



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0026261
(43) 공개일자 2020년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/81 (2006.01) *C12P 17/12* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 15/815 (2013.01)
C12P 17/12 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-7002577
(22) 출원일자(국제) 2018년07월10일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2020년01월28일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2018/068719
(87) 국제공개번호 WO 2019/011947
국제공개일자 2019년01월17일
(30) 우선권주장
17305910.6 2017년07월11일
유럽특허청(EPO)(EP)

(71) 출원인
알데리스
프랑스 91400 오르세 튀 드 파리 86
(72) 발명자
루이 도미니끄
프랑스 91470 포르쥬 레 뱅 튀 생 장 르 샤르돈네 22
제라르동 까린
프랑스 91240 생 미셸 쉬르 오르쥬 튀 데 드라공 22
또마 도미니끄
프랑스 91190 지쁘 쉬르 이베뜨 알레 데 그라비에 르 드 라 살릴 34
(74) 대리인
특허법인코리아나

전체 청구항 수 : 총 15 항

(54) 발명의 명칭 **엑토인-생산 효모**

(57) 요약

본 발명은 엑토인의 바이오-생산 분야에 관한 것이다. 이의 고도로 효율적인 합성 및 분비를 가능하게 하는 엑토인 제조 방법에 대한 요구가 당분야에 존재한다. 본 발명에서 제안하는 해법은 본 명세서에 기술된 바와 같은 많은 변형을 포함하는 유전자 변형 효모의 사용이다.

(52) CPC특허분류

C12Y 102/01011 (2013.01)

C12Y 203/01031 (2013.01)

C12Y 203/01178 (2013.01)

C12Y 206/01076 (2013.01)

C12Y 207/02004 (2013.01)

C12Y 402/01108 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

엑토인-생산 재조합 효모로서, 이의 게놈에서,

- (A) (i) 아스파토키나제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나;
- (ii) 아스파테이트 키나제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- (B) 아스파테이트 세미-알데히드 디히드로게나제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 및/또는 조효소로서 NAD 및 NADP 둘 모두를 사용할 수 있는 아스파테이트 세미-알데히드 디히드로게나제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- (C) 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- (D) (i) 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 MET2를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- (ii) 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 METX를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
- (iii) 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- (E) 엑토인 신타제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- (F) (i) 호모세린 디히드로게나제를 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 결실 및/또는 단절되었고/되었거나,
- (ii) 호모세린 디히드로게나제를 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 핵산은 독립적으로
 - 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나;
 - 약 프로모터의 제어 하에 있고/있거나;
 - 탈안정화된 형태인, 엑토인-생산 재조합 효모.

청구항 2

제1항에 있어서, 게놈에서 아스파테이트 트랜스아미나제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있는 것인 엑토인-생산 재조합 효모.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 게놈에서 옥소-글루타레이트를 글루타메이트로 전환시키는 글루타메이트 디히드로게나제, 특히 NADH를 사용하는 글루타메이트 디히드로게나제를 코딩하고, 보다 특히 엔토디니움 카우다툼 (*Entodinium caudatum*) 또는 사카로마이세스 세레비시아 (*Saccharomyces Cerevisiae*) 유래, 보다 더 특히 엔토디니움 카우다툼 유래 글루타메이트 디히드로게나제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나, 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있는 것인 엑토인-생산 재조합 효모.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 게놈에서 적어도 하나의 하기 변형이 수행된 것인 엑토인-생산 재조합 효모:

- (A) 일반 아미노산 페미아제 AGP3을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
 - (i) 일반 아미노산 페미아제 AGP3을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나
 - (ii) 탈안정화된 일반 아미노산 페미아제 AGP3을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고;
- (B) 분지쇄 아미노산 페미아제 3을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
 - (i) 분지쇄 아미노산 페미아제 3을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
 - (ii) 탈안정화된 분지쇄 아미노산 페미아제 3을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고;
- (C) 분지쇄 아미노산 페미아제 2를 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
 - (i) 분지쇄 아미노산 페미아제 2를 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
 - (ii) 탈안정화된 분지쇄 아미노산 페미아제 2를 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고;
- (D) 일반 아미노산 페미아제 GAP1을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
 - (i) 일반 아미노산 페미아제 GAP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
 - (ii) 탈안정화된 일반 아미노산 페미아제 GAP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고;
- (E) 고친화성 글루타민 페미아제 GNP1을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산이 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
 - (i) 고친화성 글루타민 페미아제 GNP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
 - (ii) 탈안정화된 고친화성 글루타민 페미아제 GNP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고;
- (F) 일반 아미노산 페미아제 AGP1을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
 - (i) 일반 아미노산 페미아제 AGP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
 - (ii) 탈안정화된 일반 아미노산 페미아제 AGP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고;
- (G) 저친화성 메티오닌 페미아제 MUP3을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
 - (i) 저친화성 메티오닌 페미아제 MUP3을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
 - (ii) 탈안정화된 저친화성 메티오닌 페미아제 MUP3을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고;
- (H) 고친화성 메티오닌 페미아제 MUP1을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
 - (i) 고친화성 메티오닌 페미아제 MUP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
 - (ii) 탈안정화된 고친화성 메티오닌 페미아제 MUP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고;

(I) 가능한 수송체 AQR1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나,

(J) 폴리아민 수송체 1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현된다.

청구항 5

제4항에 있어서, 게놈에서 제4항에 표시된 변형 중 적어도 2개, 특히 적어도 3개가 수행된 것인 엑토인-생산 재조합 효모.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 아스파토키나제를 코딩하는 핵산은 효모, 바람직하게 사카로마이세스 세레비지아 유래의 핵산인 엑토인-생산 재조합 효모.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 호모세린-O-아세틸트랜스퍼라제 METX를 코딩하는 핵산은 박테리아, 특히 코리네박테리움 글루타미쿰 (*Corynebacterium glutamicum*), 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*), 해모필리우스 인플루엔자 (*Haemophilus influenza*), 스트렙토마이세스 라벤둘라에 (*Streptomyces lavendulae*), 랩토스피라 인터로간스 (*Leptospira interrogans*), 스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumonia*) 및 마이코박테리움 튜버쿨로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택되는 박테리아 유래 핵산인 엑토인-생산 재조합 효모.

청구항 8

제1항 내지 제7항 중 어느 한 항에 있어서, 일반 아미노산 페미아제, 분지쇄 아미노산 페미아제 3, 분지쇄 아미노산 페미아제 2, 일반 아미노산 페미아제 GAP1, 고친화성 글루타민 페미아제 GNP1, 일반 아미노산 페미아제 AGP1, 저친화성 메티오닌 페미아제 MUP3 및 고친화성 메티오닌 페미아제 MUP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 독립적으로, 효모, 바람직하게 사카로마이세스 세레비지아 유래 핵산인 엑토인-생산 재조합 효모.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 적어도 하나의 과발현되는 핵산은 특히 독립적으로 pTDH3, pEN02, pTEF-K1, pTEF3, pTEF1, pADH1, pGMP1, pFBA1, pPDC1, pCCW12 및 pGK1로 이루어진 군으로부터 선택되는 강력 프로모터의 제어 하에 있는 것인 엑토인-생산 재조합 효모.

청구항 10

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 또는 억제성 프로모터는 독립적으로, 구리 유도성 또는 억제성 프로모터, 메티오닌 유도성 또는 억제성 프로모터 및 트레오틴 유도성 또는 억제성 프로모터로부터 선택되고, 특히 pSAM4, pCUP1-1, pCUP1.Cgl1a, pCUP1.Sba, pACU1, pACU2, pACU3p, pACU4p, pACU5, pACU6, pACU7, pACU8, pACU9, pACU10p, pACU11, pACU12, pACU13, pACU14, pACU15, pGAL/CUP1p, pCRS5, 및 pCHA1로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 엑토인-생산 재조합 효모.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 약 프로모터는 독립적으로 pURA3, pRPLA1, pNUP57 및 pGAP1로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 엑토인-생산 재조합 효모.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 유도성 또는 억제성 프로모터는 독립적으로, 구리 유도성 또는 억제성 프로모터, 리신 유도성 또는 억제성 프로모터 및 메티오닌 유도성 또는 억제성 프로모터로 이루어진 군으로부터 선택되고, 특히 pCTR1, pCTR3, pCUR1, pCUR2, pCUR3, pCUR4, pCUR5p, pCUR6, pCUR7, pCUR8, pCUR9, pCUR10, pCUR11, pCUR12, pCUR13, pCUR14, pCUR15, pCUR16, pCUR17, pLYS1, pLYS4, pLYS9, pLYR1p, pLYR2p, pLYR3p, pLYR4p, pLYR5p, pLYR6p, pLYR7p, pLYR8, pLYR9, pLYR10, pLYR11, pMET17, pMET6, pMET14, pMET3, pSAM1, pSAM2, pMDH2, pJEN1, pICL1, pADH2 및 pMLS1로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 엑토인-생산 재조합 효모.

청구항 13

엑토인을 제조하기 위한 방법으로서, 상기 방법은

- (a) 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 재조합 효모를 배양 배지에서 배양하는 단계; 및
- (b) 상기 배양 배지로부터 엑토인을 회수하는 단계를 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 14

제13항에 있어서, 배양 배지는 적어도 탄소원, 바람직하게 글루코스 및 수크로스로 이루어진 균으로부터 선택되는 탄소원을 포함하는 것인 제조 방법.

청구항 15

엑토인의 제조를 위한 제1항 내지 제12항 중 어느 한 항에 정의된 바와 같은 재조합 효모의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 엑토인의 바이오-생산 분야에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 엑토인 (1, 4, 5, 6-테트라히드로-2-메틸-4-피리미딘카르복실산)은 자연계에서 호염성 유기체에 의해 자연적으로 생산되는 복소환 아미노산이다. 실제로, 염분이 있는 환경에서 살아남기 위해서, 이들 유기체는 삼투 균형추로서 작용하는 호환성 용질로서 엑토인을 생산한다.

[0003] 엑토인은 실제로 또한 외부 환경, 예컨대 UV 방사선, 가열, 냉동 또는 화학제로부터의 수많은 공격으로 초래되는 변형뿐만 아니라, 건조로 인한 변성으로부터 핵산, 단백질, 세포막을 비롯하여 전체 세포를 보호할 수 있다 (예를 들어 [Lentzen G et al. Appl Microbiol Biot. 2006;72:623-34], 및 [Graf R et al. Clin Dermatol. 2008;26:326-33] 참조). 그리하여 피부 관리용 화장품에 사용된다.

[0004] 게다가 엑토인은 단백질 안정제, 화장품 첨가제, PCR 증강제 및 미생물용 건조 보호제로서 흥미로운 것으로 확인되었다.

[0005] 이들 유리한 성질 덕분에, 엑토인은 특히 호염성 박테리아 예컨대 할로모나스 엘롱가타 (*Halomonas elongata*)를 사용한 박테리아 과정을 통해서 점점 더 생산되고 있다. 그러나, 이들 방법은 높은 염 농도를 필요로 하여서 과정을 복잡하게 하고 장비의 중요한 부식을 고려하여 관련된 비용의 증가를 초래한다.

[0006] 뿐만 아니라, 박테리아 및 효모의 생합성 경로를 통한 엑토인과 같은 필수 아미노산의 생산은 NADPH의 형태로 상당량의 환원력을 요구한다. 그러나, 이들 미생물, 특히 효모에서 글루코스의 주요 대사 경로는 NADH만을 생산하는 발효가 후속되는 해당작용이다. 그러므로, 미생물 내에서 허용가능한 NADPH/NADH 균형의 유지는, 복잡할지라도, 생존 재조합 미생물을 유지시키면서 엑토인의 바이오-생산을 최적화하는데 필수적이다.

[0007] 따라서, 고도로 효율적인 이의 생산 및 분비를 가능하게 하는 추가의 엑토인 제조 방법에 대한 요구가 여전히 당분야에 존재한다.

발명의 내용

[0008] 따라서 본 발명은 엑토인-생산 재조합 효모에 관한 것으로서, 이의 게놈에서,

[0009] (A) (i) 아스파토키나제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나;

[0010] (ii) 아스파테이트 키나제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;

[0011] (B) 아스파테이트 세미-알데히드 디히드로게나제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 및/또는 조효소로서 NAD 및 NADP 둘 모두를 사용할 수 있는 아스파테이트 세미-알데히드 디히드로게나제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은

과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;

- [0012] (C) 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- [0013] (D) (i) 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 MET2를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- [0014] (ii) 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 METX를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
- [0015] (iii) 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- [0016] (E) 엑토인 신타제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- [0017] (F) (i) 호모세린 디히드로게나제를 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 결실 및/또는 단절되었고/되었거나,
- [0018] (ii) 호모세린 디히드로게나제를 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 핵산은 독립적으로
- [0019] - 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나;
- [0020] - 약 프로모터의 제어 하에 있고/있거나;
- [0021] - 탈안정화된 형태이다.
- [0022] 내포된 실시예에 예시된 바와 같이, 본 발명의 재조합 효모는 증가된 엑토인 생산성을 갖는다.
- [0023] 상기 유리한 성질은 이하 본 명세서에 기술된 추가적인 변형을 갖는 효모를 또한 재조합시켜서 더욱 증가시킬 수 있다.
- [0024] 엑토인-생산 재조합 효모는 결과적으로 유리하게 이하 본 명세서에 기술된 바와 같은 엑토인의 제조를 위한 방법에서 사용할 수 있거나 또는 엑토인의 제조에 서 사용할 수 있다.
- [0025] 본 발명은 또한 엑토인의 제조를 위한 방법에 관한 것으로서, 상기 방법은
- [0026] (a) 본 발명의 재조합 효모를 배양 배지에서 배양하는 단계; 및
- [0027] (b) 상기 배양 배지로부터 엑토인을 회수하는 단계를 포함한다.
- [0028] 바람직하게, 배양 배지는 적어도 탄소원, 바람직하게 글루코스 및 수크로스로 이루어진 군으로부터 선택되는 탄소원을 포함한다.
- [0029] 본 발명은 또한 엑토인의 제조를 위한 본 발명에 따른 재조합 효모의 용도에 관한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0030] 본 발명자는 부모 미생물과 비교하여, 특히 부모 효모와 비교하여, 증가된 엑토인 생산 능력을 갖는, 유전자 변형 미생물, 특히, 유전자 변형 효모를 고려한다.
- [0031] 이들 유전자 변형 효모를 포함한, 이들 유전자 변형 미생물이 본 명세서 전반에서 기술된다.
- [0032] **정의**
- [0033] 본 명세서에서 사용되는 용어 "미생물"은 인공적으로 변형되지 않은 효모를 의미한다. 미생물은 "엑셉터" 미생물에 통합시키려는 유전자 엘리먼트를 제공하여 이러한 외래 유전자 엘리먼트가 발현되어지거나 또는 유전자 구성체 또는 단백질 발현을 위한 도구로서 사용된다면 "도너"일 수 있다. 본 발명의 미생물은 엑토인의 생합성을 위한 유전자를 발현하는 효모 중에서 선택된다.
- [0034] 본 명세서에서 사용되는 용어 "재조합 미생물" 또는 "유전자 변형 미생물" 또는 "재조합 효모" 또는 "유전자 변형 효모"는 유전자 변형되거나 또는 유전자 조작된 효모를 의미한다. 이들 용어의 일반적인 의미에 따라서, 본 발명의 미생물이 자연계에 존재하지 않고 자연계에 존재하는 동등한 미생물 유래의 유전자 엘리먼트의 도입

또는 결실 또는 변형을 통해서 변형된 것을 의미한다. 직접 돌연변이유발법 및 특별한 선택압 하의 진화를 조합하여 새로운 물질대사 경로의 개발 및 진화를 강제하여 변형될 수도 있다 (예를 들어, WO 2004/076659 참조).

[0035] 미생물은 숙주 미생물에서 그들 발현을 허용하는 모든 엘리먼트를 갖는 미생물에 외생성 유전자들이 도입된다면 그 외생성 유전자를 발현하도록 변형될 수 있다. 미생물은 내생성 유전자의 발현 수준을 조절하도록 변형될 수 있다. 외생성 DNA를 갖는 효모와 같은 미생물의 변형 또는 "형질전환"은 당업자에게는 통상의 작업이다. 특히, 본 발명에 따른 미생물의 유전자 변형, 보다 특히 본 명세서에 정의된 유전자 변형(들)은 DiCarlo 등 (Nucl. Acids Res., vol. 41, No. 7, 2013: 4336-4343)에 기술된 바와 같은 CRISPR-Cas 시스템을 사용하여 수행될 수 있다.

[0036] 용어 "내생성 유전자"는 유전자가 임의의 유전자 변형 전 미생물, 야생형 균주에 존재하였음을 의미한다. 내생성 유전자는 내생성 조절 엘리먼트에 추가로, 또는 그를 대체하여 이중성 서열을 도입시키거나, 또는 염색체로 유전자의 하나 이상의 보충 카피 또는 플라스미드를 도입시켜 과발현될 수 있다. 내생성 유전자는 또한 그들 발현 및/또는 활성을 조절하도록 변형될 수 있다. 예를 들어, 돌연변이는 유전자 생성물을 변형시키기 위해 코딩 서열에 도입될 수 있거나 또는 이중성 서열은 내생성 조절 엘리먼트에 추가하여 또는 그를 대체하여 도입될 수 있다. 내생성 유전자의 조절은 유전자 생성물의 활성의 증강 및/또는 상향조절, 또는 대안적으로 내생성 유전자 생성물의 활성의 약화 및/또는 하향조절을 일으킬 수 있다. 내생성 유전자의 발현을 증강시키는 다른 방식은 염색체에 유전자의 하나 이상의 보충 카피 또는 플라스미드를 도입시키는 것이다.

[0037] 용어 "외생성 유전자"는 유전자가 당업자에게 충분히 공지된 방법을 통해서, 미생물에 도입된 한편, 그 유전자가 야생형 미생물에서 천연 발생되지 않는 것을 의미한다. 미생물은 이들 유전자가 숙주 미생물에서 그들 발현을 허용하는 모든 엘리먼트를 갖는 미생물에 도입되면 외생성 유전자를 발현할 수 있다. 외생성 DNA로 미생물의 형질전환은 당업자에게 통상의 작업이다. 외생성 유전자는 숙주 염색체에 통합될 수 있거나, 또는 플라스미드 또는 벡터로부터 염색체 외에서 발현될 수 있다. 세포 내에서 그들의 복제 기원 및 그들의 카피 수가 상이한 다양한 플라스미드는 모두 당분야에 공지되어 있다. 외생성 유전자의 서열은 숙주 미생물에서 이의 발현을 위해 적합화될 수 있다. 실제로, 당업자는 코돈 용법 편향성의 개념 및 추론되는 단백질의 변형없이 특정한 코돈 용법 편향성에 대해 핵산 서열을 적합화시키는 방법을 알고 있다.

[0038] 용어 "이중성 유전자"는 유전자가 이를 발현하는 수령체 미생물과 상이한 미생물 종으로부터 유래된다는 것을 의미한다. 이것은 유전자가 미생물에서 천연 발생되지 않는 것임을 의미한다.

[0039] 본 출원에서, 모든 유전자는 그들의 공통 명칭 및 그들의 뉴클레오타이드 서열, 및 발생하는 경우에, 그들 아미노산 서열을 참조하여 언급된다. 기지 유전자의 수탁 번호로 제공되는 기준을 사용하여, 당업자는 다른 유기체, 박테리아 균주, 효모, 진균, 포유동물, 식물 등에서 균등한 유전자를 결정할 수 있다. 이러한 통상의 작업은 유리하게 다른 미생물로부터 유래된 유전자와의 서열 정렬을 수행하고, 다른 유기체 내 상응하는 유전자를 클로닝하기 위한 촉진성 프로브를 디자인하여 결정될 수 있는 공통 서열을 사용해 수행된다.

[0040] 당업자는 내생성 유전자의 발현을 조절, 특히 상향조절 또는 하향조절하기 위한 상이한 수단을 알고있다. 예를 들어, 내생성 유전자의 발현을 증강시키거나, 또는 내생성 유전자를 과발현시키는 방식은 염색체에 유전자의 하나 이상의 보충 카피 또는 플라스미드를 도입시키는 것이다.

[0041] 다른 방식은 유전자의 내생성 프로모터를 보다 강력 프로모터로 대체시키는 것이다. 이들 프로모터는 상동성일 수 있거나 또는 이중성일 수 있다. 본 발명에서 특히 흥미로운 프로모터는 본 명세서의 다른 곳에 보다 상세하게 기술된다.

[0042] 핵산 발현 구성체는 5' 및/또는 3' 인식 서열 및/또는 선별 마커를 더 포함할 수 있다.

[0043] 용어 "과발현"은 유전자 또는 효소의 발현이 비변형 미생물과 비교하여 증가되는 것을 의미한다. 효소의 발현 증가는 상기 효소를 코딩하는 유전자의 발현을 증가시켜 수득된다. 유전자의 발현 증가는 당업자에게 공지된 모든 기술에 의해 수행될 수 있다. 이와 관련하여, 과발현시키고자 하는 핵산 상류에 강력 프로모터의 제공 또는 프로모터, 특히 강력 프로모터와 종결인자 사이에 상기 핵산의 다수의 카피의 도입을 특히 언급할 수 있다.

[0044] 용어 "과소발현"은 유전자 또는 효소의 발현이 비변형 미생물과 비교하여 감소되는 것을 의미한다. 효소의 발현 감소는 상기 효소를 코딩하는 유전자의 발현을 감소시켜 수득된다. 유전자의 발현 감소는 당업자에게 공지된 모든 기술에 의해 수행될 수 있다. 이와 관련하여, 과소발현시키고자 하는 핵산 상류에 약 프로모터

의 제공을 특히 언급할 수 있다. 부모 효소에 비해서 덜 활성적인 상기 효소의 변이체 또는 부모 효소에 비해 세포에서 보다 신속하게 분해되는 상기 효소의 변이체를 코딩하는 핵산의 제공을 또한 언급할 수 있다. 상기 부모 효소에 비해 보다 신속하게 분해되는 부모 효소의 변이체는 degnon-태그화 효소를 포괄한다. 또한 관심 유전자의 전사 활성인자의 발현 감소를 언급할 수 있다.

- [0045] 용어 "유도성 프로모터"는 다음의 조건 하에서 그 활성이 유도, 즉 증가되는 프로모터를 칭하는데 사용된다:
- [0046] - 하나 이상의 특정한 대사산물(들)의 존재 하. 배지 중 대사산물 농도가 높아질수록, 프로모터 활성은 더 강해진다. 또는
- [0047] - 하나 이상의 대사산물(들)의 저농도 존재 하, 또는 부재 하. 이들 대사산물은 그 증가된 존재가 프로모터의 활성을 유도하는 것과는 상이하다. 배지 중 대사산물 농도가 낮아질수록, 프로모터 활성은 더 강해진다.
- [0048] 용어 "억제성 프로모터"는 다음의 조건 하에서 그 활성이 억제, 즉 감소되는 프로모터를 칭하는데 사용된다:
- [0049] - 하나 이상의 특정한 대사산물(들)의 존재 하. 배지 중 대사산물 농도가 높아질수록, 프로모터 활성은 약해진다. 또는
- [0050] - 하나 이상의 대사산물(들)의 저농도 존재 하 또는 부재 하. 이들 대사산물은 그의 증가된 존재가 프로모터의 활성을 억제하는 것과는 상이하다. 배지 중 대사산물 농도가 낮아질 수록, 프로모터 활성은 약해진다.
- [0051] 본 명세서에서 사용되는, "degnon-태그화" 효소는 (i) 유비퀴틴-비의존적 분해 또는 (ii) 유비퀴틴-의존적 분해 일 수 있는, 분해를 상기 효소에 대해 야기시키게 되는 파괴 신호로서 작용하는 첨가된 단백질-분해 신호 아미노산 서열을 포함하는 효소를 의미한다. 당분야에서 "degnon"이라고도 하는 상기 첨가된 단백질-분해 신호는 파괴 신호로서 작용하는 아미노산 서열을 포괄하고, 상기 아미노산 서열은 표적화 단백질 분해를 야기시키는 전달가능한 분해 신호로 이루어진다. Degron은 충분히 공지된 N-말단 규칙에 따라서 표적 단백질을 분해를 야기시키는 전달가능한 N-말단 아미노산인 "N-degnon"을 포괄한다 (Bachmair et al., 1986, Science, Vol. 234 (4773): 179-186). N-degnon의 불안정한 속성은 아세틸화 또는 아르기닐화 변형되는 경향이 있어서 궁극적으로 유비퀴틴화 및 분해를 초래하는, 이의 제1 아미노산에 의한 것이다. 일반적으로, degnon은 표적화 단백질을 분해를 보장하도록 적어도 2개 성분: (i) 표적 분해 인식 태그, 예컨대 폴리-유비퀴틴 태그 및(ii) 분해 인식 태그에 밀접해 있는 비구조화된 아미노산 서열을 필요로 한다. 단백질 degnon-태그화, 특히 본 명세서에서 효소의 degnon-태그화를 위해서, 당업자는 Yu 등 (2015, Current Opinion in Biotechnology, Vol. 36: 199-204), Cho 등 (2010, Genes & Development, Vol. 24: 438-442), 또는 Fortmann 등 (2015, J Mol Biol, Vol. 427 (17): 2748-2756), Ravid 등 (2008, Nat Rev Mol Cell Biol, Vol. 9(9): 679-690) 및 Hochstrasser (1996, Annu Rev Genet, Vol. 30: 405-439)를 참조할 수 있다.
- [0052] 효소의 "활성"은 용어 "기능"과 상호교환적으로 사용되고, 본 발명의 문맥에서, 바람직한 반응을 촉매하는 효소의 능력을 표시한다.
- [0053] 용어 효소의 "감소된 활성" 또는 "약화된 활성"은 아미노산 서열의 돌연변이로 수득된 단백질의 감소된 특이적 촉매 활성 및/또는 뉴클레오티드 서열의 돌연변이 또는 상응하는 동족 유전자의 결실 또는 또한 단백질의 degnon-태그화로 수득된 세포 내 단백질의 감소된 농도를 의미한다.
- [0054] 용어 효소의 "증강된 활성"은 예를 들어 효소를 코딩하는 유전자의 과발현에 의해 수득되는, 효소의 증가된 특이적 촉매 활성, 및/또는 세포 내 효소의 증가된 분량/이용가능성을 의미한다.
- [0055] 용어 "인코딩" 또는 "코딩"은 전사 및 번역 기전을 통해서, 폴리뉴클레오티드가 아미노산 서열을 생성시키는 과정을 의미한다.
- [0056] 본 발명에서 고려되는 효소(들)를 코딩하는 유전자(들)는 외생성일 수 있거나 또는 내생성일 수 있다.
- [0057] 유전자의 "약화"는 유전자가 비변형 미생물에 비해서 더 낮은 속도로 발현되는 것을 의미한다. 약화는 당업자에게 공지된 수단 및 방법으로 획득될 수 있고 상동성 재조합으로 수득된 유전자 결실, 유전자로 외부 엘리먼트의 삽입에 의한 유전자 약화 또는 약 프로모터 하에서 유전자 발현을 함유한다. 당업자는 상이한 강도를 나타내는 다양한 프로모터 및 어떤 프로모터가 약한 유전자 발현에 사용되는 것인가를 알고 있다.
- [0058] 본 발명에서 제공되는 방법은 바람직하게 염색체 상의 특이적 위치로 이중성 뉴클레오티드 서열의 안정한 도입 또는 유전자 변형 미생물 세포에서 하나 이상의 표적 유전자의 기능적 파괴를 위해 하나 이상의 염색체 통합 구성체의 사용이 요구된다. 일부 실시형태에서, 표적 유전자의 파괴는 관련 기능성 단백질의 발현을

방지한다. 일부 실시형태에서, 표적 유전자의 파괴 결과로 파괴된 유전자로부터 비기능성 단백질의 발현이 야기된다.

- [0059] 본 발명의 실시에서 가변적일 수 있는 염색체 통합 구성체의 매개변수는 제한없이 상동성 서열의 길이; 상동성 서열의 뉴클레오티드 서열; 통합 서열의 길이; 통합 서열의 뉴클레오티드 서열; 및 표적 유전자와의 뉴클레오티드 서열을 포함한다. 일부 실시형태에서, 각각의 상동성 서열의 길이에 대한 유효 범위는 20 내지 5,000개 염기쌍, 우선적으로 50 내지 100개 염기쌍이다. 특정한 실시형태에서, 각각의 상동성 서열의 길이는 약 50개 염기쌍이다. 유전자 표적화에 필요한 상동성 길이에 관한 추가 정보는 [D. Burke *et al.*, Methods in Yeast Genetics - A cold spring harbor laboratory course Manual (2000)]를 참조한다.
- [0060] 일부 실시형태에서, (a) 상기 언급된 DNA 구성체(들)를 삽입시키고자 하는 파괴된 유전자(들)는 유리하게 형질 전환된 미생물 세포의 선별에 유용한 하나 이상의 선별가능한 마커를 포함한다. 바람직하게, 상기 선별가능한 마커(들)는 본 발명에 따른 DNA 구성체(들)에 포함된다.
- [0061] 일부 실시형태에서, 선별가능한 마커는 항생제 내성 마커이다. 항생제 내성 마커의 예시적인 예는 제한없이 NAT1, AUR1-C, HPH, DSDA, KAN<R>, 및 SH BLE 유전자 생성물을 포함한다. 에스. 노르세이 (*S. noursei*) 유래 NAT 1 유전자 생성물은 노르세오텐리신에 대한 내성을 부여하고; 사카로마이세스 세레비시아 (*Saccharomyces cerevisiae*) 유래 AUR1-C 유전자 생성물은 아우에로바시딘 A (AbA)에 대한 내성을 부여하고; 클렙시엘라 뉴모니아 (*Klebsiella pneumonia*) 유래 HPH 유전자 생성물은 하이그로마이신 B에 대한 내성을 부여하고; 이. 콜라이 (*E. coli*)의 DSDA 유전자 생성물은 세포가 단독 질소원으로서 D-세린 존재 플레이트 상에서 성장가능하게 하고; Tn903 트랜스포존의 KAN<R> 유전자는 G418에 대한 내성을 부여하고; 스트렙토알로테이쿠스 힌두스타누스 (*Streptoalloteichus hindustanus*)의 SH BLE 유전자 생성물은 제오신 (브레오마이신)에 대한 내성을 부여한다.
- [0062] 일부 실시형태에서, 항생제 내성 마커는 본 발명의 유전자 변형 미생물 세포가 단리된 후에 결실된다. 당업자는 특별한 유전자 상황에서 적합한 마커를 선택할 수 있다.
- [0063] 일부 실시형태에서, 선별가능한 마커는 유전자 변형 미생물 세포에서 영양요구성 (예를 들어, 영양분의 영양요구)을 구제한다. 이러한 실시형태에서, 부모 미생물 세포는 아미노산 또는 뉴클레오티드 생합성 경로에서 기능하는 하나 이상의 유전자 생성물, 예컨대, 예를 들어, 효모에서 HIS3, LEU2, LYS1, LYS2, MET 15, TRP1, ADE2, 및 URA3 유전자 생성물에 기능적 파괴를 포함하여서, 부모 미생물 세포가 하나 이상의 영양분 보충없이 배지에서 성장할 수 없게 한다 (영양요구성 표현형). 영양요구성 표현형은 파괴된 유전자 생성물의 기능적 카피 (NB: 유전자의 기능적 카피는 가까운 중, 예컨대 클루베로마이세스 (*Kluyveromyces*), 칸디다 (*Candida*) 등 으로부터 기원할 수 있음)를 코딩하는 염색체 통합으로 형질전환시켜 구제할 수 있고, 생성된 유전자 변형 미생물 세포는 부모 미생물 세포의 영양요구성 표현형의 상실을 기반으로 선별될 수 있다.
- [0064] 프로모터 서열, 코딩 서열 (예를 들어, 효소 코딩 서열), 또는 종결인자 서열을 포함하는 각각의 핵산 서열의 경우, 기준 서열은 본 명세서에 기술되어 있다. 본 설명은 또한 기준 핵산 서열과, 특별한 백분율의 핵산 동일성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0065] 각각 또는 관심 아미노산 서열의 경우, 기준 서열이 본 명세서에 기술되어 있다. 본 설명은 또한 기준 아미노산 서열과, 특별한 백분율의 아미노산 동일성을 갖는, 아미노산 서열 (예를 들어, 효소 아미노산 서열)을 포괄한다.
- [0066] 분명한 이유로, 모든 본 설명에서, 각각 고려되는 뉴클레오티드 또는 아미노산 동일성에 부응하는 특별한 핵산 서열 또는 특별한 아미노산 서열은 바람직한 생물학적 활성을 나타내는 단백질 (또는 효소)의 수득을 더욱 야기시켜야 한다. 본 명세서에서 사용시, 2개 핵산 서열 또는 2개 아미노산 서열 간 "동일성의 백분율"은 비교창을 통해 최적으로 정렬된 양쪽 서열을 비교하여 결정된다.
- [0067] 따라서 비교창에서 뉴클레오티드 또는 아미노산 서열의 비율은 양쪽 서열 간 최적 정렬을 수득하기 위해서 기준 서열 (첨가 또는 이들 결실을 포함하지 않음)과 비교시 첨가 또는 결실 (예를 들어, "갭")을 포함할 수 있다.
- [0068] 동일성 백분율은 동일한 핵산 염기 또는 동일한 아미노산 잔기가 양쪽 비교 서열에 대해 언급될 수 있는 위치의 개수를 결정하고 나서, 양쪽 핵산 염기 또는 양쪽 아미노산 잔기 간에 동일성이 관찰될 수 있는 위치의 개수를 비교창의 모든 위치 개수로 나눈 후에, 2개 서열 간 뉴클레오티드 동일성의 백분율 또는 2개 서열 간 아미노산 동일성의 백분율을 수득하기 위해 그 결과에 100을 곱하여 계산된다.
- [0069] 서열 최적 정렬의 비교는 기지의 알고리즘을 사용하여 컴퓨터를 통해 수행될 수 있다.

- [0070] 가장 바람직하게, 서열 동일성 백분율은 CLUSTAL W 소프트웨어 (버전 1.82)와 다음과 같이 설정된 매개변수를 사용하여 결정된다: (1) CPU 방식=ClustalW mp; (2) 정렬="전체"; (3) 출력 포맷="개수로 정렬"; (4) 출력 순서="정렬됨"; (5) 색상 정렬="안함"; (6) KTUP (글자 크기)="디폴트"; (7) 창 길이="디폴트"; (8) 점수 유형="백분율"; (9) TOPDIAG="디폴트"; (10) PAIRGAP="디폴트"; (11) 계통수/계통수 유형="없음"; (12) 매트릭스="디폴트"; (13) 갭 개방="디폴트"; (14) 종료 갭="디폴트"; (15) 갭 연장="디폴트"; (16) 갭 거리="디폴트"; (17) 계통수 유형="분기도" 및 (18) 계통수 그래프 거리="숨김".
- [0071] "발효" 또는 "배양"은 일반적으로 적어도 하나의 단순 탄소원, 및 필요하면 보조 기질을 함유하는, 배양되는 미생물에 적합화된 적절한 배양 배지가 존재하는 발효기에서 수행된다.
- [0072] 본 명세서에 개시된 미생물은 옥살로아세테이트로부터 생성물의 생산을 위한 발효 배지에서 성장될 수 있다. 엑토인의 최대 생산을 위해서, 생산 숙주로서 사용되는 미생물 균주는 바람직하게 높은 탄수화물 이용률을 갖는다. 이들 특징은 돌연변이유발법 및 선별, 유전자 조작에 의해 부여될 수 있거나, 또는 자연적일 수 있다. 본 발명의 세포를 위한 발효 배지, 또는 "배양 배지"는 적어도 약 10 g/L의 글루코스를 함유할 수 있다. 추가적인 탄소 기질은 제한없이 모노사카라이드 예컨대 프룩토스, 만노스, 자일로스 및 아라비노스; 올리고사카라이드 예컨대 락토스, 말토스, 갈락토스, 또는 수크로스; 폴리사카라이드 예컨대 전분 또는 셀룰로스 또는 이의 혼합물 및 재생 공급원료 예컨대 유장 침투 옥수수 침지액, 사탕무 당밀, 및 보리 맥아 유래의 미정제 혼합물을 포함할 수 있다. 다른 탄소 기질은 글리세롤을 포함할 수 있다.
- [0073] 그러한 이유로, 본 발명에서 이용되는 탄소의 공급원은 광범위하게 다양한 탄소 함유 기질을 포괄할 수 있고 유기체의 선택에 의해서만 제한될 것이라는 것을 고려한다.
- [0074] 상기 언급된 모든 탄소 기질 및 이의 혼합물이 본 발명에서 적합한 것으로 고려되지만, 바람직한 탄소 기질은 글루코스, 프룩토스, 및 수크로스, 또는 C5 당을 사용하도록 변형된 미생물의 경우 C5 당 예컨대 자일로스 및/또는 아라비노스와 이들의 혼합물이고, 보다 특히 글루코스이다.
- [0075] 바람직한 탄소 기질은 글루코스이다.
- [0076] 적절한 탄소원 이외에도, 발효 배지는 적합한 미네랄, 염, 보조인자, 완충제, 및 바람직한 생성물의 생산에 필요한 효소 경로의 촉진 및 배양물의 성장에 적합한, 당업자에게 공지된, 다른 성분을 함유할 수 있다.
- [0077] 게다가, 본 발명에 따른 재조합 미생물의 성장에 적합한 추가의 유전자 변형이 고려될 수 있다.
- [0078] 용어 "호기성 조건"은 호기성 또는 통성 혐기성 미생물이 최종 전자 억셉터로서 2-산소를 사용하는데 충분한 배양 배지 중 산소의 농도를 의미한다.
- [0079] "미호기성 조건"은 산소의 농도가 공기 중의 농도 미만, 즉 최대 6% O₂의 산소 농도인 배양 배지를 의미한다.
- [0080] "적절한 배양 배지"는 세포의 유지 및/또는 성장에 필수적이거나 또는 유리한 영양분 예컨대 탄소원 또는 탄소 기질, 질소원, 예를 들어, 펩톤, 효모 추출물, 육류 추출물, 맥아 추출물, 우레아, 암모늄 술페이트, 암모늄 클로라이드, 암모늄 나이트레이트 및 암모늄 포스페이트; 인 공급원, 예를 들어, 모노포타슘 포스페이트 또는 디포타슘 포스페이트; 미량 원소 (예를 들어, 금속 염), 예를 들어 마그네슘 염, 코발트 염 및/또는 망간 염을 비롯하여; 성장 인자 예컨대 아미노산, 비타민, 성장 프로모터 등을 포함하는 배지 (예를 들어, 멸균, 액체 배지)를 의미한다. 본 발명에 따른 용어 "탄소원" 또는 "탄소 기질" 또는 "탄소의 공급원"은 헥소스 (예컨대 글루코스, 갈락토스 또는 락토스), 펜토스, 모노사카라이드, 올리고사카라이드, 디사카라이드 (예컨대 수크로스, 셀로비오스 또는 말토스), 당밀, 전분 또는 이의 유도체, 셀룰로스, 헤미셀룰로스 및 이의 조합을 포함하는, 미생물의 정상 성장을 지원하기 위해 당업자가 사용할 수 있는 임의의 탄소 공급원을 의미한다.
- [0081] 본 발명에 따라 도입된 유전자 변형의 일반 특성
- [0082] - 유전자는 다음의 2개 종류의 상호 배타적이지 않은 변형에 의해 과발현된다:
- [0083] · 강력 프로모터 제어 하에 배치; 및/또는
- [0084] · 고려되는 유전자의 다수 카피의 삽입.
- [0085] - 모든 게놈 변형은 공지된 유전자 조작 기술에 따라 효모에 삽입된다:
- [0086] - 본 발명에 따라 효모 게놈에 도입되는 유전자 구성체에 포함되는 연속적인 유전자는 다음의 구조를 갖는다:

- [0087] Prom₁-ORF₁-term₁-ORF₂-유전자₂-term₂ - .../... -Prom_n-ORF_n-term_n, 여기서
- [0088] - Prom₁은 코딩 서열 ORF₁의 발현을 조절하는 서열이고,
- [0089] - ORF₁은 바람직한 단백질 PROT₁, 특히 바람직한 효소 PROT₁을 코딩하는 핵산 서열이고,
- [0090] - Term₁은 전사 복합체로부터 mRNA를 방출시키는 과정을 촉발하는 신호를 새롭게 합성된 mRNA에 제공하여 전사 종결을 매개하는 전사 종결인자 서열이고,
- [0091] - "1", "2", .../... "n"은 동일한 ORF (Open Reading Frame), 프로모터 또는 종결인자를 설명할 수 있거나 또는 그렇지 않을 수 있다. 유전자의 순서는 중요하지 않다. "n"은 일반적으로 5 내지 20 범위의 정수이다. 이들 구성체는 제어된 위치에서 효모 염색체 중 하나에 삽입된다. 일부 실시형태에서, 삽입 부위는 삽입된 구성체의 기능성이나, 또는 최종 유전자 변형 효모의 생존능에 필수적이지 않다.
- [0092] - 효모가 예를 들어 사카로마이세스 세레비지아일 때, 효모 게놈에 도입되고 사카로마이세스 세레비지아 이외의 다른 유기체로부터 기원하는 유전자는 일반적으로 "트랜스코딩" (일반적으로 코돈-최적화)되는데, 이것은 이들 유전자가 에스. 세레비지아에서 발현을 위한 최적 코돈 용법으로 합성된다는 것을 의미한다. 에스. 세레비지아 유래 일부 유전자의 뉴클레오티드 서열 (단백질 서열 아님)은 또한 상기 유전자의 내생성 카피와의 재조합을 최소화하기 위해 변형 ("트랜스코딩")되었다.
- [0093] - 유전자는 효모 유전자 조작에서 사용되는 표준 절차를 통해서 결실될 수 있다. 일부 실시형태에서, 결실의 표적이 되는 유전자는 상기 기술된 유전자 구성체 중 하나의 삽입에 의해 단절될 수 있거나, 또는 대안적으로, 결실의 표적이 되는 유전자는 뉴클레오티드의 짧은 스트레치로 대체된다.
- [0094] - 유전자 발현의 하향 조절은 유전자의 내생성 카피를 파괴하고, 이것을 약 프로모터 제어 하의 ORF 카피로 대체하여 수득될 수 있다. 약 프로모터의 목록 및 서열은 본 명세서의 다른 곳에 기술되어 있다.
- [0095] - 유전자는 (필요하다면) 유전자의 내생성 카피를 결실시키고 유도성 또는 억제성 프로모터 제어 하의 ORF의 신규 카피를 배치하여 "유도성 또는 억제성"으로 만들 수 있다. 유도성 또는 억제성 프로모터는 환경 상태 또는 외부 자극의 변화 시에 활성이 조절 또는 제어, 즉 증가 또는 감소되는 프로모터이다. 유도 또는 억제는 무생물적 인자 예컨대 관심 유기체에 천연적으로 존재하지 않는 화학적 화합물, 빛, 산소 수준, 고온 또는 저온에 의한 유도 또는 억제를 포괄하여, 인공적으로 제어될 수 있다. 유도성 또는 억제성 프로모터의 목록 및 서열은 본 명세서의 다른 곳에 기술되어 있다.
- [0096] - 본 명세서의 다른 곳에 이미 명시된 바와 같이, 단백질은 Yu 등이 2015에 설명한 "degron" 기술 (Current Opinion in Biotechnology, Vol. 36: 199-204)을 사용한 탈안정화를 통해서 과소발현될 수 있다. 간략하게 이 기술은 분해의 표적이 되는 변형을 단백질 서열에 도입시키는 것으로 이루어진다. 이것은 N-말단 규칙으로 공지된 원리에 따른 오직 2개의 처음 아미노산, 또는 유비퀴틴-프로테오솜 분해 경로로 전체 단백질을 표적화하는 거대 서열로 이루어질 수 있다.
- [0097] **본 발명에 따른 재조합 효모**
- [0098] 본 발명자는 엑토인을 생산하는 증가된 능력을 갖는 재조합 미생물, 특히 재조합 효모를 구상하였다.
- [0099] 본 발명은 증가된 엑토인 생산성을 갖는 재조합 효모에 관한 것이고, 여기서 증가된 엑토인 생산은 유전자 조작 방법을 통해서, 이의 게놈에 도입된 다수의 변형을 통해 수득된다.
- [0100] 본 발명은 엑토인-생산 재조합 효모에 관한 것이고, 이의 게놈에서,
- [0101] (A) (i) 아스파토키나제 HOM3을 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나;
- [0102] (ii) 아스파테이트 키나제 AK를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- [0103] (B) 아스파테이트 세미-알데히드 디히드로게나제 HOM2를 코딩하는 적어도 하나의 핵산 및/또는 조효소로서 NAD 및 NADP 둘 모두를 사용할 수 있는 아스파테이트 세미-알데히드 디히드로게나제 HOM2를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- [0104] (C) 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제 EctB를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성

또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;

- [0105] (D) (i) 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 MET2를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- [0106] (ii) 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 METX를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
- [0107] (iii) 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제 EctA를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- [0108] (E) 엑토인 신타제 EctC를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고;
- [0109] (F) (i) 호모세린 디히드로게나제 HOM6을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 결실되었고/되었거나,
- [0110] (ii) 호모세린 디히드로게나제 HOM6을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 핵산은 독립적으로
- [0111] - 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나;
- [0112] - 약 프로모터의 제어 하에 있고/있거나;
- [0113] - 탈안정화된 형태이다.
- [0114] 본 발명자는 효모 세포에 의한 엑토인의 증가된 생산은 이들 효모 세포의 계놈으로 다수의 유전자 변형을 도입시켜 도달될 수 있다는 것을 발견하였다. 본 명세서에서 완전히 기술되는 바와 같이, 상기 다수의 유전자 변형은 일정 유전자의 과발현, 일정 다른 유전자의 제어 발현을 비롯하여, 추가의 다른 유전자의 억제 또는 결실을 포괄한다.
- [0115] 효모 세포에 의한 증가된 엑토인 생산은 후속된 인공적으로 변형된 물질대사 경로가 주로 엑토인 생산을 향하도록 지정하기 위해, 옥살로아세테이트 및 아세틸-CoA의 물질대사를 최적화시키는 한편 동시에 최종 유전자 변형 효모 세포의 최적 생존능을 유지시킴으로써 본 발명자들에 의해 달성되었다.
- [0116] 오랜 연구 기간 이후에, 본 발명자들은 효모 세포에 의한 높은 엑토인 생산은 연속적인 중간 대사산물 포스포-아스파틸 및 아스파틸-세미알데히드로의 옥살로아세테이트의 전환을 증가시키고, 추가적으로 엑토인으로의 아스파틸-세미알데히드의 전환을 증강시키면서, 특히 최종 재조합 효모 세포의 양호한 생존능을 허용하는 산화 환원 상태, 보다 특히 적합화된 NADH/NADPH 균형을 유지하여 수득된다는 것을 밝혀내었다. 이러한 마지막 요점은 필수적이고 본 발명자들에게는 본 연구 작업 전반에서 상당한 도전을 의미한다.
- [0117] 본 발명에 따라 제안된 방법은 예상치 않게, 적은 환원력의 소비, NADPH에 비해 NADH 형태로 환원력의 소비, 및/또는 NADPH 대신 NADH의 생산을 통해 엑토인-생산 전반에서 효모 세포 중 생존 NADH/NADPH 평형을 유지시키는 것을 가능하게 한다.
- [0118] 본 명세서에서 상세하게 개시된 바와 같이, 최종 재조합 효모 세포는 (i) 아스파토키나제-코딩 유전자 (HOM3) 및/또는 (ii) 아스파테이트 키나제-코딩 유전자 (AK), 특히 아스파테이트 키나제-코딩 유전자 (AK)의 과발현 및/또는 제어 발현, 바람직하게 아스파테이트 키나제 유전자 (AK)의 과발현을 실시하도록 유전자 변형된다.
- [0119] 또한, 본 발명에 따른 재조합 효모는 아스파틸-세미알데히드 생산을 위한 중간 대사산물 포스포-아스파틸의 최적 사용을 위한 추가의 유전자 변형을 포함하고, 상기 추가의 유전자 변형은 아스파테이트 세미-알데히드 디히드로게나제-코딩 유전자 (HOM2) 및/또는 조효소로서 NADH 및 NADPH 둘 모두를 사용할 수 있는 아스파테이트 세미-알데히드 디히드로게나제를 코딩하는 유전자의 과발현 및/또는 제어 발현을 포함한다.
- [0120] 게다가, 본 발명에 따른 재조합 효모는 엑토인 생산을 위한 중간체 아스파틸-세미알데히드의 최적 사용을 위한 추가의 유전자 변형을 포함하고, 상기 추가의 유전자 변형은 (i) 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제 유전자 (EctB)의 과발현 및/또는 제어 발현, (ii) 호모세린 0-아세틸트랜스퍼라제-코딩 유전자 (MET2; METX) 및/또는 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제 유전자 (EctA)의 과발현 및/또는 제어 발현, (iii) 엑토인 신타제 유전자 (EctC)의 과발현 및/또는 제어 발현, 및 (iv) 호모세린 디히드로게나제 유전자 (HOM6)의 과소발현 및/또는 제어 발현을 포함한다.
- [0121] 본 발명에 따른 재조합 효모의 일부 실시형태에서, 상기 효모는 아스파테이트 생산을 위한 중간 대사산물 옥살

로아세테이트의 최적 사용을 위해 추가의 유전자 변형을 포함하고, 상기 추가의 유전자 변형은 (i) 아스파테이트 트랜스아미나제 유전자 (AAT2)의 과발현 및/또는 제어 발현 및/또는 (ii) 옥소-글루타레이트를 글루타메이트로 전환시키는 글루타메이트 디히드로게나제 유전자 (GDH)의 과발현 및/또는 제어 발현을 포함한다.

