



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 105814199 B

(45)授权公告日 2019.12.13

(21)申请号 201480066933.9

(22)申请日 2014.12.08

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105814199 A

(43)申请公布日 2016.07.27

(30)优先权数据
2013-255419 2013.12.10 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.06.07

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2014/082415 2014.12.08

(87)PCT国际申请的公布数据
W02015/087833 JA 2015.06.18

(73)专利权人 天野酶株式会社
地址 日本爱知县

(72)发明人 石垣佑记 石原聪 田中俊一

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 苗堃 金世煜

(51)Int.Cl.

C12N 9/20(2006.01)

C12N 15/55(2006.01)

A23C 9/12(2006.01)

A23L 27/24(2016.01)

(56)对比文件

SCHMITT, J. ET AL..Blocking the tunnel: engineering of Candida rugosa lipase mutants with short chain length specificity.《PROTEIN ENG》.2002,第15卷(第7期),第595-601页.

LEE, L.-C. ET AL..Altering the Substrate Specificity of Candida rugosa LIP4 by Engineering the Substrate-Binding Sites.《J. AGRIC. FOOD CHEM.》.2007,第55卷(第13期),第5103-5108页.

AKOH, C.C. ET AL..Protein Engineering and Applications of Candida rugosa Lipase Isoforms.《LIPIDS》.2004,第39卷(第6期),第513-526页.

审查员 姚进孝

权利要求书1页 说明书12页

序列表30页 附图5页

(54)发明名称

修饰型脂肪酶及其用途

(57)摘要

本发明的课题在于提供具有短链~中链脂肪酸选择性的来源于微生物的脂肪酶。在来源于柱状假丝酵母的脂肪酶的氨基酸序列中,进行以下的(1)或(2)的取代而得到修饰型脂肪酶,(1)将与序列号1表示的氨基酸序列的428位氨基酸相当的氨基酸取代为天冬酰胺,或(2)将与序列号1表示的氨基酸序列的429位氨基酸相当的氨基酸取代为苯丙氨酸、甲硫氨酸或异亮氨酸。

1. 一种修饰型脂肪酶, 其特征在于, 由在来源于柱状假丝酵母的脂肪酶的氨基酸序列中进行以下 (1) 或 (2) 的取代而得的氨基酸序列构成, 所述来源于柱状假丝酵母的脂肪酶的氨基酸序列是序列号 1~7 中任一个氨基酸序列,

(1) 将与序列号 1 表示的氨基酸序列的 428 位氨基酸相当的氨基酸取代为天冬酰胺;

(2) 将与序列号 1 表示的氨基酸序列的 429 位氨基酸相当的氨基酸取代为苯丙氨酸、甲硫氨酸或异亮氨酸。

2. 根据权利要求 1 所述的修饰型脂肪酶, 是由序列号 8~11 中任一个氨基酸序列构成的。

3. 一种基因, 其特征在于, 编码权利要求 1 或 2 所述的修饰型脂肪酶。

4. 根据权利要求 3 所述的基因, 含有序列号 12~19 中任一个碱基序列。

5. 一种重组 DNA, 其特征在于, 含有权利要求 3 或 4 所述的基因。

6. 一种微生物, 其特征在于, 保有权利要求 5 所述的重组 DNA。

7. 根据权利要求 6 所述的微生物, 其中, 宿主是大肠杆菌、柱状假丝酵母、米曲霉、枯草芽孢杆菌或毕赤酵母菌。

8. 一种酶制剂, 其特征在于, 含有权利要求 1 或 2 所述的修饰型脂肪酶。

9. 一种食品或食品原料的风味改善方法, 其特征在于, 使权利要求 1 或 2 所述的酶或权利要求 8 所述的酶制剂与食品或食品原料作用。

10. 一种食品的制造方法, 其特征在于, 使权利要求 1 或 2 所述的酶或权利要求 8 所述的酶制剂与食品原料或中间产物作用。

11. 根据权利要求 9 或 10 所述的方法, 其中, 所述食品是乳制品。

12. 一种用于与食品或食品原料作用的风味改善剂, 其特征在于, 含有权利要求 1 或 2 所述的酶或权利要求 8 所述的酶制剂。

13. 一种食品或食品原料, 其特征在于, 是使权利要求 1 或 2 所述的酶或权利要求 8 所述的酶制剂作用而得到的。

修饰型脂肪酶及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及修饰型脂肪酶。详细而言,本发明提供修饰型脂肪酶、和利用修饰型脂肪酶的乳制品的制造方法等。本申请主张基于2013年12月10日申请的日本国专利申请第2013-255419号的优先权,该专利申请的全部内容通过参照援引入本申请说明书。

背景技术

[0002] 脂肪酶被用于乳制品的风味生成、风味增强。传统使用来源于山羊羔、小牛或羊羔的脂肪酶制剂。这些来源于反刍动物的脂肪酶,具有从乳脂分离短链脂肪酸(C₄、C₆)的特异性,适合乳制品的风味生成。

[0003] 但是,由于对用于食品加工的酶制剂要求犹太洁食、清真品质,针对动物来源脂肪酶的代替品存在强的产业要求。为了应对这一要求,提出了来源于微生物的酶の利用(例如专利文献1)、重组酶の利用(例如专利文献2)等。此外,为了适用于特定的用途,也尝试在基因工程上修饰脂肪酶(例如专利文献3~5)。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献1:日本特开昭61-135541号公报

[0007] 专利文献2:美国专利申请公开第2004/0001819号说明书

[0008] 专利文献3:日本特表2011-512809号公报

[0009] 专利文献4:日本特表2003-524386号公报

[0010] 专利文献5:日本特表2004-517639号公报

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献1:J.Schmitt et al.,Protein Engineering,vol.15,no.7,pp.595-601,2002

发明内容

[0013] 由于来源于微生物脂肪酶相比于短链脂肪酸对长链脂肪酸具有选择性,因此使其与乳脂作用时游离脂肪酸分布也是长链居多。由于长链的脂肪酸成为皂味的原因,因此,作为乳制品、特别是奶酪的风味而不优选。

[0014] 基于以上背景,本发明的课题在于提供具有短链~中链脂肪酸选择性的、来源于微生物的脂肪酶及其用途。

[0015] 在为了解决上述课题而进行研究的过程中,本发明人等着眼于来源于柱状假丝酵母(*Candida cylindracea*)的脂肪酶(使用了以前被称为来源于褶皱假丝酵母(*Candida rugosa*)的脂肪酶的产品),尝试对其修饰。反复试验后,从构成底物口袋的氨基酸中,成功发现能够实现目的的非常有效的突变位置。对该突变位置实施特定的氨基酸取代的突变体,将乳脂水解,与动物来源脂肪酶同样地选择性游离短链~中链脂肪酸(C₄~C₈)。突变体很好地与短链脂肪酸(C₄~C₆)作用,最好地与C₄的脂肪酸作用。因此,突变的结果是,成功使

底物特异性接近于动物来源脂肪酶。应予说明,对于来源于柱状假丝酵母(*Candida cylindracea*)的脂肪酶,虽然报告了对其底物特异性有效的突变(氨基酸取代)(非专利文献1),但是新发现的突变对于底物特异性(对于短链脂肪酸的选择性)的改变是有效的。

[0016] 此处,对于氨基酸序列的同源性高的酶(典型的为同工酶),鉴于立体结构(特别是活性部位、底物口袋等与活性相关的部位)的相似性高,同样的突变会产生同样的效果的可能性高这一技术常识,对于与实施例中使用的LIP1氨基酸同源性高的其他酶也能够使用同样的突变方法。

[0017] 以下发明,主要是基于以上成果和考察而完成的。

[0018] [1]一种修饰型脂肪酶,其由在来源于柱状假丝酵母的脂肪酶的氨基酸序列中进行了以下(1)或(2)的取代的氨基酸序列构成,

[0019] (1)将与序列号1表示的氨基酸序列的428位氨基酸相当的氨基酸取代为天冬酰胺;

[0020] (2)将与序列号1表示的氨基酸序列的429位氨基酸相当的氨基酸取代为苯丙氨酸、甲硫氨酸或异亮氨酸。

[0021] [2]根据[1]记载的修饰型脂肪酶,其中,上述来源于柱状假丝酵母的脂肪酶的氨基酸序列是与序列号2的氨基酸序列70%以上相同的氨基酸序列,并进行上述(1)的取代。

[0022] [3]根据[1]记载的修饰型脂肪酶,其中,上述来源于柱状假丝酵母的脂肪酶的氨基酸序列是与序列号2的氨基酸序列90%以上相同的氨基酸序列,并进行上述(2)的取代。

[0023] [4]根据[2]或[3]记载的修饰型脂肪酶,其中,上述来源于柱状假丝酵母的脂肪酶的氨基酸序列是序列号2~7中任一个氨基酸序列。

[0024] [5]根据[1]记载的修饰型脂肪酶,其中,是由序列号8~11中任一个氨基酸序列构成。

[0025] [6]一种基因,其编码[1]~[5]中任一项记载的修饰型脂肪酶。

[0026] [7]根据[6]记载的基因,其含有序列号12~19中任一个碱基序列。

[0027] [8]一种重组DNA,其含有[6]或[7]记载的基因。

[0028] [9]一种微生物,其保有[8]记载的重组DNA。

[0029] [10]根据[9]记载的微生物,其中,宿主是大肠杆菌、柱状假丝酵母、米曲霉、枯草芽孢杆菌或毕赤酵母菌。

[0030] [11]一种酶制剂,其含有[1]~[5]中任一项记载的修饰型脂肪酶。

[0031] [12]一种食品或食品原料的风味改善方法,其特征在于,使[1]~[5]中任一项记载的酶或[11]记载的酶制剂与食品或食品原料作用。

[0032] [13]一种食品的制造方法,其特征在于,使[1]~[5]中任一项记载的酶或[11]记载的酶制剂与食品原料或中间产物作用。

[0033] [14]根据[12]或[13]记载的方法,其中,食品是乳制品。

[0034] [15]一种用于与食品或食品原料作用的风味改善剂,其含有[1]~[5]中任一项记载的酶或[11]记载的酶制剂。

[0035] [16]一种食品或食品原料,是使[1]~[5]中任一项记载的酶或[11]记载的酶制剂作用而得到的。

附图说明

[0036] 图1:酶处理后的游离脂肪酸组成。使来源于柱状假丝酵母的野生型脂肪酶LIP1与奶酪(底物)作用,分析游离脂肪酸组成。

[0037] 图2:酶处理后的游离脂肪酸组成。使各种修饰型脂肪酶(突变体)与奶酪(底物)作用,比较游离脂肪酸组成。左上:使用来源于小牛舌下腺的脂肪酶。下:使用修饰型脂肪酶(突变体1:L428N、突变体2:G429F、突变体3:G429M、突变体4:G429I)。右上:使用已知的修饰型脂肪酶(L428F)。

[0038] 图3:来源于柱状假丝酵母的野生型脂肪酶LIP1(序列号2)、LIP1'(序列号3)、LIP2(序列号4)、LIP3(序列号5)、LIP4(序列号6)、LIP5(序列号7)的序列的比较。

[0039] 图4:图3的续图。

[0040] 图5:图4的续图。

具体实施方式

[0041] 为了说明的方便,对于与本发明相关而使用的术语的一部分作以下定义。

[0042] (术语)

[0043] 术语“修饰型脂肪酶”,是指将特定的脂肪酶(为了说明的方便,称为“基准脂肪酶”)修饰或突变而得到的酶。基准脂肪酶是来源于柱状假丝酵母(*Candida cylindracea*)的脂肪酶或来源于褶皱假丝酵母(*Candida rugosa*)的脂肪酶。术语“来源于柱状假丝酵母(*Candida cylindracea*)的脂肪酶”和术语“来源于褶皱假丝酵母(*Candida rugosa*)的脂肪酶”能够交换使用。

[0044] 术语“来源于柱状假丝酵母的脂肪酶”是指其起源是柱状假丝酵母的脂肪酶,包括柱状假丝酵母产生的脂肪酶、对柱状假丝酵母进行突变处理的酵母(突变株)产生的脂肪酶、或利用这些酶的遗传信息由其他微生物等表达的脂肪酶等。同样,术语“来源于褶皱假丝酵母的脂肪酶”是指其起源是褶皱假丝酵母的脂肪酶,包括褶皱假丝酵母产生的脂肪酶、对褶皱假丝酵母进行突变处理的酵母(突变株)产生的脂肪酶、或利用这些酶的遗传信息由其他微生物等表达的脂肪酶等。

[0045] 本发明中,作为修饰或突变,进行“氨基酸的取代”。因此,将修饰型脂肪酶和基准脂肪酶进行比较时,发现部分氨基酸残基不同。应予说明,本说明书中,将修饰型脂肪酶也称为修饰型酶或突变体。

[0046] 本说明书中按照惯例,如以下所示,各氨基酸用1个字母表示。

[0047] 甲硫氨酸:M、丝氨酸:S、丙氨酸:A、苏氨酸:T、缬氨酸:V、酪氨酸:Y、亮氨酸:L、天冬酰胺:N、异亮氨酸:I、谷氨酰胺:Q、脯氨酸:P、天冬氨酸:D、苯丙氨酸:F、谷氨酸:E、色氨酸:W、赖氨酸:K、半胱氨酸:C、精氨酸:R、甘氨酸:G、组氨酸:H

[0048] 本说明书,按照惯例,将与翻译起始点对应的甲硫氨酸作为第1位,从N末端向C末端通过附带的编号确定各氨基酸的位置。因此,信号肽被切断的成熟体中,仅信号肽那部分,氨基酸编号提前。

[0049] 本说明书中,将突变点的氨基酸残基(成为取代的对象的氨基酸残基)以表示氨基酸种类的上述1个字母和表示氨基酸位置的数字的组合来表达。例如,如果428位的甘氨酸是突变点,那么记为“G428”。

[0050] 1. 修饰型脂肪酶

[0051] 本发明的第1方面涉及修饰型脂肪酶(修饰型酶)。本发明的修饰型酶具有在来源于柱状假丝酵母的脂肪酶的氨基酸序列中进行了以下(1)或(2)的取代的氨基酸序列。

[0052] (1) 将与序列号1表示的氨基酸序列的428位氨基酸相当的氨基酸取代为天冬酰胺

[0053] (2) 将与序列号1表示的氨基酸序列的429位氨基酸相当的氨基酸取代为苯丙氨酸、甲硫氨酸或异亮氨酸

[0054] 序列号1的序列,是来源于柱状假丝酵母的脂肪酶LIP1的氨基酸序列(含有信号肽)。(1)的取代中,与该氨基酸序列的428位氨基酸相当的氨基酸成为取代对象,通过将该氨基酸取代为天冬酰胺来改变脂肪酶的底物特异性。(2)的取代中,与序列号1的序列的429位氨基酸相当的氨基酸成为取代对象,通过将该氨基酸取代为苯丙氨酸、甲硫氨酸或异亮氨酸来改变脂肪酶的底物特异性。氨基酸取代后的脂肪酶,即,修饰型酶对短链~中链脂肪酸($C_4 \sim C_8$)的选择性高,使其与乳脂作用时,典型地显示出与来源于小牛舌下腺的脂肪酶相似的游离脂肪酸组成。优选修饰型酶与短链脂肪酸($C_4 \sim C_6$)良好地作用,最优选与 C_4 的脂肪酸良好地作用。

[0055] 此处,本说明书中关于氨基酸残基使用的术语“相当”是指在被比较的蛋白质(酶)之间,对于其功能的发挥带来同等的贡献。例如,以在考虑一级结构(氨基酸序列)的部分同源性的基础上能够进行最佳的比较的方式,将比较对象的氨基酸序列相对于基准脂肪酶的氨基酸序列(序列号1的氨基酸序列)进行排列时(此时也可以根据需要导入空位将比对最优化),可将与基准的氨基酸序列中特定的氨基酸对应的位置的氨基酸确定为“相当的氨基酸”。也可以代替一级结构之间的比较,或在此基础上通过立体结构(三维结构)之间的比较来确定“相当的氨基酸”。通过利用立体结构信息,可得到可靠性高的比较结果。此时,能够采用边比较多个酶的立体结构的原子坐标边进行比对的方法。突变对象酶的立体结构信息,例如能够从Protein Data Bank(http://www.pdbj.org/index_j.html)获得。

[0056] 以下示出利用X射线结晶结构解析的蛋白质立体结构的确定方法的一例。

[0057] (1) 将蛋白质结晶化。结晶化是为了进行立体结构确定不可缺少的,除此以外,作为蛋白质的高纯度的精制法、高密度下稳定的保存法也具有产业上的有用性。此时,可以将结合有底物或其类似化合物作为配体的蛋白质结晶化。

[0058] (2) 对制作的结晶照射X射线收集衍射数据。应予说明,蛋白质结晶通过X射线照射受到破坏,衍射能力劣化的情形较多。此时,快速将结晶冷却至 -173°C 左右,在该状态下收集衍射数据的低温测定技术最近已经普及。应予说明,最终,为了收集用于结构确定的分辨率数据,利用亮度高的同步辐射。

[0059] (3) 在进行结晶结构解析中,除了衍射数据,还需要相位信息。对于目的蛋白质,近缘蛋白质的结晶结构未知时,利用分子取代法进行结构确定是不可能的,必须通过重原子同晶置换法解决相位问题。重原子同晶置换法,是将汞、铂等原子序号大的金属原子导入结晶,利用金属原子大的X射线散射能力对于X射线衍射数据的贡献而得到相位信息的方法。被确定的相位,通过将结晶中的溶剂区域的电子密度平滑化而能够改善。由于溶剂区域的水分子波动大几乎观测不到电子密度,因此,通过将该区域的电子密度近似为0,能够接近真正的电子密度,甚至能够改善相位。此外,非对称单元含有多个分子时,通过这些分子的电子密度平均化能够更大幅改善相位。在使用这样得到改善的相位计算的电子密度图中

将蛋白质模型拟合。该过程,在计算机绘图上,使用MSI公司(美国)的QUANTA等程序进行。然后,使用MSI公司的X-PLOR等程序,进行结构精密化,完成结构解析。对于目的蛋白质,在近缘蛋白质的结晶结构已知的情况下,使用已知蛋白质的原子坐标通过分子取代法能够确定。分子取代和结构精密化使用程序CNS_SOLVE ver.11等能够进行。

