



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107109443 B

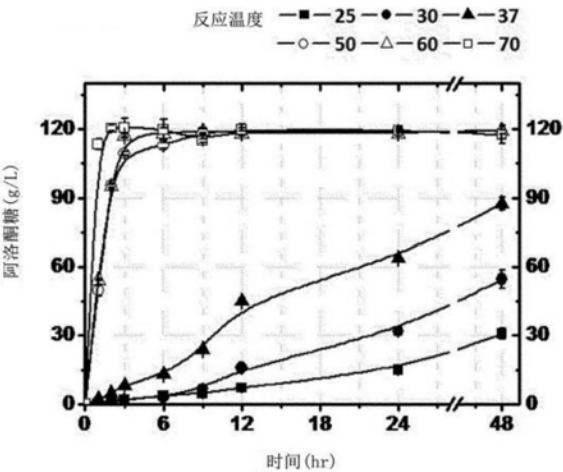
(45) 授权公告日 2021. 11. 02

(21) 申请号 201580060676.2
(22) 申请日 2015.11.06
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 107109443 A
(43) 申请公布日 2017.08.29
(30) 优先权数据
 10-2014-0153949 2014.11.06 KR
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2017.05.08
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/KR2015/011954 2015.11.06
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02016/072800 KO 2016.05.12
(73) 专利权人 庆尚大学校产学协力团
 地址 韩国庆尚南道
(72) 发明人 金善元 崔珉摺 郑圣熹 李大尹
(74) 专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
 务所(普通合伙) 11201
 代理人 宋融冰
(51) Int.Cl.
 C12P 7/18 (2006.01)
 C12P 19/24 (2006.01)
 C12P 19/02 (2006.01)
 审查员 郭雅萍

权利要求书2页 说明书21页
序列表44页 附图16页

(54) 发明名称
 阿洛酮糖的制备方法

(57) 摘要
 本发明涉及阿洛酮糖的制备方法,更详细地,涉及如下的阿洛酮糖的制备方法,其包括:在果糖及阿洛酮糖的混合物中添加甘露醇脱氢酶来使上述果糖转换为甘露醇的步骤;以及从上述混合物中分离上述甘露醇的步骤。由此,可提高阿洛酮糖生产能力,并以高纯度分离阿洛酮糖。



1. 一种阿洛酮糖的制备方法,其特征在于,包括:

在还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸供给源存在下,果糖及阿洛酮糖的混合物与甘露醇-2-脱氢酶反应来使上述果糖转换为甘露醇的步骤;以及

从上述混合物中分离上述甘露醇的步骤,

使上述果糖转换为甘露醇的步骤利用包含对甘露醇-2-脱氢酶进行编码的基因的微生物来执行。

2. 根据权利要求1所述的阿洛酮糖的制备方法,其特征在于,上述甘露醇-2-脱氢酶为氨基酸序列如序列43所示的来源于假肠膜明串珠菌(*Leuconostoc pseudomesenteroide*) ATCC 12291s的甘露醇-2-脱氢酶、氨基酸序列如序列44所示的来源于肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)的甘露醇-2-脱氢酶、氨基酸序列如序列45所示的来源于类球红细菌(*Rhodobactersphaeroides*)的甘露醇-2-脱氢酶或氨基酸序列如序列46所示的来源于荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*) DSM 50106的甘露醇-2-脱氢酶。

3. 根据权利要求1所述的阿洛酮糖的制备方法,其特征在于,上述还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸供给源为甲酸及甲酸脱氢酶。

4. 根据权利要求1所述的阿洛酮糖的制备方法,其特征在于,上述微生物为棒状杆菌属(*Corynebacterium*)微生物。

5. 根据权利要求1所述的阿洛酮糖的制备方法,其特征在于,使上述果糖转换为甘露醇的步骤在包含甲酸的培养基中执行,上述微生物还包含对甲酸脱氢酶进行编码的基因。

6. 根据权利要求5所述的阿洛酮糖的制备方法,其特征在于,上述甲酸脱氢酶为氨基酸序列如序列49所示的来源于母牛分枝杆菌(*Mycobacterium vaccae*) 菌苗N10的甲酸脱氢酶。

7. 根据权利要求5所述的阿洛酮糖的制备方法,其特征在于,使上述果糖转换为甘露醇的步骤在包含缓冲溶液的培养基的开放反应系统中执行。

8. 根据权利要求1所述的阿洛酮糖的制备方法,其特征在于,上述微生物还包含对葡萄糖转运蛋白质进行编码的基因。

9. 根据权利要求8所述的阿洛酮糖的制备方法,其特征在于,上述葡萄糖转运蛋白质为氨基酸序列如序列50所示的来源于运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)的葡萄糖转运蛋白质。

10. 根据权利要求1所述的阿洛酮糖的制备方法,其特征在于,分离上述甘露醇的步骤通过根据溶剂作用下的甘露醇与阿洛酮糖的溶解度差异的甘露醇的结晶化来执行。

11. 根据权利要求1所述的阿洛酮糖的制备方法,其特征在于,还包括如下步骤:使作为底物的果糖与阿洛酮糖-3-差向异构酶发生反应,来制备上述果糖及阿洛酮糖的混合物。

12. 根据权利要求11所述的阿洛酮糖的制备方法,其特征在于,制备上述果糖及阿洛酮糖的混合物的步骤在40℃至90℃的温度下在微生物内执行。

13. 根据权利要求1所述的阿洛酮糖的制备方法,其特征在于,上述甘露醇的分离通过液体色谱法来执行。

14. 一种阿洛酮糖和甘露醇的混合物的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:在还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸供给源存在下,果糖及阿洛酮糖的混合物与甘露醇-2-脱氢酶反应来使上述果糖转换为甘露醇,

使上述果糖转换为甘露醇的步骤利用包含对甘露醇-2-脱氢酶进行编码的基因的微生物来执行。

阿洛酮糖的制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及能够以高纯度分离阿洛酮糖的阿洛酮糖的制备方法。

背景技术

[0002] 阿洛酮糖 (D-psicose) 为果糖 (D-fructose) 的3号碳的差向异构体 (epimer), 虽然像普通糖类一样具有甜味, 但由于无法在人体内代谢, 因而属于因卡路里几乎为零而对糖尿病及肥胖患者而言可作为代替白糖的功能性甜味剂来使用的功能性糖。并且, 具有通过抑制在肝脏参与脂质合成的酶的活性来减少腹部肥胖的功能, 是当前作为糖尿病和动脉硬化治疗剂来进行研究的糖。

[0003] 像这样, 随着阿洛酮糖作为甜味剂备受瞩目, 在食品产业领域, 开发可有效生产阿洛酮糖的方法的必要性逐渐增加。由于在天然物质内的糖蜜处理过程或葡萄糖异构化反应过程中存在非常少量的阿洛酮糖, 因而现有的阿洛酮糖生产主要通过化学过程来实现。比利克 (Bilik) 等人曾开发利用钼酸 (molybdic acid) 离子的催化作用来从果糖生产阿洛酮糖的技术。麦克唐纳 (McDonald) 通过对1,2:4,5-二-o-丙酮缩甘油-β-D-果糖 (1,2:4,5-di-o-isopropylidene-bata-D-fructopyranose) 进行三步骤化学处理过程来生产了阿洛酮糖。并且, 多纳 (Doner) 通过对乙醇、三乙胺及果糖一同进行加热的方法生产了阿洛酮糖。但是, 这些通过化学方法生产阿洛酮糖的方法花费很多费用, 相反, 存在生产效率低、产生大量副产物的问题。

[0004] 作为基于生物学方法实现的阿洛酮糖生产方法, 肯·伊兹莫里 (Ken Izumori) 等人证实了可利用微生物细胞反应来从半乳糖醇 (galacitol)、d-塔格糖 (D-tagatose) 或D-塔罗糖醇 (D-talitol) 等生产阿洛酮糖。但是, 这些底物属于自然界中非常稀缺的糖或糖醇, 具有成本高的缺点。

[0005] 酶转换方法有在重组大肠杆菌中生产并纯化分离微生物菊苣假单胞菌ST-24 (*Pseudomonas cichorii* ST-24) 的D-塔格糖-3-差向异构酶 (D-tagatose-3-epimerase) 来使果糖酶转换为阿洛酮糖的方法, 肯·伊兹莫里等人曾利用固定D-塔格糖-3-差向异构酶的反应系统来以25%的转换率生产了阿洛酮糖。

[0006] 根据这种现有技术, 为了从果糖生产阿洛酮糖, 以往以通过纯化酶, 固定所纯化的酶来提高阿洛酮糖生产率的方向进行了研究。但这种酶纯化过程实际需要很多时间和费用。

[0007] 另一方面, 果糖具有与阿洛酮糖类似的物性, 从而即使生产阿洛酮糖, 也存在难以从果糖中分离其的问题。

[0008] 因此, 需要能够以高效率生产阿洛酮糖且容易分离其的阿洛酮糖的生产方法。

[0009] 现有技术文献

[0010] 专利文献

[0011] 韩国公开专利第2013-0029754号

发明内容

[0012] 技术问题

[0013] 本发明的目的在于,提供能够以高纯度分离阿洛酮糖的阿洛酮糖的制备方法。

[0014] 本发明的目的在于,提供阿洛酮糖的生产能力得到改善的阿洛酮糖的制备方法。

[0015] 解决问题的方案

[0016] 本发明的一实施方式提供阿洛酮糖的制备方法,其包括:在果糖及阿洛酮糖的混合物中添加甘露醇脱氢酶来使上述果糖转换为甘露醇的步骤;以及从上述混合物中分离上述甘露醇的步骤。

[0017] 作为阿洛酮糖的代表性的制备方法,可例举利用催化剂来将果糖转换为阿洛酮糖的化学方法、将对催化从果糖到阿洛酮糖的转换的酶进行编码的基因导入于微生物,来从中将果糖转换为阿洛酮糖的生物学方法等。

[0018] 这些方法具有均将果糖用作底物的共同点,果糖和阿洛酮糖的物性类似,从而存在难以从反应混合物中分离阿洛酮糖的问题。

[0019] 但是,本发明人着眼于可使果糖和阿洛酮糖的混合物与甘露醇脱氢酶发生反应来将果糖转换为甘露醇,并从甘露醇中分离阿洛酮糖,来更容易且高效率地分离阿洛酮糖的情况,从而完成了本发明。

[0020] 以下,详细说明本发明。

[0021] 根据本发明的一实例,首先,在果糖及阿洛酮糖的混合物中添加甘露醇脱氢酶来使上述果糖转换为甘露醇。

[0022] 上述果糖及阿洛酮糖的混合物是通过化学或生物学方法来将果糖转换为阿洛酮糖之后的经转换的阿洛酮糖和未转换的果糖的混合物。

[0023] 对此,本发明还可包括如下步骤:使作为底物的果糖与其差向异构酶发生反应,来制备上述果糖及阿洛酮糖的混合物。

[0024] 上述差向异构酶可以为阿洛酮糖-3-差向异构酶,具体地,可以为来源于根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的阿洛酮糖-3-差向异构酶或来源于粪厌氧棒状菌(*Anaerostipes caccae*)的阿洛酮糖-3-差向异构酶。

[0025] 对上述差向异构酶进行编码的基因可以为对来源于序列1的根癌土壤杆菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶进行编码的基因或对来源于序列2的粪厌氧棒状菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶进行编码的基因。

[0026] 来源于根癌土壤杆菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶可具有序列3的氨基酸序列,来源于粪厌氧棒状菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶可具有序列4的氨基酸序列。

[0027] 差向异构酶具有更优秀的高温稳定性,从这个方面来看,优选地,对差向异构酶进行编码的基因可以为对序列5的阿洛酮糖-3-差向异构酶的氨基酸序列进行编码的基因。

[0028] 上述序列5的氨基酸序列为来源于根癌土壤杆菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶的氨基酸序列中的第33个氨基酸被亮氨酸取代且第213个氨基酸被半胱氨酸取代的序列,其热稳定性优秀。

[0029] 本发明的发明人确认了来源于梭菌属的阿洛酮糖-3-差向异构酶具有优秀的热稳定性,参照图7,在热稳定性高的来源于梭菌属的阿洛酮糖-3-差向异构酶的情况下,一个氨基酸具有与其相对应的序列,或具有如上所述的两个序列。

[0030] 对此,不仅是来源于根癌土壤杆菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶,来源于其他菌株的阿洛酮糖-3-差向异构酶也被确认到与来源于上述根癌土壤杆菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶的氨基酸序列的第33个氨基酸、第213个氨基酸相对应的氨基酸序列为对提高热稳定性重要的序列。

[0031] 这种氨基酸序列的具体的例可例举在序列6的氨基酸序列中第32个氨基酸被亮氨酸取代或第196个氨基酸被半胱氨酸取代的序列。序列6为对图7中的用方框所标注的序列进行排列的序列,是在本发明中所使用的根癌土壤杆菌、粪厌氧棒状菌、鲍氏梭菌(*Clostridium bolteae*)、来源于门冬虫梭菌(*Clostridium hylemonae*)的阿洛酮糖-3-差向异构酶氨基酸序列(序列3、序列4、序列9、序列10)的共同碱基序列。因此,上述微生物可以为被对上述氨基酸序列进行编码的基因取代的,但并不限于此。

[0032] 并且,同样,从优秀的高温稳定性、阿洛酮糖的生产能力方面来看,差向异构酶可以为来源于梭菌属的阿洛酮糖-3-差向异构酶,对其进行编码的基因可以为对来源于序列7的鲍氏梭菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶进行编码的基因或对来源于序列8的门冬虫梭菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶进行编码的基因。从将高温稳定性极大化的方面来看,优选地,可以为对来源于序列8的门冬虫梭菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶进行编码的基因。

[0033] 来源于鲍氏梭菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶可具有序列9的氨基酸序列,来源于门冬虫梭菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶可具有序列10的氨基酸序列。

[0034] 在所例示的上述阿洛酮糖-3-差向异构酶中,来源于粪厌氧棒状菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶、具有在序列6的氨基酸序列中的第32个氨基酸被亮氨酸取代或第196个氨基酸被半胱氨酸取代的序列的阿洛酮糖-3-差向异构酶、来源于鲍氏梭菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶及来源于门冬虫梭菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶的最佳活性的pH为7以下。

[0035] 果糖和差向异构酶的反应可在20℃至90℃的温度下执行,从阿洛酮糖的生产能力极大化方面来看,优选地,可在40℃至90℃的温度下执行。具体地,例如,可以为40℃至50℃、40℃至60℃、40℃至70℃、40℃至80℃、40℃至90℃、45℃至60℃、45℃至70℃、45℃至80℃、45℃至90℃、50℃至70℃、50℃至80℃、50℃至90℃、55℃至60℃、55℃至70℃、55℃至80℃、55℃至90℃、60℃至70℃、60℃至80℃、60℃至90℃、70℃至80℃、70℃至90℃、75℃至80℃、75℃至90℃、80℃至90℃等。若反应温度大于90℃,则差向异构酶或后述的微生物有可能被热损伤或变性。

[0036] 若上述反应在40℃以上的温度下执行,则差向异构酶有可能被热损伤或变性,因而优选地,上述反应在微生物内执行。随着反应温度增加,阿洛酮糖生产能力更增加,但差向异构酶热变性而有可能难以将其实现,但是,在微生物内执行上述反应的情况下,差向异构酶由微生物保护,因而可在高温条件下执行反应。

[0037] 在本说明书中,术语“微生物”可以为可在液体培养基中进行培养的细胞。

[0038] 上述微生物可内在性表达上述差向异构酶或通过转化来表达上述差向异构酶。在此情况下,可在微生物内生成差向异构酶来通过上述果糖与差向异构酶的微生物内反应连续执行阿洛酮糖的生产。

[0039] 在上述微生物转化为对差向异构酶进行编码的基因来表达差向异构酶的情况下,对上述差向异构酶进行编码的基因可以为对来源于序列1的根癌土壤杆菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶进行编码的基因或对来源于序列2的粪厌氧棒状菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶

进行编码的基因。

[0040] 差向异构酶具有更优秀的高温稳定性,从这个方面来看,优选地,对差向异构酶进行编码的基因可以为对序列5的阿洛酮糖-3-差向异构酶的氨基酸序列进行编码的基因。

[0041] 并且,同样,从优秀的高温稳定性、阿洛酮糖的生产能力方面来看,对差向异构酶进行编码的基因可以为对来源于序列7的鲍氏梭菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶进行编码的基因或对来源于序列8的门冬虫梭菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶进行编码的基因。

[0042] 上述微生物为原核细胞或真核细胞,可在液体培养基中进行培养,并可在上述的高温条件下进行培养。上述微生物例如可以为细菌、霉或它们的组合。细菌可以为革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌或它们的组合,从提高阿洛酮糖生产率方面来看,优选地,可以为革兰氏阳性细菌。革兰氏阴性细菌可以为埃希氏菌属 (*Escherichia*)。革兰氏阳性细菌可以为芽孢杆菌属、棒状杆菌属、放线菌属、乳酸菌或它们的组合。霉可以为酵母、克鲁维酵母属或它们的组合。

[0043] 在本发明的阿洛酮糖的生产方法中,若果糖与差向异构酶的反应在40℃以上的温度下执行,则微生物优选为热稳定性高的高温型微生物 (thermophiles)。例如,可以为棒状杆菌属、放线菌属,更优选为谷氨酸棒状杆菌,最优选为向谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 导入对上述差向异构酶进行编码的基因的微生物。

[0044] 埃希氏菌属微生物可以为大肠杆菌,具体地,可以为向 DH5 α 、MG1655、BL21 (DE)、S17-1、XL1-Blue、BW25113 或它们的组合导入对差向异构酶进行编码的基因的微生物。

[0045] 并且,上述大肠杆菌可以为对内在性6-磷酸果糖激酶进行编码的基因及由阿洛糖代谢操纵子 (allose metabolic operon) 形成的一个区域实现非活性化的菌。

[0046] 对上述6-磷酸果糖激酶进行编码的基因例如可以为具有序列11的核苷酸序列的基因,6-磷酸果糖激酶可以为具有序列12的氨基酸序列的酶。

[0047] 构成上述阿洛糖代谢操纵子的基因为 rpiB、alsR、alsB、alsA、alsC、alsE 及 alsK,可以为其中的一个以上的基因实现非活性化的基因。

[0048] 上述 rpiB、alsR、alsB、alsA、alsC、alsE 及 alsK 基因例如可以为分别具有序列13、序列14、序列15、序列16、序列17、序列18及序列19的核苷酸序列的基因。

[0049] 上述 rpiB、alsR、alsB、alsA、alsC、alsE 及 alsK 基因可以为分别对序列20、序列21、序列22、序列23、序列24、序列25及序列26的氨基酸序列进行编码的基因。

[0050] 术语“非活性化”意味着上述基因的表达减少或未形成表达的情况。上述“非活性化”可通过本领域公知的方法来实现。例如,可通过同源重组 (homologous recombination) 来实现非活性化。上述同源重组例如可由转位子突变 (transposon mutagenesis) 或 P1 转导 (P1 transduction) 介导。

[0051] 棒状杆菌属微生物可以为谷氨酸棒状杆菌,具体地,可以为向谷氨酸棒状杆菌 ATCC13032 导入对差向异构酶进行编码的基因的微生物。

[0052] 棒状杆菌属微生物可以为将内在性 D-果糖转换为 D-果糖 1-磷酸盐并使作为向菌体内进行转运的 PTS 转运系统的 ptsF (EIIFru、fruA、NCgl1861、GI:19553141、EC 2.7.1.69) 基因缺损或实现非活性化的微生物。

[0053] ptsF 基因可以为具有序列27的核苷酸序列的基因,也可以为对序列28的氨基酸序列进行编码的基因。

[0054] 由于阿洛酮糖从D-果糖生成,因而若使上述基因缺损或实现非活性化,则可抑制果糖的磷酸化,因而可明显改善阿洛酮糖的生成效率。

[0055] 并且,棒状杆菌属微生物可以为使对甘露醇2-脱氢酶(mannitol 2-dehydrogenase)进行编码的mt1D(NCg10108、GI:19551360、EC 1.1.1.67)基因缺损或实现非活性化的微生物。

[0056] mt1D基因可以为具有序列29的核苷酸序列的基因,也可以为对序列30的氨基酸序列进行编码的基因。

[0057] 若上述果糖与其差向异构酶的反应在微生物内执行,则可在包含果糖的培养基中培养微生物。

[0058] 上述培养基可以为2YT培养基、LB培养基、TB培养基等的包含酵母提取物和氮源的营养培养基。

[0059] 培养基所包含的果糖的浓度不受特别限制,例如,能够以1% (w/v) 至80% (w/v) 的浓度包含,在上述范围内,例如,可以为1% (w/v) 至35% (w/v)、10% (w/v) 至80% (w/v)、20% (w/v) 至80% (w/v)、30% (w/v) 至80% (w/v)、40% (w/v) 至80% (w/v) 等。优选地,可以为1% (w/v) 至50% (w/v)。

[0060] 并且,培养基可以为包含葡萄糖、甘油等的碳源、包含氨、尿素(urea)等的氮源、钠、钾、钙、镁、锰、钴等的必要金属离子、包含维生素等的在本领域通常使用的规定(defined)培养基。

[0061] 上述培养可以为连续、半连续或批量(batch)形式的培养。

[0062] 上述微生物可在包含果糖的培养基中以使菌体的浊度(在600nm的吸光度下测定的测定值,以下称为OD₆₀₀)达到0.01至300的浓度接种,例如,菌体的浊度可达到1至300、10至300、20至300、5至300或40至300。通过使用包含这种高浓度的上述酶的菌体,可在包含高浓度果糖的培养基中使果糖有效地转换为阿洛酮糖。

[0063] 上述培养可通过还添加用于诱导对差向异构酶进行编码的基因的表达的物质来执行。

[0064] 用于诱导基因的表达的物质不受特别限制,可以为在本领域通常使用的物质。

[0065] 在本发明的阿洛酮糖的生产方法中,可在仅包含作为底物的果糖和用于供给辅助因子的无机盐的培养基中生产阿洛酮糖。可在仅包含作为底物的果糖和用于供给辅助因子的无机盐的培养基中执行上述反应。上述无机盐例如可以为锰盐或钴盐。从呈现更加得到改善的阿洛酮糖的生产速度的方面来看,优选为钴盐,从可将所生产的阿洛酮糖安全地用作食品等的方面来看,优选为锰盐。

[0066] 仅包含果糖和无机盐的培养基可以为果糖和无机盐溶解于溶剂的液体培养基。溶剂例如可以为水。

[0067] 当利用微生物来生产阿洛酮糖时,除了阿洛酮糖之外,培养基中还会生成微生物的有机酸等的代谢物等,因而培养基有可能逐渐被酸性化。由于本发明的仅包含果糖和无机盐的培养基并不包含缓冲溶液,因而更优选地,使用最佳活性pH低的(例如,pH为7以下)阿洛酮糖-3-差向异构酶。

[0068] 在上述果糖与差向异构酶发生反应之前,本发明的阿洛酮糖的生产方法还可包括如下的步骤:在未包含上述果糖的培养基中培养上述微生物,来以使上述微生物具有休眠

细胞的方式进行诱导。

[0069] 以具有上述休眠细胞的方式进行的诱导可通过在未包含果糖的培养基中将上述微生物培养至静止期(stationary phase)来执行。

[0070] 在本说明书中,休眠细胞(resting cell)意味着处于不再进行增殖的状态的培养细胞。在本说明书中,静止期意味着在培养细胞的过程中经过对数生长期(exponential phase)后使细胞的分裂及增殖停止来不再呈现出细胞个体数量的增加并使细胞成分的合成和分解达到均衡的状态。

[0071] 因此,本发明的休眠细胞意味着处于结束生长并使细胞内的差向异构酶的表达达到充分的状态的细胞,在以使微生物具有休眠细胞的方式进行诱导的情况下,差向异构酶的表达量呈现最大值,从而可将阿洛酮糖的生产极大化。

[0072] 除了不包含果糖之外,未包含果糖的培养基可以为与上述的包含果糖的培养基相同的培养基。

[0073] 并且,在上述果糖与其差向异构酶发生反应之后,本发明还可包括如下的步骤:回收上述微生物来再用于使其他底物转换为阿洛酮糖。

[0074] 在本发明中,在微生物内执行果糖与其差向异构酶的反应,即使露出在高温下,也可使差向异构酶得到微生物的保护,因此仍然呈现出酶的活性,因而可以再使用。

[0075] 即,可在上述反应之后,通过回收上述微生物来再用于使其他底物转换为阿洛酮糖。

[0076] 若在可使所分离的微生物的生育得到维持的环境中执行反应,则再使用次数不受限制,可达到数百次以上、数千次以上。

[0077] 若本发明还包括再使用微生物的步骤,则微生物多次露在高温下,因而优选地,使用热稳定性高的高温型微生物,以使再使用时的酶的活性达到高的水平。

[0078] 在上述的例示内容中,优选地,可以为棒状杆菌属、放线菌属,更优选为谷氨酸棒状杆菌,最优选为向谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032导入对上述差向异构酶进行编码的基因。

[0079] 在本发明中,使上述果糖及阿洛酮糖的混合物与甘露醇脱氢酶发生反应,来将未与差向异构酶发生反应的果糖转换为甘露醇。

[0080] 若在微生物内执行上述的果糖与阿洛酮糖的转换反应,则上述反应混合物可以为从微生物中分离果糖和阿洛酮糖的混合物的上清液。

[0081] 上述甘露醇脱氢酶可以为甘露醇-2-脱氢酶。具体地,可以为来源于假肠膜明串珠菌ATCC 12291(*Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291)的甘露醇-2-脱氢酶(GenBank:CAD31644.1,GI:28865823)、来源于肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)的甘露醇-2-脱氢酶(GenBank:ACT22631.1,GI:253317413)、来源于类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)的甘露醇-2-脱氢酶(GenBank:AAC45771.1,GI:2338764)或来源于荧光假单胞菌DSM 50106(*Pseudomonas fluorescens* DSM 50106)的甘露醇-2-脱氢酶(GenBank:AAC04472.1,GI:2293418),从果糖向甘露醇的转换率方面来看,优选地,可以为来源于假肠膜明串珠菌ATCC 12291的甘露醇-2-脱氢酶。

[0082] 来源于假肠膜明串珠菌ATCC 12291的甘露醇-2-脱氢酶可具有序列43的氨基酸序列,来源于肠膜明串珠菌的甘露醇-2-脱氢酶可具有序列44的氨基酸序列,来源于类球红细菌的甘露醇-2-脱氢酶可具有序列45的氨基酸序列,来源于荧光假单胞菌DSM50106的甘露

醇-2-脱氢酶可具有序列46的氨基酸序列。

[0083] 根据需要,果糖及阿洛酮糖的混合物与甘露醇脱氢酶的反应可在还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH,(NAD,Nicotinamide Adenine Dinucleotide)的还原形态)供给源存在下执行。

[0084] 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸为甘露醇脱水酶的辅酶,在向甘露醇脱水酶供给还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的情况下,可明显增加果糖向甘露醇的转换率。由此,反应液中的果糖减少,从而可更容易分离阿洛酮糖。

[0085] 还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸供给源可不受限制地使用在本领域公知的物质,例如,可以为甲酸及甲酸脱氢酶。

[0086] 甲酸脱氢酶可不受限制地使用在本领域公知的甲酸脱氢酶,例如,可以为来源于母牛分枝杆菌菌苗N10(*Mycobacterium vaccae* N10)的甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase,FDH,GenBank:AB072394.1,GI:15982576)。

[0087] 来源于母牛分枝杆菌菌苗N10(*Mycobacterium vaccae* N10)的甲酸脱氢酶可具有序列49的氨基酸序列。

[0088] 同样,上述反应混合物与甘露醇脱氢酶的反应可在微生物内执行。

[0089] 上述微生物为原核细胞或真核细胞,可在液体培养基中进行培养,并可在上述的高温条件下进行培养。上述微生物例如可以为细菌、霉或它们的组合。细菌可以为革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌或它们的组合,从提高阿洛酮糖生产率方面来看,优选地,可以为革兰氏阳性细菌。革兰氏阴性细菌可以为埃希氏菌属。革兰氏阳性细菌可以为芽孢杆菌属、棒状杆菌属、放线菌属、乳酸菌或它们的组合。霉可以为酵母、克鲁维酵母属或它们的组合。

[0090] 阿洛酮糖作为代替白糖的功能性甜味剂,用于食品中,上述微生物优选为一般认为安全的(GRAS,Generally Recognized As Safe)菌株。例如,可以为棒状杆菌属,更具体地,可以为谷氨酸棒状杆菌,最优选地,可以为谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032。

[0091] 上述微生物可内在性表达上述甘露醇脱氢酶或通过转化来表达上述甘露醇脱氢酶。在此情况下,可在微生物内生成甘露醇脱氢酶来通过上述反应混合物与甘露醇脱氢酶的微生物内反应连续执行甘露醇的生产。

[0092] 在上述微生物转化为对甘露醇脱氢酶进行编码的基因来使甘露醇脱氢酶表达的情况下,可使来源于上述假肠膜明串珠菌KCTC 3652(*Leuconostoc pseudomesenteroides* KCTC 3652)的甘露醇-2-脱氢酶(GenBank:CAD31644.1,GI:28865823)、来源于肠膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)的甘露醇-2-脱氢酶(GenBank:ACT22631.1,GI:253317413)、来源于类球红细菌的甘露醇-2-脱氢酶(GenBank:AAC45771.1,GI:2338764)或来源于荧光假单胞菌DSM 50106(*Pseudomonas fluorescens* DSM 50106)的甘露醇-2-脱氢酶(GenBank:AAC04472.1,GI:2293418)表达。

