本发明的分离多核苷酸)编码多肽, 所述多肽具有与本文所报道的氨基酸序列有至少30%、优选至少33%、优选至少40%、优选至少50%、优选至少60%、更优选至少70%、更优选至少80%、甚至更优选至少85%、甚至更优选至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。本发明的合适的核酸分子不仅具有上述同源性, 而且通常还编码具有约300至约340个氨基酸、更优选约310至约330个氨基酸、最优选约318个氨基酸的多肽。

[0245] 如本文所使用, 术语“特征基序(signature motif)”、“CE-7特征基序”和“标志性

基序”是指具有确定活性的酶家族所共有的保守结构。特征基序还可用于限定和/或鉴定对于限定底物家族具有相似酶活性的在结构上相关的酶家族。特征基序还可以是单个邻接氨基酸序列或者是一起形成特征基序的非邻接保守基序的集合。保守基序通常用氨基酸序列表示。如本文所述,本发明过水解酶属于CE-7糖酯酶家族。该酶家族可通过特征基序的存在来限定(Vincent等人,同上)。

[0246] 如本文所使用,“密码子简并性”是指遗传密码允许核苷酸序列在不影响所编码的多肽的氨基酸序列的情况下变化的性质。因此,本发明涉及编码氨基酸序列的所有或主要部分的任何核酸分子,所述氨基酸序列编码本发明的微生物多肽。技术人员非常了解在使用核苷酸密码子确定给定氨基酸时特定宿主细胞显示出的“密码子偏好性”。因此,在合成基因以改善其在宿主细胞中的表达时,希望设计基因以使得其密码子使用频率接近宿主细胞中优选的密码子使用频率。

[0247] 如本文所使用,“合成的基因”可由使用本领域技术人员已知的方法化学合成的寡核苷酸构件装配而成。将这些构件进行连接并退火以形成基因区段,该基因区段随后在酶促作用下装配而构建成完整的基因。与DNA序列有关的“化学合成”是指在体外对组分核苷酸进行装配。可以采用完善建立的方法来完成DNA的手工化学合成,或者可使用许多种可商业获得的机器的其中一种来完成自动化学合成。因此,基于最优化核苷酸序列以反映宿主细胞的密码子偏倚,可以定制基因用以最优化基因表达。如果密码子使用偏向于宿主偏好的那些密码子,则技术人员会理解成功的基因表达的可能性。优选的密码子的确定可基于对来源于宿主细胞的基因(其中序列信息可获得)的检测。

[0248] 如本文所使用,“基因”是指表达特定蛋白质的核酸分子,其包括编码序列前的调控序列(5′非编码序列)和编码序列后的调控序列(3′非编码序列)。“天然基因”是指天然存在的具有其自己的调控序列的基因。“嵌合基因”是指不是天然基因的任何基因,其包含在天然情况下不是一起存在的调控序列和编码序列。因此,嵌合基因可包含源于不同来源的调控序列和编码序列,或者包含源于同一来源但以不同于天然存在的方式排列的调控序列和编码序列。“内源性基因”指位于生物体的基因组内它的天然位置的天然基因。“外来”基因指正常情况下不存在于宿主生物体中,而是通过基因转移导入宿主生物体内的基因。外来基因可以包含插入到非天然生物体内的天然基因,或嵌合基因。“转基因”是通过转化方法导入基因组内的基因。

[0249] 如本文所使用,“编码序列”是指编码特定氨基酸序列的DNA序列。“合适的调控序列”指位于编码序列的上游(5′非编码序列)、内部或下游(3′非编码序列)的核苷酸序列,其可影响相关编码序列的转录、RNA加工或稳定性,或者翻译。调控序列可包括启动子、翻译前导序列、RNA加工位点、效应子结合位点和茎环结构。

[0250] 如本文所使用,“启动子”是指能够控制编码序列或功能RNA的表达的DNA序列。一般来讲,编码序列位于启动子序列的3′。启动子可以整个源于天然基因,或者由源于不同的天然存在的启动子的不同元件组成,或者甚至包含合成的DNA片段。本领域内的技术人员应当理解,不同的启动子可以在不同的发育阶段,或者响应不同的环境条件或生理条件而指导基因的表达。导致基因在大部分时间内表达的启动子通常称为“组成型启动子”。还应当进一步认识到,由于在大多数情况下调控序列的确切边界尚未完全确定,因此不同长度的DNA片段可能具有相同的启动子活性。

[0251] 如本文所使用,“3'非编码序列”是指位于编码序列下游且包括能够影响mRNA加工或基因表达的多腺苷酸化识别序列(通常限于真核生物)和其他序列编码调节信号的DNA序列。多腺苷酸化信号通常特征在于影响聚腺苷酸束(通常限于真核生物)在mRNA前体3'末端的添加。

[0252] 如本文所使用,术语“可操作地连接”是指单个核酸分子上的核酸序列的结合,使得其中一个核酸序列的功能受到另一个核酸序列的影响。例如,当启动子能够影响编码序列的表达(即,该编码序列受到该启动子的转录控制)时,则该启动子与该编码序列可操作地连接。编码序列可以以有义或反义的方向可操作地连接至调控序列。

[0253] 如本文所使用,术语“表达”是指源于本文描述的核酸分子的有义RNA(mRNA)或反义RNA的转录和稳定积聚。表达也可指将mRNA翻译成多肽。

[0254] 在本文所用的,术语“转化”指将核酸分子转移至宿主生物体的基因组内,从而导致遗传学上稳定的遗传。在本发明中,宿主细胞的基因组包括染色体和染色体外(例如,质粒)基因。含有转化的核酸分子的宿主生物被称为“转基因”或“重组”或“转化的”生物体。

[0255] 如本文所使用,术语“质粒”、“载体”和“盒”是指通常携带有不属于细胞中心代谢的部分的基因的染色体外元件,并且常常是环状双链DNA分子的形式。这类元件可以是源自任何来源的自主复制序列、基因组整合序列、噬菌体或单链或双链DNA或RNA的核苷酸序列(线性或环状),其中多个核苷酸序列已连接或重组进一种独特构建体中,该独特构建体能够将所选基因产物的启动子片段和DNA序列与合适的3'末端非翻译序列一起引入细胞中。“转化盒”指含有外来基因并且除了该外来基因外还含有促进特定宿主细胞转化的元件的特定载体。“表达盒”是指包含外来基因并且除该外来基因以外还具有使得该基因在外来宿主中的表达增强的元件的特定载体。

[0256] 如本文所使用,术语“序列分析软件”指可用于分析核苷酸或氨基酸序列的任何计算机算法或软件程序。“序列分析软件”可商购获得或独立开发。一般的序列分析软件将包括但不限于,GCG程序套件(Wisconsin Package Version 9.0,genetics Computer group(GCG),Madison,WI),BLASTP,BLASTN,BLASTX(Altschul et al.,J.Biol.215:403-410(1990)和DNASTAR(DNASTAR,Inc.1228S.Park St.Madison,WI 53715USA),CLUSTALW(例如1.83版本;Thompson等人,Nucleic Acids Research,22(22):4673-4680(1994),以及引入了Smith-Waterman算法的FASTA程序(W.R.Pearson,Comput.Methods genome Res.,[Proc.Int.Symp.](1994),Meeting Date 1992,111-20.编辑:Suhai,Sandor.Publisher:Plenum,New York,NY),Vector NTI(Informax,Bethesda,MD)和Sequencher版本4.05。在本申请的上下文中应当理解,使用序列分析软件进行分析时,除非另外指明,否则分析结果将基于所参考程序的“缺省值”。如本文所使用,“缺省值”将意指当第一次初始化时软件最初装载的由软件制造商设定的任何值或参数组。

[0257] 如本文所使用,术语“生物污染物”是指包括但不限于微生物、孢子、病毒、朊病毒、以及它们的混合物的一种或多种不需要的和/或致病生物实体。该方法产生用于减少和/或消除存活的生物污染物的存在的有效浓度的至少一种过羧酸。在一个优选实施方案中,微生物污染物是存活的病原微生物。

[0258] 如本文所使用,术语“消毒”是指破坏或阻止生物污染物生长的过程。如本文所使用,术语“消毒剂”是指通过破坏、中和或抑制生物污染物生长而进行消毒的试剂。消毒剂通

常用于处理无生命物体或表面。如本文所使用,术语“防腐剂”是指抑制携带疾病的微生物生长的化学试剂。在该实施方案的一个方面,生物污染物是致病微生物。

[0259] 如本文所使用,术语“杀病毒剂”是指抑制或破坏病毒的试剂,并且与“杀病毒试剂(viricide)”同义。表现出抑制或破坏病毒的能力的试剂描述为具有“杀病毒”活性。过酸可以具有杀病毒活性。可适用于本发明的本领域已知的一般供选择的杀病毒剂包括例如醇类、醚类、氯仿、甲醛、酚类、 β -丙内酯、碘、氯、汞盐、羟胺、环氧乙烷、乙二醇、季铵化合物、酶和去污剂。

[0260] 如本文所使用,术语“杀生物剂”是指灭活或破坏微生物的、一般是广谱的化学试剂。显示出灭活或破坏微生物的能力的试剂描述为具有“杀生物”活性。过酸可以具有杀生物活性。可适用于本发明的本领域已知的一般供选择的杀生物剂包括例如氯、二氧化氯、氯异氰尿酸酯、次氯酸盐、臭氧、丙烯醛、胺类、氯化酚类化合物、铜盐、有机硫化合物和季铵盐。

[0261] 如本文所使用,短语“最小杀生物浓度”是指对于特定接触时间在目标微生物的存活群体中将产生所需致命的、不可逆的减少的杀生物试剂的最小浓度。效力可以通过处理后存活微生物的 $\log_{10}$ 减少进行度量。在一个方面,处理后存活微生物的目标减少是至少3-log减少,更优选至少4-log减少,最优选至少5-log减少。在另一个方面,最小杀生物浓度是存活微生物细胞的至少6-log减少。

[0262] 如本文所使用,术语“过氧源”和“过氧的来源”是指当在水溶液中时,能够提供浓度为约1mM或更高的过氧化氢的化合物,包括但不限于过氧化氢、过氧化氢加合物(例如脲-过氧化氢加合物(过氧化脲))、过硼酸盐和过碳酸盐。如本文所描述,在反应成分组合后,由含水反应混合物中的过氧化物提供的过氧化氢浓度最初为至少1mM。在一个实施方案中,含水反应混合物中的过氧化氢浓度为至少10mM。在另一个实施方案中,含水反应混合物中的过氧化氢浓度为至少100mM。在另一个实施方案中,含水反应混合物中的过氧化氢浓度为至少200mM。在另一个实施方案中,含水反应混合物中的过氧化氢浓度为500mM或更高。在另一个实施方案中,含水反应混合物中的过氧化氢浓度为1000mM或更高。含水反应混合物中过氧化氢与酶底物例如甘油三酸酯(H_2O_2 :底物)的摩尔比可以是约0.002-20,优选约0.1-10,最优选约0.5-5。

[0263] 用于由羧酸酯和过氧化氢来酶催化制备过酸的合适的反应条件

[0264] 一个方面,提供了生产包含过酸的含水混合物的方法,所述方法是通过在具有过水解活性的酶催化剂存在下将羧酸酯与无机过氧化物反应,所述无机过氧化物不限于过氧化氢、过硼酸钠或过碳酸钠。在一个实施方案中,酶催化剂包含具有属于CE-7糖酯酶家族的结构的水解酶。在另一个实施方案中,过水解酶催化剂在结构上归类为头孢菌素C脱乙酰酶。在另一个实施方案中,过水解酶催化剂在结构上归类为乙酰木聚糖酯酶。

[0265] 在一个实施方案中,过水解酶催化剂包括具有CE-7特征基序的酶,当使用CLUSTALW与参照序列SEQ ID NO:2比对时,所述特征基序包含:

[0266] i) 在SEQ ID NO:2的氨基酸位置118-120的RGQ基序;

[0267] ii) 在SEQ ID NO:2的氨基酸位置179-183的GXSG基序;和

[0268] iii) 在SEQ ID NO:2的氨基酸位置298-299的HE基序;

[0269] 其中所述酶还包含与SEQ ID NO:2的至少30%的氨基酸同一性。

[0270] 在另一个实施方案中,当使用CLUSTALW与参照序列SEQ ID NO:2比对时,特征基序还包括第四个保守基序,该保守基序定义为在氨基酸残基267-269的LXD基序。

[0271] 在另一个实施方案中,过水解酶催化剂包含选自下组的具有过水解酶活性的酶:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:70,SEQ ID NO:82,SEQ ID NO:90,SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:106。

[0272] 在另一个实施方案中,酶催化剂包含选自SEQ ID NO:82,SEQ ID NO:90,SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:106的氨基酸序列,或通过对所述氨基酸序列取代、去除或添加一个或多个氨基酸而衍生的具有过水解酶活性的基本上相似的酶。

[0273] 在另一个实施方案中,具有过水解酶活性的基本上相似的酶与选自SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:106的一个或多个氨基酸序列具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的同源性。

[0274] 在另一个实施方案中,具有过水解活性的酶选自SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:90、SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:106。

[0275] 在另一个实施方案中,过水解酶催化剂包含这样的酶,该酶具有由核酸分子编码的氨基酸序列,所述核酸分子在严格杂交条件下与选自下组的核酸序列杂交:SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:25;SEQ ID NO:69,SEQ ID NO:74,SEQ ID NO:77,SEQ ID NO:80,SEQ ID NO:81,SEQ ID NO:85,SEQ ID NO:88,SEQ ID NO:89,SEQ ID NO:93,SEQ ID NO:96,SEQ ID NO:97,SEQ ID NO:101,SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:105。

[0276] 在另一个实施方案中,过水解酶催化剂包含这样的酶,该酶具有由核酸分子编码的氨基酸序列,所述核酸分子在严格杂交条件下与选自下组的核酸序列杂交:SEQ ID NO:77,SEQ ID NO:80,SEQ ID NO:81,SEQ ID NO:85,SEQ ID NO:88,SEQ ID NO:89,SEQ ID NO:93,SEQ ID NO:96,SEQ ID NO:97,SEQ ID NO:101,SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:105。

[0277] 在另一个实施方案中,过水解酶催化剂包含这样的酶,该酶与如SEQ ID NO:61所限定的邻接特征基序具有至少30%,优选至少36%的氨基酸同源性,其中上述保守基序(例如RGQ、GXSQG和HE,以及任选LXD)被保留。

[0278] 在一个实施方案中,合适的底物包括由下式提供的酯:

[0279] $[X]_mR_5$

[0280] 其中X=式R₆-C(O)O的酯基团

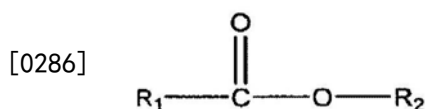
[0281] R₆=C1-C7线性、支链或环状烃基部分,其任选被羟基或C1-C4烷氧基取代,其中对于R₆=C2-C7,R₆任选包含一个或多个醚键;

[0282] R₅=C1-C6线性、支链或环状烃基部分,其任选被羟基取代;其中R₅中的每个碳原子各自包含不超过一个羟基或不超过一个酯基团;其中R₅任选包含一个或多个醚键;

[0283] m=1至R₅中的碳原子数;并且

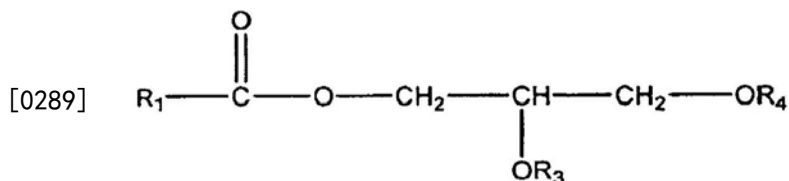
[0284] 其中所述酯在25℃下在水中具有至少5ppm的溶解度。

[0285] 在另一实施方案中,合适的底物也包括下式的酯:



[0287] 其中R₁ = 任选被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基, 并且R₂ = C1-C10直链或支链烷基、链烯基、炔基、芳基、烷基芳基、烷基杂芳基、杂芳基、(CH₂CH₂-O)_nH或(CH₂CH(CH₃)-O)_nH, 并且n = 1-10。

[0288] 在另一实施方案中, 合适的底物包括下式的甘油酯:



[0290] 其中R₁ = 任选被羟基或C1-C4烷氧基取代的C1-C7直链或支链烷基, 并且R₃和R₄各自为H或R₁C(O)。

[0291] 在另一实施方案中, R₆是任选被羟基或C1-C4烷氧基取代、任选包含一个或多个醚键的C1-C7线性烃基部分。在另一优选的实施方案中, R₆是任选被羟基取代和/或任选包含一个或多个醚键的C2-C7线性烃基部分。

[0292] 在另一实施方案中, 合适的底物也包括乙酰化糖, 其选自乙酰化单糖、乙酰化二糖和乙酰化多糖。在一个优选实施方案中, 乙酰化糖包括乙酰化单糖、乙酰化二糖和乙酰化多糖。在另一个实施方案中, 乙酰化糖选自乙酰化木聚糖、乙酰化木聚糖片段、乙酰化木糖(例如木糖四乙酸酯)、乙酰化葡萄糖(例如葡萄糖五乙酸酯)、β-D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯、三-O-乙酰基-D-半乳糖和三-O-乙酰基-己烯糖, 以及乙酰化纤维素。在一个优选的实施方案中, 乙酰化糖选自β-D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯、三-O-乙酰基-D-半乳糖和三-O-乙酰基-己烯糖, 以及乙酰化纤维素。这样, 乙酰化糖可以是用于通过本发明方法(即在过氧源存在下)产生过羧酸的合适的底物。

[0293] 在一个实施方案中, 底物选自: 甘油一乙酸酯; 甘油二乙酸酯; 甘油三乙酸酯; 甘油一丙酸酯; 甘油二丙酸酯; 甘油三丙酸酯; 甘油一丁酸酯; 甘油二丁酸酯; 甘油三丁酸酯; 葡萄糖五乙酸酯; 木糖四乙酸酯; 乙酰化木聚糖; 乙酰化木聚糖片段; β-D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯; 三-O-乙酰基-D-半乳糖; 三-O-乙酰基-己烯糖; 1,2-乙二醇、1,2-丙二醇、1,3-丙二醇、1,2-丁二醇、1,3-丁二醇、2,3-丁二醇、1,4-丁二醇、1,2-戊二醇、2,5-戊二醇、1,6-戊二醇、1,2-己二醇、2,5-己二醇、1,6-己二醇的一酯或二酯; 及其混合物。

[0294] 在一个优选实施方案中, 底物选自乙酸乙酯、乳酸甲酯、乳酸乙酯、乙醇酸甲酯、乙醇酸乙酯、甲氧基乙酸甲酯、甲氧基乙酸乙酯、3-羟基丁酸甲酯、3-羟基丁酸乙酯、2-乙酰基柠檬酸三乙酯、葡萄糖五乙酸酯、葡萄糖酸内酯、甘油酯(例如甘油单酯、二酯和三酯)例如甘油一乙酸酯、甘油二乙酸酯、甘油三乙酸酯、甘油一丙酸酯、甘油二丙酸酯(二丙酸甘油酯)、甘油三丙酸酯(1,2,3-三丙酰基甘油)、甘油一丁酸酯、甘油二丁酸酯(二丁酸甘油酯)、甘油三丁酸酯(1,2,3-三丁酰基甘油)、乙酰化糖、以及它们的混合物。

[0295] 在另一优选方面, 羧酸酯底物选自甘油一乙酸酯、甘油二乙酸酯、甘油三乙酸酯、甘油一丙酸酯、甘油二丙酸酯、甘油三丙酸酯、甘油一丁酸酯、甘油二丁酸酯、甘油三丁酸酯、乙酸乙酯和乳酸乙酯。在另外一个方面, 羧酸酯底物选自甘油二乙酸酯、甘油三乙酸酯、

乙酸乙酯和乳酸乙酯。在一个优选的方面,羧酸酯是选自甘油一乙酸酯、甘油二乙酸酯、甘油三乙酸酯、以及它们的混合物的甘油酯。

[0296] 羧酸酯以在酶催化的过水解后足以产生所需过酸浓度的浓度存在于反应混合物中。羧酸酯无需完全溶解于反应混合物中,但具有足够的溶解度,以允许通过过水解酶催化剂将酯转化成相应的过酸。羧酸酯以反应混合物的0.0005重量%至40重量%的浓度存在于反应混合物中,优选以反应混合物的0.1重量%至20重量%的浓度,和更优选以反应混合物的0.5重量%至10重量%的浓度存在于反应混合物中。羧酸酯的重量%可以任选大于羧酸酯的溶解度限度,使得羧酸酯的浓度在由水、酶催化剂和过氧源组成的反应混合物中是至少0.0005重量%,其中羧酸酯的剩余物保留为两相含水/有机反应混合物的第二个分开的相。并不是所有添加的羧酸酯都必须立即溶解于含水反应混合物中,并且在开始混合所有的反应成分后,额外的连续或不连续混合是任选的。

[0297] 过氧源可以包括但不限于过氧化氢、过氧化氢加合物(例如脲-过氧化氢加合物(过氧化脲))、过硼酸盐和过碳酸盐。反应混合物中过氧化物的浓度可以为0.0033重量%至约50重量%,优选0.033重量%至约40重量%,更优选0.33重量%至约30重量%。

[0298] 许多过水解酶催化剂(完整细胞、透化的完整细胞和部分纯化的完整细胞提取物)已报道具有过氧化氢酶活性(EC 1.11.1.6)。过氧化氢酶催化过氧化氢转化成氧和水。在一个方面,过水解酶催化剂缺乏过氧化氢酶活性。在另一个方面,向反应混合物中添加过氧化氢酶抑制剂。过氧化氢酶抑制剂的实例包括但不限于叠氮化钠和硫酸羟胺。本领域技术人员可以根据需要调整过氧化氢酶抑制剂的浓度。过氧化氢酶抑制剂的浓度一般为0.1mM至约1M;优选为约1mM至约50mM;更优选为约1mM至约20mM。在一个方面,叠氮化钠浓度一般为约20mM至约60mM,而硫酸羟胺的浓度一般为约0.5mM至约30mM,优选约10mM。

[0299] 在另一个实施方案中,酶催化剂缺乏显著的过氧化氢酶活性或被工程化以降低或消除过氧化氢酶活性。宿主细胞中的过氧化氢酶活性可以通过使用众所周知的技术破坏负责过氧化氢酶活性的基因的表达而得到下调或消除,所述技术包括但不限于转座子诱变、RNA反义表达、靶向诱变和随机诱变。在一个优选的实施方案中,编码内源性过氧化氢酶活性的基因被下调或破坏(即敲除)。如本文所使用,“破坏的”基因是其中由修饰基因编码的蛋白的活性和/或功能不再存在的基因。破坏基因的方法是本领域众所周知的,并且可以包括但不限于对基因进行插入、去除或突变,只要相应蛋白的活性和/或功能不再存在即可。在另一个优选的实施方案中,生产宿主是大肠杆菌生产宿主,其包含破坏的选自katG (SEQ ID NO:47) 和katE (SEQ ID NO:56) 的过氧化氢酶基因。在另一个实施方案中,生产宿主是大肠杆菌菌株,其包含katG1和katE过氧化氢酶基因的下调和/或破坏。本文提供了包含katG和katE的双敲除的大肠杆菌菌株(参见实施例15;大肠杆菌菌株KLP18)。

[0300] 证实了对于过水解酶的大规模(10-L和更大)生产,与过氧化氢酶阴性菌株UM2(大肠杆菌Genetic Stock Center#7156, Yale University, New Haven CT)相比,所构建的过氧化氢酶阴性大肠杆菌菌株KLP18(katG和katE双敲除)(实施例15)是优良的宿主,这是通过在发酵罐条件下的生长而确定的(实施例17-19)。虽然KLP18和UM2都是过氧化氢酶阴性菌株,但是已知UM2具有多种营养缺陷,因此需要富含酵母提取物和蛋白胨的培养基。甚至当采用富集培养基进行发酵时,UM2的生长也不佳,并且达到有限的最大细胞密度(OD)。相反,KLP18没有专门的营养需求,并且在单独的矿物质培养基中或者采用另外的酵母提取物

都生长至高细胞密度(实施例20)。

[0301] 含水反应混合物中催化剂的浓度依赖于催化剂的具体催化活性,并且进行选择以获得所需反应速率。过水解反应中的催化剂的重量一般为0.0005mg至10mg/mL反应总体积,优选为0.010mg至2.0mg/mL。还可以使用本领域技术人员众所周知的方法将催化剂固定在可溶性或不溶性载体上;参见例如,“Immobilization of Enzymes and Cells”;Gordon F.Bickerstaff,Editor;Humana Press,Totowa,NJ,USA;1997。固定化催化剂的使用允许在后续反应中回收和重新使用催化剂。酶催化剂可以是完整微生物细胞、透化的微生物细胞、微生物细胞提取物、部分纯化或纯化的酶、以及它们的混合物的形式。

[0302] 在一个方面,通过羧酸酯的化学过水解和酶促过水解的组合产生的过酸浓度足以提供在所需pH下用于漂白或消毒的有效浓度的过酸。在另一个方面,本方法提供了酶和酶底物的组合以产生所需有效浓度的过酸,其中在不添加酶的情况下,产生的过酸浓度显著较低。尽管在许多情况下通过无机过氧化物与酶底物的直接化学反应可能存在酶底物的显著化学过水解,但产生的过酸浓度可能不足以在所需应用中提供有效浓度的过酸,并且通过向反应混合物中添加合适的过水解酶催化剂达到了过酸总浓度的显著增加。

[0303] 通过至少一种羧酸酯的过水解所产生的过酸(例如过乙酸)的浓度是在过水解反应起始的10分钟内,优选5分钟内,最优选1分钟内至少约2ppm,优选至少20ppm,优选至少100ppm,更优选至少约200ppm过酸,更优选至少300ppm,更优选至少500ppm,更优选至少700ppm,更优选至少约1000ppm过酸,最优选至少2000ppm过酸。包含过酸的产物混合物可以任选用水或主要包含水的溶液稀释,以产生具有所需较低浓度的过酸的混合物。在一个方面,产生所需过酸浓度需要的反应时间不超过约2小时,优选不超过约30分钟,更优选不超过约10分钟,甚至更优选不超过约50分钟,最优选在约1分钟或更少时间内。在其他方面,在组合所述反应成分的约1分钟至约168小时内,或者在组合所述反应成分的约1分钟至约48小时内,或约1分钟至2小时内,或其中的任何此类时间间隔,将被一定浓度微生物群体污染的硬质表面或无生命物体与按照本文描述的方法形成的过酸接触。

[0304] 选择反应温度以控制反应速率和酶催化剂活性的稳定性。反应温度可以是正好高于反应混合物的凝固点(大约0℃)至约75℃,反应温度的优选范围约为5℃至约55℃。

[0305] 包含过酸的最终反应混合物的pH是约2至约9,优选约3至约8,更优选约5至约8,甚至更优选约6至约8,还甚至更优选约6.5至约7.5。在另一个实施方案中,反应混合物的pH是酸性的($\text{pH} < 7$)。反应和最终反应混合物的pH可以任选通过添加合适的缓冲剂来加以控制,所述缓冲剂包括但不限于磷酸盐、焦磷酸盐、碳酸氢盐、乙酸盐或柠檬酸盐。当采用时,缓冲剂的浓度通常为0.1mM至1.0M,优选为1mM至300mM,最优选为10mM至100mM。

[0306] 在另一个方面,酶促过水解反应混合物可以包含有机溶剂,其作为分散剂,用于增强羧酸酯在反应混合物中的溶解速度。所述溶剂包括但不限于,丙二醇甲醚、丙酮、环己酮、二甘醇丁醚、三丙二醇甲醚、二甘醇甲醚、丙二醇丁醚、双丙甘醇甲醚、环己烷、苯甲醇、异丙醇、丙二醇,及其混合物。

[0307] 在另一个方面,酶促过水解产物可以包含提供所需功能性的另外的成分。这些另外的成分包括但不限于缓冲剂、洗涤剂助剂、增稠剂、乳化剂、表面活性剂、润湿剂、抗腐蚀剂(例如苯并三唑)、酶稳定剂和过氧化物稳定剂(例如金属离子螯合剂)。许多另外的成分是洗涤剂工业中众所周知的(参见例如美国专利5,932,532;在此引入作为参考)。乳化剂的

实例包括聚乙烯醇或聚乙烯吡咯烷酮。增稠剂的实例包括但不限于 LAPONITE[®] RD、玉米淀粉、PVP、CARBOWAX[®]、CARBOPOL[®]、CABOSIL[®]、polysorbate 20、PVA 和卵磷脂。缓冲系统的实例包括但不限于磷酸二氢钠/磷酸氢二钠；氨基磺酸/三乙醇胺；柠檬酸/三乙醇胺；酒石酸/三乙醇胺；琥珀酸/三乙醇胺；和乙酸/三乙醇胺。表面活性剂的实例包括但不限于a) 非离子表面活性剂例如环氧乙烷或环氧丙烷的嵌段共聚物，乙氧基化或丙氧基化直链和支链伯醇和仲醇，以及脂族氧化膦，b) 阳离子表面活性剂例如季铵化合物，特别是具有与氮原子结合的C8-C20烷基，并且该氮原子还与3个C1-C2烷基结合的季铵化合物，c) 阴离子表面活性剂例如链烷羧酸（例如，C8-C20脂肪酸）、烷基膦酸盐、链烷磺酸盐（例如十二烷基硫酸钠“SDS”）或直链或支链烷基苯磺酸盐、烯烴磺酸盐和d) 两性和两性离子表面活性剂例如氨基羧酸、氨基二羧酸、烷基甜菜碱（alkylbetaine）以及它们的混合物。另外的成分可以包括芳香剂、染料和过氧化氢稳定剂（例如金属螯合剂例如1-羟基亚乙基-1,1-二膦酸（DEQUEST[®] 2010, Solutia Inc., St. Louis, MO 和乙二胺四乙酸（EDTA））、TURPINAL[®] SL、DEQUEST[®] 0520、DEQUEST[®] 0531、酶活性稳定剂（例如聚乙二醇（PEG））和洗涤剂助剂。

[0308] 在另一方面，在接触要消毒的表面或无生物物体前，酶促过水解产物可以预先混合，产生需要浓度的过氧羧酸。

[0309] 在另一方面，在接触要消毒的表面或无生物物体前，酶促过水解产物不预先混合产生需要浓度的过氧羧酸，而是使产生需要浓度的过氧羧酸的反应混合物的成分与要消毒的表面或无生命物体接触，产生需要浓度的过氧羧酸。在一些实施方案中，反应混合物的成分在该位点组合或混合。在一些实施方案中，将反应成分送递或施用到该位点，随后混合或组合，以产生需要浓度的过氧羧酸。

[0310] 使用过水解酶催化剂原位生产过酸

[0311] 头孢菌素C脱乙酰酶（E.C.3.1.1.41；系统命名头孢菌素C乙酰水解酶；CAHs）是具有将头孢菌素例如头孢菌素C、7-氨基头孢烷酸（cephalosporanic acid）和7-（噻吩-2-乙酰氨基）头孢烷酸上的乙酰基酯键水解的能力的酶（Abbott, B. 和 Fukuda, D., Appl. Microbiol. 30 (3): 413-419 (1975)）。CAHs属于在结构上相关的酶的较大家族，该家族称为糖酯酶家族7（CE-7；参见 Coutinho, P.M., Henrissat, B. “Carbohydrate-active enzymes: an integrated database approach”, “Recent Advances in Carbohydrate Bioengineering”, H.J. Gilbert, G. Davies, B. Henrissat 和 B. Svensson eds., (1999) The Royal Society of Chemistry, Cambridge, pp. 3-12.）

[0312] CE-7家族包括CAH和乙酰木聚糖酯酶（AXEs; E.C.3.1.1.72）。CE-7家族成员共有共同的结构基序，并且是非常与众不同的，因为它们通常对于乙酰化寡木糖（xylooligosaccharide）和头孢菌素C都表现出酯水解活性，这意味着CE-7家族代表一类具有针对一定范围小底物的多功能脱乙酰酶活性的蛋白（Vincent等人, J. Mol. Biol., 330: 593-606 (2003)）。Vincent等人描述了在该家族成员之间的结构相似性，并且限定了CE-7家族的特征序列基序。

[0313] 在植物、真菌（例如顶枝头孢（*Cephalosporidium acremonium*）），酵母（例如，类酵

母红冬孢 (*Rhodosporidium toruloides*)、胶粘红酵母 (*Rhodotorula glutinis*) 和细菌例如热厌氧杆菌属物种 (*Thermoanaerobacterium* sp.); *Norcardia lactamdurans*, 和芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 的各个成员中发现了 CE-7 家族的成员 (Politino 等人, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63 (12): 4807-4811 (1997); Sakai 等人, *J. Ferment. Bioeng.* 85: 53-57 (1998); Lorenz, W. 和 Wiegel, J., *J. Bacteriol.* 179: 5436-5441 (1997); Cardoza 等人, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 54 (3): 406-412 (2000); Mitshushima 等人, 同上, Abbott, B. 和 Fukuda, D., *Appl. Microbiol.* 30 (3): 413-419 (1975); Vincent 等人, 同上, Takami 等人, *NAR*, 28 (21): 4317-4331 (2000); Rey 等人, *genome Biol.*, 5 (10): article 77 (2004); Degraffi 等人, *Microbiology*, 146: 1585-1591 (2000); 美国专利 6,645,233; . 美国专利 5,281,525; 美国专利 5,338,676; 和 WO 99/03984。与 SEQ ID NO:2 具有显著同源性的 CE-7 糖酯酶家族成员的不完全列表在表 1 中提供。

[0314] 表 1: 与 SEQ ID NO:2 具有显著同源性的 CE-7 酶的实例

[0315]

来源生物 (CE-7 酶的 GENBANK® 登记号)	核苷酸序 列(SEQ ID NO:)	氨基酸序 列(SEQ ID NO:)	与 SEQ ID NO:2 的氨基 酸同一性%	参考文献
枯草芽孢杆菌 ATCC 31954™	1	2	100	<i>B. subtilis</i> SHS 0133 Mitshushima等人, 同上
枯草芽孢杆菌枯草亚 种菌株 168 (NP_388200) 枯草芽孢杆菌 BE1010	5	6	98	Kunst等人, 同上 WO99/03984 Payne和Jackson, <i>J.</i> <i>Bacteriol.</i> 173:2278-2282 (1991))
枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 (YP_077621.1)	7	8	96	U.S. 6,465,233
枯草芽孢杆菌 ATCC 29233	31	32	96	Abbott和Fukuda, 同上
地衣芽孢杆菌 ATCC 14580 (YP_077621.1)	9	10	77	Rey 等人, 同上
短小芽孢杆菌 PS213 (CAB76451.2)	11, 60	12	76	Degrassi等人, 同上
热纤维梭菌 ATCC 27405 (ZP_00504991)	13	14	57	Copeland 等人 US Dept. of Energy Joint Genome Institute (JGI-PGF) Direct Submission GENBANK® ZP_00504991

[0316]

那不勒斯栖 热袍菌 (AAB70869.1)	15, 41	16	42	参见 GENBANK® AAB70869.1
海栖热袍菌 MSB8 (NP_227893.1)	17, 74	18	42	Nelson等人, <i>Nature</i> 399 (6734):323-329 (1999)
芽孢杆菌 属物种 NRRL B-14911 (ZP_01168674)	21	22	40	Siefert等人 J. Craig Venter Institute. Direct Submission Under GENBANK® ZP_01168674
热厌氧芽孢杆菌属物 种 (AAB68821.1)	19	20	37	Lorenz和Wiegel, 同上
喜盐芽孢杆菌 C-125 (NP_244192)	23	24	36	Takami等人, 同上
解糖热厌氧杆菌 (S41858)	69	70	35	Lee, Y.E.和Zeikus, J.G., <i>J Gen Microbiol.</i> (1993), 139 Pt 6:1235-1243
克劳氏芽孢杆菌 KSM-K16 (YP_175265)	25, 65	26	33	Kobayashi等人, <i>Appl. Microbiol. Biotechnol.</i> 43 (3), 473-481 (1995)

[0317]

<i>Thermotoga lettingae</i> (CP000812)	77, 80和 81	82	37	Copeland等人, US Dept. of Energy Joint Genome Institute Direct Submission GENBANK® CP000812
<i>Thermotoga Petrophila</i> (CP000702)	85, 88和 89	90	41	Copeland 等人, US Dept. of Energy Joint Genome Institute Direct Submission GENBANK® CP000702
热袍菌属物种 RQ2 RQ2(a) (CP000969)	93, 96和 97	98	42	Copeland等人, US Dept. of Energy Joint Genome Institute Direct Submission GENBANK® CP000969
热袍菌属物种 RQ2 RQ2(b) (CP000969)	101, 104 和 105	106	42	Copeland等人, US Dept. of Energy Joint Genome Institute Direct Submission GENBANK® CP000969

[0318] 本发明过水解酶是CE-7糖酯酶家族的所有成员。如Vincent等人(同上)所述,该家族成员共有作为该家族特征的共同特征基序。本发明过水解酶的CLUSTALW比对表明所有成员都属于CE-7糖酯酶家族(图1,图片a-c)。表2提供了本发明过水解酶之间的总体氨基酸同一性百分比的比较。

[0319] 表2:过水解酶之间的氨基酸同一性百分比¹

[0320]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1	100														
2	99	100													
3	99	99	100												
4	96	96	97	100											
5	77	76	77	76	100										
6	76	76	76	76	68	100									

7	57	57	57	56	56	56	100								
8	42	43	43	43	43	42	41	100							
9	42	43	42	43	43	42	42	72	100						
10	42	43	43	43	44	42	43	71	91	100					
11	41	43	43	43	45	42	43	71	97	91	100				
12	41	42	42	42	43	41	42	71	98	91	97	100			
13	37	37	37	36	39	38	38	64	65	67	66	65	100		
14	34	36	35	36	35	36	33	36	32	34	34	33	36	100	
15	33	34	33	33	32	34	32	30	30	32	31	31	32	34	100

[0321] ¹=通过使用BLOSUM62的blast2seq算法确定的同一性百分比,缺口开放(gap open)=11,缺口延长(gap extension)=1,x_drop=0,预期(expect)=10,并且字长(wordsize)=3.Tatiana A.Tatusova,Thomas L.Madden(1999),“Blast 2sequences-a new tool for comparing protein and nucleotide sequences”,FEMSMicrobiol Lett. 174:247-250

[0322] 1.枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM

[0323] 2.枯草芽孢杆菌BE1010

[0324] 3.枯草芽孢杆菌ATCC 29233

[0325] 4.枯草芽孢杆菌ATCC 6633

[0326] 5.地衣芽孢杆菌14580

[0327] 6.短小芽孢杆菌PS213

[0328] 7.热纤维梭菌ATCC 27405

[0329] 8.栖热袍菌属物种RQ2 (b)

[0330] 9.栖热袍菌属物种RQ2 (a)

[0331] 10.那不勒斯栖热袍菌

[0332] 11.海栖热袍菌

[0333] 12. T. petrophila

[0334] 13. T. lettingae

[0335] 14.解糖热厌氧杆菌

[0336] 15.克劳氏芽孢杆菌

[0337] 虽然在总体氨基酸同一性百分比方面观察到了差异(即热纤维梭菌ATCC 27405TM过水解酶:SEQ ID NO:14与枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM过水解酶:SEQ ID NO:2仅具有57%的氨基酸同一性,而克劳氏芽孢杆菌过水解酶(SEQ ID NO:26)与SEQ ID NO:2仅具有33%的同一性),但是每一种本发明过水解酶都具有CE-7特征基序。因此,本发明的过水解酶催化剂是在结构上被归类为属于CE-7糖酯酶家族的酶。每一种本发明的过水解酶都包含CE-7特征(标志性)基序。

[0338] Vincent等人(同上)分析了CE-7酯酶的结构,并且已经鉴定了作为该家族标志的几个高度保守基序。如图1所示,高度保守基序(在图1中加下划线的;相对于SEQ ID NO:2的位置编号)包括Arg118-Gly119-Gln120(RGQ)、Gly179-Xaa180-Ser181-Gln182-Gly183(GXSQG)和His298-Glu299(HE)。此外,图1示出了可用于进一步表征特征基序的另外一个高度保守的Lys267-Xaa268-Asp269(LXD)基序。所有编号都是相对于参照序列(枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM过水解酶;SEQ ID NO:2)的编号。

[0339] 在一个实施方案中,合适的过水解酶可以由CE-7特征基序的存在来鉴定(Vincent等人,同上)。在一个优选的实施方案中,使用针对枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM过水解酶(SEQ ID NO:2;即用于相对氨基酸位置编号的参照序列)的CLUSTALW比对来鉴定包含CE-7特征基序的过水解酶。根据SEQ ID NO:2的氨基酸残基编号,CE-7特征基序包括如下所定义的3个保守基序:

[0340] a) Arg118-Gly119-Gln120;

[0341] b) Gly179-Xaa180-Ser181-Gln182-Gly183;和

[0342] c) His298-Glu299。

[0343] 在氨基酸残基位置180的Xaa通常是甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、色氨酸或苏氨酸。属于催化三联体的三个氨基酸残基中的两个以粗体表示。在一个实施方案中,氨基酸残基位置180上的Xaa选自甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和苏氨酸。

[0344] 对CE-7糖酯酶家族内的保守基序的进一步分析表明,存在另外一个可进一步限定属于CE-7糖酯酶家族的过水解酶的保守基序(在SEQ ID NO:2的氨基酸位置267-269的LXD)(图1a-c)。在另一个实施方案中,上面限定的特征基序包括如下所定义的第四个保守基序:

[0345] Leu267-Xaa268-Asp269。

[0346] 在氨基酸残基位置268的Xaa通常是异亮氨酸、缬氨酸或甲硫氨酸。所述第四个基序包括作为催化三联体(Ser181-Asp269-His298)的第三个成员的天冬氨酸残基(粗体)。

[0347] 可使用多种众所周知的通用比对算法(即序列分析软件)来比对两个或多个氨基酸序列(代表具有过水解酶活性的酶),以确定本发明特征基序的存在(例如,CLUSTALW或Needleman和Wunsch(J.Mol.Biol.,48:443-453(1970))。将比对的序列与参照序列(SEQ ID NO:2)进行比较。在一个实施方案中,采用参照氨基酸序列(如在本文中使用来自枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM的CAH序列(SEQ ID NO:2))的CLUSTAL比对(CLUSTALW)被用于鉴定属于CE-7酯酶家族的过水解酶。保守氨基酸残基的相对编号是基于参照氨基酸序列的残基编号,以解决比对序列内的少量插入或缺失(5个氨基酸或更少)。

[0348] 本文中例举的过水解酶之间的总体同一性百分比的比较表明,与SEQ ID NO:2具有小至33%同一性(同时保留特征基序)的酶表现出显著过水解酶活性,并且在结构上归类为CE-7糖酯酶。在一个实施方案中,本发明过水解酶包括这样的酶,所述酶包含本发明特征基序以及与SEQ ID NO:2的至少30%,优选至少33%,更优选至少40%,甚至更优选至少42%,甚至更优选至少50%,甚至更优选至少60%,甚至更优选至少70%,甚至更优选至少80%,甚至更优选至少90%,最优选至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%的氨基酸同一性。

[0349] 所有本发明过水解酶都包含如表3中所示的上述特征基序。

[0350] 表3:在具有过水解酶活性的本发明酶中发现的保守基序。

[0351]

过水解酶 序列	RGQ 基序 ^a (残基#s)	GXSQG 基序 ^a (残基#s)	LXD 基序 ^b 残基#s)	HE 基序 ^a (残基#s)
SEQ ID NO: 2	118-120	179-183	267-269	298-299
SEQ ID NO: 6	118-120	179-183	267-269	298-299
SEQ ID NO: 8	118-120	179-183	267-269	298-299
SEQ ID NO: 10	119-121	180-184	268-270	299-300
SEQ ID NO: 12	118-120	179-183	267-269	298-299
SEQ ID NO: 14	119-121	181-185	269-271	300-301
SEQ ID NO: 16	118-120	186-190	272-274	303-304
SEQ ID NO: 18	118-120	186-190	272-274	303-304
SEQ ID NO: 26	117-119	180-184	270-272	301-302
SEQ ID NO: 32	118-120	179-183	267-269	298-299
SEQ ID NO: 70	117-119	180-184	270-272	301-302
SEQ ID NO: 82	118-120	186-190	272-274	303-304
SEQ ID NO: 90	118-120	186-190	272-274	303-304
SEQ ID NO. 98 RQ2(a)	118-120	186-190	272-274	303-304
SEQ ID NO. 106 RQ2(b)	119-121	187-191	273-275	304-305

[0352] ^a=由Vincent等人,同上定义的用于限定特征基序的保守基序。

[0353] ^b=用于进一步限定Vincent等人,同上定义的特征基序的、在本文中鉴定的另一个基序。

[0354] 或者,包含4个保守基序(RGQ、GXSQG、LXD和HE;SEQ ID NO:2的氨基酸残基118-299)的邻接特征基序(SEQ ID NO:61)也可用作邻接特征基序来鉴定CE-7糖酯酶(图1,图片A-C)。这样,预期具有过水解酶活性的合适的酶还可以鉴定为,与SEQ ID NO:61(在CE-7糖酯酶中发现的4个保守基序加下划线)具有至少30%的氨基酸同一性,优选至少36%,更优选至少40%,甚至更优选至少50%,更优选至少60%,甚至更优选至少70%,甚至更优选至少80%,甚至更优选至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%的氨基酸同一性。

[0355] RGQQSSEDTSI SLHGHALGWMTKGILDKDTYYRGGVYLDAVRALEVISSFDEVDETRIGVTGGSQGGGLTIAAAALSDIPKAAVADYPYLSNFERAIDVALEQPYLEINSFFRRNGSPETEVQAMKTL SYFDIMNLADRVKVPV LMSIGLIDKVTTPSTVF AAYNHLETEKELKVYRYFGHE (SEQ ID NO:61)

[0356] 表4中提供了使用邻接特征序列针对具有过水解酶活性的本发明CE-7酯酶的比较。使用采用缺省参数的BLASTP。

[0357] 表4:具有过水解活性的各种CE-7糖酯酶相对于邻接特征序列(SEQ ID NO:61)的氨基酸同一性百分比

[0358]

过水解酶 序列	使用 BLASTP 的 同一性%	E-分数 (预计的)
SEQ ID NO: 2	100	3e-92
SEQ ID NO: 6	98	6e-91
SEQ ID NO: 8	98	4e-98
SEQ ID NO: 10	78	1e-78
SEQ IDNO: 12	80	3e-76
SEQ ID NO: 14	63	2e-56
SEQ ID NO: 16	51	1e-41
SEQ ID NO: 18	50	6e-35
SEQ ID NO: 26	36	7e-21
SEQ ID NO: 32	99	2e-90
SEQ ID NO: 70	40	2e-26
SEQ ID NO: 82	40	3e-30
SEQ ID NO: 90	46	6e-35
SEQ ID NO. 98	46	6e-35
SEQ ID NO. 106	48	9e-36

[0359] 或者,还可以使用与全长的一种或多种本发明过水解酶相比的氨基酸同一性百分比。因此,具有过水解酶活性的合适的酶与SEQ ID NO:2具有至少30%,优选至少33%,优选至少40%,优选至少40%,更优选至少50%,更优选至少60%,更优选至少70%,甚至更优选至少80%,甚至更优选至少90%,最优选至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%的氨基酸同一性。在另一个实施方案中,合适的过水解酶催化剂包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2,SEQ ID NO:6,SEQ ID NO:8,SEQ ID NO:10,SEQ ID NO:12,SEQ ID NO:14,SEQ ID NO:16,SEQ ID NO:18,SEQ ID NO:26,SEQ ID NO:32,SEQ ID NO:70,SEQ ID NO:82,SEQ ID NO:90,SEQ ID NO:98和SEQ ID NO:106。在优选实施方案中,可以使用合适的具有过水解酶活性的酶,其与SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:90或SEQ ID NO:98或SEQ ID NO:106具有至少90%,至少91%,至少92%,至少93%,至少94%,至少95%,至少96%,至少97%,至少98%或至少99%的氨基酸同一性。

