



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116034163 A

(43) 申请公布日 2023. 04. 28

(21) 申请号 202180045623.9

(22) 申请日 2021.06.25

(30) 优先权数据

20182382.0 2020.06.25 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.12.26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/067473 2021.06.25

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/260170 EN 2021.12.30

(83) 生物保藏信息

CBS 146708 2020.05.25

(71) 申请人 康齐尔庄园有限公司

地址 德国博德曼路德维希港

(72) 发明人 罗伯特·马赫

阿斯特丽德·马赫·艾格纳

凯塔琳娜·雷格纳特

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 赵晓琳

(51) Int.Cl.

C12P 7/18 (2006.01)

权利要求书1页 说明书16页

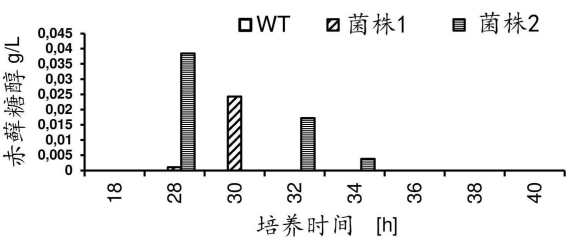
序列表39页 附图3页

(54) 发明名称

产赤藓糖醇的腐生生物

(57) 摘要

本发明涉及用于生物技术生产赤藓糖醇的转基因腐生生物和使用所述转基因腐生生物生物制备赤藓醇的方法。



1. 一种转基因腐生生物,其包含至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因、至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因和至少一种编码甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的失活基因。

2. 根据权利要求1所述的转基因腐生生物,其中所述腐生生物是选自肉座菌属、赤霉属、曲霉属和青霉属的丝状真菌。

3. 根据权利要求1或2所述的转基因腐生生物,其中所述腐生生物是红褐肉座菌(里氏木霉)。

4. 根据上述权利要求中任一项所述的转基因腐生生物,其中所述至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因是fps1。

5. 根据上述权利要求中任一项所述的转基因腐生生物,其中所述至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因是err1。

6. 根据上述权利要求中任一项所述的转基因腐生生物,其中所述至少一种编码甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的失活基因是mpdh。

7. 根据上述权利要求中任一项所述的转基因腐生生物,其中所述腐生生物还包含至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因,特别是tk11。

8. 根据上述权利要求中任一项所述的转基因腐生生物,其中所述腐生生物还包含至少一种编码至少一种转二羟丙酮基酶的基因,特别是tal1。

9. 根据上述权利要求中任一项所述的转基因腐生生物,其中所述腐生生物还包含至少一种编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛缩酶1(Dhaps-1)的失活基因。

10. 根据上述权利要求中任一项所述的转基因腐生生物,其中所述至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因、所述至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因、所述至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因和/或所述至少一种编码至少一种转二羟丙酮基酶的基因过表达。

11. 一种赤藓糖醇的制备方法,包括以下步骤:

- a) 提供至少一种根据权利要求1-10中任一项所述的转基因腐生生物,
- b) 在培养基中培养步骤a)中提供的至少一种转基因腐生生物,以在培养基中获得赤藓糖醇,
- c) 从培养基中回收赤藓糖醇。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述培养基包含木质纤维素生物质,特别是秸秆,和/或至少一种乳制品生产残留物,特别是乳清。

13. 根据权利要求11或12所述的方法,其中所述培养基包含硝酸盐作为氮源。

14. 根据权利要求11-13所述的方法,其中所述培养基包含甘油。

15. 根据权利要求11-14所述的方法,其中进行步骤b),直到培养基中赤藓糖醇的浓度达到至少1g/L、优选至少1.5g/L、优选至少2g/L、优选至少2.5g/L、优选至少3g/L。

16. 根据权利要求11或15所述的方法,其中在步骤b)中,在培养14小时后,将至少一种引起渗透胁迫的底物添加到所述培养基中。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中所述引起渗透胁迫的底物是甘油和/或氯化钠。

18. 根据权利要求1-10中任一项所述的转基因腐生生物在生产赤藓糖醇中的用途。

产赤藓糖醇的腐生生物

技术领域

[0001] 本发明涉及用于生物技术生产赤藓糖醇的转基因腐生生物和使用所述转基因腐生生物制备赤藓醇的方法

背景技术

[0002] 近年来,人们的生活方式和对高糖含量食品的日益增长的消费导致了诸如2型糖尿病(DMT2)等与血糖相关的疾病和病症的大量增加。如今,低血糖营养和避免血糖水平过高峰值被认为可以降低患某些慢性疾病的风险,有利于维持和改善健康,有利于治疗和/或预防大量与血糖相关的疾病和病症。

[0003] 赤藓糖醇是一种天然存在的四碳糖醇,由于其特殊的性质和广泛的应用领域,在食品工业中越来越重要。在一些水果(如梨、葡萄和甜瓜、蘑菇)、酒精饮料(啤酒、葡萄酒、清酒)和发酵食品(如酱油和味噌豆瓣酱)中含有赤藓糖醇,但也天然存在于人类和动物的生物液体中,如眼晶状体组织、血清、血浆、胎儿液体和尿液中。由于其分子量小,赤藓糖醇很容易在大肠上部被吸收,因此与食品工业中使用的其他糖醇相比,其消化困难较小。大多数摄入的赤藓糖醇不会在人体内代谢,并且在不改变血糖和胰岛素水平的情况下,未经修饰地排泄到尿液中(Regnat等人,Erythritol as sweetener—wherefrom and whereto?, 2018, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol.102)。此外,赤藓糖醇不致龋,热稳定,结晶良好,吸湿性低于蔗糖。由于溶解焓为负数,赤藓糖醇的摄入会在口腔中产生清凉感。10% (w/v) 的赤藓糖醇溶液的甜度是蔗糖的60-80%。

[0004] 然而,与其他糖醇(如山梨糖醇、木糖醇、甘露醇、乳糖醇和麦芽糖醇)相比,赤藓糖醇已被公认作为糖的替代品,但迄今为止,赤藓糖醇还不能以商业价值的方式进行化学生产。在高温下使用镍催化剂从双醛淀粉生产赤藓糖醇产量低(Moon等人,Biotechnological production of erythritol and its applications, 2010, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.86)。

[0005] 在酵母和真菌中,赤藓糖醇是通过所谓的磷酸戊糖途径产生的。赤藓糖醇是由D-赤藓糖-4-磷酸通过去磷酸化和随后还原赤藓糖合成的。基于此,在几项研究中已经研究了嗜高渗酵母(例如短梗菌属(Aureobasidium sp.)、毛孢子菌属(Trichosporonoides sp.)和木兰假丝酵母(Candida magnoliae))对赤藓糖醇生物技术生产的适用性(Ishizuka等人,Breeding of a mutant of Aureobasidium sp. with high erythritol production, 1989, J. Ferm. Bioeng., Vol.68 (5); US4939091A; US5962287 A; Oh等人,Increased erythritol production in fedbatch cultures of Torula sp. by controlling glucose concentration, 2001, JIM&B, Vol.26; Koh等人,Scale-up of erythritol production by an osmophilic mutant of Candida magnoliae, 2003, Biotechnol. Lett., Vol.25; Ryu等人,Optimization of erythritol production by Candida magnoliae in fed-batch culture, 2000, JIM&B, Vol.25)。最近的研究考察了丝状真菌产生赤藓糖醇的潜力(Jovanovic等人, 2013)。然而,从不同菌株获得的赤藓糖醇的

产量对于工业规模生产来说是不够的。

[0006] 因此,仍然需要一种生物技术方法以提高生产赤藓糖醇的产量。本发明通过独立权利要求的主题克服了现有技术中方法的缺点,特别是通过根据本发明的转基因腐生生物和根据本发明的赤藓糖醇的制备方法。

发明内容

[0007] 本发明特别涉及一种转基因腐生生物,其包含至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因、至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因和至少一种编码甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的失活基因。

[0008] 在本发明的一个优选实施方案中,所述转基因腐生生物是丝状真菌。优选地,所述腐生生物是选自肉座菌属(*Hypocrea*)、赤霉属(*Gibberella*)、曲霉属(*Aspergillus*)和青霉菌属(*Penicillium*)的丝状真菌。优选的,所述腐生生物是选自红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*), (里氏木霉(*Trichoderma reesei*))、赤霉菌(*Gibberella zeae*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)和产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)的丝状真菌。

[0009] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,转基因腐生生物是红褐肉座菌(里氏木霉)。优选地,所述转基因腐生生物基于里氏木霉菌株QM6a Δ tmus53。

[0010] 在本发明的另一优选实施方案中,所述至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因是fps1,特别是密码子优化的fps1。优选地,所述至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因是来自酿酒酵母的fps1,特别是来自酿酒酵母的密码子优化的fps1。

[0011] 在另一优选实施方案中,所述至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因包含SEQ ID No.1的核苷酸序列,特别是由SEQ ID No.1的核苷酸序列组成。

[0012] 在本发明的优选实施方案中,所述至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因包含与SEQ ID No.1具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。优选地,所述至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因由与SEQ ID No.1具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0013] 优选地,所述膜结合的糖醇转运蛋白包含SEQ ID No.2的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.2的氨基酸序列组成。

[0014] 优选地,所述膜结合的糖醇转运蛋白包含与SEQ ID No.2具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。在进一步优选的实施方案中,所述膜结合的糖醇转运蛋白由与SEQ ID No.2具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0015] 在本发明的另一优选实施方案中,所述膜结合的糖醇转运蛋白包含SEQ ID No.2中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。在特别优选的实施方案中,所述膜结合的糖醇转运蛋白包含SEQ ID No.2中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优

选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选最多两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。

[0016] 在本发明的优选实施方案中,所述至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因是err1,特别是密码子优化的err1。优选的,所述至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因是err1,特别是密码子优化的来自来自里氏木霉、黑曲霉或禾谷镰孢菌(*Fusarium graminearum*)的err1。

[0017] 在优选实施方案中,所述至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因包含SEQ ID No.3的核苷酸序列,特别是由SEQ ID No.3的核苷酸序列组成。

[0018] 优选地,所述至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因包含与SEQ ID No.3具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列,所述至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因,由与SEQ ID No.3具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0019] 优选地,所述赤藓糖还原酶包含SEQ ID No.4的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.4的氨基酸序列组成。

[0020] 在优选的实施方案中,所述赤藓糖还原酶包含与SEQ ID No.4具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列,所述赤藓糖还原酶由与SEQ ID No.4具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0021] 优选地,所述赤藓糖还原酶包含SEQ ID No.4中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。在本发明的优选实施方案中,所述赤藓糖还原酶包含SEQ ID No.4中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选最多两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。

[0022] 在本发明的优选实施方案中,所述至少一种编码甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的失活基因是mpdh。

[0023] 优选地,所述至少一种编码转基因腐生生物的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的基因在失活前包含SEQ ID No.12的核苷酸序列,特别是失活前由SEQ ID No.12的核苷酸序列组成。

[0024] 优选地,所述至少一种编码转基因腐生生物的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的基因在失活前包含与SEQ ID No.12具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。在另一个优选的实施方案中,所述至少一种编码转基因腐生生物的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的基因在失活前由与SEQ ID No.12具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0025] 优选地,失活前由SEQ ID No.12的核苷酸序列编码的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶包含

SEQ ID No.13的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.13的氨基酸组成。

[0026] 在优选的实施方案中,失活前由SEQ ID No.12的核苷酸序列编码的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶包含与SEQ ID No.13具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列,特别优选的是,失活前由SEQ ID No.12的核苷酸序列编码的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶由与SEQ ID No.13具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0027] 优选地,失活前由SEQ ID No.12的核苷酸序列编码的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶包含SEQ ID No.13中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。在本发明的优选实施方案中,失活前由SEQ ID No.12的核苷酸序列编码的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶包含SEQ ID No.13中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选最多两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。

[0028] 在本发明的另一个优选实施方案中,删除了所述至少一种编码转基因腐生生物的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的失活基因。

[0029] 在本发明的优选实施方案中,所述至少一种编码转基因腐生生物的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的失活基因是非功能性的。

[0030] 在一个特别优选的实施方案中,通过基因敲除,特别是基因替换,使所述至少一种编码转基因腐生生物的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的失活基因失活。优选地,通过使用缺失盒的基因替换,使所述至少一种编码转基因腐生生物的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的失活基因失活。

[0031] 在本发明的一个优选实施方案中,通过基因组编辑,特别是通过归巢核酸内切酶(meganuclease)、锌指核糖核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)或通过成簇的有规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)系统,使所述至少一种编码转基因腐生生物的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的失活基因失活,特别是使之成为非功能性的。

[0032] 在一个特别优选的实施方案中,所述转基因腐生生物包含至少一个,优选至少两个,优选地至少三个,优选是至少四个,优选为至少五个另外的失活基因。优选地,所述至少一种另外的失活基因选自编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛缩酶1(Dhaps-1)的基因、编码赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因、编码赤藓糖醇激酶(EYK1)的基因、编码赤藓糖醇脱氢酶(EYD1)的基因、编码赤藓糖醇异构酶1(EYI1)的基因和编码赤藓糖醇异构酶2(EYI2)的基因。

[0033] 在本发明的优选实施方案中,所述至少一种另外的失活基因是编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛缩酶1(Dhaps-1)的基因。优选地,编码转基因腐生生物的磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛缩酶1(Dhaps1)的至少一种基因在失活前包含SEQ ID No.14的核苷酸序列,特别是失活前由SEQ ID No.14的核苷酸序列组成。

[0034] 优选地,编码转基因腐生生物的磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛缩酶1(Dhaps1)的至少一种基因失活前包含与SEQ ID No.14具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。在另一优选实施方案中,编码转基因腐生生物的磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛

缩酶1 (Dhps1) 的至少一种基因失活前由与SEQ ID No.14具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0035] 优选地,失活前由SEQ ID No.14的核苷酸序列编码的磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛缩酶1 (Dhps1) 包含SEQ ID No.15的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.15的氨基酸序列组成。

[0036] 在优选实施方案中,失活前由SEQ ID No.14的核苷酸序列编码的磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛缩酶1 (Dhps1) 包含与SEQ ID No.15具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选的是,失活前由SEQ ID No.14的核苷酸序列编码的磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛缩酶1 (Dhps1) 由与SEQ ID No.15具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0037] 优选地,失活前由SEQ ID No.14的核苷酸序列编码的磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛缩酶1 (Dhps1) 包含SEQ ID No.15中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。在本发明的优选实施方案中,失活前由SEQ ID No.12的核苷酸序列编码的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶包含SEQ ID No.13中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选最多两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。

[0038] 在本发明的另一个实施方案中,所述至少一种另外的失活基因是编码赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因。优选地,所述至少一种编码转基因腐生生物赤藓糖醇利用因子的基因(Euf1)在失活前包含SEQ ID No.16的核苷酸序列,特别是失活前由SEQ ID No.16的核苷酸序列组成。

[0039] 优选地,所述至少一种编码转基因腐生生物赤藓糖醇利用因子的基因(Euf1)失活前包含与SEQ ID No.16具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。特别优选的是,所述至少一种编码转基因腐生生物赤藓糖醇利用因子的基因(Euf1)失活前由与SEQ ID No.16具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0040] 优选地,失活前由SEQ ID No.16的核苷酸序列编码的赤藓糖醇利用因子(Euf1)包含SEQ ID No.17的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.17的氨基酸组成。

[0041] 在优选的实施方案中,失活前由SEQ ID No.16的核苷酸序列编码的赤藓糖醇利用因子(Euf1)包含与SEQ ID No.17具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选的是,失活前由SEQ ID No.16的核苷酸序列编码的赤藓糖醇利用因子(Euf1)由与SEQ ID No.17具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0042] 优选地,失活前由SEQ ID No.16的核苷酸序列编码的赤藓糖醇利用因子(Euf1)包

含SEQ ID No.17中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。在本发明的优选实施方案中,失活前由SEQ ID No.16的核苷酸序列编码的赤藓糖醇利用因子(Euf1)包含SEQ ID No.17中定义的氨基酸序列,优选最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选最多两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。

[0043] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,所述至少一个另外的失活基因是编码赤藓糖醇激酶(EYK1)的基因。优选地,所述至少一个编码转基因腐生生物的赤藓糖醇激酶的基因(Eyk1)在失活前包含SEQ ID No.18的核苷酸序列,特别是失活前由SEQ ID No.18的核苷酸组成。

[0044] 根据本发明的另一个优选实施方案,所述至少一种编码转基因腐生生物的赤藓糖醇激酶的基因(Eyk1)失活前包含与SEQ ID No.18具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。特别优选的是,所述至少一种编码转基因腐生生物赤藓糖醇激酶的基因(Eyk1)在失活前由与SEQ ID No.18具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0045] 优选地,失活前由SEQ ID No.18的核苷酸序列编码的赤藓糖醇激酶(Eyk1)包含SEQ ID No.19的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.19的氨基酸组成。

[0046] 在优选实施方案中,所述失活前由SEQ ID No.18的核苷酸序列编码的赤藓糖醇激酶(Eyk1)包含与SEQ ID No.19具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选的是,所述失活前由SEQ ID No.18的核苷酸序列编码的赤藓糖醇激酶(Eyk1)由与SEQ ID No.19具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0047] 优选地,失活前由SEQ ID No.18的核苷酸序列编码的赤藓糖醇激酶(Eyk1)包含SEQ ID No.19中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。在本发明的优选实施方案中,所述失活前由SEQ ID No.18的核苷酸序列编码的赤藓糖醇激酶(Eyk1)包含SEQ ID No.19中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选最多两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。

[0048] 在本发明的优选实施方案中,所述至少一种另外的失活基因是编码赤藓糖醇脱氢酶(EYD1)的基因。优选地,至少一种编码转基因腐生生物赤藓糖醇脱氢酶的基因(Eyd1)在失活前包含SEQ ID No.20的核苷酸序列,特别是失活前由SEQ ID No.20的核苷酸序列组成。

[0049] 优选地,所述至少一种编码转基因腐生生物赤藓糖醇脱氢酶的基因(Eyd1)失活前包含与SEQ ID No.20具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。在本发明

的另一个优选实施方案中,所述至少一种编码转基因腐生生物赤藓糖醇脱氢酶的基因(Eyd1)失活前由与SEQ ID No.20具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0050] 优选地,失活前由SEQ ID No.20的核苷酸序列编码的赤藓糖醇脱氢酶(Eyd1)包含SEQ ID No.21的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.21的氨基酸组成。

[0051] 在优选实施方案中,失活前由SEQ ID No.20的核苷酸序列编码的赤藓糖醇脱氢酶(Eyd1)包含与SEQ ID No.21具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选的是,失活前由SEQ ID No.20的核苷酸序列编码的赤藓糖醇脱氢酶(Eyd1)由与SEQ ID No.21具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0052] 优选地,失活前由SEQ ID No.20的核苷酸序列编码的赤藓糖醇脱氢酶(Eyd1)包含SEQ ID No.21中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。在本发明的优选实施方案中,失活前由SEQ ID No.20的核苷酸序列编码的赤藓糖醇脱氢酶(Eyd1)包含SEQ ID No.21中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选最多两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。

[0053] 在本发明的优选实施方案中,至少一种另外的失活基因是编码赤藓糖醇异构酶1(EYI1)的基因。优选地,至少一种编码转基因腐生生物赤藓糖醇异构酶1的基因(Eyi1)失活前包含SEQ ID No.22的核苷酸序列,特别是失活前由SEQ ID No.22的核苷酸序列组成。

[0054] 特别优选地,至少一种编码转基因腐生生物赤藓糖醇异构酶1的基因(Eyi1)失活前包含与SEQ ID No.22具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。在本发明的另一优选实施方案中,至少一种编码转基因腐生生物赤藓糖醇异构酶1的基因(Eyi1)失活前由与SEQ ID No.22具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0055] 优选地,失活前由SEQ ID No.22的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶1(Eyi1)包含SEQ ID No.23的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.23的氨基酸组成。

[0056] 在优选实施方案中,失活前由SEQ ID No.22的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶1(Eyi1)包含与SEQ ID No.23具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选的是,失活前由SEQ ID No.22的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶1(Eyi1)由与SEQ ID No.23具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0057] 优选地,失活前由SEQ ID No.22的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶1(Eyi1)包含SEQ ID No.23中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。在本发

明的优选实施方案中,失活前由SEQ ID No.22的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶1(Eyi1)包含SEQ ID No.23中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选最多两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。

[0058] 在本发明的另一优选实施方案中,所述至少一种另外的失活基因是编码赤藓糖醇异构酶2(EYI2)的基因。优选地,所述至少一种编码转基因腐生生物赤藓糖醇异构酶2的基因(Eyi2)在失活前包含SEQ ID No.24的核苷酸序列,特别是失活前由SEQ ID No.24的核苷酸序列组成。