[0093] 并且,上述微生物可内在性表达甲酸脱氢酶或通过转化来表达甲酸脱氢酶。在此情况下,可在微生物内生成甲酸脱氢酶来从甲酸生成还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸。由此,所生成的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸起到甘露醇脱氢酶的辅酶的作用,从而可明显增加果糖向甘露醇的转换率。

[0094] 甲酸脱氢酶例如可以为来源于母牛分枝杆菌菌苗N10(*Mycobacterium vaccae* N10)的甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase,FDH,GenBank:AB072394.1,GI:15982576)。

[0095] 并且,上述微生物可内在性表达葡萄糖转运蛋白质(Glucose Transport Protein,GLF)或通过转化来表达葡萄糖转运蛋白质。在此情况下,向微生物内的作为底物的果糖的流入量增加,从而可增加甘露醇生成量。由此,反应液中的果糖减少,从而可更容易分离阿洛酮糖。

[0096] 葡萄糖转运蛋白质可不受限制地使用在本领域公知的葡萄糖转运蛋白质,例如,可以为来源于运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis* subsp.*mobilis* ZM4、ATCC 31821或KCTC 1534)的葡萄糖转运蛋白质(GenBank:AAG29864.1;GI:11095424)。

[0097] 来源于运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis* subsp.*mobilis* ZM4、ATCC 31821或KCTC 1534)的葡萄糖转运蛋白质可具有序列50的氨基酸序列。

[0098] 在上述果糖与其差向异构酶的反应在微生物内执行的情况下,可在上述的培养基中培养微生物。

[0099] 在上述微生物内在性表达甲酸脱氢酶或通过转化来表达甲酸脱氢酶的情况下,培养基还包含甲酸。

[0100] 此时,培养基的pH可以为6至7.5,更优选地,pH可以为6.5至7.0。若pH在上述范围内,则甘露醇生产率优秀,从而可更容易分离阿洛酮糖。上述范围的pH是通过将乙酸钠、哌嗪-1,4-二乙磺酸(PIPES)、磷酸钠缓冲溶液等用作液体培养基的溶剂或使用水来取得的。

[0101] 并且,若上述微生物可内在性表达甲酸脱氢酶或通过转化来表达甲酸脱氢酶,则使上述果糖转换为甘露醇的步骤可在开放的反应系统中执行。在此情况下,释放通过甲酸与甲酸脱氢酶的反应来生成的CO₂,从而可活跃地维持甲酸脱氢酶的作用。只是,甲酸的消耗有可能使培养基的pH变高,优选地,培养基包含缓冲溶液作为液体溶剂,更优选地,可使用哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲溶液。

[0102] 在上述反应混合物与甘露醇脱氢酶发生反应之前,本发明的阿洛酮糖的生产方法还可包括如下的步骤:在未包含上述果糖的培养基中培养上述微生物,来以使上述微生物具有休眠细胞的方式进行诱导。

[0103] 并且,在上述反应混合物与甘露醇脱氢酶发生反应之后,本发明还可包括如下的步骤:回收上述微生物来再用于使其他底物转换为甘露醇。

[0104] 之后,从上述混合物中分离上述甘露醇。

[0105] 果糖和阿洛酮糖具有类似的物性,从而难以分离,但甘露醇的物性与阿洛酮糖的物性不同,从而可从甘露醇容易分离阿洛酮糖。

[0106] 其分离方法不受特别限制,例如,可例举离心分离、过滤、结晶化、离子交换色谱法等方法,甘露醇和阿洛酮糖对于溶剂的溶解度差异大,因而优选地,可通过根据甘露醇和阿洛酮糖对于溶剂的溶解度差异的结晶化来进行分离。例如,可使用在包含第一溶剂的反应液内添加第一溶剂和另一第二溶剂来使甘露醇结晶化,或使反应液内的溶剂加热及浓缩来使甘露醇结晶化等方法。

[0107] 上述溶剂不受特别限制,例如,可例举水、盐类水溶液、乙醇、己烷、丙酮等。这些可单独使用或混合两种以上来使用。

[0108] 并且,甘露醇和阿洛酮糖还可通过液体色谱法来进行分离。阿洛酮糖和果糖的物性类似,从而停留在液体色谱法中的柱的时间类似,导致峰上面积相重叠,但阿洛酮糖和甘露醇的物性不同,从而在峰上分离,因而可容易进行分离。

[0109] 并且,本发明的一实施方式提供阿洛酮糖的制备方法,其包括如下的步骤:在果糖及阿洛酮糖的混合物中添加甘露醇脱氢酶来使上述果糖转换为甘露醇。

[0110] 在果糖及阿洛酮糖的混合物中添加甘露醇脱氢酶来使上述果糖转换为甘露醇的步骤如上所述可通过化学或生物学方法来将果糖转换为阿洛酮糖之后,在经转换的阿洛酮糖和未转换的果糖的混合物中添加甘露醇脱氢酶,来使果糖转换为甘露醇。

[0111] 如上所述,上述反应混合物与甘露醇脱氢酶的反应可在微生物内执行。具体的方法如上所述。

[0112] 阿洛酮糖为果糖的3号碳的差向异构体,虽然像普通糖类一样具有甜味,但由于无法在人体内代谢,因而属于因卡路里几乎为零而对糖尿病及肥胖患者而言可作为代替白糖的功能性甜味剂来使用的糖,但果糖的卡路里高,且当过度摄取时,有可能成为使胰岛素敏感性降低来诱发糖尿病的主要原因。

[0113] 但是,甘露醇与果糖不同,是卡路里低,不易被体内吸收,且需要长时间的代谢的多糖类,也是利用为糖尿病患者的甜味剂的成分。

[0114] 由此,若在果糖及阿洛酮糖的混合物中添加甘露醇脱氢酶来使上述果糖转换为甘露醇,则即使不将阿洛酮糖单独分离为甘露醇,以阿洛酮糖和甘露醇的混合物状态用作甜味剂,也可利用为减少了糖尿病、肥胖等代谢综合征诱发可能性的代替白糖的功能性甜味剂。

[0115] 并且,本发明还可包括如下的步骤:使作为底物的果糖与其差向异构酶发生反应,来制备上述果糖及阿洛酮糖的混合物。

[0116] 使作为底物的果糖与其差向异构酶发生反应,来制备上述果糖及阿洛酮糖的混合物的步骤可通过上述的方法来执行。

[0117] 并且,在上述果糖与其差向异构酶发生反应之后,本发明还可包括如下的步骤:回收上述微生物来再用于其他底物向阿洛酮糖的转换,同样,这可通过上述的方法来执行。

[0118] 发明的效果

[0119] 根据本发明的方法,能够以高纯度分离阿洛酮糖,从而明显改善阿洛酮糖的生产收率。

[0120] 根据本发明的方法,改善阿洛酮糖的生产量及生产速度。

附图说明

[0121] 图1为从导入了阿洛酮糖-3-差向异构酶的谷氨酸棒状杆菌转化体对来自作为根据休眠细胞转换反应的反应温度的底物的果糖的阿洛酮糖生产量进行测定来表示的。

[0122] 图2为从导入了阿洛酮糖-3-差向异构酶的大肠杆菌MG1655转化体对来自作为根据休眠细胞转换反应的反应温度的底物的果糖的阿洛酮糖生产量进行测定来表示的。

[0123] 图3为对利用导入了阿洛酮糖-3-差向异构酶的谷氨酸棒状杆菌和大肠杆菌MG1655转化体来在60℃温度下将阿洛酮糖生产休眠细胞转换反应进行3小时之后,再回收菌体来在相同反应条件下进行反应而得的阿洛酮糖生产量进行测定来表示的。

[0124] 图4为从根据用于导入了阿洛酮糖-3-差向异构酶的谷氨酸棒状杆菌转化体的休眠细胞转换反应的阿洛酮糖生产反应培养基的组成变化的果糖表示阿洛酮糖的生产量的。

[0125] 图5为表示导入了阿洛酮糖-3-差向异构酶的谷氨酸棒状杆菌转化体的休眠细胞

转换反应时的来源于阿洛酮糖-3-差向异构酶的菌株及根据阿洛酮糖生产反应培养基组成的阿洛酮糖的生产量的。

[0126] 图6为表示导入了阿洛酮糖-3-差向异构酶的谷氨酸棒状杆菌转化体的休眠细胞转换反应时的来源于阿洛酮糖-3-差向异构酶的菌株及根据加热时间的阿洛酮糖的生产量的。

[0127] 图7为比较来源于多种菌株的阿洛酮糖-3-差向异构酶的氨基酸序列的。

[0128] 图8为根据导入了来源于梭菌属的阿洛酮糖-3-差向异构酶的谷氨酸棒状杆菌的再使用次数的阿洛酮糖的生产量的。

[0129] 图9为表示利用导入了来源于多种菌株的甘露醇脱氢酶和甲酸脱氢酶的棒状杆菌重组菌株来生产的甘露醇生产量的图表。LpMDH表示来源于假肠膜明串珠菌的甘露醇脱氢酶, LmMDH表示来源于肠膜明串珠菌的甘露醇脱氢酶, RsMDH表示来源于类球红细菌的甘露醇脱氢酶, 且PfMDH表示来源于荧光假单胞菌的甘露醇脱氢酶。

[0130] 图10为表示当提供由阿洛酮糖和果糖形成的混合糖作为底物时, 未利用甘露醇脱氢酶来发生反应而残留的阿洛酮糖的量(图10的(A)部分)和从果糖转换的甘露醇生产量(图10的(B)部分)的图表。

[0131] 图11为表示使用包括具有分别不同的pH的缓冲溶液的转换培养基时以及不使用缓冲溶液而使用含水的转换培养基时的甘露醇生产量(图11的(A)部分)和pH变化(图11的(B)部分)的图表。W表示将无缓冲溶液的水用作转换培养基, SA表示将pH为5的乙酸钠(sodium acetate)缓冲溶液用作转换培养基, P表示将pH为6的哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲溶液用作转换培养基, SP表示将pH为6.5的磷酸钠(sodium phosphate)缓冲溶液用作转换培养基。

[0132] 图12为比较使用作为密闭反应容器的锥形管(conical tube)和作为开放反应容器的试管(test tube)之后的甘露醇生产量(图12的(A)部分)和pH变化(图12的(B)部分)的图表。

[0133] 图13为表示在作为开放反应容器的试管中将水或pH为6的哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲溶液用作转换培养基时的甘露醇生产量的图表。

[0134] 图14为比较根据葡萄糖转运蛋白质的导入与否的甘露醇生产量的图表。

[0135] 图15为表示根据乙醇添加量来分离在甘露醇转换反应混合糖溶液中进行结晶化的甘露醇之后的果糖、甘露醇、阿洛酮糖的浓度的曲线图。

[0136] 图16为表示分离随着通过蒸发减少甘露醇转换反应混合糖溶液的体积而结晶化的甘露醇之后的果糖、甘露醇、阿洛酮糖的浓度的曲线图。

[0137] 图17为比较在根据阿洛酮糖生产工序之后添加的甘露醇转换反应有无的反应液内的多种混合糖的高性能液体色谱法中分离能力状态的曲线图。

具体实施方式

[0138] 以下,为了具体说明本发明,例举实施例来进行详细说明。

[0139] 实施例

[0140] 1. 在利用谷氨酸棒状杆菌菌株来从果糖生产阿洛酮糖的过程中根据温度的阿洛酮糖生产速度及生产量变化

[0141] (1) 重组菌株的制备

[0142] 使作为大肠杆菌-棒状杆菌穿梭载体的pCES208(J.Microbiol.Biotechnol.,18:639-647,2008)发生变形来制作插入有终止子(terminator)和lac启动子的pSGT208穿梭载体,从而进行使用。

[0143] 为了从谷氨酸棒状杆菌生产阿洛酮糖,阿洛酮糖-3-差向异构酶将根癌土壤杆菌(Agrobacterium tumefaciens str.C58;taxid:176299;GenBank NID:NC_003062, ATCC33970)的dpe基因(AGR_L_260,GI:15890243,序列1)导入于已制作的上述pSGT208穿梭载体来进行使用。

[0144] 详细地,利用序列31的引物1和序列32的引物2来从根癌土壤杆菌基因组扩增dpe基因,使用限制酶KpnI和BamHI来进行切割,并向pSGT208穿梭载体的相同部位进行插入,从而制作了包含阿洛酮糖-3-差向异构酶的pS208-dpe重组穿梭载体。

[0145] 之后,为了在谷氨酸棒状杆菌中增加阿洛酮糖-3-差向异构酶的表达量,在pS208-dpe中将lac启动子取代为来源于pTrc99a的trc启动子,并将其命名为pS208cT-dpe。

[0146] 将所制作的包含上述阿洛酮糖-3-差向异构酶的重组载体pS208-dpe、pS208cT-dpe和作为其阴性对照组的pSGT208载体导入于野生型谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032来进行转化,并将其利用于从果糖生产阿洛酮糖的生产当中。转化法采用了Handbook of Corynebacterium glutamicum(Lothar Eggeling等,ISBN 0-8493-1821-1,2005by CRC press)中的方法。

[0147] (2) 重组菌株的培养及利用其的阿洛酮糖的生产

[0148] 为了确保高浓度的菌体,将在上述中制备的谷氨酸棒状杆菌转化体接种到包含20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的卡那霉素的5ml的LB培养基(Difco)来在30℃温度且250rpm的条件下进行种培养,之后,接种到包含10g/L的葡萄糖及20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的卡那霉素的最小培养基(每1l包含1g的 K_2HPO_4 、10g的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、0.4g的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、20mg的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、20mg的 $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、50mg的NaCl、2g的尿素、0.1mg的生物素(biotin)、0.1mg的硫胺素(thiamine))来进行了本培养。本培养在具有槽的500ml的三角烧瓶中以100ml的体积在30℃温度且180rpm的条件下进行12个小时,从而诱导了充分的菌体量和蛋白质的充分表达。

[0149] 对所得到的上述培养液进行离心分离来去除上清液,并回收菌体,从而在包含作为底物的40%(w/v)果糖的与上述相同的最小培养基中以使菌体浓度达到400D600的方式进行再悬浮之后,在25℃、30℃、37℃、50℃、60℃或70℃温度且180rpm的条件下进行了休眠细胞转换反应。

[0150] 利用高性能液体色谱法(HPLC)来测定了果糖及阿洛酮糖的浓度。高性能液体色谱法使用了设置有Kromasil 5NH₂柱(4.6mm×250mm)的SCL-10A(日本岛津公司,Shimadzu),移动相利用75%乙腈来在以1.5mL/分钟流下并在40℃温度下分离后,利用反射指数(RI, Reflective Index)检测器来进行了分析。在上述条件下,果糖的停留时间(retention time)为5.5分钟,阿洛酮糖的停留时间为4.6分钟。

[0151] 图1示出了测定结果。参照图1,使导入了pSGT208cT-dpe穿梭载体的谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032菌株在包含40%果糖的培养基中进行转换反应,其结果表明反应温度越高,阿洛酮糖的生产速度越快,生产量越增加。尤其,在50℃、60℃、70℃温度下发生反应的实验组大致在3个小时的时间内使阿洛酮糖-3-差向异构酶达到酶的反应平衡,从而生产了约

120g/L的阿洛酮糖,这可被视为阿洛酮糖-3-差向异构酶的从果糖转换为阿洛酮糖的转换速度及生产量依赖于温度。

[0152] 生产量以50℃温度为起点来急剧增加,这属于比正常酶反应所需的温度明显高的温度,判断为在该温度下,酶与底物之间的反应的状态发生变化。

[0153] 2.在利用大肠杆菌来从果糖生产阿洛酮糖的过程中根据温度的阿洛酮糖生产速度及生产量变化

[0154] 根据在韩国专利授权号第10-1106253号中的实施例1中所记载的方法,制备了使用向pTrc99A载体导入来源于根癌土壤杆菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶的pTPE质体进行转化的E.coli MG1655(Δ pfkA,als2)菌株。

[0155] 为了阻断阿洛酮糖分解路径,利用了pfkA(序列11)和als2(序列14、序列15、序列16、序列17、序列18及序列19)基因缺损的大肠杆菌MG1655。

[0156] 为了确保高浓度的菌体,将在上述中所制备的大肠杆菌MG1655转化体接种到包含100 μ g/ml的氨比西林的5ml的LB培养基(Difco),并在37℃温度且250rpm的条件下进行种培养,之后,接种到包含10g/L的葡萄糖及100 μ g/ml的氨比西林的2YT培养基进行了本培养。本培养在具有槽的500ml的三角烧瓶中以100ml的体积在37℃温度且180rpm的条件下进行12个小时,从而诱导了充分的菌体量和蛋白质的充分表达。

[0157] 对所得到的上述培养液进行离心分离来去除上清液,并回收菌体,从而在包含作为底物的40%(w/v)果糖的大肠杆菌最小培养基M9培养基中(每1l包含11.3g的M9最小盐(minimal salts)(Difco)、0.1mL的1M CaCl₂、2mL的1M MgSO₄、1mL的100mM MnSO₄·5H₂O)中以使菌体浓度达到400D600的方式进行再悬浮之后,分别在37℃、60℃或70℃温度且180rpm的条件下进行了休眠细胞转换反应。果糖及阿洛酮糖的浓度根据在上述实施例1中所记载的方法来进行分析。图2示出测定结果。

[0158] 参照图2,也使导入了pTPE载体的大肠杆菌MG1655(Δ pfkA,als2)菌株在包含40%果糖的培养基中进行转换反应,其结果也表明反应温度越高,阿洛酮糖的生产速度越快,生产量越增加。尤其,在60℃、70℃温度下发生反应的实验组也与棒状杆菌中的实验一样,大致在2个小时的时间内使阿洛酮糖-3-差向异构酶达到酶的反应平衡,从而生产了约120g/L的阿洛酮糖。

[0159] 这重新证明了阿洛酮糖-3-差向异构酶的从果糖转换为阿洛酮糖的转换速度及生产量依赖于温度。

[0160] 以作为代表性的革兰氏阳性菌的棒状杆菌和作为代表性的革兰氏阴性菌的大肠杆菌作为对象来在高温条件下进行休眠细胞转换反应实验,其结果可知,作为糖转换酶的阿洛酮糖-3-差向异构酶在细胞内在极寒外部环境中受到保护,因而与单纯酶的状态相比,可在高温条件下,不发生热变性,并以更快的速度生产阿洛酮糖。这种细胞转换反应的优点也可适用于大部分微生物。

[0161] 3.谷氨酸棒状杆菌转化菌体通过在休眠细胞转换反应中的菌体回收及再使用来实现的从果糖生产的阿洛酮糖的连续生产

[0162] 从上述实施例1及实施例2的结果中可知,当将阿洛酮糖-3-差向异构酶导入于棒状杆菌和大肠杆菌转化体内,并在50℃以上的高温条件下进行转换反应时,在3小时以内使阿洛酮糖的生产量达到最大值之后,并不再增加。

[0163] 即,为了确认阿洛酮糖-3-差向异构酶在达到使阿洛酮糖的生产量达到最大值的反应平衡的3个小时之后还残留多少使果糖转换为阿洛酮糖的活性,回收在存在果糖的条件下通过3个小时的休眠细胞转换反应来用于阿洛酮糖生产的菌体,来再用于阿洛酮糖生产休眠细胞转换反应中。

[0164] 上述菌体的再使用休眠细胞转换反应在60℃温度下反复进行了3次。最初的休眠细胞转换反应表示为R0,从之前的反应液中回收菌体来进行第一次再使用的休眠细胞转换反应表示为R1,进行第二次再使用的休眠细胞转换反应表示为R2,进行第三次再使用的休眠细胞转换反应表示为R3。培养条件及分析方法与实施例1相同。图3示出其结果。

[0165] 参照图3,即使在60℃的高温糖转换反应中也可再使用菌体。但是,越是再使用菌体,酶的活性的规定部分越减少。并且,当在高温条件下再使用菌体时,作为革兰氏阳性菌的谷氨酸棒状杆菌菌株的残留酶活性高于作为革兰氏阴性菌的大肠杆菌MG1655菌株的残留酶活性。

[0166] 实施例4.在多种休眠细胞转换反应培养基中从果糖生产阿洛酮糖

[0167] 在上述实施例1中,在谷氨酸棒状杆菌中从果糖生产阿洛酮糖的转换反应中,利用了包含40%果糖的最小培养基(每11包含1g的 K_2HPO_4 、10g的 $(NH_4)_2SO_4$ 、0.4g的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、20mg的 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 、20mg的 $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 、50mg的NaCl、2g的尿素、0.1mg的生物素、0.1mg的硫胺素)。将用于该转换反应的培养基的结构成分最小化来制备更经济、简便的培养基,执行了与在实施例1中使用的培养基之间的阿洛酮糖生产率比较。

[0168] 参照图4,即使使用包含40%果糖和0.1mM的 $MnSO_4$ 的磷酸盐缓冲液(phosphate buffer)(pH为7)培养基,更简便地,仅使用仅包含40%果糖和0.1mM的 $MnSO_4$ 的培养基,也在最终生产的阿洛酮糖的生产量方面没有太大差异。上述状态在30℃和60℃的反应温度下均同样被观察到。在未将0.1mM的 $MnSO_4$ 作为阿洛酮糖-3-差向异构酶的辅助因子来进行添加的情况下,得到了生产量减少的结果。

[0169] 在上述实施例中,可知用于阿洛酮糖生产休眠细胞转换反应的培养基的成分仅有作为底物的果糖和作为阿洛酮糖-3-差向异构酶的辅助因子的 $MnSO_4$ 即可。

[0170] 5.包含对来源于多种菌株的阿洛酮糖-3-差向异构酶氨基酸序列进行编码的多核苷酸的重组谷氨酸棒状杆菌的制备

[0171] 从德国微生物菌种保藏中心(DSMZ)公司购买了粪厌氧棒状菌(*Anaerostipes caccae* DSM 14662;taxid:411490)的整体基因。将所购买的整体基因作为模板以包含阿洛酮糖-3-差向异构酶推定基因(AP endonuclease;Sequence ID:gb|EDR98778.1|;GI:167654649;序列4)的方式将序列33及序列34的引物对作为引物来执行了第一次聚合酶链式反应(PCR)。以扩增的聚合酶链式反应产物作为模板将与阿洛酮糖-3-差向异构酶基因特异性结合的序列35及序列36的引物对用作引物,来执行了第二次聚合酶链式反应。

[0172] 使用限制酶BamHI和XbaI来将所得到的聚合酶链式反应的产物插入于pS208cT-dpe(在韩国专利申请号10-2013-0060703的实施例1中所记载的载体)的相同酶部位,来制备了重组载体pS208cT-AcDPE。

[0173] 将所制备的pS208cT-AcDPE载体导入于野生型谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032来进行转化,并将其用于从果糖生产阿洛酮糖的生产中。转化法采用在Handbook of *Corynebacterium glutamicum*(Lothar Eggeling等,ISBN 0-8493-1821-1,2005by CRC

press) 中记载的方法。

[0174] 所得到的重组谷氨酸棒状杆菌菌株在-80℃温度下得到保管后用于培养。

[0175] 包含鲍氏梭菌(*Clostridium boltea* ATCC BAA-613;taxid:411902)的阿洛酮糖-3-差向异构酶推定基因(hypothetical protein CLOB0L_00069;Sequence ID:gb|EDP19602.1|;GI:15844190;序列9)的质体从韩国益力多乳品有限公司购得。将与阿洛酮糖-3-差向异构酶基因特异性结合的序列37及序列38的引物对用作引物来执行了聚合酶链式反应。

[0176] 使用限制酶KpnI和XbaI来将所得到的聚合酶链式反应的产物插入于pS208cT-dpe(在韩国专利申请号10-2013-0060703的实施例1中所记载的载体)的相同酶部位,来制备了重组载体pS208cT-CbDPE。

[0177] 通过如上所述的方法将所制备的重组载体pS208cT-CbDPE载体导入于野生型谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032来进行转化,并将其用于从果糖生产阿洛酮糖的生产中。所得到的重组谷氨酸棒状杆菌菌株在-80℃温度下得到保管后用于培养。

[0178] 从德国微生物菌种保藏中心购买了门冬虫梭菌(*Clostridium hylemonae* DSM 15053;taxid:553973)的整体基因。将所购买的整体基因作为模板以包含阿洛酮糖-3-差向异构酶推定基因(dolichol monophosphate mannose synthase;Sequence ID:ref|WP_006442985.1|;GI:225161759;序列10)的方式将序列39及序列40的引物对作为引物来执行了第一次聚合酶链式反应。以扩增的聚合酶链式反应产物作为模板将与阿洛酮糖-3-差向异构酶基因特异性结合的序列41及序列42的引物对用作引物,来执行了第二次聚合酶链式反应。

[0179] 使用限制酶BamHI和XbaI来将所得到的聚合酶链式反应的产物插入于pS208cT-dpe(在韩国专利申请号10-2013-0060703的实施例1中所记载的载体)的相同酶部位,来制备了重组载体pS208cT-ChDPE。

[0180] 通过如上所述的方法将所制备的pS208cT-ChDPE载体导入于野生型谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032来进行转化,并将其用于从果糖生产阿洛酮糖的生产中。所得到的重组谷氨酸棒状杆菌菌株在-80℃温度下得到保管后用于培养。

[0181] 6. 利用导入了来源于多种菌株的阿洛酮糖-3-差向异构酶的重组谷氨酸棒状杆菌菌株来从果糖生产阿洛酮糖

[0182] 利用在上述实施例5中所制备的谷氨酸棒状杆菌转化体来确认了从高浓度的果糖生产阿洛酮糖。

[0183] 将上述的转化体接种到包含20μg/ml的卡那霉素的2YT培养基来在30℃温度且250rpm条件下进行种培养,之后,再次将转化体接种到包含20μg/ml的卡那霉素的2YT培养基来进行了本培养。本培养在具有槽的300ml的三角烧瓶中以60ml的体积在30℃温度且180rpm条件下培养7个小时,从而诱导了充分的菌体量和蛋白质的充分表达。

[0184] 对所得到的上述培养液进行离心分离来去除上清液,并回收菌体,从而在包含20μg/ml的卡那霉素、作为底物的40%(w/v)果糖和浓度为0.1mM的作为阿洛酮糖-3-差向异构酶的主要辅助因子的锰或钴的简单的转换反应培养基中,在55℃温度下进行了休眠细胞转换反应。果糖和阿洛酮糖的浓度采用在上述实施例1中所记述的方法相同的方法来进行测定。图5示出其结果。AtDPE是指以往使用的根癌土壤杆菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶。

[0185] 参照图5,在所有导入了多种阿洛酮糖-3-差向异构酶的重组菌株中,与锰相比,将钴作为辅助因子时,阿洛酮糖的生产速度更快。

[0186] 导入了来源于粪厌氧棒状菌和根癌土壤杆菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶的重组谷氨酸棒状杆菌的阿洛酮糖生产量在6个小时时达到平衡,但导入了来源于梭菌属的阿洛酮糖-3-差向异构酶的重组谷氨酸棒状杆菌的阿洛酮糖生产量在将锰作为辅助因子的情况下,也在3个小时时达到平衡。

[0187] 因此,不仅可确认到来源于梭菌属的阿洛酮糖-3-差向异构酶可实现从果糖生产阿洛酮糖,阿洛酮糖的生产速度比来源于根癌土壤杆菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶更快。

[0188] 7.导入了来源于多种菌株的阿洛酮糖-3-差向异构酶的重组谷氨酸棒状杆菌菌株的高温条件下的阿洛酮糖生产活性的持续维持

[0189] 从上述实施例1、实施例2的结果中,确认到当以50℃以上的高温条件进行转换反应时,所有阿洛酮糖生产在3个小时以内完成。像这样,在高温条件下,从果糖生产阿洛酮糖的生产速度快,因而需要即使再使用菌体的情况下也可在长时间的高温条件下维持稳定的阿洛酮糖-3-差向异构酶。因此,确认了来源于多种菌株的阿洛酮糖-3-差向异构酶在高温条件下的活性维持程度。

[0190] 使通过上述实施例1中所记载的方法得到的菌体在2YT中进行浮游,从而利用振荡培养器来在0小时、3小时、6小时、9小时、12小时、24小时的时间内持续施加60℃的热量。在按各个时间施加热量之后,回收菌体,并在仅包含20μg/ml的卡那霉素、0.1mM的锰及40% (w/v)的果糖的简单转换反应培养基中进行浮游,从而再次在60℃温度下进行3个小时的休眠细胞转换反应。果糖和阿洛酮糖的浓度通过与上述实施例1中所记载的方法相同的方法进行了测定。图6示出其结果。

[0191] 参照图6,导入了以往使用的来源于根癌土壤杆菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶和来源于粪厌氧棒状菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶的重组谷氨酸棒状杆菌在受到3个小时的60℃热量之后,几乎无法进行阿洛酮糖的生产。相反,导入了来源于梭菌属的阿洛酮糖-3-差向异构酶的重组谷氨酸棒状杆菌在受到24个小时的热量后,也维持阿洛酮糖的生产,从而与来源于根癌土壤杆菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶相比,更加有利于高温工序下的阿洛酮糖的生产。

[0192] 众所周知,当对于来源于根癌土壤杆菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶的热稳定性起到重要作用的序列(参考文献1)中的第33个氨基酸或第213个氨基酸分别被亮氨酸、半胱氨酸取代时,50℃温度下的酶的半寿命分别达到3.3倍、7.2倍,或者,在两个均被取代时,达到29.9倍。