[0060] 作为来源于柱状假丝酵母的脂肪酶,已知5种酶(LIP1、LIP2、LIP3、LIP4、LIP5)。此外,本申请人从脂肪酶生产菌的突变株发现与LIP1具有高的同源性的酶(称为LIP1')。对于这6种酶,将去除信号肽的氨基酸序列(即,成熟体的氨基酸序列)示于序列号2(LIP1)、序列号3(LIP1')、序列号4(LIP2)、序列号5(LIP3)、序列号6(LIP4)、序列号7(LIP5)。典型地,这些酶的任意一个成为基准脂肪酶(通过对其实施取代得到修饰型酶的酶)。即,基准脂肪酶的氨基酸序列的具体例是序列号2~7的氨基酸序列。与来源于柱状假丝酵母的脂肪酶LIP1的氨基酸序列(序列号2)的同源性,在序列号3的氨基酸序列中是99%,在序列号4的氨基酸序列中是79%,在序列号5的氨基酸序列中是88%,在序列号6的氨基酸序列中是81%,在序列号7的氨基酸序列中是82%(图3~5)。

[0061] 对于(1)的取代(将与序列号1的氨基酸序列的428位氨基酸相当的氨基酸进行取代),也可以将由与序列号2的氨基酸序列70%以上相同的氨基酸序列构成的酶作为基准脂肪酶。例如,LIP1、LIP1'、LIP2、LIP3、LIP4和LIP5属于该基准脂肪酶。优选使用具有与序列号2的氨基酸序列80%以上相同的氨基酸序列的酶(其中,仅局限于具有脂肪酶活性的酶),更优选使用具有与序列号2的氨基酸序列90%以上相同的氨基酸序列的酶(其中,仅局限于具有脂肪酶活性的酶),更进一步优选使用具有与序列号2的氨基酸序列95%以上相同的氨基酸序列的酶(其中,仅局限于具有脂肪酶活性的酶),最优选使用具有与序列号2的氨基酸序列99%以上相同的氨基酸序列的酶(其中,仅局限于具有脂肪酶活性的酶)作为基准脂肪酶。

[0062] 在具有序列号2的氨基酸序列的LIP1中,与序列号1的氨基酸序列的428位氨基酸相当的氨基酸是第413位亮氨酸(L)。因此,将具有序列号2的氨基酸序列的LIP1作为基准脂肪酶时该氨基酸成为取代对象。另一方面,将具有序列号3的氨基酸序列的LIP1'作为基准脂肪酶时,取代对象的氨基酸变为序列号3的第413位氨基酸即亮氨酸(L)。将具有序列号4的氨基酸序列的LIP2作为基准脂肪酶时,取代对象的氨基酸变为序列号4的氨基酸序列的第413位氨基酸即亮氨酸(L)。将具有序列号5的氨基酸序列的LIP3作为基准脂肪酶时,取代对象的氨基酸变为序列号5的第413位氨基酸即亮氨酸(L)。将具有序列号6的氨基酸序列的LIP4作为基准脂肪酶时,取代对象的氨基酸变为序列号6的氨基酸序列的第413位氨基酸即亮氨酸(L)。将具有序列号7的氨基酸序列的LIP5作为基准脂肪酶时,取代对象的氨基酸变为序列号7的氨基酸序列的第413位氨基酸即亮氨酸(L)。

[0063] 另一方面,对于(2)的取代(将与序列号1的氨基酸序列的429位氨基酸相当的氨基酸进行取代),也可以将由与序列号2的氨基酸序列90%以上相同的氨基酸序列构成的酶作为基准脂肪酶。例如,LIP1和LIP1'属于该基准脂肪酶。优选使用具有与序列号2的氨基酸序列95%以上相同的氨基酸序列的酶(其中,仅局限于具有脂肪酶活性的酶),更优选使用具有与序列号2的氨基酸序列98%以上相同的氨基酸序列的酶(其中,仅局限于具有脂肪酶活性的酶),最优选使用具有与序列号2的氨基酸序列99%以上相同的氨基酸序列的酶(其中,仅局限于具有脂肪酶活性的酶)作为基准脂肪酶。

[0064] 在具有序列号2的氨基酸序列的LIP1中,与序列号1的氨基酸序列的429位氨基酸相当的氨基酸是第414位甘氨酸(G)。因此,将具有序列号2的氨基酸序列的LIP1作为基准脂肪酶时,该氨基酸成为取代对象。另一方面,将具有序列号3的氨基酸序列的LIP1'作为基准脂肪酶时,取代对象的氨基酸成为序列号3的第414位氨基酸即甘氨酸(G)。

[0065] 此处,将修饰型酶的氨基酸序列的具体例示于序列号8~11。具有序列号8的氨基酸序列的修饰型酶(突变体1)是对具有序列号2的氨基酸序列的LIP1实施将第413位氨基酸取代为天冬酰胺(即(1)的取代)而得到的酶,具有序列号9的氨基酸序列的修饰型酶(突变体2)是对具有序列号2的氨基酸序列的LIP1实施将第414位氨基酸取代为苯丙氨酸(即(2)的取代之一)而得到的酶,具有序列号10的氨基酸序列的修饰型酶(突变体3)是对具有序列号2的氨基酸序列的LIP1实施将第414位氨基酸取代为甲硫氨酸(即(2)的取代之一)而得到的酶,具有序列号11的氨基酸序列的修饰型酶(突变体4)是对具有序列号2的氨基酸序列的LIP1实施将第414位氨基酸取代为异亮氨酸(即(2)的取代之一)而得到的酶。

[0066] 而且,通常,在使某一蛋白质的氨基酸序列的一部分突变的情形中,有时突变后的蛋白质与突变前的蛋白质具有相同的功能。即有时氨基酸序列的突变对于蛋白质的功能不产生实质的影响,蛋白质的功能在突变前后被维持。如果考虑这一技术常识,在与上述修饰型酶(突变体1~4的任一个)进行比较时,虽然发现了氨基酸序列的细微差别(其中,氨基酸序列的差异是在实施上述氨基酸取代的位置以外的位置产生的),但是没有发现特性上实质的差异,这可以视为与上述修饰型酶实质相同的酶。此处的“氨基酸序列的细微差别”是指,典型地通过构成氨基酸序列的1个~数个(上限例如为3个、5个、7个、10个)氨基酸的缺失、取代、或1个~数个(上限例如为3个、5个、7个、10个)氨基酸的追加、插入、或它们的组合而在氨基酸序列中产生突变(变化)。“实质相同的酶”的氨基酸序列和成为基准的上述修饰型酶的氨基酸序列的同源性(%),例如为90%以上,优选为95%以上,更优选为98%以上,最优选为99%以上。应予说明,氨基酸序列的差异可以在多个位置产生。“氨基酸序列的细微差别”优选通过保守性氨基酸取代而产生。

[0067] 2. 编码修饰型脂肪酶的核酸等

[0068] 本发明的第2方面提供与本发明的修饰型酶相关的核酸。即,本发明提供能够作为用于鉴定编码修饰型酶的基因、编码修饰型酶的核酸的探针使用的核酸,能够作为用于使编码修饰型酶的核酸扩增或突变等的引物使用的核酸。

[0069] 编码修饰型酶的基因典型地被用于修饰型酶的制备。通过使用编码修饰型酶的基因的基因工程制备方法,能够得到更均匀状态的修饰型酶。此外,该方法在制备大量的修饰型酶时也是优选的方法。应予说明,编码修饰型酶的基因的用途不局限于修饰型酶的制备。例如,作为以阐明修饰型酶的作用机理等为目的的实验用工具,或作为用于设计或制作酶的进一步的修饰体的工具,也能够利用该核酸。

[0070] 本说明书中“编码修饰型酶的基因”是指使其表达时得到该修饰型酶的核酸,当然包括具有与该修饰型酶的氨基酸序列对应的碱基序列的核酸,也包括在这样核酸中追加不编码氨基酸序列的序列而成的核酸。此外,也考虑了密码子的简并。

[0071] 编码修饰型酶的基因的序列(碱基序列)的例子示于序列号12~15。这些序列,如下述所示,编码后述的实施例记载的突变体。

[0072] 序列号12:突变体1(L428N)

[0073] 序列号13:突变体2 (G429F)

[0074] 序列号14:突变体3 (G429M)

[0075] 序列号15:突变体4 (G429I)

[0076] 而且,柱状假丝酵母中CTG密码子编码丝氨酸。将其他酵母等作为宿主进行表达时,根据使用的宿主,需要将CTG密码子变更为编码丝氨酸的其他密码子(TCT、TCC、TCA、AGT或AGC)。本发明,作为异种表达用的基因序列,也提供了对序列号12~15中任一个序列实施这样的密码子取代的序列。以下示出实施密码子取代的序列的例子。

[0077] 序列号16(序列号12的序列中进行密码子取代的序列)

[0078] 序列号17(序列号13的序列中进行密码子取代的序列)

[0079] 序列号18(序列号14的序列中进行密码子取代的序列)

[0080] 序列号19(序列号15的序列中进行密码子取代的序列)

[0081] 本发明的基因在宿主内表达时,通常以在上述序列(序列号5'末端侧追加编码信号肽的序列(信号序列)而成的基因构建体导入宿主。野生型的LIP1的信号序列示于序列号21。该序列编码的氨基酸序列(即信号肽)示于序列号22。信号序列可以根据宿主选择。只要是能够表达目的突变体的信号序列即可,本发明中均能够使用。能够利用的信号序列的例子,可例示:编码 α -因子的信号肽的序列(Protein Engineering,1996,vol9,p.1055-1061)、编码 α -因子受体的信号肽的序列、编码SUC2蛋白质的信号肽的序列、编码PHO5蛋白质的信号肽的序列、编码BGL2蛋白质的信号肽的序列、编码AGA2蛋白质的信号肽的序列、编码TorA(三甲胺N-氧化还原酶)的信号肽的序列、编码来源于枯草芽孢杆菌的PhoD(磷酸酯酶)的信号肽的序列、编码来源于枯草芽孢杆菌的LipA(脂肪酶)的信号肽的序列、编码来源于米曲霉的高峰淀粉酶的信号肽的序列(日本特开2009-60804号公报)、编码来源于解淀粉芽孢杆菌的 α -淀粉酶的信号肽的序列(Eur.J.Biochem.155,577-581(1986))、编码来源于枯草芽孢杆菌的中性蛋白酶的信号肽的序列(APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY, Apr. 1995, p. 1610-1613 Vol. 61, No. 4)、编码来源于Bacillus属细菌的纤维素酶的信号肽的序列(日本特开2007-130012号公报)。

[0082] 本发明的核酸可通过将本说明书或添加的序列表公开的序列信息作为参考,使用标准的基因工程方法、分子生物学方法、生化学方法等,而制备成分离的状态。

[0083] 本发明的其他实施方式中,提供与编码本发明修饰型酶的基因的碱基序列进行比较时其编码的蛋白质的功能相同但一部分碱基序列不同的核酸(以下,也称为“相同核酸”。此外,将规定相同核酸的碱基序列也称为“相同碱基序列”)。作为相同核酸的例子,能够举出将编码本发明的修饰型酶的核酸的碱基序列作为基准由含有1个或多个碱基的取代、缺失、插入、追加、或颠倒的碱基序列构成的,编码具有修饰型酶特征性的酶活性(即脂肪酶活性)的蛋白质的DNA。碱基的取代、缺失等可以在多个部位发生。此处的“多个”因该核酸编码的蛋白质的立体结构中的氨基酸残基的位置、种类不同而不同,例如是2~40碱基,优选为2~20碱基,更优选为2~10碱基。

[0084] 以上这类相同核酸,例如通过限制性内切酶处理、利用核酸外切酶、DNA连接酶等的处理、利用位置指定突变导入法(Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)、随机突变导入法(Molecular Cloning, Third Edition, Chapter 13, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)的突变导

入等而得到。此外,通过紫外线照射等其他方法也能够得到相同核酸。

[0085] 本发明的其他实施方式,涉及一种具有与编码本发明的修饰型酶的基因的碱基序列互补的碱基序列的核酸。本发明的再一其他实施方式,提供具有相对于编码本发明的修饰型酶的基因的碱基序列、或与之互补的碱基序列至少约60%、70%、80%、90%、95%、99%、99.9%相同的碱基序列的核酸。

[0086] 本发明的再一其他实施方式,涉及一种具有对编码本发明的修饰型酶的基因的碱基序列或与该相同碱基序列互补的碱基序列在严格的条件下进行杂交的碱基序列的核酸。此处的“严格的条件”是指所谓的形成特异性的杂交、不形成非特异性杂交的条件。这类严格的条件是本领域技术人员公知的,例如可参照Molecular Cloning (Third Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York)、Current protocols in molecular biology (edited by Frederick M. Ausubel et al., 1987) 进行设定。作为严格的条件,例如,能够举出使用杂交液(50%甲酰胺、10×SSC(0.15M NaCl, 15mM柠檬酸钠, pH 7.0)、5×Denhardt溶液、1%SDS、10%硫酸葡聚糖、10μg/ml的变性鲑鱼精子DNA、50mM磷酸缓冲液(pH7.5)),在约42℃~约50℃下孵育,然后使用0.1×SSC、0.1%SDS在约65℃~约70℃下清洗的条件。作为进一步优选的严格的条件,例如,能够举出作为杂交液使用50%甲酰胺、5×SSC(0.15M NaCl, 15mM柠檬酸钠, pH 7.0)、1×Denhardt溶液、1%SDS、10%硫酸葡聚糖、10μg/ml的变性鲑鱼精子DNA、50mM磷酸缓冲液(pH7.5))的条件。

[0087] 本发明的再一其他实施方式,提供具有编码本发明的修饰型酶的基因的碱基序列、或与之互补的碱基序列的一部分的核酸(核酸片段)。这类核酸片段能够用于对具有编码本发明的修饰型酶的基因的碱基序列的核酸等进行检测、鉴定、和/或扩增等。核酸片段,例如,以至少含有与编码本发明的修饰型酶的基因的碱基序列中连续的核苷酸部分(例如约10~约100碱基长,优选为约20~约100碱基长,进一步优选为约30~约100碱基长)进行杂交的部分的方式进行设计。作为探针利用时,可将核酸片段标记化。标记化中,例如,能够使用荧光物质、酶、放射性同位元素。

[0088] 本发明再一其他方面,涉及一种含有本发明的基因(编码修饰型酶的基因)的重组DNA。本发明的重组DNA,例如,以载体的形态提供。本说明书中术语“载体”,是指能够将插入其的核酸运输至细胞等靶内的核酸性分子。

[0089] 根据使用目的(克隆、蛋白质的表达),此外考虑宿主细胞的种类来选择适当的载体。作为将大肠杆菌作为宿主的载体,能够例示M13噬菌体或其修饰体、λ噬菌体或其修饰体、pBR322或其修饰体(pB325、pAT153、pUC8等)等,作为将酵母作为宿主的载体,能够例示pYepSec1、pMFa、pYES2等,作为将昆虫细胞作为宿主的载体,能够例示pAc、pVL等,作为将哺乳动物细胞作为宿主的载体,能够例示pCDM8、pMT2PC等。

[0090] 本发明的载体优选为表达载体。“表达载体”,是指能够将插入其的核酸导入目的细胞(宿主细胞)内,且在该细胞内能够表达的载体。表达载体通常包括对插入的核酸的表达所需要的启动子序列、促进表达的增强子序列等。也能够使用含有选择标记物的表达载体。使用该表达载体时,利用选择标记物能够确认表达载体有无导入(及其程度)。

[0091] 本发明的核酸在载体中的插入、选择标记物基因的插入(需要时)、启动子的插入(需要时)等能够使用标准的重组DNA技术(例如,可参照Molecular Cloning, Third Edition, 1.84, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York的使用限制性内切酶和

DNA连接酶的周知的方法)来进行。

[0092] 作为宿主细胞,从处理容易的观点出发,能够使用曲霉(例如米曲霉)、芽孢杆菌属细菌(例如枯草芽孢杆菌)、大肠杆菌(大肠杆菌)、出芽酵母(酿酒酵母)等微生物,只要是重组DNA能够复制且修饰型酶的基因能够表达的宿主细胞则均能利用。可优选使用大肠杆菌(大肠杆菌)、出芽酵母(酿酒酵母)。也能够将假丝酵母属酵母(例如柱状假丝酵母)作为宿主。此外,也能够将毕赤属酵母(例如毕赤酵母菌)作为宿主。作为大肠杆菌的例子,利用T7系启动子时,能够举出大肠杆菌BL21(DE3) pLysS,不是这种情况时能够举出大肠杆菌JM109。此外,作为出芽酵母的例子,能够举出出芽酵母SHY2、出芽酵母AH22或出芽酵母INVSc1(Invitrogen公司)。

[0093] 本发明的其他方面,涉及保有本发明的重组DNA的微生物(即转化体)。本发明的微生物,通过使用了上述本发明的载体的转染或转化而能够得到。例如,可通过氯化钙法(Journal of Molecular Biology(J.Mol.Biol.)、第53卷,第159页,(1970)),Hanahan法(Journal of Molecular Biology,第166卷,第557页(1983))、SEM法(Gene,第96卷,第23页(1990)),Chung等的方法(The Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.,第86卷,第2172页(1989))、磷酸钙共沉降法、电穿孔(Potter,H.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.81,7161-7165(1984))、脂转染(Felgner,P.L.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.84,7413-7417(1984))等来实施。此外,本发明的微生物能够用于生产本发明的修饰型酶。

[0094] 3.含有修饰型脂肪酶的酶制剂

[0095] 本发明的修饰型酶例如能够以酶制剂的形态提供。酶制剂,除有效成分(本发明的修饰型酶)外,可以含有赋形剂、缓冲剂、混悬剂、稳定剂、保存剂、防腐剂、生理盐水等。作为赋形剂能够使用淀粉、糊精、麦芽糖、海藻糖、乳糖、D-葡萄糖、山梨糖醇、D-甘露醇、白糖、甘油等。作为缓冲剂能够使用磷酸盐、柠檬酸盐、乙酸盐等。作为稳定剂能够使用丙二醇、抗坏血酸等。作为保存剂能够使用苯酚、苯扎氯铵、苄醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯等。作为防腐剂能够使用乙醇、苯扎氯铵、对羟基苯甲酸、氯丁醇等。