[0059] 优选地,所述至少一种编码转基因腐生生物赤藓糖醇异构酶2的基因(Eyi2)失活前包含与SEQ ID No.24具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。在本发明的优选实施方案中,所述至少一种编码转基因腐生生物赤藓糖醇异构酶2的基因(Eyi2)失活前由与SEQ ID No.24具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0060] 优选地,失活前由SEQ ID No.24的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶2(Eyi2)包含SEQ ID No.25的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.25的氨基酸组成。

[0061] 在优选实施方案中,失活前由SEQ ID No.24的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶2(Eyi2)包含与SEQ ID No.25具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选的是,失活前由SEQ ID No.24的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶2(Eyi2)由与SEQ ID No.25具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0062] 优选地,失活前由SEQ ID No.24的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶2(Eyi2)包含SEQ ID No.25中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。在本发明的优选实施方案中,失活前由SEQ ID No.24的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶2(Eyi2)包含SEQ ID No.25中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选最多两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。

[0063] 在本发明的另一优选实施方案中,所述至少一种另外的失活基因选自编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛缩酶1(Dhaps-1)的基因、编码赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因、编码赤藓糖醇激酶(EYK1)的基因、编码赤藓糖醇脱氢酶(EYD1)的基因编码赤藓糖醇异构酶1(EYI1)的基因和编码赤藓糖醇异构酶2(EYI2)的基因缺失。

[0064] 优选地,所述至少一种另外的失活基因选自编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛缩酶1(Dhaps-1)的基因、编码赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因、编码赤藓糖醇激酶(EYK1)的基因、编码赤藓糖醇脱氢酶(EYD1)的基因编码赤藓糖醇异构酶1(EYI1)的基因和编码赤藓糖醇异构酶2(EYI2)的基因是非功能性的。

[0065] 在特别优选的实施方案中,通过基因敲除、特别是基因替换,使转基因腐生生物的选自编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛缩酶1(Dhaps-1)的基因、编码赤藓糖醇利用因子

(EUF)的基因、编码赤藓糖醇激酶(EYK1)的基因、编码赤藓糖醇脱氢酶(EYD1)的基因编码赤藓糖醇异构酶1(EYI1)的基因和编码赤藓糖醇异构酶2(EYI2)的基因的至少一种进一步失活基因失活。优选地,通过使用缺失盒的基因替换,使转基因腐生生物的选自编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛缩酶1(Dhaps1)的基因、编码赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因、编码赤藓糖醇激酶(EYK1)的基因、编码赤藓糖醇脱氢酶(EYD1)的基因编码赤藓糖醇异构酶1(EYI1)的基因和编码赤藓糖醇异构酶2(EYI2)的基因的至少一种进一步失活基因失活。

[0066] 在本发明的优选实施方案中,所述转基因腐生生物的至少一种另外的失活基因选自编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酮酸醛缩酶1(Dhaps-1)的基因、编码赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因、编码赤藓糖醇激酶(EYK1)的基因、编码赤藓糖醇脱氢酶(EYD1)的基因编码赤藓糖醇异构酶1(EYI1)的基因和编码赤藓糖醇异构酶2(EYI2)的基因失活,特别是通过基因组编辑,特别是通过归巢核酸内切酶、锌指核糖核酸酶(ZFN)、转录激活因子样效应物核酸酶(TALEN)或通过成簇的有规律间隔的短回文重复序列(CRISPR)系统使其无功能。

[0067] 在本发明的另一优选实施方案中,转基因腐生生物还包含至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因。优选地,至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因是tk11,特别是密码子优化的tk11。在优选实施方案中,至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因包含SEQ ID No.5的核苷酸序列,特别是由SEQ ID No.5的核苷酸序列组成。

[0068] 在本发明的另一优选实施方案中,至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因包含的核苷酸序列与SEQ ID No.5具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性。优选地,至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因由与SEQ ID No.5具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0069] 优选地,所述至少一种转羟乙醛酶包含SEQ ID No.6的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.6的氨基酸序列组成。

[0070] 在本发明的另一优选实施方案中,所述至少一种转羟乙醛酶包含与SEQ ID No.6具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。优选地,所述至少一种转羟乙醛酶由与SEQ ID No.6具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0071] 在本发明的另一优选实施方案中,所述至少一种转羟乙醛酶包含SEQ ID No.6中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。在特别优选的实施方案中,所述至少一种转羟乙醛酶包含SEQ ID No.6中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选最多两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。在本发明的一个优选实施方案中,所述转基因腐生生物还包括编码至少一种转二羟丙酮基酶的至少一种基因。优选地,编码至少一种转二羟丙酮基酶的至少一种基因是tal1,特别是密码子优化的tal1。在优选实施方案中,编码至少一种转二羟丙酮基酶的至少一种基因包含SEQ ID No.7的核苷酸序列,特别是由SEQ ID No.7的核苷酸序列组成。

[0072] 在另一优选实施方案中,编码至少一种转二羟丙酮基酶的至少一种基因包含与SEQ ID No.7具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。优选地,编码至少一种转二羟丙酮基酶的至少一种基因由与SEQ ID No.7具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0073] 优选地,所述至少一种转二羟丙酮基酶包含SEQ ID No.8的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成。

[0074] 特别优选地,所述至少一种转二羟丙酮基酶包含与SEQ ID No.8具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。优选地,所述至少一种转二羟丙酮基酶由与SEQ ID No.8具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0075] 在本发明的另一优选实施方案中,所述至少一种转二羟丙酮基酶包含SEQ ID No.8中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。在特别优选的实施方案中,所述至少一种转二羟丙酮基酶包含SEQ ID No.8中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选最多两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。

[0076] 在本发明的另一优选实施方案中,所述转基因腐生生物还包含至少一种编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因。优选地,所述至少一种编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因是euf1,特别是密码子优化的euf1。在优选实施方案中,编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的至少一种基因包含SEQ ID No.16的核苷酸序列,特别是由SEQ ID No.16的核苷酸序列组成。

[0077] 在优选实施方案中,编码至少一种赤藓糖醇利用因子的至少一种基因包含与SEQ ID No.16具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。优选地,编码至少一种赤藓糖醇利用因子的至少一种基因由与SEQ ID No.16具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0078] 优选地,所述至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)包含SEQ ID No.17的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.17的氨基酸序列组成。

[0079] 在另一优选实施方案中,所述至少一种赤藓糖醇利用因子包含与SEQ ID No.17具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。优选地,所述至少一种赤藓糖醇利用因子由与SEQ ID No.17具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0080] 在本发明的另一优选实施方案中,所述至少一种赤藓糖醇利用因子包含SEQ ID No.17中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七

个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。在特别优选的实施方案中,所述至少一种赤藓糖醇利用因子包含SEQ ID No.17中定义的氨基酸序列,氨基酸被其他天然存在的氨基酸替换。

[0081] 在本发明的优选实施方案中,所述转基因腐生生物的所述至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因、所述至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因、所述至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因、所述至少一种编码至少一种转二羟丙酮基酶的基因和/或所述至少一种编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因是外源多核苷酸序列。

[0082] 优选地,所述转基因腐生生物的所述至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因、所述至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因、所述至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因、所述至少一种编码至少一种转二羟丙酮基酶的基因和/或所述至少一种编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因是内源性多核苷酸序列。

[0083] 在另一个优选的实施方案中,根据本发明的转基因腐生生物包含至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的外源基因。优选地,根据本发明的转基因腐生生物包括编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的至少一种内源性基因。

[0084] 优选地,根据本发明的转基因腐生生物包含至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的外源基因。在另一个优选的实施方案中,根据本发明的转基因腐生生物包含至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的内源性基因。

[0085] 进一步优选的是,根据本发明的转基因腐生生物包含至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的外源基因。在本发明的优选实施方案中,根据本发明的转基因腐生生物包括编码至少一种转羟乙醛酶的至少一种内源性基因。

[0086] 优选地,根据本发明的转基因腐生生物包括至少一种编码至少一种转二羟丙酮基酶的外源性基因。优选地,根据本发明的转基因腐生生物包括至少一种编码至少一种转二羟丙酮基酶的内源性基因。

[0087] 优选地,根据本发明的转基因腐生生物包含至少一种编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的外源性基因。优选地,根据本发明的转基因腐生生物包括至少一种编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的内源性基因。

[0088] 在本发明的优选实施方案中,所述至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因、至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因、至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因、至少一种编码至少一种转二羟丙酮基酶的基因和/或至少一种编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因稳定地或瞬时地引入到转基因腐生生物的基因组中。

[0089] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,所述至少一种编码至少一种膜结合的糖醇转运蛋白的基因、至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因、至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因、至少一种编码至少一种转二羟丙酮基酶的基因和/或至少一种编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因过表达。

[0090] 优选地,至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因,特别是至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的外源或内源性基因过表达。在另一优选实施方案中,至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因,特别是至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的外源或内源性基因过表达。优选地,至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因,特别是至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的外源或内源性基因过表达。进一步优选的是,至少一种编

码至少一种转二羟丙酮基酶的基因,特别是至少一种编码至少一种转二羟丙酮基酶的外源或内源性基因过表达。优选地,至少一种编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因,特别是至少一种编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的外源性或内源性基因过表达。

[0091] 在本发明的另一优选实施方案中,所述至少一种编码至少一种膜结合的糖醇转运蛋白的基因、至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因、至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因、至少一种编码至少一种转二羟丙酮基酶的基因和/或至少一种编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因受组成型或诱导型启动子的控制。在优选实施方案中,所述组成型或诱导型启动子是天然存在的启动子。在另一优选实施方案中,所述组成型或诱导型启动子是合成启动子。优选地,所述组成型启动子选自pki、tef、gpd。所述诱导型启动子优选选自bga1、bx11、cbh1、cbh2、xyn1、xyn2。优选地,所述至少一种编码至少一种膜结合的糖醇转运蛋白的基因受选自pki、tef、gpd的启动子控制,优选受pki启动子控制。优选地,所述至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因受选自pki、tef、gpd的启动子控制,优选受tef启动子控制。优选地,所述至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因受选自pki、tef、gpd的启动子控制,优选受tef启动子控制。优选地,所述至少一种编码至少一种转二羟丙酮基酶的基因受选自pki、tef、gpd的启动子控制,优选受tef启动子控制。优选地,所述至少一种编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因受选自pki、tef、gpd的启动子控制,优选受tef启动子控制。

[0092] 在本发明的另一优选实施方案中,所述至少一种编码至少一种膜结合的糖醇转运蛋白的基因、至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因、至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因、至少一种编码至少一种转二羟丙酮基酶的基因和/或至少一种编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因存在于质粒上。优选地,所述至少一种编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因、至少一种编码至少一种赤藓糖还原酶的基因、至少一种编码至少一种转羟乙醛酶的基因、至少一种编码至少一种转二羟丙酮基酶的基因和/或至少一种编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因存在于单独的质粒上。

[0093] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,所述转基因腐生生物是里氏木霉菌株,所述里氏木霉菌株的CBS编号为146708,保藏于Westerdijk真菌生物多样性研究所。

[0094] 本发明还涉及一种赤藓糖醇的制备方法,包括以下步骤:

[0095] a) 提供至少一种根据本发明的转基因腐生生物,

[0096] b) 在培养基中培养步骤a)中提供的至少一种转基因腐生生物,以在培养基中获得赤藓糖醇,

[0097] c) 从培养基中回收赤藓糖醇。

[0098] 在本发明的优选实施方案中,所述培养基包含木质纤维素生物质,特别是秸秆,和/或至少一种乳制品生产残留物,特别是乳清。特别优选的是,所述培养基包含木质纤维素生物质,特别是秸秆,优选水解秸秆。根据所述特定实施方案,所述转基因腐生生物能够在作为碳源的木质纤维素生物质上生长,特别是在作为唯一碳源的纤维素生物质上。在本发明的另一优选实施方案中,所述培养基包含至少一种乳制品生产残留物。特别优选的是,所述培养基包括乳清。以此方式,根据本发明的方法有利地利用廉价、丰富和可再生的基质作为赤藓糖醇生产的排放物。

[0099] 在本发明的优选实施方案中,所述培养基包含铵作为氮源。在本发明的另一优选

实施方案中,所述培养基包含硝酸盐作为氮源。

[0100] 在本发明的另一优选实施方案中,所述培养基包含甘油。

[0101] 在本发明的一个优选实施方案中,步骤a)中提供的至少一种转基因腐生生物在步骤b)中在25至35℃、优选26至34℃、优选27至33℃、优选28至32℃、优选29至31℃、优选30℃的温度下培养。

[0102] 优选地,步骤b)中所述培养基的pH为3至8、优选3至7、优选3.5至6.5、优选3.5到6、优选4至5.5、优选4至5。

[0103] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,进行步骤b),直到培养基中赤藓糖醇的浓度达到至少1g/L、优选至少1.5g/L、优选至少2g/L、优选至少2.5g/L、优选至少3g/L。

[0104] 在本发明的优选实施方案中,在步骤b)中,将至少一种引起渗透胁迫的底物添加到培养基中。优选地,在培养10小时、优选12小时、优选14小时、优选16小时后,将至少一种引起渗透胁迫的底物添加到所述培养基中。

[0105] 在本发明的另一优选实施方案中,所述引起渗透胁迫的底物选自甘油和氯化钠或其组合。优选地,所述引起渗透胁迫的底物是甘油。优选地,所述引起渗透胁迫的底物是氯化钠。

[0106] 在本发明的优选实施方案中,在步骤c)中,通过结晶回收赤藓糖醇。特别优选的是,步骤c)中从培养基中回收赤藓糖醇包括以下步骤:

[0107] i) 生物质去除,优选通过过滤去除生物质,

[0108] ii) 培养基脱色,优选用活性炭对培养基进行脱色,

[0109] iii) 培养基脱盐,优选用至少一种离子交换树脂对培养基脱盐和脱色,以及

[0110] iv) 浓缩并结晶赤藓糖醇。

[0111] 本发明还涉及根据本发明的转基因腐生生物在生产赤藓糖醇中的用途。

[0112] 本文中使用的术语“转基因”及其语法等同词是指核酸的一种或多种改变,例如生物体基因组内的核酸,特别是腐生生物基因组内的核苷酸。“转基因”腐生生物可以指具有添加的、删除的和/或改变的基因,特别是具有失活的基因的腐生生物。

[0113] 在本发明的上下文中,术语“赤藓糖还原酶”涉及可逆地催化醛糖还原为糖醇的任何酶,其中所述酶对赤藓糖还原为赤藓糖醇具有显著的特异活性。因此,根据本发明的“赤藓糖还原酶”对底物赤藓糖表现出高度特异性和亲和力。特别是,“赤藓糖还原酶”对赤藓糖的特异性高于任何其他底物,如甘油。

[0114] 在本发明的上下文中使用的术语“膜结合糖醇转运蛋白”是指适合于可逆地将糖醇转运穿过外膜,特别是将细胞内产生的糖醇运输至培养基的膜蛋白。根据本发明,“膜结合糖醇转运蛋白”适合于将细胞内产生的赤藓糖醇通过膜转运至培养基。

[0115] 在本发明的上下文中,术语“转羟乙醛酶”是指磷酸戊糖途径中催化C-2单位从酮糖供体向受体醛缩戊糖的硫胺素依赖可逆转移的酶。特别是,“转羟乙醛酶”催化C-2单位从木酮糖-5-磷酸转移到核糖-5-磷酸,形成景天庚酮糖-7-磷酸和甘油醛-3-磷酸。

[0116] 术语“转二羟丙酮基酶”是指磷酸戊糖途径的非氧化分支的一种酶,催化C-3单位从酮糖供体向受体醛糖的可逆转移。特别是,“转羟乙醛酶”催化C-3单位从7-磷酸景天庚酮糖转移到3-磷酸甘油醛,形成4-磷酸赤藓糖和6-磷酸果糖。

[0117] 在本发明的上下文中,“失活”基因是可以暂时或永久不转录或可以转录但转录物

不可用于基因翻译的基因。根据本发明,基因的失活包括但不限于通过部分或完全基因缺失、部分或完全的基因替换、基因抑制、基因插入和基因突变进行的失活。本发明上下文中的“失活”还包括任何转录后基因调节,特别是通过RNAi或siRNA,导致转录物翻译成基因产物受到抑制。

[0118] 在本发明的上下文中,“非功能性”基因是存在于生物体基因组或生物体质粒中的基因,该基因未被转录或被转录,但转录物未被翻译成基因产物。

[0119] 在本发明的上下文中,“缺失”基因是以前存在于生物体基因组或生物体质粒中,但已经从生物体基因组或生物体质粒中完全去除的基因。

[0120] 在本发明的上下文中,动词“过表达”是指人工表达增加量的基因。这包括使用诱导型启动子调控的基因的可诱导过表达和使用组成型启动子调控基因的持续过表达。

[0121] 在本发明的上下文中,术语“一种(a)”意味着包括“一种(one)”或“一种或多种”的含义。

[0122] 在本发明的上下文中,术语“包含(comprising)”优选地具有“包含(containing)”或“包括(including)”的含义,意味着包括特定识别的元素而不排除其他元素的存在。然而,在一个优选实施例中,术语“包括”也被理解为具有“基本上由.....组成”的含义,并且在另一个优选的实施例中具有“由.....组成”的意思。

[0123] 本文使用术语“和/或”来表示列表中连接的单个元素的任何组合的公开。仅出于说明的目的,表述“A、B和/或C”可以分别表示A、B、C、(A和B)、(B和C)、(A和C)和(A、B和C)。

[0124] 本发明的其他优选实施例是从属权利要求的主题。

附图说明

[0125] 通过以下实施例和附图进一步描述本发明。

[0126] 图1显示了里氏木霉野生型菌株(WT)、过表达糖醇转运蛋白基因fps1并包含编码甘露醇1-磷酸5-脱氢酶(mpdh)的失活基因的里氏木霉(*T.reesei*)菌株(菌株1)和过表达糖醇转运蛋白基因fps1和编码赤藓糖还原酶的基因err1的里氏木霉(*T.reesei*)菌株(菌株2)培养40小时后的干生物量比较。

[0127] 图2显示了野生型菌株(WT)和菌株1和菌株2培养18、28、30、32、34、36、38和40小时后培养基中葡萄糖的浓度。

[0128] 图3显示了野生型菌株(WT)和菌株1和菌株2培养18、28、30、32、34、36、38和40小时后培养基中甘油的浓度。

[0129] 图4显示了野生型菌株(WT)和菌株1和菌株2培养18、28、30、32、34、36、38和40小时后培养基中赤藓糖醇的浓度。

[0130] 图5显示了pKR_ReAs11fps1的质粒图谱(另见SEQ ID No.9)。

[0131] 图6显示了pKR_Rpyr4err1的质粒图谱(另见SEQ ID No.10)。

[0132] 图7显示了用于缺失mpdh的缺失盒(另见SEQ ID No.11)。

具体实施方式

[0133] 实施例

[0134] 1.1里氏木霉菌株的比较

[0135] 为了表征表型,使用了以下菌株:

[0136] -野生型菌株QM6a Δ tmus53,简称“WT”,

[0137] -QM6a Δ tmus53fps1 (Reas11) Δ mpdh (hygR),简称“菌株1”,以及

[0138] -QM6a Δ tmus53fps1 (Reas11) 0Err1 (Repyr4) Δ mpdh (hygR),简称“菌株2”。该菌株已于2020年5月25日由保藏者维也纳科技大学保藏中心(Gumpendorfer Straße 1a,1060 Vienna,Austria)根据国际承认为专利程序目的保藏微生物的《布达佩斯条约》的规定,保藏于荷兰乌得勒支韦斯特迪克真菌生物多样性研究所(Westerdijk Fungal Biodiversity Institute,Utrecht,the Netherlands)的限制性CBS保藏。已发出相应的存活能力证书,所述菌株的保藏号为CBS 146708。

[0139] 1.2材料和方法

[0140] 1.2.1里氏木霉菌株的产生

[0141] 实验中使用的里氏木霉菌株亲本对尿苷(缺乏功能性pyr4)、精氨酸(缺乏功能asl1)、组氨酸(缺乏功能80820HisG)具有营养缺陷型,并且还对潮霉素(hygR)具有抗性。用质粒pKR_Reas11fps1(见图5)进行的第一次转化以恢复asl1基因座,不仅将fps1基因引入基因组,而且使潮霉素菌株再次变得敏感。使用质粒pKR_Repyr4err1(见图6)引入编码赤藓糖还原酶的err1基因。mpdh的缺失是通过转化缺失盒(见图7)来完成的,以通过同源重组重新获得潮霉素抗性。所有转化都作为原生质体转化进行。通常,使用30至50 μ g分解的质粒DNA(在15 μ L无菌双蒸馏水中)转化 10^7 个原生质体(在200 μ L中)。为了选择对潮霉素B的抗性,将100 μ L至2mL转化反应混合物添加到10mL熔化的50 $^{\circ}$ C温麦芽提取物(MEX)琼脂中,该琼脂含有1.2M山梨糖醇。将该混合物倒入无菌培养皿中,凝固后在30 $^{\circ}$ C下孵育5小时。随后,将含有1.2M山梨糖醇和双倍浓度潮霉素B的10mL熔化的50 $^{\circ}$ C MEX琼脂倒入含原生质体层的顶部。将平板在30 $^{\circ}$ C下孵育2至5天,直到菌落可见。为了选择原养型,将100 μ L至2mL的转化反应混合物添加到20mL熔化的、50 $^{\circ}$ C的温热基本培养基琼脂中,所述琼脂含有1.2M山梨糖醇,在asl1反向转化的情况下,添加0.25mL-精氨酸。将该混合物倒入无菌培养皿中,固化后在30 $^{\circ}$ C下孵育3至7天,直到菌落可见。