[0360] 合适的过水解酶还可以包括相对于本发明过水解酶(例如SEQ ID NOs.82,90,98和106)之一具有一个或多个缺失、取代和/或插入的酶。如表2所示,具有过水解酶活性的CE-7糖酯酶共享小至32%的总体氨基酸同一性。基于本发明实施例中提供的数据,具有属于CE-7糖酯酶家族的过水解酶活性的另外的酶可具有甚至更低的同一性百分比,只要酶保留保守特征基序即可。这样,缺失、取代和/或插入的数目可以改变,只要在酶内其相对位置发现保守特征基序即可(见表3)。

[0361] 此外,根据在相应核酸序列内发现的结构相似性来鉴定合适的酶是本领域技术人员众所周知的。可使用杂交技术来鉴定相似基因序列。因此,本发明合适的过水解酶催化剂包括由在严格条件下与具有选自下组的核酸序列的核酸分子杂交的核酸分子编码的氨基酸序列:SEQ ID NO:1,SEQ ID NO:5,SEQ ID NO:7,SEQ ID NO:9,SEQ ID NO:11,SEQ ID NO:13,SEQ ID NO:15,SEQ ID NO:17;SEQ ID NO:25;SEQ ID NO:31,SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:60,SEQ ID NO:65,SEQ ID NO:69,SEQ ID NO:74,SEQ ID NO:77,SEQ ID NO:80,SEQ ID NO:81,SEQ ID NO:85,SEQ ID NO:88,SEQ ID NO:89,SEQ ID NO:93,SEQ ID NO:96,SEQ ID NO:97,SEQ ID NO:101,SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:105。

[0362] 在另一个实施方案中,过水解酶催化剂包括以下酶:其具有由在严格条件下与具有选自下组的核酸分子杂交的核酸分子编码的氨基酸序列:SEQ ID NO:77,SEQ ID NO:80,SEQ ID NO:81,SEQ ID NO:85,SEQ ID NO:88,SEQ ID NO:89,SEQ ID NO:93,SEQ ID NO:96,SEQ ID NO:97,SEQ ID NO:101,SEQ ID NO:104和SEQ ID NO:105。

[0363] 本发明方法使用属于CE-7家族糖酯酶的酶的过水解酶活性,在含水反应条件下原位产生工业上有用的、有效浓度的过酸。在一个实施方案中,具有过水解酶活性的酶在结构和功能上归类为头孢菌素C脱乙酰酶(CAH)。在另一个实施方案中,具有过水解酶活性的酶在结构和功能上归类为乙酰木聚糖酯酶(AXE)。

[0364] 产生的过酸是具有相当反应性的,并且浓度可以随着时间延长而降低,这取决于包括但不限于温度和pH的变量。这样,可能希望使各种反应成分保持分离,特别是对于液体制剂。在一个方面,使过氧化氢来源与底物或过水解酶催化剂分离,优选地与两者分离。这可以使用各种技术,包括但不限于使用多隔室分室分配器(美国专利4,585,150),以及在使用时将过水解酶催化剂与无机过氧化物和本发明底物在物理上组合以起始含水酶促过水解反应来实现。在接触被靶向用于处理的表面和/或物体之前,过水解酶催化剂可以任选固定在反应室主体内或与包含过酸的反应产物分离(例如过滤等)。过水解酶催化剂可以为液体基质或固体形式(即粉末、片)或包埋在固体基质内,所述固体基质随后与底物混合以起始酶促过水解反应。在一个进一步的方面,过水解酶催化剂可以包含在可溶性或多孔性小袋内,所述小袋可以加入含水底物基质中以起始酶促过水解。在另一个进一步方面,将包含酶催化剂的粉末悬浮在底物(例如甘油三乙酸酯)中,并且在使用时与在水中的过氧源混合。

[0365] 用于测定过酸和过氧化氢浓度的HPLC测定方法。

[0366] 在本发明方法中,可使用各种分析方法来分析反应物和产物,包括但不限于滴定、高效液相色谱法(HPLC)、气相色谱法(GC)、质谱法(MS)、毛细管电泳法(CE)、U.Karst等人描述的分析方法(Anal.Chem.,69(17):3623-3627(1997)),以及如本文实施例中描述的2,2'-连氨基-二(3-乙基苯并噻唑啉)-6-磺酸酯(ABTS)分析(S.Minning,等人,Analytica Chimica Acta 378:293-298(1999)和WO 2004/058961A1)。

[0367] 过酸的最小杀生物浓度的测定

[0368] 由J.gabrielson等人(J.Microbiol.Methods 50:63-73(2002))描述的方法可用于测定过酸或过氧化氢和酶底物的最小杀生物浓度(MBC)。该测定方法基于XTT还原抑制,其中XTT((2,3-二[2-甲氧基-4-硝基-5-磺基苯基]-5-[(苯基氨基)羰基]-2H-四唑~~鎓~~,内盐,单钠盐)是氧化还原染料,其通过在490nm或450nm处测量的光密度(OD)的变化来指示微

生物的呼吸活性。然而,存在可用于检测消毒剂和杀菌剂活性的各种其他方法,包括但不限于存活平板计数、直接显微计数、干重、浊度测量、吸光度和生物发光(参见例如Brock, Semour S., “Disinfection, Sterilization, and Preservation”, 第5版本, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, USA; 2001)。

[0369] 酶促制备的过酸组合物的用途

[0370] 根据本发明方法生产的酶催化剂产生的过酸可以在各种硬质表面/无生命物体应用中用于降低微生物、真菌、朊病毒相关和病毒污染物的浓度,例如下述的净化:医疗器械(例如内窥镜)、纺织品(例如衣服、地毯)、食物制剂表面、食物保存和食物包装设备、用于食品包装的材料、鸡孵化场和生长设施、动物围栏和具有微生物和/或杀病毒活性的用过的加工水。酶产生的过酸可以在设计为灭活朊病毒的制剂(例如某些蛋白酶)中使用以另外的提供杀生物活性。在一个优选方面,本发明过酸组合物作为用于不可高压灭菌的医疗器械和食物包装设备的消毒剂是特别有用的。因为含过酸的制剂可以使用GRAS或食物级别成分(酶、酶底物、过氧化氢和缓冲剂)进行制备,所以酶产生的过酸还可以用于动物尸体、肉、水果和蔬菜的净化,或用于制备的食物的净化。酶产生的过酸可以引入产物内,所述产物的最终形式是粉末、液体、凝胶、薄膜、固体或气溶胶。酶产生的过酸可以稀释至仍提供有效净化的浓度。

[0371] 通过使表面或物体与通过本发明方法生产的产物接触,包含有效浓度的过酸的组合物可以用于消毒被活病原微生物污染物污染(或怀疑被污染)的表面和/或物体。如本文所使用,“接触”是指使包含有效浓度的过酸的消毒组合物与怀疑被致病实体污染的表面或无生命物体接触足以清洁和消毒的一段时间。接触包括对怀疑被一定浓度微生物群体污染的表面或无生命物体喷雾、处理、浸没、冲刷、倾泻在其上或其内、混合、组合、涂抹、覆盖、施加、附着或以其他方式给予包含有效浓度过酸的过酸溶液或组合物,或形成有效浓度过酸的溶液或组合物。可将消毒剂组合物与清洁组合物进行组合,以提供清洁和消毒这两种作用。或者,可以将清洁剂(例如表面活性剂或洗涤剂)掺入到制剂内以在单一组合物中提供清洁和消毒这两种作用。

[0372] 包含有效浓度过酸的组合物还可以包含至少一种另外的抗微生物剂、朊病毒降解蛋白酶组合、杀病毒剂、杀孢子剂或杀生物剂。当用于清洁和消毒被病原微生物、孢子、病毒、真菌和/或朊病毒污染(或怀疑被污染)的表面和/或物体时,这些试剂与通过本发明方法产生的过酸的组合可以提供增加的和/或协同效应。合适的抗微生物剂包括羧酸酯(例如对羟基苯甲酸烷基酯和肉桂酸烷基酯),磺酸(例如十二烷基苯磺酸),碘化合物或活性卤素化合物(例如,元素卤素,卤素氧化物(例如 NaOCl 、 HOCl 、 HOBr 、 ClO_2),碘,卤间化物(interhalides)(例如,一氯化碘、二氯化碘、三氯化碘、四氯化碘、氯化溴、一溴化碘或二溴化碘),多卤化物,次氯酸盐,次氯酸,次溴酸盐,次溴酸,氯和溴乙内酰脲,二氧化氯和亚氯酸钠),有机过氧化物,包括过氧化苯甲酰、过氧化烷基苯甲酰、臭氧、单态氧发生器、以及它们的混合物,酚衍生物(例如邻苯基苯酚、邻苄基对氯苯酚、叔戊基苯酚和羟基苯甲酸 C_1 - C_6 烷基酯)、季铵化合物(例如氯化烷基二甲基苄基铵、氯化二烷基二甲基铵、以及它们的混合物),和此类抗微生物剂的混合物,其量足以提供所需微生物保护程度。抗微生物剂的有效量包括约0.001重量%至约60重量%抗微生物剂、约0.01重量%至约15重量%的抗微生物剂或约0.08重量%至约2.5重量%的抗微生物剂。

[0373] 在一个方面,当应用于部位上和/或部位处时,通过本方法形成的过酸可用于降低存活微生物污染物(例如,存活微生物群体)的浓度。如本文所使用,本发明“部位”包含适合于消毒或漂白的部分或全部靶表面。靶表面包括可能潜在被微生物、病毒、真菌、朊病毒或其组合污染的所有表面。非限制性实例包括在食物或饮料工业中发现的设备表面(例如罐、传送机、地板、排水管、冷却器、致冷机、设备表面、墙壁、阀、带、管、排水管、接头、裂缝其组合等);建筑物表面(例如墙壁、地板和窗户);非食物工业相关管和排水管,包括水处理设施、池和矿泉以及发酵罐;医院或兽医诊所表面(例如墙壁、地板、床、设备(例如内窥镜)、医院/兽医或其他医疗保健设施中穿着的衣物,包括衣服、刷、鞋和其他医院或兽医表面);餐馆表面;浴室表面;盥洗室;衣物和鞋;用于家畜的畜舍或马房表面,所述家畜是例如家禽、家畜、奶牛、羊、马和猪;用于家禽或用于虾的孵化场;以及药物或生物药物表面(例如药物或生物药物制造设备,药物或生物药物成分,药物或生物药物赋形剂)。另外的硬质表面还包括食品,例如牛肉、家禽、猪肉、蔬菜、水果、海鲜、其组合等。部位还可以包括吸水材料例如受感染的亚麻制品或其他纺织品。部位还包括收获的植物或植物产品,包括种子、球茎、根茎、水果和蔬菜、生长植物,和特别是农作物生长植物,包括谷类、叶菜类和沙拉农作物、根菜类、豆类、浆果类、柑橘类水果和硬水果。

[0374] 硬质表面材料的非限制性实例是金属(例如钢、不锈钢、铬、钛、铁、铜、黄铜、铝及其合金),矿物质(例如混凝土),聚合物和塑料(例如聚烯烃,例如聚乙烯、聚丙烯、聚苯乙烯、聚(甲基)丙烯酸酯、聚丙烯腈、聚丁二烯、聚(丙烯腈、丁二烯、苯乙烯)、聚(丙烯腈、丁二烯)、丙烯腈丁二烯;聚酯例如聚对苯二甲酸乙二醇酯;和聚酰胺例如尼龙)。另外的表面包括砖、瓦、陶器、瓷器、木材、乙烯树脂(vinyl)、油毡和地毯。

[0375] 重组微生物表达

[0376] 本发明序列的基因和基因产物可以在异源宿主细胞中,特别是在微生物宿主细胞中产生。用于表达本发明基因和核酸分子的优选异源宿主细胞是微生物宿主,其可以在真菌或细菌科内发现,并且在宽范围的温度、pH值和溶剂耐受力下生长。例如,预期任何细菌、酵母和丝状真菌可以适当地充当本发明核酸分子表达的宿主。过水解酶可以在细胞内、细胞外或者在细胞内和细胞外组合表达,其中与用于回收通过细胞内表达产生的蛋白的方法相比,细胞外表达使得能够更容易地从发酵产物中回收所需蛋白。转录、翻译和蛋白质生物合成装置相对于用于产生细胞生物物质的细胞原料保持不变;无论如何功能基因将得到表达。宿主菌株的实例包括但不限于细菌、真菌或酵母物种例如曲霉属(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)、糖酵母属(*Saccharomyces*)、毕赤酵母属(*Pichia*)、法夫酵母属(*Phaffia*)、假丝酵母属(*Candida*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)、耶氏酵母属(*Yarrowia*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、芽孢杆菌属(*Bacillus*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、单胞发酵菌属(*Zymomonas*)、土壤杆菌属(*Agrobacterium*)、赤杆菌属(*Erythrobacter*)、绿菌属(*Chlorobium*)、色菌属(*Chromatium*)、黄杆菌属(*Flavobacterium*)、纤维粘菌属(*Cytophaga*)、红杆菌属(*Rhodobacter*)、红球菌属(*Rhodococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、棒状杆菌属(*Corynebacteria*)、分支杆菌属(*Mycobacterium*)、异常球菌属(*Deinococcus*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、泛菌属(*Pantoea*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、假平胞菌属(*Sphingomonas*)、甲基单胞菌属(*Methylomonas*)、甲基杆菌属(*Methylobacter*)、甲基球菌属(*Methylococcus*)、

甲基弯菌属 (*Methylosinus*)、甲基微菌属 (*Methylomicrobium*)、甲基孢囊菌属 (*Methylocystis*)、产碱菌属 (*Alcaligenes*)、集胞藻属 (*Synechocystis*)、聚球蓝细菌属 (*Synechococcus*)、鱼腥蓝细菌属 (*Anabaena*)、硫杆菌属 (*Thiobacillus*)、甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 和粘球菌属 (*Myxococcus*)。在一个实施方案中,细菌宿主菌株包括埃希氏菌属、芽孢杆菌属和假单胞菌属物种。在一个优选的实施方案中,细菌宿主细胞是大肠杆菌。

[0377] 大规模的微生物生长和功能基因表达可以使用宽范围的简单或复杂的碳水化合物、有机酸和醇或饱和烃,例如在光合或化能自养宿主的情况下的甲烷或二氧化碳、氮、磷、硫、氧、碳或任何痕量微量营养素,包括小无机离子的形式和量。生长速度的调节可以通过给培养物添加或不添加一般不视为营养素或能量来源的特定调节分子来进行。

[0378] 用于转化合适的宿主细胞的载体或盒是本领域众所周知的。一般地,载体或盒包含指导相关基因转录和翻译的序列、可选标记和允许自主复制或染色体整合的序列。合适的载体包含含有转录起始控制的基因5'的区域和控制转录终止的DNA片段3'的区域。最优选的是当2个控制区都来源于与转化的宿主细胞同源和/或对生产宿主是天然的基因,尽管这样的控制区无需是这样来源的。

[0379] 可用于驱动本发明头孢菌素C脱乙酰酶编码区在所需宿主细胞中表达的起始控制区或启动子有很多,并且是本领域技术人员熟悉的。基本上能够驱动这些基因的任何启动子都适于本发明,包括但不限于CYC1、HIS3、GAL1、GAL10、ADH1、PGK、PHO5、GAPDH、ADC1、TRP1、URA3、LEU2、ENO、TPI (可用于在糖酵母属中的表达);AOX1 (可用于在毕赤酵母菌属中的表达);和lac、ara、tet、trp、lPl、lPr、T7、tac和trc (可用于在大肠杆菌中表达)以及可用于在芽孢杆菌属中表达的amy、apr、npr启动子和各种噬菌体启动子。

[0380] 终止控制区也可以来源于对优选宿主细胞是天然的各种基因。在一个实施方案中,终止控制区的引入是任选的。在另一个实施方案中,嵌合基因包括来源于优选宿主细胞的终止控制区。

[0381] 工业生产

[0382] 可以应用各种培养方法以产生本发明的过水解酶催化剂。例如,由重组微生物宿主过量表达的特定基因产物的大规模生产可以通过分批和连续培养方法来生产。

[0383] 经典的分批培养方法是封闭系统,其中培养基的组成在培养开始时设定并且在培养过程期间不进行人工改变。因此,在培养过程开始时,用所需的一种或多种生物种子培养基,并且不向系统中进一步添加任何物质就可以发生生长或代谢活性。然而,通常来说,“分批”培养是指碳源的添加是成批的,但经常试图控制诸如pH和氧浓度之类的因素。在分批系统中,系统的代谢产物和生物质组成持续改变直至培养结束时。在分批培养物内,细胞缓和经过静态迟缓期到达高速生长对数期,并最后达到稳定期,此时生长速率减缓或终止。如果不加以处理,稳定期的细胞将最终死亡。在某些系统对数期中的细胞通常负责最终产物或中间产物的批量生成。在其他系统中可以获得稳定或指数后期生成。

[0384] 标准分批系统的一种变型是补料-分批系统。补料-分批培养方法也适用于本发明,并且包括典型的分批式系统,不同的是随着培养进程递增地添加底物。在代谢产物往往抑制细胞的代谢作用,以及其中期望培养基中具有有限量的底物时,补料-分批系统是有用的。补料-分批系统中的实际底物浓度难于测量,并根据一些可测量因素(例如pH、溶解的氧

以及废气例如CO₂的分压)进行评估。分批和补料-分批培养方法在本领域内是常用的且众所周知,并且实例可见于如下文献:Thomas D.Brock,“Biotechnology:A Textbook of Industrial Microbiology”,第二版,Sinauer Associates,Inc.,Sunderland,MA (1989) 和 Deshpande,Mukund V.,Appl.Biochem.Biotechnol.,36:227 (1992)。

[0385] 所需过水解酶催化剂的商业生产也可以用连续培养来实现。连续培养是一种开放式系统,其中将成分确定的培养基连续加入到生物反应器中,并同时移出等量条件培养基用于加工。连续培养一般使细胞维持在其中细胞主要处于对数生长期的恒定高液相密度。或者,连续培养可以用固定化细胞来进行,其中连续添加碳和营养素,并且连续从细胞团块中取出有价值的产物、副产物或废弃物。细胞固定可以使用广泛多样的由天然和/或合成材料组成的固体载体来进行。

[0386] 连续或半连续培养允许调节影响细胞生长或最终产物浓度的一种因素或任何数目的因素。例如,一种方法将以固定的速率维持限制性营养物质(例如碳源或氮水平)并且允许所有其它参数调节。在其他系统中影响生长的许多因素可以连续改变,而通过培养基浊度测量的细胞浓度保持不变。连续系统努力维持稳态生长条件,并且因此由于培养基取出导致的细胞丧失必须针对培养基中的细胞生长速度进行平衡。对于连续培养过程调节营养素和生长因子的方法以及用于使产物形成速度达到最大的技术是工业微生物学领域众所周知的,并且各种方法由Brock,同上所述。

[0387] 本发明中的发酵培养基必须含有合适的碳底物。合适的底物可包括但不限于单糖,例如葡萄糖和果糖;二糖,例如乳糖或蔗糖;多糖,例如淀粉或纤维素或它们的混合物;以及来自可再生原料,例如干酪乳清渗透物、玉米浆、甜菜糖蜜及大麦麦芽的未纯化混合物。此外,碳底物还可以是一碳底物例如二氧化碳、甲烷或甲醇(例如,当宿主细胞是甲基营养微生物时)。相似地,假丝酵母属的多种物种将会代谢丙氨酸或油酸(Sulter等人,Arch.Microbiol.,153:485-489 (1990))。因此,设想本发明中所利用的碳源可涵盖各种含碳底物并且将仅受限于生物体的选择。

[0388] 可以通过本领域技术人员已知的任何方法实现从分配或补料分批发酵或连续培养物回收需要的过水解酶催化剂。例如,当细胞内生产过水解酶催化剂时,通过以下步骤从培养基分离细胞糊:离心或膜过滤,任选用水或所需pH下的含水缓冲液洗涤,然后对所需pH下的含水缓冲液中的细胞糊的悬浮液进行匀浆,产生含有所需过水解酶催化剂的细胞提取物。细胞提取物可以任选通过合适的过滤辅助物如硅藻土或二氧化硅进行过滤,以便在热处理步骤前除去细胞碎片,以便从过水解酶催化剂溶液沉淀出不需要的蛋白。然后可以通过膜过滤或离心从沉淀的细胞碎片和蛋白分离含所需过水解酶催化剂的溶液,通过额外的膜过滤浓缩得到的部分纯化的过水解酶催化剂溶液,然后任选与合适的载体(例如、麦芽糖糊精、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液、或其混合物)混合,并且喷雾干燥,产生包含所需过水解酶催化剂的固体粉末。

[0389] 申请人特别将所有引用的参考文献的完整内容引入本公开内容中。此外,当数量、浓度或其他数值或参数以范围、优选范围或优选上限数值和优选下限数值的列表形式给出时,它应理解为具体地公开由任何范围上限或优选数值和任何范围下限或优选数值的任何一对所构成的所有范围,而不管所述范围是否被单独地公开。凡在本文中给出某一数值范围之处,该范围均意在包括其端点,以及位于该范围内的所有整数和分数,除非另行指出。

当定义一个范围时,不希望将范围限定于所列举的具体数值。

[0390] 一般方法

[0391] 提供下述实施例以证实优选实施方案。本领域技术人员应当理解,下述实施例中公开的技术代表由本发明人发现在本发明的实践中良好发挥作用的技术,并且因此可以视为构成关于其实践的优选方式。然而,根据本公开内容,本领域技术人员应当理解,在不背离本发明的精神和范围的情况下,可以在公开的具体实施方案中进行许多改变并且仍获得相同或相似结果。

[0392] 除非另有说明,所有试剂和材料均得自DIFCO Laboratories (Detroit,MI)、GIBCO/BRL (Gaithersburg,MD)、TCI America (Portland,OR)、Roche Diagnostics Corporation (Indianapolis,IN)或Sigma/Aldrich Chemical Company (St.Louis,MO)。

[0393] 说明书中的下述缩写对应如下的测量单位、技术、性质或化合物:“sec”或“s”是指秒,“min”是指分钟,“h”或“hr”是指小时,“ μ L”是指微升,“mL”是指毫升,“L”是指升,“mM”是指毫摩尔浓度,“M”是指摩尔浓度,“mmol”是指毫摩尔,“ppm”是指每百万份数,“wt”是指重量,“wt%”是指重量百分比,“g”是指克,“ μ g”是指微克,“g”是指重力,“HPLC”是指高效液相层析法,“dd H₂O”是指蒸馏和去离子水,“dcw”是指细胞干重,“ATCC”或“ATCC[®]”是指美国典型培养物保藏中心 (Manassas,VA),“U”是指过水解酶活性单位,“rpm”是指每分钟转数,并且“EDTA”是指乙二胺四乙酸。

[0394] 实施例1

[0395] 枯草芽孢杆菌ATCC 31954[™]的生长和细胞提取物的制备

[0396] 将干燥培养物悬浮于5ML营养培养液 (DIFCO;0003-01-6) 中,并且在30℃培养3天后,将枯草芽孢杆菌ATCC 31954[™]培养物恢复活力。培养第3天后,将培养物的等分试样在胰酪胨琼脂培养平板 (Becton,Dickinson,and Company;Franklin Lakes,NJ) 上进行划线,并且在35℃培养24小时。将几个单个菌落刮到1微升接种环 (Becton Dickinson;目录#220215) 上,并且转移到50ML乳杆菌属MRS培养液 (Hardy Diagnostics,Santa Maria,CA;目录#C5931) 内。然后将培养物在30℃和200rpm搅拌速度下生长12小时。生长12小时后,将2mL培养物转移到包含100mLMRS培养液的无挡板的500mL摇瓶内,用于在30℃和200rpm搅拌速度下生长12-14小时。然后通过5℃以15,000×g离心25分钟来收获细胞,并且将所得细胞糊保存于-80℃。

[0397] 对于细胞提取物制备,将0.9g细胞糊以25重量% (细胞干重) 悬浮于包含二硫苏糖醇 (1mM) 和EDTA (1mM) 的0.05M磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 中。使细胞悬浮液两次通过具有16,000psi工作压力的弗氏压碎器。然后将粗提取物以20,000×g离心以去除细胞碎片,产生用于总可溶性蛋白测定 (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination,Sigma Aldrich,Sigma目录#BCA1-KT) 的澄清细胞提取物,然后在-80℃冷冻和保存。

[0398] 实施例2

[0399] 枯草芽孢杆菌ATCC 31954[™]半纯化的细胞提取物的过水解活性的测定

[0400] 将枯草芽孢杆菌 (ATCC 31954[™]) 细胞提取物的1.0mL等分试样 (10mg总蛋白/mL,如实施例1中所述制备) 用等体积的50mM磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 进行稀释,并通过100,000分子量截留 (Molecular Weight Cutoff) (MWCO) Centricon膜装置 (Millipore Corp, Bedford,MA) 进行过滤。所得到的滤液 (半纯化的细胞提取物) 包含用于可溶性总蛋白测定

(Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma 目录#BCA1-KT) 的1.5mg总蛋白/mL, 并且该滤液的测定表明没有可测量的过氧化氢酶活性。

[0401] 将在50mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中包含甘油三乙酸酯 (250mM)、过氧化氢 (2.5M) 和0.100ML半纯化的细胞提取物 (0.15mg提取物总蛋白) 的1mL反应混合物于25℃混合。对照反应通过用50mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 替换半纯化的细胞提取物来进行, 以测定在不存在添加的半纯化细胞提取物的情况下, 通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸的浓度。

[0402] 根据由Karst等人描述的方法来进行反应混合物中过乙酸浓度的测定。在10分钟和30分钟时取出反应混合物的等分试样 (0.250ML), 并且使用 Ultrafree[®] MC-滤器装置 (30,000标称分子量极限 (Normal Molecular Weight Limit) (NMWL), Millipore 目录#UFC3LKT 00) 通过在12,000rpm下离心2分钟进行过滤; 通过过滤去除等分试样的蛋白质成分来终止反应。将等分试样 (0.100ML) 的所得到的滤液转移至包含0.300M去离子水的1.5mL螺旋瓶盖HPLC瓶 (Agilent Technologies, Palo Alto, CA; #5182-0715) 中, 然后加入0.100ML 20mM MTS (甲基对甲苯基硫) 在乙腈中的溶液, 将瓶盖上盖子, 使内容物短暂混合, 然后在约25℃于不存在光的情况下培养10分钟。随后向每个瓶中添加0.400mL乙腈和0.100mL三苯基膦 (TPP, 40mM) 在乙腈中的溶液, 再次将瓶盖上盖子, 并且使所得溶液混合, 并且在约25℃于不存在光的情况下培养30分钟。随后向每个管形瓶中添加0.100mL 10mM N,N-二乙基-间甲苯甲酰胺 (DEET; HPLC外标), 并且如下所述通过HPLC分析所得到的溶液。在10分钟和30分钟内产生的过乙酸浓度列举于表5中。

[0403] HPLC方法:

[0404] Supelco Discovery C8柱 (10cm×4.0mm, 5μm) (cat.#569422-U) w/前置柱Supelco Supelguard Discovery C8 (Sigma-Aldrich; 目录#59590-U); 10微升注射体积; 采用CH₃CN (Sigma-Aldrich; #270717) 和去离子H₂O以1.0ML/min和室温进行梯度洗脱:

	时间(分钟:秒)	(% CH ₃ CN)
	0:00	40
	3:00	40
[0405]	3:10	100
	4:00	100
	4:10	40
	7:00(停止)	40

[0406] 表5: 在枯草芽孢杆菌 (ATCC 31954[™]) 半纯化细胞提取物的存在或不存在下, 通过甘油三乙酸酯 (250mM) 和过氧化氢 (2.5M) 于pH 6.5反应产生的过乙酸 (PAA)。

[0407]	枯草芽孢杆菌 (ATCC 31954™) 半纯化的细胞提取物 (mg 总蛋白/mL)	10 分钟内的过乙酸 (ppm)	30 分钟内的过乙酸 (ppm)
	0	641	1343
	0.15	3492	3032

[0408] 实施例3

[0409] 来自枯草芽孢杆菌ATCC 31954™细胞提取物的半纯化酶的过水解活性

[0410] 如实施例1中所述进行枯草芽孢杆菌ATCC 31954™生长和提取物制备,但是粗提取物不进行离心。将粗提取物用冷正丙醇(-20℃)进行分级分离。将包含无细胞提取物的烧瓶在冰浴中搅拌15分钟,随后滴加正丙醇(-20℃)(以防止提取物凝固)至40%(v/v)的浓度。将所得到的提取物/丙醇混合物在冰浴中搅拌30分钟,随后以12,000×g下于5℃离心10分钟,并将上清液放回到烧瓶中并置于冰浴内。在搅拌下向上清液中缓慢加入另外的正丙醇(-20℃)至60%(v/v)的浓度,并且如上所述在冰浴中将所得到的混合物搅拌30分钟,然后离心。将来自该第二个级份的团块保存于冰上,并将上清液放回到烧瓶中并置于冰浴内。在搅拌下向上清液中缓慢加入冷正丙醇至80%(v/v)的浓度,并且如上所述将混合物搅拌30分钟且离心。将来自60-80%级份的团块保存于冰上。将来自40-60%(v/v)正丙醇级份和60-80%(v/v)正丙醇级份的团块溶解于最小量的0.05M磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中,并且测定所得溶液的总可溶性蛋白(Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination,目录#BCA1-KT),随后冷冻和保存于-80℃。

[0411] 将在50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中包含甘油三乙酸酯(250mM)、过氧化氢(1.0M)和来自细胞提取物的40-60%(v/v)或60-80%(v/v)正丙醇级份(如上所述制备的)的0.10mg/mL可总溶性蛋白的1mL反应混合物于25℃进行混合。对照反应通过用50mM磷酸盐缓冲液(pH6.5)替换包含半纯化酶的细胞提取物的正丙醇级份来进行,以测定在不存在添加的半纯化酶的情况下,通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解所产生的过乙酸浓度。使用实施例2中描述的操作在5分钟和30分钟时测定反应混合物的过乙酸,并且将通过添加的酶产生的过乙酸浓度列于表6中。

[0412] 表6。在枯草芽孢杆菌(ATCC 31954™)半纯化细胞提取物的存在或不存在下,通过甘油三乙酸酯(250mM)和过氧化氢(1.0M)于pH 6.5反应所产生的过乙酸(PAA)。

[0413]	细胞提取物的 正丙醇级份	总蛋白 (mg/mL 反应)	5 分钟内的 过乙酸(ppm)	30 分钟内的 过乙酸(ppm)
	无提取物	0	221	803
	40 - 60 %	0.1	2829	4727
	60 - 80 %	0.1	1832	3777

[0414] 实施例4

[0415] 来自枯草芽孢杆菌ATCC 31954™细胞提取物的具有过水解活性的头孢菌素C脱乙

酯酶的鉴定

[0416] 将实施例3中描述的40-60%正丙醇级份的0.1mL样品(500μg总蛋白)在室温下与等体积的2×非变性(天然)样品缓冲液(Invitrogen)混合,并装载到1.5mm 8-16%Tris-甘氨酸聚丙烯酰胺小凝胶(2D凝胶;Invitrogen)的制备样品孔内。天然凝胶电泳使用Tris-甘氨酸电泳缓冲液(Invitrogen)在125V下操作90分钟。电泳后,制备凝胶用于使用pH指示剂溴百里酚蓝的原位酯酶活性测定。

[0417] 将凝胶用去离子水洗涤10分钟×2,并且进行缓慢机械混合。然后使用10mM磷酸盐缓冲液将凝胶洗涤10分钟。除去磷酸盐缓冲液后,使包含665μL饱和溴百里酚蓝(溶于水中)的50mL 10mM磷酸盐缓冲液与凝胶一起培养10分钟,然后添加1mL纯甘油三乙酸酯(Sigma Aldrich)。在培养10分钟内,在凝胶上146 kDa处出现指示酯酶活性的1个黄色条带。

[0418] 从凝胶中切下酯酶阳性条带,并且转移到50mL聚丙烯锥形管(Falcon)内。伴随轻轻混合的2次5mL去离子水洗涤后,从凝胶切片中取出黄色的溴百里酚蓝染色。然后在轻轻混合下将凝胶切片用0.9mL 2×Novex Tris-甘氨酸SDS样品缓冲液加100μL 10×NuPAGE还原剂(Invitrogen)处理30分钟。样品处理后,使用热水浴将凝胶切片和样品缓冲液于85℃培养5分钟。随后从培养管中取出凝胶切片,并且小心地置于1.5mm 8-16%Tris-Gly小凝胶的单个制备孔中。小心地排除气泡并且与成层凝胶直接接触。将在去离子水中制备的250-300μL温0.5%琼脂糖溶液加到制备孔内后,原位固定凝胶切片。将单个分子标记泳道装载15μL SeeBlue[®] Plus2预染色的MW标记(Invitrogen)。

[0419] 凝胶切片的电泳在30V下操作30分钟,用于将蛋白质从凝胶切片电洗脱到平板凝胶内。电压随后经过10分钟从30V斜线上升至125V,随后为在125V进行90分钟的操作。电泳后,如XCell II[™]印迹手册(Invitrogen)中所述将分离的蛋白条带印迹到PVDF膜上,并且印迹缓冲液是10mM CAPS, pH 11.0。电泳印迹操作在25V下在转移装置的夹套中于室温用冰水操作2小时。

[0420] 转移后,将PVDF膜用ProBlot染色溶液(Applied Biosystems, Foster City, CA)染色1分钟,随后用甲醇:水(50:50)脱色。鉴定6个蛋白质条带并且各自进行N-末端测序。GenBank[®]氨基酸序列数据库的Blast搜索后,具有酯酶相关序列同源性的唯一一条带鉴定为条带1,并且17个N-末端氨基酸调用与枯草芽孢杆菌头孢菌素C脱乙酰酶(GENBANK[®] BAA01729; Mitsushima等人,同上;美国专利5,528,152;和美国专利5,338,676)具有100%的氨基酸同一性。

[0421] 实施例5

[0422] 来自枯草芽孢杆菌ATCC 31954[™]的过水解酶的克隆和表达

[0423] 使用PUREGENE[®] DNA纯化系统(Gentra Systems, Minneapolis MN)从枯草芽孢杆菌ATCC 31954[™]分离出基因组DNA。通过PCR(94℃0.5分钟,55℃0.5分钟,70℃1分钟,30个循环),使用鉴定为SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的引物,从基因组DNA扩增过水解酶基因。将所得到的核酸产物(SEQ ID NO:1)亚克隆到pTrcHis2-TOPO[®](Invitrogen, Carlsbad CA)内,以产生鉴定为pSW186的质粒。还通过PCR(94℃0.5分钟,55℃0.5分钟,70℃1分钟,30个循环),使用鉴定为SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的引物,从基因组DNA扩增过水解酶基

因。用限制酶PstI和XbaI切割所得核酸产物(SEQ ID NO:29),并且亚克隆到pUC19中的PstI与XbaI位点之间,以产生鉴定为pSW194质粒。使用质粒pSW186和pSW194来转化大肠杆菌TOP10(Invitrogen,Carlsbad CA)、大肠杆菌MG1655(ATCC 47076TM)、大肠杆菌UM2(大肠杆菌Genetic Stock Center#7156,Yale University,New Haven CT)和大肠杆菌KLP18(见实施例15)以产生分别鉴定为TOP10/pSW186、MG1655/pSW186、UM2/pSW186、KLP18/pSW186、TOP10/pSW194、MG1655/pSW194、UM2/pSW194和KLP18/pSW194的菌株。将TOP10/pSW186、MG1655/pSW186、UM2/pSW186、KLP18/pSW186、TOP10/pSW194、MG1655/pSW194、UM2/pSW194和KLP18/pSW194在LB培养基中于37℃在摇动下生长直至OD_{600nm}=0.4-0.5,这时加入IPTG至最终浓度为1mM,并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞,并且进行SDS-PAGE以证实在20-40%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。

[0424] 实施例6

[0425] 来自枯草芽孢杆菌BE1010的过水解酶的克隆和表达

[0426] 使用PUREGENE[®]DNA纯化系统(Gentra Systems)从枯草芽孢杆菌BE1010(Payne和Jackson 1991J.Bacteriol.173:2278-2282)分离出基因组DNA。通过PCR(94℃0.5分钟,55℃0.5分钟,70℃1分钟,30个循环),使用鉴定为SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的引物,从基因组DNA扩增过水解酶基因。将所得核酸产物(SEQ ID NO:5)亚克隆到pTrcHis2-TOPO[®](Invitrogen)内,以产生鉴定为pSW187的质粒。还通过PCR(94℃0.5分钟,55℃0.5分钟,70℃1分钟,30个循环),使用鉴定为SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的引物,从基因组DNA扩增过水解酶基因。用限制酶PstI和XbaI切割所得核酸产物(SEQ ID NO:30),并且亚克隆到pUC19中的PstI与XbaI位点之间,以产生鉴定为pSW189的质粒。使用质粒pSW187和pSW189来转化大肠杆菌TOP10(Invitrogen)、大肠杆菌MG1655(ATCC 47076TM)、大肠杆菌UM2(大肠杆菌Genetic Stock Center #7156,Yale University,New Haven CT)和大肠杆菌KLP18(见实施例15)以产生分别鉴定为TOP10/pSW187、MG1655/pSW187、UM2/pSW187、KLP18/pSW187、TOP10/pSW189、MG1655/pSW189、UM2/pSW189和KLP18/pSW189的菌株。将TOP10/pSW187、MG1655/pSW187、UM2/pSW187、KLP18/pSW187、TOP10/pSW189、MG1655/pSW189、UM2/pSW189和KLP18/pSW189在LB培养基中于37℃在摇动下生长直至OD_{600nm}=0.4-0.5,这时加入IPTG至最终浓度为1mM,并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞,并且进行SDS-PAGE以证实在20-40%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。

[0427] 实施例7

[0428] 来自枯草芽孢杆菌ATCC 6633TM的过水解酶的克隆和表达

[0429] 使用PUREGENE[®]DNA纯化系统从枯草芽孢杆菌ATCC 6633TM分离出基因组DNA。通过PCR(94℃0.5分钟,55℃0.5分钟,70℃1分钟,30个循环),使用鉴定为SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的引物,从基因组DNA扩增过水解酶基因。将所得核酸产物(SEQ ID NO:7)亚克隆到pTrcHis2-TOPO[®]内,以产生鉴定为pSW188的质粒。使用质粒pSW188来转化大肠杆菌MG1655(ATCC 47076TM)和大肠杆菌UM2(大肠杆菌Genetic Stock Center#7156,Yale University,New Haven CT)以产生分别鉴定为MG1655/pSW188和UM2/pSW188的菌株。将MG1655/pSW188和UM2/pSW188在LB培养基中于37℃在摇动下生长直至OD_{600nm}=0.4-0.5,这

时加入IPTG至最终浓度为1mM,并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞,并且进行SDS-PAGE以证实在20-40%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。

[0430] 实施例8

[0431] 来自枯草芽孢杆菌ATCC 29233TM的过水解酶的克隆和表达

[0432] 使用 PUREGENE[®] DNA纯化系统从枯草芽孢杆菌ATCC 29233TM分离出基因组DNA。通过PCR (94℃0.5分钟,55℃0.5分钟,70℃1分钟,30个循环),使用鉴定为SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的引物,从基因组DNA扩增过水解酶基因。将所得核酸产物 (SEQ ID NO:31) 亚克隆到 pTrcHis2-TOPO[®] 内,以产生鉴定为pSW190的质粒。使用质粒pSW190来转化大肠杆菌MG1655 (ATCC 47076TM)、大肠杆菌UM2 (大肠杆菌genetic Stock Center#7156,Yale University,New Haven CT) 和大肠杆菌KLP18 (见实施例15) 以产生分别鉴定为MG1655/pSW190、UM2/pSW190和KLP18/pSW190的菌株。将MG1655/pSW190、UM2/pSW190和KLP18/pSW190在LB培养基中于37℃在摇动下生长直至OD_{600nm}=0.4-0.5,这时加入IPTG至最终浓度为1mM,并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞,并且进行SDS-PAGE以证实在20-40%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。

[0433] 实施例9

[0434] 来自地衣芽孢杆菌 (Bacillus licheniformis) ATCC 14580TM的过水解酶的克隆和表达

[0435] 使用 PUREGENE[®] DNA纯化系统从地衣芽孢杆菌ATCC 14580TM分离出基因组DNA。通过PCR (94℃0.5分钟,55℃0.5分钟,70℃1分钟,30个循环),使用鉴定为SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34的引物,从基因组DNA扩增过水解酶基因。将所得核酸产物 (SEQ ID NO:9) 亚克隆到 pTrcHis2-TOPO[®] 内,以产生鉴定为pSW191的质粒。使用质粒pSW191来转化大肠杆菌MG1655 (ATCC 47076TM)、大肠杆菌UM2 (大肠杆菌Genetic Stock Center #7156,Yale University,New Haven CT)、大肠杆菌PIR1 (Invitrogen,Carlsbad CA) 和大肠杆菌KLP18 (见实施例15) 以产生分别鉴定为MG1655/pSW191、UM2/pSW191、PIR1/pSW191和KLP18/pSW191的菌株。将MG1655/pSW191、UM2/pSW191、PIR1/pSW191和KLP18/pSW191在LB培养基中于37℃在摇动下生长直至OD_{600nm}=0.4-0.5,这时加入IPTG至最终浓度为1mM,并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞,并且进行SDS-PAGE以证实在20-40%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。

[0436] 实施例10

[0437] 来自热纤维梭菌 (Clostridia thermocellum) ATCC 27405TM的过水解酶的克隆和表达

[0438] 使用 PUREGENE[®] DNA纯化系统从热纤维梭菌ATCC 27405TM分离出基因组DNA。通过PCR (94℃0.5分钟,55℃0.5分钟,70℃1分钟,30个循环),使用鉴定为SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36的引物,从基因组DNA扩增过水解酶基因。将所得核酸产物 (SEQ ID NO:13) 亚克隆到 pTrcHis2-TOPO[®] 内,以产生鉴定为pSW193的质粒。使用质粒pSW193来转化大肠杆菌MG1655 (ATCC 47076TM)、大肠杆菌UM2 (大肠杆菌Genetic Stock Center #7156,Yale

University, New Haven CT) 和大肠杆菌KLP18 (见实施例15) 以产生分别鉴定为MG1655/pSW193、UM2/pSW193和KLP18/pSW193的菌株。将MG1655/pSW193、UM2/pSW193和KLP18/pSW193在LB培养基中于37℃在摇动下生长直至OD_{600nm}=0.4-0.5, 这时加入IPTG至最终浓度为1mM, 并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞, 并且进行SDS-PAGE以证实在20-40%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。

[0439] 实施例11

[0440] 来自短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) PS213的过水解酶的克隆和表达

[0441] 使用对于在大肠杆菌中表达最优化的密码子 (DNA 2.0, Menlo Park CA) 来合成如在 GENBANK[®] (登录号AJ249957) 中报道的来自短小芽孢杆菌PS213的编码乙酰木聚糖酯酶的基因 (axe1)。然后通过PCR (94℃0.5分钟, 55℃0.5分钟, 70℃1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的引物来扩增该基因。将所得核酸产物 (SEQ ID NO:60) 亚克隆到 pTrcHis2-TOPO[®] (Invitrogen, Carlsbad CA) 内, 以产生鉴定为pSW195的质粒。使用质粒pSW195来转化大肠杆菌MG1655 (ATCC47076TM)、大肠杆菌UM2 (大肠杆菌 Genetic Stock Center #7156, Yale University, New Haven CT) 和大肠杆菌KLP18 (见实施例15) 以产生分别鉴定为MG1655/pSW195、UM2/pSW195和KLP18/pSW195的菌株。将MG1655/pSW195、UM2/pSW195和KLP18/pSW195在LB培养基中于37℃在摇动下生长直至OD_{600nm}=0.4-0.5, 这时加入IPTG至最终浓度为1mM, 并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞, 并且进行SDS-PAGE以证实在20-40%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。

[0442] 实施例12

[0443] 来自那不勒斯栖热袍菌 (*Thermotoga neapolitana*) 的过水解酶的克隆和表达

[0444] 使用对于在大肠杆菌中表达最优化的密码子 (DNA 2.0, Menlo Park CA) 来合成如在 GENBANK[®] (登录号58632) 中报道的来自那不勒斯栖热袍菌的编码乙酰木聚糖酯酶基因。然后通过PCR (94℃0.5分钟, 55℃0.5分钟, 70℃1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40的引物来扩增该基因。将所得核酸产物 (SEQ ID NO:41) 亚克隆到 pTrcHis2-TOPO[®] 内, 以产生鉴定为pSW196的质粒。使用质粒pSW196来转化大肠杆菌MG1655 (ATCC 47076TM)、大肠杆菌UM2 (大肠杆菌 Genetic Stock Center #7156, Yale University, New Haven CT) 和大肠杆菌KLP18 (见实施例15) 以产生分别鉴定为MG1655/pSW196、UM2/pSW196和KLP18/pSW196的菌株。将MG1655/pSW196、UM2/pSW196和KLP18/pSW196在LB培养基中于37℃在摇动下生长直至OD_{600nm}=0.4-0.5, 这时加入IPTG至最终浓度为1mM, 并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞, 并且进行SDS-PAGE以证实在20-40%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。

[0445] 实施例13

[0446] katG过氧化氢酶破坏的大肠杆菌菌株的构建

[0447] 通过PCR (94℃0.5分钟, 55℃0.5分钟, 70℃1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:45的引物来从质粒pKD13 (SEQ ID NO:43) 扩增卡那霉素抗性基因 (kan; SEQ ID NO:42), 以产生鉴定为SEQ ID NO:46的PCR产物。katG核酸序列作为SEQ ID NO:47提供, 并且相应的氨基酸序列是SEQ ID NO:48。用温度敏感性质粒pKD46 (SEQ ID NO:49) 转

化大肠杆菌MG1655 (ATCC 47076™), 所述质粒含有λ-Red重组酶基因 (Datsenko和Wanner, 2000, PNAS USA 97:6640-6645), 并且在LB-amp平板上于30℃选择24小时。通过电穿孔 (BioRadgene Pulser, 0.2cm比色杯, 2.5kV, 200W, 25uF) 将MG1655/pKD46用50-500ng PCR产物转化, 并且在LB-kan平板上于37℃选择24小时。将几个菌落划线到LB-kan平板上, 并且在42℃培养过夜以让pKD46质粒熟化。检查菌落以证实kanR/ampS表型。使用PUREGENE® DNA纯化系统从几个菌落分离出基因组DNA, 并且使用鉴定为SEQ ID NO:50和SEQ ID NO:51的引物, 通过PCR检查, 以证实katG基因的破坏。将几个katG-破坏的菌株用温度敏感性质粒pCP20 (SEQ ID NO:52) 转化, 所述质粒含有用于切除kan基因的FLP重组酶, 并且在LB-amp平板上于37℃选择24小时。将几个菌落划线到LB平板上, 并且在42℃培养过夜以让pCP20质粒熟化。检查两个菌落以证实kanS/ampS表型, 并且称为MG1655KatG1和MG1655KatG2。

[0448] 实施例14

[0449] katE过氧化氢酶破坏的大肠杆菌菌株的构建

[0450] 通过PCR (94℃0.5分钟, 55℃0.5分钟, 70℃1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:54的引物来从质粒pKD13 (SEQ ID NO:43) 扩增卡那霉素抗性基因 (SEQ ID NO:42) 以产生鉴定为SEQ ID NO:55的PCR产物。katE核酸序列作为SEQ ID NO:56提供, 并且相应的氨基酸序列是SEQ ID NO:57。用温度敏感性质粒pKD46 (SEQ ID NO:49) 转化大肠杆菌MG1655 (ATCC 47076™), 所述质粒含有λ-Red重组酶基因, 并且在LB-amp平板上于30℃选择24小时。通过电穿孔 (BioRadgene Pulser, 0.2cm比色杯, 2.5kV, 200W, 25uF) 将MG1655/pKD46用50-500ng PCR产物转化, 并且在LB-kan平板上于37℃选择24小时。将几个菌落划线到LB-kan平板上, 并且在42℃培养过夜以让pKD46质粒熟化。检查菌落以证实kanR/ampS表型。使用PUREGENE DNA纯化系统从几个菌落分离出基因组DNA, 并且使用鉴定为SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59的引物, 通过PCR检查, 以证实katE基因的破坏。将几个katE-破坏的菌株用温度敏感性质粒pCP20 (SEQ ID NO:52) 转化, 所述质粒含有用于切除kan基因的FLP重组酶, 并且在LB-amp平板上于37℃选择24小时。将几个菌落划线到LB平板上, 并且在42℃培养过夜以让pCP20质粒熟化。检查两个菌落以证实kanS/ampS表型, 并且称为MG1655KatE1和MG1655KatE2。

