



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111655859 B

(45) 授权公告日 2024.09.03

(21) 申请号 201880059726.9	C12P 13/00 (2006.01)
(22) 申请日 2018.07.19	(56) 对比文件
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111655859 A	CN 102471758 A, 2012.05.23 CN 105492593 A, 2016.04.13 CN 106459888 A, 2017.02.22
(43) 申请公布日 2020.09.11	Anh Q. D. Nguyen等.Fermentative Production of the Diamine Putrescine: System Metabolic Engineering of Corynebacterium Glutamicum.《Metabolites》 .2015,第5卷第211-231页.
(30) 优先权数据 10-2017-0091628 2017.07.19 KR	Anh Q. D. Nguyen等.Fermentative Production of the Diamine Putrescine: System Metabolic Engineering of Corynebacterium Glutamicum.《Metabolites》 .2015,第5卷第211-231页.
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.03.13	GenBank.NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Streptococcus mutans] .《GenBank》.2013,第 1页.
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/KR2018/008165 2018.07.19	GenBank.nadp-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus ATCC 11842 = JCM 1002] . 《GenBank》.2015,第1-2页.
(87) PCT国际申请的公布数据 W02019/017706 KO 2019.01.24	审查员 王娟
(83) 生物保藏信息 KCCM12052P 2017.06.29	
(73) 专利权人 CJ第一制糖株式会社 地址 韩国首尔	
(72) 发明人 李京珉 李成根 金善慧 罗景洙 李红仙 裴贤贞 梁荣烈 严惠媛 李孝炯	
(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限 公司 11245 专利代理师 金德善	
(51) Int.Cl. C12N 15/77 (2006.01)	权利要求书1页 说明书39页 序列表53页

(54) 发明名称  
生产腐胺的微生物及利用其生产腐胺的方法

(57) 摘要  
本申请涉及棒杆菌属的生产腐胺的微生物，  
以及利用其生产腐胺的方法。

CN 111655859 B

1. 谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 的生产腐胺的微生物, 其中通过增强 NADP- 依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的活性, 与非修饰的微生物相比, NADPH (还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸) 的生产能力被增加,

其中所述 NADP- 依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶由 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列组成。

2. 权利要求 1 所述的生产腐胺的微生物, 其中所述微生物具有 (1) 转酮醇酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、NAD(P) 转氢酶、烟酸磷酸核糖基转移酶、和 NAD<sup>+</sup> 激酶中的一种或多种的活性的进一步增强; (2) 葡萄糖酸激酶和 NAD<sup>+</sup> 二磷酸酶中的一种或多种的活性的进一步失活; 或 (3) 进一步的 (1) 和 (2) 的组合, 从而与非修饰的微生物相比, 显示增加的 NADPH 生产能力。

3. 权利要求 2 所述的生产腐胺的微生物, 其中所述转酮醇酶由 SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:16 所示氨基酸序列组成。

4. 权利要求 2 所述的生产腐胺的微生物, 其中所述葡萄糖-6-磷酸脱氢酶由 SEQ ID NO:20 或 SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列组成。

5. 权利要求 2 所述的生产腐胺的微生物, 其中所述 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶由 SEQ ID NO:32 或 SEQ ID NO:36 所示氨基酸序列组成。

6. 权利要求 2 所述的生产腐胺的微生物, 其中所述 NAD(P) 转氢酶由 SEQ ID NO:39 或 SEQ ID NO:41 所示氨基酸序列组成。

7. 权利要求 2 所述的生产腐胺的微生物, 其中所述葡萄糖酸激酶由 SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:51 或 SEQ ID NO:59 所示氨基酸序列组成。

8. 权利要求 2 所述的生产腐胺的微生物, 其中所述烟酸磷酸核糖基转移酶由 SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65 或 SEQ ID NO:69 所示氨基酸序列组成。

9. 权利要求 2 所述的生产腐胺的微生物, 其中所述 NAD<sup>+</sup> 二磷酸酶由 SEQ ID NO:73 或 SEQ ID NO:79 所示氨基酸序列组成。

10. 权利要求 2 所述的生产腐胺的微生物, 其中所述 NAD<sup>+</sup> 激酶由 SEQ ID NO:81 或 SEQ ID NO:85 所示氨基酸序列组成。

11. 权利要求 1 所述的生产腐胺的微生物, 其中进一步引入鸟氨酸脱羧酶的活性。

12. 权利要求 1 所述的生产腐胺的微生物, 其中进一步减弱腐胺乙酰转移酶的活性。

13. 权利要求 1 所述的生产腐胺的微生物, 其中进一步增强腐胺输出蛋白的活性。

14. 权利要求 13 所述的生产腐胺的微生物, 其中所述腐胺输出蛋白的活性的增强是所述微生物中具有 SEQ ID NO:87 的氨基酸序列的蛋白质的活性的增强。

15. 权利要求 13 所述的生产腐胺的微生物, 其中所述腐胺输出蛋白的活性的增强是所述微生物中具有 SEQ ID NO:88 的氨基酸序列的蛋白质的活性的失活。

16. 生产腐胺的方法, 所述方法包括以下步骤:

(i) 在培养基中培养权利要求 1 至 15 中任一项所述的生产腐胺的微生物; 以及

(ii) 从培养的所述微生物或培养基中收集腐胺。

## 生产腐胺的微生物及利用其生产腐胺的方法

### 技术领域

[0001] 本公开涉及生产腐胺的微生物和使用相应微生物生产腐胺的方法。

### 背景技术

[0002] 棒状 (Coryneform) 微生物是革兰氏阳性微生物,常用于具有各种用途的物质(如饲料、药物、以及包括L-氨基酸和各种核酸的食品)的工业生产。近年来,从棒状微生物生产二胺和酮酸。

[0003] 为了通过微生物发酵生产有用的产物,增加了对能量来源或还原力的要求,同时加强了在微生物中目的产物的生物合成途径。其中,NADPH(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)是提供还原力的必需要素。氧化型NADP<sup>+</sup>和还原型NADPH是体内电子转移材料,且参与多种合成过程。在中心代谢途径中,已知NADPH主要由1) 氧化磷酸戊糖途径和2) TCA途径的NADP-依赖性异柠檬酸脱氢酶(Icd基因)产生。此外,各种微生物在各种可替代途径中具有苹果酸酶、葡萄糖脱氢酶和非磷酸化甘油醛-3-磷酸脱氢酶以供应NADPH。

[0004] 进一步,不管中心代谢途径,产生NADPH的酶包括转氢酶、铁氧还蛋白:NADP<sup>+</sup>氧化还原酶等。

[0005] 同时,腐胺已知为聚酰胺的原料之一。腐胺已主要通过以石油化合物为原料的化学方法生产,目前正在研究通过利用基因工程技术和发酵技术发酵来生产腐胺的技术。例如,公开了通过转化大肠杆菌(*E. coli*)和棒杆菌属(genus *Corynebacterium*)的微生物生产高浓度腐胺的方法(Morris等人,*J Biol.Chem.*241:13,3129-3135,1966,国际公开号W006/005603;国际公开号W009/125924;Qian ZD等人,*Biotechnol.Bioeng.*104:4,651-662,2009;Schneider等人,*Appl.Microbiol.Biotechnol.*88:4,859-868,2010;Schneider等人,*Appl.Microbiol.Biotechnol.*91:17-30,2011)。

[0006] 然而,还没有关于还原力与腐胺生产能力之间关系的报告。

### 发明内容

[0007] 技术问题

[0008] 本发明人已经为增加生产腐胺的微生物中腐胺的生产进行了密集的努力,且结果,通过增强NADPH以产生高浓度腐胺的各种研究,他们已经确认了在棒杆菌属的微生物中腐胺产生被增加,从而完成了本公开。

[0009] 技术方案

[0010] 本公开的目的是提供棒杆菌属的生产腐胺的微生物,其中与非修饰的微生物相比,NADPH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)的生产能力被增加。

[0011] 本发明的另一个目的是提供利用微生物生产腐胺的方法。

[0012] 技术效果

[0013] 本公开涉及生产腐胺的微生物和利用相应微生物生产腐胺的方法,并且本公开具有在棒杆菌属的微生物中增加腐胺产生的优异效果。

## 具体实施方式

[0014] 下面将详细描述本公开。同时,本公开中公开的每个描述和实施方式也可应用于其它描述和实施方式。也就是说,本公开中公开的各种要素的所有组合都落入本公开的范围。进一步,本公开的范围不受下面描述的具体描述的限制。

[0015] 为了实现上述目的,本公开的一个方面是提供棒杆菌属的生产腐胺的微生物,其中与非修饰的微生物相比,NADPH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)的生产能力增加。

[0016] 如本文所用,术语“NADPH(还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)”是一种作为电子供体参与许多氧化还原酶和脱氢酶的反应,与具有烟酰胺腺嘌呤二核苷酸结构的NADH一起提供还原能力的辅酶。已知这些辅酶的氧化物(NAD<sup>+</sup>和NADP<sup>+</sup>)以电子和质子的形式执行接收生物分解代谢中产生的能量的重要功能,并作为电子受体参与氧化还原酶的反应。

[0017] 具体地,为了提高NADPH的生产能力,棒杆菌属的生产腐胺的微生物可以具有(1) NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶、转酮醇酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、NAD(P)转氢酶、烟酸磷酸核糖基转移酶和NAD<sup>+</sup>激酶中的一种或多种的活性的增强;(2) 葡萄糖酸激酶和NAD<sup>+</sup>二磷酸酶中的一种或多种的活性的失活;或(3) (1)和(2)的组合,但不限于此。

[0018] 进一步,(1)选自NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶、转酮醇酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、NAD(P)转氢酶、烟酸磷酸核糖基转移酶和NAD<sup>+</sup>激酶的一种或多种的活性的增强可以是其中一种或多种、其中两种或更多种、其中三种或更多种、其中四种或更多种、其中五种或更多种,或全部酶的活性的增强。

[0019] 进一步,(2)选自葡萄糖酸激酶和NAD<sup>+</sup>二磷酸酶的一种或全部可被失活。

[0020] 进一步,在(3)中,(1)和(2)的组合可以是选自NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶、转酮醇酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、NAD(P)转氢酶、烟酸磷酸核糖基转移酶和NAD<sup>+</sup>激酶的一种或多种、两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、或全部酶的活性的增强与和选自葡萄糖酸激酶和NAD<sup>+</sup>二磷酸酶的任何一种或全部酶的活性(activity或activities)的失活的组合。

[0021] 如本文所用,术语“NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶”统称为通过将D-甘油醛-3-磷酸转化成3-磷酸-D-甘油酸而合成一分子NADPH的酶。

[0022] 具体地,NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶可以是包括由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的蛋白质,但不限于此,并且可以与具有由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7所示氨基酸序列的蛋白质或由SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:7所示氨基酸序列组成的蛋白质互换使用。

[0023] 如本文所用,术语“转酮醇酶”是影响磷酸戊糖途径的酶,并由D-木酮糖-5-磷酸和D-核糖-5-磷酸产生D-景天庚酮糖-7-磷酸和D-甘油醛-3-磷酸。

[0024] 具体地,转酮醇酶可以是包括由SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的蛋白质,但不限于此,并且可以与具有由SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:16所示氨基酸序列的蛋白质或由SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:16所示氨基酸序列组成的蛋白质互换使用。

[0025] 如本文所用,术语“葡萄糖-6-磷酸脱氢酶”统称为通过将β-D-葡萄糖-6-磷酸盐转化成6-磷酸D-葡萄糖酸-1,5-内酯来合成一分子NADPH的酶。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶也被称为不同的名称,G6PD、G6PDH等。进一步,在本公开中,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶可以与G6PD或

G6PDH互换使用。

[0026] 具体地,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶可以是包括由SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的蛋白质,但不限于此,并且可以与具有由SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的蛋白质或由SEQ ID NO:20或SEQ ID NO:27所示氨基酸序列组成的蛋白质互换使用。

[0027] 如本文所用,术语“6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶”统称为通过将D-葡萄糖酸6-磷酸转化成D-核酮糖5-磷酸来合成一分子NADPH的酶。6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶也被称为不同的名称、6PGD等。进一步,在本公开中,6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶可以与6PGD互换使用。

[0028] 具体地,6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶可以是包括由SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:36所示氨基酸序列的蛋白质,但不限于此,并且可以与具有由SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:36所示氨基酸序列的蛋白质或由SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:36所示氨基酸序列组成的蛋白质互换使用。

[0029] 如本文所用,术语“NAD(P)转氢酶”统称为通过将NADH的氢转移到NADP<sup>+</sup>来合成一分子NADPH的酶。

[0030] 具体地,NAD(P)转氢酶可以是包括由SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:41所示氨基酸序列的蛋白质,但不限于此,并且可以与具有由SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:41所示氨基酸序列的蛋白质或由SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:41所示氨基酸序列组成的蛋白质互换使用。

[0031] 如本文所用,术语“葡萄糖酸激酶”统称为将作为戊糖磷酸化途径中的中间体的6-磷酸-D-葡萄糖酸转化成葡萄糖酸的酶。

[0032] 具体地,葡萄糖酸激酶可以是包括由SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的蛋白质,但不限于此,并且可以与具有由SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的蛋白质或由SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:59所示氨基酸序列组成的蛋白质互换使用。

[0033] 如本文所用,术语“烟酸磷酸核糖基转移酶”统称为从烟酸(nicotinate)合成 $\beta$ -烟酸D-核糖核苷酸的酶。 $\beta$ -烟酸D-核糖核苷酸可经由脱氨基NAD<sup>+</sup>转化成NAD<sup>+</sup>,且NAD<sup>+</sup>又被可转化成NADP<sup>+</sup>,并因此烟酸磷酸核糖基转移酶的增强可增加NADPH前体的量。

[0034] 具体地,烟酸磷酸核糖基转移酶可以是包括由SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:69所示氨基酸序列的蛋白质,但不限于此,并且可以与具有由SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:69所示氨基酸序列的蛋白质或由SEQ ID NO:65或SEQ ID NO:69所示氨基酸序列组成的蛋白质互换使用。

[0035] 如本文所用,术语“NAD<sup>+</sup>二磷酸酶”统称为将NAD<sup>+</sup>裂解成 $\beta$ -烟酰胺D-核糖核苷酸的酶。NAD<sup>+</sup>二磷酸酶的减弱可以增加NAD的量,NAD是NADPH的前体。

[0036] 具体地,NAD<sup>+</sup>二磷酸酶可以是包括由SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:79所示氨基酸序列的蛋白质,但不限于此,并且可以与具有由SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:79所示氨基酸序列的蛋白质或由SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:79所示氨基酸序列组成的蛋白质互换使用。

[0037] 如本文所用,术语“NAD<sup>+</sup>激酶”统称为从NAD<sup>+</sup>合成NADP<sup>+</sup>的酶。NADP<sup>+</sup>是NADPH的前体。

[0038] 具体地,NAD<sup>+</sup>激酶可以是包括由SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:85所示氨基酸序列的蛋白质,但不限于此,并且可以与具有由SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:85所示氨基酸序列的蛋白质或由SEQ ID NO:81或SEQ ID NO:85所示氨基酸序列组成的蛋白质互换使用。

[0039] NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶、转酮醇酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、NAD(P)转氢酶、烟酸磷酸核糖基转移酶、NAD<sup>+</sup>激酶、葡萄糖酸激酶或NAD<sup>+</sup>二磷酸酶的遗传信息可以从公共数据库获得,且其实例可以是美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI)的GenBank等,但不限于此。

[0040] 关于NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶、转酮醇酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、NAD(P)转氢酶、烟酸磷酸核糖基转移酶、NAD<sup>+</sup>激酶、葡萄糖酸激酶或NAD<sup>+</sup>二磷酸酶,显示活性的给定蛋白质的氨基序列可以根据微生物的种类或菌株而变化,并且所以,且因此不限于其来源或序列。

[0041] 进一步,在本公开中,上述酶中的每一种可以包括具有上述SEQ ID NO.的氨基酸序列的蛋白质、或者与该氨基酸序列具有80%或更多、85%或更多、具体地90%或更多、更具体地95%或更多、和更加具体地99%或更多的同源性或同一性的蛋白质。

[0042] 进一步,作为与该序列具有同源性或同一性的序列,如果该氨基酸序列实质上具有与上述SEQ ID NO.的各酶蛋白的生物活性相同或相应的生物活性,则明显的是,在部分序列中具有缺失、修饰、取代或添加的氨基酸序列也应包括在本公开的范围中。

[0043] 只要其具有与NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶、转酮醇酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、NAD(P)转氢酶、烟酸磷酸核糖基转移酶、NAD<sup>+</sup>激酶、葡萄糖酸激酶或NAD<sup>+</sup>二磷酸酶的酶蛋白的生物活性相同或相应的生物活性,则编码本公开的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶、转酮醇酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、NAD(P)转氢酶、烟酸磷酸核糖基转移酶、NAD<sup>+</sup>激酶、葡萄糖酸激酶、或NAD<sup>+</sup>二磷酸酶的多核苷酸可包括编码具有上述SEQ ID NO.的氨基酸序列的蛋白质、或者与上述序列具有80%或更多、85%或更多、具体地90%或更多、更具体地95%或更多、更加具体地99%更多同源性或同一性的蛋白质的多核苷酸。例如,NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶可由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:8的多核苷酸序列编码,转酮醇酶可由SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:17的多核苷酸序列编码,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶可由SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:28的多核苷酸序列编码,6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶可由SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:37的多核苷酸序列编码,NAD(P)转氢酶可由SEQ ID NO:40或SEQ ID NO:42的多核苷酸序列编码,烟酸磷酸核糖基转移酶可由SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:70的多核苷酸序列编码,NAD<sup>+</sup>激酶可由SEQ ID NO:82或SEQ ID NO:86的多核苷酸序列编码,以及葡萄糖酸激酶可由SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:54或SEQ ID NO:60的多核苷酸序列编码,以及NAD<sup>+</sup>二磷酸酶可由SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:80的多核苷酸序列编码,但不限于此。

[0044] 进一步,在多核苷酸中,由于密码子简并性或考虑到其中待表达蛋白质的生物体中所优选的密码子,如果修饰不改变从编码区表达的蛋白质的氨基酸序列,则可以在编码区中进行各种修饰。因此,只要多核苷酸序列是编码酶蛋白的多核苷酸序列,编码NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶、转酮醇酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、NAD(P)转氢酶、烟酸磷酸核糖基转移酶、NAD<sup>+</sup>激酶、葡萄糖酸激酶或NAD<sup>+</sup>二磷酸酶的任何多核苷酸均可不受限制地被包括。

[0045] 进一步,可由已知核苷酸序列——例如,在严格条件下与多核苷酸序列的全部或部分的互补序列杂交以编码具有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶、转酮醇酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、NAD(P)转氢酶、烟酸磷酸核糖基转移酶、NAD<sup>+</sup>激酶、葡

葡萄糖酸激酶、或NAD<sup>+</sup>二磷酸酶的酶蛋白的活性的蛋白质的序列——生产的探针,也可以不受限制地被包括。

[0046] “同源性”或“同一性”是指两个给定氨基酸序列或核苷酸序列之间的相关程度,且可以表示为百分比。

[0047] 术语“同源性”和“同一性”经常可以互换使用。

[0048] 保守的多核苷酸或多肽的序列同源性或同一性可以通过标准比对算法来确定,并且可以与由使用的程序建立的默认空位罚值(default gap penalty)一起使用。实质上,同源或相同的序列可以在中等或高度严格的条件下杂交,使得序列的全长或全长的至少约50%、60%、70%、80%或90%或更多可以杂交。此外,也考虑在杂交中含有代替密码子的简并密码子的多核苷酸。

[0049] 任何两个多核苷酸或多肽序列是否具有同源性、相似性或同一性可以,利用例如,在Pearson等人,(1988) [Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85]:2444中的默认参数,利用已知的计算机算法如“FASTA”程序来确定,或使用如EMBOSS包的Needleman程序(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice等人,2000,Trends Genet.16:276-277)(版本5.0.0或其后续版本)中实施的Needleman-Wunsch算法(Needleman and Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453)来确定(包括GCG程序包(Devereux,J.等人,Nucleic Acids Research 12:387(1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul,[S.][F.,][ET AL,J MOLEC BIOL 215]:403(1990);Guide to Huge Computers,Martin J.Bishop,[ED.,] Academic Press,San Diego,1994,和[CARILLO ETA/.](1988)SIAM J Applied Math 48:1073)。例如,可利用美国国家生物技术信息中心的BLAST或ClustalW来确定同源性、相似性或同一性。

[0050] 多核苷酸或多肽的同源性、相似性、或同一性例如可通过使用例如GAP计算机程序(如Smith and Waterman,Adv.Appl.Math(1981)2:482中公开的,Needleman等人,(1970),J Mol Biol.48:443)比较序列信息来确定。简而言之,GAP程序将相似性定义为相似的对比如号(即,核苷酸或氨基酸)的数量除以两序列中较短者的符号总数。GAP程序的默认参数可包括:(1)一元比较矩阵(含有同一性值为1和非同一性值为0)和如Schwartz and Dayhoff, eds.,Atlas Of Protein Sequence And Structure,National Biomedical Research Foundation,pp.353-358(1979)中公开的Gribskov等人,(1986),Nucl.Acids Res.14:6745的加权比较矩阵(或EDNAFULL(NCBI NUC4.4的EMBOSS版本)取代矩阵);(2)每个空位的罚值为3.0,且每个空位中每个符号为附加的0.10罚值(或空位开放罚值(gap open penalty)为10和空位延伸罚值(gap extension penalty)为0.5);和(3)末端空位无罚值。因此,如本文所用,术语“同源性”或“同一性”代表序列之间的相关性。

[0051] 如本文所用,术语“活性的增强”是指与微生物具有的内源活性或其修饰前的活性相比,酶蛋白的活性被引入或活性被提高。活性的“引入”是指微生物原本不具有的特定蛋白质的活性被自然或人工地表现出来。“非修饰微生物”是指当待比较微生物的性状由自然或人为因素引起的微生物特定蛋白的遗传变异而改变时,具有由转化前亲本菌株原本具有的特定蛋白活性的微生物。“内源活性”是指当微生物的性状因自然或人为因素引起的遗传变异而改变时,由转化前亲本菌株所原本具有的特定蛋白质的活性。在本公开中,非修饰可以与具有内源活性而无遗传变异的状态互换使用。

[0052] 例如,活性的增强可包括外源性NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶和/或NAD(P)转氢酶的引入或引入后其活性的增强,以及内源性转酮醇酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、烟酸磷酸核糖基转移酶和/或NAD<sup>+</sup>激酶的活性的增强的全部。具体地,本公开中的活性的增强可以通过以下方式进行:

[0053] (1) 增加编码每种酶的多核苷酸的拷贝数,

[0054] (2) 修饰用于增加多核苷酸的表达的表达控制序列,

[0055] (3) 修饰染色体上的多核苷酸序列以增强每种酶的活性;以及

[0056] (4) 通过其组合来修饰以用于增强,但不限于此。

[0057] 1) 多核苷酸的拷贝数的增加可以但不特别限于以多核苷酸可操作地连接到载体的形式进行,或者通过将多核苷酸插入到宿主细胞的染色体中进行。进一步,拷贝数的增加可通过将显示酶活性的外源多核苷酸或多核苷酸的密码子优化的变体多核苷酸引入到宿主细胞中来进行。只要外源多核苷酸序列表现出与上述酶的活性相同/相似的活性,则任何外源多核苷酸序列可以在其来源或序列上不受限制地使用。引入可以通过本领域技术人员适当选择的已知转化方法进行,并且可以通过在宿主细胞中表达引入的多核苷酸来产生酶,且结果可以增加其活性。

[0058] 接下来,2) 用于增加多核苷酸的表达的表达控制序列的修饰可以但不特别限于,通过核苷酸序列的缺失、插入、非保守或保守取代或其组合来诱导序列的修饰以进一步增强表达控制序列的活性来进行,或者通过用具有更强活性的核苷酸序列置换多核苷酸序列来进行。表达控制序列包括但不特别限于启动子、操纵子序列、编码核糖体结合位点的序列、以及调节转录和翻译的终止的序列。

[0059] 具体地,代替原始启动子的强外源启动子可以被连接到多核苷酸的表达单元的上游区域。强启动子的实例可以包括CJ7启动子、lysCP1启动子、EF-Tu启动子、groEL启动子、aceA或aceB启动子等。更具体地,棒杆菌来源的启动子lysCP1启动子(WO 2009/096689)或CJ7启动子(WO2006/065095)可以可操作地连接以增加编码酶的多核苷酸的表达率,但不限于此。

[0060] 此外,3) 染色体上的多核苷酸序列的修饰可以但不特别限于,通过多核苷酸序列的缺失、插入、非保守或保守取代或其组合来诱导表达控制序列的修饰以进一步增强多核苷酸序列的活性来进行,或者通过用改进以具有更强活性的多核苷酸序列置换多核苷酸序列来进行。

[0061] 最后,4) 通过1)至3)的组合来修饰以用于增强的方法可以通过应用以下方法中的一种或多种来进行:增加编码蛋白质的多核苷酸的拷贝数、修饰用于增加多核苷酸的表达的表达控制序列、修饰染色体上的多核苷酸序列、以及引入显示蛋白质活性的外源多核苷酸或其密码子被密码子优化的变体多核苷酸。

[0062] 如本文所用,术语“载体”是包括编码期望的蛋白的多核苷酸的核苷酸序列的DNA构建体(construct),该期望的蛋白可操作地被连接至适当的调节序列以能够在适当的宿主细胞中表达期望的蛋白。调节序列可以包括能够起始转录的启动子、用于调节这种转录的任何操纵子序列、编码适当的mRNA核糖体结合域的序列、和调节转录和翻译的终止的序列。在载体被转化到适当的宿主细胞中后,载体可以独立于宿主基因组复制或起作用,且可以被整合到其基因组中。

[0063] 只要本公开中使用的载体能够在宿主中复制,则其没有特别的限制,并且可以是本领域中已知的任何载体。常用载体的实例可包括天然或重组质粒、粘粒、病毒和噬菌体。例如,作为噬菌体载体或粘粒载体,可以使用pWE15、M13、MBL3、MBL4、IXII、ASHII、APII、t10、t11、Charon4A和Charon21A等。作为质粒载体,可以使用pBR型、pUC型、pBluescriptII型、pGEM型、pTZ型、pCL型、和pET型等。具体地,可以使用pDZ、pACYC177、pACYC184、pCL、pECCG117、pUC19、pBR322、pMW118、和pCC1BAC载体等,但不限于此。

[0064] 本公开中可适用的载体没有特别的限制,可以使用已知的表达载体。进一步,可以使用用于细胞内染色体插入的载体将编码期望的蛋白的多核苷酸插入到染色体中。多核苷酸的染色体插入可以通过本领域已知的任何方法(例如,同源重组)进行,但不限于此。可进一步包括选择标记以确认染色体插入。选择标记用于选择被载体转化的细胞,即确认所期望的核酸分子的插入,且选择标记可包括提供可选择表型的标记,如耐药性、辅源营养、对细胞毒剂的耐性、或表面蛋白的表达。由于在用选择剂处理的环境下,只有表达选择标记的细胞能够存活或表现出不同的表型,所以转化的细胞可以被选择。

[0065] 如本文所用,术语“转化”意指将包括编码目的蛋白的多核苷酸的载体引入到宿主细胞中,以这种方式使由多核苷酸编码的蛋白在宿主细胞中表达。只要转化的多核苷酸可以在宿主细胞中表达,其就可能被整合到宿主细胞的染色体中并位于宿主细胞的染色体中或其可存在于染色体外、或与之无关。进一步,多核苷酸包括编码目的蛋白的DNA和RNA。只要多核苷酸能够被引入到宿主细胞中并在其中表达,其可以以任何形式被引入。例如,可以以表达盒的形式将多核苷酸引入到宿主细胞中,表达盒是包括用于其自主表达所需的所有元件的基因构建体。通常,表达盒包括可操作地连接到多核苷酸的启动子、转录终止信号、核糖体结合位点、和翻译终止信号。表达盒可以是可自复制表达载体的形式。而且,多核苷酸可以原样被引入宿主细胞中并可操作地被连接到在宿主细胞中表达所需的序列,但不限于此。进行转化方法包括将核酸引入到细胞中的任何方法,并且可以依据宿主细胞通过选择本领域已知的适当的标准技术进行转化。例如,方法可以包括电穿孔、磷酸钙( $\text{CaPO}_4$ )沉淀、氯化钙( $\text{CaCl}_2$ )沉淀、显微注射、聚乙二醇(PEG)法、DEAE-葡聚糖法、阳离子脂质体法、和乙酸锂-DMSO法等,但不限于此。

[0066] 如本文所用,术语“可操作地连接”意指编码本公开的期望的蛋白的多核苷酸序列与起始和介导多核苷酸的转录的启动子序列之间的功能性连接。可操作的连接可以利用本领域已知的遗传重组技术制备,以及位点特异性DNA切割和连接可以使用本领域的限制酶和连接酶制备,但不限于此。