[0142] 1.2.2里氏木霉的培养和赤藓糖醇合成的诱导

[0143] 在渗透胁迫下,铵作为氮源,葡萄糖作为碳源。培养总时间为40小时。在生物质生产培养10小时后,向培养基中加入氯化钠以引发渗透胁迫。在添加培养液时,在总培养时间28小时后,然后每两小时采集一次培养液样品,直到培养结束。将样品离心以从上清液中分离菌丝体。

[0144] 在含有25mL培养基((NH_4)₂SO₄ 2.80g/L、KH₂PO₄ 4.00g/L、MgSO₄·7H₂O 1.0g/L、NaCl 0.5g/L、酪蛋白蛋白胨0.1g/L、Tween®80 0.5g/L)的100mL摇瓶中培养野生型菌株(WT)、QM6a_fm(菌株1)和QM6a_fem(菌株2),补充有1.5mL/L微量元素溶液(FeSO₄·7H₂O 0.90mM、MnSO₄·xH₂O 0.50mM、ZnSO₄·7H₂O 0.24mM、CaCl₂·xH₂O 0.68mM)。接种时,每升使用 10^9 个分生孢子。向所有烧瓶中加入0.3mL 0.2M组氨酸和0.25mL 0.2M尿苷。10小时后,加入0.5mL 5M NaCl。搅拌速度为180rpm,温度为30 $^{\circ}$ C。

[0145] 培养完成后,将整个培养液通过神奇滤布(miracloth)过滤,用沃特曼(Whatman)滤纸将菌丝压干,并在80 $^{\circ}$ C下干燥过夜。

[0146] 葡萄糖、甘油、甘露醇和赤藓糖醇浓度通过高效液相色谱(HPLC)(配备RID-20A折

光率检测器的Shimadzu Prominence系列)进行定量。通过0.20 μ m膜过滤培养上清液,并使用Rezex RCM单糖柱(300mm $\times$ 7.8mm;Phenomenex,托伦斯市,加利福尼亚州,美国)通过HPLC进行检测。流动相为30%乙腈(HPLC级)。对于样品分析,在60 $^{\circ}$ C下用30%乙腈(HPLC级)以0.6mL/min的流速洗脱色谱柱。

[0147] 1.3结果

[0148] 所有菌株在培养结束时的生物量产量几乎相同。WT产生的生物量稍多(图1)。与WT和菌株1相比,菌株2的葡萄糖消耗更快,这是从各自上清液中的浓度检测得出的(图2)。

[0149] 由于甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的缺失,菌株1上清液中的甘油浓度始终高于WT中的甘油浓度(图3),因为这种缺失导致甘露醇的产生降低,并且菌株产生更多的渗透液甘油。尽管菌株1显示出甘油产量的持续增加,但携带过表达err1基因的菌株2显示出甘油随时间的波动积累(图3)。赤藓糖醇仅在携带酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)转运蛋白FPS1的菌株的上清液中可检测到(图4)。对赤藓糖醇消耗量的研究表明,包括WT在内的所有菌株都可以以赤藓糖醇为唯一碳源生长(数据未显示)。上清液中赤藓糖醇的存在似乎与甘油的分泌一致,菌株2的赤藓糖醇含量更高(图3和图4)。

序列表

<110> 康齐尔庄园有限公司

<120> 产赤藓糖醇的腐生生物

<130> 209133

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2010

<212> DNA

<213> 酿酒酵母

<400> 1

```

atgagcaatc cccaaaaggc actgaacgac ttctctagct ccgagagcgt ccacacccac 60
gactcctcac gtaagcagtc caacaagcaa tcctcggacg agggccgtag ctcgagccag 120
ccctcccacc atcactccgg aggaactaat aacaataaca acaataacaa caacaacaac 180
aacagcaaca acaacaacaa cggtaacgat ggcggaacg acgacgacta tgactacgag 240
atgcaggact accgtccctc cccacagtct gctaggccta ctcccaccta cgtgccccaa 300
tacagtgtcg agtcgggcac cgcattcccc attcaagagg tcattccctc ggcctacatt 360
aacacccaag acatcaacca caaggacaac ggccccctt ccgcatcgtc aaaccgcgct 420
ttccgcccc gcggccagac gaccgtcagc gccaacgtcc tgaacataga ggactttctac 480
aagaatgcgg acgatgcaca cacaattcca gagtgcgcatc tgagccggcg tcgctcccca 540
tcacgggcca cgtcaaagtc aggccactcc gccaacaccg gcgccacca tggtcgtact 600
acgggcgccc agaccaacat ggagagcaac gagtccccca ggaacgtgcc gataatggtc 660
aagcctaaga ccctctacca gaaccgcag acccccacag ttctccctc aacttaccac 720
ccgattaaca agtggagctc cgttaagaat acctatttaa aagagttcct cgccgagttt 780
atgggtacga tgggtcatgat catcttcggc agcgccgtcg tatgccaggt caacgtcgcc 840
ggcaagatcc agcaggacaa cttcaacgta gccctcgaca acctcaatgt cacgggctct 900
tccgccgaga caatcgacgc catgaagagc ctgactagcc tagtctctc tgctcgccgt 960
ggcaccttcg atgacgttgc cctcgggtgg gccgtgccg tggtaatggg ctacttttgt 1020
gcaggtggct cggaatctc tggagccac ctgaacccat caatcaccct cgctaacctc 1080
gtttatcgag gctttccct gaagaaggtc ccatattact tcgcaggcca gctgattgg 1140
gctttcacgg gagccctcat tctgttcatt tggtaacaaga gggtccttca ggaggcatac 1200
tcggactggg ggatgaacga atccgtcgct ggcatgttt gtgtcttccc aaagccctac 1260
ctgagctctg ggcggcagtt ttttagcgag ttctctcgcg gcgcatgct ccaggccggg 1320
acattcgccc tgacggatcc ctacacgtgc ttgagctcag atgtatttcc cctgatgatg 1380
ttcattctca ttttcatcat taacgcttcg atggcatatc agacaggtac tgcgatgaac 1440
ctggcacggg atctgggccc ccgcctcgcc ctctacgcag tgggcttcga ccacaagatg 1500
ctctgggtcc accaccacca cttcttttgg gtgccgatgg tagggccgtt tattggtgcc 1560
ctgatggggg gcctcgtcta cgacgtctgt atctaccaag gccacgaatc accggttaac 1620

```

tggctctctcc ccgtgtacaa ggaaatgatt atgcgcgcat ggtttaggcg ccccgatgg 1680
 aagaagcgga accgagctag gaggacttct gacctctccg acttctctta caataatgac 1740
 gacgacgagg aattcggcga acgcatggcg cttcagaaga cgaagacgaa gtctagcatt 1800
 tccgacaacg agaacgaggc cggcgagaag aaggttcagt tcaagtccgt tcagcgaggg 1860
 aagcggacct tcggcggcat cccgacaatt cttgaggagg aggatagcat cgagactgcc 1920
 agcctcggcg ccacgacaac ggattctatt ggtctctctg acactagctc tgaggacagc 1980
 cactacggca acgcgaagaa agtcacctga 2010

<210> 2

<211> 669

<212> PRT

<213> 酿酒酵母

<400> 2

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

210	215	220
Leu Tyr Gln Asn Pro Gln Thr Pro Thr Val	Leu Pro Ser Thr Tyr His	
225	230	235
Pro Ile Asn Lys Trp Ser Ser Val Lys Asn Thr Tyr Leu Lys Glu Phe		240
245	250	255
Leu Ala Glu Phe Met Gly Thr Met Val Met Ile Ile Phe Gly Ser Ala		
260	265	270
Val Val Cys Gln Val Asn Val Ala Gly Lys Ile Gln Gln Asp Asn Phe		
275	280	285
Asn Val Ala Leu Asp Asn Leu Asn Val Thr Gly Ser Ser Ala Glu Thr		
290	295	300
Ile Asp Ala Met Lys Ser Leu Thr Ser Leu Val Ser Ser Val Ala Gly		
305	310	315
Gly Thr Phe Asp Asp Val Ala Leu Gly Trp Ala Ala Ala Val Val Met		320
325	330	335
Gly Tyr Phe Cys Ala Gly Gly Ser Ala Ile Ser Gly Ala His Leu Asn		
340	345	350
Pro Ser Ile Thr Leu Ala Asn Leu Val Tyr Arg Gly Phe Pro Leu Lys		
355	360	365
Lys Val Pro Tyr Tyr Phe Ala Gly Gln Leu Ile Gly Ala Phe Thr Gly		
370	375	380
Ala Leu Ile Leu Phe Ile Trp Tyr Lys Arg Val Leu Gln Glu Ala Tyr		
385	390	395
Ser Asp Trp Trp Met Asn Glu Ser Val Ala Gly Met Phe Cys Val Phe		400
405	410	415
Pro Lys Pro Tyr Leu Ser Ser Gly Arg Gln Phe Phe Ser Glu Phe Leu		
420	425	430
Cys Gly Ala Met Leu Gln Ala Gly Thr Phe Ala Leu Thr Asp Pro Tyr		
435	440	445
Thr Cys Leu Ser Ser Asp Val Phe Pro Leu Met Met Phe Ile Leu Ile		
450	455	460
Phe Ile Ile Asn Ala Ser Met Ala Tyr Gln Thr Gly Thr Ala Met Asn		
465	470	475
Leu Ala Arg Asp Leu Gly Pro Arg Leu Ala Leu Tyr Ala Val Gly Phe		480
485	490	495
Asp His Lys Met Leu Trp Val His His His His Phe Phe Trp Val Pro		
500	505	510
Met Val Gly Pro Phe Ile Gly Ala Leu Met Gly Gly Leu Val Tyr Asp		
515	520	525

Val Cys Ile Tyr Gln Gly His Glu Ser Pro Val Asn Trp Ser Leu Pro		
530	535	540
Val Tyr Lys Glu Met Ile Met Arg Ala Trp Phe Arg Arg Pro Gly Trp		
545	550	555 560
Lys Lys Arg Asn Arg Ala Arg Arg Thr Ser Asp Leu Ser Asp Phe Ser		
565	570	575
Tyr Asn Asn Asp Asp Asp Glu Glu Phe Gly Glu Arg Met Ala Leu Gln		
580	585	590
Lys Thr Lys Thr Lys Ser Ser Ile Ser Asp Asn Glu Asn Glu Ala Gly		
595	600	605
Glu Lys Lys Val Gln Phe Lys Ser Val Gln Arg Gly Lys Arg Thr Phe		
610	615	620
Gly Gly Ile Pro Thr Ile Leu Glu Glu Glu Asp Ser Ile Glu Thr Ala		
625	630	635 640
Ser Leu Gly Ala Thr Thr Thr Asp Ser Ile Gly Leu Ser Asp Thr Ser		
645	650	655
Ser Glu Asp Ser His Tyr Gly Asn Ala Lys Lys Val Thr		
660	665	

<210> 3

<211> 996

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 3

```

atgtcttccg gaaggaccgt caccctcaac accggctaca agatcccca gatcggctac 60
ggcacctggc aggccgctcc cggcgaggtc ggcgctggtg tctttgaggc cctcaaggtt 120
ggctaccgcc acctcgacct ggccaaggctc tacggcaacc agaaggaggt tggtaggggc 180
atcaagaagg ctcttgctga ggtccccggc ctgaagcgcg aggatatttt catcacctcc 240
aagctgtgga acaactccca caagcccag gacgtcgagc ccgctctcga cgacaccctg 300
gccgagcttg gcctcgacta cttgacctc tacctcatcc actggcccgt tgcctttgct 360
cccggcgccg acctcttccc caagtccgag gacggctccg aggtgcagct caaccagaat 420
gtgtccattg tccagacctg gaaggccatg accgagctgc ccaagtccaa ggtccgctcc 480
gtcggtgtct ccaactttac catagagcac ctgcagccg tcatcgaggc caccggcgctc 540
gtccccgccg tcaaccagat cgagcgccac ccccgctcc ccaaccagcc tctgatcgac 600
tactgcgcca agaaggcat catcatcacc gcctactccg cctttggcaa caacacaaag 660
ggcctgcccc tgctcgtcag ctccgacgag gtcaaggccg tcgccgacaa cctgtccaag 720
aagcagggca agaccgtcac tcccgccag gtcactctcg cctgggtcca gattggtggc 780
cacaccgtca ttcccaagtc cgtcaccaag gcgcgcattg cggagaactt ccaggaggtt 840
gagctggatg acgaggccat tgctgcgctg aacaagttgg gcgagaagcc tcagcggttc 900
aacattcctt acacctacaa gcctaggtgg aacattaacc tgttcaacac cgaggaggag 960

```

aaggccgctg cccacactgc tgtcatcaag ctgtaa 996

<210> 4

<211> 331

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 4

Met Ser Ser Gly Arg Thr Val Thr Leu Asn Thr Gly Tyr Lys Ile Pro

1 5 10 15

Gln Ile Gly Tyr Gly Thr Trp Gln Ala Ala Pro Gly Glu Val Gly Ala

20 25 30

Gly Val Phe Glu Ala Leu Lys Val Gly Tyr Arg His Leu Asp Leu Ala

35 40 45

Lys Val Tyr Gly Asn Gln Lys Glu Val Gly Glu Gly Ile Lys Lys Ala

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Asp Asp Thr Leu Ala Glu Leu Gly Leu Asp Tyr Leu Asp Leu Tyr Leu

100 105 110

Ile His Trp Pro Val Ala Phe Ala Pro Gly Ala Asp Leu Phe Pro Lys

115 120 125

Ser Glu Asp Gly Ser Glu Val Gln Leu Asn Gln Asn Val Ser Ile Val

130 135 140

Gln Thr Trp Lys Ala Met Thr Glu Leu Pro Lys Ser Lys Val Arg Ser

145 150 155 160

Val Gly Val Ser Asn Phe Thr Ile Glu His Leu Asp Ala Val Ile Glu

165 170 175

Ala Thr Gly Val Val Pro Ala Val Asn Gln Ile Glu Arg His Pro Arg

180 185 190

Leu Pro Asn Gln Pro Leu Ile Asp Tyr Cys Ala Lys Lys Gly Ile Ile

195 200 205

Ile Thr Ala Tyr Ser Ala Phe Gly Asn Asn Thr Lys Gly Leu Pro Leu

210 215 220

Leu Val Ser Ser Asp Glu Val Lys Ala Val Ala Asp Asn Leu Ser Lys

225 230 235 240

Lys Gln Gly Lys Thr Val Thr Pro Ala Gln Val Ile Leu Ala Trp Ser

245 250 255

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

260	265	270
Ile Ala Glu Asn Phe Gln Glu Val Glu Leu Asp Asp Glu Ala Ile Ala		
275	280	285
Ala Leu Asn Lys Leu Gly Glu Lys Pro Gln Arg Phe Asn Ile Pro Tyr		
290	295	300
Thr Tyr Lys Pro Arg Trp Asn Ile Asn Leu Phe Asn Thr Glu Glu Glu		
305	310	315
Lys Ala Ala Ala His Thr Ala Val Ile Lys Leu		
325	330	

<210> 5

<211> 2055

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 5

```

atgggctaca cagagggtga ccagaaggcc atcaacacca tccgcctgct cgcggtcgat 60
gccaccttca agagcaactc gggccacccg ggtgccccca tgggcatggc tcccgttgcc 120
cacgtccttt gggacaagtt catgaggttc aacccaaga accccaagtg gctgaaccgt 180
gaccgattcg ttctctccaa cggccacggc tgcattgctc agtatgctct gcttcacctg 240
ttcggctacg acctgacctc cgatgacctc aaggccttcc gaaccgtcga cagcaagact 300
cctggtcacc ccgaggccca cgatactccc ggtgtcgagg tcaccaccgg cccctgggt 360
cagggtatct ccaatgccgt cggctctggc atggcccagg cccacaccgc cgccaccttc 420
aacaagcccc gcttcaccct gtgtgacaac tacacctact gcttcctcgg cgatggctgc 480
ttgatggagg gtgtctctgc cgaggcctcg tccctggccg gccacctcca gctcggcaac 540
ctcatctgca tctacgatga caaccacatc tccattgacg gcgacaccaa ctgtgccttc 600
accgaggacg tggccaagcg ctacgaggcc tacggctggc acgtcgaggt cgtcgagaac 660
ggcgaccacg acctcgaggc catggaggcc gccatcaaga agtgccagga ggtcaaggac 720
aagccctcaa tcatcaagct gcgcaccacc attggcttcg gctctctcca ggagggcacc 780
cacggagtcc acggctctcc cctcaaggcc gacgacatca agcagctcaa gcagaagttt 840
ggcttcaacc ccgacgagag cttcgtctgc cccaaggagg tctccgacct ctacgcccgc 900
cactcagccg agggcgccgc cgccgaggag gactggaaca agctgttcgc caagtacgcc 960
gagaagtacc ccgccgaggc tgctgacctc cagcgccgcc tcaagggcga gctgcccag 1020
ggctgggaga agaacctgcc cgtctactcg ccagcgatg ctgccattgc cagccgaaag 1080
ctgtccgaga cggtcctcac caagatccac gacgtctgc ccgagctcca ggggtggttc 1140
gccgatctga ctggttccaa cctgaccgc tggaaggacg ctgttgactt ccagcccccc 1200
gccaccggcc tcggtgacta ctccggacga tacatccgt acggtgtccg cgagcacggc 1260
atgggcgcca tcatgaacgg cctggccgcc tacggacca tcatecccta cggcggtacc 1320
ttcctcaact tcgtctccta cgccgccggg gccgtccgc tgtccgtct gtcccgcgtc 1380
cgcgtcatct gggctgccac ccacgactcc attggcctgg gcgaggacgg tcctactcac 1440
cagcctatcg agactctggc tcacttccgc gccctgccc actgcatggt gtggcgcccc 1500

```

gccgacggca acgagaccag cgctgcctac tacattgccc tgacctccaa gcacaccccc 1560
 agcatcattg ccctgtctcg ccagaacctg cccagctcg agggctccgt catcgagaag 1620
 gccatcaagg gaggatacgt cctgcaggag gtcgagggtg cccagatcac cctggtctcc 1680
 accggttccg aggtttccat cgccgtggat gccgccaagt acctcctgga gaagcacaac 1740
 gtcaaggccc gcgtcgtctc catgccctgc ttcgaggttt tcgatgctca gccaaggag 1800
 tacagactct ccgtcctgcc cgacggcatc ccctctctgt ccattgaggt gatgagcacc 1860
 atgggctggg agcgatacac tcacgagcag tttggtctca accgattcgg tgcctctggc 1920
 gcctacaagg atgtctacaa gaagtctgag ttcacccccg agggcatcac caagcgcgct 1980
 cttctcacca ttgacttctg gaaggacgtc cccaacgtcc gctctcccat caaccgtgcc 2040
 ttccagcagc tcac 2055

<210> 6

<211> 685

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 6

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

Asp Gly Asp Thr Asn Cys Ala Phe Thr Glu Asp Val Ala Lys Arg Tyr		
195	200	205
Glu Ala Tyr Gly Trp His Val Glu Val Val Glu Asn Gly Asp His Asp		
210	215	220
Leu Glu Ala Met Glu Ala Ala Ile Lys Lys Cys Gln Glu Val Lys Asp		
225	230	235
Lys Pro Ser Ile Ile Lys Leu Arg Thr Thr Ile Gly Phe Gly Ser Leu		
	245	250
		255
Gln Glu Gly Thr His Gly Val His Gly Ser Pro Leu Lys Ala Asp Asp		
	260	265
		270
Ile Lys Gln Leu Lys Gln Lys Phe Gly Phe Asn Pro Asp Glu Ser Phe		
	275	280
		285
Val Val Pro Lys Glu Val Ser Asp Leu Tyr Ala Arg His Ser Ala Glu		
	290	295
		300
Gly Ala Ala Ala Glu Glu Glu Trp Asn Lys Leu Phe Ala Lys Tyr Ala		
305	310	315
		320
Glu Lys Tyr Pro Ala Glu Ala Ala Asp Leu Gln Arg Arg Leu Lys Gly		
	325	330
		335
Glu Leu Pro Glu Gly Trp Glu Lys Asn Leu Pro Val Tyr Ser Pro Ser		
	340	345
		350
Asp Ala Ala Ile Ala Ser Arg Lys Leu Ser Glu Thr Val Leu Thr Lys		
	355	360
		365
Ile His Asp Val Leu Pro Glu Leu Gln Gly Gly Ser Ala Asp Leu Thr		
	370	375
		380
Gly Ser Asn Leu Thr Arg Trp Lys Asp Ala Val Asp Phe Gln Pro Pro		
385	390	395
		400
Ala Thr Gly Leu Gly Asp Tyr Ser Gly Arg Tyr Ile Arg Tyr Gly Val		
	405	410
		415
Arg Glu His Gly Met Gly Ala Ile Met Asn Gly Leu Ala Ala Tyr Gly		
	420	425
		430
Thr Ile Ile Pro Tyr Gly Gly Thr Phe Leu Asn Phe Val Ser Tyr Ala		
	435	440
		445
Ala Gly Ala Val Arg Leu Ser Ala Leu Ser Arg Val Arg Val Ile Trp		
	450	455
		460
Val Ala Thr His Asp Ser Ile Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His		
465	470	475
		480
Gln Pro Ile Glu Thr Leu Ala His Phe Arg Ala Leu Pro Asn Cys Met		
	485	490
		495
Val Trp Arg Pro Ala Asp Gly Asn Glu Thr Ser Ala Ala Tyr Tyr Ile		