[0451] 实施例15

[0452] katG过氧化氢酶和katE过氧化氢酶破坏的大肠杆菌菌株 (KLP18) 的构建

[0453] 通过PCR (94℃0.5分钟, 55℃0.5分钟, 70℃1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:54的引物来从质粒pKD13 (SEQ ID NO:43) 扩增卡那霉素抗性基因 (SEQ ID NO:42) 以产生鉴定为SEQ ID NO:55的PCR产物。用温度敏感性质粒pKD46 (SEQ ID NO:49) 转化大肠杆菌MG1655 KatG1 (实施例13), 所述质粒含有λ-Red重组酶基因, 并且在LB-amp平板上于30℃选择24小时。通过电穿孔 (BioRadgene Pulser, 0.2cm比色杯, 2.5kV, 200W, 25uF) 将MG1655KatG1/pKD46用50-500ng PCR产物转化, 并且在LB-kan平板上于37℃选择24小时。将几个菌落划线到LB-kan平板上, 并且在42℃培养过夜以让pKD46质粒熟化。检查菌落以证实kanR/ampS表型。使用PUREGENE® DNA纯化系统从几个菌落分离出基因组DNA, 并且使用鉴定为SEQ ID NO:58和SEQ ID NO:59的引物, 通过PCR检查, 以证实katE基因的破坏。将几个katE-破坏的菌株 (Δ katE) 用温度敏感性质粒pCP20 (SEQ ID NO:52) 转

化,所述质粒含有用于切除kan基因的FLP重组酶,并且在LB-amp平板上于37℃选择24小时。将几个菌落划线到LB平板上,并且在42℃培养过夜以让pCP20质粒熟化。检查两个菌落以证实kan^S/amp^S表型,并且称为MG1655 KatG1KatE18.1和MG1655KatG1KatE23。MG1655 KatG1KatE18.1指定为大肠杆菌KLP18。

[0454] 实施例16

[0455] 评估过水解酶分子量

[0456] 将获自表达得自枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和热纤维梭菌的过水解酶基因的大肠杆菌KLP18(一种过氧化氢酶双敲除的大肠杆菌MG1655)的摇瓶生长物的细胞团悬浮在含有二硫苏糖醇(1mM)的2.2mL0.05M磷酸钾缓冲液(pH 7.0)中。将每个细胞悬浮液通过具有16,000psi(约110.3MPa)的工作压力的弗氏压碎器两次。将粗提取物以20,000×g离心以除去细胞碎片,获得澄清粗提取物,分析其总可溶性蛋白(Bicinchoninic Acid Kit[BCA]for Protein Determination,Sigma Aldrich,BCA1-KT)。

[0457] 将含有20μg总蛋白的澄清化的粗提取物(5μL)在室温与等体积的2×非变性(天然)样品缓冲液(Invitrogen)混合,并且加载到1.5mM×10孔4-12%Tris-甘氨酸聚丙烯酰胺小凝胶(Invitrogen)的样品孔内,向两个单独的孔内加载7.5μL NATIVEMARK™Unstained Protein Standard(Invitrogen)。使用Tris-甘氨酸电泳缓冲液(Invitrogen)在125V进行天然凝胶电泳105分钟。电泳后,使用pH指示剂溴百里酚蓝原位进行凝胶的酯酶活性测定。

[0458] 在缓慢机械混合下,将凝胶用去离子水洗涤10min×2。然后在缓慢机械混合下,将凝胶用10mM pH 7.0磷酸盐缓冲液洗涤10分钟。除去磷酸盐缓冲液之后,将含有400μL饱和溴百里酚蓝水溶液的30ML 10mM pH 7.0磷酸盐缓冲液与凝胶培养10分钟,然后加入1ML纯净的甘油三乙酸酯(Tessenderlo Fine Chemicals;Staffordshire,UK)。在培养2分钟内,在活性过水解酶位点形成了黄色条带。所有枯草芽孢杆菌物种和地衣芽孢杆菌都具有在约216kDa分子量的强条带。热纤维梭菌表现出在约432kDa的强主要条带以及在约576kDa的次要条带,这表明了酯酶活性。通过在与条带相邻的凝胶中打小孔来将所有条带标记。将凝胶用去离子水洗涤10min×2,并且缓慢机械混合,以除去酯酶活性染色。然后在缓慢机械混合下将凝胶用10mM pH 7.0磷酸盐缓冲液洗涤10分钟以准备进行蛋白染色。加入考马斯蓝(Coomassie blue)染色剂以覆盖凝胶。缓慢机械混合5分钟后,倾析出考马斯蓝,并且用40mL去染液(de-stain)(10%乙酸、30%甲醇、60%去离子水)替换。去染后,估测活性区域的分子量。结果总结于表7中。

[0459] 表7:过水解酶分子量的评估

	转化体 菌株	过水解 酶源	主要天然凝胶 活性染色, 估测 的分子量(kDa)	次要天然凝胶 活性染色, 估测 的分子量(kDa)	计算的亚基 分子量 (kDa)
	KLP18	无	无	无	-
	KLP18/pSW186	枯草芽孢杆菌 ATCC 31954 TM	216	未检测到	35.8
[0460]	KLP18/pSW189	枯草芽孢杆菌 BE1010	216	未检测到	35.9
	KLP18/pSW190	枯草芽孢杆菌 ATCC 29233 TM	216	未检测到	35.8
	KLP18/pSW191	地衣芽孢杆菌 ATCC14580 TM	216	未检测到	35.8
	KLP18/pSW193	热纤维梭菌 ATCC 27405 TM	432	648	36.0

[0461] 实施例17

[0462] 表达枯草芽孢杆菌BE1010过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW187的发酵

[0463] 通过向2L摇瓶中加入包含LB Miller培养基(DIFCO)的0.5L种子培养基来制备发酵罐种子培养物。将培养基的pH调节至6.8,并且在摇瓶中灭菌。灭菌后,加入1mL氨苄青霉素贮备液(25mg/mL)。给种子培养基接种1mL大肠杆菌UM2/pSW187在20%甘油中的培养物,并且在36℃以300rpm培养。将种子培养物以大约1-20D₅₅₀转移到35℃下的14L发酵罐(Braun)中,所述发酵罐包含8L培养基,所述培养基含有KH₂PO₄(3.50g/L)、七水FeSO₄(0.05g/L)、七水MgSO₄(2.0g/L)、二水柠檬酸钠(1.90g/L)、酵母提取物(Ambrex 695,5.0g/L)、Biospumex153K消泡剂(0.25ML/L,Cognis Corporation)、NaCl(1.0g/L)、二水CaCl₂(10g/L)和NIT痕量元素溶液(10ML/L)。所述痕量元素溶液含有一水柠檬酸(10g/L)、水合MnSO₄(2g/L)、NaCl(2g/L)、七水FeSO₄(0.5g/L)、七水ZnSO₄(0.2g/L)、五水CuSO₄(0.02g/L)和二水NaMoO₄(0.02g/L)。灭菌后的加入包括60g补料分批溶液(见下文)和16.0ML氨苄青霉素贮备液(25mg/mL)。所述补料分批溶液含有2.4kg 60%w/w葡萄糖、0.6L 25g/L酵母提取物和50g/L Bacto蛋白胨(DIFCO)。当葡萄糖浓度降至低于0.5g/L时,开始葡萄糖进料,以0.3g/分钟开始,并且每小时分别逐渐提高至0.35、0.40、0.47和0.53g/分钟;之后速度保持恒定。监测培养基中的葡萄糖浓度,并且如果浓度超过0.1g/L,则降低加入速度或者暂时停止加入。在OD₅₅₀=7时,通过加入16ML IPTG(0.5M)来开始诱导。将温度控制在36℃,并且充气固定在2slpm(每分钟标准升数),以400rpm进行搅拌。将pH控制在6.8;使用NH₄OH(29%w/w)和H₂SO₄(20%w/v)来进行pH控制。头部压力为0.5巴。在加入IPTG之后8小时,通过离心来收获细胞。

[0464] 实施例18

[0465] 表达枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW186或表达地衣芽孢杆菌ATCC 14580TM过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW191的发酵

[0466] 使用表达枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW186或表达地衣芽孢杆菌ATCC 14580TM过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW191,如实施例17所述制备种子培养物。发酵培养基是LB Miller (25g/L,DIFCO)。灭菌后的加入包括50g葡萄糖溶液(50%w/w)和16.0ML氨苄青霉素贮备液(25mg/mL)。使用葡萄糖(50%w/w)用于补料分批发酵。当葡萄糖浓度降低至0.5g/L时,以0.3g/分钟的恒定速度开始葡萄糖进料。监测培养基中的葡萄糖浓度,并且如果浓度超过0.1g/L,则降低加入速度或者暂时停止加入。在OD₅₅₀=2时,通过加入16mL IPTG (0.5M) 来开始诱导。将温度控制在36℃,并且充气固定在2slpm,以400rpm进行搅拌。将pH控制在6.8;使用NH₄OH (29%w/w) 和H₂SO₄ (20%w/v) 进行pH控制。头部压力为0.5巴。在加入IPTG之后8小时,通过离心来收获细胞。

[0467] 实施例19

[0468] 表达枯草芽孢杆菌BE1010过水解酶的大肠杆菌KLP18/PSW189或表达地衣芽孢杆菌ATCC 14580TM过水解酶的大肠杆菌KLP18/PSW191的发酵

[0469] 通过向2L摇瓶中加入0.5L种子培养基来制备发酵罐种子培养物,所述培养基含有酵母提取物(Amberx 695,5.0g/L)、K₂HPO₄ (10.0g/L)、KH₂PO₄ (7.0g/L)、二水柠檬酸钠(1.0g/L)、(NH₄)₂SO₄ (4.0g/L)、七水MgSO₄ (1.0g/L)和柠檬酸铁铵(0.10g/L)。将培养基的pH调节至6.8,并且将培养基在摇瓶中灭菌。灭菌后的加入包括葡萄糖(50wt%,10.0ML)和1ML氨苄青霉素(25mg/mL)贮备液。给种子培养基接种1mL大肠杆菌KLP18/PSW189或KLP18/PSW191在20%甘油中的培养物,并且在35℃和300rpm培养。将种子培养物以约1-20D₅₅₀转移到35℃下的14L发酵罐(Braun)中,所述发酵罐包含8L培养基,所述培养基含有KH₂PO₄ (3.50g/L)、七水FeSO₄ (0.05g/L)、七水MgSO₄ (2.0g/L)、二水柠檬酸钠(1.90g/L)、酵母提取物(Ambrex 695,5.0g/L)、Biospumex153K消泡剂(0.25ML/L,Cognis Corporation)、NaCl (1.0g/L)、二水CaCl₂ (10g/L)和NIT痕量元素溶液(10ML/L)。所述痕量元素溶液含有一水柠檬酸(10g/L)、水合MnSO₄ (2g/L)、NaCl (2g/L)、七水FeSO₄ (0.5g/L)、七水ZnSO₄ (0.2g/L)、五水CuSO₄ (0.02g/L)和二水NaMoO₄ (0.02g/L)。灭菌后的加入包括葡萄糖溶液(50%w/w,80.0g)和氨苄青霉素(25mg/mL)贮备液(16.00ML)。使用葡萄糖溶液(50%w/w)用于分批补料。当葡萄糖浓度降至0.5g/L时,开始葡萄糖进料,以0.31g进料/分钟开始,并且每小时分别逐渐提高至0.36、0.42、0.49、0.57、0.66、0.77、0.90、1.04、1.21、1.41、1.63g/分钟;之后速度保持恒定。监测培养基中的葡萄糖浓度,并且如果浓度超过0.1g/L,则降低加入速度或者暂时停止加入。对于大肠杆菌KLP18/PSW191,在OD₅₅₀=80时,通过加入16ML IPTG (0.5M) 来开始诱导,对于大肠杆菌KLP18/PSW189,生长较慢,在OD₅₅₀=56时开始诱导。将溶解氧(DO)浓度控制在25%空气饱和度。首先通过叶轮搅拌速度(400至1400rpm),然后通过充气速度(2至10slpm)来控制DO。将pH控制在6.8。使用NH₄OH (29%w/w) 和H₂SO₄ (20%w/v) 进行pH控制。头部压力为0.5巴。在加入IPTG之后16小时,通过离心来收获细胞。

[0470] 实施例20

[0471] 大肠杆菌KLP18与大肠杆菌UM2作为发酵宿主用于过水解酶生产的比较

[0472] 使用大肠杆菌KLP18(实施例15)来产生转化体(实施例5、8、9和10),按照实施例19中描述的方法让所述转化体在多个10L发酵中生长。将这些操作的最终OD与按照实施例17

和18中描述的发酵方法操作的产生表达这些相同过水解酶的大肠杆菌UM2转化体(实施例5、8、9和10)的发酵进行比较。表8总结了用UM2和KLP18作为宿主的10-L发酵操作,并且证明了与UM2相比,KLP18具有优异的性能。

[0473] 表8

	操作 ID	宿主	质粒	过水解酶	操作时间	最终的
					(h)	OD ₅₅₀
[0474]	PAA25	UM2	pSW186	SEQ ID NO:2	21.6	11.9
	PAA26	UM2	pSW186	SEQ ID NO:2	7.4	11.9
	PAA42	UM2	pSW186	SEQ ID NO:2	12.4	5.5
	PAA43	UM2	pSW186	SEQ ID NO:2	12.4	5.5
	PAA48	KLP18	pSW186	SEQ ID NO:2	33.1	181.0
	PAA30	UM2	pSW190	SEQ ID NO:32	12.1	6.2
	PAA31	UM2	pSW190	SEQ ID NO:32	12.3	8.8
	PAA40	UM2	pSW190	SEQ ID NO:32	12.7	4.6
	PAA41	UM2	pSW190	SEQ ID NO:32	12.6	5.3
	PAA49	KLP18	pSW190	SEQ ID NO:32	33.6	128.0
	PAA39	UM2	pSW191	SEQ ID NO:10	10.6	6.5
	PAA46	KLP18	pSW191	SEQ ID NO:10	33.6	140.0
	PAA50	KLP18	pSW191	SEQ ID NO:10	36.2	155.0
	PAA45	UM2	pSW193	SEQ ID NO:14	12.4	5.7
	PAA51	KLP18	pSW193	SEQ ID NO:14	35.7	147.0

[0475] 实施例21

[0476] 在大肠杆菌转化体中表达的枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM过水解酶的评估

[0477] 将在实施例5中描述的3种转化体大肠杆菌TOP10/pSW186、大肠杆菌MG1655/pSW186和大肠杆菌UM2/pSW186在包含具有氨苄青霉素(100μg/mL)的Miller's LB培养液(50mL;Mediatech,Inc,Herndon,VA)的无挡板的摇瓶中,于35-37℃在200rpm搅拌下生长14-16小时。这3种转化体过夜生长后,通过在含有氨苄青霉素(100μg/mL)的新鲜Miller's LB培养液内制备每种培养物的1:100稀释液,将每种培养物进行传代培养。于35-37℃在200rpm搅拌下生长3小时后,通过添加IPTG至1mM的终浓度来诱导每种培养物。在相同条件下另外生长3小时后,通过以26,000×g下于5℃离心20分钟收获来自每种培养物的细胞糊。将每种转化体的细胞提取物根据实施例1中描述的操作进行制备,不同之处是用于制备25wt%湿细胞悬浮液的提取缓冲液包含0.05M磷酸钾(pH 7.0)和1mM二硫苏糖醇。

[0478] 包含在50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中的甘油三乙酸酯(250mM)、过氧化氢(1.0M)和来自3种细胞提取物(如上所述制备)之一的50μg提取物总蛋白的单独1mL反应于25℃进行。通过用50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)替换提取物总蛋白溶液来进行对照反应,以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下,通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过

乙酸浓度。第二组对照反应使用由未转化的大肠杆菌TOP10、大肠杆菌MG1655和大肠杆菌UM2的提取物制备的50μg提取物总蛋白来进行,以测定在不存在表达的过水解酶的情况下由每种菌株产生的过酸的本底水平。反应混合物中的过乙酸浓度(表9)是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。

[0479] 表9:在大肠杆菌TOP10/pSW186、大肠杆菌MG1655/pSW186和大肠杆菌UM2/pSW186的细胞提取物存在下,通过甘油三乙酸酯(250mM)和过氧化氢(1.0M)于pH 6.5的反应产生的过乙酸(PAA)。

	总蛋白提取物来源	总蛋白 (μg/mL 反应)	5 分钟内的 过乙酸(ppm)	30 分钟内的 过乙酸(ppm)
[0480]	无提取物	0	188	598
	TOP10	50	181	654
	TOP10/pSW186	50	2684	5363
	MG1655	50	173	638
	MG1655/pSW186	50	1354	4333
	UM2	50	175	655
	UM2/pSW186	50	3002	6529

[0481] 实施例22

[0482] 表达枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM过水解酶的大肠杆菌TOP10/pSW186提取物的过水解活性

[0483] 按照实施例21中描述的方法,使用大肠杆菌TOP10/pSW186转化体提取物来进行单独的1.0ML甘油三乙酸酯过水解反应,以在反应中提供下列总蛋白浓度之一:每一反应中196μg/mL、98μg/mL、49μg/mL、25μg/mL、12.5μg/mL、6.25μg/mL、3.0μg/mL或1.5μg/mL总蛋白浓度(表10)。

[0484] 表10:在包含甘油三乙酸酯(250mM)和过氧化氢(1.0M)于pH6.5的反应中,过乙酸(PAA)浓度对于来源于大肠杆菌TOP10/pSW186转化体提取物的总蛋白浓度的依赖性。

	总蛋白 提取物来源	总蛋白 ($\mu\text{g/mL}$ 反应)	5 分钟内的 过乙酸(ppm)	30 分钟内的 过乙酸(ppm)
	无提取物	0	193	854
	TOP10	50	181	654
	TOP10/pSW186	1.5	580	1710
[0485]	TOP10/pSW186	3.0	824	2233
	TOP10/pSW186	6.3	1371	3029
	TOP10/pSW186	12.5	2052	4587
	TOP10/pSW186	25	2849	4957
	TOP10/pSW186	49	4294	
	TOP10/pSW186	98	4244	
	TOP10/pSW186	196	4294	

[0486] 实施例23

[0487] 表达枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW186提取物的过水解活性

[0488] 在包含在磷酸盐缓冲液 (Pi, 100mM、200mM或300mM) 中的甘油三乙酸酯 (40mM或100mM)、过氧化氢 (40mM或100mM) 和提取物总蛋白 (0.1mg/mL或1.0mg/mL) 的1.0ML过水解反应 (如实施例21中所述进行) 中, 使用大肠杆菌UM2/pSW186转化体提取物 (20mg总蛋白/mL提取物, 如实施例21中所述制备), 每一反应于pH 6.5或7.5在25℃进行 (表11)。

[0489] 表11: 使用来源于大肠杆菌UM2/pSW186转化体提取物的过水解酶, 在pH 6.5或7.5下过乙酸 (PAA) 浓度对甘油三乙酸酯和过氧化氢浓度的依赖性。

	甘油三乙						
	总蛋白	H ₂ O ₂	酸酯	Pi		5 分钟内的	30 分钟内的
	(mg/mL)	(mM)	(mM)	(mM)	PH 值	PAA(ppm)	PAA(ppm)
[0490]	0	40	40	100	6.5	0	0
	0	40	100	100	6.5	0	0
	0.1	40	40	100	6.5	49	0
	1	40	40	100	6.5	239	160
	1	40	100	100	6.5	439	560
	0	40	100	200	6.5	0	0
	0	100	100	200	6.5	1	30
	0	100	100	200	7.5	14	1
	0	100	100	300	7.5	5	4
	1	100	40	200	6.5	75	9
	1	100	100	200	6.5	1150	925
	1	40	100	200	7.5	290	80
	1	100	100	300	7.5	332	58

[0491] 实施例24

[0492] 在来源于枯草芽孢杆菌BE1010的大肠杆菌转化体中表达的过水解酶的评估

[0493] 将在实施例6中描述的大肠杆菌TOP10/pSW187、大肠杆菌MG1655/pSW187和大肠杆菌UM2/pSW187转化体在包含具有氨苄青霉素(100μg/mL)的Miller's LB培养液(50mL; Mediatech, Inc., Herndon, VA)的无挡板的摇瓶中,于35-37℃在200rpm搅拌下生长14-16小时。这3种转化体过夜生长后,通过在包含氨苄青霉素(100μg/mL)的新鲜Miller's LB培养液内制备每种培养物的1:100稀释,将每种培养物进行传代培养。于35-37℃在200rpm搅拌下生长3小时后,通过添加IPTG至1mM的终浓度来诱导每种培养物。在相同条件下另外生长3小时后,通过以26,000×g下于5℃离心20分钟收获来自每种培养物的细胞糊。对于细胞提取物制备,重复实施例1中描述的操作,不同之处是用于制备25wt%湿细胞悬浮液的提取缓冲液包含0.05M磷酸钾(pH 7.0)和1mM二硫苏糖醇。

[0494] 将在50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中包含甘油三乙酸酯(250mM)、过氧化氢(1.0M)和50μg提取物总蛋白的单独1.0mL反应于25℃使用每种转化体提取物来进行。通过用50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)替换提取物总蛋白溶液来进行对照反应,以测定通过甘油三乙酸酯由过氧化氢的化学过水解产生的过乙酸浓度。第二组对照反应使用由未转化的大肠杆菌TOP10、大肠杆菌MG1655和大肠杆菌UM2的提取物制备的50μg提取物总蛋白来进行,以测定在不存在表达的过水解酶的情况下由每种菌株生产的过酸的本底水平。反应混合物中的过乙酸浓度(表12)是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。

[0495] 表12:在大肠杆菌TOP10/pSW187、大肠杆菌MG1655/pSW187和大肠杆菌UM2/pSW187的细胞提取物的存在下,通过甘油三乙酸酯(250mM)与过氧化氢(1.0M)于pH 6.5的反应产

生的过乙酸(PAA)。

	总蛋白 提取物来源	总蛋白 ($\mu\text{g/mL}$ 反应)	5 分钟内的 过乙酸(ppm)	30 分钟内的 过乙酸(ppm)
	无提取物	0	159	626
	TOP10	50	181	654
[0496]	TOP10/pSW187	50	3192	6663
	MG1655	50	173	638
	MG1655/pSW187	50	3472	7349
	UM2	50	175	655
	UM2/pSW187	50	3741	7626

[0497] 实施例25

[0498] 评估在大肠杆菌转化体中表达的过水解酶

[0499] 如实施例5、6、7、8、9、10、18和19中所述制备转化体。将每种转化体的细胞提取物根据实施例1中描述的操作进行制备,不同之处是用于制备25wt%湿细胞悬浮液的提取缓冲液包含0.05M磷酸钾(pH7.0)和1mM二硫苏糖醇。

[0500] 将在50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中包含甘油三乙酸酯(250mM)、过氧化氢(1.0M)和50 μg 提取物总蛋白的单独1mL反应于25 $^{\circ}\text{C}$ 进行。通过用50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)替换提取物总蛋白溶液来进行对照反应,以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下,通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。第二组对照反应使用由未转化的大肠杆菌TOP10、大肠杆菌MG1655、大肠杆菌UM2和大肠杆菌KLP18的提取物制备的50 μg 提取物总蛋白来进行,以测定在不存在表达的过水解酶的情况下由每种菌株产生的过酸的本底水平。反应混合物中的过乙酸浓度(表13)是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。

[0501] 表13:在得自大肠杆菌TOP10、大肠杆菌MG1655、大肠杆菌UM2、大肠杆菌PIR2和大肠杆菌KLP18的转化体细胞提取物的50 μg 总提取物蛋白/mL存在下,通过甘油三乙酸酯(250mM)和过氧化氢(1.0M)于pH 6.5的反应产生的过乙酸(PAA)。

	转化体细胞 提取物	过水解酶 来源	5 分钟内 的 PAA (ppm)	5 分钟内 PAA (ppm) 没有提取物	30 分钟 内的 PAA (ppm)	30 分钟内的 PAA(ppm) 没有提取物
[0502]	TOP10	无(对照)	181	188	654	598
	MG1655	无(对照)	173	188	638	598
	UM2	无(对照)	175	188	655	598
	PIR2	无(对照)	144	276	515	677
	KLP18	无(对照)	200	100	555	330
	TOP10/pSW186	枯草芽孢杆菌 ATCC 31954™	2684	188	5363	598
	MG1655/pSW186	枯草芽孢杆菌 ATCC 31954™	1354	188	4333	598

	UM2/pSW186	枯草芽孢杆菌 ATCC 31954 TM	3002	188	6529	598
	KLP18/pSW186	枯草芽孢杆菌 ATCC 31954 TM	1033	268	2641	792
	TOP10/pSW187	枯草芽孢杆菌 BE1010	3192	159	6663	626
	MG1655/pSW187	枯草芽孢杆菌 BE1010	3472	159	7349	626
	UM2/pSW187	枯草芽孢杆菌 BE1010	3741	159	7626	626
	KLP18/pSW189	枯草芽孢杆菌 BE1010	2631	146	6579	625
[0503]	UM2/pSW188	枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 TM	4617	289	8742	306
	UM2/pSW190	枯草芽孢杆菌 ATCC 29233 TM	5314	320	8845	738
	UM2/pSW190a	枯草芽孢杆菌 ATCC 29233 TM	2622	234	3553	642
	KLP18/pSW190	枯草芽孢杆菌 ATCC 29233 TM	1006	146	3285	625
	PIR2/pSW191	地衣芽胞杆菌 ATCC 14580 TM	3125	276	6338	677
	UM2/pSW191	地衣芽胞杆菌 ATCC 14580 TM	1632	276	4640	677
	KLP18/pSW191	地衣芽胞杆菌 ATCC 14580 TM	3936	146	8016	625

[0504]	MG1655/pSW193	热纤维梭菌	2279	349	3178	645
		ATCC 27405™				
	UM2/pSW193	热纤维梭菌	2738	349	3597	645
		ATCC 27405™				
	KLP18/pSW193	热纤维梭菌	1687	146	2407	625
		ATCC 27405™				
	UM2/pSW195	短小芽孢杆菌	2226	360	6354	776
		PS213				
	KLP18/pSW195	短小芽孢杆菌	5023	100	9642	394
		PS213				
	UM2/pSW196	那不勒斯栖	1347	360	2553	776
		热袍菌				
	KLP18/pSW196	那不勒斯栖	878	100	2023	394
		热袍菌				

[0505] 实施例26 (比较实施例)

[0506] 评估市售脂肪酶的过水解

[0507] 在50mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中包含甘油三乙酸酯 (250mM)、过氧化氢 (1.0M) 和 50μg 市售脂肪酶的单独1mL反应于25℃进行。不采用市售脂肪酶来进行对照反应,以测定在不存在添加的脂肪酶下,通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度 (表14) 是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。市售脂肪酶得自Sigma/Aldrich Chemical Company (St.Louis,MO), BioCatalytics (Pasadena, CA), Meito Sangyo Co. (Nagoya, Japan), Amano Enzymes (Lombard, IL), Novozymes (Franklinton, NC), Valley Research (South Bend, IN) 和 Enzyme Development Corporation (ENZECO®; New York, NY)。

[0508] 表14: 在50μg/mL市售脂肪酶存在下通过甘油三乙酸酯 (250mM) 与过氧化氢 (1.0M) 于pH 6.5的反应产生的过乙酸 (PAA)。

	市售脂肪酶	脂肪酶来源	5 分钟内	30 分钟内的
			PAA(ppm)	PAA(ppm)
[0509]	没有酶	对照	105	105
	MeitoMY	皱褶假丝酵母 (<i>Candida rugosa</i>)	155	280
	Meito OF	皱褶假丝酵母	120	340
	Meito AL	无色杆菌属物种 (<i>Achromobacter</i> sp.)	165	315
	Meito PL	产碱杆菌属物种 (<i>Alcaligines</i> sp.)	165	430
	Meito SL	洋葱假单胞菌 (<i>Pseudomonas cepacia</i>)	210	440
	Meito TL	斯氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas stutzeri</i>)	225	500
	Meito QLC	产碱杆菌属物种	195	240
	Meito QLM	产碱杆菌属物种	225	555
	没有酶	对照	150	205
	Amano F-DS	米根霉 (<i>Rhizopus oryzae</i>)	180	265
	Amano R	娄地青霉 (<i>Penicillium roqueforti</i>)	170	160
	AmanoM 10	爪哇毛霉 (<i>Mucor javanicus</i>)	255	425
	Amanog 50	卡门柏青霉 (<i>Penicillium cambertii</i>)	40	40
	Amano F-AP15	米根霉	120	50
	Amano AY 30	皱褶假丝酵母	140	300
	Amano PS	洋葱伯克霍尔德菌 (<i>Burkholder cepacia</i>)	150	150

	Amano DS	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)	140	125
	Amano AY	皱褶假丝酵母	180	390
	Amano AK-20	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)	215	500
	Amano LPS	洋葱伯克霍尔德菌	315	350
	Amano A 12	黑曲霉	245	490
	没有酶	对照	30	55
	BioCatalytics ICR 110	南极洲假丝酵母 B (<i>Candida antarctica</i> B)	145	245
[0510]	Novozymes Lipolase	嗜热真菌	10	0
	100 L 型 EX	(<i>Thermomyces lanuginosus</i>)		
	Novozymes Lipozyme	嗜热真菌	125	370
	TL 100 L			
	Novozymes Lipozyme	南极洲假丝酵母	0	180
	CALB L	(<i>Candida antarctica</i>)		
	Novozymes Palatase	米曲霉	95	220
	20000L	(<i>Aspergillus oryzae</i>)		
	Valley Research CR	皱褶假丝酵母	70	320
	Valley Research MJ	爪哇毛霉	140	440
	Valley Research AN	黑曲霉	165	240
	Enzeco LC	皱褶假丝酵母	105	120
	Enzeco MLC	黑曲霉	140	370
	Enzeco R0 20	米根霉	55	100

[0511] 实施例27

[0512] 评估在大肠杆菌转化体中表达的过水解酶

[0513] 按照实施例21中描述的方法制备表达过水解酶的转化体的细胞提取物。将在50mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中包含甘油三乙酸酯 (105mM)、过氧化氢 (78mM) 和1mg或2mg来自细胞提取物 (如上所述制备的) 的提取物总蛋白的单独1mL反应在25℃进行。通过用50mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 替换提取物总蛋白溶液来进行对照反应,以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下,通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度 (表15) 是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。

[0514] 表15:在得自大肠杆菌MG1655、大肠杆菌UM2、大肠杆菌PIR2和大肠杆菌KLP18的转化体细胞提取物的1mg或2mg总提取物蛋白/mL存在下,通过甘油三乙酸酯 (105mM) 和过氧化氢 (78mM) 于pH6.5或7.5的反应产生的过乙酸 (PAA) 。

[0515]

转化体细胞 提取物	过水解酶 来源	总蛋白 (mg/mL)	PH 值	5 分钟内 的 PAA (ppm)	30 分钟内 的 PAA (ppm)
没有提取物	对照	0	6.5	0	0
没有提取物	对照	0	7.5	8	12
UM2/pSW186	枯草芽孢杆菌 ATCC 31954™	1.0	6.5	945	1420
UM2/pSW186	枯草芽孢杆菌 ATCC 31954™	2.0	6.5	1000	1250
UM2/pSW186	枯草芽孢杆菌 ATCC 31954™	1.0	7.5	1001	1215
UM2/pSW186	枯草芽孢杆菌 ATCC 31954™	2.0	7.5	1036	1050
没有提取物	对照	0	6.5	0	0
没有提取物	对照	0	7.5	45	0
MG1655/pSW187	枯草芽孢杆菌 BE1010	1.0	6.5	690	265
UM2/pSW187	枯草芽孢杆菌 BE1010	1.0	6.5	730	755
UM2/pSW187	枯草芽孢杆菌 BE1010	2.0	6.5	1400	1990

[0516]	UM2/pSW187	枯草芽孢杆菌 BE1010	2.0	7.5	1710	2105
	KLP18/pSW189	枯草芽孢杆菌 BE1010	1.0	6.5	885	1288
	KLP18/pSW189	枯草芽孢杆菌 BE1010	2.0	6.5	950	1263
	没有提取物	对照	0	6.5	0	0
	UM2/pSW190	枯草芽孢杆菌 ATCC 29233™	1.0	6.5	940	685
	没有提取物	对照	0	6.5	0	0
	PIR2/pSW191	地衣芽孢杆菌 ATCC 14580™	1.0	6.5	860	1305
	UM2/pSW191	地衣芽孢杆菌 ATCC 14580™	1.0	6.5	675	1530
	没有提取物	对照	0	6.5	0	0
	UM2/pSW195	短小芽孢杆菌 PS213	1.0	6.5	400	850
	UM2/pSW195	短小芽孢杆菌 PS213	2.0	6.5	460	790
	没有提取物	对照	0	6.5	0	0
	UM2/pSW196	那不勒斯栖热袍菌	1.0	6.5	1100	1685
	UM2/pSW196	那不勒斯栖热袍菌	2.0	6.5	1190	1900

[0517] 实施例28 (比较实施例)

[0518] 评估市售脂肪酶的过水解

[0519] 将在50mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中包含甘油三乙酸酯 (105mM)、过氧化氢 (78mM) 和1mg市售脂肪酶的单独1mL反应于25℃进行。不采用市售脂肪酶来进行对照反应,以测定在不存在添加的脂肪酶下,通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度 (表16) 是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。

[0520] 表16:在1mg/mL市售脂肪酶存在下通过甘油三乙酸酯 (105mM) 与过氧化氢 (78mM) 于pH 6.5的反应产生的过乙酸 (PAA)。

	市售脂肪酶	脂肪酶来源	5 分钟内的	30 分钟内的
			PAA(ppm)	PAA(ppm)
[0521]	没有酶	对照	15	20
	MeitoMY	皱褶假丝酵母	25	45
	Meito SL	洋葱假单胞菌	0	0
	Meito QLM	产碱杆菌属物种	35	85
	Amano F-DS	米根霉	20	50
	AmanoM 10	爪哇毛霉	20	40
	Amano A 12	黑曲霉	70	140
	BioCatalytics ICR 110	南极洲假丝酵母 B	55	110

[0522] 实施例29

[0523] 具有润湿剂的芽孢杆菌ATCC31954TM过水解酶活性

[0524] 按照实施例21中描述的方法制备表达枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW186转化体的细胞提取物。将在50mM磷酸盐缓冲液 (pH 7.5) 中包含甘油三乙酸酯 (105mM)、过氧化氢 (78mM)、润湿剂 COLATERIC[®] MSC-NA (混合的短链二丙酸钠; Colonial Chemical Co.), SURFYNOL[®] 2502 (一种乙氧基化/丙氧基化基于炔的表面活性剂; Air Products and Chemicals; Utrecht, NL), SURFYNOL[®] MD-20, SILWET[®] L7650 (一种聚环氧烷改性的聚二甲基硅氧烷; Chemtura Corp, Middlebury, CT) 或 SILWET[®] L8620; 一种基于硅氧烷的表面活性剂) 和1mg提取物总蛋白的单独1mL反应在25℃进行。通过用50mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 替换提取物总蛋白溶液来进行对照反应, 以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下, 通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度 (表17) 是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。

[0525] 表17: 在得自表达枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW186的转化体细胞提取物的1mg总提取物蛋白/mL存在下, 通过甘油三乙酸酯 (105mM) 和过氧化氢 (78mM) 于pH 7.5的反应产生的过乙酸 (PAA)。

	润湿剂	润湿剂浓度 (ppm)	总蛋白 (mg/mL)	5 分钟内的 PAA(ppm)	30 分钟内的 PAA(ppm)
[0526]	无	0	0	130	170
	COLATERICMSC-NA	1000	0	80	70
	COLATERICMSC-NA	1000	1.0	745	1520
	SURFYNOL [®] 2502	1000	0	35	10
	SURFYNOL [®] 2502	1000	1.0%	650	1210
	SURFYNOL [®] MD-20	1000	0	110	150
	SURFYNOL [®] MD-20	1000	1.0	555	1110
	SILWET [®] L7650	1000	0	50	0
	SILWET [®] L7650	1000	1.0	830	1360
	SILWET [®] L8620	1000	0	60	135
	SILWET [®] L8620	1000	1.0	735	1145

[0527] 实施例30

[0528] 具有润湿剂的枯草芽孢杆菌BE1010过水解酶活性

[0529] 按照实施例21中描述的方法制备表达枯草芽孢杆菌BE1010过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW187转化体的细胞提取物。将在50mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中包含甘油三乙酸酯 (105mM)、过氧化氢 (78mM)、润湿剂 (PLURONIC[®] 17R4 (一种聚氧化烯醚表面活性剂; BASF, Mount Olive, NJ), PLURONIC[®] L43 (一种双官能嵌段共聚物表面活性剂) 或 SILWET[®] L7650) 和1mg提取物总蛋白的单独1mL反应在25℃进行。通过用50mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 替换提取物总蛋白溶液来进行对照反应,以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下,通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度 (表18) 是根据实施例2中描述的KarstKarst等人的方法测定的。

[0530] 表18:在得自表达枯草芽孢杆菌BE1010过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW187的转化体细胞提取物的1mg总提取物蛋白/mL存在下,通过甘油三乙酸酯 (105mM) 和过氧化氢 (78mM) 于pH 6.5的反应产生的过乙酸 (PAA)。

	润湿剂	润湿剂浓度 (ppm)	总蛋白 (mg/mL)	5 分钟内的 PAA(ppm)	30 分钟内的 PAA(ppm)
[0531]	无	0	0	0	0
	无	0	1.0	975	1345
	PLURONIC® 17R4	2500	0	0	0
	PLURONIC® 17R4	2500	1.0	860	1360
	PLURONIC® L43	2500	0	0	0
	PLURONIC® L43	2500	1.0	855	1360
	SILWET® L7650	2500	0	0	0
	SILWET® L7650	2500	1.0	975	1205

[0532] 实施例31

[0533] 具有润湿剂和螯合剂的过水解酶活性

[0534] 按照实施例21中描述的方法制备表达枯草芽孢杆菌BE1010过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW187转化体的细胞提取物。将在50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中包含甘油三乙酸酯(105mM)、过氧化氢(78mM)、润湿剂(SILWET® L7650)、螯合剂(TURPINAL® SL; 羟乙磷酸; Solutia Inc., St. Louis, MO)和1mg提取物总蛋白的单独1mL反应在25℃进行。通过用50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)替换提取物总蛋白溶液来进行对照反应,以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下,通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度(表19)是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。

[0535] 表19:在得自表达枯草芽孢杆菌BE1010过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW187的转化体细胞提取物的1mg总提取物蛋白/mL存在下,通过甘油三乙酸酯(105mM)和过氧化氢(78mM)于pH 6.5的反应产生的过乙酸(PAA)。

	SILWET® L7650 (ppm)	Turpinal® SL(ppm)	总蛋白 (mg/mL)	5 分钟内的 PAA(ppm)	30 分钟内的 PAA(ppm)
[0536]	0	0	0	21	50
	1000	0	0	20	26
	0	500	0	10	45
	1000	500	0	0	100
	0	0	1.0	1600	2245
	1000	0	1.0	1550	2136
	0	500	1.0	1520	2130
	1000	500	1.0	1505	2080

[0537] 实施例32

[0538] 具有润湿剂、螯合剂和腐蚀抑制剂的过水解酶活性

[0539] 按照实施例21中描述的方法制备表达枯草芽孢杆菌BE1010过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW187转化体的细胞提取物。将在50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中包含甘油三乙酸酯(105mM)、过氧化氢(78mM)、润湿剂(SILWET® L7650)、螯合剂(TURPINAL® SL)、腐蚀抑制剂(苯并三唑)和1mg提取物总蛋白的单独1mL反应在25℃进行。通过用50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)替换提取物总蛋白溶液来进行对照反应,以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下,通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度(表20)是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。

[0540] 表20:在得自表达枯草芽孢杆菌BE1010过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW187的转化体细胞提取物的1mg总提取物蛋白/mL存在下,通过甘油三乙酸酯(105mM)和过氧化氢(78mM)于pH 6.5的反应产生的过乙酸(PAA)。

	SILWET® L7650 (ppm)	Turpinal® SL (ppm)	苯并三唑 (ppm)	总蛋白 (mg/mL)	5 分钟内的 PAA(ppm)	30 分钟内的 PAA(ppm)
	0	0	0	0	0	0
	0	0	0	1.0	795	1205
[0541]	1000	500	1000	0	0	20
	1000	500	1000	1.0	825	960
	1000	500	2500	0	0	24
	1000	500	2500	1.0	795	960
	1000	2000	2500	0	0	0
	1000	2000	2500	1.0	270	450

[0542] 实施例33

[0543] 使用固定化枯草芽孢杆菌ATCC 31954™或BE1010过水解酶的过乙酸生成

[0544] 将0.50g AMBERZYME® Oxirane酶固定聚合载体(Rohm and Haas, Philadelphia,PA)在5.0mL 0.225M磷酸钠缓冲液(pH 8.0)中的悬浮液于室温在旋转平台上混合24小时,所述缓冲液含有得自大肠杆菌KLP/pSW189(表达枯草芽孢杆菌BE1010过水解酶)或大肠杆菌UM2/pSW186(表达枯草芽孢杆菌ATCC 31954™过水解酶)的提取物(如实施例21中所述制备的)的10mg/mL总可溶性蛋白,然后将悬浮液从固定化的酶中倾析出,用4份40mL体积的磷酸盐缓冲液(50mM, pH 6.5)洗涤,并且在该相同缓冲液中于5℃保存。在使用之前,将固定化酶通过真空过滤来干燥。

[0545] 将在50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中包含甘油三乙酸酯(250mM)、过氧化氢(1.0M)和1.5mg/mL或5.0mg/mL固定化过水解酶(如上所述制备的)的单独1mL反应于25℃进行。进行对照反应以确定在没有添加的固定化酶存在的情况下,通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度(表21)是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。

[0546] 表21:在固定化枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM或BE1010过水解酶存在下通过甘油三乙酸酯(250mM)和过氧化氢(1.0M)于pH 6.5的反应产生的过乙酸(PAA)。

	固定化的过水解酶	催化剂载量	5 分钟内的	30 分钟内的
		(mg 固定化酶/mL)	PAA(ppm)	PAA(ppm)
[0547]	没有酶	0	83	240
	枯草芽孢杆菌 ATCC 31954 TM	1.5	185	700
	枯草芽孢杆菌 BE1010	1.5	502	1715
	没有酶	0	99	319
	枯草芽孢杆菌 ATCC 31954 TM	5.0	596	972
	枯草芽孢杆菌 BE1010	5.0	1669	2610

[0548] 实施例34

[0549] 使用得自枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌和热纤维梭菌的过水解酶的甘油二乙酸酯、甘油三乙酸酯和甘油一乙酸酯的混合物的过水解

[0550] 将在50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中包含甘油二乙酸酯(118mM)、甘油三乙酸酯(42mM)和甘油一乙酸酯(90mM)的混合物、过氧化氢(1.0M)和得自大肠杆菌UM2细胞提取物(如实施例21所述制备的)的含有枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌或热纤维梭菌过水解酶的50μg提取物总蛋白的单独1mL反应于25℃进行。通过用50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)替换提取物总蛋白溶液来进行对照反应,以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下,通过甘油二乙酸酯(118mM)、甘油三乙酸酯(42mM)和甘油一乙酸酯(90mM)的混合物被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。使用由未转化的大肠杆菌UM2的提取物制备的50μg提取物总蛋白来运行第二个对照反应,以确定在没有表达的过水解酶存在的情况下由大肠杆菌菌株产生的过酸本底水平。反应混合物中的过乙酸浓度(表22)是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。

[0551] 表22:在得自表达过水解酶的大肠杆菌UM2的转化体细胞提取物的50μ总提取物蛋白/mL存在下,通过甘油二乙酸酯(118mM)、甘油三乙酸酯(42mM)和甘油一乙酸酯(90mM)的混合物与过氧化氢(1.0M)于pH6.5的反应而产生的过乙酸(PAA)。

	转化体细胞提取物	过水解酶来源	5 分钟内的	30 分钟内的
			PAA(ppm)	PAA(ppm)
[0552]	没有提取物	对照	76	270
	UM2	无(对照)	110	276
	UM2/pSW186	枯草芽孢杆菌 ATCC 31954 TM	2352	4341
	UM2/pSW187	枯草芽孢杆菌 BE1010	2710	4713
	UM2/pSW188	枯草芽孢杆菌 ATCC 6633 TM	2685	4234
	UM2/pSW190	枯草芽孢杆菌 ATCC 29233 TM	641	1889
	UM2/pSW191	地衣芽孢杆菌 ATCC 14580 TM	1183	2608
	UM2/pSW193	热纤维梭菌 ATCC 27405 TM	1498	1708

[0553] 实施例35

[0554] 使用得自枯草芽孢杆菌BE1010的过水解酶的甘油二乙酸酯、甘油三乙酸酯和甘油一乙酸酯的混合物的过水解

[0555] 将在50mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中包含甘油二乙酸酯 (49.6mM)、甘油三乙酸酯 (17.6mM) 和甘油一乙酸酯 (37.8mM) 的混合物、过氧化氢 (78mM) 和得自大肠杆菌KLP18/pSW189细胞提取物 (如实施例21所述制备的) 的1mg或2mg提取物总蛋白的单独1mL反应在25℃进行。通过用50mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 替换提取物总蛋白溶液来进行对照反应,以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下,通过甘油二乙酸酯 (49.6mM)、甘油三乙酸酯 (17.6mM) 和甘油一乙酸酯 (37.8mM) 被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度 (表23) 是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。

[0556] 表23:在得自表达枯草芽孢杆菌BE1010过水解酶的大肠杆菌KLP18/pSW189的转化体细胞提取物的1mg或2mg总提取物蛋白/mL存在下,通过甘油二乙酸酯 (49.6mM)、甘油三乙酸酯 (17.6mM) 和甘油一乙酸酯 (37.8mM) 的混合物与过氧化氢 (78mM) 于pH 6.5的反应而产生的过乙酸 (PAA)。

	转化体细胞 提取物	过水解酶来源	总蛋白 (mg/mL)	PH 值	5 分钟内的	30 分钟内的
					PAA(ppm)	PAA(ppm)
[0557]	没有提取物	对照	0	6.5	0	0
	KLP18/pSW189	枯草芽孢杆菌	1.0	6.5	475	423
		BE1010				
	KLP18/pSW189	枯草芽孢杆菌	2.0	6.5	505	463
		BE1010				

[0558] 实施例36

[0559] 通过枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM过水解酶的乙酰化糖的过水解

[0560] 按照实施例21中描述的方法制备表达枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW186转化体的细胞提取物。将在50mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中包含0.1M乙酰化糖 (β-D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯、三-O-乙酰基-D-半乳糖或三-O-乙酰基-己烯糖

(Aldrich))、过氧化氢(100或500mM)、2mg提取物总蛋白的单独1mL反应于25℃进行。通过用50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)替换提取物总蛋白溶液来进行对照反应,以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下,通过0.1M乙酰化糖(β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯、三-O-乙酰基-D-半乳糖或三-O-乙酰基-己烯糖)被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度(表24)是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。

[0561] 表24:在得自表达枯草芽孢杆菌ATCC 31954TM过水解酶的大肠杆菌UM2/pSW186的转化体细胞提取物的2mg总提取物蛋白/mL存在下,通过乙酰化糖(100mM)和过氧化氢(100或500mM)于pH 6.5的反应而产生的过乙酸(PAA)。