- [0122] 본 발명에 따른 재조합 효모의 일부 실시형태에서, 상기 효모는 생산된 엑토인의 최적 분비를 위해 추가의 유전자 변형을 포함하고, 상기 추가의 유전자 변형은 (i) 일반 아미노산 페르미아제 유전자 (AGP3)의 과소발현 및/또는 제어 발현, (ii) 분지쇄 아미노산 페르미아제 3 유전자 (BAP3)의 과소발현 및/또는 제어 발현, (iii) 분지쇄 아미노산 페르미아제 2 유전자 (BAP2)의 과소발현 및/또는 제어 발현, (iv) 일반 아미노산 페르미아제 유전자 (GAP1)의 과소발현 및/또는 제어 발현, (v) 고친화성 글루타민 페르미아제 유전자 (GNP1)의 과소발현 및/또는 제어 발현, (vi) 일반 아미노산 페르미아제 유전자 (AGP1)의 과소발현 및/또는 제어 발현, (vii) 저친화성 메티오닌 페르미아제 유전자 (MUP3; MUP1)의 과소발현 및/또는 제어 발현, (viii) 가능한 수송체 유전자 (AQR1)의 과발현 및/또는 제어 발현 및/또는 (ix) 폴리아민 수송체 1 유전자 (TP01)의 과발현 및/또는 제어 발현을 포함한다.
- [0123] 특정 실시형태에서, 일반 아미노산 페르미아제, 분지쇄 아미노산 페르미아제 3, 분지쇄 아미노산 페르미아제 2, 일반 아미노산 페르미아제 GAP1, 고친화성 글루타민 페르미아제 GNP1, 일반 아미노산 페르미아제 AGP1, 저친화성 메티오닌 페르미아제 MUP3 및 고친화성 메티오닌 페르미아제 MUP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 독립적으로, 효모, 바람직하게 사카로마이세스 세레비지아 유래 핵산이다.
- [0124] 본 발명에 따른 재조합 효모는 상기 기술된 유전자 변형을 함유하지 않는 부모 효모에 비해 더 높은 수율로 엑토인을 생산한다.
- [0125] 본 발명에 따른 재조합 효모는 NADPH 보다는 NADH를 이용하는 효소, 예컨대 적절한 글루타메이트 디히드로게나제 또는 적절한 아스파테이트 세미알데히드 디히드로게나제의 발현을 촉진하도록 유전자 조작되었다.
- [0126] 본 발명에 따른 재조합 효모의 일부 실시형태에서, 과발현되는 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제는 강력 프로모터 및/또는 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 배치된 에스. 세레비지아 내생성 유전자로 이루어진다.
- [0127] 일부 실시형태에서, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제는 바람직하게 에스. 세레비지아 HOM2 유전자에 의해 코딩된다.
- [0128] 일부 실시형태에서, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제는 가장 바람직하게는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, NAD 및 NADP 둘 모두를 사용하는 돌연변이된 HOM2 단백질을 코딩하는 유전자인, 에스. 세레비지아 HOM2 유전자의 변이체에 의해 코딩된다. 이러한 유전자 변이체는 예를 들어 실시예에 예시되어 있고 HOM2-2라고 한다. 이것은 하기에 논의되는 바와 같이 돌연변이된 에스. 세레비지아 HOM2 유전자에 상응한다.
- [0129] 조효소로서 NADP에 대한 HOM2의 높은 선택성을 완화시키고 NAD에 대한 효소의 친화성을 증강시키기 위해서 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제 변이체 중 몇몇 아미노산 잔기를 목표로 하는 돌연변이의 성질은 당업자에게 공지되어 있고 예를 들어 [Faehnle, C. R. et al., Journal of Molecular Biology 1055-1068 (2005)]에서 확인할 수 있다. 특히, 뉴클레오티드 GAG에 의한 뉴클레오티드 서열의 위치 115 내지 117의 뉴클레오티드 TCT의 치환에 상응하는 S39에서 E39로의 돌연변이를 언급할 수 있다.
- [0130] 당업자에게 충분히 공지된 아미노산의 명명법에 따라서, S는 세린을 나타내고 E는 글루탐산을 나타낸다.
- [0131] 일부 실시형태에서, 아스파토키나제는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, 가장 바람직하게는 에스. 세레비지아 HOM3 유전자에 의해 코딩된다.
- [0132] 아스파토키나제-코딩 유전자 과발현 및/또는 제어 발현
- [0133] 본 발명에 따른 재조합 효모의 일부 실시형태에서, 아스파토키나제-코딩 유전자의 과발현은 효모 계능의 선택된 위치(들)에, 아스파토키나제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피를 삽입시켜 수득된다. 본 발명에 포괄되는 아스파토키나제 및 아스파토키나제-코딩 유전자는 본 명세서의 다른 곳에 상술되어 있다.
- [0134] 이들 실시형태의 일부에서, 아스파토키나제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 상기 하나 이상의 카피는 아스파토키나제의 강력한 발현을 허용하는 조절 서열, 예컨대 효모 세포에서 기능성인 강력 프로모터를 포함한다.
- [0135] 본 발명에 따른 재조합 효모의 이들 실시형태에 추가하여 또는 그 대안으로서, 적어도 하나의 아스파토키나제-코딩 유전자는 효모 세포에서 기능성인 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다.

- [0136] 이들 실시형태에서, 아스파토키나제-코딩 유전자의 제어 발현은 천연 효모 아스파토키나제 오픈 리딩 프레임의 위치에, 유도성 조절 서열, 예컨대 유도성 또는 억제성 프로모터를 삽입시켜, 이 계놈 위치에서 효모 계놈에 처음에 존재한 내생성 프로모터를 치환시켜 수득될 수 있다.
- [0137] 임의의 특정한 이론에 국한하고 싶지 않지만, 발명자들은 아스파토키나제-코딩 유전자의 과발현으로, 포스포-아스파틸이라고도 하는 아스파틸 포스페이트 (아스파틸-P)로의 아스파테이트의 전환의 제어 수준이 수득되어, 본 발명에 따른 재조합 효모의 높은 생존능 수준에 기여할 것이라고 믿는다. 동일한 것이 적어도 하나의 아스파토키나제 코딩 서열이 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 때 적용된다.
- [0138] 일부 바람직한 실시형태에서, 상기 아스파토키나제-코딩 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, 사카로마이세스 세레비시아 유래의 HOM3 유전자이다.
- [0139] 바람직한 실시형태에서, 상기 아스파토키나제-코딩 유전자는 강력 프로모터 pCCW12 또는 유도성 또는 억제성 프로모터 pCUP-1-1의 제어 하에 배치된다.
- [0140] 예시적으로, 아스파토키나제 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, HOM6 유전자 내 및/또는 SAM3 유전자 내에 삽입될 수 있다.
- [0141] 아스파테이트 키나제-코딩 유전자 과발현 및/또는 제어 발현
- [0142] 상기 기술된 바와 같이 아스파토키나제의 과발현 및/또는 제어 발현에 추가하여 또는 대안적으로, 본 발명에 따른 재조합 효모는 아스파테이트 키나제-코딩 유전자의 과발현 및/또는 제어 발현을 포함하도록 될 수 있다.
- [0143] 따라서, 본 발명에 따른 재조합 효모의 바람직한 실시형태에서, 아스파테이트 키나제-코딩 유전자의 과발현은 효모 계놈의 선택된 위치(들)에, 아스파테이트 키나제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피를 삽입시켜 수득된다. 본 발명에 포괄되는 아스파테이트 키나제 및 아스파테이트 키나제-코딩 유전자는 본 명세서의 다른 곳에 상술되어 있다.
- [0144] 이들 실시형태의 일부에서, 상기 아스파테이트 키나제-코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피는 아스파테이트 키나제의 강력한 발현을 허용하는 조절 서열, 예컨대 효모 세포에서 기능성인 강력 프로모터를 포함한다.
- [0145] 본 발명에 따른 재조합 효모의 이들 실시형태에 추가하여 또는 이의 대안으로서, 적어도 하나의 아스파테이트 키나제-코딩 유전자는 효모 세포에서 기능성인 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다.
- [0146] 임의의 특정한 이론에 국한하고 싶지 않지만, 본 발명자는 아스파테이트 키나제-코딩 유전자의 제어 발현, 아스파틸 포스페이트 (아스파틸-P)로의 아스파테이트의 전환의 제어된 수준이 수득되어 본 발명에 따른 재조합 효모의 높은 수준의 생존능에 기여할 것이라고 믿는다.
- [0147] 바람직한 실시형태에서, 상기 아스파테이트 키나제-코딩 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) 유래 AK 유전자이다.
- [0148] 바람직한 실시형태에서, 상기 아스파테이트 키나제-코딩 유전자는 유도성 또는 억제성 프로모터 pACU7의 제어 하에 배치된다.
- [0149] 예시적으로, 아스파테이트 키나제 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, TRP1 유전자 내에 삽입될 수 있다.
- [0150] 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제-코딩 유전자 과발현 및/또는 제어 발현
- [0151] 본 발명에 따른 재조합 효모의 바람직한 실시형태에서, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제-코딩 유전자의 과발현은 효모 계놈의 선택된 위치(들)에, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피를 삽입시켜 수득된다. 본 발명에 포괄되는 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제 및 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제 코딩 유전자는 본 명세서의 다른 곳에 상술되어 있다.
- [0152] 이들 실시형태의 일부에서, 상기 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피는 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제의 강력한 발현을 허용하는 조절 서열, 예컨대 효모 세포에서 기능성인 강력 프로모터를 포함한다.

- [0153] 본 발명에 따른 재조합 효모의 이들 실시형태에 추가하여 또는 그의 대안으로서, 적어도 하나의 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제-코딩 유전자는 효모 세포에서 기능성인 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다.
- [0154] 임의의 특정한 이론에 국한하고 싶지 않지만, 발명자는 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제의 과발현이 아스파틸-세미알데히드로의 중간 대사산물 아스파틸 포스페이트 (아스파틸-P)의 전환을 증강시킬 수 있다고 믿는다. 동일한 것이 적어도 하나의 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제 코딩 서열이 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 때 적용된다.
- [0155] 일부 실시형태에서, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제는 아스파틸 포스페이트 (아스파틸-P)의 아스파틸-세미알데히드로의 전환을 촉매하기 위해 NADH 또는 NADPH 둘 모두를 사용하는 효소 변이체일 수 있다.
- [0156] 일부 바람직한 실시형태에서, 상기 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제 -코딩 유전자는 사카로마이세스 세레비시아 유래의 HOM2 유전자인거나, 또는 대안적으로 본 명세서의 실시예에 표시되고 이전에 기술된 바와 같이 NADH 및 NADPH 둘 모두를 이용하는 HOM2의 변이체이다.
- [0157] 바람직한 실시형태에서, 상기 아스파테이트 세미-알데히드 디히드로게나제-코딩 유전자는 유도성 또는 억제성 프로모터 pACU5 또는 강력 프로모터 pCCW12의 제어 하에 배치된다.
- [0158] 예시적으로, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, HIS3 유전자 내, 및/또는 MUP3 유전자 내에 삽입될 수 있다.
- [0159] 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제-코딩 유전자 과발현 및/또는 제어 발현
- [0160] 본 발명에 따른 재조합 효모의 바람직한 실시형태에서, 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제-코딩 유전자의 과발현은 효모 계능의 선택된 위치(들)에, 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피를 삽입시켜 수득된다. 본 발명에 포괄되는 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제 및 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제-코딩 유전자는 본 명세서의 다른 곳에 상술되어 있다.
- [0161] 이들 실시형태의 일부에서, 상기 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피는 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제의 강력한 발현을 허용하는 조절 서열, 예컨대 효모 세포에서 기능성인 강력 프로모터를 포함한다.
- [0162] 본 발명에 따른 재조합 효모의 이들 실시예에 추가적으로 또는 그 대안으로서, 적어도 하나의 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제-코딩 유전자는 효모 세포에서 기능성인 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다.
- [0163] 임의의 특정한 이론에 국한하고 싶지 않지만, 발명자는 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제의 과발현이 중간 대사산물 아스파틸-세미알데히드의 2,4-디아미노부티레이트로의 전환을 증강시킬 수 있다고 믿는다. 동일한 것이 적어도 하나의 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제 코딩 서열이 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 때 적용된다.
- [0164] 바람직한 실시형태에서, 상기 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제-코딩 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, 슈도모나스 애루지노사 (*Pseudomonas aeruginosa*) 유래 EctB 유전자, 또는 할로모나스 엘롱가타 (*Halomonas elongata*) (때때로 크로모할로박터 살렉시겐스 (*Chromohalobacter salexigens*)라고도 함) 유래 EctB 유전자이다.
- [0165] 바람직한 실시형태에서, 상기 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제-코딩 유전자는 강력 프로모터 pCCW12 및/또는 강력 프로모터 pTDH3의 제어 하에 배치된다.
- [0166] 예시적으로, 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, HOM6 유전자 내 및/또는 SAM3 유전자 내 및/또는 MUP3 유전자 내 및/또는 URA3 유전자 내에 삽입될 수 있다.
- [0167] 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제-코딩 유전자 과발현 및/또는 제어 발현
- [0168] 본 발명에 따른 재조합 효모의 바람직한 실시형태에서, 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 -코딩 유전자의 과발현은 효모 계능의 선택된 위치(들)에, 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피를 삽입하여 수득된다. 본 발명에 포괄되는 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 및 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 -코딩 유전자는 본 명세서의 다른 곳에 상술되어 있다.

- [0169] 이들 실시형태의 일부에서, 상기 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피는 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제의 강력한 발현을 허용하는 조절 서열, 예컨대 효모 세포에서 기능성인 강력 프로모터를 포함한다.
- [0170] 본 발명에 따른 재조합 효모의 이들 실시예에 추가로 또는 그의 대안으로서, 적어도 하나의 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 -코딩 유전자는 효모 세포에 기능성인 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다.
- [0171] 임의의 특정한 이론에 국한하고 싶지 않지만, 발명자는 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제의 과발현이 허용되어 결과적으로 아세틸-CoA의 존재 하에서, 중간 대사산물 2,4-디아미노부티레이트의 아세틸-2,4-디아미노부티레이트로의 전환 수준을 증가시킨다고 믿는다. 동일한 것이 적어도 하나의 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 코딩 서열이 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 때 적용된다.
- [0172] 바람직한 실시형태에서, 상기 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제-코딩 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, 사카로마이세스 세레비지아 유래의 MET2 유전자이다.
- [0173] 바람직한 실시형태에서, 상기 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제-코딩 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, 코리네박테리움 글루타미컴 (*Corynebacterium glutamicum*) 유래 METX 유전자이다.
- [0174] 특히 바람직한 실시형태에서, 본 발명에 따른 재조합 효모는 사카로마이세스 세레비지아 유래의 MET2 유전자인 적어도 하나의 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제-코딩 유전자 및 코리네박테리움 글루타미컴 유래 METX 유전자인 적어도 하나의 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제-코딩 유전자를 포함한다.
- [0175] 바람직한 실시형태에서, 상기 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제-코딩 유전자는 다수 카피가 존재하면 상기 유전자의 각 카피에 대해 독립적으로 강력 프로모터 pPDC1 또는 유도성 또는 억제성 프로모터 pACU6의 제어 하에 배치된다.
- [0176] 예시적으로, 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, SAM3 유전자 내 및/또는 HIS3 유전자 내에 삽입될 수 있다.
- [0177] 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제-코딩 유전자 과발현 및/또는 제어 발현
- [0178] 본 발명에 따른 재조합 효모의 바람직한 실시형태에서, 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제-코딩 유전자의 과발현은 효모 계통의 선택된 위치(들)에, 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피를 삽입시켜 수득된다. 본 발명에 포괄되는 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제 및 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제-코딩 유전자는 본 명세서의 다른 곳에 상술되어 있다.
- [0179] 이들 실시형태의 일부에서, 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피는 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제의 강력한 발현을 허용하는 조절 서열, 예컨대 효모 세포에서 기능성인 강력 프로모터를 포함한다.
- [0180] 본 발명에 따른 재조합 효모에 추가로 또는 그의 대안으로서, 적어도 하나의 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제-코딩 유전자는 효모에서 기능성인 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다.
- [0181] 임의의 특정한 이론에 국한하고 싶지 않지만, 발명자는 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제의 과발현이 허용되어, 결과적으로 아세틸-CoA의 존재 하에서, 중간 대사산물 2,4-디아미노부티레이트의 아세틸-2,4-디아미노부티레이트로의 전환 수준을 증가시킨다고 믿는다. 동일한 것이 적어도 하나의 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제 코딩 서열이 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 때 적용된다.
- [0182] 바람직한 실시형태에서, 상기 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제-코딩 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, 할로모나스 엘롱가타 (때때로 크로모할로박터 살렉시겐스라고도 함) 유래 EctA 유전자이다.
- [0183] 바람직한 실시형태에서, 상기 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제-코딩 유전자는 강력 프로모터 pPDC1의 제어 하에 배치된다.
- [0184] 예시적으로, 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이 LYP1 유전자 내 및/또는 MUP3 유전자 내에 삽입될 수 있다.
- [0185] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 재조합 효모는 이의 계통에 다음을 포함한다:
- [0186] - 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고, 바람직하게는 유도성 또는 억제성 프로모

터의 제어 하에 있는 호모세린-0-아세틸트랜스퍼라제 METX를 코딩하는 적어도 하나의 핵산; 및

[0187] - 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고, 바람직하게는 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있는 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제 EctA를 코딩하는 적어도 하나의 핵산.

[0188] 엑토인 신타제-코딩 유전자 과발현 및/또는 제어 발현

[0189] 본 발명에 따른 재조합 효모의 바람직한 실시형태에서, 엑토인 신타제-코딩 유전자의 과발현은 효모 계능의 선택된 위치(들)에, 엑토인 신타제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피를 삽입시켜 수득된다.

본 발명에 포괄되는 엑토인 신타제 및 엑토인 신타제-코딩 유전자는 본 명세서의 다른 곳에 상술되어 있다.

[0190] 이들 실시형태의 일부에서, 상기 엑토인 신타제 코딩 서열을 코딩하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피는 엑토인 신타제의 강력한 발현을 허용하는 조절 서열, 예컨대 효모에서 기능성인 강력 프로모터를 포함한다.

[0191] 본 발명에 따른 재조합 효모의 이들 실시형태에 추가로 또는 그의 대안으로서, 적어도 하나의 엑토인 신타제-코딩 유전자는 효모 세포에서 기능성인 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다.

[0192] 임의의 특정한 이론에 국한하고 싶지 않지만, 발명자는 엑토인 신타제의 과발현을 허용하여, 결과적으로 중간 대사산물 아세틸-2,4-디아미노부티레이트의 엑토인으로의 전환 수준을 증가시킨다고 믿는다. 동일한 것이 적어도 하나의 엑토인 신타제 코딩 서열이 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 때 적용된다.

[0193] 바람직한 실시형태에서, 상기 엑토인 신타제-코딩 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, 할로모나스 엘롱가타 유래 EctC 유전자이다.

[0194] 바람직한 실시형태에서, 상기 엑토인 신타제-코딩 유전자는 강력 프로모터 pTDH3 및/또는 강력 프로모터 pTEF1의 제어 하에 배치된다.

[0195] 예시적으로, 엑토인 신타제 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, LYP1 유전자 내 및/또는 MUP3 유전자 내 및/또는 URA3 유전자 내에 삽입될 수 있다.

[0196] 호모세린 디히드로게나제의 결실 또는 과소발현

[0197] 본 발명에 따른 재조합 효모는 다음과 같은 계능을 갖는다고 더욱 정의된다:

[0198] (i) 호모세린 디히드로게나제 HOM6을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산이 결실 및/또는 단절되었고/되었거나,

[0199] (ii) 호모세린 디히드로게나제 HOM6을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 핵산은 독립적으로

[0200] - 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나;

[0201] - 약 프로모터의 제어 하에 있고/있거나;

[0202] - 탈안정화된 형태이다.

[0203] 임의의 특정한 이론에 국한하고 싶지 않지만, 발명자는 호모세린 디히드로게나제 유전자의 과소 발현이 호모세린으로의 이의 전환을 통해 생산된 아스파틸-세미알데히드의 소비를 감소시킴으로써 재조합 효모에 의한 2,4-디아미노부티레이트 생산을 증가시킬 것이라고 믿는다.

[0204] 일부 실시형태에서, 호모세린 디히드로게나제의 과소발현은 예를 들어 이 유전자의 발현을 억제성 조절 서열, 예컨대 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 배치시킴으로써 조건적으로 만들어 질 수 있다.

[0205] 유전자 발현의 억제, 표적 유전자의 단절 또는 표적 유전자의 결실을 위한 방법은 당업자에게 충분히 공지되어 있다.

[0206] 호모세린 디히드로게나제 과소발현은 탈안정화된 호모세린 디히드로게나제를 코딩하는 핵산의 삽입을 포괄한다. 탈안정화된 호모세린 디히드로게나제는 부모 호모세린 디히드로게나제에 비해 효모 세포 내에서 더 신속하게 분해되는 호모세린 디히드로게나제의 변이체이다 .

[0207] 바람직한 실시형태에서, 탈안정화된 호모세린 디히드로게나제는 degron-태그화 호모세린 디히드로게나제 단백질로 이루어진다.

[0208] 예를 들어, 호모세린 디히드로게나제 유전자는 loxP, 또는 예를 들어 URA3.K1-loxP에 의해 단절될 수 있고, 그

에 따라 결실된다 (불활성화될 수 있다고 할 수 있음).

[0209] 대안적으로 출원된 실시예에 예시된 바와 같이, 관심 유전자를 포함하는 카세트에 의해 단절될 수 있다.

[0210] **아스파토키나제 (HOM3)**

[0211] 아스파토키나제 효소는 ATP의 존재 하에서 L-아스파테이트의 4-포스포-L-아스파테이트로의 전환을 촉매하는 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다. 사카로마이세스 세레비지아의 게놈에 의해 코딩되는 아스파토키나제는 HOM3이라고 할 수 있다.

[0212] 아스파토키나제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.

[0213] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 Stadtman 등이 기술한 방법 (1961, J Biol Chem, Vol. 236 (7): 2033-2038)을 언급할 수 있다.

[0214] 본 명세서에서 바람직한 아스파토키나제는 n° EC 2.7.2.4의 EC 번호를 갖는 효소이다.

[0215] 바람직한 실시형태에 따라서, 아스파토키나제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게 원핵생물 유기체 및 진핵생물 유기체를 포함하는 군으로부터 선택되는 유기체로부터 기원한 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 아스파토키나제를 코딩하는 핵산(들)은 고세균으로부터 기원한 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 아스파토키나제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게 바실러스 서브틸리스 및 효모로부터 선택되는 유기체로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 다른 바람직한 실시형태에서, 아스파토키나제를 코딩하는 핵산(들)은 효모, 특히 사카로마이세스 세레비지아로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다.

[0216] 역시 바람직한 실시형태에 따라서, 아스파토키나제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 1의 핵산과 적어도 25%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 핵산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산(들)일 수 있다. SEQ ID NO: 1의 핵산은 역시 HOM3이라고 할 수 있는 사카로마이세스 세레비지아로부터 기원된 아스파토키나제를 코딩한다.

[0217] 이 서열과 관련된 동일한 속성의 생물학적 활성은 ATP 존재 하에서 L-아스파테이트의 4-포스포-L-아스파테이트로의 전환을 촉매하는 효소를 코딩하는 능력이다.

[0218] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 25%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포함한다.

[0219] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 65%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.

[0220] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 80%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.

[0221] 사카로마이세스 세레비지아 유래 아스파토키나제의 아미노산 서열의 경우, 당업자는 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP010972, 또는 본 명세서에 기술된 SEQ ID NO: 2를 언급할 수 있다.

[0222] 다른 특정한 실시형태에 따라서, 아스파토키나제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 2의 아미노산 서열과 적어도 25%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산(들)일 수 있다. 예시적으로, 아쿠아마리나 아틀란티카 (*Aquamarina atlantica*)로부터 기원된 아스파토키나제는 SEQ ID NO: 2의 아스파토키나제와 25%의 아미노산 동일성을 갖는다.

[0223] 이 서열과 관련된 동일 속성의 생물학적 활성은 이전에 기술된 바와 같고, 즉 ATP의 존재 하에서 L-아스파테이트의 4-포스포-L-아스파테이트로의 전환을 촉매하는 능력이다.

- [0224] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 25%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0225] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 65%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 아미노산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0226] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 80%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 아미노산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0227] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명에서 아스파토키나제의 발현 수준은 이하 본 명세서에서 보다 상세하게 정의되는 바와 같이, 상기 아스파토키나제를 코딩하는 핵산 서열의 각각 5' 및 3' 위치에 존재하는 적어도 하나의 프로모터 및 적어도 하나의 종결인자에 의해 조절된다.
- [0228] 본 설명의 다른 곳에 명시된 바와 같이, 아스파토키나제는 본 발명에 따른 재조합 효모에서 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있다.
- [0229] 일부 실시형태에서, 아스파토키나제의 과발현은 상기 재조합 효모 내에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어에 의한 결과일 수 있다.
- [0230] 일부 다른 실시형태에서, 아스파토키나제의 과발현은 상기 재조합 효모의 게놈 내에 아스파토키나제-코딩 서열의 다수 카피의 존재로 인한 결과일 수 있다.
- [0231] 여전히 추가의 실시형태에서, 아스파토키나제의 과발현은 (i) 상기 재조합 효모 내 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어 및 (ii) 상기 재조합 효모의 게놈 내 아스파토키나제-코딩 서열의 다수 카피의 존재 둘 모두로 인한 결과일 수 있다.
- [0232] **아스파테이트 키나제 (AK)**
- [0233] 아스파테이트 키나제 효소는 ATP의 존재 하에서 L-아스파테이트의 4-포스포-L-아스파테이트로의 전환을 촉매하는 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다. 바실러스 서브틸리스의 게놈에 의해 코딩되는 아스파테이트 키나제는 AK라고 할 수 있다.
- [0234] 아스파테이트 키나제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속하고 아스파토키나제에 대해 이전에 표시한 것과 동일하다.
- [0235] 바람직한 실시형태에 따라서, 아스파테이트 키나제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게는 원핵생물 유기체 및 진핵생물 유기체를 포함하는 군으로부터 선택되는 유기체로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 아스파테이트 키나제를 코딩하는 핵산(들)은 고세균으로부터 기원하는 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 아스파테이트 키나제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게는 바실러스 서브틸리스 및 효모로부터 선택되는 유기체로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 다른 바람직한 실시형태에서, 아스파테이트 키나제를 코딩하는 핵산(들)은 효모, 특히 사카로마이세스 세레비시아로부터 기원하는 핵산(들)일 수 있다.
- [0236] 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NC_000964.3에 개시된 것을 언급할 수 있다.
- [0237] 역시 바람직한 실시형태에서, 아스파테이트 키나제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 3의 핵산과 적어도 25%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 핵산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산(들)일 수 있다. SEQ ID NO: 3의 핵산은 AK라고도 할 수 있는, 바실러스 서브틸리스로부터 기원하는 아스파테이트 키나제를 코딩한다.
- [0238] 이 서열과 관련하여 동일 속성의 생물학적 활성은 ATP의 존재 하에서 L-아스파테이트의 4-포스포-L-아스파테이트로의 전환을 촉매하는 효소를 코딩하는 능력이다.

- [0239] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 25%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0240] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 65%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0241] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 80%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0242] 바실러스 서브틸리스 유래 아스파테이트 키나제의 아미노산 서열의 경우, 당업자는 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_389558.2, 또는 본 명세서에 기술된 SEQ ID NO: 4를 언급할 수 있다.
- [0243] 다른 특정한 실시형태에 따라서, 아스파테이트 키나제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 4의 아미노산 서열과 적어도 25%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산(들)일 수 있다. 예시적으로, 아쿠아마리나 아틀란티카로부터 기원된 아스파테이트 키나제는 SEQ ID NO: 4의 아스파토키나제와 25%의 아미노산 동일성을 갖는다.
- [0244] 이 서열과 관련된 동일 속성의 생물학적 활성은 이전에 기술된 바와 같고, 즉 ATP의 존재 하에서 L-아스파테이트의 4-포스포-L-아스파테이트로의 전환을 촉매하는 능력이다.
- [0245] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 25% 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 26%, 27%, 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0246] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 65%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 아미노산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0247] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 80%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 아미노산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0248] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명에서 아스파테이트 키나제의 발현 수준은 이하 본 명세서에서 보다 상세히 정의되는 바와 같이, 상기 아스파테이트 키나제를 코딩하는 핵산 서열의 각각 5' 및 3' 위치에 존재하는, 적어도 하나의 프로모터 및 적어도 하나의 종결인자에 의해 조절된다.
- [0249] 본 명세서의 다른 곳에 명시된 바와 같이, 아스파테이트 키나제는 본 발명에 따른 재조합 효모에서 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있다.
- [0250] 일부 실시형태에서, 아스파테이트 키나제의 과발현은 상기 재조합 효모 내에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어에 의한 결과일 수 있다.
- [0251] 일부 다른 실시형태에서, 아스파테이트 키나제의 과발현은 상기 재조합 효모의 게놈 내에서 아스파테이트 키나제-코딩 서열의 다수 카피의 존재로 인한 결과일 수 있다.
- [0252] 여전히 추가의 실시형태에서, 아스파테이트 키나제의 과발현은 (i) 상기 재조합 효모 내에서 강력 프로모터에

의한 상응하는 유전자의 제어 및 (ii) 상기 재조합 효모의 게놈 내에서 아스파테이트 키나제-코딩 서열의 다수 카피의 존재 둘 모두로 인한 결과일 수 있다.

[0253] **아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제 (HOM2)**

[0254] 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제는 L-아스파틸-4-포스페이트의 환원적 탈인산화에 의한 L-아스파테이트-세미알데히드의 NADPH-의존적 형성을 촉매하는 것으로 당분야에 공지된 단백질이다. 사카로마이세스 세레비지아의 게놈에 의해 코딩되는 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제는 HOM2라고 할 수 있다.

[0255] 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.

[0256] 본 명세서에서 바람직한 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제는 EC 번호 1.2.1.11을 갖는 효소이다.

[0257] 바람직한 실시형태에 따라서, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게는 원핵생물 유기체 및 진핵생물 유기체를 포함하는 군으로부터 선택되는 유기체로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제를 코딩하는 핵산(들)은 고세균으로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 바람직한 실시형태에서, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제를 코딩하는 핵산(들)은 효모, 특히 사카로마이세스 세레비지아로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다.

[0258] 다른 바람직한 실시형태에 따라서, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제를 코딩하는 핵산은 사카로마이세스 세레비지아 유래 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제의 변이체 또는 돌연변이체일 수 있고, 여기서 상기 변이체 효소 또는 상기 돌연변이체 효소는 반응의 촉매를 위해 NADH 또는 NADPH 둘 모두를 사용한다. 이러한 변이체 또는 돌연변이체 효소는 당분야에 공지되어 있고 본 내용에서 앞서 설명되어 있다.

[0259] 역시 바람직한 실시형태에 따라서, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 6의 기준 핵산 서열로 이루어진 군에서 선택된 핵산과 적어도 27%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 핵산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군에서 선택되는 핵산(들)일 수 있다. SEQ ID NO: 5 및 SEQ ID NO: 6의 핵산은 집합적으로 본 명세서에서 HOM2라고 할 수 있는, 사카로마이세스 세레비지아로부터 기원된 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제를 코딩한다.

[0260] 이 서열과 관련된 동일 속성의 생물학적 활성은 L-아스파틸-4-포스페이트의 환원적 탈인산화에 의한 L-아스파테이트-세미알데히드의 NADPH-의존적 형성을 촉매하는 효소를 코딩하는 능력이다.

[0261] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 27% 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오타이드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.

[0262] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 65%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오타이드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.

[0263] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 80% 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오타이드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.

[0264] 사카로마이세스 세레비지아 유래 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제의 아미노산 서열의 경우, 당업자는 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP010442, 또는 본 명세서에 기술된 SEQ ID NO: 7을 언급할 수 있다.

[0265] 다른 특정한 실시형태에 따라서, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 7의 아미노산 서열과 적어도 27%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산(들)일 수 있다. 예시적으로, 락토바실러스 와사트첸시스 (*Lactobacillus wasatchensis*)로부터 기원된 아스

파테이트-세미알데히드 디히드로게나제는 SEQ ID NO: 7의 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제와 27%의 아미노산 동일성을 갖는다.

- [0266] 이 서열과 관련된 동일 속성의 생물학적 활성은 이전에 기술된 바와 같고, 즉 L-아스파틸-4-포스페이트의 환원적 탈인산화에 의한 L-아스파테이트-세미알데히드의 NADPH-의존적 형성을 촉매하는 능력이다.
- [0267] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 27%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0268] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 65% 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 아미노산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0269] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 80% 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 아미노산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0270] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명에서 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제의 발현 수준은 이하 본 명세서에서 보다 상세히 정의되는 바와 같이, 상기 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제를 코딩하는 핵산 서열의 각각 5' 및 3' 위치에 존재하는, 적어도 하나의 프로모터 및 적어도 하나의 종결인자에 의해 조절된다.
- [0271] 본 설명의 다른 곳에 명시된 바와 같이, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제는 본 발명에 따른 재조합 효모에서 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있다.
- [0272] 일부 실시형태에서, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제의 과발현은 상기 재조합 효모 내에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어에 의한 결과일 수 있다.
- [0273] 일부 다른 실시형태에서, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제의 과발현은 상기 재조합 효모의 게놈 내에 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제-코딩 서열의 다수 카피의 존재로 인한 결과일 수 있다.
- [0274] 여전히 추가 실시형태에서, 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제의 과발현은 (i) 상기 재조합 효모 내에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어 및 (ii) 상기 재조합 효모의 게놈 내에 아스파테이트-세미알데히드 디히드로게나제-코딩 서열의 다수 카피의 존재 둘 모두로 인한 결과일 수 있다.
- [0275] **디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제 (EctB)**
- [0276] 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제 효소는 글루타메이트의 존재 하에 아스파틸 세미알데히드의 2,4-디아미노부티레이트로의 전환을 촉매하는 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다. 할로모나스 엘롱가타의 게놈에 의해 코딩되는 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제는 EctB 또는 EctB.He라고 할 수 있다.
- [0277] 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.
- [0278] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 [Ono H et al., 1999, Journal of Bacteriology, p91-99]에 기술된 방법을 언급할 수 있다.
- [0279] 본 명세서에서 바람직한 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제는 n° 2.6.1.76의 EC 번호를 갖는 효소이다.
- [0280] 바람직한 실시형태에서, 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게는 원핵생물 유기체 및 진핵생물 유기체를 포함하는 군으로부터 선택되는 유기체로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 고세균으로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게 박테리아로부터 선택되는 유기체, 특히 슈도모나스 애루지노사 (*Pseudomonas aeruginosa*), 할로모나스 엘롱가타 (*Halomonas elongata*), 또는 스포로카르시나 뉴요켄시스 (*Sporocarcina newyorkensis*), 및 바람직하

게는 슈도모나스 에루지노사 또는 할로모나스 엘롱가타로부터 기원하는 핵산(들)일 수 있다.

- [0281] 역시 바람직한 실시형태에 따라서, 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 8 또는 SEQ ID NO: 9의 핵산과 적어도 35%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 핵산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산(들)일 수 있다.
- [0282] 이 서열과 관련된 동일 속성의 생물학적 활성은 글루타메이트의 존재 하에 아스파틸 세미알데히드의 2,4-디아미노부티레이트로의 전환을 촉매하는 효소를 코딩하는 능력이다.
- [0283] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 35%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오타이드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0284] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 65%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0285] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 80%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오타이드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0286] 할로모나스 엘롱가타 유래 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제의 아미노산 서열의 경우에, 당업자는 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 WP_013332345.1, 또는 본 명세서에 기술된 SEQ ID NO: 10 또는 SEQ ID NO: 11을 언급할 수 있다.
- [0287] 다른 특정한 실시형태에 따라서, 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 10 또는 SEQ ID NO: 11의 아미노산 서열과 적어도 35%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산(들)일 수 있다.
- [0288] 이 서열과 관련된 동일 속성의 생물학적 활성은 이전에 기술된 바와 같고, 즉 글루타메이트의 존재 하에 아스파틸 세미알데히드의 2,4-디아미노부티레이트로의 전환을 촉매하는 능력이다.
- [0289] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 35% 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0290] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 65% 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 아미노산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0291] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 80%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 아미노산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0292] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명에서 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제의 발현 수준은 이하 본 명세서에서 보다 상세히 정의되는 바와 같이, 상기 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산 서열의 각각 5' 및 3'에 존재하는 적어도 하나의 프로모터 및 적어도 하나의 종결인자에 의해 조절된다.
- [0293] 본 설명의 다른 곳에 명시된 바와 같이, 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제는 본 발명에 따른 재조합 효모

에서 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있다.

- [0294] 일부 실시형태에서, 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제의 과발현은 상기 재조합 효모 내에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어에 의한 결과일 수 있다.
- [0295] 일부 다른 실시형태에서, 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제의 과발현은 상기 재조합 효모의 게놈 내에 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제-코딩 서열의 다수 카피의 존재로 인한 결과일 수 있다.
- [0296] 여전히 추가의 실시형태에서, 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제의 과발현은 (i) 상기 재조합 효모 내에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어 및 (ii) 상기 재조합 효모의 게놈 내에서 디아미노부티레이트 아미노트랜스퍼라제-코딩 서열의 다수 카피의 존재 둘 모두로 인한 결과일 수 있다.
- [0297] **호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제 (MET2; METX)**
- [0298] 호모세린 O-아세틸 트랜스퍼라제 효소는 CoA 및 아세틸-2,4-디아미노부티레이트로의 아세틸-CoA 및 2,4-디아미노부티레이트 간 반응을 촉매하기 위한 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다. 사카로마이세스 세레비시아의 게놈에 의해 코딩되는 호모세린 O-아세틸 트랜스퍼라제는 MET2라고 할 수 있다.
- [0299] 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.
- [0300] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게는 Shuzo Yamagata가 기술한 방법 (1987, The Journal of Bacteriology, Vol. 169(8): 3458-3463)을 언급할 수 있다.
- [0301] 본 명세서에서 바람직한 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제는 n° EC 2.3.1.31의 EC 번호를 갖는 효소이다.
- [0302] 바람직한 실시형태에서, 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게는 원핵생물 유기체 및 진핵생물 유기체를 포함하는 군으로부터 선택되는 유기체로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 고세균으로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게는 코리네박테리움 글루타미컴 및 효모로부터 선택되는 유기체로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 다른 바람직한 실시형태에서, 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 효모, 특히 사카로마이세스 세레비시아로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다.
- [0303] 특정한 실시형태에 따라서, 호모세린-O-아세틸트랜스퍼라제 METX를 코딩하는 핵산은 박테리아, 특히 코리네박테리움 글루타미컴 (*Corynebacterium glutamicum*), 에스케리치아 콜라이 (*Escherichia coli*), 헤모필리우스 인플루엔자 (*Haemophilus influenza*), 스트렙토마이세스 라벤둘라에 (*Streptomyces lavendulae*), 렙토스피라 인터로간스 (*Leptospira interrogans*), 스트렙토코커스 뉴모니아 (*Streptococcus pneumonia*) 및 마이코박테리움 튜버큘로시스 (*Mycobacterium tuberculosis*)로 이루어진 군으로부터 독립적으로 선택된 박테리아 유래 핵산이다.
- [0304] 역시 바람직한 실시형태에 따라서, 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 12의 핵산과 적어도 27%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%, 핵산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산(들)일 수 있다. SEQ ID NO: 12의 핵산은 MET2라고도 할 수 있는, 사카로마이세스 세레비시아로부터 기원된 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제를 코딩한다. 코리네박테리움 글루타미컴으로부터 기원된 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제는 일반적으로 METX라고 한다.
- [0305] 이 서열과 관련된 동일 속성의 생물학적 활성은 CoA 및 아세틸-2,4-디아미노부티레이트로의 아세틸-CoA 및 2,4-디아미노부티레이트 간 반응을 촉매하는 효소를 코딩하는 능력이다.
- [0306] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 27%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0307] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 65%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.

- [0308] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 80%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0309] 사카로마이세스 세레비시아 유래 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제의 아미노산 서열의 경우, 당업자는 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP014122, 또는 본 명세서에 기술된 SEQ ID NO: 13을 언급할 수 있다.
- [0310] 다른 특정한 실시형태에 따라서, 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 13의 아미노산 서열과 적어도 27%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산(들)일 수 있다. 예시적으로, 아쿠아마리나 아틀란티카로부터 기원된 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제는 SEQ ID NO: 13의 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제와 27% 아미노산 동일성을 갖는다.
- [0311] 이 서열과 관련하여 동일 속성의 생물학적 활성은 이전에 기술된 바와 같고, 즉 CoA 및 아세틸-2,4-디아미노부티레이트로의 아세틸-CoA 및 2,4-디아미노부티레이트 간 반응을 촉매하는 능력이다.
- [0312] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 27%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 28%, 29%, 30%, 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0313] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 65%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 아미노산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0314] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 80%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 아미노산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0315] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명에서 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제의 발현 수준은 이하 본 명세서에서 보다 상세히 정의하는 바와 같이, 상기 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산 서열의 각각 5' 및 3' 위치에 존재하는 적어도 하나의 프로모터 및 적어도 하나의 종결인자에 의해 조절된다.
- [0316] 본 설명의 다른 곳에 명시된 바와 같이, 본 발명의 일부 실시형태에서, 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제는 본 발명에 따른 재조합 효모에서 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있다.
- [0317] 일부 실시형태에서, 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제의 과발현은 상기 재조합 효모 내에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어에 의한 결과일 수 있다.
- [0318] 일부 다른 실시형태에서, 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제의 과발현은 상기 재조합 효모의 계능 내에 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제 -코딩 서열의 다수 카피의 존재로 인한 결과일 수 있다.
- [0319] 여전히 추가의 실시형태에서, 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제의 과발현은 (i) 상기 재조합 효모 내에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어 및 (ii) 상기 재조합 효모의 계능 내에 호모세린 O-아세틸트랜스퍼라제 -코딩 서열의 다수 카피의 존재 둘 모두로 인한 결과일 수 있다.
- [0320] **디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제 (EctA)**
- [0321] 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제 효소는 아세틸-CoA의 존재 하에 2,4-디아미노부티레이트의 아세틸-2,4-디아미노부티레이트로의 전환을 촉매하기 위한 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다. 할로모나스 엘롱가타의 계능에 의해 코딩되는 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제는 EctA 또는 EctA.He라고 할 수 있다.
- [0322] 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.
- [0323] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 [Ono H *et al.*, 1999, Journal of Bacteriology, p91-99]를 언급할 수

있다.

- [0324] 본 명세서에서 바람직한 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제는 n° 2.3.1.178의 EC 번호를 갖는 효소이다.
- [0325] 바람직한 실시형태에서, 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게는 원핵생물 유기체 및 진핵생물 유기체를 포함하는 군에서 선택되는 유기체로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 고세균으로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게는 박테리아로부터 선택된 유기체, 특히 크로모할로박터 살렉시겐스, 슈도모나스 애루지노사, 타우레아 (*Thaurea*) *sp.28* 또는 할로모나스 엘롱가타로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다.
- [0326] 역시 바람직한 실시형태에 따라서, 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 14의 핵산과 적어도 30%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 핵산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산(들)일 수 있다.
- [0327] 이와 관련된 동일 속성의 생물학적 활성은 아세틸-CoA의 존재 하에 2,4-디아미노부티레이트의 아세틸-2,4-디아미노부티레이트로의 전환을 촉매하는 효소를 코딩하는 능력이다.
- [0328] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 30%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오타이드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0329] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 65%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오타이드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0330] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 80%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오타이드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0331] 할로모나스 엘롱가타 유래 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제의 아미노산 서열의 경우, 당업자는 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 WP_035409657.1, 또는 본 명세서에 기술된 SEQ ID NO: 15를 언급할 수 있다.
- [0332] 다른 특정한 실시형태에 따라서, 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 15의 아미노산 서열과 적어도 30%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산(들)일 수 있다.
- [0333] 이 서열과 관련하여 동일 속성의 생물학적 활성은 이전에 기술된 바와 같고, 즉 아세틸-CoA의 존재 하에 2,4-디아미노부티레이트의 아세틸-2,4-디아미노부티레이트로의 전환을 촉매하는 능력이다.
- [0334] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 30%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 31%, 32%, 33%, 34%, 35%, 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0335] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 65%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 아미노산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0336] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 80%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준

아미노산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.