[0067] 如本文所用,术语“失活”是指与微生物原本具有的酶蛋白的内源活性或修饰前的活性相比,活性的减弱、活性的不表达、或即使表达也没有活性。失活是指由于编码酶的多核苷酸中的修饰而使酶的活性与微生物原本具有的活性相比被减弱或被消除的情况、由于编码该酶的基因的表达抑制或其翻译抑制而使整个细胞内酶活性与微生物的天然型菌株的酶活性相比被减弱或被消除的情况、部分或全部基因缺失的情况、以及它们的组合的概念,但不限于此。

[0068] 酶活性的失活可以通过应用本领域公知的各种方法来实现。方法的实例可以包括1)用突变基因置换染色体上编码酶的基因以使酶活性可被减弱的方法,包括当酶活性被消除时的情况;2)修饰染色体上编码酶的基因的表达调节序列的方法;3)用具有弱活性或无

活性的序列置换编码酶的基因的表达调节序列的方法;4) 缺失染色体上编码酶的部分或全部基因的方法;5) 引入反义寡核苷酸(例如,反义RNA)的方法,反义寡核苷酸经由与染色体上的基因转录物的互补结合抑制从mRNA翻译成酶;6) 通过编码酶的基因的SD序列的前端上人工添加与SD序列互补的序列而形成二级结构,使核糖体不能附着的方法;7) 在相应序列的ORF(开放阅读框)的3'末端上添加启动子以反转录的RTE(反转录工程)方法等,以及还包括其组合,但不限于此。

[0069] 修饰染色体上的核苷酸序列的方法可以通过核苷酸序列的缺失、插入、非保守或保守取代或它们的组合来诱导序列上的修饰,以进一步减弱酶的活性来进行,或者可以通过用改进为具有较弱活性的核苷酸序列或改进为没有活性的核苷酸序列置换该核苷酸序列来进行,但不限于此。

[0070] 修饰表达调节序列的方法可以通过核苷酸序列的缺失、插入、非保守或保守取代、或其组合来诱导表达调控序列上的修饰,以进一步减弱表达调节序列的活性来进行,或者可以通过用具有较弱活性的核苷酸序列置换核苷酸序列来进行。表达调节序列包括启动子、操纵子序列、编码核糖体结合位点的序列,以及用于调节转录和翻译终止的序列,但不限于此。

[0071] 进一步,缺失编码酶的部分或全部多核苷酸的方法可以通过将经由用于在微生物中染色体插入的载体在染色体内部编码内源性目的蛋白的多核苷酸置换为缺失了部分核苷酸序列的多核苷酸或标记来进行。缺失部分或全部多核苷酸的方法的实例可以包括经由同源重组缺失多核苷酸的方法,但不限于此。

[0072] 如果多核苷酸是可发挥作用的多核苷酸的集合,则可将其描述为基因。在本公开中,多核苷酸可与基因互换地使用。

[0073] 如本文所用,术语“部分”,尽管它可以依据多核苷酸的种类变化,可具体地指1个核苷酸至300个核苷酸,更具体地指1个核苷酸至100个核苷酸,且更加具体地指1个核苷酸至50个核苷酸,但并不特别限于此。

[0074] 如本文所用,术语“生产腐胺的微生物”或“具有腐胺生产能力的微生物”是指天然具有腐胺生产能力的微生物、或通过不具有腐胺生产能力或腐胺生产能力显著低的亲本菌株中的变异而获得腐胺生产能力的微生物。

[0075] 具体地,本公开中的生产腐胺的微生物可以是指微生物自身的天然形式、或者是通过腐胺生产机制相关的外源多核苷酸的插入或通过内源性基因的活性的增强或失活而获得腐胺生产能力的微生物。

[0076] 更具体地,本公开中生产腐胺的微生物可以是“棒杆菌属的微生物”。棒杆菌属的微生物可以具体地包括谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、产氨棒杆菌(*Corynebacterium ammoniagenes*)、乳发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*)、黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)、热氨基棒杆菌(*Corynebacterium thermoaminogenes*)、有效棒杆菌(*Corynebacterium efficiens*)等,但不限于此。更加具体地,本公开中的棒杆菌属的微生物可以是谷氨酸棒杆菌。

[0077] 生产腐胺的微生物可以是,但不特别限于,其中另外引入有鸟氨酸脱羧酶(ODC)活性的微生物。鸟氨酸脱羧酶是指经由鸟氨酸脱羧生产腐胺的酶。棒杆菌属的微生物不具有腐胺生物合成途径,但可通过引入外源鸟氨酸脱羧酶(ODC)合成腐胺。

[0078] 进一步,生产腐胺的微生物可以是,但不特别限于,其中参与由鸟氨酸合成精氨酸的鸟氨酸氨甲酰基转移酶(ArgF)和参与谷氨酸输出的蛋白质(NCg11221)被失活的微生物。

[0079] 进一步,生产腐胺的微生物可以是,但不特别限于,例如,其中通过与其内源活性相比,增强将谷氨酸转化为N-乙酰谷氨酸的乙酰谷氨酸合酶、将乙酰鸟氨酸转化为鸟氨酸的鸟氨酸乙酰转移酶(ArgJ)、将乙酰谷氨酸转化为N-乙酰谷氨酰磷酸的乙酰谷氨酸激酶(ArgB)、将乙酰谷氨酰磷酸转化为N-乙酰谷氨酸半醛的乙酰- $\gamma$ -谷氨酰磷酸还原酶(ArgC)、将乙酰谷氨酸半醛转化为N-乙酰鸟氨酸的乙酰鸟氨酸转氨酶(ArgD)的活性,以增强从谷氨酸到鸟氨酸的生物合成途径,来提高被用作腐胺生物合成原料的鸟氨酸的生产能力的微生物。

[0080] 进一步,生产腐胺的微生物可以是,但不特别限于,具有腐胺生产能力的棒杆菌属的微生物,其中腐胺乙酰转移酶的活性被额外减弱。

[0081] 此外,生产腐胺的微生物可以是,但不特别限于,其中腐胺输出蛋白的活性被增强的微生物,但不限于此。腐胺输出蛋白的活性的增强可以是具有腐胺生产能力的棒杆菌属的微生物中具有SEQ ID NO:87的氨基酸序列的蛋白活性的增强,但不限于此。

[0082] 进一步,腐胺输出蛋白的活性的增强可以是具有腐胺生产能力的棒杆菌属的微生物中具有SEQ ID NO:88的氨基酸序列的蛋白活性的失活,但不限于此。

[0083] 本公开的另一方面提供生产腐胺的方法,方法包括在培养基中培养棒杆菌属的生产腐胺的微生物的步骤,其中通过(1)增强来自NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶、转酮醇酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶、NAD(P)转氢酶、烟酸磷酸核糖基转移酶和NAD<sup>+</sup>激酶的一种或多种的活性,通过(2)失活来自葡萄糖酸激酶和NAD<sup>+</sup>二磷酸酶的一种或多种的活性,或通过(3)(1)和(2)的组合来增加NADPH的生产能力;以及从步骤(b)中获得的微生物或培养基中收集腐胺。

[0084] “NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶”、“转酮醇酶”、“葡萄糖-6-磷酸1-脱氢酶”、“6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶”、“NAD(P)转氢酶”、“烟酸磷酸核糖基转移酶”、“NAD激酶”、“活性的增强”、“葡萄糖酸激酶”、“NAD<sup>+</sup>二磷酸酶”、“活性的失活”和“棒杆菌属的生产腐胺的微生物”与上述相同。

[0085] 在该方法中,培养微生物的步骤可以,但不特别限于,通过已知的分批培养、连续培养、补料分批培养等来进行。在这一点上,培养条件没有特别限制,但是可以使用碱性化合物(例如,氢氧化钠、氢氧化钾或氨)或酸性化合物(例如,磷酸或硫酸)来调节适当的pH(例如,pH为5至9、特别地pH为6至8、且最具体地pH为6.8)。可以将氧气或含氧气体混合物引入培养物中以维持有氧条件。培养物的温度可维持在20°C至45°C,具体地25°C至40°C,并且可培养约10小时至约160小时,但不限于此。通过培养产生的腐胺可能分泌到培养基中,也可能留在细胞中。

[0086] 另外,在所使用的培养基中,碳源,如糖和碳水化合物(例如,葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、糖蜜、淀粉和纤维素),油和脂肪(例如,大豆油、葵花籽油、花生油和椰子油),脂肪酸(例如,棕榈酸、硬脂酸和亚油酸),醇(例如,甘油和乙醇)和有机酸(例如,乙酸)可以单独使用或以其混合物使用,但不限于此。氮源,如含氮有机化合物(例如,蛋白胨、酵母提取物、肉汁、麦芽提取物、玉米浆、大豆粉和尿素)或无机化合物(例如,硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵和硝酸铵)可以单独使用或以其混合物使用,但不限于此。磷源,如磷酸二氢钾、

磷酸氢二钾或与其对应的含钠盐,可单独使用或以其混合物使用,但不限于此。此外,在培养基中可以包括其他必需的生长促进物质,包括金属盐(例如,硫酸镁或硫酸铁)、氨基酸和维生素。

[0087] 关于收集在本公开的培养步骤中生产的腐胺的方法,根据培养方法,可以通过本领域已知的适当方法从培养基中收集期望的氨基酸。例如,可以使用离心、过滤、阴离子交换层析、结晶、HPLC等,并且可以利用本领域已知的适当方法从培养基或微生物中收集期望的腐胺。收集腐胺的方法进一步可以包括纯化步骤。

#### [0088] 实施例

[0089] 以下,将参考实施例更详细地描述本公开。然而,这些实施例仅用于说明性目的,并且本公开的范围并不意在被这些实例限制。

#### [0090] 实施例1:通过NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的引入的腐胺的产生

[0091] 通过增强生产腐胺的微生物中NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性来检查腐胺的产生。

[0092] 1-1:用于将德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*) ATCC 11842来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶引入到棒状微生物染色体上的转座子中的载体的制备

[0093] 选择德氏乳杆菌保加利亚亚种来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶作为对棒杆菌(*Corynebacterium*)具有高亲和力的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶。此后,为了增强其活性,进行了以下实验。

[0094] 从NIH GenBank获得德氏乳杆菌保加利亚亚种ATCC 11842来源的编码gapN的Ldb1179基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)和核苷酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0095] 进一步,为了利用棒杆菌属的微生物的转座子基因区域将Ldb1179基因引入到染色体中,使用用于转化的载体pDZTn(W02009/125992),并且使用cj7(W02006/65095)作为启动子。利用德氏乳杆菌保加利亚亚种ATCC 11842菌株的染色体作为模板,并用SEQ ID NO:3和4的引物,通过将起始密码子TTG修饰为ATG,将Ldb1179基因扩增为约1.43kb的基因片段(表1)。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95°C下变性30秒,在55°C下退火30秒,以及在72°C下延伸1分30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化出约1.4kb的条带。进一步,使用SEQ ID NO:5和6的一对引物在相同条件下进行CJ7启动子区的PCR,以获得PCR产物。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95°C下变性30秒,在55°C下退火30秒,以及在72°C下延伸30秒)进行。用XhoI处理pDZTn载体,然后对上述获得的PCR产物中的每个进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZTN:P(CJ7)-(L)。

[0096] [表1]

SEQ ID NO.	引物	序列 (5'-3')
[0097]	gapN(L)-F	aaggaaacactgatatc
		aTGACAGAACACTATTTAAACTATGTCAATG
	gapN(L)-R	gccaaaacagcctcgagTTAGTCTTCGATGTTGAAGACAACG
	CJ7-F	ggcccactagtctcgagGCCGGCATAGCCTACCGAT
6	CJ7-R	GATATCAGTGTTTCCTTTCGTTGG

[0098] 1-2:用于将变异链球菌(*Streptococcus mutans*) ATCC 25175来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶引入到棒状微生物的染色体上转座子基因中的载体的制备

[0099] 作为德氏乳杆菌保加利亚亚种ATCC 11842来源的gapN的对照组,为了将具有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的SMUFR\_0590(韩国专利号1182033)引入到变异链球菌ATCC 2517中5,进行了以下实验。

[0100] 从NIH GenBank获得变异链球菌ATCC 25175来源的编码gapN的SMUFR\_0590基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:7)和核苷酸序列(SEQ ID NO:8),以及制备用于将由CJ7启动子表达的SMUFR\_0590引入到转座子基因中的载体。

[0101] 如实施例1-1中,使用pDZTn作为用于转化的载体,并使用cj7作为启动子。使用pECCG117-Pcj7-gapN1(韩国专利号1182033)作为模板和用SEQ ID NO:5和9的引物,将变异链球菌ATCC 25175来源的SMUFR\_0590基因扩增为约1.7kb的基因片段(表2)。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95℃下变性30秒、在55℃下退火30秒、以及在72℃下延伸2分钟)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱和纯化期望大小的条带。用XhoI处理pDZTn载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZTN:P(CJ7)-gapN(S)。

[0102] [表2]

SEQ ID NO.	引物	序列 (5' -3')
5	CJ7-F	ggcccactagtctcgagGCCGGCATAGCCTACCGAT
9	gapN(S)-R	gccaaaacagcctcgagTTATTTGATATCAAATACGACGGATTTA

[0104] 1-3.通过将NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶引入到生产腐胺的棒状菌株中的腐胺的发酵

[0105] <1-3-1>将NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶引入到基于ATCC 13032的生产腐胺的微生物的染色体上的转座子基因中

[0106] 将实施例1-1中制备的质粒pDZTN:P(CJ7)-gapN(L)或实施例1-2中制备的质粒pDZTN:P(CJ7)-gapN(S)通过电穿孔引入到谷氨酸棒杆菌KCCM11240P(韩国专利公开号2013-0003648)、KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522(韩国专利公开号2014-0115244)或KCCM11520P(韩国专利公开号2014-0049766)中,以获得各转化体,并将各转化体涂布在含有卡那霉素(25μg/ml)和X-gal(5-溴-4-氯-3-吡啶-D-半乳糖苷)的BHIS平板培养基(37g/1脑心浸液、91g/1山梨醇、2%琼脂)上,并培养以形成菌落。从由此形成的菌落中,选择了蓝色菌落以选择引入有质粒pDZTN:P(CJ7)-gapN(L)或pDZTN:P(CJ7)-gapN(S)的菌株。

[0107] 将所选菌株接种于CM培养基(10g/L葡萄糖、10g/L聚蛋白胍、5g/L酵母提取物、5g/L

L牛肉提取物、2.5g/L氯化钠(NaCl)、2g/L尿素,pH 6.8)中,并在30°C下振荡培养8小时。进行从 $10^{-4}$ 至 $10^{-10}$ 的连续稀释,然后涂布在含有X-gal的固体培养基上,并培养以形成菌落。从由此形成的菌落中选择以相对较低比例形成的白色菌落,以获得分别引入有编码gapN(L)或gapN(S)的Ldb1179或SMUFR\_0590基因的生产腐胺的谷氨酸棒杆菌。将由此制备的谷氨酸棒杆菌变体菌株分别命名为KCCM11240P Tn:P(CJ7)-gapN(L)、KCCM11240P Tn:P(CJ7)-gapN(S)、KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(L)、KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)、KCCM11520P Tn:P(CJ7)-gapN(L)、和KCCM11520P Tn:P(CJ7)-gapN(S)。

[0108] <1-3-2>将NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶引入到基于ATCC 13869的生产腐胺的微生物的染色体上的转座子基因中

[0109] 以与实施例<1-3-1>相同的方式,用制备的pDZTn:P(CJ7)-gapN(L)或pDZTn:P(CJ7)-gapN(S)转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC13869的生产腐胺的菌株DAB12-b(韩国专利公开号2013-0003648)、DAB12-b P(CJ7)-NCg12522(韩国专利公开号2014-0115244)和DAB12-b  $\Delta$ NCg12523(韩国专利公开号2014-0049766)。将由其制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株分别命名为DAB12-b Tn:P(CJ7)-gapN(L)、DAB12-b Tn:P(CJ7)-gapN(S)、DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(L)、DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)、DAB12-b  $\Delta$ NCg12523 Tn:P(CJ7)-gapN(L)、和DAB12-b  $\Delta$ NCg12523 Tn:P(CJ7)-gapN(S)。

[0110] <1-3-3>引入NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因的棒杆(Coryne)生产腐胺的菌株的腐胺生产能力的的评价

[0111] 为了检查通过将NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因引入到生产腐胺的菌株中而生产腐胺的情况,在实施例<1-3-1>和<1-3-2>中制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株之间比较腐胺生产能力。

[0112] 详细地,6种对照组(KCCM11240P、KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522、KCCM11520P、DAB12-b、DAB12-b P(CJ7)-NCg12522、和DAB12-b  $\Delta$ NCg12523)和12种谷氨酸棒杆菌突变菌株(KCCM11240P Tn:P(CJ7)-gapN(L)、KCCM11240P Tn:P(CJ7)-gapN(S)、KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(L)、KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)、KCCM11520P Tn:P(CJ7)-gapN(L)、KCCM11520P Tn:P(CJ7)-gapN(S)、DAB12-b Tn:P(CJ7)-gapN(L)、DAB12-b Tn:P(CJ7)-gapN(S)、DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(L)、DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)、DAB12-b  $\Delta$ NCg12523 Tn:P(CJ7)-gapN(L)、和DAB12-b  $\Delta$ NCg12523 Tn:P(CJ7)-gapN(S))分别涂布在含1mM精氨酸的CM平板培养基上,并在30°C下培养24小时。将一个铂环(platinum loop)的由此培养的各菌株接种到25mL的生产培养基中,然后在30°C下以200rpm50小时后取样。共进行98小时的取样。在培养所有菌株时,向各培养基中加入1mM精氨酸。

[0113] <CM平板培养基(pH 6.8)>

[0114] 1%葡萄糖、1%聚蛋白胨、0.5%酵母提取物、0.5%牛肉提取物、0.25%氯化钠(NaCl)、0.2%尿素、100 $\mu$ l的50%氢氧化钠(NaOH)、2%琼脂、pH 6.8(基于1升蒸馏水)。

[0115] <生产培养基(pH7.0)>

[0116] 8%葡萄糖、0.25%大豆蛋白、0.50%玉米浆固体(corn steep solids)、4%硫酸铵((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、0.1%磷酸钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、0.05%七水硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)、0.15%尿素、100 $\mu$

g生物素,3mg硫酸素HCl、3mg泛酸钙、3mg烟酰胺、5%碳酸钙(CaCO<sub>3</sub>) (基于1升蒸馏水)。

[0117] 测定从50小时取样的培养物生产的腐胺浓度,且结果显示在下表3中。

[0118] [表3]

[0119]	菌株名称	腐胺 (g/L)	生产能力 (g/l/min)
	KCCM11240P	5.8	6.96
	KCCM11240P Tn:P(CJ7)-gapN(L)	6.4	7.68
	KCCM11240P Tn:P(CJ7)-gapN(S)	6.3	7.56
	KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522	7.3	8.76
	KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(L)	10.6	12.72
	KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)	9.8	11.76
	KCCM11520P	7.0	8.40
	KCCM11520P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(L)	9.8	11.76
	KCCM11520P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)	9.2	11.04
[0120]	DAB12-b	6.5	7.80
	DAB12-b Tn:P(CJ7)-gapN(L)	7.0	8.40
	DAB12-b Tn:P(CJ7)-gapN(S)	6.9	8.28
	DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522	7.8	9.36
	DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(L)	11.5	13.80
	DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)	10.7	12.84
	DAB12-b ΔNCgl2523	7.5	9.00
	DAB12-b ΔNCgl2523 Tn:P(CJ7)-gapN(L)	10.6	12.72
	DAB12-b ΔNCgl2523 Tn:P(CJ7)-gapN(S)	10.1	12.12

[0121] 如表3中所示,通过引入德氏乳杆菌保加利亚亚种ATCC 11842来源的gapN(L)基因或变异链球菌ATCC 25175来源的gapN(S)基因到谷氨酸棒杆菌ATCC 13032或13869来源的生产腐胺的菌株中获得的所有12种谷氨酸棒杆菌突变菌株,与对照组相比,显示了增加的腐胺生产能力率,表明通过NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶提供NADPH而增加了腐胺的生产能力。

[0122] 进一步,与6种引入变异链球菌ATCC 25175来源的gapN(S)的突变菌株KCCM11240P Tn:P(CJ7)-gapN(S)、KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)、KCCM11520P Tn:P(CJ7)-gapN(S)、DAB12-b Tn:P(CJ7)-gapN(S)、DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)、和DAB12-b ΔNCgl2523 Tn:P(CJ7)-gapN(S)相比,6种引入德氏乳杆菌保加利亚亚种来源的gapN(L)的突变菌株,KCCM11240P Tn:P(CJ7)-gapN(L)、KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(L)、KCCM11520P Tn:P(CJ7)-gapN(L)、DAB12-b Tn:P(CJ7)-gapN(L)、DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(L)、和DAB12-b ΔNCgl2523 Tn:P(CJ7)-gapN(L)显示了高腐胺生产能力。

[0123] 测定从98小时取样的培养物生产的腐胺浓度,且结果显示在下表4中。

[0124] [表4]

菌株名称	腐胺 (g/L)	生产能力 (g/L/min)
KCCM11240P	12.3	7.52
KCCM11240P Tn:P(cj7)-gapN(L)	12.5	7.65
KCCM11240P Tn:P(cj7)-gapN(S)	12.3	7.52
KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522	15.5	9.48
KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(cj7)-gapN(L)	16.5	10.01
KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(cj7)-gapN(S)	16.0	9.79
KCCM11520P	14.5	8.87
KCCM11520P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(cj7)-gapN(L)	15.3	9.36
KCCM11520P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(cj7)-gapN(S)	15.0	9.18
DAB12-b	13.1	8.02
DAB12-b Tn:P(cj7)-gapN(L)	13.4	8.20
DAB12-b Tn:P(cj7)-gapN(S)	13.3	8.14
DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522	15.9	9.73
DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(cj7)-gapN(L)	16.7	10.22
DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(cj7)-gapN(S)	16.4	10.04
DAB12-b $\Delta$ NCgl2523	15.0	9.18
DAB12-b $\Delta$ NCgl2523 Tn:P(cj7)-gapN(L)	15.7	9.61
DAB12-b $\Delta$ NCgl2523 Tn:P(cj7)-gapN(S)	15.5	9.49

[0125] 相似地,在表4中,基于KCCM11240P或DAB12-b的gapN增强的4种突变菌株KCCM11240P Tn:P(CJ7)-gapN(L)、KCCM11240P Tn:P(CJ7)-gapN(S)、DAB12-b Tn:P(CJ7)-gapN(L)、和DAB12-b Tn:P(CJ7)-gapN(S)显示了与对照组的腐胺生产能力相等或比其更高的腐胺生产能力,和具有增强的腐胺输出能力的基于KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522、KCCM11520P、DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522、DAB12-b  $\Delta$ NCgl2523的gapN增强的8种突变菌株KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(L)、KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)、KCCM11520P Tn:P(CJ7)-gapN(L)、KCCM11520P Tn:P(CJ7)-gapN(S)、DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(L)、DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)、DAB12-b  $\Delta$ NCgl2523 Tn:P(CJ7)-gapN(L)、DAB12-b  $\Delta$ NCgl2523 Tn:P(CJ7)-gapN(S)显示了更加增加的腐胺生产能力。

[0127] 因此,确认了在谷氨酸棒杆菌ATCC 13032或13869来源的生产腐胺的菌株中,当NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因被增强时,生产能力和生产量(production)都被增加,并且当腐胺输出能力一起被增强时,增加进一步被增加。

[0128] 1-4: 腐胺菌株中NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的比较

[0129] 比较了在引入Ldb1179基因或SMUFR\_0590基因的KCCM11240P Tn:P(CJ7) -gapN(L)和KCCM11240P Tn:P(CJ7) -gapN(S)菌株中,德氏乳杆菌保加利亚亚种来源的gapN(L)或变异链球菌来源的gapN(S)的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性。作为对照组,使用不具有gapN基因的KCCM11240P菌株。各菌株在含有1mM精氨酸的复合平板培养基中培养约1天,然后在含有1mM精氨酸的种子培养基中以初始 $OD_{600}=0.2$ 培养。当 $OD_{600}=10$ 时回收细胞。

[0130] <种子培养基>

[0131] 20g葡萄糖、10g蛋白胨、10g酵母提取物、5g尿素、4g  $KH_2PO_4$ 、8g的 $K_2HPO_4$ 、0.5g的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、100 $\mu$ g生物素、1000 $\mu$ g硫胺素-HCl(基于1升工艺用水)

[0132] 利用已知的方法(A.Soukri等人,Protein Expression and Purification;25;(2002)519-529)以测定NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性,且结果显示在下表5中。

[0133] [表5]

菌株名称	gapN活性(%)
KCCM 11240P	0
KCCM 11240P Tn:P(CJ7) -gapN(L)	154
KCCM 11240P Tn:P(CJ7) -gapN(S)	100

[0135] 如表5中所示,当引入变异链球菌来源的gapN(S)的KCCM 11240P Tn:P(CJ7) -gapN(S)的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性被认为是100时,引入德氏乳杆菌保加利亚亚种来源的gapN(L)的KCCM 11240P Tn:P(CJ7) -gapN(L)菌株的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性为高1.5倍(1.5times higher),表明NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性越高,并且提供的NADPH量越多,腐胺生产能力和生产量被增加。

[0136] 实施例2:通过转酮醇酶增强的腐胺生产

[0137] 通过增强产生腐胺的菌株中转酮醇酶活性来检查腐胺生产。

[0138] 2-1:用于转酮醇酶增强的起始密码子的置换

[0139] <2-1-1>用于将转酮醇酶的起始密码子TTG置换为ATG的载体的制备

[0140] 为了增强转酮醇酶活性,制备了将编码其的基因的起始密码子TTG置换为ATG的载体。

[0141] 从NIH GenBank获得编码谷氨酸棒杆菌ATCC 13032来源的转酮醇酶的NCg11512基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:10)和核苷酸序列(SEQ ID NO:11)。

[0142] 在本公开的具体实施里中,使用了用于转化的载体pDZ。使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株的染色体作为模板,和SEQ ID NO:12和13的引物以及SEQ ID NO:14和15的引物,扩增两个约0.5kb的基因片段(表6)。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95 $^{\circ}$ C下变性30秒,在55 $^{\circ}$ C下退火30秒,以及在72 $^{\circ}$ C下延伸30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化期望大小的条带。用XbaI处理pDZ载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion<sup>®</sup>HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZ-1' tkt(ATG)。

[0143] [表6]

SEQ ID NO.	引物	序列 (5'-3')
12	NCgl1512_5F	CCGGGGATCCTCTAGAGTAGACGCTTGATTGGCGG AC
[0144] 13	NCgl1512_5R	TCCTTCCTGGGTAAACCGGG
14	NCgl1512_ATG_3F	gtttaaccaggaaggaaTGACCACCTTGACGCTGTCAC
15	NCgl1512_3R	GCAGGTCGACTCTAGAGTCGAATAGGCCACGCTCA C

[0145] 进一步,通过基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的核苷酸序列的PCR反应和测序,获得了与编码谷氨酸棒杆菌ATCC 13869的转酮醇酶的NCg11512具有同源性的基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:16)和核苷酸序列(SEQ ID NO:17)。

[0146] 相似地,使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株的染色体为模板并用相同的引物,扩增2个约0.5kb的基因片段,并以与上述相同的方式制备载体。得到的质粒命名为pDZ-2' tkt (ATG)。

[0147] <2-1-2>基于ATCC 13032的生产腐胺的菌株的染色体上转座子基因中转酮醇酶的起始密码子的置换

[0148] 用实施例2-1-1中制备的质粒pDZ-1' tkt (ATG) 以与实施例<1-4-1>中相同的方式分别转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的生产腐胺的菌株KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 (韩国专利公开号2014-0115244) 或KCCM11520P (韩国专利公开号2014-0049766),以制备其中NCg11512的起始密码子被ATG置换的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株分别命名为KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 tkt (ATG) 和KCCM11520P tkt (ATG)。

[0149] <2-1-3>基于ATCC 13869的生产腐胺的菌株的染色体上转座子基因中转酮醇酶的起始密码子的置换

[0150] 用实施例2-1-1中制备的质粒pDZ-2' tkt (ATG) 以与实施例<1-4-1>相同的方式分别转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC13869的生产腐胺的菌株DAB12-b P (CJ7) -NCg12522 (韩国专利公开号2014-0115244) 或DAB12-b Δ NCg12523 (韩国专利公开号2014-0049766),以制备其中NCg11512的起始密码子被ATG置换的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株分别命名为DAB12-b P (CJ7) -NCg12522 tkt (ATG) 和DAB12-b Δ NCg12523 tkt (ATG)。

[0151] <2-1-4>转酮醇酶起始密码子置换的棒杆菌生产腐胺的菌株的腐胺生产能力的评价

[0152] 为了检查在生产腐胺的菌株中通过增加编码转酮醇酶的基因tkt的表达的腐胺生产,以与实施例1-4-3相同的方式比较实施例2-1-2和2-1-3中制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株之间的腐胺生产能力。