	乙酰化糖	过氧化氢 (mM)	蛋白 (mg/mL)	5 分钟内的 PAA(ppm)	30 分钟内的 PAA(ppm)
[0562]	β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯	500	0	550	705
	β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯	500	2.0	1115	1540
	三-O-乙酰基-D-半乳糖	500	0	220	225
	三-O-乙酰基-D-半乳糖	500	2.0	885	815
	三-O-乙酰基-己烯糖	500	0	20	25
	三-O-乙酰基-己烯糖	500	2.0	420	275
	β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯	100	0	52	37
	β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯	100	2.0	289	354
	三-O-乙酰基-D-半乳糖	100	0	5	95
	三-O-乙酰基-D-半乳糖	100	2.0	185	175
	三-O-乙酰基-己烯糖	100	0	65	0
	三-O-乙酰基-己烯糖	100	2.0	102	60

[0563] 实施例37

[0564] 通过枯草芽孢杆菌BE1010过水解酶的乙酰化糖的过水解

[0565] 按照实施例21中描述的方法制备表达枯草芽孢杆菌BE1010过水解酶的大肠杆菌KLP18/pSW189转化体的细胞提取物。将在50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)中包含0.1M乙酰化糖(β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯,三-O-乙酰基-D-半乳糖或三-O-乙酰基-己烯糖(Aldrich))、过氧化氢(100或500mM)、2mg提取物总蛋白的单独1mL反应于25℃运行。通过用50mM磷酸盐缓冲液(pH 6.5)替换提取物总蛋白溶液来进行对照反应,以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下,通过0.1M乙酰化糖(β -D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯、三-O-乙酰基-D-半乳糖或三-O-乙酰基-己烯糖)被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度(表25)是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。

[0566] 表25:在得自表达枯草芽孢杆菌BE1010过水解酶的大肠杆菌KLP18/pSW189转化体的转化体细胞提取物的2mg总提取物蛋白/mL存在下,通过乙酰化糖(100mM)和过氧化氢(100或500mM)于pH 6.5的反应而产生的过乙酸(PAA)。

	乙酰化糖	过氧化氢 (mM)	总蛋白 (mg/mL)	5 分钟内的 PAA(ppm)	30 分钟内的 PAA(ppm)
[0567]	β-D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯	500	0	550	705
	β-D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯	500	2.0	1465	1950
	三-O-乙酰基-D-半乳糖	500	0	185	375
	三-O-乙酰基-D-半乳糖	500	2.0	880	985
	三-O-乙酰基-己烯糖	500	0	10	40
	三-O-乙酰基-己烯糖	500	2.0	770	405
	β-D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯	100	0	52	37
	β-D-呋喃核糖-1,2,3,5-四乙酸酯	100	2.0	360	437
	三-O-乙酰基-D-半乳糖	100	0	102	112
	三-O-乙酰基-D-半乳糖	100	2.0	305	262
	三-O-乙酰基-己烯糖	100	0	12	17
	三-O-乙酰基-己烯糖	100	2.0	240	137

[0568] 实施例38

[0569] 来自克劳氏芽孢杆菌 (*Bacillus clausii*) KSM-K16的过水解酶的克隆和表达

[0570] 使用对于在大肠杆菌中表达最优化的密码子 (DNA 2.0, Menlo Park CA) 来合成如在 **GENBANK**[®] (登录号P_175265; SEQ ID NO:26) 中报道的来自克劳氏芽孢杆菌KSM-K16的编码头孢菌素-C水解酶的基因。然后通过PCR (94°C 0.5分钟, 55°C 0.5分钟, 70°C 1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:66和SEQ ID NO:67的引物来扩增该基因 (SEQ ID NO:65)。将所得核酸产物 (SEQ ID NO:64) 用限制酶PstI和XbaI切割, 亚克隆到pUC19中的PstI和XbaI位点之间, 产生鉴定为pSW200的质粒。使用pSW200质粒来转化大肠杆菌UM2 (大肠杆菌 Genetic Stock Center#7156, Yale University, New Haven CT) 以产生鉴定为UM2/pSW200的菌株。将UM2/pSW200在LB培养基中于37°C在摇动下生长直至OD_{600nm}=0.4-0.5, 这时加入IPTG至最终浓度为1mM, 并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞, 并且进行SDS-PAGE以证实20-40%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。冷冻细胞糊, 在-80°C下保存。

[0571] 实施例39

[0572] 来自解糖热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacterium saccharolyticum*) 的过水解酶的克隆和表达

[0573] 使用对于在大肠杆菌中表达最优化的密码子 (DNA 2.0, Menlo Park CA) 来合成如在 **GENBANK**[®] 登录号S41858 (SEQ ID NO:70) 中报道的来自解糖热厌氧杆菌的编码乙酰木聚糖酯酶的基因。然后通过PCR (94°C 0.5分钟, 55°C 0.5分钟, 70°C 1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的引物来扩增该基因 (SEQ ID NO:69)。将所得核酸产物 (SEQ ID NO:68) 用限制酶PstI和XbaI切割, 亚克隆到pUC19中的PstI和XbaI位点之间, 产生鉴定为pSW201的质粒。使用pSW201质粒来转化大肠杆菌UM2 (大肠杆菌 Genetic Stock

Center#7156, Yale University, New Haven CT) 以产生鉴定为UM2/pSW201的菌株。将UM2/pSW201在LB培养基中于37℃在摇动下生长直至 $OD_{600nm}=0.4-0.5$, 这时加入IPTG至最终浓度为1mM, 并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞, 并且进行SDS-PAGE以证实在20-40%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。冷冻细胞糊, 在-80℃下保存。

[0574] 实施例40

[0575] 来自海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) MSB8的过水解酶的克隆和表达

[0576] 使用对于在大肠杆菌中表达最优化的密码子 (DNA 2.0, Menlo Park CA) 来合成如在GENBANK® (登录号NP_227893.1; SEQ ID NO:18) 中报道的来自海栖热袍菌MSB8的编码乙酰木聚糖酯酶的基因。然后通过PCR (94℃0.5分钟, 55℃0.5分钟, 70℃1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:71和SEQ ID NO:72的引物来扩增该基因 (SEQ ID NO:74)。将所得核酸产物 (SEQ ID NO:73) 用限制酶PstI和XbaI切割, 亚克隆到pUC19中的PstI和XbaI位点之间, 产生鉴定为pSW202的质粒。使用pSW202质粒来转化大肠杆菌UM2 (大肠杆菌Genetic Stock Center#7156, Yale University, New Haven CT) 以产生鉴定为UM2/pSW202的菌株。将UM2/pSW202在LB培养基中于37℃在摇动下生长直至 $OD_{600nm}=0.4-0.5$, 这时加入IPTG至最终浓度为1mM, 并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞, 并且进行SDS-PAGE以证实在20-40%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。冷冻细胞糊, 在-80℃下保存。

[0577] 实施例41

[0578] 使用来自克劳氏芽孢杆菌KSM-K16、解糖热厌氧杆菌和海栖热袍菌MSB8的过水解酶生产过乙酸

[0579] 表达来自克劳氏芽孢杆菌KSM-K16 (大肠杆菌UM2/pSW200, 实施例38)、解糖热厌氧杆菌 (大肠杆菌UM2/pSW201, 实施例39) 和海栖热袍菌MSB8 (大肠杆菌UM2/pSW202, 实施例40) 的过水解酶的转化体的细胞提取物各自是通过以下方法制备的: 使细胞糊 (25wt%湿细胞重量) 在含二硫苏糖醇 (1mM) 的0.05M磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 中的悬浮液通过具有16,000psi (约110.32MPa) 的工作压力的弗氏压碎器两次。然后将粗提取物以20,000×g离心以去除细胞碎片, 产生用于总可溶性蛋白测定 (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma Aldrich, Sigma目录#BCA1-KT) 的澄清细胞提取物, 然后在-80℃冷冻和保存。

[0580] 50mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 中的含甘油三乙酸酯、过氧化氢和提取物总蛋白 (按照上文描述制备) 的反应 (5mL) 在25℃下进行。在第一组双份反应中, 反应物 (和相应浓度) 是: 甘油三乙酸酯 (250mM)、过氧化氢 (1.0M) 和提取物总蛋白 (50μg/mL)。在第二组双份反应中, 反应物 (和相应浓度) 是: 甘油三乙酸酯 (100mM)、过氧化氢 (250mM) 和提取物总蛋白 (1.0mg/mL)。对照反应是通过用50mM磷酸盐缓冲液 (pH 6.5) 代替提取物总蛋白溶液而进行的, 以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下, 通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。所有反应另外含有500ppm TURPINAL®SL (羟乙磷酸; Solutia Inc., St. Louis, MO), 其最初是在使用前作为稳定剂加入过氧化氢水溶液中的。

[0581] 反应混合物中的过乙酸浓度是根据Karst等人, 同上的方法测定的。在5分钟和30分钟内产生的过乙酸浓度列于表26中。

[0582] 表26: 25℃和pH 6.5时过乙酸 (PAA) 浓度对甘油三乙酸酯、过氧化氢和从表达来自

克劳氏芽孢杆菌KSM-K16(大肠杆菌UM2/pSW200)、解糖热厌氧杆菌(大肠杆菌UM2/pSW201)和海栖热袍菌MSB8(大肠杆菌UM2/pSW202)的过水解酶的转化体制备的提取物总蛋白浓度的依赖性

	细胞提取物 (UM2/)	过水解酶	总蛋白 (mg/mL)	H ₂ O ₂ (mM)	甘油三 乙酸酯 (mM)	5 分钟内 的 PAA (ppm)	30 分钟内 的 PAA (ppm)
[0583]	无	对照	0.00	1000	250	60	462
	pSW200	克劳氏芽孢杆菌	0.05	1000	250	85	520
	pSW200	克劳氏芽孢杆菌	0.05	1000	250	110	534
	pSW201	解糖热厌氧杆菌	0.05	1000	250	70	615
	pSW201	解糖热厌氧杆菌	0.05	1000	250	95	595
	pSW202	海栖热袍菌	0.05	1000	250	1995	3270
	pSW202	海栖热袍菌	0.05	1000	250	1978	3315
	无	对照	0.0	250	100	0	0
	pSW200	克劳氏芽孢杆菌	1.0	250	100	105	525
	pSW200	克劳氏芽孢杆菌	1.0	250	100	120	585
	pSW201	解糖热厌氧杆菌	1.0	250	100	290	790
	pSW201	解糖热厌氧杆菌	1.0	250	100	195	855
	pSW202	海栖热袍菌	1.0	250	100	4770	6025
	pSW202	海栖热袍菌	1.0	250	100	4770	6005

[0584] 实施例42

[0585] 来自Thermotoga lettingae的过水解酶的克隆和表达

[0586] 使用对于在大肠杆菌中表达最优化的密码子(DNA 2.0, Menlo Park CA)来合成如在 GENBANK[®] (登录号CP000812) 中报道的来自Thermotoga lettingae的编码乙酰木聚糖酯酶(SEQ ID NO:82)的基因。然后通过PCR(94℃0.5分钟, 55℃0.5分钟, 70℃1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:75和SEQ ID NO:76的引物来扩增该基因。将所得核酸产物(SEQ ID NO:77)亚克隆到pTrcHis2-TOP0(Invitrogen, Carlsbad CA)中, 产生鉴定为pSW219的质粒。也通过PCR(94℃0.5分钟, 55℃0.5分钟, 70℃1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:78和SEQ ID NO:79的引物来扩增该基因。将所得核酸产物(SEQ ID NO:80)用限制酶PstI和XbaI切割, 使用PstI和XbaI位点亚克隆到pUC19中, 产生pSW220。使用质粒pSW219和pSW220来转化大肠杆菌KLP18(过氧化氢酶双敲除), 分别产生鉴定为KLP18/PSW219和KLP18/pSW220的菌株。将KLP18/PSW219和KLP18/pSW220在LB培养基中于37℃在摇动下生长直至OD_{600nm}=0.4-0.5, 这时加入IPTG至最终浓度为1mM, 并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞, 并且进行SDS-PAGE以证实在10-20%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。

[0587] 实施例43

[0588] 来自Thermotoga petrophila的过水解酶的克隆和表达

[0589] 使用对于在大肠杆菌中表达最优化的密码子 (DNA 2.0, Menlo Park CA) 来合成如在GENBANK[®] (登录号CP000702) 中报道的来自Thermotoga petrophila的编码乙酰木聚糖酯酶的基因 (SEQ ID NO:90)。然后通过PCR (94°C 0.5分钟, 55°C 0.5分钟, 70°C 1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:83和SEQ ID NO:84的引物来扩增该基因。将所得核酸产物 (SEQ ID NO:85) 亚克隆到pTrcHis2-TOP0 (Invitrogen, Carlsbad CA) 中, 产生鉴定为pSW221的质粒。也通过PCR (94°C 0.5分钟, 55°C 0.5分钟, 70°C 1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:86和SEQ ID NO:87的引物来扩增该基因。将所得核酸产物 (SEQ ID NO:88) 用限制酶PstI和XbaI切割, 亚克隆到pUC19中的PstI和XbaI位点之间, 产生鉴定为pSW222的克隆。使用质粒pSW221和pSW222来转化大肠杆菌KLP18 (过氧化氢酶双敲除), 分别产生鉴定为KLP18/PSW221和KLP18/pSW222的菌株。将KLP18/PSW221和KLP18/pSW222在LB培养基中于37°C在摇动下生长直至OD_{600nm} = 0.4-0.5, 这时加入IPTG至最终浓度为1mM, 并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞, 并且进行SDS-PAGE以证实在10-20%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。

[0590] 实施例44

[0591] 使用来自Thermotoga lettingae的过水解酶生产过乙酸

[0592] 表达来自Thermotoga lettingae的过水解酶的转化体 (KLP18/pSW220, 实施例42) 的细胞提取物是通过以下方法制备的: 使细胞糊 (20wt%湿细胞重量) 在含二硫苏糖醇 (1mM) 的0.05M磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 中的悬浮液通过具有16,000psi (约110.32MPa) 的工作压力的弗氏压碎器两次。然后将粗提取物以20,000×g离心以去除细胞碎片, 产生用于总可溶性蛋白测定 (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma Aldrich, Sigma目录#BCA1-KT) 的澄清细胞提取物。将澄清的提取物在75°C下加热20分钟, 然后立即在冰/水浴中冷却。得到的混合物离心除去沉淀的蛋白, 收集上清液, 按上文测定总可溶性蛋白。上清液的SDS-PAGE表明过水解酶至少85-90%纯。将上清液在干冰中冷冻, 在-80°C下保存。

[0593] 50mM磷酸钠缓冲液 (pH 7.2) 或50mM碳酸氢钠缓冲液 (pH 8.5) 中的含甘油三乙酸酯、过氧化氢和来自热处理的、离心细胞提取物上清液的总蛋白 (按照上文描述制备) 的反应 (10mL总体积) 在24°C或10°C下进行。对每个反应条件进行对照反应, 以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下, 通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。在1分钟、5分钟和30分钟内产生的过乙酸浓度列于表27中。

[0594] 表27: 过乙酸 (PAA) 浓度对甘油三乙酸酯、过氧化氢和来自热处理的、离心细胞提取物上清液的总蛋白浓度的依赖性, 所述上清液从表达来自Thermotoga lettingae的过水解酶的转化体 (大肠杆菌KLP18/pSW220) 制备

缓冲液 (50 mM)	温度 (°C)	总蛋白 (mg/mL)	H ₂ O ₂ (mM)	甘油三 乙酸酯 (mM)	1 分钟 内 的 PAA (ppm)	5 分钟 内 的 PAA (ppm)	30 分钟 内 的 PAA (ppm)	
磷酸盐	24	0	250	250	54	60	160	
磷酸盐	24	0.10	250	250	958	2195	2647	
磷酸盐	24	0	250	100	24	58	56	
磷酸盐	24	0.10	250	100	464	1232	1566	
磷酸盐	24	0	100	100	134	155	244	
磷酸盐	24	0.10	100	100	415	1209	1659	
[0595]	磷酸盐	24	0	100	50	127	135	179
	磷酸盐	24	0.10	100	50	312	1068	1740
	磷酸盐	24	0	50	100	0	6	61
	磷酸盐	24	0.10	50	100	239	602	1161
	磷酸盐	24	0	50	50	0	11	364
	磷酸盐	24	0.10	50	50	252	539	1018
	磷酸盐	24	0	250	100	49	104	125
	磷酸盐	24	0.050	250	100	510	1255	2113
	磷酸盐	24	0	500	250	24	149	319
	磷酸盐	24	0.050	500	250	889	2300	2960
	磷酸盐	10	0	100	100	0	50	69
	磷酸盐	10	0.10	100	100	94	390	709
[0596]	碳酸氢盐	24	0	100	100	111	219	679
	碳酸氢盐	24	0.10	100	100	380	1073	1939
[0597]	实施例45							
[0598]	使用来自Thermotoga petrophila的过水解酶生产过乙酸							

[0599] 表达来自 *Thermotoga petrophila* 的过水解酶 (SEQ ID NO.90) 的转化体 (KLP18/pSW221, 实施例43) 的细胞提取物是通过以下方法制备的: 使细胞糊 (20wt% 湿细胞重量) 在含二硫苏糖醇 (1mM) 的 0.05M 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 中的悬浮液通过具有 16,000psi (约 110.32MPa) 的工作压力的弗氏压碎器两次。然后将粗提取物以 $20,000 \times g$ 离心以去除细胞碎片, 产生用于总可溶性蛋白测定 (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma Aldrich, Sigma 目录 #BCA1-KT) 的澄清细胞提取物。将澄清的提取物在 75°C 下加热 20 分钟, 然后立即在冰/水浴中冷却。得到的混合物离心除去沉淀的蛋白, 收集上清液, 按上文测定总可溶性蛋白。上清液的 SDS-PAGE 表明过水解酶至少 85-90% 纯。将上清液在干冰中冷冻, 在 -80°C 下保存。

[0600] 50mM 磷酸钠缓冲液 (pH 7.2) 或 50mM 碳酸氢钠缓冲液 (pH 8.5) 中的含甘油三乙酸酯、过氧化氢和来自热处理的、离心细胞提取物上清液的总蛋白 (按照上文描述制备) 的反应 (2mL 总体积) 在 24°C 或 10°C 下进行。对每个反应条件进行对照反应, 以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下, 通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度是根据实施例 2 中描述的 Karst 等人的方法测定的。在 1 分钟、5 分钟和 30 分钟内产生的过乙酸浓度列于表 28 中。

[0601] 表 28: 过乙酸 (PAA) 浓度对甘油三乙酸酯、过氧化氢和来自热处理的、离心细胞提取物上清液的总蛋白浓度的依赖性, 所述上清液从表达来自 *Thermotoga petrophila* 的过水解酶的转化体 (大肠杆菌 KLP18/pSW221) 制备

缓冲液 (50 mM)	温度 (°C)	总蛋白 (mg/mL)	H ₂ O ₂ (mM)	甘油三 乙酸酯 (mM)	1 分钟 内的 PAA (ppm)	5 分钟 内的 PAA (ppm)	30 分钟 内的 PAA (ppm)
磷酸盐	24	0	250	250	96	179	434
磷酸盐	24	0.30	250	250	2780	5957	6428
磷酸盐	24	0	250	100	0	21	413
磷酸盐	24	0.30	250	100	1894	3769	3762
磷酸盐	24	0	100	100	86	22	62
磷酸盐	24	0.30	100	100	1168	2642	2800
[0602]	磷酸盐	24	0	100	50	0	4
	磷酸盐	24	0.30	100	50	719	1599
	磷酸盐	24	0	50	100	40	0
	磷酸盐	24	0.300	50	100	551	1383
	磷酸盐	24	0	50	50	0	67
	磷酸盐	24	0.30	50	50	408	856
	磷酸盐	24	0	500	250	64	67
	磷酸盐	24	0.150	500	250	3147	5902
	磷酸盐	24	0	250	100	0	121
	磷酸盐	24	0.150	250	100	1214	2919
	磷酸盐	10	0	100	100	2	2
	磷酸盐	10	0.30	100	100	290	949
[0603]	碳酸氢盐	24	0	100	100	170	409
	碳酸氢盐	24	0.30	100	100	1208	2266
[0604]	实施例46						
[0605]	来自热袍菌属物种(Thermotogasp.) RQ2的第一过水解酶的克隆和表达						

[0606] 使用对于在大肠杆菌中表达最优化的密码子 (DNA 2.0, Menlo Park CA) 来合成如在 GENBANK[®] (登录号CP000969) 中报道的来自热袍菌属物种RQ2的编码第一乙酰木聚糖酯酶 (SEQ ID NO:98) 的基因。第一过水解酶在本文称作“RQ 2 (a)”。然后通过PCR (94℃ 0.5分钟, 55℃ 0.5分钟, 70℃ 1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:91和SEQ ID NO:92的引物来扩增该基因。将所得核酸产物 (SEQ ID NO:93) 亚克隆到pTrcHis2-TOP0 (Invitrogen, Carlsbad CA) 中, 产生鉴定为pSW223的质粒。也通过PCR (94℃ 0.5分钟, 55℃ 0.5分钟, 70℃ 1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:94和SEQ ID NO:95的引物来扩增该基因。将所得核酸产物 (SEQ ID NO:96) 用限制酶PstI和XbaI切割, 亚克隆到pUC19中的PstI和XbaI位点之间, 产生鉴定为pSW224的质粒。使用质粒pSW223和pSW224来转化大肠杆菌KLP18 (过氧化氢酶双敲除), 分别产生鉴定为KLP18/PSW223和KLP18/pSW224的菌株。将KLP18/PSW223和KLP18/pSW224在LB培养基中于37℃在摇动下生长直至OD_{600nm}为约0.4-0.5, 这时加入IPTG至最终浓度为1mM, 并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞, 并且进行SDS-PAGE以证实在10-20%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。

[0607] 实施例47

[0608] 来自热袍菌属物种 (Thermotoga sp.) RQ2的第二过水解酶的克隆和表达

[0609] 使用对于在大肠杆菌中表达最优化的密码子 (DNA 2.0, Menlo Park CA) 来合成如在 GENBANK[®] (登录号CP000969) 中报道的来自热袍菌属物种RQ2的编码第二乙酰木聚糖酯酶 (SEQ ID NO:106) 的基因。第二过水解酶在本文称作“RQ 2 (b)”。然后通过PCR (94℃ 0.5分钟, 55℃ 0.5分钟, 70℃ 1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:99和SEQ ID NO:100的引物来扩增该基因。将所得核酸产物 (SEQ ID NO:101) 亚克隆到pTrcHis2-TOP0 (Invitrogen, Carlsbad CA) 中, 产生鉴定为pSW225的质粒。也通过PCR (94℃ 0.5分钟, 55℃ 0.5分钟, 70℃ 1分钟, 30个循环), 使用鉴定为SEQ ID NO:102和SEQ ID NO:103的引物来扩增该基因。将所得核酸产物 (SEQ ID NO:104) 用限制酶PstI和XbaI切割, 亚克隆到pUC19中的PstI和XbaI位点之间, 产生鉴定为pSW226的克隆。使用质粒pSW225和pSW226来转化大肠杆菌KLP18 (过氧化氢酶双敲除), 分别产生鉴定为KLP18/PSW225和KLP18/pSW226的菌株。将KLP18/PSW225和KLP18/pSW226在LB培养基中于37℃在摇动下生长直至OD_{600nm}为约0.4-0.5, 这时加入IPTG至最终浓度为1mM, 并且继续培养2-3小时。通过离心收获细胞, 并且进行SDS-PAGE以证实在10-20%总可溶性蛋白的过水解酶的表达。

[0610] 实施例48

[0611] 用来自热袍菌属物种RQ2的第一过水解酶的过水解酶活性生产过乙酸

[0612] 表达来自热袍菌属物种RQ2的本文中称作“RQ2 (a)”第一乙酰木聚糖酯酶 (SEQ ID NO:98) 的过水解酶的转化体 (KLP18/pSW223, 实施例46) 的细胞提取物是通过以下方法制备的: 使细胞糊 (20wt%湿细胞重量) 在含二硫苏糖醇 (1mM) 的0.05M磷酸钾缓冲液 (pH 7.0) 中的悬浮液通过具有16,000psi (约110.32MPa) 的工作压力的弗氏压碎器两次。然后将粗提取物以20,000×g离心以去除细胞碎片, 产生用于总可溶性蛋白测定 (Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination, Sigma Aldrich, Sigma目录#BCA1-KT) 的澄清细胞提取物。将澄清的提取物在75℃下加热20分钟, 然后立即在冰/水浴中冷却。得到的混合物离心除去沉淀的蛋白, 收集上清液, 按上文测定总可溶性蛋白。上清液的SDS-PAGE表明过水解酶

至少85-90%纯。将上清液在干冰中冷冻,在-80℃下保存。

[0613] 50mM碳酸氢钠缓冲液(10mL总体积,pH 8.1)或50mM磷酸钠缓冲液(2mL总体积,pH 7.2)中的含甘油三乙酸酯、过氧化氢和来自热处理的、离心细胞提取物上清液的总蛋白(按照上文描述制备)的反应(2mL总体积)在25℃下进行。对每个反应条件进行对照反应,以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下,通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。在1分钟、5分钟和30分钟内产生的过乙酸浓度列于表29中。

[0614] 表29:过乙酸(PAA)浓度对甘油三乙酸酯、过氧化氢和来自热处理的、离心细胞提取物上清液的总蛋白浓度的依赖性,所述上清液从表达来自热孢菌属物种RQ2的RQ2(a)过水解酶的转化体(大肠杆菌KLP 18/pSW223)制备

缓冲液 (50 mM)	总蛋白 (mg/mL)	H ₂ O ₂ (mM)	甘油三乙 酸酯 (mM)	1 分钟内 的 PAA (ppm)	5 分钟内 的 PAA (ppm)	30 分钟内 的 PAA (ppm)
碳酸氢盐	0	100	100	6	69	339
碳酸氢盐	0.10	100	100	242	877	1396
碳酸氢盐	0	100	50	32	40	251
碳酸氢盐	0.10	100	50	197	573	880
碳酸氢盐	0	50	100	43	109	214
碳酸氢盐	0.10	50	100	188	593	975
碳酸氢盐	0	250	100	56	260	491
碳酸氢盐	0.10	250	100	558	1568	2250
磷酸盐	0	1000	250	62	295	-
磷酸盐	0.015	1000	250	327	1422	-

[0615]

[0616] 实施例49

[0617] 用来自热孢菌属物种RQ2的第二过水解酶的过水解酶活性生产过乙酸

[0618] 表达来自热孢菌属物种RQ2的本文中称作“RQ2(b)”的第二乙酰木聚糖酯酶(SEQ ID NO:106)的过水解酶的转化体(KLP18/pSW226,实施例47)的细胞提取物是通过以下方法制备的:使细胞糊(20wt%湿细胞重量)在含二硫苏糖醇(1mM)的0.05M磷酸钾缓冲液(pH 7.0)中的悬浮液通过具有16,000psi(约110.32MPa)的工作压力的弗氏压碎器两次。然后将粗提取物以20,000×g离心以去除细胞碎片,产生用于总可溶性蛋白测定(Bicinchoninic Acid Kit for Protein Determination,Sigma Aldrich,Sigma目录#BCA1-KT)的澄清细胞提取物。将澄清的提取物在75℃下加热20分钟,然后立即在冰/水浴中冷却。得到的混合物

离心除去沉淀的蛋白,收集上清液,按上文测定总可溶性蛋白。上清液的SDS-PAGE表明过水解酶至少85-90%纯。将上清液在干冰中冷冻,在-80℃下保存。

[0619] 50mM碳酸氢钠缓冲液(10mL总体积,pH 8.1)或50mM磷酸钠缓冲液(2mL总体积,pH 7.2)中的含甘油三乙酸酯、过氧化氢和来自热处理的、离心细胞提取物上清液的总蛋白(按照上文描述制备)的反应(2mL总体积)在25℃下进行。对每个反应条件进行对照反应,以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下,通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。在1分钟、5分钟和30分钟内产生的过乙酸浓度列于表30中。

[0620] 表30:过乙酸(PAA)浓度对甘油三乙酸酯、过氧化氢和来自热处理的、离心细胞提取物上清液的总蛋白浓度的依赖性,所述上清液从表达来自热袍菌属物种RQ2的RQ2(b)过水解酶的转化体(大肠杆菌KLP 18/pSW226)制备

缓冲液 (50 mM)	总蛋白 (mg/mL)	H ₂ O ₂ (mM)	甘油三乙 酸酯 (mM)	1 分钟内 的 PAA (ppm)	5 分钟内 的 PAA (ppm)	30 分钟 内的 PAA (ppm)
碳酸氢盐	0	100	100	6	69	339
碳酸氢盐	0.050	100	100	314	919	1659
碳酸氢盐	0	100	50	32	40	251
碳酸氢盐	0.050	100	50	230	691	1043
碳酸氢盐	0	50	100	43	109	214
碳酸氢盐	0.050	50	100	241	654	1126
碳酸氢盐	0	250	100	56	260	491
碳酸氢盐	0.050	250	100	563	1452	2077
磷酸盐	0	1000	250	79	311	-
磷酸盐	0.010	1000	250	686	2020	-

[0621]

[0622] 实施例50

[0623] 用过碳酸钠和来自*Thermotoga lettingae*或*Thermotoga petrophila*的过水解酶生产过乙酸

[0624] 用来自表达来自*Thermotoga lettingae*的过水解酶(SEQ ID NO.82)的转化体(KLP18/pSW220,实施例42)或表达来自*Thermotogapetrophila*的过水解酶(SEQ ID NO.90)的转化体(KLP18/pSW222,实施例43)重复实施例44和45描述的程序,但是用过碳酸钠(约25wt% H₂O₂)代替过氧化氢水溶液,以产生100mM或250mM过氧化氢的最初浓度。50mM碳酸氢钠缓冲液(2mL总体积,pH 8.1)中的含甘油三乙酸酯、过碳酸钠和热处理的、离心细胞提取

物上清液的反应在24℃下进行。对每个反应条件进行对照反应,以测定在不存在添加的提取物蛋白的情况下,通过甘油三乙酸酯被过氧化氢化学过水解而产生的过乙酸浓度。反应混合物中的过乙酸浓度是根据实施例2中描述的Karst等人的方法测定的。在1分钟、5分钟和30分钟内产生的过乙酸浓度列于表31中。

[0625] 表31:过乙酸(PAA)浓度对甘油三乙酸酯、过氧化氢和来自热处理的、离心细胞提取物上清液的总蛋白浓度的依赖性,所述上清液从表达来自Thermotoga lettingae (KLP18/pSW220)或Thermotoga petrophila (KLP18/pSW222)的过水解酶的转化体制备

	过水解酶	总蛋白 (mg/mL)	来自过碳酸盐 的 H ₂ O ₂ (mM)	甘油三 乙酸酯 (mM)	1 分钟内 的 PAA (ppm)	5 分钟内 的 PAA (ppm)	30 分钟 内的 PAA (ppm)
[0626]	无	0	100	100	41	41	172
	<i>T. lettingae</i>	0.050	100	100	23	244	854
	<i>T. petrophila</i>	0.15	100	100	312	1314	2230
	无	0	250	100	275	440	1913
	<i>T. lettingae</i>	0.050	250	100	546	1280	3593
	<i>T. petrophila</i>	0.15	250	100	1419	2678	4556

序列表

<110>	E. I. duPont de Nemours and Company Di Cosimo, Robert Cooling, III, Frederick B. Gavagan, John E. Payne, Mark	
<120>	使用具有过水解活性的酶生产过酸	
<130>	DPAX-0163	
<150>	US 11/943,872	
<151>	2007-11-21	
<160>	106	
<170>	PatentIn version 3.5	
<210>	1	
<211>	960	
<212>	DNA	
<213>	枯草芽孢杆菌 ATCC 31954	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(1).. (960)	
<400>	1	
[0001]	atg caa cta ttc gat ctg ccg ctc gac caa ttg caa aca tat aag cct Met Gln Leu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Gln Leu Gln Thr Tyr Lys Pro 1 5 10 15	48
	gaa aaa aca gca ccg aaa gat ttt tct gag ttt tgg aaa ttg tct ttg Glu Lys Thr Ala Pro Lys Asp Phe Ser Glu Phe Trp Lys Leu Ser Leu 20 25 30	96
	gag gaa ctt gca aaa gtc caa gca gaa cct gat tta cag ccg gtt gac Glu Glu Leu Ala Lys Val Gln Ala Glu Pro Asp Leu Gln Pro Val Asp 35 40 45	144
	tat cct gct gac gga gta aaa gtg tac cgt ctc aca tat aaa agc ttc Tyr Pro Ala Asp Gly Val Lys Val Tyr Arg Leu Thr Tyr Lys Ser Phe 50 55 60	192
	gga aac gcc cgc att acc gga tgg tac gcg gtg cct gac aag caa ggc Gly Asn Ala Arg Ile Thr Gly Trp Tyr Ala Val Pro Asp Lys Gln Gly 65 70 75 80	240
	ccg cat ccg gcg atc gtg aaa tat cat ggc tac aat gca agc tat gat Pro His Pro Ala Ile Val Lys Tyr His Gly Tyr Asn Ala Ser Tyr Asp 85 90 95	288
	ggt gag att cat gaa atg gta aac tgg gca ctc cat ggc tac gcc gca Gly Glu Ile His Glu Met Val Asn Trp Ala Leu His Gly Tyr Ala Ala 100 105 110	336
	ttc ggc atg ctt gtc cgc ggc cag cag agc agc gag gat acg agt att Phe Gly Met Leu Val Arg Gly Gln Gln Ser Ser Glu Asp Thr Ser Ile 115 120 125	384
	tca ctg cac ggt cac gct ttg ggc tgg atg acg aaa gga att ctt gat	432

	Ser Leu His Gly His Ala Leu Gly Trp Met Thr Lys Gly Ile Leu Asp 130 135 140	
	aaa gat aca tac tat tac cgc ggt gtt tat ttg gac gcc gtc cgc gcg Lys Asp Thr Tyr Tyr Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp Ala Val Arg Ala 145 150 155 160	480
	ctt gag gtc atc agc agc ttc gac gag gtt gac gaa aca agg atc ggt Leu Glu Val Ile Ser Ser Phe Asp Glu Val Asp Glu Thr Arg Ile Gly 165 170 175	528
	gtg aca gga gga agc caa ggc gga ggt tta acc att gcc gca gca gcg Val Thr Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala Ala Ala 180 185 190	576
	ctg tca gac att cca aaa gcc gcg gtt gcc gat tat cct tat tta agc Leu Ser Asp Ile Pro Lys Ala Ala Val Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Ser 195 200 205	624
	aac ttc gaa cgg gcc att gat gtg gcg ctt gaa cag ccg tac ctt gaa Asn Phe Glu Arg Ala Ile Asp Val Ala Leu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu 210 215 220	672
	atc aat tcc ttc ttc aga aga aat ggc agc ccg gaa aca gaa gtg cag Ile Asn Ser Phe Phe Arg Arg Asn Gly Ser Pro Glu Thr Glu Val Gln 225 230 235 240	720
	gcg atg aag aca ctt tca tat ttc gat att atg aat ctc gct gac cga Ala Met Lys Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Met Asn Leu Ala Asp Arg 245 250 255	768
[0002]	gtg aag gtg cct gtc ctg atg tca atc ggc ctg att gac aag gtc acg Val Lys Val Pro Val Leu Met Ser Ile Gly Leu Ile Asp Lys Val Thr 260 265 270	816
	ccg ccg tcc acc gtg ttt gcc gcc tac aat cat ttg gaa aca gag aaa Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Glu Lys 275 280 285	864
	gag ctg aag gtg tac cgc tac ttc gga cat gag tat atc cct gct ttt Glu Leu Lys Val Tyr Arg Tyr Phe Gly His Glu Tyr Ile Pro Ala Phe 290 295 300	912
	caa acg gaa aaa ctt gct ttc ttt aag cag cat ctt aaa ggc tga taa Gln Thr Glu Lys Leu Ala Phe Phe Lys Gln His Leu Lys Gly 305 310 315	960
	<210> 2 <211> 318 <212> PRT <213> 枯草芽孢杆菌 ATCC 31954	
	<400> 2	
	Met Gln Leu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Gln Leu Gln Thr Tyr Lys Pro 1 5 10 15	
	Glu Lys Thr Ala Pro Lys Asp Phe Ser Glu Phe Trp Lys Leu Ser Leu 20 25 30	

Glu Glu Leu Ala Lys Val Gln Ala Glu Pro Asp Leu Gln Pro Val Asp
 35 40 45
 Tyr Pro Ala Asp Gly Val Lys Val Tyr Arg Leu Thr Tyr Lys Ser Phe
 50 55 60
 Gly Asn Ala Arg Ile Thr Gly Trp Tyr Ala Val Pro Asp Lys Gln Gly
 65 70 75 80
 Pro His Pro Ala Ile Val Lys Tyr His Gly Tyr Asn Ala Ser Tyr Asp
 85 90 95
 Gly Glu Ile His Glu Met Val Asn Trp Ala Leu His Gly Tyr Ala Ala
 100 105 110
 Phe Gly Met Leu Val Arg Gly Gln Gln Ser Ser Glu Asp Thr Ser Ile
 115 120 125
 Ser Leu His Gly His Ala Leu Gly Trp Met Thr Lys Gly Ile Leu Asp
 130 135 140
 Lys Asp Thr Tyr Tyr Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp Ala Val Arg Ala
 145 150 155 160
 [0003]
 Leu Glu Val Ile Ser Ser Phe Asp Glu Val Asp Glu Thr Arg Ile Gly
 165 170 175
 Val Thr Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala Ala Ala
 180 185 190
 Leu Ser Asp Ile Pro Lys Ala Ala Val Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Ser
 195 200 205
 Asn Phe Glu Arg Ala Ile Asp Val Ala Leu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu
 210 215 220
 Ile Asn Ser Phe Phe Arg Arg Asn Gly Ser Pro Glu Thr Glu Val Gln
 225 230 235 240
 Ala Met Lys Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Met Asn Leu Ala Asp Arg
 245 250 255
 Val Lys Val Pro Val Leu Met Ser Ile Gly Leu Ile Asp Lys Val Thr
 260 265 270
 Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Glu Lys
 275 280 285

Glu Leu Lys Val Tyr Arg Tyr Phe Gly His Glu Tyr Ile Pro Ala Phe
290 295 300

Gln Thr Glu Lys Leu Ala Phe Phe Lys Gln His Leu Lys Gly
305 310 315

<210> 3
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 3
atgcaactat tcgatctgcc gctc

24

<210> 4
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 4
ttatcagcct ttaagatget gettaa

26

[0004]

<210> 5
<211> 957
<212> DNA
<213> 枯草芽孢杆菌枯草亚种菌株 168

<400> 5
atgcaactat tcgatctgcc gctcgaccaa ttgcaaacat ataagcctga aaaaacagca 60
ccgaaagatt tttctgagtt ttggaaattg tctttggagg aacttgcaaa agtccaagca 120
gaacctgatt tacagccggt tgactatcct gctgacggag taaaagtgt cgtctcaca 180
tataaaagct tcggaaacgc ccgcattacc ggatggtagc cggtagcctga caaggaagc 240
ccgcacccgg cgcagctgaa atatcatggc tacaatgcaa gctatgatgg tgagattcat 300
gaaatggtaa actgggcact ccatggctac gccacattcg gcatgcttgt ccgcggccag 360
cagagcagcg aggatacgag tatttcacgc caggtcacg ctttgggctg gatgacgaaa 420
ggaattcttg ataaagatac atactattac cgcggtgttt atttgacgc cgtccgcgcg 480
cttgaggtea tcagcagctt cgacgaggtt gacgaaacaa ggatcgggtg gacaggagga 540
agccaaggcg gaggtttaac cattgccga gcagcgtgt cagacattcc aaaagccgcg 600
gttgccgatt atccttattt aagcaacttc gaacgggcca ttgatgtggc gcttgacag 660
ccgtaccttg aaatcaattc cttcttcaga agaaatggca gcccggaac agaagtgcag 720

gcgatgaaga cactttcata ttctgatatt atgaatctcg ctgaccgagt gaaggtgcct 780
gtectgatgt caatcggect gattgacaag gtcacgecgc cgtccaccgt gtttgcgcgc 840
tacaatcatt tggaacaaa gaaagagctg aaggtgtacc gctacttcgg acatgagtat 900
atccctgett ttcaaactga aaaacttget ttctttaage agcatcttaa aggetga 957

<210> 6
<211> 318
<212> PRT
<213> 枯草芽孢杆菌枯草亚种菌株 168

<400> 6

Met Gln Leu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Gln Leu Gln Thr Tyr Lys Pro
1 5 10 15

Glu Lys Thr Ala Pro Lys Asp Phe Ser Glu Phe Trp Lys Leu Ser Leu
20 25 30

Glu Glu Leu Ala Lys Val Gln Ala Glu Pro Asp Leu Gln Pro Val Asp
35 40 45

Tyr Pro Ala Asp Gly Val Lys Val Tyr Arg Leu Thr Tyr Lys Ser Phe
50 55 60

[0005]

Gly Asn Ala Arg Ile Thr Gly Trp Tyr Ala Val Pro Asp Lys Glu Gly
65 70 75 80

Pro His Pro Ala Ile Val Lys Tyr His Gly Tyr Asn Ala Ser Tyr Asp
85 90 95

Gly Glu Ile His Glu Met Val Asn Trp Ala Leu His Gly Tyr Ala Thr
100 105 110

Phe Gly Met Leu Val Arg Gly Gln Gln Ser Ser Glu Asp Thr Ser Ile
115 120 125

Ser Pro His Gly His Ala Leu Gly Trp Met Thr Lys Gly Ile Leu Asp
130 135 140

Lys Asp Thr Tyr Tyr Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp Ala Val Arg Ala
145 150 155 160

Leu Glu Val Ile Ser Ser Phe Asp Glu Val Asp Glu Thr Arg Ile Gly
165 170 175

Val Thr Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala Ala Ala
180 185 190

Leu Ser Asp Ile Pro Lys Ala Ala Val Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Ser
195 200 205

Asn Phe Glu Arg Ala Ile Asp Val Ala Leu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu
210 215 220

Ile Asn Ser Phe Phe Arg Arg Asn Gly Ser Pro Glu Thr Glu Val Gln
225 230 235 240

Ala Met Lys Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Met Asn Leu Ala Asp Arg
245 250 255

Val Lys Val Pro Val Leu Met Ser Ile Gly Leu Ile Asp Lys Val Thr
260 265 270

Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Lys Lys
275 280 285

Glu Leu Lys Val Tyr Arg Tyr Phe Gly His Glu Tyr Ile Pro Ala Phe
290 295 300

Gln Thr Glu Lys Leu Ala Phe Phe Lys Gln His Leu Lys Gly
305 310 315

[0006]

<210> 7
<211> 957
<212> DNA
<213> 枯草芽孢杆菌 ATCC 6633

<400> 7
atgcaactat tcgatctgcc gctcgaccaa ttgcaaacgt ataagcctga aaaaacaaca 60
ccgaacgatt tttctgagtt ttggaaatcg tctttggacg aacttgcgaa agtcaaagca 120
gcacctgatt tacagctggg tgattatcct gctgatggag tcaagggtga ccgcctcaca 180
tataaaagct tcggaaacgc ccgcattacc ggatgggtacg cagtgcctga caaggaagga 240
ccgcacccgg cgategtcaa atatcatggc tacaacgcta gctatgacgg tgagattcat 300
gaaatggtaa actgggcgct ccacggttac gccgcattcg gcatgctagt ccgcggccag 360
cagagcagcg aggatacgag tttttctcca catggccatg ctttgggctg gatgacgaaa 420
ggaatccttg ataaagatac atactattac cggggcggtt atttggacgc tgtccgcgcg 480
cttgagggtca tcagcagctt tgacgaagtt gacgaaacaa gaatcggtgt gacaggcgga 540
agccaaggag gcggttaac cattgccga gccgctctgt cagacattcc aaaagccgcg 600
gttgccgatt atccttattt aagcaacttt gaacgggcca ttgatgtggc gcttgaacag 660
ccgtaccttg aaatcaattc cttctttaga agaaatggaa gcccggaac ggaagagaag 720

gcgatgaaga cactttcata ttctgatatt atgaatctcg ctgaccgagt gaaggtccct 780
gtectgatgt cgategggtct gattgacaag gtcacgecgc cgtccaccgt gtttgccgca 840
tacaaccact tggagacaga gaaagagctc aaagtgtacc gctacttcgg gcatgagtat 900
atccctgect ttcaaacaga aaaacttget ttctttaage agcatcttaa aggetga 957

<210> 8
<211> 318
<212> PRT
<213> 枯草芽孢杆菌 ATCC 6633

<400> 8

Met Gln Leu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Gln Leu Gln Thr Tyr Lys Pro
1 5 10 15

Glu Lys Thr Thr Pro Asn Asp Phe Ser Glu Phe Trp Lys Ser Ser Leu
20 25 30

Asp Glu Leu Ala Lys Val Lys Ala Ala Pro Asp Leu Gln Leu Val Asp
35 40 45

Tyr Pro Ala Asp Gly Val Lys Val Tyr Arg Leu Thr Tyr Lys Ser Phe
50 55 60

[0007]

Gly Asn Ala Arg Ile Thr Gly Trp Tyr Ala Val Pro Asp Lys Glu Gly
65 70 75 80

Pro His Pro Ala Ile Val Lys Tyr His Gly Tyr Asn Ala Ser Tyr Asp
85 90 95

Gly Glu Ile His Glu Met Val Asn Trp Ala Leu His Gly Tyr Ala Ala
100 105 110

Phe Gly Met Leu Val Arg Gly Gln Gln Ser Ser Glu Asp Thr Ser Ile
115 120 125

Ser Pro His Gly His Ala Leu Gly Trp Met Thr Lys Gly Ile Leu Asp
130 135 140

Lys Asp Thr Tyr Tyr Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp Ala Val Arg Ala
145 150 155 160

Leu Glu Val Ile Ser Ser Phe Asp Glu Val Asp Glu Thr Arg Ile Gly
165 170 175

Val Thr Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala Ala Ala
180 185 190

Leu Ser Asp Ile Pro Lys Ala Ala Val Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Ser
195 200 205

Asn Phe Glu Arg Ala Ile Asp Val Ala Leu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu
210 215 220

Ile Asn Ser Phe Phe Arg Arg Asn Gly Ser Pro Glu Thr Glu Glu Lys
225 230 235 240

Ala Met Lys Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Met Asn Leu Ala Asp Arg
245 250 255

Val Lys Val Pro Val Leu Met Ser Ile Gly Leu Ile Asp Lys Val Thr
260 265 270

Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Glu Lys
275 280 285

Glu Leu Lys Val Tyr Arg Tyr Phe Gly His Glu Tyr Ile Pro Ala Phe
290 295 300

Gln Thr Glu Lys Leu Ala Phe Phe Lys Gln His Leu Lys Gly
305 310 315

[0008]

<210> 9

<211> 957

<212> DNA

<213> 地衣芽孢杆菌 ATCC 14580

<400> 9

atgcagcagc cttatgatat gccgettgaa cagctttatc agtataaacc tgaacggacg 60

gcaccggccg attttaaaga gttctggaag ggttcattgg aggaattggc aaatgaaaaa 120

gcgggaccgc agcttgaacc gcatgaatat ccggetgacg gggtaaaagt ctactggett 180

acatacagaa gcatcggggg agcgcgaatt aaaggctggg acgcagtacc cgaccgcaa 240

gggcctcatc ctgcgatcgt caaataccac ggctataacg caagctatga cggagacatt 300

cacgatattg tcaattgggc tcttcacggc tatcgggcat tcggtatgct ggtccgcgga 360

cagaacagca gtgaagatac agagatctct catcacggac atgtaccggg ctggatgaca 420

aaaggaatcc tcgatecgaa aacatattac tacagagggg tctatttaga tgccgtacga 480

gcagtcgaag tggtcagcgg ttttgctgaa gtcgatgaaa agcggatcgg ggtgatcggg 540

gcaagccaag gaggcgggct ggccgtcgcg gtttcggcgc tgtccgatat tccaaaagca 600

gccgtgtcag aataccctta ttttaagcaat tttcaacgag cgategatac agcgatecagc 660

cagccatata tcgaaatcaa ctcttttttc agaagaaaca ccagtcgga tattgagcag 720

gcggccatgc ataccctgtc ttatttcgat gtcatgaacc ttgcccaatt ggtcaaagcg 780
 accgtactca tgtcgatcgg actggttgac accatcactc cgccatccac cgtctttgcg 840
 gcttacaatc acttggaac ggataaagaa ataaaagtgt accgttattt tggacacgaa 900
 tacatccgcg cgttccaaac cgaaaagctg gcgtttctga gaaagcatct gaaataa 957