[0193] 图7示出来源于根癌土壤杆菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶的氨基酸序列与来源于梭菌属的阿洛酮糖-3-差向异构酶的氨基酸序列之间的比较,参照图7,热稳定性高的来源于梭菌属的阿洛酮糖-3-差向异构酶使一个氨基酸具有与其相对应的序列或具有两个序列。

[0194] 8.导入了来源于梭菌属的阿洛酮糖-3-差向异构酶的重组谷氨酸棒状杆菌菌体通过在休眠细胞转换反应中的菌体回收及再使用来实现从果糖生产阿洛酮糖

[0195] 由于在上述实施例7中确认到来源于梭菌属的阿洛酮糖-3-差向异构酶在高温条件下具有稳定性,因而在导入了来源于梭菌属的阿洛酮糖-3-差向异构酶的两个重组菌株

中,代表性地,使导入了门冬虫梭菌的阿洛酮糖-3-差向异构酶的重组谷氨酸棒状杆菌菌体在高温条件下进行休眠细胞转换反应之后,确认了菌体再使用效果。

[0196] 在使通过与在上述实施例3中所记述的方法相同的方法得到的菌体在60℃温度下进行3个小时的休眠细胞转换反应之后,再回收菌体来实施相同的休眠细胞转换反应,菌体共被再使用3次(与上述实施例3中的条件相同的条件进行实验)。最初的休眠细胞转换反应表示为R0,从之前的反应液中回收菌体来进行第一次再使用的休眠细胞转换反应表示为R1,进行第二次再使用的休眠细胞转换反应表示为R2,进行第三次再使用的休眠细胞转换反应表示为R3。图8示出其结果。

[0197] 参照图8,可知在高温条件下多次再使用菌体的过程中,导入了梭菌属的阿洛酮糖-3-差向异构酶的重组菌体以阿洛酮糖生产量没有任何减少的方式维持规定量。可结合上述实施例7的结果来确认到酶本身的热稳定性在高温条件下持续进行糖转换反应,并且,在菌体的再使用过程中也非常有利。

[0198] 9. 从果糖生产甘露醇的谷氨酸棒状杆菌重组菌株的开发

[0199] (1) 重组棒状杆菌菌株的开发

[0200] 将以容易克隆的方式变形的pSGT208载体用作作为大肠杆菌-棒状杆菌穿梭载体的pCES208载体(在韩国专利申请号10-2013-0060703的实施例1中所记载的载体)。启动子使用了去除lac操纵子来持续表达的trc启动子。

[0201] 作为甘露醇生产酶,使用了来源于假肠膜明串珠菌ATCC 12291(或KCTC 3652, *Leuconostoc pseudomesenteroides* ATCC 12291)、肠膜明串珠菌、类球红细菌及荧光假单胞菌DSM 50106(*Pseudomonas fluorescens* DSM 50106)的酶。

[0202] 从KCTC购买假肠膜明串珠菌菌株,并对整体基因组进行纯化之后,将其作为模板来以包含甘露醇脱氢酶(mannitol 2-dehydrogenase;MDH;GenBank:AJ486977.1,GI:28865822,序列43,LpMDH)的方式将序列47及序列48的引物对作为引物执行了聚合酶链式反应。

[0203] 从GenScript合成了来源于肠膜明串珠菌的甘露醇脱氢酶(GenBank:ACT22631.1,GI:253317413,序列44,LmMDH)、来源于类球红细菌的甘露醇脱氢酶(GenBank:AAC45771.1,GI:2338764,序列45,RsMDH)及来源于荧光假单胞菌的甘露醇脱氢酶(GenBank:AAC04472.1,GI:2293418,序列46,PfMDH)。

[0204] 使用限制酶KpnI和BamHI来向导入了去除lac操纵子的trc启动子的pSGT208载体的相同的限制酶部位插入所得到的聚合酶链式反应产物及合成基因,从而制备了重组载体pS208cT-LpMDH、pS208cT-LmMDH、pS208cT-RsMDH及pS208cT-PfMDH。

[0205] 并且,一同导入了有助于用作甘露醇脱氢酶的辅酶的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的持续再生的酶。作为有助于还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的再生的酶,利用了通过从甲酸到二氧化碳的氧化来再生还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的甲酸脱氢酶。利用了来源于母牛分枝杆菌菌苗N10(*Mycobacterium vaccae* N10)的甲酸脱氢酶(formate dehydrogenase,FDH,GenBank:AB072394.1,GI:15982576,序列49),并从GenScript合成了基因。使用限制酶BamHI和XbaI来向之前构筑的pS208cT-LpMDH、pS208cT-LmMDH、pS208cT-RsMDH及pS208cT-PfMDH载体的相同的限制酶部位插入所合成的基因,从而制备了重组载体pS208cT-LpMDH-FDH、pS208cT-LmMDH-FDH、pS208cT-RsMDH-FDH及pS208cT-PfMDH-FDH。

[0206] 将所制备的pS208cT-LpMDH-FDH、pS208cT-LmMDH-FDH、pS208cT-RsMDH-FDH及pS208cT-PfMDH-FDH载体导入于野生型谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032 (*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032), 转化法采用Handbook of *Corynebacterium glutamicum* (Lothar Eggeling等, ISBN 0-8493-1821-1, 2005by CRC press) 中的方法。所转化的重组棒状杆菌菌株在-80℃温度下进行保管来使用。

[0207] (2) 利用重组菌株的甘露醇生产实验

[0208] 甘露醇生产使用了利用高浓度的菌体的休眠细胞转换反应。为了确保高浓度的菌体, 将所制备的上述谷氨酸棒状杆菌重组菌株接种到包含20μg/ml的卡那霉素的2YT培养基, 并以30℃温度且250rpm的条件进行种培养之后, 在包含20μg/ml的卡那霉素、0.5% (v/v) 葡萄糖的2YT培养基中接种5% (v/v) 至10% (v/v) 的种培养液, 从而以30℃温度且180rpm的条件进行了诱导充分的菌体量及蛋白质表达的本培养。

[0209] 针对通过本培养得到的大量的菌体去除培养基之后, 利用于转换反应中。休眠细胞转换反应通过在包含10% (v/v) 果糖和555mM的甲酸的100mM的磷酸钠 (pH为6.5) 缓冲溶液中以使浓度成为OD60040的方式将菌体进行悬浮, 来以30℃温度且250rpm的条件进行了48个小时。果糖及甘露醇的浓度利用高性能液体色谱法来进行了测定。高性能液体色谱法使用了设置有Kromasil 5NH2柱 (4.6mm×250mm) 的SCL-10A (日本岛津公司), 移动相利用80%乙腈来以1.5mL/分钟流下并在40℃温度下分离之后, 利用反射指数检测器来进行了分析。图9示出其测定结果。

[0210] 参照图9, 根据甘露醇脱氢酶的甘露醇生产量无大的差异, 但当利用来源于假肠膜明串珠菌的甘露醇脱氢酶时, 在48个小时的转换反应之后, 从100g/L的果糖生产约26g/L的甘露醇, 从而呈现最多的甘露醇生产量。由此, 之后, 在甘露醇转换反应中继续使用了来源于假肠膜明串珠菌的甘露醇脱氢酶。虽然未在实施例中表示, 但与导入甲酸脱氢酶之前相比, 甘露醇生产量增加约86倍, 从而可以确认到利用了甲酸脱氢酶的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的再生起到有效作用。

[0211] 10. 利用了阿洛酮糖和果糖的混合糖的甘露醇生产

[0212] 如上所述, 阿洛酮糖和果糖的物性很类似。由此, 若甘露醇脱氢酶为对于底物的特异性不高的酶, 则不仅是果糖, 阿洛酮糖也被认定为底物, 从而还可以被还原。因此, 在阿洛酮糖和果糖的混合糖中, 仅将果糖转换为甘露醇, 从而确认了容易与阿洛酮糖分离的战略是否适用。

[0213] 利用所构筑的上述重组棒状杆菌菌株来仅将底物换为阿洛酮糖和果糖的混合糖, 从而以与实施例9中的实验条件相同的条件进行了实验。混合糖以可在从果糖到阿洛酮糖的转换反应之后得到的果糖7和阿洛酮糖3 (v/v) 的比率制备而成, 混合糖的浓度如同实施例9利用了10% (v/v)。图10的 (A) 部分和图10的 (B) 部分示出其结果。

[0214] 图10的 (A) 部分表示未用作底物而残留的阿洛酮糖浓度, 在48个小时的转换反应期间, 一直维持作为初始浓度的约30g/L, 可确认到几乎未使用。图10的 (B) 部分表示从构成100g/L的混合糖的70g/L的果糖生产的甘露醇量, 在30℃的转换温度下, 在48个小时的转换反应期间, 生产了约20g/L。由此, 可以确认到甘露醇脱氢酶在阿洛酮糖和果糖一同存在的混合糖底物溶液中选择性地仅将果糖用作底物。因此, 确认了可成功适用将在从果糖到阿洛酮糖的转换反应之后残留的果糖转换为甘露醇, 从而容易分离阿洛酮糖的本专利的概

念。

[0215] 11. 利用多种转换培养基的甘露醇生产比较

[0216] 需要寻找用于提高甘露醇生产率的最佳pH条件,从而比较了根据pH的甘露醇生产量。众所周知,甘露醇转换反应在弱酸性条件下发生,因而筛选了以弱酸性的pH维持的缓冲溶液。并且,一同确认了即使利用无缓冲溶液而仅由水构成的转换培养基,甘露醇生产是否也有效进行。

[0217] 使用无缓冲溶液的水(W)、pH为5的乙酸钠缓冲溶液(SA)、pH为6的哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲溶液(P)来与以往使用的pH为6.5的磷酸钠缓冲溶液(SP)比较了甘露醇生产率。未用实施例表示转换温度,但利用了比30℃呈现更快的转换反应的45℃,作为转换培养基,在之前说明的水或缓冲溶液中包含作为底物的10%(v/v)果糖和555mM的甲酸,若使用缓冲溶液,则使缓冲溶液浓度成为100mM。此外,以与上述实施例9中的实验条件相同的条件进行了实验,随着转换速度变快,转换反应进行至24个小时为止。图11的(A)部分及图11的(B)部分示出其结果。

[0218] 参照图11的(A)部分,当使用pH为6的哌嗪-1,4-二乙磺酸时,生产约29g/L的甘露醇,从而呈现了最多的甘露醇生产量。并且,当使用由水构成的转换培养基时,与将以往使用的pH为6.5的磷酸钠缓冲溶液作为转换培养基来生产的甘露醇生产量无差异,从而可以确认到即使将水用作转换培养基来代替缓冲溶液,也可有效地生产甘露醇。

[0219] 根据使用图11的(A)部分的分别不同的转换培养基时的甘露醇生产量和图11的(B)部分的转换反应时的pH变化的对照结果可知,若转换培养基的pH维持在6.5至7之间,则活跃地进行甘露醇的生产。由此,当前条件下的最佳甘露醇生产pH视为6.5至7之间,这视为将弱酸性pH5为最佳的甘露醇生产环境和将弱碱性pH7.5为最佳的甲酸脱氢酶的折中pH。

[0220] 12. 根据有无反应容器密闭的甘露醇生产量比较

[0221] 在之前的实施例中,在转换反应中使用锥形管来在密闭的环境中实施了甘露醇转换反应。但是,为了确认在甲酸的脱氢反应过程中生产的CO₂不被排出而再次溶解于转换反应培养基,从而影响反应的情况,使用气体进出自由的试管来执行了实验。以与将之前实施例11的水用作转换培养基的实验条件相同的条件进行了实验。图12的(A)部分和图12的(B)部分示出实验结果。

[0222] 图12的(A)部分表示在作为密闭容器反应条件的锥形管和作为开放容器反应条件的试管中得到的甘露醇生产量。有关甘露醇生产,可以确认到在利用试管的开放环境下,反而更少生产约9倍左右。但是,参照图12的(B)部分的pH测定结果,在开放环境下,甘露醇转换反应进行24个小时之后的pH为9.2,可见与密闭环境下的pH为7.2相比,非常高。其原因推定为在密闭的环境下,未排出CO₂而以碳酸形态溶解于培养基,从而还妨碍pH的上升和甲酸脱氢酶的作用。

[0223] 甲酸脱氢酶的作用具有通过甲酸消耗使培养基的pH上升的效果。但是,这应该是在开放的环境下,容易排出CO₂,且甲酸脱氢酶的作用也活跃,从而使pH大大上升,在这种高的pH条件下,甘露醇脱氢酶的作用受到阻碍,从而减少甘露醇生产量的原因。

[0224] 因此,若甲酸脱氢酶的作用考虑是供给甘露醇脱氢酶的作用所需的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的反应,则推定为只要防止在甲酸脱氢酶的反应活跃的开放的环境下,pH上升至阻碍甘露醇脱氢酶的反应的水平以上,则可得到高的甘露醇生产率。

[0225] 13. 在开放的环境下,利用弱酸性转换培养基的甘露醇生产

[0226] 如从之前实施例12中所确认,在利用试管的情况下,由于甲酸脱氢酶的活跃作用,还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的供给变得丰富。因此,在开放的环境下,以适合生产甘露醇的方式将pH校正为弱酸性来生产了甘露醇。以使最终浓度成为300mM的方式向转换培养基添加哌嗪-1,4-二乙磺酸(pH 6)缓冲溶液来校正了pH,转换温度利用了45℃。图13示出其结果。

[0227] 参照图13,当未校正pH且使用仅由底物和水构成的培养基时,在12个小时期间,甘露醇生产量低,是3.6g/L,但若利用哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲溶液来校正pH,则可以确认在24个小时的转换反应之后,是51g/L,可知100g/L的果糖中的一半转换为甘露醇。这应该是在开放的环境下,由于甲酸脱氢酶的还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的再生速度得到提高,且因使用哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲溶液来校正pH而提高甘露醇脱氢酶的甘露醇生产速度的原因。

[0228] 14. 通过导入果糖转运蛋白质来提高底物流入量

[0229] (1) 重组棒状杆菌菌株的开发

[0230] 利用众所周知的流入了果糖的葡萄糖转运蛋白质来增加细胞内作为底物的果糖的流入量,从而提高甘露醇的生产量。葡萄糖转运蛋白质使用了来源于运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ZM4或ATCC 31821)的酶,并从KCTC购买(KCTC 1534)。将所纯化的基因组作为模板,并对于运动发酵单胞菌的葡萄糖转运蛋白质(GenBank:AAG29864.1;GI:11095424;序列50)将序列51及序列52的引物对作为引物来执行了聚合酶链式反应。使用限制酶BamHI及XbaI来向pJC1-1-cT-Cmp载体的相同的限制酶部位插入所得到的聚合酶链式反应产物,从而构筑了重组载体pJC1-1-cT-GLF-Cmp。

[0231] 用于构筑的表达载体(pJC1-1-cT-Cmp)是将作为大肠杆菌-棒状杆菌穿梭载体的pJC1变形而得的,导入了pSGT208载体的启动子可变区域和MCS区域,追加地,导入棒状杆菌的终止子区域来构筑了pJC1-1载体。由trc启动子取代包含pJC1-1载体的lac操纵子的lac启动子区域来构筑了pJC1-1-cT载体,为了与在之前实施例中使用的pSGT208载体一同用于表达,由氯霉素抗生素抗性基因取代卡那霉素抗生素抗性基因来最终构筑了pJC1-1-cT-Cmp载体。

[0232] 将之前制备的pJC1-1-cT-GLF-Cmp重组载体导入于由pS208cT-LpMDH-FDH转化的谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032(*Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032),重组棒状杆菌菌株在-80℃温度下进行保管来使用。

[0233] (2) 利用重组菌株的甘露醇生产实验

[0234] 利用之前构筑的重组棒状杆菌菌株来以与实施例13中的条件相同的条件使用哌嗪-1,4-二乙磺酸缓冲溶液转换培养基进行了甘露醇生产实验,氯霉素浓度使用了5μg/ml。图14示出其结果。

[0235] 参照图14,在未导入葡萄糖转运蛋白质的情况下,在24个小时的转换反应之后,生产51g/L的甘露醇,相反,在导入葡萄糖转运蛋白质来提高果糖的流入量的情况下,通过24个小时的转换反应来生产95g/L的甘露醇,从而呈现了从果糖接近100%的转换率。

[0236] 由此,将难以与阿洛酮糖分离的果糖转换为甘露醇,从而可从甘露醇容易分离阿洛酮糖,且将阿洛酮糖和甘露醇混合糖其本身也能够以高价的功能性糖所利用。

[0237] 15. 通过甘露醇转换反应液中的甘露醇结晶化的阿洛酮糖含量增加

[0238] (1) 通过添加乙醇的甘露醇的结晶化

[0239] 以往的果糖和阿洛酮糖的物理特性类似,从而当前难以分离及纯化。但是,甘露醇与果糖和阿洛酮糖的溶解度差异大,因而可容易分离及纯化。在阿洛酮糖生产工序中,作为底物的果糖以约30%的转换率转换为阿洛酮糖。因此,在使用400g/L的果糖的情况下,反应结束之后的反应液混合有约280/L的果糖和约120g/L的阿洛酮糖。

[0240] 在上述反应液中,利用实施例13的重组棒状杆菌菌株(pS208cT-MDH-FDH)来执行残留果糖的甘露醇转换反应,从而得到了混合有果糖(140g/L)、甘露醇(140g/L)及阿洛酮糖(120g/L)的最终反应液。在微量离心管(Eppendorf-tube)中以500 μ l的方式分注果糖(140g/L)、甘露醇(140g/L)及阿洛酮糖(120g/L)混合糖溶液,并将乙醇从100 μ l添加至900 μ l的体积,从而对溶解度低的甘露醇进行结晶化来分离。

[0241] 在添加乙醇之后,在常温(25℃)条件下定置1个小时,并通过离心分离(13000rpm, 10分钟)来分离了经结晶化的甘露醇和溶液。以与实施例9中的条件相同的条件利用高性能液体色谱法来分析通过离心分离所得到的溶液中的糖浓度。图15示出其结果。

[0242] 参照图15,可以确认通过甘露醇结晶化维持甘露醇转换反应液中的果糖和阿洛酮糖的浓度,相反,只有甘露醇的浓度明显下降。因此,通过添加乙醇仅分离甘露醇,从而可容易得到阿洛酮糖含量增加的溶液。

[0243] (2) 通过蒸发的甘露醇的结晶化

[0244] 将100mL的甘露醇转换反应混合糖溶液(果糖140g/L、甘露醇140g/L、阿洛酮糖120g/L)放入烧杯进行搅拌,并通过水浴来煮。随着混合糖溶液蒸发,整体溶液浓度变高,体积减小。此时,当通过蒸发的溶液的体积分别减小为100mL、75mL、50mL时,提取1mL的溶液来在常温(25℃)条件下进行冷却,并使甘露醇进行结晶化。在对冷却的溶液进行离心分离(13000rpm, 10分钟)之后,提取上清液来以与实施例9中的条件相同的条件利用高性能液体色谱法来测定了糖浓度。图16示出其结果。

[0245] 参照图16,可以确认在初始混合糖溶液中,果糖和阿洛酮糖的浓度被浓缩而增加,相反,甘露醇的浓度下降。因此,若果糖转换为甘露醇,则仅通过提高温度的方法也可提高混合糖内阿洛酮糖比率。

[0246] 16. 从使用高性能液体色谱法的混合糖中分离阿洛酮糖

[0247] 利用实施例1的高性能液体色谱法分析条件来观察了甘露醇转换反应前后的反应液内的多种混合糖的分离能力状态。使用阿洛酮糖生产反应液(阿洛酮糖120g/L、果糖280g/L;图17的(A)部分)、50%甘露醇转换反应液(阿洛酮糖120g/L、果糖140g/L、甘露醇140g/L;图17的(B)部分)、100%甘露醇转换反应液(阿洛酮糖120g/L、甘露醇280g/L;图17的(C)部分)来进行了分析。

[0248] 参照图17的(A)部分,可以确认阿洛酮糖和果糖的停留时间相似,从而在峰上相重叠的面积宽。参照图17的(B)部分,果糖50%转换为停留时间更长的甘露醇,从而呈现阿洛酮糖与果糖相重叠的区间减小的状态。参照图17的(C)部分,若果糖均转换为甘露醇,则可以确认阿洛酮糖和甘露醇在高性能液体色谱法峰上完全分离。

[0249] 用于上述实验的高性能液体色谱法柱为实验室水平的柱。产业用高性能液体色谱法柱的容积大于实验室水平柱的容积,可在不稀释的情况下直接分离高浓度的溶液,但分

离能力是不及于此的水平。因此,当使用产业用高性能液体色谱法柱时,阿洛酮糖与果糖的重叠面积更明显突出。因而,当使用产业用高性能液体色谱法柱时,为了从果糖有效地分离阿洛酮糖,有利的是,必须将残留果糖转换为甘露醇。

阿洛酮糖的制备方法-序列表

<110>	庆尚大学校 产学协力团	
<120>	阿洛酮糖的制备方法	
<130>	P2014-451	
<160>	52	
<170>	KopatentIn 2.0	
<210>	1	
<211>	870	
<212>	DNA	
<213>	根癌土壤杆菌	
<400>	1	
	atgaaacacg gcatctatta ttcttactgg gaacatgagt ggagcgccaa gttcgggtccc	60
	tatatcgaga aggtcgccaa gctcggtttc gacatcatcg aagtcgccgc ccaccatata	120
	aacgaataca gcgacgccga actcgcgacc atcaggaaga gcgcaagga taacggcatc	180
	atcctcaccg ccggcatcgg tccgtcgaaa accaagaacc tgtcgtcgga agatgctgcg	240
	gtgcgtgcgg ccggcaaggc gttctttgaa agaacccttt cgaacgtcgc caagctcgat	300
[0001]	atccacacca tcggcggcgc attgcattcc tattggccaa tcgattatc gcagcccgtc	360
	gacaaggcag gcgattatgc gcgcggcgtc gagggtatca acggcattgc cgatttcgcc	420
	aatgatctcg gcatcaacct gtgcatcgaa gtcctcaacc gctttgaaaa ccacgtcctc	480
	aacacggcgg cggaaggcgt cgcttttgtg aaggatgtcg gcaagaacaa tgtgaaagtc	540
	atgctggata cttccacat gaacatcgag gaagacagtt tcggtgacgc catccgcacg	600
	gccggcccgc ttctggggca ctccataacc ggtgaaagca atcgccgcgt accgggcaag	660
	ggcagaatgc cgtggcacga aatcggcctt gcgctgcgtg atatcaacta caccggcgcg	720
	gtaatcatgg agcctttcgt caagacaggc ggcaccatcg gctcggatat caaggtgtgg	780
	cgcgacctga gcggtggcgc cgacatcgcg aaaatggatg aagatgcccg caatgcgctg	840
	gcattctccc gcttcgttct tggtggctaa	870
<210>	2	
<211>	858	
<212>	DNA	
<213>	粪灰棒状菌	
<400>	2	
	atgaaaaata aattcggagt tgacagtttt atttgactg aatccttttc taaaaaagat	60
	ttatggatca tcccaaggc aaaagaactg ggatttgaag tcatcgactt tgcgatctcc	120

```

aaccattca cattccctgt agagaaagtg aaggcagagc tagagagagt gggaatcgac      180
tgtgtctgca ctaccacget gacacctgaa accaatccga tttctccgga tgccgagatc      240
cgtgcggcag gcgtaaaagc catgaaaaaa tgtgtggata tctgcaacga actgggtgca      300
ccgatcttag gcggtgtaaa ttatgcaggc tggggatatac tgacgaagaa gccaaggacc      360
gaggaagagt ggaactgggg cgtagagtgc atgagggaag ttgccgagta cgcaaagcaa      420
accggagatg ttaccatctg tgtggaatgt gtcaacagat ttgaaacca cttcttaaac      480
attgcggaag atgcagtggc cttctgtaag gatgttgaa caggaaatgt caaggttcat      540
ctcgaactgt tccatatgat cagagaagaa aagagctttg caggggcagt aaagacctgc      600
ggcaaagaat atctcggata cattcatgtc aatgaaaacg acagaggtat tcctggaaca      660
gggcttgtag cgtttaaga atttttcaat gcattagtag agatcgggta tgacggacct      720
ttggtgatcg aatcttttga tccgagcttt gaagaactgt cggcaactg tgcgatctgg      780
agaaaacttg ccgatactgg agaagaactt gcgattgaag ggctgaaaaa tctgaaagcc      840
atcgtgctg agatataa                                     858

```

[0002]

<210> 3
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> 根癌土壤杆菌

<400> 3
 Met Lys His Gly Ile Tyr Tyr Ser Tyr Trp Glu His Glu Trp Ser Ala
 1 5 10 15
 Lys Phe Gly Pro Tyr Ile Glu Lys Val Ala Lys Leu Gly Phe Asp Ile
 20 25 30
 Ile Glu Val Ala Ala His His Ile Asn Glu Tyr Ser Asp Ala Glu Leu
 35 40 45
 Ala Thr Ile Arg Lys Ser Ala Lys Asp Asn Gly Ile Ile Leu Thr Ala
 50 55 60
 Gly Ile Gly Pro Ser Lys Thr Lys Asn Leu Ser Ser Glu Asp Ala Ala
 65 70 75 80
 Val Arg Ala Ala Gly Lys Ala Phe Phe Glu Arg Thr Leu Ser Asn Val
 85 90 95
 Ala Lys Leu Asp Ile His Thr Ile Gly Gly Ala Leu His Ser Tyr Trp
 100 105 110
 Pro Ile Asp Tyr Ser Gln Pro Val Asp Lys Ala Gly Asp Tyr Ala Arg

	115	120	125	
	Gly Val Glu Gly Ile Asn Gly Ile Ala Asp Phe Ala Asn Asp Leu Gly			
	130	135	140	
	Ile Asn Leu Cys Ile Glu Val Leu Asn Arg Phe Glu Asn His Val Leu			
	145	150	155	160
	Asn Thr Ala Ala Glu Gly Val Ala Phe Val Lys Asp Val Gly Lys Asn			
	165	170	175	
	Asn Val Lys Val Met Leu Asp Thr Phe His Met Asn Ile Glu Glu Asp			
	180	185	190	
	Ser Phe Gly Asp Ala Ile Arg Thr Ala Gly Pro Leu Leu Gly His Phe			
	195	200	205	
	His Thr Gly Glu Ser Asn Arg Arg Val Pro Gly Lys Gly Arg Met Pro			
	210	215	220	
	Trp His Glu Ile Gly Leu Ala Leu Arg Asp Ile Asn Tyr Thr Gly Ala			
	225	230	235	240
	Val Ile Met Glu Pro Phe Val Lys Thr Gly Gly Thr Ile Gly Ser Asp			
	245	250	255	
	Ile Lys Val Trp Arg Asp Leu Ser Gly Gly Ala Asp Ile Ala Lys Met			
	260	265	270	
	Asp Glu Asp Ala Arg Asn Ala Leu Ala Phe Ser Arg Phe Val Leu Gly			
	275	280	285	
	Gly			

[0003]

<210> 4
 <211> 285
 <212> PRT
 <213> 粪厌棒状菌

<400> 4
 Met Lys Asn Lys Phe Gly Val Asp Ser Phe Ile Trp Thr Glu Ser Phe
 1 5 10 15
 Ser Lys Lys Asp Leu Trp Ile Ile Pro Lys Ala Lys Glu Leu Gly Phe
 20 25 30
 Glu Val Ile Asp Phe Ala Ile Ser Asn Pro Phe Thr Phe Pro Val Glu
 35 40 45
 Lys Val Lys Ala Glu Leu Glu Arg Val Gly Ile Asp Cys Val Cys Thr
 50 55 60
 Thr Thr Leu Thr Pro Glu Thr Asn Pro Ile Ser Pro Asp Ala Glu Ile
 65 70 75 80

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

[0004]

<210> 5
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> 根癌土壤杆菌
 <400> 5
 Met Lys His Gly Ile Tyr Tyr Ser Tyr Trp Glu His Glu Trp Ser Ala
 1 5 10 15
 Lys Phe Gly Pro Tyr Ile Glu Lys Val Ala Lys Leu Gly Phe Asp Ile
 20 25 30
 Leu Glu Val Ala Ala His His Ile Asn Glu Tyr Ser Asp Ala Glu Leu
 35 40 45