[0096] 4.修饰型脂肪酶的用途

[0097] 本发明再一方面涉及修饰型酶和酶制剂的用途。本发明的修饰型酶,具有与动物来源脂肪酶近似的底物特异性,即,具有短链~中链脂肪酸选择性。本发明中,发挥该特性,将修饰型酶或酶制剂用于食品、食品原料等的风味改善。“风味改善”是指通过增强或赋予特定的风味成分,带来比本来的风味(即,不使用本发明时的风味)更好的风味。典型地,风味改善的结果是该食品或食品原料特征性的风味得到增强。也存在通过将不好的风味成分屏蔽来改善风味的情形。

[0098] 作为能够使用本发明的食品或食品原料,可例示乳制品、人造奶油类(人造奶油、涂脂)、起酥油、冰激凌类(冰激凌、意式冰淇淋、冷冻酸奶、圣代冰淇淋、沐昔、软冰淇淋等)、冰糕、慕斯、巴伐利亚奶油、零食点心、调味品、汤、各种植物油(大豆油、菜籽油、玉米油、棕榈油、棕榈仁油、椰子油、葵花籽油、棉籽油等)。

[0099] 例如,通过使本发明的修饰型酶或酶制剂与食品或食品原料作用能够实现风味的改善。另一方面,在食品的制造工序中在原料或中间产物中如果添加、混合本发明的修饰型酶或酶制剂等,那么能够制造风味改善的食品。或者通过添加、混合利用本发明的修饰型酶

或酶制剂而得到的组合物等,可以改善食品或食品原料的风味。

[0100] 本发明的修饰型酶或酶制剂,特别适合于乳制品的制造。通过使用本发明的修饰型酶或酶制剂,能够增强或改善乳制品的风味(特别是奶酪风味)。

[0101] 作为能够使用本发明的修饰型酶或酶制剂的乳制品的例子,可举出奶酪(切斯特奶酪、切达乳酪、埃德姆芝士、高达奶酪、埃曼塔奶酪、帕尔玛奶酪、匹克利诺罗曼奶酪等)、加工奶酪(人工奶酪)、EMC(酶改性干酪,Enzyme modified cheese)、奶酪食品(将一种以上的天然奶酪或人工奶酪加工制造得到的奶酪,制品中的奶酪成分的重量为51%以上)、黄油、酸奶、奶油、涂脂、制备乳粉、调味料(例如,用于零食点心、调味品、汤等的调味料)。作为乳制品的主要原料的奶,例如是牛、绵羊、山羊等的奶。

[0102] 本发明的修饰型酶或酶制剂,例如,在乳制品的制造过程中添加至原料或中间产物。由此,对原料或中间产物中的乳脂发挥酶作用,产生脂肪酸的游离。本发明的修饰型酶或酶制剂,在乳制品的制造过程中,可在各个阶段添加。使用的酶量(酶浓度)、温度条件、反应时间等可以通过预备实验确定。

[0103] 实施例

[0104] A. 新型脂肪酶的制作

[0105] 以新型脂肪酶的制作为目的,进行以下研究。

[0106] 1. 目标·研究方针

[0107] 着眼于以下方面进行研究。

[0108] (1) 以与奶酪作用时产生与来源于小牛舌下腺的脂肪酶类似的游离脂肪酸组成的微生物脂肪酶的获得为目的。具体而言,尝试将脂肪酸特异性由长链变更为短链。

[0109] (2) 通过使酶蛋白质的底物口袋变窄来改变底物特异性。

[0110] (3) 通过将底物口袋内的氨基酸变为体积更大的氨基酸来将口袋变窄。

[0111] 2. 方法

[0112] (1) 突变点的选择

[0113] 从来源于柱状假丝酵母的脂肪酶LIP1的序列(含有信号肽的氨基酸序列示于序列号1,编码该氨基酸序列的基因的序列示于序列号20,不含有信号肽的成熟体的氨基酸序列示于序列号2)和登记在公共数据库的立体结构,选择与底物相互作用的氨基酸。具体而言,选择261位脯氨酸(P261)、319位亮氨酸(L319)、428位亮氨酸(L428)。应予说明,这些氨基酸残基,与Schmitt等的文献(非专利文献1:J.Schmitt et al.,Protein Engineering, vol.15,no.7,pp.595-601,2002)中的P246、L304和L413分别对应。

[0114] 另一方面,着眼于通过提高口袋内的疏水性提高酯合成能力,通过计算机解析检索突变点,选择作为中性氨基酸的380位丝氨酸(S380)和429位甘氨酸(G429)。

[0115] (2) 编码突变氨基酸序列的DNA序列的取得

[0116] 使用毕赤酵母菌(*Pichia pastoris*)宿主表达系统(Invitrogen,*Pichia* Expression Kit)。质粒使用pPIC3.5K,作为模板的来源于柱状假丝酵母的LIP1基因中使用最适于出芽酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的密码子序列。进行利用Inverse PCR法的突变导入(TOYOBO,KOD-Plus-Mutagenesis Kit),制备编码在选择突变点产生氨基酸取代的各种突变体的基因。将含有突变体LIP1基因的质粒转化至*E.coli* DH5 α 。接下来,从转化有含有突变体LIP1基因的质粒的*E.coli*提取。

[0117] (3) 表达突变体氨基酸序列的转化体的取得

[0118] 将含有突变体LIP1基因的质粒转化至毕赤酵母菌GS115 (Invitrogen, Pichia Expression Kit)。培养得到的毕赤酵母菌转化体,从培养上清回收酶(突变体脂肪酶)。

[0119] (4) 使用突变体脂肪酶的乳脂分解

[0120] 底物使用将天然奶酪(YOUNG CHEDDAR CHEESE)在磷酸缓冲液(pH 6.8)中以重量比为1:1方式混悬・分散的而得的物质。反应条件设为50℃、16小时。各突变体脂肪酶的添加量设为相对于奶酪1g为蛋白量0.1mg。反应结束后,利用二乙醚提取奶酪中的游离脂肪酸,供于气相色谱。

[0121] 针对超过10种的突变体脂肪酶进行评价,结果与野生型脂肪酶(图1)不同,发现了显示与来源于小牛舌下腺的脂肪酶类似的脂肪酸组成的突变体脂肪酶(突变体1:L428N、突变体2:G429F、突变体3:G429M、突变体4:G429I)(图2)。即,成功取得选择性游离短链~中链脂肪酸(C₄~C₈)的突变体脂肪酶。与乳脂作用时,突变体脂肪酶与短链脂肪酸(C₄~C₆)很好地作用,与C₄的脂肪酸最好地作用。此处,突变体3,与来源于小牛舌下腺的脂肪酶相比短链脂肪酸特异性高这一点值得关注。为了比较,示出上述文献中报告的突变体L428F(文献中称为L413F)的结果(图2的右上)。突变体L428F中长链脂肪酸的游离比较多。应予说明,以下示出各突变体的氨基酸序列和编码其的基因的序列(为了与野生型对应,使用假丝酵母所特有的密码子)。

[0122] <突变体1>

[0123] 氨基酸序列:序列号8

[0124] 基因序列:序列号12

[0125] <突变体2>

[0126] 氨基酸序列:序列号9

[0127] 基因序列:序列号13

[0128] <突变体3>

[0129] 氨基酸序列:序列号10

[0130] 基因序列:序列号14

[0131] <突变体4>

[0132] 氨基酸序列:序列号11

[0133] 基因序列:序列号15

[0134] B. 突变体脂肪酶在各种宿主中的表达

[0135] (1) 在大肠杆菌中的表达

[0136] 在质粒pET20b中导入突变体脂肪酶(G429M)基因。使大肠杆菌Origami B(DE3)作为宿主表达。得到的转化体在15℃的条件下培养40小时,得到菌体。菌体利用珠振荡器破碎,测定得到的提取液的活性。为了测定对于短链脂肪酸的活性,使用脂肪酶试剂盒S(DS Pharma Biomedical)。为了测定对于长链脂肪酸的活性,使用脂肪消化力LMAP法。最终,细胞提取液的活性,使用脂肪酶试剂盒S时为1.85u/mL、使用LMAP法时为0u/mL。

[0137] 在质粒pCold-TF中导入突变体脂肪酶(G429M)基因。使大肠杆菌Origami B(DE3)作为宿主表达。得到的转化体利用LB培地在15℃的条件下培养40小时,得到菌体。菌体利用珠振荡器破碎。测定得到的提取液的活性。最终,细胞提取液的活性,使用脂肪酶试剂盒S时

是3.95u/mL,使用LMAP法时是0u/mL。

[0138] 如以上所示,能够表达短链脂肪酸特异性突变体脂肪酶(G429M)。

[0139] (2) 在酵母(柱状假丝酵母)中的表达

[0140] 使通过突变赋予营养需求性的柱状假丝酵母作为宿主,表达突变体脂肪酶(G429M)。得到的转化体在25℃的条件下培养48小时,测定培养上清的活性。为了测定对于短链脂肪酸的活性,使用FCCIII法。为了测定对于长链脂肪酸的活性,使用脂肪消化力LMAP法。最终,表达突变体脂肪酶(G429M)的柱状假丝酵母的培养上清的活性,使用FCCIII法时是470u/mL,使用LMAP法时是155u/mL(短链:长链=3:1)。为了比较,测定不导入突变体脂肪酶基因的宿主的培养上清的活性,结果使用FCCIII法时是267u/mL,使用LMAP法时是599u/mL(短链:长链=2:5)。

[0141] 如以上所示,能够表达短链脂肪酸特异性突变体脂肪酶(G429M)。

[0142] (3) 在丝状菌(米曲霉)中的表达

[0143] 使通过突变赋予营养需求性的米曲霉作为宿主,使用淀粉酶启动子表达突变体脂肪酶(G429M)。得到的转化体在30℃的条件下培养76小时,测定培养上清的活性。为了测定对于短链脂肪酸的活性,使用FCCIII法。为了测定对于长链脂肪酸的活性,使用脂肪消化力LMAP法。最终,表达突变型脂肪酶(G429M)的米曲霉的培养上清的活性,使用FCCIII法时是39u/mL,使用LMAP法时是0u/mL。

[0144] 如以上所示,能够表达短链脂肪酸特异性突变体脂肪酶(G429M)。

[0145] (4) 在枯草菌(枯草芽孢杆菌)中的表达

[0146] 将赋予普鲁兰酶启动子的突变体脂肪酶(G429M)基因导入质粒pHY300PLK。使枯草芽孢杆菌作为宿主表达。测定得到的转化体的培养液的活性。为了测定对于短链脂肪酸的活性,使用脂肪酶试剂盒S(DS Pharma Biomedical)。为了测定对于长链脂肪酸的活性,使用脂肪消化力LMAP法。最终,培养液的活性,使用脂肪酶试剂盒S时是0.3u/mL(以空载体转化的对照是0.1u/mL),使用LMAP法时是0u/mL。

[0147] 如以上所示,能够表达短链脂肪酸特异性突变体脂肪酶(G429M)。

[0148] 本发明的修饰型脂肪酶具有短链~中链脂肪酸选择性。特别是,在奶酪或奶酪加工品等呈现奶酪风味的乳制品的制造中本发明的修饰型脂肪酶的利用价值高。

[0149] 本发明不受上述发明的实施方式和实施例的说明的任何限制。在不脱离要求保护的范围的记载且本领域技术人员能够容易想到的范围内各种变形的实施方式也包含于发明。本说明书中明示的论文、公开专利公报、和专利公报等内容,其全部内容通过援引而引入本说明书。

序列表

<110> 天野酶株式会社

<120> 修饰型脂肪酶及其用途

<130> AE13003P

<150> JP P2013-255419

<151> 2013-12-10

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 549

<212> PRT

<213> 柱状假丝酵母

<400> 1

Met Glu Leu Ala Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ser Val Ala Ala Ala
1 5 10 15

Pro Thr Ala Thr Leu Ala Asn Gly Asp Thr Ile Thr Gly Leu Asn Ala
20 25 30

Ile Ile Asn Glu Ala Phe Leu Gly Ile Pro Phe Ala Glu Pro Pro Val
35 40 45

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

[0001]

Gly Gln Lys Phe Thr Ser Tyr Gly Pro Ser Cys Met Gln Gln Asn Pro
65 70 75 80

Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Asn Leu Pro Lys Ala Ala Leu Asp Leu Val
85 90 95

Met Gln Ser Lys Val Phe Glu Ala Val Ser Pro Ser Ser Glu Asp Cys
100 105 110

Leu Thr Ile Asn Val Val Arg Pro Pro Gly Thr Lys Ala Gly Ala Asn
115 120 125

Leu Pro Val Met Leu Trp Ile Phe Gly Gly Gly Phe Glu Val Gly Gly
130 135 140

Thr Ser Thr Phe Pro Pro Ala Gln Met Ile Thr Lys Ser Ile Ala Met
145 150 155 160

Gly Lys Pro Ile Ile His Val Ser Val Asn Tyr Arg Val Ser Ser Trp
165 170 175

Gly Phe Leu Ala Gly Asp Glu Ile Lys Ala Glu Gly Ser Ala Asn Ala
180 185 190

Gly Leu Lys Asp Gln Arg Leu Gly Met Gln Trp Val Ala Asp Asn Ile
195 200 205

Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Thr Lys Val Thr Ile Phe Gly Glu Ser

	210	215	220
	Ala Gly Ser Met Ser Val Met Cys His Ile Leu Trp Asn Asp Gly Asp 225 230 235 240		
	Asn Thr Tyr Lys Gly Lys Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ile Met Gln Ser 245 250 255		
	Gly Ala Met Val Pro Ser Asp Ala Val Asp Gly Ile Tyr Gly Asn Glu 260 265 270		
	Ile Phe Asp Leu Leu Ala Ser Asn Ala Gly Cys Gly Ser Ala Ser Asp 275 280 285		
	Lys Leu Ala Cys Leu Arg Gly Val Ser Ser Asp Thr Leu Glu Asp Ala 290 295 300		
	Thr Asn Asn Thr Pro Gly Phe Leu Ala Tyr Ser Ser Leu Arg Leu Ser 305 310 315 320		
	Tyr Leu Pro Arg Pro Asp Gly Val Asn Ile Thr Asp Asp Met Tyr Ala 325 330 335		
	Leu Val Arg Glu Gly Lys Tyr Ala Asn Ile Pro Val Ile Ile Gly Asp 340 345 350		
[0002]	Gln Asn Asp Glu Gly Thr Phe Phe Gly Thr Ser Ser Leu Asn Val Thr 355 360 365		
	Thr Asp Ala Gln Ala Arg Glu Tyr Phe Lys Gln Ser Phe Val His Ala 370 375 380		
	Ser Asp Ala Glu Ile Asp Thr Leu Met Thr Ala Tyr Pro Gly Asp Ile 385 390 395 400		
	Thr Gln Gly Ser Pro Phe Asp Thr Gly Ile Leu Asn Ala Leu Thr Pro 405 410 415		
	Gln Phe Lys Arg Ile Ser Ala Val Leu Gly Asp Leu Gly Phe Thr Leu 420 425 430		
	Ala Arg Arg Tyr Phe Leu Asn His Tyr Thr Gly Gly Thr Lys Tyr Ser 435 440 445		
	Phe Leu Ser Lys Gln Leu Ser Gly Leu Pro Val Leu Gly Thr Phe His 450 455 460		
	Ser Asn Asp Ile Val Phe Gln Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Gly Ser Leu 465 470 475 480		
	Ile Tyr Asn Asn Ala Phe Ile Ala Phe Ala Thr Asp Leu Asp Pro Asn 485 490 495		
	Thr Ala Gly Leu Leu Val Lys Trp Pro Glu Tyr Thr Ser Ser Ser Gln 500 505 510		

Ser Gly Asn Asn Leu Met Met Ile Asn Ala Leu Gly Leu Tyr Thr Gly
 515 520 525
 Lys Asp Asn Phe Arg Thr Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Phe Ser Asn Pro
 530 535 540
 Pro Ser Phe Phe Val
 545
 <210> 2
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> 柱状假丝酵母
 <400> 2
 Ala Pro Thr Ala Thr Leu Ala Asn Gly Asp Thr Ile Thr Gly Leu Asn
 1 5 10 15
 Ala Ile Ile Asn Glu Ala Phe Leu Gly Ile Pro Phe Ala Glu Pro Pro
 20 25 30
 Val Gly Asn Leu Arg Phe Lys Asp Pro Val Pro Tyr Ser Gly Ser Leu
 35 40 45
 Asp Gly Gln Lys Phe Thr Ser Tyr Gly Pro Ser Cys Met Gln Gln Asn
 50 55 60
 [0003] Pro Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Asn Leu Pro Lys Ala Ala Leu Asp Leu
 65 70 75 80
 Val Met Gln Ser Lys Val Phe Glu Ala Val Ser Pro Ser Ser Glu Asp
 85 90 95
 Cys Leu Thr Ile Asn Val Val Arg Pro Pro Gly Thr Lys Ala Gly Ala
 100 105 110
 Asn Leu Pro Val Met Leu Trp Ile Phe Gly Gly Gly Phe Glu Val Gly
 115 120 125
 Gly Thr Ser Thr Phe Pro Pro Ala Gln Met Ile Thr Lys Ser Ile Ala
 130 135 140
 Met Gly Lys Pro Ile Ile His Val Ser Val Asn Tyr Arg Val Ser Ser
 145 150 155 160
 Trp Gly Phe Leu Ala Gly Asp Glu Ile Lys Ala Glu Gly Ser Ala Asn
 165 170 175
 Ala Gly Leu Lys Asp Gln Arg Leu Gly Met Gln Trp Val Ala Asp Asn
 180 185 190
 Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Thr Lys Val Thr Ile Phe Gly Glu
 195 200 205
 Ser Ala Gly Ser Met Ser Val Met Cys His Ile Leu Trp Asn Asp Gly
 210 215 220