[0153] [表7]

菌株的名称	腐胺	生产能力
	(g/L)	(g/l/min)
KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522	7.3	8.76
KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522 tkt(ATG)	8.3	9.96
KCCM11520P	7.0	8.40
KCCM11520P P(CJ7)-NCgl2522 tkt(ATG)	7.9	9.48
DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522	7.8	9.36
DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522 tkt(ATG)	8.9	10.68
DAB12-b ΔNCgl2523	7.5	9.00
DAB12-b ΔNCgl2523 tkt(ATG)	8.5	10.2

[0154] 如表7中所示,在谷氨酸棒杆菌ATCC 13032或13869来源的生产腐胺的菌株中,与对照组相比,其中tkt的起始密码子被ATG置换的所有突变菌株显示了增加的腐胺生产能力。

[0155] 2-2:用于转酮醇酶的增强和磷酸戊糖途径的增强的启动子置换

[0156] <2-2-1>置换转酮醇酶启动子的载体的制备

[0157] 为了增强具有转酮醇酶活性的NCg11512的活性,制备了用于在染色体上NCg11512基因的起始密码子前引入CJ7启动子的载体。

[0158] 在本公开的具体实施例中,使用了用于转化的载体pDZ。使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株的染色体作为模板,和SEQ ID NO:12和13的引物以及SEQ ID NO:19和15的引物,扩增两个约0.5kb的基因片段(表8)。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化所期望大小的条带。利用SEQ ID NO:18和6的一对引物,通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒),获得CJ7启动子区。用XbaI处理pDZ载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZ-P(CJ7)-1' tkt(ATG)。

[0159] [表8]

SEQ ID NO.	引物	序列(5'-3')
12	NCgl1512_5F	CCGGGGATCCTCTAGAGTAGACGCTTGATTGGCGG AC
13	NCgl1512_5R	TCCTTCCTGGGTAAACCGGG
18	NCgl1512-PC7 -F	gtttaaccagggaaggaGCCGGCATAGCCTACCGAT
6	PC7-R	GATATCAGTGTTTCCTTTCGTTGG
19	NCgl1512-PC7 -ATG-F	aaggaaacactgatatcaTGACCACCTTGACGCTGTCAC
15	NCgl1512_3R	GCAGGTCGACTCTAGAGTCGAATAGGCCACGCTCA C

[0161] 相似地,使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株的染色体为模板和用相同的引物,扩增3个基因片段,并以与上述相同的方式制备载体。得到的质粒命名为pDZ-P (CJ7) -2' tkt (ATG)。

[0162] <2-2-2>基于ATCC 13032的生产腐胺的菌株的染色体上转酮醇酶启动子的置换

[0163] 用实施例2-2-1中制备的质粒pDZ-P (CJ7) -1' tkt (ATG) 以与实施例<1-4-1>相同的方式分别转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的生产腐胺的菌株KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 (韩国专利公开号2014-0115244) 或KCCM11520P (韩国专利公开号2014-0049766), 以制备其中在NCg11512的起始密码子前引入CJ7启动子的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株分别命名为KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 P (CJ7) -tkt (ATG) 和KCCM11520P P (CJ7) -tkt (ATG)。

[0164] <2-2-3>基于ATCC 13869的生产腐胺的菌株的染色体上转酮醇酶启动子的置换

[0165] 用实施例2-2-1中制备的质粒pDZ-P (CJ7) -2' tkt (ATG) 以与实施例<1-4-1>相同的方式分别转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC13869的生产腐胺的菌株DAB12-b P (CJ7) -NCg12522 (韩国专利公开号2014-0115244) 或DAB12-b ΔNCg12523 (韩国专利公开号2014-0049766), 以制备其中在NCg11512的起始密码子前引入CJ7启动子的菌株。从中选出的谷氨酸棒杆菌突变菌株分别命名为DAB12-b P (CJ7) -NCg12522 P (CJ7) -tkt (ATG) 和DAB12-b ΔNCg12523 P (CJ7) -tkt (ATG)。

[0166] <2-2-4>转酮醇酶启动子增强的棒杆生产腐胺的菌株的腐胺生产能力的评价

[0167] 为了检查通过置换在生产腐胺的菌株中的转酮醇酶启动子的腐胺生产,以与实施例1-4-3相同的方式比较实施例2-2-2和2-2-3中制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株之间的腐胺生产能力。

[0168] [表9]

菌株的名称	腐胺 (g/L)	生产能力 (g/l/min)
KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522	7.3	8.76
KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522 P(CJ7)-tkt(ATG)	12.4	14.94
KCCM11520P	7.0	8.4
KCCM11520P P(CJ7)-NCgl2522 P(CJ7)-tkt(ATG)	11.8	14.22
DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522	7.8	9.36
DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522 P(CJ7)-tkt(ATG)	13.4	16.08
DAB12-b ΔNCgl2523	7.5	9.00
DAB12-b ΔNCgl2523 P(CJ7)-tkt(ATG)	12.5	15.06

[0170] 如表9中所示,在谷氨酸棒杆菌ATCC 13032或13869来源的生产腐胺的菌株中,与对照组相比,tkt启动子被CJ7启动子置换的所有突变菌株显示了大大增加的腐胺生产能力。

[0172] 实施例3:通过G6PD增强的腐胺生产

[0173] 通过增强生产腐胺的菌株中的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的活性检查腐胺生产。

[0174] 3-1:用于G6PD增强的启动子的置换

[0175] <3-1-1>用于置换G6PD启动子的载体的制备

[0176] 为增强G6PD活性,制备了在染色体上编码其的基因的起始密码子前引入CJ7启动子的载体。从NIH GenBank获得谷氨酸棒杆菌ATCC 13032来源的编码G6PD的NCgl11514基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:20)和核苷酸序列(SEQ ID NO:21)。

[0177] 在本公开的具体实施例中,使用了用于转化的载体pDZ。使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株的染色体作为模板,和SEQ ID NO:22和23的引物以及SEQ ID NO:25和26的引物,扩增两个约0.5kb的基因片段(表10)。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化所期望大小的条带。利用SEQ ID NO:24和6的一对引物,通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒),获得CJ7启动子区。用XbaI处理pDZ载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion® HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZ-P(CJ7)-1' zwf。

[0178] [表10]

[0179]

SEQ ID NO.	引物	序列 (5'-3')
22	NCgl1514-5F	CCGGGGATCCTCTAGACTGAAGGTGCCAACACTC AGC
23	NCgl1514-5R	GATGGTAGTGTCACGATCCTTTC
24	PC7-F(1514)	gatcgtgacactaccatcGCCGGCATAGCCTACCGAT
6	PC7-R	GATATCAGTGTTTCCTTTCGTTGG
25	NCgl1514-3F(C7-GTG)	aaggaaacactgatatcGTGAGCACAAACACGACCCCC
26	NCgl1514-3R	GCAGGTCTGACTCTAGACGGTGGATTTCAGCCATGC C

[0180] 进一步,通过基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的核苷酸序列的PCR反应和测序,从NIH GenBank获得与编码谷氨酸棒杆菌ATCC 13869的G6PD的NCg11514具有同源性的基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:27)和核苷酸序列(SEQ ID NO:28)。

[0181] 相似地,使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株的染色体作为模板,和SEQ ID NO:22和29的引物以及SEQ ID NO:25和26的引物,扩增两个约0.5kb的基因片段(表11)。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95°C下变性30秒,在55°C下退火30秒,以及在72°C下延伸30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化所期望大小的条带。进一步,利用SEQ ID NO:30和6的一对引物,通过重复30个循环(在95°C下变性30秒,在55°C下退火30秒,以及在72°C下延伸30秒),获得CJ7启动子区。用XbaI处理pDZ载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZ-P(CJ7)-2' zwf。

[0182] [表11]

[0183]

SEQ ID NO.	引物	序列 (5'-3')
22	NCgl1514-5F	CCGGGGATCCTCTAGACTGAAGGTGCCAACACTC AGC
29	2'NCgl1514-5R	GATGGTAGCGTCACGATCCTTTC
30	2'PC7-F(1514)	GATCGTGACGCTACCATCGCCGGCATAGCCTACCG AT
6	PC7-R	GATATCAGTGTTTCCTTTCGTTGG
25	NCgl1514-3F(C7-GTG )	AAGGAAACACTGATATCGTGAGCACAAACACGAC CCCC
26	NCgl1514-3R	GCAGGTCTGACTCTAGACGGTGGATTTCAGCCATGC C

[0184]

[0185] &lt;3-1-2&gt;基于ATCC 13032的生产腐胺的菌株的染色体上G6PD启动子的置换

[0186] 用实施例3-1-1中制备的质粒pDZ-P(CJ7)-1' zwf以与实施例&lt;1-4-1&gt;相同的方式

分别转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的生产腐胺的菌株KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 (韩国专利公开号2014-0115244)或KCCM11520P(韩国专利公开号2014-0049766),以制备其中在NCg11514的起始密码子前引入CJ7启动子的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株分别命名为KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 P(CJ7)-zwf和KCCM11520P P(CJ7)-zwf。

[0187] <3-1-3>基于ATCC 13869的生产腐胺的菌株的染色体上G6PD启动子的置换

[0188] 用实施例3-1-1中制备的质粒pDZ-P(CJ7)-2' zwf以与实施例<1-4-1>相同的方式分别转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC13869的生产腐胺的菌株DAB12-b P(CJ7)-NCg12522(韩国专利公开号2014-0115244)或DAB12-b ΔNCg12523(韩国专利公开号2014-0049766),以制备其中在NCg11512的起始密码子前引入CJ7启动子的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株分别命名为DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 P(CJ7)-zwf和DAB12-b ΔNCg12523 P(CJ7)-zwf。

[0189] <3-1-4>G6PD启动子增强的棒杆生产腐胺的菌株的腐胺生产能力的评价

[0190] 为了检查通过置换在生产腐胺的菌株中的G6PD启动子的腐胺生产,以与实施例1-4-3相同的方式比较实施例3-1-2和3-1-3中制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株之间的腐胺生产能力。

[0191] [表12]

[0192]	菌株的名称	腐胺 (g/L)	生产能力 (g/l/h)
	KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522	7.3	8.76
	KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 P(CJ7)-zwf	7.9	9.48
	KCCM11520P	7.0	8.40
	KCCM11520P P(CJ7)-NCg12522 P(CJ7)-zwf	7.5	9.00
	DAB12-b P(CJ7)-NCg12522	7.8	9.36
	DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 P(CJ7)-zwf	8.5	10.20
	DAB12-b ΔNCg12523	7.5	9.00
	DAB12-b ΔNCg12523 P(CJ7)-zwf	8.0	9.60

[0194] 如表12中所示,在谷氨酸棒杆菌ATCC 13032或13869来源的生产腐胺的菌株中,与对照组相比,其中G6PD启动子被CJ7启动子置换的所有突变菌株显示了增加的腐胺生产能力。

[0195] 3-2:用于G6PD增强的启动子和起始密码子的共置换(Co-replacement)

[0196] <3-2-1>G6PD启动子和起始密码子共置换的载体的制备

[0197] 为增强G6PD活性,制备了在染色体上编码其的基因的起始密码子前引入CJ7启动子以及同时用ATG置换起始密码子GTG的载体。

[0198] 在本公开的具体实施例中,使用了用于转化的载体pDZ。使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株的染色体作为模板,和SEQ ID NO:22和23的引物以及SEQ ID NO:31和26的引物,扩增两个约0.5kb的基因片段(表13)。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化所期望大小的条带。利用SEQ ID NO:24和6的一对引物,通过

重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒),获得CJ7启动子区。用XbaI处理pDZ载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion® HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZ-P(CJ7)-1' zwf(ATG)。

[0199] [表13]

SEQ ID NO.	引物	序列(5'-3')
[0200] 22	NCgl1514-5F	CCGGGGATCCTCTAGACTGAAGGTGCCAACACTCAGC
23	NCgl1514-5R	GATGGTAGTGTCACGATCCTTTC
24	PC7-F(1514)	gatcgtgacactaccatcGCCGGCATAGCCTACCGAT
6	PC7-R	GATATCAGTGTTTCCTTTCGTTGG
[0201] 31	NCgl1514-3F(C7-ATG)	aaggaaactgatatcATGAGCACAAACACGACCCCC
26	NCgl1514-3R	GCAGGTCGACTCTAGACGGTGGATTCAGCCATGCC

[0202] 相似地,使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株的染色体作为模板,和SEQ ID NO:22和29的引物以及SEQ ID NO:31和26的引物,扩增两个约0.5kb的基因片段(表14)。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化所期望大小的条带。进一步,利用SEQ ID NO:30和6的一对引物,通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒),获得CJ7启动子区。用XbaI处理pDZ载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion® HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZ-P(CJ7)-2' zwf(ATG)。

[0203] [表14]

SEQ ID NO.	引物	序列(5'-3')
[0204] 22	NCgl1514-5F	CCGGGGATCCTCTAGACTGAAGGTGCCAACACTCAGC
29	2'NCgl1514-5R	GATGGTAGCGTCACGATCCTTTC
30	2'PC7-F(1514)	gatcgtgacgctaccatcGCCGGCATAGCCTACCGAT
6	PC7-R	GATATCAGTGTTTCCTTTCGTTGG
31	NCgl1514-3F(C7-ATG)	aaggaaactgatatcATGAGCACAAACACGACCCCC
26	NCgl1514-3R	GCAGGTCGACTCTAGACGGTGGATTCAGCCATGCC

[0205] <3-2-2>基于ATCC 13032的生产腐胺的菌株的染色体上G6PD启动子的置换

[0206] 用实施例3-2-1中制备的质粒pDZ-P(CJ7)-1' zwf(ATG) 以及与实施例<1-4-1>相同的方式分别转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的生产腐胺的菌株KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522(韩国专利公开号2014-0115244)或KCCM11520P(韩国专利公开号2014-0049766),

以制备其中在NCg115124的起始密码子前引入CJ7启动子以及起始密码子被ATG置换的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株分别命名为KCCM11240P P(CJ7) -NCg12522 P(CJ7) -zwf (ATG) 和KCCM11520P P(CJ7) -zwf (ATG)。

[0207] <3-2-3>基于ATCC 13869的生产腐胺的菌株的染色体上G6PD启动子的置换

[0208] 用实施例3-2-1中制备的质粒pDZ-P(CJ7) -2' zwf (ATG) 以与实施例<1-4-1>相同的方式分别转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC13869的生产腐胺的菌株DAB12-b P(CJ7) -NCg12522 (韩国专利公开号2014-0115244) 或DAB12-b ΔNCg12523 (韩国专利公开号2014-0049766), 以制备其中在NCg11512的起始密码子前引入CJ7启动子的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株分别命名为DAB12-b P(CJ7) -NCg12522 P(CJ7) -zwf (ATG) 和DAB12-b ΔNCg12523 P(CJ7) -zwf (ATG)。

[0209] <3-2-4>G6PD启动子增强和起始密码子ATG置换的棒杆菌生产腐胺的菌株的腐胺生产能力的评估

[0210] 为了检查生产腐胺的菌株中通过用CJ7启动子置换G6PD启动子和用ATG置换起始密码子的腐胺的生产, 以与实施例1-4-3相同的方式比较实施例3-2-2和3-2-3中制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株之间的腐胺生产能力。

[0211] [表15]

[0212]

菌株的名称	腐胺 (g/L)	生产能力 (g/l/min)
KCCM11240P P(CJ7) -NCg12522	7.3	8.76
KCCM11240P P(CJ7) -NCg12522P(CJ7) -zwf (ATG)	7.9	9.48
KCCM11520P	7.0	8.40
KCCM11520P P(CJ7) -NCg12522P(CJ7) -zwf (ATG)	7.6	9.12
DAB12-b P(CJ7) -NCg12522	7.8	9.36
DAB12-b P(CJ7) -NCg12522P(CJ7) -zwf (ATG)	8.6	10.32
DAB12-b ΔNCg12523	7.5	9.00
DAB12-b ΔNCg12523P(CJ7) -zwf (ATG)	8.1	9.72

[0213] 如表15中所示, 在谷氨酸棒杆菌ATCC 13032或13869来源的生产腐胺的菌株中, 与对照组相比, 其中zwf启动子被CJ7启动子置换并且起始密码子被ATG置换的所有突变菌株显示了增加的腐胺生产能力。

[0214] 实施例4: 通过6PGD增强的腐胺生产

[0215] 通过增强生产腐胺的菌株中6PGD (6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶) 活性来检查腐胺生产。

[0216] 4-1: 用于将6PGD引入到棒状微生物的染色体上转座子基因中的载体的制备

[0217] 为了增强具有6PGD活性的NCg11396的活性, 制备了用于将由CJ7启动子表达的NCg11396引入到染色体上转座子基因中的载体。从NIH GenBank获得编码具有谷氨酸棒杆菌ATCC 13032来源的6PGD活性的Gnd的NCg11396的氨基酸序列 (SEQ ID NO:32) 和核苷酸序列 (SEQ ID NO:33)。

[0218] 在本公开的具体实施例中, 使用用于转化的载体pDZTn, 以利用棒杆菌属的微生物的转座子基因区将基因引入到染色体上的转座子基因中。使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株的染色体作为模板, 和SEQ ID NO:34和35的引物, 扩增约1.45kb的基因片段 (表16)。此时, PCR反应通过重复30个循环 (在95°C下变性30秒, 在55°C下退火30秒, 以及在72°C下延伸

1分30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化所期望大小的条带。利用SEQ ID NO:5和6的一对引物,通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒),获得CJ7启动子区。用XbaI处理pDZ载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZTn:P(CJ7)-1' gnd。

[0219] [表16]

SEQ ID NO.	引物	序列(5'-3')
34	NCg11396-F	aaggaaacactgatatcATGACTAATGGAGATAATCTCGCAC
35	1' NCg11396-R	gccaaaacagcctcgagTTAAGCTTCAACCTCGGAGCG
5	CJ7-F	ggcccactagtctcgagGCCGGCATAGCCTACCGAT
6	CJ7-R	GATATCAGTGTTTCCTTTCGTTGG

[0221] 进一步,通过基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的核苷酸序列的PCR反应和测序,从NIH GenBank获得与编码谷氨酸棒杆菌ATCC 13869的Gnd的NCg11396具有同源性的基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:36)和核苷酸序列(SEQ ID NO:37)。

[0222] 相似地,使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株的染色体作为模板,和SEQ ID NO:34和38的引物,扩增约1.45kb的基因片段(表17)。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化所期望大小的条带。利用SEQ ID NO:5和6的一对引物,通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒),获得CJ7启动子区。用XbaI处理pDZ载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZTn:P(CJ7)-2' gnd。

[0223] [表17]

SEQ ID NO.	引物	序列(5'-3')
34	NCg11396-F	aaggaaacactgatatcATGTCTGGAGGATTAGTTACAGC
38	2'NCg11396-R	gccaaaacagcctcgagTTAAGCTTCCACCTCGGAGC
5	CJ7-F	ggcccactagtctcgagGCCGGCATAGCCTACCGAT
6	CJ7-R	GATATCAGTGTTTCCTTTCGTTGG

[0226] 4-2:将6PGD引入到基于ATCC 13032的生产腐胺的菌株的染色体上转座子基因中

[0227] 用实施例4-1中制备的质粒pDZTn:P(CJ7)-1' gnd以与实施例<1-4-1>相同的方式转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的生产腐胺的菌株KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522(韩国专利公开号2014-0115244)或KCCM11520P(韩国专利公开号2014-0049766),以确认是否编码Gnd的基因NCg11396被引入到转座子中。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变株分别命名为KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gnd和KCCM11520P Tn:P(CJ7)-gnd。

[0228] 4-3:将6PGD引入到基于ATCC 13869的生产腐胺的菌株的染色体上转座子基因中

[0229] 用实施例4-1中制备的质粒pDZTn:P(CJ7)-1' gnd以与实施例<1-4-1>相同的方式转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC13869的生产腐胺的菌株DAB12-b P(CJ7)-NCg12522(韩国专利

公开号2014-0115244)或DAB12-b  $\Delta$ NCg12523(韩国专利公开号2014-0049766),以确认是否编码Gnd的基因NCg11396被引入到转座子中。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株分别命名为DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gnd和DAB12-b  $\Delta$ NCg12523 Tn:P(CJ7)-gnd。

[0230] 4-4:6PGD增强的棒杆菌生产腐胺的菌株的腐胺生产能力的评价

[0231] 为了检查通过将编码6PGD的NCg11396引入到生产腐胺的菌株中的染色体上的转座子基因中的腐胺的生产,比较在实施例4-2和4-3中制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株之间的腐胺生产能力。

[0232] 具体地,4种对照组(KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522、KCCM11520P、DAB12-b P(CJ7)-NCg12522、和DAB12-b  $\Delta$ NCg12523)以及4种谷氨酸棒杆菌突变株(KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gnd、KCCM11520P Tn:P(CJ7)-gnd、DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gnd、和DAB12-b  $\Delta$ NCg12523 Tn:P(CJ7)-gnd)分别涂布在含有1mM精氨酸的CM平板培养基上,并且在30°C下培养24小时。将一个铂环的由此培养的各菌株接种到25mL的生产培养基中,然后在30°C下以200rpm的振荡下培养98小时。在培养所有菌株时,向各培养基中加入1mM精氨酸。

[0233] <CM平板培养基(pH 6.8)>

[0234] 1%葡萄糖、1%聚蛋白胨、0.5%酵母提取物、0.5%牛肉提取物、0.25%氯化钠(NaCl)、0.2%尿素、100 $\mu$ l的50%氢氧化钠(NaOH)、2%琼脂,pH 6.8(基于1升蒸馏水)。

[0235] <生产培养基(pH7.0)>

[0236] 8%葡萄糖、0.25%大豆蛋白、0.50%玉米浆固体、4%硫酸铵((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)、0.1%磷酸钾(KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)、0.05%七水硫酸镁(MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)、0.15%尿素、100 $\mu$ g生物素、3mg硫胺素·HCl、3mg泛酸钙、3mg烟酰胺、5%碳酸钙(CaCO<sub>3</sub>) (基于1升蒸馏水)。

[0237] 测定从培养98小时的最终产物生产的腐胺的浓度,结果显示在下表18中。

[0238] [表18]

菌株的名称	腐胺 (g/L)	生产能力 (g/L/min)
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522	15.5	9.48
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gnd	15.9	9.73
KCCM11520P	14.5	8.87
KCCM11520P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gnd	15.2	9.30
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522	15.9	9.73
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gnd	16.2	9.91
DAB12-b $\Delta$ NCg12523	15.0	9.18
DAB12-b $\Delta$ NCg12523 Tn:P(CJ7)-gnd	15.5	9.49

[0240] 如表18中所示,与对照组相比,通过增加谷氨酸棒杆菌ATCC 13032或13869来源的生产腐胺的菌株中gnd的表达水平而获得的所有突变菌株显示了增加的腐胺生产量。

[0241] 实施例5:通过NAD(P)转氢酶的引入的腐胺生产

[0242] 通过增强生产腐胺的谷氨酸棒杆菌中NAD(P)转氢酶的活性,检查了根据NADPH供

给的腐胺生产。

[0243] 5-1:用于将大肠杆菌W3110来源的NAD(P)转氢酶引入到棒状微生物的染色体上转座子基因中的载体的制备

[0244] 为了增强编码具有大肠杆菌W3110来源的NAD(P)转氢酶活性的PntAB的Y75\_p1579和Y75\_p1578的表达,制备了用于将由CJ7启动子表达的Y75\_p1579和Y75\_p1578基因引入到染色体上转座子基因中的载体。从NIH GenBank获得大肠杆菌W3110来源的NAD(P)转氢酶形成PntA和PntB的复合物。编码PntA的Y75\_p1579基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:39)和核苷酸序列(SEQ ID NO:40)以及编码PntB的Y75\_p1578基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:41)和核苷酸序列(SEQ ID NO:42)。

[0245] 在本公开的具体实施例中,使用用于转化的载体pDZTn,以利用棒杆菌属的微生物的转座子基因区将基因引入到染色体上的转座子基因中。使用大肠杆菌W3110菌株的染色体作为模板,和SEQ ID NO:43和44的引物,扩增约2.92kb的基因片段(表19)。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸3分钟)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化所期望大小的条带。利用SEQ ID NO:5和6的一对引物,通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒),获得CJ7启动子区。用XhoI处理pDZTn载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZTn:P(CJ7)-pntAB。

[0246] [表19]

SEQ ID NO.	引物	序列(5' -3')
43	Y75_p1579-F	aaggaaacactgatatcATGCGAATTGGCATAACCAAGAGAAC
44	Y75_p1578-R	gccaaaacagcctcgagTTACAGAGCTTTCAGGATTGCATCC
5	CJ7-F	ggcccactagtctcgagGCCGGCATAGCCTACCGAT
6	CJ7-R	GATATCAGTGTTCCTTTCGTTGG

[0248] 5-2:将NAD(P)转氢酶引入到基于ATCC 13032的生产腐胺的菌株的染色体上转座子基因中

[0249] 用实施例5-1中制备的质粒pDZTn:P(CJ7)-pntAB以与实施例<1-4-1>相同的方式转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的生产腐胺的菌株KCCM11240P(韩国专利公开号2013-0003648)或KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522(韩国专利公开号2014-0115244),以确认是否将编码PntAB的基因Y75\_p1579和Y75\_p1578引入到转座子中。从选择的谷氨酸棒杆菌突变株分别命名为KCCM11240P Tn:P(CJ7)-pntAB和KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-pntAB。

[0250] 5-3:将NAD(P)转氢酶引入到基于ATCC 13869的生产腐胺的菌株生物染色体上转座子基因中

[0251] 用实施例5-1中制备的质粒pDZTn:P(CJ7)-pntAB以与实施例<1-4-1>相同的方式转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC13869的生产腐胺的菌株DAB12-b(韩国专利公开号10-2013-0003648)或DAB12-b P(CJ7)-NCg12522(韩国专利公开号2014-0115244),以确认是否编码PntAB的基因Y75\_p1579和Y75\_p1578被引入到转座子中。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变株分别命名为DAB12-b Tn:P(CJ7)-pntAB和DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-pntAB。

[0252] 5-4: 引入NAD(P) 转氢酶的棒杆菌生产腐胺的菌株的腐胺生产能力的评价

[0253] 为了检查通过在生产腐胺的菌株中引入NAD(P) 转氢酶基因的腐胺生产能力, 以与实施例1-4-3相同的方式比较在实施例5-2和5-3中制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株之间的腐胺生产能力。

[0254] [表20]

	菌株的名称	腐胺(g/L)	生产能力(g/l/min)
[0255]	KCCM11240P	5.8	6.96
	KCCM11240P Tn:P(CJ7)-pntAB	6.1	7.32
	KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522	7.3	8.76
	KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-pntAB	7.5	9.00
[0256]	DAB12-b	6.5	7.80
	DAB12-b Tn:P(CJ7)-pntAB	6.7	8.04
	DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522	7.8	9.36
	DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-pntAB	8.1	9.72

[0257] 如表20中所示, 在谷氨酸棒杆菌ATCC 13032或13869来源的生产腐胺的菌株中, 与对照组相比, 引入了大肠杆菌来源的NADP转氢酶pntAB的所有突变菌株显示了略有增加的腐胺生产能力。

[0258] 实施例6: 通过葡萄糖酸激酶的失活的腐胺生产

[0259] 通过减弱生产腐胺的菌株中葡萄糖酸激酶活性检查腐胺生产。

[0260] 实施例6-1: 用于葡萄糖酸激酶基因NCg12399或NCg12905缺失的载体的制备

[0261] <6-1-1>用于NCg12399缺失的载体的制备

[0262] 谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的染色体包括具有葡萄糖酸激酶活性的NCg12399和NCg12905基因。制备用于在具有葡萄糖酸激酶活性的两个基因中NCg12399基因缺失的载体。从NIH GenBank获得谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株的NCg12399基因的氨基酸序列 (SEQ ID NO:45) 和核苷酸序列 (SEQ ID NO:46)。

[0263] 在本公开的具体实施例中, 使用了用于转化的载体pDZ。使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株的染色体作为模板, 和SEQ ID NO:47和48的引物以及SEQ ID NO:49和50的引物, 扩增两个约0.5kb的基因片段(表21)。此时, PCR反应通过重复30个循环(在95°C下变性30秒, 在55°C下退火30秒, 以及在72°C下延伸30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳, 以及洗脱并纯化所期望大小的条带。用XbaI处理pDZ载体, 然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZ-1' NCg12399(K/O)。

[0264] [表21]

SEQ ID NO.	引物	序列(5'-3')
[0265] 47	NCgl2399-del-5F	CCGGGGATCCTCTAGAgccccacgtttgtatcaatgg
48	NCgl2399-del-5R	GAAGTTCGTCGCCGTCTTTG
49	NCgl2399-del-3F	GACGGCGACGAACTTCGGCCGCCCAATCTGCAG
[0266] 50	NCgl2399-del-3R	GCAGGTCGACTCTAGAGGGTGGGGTCTGCTTTGG