	Ala	Thr	Ile	Arg	Lys	Ser	Ala	Lys	Asp	Asn	Gly	Ile	Ile	Leu	Thr	Ala	
	50						55					60					
	Gly	Ile	Gly	Pro	Ser	Lys	Thr	Lys	Asn	Leu	Ser	Ser	Glu	Asp	Ala	Ala	
	65					70					75					80	
	Val	Arg	Ala	Ala	Gly	Lys	Ala	Phe	Phe	Glu	Arg	Thr	Leu	Ser	Asn	Val	
					85					90					95		
	Ala	Lys	Leu	Asp	Ile	His	Thr	Ile	Gly	Gly	Ala	Leu	His	Ser	Tyr	Trp	
				100					105					110			
	Pro	Ile	Asp	Tyr	Ser	Gln	Pro	Val	Asp	Lys	Ala	Gly	Asp	Tyr	Ala	Arg	
			115					120					125				
	Gly	Val	Glu	Gly	Ile	Asn	Gly	Ile	Ala	Asp	Phe	Ala	Asn	Asp	Leu	Gly	
		130					135					140					
	Ile	Asn	Leu	Cys	Ile	Glu	Val	Leu	Asn	Arg	Phe	Glu	Asn	His	Val	Leu	
	145					150					155					160	
	Asn	Thr	Ala	Ala	Glu	Gly	Val	Ala	Phe	Val	Lys	Asp	Val	Gly	Lys	Asn	
					165					170					175		
	Asn	Val	Lys	Val	Met	Leu	Asp	Thr	Phe	His	Met	Asn	Ile	Glu	Glu	Asp	
				180					185					190			
[0005]	Ser	Phe	Gly	Asp	Ala	Ile	Arg	Thr	Ala	Gly	Pro	Leu	Leu	Gly	His	Phe	
			195					200					205				
	His	Thr	Gly	Glu	Cys	Asn	Arg	Arg	Val	Pro	Gly	Lys	Gly	Arg	Met	Pro	
		210					215					220					
	Trp	His	Glu	Ile	Gly	Leu	Ala	Leu	Arg	Asp	Ile	Asn	Tyr	Thr	Gly	Ala	
	225					230					235					240	
	Val	Ile	Met	Glu	Pro	Phe	Val	Lys	Thr	Gly	Gly	Thr	Ile	Gly	Ser	Asp	
					245					250					255		
	Ile	Lys	Val	Trp	Arg	Asp	Leu	Ser	Gly	Gly	Ala	Asp	Ile	Ala	Lys	Met	
				260					265					270			
	Asp	Glu	Asp	Ala	Arg	Asn	Ala	Leu	Ala	Phe	Ser	Arg	Phe	Val	Leu	Gly	
		275						280					285				
	Gly																
<210>	6																
<211>	269																
<212>	PRT																
<213>	未知																
<220>																	
<223>	阿洛酮糖-3-差向异构酶																

<400>	6															
Met	Lys	His	Gly	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Tyr	Trp	Thr	Glu	Trp	Ser	Ala	Lys	
1				5					10					15		
Tyr	Lys	Lys	Tyr	Ile	Glu	Lys	Val	Ala	Lys	Leu	Gly	Phe	Asp	Ile	Ile	
			20					25					30			
Glu	Ile	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	Tyr	Ser	Asp	Asp	Leu	Glu	Leu	Lys	Lys	
		35					40					45				
Ala	Lys	Asp	Asn	Gly	Ile	Ile	Leu	Thr	Ala	Gly	Tyr	Gly	Pro	Thr	Lys	
	50					55					60					
Asn	Leu	Ser	Glu	Asp	Ala	Glu	Val	Arg	Ala	Ala	Ala	Leu	Phe	Phe	Lys	
65					70					75					80	
Arg	Leu	Leu	Asp	Ile	Leu	Ala	Glu	Leu	Asp	Ile	His	Ile	Ile	Gly	Gly	
				85					90					95		
Ala	Leu	Tyr	Ser	Tyr	Trp	Pro	Val	Asp	Phe	Ser	Asn	Asp	Lys	Gly	Asp	
			100					105					110			
Trp	Ala	Trp	Gly	Val	Glu	Gly	Met	Arg	Glu	Leu	Ala	Asp	Phe	Ala	Asp	
		115					120					125				
Asp	Ile	Asn	Leu	Gly	Met	Glu	Val	Leu	Asn	Arg	Phe	Glu	Ser	His	Ile	
	130					135					140					
Leu	Asn	Thr	Ala	Glu	Glu	Ala	Val	Ala	Phe	Val	Lys	Asp	Val	Gly	Ser	
145					150					155					160	
Asn	Val	Lys	Val	Met	Leu	Asp	Thr	Phe	His	Met	Asn	Ile	Glu	Glu	Ser	
				165					170					175		
Phe	Ala	Gly	Ala	Ile	Arg	Thr	Ala	Gly	Asp	Leu	Leu	Gly	His	Phe	His	
			180					185					190			
Thr	Gly	Glu	Asn	Asn	Arg	Leu	Val	Pro	Gly	Lys	Gly	Arg	Ile	Pro	Trp	
		195					200					205				
Lys	Glu	Ile	Gly	Asn	Ala	Leu	Arg	Asp	Ile	Asn	Tyr	Asp	Gly	Ala	Ala	
	210					215					220					
Val	Met	Glu	Pro	Phe	Val	Lys	Ser	Gly	Gly	Thr	Ile	Gly	Ser	Asp	Ile	
225					230					235					240	
Lys	Val	Trp	Arg	Asp	Leu	Ser	Gly	Ala	Asp	Glu	Ala	Ala	Leu	Asp	Asp	
				245					250					255		
Asp	Ala	Arg	Ala	Leu	Glu	Phe	Ala	Arg	His	Val	Leu	Gly				
			260					265								
<210>	7															

<211>	876	
<212>	DNA	
<213>	鲍氏梭菌	
<400>	7	
	atgaaatatg gtatttattt tgcttattgg acgaaggaat ggtttgctga ttataagaag	60
	tatatggata aggtgtctgc tttggggttt gatgtcctgg aaatttcctg tgcagccctc	120
	agagatgtat acacaaccaa ggaacagctg attgagctac gtgaatacgc caaagaaaaa	180
	gggcttggtc taacagctgg ttatggacct actaaagcag aaaatctgtg ttcagaagac	240
	ccggaggcag tgagacgggc catgacattc ttcaaggacc tgcttcctaaa gctgcagtta	300
	atggatatcc atatcctggg aggggggatta tattcctact ggcccgtgga ttttaccatt	360
	aataatgaca agcagggaga ccgggccagg gctgtcagga atctgaggga attgtccaaa	420
	acagcggagg aatgtgacgt ggtgcttgga atggaggtac tgaaccgcta tgaggggtat	480
	attcttaata cctgtgaaga ggcaattgat tttgtcgatg agattggaag cagccatgta	540
	aaaatcatgc tggatacttt ccatatgaat attgaagaga caaatatggc tgatgcaatc	600
	cgcaaggcgg gagacaggct gggacatctc catctgggag aacagaaccg cctggtgccg	660
[0007]	ggaaaaggca gcctgccatg ggctgagata gggcaggcgc tccgtgatat taactatcag	720
	ggagccgctg tcatggaacc ttttgtcatg caggagggga ccatcggttc tgagataaag	780
	gtatggagag acatggtgcc ggatctttct gaggaagcac tggacaggga tgcaaagggt	840
	gcgctggaat tctgcaggca tgtgttttgggt atctaa	876
<210>	8	
<211>	870	
<212>	DNA	
<213>	门冬虫梭菌	
<400>	8	
	atgaaacatg gtatctatta tgcatactgg gaacaagaat gggcggccga ctacaagcgc	60
	tatgttgaag aggtggcaaa gcttgggttt gacattctgg agatcggcgc tgggcgctg	120
	ccggaatacg cagagcagga tgtgaaggaa ctgaagaaat gtgcgcagga caatgggatc	180
	acgctgacgg ccgatatatg tccgacgttc aaccacaata tcggttcttc agacgccggg	240
	gtaagggaag aggcgctgga atggtataag aggttatttg aagtgctggc agagcttgat	300
	atccacctga tcggaggggc gctctattct tactggcctg tcgattttgc aaacgccgat	360
	aaaacggaag actggaagtg gactgtagag ggcatgcaga ggctggcgcc ggccgcggcc	420

```

aaatatgaca tcaacctggg catggaagtt ctgaaccggt ttgagagcca tatcctgaat      480
acagccgagg aaggtgtgaa gttttagtag gaagtcggca tggacaacgt aaaggtcatg      540
ctggatacat tccatatgaa tatagaagag caaagcatag gcggcgcgat ccgccgggca      600
ggaaaactgc tcgggcattt ccacaccgga gaatgcaacc gcatgggtgcc cggaaggga      660
cgtattccat ggcgtgagat aggggatgct ctccgtgata tcggatatga cggaactgct      720
gtaatggagc cgttcgttcg catgggagga caggtcggcg ctgatatcaa ggtgtggaga      780
gacataagcc gtggagcaga cgaggcacag cttgacgatg acgcgcgccg tgcgctggag      840
ttccagagat atatgctgga gtggaagtaa      870

```

<210> 9
 <211> 291
 <212> PRT
 <213> 鲍氏梭菌

<400> 9
 Met Lys Tyr Gly Ile Tyr Phe Ala Tyr Trp Thr Lys Glu Trp Phe Ala
 1 5 10 15
 Asp Tyr Lys Lys Tyr Met Asp Lys Val Ser Ala Leu Gly Phe Asp Val
 20 25 30
 Leu Glu Ile Ser Cys Ala Ala Leu Arg Asp Val Tyr Thr Thr Lys Glu
 35 40 45
 Gln Leu Ile Glu Leu Arg Glu Tyr Ala Lys Glu Lys Gly Leu Val Leu
 50 55 60
 Thr Ala Gly Tyr Gly Pro Thr Lys Ala Glu Asn Leu Cys Ser Glu Asp
 65 70 75 80
 Pro Glu Ala Val Arg Arg Ala Met Thr Phe Phe Lys Asp Leu Leu Pro
 85 90 95
 Lys Leu Gln Leu Met Asp Ile His Ile Leu Gly Gly Gly Leu Tyr Ser
 100 105 110
 Tyr Trp Pro Val Asp Phe Thr Ile Asn Asn Asp Lys Gln Gly Asp Arg
 115 120 125
 Ala Arg Ala Val Arg Asn Leu Arg Glu Leu Ser Lys Thr Ala Glu Glu
 130 135 140
 Cys Asp Val Val Leu Gly Met Glu Val Leu Asn Arg Tyr Glu Gly Tyr
 145 150 155 160
 Ile Leu Asn Thr Cys Glu Glu Ala Ile Asp Phe Val Asp Glu Ile Gly
 165 170 175

[0008]

Ser Ser His Val Lys Ile Met Leu Asp Thr Phe His Met Asn Ile Glu
 180 185 190
 Glu Thr Asn Met Ala Asp Ala Ile Arg Lys Ala Gly Asp Arg Leu Gly
 195 200 205
 His Leu His Leu Gly Glu Gln Asn Arg Leu Val Pro Gly Lys Gly Ser
 210 215 220
 Leu Pro Trp Ala Glu Ile Gly Gln Ala Leu Arg Asp Ile Asn Tyr Gln
 225 230 235 240
 Gly Ala Ala Val Met Glu Pro Phe Val Met Gln Gly Gly Thr Ile Gly
 245 250 255
 Ser Glu Ile Lys Val Trp Arg Asp Met Val Pro Asp Leu Ser Glu Glu
 260 265 270
 Ala Leu Asp Arg Asp Ala Lys Gly Ala Leu Glu Phe Cys Arg His Val
 275 280 285
 Phe Gly Ile
 290

[0009]

<210> 10
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> 门冬虫梭菌

<400> 10
 Met Lys His Gly Ile Tyr Tyr Ala Tyr Trp Glu Gln Glu Trp Ala Ala
 1 5 10 15
 Asp Tyr Lys Arg Tyr Val Glu Lys Val Ala Lys Leu Gly Phe Asp Ile
 20 25 30
 Leu Glu Ile Gly Ala Gly Pro Leu Pro Glu Tyr Ala Glu Gln Asp Val
 35 40 45
 Lys Glu Leu Lys Lys Cys Ala Gln Asp Asn Gly Ile Thr Leu Thr Ala
 50 55 60
 Gly Tyr Gly Pro Thr Phe Asn His Asn Ile Gly Ser Ser Asp Ala Gly
 65 70 75 80
 Val Arg Glu Glu Ala Leu Glu Trp Tyr Lys Arg Leu Phe Glu Val Leu
 85 90 95
 Ala Glu Leu Asp Ile His Leu Ile Gly Gly Ala Leu Tyr Ser Tyr Trp
 100 105 110
 Pro Val Asp Phe Ala Asn Ala Asp Lys Thr Glu Asp Trp Lys Trp Ser
 115 120 125
 Val Glu Gly Met Gln Arg Leu Ala Pro Ala Ala Ala Lys Tyr Asp Ile

	130	135	140	
	Asn Leu Gly Met Glu Val Leu Asn Arg Phe Glu Ser His Ile Leu Asn 145 150 155 160			
	Thr Ala Glu Glu Gly Val Lys Phe Val Glu Glu Val Gly Met Asp Asn 165 170 175			
	Val Lys Val Met Leu Asp Thr Phe His Met Asn Ile Glu Glu Gln Ser 180 185 190			
	Ile Gly Gly Ala Ile Arg Arg Ala Gly Lys Leu Leu Gly His Phe His 195 200 205			
	Thr Gly Glu Cys Asn Arg Met Val Pro Gly Lys Gly Arg Ile Pro Trp 210 215 220			
	Arg Glu Ile Gly Asp Ala Leu Arg Asp Ile Gly Tyr Asp Gly Thr Ala 225 230 235 240			
	Val Met Glu Pro Phe Val Arg Met Gly Gly Gln Val Gly Ala Asp Ile 245 250 255			
	Lys Val Trp Arg Asp Ile Ser Arg Gly Ala Asp Glu Ala Gln Leu Asp 260 265 270			
	Asp Asp Ala Arg Arg Ala Leu Glu Phe Gln Arg Tyr Met Leu Glu Trp 275 280 285			
[0010]	Lys			
<210>	11			
<211>	963			
<212>	DNA			
<213>	大肠杆菌			
<400>	11			
	atgattaaga aaatcgggtgt gttgacaagc ggcggtgatg cgccaggcat gaacgccgca			60
	attcgcgggg ttgttcgttc tgcgctgaca gaaggtctgg aagtaatggg tatttatgac			120
	ggctatctgg gtctgtatga agaccgtatg gtacagctag accgttacag cgtgtctgac			180
	atgatcaacc gtggcggtac gttcctcggt tctgcgcggt tcccggaatt ccgcgacgag			240
	aacatccgcg ccgtggctat cgaaaacctg aaaaaacgtg gtatcgacgc gctggtggtt			300
	atcggcgggtg acggttccta catgggtgca atgcgtctga ccgaaatggg cttcccgtgc			360
	atcggctctgc cgggcactat cgacaacgac atcaaaggca ctgactacac tatcggtttc			420
	ttcactgcgc tgagcaccgt tgtagaagcg atcgaccgtc tgcgtgacac ctcttcttct			480
	caccagcgta tttccgtggt ggaagtgatg ggccgttatt gtggagatct gacgttggt			540

```

gcggccattg ccggtggctg tgaattcggt gtggttccgg aagttagaatt cagccgtgaa      600
gacctggtaa acgaaatcaa agcgggtatc gcgaaaggta aaaaacacgc gatcgtggcg      660
attaccgaac atatgtgtga tgttgacgaa ctggcgcatt tcatcgagaa agaaaccggt      720
cgtgaaaccc gcgcaactgt gctgggccac atccagcgcg gtggttctcc ggtgccttac      780
gaccgtattc tggettcccg tatgggcgct tacgctatcg atctgtgct ggcaggttac      840
ggcggtcggt gtgtaggtat ccagaacgaa cagctggttc accacgacat catcgacgt      900
atcgaaaaca tgaagcgctc gttcaaaggt gactggctgg actgcgcgaa aaaactgtat      960
taa                                                                 963

```

<210> 12
 <211> 320
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌

<400> 12
 Met Ile Lys Lys Ile Gly Val Leu Thr Ser Gly Gly Asp Ala Pro Gly
 1 5 10 15
 Met Asn Ala Ala Ile Arg Gly Val Val Arg Ser Ala Leu Thr Glu Gly
 20 25 30
 Leu Glu Val Met Gly Ile Tyr Asp Gly Tyr Leu Gly Leu Tyr Glu Asp
 35 40 45
 Arg Met Val Gln Leu Asp Arg Tyr Ser Val Ser Asp Met Ile Asn Arg
 50 55 60
 Gly Gly Thr Phe Leu Gly Ser Ala Arg Phe Pro Glu Phe Arg Asp Glu
 65 70 75 80
 Asn Ile Arg Ala Val Ala Ile Glu Asn Leu Lys Lys Arg Gly Ile Asp
 85 90 95
 Ala Leu Val Val Ile Gly Gly Asp Gly Ser Tyr Met Gly Ala Met Arg
 100 105 110
 Leu Thr Glu Met Gly Phe Pro Cys Ile Gly Leu Pro Gly Thr Ile Asp
 115 120 125
 Asn Asp Ile Lys Gly Thr Asp Tyr Thr Ile Gly Phe Phe Thr Ala Leu
 130 135 140
 Ser Thr Val Val Glu Ala Ile Asp Arg Leu Arg Asp Thr Ser Ser Ser
 145 150 155 160
 His Gln Arg Ile Ser Val Val Glu Val Met Gly Arg Tyr Cys Gly Asp
 165 170 175

[0011]

Leu Thr Leu Ala Ala Ala Ile Ala Gly Gly Cys Glu Phe Val Val Val	
180	185
Pro Glu Val Glu Phe Ser Arg Glu Asp Leu Val Asn Glu Ile Lys Ala	
195	200
Gly Ile Ala Lys Gly Lys Lys His Ala Ile Val Ala Ile Thr Glu His	
210	215
Met Cys Asp Val Asp Glu Leu Ala His Phe Ile Glu Lys Glu Thr Gly	
225	230
Arg Glu Thr Arg Ala Thr Val Leu Gly His Ile Gln Arg Gly Gly Ser	
245	250
Pro Val Pro Tyr Asp Arg Ile Leu Ala Ser Arg Met Gly Ala Tyr Ala	
260	265
Ile Asp Leu Leu Leu Ala Gly Tyr Gly Gly Arg Cys Val Gly Ile Gln	
275	280
Asn Glu Gln Leu Val His His Asp Ile Ile Asp Ala Ile Glu Asn Met	
290	295
Lys Arg Pro Phe Lys Gly Asp Trp Leu Asp Cys Ala Lys Lys Leu Tyr	
305	310
	315
	320

[0012]

<210>	13	
<211>	450	
<212>	DNA	
<213>	大肠杆菌	
<400>	13	
atgaaaaaga ttgcatttgg ctgtgatcat gtcggtttca ttttaaaaca tgaaatagt		60
gcacatttag ttgagcgtgg cgttgaagt attgataaag gaacctggtc gtcagagcgt		120
actgattatc cacattacgc cagtcaagtc gcactggctg ttgctggcgg agaggttgat		180
ggcgggattt tgatttgtgg tactggcgtc ggtatttcga tagcggcgaa caagtttgcc		240
ggaattcgcg cggtcgtctg tagcgaacct tattccgcgc aactttcgcg gcagcataac		300
gacaccaacg tgctggcttt tggttcacga gtggttgcc tcgaactggc aaaaatgatt		360
gtggatgcgt ggctgggcgc acagtacgaa ggcggtcgtc atcaacaacg cgtggaggcg		420
attacggcaa tagagcagcg gagaaattga		450
<210>	14	
<211>	891	
<212>	DNA	
<213>	大肠杆菌	

[0013]	<400>	14	
	atgagccagt	cagagtttga	ttcagcgctt ccgaacggta tagggttagc gccttacctg 60
	cgaatgaagc	aggaaggaat	gacagaaaat gaaagccgca tcgtggagtg gttactcaaa 120
	cccggttaacc	tgagttgtgc	acccgcaatt aaagatgtcg cagaagctct ggcggtatct 180
	gaagcgatga	tagttaaggt	atcaaagctg ctggggttta gcggctttcg taacttacgc 240
	agtgcgctgg	aagattatit	ttctcagtca gaacaggtat tgccttcga gttggctttt 300
	gatgaagcgc	cgcaggatgt	ggtgaataag gtatttaaca tcactttacg caccattatg 360
	gaaggtcagt	cgatcgtaaa	cggtgatgag atccaccgtg ccgcccgtt tttctatcag 420
	gccagacagc	gggatttgta	cggtgccgga ggatcaaagt ctatctgtgc tgatgtacag 480
	cacaagttct	tgcgcattgg	cgtacgctgt caggcctatc ctgatgtca catcatgatg 540
	atgtccgctt	cggtgttaca	ggaaggagat gttgtgctgg tagtgacca ttccgggcca 600
	accagtgatg	taaaagcggc	cgtagaactg gcaaaaaaga acggggcaaa gattatttgt 660
	ataaccata	gtaccattc	accgatagcg aaactggccg attatattat ttgctacca 720
	gccccgaaa	cgccgttatt	aggtcgtaat gcctcggcaa gaatattaca actaactttg 780
	ctggacgctt	ttttgtctc	tgctgcccag ctcaacattg aacaagctaa tattaatatg 840
	caaaaaaccg	gcgcaattgt	tgattttctc tcaccaggcg cgctgaaata a 891
	<210>	15	
	<211>	936	
	<212>	DNA	
	<213>	大肠杆菌	
	<400>	15	
	atgaataaat	atctgaaata	tttcagcggc acactcgtgg gcttaatgtt gtcaaccage 60
	gcttttgctg	ccgccgaata	tgtgtcgtga ttgaaaacce tctccaacce attttgggta 120
	gatatgaaaa	aaggcattga	agatgaagca aaaacactgg gcgtcagcgt tgatattttt 180
	gcctctcctt	cagaaggcga	ttttcaatct caattgcagt tatttgaaga tctcagtaat 240
	aaaaattaca	aaggtatcgc	cttcgctcca ttatcctcag tgaatctggt catgcctgtc 300
	gcccgcgcat	ggaaaaaagg	catttatctg gttaatctcg atgaaaaaat cgacatggat 360
	aatctgaaaa	aagctggcgg	caatgtggaa gcttttgtca ccaccgataa cgttgctgtc 420
	ggggcgaaa	gcgcgtcgtt	cattattgac aaattgggcg ctgaaggtgg tgaagtcgca 480
	atcattgagg	gtaaagccgg	taacgcctcc ggtgaagcgc gtcgtaatgg tgccaccgaa 540

	gccttcaaaa aagcaagcca gatcaagctt gtcgccagcc agcctgccga ctgggaccgc	600
	attaaagcac tggatgtcgc cactaacgtg ttgcaacgta atccgaatat taaagcgatc	660
	tattgcgcga atgacacgat ggcaatgggt gttgctcagg cagtcgcaaa cgccggaaaa	720
	acgggaaaaag tgctggtcgt cggtacagat ggcatccgg aagcccgcaa aatggtgga	780
	gccggacaaa tgaccgcgac ggttgcccag aacccggcgg atatcggcgc aacgggtctg	840
	aagctgatgg ttgacgtga gaaatccggc aaggttatcc cgctggataa agcaccggaa	900
	tttaaactgg tcgattcaat cctggtcact caataa	936
<210>	16	
<211>	1533	
<212>	DNA	
<213>	大肠杆菌	
<400>	16	
[0014]	atggccacgc catatatatc gatggcgggg atcggcaagt cctttggtcc ggttcacgca	60
	ttaaagtcgg ttaatttaac ggtttatcct ggtgaaatac atgcattact aggagaaaat	120
	ggcgcgggta aatccacgct aatgaaagtt ttatccggaa tacatgagcc gaccaaaggc	180
	accattacca ttaataacat tagctataac aagctggatc ataaattagc ggcacaactc	240
	ggtatcggga ttatttatca ggaactcagc gttattgatg aattaaccgt actggaaaat	300
	ttatatattg gtcgtcatct gacgaaaaaa atctgtggcg tcaatattat cgactggcga	360
	gaaatgcgtg tccgcgccgc catgatgtta ttacgcgtgg gcttgaaagt tgatctagat	420
	gagaaagtgg cgaatttatc tatcagccac aagcagatgc tagaaattgc caaacgctg	480
	atgctcgatg ccaaagtcac catcatggat gaaccacac ctcactcac caataaagag	540
	gtggactatc tgtttctgat catgaatcag ttgcgtaaag agggtagcgc catcgtctat	600
	atctcgcata agttggcgga aattcgccgt atttgcgacc gctatacggg gatgaaagac	660
	ggcagcagcg ttgacgcgg catagtaagc gatgtgtcaa atgacgatat cgtccgtctg	720
	atggtaggcc gcgaactgca aaaccgtttt aacgcgatga aggagaatgt cagcaacctt	780
	gcgcacgaaa cggtttttga ggtgcggaac gtcaccagtc gtgacagaaa aaaggtccgg	840
	gatatctcat ttagcgtctg ccggggagaa atattaggtt ttgccggact ggtcggttcc	900
	ggacgtactg aactgatgaa ttgtctgttt ggcggtgata aacgcgctgg cggagaaatc	960
	cgtcttaatg gcaaagatat ctctccacgt tcacccttgg atgccgtgaa aaaagggatg	1020

	gcttacatca ctgaaagccg ccgggataac ggttttttcc ccaacttttc categctcag	1080
	aacatggcga tcagccgcag tctgaaagac ggcggtctata aaggcgcgat gggcttggtt	1140
	catgaagttg acgagcaacg taccgctgaa aatcaacgcg aactgctggc gctgaaatgt	1200
	cattcggtaa accagaatat caccgaactc tccgggggaa atcagcagaa agtcctgata	1260
	tccaaatggc tgtgctgttg cccggaagtg attattttcg atgaacctac ccgcgcatc	1320
	gacgttggcg cgaaagccga aatttacaaa gtgatgcgcc aactggcgga cgacggaaaa	1380
	gtcatcctga tgggtgcata tgaactacct gaaattatca ccgtctgcga ccgcatcgcc	1440
	gtgttctgcg aaggacgact gacgcaaate ctgacgaate gcgatgacat gagcgaagag	1500
	gagattatgg catgggcttt accacaagag taa	1533
	<210> 17	
	<211> 981	
	<212> DNA	
	<213> 大肠杆菌	
	<400> 17	
	atgggcttta ccacaagagt aaaaagcgaa gcgagcgaga agaaaccgtt caactttgcg	60
[0015]	ctgttctggg ataaatacgg cacctttttt atcctggcga tcatcgctgc catctttggt	120
	tcgctgtcac cagaatattt tctgaccacc aataatatta cccagatttt tgttcaaagc	180
	tccgtgacgg tattgatcgg catgggcgag tttttcgcta tcctggctgc tggatatcac	240
	ctctcgggtg gcgcgattct ggcgctttcc ggtatggtga ccgccaaact gatgttggca	300
	ggtgttgacc cgtttctcgc agcgatgatt ggcggtgtac tggttggcgg cgcactgggg	360
	gcgatcaacg gctgcctggt caactggacg gggctacacc cgttcatcat cacccttggc	420
	accaacgcga ttttccgtgg gatcacgtg gtgatctccg atgccaaact ggtatacggc	480
	ttctcatttg acttcgtgaa cttcttttgc gccagcgtaa ttgggatacc tgtccccgtt	540
	atcttctcac taattgtcgc gctcatcctt tggtttctga caacgcgtat gcggctcggg	600
	cgcaacatct acgcaactgg cggaacaaaa aattcggcgt tctattccgg gattgacgtg	660
	aaattccaca tcctgggtgt gtttatcact tccggtgttt gtgcaggtct ggcaggcgctc	720
	gtctcaactg cagcactcgg tgccgcagaa ccgcttgccg gtatgggttt tgaaacctat	780
	gccattgccg gcgccatcat tggcggcacc agtttcttcg gcggcaaggg gcgcattttc	840
	tctgtggtga ttggcgggtt gatcatcggc accatcaaca acggtctgaa tattttgcag	900
	gtacaaacct attaccaact ggtggtgatg ggcggtatga ttatcgcggc tgtcgccctt	960

	gaccgtctta tcagtaagta a	981
<210>	18	
<211>	696	
<212>	DNA	
<213>	大肠杆菌	
<400>	18	
	atgaaaatct cccctcgtt aatgtgtatg gatctgctga aatttaaaga acagatcgaa	60
	tttatcgaca gccatgccga ttacttccac atcgatatca tggacggtca ctttgtcccc	120
	aatctgacac tctcaccgtt cttegttaagt caggttaaaa aactggcaac taaaccgctc	180
	gactgtcatc tgatgggtgac gcggccgcag gattacattg ctcaactggc gcgtgcggga	240
	gcagatttca tcaactctgca tccggaaacc atcaacggcc aggcggtccg cctgattgat	300
	gaaatccgcc gtcattgacat gaaagtgggg ctgatcetta acccgagac gccagttgag	360
	gccatgaaat actatatcca taaggccgat aaaattacgg tcatgactgt cgatcccggc	420
	tttgccggac aaccgttcat tctgaaatg ctggataaac ttgccgaact gaaggcatgg	480
	cgtgaacgag aaggtctgga gtacgaaatt gaggtggacg gttcctgcaa ccaggcaact	540
[0016]	tacgaaaaac tgatggcggc aggggcggat gtctttatcg tcggcacttc cggcctgttt	600
	aatcatgcgg aaaatatcga cgaagcatgg agaattatga ccgcgcagat tctggctgca	660
	aaaagcgagg tacagcctca tgcaaaaaca gcataa	696
<210>	19	
<211>	930	
<212>	DNA	
<213>	大肠杆菌	
<400>	19	
	atgcaaaaac agcataacgt cgtagcgggc gtggatatgg gggcaacgca tatccgcttt	60
	tgtctgcgga cagcagaagg tgaaacgcta cactgcgaaa aaaagcggac cgcagaagtc	120
	attgctcccg gcctgggtgtc gggtatcggc gaaatgattg acgagcaact caggcgcttt	180
	aacgctcgct gtcattgtct ggtgatggga tttccggcgc tggtcagtaa agataaacgc	240
	accattattt ctacgcctaa cctgccgtta acagcggcgg atttatatga tctcgccgat	300
	aagctcgaaa atacgtgaa ttgtccggtt gagttttccc gcgacgttaa cctgcaactc	360
	tcctgggacg tagtagaaaa ccgccttacg caacaactgg ttctggcggc ctatctcggt	420
	acgggggatgg ggttcgcagt gtggatgaac ggtgcgccgt ggacgggtgc acacggtgtg	480

```

gcaggcgaac tgggtcatat ccccttgga gatatgaccc aacactgcgc gtgtggcaat      540
cctgggtgcc tggaaccaa ttgctctgga atggcgctaa gacgttgga cgaacaacag      600
ccccgaaatt acccattgcg cgatcttttc gtccatgcgg aaaacgcccc ttctgtccag      660
agtctgcttg aaaacgcggc acgggccatt gccaccagca ttaatctgtt cgatcccgat      720
gcggtgatcc tgggcggtgg cgtgatggat atgcccgcct tcccacgga gactctcggt      780
gccatgaccc aaaagtacct gcgccgtcca ctgccgcac aggtcgtgcg ctttattgcc      840
gcctcatctt ctgactttaa tggcgctcag ggtgcagcaa tattggcgca tcaacgtttt      900
ttgccacagt tctgtgctaa agcccatga      930