- [0337] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명에서 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제의 발현 수준은 이하 본 명세서에서 보다 상세히 정의되는 바와 같이, 상기 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제를 코딩하는 핵산 서열의 각각 5' 및 3'에 존재하는 적어도 하나의 프로모터 및 적어도 하나의 종결인자에 의해 조절된다.
- [0338] 본 설명의 다른 곳에 명시된 바와 같이, 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제는 본 발명에 따른 재조합 효모에서 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있다.
- [0339] 일부 실시형태에서, 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제의 과발현은 상기 재조합 효모 내에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어로 인한 결과일 수 있다.
- [0340] 일부 다른 실시형태에서, 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제의 과발현은 상기 재조합 효모의 게놈 내에서 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제-코딩 서열의 다수 카피의 존재로 인한 결과일 수 있다.
- [0341] 역시 추가의 실시형태에서, 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제의 과발현은 (i) 상기 재조합 효모 내에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어 및 (ii) 상기 재조합 효모의 게놈 내에서 디아미노부티르산 아세틸트랜스퍼라제-코딩 서열의 다수 카피의 존재 둘 모두로 인한 결과일 수 있다.
- [0342] **엑토인 신타제 (EctC)**
- [0343] 엑토인 신타제 효소는 아세틸-2,4-디아미노부티레이트의 엑토인으로의 전환을 촉매하기 위한 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다. 할로모나스 엘롱가타의 게놈에 의해 코딩되는 엑토인 신타제는 EctC 또는 EctC.He라고 할 수 있다.
- [0344] 엑토인 신타제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.
- [0345] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 [Ono H et al., 1999, Journal of Bacteriology, p91-99]에 기술된 방법을 언급할 수 있다.
- [0346] 본 명세서에서 바람직한 엑토인 신타제는 n° 4.2.1.108의 EC 번호를 갖는 효소이다.
- [0347] 바람직한 실시형태에서, 엑토인 신타제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게 원핵생물 유기체 및 진핵생물 유기체를 포함하는 군에서 선택되는 유기체로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 엑토인 신타제를 코딩하는 핵산(들)은 고세균으로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 엑토인 신타제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게는 박테리아로부터 선택된 유기체, 특히 슈도모나스 애틀지노사, 할로모나스 엘롱가타 또는 마이코코커스 루테우스 (*Micrococcus luteus*)로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다.
- [0348] 역시 바람직한 실시형태에 따라서, 엑토인 신타제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 16의 핵산과 적어도 35%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 핵산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산(들)일 수 있다.
- [0349] 이러한 서열과 관련된 동일 속성의 생물학적 활성은 아세틸-2,4-디아미노부티레이트의 엑토인으로의 전환을 촉매하는 효소를 코딩하는 능력이다.
- [0350] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 35%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오타이드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0351] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 65%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 포괄한다.
- [0352] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 80%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%,

98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.

- [0353] 할로모나스 엘롱가타 유래 엑토인 신타제의 아미노산 서열의 경우, 당업자는 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 WP_013332346, 또는 본 명세서에 기술된 SEQ ID NO: 17을 언급할 수 있다.
- [0354] 다른 특정한 실시형태에 따라서, 엑토인 신타제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 17의 아미노산 서열과 적어도 35%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산(들)일 수 있다.
- [0355] 이 서열과 관련된 동일 속성의 생물학적 활성은 이전에 기술된 바와 같고, 즉 아세틸-2,4-디아미노부티레이트의 엑토인으로의 전환을 촉매하는 능력이다.
- [0356] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 35%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 핵산 서열과 적어도 36%, 37%, 38%, 39%, 40%, 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0357] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 65%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 아미노산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0358] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 80%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 상기 기준 아미노산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0359] 상기에 언급된 바와 같이, 본 발명의 엑토인 신타제의 발현 수준은 이하 본 명세서에서 더욱 상술되는 바와 같이, 상기 엑토인 신타제를 코딩하는 핵산 서열의 각각 5' 및 3'에 존재하는 적어도 하나의 프로모터 및 적어도 하나의 종결인자에 의해 조절된다.
- [0360] 본 설명의 다른 곳에 명시된 바와 같이, 엑토인 신타제는 본 발명에 따른 재조합 효모에서 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있다.
- [0361] 일부 실시형태에서, 엑토인 신타제의 과발현은 상기 재조합 효모 내에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어에 의한 결과일 수 있다.
- [0362] 일부 다른 실시형태에서, 엑토인 신타제의 과발현은 상기 재조합 효모의 게놈 내에 엑토인 신타제-코딩 서열의 다수 카피의 존재로 인한 결과일 수 있다.
- [0363] 여전히 추가의 실시형태에서, 엑토인 신타제의 과발현은 (i) 상기 재조합 효모 내에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어 및 (ii) 상기 재조합 효모의 게놈 내에 엑토인 신타제-코딩 서열의 다수 카피의 존재 둘 모두로 인한 결과일 수 있다.
- [0364] **호모세린 디히드로게나제 (HOM6)**
- [0365] 호모세린 디히드로게나제 효소는 NAD 또는 NADP의 존재 하에, L-호모세린의 L-아스파테이트 4-세미알데히드로의 전환을 촉매하기 위한 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다. 사카로마이세스 세레비지아의 게놈에 의해 코딩되는 호모세린 디히드로게나제는 HOM6일 수 있다.
- [0366] 호모세린 디히드로게나제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.
- [0367] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 Calnyanto 등이 기술한 방법 (2006, Microbiology, Vol. 152: 105-112)을 언급할 수 있다.
- [0368] 본 명세서에서 바람직한 호모세린 디히드로게나제는 n° 1.1.1.3의 EC 번호를 갖는 효소이다.
- [0369] 바람직한 실시형태에서, 호모세린 디히드로게나제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게는 원핵생물 유기체 및 진핵생물 유기체를 포함하는 군에서 선택되는 유기체로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 바람직한 실시형태에서, 호모세린 디히드로게나제를 코딩하는 핵산(들)은 효모, 특히 사카로마이세스 세레비지아로부터 기원

된 핵산(들)일 수 있다.

- [0370] 특정한 실시형태에 따라서, 호모세린 디히드로게나제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 18의 핵산일 수 있다. SEQ ID NO: 18의 핵산은 HOM6이라고도 할 수 있는, 사카로마이세스로부터 기원된 호모세린 디히드로게나제를 코딩한다.
- [0371] 사카로마이세스 세레비지아 유래 호모세린 디히드로게나제의 아미노산 서열의 경우, 당업자는 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 AJR75529 또는 NP012673, 또는 본 명세서에 기술된 SEQ ID NO: 19를 언급할 수 있다.
- [0372] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명에서 호모세린 디히드로게나제의 발현 수준은 이하 본 명세서에서 더욱 상세하게 정의하는 바와 같이, 상기 호모세린 디히드로게나제를 코딩하는 핵산 서열의 각각 5' 및 3'에 존재하는 적어도 하나의 프로모터 및 적어도 하나의 종결인자에 의해 조절된다.
- [0373] 본 설명의 다른 곳에 명시된 바와 같이, 본 발명의 일부 실시형태에서, 호모세린 디히드로게나제는 본 발명에 따른 재조합 효모에서, (a) 완전하게 또는 부분적으로 결실 또는 단절되거나, 또는 (b) 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하; 약 프로모터의 제어 하에 있고/있거나; 탈안정화된 형태이다.
- [0374] **엑토인-생산 재조합 효모의 특별한 실시형태**
- [0375] 아스파테이트 트랜스아미나제 과발현 및/또는 제어 발현
- [0376] 본 발명에 따른 재조합 효모의 바람직한 실시형태에서, 아스파테이트 트랜스아미나제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있다.
- [0377] 아스파테이트 트랜스아미나제 효소 (아스파테이트 아미노트랜스퍼라제라고도 알려짐)는 옥살로아세테이트 및 L-글루타메이트의 생산을 위해 L-아스파테이트 및 2-옥소글루타레이트의 반응을 촉매하기 위한 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다. 사카로마이세스 세레비지아의 게놈에 의해 코딩되는 아스파테이트 트랜스아미나제 효소는 AAT2라고 할 수 있다.
- [0378] 이들 실시형태에 따라서, 아스파테이트 트랜스아미나제-코딩 유전자의 과발현은 효모 게놈의 선택된 위치(들)에, 아스파테이트 트랜스아미나제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피를 삽입시켜 수득된다. 본 발명에 포괄되는 아스파테이트 트랜스아미나제 및 아스파테이트-트랜스아미나제-코딩 유전자는 본 명세서의 다른 곳에 상술되어 있다.
- [0379] 이들 실시형태의 일부에서, 상기 아스파테이트 트랜스아미나제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피는 아스파테이트 트랜스아미나제의 강력한 발현을 허용하는 조절 서열, 예컨대 효모 세포에서 기능성인 강력 프로모터를 포함한다.
- [0380] 본 발명에 따른 재조합 효모의 이들 실시형태에 추가로 또는 대안으로서, 적어도 하나의 아스파테이트 트랜스아미나제-코딩 유전자는 효모 세포에서 기능성인 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다.
- [0381] 임의의 특정한 이론에 국한하고 싶지 않지만, 발명자는 아스파테이트 트랜스아미나제의 과발현이 옥살로아세테이트의 아스파테이트로의 높은 수준의 전환을 유도시킬 수 있다고 믿는다. 동일한 것이 적어도 하나의 아스파테이트 트랜스아미나제 코딩 서열이 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 때 적용된다.
- [0382] 아스파테이트 트랜스아미나제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.
- [0383] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 Yagi 등이 기술한 방법 (1982, Biochem, Vol. 92: 35-43)을 언급할 수 있다.
- [0384] 일부 실시형태에서, 상기 아스파테이트 트랜스아미나제-코딩 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, 사카로마이세스 세레비지아 유래 AAT2 유전자이다.
- [0385] 바람직한 실시형태에서, 아스파테이트 아미노트랜스퍼라제는 에이. 탈리아나 (*A. Thaliana*) AAT2-유전자에 의해 코딩된다.
- [0386] 바람직한 실시형태에서, 상기 아스파테이트 트랜스아미나제-코딩 유전자는 유도성 또는 억제성 프로모터 pACU1 또는 강력 프로모터 pADH1 또는 강력 프로모터 pPGK1의 제어 하에 배치된다.
- [0387] 예시적으로, AAT2 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, CAN1 유전자 내 및/또는 GNP1 유전자 내 및/또는 MUP3 유전자 내에 삽입될 수 있다.

- [0388] 본 명세서에서 바람직한 아스파테이트 트랜스아미나제는 EC 번호 2.6.1.1로 공지되어 있다.
- [0389] 아스파테이트 트랜스아미나제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게는 원핵생물 유기체 및 진핵생물 유기체를 포함하는 군에서 선택되는 유기체로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 아스파테이트 트랜스아미나제를 코딩하는 핵산(들)은 고세균으로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 바람직한 실시형태에서, 아스파테이트 트랜스아미나제를 코딩하는 핵산(들)은 효모 유기체, 및 가장 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지아로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다.
- [0390] 역시 바람직한 실시형태에 따라서, 아스파테이트 트랜스아미나제 또는 AAT2를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 20의 핵산 서열과 적어도 39%, 유리하게는 적어도 65%, 및 바람직하게 적어도 80%의 핵산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산(들)일 수 있다.
- [0391] 이 서열과 관련된 동일 속성의 생물학적 활성은 옥살로아세테이트 및 L-글루타메이트의 생산을 위한 L-아스파테이트 및 2-옥소글루타레이트의 반응을 촉매하는 효소를 코딩하는 능력이다.
- [0392] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 39%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 20의 핵산 서열과 적어도 40% 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오타이드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0393] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 65%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 20의 핵산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오타이드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0394] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 80%의 뉴클레오타이드 동일성을 갖는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 20의 핵산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오타이드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0395] 사카로마이세스 세레비지아 유래 아스파테이트 트랜스아미나제 AAT2의 아미노산 서열의 경우, 당업자는 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP013127, 또는 본 명세서에 기술된 SEQ ID NO: 21을 언급할 수 있다. 예시적으로, 이. 콜라이로부터 기원된 아스파테이트 트랜스아미나제는 SEQ ID NO: 21의 아스파테이트 트랜스아미나제 AAT2와 39%의 아미노산 동일성을 갖는다.
- [0396] 다른 특정한 실시형태에 따라서, 아스파테이트 트랜스아미나제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열과 적어도 39%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산(들)일 수 있다.
- [0397] 이 서열과 관련된 동일 속성의 생물학적 활성은 이전에 기술된 바와 같고, 즉 옥살로아세테이트 및 L-글루타메이트의 생산을 위한 L-아스파테이트 및 2-옥소글루타레이트의 반응을 촉매하는 능력이다.
- [0398] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 39%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열과 적어도 40% 41%, 42%, 43%, 44%, 45%, 46%, 47%, 48%, 49%, 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0399] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 65%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.
- [0400] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 80%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 21의 아미노산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.

- [0401] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명에서 아스파테이트 트랜스아미나제의 발현 수준은 이하 본 명세서에서 보다 상세히 정의되는 바와 같이, 아스파테이트 트랜스아미나제를 코딩하는 핵산 서열의 각각 5' 및 3'에 존재하는 적어도 하나의 프로모터 및 적어도 하나의 종결자에 의해 조절된다.
- [0402] 본 설명의 다른 곳에 명시된 바와 같이, 아스파테이트 트랜스아미나제는 본 발명에 따른 재조합 효모에서 과발현된다.
- [0403] 일부 실시형태에서, 아스파테이트 트랜스아미나제의 과발현은 상기 재조합 효모 내에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어에 의한 결과일 수 있다.
- [0404] 일부 다른 실시형태에서, 아스파테이트 트랜스아미나제의 과발현은 상기 재조합 효모의 게놈에 아스파테이트 트랜스아미나제-코딩 서열의 다수 카피의 존재로 인한 결과일 수 있다.
- [0405] 여전히 추가의 실시형태에서, 아스파테이트 트랜스아미나제의 과발현은 (i) 상기 재조합 효모에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어 및 (ii) 상기 재조합 효모의 게놈에 아스파테이트 트랜스아미나제-코딩 서열의 다수 카피의 존재 둘 모두로 인한 결과일 수 있다.
- [0406] 글루타메이트 디히드로게나제 과발현 및/또는 제어 발현
- [0407] 본 발명에 따른 재조합 효모의 바람직한 실시형태에서, 옥소-글루타레이트를 글루타메이트로 전환시키는 글루타메이트 디히드로게나제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산-코딩 유전자는 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있다.
- [0408] 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명의 재조합 효모의 게놈은 옥소-글루타레이트를 글루타메이트로 전환시키는 글루타메이트 디히드로게나제를 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 과발현되고/되거나 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있도록 된다.
- [0409] 글루타메이트 디히드로게나제 효소 (NAD-특이적 글루타메이트 디히드로게나제라고도 함)는 L-글루타메이트의 생산을 위한 2-옥소글루타레이트의 형질전환을 촉매하기 위한 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다. 따라서, 글루타메이트 디히드로게나제는 NADH의 존재 하에서, 2-옥소글루타레이트의 L-글루타메이트로의 전환을 포함하는 화학 반응에 특이적으로 관여되는 효소이다.
- [0410] 이들 실시형태에 따라서, 글루타메이트 디히드로게나제 효소-코딩 유전자의 과발현은 효모 게놈의 선택된 위치(들)에, 글루타메이트 디히드로게나제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피를 삽입시켜 수득된다. 본 발명에 포괄되는 글루타메이트 디히드로게나제 및 글루타메이트 디히드로게나제 -코딩 유전자는 본 명세서의 다른 곳에 상술되어 있다.
- [0411] 이들 실시형태의 일부에서, 상기 글루타메이트 디히드로게나제 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피는 글루타메이트 디히드로게나제의 강력한 발현을 허용하는 조절 서열, 예컨대 효모 세포에서 기능적인 강력 프로모터를 포함한다.
- [0412] 본 발명에 따른 재조합 효모의 이들 실시형태에 추가로 또는 그의 대안으로서, 적어도 하나의 글루타메이트 디히드로게나제-코딩 유전자는 효모 세포에서 기능적인 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 수 있다.
- [0413] 임의의 특정한 이론에 국한하고 싶지 않지만, 발명자는 글루타메이트 디히드로게나제의 과발현은 옥소글루타레이트를 글루타메이트로 전환시킴으로서, 동시에 NAD를 발생시킨다고 믿는다. 동일한 것이 적어도 하나의 글루타메이트 디히드로게나제 코딩 서열이 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있을 때 적용된다.
- [0414] 글루타메이트 디히드로게나제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.
- [0415] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 Noor 및 Punekar가 기술한 방법 (2005, Microbiology, Vol. 151 : 1409-1419)을 언급할 수 있다.
- [0416] 바람직한 실시형태에서, 상기 글루타메이트 디히드로게나제 -코딩 유전자는 NADPH 대신에 NADH를 사용하는 글루타메이트 디히드로게나제를 코딩하고, 보다 특히 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, 엔토디니움 카우다툼 (*Entodinium caudatum*) 유래 (GDH.Eca 또는 GDH2.Eca로서 표시됨) 또는 사카로마이세스 세레비지아 유래 (GDH2로서 표시됨)의 GDH 유전자이다. 특정 실시형태에서, 상기 글루타메이트 디히드로게나제 -코딩 유전자는 엔

토디니움 카우다툼 유래 글루타메이트 디히드로게나제를 코딩한다.

- [0417] 본 명세서에서 바람직한 글루타메이트 디히드로게나제는 특히 EC 번호 n° EC 1.4.1.2를 갖는 효소일 수 있다.
- [0418] 바람직한 실시형태에서, 상기 글루타메이트 디히드로게나제 -코딩 유전자는 강력 프로모터 pTDH3 또는 유도성 또는 억제성 프로모터 pCUP1-1의 제어 하에 배치된다.
- [0419] 예시적으로, 글루타메이트 디히드로게나제 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, HIS3 유전자 내 및/또는 MUP3 유전자 내에 삽입될 수 있다.
- [0420] 바람직한 실시형태에서, 글루타메이트 디히드로게나제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게는 원핵생물 유기체 및 진핵생물 유기체를 포함하는 군에서 선택되는 유기체로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 글루타메이트 디히드로게나제를 코딩하는 핵산(들)은 고세균으로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다. 일부 실시형태에서, 글루타메이트 디히드로게나제를 코딩하는 핵산(들)은 바람직하게는 엔토디니움 카우다툼, 바실러스 서브틸리스, 클로스트리디움 심비오시움 (*Clostridium symbiosum*)으로부터 선택된 유기체로부터 기원된 핵산(들)일 수 있다.
- [0421] 역시 바람직한 실시형태에 따라서, 글루타메이트 디히드로게나제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 22의 핵산 서열과 적어도 49%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 핵산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산(들)일 수 있다. SEQ ID NO: 22의 핵산은 엔토디니움 카우다툼으로부터 기원된 글루타메이트 디히드로게나제를 코딩하고, 상기 핵산 서열은 효모, 특히 사카로마이세스 세레비시아에서 이의 발현을 위해 코돈-최적화된다.
- [0422] 이 서열과 관련하여 동일 속성의 생물학적 활성은 L-글루타메이트의 생산을 위한 2-옥소글루타레이트의 형질전환을 촉매하는 효소를 코딩하는 능력이다.
- [0423] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 49%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 22의 핵산 서열과 적어도 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0424] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 65%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 22의 핵산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0425] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 80%의 뉴클레오티드 동일성을 갖는 핵산 서열은 SEQ ID NO: 22의 핵산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 뉴클레오티드 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 핵산 서열을 포괄한다.
- [0426] 엔토디니움 카우다툼 유래 글루타메이트 디히드로게나제의 아미노산 서열의 경우, 당업자는 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 AAF15393, 또는 본 명세서에 기술된 SEQ ID NO: 23을 언급할 수 있다. 예시적으로, 지아르디아 인테스티nalis (*Giardia intestinalis*)로부터 기원된 글루타메이트 디히드로게나제는 SEQ ID NO: 23의 글루타메이트 디히드로게나제와 49%의 아미노산 동일성을 갖는다.
- [0427] 다른 특정한 실시형태에 따라서, 글루타메이트 디히드로게나제를 코딩하는 핵산(들)은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열과 적어도 49%, 유리하게는 적어도 65%, 바람직하게 적어도 80%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 아미노산 서열을 코딩하는 핵산(들)일 수 있다.
- [0428] 이와 관련하여 동일 속성의 생물학적 활성은 이전에 기술된 바와 같고, 즉 L-글루타메이트의 생산을 위한 2-옥소글루타레이트의 형질전환을 촉매하는 능력이다.
- [0429] 본 명세서에서 설명시, 기준 핵산 서열과 적어도 49%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열과 적어도 50%, 51%, 52%, 53%, 54%, 55%, 56%, 57%, 58%, 59%, 60%, 61%, 62%, 63%, 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%,

85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.

[0430] 본 명세서에서 설명시, 기준 서열과 적어도 65%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열과 적어도 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.

[0431] 본 명세서에서 설명시, 기준 아미노산 서열과 적어도 80%의 아미노산 동일성을 갖는 아미노산 서열은 SEQ ID NO: 23의 아미노산 서열과 적어도 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% 및 99%의 아미노산 동일성, 및 또한 동일 속성의 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열을 포괄한다.

[0432] 상기 언급된 바와 같이, 본 발명에서 글루타메이트 디히드로게나제의 발현 수준은 하기 본 명세서에서 더욱 상세히 정의되는 바와 같이, 상기 글루타메이트 디히드로게나제를 코딩하는 핵산 서열의 각각 5' 및 3'에 존재하는 적어도 하나의 프로모터 및 적어도 하나의 종결인자에 의해 조절된다.

[0433] 본 설명의 다른 곳에 명시된 바와 같이, 글루타메이트 디히드로게나제는 본 발명에 따른 재조합 효모에서 과발현된다.

[0434] 일부 실시형태에서, 글루타메이트 디히드로게나제의 과발현은 상기 재조합 효모에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어에 의한 결과일 수 있다.

[0435] 일부 다른 실시형태에서, 글루타메이트 디히드로게나제의 과발현은 상기 재조합 효모의 게놈에 글루타메이트 디히드로게나제-코딩 서열의 다수의 카피의 존재로 인한 결과일 수 있다.

[0436] 여전히 추가의 실시형태에서, 글루타메이트 디히드로게나제의 과발현은 (i) 상기 재조합 효모에서 강력 프로모터에 의한 상응하는 유전자의 제어 및 (ii) 상기 재조합 효모의 게놈에 글루타메이트 디히드로게나제-코딩 서열의 다수 카피의 존재 둘 모두로 인한 결과일 수 있다.

[0437] 관심 화합물의 이출

[0438] 본 발명에 따른 재조합 효모의 추가 실시형태에서, 생산된 엑토인의 효모 세포 밖으로의 이출은 (i) 효모 퍼미아제를 코딩하는 유전자의 과소발현, (ii) 아미노산 엑스포터 단백질을 코딩하는 유전자의 과소발현, 또는 (iii) 효모 퍼미아제를 코딩하는 유전자의 과소발현 및 아미노산 엑스포터 단백질을 코딩하는 유전자의 과소발현 둘 모두에 의해 증강될 수 있다.

[0439] 퍼미아제-코딩 유전자(들)의 과소발현

[0440] 하기에 기술되는 바와 같이, 본 발명에 따른 재조합 효모에서 과소발현될 수 있는 퍼미아제-코딩 유전자는 AGP1, AGP3, BAP3, BAP2, GAP1, GNP1, MUP3 및 MUP1을 포괄한다.

[0441] AGP1은 사카로마이세스 세레비지아 유래 일반 아미노산 퍼미아제 1이다. AGP 1의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_009905를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001178671을 언급할 수 있다.

[0442] AGP3은 사카로마이세스 세레비지아 유래의 일반 아미노산 퍼미아제 3이다. AGP3의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_116600을 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001179912를 언급할 수 있다.

[0443] BAP3은 사카로마이세스 세레비지아 유래의 발린 아미노산 퍼미아제이다. BAP3의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_010331을 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001180354를 언급할 수 있다.

[0444] BAP2는 사카로마이세스 세레비지아 유래의 Leu/Val/Ile 아미노산 퍼미아제이다. BAP2의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_009624를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001178416을 언급할 수 있다.

[0445] GAP1은 사카로마이세스 세레비지아 유래의 일반 아미노산 퍼미아제이다. GAP1의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_012965.3을 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의

수탁 번호 NM_001179829를 언급할 수 있다.

- [0446] GNP1은 사카로마이세스 세레비지아 유래의 고친화성 글루타민 퍼미아제이다. GNP1의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_010796을 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001180816을 언급할 수 있다.
- [0447] MUP3은 사카로마이세스 세레비지아 유래의 저친화성 메티오닌 퍼미아제이다. MUP3의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_011827을 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001179116을 언급할 수 있다.
- [0448] MUP1은 사카로마이세스 세레비지아 유래의 저친화성 메티오닌 퍼미아제이다. MUP의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_011569를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001181184를 언급할 수 있다.
- [0449] 본 발명에 따른 재조합 효모의 일부 실시형태에서, 상기 재조합 효모는 AGP1, AGP3, BAP3, BAP2, GAP1, GNP1, MUP3 및 MUP1 퍼미아제를 포함하는, 퍼미아제를 코딩하는 하나 이상의 유전자의 과소발현을 갖는 것으로 더욱 정의된다.
- [0450] 따라서, 특정 실시형태에서, 본 발명의 재조합 효모의 게놈은 하기 변형 중 적어도 하나가 수행되었다:
- [0451] (A) 일반 아미노산 퍼미아제 AGP3을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
- [0452] (i) 일반 아미노산 퍼미아제 AGP3을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
- [0453] (ii) 탈안정화된 일반 아미노산 퍼미아제 AGP3을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고/되었거나;
- [0454] (B) 분지쇄 아미노산 퍼미아제 3을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
- [0455] (i) 분지쇄 아미노산 퍼미아제 3을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
- [0456] (ii) 탈안정화된 분지쇄 아미노산 퍼미아제 3을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고/되었거나;
- [0457] (C) 분지쇄 아미노산 퍼미아제 2를 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
- [0458] (i) 분지쇄 아미노산 퍼미아제 2를 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
- [0459] (ii) 탈안정화된 분지쇄 아미노산 퍼미아제 2를 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고/되었거나;
- [0460] (D) 일반 아미노산 퍼미아제 GAP1을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
- [0461] (i) 일반 아미노산 퍼미아제 GAP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
- [0462] (ii) 탈안정화된 일반 아미노산 퍼미아제 GAP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고/되었거나;
- [0463] (E) 고친화성 글루타민 퍼미아제 GNP1을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
- [0464] (i) 고친화성 글루타민 퍼미아제 GNP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
- [0465] (ii) 탈안정화된 고친화성 글루타민 퍼미아제 GNP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고/되었거나;
- [0466] (F) 일반 아미노산 퍼미아제 AGP1을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
- [0467] (i) 일반 아미노산 퍼미아제 AGP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의

제어 하에 있고/있거나,

- [0468] (ii) 탈안정화된 일반 아미노산 퍼미아제 AGP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고/되었거나;
- [0469] (G) 저친화성 메티오닌 퍼미아제 MUP3을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
- [0470] (i) 저친화성 메티오닌 퍼미아제 MUP3을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
- [0471] (ii) 탈안정화된 저친화성 메티오닌 퍼미아제 MUP3을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고/되었거나;
- [0472] (H) 고친화성 메티오닌 퍼미아제 MUP1을 코딩하는 적어도 하나, 바람직하게 모든 내생성 핵산은 효모의 게놈으로부터 결실되었고, 임의로
- [0473] (i) 고친화성 메티오닌 퍼미아제 MUP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 있고/있거나,
- [0474] (ii) 탈안정화된 고친화성 메티오닌 퍼미아제 MUP1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산이 삽입되었고/되었거나;
- [0475] (I) 가능한 수송체 AQR1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현되고/되거나,
- [0476] (J) 폴리아민 수송체 1을 코딩하는 적어도 하나의 핵산은 과발현된다.
- [0477] 특정 실시형태에서, 이들 변형 중 적어도 2개, 특히 적어도 3개가 수행되었다.
- [0478] 임의의 특정 이론에 국한하고 싶지 않지만, 발명자는 임의의 퍼미아제 유전자의 과소발현이 효모 세포 밖으로, 예를 들어 배양 배지로 생산된 엑토인의 배출을 증가시키는 것이라고 믿는다.
- [0479] 퍼미아제와 관련하여, 이들 유전자 중 하나 이상의 과소발현은 예를 들어 상기 하나 이상의 퍼미아제 유전자의 단절 또는 결실에 의한 그들 발현의 완전한 억제를 포괄한다.
- [0480] 일부 실시형태에서, 퍼미아제-코딩 유전자의 과소발현은 예를 들어 억제성 조절 서열, 예컨대 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 이 유전자의 발현을 배치시킴으로써 조건적으로 만들 수 있다.
- [0481] 유전자 발현의 억제, 표적 유전자의 단절, 또는 표적 유전자의 결실을 위한 방법은 당업자에게 충분히 공지되어 있다.
- [0482] 퍼미아제 유전자와 관련하여, 과소발현은 또한 탈안정화된 퍼미아제 단백질을 코딩하는 핵산의 삽입 또는 탈안정화된 퍼미아제 단백질을 코딩하는 핵산의 삽입, 또는 둘 모두를 포괄한다.
- [0483] 탈안정화된 퍼미아제는 부모 퍼미아제에 비해 효모 세포 내에서 보다 신속하게 분해되는 퍼미아제의 변이체이다.
- [0484] 바람직한 실시형태에서, 탈안정화된 퍼미아제는 degraon-태그화 퍼미아제 단백질로 이루어진다.
- [0485] 실시예에 예시된 바와 같이, GAP3 유전자, BAP3 유전자, GAP1 유전자, GNP1 유전자 및 MUP3 유전자는 loxP에 의해 단절될 수 있고 그에 따라 결실된다.
- [0486] 아미노산 엑스포터 단백질-코딩 유전자(들)의 과발현
- [0487] 하기에 기술된 바와 같이, 본 명세서에 따른 재조합 효모에서 과발현될 수 있는 엑스포터 단백질-코딩 유전자는 AQR1 및 TP01을 포괄한다.
- [0488] AQR1은 사카로마이세스 세레비지아 유래 수송체이다. AQR1의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_014334를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001182903을 언급할 수 있다.
- [0489] TP01은 사카로마이세스 세레비지아 유래 폴리아민 수송체이다. TP01의 아미노산 서열의 경우 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_013072를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001181848을 언급할 수 있다.
- [0490] 본 발명에 따른 재조합 효모의 바람직한 실시형태에서, 수송체-코딩 유전자의 과발현은 효모 게놈의 선택된 위치(들)에, 상기 수송체 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 추가 카피를 삽입시켜 수득된다.

- [0491] 임의의 특정한 이론에 국한하고 싶지 않지만, 발명자는 수송체-코딩 유전자의 과발현이 효모 세포 밖으로, 예를 들어 배양 배지로 생산된 엑토인의 배출을 증가시킬 것이라고 믿는다.
- [0492] 일부 실시형태에서, 수송체-코딩 유전자의 과발현은 효모 계놈의 선택된 위치(들)에, 수송체 유전자 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 추가 카피를 삽입시켜 수득된다. 이들 실시형태의 일부에서, 상기 수송체 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피는 상기 수송체의 강력한 발현을 허용하는 조절 서열, 예컨대 효모 세포에서 기능성인 강력 프로모터를 포함한다.
- [0493] 일부 다른 실시형태에서, 수송체-코딩 유전자의 하나의 카피가 효모 계놈의 선택된 위치에 삽입된다. 이들 다른 실시형태에서, 상기 수송체 코딩 서열을 포함하는 발현 카세트의 하나 이상의 카피는 상기 수송체의 강력한 발현을 허용하는 조절 서열, 예컨대 효모 세포에서 기능성인 강력 프로모터를 포함한다.
- [0494] 바람직한 실시형태에서, 상기 아미노산 엑스포터 단백질-코딩 유전자 AQR1은 강력 프로모터 pTEF3의 제어 하에 배치된다.
- [0495] 예시적으로, AQR1 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, PYK1 유전자 내에 삽입될 수 있다.
- [0496] 바람직한 실시형태에서, 상기 아미노산 엑스포터 단백질-코딩 유전자_TPO1은 강력한 유도성 또는 억제성 프로모터 pSAM4 또는 강력한 항상성 프로모터 pTEF1의 제어 하에 배치된다.
- [0497] TPO1-1은 TPO1 대신에 사용될 수 있다. TPO1-1은 리신 10, 49, 86, 143, 144 및 145이 아르기닌으로 치환된 인공 대립유전자이다.
- [0498] 본 발명자는 이들 변형이 유비퀴틴-프로테아솜 경로를 통한 분해로부터 TPO1을 보호하여 안정화시킨다고 믿는다.
- [0499] 바람직한 실시형태에서, 상기 아미노산 엑스포터 단백질-코딩 유전자_TPO1은 강력 프로모터 pTEF3의 제어 하에 배치된다.
- [0500] 예시적으로, TPO1 유전자는 본 명세서의 실시예에 표시된 바와 같이, PYK1 유전자 내에 삽입될 수 있다.
- [0501] 추가로 증가된 엑토인 생산의 관점에서, 본 발명에 따른 재조합 효모는 추가의 유전자 변형을 포함할 수 있어서, 그들이 대량으로 중간체 생산물 옥살로아세테이트를 생산하게 된다. 이들 선택적 유전자 변화는 하기 본 명세서에 기술된다.
- [0502] **엑토인-생산 재조합 효모의 추가 실시형태**
- [0503] 본 발명에 따른 재조합 효모의 일부 실시형태에 따라서, 엑토인의 생산은 중간 대사산물 옥살로아세테이트의 증가된 생산을 야기시키는 조건에 상기 재조합 효모를 배치시켜 더 증가시킬 수 있다.
- [0504] 옥살로아세테이트의 증가된 생산을 야기시키는 조건에 상기 재조합 효모의 배치는 효모 계놈에 추가의 유전자 변형을 도입시켜 수행될 수 있다.
- [0505] 본 발명자는 최적으로 증가된 엑토인 생산이 하기에 기술되는, 엑토인-생산 재조합 효모에 추가의 유전자 변화를 도입시켜 도달될 수 있다는 것을 발견하였다.
- [0506] **엑토인-생산 재조합 효모의 제1 추가 실시형태**
- [0507] 본 발명에 따른 엑토인-생산 재조합 효모의 이들 제1 추가 실시형태에 따라서, 재조합 효모의 추가의 유전자 조작은 중간 생성물 포스포에놀-피루베이트 (PEP)의 생산 증가를 목적으로 수행된다.
- [0508] 임의의 특정한 이론에 국한하고 싶지 않지만, 발명자는 엑토인-생산 재조합 효모에 도입된 추가의 유전자 변화가 (i) NADPH의 과생산을 야기하고, (ii) 포스포에놀 피루베이트의 각각 옥살로아세테이트 및 피루베이트로의 제어 및 균형 전환을 야기하며, (iii) 피루베이트의 에탄올로의 감소된 전환 및 포스포에놀 피루베이트의 옥살로아세테이트로의 전환으로 재지정을 야기시킨다고 믿는다.
- [0509] 본 발명에 따른 엑토인-생산 재조합 효모에 유전자 조작으로 도입된 이들 추가의 유전자 변화는 하기에 보다 상세히 명시된다.
- [0510] 이들 실시형태에 따라서, 유전자 변화는 글루코스-6-포스페이트-1-디히드로게나제 (MET19 또는 ZWF1라고도 함) 및 6-포스포글루코네이트 디히드로게나제, 디카복실레이팅 1 (GND1이라고도 함)을 과발현하도록 도입된다. 임의의 특정한 이론에 국한하고 싶지 않지만, 발명자는 MET19 및 GND1의 과발현이 NADPH 생산의 증가를 야기시

킨다고 믿는다.

- [0511] 이들 실시형태에 따라서, 유전자 변화는 포스포에놀피루베이트 카복실라제 (PEPC 또는 PPC라고 함) 및/또는 포스포에놀피루베이트 카복시키나제 [ATP] (PCK1 또는 PEPCK라고도 함)를 과발현시키도록 도입된다.
- [0512] 이들 실시형태에 따라서, 유전자 변화는 피루베이트 키나제 1 (PYK1 또는 CDC19라고도 함) 및 피루베이트 키나제 2 (PYK2라고도 함)를 과소발현하도록 도입된다. 이들 실시형태의 일부에서, PYK2 유전자는 과소발현되기 보다는 결실될 수 있다.
- [0513] 이들 실시형태의 일부에서, 피루베이트 디카복실라제를 코딩하는 하나 이상의 유전자는 바람직하게 결실에 의해 불활성화된다. 피루베이트 디카복실라제-코딩 유전자는 각각 PDC1, PDC5 및 PDC6이라고 명명된 것들을 포함한다. 이들 실시형태의 일부에 따라서, PDC1 및/또는 PDC6 유전자는 바람직하게 단절 또는 결실에 의해 불활성화되는 반면, 다른 피루베이트 디카복실라제-코딩 유전자 PDC5는 비변경된 채로 남겨나, 또는 이의 발현이 약 프로모터에 의해 제어되어 감소된다.
- [0514] 이들 실시형태의 일부에서, 재조합 효모의 알콜 디히드로게나제 활성은 하나 이상의 알콜 디히드로게나제-코딩 유전자의 발현을 변경시켜 감소된다. 이들 실시형태의 일부에서, ADH1의 발현은 약 프로모터의 제어 하에 유전자를 배치시키거나 또는 탈안정화된 ADH1 효소를 생산시켜 감소된다. 이들 실시형태의 일부에서, ADH3, ADH4 및 ADH5 중 하나 이상은 바람직하게 단절 또는 결실에 의해 불활성화될 수 있다.
- [0515] 이들 실시형태의 일부에서, 외생성 아세틸 디히드로게나제-코딩 유전자 (MHPF라고도 함)는 효모 계놈에 도입될 수 있고 과발현될 수 있다.
- [0516] 이들 실시형태의 일부에서, 외생성 아세테이트 키나제-코딩 유전자 (ACKA라고도 함)는 효모 계놈에 도입될 수 있고 과발현될 수 있다.
- [0517] 이들 실시형태의 일부에서, 외생성 포스페이트 아세틸 트랜스퍼라제-코딩 유전자 (PTA라고도 함)는 효모 계놈에 도입될 수 있고 과발현될 수 있다.
- [0518] 글루코스-6-포스페이트-1-디히드로게나제
- [0519] 글루코스-6-포스페이트-1-디히드로게나제 효소는 NADP의 NADPH로의 환원을 수반하는, D-글루코스 6-포스페이트가 6-포스포-D-글루코노-1,5-락톤이 되는 것을 촉매한다고 당분야에서 설명되는 단백질이다.
- [0520] 글루코스-6-포스페이트-1-디히드로게나제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.
- [0521] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게는 [Kuby, S. *et al.* (1966) Dehydrogenase and Oxidases Methods in Enzymology 9, 116-117]에 기술된 방법을 언급할 수 있다.
- [0522] 본 명세서에서 바람직한 글루코스-6-포스페이트-1-디히드로게나제는 n° 1.1.1.49의 EC 번호를 갖는 효소이다.
- [0523] 글루코스-6-포스페이트-1-디히드로게나제 (MET19라고도 함)의 아미노산 서열 경우에, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_014158.1을 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001183079.1을 언급할 수 있다.
- [0524] 6-포스포글루코네이트 디히드로게나제, 디카르복실레이팅 1
- [0525] 6-포스포글루코네이트 디히드로게나제, 디카르복실레이팅 1 효소는 NADP의 NADPH로의 환원을 수반하는, 6-포스포글루코네이트의 리볼로스 5-포스페이트 및 CO₂로의 산화적 디카르복실화를 촉매하기 위한것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다.
- [0526] 6-포스포글루코네이트 디히드로게나제, 디카르복실레이팅 1의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.
- [0527] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 [He W. *et al.* (2007) BMC Structural Biology, 7:38]에 기술된 방법을 언급할 수 있다.
- [0528] 본 명세서에서 바람직한 6-포스포글루코네이트 디히드로게나제, 디카르복실레이팅 1은 n° 1.1.1.44의 EC 번호를 갖는 효소이다.
- [0529] 6-포스포글루코네이트 디히드로게나제, 디카르복실레이팅 1 (GND1이라고 함)의 아미노산 서열의 경우, UniProt

데이터베이스의 수탁 번호 NP_012053을 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001179314를 언급할 수 있다.

[0530] 피루베이트 키나제 1

[0531] 피루베이트 키나제 1 효소는 ATP의 존재 하에 피루베이트의 포스포에놀피루베이트로의 전환을 촉매하는 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다.

[0532] 피루베이트 키나제 1의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.

[0533] 이와 관련하여 당업자는 유리하게 Susan-resiga 및 Nowak가 기술한 방법 (biochemistry, 2004, 43, 15230-15245)을 언급할 수 있다.

[0534] 본 명세서에서 바람직한 피루베이트 키나제 1은 n° 2.7.1.40의 EC 번호를 갖는 효소이다.

[0535] 피루베이트 키나제 1 (PYK1이라고도 함)의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_009362를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001178183을 언급할 수 있다.

[0536] 피루베이트 키나제 2

[0537] 피루베이트 키나제 2 효소는 ATP의 존재 하에서 피루베이트의 포스포에놀피루베이트로의 전환을 촉매하는 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다. 피루베이트 키나제 2는 해당작용 흐름 수준이 매우 낮은 조건 하에서 효모 세포에 의해 사용될 수 있다.

[0538] 피루베이트 키나제 2의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.

[0539] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 Susan-resiga 및 Nowak가 기술한 방법 (biochemistry, 2004, 43, 15230-15245)을 언급할 수 있다.

[0540] 본 명세서에서 바람직한 피루베이트 키나제 2는 n° 2.7.1.40의 EC 번호를 갖는 효소이다.

[0541] 피루베이트 키나제 2 (PYK2라고도 함)의 아미노산 서열의 경우 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_014992를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001183767을 언급할 수 있다.

[0542] 피루베이트 디카복실라제 이소자임 1

[0543] 피루베이트 디카복실라제 이소자임 1은 알콜 발효 동안 피루베이트의 아세트알데히드 및 이산화탄소로의 비산화적 전환에 관여되는 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다.

[0544] 피루베이트 디카복실라제 이소자임 1의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당분야의 일반 지식에 속한다.

[0545] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 Wang 등이 기술한 방법 (Biochemistry, 2001, 40:1755-1763)을 언급할 수 있다.

[0546] 본 명세서에서 바람직한 피루베이트 디카복실라제 이소자임 1은 n° 4.1.1.1의 EC 번호를 갖는 효소이다.

[0547] 피루베이트 디카복실라제 이소자임 1 (PDC1이라고도 함)의 아미노산 서열의 경우 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_013145를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001181931을 언급할 수 있다.

[0548] 피루베이트 디카복실라제 이소자임 5

[0549] 피루베이트 디카복실라제 이소자임 5는 알콜 발효 동안 아세트알데히드 및 이산화탄소로 피루베이트의 비산화적 전환에 관여되는 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다.

[0550] 피루베이트 디카복실라제 이소자임 5의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.

[0551] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 Wang 등이 기술한 방법 (Biochemistry, 2001, 40:1755-1763)을 언급할 수 있다.

[0552] 본 명세서에서 바람직한 피루베이트 디카복실라제 이소자임 5는 n° 4.1.1.1의 EC 번호를 갖는 효소이다.

[0553] 피루베이트 디카복실라제 이소자임 5 (PDC5라고도 함)의 아미노산 서열 경우 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호

NP_013235를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001182021을 언급할 수 있다.

[0554] 피루베이트 디카복실라제 이소자임 6

[0555] 피루베이트 디카복실라제 이소자임 6은 알콜 발효 동안 아세트알데히드 및 이산화탄소로 피루베이트의 비산화적 전환에 관여되는 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다.

[0556] 피루베이트 디카복실라제 이소자임 5의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.

[0557] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 Wang 등이 기술하는 방법 (Biochemistry, 2001, 40:1755-1763)을 언급할 수 있다.

[0558] 본 명세서에서 바람직한 피루베이트 디카복실라제 이소자임 6은 n° 4.1.1.1의 EC 번호를 갖는 효소이다.

[0559] 피루베이트 디카복실라제 이소자임 6 (PDC6이라고도 함)의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_013235를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001182021을 언급할 수 있다.

[0560] 아세트알데히드 디히드로게나제

[0561] 아세트알데히드 디히드로게나제는 NAD 및 조효소 A를 사용하여, 아세틸-CoA로 아세트알데히드의 전환을 촉매하는 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다.

[0562] 아세트알데히드 디히드로게나제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.

[0563] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 [Fisher *et al.* (2013) Chemi. Biol. Interact. 202 70-77]에 기술된 방법을 언급할 수 있다.

[0564] 본 명세서에서 바람직한 아세트알데히드 디히드로게나제는 n° 1.1.1.10의 EC 번호를 갖는 효소이다.

[0565] 아세트알데히드 디히드로게나제 (MHPP라고도 함)의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_414885를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스에 수탁 번호 NC_000913.3으로 개시된 것을 언급할 수 있다.

[0566] 아세테이트 키나제

[0567] 아세테이트 키나제는 아세테이트 및 ATP로부터 아세틸 포스페이트의 형성을 위한 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다.

[0568] 아세테이트 키나제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.

[0569] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 [Sagers *et al.* J.Bacteriology (1961) 82 233-238]에 기술된 방법을 언급할 수 있다.

[0570] 아세테이트 키나제 (ACKA라고도 함)의 아미노산 서열의 경우 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_416799를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NC_000913.3으로 개시된 것을 언급할 수 있다.

[0571] 포스페이트 아세틸트랜스퍼라제

[0572] 포스페이트 아세틸트랜스퍼라제는 아세틸-CoA 및 아세틸 포스페이트의 가역적인 상호전환을 촉매하는 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다.

[0573] 포스페이트 아세틸트랜스퍼라제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.

[0574] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 [Castano-Cerezo and Canovas, Microbial Cell Factories 2009, 8:54]에 기술된 방법을 언급할 수 있다.

[0575] 본 명세서에서 바람직한 포스페이트 아세틸트랜스퍼라제는 n° 2.3.1.8의 EC 번호를 갖는 효소이다.

[0576] 포스페이트 아세틸트랜스퍼라제 (PTA라고도 함)의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_416800을 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NC_000913에 개시된 것을

언급할 수 있다.

[0577] 알콜 디히드로게나제 1

[0578] 알콜 디히드로게나제 1은 그들의 상응하는 알데히드로 1차 비분지형 알콜의 전환을 촉매하기 위한 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다.

[0579] 알콜 디히드로게나제 1의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.

[0580] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 [Ganzhorn *et al.* (1987) The Journal of Biological Chemistry, 262, 3754-61]에 기술된 방법을 언급할 수 있다.

[0581] 본 명세서에서 바람직한 알콜 디히드로게나제 1은 n° 1.1.1.1의 EC 번호를 갖는 효소이다.

[0582] 알콜 디히드로게나제 1 (ADH1이라고도 함)의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_014555를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001183340을 언급할 수 있다.

[0583] 알콜 디히드로게나제 3

[0584] 알콜 디히드로게나제 3은 그들의 상응하는 알데히드로 1차 비분지형 알콜의 전환을 촉매하기 위해 당분야에서 설명되는 단백질이다.

[0585] 알콜 디히드로게나제 3의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.

[0586] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 [Ganzhorn *et al.* (1987) The Journal of Biological Chemistry, 262, 3754-61]에 기술된 방법을 언급할 수 있다.

[0587] 본 명세서에서 바람직한 알콜 디히드로게나제 3은 n° 1.1.1.1의 EC 번호를 갖는 효소이다.