500	505	510
Ala Leu Thr Ser Lys His Thr Pro Ser Ile Ile Ala Leu Ser Arg Gln		
515	520	525
Asn Leu Pro Gln Leu Glu Gly Ser Val Ile Glu Lys Ala Ile Lys Gly		
530	535	540
Gly Tyr Val Leu Gln Glu Val Glu Gly Ala Gln Ile Thr Leu Val Ser		
545	550	555
Thr Gly Ser Glu Val Ser Ile Ala Val Asp Ala Ala Lys Tyr Leu Leu		
565	570	575
Glu Lys His Asn Val Lys Ala Arg Val Val Ser Met Pro Cys Phe Glu		
580	585	590
Val Phe Asp Ala Gln Pro Lys Glu Tyr Arg Leu Ser Val Leu Pro Asp		
595	600	605
Gly Ile Pro Ser Leu Ser Ile Glu Val Met Ser Thr Met Gly Trp Glu		
610	615	620
Arg Tyr Thr His Glu Gln Phe Gly Leu Asn Arg Phe Gly Ala Ser Gly		
625	630	635
Ala Tyr Lys Asp Val Tyr Lys Lys Phe Glu Phe Thr Pro Glu Gly Ile		
645	650	655
Thr Lys Arg Ala Leu Leu Thr Ile Asp Phe Trp Lys Asp Val Pro Asn		
660	665	670
Val Arg Ser Pro Ile Asn Arg Ala Phe Gln Gln Leu Ile		
675	680	685

<210> 7

<211> 975

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 7

```

atgagctcct ctcttgacca gctcaaggcc actggcaccg ttgtcgtctc tgacactggc 60
gactttgctg ccacgcca gtacaagccc caggatgcca ccaccaaccc ctccctcatc 120
ctggccgcct ccaagaagcc cgagtacgcc aagctgatag acgtcgccat cgactacgcc 180
aagcagaagg gcggcgacat tgagcagcag gtcgacgatg cctcgaccg cctgctggtc 240
gagttcggca aggagattct caagattgtt cccggcaagg tctccaccga ggtcgacgcc 300
cggttctcct ttgacaccaa ggctctgtc gacaaggccc tccacattat cgagctctac 360
aaggagctcg gcatcccaaa ggagcgcgtc ctcatcaaga tcgcctccac ctgggagggc 420
atcaaggccg ccgagatcct gcagcgcgac cacggcatca actgcaacct gacgctcatg 480
ttctccctgc cccaggccat cggcgccgcc gaggccggcg ccttctcat ctcccccttc 540
gttgccgca tcctcgactg gttcaaggcg agcaccaaga aggactactc caaggaggag 600
gaccccggtg tcgcctccgt caagagcatc ttcaactact acaagaagtt tggctacaag 660

```

accattgtca tgggtgcctc gttccgcaac acgggcgaga ttaccgagct cgctggctgc 720
 gactacctga ccatttctcc caacctgctc gaggagctcc tcaactccac cgagcccgtc 780
 cccaagaagc tcgacgccgc cgccgctgcc tcccttaaca ttgagaagaa gtcgtacatc 840
 aacgacgagt ccctgttccg cttcgacttc aacgaggacc agatggccgt cgagaagctg 900
 cgcgagggca tcagcaagtt tgccgccgac gccgtcacc tcaaggacat tctgaggcag 960
 aagctgtctg cttaa 975

<210> 8

<211> 324

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 8

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

Gly Ala Ser Phe Arg Asn Thr Gly Glu Ile Thr Glu Leu Ala Gly Cys
 225 230 235 240
 Asp Tyr Leu Thr Ile Ser Pro Asn Leu Leu Glu Glu Leu Leu Asn Ser
 245 250 255
 Thr Glu Pro Val Pro Lys Lys Leu Asp Ala Ala Ala Ala Ser Leu
 260 265 270
 Asn Ile Glu Lys Lys Ser Tyr Ile Asn Asp Glu Ser Leu Phe Arg Phe
 275 280 285
 Asp Phe Asn Glu Asp Gln Met Ala Val Glu Lys Leu Arg Glu Gly Ile
 290 295 300
 Ser Lys Phe Ala Ala Asp Ala Val Thr Leu Lys Asp Ile Leu Arg Gln
 305 310 315 320
 Lys Leu Ser Ala

<210> 9

<211> 9538

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pKR_ReAs11fps1

<400> 9

ctaaattgta agcgttaata ttttgtaaatttgcgtta aatttttgtt aaatcagctc 60
 attttttaac caataggccg aaatcggcaa aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
 gataggggttg agtggccgct acagggcgct cccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt 180
 gggaagggcg tttcgggtgcg ggcctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt 240
 gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg 300
 acggccagtg agcgcgacgt aatacgactc actatagggc gaattgagtg aaggccgtca 360
 aggccataggc gcgccagcgg ccgcgaaata gaagacgaag acgagaggag gagagggtgc 420
 gagagggtgc gaaactgcgc cttcagctc gctaattccg cccattacat tcagcgcaca 480
 cttggtggta catacatacc tacatacgta cccgtagttg tgcgaagcga gtcgagccag 540
 cggtcggatg tgccaatatg tacctttagt gtactcatga tagtcagcag gaagccgagg 600
 gatgatagca cgcacagcca gtctggtgtt tgtgctctgg attcagcccc tagattcact 660
 gacaaaaaga agcaagagaa gggaaaggga aaaggaagcc ctaaaaaaga gcagggttgt 720
 ccttcggcac caccgccaaa gcaacagcag tgatggacgg gactacgaca ctgtagtaca 780
 tacgccaacc caaagattcc gagttgcaat cattgccaca aaattgctcg actgtggcgg 840
 gagaggggaa agtctccgcg agggcatctc tgatgagtc cgtgccacgc cgggtttctt 900
 gccttgaatc accacaaaat gtctcagcgc ggctcatcca tggccgcctt tttgggcgtt 960
 tcgtattact cttgggtttg actgtattat cggatcaagag ccaaaggcca ctcggctttt 1020
 ccgcccttgc ctctcttcca tttccccagg cgctgatagt atgatagttt cccctcattg 1080
 cagcttttga cgtcaatgcc aataactgta ttgtattgac aaatcatttg tccaaagacg 1140

```

accgacacct ctgatatcac atacgagtag tagtacatac aatccccccc aaactccgcc 1200
tttttggcgc gtgtgtgccg cgtagctcgt gcacaatgtc gggccgccgc cgccagcggc 1260
cacttgctta gcaggaacct agtcagccgt ccttgtgtga ttaatataac ggtgagacta 1320
gcggccggtc ccttatccag ctgtccacgt tggcctgccc tcagttagcg ctcaactcat 1380
gccctcactg gcgaggcgag ggcaaggatg gaggggcagc atcgcctgag ttggagcaaa 1440
gcgccgccat gggagcagcg aaccaacgga gggatgccgt gctttgtcgt ggctgctgtg 1500
gccaatccgg gcccttggtt ggctcacaga gcgttgctgt gagaccatga gctattattg 1560
ctaggtacag tatagagaga ggagagagag agagagagtg tgagagggaa aaggtgaggt 1620
tgaagtgagg tagtaagtga aaaaaaaaaa aaaatcaaca ctgacggctg ccgtctgcc 1680
ccctcctcca ccagccacc tgcacactca gcgcgcagca tcacctaatc ttggctcgcc 1740
ttccgcagct cagggtgttt ttttttttct tctctctcgc tcgaagccgc ccttgctccc 1800
ttatttatatt ccctctccta ccttgtctgc ctttgggtcca tctgccccct tgtctgcctc 1860
tcttttgca ccatcgccct atcgtcgtct cttttttcac tcacgggagc ttgacgaaga 1920
cctgactcgt gagcctcacc tgctgatttc tctccccccc tcccgaccgg cttgactttt 1980
gtttctcctc cagtacctta tcgcgaagcc ggaagaacct tcttaacctc tagaatgagc 2040
aatccccaaa aggcaactgaa cgacttcctc agctccgaga gcgtccacac ccacgactcc 2100
tcacgtaagc agtccaacaa gcaatcctcg gacgagggcc gtagctcgag ccagccctcc 2160
caccatcact ccggaggaac taataacaat aacaacaata acaacaacaa caacaacagc 2220
aacaacaaca acaacggtaa cgatggcggc aacgacgacg actatgacta cgagatgcag 2280
gactaccgtc cctccccaca gtctgctagg cctactccca cctacgtgcc ccaatacagt 2340
gtcgagtcgg gcaccgcatt cccattcaa gaggtcattc cctcgcccta cattaacacc 2400
caagacatca accacaagga caacggcccc cttccgcat cgtcaaaccg cgctttccgc 2460
ccccgcggcc agacgaccgt cagcgccaac gtctgaaca tagaggactt ctacaagaat 2520
gcggacgatg cacacacaat tccagagtcg catctgagcc ggcgtcgctc ccgatcacgg 2580
gccacgtcaa atgcaggcca ctccgccaac accggcgcca ccaatggctg tactacgggc 2640
gcccagacca acatggagag caacgagtcc cccaggaacg tgccgataat ggtcaagcct 2700
aagaccctct accagaaccc gcagacccc acagttctcc cctcaactta ccaccgatt 2760
aacaagtgga gtcctgtaa gaatacctat taaaagagt tcctcgccga gtttatgggt 2820
acgatggta tgatcatctt cggcagcgcc gtcgtatgcc aggtcaacgt cgccggcaag 2880
atccagcagg acaacttcaa cgtagccctc gacaacctca atgtcacggg ctcttccgcc 2940
gagacaatcg acgcatgaa gagcctgact agcctagtct cctctgtcgc cggtaggcacc 3000
ttcgatgacg ttgccctcgg gtgggcccgt gccgtggtaa tgggctactt ttgtgcaggt 3060
ggctcggcaa tctctggagc ccacctgaac ccatcaatca cctcgctaa cctcgtttat 3120
cgaggctttc ccctgaagaa ggtcccatat tacttcgcag gccagctgat tgggtgctttc 3180
acgggagccc tcattctgtt catttggtac aagagggtcc ttcaggaggc atactcgac 3240
tggtggatga acgaatccgt cgctggcatg ttttgtgtct tcccaaagcc ctacctgagc 3300
tctgggcggc agtttttttag cgagttcctc tgcggcgcca tgctccaggc cgggacattc 3360
gccctgacgg atccctacac gtgcttgagc tcagatgtat ttcccctgat gatgttcatt 3420
ctcattttca tcattaacgc ttcgatggca tatcagacag gtactgcgat gaacctggca 3480

```

cgggatctgg gccccgcct cgccctctac gcagtgggct tcgaccacaa gatgctctgg 3540
gtccaccacc accacttctt ttgggtgccg atggtagggc cgtttattgg tgccctgatg 3600
gggggcctcg tctacgacgt ctgtatctac caaggccacg aatcaccggt taactggtct 3660
ctccccgtgt acaaggaaat gattatgcgc gcatggttta ggcgccccgg atggaagaag 3720
cggaaccgag ctaggaggac ttctgacctc tccgacttct cttacaataa tgacgacgac 3780
gaggaattcg gcaaacgcat ggcgcttcag aagacgaaga cgaagtctag catttccgac 3840
aacgagaacg aggccggcga gaagaagggt cagttcaagt ccgttcagcg agggaagcgg 3900
accttcggcg gcatccccgac aattcttgag gaggaggata gcatcgagac tgccagcctc 3960
ggcgccacga caacggattc tattggtctc tctgacacta gctctgagga cagccactac 4020
ggcaacgcga agaaaagtcac ctgaatgcat ggctttcgtg accgggcttc aaacaatgat 4080
gtgcgatggg gtggttcccc gttggcggag tctttgtcta ctttggttgt ctgtcgcagg 4140
tcggtagacc gcaaatgagc aactgatgga ttgttgccag cgatactata attcacatgg 4200
atggctcttg cgatcagtag ctagtgagag agagagaaca tctatccaca atgtcgagtg 4260
tctattagac atactccgag aataaagtca actgtgtctg tgatctaaag atcgattcgg 4320
cagtcgagta gcgtataaca actccgagta ccagcaaaag cacgtcgtga caggagcagg 4380
ctttgccaac tgcgcaacct tgcttgaatg aggatacacg gggtgcaaca tggctgtact 4440
gatccatcgc aacaaaaatt tctgtttata gatcaagctg gtagattcca attactccac 4500
ctcttgcgct tctccatgac atgtaagtgc acgtaggaaa ccatacccaa attgcctaca 4560
gctgcggagc atgagcctat ggcgatcagt ctggctcatgt taaccagcct gtgctctgac 4620
gttaatgcag aatagaaagc cgcggttgca atgcaaatga tgatgccttt gcagaaatgg 4680
cttgctcgct gactgatacc agtaacacct ttgcttgccc gtctagcgct gttgattgta 4740
ttcatcaciaa cctcgtctcc ctcttttggg ttgagctctt tggatggctt tccaaacgtt 4800
aatagcgcgt ttttctccac aaagtattcg tatggacgcg cttttggctg tattgcgtga 4860
gctaccagca gcccatttgg cgaagtcttg agccgcactc gcatagaata attgattgcg 4920
catttgatgc gatttttgag cggctgtttc aggcgacatt tcgcccggcc ttatttgctc 4980
cattatatca tcgacggcat gtccaatagc ccggtgatag tcttgtcgaa tatggctgtc 5040
gtgaataacc catcggcagc agatgataat gattccgcag cacgctagcg agctctccgg 5100
agcccaaaaat agaagcaccg gaattcaggg cttttttctc cacaccaatc accaaattca 5160
ctgatttcaa ggttgtagc cgctctttat cactaggtag actagcacct aattttaccg 5220
atatgtgtag tccatacatg tatgagatat acatcatgat ctcgaagtaa aaccgggtac 5280
gaagaggat aaaaagccgc gaacaacaac ttgcagatgc catcacgcaa gacgcagaca 5340
cggctctctt ctcgcgggca tcaccagagc ccaatcacct ggtcctcagg tggccacttg 5400
agcgccgtca gaatggccgc acagcagcag cagcatcacc acagatcttg gcctcaactc 5460
ttgatatttc ggcgagaata caattactag tctagtctat ggaaattgga tgttggtcgg 5520
ctctttggag actggtagta cataagccac gaacatgata ttggcgggga aggttttagct 5580
ggaaattgga acaagtcaga gaagtcgccc cgtattagct tgggtgttagt agacacagca 5640
agtcaagagt gggagttaga tttctgaatt gactgacgca gatggatgta gtattcatta 5700
ttgaagacag agcctttcca tcaacgtgca gagccatgaa atgcaatgac ctttaaggagg 5760
ggcatctctc cgctttccat ctgactgaga tactaaccgg attccatctc cattttctag 5820

cacacacata cctggagtca tacctcaacc ggccttcagt agctaaacag ctatgtagcg 5880
 catccgcgct aagccgctta ggcgataacg ttggccgggtg tcggccatac aattcttgcc 5940
 tatgactctg tctcgactaa ctgattgacc aacgtcaatt ccttatcaaa gttttcgacc 6000
 ttgataactc tcgactctaa tctcgagctt tttatttcct caacatcatt cacagtaacg 6060
 actcaagccc ttggacttgg ccagcaattg acacaaccac gcgccatctg ctccattggc 6120
 ctcatcgatc ccatcgactt cgtcagcctc gacaacgcat ccaacgcaat cacaaatact 6180
 tcaacatggc tgagaaaaag gcggacgccc cggcagccgg catgctctgg ggtggcaggt 6240
 tcacaggttg cagcctcgca aatctagctg cggattcagt atactgacct ctcgcgatgc 6300
 gcaggtgcaa ttgatcctct catgcacaag tacaatgcct ccatcgggta cgacaaggcc 6360
 ctgtacaagg aagatatacct tggatccatt gcctttgcga gggccaattc aaaggctggc 6420
 atcatcagcg aagacgaatt ccagcgatc gagcgtggct tgctccaagt gatggaagaa 6480
 tggaagcagg gcactttcgc catcatgccg aatgacgaag atgtgagagg gcacactcga 6540
 ttctaatactc aaacttcttt cgaggetgac acaatggacc agattcatac ggcaaacgaa 6600
 cgtcgcttgg gagaggtcat cggcaaggac atcgcgggaa agcttcacac aggtcgcagc 6660
 cgcaacgagc aagttgtctg tgatatgcgc atgtggcttc gcgatcggat ccgcgaaatc 6720
 gacagccaac tcgttgcttt cctcaaggtc attatcacac gtgccgaatc tgaaatgtaa 6780
 gccagccgt acccttccag ctaaatgccc cccccccccc cccccccctc tcttactgac 6840
 ggacaacctc agcgactaca tcatgcccgg atacacccat ctccagcgcg ctccagccagt 6900
 tcggtggtct caatggctca tgtcctatgc cgctgcgttc aagcaggatc tcgagcggtt 6960
 gcgtcaagtc ttcgagaggg tcaacctcag tccacttggc tgtggcgctt tggccggcaa 7020
 tccattcgga atcgaccgag actcaatagc tgcggagctt ggcttcagcg gaatcacctt 7080
 gaactccatg aatacttcgg ccgaccgca tttcctcgtc gatttcctgt cctggaactc 7140
 catcttcacc aaccacgtca gcaggtgggc tgaggacctc atcatctact cgacctctga 7200
 gttcagtttc gtccgtcttg ccgacgccta ttccacgggc agctctctca tgcccaacaa 7260
 attcaacccg gactcggttg agcttcttcg cggcaagtca gggcgtgctt tcggccaaat 7320
 ggctggtttg atgatggtga gtcctcatat caaacatctc agccagtttg acttggtttt 7380
 tgagggtgac cgcggccgcc gttccggtaa ttaactggcc tcatgggcct tcaattcact 7440
 gcccgctttc cagtcgggaa acctgtcgtg ccagctgcat taacatggtc atagctgttt 7500
 ccttgcgat tgggcgctct ccgcttcctc gctcactgac tcgctgcgct cggctgcttcg 7560
 ggtaaagcct ggggtgccta atgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa ccgtaaaaag 7620
 gccgcgttgc tggcgttttt ccataggctc cgccccctg acgagcatca caaaaatcga 7680
 cgctcaagtc agaggtggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc gtttccccct 7740
 ggaagctccc tcgtgcgtc tctgtttccg acctgcccgc ttaccggata cctgtccgcc 7800
 tttctccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta tctcagttcg 7860
 gtgtaggtcg ttcgctccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgttca gcccgaccgc 7920
 tgcgccttat ccgtaacta tcgtcttgag tccaacccgg taagacacga cttatcgcca 7980
 ctggcagcag ccaactggtaa caggattagc agagcgaggt atgtaggcgg tgctacagag 8040
 ttcttgaaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagaa cagtatttgg tatctgcgct 8100
 ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg caaacaacc 8160

accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag aaaaaaagga 8220
 tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggctctgacg ctcaagtggaa cgaaaactca 8280
 cgtaagggga ttttgggtcat gagattatca aaaaggatct tcacctagat ctttttaaat 8340
 taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc tgacagttat 8400
 tattttacca ccactttggt aatttcgcct ttcacgtaat gcacaaattc ttccagctga 8460
 tccgcacggc tggccagacg atcttcttcc tggcccagat acgcctgacg cgcttccaga 8520
 atcaccggct gatactgcgc cggcagacgt tccatggccc aatccgccgc cacatctttc 8580
 ggcgcaattt tgccggtcac cgcgctatac caaatacggc tcagggtcag caccacgttg 8640
 cgttcatcac ccgccaatc cggcgggctg ttccacaggg tcagggtttc gttcagcgct 8700
 tcaaacaggt cctgttccgg caccggatca aacagttctt ccgctgccgg accaaccagc 8760
 gccacgctat gttcacgcgc tttggtcagc agaatggcca gatcgatatac aatggtcgcc 8820
 ggttcaaaaa tgccggccag aatatcgta cgctgccatt cgccaaactg cagctcacgt 8880
 ttgccggat aacgccacgg aataatgtca tcatgcacca cgatggtcac ttccaccgca 8940
 cgcagaattt cgctttcacc cgggctcgcg ctggtttcca gcagatcgtt aatcagcgca 9000
 cgacgggtgg tttcatccag acgcacggc acggtcacca gcagatcaat atcgctatgc 9060
 ggtttcaggc cgccatccac cgcgctgcca tacagatgca cggccagcag ggtcggttcc 9120
 agatgacgtt caatcacgcc caccacttca gacagctggg tgctcacttc cgcaatcacc 9180
 gcttcacgca taatgttcag tttggttttc ggacggctgc cctgctgggt cacatcgttg 9240
 ctgctccaca gcatcaggca acggcccacc gcataacgcg cctgctgttt gctcgcacgc 9300
 ggcatgctct gcacgcaaaa aaagcaatca tagcacgcca taaacaccgc caccgcacca 9360
 ttaccgccgc tacgttcggt cagggtacgg ctccaattac ggctacgat actcttcctt 9420
 tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa 9480
 tgtatttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat ttccccgaaa agtgccac 9538