```

<210> 20
 <211> 149
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌

<400> 20
 Met Lys Lys Ile Ala Phe Gly Cys Asp His Val Gly Phe Ile Leu Lys
 1 5 10 15
 His Glu Ile Val Ala His Leu Val Glu Arg Gly Val Glu Val Ile Asp
 20 25 30
 Lys Gly Thr Trp Ser Ser Glu Arg Thr Asp Tyr Pro His Tyr Ala Ser
 35 40 45
 Gln Val Ala Leu Ala Val Ala Gly Gly Glu Val Asp Gly Gly Ile Leu
 50 55 60
 Ile Cys Gly Thr Gly Val Gly Ile Ser Ile Ala Ala Asn Lys Phe Ala
 65 70 75 80
 Gly Ile Arg Ala Val Val Cys Ser Glu Pro Tyr Ser Ala Gln Leu Ser
 85 90 95
 Arg Gln His Asn Asp Thr Asn Val Leu Ala Phe Gly Ser Arg Val Val
 100 105 110
 Gly Leu Glu Leu Ala Lys Met Ile Val Asp Ala Trp Leu Gly Ala Gln
 115 120 125
 Tyr Glu Gly Gly Arg His Gln Gln Arg Val Glu Ala Ile Thr Ala Ile
 130 135 140
 Glu Gln Arg Arg Asn
 145

<210> 21

<211>	296
<212>	PRT
<213>	大肠杆菌
<400>	21
Met Ser Gln Ser Glu Phe Asp Ser Ala Leu Pro Asn Gly Ile Gly Leu	
1 5 10 15	
Ala Pro Tyr Leu Arg Met Lys Gln Glu Gly Met Thr Glu Asn Glu Ser	
20 25 30	
Arg Ile Val Glu Trp Leu Leu Lys Pro Gly Asn Leu Ser Cys Ala Pro	
35 40 45	
Ala Ile Lys Asp Val Ala Glu Ala Leu Ala Val Ser Glu Ala Met Ile	
50 55 60	
Val Lys Val Ser Lys Leu Leu Gly Phe Ser Gly Phe Arg Asn Leu Arg	
65 70 75 80	
Ser Ala Leu Glu Asp Tyr Phe Ser Gln Ser Glu Gln Val Leu Pro Ser	
85 90 95	
Glu Leu Ala Phe Asp Glu Ala Pro Gln Asp Val Val Asn Lys Val Phe	
100 105 110	
Asn Ile Thr Leu Arg Thr Ile Met Glu Gly Gln Ser Ile Val Asn Val	
115 120 125	
Asp Glu Ile His Arg Ala Ala Arg Phe Phe Tyr Gln Ala Arg Gln Arg	
130 135 140	
Asp Leu Tyr Gly Ala Gly Gly Ser Asn Ala Ile Cys Ala Asp Val Gln	
145 150 155 160	
His Lys Phe Leu Arg Ile Gly Val Arg Cys Gln Ala Tyr Pro Asp Ala	
165 170 175	
His Ile Met Met Met Ser Ala Ser Leu Leu Gln Glu Gly Asp Val Val	
180 185 190	
Leu Val Val Thr His Ser Gly Arg Thr Ser Asp Val Lys Ala Ala Val	
195 200 205	
Glu Leu Ala Lys Lys Asn Gly Ala Lys Ile Ile Cys Ile Thr His Ser	
210 215 220	
Tyr His Ser Pro Ile Ala Lys Leu Ala Asp Tyr Ile Ile Cys Ser Pro	
225 230 235 240	
Ala Pro Glu Thr Pro Leu Leu Gly Arg Asn Ala Ser Ala Arg Ile Leu	
245 250 255	
Gln Leu Thr Leu Leu Asp Ala Phe Phe Val Ser Val Ala Gln Leu Asn	
260 265 270	

[0018]

Ile Glu Gln Ala Asn Ile Asn Met Gln Lys Thr Gly Ala Ile Val Asp
275 280 285

Phe Phe Ser Pro Gly Ala Leu Lys
290 295

<210> 22
<211> 311
<212> PRT
<213> 大肠杆菌

<400> 22
Met Asn Lys Tyr Leu Lys Tyr Phe Ser Gly Thr Leu Val Gly Leu Met
1 5 10 15

Leu Ser Thr Ser Ala Phe Ala Ala Ala Glu Tyr Ala Val Val Leu Lys
20 25 30

Thr Leu Ser Asn Pro Phe Trp Val Asp Met Lys Lys Gly Ile Glu Asp
35 40 45

Glu Ala Lys Thr Leu Gly Val Ser Val Asp Ile Phe Ala Ser Pro Ser
50 55 60

Glu Gly Asp Phe Gln Ser Gln Leu Gln Leu Phe Glu Asp Leu Ser Asn
65 70 75 80

[0019]

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

Val Met Pro Val Ala Arg Ala Trp Lys Lys Gly Ile Tyr Leu Val Asn
100 105 110

Leu Asp Glu Lys Ile Asp Met Asp Asn Leu Lys Lys Ala Gly Gly Asn
115 120 125

Val Glu Ala Phe Val Thr Thr Asp Asn Val Ala Val Gly Ala Lys Gly
130 135 140

Ala Ser Phe Ile Ile Asp Lys Leu Gly Ala Glu Gly Gly Glu Val Ala
145 150 155 160

Ile Ile Glu Gly Lys Ala Gly Asn Ala Ser Gly Glu Ala Arg Arg Asn
165 170 175

Gly Ala Thr Glu Ala Phe Lys Lys Ala Ser Gln Ile Lys Leu Val Ala
180 185 190

Ser Gln Pro Ala Asp Trp Asp Arg Ile Lys Ala Leu Asp Val Ala Thr
195 200 205

Asn Val Leu Gln Arg Asn Pro Asn Ile Lys Ala Ile Tyr Cys Ala Asn
210 215 220

Asp Thr Met Ala Met Gly Val Ala Gln Ala Val Ala Asn Ala Gly Lys

	225		230		235		240
	Thr Gly Lys Val	Leu Val Val Gly Thr	Asp Gly Ile Pro Glu Ala Arg				
		245	250			255	
	Lys Met Val Glu	Ala Gly Gln Met Thr	Ala Thr Val Ala Gln Asn Pro				
		260	265			270	
	Ala Asp Ile Gly	Ala Thr Gly Leu Lys Leu Met Val	Asp Ala Glu Lys				
		275	280		285		
	Ser Gly Lys Val	Ile Pro Leu Asp Lys Ala Pro	Glu Phe Lys Leu Val				
		290	295		300		
	Asp Ser Ile Leu	Val Thr Gln					
	305	310					
	<210>	23					
	<211>	326					
	<212>	PRT					
	<213>	大肠杆菌					
	<400>	23					
	Met Gly Phe Thr	Thr Arg Val Lys Ser Glu Ala Ser Glu Lys Lys Pro					
	1	5			10		15
[0020]	Phe Asn Phe Ala	Leu Phe Trp Asp Lys Tyr Gly Thr Phe Phe Ile Leu					
		20		25		30	
	Ala Ile Ile Val	Ala Ile Phe Gly Ser Leu Ser Pro Glu Tyr Phe Leu					
		35		40		45	
	Thr Thr Asn Asn	Ile Thr Gln Ile Phe Val Gln Ser Ser Val Thr Val					
		50		55		60	
	Leu Ile Gly Met	Gly Glu Phe Phe Ala Ile Leu Val Ala Gly Ile Asp					
		65		70		75	80
	Leu Ser Val Gly	Ala Ile Leu Ala Leu Ser Gly Met Val Thr Ala Lys					
		85		90		95	
	Leu Met Leu Ala	Gly Val Asp Pro Phe Leu Ala Ala Met Ile Gly Gly					
		100		105		110	
	Val Leu Val Gly	Gly Ala Leu Gly Ala Ile Asn Gly Cys Leu Val Asn					
		115		120		125	
	Trp Thr Gly Leu	His Pro Phe Ile Ile Thr Leu Gly Thr Asn Ala Ile					
		130		135		140	
	Phe Arg Gly Ile	Thr Leu Val Ile Ser Asp Ala Asn Ser Val Tyr Gly					
		145		150		155	160
	Phe Ser Phe Asp	Phe Val Asn Phe Phe Ala Ala Ser Val Ile Gly Ile					
		165		170		175	

Pro Val Pro Val Ile Phe Ser Leu Ile Val Ala Leu Ile Leu Trp Phe
 180 185 190
 Leu Thr Thr Arg Met Arg Leu Gly Arg Asn Ile Tyr Ala Leu Gly Gly
 195 200 205
 Asn Lys Asn Ser Ala Phe Tyr Ser Gly Ile Asp Val Lys Phe His Ile
 210 215 220
 Leu Val Val Phe Ile Ile Ser Gly Val Cys Ala Gly Leu Ala Gly Val
 225 230 235 240
 Val Ser Thr Ala Arg Leu Gly Ala Ala Glu Pro Leu Ala Gly Met Gly
 245 250 255
 Phe Glu Thr Tyr Ala Ile Ala Ser Ala Ile Ile Gly Gly Thr Ser Phe
 260 265 270
 Phe Gly Gly Lys Gly Arg Ile Phe Ser Val Val Ile Gly Gly Leu Ile
 275 280 285
 Ile Gly Thr Ile Asn Asn Gly Leu Asn Ile Leu Gln Val Gln Thr Tyr
 290 295 300
 Tyr Gln Leu Val Val Met Gly Gly Leu Ile Ile Ala Ala Val Ala Leu
 305 310 315 320
 [0021] Asp Arg Leu Ile Ser Lys
 325

<210> 24
 <211> 326
 <212> PRT
 <213> 大肠杆菌

<400> 24
 Met Gly Phe Thr Thr Arg Val Lys Ser Glu Ala Ser Glu Lys Lys Pro
 1 5 10 15
 Phe Asn Phe Ala Leu Phe Trp Asp Lys Tyr Gly Thr Phe Phe Ile Leu
 20 25 30
 Ala Ile Ile Val Ala Ile Phe Gly Ser Leu Ser Pro Glu Tyr Phe Leu
 35 40 45
 Thr Thr Asn Asn Ile Thr Gln Ile Phe Val Gln Ser Ser Val Thr Val
 50 55 60
 Leu Ile Gly Met Gly Glu Phe Phe Ala Ile Leu Val Ala Gly Ile Asp
 65 70 75 80
 Leu Ser Val Gly Ala Ile Leu Ala Leu Ser Gly Met Val Thr Ala Lys
 85 90 95

	Leu	Met	Leu	Ala	Gly	Val	Asp	Pro	Phe	Leu	Ala	Ala	Met	Ile	Gly	Gly	
				100					105					110			
	Val	Leu	Val	Gly	Gly	Ala	Leu	Gly	Ala	Ile	Asn	Gly	Cys	Leu	Val	Asn	
			115					120					125				
	Trp	Thr	Gly	Leu	His	Pro	Phe	Ile	Ile	Thr	Leu	Gly	Thr	Asn	Ala	Ile	
		130					135					140					
	Phe	Arg	Gly	Ile	Thr	Leu	Val	Ile	Ser	Asp	Ala	Asn	Ser	Val	Tyr	Gly	
	145					150					155					160	
	Phe	Ser	Phe	Asp	Phe	Val	Asn	Phe	Phe	Ala	Ala	Ser	Val	Ile	Gly	Ile	
				165						170					175		
	Pro	Val	Pro	Val	Ile	Phe	Ser	Leu	Ile	Val	Ala	Leu	Ile	Leu	Trp	Phe	
				180					185					190			
	Leu	Thr	Thr	Arg	Met	Arg	Leu	Gly	Arg	Asn	Ile	Tyr	Ala	Leu	Gly	Gly	
			195					200					205				
	Asn	Lys	Asn	Ser	Ala	Phe	Tyr	Ser	Gly	Ile	Asp	Val	Lys	Phe	His	Ile	
		210					215					220					
	Leu	Val	Val	Phe	Ile	Ile	Ser	Gly	Val	Cys	Ala	Gly	Leu	Ala	Gly	Val	
	225					230					235					240	
[0022]	Val	Ser	Thr	Ala	Arg	Leu	Gly	Ala	Ala	Glu	Pro	Leu	Ala	Gly	Met	Gly	
				245						250					255		
	Phe	Glu	Thr	Tyr	Ala	Ile	Ala	Ser	Ala	Ile	Ile	Gly	Gly	Thr	Ser	Phe	
				260					265					270			
	Phe	Gly	Gly	Lys	Gly	Arg	Ile	Phe	Ser	Val	Val	Ile	Gly	Gly	Leu	Ile	
			275					280					285				
	Ile	Gly	Thr	Ile	Asn	Asn	Gly	Leu	Asn	Ile	Leu	Gln	Val	Gln	Thr	Tyr	
		290					295					300					
	Tyr	Gln	Leu	Val	Val	Met	Gly	Gly	Leu	Ile	Ile	Ala	Ala	Val	Ala	Leu	
	305					310					315					320	
	Asp	Arg	Leu	Ile	Ser	Lys											
					325												
	<210>				25												
	<211>				309												
	<212>				PRT												
	<213>				大肠杆菌												
	<400>				25												
	Met	Gln	Lys	Gln	His	Asn	Val	Val	Ala	Gly	Val	Asp	Met	Gly	Ala	Thr	
	1				5					10					15		
	His	Ile	Arg	Phe	Cys	Leu	Arg	Thr	Ala	Glu	Gly	Glu	Thr	Leu	His	Cys	

	20	25	30
	Glu Lys Lys Arg Thr Ala Glu Val Ile Ala Pro Gly Leu Val Ser Gly 35 40 45		
	Ile Gly Glu Met Ile Asp Glu Gln Leu Arg Arg Phe Asn Ala Arg Cys 50 55 60		
	His Gly Leu Val Met Gly Phe Pro Ala Leu Val Ser Lys Asp Lys Arg 65 70 75 80		
	Thr Ile Ile Ser Thr Pro Asn Leu Pro Leu Thr Ala Ala Asp Leu Tyr 85 90 95		
	Asp Leu Ala Asp Lys Leu Glu Asn Thr Leu Asn Cys Pro Val Glu Phe 100 105 110		
	Ser Arg Asp Val Asn Leu Gln Leu Ser Trp Asp Val Val Glu Asn Arg 115 120 125		
	Leu Thr Gln Gln Leu Val Leu Ala Ala Tyr Leu Gly Thr Gly Met Gly 130 135 140		
	Phe Ala Val Trp Met Asn Gly Ala Pro Trp Thr Gly Ala His Gly Val 145 150 155 160		
[0023]	Ala Gly Glu Leu Gly His Ile Pro Leu Gly Asp Met Thr Gln His Cys 165 170 175		
	Ala Cys Gly Asn Pro Gly Cys Leu Glu Thr Asn Cys Ser Gly Met Ala 180 185 190		
	Leu Arg Arg Trp Tyr Glu Gln Gln Pro Arg Asn Tyr Pro Leu Arg Asp 195 200 205		
	Leu Phe Val His Ala Glu Asn Ala Pro Phe Val Gln Ser Leu Leu Glu 210 215 220		
	Asn Ala Ala Arg Ala Ile Ala Thr Ser Ile Asn Leu Phe Asp Pro Asp 225 230 235 240		
	Ala Val Ile Leu Gly Gly Gly Val Met Asp Met Pro Ala Phe Pro Arg 245 250 255		
	Glu Thr Leu Val Ala Met Thr Gln Lys Tyr Leu Arg Arg Pro Leu Pro 260 265 270		
	His Gln Val Val Arg Phe Ile Ala Ala Ser Ser Ser Asp Phe Asn Gly 275 280 285		
	Ala Gln Gly Ala Ala Ile Leu Ala His Gln Arg Phe Leu Pro Gln Phe 290 295 300		
	Cys Ala Lys Ala Pro 305		

<210>	26
<211>	309
<212>	PRT
<213>	大肠杆菌

<400> 26
Met Gln Lys Gln His Asn Val Val Ala Gly Val Asp Met Gly Ala Thr
1 5 10 15
His Ile Arg Phe Cys Leu Arg Thr Ala Glu Gly Glu Thr Leu His Cys
20 25 30
Glu Lys Lys Arg Thr Ala Glu Val Ile Ala Pro Gly Leu Val Ser Gly
35 40 45
Ile Gly Glu Met Ile Asp Glu Gln Leu Arg Arg Phe Asn Ala Arg Cys
50 55 60
His Gly Leu Val Met Gly Phe Pro Ala Leu Val Ser Lys Asp Lys Arg
65 70 75 80
Thr Ile Ile Ser Thr Pro Asn Leu Pro Leu Thr Ala Ala Asp Leu Tyr
85 90 95
Asp Leu Ala Asp Lys Leu Glu Asn Thr Leu Asn Cys Pro Val Glu Phe
100 105 110

[0024]	Ser	Arg	Asp	Val	Asn	Leu	Gln	Leu	Ser	Trp	Asp	Val	Val	Glu	Asn	Arg
			115					120					125			
	Leu	Thr	Gln	Gln	Leu	Val	Leu	Ala	Ala	Tyr	Leu	Gly	Thr	Gly	Met	Gly
		130					135					140				
	Phe	Ala	Val	Trp	Met	Asn	Gly	Ala	Pro	Trp	Thr	Gly	Ala	His	Gly	Val
	145					150					155					160
	Ala	Gly	Glu	Leu	Gly	His	Ile	Pro	Leu	Gly	Asp	Met	Thr	Gln	His	Cys
					165					170					175	
	Ala	Cys	Gly	Asn	Pro	Gly	Cys	Leu	Glu	Thr	Asn	Cys	Ser	Gly	Met	Ala
				180					185					190		
	Leu	Arg	Arg	Trp	Tyr	Glu	Gln	Gln	Pro	Arg	Asn	Tyr	Pro	Leu	Arg	Asp
			195					200					205			
	Leu	Phe	Val	His	Ala	Glu	Asn	Ala	Pro	Phe	Val	Gln	Ser	Leu	Leu	Glu
		210					215					220				
	Asn	Ala	Ala	Arg	Ala	Ile	Ala	Thr	Ser	Ile	Asn	Leu	Phe	Asp	Pro	Asp
	225					230					235					240
	Ala	Val	Ile	Leu	Gly	Gly	Gly	Val	Met	Asp	Met	Pro	Ala	Phe	Pro	Arg
					245					250					255	
	Glu	Thr	Leu	Val	Ala	Met	Thr	Gln	Lys	Tyr	Leu	Arg	Arg	Pro	Leu	Pro

	260	265	270	
	His Gln Val Val Arg Phe Ile Ala Ala Ser Ser Ser Asp Phe Asn Gly			
	275	280	285	
	Ala Gln Gly Ala Ala Ile Leu Ala His Gln Arg Phe Leu Pro Gln Phe			
	290	295	300	
	Cys Ala Lys Ala Pro			
	305			
<210>	27			
<211>	2067			
<212>	DNA			
<213>	棒状杆菌			
<400>	27			
[0025]	atgaatagcg taaataattc ctgcgttgct cggttgatg tcgatttcgg cgactccacc			60
	acggatgtca tcaacaacct tgccactgtt attttcgacg ctggccgagc ttcttcggcc			120
	gacgcccttg ccaaagacgc gctggatcgt gaagcaaagt ccggcaccgg cgttcctggt			180
	caagttgcta tccccactg ccgttcgaa gccgtatctg tcctacatt gggtttgct			240
	cgcttgagca aggggtgtga cttcagcgga cctgatggcg atgccaactt ggtgttcctc			300
	attgcagcac ctgctggcgg cggcaaagag cacctgaaga tcctgtccaa gcttgctcgc			360
	tccttggtga agaaggattt catcaaggct ctgcaggaag ccaccaccga gcaggaaatc			420
	gtcgacgttg tcgatgccgt gctcaaccca gcacaaaaa ccaccgagcc agctgcagct			480
	ccggctgcgg cggcggttgc tgagagtggg gcggcgctga caagcgttac tcgtatcgtg			540
	gcaatcaccg catgcccac cggtatcgca cacacctaca tggtcgcgga ttccctgacg			600
	caaaacgcgg aaggccgca tgatgtggaa ctcgttgtgg agactcaggg ctcttcgct			660
	gtcaccacag tcgatccgaa gatcatcgaa gctgccgacg ccgtcatctt cgccaccgac			720
	gtgggagtta aagaccgca gcgtttcgt ggcaagccag tcattgaatc cggcgtcaag			780
	cgcgcgatca atgagccagc caagatgac gacgaggcca tcgcagcctc caagaaccca			840
	aacgcccga aggtttccgg ttccggtgtc gcggcatctg ctgaaaccac cggcgagaag			900
	ctcggtggg gcaagcgcat ccagcaggca gtcattgacc gcgtgtccta catggttcca			960
	ttcgtagctg ccggcgccct cctgttggt ctcggcttcg cattcggtgg atacgacatg			1020
	gcgaacggct ggcaagcaat cgccaccag ttctctctga ccaacctgcc aggcaacacc			1080
	gtcgatgttg acggcgtggc catgacctc gagegttcag gcttctgtt gtacttcggc			1140

	gcagtcctgt tcgccaccgg ccaagcagcc atgggcttca tcgtggcagc cctgtctggc	1200
	tacaccgcat acgcacttgc tggacgcccc ggcatcgcg cggtgtcgcc	1260
	atctccgtca ccatcgcgcg tggcttcatt ggtggtctgg ttaccggtat ctgggtgtg	1320
	ctcattgccc tgttgattgg ctcttgaag gtgccacgcg tggcagtc actgatgcct	1380
	gtggatcatca tcccgctact tacctcagt gttgttggtc tcgtcatgta cctcctgtg	1440
	ggtcgcccac tcgcatccat catgactggt ttgcaggact ggctatcgtc aatgtccgga	1500
	agctccgcca tcttgctggg tatcatcttg ggcctcatga tgtgtttcga cctcgcgga	1560
	ccagtaaaca aggcagccta cctctttggt accgcaggcc tgtctaccgg cgaccaagct	1620
	tccatggaaa tcatggcgc gatcatggca gctggcatgg tcccaccaat cgcgttgtcc	1680
	attgctaccc tgctgcgcaa gaagctgttc accccagcag agcaagaaaa cggcaagtct	1740
	tcctggctgc ttggcctggc attcgtctcc gaaggtgcca tccattcgc cgcagctgac	1800
	ccattccgtg tgatcccagc aatgatggct ggcggtgcaa ccaactggtc aatctccatg	1860
	gcaactggcg tcggctctcg ggctccacac ggcggtatct tcgtggtctg ggcaatcgaa	1920
	ccatggtggg gctggctcat cgcacttgca gcaggcacca tcgtgtccac catcgttgtc	1980
[0026]	atcgcaactga agcagttctg gccaaacaag gccgtcgctg cagaagtcgc gaagcaagaa	2040
	gcacaacaag cagctgtaaa cgcataa	2067

<210> 28
 <211> 688
 <212> PRT
 <213> 棒状杆菌

<400> 28
 Met Asn Ser Val Asn Asn Ser Ser Leu Val Arg Leu Asp Val Asp Phe
 1 5 10 15
 Gly Asp Ser Thr Thr Asp Val Ile Asn Asn Leu Ala Thr Val Ile Phe
 20 25 30
 Asp Ala Gly Arg Ala Ser Ser Ala Asp Ala Leu Ala Lys Asp Ala Leu
 35 40 45
 Asp Arg Glu Ala Lys Ser Gly Thr Gly Val Pro Gly Gln Val Ala Ile
 50 55 60
 Pro His Cys Arg Ser Glu Ala Val Ser Val Pro Thr Leu Gly Phe Ala
 65 70 75 80
 Arg Leu Ser Lys Gly Val Asp Phe Ser Gly Pro Asp Gly Asp Ala Asn
 85 90 95

	Leu	Val	Phe	Leu	Ile	Ala	Ala	Pro	Ala	Gly	Gly	Gly	Lys	Glu	His	Leu	
				100					105					110			
	Lys	Ile	Leu	Ser	Lys	Leu	Ala	Arg	Ser	Leu	Val	Lys	Lys	Asp	Phe	Ile	
			115					120					125				
	Lys	Ala	Leu	Gln	Glu	Ala	Thr	Thr	Glu	Gln	Glu	Ile	Val	Asp	Val	Val	
		130					135					140					
	Asp	Ala	Val	Leu	Asn	Pro	Ala	Pro	Lys	Thr	Thr	Glu	Pro	Ala	Ala	Ala	
	145					150					155					160	
	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Val	Ala	Glu	Ser	Gly	Ala	Ala	Ser	Thr	Ser	Val	
					165					170					175		
	Thr	Arg	Ile	Val	Ala	Ile	Thr	Ala	Cys	Pro	Thr	Gly	Ile	Ala	His	Thr	
				180					185					190			
	Tyr	Met	Ala	Ala	Asp	Ser	Leu	Thr	Gln	Asn	Ala	Glu	Gly	Arg	Asp	Asp	
			195					200					205				
	Val	Glu	Leu	Val	Val	Glu	Thr	Gln	Gly	Ser	Ser	Ala	Val	Thr	Pro	Val	
		210					215					220					
	Asp	Pro	Lys	Ile	Ile	Glu	Ala	Ala	Asp	Ala	Val	Ile	Phe	Ala	Thr	Asp	
	225					230					235					240	
[0027]	Val	Gly	Val	Lys	Asp	Arg	Glu	Arg	Phe	Ala	Gly	Lys	Pro	Val	Ile	Glu	
					245					250					255		
	Ser	Gly	Val	Lys	Arg	Ala	Ile	Asn	Glu	Pro	Ala	Lys	Met	Ile	Asp	Glu	
				260					265					270			
	Ala	Ile	Ala	Ala	Ser	Lys	Asn	Pro	Asn	Ala	Arg	Lys	Val	Ser	Gly	Ser	
			275					280					285				
	Gly	Val	Ala	Ala	Ser	Ala	Glu	Thr	Thr	Gly	Glu	Lys	Leu	Gly	Trp	Gly	
		290					295					300					
	Lys	Arg	Ile	Gln	Gln	Ala	Val	Met	Thr	Gly	Val	Ser	Tyr	Met	Val	Pro	
	305					310					315					320	
	Phe	Val	Ala	Ala	Gly	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Gly	Phe	Ala	Phe	Gly	
					325					330					335		
	Gly	Tyr	Asp	Met	Ala	Asn	Gly	Trp	Gln	Ala	Ile	Ala	Thr	Gln	Phe	Ser	
				340					345					350			
	Leu	Thr	Asn	Leu	Pro	Gly	Asn	Thr	Val	Asp	Val	Asp	Gly	Val	Ala	Met	
			355					360					365				
	Thr	Phe	Glu	Arg	Ser	Gly	Phe	Leu	Leu	Tyr	Phe	Gly	Ala	Val	Leu	Phe	
		370					375					380					
	Ala	Thr	Gly	Gln	Ala	Ala	Met	Gly	Phe	Ile	Val	Ala	Ala	Leu	Ser	Gly	

	385		390		395		400
	Tyr Thr Ala Tyr	Ala 405	Leu Ala Gly Arg	Pro 410	Gly Ile Ala Pro	Gly Phe 415	
	Val Gly Gly Ala	Ile 420	Ser Val Thr	Ile 425	Gly Ala Gly Phe	Ile 430	Gly Gly
	Leu Val Thr	Gly 435	Ile Leu Ala	Gly 440	Leu Ile Ala Leu	Trp 445	Ile Gly Ser
	Trp Lys Val	Pro 450	Arg Val Val	Gln 455	Ser Leu Met	Pro 460	Val Val Ile Ile
	Pro Leu Leu Thr	Ser 465	Val Val Val	Gly 470	Leu Val Met	Tyr 475	Leu Leu Leu 480
	Gly Arg Pro Leu	Ala 485	Ser Ile Met	Thr 490	Gly Leu Gln Asp	Trp 495	Leu Ser
	Ser Met Ser	Gly 500	Ser Ser Ala	Ile 505	Leu Leu Gly Ile	Ile 510	Leu Gly Leu
	Met Met Cys	Phe 515	Asp Leu Gly	Gly 520	Pro Val Asn Lys	Ala 525	Ala Tyr Leu
[0028]	Phe Gly Thr Ala	Gly 530	Leu Ser Thr	Gly 535	Asp Gln Ala	Ser 540	Met Glu Ile
	Met Ala Ala Ile	Met 545	Ala Ala Gly	Met 550	Val Pro Pro	Ile 555	Ala Leu Ser 560
	Ile Ala Thr Leu	Leu 565	Arg Lys Lys	Leu 570	Phe Thr Pro	Ala 575	Glu Gln Glu
	Asn Gly Lys Ser	Ser 580	Trp Leu Leu	Gly 585	Leu Ala Phe	Val 590	Ser Glu Gly
	Ala Ile Pro Phe	Ala 595	Ala Ala Asp	Pro 600	Phe Arg Val	Ile 605	Pro Ala Met
	Met Ala Gly Gly	Ala 610	Thr Thr Gly	Ala 615	Ile Ser Met	Ala 620	Leu Gly Val
	Gly Ser Arg Ala	Pro 625	His Gly Gly	Ile 630	Phe Val Val	Trp 635	Ala Ile Glu 640
	Pro Trp Trp Gly	Trp 645	Leu Ile Ala	Leu 650	Ala Ala Gly	Thr 655	Ile Val Ser
	Thr Ile Val Val	Ile 660	Ala Leu Lys	Gln 665	Phe Trp Pro	Asn 670	Lys Ala Val
	Ala Ala Glu Val	Ala 675	Lys Gln Glu	Ala 680	Gln Gln Ala	Ala 685	Val Asn Ala