[0588] 알콜 디히드로게나제 3 (ADH3이라고도 함)의 아미노산 서열의 경우 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_013800을 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001182582를 언급할 수 있다.

[0589] 알콜 디히드로게나제 4

[0590] 알콜 디히드로게나제 4는 그들의 상응하는 알데히드로 1차 비분지형 알콜의 전환을 촉매하는 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다.

[0591] 알콜 디히드로게나제 4의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.

[0592] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 [Ganzhorn *et al.* (1987) The Journal of Biological Chemistry, 262, 3754-61]에 기술된 방법을 언급할 수 있다.

[0593] 본 명세서에서 바람직한 알콜 디히드로게나제 4는 n° 1.1.1.1의 EC 번호를 갖는 효소이다.

[0594] 알콜 디히드로게나제 4 (ADH4라고도 함)의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_011258을 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001181122를 언급할 수 있다.

[0595] 알콜 디히드로게나제 5

[0596] 알콜 디히드로게나제 5는 그들의 상응하는 알데히드로 1차 비분지형 알콜의 전환을 촉매하는 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다.

[0597] 알콜 디히드로게나제 5의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.

[0598] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 [Ganzhorn *et al.* (1987) The Journal of Biological Chemistry, 262, 3754-61]에 기술된 방법을 언급할 수 있다.

[0599] 본 명세서에서 바람직한 알콜 디히드로게나제 5는 n° 1.1.1.1의 EC 번호를 갖는 효소이다.

[0600] 알콜 디히드로게나제 5 (ADH5라고도 함)의 아미노산 서열의 경우 UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_009703을 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_001178493을 언급할 수 있다.

[0601] 엑토인-생산 제조합 효모의 제2의 추가 실시형태

- [0602] 본 발명에 따른 엑토인-생산 재조합 효모의 이들 추가 실시형태에 따라서, 재조합 효모의 추가적인 유전자 조작은 중간 생성물 포스포에놀-피루베이트 (PEP)의 생산 증가를 목적으로 수행된다.
- [0603] 임의의 특정 이론에 국한하고 싶지 않지만, 발명자는 엑토인-생산 재조합 효모에 도입된 추가의 유전자 변화가 (i) NADPH의 과생산을 야기하고, (ii) 각각 옥살로아세테이트 및 피루베이트로의 포스포에놀 피루베이트의 제어 및 균형 전환을 야기하고, (iii) 에탄올로의 피루베이트의 감소된 전환 및 옥살로아세테이트로의 포스포에놀 피루베이트의 전환으로의 재지정을 야기한다고 믿는다.
- [0604] 이러한 목적을 위해서, 발명자는 포스포에놀피루베이트로부터 출발하여 옥살로아세테이트의 생산으로 종결되는 완전히 새로운 신규한 물질대사 경로를 구상하였다.
- [0605] 본 발명에 따른 엑토인-생산 재조합 효모에 유전자 조작을 통해 도입된 이들 추가의 유전자 변화는 하기에 보다 상세히 명시된다.
- [0606] 이들 실시형태에 따라서, 유전자 변화는 피루베이트 키나제 1 (PYK1이라고도 함), 및 임의로 또한 피루베이트 키나제 2 (PYK2라고도 함)를 과소발현하도록 도입된다. 이들 실시형태의 일부에서, PYK1은 약 프로모터 또는 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 유전자를 배치시켜 과소발현될 수 있다. 이들 실시형태의 일부에서, PYK2는 예를 들어, 단절 또는 결실에 의해 불활성화될 수 있다. 이들 실시형태의 일부에서, PYK1 유전자는 과소발현되기 보다는 결실될 수 있다. 이들 실시형태의 일부에서, PYK1 유전자 및 PYK2 유전자는 과소발현되기 보다는 결실될 수 있다.
- [0607] 이들 실시형태에 따라서, 유전자 변화는 포스포에놀피루베이트 카복시키나제 [ATP] (PCK 또는 PCKA 또는 PEPCK라고도 함)를, (i) 항상성 과발현 또는 (ii) 유도성 과발현에 의해 과발현하도록 도입된다.
- [0608] 이들 실시형태에 따라서, 유전자 변화는 세포질에서, 말레이트 디히드로게나제, 예컨대 퍼옥시좀 말레이트 디히드로게나제 (MDH3이라고도 함)를, (i) 항상성 과발현 또는 (ii) 유도성 과발현에 의해 과발현하도록 도입된다.
- [0609] 이들 실시형태에 따라서, 유전자 변화는 NADP-의존적 말산 효소 3 (ME3 또는 NADP-ME3이라고도 함)를, (i) 항상성 과발현 또는 (ii) 유도성 과발현에 의해 과발현하도록 도입된다.
- [0610] 이들 실시형태에 따라서, 유전자 변화는 하나 이상의 알콜 디히드로게나제(들), 바람직하게는 알콜 디히드로게나제 1 (ADH1이라고도 함), 알콜 디히드로게나제 3 (ADH3이라고도 함), 알콜 디히드로게나제 4 (ADH4라고도 함) 및 알콜 디히드로게나제 5 (ADH5라고도 함)를 포함하는 군에서 선택되는 하나 이상의 알콜 디히드로게나제(들)의 발현을, 예를 들어 (i) 약 프로모터 또는 유도성 또는 억제성 프로모터의 제어 하에 상응하는 코딩 서열을 배치시키거나, 또는 (ii) 상기 알콜 디히드로게나제(들)의 탈안정화된 형태의 생산에 의해서 감소시키도록 도입된다.
- [0611] 여전히 이들 실시형태에 따라서, 유전자 변화는 외생성 아세트알데히드 디히드로게나제 (MHPF라고도 함)를, (i) 항상성 과발현 또는 (ii) 유도성 과발현에 의해 과발현하도록 도입된다.
- [0612] 포스포에놀피루베이트 카복시키나제 (PPCK)
- [0613] 포스포에놀 카복시키나제 [ATP] 효소는 뉴클레오타이드 트리포스페이트 및 옥살로아세테이트 간 직접 포스포릴 전달을 통해 포스포에놀피루베이트로 옥살로아세테이트의 전환을 촉매하기 위한 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다.
- [0614] 포스포에놀 카복시키나제 [ATP]의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.
- [0615] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 [Bazaes S. *et al.* (2007) The Protein Journal, 26, 265-269] 및 [Mariet J. Van der Werf *et al.* (1997) Arch Microbiol 167: 332-342]에 기술된 방법을 언급할 수 있다.
- [0616] 본 명세서에서 바람직한 포스포에놀 카복시키나제 [ATP]는 n° 4.1.1.49의 EC 번호를 갖는 효소이다.
- [0617] 포스포에놀 카복시키나제 [ATP] (PCKA라고도 함)의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_417862를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NC_000913으로 개시된 것을 언급할 수 있다.
- [0618] 본 발명에 따른 바람직한 포스포에놀 카복시키나제는 포스포에놀피루베이트 카복시키나제 PPCK 예컨대 n° 4.1.1.32의 EC 번호를 갖는 PEPCK로부터 선택될 수 있다.

- [0619] 말레이트 디히드로게나제
- [0620] 말레이트 디히드로게나제 효소는 NADH의 존재 하에서, 옥살로아세테이트로 말레이트의 전환을 촉매하기 위한 것으로 당분야에서 설명되는 단백질이다.
- [0621] 말레이트 디히드로게나제의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다. 예를 들어, MAK196-1KT의 참조 번호 하에 "말레이트 디히드로게나제 어레이 키트"의 명칭으로 Sigma에서 판매하는 상업적 키트를 언급할 수 있다.
- [0622] 말레이트 디히드로게나제 (MDH3이라고도 함)의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_010205를 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_00118037을 언급할 수 있다.
- [0623] NADP-의존적 말산 효소 3
- [0624] NADP-의존적 말산 효소 3 효소는 NADP의 존재 하에, 피루베이트로 말레이트의 전환을 촉매하기 위해 당분야에서 설명되는 단백질이다.
- [0625] NADP-의존적 말산 효소 3의 활성 수준을 측정하기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다.
- [0626] 이와 관련하여, 당업자는 유리하게 [Gerrard-Wheeler *et al.* FEBS Journal 276 (2009) 5665-5677]에 기술된 방법을 언급할 수 있다.
- [0627] 본 명세서에서 바람직한 NADP-의존적 말산 효소 3은 n° 1.1.1.40의 EC 번호를 갖는 효소이다.
- [0628] NADP-의존적 말산 효소 3 (NADP-ME3 또는 ME3이라고도 함)의 아미노산 서열의 경우, UniProt 데이터베이스의 수탁 번호 NP_197960을 언급할 수 있다. 핵산 서열의 경우, NCBI 데이터베이스의 수탁 번호 NM_122489를 언급할 수 있다.
- [0629] 알콜 디히드로게나제 1, 알콜 디히드로게나제 3, 알콜 디히드로게나제 4, 알콜 디히드로게나제 5 및 아세트알데히드 디히드로게나제는 상기 본 명세서에서 언급한 바와 같다.
- [0630] 프로모터
- [0631] 본 명세서에 개시된 바와 같이, 본 발명에 따른 재조합 효모를 획득하기 위해 유전자 조작된 관심 유전자의 발현은 사카로마이세스 세레비시아를 포함한, 효모 세포에서 기능성인 적절한 조절 서열을 포함한다.
- [0632] 본 명세서에 개시된 바와 같이, (i) 항상성 강력 프로모터 (본 명세서에서 강력 프로모터라고 함), (ii) 항상성 약 프로모터 (본 명세서에서 약 프로모터라고 함) 및 (iii) 유도성 또는 억제성 프로모터를 포함하는, 다양한 프로모터가 관심 코딩 서열의 바람직한 발현을 위해 사용될 수 있다. 상이한 배지 중에서 그들의 상대적 활성에 따른 효모 프로모터의 목록은 [Keren *et al.* (2013) Molecular Systems Biology 9:701]에서 확인할 수 있다.
- [0633] 소정 유전자의 항상성 과발현을 허용하는 프로모터는 문헌 [Velculescu *et al.* (1997) Cell 88, 243-251]에서 확인할 수 있다.
- [0634] 본 발명에서 보다 특히 흥미로운 강력 프로모터는 다음을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다:
- [0635] · pTDH3 (SEQ ID NO: 24),
- [0636] · pENO2 (SEQ ID NO: 25),
- [0637] · pTEF KI (SEQ ID NO: 26),
- [0638] · pTEF3 (SEQ ID NO: 27),
- [0639] · pTEF1 (SEQ ID NO: 28),
- [0640] · pADH1 (SEQ ID NO: 29),
- [0641] · pGMP1 (SEQ ID NO: 30),
- [0642] · pFBA1 (SEQ ID NO: 31),

- [0643] · pPDC1 (SEQ ID NO: 32),
- [0644] · pCCW12 (SEQ ID NO: 33), 및
- [0645] · pGK1 (SEQ ID NO: 34).
- [0646] 특정한 실시형태에 따라서, 본 발명에 따른 강력 프로모터는, 독립적으로, pTDH3, pENO2, pTEF-KI, pTEF3, pTEF1, pADH1, pGMP1, pFBA1, pPDC1, pCCW12 및 pGK1로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0647] 본 발명에서 보다 특히 흥미로운 약 프로모터는 다음을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다:
- [0648] · pURA3 (SEQ ID NO: 36),
- [0649] · pRPLA1 (SEQ ID NO: 37),
- [0650] · pNUP57 (SEQ ID NO: 119), 및
- [0651] · pGAP1 (SEQ ID NO: 120).
- [0652] 특정한 실시형태에 따라서, 본 발명에 따른 약 프로모터는, 독립적으로, pURA3, pRPLA1, pNUP57 및 pGAP1로 이루어진 군으로부터 선택된다.
- [0653] 앞서 언급된 바와 같이, 유도성 또는 억제성 프로모터는 그의 활성이 생물 또는 무생물 인자의 존재 또는 부재, 및 상기 인자의 분량에 의해 제어되는 프로모터이다. 따라서, 일부 프로모터의 경우, 그들 활성은 특히 소정 인자의 분량이 증가하거나 또는 증가될 때 유도되고 그에 따라 증가될 것이며, 따라서, 이들 동일 프로모터의 활성은 상기 인자의 분량이 저하 또는 감소될 때 억제될 수 있고 그에 따라 감소될 수 있다. 유도성 또는 억제성 프로모터를 포함하는 본 발명의 재조합 효모의 배양 배지 중 상기 인자(들)의 분량은 당업자가 결정할 수 있으며 그에 따라 제어할 수 있다.
- [0654] 예를 들어, pSAM4 프로모터를 포함하는 본 발명에 따른 재조합 효모의 배양 배지 중 메티오닌의 분량 증가는 이 프로모터의 제어 하에 있는 유전자의 전사를 유도하게 되고 그에 따라 증가시킬 것이다. 반대로, 상기 배양 배지 중 메티오닌의 분량 감소는 이 프로모터 제어 하의 유전자의 전사의 억제를 야기시키게 되고, 그에 따라 감소시킬 것이다.
- [0655] 다른 예에서, pCTR1 프로모터를 포함하는 본 발명에 따른 재조합 효모의 배양 배지 중 구리의 분량 증가는 이 프로모터의 제어 하에 있는 유전자의 전사를 억제하게 되고 그에 따라 감소시킬 것이다. 반대로, 상기 배양 배지 중 구리의 분량 감소는 이 프로모터의 제어 하에 있는 유전자의 전사의 유도를 야기시키게 되고, 그리하여 증가시킬 것이다.
- [0656] 이러한 이유로, 다음의 프로모터는 본 명세서에서 "*유도성 또는 억제성 프로모터*"라고 언급된다.
- [0657] 제1 실시형태에 따라서, 본 발명에 따른 유도성 또는 억제성 프로모터는 구리 유도성 또는 억제성 프로모터, 메티오닌 유도성 또는 억제성 프로모터 및 트레오닌 유도성 또는 억제성 프로모터를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있고, 특히 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0658] · pSAM4 - 메티오닌 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 38),
- [0659] · pCUP1-1 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 39),
- [0660] · pCUP1.cgl1a - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 40),
- [0661] · pCUP1.sba - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 41),
- [0662] · pACU1 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 42),
- [0663] · pACU2 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 43),
- [0664] · pACU3p - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 44),
- [0665] · pACU4p - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 45),
- [0666] · pACU5 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 46),
- [0667] · pACU6 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 47),

- [0668] · pACU7 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 48),
- [0669] · pACU8 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 49),
- [0670] · pACU9 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 50),
- [0671] · pACU10p - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 51),
- [0672] · pACU11 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 52),
- [0673] · pACU12 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 53),
- [0674] · pACU13 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 54),
- [0675] · pACU14 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 55),
- [0676] · pACU15 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 56),
- [0677] · pGAL/CUP1p - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 57),
- [0678] · pCRS5 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 58), 및
- [0679] · pCHA1 - 트레오닌 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 59).
- [0680] 이 실시형태에 따라서, 본 발명에 따른 유도성 또는 억제성 프로모터는 특히, 독립적으로, pSAM4, pCUP1-1, pCUP1.Cgl1a, pCUP1.Sba, pACU1, pACU2, pACU3p, pACU4p, pACU5, pACU6, pACU7, pACU8, pACU9, pACU10p, pACU11, pACU12, pACU13, pACU14, pACU15, pGAL/CUP1p, pCRS5, 및 pCHA1로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0681] 따라서, 이들 프로모터의 활성은 상기에 언급된 바와 같이, 메티오닌, 구리 또는 트레오닌의 증가된 존재에 의해 유도되고, 그들 활성은 메티오닌, 구리 또는 트레오닌의 분량이 감소될 때, 저하, 즉 억제된다.
- [0682] 제2 실시형태에 따라서, 본 발명에 따른 유도성 또는 억제성 프로모터는 구리 유도성 또는 억제성 프로모터, 리신 유도성 또는 억제성 프로모터 및 메티오닌 유도성 또는 억제성 프로모터를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있고, 특히 다음으로 이루어진 군으로부터 선택된다:
- [0683] · pCTR1 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 60),
- [0684] · pCTR3 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 61),
- [0685] · pCUR1 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 62),
- [0686] · pCUR2 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 63),
- [0687] · pCUR3 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 64),
- [0688] · pCUR4 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 65),
- [0689] · pCUR5p - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 66),
- [0690] · pCUR6 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 67),
- [0691] · pCUR7 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 68),
- [0692] · pCUR8 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 69),
- [0693] · pCUR9 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 70),
- [0694] · pCUR10 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 71),
- [0695] · pCUR11 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 72),
- [0696] · pCUR12 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 73),
- [0697] · pCUR13 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 74),
- [0698] · pCUR14 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 75),

- [0699] · pCUR15 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 76),
- [0700] · pCUR16 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 77),
- [0701] · pCUR17 - 구리 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 78),
- [0702] · pLYS1 - 리신 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 79),
- [0703] · pLYS4 - 리신 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 80),
- [0704] · pLYS9 - 리신 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 81),
- [0705] · pLYR1p - 리신 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 82),
- [0706] · pLYR2p - 리신 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 83),
- [0707] · pLYR3p - 리신 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 84),
- [0708] · pLYR4p - 리신 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 85),
- [0709] · pLYR5p - 리신 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 86),
- [0710] · pLYR6p - 리신 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 87),
- [0711] · pLYR7p - 리신 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 88),
- [0712] · pLYR8 - 리신 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 89),
- [0713] · pLYR9 - 리신 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 90),
- [0714] · pLYR10 - 리신 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 91),
- [0715] · pLYR11 - 리신 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 92),
- [0716] · pMET17 - 메티오닌 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 93),
- [0717] · pMET6 - 메티오닌 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 94),
- [0718] · pMET14 - 메티오닌 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 95),
- [0719] · pMET3 - 메티오닌 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 96),
- [0720] · pSAM1 - 메티오닌 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 97),
- [0721] · pSAM2 - 메티오닌 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 98),
- [0722] · pMDH2 - 글루코스 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 35),
- [0723] · pJEN1 - 글루코스 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 118),
- [0724] · pICL1 - 글루코스 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 119),
- [0725] · pADH2 - 글루코스 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 120), 및
- [0726] · pMLS1 - 글루코스 유도성 또는 억제성 (SEQ ID NO: 121).
- [0727] 특정한 실시형태에 따라서, 본 발명에 따른 유도성 또는 억제성 프로모터는, 독립적으로, pCTR1, pCTR3, pCUR1, pCUR2, pCUR3, pCUR4, pCUR5p, pCUR6, pCUR7, pCUR8, pCUR9, pCUR10, pCUR11, pCUR12, pCUR13, pCUR14, pCUR15, pCUR16, pCUR17, pLYS1, pLYS4, pLYS9, pLYR1p, pLYR2p, pLYR3p, pLYR4p, pLYR5p, pLYR6p, pLYR7p, pLYR8, pLYR9, pLYR10, pLYR11, pMET17, pMET6, pMET14, pMET3, pSAM1, pSAM2, pMDH2, pJEN1, pICL1, pADH2 및 pMLS1로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0728] 따라서 이들 프로모터의 활성은 상기에 언급된 바와 같이, 메티오닌, 구리, 리신 또는 글루코스의 증가된 존재에 의해 억제되고, 그들 활성은 메티오닌, 구리, 리신 또는 글루코스의 분량이 감소될 때 증가, 즉 유도된다.
- [0729] 특정 실시형태에서, 본 발명에 따른 유도성 또는 억제성 프로모터는 구리 유도성 또는 억제성 프로모터, 글루코스 유도성 또는 억제성 프로모터, 리신 유도성 또는 억제성 프로모터, 메티오닌 유도성 또는 억제성 프로모터 및 트레오닌 유도성 또는 억제성 프로모터를 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다.

- [0730] 보다 특정한 실시형태에서, 본 발명에 따른 유도성 또는 억제성 프로모터는, 독립적으로, pSAM4, pCUP1-1, pCUP1.Cgl1a, pCUP1.Sba, pACU1, pACU2, pACU3p, pACU4p, pACU5, pACU6, pACU7, pACU8, pACU9, pACU10p, pACU11, pACU12, pACU13, pACU14, pACU15, pGAL/CUP1p, pCRS5, pCHA1, pCTR1, pCTR3, pCUR1, pCUR2, pCUR3, pCUR4, pCUR5p, pCUR6, pCUR7, pCUR8, pCUR9, pCUR10, pCUR11, pCUR12, pCUR13, pCUR14, pCUR15, pCUR16, pCUR17, pLYS1, pLYS4, pLYS9, pLYR1p, pLYR2p, pLYR3p, pLYR4p, pLYR5p, pLYR6p, pLYR7p, pLYR8, pLYR9, pLYR10, pLYR11, pMET17, pMET6, pMET14, pMET3, pSAM1, pSAM2, pMDH2, pJEN1, pICL1, pADH2 및 pMLS1로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0731] 보다 특히, 동일하거나 또는 상이한, 상기 프로모터는 바람직하게 SEQ ID NO: 24 내지 98 및 116-121과 적어도 80%의 동일성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택되는 핵산의 서열을 특징으로 할 수 있다.
- [0732] [Blazeck & Alper (2013) Biotechnol. J. 8 46-58]에 기술된 바와 같은 합성 프로모터가 또한 사용될 수 있다.
- [0733] 본 발명의 강, 약, 및 유도성 또는 억제성 프로모터는 사카로마이세스 강 유래의 임의 유기체로부터 기원할 수 있고, 특히, 독립적으로 사카로마이세스 세레비지아 (*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 불라르디 (*Saccharomyces boulardii*), 사카로마이세스 카스텔리 (*Saccharomyces castelii*), 사카로마이세스 바야너스 (*Saccharomyces bayanus*), 사카로마이세스 아르보리콜라 (*Saccharomyces arboricola*), 사카로마이세스 쿠드리아브제비 (*Saccharomyces kudriavzevii*), 아쉬비아 고시피 (*Ashbya gossypii*), 클루베로마이세스 락티스 (*Kluyveromyces lactis*), 피키아 파스토리스 (*Pichia pastoris*), 칸디다 글라브라타 (*Candida glabrata*), 칸디다 트로피칼리스 (*Candida tropicalis*), 데바리오마이세스 카스텔리 (*Debaryomyces castelii*), 야로위아 리폴리티카 (*Yarrowia lipolitica*) 및 사이버린드네라 자디니 (*Cyberlindnera jadinii*)로 이루어진 군으로부터 선택된 유기체로부터 기원할 수 있다.
- [0734] 본 발명의 강, 약, 및 유도성 또는 억제성 프로모터는 사카로마이세스 세레비지아, 사카로마이세스 카스텔리, 사카로마이세스 바야너스, 사카로마이세스 아르보리콜라, 사카로마이세스 쿠드리아브제비 및 클루베로마이세스 락티스로 이루어진 군으로부터 선택되는 유기체로부터 기원될 수 있다.
- [0735] **종결인자**
- [0736] 본 명세서에 개시된 바와 같이, 본 발명에 따른 재조합 효모를 수득하기 위해 유전자 조작된 관심 유전자의 발현은 사카로마이세스 세레비지아를 포함하여, 효모에서 기능성인 적절한 전사 종결인자 서열을 포함한다.
- [0737] 동일하거나 또는 상이한, 상기 전사 종결인자는 문헌 [Yamanishi *et al.*, (2013) ACS synthetic biology 2, 337-347]에서 확인할 수 있다.
- [0738] 본 발명에서 보다 특히 흥미로운 종결인자는 다음을 포함하는 군으로부터 선택될 수 있다:
- [0739] · 글리세르알데히드-3-포스페이트 디히드로게나제, 이소자임 2를 코딩하는 유전자 유래 tTDH2 (TDH2 유전자 = 서열 SEQ ID NO: 99),
- [0740] · tCYC1 (= 서열 SEQ ID NO: 100),
- [0741] · tTDH3 (= 서열 SEQ ID NO: 101), 및
- [0742] · 알콜 디히드로게나제를 코딩하는 유전자 유래 tADH1 (ADH1 유전자 = 서열 SEQ ID NO: 102),
- [0743] · 알콜 디히드로게나제를 코딩하는 유전자 유래 tADH2 (ADH2 유전자 = 서열 SEQ ID NO: 103),
- [0744] · 트리오스 포스페이트 이소머라제를 코딩하는 유전자 유래 tTPI1 (TPI1 유전자 = 서열 SEQ ID NO: 104),
- [0745] · 0-아세틸 호모세린-0-아세틸 세린 술폰히드릴라제를 코딩하는 유전자 유래 tMET17 (Met17 유전자 = 서열 SEQ ID NO: 105),
- [0746] · 에놀라제 II를 코딩하는 유전자 유래 tENO2 (ENO2 유전자 = 서열 SEQ ID NO: 106),
- [0747] · tMET3 (= 서열 SEQ ID NO: 107), 및
- [0748] · 3-포스포글리세레이트 키나제를 코딩하는 유전자 유래 tPGK1 (PGK1 유전자 = 서열 SEQ ID NO: 108),
- [0749] · tDIT1 (= 서열 SEQ ID NO: 109)
- [0750] · tRPL3 (= 서열 SEQ ID NO: 110)

- [0751] · tRPL41B (= 서열 SEQ ID NO: 111)
- [0752] · tRPL15A (= 서열 SEQ ID NO: 112)
- [0753] · tIDP1 (= 서열 SEQ ID NO: 113).
- [0754] 보다 특히, 동일하거나 또는 상이한, 상기 종결인자는 바람직하게 서열 SEQ ID NO: 99 내지 113와 적어도 80%의 동일성을 갖는 서열로 이루어진 군으로부터 선택된 핵산의 서열을 특징으로 할 수 있다.
- [0755] **재조합 효모**
- [0756] 일반적으로, 효모는 신속하게 성장할 수 있고 박테리아와 비교하여 더 높은 밀도로 배양될 수 있으며, 산업 환경에서 무균 환경을 필요로 하지 않는다. 뿐만 아니라, 효모 세포는 박테리아 세포와 비교하여 배양 배지에서부터 보다 쉽게 분리할 수 있어서, 생성물 추출 및 정제 과정을 상당히 단순하게 할 수 있다.
- [0757] 우선적으로, 본 발명의 효모는 사카로마이세스 (*Saccharomyces*), 칸디다 (*Candida*), 아시비아 (*Ashbya*), 텍케라 (*Dekkera*), 피키아 (*Pichia*)(한센울라 (*Hansenula*)), 데바리오마이세스 (*Debaryomyces*), 클라비스포라 (*Clavispora*), 로테로마이세스 (*Lodderomyces*), 야로위아 (*Yarrowia*), 지고사카로마이세스 (*Zigosaccharomyces*), 스킨조사카로마이세스 (*Schizosaccharomyces*), 토룰라스포라 (*Torulaspora*), 클루이베로마이세스 (*Kluyveromyces*), 브레타노마이세스 (*Brettanomyces*), 크립토크커스 (*Cryptococcus*) 또는 말라세지아 (*Malassezia*) 속 중에서 선택될 수 있다.
- [0758] 보다 우선적으로, 효모는 사카로마이세스, 텍케라, 스킨조사카로마이세스, 클루이베로마이세스, 토룰라스포라, 지고사카로마이세스 또는 브레타노마이세스 속의 크랩트리 양성 효모일 수 있다.
- [0759] 보다 우선적으로, 효모는 사카로마이세스 세레비지아 (*Saccharomyces cerevisiae*), 사카로마이세스 볼라르디 (*Saccharomyces boulardii*), 사카로마이세스 도우글라시 (*Saccharomyces douglasii*), 사카로마이세스 바야너스 (*Saccharomyces bayanus*), 지고사카로마이세스 바일리 (*Zigosaccharomyces bailii*), 스킨조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*), 텍케라 브루셀렌시스 (*Dekkera bruceiensis*), 텍케라 인테르메디아 (*Dekkera intermedia*), 브레타노마이세스 쿠스테르시 (*Brettanomyces custersii*), 브레타노마이세스 인테르메디우스 (*Brettanomyces intermedius*), 클루이베로마이세스 썬모톨레렌스 (*Kluyveromyces thermotolerans*), 토룰라스포라 글로보사 (*Torulaspora globosa*) 또는 토룰라스포라 글라브라타 (*Torulaspora glabrata*)의 종으로부터 선택될 수 있다.
- [0760] 보다 우선적으로, 재조합 효모는 사카로마이세스 속, 바람직하게는 사카로마이세스 세레비지아 종에 속할 수 있다.
- [0761] 상기에 언급된 바와 같이, 본 발명에 따른 재조합 효모는 본 명세서에 개시된 것들로부터 선택된 적어도 하나의 DNA 구성체(들)의 삽입에 의해 감소되는 피루베이트 디카복실라제 활성을 갖는다.
- [0762] 유전자 내에 특별한 DNA 구성체를 삽입시키기 위해 제공되는 방법은 당업자의 일반 지식에 속한다. 관련 방법은 이하 본 명세서의 실시예에서 더욱 상세히 기술한다.
- [0763] **배양 조건**
- [0764] 본 발명은 또한 엑토인의 제조를 위한, 상기 정의된 바와 같은 재조합 효모의 용도에 관한 것이다.
- [0765] 본 발명은 또한 엑토인의 제조 방법에 관한 것으로서, 방법은
- [0766] - 이전에 기술된 바와 같은 재조합 미생물을 제공하고, 재조합 미생물을 탄소원을 함유하는 배양 배지에서 배양시키는 단계, 및
- [0767] - 엑토인을 회수하는 단계를 포함한다.
- [0768] 전형적으로, 본 발명의 미생물은 적절한 배양 배지 중에서, 약 20℃ 내지 약 37℃ 범위의 온도, 바람직하게 27℃ 내지 34℃ 범위의 온도에서 성장된다.
- [0769] 본 발명에 따른 재조합 효모가 에스. 세레비지아 종에 속할 때, 온도는 적절한 배양 배지에서, 유리하게 27℃ 내지 34℃ 범위일 수 있다.
- [0770] 효모에 적합한 성장 배지는 일반적으로 상업적으로 제조된 배지 예컨대 효모 질소 염기, 암모늄 술페이트 및 탄소/에너지원으로서 텍스트로스를 포함하는 액체배지 또는 YPD 배지, 최대 성장을 위한 최적 비율의 펩톤, 효모

추출물 및 텍스트로스의 블렌드가 있다. 다른 제한 또는 합성 성장 배지가 역시 사용될 수 있고 특정한 미생물의 성장을 위한 적절한 배지는 미생물 또는 발효 과학의 당업자가 알게 될 것이다.

[0771] 용어 "적절한 배양 배지"는 상기에 정의되어 있다.

[0772] 본 발명에 따른 제조합 효모를 위해 공지된 배양 배지의 예는 당업자에게 공지되어 있고, 다음의 공개물 [D. Burke et al., Methods in Yeast Genetics - A cold spring harbor laboratory course Manual (2000)]에 제시되어 있다.

[0773] 발효에 적합한 pH 범위는 pH 3.0 내지 pH 7.5일 수 있고, 초기 조건으로서 pH 4.5 내지 pH 6.5가 바람직하다.

[0774] 발효는 호기성 조건 또는 미호기성 조건 하에서 수행될 수 있다.

[0775] 발효 배지 중 생성물의 양은 당분야에 공지된 다수의 방법들, 예를 들어 고성능 액상 크로마토그래피 (HPLC) 또는 가스 크로마토그래피 (GC)를 사용해 결정될 수 있다.

[0776] 본 방법은 회분식 발효 방법을 적용할 수 있다. 고전적인 회분식 발효는 배지의 조성물이 발효의 시작시에 설정되어 발효 동안 인공적 변경을 겪지않는 폐쇄형 시스템이다. 따라서, 발효의 시작 시에, 배지는 바람직한 유기체 또는 유기체들로 접종되고, 발효는 시스템에 아무것도 첨가하지 않고 일어나게 허용한다. 그러나, 전형적으로, "회분식" 발효는 탄소원의 첨가에 대해 회분식이고 종종 온도, pH 및 산소 농도와 같은 인자의 제어가 시도된다. 회분식 시스템에서, 시스템의 대사산물 및 생물량 조성물은 발효가 중지되는 시점까지 끊임없이 변화된다. 회분식 배양물 내에서, 세포는 정적 지연기를 통해서 고성장의 대수기 및 최종적으로 성장률이 저하 또는 중단되는 정체기까지 진행된다. 미처리되면, 정체기의 세포는 궁극적으로 사멸될 것이다. 대수기의 세포는 일반적으로 최종 생성물 또는 중간체의 대량 생산을 담당한다.

[0777] 유가식 시스템이 또한 본 발명에서 사용될 수 있다. 유가식 시스템은 탄소원 기질이 발효가 진행되면서 증분량으로 첨가되는 것을 제외하고 전형적인 회분식 시스템과 유사하다. 유가식 시스템은 이화산물 억제 (예를 들어, 글루코스 억제)가 세포의 물질대사를 억제하는 경향이 있을 때, 그리고 배지 중에 제한된 양으로 기질을 갖는 것이 바람직한 경우에 유용하다. 유가식 시스템에서 실제 기질 농도의 측정은 어렵고, 그러므로 pH, 용존 산소 및 폐가스 예컨대 CO₂의 분압과 같은 측정가능한 인자의 변화를 기반으로 평가된다.

[0778] 발효는 당분야에서 일반적이고 충분히 공지되어 있으며 그 예는 본 명세서에 참조로 편입된 [Sunderland et al., (1992)]에서 확인할 수 있다. 본 발명은 회분식 방식으로 수행되지만, 방법은 연속 발효에 적합화되는 것을 고려한다.

[0779] 연속 발효는 한정된 배양 배지가 생물반응기에 연속적으로 첨가되고 동일량의 조건화 배지는 프로세싱을 위해 동시에 제거되는 개방형 시스템이다. 연속 발효는 일반적으로 배양물을 일정하게 고밀도로 유지시키고 여기서 세포는 주로 대수기 성장된다.

[0780] 연속 발효는 세포 성장 또는 최종 생성물 농도에 영향을 미치는 하나의 인자 또는 임의수의 인자의 조절을 가능하게 한다. 예를 들어, 한 방법은 제한 영양분 예컨대 탄소원 또는 질소 수준을 고정된 비율로 유지시키게 되고 모든 다른 매개변수는 가변적이게 할 수 있다. 다른 시스템에서 성장에 영향을 미치는 다수의 인자는 연속적으로 변경시킬 수 있는 한편 배지 혼합도로 측정된 세포 농도는 일정하게 유지된다. 연속 시스템은 정상 상태 성장 조건을 유지하려고 노력하며, 그에 따라 배지 배출로 인한 세포 손실은 발효되는 세포 성장 속도에 대해 균형을 유지해야만 한다. 연속 발효 과정을 위해 영양분 및 성장 인자를 조절하는 방법을 비롯하여 생성물 형성 속도를 최대화하기 위한 기술은 산업 미생물 분야에서 충분히 공지되어 있다.

[0781] 본 발명은 회분식, 유가식 또는 연속식 과정을 사용해 실시될 수 있고 임의의 공지된 발효 방식이 적합할 수 있다는 것을 고려한다. 추가적으로, 세포는 전체 세포 촉매로서 기질 상에 고정될 수 있고 생산을 위한 발효 조건이 가해질 수 있다는 것을 고려한다.

[0782] 여전히 액토인 생산을 개선시키기 위해서, 특정한 실시형태는 제조합 효모 세포를 상기 언급된 바와 같은 적절한 배양 배지에서 배양시키는 단계로 이루어지고, 여기서 상기 배양 배지는 최적량의 탄소원, 특히 글루코스를 포함한다.

[0783] 바람직하게, 세포는 전체 배양 지속기간의 오직 일부분 동안만 이러한 최적 배양 배지에서 배양된다. 일부 실시형태에서, 효모 세포는 배양 개시 후 11시간, 12시간, 13시간, 14시간, 15시간 또는 16시간 또는 그 이상을 포괄하여, 배양의 개시 후에 10시간 또는 그 이상 상기 최적 배양 배지에서 인큐베이션된다.

- [0784] 바람직하게, 세포는 배양 개시 후 6시간 내지 10시간, 예를 들어 8시간을 포함하여, 5시간 내지 15시간 범위의 기간 동안 이러한 최적 배양 배지에서 배양된다.
- [0785] 바람직한 실시형태에서, 상기 최적 배양 배지에 포함되는 탄소원은 글루코스로 이루어진다. 바람직한 실시형태에서, 상기 최적 배양 배지는 15% w/w 이상의 글루코스를 포함하여, 12% w/w 이상의 글루코스를 포함한다. 바람직한 실시형태에서, 상기 최적 배양 배지는 35% w/w 이하의 글루코스를 포함하여, 40% w/w 이하의 글루코스를 포함한다.
- [0786] 따라서, 상기 기술된 바람직한 실시형태에서, 본 발명에 따라 엑토인을 제조하기 위한 방법은 단계 (a) 및 (c) 사이에, 효모 세포를 상기 최적 배양 배지에서 배양시키는 단계로 이루어진 중간 단계 (b)를 더 포함할 수 있다.
- [0787] **엑토인의 정제**
- [0788] 본 발명의 특별한 양상에 따라서, 엑토인의 발효 생산은 배양 배지로부터 엑토인의 단리 단계를 포함한다. 배양 배지로부터 엑토인을 회수하는 단계는 당업자에게는 통상적인 작업이다. 이것은 제한없이 증류, 가스-스트리핑, 투과증발법, 선택 침전법 또는 액체 추출법을 포함하는 당분야에 충분히 공지된 많은 기술을 통해 달성될 수 있다. 당분야의 전문가가 분리시키려는 물질의 특징에 따라서 각 기술의 매개변수를 적합화시키는 방법을 알고 있다.
- [0789] 본 발명에서 미생물의 모델로서 효모는 합성된 엑토인이 전체적으로 세포 밖으로 배출되게 유지시켰고, 따라서 정제 과정을 단순화시켰다.
- [0790] 합성된 엑토인은 증류를 통해서 수집될 수 있다. 증류는 특히 물과 공비혼합물을 형성하여 엑토인의 단리를 촉진하기 위해서 배양 배지와 상이한 선택 성분을 포함할 수 있다. 이러한 선택 성분은 유기 용매 예컨대 시클로헥산, 펜탄, 부탄올, 벤젠, 톨루엔, 트리클로로에틸렌, 옥탄, 디에틸에테르 또는 이의 혼합물이다.
- [0791] 가스 스트리핑은 헬륨, 아르곤, 이산화탄소, 수소, 질소 또는 이의 혼합물 중에서 선택된 스트리핑 가스를 사용해 달성된다.
- [0792] 액체 추출은 소수성층으로서 유기 용매 예컨대 펜탄, 헥산, 헵탄 또는 도데칸으로 달성된다.
- [0793] 용어 "... 내지 ..." 및 "... 내지 ... 범위"는 달리 명시하지 않으면, 한계치를 포함하는 것으로 이해해야 한다.
- [0794] 하기의 실시예 및 도면은 본 발명의 암시적인 제한없이 예시로 제시된다.
- [0795] **실시예**
- [0796] 실시예 1: 본 발명에 따른 재조합 사카로마이세스 세레비지아 균주의 제조를 위한 프로토콜
- [0797] 모든 하기에 제공되는 재조합 사카로마이세스 세레비지아 균주는 표준 효모 분자 유전학 절차 (Methods in Yeast Genetics - A cold spring harbor laboratory course Manual (2000) by D. Burke, D. Dawson, T. Stearns CSHL Press)를 사용하여 표준 균주로부터 제작되었다.
- [0798] 하기 언급된 유전자의 클러스터는 서열 상동성을 갖는 자유 DNA 말단을 효율적으로 재조합시키는 효모의 능력을 사용하여 한번에 재조합 효모에 통합시켰다.
- [0799] 또한, 하기 유전자형의 보다 나은 이해를 위해서,
- [0800] - ade2, his3, leu2, trp1 및 ura3은 영양요구성 마커 유전자이다.
- [0801] - 소문자는 고려되는 유전자가 불활성임을 의미하고, 대문자는 활성 유전자를 의미한다.
- [0802] - "::": 유전자 명칭에 뒤따르면 그 유전자는 그 후속된 것이 단절된 것을 의미한다 (하나 초과와 유전자가 삽입되면, 그들은 괄호 [] 표시됨). 유전자의 단절은 코딩 서열의 전체 결실을 수반하지만 프로모터는 보존된다. 결론적으로, "::"가 후속되는 유전자는 불활성이고 소문자로 표시된다. 명시되지 않으면 삽입된 유전자의 전사는 파괴된 유전자의 프로모터에 의해 제어된다.
- [0803] - "유전자.K1"은 유전자가 클루이베로마이세스 락티스로부터 기원된다는 것을 의미한다.
- [0804] 보다 특히, 클로닝되는 코딩 서열은 인공적으로 합성되었다. 이중성 서열 (비효모)의 경우, 헥산 서열은 효

모 코돈 용법을 사용하여 동의 코딩 서열을 획득하기 위해 변형되었다. 제한 효소 및 고전적인 클로닝 기술을 사용하여, 각 합성 서열을 전사 프로모터와 전사 종결인자 사이에 클로닝하였다. 각각의 프로모터 서열은 상류 유전자의 종결인자 서열과 상동성인 50 내지 200개 뉴클레오타이드 서열이 선행된다. 유사하게, 각 유전자 (프로모터-코딩 서열-종결인자를 포함하는 유전자)의 종결인자는 바로 뒤에 후속되는 유전자와 상동성인 서열이 후속된다. 그래서 통합되는 각각의 유닛은 상류 유닛 및 하류 유닛 둘 모두와 중복되는 50개 내지 200개 뉴클레오타이드를 갖는다. 제1 유닛의 경우, 프로모터는 통합될 유전자좌에 대한 효모 염색체 뉴클레오타이드와 상동성인 50개 내지 200개 뉴클레오타이드가 선행된다. 유사하게, 마지막 유닛의 경우, 종결인자는 통합될 유전자좌에 대한 효모 염색체 뉴클레오타이드와 상동성인 50개 내지 200개 뉴클레오타이드가 후속된다.

[0805] 그 다음으로 각 유닛은 플라스미드 구조체로부터 PCR 증폭되어 중복된 서열을 갖는 선형 DNA의 X 유닛을 산출한다. 이들 유전자 중 적어도 하나는 재조합 사건에 대한 선별을 위해, 영양요구성 마커이다. 모든 선형 단편은 한번에 효모를 형질전환시키고, 재조합 효모는 사용된 마커와 관련된 영양요구성에 대해 선별된다. 그 다음으로 서열의 무결성은 PCR 및 시퀀싱으로 검증된다.

[0806] 실시예 2: 엑토인 생산의 비교예

[0807] A. 먼저, 2종의 재조합 균주: YA3370-20 및 YA3371-46을 획득한다. 이들 2종 균주는 오직 본 발명에 따른 변형의 일부를 포함하기 위해 재조합되었다.

[0808] 따라서, 이들 2종의 균주는 다음과 같다:

[0809] **YA3370-20** : ade2, can1::[pACU1-AAT2-tRPL3-pCUP1-1-PPC-5.Ec-tTPI1]x4, his3::[pACU5-HOM2-2-tRPL3-pTDH3-GDH-2.Eca-tIDP1]x4, hom6::[URA3-pCCW12-ECTB.He-tIDP1]x5, leu2, lyp1::[pPDC1-ECTA.He-tCYC1-pTDH3-ECTC.He-

tTDH3]x2, pyk1::[LEU2.KI-RS,pTDH3-PEPCK-1.Ec-tIDP1,pTEF3-AQR1-tRPL41B,pCUR3-PYK1-tPYK1], sam3::[pPDC1-METX.Cg-tRPL3-pTDH3-MHPF.ec-tIDP1]x2, trp1::[pPDC1-PPC-5.Ec-tRPL3-pACU7-AK.Bs-tIDP1-TRP1]x6, ura3

YA3371-46 : ade2, can1::[pACU1-AAT2-tRPL3-pCUP1-1-PPC-5.Ec-tTPI1]x4, his3::[pACU5-HOM2-2-tRPL3-pTDH3-GDH-2.Eca-tIDP1]x4, hom6::[URA3-pCCW12-ECTB.He-tIDP1]x5, leu2, lyp1::[pPDC1-ECTA.He-tCYC1-pTDH3-ECTC.He-tTDH3]x2, pyk1::[LEU2.KI-RS,pTDH3-PEPCK-1.Ec-tIDP1,pTEF3-AQR1-tRPL41B,pCUR3-PYK1-tPYK1], sam3::[pCCW12-ECTB.Pa-tRPL3-pTDH3-MHPF.Ec-tRPL41B]x4, trp1::[pPDC1-PPC-5.Ec-tRPL3-pACU7-AK.Bs-tIDP1-TRP1]x6, ura3

[0810] PEPCK-1은 글리신으로 위치 2의 아르기닌 아미노산의 변형을 통해 안정화된 PEPCK의 형태이다.

[0812] PPC-5는 알라닌이 N+1로 첨가된 PPC의 보다 안정된 형태이다.

[0813] 모든 이들 균주는 24시간 동안 YE (효모 추출물 (Yeast Extract)) 2% 및 글루코스 8%에서 성장시켰고, 500 μ M의 CuSO₄는 8시간 후에 첨가되었다. 배지 중 엑토인의 함량은 24시간 후에 제조사의 조언에 따라서 Waters의 AccQ-Tag Ultra Derivatization 키트를 사용하여 아미노산 결정을 위한 AccQ-Tag 프리컬럼 유도체화 방법을 사용해 어세이하였다.

[0814] 이들 상이한 균주로 획득된 엑토인의 양은 각각 다음과 같다:

[0815] - YA3370-20: 1 g/L⁻¹.

[0816] - YA3371-46: 1.55 g/L⁻¹.

[0817] 비교하여, 천연 균주는 엑토인을 생산하지 않는다.

[0818] 이러한 비교 실험의 결과로서, 본 발명에 따른 변형을 포함하는 재조합 균주는 본 발명에 따른 모든 유전자 변형을 포함하지 않는 다른 재조합 균주와 동일 조건에서 배양시 더 많은 양의 엑토인을 생산한다.

[0819] B. 5종의 다른 재조합 균주: YA3380-40B, YA3595-25 및 YA3595-34가 또한 수득되었다.