	Asp	Asn	Thr	Tyr	Lys	Gly	Lys	Pro	Leu	Phe	Arg	Ala	Gly	Ile	Met	Gln
	225					230					235					240
	Ser	Gly	Ala	Met	Val	Pro	Ser	Asp	Ala	Val	Asp	Gly	Ile	Tyr	Gly	Asn
					245					250					255	
	Glu	Ile	Phe	Asp	Leu	Leu	Ala	Ser	Asn	Ala	Gly	Cys	Gly	Ser	Ala	Ser
				260					265					270		
	Asp	Lys	Leu	Ala	Cys	Leu	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Asp	Thr	Leu	Glu	Asp
		275						280					285			
	Ala	Thr	Asn	Asn	Thr	Pro	Gly	Phe	Leu	Ala	Tyr	Ser	Ser	Leu	Arg	Leu
		290					295					300				
	Ser	Tyr	Leu	Pro	Arg	Pro	Asp	Gly	Val	Asn	Ile	Thr	Asp	Asp	Met	Tyr
	305					310					315					320
	Ala	Leu	Val	Arg	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ala	Asn	Ile	Pro	Val	Ile	Ile	Gly
					325					330					335	
	Asp	Gln	Asn	Asp	Glu	Gly	Thr	Phe	Phe	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Asn	Val
				340					345					350		
	Thr	Thr	Asp	Ala	Gln	Ala	Arg	Glu	Tyr	Phe	Lys	Gln	Ser	Phe	Val	His
			355					360					365			
[0004]	Ala	Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Asp	Thr	Leu	Met	Thr	Ala	Tyr	Pro	Gly	Asp
		370					375					380				
	Ile	Thr	Gln	Gly	Ser	Pro	Phe	Asp	Thr	Gly	Ile	Leu	Asn	Ala	Leu	Thr
	385					390					395					400
	Pro	Gln	Phe	Lys	Arg	Ile	Ser	Ala	Val	Leu	Gly	Asp	Leu	Gly	Phe	Thr
					405					410					415	
	Leu	Ala	Arg	Arg	Tyr	Phe	Leu	Asn	His	Tyr	Thr	Gly	Gly	Thr	Lys	Tyr
				420					425					430		
	Ser	Phe	Leu	Ser	Lys	Gln	Leu	Ser	Gly	Leu	Pro	Val	Leu	Gly	Thr	Phe
		435						440					445			
	His	Ser	Asn	Asp	Ile	Val	Phe	Gln	Asp	Tyr	Leu	Leu	Gly	Ser	Gly	Ser
		450					455					460				
	Leu	Ile	Tyr	Asn	Asn	Ala	Phe	Ile	Ala	Phe	Ala	Thr	Asp	Leu	Asp	Pro
	465					470					475					480
	Asn	Thr	Ala	Gly	Leu	Leu	Val	Lys	Trp	Pro	Glu	Tyr	Thr	Ser	Ser	Ser
					485					490					495	
	Gln	Ser	Gly	Asn	Asn	Leu	Met	Met	Ile	Asn	Ala	Leu	Gly	Leu	Tyr	Thr
				500					505					510		
	Gly	Lys	Asp	Asn	Phe	Arg	Thr	Ala	Gly	Tyr	Asp	Ala	Leu	Phe	Ser	Asn
		515						520					525			

Pro Pro Ser Phe Phe Val
530

<210> 3
<211> 534
<212> PRT
<213> 柱状假丝酵母

<400> 3

Ala Pro Thr Ala Thr Leu Ala Asn Gly Asp Thr Ile Thr Gly Leu Asn
1 5 10 15

Ala Ile Ile Asn Glu Ala Phe Leu Gly Ile Pro Phe Ala Glu Pro Pro
20 25 30

Val Gly Asn Leu Arg Phe Lys Asp Pro Val Pro Tyr Ser Gly Ser Leu
35 40 45

Asp Gly Gln Lys Phe Thr Ser Tyr Gly Pro Ser Cys Met Gln Gln Asn
50 55 60

Pro Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Asn Leu Pro Lys Ala Ala Leu Asp Leu
65 70 75 80

Val Met Gln Ser Lys Val Phe Glu Ala Val Ser Pro Ser Ser Glu Asp
85 90 95

[0005]

Cys Leu Thr Ile Asn Val Val Arg Pro Pro Gly Thr Lys Ala Gly Ala
100 105 110

Asn Leu Pro Val Met Leu Trp Ile Phe Gly Gly Gly Phe Glu Val Gly
115 120 125

Gly Thr Ser Thr Phe Pro Pro Ala Gln Met Ile Thr Lys Ser Ile Ala
130 135 140

Met Gly Lys Pro Ile Ile His Val Ser Val Asn Tyr Arg Val Ser Ser
145 150 155 160

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

Ala Gly Leu Lys Asp Gln Arg Leu Gly Met Gln Trp Val Ala Asp Asn
180 185 190

Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Thr Lys Val Thr Ile Phe Gly Glu
195 200 205

Ser Ala Gly Ser Met Ser Val Met Cys His Ile Leu Trp Asn Asp Gly
210 215 220

Asp Asn Thr Tyr Lys Gly Lys Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ile Met Gln
225 230 235 240

Ser Gly Ala Met Val Pro Ser Asp Ala Val Asp Gly Ile Tyr Gly Asn
245 250 255

	Glu Ile Phe Asp Leu Leu Ala Ser Asn Ala Gly Cys Gly Ser Ala Ser	260	265	270
	Asp Lys Leu Ala Cys Leu Arg Ser Val Ser Ser Asp Thr Leu Glu Asp	275	280	285
	Ala Thr Asn Asn Thr Pro Gly Phe Leu Ala Tyr Ser Ser Leu Arg Leu	290	295	300
	Ser Tyr Leu Pro Arg Pro Asp Gly Val Asn Ile Thr Asp Asp Met Tyr	305	310	315
	Ala Leu Val Arg Glu Gly Lys Tyr Ala Asn Ile Pro Val Ile Ile Gly	325	330	335
	Asp Gln Asn Asp Glu Gly Thr Phe Phe Gly Thr Ser Ser Leu Asn Val	340	345	350
	Thr Thr Asp Ala Gln Ala Arg Glu Tyr Phe Lys Gln Ser Phe Val His	355	360	365
	Ala Ser Asp Ala Glu Ile Asp Thr Leu Met Thr Ala Tyr Pro Gln Asp	370	375	380
	Ile Thr Gln Gly Ser Pro Phe Asp Thr Gly Ile Leu Asn Ala Leu Thr	385	390	395
[0006]	Pro Gln Phe Lys Arg Ile Ser Ala Val Leu Gly Asp Leu Gly Phe Thr	405	410	415
	Leu Ala Arg Arg Tyr Phe Leu Asn His Tyr Thr Gly Gly Thr Lys Tyr	420	425	430
	Ser Phe Leu Ser Lys Gln Leu Ser Gly Leu Pro Val Leu Gly Thr Phe	435	440	445
	His Ser Asn Asp Ile Val Phe Gln Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Gly Ser	450	455	460
	Leu Ile Tyr Asn Asn Ala Phe Ile Ala Phe Ala Thr Asp Leu Asp Pro	465	470	475
	Asn Thr Ala Gly Leu Leu Val Lys Trp Pro Glu Tyr Thr Ser Ser Ser	485	490	495
	Gln Ser Gly Asn Asn Leu Met Met Ile Asn Ala Leu Gly Leu Tyr Thr	500	505	510
	Gly Lys Asp Asn Phe Arg Thr Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Phe Ser Asn	515	520	525
	Pro Pro Ser Phe Phe Val	530		
	<210> 4			
	<211> 534			

<212> PRT

<213> 柱状假丝酵母

<400> 4

Ala Pro Thr Ala Thr Leu Ala Asn Gly Asp Thr Ile Thr Gly Leu Asn
1 5 10 15

Ala Ile Val Asn Glu Lys Phe Leu Gly Ile Pro Phe Ala Glu Pro Pro
20 25 30

Val Gly Thr Leu Arg Phe Lys Pro Pro Val Pro Tyr Ser Ala Ser Leu
35 40 45

Asn Gly Gln Gln Phe Thr Ser Tyr Gly Pro Ser Cys Met Gln Met Asn
50 55 60

Pro Met Gly Ser Phe Glu Asp Thr Leu Pro Lys Asn Ala Arg His Leu
65 70 75 80

Val Leu Gln Ser Lys Ile Phe Gln Val Val Leu Pro Asn Asp Glu Asp
85 90 95

Cys Leu Thr Ile Asn Val Ile Arg Pro Pro Gly Thr Arg Ala Ser Ala
100 105 110

Gly Leu Pro Val Met Leu Trp Ile Phe Gly Gly Gly Phe Glu Leu Gly
115 120 125

[0007] Gly Ser Ser Leu Phe Pro Gly Asp Gln Met Val Ala Lys Ser Val Leu
130 135 140

Met Gly Lys Pro Val Ile His Val Ser Met Asn Tyr Arg Val Ala Ser
145 150 155 160

Trp Gly Phe Leu Ala Gly Pro Asp Ile Gln Asn Glu Gly Ser Gly Asn
165 170 175

Ala Gly Leu His Asp Gln Arg Leu Ala Met Gln Trp Val Ala Asp Asn
180 185 190

Ile Ala Gly Phe Gly Gly Asp Pro Ser Lys Val Thr Ile Tyr Gly Glu
195 200 205

Ser Ala Gly Ser Met Ser Thr Phe Val His Leu Val Trp Asn Asp Gly
210 215 220

Asp Asn Thr Tyr Asn Gly Lys Pro Leu Phe Arg Ala Ala Ile Met Gln
225 230 235 240

Ser Gly Cys Met Val Pro Ser Asp Pro Val Asp Gly Thr Tyr Gly Thr
245 250 255

Glu Ile Tyr Asn Gln Val Val Ala Ser Ala Gly Cys Gly Ser Ala Ser
260 265 270

Asp Lys Leu Ala Cys Leu Arg Gly Leu Ser Gln Asp Thr Leu Tyr Gln
275 280 285

Ala Thr Ser Asp Thr Pro Gly Val Leu Ala Tyr Pro Ser Leu Arg Leu
 290 295 300
 Ser Tyr Leu Pro Arg Pro Asp Gly Thr Phe Ile Thr Asp Asp Met Tyr
 305 310 315 320
 Ala Leu Val Arg Asp Gly Lys Tyr Ala His Val Pro Val Ile Ile Gly
 325 330 335
 Asp Gln Asn Asp Glu Gly Thr Leu Phe Gly Leu Ser Ser Leu Asn Val
 340 345 350
 Thr Thr Asp Ala Gln Ala Arg Ala Tyr Phe Lys Gln Ser Phe Ile His
 355 360 365
 Ala Ser Asp Ala Glu Ile Asp Thr Leu Met Ala Ala Tyr Thr Ser Asp
 370 375 380
 Ile Thr Gln Gly Ser Pro Phe Asp Thr Gly Ile Phe Asn Ala Ile Thr
 385 390 395 400
 Pro Gln Phe Lys Arg Ile Ser Ala Leu Leu Gly Asp Leu Ala Phe Thr
 405 410 415
 Leu Ala Arg Arg Tyr Phe Leu Asn Tyr Tyr Gln Gly Gly Thr Lys Tyr
 420 425 430
 [0008] Ser Phe Leu Ser Lys Gln Leu Ser Gly Leu Pro Val Leu Gly Thr Phe
 435 440 445
 His Gly Asn Asp Ile Ile Trp Gln Asp Tyr Leu Val Gly Ser Gly Ser
 450 455 460
 Val Ile Tyr Asn Asn Ala Phe Ile Ala Phe Ala Asn Asp Leu Asp Pro
 465 470 475 480
 Asn Lys Ala Gly Leu Trp Thr Asn Trp Pro Thr Tyr Thr Ser Ser Ser
 485 490 495
 Gln Ser Gly Asn Asn Leu Met Gln Ile Asn Gly Leu Gly Leu Tyr Thr
 500 505 510
 Gly Lys Asp Asn Phe Arg Pro Asp Ala Tyr Ser Ala Leu Phe Ser Asn
 515 520 525
 Pro Pro Ser Phe Phe Val
 530
 <210> 5
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> 柱状假丝酵母
 <400> 5
 Ala Pro Thr Ala Lys Leu Ala Asn Gly Asp Thr Ile Thr Gly Leu Asn
 1 5 10 15

	Ala	Ile	Ile	Asn	Glu	Ala	Phe	Leu	Gly	Ile	Pro	Phe	Ala	Glu	Pro	Pro	
				20					25					30			
	Val	Gly	Asn	Leu	Arg	Phe	Lys	Asp	Pro	Val	Pro	Tyr	Ser	Gly	Ser	Leu	
			35					40					45				
	Asn	Gly	Gln	Lys	Phe	Thr	Ser	Tyr	Gly	Pro	Ser	Cys	Met	Gln	Gln	Asn	
		50					55					60					
	Pro	Glu	Gly	Thr	Phe	Glu	Glu	Asn	Leu	Gly	Lys	Thr	Ala	Leu	Asp	Leu	
	65					70					75					80	
	Val	Met	Gln	Ser	Lys	Val	Phe	Gln	Ala	Val	Leu	Pro	Gln	Ser	Glu	Asp	
					85					90					95		
	Cys	Leu	Thr	Ile	Asn	Val	Val	Arg	Pro	Pro	Gly	Thr	Lys	Ala	Gly	Ala	
				100					105					110			
	Asn	Leu	Pro	Val	Met	Leu	Trp	Ile	Phe	Gly	Gly	Gly	Phe	Glu	Ile	Gly	
		115						120					125				
	Ser	Pro	Thr	Ile	Phe	Pro	Pro	Ala	Gln	Met	Val	Thr	Lys	Ser	Val	Leu	
		130					135					140					
	Met	Gly	Lys	Pro	Ile	Ile	His	Val	Ala	Val	Asn	Tyr	Arg	Val	Ala	Ser	
	145					150					155					160	
[0009]	Trp	Gly	Phe	Leu	Ala	Gly	Asp	Asp	Ile	Lys	Ala	Glu	Gly	Ser	Gly	Asn	
				165						170					175		
	Ala	Gly	Leu	Lys	Asp	Gln	Arg	Leu	Gly	Met	Gln	Trp	Val	Ala	Asp	Asn	
				180					185					190			
	Ile	Ala	Gly	Phe	Gly	Gly	Asp	Pro	Ser	Lys	Val	Thr	Ile	Phe	Gly	Glu	
		195						200					205				
	Ser	Ala	Gly	Ser	Met	Ser	Val	Leu	Cys	His	Leu	Ile	Trp	Asn	Asp	Gly	
		210					215					220					
	Asp	Asn	Thr	Tyr	Lys	Gly	Lys	Pro	Leu	Phe	Arg	Ala	Gly	Ile	Met	Gln	
	225					230					235				240		
	Ser	Gly	Ala	Met	Val	Pro	Ser	Asp	Pro	Val	Asp	Gly	Thr	Tyr	Gly	Asn	
				245						250					255		
	Glu	Ile	Tyr	Asp	Leu	Phe	Val	Ser	Ser	Ala	Gly	Cys	Gly	Ser	Ala	Ser	
			260						265					270			
	Asp	Lys	Leu	Ala	Cys	Leu	Arg	Ser	Ala	Ser	Ser	Asp	Thr	Leu	Leu	Asp	
		275						280					285				
	Ala	Thr	Asn	Asn	Thr	Pro	Gly	Phe	Leu	Ala	Tyr	Ser	Ser	Leu	Arg	Leu	
		290					295					300					
	Ser	Tyr	Leu	Pro	Arg	Pro	Asp	Gly	Lys	Asn	Ile	Thr	Asp	Asp	Met	Tyr	

[0010]

305	310	315	320
Lys Leu Val Arg Asp Gly Lys Tyr Ala Ser Val Pro Val Ile Ile Gly	325	330	335
Asp Gln Asn Asp Glu Gly Thr Ile Phe Gly Leu Ser Ser Leu Asn Val	340	345	350
Thr Thr Asn Ala Gln Ala Arg Ala Tyr Phe Lys Gln Ser Phe Ile His	355	360	365
Ala Ser Asp Ala Glu Ile Asp Thr Leu Met Ala Ala Tyr Pro Gln Asp	370	375	380
Ile Thr Gln Gly Ser Pro Phe Asp Thr Gly Ile Phe Asn Ala Ile Thr	385	390	400
Pro Gln Phe Lys Arg Ile Ser Ala Val Leu Gly Asp Leu Ala Phe Ile	405	410	415
His Ala Arg Arg Tyr Phe Leu Asn His Phe Gln Gly Gly Thr Lys Tyr	420	425	430
Ser Phe Leu Ser Lys Gln Leu Ser Gly Leu Pro Ile Met Gly Thr Phe	435	440	445
His Ala Asn Asp Ile Val Trp Gln Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Gly Ser	450	455	460
Val Ile Tyr Asn Asn Ala Phe Ile Ala Phe Ala Thr Asp Leu Asp Pro	465	470	475
Asn Thr Ala Gly Leu Leu Val Asn Trp Pro Lys Tyr Thr Ser Ser Ser	485	490	495
Gln Ser Gly Asn Asn Leu Met Met Ile Asn Ala Leu Gly Leu Tyr Thr	500	505	510
Gly Lys Asp Asn Phe Arg Thr Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Met Thr Asn	515	520	525
Pro Ser Ser Phe Phe Val	530		
<210> 6			
<211> 534			
<212> PRT			
<213> 柱状假丝酵母			
<400> 6			
Ala Pro Thr Ala Thr Leu Ala Asn Gly Asp Thr Ile Thr Gly Leu Asn	1	5	10
Ala Ile Ile Asn Glu Ala Phe Leu Gly Ile Pro Phe Ala Gln Pro Pro	20	25	30
Val Gly Asn Leu Arg Phe Lys Pro Pro Val Pro Tyr Ser Ala Ser Leu			