<210>	29	
<211>	1512	
<212>	DNA	
<213>	棒状杆菌	
<400>	29	
	atgaacaccc cactccagct caacactgaa aacctgcagg aaatcgcttc gacttccgga	60
	gtgcagatcc cagcggtcaa ccgcgctgac gtgcgcccg gcatgttcca cttegggtgtt	120
	ggcggattcc atcgcgctca ccaagcgatg tacctcaatg aattgatgaa tgagggaag	180
	gccttggtt ggggcatcat cggcattgggt gtcattgcctt ccgatgtgca catgcgcgat	240
	gccctggcca gccaatgata cctttatacc ctgaccataa aagctcctga tggaaactctt	300
	gatcaaaaaa tcatcggatc catcattgac tacgtgttcg ctcccaggga cccagcacgg	360
	gccgttgcaa ccctcgcgca ggactccatc cgcattgttt ccctcacggg gactgaaggc	420
	ggatacaaca tcgatccggc gacagaagat ttgaccaca ccaaccctcg aatcggtgct	480
	gaccgcgaag ccctgcaggc gggcgatact tccactttgc agaccttctt tgggttgatc	540
	actgccgcat tgatttcccg aaaagaatca ggatctacgc catttaccat catgagctgc	600
[0029]	gataacatcc aaggcaacgg cgatctggct aagcgtttct tctcgcctt cgcacattcc	660
	gtgtctttctg agctcggcga atgggtggaa aacaacgtgg ccttcccaa ctccatggtg	720
	gaccgcatca cccctgaaac caccgacggc gaccgcgatg acatcaagga aatcggtac	780
	atcgatgcgt ggccagtgtt ttctgaagat ttcaccaat gggtcctcga ggatgccttc	840
	accagggcc gccccgcgta cgaggaggtt ggctgcagg tcgtctccga cgtggagcct	900
	tatgaattaa tgaagctgca cctgctcaac gcctcccacc agggactttg ctacttcggc	960
	cacttggttg gccaccacat ggtccacgac gtcattggcg ataccgctt ccaggatttc	1020
	ctcttggtt acatggagcg cgaagccacc cctaccctca aggaacttcc aggtgtcgat	1080
	ctagatgctt atcgacgcca actcatcgcg cgattcggca acgcccagc caaagacacc	1140
	gtaccgcgcc tgtgtgcgga atcctccgac cgcattccaa agtggctgtt gccagtcgta	1200
	cgcgaaaacc tcgcagcagg ccgcgacgac acactttctg cagccatcgt cgcattcctg	1260
	gcgcgctacg cagaaggcac cgacgagcag ggcaaccaa taaagattgt tgaccgtttg	1320
	agtgagcgcg tccaagaaaa cgcattcagg aatcgacccg atattttgtc attcatccgc	1380
	gaccgtggaa tcttcggaga cttggtcgat gctgaacat tcaccaaggc atactccgag	1440

acactgtcct cccttcatga ccgtggcgcg gaagcaacca tcgatgcact tcttacgcag 1500
gtaactgtct aa 1512

<210> 30
<211> 503
<212> PRT
<213> 棒状杆菌

<400> 30
Met Asn Thr Pro Leu Gln Leu Asn Thr Glu Asn Leu Gln Glu Ile Ala
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Val Gln Ile Pro Ala Phe Asn Arg Ala Asp Val Ala
20 25 30

Pro Gly Ile Val His Phe Gly Val Gly Gly Phe His Arg Ala His Gln
35 40 45

Ala Met Tyr Leu Asn Glu Leu Met Asn Glu Gly Lys Ala Leu Asp Trp
50 55 60

Gly Ile Ile Gly Met Gly Val Met Pro Ser Asp Val Arg Met Arg Asp
65 70 75 80

[0030] Ala Leu Ala Ser Gln Asp His Leu Tyr Thr Leu Thr Thr Lys Ala Pro
85 90 95

Asp Gly Thr Leu Asp Gln Lys Ile Ile Gly Ser Ile Ile Asp Tyr Val
100 105 110

Phe Ala Pro Glu Asp Pro Ala Arg Ala Val Ala Thr Leu Ala Gln Asp
115 120 125

Ser Ile Arg Ile Val Ser Leu Thr Val Thr Glu Gly Gly Tyr Asn Ile
130 135 140

Asp Pro Ala Thr Glu Asp Phe Asp His Thr Asn Pro Arg Ile Val Ala
145 150 155 160

Asp Arg Glu Ala Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ser Thr Leu Gln Thr Phe
165 170 175

Phe Gly Leu Ile Thr Ala Ala Leu Ile Ser Arg Lys Glu Ser Gly Ser
180 185 190

Thr Pro Phe Thr Ile Met Ser Cys Asp Asn Ile Gln Gly Asn Gly Asp
195 200 205

Leu Ala Lys Arg Phe Phe Leu Ala Phe Ala His Ser Val Ser Ser Glu
210 215 220

Leu Gly Glu Trp Val Glu Asn Asn Val Ala Phe Pro Asn Ser Met Val
225 230 235 240

	Asp	Arg	Ile	Thr	Pro	Glu	Thr	Thr	Asp	Gly	Asp	Arg	Asp	Asp	Ile	Lys
					245					250					255	
	Glu	Ile	Gly	Tyr	Ile	Asp	Ala	Trp	Pro	Val	Val	Ser	Glu	Asp	Phe	Thr
				260					265					270		
	Gln	Trp	Val	Leu	Glu	Asp	Ala	Phe	Thr	Gln	Gly	Arg	Pro	Ala	Tyr	Glu
			275					280					285			
	Glu	Val	Gly	Val	Gln	Val	Val	Ser	Asp	Val	Glu	Pro	Tyr	Glu	Leu	Met
		290					295					300				
	Lys	Leu	Arg	Leu	Leu	Asn	Ala	Ser	His	Gln	Gly	Leu	Cys	Tyr	Phe	Gly
	305					310					315					320
	His	Leu	Ala	Gly	His	His	Met	Val	His	Asp	Val	Met	Ala	Asp	Thr	Arg
				325						330					335	
	Phe	Gln	Asp	Phe	Leu	Leu	Ala	Tyr	Met	Glu	Arg	Glu	Ala	Thr	Pro	Thr
				340					345						350	
	Leu	Lys	Glu	Leu	Pro	Gly	Val	Asp	Leu	Asp	Ala	Tyr	Arg	Arg	Gln	Leu
			355					360					365			
	Ile	Ala	Arg	Phe	Gly	Asn	Ala	Ala	Val	Lys	Asp	Thr	Val	Pro	Arg	Leu
		370					375					380				
[0031]	Cys	Ala	Glu	Ser	Ser	Asp	Arg	Ile	Pro	Lys	Trp	Leu	Leu	Pro	Val	Val
	385					390					395					400
	Arg	Glu	Asn	Leu	Ala	Ala	Gly	Arg	Asp	Val	Thr	Leu	Ser	Ala	Ala	Ile
				405						410					415	
	Val	Ala	Ser	Trp	Ala	Arg	Tyr	Ala	Glu	Gly	Thr	Asp	Glu	Gln	Gly	Asn
			420						425					430		
	Pro	Ile	Lys	Ile	Val	Asp	Arg	Leu	Ser	Glu	Arg	Val	Gln	Glu	Asn	Ala
			435					440					445			
	Ser	Gly	Asn	Arg	Thr	Asp	Ile	Leu	Ser	Phe	Ile	Arg	Asp	Arg	Gly	Ile
		450					455					460				
	Phe	Gly	Asp	Leu	Val	Asp	Ala	Glu	Pro	Phe	Thr	Lys	Ala	Tyr	Ser	Glu
	465					470					475					480
	Thr	Leu	Ser	Ser	Leu	His	Asp	Arg	Gly	Ala	Glu	Ala	Thr	Ile	Asp	Ala
					485					490					495	
	Leu	Leu	Thr	Gln	Val	Thr	Val									
				500												
<210>	31															
<211>	53															
<212>	DNA															

	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	31	
		gcaggtacca ggaggtata aatatgaaac acggcatcta ttattcttac tgg	53
	<210>	32	
	<211>	32	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	32	
		gctggatcct tagccaccaa gaacgaagcg gg	32
	<210>	33	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
[0032]	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	33	
		ccacggaact ttcggctgtt ttg	23
	<210>	34	
	<211>	22	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	34	
		cttcgtagg tgccacaata tc	22
	<210>	35	
	<211>	44	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	

	<400> 35 cgaggatcca ggaggtaata atatgaaaaa taaattcgga gttg	44
	<210> 36 <211> 28 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物	
	<400> 36 gtctagatta tatctcagca gcgatggc	28
	<210> 37 <211> 53 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物	
[0033]	<400> 37 cggtagcagg aggtaataat atgaaatatg gtatttattt tgcttattgg acg	53
	<210> 38 <211> 32 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物	
	<400> 38 ctctagatta gataccaaac acatgcctgc ag	32
	<210> 39 <211> 24 <212> DNA <213> 人工序列	
	<220> <223> 引物	
	<400> 39 cggactatct gaacgaactg acgg	24

	<210>	40	
	<211>	23	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	40	
		ctccataagc atcctcctca tcc	23
	<210>	41	
	<211>	45	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	41	
		cgaggatcca ggaggtaata atatgaaaca tggatatctat tatgc	45
[0034]	<210>	42	
	<211>	27	
	<212>	DNA	
	<213>	人工序列	
	<220>		
	<223>	引物	
	<400>	42	
		gtctagatta cttccactcc agcatat	27
	<210>	43	
	<211>	338	
	<212>	PRT	
	<213>	假肠膜明串珠菌 ATCC 12291	
	<400>	43	
		Met Glu Ala Leu Val Leu Thr Gly Thr Lys Lys Leu Glu Val Glu Asn	
		1 5 10 15	
		Ile Glu Gln Pro Glu Val Lys Pro Asn Glu Val Leu Ile His Thr Ala	
		20 25 30	
		Phe Ala Gly Ile Cys Gly Thr Asp His Ala Leu Tyr Ala Gly Leu Pro	
		35 40 45	

	Gly	Ser	Ala	Asp	Ala	Val	Pro	Pro	Ile	Val	Leu	Gly	His	Glu	Asn	Ser	
	50						55					60					
	Gly	Val	Val	Ala	Glu	Ile	Gly	Ser	Asp	Val	Thr	Asn	Val	Ala	Val	Gly	
	65					70					75					80	
	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Asp	Pro	Asn	Ile	Tyr	Cys	Gly	Gln	Cys	Lys	Tyr	
					85					90					95		
	Cys	Arg	Thr	Ala	Arg	Pro	Glu	Leu	Cys	Glu	Asn	Leu	Ser	Ala	Val	Gly	
				100					105					110			
	Val	Thr	Arg	Asn	Gly	Gly	Phe	Glu	Glu	Tyr	Phe	Thr	Ala	Pro	Ala	Ser	
			115					120					125				
	Val	Val	Tyr	Gln	Ile	Pro	Asp	Asn	Val	Ser	Leu	Lys	Ser	Ala	Ala	Val	
		130					135					140					
	Val	Glu	Pro	Ile	Ser	Cys	Ala	Val	His	Gly	Ile	Gln	Leu	Leu	Lys	Val	
	145					150					155					160	
	Thr	Pro	Tyr	Gln	Lys	Ala	Leu	Val	Ile	Gly	Asp	Gly	Phe	Met	Gly	Glu	
					165					170					175		
	Leu	Phe	Val	Gln	Ile	Leu	Gln	Ala	Tyr	Gly	Ile	His	Gln	Val	Asp	Leu	
				180					185					190			
[0035]	Ala	Gly	Ile	Val	Pro	Glu	Lys	Leu	Ala	Met	Asn	Lys	Glu	Lys	Phe	Gly	
			195					200					205				
	Val	Lys	Asn	Thr	Tyr	Asn	Thr	Lys	Asp	Gly	Asp	Lys	Ile	Pro	Glu	Gly	
		210					215					220					
	Thr	Tyr	Asp	Val	Val	Val	Glu	Ala	Val	Gly	Leu	Pro	Gln	Thr	Gln	Glu	
	225					230					235					240	
	Ala	Ala	Ile	Glu	Ala	Ser	Ala	Arg	Gly	Ala	Gln	Val	Leu	Met	Phe	Gly	
					245					250					255		
	Val	Gly	Gly	Pro	Asp	Ala	Lys	Phe	Gln	Met	Asn	Thr	Tyr	Glu	Val	Phe	
				260					265					270			
	Gln	Lys	Gln	Leu	Thr	Ile	Gln	Gly	Ser	Phe	Ile	Asn	Pro	Asn	Ala	Phe	
			275					280					285				
	Glu	Asp	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Ser	Ser	Gly	Lys	Leu	Asp	Val	Glu	Ser	
		290					295					300					
	Leu	Met	Ser	His	Glu	Leu	Asp	Tyr	Gln	Thr	Val	Asp	Asp	Phe	Val	Asn	
	305					310					315					320	
	Gly	Lys	Leu	Gly	Val	Val	Ser	Lys	Ala	Val	Val	Lys	Val	Gly	Gly	Glu	
					325					330					335		
	Glu	Ala															

<210> 44
 <211> 338
 <212> PRT
 <213> 肠膜明串珠菌

 <400> 44
 Met Glu Ala Leu Val Leu Thr Gly Thr Lys Lys Leu Glu Val Lys Asp
 1 5 10 15
 Ile Asp Arg Pro Lys Val Leu Pro Asn Glu Val Leu Ile His Thr Ala
 20 25 30
 Phe Ala Gly Ile Cys Gly Thr Asp His Ala Leu Tyr Ala Gly Leu Pro
 35 40 45
 Gly Ser Ala Asp Ala Val Pro Pro Ile Val Leu Gly His Glu Asn Ser
 50 55 60
 Gly Val Val Ala Glu Val Gly Ser Ala Val Thr Asn Val Lys Val Gly
 65 70 75 80
 Asp Arg Val Thr Val Asp Pro Asn Ile Tyr Cys Gly Gln Cys Lys Tyr
 85 90 95
 Cys Arg Thr Ala Arg Pro Glu Leu Cys Glu Asn Leu Ser Ala Val Gly
 100 105 110
 Val Thr Arg Asp Gly Gly Phe Glu Glu Phe Phe Thr Ala Pro Ala Ser
 115 120 125
 Val Val Tyr Pro Ile Pro Asp Asn Val Ser Leu Lys Ser Ala Ala Val
 130 135 140
 Val Glu Pro Ile Ser Cys Ala Val His Gly Ile Gln Leu Leu Lys Val
 145 150 155 160
 Thr Pro Tyr Gln Lys Ala Leu Val Ile Gly Asp Gly Phe Met Gly Glu
 165 170 175
 Leu Phe Val Gln Ile Leu Gln Ala Tyr Gly Ile His Gln Val Asp Leu
 180 185 190
 Ala Gly Ile Val Asp Glu Lys Leu Ala Met Asn Lys Glu Lys Phe Gly
 195 200 205
 Val Lys Asn Thr Tyr Asn Thr Met Lys Gly Asp Lys Ile Pro Glu Gly
 210 215 220
 Lys Tyr Asp Val Ile Ile Glu Ala Val Gly Leu Pro Gln Thr Gln Glu
 225 230 235 240
 Ala Ala Ile Glu Ala Ser Ala Arg Gly Ala Gln Val Leu Met Phe Gly
 245 250 255

[0036]

Val Gly Gly Pro Asp Ala Lys Phe Gln Met Asn Thr Tyr Glu Val Phe
260 265 270

Gln Lys Gln Leu Thr Ile Gln Gly Ser Phe Ile Asn Pro Asn Ala Phe
275 280 285

Glu Asp Ser Leu Ala Leu Leu Ser Ser Gly Lys Leu Asn Val Glu Ala
290 295 300

Leu Met Ser His Glu Leu Asp Tyr Lys Thr Val Asp Asp Phe Val Asn
305 310 315 320

Gly Lys Leu Gly Val Val Ser Lys Ala Val Val Lys Val Gly Gly Glu
325 330 335

Glu Ala

<210> 45
 <211> 477
 <212> PRT
 <213> 类球红细菌

<400> 45
 Met Thr Arg Ser Val Thr Arg Pro Ser Tyr Asp Arg Lys Ala Leu Thr
1 5 10 15

[0037]

Pro Gly Ile Val His Ile Gly Val Gly Asn Phe His Arg Ala His Gln
20 25 30

Ala Val Tyr Leu Asp Asp Leu Phe Ala Leu Gly Glu Gly His Asp Trp
35 40 45

Ala Ile Leu Gly Ala Gly Val Arg Pro Thr Asp Ala Arg Met Arg Glu
50 55 60

Ala Leu Ala Ala Gln Asp Asn Leu Ser Thr Val Ile Glu Leu Asp Pro
65 70 75 80

Ala Gly His Arg Ala Arg Gln Val Gly Ala Met Val Gly Phe Leu Pro
85 90 95

Val Glu Ala Asp Asn Ala Ala Leu Ile Glu Ala Met Ser Asp Pro Arg
100 105 110

Ile Arg Ile Val Ser Leu Thr Val Thr Glu Gly Gly Tyr Tyr Val Asp
115 120 125

Ala Ser Gly Ala Phe Asp Pro Thr His Pro Asp Ile Val Ala Asp Ala
130 135 140

Ala His Pro Ala Arg Pro Ala Thr Ala Phe Gly Ala Ile Leu Ala Ala
145 150 155 160

Leu Arg Ala Arg Arg Asp Ala Gly Val Thr Pro Phe Thr Val Met Ser

	165	170	175
	Cys Asp Asn Leu Pro Gly Asn Gly His Val Thr Arg Asn Ala Val Val 180 185 190		
	Gly Leu Ala Glu Leu Tyr Asp Ala Glu Leu Ala Gly Trp Val Lys Ala 195 200 205		
	Gln Val Ala Phe Pro Asn Gly Met Val Asp Arg Ile Thr Pro Ala Thr 210 215 220		
	Gly Pro His Glu Arg Glu Leu Ala Gln Gly Phe Gly Leu Ala Asp Pro 225 230 235 240		
	Val Pro Val Thr Cys Glu Pro Phe Arg Gln Trp Val Ile Glu Asp His 245 250 255		
	Phe Pro Ala Gly Arg Pro Ala Leu Glu Lys Val Gly Val Thr Phe Thr 260 265 270		
	Pro His Val His Ala Tyr Glu Ala Met Lys Ile Arg Ile Leu Asn Gly 275 280 285		
	Gly His Ala Val Ile Ala Tyr Pro Ser Ala Leu Met Asp Ile Gln Leu 290 295 300		
[0038]	Val His Ala Ala Met Ala His Pro Leu Ile Ala Ala Phe Leu His Lys 305 310 315 320		
	Val Glu Val Glu Glu Ile Leu Pro His Val Pro Pro Val Pro Asp Thr 325 330 335		
	Ser Ile Pro Asp Tyr Leu Thr Leu Ile Glu Ser Arg Phe Ser Asn Pro 340 345 350		
	Glu Ile Ala Asp Thr Thr Arg Arg Leu Cys Leu Asp Gly Ser Asn Arg 355 360 365		
	Gln Pro Lys Phe Ile Val Pro Ser Leu Arg Asp Asn Leu Ala Ala Gly 370 375 380		
	Thr Val Pro Lys Gly Leu Val Leu Leu Ser Ala Leu Trp Cys Arg Tyr 385 390 395 400		
	Cys Phe Gly Thr Thr Asp Ser Gly Val Val Val Glu Pro Asn Asp Pro 405 410 415		
	Asn Trp Thr Ala Leu Gln Asp Arg Ala Arg Arg Ala Lys Glu Thr Pro 420 425 430		
	Ala Glu Trp Leu Ala Met Thr Glu Val Tyr Gly Asp Leu Ala Gln Asn 435 440 445		
	Asp Leu Leu Ala Ala Glu Phe Ala Ala Ala Leu Glu Ala Val Trp Arg 450 455 460		

Asp Gly Ala Glu Ala Val Leu Arg Arg Phe Leu Ala Ala
465 470 475

<210> 46
<211> 493
<212> PRT
<213> 荧光假单胞菌 DSM 50106

<400> 46
Met Lys Leu Asn Lys Gln Asn Leu Thr Gln Leu Ala Pro Glu Val Lys
1 5 10 15

Leu Pro Ala Tyr Thr Leu Ala Asp Thr Arg Gln Gly Ile Ala His Ile
20 25 30

Gly Val Gly Gly Phe His Arg Ala His Gln Ala Tyr Tyr Thr Asp Ala
35 40 45

Leu Met Asn Thr Gly Glu Gly Leu Asp Trp Ser Ile Cys Gly Val Gly
50 55 60

Leu Arg Ser Glu Asp Arg Lys Ala Arg Asp Asp Leu Ala Gly Gln Asp
65 70 75 80

Tyr Leu Phe Thr Leu Tyr Glu Leu Gly Asp Thr Asp Asp Thr Glu Val
85 90 95

[0039]

Arg Val Ile Gly Ser Ile Ser Asp Met Leu Leu Ala Glu Asp Ser Ala
100 105 110

Gln Ala Leu Ile Asp Lys Leu Ala Ser Pro Glu Ile Arg Ile Val Ser
115 120 125

Leu Thr Ile Thr Glu Gly Gly Tyr Cys Ile Asp Asp Ser Asn Gly Glu
130 135 140

Phe Met Ala His Leu Pro Gln Ile Gln His Asp Leu Ala His Pro Ser
145 150 155 160

Ser Pro Lys Thr Val Phe Gly Phe Ile Cys Ala Ala Leu Thr Gln Arg
165 170 175

Arg Ala Ala Gly Ile Pro Ala Phe Thr Val Met Ser Cys Asp Asn Leu
180 185 190

Pro His Asn Gly Ala Val Thr Arg Lys Ala Leu Leu Ala Phe Ala Ala
195 200 205

Leu His Asn Ala Glu Leu His Asp Trp Ile Lys Ala His Val Ser Phe
210 215 220

Pro Asn Ala Met Val Asp Arg Ile Thr Pro Met Thr Ser Thr Ala His
225 230 235 240

Arg Leu Gln Leu His Asp Glu His Gly Ile Asp Asp Ala Trp Pro Val

	245	250	255
	Val Cys Glu Pro Phe Val Gln Trp	Val Leu Glu Asp Lys Phe Val Asn	
	260	265	270
	Gly Arg Pro Ala Trp Glu Lys Val Gly Val Gln Phe Thr Asp Asp Val		
	275	280	285
	Thr Pro Tyr Glu Glu Met Lys Ile Gly Leu Leu Asn Gly Ser His Leu		
	290	295	300
	Ala Leu Thr Tyr Leu Gly Phe Leu Lys Gly Tyr Arg Phe Val His Glu		
	305	310	315
	Thr Met Asn Asp Pro Leu Phe Val Ala Tyr Met Arg Ala Tyr Met Asp		
	325	330	335
	Leu Asp Val Thr Pro Asn Leu Ala Pro Val Pro Gly Ile Asp Leu Thr		
	340	345	350
	Asp Tyr Lys Gln Thr Leu Val Asp Arg Phe Ser Asn Gln Ala Ile Ala		
	355	360	365
	Asp Gln Leu Glu Arg Val Cys Ser Asp Gly Ser Ser Lys Phe Pro Lys		
	370	375	380
[0040]	Phe Thr Val Pro Thr Ile Asn Arg Leu Ile Ala Asp Gly Arg Glu Thr		
	385	390	395
	Glu Arg Ala Ala Leu Val Val Ala Ala Trp Ala Leu Tyr Leu Lys Gly		
	405	410	415
	Val Asp Glu Asn Gly Val Ser Tyr Thr Ile Pro Asp Pro Arg Ala Glu		
	420	425	430
	Phe Cys Gln Gly Leu Val Ser Asp Asp Ala Leu Ile Ser Gln Arg Leu		
	435	440	445
	Leu Ala Val Glu Glu Ile Phe Gly Thr Ala Ile Pro Asn Ser Pro Glu		
	450	455	460
	Phe Val Ala Ala Phe Glu Arg Cys Tyr Gly Ser Leu Arg Asp Asn Gly		
	465	470	475
	Val Thr Thr Thr Leu Lys His Leu Leu Lys Lys Pro Val		
	485	490	
<210>	47		
<211>	45		
<212>	DNA		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	正向引物		

<400> 47
 gcggtaccag gaggaggtag atatggaagc acttgtgtta actgg

<210> 48
 <211> 31
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反向引物

<400> 48
 gctggatect tatgcctctt cgccaccaac c

<210> 49
 <211> 401
 <212> PRT
 <213> 母牛分枝杆菌菌苗 N10

<400> 49
 Met Ala Lys Val Leu Cys Val Leu Tyr Asp Asp Pro Val Asp Gly Tyr
 1 5 10 15
 Pro Lys Thr Tyr Ala Arg Asp Asp Leu Pro Lys Ile Asp His Tyr Pro
 20 25 30
 Gly Gly Gln Ile Leu Pro Thr Pro Lys Ala Ile Asp Phe Thr Pro Gly
 35 40 45
 Gln Leu Leu Gly Ser Val Ser Gly Glu Leu Gly Leu Arg Glu Tyr Leu
 50 55 60
 Glu Ser Asn Gly His Thr Leu Val Val Thr Ser Asp Lys Asp Gly Pro
 65 70 75 80
 Asp Ser Val Phe Glu Arg Glu Leu Val Asp Ala Asp Val Val Ile Ser
 85 90 95
 Gln Pro Phe Trp Pro Ala Tyr Leu Thr Pro Glu Arg Ile Ala Lys Ala
 100 105 110
 Lys Asn Leu Lys Leu Ala Leu Thr Ala Gly Ile Gly Ser Asp His Val
 115 120 125
 Asp Leu Gln Ser Ala Ile Asp Arg Asn Val Thr Val Ala Glu Val Thr
 130 135 140
 Tyr Cys Asn Ser Ile Ser Val Ala Glu His Val Val Met Met Ile Leu
 145 150 155 160
 Ser Leu Val Arg Asn Tyr Leu Pro Ser His Glu Trp Ala Arg Lys Gly
 165 170 175

Gly Trp Asn Ile Ala Asp Cys Val Ser His Ala Tyr Asp Leu Glu Ala
 180 185 190
 Met His Val Gly Thr Val Ala Ala Gly Arg Ile Gly Leu Ala Val Leu
 195 200 205
 Arg Arg Leu Ala Pro Phe Asp Val His Leu His Tyr Thr Asp Arg His
 210 215 220
 Arg Leu Pro Glu Ser Val Glu Lys Glu Leu Asn Leu Thr Trp His Ala
 225 230 235 240
 Thr Arg Glu Asp Met Tyr Pro Val Cys Asp Val Val Thr Leu Asn Cys
 245 250 255
 Pro Leu His Pro Glu Thr Glu His Met Ile Asn Asp Glu Thr Leu Lys
 260 265 270
 Leu Phe Lys Arg Gly Ala Tyr Ile Val Asn Thr Ala Arg Gly Lys Leu
 275 280 285
 Cys Asp Arg Asp Ala Val Ala Arg Ala Leu Glu Ser Gly Arg Leu Ala
 290 295 300
 Gly Tyr Ala Gly Asp Val Trp Phe Pro Gln Pro Ala Pro Lys Asp His
 305 310 315 320
 [0042] Pro Trp Arg Thr Met Pro Tyr Asn Gly Met Thr Pro His Ile Ser Gly
 325 330 335
 Thr Thr Leu Thr Ala Gln Ala Arg Tyr Ala Ala Gly Thr Arg Glu Ile
 340 345 350
 Leu Glu Cys Phe Phe Glu Gly Arg Pro Ile Arg Asp Glu Tyr Leu Ile
 355 360 365
 Val Gln Gly Gly Ala Leu Ala Gly Thr Gly Ala His Ser Tyr Ser Lys
 370 375 380
 Gly Asn Ala Thr Gly Gly Ser Glu Glu Ala Ala Lys Phe Lys Lys Ala
 385 390 395 400
 Val

<210> 50
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> 运动发酵单胞菌亚种菌 ZM4

<400> 50
 Met Ser Ser Glu Ser Ser Gln Gly Leu Val Thr Arg Leu Ala Leu Ile
 1 5 10 15