<210> 10

<211> 11413

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> pKR_Rpyr4err1

<400> 10

ctaaatgtga agcgtaata ttttgttaaa attcgcgtta aatttttgtt aaatcagctc 60
 attttttaac caataggccg aaatcgga aatcccttat aaatcaaaag aatagaccga 120
 gatagggttg agtggccgct acagggcgct cccattcgcc attcaggctg cgcaactgtt 180
 gggaagggcg tttcggtgcg ggctcttcg ctattacgcc agctggcgaa agggggatgt 240
 gctgcaaggc gattaagttg ggtaacgcca gggttttccc agtcacgacg ttgtaaaacg 300
 acggccagtg agcgcgacgt aatacgactc actatagggc gaattgagtg aaggccgtca 360
 aggccataggc gcgccagcgg ccgccagatc tcgagatagt atctcattca gtaaaatact 420
 cgtacgagtt tgagggggcg cgaggctaag ctgcaagcgg gcgcggcaac actacctgta 480
 tgtattaata aagcagcaga gagagagaga gccctggact gccggcaatc ctgagaaggg 540

```

gggatcgacc ggaccatctg cacgcagcag ggctgctgct gccaacatgg agagactaaa 600
gatgggattg gtggtacata gcaagacgct tggatgcttg ttgacgggct gctccaataa 660
gcaagctcac aagcagtgtg ttgggggtcc gcacggacgg tcgagagggc tcggacggct 720
gatattgcag acctggacga gtcagtgtg caggtaggca ctcgtatgtg tgtctttgtg 780
cttgatcaac cttgagtaag tattattagg gtgatggctt aggtaggtag gttaggtagg 840
tagtttaggt acagggaggt gaggaggga gacgtccagc tgccatatgc gccacttgca 900
gcctcaactc tgcaaaagcc agccccgatc acggcatgtc gtacatactg taaggtagta 960
cctagtagta gaacgaatgc taaaggtgca gagcaactaa cttgagcaaa accccccctc 1020
cccccatcga gattgattgc cctctacgct gaaaatagtc tcgccagccg gcgacgctta 1080
gccgtggcgc taccgcgaca tggcgcttgt tagcctgcgg tccaggttga tgcgaagcat 1140
gtcgcagggc ggggtctcgtg cgtgccgaca gccagcagag agacagaaga gagcgagaga 1200
gcgagagagc gagagagaga gagagagaga aagacgcctc gggggtttgg ctggtggctt 1260
cgatgcttgt ccgtgtcaag gggtcacgaa agacgggacg gctgagttgg tgactggcgg 1320
cgggtggcatc gaggttgag tccaggcaca tgcattggcg aaggcatgtc aggccatgtc 1380
gtgtcatgcc ccggcacagc tgaagggaat actactattg agagctgttc tccaaggcgt 1440
caagcatgtg agcaaaaact cgagttgtct agactcgact cgacttgccg ctgcagtaca 1500
acaatacagt actactcgta cacgtatgta cagcaaggag caggtggatc agcaaagttg 1560
catgataatg gactggaccg gcaacgtca aagttcgctt tgcagctccg gcatgaaggg 1620
cagacccccg ccattattag cgatgactag ccgtggaggc cactttggct ttagtgattt 1680
aaaccccgag attcatgtc gatgctctac aggtatgtat gtactagctc agctcagcct 1740
tagtaggtag gtattgaagt ctggtgggtg caggaggacc tgcaggtggg agttttgggg 1800
gaaaaagatg atgctcacca actaaaataa atagtcaggc cacacacaca acctactgag 1860
cagaaccacc acaaccagtg aagagctact ccggaattct cgactccgga gagttgggca 1920
aaatcaggcg cggaccagcg ccaaggtgtg ggtggattgg gtcgtaagaa aaagaggcat 1980
ccctacatgc agcaaccggc tggagacgag ccagcccag cactggcagc ctacagaccg 2040
aggcatctcg accacggctt caagtatcag actgggagct gtgccgagtt tgctggctac 2100
ttacctagtc aaaaaggctg ccgtgactg tctgtgtcat attaacgagc caggtctcaa 2160
ccttctgtcg aatgaaatgg aaagcggcga atgactcttc ggggttggcc agaaacaacg 2220
acgaccactg agggatcggg acgatgtaca tctactgcga tatgccgggc tcgaatgtga 2280
ctgcacacac cacacacaca cacacacag gacacatctg agcagtacta tcaaagcggg 2340
gggagtgcac ctgcactggg cacccttact gtaggtagga aggataccta aggtagaggg 2400
ctcgtgctg caagttgata tgacggccac caatcggaag ggtgtcgtat ctacatcac 2460
cagcgtcagg acacgttca caaaattccc acaagttcca gttgaaatga cccgtaggag 2520
agcgctcga gggacagaat gtacagtact atactaccta ccttagatgc catcacccct 2580
tcgcaggcca tggaatttct ggcaagtgc acccttcagc catgcctgtc cgccatcatc 2640
ataccagatc gtgtcgtggc gggcacttgg gaaggacgag ctccaaccgc cgccgctgat 2700
tggcctgatc cgccacagcc actggcgctc gcggcgagga aaaaaaaaaa tcttgcgggt 2760
gtgcagcagc attgagtga aagcgggagc cgctgcacga cgctgattcg tccgggctgc 2820
ctcgttaggg ctagaccagc aggcgggcg cgcttatttt gccctcctc aggttttttt 2880

```

```

tcacaagccc cgttttgctg ccccgcgctg ggcagaaaaa aaaaatacag caccagccac 2940
tggcacttgc acccctccac cctccgccc accacctttt aaatctctc ctcccacat 3000
ctgctttcga aattttctct ctctgctct tcgtctcgca tacccggttc aagcatccga 3060
tctgcgaatt tgtatgtgct gcctctccct ctgaccttct ggtctggtga taccatctc 3120
cctcagtttg gatcatcgcc ttattcttct tccctcttct gcctctgctt cctgctcgtt 3180
tgaggaacat cgccagctga ctctgcttgc ctgcagcga tctagtcaag aacaacacag 3240
ctctcacgct acatcacact taagtctaga atgtcttccg gaaggaccgt caccctcaac 3300
accggctaca agatccccc gatcggctac ggcacctggc aggccgctcc cggcgaggtc 3360
ggcgctggtg tctttgaggc cctcaagggt ggctaccgcc acctcgacct ggccaaggtc 3420
tacggcaacc agaaggaggt tggtaggggc atcaagaagg ctcttgctga ggtccccggc 3480
ctgaagcgcg aggatatttt catcacctcc aagctgtgga acaactcca caagcccag 3540
gacgtcgagc ccgtctcga cgacacctg gccgagcttg gctcgacta ccttgacctc 3600
tacctcatcc actggcccgt tgcctttgct cccggcgccg acctcttccc caagtccag 3660
gacggctccg aggtgcagct caaccagaat gtgtccattg tccagacctg gaaggccatg 3720
accgagctgc ccaagtccaa ggtccgctcc gtcggtgtct ccaactttac catagagcac 3780
ctcgacgccg tcatcgaggc caccggcgtc gtccccgccg tcaaccagat cgagcgccac 3840
ccccgctcc ccaaccagcc tctgatcgac tactgcgcca agaaggcat catcatcacc 3900
gcctactccg cctttggcaa caacacaaag ggctgcccc tgctcgtcag ctccgacgag 3960
gtcaaggccg tcgccgacaa cctgtccaag aagcagggca agaccgtcac tcccgcccag 4020
gtcatcctcg cctgggtcca gattggtggc cacaccgtca ttcccaagtc cgtcaccaag 4080
gcgcgcattg cggagaactt ccaggagggt gagctggatg acgaggccat tgctgcgctg 4140
aacaagttgg gcgagaagcc tcagcgggtc aacattcctt acacctaaa gcctaggtgg 4200
aacattaacc tgttcaacac cgaggaggag aaggccgctg cccacactgc tgtcatcaag 4260
ctgtaaaacta gtgaattctg gatcctttcg tgaccgggct tcaaacaatg atgtgcgatg 4320
gtgtggttcc cggttggcgg agtctttgtc tactttggtt gtctgtcgca ggtcggtaga 4380
ccgcaaatga gcaactgatg gattgttgcc agcgatacta taattcacat ggatggtctt 4440
tgcgatcagt agctagttag agagagagaa catctatcca caatgtcgag tgtctattag 4500
acatactccg agaataaagt caactgtgtc tgtgatctaa agatcgattc ggcagtcgag 4560
tagcgataaa caactccgag taccagcaaa agcacgtcgt gacaggagca ggctttgcc 4620
actgcgcaac cttgcttgaa tgaggataca cggggtgcaa catggctgta ctgatccatc 4680
gcaacaaaaa tttctgttta tagatcaagc tggtagattc caattactcc acctcttgcg 4740
cttctccatg acatgtaagt gcacgtagga aaccataccc aaattgccta cagctgcgga 4800
gcatgagcct atggcgatca gtctggtcat gttaaccagc ctgtgctctg acgttaatgc 4860
agaatagaaa gccgcggttg caatgcaaat gatgatgcct ttgcagaaat ggcttgctcg 4920
ctgactgata ccagtaacac ctttgcttgg ccgtctagcg ctgttgattg tattcatcac 4980
aacctcgtct cctcctttg ggttgagctc tttggatggc tttccaaacg ttaatagcgc 5040
tagtagtaga aatggagggt aaactgaaca tcagtcaaaa gacgtcgaga cgcagatact 5100
actagatacc tatcccagcg acggaatg gacaaggtgt cgccgccgcc aagctctcag 5160
atgcgctatc gtgcatgatg cctctcatca acaaacggcg ccagtgcagg gctagccgtg 5220

```

```

ggattgactc gagctcgcct cttctttgtg cttttctcct gtcgacatcc cggcttgccg 5280
ttggacctcg cggggacgtg caaacgaaca catcactttc aaagagagtg tttgatgctc 5340
acgctcggat gctccagccc ccccttgctt gcttgccat cattgaggct cgaaggggca 5400
gttgctcccc attccctctg ctccaacagg aactgtaacc gaaaaaaaaag ccatcctcct 5460
tcttcctctt cctcttccgc ctccctcctt tctcctcctt actaatacct actcctcctc 5520
tcctcatcga ctagactgac cccccgggtt gggccctcgc tcccgtctcc aacagagcac 5580
caccagacaa agaccctgc ccgcgcgaat ccagaccccc ccagcaattc cgggcctcgt 5640
tgatcctcct ctactgtagt tgtacataca tacctaccga ctgcattgca ttggtacagc 5700
tgcaggcact tccaggcacg gccaccaaatt tgcagcggcc cttgcttgct tgcttggttc 5760
gagaactagg atctgtgtct tttgccttgc cttgtcttgt ctgggttcct gctcgtctgc 5820
ggcaatcga acgccgccag tgcggtgcca agcaaaccag ccaaggtagg tacctaccac 5880
taggcttctt ttctcgttgt ctcaactctt ctttctctt ttgtcctctc ttatcccat 5940
cttttctctc tctctctgct ctttctctaa ccacttccct accttctctt ttttctttt 6000
cttgtcatct ccatcttggc tgacgaaaaa ggtctgactg ggtaggtatt atctggcaga 6060
cttgtgtgta tcattcacc ctttctgtct tcatagtaca tgtactgtac ctgaacggct 6120
caaccgctat ttacgactct ttttttttg tggcgttggt cacgtttgcc agctgttgct 6180
cgtctttcta gggtcctca aacttgacct gaccgagctc ctttctgga cccggtgggc 6240
ttcacttcca gctgctgagc gacctgagcc gaacatctc agtccttgct cagcgcaatt 6300
cattttcttt cttttcttt ttttttatt ctttctttac ttttattctc tctttttctc 6360
ctcttctctt tcttcttctt tctcctcctc ctccatatcc tcaactctgt ctccctcatt 6420
actaccctct cggctcctca ggtccaccaa ccctcccga cccaaacctc tgccgctgaa 6480
acccattcgg tggctgccgt ttttttttt tttttttct caccctaaa gtcgcaatat 6540
cgggtatcgc cgccggcatt gaatgcctt ctccgctagc atcgactact gctgctctgc 6600
tctcgttgcc agcgtgctc cctagaattt tgaccagggg acgagcccga cattaaagca 6660
actccctcgc ctgagacga ctcgatcgc acgaaattct cccaatgcc gacagttcct 6720
actcctcttc ctccgcacg gctgtcgcgc ttccaacgtc attcgcacag cagaattgtg 6780
ccatctctct ctttttttt cccccctta aaccgccaca acggcaccct aagggttaa 6840
ctatccaacc agccgcagcc tcagcctctc tcagcctcat cagccatggc accacaccgc 6900
acgctcaagg ccacctcgc ggccaggagc gagacggcga cgcacccgct gacggcttac 6960
ctgttcaagc tcatggacct caaggcgtc aacctgtgcc tgagcgccga cgtgccgaca 7020
gcgcgcgagc tgctgtacct ggccgacaag attggccgt cgattgtcgt gctcaagacg 7080
cactacgaca tggctctcgg ctgggacttc caccggaga cgggcacggg agcccagctg 7140
gcgtcgttg gcgcgaagca cggttctc atcttcgagg accgcaagtt tggcgacatt 7200
ggccacaccg tcgagctgca gtacacgggc ggtcggcgc gcacatcga ctgggcgcac 7260
attgtcaacg tcaacatggt gcccggcaag gcgtcgttg cctcgttgcc ccaggcgcc 7320
aagcgtggc tcgagcgcta cccctgcgag gtcaagacgt ccgtcaccgt cggcacgccc 7380
accatggact cgtttgacga cgacccgac tccaggagc ccgagcccgc cggcgccgtc 7440
aacggcatgg gctccattgg cgtcctggac aagccatct actgaaccg gtccggcgac 7500
ggccgcaagg gcagcatcgt ctccatcacc accgtcacc agcagtacga gtccgtctcc 7560

```

```

tcgccccggt taacaaaggc catcgccgag ggcgacgagt cgctcttccc gggcatcgag 7620
gaggcgccgc tgagccgcgg cctcctgatc ctgcccacaa tgtccagcca gggcaacttc 7680
atgaacaagg agtacacgca ggcctgcgtc gaggccgccc gggagcacia ggactttgtc 7740
atgggcttca tctcgcagga gacgtcaac accgagcccc acgatgcctt tatccacatg 7800
acgccccggt gccagctgcc ccccgaagac gaggaccagc agaccaacgg atcggtcggt 7860
ggagacggcc agggccagca gtacaacacg ccgcacaagc tgattggcat cgccggcagc 7920
gacattgcca ttgtgggccc gggcatcctc aaggcctcag accccgtaga ggaggcagag 7980
cggtaccgat cagcagcgtg gaaagcctac accgagaggc tgctgcgata ggggagggaa 8040
gggaagaaaag aagtaaagaa aggcatttag caagaagggg gaaaaggag ggaggacaaa 8100
cggagctgag aaagagctct tgtccaaagc ccggcatcat agaatgcagc tgtatttagg 8160
cgacctcttt ttccatcttg tcgatttttg ttatgacgta ccagttggga tgatggatga 8220
ttgtacccca gctgcgattg atgtgtatct ttgcatgcaa caacacgca tggcggaggc 8280
gaactgcaca ttggaaggtt catatatggt cctgacatat ctggtggatc tggaagcatg 8340
gaattgtatt tttgatttgg catttgcttt tgcgcgtgga gggaacatat caccctcggg 8400
catttttcat ttggtaggat ggtttggatg cagttgtcga cgatatcagc ttccatata 8460
acggaattgt tcaattgagt attacctgat ggctatttgt gtcgatcctt tgtgacattg 8520
acatgtgatg gcgcctgtac ctctaaatgt atgcagcgta acatcttcag agcacggcgg 8580
catgttctcc cctctacaat attcagataa gcagtacttg tgctgtgaga aaccattga 8640
tcgctggtgg caaccaaggc gatatgtctc caggagagga aattgcacga tcattgatcg 8700
tttgtgctac tcgtttcgtg tccaagcgaa cagagtatta atatatacca ttatatcata 8760
tgcacgtgg agtcgttact atgcagccta acctaaggtta cctacaaatc ggcaccccg 8820
agttaacgcg gaggctctca tcgccgggcg tctccaccaa ttcgacatat caatgcta 8880
cgggcgcaaa ggctccaacg cggatgctgg tcgcatgag gttccgcatt ctttttcctc 8940
cttccgaccc tctttcttac atctcactct cacatcccg ttgccggccc gctccccacc 9000
gagacacgaa acggacggca acaatcaacc gtcccccg aacagegacc tgacctccc 9060
tccccccata tacgattacg agctgaacga gacgagagag agagagagag agaagaagaa 9120
gacagagaag aggcattggc gacattgagg tggcagtcaa cgtacgggcc gagcggggcc 9180
cgactaagaa gcggagacgg atcgtcatct cgtgcaccga gtgccatcga aggaagcaaa 9240
aggtcaggct tctttcctac caagaaacaa agtgaagctt attaattaac tggcctcatg 9300
ggccttcaact tcaactgccc ctttccagtc gggaaacctg tcgtgccagc tgcattaaca 9360
tggtcatagc tgtttccttg cgtattgggc gctctccgct tcctcgctca ctgactcgct 9420
gcgctcggtc gttcgggtaa agcctggggg gcctaattag caaaaggcca gcaaaaggcc 9480
aggaaccgta aaaaggccgc gttgctggcg tttttccata ggctccgcc cctgacgag 9540
catcacaaaa atcgacgctc aagtcagagg tggcgaaacc cgacaggact ataaagatac 9600
caggcgtttc cccctggaag ctccctcgtg cgctctcctg ttccgacct gccgcttacc 9660
ggatacctgt ccgcctttct cccttcggga agcgtggcgc tttctcatag ctacgctgt 9720
aggtatctca gttcgggtga ggtcgttcgc tccaagctgg gctgtgtgca cgaaccccc 9780
gttcagcccc accgctgcgc cttatccggt aactatcgct ttgagtccaa cccgtaaga 9840
cacgacttat cgccactggc agcagccact ggtaacagga ttagcagagc gaggtatgta 9900