	35	40	45
	Asn Gly Gln Lys Phe Thr Ser Tyr Gly Pro Ser Cys Met Gln Met Asn 50	55	60
	Pro Leu Gly Asn Trp Asp Ser Ser Leu Pro Lys Ala Ala Ile Asn Ser 65	70	75 80
	Leu Met Gln Ser Lys Leu Phe Gln Ala Val Leu Pro Asn Gly Glu Asp 85	90	95
	Cys Leu Thr Ile Asn Val Val Arg Pro Ser Gly Thr Lys Pro Gly Ala 100	105	110
	Asn Leu Pro Val Met Val Trp Ile Phe Gly Gly Gly Phe Glu Val Gly 115	120	125
	Gly Ser Ser Leu Phe Pro Pro Ala Gln Met Ile Thr Ala Ser Val Leu 130	135	140
	Met Gly Lys Pro Ile Ile His Val Ser Met Asn Tyr Arg Val Ala Ser 145	150	155 160
	Trp Gly Phe Leu Ala Gly Pro Asp Ile Lys Ala Glu Gly Ser Gly Asn 165	170	175
[0011]	Ala Gly Leu His Asp Gln Arg Leu Gly Leu Gln Trp Val Ala Asp Asn 180	185	190
	Ile Ala Gly Phe Gly Gly Asp Pro Ser Lys Val Thr Ile Phe Gly Glu 195	200	205
	Ser Ala Gly Ser Met Ser Val Met Cys Gln Leu Leu Trp Asn Asp Gly 210	215	220
	Asp Asn Thr Tyr Asn Gly Lys Pro Leu Phe Arg Ala Ala Ile Met Gln 225	230	235 240
	Ser Gly Ala Met Val Pro Ser Asp Pro Val Asp Gly Pro Tyr Gly Thr 245	250	255
	Gln Ile Tyr Asp Gln Val Val Ala Ser Ala Gly Cys Gly Ser Ala Ser 260	265	270
	Asp Lys Leu Ala Cys Leu Arg Ser Ile Ser Asn Asp Lys Leu Phe Gln 275	280	285
	Ala Thr Ser Asp Thr Pro Gly Ala Leu Ala Tyr Pro Ser Leu Arg Leu 290	295	300
	Ser Phe Leu Pro Arg Pro Asp Gly Thr Phe Ile Thr Asp Asp Met Phe 305	310	315 320
	Lys Leu Val Arg Asp Gly Lys Cys Ala Asn Val Pro Val Ile Ile Gly 325	330	335

	Asp	Gln	Asn	Asp	Glu	Gly	Thr	Val	Phe	Ala	Leu	Ser	Ser	Leu	Asn	Val	
				340					345					350			
	Thr	Thr	Asp	Ala	Gln	Ala	Arg	Gln	Tyr	Phe	Lys	Glu	Ser	Phe	Ile	His	
			355					360					365				
	Ala	Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Asp	Thr	Leu	Met	Ala	Ala	Tyr	Pro	Ser	Asp	
		370					375					380					
	Ile	Thr	Gln	Gly	Ser	Pro	Phe	Asp	Thr	Gly	Ile	Phe	Asn	Ala	Ile	Thr	
	385					390					395					400	
	Pro	Gln	Phe	Lys	Arg	Ile	Ala	Ala	Val	Leu	Gly	Asp	Leu	Ala	Phe	Thr	
				405						410					415		
	Leu	Pro	Arg	Arg	Tyr	Phe	Leu	Asn	His	Phe	Gln	Gly	Gly	Thr	Lys	Tyr	
			420						425					430			
	Ser	Phe	Leu	Ser	Lys	Gln	Leu	Ser	Gly	Leu	Pro	Val	Ile	Gly	Thr	His	
		435					440					445					
	His	Ala	Asn	Asp	Ile	Val	Trp	Gln	Asp	Phe	Leu	Val	Ser	His	Ser	Ser	
	450					455					460						
	Ala	Val	Tyr	Asn	Asn	Ala	Phe	Ile	Ala	Phe	Ala	Asn	Asp	Leu	Asp	Pro	
	465				470					475					480		
[0012]	Asn	Lys	Ala	Gly	Leu	Leu	Val	Asn	Trp	Pro	Lys	Tyr	Thr	Ser	Ser	Ser	
				485					490					495			
	Gln	Ser	Gly	Asn	Asn	Leu	Leu	Gln	Ile	Asn	Ala	Leu	Gly	Leu	Tyr	Thr	
			500					505					510				
	Gly	Lys	Asp	Asn	Phe	Arg	Thr	Ala	Gly	Tyr	Asp	Ala	Leu	Phe	Thr	Asn	
		515					520					525					
	Pro	Ser	Ser	Phe	Phe	Val											
	530																
	<210>	7															
	<211>	534															
	<212>	PRT															
	<213>	柱状假丝酵母															
	<400>	7															
	Ala	Pro	Thr	Ala	Thr	Leu	Ala	Asn	Gly	Asp	Thr	Ile	Thr	Gly	Leu	Asn	
	1			5					10					15			
	Ala	Ile	Ile	Asn	Glu	Ala	Phe	Leu	Gly	Ile	Pro	Phe	Ala	Glu	Pro	Pro	
			20					25					30				
	Val	Gly	Asn	Leu	Arg	Phe	Lys	Asp	Pro	Val	Pro	Tyr	Arg	Gly	Ser	Leu	
		35					40					45					
	Asn	Gly	Gln	Ser	Phe	Thr	Ala	Tyr	Gly	Pro	Ser	Cys	Met	Gln	Gln	Asn	
	50					55					60						

[0013]

Pro Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Asn Leu Pro Lys Val Ala Leu Asp Leu
 65 70 75 80
 Val Met Gln Ser Lys Val Phe Gln Ala Val Leu Pro Asn Ser Glu Asp
 85 90 95
 Cys Leu Thr Ile Asn Val Val Arg Pro Pro Gly Thr Lys Ala Gly Ala
 100 105 110
 Asn Leu Pro Val Met Leu Trp Ile Phe Gly Gly Gly Phe Glu Ile Gly
 115 120 125
 Ser Pro Thr Ile Phe Pro Pro Ala Gln Met Val Ser Lys Ser Val Leu
 130 135 140
 Met Gly Lys Pro Ile Ile His Val Ala Val Asn Tyr Arg Leu Ala Ser
 145 150 155 160
 Phe Gly Phe Leu Ala Gly Pro Asp Ile Lys Ala Glu Gly Ser Ser Asn
 165 170 175
 Ala Gly Leu Lys Asp Gln Arg Leu Gly Met Gln Trp Val Ala Asp Asn
 180 185 190
 Ile Ala Gly Phe Gly Gly Asp Pro Ser Lys Val Thr Ile Phe Gly Glu
 195 200 205
 Ser Ala Gly Ser Met Ser Val Leu Cys His Leu Leu Trp Asn Gly Gly
 210 215 220
 Asp Asn Thr Tyr Lys Gly Lys Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ile Met Gln
 225 230 235 240
 Ser Gly Ala Met Val Pro Ser Asp Pro Val Asp Gly Thr Tyr Gly Thr
 245 250 255
 Gln Ile Tyr Asp Thr Leu Val Ala Ser Thr Gly Cys Ser Ser Ala Ser
 260 265 270
 Asn Lys Leu Ala Cys Leu Arg Gly Leu Ser Thr Gln Ala Leu Leu Asp
 275 280 285
 Ala Thr Asn Asp Thr Pro Gly Phe Leu Ser Tyr Thr Ser Leu Arg Leu
 290 295 300
 Ser Tyr Leu Pro Arg Pro Asp Gly Ala Asn Ile Thr Asp Asp Met Tyr
 305 310 315 320
 Lys Leu Val Arg Asp Gly Lys Tyr Ala Ser Val Pro Val Ile Ile Gly
 325 330 335
 Asp Gln Asn Asp Glu Gly Phe Leu Phe Gly Leu Ser Ser Leu Asn Thr
 340 345 350
 Thr Thr Glu Ala Asp Ala Glu Ala Tyr Leu Arg Lys Ser Phe Ile His
 355 360 365

Ala Thr Asp Ala Asp Ile Thr Ala Leu Lys Ala Ala Tyr Pro Ser Asp
370 375 380

Val Thr Gln Gly Ser Pro Phe Asp Thr Gly Ile Leu Asn Ala Leu Thr
385 390 395 400

Pro Gln Leu Lys Arg Ile Asn Ala Val Leu Gly Asp Leu Thr Phe Thr
405 410 415

Leu Ser Arg Arg Tyr Phe Leu Asn His Tyr Thr Gly Gly Pro Lys Tyr
420 425 430

Ser Phe Leu Ser Lys Gln Leu Ser Gly Leu Pro Ile Leu Gly Thr Phe
435 440 445

His Ala Asn Asp Ile Val Trp Gln His Phe Leu Leu Gly Ser Gly Ser
450 455 460

Val Ile Tyr Asn Asn Ala Phe Ile Ala Phe Ala Thr Asp Leu Asp Pro
465 470 475 480

Asn Thr Ala Gly Leu Ser Val Gln Trp Pro Lys Ser Thr Ser Ser Ser
485 490 495

Gln Ala Gly Asp Asn Leu Met Gln Ile Ser Ala Leu Gly Leu Tyr Thr
500 505 510

[0014]

Gly Lys Asp Asn Phe Arg Thr Ala Gly Tyr Asn Ala Leu Phe Ala Asp
515 520 525

Pro Ser His Phe Phe Val
530

<210> 8
<211> 534
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 突变酶 1

<400> 8

Ala Pro Thr Ala Thr Leu Ala Asn Gly Asp Thr Ile Thr Gly Leu Asn
1 5 10 15

Ala Ile Ile Asn Glu Ala Phe Leu Gly Ile Pro Phe Ala Glu Pro Pro
20 25 30

Val Gly Asn Leu Arg Phe Lys Asp Pro Val Pro Tyr Ser Gly Ser Leu
35 40 45

Asp Gly Gln Lys Phe Thr Ser Tyr Gly Pro Ser Cys Met Gln Gln Asn
50 55 60

Pro Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Asn Leu Pro Lys Ala Ala Leu Asp Leu
65 70 75 80

	Val	Met	Gln	Ser	Lys	Val	Phe	Glu	Ala	Val	Ser	Pro	Ser	Ser	Glu	Asp	
					85					90					95		
	Cys	Leu	Thr	Ile	Asn	Val	Val	Arg	Pro	Pro	Gly	Thr	Lys	Ala	Gly	Ala	
				100					105					110			
	Asn	Leu	Pro	Val	Met	Leu	Trp	Ile	Phe	Gly	Gly	Gly	Phe	Glu	Val	Gly	
			115					120					125				
	Gly	Thr	Ser	Thr	Phe	Pro	Pro	Ala	Gln	Met	Ile	Thr	Lys	Ser	Ile	Ala	
			130					135					140				
	Met	Gly	Lys	Pro	Ile	Ile	His	Val	Ser	Val	Asn	Tyr	Arg	Val	Ser	Ser	
	145					150					155					160	
	Trp	Gly	Phe	Leu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ile	Lys	Ala	Glu	Gly	Ser	Ala	Asn	
				165						170					175		
	Ala	Gly	Leu	Lys	Asp	Gln	Arg	Leu	Gly	Met	Gln	Trp	Val	Ala	Asp	Asn	
				180					185					190			
	Ile	Ala	Ala	Phe	Gly	Gly	Asp	Pro	Thr	Lys	Val	Thr	Ile	Phe	Gly	Glu	
			195					200					205				
	Ser	Ala	Gly	Ser	Met	Ser	Val	Met	Cys	His	Ile	Leu	Trp	Asn	Asp	Gly	
		210					215					220					
[0015]	Asp	Asn	Thr	Tyr	Lys	Gly	Lys	Pro	Leu	Phe	Arg	Ala	Gly	Ile	Met	Gln	
	225					230					235				240		
	Ser	Gly	Ala	Met	Val	Pro	Ser	Asp	Ala	Val	Asp	Gly	Ile	Tyr	Gly	Asn	
				245						250					255		
	Glu	Ile	Phe	Asp	Leu	Leu	Ala	Ser	Asn	Ala	Gly	Cys	Gly	Ser	Ala	Ser	
				260					265					270			
	Asp	Lys	Leu	Ala	Cys	Leu	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Asp	Thr	Leu	Glu	Asp	
		275						280					285				
	Ala	Thr	Asn	Asn	Thr	Pro	Gly	Phe	Leu	Ala	Tyr	Ser	Ser	Leu	Arg	Leu	
		290					295					300					
	Ser	Tyr	Leu	Pro	Arg	Pro	Asp	Gly	Val	Asn	Ile	Thr	Asp	Asp	Met	Tyr	
	305					310					315				320		
	Ala	Leu	Val	Arg	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ala	Asn	Ile	Pro	Val	Ile	Ile	Gly	
				325						330					335		
	Asp	Gln	Asn	Asp	Glu	Gly	Thr	Phe	Phe	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Asn	Val	
				340					345					350			
	Thr	Thr	Asp	Ala	Gln	Ala	Arg	Glu	Tyr	Phe	Lys	Gln	Ser	Phe	Val	His	
			355					360					365				
	Ala	Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Asp	Thr	Leu	Met	Thr	Ala	Tyr	Pro	Gly	Asp	
		370					375					380					

Ile Thr Gln Gly Ser Pro Phe Asp Thr Gly Ile Leu Asn Ala Leu Thr
 385 390 395 400
 Pro Gln Phe Lys Arg Ile Ser Ala Val Leu Gly Asp Asn Gly Phe Thr
 405 410 415
 Leu Ala Arg Arg Tyr Phe Leu Asn His Tyr Thr Gly Gly Thr Lys Tyr
 420 425 430
 Ser Phe Leu Ser Lys Gln Leu Ser Gly Leu Pro Val Leu Gly Thr Phe
 435 440 445
 His Ser Asn Asp Ile Val Phe Gln Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Gly Ser
 450 455 460
 Leu Ile Tyr Asn Asn Ala Phe Ile Ala Phe Ala Thr Asp Leu Asp Pro
 465 470 475 480
 Asn Thr Ala Gly Leu Leu Val Lys Trp Pro Glu Tyr Thr Ser Ser Ser
 485 490 495
 Gln Ser Gly Asn Asn Leu Met Met Ile Asn Ala Leu Gly Leu Tyr Thr
 500 505 510
 Gly Lys Asp Asn Phe Arg Thr Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Phe Ser Asn
 515 520 525

[0016]

Pro Pro Ser Phe Phe Val
530

<210> 9
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变酶 2

<400> 9

Ala Pro Thr Ala Thr Leu Ala Asn Gly Asp Thr Ile Thr Gly Leu Asn
1 5 10 15

Ala Ile Ile Asn Glu Ala Phe Leu Gly Ile Pro Phe Ala Glu Pro Pro
20 25 30

Val Gly Asn Leu Arg Phe Lys Asp Pro Val Pro Tyr Ser Gly Ser Leu
35 40 45

Asp Gly Gln Lys Phe Thr Ser Tyr Gly Pro Ser Cys Met Gln Gln Asn
50 55 60

Pro Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Asn Leu Pro Lys Ala Ala Leu Asp Leu
65 70 75 80

Val Met Gln Ser Lys Val Phe Glu Ala Val Ser Pro Ser Ser Glu Asp
85 90 95

[0017]

Cys Leu Thr Ile Asn Val Val Arg Pro Pro Gly Thr Lys Ala Gly Ala
 100 105 110

Asn Leu Pro Val Met Leu Trp Ile Phe Gly Gly Gly Phe Glu Val Gly
 115 120 125

Gly Thr Ser Thr Phe Pro Pro Ala Gln Met Ile Thr Lys Ser Ile Ala
 130 135 140

Met Gly Lys Pro Ile Ile His Val Ser Val Asn Tyr Arg Val Ser Ser
 145 150 155 160

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

Ala Gly Leu Lys Asp Gln Arg Leu Gly Met Gln Trp Val Ala Asp Asn
 180 185 190

Ile Ala Ala Phe Gly Gly Asp Pro Thr Lys Val Thr Ile Phe Gly Glu
 195 200 205

Ser Ala Gly Ser Met Ser Val Met Cys His Ile Leu Trp Asn Asp Gly
 210 215 220

Asp Asn Thr Tyr Lys Gly Lys Pro Leu Phe Arg Ala Gly Ile Met Gln
 225 230 235 240

Ser Gly Ala Met Val Pro Ser Asp Ala Val Asp Gly Ile Tyr Gly Asn
 245 250 255

Glu Ile Phe Asp Leu Leu Ala Ser Asn Ala Gly Cys Gly Ser Ala Ser
 260 265 270

Asp Lys Leu Ala Cys Leu Arg Gly Val Ser Ser Asp Thr Leu Glu Asp
 275 280 285

Ala Thr Asn Asn Thr Pro Gly Phe Leu Ala Tyr Ser Ser Leu Arg Leu
 290 295 300

Ser Tyr Leu Pro Arg Pro Asp Gly Val Asn Ile Thr Asp Asp Met Tyr
 305 310 315 320

Ala Leu Val Arg Glu Gly Lys Tyr Ala Asn Ile Pro Val Ile Ile Gly
 325 330 335

Asp Gln Asn Asp Glu Gly Thr Phe Phe Gly Thr Ser Ser Leu Asn Val
 340 345 350

Thr Thr Asp Ala Gln Ala Arg Glu Tyr Phe Lys Gln Ser Phe Val His
 355 360 365

Ala Ser Asp Ala Glu Ile Asp Thr Leu Met Thr Ala Tyr Pro Gly Asp
 370 375 380

Ile Thr Gln Gly Ser Pro Phe Asp Thr Gly Ile Leu Asn Ala Leu Thr
 385 390 395 400

Pro Gln Phe Lys Arg Ile Ser Ala Val Leu Gly Asp Leu Phe Phe Thr
 405 410 415

Leu Ala Arg Arg Tyr Phe Leu Asn His Tyr Thr Gly Gly Thr Lys Tyr
 420 425 430

Ser Phe Leu Ser Lys Gln Leu Ser Gly Leu Pro Val Leu Gly Thr Phe
 435 440 445

His Ser Asn Asp Ile Val Phe Gln Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Gly Ser
 450 455 460

Leu Ile Tyr Asn Asn Ala Phe Ile Ala Phe Ala Thr Asp Leu Asp Pro
 465 470 475 480

Asn Thr Ala Gly Leu Leu Val Lys Trp Pro Glu Tyr Thr Ser Ser Ser
 485 490 495

Gln Ser Gly Asn Asn Leu Met Met Ile Asn Ala Leu Gly Leu Tyr Thr
 500 505 510

Gly Lys Asp Asn Phe Arg Thr Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Phe Ser Asn
 515 520 525

Pro Pro Ser Phe Phe Val
 530

[0018]