[0267] 进一步,通过基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的核苷酸序列的PCR反应和测序,从NIH GenBank获得与谷氨酸棒杆菌ATCC 13869的NCg12399具有同源性的基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:51)和核苷酸序列(SEQ ID NO:52)。

[0268] 相似地,使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株的染色体为模板,并用相同的引物,扩增两个约0.5kb的基因片段,以与上述相同的方式制备载体。得到的质粒命名为pDZ-2' NCg12399(K/0)。

[0269] <6-1-2>用于NCg12905缺失的载体的制备

[0270] 制备用于NCg12905基因缺失的载体,NCg12905基因是具有葡萄糖酸激酶活性的另一个基因。从NIH GenBank获得谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株NCg12905基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:53)和核苷酸序列(SEQ ID NO:54)。

[0271] 在本公开的具体实施例中,使用了用于转化的载体pDZ。使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株的染色体作为模板,并用SEQ ID NO:55和56的引物以及SEQ ID NO:57和58的引物,扩增两个约0.5kb的基因片段(表22)。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95°C下变性30秒,在55°C下退火30秒,以及在72°C下延伸30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化所期望大小的条带。用XbaI处理pDZ载体,以及然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZ-1' NCg12905(K/0)。

[0272] [表22]

SEQ ID NO.	引物	序列(5'-3')
[0273] 55	NCgl2905-del-5F	CCGGGGATCCTCTAGACTGGGTCGTGGCATAAGA A
56	NCgl2905-del-5R	GTGCCTTTGATTGGGCAGC
57	NCgl2905-del-3F	GCCCAATCAAAGGCACGAATTCCTCGCGATGCTT TCC
58	NCgl2905-del-3R	GCAGGTCGACTCTAGACTAGACCAACTTGAGGTA GAGG

[0274] 进一步,通过基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的核苷酸序列的PCR反应和测序,从NIH GenBank获得与谷氨酸棒杆菌ATCC 13869的NCg12905具有同源性的基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:59)和核苷酸序列(SEQ ID NO:60)。

[0275] 相似地,使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株的染色体作为模板与相同的引物,扩

增两个约0.5kb的基因片段,以与上述相同的方式制备载体。得到的质粒命名为pDZ-2' NCg12905(K/O)。

[0276] 6-2:具有葡萄糖酸激酶基因NCg12399或NCg12905缺失的菌株的制备和评价

[0277] <6-2-1>基于ATCC 13032的生产腐胺的菌株的NCg12399缺失的菌株的制备

[0278] 用实施例6-1-1中制备的质粒pDZ-1' NCg12399(K/O)以与实施例<1-4-1>相同的方式转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的生产腐胺的菌株的谷氨酸棒杆菌KCCM11240P(韩国专利公开号2013-0003648),以制备其中NCg12399基因缺失的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株命名为KCCM11240P ΔNCg12399。

[0279] <6-2-2>基于ATCC 13032的生产腐胺的菌株的NCg12399和NCg12905-共缺失菌株的制备

[0280] 用实施例6-1-2中制备的质粒pDZ-1' NCg12905(K/O)以与实施例<1-4-1>相同的方式转化实施例6-2-1中制备的KCCM11240P ΔNCg12399,以制备其中NCg12399基因和NCg12905基因均缺失的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变株命名为KCCM11240P ΔNCg12399 ΔNCg12905。

[0281] <6-2-3>基于ATCC 13869的生产腐胺的菌株的NCg12399缺失的菌株的制备

[0282] 用实施例6-1-1中制备的质粒pDZ-1' NCg12399(K/O)以与实施例<1-4-1>相同的方式转化基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的生产腐胺的菌株谷氨酸棒杆菌DAB12-b(韩国专利公开号2013-0003648),以制备其中NCg12399基因缺失的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变株命名为DAB12-b ΔNCg12399。

[0283] <6-2-4>基于ATCC 13869的生产腐胺的菌株的NCg12399和NCg12905-共缺失的菌株的制备

[0284] 用实施例6-1-2中制备的质粒pDZ-2' NCg12905(K/O)以与实施例<1-4-1>相同的方式转化实施例6-2-3中制备的KCCM11240P ΔNCg12399,以制备其中NCg12399基因和NCg12905基因均缺失的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株命名为DAB12-b ΔNCg12399 ΔNCg12905。

[0285] <6-2-5>葡萄糖酸激酶活性失活的菌株的腐胺生产能力的评价

[0286] 为了检查通过在生产腐胺的菌株中缺失葡萄糖酸激酶基因NCg12399和NCg12905的腐胺生产,比较与实施例1-4-3相同的方式在实施例6-2-1、6-2-2、6-2-3和6-2-4中制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株之间的腐胺生产能力。

[0287] [表23]

菌株的名称	腐胺(g/L)	生产能力(g/l/min)
KCCM11240P	5.8	6.96
KCCM11240P ΔNCg12399	5.9	7.08
KCCM11240P ΔNCg12399 ΔNCg12905	6.4	7.68
DAB12-b	6.5	7.80
DAB12-b ΔNCg12399	6.5	7.80
DAB12-b ΔNCg12399 ΔNCg12905	7.1	8.52

[0288]

[0289] 如表23中所示,在谷氨酸棒杆菌ATCC 13032或13869来源的生产腐胺的菌株中,与对照组相比,其中葡萄糖酸激酶基因NCg12399和NCg12905均缺失的所有突变菌株显示了增加的腐胺生产能力。进一步,其中NCg12399和NCg12905均缺失的菌株比其中单独缺失NCg12399的菌株显示了更高的腐胺生产能力。

[0290] 实施例7:通过NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的引入和转酮醇酶的增强的腐胺生产

[0291] 通过增强生产腐胺的菌株的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性和转酮醇酶活性两者检查腐胺生产。

[0292] 7-1:用于在引入变异链球菌ATCC 25175来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的生产腐胺的菌株中转酮醇酶增强的起始密码子置换的组合菌株的制备

[0293] 用实施例2-1-1中制备的质粒pDZ-1' tkt (ATG) 以与实施例<1-4-1>相同的方式转化实施例1-4-1中制备的基于ATCC 13032的生产腐胺的菌株KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (CJ7) -gapN (S)。由其制备的谷氨酸棒杆菌突变株命名为KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (cj7) -gapN(S) tkt (ATG)。

[0294] 相似地,用实施例2-1-1中制备的质粒pDZ-2' tkt (ATG) 以与实施例<1-4-1>相同的方式转化实施例1-4-2中制备的基于ATCC 13869的生产腐胺的菌株DAB-b P (CJ7) -NCg12522 P (CJ7) -gapN (S)。由其制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株命名为DAB-b P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (cj7) -gapN(S) tkt (ATG)。

[0295] 7-2:用于变异链球菌ATCC 25175来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶引入的生产腐胺的菌株中转酮醇酶增强的启动子置换的组合菌株的制备

[0296] 用实施例2-2-1中制备的质粒pDZ-P (CJ7) -1' tkt (ATG) 以与实施例<1-4-1>相同的方式转化实施例1-4-1中制备的基于ATCC 13032的生产腐胺的菌株KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (CJ7) -gapN (S)。由其制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株命名为KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (cj7) -gapN(S)P (CJ7) -tkt (ATG)。

[0297] 相似地,用实施例2-2-1中制备的质粒pDZ-P (CJ7) -2' tkt (ATG) 以与实施例<1-4-1>相同的方式转化实施例1-4-2中制备的基于ATCC 13869的生产腐胺的菌株DAB-b P (CJ7) -NCg12522 P (CJ7) -gapN (S)。由其制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株命名为DAB-b P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (cj7) -gapN(S)P (CJ7) -tkt (ATG)。

[0298] 7-3:变异链球菌ATCC 25175来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的引入和转酮醇酶活性的增强的组合菌株的腐胺生产能力的评价

[0299] 为了检查当具有NADP依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的gapN基因被增强,以及同时转酮醇酶NCg11512的起始密码子TTG被ATG置换时、或者当NCg11512的启动子被CJ7置换时的腐胺生产,检查了实施例7-1和7-2中制备的谷氨酸棒杆菌突变株的腐胺生产能力。

[0300] 详细地,以与实施例1-4-3相同的方式,比较了两个对照组(KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522和DAB12-b P (CJ7) -NCg12522)、其中引入变异链球菌ATCC 25175来源的gapN的两个突变菌株(KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (CJ7) -gapN (S)和DAB12-b P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (CJ7) -gapN(S))、其中引入变异链球菌ATCC 25175来源的gapN且tkt的起始密码子TTG置换为ATG的两个突变菌株的谷氨酸棒杆菌突变菌株(KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (cj7) -gapN(S) tkt (ATG)和DAB12-b P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (cj7) -gapN(S))

tkt (ATG))、和其中引入变异链球菌ATCC 25175来源的gapN且tkt的启动子置换为CJ7的两个突变菌株的谷氨酸棒杆菌突变菌株 (KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (cj7) -gapN(S) P (CJ7) -tkt (ATG) 和DAB12-b P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (cj7) -gapN(S) P (CJ7) -tkt (ATG)) 的腐胺生产能力。

[0301] [表24]

菌株的名称	腐胺(g/L)	生产能力 (g/l/min)
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522	7.3	8.76
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(cj7)-gapN(S)	9.9	11.88
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(cj7)-gapN(S) tkt(ATG)	10.5	12.60
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(cj7)-gapN(S) P(CJ7)-tkt(ATG)	12.7	15.24
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522	7.9	9.48
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(cj7)-gapN(S)	10.7	12.84
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(cj7)-gapN(S) tkt(ATG)	11.3	13.56
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(cj7)-gapN(S) P(CJ7)-tkt(ATG)	13.6	16.32

[0303] 如表24中所示,当NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶gapN被引入且tkt的起始密码子被置换为ATG、或gapN被引入且tkt启动子被置换以增加谷氨酸棒杆菌ATCC 13032或13869来源的生产腐胺的菌株中的表达水平时,与单独增强gapN的菌株相比,腐胺生产能力被增加。

[0304] 实施例8:通过NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的引入和G6PD的增强的腐胺的生产

[0305] 通过增强生产腐胺的菌株中的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性和G6PD活性检查腐胺生产。

[0306] 8-1:用于变异链球菌ATCC 25175来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶引入的生产腐胺的菌株中G6PD增强的CJ7启动子引入的组合菌株的制备

[0307] 以与实施例<1-4-1>相同的方式,用实施例3-1-1中制备的质粒pDZ-P (CJ7) -1' zwf转化实施例1-4-1中制备的基于ATCC 13032的生产腐胺的菌株KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (CJ7) -gapN (S),以制备其中在NCg11514的起始密码子前引入CJ7启动子的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株命名为KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (CJ7) -gapN (S) P (CJ7) -zwf。

[0308] 相似地,用实施例3-1-1中制备的质粒pDZ-P (CJ7) -2' zwf以与实施例<1-4-1>相同的方式转化实施例1-4-2中制备的基于ATCC 13869的生产腐胺的菌株DAB-b P (CJ7) -NCg12522 P (CJ7) -gapN (S),以制备其中在NCg11514的起始密码子前引入CJ7启动子的菌株。由其制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株命名为DAB-b P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (CJ7) -gapN (S) P (CJ7) -zwf。

[0309] 8-2:变异链球菌ATCC 25175来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性引入和G6PD活性增强的组合菌株的腐胺生产能力的评价

[0310] 为了检查当具有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的gapN基因被增强,并且

同时在G6PD NCg11514的起始密码子前引入CJ7启动子时的腐胺生产,检查了实施例8-1中制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株腐胺生产能力。

[0311] 详细地, 以与实施例1-4-3中相同的方式, 比较了两个对照组 (KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522和DAB12-b P (CJ7) -NCg12522)、其中引入变异链球菌ATCC 25175来源的gapN的两个突变菌株 (KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (CJ7) -gapN(S) 和DAB12-b P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (CJ7) -gapN(S))、以及其中引入变异链球菌ATCC 25175来源的gapN并且在NCg11514前引入CJ7启动子的两个突变菌株的谷氨酸棒杆菌突变菌株 ((KCCM11240P P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (CJ7) -gapN(S) P (CJ7) -zwf和DAB12-b P (CJ7) -NCg12522 Tn:P (CJ7) -gapN(S) P (CJ7) -zwf)的腐胺生产能力。

[0312] [表25]

菌株的名称	腐胺 (g/L)	生产能力 (g/l/min)
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522	7.3	8.76
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)	9.9	11.88
[0313] KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) P(CJ7)-zwf	10.0	12.00
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522	7.8	9.48
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)	10.7	12.84
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) P(CJ7)-zwf	10.9	13.08

[0314] 如表25中所示, 当在谷氨酸棒杆菌ATCC 13032或13869来源的生产腐胺的菌株中引入NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶gapN和在zwf的起始密码子前引入CJ7启动子时, 与其中单独增强gapN的菌株相比, 腐胺生产能力略有增加。

[0315] 实施例9:通过NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的引入和烟酸磷酸核糖基转移酶的增强的腐胺生产

[0316] 在这个实施例中, 为了激活由NADP合成NADPH的反应且同时增强NAD和NADP的前体 $\beta$ -烟酸D-核糖核苷酸, 通过增强生产腐胺的菌株中NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性和烟酸磷酸核糖基转移酶活性两者来检查腐胺生产。分别应用了大肠杆菌来源的基因和谷氨酸棒杆菌来源的基因, 作为烟酸磷酸核糖基转移酶。

[0317] 9-1: 用于将大肠杆菌W3110来源的烟酸磷酸核糖基转移酶 (EC.2.4.2.11) 引入到棒状微生物的染色体上的转座子基因中的载体的制备

[0318] 制备了用于将编码具有大肠杆菌W3110来源的烟酸磷酸核糖基转移酶活性的pncB的Y75\_p0903引入到染色体上的转座子基因中的载体。从NIH GenBank获得编码具有大肠杆菌W3110来源的烟酸磷酸核糖基转移酶活性的pncB的Y75\_p0903基因的氨基酸序列 (SEQ ID NO:61) 和核苷酸序列 (SEQ ID NO:62)。

[0319] 在本公开的具体实施例中, 使用用于转化的载体pDZTn, 以利用棒杆菌属的微生物的转座子基因区将基因引入到染色体中。使用大肠杆菌W3110菌株的染色体作为模板和SEQ ID NO:63和64的引物, 扩增Y75\_p0903基因的约1.2kb的基因片段 (表26)。此时, PCR反应通过重复30个循环 (在95°C下变性30秒, 在55°C下退火30秒, 以及在72°C下延伸1分30秒) 进

行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化所期望大小的条带。进一步,利用SEQ ID NO:5和6的一对引物,在相同条件下对CJ7启动子区进行PCR以获得PCR产物。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒)进行。用XhoI处理pDZTn载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZTn:P(CJ7)-pncB(Eco)。

[0320] [表26]

SEQ ID NO.	引物	序列(5' -3')
63	pncB(Eco)-F	aaggaaacactgatatcATGACACAATTCGCTTCTCCTG
64	pncB(Eco)-R	gccaaaacagcctcgagTAACTGGCTTTTTTAATATGCGGAAG
5	CJ7-F	ggcccactagtctcgagGCCGGCATAGCCTACCGAT
6	CJ7-R	GATATCAGTGTTCCTTTCGTTGG

[0322] 9-2:用于将烟酸磷酸核糖基转移酶引入到棒状微生物的染色体上的转座子基因中的载体的制备

[0323] 制备了用于将编码具有谷氨酸棒杆菌ATCC 13032来源的烟酸磷酸核糖基转移酶活性的PncB的NCg12431引入到染色体中的载体。从NIH GenBank获得谷氨酸棒杆菌ATCC 13032来源的NCg12431基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:65)和核苷酸序列(SEQ ID NO:66)。此时,ATG(代替GTG)被引入作为NCg12431的起始密码子。

[0324] 在本公开的具体实施例中,使用用于转化的载体pDZTn,以利用棒杆菌属的微生物的转座子基因区将基因引入到染色体中。使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株的染色体作为模板和SEQ ID NO:67和68的引物,扩增约1.3kb的基因片段(表27)。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸1分30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化所期望大小的条带。进一步,利用SEQ ID NO:5和6的一对引物,通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒),获得CJ7启动子区。用XbaI处理pDZ载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZTn:P(CJ7)-1' pncB。

[0325] [表27]

SEQ ID NO.	引物	序列(5' -3')
67	1' NCg12431-F	aaggaaacactgatatcATGAATACCAATCCGTCTGAATTCTCC
68	1' NCg12431-R	gccaaaacagcctcgagCTAAGCGGCCGCGGAA
5	CJ7-F	ggcccactagtctcgagGCCGGCATAGCCTACCGAT
6	CJ7-R	GATATCAGTGTTCCTTTCGTTGG

[0327] 进一步,通过基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的核苷酸序列的PCR反应和测序,获得了与谷氨酸棒杆菌ATCC 13869的NCg12431具有同源性的基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:69)和核苷酸序列(SEQ ID NO:70)。

[0328] 相似地,使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株的染色体作为模板和SEQ ID NO:71和72的引物,扩增约1.45kb的基因片段(表28)。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖

凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化所期望大小的条带。进一步,利用SEQ ID NO:5和6的一对引物,通过重复30个循环(在95°C下变性30秒,在55°C下退火30秒,以及在72°C下延伸30秒),获得CJ7启动子区。用XbaI处理pDZ载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZTn:P(CJ7)-2' pncB。

[0329] [表28]

SEQ ID NO.	引物	序列(5' -3')
71	2' NCg12431-F	aaggaaacactgatatcATGAATACCAATCCTTCTGAATTCTCC
72	2' NCg12431-R	gccaaaacagcctcgagCTAAGCGACCGGCGGAATC
5	CJ7-F	ggcccactagtctcgagGCCGGCATAGCCTACCGAT
6	CJ7-R	GATATCAGTGTTCCTTTCGTTGG

[0331] 9-3:通过引入NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的基于棒杆的生产腐胺的菌株中烟酸磷酸核糖基转移酶的增强的腐胺发酵

[0332] <9-3-1>变异链球菌ATCC 25175来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶引入的基于棒状的生产腐胺的菌株中烟酸磷酸核糖基转移酶增强的菌株的制备

[0333] 用实施例9-1中制备的质粒pDZTn:P(CJ7)-pncB(Eco)或实施例9-2中制备的质粒pDZTn:P(CJ7)-1' pncB以与<1-4-1>中相同的方式转化实施例1-4-1中制备的基于ATCC 13032的生产腐胺的菌株KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S),以制备其中将大肠杆菌W3110来源的编码pncB的Y75\_p0903基因的或谷氨酸棒杆菌ATCC 13032来源的编码pncB的NCg12431基因引入到转座子中的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株分别命名为KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-pncB(Eco)和KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-1' NCg12431。

[0334] 相似地,用实施例9-1中制备的质粒pDZTn:P(CJ7)-pncB(Eco)或实施例9-2中制备的质粒pDZTn:P(CJ7)-2' pncB以与<1-4-1>中相同的方式转化实施例1-4-2中制备的基于ATCC 13869的生产腐胺的菌株DAB-b P(CJ7)-NCg12522 P(CJ7)-gapN(S),以制备其中将大肠杆菌W3110来源的编码pncB的Y75\_p0903基因或谷氨酸棒杆菌ATCC 13869来源的编码pncB的NCg12431基因引入到转座子中的菌株。中选出的谷氨酸棒杆菌突变菌株分别命名为DAB-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-pncB(Eco)和DAB-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-2' NCg12431。

[0335] <9-3-2>变异链球菌ATCC 25175来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的引入和烟酸磷酸核糖基转移酶活性的增强的组合菌株的腐胺生产能力的评价

[0336] 为了检查当大肠杆菌W3110来源的编码PncB的Y75\_p0903基因或谷氨酸棒杆菌来源的编码PncB的NCg12431基因被增强时的腐胺生产,检查了实施例9-1中制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株的腐胺生产能力。

[0337] 详细地,以与实施例1-4-3中相同的方式,比较了两个对照组(KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522和DAB12-b P(CJ7)-NCg12522)、将其中引入变异链球菌ATCC 25175来源的gapN的两个突变菌株(KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)、DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S))、和其中引入变异链球菌ATCC 25175来源的gapN且引入大肠杆菌W3110来源的编码pncB的Y75\_p0903基因或谷氨酸棒杆菌来源的编码pncB的

NCg12431基因的4种突变菌株的谷氨酸棒杆菌突变菌株(KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-pncB(Eco)、KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-1' NCg12431、DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-pncB(Eco)、DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-2' NCg12431)的腐胺生产能力。

[0338] [表29]

菌株的名称	腐胺 (g/L)	生产能力 (g/l/min)
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522	7.3	8.76
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)	9.9	11.88
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-pncB(Eco)	10.0	12.00
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-1'NCg12431	10.2	12.24
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522	7.8	9.48
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)	10.7	12.84
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-pncB(Eco)	10.9	13.08
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-2'NCg12431	11.1	13.32

[0340] 如表29中所示,确认当在谷氨酸棒杆菌ATCC 13032或13869来源的生产腐胺的菌株中,引入NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶gapN并且增强大肠杆菌W3110来源的编码pncB的Y75\_p0903基因或谷氨酸棒杆菌来源的编码pncB的NCg12431时,腐胺生产能力增加了。还确认了增强棒杆来源的pncB比引入大肠杆菌来源的pncB,更增加了腐胺生产能力。

[0341] 实施例10:通过NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的引入和NAD<sup>+</sup>二磷酸酶的缺失的腐胺生产

[0342] 通过增强生产腐胺的菌株中NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性和NAD<sup>+</sup>二磷酸酶活性来检查腐胺生产。

[0343] 10-1:NAD<sup>+</sup>二磷酸酶基因NCg10744缺失的载体的制备

[0344] 从NIH GenBank获得具有NAD<sup>+</sup>二磷酸酶活性NCg10744基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:73)和核苷酸序列(SEQ ID NO:74)。为了减弱NAD<sup>+</sup>二磷酸酶活性,制备了用于NCg10744基因缺失的载体。

[0345] 在本公开的具体实施例中,使用了用于转化的载体pDZ。使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株的染色体作为模板,和SEQ ID NO:75和76的引物以及SEQ ID NO:77和78的引物,扩增两个约0.5kb的基因片段(表30)。此时,此时,PCR反应通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒)进行。这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化所期望大小的条带。用XbaI处理pDZ载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZ-1' NCg10744(K/O)。

[0346] [表30]

SEQ ID NO.	引物	序列 (5'-3')
75	0744-del-5F	CCGGGGATCCTCTAGAGCAGATGTGTTGCGTCTAGC
76	0744-del-5R	TTGTCATTTACCTCCTCGCTAAATAC
77	0744-del-3F	CGAGGAGGTAAATGACAAGGAAGATGAGTTGCCTCA AGG
78	0744-del-3R	GCAGGTCTGACTCTAGACAGATTACCCGCCACCTGAG

[0347] 进一步,通过基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的核苷酸序列的PCR反应和测序,获得了与谷氨酸棒杆菌ATCC 13869的NCg10744具有同源性的基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:79)和核苷酸序列(SEQ ID NO:80)。

[0349] 相似地,使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株的染色体为模板和相同的引物,扩增两个约0.5kb的基因片段,以与上述相同的方式制备载体。得到的质粒命名为pDZ-2' NCg10744(K/O)。

[0350] 10-2:NAD<sup>+</sup>二磷酸酶基因NCg10744缺失的菌株的制备和评价

[0351] <10-2-1>变异链球菌ATCC 25175来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶引入的基于棒杆的生产腐胺的菌株中NAD<sup>+</sup>二磷酸酶缺失的菌株的制备

[0352] 用实施例10-1中制备的质粒pDZ-1' NCg10744(K/O)以与<1-4-1>中相同的方式转化实施例1-4-1中制备的基于ATCC 13032的生产腐胺的菌株KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S),以制备其中缺失NCg10744基因的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株分别命名为KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) ΔNCg10744和KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) ΔNCg10744。

[0353] 相似地,用实施例10-1中制备的质粒pDZ-2' NCg10744(K/O)以与<1-4-1>中相同的方式转化实施例1-4-2中制备的基于ATCC 13869的生产腐胺的菌株DAB-b P(CJ7)-NCg12522 P(CJ7)-gapN(S),以制备其中缺失NCg10744基因的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株分别命名为DAB-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) ΔNCg10744、DAB-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) ΔNCg10744。

[0354] <10-2-2>引入变异链球菌ATCC 25175来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性并使NAD<sup>+</sup>二磷酸酶活性失活的菌株的腐胺生产能力的评价

[0355] 为了检查生产腐胺的菌株中缺失NAD<sup>+</sup>二磷酸酶基因NCg10744时的腐胺生产,以与实施例1-4-3相同的方式检查了实施例10-2-1中制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株的腐胺生产能力。

[0356] [表31]

菌株名称	腐胺	生产能力
	(g/L)	(g/l/min)
KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522	7.3	8.76
KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)	9.9	11.88
KCCM11240P P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) ΔNCgl0744	10.1	12.12
DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522	7.8	9.48
DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)	10.7	12.84
DAB12-b P(CJ7)-NCgl2522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) ΔNCgl0744	11.0	13.20

[0357] 如表31中所示,确认了当在谷氨酸棒杆菌ATCC 13032或13869来源的生产腐胺的菌株中引入NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶gapN和缺失编码NAD<sup>+</sup>二磷酸酶的NCg10744时,腐胺生产能力略有增加。

[0359] 实施例11:通过NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的引入和NAD<sup>+</sup>激酶的增强的腐胺生产

[0360] 通过增强生产腐胺的菌株中的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性和NAD<sup>+</sup>激酶活性来检查腐胺生产。

[0361] 11-1:用于将NAD<sup>+</sup>激酶引入到棒状微生物的染色体上转座子基因中的载体的制备

[0362] 为了增强具有NAD<sup>+</sup>激酶活性的NCg11358的活性,制备了用于将由CJ7启动子表达的NCg11358引入到染色体上转座子基因中的载体。从NIH GenBank获得谷氨酸棒杆菌ATCC 13032来源的NCg11358基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:81)和核苷酸序列(SEQ ID NO:82)。

[0363] 在本公开的具体实施例中,使用用于转化的载体pDZTn,以利用棒杆菌属微生物的转座子基因区将基因引入到染色体上的转座子基因中。使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株的染色体作为模板,和SEQ ID NO:83和84的引物,扩增约0.96kb的基因片段(表32)。此时,PCR反应通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸1分钟)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,以及洗脱并纯化所期望大小的条带。利用SEQ ID NO:5和6的一对引物,通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒),获得CJ7启动子区。用XbaI处理pDZ载体,然后将上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion<sup>®</sup>HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZTn:P(CJ7)-1' ppnk。

[0364] [表32]

SEQ ID NO.	引物	序列(5' -3')
83	NCg11358-F	AAGGAAACACTGATATC_ATGACTGCACCCACGAACGC
84	NCg11358-R	GCCAAAACAGCCTCGAG TTACCCCGCTGACCTGGG
5	CJ7-F	GGCCCACTAGTCTCGAG GCCGGCATAGCCTACCGAT
6	CJ7-R	GATATCAGTGTTCCTTTCGTTGG

[0366] 进一步,通过基于谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的核苷酸序列的PCR反应和测序,获得了与谷氨酸棒杆菌ATCC 13869的编码ppnK的NCg11358具有同源性的基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:85)和核苷酸序列(SEQ ID NO:86)。

[0367] 相似地,使用谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株的染色体为模板和相同的引物,扩增约0.96kb的基因片段。此时,PCR反应和克隆方法同上,且所得质粒命名为pDZTn:P(CJ7)-2'ppnk。

[0368] 11-2:通过NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶引入的基于棒杆菌的生产腐胺的菌株中的NAD<sup>+</sup>激酶的增强的腐胺发酵

[0369] <11-2-1>变异链球菌ATCC 25175来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶引入的基于棒杆菌的生产腐胺的菌株中NAD激酶增强的菌株的制备

[0370] 用实施例11-1中制备的质粒pDZTn:P(CJ7)-1'ppnk以与<1-4-1>中相同的方式转化实施例1-4-1中制备的基于ATCC 13032的生产腐胺的菌株KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S),以制备其中NCg11358基因被引入到转座子中的菌株。将从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株命名为KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-1'ppnk。

[0371] 相似地,用实施例11-1中制备的质粒pDZTn:P(CJ7)-2'ppnk以与<1-4-1>中相同的方式转化实施例1-4-2中制备的基于ATCC 13869的腐胺生产菌株DAB-b P(CJ7)-NCg12522 P(CJ7)-gapN(S),以制备其中NCg11358基因被引入到转座子中的菌株。从中选择的谷氨酸棒杆菌突变菌株命名为DAB-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-2'ppnK。