<210> 10
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> 地衣芽孢杆菌 ATCC 14580

<400> 10

Met Gln Gln Pro Tyr Asp Met Pro Leu Glu Gln Leu Tyr Gln Tyr Lys
 1 5 10 15

Pro Glu Arg Thr Ala Pro Ala Asp Phe Lys Glu Phe Trp Lys Gly Ser
 20 25 30

Leu Glu Glu Leu Ala Asn Glu Lys Ala Gly Pro Gln Leu Glu Pro His
 35 40 45

Glu Tyr Pro Ala Asp Gly Val Lys Val Tyr Trp Leu Thr Tyr Arg Ser
 50 55 60

[0009]

Ile Gly Gly Ala Arg Ile Lys Gly Trp Tyr Ala Val Pro Asp Arg Gln
 65 70 75 80

Gly Pro His Pro Ala Ile Val Lys Tyr His Gly Tyr Asn Ala Ser Tyr
 85 90 95

Asp Gly Asp Ile His Asp Ile Val Asn Trp Ala Leu His Gly Tyr Ala
 100 105 110

Ala Phe Gly Met Leu Val Arg Gly Gln Asn Ser Ser Glu Asp Thr Glu
 115 120 125

Ile Ser His His Gly His Val Pro Gly Trp Met Thr Lys Gly Ile Leu
 130 135 140

Asp Pro Lys Thr Tyr Tyr Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp Ala Val Arg
 145 150 155 160

Ala Val Glu Val Val Ser Gly Phe Ala Glu Val Asp Glu Lys Arg Ile
 165 170 175

Gly Val Ile Gly Ala Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ala Val Ala Val Ser
 180 185 190

Ala Leu Ser Asp Ile Pro Lys Ala Ala Val Ser Glu Tyr Pro Tyr Leu
195 200 205

Ser Asn Phe Gln Arg Ala Ile Asp Thr Ala Ile Asp Gln Pro Tyr Leu
210 215 220

Glu Ile Asn Ser Phe Phe Arg Arg Asn Thr Ser Pro Asp Ile Glu Gln
225 230 235 240

Ala Ala Met His Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Val Met Asn Leu Ala Gln
245 250 255

Leu Val Lys Ala Thr Val Leu Met Ser Ile Gly Leu Val Asp Thr Ile
260 265 270

Thr Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Asp
275 280 285

Lys Glu Ile Lys Val Tyr Arg Tyr Phe Gly His Glu Tyr Ile Pro Pro
290 295 300

Phe Gln Thr Glu Lys Leu Ala Phe Leu Arg Lys His Leu Lys
305 310 315

[0010]

<210> 11

<211> 963

<212> DNA

<213> 短小芽孢杆菌

<400> 11

atgcaattgt tcgatttate actagaagag ctaaaaaat ataaacaaa gaaaacagca 60

cgctctgatt tctcagactt ttggaagaaa tcgctcgaag aactgcgcca agtggaggca 120

gagccaacac ttgaatetta tgactatcca gtgaaaggcg tcaagggtga ccgectgacg 180

tatcaaagct ttggacattc taaaattgaa ggcttttatg ctgtgcctga tcaaactggt 240

ccgcatccag cgetcgttcg ttttcatggc tataatgcca gctatgacgg cggcattcac 300

gacatcgtea actgggcgct gcacggctat gcaacatttg gtatgctcgt ccgcggtcaa 360

gggtggcagtg aagacacatc agtgacacca ggcgggcatg cattaggggtg gatgacaaaa 420

ggcattttat cgaaagatac gtactattat cgaggcgttt atctagatgc tgttcgtgca 480

cttgaagtca ttcagttctt ccccgaaagta gatgaacacc gtatcggcgt gatcgggtgga 540

agtcaggggg gtgcgttagc gattgcggcc gcagcccttt cagacattcc aaaagtcgtt 600

gtggcagact atccttactt atcaaatttt gagegtgcag ttgatgttgc cttggagcag 660

ccttatttag aaatcaattc atactttcgc agaaacagtg atccgaaagt ggaggaaaag 720

```
gcatttgaga cattaagcta ttttgattta atcaatttag ctggatgggt gaaacagcca 780
acattgatgg cgatcgggtc gattgacaaa ataacccac catctactgt gtttgcggca 840
tacaaccatt tagaaacaga taaagacctg aaagtatatc gctattttgg acacgagttt 900
atccctgctt ttcaaacaga gaagctgtcc tttttacaaa agcatttget tctatcaaca 960
taa 963
```

<210> 12
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> 短小芽孢杆菌
 <400> 12

```
Met Gln Leu Phe Asp Leu Ser Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Lys Pro
1          5          10          15
```

```
Lys Lys Thr Ala Arg Pro Asp Phe Ser Asp Phe Trp Lys Lys Ser Leu
          20          25          30
```

```
Glu Glu Leu Arg Gln Val Glu Ala Glu Pro Thr Leu Glu Ser Tyr Asp
          35          40          45
```

```
[0011] Tyr Pro Val Lys Gly Val Lys Val Tyr Arg Leu Thr Tyr Gln Ser Phe
          50          55          60
```

```
Gly His Ser Lys Ile Glu Gly Phe Tyr Ala Val Pro Asp Gln Thr Gly
65          70          75          80
```

```
Pro His Pro Ala Leu Val Arg Phe His Gly Tyr Asn Ala Ser Tyr Asp
          85          90          95
```

```
Gly Gly Ile His Asp Ile Val Asn Trp Ala Leu His Gly Tyr Ala Thr
          100          105          110
```

```
Phe Gly Met Leu Val Arg Gly Gln Gly Gly Ser Glu Asp Thr Ser Val
          115          120          125
```

```
Thr Pro Gly Gly His Ala Leu Gly Trp Met Thr Lys Gly Ile Leu Ser
          130          135          140
```

```
Lys Asp Thr Tyr Tyr Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp Ala Val Arg Ala
145          150          155          160
```

```
Leu Glu Val Ile Gln Ser Phe Pro Glu Val Asp Glu His Arg Ile Gly
          165          170          175
```

```
Val Ile Gly Gly Ser Gln Gly Gly Ala Leu Ala Ile Ala Ala Ala Ala
```

	180	185	190
	Leu Ser Asp Ile Pro Lys Val Val Val Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Ser 195 200 205		
	Asn Phe Glu Arg Ala Val Asp Val Ala Leu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu 210 215 220		
	Ile Asn Ser Tyr Phe Arg Arg Asn Ser Asp Pro Lys Val Glu Glu Lys 225 230 235 240		
	Ala Phe Glu Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Leu Ile Asn Leu Ala Gly Trp 245 250 255		
	Val Lys Gln Pro Thr Leu Met Ala Ile Gly Leu Ile Asp Lys Ile Thr 260 265 270		
	Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Asp Lys 275 280 285		
	Asp Leu Lys Val Tyr Arg Tyr Phe Gly His Glu Phe Ile Pro Ala Phe 290 295 300		
[0012]	Gln Thr Glu Lys Leu Ser Phe Leu Gln Lys His Leu Leu Leu Ser Thr 305 310 315 320		
<210>	13		
<211>	963		
<212>	DNA		
<213>	热纤维梭菌 ATCC 27405		
<400>	13		
	atggcacaat tatatgatat gcctttggag gaattaaaaa aatataagcc tgcgcttaca	60	
	aaacagaaaag attttgatga gttttgggaa aaaagcctta aagagctggc tgaaattcct	120	
	ttaaaaatate aacttatacc ttatgatttt cgggcccgga gggtaaaagt tticagagtt	180	
	gaatatcttg gttttaaagg tgcaaatatt gaagggtggc ttgccgttcc cgaggagaa	240	
	gggttgatc cgggcttg acagtttcac ggatacaact gggcgatgga tggatgtgtt	300	
	cccgatgtgg taaattgggc ttgaatgga tatgccgc atttctatgct tgttcgggga	360	
	cagcaggga gaagcgtgga caatattgtg cccggcagcg gtcattgttt gggatggatg	420	
	tcgaaaggta tttgtcacc ggaggaatat tattatagag gattatatat ggatgcgggt	480	
	cgtgtgttg aaattttggc ttcgttccet tgtgtggatg aatcgagaat aggagtgaca	540	
	gggggcagcc aggggtggagg acttgcactg gcggtggctg ctctgtccgg cataccgaaa	600	
	gttgacgccc tgcattatcc gtttctggca cttttgagc gtgccattga cgttgccgcg	660	

```

gacggccctt atcttgaaat taacgaatat ttaagaagaa acagcgggtga agaaatagaa      720
agacaggtaa agaaaaccct ttctatttt gatatcatga atcttgetcc ccgtataaaa      780
tgccgtactt ggatttgac tggctctgtg gatgagatta ctctccgtc aacggtttt      840
gcagtgtaca atcacctcaa atgcccaaag gaaatttcgg tattcagata ttttgggcat      900
gaacatatgc caggaagcgt tgaaatcaag ctgaggatac ttatggatga gctgaatccg      960
taa                                                                    963

```

<210> 14
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> 热纤维梭菌 ATCC 27405

<400> 14

```

Met Ala Gln Leu Tyr Asp Met Pro Leu Glu Leu Lys Lys Tyr Lys
1              5              10              15

```

```

Pro Ala Leu Thr Lys Gln Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Glu Lys Ser
                20              25              30

```

```

Leu Lys Glu Leu Ala Glu Ile Pro Leu Lys Tyr Gln Leu Ile Pro Tyr
35              40              45

```

[0013]

```

Asp Phe Pro Ala Arg Arg Val Lys Val Phe Arg Val Glu Tyr Leu Gly
50              55              60

```

```

Phe Lys Gly Ala Asn Ile Glu Gly Trp Leu Ala Val Pro Glu Gly Glu
65              70              75              80

```

```

Gly Leu Tyr Pro Gly Leu Val Gln Phe His Gly Tyr Asn Trp Ala Met
85              90              95

```

```

Asp Gly Cys Val Pro Asp Val Val Asn Trp Ala Leu Asn Gly Tyr Ala
100             105             110

```

```

Ala Phe Leu Met Leu Val Arg Gly Gln Gln Gly Arg Ser Val Asp Asn
115             120             125

```

```

Ile Val Pro Gly Ser Gly His Ala Leu Gly Trp Met Ser Lys Gly Ile
130             135             140

```

```

Leu Ser Pro Glu Glu Tyr Tyr Tyr Arg Gly Val Tyr Met Asp Ala Val
145             150             155             160

```

```

Arg Ala Val Glu Ile Leu Ala Ser Leu Pro Cys Val Asp Glu Ser Arg
165             170             175

```

Ile Gly Val Thr Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ala Leu Ala Val
180 185 190

Ala Ala Leu Ser Gly Ile Pro Lys Val Ala Ala Val His Tyr Pro Phe
195 200 205

Leu Ala His Phe Glu Arg Ala Ile Asp Val Ala Pro Asp Gly Pro Tyr
210 215 220

Leu Glu Ile Asn Glu Tyr Leu Arg Arg Asn Ser Gly Glu Glu Ile Glu
225 230 235 240

Arg Gln Val Lys Lys Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Met Asn Leu Ala
245 250 255

Pro Arg Ile Lys Cys Arg Thr Trp Ile Cys Thr Gly Leu Val Asp Glu
260 265 270

Ile Thr Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Val Tyr Asn His Leu Lys Cys
275 280 285

Pro Lys Glu Ile Ser Val Phe Arg Tyr Phe Gly His Glu His Met Pro
290 295 300

[0014]

Gly Ser Val Glu Ile Lys Leu Arg Ile Leu Met Asp Glu Leu Asn Pro
305 310 315 320

<210> 15

<211> 978

<212> DNA

<213> 那不勒斯栖热袍菌

<400> 15

atggcettct tcgatatgcc ccttgaggaa ctgaaaaagt accggcctga aaggtacgag 60

gagaaagatt tcgatgagtt ctggagggaa acacttaaag aaagcgaagg attccctctg 120

gateccgtct ttgaaaaggt ggactttcat ctcaaaacgg ttgaaacgta cgatgttact 180

ttctctggat acagggggca gagaataaag ggcttgcttc ttgttcgaa gttggcggaa 240

gaaaagcttc catgcgtcgt gcagtacata ggttacaatg gtggaagggg tttccacac 300

gactggctgt tctggccgtc aatgggttac atctgttttg tcatggacac cagggggcag 360

ggaagcggct ggatgaaggg agacacaccg gattaccctg aggttccagt cgatccacag 420

taccccgat tcatgacgag gggcattctg gatccgggaa cctattacta caggcgagtc 480

ttcgtggatg cggtcagggc ggtggaagca gccatttcct tcccagagat ggattccagg 540

aaggtggtgg tggccggagg cagtcagggt gggggaatcg cccttgcggt gagtgcctg 600

```

tcgaacaggg tgaaggtctt gctctgcgat gtgccgtttc tgtgccactt cagaagggcc      660
gtgcaacttg tcgacacaca cccatacgtg gagatcacca acttctctca aaccacacagg      720
gacaaagagg agattgtttt cagaacactt tcctacttcg atgggtgtgaa ctttcagca      780
agggcaaagg tgcccgcctt gttttccgtt gggtcatgg acaccatctg tcctccctcg      840
acggctcttcg ccgcttacaa ccactacgcc ggtccaaagg agatcagaat ctatccgtac      900
aacaaccacg aaggtggagg ttctttccag gcaattgagc aggtgaaatt cttgaagaga      960
ctatttgagg aagctag                                     978

```

<210> 16
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> 那不勒斯栖热袍菌

<400> 16

```

Met Ala Phe Phe Asp Met Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
1              5              10              15

```

```

Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Arg Glu Thr Leu
                20              25              30

```

[0015]

```

Lys Glu Ser Glu Gly Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Lys Val Asp
35              40              45

```

```

Phe His Leu Lys Thr Val Glu Thr Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
50              55              60

```

```

Arg Gly Gln Arg Ile Lys Gly Trp Leu Leu Val Pro Lys Leu Ala Glu
65              70              75              80

```

```

Glu Lys Leu Pro Cys Val Val Gln Tyr Ile Gly Tyr Asn Gly Gly Arg
85              90              95

```

```

Gly Phe Pro His Asp Trp Leu Phe Trp Pro Ser Met Gly Tyr Ile Cys
100              105              110

```

```

Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Gly Trp Met Lys Gly Asp
115              120              125

```

```

Thr Pro Asp Tyr Pro Glu Gly Pro Val Asp Pro Gln Tyr Pro Gly Phe
130              135              140

```

```

Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Gly Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
145              150              155              160

```

```

Phe Val Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Ala Ala Ile Ser Phe Pro Arg

```


	165	170	175
	Val Asp Ser Arg Lys Val Val Val Ala Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly 180 185 190		
	Ile Ala Leu Ala Val Ser Ala Leu Ser Asn Arg Val Lys Ala Leu Leu 195 200 205		
	Cys Asp Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Leu Val 210 215 220		
	Asp Thr His Pro Tyr Val Glu Ile Thr Asn Phe Leu Lys Thr His Arg 225 230 235 240		
	Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly Val 245 250 255		
	Asn Phe Ala Ala Arg Ala Lys Val Pro Ala Leu Phe Ser Val Gly Leu 260 265 270		
	Met Asp Thr Ile Cys Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His 275 280 285		
[0016]	Tyr Ala Gly Pro Lys Glu Ile Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Asn His Glu 290 295 300		
	Gly Gly Gly Ser Phe Gln Ala Ile Glu Gln Val Lys Phe Leu Lys Arg 305 310 315 320		
	Leu Phe Glu Glu Gly 325		
	<210> 17 <211> 978 <212> DNA <213> 海栖热袍菌 MSB8		
	<400> 17 atggccttct tcgatttacc actcgaagaa ctgaagaaat atcgccaga gcggtacgaa 60 gagaaagact tcgatgagtt ctgggaagag aactcgcag agagcgaaaa gttccctta 120 gaccccgctc tcgagaggat ggagtctcac ctcaaacag tcgaagcgta cgatgtcacc 180 ttctccgat acaggggaca gaggatcaaa ggttggtctc ttgttccaaa actggaagaa 240 gaaaaacttc cctgcgttgt gcagtacata ggatacaacg gtggaagagg attccctcac 300 gactggctgt tctggccttc tatgggttac atatgtttcg tcatggatac tcgaggtcag 360 ggaagcggct ggctgaaagg agacacaccg gattaccctg agggccccgt tgaccctcag 420		

```

tatccaggat tcatgacaag aggaatactg gatcccagaa cttactacta cagacgagtc      480
ttcacggacg ctgtcagage cgttgaagct getgettett ttcctcaggt agatcaagaa      540
agaatcgtga tagctggagg cagtcagggt ggcggaatag cccttgcggt gacgcgtctc      600
tcaaagaaag caaaggetct tctgtgcgat gtgccgtttc tgtgtcactt cagaagagca      660
gtacagcttg tggatacgca tccatacgcg gagatcacga actttctaaa gaccacaga      720
gacaaggaag aaatcgtgtt caggactctt tectatttcg atggagttaa cttegcagcc      780
agagcgaaga tccctgcgct gttttctgtg ggtctcatgg acaacatttg tcctccttca      840
acggttttcg ctgcctacaa ttactacgct ggaccgaagg aaatcagaat ctatccgtac      900
aacaaccacg agggaggagg ctctttccaa gcggttgaac aggtgaaatt cttgaaaaaa      960
ctatttgaga aaggctaa

```

<210> 18
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> 海栖热袍菌 MSB8

<400> 18

```

Met Ala Phe Phe Asp Leu Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
1              5              10              15

```

[0017]

```

Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Glu Glu Thr Leu
20              25              30

```

```

Ala Glu Ser Glu Lys Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Arg Met Glu
35              40              45

```

```

Ser His Leu Lys Thr Val Glu Ala Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
50              55              60

```

```

Arg Gly Gln Arg Ile Lys Gly Trp Leu Leu Val Pro Lys Leu Glu Glu
65              70              75              80

```

```

Glu Lys Leu Pro Cys Val Val Gln Tyr Ile Gly Tyr Asn Gly Gly Arg
85              90              95

```

```

Gly Phe Pro His Asp Trp Leu Phe Trp Pro Ser Met Gly Tyr Ile Cys
100              105              110

```

```

Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Gly Trp Leu Lys Gly Asp
115              120              125

```

```

Thr Pro Asp Tyr Pro Glu Gly Pro Val Asp Pro Gln Tyr Pro Gly Phe
130              135              140

```

Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Arg Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
145 150 155 160

Phe Thr Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Ala Ala Ala Ser Phe Pro Gln
165 170 175

Val Asp Gln Glu Arg Ile Val Ile Ala Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly
180 185 190

Ile Ala Leu Ala Val Ser Ala Leu Ser Lys Lys Ala Lys Ala Leu Leu
195 200 205

Cys Asp Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Leu Val
210 215 220

Asp Thr His Pro Tyr Ala Glu Ile Thr Asn Phe Leu Lys Thr His Arg
225 230 235 240

Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly Val
245 250 255

Asn Phe Ala Ala Arg Ala Lys Ile Pro Ala Leu Phe Ser Val Gly Leu
260 265 270

[0018]

Met Asp Asn Ile Cys Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn Tyr
275 280 285

Tyr Ala Gly Pro Lys Glu Ile Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Asn His Glu
290 295 300

Gly Gly Gly Ser Phe Gln Ala Val Glu Gln Val Lys Phe Leu Lys Lys
305 310 315 320

Leu Phe Glu Lys Gly
325

<210> 19

<211> 963

<212> DNA

<213> 热厌氧芽孢杆菌属物种

<400> 19

atgggacttt tcgacatgcc attacaaaaa cttagagaat aacttggtac aaatccatgc 60

cctgaagatt tcgatgagta ttggaatagg gcttttagatg agatgaggtc agttgatcct 120

aaaattgaat tgaagaaaag tagctttcaa gtatcctttg cagaatgcta tgacttgtag 180

tttacaggtg ttcgtggtgc cagaattcat gcaaagtata taaaacctaa gacagaaggg 240

```

aaacatccag cgttgataag atttcatgga tattegtcaa attcaggcga ctggaacgac    300
aaattaaatt acgtggcggc aggettccacc gttgtggcta tggatgtaag aggtcaagga    360
gggcagtctc aagatgttgg cgggtgtaact gggaatactt taaatgggca tattataaga    420
gggctagacg atgatgctga taatatgctt ttcaggcata ttttcttaga cactgcccac    480
ttggettgaa tagttatgaa catgccagaa gttgatgaag atagagtggg agtcatggga    540
ccttctcaag gcgaggggct gtcgttggcg tgtgctgcat tggagccaag ggtacgcaaa    600
gtagtatctg aatatccttt tttatctgac tacaagagag tttgggactt agaccttgca    660
aaaaacgect atcaagagat tacggactat ttcaggcttt ttgaccaag gcatgaaagg    720
gagaatgagg tatttacaaa gcttggatat atagacgta aaaaccttgc gaaaaggata    780
aaaggcgatg tettaatgtg cgttgggctt atggaccaag tatgtccgcc atcaactgtt    840
tttgcagcct acaacaacat acagtcaaaa aaagatataa aagtgtatcc tgattatgga    900
catgaaccta tgagaggatt tggagattta gcgatgcagt ttatgttgga actatattca    960
taa                                                                    963

```

<210> 20
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> 热厌氧芽孢杆菌属物种

[0019]

<400> 20

Met Gly Leu Phe Asp Met Pro Leu Gln Lys Leu Arg Glu Tyr Thr Gly
 1 5 10 15

Thr Asn Pro Cys Pro Glu Asp Phe Asp Glu Tyr Trp Asn Arg Ala Leu
 20 25 30

Asp Glu Met Arg Ser Val Asp Pro Lys Ile Glu Leu Lys Glu Ser Ser
 35 40 45

Phe Gln Val Ser Phe Ala Glu Cys Tyr Asp Leu Tyr Phe Thr Gly Val
 50 55 60

Arg Gly Ala Arg Ile His Ala Lys Tyr Ile Lys Pro Lys Thr Glu Gly
 65 70 75 80

Lys His Pro Ala Leu Ile Arg Phe His Gly Tyr Ser Ser Asn Ser Gly
 85 90 95

Asp Trp Asn Asp Lys Leu Asn Tyr Val Ala Ala Gly Phe Thr Val Val
 100 105 110

Ala Met Asp Val Arg Gly Gln Gly Gly Gln Ser Gln Asp Val Gly Gly

	115	120	125
	Val Thr Gly Asn Thr Leu Asn Gly His Ile Ile Arg Gly Leu Asp Asp 130 135 140		
	Asp Ala Asp Asn Met Leu Phe Arg His Ile Phe Leu Asp Thr Ala Gln 145 150 155 160		
	Leu Ala Gly Ile Val Met Asn Met Pro Glu Val Asp Glu Asp Arg Val 165 170 175		
	Gly Val Met Gly Pro Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ser Leu Ala Cys Ala 180 185 190		
	Ala Leu Glu Pro Arg Val Arg Lys Val Val Ser Glu Tyr Pro Phe Leu 195 200 205		
	Ser Asp Tyr Lys Arg Val Trp Asp Leu Asp Leu Ala Lys Asn Ala Tyr 210 215 220		
	Gln Glu Ile Thr Asp Tyr Phe Arg Leu Phe Asp Pro Arg His Glu Arg 225 230 235 240		
[0020]	Glu Asn Glu Val Phe Thr Lys Leu Gly Tyr Ile Asp Val Lys Asn Leu 245 250 255		
	Ala Lys Arg Ile Lys Gly Asp Val Leu Met Cys Val Gly Leu Met Asp 260 265 270		
	Gln Val Cys Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn Asn Ile Gln 275 280 285		
	Ser Lys Lys Asp Ile Lys Val Tyr Pro Asp Tyr Gly His Glu Pro Met 290 295 300		
	Arg Gly Phe Gly Asp Leu Ala Met Gln Phe Met Leu Glu Leu Tyr Ser 305 310 315 320		
	<210> 21		
	<211> 1023		
	<212> DNA		
	<213> 芽孢杆菌属物种 NRRL B-14911		
	<400> 21		
	atgaggacgg ttctgtctcc tgtttttttg gagaggagtg gggagatgaa cctttttgat	60	
	atgccccttg aggagctgca gcattacaag cctgcccaga ccaggcagga tgattttgag	120	
	tcattctgga aaaagcggat tgaggagaac agtcaatatc cgctgaatat agaagtaatg	180	

```

gagcggggttt atccgggttcc gggagtgaga gtatatgata tttattttga cgggttccgg 240
aattcccgcga tccatggggt gtatgttact ccagaaactc cgggagcgga cactcctgcg 300
gcagtgattt ttcacggcta taactggaac acgtgcagc cgcattacag cttaagcac 360
gtgattcagg ggattcctgt actgatggtg gaggtgcggg gacaaaatct cttgtctcca 420
gatagaaatc attatgggaa tggaggtcgg ggaggctgga tgacactcgg cgtgatggat 480
cccgatcaat attattacag cctggtatat atggactget tccgcagcat tgatgctgtc 540
agggaactgt cgaggaagag aagtgtgttt gtggaaggcg gaagccaggg aggtgcactg 600
gcgattgcgg cagccgccct gcaggatgac atcctgcttg cactcgccga catccctttt 660
ctcaccatt tcaagcgttc cgtggagctt tcctcgatg gaccgtatca ggagatttcc 720
cactacttca aagttcatga tcctcttcat caaacggaag agcaggtata tcagacgtc 780
agctatgtgg actgcatgaa catggccagc atggttgaat gtccagtcct tcttcagcc 840
ggctctggaag acatcgtttg tccccgtcc agtgcatttg cactgttcaa ccatctcggc 900
gggccaaaag aaatacgggc ctatccggaa tacgcccagc aagtaccggc tgtccatgaa 960
gaggaagagc tgaagtttat atcttcaagg ctaaaaata gagaaaagag gtgccggcca 1020
tga 1023

```

[0021]

<210> 22
 <211> 340
 <212> PRT
 <213> 芽孢杆菌属物种 NRRL B-14911

<400> 22

Met Arg Thr Val Pro Ala Pro Val Phe Leu Glu Arg Ser Gly Glu Met
1 5 10 15

Asn Leu Phe Asp Met Pro Leu Glu Glu Leu Gln His Tyr Lys Pro Ala
20 25 30

Gln Thr Arg Gln Asp Asp Phe Glu Ser Phe Trp Lys Lys Arg Ile Glu
35 40 45

Glu Asn Ser Gln Tyr Pro Leu Asn Ile Glu Val Met Glu Arg Val Tyr
50 55 60

Pro Val Pro Gly Val Arg Val Tyr Asp Ile Tyr Phe Asp Gly Phe Arg
65 70 75 80

Asn Ser Arg Ile His Gly Val Tyr Val Thr Pro Glu Thr Pro Gly Ala
85 90 95

Asp Thr Pro Ala Ala Val Ile Phe His Gly Tyr Asn Trp Asn Thr Leu

100	105	110
Gln Pro His Tyr Ser Phe Lys His Val Ile Gln Gly Ile Pro Val Leu 115 120 125		
Met Val Glu Val Arg Gly Gln Asn Leu Leu Ser Pro Asp Arg Asn His 130 135 140		
Tyr Gly Asn Gly Gly Pro Gly Gly Trp Met Thr Leu Gly Val Met Asp 145 150 155 160		
Pro Asp Gln Tyr Tyr Tyr Ser Leu Val Tyr Met Asp Cys Phe Arg Ser 165 170 175		
Ile Asp Ala Val Arg Glu Leu Ser Arg Lys Arg Ser Val Phe Val Glu 180 185 190		
Gly Gly Ser Gln Gly Gly Ala Leu Ala Ile Ala Ala Ala Ala Leu Gln 195 200 205		
Asp Asp Ile Leu Leu Ala Leu Ala Asp Ile Pro Phe Leu Thr His Phe 210 215 220		
[0022]		
Lys Arg Ser Val Glu Leu Ser Ser Asp Gly Pro Tyr Gln Glu Ile Ser 225 230 235 240		
His Tyr Phe Lys Val His Asp Pro Leu His Gln Thr Glu Glu Gln Val 245 250 255		
Tyr Gln Thr Leu Ser Tyr Val Asp Cys Met Asn Met Ala Ser Met Val 260 265 270		
Glu Cys Pro Val Leu Leu Ser Ala Gly Leu Glu Asp Ile Val Cys Pro 275 280 285		
Pro Ser Ser Ala Phe Ala Leu Phe Asn His Leu Gly Gly Pro Lys Glu 290 295 300		
Ile Arg Ala Tyr Pro Glu Tyr Ala His Glu Val Pro Ala Val His Glu 305 310 315 320		
Glu Glu Lys Leu Lys Phe Ile Ser Ser Arg Leu Lys Asn Arg Glu Lys 325 330 335		
Arg Cys Arg Pro 340		

[0023]

<400> 24

Arg Gly Ala Arg Ile His Ala Lys Tyr Val Arg Pro Arg His Thr Ser

65	70	75	80
Gly Thr His Pro Ala Val Ile His Phe His Gly Tyr Thr Met Asn Ala	85	90	95
Gly Glu Trp Thr Gly Leu Leu His Tyr Ala Ala Leu Gly Tyr Ser Val	100	105	110
Leu Ala Met Asp Val Arg Gly Gln Gly Gly Leu Ser Glu Asp Thr Gly	115	120	125
Gly Val Lys Gly Asn Thr His Ser Gly His Ile Ile Arg Gly Leu Asp	130	135	140
Asp Asn Ala Asp Gln Leu Leu Phe Arg His Val Phe Leu Asp Thr Ala	145	150	155
Gln Leu Ala Asn Ile Val Met Asn Leu Pro Glu Val Asp Glu Glu Arg	165	170	175
Val Ala Val Thr Gly Trp Ser Gln Gly Gly Ala Leu Ala Ile Ala Cys	180	185	190
[0024]			
Ala Ala Leu Glu Pro Lys Ile Lys Lys Val Ala Pro Val Tyr Pro Phe	195	200	205
Leu Ser Asp Tyr Gln Arg Val Trp Glu Met Asp Leu Ala Glu Lys Ala	210	215	220
Tyr Asp Glu Leu Gln Thr Tyr Phe Arg Arg Phe Asp Pro Gln His Arg	225	230	235
Arg Glu Ala Glu Ile Phe Thr Lys Leu Gly Tyr Ile Asp Ile Gln His	245	250	255
Leu Ala Pro Leu Val Lys Gly Glu Val Leu Leu Ala Val Gly Leu Met	260	265	270
Asp Thr Val Cys Pro Pro Ser Thr Gln Phe Ala Met Tyr Asn Lys Leu	275	280	285
Thr Thr Thr Lys Ser Ile Glu Leu Tyr Pro Asp Phe Ala His Glu Asp	290	295	300
Leu Pro Gly His Arg Asp Arg Ile Phe Gln Phe Leu Ser Asp Leu	305	310	315

<210>	25	
<211>	954	
<212>	DNA	
<213>	克劳氏芽孢杆菌 KSM-K16	
<400>	25	
atgccattag	togatatgcc gttgcgcgag ttgttagctt atgaaggaat aaaccctaaa	60
ccagcagatt	ttgaccaata ctggaaccgg gccaaaacgg aaattgaagc gattgatccc	120
gaagtcactc	tagtgaate ttctttccag tgttcgtttg caaactgtta ccattttctat	180
tatcgaagcg	ctggaaatgc aaaaatccat gcgaaatacg tacagccaaa agcaggggag	240
aagacgccag	cagtttttat gttccatggg tatggggggc gttcagccga atggagcagc	300
ttgttaaatt	atgtagcggc ggggtttttct gttttctata tggacgtgcg tggacaaggt	360
ggaaacttcag	aggatcctgg gggcgtaagg gggaatacat ataggggcca cattattcgc	420
ggcctcgatg	ccgggccaga cgcacttttt taccgcagcg ttttcttgga caccgtccaa	480
ttggttcgtg	ctgctaaaac attgcctcac atcgataaaa cacggcttat ggccacaggg	540
tggtcgcaag	ggggcgccctt aacgcttgcc tgtgctgccc ttgttctga aatcaagcgt	600
cttgcctcag	tatacccggt ttaagcgat tacaagcgag tgtggcaaat ggatttagcg	660
gttcgttcgt	ataaagaatt ggctgattat ttccgttcac acgatccgca acataaacgc	720
catggcgaaa	tttttgaacg ccttggetac atcgatgtcc agcatcttgc tgaccggatt	780
caaggagatg	tcctaatggg agttggttta atggatacag aatgcccgcc gtctacccaa	840
tttgcctgct	ataataaaat aaaggctaaa aaatcgatg agctctatcc tgattttggc	900
catgagcacc	ttccaggaat gaacgatcat atttttcgct ttttactag ttga	954
<210>	26	
<211>	317	
<212>	PRT	
<213>	克劳氏芽孢杆菌 KSM-K16	
<400>	26	
Met Pro Leu Val Asp Met Pro Leu Arg Glu Leu Leu Ala Tyr Glu Gly		
1 5 10 15		
Ile Asn Pro Lys Pro Ala Asp Phe Asp Gln Tyr Trp Asn Arg Ala Lys		
20 25 30		
Thr Glu Ile Glu Ala Ile Asp Pro Glu Val Thr Leu Val Glu Ser Ser		
35 40 45		
Phe Gln Cys Ser Phe Ala Asn Cys Tyr His Phe Tyr Tyr Arg Ser Ala		
50 55 60		
Gly Asn Ala Lys Ile His Ala Lys Tyr Val Gln Pro Lys Ala Gly Glu		

65	70	75	80
Lys Thr Pro Ala Val Phe Met Phe His Gly Tyr Gly Gly Arg Ser Ala	85	90	95
Glu Trp Ser Ser Leu Leu Asn Tyr Val Ala Ala Gly Phe Ser Val Phe	100	105	110
Tyr Met Asp Val Arg Gly Gln Gly Gly Thr Ser Glu Asp Pro Gly Gly	115	120	125
Val Arg Gly Asn Thr Tyr Arg Gly His Ile Ile Arg Gly Leu Asp Ala	130	135	140
Gly Pro Asp Ala Leu Phe Tyr Arg Ser Val Phe Leu Asp Thr Val Gln	145	150	155
Leu Val Arg Ala Ala Lys Thr Leu Pro His Ile Asp Lys Thr Arg Leu	165	170	175
Met Ala Thr Gly Trp Ser Gln Gly Gly Ala Leu Thr Leu Ala Cys Ala	180	185	190
[0026]			
Ala Leu Val Pro Glu Ile Lys Arg Leu Ala Pro Val Tyr Pro Phe Leu	195	200	205
Ser Asp Tyr Lys Arg Val Trp Gln Met Asp Leu Ala Val Arg Ser Tyr	210	215	220
Lys Glu Leu Ala Asp Tyr Phe Arg Ser Tyr Asp Pro Gln His Lys Arg	225	230	235
His Gly Glu Ile Phe Glu Arg Leu Gly Tyr Ile Asp Val Gln His Leu	245	250	255
Ala Asp Arg Ile Gln Gly Asp Val Leu Met Gly Val Gly Leu Met Asp	260	265	270
Thr Glu Cys Pro Pro Ser Thr Gln Phe Ala Ala Tyr Asn Lys Ile Lys	275	280	285
Ala Lys Lys Ser Tyr Glu Leu Tyr Pro Asp Phe Gly His Glu His Leu	290	295	300
Pro Gly Met Asn Asp His Ile Phe Arg Phe Phe Thr Ser	305	310	315

	<210> 27	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 27	
	taactgcagt aaggaggaat aggacatgca actattcgat ctgccgctc	49
	<210> 28	
	<211> 35	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 28	
	tgatctagat taccagcctt taagatgetg cttaa	35
	<210> 29	
	<211> 994	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0027]	<223> 合成构建体	
	<400> 29	
	taactgcagt aaggaggaat aggacatgca actattcgat ctgccgctcg accaattgca	60
	aacatataag cctgaaaaaa cagcaccgaa agatttttct gagttttgga aattgtcttt	120
	ggaggaactt gcaaaagtcc aagcagaacc tgatttacag ccggttgact atcctgetga	180
	cggagtaaaa gtgtaccgtc tcacatataa aagcttcgga aacgcccga ttaccggatg	240
	gtacgcggtg cctgacaage aaggeccgca tccggcgatc gtgaaatate atggctacaa	300
	tgcaagctat gatggtgaga ttcatgaaat ggtaaactgg gcaactccatg gctacgccgc	360
	attcggcgatg cttgtccgcg gccagcagag cagcaggat acgagtattt cactgcaagg	420
	tcacgctttg ggctggatga cgaaaggaat tcttgataaa gatacatact attaccgcgg	480
	tgttttatttg gacgccgtcc gcgcgcttga ggtcatcage agcttcgacg aggttgacga	540
	aacaaggatc ggtgtgacag gaggaagcca aggcggaggt ttaaccattg ccgcagcagc	600
	gctgtcagac attccaaaag ccgcggttgc cgattatcct tatttaagca acttcgaacg	660
	ggccattgat gtggcgcttg aacagccgta ccttgaaatc aattccttct tcagaagaaa	720
	tggcagcccg gaaacagaag tgcaggcgat gaagacactt tcatatctcg atattatgaa	780
	tctcgtgac cgagtgaagg tgccgtgcct gatgtcaatc ggccgtgattg acaaggtcac	840
	gccgccgtcc accgtgtttg ccgcctacaa tcatttgtaa acagagaaaag agctgaaggt	900

	gtaccgctac ttcggacatg agtatatccc tgcttttcaa acggaaaaac ttgctttctt	960
	taagcagcat cttaaagget gataatctag atca	994
	<210> 30	
	<211> 994	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 30	
	taactgcagt aaggaggaat aggacatgca actattcgat ctgccgctcg accaattgca	60
	aacatataag cctgaaaaaa cagcaccgaa agatttttct gagttttgga aattgtcttt	120
	ggaggaactt gcaaaagtcc aagcagaacc tgatttacag ccggttgact atcctgctga	180
	cggagtaaaa gtgtaccgtc tcacatataa aagcttcgga aacgcccga ttaccggatg	240
	gtacgcggtg cctgacaagg aaggcccga tccggcgatc gtgaaatata atggctacaa	300
	tgaagctat gatggtgaga ttcataaat ggtaaaactgg gcactccatg gctacgccac	360
	attcggcatg cttgtccgcg gccagcagag cagcaggat acgagtattt caccgcacgg	420
	tcacgctttg ggctggatga cgaaaggaat tcttgataaa gatacatact attaccgcg	480
[0028]	tgtttatattg gacgccgtcc gcgcgcttga ggatcatcagc agcttcgacg aggttgaaga	540
	aacaaggatc ggtgtgacag gaggaagcca aggcggaggt ttaaccattg ccgcagcagc	600
	gctgtcagac attccaaaag ccgcggttgc cgattatcct tatttaagca acttcgaacg	660
	ggccattgat gtggcgcttg aacagccgta ccttgaaatc aattccttct tcagaagaaa	720
	tggcagcccg gaaacagaag tgcaggcgat gaagacactt tcataatttcg atattatgaa	780
	tctcgtgac cgagtgaagg tgccgttcct gatgtcaatc ggccgtgattg acaaggtcac	840
	gccgccgtcc accgtgtttg ccgcctacaa tcatttggaa acaaagaaag agctgaaggt	900
	gtaccgctac ttcggacatg agtatatccc tgcttttcaa actgaaaaac ttgctttctt	960
	taagcagcat cttaaagget gataatctag atca	994
	<210> 31	
	<211> 960	
	<212> DNA	
	<213> 枯草芽孢杆菌 ATCC 29233	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1).. (960)	
	<400> 31	
	atg caa cta ttc gat ctg ccg ctc gac caa ttg caa aca tat aag cct	48
	Met Gln Leu Phe Asp Leu Pro Leu Asp Gln Leu Gln Thr Tyr Lys Pro	
	1 5 10 15	

[0029]	gaa aaa aca gca ccg aaa gat ttt tct gag ttt tgg aaa ttg tct ttg	96
	Glu Lys Thr Ala Pro Lys Asp Phe Ser Glu Phe Trp Lys Leu Ser Leu	
	20 25 30	
	gag gaa ctt gca aaa gtc caa gca gaa cct gat cta cag ccg gtt gac	144
	Glu Glu Leu Ala Lys Val Gln Ala Glu Pro Asp Leu Gln Pro Val Asp	
	35 40 45	
	tat cct gct gac gga gta aaa gtg tac cgt ctc aca tat aaa agc ttc	192
	Tyr Pro Ala Asp Gly Val Lys Val Tyr Arg Leu Thr Tyr Lys Ser Phe	
	50 55 60	
	gga aac gcc cgc att acc gga tgg tac gcg gtg cct gac aag caa ggc	240
	Gly Asn Ala Arg Ile Thr Gly Trp Tyr Ala Val Pro Asp Lys Gln Gly	
	65 70 75 80	
	ccg cat ccg gcg atc gtg aaa tat cat ggc tac aat gca agc tat gat	288
	Pro His Pro Ala Ile Val Lys Tyr His Gly Tyr Asn Ala Ser Tyr Asp	
	85 90 95	
	ggt gag att cat gaa atg gta aac tgg gca ctc cat ggc tac gcc gca	336
	Gly Glu Ile His Glu Met Val Asn Trp Ala Leu His Gly Tyr Ala Ala	
	100 105 110	
	ttc ggc atg ctt gtc cgc ggc cag cag agc agc gag gat acg agt att	384
	Phe Gly Met Leu Val Arg Gly Gln Gln Ser Ser Glu Asp Thr Ser Ile	
	115 120 125	
	tca ccg cac ggt cac gct ttg ggc tgg atg acg aaa gga att ctt gat	432
	Ser Pro His Gly His Ala Leu Gly Trp Met Thr Lys Gly Ile Leu Asp	
	130 135 140	
	aaa gat aca tac tat tac cgc ggt gtt tat ttg gac gcc gtc cgc gcg	480
	Lys Asp Thr Tyr Tyr Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp Ala Val Arg Ala	
	145 150 155 160	
	ctt gag gtc atc agc agc ttc gac gag gtt gac gaa aca agg atc ggt	528
	Leu Glu Val Ile Ser Ser Phe Asp Glu Val Asp Glu Thr Arg Ile Gly	
	165 170 175	
	gtg aca gga gga agc caa ggc gga ggt tta acc att gcc gca gca gcg	576
	Val Thr Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala Ala Ala	
	180 185 190	
	ctg tca gac att cca aaa gcc gcg gtt gcc gat tat cct tat tta agc	624
	Leu Ser Asp Ile Pro Lys Ala Ala Val Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Ser	
	195 200 205	
	aac ttc gaa cgg gcc att gat gtg gcg ctt gaa cag ccg tac ctt gaa	672
	Asn Phe Glu Arg Ala Ile Asp Val Ala Leu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu	
	210 215 220	
	atc aat tcc ttc ttc aga aga aat ggc agc ccg gaa aca gaa gtg cag	720
	Ile Asn Ser Phe Phe Arg Arg Asn Gly Ser Pro Glu Thr Glu Val Gln	
	225 230 235 240	
	gcg atg aag aca ctt tca tat ttc gat att atg aat ctc gct gac cga	768
	Ala Met Lys Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Met Asn Leu Ala Asp Arg	
	245 250 255	
	gtg aag gtg cct gtc ctg atg tca atc ggc ctg att gac aag gtc acg	816
	Val Lys Val Pro Val Leu Met Ser Ile Gly Leu Ile Asp Lys Val Thr	

	260	265	270	
	c c g c c a t c c a c c g t g t t t g c c g c c t a c a a t c a t t t g g a a c a g a g a a a			864
	Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Glu Lys			
	275	280	285	
	g a g c t g a a g g t g t a c c g c t a c t t c g g a c a t g a g t a t a t c c c t g c t t t t			912
	Glu Leu Lys Val Tyr Arg Tyr Phe Gly His Glu Tyr Ile Pro Ala Phe			
	290	295	300	
	c a a a c g g a a a a a c t t g c t t t c t t t a a g c a g c a t c t t a a a g g c t g a t a a			960
	Gln Thr Glu Lys Leu Ala Phe Phe Lys Gln His Leu Lys Gly			
	305	310	315	
	<210> 32			
	<211> 318			
	<212> PRT			
	<213> 枯草芽孢杆菌 ATCC 29233			
	<400> 32			
	M e t G l n L e u P h e A s p L e u P r o L e u A s p G l n L e u G l n T h r T y r L y s P r o			
	1 5 10 15			
	G l u L y s T h r A l a P r o L y s A s p P h e S e r G l u P h e T r p L y s L e u S e r L e u			
	20 25 30			
[0030]	G l u G l u L e u A l a L y s V a l G l n A l a G l u P r o A s p L e u G l n P r o V a l A s p			
	35 40 45			
	T y r P r o A l a A s p G l y V a l L y s V a l T y r A r g L e u T h r T y r L y s S e r P h e			
	50 55 60			
	G l y A s n A l a A r g I l e T h r G l y T r p T y r A l a V a l P r o A s p L y s G l n G l y			
	65 70 75 80			
	P r o H i s P r o A l a I l e V a l L y s T y r H i s G l y T y r A s n A l a S e r T y r A s p			
	85 90 95			
	G l y G l u I l e H i s G l u M e t V a l A s n T r p A l a L e u H i s G l y T y r A l a A l a			
	100 105 110			
	P h e G l y M e t L e u V a l A r g G l y G l n G l n S e r S e r G l u A s p T h r S e r I l e			
	115 120 125			
	S e r P r o H i s G l y H i s A l a L e u G l y T r p M e t T h r L y s G l y I l e L e u A s p			
	130 135 140			
	L y s A s p T h r T y r T y r T y r A r g G l y V a l T y r L e u A s p A l a V a l A r g A l a			
	145 150 155 160			
	L e u G l u V a l I l e S e r S e r P h e A s p G l u V a l A s p G l u T h r A r g I l e G l y			

	165	170	175	
	Val Thr Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala Ala Ala			
	180	185	190	
	Leu Ser Asp Ile Pro Lys Ala Ala Val Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Ser			
	195	200	205	
	Asn Phe Glu Arg Ala Ile Asp Val Ala Leu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu			
	210	215	220	
	Ile Asn Ser Phe Phe Arg Arg Asn Gly Ser Pro Glu Thr Glu Val Gln			
	225	230	235	240
	Ala Met Lys Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Met Asn Leu Ala Asp Arg			
	245	250	255	
	Val Lys Val Pro Val Leu Met Ser Ile Gly Leu Ile Asp Lys Val Thr			
	260	265	270	
	Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Glu Lys			
	275	280	285	
[0031]	Glu Leu Lys Val Tyr Arg Tyr Phe Gly His Glu Tyr Ile Pro Ala Phe			
	290	295	300	
	Gln Thr Glu Lys Leu Ala Phe Phe Lys Gln His Leu Lys Gly			
	305	310	315	
	<210> 33			
	<211> 24			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 引物			
	<400> 33			
	atgcagcagc cttatgatgt gccg			24
	<210> 34			
	<211> 25			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 引物			
	<400> 34			
	ttatttcaga tgetttctca gaaac			25

[0032]	<210>	35	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	35	
		atggcacaat tatatgatat gcctttg	27
	<210>	36	
	<211>	28	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	36	
		ttacggattc agctcatcca taagtatc	28
[0033]	<210>	37	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	37	
		atgcagctgt ttgacctgag cctg	24
	<210>	38	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	38	
		ttaggtggac agcagcaggt gcttttg	27
[0034]	<210>	39	
	<211>	24	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	39	
		atggttttct ttgacatgcc gctg	24
[0035]	<210>	40	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	40	
		atggctttct ttgacatgcc gctg	24
	<210>	41	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	41	
		atggctttct ttgacatgcc gctg	24