<210> 10
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变酶 3

<400> 10

Ala Pro Thr Ala Thr Leu Ala Asn Gly Asp Thr Ile Thr Gly Leu Asn
 1 5 10 15

Ala Ile Ile Asn Glu Ala Phe Leu Gly Ile Pro Phe Ala Glu Pro Pro
 20 25 30

Val Gly Asn Leu Arg Phe Lys Asp Pro Val Pro Tyr Ser Gly Ser Leu
 35 40 45

Asp Gly Gln Lys Phe Thr Ser Tyr Gly Pro Ser Cys Met Gln Gln Asn
 50 55 60

Pro Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Asn Leu Pro Lys Ala Ala Leu Asp Leu
 65 70 75 80

Val Met Gln Ser Lys Val Phe Glu Ala Val Ser Pro Ser Ser Glu Asp
 85 90 95

Cys Leu Thr Ile Asn Val Val Arg Pro Pro Gly Thr Lys Ala Gly Ala
 100 105 110

Asn	Leu	Pro	Val	Met	Leu	Trp	Ile	Phe	Gly	Gly	Gly	Phe	Glu	Val	Gly	
		115					120					125				
Gly	Thr	Ser	Thr	Phe	Pro	Pro	Ala	Gln	Met	Ile	Thr	Lys	Ser	Ile	Ala	
	130					135					140					
Met	Gly	Lys	Pro	Ile	Ile	His	Val	Ser	Val	Asn	Tyr	Arg	Val	Ser	Ser	
145					150					155					160	
Trp	Gly	Phe	Leu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ile	Lys	Ala	Glu	Gly	Ser	Ala	Asn	
				165					170					175		
Ala	Gly	Leu	Lys	Asp	Gln	Arg	Leu	Gly	Met	Gln	Trp	Val	Ala	Asp	Asn	
			180					185					190			
Ile	Ala	Ala	Phe	Gly	Gly	Asp	Pro	Thr	Lys	Val	Thr	Ile	Phe	Gly	Glu	
		195					200					205				
Ser	Ala	Gly	Ser	Met	Ser	Val	Met	Cys	His	Ile	Leu	Trp	Asn	Asp	Gly	
	210					215					220					
Asp	Asn	Thr	Tyr	Lys	Gly	Lys	Pro	Leu	Phe	Arg	Ala	Gly	Ile	Met	Gln	
225					230					235					240	
Ser	Gly	Ala	Met	Val	Pro	Ser	Asp	Ala	Val	Asp	Gly	Ile	Tyr	Gly	Asn	
				245					250					255		
Glu	Ile	Phe	Asp	Leu	Leu	Ala	Ser	Asn	Ala	Gly	Cys	Gly	Ser	Ala	Ser	
			260					265					270			
Asp	Lys	Leu	Ala	Cys	Leu	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Asp	Thr	Leu	Glu	Asp	
		275					280					285				
Ala	Thr	Asn	Asn	Thr	Pro	Gly	Phe	Leu	Ala	Tyr	Ser	Ser	Leu	Arg	Leu	
	290					295					300					
Ser	Tyr	Leu	Pro	Arg	Pro	Asp	Gly	Val	Asn	Ile	Thr	Asp	Asp	Met	Tyr	
305					310					315					320	
Ala	Leu	Val	Arg	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ala	Asn	Ile	Pro	Val	Ile	Ile	Gly	
				325					330					335		
Asp	Gln	Asn	Asp	Glu	Gly	Thr	Phe	Phe	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Asn	Val	
			340					345					350			
Thr	Thr	Asp	Ala	Gln	Ala	Arg	Glu	Tyr	Phe	Lys	Gln	Ser	Phe	Val	His	
		355					360					365				
Ala	Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Asp	Thr	Leu	Met	Thr	Ala	Tyr	Pro	Gly	Asp	
	370					375					380					
Ile	Thr	Gln	Gly	Ser	Pro	Phe	Asp	Thr	Gly	Ile	Leu	Asn	Ala	Leu	Thr	
385					390					395					400	
Pro	Gln	Phe	Lys	Arg	Ile	Ser	Ala	Val	Leu	Gly	Asp	Leu	Met	Phe	Thr	
				405					410					415		

Leu Ala Arg Arg Tyr Phe Leu Asn His Tyr Thr Gly Gly Thr Lys Tyr
 420 425 430
 Ser Phe Leu Ser Lys Gln Leu Ser Gly Leu Pro Val Leu Gly Thr Phe
 435 440 445
 His Ser Asn Asp Ile Val Phe Gln Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Gly Ser
 450 455 460
 Leu Ile Tyr Asn Asn Ala Phe Ile Ala Phe Ala Thr Asp Leu Asp Pro
 465 470 475 480
 Asn Thr Ala Gly Leu Leu Val Lys Trp Pro Glu Tyr Thr Ser Ser Ser
 485 490 495
 Gln Ser Gly Asn Asn Leu Met Met Ile Asn Ala Leu Gly Leu Tyr Thr
 500 505 510
 Gly Lys Asp Asn Phe Arg Thr Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Phe Ser Asn
 515 520 525
 Pro Pro Ser Phe Phe Val
 530
 <210> 11
 <211> 534
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 突变酶 4
 <400> 11
 Ala Pro Thr Ala Thr Leu Ala Asn Gly Asp Thr Ile Thr Gly Leu Asn
 1 5 10 15
 Ala Ile Ile Asn Glu Ala Phe Leu Gly Ile Pro Phe Ala Glu Pro Pro
 20 25 30
 Val Gly Asn Leu Arg Phe Lys Asp Pro Val Pro Tyr Ser Gly Ser Leu
 35 40 45
 Asp Gly Gln Lys Phe Thr Ser Tyr Gly Pro Ser Cys Met Gln Gln Asn
 50 55 60
 Pro Glu Gly Thr Tyr Glu Glu Asn Leu Pro Lys Ala Ala Leu Asp Leu
 65 70 75 80
 Val Met Gln Ser Lys Val Phe Glu Ala Val Ser Pro Ser Ser Glu Asp
 85 90 95
 Cys Leu Thr Ile Asn Val Val Arg Pro Pro Gly Thr Lys Ala Gly Ala
 100 105 110
 Asn Leu Pro Val Met Leu Trp Ile Phe Gly Gly Gly Phe Glu Val Gly
 115 120 125

[0020]

	Gly	Thr	Ser	Thr	Phe	Pro	Pro	Ala	Gln	Met	Ile	Thr	Lys	Ser	Ile	Ala	
	130						135					140					
	Met	Gly	Lys	Pro	Ile	Ile	His	Val	Ser	Val	Asn	Tyr	Arg	Val	Ser	Ser	
	145					150					155					160	
	Trp	Gly	Phe	Leu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ile	Lys	Ala	Glu	Gly	Ser	Ala	Asn	
					165					170					175		
	Ala	Gly	Leu	Lys	Asp	Gln	Arg	Leu	Gly	Met	Gln	Trp	Val	Ala	Asp	Asn	
				180					185					190			
	Ile	Ala	Ala	Phe	Gly	Gly	Asp	Pro	Thr	Lys	Val	Thr	Ile	Phe	Gly	Glu	
		195						200					205				
	Ser	Ala	Gly	Ser	Met	Ser	Val	Met	Cys	His	Ile	Leu	Trp	Asn	Asp	Gly	
	210						215					220					
	Asp	Asn	Thr	Tyr	Lys	Gly	Lys	Pro	Leu	Phe	Arg	Ala	Gly	Ile	Met	Gln	
	225					230					235					240	
	Ser	Gly	Ala	Met	Val	Pro	Ser	Asp	Ala	Val	Asp	Gly	Ile	Tyr	Gly	Asn	
					245					250					255		
	Glu	Ile	Phe	Asp	Leu	Leu	Ala	Ser	Asn	Ala	Gly	Cys	Gly	Ser	Ala	Ser	
				260					265					270			
[0021]	Asp	Lys	Leu	Ala	Cys	Leu	Arg	Gly	Val	Ser	Ser	Asp	Thr	Leu	Glu	Asp	
			275					280					285				
	Ala	Thr	Asn	Asn	Thr	Pro	Gly	Phe	Leu	Ala	Tyr	Ser	Ser	Leu	Arg	Leu	
	290						295					300					
	Ser	Tyr	Leu	Pro	Arg	Pro	Asp	Gly	Val	Asn	Ile	Thr	Asp	Asp	Met	Tyr	
	305					310					315					320	
	Ala	Leu	Val	Arg	Glu	Gly	Lys	Tyr	Ala	Asn	Ile	Pro	Val	Ile	Ile	Gly	
					325					330					335		
	Asp	Gln	Asn	Asp	Glu	Gly	Thr	Phe	Phe	Gly	Thr	Ser	Ser	Leu	Asn	Val	
				340					345					350			
	Thr	Thr	Asp	Ala	Gln	Ala	Arg	Glu	Tyr	Phe	Lys	Gln	Ser	Phe	Val	His	
			355					360					365				
	Ala	Ser	Asp	Ala	Glu	Ile	Asp	Thr	Leu	Met	Thr	Ala	Tyr	Pro	Gly	Asp	
	370						375					380					
	Ile	Thr	Gln	Gly	Ser	Pro	Phe	Asp	Thr	Gly	Ile	Leu	Asn	Ala	Leu	Thr	
	385					390					395					400	
	Pro	Gln	Phe	Lys	Arg	Ile	Ser	Ala	Val	Leu	Gly	Asp	Leu	Ile	Phe	Thr	
					405					410					415		
	Leu	Ala	Arg	Arg	Tyr	Phe	Leu	Asn	His	Tyr	Thr	Gly	Gly	Thr	Lys	Tyr	
					420				425					430			

Ser Phe Leu Ser Lys Gln Leu Ser Gly Leu Pro Val Leu Gly Thr Phe
 435 440 445

His Ser Asn Asp Ile Val Phe Gln Asp Tyr Leu Leu Gly Ser Gly Ser
 450 455 460

Leu Ile Tyr Asn Asn Ala Phe Ile Ala Phe Ala Thr Asp Leu Asp Pro
 465 470 475 480

Asn Thr Ala Gly Leu Leu Val Lys Trp Pro Glu Tyr Thr Ser Ser Ser
 485 490 495

Gln Ser Gly Asn Asn Leu Met Met Ile Asn Ala Leu Gly Leu Tyr Thr
 500 505 510

Gly Lys Asp Asn Phe Arg Thr Ala Gly Tyr Asp Ala Leu Phe Ser Asn
 515 520 525

Pro Pro Ser Phe Phe Val
 530

<210> 12
 <211> 1605
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变酶 1

[0022]

<400> 12
 gccccaccg ccacgtcgc caacggcgac accatcaccg gtctcaacgc catcatcaac 60
 gaggcgttcc tcggcattcc ctttgccgag cgcgccgttg gcaacctccg cttcaaggac 120
 cccgtgccgt actccggctc gctcgatggc cagaagttca cgctgtacgg cccgctgtgc 180
 atgcagcaga accccgaggg cacctacgag gagaacctcc ccaaggcagc gctcgacttg 240
 gtgatgcagt ccaaggtggt tgaggcgtg ctgccgtga gcgaggactg tctcaccatc 300
 aacgtgtgtc ggccgccggg caccaaggcg ggtgcccaacc tcccgtgat gctctggatc 360
 ttggcgggc gggttgaggt ggggtggcacc agcaccttcc ctcccgccca gatgatcacc 420
 aagagcattg ccatgggcaa gcccatcatc cacgtgagcg tcaactaccg cgtgtcgtcg 480
 tgggggttct tggtggtgca cgagatcaag gccgagggca gtgccaacgc cggtttgaag 540
 gaccagcgtt tgggcatgca gtgggtggcg gacaacattg cggcgtttgg cggcgaccgc 600
 accaagtgta ccatcttttg cgagctggcg ggcagcatgt cggatcatgt ccacattctc 660
 tggaacgacg gcgacaacac gtacaaggcg aagccgtct tccgcgcggg catcatgcag 720
 ctgggggcca tggtgccgtt ggacgccgtg gacggcatct acggcaacga gatctttgac 780
 ctcttgccgt cgaacgcggg ctgcggcagc gccagcgaca agcttgctgt cttgcgcggt 840
 gtgctgagcg acacgttgga ggacgccacc aacaacaccc ctgggttctt ggcgtactcc 900
 tcgttgccgt tgctgtacct ccccgggccc gacggcgtga acatcaccga cgacatgtac 960
 gccttggtgc gcgagggcaa gtatgccaac atccctgtga tcatcggcga ccagaacgac 1020
 gagggcacct tctttggcac cctgctgttg aacgtgacca cggatgccca ggcccgcgag 1080
 tacttcaagc agctgtttgt ccacgccagc gacgcggaga tcgacacgtt gatgacggcg 1140

	taccccgcg acatcaccca gggectgccg ttcgacacgg gtatttctcaa cgccctcacc	1200
	ccgcagttca agagaatcct ggcggtgctc ggcgacaacg gctttacgct tgctcgtcgc	1260
	tacttctctca accactacac cggeggcacc aagtactcat tcttcctgaa gcagctcctg	1320
	ggcttgccgg tgctcggaac gtteccactcc aacgacattg tcttcagga ctacttggtg	1380
	ggcagcggtc cgctcatcta caacaacgcg ttcatcgct ttgccacgga cttggacccc	1440
	aacaccgcgg ggttggttgg gaagtggccc gactacacca gcagcctgca gctgggcaac	1500
	aacttgatga tgatcaacgc cttgggcttg tacaccggca aggacaactt ccgcaccgcc	1560
	ggctacgacg cgttgttctc caaccgcgcg ctgttctttg tgtga	1605
	<210> 13	
	<211> 1605	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 突变酶 2	
	<400> 13	
	gccccaccg ccacgctcgc caacggcgac accatcacgc gtctcaacgc catcatcaac	60
	gaggcgttcc tcggcattcc ctttgccgag ccgccgttg gcaacctccg cttcaaggac	120
	cccgtgccgt actccggctc gctcgatggc cagaagtcca cgctgtacgg cccgctgtgc	180
	atgcagcaga accccgaggg cacctacgag gagaacctcc ccaaggcagc gctcgacttg	240
	gtgatgcagt ccaaggtgtt tgaggcgtg ctgccgtga gcgaggactg tctcaccatc	300
[0023]	aacgtgtgtc ggccgcggg caccaaggcg ggtgccaacc tcccgtgat gctctggatc	360
	tttgccggcg ggttgaggt ggggtgcacc agcaccttc ctcgcccca gatgatcacc	420
	aagagcattg ccatgggcaa gcccatcatc cacgtgagcg tcaactaccg cgtgtcgtcg	480
	tgggggttct tggctggcga cgagatcaag gccgagggca gtgccaacgc cggtttgaag	540
	gaccagcgtc tgggcatgca tgggtggcg gacaacattg cggcgtttgg cggcgacccg	600
	accaaggtga ccatctttgg cgagctggcg ggcagcatgt cggtcattgt ccacattctc	660
	tggaacgacg gcgacaacac gtacaaggc aagccgtct tccgcgcggg catcatgcag	720
	ctgggggcca tgggtccgct ggacgccgtg gacggcatct acggcaacga gatctttgac	780
	ctcttgcgct cgaacgcggg ctgcggcagc gccagcgaca agcttgctgtg cttgcgcggt	840
	gtgctgagcg acacgttga ggacgccacc aacaacacc ctgggttctt ggcgtactcc	900
	tcgttgcggt tgctgtacct ccccgcccc gacggcgtga acatcacga cgacatgtac	960
	gccttggtgc gcgagggcaa gtatgccaac atccctgtga tcatcggcga ccagaacgac	1020
	gagggcacct tctttggcac cctgctgttg aacgtgacca cggatgcca gggccgcgag	1080
	tacttcaagc agctgtttgt ccacgccagc gacgcggaga tcgacagt ttgatcggcg	1140
	taccccgcg acatcaccca gggectgccg ttcgacacgg gtatttctcaa cgccctcacc	1200
	ccgcagttca agagaatcct ggcggtgctc ggcgaccttt tctttacgct tgctcgtcgc	1260
	tacttctctca accactacac cggeggcacc aagtactcat tcttcctgaa gcagctcctg	1320
	ggcttgccgg tgctcggaac gtteccactcc aacgacattg tcttcagga ctacttggtg	1380
	ggcagcggtc cgctcatcta caacaacgcg ttcatcgct ttgccacgga cttggacccc	1440

	aacaccgcgg ggttggttggg gaagtggccc gactacacca gcagcctgca gctgggcaac	1500
	aacttgatga tgatcaacgc cttgggcttg tacaccggca aggacaactt ccgcaccgcc	1560
	ggctacgacg cgttggttctc caaccgccg ctgttctttg tgtga	1605
	<210> 14	
	<211> 1605	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 突变酶 3	
	<400> 14	
	gccccaccg ccacgctcgc caacggcgac accatcaccg gtctcaacgc catcatcaac	60
	gaggcggttc tggcatttc ctttgccgag ccgcccgttg gcaacctccg cttcaaggac	120
	cccgtgccgt actccggctc gctcgatggc cagaagtcca cgctgtacgg cccgctgtgc	180
	atgcagcaga accccgaggg cacctacgag gagaacctcc ccaaggcage gctcgacttg	240
	gtgatgcagt ccaaggtgtt tgaggcggtg ctgccgctga gcgaggactg tctcaccatc	300
	aacgtgtgac ggcgcgggg caccaaggcg ggtgcccaacc tcccgtgat gctctggatc	360
	tttggcgggg ggtttgaggt ggggtggcacc agcaccttcc ctccgccca gatgatcacc	420
	aagagcattg ccatgggcaa gcccatcatc cactgagcg tcaactaccg cgtgtcgtcg	480
	tgggggttct tggctggcga cgagatcaag gccgagggca gtgccaacgc cggtttgaag	540
	gaccagcgct tgggcatgca gtgggtggcg gacaacattg cggcgtttgg cggcgaccgc	600
	accaaggtga ccatctttgg cgagctggcg ggcagcatgt cggtcattgt ccacattctc	660
[0024]	tggaacgacg gcgacaacac gtacaaggge aagccgctct tccgcgcggg catcatgcag	720
	ctgggggcca tgggtgccgt ggacgccgtg gacggcatct acggcaacga gatctttgac	780
	ctcttggcgt cgaacgcggg ctgcggcage gccagcgaca agcttgcgtg cttgcgcggt	840
	gtgtgagcg acacgttga ggacgccacc aacaacaccc ctgggttctt ggcgtactcc	900
	tcgttgcggt tgctgtacct ccccgggccc gacggcgtga acatcaccga cgacatgtac	960
	gccttggtag gcgagggcaa gtatgccaac atccctgtga tcatcggcga ccagaacgac	1020
	gagggcacct tctttggcac cctgctgttg aacgtgacca cgcatgccca ggcccgcgag	1080
	tacttcaagc agctgtttgt ccacgccage gacgcggaga tcgacacgtt gatgacggcg	1140
	taccccgggc acatcaccca gggcctgccg ttcgacacgg gtatttctaa cgccttacc	1200
	ccgcagttca agagaatcct ggcgggtgctc ggcgacctta tgtttacgct tgctcgtcgc	1260
	tacttctca accactacac cggcggcacc aagtactcat tcttctgaa gcagctcctg	1320
	ggcttgccgg tgctcggaac gttccactcc aacgacattg tcttccagga ctacttgttg	1380
	ggcagcggtc cgtctatcta caacaacgcg ttcatgtcgt ttgccacgga cttggacccc	1440
	aacaccgcgg ggttggttggg gaagtggccc gactacacca gcagcctgca gctgggcaac	1500
	aacttgatga tgatcaacgc cttgggcttg tacaccggca aggacaactt ccgcaccgcc	1560
	ggctacgacg cgttggttctc caaccgccg ctgttctttg tgtga	1605
	<210> 15	
	<211> 1605	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	