[0820] 이들 3종의 균주는 다음과 같다:

[0821] **YA3380-40B:** gnp1::[LEU2.Kl-RS, pADH1-AAT2-tRPL15A, pTEF3-MDH3-1-tRPL3, pPDC1-PEPCK-1.Ec-tMET25, pTDH3-MHPF.Ec-tTPI1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tIDP1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tTPI1,

pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tIDP1, pCCW12-ME3.At-tRPL3], his3::[pACU5-ME3.At-tRPL3 -pACU6-METX-1.Cg-tIDP1]x11, hom6::[TRP1.Kl, pCCW12.Sba-HOM3-tDIT1], leu2, mup3::[HIS5.Sp, pACU7-PEPCK-1.Ec-tRPL3, pCCW12-HOM2-1-tTDH3, pPGK1-AAT2-tTDH2, pENO2-MDH3-1-tRPL15A, pCUP1-1-GDH-2.Eca-tTPI1, pTDH3.Sba-ECTB.He-tIDP1, pPDC1-ECTA.He-tRPL41B, pTEF1.Sba-ECTC.He-tRPL15A], pyk1::[LEU2.Kl, pTDH3-PEPCK-1.Ec-tIDP1, pPDC1-MDH3-1-tRPL15A, pTEF3-TPO1-tENO2, pCUR3-PYK1-7-tCYC1], trp1, ura3

YA3595-25: ade2, gnp1::[LEU2.Kl-RS,pADH1-AAT2-tRPL15A, pTEF3-MDH3-1-tRPL3, pPDC1-PEPCK-1.Ec-tMET25, pTDH3-MHPF.Ec-tTPI1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tIDP1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tTPI1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tIDP1, pCCW12-ME3.At-tRPL3], his3, hom6::[TRP1.Kl, pCCW12.Sba-HOM3-tDIT1], leu2, mup3::[HIS5.Sp, pACU7-PEPCK-1.Ec-tRPL3, pCCW12-HOM2-1-tTDH3, pPGK1-AAT2-tTDH2, pENO2-MDH3-1-tRPL15A, pCUP1-1-GDH-2.Eca-tTPI1, pTDH3.Sba-ECTB.He-tIDP1, pPDC1-ECTA.He-tRPL41B, pTEF1.Sba-ECTC.He-tRPL15A], pyk1::[LEU2.Kl, pTDH3-PEPCK-1.Ec-tIDP1, pPDC1-MDH3-1-tRPL15A, pTEF3-TPO1-tENO2, pCUR3-PYK1-7-tCYC1], sam3::[pACU7-PEPCK-1.Ec-tRPL3 -pCUP1-1-HOM3-tDIT1]x7, trp1, ura3::[pCCW12-ECTB.Ab- tRPL3 -pTDH3-ECTC.He-tRPL41B.Sba]x14

[0822] **YA3595-34:** ade2, gnp1::[LEU2.Kl-RS,pADH1-AAT2-tRPL15A, pTEF3-MDH3-1-tRPL3, pPDC1-PEPCK-1.Ec-tMET25, pTDH3-MHPF.Ec-tTPI1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tIDP1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tTPI1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tIDP1, pCCW12-ME3.At-tRPL3], his3, hom6::[TRP1.Kl, pCCW12.Sba-HOM3-tDIT1], leu2, mup3::[HIS5.Sp, pACU7-PEPCK-1.Ec-tRPL3, pCCW12-HOM2-1-tTDH3, pPGK1-AAT2-tTDH2, pENO2-MDH3-1-tRPL15A, pCUP1-1-GDH-2.Eca-tTPI1, pTDH3.Sba-ECTB.He-tIDP1, pPDC1-ECTA.He-tRPL41B, pTEF1.Sba-ECTC.He-tRPL15A], pyk1::[LEU2.Kl, pTDH3-PEPCK-1.Ec-tIDP1, pPDC1-MDH3-1-tRPL15A, pTEF3-TPO1-tENO2, pCUR3-PYK1-7-tCYC1], sam3::[pACU7-PEPCK-1.Ec-tRPL3 -pCUP1-1-HOM3-tDIT1]x7, trp1, ura3::[pCCW12-ECTB.Ab- tRPL3 -pTDH3-ECTC.He-tRPL41B.Sba]x9

[0823] 균주 YA3380-40B 및 YA3595-25는 24시간 동안 YPA 배지 (1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 0.01% 아데닌 헤미술페이트), 글루코스 8%, (NH₄)₂SO₄ 50 mM, 및 메티오닌 0.5 mM 및 트레오닌 0.85 mM에서 성장시켰다. 배지 중 엑토인의 함량은 24시간 후에 제조사의 조언에 따라 Waters의 AccQ-Tag Ultra Derivatization 키트를 사용하여 아미노산 결정을 위한 AccQ-Tag 프리퀼럼 유도체화 방법을 사용해 어레이하였다.

[0824] PEPCK-1은 글리신으로 위치 2의 아르기닌 아미노산의 변형을 통해 안정화된 PEPCK의 형태이다.

[0825] 이들 2종 균주로 수득된 엑토인의 양은 각각 다음과 같다:

- [0826] - YA3380-40B: 211 mg/L⁻¹.
- [0827] - YA3595-25: 1.29 g/L⁻¹.
- [0828] 비교하여, 천연 균주는 액토인을 생산하지 않는다.
- [0829] 균주 YA3595-34를 비롯하여 균주 YA3595-25는 24시간 동안 YPA 배지 (1% 효모 추출물, 2% 펩톤, 0.01% 아데닌 헤미술페이트), 사카로스 8%, (NH₄)₂SO₄ 50 mM, 및 메티오닌 0.5 mM 및 트레오닌 0.85 mM에서 성장시켰다. 배지 중 액토인의 함량은 24시간 후에 제조사의 조언에 따라 AccQ-Tag Ultra Derivatization 키트를 사용하여 아미노산 결정을 위한 AccQ-Tag 프리컬럼 유도체화 방법을 사용해 어세이하였다.
- [0830] 이들 2종 균주로부터 수득된 액토인의 양은 각각 다음과 같다:
- [0831] - YA3595-25: 2.63 g/L⁻¹.
- [0832] - YA3595-34: 2.58 g/L⁻¹.
- [0833] 비교시에, 천연 균주는 액토인을 생산하지 않는다.
- [0834] 이러한 비교 실험으로부터, 본 발명에 따른 변형을 포함하는 재조합 균주는 본 발명에 따른 모든 유전자 변형을 포함하지 않는 다른 재조합 균주와 동일 조건 하에서 배양했을 때 더 많은 양의 액토인을 생산하는 결과를 얻었다.
- [0835] C. 3종의 다른 재조합 균주: YA4440, YA4442 및 YA4444가 또한 수득되었다.
- [0836] 이들 3종 균주는 다음과 같다:
- [0837] YA4440: MAT- α , gnp1::[LEU2.Kl-RS, pADH1-AAT2-tRPL15A, pTEF3-MDH3-1-tRPL3, pPDC1-PEPCK-1.Ec-tMET17, pTDH3-MHPF.Ec-tTPI1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tIDP1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tTPI1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tIDP1, pCCW12-ME3.At-tRPL3], his3::[HIS3-pACU5-ME3.At-tRPL3, pACU6-METX-1.Cg-tIDP1]x5, hom6::[TRP1.Kl-RS, pCCW12.Sba-HOM3-tDIT1], leu2, lys2 Δ 201, mup3::[HIS5.sp-RS, pACU7-PEPCK-

1.Ec-tRPL3, pCCW12-HOM2-1-tTDH3, pPGK1-AAT2-tTDH2, pENO2-MDH3-1-tRPL15A, pCUP1-1-GDH-21.Eca-tTPI1, pTDH3.Sba-ECTB.He-tIDP1, pPDC1-ECTA.He-tRPL41B, pTEF1.Sba-ECTC.He-tRPL15A], pyk1::[LEU2.Kl-RS, pTDH3-PEPCK-1.Ec-tIDP1, pPDC1-MDH3-1-tRPL15A, pTEF3-TPO1-tENO2, pCUR3-PYK1-7-tCYC1], sam3::[pACU7-PEPCK-1.Ec-tRPL3, pCUP1-1-HOM3-tDIT1-sam3]x5, trp1, trp4::[LYS2-loxP, pCCW12 -PEPCK-1.Ec-tTPI1, **pCCW12-GDH2-tRPL3**, pCCW12-METX-1.Cg-tRPL41B.Sba, pCCW12.Sba-HOM3-tRPL15A], ura3::[ECTB.Ab-ECTC.He-URA3]x7

YA4442: MAT- α , gnp1::[LEU2.Kl-RS, pADH1-AAT2-tRPL15A, pTEF3-MDH3-1-tRPL3, pPDC1-PEPCK-1.Ec-tMET17, pTDH3-MHPF.Ec-tTPI1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tIDP1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tTPI1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tIDP1, pCCW12-ME3.At-tRPL3], his3::[HIS3-pACU5-ME3.At-tRPL3, pACU6-METX-1.Cg-tIDP1]x5, hom6::[TRP1.Kl-RS, pCCW12.Sba-HOM3-tDIT1], leu2, lys2 Δ 201, mup3::[HIS5.sp-RS, pACU7-PEPCK-1.Ec-tRPL3, pCCW12-HOM2-1-tTDH3, pPGK1-AAT2-tTDH2, pENO2-MDH3-1-tRPL15A, pCUP1-1-GDH-21.Eca-tTPI1, pTDH3.Sba-ECTB.He-tIDP1, pPDC1-ECTA.He-tRPL41B, pTEF1.Sba-ECTC.He-tRPL15A], pyk1::[LEU2.Kl-RS, pTDH3-PEPCK-1.Ec-tIDP1, pPDC1-MDH3-1-tRPL15A, pTEF3-TPO1-tENO2, pCUR3-PYK1-7-tCYC1], sam3::[pACU7-PEPCK-1.Ec-tRPL3, pCUP1-1-HOM3-tDIT1-sam3]x5, trp1, trp4::[LYS2-loxP, pCCW12 -PEPCK-1.Ec-tTPI1, **pCCW12-GDH1-tRPL3**, pCCW12-METX-1.Cg-tRPL41B.Sba, pCCW12.Sba-HOM3-tRPL15A], ura3::[ECTB.Ab-ECTC.He-URA3]x7

YA4444: MAT- α , gnp1::[LEU2.Kl-RS, pADH1-AAT2-tRPL15A, pTEF3-MDH3-1-tRPL3, pPDC1-PEPCK-1.Ec-tMET17, pTDH3-MHPF.Ec-tTPI1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tIDP1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tTPI1, pCCW12-ME3.At-tRPL3, pTDH3-MHPF.Ec-tIDP1, pCCW12-ME3.At-tRPL3], his3::[HIS3-pACU5-ME3.At-tRPL3, pACU6-METX-1.Cg-tIDP1]x5, hom6::[TRP1.Kl-RS, pCCW12.Sba-HOM3-tDIT1], leu2, lys2 Δ 201, mup3::[HIS5.sp-RS, pACU7-PEPCK-1.Ec-tRPL3, pCCW12-HOM2-1-tTDH3, pPGK1-AAT2-tTDH2, pENO2-MDH3-1-tRPL15A, pCUP1-1-GDH-21.Eca-tTPI1, pTDH3.Sba-ECTB.He-tIDP1, pPDC1-ECTA.He-tRPL41B, pTEF1.Sba-ECTC.He-tRPL15A], pyk1::[LEU2.Kl-RS, pTDH3-PEPCK-1.Ec-tIDP1, pPDC1-MDH3-1-tRPL15A, pTEF3-TPO1-tENO2, pCUR3-PYK1-7-

tCYC1], sam3::[pACU7-PEPCK-1.Ec-tRPL3, pCUP1-1-HOM3-tDIT1-sam3]x5, trp1, trp4::[LYS2-loxP, pCCW12 -PEPCK-1.Ec-tTPI1, **pCCW12-GDH2.Eca-tRPL3**, pCCW12-METX-1.Cg-tRPL41B.Sba, pCCW12.Sba-HOM3-tRPL15A], ura3::[ECTB.Ab-ECTC.He-URA3]x7

GDH1 및 GDH2는 내생성 사카로마이세스 세레비지아 효소인 반면, GDH2.Eca는 엔토디미움 카우다툼 유래 GDH 효소이다.

이들 균주는 엘렌메이어 플라스크에서 28℃로 16시간 동안 효모 추출물 2%, 수크로스 8%, 메티오닌 0.5 mM, 트레오닌 4.2 mM, 우레아 50 mM, 비타민 B5 4 μ M, 비타민 B1 6 μ M, 비타민 B6 10 μ M, 비타민 B10 1.5 μ M, 비타민 B3 2.9 μ M, 비타민 B2 0.5 μ M, 비타민 B8 0.08 μ M, 비타민 B9 4.5 nM, CuSO4 500 μ M 중에서 성장시켰다. 16시간 후에, 500 μ M의 CuSO4 및 우레아 100 mM을 첨가하였고 배양물을 추가 8시간 동안 성장시켰다.

- [0842] 이어서, 엑토인 생산은 엑토인을 HPLC-UV로 검출한 것을 제외하고 [Ono H, et al. (1999) Journal of Bacteriology, p, 91-99]에 기술된 대로 본질적으로 평가하였다.
- [0843] 이러한 조건 하에서, YA4440는 6.4 g/L의 엑토인을 생산하였고, YA4442는 4.7 g/L의 엑토인을 생산하였으며, YA4444는 6.1 g/L의 엑토인을 생산하였다. 이들 동일 조건 하에서, 야생형 균주 (예를 들어, 비재조합체)는 검출가능한 양의 엑토인을 생산하지 않는다는 것을 상기한다.
- [0844] 이들 3종 균주는 동일하지만 GDH 효소를 과발현한다. 상기 결과는 NADH 의존적 GDH (YA4440의 경우 GDH2 및 YA4444의 경우 GDH2.Eca)의 과발현이 NADPH 의존적 GDH (YA4442의 경우 GDH1)의 과발현에 비해 더 많은 엑토인의 생산을 가능하게 한다는 것을 보여준다.
- [0845] 따라서, NADH 의존적 글루타메이트 디히드로게나제의 과발현은 NADPH 의존적 글루타메이트 디히드로게나제 (GDH1)의 과발현에 비해 더 많은 엑토인의 생산을 가능하게 한다.

서열 목록

SEQUENCE LISTING

<110> ALDERYS

<120> Ectoine-producing yeast

<130> PR75767

<150> EP17305910

<151> 2017-07-11

<160> 121

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 1583

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> ASPARTOKINASE (HOM3)

<220>

<223> ASPARTOKINASE (HOM3)

<400> 1

atgccaatgg atttccaacc tacatcaagt cattcgaact gggtcgtgca aaagttcggg 60

ggtagatctg tcggtaaatt tcccgcccaa atagtggatg acattgtgaa gcactattct 120

aaacctgacg gcccaaacaa taatgtcgct gtcgtttgtt ccgcccgttc ttcatacacc 180

aaggctgaag gtaccacttc tcgtcttttg aaatgttgtg atttggcttc gcaagaatct 240

gaatttcaag acattatcga agttatcaga caagaccata tcgataatgc cgaccgttc 300

attctcaatc ctgccttgca agccaagtta gtggatgata ccaataaaga acttgaactg 360

gtcaagaaat atttaaagtc ttcaaaagtt ttgggtgaag tgagttcacg tacagtagat 420

ctggtgatgt catgttgtga gaagttgagt tgtttgttca tgactgcttt atgtaatgac 480

cgtggctgta aggccaaata tgtggatttg agccacattg ttccctctga tttcagtgcc 540
 agcgctttgg ataacagttt ctacactttc ctggttcaag cattgaaaga aaaattggcc 600

 ccccttgtaa gtgctaaaga gcgtatcgtt ccagtcttta cagggttttt tggtttagtt 660
 ccaactggtc ttctgaatgg tgttggtcgt ggctataccg atttatgtgc cgctttgata 720
 gcagttgctg taaatgctga tgaactacaa gtttgggaagg aagttgatgg tatatttact 780
 gctgacctc gtaaggttcc tgaagcacgt ttgctagaca gtgttactcc agaagaagct 840
 tctgaattaa catattatgg ttccgaagtt atacatcctt ttacgatgga acaagttatt 900
 agggctaaga ttctattag aatcaagaat gttcaaaatc cattaggtaa cggtaccatt 960
 atctaccag ataatgtagc aaagaagggt gaatctactc caccacatcc tcctgagaac 1020

 ttatcctcat ctttctatga aaagagaaag agaggtgcca ctgctatcac caccaaaaat 1080
 gacattttcg tcatcaacat tcattccaat aagaaaaccc tatcccatgg ttctctagct 1140
 caaatattta ccatcctgga taagtacaag ttagtcgtag atttaatatc tactttctgaa 1200
 gttcatgttt cgatggcttt gccattcca gatgcagact cattaaaatc tctgagacaa 1260
 gctgaggaaa aattgagaat tttaggttct gttgatatca caaagaagtt gtctattgtt 1320
 tcattagttg gtaaacatat gaaacaatac atcggcattg ctgggtaccat gtttactact 1380
 cttgctgaag aaggcatcaa cattgaaatg atttctcaag gggcaaatga aataaacata 1440

 tcctgcgtta tcaatgaatc tgactccata aaagcgctac aatgtattca tgccaagtta 1500
 ctaagtgagc ggacaaatc ttcaaacc aa tttgaacatg ccattgatga acgttttagaa 1560
 caattgaaaa gacttggaaat taa 1583

<210> 2

<211> 526

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> ASPARTOKINASE (HOM3)

<220>

<223> ASPARTOKINASE (HOM3)

<400> 2

Pro Met Asp Phe Gln Pro Thr Ser Ser His Ser Asn Trp Val Val Gln

1 5 10 15

Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Gly Lys Phe Pro Val Gln Ile Val Asp

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

Ser Val Thr Pro Glu Glu Ala Ser Glu Leu Thr Tyr Tyr Gly Ser Glu
 275 280 285
 Val Ile His Pro Phe Thr Met Glu Gln Val Ile Arg Ala Lys Ile Pro
 290 295 300
 Ile Arg Ile Lys Asn Val Gln Asn Pro Leu Gly Asn Gly Thr Ile Ile
 305 310 315 320
 Tyr Pro Asp Asn Val Ala Lys Lys Gly Glu Ser Thr Pro Pro His Pro
 325 330 335

 Pro Glu Asn Leu Ser Ser Ser Phe Tyr Glu Lys Arg Lys Arg Gly Ala
 340 345 350
 Thr Ala Ile Thr Thr Lys Asn Asp Ile Phe Val Ile Asn Ile His Ser
 355 360 365
 Asn Lys Lys Thr Leu Ser His Gly Phe Leu Ala Gln Ile Phe Thr Ile
 370 375 380
 Leu Asp Lys Tyr Lys Leu Val Val Asp Leu Ile Ser Thr Ser Glu Val
 385 390 395 400

 His Val Ser Met Ala Leu Pro Ile Pro Asp Ala Asp Ser Leu Lys Ser
 405 410 415
 Leu Arg Gln Ala Glu Glu Lys Leu Arg Ile Leu Gly Ser Val Asp Ile
 420 425 430
 Thr Lys Lys Leu Ser Ile Val Ser Leu Val Gly Lys His Met Lys Gln
 435 440 445
 Tyr Ile Gly Ile Ala Gly Thr Met Phe Thr Thr Leu Ala Glu Glu Gly
 450 455 460

 Ile Asn Ile Glu Met Ile Ser Gln Gly Ala Asn Glu Ile Asn Ile Ser
 465 470 475 480
 Cys Val Ile Asn Glu Ser Asp Ser Ile Lys Ala Leu Gln Cys Ile His
 485 490 495
 Ala Lys Leu Leu Ser Glu Arg Thr Asn Thr Ser Asn Gln Phe Glu His
 500 505 510
 Ala Ile Asp Glu Arg Leu Glu Gln Leu Lys Arg Leu Gly Ile

515	520	525
<210> 3		
<211> 1215		
<212> DNA		
<213> Bacillus subtilis		
<220>		
<223> ASPARTATE KINASE (AK)		
<220>		
<223> ASPARTATE KINASE (AK)		
<400> 3		
atggctatta tcgtccaaaa attcggagga actagcgta aggatgacaa agggagaaag	60	
ttggccttag ggcacattaa ggaggcaatt tcagagggtt ataagggtgt ttagttgtta	120	
tcggctatgg gtagaaaagg ggacccttac gcgacggact cactattggg ttactttac	180	
ggggatcaat cagcaatcag cccaagagag caggatctgc tgctatcatg tggagaaacc	240	
atatcctcgg ttgtgttcac cagcatgtta ttagataatg gagtaaaagc agcagccctg	300	
acgggagccc aggctggttt tttaaccaac gatcagcata ctaatgcaa aattatagag	360	
atgaagcctg aacgtctttt cagtgttctt gcaaaccacg acgcagttgt cgtcgctgga	420	
tttcaggcgc ctaccgagaa aggagatact accacaatcg gtagagggtg ctcggacacg	480	
tcagctgcag ccctagggtc tgctgttgat gcagagtaca tagatatctt tactgacgta	540	
gaaggggtga tgaccgcaga tccaagagta gtagaaaatg caaagccact accagtggta	600	
acttataccg aaatctgcaa cttagcttac caaggtgcta aggtaatatc tccaagagct	660	
gtggaaattg ctatgcaagc aaaggttcct atccgtgtta ggagtactta ttcaaacgat	720	
aaaggtacgt tagtaactag tcatcatagt tccaaagttg gctctgacgt ctttgaaagg	780	
ttaatcactg gtatcgaca tgtaaagac gtcactcaat tcaaggctcc gcgaaaaata	840	
ggtcaatata acgttcaaac agaagtgttt aaagcgatgg cgaatgccgg tatatctgtc	900	
gatttcttta atattacacc ctctgaaata gtatatacag tcgcggttaa taagactgaa	960	
acagctcaaa ggattttgat ggatatgggc tatgatccta tggtcacaag aaattgtgcc	1020	
aaggtgtctg ccgtgggtgc tggcattatg ggtgtcccag gtgtgacatc gaaaattgtt	1080	
tctgccttat ctgaaaaaga aattccgatt ttgcaatctg ctgattcca tacaacaatt	1140	
tgggttttgg ttcatgaagc cgatatggtt cctgctgtta atgccttgca cgaagttttt	1200	
gaattgtcca aataa	1215	

<210> 4

<211> 404

<212> PRT

<213> Bacillus subtilis

<220>

<223> ASPARTATE KINASE (AK)

<220>

<223> ASPARTATE KINASE (AK)

<400> 4

Met Ala Ile Ile Val Gln Lys Phe Gly Gly Thr Ser Val Lys Asp Asp

1 5 10 15

Lys Gly Arg Lys Leu Ala Leu Gly His Ile Lys Glu Ala Ile Ser Glu

20 25 30

Gly Tyr Lys Val Val Val Val Val Ser Ala Met Gly Arg Lys Gly Asp

35 40 45

Pro Tyr Ala Thr Asp Ser Leu Leu Gly Leu Leu Tyr Gly Asp Gln Ser

50 55 60

Ala Ile Ser Pro Arg Glu Gln Asp Leu Leu Leu Ser Cys Gly Glu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Val Val Phe Thr Ser Met Leu Leu Asp Asn Gly Val Lys

85 90 95

Ala Ala Ala Leu Thr Gly Ala Gln Ala Gly Phe Leu Thr Asn Asp Gln

100 105 110

His Thr Asn Ala Lys Ile Ile Glu Met Lys Pro Glu Arg Leu Phe Ser

115 120 125

Val Leu Ala Asn His Asp Ala Val Val Val Ala Gly Phe Gln Gly Ala

130 135 140

Thr Glu Lys Gly Asp Thr Thr Thr Ile Gly Arg Gly Gly Ser Asp Thr

145 150 155 160

Ser Ala Ala Ala Leu Gly Ala Ala Val Asp Ala Glu Tyr Ile Asp Ile

165 170 175

Phe Thr Asp Val Glu Gly Val Met Thr Ala Asp Pro Arg Val Val Glu

180 185 190
 Asn Ala Lys Pro Leu Pro Val Val Thr Tyr Thr Glu Ile Cys Asn Leu
 195 200 205
 Ala Tyr Gln Gly Ala Lys Val Ile Ser Pro Arg Ala Val Glu Ile Ala
 210 215 220

 Met Gln Ala Lys Val Pro Ile Arg Val Arg Ser Thr Tyr Ser Asn Asp
 225 230 235 240
 Lys Gly Thr Leu Val Thr Ser His His Ser Ser Lys Val Gly Ser Asp
 245 250 255
 Val Phe Glu Arg Leu Ile Thr Gly Ile Ala His Val Lys Asp Val Thr
 260 265 270
 Gln Phe Lys Val Pro Ala Lys Ile Gly Gln Tyr Asn Val Gln Thr Glu
 275 280 285

 Val Phe Lys Ala Met Ala Asn Ala Gly Ile Ser Val Asp Phe Phe Asn
 290 295 300
 Ile Thr Pro Ser Glu Ile Val Tyr Thr Val Ala Gly Asn Lys Thr Glu
 305 310 315 320
 Thr Ala Gln Arg Ile Leu Met Asp Met Gly Tyr Asp Pro Met Val Thr
 325 330 335
 Arg Asn Cys Ala Lys Val Ser Ala Val Gly Ala Gly Ile Met Gly Val
 340 345 350

 Pro Gly Val Thr Ser Lys Ile Val Ser Ala Leu Ser Glu Lys Glu Ile
 355 360 365
 Pro Ile Leu Gln Ser Ala Asp Ser His Thr Thr Ile Trp Val Leu Val
 370 375 380
 His Glu Ala Asp Met Val Pro Ala Val Asn Ala Leu His Glu Val Phe
 385 390 395 400
 Glu Leu Ser Lys

<210> 5

<211> 1098

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<

223> ASPARTATE-SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE (HOM2)

<220>

<223> ASPARTATE-SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE (HOM2)

<400> 5

atggctggaa agaaaattgc tgggtgtttg ggtgctactg gttccgttgg tcaacgtttc	60
attctgttgt tggcaaatca cccctatttc gaactgaaag ttcttgggtc ctcttctaga	120
tcagctggca agaaatacgt tgacgtgtg aactggaagc aaaccgattt gctaccggaa	180
tctgctaccg atattattgt ttccgaatgt aaatctgaat tctttaaaga gtgtgacatc	240
gtcttttccg gattggatgc tgactatgct ggcgctatcg aaaaggaatt catggaagct	300
ggtatcgcca ttgtttccaa tgccaagaat tatagaagag aacaagatgt gccattgatt	360

gttcctgttg tcaatcctga gcatttggat attgtagctc aaaagcttga caccgccaag	420
gtcgaagga agccaagacc agggttcatt atctgtatct ccaattgttc cactgcaggt	480
ttggttgcac cattgaagcc tttagttgaa aaattcggtc ctattgatgc ttgaccact	540
actactttgc aagcaatctc aggtgctggt ttctccccag gtgtaccagg tattgatatt	600
ctagacaata ttattccata cattgggtgt gaagaagaca agatggaatg ggagaccaag	660
aaaatcttgg ctccattagc agaagacaag acacacgtca aactattgac tccagaagaa	720
atcaaagtct ctgctcaatg taacagagtc gctgtttccg atgggcacac cgaatgtatc	780

tctttgaggt tcaagaacag acctgctcca tccgtcgagc aagicaagac atgcctaaaa	840
gaatacgtct gcgatgccta caaattaggc tgcattctg ctcaaagca aactattcat	900
gttttggaa aaccagacag acctcaacca aggttggaca ggaacagaga cagcggttac	960
ggtgtttccg ttggtagaat cagagaagac ccattgttag atttcaaat ggttgtcctt	1020
tcccacaaca ccattattgg tgccgctggt tctggtgtct tgattgccga aatcttacta	1080
gcaagaaact tgatttaa	1098

<210> 6

<211> 1098

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> ASPARTATE-SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE (HOM2)

<220>

<223> ASPARTATE-SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE (HOM2)

<400> 6

atggctggaa agaaaattgc tgggtttttg ggtgctactg gttccgttgg tcaacgtttc	60
attctgttgt tggcaaatca ccctcatttc gaactgaaag ttcttgggtc ctctgagaga	120
tcagctggca agaaatacgt tgacgtgtg aactggaagc aaaccgattt gctaccggaa	180
tctgctaccg atattattgt ttccgaatgt aaatctgaat tctttaaaga gtgtgacatc	240
gtcttttccg gattggatgc tgactatgct ggcgctatcg aaaaggaatt catggaagct	300
ggtatcgcca ttgtttccaa tgccaagaat tatagaagag aacaagatgt gccattgatt	360
gttcctgttg tcaatcctga gcatttggat attgtagctc aaaagcttga caccgccaag	420
gctcaaggta agccaagacc agggttcatt atctgtatct ccaattgttc cactgcaggt	480
ttggttgac cattgaagcc ttgtattgaa aaattcggtc ctattgatgc ttgaccact	540
actactttgc aagcaatctc aggtgctggg ttctccccag gtgtaccagg tattgatatc	600
ctagacaata ttattccata cattggtggg gaagaagaca agatggaatg ggagaccaag	660
aaaatcttgg ctccattagc agaagacaag acacacgtca aactattgac tccagaagaa	720
atcaaagtct ctgctcaatg taacagagtc gctgtttccg atgggcacac cgaatgtatc	780
tctttgaggt tcaagaacag acctgctcca tccgtcgagc aagtcaagac atgcctaaaa	840
gaatacgtct gcgatgccta caaattaggc tgcattctg ctccaaagca aactattcat	900
gttttggac aaccagacag acctcaacca aggttggaca ggaacagaga cagcggttac	960
ggtgtttccg ttggtagaat cagagaagac ccattgttag atttcaaaat ggttgtcctt	1020
tcccacaaca ccattattgg tgccgtggg tctggtgtct tgattgccga aatcttacta	1080
gcaagaaaact tgatttaa	1098

<210> 7

<211> 365

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> ASPARTATE-SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE (HOM2)

<220>

<223> ASPARTATE-SEMIALDEHYDE DEHYDROGENASE (HOM2)

<400> 7

Met Ala Gly Lys Lys Ile Ala Gly Val Leu Gly Ala Thr Gly Ser Val

1 5 10 15
 Gly Gln Arg Phe Ile Leu Leu Leu Ala Asn His Pro His Phe Glu Leu
 20 25 30
 Lys Val Leu Gly Ala Ser Ser Arg Ser Ala Gly Lys Lys Tyr Val Asp
 35 40 45

 Ala Val Asn Trp Lys Gln Thr Asp Leu Leu Pro Glu Ser Ala Thr Asp
 50 55 60
 Ile Ile Val Ser Glu Cys Lys Ser Glu Phe Phe Lys Glu Cys Asp Ile
 65 70 75 80
 Val Phe Ser Gly Leu Asp Ala Asp Tyr Ala Gly Ala Ile Glu Lys Glu
 85 90 95
 Phe Met Glu Ala Gly Ile Ala Ile Val Ser Asn Ala Lys Asn Tyr Arg
 100 105 110

 Arg Glu Gln Asp Val Pro Leu Ile Val Pro Val Val Asn Pro Glu His
 115 120 125
 Leu Asp Ile Val Ala Gln Lys Leu Asp Thr Ala Lys Ala Gln Gly Lys
 130 135 140
 Pro Arg Pro Gly Phe Ile Ile Cys Ile Ser Asn Cys Ser Thr Ala Gly
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Pro Leu Lys Pro Leu Ile Glu Lys Phe Gly Pro Ile Asp
 165 170 175

 Ala Leu Thr Thr Thr Thr Leu Gln Ala Ile Ser Gly Ala Gly Phe Ser
 180 185 190
 Pro Gly Val Pro Gly Ile Asp Ile Leu Asp Asn Ile Ile Pro Tyr Ile
 195 200 205
 Gly Gly Glu Glu Asp Lys Met Glu Trp Glu Thr Lys Lys Ile Leu Ala
 210 215 220
 Pro Leu Ala Glu Asp Lys Thr His Val Lys Leu Leu Thr Pro Glu Glu
 225 230 235 240

 Ile Lys Val Ser Ala Gln Cys Asn Arg Val Ala Val Ser Asp Gly His
 245 250 255

Thr Glu Cys Ile Ser Leu Arg Phe Lys Asn Arg Pro Ala Pro Ser Val
 260 265 270
 Glu Gln Val Lys Thr Cys Leu Lys Glu Tyr Val Cys Asp Ala Tyr Lys
 275 280 285
 Leu Gly Cys His Ser Ala Pro Lys Gln Thr Ile His Val Leu Glu Gln
 290 295 300

Pro Asp Arg Pro Gln Pro Arg Leu Asp Arg Asn Arg Asp Ser Gly Tyr
 305 310 315 320
 Gly Val Ser Val Gly Arg Ile Arg Glu Asp Pro Leu Leu Asp Phe Lys
 325 330 335
 Met Val Val Leu Ser His Asn Thr Ile Ile Gly Ala Ala Gly Ser Gly
 340 345 350
 Val Leu Ile Ala Glu Ile Leu Leu Ala Arg Asn Leu Ile
 355 360 365

<210> 8

<211> 1413

<212> DNA

<213> Pseudomonas aeruginosa

<220>

<223> DIAMINOBUTYRATE AMINOTRANSFERASE (EctB)

<220>

<223> DIAMINOBUTYRATE AMINOTRANSFERASE (EctB)

<400> 8

atggctcagc ttgtacatc agttatcgag gaccaaccct tacgcgccac tcccgcagaa	60
ggcgagactc tgtacgagtt ctccaatct cctctcttag aacgtcagtc tcgccaagag	120
agcaatgctc gaagctatcc acgtagaata ccacttgcat taaagaaggc ccgaggtctg	180
ctagtggaag acgtcgaagg gaggactttc attgactgtc tcgccggtgc aggaacccta	240
gcattgggac ataatacccc ggtagttata gaagccatta gacaggttct tgctgatgaa	300
ttgcccttgc acaccttaga tttagcagacc cctgtgaagg accaattcgt ccaggattta	360
tttgggttgc tcccactgc tttggcagcg gaagccaaga tccaattctg tgggccaaca	420
ggaacagacg cagttgaggc cgctcttaag cttgtgcgga cggcgactgg ccgtttctaca	480
atactaagtt ttcaaggagg atatacagga atgtccaag gtgcactggg cttgatgggc	540

aacctcggtc caaagaagcc attgggcgca gtactctcaa ccggcggtcca attcctccca 600
taccgtacg attacagatg tccattcggt ctgggtggcg aagctggagt caaggcgaat 660
ctacattact tagaaaattt gctcaatgat cctgaaggag gtgtacaatt gccggccgct 720

gtcattgttg aagttgtaca aggcgaaggt ggggtcgtgc cagcagattt ggactggtta 780
cgaggattac gtaggattac tgagcaggcc ggtgtagccc ttattgtgga tgaaattcaa 840
tccggctttg cgcgtactgg tcggatgttc gcctttgagc atgccggcat cgtgcctgat 900
gtggtagtgc ttcccaaagc tatcggtggc tcctccctt tagctgtggt cgtatatcgg 960
gaatggctag acaagtggca acctggggca catgctggaa ccttcagagg caatcagatg 1020
gcgatggcag ctggcagtc agtcatgaga tacctaaaag agcatgatct ggcagcccat 1080
gcagccgcca tgggcgaacg actagctgag catctcagga tcttcagag agactatccg 1140

cagttaggtg atatacgagg ccggcgctta atgttaggtg tcgagatagt agatccgcag 1200
ggcgaagctg acgctctagg tcatccacc actgacggag ccctggcctc gcgggtacaa 1260
cgggaatgtt tgagaagagg tctcatattg gaattaggcg ggcgacacgg atctgttgta 1320
agattcttgc cacctttgat tattggggca gaacagatag acgaagtggc gcgtagattt 1380
gccagggcat taggagctgc ccttgctggg taa 1413

<210> 9

<211> 1266

<212> DNA

<213> Halomonas elongata

<220>

<223> DIAMINOBUTYRATE AMINOTRANSFERASE (EctB)

<220>

<223>

DIAMINOBUTYRATE AMINOTRANSFERASE (EctB)

<400> 9

atgcagacac aaatcttga acgtatggaa tccgacgtca gaacgtactc aagatctttc 60
cctgtagtct ttaccaaggc gcgaaatgct cgacttaccg acgaagaagg gcgagagtac 120
atagacttcc tagcaggcgc tggtagctta aattatgggc ataacaatcc acacctgaag 180
caagcattac tcgactacat tgattcagac ggcatgttcc atggcttga tttctggacc 240
gcggcaaagc gcgattacct tgagacactc gaagaggtca ttttgaaacc gcgtggtttg 300
gactataagg ttacttacc gggcccaacg ggcaccaatg cagttgaagc cgccattcgt 360
ttggccaggg tcgccaagg tcgtcataat attgtctctt ttacaaatgg ctttcacggt 420

gttactatgg gcgctctggc gacgaccggt aacagaaagt ttcgggaagc gacaggtggc 480
 gtcctactc aggcagcgag cttcatgcca ttgacgggt atcttggctc ttccactgat 540
 acacttgatt acttcgaaaa gttattgggt gataagtcag gtgggcttga tgtgccagcc 600
 gcggtaatag ttgaaacagt ccaaggagaa ggcggaataa acgttgcggg acttgagtgg 660
 ctcaagagat tagaaagcat ttgtagagca aatgatattt tgtaaatcat cgatgatata 720
 caagccggct gcggaagaac tggaaagttc ttctatttcg aacatgctgg tattactcct 780
 gatattgtca caaactcgaa atctttgtca ggatatgggt tgccttttgc tcatgtgctt 840

atgagaccgg agcttgataa atggaaacca ggacaatata acggaacatt ccgggggtttc 900
 aatctagctt tcgcgaccgc tgctgcagca atgaggaaat actggtcgga cgatacgttt 960
 gaacgagacg ttcaaaggaa agctagaata gttgaggaaa gatttggtta aatcgagct 1020
 tggctttctg aaaacgggat tgaagcttcc gaacggggta ggggtttgat gagaggtatc 1080
 gacgttgggt ctggggacat agcagataaa attacgcac aagcgtttga aaatggttta 1140
 atcatcgaaa caagtggta agatgggtgag gttgttaaat gcttatgccc cttaccata 1200
 ccagatgaag atttagtaga aggttttagac atattagaaa ctagcacaaa acaagccttc 1260

tcttaa 1266

<210> 10

<211> 470

<212> PRT

<213> Pseudomonas aeruginosa

<220>

<223> DIAMINOBUTYRATE AMINOTRANSFERASE (EctB)

<220>

<223> DIAMINOBUTYRATE AMINOTRANSFERASE (EctB)

<400> 10

Met Ala His Val Ala Thr Ser Val Ile Glu Asp Gln Pro Leu Arg Ala

1 5 10 15

Thr Pro Ala Glu Gly Glu Thr Leu Tyr Glu Phe Ser Gln Ser Pro Leu

20 25 30

Leu Glu Arg Gln Ser Arg Gln Glu Ser Asn Ala Arg Ser Tyr Pro Arg

35 40 45

Arg Ile Pro Leu Ala Leu Lys Lys Ala Arg Gly Leu Leu Val Glu Asp

50 55 60

Val Glu Gly Arg Thr Phe Ile Asp Cys Leu Ala Gly Ala Gly Thr Leu
65 70 75 80
Ala Leu Gly His Asn His Pro Val Val Ile Glu Ala Ile Arg Gln Val
85 90 95

Leu Ala Asp Glu Leu Pro Leu His Thr Leu Asp Leu Thr Thr Pro Val
100 105 110
Lys Asp Gln Phe Val Gln Asp Leu Phe Gly Leu Leu Pro Pro Ala Leu
115 120 125
Ala Ala Glu Ala Lys Ile Gln Phe Cys Gly Pro Thr Gly Thr Asp Ala
130 135 140
Val Glu Ala Ala Leu Lys Leu Val Arg Thr Ala Thr Gly Arg Ser Thr
145 150 155 160

Ile Leu Ser Phe Gln Gly Gly Tyr His Gly Met Ser Gln Gly Ala Leu
165 170 175
Gly Leu Met Gly Asn Leu Gly Pro Lys Lys Pro Leu Gly Ala Val Leu
180 185 190
Ser Thr Gly Val Gln Phe Leu Pro Tyr Pro Tyr Asp Tyr Arg Cys Pro
195 200 205
Phe Gly Leu Gly Gly Glu Ala Gly Val Lys Ala Asn Leu His Tyr Leu
210 215 220

Glu Asn Leu Leu Asn Asp Pro Glu Gly Gly Val Gln Leu Pro Ala Ala
225 230 235 240
Val Ile Val Glu Val Val Gln Gly Glu Gly Gly Val Val Pro Ala Asp
245 250 255
Leu Asp Trp Leu Arg Gly Leu Arg Arg Ile Thr Glu Gln Ala Gly Val
260 265 270
Ala Leu Ile Val Asp Glu Ile Gln Ser Gly Phe Ala Arg Thr Gly Arg
275 280 285

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

305 310 315 320
 Glu Trp Leu Asp Lys Trp Gln Pro Gly Ala His Ala Gly Thr Phe Arg
 325 330 335
 Gly Asn Gln Met Ala Met Ala Ala Gly Ser Ala Val Met Arg Tyr Leu
 340 345 350

Lys Glu His Asp Leu Ala Ala His Ala Ala Ala Met Gly Glu Arg Leu
 355 360 365
 Ala Glu His Leu Arg Ile Leu Gln Arg Asp Tyr Pro Gln Leu Gly Asp
 370 375 380
 Ile Arg Gly Arg Gly Leu Met Leu Gly Val Glu Ile Val Asp Pro Gln
 385 390 395 400
 Gly Glu Ala Asp Ala Leu Gly His Pro Pro Thr Asp Gly Ala Leu Ala
 405 410 415

Ser Arg Val Gln Arg Glu Cys Leu Arg Arg Gly Leu Ile Leu Glu Leu
 420 425 430
 Gly Gly Arg His Gly Ser Val Val Arg Phe Leu Pro Pro Leu Ile Ile
 435 440 445
 Gly Ala Glu Gln Ile Asp Glu Val Ala Arg Arg Phe Ala Arg Ala Leu
 450 455 460

Gly Ala Ala Leu Ala Gly
 465 470

<210> 11

<211> 421

<212> PRT

<213> Halomonas elongata

<220>

<223> DIAMINOBUTYRATE AMINOTRANSFERASE (EctB)

<220>

<223> DIAMINOBUTYRATE AMINOTRANSFERASE (EctB)

<400> 11

Met Gln Thr Gln Ile Leu Glu Arg Met Glu Ser Asp Val Arg Thr Tyr

1 5 10 15

Ser Arg Ser Phe Pro Val Val Phe Thr Lys Ala Arg Asn Ala Arg Leu
20 25 30

Thr Asp Glu Glu Gly Arg Glu Tyr Ile Asp Phe Leu Ala Gly Ala Gly
35 40 45

Thr Leu Asn Tyr Gly His Asn Asn Pro His Leu Lys Gln Ala Leu Leu
50 55 60

Asp Tyr Ile Asp Ser Asp Gly Ile Val His Gly Leu Asp Phe Trp Thr
65 70 75 80

Ala Ala Lys Arg Asp Tyr Leu Glu Thr Leu Glu Glu Val Ile Leu Lys
85 90 95

Pro Arg Gly Leu Asp Tyr Lys Val His Leu Pro Gly Pro Thr Gly Thr
100 105 110

Asn Ala Val Glu Ala Ala Ile Arg Leu Ala Arg Val Ala Lys Gly Arg
115 120 125

His Asn Ile Val Ser Phe Thr Asn Gly Phe His Gly Val Thr Met Gly
130 135 140

Ala Leu Ala Thr Thr Gly Asn Arg Lys Phe Arg Glu Ala Thr Gly Gly
145 150 155 160

Val Pro Thr Gln Ala Ala Ser Phe Met Pro Phe Asp Gly Tyr Leu Gly
165 170 175

Ser Ser Thr Asp Thr Leu Asp Tyr Phe Glu Lys Leu Leu Gly Asp Lys
180 185 190

Ser Gly Gly Leu Asp Val Pro Ala Ala Val Ile Val Glu Thr Val Gln
195 200 205

Gly Glu Gly Gly Ile Asn Val Ala Gly Leu Glu Trp Leu Lys Arg Leu
210 215 220

Glu Ser Ile Cys Arg Ala Asn Asp Ile Leu Leu Ile Ile Asp Asp Ile
225 230 235 240

Gln Ala Gly Cys Gly Arg Thr Gly Lys Phe Phe Ser Phe Glu His Ala
245 250 255

Gly Ile Thr Pro Asp Ile Val Thr Asn Ser Lys Ser Leu Ser Gly Tyr

260 265 270
 Gly Leu Pro Phe Ala His Val Leu Met Arg Pro Glu Leu Asp Lys Trp
 275 280 285
 Lys Pro Gly Gln Tyr Asn Gly Thr Phe Arg Gly Phe Asn Leu Ala Phe
 290 295 300

 Ala Thr Ala Ala Ala Ala Met Arg Lys Tyr Trp Ser Asp Asp Thr Phe
 305 310 315 320
 Glu Arg Asp Val Gln Arg Lys Ala Arg Ile Val Glu Glu Arg Phe Gly
 325 330 335
 Lys Ile Ala Ala Trp Leu Ser Glu Asn Gly Ile Glu Ala Ser Glu Arg
 340 345 350
 Gly Arg Gly Leu Met Arg Gly Ile Asp Val Gly Ser Gly Asp Ile Ala
 355 360 365

 Asp Lys Ile Thr His Gln Ala Phe Glu Asn Gly Leu Ile Ile Glu Thr
 370 375 380
 Ser Gly Gln Asp Gly Glu Val Val Lys Cys Leu Cys Pro Leu Thr Ile
 385 390 395 400
 Pro Asp Glu Asp Leu Val Glu Gly Leu Asp Ile Leu Glu Thr Ser Thr
 405 410 415
 Lys Gln Ala Phe Ser
 420

<210> 12

<211> 1461

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<

220>

<223> HOMOSERINE O-ACETYLTRANSFERASE (MET2; METX)

<220>

<223> HOMOSERINE O-ACETYLTRANSFERASE (MET2; METX)

<400> 12

atgtcgcata ctttaaaatc gaaaacgctc caagagctgg acattgagga gattaaggaa 60

actaaccat tgctcaaaact agttcaaggg cagaggattg ttcaagttcc ggaactagtg 120

cttgagtctg gcgtggatcat aaataatttc cctattgctt ataagacgtg gggtagactg 180
aatgaagctg gtgataatgt tctggtaatt tgcacatgcct tgactgggtc cgcagatgtt 240
gctgactggt ggggccctct tctgggtaac gacttagcat tcgacccatc aagggttttt 300
atcatatgtt taaactctat gggctctcca tatgggtctt tttcgccatt aacgataaat 360

gaggagacgg gcgttagata tggacccgaa ttccattat gtactgtgcg ccatgacgtt 420
agagctcaca gaattgttct ggattctctg ggagtaaagt caatagcctg tgttattggt 480
ggctctatgg gggggatgct gagtttggaa tgggctgcca tgtatggtaa ggaatatgtg 540
aagaatatgg ttgctctggc gacatcagca agacattctg cctggtgcat atcgtggtct 600
gaggctcaaa gacaatcgat ttactcagat cccaactact tggacgggta ctatccggtg 660
gaggagcaac ctgtggccgg actatcggct gcacgtatgt ctgcattgtt gacgtacagg 720
acaagaaca gtttcgagaa caaattctcc agaagatctc cttcaatagc acaacaaca 780

aaagctcaaa gggaggagac acgcaaacca tctactgtca gcgaacactc cctacaaatc 840
cacaatgatg ggtataaaac aaaagccagc actgccatcg ctggcatttc tgggcaaaaa 900
ggtcaaaagg tgggtgtccac cgcactttct tcggattcat tgaattcttc aacatcgatg 960
acttcggtaa gtctgtaac ggggtgaagtg aaggacataa agcctgcgca gacgtatatt 1020
tctgcacaaa gttacttgag gtaccagggc acaaagtcca tcaataggtt cgacccaat 1080
tgttacattg ccatcacag taaactggat acgcacgatt tggcaagaga cagagtagat 1140
gacatcactg aggtcctttc taccatcaa caaccatccc tgatcatcgg tatccaatct 1200

gatggactgt tcacatatc agaacaagaa tttttggctg agcacatacc gaagtcgcaa 1260
ttagaaaaaa ttgaatctcc cgaaggccac gatgccttcc tatiggagtt taagctgata 1320
aacaactga tagtacaatt tttaaaaacc aactgcaagg ccattaccga tgccgtcca 1380
agagcttggg gaggtgacgt tggtaacgat gaaacgaaga cgtctgtctt tggtagggcc 1440
gaagaagtta ccaactggtg g 1461