[0372] <11-2-2>变异链球菌ATCC 25175来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性引入和NAD<sup>+</sup>激酶活性增强的菌株的腐胺生产能力的评价

[0373] 为了检查当将具有NAD<sup>+</sup>激酶活性的NCg11358以由CJ7启动子表达的形式引入到染色体上的转座子基因中,以促进作为谷氨酸棒杆菌NADPH前体的NADP的供应时的腐胺生产,检查了实施例11-2-1中制备的谷氨酸棒杆菌突变菌株的腐胺生产能力。

[0374] 详细地,以与实施例1-4-3相同的方式,比较了两个对照组(KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522和DAB12-b P(CJ7)-NCg12522)、其中引入变异链球菌ATCC 25175来源的gapN的两个突变菌株(KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)、DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S))、和其中引入变异链球菌ATCC 25175来源的gapN且引入谷氨酸棒杆菌来源的ppnK的4种突变菌株的谷氨酸棒杆菌突变菌株(KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-1'ppnK和DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-2'ppnK)的来自培养98小时的最终产物的腐胺生产能力。

[0375] [表33]

菌株的名称	腐胺 (g/L)	生产能力 (g/L/min)
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522	15.5	9.48
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)	16.1	9.85
KCCM11240P P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-1'ppnK	16.7	10.22
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522	15.9	9.73
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S)	16.5	10.01
DAB12-b P(CJ7)-NCg12522 Tn:P(CJ7)-gapN(S) Tn:P(CJ7)-2'ppnK	16.9	10.34

[0377] 如表33中所示,确认当在谷氨酸棒杆菌ATCC 13032或13869来源的生产腐胺的菌

株中引入NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶gapN和增强编码谷氨酸棒杆菌来源的NAD<sup>+</sup>激酶ppnK的NCg11358时,腐胺生产能力略有增加。

[0378] 在本公开中,确认谷氨酸棒杆菌菌株(其中Ldb1179被引入到具有乙酰腐胺合成途径缺失的生产腐胺的棒杆菌属的微生物的转座子中,以增强NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性)能够以高产率和高生产能力生产腐胺,并且该菌株命名为KCCM11240P Tn:P (CJ7)-gapN(L),CC01-0811,然后于2017年6月29日被保藏在布达佩斯条约下的国际保藏机构韩国微生物保藏中心(KCCM),保藏号为KCCM12052P。

[0379] 基于以上描述,本领域技术人员将理解,在不改变本公开的技术精神或必要特征的情况下,可以以不同的具体形式实施本公开。因此,应当理解,上述实施方式不是限制性的,而在所有方面是说明性的。本公开的范围由所附权利要求限定,而不是由前面的描述限定,且因此意在将落入权利要求的范围和界限内的所有改变和修改、或者这些范围和界限的等同物涵盖在权利要求中。

### 关于用于专利步骤的微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约

#### 国际形式

至: CJ 第一制糖株式会社  
CJ 第一制糖株式会社中心  
330, DONGHO-RO,  
JUNG-GU, 首尔 100-400, 大韩民国

由国际保藏机构依照第 7.1  
条发布的原始保藏接收证明

[0380]

I. 微生物鉴定	
由保藏人提供的标识参考: 谷氨酸棒杆菌 CC01-0811	由国际保藏机构提供的登记号: KCCM12052P
II. 科学描述和/或建议的分类学名称	
如上 I 标识的微生物带有: <input type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用, 用叉号标记)	
III. 收到和接收	
该国际保藏机构接收如上 I 标识的微生物, 其于 2017 年 6 月 29 日收到。(原始保藏日) <sup>1</sup>	
IV. 国际保藏机构	
名称: 韩国微生物保藏中心  地址: Yurim B/D, 45,Hongjenae-2ga-gil Seodaemun-gu 首尔 120-861 大韩民国	具有代表该国际保藏机构的权利的自然人 或授权官员签名(盖章): 日期: 2017 年 6 月 29 日

证明上述翻译与原文无误

2017 年 7 月 19 日

专利代理人 Son Min 印



[0042]	210	215	220
[0043]	Phe Ile Asn Phe Thr Gly Ser Ser Ala Val Gly Lys Asn Ile Gly Lys		
[0044]	225	230	235 240
[0045]	Leu Ala Gly Met Arg Pro Ile Met Leu Glu Leu Gly Gly Lys Asp Ala		
[0046]		245	250 255
[0047]	Ala Ile Val Leu Glu Asp Ala Asp Leu Asp Leu Thr Ala Lys Asn Ile		
[0048]		260	265 270
[0049]	Val Ala Gly Ala Phe Gly Tyr Ser Gly Gln Arg Cys Thr Ala Val Lys		
[0050]		275	280 285
[0051]	Arg Val Leu Val Met Asp Ser Val Ala Asp Glu Leu Val Glu Lys Val		
[0052]		290	295 300
[0053]	Thr Ala Leu Ala Lys Asp Leu Thr Val Gly Ile Pro Glu Glu Asp Ala		
[0054]		305	310 315 320
[0055]	Asp Ile Thr Pro Leu Ile Asp Thr Lys Ser Ala Asp Tyr Val Gln Gly		
[0056]		325	330 335
[0057]	Leu Ile Glu Glu Ala Ala Glu Lys Gly Ala Lys Pro Leu Phe Asp Phe		
[0058]		340	345 350
[0059]	Lys Arg Glu Gly Asn Leu Ile Tyr Pro Met Val Met Asp Gln Val Thr		
[0060]		355	360 365
[0061]	Thr Asp Met Arg Leu Ala Trp Glu Glu Pro Phe Gly Pro Val Leu Pro		
[0062]		370	375 380
[0063]	Phe Ile Arg Val Lys Ser Ala Asp Glu Ala Val Met Ile Ala Asn Glu		
[0064]		385	390 395 400
[0065]	Ser Glu Tyr Gly Leu Gln Ser Ser Val Phe Ser Arg Asn Phe Glu Lys		
[0066]		405	410 415
[0067]	Ala Phe Ala Ile Ala Gly Lys Leu Glu Val Gly Thr Val His Ile Asn		
[0068]		420	425 430
[0069]	Asn Lys Thr Gln Arg Gly Pro Asp Asn Phe Pro Phe Leu Gly Val Lys		
[0070]		435	440 445
[0071]	Ser Ser Gly Ala Gly Val Gln Gly Val Lys Tyr Ser Ile Gln Ala Met		
[0072]		450	455 460
[0073]	Thr Arg Val Lys Ser Val Val Phe Asn Ile Glu Asp		
[0074]		465	470 475
[0075]	<210>	2	
[0076]	<211>	1371	
[0077]	<212>	DNA	
[0078]	<213>	未知	
[0079]	<220>		
[0080]	<223>	德氏乳杆菌保加利亚亚种 ATCC 11842	
[0081]	<400>	2	
[0082]	ttgacagaac actatttaaa ctatgtcaat ggcgaatggc gggactccgc tgacgcgatt	60	
[0083]	gaaattttcg aaccagcaac tggcaagtcc ctgggtaactg tacctgceat gtcccacgaa	120	

[0084]	gacgtggact acgtaatgaa cagcgccaaa aaggcccttc cagcctggcg ggcctctca	180
[0085]	tacgttgaac gggccgcata cttgcaaaag gcagcggaca tcctttaccg agatgctgaa	240
[0086]	aagatcggtt ctacctgtc caaggaaatc gccaaaggcc tcaagtctc tatcggcgaa	300
[0087]	gtaacccgga cggcggaaat cgttgaatac acggccaagg tcggcgtaac tttggacggg	360
[0088]	gaagtcattg agggcggcaa ctttgaagcg gcaagcaaga acaagttggc tgttgtccgc	420
[0089]	cgggaaccag tcggcctggt tttggcaatt tcaccctca actaccgggt taacctggcc	480
[0090]	ggctcaaaga tcgcgcctgc tttgatgggc gggaacgtgg tggccttcaa gccgccgaca	540
[0091]	caagggtcaa tctccggtct gcttttggcc aaggccttcg ccgaagctgg cctgccagcc	600
[0092]	ggcgtcttca acaccattac cggccggggt cgggttatcg gcgactacat cgttgaacac	660
[0093]	ccggcagtc acttcatcaa cttaccgggt tccagtgtg tcggcaagaa catcgccaaa	720
[0094]	ctggccggga tgcggccgat tatgctggaa cttggcggca aggacgcggc catcgtcttg	780
[0095]	gaagacgtg acttggacct gacggccaag aacatcgtt cggcgcctt tggctactcc	840
[0096]	ggccagcgtt gtaccgccgt taagcgggt ctggtcatgg acagcgtgc tgacgaattg	900
[0097]	gttghaaagg tgactgcttt ggccaaggat ttgacggtcg ggataccaga agaggatgcc	960
[0098]	gacatcactc ctttgatcga cactaagtct gccgactacg tacaaggctt aattgaagaa	1020
[0099]	gccgcagaaa agggcgctaa gcctttgttt gacttcaagc gcgaaggcaa cctgatctac	1080
[0100]	ccaatggtca tggaccaagt gacgactgac atgcgcctgg cctgggaaga accatttggg	1140
[0101]	ccagtattgc cattcatccg cgtcaagtca gctgacgaag ctgtcatgat tgccaatgaa	1200
[0102]	tcagaatacg gccttcaaag ctccgtcttc tcacggaact ttgaaaaagc ctttgccatt	1260
[0103]	gcaggaaaat tggaagtggg cacggtccac atcaacaaca agaccxaaag aggtccggac	1320
[0104]	aacttcccat tcttggcgt aaagagctca ggggcaggcg tacaggggt c	1371
[0105]	<210>	3
[0106]	<211>	48
[0107]	<212>	DNA
[0108]	<213>	人工序列
[0109]	<220>	
[0110]	<223>	gapN(L) -F
[0111]	<400>	3
[0112]	aaggaaacac tgatatcatg acagaacact atttaaacta tgtcaatg	48
[0113]	<210>	4
[0114]	<211>	42
[0115]	<212>	DNA
[0116]	<213>	人工序列
[0117]	<220>	
[0118]	<223>	gapN(L) -R
[0119]	<400>	4
[0120]	gccaaaacag cctcgagtta gtcttcgatg ttgaagacaa cg	42
[0121]	<210>	5
[0122]	<211>	36
[0123]	<212>	DNA
[0124]	<213>	人工序列
[0125]	<220>	



[0168]	Phe Ala Glu Ala Gly Leu Pro Ala Gly Val Phe Asn Thr Ile Thr Gly
[0169]	195 200 205
[0170]	Arg Gly Ser Glu Ile Gly Asp Tyr Ile Val Glu His Gln Ala Val Asn
[0171]	210 215 220
[0172]	Phe Ile Asn Phe Thr Gly Ser Thr Gly Ile Gly Glu Arg Ile Gly Lys
[0173]	225 230 235 240
[0174]	Met Ala Gly Met Arg Pro Ile Met Leu Glu Leu Gly Gly Lys Asp Ser
[0175]	245 250 255
[0176]	Ala Ile Val Leu Glu Asp Ala Asp Leu Glu Leu Thr Ala Lys Asn Ile
[0177]	260 265 270
[0178]	Ile Ala Gly Ala Phe Gly Tyr Ser Gly Gln Arg Cys Thr Ala Val Lys
[0179]	275 280 285
[0180]	Arg Val Leu Val Met Glu Ser Val Ala Asp Glu Leu Val Glu Lys Ile
[0181]	290 295 300
[0182]	Arg Glu Lys Val Leu Ala Leu Thr Ile Gly Asn Pro Glu Asp Asp Ala
[0183]	305 310 315 320
[0184]	Asp Ile Thr Pro Leu Ile Asp Thr Lys Ser Ala Asp Tyr Val Glu Gly
[0185]	325 330 335
[0186]	Leu Ile Asn Asp Ala Asn Asp Lys Gly Ala Ala Ala Leu Thr Glu Ile
[0187]	340 345 350
[0188]	Lys Arg Glu Gly Asn Leu Ile Cys Pro Ile Leu Phe Asp Lys Val Thr
[0189]	355 360 365
[0190]	Thr Asp Met Arg Leu Ala Trp Glu Glu Pro Phe Gly Pro Val Leu Pro
[0191]	370 375 380
[0192]	Ile Ile Arg Val Thr Ser Val Glu Glu Ala Ile Glu Ile Ser Asn Lys
[0193]	385 390 395 400
[0194]	Ser Glu Tyr Gly Leu Gln Ala Ser Ile Phe Thr Asn Asp Phe Pro Arg
[0195]	405 410 415
[0196]	Ala Phe Gly Ile Ala Glu Gln Leu Glu Val Gly Thr Val His Ile Asn
[0197]	420 425 430
[0198]	Asn Lys Thr Gln Arg Gly Thr Asp Asn Phe Pro Phe Leu Gly Ala Lys
[0199]	435 440 445
[0200]	Lys Ser Gly Ala Gly Ile Gln Gly Val Lys Tyr Ser Ile Glu Ala Met
[0201]	450 455 460
[0202]	Thr Thr Val Lys Ser Val Val Phe Asp Ile Lys
[0203]	465 470 475
[0204]	<210> 8
[0205]	<211> 1428
[0206]	<212> DNA
[0207]	<213> 未知
[0208]	<220>
[0209]	<223> 变异链球菌 ATCC 25175

[0210]	<400>	8	
[0211]	ttgacaaaac aatataaaaa ttatgtcaat ggcgagtga agctttcaga aaatgaaatt	60	
[0212]	aaaatctacg aaccggccag tggagctgaa ttgggttcag ttccagcaat gactactgaa	120	
[0213]	gaagtagatt atgtttatgc ttcagccaag aaagctcaac cagcttggcg atcactttca	180	
[0214]	tacatagaac gtgctgccta cttcataag gtagcagata ttttgatgcg tgataaagaa	240	
[0215]	aaaataggtg ctgttcttcc caaagaggtt gctaaaggtt ataatcagc agtcagcgaa	300	
[0216]	gttgttcgta ctgcagaaat cattaattat gcagctgaag aaggccttcg tatggaaggt	360	
[0217]	gaagtccttg aaggcggcag ttttgaagca gccagcaaga aaaaaattgc cgttgttcgt	420	
[0218]	cgtgaaccag taggtcttgt attagctatt tcaccattta actaccctgt taacttgga	480	
[0219]	ggttcgaaaa ttgcaccggc tcttattgcg ggaaatgta ttgcttttaa accaccgacg	540	
[0220]	caaggatcaa tctcagggct cttacttgcg gaagcatttg ctgaagctgg acttcctgca	600	
[0221]	ggtgtcttta ataccattac aggtcgtggt tctgaaattg gagactatat tgtagaacat	660	
[0222]	caagccgta actttatcaa tttcactggt tcaacaggaa ttggggaacg tattggcaaa	720	
[0223]	atggctggta tgcgtccgat tatgctgaa ctcggtgaa aagattcagc catcgttctt	780	
[0224]	gaagatgcag accttgaatt gactgctaaa aatattattg caggtgcttt tggttattca	840	
[0225]	ggtcaacgct gtacagcagt taaacgtgtt cttgtgatgg aaagtgttgc tgatgaactg	900	
[0226]	gtcgaaaaaa tccgtgaaaa agttcttgc ttaacaattg gtaatccaga agacgatgca	960	
[0227]	gatattacac cgttgattga taaaaatca gctgattatg tagaaggctt tattaatgat	1020	
[0228]	gccaatgata aaggagccgc tgcccttact gaaatcaaac gtgaaggtaa tcttatctgt	1080	
[0229]	ccaatcctct ttgataaggt aacgacagat atgcgtcttg cttgggaaga accatttggg	1140	
[0230]	cctgttcttc cgatcattcg tgtgacatct gtagaagaag ccattgaaat ttctaacaaa	1200	
[0231]	tcggaatatg gacttcaggc ttctatcttt acaaatgatt tcccacgcgc ttttgggtatt	1260	
[0232]	gctgagcagc ttgaagttgg tacagttcat atcaataata agacacagcg cggtagcgac	1320	
[0233]	aacttcccat tcttaggggc taaaaaatca ggtgcaggta ttcaaggggt aaaatattct	1380	
[0234]	attgaagcta tgacaactgt taaatccgct gtatttgata tcaaataa	1428	
[0235]	<210>	9	
[0236]	<211>	45	
[0237]	<212>	DNA	
[0238]	<213>	人工序列	
[0239]	<220>		
[0240]	<223>	gapN(S) -R	
[0241]	<400>	9	
[0242]	gcaaaaacag cctcgagtta tttgatatca aatagcagcg attta	45	
[0243]	<210>	10	
[0244]	<211>	80	
[0245]	<212>	PRT	
[0246]	<213>	谷氨酸棒杆菌	
[0247]	<400>	10	
[0248]	Leu Thr Thr Leu Thr Leu Ser Pro Glu Leu Gln Ala Leu Thr Val Arg		
[0249]	1 5 10 15		
[0250]	Asn Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Asp Val Asp Thr Lys Ala Val Asp Thr		
[0251]	20 25 30		

[0252]	Val Arg Val Leu Ala Ala Asp Ala Val Glu Asn Cys Gly Ser Gly His			
[0253]	35	40		
[0254]	Pro Gly Thr Ala Met Ser Leu Ala Pro Leu Ala Tyr Thr Leu Tyr Gln			
[0255]	50	55	60	
[0256]	Arg Val Met Asn Val Asp Pro Gln Asp Thr Asn Trp Ala Gly Arg Asp			
[0257]	65	70	75	80
[0258]	<210>	11		
[0259]	<211>	2103		
[0260]	<212>	DNA		
[0261]	<213>	谷氨酸棒杆菌		
[0262]	<400>	11		
[0263]	ttgaccacct tgacgtgtc acctgaactt caggcgetca ctgtacgeaa ttaccctct	60		
[0264]	gattggtccg atgtggacac caaggctgta gacactgttc gtgtcctcgc tgcagacgt	120		
[0265]	gtagaaaact gtggctccgg ccaccaggc accgcaatga gcctggctcc ccttgcatc	180		
[0266]	accttgacc agcgggttat gaacgtagat ccacaggaca ccaactgggc aggccgtgac	240		
[0267]	cgttcgttc tttcttggg ccaactcctt ttgaccagt acatccagt ttacttgggt	300		
[0268]	ggattcggcc ttgagatgga tgacctgaag gctctgcgca cctgggattc cttgaccca	360		
[0269]	ggacacctg agtaccgcca caccaaggc gttgagatca ccaactggcc tcttgccag	420		
[0270]	ggtcttgcac ctgcagttgg tatggccatg gctgctcgtc gtgagcgtgg cctattgcac	480		
[0271]	ccaaccgtg ctgaggcga atccccattc gaccaccaca tctacgtcat tgcttctgat	540		
[0272]	ggtgacctgc aggaaggtgt cacctctgag gcatcctcca tcgctggcac ccagcagctg	600		
[0273]	ggcaacctca tcgtgtctg ggatgacaac cgcactcca tcgaagacaa cactgagatc	660		
[0274]	gcttcaacg aggacgttgt tgctcgttac aaggcttacg gctggcagac cattgaggt	720		
[0275]	gagctggcg aggacgttc agcaatcga gctgcagtgg ctgaggctaa gaaggacacc	780		
[0276]	aagcagccta cttcatccg cgttcgcacc atcatcgct tcccagctcc aactatgatg	840		
[0277]	aacaccgtg ctgtgcacgg tgctgctctt ggcgcagctg aggttgcagc aaccaagact	900		
[0278]	gagcttgat tcgatcctga ggctcactc gcgatcgacg atgaggttat cgctcacacc	960		
[0279]	cgctccctcg cagagcgcgc tgacacagaag aaggctgcat ggcaggtcaa gttcgatgag	1020		
[0280]	tgggcagctg ccaacctga gaacaaggct ctgttcgacg gctgaactc ccgtgagctt	1080		
[0281]	ccagcgggct acgtgacga gctcccaaca tgggatgcag atgagaagg cgctgcaact	1140		
[0282]	cgtaaggctt ccgagctgc acttcaggca ctgggcaaga cccttctga gctgtggggc	1200		
[0283]	ggttccgctg acctgcagg ttccaacaac accgtgatca agggctccc ttccttcggc	1260		
[0284]	cctgagcca tctccaccga gacctggtc gctgagcctt acggccgtaa cctgcactc	1320		
[0285]	ggtatccgtg agcacgtat gggatccatc ctcaacggca tttccctcca cgggtggcacc	1380		
[0286]	cgccatacgc gcggaacctt cctcatctc tccgactaca tgcgtcctgc agttcgtctt	1440		
[0287]	gcagctctca tggagaccga cgcttactac gtctggacc acgactccat cggcttgggc	1500		
[0288]	gaagatggcc caaccacca gctgttgaa accttgctg cactgcgcgc catcccaggt	1560		
[0289]	ctgtccgtcc tgcgtcctgc agatgcgaac gagaccgcc aggcttgggc tgcagcactt	1620		
[0290]	gagtacaagg aaggccctaa gggctctgca ctgaccgcc agaacgttcc tgttctggaa	1680		
[0291]	ggaccaagg agaaggctgc tgaaggcgtt cgccgcggtg gctacgtcct ggttgagggt	1740		
[0292]	tccaaggaaa cccagatgt gatcctcatg ggctccgct ccgaggttca gcttgagctt	1800		
[0293]	aacgtgcga aggtcttga agctgaggc gttgcagctc gcgttgttc cgttcttgc	1860		

[0294]	atggattggt tccaggagca ggacgcagag tacatcgagt ccgttctgcc tgcagctgtg	1920
[0295]	accgctcgtg tgtctgttga agctggcatc gcaatgcctt ggtaccgctt cttgggcacc	1980
[0296]	cagggccgtg ctgtctccct tgagcacttc ggtgcttctg cggattacca gaccctgttt	2040
[0297]	gagaagtctg gcatcaccac cgatgcagtc gtggcagcgg ccaaggactc cattaacggt	2100
[0298]	taa	2103
[0299]	<210>	12
[0300]	<211>	37
[0301]	<212>	DNA
[0302]	<213>	人工序列
[0303]	<220>	
[0304]	<223>	NCg11512_5F
[0305]	<400>	12
[0306]	ccgggatcc tctagagtag acgcttgatt ggcggac	37
[0307]	<210>	13
[0308]	<211>	21
[0309]	<212>	DNA
[0310]	<213>	人工序列
[0311]	<220>	
[0312]	<223>	NCg11512_5R
[0313]	<400>	13
[0314]	tccttcctgg gttaaaccgg g	21
[0315]	<210>	14
[0316]	<211>	39
[0317]	<212>	DNA
[0318]	<213>	人工序列
[0319]	<220>	
[0320]	<223>	NCg11512_ATG_3F
[0321]	<400>	14
[0322]	gtttaacca ggaaggaatg accacettga cgctgtcac	39
[0323]	<210>	15
[0324]	<211>	36
[0325]	<212>	DNA
[0326]	<213>	人工序列
[0327]	<220>	
[0328]	<223>	NCg11512_3R
[0329]	<400>	15
[0330]	gcaggtcgac tctagagtcg aataggccac gctcac	36
[0331]	<210>	16
[0332]	<211>	700
[0333]	<212>	PRT
[0334]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[0335]	<400>	16

[0336]	Leu Thr Thr Leu Thr Leu Ser Pro Glu Leu Gln Ala Leu Thr Val Arg
[0337]	1 5 10 15
[0338]	Asn Tyr Pro Ser Asp Trp Ser Asp Val Asp Thr Lys Ala Val Asp Thr
[0339]	20 25 30
[0340]	Val Arg Val Leu Ala Ala Asp Ala Val Glu Asn Cys Gly Ser Gly His
[0341]	35 40 45
[0342]	Pro Gly Thr Ala Met Ser Leu Ala Pro Leu Ala Tyr Thr Leu Tyr Gln
[0343]	50 55 60
[0344]	Arg Val Met Asn Val Asp Pro Gln Asp Thr Asp Trp Ala Gly Arg Asp
[0345]	65 70 75 80
[0346]	Arg Phe Val Leu Ser Cys Gly His Ser Ser Leu Thr Gln Tyr Ile Gln
[0347]	85 90 95
[0348]	Leu Tyr Leu Gly Gly Phe Gly Leu Glu Met Asp Asp Leu Lys Ala Leu
[0349]	100 105 110
[0350]	Arg Thr Trp Asp Ser Leu Thr Pro Gly His Pro Glu Tyr Arg His Thr
[0351]	115 120 125
[0352]	Lys Gly Val Glu Ile Thr Thr Gly Pro Leu Gly Gln Gly Leu Ala Ser
[0353]	130 135 140
[0354]	Ala Val Gly Met Ala Met Ala Ala Arg Arg Glu Arg Gly Leu Phe Asp
[0355]	145 150 155 160
[0356]	Pro Thr Ala Ala Glu Gly Glu Ser Pro Phe Asp His His Ile Tyr Val
[0357]	165 170 175
[0358]	Ile Ala Ser Asp Gly Asp Leu Gln Glu Gly Val Thr Ser Glu Ala Ser
[0359]	180 185 190
[0360]	Ser Ile Ala Gly Thr Gln Gln Leu Gly Asn Leu Ile Val Phe Trp Asp
[0361]	195 200 205
[0362]	Asp Asn Arg Ile Ser Ile Glu Asp Asn Thr Glu Ile Ala Phe Asn Glu
[0363]	210 215 220
[0364]	Asp Val Val Ala Arg Tyr Lys Ala Tyr Gly Trp Gln Thr Ile Glu Val
[0365]	225 230 235 240
[0366]	Glu Ala Gly Glu Asp Val Ala Ala Ile Glu Ala Ala Val Ala Glu Ala
[0367]	245 250 255
[0368]	Lys Lys Asp Thr Lys Arg Pro Thr Phe Ile Arg Val Arg Thr Ile Ile
[0369]	260 265 270
[0370]	Gly Phe Pro Ala Pro Thr Met Met Asn Thr Gly Ala Val His Gly Ala
[0371]	275 280 285
[0372]	Ala Leu Gly Ala Ala Glu Val Ala Ala Thr Lys Thr Glu Leu Gly Phe
[0373]	290 295 300
[0374]	Asp Pro Glu Ala His Phe Ala Ile Asp Asp Glu Val Ile Ala His Thr
[0375]	305 310 315 320
[0376]	Arg Ser Leu Ala Glu Arg Ala Ala Gln Lys Lys Ala Ala Trp Gln Val
[0377]	325 330 335

[0378]	Lys Phe Asp Glu Trp Ala Ala Ala Asn Pro Glu Asn Lys Ala Leu Phe
[0379]	340 345 350
[0380]	Asp Arg Leu Asn Ser Arg Glu Leu Pro Ala Gly Tyr Ala Asp Glu Leu
[0381]	355 360 365
[0382]	Pro Thr Trp Asp Ala Asp Glu Lys Gly Val Ala Thr Arg Lys Ala Ser
[0383]	370 375 380
[0384]	Glu Ala Ala Leu Gln Ala Leu Gly Lys Thr Leu Pro Glu Leu Trp Gly
[0385]	385 390 395 400
[0386]	Gly Ser Ala Asp Leu Ala Gly Ser Asn Asn Thr Val Ile Lys Gly Ser
[0387]	405 410 415
[0388]	Pro Ser Phe Gly Pro Glu Ser Ile Ser Thr Glu Thr Trp Ser Ala Glu
[0389]	420 425 430
[0390]	Pro Tyr Gly Arg Asn Leu His Phe Gly Ile Arg Glu His Ala Met Gly
[0391]	435 440 445
[0392]	Ser Ile Leu Asn Gly Ile Ser Leu His Gly Gly Thr Arg Pro Tyr Gly
[0393]	450 455 460
[0394]	Gly Thr Phe Leu Ile Phe Ser Asp Tyr Met Arg Pro Ala Val Arg Leu
[0395]	465 470 475 480
[0396]	Ala Ala Leu Met Glu Thr Asp Ala Tyr Tyr Val Trp Thr His Asp Ser
[0397]	485 490 495
[0398]	Ile Gly Leu Gly Glu Asp Gly Pro Thr His Gln Pro Val Glu Thr Leu
[0399]	500 505 510
[0400]	Ala Ala Leu Arg Ala Ile Pro Gly Leu Ser Val Leu Arg Pro Ala Asp
[0401]	515 520 525
[0402]	Ala Asn Glu Thr Ala Gln Ala Trp Ala Ala Ala Leu Glu Tyr Lys Glu
[0403]	530 535 540
[0404]	Gly Pro Lys Gly Leu Ala Leu Thr Arg Gln Asn Ile Pro Val Leu Glu
[0405]	545 550 555 560
[0406]	Gly Thr Lys Glu Lys Ala Ala Glu Gly Val Arg Arg Gly Gly Tyr Val
[0407]	565 570 575
[0408]	Leu Val Glu Gly Ser Lys Glu Thr Pro Asp Val Ile Leu Met Gly Ser
[0409]	580 585 590
[0410]	Gly Ser Glu Val Gln Leu Ala Val Asn Ala Ala Lys Ala Leu Glu Ala
[0411]	595 600 605
[0412]	Glu Gly Val Ala Ala Arg Val Val Ser Val Pro Cys Met Asp Trp Phe
[0413]	610 615 620
[0414]	Gln Glu Gln Asp Ala Glu Tyr Ile Glu Ser Val Leu Pro Ala Ala Val
[0415]	625 630 635 640
[0416]	Thr Ala Arg Val Ser Val Glu Ala Gly Ile Ala Met Pro Trp Tyr Arg
[0417]	645 650 655
[0418]	Phe Leu Gly Thr Gln Gly Arg Ala Val Ser Leu Glu His Phe Gly Ala
[0419]	660 665 670