<220>	
<223> 突变酶 4	
<400> 15	
gccccaccg ccacgctcgc caacggcgac accatcaccg gtctcaacgc catcatcaac	60
gaggcgttcc tcggcattcc ctttgccgag ccgccggtgg gcaacctccg cttcaaggac	120
cccggtccgt actccggctc gctcgatggc cagaagtcca cgctgtacgg cccgctgtgc	180
atgcagcaga accccgaggg cacctacgag gagaacctcc ccaaggcagc gctcgacttg	240
gtgatgcagt ccaaggtgtt tgaggcgggtg ctgccgtga gcgaggactg tctcaccatc	300
aacgtggtgc ggccgccggg caccaaggcg ggtgccaaacc tcccgggtgat gctctggatc	360
tttgccggcg ggtttgaggt ggggtggcacc agcaccttcc ctcccgccca gatgatcacc	420
aagagcattg ccatgggcaa gcccatcatc cacgtgagcg tcaactaccg cgtgtcgtcg	480
tgggggttct tggctggcga cgagatcaag gccgagggca gtgccaacgc cggtttgaag	540
gaccagcgt tgggcatgca gtgggtggcg gacaacattg cggcgtttgg cggcgacccg	600
accaagtgta ccatcttttg cgagctggcg ggcagcatgt cggtcatttg ccacattctc	660
tggaacgacg gcgacaacac gtacaaggcg aagccgtctt tccgcgcggg catcatgcag	720
ctgggggcca tgggtccgct ggacgccgtg gacggcatct acggcaacga gatctttgac	780
ctcttggcgt cgaacgcggg ctgcggcagc gccagcgaca agcttgcgtg cttgcgcggt	840
gtgctgagcg acacgttga ggacgccacc aacaacaccc ctgggttctt ggcgtactcc	900
tcgttgcggt tgetgtacct cccccggccc gacggcgtga acatcaccga cgacatgtac	960
[0025] gccttggtc gcgagggcaa gtatgccaac atccctgtga tcacggcgga ccagaacgac	1020
gagggcacct tctttggcac cctgctgttg aacgtgacca cggatgccca ggcccgcgag	1080
tacttcaagc agctgtttgt ccacgccagc gacgcggaga tcgacacgtt gatgacggcg	1140
taccccgcg acatcaccca ggccctgccg ttcgacacgg gtattctcaa cgcctcacc	1200
ccgcagtcca agagaatcct ggccgtgctc ggcgacctta tttttacgct tgctcgtcgc	1260
tacttctca accactacac cggcggcacc aagtactcat tcctctgaa gcagctcctg	1320
ggcttgcggg tgctcggaac gtccactcc aacgacattg tcttcagga ctacttgttg	1380
ggcagcggt cgctcatcta caacaacgcg ttcatcgtg ttgccacgga cttggacccc	1440
aacaccgcgg ggttgttggg gaagtggccc gactacacca gcagcctgca gctgggcaac	1500
aacttgatga tgatcaacgc cttgggcttg tacaccgga aggacaactt ccgcaccgcc	1560
ggctacgacg cgttgttctc caaccgcgg ctgttctttg tgtga	1605
<210> 16	
<211> 1605	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 突变酶 1	
<400> 16	
gccccaccg ccacgctcgc caacggcgac accatcaccg gtctcaacgc catcatcaac	60
gaggcgttcc tcggcattcc ctttgccgag ccgccggtgg gcaacctccg cttcaaggac	120
cccggtccgt actccggctc gctcgatggc cagaagtcca cgtcttacgg cccgtcttgc	180

[0026]

```

atgcagcaga accccgaggg caccatcgag gagaacctcc ccaaggcagc gctcgacttg      240
gtgatgcagt ccaaggtggt tgaggcggtg tctccgtcta gcgaggactg tctcaccatc      300
aacgtggtgc ggccgccggg caccaaggcg ggtgccaaacc tcccggatgat gctctggatc      360
tttggcggcg ggtttgaggt ggggtggcacc agcaccttcc ctcccgccca gatgatcacc      420
aagagcattg ccatgggcaa gcccatcatc cactgagcg tcaactaccg cgtgtcgtcg      480
tgggggttct tggttgcgca cgagatcaag gccgagggca gtgccaacgc cggtttgaag      540
gaccagcgct tgggcatgca gtgggtggcg gacaacattg cggcgtttgg cggcgacccg      600
accaaggtga ccatctttgg cgagtctgcg ggcagcatgt cggtcattgt ccacattctc      660
tggaacgacg gcgacaacac gtacaagggc aagccgctct tccgcgcggg catcatgcag      720
tctggggcca tgggtgccgc tgacgccgtg gacggcatct acggcaacga gatctttgac      780
ctcttggcgt cgaacgcggg ctgcccgcgc gccagcgaca agcttgcgtg cttgcgcggg      840
gtgtctagcg acacgttga ggaagccacc aacaacaccc ctgggttctt ggcgtactcc      900
tcgttgcggg tgtcttacct ccccgggccc gacggcgtga acatcaccga cgacatgtac      960
gccttggatg gcgagggcaa gtatgccaac atccctgtga tcatcggcga ccagaacgac     1020
gagggcacct tctttggcac ctcttctttg aacgtgacca cggatgccca ggcccgcgag     1080
tacttcaagc agtcttttgt ccacgccagc gacgcggaga tcgacacgtt gatgacggcg     1140
taccgccggc acatcaccca gggctctccg ttcgacacgg gtatttctaa cgcctcacc     1200
ccgcagtcca agagaatctc tgcggtgctc ggcgacaacg gctttacgct tgctcgtcgc     1260
tacttctcca accactacac cggcggcacc aagtactcat tctctctaa gcagctctct     1320
ggcttgccgg tgcctggaac gttccactcc aacgacattg tcttccagga ctacttgttg     1380
ggcagcggtc cgtctatcta caacaacgcg ttcatctgct ttgccacgga cttggacccc     1440
aacaccgcgg ggttgttggg gaagtggccc gactacacca gcagctctca gtctggcaac     1500
aacttgatga tgatcaacgc cttgggcttg tacaccggca aggacaactt ccgcaccgcc     1560
ggctacgacg cgttgttctc caaccgccg tcttcttttg tgtga                        1605

```

<210> 17
 <211> 1605
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变酶 2

```

<400> 17
gccccaccg ccacgtcgc caacggcgac accatcaccg gtctcaacgc catcatcaac      60
gaggcgttcc tcggcattcc ctttgccgag ccgccggtgg gcaacctccg cttcaaggac     120
cccgtgccgt actccggctc gctcgatggc cagaagtcca cgtcttacgg cccgtcttgc     180
atgcagcaga accccgaggg caccatcgag gagaacctcc ccaaggcagc gctcgacttg     240
gtgatgcagt ccaaggtggt tgaggcggtg tctccgtcta gcgaggactg tctcaccatc     300
aacgtggtgc ggccgccggg caccaaggcg ggtgccaaacc tcccggatgat gctctggatc     360
tttggcggcg ggtttgaggt ggggtggcacc agcaccttcc ctcccgccca gatgatcacc     420
aagagcattg ccatgggcaa gcccatcatc cactgagcg tcaactaccg cgtgtcgtcg     480
tgggggttct tggttgcgca cgagatcaag gccgagggca gtgccaacgc cggtttgaag     540

```



```

gaccagcgct tgggcatgca gtgggtggcg gacaacattg cggcgtttgg cggcgaccg      600
accaaggtga ccatcttttg cgagtctgcg ggcagcatgt cggtcattgt ccacattctc      660
tggaacgacg gcgacaacac gtacaagggc aagccgctct tccgcgcggg catcatgcag      720
tctggggcca tggtgccgtc tgacgccgtg gacggcatct acggcaacga gatctttgac      780
ctcttggcgt cgaacgcggg ctgcggcagc gccagcgaca agcttgcgtg cttgcgcggt      840
gtgtctagcg acacgttggg ggacgccacc aacaacaccc ctgggttctt ggcttactcc      900
tcgttgcggt tgtcttacct cccccggccc gacggcgtga acatcaccga cgacatgtac      960
gccttgggtg gcgagggcaa gtatgccaac atccctgtga tcatcgcgga ccagaacgac     1020
gagggcacct tctttggcac ctcttctttg aacgtgacca cggatgcccc ggcccgcgag     1080
tacttcaage agtcttttgt ccacgccagc gacggcgaga tcgacacgtt gatgacggcg     1140
taccceggcg acatcaccca gggtctctcg ttcgacacgg gtattctcaa cgcctcacc     1200
ccgcagtcca agagaatctc tgcggtgtc ggcgaccttt tctttacgct tgcctgtcgc     1260
tacttctcta accactacac cgcgccgacc aagtactcat tctctctaa gcagctctct     1320
ggcttgcggt tgctcggaac gtccactcc aacgacattg tcttcagga ctacttgttg     1380
ggcagcggtt cgtctactta caacaacgcg ttcatgtcgt ttgccacgga cttggacccc     1440
aacaccgcgg ggttgttggg gaagtggccc gactacacca gcagctctca gtcttgcaac     1500
aacttgatga tgatcaacgc ctggggttgg tacaccgcca aggacaactt ccgcaccgcc     1560
ggctacgacg cgttgttctc caaccgcggc tctttctttg tgtga                      1605

```

[0027]

<210> 18
 <211> 1605
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变酶 3

```

<400> 18
gccccaccg ccacgtcgc caacggcgac accatcaccg gtctcaacgc catcatcaac      60
gaggcgttcc tcggcattcc ctttgccgag ccgccggtgg gcaacctccg cttcaaggac     120
cccgtgccgt actccggctc gctcgatggc cagaagtcca cgtcttacgg cccgtcttgc     180
atgcagcaga accccgaggg cacctacgag gagaacctcc ccaaggcagc gctcgacttg     240
gtgatgcagt ccaaggtgtt tgaggcgggt tctccgtcta gcgaggactg tctcaccatc     300
aacgtgtgtc ggccgccggg caccaaggcg ggtgccaaacc tcccggatgat gctctggatc     360
tttggcggcg ggtttgaggt ggggtggcacc agcaccttcc ctcccgccca gatgatcacc     420
aagagcattg ccatgggcaa gcccatcatc cacgtgagcg tcaactaccg cgtgtcgtcg     480
tgggggttct tggctggcga cgagatcaag gccgagggca gtgccaaacgc cggtttgaag     540
gaccagcgct tgggcatgca gtgggtggcg gacaacattg cggcgtttgg cggcgaccg      600
accaaggtga ccatcttttg cgagtctgcg ggcagcatgt cggtcattgt ccacattctc      660
tggaacgacg gcgacaacac gtacaagggc aagccgctct tccgcgcggg catcatgcag      720
tctggggcca tggtgccgtc tgacgccgtg gacggcatct acggcaacga gatctttgac      780
ctcttggcgt cgaacgcggg ctgcggcagc gccagcgaca agcttgcgtg cttgcgcggt      840

```

```

gtgtctagcg acacgttggg ggagccacc aacaacaccc ctgggttctt ggcgtactcc 900
tcgttgcggt tgtcttacct cccccggccc gacggcgtga acatcaccca cgacatgtac 960
gccttgggtgc gcgagggcaa gtatgccaac atccctgtga tcacggcgga ccagaacgac 1020
gagggcacct tctttggcac ctcttctttg aacgtgacca cgcatgcccc ggcccgcgag 1080
tacttcaagc agtcttttgt ccacgccagc gacgcggaga tcgacacgtt gatgacggcg 1140
taccgccggc acatcaccca gggtcttccg ttcgacacgg gtatttctaa cgcctcacc 1200
ccgcagtta agagaatctc tgcggtgctc ggcgacctta tgtttacgt tgcctcgc 1260
tacttctca accactacac cggcggcacc aagtactcat tctctctaa gcagctctt 1320
ggcttgcggg tgcctggaac gtccactcc aacgacattg tcttcaggga ctacttgtt 1380
ggcagcggtc cgctcatcta caacaacgcg ttcatgtcgt ttgccacgga cttggacccc 1440
aacaccgcgg ggttgttgtt gaagtggccc gactacacca gcagctctca gtctggcaac 1500
aacttgatga tgatcaacgc cttgggcttg tacaccggca aggacaactt ccgcaccgcc 1560
ggctacgacg cgttgttctc caaccgccg tcttctttg tgtga 1605

```

<210> 19
 <211> 1605
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 突变酶 4

[0028]

```

<400> 19
gccccacccg ccacgtcgc caacggcgac accatcaccc gtctcaacgc catcatcaac 60
gaggcggtcc tcggcatcc ctttgccgag ccgccggtgg gcaacctccg cttcaaggac 120
cccgtgccgt actccggctc gctcgatggc cagaagtcca cgtcttacgg cccgtcttgc 180
atgcagcaga accccgaggg cactacgag gagaacctcc ccaaggcagc gctcgacttg 240
gtgatgcagt ccaaggtgtt tgaggcggtg tctccgtcta gcgaggactg tctcaccatc 300
aacgtgtgtc ggccgccggg caccaaggcg ggtgccaaac tcccgtgat gctctggatc 360
tttggcgggc ggtttgaggt ggttggcacc agcaccttcc ctccgccca gatgatcacc 420
aagagcattg ccatgggcaa gccatcatc cactgagcg tcaactaccg cgtgtcgtcg 480
tgggggttct tggctggcga cgagatcaag gccagggca gtgccaacgc cggtttgaag 540
gaccagcgct tgggcatgca gtgggtggcg gacaacattg cggcgtttgg cggcgacccg 600
accaagtgta ccatctttgg cgagtctcgc ggcagcatgt cggcatgtg ccacattctc 660
tggaacgacg gcgacaacac gtacaagggc aagccgtct tccgcgcggg catcatgcag 720
tctggggcca tgggtccgtc tgacgccgtg gacggcatct acggcaacga gatctttgac 780
ctcttggcgt cgaacgcggg ctgcggcagc gccagcgaca agcttgcgtg cttgcgcggt 840
gtgtctagcg acacgttggg ggagccacc aacaacaccc ctgggttctt ggcgtactcc 900
tcgttgcggt tgtcttacct cccccggccc gacggcgtga acatcaccca cgacatgtac 960
gccttgggtgc gcgagggcaa gtatgccaac atccctgtga tcacggcgga ccagaacgac 1020
gagggcacct tctttggcac ctcttctttg aacgtgacca cgcatgcccc ggcccgcgag 1080
tacttcaagc agtcttttgt ccacgccagc gacgcggaga tcgacacgtt gatgacggcg 1140
taccgccggc acatcaccca gggtcttccg ttcgacacgg gtatttctaa cgcctcacc 1200

```

	ccgcagttca agagaatctc tgcggtgctc ggcgacctta tgtttacgct tgctcgtcgc	1260
	tacttctctca accactacac cggcggcacc aagtactcat tcctctctaa gcagctctct	1320
	ggcttgccgg tgctcggaac gttccactcc aacgacattg tcttcagga ctacttggtg	1380
	ggcagcggct cgctcatcta caacaacgcg ttcatgtcgt ttgccacgga cttggacccc	1440
	aacaccgcgg ggttggttgt gaagtggccc gactacacca gcagctctca gtcgtgcaac	1500
	aacttgatga tgatcaacgc cttgggcttg tacaccggca aggacaactt ccgcaccgcc	1560
	ggctacgacg cgttggtctc caaccgcgcg tctttctttg tgtga	1605
	<210> 20	
	<211> 1650	
	<212> DNA	
	<213> 柱状假丝酵母	
	<400> 20	
	atggagctcg ctcttgcgct cctgctcatt gcctcggtgg ctgctgcccc caccgccacg	60
	ctcgccaacg gcgacaccat caccggtctc aacgccatca tcaacgaggc gttctctggc	120
	attccctttg ccgagccgcc ggtgggcaac ctccgcttca aggaccccggt gccgtactcc	180
	ggctcgtctg atggccagaa gttcacgctg tacggcccgc tgtgcatgca gcagaacccc	240
	gagggcacct acgaggagaa cctccccaag gcagcgtcgc acttggtgat gcagtccaag	300
	gtgtttgagg cgggtgctgc gctgagcgag gactgtctca ccatcaacgt ggtgcggccg	360
	ccgggcacca aggcgggtgc caacctcccg gtgatgctct ggatctttgg cggcgggttt	420
	gaggtgggtg gcaccagcac cttccctccc gccagatga tcaccaagag cattgccatg	480
[0029]	ggcaagccca tcatccacgt gagcgtcaac taccgcgtgt cgctgtgggg gttcttggt	540
	ggcgacgaga tcaaggccga gggcagtgcc aacgccggtt tgaaggacca gcgcttgggc	600
	atgcagtggtg tggcggacaa cattgcggcg tttggcggcg acccgaccaa ggtgaccatc	660
	tttggcgagc tggcgggcag catgtcggtc atgtgccaca ttctctggaa cgacggcgac	720
	aacacgtaca agggcaagcc gctcttccgc gcgggcatca tgcagctggg ggccatggtg	780
	ccgctggacg ccgtggacgg catctacggc aacgagatct ttgacctctt ggcgtcgaac	840
	gcgggctcgc gcagcgccag cgacaagctt gcgtgcttgc gcggtgtgct gagcgacacg	900
	ttggaggacg ccaccaacaa caccctggg ttcttggcgt actcctcgtt gcggttgctg	960
	tacctcccc ggcccagcgg cgtgaacatc accgacgaca tgtacgcctt ggtgcgcgag	1020
	ggcaagtatg ccaacatccc tgtgatcctc ggcgaccaga acgacgaggg caccctcttt	1080
	ggcaccctgc tgttgaacgt gaccacgat gcccgagccc gcgagtactt caagcagctg	1140
	tttgtccacg ccagcgacgc ggagatcgac acgttgatga cggcgtaccc cggcgacatc	1200
	accagggccc tgccgttcga cagggtatt ctcaacgccc tcaccccgca gttcaagaga	1260
	atcctggcgg tgctcggcga ccttggtttt acgttgctc gtcgctactt cctcaaccac	1320
	tacaccggcg gcaccaagta ctattctctc ctgaagcagc tcctgggctt gccggtgctc	1380
	ggaacgttcc actccaacga cattgtcttc caggactact tgttgggcag cggctcgtc	1440
	atctacaaca acgcgttcat tgcgtttgcc acggacttgg accccaacac cgcggggttg	1500
	ttggtgaagt ggcccagata caccagcagc ctgcagctgg gcaacaactt gatgatgatc	1560
	aacgccttgg gcttgtacac cggcaaggac aacttccgca ccgcccgtta cgacgcgttg	1620

	ttctccaacc cgccgctggt ctttgtgtga	1650
	<210> 21	
	<211> 45	
	<212> DNA	
	<213> 柱状假丝酵母	
[0030]	<400> 21	
	atggagctcg ctcttgcgct cctgctcatt gcctcggtgg ctgct	45
	<210> 22	
	<211> 15	
	<212> PRT	
	<213> 柱状假丝酵母	
	<400> 22	
	Met Glu Leu Ala Leu Ala Leu Ser Leu Ile Ala Ser Val Ala Ala	
	1 5 10 15	