<210> 13

<211> 486

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> HOMOSERINE O-ACETYLTRANSFERASE (MET2; METX)

<220>

>

<223> HOMOSERINE O-ACETYLTRANSFERASE (MET2; METX)

<400> 13

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

Thr Arg Asn Ser Phe Glu Asn Lys Phe Ser Arg Arg Ser Pro Ser Ile

245 250 255

Ala Gln Gln Gln Lys Ala Gln Arg Glu Glu Thr Arg Lys Pro Ser Thr

260 265 270

Val Ser Glu His Ser Leu Gln Ile His Asn Asp Gly Tyr Lys Thr Lys

275 280 285

Ala Ser Thr Ala Ile Ala Gly Ile Ser Gly Gln Lys Gly Gln Ser Val

290 295 300

Val Ser Thr Ala Ser Ser Ser Asp Ser Leu Asn Ser Ser Thr Ser Met

305 310 315 320

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

325 330 335

Gln Thr Tyr Phe Ser Ala Gln Ser Tyr Leu Arg Tyr Gln Gly Thr Lys

340 345 350

Phe Ile Asn Arg Phe Asp Ala Asn Cys Tyr Ile Ala Ile Thr Arg Lys

355 360 365

Leu Asp Thr His Asp Leu Ala Arg Asp Arg Val Asp Asp Ile Thr Glu

370 375 380

Val Leu Ser Thr Ile Gln Gln Pro Ser Leu Ile Ile Gly Ile Gln Ser

385 390 395 400

Asp Gly Leu Phe Thr Tyr Ser Glu Gln Glu Phe Leu Ala Glu His Ile

405 410 415

Pro Lys Ser Gln Leu Glu Lys Ile Glu Ser Pro Glu Gly His Asp Ala

420 425 430

Phe Leu Leu Glu Phe Lys Leu Ile Asn Lys Leu Ile Val Gln Phe Leu

435 440 445

Lys Thr Asn Cys Lys Ala Ile Thr Asp Ala Ala Pro Arg Ala Trp Gly

450 455 460

Gly Asp Val Gly Asn Asp Glu Thr Lys Thr Ser Val Phe Gly Glu Ala

465 470 475 480

Glu Glu Val Thr Asn Trp

485

<210> 14

<211> 579

<212> DNA

<213> Halomonas elongata

<220>

<223> ACID ACETYLTRANSFERASE (EctA)

<220>

<223> ACID ACETYLTRANSFERASE (EctA)

<400> 14

```
atgactccca caacagaaaa ttttactcct agtgcagatc tggctcgccc ttcagtggct    60
gacaccgtta ttggctccgc caagaaaaca ctattcatca gaaagcctac cacggacgat    120
ggttggggta tctacgagtt agttaaggcg tgcccacctt tggacgtaaa ctctggatac    180
gcttacttat tattagccac gcaatttagg gatacgtgtg ctgtcgctac cgacgaggaa    240
ggggagatcg ttggctttgt atcaggatac gttaagcgta acgcacctga tacctatitt    300
ctatggcaag ttgctgtggg cgaaaaggct cgtgggacgg gtcttgcaag aagattagtc    360
gaagccgtat tgatgagacc aggtatggga gatgtccggc acctggagac taccataact    420
```

```
cttgataacg aagcaagctg gggctctctt aaacgacttg ccgatagatg gcaagcgcca    480
ttgaattcta gggaaatatt ctctactggg cagttgggtg gtgaacatga tccggaaaat    540
ctggtgagaa ttggaccgtt cgaaccacag caaatattaa    579
```

<210> 15

<211> 192

<212> PRT

<213> Halomonas elongata

<220>

<223> ACID ACETYLTRANSFERASE (EctA)

<220>

<223> ACID ACETYLTRANSFERASE (EctA)

<400> 15

```
Met Thr Pro Thr Thr Glu Asn Phe Thr Pro Ser Ala Asp Leu Ala Arg
1           5           10           15
```

```
Pro Ser Val Ala Asp Thr Val Ile Gly Ser Ala Lys Lys Thr Leu Phe
```

20 25 30
 Ile Arg Lys Pro Thr Thr Asp Asp Gly Trp Gly Ile Tyr Glu Leu Val
 35 40 45
 Lys Ala Cys Pro Pro Leu Asp Val Asn Ser Gly Tyr Ala Tyr Leu Leu
 50 55 60
 Leu Ala Thr Gln Phe Arg Asp Thr Cys Ala Val Ala Thr Asp Glu Glu
 65 70 75 80

Gly Glu Ile Val Gly Phe Val Ser Gly Tyr Val Lys Arg Asn Ala Pro
 85 90 95
 Asp Thr Tyr Phe Leu Trp Gln Val Ala Val Gly Glu Lys Ala Arg Gly
 100 105 110
 Thr Gly Leu Ala Arg Arg Leu Val Glu Ala Val Leu Met Arg Pro Gly
 115 120 125
 Met Gly Asp Val Arg His Leu Glu Thr Thr Ile Thr Pro Asp Asn Glu
 130 135 140

Ala Ser Trp Gly Leu Phe Lys Arg Leu Ala Asp Arg Trp Gln Ala Pro
 145 150 155 160
 Leu Asn Ser Arg Glu Tyr Phe Ser Thr Gly Gln Leu Gly Gly Glu His
 165 170 175
 Asp Pro Glu Asn Leu Val Arg Ile Gly Pro Phe Glu Pro Gln Gln Ile
 180 185 190

<210> 16

<211> 414

<212> DNA

<213> Halomonas elongata

<220>

<223> ECTOINE SYNTHASE (EctC)

<220>

<223>

> ECTOINE SYNTHASE (EctC)

<400> 16

atgatagttc gtaacctgga ggaagctagg caaacagata gattagtgac cgctgagaat 60
 ggcaactggg acagtaccag attatcatta gctgaggacg gaggttaattg ttcttttcac 120

attaccagaa tatttgaagg gactgaaact cacatacact acaagcatca ctttgaagcc 180
 gtttactgca tcgagggatga aggagaagtc gaaaccctcg ctgatggaaa gatctggccc 240
 ataaaacctg gggatattta tattttggat cagcatgacg aacatttgct tagggcttcg 300
 aaaactatgc atctagcatg cgtattcacg ccgggtctaa ctggtaatga agttcatcga 360
 gaagacggtt cctatgcacc agcggatgaa gcagatgatc agaaaccact ttaa 414

<210> 17

<211> 137

<212> PRT

<213> Halomonas elongata

<220>

<223> ECTOINE SYNTHASE (EctC)

<220>

<223> ECTOINE SYNTHASE (EctC)

<400> 17

Met Ile Val Arg Asn Leu Glu Glu Ala Arg Gln Thr Asp Arg Leu Val

1 5 10 15

Thr Ala Glu Asn Gly Asn Trp Asp Ser Thr Arg Leu Ser Leu Ala Glu

20 25 30

Asp Gly Gly Asn Cys Ser Phe His Ile Thr Arg Ile Phe Glu Gly Thr

35 40 45

Glu Thr His Ile His Tyr Lys His His Phe Glu Ala Val Tyr Cys Ile

50 55 60

Glu Gly Glu Gly Glu Val Glu Thr Leu Ala Asp Gly Lys Ile Trp Pro

65 70 75 80

Ile Lys Pro Gly Asp Ile Tyr Ile Leu Asp Gln His Asp Glu His Leu

85 90 95

Leu Arg Ala Ser Lys Thr Met His Leu Ala Cys Val Phe Thr Pro Gly

100 105 110

Leu Thr Gly Asn Glu Val His Arg Glu Asp Gly Ser Tyr Ala Pro Ala

115 120 125

Asp Glu Ala Asp Asp Gln Lys Pro Leu

130 135

<210> 18

<211> 1080

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> HOMOSERINE DESHYDROGENASE (HOM6)

<220>

<223> HOMOSERINE DESHYDROGENASE (HOM6)

<400> 18

atgagcacta aagttgttaa tgttgccgtt atcgggtccg gtgttggttg ttcagctttc 60
ttggatcaat tgtagccat gaagtctacc attacttaca atctagttct tttggctgaa 120

gctgagcgtt ctttaatctc caaggacttt tctccattaa atgttggttc tgattggaag 180
gctgcttttag cagcctccac tactaaaacg ttgccttttg atgatttaat tgctcatttg 240
aagacttcac ctaagccagt cattttggtt gataaacatt ccagcgtta cattgctggt 300
ttttacacta agtttgcga aaatggtatt tccattgcta ctccaaacaa gaaggccttt 360
tcctctgatt tggtacctg gaaggtcttt ttctcaata agccaactaa cggttttgtc 420
tatcatgaag ctaccgtcgg tgctggtttg cctatcatca gtttcttaag agaaattatt 480
caaaccggtg acgaagtga aaaaattgaa ggtatcttct ctggtactct atcttatatt 540

ttcaacgagt tctccactag tcaagctaac gacgtcaaat tctctgatgt tgtcaaagtt 600
gctaaaaaat tgggttatac tgaaccagat ccaagagatg atttgaatgg gttggatgtt 660
gctagaaagg ttaccattgt tggtaggata tctggtgttg aagtgaatc tccaacttcc 720
ttccctgtcc agtctttgat tccaaaacca ttggaatctg tcaagtctgc tgatgaattc 780
ttggaaaaat tatctgatta cgataaagat ttgactcaat tgaagaagga agctgccact 840
gaaaataagg tattgagatt cattggtaaa gtcgatgttg ccaccaaac tgtgtctgta 900
ggaattgaaa agtacgatta ctacacacca ttgcacatcat tgaagggatc agataacgtt 960

atttccatca agactaagcg ttacaccaat cctgttgtca ttcaaggtgc cgggtgccgt 1020
gctgccgtta ctgccgtgg tgttttgggt gatgttatca agattgtca aagactttaa 1080

<210> 19

<211> 308

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> HOMOSERINE DESHYDROGENASE (HOM6)

<220>

<223> HOMOSERINE DESHYDROGENASE (HOM6)

<400> 19

Met Ser Thr Lys Val Val Asn Val Ala Val Ile Gly Ala Gly Val Val

1 5 10 15

Gly Ser Ala Phe Leu Asp Gln Leu Leu Ala Met Lys Ser Thr Ile Thr

20 25 30

Tyr Asn Leu Val Leu Leu Ala Glu Ala Glu Arg Ser Leu Ile Ser Lys

35 40 45

Asp Phe Ser Pro Leu Asn Val Gly Ser Asp Trp Lys Ala Ala Leu Ala

50 55 60

Ala Ser Thr Thr Lys Thr Leu Pro Leu Asp Asp Leu Ile Ala His Leu

65 70 75 80

Lys Thr Ser Pro Lys Pro Val Ile Leu Val Asp Asn Thr Ser Ser Ala

85 90 95

Tyr Ile Ala Gly Phe Tyr Thr Lys Phe Val Glu Asn Gly Ile Ser Ile

100 105 110

Ala Thr Pro Asn Lys Lys Ala Phe Ser Ser Asp Leu Ala Thr Trp Lys

115 120 125

Ala Leu Phe Ser Asn Lys Pro Thr Asn Gly Phe Val Tyr His Glu Ala

130 135 140

Thr Val Gly Ala Gly Leu Pro Ile Ile Ser Phe Leu Arg Glu Ile Ile

145 150 155 160

Gln Thr Gly Asp Glu Val Glu Lys Ile Glu Gly Ile Phe Ser Gly Thr

165 170 175

Leu Ser Tyr Ile Phe Asn Glu Phe Ser Thr Ser Gln Ala Asn Asp Val

180 185 190

Lys Phe Ser Asp Val Val Lys Val Ala Lys Lys Leu Gly Tyr Thr Glu

195 200 205

Pro Asp Pro Arg Asp Asp Leu Asn Gly Leu Asp Val Ala Arg Lys Val

210 215 220
 Thr Ile Val Gly Arg Ile Ser Gly Val Glu Val Glu Ser Pro Thr Ser
 225 230 235 240
 Phe Pro Val Gln Ser Leu Ile Pro Lys Pro Leu Glu Ser Val Lys Ser
 245 250 255
 Ala Asp Glu Phe Leu Glu Lys Leu Ser Asp Tyr Asp Lys Asp Leu Thr
 260 265 270
 Gln Leu Lys Lys Glu Ala Ala Thr Glu Asn Lys Val Leu Arg Phe Ile

275 280 285
 Gly Lys Val Asp Val Ala Thr Lys Ser Val Ser Val Gly Ile Glu Lys
 290 295 300
 Tyr Asp Tyr Ser

305

<210> 20

<211> 1257

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> ASPARTATE TRANSAMINASE (AAT2)

<220>

<223> ASPARTATE TRANSAMINASE (AAT2)

<400> 20

atgtctgccca ctctgttcaa taacatcgaa ttgctgcccc ctgatgcct ttttggtatt 60

aagcaaaggt acgggcaaga tcaacgtgct accaaggtcg acttgggtat cggggcctac 120

agagacgaca acggtaaacc atgggtcttg ccaagtgtta aagccgccga aaagctaatt 180

cataacgaca gtcctacaa ccatgaatac ctcggtatta cgggtctgcc aagtttgaca 240

tctaacgccg ccaagatcat ctctggtagc caatccgatg cctttcagga agacagagta 300

atctcagtag aatcactgtc tggtaggggt gctcttcata tatctgcgaa gtttttttca 360

aaattcttcc cagataaact ggtctatttg tctaagccta cttgggcca ccacatggcc 420

atttttgaga atcaaggctt gaaaacggcg acttaccctt actgggcca cgaaactaag 480

tctttggacc taaacggctt tctaaatgct attcaaaaag ctccagaggg ctccattttc 540

gttctgcact ctgcgccca taaccaact ggtctggacc ctactagtga acaatgggtt 600

caaatcgttg atgctatcgc ctcaaagaac cacatcgctt tatttgacac cgcctaccaa 660
 gggtttgccg ctggagattt ggacaaggat gcctatgctg tgcgtctagg tgtggagaag 720
 ctttcaacgg tctctcccg tttgtctgt cagtcctttg ccaagaacgc cggtatgtac 780
 ggtgagcgtg taggttggtt ccacttagca cttacaaaac aagctcaaaa caaaactata 840
 aagcctgctg ttacatctca attggccaaa atcattcgta gtgaagtgtc caaccaccc 900
 gcctacggcg ctaagattgt cgctaaactg ttggaaacgc cagaattaac ggaacagtgg 960

cacaaggata tggttacat gtcctccaga attacgaaa tgaggcacgc attaagagac 1020
 catttagtca agttgggcac tctggcaac tgggatacata tagtaaatca atgcgggatg 1080
 ttctccttta cagggttgac tcctcaaatg gttaaacgac ttgaagaaac ccacgcagtt 1140
 tacttggttg cctcaggtag agcttctatt gctggattga atcaaggaaa cgtggaatac 1200
 gtggctaaag ccattgatga agtgggtgagc ttctatacta ttgaagctaa attgtaa 1257

<210> 21

<211> 418

<212> PRT

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> ASPARTATE TRANSAMINASE (AAT2)

<220>

<223> ASPARTATE TRANSAMINASE (AAT2)

<400> 21

Met Ser Ala Thr Leu Phe Asn Asn Ile Glu Leu Leu Pro Pro Asp Ala

1 5 10 15

Leu Phe Gly Ile Lys Gln Arg Tyr Gly Gln Asp Gln Arg Ala Thr Lys

20 25 30

Val Asp Leu Gly Ile Gly Ala Tyr Arg Asp Asp Asn Gly Lys Pro Trp

35 40 45

Val Leu Pro Ser Val Lys Ala Ala Glu Lys Leu Ile His Asn Asp Ser

50 55 60

Ser Tyr Asn His Glu Tyr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Pro Ser Leu Thr

65 70 75 80

Ser Asn Ala Ala Lys Ile Ile Phe Gly Thr Gln Ser Asp Ala Phe Gln

85 90 95

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

340 345 350
His Ile Val Asn Gln Cys Gly Met Phe Ser Phe Thr Gly Leu Thr Pro
355 360 365
Gln Met Val Lys Arg Leu Glu Glu Thr His Ala Val Tyr Leu Val Ala
370 375 380

Ser Gly Arg Ala Ser Ile Ala Gly Leu Asn Gln Gly Asn Val Glu Tyr
385 390 395 400
Val Ala Lys Ala Ile Asp Glu Val Val Arg Phe Tyr Thr Ile Glu Ala
405 410 415
Lys Leu

<210> 22

<211> 1317

<212> DNA

<213> Entodinium caudatum

<220>

<223> GLUTAMATE DESHYDROGENASE (GDH)

<220>

<223> GLUTAMATE DESHYDROGENASE (GDH)

<400> 22

atgatagatt tagaagcgag aaacctgct caaccgaat tcattcaagc cagtagagaa 60

gtaatcgaat cgatcattga tgttgtaaat agcaatccga aatacctgga aaacaaaatt 120

ttggagagaa ttacggaacc aaacctaat cagcaattca aagtcgaatg ggagaatgac 180

aagcacgaaa tcatggtgaa caaaggttat cgtattcagt tcaataatgc gataggtccc 240

tataagggag gcctaaggtt tcacagagca gtactctag gtactctgaa attccttggt 300

tttgaacaga tatttaagaa ttccttgaca ggattaccta tgggaggtgg caaaggtggt 360

tcagattttg atcctagagg taaatcagat gccgagattt taagattctg taggtctttt 420

atgacttcgt tgttcaaata tattgggcca gagatagatg ttctgctgg agatataggt 480

gtcggaggta gggaaattgg ttacttggtt ggccaataca aaagactgac ccaacaacat 540

gaaggagtgc taactggtaa gggctttaac tggggtggct ctcttgtag acctgaagcc 600

acaggttttg gaacgatgta ttttgctaac gaagtcttac atgcacatgg tgacgacatc 660

aaggggaaaa ccattgcat atccggattt ggtaatgttg ccttggtgc tgtcttaaaa 720

gcgaaacaat taggcgctaa ggtagtcact atatctggcc cagatgggta catttatgac 780
gagaatggga taaacaccga cgagaaaatc aactacatgt tggaattaag agcctcaaat 840
aatgatgtgg ttgcgccatt tgcagagaag ttgggtgcaa aattcatacc agggaagaag 900

ccatgggaag ttccagtgga tatggctttt cctgtgcca ttcagaacga attgaatgcc 960
gaagatgctg ccactttaca taagaatgga gtgaaatatg tgatcgagac atccaatatg 1020
ggctgtacag cagatgctgt gcaatacttc attaagaacc gtattgtttt cgctccgggt 1080
aaagcagcta atgctgggtg tgttgacgta tctgggttgg aaatgagcca aaactcaatg 1140
aagttgaact ggacagctga agaagttgac gctaaattga agaatatcat gaccaatatt 1200
catgcaagtt gcgtaaagga aggaaaagag agtgacgggt atatcaatta cgtaaaggc 1260
gcaaatatag caggcttcaa gaaagtagct gatgcaatgg tagatcttgg ctattaa 1317

<210> 23

<211> 438

<212> PRT

<213> Entodinium caudatum

<220>

<223> GLUTAMATE DESHYDROGENASE (GDH)

<220>

<223> GLUTAMATE DESHYDROGENASE (GDH)

<400> 23

Met Ile Asp Leu Glu Ala Arg Asn Pro Ala Gln Pro Glu Phe Ile Gln

1 5 10 15

Ala Ser Arg Glu Val Ile Glu Ser Ile Ile Asp Val Val Asn Ser Asn

20 25 30

Pro Lys Tyr Leu Glu Asn Lys Ile Leu Glu Arg Ile Thr Glu Pro Asn

35 40 45

Leu Ile His Glu Phe Lys Val Glu Trp Glu Asn Asp Lys His Glu Ile

50 55 60

Met Val Asn Lys Gly Tyr Arg Ile Gln Phe Asn Asn Ala Ile Gly Pro

65 70 75 80

Tyr Lys Gly Gly Leu Arg Phe His Arg Ala Val Thr Leu Gly Thr Leu

85 90 95

Lys Phe Leu Gly Phe Glu Gln Ile Phe Lys Asn Ser Leu Thr Gly Leu

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

Asn Arg Ile Val Phe Ala Pro Gly Lys Ala Ala Asn Ala Gly Gly Val
355 360 365

Ala Val Ser Gly Leu Glu Met Ser Gln Asn Ser Met Lys Leu Asn Trp
370 375 380

Thr Ala Glu Glu Val Asp Ala Lys Leu Lys Asn Ile Met Thr Asn Ile
385 390 395 400

His Ala Ser Cys Val Lys Glu Gly Lys Glu Ser Asp Gly Tyr Ile Asn
405 410 415

Tyr Val Lys Gly Ala Asn Ile Ala Gly Phe Lys Lys Val Ala Asp Ala
420 425 430

Met Val Asp Leu Gly Tyr
435

<210> 24

<211> 554

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pTDH3" <223> "pTDH3

<220>

<223> pTDH3

<220>

<223> pTDH3

<400> 24

ccaaaatagg gggcgggtta cacagaatat ataacatcgt aggtgtctgg gtgaacagtt	60
tattcctggc atccactaaa tataatggag cccgcttttt aagctggcat ccagaaaaaa	120
aaagaatccc agcaccaaaa tattgttttc ttcaccaacc atcagttcat aggtccattc	180
tcttagcgca actacagaga acaggggcac aaacaggcaa aaaacgggca caacctcaat	240

ggagtgatgc aacctgcctg gagtaaatga tgacacaagg caattgaccc acgcatgtat	300
ctatctcatt ttcttacacc ttctattacc ttctgctctc tctgatttgg aaaaagctga	360
aaaaaaaggt tgaaccagt tccctgaaat tattcccta cttgactaat aagtatataa	420
agacggtagg tattgattgt aattctgtaa atctatttct taaacttctt aaattctact	480
tttatagtta gtcttttttt tagtttttaa acaccaagaa cttagtttcg aataaacaca	540

cataaaca aa caaa 554

<210> 25

<211> 550

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pEN02" <223> "pEN02

<220>

<223> pEN02

<220>

<223> pEN02

<400> 25

cgctcagcat ctgcttcttc ccaaagatga acgcggcggtt atgtcactaa cgacgtgcac 60

caacttgagg aaagtgggaat cccgttcctaa aactggcctc cactaattga tacatctaca 120

caccgcacgc cttttttctg aagccctctt tcgtggactt tgccatatgc aaaattcatg 180

aagtgtgata ccaagtcagc atacacctca ctagggtagt ttctttgggtt gtattgatca 240

tttggttcat cgtgggttcat taattttttt tctccattgc ttcttggtt tgatcttact 300

atcatttgga tttttgtcga aggttgtaga attgtatgtg acaagtggca ccaagcatat 360

ataaaaaaaaa aaagcattat cttcttacca gagttgattg ttaaaaacgt atttatagca 420

aacgcaattg taattaattc ttattttgta tcttttcttc ctttgtctca atcttttatt 480

tttattttat ttttcttttc ttagtttctt tcataacacc aagcaactaa tactataaca 540

tacaataata 550

<210> 26

<211> 419

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pTEF K1" <223> "pTEF K1

<220>

<223> pTEF K1

<220>

<223> pTEF K1

<400> 26

ctctctcgca ataacaatga acactgggtc aatcatagcc tacacaggtg aacagagtag 60

cgtttataca gggttttatc ggtgattcct acggcaaaaa tttttcattt ctaaaaaaaa 120

aaagaaaaat ttttctttcc aacgctagaa ggaaaagaaa aatctaatta aattgatttg 180

gtgattttct gagagtcccc ttttccatat atcgaatttt gaataataaa ggagatcgaa 240

aaaatttttc tattcaatct gttttctggt tttatttgat agtttttttg tgtattatta 300

ttatggatta gtactggttt atatgggttt ttcgtataaa cttcttttta ttttagtttg 360

tttaacttta ttttgagtta cattatagtt ccctaactgc aagagaagta acattaaaa 419

<210> 27

<211> 598

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pTEF3" <223> "pTEF3

<220>

<223> pTEF3

<220>

<223> pTEF3

<400> 27

ggctgataat agcgtataaa caatgcatac tttgtacgtt caaaatacaa tgcagtagat 60

atatttatgc atattacata taatacatat cacataggaa gcaacaggcg cgttggactt 120

ttaattttcg aggaccgcga atccttacat cacaccaat cccccacaag tgatcccca 180

cacaccatag cttcaaaatg tttctactcc ttttttactc ttccagattt tctcggactc 240

cgcgcacgcg cgtiaccactt caaaacaccc aagcacagca tactaaattt cccctctttc 300

ttcctctagg gtgtcgttaa ttaccgtac taaaggtttg gaaaagaaaa aagagaccgc 360

ctcgtttctt tttcttcgtc gaaaaaggca ataaaaattt ttatcacgtt tctttttctt 420

gaaaattttt ttttttgatt tttttctctt tcgatgacct cccattgata ttttaagttaa 480

taaacggtct tcaatttctc aagtttcagt ttcatttttc ttgttctatt acaacttttt 540

ttacttcttg ctcattagaa agaaagcata gcaatctaata ctaagtttta attacaaa 598

<210> 28

<211> 383

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pTEF1" <223> "pTEF1

<220>

<223> pTEF1

<220>

<223> pTEF1

<400> 28

gttttagcttg cctcgtcccc gccgggtcac ccggccagcg acatggaggc ccagaatacc 60

ctccttgaca gtcttgacgt gcgcagctca ggggcatgat gtgactgtcg cccgtacatt 120

tagcccatat atccccatgt ataatacttt gcatccatag attttgatgg ccgcacggcg 180

cgaagcaaaa attacggctc ctcgtctcag acctgcgagc agggaaacgc tcccctcaca 240

gacgcgttga attgtcccca cgccgcgccc ctgtagagaa atataaaagg ttaggatttg 300

ccactgaggt tcttctttca tatacttctt tttaaaatct tgctacgata cagttctcac 360

atcacatccg aacataaaca acc 383

<210> 29

<211> 700

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pADH1" <223> "pADH1

<220>

<223> pADH1

<220>

<223> pADH1

<400> 29

gggtgtacaa tatggacttc cttttttctg gcaaccaaac ccatacatcg ggattcctat 60

aataccttcg ttggtctccc taacatgtag gtggcggagg ggagatatag aatagaacag 120

ataccagaca agacataatg ggctaataaa gactacacca attacactgc ctcatatgatg 180

gtggtacata acgaactaat actgtagccc tagacttgat agccatcatc atatcgaagt 240

ttcactaccc ttttttcatt tgccatctat tgaagtaata ataggcgcat gcaacttctt 300

ttcttttttt ttcttttctc tctccccctg tgttgtctca ccatatccgc aatgacaaaa 360

aaatgatgga agacactaaa ggaaaaaatt aacgacaaag acagcaccaa cagatgtcgt 420

tgttccagag ctgatgaggg gtatctcgaa gcacacgaaa ctttttcctt ccttcattca 480
 cgcacactac tctctaata gcaacgggtat acggccttcc ttccagttac ttgaatttga 540
 aataaaaaaa agtttgctgt cttgctatca agtataaata gacctgcaat tattaatctt 600
 ttgtttcctc gtcattgttc tcgttccctt tcttcttgt tttttttct gcacaatatt 660
 tcaagctata ccaagcatat aatcaactat ctcatatata 700

<210> 30

<211> 549

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pGPM 1" <223> "pGPM 1

<220>

<223> pGPM 1

<220>

<223> pGPM 1

<400> 30

gccaaacttt tcggttaaca catgcagtga tgcacgcgcg atggtgctaa gttacatata 60
 tataatatata tataatatata tataatatata gccatagtga tgtctaagta acctttatgg 120
 tatatttctt aatgtggaaa gatactagcg cgcgcaccca cacacaagct tcgtcttttc 180
 ttgaagaaaa gaggaagctc gctaaatggg attccacttt ccgttccctg ccagctgatg 240
 gaaaaagggtt agtgggaacga tgaagaataa aaagagagat ccaactgaggt gaaatttcag 300
 ctgacagcga gtttcatgat cgtgatgaac aatggtaacg agttgtggct gttgccaggg 360

agggtgggtc tcaactttta atgtatggcc aaatcgctac ttgggtttgt tatataacaa 420
 agaagaata atgaactgat tcttctctc cttcttgctc tttcttaatt ctgttgtaat 480
 taccttctt tgtaattttt ttgtgaatta ttcttcttaa taatccaaac aaacacacat 540
 attacaata 549

<210> 31

<211> 650

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pFBA1" <223> "pFBA1

<220>

<223> pFBA1

<220>

<223> pFBA1

<400> 31

acgcaagccc taagaaatga ataacaatac tgacagtact aaataattgc ctacttggct 60

tcacatacgt tgcatacgtc gatatagata ataagtataa tgacagcagg attatcgtaa 120

tacgtaatat ttgaaaatct caaaaatgtg tgggtcatta cgtaaataat gataggatg 180

ggattcttct atttttcctt ttccattct agcagccgtc gggaaaacgt ggcacccctt 240

ctttcgggct caattggagt cacgtgccg tgagcacct cttttccat atctaacaac 300

tgagcacgta accaatggaa aagcatgagc ttagcgttgc tccaaaaag tattggatgg 360

ttaataccat ttgtctgttc tcttctgact ttgactctc aaaaaaaaaa aatctacaat 420

caacagatcg ctcaattac gccctcacia aaactttttt cttctttctt cgcccacgtt 480

aaattttate cctcatgttg tctaacggat ttctgcactt gatttattat aaaaagacaa 540

agacataata cttctctatc aatttcagtt attgttcttc cttgcgttat tcttctgttc 600

ttctttttct ttgtcatat ataaccataa ccaagtaata catattcaaa 650

<210> 32

<211> 700

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pPDC1" <223> "pPDC1

<220>

<223> pPDC1

<220>

<223> pPDC1

<400> 32

ttattttacct atctctaaac ttcaacacct tatatcataa ctaatatttc ttgagataag 60

cacactgcac ccataccttc cttaaaaacg tagcttccag tttttggtgg ttccgcttc 120

cttcccgatt ccgcccgtc aacgcataat ttgttgccct ggtggcattt gcaaaatgca 180

taacctatgc atttaaaaga ttatgtatgc tcttctgact ttctgtgtga tgaggctcgt 240

ggaaaaaatg aataatttat gaatttgaga acaattttgt gttgttacgg tattttacta 300

tggaataatc aatcaattga ggattttatg caaatatcgt ttgaatattt ttccgaccct 360

ttgagtactt ttcttcataa ttgcataata ttgtccgctg cccctttttc tgtagacgg 420

tgtcttgatc tacttgctat cgttcaacac cacttattt tctaactatt ttttttttag 480

ctcatttgaa tcagcttatg gtgatggcac atttttgcat aaacctagct gtcctcgttg 540

aacataggaa aaaaaaatat ataaacaagg ctctttcact ctccttgcaa tcagatttgg 600

gtttgttccc tttattttca tttttcttgt catattcctt tctcaattat tattttctac 660

tcataacctc acgcaaaaata acacagtcaa atcaatcaaa 700

<210> 33

<211> 998

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pCCW12" <223> "pCCW12

<220>

<223> pCCW12

<220>

<223> pCCW12

<400> 33

aaccaggga aagcaaaaata aaagaaactt aatagttat gccgtaatga agggctacca 60

aaaacgataa tctcaactgt aaacaggtac aatgcggacc cttttgccac aaaacataca 120

tcattcattg ccggaaaaag aaagaagtga agacagcagt gcagccagcc atgttgcgcc 180

aatctaatta tagatgctgg tgccctgagg atgtatctgg agccagccat ggcatcatgc 240

gctaccgccc gatgtaaaat ccgacacgca aaagaaaacc ttcgaggttg cgcacttcgc 300

ccacccatga accacacggt tagtccaaaa ggggcagttc agattccaga tgcgggaatt 360

agcttgctgc caccctcacc tctaactgc tgcggtgtgc ggatacttca tgctatttat 420

agacgcgctg gtcggaatca gcacgcgcaa gaacaaatg ggaaaatcgg aatgggtcca 480

gaactgcttt gagtgtctggc tattggcgctc tgatttccgt tttgggaatc ctttgccgcg 540

cgccctcttc aaaactccgc acaagtccca gaaagcggga aagaataaa acgccaccaa 600

aaaaaaaaat aaaagccaat cctcgaagcg tgggtggtag gccctggatt atcccgtaca 660

agtatttctc aggagtaaaa aaaccgtttg ttttggaatt cccatttcg cggccaccta 720

cgccgctatc tttgcaacaa ctatctgcga taactcagca aattttgcat attcgtgttg 780

cagtattgcg ataatgggag tcttacttcc aacataacgg cagaaagaaa tgtgagaaaa 840

ttttgcatcc ttgcctccg ttcaagtata taaagtcggc atgcttgata atctttcttt 900

ccatcctaca ttgttctaatt tattcttatt ctccctttatt ctttcctaac ataccaagaa 960

attaatcttc tgcattcgc ttaaacta tatcaata 998

<210> 34

<211> 700

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pGK1" <223> "pGK1

<220>

<223> pGK1

<220>

<223> pGK1

<400> 34

gtgagtaagg aaagagttag gaactatcgc atacctgcat ttaaagatgc cgatttgggc 60

gcgaatcctt tattttggct tcacctcat actattatca gggccagaaa aaggaagtgt 120

tccctcctt cttgaattga tgttacctc ataaagcacg tggcctctta tcgagaaaga 180

aattaccgtc gtcgtgatt tgtttgcaaa aagaacaaaa ctgaaaaaac ccagacacgc 240

tcgacttctt gtcttctat tgattgcagc ttccaatttc gtcacacaac aaggtcctag 300

cgacggctca caggttttgt aacaagcaat cgaaggctct ggaatggcgg gaaagggttt 360

agtaccacat gctatgatgc ccactgtgat ctccagagca aagttcgttc gatcgtactg 420

ttactctctc tctttcaaac agaattgtcc gaatcgtgtg acaacaacag cctgttctca 480

cacactcttt tcttctaacc aagggggtgg tttagtttag tagaacctcg tgaaacttac 540

atttacatat atataaactt gcataaattg gtcaatgcaa gaaatacata ttgggtcttt 600

tctaattcgt agtttttcaa gttcttagat gctttctttt tctctttttt acagatcatc 660

aaggaagtaa ttatctactt tttaacaaca atataaaaca 700

<210> 35

<211> 913

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pMDH2" <223> "pMDH2

<220>

<223> pMDH2

<220>

<223> pMDH2

<400> 35

ccttcgctaa ataataaacc tgaactgtac ttagcgaagc cttcatagca cctacgtaca	60
cgtatatata gacatittac gtaatggaga aactgagggt tttgttttca ctttttttct	120
ttctttttca ctattgctcg aaccgcctgc gatgagctaa gaaaaaaaaag tgaaagaaat	180
catagaaagc aaaaatgaga ttatatagcc cagagccctc ttctggcgcc tgtccaagg	240

cggaccaaca acaacacttg cccaaacctt agaaaatccc ctcatacttt tccgtttgta	300
tctcctactt tcttacttcc tttttttctt ctttatttgc ttggtttacc attgaagtcc	360
atttttacta cagacaatag ctatgcattc gctatcttcc gtttgcact ttttttcaaa	420
tttctcatct atatagcgaa gtacggaaaa gatgtcactt gccggcatct cggccttccc	480
cggccaaatg gactcatcat ctacgatacg gcccttttaa tccgcaatta ctttgcccat	540
tcggccgtag ccgttctaaa gccgccgtgc cttgccccca ataactccct aatgatccgg	600
gaagttccgg tttttttcct ttgttttagtg gcattttgtg ttgccaagg ttgggaaggt	660

ccgatttgac ttaaggaac tacggaaggt atctaaggtt tctaaaaaca atatacacgc	720
gcgtgcgtag atatataaag ataaagattt atcgatatga gataaagatt gctgcatgat	780
tctccttctg attctttttc cctgtatata ttttctcccc ttctgtataa atcgtacagt	840
cagaagtagt ccagaatata gtgctgcaga ctattacaaa agttcaatac aatatcataa	900
aagttatagt aac	913

<210> 36

<211> 406

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pURA3" <223> "pURA3

<220>

<223> pURA3

<220>

<223> pURA3

<400> 36

ggtacccaaa ccgaagttat ctgatgtaga aaaggattaa agatgctaag agatagtgat	60
---	----

gatatttcat aaataatgta attctatata tgtaattac cttttttgcg aggcatattt 120
atggtgaagg ataagttttg accatcaaag aaggtaatg tggctgtggt ttcagggtcc 180
ataaagcttt tcaattcatc tttttttttt ttgttctttt ttttgattcc ggtttctttg 240
aaattttttt gattcggtaa tctccgagca gaaggaagaa cgaaggaagg agcacagact 300
tagattggta tatatacgca tatgtggtgt tgaagaaca tgaaattgcc cagtattctt 360
aacccaactg cacagaacaa aaacctgcag gaaacgaaga taaatc 406

<210> 37

<211> 535

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> pRPLA1" <223> "pRPLA1

<220>

<223> pRPLA1

<220>

<223> pRPLA1

<400> 37

tcaagttgga tactgatctg atctctccgc cctactacca gggaccctca tgattaccgc 60
tcgaatgcga cgtttcctgc ctcatataaac tggcttgaaa atatttattc gctgaacagt 120
agcctagctt ataaaaattt catttaatta atgtaatatg aaaactcaca tgccttctgt 180
ttctaaaatt gtcacagcaa gaaataacat taccatacgt gatcttatta aactctagta 240
tcttgcttaa tacttcattht aaaagaagcc ttaaccctgt agcctcatct atgtctgcta 300

catatcgtga ggtacgaata tcgtaagatg ataccacgca actttgtaat gatthttttt 360
ttttcatttt ttaaagaatg cctttacatg gtatttgaaa aaaatatctt tataaagttt 420
gcgatctctt ctgttctgaa taatttttag taaaagaat caaaagaata aagaaatagt 480
ccgctttgtc caatacaaca gcttaaaccg attatctcta aaataacaag aagaa 535

<210> 38

<211> 400

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> pSAM4" <223> "pSAM4

<220>

<223> pSAM4

<220>

<223> pSAM4

<400> 38

agatttttgt gttagatggg actcttgcg atgtaacctt taataaatTT tgcaaatcga 60

attcctttgt aacgtgcaaa gcattttata gcctggcgct cgcatgttta agcaacaggc 120

ggtgcggcaa cgttgaaatg ttccacgcag ggttttttac gtactgcacg gcattctgga 180

gtgaaaaaaa atgaaaagta cagctcgaag tttttgtcc atcggttgta ctttgcagag 240

tattagtcat tttgatatac agagtactac tatcgaagca tttttacgt tgaataactt 300

gaatattatt gaaagcttag ttcaaccaag ctgaaaagaa ccattattca acataattgg 360

aaatcatttc gttactaaat cgtccgaaaa ttgcagaaaa 400

<210> 39

<211> 505

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pCUP1-1" <223> "pCUP1-1

<220>

<223> pCUP1-1

<220>

<223> pCUP1-1

<400> 39

cggcaaaact caacgatttc tatgatgcat ttataatta gtaagccgat cccattaccg 60

acatttgggc gctatacgtg catatgttca tgtatgtatc tgtattttaa acacttttgt 120

attatttttc ctcatatatg tgtatagggt tatacggatg atttaattat tacttcacca 180

ccctttatTT caggctgata tcttagcctt gttactagtt agaaaaagac atttttgctg 240

tcagtcactg tcaagagatt cttttgctgg cttttcttcc agaagcaaaa agagcgatgc 300

gtcttttccg ctgaaccgtt ccagcaaaaa agactaccaa cgcaatatgg attgtcagaa 360

tcataaaaa gagaagcaaa taactccttg tcttgatca attgcattat aatatcttct 420

tgtagtgca atatcatata gaagtcacg aaatagatat taagaaaaac aaactgtaca 480

atcaatcaat caatcatcac ataaa 505

<210> 40

<211> 500

<212> DNA

<213> Candida glabrata

<220>

<223> pCUP1.Cgla" <223> "pCUP1.Cgla

<220>

<223> pCUP1.Cgla

<220>

<223> pCUP1.Cgla

<400> 40

cacaccacac aaccgtcagc accccgctg tacgtctgtg aaggctgcgg tatagacacg 60
gactgcgata cagaactcat gacttatatc ttagactcc tctgcttcaa tgcgaactcc 120

aggatcaccg aatagcatgc gatgagctgt tgattcttat atataattat ctattgcatt 180
ttttttttaa tgctgcatgg gggggcctag taaatcacc gtacaagtca cgcgtgagag 240
aaagagaagg gccctttcgt cgtggaagcg tggatcgtga gcgacctgtt tctaaatata 300
gcttttgggt aggatattat attaatgaa attttattag agggtaaag tatgtgaaag 360
ttatgtataa tatgttgcta aattagcgat cgtgaatgca tagaatctaa tcgttataga 420
aaaccgcaac ttgtgctgtt ttgttgtgtt ttcttgctgt tttttatat ttttatcta 480
gtattttgct ttagttgtta 500

<210> 41

<211> 425

<212> DNA

<213> Saccharomyces bayanus

<220>

<223> pCUP1.Sba" <223> "pCUP1.Sba

<220>

<223> pCUP1.Sba

<220>

<223> pCUP1.Sba

<400> 41

agaaggaggg gtcctattac caatacttgg acgctatacg tgcatatgta catgtacgta 60
tctgtattta aacacttttg tattattttc ttatatatg tgtataggtt tacatggttg 120
acttttatca ttgtttgtgc acatttgcaa tggccatttt ttgtttttg agaaaggat 180

tattgtgtc aciattcgag atgcttttgc tgacattcct cctagaagcc aaaaggccga 240

tcgctttttt ccgctgagag gataccagca aaaaaagcta ccagtacaag atgggacggc 300

aaaagcgtat aaaagaagaa gcaaaatgac cagatatgct ttcaatttca tcaatgtttc 360

tttctccctg ttatgatcca gaagaataat caaaagcaaa acatctattc aatcaatctc 420

ataaa 425

<210> 42

<211> 741

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pACU1" <223> "pACU1

<220>

<223> pACU1

<220>

<223> pACU1

<400> 42

ttacattatc aatccttgcg ttccagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt 60

tcggtcatct tctaaccacg tataatgataa tataactagta acgtaaatac tagtttagtag 120

atgatagttg atttttattc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt 180

aaagatattt aatgctataa tagacattta aatccaattc ttccaacata caatgggagt 240

ttggccgagt gggttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat 300

cttcggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgaat 360

tcgaaaaaga catTTTTGCT gtcagtcact gtcaagagat tcttttgctg gcatttcttc 420

cagaagcaaa aagagcgatg cgtcttttcc gctgaaccgt tccagcaaaa aagactacca 480

acgaattcta attaatgtag tcaaggcgcc atcctcatga aaactgtgta acataataac 540

cgaagtgtcg aaaaggtggc accttgcca attgaacacg ctcatgaaa aaaataagat 600

atatataagg ttaagtaaag cgtctgttag aaaggaagtt tttccttttt ctgtctctct 660

tgtcttttca tctactattt ccttcgtgta atacagggtc gtcagataca tagatacaat 720

tctattacc ccatccatac a 741

<210> 43

<211> 757

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pACU2" <223> "pACU2

<220>

<223> pACU2

<220>

<223> pACU2

<400> 43

ttacattatc aatccttgcg tticagcttc cactaattha gatgactatt tctcatcatt 60

tgcgtcatct tctaaccacg tatatgataa tatactagta acgtaaatac tagttagtag 120

atgatagttg atttttatc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtatth 180

aaagatatth aatgctataa tagacattta aatccaattc ttccaacata caatgggagt 240

ttggccgagt ggtttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat 300

cttcggatgc aagggttcga atcccgaatt cgaaaaagac attttgctg tcagtcactg 360

tcaagagatt cttttgctgg catttcttcc agaagcaaaa agagcgatgc gtcctttccg 420

ctgaaccgtt ccagcaaaaa agactaccaa cgaattccac gtgaagctgt cgatatggg 480

gaactgtggt ggttggcaaa tgactaatta agttagtcaa ggcgccatcc tcatgaaaac 540

tgtgtaacat aataaccgaa gtgtcgaaaa ggtggcacct tgtccaattg aacacgctcg 600

atgaaaaaaaa taagatatat ataaggttaa gtaaagcgtc tgtagaaaag gaagtttttc 660

ctttttcttg ctctcttgtc ttttcatcta ctatttcctt cgtgtaatac agggctcgtca 720

gatacataga tacaattcta ttaccccat ccataca 757

<210> 44

<211> 498

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pACU3p" <223> "pACU3p

<220>

<223> pACU3p

<220>

<223> pACU3p

<400> 44

ttatatgaa ttttcaaaaa ttcttacttt ttttttggat ggacgcaaag aagtttaata 60
atcatattac atggcattac caccatatac atatccatat ctaatcttac ttatatgttg 120
tggaaatgta aagagcccga attcgaaaaa gacatttttg ctgtcagtca ctgtcaagag 180
attctttttgc tggcatttct tccagaagca aaaagagcga tgcgtctttt ccgctgaacc 240
gttcagcaa aaaagactac caacgaattc ggatgataat gcgattagtt ttttagcctt 300
atttctgggg taattaatca gcgaagcgat gatTTTTgat ctattaacag atataataat 360
ggaaaagctg cataaccact ttaactaata ctttcaacat tttcagtttg tattacttct 420

tattcaaatg tcataaaagt atcaacaaaa aattgttaat atacctctat actttaacgt 480
caaggagaaa aaactata 498

<210> 45

<211> 498

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pACU4p" <223> "pACU4p

<220>

<223> pACU4p

<220>

<223> pACU4p

<400> 45

ttatatgaa ttttcaaaaa ttcttacttt ttttttggat ggacgcaaag aagtttaata 60
atcatattac atggcattac caccatatac atatccatat ctaatcttac ttatatgttg 120
tggaaatgta aagagcccga attcgttggg agtctttttt gctggaacgg ttcagcggaa 180

aagacgcac gctctttttg cttctggaag aaatgccagc aaaagaatct cttgacagtg 240
actgacagca aaaatgtctt tttcgaattc ggatgataat gcgattagtt ttttagcctt 300
atttctgggg taattaatca gcgaagcgat gatTTTTgat ctattaacag atataataat 360
ggaaaagctg cataaccact ttaactaata ctttcaacat tttcagtttg tattacttct 420
tattcaaatg tcataaaagt atcaacaaaa aattgttaat atacctctat actttaacgt 480
caaggagaaa aaactata 498

<210> 46

<211> 530

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pACU5" <223> "pACU5

<220>

<223> pACU5

<220>

<223> pACU5

<400> 46

ggaggacgaa acaaaaaagt gaaaaaaaat gaaaattttt ttggaaaacc aagaaatgaa	60
ttatatattcc gtgtgagacg acatcgtcga atatgattca gggtaacagt attgatgtaa	120
tcaatttctt acctgaatct aaaattcccg gaattcgaaa aagacatttt tgctgtcagt	180
cactgtcaag agattctttt gctggcattt cttccagaag caaaaagagc gatgcgtctt	240
ttccgctgaa ccgttcagc aaaaaagact accaacgaat tccgagcaga tccgccaggc	300
gtgtatatat agcgtggatg gccaggcaac tttagtgtg acacatacag gcatatatat	360

atgtgtgcga cgacacatga tcatatggca tgcattgtgt ctgtatgtat ataaaactct	420
tgttttcttc ttttctctaa atattctttc cttatacatt aggacctttg cagcataaat	480
tactatactt ctatagacac acaaacacaa atacacacac taaattaata	530