[0420] Ser Ala Asp Tyr Gln Thr Leu Phe Glu Lys Phe Gly Ile Thr Thr Asp  
 [0421] 675 680 685  
 [0422] Ala Val Val Ala Ala Ala Lys Asp Ser Ile Asn Gly  
 [0423] 690 695 700  
 [0424] <210> 17  
 [0425] <211> 2103  
 [0426] <212> DNA  
 [0427] <213> 谷氨酸棒杆菌  
 [0428] <400> 17  
 [0429] ttgaccacct tgacgctgtc acctgaactt caggcgtca ctgtacgcaa ttaccctct 60  
 [0430] gattggtccg atgtggacac caaggctgta gacactgttc gtgtcctcgc tgcagacgct 120  
 [0431] gtagaaaact gtggctccgg ccaccaggc accgcaatga gcctggctcc ccttgcatac 180  
 [0432] acctgtacc agcgggttat gaacgtagat ccacaggaca ccgactgggc aggccgtgac 240  
 [0433] cgcttcgttc tttcttgtgg ccactcctct ttgaccagt acatccagct ttacttgggt 300  
 [0434] ggattcggcc ttgagatgga tgacctgaag gctctgcgca cctgggattc cttgacccca 360  
 [0435] ggacaccctg agtaccgcca caccaaggc gtagagatca ccaactggccc tcttgccag 420  
 [0436] ggtcttgcac ctgcagttgg tatggccatg gctgctcgtc gtgagcgtgg cctattcgac 480  
 [0437] ccaaccgctg ctgaggcga atccccattc gaccaccaca tctacgtcat tgcttctgat 540  
 [0438] ggtgacctgc aggaagggtg cacctctgag gcactcctca tcgctggcac ccagcagctg 600  
 [0439] ggcaacctca tcgtgttctg ggatgacaac cgcactcctca tcgaagacaa cactgagatc 660  
 [0440] gcttcaacg aggacgttgt tgctcgttac aaggcttac gctggcagac cattgaggtt 720  
 [0441] gaggtggcg aggacgttgc agcaatcga gctgcagtgg ctgaggctaa gaaggacacc 780  
 [0442] aagcgacctc cttcatccg cgttcgcacc atcatcggtc tcccagctcc aaccatgatg 840  
 [0443] aacaccggtg ctgtgcacgg tgctgctctt ggccgagctg aggttgcagc aaccaagact 900  
 [0444] gagcttgat tcgatcctga ggctcacttc gcgatcgacg atgaggttat cgctcacacc 960  
 [0445] cgctccctcg cagagcgcgc tgcacagaag aaggctgcat ggcaggtcaa gttcgatgag 1020  
 [0446] tgggcagctg ccaaccctga gaacaaggct ctgttcgatc gcctgaactc ccgtgagctt 1080  
 [0447] ccagcgggct acgctgacga gctcccaaca tgggatgcag atgagaaggc cgctcgcaact 1140  
 [0448] cgtaaggctt ccgagctgc acttcaggca ctgggcaaga cccttctga gctgtggggc 1200  
 [0449] ggttccgctg acctcgcagg ttccaacaac accgtgatca agggctccc ttcttcggc 1260  
 [0450] cctgagtcca tctccaccga gacctggtct gctgagcctt acggccgtaa cctgcacttc 1320  
 [0451] ggtatccgtg agcacgctat gggatccatc ctcaacggca tttccctcca cggtggcacc 1380  
 [0452] cgccatacag gcggaacctt cctcatcttc tccgactaca tgcgtcctgc agttcgtctt 1440  
 [0453] gcagctctca tggagaccga cgcttactac gtctggacc accgactccat cggctctgggc 1500  
 [0454] gaagatggcc caaccacca gcctgttgaa accttggtg cactgcgcgc catcccaggt 1560  
 [0455] ctgtccgtcc tgcgtcctgc agatgcgaac gagaccgcc aggcttgggc tgcagcactt 1620  
 [0456] gagtacaagg aaggcctaa ggtcttga ctaaccgcc agaacattc tgttctggaa 1680  
 [0457] ggcaccaagg agaagctgc tgaaggcgtt cgcccggtg gctacgtcct ggttgagggt 1740  
 [0458] tccaaggaaa cccagatgt gatcctcatg ggctccggt cagaggttca gcttgagtt 1800  
 [0459] aacgctgcga aggtcttga agctgaggc gttgcagctc gcgttgttc cgttccttgc 1860  
 [0460] atggattggt tccaggagca ggacgcagag tacatcgagt ccgttctgcc tgcagctgtg 1920  
 [0461] accgctcgtg tgtctgttga agctggcatc gcaatgcctt ggtaccgctt cttgggcacc 1980



[0504]	Pro Pro Asp Ser Phe Thr Ala Val Cys His Gln Leu Glu Arg Ser Gly
[0505]	145 150 155 160
[0506]	Met Ala Glu Ser Thr Glu Glu Ala Trp Arg Arg Val Ile Ile Glu Lys
[0507]	165 170 175
[0508]	Pro Phe Gly His Asn Leu Glu Ser Ala His Glu Leu Asn Gln Leu Val
[0509]	180 185 190
[0510]	Asn Ala Val Phe Pro Glu Ser Ser Val Phe Arg Ile Asp His Tyr Leu
[0511]	195 200 205
[0512]	Gly Lys Glu Thr Val Gln Asn Ile Leu Ala Leu Arg Phe Ala Asn Gln
[0513]	210 215 220
[0514]	Leu Phe Glu Pro Leu Trp Asn Ser Asn Tyr Val Asp His Val Gln Ile
[0515]	225 230 235 240
[0516]	Thr Met Ala Glu Asp Ile Gly Leu Gly Gly Arg Ala Gly Tyr Tyr Asp
[0517]	245 250 255
[0518]	Gly Ile Gly Ala Ala Arg Asp Val Ile Gln Asn His Leu Ile Gln Leu
[0519]	260 265 270
[0520]	Leu Ala Leu Val Ala Met Glu Glu Pro Ile Ser Phe Val Pro Ala Gln
[0521]	275 280 285
[0522]	Leu Gln Ala Glu Lys Ile Lys Val Leu Ser Ala Thr Lys Pro Cys Tyr
[0523]	290 295 300
[0524]	Pro Leu Asp Lys Thr Ser Ala Arg Gly Gln Tyr Ala Ala Gly Trp Gln
[0525]	305 310 315 320
[0526]	Gly Ser Glu Leu Val Lys Gly Leu Arg Glu Glu Asp Gly Phe Asn Pro
[0527]	325 330 335
[0528]	Glu Ser Thr Thr Glu Thr Phe Ala Ala Cys Thr Leu Glu Ile Thr Ser
[0529]	340 345 350
[0530]	Arg Arg Trp Ala Gly Val Pro Phe Tyr Leu Arg Thr Gly Lys Arg Leu
[0531]	355 360 365
[0532]	Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His
[0533]	370 375 380
[0534]	Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile
[0535]	385 390 395 400
[0536]	Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser
[0537]	405 410 415
[0538]	Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe
[0539]	420 425 430
[0540]	Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg
[0541]	435 440 445
[0542]	Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn
[0543]	450 455 460
[0544]	Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala
[0545]	465 470 475 480

[0546]	Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly		
[0547]		485	490
[0548]	Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg		
[0549]		500	505
[0550]	Arg Pro		
[0551]	<210>	21	
[0552]	<211>	1545	
[0553]	<212>	DNA	
[0554]	<213>	谷氨酸棒杆菌	
[0555]	<400>	21	
[0556]	gtgagcacia acacgacccc ctccagctgg acaaaccac tgcgcgaccc gcaggataaa	60	
[0557]	cgactcccc gcacgctgg cccttccggc atggtgatct tcggtgtcac tggcgacttg	120	
[0558]	gctcgaaaga agctgctccc cgccatttat gatctagcaa accgcggatt gctgccccca	180	
[0559]	ggattctcgt tggtaggtta cggccgccc gaatggtcca aagaagactt tgaaaaatac	240	
[0560]	gtacgcgatg ccgcaagtgc tggctgctgt acggaattcc gtgaaaatgt ttgggagcgc	300	
[0561]	ctcgcgagg gtatggaatt tgttcgccc aactttgatg atgatgcagc tttcgacaac	360	
[0562]	ctcgtgcaa cactcaagcg catcgacaaa acccgcggca ccgcccggca ctgggcttac	420	
[0563]	tacctgtcca ttccaccaga ttcttcaca gcggtctgcc accagctgga gcgttccggc	480	
[0564]	atggttgaat ccaccgaaga agcatggcgc cgcgtgatca tcgagaagcc tttcgccac	540	
[0565]	aacctgcaat ccgcacacga gctcaaccag ctggtcaacg cagtcttccc agaattctt	600	
[0566]	gtgttccgca tcgaccacta tttgggcaag gaaacagttc aaaacatcct ggctctgcgt	660	
[0567]	tttgctaacc agctgtttga gccactgtgg aactccaact acgttgacca cgtccagatc	720	
[0568]	accatggctg aagatattgg cttgggtgga cgtgctggtt actacgacgg catcgcgca	780	
[0569]	gcccgcgacg tcatccagaa ccacctgac cagctcttgg ctctggttgc catggaagaa	840	
[0570]	ccaatttctt tcgtgccagc gcagctgcag gcagaaaaga tcaaggtgct ctctgcgaca	900	
[0571]	aagccgtgct acccattgga taaaacctcc gctcgtggtc agtacgctgc cggttggcag	960	
[0572]	ggctctgagt tagtcaaggg acttcgcgaa gaagatggct tcaacctga gtccaccact	1020	
[0573]	gagacttttg cggcttgtag cttagagatc acgtctcgtc gctgggctgg tgtgccgttc	1080	
[0574]	tacctgcgca ccgtaagcg tcttggtcgc cgtgttactg agattgccgt ggtgtttaaa	1140	
[0575]	gacgcaccac accagccttt cgacggcgac atgactgtat cccttggcca aaacgccatc	1200	
[0576]	gtgattcgcg tgcagcctga tgaaggtgtg ctcatccgct tcggttccaa ggttccaggt	1260	
[0577]	tctgccatgg aagtccgtga cgtcaacatg gacttctcct actcagaatc cttcactgaa	1320	
[0578]	gaatcacctg aagcatacga gcgcctcatt ttggatgcgc tgtagatga atccagcctc	1380	
[0579]	ttccctacca acgaggaagt ggaactgagc tggaagattc tggatccaat tcttgaagca	1440	
[0580]	tgggatgccg atggagaacc agaggattac ccagcgggta cgtggggtcc aaagagcgt	1500	
[0581]	gatgaaatgc tttcccgcaa cggtcacacc tggcgcagcc cataa	1545	
[0582]	<210>	22	
[0583]	<211>	37	
[0584]	<212>	DNA	
[0585]	<213>	人工序列	
[0586]	<220>		
[0587]	<223>	NCg11514-5F	

[0588]	<400>	22	
[0589]	ccgggatcc tctagactga aggtgccaac actcagc		37
[0590]	<210>	23	
[0591]	<211>	23	
[0592]	<212>	DNA	
[0593]	<213>	人工序列	
[0594]	<220>		
[0595]	<223>	NCg11514-5R	
[0596]	<400>	23	
[0597]	gatgtagtg tcacgatcct ttc		23
[0598]	<210>	24	
[0599]	<211>	37	
[0600]	<212>	DNA	
[0601]	<213>	人工序列	
[0602]	<220>		
[0603]	<223>	PC7-F(1514)	
[0604]	<400>	24	
[0605]	gatcgtgaca ctaccatcgc cggcatagcc taccgat		37
[0606]	<210>	25	
[0607]	<211>	38	
[0608]	<212>	DNA	
[0609]	<213>	人工序列	
[0610]	<220>		
[0611]	<223>	NCg11514-3F(C7-GTG)	
[0612]	<400>	25	
[0613]	aaggaaacac tgatatcgtg agcacaaca cgaccccc		38
[0614]	<210>	26	
[0615]	<211>	35	
[0616]	<212>	DNA	
[0617]	<213>	人工序列	
[0618]	<220>		
[0619]	<223>	NCg11514-3R	
[0620]	<400>	26	
[0621]	gcaggtcgac tctagacggt ggattcagcc atgcc		35
[0622]	<210>	27	
[0623]	<211>	514	
[0624]	<212>	PRT	
[0625]	<213>	谷氨酸棒杆菌	
[0626]	<400>	27	
[0627]	Val Ser Thr Asn Thr Thr Pro Thr Ser Trp Thr Asn Pro Leu Arg Asp		
[0628]	1	5	10
[0629]	Pro Gln Asp Lys Arg Leu Pro Arg Ile Ala Gly Pro Ser Gly Met Val		



[0672]	355	360	365
[0673]	Gly Arg Arg Val Thr Glu Ile Ala Val Val Phe Lys Asp Ala Pro His		
[0674]	370	375	380
[0675]	Gln Pro Phe Asp Gly Asp Met Thr Val Ser Leu Gly Gln Asn Ala Ile		
[0676]	385	390	395
[0677]	Val Ile Arg Val Gln Pro Asp Glu Gly Val Leu Ile Arg Phe Gly Ser		
[0678]		405	410
[0679]	Lys Val Pro Gly Ser Ala Met Glu Val Arg Asp Val Asn Met Asp Phe		415
[0680]		420	425
[0681]	Ser Tyr Ser Glu Ser Phe Thr Glu Glu Ser Pro Glu Ala Tyr Glu Arg		430
[0682]		435	440
[0683]	Leu Ile Leu Asp Ala Leu Leu Asp Glu Ser Ser Leu Phe Pro Thr Asn		445
[0684]		450	455
[0685]	Glu Glu Val Glu Leu Ser Trp Lys Ile Leu Asp Pro Ile Leu Glu Ala		460
[0686]	465	470	475
[0687]	Trp Asp Ala Asp Gly Glu Pro Glu Asp Tyr Pro Ala Gly Thr Trp Gly		480
[0688]		485	490
[0689]	Pro Lys Ser Ala Asp Glu Met Leu Ser Arg Asn Gly His Thr Trp Arg		495
[0690]		500	505
[0691]	Arg Pro		510
[0692]	<210>	28	
[0693]	<211>	1545	
[0694]	<212>	DNA	
[0695]	<213>	谷氨酸棒杆菌	
[0696]	<400>	28	
[0697]	gtgagcacia acacgacccc caccagctgg acaaaccac tgcgcgacce gcaggataaa	60	
[0698]	cgactcccc gcactgctgg cccttcggc atggtgatct tcggtgtcac tggcgacttg	120	
[0699]	gctcgaaaga agctgcttcc cgccatttat gatctagcaa accgcgatt gctgccccca	180	
[0700]	ggattctcgt tggtaggtta cggccgccgc gaatggtcca aagaagactt tgaaaaatac	240	
[0701]	gtacgcgatg ccgcaagtgc tgggtctcgt acggaatttc gtgaaaatgt ttgggagcgc	300	
[0702]	ctcgccgagg gtatggaatt tgttcgccc aactttgatg atgatgcagc tttcgacaac	360	
[0703]	ctcgtgcaa cactcaagcg catcgacaaa acccgcgca ccgcccggca ctgggcttac	420	
[0704]	tacctgtcca ttccaccaga ttcttcaca gcggtctgcc accagctgga gcgttcggc	480	
[0705]	atggtgaat ccaccgaaga agcatggcgc cgcgtgatca tcgagaagcc tttcgccac	540	
[0706]	aacctgaat ccgcacacga gctcaaccag ctggtcaacg cagtcttccc agaattctt	600	
[0707]	gtgttcgca tcgaccacta tttgggcaag gaaacagtc aaaacatcct ggctctgcgt	660	
[0708]	tttgetaacc agctgtttga gccactgtgg aactccaact acgttgacca cgtccagatc	720	
[0709]	accatggctg aagatatcgg cttgggtgga cgtgctggtt actacgacgg catcggtgca	780	
[0710]	gcccgcgacg tcatccagaa ccacctgac cagctcttgg ctctggttgc catggaagaa	840	
[0711]	ccaatttctt tcgtgccagc gcagctgcag gcagaaaaga tcaaggtgct ctctgcgaca	900	
[0712]	aagccatgct acccattgga taaaacctcc gctcgtggtc agtacgctgc cggttggcag	960	
[0713]	ggctctgagt tagtcaaggg acttcgcaa gaagatggtt tcaacctga gtccaccact	1020	



[0756]	Val Ala Val Tyr Asn Arg Ser Thr Asp Lys Thr Asp Lys Leu Ile Ala
[0757]	35 40 45
[0758]	Asp His Gly Ser Glu Gly Asn Phe Ile Pro Ser Ala Thr Val Glu Glu
[0759]	50 55 60
[0760]	Phe Val Ala Ser Leu Glu Lys Pro Arg Arg Ala Ile Ile Met Val Gln
[0761]	65 70 75 80
[0762]	Ala Gly Asn Ala Thr Asp Ala Val Ile Asn Gln Leu Ala Asp Ala Met
[0763]	85 90 95
[0764]	Asp Glu Gly Asp Ile Ile Ile Asp Gly Gly Asn Ala Leu Tyr Thr Asp
[0765]	100 105 110
[0766]	Thr Ile Arg Arg Glu Lys Glu Ile Ser Ala Arg Gly Leu His Phe Val
[0767]	115 120 125
[0768]	Gly Ala Gly Ile Ser Gly Gly Glu Glu Gly Ala Leu Asn Gly Pro Ser
[0769]	130 135 140
[0770]	Ile Met Pro Gly Gly Pro Ala Lys Ser Tyr Glu Ser Leu Gly Pro Leu
[0771]	145 150 155 160
[0772]	Leu Glu Ser Ile Ala Ala Asn Val Asp Gly Thr Pro Cys Val Thr His
[0773]	165 170 175
[0774]	Ile Gly Pro Asp Gly Ala Gly His Phe Val Lys Met Val His Asn Gly
[0775]	180 185 190
[0776]	Ile Glu Tyr Ala Asp Met Gln Val Ile Gly Glu Ala Tyr His Leu Leu
[0777]	195 200 205
[0778]	Arg Tyr Ala Ala Gly Met Gln Pro Ala Glu Ile Ala Glu Val Phe Lys
[0779]	210 215 220
[0780]	Glu Trp Asn Ala Gly Asp Leu Asp Ser Tyr Leu Ile Glu Ile Thr Ala
[0781]	225 230 235 240
[0782]	Glu Val Leu Ser Gln Val Asp Ala Glu Thr Gly Lys Pro Leu Ile Asp
[0783]	245 250 255
[0784]	Val Ile Val Asp Ala Ala Gly Gln Lys Gly Thr Gly Arg Trp Thr Val
[0785]	260 265 270
[0786]	Lys Ala Ala Leu Asp Leu Gly Ile Ala Thr Thr Gly Ile Gly Glu Ala
[0787]	275 280 285
[0788]	Val Phe Ala Arg Ala Leu Ser Gly Ala Thr Ser Gln Arg Ala Ala Ala
[0789]	290 295 300
[0790]	Gln Gly Asn Leu Pro Ala Gly Val Leu Thr Asp Leu Glu Ala Leu Gly
[0791]	305 310 315 320
[0792]	Val Asp Lys Ala Gln Phe Val Glu Asp Val Arg Arg Ala Leu Tyr Ala
[0793]	325 330 335
[0794]	Ser Lys Leu Val Ala Tyr Ala Gln Gly Phe Asp Glu Ile Lys Ala Gly
[0795]	340 345 350
[0796]	Ser Asp Glu Asn Asn Trp Asp Val Asp Pro Arg Asp Leu Ala Thr Ile
[0797]	355 360 365

[0798]	Trp Arg Gly Gly Cys Ile Ile Arg Ala Lys Phe Leu Asn Arg Ile Val
[0799]	370 375 380
[0800]	Glu Ala Tyr Asp Ala Asn Ala Glu Leu Glu Ser Leu Leu Leu Asp Pro
[0801]	385 390 395 400
[0802]	Tyr Phe Lys Ser Glu Leu Gly Asp Leu Ile Asp Ser Trp Arg Arg Val
[0803]	405 410 415
[0804]	Ile Val Thr Ala Thr Gln Leu Gly Leu Pro Ile Pro Val Phe Ala Ser
[0805]	420 425 430
[0806]	Ser Leu Ser Tyr Tyr Asp Ser Leu Arg Ala Glu Arg Leu Pro Ala Ala
[0807]	435 440 445
[0808]	Leu Ile Gln Gly Gln Arg Asp Phe Phe Gly Ala His Thr Tyr Lys Arg
[0809]	450 455 460
[0810]	Ile Asp Lys Asp Gly Ser Phe His Thr Glu Trp Ser Gly Asp Arg Ser
[0811]	465 470 475 480
[0812]	Glu Val Glu Ala
[0813]	<210> 33
[0814]	<211> 1455
[0815]	<212> DNA
[0816]	<213> 谷氨酸棒杆菌
[0817]	<400> 33
[0818]	atgactaatg gagataatct cgcacagatc ggcgtttag gcttagcagt aatgggctca 60
[0819]	aacctgccc gcaacttcgc ccgcaacggc aacctgtcg ctgtctacaa ccgcagcact 120
[0820]	gacaaaaccg acaagtcac cgccgatcac ggctccgaag gcaacttcac cccttctgca 180
[0821]	accgtcgaag agttcgtagc atccctgaa aagccacgcc gcgcatcat catggttcag 240
[0822]	gctggtaacg ccaccgacgc agtcatcaac cagctggcag atgcatgga cgaaggcagc 300
[0823]	atcatcatcg acggcggcaa cgccctctac accgacacca ttcgtcgcga gaaggaaatc 360
[0824]	tccgcacgcg gtctccactt cgctcgtgct ggtatctccg gcggcgaaga aggcgcactc 420
[0825]	aacggcccat ccatcatgcc tgggtggcca gcaaagtcc acgagtcct cggaccactg 480
[0826]	cttgagtcca tcgtgccaa cgttgacggc acccatgtg tcaccacat cggcccagac 540
[0827]	ggcgcggcc acttcgtcaa gatggtccac aacggcatcg agtacccga catgcaggtc 600
[0828]	atcggcgagg cataccacct tctccgctac gcagcaggca tgcagccagc tgaaatcgct 660
[0829]	gaggttttca agaatggaa cgcaggcgac ctggattcct acctcatcga aatcaccgca 720
[0830]	gagttctct cccagtgga tgctgaaacc ggcaagccac taatcgacgt catcgttgac 780
[0831]	gctgcaggtc agaagggcac cggacgttg accgtcaagg ctgctcttga tctgggtatt 840
[0832]	gctaccaccg gcatcggcga agctgttttc gcacgtgcac tctccggcgc aaccagccag 900
[0833]	cgcgctgcag cacaggcaa cctacctgca ggtgtcctca ccgatctgga agcacttggc 960
[0834]	gtggacaagg cacagttcgt cgaagacgtt cgccgtgcac tgtacgcatc caagcttgtt 1020
[0835]	gcttacgcac agggcttga cgagatcaag gctggtccg acgagaacaa ctgggacgtt 1080
[0836]	gaccctcgcg acctcgtac catctggcgc ggcggtgca tcattcgcgc taagtctctc 1140
[0837]	aaccgcatcg tcgaagcata cgatgcaaac gctgaacttg agtccttctg gctcgatcct 1200
[0838]	tacttcaaga gcgagctcgg cgacctatc gattcatggc gtcgcgtgat tgccaccgcc 1260
[0839]	accagcttg gctgccaat cccagtgttc gcttctctcc tgtctacta cgacagcctg 1320

[0840]	cgtgcagagc gtctgccagc agccctgatc caaggacagc gcgacttctt cggtgcgcac	1380
[0841]	acctacaagc gcatcgacaa ggatggctcc ttccacaccg agtgggtccg cgaccgctcc	1440
[0842]	gaggttgaag cttaa	1455
[0843]	<210> 34	
[0844]	<211> 42	
[0845]	<212> DNA	
[0846]	<213> 人工序列	
[0847]	<220>	
[0848]	<223> NCg11396-F	
[0849]	<400> 34	
[0850]	aaggaaacac tgatatcatg actaatggag ataatctcgc ac	42
[0851]	<210> 35	
[0852]	<211> 38	
[0853]	<212> DNA	
[0854]	<213> 人工序列	
[0855]	<220>	
[0856]	<223> 1'NCg11396-R	
[0857]	<400> 35	
[0858]	gccaaaacag cctcgagtta agcttcaacc tcggagcg	38
[0859]	<210> 36	
[0860]	<211> 484	
[0861]	<212> PRT	
[0862]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[0863]	<400> 36	
[0864]	Met Thr Asn Gly Asp Asn Leu Ala Gln Ile Gly Val Val Gly Leu Ala	
[0865]	1 5 10 15	
[0866]	Val Met Gly Ser Asn Leu Ala Arg Asn Phe Ala Arg Asn Gly Asn Thr	
[0867]	20 25 30	
[0868]	Val Ala Val Tyr Asn Arg Ser Thr Asp Lys Thr Asp Lys Leu Ile Ala	
[0869]	35 40 45	
[0870]	Asp His Gly Ser Glu Gly Asn Phe Ile Pro Ser Ala Thr Val Glu Glu	
[0871]	50 55 60	
[0872]	Phe Val Ala Ser Leu Glu Lys Pro Arg Arg Ala Ile Ile Met Val Gln	
[0873]	65 70 75 80	
[0874]	Ala Gly Asn Ala Thr Asp Ala Val Ile Asn Gln Leu Ala Asp Ala Met	
[0875]	85 90 95	
[0876]	Asp Glu Gly Asp Ile Ile Ile Asp Gly Gly Asn Ala Leu Tyr Thr Asp	
[0877]	100 105 110	
[0878]	Thr Ile Arg Arg Glu Lys Glu Ile Ser Ala Arg Gly Leu His Phe Val	
[0879]	115 120 125	
[0880]	Gly Ala Gly Ile Ser Gly Gly Glu Glu Gly Ala Leu Asn Gly Pro Ser	
[0881]	130 135 140	

[0882]	Ile Met Pro Gly Gly Pro Ala Lys Ser Tyr Glu Ser Leu Gly Pro Leu			
[0883]	145	150	155	160
[0884]	Leu Glu Ser Ile Ala Ala Asn Val Asp Gly Thr Pro Cys Val Thr His			
[0885]		165	170	175
[0886]	Ile Gly Pro Asp Gly Ala Gly His Phe Val Lys Met Val His Asn Gly			
[0887]		180	185	190
[0888]	Ile Glu Tyr Ala Asp Met Gln Val Ile Gly Glu Ala Tyr His Leu Leu			
[0889]		195	200	205
[0890]	Arg Tyr Ala Ala Gly Met Gln Pro Ala Glu Ile Ala Glu Val Phe Lys			
[0891]		210	215	220
[0892]	Glu Trp Asn Ala Gly Asp Leu Asp Ser Tyr Leu Ile Glu Ile Thr Ala			
[0893]		225	230	235
[0894]	Glu Val Leu Ser Gln Val Asp Ala Glu Thr Gly Lys Pro Leu Ile Asp			
[0895]		245	250	255
[0896]	Val Ile Val Asp Ala Ala Gly Gln Lys Gly Thr Gly Arg Trp Thr Val			
[0897]		260	265	270
[0898]	Lys Ala Ala Leu Asp Leu Gly Ile Ala Thr Thr Gly Ile Gly Glu Ala			
[0899]		275	280	285
[0900]	Val Phe Ala Arg Ala Leu Ser Gly Ala Thr Ser Gln Arg Ala Ala Ala			
[0901]		290	295	300
[0902]	Gln Gly Asn Leu Pro Ala Gly Val Leu Thr Asp Leu Glu Ala Leu Gly			
[0903]		305	310	315
[0904]	Met Asp Lys Ala Gln Phe Val Glu Asp Val Arg Arg Ala Leu Tyr Ala			
[0905]		325	330	335
[0906]	Ser Lys Leu Val Ala Tyr Ala Gln Gly Phe Asp Glu Ile Lys Ala Gly			
[0907]		340	345	350
[0908]	Ser Asp Glu Asn Asn Trp Asp Val Asp Pro Arg Asp Leu Ala Thr Ile			
[0909]		355	360	365
[0910]	Trp Arg Gly Gly Cys Ile Ile Arg Ala Lys Phe Leu Asn Arg Ile Val			
[0911]		370	375	380
[0912]	Glu Ala Tyr Asp Ala Asn Ala Glu Leu Glu Ser Leu Leu Leu Asp Pro			
[0913]		385	390	395
[0914]	Tyr Phe Lys Ser Glu Leu Gly Asp Leu Ile Asp Ser Trp Arg Arg Val			
[0915]		405	410	415
[0916]	Ile Val Thr Ala Thr Gln Leu Gly Leu Pro Ile Pro Val Phe Ala Ser			
[0917]		420	425	430
[0918]	Ser Leu Ser Tyr Tyr Asp Ser Leu Arg Ala Glu Arg Leu Pro Ala Ala			
[0919]		435	440	445
[0920]	Leu Ile Gln Gly Gln Arg Asp Phe Phe Gly Ala His Thr Tyr Lys Arg			
[0921]		450	455	460
[0922]	Ile Asp Lys Asp Gly Ser Phe His Thr Glu Trp Ser Gly Asp Arg Ser			
[0923]		465	470	475
				480