野生型 LIP1

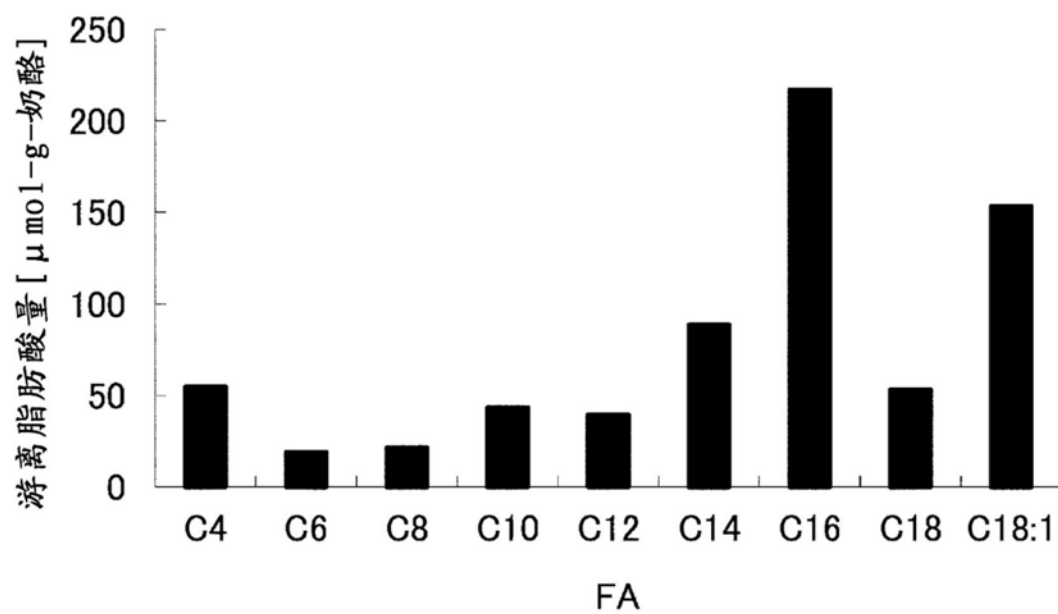


图1

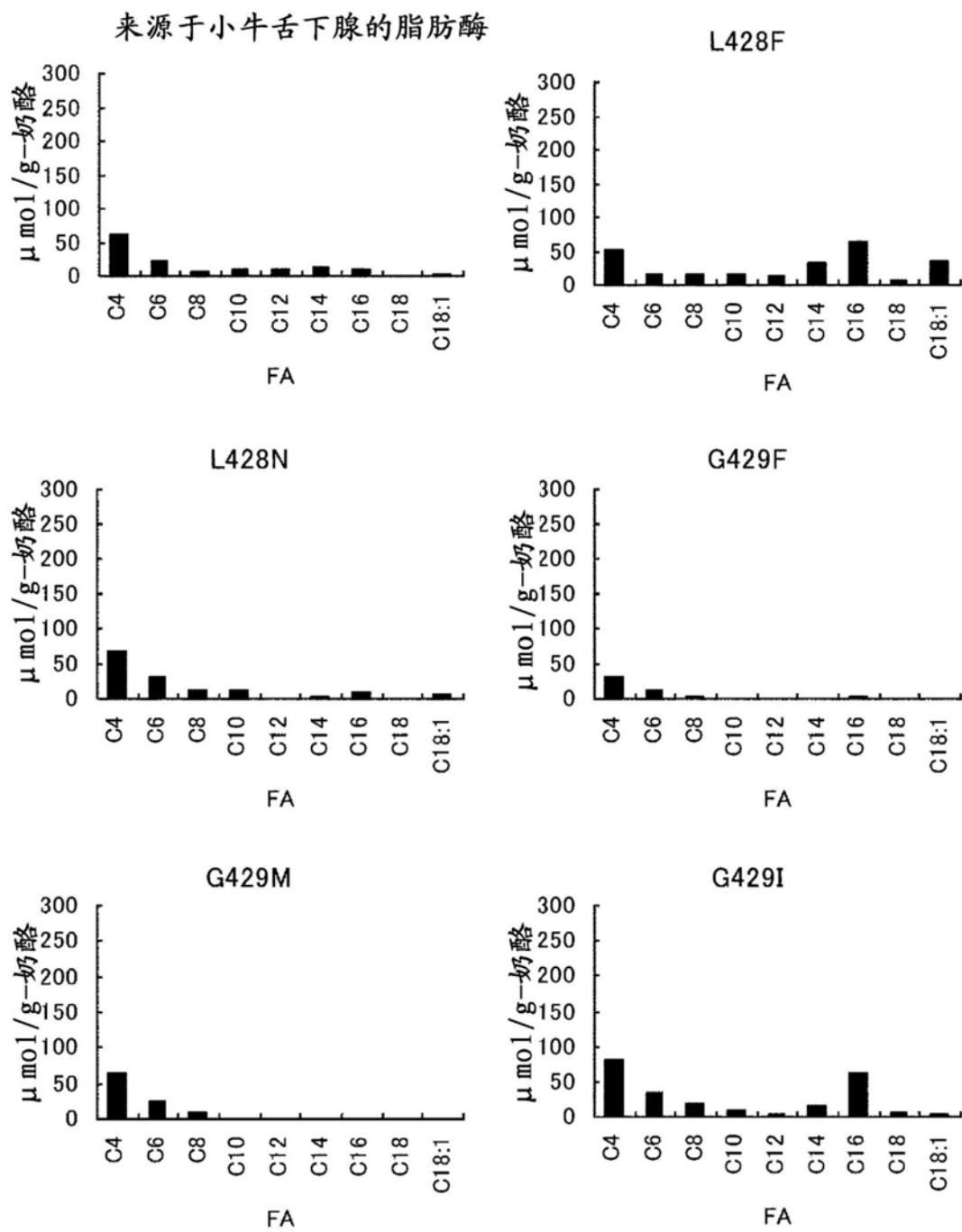


图2

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
             10         20         30         40         50
LIP1(序列号2) APTATLANGD TITGLNAIIN EAFLGIPFAE PPVGNLRFKD PVPYSGSLDG
LIP1(序列号3) APTATLANGD TITGLNAIIN EAFLGIPFAE PPVGNLRFKD PVPYSGSLDG
LIP2(序列号4) APTATLANGD TITGLNAIVN EKFLGIPFAE PPVGTLRFKP PVPYSASLNG
LIP3(序列号5) APTAKLANGD TITGLNAIIN EAFLGIPFAE PPVGNLRFKD PVPYSGSLNG
LIP4(序列号6) APTATLANGD TITGLNAIIN EAFLGIPFAQ PPVGNLRFKP PVPYSASLNG
LIP5(序列号7) APTATLANGD TITGLNAIIN EAFLGIPFAE PPVGNLRFKD PVPYRGS LNG
Clustal Co  ****.***** *****:* * *****: ****.****  **** .**:*

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
             60         70         80         90        100
LIP1          QKFTSYGPSC MQQNPEGTYE ENLPKAALDL VMQSKVFEAV SPSSDCLTI
LIP1'         QKFTSYGPSC MQQNPEGTYE ENLPKAALDL VMQSKVFEAV SPSSDCLTI
LIP2          QKFTSYGPSC MQMNPMGSFE DTLPKNARHL VLQSKIFQVV LPNDEDCLTI
LIP3          QKFTSYGPSC MQQNPEGTFE ENLGKTALDL VMQSKVFQAV LPQSEDCLTI
LIP4          QKFTSYGPSC MQMNPLGNWD SSLPKAAINS LMQSKLFQAV LPNGEDCLTI
LIP5          QSFTAYGPSC MQQNPEGTYE ENLPKVALDL VMQSKVFQAV LPNSEDCLTI
Clustal Co   *,**:****** ** ** *,:: ,,* * * , :*****:*,* *,*****

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
             110        120        130        140        150
LIP1          NVVRPPGTKA GANLPVMLWI FGGGFEVGGT STFPPAQMIT KSIAMGKPII
LIP1'         NVVRPPGTKA GANLPVMLWI FGGGFEVGGT STFPPAQMIT KSIAMGKPII
LIP2          NVIRPPGTRA SAGLPVMLWI FGGGFELGGS SLFPGDQMVV KSVLMGKPII
LIP3          NVVRPPGTKA GANLPVMLWI FGGGFEIGSP TIFPPAQMTV KSVLMGKPII
LIP4          NVVRPSGTPK GANLPVMVWI FGGGFEVGGG SLFPPAQMIT ASVLMGKPII
LIP5          NVVRPPGTKA GANLPVMLWI FGGGFEIGSP TIFPPAQMVS KSVLMGKPII
Clustal Co   **:**.***. ,*,***** ** *****:*, , : ** **:: * :*****

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
             160        170        180        190        200
LIP1          HVSVNRYRVSS WGFLAGDEIK AEGSANAGLK DQRLGMQWVA DNIAAFGGDP
LIP1'         HVSVNRYRVSS WGFLAGDEIK AEGSANAGLK DQRLGMQWVA DNIAAFGGDP
LIP2          HVSMNYRVAS WGFLAGPDIQ NEGSGNAGLH DQRLAMQWVA DNIAGFGGDP
LIP3          HVAVNRYRVAS WGFLAGDDIK AEGSGNAGLK DQRLGMQWVA DNIAGFGGDP
LIP4          HVSMNYRVAS WGFLAGPDIK AEGSGNAGLH DQRLGLQWVA DNIAGFGGDP
LIP5          HVAVNRYRLAS FGFLAGPDIK AEGSSNAGLK DQRLGMQWVA DNIAGFGGDP
Clustal Co   **::*****:* :***** :*: ***.*****: ****.***** *****

```

图3

```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      210      220      230      240      250
LIP1   TKVTIFGESA  GSMSVMCHIL  WNDGDNTYKG  KPLFRAGIMQ  SGAMVPSDAV
LIP1'  TKVTIFGESA  GSMSVMCHIL  WNDGDNTYKG  KPLFRAGIMQ  SGAMVPSDAV
LIP2   SKVTIYGESA  GSMSTFVHLV  WNDGDNTYNG  KPLFRAAIMQ  SGCMVPSDPV
LIP3   SKVTIFGESA  GSMSVLCHLI  WNDGDNTYKG  KPLFRAGIMQ  SGAMVPSDPV
LIP4   SKVTIFGESA  GSMSVMCQLL  WNDGDNTYNG  KPLFRAAIMQ  SGAMVPSDPV
LIP5   SKVTIFGESA  GSMSVLCHLL  WNGGDNTYKG  KPLFRAGIMQ  SGAMVPSDPV
Clustal Co  :****:****  ****, : : :  **, *****:*  *****, ***  **, *****. *

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      260      270      280      290      300
LIP1   DGIYGNEIFD  LLASNAGCGS  ASDKLACLRG  VSSDTLEDAT  NNTPGFLAYS
LIP1'  DGIYGNEIFD  LLASNAGCGS  ASDKLACLRG  VSSDTLEDAT  NNTPGFLAYS
LIP2   DGTYGTEIYN  QVVASAGCGS  ASDKLACLRG  LSQDTLYQAT  SDTPGVLAYP
LIP3   DGTYGNEIYD  LJVSSAGCGS  ASDKLACLRG  ASSDTLLDAT  NNTPGFLAYS
LIP4   DGPYGTQIYD  QVVASAGCGS  ASDKLACLRG  ISNDKLFQAT  SDTPGALAYP
LIP5   DGTYGTEIYD  TLVASTGCSS  ASNKLACLRG  LSTQALLDAT  NDTPGFLSYT
Clustal Co  **  **, :*: : : : : **, *  **:*:*****, * : * :** , :**** **:*,

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      310      320      330      340      350
LIP1   SLRLSYLPRP  DGVNITDDMY  ALVREGKYAN  IPVIIGDQND  EGTFFGTSSL
LIP1'  SLRLSYLPRP  DGVNITDDMY  ALVREGKYAN  IPVIIGDQND  EGTFFGTSSL
LIP2   SLRLSYLPRP  DGTFITDDMY  ALVRDGKYAH  VPVIIGDQND  EGTFLGLSSL
LIP3   SLRLSYLPRP  DGKNITDDMY  KLVRDGKYAS  VPVIIGDQND  EGTIFGLSSL
LIP4   SLRLSFLPRP  DGTFITDDMF  KLVRDGKCAN  VPVIIGDQND  EGTVFALSSL
LIP5   SLRLSYLPRP  DGANITDDMY  KLVRDGKYAS  VPVIIGDQND  EGFLFGLSSL
Clustal Co  *****:****  **  *****:  ***:** *  :***** ** , *, ***

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
      360      370      380      390      400
LIP1   NVTDDAQARE  YFKQSFIHAS  DAEIDTLMTA  YPGDITQGSP  FDTGILNALT
LIP1'  NVTDDAQARE  YFKQSFIHAS  DAEIDTLMTA  YPDITQGSP  FDTGILNALT
LIP2   NVTDDAQARA  YFKQSFIHAS  DAEIDTLMAA  YTSITQGSP  FDTGIFNAIT
LIP3   NVTDDAQARA  YFKQSFIHAS  DAEIDTLMAA  YPDITQGSP  FDTGIFNAIT
LIP4   NVTDDAQARQ  YFKESFIHAS  DAEIDTLMAA  YPSDITQGSP  FDTGIFNAIT
LIP5   NTTTEADAEA  YLRKSFIHAT  DADITALKAA  YPSDVTQGSP  FDTGILNALT
Clustal Co  *, **:*:*, * : : : **:*, **:* : * : * , * :***** *****:***:

```

图4


```

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
            410      420      430      440      450
LIP1      PQFKRISAVL GDLGFTLARR YFLNHYTGGT KYSFLSKQLS GLPVLGTFHS
LIP1'     PQFKRISAVL GDLGFTLARR YFLNHYTGGT KYSFLSKQLS GLPVLGTFHS
LIP2      PQFKRISALL GDLAFTLARR YFLNYYQGGT KYSFLSKQLS GLPVLGTFHG
LIP3      PQFKRISAVL GDLAFIHARR YFLNHFQGGT KYSFLSKQLS GLPIMGTFHA
LIP4      PQFKRIAAVL GDLAFTLPRR YFLNHFQGGT KYSFLSKQLS GLPVIQTHHA
LIP5      PQLKRINAVL GDLTFTLSRR YFLNHYTGGP KYSFLSKQLS GLPILGTFHA
Clustal Co **:* ** * . ** ***** ** ***** ****:*.*

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
            460      470      480      490      500
LIP1      NDIVFQDYLL GSGSLIYNNA FIAFATDLDP NTAGLLVKWP EYTSSSQSGN
LIP1'     NDIVFQDYLL GSGSLIYNNA FIAFATDLDP NTAGLLVKWP EYTSSSQSGN
LIP2      NDIIWQDYLV GSGSVIYNNA FIAFANDLDP NKAGLWTNWP TYTSSSQSGN
LIP3      NDIVWQDYLL GSGSVIYNNA FIAFATDLDP NTAGLLVNWP KYTSSSQSGN
LIP4      NDIVWQDFLV SHSSAVYNNA FIAFANDLDP NKAGLLVNWP KYTSSSQSGN
LIP5      NDIVWQHFLV GSGSVIYNNA FIAFATDLDP NTAGLSVQWP KSTSSSQAGD
Clustal Co ***:*:*: . * :***** ***** *.* ** :** *****:*

      ....|....|....|....|....|....|....|....|....|
            510      520      530
LIP1      NLMMINALGL YTGKDNFRTA GYDALFSNPP SFFV
LIP1'     NLMMINALGL YTGKDNFRTA GYDALFSNPP SFFV
LIP2      NLMQINGLGL YTGKDNFRPD AYSALFSNPP SFFV
LIP3      NLMMINALGL YTGKDNFRTA GYDALMTNPS SFFV
LIP4      NLLQINALGL YTGKDNFRTA GYDALFTNPS SFFV
LIP5      NLMQISALGL YTGKDNFRTA GYNALFADPS HFFV
Clustal Co **: *.*** *****. *.**::*. ***

```

图5