	Ala	Ala	Ile	Gly	Gly	Leu	Leu	Phe	Gly	Tyr	Asp	Ser	Ala	Val	Ile	Ala	
				20					25					30			
	Ala	Ile	Gly	Thr	Pro	Val	Asp	Ile	His	Phe	Ile	Ala	Pro	Arg	His	Leu	
			35					40					45				
	Ser	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Ser	Leu	Ser	Gly	Met	Val	Val	Val	Ala	Val	
		50					55					60					
	Leu	Val	Gly	Cys	Val	Thr	Gly	Ser	Leu	Leu	Ser	Gly	Trp	Ile	Gly	Ile	
		65				70					75					80	
	Arg	Phe	Gly	Arg	Arg	Gly	Gly	Leu	Leu	Met	Ser	Ser	Ile	Cys	Phe	Val	
					85					90					95		
	Ala	Ala	Gly	Phe	Gly	Ala	Ala	Leu	Thr	Glu	Lys	Leu	Phe	Gly	Thr	Gly	
				100					105					110			
	Gly	Ser	Ala	Leu	Gln	Ile	Phe	Cys	Phe	Phe	Arg	Phe	Leu	Ala	Gly	Leu	
			115					120					125				
	Gly	Ile	Gly	Val	Val	Ser	Thr	Leu	Thr	Pro	Thr	Tyr	Ile	Ala	Glu	Ile	
			130				135					140					
	Arg	Pro	Pro	Asp	Lys	Arg	Gly	Gln	Met	Val	Ser	Gly	Gln	Gln	Met	Ala	
		145				150					155					160	
[0043]	Ile	Val	Thr	Gly	Ala	Leu	Thr	Gly	Tyr	Ile	Phe	Thr	Trp	Leu	Leu	Ala	
					165					170					175		
	His	Phe	Gly	Ser	Ile	Asp	Trp	Val	Asn	Ala	Ser	Gly	Trp	Cys	Trp	Ser	
				180					185					190			
	Pro	Ala	Ser	Glu	Gly	Leu	Ile	Gly	Ile	Ala	Phe	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	
			195					200					205				
	Thr	Ala	Pro	Asp	Thr	Pro	His	Trp	Leu	Val	Met	Lys	Gly	Arg	His	Ser	
			210				215					220					
	Glu	Ala	Ser	Lys	Ile	Leu	Ala	Arg	Leu	Glu	Pro	Gln	Ala	Asp	Pro	Asn	
		225				230					235					240	
	Leu	Thr	Ile	Gln	Lys	Ile	Lys	Ala	Gly	Phe	Asp	Lys	Ala	Met	Asp	Lys	
				245						250					255		
	Ser	Ser	Ala	Gly	Leu	Phe	Ala	Phe	Gly	Ile	Thr	Val	Val	Phe	Ala	Gly	
				260					265					270			
	Val	Ser	Val	Ala	Ala	Phe	Gln	Gln	Leu	Val	Gly	Ile	Asn	Ala	Val	Leu	
			275					280					285				
	Tyr	Tyr	Ala	Pro	Gln	Met	Phe	Gln	Asn	Leu	Gly	Phe	Gly	Ala	Asp	Thr	
		290					295					300					
	Ala	Leu	Leu	Gln	Thr	Ile	Ser	Ile	Gly	Val	Val	Asn	Phe	Ile	Phe	Thr	
		305				310					315					320	

	Met	Ile	Ala	Ser	Arg	Val	Val	Asp	Arg	Phe	Gly	Arg	Lys	Pro	Leu	Leu	
					325					330					335		
	Ile	Trp	Gly	Ala	Leu	Gly	Met	Ala	Ala	Met	Met	Ala	Val	Leu	Gly	Cys	
				340					345					350			
	Cys	Phe	Trp	Phe	Lys	Val	Gly	Gly	Val	Leu	Pro	Leu	Ala	Ser	Val	Leu	
			355					360					365				
	Leu	Tyr	Ile	Ala	Val	Phe	Gly	Met	Ser	Trp	Gly	Pro	Val	Cys	Trp	Val	
		370					375					380					
	Val	Leu	Ser	Glu	Met	Phe	Pro	Ser	Ser	Ile	Lys	Gly	Ala	Ala	Met	Pro	
	385					390					395					400	
	Ile	Ala	Val	Thr	Gly	Gln	Trp	Leu	Ala	Asn	Ile	Leu	Val	Asn	Phe	Leu	
					405					410					415		
	Phe	Lys	Val	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro	Ala	Leu	Asn	Gln	Thr	Phe	Asn	His	
				420					425					430			
	Gly	Phe	Ser	Tyr	Leu	Val	Phe	Ala	Ala	Leu	Ser	Ile	Leu	Gly	Gly	Leu	
			435					440					445				
	Ile	Val	Ala	Arg	Phe	Val	Pro	Glu	Thr	Lys	Gly	Arg	Ser	Leu	Asp	Glu	
		450					455					460					
[0044]	Ile	Glu	Glu	Met	Trp	Arg	Ser	Gln	Lys								
	465					470											

<210> 51
 <211> 45
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 正向引物

<400> 51
 cgaggatcca ggaggtaata atatgagttc tgaaagtagt caggg

45

<210> 52
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 反向引物

<400> 52
 gtctagatta cttctgggag cgccacatc

29

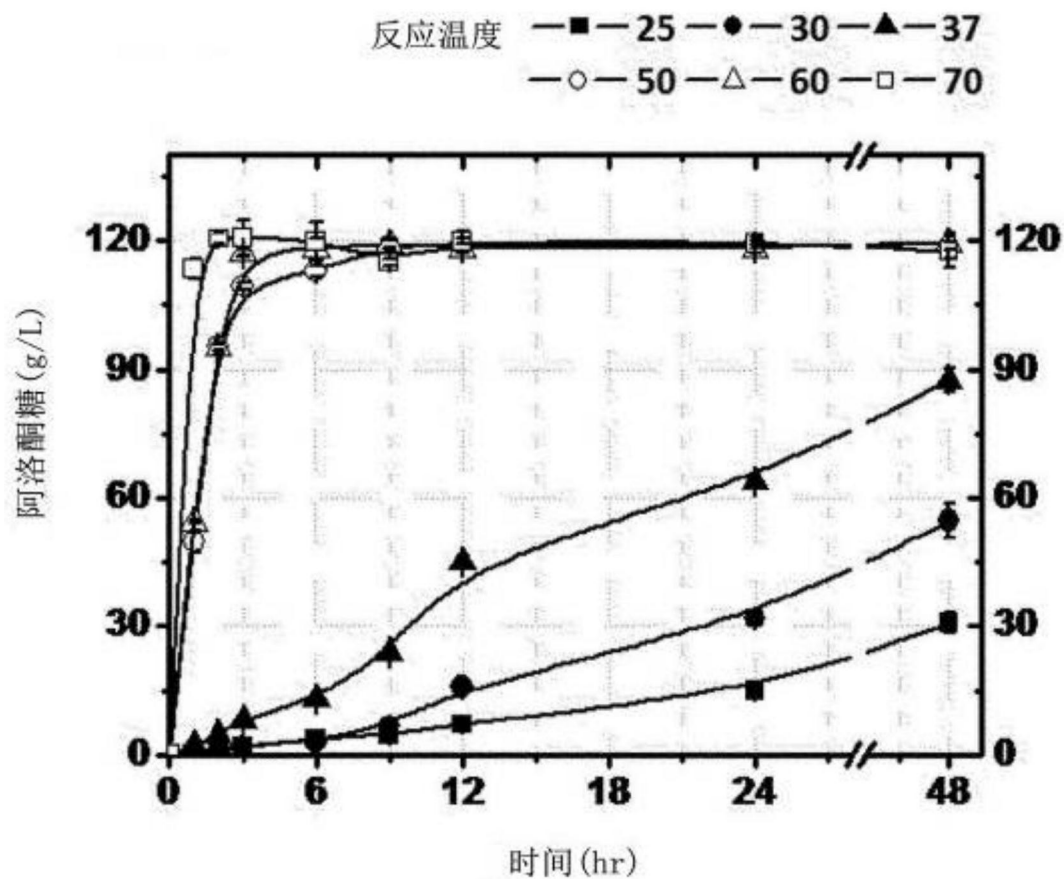


图1

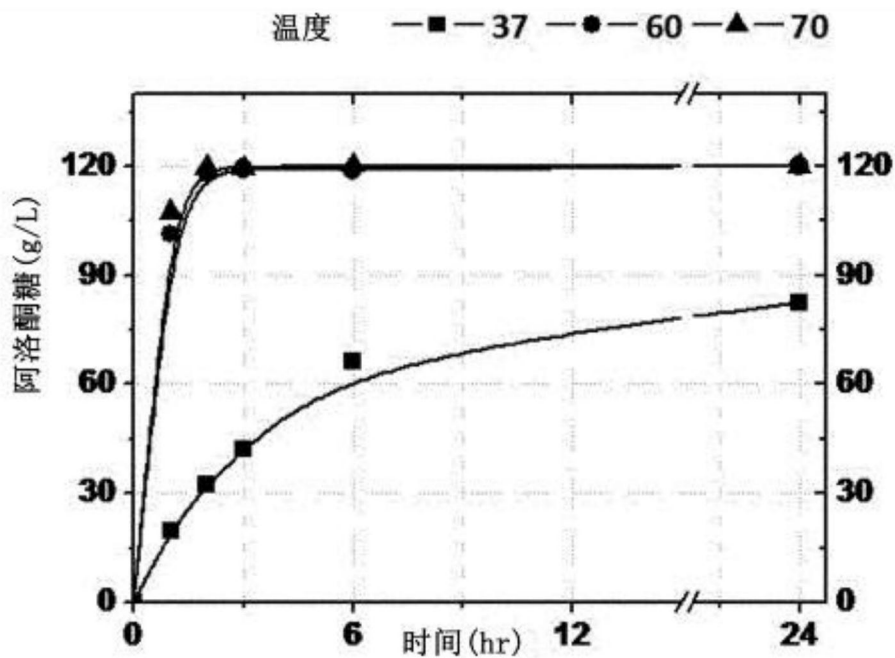


图2

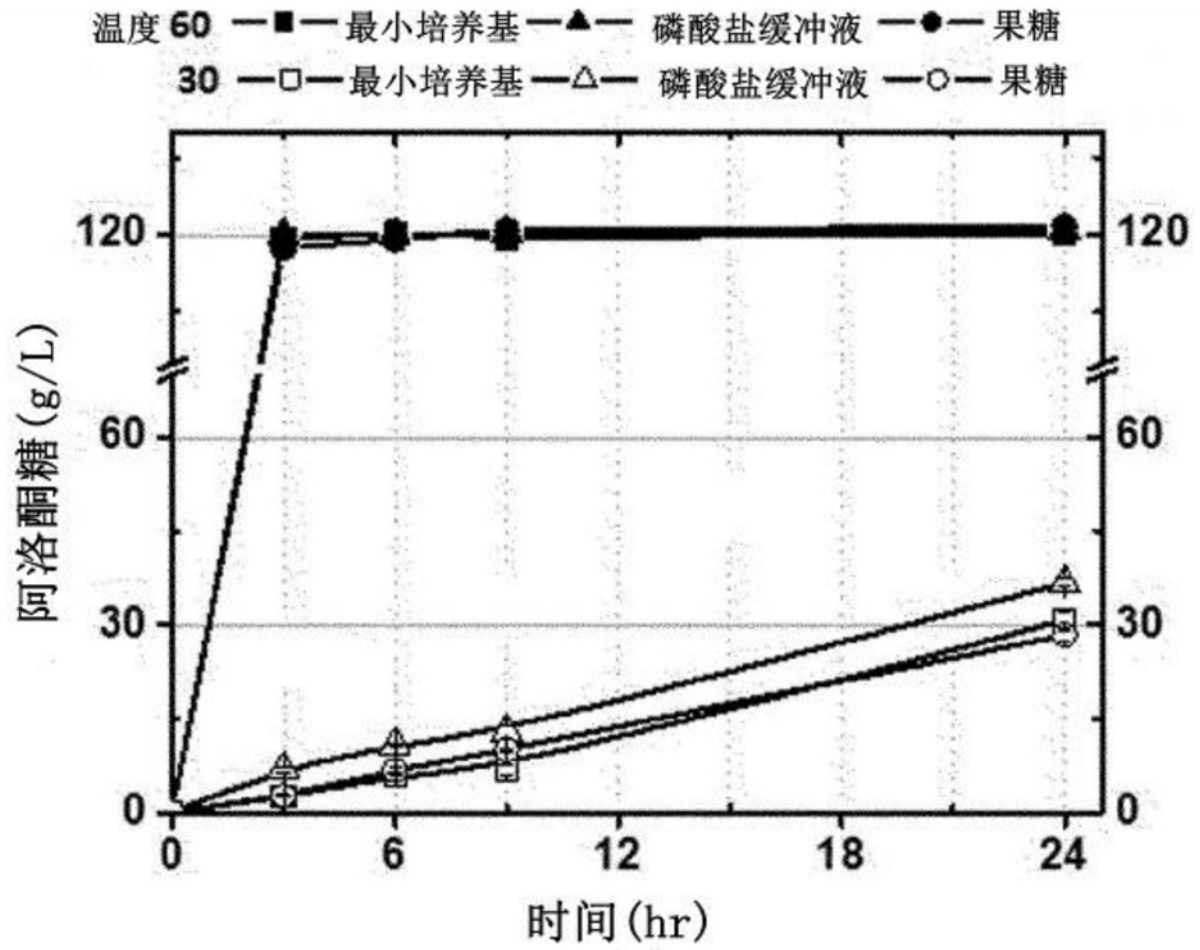


图3

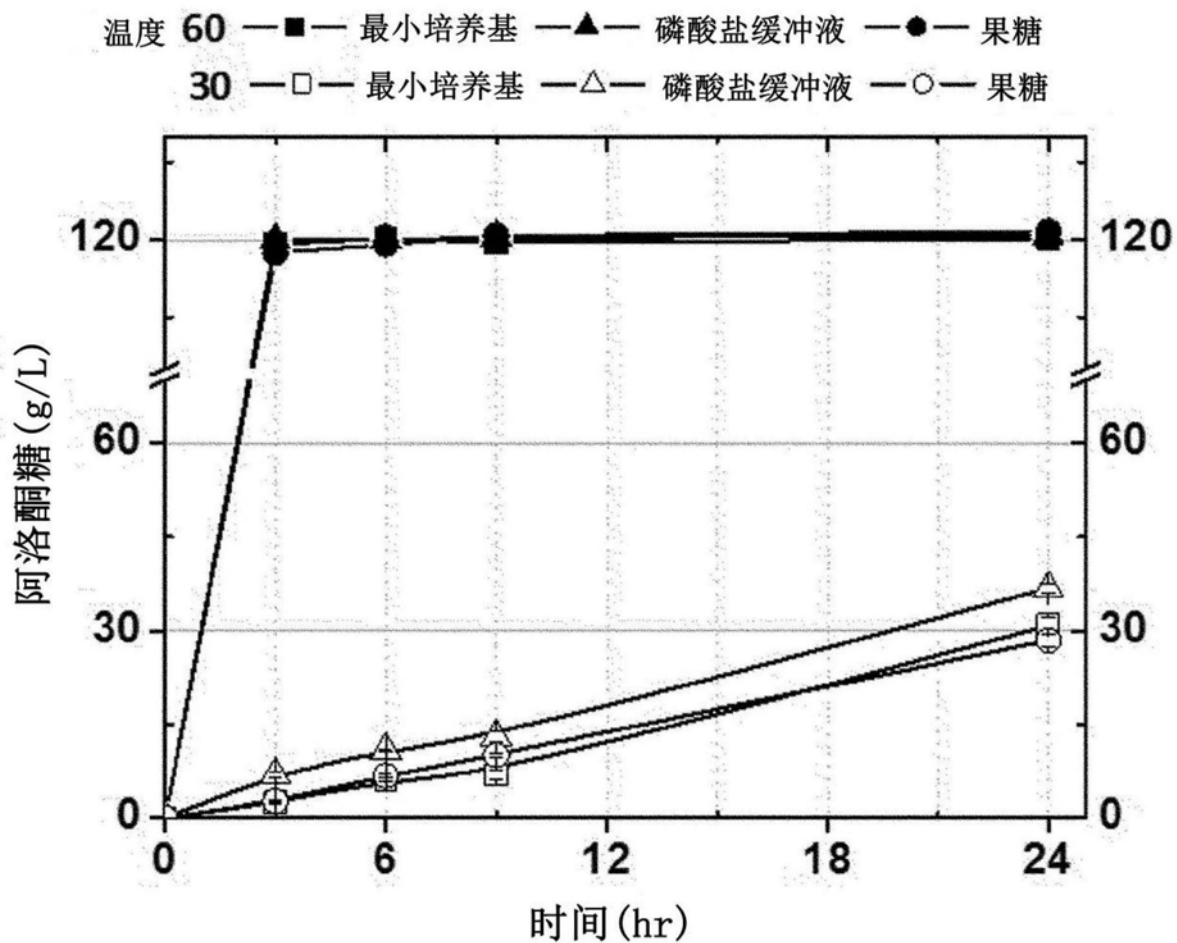


图4

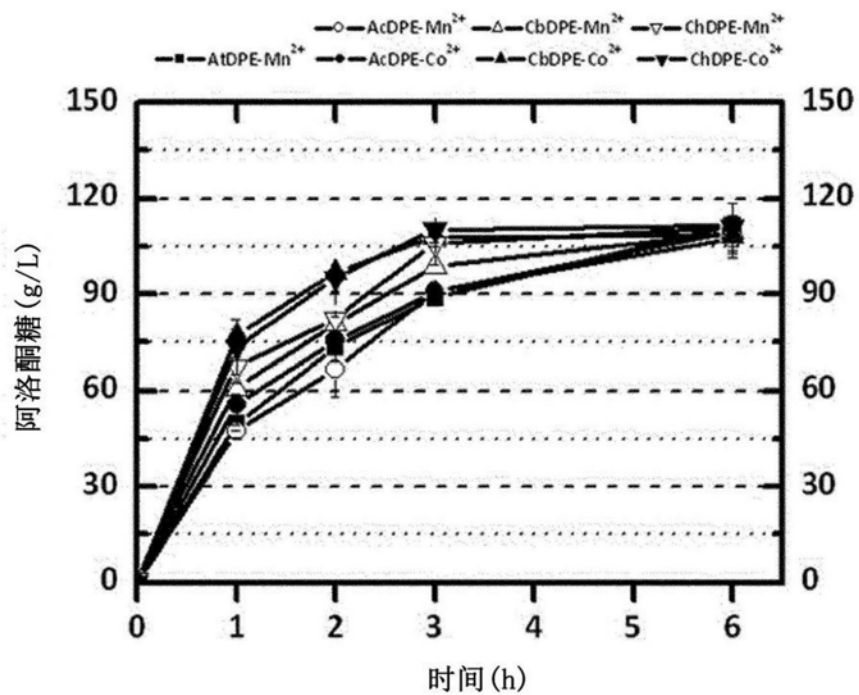


图5

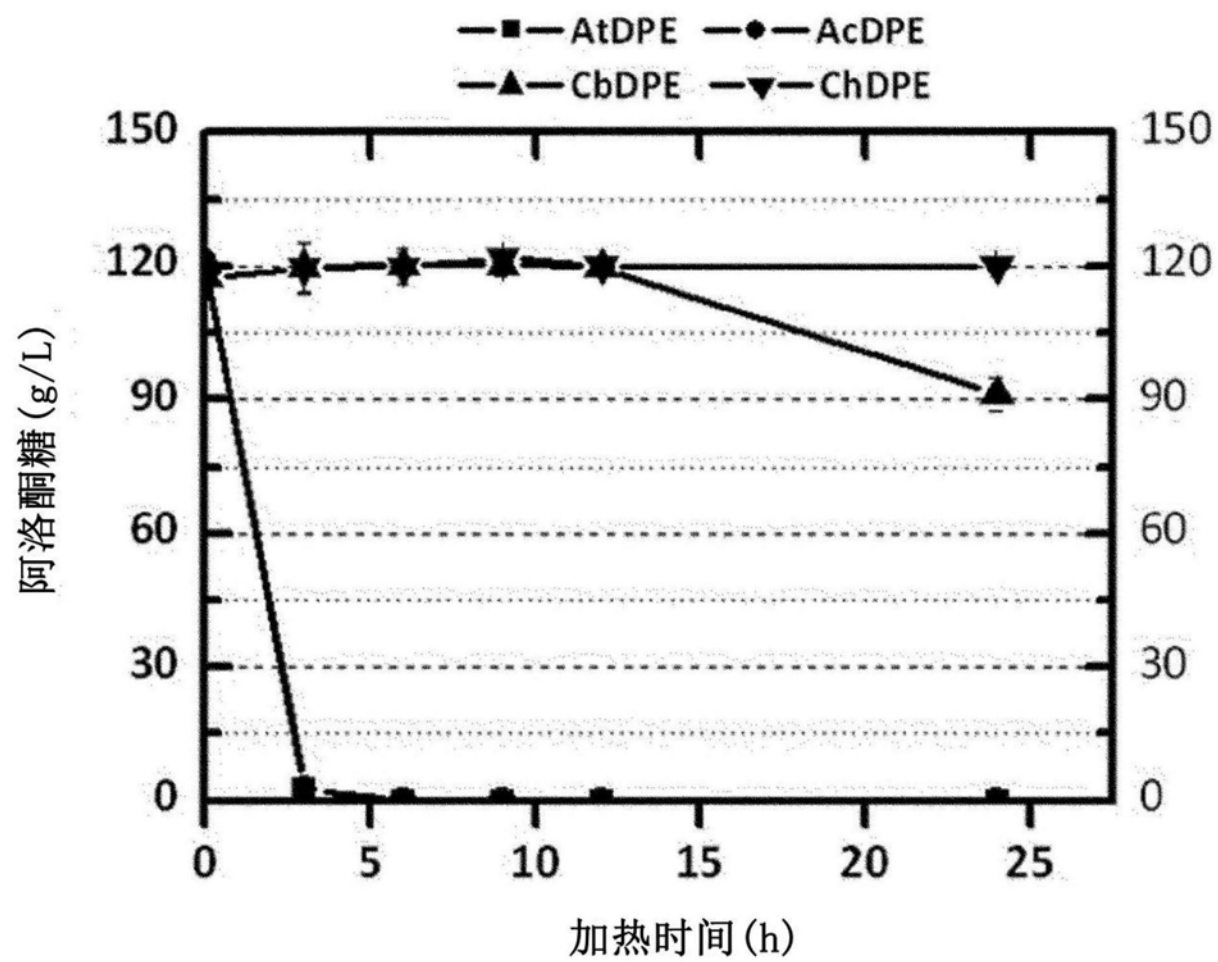


图6

		1	I33L	50
AtDPE	(1)	--MKHGIYYSYWEHEWSAKFGPYIEKVAKLGFDIIEVAHHINEY--SDA		
AcDPE	(1)	MKNKFGVDSFIWTESFSKKDLWIIPKAKELGFEVIDFAISNPFTFP----		
CbDPE	(1)	--MKYGIYFAYWTKWFADYKKYMDKVSALGFDVLEISCAALRDVYTTKE		
ChDPE	(1)	--MKHGIYYAYWEQEWAAADYKRYVEKVAKLGFIDILEIGAGPLPEY--AEQ		
共有序列	(1)	MKHGIYYAYWT EWSAKYKKYIEKVAKLGFIDIEIAAA L EY SD		
		51		100
AtDPE	(47)	ELATIRKSAKDNGIILTAGIGPSKTKNLSSEDA AVRAAGKAFFERTLSNV		
AcDPE	(47)	-VEKVKAELERVGIDCVCTTTLT PETNPISPDAEIRAAGVKAMKKCVDIC		
CbDPE	(49)	QLIELREYAKEKGLVLTAGYGPTKAENLCSDEAVRRAMTFFKDLLPKL		
ChDPE	(47)	DVKELKKCAQDNGITLTAGYGPTFNHNIGSSDAGVREEALEWYKRLFEVL		
共有序列	(51)	DL ELKK AKDNGIILTAGYGPTK NL SEDA EVRAAAL FFKRLLDIL		
		101		150
AtDPE	(97)	AKLDIHTIGGALHSYWPIDYSQPVDKAGDYARGVEGINGIADFANDL-GI		
AcDPE	(96)	NELGAPILGGVNYAGWGYLTKK-PRTEEEWNWGVECMREVAEYAKQTGDV		
CbDPE	(99)	QLMDIHLGGGLYSYWPVDF TINNDKQGDRAVRNLRELSKTAEEC-DV		
ChDPE	(97)	AELDIHLIGGALYSYWPVDFAN-ADKTEDWKWSVEGMQRLAPAAKY-DI		
共有序列	(101)	AELDIHIIGGALYSYWPVDFSN DK GDWAWGVEGMRELADFA D DI		
		151		200
AtDPE	(146)	NLCIEVLNRFENHVLNTAAEGVAFVKDVGKNNVKVMLDTFHMNIEEDSFG		
AcDPE	(145)	TICVECVNRFETHFLNIAEDAVAFCKDVGTGNVKVHLDCFHMIREEKSFA		
CbDPE	(148)	VLGMEVLNRYEGYILNTCEE AIDFVDEIGSSHVKIMLDTFHMNIEETNMA		
ChDPE	(145)	NLGMEVLNRFESHILNTAEEGVKFVEEVGMDNVKVMMLDTFHMNIEEQSIG		
共有序列	(151)	NLGMEVLNRFESHILNTAEEAVAFVKDVGS NVKVMMLDTFHMNIEE SFA		
		201	S213C	250
AtDPE	(196)	DAIRTAG-PLLGHFHTGESNRRVPGKGRMPWHEIGLALRDINYTGAVIME		
AcDPE	(195)	GAVKTCGKEYLGYIHVNENDRGIPGTGLVPFKEFFNALVEIGYDGPLVIE		
CbDPE	(198)	DAIRKAG-DRLGHLHLGEQNRLVPGKGS LPWAEIGQALRDINYQGA AVME		
ChDPE	(195)	GAIRRAG-KLLGHFHTGECNRMVPGKGRI PWREIGDALRDIGYDGTAVME		
共有序列	(201)	GAIRTAG DLLGHFHTGENNRLVPGKGRI PWKEIGNALRDINYDGA AVME		
		251		296
AtDPE	(245)	PFVKTGGTIGSDIKVWRDLSSGADI AKMDEDARNALAFS RFVLGG--		
AcDPE	(245)	SFDPSFEELSGNCAIWRKLADTGEELAIEGLKNLKAIAAEI-----		
CbDPE	(247)	PFVMQGGTIGSEIKVWRDMVPDLSEEALDRDAKGALEFCRHVFGI--		
ChDPE	(244)	PFVRMGGQVGADIKVWRDISRGAD E AQLDD DARRALEFQRYMLEWK		
共有序列	(251)	PFVKS GGTIGSDIKVWRDLS GADEAALDD DAR ALEFARHVLG		