[0033]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 40	
	ttagccttct tcgaacagge gtttcag	27
	<210> 41	
	<211> 978	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 41	
	atggctttct ttgacatgcc gctggaagaa ctgaaaaagt accgtccgga acgttacgag	60
	gaaaaagact ttgacgaatt ttggcgcgaa accctgaaag aatccgaggg ttccccactg	120
	gacccggtat ttgaaaaagt tgacttcac ctgaagaccg tcgaaactta cgacgtcacc	180
	ttcagcggtt atcgtggcca gcgtatcaaa ggttggtgc tggtagcgaa actggcgga	240
	gagaaactgc cgtgtgtgtg tcagtacatt ggttacaacg gtggccgtgg ttccccgcac	300
	gactggctgt tctggcgcgc tatgggttac atctgcttcg ttatggacac ccgtggtcag	360
	ggtagcggtt ggatgaaggg tgatactccg gactaccggg aaggctccgt ggaccgcgag	420
	taccgggct tcatgacgcg cggcatcctg gatcctggca cctattacta ccgtcgtgtg	480
	tttgctgatg ccgtgcgcgc cgttgaagcc gctatcagct tcccacgcgt cgattctcgt	540
	aaagtggtag ttgctggtag ctctcaaggt ggccgcatg cactggcagt ttccgcgctg	600
	tccaaccgtg ttaaagccct gctgtcgat gtccgttc tgtgccactt ccgtcgtgcg	660
	gtacagctgg tggacacca cccgtacgta gaaattacga acttctgaa aaccatcgt	720
	gataaagaag agatcgtatt ccgtaccctg tcttactttg atggcgtaa ttttgcggt	780
	cgtgcaaaag taccggcgtt gttcagcgta ggtctgatgg aactatttg tccgcgctc	840
	accgtattcg cagcctacaa ccactacgtt ggtccgaaag aaatccgcat ctaccgtac	900
	aacaaccacg aaggtggtgg ttctttccag gcaatcgaac aggttaaatt cctgaaacgc	960
	ctgttcgaag aaggctaa	978
	<210> 42	
	<211> 795	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 42	
	atgattgaac aagatggatt gcaecgaggt tctccggccg cttgggtgga gaggtattc	60

```

ggctatgact gggcacaaca gacaatcggc tgctctgatg ccgccgtgtt cggctgtca      120
gcgcaggggc gcccggttct ttttgtcaag accgacctgt ccggtgccct gaatgaactg      180
caggacgagg cagcgcggct atcgtggctg gccacgacgg gcgttccttg cgcagctgtg      240
ctcgacgttg tcaactgaagc gggaaggac tggtctctat tgggcgaagt gccggggcag      300
gatctcctgt catctcacct tgcctctgcc gagaaagtat ccatcatggc tgatgcaatg      360
cggcggctgc atacgcttga tccggctacc tgcccattcg accaccaagc gaaacatcgc      420
atcgagcgag cactactcg gatggaagcc ggtcttctcg atcaggatga tctggacgaa      480
gagcatcagg ggctcgcgcc agccgaactg ttcgccaggg tcaaggcgcg catgcccagc      540
ggcgaggatc tcgtctgac ccatggcgat gcctgcttgc cgaatatcat ggtggaaaat      600
ggccgctttt ctggattcat cgactgtggc cggctgggtg tggcggaccg ctatcaggac      660
atagcgttgg ctaccctga tattgtgaa gagcttggcg gcgaatgggc tgaccgttc      720
ctcgtgcttt acggtatcgc cgtccccgat tcgcagcgca tcgccttcta tcgccttctt      780
gacgagttct tctaa

```

```

<210> 43
<211> 3434
<212> DNA
<213> 人工序列

```

[0034]

```

<220>
<223> 质粒 pKD13

```

```

<400> 43
agattgcagc attacacgtc ttgagcgatt gtgtaggctg gagctgcttc gaagtctcta      60
tactttctag agaataggaa cttcggaata ggaacttcaa gateccctta ttagaagaac      120
tcgtcaagaa ggcgatagaa ggcgatgcgc tgcgaatcgg gagcggcgat accgtaaagc      180
acgaggaagc ggtcagccca ttcgcccca agctcttcag caatatcacg ggtageccaa      240
gctatgtcct gatagcggtc cgccacacc agccggccac agtcgatgaa tccagaaaag      300
cgcccatttt ccacatgat attcggaag caggcatcgc catgggtcac gacgagatec      360
tcgccgtcgg gcatgcgcgc cttgagcctg gcgaacagtt cggttggcgc gagccctga      420
tgctcttcgt ccagatcatc ctgatcgaca agaccggtt ccatccgagt acgtgctcgc      480
tcgatcgat gtttcgcttg gtggtcgaat gggcaggtag ccgcatcaag cgtatgcagc      540
cgccgcattg catcagccat gatggatact ttctcggcag gagcaagggt agatgacagg      600
agatcctgcc ccggcacttc gcccaatage agccagtcct ttcccgttc agtgacaacg      660
tcgagcacag ctgcgaagg aacccccgtc gtggccagcc acgatagccg cgctgcctcg      720
tctgcagtt cattcagggc accggacagg tcggtcttga caaaaagaac cgggcgcccc      780

```

[0035]	tgcgctgaca gccggaacac ggcgcatca gagcagccga ttgtctgttg tgcccagtea	840
	tagccgaata geetctccac ccaagcggee ggagaacctg cgtgcaatcc atcttgttca	900
	atcatgcgaa acgatccctca tectgtctct tgatcagatc ttgatccctt gcgccatcag	960
	atccttggcg gcaagaaage catccagttt actttgcagg gcttcccaac cttaccagag	1020
	ggcgccccag ctggcaattc cggttcgctt gctgtccata aaaccgcccc gtctagctat	1080
	cgccatgtaa gcccactgca agctacctgc tttctctttg cgttgcgtt ttcccttgte	1140
	cagatagecc agtagctgac attcatccgg ggtagcacc gtttctgcgg actggctttc	1200
	tacgtgttcc gtttcttta gcagcccttg cgccctgagt gcttgcggca gcgtgagctt	1260
	caaaagegct ctgaagtcc tatactttct agagaatagg aacttcgaac tgcaggtcga	1320
	cggatccccc gaattaattc tcatgtttga cagcttata ctgatcagtg aattaatggc	1380
	gatgacgcac cctcacgata atatccgggt aggcgcaatc actttcgtct ctactccgtt	1440
	acaaagcgag gctgggtatt tcccgccctt tctgttatcc gaaatccact gaaagcacag	1500
	cggctggctg aggagataaa taataaacga ggggctgtat gcacaaagca tcttctgttg	1560
	agttaagaac gagtatcgag atggcacata gccttgcctc aattggaatc aggtttgtgc	1620
	caataccagt agaaacagac gaagaagcta gctttgcact ggattgcgag gctttgcat	1680
	ggctaattcc catgtcagcc gttaagtgtt cctgtgtcac tgaaaattgc tttagagggc	1740
	tctaagggtt tctcagtgcg ttacatccct ggcttgttgt ccacaaccgt taaaccttaa	1800
	aagctttaa agccttatat attctttttt ttcttataaa acttaaaacc ttagaggcta	1860
	tttaagtgc tgatttatat taattttatt gttcaacat gagagcttag tacgtgaaac	1920
	atgagagctt agtacgttag ccatgagagc ttagtacgtt agccatgagg gtttagttcg	1980
	ttaaacatga gagcttagta cgttaaacat gagagcttag tacgtgaaac atgagagctt	2040
	agtagctact atcaacaggt tgaactgcgg atcttgcggc cgcaaaaatt aaaaatgaag	2100
	ttttaaatca atctaaagta tatatgagta aacttggctt gacagttacc aatgcttaat	2160
	cagtgaggca cctatctcag cgatctgtct atttcgttca tccatagttg cctgactccc	2220
	cgctgtgtag ataactacga tacgggaggg cttaacctct ggcgccagtg ctgcaatgat	2280
	accgcgagac ccacgtcac cggctccaga tttatcagca ataaaccagc cagccggaag	2340
	ggccgagcgc agaagtggte ctgcaacttt atccgcctcc atccagtcta ttaattgttg	2400
	ccgggaagct agagtaagta gttagccagt taatagtttg cgcaacgttg ttgccattgc	2460
	tacaggcatc gtggtgtcac gctcgtcgtt tggtagggtt tcatcagct ccggttccca	2520
	acgatcaagg cgagttacat gateccccat gttgtgcaaa aaagcgggta gctccttcgg	2580
	tcctccgac gttgtcagaa gtaagtggc cgcagtgtta tcaatcatgg ttatggcagc	2640
	actgcataat tctcttactg tcatgccatc cgtaagatgc ttttctgtga ctggtgagta	2700

	ctcaaccaag tcattctgag aatagtgtat gcggcgaccg agttgctctt gcccggcgtc	2760
	aatacgggat aataccgcgc cacatagcag aactttaaaa gtgctcatca ttggaaaacg	2820
	ttcttcgggg cgaaaactct caaggatctt accgctgttg agatccagtt cgatgtaacc	2880
	cactcgtgca cccaactgat cttcagcatc ttttactttc accagcgttt ctgggtgagc	2940
	aaaaacagga aggcaaatg ccgcaaaaaa ggggaataagg gcgacacgga aatgttgaat	3000
	actcatactc ttcttttttc aatattattg aagcatttat cagggttatt gtctcatgag	3060
	cggatacata ttggaatgta tttagaaaaa taaacaaata ggggttccgc gcacatttcc	3120
	ccgaaaagtg ccacctgcat cgatggcccc ccgatggtag tgtggggtct ccccatgcca	3180
	gagtagggaa ctgccaggca tcaaataaaa cgaaaggctc agtcgaaaga ctgggccttt	3240
	cgttttatct gttgtttgtc ggtgaacget ctctgagta ggacaaatcc gccgggagcg	3300
	gatttgaacg ttgcgaagca acggccccga ggggtggcggg caggacgccc gccataaact	3360
	gccaggcatc aaattaagca gaaggccatc ctgaeggatg gcctttttgc gtggccagtg	3420
	ccaagcttgc atgc	3434
[0036]	<210> 44	
	<211> 80	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 44	
	atgagcacgt cagacgatat ccataacacc acagccactg gcaaatgccc gttccatcag	60
	gtgtaggctg gagctgcttc	80
	<210> 45	
	<211> 82	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 45	
	taacagcagg tcgaaacggt cgaggttcat cactttcacc catgccgcca cgaagtcttt	60
	attccgggga tccgtcgacc tg	82
	<210> 46	
	<211> 1424	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	

[0037]	<400> 46	
	taacagcagg tcgaaacggg cgaggttcat cactttcacc catgccgcca cgaagtcttt	60
	attccgggga tccgtcgacc tgcagttcga agttectatt ctctagaaag tataggaact	120
	tcagagcgct tttgaagctc acgctgccgc aagcactcag ggcgcaaggg ctgctaaagg	180
	aagcggaaca cgtagaaagc cagtccgcag aaacgggtgt gaccccgat gaatgtcagc	240
	tactgggcta tctggacaag ggaaaacgca agcgcaaaga gaaagcaggt agcttgcagt	300
	gggcttacat ggcgatagct agactgggcg gttttatgga cagcaagcga accggaattg	360
	ccagctgggg cgccctctgg taaggttggg aagccctgca aagtaaaactg gatggcttct	420
	ttgccgcaaa ggatctgatg gcgcagggga tcaagatctg atcaagagac aggatgagga	480
	tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg cagcagagtt ctccggccgc ttgggtggag	540
	aggctattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggt gctctgatgc cgccgtgttc	600
	cggtgtcag cgccggggcg cccggttctt tttgtcaaga ccgacctgtc cggtgccctg	660
	aatgaactgc aggacgagge agcgcggtta tcgtggctgg ccacgacggg cgttcttgc	720
	gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggaact ggtgtctatt gggcgaagtg	780
	ccggggcagg atctctgtc atctcacctt gctctgcgc agaaagtatc catcatggt	840
	gatgcaatgc ggcggtgca tacgtttgat ccggtacct gccattcga ccaccaagcg	900
	aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagcgc gtcttgctga tcaggatgat	960
	ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggt caaggcgcgc	1020
	atgcccgacg gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg	1080
	gtggaaaatg gccgcttttc tggattcacc gactgtggcc ggtgggtgt ggcggaccgc	1140
	tatcaggaca tagcgttggc tacccgtgat attgctgaag agcttgccgg cgaatgggt	1200
	gaccgttcc tcgtgcttta cggatcgcc gctcccgatt cgcagcgcat cgcttctat	1260
	cgcttcttg acgagttctt ctaataaggg gatcttgaag ttctattcc gaagttccta	1320
	ttctetagaag agtataggaa ctctgaagca gctccagcct acacctgatg gaacgggcat	1380
	ttgccagtgg ctgtggtgtt atggatatcg tctgacgtgc tcat	1424
	<210> 47	
	<211> 2181	
	<212> DNA	
	<213> 大肠杆菌	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1).. (2181)	
	<400> 47	
	atg agc acg tca gac gat atc cat aac acc aca gcc act ggc aaa tgc	48

	Met Ser Thr Ser Asp Asp Ile His Asn Thr Thr Ala Thr Gly Lys Cys 1 5 10 15	
	cgc ttc cat cag ggc ggt cac gac cag agt gcg ggg gcg ggc aca acc Pro Phe His Gln Gly Gly His Asp Gln Ser Ala Gly Ala Gly Thr Thr 20 25 30	96
	act cgc gac tgg tgg cca aat caa ctt cgt gtt gac ctg tta aac caa Thr Arg Asp Trp Trp Pro Asn Gln Leu Arg Val Asp Leu Leu Asn Gln 35 40 45	144
	cat tct aat cgt tct aac cca ctg ggt gag gac ttt gac tac cgc aaa His Ser Asn Arg Ser Asn Pro Leu Gly Glu Asp Phe Asp Tyr Arg Lys 50 55 60	192
	gaa ttc agc aaa tta gat tac tac ggc ctg aaa aaa gat ctg aaa gcc Glu Phe Ser Lys Leu Asp Tyr Tyr Gly Leu Lys Lys Asp Leu Lys Ala 65 70 75 80	240
	ctg ttg aca gaa tct caa ccg tgg tgg cca gcc gac tgg ggc agt tac Leu Leu Thr Glu Ser Gln Pro Trp Trp Pro Ala Asp Trp Gly Ser Tyr 85 90 95	288
	gcc ggt ctg ttt att cgt atg gcc tgg cac ggc gcg ggg act tac cgt Ala Gly Leu Phe Ile Arg Met Ala Trp His Gly Ala Gly Thr Tyr Arg 100 105 110	336
	tca atc gat gga cgc ggt ggc gcg ggt cgt ggt cag caa cgt ttt gca Ser Ile Asp Gly Arg Gly Gly Ala Gly Arg Gly Gln Gln Arg Phe Ala 115 120 125	384
[0038]	ccg ctg aac tcc tgg ccg gat aac gta agc ctc gat aaa gcg cgt cgc Pro Leu Asn Ser Trp Pro Asp Asn Val Ser Leu Asp Lys Ala Arg Arg 130 135 140	432
	ctg ttg tgg cca atc aaa cag aaa tat ggt cag aaa atc tcc tgg gcc Leu Leu Trp Pro Ile Lys Gln Lys Tyr Gly Gln Lys Ile Ser Trp Ala 145 150 155 160	480
	gac ctg ttt atc ctc gcg ggt aac gtg gcg cta gaa aac tcc ggc ttc Asp Leu Phe Ile Leu Ala Gly Asn Val Ala Leu Glu Asn Ser Gly Phe 165 170 175	528
	cgt acc ttc ggt ttt ggt gcc ggt cgt gaa gac gtc tgg gaa ccg gat Arg Thr Phe Gly Phe Gly Ala Gly Arg Glu Asp Val Trp Glu Pro Asp 180 185 190	576
	ctg gat gtt aac tgg ggt gat gaa aaa gcc tgg ctg act cac cgt cat Leu Asp Val Asn Trp Gly Asp Glu Lys Ala Trp Leu Thr His Arg His 195 200 205	624
	ccg gaa gcg ctg gcg aaa gca ccg ctg ggt gca acc gag atg ggt ctg Pro Glu Ala Leu Ala Lys Ala Pro Leu Gly Ala Thr Glu Met Gly Leu 210 215 220	672
	att tac gtt aac ccg gaa ggc ccg gat cac agc ggc gaa ccg ctt tct Ile Tyr Val Asn Pro Glu Gly Pro Asp His Ser Gly Glu Pro Leu Ser 225 230 235 240	720
	gcg gca gca gct atc cgc gcg acc ttc ggc aac atg ggc atg aac gac Ala Ala Ala Ala Ile Arg Ala Thr Phe Gly Asn Met Gly Met Asn Asp 245 250 255	768

[0039]	gaa gaa acc gtg gcg ctg att gcg ggt ggt cat acg ctg ggt aaa acc Glu Glu Thr Val Ala Leu Ile Ala Gly Gly His Thr Leu Gly Lys Thr 260 265 270	816
	cac ggt gcc ggt ccg aca tca aat gta ggt cct gat cca gaa gct gca His Gly Ala Gly Pro Thr Ser Asn Val Gly Pro Asp Pro Glu Ala Ala 275 280 285	864
	ccg att gaa gaa caa ggt tta ggt tgg gcg agc act tac ggc agc ggc Pro Ile Glu Glu Gln Gly Leu Gly Trp Ala Ser Thr Tyr Gly Ser Gly 290 295 300	912
	gtt ggc gca gat gcc att acc tct ggt ctg gaa gta gtc tgg acc cag Val Gly Ala Asp Ala Ile Thr Ser Gly Leu Glu Val Val Trp Thr Gln 305 310 315 320	960
	acg ccg acc cag tgg agc aac tat ttc ttc gag aac ctg ttc aag tat Thr Pro Thr Gln Trp Ser Asn Tyr Phe Phe Glu Asn Leu Phe Lys Tyr 325 330 335	1008
	gag tgg gta cag acc cgc agc ccg gct ggc gca atc cag ttc gaa gcg Glu Trp Val Gln Thr Arg Ser Pro Ala Gly Ala Ile Gln Phe Glu Ala 340 345 350	1056
	gta gac gca ccg gaa att atc ccg gat ccg ttt gat ccg tcg aag aaa Val Asp Ala Pro Glu Ile Ile Pro Asp Pro Phe Asp Pro Ser Lys Lys 355 360 365	1104
	cgt aaa ccg aca atg ctg gtg acc gac ctg acg ctg cgt ttt gat cct Arg Lys Pro Thr Met Leu Val Thr Asp Leu Thr Leu Arg Phe Asp Pro 370 375 380	1152
	gag ttc gag aag atc tct cgt cgt ttc ctc aac gat ccg cag gcg ttc Glu Phe Glu Lys Ile Ser Arg Arg Phe Leu Asn Asp Pro Gln Ala Phe 385 390 395 400	1200
	aac gaa gcc ttt gcc cgt gcc tgg ttc aaa ctg acg cac agg gat atg Asn Glu Ala Phe Ala Arg Ala Trp Phe Lys Leu Thr His Arg Asp Met 405 410 415	1248
	ggg ccg aaa tct cgc tac atc ggg ccg gaa gtg ccg aaa gaa gat ctg Gly Pro Lys Ser Arg Tyr Ile Gly Pro Glu Val Pro Lys Glu Asp Leu 420 425 430	1296
	atc tgg caa gat ccg ctg ccg cag ccg atc tac aac ccg acc gag cag Ile Trp Gln Asp Pro Leu Pro Gln Pro Ile Tyr Asn Pro Thr Glu Gln 435 440 445	1344
	gac att atc gat ctg aaa ttc gcg att gcg gat tct ggt ctg tct gtt Asp Ile Ile Asp Leu Lys Phe Ala Ile Ala Asp Ser Gly Leu Ser Val 450 455 460	1392
	agt gag ctg gta tcg gtg gcc tgg gca tct get tct acc ttc cgt ggt Ser Glu Leu Val Ser Val Ala Trp Ala Ser Ala Ser Thr Phe Arg Gly 465 470 475 480	1440
	ggc gac aaa cgc ggt ggt gcc aac ggt gcg cgt ctg gca tta atg ccg Gly Asp Lys Arg Gly Gly Ala Asn Gly Ala Arg Leu Ala Leu Met Pro 485 490 495	1488
	cag cgc gac tgg gat gtg aac gcc gca gcc gtt cgt get ctg cct gtt Gln Arg Asp Trp Asp Val Asn Ala Ala Ala Val Arg Ala Leu Pro Val 500 505 510	1536

[0040]	ctg gag aaa atc cag aaa gag tct ggt aaa gcc tcg ctg gcg gat atc Leu Glu Lys Ile Gln Lys Glu Ser Gly Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ile 515 520 525	1584
	ata gtg ctg gct ggt gtg gtt ggt gtt gag aaa gcc gca agc gcc gca Ile Val Leu Ala Gly Val Val Gly Val Glu Lys Ala Ala Ser Ala Ala 530 535 540	1632
	ggt ttg agc att cat gta ccg ttt gcg ccg ggt cgc gtt gat gcg cgt Gly Leu Ser Ile His Val Pro Phe Ala Pro Gly Arg Val Asp Ala Arg 545 550 555 560	1680
	cag gat cag act gac att gag atg ttt gag ctg ctg gag cca att gct Gln Asp Gln Thr Asp Ile Glu Met Phe Glu Leu Leu Glu Pro Ile Ala 565 570 575	1728
	gac ggt ttc cgt aac tat cgc gct cgt ctg gac gtt tcc acc acc gag Asp Gly Phe Arg Asn Tyr Arg Ala Arg Leu Asp Val Ser Thr Thr Glu 580 585 590	1776
	tca ctg ctg atc gac aaa gca cag caa ctg acg ctg acc gcg ccg gaa Ser Leu Leu Ile Asp Lys Ala Gln Gln Leu Thr Leu Thr Ala Pro Glu 595 600 605	1824
	atg act gcg ctg gtg ggc ggc atg cgt gta ctg ggt gcc aac ttc gat Met Thr Ala Leu Val Gly Gly Met Arg Val Leu Gly Ala Asn Phe Asp 610 615 620	1872
	ggc agc aaa aac ggc gtc ttc act gac cgc gtt ggc gta ttg agc aat Gly Ser Lys Asn Gly Val Phe Thr Asp Arg Val Gly Val Leu Ser Asn 625 630 635 640	1920
	gac ttc ttc gtg aac ttg ctg gat atg cgt tac gag tgg aaa gcg acc Asp Phe Phe Val Asn Leu Leu Asp Met Arg Tyr Glu Trp Lys Ala Thr 645 650 655	1968
	gac gaa tcg aaa gag ctg ttc gaa ggc cgt gac cgt gaa acc ggc gaa Asp Glu Ser Lys Glu Leu Phe Glu Gly Arg Asp Arg Glu Thr Gly Glu 660 665 670	2016
	gtg aaa ttt acg gcc agc cgt gcg gat ctg gtg ttt ggt tct aac tcc Val Lys Phe Thr Ala Ser Arg Ala Asp Leu Val Phe Gly Ser Asn Ser 675 680 685	2064
	gtc ctg cgt gcg gtg gcg gaa gtt tac gcc agt agc gat gcc cac gag Val Leu Arg Ala Val Ala Glu Val Tyr Ala Ser Ser Asp Ala His Glu 690 695 700	2112
	aag ttt gtt aaa gac ttc gtg gcg gca tgg gtg aaa gtg atg aac ctc Lys Phe Val Lys Asp Phe Val Ala Ala Trp Val Lys Val Met Asn Leu 705 710 715 720	2160
	gac cgt ttc gac ctg ctg taa Asp Arg Phe Asp Leu Leu 725	2181
	<210> 48 <211> 726 <212> PRT <213> 大肠杆菌	

<400> 48

Met Ser Thr Ser Asp Asp Ile His Asn Thr Thr Ala Thr Gly Lys Cys
1 5 10 15

Pro Phe His Gln Gly Gly His Asp Gln Ser Ala Gly Ala Gly Thr Thr
20 25 30

Thr Arg Asp Trp Trp Pro Asn Gln Leu Arg Val Asp Leu Leu Asn Gln
35 40 45

His Ser Asn Arg Ser Asn Pro Leu Gly Glu Asp Phe Asp Tyr Arg Lys
50 55 60

Glu Phe Ser Lys Leu Asp Tyr Tyr Gly Leu Lys Lys Asp Leu Lys Ala
65 70 75 80

Leu Leu Thr Glu Ser Gln Pro Trp Trp Pro Ala Asp Trp Gly Ser Tyr
85 90 95

Ala Gly Leu Phe Ile Arg Met Ala Trp His Gly Ala Gly Thr Tyr Arg
100 105 110

[0041]

Ser Ile Asp Gly Arg Gly Gly Ala Gly Arg Gly Gln Gln Arg Phe Ala
115 120 125

Pro Leu Asn Ser Trp Pro Asp Asn Val Ser Leu Asp Lys Ala Arg Arg
130 135 140

Leu Leu Trp Pro Ile Lys Gln Lys Tyr Gly Gln Lys Ile Ser Trp Ala
145 150 155 160

Asp Leu Phe Ile Leu Ala Gly Asn Val Ala Leu Glu Asn Ser Gly Phe
165 170 175

Arg Thr Phe Gly Phe Gly Ala Gly Arg Glu Asp Val Trp Glu Pro Asp
180 185 190

Leu Asp Val Asn Trp Gly Asp Glu Lys Ala Trp Leu Thr His Arg His
195 200 205

Pro Glu Ala Leu Ala Lys Ala Pro Leu Gly Ala Thr Glu Met Gly Leu
210 215 220

Ile Tyr Val Asn Pro Glu Gly Pro Asp His Ser Gly Glu Pro Leu Ser
225 230 235 240

Ala Ala Ala Ala Ile Arg Ala Thr Phe Gly Asn Met Gly Met Asn Asp

	245	250	255
	Glu Glu Thr Val Ala Leu Ile Ala Gly Gly His Thr Leu Gly Lys Thr 260 265 270		
	His Gly Ala Gly Pro Thr Ser Asn Val Gly Pro Asp Pro Glu Ala Ala 275 280 285		
	Pro Ile Glu Glu Gln Gly Leu Gly Trp Ala Ser Thr Tyr Gly Ser Gly 290 295 300		
	Val Gly Ala Asp Ala Ile Thr Ser Gly Leu Glu Val Val Trp Thr Gln 305 310 315 320		
	Thr Pro Thr Gln Trp Ser Asn Tyr Phe Phe Glu Asn Leu Phe Lys Tyr 325 330 335		
	Glu Trp Val Gln Thr Arg Ser Pro Ala Gly Ala Ile Gln Phe Glu Ala 340 345 350		
	Val Asp Ala Pro Glu Ile Ile Pro Asp Pro Phe Asp Pro Ser Lys Lys 355 360 365		
[0042]	Arg Lys Pro Thr Met Leu Val Thr Asp Leu Thr Leu Arg Phe Asp Pro 370 375 380		
	Glu Phe Glu Lys Ile Ser Arg Arg Phe Leu Asn Asp Pro Gln Ala Phe 385 390 395 400		
	Asn Glu Ala Phe Ala Arg Ala Trp Phe Lys Leu Thr His Arg Asp Met 405 410 415		
	Gly Pro Lys Ser Arg Tyr Ile Gly Pro Glu Val Pro Lys Glu Asp Leu 420 425 430		
	Ile Trp Gln Asp Pro Leu Pro Gln Pro Ile Tyr Asn Pro Thr Glu Gln 435 440 445		
	Asp Ile Ile Asp Leu Lys Phe Ala Ile Ala Asp Ser Gly Leu Ser Val 450 455 460		
	Ser Glu Leu Val Ser Val Ala Trp Ala Ser Ala Ser Thr Phe Arg Gly 465 470 475 480		
	Gly Asp Lys Arg Gly Gly Ala Asn Gly Ala Arg Leu Ala Leu Met Pro 485 490 495		

Gln Arg Asp Trp Asp Val Asn Ala Ala Ala Val Arg Ala Leu Pro Val
500 505 510

Leu Glu Lys Ile Gln Lys Glu Ser Gly Lys Ala Ser Leu Ala Asp Ile
515 520 525

Ile Val Leu Ala Gly Val Val Gly Val Glu Lys Ala Ala Ser Ala Ala
530 535 540

Gly Leu Ser Ile His Val Pro Phe Ala Pro Gly Arg Val Asp Ala Arg
545 550 555 560

Gln Asp Gln Thr Asp Ile Glu Met Phe Glu Leu Leu Glu Pro Ile Ala
565 570 575

Asp Gly Phe Arg Asn Tyr Arg Ala Arg Leu Asp Val Ser Thr Thr Glu
580 585 590

Ser Leu Leu Ile Asp Lys Ala Gln Gln Leu Thr Leu Thr Ala Pro Glu
595 600 605

Met Thr Ala Leu Val Gly Gly Met Arg Val Leu Gly Ala Asn Phe Asp
610 615 620

[0043]

Gly Ser Lys Asn Gly Val Phe Thr Asp Arg Val Gly Val Leu Ser Asn
625 630 635 640

Asp Phe Phe Val Asn Leu Leu Asp Met Arg Tyr Glu Trp Lys Ala Thr
645 650 655

Asp Glu Ser Lys Glu Leu Phe Glu Gly Arg Asp Arg Glu Thr Gly Glu
660 665 670

Val Lys Phe Thr Ala Ser Arg Ala Asp Leu Val Phe Gly Ser Asn Ser
675 680 685

Val Leu Arg Ala Val Ala Glu Val Tyr Ala Ser Ser Asp Ala His Glu
690 695 700

Lys Phe Val Lys Asp Phe Val Ala Ala Trp Val Lys Val Met Asn Leu
705 710 715 720

Asp Arg Phe Asp Leu Leu
725

<210> 49
<211> 6329
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 质粒 pKD46

<400> 49

catcgattta ttatgacaac ttgacggeta catcattcac tttttcttca caaccggcac	60
ggaactcgct cgggctggcc cgggtgcatt ttttaatac ccgcgagaaa tagagttgat	120
cgtaaaaacc aacattgcga ccgacgggtg cgataggeat ccgggtgggtg ctcaaaagca	180
gcttcgcctg gctgatacgt tggtcctcgc gccagcttaa gacgctaata cctaactgct	240
ggcgaaaaag atgtgacaga cgcgacggcg acaagcaaac atgctgtgcg acgctggcga	300
tatcaaaatt gctgtctgcc aggtgategc tgatgtactg acaagcctcg cgtaccgat	360
tatccatcgg tggatggagc gactcgtaa tgccttccat gcgcgcgagt aacaattgct	420
caagcagatt tatcgccage agctccgaat agcgccttc cccttgcctg gcgttaatga	480
tttgccaaa caggctcgtg aaatgcggct ggtgcgcttc atccgggcga aagaaccccg	540
tattggcaaa tattgacggc cagttaagcc attcatgcca gtaggcgcgc ggacgaaagt	600
aaaccactg gtgataccat tcgcgagcct ccgatgacg accgtagtga tgaatctctc	660
ctggcgggaa cagcaaaata tcaccggtc ggcaaaaaa ttctcgtccc tgatttttca	720
ccacccctg acegcgaatg gtgagattga gaataaacc ttcattecc agcggtcggt	780
cgataaaaaa atcgagataa ccgttgcct caatcgcgct taaacccgcc accagatggg	840
cattaaacga gtatcccgcc agcaggggat cattttgcgc ttcagccata cttttcatac	900
tcccgcatt cagagaagaa accaattgtc catattgcat cagacattgc cgtcactgcg	960
tcttttactg gctcttctcg ctaaccaaac cggtaacccc gcttattaaa agcattctgt	1020
aacaaagcgg gaccaaagcc atgacaaaaa cgcgtaacaa aagtgtctat aatcacggca	1080
gaaaagtcca cattgattat ttgcacggcg tcacactttg ctatgccata gcatttttat	1140
ccataagatt agcggatcct acctgacgct ttttatcgca actctctact gtttctccat	1200
accggttttt ttgggaattc gagctctaag gaggttataa aaaatggata ttaatactga	1260
aactgagatc aagcaaaagc attcaatac ccccttccct gttttcctaa tcagcccggc	1320
atttcgctgg cgatattttc acagctatct caggagtcca gccatgaacg ctatttacat	1380
tcaggatcgt cttgagctc agagctgggc gcgtcactac cagcagctcg cccgtgaaga	1440
gaaagaggca gaactggcag acgacatgga aaaaggcctg cccagcacc tgtttgaatc	1500
gctatgcate gatcatttgc aacgccacgg ggccagcaaa aaatccatta cccgtgcgtt	1560
tgatgacgat gttgagtttc aggagcgcac ggacgaacac atccggtaca tgggtgaaac	1620
cattgctcac caccaggttg atattgattc agaggtataa aacgaatgag tactgcactc	1680
gcaacgctgg ctgggaagct ggctgaacgt gtcggcatgg attctgtcga cccacaggaa	1740

[0044]

	ctgatcacca ctcttcgcca gacggcattt aaaggtgatg ccagcgatgc gcagttcate	1800
	gcattactga tcgttgccaa ccagtaacggc cttaatccgt ggacgaaaga aatttacgcc	1860
	tttcttgata agcagaatgg catcgttccg gtgggtggcg ttgatggctg gteccgcate	1920
	atcaatgaaa accagcagtt tgatggcatg gactttgagc aggacaatga atcctgtaca	1980
	tgccggattt accgcaagga ccgtaatcat ccgatctcg ttaccgaatg gatggatgaa	2040
	tgccgccgcg aaccattcaa aactcgcgaa ggcagagaaa tcacggggcc gtggcagtcg	2100
	catcccaaac ggatgttacg tcataaagcc atgattcagt gtgccctctt ggccttcgga	2160
	tttgctggta tctatgacaa ggatgaagcc gagegcattg tcgaaaatac tgcatacact	2220
	gcagaacgtc agccggaacg cgacatcact ccggttaacg atgaaacat gcaggagatt	2280
	aacactctgc tgatcgccct ggataaaaca tgggatgacg acttattgcc gctctgttcc	2340
	cagatatttc gccgcgacat tcgtgcatcg tcagaactga cacaggccga agcagtaaaa	2400
	gctcttggat tcttgaacaa gaaagccgca gagcagaagg tggcagcatg acaccggaca	2460
	ttatcctgca gcgtaccggg atcgatgtga gagctgtcga acagggggat gatgcgtggc	2520
	acaaattacg gctcggcgtc atcacgcctt cagaagtcca caacgtgata gcaaaacccc	2580
	gctccggaaa gaagtggcct gacatgaaaa tgctctactt ccacacctg cttgtgagg	2640
[0045]	tttgcaaccgg tgtggctccg gaagttaacg ctaaagcact ggcttgggga aaacagtacg	2700
	agaacgacgc cagaacctg tttgaattca ctccggcgt gaatgttact gaatccccga	2760
	tcctctatcg cgacgaaagt atgcgtaccg cctgctctcc cgatggttta tgcagtacg	2820
	gcaacggcct tgaactgaaa tgcccgttta cctcccgga tttcatgaag ttccggtcgc	2880
	gtggtttcga ggccataaag tcagettaca tggeccaggc gcagtacagc atgtgggtga	2940
	cgcgaaaaaa tgccgtgtac ttgccaact atgaccgcg tatgaagcgt gaaggcctgc	3000
	attatgtcgt gattgagcgg gatgaaaagt acatggcgag ttttgacgag atcgtccgg	3060
	agttcatcga aaaaatggac gaggcactgg ctgaaattgg tttgtattt ggggagcaat	3120
	ggcgatgacg catcctcacg ataatatccg ggtaggcgca atcaatttcg tctactccgt	3180
	tacaaagcga ggctgggtat ttcccgccct ttctgttata cgaaatccac tgaaagcaca	3240
	gcggttggtt gaggagataa ataataaacg aggggctgta tgcacaaagc atcttctgtt	3300
	gagttaagaa cgagtatcga gatggcacat agccttgctc aaattggaat caggtttgtg	3360
	ccaataccag tagaaacaga cgaagaatcc atgggtatgg acagttttcc ctttgatatg	3420
	taacggtgaa cagttgttct acttttgttt gtagtcttg atgttccact gatagataca	3480
	agagccataa gaacctcaga tccttcgta tttagccagt atgttctcta gtgtggttcg	3540
	ttgtttttgc gtgagccatg agaacgaacc attgagatca tacttacttt gcattgcaact	3600

	caaaaatttt gcctcaaaac tggtagctg aatttttgca gttaaagcat cgtgtagtgt	3660
	ttttcttagt cegttacgta ggtaggaatc tgatgtaatg gttgttggtta tttgtcacc	3720
	attcattttt atctggttgt tctcaagttc ggttacgaga tccatttgtc tatctagttc	3780
	aacttggaat atcaacgtat cagtcgggag gcctcgctta tcaaccacca atttcatatt	3840
	gctgtaagtg tttaaatctt tacttattgg tttcaaaacc cattgggtta gcctttttaa	3900
	ctcatggtag ttattttcaa gcattaacat gaacttaaat tcatcaaggc taatctctat	3960
	atttgccttg tgagttttct tttgtgttag ttcttttaat aaccactcat aaatcctcat	4020
	agagtatttg ttttcaaaag acttaacatg ttccagatta tattttatga atttttttaa	4080
	ctggaaaaga taaggcaata tctcttcaat aaaaactaat tctaattttt cgttgagaa	4140
	cttggcatag tttgtccact ggaaaatctc aaagccttta accaaaggat tctgatttc	4200
	cacagttctc gtcacagct ctctggttgc tttagctaat acaccataag cattttcct	4260
	actgatgttc atcatctgag cgtatttggt ataagtgaac gataccgtcc gttctttcct	4320
	tgtagggttt tcaatcgtgg ggttgagtag tgccacacag cataaaatta gcttggttcc	4380
	atgtccgtt aagtcatagc gactaatcgc tagttcatth gctttgaaaa caactaattc	4440
	agacatacat ctcaattggt ctaggtgatt ttaatcacta taccaattga gatgggctag	4500
[0046]	tcaatgataa ttactagtc ttttctttg agttgtgggt atctgtaaat tctgctagac	4560
	ctttgctgga aaacttgtaa attctgctag accctctgta aattccgcta gacctttgtg	4620
	tgtttttttt gtttatattc aagtgttat aatttataga ataaagaaag aataaaaaaa	4680
	gataaaaaga atagatccca gccctgtgta taactcacta ctttagtcag ttccgcagta	4740
	ttacaaaagg atgtcgcaaa cgtgtttgc tctctacaa aacagacctt aaaacctaa	4800
	aggettaagt agcaccctcg caagctcgtt tgcggccgca atcgggcaaa tcgctgaata	4860
	ttccttttgt ctccgacct caggcacctg agtcgtgtc ttttctgtga cattcagttc	4920
	gctgcgtca cggtctggc agtgaatggg ggtaaatggc actacaggcg ctttttatgg	4980
	attcatgcaa ggaaactacc cataatacaa gaaaagcccg tcacgggctt ctcaggcggt	5040
	tttatggcgg gtctgctatg tgggtctatc tgactttttg ctgttcagca gttctgccc	5100
	tctgattttc cagctgacc acttcggatt atccctgac aggtcattca gactggctaa	5160
	tgcaccagct aaggcagcgg tatcatcaac ggggtctgac gctcagtga acgaaaactc	5220
	acgttaaggg attttgtca tgagattatc aaaaaggatc ttcacctaga tctttttaa	5280
	ttaaaaatga agtttttaaa caatctaaag tatatatgag taaacttggc ctgacagtta	5340
	ccaatgctta atcagtgagg cactatctc agcgatctgt ctatttcgtt catccatagt	5400
	tgctgactc cccgtcgtgt agataactac gatacgggag ggcttaccat ctggccccag	5460
	tgctgcaatg ataccgcgag acccagctc accggtcca gatttatcag caataacca	5520

	gccagccgga agggccgagc gcagaagtgg tcctgcaact ttatccgect ccatccagtc	5580
	tattaattgt tgccgggaag ctagagtaag tagttegcca gttaatagtt tgcgcaacgt	5640
	tgttgccatt gctacaggca tcgtgggtgc acgctcgctg tttggtatgg cttcattcag	5700
	ctccggttcc caacgatcaa ggcgagttac atgatecccc atgttgtgca aaaaagcggt	5760
	tagtccttc ggctctccga tcgttgtcag aagtaagttg gccgcagtgt tatcactcat	5820
	ggttatggca gcaactgcata attctcttac tgtcatgcca tccgtaagat gcttttctgt	5880
	gactgggtgag tactcaacca agtcattctg agaatagttg atgcggcgac cgagttgctc	5940
	ttgcccggcg tcaatacggg ataataccgc gccacatagc agaactttaa aagtgtcat	6000
	cattggaaaa cgttcttcgg ggcgaaaact ctcaaggatc ttaccgctgt tgagatccag	6060
	ttcgatgtaa cccactcgtg caccacaactg atcttcagca tcttttactt tcaccagegt	6120
	ttctgggtga gcaaaaacag gaaggcaaaa tgccgcaaaa aagggaataa gggcgacacg	6180
	gaaatgttga atactcatac tcttctttt tcaatattat tgaagcattt atcagggtta	6240
	ttgtctcatg agcggataca tatttgaatg tatttagaaa aataaacaaa taggggttcc	6300
	gcgcacattt ccccgaaaag tgccacctg	6329
[0047]	<210> 50	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 50	
	aacaatatgt aagatctcaa ctatc	25
	<210> 51	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 51	
	cagacatgag agatccagtg tgtag	25
	<210> 52	
	<211> 9332	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 质粒 pCP20	
	<400> 52	

[0048]	gagacacaac gtggctttgt tgaataaatc gaacttttgc tgagttgaag gatcagatca	60
	cgcattcttc cgacaacgca gaccgttccg tggcaaagca aaagttcaaa atcaccaact	120
	gggccacctc caacaaagct ctcatcaacc gtggctccct cactttctgg ctggatgatg	180
	gggcgattca ggccctggat gagtcagcaa caccttcttc acgaggcaga cctcagcgcc	240
	acagggtcgg ttgctggcgc taaccgtttt tatcaggctc tgggaggcag aataaatgat	300
	catatcgtca attattacct ccacggggag agcctgagca aactggcctc aggcatttga	360
	gaagcacacg gtcacactgc ttccggtagt caataaacgg gtaaaccagc aatagacata	420
	agcggctatt taacgacct gccctgaacc gacgaccggg tcgaatttgc tttcgaattt	480
	ctgccattca tccgttatt atcaattatt caggcgtage aaccaggcgt ttaagggcac	540
	caataactgc cttaaaaaaa ttacgccccg ccctgccact catcgcagta ctgttgtaat	600
	tcattaagca ttctgccgac atggaagcca tcacaaacgg catgatgaac ctgaatgcc	660
	agcggcatca gcaccttgtc gccttgcgta taatatttgc ccatggtgaa aacgggggcg	720
	aagaagttgt ccatatttgc caggtttaa tcaaaactgg tgaaactcac ccagggtattg	780
	gctgagacga aaaacatatt ctcaataaac cctttaggga aataggccag gttttcacg	840
	taacacgcca catcttgcga atatatgtgt agaaactgcc ggaaatcgtc gtggtattca	900
	ctccagagcg atgaaaacgt ttacgtttgc tcatggaaaa cgggtgaaca aggggtgaaca	960
	ctatcccata tcaccagctc accgtcttctc attgccatac ggaattccgg atgagcattc	1020
	atcaggcggg caagaatgtg aataaaggcc ggataaaact tgtgcttatt tttctttacg	1080
	gtctttaaaa aggccgtaat atccagctga acggctctgg tataggtaca ttgagcaact	1140
	gactgaaatg cctcaaaatg ttctttacga tgccattggg atatatcaac ggtggtatat	1200
	ccagtgattt tttctccat tttagcttcc ttagctcctg aaaatctcga taactcaaaa	1260
	aatacgcctg gtagtgatct tatttcatta tgggtgaaat tggaacctct tacgtgccga	1320
	tcaacgtctc attttcgcca aaagttggcc cagggtctcc cggtatcaac agggacacca	1380
	ggatttattt attctgcgaa gtgatcttcc gtcacaggta tttattcggc gcaaagtgcg	1440
	tcgggtgatg ctgccaactt actgatttag tgtatgatgg tgtttttgag gtgetccagt	1500
	ggcttctgtt tctatcagct gtccctcctg ttcagctact gacgggtggg tgcgtaacgg	1560
	caaaagcacc gccggacatc ageccttggt tcggcgtggg tatggtggca ggccccgtgg	1620
	ccgggggact gttgggcgcc tgtagtgcca tttaccccca ttcactgcca gagccgtgag	1680
	cgcagcgaac tgaatgtcac gaaaaagaca gcactcagg tgccctgatgg tcggagacaa	1740
	aaggaaatatt cagcgatttg cccgagcttg cgagggtgct acttaagcct ttagggtttt	1800
	aaggctctgtt ttgtagagga gcaaacagcg tttgcgacat ccttttgtaa tactgcggaa	1860
	ctgactaaag tagtgagtta tacacagggc tgggatctat tctttttatc tttttttatt	1920

	ctttctttat tctataaatt ataaccactt gaatataaac aaaaaaaca cacaaaggtc	1980
	tagcgggaatt tacagagggt ctacgagaat ttacaagttt tccagcaaag gtctagcaga	2040
	atttacagat acccacaact caaaggaaaa ggactagtaa ttatcattga ctagcccatc	2100
	tcaattggta tagtgattaa aatcacctag accaattgag atgtatgtct gaattagttg	2160
	ttttcaaagc aaatgaacta gcgattagtc gctatgactt aacggagcat gaaaccaagc	2220
	taattttatg ctgtgtggca ctactcaacc ccacgattga aaacctaca aggaaagaac	2280
	ggacggatc gttcacttat aaccaatacg ttcagatgat gaacatcagt agggaaaatg	2340
	cttatgggtg attagctaaa gcaaccagag agctgatgac gagaactgtg gaaatcagga	2400
	atcctttggt taaaggcttt gagattttcc agtggacaaa ctatgccaag ttctcaagcg	2460
	aaaaattaga attagttttt agtgaagaga tattgcctta tcttttcag ttaaaaaaat	2520
	tcataaaaata taatctggaa catgttaagt cttttgaaaa caaatactct atgaggattt	2580
	atgagtgggt attaaaagaa ctaacacaaa agaaaactca caaggcaa atagagatta	2640
	gccttgatga atttaagttc atgttaatgc ttgaaaataa ctacatgag tttaaaaggc	2700
	ttaaccaatg ggttttgaaa ccaataagta aagatttaaa cacttacagc aatatgaaat	2760
	tggtgggtga taagcgaggc cgcccgactg atacgttgat tttccaagtt gaactagata	2820
[0049]	gacaaatgga tctcgtaacc gaacttgaga acaaccagat aaaaatgaat ggtgacaaaa	2880
	taccaacaac cattacatca gattcctacc tacataacgg actaagaaaa acactacacg	2940
	atgctttaac tgcaaaaatt cagctcacca gttttgaggc aaaatttttg agtgacatgc	3000
	aaagtaagta tgatctcaat ggttcgttct catggctcac gcaaaaacaa cgaaccacac	3060
	tagagaacat actggctaaa tacggaagga tctgaggttc ttatggctct tgtatctatc	3120
	agtgaagcat caagactaac aaacaaaagt agaacaactg ttcaccgtta catatcaaag	3180
	ggaaaactgt ccatatgcac agatgaaaac ggtgtaaaaa agatagatac atcagagctt	3240
	ttacgagttt ttggtgcatt taaagctgtt caccatgaac agatcgacaa tgtaacagat	3300
	gaacagcatg taacacctaa tagaacaggt gaaaccagta aaacaaagca actagaacat	3360
	gaaattgaac acctgagaca acttggtaca gctcaacagt cacacataga cagcctgaaa	3420
	caggcgatgc tgcttatcga atcaaagctg ccgacaacac gggagccagt gacgcctccc	3480
	gtggggaaaa aatcatggca attctggaag aaatagcgcc tgtttcgttt caggcaggtt	3540
	atcagggagt gtcagcgtcc tgcggttctc cggggcgttc gggtcatgca gcccgtaatg	3600
	gtgatttacc agcgtctgcc aggcattcaat tctaggcctg tctgcgcggt cgtagtacgg	3660
	ctggaggcgt tttccggtct gtagctccat gttecggaatg acaaaattca gctcaagccg	3720
	tcccttgtec tgggtgtcca cccacaggat getgtactga tttttttcga gaccgggcat	3780