<210> 47

<211> 867

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pACU6" <223> "pACU6

<220>

<223> pACU6

<220>

<223> pACU6

<400> 47

ttacattatc aatccttgcg ttccagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt	60
tgcgtcatct tctaaccagg tatatgataa tatactagta acgtaaatac tagttagtag	120
atgatagttg atttttattc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt	180
aaagatatat aatgctataa tagacattta aatccaattc ttccaacata caatgggagt	240

ttggccgagt ggtttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat 300
cttcggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgaat 360
tcgaaaaaga catttttgct gtcagtcact gtcaagagat tcttttgctg gcattttctt 420
cagaagcaaa aagagcgatg cgtcttttcc gctgaaccgt tccagcaaaa aagactacca 480
acgaattcga aaaagacatt tttgctgtca gtcactgtca agagattctt ttgctggcat 540

ttcttccaga agcaaaaaga gcgatgcgtc ttttccgctg aaccgttcca gcaaaaaaga 600
ctaccaacga attctaatta agtttagtcaa ggcgccatcc tcatgaaaac tgtgtaacat 660
aataaccgaa gtgtcgaaaa ggtggcacct tgtccaattg aacacgctcg atgaaaaaaa 720
taagatatat ataaggttaa gtaaagcgtc tgtagaaag gaagttttt ctttttcttg 780
ctctctgtgc ttttcatcta ctatttcctt cgtgtaatac agggctcgtc gatacataga 840
tacaattcta ttaccccat ccataca 867

<210> 48

<211> 867

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pACU7" <223> "pACU7

<220>

<223> pACU7

<220>

<223> pACU7

<400> 48

ttacattatc aatccttgcg tttcagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt 60
tgcgtcatct tctaaccgg tatatgataa tatactagta acgtaaatac tagttagtag 120
atgatagttg atttttatc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt 180
aaagatattt aatgctataa tagacattta aatccaattc ttccaacata caatgggagt 240
ttggccgagt ggtttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat 300
cttcggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgaat 360

tcgttggtag tcttttttgc tggaacggtt cagcggaaaa gacgcatcgc tctttttgct 420
tctggaagaa atgccagcaa aagaatctct tgacagtgc tgacagcaaa aatgtctttt 480
tcgaattcgt tggtagtctt ttttgctgga acggttcagc ggaaaagacg catcgctctt 540
tttgcttctg gaagaaatgc cagcaaaaaga atctcttgac agtgactgac agcaaaaatg 600

tctttttcga attctaatta agttagtcaa ggcgccatcc tcatgaaaac tgtgtaacat 660
 aataaccgaa gtgtcgaaaa ggtggcacct tgtccaattg aacacgctcg atgaaaaaaa 720
 taagatatat ataaggttaa gtaaagcgtc tgtagaaaag gaagtttttc ctttttcttg 780

 ctctcttgtc ttttcatcta ctatttcctt cgtgtaatac agggctcgtca gatacataga 840
 tacaattcta ttaccccat ccataca 867

 <210> 49
 <211> 1119
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> pACU8" <223> "pACU8
 <220>
 <223> pACU8
 <220>
 <223> pACU8
 <400> 49

 ttacattatc aatccttgcg tttcagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt 60
 tgcgtcatct tctaacaccg tataatgataa tatactagta acgtaaatac tagttagtag 120
 atgatagttg atttttattc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt 180

 aaagatattt aatgctataa tagacattta aatccaattc ttccaacata caatgggagt 240
 ttggccgagt gggttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat 300
 ctctggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgaat 360
 tcgaaaaaga catTTTTGCT gtcagtcact gtcaagagat tcttttgctg gcatttcttc 420
 cagaagcaaa aagagcgatg cgtcttttcc gctgaaccgt tccagcaaaa aagactacca 480
 acgaattcga aaaagacatt tttgctgtca gtcactgtca agagattctt ttgctggcat 540
 ttcttcaga agcaaaaaga gcgatgcgtc tttccgctg aaccgttcca gcaaaaaaga 600

 ctaccaacga attcgaaaaa gacatttttg ctgtcagtc ctgtcaagag attcttttgc 660
 tggcatttct tccagaagca aaaagagcga tgcgtctttt ccgctgaacc gtccagcaa 720
 aaaagactac caacgaattc gaaaaagaca ttttgctgtg cagtcactgt caagagattc 780
 ttttgctggc atttcttcca gaagcaaaaa gagcgtatgcg tcttttccgc tgaaccgttc 840
 cagcaaaaaa gactaccaac gaattctaata taagttagtc aaggcgccat cctcatgaaa 900
 actgtgtaac ataataaccg aagtgtcgaa aaggtggcac cttgtccaat tgaacacgct 960

cgatgaaaaa aataagatat atataagggtt aagtaaagcg tctgttagaa aggaagtttt 1020

tcctttttct tgctctcttg tcttttcac tactatttcc ttcgtgtaac acagggtcgt 1080

cagatacata gatacaattc tattaccccc atccataca 1119

<210> 50

<211> 624

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pACU9" <223> "pACU9

<220>

<223> pACU9

<220>

<223> pACU9

<400> 50

tatagttttt tctccttgac gttaaagtat agaggatat taacaatttt ttgttgatac 60

ttttatgaca ttggaataag aagtaataca aactgaaaat gttgaaagta ttagttaag 120

tggttatgca gcttttccat ttatatatct gttaatagat caaaaatcat cgcttcgctg 180

attaattacc ccagaaataa ggctaaaaaa ctaatcgcat tatcatccga attcgaaaaa 240

gacatttttg ctgtcagtc ctgtcaagag attcttttgc tggcatttct tccagaagca 300

aaaagagcga tgcgtctttt ccgctgaacc gttccagcaa aaaagactac caacgaattc 360

gaaaaagaca tttttgctgt cagtactgt caagagattc ttttgctggc atttcttcca 420

gaagcaaaaa gagcgatgag tcttttccgc tgaaccgttc cagcaaaaaa gactaccaac 480

gaattcgggc tctttacatt tccacaacat ataagtaaga ttagatatgg atatgtatat 540

ggtggtaatg ccatgtaata tgattattaa acttctttgc gtccatcaa aaaaaaagta 600

agaatttttg aaaattcaat ataa 624

<210> 51

<211> 876

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pACU10p" <223> "pACU10p

<220>

<223> pACU10p

<220>

<223> pACU10p

<400> 51

ttatatgaa ttttcaaaaa ttcttacttt ttttttggat ggacgcaaag aagtttaata	60
atcatattac atggcattac caccatatac atatccatat ctaatcttac ttatatgttg	120
tggaaatgta aagagcccga attggtttggt agtctttttt gctggaacgg ttcagcggaa	180
aagacgcacg gctctttttg cttctggaag aaatgccagc aaaagaatct cttgacagtg	240

actgacagca aaaatgtctt tttcgaattc gttggtagtc ttttttgctg gaacggttca	300
gcggaaaaga cgcatcgctc tttttgcttc tggaagaaat gccagcaaaa gaatctcttg	360
acagtgactg acagcaaaaa tgtctttttc gaattcgttg gtagtctttt ttgctggaac	420
ggttcagcgg aaaagacgca tcgctctttt tgcttctgga agaaatgccg gcaaaaagaat	480
ctcttgacag tgactgacag caaaaatgtc tttttcgaat tcgttggttag tcttttttgc	540
tggaacggtt cagcggaaaa gacgcacgc tctttttgct tctggaagaa atgccagcaa	600
aagaatctct tgacagtgc tgacagcaaa aatgtctttt tccaattcgg atgataatgc	660

gattagtttt ttagccttat ttctggggta attaatacgc gaagcgatga tttttgatct	720
attaacagat atataaatgg aaaagctgca taaccacttt aactaatact ttcaacattt	780
tcagtttgta ttacttctta ttcaaatgtc ataaaagtat caacaaaaaa ttgttaatat	840
acctctatac tttaacgtca aggagaaaaa actata	876

<210> 52

<211> 633

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pACU11" <223> "pACU11

<220>

<223> pACU11

<220>

<223> pACU11

<400> 52

gctcagcatc tgetttctcc caaagatgaa cgcggcgtaa tgtcactaac gacgtgcacc	60
aacttgcggg aattcgaaaa agacattttt gctgtcagtc actgtcaaga gattcttttg	120

ctggcatttc ttccagaagc aaaaagagcg atgcgtcttt tccgtgaac cgttcagca 180
 aaaaagacta ccaacgaatt ccaccgcacg ccttttttct gaagcccact ttcgtggact 240
 ttgcatata tgcaaaattc atgaagtgtg ataccaagtc agcatacacc tcactagggt 300
 agtttctttg gtigtattga tcatttgggt catcgtgggt cattaatTTT tttctccat 360
 tgctttctgg ctttgatctt actatcattt ggatttttgt cgaaggttgt agaattgtat 420
 gtgacaagtg gcaccaagca tatataaaaa aaaaaagcat tatcttccca ccagagtga 480

ttgttaaaaa cgtatttata gcaaacgcaa ttgtaattaa ttcttatttt gtatcttttc 540
 ttccttctgc tcaatctttt atttttattt ttttttctt ttcttagttt ctttcataac 600
 accaagcaac taatactata acatacaata ata 633

<210> 53

<211> 1119

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pACU12" <223> "pACU12

<220>

<223> pACU12

<220>

<223> pACU12

<400> 53

ttacattatc aatccttgcg tttagcttc cactaatTTa gatgactatt tctcatcatt 60
 tgcgtcatct tctaacaccg tatatgataa tatactagta acgtaaatac tagttagtag 120

atgatagttg atttttattc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt 180
 aaagatattt aatgctataa tagacattta aatccaattc ttccaacata caatgggagt 240
 ttggccgagt ggtttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat 300
 cttaggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgaat 360
 tggttggttag tcttttttgc tggaacggtt cagcggaaaa gacgcatcgc tctttttgct 420
 tctggaagaa atgccagcaa aagaatctct tgacagtgc tgacagcaaa aatgtctttt 480
 tcgaattcgt tggtagtctt ttttgctgga acggttcagc ggaaaagacg catcgtcttt 540

tttgcttctg gaagaaatgc cagcaaaaga atctcttgac agtgactgac agcaaaaatg 600
 tctttttcga attcgttgggt agtctttttt gctggaacgg tttagcggaa aagacgcatc 660
 gctctttttg ctcttggaag aaatgccagc aaaagaatct cttgacagtg actgacagca 720

aaaatgtctt tttcgaattc gttggtagtc ttttttgctg gaacggttca gcgaaaaga 780
 cgcacgctc ttttgcttc tggaagaaat gccagcaaaa gaatctcttg acagtgactg 840
 acagcaaaaa tgtctttttc caattctaata taagttagtc aaggcgccat cctcatgaaa 900
 actgtgtaac ataataaccg aagtgtcgaa aagggtggcac cttgtccaat tgaacacgct 960

 cgatgaaaaa aataagatat atataaggtt aagtaaagcg tctgttagaa aggaagtttt 1020
 tcctttttct tgcctctctg tcttttcac tactatttcc ttcgtgtaat acagggtcgt 1080
 cagatacata gatacaattc tattaccccc atccatata 1119
 <210> 54
 <211> 1497
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> pACU13" <223> "pACU13
 <220>
 <223> pACU13
 <220>
 <223> pACU13
 <400> 54
 ttacattatc aatccttgcg ttccagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt 60
 tgcgtcatct tctaacaccg tatatgataa tatactagta acgtaaacat tagttagtag 120

 atgatagttg atttttattc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt 180
 aaagatattt aatgctataa tagacattta aatccaattc ttccaacata caatgggagt 240
 ttggccgagt gggttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat 300
 ctccggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgaat 360
 tggttggtag tcttttttgc tggaacggtt cagcggaata gacgcatcgc tctttttgct 420
 tctggaagaa atgccagcaa aagaatctct tgacagtgc tgacagcaaa aatgtctttt 480
 tcgaattcgt tggtagtcct ttttgctgga acggttcagc ggaaaagacg catcgtctct 540

 ttgcttctg gaagaaatgc cagcaaaaaga atctcttgac agtgactgac agcaaaaatg 600
 tctttttcga attcgttggg agtctttttt gctggaacgg ttcagcggaa aagacgcatc 660
 gctctttttg ctcttggaag aaatgccagc aaaagaatct cttgacagtg actgacagca 720
 aaaatgtctt tttcgaattc gttggtagtc ttttttgctg gaacggttca gcgaaaaga 780
 cgcacgctc ttttgcttc tggaagaaat gccagcaaaa gaatctcttg acagtgactg 840

acagcaaaaa tgictttttc gaattcgttg gtagtctttt ttgctggaac ggttcagcgg 900
aaaagacgca tcgctctttt tgcttctgga agaaatgccca gcaaaagaat ctcttgacag 960

tgactgacag caaaaatgtc tttttcgaat tcgttggttag tcttttttgc tggaacggtt 1020
cagcggaataa gacgcatcgc tctttttgct tctggaagaa atgccagcaa aagaatctct 1080
tgacagtac tgacagcaaa aatgtctttt tcgaattcgt tggtagtctt ttttgctgga 1140
acggttcagc ggaaaagacg catcgtctctt tttgcttctg gaagaaatgc cagcaaaaga 1200
atctcttgac agtgactgac agcaaaaatg tctttttcca attctaatta agttagtcaa 1260
ggcgccatcc tcatgaaaaa tgtgtaacat aataaccgaa gtgtcgaaaa ggtggcacct 1320
tgtccaattg aacacgctcg atgaaaaaaa taagatatat ataagggtta gtaaagcgtc 1380

tgtagaaag gaagtttttc ctttttcttg ctctcttgtc ttttcatcta ctatttcctt 1440
cgtgtaatac agggctgctca gatacataga tacaattcta ttaccccat ccataca 1497

<210> 55
<211> 1011
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> pACU14" <223> "pACU14
<220>
<223> pACU14
<220>
<223> pACU14
<400> 55

gtcagcatc tgcttcttcc caaagatgaa cgcggcggtta tgtcactaac gacgtgcacc 60
aacttgccgg aattggaaaa agacattttt gctgtcagtc actgtcaaga gattcttttg 120
ctggcatttc ttccagaagc aaaaagagcg atcgctcttt tccgtgaac cgttccagca 180

aaaaagacta ccaacgaatt cgaaaaagac atttttgctg tcagtcactg tcaagagatt 240
cttttctggt catttcttcc agaagcaaaa agagcgatgc gtcttttccg ctgaaccgtt 300
ccagcaaaaa agactaccaa cgaattcgaa aaagacattt ttgctgtcag tcaactgtcaa 360
gagattcttt tgctggcatt tcttccagaa gcaaaaagag cgatgcgtct tttccgtga 420
accgttcag caaaaaagac taccaacgaa ttcgaaaaag acatttttgc tgtcagtcac 480
tgtcaagaga ttcttttctt ggcatcttct ccagaagcaa aaagagcgat gcgtcttttc 540

cgctgaaccg ttccagcaaa aaagactacc aaccaattcc accgcacgcc tttttctga 600

agcccacttt cgtggacttt gccatatatg caaaattcat gaagtgtgat accaagtcag 660

catacacctc actagggtag tttcttttgt tgtattgatc atttggttca tcgtggttca 720

ttaatttttt ttctccattg ctttctggct ttgatcttac tatcatttgg atttttgtcg 780

aaggtttag aattgtatgt gacaagtggc accaagcata tataaaaaaa aaaagcatta 840

tcttctacc agagttagt gttaaaaacg ttttatagc aaacgcaatt gtaattaatt 900

cttattttgt atcttttctt cccttgtctc aatcttttat ttttatttta tttttctttt 960

cttagtttct ttcataacac caagcaacta atactataac atacaataat a 1011

<210> 56

<211> 398

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pACU15" <223> "pACU15

<220>

<223> pACU15

<220>

<223> pACU15

<400> 56

tatagttttt tctccttgac gttaaagtat agaggtatat taacaatttt ttgttgatac 60

ttttatgaca ttgaataag aagtaataca aactgaaaat gttgaaagta ttagttaag 120

tggttatgca gcttttccat ttatatatct gttaatagat caaaaatcat cgcttcgctg 180

attaattacc ccagaaataa ggctaaaaaa ctaatcgcat tatcatccga attcgttggt 240

agtctttttt gctggaacgg ttcagcggaa aagacgcac gctctttttg cttctggaag 300

aaatgccagc aaaagaatct cttgacagtg actgacagca aaaatgtctt tttcgaattc 360

gggctcttta catttcaca acatataagi aagattag 398

<210> 57

<211> 428

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pGAL/CUP1p" <223> "pGAL/CUP1p

<220>

<223> pGAL/CUP1p

<220>

<223> pGAL/CUP1p

<400> 57

ttatatgaa ttttcaaaaa ttcttacttt ttttttggat ggacgcaaag aagtttaata	60
atcatattac atggcattac caccatatac atatccatat ctaatcttac ttatatgttg	120
tggaaatgta aagagcccga attcgaaaaa gacatttttg ctgtcagtca ctgtcaagag	180

attcttttgc tggcatttct tccagaagca aaaagagcga tgcgtctttt ccgctgaacc	240
gttccagcaa aaaagactac caacgcaata tggattgtca gaatcatata aaagagaagc	300
aaataactcc ttgtcttgta tcaattgcat tataatatct tcttgtagt gcaatatcat	360
atagaagtca tcgaaataga tattaagaaa aacaaactgt acaatcaatc aatcaatcat	420
cacataaa	428

<210> 58

<211> 518

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pCRS5" <223> "pCRS5

<220>

<223> pCRS5

<220>

<223> pCRS5

<400> 58

gtggacgaaa agacataact gcagaagtac agctgccttt atttcttgtg gtcatttatt	60
gctttttatt tcaagtcaga tatacaagaa aatcaaattc catcgtcaac gtcacgtata	120
aacgattaat ttacagtaat accatactct accaacatta ttttagtccg acgttcagtc	180
ctgtaggtgt tccaaatcct tctggcattg acttctgtgc agaaaccctt caaatgagt	240
tccactttac gtcagatcgc ataacaaccg gtcatatatt ttttctttt gctaaacccc	300
ctactgcaag cacttttaag aaaaagaaca ataatgcgt ctttattgct gtgtggaagt	360
gatttttgtc tttcggacaa aaaaaggata gggatgcgag agggctgtga agtagtgatc	420
aagcggggcc tatataagaa gggcgcacat cgtccccctt aagaatagcg aagcgatatt	480

acactgaaca ctacaatgtc aaatagtact caataaat 518

<210> 59

<211> 510

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pCHA1" <223> "pCHA1

<220>

<223> pCHA1

<220>

<223> pCHA1

<400> 59

gatctctgct gacgttgtat ccacagatct aattgcaaga tagcctcttg cgaccttatt 60

aaaagcctct ccgtgatatc ctctagggct tgggttgcca ttaatcgatg tgccttggt 120

tccttatgcg agctgtttct tatctatctt atggteccat tctttactgc actgtttaca 180

ttttgatcaa ttgcgaaatg ttctactat ttttctttt ctcctttcgc gagtactaat 240

caccgcgaac ggaaactaat gagtcctctg cgcggagaca tgattcgcga tgggcggctc 300

ctgttaagcc ccagcggaaa tgtaattcca ctgagtgta ttaaatagt ccaaagcttt 360

atcaaattgt ttgcgatgag ataagataaa agggacaata tgaggaggaa cacaggtata 420

taaataatcg caaataaaa gaaaatgttt atacagtitt ctccttttta agtgctggat 480

agacaagaga caggaaaatt aaccagcgag 510

<210> 60

<211> 601

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pCTR1" <223> "pCTR1

<220>

<223> pCTR1

<220>

<223> pCTR1

<400> 60

caagtccgat tgttctctt caggagcttc ctgaacaaaa ctttttccgc aaggccgcat 60

tttgaaccgt attttgctcg ttccagcctt tccacgtttt tgttatctaa gcaacttggc 120
acatttcctt actatactac aaaccgatac gtaaatactt ccctaaatag catatgaatt 180
attcagtaat ttttaaggat cgaaactgca cctcaactat tcgttactgt ggttatgttc 240
tcatgtattg atgcaaatca tgggatattt gctcaagacg acggtaaaat gagcaaaaat 300
ggcacgatcc tgaagagagc acttttcaag attcgggcta caaaatgcaa cataaaaaat 360

gttgatttgt catctcgaca gggctcttga tgttttattc ctcttatgat tagttcacat 420
tagtaaaaca gatacgcagt gtgctcttaa taaacaacta ctccatagct ttatttgcatt 480
aacaatactt ttaagcaca acttaaacag gtggagtaat agttcggcgg cgactcaaat 540
tacatttgtt ggaagaatcg aatagaaaat aaaaaaaagt gtattatatt tgacattcaa 600
a 601

<210> 61

<211> 522

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pCTR3" <223> "pCTR3

<220>

<223> pCTR3

<220>

<223> pCTR3

<400> 61

gatgtgatga caaacctct tccgataaaa acattttaaac tattaacaaa caaatggatt 60
cattagatct attacattat ggggtggtatg ttggaataaa aatcaactat catctactaa 120
ctagtattta cgttactagt atattatcat atacggtgtt agaagatgac gcaaatgatg 180
agaaatagtc atctaaatta gtggaagctg aaacgcaagg attgataatg taataggatc 240
aatgaatatt aacataataa acgatgataa taatatttat agaatttgtt agaattgcag 300
attccctttt atggattcct aaatcctcca ggagaacttc tagtatactt acatacctaa 360
tattattgcc ttattaaaaa tggaatccca acaattacat caaaatccac attctcttca 420

cttctccgat agacttgtaa tttatcttat ttcatctcct aacactttga tcgaagaaga 480
gggataacaa cagacgaaaa cacatttaag ggctatacaa ag 522

<210> 62

<211> 675

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pCUR1" <223> "pCUR1

<220>

<223> pCUR1

<220>

<223> pCUR1

<400> 62

ttacattatc aatccttgcg tttagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt	60
tgcgtcatct tctaaccacg tatatgataa tataactagta acgtaaatac tagttagtag	120
atgatagttg atttttattc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt	180

aaagatatatt aatgctataa tagacattta aatccaattc ttccaacata caatgggagt	240
ttggccgagt ggtttaagcg gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat	300
cttcggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgaat	360
tgtcatggga tatttgctca agacgacggt aaaatgagca aatatggcac gatcctcaat	420
tctaattaag ttagtcaagg cgccatcttc atgaaaactg tgtaacataa taaccgaagt	480
gtcgaaaagg tggcaccttg tccaattgaa cacgctcgat gaaaaaata agatatatat	540
aaggtttaagt aaagcgtctg ttagaaagga agtttttctt ttttcttgct ctcttgtctt	600

ttcatctact atttccttcg tgtaatacag ggtcgtcaga tacatagata caattctatt	660
accccatcc ataca	675

<210> 63

<211> 674

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pCUR2" <223> "pCUR2

<220>

<223> pCUR2

<220>

<223> pCUR2

<400> 63

ttacattatc aatccttgcg tttagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt	60
--	----

tgcgtcatct tctaaccacg tataatgataa tataactagta acgtaaatac tagttagtag 120
 atgatagttg atttttatc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt 180

 aaagatattt aatgctataa tagacattta aatccaattc tccaacata caatgggagt 240
 ttggccgagt ggtttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat 300
 ctccggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgatt 360
 gaggatcgtg ccatatttgc tcatittacc gtcgtcttga gcaaatatcc catgacaatt 420
 ctaattaagt tagtcaaggc gccatcctca tgaaaactgt gtaacataat aaccgaagtg 480
 tcgaaaagggt ggcaccttgc ccaattgaac acgctcgatg aaaaaataa gatatatata 540
 aggttaagta aagcgtctgt tagaaaggaa gtttttcctt tttcttgctc tcttgctttt 600

 tcatctacta tttccttcgt gtaatacagg gtcgtcagat acatagatac aattctatta 660
 ccccatcca taca 674

 <210> 64
 <211> 794
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> pCUR3" <223> "pCUR3
 <220>
 <223> pCUR3
 <220>
 <223> pCUR3
 <400> 64

 ttacattatc aatccttgcg tttcagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt 60
 tgcgtcatct tctaaccacg tataatgataa tataactagta acgtaaatac tagttagtag 120
 atgatagttg atttttatc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt 180

 aaagatattt aatgctataa tagacattta aatccaattc tccaacata caatgggagt 240
 ttggccgagt ggtttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat 300
 ctccggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgaat 360
 taggatcgtg ccatatttgc tcatittacc gtcgtcttga gcaaatatcc catgacaatt 420
 gaggatcgtg ccatatttgc tcatittacc gtcgtcttga gcaaatatcc catgacaatt 480
 gaggatcgtg ccatatttgc tcatittacc gtcgtcttga gcaaatatcc catgacaatt 540

ctaattaagt tagtcaaggc gccatcctca tgaaaactgt gtaacataat aaccgaagtg	600
tcgaaaaggt ggcaccttgt ccaattgaac acgctcgatg aaaaaataa gatatatata	660
aggttaagta aagcgtctgt tagaaaggaa gtttttcctt tttcttgctc tcttgtcttt	720
tcatctacta tttccttcgt gtaatacagg gtcgtcagat acatagatac aattctatta	780
cccccatcca taca	794
<210> 65	
<211> 850	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> pCUR4" <223> "pCUR4	
<220>	
<223> pCUR4	
<220>	
<223> pCUR4	
<400> 65	
ttacattatc aatccttgcg ttfcagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt	60
tgcgtcatct tctaacaccg tataatgataa tatactagta acgtaaatac tagttagtag	120
atgatagttg atttttattc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt	180
aaagatattt aatgctataa tagacattta aatccaattc ttccaacata caatgggagt	240
ttggccgagt ggtttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat	300
cttcggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgaat	360
tgtcatggga tatttgctca agacgacggt aaaatgagca aatatggcac gatcctcaat	420
tgtcatggga tatttgctca agacgacggt aaaatgagca aatatggcac gatcctcaat	480
gltcatgggat atttgcctaa gacgacggta aaatgagcaa atatggcacg atcctcaatt	540
gltcatgggat atttgcctaa gacgacggta aaatgagcaa atatcccatg acaattctaa	600
ttaagttagt caaggcgcca tctcatgaa aactgtgtaa cataataacc gaagtgtcga	660
aaagggtggca ccttgcctaa ttgaacacgc tcgatgaaaa aaataagata tatataaggt	720
taagtaaagc gtctgttaga aaggaagttt ttctttttc ttgctctctt gtcttttcat	780
ctactatttc cttcgtgtaa tacagggtcg tcagatacat agatacaatt ctattacccc	840
catccataca	850

<210> 66

<211> 491

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pCUR5p" <223> "pCUR5p

<220>

<223> pCUR5p

<220>

<223> pCUR5p

<400> 66

ttatatggaa ttttcaaaaa ttcttacttt ttttttggat ggacgcaaag aagtttaata	60
atcatattac atggcattac caccatatac atatccatat ctaatcttac ttatatgttg	120
tggaaatgta aagagcccga attgtcatgg gatatttgct caagacgacg gtaaaatgag	180
caaatatggc acgatcctca attgtcatgg gatatttgct caagacgacg gtaaaatgag	240
caaatatggc acgatcccaa ttcggatgat aatgcgatta gttttttagc cttatttctg	300

gggtaattaa tcagcgaagc gatgatTTTT gatctattaa cagatatata aatggaaaag	360
ctgcataacc actttaacta atactttcaa catTTTcagt ttgtattact tcttattcaa	420
atgtcataaa agtatcaaca aaaaattgtt aatatacttc tatactttaa cgtcaaggag	480
aaaaaactat a	491

<210> 67

<211> 833

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pCUR6" <223> "pCUR6

<220>

<223> pCUR6

<220>

<223> pCUR6

<400> 67

ttacattatc aatccttgcg tttcagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt	60
tgcgtcatct tctaacaccg tatatgataa tatactagta acgtaaatac tagttagtag	120

atgatagttg atttttattc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt 180
 aaagatattt aatgctataa tagacattta aatccaattc ttccaacata caatgggagt 240
 ttggccgagt ggtttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat 300
 cticggatgc aagggttcga atcccgaatt gaggatcgtg ccatatttgc tcattttacc 360
 gtcgtcttga gcaaataatcc catgacaatt gaggatcgtg ccatatttgc tcattttacc 420
 gtcgtcttga gcaaataatcc catgacaatt gaggatcgtg ccatatttgc tcattttacc 480

gtcgtcttga gcaaataatcc catgacaatt catgatcgca aaatggcaaa tggcacgtga 540
 agctgtcgat attggggaac tgtggtggtt ggcaaatgac taattaagtt agtcaaggcg 600
 ccatctcat gaaaactgtg taacataata accgaagtgt cgaaaagggtg gcacctgtgc 660
 caattgaaca cgctcgatga aaaaaataag atatatataa ggttaagtaa agcgtctgtt 720
 agaaaggaag tttttccttt ttcttgcctc ctgtctttt catctactat ttcttctgtg 780
 taatacaggg tcgtcagata catagataca attctattac ccccatccat aca 833

<210> 68

<211> 803

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pCUR7" <223> "pCUR7

<220>

<223> pCUR7

<220>

<223> pCUR7

<400> 68

gtgagtaagg aaagagttag gaactatcgc atacctgcat ttaaagatgc cgatttgggc 60
 gcgaatcctt tattttggct tcacctcat actattatca gggccagaaa aaggaagtgt 120
 ttccctcctt ctigaattga tgttacccctc ataaagcacg tggcctctta tcgagaaaga 180
 aattaccgtc gtcgtgatt tgtttgcaaa aagaacaaaa ctgaattcag gatcgtgcca 240
 tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gacaattgag gatcgtgcca 300
 tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gagaattctt cctgtcttcc 360

tattgattgc agcttccaat ttctgcacac aacaaggtec tagcgacggc tcacaggttt 420
 tgtaacaagc aatcgaaggt tctggaatgg cgggaaaggg tttagtacca catgctatga 480
 tgcccactgt gatctccaga gcaaagttcg ttcatcgta ctgttactct ctctctttca 540

aacagaattg tccgaatcgt gtgacaacaa cagcctgttc tcacacactc ttttcttcta 600
 accaaggggg tggttttagtt tagtagaacc tcgtgaaact tacatttaca tatatataaa 660
 cttgcataaa ttggatcaatg caagaaatac atatttggtc ttttctaatt cgtagttttt 720
 caagtcttta gatgctttct ttttctcttt ttacagatc atcaaggaag taattatcta 780

 ctttttataa caaatataaa aca 803
 <210> 69
 <211> 863
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> pCUR8" <223> "pCUR8
 <220>
 <223> pCUR8
 <220>
 <223> pCUR8
 <400> 69
 gtgagtaagg aaagagttag gaactatcgc atacctgcat ttaaagatgc cgatttgggc 60
 gcgaatcctt tattttggct tcacctcat actattatca gggccagaaa aaggaagtgt 120
 ttccctcctt ctggaattga tgttaccctc ataaagcacg tggcctctta tcgagaaaga 180
 aattaccgtc gctcgtgatt tgtttgcaaa aagaacaaaa ctgaattcag gatcgtgcca 240

 tatttctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gacaattgag gatcgtgcca 300
 tatttctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gacaattgag gatcgtgcca 360
 tatttctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gagaattctt cctgtcttcc 420
 tattgattgc agcttccaat ttctgcacac aacaaggctc tagcgacggc tcacaggttt 480
 tgtaacaagc aatcgaaggt tctggaatgg cgggaaaggg tttagtacca catgctatga 540
 tgcccactgt gatctccaga gcaaagtctg ttcatcgta ctgttactct ctctctttca 600
 aacagaattg tccgaatcgt gtgacaacaa cagcctgttc tcacacactc ttttcttcta 660

 accaaggggg tggttttagtt tagtagaacc tcgtgaaact tacatttaca tatatataaa 720
 cttgcataaa ttggatcaatg caagaaatac atatttggtc ttttctaatt cgtagttttt 780
 caagtcttta gatgctttct ttttctcttt ttacagatc atcaaggaag taattatcta 840
 ctttttataa caaatataaa aca 863
 <210> 70

<211> 863

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pCUR9" <223> "pCUR9

<220>

<223> pCUR9

<220>

<223> pCUR9

<400> 70

gtgagtaagg aaagagtgag gaactatcgc atacctgcat ttaaagatgc cgatttgggc 60

gcgaatcctt tattttggct tcaccctcat actattatca gggccagaaa aaggaagtgt 120

tccctcctt ctgaattga tgttacctc ataaagcacg tggcctctta tcgagaaaga 180

aattaccgtc gctcgtgatt tgtttgcaaa aagaacaaaa ctgaattctc atgggatatt 240

tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 300

tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 360

tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctgaattctt cctgtcttcc 420

tattgattgc agcttccaat ttcgtcacac aacaagggtcc tagcgacggc tcacaggttt 480

tgtaacaagc aatcgaaggt tctggaatgg cgggaaaggg tttagtacca catgctatga 540

tgcccactgt gatctccaga gcaaagtctg ttcgatacgt ctgttactct ctctctttca 600

aacagaattg tccgaatcgt gtgacaacaa cagcctgttc tcacacactc ttttcttcta 660

accaaggggg tggtttagtt tagtagaacc tcgtgaaact tacatttaca tatatataaa 720

cttgcataaa ttggtcaatg caagaaatac atatttggtc ttttctaatt cgtagttttt 780

caagtcttta gatgctttct ttttctcttt ttacagatc atcaaggaag taattatcta 840

ctttttacaa caaatataaa aca 863

<210> 71

<211> 923

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pCUR10" <223> "pCUR10

<220>

<223> pCUR10

<220>

<223> pCUR10

<400> 71

gtgagtaagg aaagagtgag gaactatcgc atacctgcat ttaaagatgc cgatttgggc	60
gcgaatcctt tattttggct tcacctcat actattatca gggccagaaa aaggaagtgt	120
ttccctcctt ctigaattga tgttaccctc ataaagcacg tggcctctta tcgagaaaga	180
aattaccgtc gctcgtgatt tgtttgcaaa aagaacaaaa ctgaattctc atgggatatt	240
tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt	300
tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt	360
tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt	420
tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctgaattctt cctgtcttcc	480
tattgattgc agcttccaat ttcgtcacac aacaaggctc tagcgacggc tcacaggttt	540
tgtaacaagc aatcgaaggt tctggaatgg cgggaaaggg tttagtacca catgctatga	600
tgcccactgt gatctccaga gcaaagtctg ttcgatcgta ctgttactct ctctctttca	660
aacagaattg tccgaatcgt gtgacaacaa cagcctgttc tcacacactc ttttcttcta	720
accaaggggg tggtttagtt tagtagaacc tcgtgaaact tacatttaca tatatataaa	780
cttgcataaa ttggtcaatg caagaaatac atatttggtc ttttctaatt cgtagttttt	840
caagttctta gatgctttct ttttctcttt ttacagata atcaaggaag taattatcta	900
ctttttacaa caaatataaa aca	923

<210> 72

<211> 983

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pCUR11" <223> "pCUR11

<220>

<223> pCUR11

<220>

<223> pCUR11

<400> 72

gtgagtaagg aaagagtgag gaactatcgc atacctgcat ttaaagatgc cgatttgggc	60
---	----

gcgaatcctt tatTTTggct tcacctcat actattatca gggccagaaa aaggaagtgt 120

ttccctcctt ctTgaattga tgttaccctc ataaagcacg tggcctctta tcgagaaaga 180

aattaccgtc gctcgtgatt tgTTtgcaaa aagaacaaaa ctgaattctc atgggatatt 240

tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 300

tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 360

tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 420

tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 480

tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctgaattctt cctgtcttcc 540

tattgattgc agcttccaat ttctgcacac aacaaggctc tagcgacggc tcacaggttt 600

tgtaacaagc aatcgaaggt tctggaatgg cgggaaaggg tttagtacca catgctatga 660

tgccactgt gatctccaga gcaaagtctg ttcgatcgta ctgttactct ctctctttca 720

aacagaattg tccgaatcgt gtgacaacaa cagcctgttc tcacacactc ttttcttcta 780

accaaggggg tggtttagtt tagtagaacc tcgtgaaact tacatttaca tatatataaa 840

cttgcataaa ttggtcaatg caagaaatac atatttggtc ttttctaatt cgtagttttt 900

caagttctta gatgctttct ttttctcttt ttacagatac atcaaggaag taattatcta 960

ctttttacaa caaatataaa aca 983

<210> 73

<211> 1043

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pCUR12" <223> "pCUR12

<220>

<223> pCUR12

<220>

<223> pCUR12

<400> 73

gtgagtaagg aaagagtgag gaactatcgc atacctgcat ttaaagatgc cgatttgggc 60

gcgaatcctt tatTTTggct tcacctcat actattatca gggccagaaa aaggaagtgt 120

ttccctcctt ctTgaattga tgttaccctc ataaagcacg tggcctctta tcgagaaaga 180

aattaccgtc gctcgtgatt tgTTtgcaaa aagaacaaaa ctgaattcag gatcgtgcc 240

tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gacaattgag gatcgtgcc 300

tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gacaattgag gatcgtgcca 360
tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gagaattcag gatcgtgcca 420
tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gacaattgag gatcgtgcca 480
tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gacaattgag gatcgtgcca 540
tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gagaattctt cctgtcttcc 600

tattgattgc agcttccaat ttctgcacac aacaaggctc tagcgacggc tcacaggttt 660
tgtaacaagc aatcgaaggt tctggaatgg cgggaaaggg tttagtacca catgctatga 720
tgcccactgt gatctccaga gcaaagttcg ttcgatcgta ctgttactct ctctctttca 780
aacagaattg tccgaatcgt gtgacaacaa cagcctgttc tcacacactc ttttcttcta 840
accaaggggg tggttttagtt tagtagaacc tcgtgaaact tacatttaca tatatataaa 900
cttgcataaa ttggtcaatg caagaatac atatttggtc ttttctaatt cgtagttttt 960
caagttctta gatgctttct ttttctcttt ttacagatc atcaaggaag taattatcta 1020

ctttttacaa caaatataaa aca 1043

<210> 74

<211> 1043

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pCUR13" <223> "pCUR13

<220>

<223> pCUR13

<220>

<223> pCUR13

<400> 74

gtgagtaagg aaagagtgag gaactatcgc atacctgcat ttaaagatgc cgatttgggc 60
gcgaatcctt tattttggct tcacctcat actattatca gggccagaaa aaggaagtgt 120
ttccctcctt ctggaattga tgttaccctc ataaagcacg tggcctctta tcgagaaaga 180
aattaccgtc gctcgtgatt tgtttgcaaa aagaacaaaa ctgaattctc atgggatatt 240

tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 300
tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 360
tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctgaattctc atgggatatt 420
tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 480

tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 540
 tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctgaattctt cctgtcttcc 600
 tattgattgc agcttccaat ttctgcacac aacaaggtec tagcgacggc tcacaggttt 660

tgtaacaagc aatcgaaggt tctggaatgg cgggaaaggg tttagtacca catgctatga 720
 tgcccactgt gatctccaga gcaaagttcg ttcgatcgta ctgttactct ctctctttca 780
 aacagaattg tccgaatcgt gtgacaacaa cagcctgttc tcacacactc ttttcttcta 840
 accaaggggg tggtttagtt tagtagaacc tcgtgaaact tacatttaca tatatataaa 900
 cttgcataaa ttggtcaatg caagaaatac atatttggtc ttttctaatt cgtagttttt 960
 caagttctta gatgctttct ttttctttt ttacagatc atcaaggaag taattatcta 1020
 ctttttaca caaatataaa aca 1043

<210> 75

<211> 1223

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pCUR14" <223> "pCUR14

<220>

<223> pCUR14

<220>

<223> pCUR14

<400> 75

gtgagtaagg aaagagtgag gaactatcgc atacctgcat ttaaagatgc cgatttgggc 60
 gcgaatcctt tattttggct tcacctcat actattatca gggccagaaa aaggaagtgt 120
 ttccctcctt ctggaattga tgttacctc ataaagcacg tggcctctta tcgagaaaga 180
 aattaccgtc gctcgtgatt tgtttgcaaa aagaacaaaa ctgaattctc atgggatatt 240
 tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 300

tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 360
 tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctgaattctc atgggatatt 420
 tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 480
 tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 540
 tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctgaattctc atgggatatt 600
 tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt 660

tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctcaattgtc atgggatatt	720
tgctcaagac gacggtaaaa tgagcaaata tggcacgata ctgaattctt cctgtcttcc	780
tattgattgc agcttccaat ttctgcacac aacaagggtcc tagcgacggc tcacagggtt	840
tgtacaagc aatcgaaggt tctggaatgg cgggaaaggg tttagtacca catgctatga	900
tgccactgt gatctccaga gcaaagttcg ttcatcgta ctgttactct ctctcttcca	960
aacagaattg tccgaatcgt gtgacaacaa cagcctgttc tcacacactc ttttcttcta	1020
accaaggggg tggtttagtt tagtagaacc tcgtgaaact tacatttaca tatatataaa	1080
cttgcataaa ttggtcaatg caagaaatac atatttggtc ttttctaatt cgtagttttt	1140
caagttctta gatgctttct ttttctcttt ttacagata atcaaggaag taattatcta	1200
ctttttacaa caaatataaa aca	1223
<210> 76	
<211> 1283	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> pCUR15" <223> "pCUR15	
<220>	
<223> pCUR15	
<220>	
<223> pCUR15	
<400> 76	
gtgagtaagg aaagagttag gaactatcgc atacctgcat ttaaagatgc cgatttgggc	60
gcgaatcctt tattttggct tcacctcat actattatca gggccagaaa aaggaagtgt	120
ttccctcctt ctgaattga tgttacctc ataaagcacg tggcctctta tcgagaaaga	180
aattaccgtc gctcgtgatt tgtttgcaaa aagaacaaaa ctgaattcag gatcgtgcca	240
tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gacaattgag gatcgtgcca	300
tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gacaattgag gatcgtgcca	360
tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gacaattgag gatcgtgcca	420
tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gagaattcag gatcgtgcca	480
tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gacaattgag gatcgtgcca	540
tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gacaattgag gatcgtgcca	600

tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gagaattcag gatcgtgcca 660
tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gacaattgag gatcgtgcca 720
tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gacaattgag gatcgtgcca 780
tatttgctca ttttaccgtc gtcttgagca aatatcccat gagaattctt cctgtcttcc 840
tattgattgc agcttccaat ttcgtcacac aacaagggtcc tagcgacggc tcacaggttt 900
tgtaacaagc aatcgaaggt tctggaatgg cgggaaaggg tttagtacca catgctatga 960
tgcccactgt gatctccaga gcaaagtctg ttcgatcgta ctgttactct ctctctttca 1020

aacagaattg tccgaatcgt gtgacaacaa cagcctgttc tcacacactc ttttcttcta 1080
accaaggggg tggttttagtt tagtagaacc tcgtgaaact tacatttaca tatatataaa 1140
cttgcataaa ttggatcaatg caagaataac atatttggtc ttttctaatt cgtagttttt 1200
caagtcttta gatgctttct ttttctcttt ttacagatc atcaaggaag taattatcta 1260
ctttttacaa caaatataaa aca 1283

<210> 77

<211> 686

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pCUR16" <223> "pCUR16

<220>

<223> pCUR16

<220>

<223> pCUR16

<400> 77

gctcagcatc tgcttcttcc caaagatgaa cgcggcggtta tgtcactaac gacgtgcacc 60
aacttgccggg aattctcatg ggatatttgc tcaagacgac ggtaaaatga gcaaatatgg 120
cacgacctc aattgtcatg ggatatttgc tcaagacgac ggtaaaatga gcaaatatgg 180
cacgacctc aatgtcatgg gatatttgc caagacgacg gtaaaatgag caaatatggc 240
acgatcctga attccaccgc acgccttttt tctgaagccc actttcgtgg actttgccat 300
atatgcaaaa ttcatgaagt gtgatccaa gtcagcatac acctcactag ggtagtttct 360
ttggttgat tgatcatttg gttcatcgtg gttcattaat ttttttctc cattgcttcc 420

tggtttgat ctactatca tttggatttt tgcgaaggt tgtagaattg tatgtgacaa 480
gtggcaccaa gcatatataa aaaaaaaaag cattatcttc ctaccagagt tgattgttaa 540

aaacgtatatt atagcaaacg caattgtaat taattcttat tttgtatctt ttcttccctt 600
gtctcaatct tttattttta ttttattttt cttttcttag tttctttcat aacaccaagc 660
aactaatact ataacatata ataata 686

<210> 78

<211> 747

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pCUR17" <223> "pCUR17

<220>

<223> pCUR17

<220>

<223> pCUR17

<400> 78

gtcagcatc tgcttcttcc caaagatgaa cgcgcggtta tgtcactaac gacgtgcacc 60
aacttgccgg aattctcatg ggatatttgc tcaagacgac ggtaaaatga gcaaataatgg 120
cacgacctc aattgtcatg ggatatttgc tcaagacgac ggtaaaatga gcaaataatgg 180
cacgacctc aattctcatg ggatatttgc tcaagacgac ggtaaaatga gcaaataatgg 240
cacgacctc aattctcatg ggatatttgc tcaagacgac ggtaaaatga gcaaataatgg 300
cacgacctg aattccaccg cagcctttt ttctgaagcc cactttcgtg gactttgcca 360
tatatgcaa attcatgaag tgtgatacca agtcagcata cacctcacta gggtagtttc 420

tttggttgta ttgatcttt ggttcacgt ggttcattaa ttttttttct ccattgcttt 480
ctggctttga tcttactatc atttgatttt ttgtcgaagg ttgtagaatt gtatgtgaca 540
agtggacca agcatatata aaaaaaaaaa gcattatctt cctaccagag ttgattgtta 600
aaaacgtatt tatagcaaac gcaattgtta ttaattctta tttgtatct ttcttccct 660
tgtctcaatc tttattttt attttatttt tcttttctta gtttctttca taacaccaag 720
caactaatac tataacatac aataata 747

<210> 79

<211> 500

<212> DNA

<213> Saccharomyces cerevisiae

<220>

<223> pLYS1" <223> "pLYS1

<220>

<223> pLYS1

<220>

<223> pLYS1

<400> 79

gcaagttaac attagggaga acgtggggcc ttcctccatg agtgcagagc aattgaagat	60
gttttagagg ttaaaggaga ataaccagtt gctggatagc tctgtgccag ctacagttaa	120
tgccaaattg gcccttcatg gtattcctga cgggtgtaat ggacagtact tgagctataa	180
tgacctgcc ttggcggact ttatgccttg aggatagcag gtacataaa attgttacat	240
actaagtcca tgagtcaaaa aagactctta tacatttata cttttgcat tattattttt	300
ttttccagc ggaatttga attccgctct caaccgcaa aattccctg cgatttcagc	360

gacaaagagt cataaagtca tcctcgagaa accacgatga aatatataaa aagcccatct	420
tcctgacgg aaactggat tttaggagc ataccataag ataacaacga aaacgttta	480
ttttcacac aaccgcaaaa	500