图7

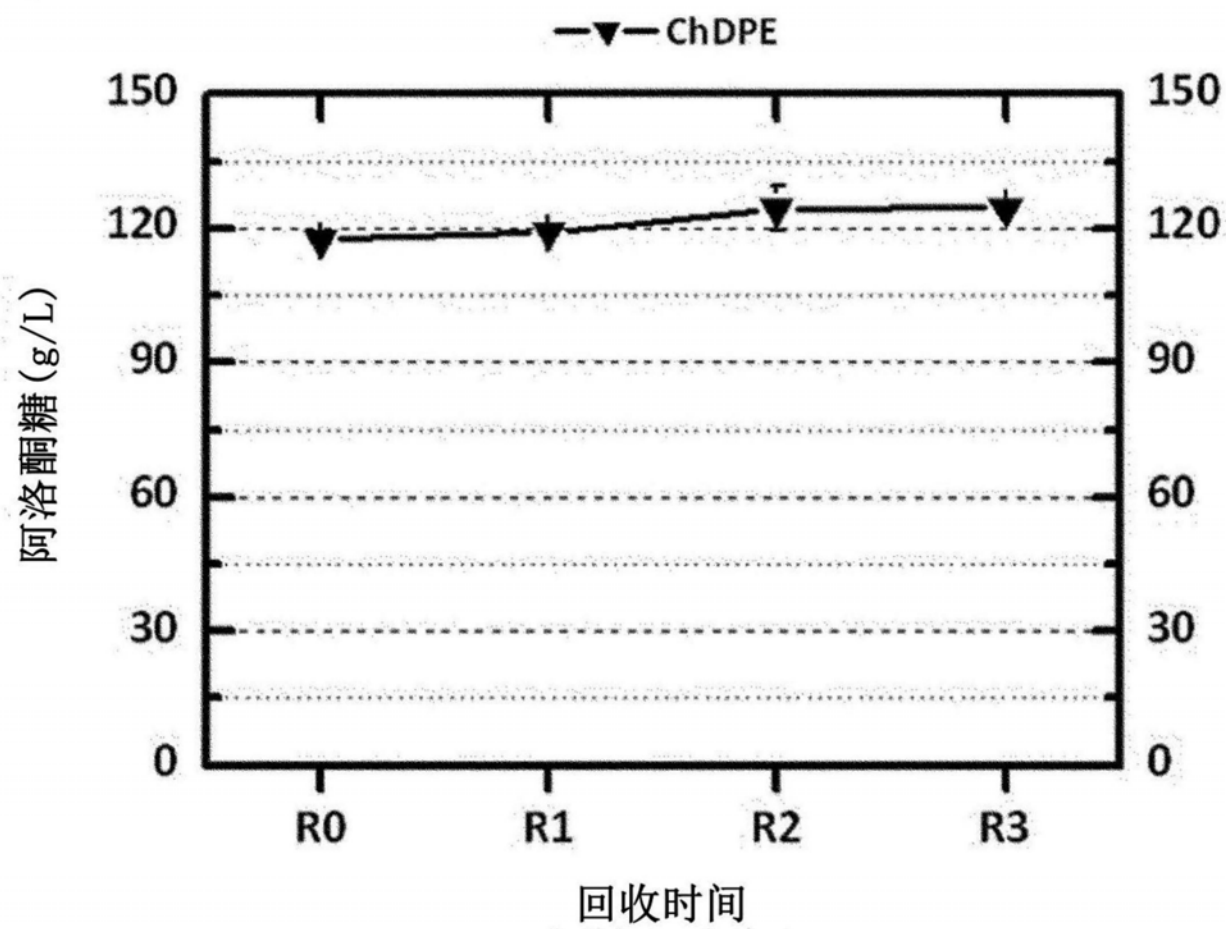


图8

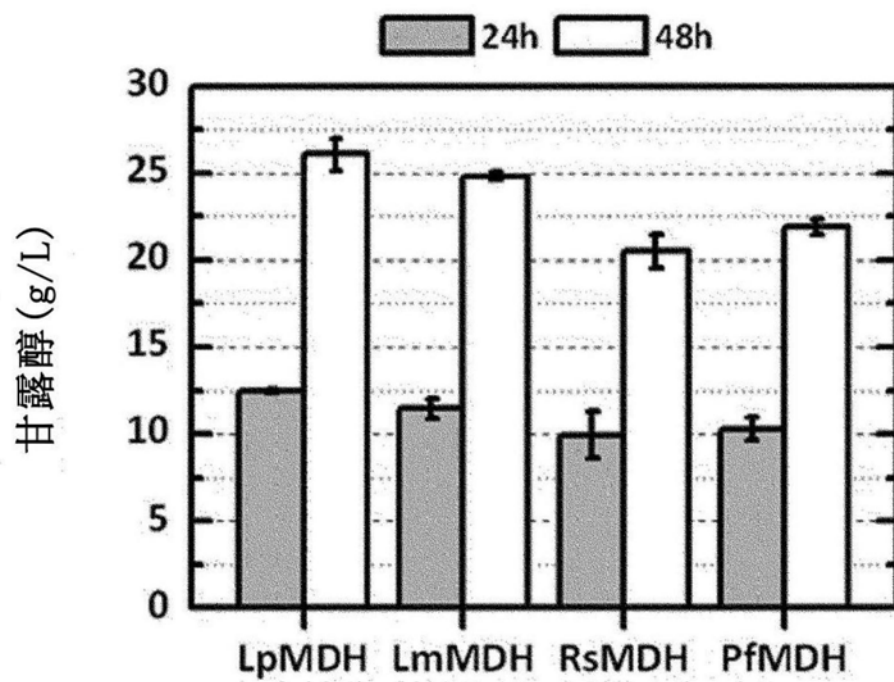


图9

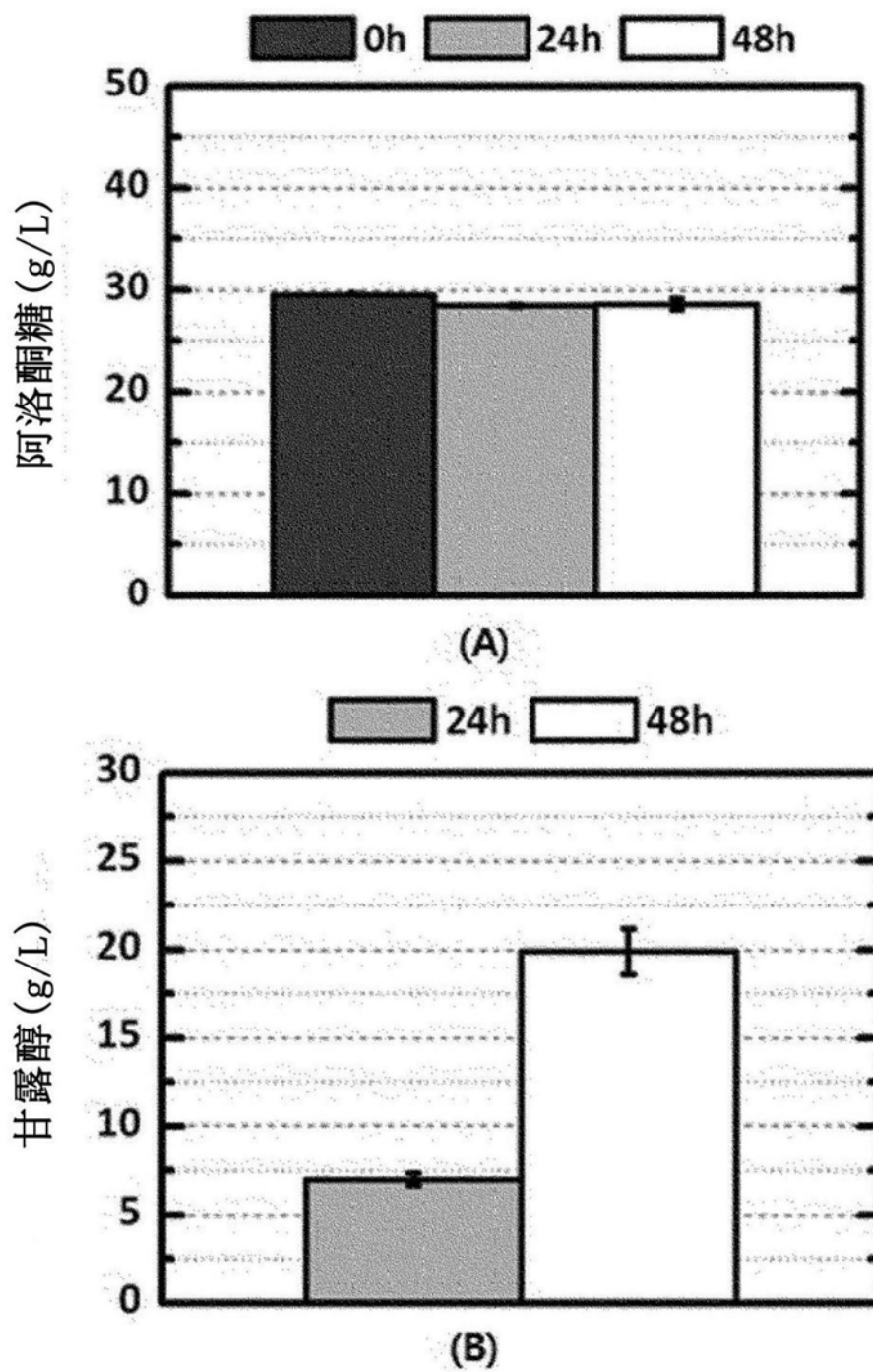


图10

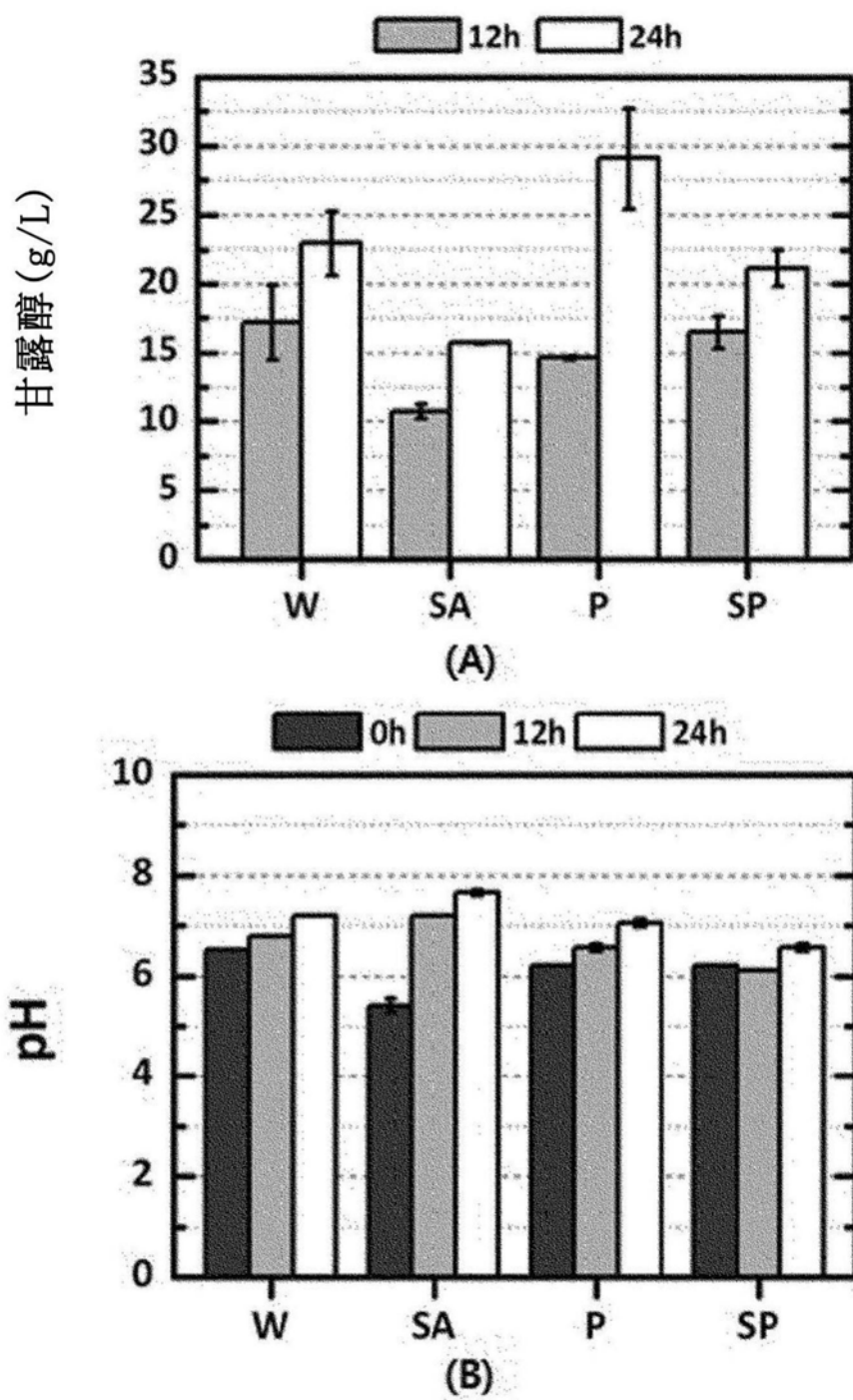


图11

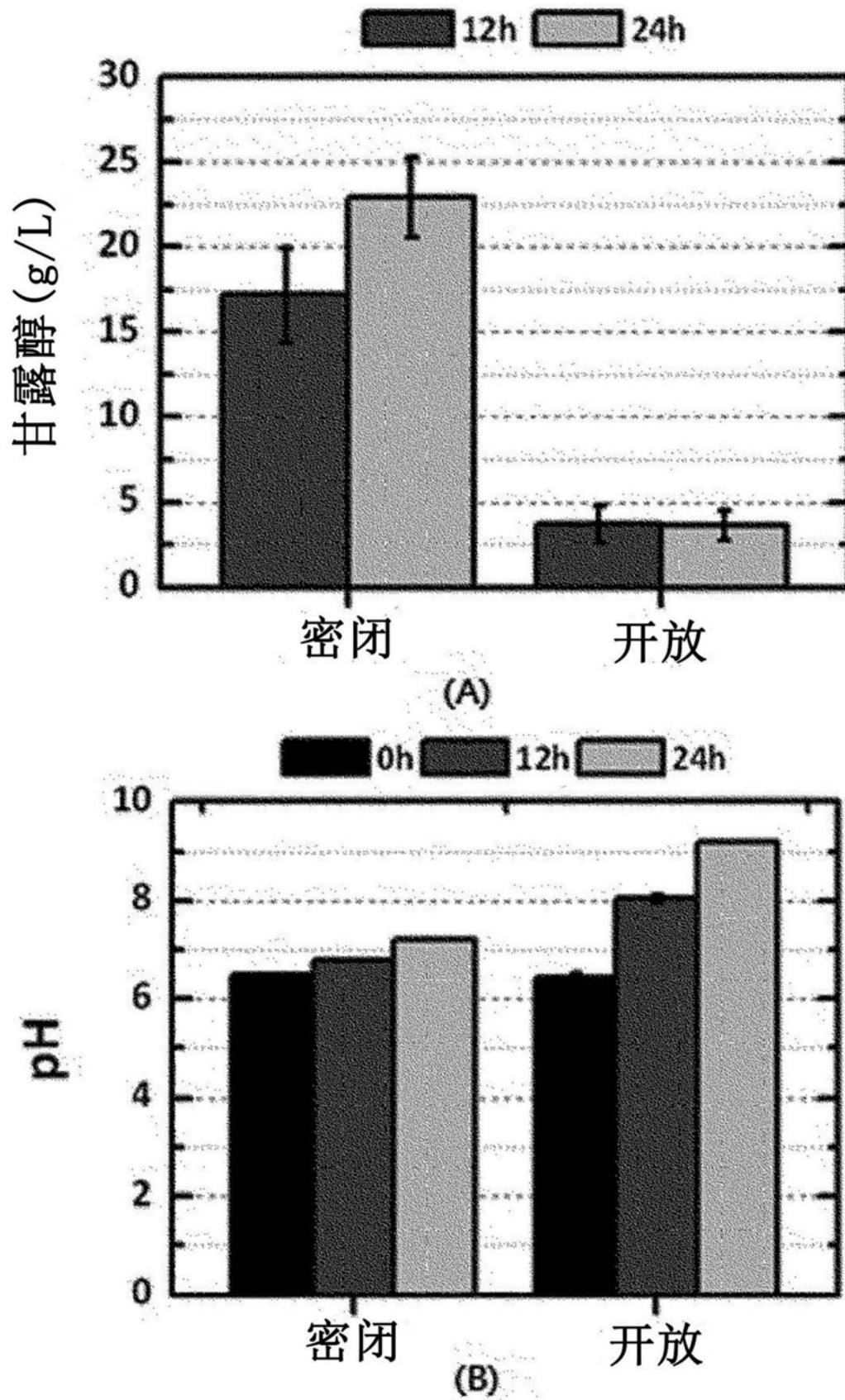


图12

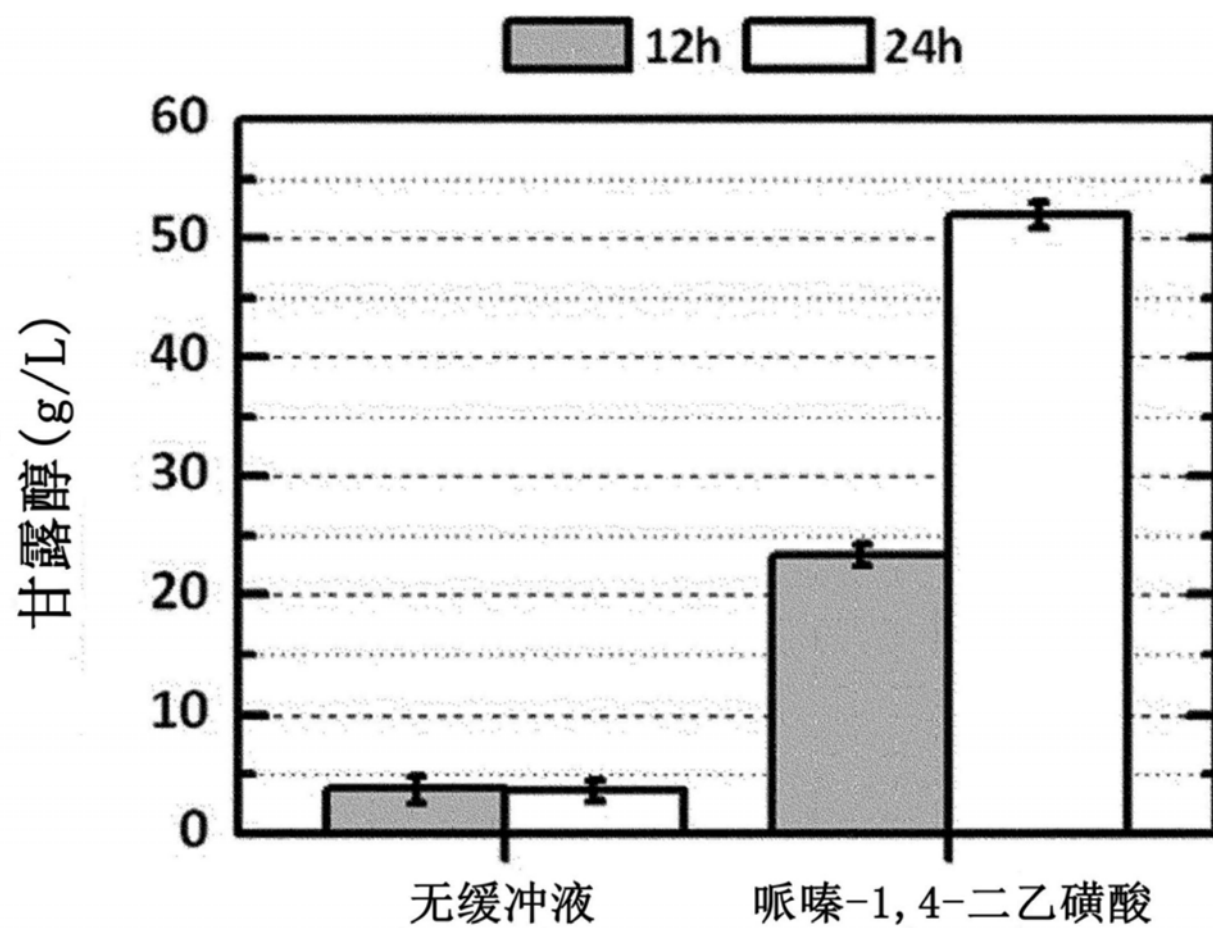


图13

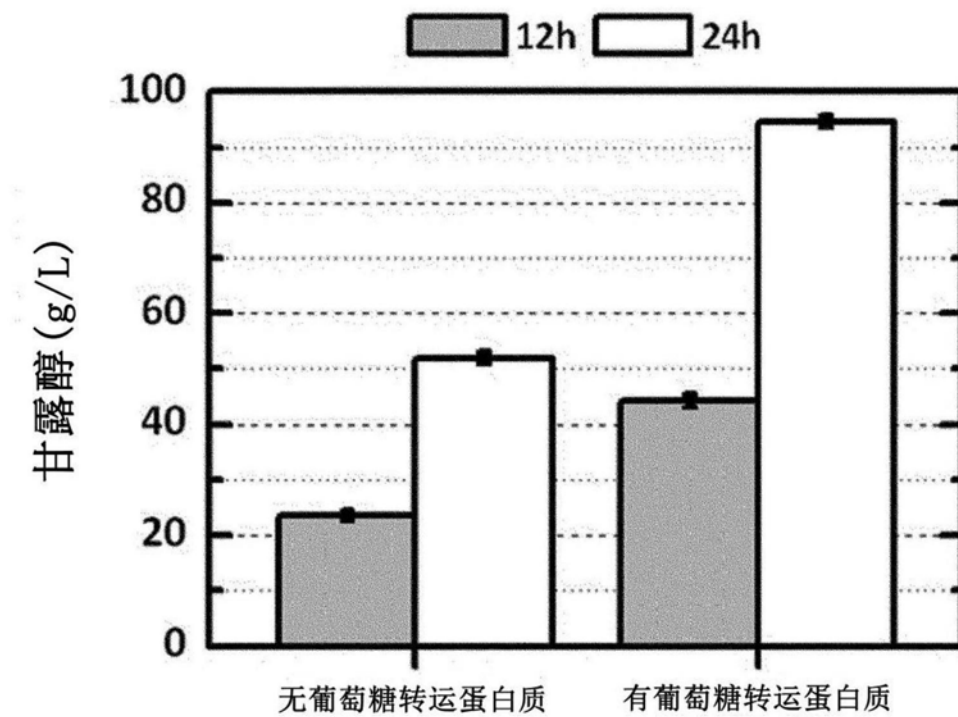


图14

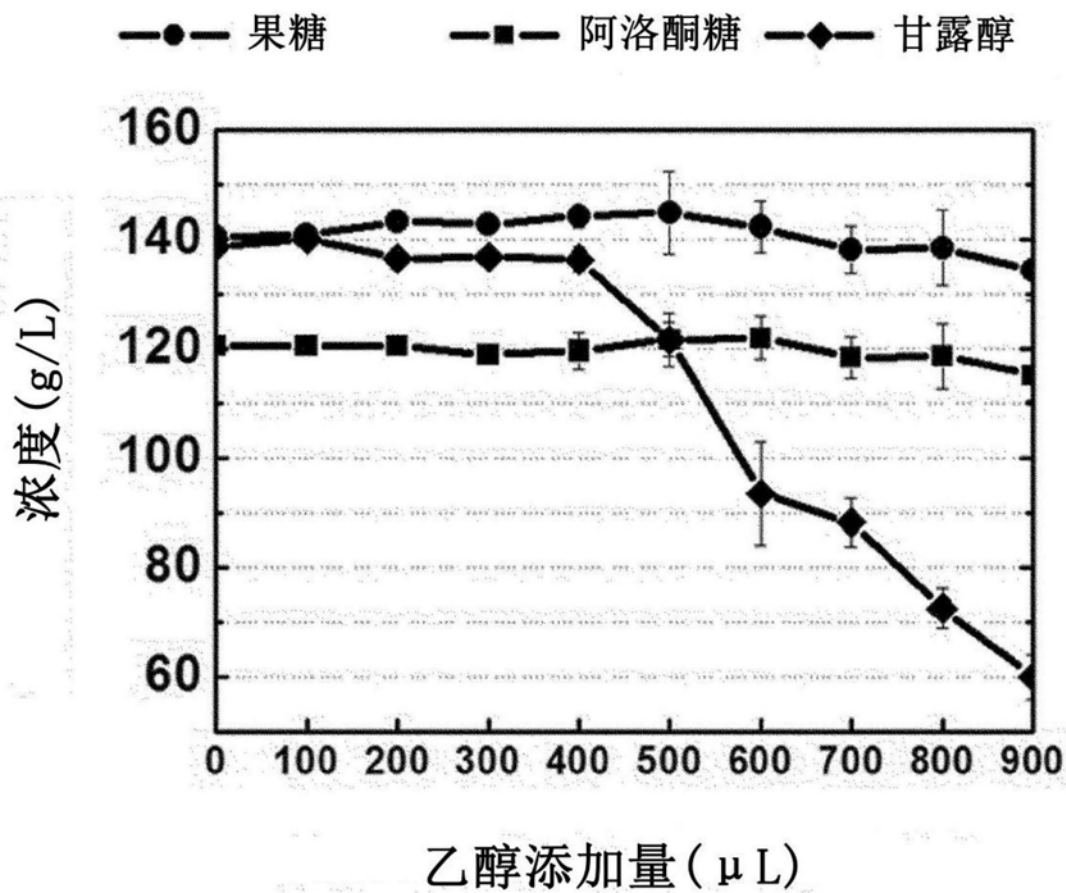


图15

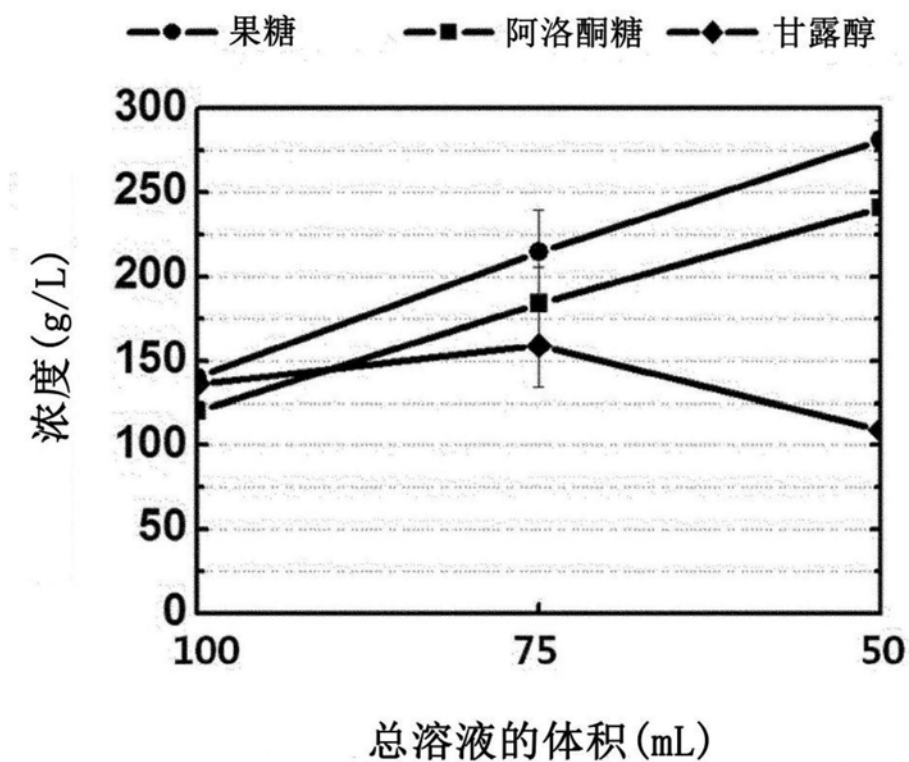


图16

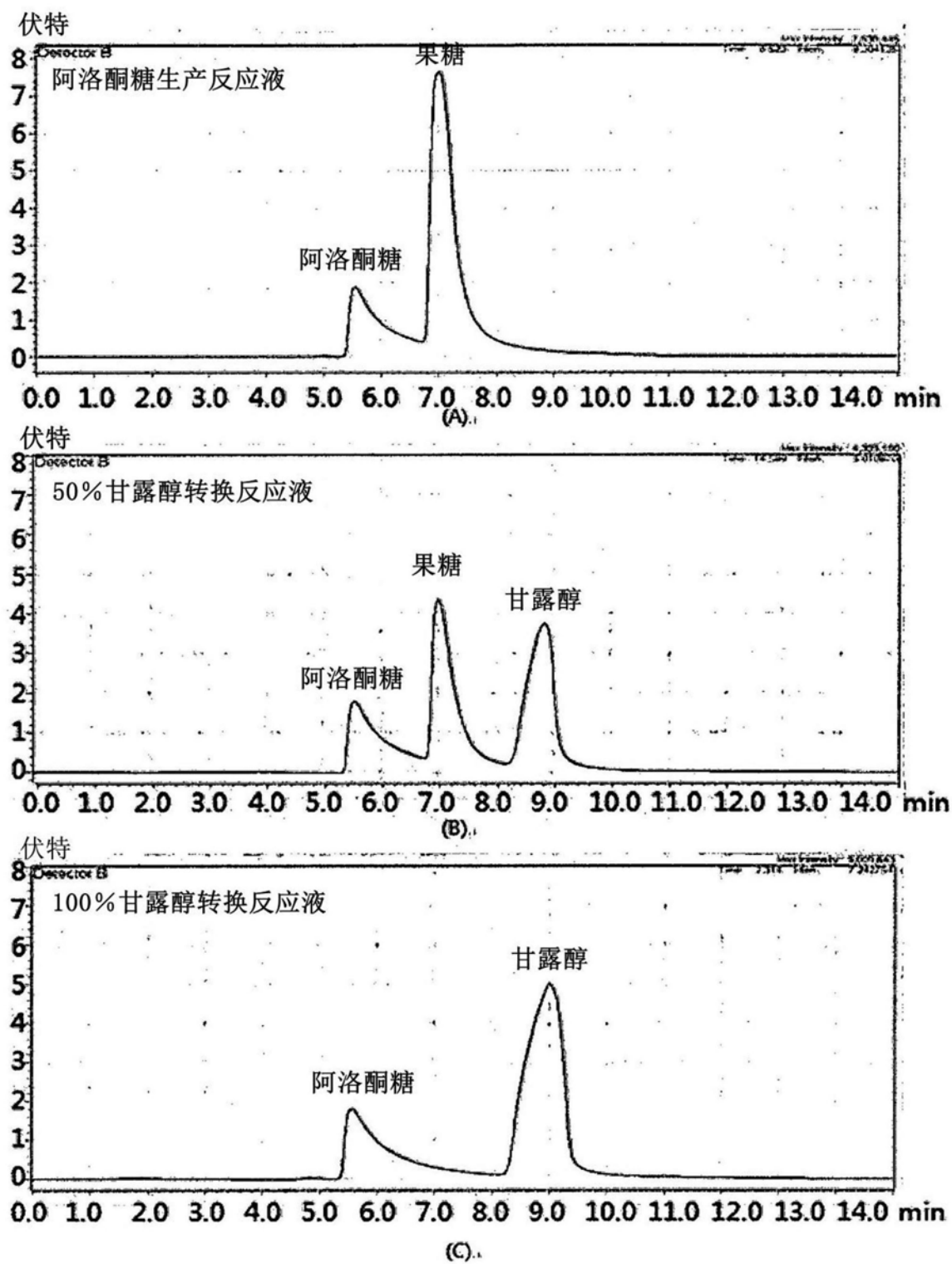


图17