```

ggcggtgcta cagagttctt gaagtgggtg cctaactacg gctacactag aagaacagta 9960
 tttggtatct gcgctctgct gaagccagtt accttcgaa aaagagttgg tagctcttga 10020
 tccggcaaac aaaccaccgc tggtagcggg ggtttttttg tttgcaagca gcagattacg 10080
 cgcagaaaaa aaggatctca agaagatcct ttgatctttt ctacggggtc tgacgctcag 10140
 tggaacgaaa actcacgtta agggattttg gtcattgagat tatcaaaaag gatcttcacc 10200
 tagatccttt taaattaaaa atgaagtttt aaatcaatct aaagtatata tgagtaaact 10260
 tggctctgaca gttattatct acccaccact ttggtaattt cgcctttcac gtaatgcaca 10320
 aattctttcca gctgatccgc acggctggcc agacgatctt cttcctggcc cagatacgcc 10380
 tgacgcgctt ccagaatcac cggctgatac tgcgccggca gacgttccat ggcccaatcc 10440
 gccgccacat ctttcggcgc aattttgccg gtcaccgcgc tataccaaat acggctcagg 10500
 gtcagcacca cgttgcgctt atcaccgcc caatccggcg ggctgttcca cagggtcagg 10560
 gtttcgttca gcgcttcaaa caggtcctgt tccggcaccg gatcaaacag ttcttccgct 10620
 gccggacca ccagcgccac gctatgttca cgcgctttgg tcagcagaat ggccagatcg 10680
 atatcaatgg tcgccggtt aaaaatgccg gccagaatat cgttacgctg ccattcgcca 10740
 aactgcagct cacgtttcgc cggataacgc cacggaataa tgtcatcatg caccacgatg 10800
 gtcacttcca ccgcacgcag aatttcgctt tcaccgggc tcgcgctggt ttccagcaga 10860
 tcgttaatca gcgcacgacg ggtggtttca tccagacgca cggtcacggt caccagcaga 10920
 tcaatatcgc tatgcggttt caggccgcca tccaccgcgc tgccatacag atgcacggcc 10980
 agcagggtcg gttccagatg acgttcaatc acgcccacca cttcagacag ctgggtgctc 11040
 acttccgcaa tcaccgctt acgcataatg ttcagtttgg ttttcggacg gctgccttgc 11100
 tgggtcacat cgttgctgct ccacagcatc aggcaacggc ccaccgcata acgcgcctgc 11160
 tgtttgctcg cacgcggcat gctctgcacg ccaaaaaagc aatcatagca cgccataaac 11220
 accgccaccg caccattacc gccgctacgt tcggtcaggg tacggctcca attacggcta 11280
 cgcatactct tcctttttca atattattga agcatttatt agggttattg tctcatgagc 11340
 ggatacatat ttgaatgtat ttagaaaaat aaacaaatag gggttccgcg cacatttccc 11400
 cgaaaagtgc cac 11413

<210> 11

<211> 4768

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> mpdh缺失盒

<400> 11

aaagacatga accaggctgg agacgagata gtcaggcacc agatggcgag atgggacgag 60
 gaagaaccat ggacgaggcg aagaatgagg caaagttgga atgacggact gcagtgagt 120
 gatggagttc aaagtacctg ggtacctaca tactgcgtgc atgggccacg atacggcaa 180
 ggaccagcga cacggcaggt acgaagcacg aaccagcaag cacgaaccag catcgtccgt 240
 aaatgcaggt gcgttcctgc cttctagacg gcggtaccag ataagagacg ctgcaccgca 300
 cataacggaa ggtcactcga cccgctttca aggtggctct tgcgccacgg cctgctggaa 360

```

gccacgcccc atgattggcc agcagagagg ctcatgccac tggacagctg tactggtacc 420
tgctgcttct cacctcatgc cctgatgcgt tggtggactg atgggatggt ctcacccgta 480
cgacgtagca cgaggcctgg accactctgg cattgacacg gcactcaatg caacaatggc 540
atccgatggc cgctgtatgt tgtatcatgt agagcatcga gtacttccac tcgtacctgt 600
acctgcgctc tcgaatgggg accccccctg tggatctggc ggtacaagct gcatgtactc 660
cctggactcg gtccacaccc cccctgctgt gacgatggtc gatcagcttc aaagtccttc 720
catcttcttc gcctgttggc cccgattgag gcgccatcgt catcgggacc ccctacctga 780
cctctggcct gtaatactgt cctggctgta tgtcctgcta ccacctggag cagcctttcg 840
gtggctctcg tgcttctcgt ggactctgtc aaactcatcc tcgaattatt ataaagctgg 900
ccggactccc gctcctccta cttgactctt agttcctctc catcatcaac cagctttcac 960
cacacaaaaa ctcccatttc tctttctctt tctcttctc ctacaaccac cacatcgcca 1020
actcttcctt ctgcaactcc aactccttca cttctcttct ctgttctact cttctccacc 1080
tacttcacct accgcaatcg agagctacct tacatcaata tggccagcac ctcttcggcg 1140
atacatactc gccaccccag ccggggcgat tgtgtgtact aggtaggctc gtactatacc 1200
agcaggagag gtgctgcttg gcaatcgtgc tcagctgtta ggttgacttt gtatggtact 1260
tgtaaggtagg tcatgcagtt gctaaggtag ctagggaggg attcaacgag ccctgcttcc 1320
aatgtccatc tggataggat ggcggtggc ggggccgaag ctgggaactc gccaacagtc 1380
atatgtaata gctcaagttg atgataccgt tttgccagga ttaggatgcg agaagcagca 1440
tgaatgtcgc tcatccgatg ccgcatcacc gttgtgtcag aaacgaccaa gctaagcaac 1500
taaggtagct taccgtccac tatctcaggt aaccaggtac taccagctac cctacctgcc 1560
gtgcctacct gcttttagtat taatctttcc acctccctcc tcaatcttct tttccctcct 1620
ctcctctttt tttttcttc ctcctcttct tctccataac cattcctaac aacatcgaca 1680
ttctctccta atcaccagcc tcgcaaacc tcaggtagt attactacta ctacaatcat 1740
caccacgatg ctccgcccga cgatgcggct tctgttcgcc tgccccctct ctactcgtg 1800
cccttgacga gctaccccgc cagactctcc tgcgtaacca attttttcc ctattttacc 1860
ctcctccctc tctccctctc gtttcttctt aacaaacaac caccaccaa atctctttgg 1920
aagctcacga ctacgcaag ctcaattcgc agatacaaat ctagaatgaa aaagcctgaa 1980
ctcaccgcga cgtctgtcga gaagtttctg atcgaaaagt tcgacagcgt ctccgacctg 2040
atgcagctct cgaggggcga agaattctgt gtttcagct tcgatgtagg agggcgtgga 2100
tatgtcctgc gggtaaatag ctgcgccgat gtttcttaca aagatcgtaa tgtttatcgg 2160
cactttgcat cgcccgctc cccgattccg gaagtgttg acattgggga attcagcgag 2220
agcctgacct attgcatctc ccgccgtgca cagggtgtca cgttgcaaga cctgcctgaa 2280
accgaactgc ccgctgttct gcagccggtc gcggaggcca tggatgcgat cgctgcggcc 2340
gatcttagcc agacgagcgg gttcgggcca ttcggaccgc aaggaatcgg tcaatacact 2400
acatggcgtg atttcatatg cgcgattgct gatcccatg tgtatcactg gcaactgtg 2460
atggacgaca ccgtcagtc gtccgtcgcg caggctctcg atgagctgat gctttgggcc 2520
gaggactgcc ccgaagtccg gcacctcgtg cacgcggatt tcggctccaa caatgtcctg 2580
acggacaatg gccgcataac agcggtcatt gactggagcg aggcgatgtt cggggattcc 2640
caatacgagg tcgccaacat cttcttctgg aggccgtggt tggcttgtat ggagcagcag 2700

```

acgcgctact tcgagcggag gcatccggag cttgcaggat cgcccgcggt cggggcggtat 2760
 atgctccgca ttggtcttga ccaactctat cagagcttgg ttgacggcaa tttcgatgat 2820
 gcagcttggg cgcagggtcg atgcgacgca atcgtccgat ccggagccgg gactgtcggg 2880
 cgtacacaaa tcgcccgcag aagcgcggcc gtctggaccg atggctgtgt agaagtactc 2940
 gccgatagtg gaaaccgacg ccccgact cgtccgaggg caaaggaata atgcatgtgc 3000
 tgtgttcctc agaatgggccc ccagaagggc gtcgagcatt gtctatgaat gcaaacaaaa 3060
 atagtaaata aatagtaatt ctggccatga cgaatagagc caatctgctc cacttgacta 3120
 tccttgtgac tgtatcgtat gtcgaaccct tgactgccc ttcaaacaat tgtaaaggaa 3180
 tatgagctac aagtattgtc tcacgtttgc gtgcgagccc gtttgtacgt tattttgaga 3240
 aagcgttgcc atcacatgct cacagtcaact tggcttacga tcatgtttgc gatctttcgg 3300
 taagaataca cagagtaacg attatacatc catcgcttcc tatgattagg tactcagaca 3360
 acacatggga aacaagataa ccatcgcatg caaggtcgat tccaatcatg atctggactg 3420
 gggatttcca tctaagccat agtacccttg cgatggctct tctggcgctc tagctcggca 3480
 tcaactacgg cgctgagtgg tgaccggcct actgcatctg gctttgggct tcttttgatc 3540
 ttttacttct actttttctc ttctacaact tgtgttaaga atgcacgaat gaacggcaag 3600
 gcgctgggtt ccgggttaat agagcatcgt ctcttttggt ttctattttt tttgtactct 3660
 gctagggcat tccttgacgg gaacaaaagg tgctcgggat atcttcatgg gaagcttcag 3720
 tctatagatg gactgagcag gcagcataac gggatcaagat accacatcaa taaaagcaga 3780
 cttgatcatg accttccttt tcatccatca ttgcaatgtc ctcgtagatg tagctctagt 3840
 agcaggcaat ctaaagtga ggtcaccatg atctcaagct gaagtttcca cagccagtag 3900
 tagacttctt aacgatgcaa atgcagccac cccgtccaat acggctcggg aggaacattt 3960
 cctccaatcc gtcaaccaac ccatctcacg ttccggctcg gcagctaatt aatcagccca 4020
 ggccatgaca ggcgacacat tggatggaag ttccgtcaca cacatccgct aaagcatgcc 4080
 ataccctttg ctagcacacc acccacacc aaccagtcat gccgttccgt cccaccacc 4140
 cctcttaatc ttgggtacgt atatggatgg atggatggac agacggctgg aaggacggat 4200
 ggatggatgc atccctgaga attaccaat taggaagggc acgatgtgtg gccggctgat 4260
 tgggccctga gcatttcatt cctagtgcc ttctttttcc ttcttcttct attttctcaa 4320
 ggggcagcct tacgctaggt attccaatac gtaacatggt gtctcgaggt atgtcactgc 4380
 agagcaggtc aaagcaagac aaggctgagt ctacaggcac ctgcctccat tctcgtctct 4440
 ccgcatagta gtagtactac ctatttaacc aaatcccga ctacgccgac catggacaac 4500
 atgatgtgag acacatctgg acagaagtgg gcaatgccat ttacagcctc atgcatgcca 4560
 cttcagcagc ttgagccctt gctgcagcat tatcacagca cctactggga cagtacatag 4620
 gtagtaggta ggaagtatgc aggtagcact acatggacat gccccctcgt ggccccctat 4680
 ttctgcgcgc atttcacgca cgacaattcc tcacacgagt tggggaacgg aaagattact 4740
 gacaggccct tgttttatgc cgactcgg 4768

<210> 12

<211> 1615

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 12

ctacaaccac cacatcgcca actcttcctt ctgcaactcc aactccttca cttctcttct 60
 ctgttctact cttctccacc tacttcacct accgcaatca tggccaacgc aactggcaag 120
 aaggcagtc actttggcgc cggcaacatc ggccgtggct tcgttgcttg cttcctccac 180
 aactcgggct atgaggtcgt ttttgccgac gtcaacggag acctgattga taccatcaac 240
 tctacccccct cctacaaagt catcgaggtc ggctccgagg gcacctcaga aaacgtcatc 300
 accaactacc gggccatcaa ctctcggact cagcaggaag acctcgttga ggagatccgc 360
 actgccgacg tcgtcacctg ctccgtcggc cccaacatcc tcaagttcat cgctcccgtc 420
 atcgcaaagg gcatcgaccg ccgctccgac gacgagacgc ccctgcacgt cattgcctgc 480
 gagaacgcca ttggcgccac cgacacgctg gccagctaca tcaaggatgc caagaacacg 540
 gatcctgccc gtctcgagac gcaccacctg cgtgcccgct acgccaactc ggctattgac 600
 cggatcgtgc cggcgcagga cccaatgcc ggcttgacg tgaagctgga gaagttcttt 660
 gagtgggttg tcgacaagac cccctttgag gacattggca tcccgcccat tgagggcac 720
 cagtgggtcg acaacctgga gcccttcac gagcgcaagc tgtacacggt caaacctggc 780
 cacgtacgg ctgcctacca cggctactac cgcagaaagc gcaccgtcta cgatgctctc 840
 caggacaagg agatcatggc tgaggtccgt ggccgctga ccgagacca gaacctgctc 900
 gttgccaagc acggcatcga cgaggaggcc cagctcgctt acatgaacaa gattatcaag 960
 cgcacggca acccccatth ggaggatgct gtcgagcgtg tcggccgcgc tcccctgagg 1020
 aagctgtcgc gcaaggagcg cttcatcggc cccgccgccg aggccgccga gaacgacatg 1080
 cccgtcaagt acctcctcga cgccatcgag atgacgttcc gttccagga cgtcgagggt 1140
 gacgacgagt ccaaggagct ctctaccatc atgtccgaga acacccccga ggacgttgctc 1200
 gccaaaggtct gcggcatcaa gccgacggag aagatctacc ctgccttgt cgaggttgctc 1260
 aagcgtgtgc aggctgacag ccaggaggag taacttgca tggctcttct ggcttcttag 1320
 ctcgccatca ctacggcgc tgagtgggtga ccggcctact gcatctggct ttgggcttct 1380
 tttgatcttt tacttctact ttttctctc tacaacttgt gttaagaatg cacgaatgaa 1440
 cggcaaggcg ctgggttccg ggtaaataga gcatcgtctc ttttgtttctc ttttttttt 1500
 gtactctgct agggcattcc ttgacgggaa caaaaggtgc tcgggatatc ttcatgggaa 1560
 gcttcagtct atagatggac tgagcaggca gcataacggg tcaagatacc acatc 1615

<210> 13

<211> 397

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 13

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

Thr	Pro	Ser	Tyr	Lys	Val	Ile	Glu	Val	Gly	Ser	Glu	Gly	Thr	Ser	Glu
50			55			60									
Asn	Val	Ile	Thr	Asn	Tyr	Arg	Ala	Ile	Asn	Ser	Arg	Thr	His	Glu	Glu
65			70			75			80						
Asp	Leu	Val	Glu	Glu	Ile	Arg	Thr	Ala	Asp	Val	Val	Thr	Cys	Ser	Val
85			90			95									
Gly	Pro	Asn	Ile	Leu	Lys	Phe	Ile	Ala	Pro	Val	Ile	Ala	Lys	Gly	Ile
100			105			110									
Asp	Arg	Arg	Ser	Asp	Asp	Glu	Thr	Pro	Leu	His	Val	Ile	Ala	Cys	Glu
115			120			125									
Asn	Ala	Ile	Gly	Ala	Thr	Asp	Thr	Leu	Ala	Ser	Tyr	Ile	Lys	Asp	Ala
130			135			140									
Lys	Asn	Thr	Asp	Pro	Ala	Arg	Leu	Glu	Thr	His	His	Leu	Arg	Ala	Arg
145			150			155			160						
Tyr	Ala	Asn	Ser	Ala	Ile	Asp	Arg	Ile	Val	Pro	Ala	Gln	Asp	Pro	Asn
165			170			175									
Ala	Gly	Leu	Asp	Val	Lys	Leu	Glu	Lys	Phe	Phe	Glu	Trp	Val	Val	Asp
180			185			190									
Lys	Thr	Pro	Phe	Glu	Asp	Ile	Gly	Ile	Pro	Pro	Ile	Glu	Gly	Ile	Gln
195			200			205									
Trp	Val	Asp	Asn	Leu	Glu	Pro	Phe	Ile	Glu	Arg	Lys	Leu	Tyr	Thr	Val
210			215			220									
Asn	Thr	Gly	His	Ala	Thr	Ala	Ala	Tyr	His	Gly	Tyr	Tyr	Arg	Arg	Lys
225			230			235			240						
Arg	Thr	Val	Tyr	Asp	Ala	Leu	Gln	Asp	Lys	Glu	Ile	Met	Ala	Glu	Val
245			250			255									
Arg	Gly	Ala	Leu	Thr	Glu	Thr	Lys	Asn	Leu	Leu	Val	Ala	Lys	His	Gly
260			265			270									
Ile	Asp	Glu	Glu	Ala	Gln	Leu	Ala	Tyr	Met	Asn	Lys	Ile	Ile	Lys	Arg
275			280			285									
Ile	Gly	Asn	Pro	His	Leu	Glu	Asp	Ala	Val	Glu	Arg	Val	Gly	Arg	Ala
290			295			300									
Pro	Leu	Arg	Lys	Leu	Ser	Arg	Lys	Glu	Arg	Phe	Ile	Gly	Pro	Ala	Ala
305			310			315			320						
Glu	Ala	Ala	Glu	Asn	Asp	Met	Pro	Val	Lys	Tyr	Leu	Leu	Asp	Ala	Ile
325			330			335									
Glu	Met	Thr	Phe	Arg	Phe	Gln	Asp	Val	Glu	Gly	Asp	Asp	Glu	Ser	Lys
340			345			350									
Glu	Leu	Ser	Thr	Ile	Met	Ser	Glu	Asn	Thr	Pro	Glu	Asp	Val	Val	Ala

355	360	365
Lys Val Cys Gly Ile	Lys Pro Thr Glu Lys Ile	Tyr Pro Arg Leu Val
370	375	380
Glu Val Val Lys Arg Val	Gln Ala Asp Ser Gln Glu Glu	
385	390	395
<210> 14		
<211> 1418		
<212> DNA		
<213> 里氏木霉		
<400> 14		
cagacaacta caaacaagat ggttggcggtt gacgcagaga ttatcgccga tgataccaga 60		
atcctgggtc aggatccttt gatccccccg gctctgctca tctccgagat ccccatgact 120		
cccaatgccc tccagaccgt cgtcaagggc cggagagacg ctgcccagat catcatgggc 180		
cagaacgaca ggctattagt cgtcgtcgggt ccctgctcca tccacgaccc cgaagccgcc 240		
cacgagtacg ccgcccgcct caagcagctc tccgagaagc tcgccgacga cctctgcatc 300		
gtgatgcgcg cctacctgga gaagcctcgc acgaccgtcg gctggaaggg cctgatcaac 360		
gatcccgata tcgactcgtc cttccagatc aacaagggcc tgcgcgtctc ccgccggctc 420		
ttcgtcgacc tgacctcaa cggcatgccc attgccaccg agatgctcga caccatctcc 480		
ccccagttcc tcgccgactg catctccgtc ggcgccattg gcgcgcgaac gaccgagtcc 540		
cagctgcacc gtgagctcgc ttccggcctg tccttccccg tgggcttcaa gaacggaacc 600		
gacggcagcc ttggcgtcgc cattgatgcc attggcgtcg ccgcggccaa gcaccacttc 660		
atgggtgtga cgaagcaggg cctggctgcc attaccgcga ccaagggcaa cgagcacggc 720		
ttcgtgatcc tgagaggcgg aagcaagggc cccaactttg acaaggagag cgtccaggcg 780		
gccaagaaga tgctgacgga caagggccag aagctggcca ttatgattga ctgttctcac 840		
ggcaactctc agaagaacca caacaaccag cccaaggttg ccaaggccat tgccgaccag 900		
ctgcgcgagg gcgagcgagc cattgtcggc gtcatgatcg agtccaacat caacgagggc 960		
aacaaaaagg tccctgctga ggtccggcc ggtctcaagc gcggcgtag catcacggat 1020		
gcattgcatca actgggagga cacagtcacg gtctcagagg accttgccgc tgccgtccgc 1080		
acccgacgcg aggtcaactc ggtgctcct agcgcagagg ccaaggtgag cactctggag 1140		
gaggactaga cgtagtttta ccggaagggg cgtatgtgtg tacgatgaga gagaggaacg 1200		
aaaagcatga gggtcggttt gttgattttg aacattacga tgcgtgagtt tatgcgcgcg 1260		
aatcctggct tcctccctgg ccagcgtaaa taagaaaagt tttagggaga gcattcgaca 1320		
cggatatcga gaaattggcg caccaaagga acatgtatga aggcataatat tgttggctgt 1380		
ccactttgtc acagacggcg cacacgaacc agtttcag 1418		
<210> 15		
<211> 376		
<212> PRT		
<213> 里氏木霉		
<400> 15		