[0924]	Glu Val Glu Ala	
[0925]	<210>	37
[0926]	<211>	1455
[0927]	<212>	DNA
[0928]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[0929]	<400>	37
[0930]	atgactaatg gagataatct cgcacagatc ggcgtttag gcctagcagt aatgggctca	60
[0931]	aacctgccc gcaacttgc ccgcaacggc aacctgtcg ctgtctacaa ccgcagcact	120
[0932]	gacaaaaccg acaagctcat cgccgatcac ggctccgaag gcaacttcat cccttccgca	180
[0933]	accgtcgaag agttcgtagc atccctggaa aagccacgcc gcgcatcat catggttcag	240
[0934]	gctggtaacg ccaccgacgc agtcatcaac cagctagcag atgccatgga cgaaggcgac	300
[0935]	atcatcatcg acggcggcaa cgccctctac accgacacca ttcgtcgcga gaaggaaatc	360
[0936]	tccgcacgcg gtctccactt cgtcgggtct ggtatctcc gcggcgaaga aggcgcactc	420
[0937]	aacggcccat ccatcatgcc tgggtggcca gcaaagtct acgagtccct cggaccactg	480
[0938]	cttgaatcca tcgtgccaa cgttgacggc acccatgtg tcaccacat cggcccagac	540
[0939]	ggcggccgcc acttcgtcaa gatggtccac aacggcatcg agtacgcgga catgcagtc	600
[0940]	atcggcgagg cataccacct tctccgtac gcagcaggca tgcagccagc tgaaatcgt	660
[0941]	gaggttttca agaatggaa cgcaggcgac ctggattcct acctcatcga aatcacgcga	720
[0942]	gaggttctct cccaggtgga tgctgaaacc ggcaagccac tgatcgacgt catcgttgac	780
[0943]	gctgcaggcc agaaggcac cggacgttg accgtcaagg ctgctcttga tctgggtatt	840
[0944]	gctaccaccg gcatcggcga agctgtttc gcacgtgcac tctccggcgc aaccagccag	900
[0945]	cgcgctgcag cacagggcaa cctacctgca ggtgtcctca ccgatctgga agcacttggc	960
[0946]	atggacaagg cacagttcgt cgaagacgtt cgccgtgcac tgtacgcat caagcttgtt	1020
[0947]	gcttacgcac agggcttcca cgagatcaag gctggctccg acgagaacaa ctgggacgtt	1080
[0948]	gacctcgcg acctcgtac catctggcgc ggcggtgca tcattcgcgc taagttctc	1140
[0949]	aaccgcatcg tcgaagcata cgatgcaaac gctgaactg agtccctgct gctcgatcct	1200
[0950]	tacttcaaga gcgagctcgg cgacctatc gattcatggc gtcgcgtgat tgtcaccgcc	1260
[0951]	accagcttg gcctgccaat cccagtgtc gcttctctcc tgtcctacta cgacagcctg	1320
[0952]	cgtgcagagc gtctgccagc agccctgatc caggacagc ggcacttctt cgggtgcgac	1380
[0953]	acctacaagc gcatcgacaa ggatggtcc ttccacacc agtgggtccg cgaccgtcc	1440
[0954]	gagtggaag cttaa	1455
[0955]	<210>	38
[0956]	<211>	37
[0957]	<212>	DNA
[0958]	<213>	人工序列
[0959]	<220>	
[0960]	<223>	2'NCg11396-R
[0961]	<400>	38
[0962]	gcaaaaacag cctcgagtta agcttccacc tcggagc	37
[0963]	<210>	39
[0964]	<211>	510
[0965]	<212>	PRT

[0966]	<213>	大肠杆菌
[0967]	<400>	39
[0968]	Met Arg Ile Gly Ile Pro Arg Glu Arg Leu Thr Asn Glu Thr Arg Val	
[0969]	1	5 10 15
[0970]	Ala Ala Thr Pro Lys Thr Val Glu Gln Leu Leu Lys Leu Gly Phe Thr	
[0971]		20 25 30
[0972]	Val Ala Val Glu Ser Gly Ala Gly Gln Leu Ala Ser Phe Asp Asp Lys	
[0973]		35 40 45
[0974]	Ala Phe Val Gln Ala Gly Ala Glu Ile Val Glu Gly Asn Ser Val Trp	
[0975]		50 55 60
[0976]	Gln Ser Glu Ile Ile Leu Lys Val Asn Ala Pro Leu Asp Asp Glu Ile	
[0977]		65 70 75 80
[0978]	Ala Leu Leu Asn Pro Gly Thr Thr Leu Val Ser Phe Ile Trp Pro Ala	
[0979]		85 90 95
[0980]	Gln Asn Pro Glu Leu Met Gln Lys Leu Ala Glu Arg Asn Val Thr Val	
[0981]		100 105 110
[0982]	Met Ala Met Asp Ser Val Pro Arg Ile Ser Arg Ala Gln Ser Leu Asp	
[0983]		115 120 125
[0984]	Ala Leu Ser Ser Met Ala Asn Ile Ala Gly Tyr Arg Ala Ile Val Glu	
[0985]		130 135 140
[0986]	Ala Ala His Glu Phe Gly Arg Phe Phe Thr Gly Gln Ile Thr Ala Ala	
[0987]		145 150 155 160
[0988]	Gly Lys Val Pro Pro Ala Lys Val Met Val Ile Gly Ala Gly Val Ala	
[0989]		165 170 175
[0990]	Gly Leu Ala Ala Ile Gly Ala Ala Asn Ser Leu Gly Ala Ile Val Arg	
[0991]		180 185 190
[0992]	Ala Phe Asp Thr Arg Pro Glu Val Lys Glu Gln Val Gln Ser Met Gly	
[0993]		195 200 205
[0994]	Ala Glu Phe Leu Glu Leu Asp Phe Lys Glu Glu Ala Gly Ser Gly Asp	
[0995]		210 215 220
[0996]	Gly Tyr Ala Lys Val Met Ser Asp Ala Phe Ile Lys Ala Glu Met Glu	
[0997]		225 230 235 240
[0998]	Leu Phe Ala Ala Gln Ala Lys Glu Val Asp Ile Ile Val Thr Thr Ala	
[0999]		245 250 255
[1000]	Leu Ile Pro Gly Lys Pro Ala Pro Lys Leu Ile Thr Arg Glu Met Val	
[1001]		260 265 270
[1002]	Asp Ser Met Lys Ala Gly Ser Val Ile Val Asp Leu Ala Ala Gln Asn	
[1003]		275 280 285
[1004]	Gly Gly Asn Cys Glu Tyr Thr Val Pro Gly Glu Ile Phe Thr Thr Glu	
[1005]		290 295 300
[1006]	Asn Gly Val Lys Val Ile Gly Tyr Thr Asp Leu Pro Gly Arg Leu Pro	
[1007]		305 310 315 320

[1008]	Thr Gln Ser Ser Gln Leu Tyr Gly Thr Asn Leu Val Asn Leu Leu Lys		
[1009]		325	330 335
[1010]	Leu Leu Cys Lys Glu Lys Asp Gly Asn Ile Thr Val Asp Phe Asp Asp		
[1011]		340	345 350
[1012]	Val Val Ile Arg Gly Val Thr Val Ile Arg Ala Gly Glu Ile Thr Trp		
[1013]		355	360 365
[1014]	Pro Ala Pro Pro Ile Gln Val Ser Ala Gln Pro Gln Ala Ala Gln Lys		
[1015]		370	375 380
[1016]	Ala Ala Pro Glu Val Lys Thr Glu Glu Lys Cys Thr Cys Ser Pro Trp		
[1017]		385	390 395 400
[1018]	Arg Lys Tyr Ala Leu Met Ala Leu Ala Ile Ile Leu Phe Gly Trp Met		
[1019]		405	410 415
[1020]	Ala Ser Val Ala Pro Lys Glu Phe Leu Gly His Phe Thr Val Phe Ala		
[1021]		420	425 430
[1022]	Leu Ala Cys Val Val Gly Tyr Tyr Val Val Trp Asn Val Ser His Ala		
[1023]		435	440 445
[1024]	Leu His Thr Pro Leu Met Ser Val Thr Asn Ala Ile Ser Gly Ile Ile		
[1025]		450	455 460
[1026]	Val Val Gly Ala Leu Leu Gln Ile Gly Gln Gly Gly Trp Val Ser Phe		
[1027]		465	470 475 480
[1028]	Leu Ser Phe Ile Ala Val Leu Ile Ala Ser Ile Asn Ile Phe Gly Gly		
[1029]		485	490 495
[1030]	Phe Thr Val Thr Gln Arg Met Leu Lys Met Phe Arg Lys Asn		
[1031]		500	505 510
[1032]	<210>	40	
[1033]	<211>	1533	
[1034]	<212>	DNA	
[1035]	<213>	大肠杆菌	
[1036]	<400>	40	
[1037]	atgcaattg gcataccaag agaacggta accaatgaaa cccgtgttgc agcaacgcca	60	
[1038]	aaaacagtgg aacagctgct gaaactgggt ttaccgtcg cggtagagag cggcgcgggt	120	
[1039]	caactggcaa gttttgacga taaagcgttt gtgcaagcgg gcgctgaaat tgtagaagg	180	
[1040]	aatagcgtct ggcagtcaga gatcattctg aaggtaaatg cgccgttaga tgatgaaatt	240	
[1041]	gcgttactga atcctgggac aacgctggtg agttttatct ggctgcgca gaatccggaa	300	
[1042]	ttaatgcaaa aacttgcgga acgtaacgtg accgtgatgg cgatggactc tgtgccgcgt	360	
[1043]	atctcacgcg cacaatcgtt ggacgcacta agctcgatgg cgaacatcgc cggttatcgc	420	
[1044]	gccattgttg aagcggcaca tgaatttggg cgcttcttta ccgggcaaat tactgcggcc	480	
[1045]	gggaaagtgc caccggcaaa agtgatggtg attggtgcgg gtgttgcagg tctggccgcc	540	
[1046]	attggcgcag caaacagtct cggcgcgatt gtgcgtgcat tcgacaccg cccggaagt	600	
[1047]	aaagaacaag ttcaaagtat gggcgcggaa ttctctgagc tggattttaa agaggaagct	660	
[1048]	ggcagcggcg atggctatgc caaagtgatg tcggacgcgt tcatcaaagc ggaaatggaa	720	
[1049]	ctctttgccg cccaggcaaa agaggtcgat atcattgtca ccaccgct tattccagc	780	

[1050]	aaaccagcgc cgaagctaata taccctgtaa atggttgact ccatgaagc gggcagtg 840
[1051]	attgtcgacc tggcagccca aaacggcggc aactgtgaat acaccgtgcc gggtgaaatc 900
[1052]	ttcactacgg aaaatgggtgt caaagtgatt ggttataccg atcttccggg ccgtctgccg 960
[1053]	acgcaatcct cacagcttta cggcacaac ctcgttaatc tgctgaaact gttgtgcaaa 1020
[1054]	gagaaagacg gcaatcac tgttgatttt gatgatgtgg tgattcgcgg cgtgaccgtg 1080
[1055]	atccgtgcgg gcgaaattac ctggccggca ccgccgattc aggtatcagc tcagccgcag 1140
[1056]	gcggcacaaa aagcggcacc ggaagtgaaa actgaggaaa aatgtacctg ctcaccgtgg 1200
[1057]	cgtaaatagc cgttgatggc gctggcaatc attctttttg gctggatggc aagcgttgcg 1260
[1058]	ccgaaagaat tccttgggca cttaccggtt ttcgcgctgg cctgcggttg cggttattac 1320
[1059]	gtggtgtgga atgtatcgca cgcgctgcat acaccgttga tgctcggtcac caacgcgatt 1380
[1060]	tcagggatta ttgttgcgg agcactgttg cagattggcc agggcggctg ggtagcttc 1440
[1061]	cttagtttta tcgcggtgct tatagccagc attaataattt tcggtggett caccgtgact 1500
[1062]	cagcgcagtc tgaaaatggt ccgcaaaaat taa 1533
[1063]	<210> 41
[1064]	<211> 462
[1065]	<212> PRT
[1066]	<213> 大肠杆菌
[1067]	<400> 41
[1068]	Met Ser Gly Gly Leu Val Thr Ala Ala Tyr Ile Val Ala Ala Ile Leu
[1069]	1 5 10 15
[1070]	Phe Ile Phe Ser Leu Ala Gly Leu Ser Lys His Glu Thr Ser Arg Gln
[1071]	20 25 30
[1072]	Gly Asn Asn Phe Gly Ile Ala Gly Met Ala Ile Ala Leu Ile Ala Thr
[1073]	35 40 45
[1074]	Ile Phe Gly Pro Asp Thr Gly Asn Val Gly Trp Ile Leu Leu Ala Met
[1075]	50 55 60
[1076]	Val Ile Gly Gly Ala Ile Gly Ile Arg Leu Ala Lys Lys Val Glu Met
[1077]	65 70 75 80
[1078]	Thr Glu Met Pro Glu Leu Val Ala Ile Leu His Ser Phe Val Gly Leu
[1079]	85 90 95
[1080]	Ala Ala Val Leu Val Gly Phe Asn Ser Tyr Leu His His Asp Ala Gly
[1081]	100 105 110
[1082]	Met Ala Pro Ile Leu Val Asn Ile His Leu Thr Glu Val Phe Leu Gly
[1083]	115 120 125
[1084]	Ile Phe Ile Gly Ala Val Thr Phe Thr Gly Ser Val Val Ala Phe Gly
[1085]	130 135 140
[1086]	Lys Leu Cys Gly Lys Ile Ser Ser Lys Pro Leu Met Leu Pro Asn Arg
[1087]	145 150 155 160
[1088]	His Lys Met Asn Leu Ala Ala Leu Val Val Ser Phe Leu Leu Leu Ile
[1089]	165 170 175
[1090]	Val Phe Val Arg Thr Asp Ser Val Gly Leu Gln Val Leu Ala Leu Leu
[1091]	180 185 190

[1092]	Ile Met Thr Ala Ile Ala Leu Val Phe Gly Trp His Leu Val Ala Ser
[1093]	195 200 205
[1094]	Ile Gly Gly Ala Asp Met Pro Val Val Val Ser Met Leu Asn Ser Tyr
[1095]	210 215 220
[1096]	Ser Gly Trp Ala Ala Ala Ala Ala Gly Phe Met Leu Ser Asn Asp Leu
[1097]	225 230 235 240
[1098]	Leu Ile Val Thr Gly Ala Leu Val Gly Ser Ser Gly Ala Ile Leu Ser
[1099]	245 250 255
[1100]	Tyr Ile Met Cys Lys Ala Met Asn Arg Ser Phe Ile Ser Val Ile Ala
[1101]	260 265 270
[1102]	Gly Gly Phe Gly Thr Asp Gly Ser Ser Thr Gly Asp Asp Gln Glu Val
[1103]	275 280 285
[1104]	Gly Glu His Arg Glu Ile Thr Ala Glu Glu Thr Ala Glu Leu Leu Lys
[1105]	290 295 300
[1106]	Asn Ser His Ser Val Ile Ile Thr Pro Gly Tyr Gly Met Ala Val Ala
[1107]	305 310 315 320
[1108]	Gln Ala Gln Tyr Pro Val Ala Glu Ile Thr Glu Lys Leu Arg Ala Arg
[1109]	325 330 335
[1110]	Gly Ile Asn Val Arg Phe Gly Ile His Pro Val Ala Gly Arg Leu Pro
[1111]	340 345 350
[1112]	Gly His Met Asn Val Leu Leu Ala Glu Ala Lys Val Pro Tyr Asp Ile
[1113]	355 360 365
[1114]	Val Leu Glu Met Asp Glu Ile Asn Asp Asp Phe Ala Asp Thr Asp Thr
[1115]	370 375 380
[1116]	Val Leu Val Ile Gly Ala Asn Asp Thr Val Asn Pro Ala Ala Gln Asp
[1117]	385 390 395 400
[1118]	Asp Pro Lys Ser Pro Ile Ala Gly Met Pro Val Leu Glu Val Trp Lys
[1119]	405 410 415
[1120]	Ala Gln Asn Val Ile Val Phe Lys Arg Ser Met Asn Thr Gly Tyr Ala
[1121]	420 425 430
[1122]	Gly Val Gln Asn Pro Leu Phe Phe Lys Glu Asn Thr His Met Leu Phe
[1123]	435 440 445
[1124]	Gly Asp Ala Lys Ala Ser Val Asp Ala Ile Leu Lys Ala Leu
[1125]	450 455 460
[1126]	<210> 42
[1127]	<211> 1389
[1128]	<212> DNA
[1129]	<213> 大肠杆菌
[1130]	<400> 42
[1131]	atgtctggag gattagttac agctgcatac attggtgccg cgatcctggt tatcttcagt 60
[1132]	ctggccggtc tttcgaaca tgaacgtct cgccagggtg acaacttcgg tatcgccggg 120
[1133]	atggcgattg cgttaatcgc aaccattttt ggaccggata cgggtaatgt tggctggatc 180

[1134]	ttgctggcga tggtcattgg tggggcaatt ggtatccgtc tggcgaagaa agttgaaatg	240
[1135]	accgaaatgc cagaactggt ggcgatcctg catagcttcg tgggtctggc ggcagtgctg	300
[1136]	gttgcttta acagctatct gcatcatgac gcgggaatgg caccgattct ggtcaatatt	360
[1137]	cacctgacgg aagtgttctt cggatcttc atcggggcgg taacgttcac gggttcggtg	420
[1138]	gtggcgttcg gcaactgtg tggcaagatt tcgtctaac cattgatgct gccaaaccgt	480
[1139]	cacaaaatga acctggcggc tctggtcgtt tccttctgc tgctgattgt atttgttcgc	540
[1140]	acggacagcg tcggctgca agtgcctggca ttgctgataa tgaccgcaat tgcgctggta	600
[1141]	ttcgctggc atttagtcgc ctccatcggg ggtgcagata tgccagtggg ggtgtcgtg	660
[1142]	ctgaactcgt actccggctg ggcggctcgc gctgcgggct ttatgctcag caacgacctg	720
[1143]	ctgattgtga ccggtcgcct ggtcggttct tcgggggcta tcctttctta cattatgtgt	780
[1144]	aaggcgatga accgttcctt tatcagcgtt attgcgggtg gtttcggcac cgacggctct	840
[1145]	tctactggcg atgatcagga agtgggtgag caccgcgaaa tcaccgcaga agagacagcg	900
[1146]	gaactgctga aaaactccca ttcagtgatc attactccgg ggtacggcat ggcagtcgcg	960
[1147]	caggcgaat atcctgtcgc tgaattact gagaaattgc gcgctcgtgg tattaatgtg	1020
[1148]	cgtttcggta tccaccggg cgcgggcgt ttgcctggac atatgaacgt attgctggct	1080
[1149]	gaagcaaaag taccgatga catcgtctg gaaatggac agatcaatga tgactttgct	1140
[1150]	gataccgata ccgtactggt gattggtgct aacgatacgg ttaaccggc ggcgcaggat	1200
[1151]	gatccaaga gtccgattgc tggatgcct gtgctggaag tgtgaaagc gcagaacgtg	1260
[1152]	attgtcttta aacgttcgat gaacctggc tatgctgggt tgcaaaacc gctgttcttc	1320
[1153]	aaggaaaaca cccacatgct gtttggtgac gccaaagcca gcgtggatgc aatcctgaaa	1380
[1154]	gctctgtaa	1389
[1155]	<210> 43	
[1156]	<211> 42	
[1157]	<212> DNA	
[1158]	<213> 人工序列	
[1159]	<220>	
[1160]	<223> Y75_p1579-F	
[1161]	<400> 43	
[1162]	aaggaaacac tgatatcatg cgaattggca taccaagaga ac	42
[1163]	<210> 44	
[1164]	<211> 42	
[1165]	<212> DNA	
[1166]	<213> 人工序列	
[1167]	<220>	
[1168]	<223> Y75_p1578-R	
[1169]	<400> 44	
[1170]	gcaaaaacag cctcgagtta cagagctttc aggattgcat cc	42
[1171]	<210> 45	
[1172]	<211> 167	
[1173]	<212> PRT	
[1174]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[1175]	<400> 45	

[1176]	Met Ser Ala Ala Glu Gly Leu His Ile Val Val Met Gly Val Ser Gly	
[1177]	1	5 10 15
[1178]	Cys Gly Lys Ser Ser Val Gly Lys Ala Leu Ala Ala Glu Leu Gly Ile	
[1179]		20 25 30
[1180]	Glu Tyr Lys Asp Gly Asp Glu Leu His Pro Gln Glu Asn Ile Asp Lys	
[1181]		35 40 45
[1182]	Met Ala Ser Gly Gln Ala Leu Asp Asp Asp Asp Arg Ala Trp Trp Leu	
[1183]		50 55 60
[1184]	Val Gln Val Gly Lys Trp Leu Arg Asp Arg Pro Ser Gly Val Ile Ala	
[1185]		65 70 75 80
[1186]	Cys Ser Ala Leu Lys Arg Ser Tyr Arg Asp Leu Leu Arg Thr Lys Cys	
[1187]		85 90 95
[1188]	Pro Gly Thr Val Phe Val His Leu His Gly Asp Tyr Asp Leu Leu Leu	
[1189]		100 105 110
[1190]	Ser Arg Met Lys Ala Arg Glu Asp His Phe Met Pro Ser Thr Leu Leu	
[1191]		115 120 125
[1192]	Asp Ser Gln Phe Ala Thr Leu Glu Pro Leu Glu Asp Asp Glu Asp Gly	
[1193]		130 135 140
[1194]	Lys Val Phe Asp Val Ala His Thr Ile Ser Glu Leu Ala Ala Gln Ser	
[1195]		145 150 155 160
[1196]	Ala Glu Trp Val Arg Asn Lys	
[1197]		165
[1198]	<210>	46
[1199]	<211>	504
[1200]	<212>	DNA
[1201]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[1202]	<400>	46
[1203]	atgtcagcag ccgaaggctt acatattgtc gtcattggcg tttctggctg cggcaaatcc	60
[1204]	tccgtcggta aagccctagc agcggagctc ggaatcgaat acaaagacgg cgacgaactt	120
[1205]	cacccccagg aaaacatcga caagatggcc tccggccagg cacttgacga cgacgaccgt	180
[1206]	gcatggtggc tagtccaggt tggcaagtgg ctccgcgacc gaccaagcgg cgtcatcgca	240
[1207]	tgctccgcc tcaagcgtc ctaccgcgat ctctgcgca ccaaagccc aggaaccgtc	300
[1208]	ttcgtccacc tccacggcga ctacgatctc ctactttccc gcatgaagge ccgcaagat	360
[1209]	cacttcatgc catccacctt gctagattcc caatttgcaa ccctcgagcc gctcgaagat	420
[1210]	gacgaagatg gcaaggtttt cgacgttgc cacaccatca gcgaactggc cgcccaatct	480
[1211]	gcagagtggg ttcgcaacaa ataa	504
[1212]	<210>	47
[1213]	<211>	37
[1214]	<212>	DNA
[1215]	<213>	人工序列
[1216]	<220>	
[1217]	<223>	NCg12399-del-5F





[1302]	Ser Ile Ala Ala Trp Ser Gly Ile Leu Asp Ala His Thr Gly Glu Leu
[1303]	195 200 205
[1304]	Asp Leu Thr Ile Leu Glu His Ile Gly Val Asp Pro Ala Leu Phe Gly
[1305]	210 215 220
[1306]	Glu Ile Arg Asn Pro Asp Glu Pro Ala Thr Asp Ala Lys Val Val Asp
[1307]	225 230 235 240
[1308]	Lys Lys Trp Lys His Leu Glu Glu Ile Pro Trp Phe His Ala Ile Pro
[1309]	245 250 255
[1310]	Asp Gly Trp Pro Ser Asn Ile Gly Pro Gly Ala Val Asp Ser Lys Thr
[1311]	260 265 270
[1312]	Val Ala Val Ala Ala Ala Thr Ser Gly Ala Met Arg Val Ile Leu Pro
[1313]	275 280 285
[1314]	Ser Val Pro Glu Gln Ile Pro Ser Gly Leu Trp Cys Tyr Arg Val Ser
[1315]	290 295 300
[1316]	Arg Asp Gln Cys Ile Val Gly Gly Ala Leu Asn Asp Val Gly Arg Ala
[1317]	305 310 315 320
[1318]	Val Thr Trp Leu Glu Arg Thr Ile Ile Lys Pro Glu Asn Leu Asp Glu
[1319]	325 330 335
[1320]	Val Leu Ile Arg Glu Pro Leu Glu Gly Thr Pro Ala Val Leu Pro Phe
[1321]	340 345 350
[1322]	Phe Ser Gly Glu Arg Ser Ile Gly Trp Ala Ala Ser Ala Gln Ala Thr
[1323]	355 360 365
[1324]	Ile Thr Asn Ile Gln Glu Gln Thr Gly Pro Glu His Leu Trp Arg Gly
[1325]	370 375 380
[1326]	Val Phe Glu Ala Leu Ala Leu Ser Tyr Gln Arg Val Trp Glu His Met
[1327]	385 390 395 400
[1328]	Gly Lys Ala Gly Ala Ala Pro Glu Arg Val Ile Ala Ser Gly Arg Val
[1329]	405 410 415
[1330]	Ser Thr Asp His Pro Glu Phe Leu Ala Met Leu Ser Asp Ala Leu Asp
[1331]	420 425 430
[1332]	Thr Pro Val Ile Pro Leu Glu Met Lys Arg Ala Thr Leu Arg Gly Thr
[1333]	435 440 445
[1334]	Ala Leu Ile Val Leu Glu Gln Leu Glu Pro Gly Gly Thr Arg Ala Thr
[1335]	450 455 460
[1336]	Pro Pro Phe Gly Thr Thr His Gln Pro Arg Phe Ala His His Tyr Ser
[1337]	465 470 475 480
[1338]	Lys Ala Arg Glu Leu Phe Asp Ala Leu Tyr Leu Lys Leu Val
[1339]	485 490
[1340]	<210> 54
[1341]	<211> 1485
[1342]	<212> DNA
[1343]	<213> 谷氨酸棒杆菌

[1344]	<400>	54	
[1345]	atgggatcaa ttccaacaat gtccatccct tttgatgact cacgtggacc ttatgtcctt	60	
[1346]	gctatggata ttggttccac tgcatacaga ggtggacttt atgatgcttc cggctgceca	120	
[1347]	atcaaaggca ccaagcagcg cgaatcccat gaattcacca ccggtgaggg cgtttccacc	180	
[1348]	attgatgctg accagtggt ttcggagatc acctcagtta ttaatggcat tttgaacgcg	240	
[1349]	gctgatcatc acaacatcaa agatcagatc gccgctgtcg cgctagattc ttttgcattc	300	
[1350]	tcattaatct tggtcgatgg tgaaggcaat gcgctcacc cgtgcattac ctacgcggat	360	
[1351]	tctcgttctg cacagtatgt ggagcagctg cgcgcggaaa tcgatgagga ggcctaccac	420	
[1352]	ggccgcaccg gcgtctgcct gcacacctcc taccacccat cgcgcctgct gtggctgaaa	480	
[1353]	actgagttcg aggaagagtt caacaaagcc aagtatgtga tgaccatcgg tgagtacgtc	540	
[1354]	tacttcaaac ttgcaggcat caccggaatg gctacttcca ttgccgctg gagtggcatt	600	
[1355]	ttggacgcc ataccggcga acttgatctg actatcttgg agcacatcgg tgttgatccg	660	
[1356]	gctctgttcg gtgagatcag aaacctgat gaaccagcca ccgatgcaa agttgtcgac	720	
[1357]	aaaaagtgga agcacctgga agaaatccct tggttccatg ccattccaga cggctggcct	780	
[1358]	tccaacattg gccagcgc cgtggattct aaaaccgtc cagtcgccg cgctacatcc	840	
[1359]	ggcgccatgc gcgtgatcct tccgagcgt cccgaacaga tcccctctgg cctgtggtgt	900	
[1360]	taccgcgttt cccgcgacca gtgcatcgtt ggtggcgcac tcaacgacgt cggacgcgc	960	
[1361]	gtcacctggc tggaacgac cattatcaag cctgaaaacc tcgacgaagt gctgatccgc	1020	
[1362]	gaaccctcg aaggcacccc agctgtcctg ccgttcttct ccggggaacg ctccatcggc	1080	
[1363]	tgggcagcct cagcgcagge cagatcacc aacattcagg aacaaaccgg ccctgaacac	1140	
[1364]	ttgtggcgc gcgttttga agccctcga ctctctacc agcgcgtttg ggaacacatg	1200	
[1365]	gggaaagccg gcgcagcccc tgaacgggtc atcgcacag gacgagtctc caccgaccac	1260	
[1366]	ccagaattcc tcgcgatgct ttccgagccc ctgcacacc cagtcaccc tctggaaatg	1320	
[1367]	aagcgcgcca ccctccgcg caccgcaatt atcgtccttg agcagctcga accagcggc	1380	
[1368]	acgcgcgca ccccaccatt cggcacgac catcagccc gctttgcgca ccattactcc	1440	
[1369]	aaggcaagag agcttttga cgcctctac ctcaagtgg tctag	1485	
[1370]	<210>	55	
[1371]	<211>	35	
[1372]	<212>	DNA	
[1373]	<213>	人工序列	
[1374]	<220>		
[1375]	<223>	NCg12905-del-5F	
[1376]	<400>	55	
[1377]	ccgggatcc tctagactgg gtcgtggcat aagaa	35	
[1378]	<210>	56	
[1379]	<211>	19	
[1380]	<212>	DNA	
[1381]	<213>	人工序列	
[1382]	<220>		
[1383]	<223>	NCg12905-del-5R	
[1384]	<400>	56	
[1385]	gtgcctttga ttgggcagc	19	