[0050]	cagtacacgc tcaaagctcg ccatcacttt ttcacgtcct cccggcggca gctccttctc	3840
	cgcgaaacgac agaacaccgg agctgtatatt cttegcaaat ggctgtggcat cgatgagttc	3900
	ccggactttct tccggattac cctgaagcac cgttgccctc tcgcggttac gctccctccc	3960
	cagcaggtaa tcaaccggac cactgccacc accttttccc ctggcatgaa atttaactat	4020
	catcccgcgc cccctgttcc ctgacagcca gacgcagccg gcgcagctca tccccgatgg	4080
	ccatcagtgc ggccaccacc tgaaccgggt caccggaaga ccaactgccg ctgttcacct	4140
	tacgggctgt ctgattcagg ttatttccga tggcggccag ctgacgcagt aacggcggtg	4200
	ccagtgtcgg cagttttccg gaacgggcaa ccggctcccc caggcagacc cgccgcatcc	4260
	ataccgccag ttgtttacce tcacagcgtt caagtaaccg ggcatgttca tcatcagtaa	4320
	cccgatttgt gagcctctc tegegtttca tcggatcat taccctatga acagaaatcc	4380
	cccttacacg gaggcacag tgactaaacg gggctctgacg ctacgtggaa cgaaaactca	4440
	cgtaaaggga ttttggctcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ccttttaaat	4500
	taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttac	4560
	caatgcttaa tcagtgggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc atccatagtt	4620
	gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc tggccccagt	4680
	gctgcaatga taccgcgaga ccacgcctca ccggctccag atttatcage aataaaccag	4740
	ccagccggaa gggccgagcg cagaagtgggt cctgcaactt tatccgctc catccagtct	4800
	attaattgtt gccgggaagc tagagtaagt agttgccag ttaatagttt gcgcaacgtt	4860
	gttgccattg ctgcaggcat cgtgggtgca cgtcgtcgt ttggtatggc ttcatcage	4920
	tccggtccc aacgatcaag gcgagttaca tgatecccca tgttgtgcaa aaaagcgggt	4980
	agctccttcg gtctccgat cgtttgcaga agtaagtgg ccgcagtgtt atcactcatg	5040
	gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgcat ccgtaagatg cttttctgtg	5100
	actggtgagt actcaacca gtcattctga gaatagtga tgcggcgacc gatttgctct	5160
	tgcccgcgct caacacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa agtgcctc	5220
	attgaaaaac gttcttcggg gegaaaactc tcaaggatct taccgtgtt gagatccagt	5280
	tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt caccagcgtt	5340
	tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaa agggaataag ggcgacacgg	5400
	aaatgttgaa tactcatact ctctcttttt caatattatt gaagcattta tcagggttat	5460
	tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat aggggttccg	5520
	cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat catgacatta	5580
	acctataaaa ataggcgtat caccaggccc ttctgtcttc aagaatttta taaaccgtgg	5640
	agcgggcaat actgagctga tgagcaattt ccgttgacc agtgccttc tgatgaagcg	5700

	tcagcacgac gttcctgtcc acggtacgcc tgcggccaaa tttgattcct ttcagctttg	5760
	cttctgtcg gccctcatte gtgcgtctta ggatcctcta cgcggagcgc atcgtggcgc	5820
	gcatacccg cgctgaggtc tgcctcgtga agaagggtgt gctgactcat accaggcctg	5880
	aatcgcccca tcatccagcc agaaagttag ggagccacgg ttgatgagag ctttgttgta	5940
	ggtggaccag ttggtgattt tgaacttttg ctttgccacg gaacggctctg cgttgctggg	6000
	aagatgcgtg atctgatcct tcaactcagc aaaagtctga tttattcaac aaagccgcgc	6060
	tcccgtaag tcagcgtaat gctctgccag tgttacaacc aattaacca ttctgattag	6120
	aaaaactcat cgagcatcaa atgaaactgc aatttattca tctcaggatt atcaatacca	6180
	tatttttgaa aaagccgttt ctgtaatgaa ggagaaaact caccgaggca gttccatagg	6240
	atggcaagat cctggatcgc gtctgcgatt ccgactcgtc caacatcaat acaacctatt	6300
	aatttccct cgtcaaaaat aaggttatca agtgagaaat caccatgagt gacgactgaa	6360
	tccggtgaga atggcagaat aggaacttcg gaataggaaac ttcaaagcgt ttccgaaaac	6420
	gagcgttcc gaaaatgcaa cgcgagctgc gcacatacag ctcaactgtc acgtcgcacc	6480
	tatatctgcg tgttgccgtg atatatatat acatgagaag aacggcatag tgcgtgttta	6540
	tgtttaaag cgtacttata tgcgtctatt tatgtaggat gaaaggtagt ctagtacctc	6600
[0051]	ctgtgatatt atccattcc atgcggggta tegtatgett ccttcagcac tacccttag	6660
	ctgttctata tgcctccact cctcaattgg attagtctca tcttcaatg ctatcatctc	6720
	ctttgatatt ggatcatatg catagtaccg agaaactagt gcgaagtagt gatcaggtag	6780
	tgcgtttatc tgatgagtat acgttgctct ggccacggca gaagcacgt tatcgtccca	6840
	atttcccaca acattagtca actccgttag gcccttcatt gaaagaaatg aggtcatcaa	6900
	atgtcttcca atgtgagatt ttgggccatt tttatagca aagattgaat aaggcgcatt	6960
	tttcttcaaa gctttattgt acgatctgac taagttatct ttttaataatt ggtattcctg	7020
	tttattgett gaagaattgc cggctctatt tactcgtttt aggactgggt cagaattcct	7080
	caaaaattca tccaaatata caagtggatc gatectaccc cttgcgctaa agaagtatat	7140
	gtgcctacta acgcttgtct ttgtctctgt cactaaacac tggattatta ctcccagata	7200
	cttatttttg actaatttaa atgatttcgg atcaacgttc ttaatatcgc tgaatcttcc	7260
	acaattgatg aaagtagcta ggaagaggaa ttggtataaa gtttttgttt ttgtaaatct	7320
	cgaagtatac tcaaacgaat ttagtatttt ctcaagtatc tcccagatgc tttaccctc	7380
	acttagaagt gctttaagca ttttttact gtggtatatt cccttatctg cttcttccga	7440
	tgattcgaac tgtaattgca aactacttac aatatcagtg atatcagatt gatgtttttg	7500
	tccatagtaa ggaataattg taaattccca agcaggaatc aatttcttta atgaggettc	7560

	cagaattgtt gctttttgcg tcttgtatit aaactggagt gatttattga caatategaa	7620
	actcagegaa ttgcttatga tagtattata gctcatgaat gtggetctct tgattgctgt	7680
	tccgttatgt gtaatcatcc aacataaata ggtagttca gcagcacata atgctatit	7740
	ctcacctgaa ggtctttcaa acctttccac aaactgacga acaagcacct taggtggtgt	7800
	ttacataat atatcaaatt gtggcataca acctccttag tacatgcaac cattatcacc	7860
	gccagaggta aaatagtcaa cacgcacggt gttagatatt tatcccttgc ggtgatagat	7920
	ttaacgtatg agcacaaaaa agaaaccatt aacacaagag cagcttgagg acgcacgtcg	7980
	ccttaaagca atttatgaaa aaaagaaaaa tgaacttggc ttatcccagg aatctgtcgc	8040
	agacaagatg gggatggggc agtcaggcgt tgggtgcttta tttaatggca tcaatgcatt	8100
	aaatgcttat aacgcgcgat tgcctacaaa aattctcaaa gttagcgttg aagaatttag	8160
	ccctcaatc gccagagaaa tctacgagat gtatgaagcg gttagtatgc agcgcact	8220
	tagaagttag tatgagtacc ctgttttttc tcatgttcag gcagggatgt tctcacctaa	8280
	gcttagaacc ttaccaaaag gtgatgcgga gagatgggta agcacacca aaaaagccag	8340
	tgattctgca ttctggcttg aggttgaagg taattccatg accgcacca caggctccaa	8400
	gccaaagctt cctgacggaa tgttaattct cgttgacct gagcaggtg ttgagccagg	8460
[0052]	tgatttctgc atagccagac ttgggggtga tgagtttacc ttcaagaaac tgatcaggga	8520
	tagcggtcag gtgtttttac aaccactaaa cccacagtac ccaatgatcc catgcaatga	8580
	gagttgttcc gttgtgggga aagttatcgc tagtcagtgg cctgaagaga cgtttgctg	8640
	atcggaagg tgttctggtc ggcgcatagc tgataacaat tgagcaagaa tctgcatttc	8700
	tttcagact tgttcaacag gccagccatt acgctcgtca tcaaaatcac tcgcatcaac	8760
	caaaccgtta ttcatctgtg attgcgcctg agcgagacga aatacgcgat cgtgtttaa	8820
	aggacaatta caaacaggaa tcgaatgcaa ccggcgcagg aacactgcca gcgcatcaac	8880
	aatattttca cctgaatcag gatattcttc taatacctgg aatgctgttt tcccggggat	8940
	cgcagtgggt agtaaccatg catcatcagg agtacggata aaatgcttga tggtcggaag	9000
	aggcataaat tccgtcagcc agtttagtct gaccatctca tctgtaacat cattggcaac	9060
	gctacctttg ccatgtttca gaaacaactc tggcgcacgc ggttcccat acaatcgata	9120
	gattgtcga cctgattgcc cgacattatc gcgagcccat ttatacccat ataaatcagc	9180
	atccatgttg gaatttaatc gcggcctcga gcaagacgtt tccggttga tatggctcat	9240
	aacacccctt gtattactgt ttatgtaagc agacagtttt attgttcatg atgatatatt	9300
	tttatcttgt gcaatgtaac atcagagatt tt	9332
	<210> 53	
	<211> 80	

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 53	
	atgtcgcaac ataacgaaaa gaaccacat cagcaccagt caccactaca cgattccagc	60
	gtgtaggctg gagctgcttc	80
	<210> 54	
	<211> 82	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 54	
	ttacgccggg attttgtcaa tcttaggaat gcgtgaccac acgcggtgtg ctgtcatcag	60
	attccgggga tccgtcgacc tg	82
	<210> 55	
	<211> 1424	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
[0053]	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 55	
	ttacgccggg attttgtcaa tcttaggaat gcgtgaccac acgcggtgtg ctgtcatcag	60
	attccgggga tccgtcgacc tgcagttcga agttcctatt ctctagaaag tataggaact	120
	tcagagcgct tttgaagctc acgtgccgc aagcactcag ggcgcaaggg ctgctaaagg	180
	aagcggaaca cgtagaaagc cagtcgcag aaacggtgct gaccccgat gaatgtcagc	240
	tactgggcta tctggacaag ggaaaacga agcgcaaaga gaaagcaggt agcttgcatg	300
	gggettacat ggcatagct agactggcg gttttatgga cagcaagcga accggaattg	360
	ccagctgggg cgcctcttgg taaggttggg aagccctgca aagtaactg gatggcttc	420
	ttgccgcaa ggatctgatg gcgcagggga tcaagatctg atcaagagac aggatgagga	480
	tcgtttcgca tgattgaaca agatggattg cagcaggtt ctccggccgc ttgggtggag	540
	aggetattcg gctatgactg ggcacaacag acaatcggt getctgatgc cgcctgttc	600
	cggtgtcag cgcaggggcg cccggttctt ttgtcaaga ccgacctgtc cgggtgccctg	660
	aatgaactgc aggacgagge agcgcggtc tcgtggttgg ccacgacggg cgttccttgc	720
	gcagctgtgc tcgacgttgt cactgaagcg ggaagggact ggctgctatt gggcgaagtg	780
	ccggggcagg atctctgtc atctcacctt gctctgccg agaaagtatc catcatggt	840

```

gatgcaatgc ggcggctgca tacgcttgat ccggtacct gccattcga ccaccaagcg      900
aaacatcgca tcgagcgagc acgtactcgg atggaagccg gtcttgctga tcaggatgat      960
ctggacgaag agcatcaggg gctcgcgcca gccgaactgt tcgccaggct caaggegcgc     1020
atgcccgaag gcgaggatct cgtcgtgacc catggcgatg cctgcttgcc gaatatcatg     1080
gtggaaaatg gccgcttttc tggattcatc gactgtggcc ggctgggtgt ggcggaaccg     1140
tatcaggaca tagegttgcc tacccgtgat attgctgaag agcttgccgg cgaatgggct     1200
gaccgcttcc tcgtgcttta cggtatcgcc gctcccgatt cgcagcgcat cgccttctat     1260
cgcttctctg acgagttctt ctaataaggg gatcttgaag ttctattcc gaagttccta     1320
ttctetagaa agtataggaa cttegaagca getccagcct acaacgtgga atcgtgtagt     1380
ggtgactggg gctgatgtgg gttcttttcg ttatgttgcg acat                        1424

```

<210> 56
 <211> 2262
 <212> DNA
 <213> 大肠杆菌

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2262)

[0054]

```

<400> 56
atg tcg caa cat aac gaa aag aac cca cat cag cac cag tca cca cta      48
Met Ser Gln His Asn Glu Lys Asn Pro His Gln His Gln Ser Pro Leu
1          5          10          15

cac gat tcc agc gaa gcg aaa ccg ggg atg gac tca ctg gca cct gag      96
His Asp Ser Ser Glu Ala Lys Pro Gly Met Asp Ser Leu Ala Pro Glu
          20          25          30

gac ggc tct cat cgt cca gcg gct gaa cca aca ccg cca ggt gca caa      144
Asp Gly Ser His Arg Pro Ala Ala Glu Pro Thr Pro Pro Gly Ala Gln
          35          40          45

cct acc gcc cca ggg agc ctg aaa gcc cct gat acg cgt aac gaa aaa      192
Pro Thr Ala Pro Gly Ser Leu Lys Ala Pro Asp Thr Arg Asn Glu Lys
          50          55          60

ctt aat tct ctg gaa gac gta cgc aaa ggc agt gaa aat tat gcg ctg      240
Leu Asn Ser Leu Glu Asp Val Arg Lys Gly Ser Glu Asn Tyr Ala Leu
65          70          75          80

acc act aat cag ggc gtg cgc atc gcc gac gat caa aac tca ctg cgt      288
Thr Thr Asn Gln Gly Val Arg Ile Ala Asp Asp Gln Asn Ser Leu Arg
          85          90          95

gcc ggt agc cgt ggt cca acg ctg ctg gaa gat ttt att ctg cgc gag      336
Ala Gly Ser Arg Gly Pro Thr Leu Leu Glu Asp Phe Ile Leu Arg Glu
          100          105          110

aaa atc acc cac ttt gac cat gag cgc att ccg gaa cgt att gtt cat      384
Lys Ile Thr His Phe Asp His Glu Arg Ile Pro Glu Arg Ile Val His
          115          120          125

```

[0055]	gca cgc gga tca gcc gct cac ggt tat ttc cag cca tat aaa agc tta Ala Arg Gly Ser Ala Ala His Gly Tyr Phe Gln Pro Tyr Lys Ser Leu 130 135 140	432
	agc gat att acc aaa gcg gat ttc ctc tca gat ccg aac aaa atc acc Ser Asp Ile Thr Lys Ala Asp Phe Leu Ser Asp Pro Asn Lys Ile Thr 145 150 155 160	480
	cca gta ttt gta cgt ttc tct acc gtt cag ggt ggt gct ggc tct gct Pro Val Phe Val Arg Phe Ser Thr Val Gln Gly Gly Ala Gly Ser Ala 165 170 175	528
	gat acc gtg cgt gat atc cgt ggc ttt gcc acc aag ttc tat acc gaa Asp Thr Val Arg Asp Ile Arg Gly Phe Ala Thr Lys Phe Tyr Thr Glu 180 185 190	576
	gag ggt att ttt gac ctc gtt ggc aat aac acg cca atc ttc ttt atc Glu Gly Ile Phe Asp Leu Val Gly Asn Asn Thr Pro Ile Phe Phe Ile 195 200 205	624
	cag gat gcg cat aaa ttc ccc gat ttt gtt cat gcg gta aaa cca gaa Gln Asp Ala His Lys Phe Pro Asp Phe Val His Ala Val Lys Pro Glu 210 215 220	672
	ccg cac tgg gca att cca caa ggg caa agt gcc cac gat act ttc tgg Pro His Trp Ala Ile Pro Gln Gly Gln Ser Ala His Asp Thr Phe Trp 225 230 235 240	720
	gat tat gtt tct ctg caa cct gaa act ctg cac aac gtg atg tgg gcg Asp Tyr Val Ser Leu Gln Pro Glu Thr Leu His Asn Val Met Trp Ala 245 250 255	768
	atg tcg gat cgc ggc atc ccc cgc agt tac cgc acc atg gaa ggc ttc Met Ser Asp Arg Gly Ile Pro Arg Ser Tyr Arg Thr Met Glu Gly Phe 260 265 270	816
	ggt att cac acc ttc cgc ctg att aat gcc gaa ggg aag gca acg ttt Gly Ile His Thr Phe Arg Leu Ile Asn Ala Glu Gly Lys Ala Thr Phe 275 280 285	864
	gta cgt ttc cac tgg aaa cca ctg gca ggt aaa gcc tca ctc gtt tgg Val Arg Phe His Trp Lys Pro Leu Ala Gly Lys Ala Ser Leu Val Trp 290 295 300	912
	gat gaa gca caa aaa ctc acc gga cgt gac ccg gac ttc cac cgc cgc Asp Glu Ala Gln Lys Leu Thr Gly Arg Asp Pro Asp Phe His Arg Arg 305 310 315 320	960
	gag ttg tgg gaa gcc att gaa gca ggc gat ttt ccg gaa tac gaa ctg Glu Leu Trp Glu Ala Ile Glu Ala Gly Asp Phe Pro Glu Tyr Glu Leu 325 330 335	1008
	ggc ttc cag ttg att cct gaa gaa gat gaa ttc aag ttc gac ttc gat Gly Phe Gln Leu Ile Pro Glu Glu Asp Glu Phe Lys Phe Asp Phe Asp 340 345 350	1056
	ctt ctc gat cca acc aaa ctt atc ccg gaa gaa ctg gtg ccc gtt cag Leu Leu Asp Pro Thr Lys Leu Ile Pro Glu Glu Leu Val Pro Val Gln 355 360 365	1104
	cgt gtc ggc aaa atg gtg ctc aat cgc aac ccg gat aac ttc ttt gct Arg Val Gly Lys Met Val Leu Asn Arg Asn Pro Asp Asn Phe Phe Ala	1152

	370	375	380	
	gaa aac gaa cag gcg gct ttc cat cct ggg cat atc gtg ccg gga ctg Glu Asn Glu Gln Ala Ala Phe His Pro Gly His Ile Val Pro Gly Leu 385 390 395 400	1200		
	gac ttc acc aac gat ccg ctg ttg cag gga cgt ttg ttc tcc tat acc Asp Phe Thr Asn Asp Pro Leu Leu Gln Gly Arg Leu Phe Ser Tyr Thr 405 410 415	1248		
	gat aca caa atc agt cgt ctt ggt ggg ccg aat ttc cat gag att ccg Asp Thr Gln Ile Ser Arg Leu Gly Gly Pro Asn Phe His Glu Ile Pro 420 425 430	1296		
	att aac cgt ccg acc tgc cct tac cat aat ttc cag cgt gac ggc atg Ile Asn Arg Pro Thr Cys Pro Tyr His Asn Phe Gln Arg Asp Gly Met 435 440 445	1344		
	cat cgc atg ggg atc gac act aac ccg gcg aat tac gaa ccg aac tcg His Arg Met Gly Ile Asp Thr Asn Pro Ala Asn Tyr Glu Pro Asn Ser 450 455 460	1392		
	att aac gat aac tgg ccg cgc gaa aca ccg ccg ggg ccg aaa cgc ggc Ile Asn Asp Asn Trp Pro Arg Glu Thr Pro Pro Gly Pro Lys Arg Gly 465 470 475 480	1440		
	ggt ttt gaa tca tac cag gag cgc gtg gaa ggc aat aaa gtt cgc gag Gly Phe Glu Ser Tyr Gln Glu Arg Val Glu Gly Asn Lys Val Arg Glu 485 490 495	1488		
[0056]	cgc age cca tcg ttt ggc gaa tat tat tcc cat ccg cgt ctg ttc tgg Arg Ser Pro Ser Phe Gly Glu Tyr Tyr Ser His Pro Arg Leu Phe Trp 500 505 510	1536		
	cta agt cag acg cca ttt gag cag cgc cat att gtc gat ggt ttc agt Leu Ser Gln Thr Pro Phe Glu Gln Arg His Ile Val Asp Gly Phe Ser 515 520 525	1584		
	ttt gag tta agc aaa gtc gtt cgt ccg tat att cgt gag cgc gtt gtt Phe Glu Leu Ser Lys Val Val Arg Pro Tyr Ile Arg Glu Arg Val Val 530 535 540	1632		
	gac cag ctg gcg cat att gat ctc act ctg gcc cag gcg gtg gcg aaa Asp Gln Leu Ala His Ile Asp Leu Thr Leu Ala Gln Ala Val Ala Lys 545 550 555 560	1680		
	aat ctc ggt atc gaa ctg act gac gac cag ctg aat atc acc cca cct Asn Leu Gly Ile Glu Leu Thr Asp Asp Gln Leu Asn Ile Thr Pro Pro 565 570 575	1728		
	ccg gac gtc aac ggt ctg aaa aag gat cca tcc tta agt ttg tac gcc Pro Asp Val Asn Gly Leu Lys Lys Asp Pro Ser Leu Ser Leu Tyr Ala 580 585 590	1776		
	att cct gac ggt gat gtg aaa ggt cgc gtg gta gcg att tta ctt aat Ile Pro Asp Gly Asp Val Lys Gly Arg Val Val Ala Ile Leu Leu Asn 595 600 605	1824		
	gat gaa gtg aga tcg gca gac ctt ctg gcc att ctc aag gcg ctg aag Asp Glu Val Arg Ser Ala Asp Leu Leu Ala Ile Leu Lys Ala Leu Lys 610 615 620	1872		
	gcc aaa ggc gtt cat gcc aaa ctg ctc tac tcc cga atg ggt gaa gtg	1920		

Ala Lys Gly Val His Ala Lys Leu Leu Tyr Ser Arg Met Gly Glu Val 625 630 635 640	
act gcg gat gac ggt acg gtg ttg cct ata gcc gct acc ttt gcc ggt Thr Ala Asp Asp Gly Thr Val Leu Pro Ile Ala Ala Thr Phe Ala Gly 645 650 655	1968
gca cct teg ctg acg gtc gat gcg gtc att gtc cct tgc ggc aat atc Ala Pro Ser Leu Thr Val Asp Ala Val Ile Val Pro Cys Gly Asn Ile 660 665 670	2016
gcg gat atc get gac aac ggc gat gcc aac tac tac ctg atg gaa gcc Ala Asp Ile Ala Asp Asn Gly Asp Ala Asn Tyr Tyr Leu Met Glu Ala 675 680 685	2064
tac aaa cac ctt aaa ccg att gcg ctg gcg ggt gac gcg cgc aag ttt Tyr Lys His Leu Lys Pro Ile Ala Leu Ala Gly Asp Ala Arg Lys Phe 690 695 700	2112
aaa gca aca atc aag atc gct gac cag ggt gaa gaa ggg att gtg gaa Lys Ala Thr Ile Lys Ile Ala Asp Gln Gly Glu Glu Gly Ile Val Glu 705 710 715 720	2160
gct gac agc gct gac ggt agt ttt atg gat gaa ctg cta acg ctg atg Ala Asp Ser Ala Asp Gly Ser Phe Met Asp Glu Leu Leu Thr Leu Met 725 730 735	2208
gca gca cac cgc gtg tgg tca cgc att cct aag att gac aaa att cct Ala Ala His Arg Val Trp Ser Arg Ile Pro Lys Ile Asp Lys Ile Pro 740 745 750	2256
[0057] gcc tga Ala	2262
<210> 57 <211> 753 <212> PRT <213> 大肠杆菌	
<400> 57	
Met Ser Gln His Asn Glu Lys Asn Pro His Gln His Gln Ser Pro Leu 1 5 10 15	
His Asp Ser Ser Glu Ala Lys Pro Gly Met Asp Ser Leu Ala Pro Glu 20 25 30	
Asp Gly Ser His Arg Pro Ala Ala Glu Pro Thr Pro Pro Gly Ala Gln 35 40 45	
Pro Thr Ala Pro Gly Ser Leu Lys Ala Pro Asp Thr Arg Asn Glu Lys 50 55 60	
Leu Asn Ser Leu Glu Asp Val Arg Lys Gly Ser Glu Asn Tyr Ala Leu 65 70 75 80	

Thr Thr Asn Gln Gly Val Arg Ile Ala Asp Asp Gln Asn Ser Leu Arg
 85 90 95
 Ala Gly Ser Arg Gly Pro Thr Leu Leu Glu Asp Phe Ile Leu Arg Glu
 100 105 110
 Lys Ile Thr His Phe Asp His Glu Arg Ile Pro Glu Arg Ile Val His
 115 120 125
 Ala Arg Gly Ser Ala Ala His Gly Tyr Phe Gln Pro Tyr Lys Ser Leu
 130 135 140
 Ser Asp Ile Thr Lys Ala Asp Phe Leu Ser Asp Pro Asn Lys Ile Thr
 145 150 155 160
 Pro Val Phe Val Arg Phe Ser Thr Val Gln Gly Gly Ala Gly Ser Ala
 165 170 175
 Asp Thr Val Arg Asp Ile Arg Gly Phe Ala Thr Lys Phe Tyr Thr Glu
 180 185 190
 Glu Gly Ile Phe Asp Leu Val Gly Asn Asn Thr Pro Ile Phe Phe Ile
 195 200 205
 [0058]
 Gln Asp Ala His Lys Phe Pro Asp Phe Val His Ala Val Lys Pro Glu
 210 215 220
 Pro His Trp Ala Ile Pro Gln Gly Gln Ser Ala His Asp Thr Phe Trp
 225 230 235 240
 Asp Tyr Val Ser Leu Gln Pro Glu Thr Leu His Asn Val Met Trp Ala
 245 250 255
 Met Ser Asp Arg Gly Ile Pro Arg Ser Tyr Arg Thr Met Glu Gly Phe
 260 265 270
 Gly Ile His Thr Phe Arg Leu Ile Asn Ala Glu Gly Lys Ala Thr Phe
 275 280 285
 Val Arg Phe His Trp Lys Pro Leu Ala Gly Lys Ala Ser Leu Val Trp
 290 295 300
 Asp Glu Ala Gln Lys Leu Thr Gly Arg Asp Pro Asp Phe His Arg Arg
 305 310 315 320
 Glu Leu Trp Glu Ala Ile Glu Ala Gly Asp Phe Pro Glu Tyr Glu Leu
 325 330 335

Gly Phe Gln Leu Ile Pro Glu Glu Asp Glu Phe Lys Phe Asp Phe Asp
 340 345 350
 Leu Leu Asp Pro Thr Lys Leu Ile Pro Glu Glu Leu Val Pro Val Gln
 355 360 365
 Arg Val Gly Lys Met Val Leu Asn Arg Asn Pro Asp Asn Phe Phe Ala
 370 375 380
 Glu Asn Glu Gln Ala Ala Phe His Pro Gly His Ile Val Pro Gly Leu
 385 390 395 400
 Asp Phe Thr Asn Asp Pro Leu Leu Gln Gly Arg Leu Phe Ser Tyr Thr
 405 410 415
 Asp Thr Gln Ile Ser Arg Leu Gly Gly Pro Asn Phe His Glu Ile Pro
 420 425 430
 Ile Asn Arg Pro Thr Cys Pro Tyr His Asn Phe Gln Arg Asp Gly Met
 435 440 445
 His Arg Met Gly Ile Asp Thr Asn Pro Ala Asn Tyr Glu Pro Asn Ser
 450 455 460
 [0059]
 Ile Asn Asp Asn Trp Pro Arg Glu Thr Pro Pro Gly Pro Lys Arg Gly
 465 470 475 480
 Gly Phe Glu Ser Tyr Gln Glu Arg Val Glu Gly Asn Lys Val Arg Glu
 485 490 495
 Arg Ser Pro Ser Phe Gly Glu Tyr Tyr Ser His Pro Arg Leu Phe Trp
 500 505 510
 Leu Ser Gln Thr Pro Phe Glu Gln Arg His Ile Val Asp Gly Phe Ser
 515 520 525
 Phe Glu Leu Ser Lys Val Val Arg Pro Tyr Ile Arg Glu Arg Val Val
 530 535 540
 Asp Gln Leu Ala His Ile Asp Leu Thr Leu Ala Gln Ala Val Ala Lys
 545 550 555 560
 Asn Leu Gly Ile Glu Leu Thr Asp Asp Gln Leu Asn Ile Thr Pro Pro
 565 570 575
 Pro Asp Val Asn Gly Leu Lys Lys Asp Pro Ser Leu Ser Leu Tyr Ala
 580 585 590

Ile Pro Asp Gly Asp Val Lys Gly Arg Val Val Ala Ile Leu Leu Asn
595 600 605

Asp Glu Val Arg Ser Ala Asp Leu Leu Ala Ile Leu Lys Ala Leu Lys
610 615 620

Ala Lys Gly Val His Ala Lys Leu Leu Tyr Ser Arg Met Gly Glu Val
625 630 635 640

Thr Ala Asp Asp Gly Thr Val Leu Pro Ile Ala Ala Thr Phe Ala Gly
645 650 655

Ala Pro Ser Leu Thr Val Asp Ala Val Ile Val Pro Cys Gly Asn Ile
660 665 670

Ala Asp Ile Ala Asp Asn Gly Asp Ala Asn Tyr Tyr Leu Met Glu Ala
675 680 685

Tyr Lys His Leu Lys Pro Ile Ala Leu Ala Gly Asp Ala Arg Lys Phe
690 695 700

[0060]

Lys Ala Thr Ile Lys Ile Ala Asp Gln Gly Glu Glu Gly Ile Val Glu
705 710 715 720

Ala Asp Ser Ala Asp Gly Ser Phe Met Asp Glu Leu Leu Thr Leu Met
725 730 735

Ala Ala His Arg Val Trp Ser Arg Ile Pro Lys Ile Asp Lys Ile Pro
740 745 750

Ala

<210> 58
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 58
gatctgactg gtggtctata gtttag

25

<210> 59
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

146

20	25	30
Tyr Arg Gly Val Tyr Leu Asp	Ala Val Arg Ala Leu Glu Val Ile Ser	
35	40	45
Ser Phe Asp Glu Val Asp	Glu Thr Arg Ile Gly Val Thr Gly Gly Ser	
50	55	60
Gln Gly Gly Gly Leu Thr Ile Ala Ala Ala Ala Leu Ser Asp Ile Pro		
65	70	75 80
Lys Ala Ala Val Ala Asp Tyr Pro Tyr Leu Ser Asn Phe Glu Arg Ala		
85	90	95
Ile Asp Val Ala Leu Glu Gln Pro Tyr Leu Glu Ile Asn Ser Phe Phe		
100	105	110
Arg Arg Asn Gly Ser Pro Glu Thr Glu Val Gln Ala Met Lys Thr Leu		
115	120	125
Ser Tyr Phe Asp Ile Met Asn Leu Ala Asp Arg Val Lys Val Pro Val		
130	135	140
[0062] Leu Met Ser Ile Gly Leu Ile Asp Lys Val Thr Pro Pro Ser Thr Val		
145	150	155 160
Phe Ala Ala Tyr Asn His Leu Glu Thr Glu Lys Glu Leu Lys Val Tyr		
165	170	175
Arg Tyr Phe Gly His Glu		
180		

<210> 62

<211> 53

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 62

taactgcagt aaggaggaat aggacatgcc tctggttgat atgcctctgc gtg

53

<210> 63

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

	<400> 63	
	tgatctagat taggaggtga agaagcggaa gatctgac	39
	<210> 64	
	<211> 988	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 扩增产物	
[0063]	<400> 64	
	taactgcagt aaggaggaat aggacatgcc tctggttgat atgcctctgc gtgaactgct	60
	ggcttatgaa ggcatcaacc caaaacctgc tgacttcgat cagtattgga accgcgctaa	120
	aaccgaaatt gaggtatcg atcctgaagt aactctggta gagtccctct tccagtctc	180
	cttcgctaac tgetaccatt tctattatcg ttccgcgggc aacgtaaaa tccacgcgaa	240
	gtacgtacag ccaaaagcgg gtgaaaaaac tccggcagtc ttcattgttc acggtacgg	300
	tggtcgttcc gctgaatggt cctctctgct gaactacgtt gctgctggtt tcagcgtctt	360
	ctacatggat gtctgtggcc agggcggtag ctccaggac cgggtggcg tacgtggtaa	420
	cacctatcgt ggtcatatca tccgtggcct ggacgcgggt ccggatgcgc tgttctaccg	480
	ttccgtgttc ctggacacgg tacagctggt gcgcgtgca aaaacctgc cgcacattga	540
	caagaccctg ctgatggcca ccggctggag ccagggtggc gcaactgactc tggcgtgtgc	600
	agcgttggt cgggaaatca aacgtctggc gccggtctac ccgttctgt ctgactacaa	660
	acgcgtatgg cagatggacc tggctgttcg ttctacaaa gaactggcgg actatttcg	720
	ctcctatgat ccgcagcata aacgccacgg tgaaattttc gaacgcctgg gttatatcga	780
	cgttcagcac ctggctgac gtattcaggg cgacgttctg atgggtgtgg gcctgatgga	840
	caccgaatgc ccgcgagca ccaatttgc gggtacaac aagattaaag ctaagaaaag	900
	ctacgaactg tacccggact ttggtcatga gcatctgcct ggtatgaacg atcacatctt	960
	ccgtttcttc acctcctaata ctatgaca	988
	<210> 65	
	<211> 951	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成基因—密码子最优化的	
	<400> 65	
	atgcctctgg ttgatatgcc tctgcgtgaa ctgetggctt atgaaggcat caacccaaaa	60
	cctgctgact tcgatcagta ttggaaccgc gctaaaaccg aaattgaggc tatcgatcct	120
	gaagtaactc tggtagagtc ctccttcag tgctccttcg ctaactgcta ccatttctat	180

	tatcggttccg cgggcaacgc taaaatccac gcgaagtacg tacagccaaa agcgggtgaa	240
	aaaactccgg cagtcttcat gtttcaaggc tacgggtggc gttecgctga atggctctct	300
	ctgctgaact acgttgctgc tggtttcagc gtcttctaca tggatgttcg tggccagggc	360
	ggtacctccg aggaccggg tggcgtacgt ggtaacacct atcgtggtea tatcatccgt	420
	ggcctggacg cgggtccgga tgcgtgttc taccgttccg tgttctgga cacggtacag	480
	ctggtgcgcg ctgcaaaaac cctgccgcac attgacaaga cccgtctgat ggccaccggc	540
	tggagccagg gtggcgcaact gactctggcg tgtgcagcg tggaccgga aatcaaactg	600
	ctggcgccgg tctaccggtt cctgtctgac tacaacgcg tatggcagat ggacctggct	660
	gttcgttctt acaaagaact ggcggaactat ttccgtctct atgatccgca gcataaacgc	720
	cacggtgaaa ttttcgaacg cctgggttat atcgacgttc agcacctggc tgatcgtatt	780
	caggcgacg ttctgatggg tgtgggcctg atggacaccg aatgcccgcc gagcacccaa	840
	tttgcggcgt acaacaagat taaagctaag aaaagctacg aactgtaccc ggacttttgt	900
	catgagcatc tgcctggtat gaacgatcac atcttccgct tcttcacctc c	951
[0064]	<210> 66	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 66	
	taactgcagt aaggaggaat aggacatggg tctgttcgat atgccactgc aa	52
	<210> 67	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 67	
	tgatctagat taagaataca gtccagcat gaactg	36
	<210> 68	
	<211> 997	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> PCR 扩增产物	
	<400> 68	
	taactgcagt aaggaggaat aggacatggg tctgttcgat atgccactgc aaaaactgcg	60
	tgaatatacc ggtaccaacc catgtctga ggatttcgat gaatactggg atcgcgcaact	120

```

ggacgaaatg cgtagcgttg atcctaaaat caagatgaag aagagctcct ttcaagttcc 180
gttcgcggaa tgttacgac tgtattttac cggegttcgt ggtgcecgca ttcacgcgaa 240
atacatctgt ccgaaaaccg aaggcaaaca cccggcgtg attegettcc atggttactc 300
cagcaactct ggtgattgga acgacaagct gaactacgtt gcggctggtt ttaccgtagt 360
agcgatggac gctcgtggcc aggggtggcca atctcaggac gtcggcggtg ttaatggcaa 420
caccctgaac ggtcacatca tccgtggcct ggacgatgat gcagataaca tgctgttccg 480
tcataatttc ctggacaccg cgcagctggc tggtatcgtt atgaacatgc cggaaatcga 540
tgaggaccgc gtagctgtta tgggtccgtc ccagggcggc ggtctgtccc tggcgtgtgc 600
ggctctggaa cctaaaatcc gtaaagtagt gtccgaatat ccgttctga gcgactacaa 660
gcgtgtgtgg gatctggatc tggccaaaaa tgcgtacca gaaatcactg actatttccg 720
tctgttcgac ccacgccacg aacgtgagaa cgaggttttt actaaactgg gttacattga 780
cgtaaagaac ctggcgaaac gtatcaaagg tgatgttctg atgtgcgtgg gcctgatgga 840
tcaggctctgc ccgccgagca ccgtatttgc agcatacaac aacatccagt ccaagaagga 900
catcaaagtc taccggact atggtcacga accgatgcgt ggcttcggtg acctggetat 960
gcagttcatg ctggaactgt attettaatc tagatca 997

```

[0065]

<210> 69
 <211> 960
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成基因—密码子最优化的

```

<400> 69
atgggtctgt tcgatatgcc actgcaaaaa ctgcgtgaat ataccggtac caacccatgt 60
cctgaggatt tcgatgaata ctgggacgac gcaactggacg aaatgcgtag cgttgatcct 120
aaaatcaaga tgaagaagag ctcccttcaa gttccgttcg cggaatgtta cgatctgtat 180
tttaccggcg ttcgtggtgc ccgcattcac gcgaaataca ttcgtccgaa aaccgaagcg 240
aaacacccgg cgctgattcg cttccatggt tactccagca actctggtga ttggaacgac 300
aagctgaact acgttgcggc tggttttacc gtagtagcga tggacgctcg tggccagggt 360
ggccaatctc aggacgtcgg cgggtgtaat ggcaacaccc tgaacggtca catcatccgt 420
ggcctggacg atgatgcaga taacatgctg ttccgtcata ttttctgga caccgcgcag 480
ctggtcggta tcgttatgaa catgccgaa atcgatgagg accgcgtage tgttatgggt 540
ccgtcccagg gcggcggtct gtccctggcg tgtgcggctc tggaacctaa aatccgtaaa 600
gtagtgtccg aatatccgtt cctgagcgac tacaagcgtg tgtgggatct ggatctggcc 660

```

```

aaaaatgcgt accaagaaat cactgactat ttccgtctgt tcgacccacg ccacgaacgt      720
gagaacgagg tttttactaa actgggttac attgacgtaa agaacctggc gaaacgtatc      780
aaaggtgatg ttctgatgtg cgtgggcctg atggatcagg tctgcccgcc gagcaccgta      840
tttgacgcat acaacaacat ccagtccaag aaggacatca aagtctaccc ggactatggg      900
cacgaaccga tgcgtggcct cggtgacctg gctatgcagt tcatgctgga actgtattct      960

```

```

<210> 70
<211> 320
<212> PRT
<213> 解糖热厌氧杆菌
<400> 70

```

```

Met Gly Leu Phe Asp Met Pro Leu Gln Lys Leu Arg Glu Tyr Thr Gly
1           5           10           15

```

```

Thr Asn Pro Cys Pro Glu Asp Phe Asp Glu Tyr Trp Asp Arg Ala Leu
          20           25           30

```

```

Asp Glu Met Arg Ser Val Asp Pro Lys Ile Lys Met Lys Lys Ser Ser
          35           40           45

```

```

[0066] Phe Gln Val Pro Phe Ala Glu Cys Tyr Asp Leu Tyr Phe Thr Gly Val
          50           55           60

```

```

Arg Gly Ala Arg Ile His Ala Lys Tyr Ile Arg Pro Lys Thr Glu Gly
65           70           75           80

```

```

Lys His Pro Ala Leu Ile Arg Phe His Gly Tyr Ser Ser Asn Ser Gly
          85           90           95

```

```

Asp Trp Asn Asp Lys Leu Asn Tyr Val Ala Ala Gly Phe Thr Val Val
          100          105          110

```

```

Ala Met Asp Ala Arg Gly Gln Gly Gly Gln Ser Gln Asp Val Gly Gly
          115          120          125

```

```

Val Asn Gly Asn Thr Leu Asn Gly His Ile Ile Arg Gly Leu Asp Asp
          130          135          140

```

```

Asp Ala Asp Asn Met Leu Phe Arg His Ile Phe Leu Asp Thr Ala Gln
145           150           155           160

```

```

Leu Ala Gly Ile Val Met Asn Met Pro Glu Ile Asp Glu Asp Arg Val
          165          170          175

```

```

Ala Val Met Gly Pro Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ser Leu Ala Cys Ala

```

	180	185	190	
	Ala Leu Glu Pro Lys Ile Arg Lys Val Val Ser Glu Tyr Pro Phe Leu 195	200	205	
	Ser Asp Tyr Lys Arg Val Trp Asp Leu Asp Leu Ala Lys Asn Ala Tyr 210	215	220	
	Gln Glu Ile Thr Asp Tyr Phe Arg Leu Phe Asp Pro Arg His Glu Arg 225	230	235	240
	Glu Asn Glu Val Phe Thr Lys Leu Gly Tyr Ile Asp Val Lys Asn Leu 245	250	255	
	Ala Lys Arg Ile Lys Gly Asp Val Leu Met Cys Val Gly Leu Met Asp 260	265	270	
	Gln Val Cys Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn Asn Ile Gln 275	280	285	
	Ser Lys Lys Asp Ile Lys Val Tyr Pro Asp Tyr Gly His Glu Pro Met 290	295	300	
[0067]	Arg Gly Phe Gly Asp Leu Ala Met Gln Phe Met Leu Glu Leu Tyr Ser 305	310	315	320
	<210> 71			
	<211> 49			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 引物			
	<400> 71			
	taactgcagt aaggaggaat aggacatggg gttcttcgac ctgcctctg			49
	<210> 72			
	<211> 38			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 引物			
	<400> 72			
	tgatctagat tagcccttct caaacagttt ctttcagg			38
	<210> 73			
	<211> 1012			
	<212> DNA			
	<213> 人工序列			

<220>	
<223> PCR 扩增产物	
<400> 73	
taactgcagt aaggaggaat aggacatggc gttcttcgac ctgcctctgg aagaactgaa	60
gaaataccgt ccagagcggt acgaagagaa ggacttcgac gagttctggg aggaaactct	120
ggcggagagc gaaaagtctt cgctggaccc agtggttcgag cgtatggaat ctcacctgaa	180
aaccgtggag gcatatgacg ttactttttt tggttaccgt ggccagcgta tcaaaggctg	240
gctgctgggt ccgaaactgg aggaagaaaa actgccgtgc gtagttcagt acatcggtta	300
caacggtggc cgtggcttct cgcacgattg gctgttctgg ccgtctatgg gctacatttg	360
cttcgtcatg gatactcgtg gtcagggttc cggtggtg aaaggcgata ctccggatta	420
tccggagggc ccggtagacc cgcagtaccc tggcttcatg acgcgtggta ttctggatcc	480
gcgtacctat tactatcgcc gcgtttttac cgatgcagtt cgtgccgtag aggccggcgc	540
ttctttccct caggttgacc aggagcgtat tgttatcgtt ggtggctccc aggggtggcgg	600
categccctg gcggtatctg cgtgagcaa gaaagctaag gcactgctgt gtgacgtccc	660
gttcctgtgt cacttccgtc gcgtgttca gctggtagat acccatcgt acgcggagat	720
tactaacttc ctgaaaactc accgcgacaa agaagaaatc gttttccgca cctgtccta	780
[0068] tttcgaaggc gtttaactcg cggctcgtgc aaaaattccg gcactgttct ctgttggtct	840
gatggacaac atctgccctc cttctaccgt tttcgcggca tataactatt atgcgggtcc	900
gaaagaaatc cgtatctatc cgtacaacaa ccacgaaggc ggtggtagct ttcagctgt	960
tgaacaagtg aaattcctga agaaactgtt tgagaagggc taatctagat ca	1012
<210> 74	
<211> 975	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成基因—密码子最优化的	
<400> 74	
atggcgttct tcgacctgcc tctggaagaa ctgaagaaat accgtccaga gcgttacgaa	60
gagaaggact tcgacgagtt ctgggaggaa actctggcgg agagcgaaaa gtttccgctg	120
gaccagtggt tcgagcgtat ggaatctcac ctgaaaaccg tggaggcata tgacgttact	180
ttttctgggt accgtggcca gcgtatcaaa ggctggctgc tggttccgaa actggaggaa	240
gaaaaactgc cgtgcgtagt tcagtacatc ggttacaacg gtggccgtgg ctttccgcac	300
gattggctgt tctggccgtc tatgggctac atttgcttcg tcatggatac tcgtggtcag	360
ggttccggtt ggctgaaagg cgatactccg gattatccgg agggcccggt agaccgcag	420

	taccttggt tcatgacgcg tggattctg gatccgcgta cctattacta tcgcccggtt	480
	tttaccgatg cagttcgtgc cgtagaggcc gcggttctt tccctcaggt tgaccaggag	540
	cgtattgtta tcgctgggtg ctcaccagggt ggccgcatcg ccctggcgggt atctgcgctg	600
	agcaagaaag ctaaggcact gctgtgtgac gtccegttcc tgtgtcactt ccgtcgcgt	660
	gttcagctgg tagataccca tccgtacgcg gagattacta acttctgaa aactcaccgc	720
	gacaaagaag aaatcgtttt ccgcaccctg tcctatttcg acggcggtta cttcgcgggt	780
	cgtgcaaaaa ttccggcact gttctctgtt ggtctgatgg acaacatctg ccctccttct	840
	accgttttcg cggcatataa ctattatgcg ggtccgaaag aaatccgtat ctatccgtac	900
	aacaaccacg aaggcgggtg tagctttcag gctgttgaac aagtgaatt cctgaagaaa	960
	ctgtttgaga agggc	975
	<210> 75	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 75	
[0069]	atggtttact tcgatatgcc actg	24
	<210> 76	
	<211> 30	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 76	
	ttatcgcgc atagaaatgg tttcttaac	30
	<210> 77	
	<211> 981	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 77	
	atggtttact tcgatatgcc actggaagat ctgcgcaaat acctgccgca gcgtacgaa	60
	gaaaaagact ttgacgattt ctggaacag acgattcacg aaaccctgg ttacttcag	120
	gagccgatcc tgaagaaagt tgatttctac ctgcaaaacg ttgaaacgtt cgatgtgacc	180
	ttctctggtt accgtggtca gaagatcaaa ggctggtga tctgcctaa atttcgtaac	240
	ggcaaacctgc catgcgttgt tgagttcgta ggttacggtg gcggccgtgg tttcccgat	300

	gattggctgc tgtggtcgc tgccggctac gctcacttca tcattggatac ccgcggctcag	360
	ggtttetaact ggatgaaagg cgacacgcca gactatgagg acaaccgag cgatccgcag	420
	taccggggtt ttctgaccaa aggcgtgctg aaccgggaaa cctactatta tcgtcgcgtt	480
	ttcatggatg ctttcatggc ggttgaaact atctctcagc tggagcagat tgactcccag	540
	accatcatcc tgtccggtgc aagccagggt ggccggtatcg ctctggccgt tagcgcctg	600
	tctagcaaag tgatggccct gctgtgcgat gtaccgttcc tgtgccatta taaacgcgca	660
	gtacagatta ctgattctat gccgtatgca gaaatcacc gttactgcaa aacgcacatc	720
	gacaaaattc agaccgtttt tcgcaccctg tcttactttg atggcgtaaa cttcgcagcc	780
	cgcgctaagt gcccggcact gttctccgtt ggccgtgatg atgatatttg cccgccgtct	840
	acgggtattcg ccgcatacaa ctactatgca ggcgagaaag atattcgtat ttaccggtat	900
	aacaaccatg aaggcggtgg ctctttccac actctggaga aactgaagtt cgttaagaaa	960
	accatttcta tgcgcgaata a	981
[0070]	<210> 78	
	<211> 46	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 78	
	taactgcagt aaggaggaat aggacatggt ttacttcgat atgcca	46
	<210> 79	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 79	
	tgatctagat tattcgcgca tagaaatggt tttctt	36
	<210> 80	
	<211> 1015	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 80	
	taactgcagt aaggaggaat aggacatggt ttacttcgat atgccactgg aagatctgcg	60
	caaataacct ccgcagcgt acgaagaaaa agactttgac gatttctgga aacagacgat	120

tcacgaaacc cgtggttact tccaggagcc gatcctgaag aaagttgatt tctacctgca	180
aaacgttgaa acgttcgatg tgaccttctc tggttaccgt ggtcagaaga tcaaaggetg	240
gctgatcctg cctaaatttc gtaacggcaa actgccatgc gttgttgagt tcgtaggtta	300
cgggtggcggc cgtggtttcc cgtatgattg gctgctgtgg tccgetgcgc gctacgetca	360
cttcatcatg gatacccgcg gtcagggttc taactggatg aaaggcgaca cgccagacta	420
tgaggacaac ccgagcgatc cgcagtagcc gggttttctg accaaaggcg tgetgaaccc	480
ggaaacctac tattatcgtc gcgttttcat ggatgcttcc atggcgggtg aaactatctc	540
tcagctggag cagattgact cccagacat catcctgtcc ggtgcaagcc aggggtggcg	600
tatcgctctg gccgttagcg cctgtctag caaagtgatg gccctgctgt gcgatgtacc	660
gttcctgtgc cattataaac gcgcagtaca gattactgat tctatgccgt atgcagaaat	720
cacccgttac tgcaaaacgc acatcgacaa aattcagacc gtttttcgca ccctgtctta	780
ctttgatggc gtaaacttcg cageccgcgc taagtgcccg gcaactgtct ccgttgccct	840
gatggatgat atttgccgc cgtctacggt attcgcgcga tacaactact atgcaggcga	900
gaaagatatt cgtatttacc cgtataacaa ccatgaagcg ggtggetctt tccacactct	960
ggagaaactg aagttcgta agaaaacat ttctatgcgc gaataatcta gatca	1015