Met	Val	Gly	Val	Asp	Ala	Glu	Ile	Ile	Ala	Asp	Asp	Thr	Arg	Ile	Leu
1				5					10					15	
Gly	Gln	Asp	Pro	Leu	Ile	Pro	Pro	Ala	Leu	Leu	Ile	Ser	Glu	Ile	Pro
				20				25						30	
Met	Thr	Pro	Asn	Ala	Leu	Gln	Thr	Val	Val	Lys	Gly	Arg	Arg	Asp	Ala
				35				40						45	
Ala	Gln	Ile	Ile	Met	Gly	Gln	Asn	Asp	Arg	Leu	Leu	Val	Val	Val	Gly
				50				55						60	
Pro	Cys	Ser	Ile	His	Asp	Pro	Glu	Ala	Ala	His	Glu	Tyr	Ala	Ala	Arg
65					70					75					80
Leu	Lys	Gln	Leu	Ser	Glu	Lys	Leu	Ala	Asp	Asp	Leu	Cys	Ile	Val	Met
					85					90					95
Arg	Ala	Tyr	Leu	Glu	Lys	Pro	Arg	Thr	Thr	Val	Gly	Trp	Lys	Gly	Leu
					100					105				110	
Ile	Asn	Asp	Pro	Asp	Ile	Asp	Ser	Ser	Phe	Gln	Ile	Asn	Lys	Gly	Leu
					115					120				125	
Arg	Val	Ser	Arg	Arg	Leu	Phe	Val	Asp	Leu	Thr	Ser	Asn	Gly	Met	Pro
					130					135				140	
Ile	Ala	Thr	Glu	Met	Leu	Asp	Thr	Ile	Ser	Pro	Gln	Phe	Leu	Ala	Asp
145						150					155				160
Cys	Ile	Ser	Val	Gly	Ala	Ile	Gly	Ala	Arg	Thr	Thr	Glu	Ser	Gln	Leu
					165					170					175
His	Arg	Glu	Leu	Ala	Ser	Gly	Leu	Ser	Phe	Pro	Val	Gly	Phe	Lys	Asn
					180					185				190	
Gly	Thr	Asp	Gly	Ser	Leu	Gly	Val	Ala	Ile	Asp	Ala	Ile	Gly	Ala	Ala
					195					200				205	
Ala	Ala	Lys	His	His	Phe	Met	Gly	Val	Thr	Lys	Gln	Gly	Leu	Ala	Ala
					210					215				220	
Ile	Thr	Arg	Thr	Lys	Gly	Asn	Glu	His	Gly	Phe	Val	Ile	Leu	Arg	Gly
225						230				235					240
Gly	Ser	Lys	Gly	Pro	Asn	Phe	Asp	Lys	Glu	Ser	Val	Gln	Ala	Ala	Lys
					245					250					255
Lys	Met	Leu	Thr	Asp	Lys	Gly	Gln	Lys	Leu	Ala	Ile	Met	Ile	Asp	Cys
					260					265				270	
Ser	His	Gly	Asn	Ser	Gln	Lys	Asn	His	Asn	Asn	Gln	Pro	Lys	Val	Ala
					275					280				285	
Lys	Ala	Ile	Ala	Asp	Gln	Leu	Arg	Glu	Gly	Glu	Arg	Ala	Ile	Val	Gly
					290					295				300	
Val	Met	Ile	Glu	Ser	Asn	Ile	Asn	Glu	Gly	Asn	Gln	Lys	Val	Pro	Ala

305	310	315	320
Glu Gly Pro Ala Gly Leu Lys Arg Gly Val Ser Ile Thr Asp Ala Cys			
	325	330	335
Ile Asn Trp Glu Asp Thr Val Thr Val Leu Glu Asp Leu Ala Ala Ala			
	340	345	350
Val Arg Thr Arg Arg Glu Val Asn Ser Gly Ala Pro Ser Ala Glu Ala			
	355	360	365
Lys Val Ser Thr Leu Glu Glu Asp			
	370	375	

<210> 16

<211> 3267

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 16

```

atgacaacgc tgctcaacaa cccgccgat tcgggtcccc cgccgcgcca gattcgcttc 60
gtacataacc agggccagcc gccgtccaag cgacgcagga tcaatgcagc gtatgttctt 120
ctggggcttc tctgccttg cttcgtctgt cttgccgct cacccttggt ggcaaatggc 180
tgtcctagac agataagtgc aagatggcgc gagcatcaac accatgcggt taccagtga 240
gctataagta tgtagagcta acctcgtctt gcgcgcagat gcttgacctg tcgaagacga 300
aagacgagat gcgccggcga acgaccgctt tgcaccacat gcactaagaa cgggcaccaa 360
tgccctcggtt atcccagga caggagagat ggcgaggcag cggcaaggac gggcgacgag 420
gaaacgacgc caagggagga tgtcaaccaa ggcgaggacg acgtcgcctc tagaaaaccc 480
gctgcttcgg ggcttgcgaa ccgtccgacg tcctctgggg gcagcaatct gcaagctacg 540
catgctgctg cctctgctgc ctctgcttca cggccgccgc ggcgcaatat caagcagact 600
atcgaagtcg gcgccgatgc caaccggggc gacgcagagc cgcaacagtc tcccgtacta 660
catcaccacc accagagcca ccaccagaat caccatcctc atcatcaagc tcatctctca 720
gtcacgtccg atgacttgcc cagttcgccc accctccgcc gatcggcccc cagccgtcgc 780
atccccctatt tccgctactt tggtccacg gccatcgtcc ccggcttcaa gcaaatggtg 840
gtctctgttc gcgaccgtcg ccgttcgacg gcaggtcac attccggcgc ctctcttcat 900
tcgacgcca gcggggcgat ggccagtggc tcggccattg acagcgacat tgtccgcgaa 960
gacattccct cctacgaccc caacaactcc gccccgttc atcccttaat cattcagcta 1020
gtcaatacgt tttttgttca cgtcgggtgc aattaccctt ttctcaaaca agacaagttt 1080
ctgcaacatg taaaggagaa acgggtcgag ccgatacttg tcgatgccgt ctgcgccatc 1140
gcggcgcgct tctcggacca tcacatcctg acgggcggca acgacaagat gccccggaca 1200
gagagaggcc aggtctttgc gcaacgggcc aggcaggcca ccgtcgacac tttcccttgc 1260
ccttctgtgg gtgcggtcca ggcttgctg ctgatggcat acgagggtt cggggcggcc 1320
caggatagcg cgctgtggat gtatctgggc ttggccattc gcatggcggg tgatctcggt 1380
ctccaaaagt gcgtgggcgt tcaatatcaa ggcgaaaagg acccttggtg caccggcat 1440
cgaagtcggg ccaacgacga tgatcaggac agcccagagg cgcacaaggc ggatgccgtc 1500

```

gacgccccta gcccgaggga acagaaggag gtagagcagg agcgcatata taccttcttg 1560
 tccgtcttca tcctggaccg gctcatctcc tctggcactg gacggccggt cacgatccgc 1620
 gacggcgact acgagctcgc ctttcccgaa tccagcgtcg acctcgctac cggatggccg 1680
 aacccatttc ctgttctcct ccagatcatc cacctctacg gtcaagtgtg cgatgtgctg 1740
 aacaatctcc acgacgccc aacacattacc caggacaagt gggatcagct atccgagatg 1800
 gagcatcgac tcacgagaat gtacaagcac tgggaccgcg ggcttcagtt caacgtcaac 1860
 aactttaaga cgtacctcgg catgggccag ggcaccaact ttatcctcct ccacttttgg 1920
 ttccacgcgc tcttcatcat attgcatcaa ccgactcttc ttacccctt ttgcgaactg 1980
 cggagcgagc tccagctgct ctcggacagc cgtgagctga gcatgagcag cgcaaagacc 2040
 atctgcgaca ttttgtcctt tgccgacttg atagatccga cgagttttat tggcaaccca 2100
 ttcacgaatc agccatttta tatcgcgga tgcgcatctc tcatggaatc gagcgccaac 2160
 aatgcatctg agggctcgtc cagggagggc tcgctccca ctcaagcag tcgctccagg 2220
 caacagacga agcacttta caagcagctc cggcattcgc ttctcgcgc ggccgccaac 2280
 cagaattacc agcgatgcta caactccctg cagcagatcc aggcgtactg gggcgagta 2340
 ggctatatcc tcaccgcgct ggaccagaag tcaaaggga agtgggactg cgagacgtat 2400
 accgtggagg agtatgagag caccaagctg cccctcctc ggccgtcgat tggtagcag 2460
 ctgtcgcggt tcgagaagca gtcgtcgccc aagattgccg gtcaccgat tgcttgagat 2520
 ctgtccggca cggccaattc gccaactcc agcctgacac tcatgtatca ggctctcaac 2580
 gccagcgcag gcggccacac tggattccct ccgcctgtgc agtccgtggc gagggctgcc 2640
 aatggttcgc cggggagcat cgcgctggac ccattcgac acacgatgcc ggaagtggga 2700
 atgtttacgt cggcggttcc gcagccaaac atgtctgcca ttcgaaactc tcctcggcgg 2760
 ccatatgctg ccaattctat gaatgccgcg ggggcgaact cgcggaatca gaatatcatg 2820
 ggcttcgaag acattccgga agagtgcgcg gatgcaaagg gtctgatgtc caattactca 2880
 acctctggcc agccctacga tggatataat gcatccccga ccagcggcaa ttcgggcatg 2940
 ggcaattcta cagccgtgac gagggtcccc agtggaaaca cgacgtcgaa tgcgaatacc 3000
 cacaacaata acaacaaca cagcaccacc accaccagca gcagcaacag caacagcatg 3060
 tatttcgcgc aaaacatggc atcatatcaa gcctgggggc cgatgacggg caacatggac 3120
 gccatcacgt tcgacagcca ggacattgac attgaggcgc tggggctgca gcagccggac 3180
 ctgatgagcg ggtggctcga gtatcttccc agtgatgtgc tggggctgtt tgacgagcat 3240
 ggcgagtcgg ggcagggcgg ccattga 3267

<210> 17

<211> 983

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 17

Met Thr Thr Leu Leu Asn Asn Pro Pro Asp Ser Gly Pro Pro Pro Arg

1 5 10 15

Gln Ile Arg Phe Val His Asn Gln Gly Gln Pro Pro Ser Lys Arg Arg

20 25 30

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

	340		345		350
Gly Phe Gly Ala Ala Gln Asp Ser Ala Leu Trp Met Tyr Leu Gly Leu					
	355		360		365
Ala Ile Arg Met Ala Val Asp Leu Gly Leu Gln Lys Cys Val Gly Val					
	370		375		380
Gln Tyr Gln Gly Glu Lys Asp Pro Trp Tyr Thr Arg His Arg Ser Arg					
385			390		395
Ala Asn Asp Asp Asp Gln Asp Ser Pro Glu Ala His Lys Ala Asp Ala					
	405		410		415
Val Asp Ala Pro Ser Pro Glu Glu Gln Lys Glu Val Glu Gln Glu Arg					
	420		425		430
Ile Tyr Thr Phe Trp Ser Val Phe Ile Leu Asp Arg Leu Ile Ser Ser					
	435		440		445
Gly Thr Gly Arg Pro Val Thr Ile Arg Asp Gly Asp Tyr Glu Leu Ala					
	450		455		460
Phe Pro Glu Ser Ser Val Asp Leu Ala Thr Gly Trp Pro Asn Pro Phe					
465			470		475
Pro Val Leu Leu Gln Ile Ile His Leu Tyr Gly Gln Val Cys Asp Val					
	485		490		495
Leu Asn Asn Leu His Asp Ala Gln Asp Leu Thr Gln Asp Lys Trp Asp					
	500		505		510
Gln Leu Ser Glu Met Glu His Arg Leu Thr Arg Met Tyr Lys His Trp					
	515		520		525
Asp Pro Arg Leu Gln Phe Asn Val Asn Asn Phe Lys Thr Tyr Leu Gly					
	530		535		540
Met Gly Gln Gly Thr Asn Phe Ile Leu Leu His Phe Trp Phe His Ala					
545			550		555
Leu Phe Ile Ile Leu His Gln Pro Thr Leu Leu Thr Pro Phe Cys Glu					
	565		570		575
Leu Arg Ser Glu Leu Gln Leu Leu Ser Asp Ser Arg Glu Leu Ser Met					
	580		585		590
Ser Ser Ala Lys Thr Ile Cys Asp Ile Leu Ser Phe Ala Asp Leu Ile					
	595		600		605
Asp Pro Thr Ser Phe Ile Gly Asn Pro Phe Thr Asn Gln Pro Ile Tyr					
	610		615		620
Ile Ala Ala Cys Ala Phe Leu Met Glu Ser Ser Ala Asn Asn Ala Ser					
625			630		635
Glu Gly Ser Ser Arg Glu Gly Ser Pro Pro Thr Gln Ala Ser Arg Ser					
	645		650		655

Arg	Gln	Gln	Thr	Lys	His	Phe	Asn	Lys	Gln	Ser	Arg	His	Ser	Leu	Leu
660				665				670							
Ala	Ser	Ala	Ala	Asn	Gln	Asn	Tyr	Gln	Arg	Cys	Tyr	Asn	Ser	Leu	Gln
675				680				685							
Gln	Ile	Gln	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gly	Val	Gly	Tyr	Ile	Leu	Thr	Ala	Leu
690				695				700							
Asp	Gln	Lys	Ser	Lys	Gly	Lys	Trp	Asp	Cys	Glu	Thr	Tyr	Thr	Val	Glu
705				710				715				720			
Glu	Tyr	Glu	Ser	Thr	Lys	Leu	Pro	Pro	Pro	Arg	Pro	Ser	Ile	Gly	Glu
725				730				735							
Gln	Leu	Ser	Arg	Phe	Glu	Lys	Gln	Ser	Ser	Pro	Lys	Ile	Ala	Gly	Ser
740				745				750							
Pro	Ile	Ala	Trp	Ser	Leu	Ser	Gly	Thr	Ala	Asn	Ser	Pro	Asn	Ser	Ser
755				760				765							
Leu	Thr	Leu	Met	Tyr	Gln	Ala	Leu	Asn	Ala	Ser	Ala	Gly	Gly	His	Thr
770				775				780							
Gly	Phe	Pro	Pro	Pro	Val	Gln	Ser	Val	Ala	Arg	Ala	Ala	Asn	Gly	Ser
785				790				795				800			
Pro	Gly	Ser	Ile	Ala	Leu	Asp	Pro	Ile	Arg	His	Thr	Met	Pro	Glu	Val
805				810				815							
Gly	Met	Phe	Thr	Ser	Ala	Val	Pro	Gln	Pro	Asn	Met	Ser	Ala	Ile	Arg
820				825				830							
Asn	Ser	Pro	Arg	Arg	Pro	Tyr	Ala	Ala	Asn	Ser	Met	Asn	Ala	Ala	Gly
835				840				845							
Ala	Asn	Ser	Arg	Asn	Gln	Asn	Ile	Met	Gly	Phe	Glu	Asp	Ile	Pro	Glu
850				855				860							
Glu	Ser	Pro	Asp	Ala	Lys	Gly	Leu	Met	Ser	Asn	Tyr	Ser	Thr	Ser	Gly
865				870				875				880			
Gln	Pro	Tyr	Asp	Gly	Tyr	Asn	Ala	Ser	Pro	Thr	Ser	Gly	Asn	Ser	Gly
885				890				895							
Met	Gly	Asn	Ser	Thr	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Ser	Gly	Asn	Thr	Thr
900				905				910							
Asn	Ser	Met	Tyr	Phe	Ala	Gln	Asn	Met	Ala	Ser	Tyr	Gln	Ala	Trp	Gly
915				920				925							
Pro	Met	Thr	Gly	Asn	Met	Asp	Ala	Ile	Thr	Phe	Asp	Ser	Gln	Asp	Ile
930				935				940							
Asp	Ile	Glu	Ala	Leu	Gly	Leu	Gln	Gln	Pro	Asp	Leu	Met	Ser	Gly	Trp
945				950				955				960			
Leu	Glu	Tyr	Leu	Pro	Ser	Asp	Val	Leu	Gly	Leu	Phe	Asp	Glu	His	Gly

	965	970	975
Glu Ser Gly Gln Gly Gly His			
980			
<210> 18			
<211> 1773			
<212> DNA			
<213> 里氏木霉			
<400> 18			
atgtcaacca gacacatttt tacgtcatgt gacggcctcg tcaacaaggc catccgaggc	60		
atcattacct acaacccttc tctcagccta gacgaaagca accgggtcgt ctatgacacc	120		
acatacgaca agtccaaaagt cgtcatcata agcggaggcg gctccggaca tgagcctgcg	180		
tggacaggct atgtcgggtca aaacatgctc gcagcttcgg ttcaaggaga catctttgcc	240		
agccccagca caaagcaaat ccttgacgca gtggacgctg ttccgagtga caagggcacc	300		
attctgggtca tcacaaacta cactgggtgac tgtctgcact ttgggctggc caacgagaaa	360		
gccaatgcca aaggccacaa ctgccggacc atcatctgcg gcgacgatgt ctctgtcggc	420		
aagaacggga gcatggttgg tcgcagaggt ttggctggac agatgggtgt cctcaaagtc	480		
atgggcggag ctgctggtgc tggaggctcg ctggacgaag tttaaatct tggtgtcgca	540		
ttctcgcagc agattgtgtc tattgcggca accttgatc attgccatgt tccaggacgt	600		
gctgaacatg gcatgcttca agaaggcgtt gttgaactcg gcaccggccc tcataacgaa	660		
cccggataca agaaactatc ccctgcgcca tctgcgtctg atctcgtctc ccagattcta	720		
caatactgtc tgaatgaaaa ggatccggaa agaggctacg ttcaattcgc ccctagtgt	780		
gaagtcatac tacttctcag caactacggc ggcatatcgc acctggagat gggcgctctg	840		
gttgacgaaa ttctcgagca gcttgcaaga gactggaaga ttgagccggt gaggttatgc	900		
gccggcttca tcgagacgtc actcaatgct ccagcctttt ctgtctccgt catcaatgtg	960		
actgctgccg caaagaattg cagttactct gtggaagaga tcaagtcctt ctttgatgcc	1020		
aggacgacga cgttttggga gtccatgact gggtcgcaga cacggcggag gacgagacag	1080		
cagcagattg ttcagcccc ggaggaagag gtcaaggcag ttgatgagtc aaaagatctg	1140		
actattgatc ccacgctctt agagaagatg ttgaggaacg cttgtgaagc gctcgtcaag	1200		
gctgagccag atctcaccaa gtgggatacc gtcatgggtg atggagattg cggagagacg	1260		
ctcaggactg gagccacatc tttgctcacg gcccttgatt cgggattggc gaaatctggg	1320		
tcagttgtga gagtactatt ggaactcgaa gacatcgtgg agagcaagat gggcgggtact	1380		
ctgggcggca tattgggcat cttttttgtc tccttgctg cagctgtcga gaagaatatt	1440		
ggactggccc aaagcccgggt cttgctctgg ggaacagctc ttgcaacagc tctggagagt	1500		
ctcaggaggt atacgcctgc caaggtcgga gatcgtactg tcatggacac actcatcccc	1560		
tttgtaccg tcatgtgtga gtcgggcttt gataacggcg tcaaggcggc acaggatgga	1620		
gcggatgcga ccaagacgat gaagccgaga ctgggaagag caacgtatgt tggcgtgtcg	1680		
agtgagaaca aggagttgcc tcctgatccc ggtgcttggg gggccatggt ggccattcgc	1740		
ggtttgcgac aaggtctggt tgaagcgatc tag 1773			
<210> 19			

<211> 590

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 19

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

275	280	285
Ala Arg Asp Trp Lys Ile Glu Pro Val Arg Val Cys Ala Gly Phe Ile		
290	295	300
Glu Thr Ser Leu Asn Ala Pro Ala Phe Ser Val Ser Val Ile Asn Val		
305	310	315
Thr Ala Ala Ala Lys Asn Cys Ser Tyr Ser Val Glu Glu Ile Lys Ser		
325	330	335
Phe Phe Asp Ala Arg Thr Thr Thr Phe Trp Glu Ser Met Thr Gly Ser		
340	345	350
Gln Thr Arg Arg Arg Thr Arg Gln Gln Gln Ile Val Gln Pro Pro Glu		
355	360	365
Glu Glu Val Lys Ala Val Asp Glu Ser Lys Asp Leu Thr Ile Asp Pro		
370	375	380
Thr Leu Leu Glu Lys Met Leu Arg Asn Ala Cys Glu Ala Leu Val Lys		
385	390	395
Ala Glu Pro Asp Leu Thr Lys Trp Asp Thr Val Met Gly Asp Gly Asp		
405	410	415
Cys Gly Glu Thr Leu Arg Thr Gly Ala Thr Ser Leu Leu Thr Ala Leu		
420	425	430
Asp Ser Gly Leu Ala Lys Ser Gly Ser Val Val Arg Val Leu Leu Glu		
435	440	445
Leu Glu Asp Ile Val Glu Ser Lys Met Gly Gly Thr Leu Gly Gly Ile		
450	455	460
Leu Gly Ile Phe Phe Val Ser Leu Arg Ala Ala Val Glu Lys Asn Ile		
465	470	475
Gly Leu Ala Gln Ser Pro Val Leu Leu Trp Gly Thr Ala Leu Ala Thr		
485	490	495
Ala Leu Glu Ser Leu Arg Arg Tyr Thr Pro Ala Lys Val Gly Asp Arg		
500	505	510
Thr Val Met Asp Thr Leu Ile Pro Phe Ala Thr Val Met Cys Glu Ser		
515	520	525
Gly Phe Asp Asn Gly Val Lys Ala Ala Gln Asp Gly Ala Asp Ala Thr		
530	535	540
Lys Thr Met Lys Pro Arg Leu Gly Arg Ala Thr Tyr Val Gly Val Ser		
545	550	555
Ser Glu Asn Lys Glu Leu Pro Pro Asp Pro Gly Ala Trp Gly Ala Met		
565	570	575
Val Ala Ile Arg Gly Leu Arg Gln Gly Leu Val Glu Ala Ile		
580	585	590