<210> 80

<211> 650

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pLYS4" <223> "pLYS4

<220>

<223> pLYS4

<220>

<223> pLYS4

<400> 80

ttgaaaaatg cgaagttgaa gtgccataga agagaaacag cccacacagg ggagaagccc	60
actggaaagg gggcactgac caactttaaa taggaaacag aagataccac aagccagcga	120
tacaacagca ccaaaccg aaaagaatag ccaaagctgt cctctggtgt tggaaaaact	180
ggaaaaaacg caactgcgtt ggctgctacg gtgaaaaatt ttcctatgac ttttttact	240
gcttgttctg gcgaaattac cgcaaacccg gtaaaatgta cacgtatcaa gtgataaaca	300
atttctgtgc aagttagcag aatggagcga ttggaaaaa aaaaattttt attgtttttt	360
ccccgggat ttgtctgag atgactgaaa tttgtaatc gatgagtcta taccagaggc	420

agcaaatatc accaacatac acaggtatac acaatctcat gtccacacac acgtacagac 480

acgcacatat atatatatat atatatatcc ccataggtat ttatatatac aaaagaatcc 540

tcgtgtgttt gtgtgtgcaa tagctagttt tgcgctgcct cttatagtag acaatatcac 600

tttttcaata aaatagaact tgcaaggaaa caaaattgta tcgcttcaag 650

<210> 81

<211> 500

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pLYS9" <223> "pLYS9

<220>

<223> pLYS9

<220>

<223> pLYS9

<400> 81

acatatgcaa gagtcttatg tategtatct aagtgccacg taggggattc ccatcatttg 60

atgatttcca aatataatac ctgtagagag cggtaggagca aaagtcaaatt ttaaatcgca 120

actgcagaca agtcaagctg aggaaattgt ggatgatctc ttgtttcttt tgatattcac 180

cacaacagaa gtgaagagtg tgattgcggt tactactgac cacgaagcaa tgcgtttagt 240

agtgaagaaga attactcata ctctggaatc gaaattccgt tggaaaaatt cgctttgtag 300

tgaaaaataa agatgtcaat aaagggtatt gagaatttcc aatggaatta tcagcaatag 360

atgatagaaa gtagcacaga atttggttta atggtatata aaccgtaggg tccttggtaaa 420

attacatggg aaggatcctt aggcagtagg gaaaacttat caggacaatt gagttatatt 480

aacgtattat atattttaat 500

<210> 82

<211> 494

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pLYR1p" <223> "pLYR1p

<220>

<223> pLYR1p

<220>

<223> pLYR1p

<400> 82

ttatatgaa ttttcaaaaa ttcttacttt ttttttggat ggacgcaaag aagtttaata	60
atcatattac atggcattac caccatatac atatccatat ctaatcttac ttatatgttg	120
tggaaatgta aagagcccgga attcttcata ctctggaate gaaattccgt tggaaaaatt	180
cgctttgtag tgaaaaataa agatgtcaat aaagggtatt gagaatttcc aatggaatta	240
tcagcaatag atgatagaaa gaattcggat gataatgcga ttagtttttt agccttattt	300
ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt ttgatctat taacagatat ataaatggaa	360
aagctgcata accactttaa ctaatacttt caacattttc agtttgtatt acttcttatt	420
caaagtgcac aaaagtatca acaaaaaatt gttaatatatac ctctatactt taacgtcaag	480
gagaaaaaac tata	494

<210> 83

<211> 494

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pLYR2p" <223> "pLYR2p

<220>

<223> pLYR2p

<220>

<223> pLYR2p

<400> 83

ttatatgaa ttttcaaaaa ttcttacttt ttttttggat ggacgcaaag aagtttaata	60
atcatattac atggcattac caccatatac atatccatat ctaatcttac ttatatgttg	120
tggaaatgta aagagcccgga attcttttcta tcactctattg ctgataattc cattggaaat	180
tctcaatacc ctttattgac atctttattt ttactacaa agcgaatttt tccaacggaa	240
tttcgattcc agagtatgag gaattcggat gataatgcga ttagtttttt agccttattt	300
ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt ttgatctat taacagatat ataaatggaa	360
aagctgcata accactttaa ctaatacttt caacattttc agtttgtatt acttcttatt	420
caaagtgcac aaaagtatca acaaaaaatt gttaatatatac ctctatactt taacgtcaag	480
gagaaaaaac tata	494

<210> 84

<211> 616

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pLYR3p" <223> "pLYR3p

<220>

<223> pLYR3p

<220>

<223> pLYR3p

<400> 84

ttatatggaa ttttcaaaaa ttcttacttt ttttttggat ggacgcaaag aagtttaata	60
atcatattac atggcattac caccatatac atatccatat ctaatcttac ttatatgttg	120
tggaaatgta aagagcccgga attcctcata ctctggaatc gaaattccgt tggaaaaatt	180
cgctttgtag tgaaaaataa agatgtcaat aaagggtatt gagaatttcc aatggaatta	240
tcagcaatag atgatatgaaa gaattcctca tactctggaa tcgaaattcc gttggaaaaa	300

ttcgctttgt agtgaataat aaagatgtca ataaagggtg ttgagaattt ccaatggaat	360
tatcagcaat agatgataga aagaattcgg atgataatgc gattagtttt ttagccttat	420
ttctggggta attaatcagc gaagcgatga tttttgatct attaacagat atataaatgg	480
aaaagctgca taaccacttt aactaatact ttcaacattt tcagtttgta ttacttctta	540
ttcaaatgtc ataaaaglat caacaaaaaa ttgttaatat acctctatac tttaacgtca	600
aggagaaaaa actata	616

<210> 85

<211> 616

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pLYR4p" <223> "pLYR4p

<220>

<223> pLYR4p

<220>

<223> pLYR4p

<400> 85

ttatatggaa ttttcaaaaa ttcttacttt ttttttggat ggacgcaaag aagtttaata 60
atcatattac atggcattac caccatatac atatccatat ctaatcttac ttatatgttg 120
tggaaatgta aagagcccgga attcttttcta tcatctattg ctgataatc cattggaaat 180
tctcaatacc ctttattgac atctttatctt ttactacaa agcgaatctt tccaacggaa 240
tttcgattcc agagtatgag gaattctttc tatcatctat tgctgataat tccattggaa 300
attctcaata ccccttatig acatctttat ttttactac aaagcgaatt tttccaacgg 360

aatttcgatt ccagagtatg aggaattcgg atgataatgc gattagtttt ttagccttat 420
ttctggggta attaatacgc gaagcgatga tttttgatct attaacagat atataaatgg 480
aaaagctgca taaccacttt aactaatact ttcaacattt tcagtttgta ttacttctta 540
ttcaaatgtc ataaaagtat caacaaaaaa ttgttaatat acctctatac tttaacgtca 600
aggagaaaaa actata 616

<210> 86

<211> 738

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pLYR5p" <223> "pLYR5p

<220>

<223> pLYR5p

<220>

<223> pLYR5p

<400> 86

ttatatggaa ttttcaaaaa ttcttacttt ttttttggat ggacgcaaag aagtttaata 60
atcatattac atggcattac caccatatac atatccatat ctaatcttac ttatatgttg 120
tggaaatgta aagagcccgga attcttttcta tcatctattg ctgataatc cattggaaat 180
tctcaatacc ctttattgac atctttatctt ttactacaa agcgaatctt tccaacggaa 240
tttcgattcc agagtatgag gaattctttc tatcatctat tgctgataat tccattggaa 300
attctcaata ccccttatig acatctttat ttttactac aaagcgaatt tttccaacgg 360
aatttcgatt ccagagtatg aggaattcctt tctatcatct attgctgata attcattgg 420

aaattctcaa taccctttat tgacatcttt atttttcact acaaagcgaa tttttccaac 480
ggaatttcga ttccagagta tgaggaattc ggatgataat gcgattagtt ttttagcctt 540
atttctgggg taattaatca gcgaagcgat gatttttgat ctattaacag atataataat 600

ggaaaagctg cataaccact ttaactaata ctttcaacat tttcagtttg tattacttct 660
tattcaaatg tcataaaaagt atcaacaaaa aattgttaat atacctctat actttaacgt 720
caaggagaaa aaactata 738

<210> 87

<211> 1104

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pLYR6p" <223> "pLYR6p

<220>

<223> pLYR6p

<220>

<223> pLYR6p

<400> 87

ttatatgaa ttttcaaaaa ttcttacttt ttttttggat ggacgcaaag aagtttaata 60
atcatattac atggcattac caccatatac atatccatat ctaatcttac ttatatgttg 120
tggaatgta aagagcccgga attgctcata ctctggaatc gaaattccgt tggaaaaatt 180
cgctttgtag tgaaaaataa agatgtcaat aaagggtatt gagaatttcc aatggaatta 240
tcagcaatag atgatagaaa gaattcctca tactctggaa tcgaaattcc gttggaaaaa 300
ttcgctttgt agtgaaaaat aaagatgtca ataaagggtta ttgagaattt ccaatggaat 360

tatcagcaat agatgataga aagaattcct catactctgg aatcgaaatt ccgttggaaa 420
aattcgcttt gtagtgaaaa ataaagatgt caataaaggg tattgagaat ttccaatgga 480
attatcagca atagatgata gaaacaattg ctcatactct ggaatcgaaa ttccgttggaa 540
aaaattcgct ttgtagttaa aaataaagat gtcaataaag ggtattgaga atttccaatg 600
gaattatcag caatagatga tagaaagaat tcctcact ctggaatcga aattccgttg 660
gaaaaattcg cttttagtg taaaaataaag atgtcaataa agggtattga gaatttccaa 720
tggaattatc agcaatagat gatagaaaga attcctcata ctctggaatc gaaattccgt 780

tggaaaaatt cgctttgtag tgaaaaataa agatgtcaat aaagggtatt gagaatttcc 840
aatggaatta tcagcaatag atgatagaaa caattcggat gataatgcga ttagtttttt 900
agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt tttgatctat taacagatat 960
ataaatggaa aagctgcata accacttta ctaatacttt caacattttc agtttgtatt 1020
acttcttatt caaatgtcat aaaagtatca acaaaaaatt gttaatatat ctctatactt 1080

taacgtcaag gagaaaaaac tata 1104

<210> 88

<211> 1836

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pLYR7p" <223> "pLYR7p

<220>

<223> pLYR7p

<220>

<223> pLYR7p

<400> 88

ttatatggaa ttttcaaaaa ttcttacttt ttttttggat ggacgcaaag aagtttaata 60

atcatattac atggcattac caccatatac atatccatat ctaatcttac ttatatgttg 120

tggaaatgta aagagcccgga attgtttctta tcatctattg ctgataattc cattggaaat 180

tctcaatacc ctttattgac atctttatctt ttactacaa agcgaatttt tccaacggaa 240

tttcgattcc agagtatgag gaattctttc tatcatctat tgctgataat tccattggaa 300

atttcaata ccctttattg acatctttat ttttactac aaagcgaatt tttccaacgg 360

aatttcgatt ccagagtatg aggaattctt tctatcatct attgctgata attccattgg 420

aaattctcaa taccctttat tgacatcttt atttttcact acaaagcgaa tttttccaac 480

ggaatttcga ttccagagta tgagcaattg tttctatcat ctattgctga taattccatt 540

ggaaattctc aatacccttt attgacatct ttatttttca ctacaaagcg aatttttcca 600

acggaatttc gattccagag tatgaggaat tctttctatc atctattgct gataattcca 660

ttggaaattc tcaataacct ttattgacat ctttattttt cactacaaag cgaatttttc 720

caacggaatt tcgattccag agtatgagga attctttcta tcatctattg ctgataattc 780

cattggaaat tctcaatacc ctttattgac atctttatctt ttactacaa agcgaatttt 840

tccaacggaa tttcgattcc agagtatgag caattgtttc tatcatctat tgctgataat 900

tccattggaa atttcaata ccctttattg acatctttat ttttactac aaagcgaatt 960

tttccaacgg aatttcgatt ccagagtatg aggaattctt tctatcatct attgctgata 1020

attccattgg aaattctcaa taccctttat tgacatcttt atttttcact acaaagcgaa 1080

tttttccaac ggaatttcga ttccagagta tgaggaattc tttctatcat ctattgctga 1140

taattccatt ggaaattctc aatacccttt attgacatct ttatittttca ctacaaagcg	1200
aattttttcca acggaatttc gattccagag tatgagcaat tgtttctatc atctattgct	1260
gataattcca ttggaaattc tcaataacct ttattgacat ctttattttt cactacaaag	1320
cgaatttttc caacggaatt tgcattccag agtatgagga attctttcta tcatctattg	1380
ctgataattc cattggaaat tctcaatacc ctttattgac atctttattt ttcactacaa	1440
agcgaatttt tccaacggaa ttctgattcc agagtatgag gaattctttc tatcatctat	1500
tgctgataat tcattggaa attctcaata ccttttattg acatctttat ttttactac	1560
aaagcgaatt ttccaacgg aatttcgatt ccagagtatg agcaattcgg atgataatgc	1620
gattagtttt ttagcccttat ttctggggta attaatcagc gaagcgatga tttttgatct	1680
attaacagat atataaatgg aaaagctgca taaccacttt aactaatact ttcaacattt	1740
tcagtttgta ttacttctta ttcaaatgtc ataaaagtat caacaaaaaa ttgttaatat	1800
acctctatac tttaacgtca aggagaaaaa actata	1836
<210> 89	
<211> 981	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> pLYR8" <223> "pLYR8	
<220>	
<223> pLYR8	
<220>	
<223> pLYR8	
<400> 89	
ttacattatc aatccttgcg ttccagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt	60
tcggtcatct tctaacaccg tatatgataa tatactagta acgtaaatac tagtttagtag	120
atgatagttg atttttattc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt	180
aaagatattt aatgctataa tagacattta aatccaattc ttccaacata caatgggagt	240
ttggccgagt ggtttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat	300
cttcggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgaat	360
tgctcatact ctggaatcga aattccgttg gaaaaattcg ctttgtagtg aaaaataaag	420
atgtcaataa aggggtattga gaatttccaa tggaattatc agcaatagat gatagaaaga	480

attcctcata ctctggaatc gaaattccgt tggaaaaatt cgctttgtag tgaaaaataa 540
 agatgtcaat aaaggttatt gagaatttcc aatggaatta tcagcaatag atgataaaaa 600
 gaattcctca tactctggaa tcgaaattcc gttggaaaaa ttcgctttgt agtgaaaaat 660
 aaagatgtca ataaagggtta ttgagaattt ccaatggaat tatcagcaat agatgataga 720
 aacaattcta attaagttag tcaaggcgcc atcctcatga aaactgtgta acataataac 780
 cgaagtgtcg aaaagggtgc accttggtcca attgaacacg ctcgatgaaa aaaataagat 840
 atatataagg ttaagtaaag cgctctgttag aaaggaagtt tttccttttt ctgtctctct 900

tgtcttttca tctactattt ctttcgtgta atacagggtc gtcagataca tagatacaat 960
 tctattacce ccatccatac a 981

<210> 90

<211> 981

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pLYR9" <223> "pLYR9

<220>

<223> pLYR9

<220>

<223> pLYR9

<400> 90

ttacattatc aatccttgcg ttccagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt 60
 tgcgtcatct tctaacaccg tataatgataa tataactagta acgtaaatac tagtttagtag 120
 atgatagttg atttttatcc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt 180

aaagatattt aatgctataa tagacattta aatccaattc ttccaacata caatgggagt 240
 ttggccgagt ggtttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat 300
 ctccggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgaat 360
 tgtttctatc atctattgct gataattcca ttggaaattc tcaataccct ttattgacat 420
 cttttttttt cactacaaaag cgaatttttc caacggaatt tcgattccag agtatgagga 480
 attctttcta tcatctattg ctgataattc catttgaaat tctcaatacc ctttattgac 540
 atcttttatt ttactacaa agcgaatttt tccaacggaa tttcgattcc agagtatgag 600

gaattctttc tatcatctat tgctgataat tccattggaa atttctcaata ccctttattg 660
 acatctttat ttttactac aaagcgaatt tttccaacgg aatttcgatt ccagagtatg 720

agcaattcta attaagtttag tcaaggcgcc atcctcatga aaactgtgta acataataac 780
cgaagtgtcg aaaagggtggc accttgtcca attgaacacg ctcgatgaaa aaaataagat 840
atatataagg ttaagtaaag cgtctgttag aaaggaagtt tttccttttt ctgtctctct 900
tgtcttttca tctactatit ccttcgtgta atacagggtc gtcagataca tagatacaat 960
tctattaccc ccatccatac a 981

<210> 91

<211> 1225

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> pLYR10" <223> "pLYR10

<220>

<223> pLYR10

<220>

<223> pLYR10

<400> 91

ttacattatc aatccttgcg tttcagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt 60
tgcgtcatct tctaacaccg tataatgataa tataactagta acgtaaatag tagtttagtag 120
atgatagttg atttttattc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtatit 180
aaagatatit aatgctataa tagacattta aatccaattc tccaacata caatgggagt 240
ttggccgagt ggitttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat 300

cttcggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgaat 360
tgtttctatc atctattgct gataattcca ttggaaattc tcaataccct ttattgacat 420
ctttattttt cactacaag cgaatttttc caacggaatt tcgattccag agtatgagga 480
attctttcta tcatctatig ctgataattc catiggaat tctcaatacc ctttattgac 540
atctttatit ttactacaa agcgaatttt tccaacggaa tttcgattcc agagtatgag 600
gaattctttc tatcatctat tgctgataat tccattggaa attctcaata ccctttattg 660
acatctttat ttttactac aaagcgaatt tttccaacgg aatttcgatt ccagagtatg 720

aggaattctt tctatcatct attgctgata attccattgg aaattctcaa taccctttat 780
tgacatcttt atttttcact acaaagcgaa tttttccaac ggaatttcga ttccagagta 840
tgaggaattc tttctatcat ctattgctga taattccatt ggaaattctc aatacccttt 900
attgacatct ttatttttca ctacaaagcg aatttttcca acggaatttc gattccagag 960

tatgagcaat tctaattaag ttagtcaagg cgccatcctc atgaaaactg tgtaacataa	1020
taaccgaagt gtcgaaaagg tggcaccttg tccaattgaa cacgctcgat gaaaaaata	1080
agatatatat aaggtttaagt aaagcgtctg ttagaaagga agtttttcct ttttcttgct	1140
ctcttgctctt ttcacttact atttccttcg tgtaatacag ggctcgtcaga tacatagata	1200
caattctatt acccccatcc ataca	1225
<210> 92	
<211> 1347	
<212> DNA	
<213> Artificial Sequence	
<220>	
<223> pLYR11" <223> "pLYR11	
<220>	
<223> pLYR11	
<220>	
<223> pLYR11	
<400> 92	
ttacattatc aatccttgcg ttfcagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt	60
tgcgtcatct tctaaccaccg tataatgataa tatactagta acgtaaatag tagttagtag	120
atgatagttg atttttattc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt	180
aaagatatatt aatgctataa tagacattta aatccaattc ttccaacata caatgggagt	240
ttggccgagt gggttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat	300
cttcggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgaat	360
tgctcatact ctggaatcga aattccgttg gaaaaattcg ctttgtagtg aaaaataaag	420
atgtcaataa aggttatgga gaatttcctc tggaattatc agcaatagat gatagaaaga	480
attcctcata ctctggaatc gaaattccgt tggaataatt cgctttgtag tgaaaaataa	540
agatgtcaat aaagggtatt gagaatttcc aatggaatta tcagcaatag atgatagaaa	600
gaattcctca tactctggaa tcgaaattcc gttggaaaaa ttcgctttgt agtgaaaaat	660
aaagatgtca ataaagggtg ttgagaattt ccaatggaat tatcagcaat agatgataga	720
aagaattcct cactactctgg aatcgaaatt ccgttggaat aattcgcttt gtagtgaaaa	780
ataaagatgt caataaaggg tattgagaat ttccaatgga attatcagca atagatgata	840
gaaagaattc ctcatactct ggaatcgaaa ttccgttgga aaaattcgct ttgtagtgaa	900
aaataaagat gtcaataaag ggtattgaga atttccaatg gaattatcag caatagatga	960

tagaaagaat tcctcatact ctggaatcga aattccgttg gaaaaattcg cttttagtg 1020

aaaaataaag atgtcaataa agggtattga gaatttccaa tggaattatc agcaatagat 1080

gatagaaaca attctaatta agttagtcaa ggcgccatcc tcatgaaaac tgtgtaacat 1140

aataaccgaa gtgtcgaaaa ggtggcacct tgtccaattg aacacgctcg atgaaaaaaa 1200

taagatatat ataaggttaa gtaaagcgtc tgtagaaag gaagtttttc ctttttcttg 1260

ctctcttgtc ttttcatcta ctatttcctt cgtgtaatac agggtcgtca gatacataga 1320

tacaattcta ttaccccat ccataca 1347

<210> 93

<211> 686

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pMET17" <223> "pMET17

<220>

<223> pMET17

<220>

<223> pMET17

<400> 93

ttacattatc aatccttgcg tticagcttc cactaattta gatgactatt tctcatcatt 60

tgcgtcatct tctaaccacg tataatgataa tatactagta acgtaaatac tagttagtag 120

atgatagttg atttttatcc caacactaag aaataatttc gccatttctt gaatgtattt 180

aaagatatat aatgctataa tagacattta aatccaattc ttccaacata caatgggagt 240

ttggccgagt ggtttaaggc gtcagattta ggtggattta acctctaaaa tctctgatat 300

cttcggatgc aagggttcga atcccttagc tctcattatt ttttgctttt tctcttgagg 360

tcacatgac gcaaaatggc aaatggcacg tgaagctgac gatattgggg aactgtggtg 420

gttggcaaat gactaattaa gttagtcaag gcgccatcct catgaaaact gtgtaacata 480

ataaccgaag tgtcgaaaaa gtggcacctt gtccaattga acacgctcga tgaaaaaaat 540

aagatatata taaggtttaag taaagcgtct gtagaaagg aagtttttcc tttttcttgc 600

tctcttgctt tttcatctac tatttccttc gtgtaataca gggtcgtcag atacatagat 660

acaattctat taccccatc cataca 686

<210> 94

<211> 510

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pMET6" <223> "pMET6

<220>

<223> pMET6

<220>

<223> pMET6

<400> 94

ccacaggaatg ttttcacgt gacttacaaa cagagtcgta cgtcaggacc ggagtcaggt	60
gaaaaaatgt gggccggtaa agggaaaaaa ccagaaacgg gactactatc gaactcgttt	120
agtcgcgaac gtgcaaaagg ccaatatattt tcgctagagt catcgcagtc atggcagctc	180
tttcgctcta tctcccggtc gcaaaactgt ggtagtcata gctcgttctg ctcaattgag	240
aactgtgaat gtgaatatgg aacaaatgag atagatgcac taatttaagg gaagctagct	300
agttttccca actgcgaaag aaaaaaagga aagaaaaaaa aattctatat aagtgataga	360

tatttccatc ttactagca ttagtttctc ttttacgtat tcaatatattt tgtaaactc	420
ttcctttatc ataaaaaagc aagcatctaa gagcattgac aacactctaa gaaacaaaat	480
accaatataa ttcaaaagta catatcaaaa	510

<210> 95

<211> 508

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pMET14" <223> "pMET14

<220>

<223> pMET14

<220>

<223> pMET14

<400> 95

cctatgcatg tttagagcaa ggcctttgt gagccctccc ggttacgacg ccttggaat	60
gtagcagata actctgcaat tctagaatca ttccactacg acatttggt catcaccagc	120
tcgcgagaaa tgtaaataag ccaacaacca agaatgcgta acattaaaga atacagttgc	180

tttcatttcg gcgtgatggc acggcaccca cggttcctta cattattctc gaaaaatagc 240
 tgcacgcttt tccaggaata aaagaccgtg ccactaattt cagtgatca atatatttac 300
 aagccacctc aaaaaatgtg gcaatggaga agaggatgaa cgactcaata tgacttcaac 360
 ttcatagaatt tgcacaaata tctatataag atgcaaaatt tctatacaac atcagttgcg 420
 tatccgttaa tgcgtttcat tttctctctt tgttcgaact tgacatcaag aaaagttgga 480
 attatttctc caagcacact gtacacca 508

<210> 96

<211> 552

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pMET3" <223> "pMET3

<220>

<223> pMET3

<220>

<223> pMET3

<400> 96

aacgatatgt acgtagtggc ataaggtag ggggtccaca gatataacat cgtttaattt 60
 agtactaaca gagacttttg tcacaactac atataagtgt acaaatatag tacagatatg 120
 acacacttgt agcgccaacg cgcacccctac ggattgctga cagaaaaaaaa ggtcacgtga 180
 ccagaaaagt cagtgtaat ttgtgaactc accgcattct agcggtcctt gtcgtgcaca 240
 ctgcactcaa caccataaac cttagcaacc tccaaaggaa atcacctgat acaaagcca 300

cagttttaca acttagtctc ttatgaagtt acttaccaat gagaaataga ggctctttct 360
 cgacaaatat gaatatggat atatatatat atatatatat atatatatgt 420
 aaacttgggt cttttttagc ttgtgatctc tagcttgggt ctctctctgt cgtaacagtt 480
 gtgatatcgt ttcttaacaa ttgaaaagga actaagaaag tataataata acaagaataa 540
 agtataatta ac 552

<210> 97

<211> 363

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pSAM1" <223> "pSAM1

<220>

<223> pSAM1

<220>

<223> pSAM1

<400> 97

gaaacggacg taagacggaa atagaatttg aagataaagt tatatatcac tacacacgaa	60
tactttcttt ttttttttc acaggaaaac tgggtggcg ccctgccta ctagtgcatt	120
tcttttttcg ggttcttgtc tcgacgaaat tttagcctca tcgtagtttt tcactctggt	180
atcgatgaaa aagggaagag taaaaagttt tccgtttagt acttaatggg attggtttgg	240
gacgtatata tcgactgggtg ttgtctgtta ttcacgttg ttttcggtt agcttcgaaa	300
aaaaaataga gtaaaaacca ggaatttacc ctaaaaacaa gaaaaataa gataaacgaa	360
aat	363

<210> 98

<211> 500

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pSAM2" <223> "pSAM2

<220>

<223> pSAM2

<220>

<223> pSAM2

<400> 98

gagctttgct ctattatata agataaaata tgcactaaaa gtttgcattt ctttacataa	60
ctaaaactaa gacattatgc atagcttacc tgatcaaaaa gtatgtaaac ttgttaacat	120
cttcacatgt gattcatctg gtcgtacttt cttgcggtgc agtgtaatat ttctaccac	180
gtgactataa ttgagcttga aaactgtggc gtttttccac cgatgggtcc acgccagata	240
ttaaccgaag ccaaaatacc gatgaaattt ctgagatagc tcttgtaaac gacgtcaaat	300
cttcatatgc aaggagatct tgatttcttt ttggtagtca tctgtcgtct tgaggcgtat	360
aagaaggagg ttatatctgt cttttctaca aagtattttc gagaatcttg cttctgcccc	420
ttttttcttt ttttaaagg tttaaaaaac ataactgtct tcaatatac cagtatttac	480
gacaatatac aaacataatc	500

<210> 99

<211> 300

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tTDH2" <223> "tTHD2

<220>

<223> tTDH2

<220>

<223> tTHD2

<400> 99

atttaactcc ttaagttact ttaatgattt agtttttatt attaataatt catgctcatg 60

acatctcata tacacgttta taaaacttaa atagattgaa aatgtattaa agattcctca 120

gggattcgat ttttttgaa gtttttggtt ttttttcctt gagatgctgt agtatttggg 180

aacaattata caatcgaaag atatatgctt acattcgacc gtttagccg tgatcattat 240

cctatagtaa cataacctga agcataactg acactactat catcaatact tgtcacatga 300

<210> 100

<211> 300

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tCYC1" <223> "tCYC1

<220>

<223> tCYC1

<220>

<223> tCYC1

<400> 100

acaggccctt tttcctttgt cgatatcatg taattagtta tgtcacgctt acattcacgc 60

cctcctccca catccgctct aaccgaaaag gaaggagtta gacaacctga agtctaggtc 120

cctattttatt ttttttaata gttatgttag tattaagaac gttattttata tttcaaattt 180

ttcttttttt tctgtacaaa cgcgtgtacg catgtaacat tatactgaaa accttgcttg 240

agaaggtttt gggacgctcg aaggctttta ttgcaagct tgcagttta cactctcatc 300

<210> 101

<211> 300

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tTDH3" <223> "tTDH3

<220>

<223> tTDH3

<220>

<223> tTDH3

<400> 101

gtgaatttac tttaaactctt gcatttaaataa aaattttctt tttatagctt tatgacttag 60

tttcaattta tataactattt taatgacatt ttcgattcat tgattgaaag ctttggttt 120

tttcttgatg cgctattgca ttgttcttgt ctttttcgcc acatgtaata tctgtagtag 180

atactgata cattgtggat gctgagtga attttagtta ataattggagg cgctcttaata 240

aaatttgggg atattggctt ttttttttaa agtttcaaaa tgaatttttt cgcgcaggat 300

<210> 102

<211> 354

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tADH1" <223> "tADH1

<220>

<223> tADH1

<220>

<223> tADH1

<400> 102

actagttcta gagcgccgc caccgcggtg ggccaatttc ttatgattta tgattttat 60

tattaaataa gttataaaaa aaataagtgt atacaaattt taaagtgact cttaggtttt 120

aaaacgaaaa ttcttattct tgagttaactc ttctctgtag gtcagggtgc tttctcaggt 180

atagcatgag gtcgctctta ttgaccacac ctctaccggc atgccgagca aatgcctgca 240

aatcgtccc catttaccac aattgtagat atgctaactc cagcaatgag ttgatgaatc 300

tcggtgtgta ttttatgtcc tcagaggaca acacctgttg taatcgttct tcca 354

<210> 103

<211> 301

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tADH2" <223> "tADH2

<220>

<223> tADH2

<220>

>

<223> tADH2

<400> 103

gcggatctct tatgtcttta cgatttatag ttttcattat caagtatgcc tatattagta	60
tatagcatct ttagatgaca gtgttcgaag tttcacgaat aaaagataat attctacttt	120
ttgctccac cgcgtttgct agcacgagtg aacaccatcc ctgcctgtg agttgtaccc	180
attcctctaa actgtagaca tggtagcttc agcagtgttc gttatgtacg gcatcctcca	240
aaaacagtc ggttatagtt tgtcctgctc ctctgaatcg tctccctcga tttttctcat	300
t	301

<210> 104

<211> 299

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tTPI1" <223> "tTPI1

<220>

<223> tTPI1

<220>

<223> tTPI1

<400> 104

gattaatata attatataaa aatattatct tcttttcttt atatctagtg ttatgtaaaa	60
taaatlgatg actacggaaa gcttttttat attgtttctt tttcattctg agccacttaa	120
atttcgtgaa tgttcttgta agggacggta gatttacaag tgatacaaca aaaagcaagg	180
cgctttttct aataaaaaaga agaaaagcat ttaacaattg aacacctcta tatcaacgaa	240
gaatattact ttgtctctaa atccttgtaa aatgtgtacg atctctatat gggttactc	299

<210> 105

<211> 299

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tMET17" <223> "tMET17

<220>

<223> tMET17

<220>

<223> tMET17

<400> 105

gtgtgcgtaa tgagttgtaa aattatgtat aaacctactt tctctcacia gtactatact	60
tttataaaac gaactttatt gaaatgaata tccttttttt cccttggtac atgtcgtgac	120
tcgtactttg aacctaaatt gttctaacat caaagaacag tgtaattcg cagtcgagaa	180
gaaaaatatg gtgaacaaga ctcatctact tcatgagact actttacgcc tcctataaag	240
ctgtcacact ggataaattt attgtaggac caagttacaa aagaggatga tggaggttt	299

<210> 106

<211> 305

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tENO2" <223> "tENO2

<220>

<223> tENO2

<220>

<223> tENO2

<400> 106

ggatcctaaa gtgcttttaa ctaagaatta ttagtctttt ctgcttattt ttatcatata	60
gtttagaaca ctttatatta acgaatagtt tatgaatcta tttagggtta aaaattgata	120
cagttttata agttactttt tcaaagactc gtgctgtcta ttgcataatg cactggaagg	180
ggaaaaaaaa ggtgcacacg cgtggctttt tcttgaattt gcagtttgaa aaataactac	240
atggatgata agaaaacatg gactacagtc actttgagaa ccttcaatca gctggtaacg	300

tcttc 305

<210> 107

<211> 300

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tMET3" <223> "tMET3

<220>

<223> tMET3

<220>

<223> tMET3

<400> 107

tcgtcataaa atgctcccat ctcaaaagta gggcaaaatt catgatcgac cgcgcaaaat 60

aaatagatatt gcaataaagt ttgtatgta catttattaa tatatataat atatcaaaag 120

aaaaaaaaatca aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa ttgcactctt attcagtcac caattacaaa 180

acctagagat agcgatgggtg catattcaat aaaaaactcc ttatactgtc gagaaagctt 240

attattggta cttctcgaag atactaaaaa aggttaattt ttggagacgg aggcaatagc 300

<210> 108

<211> 301

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tPGK1" <223> "tPGK1

<220>

<223> tPGK1

<220>

<223> tPGK1

<400> 108

attgaattga attgaaatcg atagatcaat ttttttcttt tctctttccc catcctttac 60

gctaaaaata tagtttattt tattttttga atatttttta tttatatacg tatatataga 120

ctattattta tcttttaatg attattaaga tttttattaa aaaaaaatc gctcctcttt 180

taatgccttt atgcagtttt tttttcccat tcgatatttc tatgttcggg ttcagcgtat 240

tttaagttaa ataactcgaa aattctgcgt tcgttaaagc tttcgagaag gatattattt 300

a 301

<210> 109

<211> 300

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tDIT1" <223> "tDIT1

<220>

<223> tDIT1

<220>

<223> tDIT1

<400> 109

taaagtaaga gcgctacatt ggtctacatt ttgtttcttt tacttaaca ttagttagtt	60
cgttttcttt ttctcatttt tttatgtttc ccccccaaag ttctgatttt ataatatatt	120
atttcacaca attccattta acagaggggg aatagattct ttagcttaga aaattagtag	180
tcaatatata ttgcctttc ttttcatttt ttcatgtata ttaattggttt cgagacactg	240
caatggccct agttgtctaa gaggatagat gttactgtca aagatgatat ttigaatttc	300

<210> 110

<211> 300

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tRPL3" <223> "tRPL3

<220>

<223> tRPL3

<220>

<223> tRPL3

<400> 110

gaagttttgt tagaaaataa atcatttttt aattgagcat tcttattcct attttattta	60
aatagtttta tgtattgta gctacataca acagtttaaa tcaaattttc tttttccaa	120
gtccaaaatg gaggtttatt ttgatgacc gcatgagatt atgttttgaa agtataagac	180
tacatacatg tacatatatt taaacatgta aaccggtcca ttatattgct tactttcttc	240
ttttttgccg ttttgacttg gacctctggt ttgctatttc cttacaatct ttgctacaat	300

<210> 111

<211> 300

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tRPL41B" <223> "tRPL41B

<220>

<223> tRPL41B

<220>

<223> tRPL41B

<400> 111

gcggtattgag agcaaatcgt taagttcagg tcaagtaaaa attgatttcg aaaactaatt 60

tctcttatac aatcctttga ttggaccgtc atcctttcga atataagatt ttgttaagaa 120

tattttagac agagatctac tttatatatta atatctagat attacataat ttcctctcta 180

ataaaatatac attaataaaa taaaaatgaa gcgatttgat tttgtgttgt caacttagtt 240

tgccgctatg cctcttgggt aatgctatta ttgaatcgaa gggctttatt atattaccct 300

<210> 112

<211> 300

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tRPL15A" <223> "tRPL15A

<220>

<223> tRPL15A

<220>

<223> tRPL15A

<400> 112

gctggttgat ggaaaatata attttattgg gcaaactttt gtttatctga tgtgttttat 60

actattatct ttttaattaa tgattctata tacaacctg tatatTTTTT cttaaccaa 120

TTTTTTTTT tatagaccta gagctgtact tttattctgc tatcaagcaa acccctaccc 180

cctcttctca atcctccct caggcagaac ttatctacct gtatcaagga gcggacgagg 240

gagtcctaatt tgttctacgt ataccaatgc tagcagctta cataggtggt ggcactacca 300

<210> 113

<211> 300

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> tIDP1" <223> "tIDP1

<220>

<223> tIDP1

<220>

<223> tIDP1

<400> 113

tcgaatttac gtagcccaat ctaccacttt tttttttcat tttttaaaagt gttataactta	60
gttatgctct aggataatga actacttttt tttttttttt tttactgtta tcataaatat	120
atatacctta ttgttgtttg caaccgtcgg ttaattcctt atcaaggttc cccaagttcg	180

gatcattacc atcaatttcc aacattttca tgagttcttc ttcttcatta cegtgtttta	240
gggggctgtt cgcacttcta atagggtat caccaagctg ttctaattcg tccaaaagtt	300

<210> 114

<211> 1089

<212> DNA

<213> *Kluyveromyces lactis*

<220>

<223> Leu2" <223> "Leu2

<220>

<223> Leu2

<220>

<223> Leu2

<400> 114

atgtctaaga atatcgttgt cctaccgggt gatcacgtcg gtaaagaagt tactgacgaa	60
gctattaagg tcttgaatgc cattgctgaa gtccgtccag aaattaagtt caatttccaa	120
catcacttga tcgggggtgc tgccatcgat gccactggca ctcttttacc agatgaagct	180

ctagaagcct ctaagaaagc cgatgctgtc ttactagggt ctgttggtgg tccaaaatgg	240
ggtacgggcg cagtttagacc agaacaaggt ctattgaaga tcagaaagga attgggtcta	300
tacgccaact tgagaccatg taactttgct tctgattctt tactagatct ttctcctttg	360
aagcctgaat atgcaaaggg taccgatttc gtcgtcgtta gagaattggt tgggtgtatc	420

tactttggtg aaagaaaaga agatgaaggt gacggagttg cttgggactc tgagaaatac 480
 agtgttcctg aagttcaaag aattacaaga atggctgctt tcttggcatt gcaacaaaac 540
 ccaccattac caatctgggc tcttgacaag gctaactgac ttgcctcttc cagattgtgg 600

agaaagactg ttgaagaaac catcaagact gagttccac aattaactgt tcagcaccaa 660
 ttgatcgact ctgctgctat gattttggtt aaatcaccaa ctaagctaaa cgggtgttgtt 720
 attaccaaca acatgtttgg tgatattatc tccgatgaag cctctgttat tccaggttct 780
 ttgggtttat taccttctgc atctctagct tcctacctg acactaaca ggcatcgggt 840
 ttgtacgaac catgtcatgg ttctgcccc aatttaccag caaacaaggt taaccaatt 900
 gctaccatct taatctgcgc tatgatgttg aagttatcct tggatttggg tgaagaaggt 960
 agggctcttg aagaagctgt tagaaatgtc ttggatgcag gtgtcagaac cgggtgacctt 1020

ggtgggttcta actctaccac tgaggttggc gatgctatcg ccaaggctgt caaggaaatc 1080
 ttggcttaa 1089

<210> 115

<211> 362

<212> PRT

<213> Kluyveromyces lactis

<220>

<223> Leu2 " <223> Leu2

<220>

<223> Leu2

<220>

<223> Leu2

<400> 115

Met Ser Lys Asn Ile Val Val Leu Pro Gly Asp His Val Gly Lys Glu

1 5 10 15

Val Thr Asp Glu Ala Ile Lys Val Leu Asn Ala Ile Ala Glu Val Arg

20 25 30

Pro Glu Ile Lys Phe Asn Phe Gln His His Leu Ile Gly Gly Ala Ala

35 40 45

Ile Asp Ala Thr Gly Thr Pro Leu Pro Asp Glu Ala Leu Glu Ala Ser

50 55 60

Lys Lys Ala Asp Ala Val Leu Leu Gly Ala Val Gly Gly Pro Lys Trp

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

Arg Ala Leu Glu Glu Ala Val Arg Asn Val Leu Asp Ala Gly Val Arg
 325 330 335
 Thr Gly Asp Leu Gly Gly Ser Asn Ser Thr Thr Glu Val Gly Asp Ala
 340 345 350

Ile Ala Lys Ala Val Lys Glu Ile Leu Ala
 355 360

<210> 116

<211> 499

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pNUP57

<220>

<223> pNUP57

<400> 116

tcacatgcgc aatgactatc aagaccttct gcaagaattt caaatctcac tgaaaatctt 60
 gaccgaaaag tgtcttgaaa acccatcaag cctgcaaaac ctatctttga cattagtctc 120
 cattataaaa acggcatagt tgggagaaaa cttttcatac ttcaattgtg gactgatata 180
 agtatttttg ttttgccgc atgatcatcc cacatggcta cagcagttct ctcataaggaa 240

atagtacaat agctacgtga tataatctaa ataattgttg ccaatgtgta attatatcat 300
 tttgaacgtt cgcgaaatgg attattttca aaaattttgt ttcttgaaat gagtaaaagc 360
 aaaagtccaa ctctccaagt cgatgtaaac aactttttgc caaagggact gaaagactaa 420
 atcgaggatt atcccgttca aactattcca gaaacgctcg ttagtaacaa aagacatacc 480
 ttgttgacca attgatcac 499

<210> 117

<211> 451

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pGAP1

<220>

<223> pGAP1

<400> 117

cactttcacc agatcccaaa tgtcccgccc ctattcccggt gttccatcac gtaccataac 60

ttaccatttc atcacgttct ctatggcaca ctggtactgc ttcgactgct ttgcttcate 120

ttctctatgg gccaatgagc taatgagcac aatgtgctgc gaaataaagg gatatctaata 180

ttatattatt acattataat atgtactagt gtggttattg gtaattgtac ttaattttga 240

tatataaagg gtggatcttt ttcattttga atcagaattg gaattgcaac ttgtctcttg 300

tcactattac ttaatagtaa ttatatttct tattaacctt tttttaagt caaacacca 360

aggacaagaa ctactcttca aaggtatttc aagttatcat acgtctcaca cacgcttcac 420

agtttcaagt aaaaaaaaaa aatattacac a 451

<210> 118

<211> 998

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pJEN1

<220>

<223> pJEN1

<400> 118

aatgtgttta taaattattt tttttgctgg tagcaaaatc aactcattgt ctccattca 60

gagtctaate gaacgttate gcaatgcttg cacactttta aacaatacga tttagtttaa 120

gtggatggac cccacagctt agtgttccac aggtttgtcc ccaactgttt tacattccac 180

tgtacatttt tgcaatagaa ggtcattgta tgctaccttg ggcggttaag aatacctgta 240

aaaatttggg gaaattagat tcgtaaagaa tgactcgcaa cgactccaat gatttcttct 300

tttaccctt tgaacggcgc atatccgcgc gggatcctga ccccgcaatt tactccacta 360

gaccggcgtg tttctctttt tcttttctt ggggttagag cccaagagct aatagccgac 420

aaacggactc caaaaaaaaa aggaggcaca ggacaaacgc agcacctgcg tcattcacgc 480

tgaagcggca gcaagcattt tcgatcagct ccaattaaat gaagactatt cgccgtaccg 540

ttccagatg ggtgcgaaag tcagtatcg aggaagtat tgagcgcgcg gcttgaaact 600

atttctccat ctgagagcgc ccaagcctac cattattctc caccaggaag ttagtttgta 660

agcttctgca caccatccgg acgtccataa ttcttcactt aacggctttt tgccccccct 720

tctactataa tgcattagaa cgttacctgg tcatttggat ggagatctaa gtaacactta 780

ctatctccta tggtaactat ctttaccaaa aaaaaaaaaa aaaaaaatcag 840

caaagtgaag taccctcttg atgtataaat acattgcaca tcattgttga gaaatagttt 900
 tggaagtgtg ctagtccttc tcccttagat ctaaaaggaa gaagagtaac agtttcaaaa 960
 gtttttcttc aaagagatta aatactgcta ctgaaaat 998

<210> 119

<211> 450

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pICL1

<220>

<223> pICL1

<400> 119

ttttgtact cgicacccga tgagaaaaac tgttcccttt tgccccaggt ttccattcat 60
 ccgagcgatc acttatctga cttcgtcact ttttcatttc atccgaaaca atcaaaactg 120

aagccaatca ccacaaaatt aacactcaac gtcactcttc actacccttt acagaagaaa 180
 atatccatag tccggactag catccagta tgtgactcaa tattggtgca aaagagaaaa 240
 gcataagtea gtccaaagtc cgcccttaac caggcacatc ggaattcaca aaacgtttct 300
 ttattatata aaggagctgc ttacttgca aaattcttat tatttgtctt ggcttgctaa 360
 tttcatctta tccttttttt cttttcacac ccaaatacct aacaattgag agaaaactct 420
 tagcataaca taacaaaaag tcaacgaaaa 450

<210> 120

<211> 598

<212> DNA

<213> *Saccharomyces cerevisiae*

<220>

<223> pADH2

<220>

<223> pADH2

<400> 120

tatcttaact gatagtttga tcaaaggggc aaaacgtagg ggcaaacaaa cggaataatc 60
 gttttcmeta ttttctgatg ccaagaactc taaccagtct tatctaaaaa ttgccttatg 120
 atccgtctct ccggttacag cctgtgtaac tgattaatcc tgcctttcta atcaccattc 180
 taatgtttta attaagggat tttgtcttca ttaacggctt tcgctcataa aaatgttatg 240

acgttttgcc cgaggcgagg aaaccatcca cttcacgaga ctgatctcct ctgccggaac	300
accgggcac tcacacttat aagttggaga aataagagaa ttccagattg agagaatgaa	360
aaaaaaaaa aaaaaaggca gaggagagca tagaaatggg gttcactttt tggtaaagct	420
atagcatgcc tatcacatat aaatagagtg ccagtagcga cttttttcac actcgaaata	480
ctcttactac tgctctcttg ttgtttttat cacttcttgt ttcttcttgg taaatagaat	540
atcaagctac aaaaagcata caatcaacta tcaactatta actatatcgt aatacaca	598
<210> 121	
<211> 793	
<212> DNA	
<213> <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
<220>	
<223> pMLS1	
<220>	
<223> pMLS1	
<400> 121	
tgctaatgc gaaggtactt ttatTTTTT cagattcaaa gcaatattat ttagacaatt	60
gatactaagt gagcttaagg aggattaaac aactgtggaa tccttcacaa ggattcaata	120
tttgttttct ctggttattt tgccatcatt caactttcct cagacgtaaa attcgtgctt	180
agtgatgtct caatattccc gcagggtaat aaaattcaat aactatcact atatacgcaa	240
cagtattacc ctacattgct atcggctcaa tggaaatccc catatcatag ctccatttgg	300
gccgatgaag ttagtcgacg gatagaagcg gttgtccctt ttcccggcga gccggcagtc	360
gggccgaggt tcggataaat ttgtatttgt gttttgattc tgtcatgagt attacttatg	420
ttctcttttag gtaaccccg gttaatcaat cacagtttca taccggctag tattcaaatt	480
atgacttttc ttctgcagtg tcagccttac gacgattatc tatgagcttt gaatatagtt	540
tgccgtgatt cgtatcttta attggataat aaaatgcgaa ggatcgatga cccttattat	600
tatttttcta cactggctac cgatttaact catcttcttg aaagtatata agtaacagta	660
aaatataccg tacttctgct aatgttattt gtcccttatt ttcttttct tgtcttatgc	720
tatagtacct aagaataacg actattgttt tgaactaaac aaagtagtaa aagcacataa	780
aagaattaag aaa	793