[0071]

<210> 81
 <211> 981
 <212> DNA
 <213> Thermotoga lettingae

<400> 81	
atggtctatt ttgatatgcc attggaagat ttgagaaaat atctgccaca gaggtacgaa	60
gaaaaggatt tcgatgattt ctggaaacaa acaatccatg aaacaagggg atattttcaa	120
gaaccaatc tcaaaaaagt ggatttttat ttgcagaatg ttgagacttt tgatgtgact	180
ttctctgggt acagaggta gaagataaaa ggatgggtga ttttgccaaa attcagaaat	240
gggaaattac cctgcgtagt tgaatttgtt ggttatggag gaggaagagg atttccatat	300
gactggctgc tttggagtgc ggcaggatac gcacatttca taatggacac gagaggacaa	360
ggtagcaact ggatgaaggg tgataacca gattatgaag ataatccttc agatccacaa	420
tatccaggct ttctgacaaa aggagtactg aacccgaaa cttattatta caggagagtt	480
tttatggatg catttatggc tgttgaaact atcagccaac ttgaacaaat agattcacia	540
accataatat tatcaggatg aagccagggt ggtggaatag ctttgctgtg gattgcattg	600
tcttcaaagg tcatggetct actttgtgat gtcccttctc tgtgtcatta caaaagagca	660
gttcagataa cagattcaat gccctatgca gaaattacga gatattgcaa aactcacatt	720
gacaaaatcc aaacagtatt cagaaccctc tcttattttg acggcgtaaa ttttcagct	780

cgtgcaaaat gccctgcttt gttttcgggtg ggactcatgg acgacatttg cccaccttca 840
 acagtgtttg ccgcttaca ttattacget ggtgagaaag atattagaat ttaccatac 900
 aacaaccatg aaggcgggtg ttccttccat acactggaaa aattgaaatt tgtgaaaaaa 960
 acaatttcta tgagagagtg a 981

<210> 82
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> Thermotoga lettingae

<400> 82

Met Val Tyr Phe Asp Met Pro Leu Glu Asp Leu Arg Lys Tyr Leu Pro
 1 5 10 15

Gln Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Asp Phe Trp Lys Gln Thr Ile
 20 25 30

His Glu Thr Arg Gly Tyr Phe Gln Glu Pro Ile Leu Lys Lys Val Asp
 35 40 45

Phe Tyr Leu Gln Asn Val Glu Thr Phe Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
 50 55 60

[0072]

Arg Gly Gln Lys Ile Lys Gly Trp Leu Ile Leu Pro Lys Phe Arg Asn
 65 70 75 80

Gly Lys Leu Pro Cys Val Val Glu Phe Val Gly Tyr Gly Gly Gly Arg
 85 90 95

Gly Phe Pro Tyr Asp Trp Leu Leu Trp Ser Ala Ala Gly Tyr Ala His
 100 105 110

Phe Ile Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Asn Trp Met Lys Gly Asp
 115 120 125

Thr Pro Asp Tyr Glu Asp Asn Pro Ser Asp Pro Gln Tyr Pro Gly Phe
 130 135 140

Leu Thr Lys Gly Val Leu Asn Pro Glu Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
 145 150 155 160

Phe Met Asp Ala Phe Met Ala Val Glu Thr Ile Ser Gln Leu Glu Gln
 165 170 175

Ile Asp Ser Gln Thr Ile Ile Leu Ser Gly Ala Ser Gln Gly Gly Gly
 180 185 190

Ile Ala Leu Ala Val Ser Ala Leu Ser Ser Lys Val Met Ala Leu Leu
195 200 205

Cys Asp Val Pro Phe Leu Cys His Tyr Lys Arg Ala Val Gln Ile Thr
210 215 220

Asp Ser Met Pro Tyr Ala Glu Ile Thr Arg Tyr Cys Lys Thr His Ile
225 230 235 240

Asp Lys Ile Gln Thr Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly Val
245 250 255

Asn Phe Ala Ala Arg Ala Lys Cys Pro Ala Leu Phe Ser Val Gly Leu
260 265 270

Met Asp Asp Ile Cys Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn Tyr
275 280 285

Tyr Ala Gly Glu Lys Asp Ile Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Asn His Glu
290 295 300

Gly Gly Gly Ser Phe His Thr Leu Glu Lys Leu Lys Phe Val Lys Lys
305 310 315 320

[0073]

Thr Ile Ser Met Arg Glu
325

<210> 83
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 83
atggcattct tcgacctgcc gctg

24

<210> 84
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引物

<400> 84
ttaacctttc tcgaacagac gtttcag

27

<210> 85
<211> 978

	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 85	
	atggcattct tcgacctgcc gctggaggaa ctgaaaaagt atcgcccgga gcgttacgaa	60
	gaaaaggatt tcgatgagtt ctgggaagge accctggccg agaacgaaaa attccctctg	120
	gatccggtct tcgaacgtat ggaaagccat ctgaaaaccg tagaggctta cgacgtgacc	180
	ttcagcgggtt acatgggcca gcgtatcaaa ggctggctgc tggteccgaa actggaggag	240
	gagaaactgc cgtgcgttgt tcagtacatc ggctacaacg gcggtcgcgg tttcccgcac	300
	gattggctgt tctggccgct tatgggttac atctgctttg ttatggacac ccgtggccag	360
	ggtagcgggt ggatgaaggg tgacaccccg gactatccgg aggaccgggt agaccgcgag	420
	taccagget ttatgacccg cggcattctg gaccgcgca cttactacta ccgtcgcgtt	480
	tttaccgatg ctgttcgcgc agtggaggca gccgcgtcct ttccacgcgt agaccaagaa	540
	cgtatcgtaa tcgcaggcgg ctcccagggt ggccggcatcg cgtggcggt ttccgcactg	600
	agcaaaaagg ccaaagcgt getgtgcgat gtgcggttc tgtgtcactt ccgtcgtgcg	660
	gttcagctgg tagataccca cccgtacgt gagatcacca actttctgaa gacgcacgt	720
[0074]	gataaagagg aaatcgtatt tcgtacgtg tcctatttcg atgggtgtgaa ctttgcggta	780
	cgtgcaaaga tcccggccct gttctctgtt ggtctgatgg acaacatttg cccgccgagc	840
	actgtctttg cagcgtacaa ccactatgcg ggcccaaaag aaattcgcat ctaccatac	900
	aacaaccacg aaggcggcgg ttccttcag gcaatcgaac aggtcaaatt cctgaaacgt	960
	ctgttcgaga aaggttaa	978
	<210> 86	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 86	
	taactgcagt aaggaggaat aggacatggc attcttcgac ctgccgctg	49
	<210> 87	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 87	

	tgatctagat taacctttct cgaacagacg tttcag	36
	<210> 88	
	<211> 1012	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 88	
	taactgcagt aaggaggaat aggacatggc attcttcgac ctgccgctgg aggaactgaa	60
	aaagtatcgc ceggagcggt acgaagaaaa ggatttcgat gagttctggg aaggcaccct	120
	ggccgagaac gaaaaattcc ctctggatcc ggtcttcgaa cgtatggaaa gccatctgaa	180
	aaccgtagag gcttacgacg tgaccttcag cggttacatg ggccagcgta tcaaagcgtg	240
	gctgctggtc ccgaaactgg aggaggagaa actgccgtgc gttgttcagt acatcggtta	300
	caacggcggt cgcggtttcc cgcacgattg gctgttctgg ccgtctatgg gttacatctg	360
	ctttgttatg gacaccctg gccagggtag cggttggatg aagggtgaca ccccgacta	420
	tccgaggac cggtagacc cgcagtacc aggtttatg acccgcgca ttctggacc	480
	gcgcacttac tactaccgtc gcgtttttac cgatgctgtt cgcgcagtgg aggcagccgc	540
[0075]	gtcctttcca cgcgtagacc acgaacgtat cgtaatcgca ggcggtccc aggggtggcg	600
	catcgcgctg gcggtttccg cactgagcaa aaaggccaaa gcgctgctgt gcgatgtgcc	660
	gttcctgtgt cacttcgtc gtgcggttca gctggtagat acccaccgt acgtgagat	720
	caccaacttt ctgaagacgc atcgtgataa agaggaaatc gtatttcgta cgctgtccta	780
	tttcgatggt gtgaactttg cggtagctgc aaagatccc gccctgttct ctgttggtct	840
	gatggacaac atttgcccgc cgagcactgt ctttcagcg tacaaccact atgcgggccc	900
	aaaagaaatt cgcactacc catacaaca ccacgaaggc ggcggttct tccaggaat	960
	cgaacaggtc aaattcctga aacgtctgtt cgagaaagg taatctagat ca	1012
	<210> 89	
	<211> 978	
	<212> DNA	
	<213> Thermotoga petrophilia	
	<400> 89	
	atggcctttt tcgatttacc actcgaagaa ctgaagaaat atcgtccaga gcggtacgaa	60
	gagaaagact tcgatgagtt ctgggaagg acactcgcag agaacgaaaa gtcccccta	120
	gaccccgctc tcgagaggat ggagtctcac ctcaaacag tcgaagcgta cgatgtaact	180
	ttctcggat acatgggaca gaggatcaag ggttggtcc ttgttccaaa actggaagaa	240
	gaaaaacttc cctgcgttgt gcagtacata ggatacaac gtggaagagg attccctcac	300

```

gactggctgt tctggccttc tatgggttac atatgtttcg tcatggatac tcgaggacag      360
ggaagcggtt ggatgaaagg agatacacgg gattaccctg aggatccctg tgacctcag      420
tatccaggat tcatgacaag aggaatactg gatcccgaaa cttactacta cagacgagtc      480
ttcacggacg ctgtcagagc cgttgaagcc gctgcttctt ttctcgggt agatcacgaa      540
agaatcgtga tagctggagg cagtcagggt ggcggaatag cccttgcggt gagecgtctc      600
tcaaagaaag caaagctctt tctgtgcgat gtgccgtttc tgtgtcactt cagaagggca      660
gtgcagcttg tggatacgca tccatacgcg gagatcacga actttctaaa gaccacaggg      720
gacaaggaag aaatcgtgtt caggactctt tctatttctg atggagttaa cttcgcagtc      780
agagcgaaga tccctgcgct gttttctgtg ggtctcatgg acaacatttg tctccttca      840
acggtttttg ctgectacaa tcaactacgt gggccgaagg aaatcagaat ctatccgtac      900
aacaaccacg agggaggagg ctctttccag gcaattgaac aggtgaaatt cttgaagaga      960
ctatttgaga aaggctag                                     978

```

```

<210> 90
<211> 325
<212> PRT
<213> Thermotoga petrophilia

```

[0076]

```

<400> 90
Met Ala Phe Phe Asp Leu Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
1          5          10          15

Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Glu Gly Thr Leu
20          25          30

Ala Glu Asn Glu Lys Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Arg Met Glu
35          40          45

Ser His Leu Lys Thr Val Glu Ala Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
50          55          60

Met Gly Gln Arg Ile Lys Gly Trp Leu Leu Val Pro Lys Leu Glu Glu
65          70          75          80

Glu Lys Leu Pro Cys Val Val Gln Tyr Ile Gly Tyr Asn Gly Gly Arg
85          90          95

Gly Phe Pro His Asp Trp Leu Phe Trp Pro Ser Met Gly Tyr Ile Cys
100         105         110

Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Ser Gly Trp Met Lys Gly Asp
115         120         125

```

Thr Pro Asp Tyr Pro Glu Asp Pro Val Asp Pro Gln Tyr Pro Gly Phe
130 135 140

Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Arg Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg Val
145 150 155 160

Phe Thr Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Ala Ala Ala Ser Phe Pro Arg
165 170 175

Val Asp His Glu Arg Ile Val Ile Ala Gly Gly Ser Gln Gly Gly Gly
180 185 190

Ile Ala Leu Ala Val Ser Ala Leu Ser Lys Lys Ala Lys Ala Leu Leu
195 200 205

Cys Asp Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Leu Val
210 215 220

Asp Thr His Pro Tyr Ala Glu Ile Thr Asn Phe Leu Lys Thr His Arg
225 230 235 240

Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly Val
245 250 255

[0077]

Asn Phe Ala Val Arg Ala Lys Ile Pro Ala Leu Phe Ser Val Gly Leu
260 265 270

Met Asp Asn Ile Cys Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn His
275 280 285

Tyr Ala Gly Pro Lys Glu Ile Arg Ile Tyr Pro Tyr Asn Asn His Glu
290 295 300

Gly Gly Gly Ser Phe Gln Ala Ile Glu Gln Val Lys Phe Leu Lys Arg
305 310 315 320

Leu Phe Glu Lys Gly
325

<210> 91

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 91

atggcggttct ttgatctgcc tctg

24

	<210> 92	
	<211> 25	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 92	
	ttagcctttc tcgaacagac gtttc	25
	<210> 93	
	<211> 978	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 93	
	atggcggttct ttgatctgcc tctggaagaa ctgaagaaat accgtccaga acgctatgaa	60
	gaaaaggatt ttgatgaatt ttggaagaa actctggctg aatctgaaaa gttcccgcgtg	120
	gatccggttt tcgaacgtat ggaatctcac ctgaagactg ttgaggttta cgatgtgact	180
	tttagcggct atcgtggcca gcgtatcaaa ggcctggctgc tggcgccgaa actggaggag	240
[0078]	gagaaactgc cgtgtgtcgt tcaatacatt ggttataatg gtggccgcgg tttcccgcgt	300
	gattggctgt tctggccgtc catgggctat atctgctttg taatggacac ccgtggccag	360
	ggctccggtt ggctgaaagg tgatacccg gactaccgg aggaccgggt tgatccgcag	420
	tatccgggtt ttatgaccg cggatcctg gaccctcgta cttactatta ccgtcgcgt	480
	ttcacgatg cagtgcgcgc tgttgaggcg gcagcaagct tcccgcgcgt cgaccacgag	540
	cgtatcgta tcgcggttg ttctcaagc ggtggcattg ccctggcggt gtccgcgtg	600
	agcaagaaag cgaaagcgt gctgtgcgac gttccattcc tgtgtcactt ccgccgtgct	660
	gttcagctgg ttgatactca ccatacgt gaaatcacta acttctgaa aactcacgt	720
	gacaaggaag agattgtatt ccgtactctg tctacttctg acggtgtgaa cttcgcgtt	780
	cgtgcaaaga tccagccct gttttctgtg ggtctgatgg ataacatctg cccgccgagc	840
	acggtttttg ctgcgtacaa ccactatgt ggtccaaaag aaatccgtat ctatccgtac	900
	aacaatcacg agggcgggtg ttctttccag gcgattgagc aggtgaagtt cctgaaacgt	960
	ctgttcgaga aaggctaa	978
	<210> 94	
	<211> 49	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	94	
	taactgcagt aaggaggaat aggacatggc gttctttgat ctgcctctg		49
	<210>	95	
	<211>	34	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	95	
	tgatctagat tagcctttct cgaacagacg ttcc		34
	<210>	96	
	<211>	1012	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	合成构建体	
	<400>	96	
	taactgcagt aaggaggaat aggacatggc gttctttgat ctgcctctgg aagaactgaa		60
[0079]	gaaataccgt ccagaacgct atgaagaaaa ggattttgat gaattttgga aagaaactct		120
	ggctgaatct gaaaagtcc cgctggatcc ggttttcgaa cgtatggaat ctcacctgaa		180
	gactgttgag gtttacgatg tgacttttag cggctatcgt ggccagcgta tcaaaggetg		240
	gctgctggtg ccgaaactgg aggaggagaa actgccgtgt gtcgttcaat acattggtta		300
	taatggtgge cgcggtttcc cgcagtgatt gctgttctgg ccgtccatgg gctatatctg		360
	ctttgtaatg gacacccgtg gccagggtcc cggttggctg aaaggtgata ccccgacta		420
	cccgaggac ccggttgatc cgcagtatcc gggttttatg acccgcggtg tccctggacce		480
	tcgtacttac tattaccgtc gcgtattcac cgatgcagtg cgcgctgttg aggcggcage		540
	aagcttcccg cgcgtcgacc acgagcgtat cgttatcgcg ggtggttctc aaggcggtgg		600
	cattgccctg gcggtgtccg cgtgagcaa gaaagcgaaa gcgtgctgt gcgacgttcc		660
	attcctgtgt cacttccgcc gtgctgttca gctggttgat actcaccat acgtgaaat		720
	cactaacttc ctgaaaactc accgtgacaa ggaagagatt gtattccgta ctctgtccta		780
	cttcgacggt gtgaacttcg cggttcgtgc aaagatccca gccctgtttt ctgtgggtct		840
	gatggataac atctgcccgc cgagcacggt ttttgcgtgc tacaaccact atgtggtcc		900
	aaaagaaatc cgtatctatc cgtacaacaa tcacagggc ggtggttctt tccaggcgat		960
	tgacgaggtg aagttcctga aacgtctgtt cgagaaagge taatctagat ca		1012

<210> 97
 <211> 978
 <212> DNA
 <213> 热袍菌属物种 RQ2

<400> 97
 atggcctttt tcgatttacc actegaagaa ctgaagaaat accgtccgga gcggtacgaa 60
 gagaaagact tcgatgagtt ctggaaagaa acactcgcag agagcgaaaa gtttccctg 120
 gaccccgctet tcgagaggat ggagtctcac ctcaaaacgg tcgaagtgt cgaatgcacc 180
 ttctccggat acagaggaca gaggatcaag ggggtgctcc ttgttccaaa attggaagaa 240
 gaaaaacttc cctgcgttgt gcagtacata ggatacaacg gtggaagagg attccctcac 300
 gactggctgt tctggccttc tatgggttac atatgtttcg tcatggatac tcgaggacag 360
 ggaagcggtt ggtgaaagg agatacccg gattaccctg aggatccctg tgaccctcag 420
 tatccaggat tcatgacaag aggaatactg gateccagaa cttactacta cagacgagtc 480
 ttcacggacg ctgtcagagc cgttgaagcc gctgcttctt ttctcgggt agatcacgaa 540
 agaatcgtga tagctggagg cagtcagggt ggccggaatag cccttgcggt gagecgtctc 600
 tcaaagaaag caaagctct tctgtcgat gtgccgtttc tgtgtcactt cagaagggca 660
 gtgcagcttg tggatacgca tccatacgcg gagatcacga actttctaaa gactcacagg 720
 [0080] gacaaggaag aaatcgtgtt caggactctt tctatctcg atggagtga cttcgcagtc 780
 agagcgaaga tccctgcgt gttttctgtg ggtctcatgg acaacatttg tctccttca 840
 acggtttttg ctgectacaa tcactacgct gggccgaagg aaatcagaat ctatccgtac 900
 aacaaccacg agggaggagg ctctttccag gcaattgaac aggtgaaatt cttgaagaga 960
 ctatttgaga aaggctag 978

<210> 98
 <211> 325
 <212> PRT
 <213> 热袍菌属物种 RQ2

<400> 98
 Met Ala Phe Phe Asp Leu Pro Leu Glu Glu Leu Lys Lys Tyr Arg Pro
 1 5 10 15
 Glu Arg Tyr Glu Glu Lys Asp Phe Asp Glu Phe Trp Lys Glu Thr Leu
 20 25 30
 Ala Glu Ser Glu Lys Phe Pro Leu Asp Pro Val Phe Glu Arg Met Glu
 35 40 45
 Ser His Leu Lys Thr Val Glu Val Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
 50 55 60

Arg	Gly	Gln	Arg	Ile	Lys	Gly	Trp	Leu	Leu	Val	Pro	Lys	Leu	Glu	Glu	65	70	75	80
Glu	Lys	Leu	Pro	Cys	Val	Val	Gln	Tyr	Ile	Gly	Tyr	Asn	Gly	Gly	Arg	85	90	95	
Gly	Phe	Pro	His	Asp	Trp	Leu	Phe	Trp	Pro	Ser	Met	Gly	Tyr	Ile	Cys	100	105	110	
Phe	Val	Met	Asp	Thr	Arg	Gly	Gln	Gly	Ser	Gly	Trp	Leu	Lys	Gly	Asp	115	120	125	
Thr	Pro	Asp	Tyr	Pro	Glu	Asp	Pro	Val	Asp	Pro	Gln	Tyr	Pro	Gly	Phe	130	135	140	
Met	Thr	Arg	Gly	Ile	Leu	Asp	Pro	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Arg	Arg	Val	145	150	155	160
Phe	Thr	Asp	Ala	Val	Arg	Ala	Val	Glu	Ala	Ala	Ala	Ser	Phe	Pro	Arg	165	170	175	
Val	Asp	His	Glu	Arg	Ile	Val	Ile	Ala	Gly	Gly	Ser	Gln	Gly	Gly	Gly	180	185	190	
Ile	Ala	Leu	Ala	Val	Ser	Ala	Leu	Ser	Lys	Lys	Ala	Lys	Ala	Leu	Leu	195	200	205	
Cys	Asp	Val	Pro	Phe	Leu	Cys	His	Phe	Arg	Arg	Ala	Val	Gln	Leu	Val	210	215	220	
Asp	Thr	His	Pro	Tyr	Ala	Glu	Ile	Thr	Asn	Phe	Leu	Lys	Thr	His	Arg	225	230	235	240
Asp	Lys	Glu	Glu	Ile	Val	Phe	Arg	Thr	Leu	Ser	Tyr	Phe	Asp	Gly	Val	245	250	255	
Asn	Phe	Ala	Val	Arg	Ala	Lys	Ile	Pro	Ala	Leu	Phe	Ser	Val	Gly	Leu	260	265	270	
Met	Asp	Asn	Ile	Cys	Pro	Pro	Ser	Thr	Val	Phe	Ala	Ala	Tyr	Asn	His	275	280	285	
Tyr	Ala	Gly	Pro	Lys	Glu	Ile	Arg	Ile	Tyr	Pro	Tyr	Asn	Asn	His	Glu	290	295	300	
Gly	Gly	Gly	Ser	Phe	Gln	Ala	Ile	Glu	Gln	Val	Lys	Phe	Leu	Lys	Arg	305	310	315	320

[0081]

	Leu Phe Glu Lys Gly	
	325	
	<210> 99	
	<211> 24	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 99	
	atggctctgt tcgatatgcc gctg	24
	<210> 100	
	<211> 28	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 100	
	ttacgcctta aattgccctt tcaggatg	28
[0082]	<210> 101	
	<211> 990	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 101	
	atggctctgt tcgatatgcc gctggaaaaa ctgcgtcttt atctgccgga tcgctatgag	60
	gaggaagact ttgatctgtt ctggaaagaa accctggagg agtctctgtaa gttcccctg	120
	gatccaatct tcgaacgcgt agattacctg ctggagaacg tagaggttta cgacgtgacc	180
	ttttccggct atcgtggcca gcgtatcaaa gectggetga ttctgccggt tgtaaaaaag	240
	gaggagcgcc tgccgtgcat cgtcgagttc atcggtacc gcggtggtcg cggttcccg	300
	ttcgattggc tgttctggtc tagcgcgggc tatgtcact tcgttatgga tactcgcggc	360
	cagggcacta gccgtgtcaa gggcgatacc ccggttact gcgatgagcc gatcaaccgc	420
	cagttcccg gtttcatgac ccgtggcatc ctggaccac gcacgtacta ctatcgtcgt	480
	gttttcaccg acgtgtgctg cgcagttgag accgctagca gctttccggg catcgatccg	540
	gaacgtattg ctgttgttgg caccctccag ggtggtggtg tcgctctggc ggtagctgct	600
	ctgtctgaaa ttccgaaagc actggtttct aacgtcccat tcctgtgcca ttttcgtcgt	660
	gcggttcaga tcaccgataa tgetccgtac agcgaaatcg tgaactacct gaaagttcac	720

	cgcgataaag aagagatcgt tttccgcacc ctgtcttact ttgatggcgt gaatttcgcg	780
	gctcgcgcaa agattccagc getgttttct gttgccctga tggataaaac ctgtccgcgc	840
	tccaccgttt tcgtcgcgta taaccattac gcgggtccga aagaaatcaa agtttatccg	900
	ttcaatgagc acgaaggcgg tgaatccttt cagcgtatgg aggagctgcg ttttatgaag	960
	cgcctcctga aaggcgaatt taaggcgtaa	990
	<210> 102	
	<211> 52	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
	<400> 102	
	ttactgcagc agtccggagg aataggacat ggcctctgttc gatatgccgc tg	52
	<210> 103	
	<211> 37	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 引物	
[0083]	<400> 103	
	tgatctagat tacgccttaa attgcccttt caggatg	37
	<210> 104	
	<211> 1027	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成构建体	
	<400> 104	
	ttactgcagc agtccggagg aataggacat ggcctctgttc gatatgccgc tggaaaaact	60
	gcgctcttat ctgccggatc gctatgagga ggaagacttt gatctgttct ggaaagaaac	120
	cctggaggag tctcgtaagt tcccgtgga tccaatcttc gaacgcgtag attacctgct	180
	ggagaacgta gaggttttacg acgtgacctt ttccggctat cgtggccagc gtatcaaagc	240
	ctggetgatt ctgccggttg ttaaaaagga ggagcgctg ccgtgcatcg tcgagttcat	300
	cggctaccgc ggtggtcgcg gcttcccggt cgattggctg ttctggctct gcgcgggcta	360
	tgctcacttc gttatggata ctccgggcca gggcactagc cgtgtcaagg gcgatacccc	420
	ggattactgc gatgagccga tcaaccgca gtccccgggt ttcatgacct gtggcatcct	480
	ggaccacgc acgtactact atcgtcgtgt ttccaccgac gctgtgcgcg cagttgagac	540
	cgctagcagc tttccgggca tcgacccgga acgtattgct gttgttggca cctcccaggg	600

	tggtggtatc gctctggcgg tagctgctct gtctgaaatt ccgaaagcac tggtttctaa	660
	cgteccattc ctgtgccatt ttctgtgtgc ggttcagatc accgataatg ctccgtacag	720
	cgaaatcgtg aactacctga aagttcaccc cgataaagaa gagatcgttt tccgcacct	780
	gtcttacttt gatggcgtga atttcgcggc tcgcgcaaag attccagcgc tgttttctgt	840
	tgccctgatg gataaaacct gtccgcgcgc caccgttttc gctgcgtata accattacgc	900
	gggtccgaaa gaaatcaaag tttatccgtt caatgagcac gaaggcgggtg aatcctttca	960
	gcgtatggag gagctgcgtt ttatgaagcg catcctgaaa ggcaattta aggcgtaac	1020
	tagatca	1027
	<210> 105	
	<211> 990	
	<212> DNA	
	<213> 热袍菌属物种 RQ2	
	<400> 105	
	atggcgctat ttgatatgcc tctggaaaag ttaagatcat accttccga tagatacgag	60
	gaggaagatt ttgatctgtt ctggaaagag actcttgagg agtcaagaaa attcccactg	120
	gacctatatt ttgaaagagt agattatctg ctggagaacg tggaagtata cgatgtcacc	180
	ttctccggtt acaggggtca aagaataaag gcgtgggtga ttctaccggt tgtaagaag	240
[0084]	gaagaaaggc ttccctgcat cgttgaattc ataggttaca ggggaggaag aggttttccc	300
	ttcgattggc tcttctggag cagtgcgggg tatgccatt tcgtgatgga cactgcgggc	360
	caggaacca gtagagtaaa ggggtgatact cctgactact gtgatgaacc cataaatcct	420
	caattcccgc gattcatgac gcggggaata ctggatccca ggacttacta ttacagaaga	480
	gtttttaccg atgctgtaag agcagtggaa accgcttcga gtttcccggt aatagatccc	540
	gaaaggatag ccgtcgtggg aacaagccag ggtgggggaa ttgcattggc ggtggcggcg	600
	ctttccgaaa ttccaaagc tcttgatcg aatgttccgt ttctgtgtca ttccagaaga	660
	gcggttcaga taacagataa cgtcccttac agtgagatag tgaattattt gaaagtccac	720
	agagacaaag aggaaattgt gttcagaacg ctttcgtact ttgatggagt gaactttgct	780
	gcgagggcaa aaataccage acttttctct gttgctctca tggacaaaac ctgtccacct	840
	tctacagttt ttgtgtgta caaccattac gctgggtcaa aagaaatcaa agtgtatcca	900
	ttcaacgaac atgaaggtgg agaattcttc cagagaatgg aggaacttcg ctttatgaaa	960
	aggattctaa aagggaatt caaagcatga	990
	<210> 106	
	<211> 329	
	<212> PRT	
	<213> 热袍菌属物种 RQ2	

<400> 106

Met Ala Leu Phe Asp Met Pro Leu Glu Lys Leu Arg Ser Tyr Leu Pro
1 5 10 15

Asp Arg Tyr Glu Glu Glu Asp Phe Asp Leu Phe Trp Lys Glu Thr Leu
20 25 30

Glu Glu Ser Arg Lys Phe Pro Leu Asp Pro Ile Phe Glu Arg Val Asp
35 40 45

Tyr Leu Leu Glu Asn Val Glu Val Tyr Asp Val Thr Phe Ser Gly Tyr
50 55 60

Arg Gly Gln Arg Ile Lys Ala Trp Leu Ile Leu Pro Val Val Lys Lys
65 70 75 80

Glu Glu Arg Leu Pro Cys Ile Val Glu Phe Ile Gly Tyr Arg Gly Gly
85 90 95

Arg Gly Phe Pro Phe Asp Trp Leu Phe Trp Ser Ser Ala Gly Tyr Ala
100 105 110

[0085]

His Phe Val Met Asp Thr Arg Gly Gln Gly Thr Ser Arg Val Lys Gly
115 120 125

Asp Thr Pro Asp Tyr Cys Asp Glu Pro Ile Asn Pro Gln Phe Pro Gly
130 135 140

Phe Met Thr Arg Gly Ile Leu Asp Pro Arg Thr Tyr Tyr Tyr Arg Arg
145 150 155 160

Val Phe Thr Asp Ala Val Arg Ala Val Glu Thr Ala Ser Ser Phe Pro
165 170 175

Gly Ile Asp Pro Glu Arg Ile Ala Val Val Gly Thr Ser Gln Gly Gly
180 185 190

Gly Ile Ala Leu Ala Val Ala Ala Leu Ser Glu Ile Pro Lys Ala Leu
195 200 205

Val Ser Asn Val Pro Phe Leu Cys His Phe Arg Arg Ala Val Gln Ile
210 215 220

Thr Asp Asn Ala Pro Tyr Ser Glu Ile Val Asn Tyr Leu Lys Val His
225 230 235 240

Arg Asp Lys Glu Glu Ile Val Phe Arg Thr Leu Ser Tyr Phe Asp Gly
245 250 255

Val Asn Phe Ala Ala Arg Ala Lys Ile Pro Ala Leu Phe Ser Val Ala
260 265 270

Leu Met Asp Lys Thr Cys Pro Pro Ser Thr Val Phe Ala Ala Tyr Asn
275 280 285

[0086]

His Tyr Ala Gly Pro Lys Glu Ile Lys Val Tyr Pro Phe Asn Glu His
290 295 300

Glu Gly Gly Glu Ser Phe Gln Arg Met Glu Glu Leu Arg Phe Met Lys
305 310 315 320

Arg Ile Leu Lys Gly Glu Phe Lys Ala
325

SEQ ID NO.2	-MQLFDLPLDQLQTYKPEKTAPKDFSEFWKLSLEELAKVQAEPLQPVVDYPADGVKVYRL
SEQ ID NO.6	-MQLFDLPLDQLQTYKPEKTAPKDFSEFWKLSLEELAKVQAEPLQPVVDYPADGVKVYRL
SEQ ID NO.8	-MQLFDLPLDQLQTYKPEKTTNDFSEFWKSSLEELAKVKAAPDLQLVVDYPADGVKVYRL
SEQ ID NO.10	MQQPYDMPLEQLYQYKPERTAPADFKFSEFWKGSLEELANEKAGPQLEPHEY PADGVKVYWL
SEQ ID NO.12	-MQLFDLSLEELKKYKPKKTARPDFSDFWKSSLEELRQVEAEPTLESYDYPVKGVKVYRL
SEQ ID NO.14	MAQLYDMPLEELKKYKPAITKQKDFDEFWEKSLKELAEIPLKYQLI PYDFPARRVKVFRV
SEQ ID NO.16	-MAFFDMPLEELKKYRPERYEEKDFDEFWRETKESEGFPLDPVFEKVD FHLKTVETVDV
SEQ ID NO.18	-MAFFDLPLEELKKYRPERYEEKDFDEFWEETLAESEKFPPLDPVFERMESHLKTVEAYDV
SEQ ID NO.26	-MPLVDMPLRELLAYEGINPKPADFDQYWNRAKTEIEAIDPEVTLVESFQCSFANCYHF
SEQ ID NO.32	-MQLFDLPLDQLQTYKPEKTAPKDFSEFWKLSLEELAKVQAEPLQPVVDYPADGVKVYRL
SEQ ID NO.70	-MGLFDMPLQKLREYTGTPCEDFDEFYWDRADEMRSVDPKIKMKKSSFQVFFAEACYDL
SEQ ID NO.82	-MVYFDMPLEDLRKYLPRYEEKDFDDFWKQTIHETRQYFQEPILKKVD FYLQNVETFDV
SEQ ID NO.90	-MAFFDLPLEELKKYRPERYEEKDFDEFWEGTLAENEKFPPLDPVFERMESHLKTVEAYDV
SEQ ID NO.98	-MAFFDLPLEELKKYRPERYEEKDFDEFWKETLAESEKFPPLDPVFERMESHLKTVEYVDV
SEQ ID NO.106	-MALFDMPLEKLRSYLPDRYEEEDFDLFWKETLEESRKFPPLDPIFERVDYLLNVEYVDV
	*:. * . * * * * . : * : * : . . : : .
SEQ ID NO.2	TYKSGNARITGWYAVPDKQ--GPHPAIVKYHGYNASYDGEIHEMVNWALHGYAAFGMLV
SEQ ID NO.6	TYKSGNARITGWYAVPDKQ--GPHPAIVKYHGYNASYDGEIHEMVNWALHGYATFGMLV
SEQ ID NO.8	TYKSGNARITGWYAVPDKQ--GPHPAIVKYHGYNASYDGEIHEMVNWALHGYAAFGMLV
SEQ ID NO.10	TYRSIGGARIKGWYAVPDRQ--GPHPAIVKYHGYNASYDGDHIDIVNWALHGYAAFGMLV
SEQ ID NO.12	TYQSFGHSKIEGFYAVPDQT--GPHPALVRFHGYNASYDGGIHDIVNWALHGYATFGMLV
SEQ ID NO.14	EYLGFGKGANIEGWLAVPEGE--GLYPGLVQFHGYNWAMDGCVDPVNVWALNGYAAFLMLV
SEQ ID NO.16	TFSGYRGQRIKGWLLVPKLA--EEKLPCVVQYIGYNGGR--GFPHDWLFWPSMGYICFVMDT
SEQ ID NO.18	TFSGYRGQRIKGWLLVPKLE--EEKLPCVVQYIGYNGGR--GFPHDWLFWPSMGYICFVMDT
SEQ ID NO.26	YYRSAGNAKIHAKEYVQPKAG--EKTPAVFMFHGYGGRS--AEWSSLLNYVAAGFSVFYMDV
SEQ ID NO.32	TYKSGNARITGWYAVPDKQ--GPHPAIVKYHGYNASYDGEIHEMVNWALHGYAAFGMLV
SEQ ID NO.70	YFTGVRGARIHAKEYIRPKTE--GKHPALIRFHGYSSNS--GDWNDKLNVAAGFTVVAMDA
SEQ ID NO.82	TFSGYRGQRIKGWLLVPKFR--NGKLPCVVEFVGYGGGR--GFPYDWLLWSAAGYAHFIMDT
SEQ ID NO.90	TFSGYMGQRIKGWLLVPKLE--EEKLPCVVQYIGYNGGR--GFPHDWLFWPSMGYICFVMDT
SEQ ID NO.98	TFSGYRGQRIKGWLLVPKLE--EEKLPCVVQYIGYNGGR--GFPHDWLFWPSMGYICFVMDT
SEQ ID NO.106	TFSGYRGQRIKAWLILPVVKEERLPCIVEFIGYRGGR--GFPFDWLFWSSAGYAHFVMDT
	: . . * . * * * : . : ** . . : : * : . * .

图1A


```

SEQ ID NO.2      RGQQS-SEDTSISLH-----GHALGWMTKGILD-KDTYYYRGVYLDRAVALEVISSFDE
SEQ ID NO.6      RGQQS-SEDTSISPH-----GHALGWMTKGILD-KDTYYYRGVYLDRAVALEVISSFDE
SEQ ID NO.8      RGQQS-SEDTSISPH-----GHALGWMTKGILD-KDTYYYRGVYLDRAVALEVISSFDE
SEQ ID NO.10     RGQNS-SEDTEISHH-----GHVPGWMTKGILD-PKTTYRGGVYLDRAVALEVVSFGAE
SEQ ID NO.12     RGQGG-SEDTSVTPG-----GHALGWMTKGILS-KDTYYYRGVYLDRAVALEVIQSFPF
SEQ ID NO.14     RGQGRSVDNIVPGS-----GHALGWMSKGILS-PEEYYYRGVYMDRAVAEILASLPC
SEQ ID NO.16     RGQGSWMMKGDTDPDYPEGPVDPQYPGFMTRGILD-PGTYYYRRVFVDAVRAVEAAISFPR
SEQ ID NO.18     RGQGSWGLKGDTDPDYPEGPVDPQYPGFMTRGILD-PRTYYYRRVFVDAVRAVEAAASFPQ
SEQ ID NO.26     RGQGGTSEDPPGVVRG-----NTYRGHIIRGLDAGPDALFYRSVFLDTVQLVRAAKTLPH
SEQ ID NO.32     RGQQS-SEDTSISPH-----GHALGWMTKGILD-KDTYYYRGVYLDRAVALEVISSFDE
SEQ ID NO.70     RGQGGQSQDVGGVNG-----NTLNGLHIIRGLDDDADNMLFRHIFLDTAQIAGIVMMNPE
SEQ ID NO.82     RGQGSNWMKGDTPDYEDNPSDPQYPGFLTKGVLN-PETYYYRRVFMDAFMAVETISQLEQ
SEQ ID NO.90     RGQGSWMMKGDTDPDYPEDPVDQYPGFMTRGILD-PRTYYYRRVFVDAVRAVEAAASFP
SEQ ID NO.98     RGQGSWGLKGDTDPDYPEDPVDQYPGFMTRGILD-PRTYYYRRVFVDAVRAVEAAASFP
SEQ ID NO.106    RGQGTSRVKGDTPDYCDEPINPQFPGFMTRGILD-PRTYYYRRVFVDAVRAVETASSFP
***          .          * : : * :          : * : : * :          :

SEQ ID NO.2      VDETRIGVTGGSQGGGLTIAAAALSDIPKAAVADYPYLSNFERAIDVALEQ-PYLEINSF
SEQ ID NO.6      VDETRIGVTGGSQGGGLTIAAAALSDIPKAAVADYPYLSNFERAIDVALEQ-PYLEINSF
SEQ ID NO.8      VDETRIGVTGGSQGGGLTIAAAALSDIPKAAVADYPYLSNFERAIDVALEQ-PYLEINSF
SEQ ID NO.10     VDEKRIGVIGASQGGGLAVAVSALSIPKAAVSEYPYLSNFQRAIDTAIDQ-PYLEINSF
SEQ ID NO.12     VDEHRIGVIGGSQGGGALIAAAALSDIPKVVVADYPYLSNFERAIDVALEQ-PYLEINSY
SEQ ID NO.14     VDESRIQVTGGSQGGGLALAVAALSGIPKVAHVHPFLAHFERAIDVAPDG-PYLEINEY
SEQ ID NO.16     VDSRKVVVAGGSQGGGIALAVSALSNRVKALLCDVPFLCHFRRAVQLVDTH-PYVEITNF
SEQ ID NO.18     VDQERIVIAGGSQGGGIALAVSALSKKAKALLCDVPFLCHFRRAVQLVDTH-PYAEITNF
SEQ ID NO.26     IDKTRIMATGWSQGGGALTACAALVPEIKRLAPVYPFLSDYKRVWQMDLAVRSYKELADY
SEQ ID NO.32     VDETRIGVTGGSQGGGLTIAAAALSDIPKAAVADYPYLSNFERAIDVALEQ-PYLEINSF
SEQ ID NO.70     IDEDRVAVMGPSQGGGLSLACAALPKIRKVVSEYPFLSDYKRVWDLDLAKNAYQEITDY
SEQ ID NO.82     IDSQTIIISGASQGGGIALAVSALSCKKAKALLCDVPFLCHYKRAVQITDSM-PYAEITRY
SEQ ID NO.90     VDHERIVIAGGSQGGGIALAVSALSCKKAKALLCDVPFLCHFRRAVQLVDTH-PYAEITNF
SEQ ID NO.98     VDHERIVIAGGSQGGGIALAVSALSCKKAKALLCDVPFLCHFRRAVQLVDTH-PYAEITNF
SEQ ID NO.106    IDPERIAVVGTSQGGGIALAVAALSEIPKALVSNVPFLCHFRRAVQITDNA-PYSEIVNY
: *      :      * * * * . : : : * : * *      * : * . . . * . :      . * * : :

```

图1B

```

SEQ ID NO.2      FRRNGS-PETEVQAMKTLSTSYFDIMNLADRVKVPVLMSIGLIDKVTTPPSTVFAAYNHLETE
SEQ ID NO.6      FRRNGS-PETEVQAMKTLSTSYFDIMNLADRVKVPVLMSIGLIDKVTTPPSTVFAAYNHLETK
SEQ ID NO.8      FRRNGS-PETEEKAMKTLSTSYFDIMNLADRVKVPVLMSIGLIDKVTTPPSTVFAAYNHLETE
SEQ ID NO.10     FRRNTS-PDIEQAAMHTLSYFDVMNLAQLVKATVLMSIGLVDITTPPSTVFAAYNHLETD
SEQ ID NO.12     FRRNSD-PKVEEKAFETLSYFDLINLAGWVKQPTLMAIGLIDKITPPSTVFAAYNHLETD
SEQ ID NO.14     LRRNSG-EEIERQVKKTLSTSYFDIMNLAPRIKCRTWICTGLVDEITPPSTVFAAYNHLKCP
SEQ ID NO.16     LKTHR---DKEEIVFRTLSYFDGVNFAARAKVPALFSVGLMDTICPPSTVFAAYNHYAGP
SEQ ID NO.18     LKTHR---DKEEIVFRTLSYFDGVNFAARAKIPALFSVGLMDNICPPSTVFAAYNYYAGP
SEQ ID NO.26     FRSYDPQHKRHGEIIFERLGYIDVQHLADRIQGDVLMGVGLMDTECPPSTQFAAYNKIKAK
SEQ ID NO.32     FRRNGS-PETEVQAMKTLSTSYFDIMNLADRVKVPVLMSIGLIDKVTTPPSTVFAAYNHLETE
SEQ ID NO.70     FRLFDPRHERENEVFTKLGYIDVKNLAKRIKGDVLMCVGLMDQVCPSTVFAAYNNIQSK
SEQ ID NO.82     CKTHI---DKIQTVFRTLSYFDGVNFAARAKCPALFSVGLMDDICPPSTVFAAYNYYAGE
SEQ ID NO.90     LKTHR---DKEEIVFRTLSYFDGVNFAVRAKIPALFSVGLMDNICPPSTVFAAYNHYAGP
SEQ ID NO.98     LKTHR---DKEEIVFRTLSYFDGVNFAVRAKIPALFSVGLMDNICPPSTVFAAYNHYAGP
SEQ ID NO.106    LKVHR---DKEEIVFRTLSYFDGVNFAARAKIPALFSVALMDKTCPPSTVFAAYNHYAGP
                  :      .      *.*:*  :.*  :  . :  .*:*  *****.*.*

SEQ ID NO.2      KELKVYRYFGHEYIPAFQT-EKLAFFKQHLKG----
SEQ ID NO.6      KELKVYRYFGHEYIPAFQT-EKLAFFKQHLKG----
SEQ ID NO.8      KELKVYRYFGHEYIPAFQT-EKLAFFKQHLKG----
SEQ ID NO.10     KEIKVYRYFGHEYIPPFQT-EKLAFLRKHLK-----
SEQ ID NO.12     KDLKVYRYFGHEFIPAFQT-EKLSFLQKHLLLST--
SEQ ID NO.14     KEISVFRYFGHEHMPGSVE-IKLRIILMDELNP----
SEQ ID NO.16     KEIRIYPYNNHEGGGSFQAIEQVKFLKRLFEEG---
SEQ ID NO.18     KEIRIYPYNNHEGGGSFQAVEQVKFLKKLFEKG---
SEQ ID NO.26     KSYELYPDFGHEHLPGMND-HIFRFFTS-----
SEQ ID NO.32     KELKVYRYFGHEYIPAFQT-EKLAFFKQHLKG----
SEQ ID NO.70     KDIKVYPDYGHEPMRGFGD-LAMQFMLELYS-----
SEQ ID NO.82     KDIRIYPYNNHEGGGSFHTLEKLKFKVKTISMRE--
SEQ ID NO.90     KEIRIYPYNNHEGGGSFQAIEQVKFLKRLFEEG---
SEQ ID NO.98     KEIRIYPYNNHEGGGSFQAIEQVKFLKRLFEEG---
SEQ ID NO.106    KEIKVYPFNEHEGGESFQRMEEELRFMKRILKGEFKA
                  *.  ::      **      .  :.

```

图1C