<210> 20

<211> 1326

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 20

```

ttaggtgagg gtgtaaccgc catcaacgcg aatatcggca ccggtcacat agcggctggc 60
atcagacagc aggaaaagcca ctgggcccct gagatcctga ggcagaccca tcttgccctg 120
aggaatgagg gacacccatt tcttcttcag gtcaggcttt tcatccagga ttttctcggt 180
cctagttaag gatttgagtt agccggccga ggtcacggct accgttcaag aacagagaag 240
agtgggttca actcacaaaag ccgtcagcat gtatcccggc gagatacagt tgactcggat 300
gccagcatgc gcccaactcaa cggcgagcga agccgcgaga tggcggactg cggccttgga 360
ggcgttatag ggcctagtcc agttcaaccc gttagctgtc ttatgctctg ctcacccatg 420
tctccttttt ttctttcttt cttttttccg tcgtggaagg gactcacgct tgaggctggg 480
ggacgttgac aatggccccc gacatgctgc ctatcatgac catgctacca gggctcttcc 540
tctccatgag gtgacgagca accgatgtag cgaagagata tgtgccgtcg acgttgacgc 600
cccagagctt gcgaactcta tcaatggggg agttgggtggc ctcgaagttc tcggtgaagc 660
cagccgaggt gaccaggttg tcaatcttgc catgttgctg gatgatctcg gcgatacacg 720
cctcaacgga atcggcatct gagacgtcgg cgtaatgcgc cgtcactttg ggaacgctag 780
accgggtgtc agccgtctgc ctgcaaagcc gtgttacgtg cagagcggag cggcagctca 840
ctcaccgttt tgcgttgggg ttctccttga gaaaggcatc cacgagcagt ttcgtctgct 900
tctcggcctc ctctctgtc gctgcgtcag ctgtctggcc tggggtacga gcgacccgga 960
actggcacgc ggaatctcac tgttcatgtc gacgagggcc aggtcggcgc cagagaagac 1020
cattccctgg ccaatcacca gtcccagccc tcttgcgccg ccggtgacga caccgacgtt 1080
tccatcgagg gagaagccgg caagcgtagg ctgacatac tggccgccgg tgccagagac 1140
gggctcgctg ctcggaagct catgctccgg aggatactcg aactcgacct cggcgtcggt 1200
tcgagagtgg ctgccgggct tatcctgccg cggcggcggc aactatgga acttcctcgc 1260
agcggccagc ggcaggcgtc tggcggggcg ggaggcaaag gttcggcgag ccgcaagccg 1320
cagcat 1326

```

<210> 21

<211> 334

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 21

```

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

```

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

<210> 22

<211> 640

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 22

```
tcatgcctca agatgccccaa tctcttccac cttcttcgca ctcgcactcg atggatcaaa 60
ctcatacccc agccactcag tagccaacct cctcgcaact tccagcccaa caaccctctc 120
ccccatacac aacacctgcg cattattgct ctttacctg cgctcaacgc taaagctatc 180
atgtgccgta accgctcgta tgcccttgac cttgttggca gaaatggcga cgcctagacc 240
tgtgccgcag atgagcagag cgcggtccgc tttgccctcg gcgacgaggc gggcggcggc 300
ggcggcgcgcg tggggatagg gtgtcttgtc ggagggctcg tcggatccta cgtcgatgac 360
ttgggtctacg cgggcgtcgc tttcaaagtc ttttttgatg gtgtttttgt agctgacgcc 420
ggcgtcctgc ggaagcgtga gtgagctcgt gtcagtact gcccgttctg atgacctaga 480
ttatgcaatc ttgacgatga agagaccgat agtcatgaag acttatgaag ttgacacttg 540
atctcgttgt gatatgagat gtgctggttc tggcagccga aacagaagca cttacatcgc 600
agcccatggc gattctccat ttcggtgccg tcgtatatgt 640
```

<210> 23

<211> 156

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 23

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

<210> 24

<211> 726

<212> DNA

<213> 里氏木霉

<400> 24

```

tcacgcttca gctacttcct gtatcgtctt gacaaactgc tccggatcgt gtccgaaccg 60
ccccaggaac aatccgtcca gtccgctctt caacttctcg tagagccccc gcccggcact 120
ccccccatac aaaaccctcg tcgtccccgc ctcctcccca acggactcca accctctgat 180
cccagcaaca acatcgagga tgtgtctctc tccagcaggt tgactggcac caatcgccca 240
tacaggctca tacgccaaaa tgacctctgc ctcggcgggc acagcattca tgacagcatc 300
aacctgcacc cgacactcct caaccgcgat atgcacgtcg ccttgagtct tttctccaat 360
gcacacaagc ggtatcatgc cattgcgact tacagcgga gccttattcg caaccatggt 420
gtcgtcctcg ccaaagatgc tcctgcgtc tgcattgccg acttccacga gcttgacgcc 480
tgcgtgcgc aacacggagg ggctgacttc gccggtgaat gcgccttggt cttcccagtg 540
gcagtcttga gcgccggtcc aaatggcaac ggagctggac ttaagctggg cgattgtggt 600
ggtcagggag acgaagtcgg ggatgatgaa gatgtcaatg tgggagagga gctctatcgg 660
gacgtctgcc agcttgata agaagctgtt tgtgaagtct cttgtttgct ggagagaaaa 720
gtacat 726

```

<210> 25

<211> 241

<212> PRT

<213> 里氏木霉

<400> 25

```

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

```

130	135	140
Val Met Asn Ala Val Pro Ala Glu Ala Glu Val Ile Leu Ala Tyr Glu		
145	150	155
Pro Val Trp Ala Ile Gly Ala Ser Gln Pro Ala Gly Glu Lys His Ile		
165	170	175
Leu Asp Val Val Ala Gly Ile Arg Gly Leu Glu Ser Val Gly Arg Arg		
180	185	190
Ala Gly Thr Thr Arg Val Leu Tyr Gly Gly Ser Ala Gly Pro Gly Leu		
195	200	205
Tyr Glu Lys Leu Lys Ser Gly Leu Asp Gly Leu Phe Leu Gly Arg Phe		
210	215	220
Gly His Asp Pro Glu Gln Phe Val Lys Thr Ile Gln Glu Val Ala Glu		
225	230	235
Ala		240

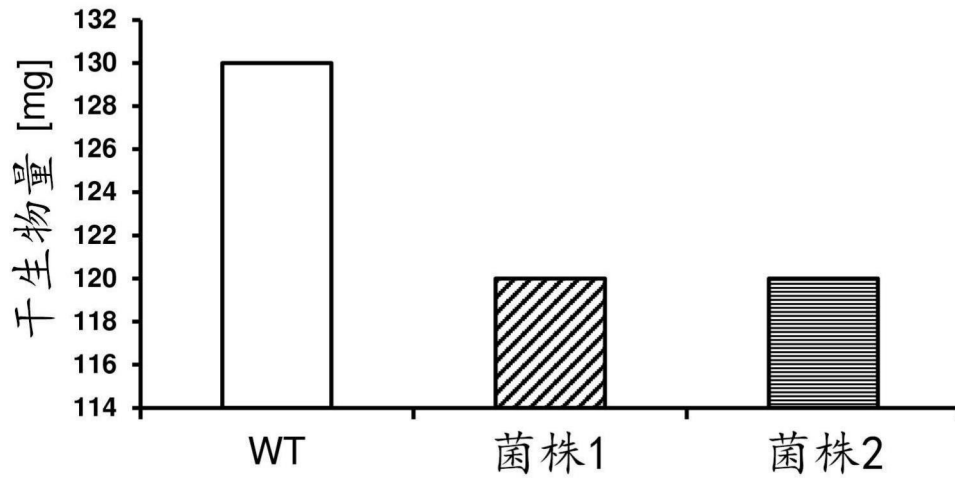


图1

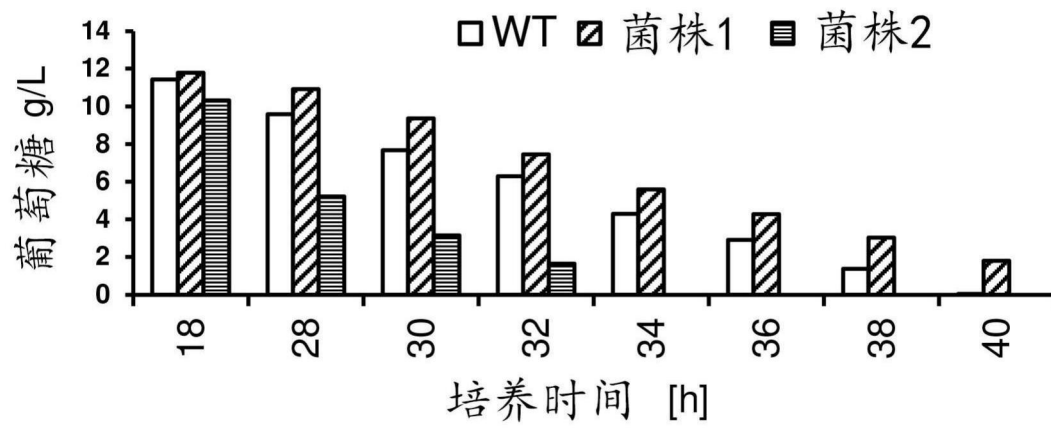


图2

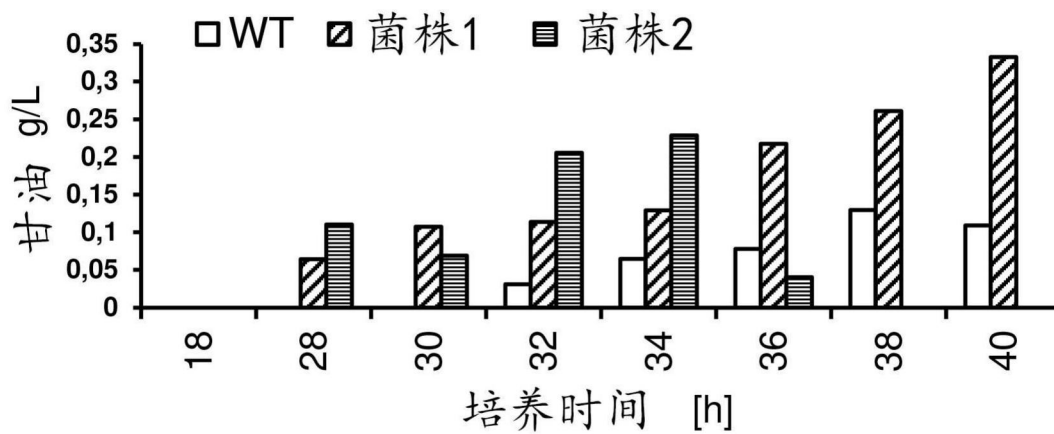


图3

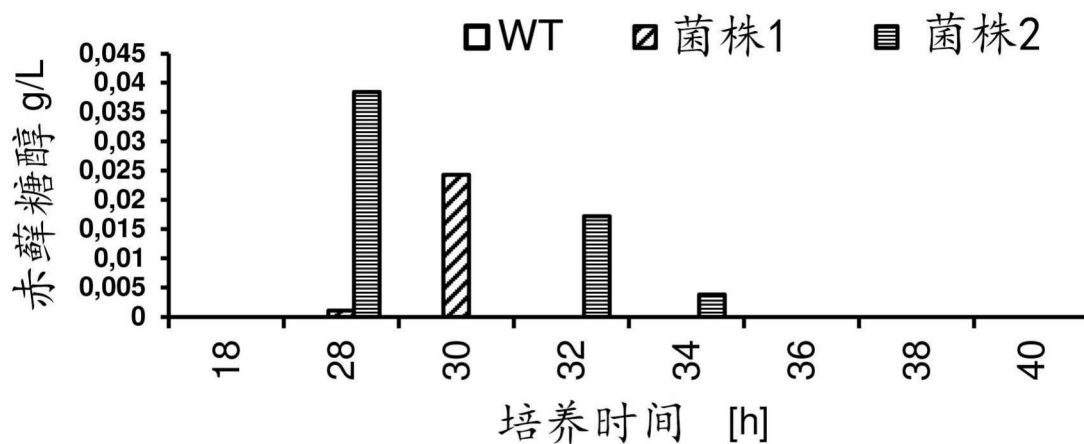


图4

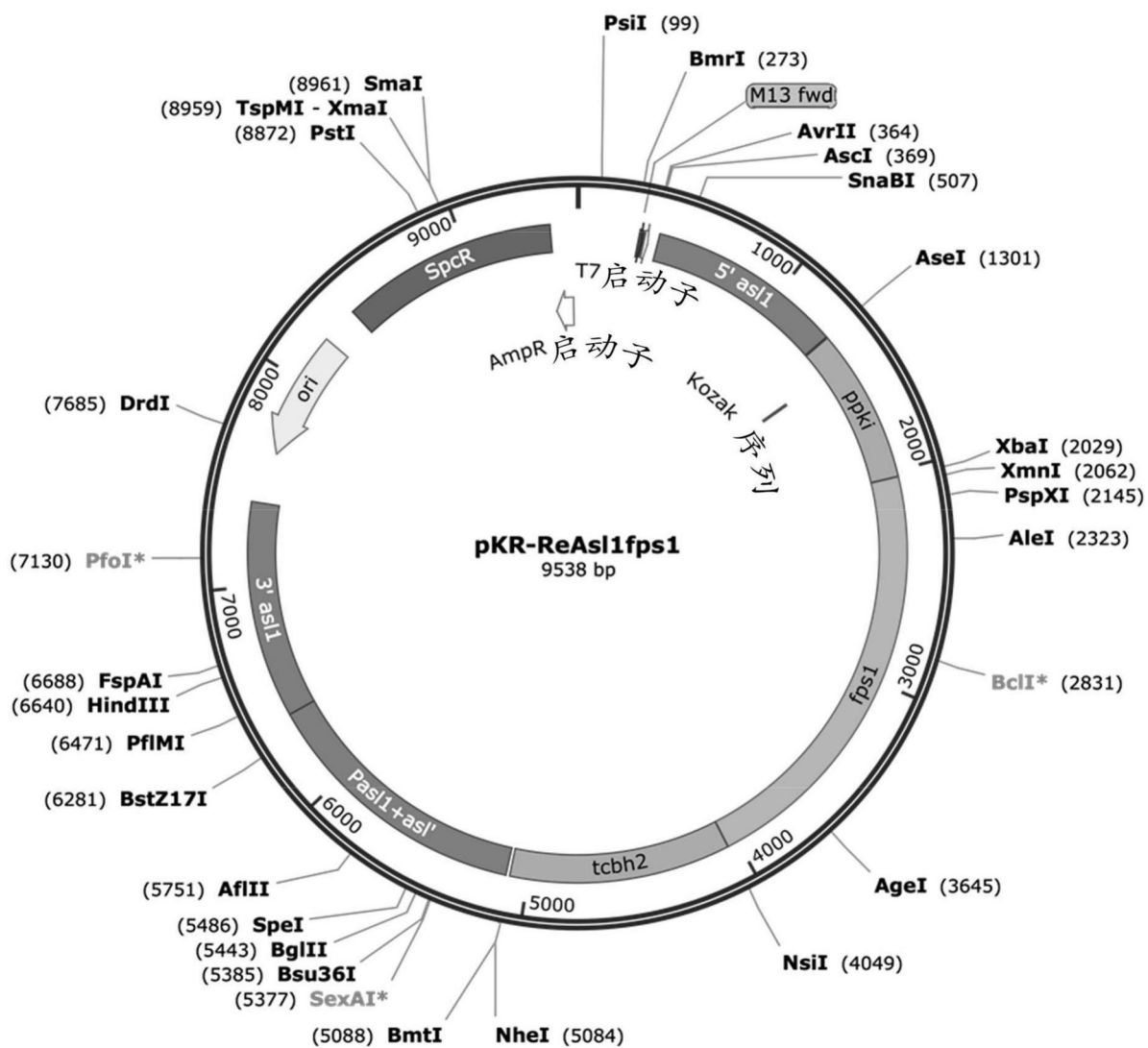


图5

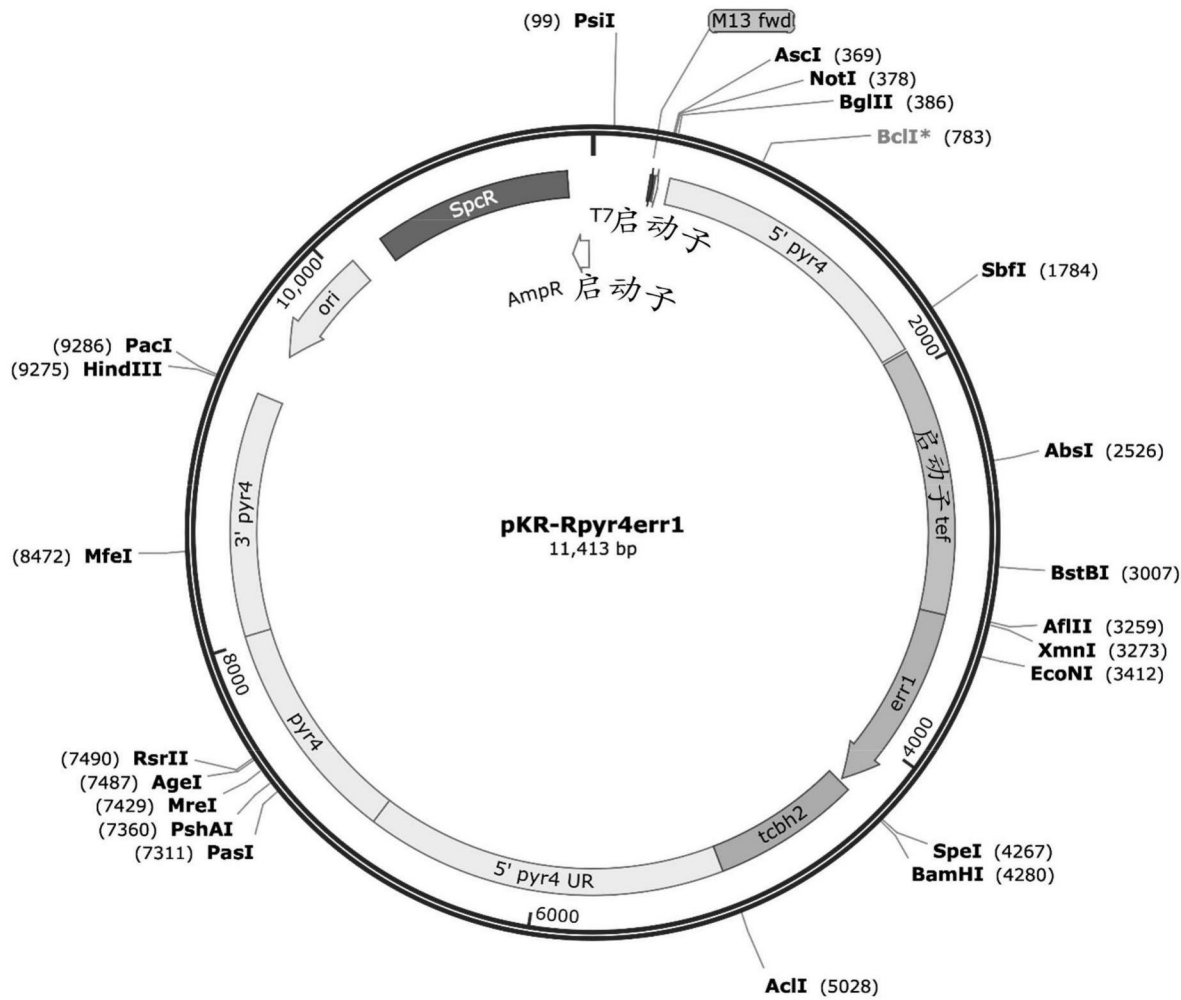
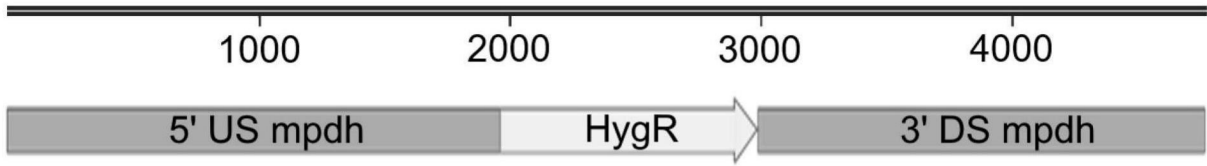


图6



缺失 -mpdh
4768 bp

图7