[1428]		165		170		175
[1429]	Gly Glu Tyr Val Tyr Phe Lys Leu Ala Gly Leu Thr Gly Met Ala Thr					
[1430]		180		185		190
[1431]	Ser Ile Ala Ala Trp Ser Gly Ile Leu Asp Ala His Thr Gly Glu Leu					
[1432]		195		200		205
[1433]	Asp Leu Thr Ile Leu Glu His Ile Gly Val Asp Pro Ala Leu Phe Gly					
[1434]		210		215		220
[1435]	Glu Ile Arg Asn Pro Asp Glu Pro Ala Thr Asp Ala Lys Val Val Asp					
[1436]		225		230		235
[1437]	Lys Lys Trp Lys His Leu Glu Glu Ile Pro Trp Phe His Ala Ile Pro					
[1438]		245		250		255
[1439]	Asp Gly Trp Pro Ser Asn Ile Gly Pro Gly Ala Val Asp Ser Lys Thr					
[1440]		260		265		270
[1441]	Val Ala Val Ala Val Ala Thr Ser Gly Ala Met Arg Val Ile Leu Pro					
[1442]		275		280		285
[1443]	Ser Val Pro Glu Gln Ile Pro Ser Gly Leu Trp Cys Tyr Arg Val Ser					
[1444]		290		295		300
[1445]	Arg Asp Gln Cys Ile Val Gly Gly Ala Leu Asn Asp Val Gly Arg Ala					
[1446]		305		310		315
[1447]	Val Thr Trp Leu Glu Arg Thr Ile Ile Lys Pro Glu Asn Leu Asp Glu					
[1448]		325		330		335
[1449]	Val Leu Ile Cys Glu Pro Leu Glu Gly Thr Pro Ala Val Leu Pro Phe					
[1450]		340		345		350
[1451]	Phe Ser Gly Glu Arg Ser Ile Gly Trp Ala Ala Ser Ala Gln Ala Thr					
[1452]		355		360		365
[1453]	Ile Thr Asn Ile Gln Glu Gln Thr Gly Pro Glu His Leu Trp Arg Gly					
[1454]		370		375		380
[1455]	Val Phe Glu Ala Leu Ala Leu Ser Tyr Gln Arg Val Trp Glu His Met					
[1456]		385		390		395
[1457]	Glu Lys Ala Gly Ala Ala Pro Glu Arg Val Ile Ala Ser Gly Arg Val					
[1458]		405		410		415
[1459]	Ser Thr Asp His Pro Glu Phe Leu Ala Met Leu Ser Asp Ala Leu Asp					
[1460]		420		425		430
[1461]	Thr Pro Val Ile Pro Leu Glu Met Lys Arg Ala Thr Leu Arg Gly Thr					
[1462]		435		440		445
[1463]	Ala Leu Ile Val Leu Glu Gln Leu Glu Pro Gly Gly Thr Arg Ala Thr					
[1464]		450		455		460
[1465]	Pro Pro Phe Gly Thr Thr His Gln Pro Arg Phe Ala His Tyr Tyr Ser					
[1466]		465		470		475
[1467]	Lys Ala Arg Glu Leu Phe Asp Ala Leu Tyr Leu Lys Leu Val					
[1468]		485		490		
[1469]	<210>	60				



[1512]	Arg Leu Gln Asp Asp Glu Tyr Gln Trp Leu Ser Ala Leu Pro Phe Phe
[1513]	65 70 75 80
[1514]	Lys Ala Asp Tyr Leu Asn Trp Leu Arg Glu Phe Arg Phe Asn Pro Glu
[1515]	85 90 95
[1516]	Gln Val Thr Val Ser Asn Asp Asn Gly Lys Leu Asp Ile Arg Leu Ser
[1517]	100 105 110
[1518]	Gly Pro Trp Arg Glu Val Ile Leu Trp Glu Val Pro Leu Leu Ala Val
[1519]	115 120 125
[1520]	Ile Ser Glu Met Val His Arg Tyr Arg Ser Pro Gln Ala Asp Val Ala
[1521]	130 135 140
[1522]	Gln Ala Leu Asp Thr Leu Glu Ser Lys Leu Val Asp Phe Ser Ala Leu
[1523]	145 150 155 160
[1524]	Thr Ala Gly Leu Asp Met Ser Arg Phe His Leu Met Asp Phe Gly Thr
[1525]	165 170 175
[1526]	Arg Arg Arg Phe Ser Arg Glu Val Gln Glu Thr Ile Val Lys Arg Leu
[1527]	180 185 190
[1528]	Gln Gln Glu Ser Trp Phe Val Gly Thr Ser Asn Tyr Asp Leu Ala Arg
[1529]	195 200 205
[1530]	Arg Leu Ser Leu Thr Pro Met Gly Thr Gln Ala His Glu Trp Phe Gln
[1531]	210 215 220
[1532]	Ala His Gln Gln Ile Ser Pro Asp Leu Ala Asn Ser Gln Arg Ala Ala
[1533]	225 230 235 240
[1534]	Leu Ala Ala Trp Leu Glu Glu Tyr Pro Asp Gln Leu Gly Ile Ala Leu
[1535]	245 250 255
[1536]	Thr Asp Cys Ile Thr Met Asp Ala Phe Leu Arg Asp Phe Gly Val Glu
[1537]	260 265 270
[1538]	Phe Ala Ser Arg Tyr Gln Gly Leu Arg His Asp Ser Gly Asp Pro Val
[1539]	275 280 285
[1540]	Glu Trp Gly Glu Lys Ala Ile Ala His Tyr Glu Lys Leu Gly Ile Asp
[1541]	290 295 300
[1542]	Pro Gln Ser Lys Thr Leu Val Phe Ser Asp Asn Leu Asp Leu Arg Lys
[1543]	305 310 315 320
[1544]	Ala Val Glu Leu Tyr Arg His Phe Ser Ser Arg Val Gln Leu Ser Phe
[1545]	325 330 335
[1546]	Gly Ile Gly Thr Arg Leu Thr Cys Asp Ile Pro Gln Val Lys Pro Leu
[1547]	340 345 350
[1548]	Asn Ile Val Ile Lys Leu Val Glu Cys Asn Gly Lys Pro Val Ala Lys
[1549]	355 360 365
[1550]	Leu Ser Asp Ser Pro Gly Lys Thr Ile Cys His Asp Lys Ala Phe Val
[1551]	370 375 380
[1552]	Arg Ala Leu Arg Lys Ala Phe Asp Leu Pro His Ile Lys Lys Ala Ser
[1553]	385 390 395 400

[1554]	<210>	62	
[1555]	<211>	1203	
[1556]	<212>	DNA	
[1557]	<213>	大肠杆菌	
[1558]	<400>	62	
[1559]		atgacacaat tcgcttctcc tgttctgcac tcgttgctgg atacagatgc ttataagttg	60
[1560]		catatgcagc aagccgtgtt tcatcactat tacgatgtgc atgtcgcggc ggagtttcgt	120
[1561]		tgccgaggtg acgatctgct gggatattat gccgatgcta ttcgtgaaca ggttcaggcg	180
[1562]		atgcagcacc tgcgcctgca ggatgatgaa tatcagtggc tttctgcct gcctttcttt	240
[1563]		aaggccgact atcttaactg gttacgcgag ttccgctta acccggaaca agtcaccgtg	300
[1564]		tccaacgata atggcaagct ggatattcgt ttaageggcc cgtggcgtga agtcatcctc	360
[1565]		tgggaagttc ctttgcctggc ggttatcagt gaaatggtac atcgtatcg ctcaccgcag	420
[1566]		gccgacgttg cgcaagcct cgacacgtg gaaagcaaat tagtcgactt ctcggcgta	480
[1567]		accgccggtc ttgatatgtc gcgcttccat ctgatggatt ttggcaccg tcgccgtttt	540
[1568]		tctcgcgaag tacaagaaac catcgtaag cgtctgcaac agaatcctg gtttgtgggc	600
[1569]		accgcaact acgatctggc gcgtcgctt tcctcagc cgatgggaac acaggcacac	660
[1570]		gaatggttc aggcacatca gcaatcagc ccgatctag ccaacagcca gcgagctgca	720
[1571]		cttgcctcct ggctggaaga gtatccgac caacttgca ttgcattaac cgactgcatc	780
[1572]		actatggatg ctttctcgc tgatttcggt gtcgagttcg ctatcggtg tcaggcctg	840
[1573]		cgtcatgact ctggcaccg ggttgaatgg ggtgaaaaag ccattgcaca ttatgaaaag	900
[1574]		ctgggaattg atccacagag taaaacgtg gttttctctg acaatctgga tttacgcaa	960
[1575]		gcggttgagc tataccgcca cttctctcc cgcgtgcaat taagttttgg tattgggact	1020
[1576]		cgctgacct gcgataccc ccaggtaaaa cccctgaata ttgtcatta gttgtagag	1080
[1577]		tgtaacgta aaccggtggc gaaactttct gacagcctg gcaaaactat ctgccatgat	1140
[1578]		aaagcgtttg ttcgggcgct gcgcaaagc ttcgacctc cgcatattaa aaaagccagt	1200
[1579]		taa	1203
[1580]	<210>	63	
[1581]	<211>	39	
[1582]	<212>	DNA	
[1583]	<213>	人工序列	
[1584]	<220>		
[1585]	<223>	pncB(Eco) -F	
[1586]	<400>	63	
[1587]		aaggaaacac tgatatcatg acacaattcg cttctcctg	39
[1588]	<210>	64	
[1589]	<211>	44	
[1590]	<212>	DNA	
[1591]	<213>	人工序列	
[1592]	<220>		
[1593]	<223>	pncB(Eco) -F	
[1594]	<400>	64	
[1595]		gccaaaacag cctcgagtta actggtttt ttaatatgcg gaag	44

[1596]	<210>	65
[1597]	<211>	446
[1598]	<212>	PRT
[1599]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[1600]	<400>	65
[1601]	Val Asn Thr Asn Pro Ser Glu Phe Ser Ser Asn Arg Ser Thr Ala Leu	
[1602]	1	5 10 15
[1603]	Leu Thr Asp Lys Tyr Glu Leu Thr Met Leu Gln Ala Ala Leu Ala Asp	
[1604]		20 25 30
[1605]	Gly Ser Ala Glu Arg Pro Ser Thr Phe Glu Val Phe Ser Arg Arg Leu	
[1606]		35 40 45
[1607]	Pro Asn Glu Arg Arg Tyr Gly Val Val Ala Gly Thr Ala Arg Val Leu	
[1608]		50 55 60
[1609]	Lys Ala Ile Arg Asp Phe Val Phe Thr Glu Glu Gln Leu Ala Asp Leu	
[1610]	65	70 75 80
[1611]	Asp Phe Leu Asp Asp Arg Thr Leu Glu Tyr Leu Arg Asn Tyr Arg Phe	
[1612]		85 90 95
[1613]	Thr Gly Gln Val Asp Gly Tyr Arg Glu Gly Glu Ile Tyr Phe Pro Gln	
[1614]		100 105 110
[1615]	Ser Pro Leu Leu Thr Val Arg Gly Thr Phe Ala Glu Cys Val Ile Leu	
[1616]		115 120 125
[1617]	Glu Thr Val Ile Leu Ser Ile Met Asn Ala Asp Ser Ala Val Ala Ser	
[1618]		130 135 140
[1619]	Ala Ala Ala Arg Met Val Thr Ala Ala Asp Gly Arg Pro Ile Ile Glu	
[1620]	145	150 155 160
[1621]	Met Gly Ser Arg Arg Thr His Glu Tyr Ser Ala Val Thr Ala Ser Arg	
[1622]		165 170 175
[1623]	Ala Ala Tyr Leu Ala Gly Phe Ser Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ala Ala	
[1624]		180 185 190
[1625]	Tyr Arg Tyr Gly Ile Pro Ala Ser Gly Thr Ser Ala His Ala Trp Thr	
[1626]		195 200 205
[1627]	Leu Leu His Ile Asn Asp Asp Gly Thr Pro Asn Glu Ala Ala Ala Phe	
[1628]		210 215 220
[1629]	Lys Ala Gln Val Glu Ser Leu Gly Val Asp Thr Thr Leu Leu Val Asp	
[1630]	225	230 235 240
[1631]	Thr Tyr Asp Ile Thr Gln Gly Val Ala Thr Ala Ile Glu Val Ala Gly	
[1632]		245 250 255
[1633]	Pro Asp Leu Gly Gly Val Arg Ile Asp Ser Gly Asp Leu Gly Val Leu	
[1634]		260 265 270
[1635]	Ala Arg Lys Val Arg Lys Gln Leu Asp Asp Leu Asn Ala His Asn Thr	
[1636]		275 280 285
[1637]	Lys Ile Val Val Ser Ser Asp Leu Asp Glu Phe Ala Ile Ala Gly Leu	

[1638]	290	295	300
[1639]	Arg Gly Glu Pro Val Asp Val Phe Gly Val Gly Thr Ser Val Val Thr		
[1640]	305	310	315
[1641]	Gly Ser Gly Ala Pro Thr Ala Gly Leu Val Tyr Lys Ile Val Glu Val		
[1642]		325	330
[1643]	Ala Gly His Pro Val Ala Lys Arg Ser Arg Asn Lys Glu Ser Tyr Gly		
[1644]		340	345
[1645]	Gly Gly Lys Lys Ala Val Arg Thr His Arg Lys Ser Gly Thr Ala Ile		
[1646]		355	360
[1647]	Glu Glu Ile Val Tyr Pro Phe Asn Ala Glu Ala Pro Asp Thr Gly Lys		
[1648]	370	375	380
[1649]	Leu Asp Thr Leu Ser Leu Thr Ile Pro Leu Met Arg Asp Gly Glu Ile		
[1650]	385	390	395
[1651]	Val Pro Gly Leu Pro Thr Leu Glu Asp Ser Arg Ala Tyr Leu Ala Lys		
[1652]		405	410
[1653]	Gln Leu Val Ser Leu Pro Trp Glu Gly Leu Ala Leu Ser Arg Asp Glu		
[1654]		420	425
[1655]	Pro Val Leu His Thr Arg Phe Val Gly Phe Pro Pro Ala Ala		
[1656]		435	440
[1657]	<210>	66	
[1658]	<211>	1341	
[1659]	<212>	DNA	
[1660]	<213>	谷氨酸棒杆菌	
[1661]	<400>	66	
[1662]	gtgaatacca atccgtctga attctcctca aaccgttcaa cagctctcct tactgataaa	60	
[1663]	tatgagctga ccatgcttca agcagcgtc gctgatggtt ctgcagaacg cccctcaacg	120	
[1664]	tttgaggtct ttagccgccg cctccccaac gagcgccgat acggtgtcgt cgcaggaaca	180	
[1665]	gcacgagtgc tgaaggcgtat tcgtgacttt gtattcacag aggaacaact cgccgatctt	240	
[1666]	gactttttag acgaccgtac cctggaatac ctccgcaact accgattcac cggccaagtt	300	
[1667]	gatggctacc gcgaaggcga aatctacttc ccgcagtccc ctcttctgac tgtgctggc	360	
[1668]	acgtttgcag aatgcgtcat cctagaaact gtcattttgt ccatcatgaa tgcagattct	420	
[1669]	gccgtcgctt ccgccgtgc gcgcatggtc accgcagctg atggtcgccc catcatcgaa	480	
[1670]	atgggatcca ggcgaccca cgaatactcg gcagtcaccg catcccgcgc agcatacctc	540	
[1671]	gctggattct ccaccacctc caacctcgag gcggcctacc gctacggaat tccagcatcc	600	
[1672]	ggaacctccg cccacgcatg gactttgctg cacatcaacg atgacggcac cccaacgaa	660	
[1673]	gcagcagctt tcaaagcaca ggttgaatcc ctcggcgtgg acaccacctt gctggtagat	720	
[1674]	acttatgaca taccceaagg tgtggccacc gccattgaag ttgcaggtcc agaccttgg	780	
[1675]	ggcgtacgta tgactccgg cgacctaggt gtgcttggcc gaaaggtccg caagcagctc	840	
[1676]	gacgatctca acgcccacaa caccaagatt gtggtctcct ccgacctgga tgaattgcc	900	
[1677]	atcgcgggtc ttcgcggcga accagttgac gtctttggcg ttggcacctc cgttgtcaca	960	
[1678]	ggttctggcg caccaaccgc tggcctctgt tacaagatcg tggaagttgc cggtcacct	1020	
[1679]	gtggccaagc gttcccgaac caaggaaagc tacggtggtg gcaagaagge tgtgctgacc	1080	



[1722]	Glu Thr Val Ile Leu Ser Ile Met Asn Ala Asp Ser Ala Val Ala Ser
[1723]	130 135 140
[1724]	Ala Ala Ala Arg Met Val Thr Ala Ala Asp Gly Arg Pro Ile Ile Glu
[1725]	145 150 155 160
[1726]	Met Gly Ser Arg Arg Thr His Glu Tyr Ser Ala Val Thr Ala Ser Arg
[1727]	165 170 175
[1728]	Ala Ala Tyr Leu Ala Gly Phe Ser Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ala Ala
[1729]	180 185 190
[1730]	Tyr Arg Tyr Gly Ile Pro Ala Ser Gly Thr Ser Ala His Ala Trp Thr
[1731]	195 200 205
[1732]	Leu Leu His Ile Asn Asp Asp Gly Thr Pro Asn Glu Ala Ala Ala Phe
[1733]	210 215 220
[1734]	Lys Ala Gln Val Glu Ser Leu Gly Val Asp Thr Thr Leu Leu Val Asp
[1735]	225 230 235 240
[1736]	Thr Tyr Asp Ile Thr Gln Gly Val Ala Thr Ala Ile Glu Val Ala Gly
[1737]	245 250 255
[1738]	Pro Asp Leu Gly Gly Val Arg Ile Asp Ser Gly Asp Leu Gly Val Leu
[1739]	260 265 270
[1740]	Ala Arg Lys Val Arg Lys Gln Leu Asp Asp Leu Asn Ala His Asn Thr
[1741]	275 280 285
[1742]	Lys Ile Val Val Ser Ser Asp Leu Asp Glu Phe Ala Ile Ala Gly Leu
[1743]	290 295 300
[1744]	Arg Gly Glu Pro Val Asp Val Phe Gly Val Gly Thr Ser Val Val Thr
[1745]	305 310 315 320
[1746]	Gly Ser Gly Ala Pro Thr Ala Gly Leu Val Tyr Lys Ile Val Glu Val
[1747]	325 330 335
[1748]	Ala Gly His Pro Val Ala Lys Arg Ser Arg Asn Lys Glu Ser Tyr Gly
[1749]	340 345 350
[1750]	Gly Gly Lys Lys Ala Leu Arg Thr His Arg Lys Ser Gly Thr Ala Ile
[1751]	355 360 365
[1752]	Glu Glu Ile Val Tyr Pro Phe Asn Ala Glu Ala Pro Asp Thr Gly Lys
[1753]	370 375 380
[1754]	Leu Asp Thr Leu Ser Leu Thr Ile Pro Leu Met Arg Asp Gly Glu Ile
[1755]	385 390 395 400
[1756]	Val Pro Gly Leu Pro Thr Leu Glu Asp Ser Arg Ala Tyr Leu Ala Lys
[1757]	405 410 415
[1758]	Gln Leu Val Ser Leu Pro Trp Glu Gly Leu Ala Leu Ser Arg Asp Glu
[1759]	420 425 430
[1760]	Pro Val Leu His Thr Arg Phe Val Gly Phe Pro Pro Val Ala
[1761]	435 440 445
[1762]	<210> 70
[1763]	<211> 1341

[1764]	<212>	DNA	
[1765]	<213>	谷氨酸棒杆菌	
[1766]	<400>	70	
[1767]		gtgaatacca atccttctga attctcctca aaccgttcga cagctctcct tactgataaa	60
[1768]		tatgagctga ccatgcttca agcagcgctc gctgatggtt cagcagagcg cccctcaacg	120
[1769]		tttgaggctct ttagccgccg cctcccacaac gagcgccgat acgggtgctgt tgcaggaacc	180
[1770]		gccccagtggt tgaaggcgat ccgtgacttt gtattcacag aggaacaact cgccgacctc	240
[1771]		gacttcttag acgaccgcac cctggaatac ctccgcaact accgattcac cggccaagtt	300
[1772]		gatggatacc gcgaaggcga aatctacttc ccgcagtccc ctcttctgac tgtgctgtggc	360
[1773]		acgtttgcag aatgcgtcat cctagaaacc gtcattttgt ccatcatgaa tgcggattcc	420
[1774]		gccgttgccct ctgccgcagc gcgcatggtt accgcagctg atggccgcc catcattgaa	480
[1775]		atgggctcca ggcgcacca cgaatactct gcagteactg catcccgcgc cgcctacctc	540
[1776]		gcgggattct ccaccacctc caacctcgag gcggcctacc gctacggaat tccagcatcc	600
[1777]		ggaacctccg cccacgcatg gactttgcta cacatcaacg atgacggcac ccccaacgaa	660
[1778]		gcagcagctt tcaaagcaca ggttgaatcc ctccggcgtg acaccacctt gctggtagat	720
[1779]		acttatgaca tcaccaagg tgtggccacc gccatcgaag ttgcaggccc agaccttggg	780
[1780]		ggcgtgcgca tcgattccgg cgacctgggt gtgcttgccc gcaaggccg caagcagctc	840
[1781]		gacgatctca acgcccaca caccaagatt gtggctctct ccgacctgga tgaattgcc	900
[1782]		atcgcgggctc ttgcggcga accagttgac gtctttggcg ttggcacctc cgttgtcaca	960
[1783]		ggttctggcg caccaaccgc tggcctcgtg tacaagatcg tggaagttgc cggtcacct	1020
[1784]		gtggccaagc gttcccgaaa caaggaaagc tacggcgcg gcaagaagc tctgctgacc	1080
[1785]		caccgcaagt ccggtaccgc aatcgaagaa atcgtctacc cattcaacgc ggaagcacca	1140
[1786]		gatactggaa agctcgacac tttgagcctg accatcccat tgatgcgtga cggtgaaatc	1200
[1787]		gttccaggtt tgctacttt ggaagattcc cgagcgtatt tggccaagca attggtctct	1260
[1788]		ttgccatggg aaggccttgc actttctcgt gatgagcctg tgctgcacac tcgtttcgta	1320
[1789]		ggattcccgc cggctcgtta g	1341
[1790]	<210>	71	
[1791]	<211>	44	
[1792]	<212>	DNA	
[1793]	<213>	人工序列	
[1794]	<220>		
[1795]	<223>	2'NCg12431-F	
[1796]	<400>	71	
[1797]		aaggaaacac tgatatcatg aataccaatc cttctgaatt ctcc	44
[1798]	<210>	72	
[1799]	<211>	37	
[1800]	<212>	DNA	
[1801]	<213>	人工序列	
[1802]	<220>		
[1803]	<223>	2'NCg12431-R	
[1804]	<400>	72	
[1805]		gccccaaacag cctcgagcta agcgaccggc gggaatc	37

[1806]	<210>	73
[1807]	<211>	238
[1808]	<212>	PRT
[1809]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[1810]	<400>	73
[1811]	Met Arg Ile Leu Pro Ile Gly Pro His Asp Glu Ile Ala Val Asn Gly	
[1812]	1	5 10 15
[1813]	Ser Ile Val Leu Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Ile Val Ser Val Gly	
[1814]		20 25 30
[1815]	Pro Asp Leu Gly Thr Val Arg Val Thr Leu Glu Glu Ile Glu Ser Leu	
[1816]		35 40 45
[1817]	Gly Thr Pro Thr Ala Pro Arg Asp Leu Gly Ser Arg Glu Val Asp Ala	
[1818]		50 55 60
[1819]	Cys Val Ser Leu Leu Arg Asn Arg Glu Leu Val Arg Phe Asp Pro His	
[1820]	65	70 75 80
[1821]	Asp Gly Ser Glu Leu Thr Tyr Arg Glu His Ser Val Ala Tyr Gly Ala	
[1822]		85 90 95
[1823]	Ser Gly Lys Pro Leu Phe Pro Arg Leu Asp Pro Ala Val Ile Gly Ile	
[1824]		100 105 110
[1825]	Val Glu Leu Arg Gly Glu Asp Arg Leu Leu Leu Gly Met Asn Ala Gln	
[1826]		115 120 125
[1827]	Lys Arg Gln Arg Tyr Ser Leu Ile Ala Gly Tyr Val Ser His Gly Glu	
[1828]		130 135 140
[1829]	Ser Leu Glu Asp Ala Phe Thr Arg Glu Val Phe Glu Glu Ala Ala Arg	
[1830]	145	150 155 160
[1831]	Arg Val Ser Glu Ile Ser Tyr Val Ser Ser Gln Pro Trp Pro Ile Ser	
[1832]		165 170 175
[1833]	Gly Ser Leu Met Leu Gly Met Lys Gly Phe Thr Glu Asp Glu Leu Pro	
[1834]		180 185 190
[1835]	Gln Gly Glu Thr Asp Gly Glu Leu Ala Glu Thr Ile Trp Ala Ser Pro	
[1836]		195 200 205
[1837]	Leu Asp Ile Ile Asp Arg Lys Ile Pro Ile Ala Pro Pro Gly Ser Ile	
[1838]		210 215 220
[1839]	Ala Tyr Asp Met Ile Asn Ala Trp Ala Arg Asp Lys Gln Asn	
[1840]	225	230 235
[1841]	<210>	74
[1842]	<211>	717
[1843]	<212>	DNA
[1844]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[1845]	<400>	74
[1846]	atgagaattc ttccatcgg cccccacgat gaaatcgccg tcaacggatc aatagtcctt	60
[1847]	ctatccgagc acgacggaga catcgtatcg gtcggccccg acctcggcac ggtgcgagtt	120

[1848]	acccttgaag agatcgaaag tttaggtaca ccgacggcac cccgcgatct gggttctcgg	180
[1849]	gaagtcgacg catgcgtatc gttgctccgc aaccgcgagt tagtgcgatt cgatccccac	240
[1850]	gatggcagtg aattaaccta tcgggaacat agcgttgctt acggtgcgag tggcaagcca	300
[1851]	ttgtttcccc gattggatcc agcggtgatc ggcatttggt agctgcgagg tgaggatcgt	360
[1852]	ttgcttctgg gcatgaatgc gcagaaacgc caacgctatt cattaatgc aggttatggt	420
[1853]	tcgcatggtg agtcgctgga agacgcattc accagagaag tgttcgagga agcggcgcgc	480
[1854]	cgggtatctg agatttccta tgtgtcgtct caacctggc cgatctctgg ttcgctgatg	540
[1855]	ctgggtatga agggcttcac ggaagatgag ttgcctcaag gcgaaactga tggatgaatta	600
[1856]	gcggagacaa tctgggcttc gccactagac attatcgatc gtaagattcc gatcgcccc	660
[1857]	cccgatcga ttgcctacga catgatcaac gcctgggcgc gagataaaca aaactaa	717
[1858]	<210>	75
[1859]	<211>	36
[1860]	<212>	DNA
[1861]	<213>	人工序列
[1862]	<220>	
[1863]	<223>	0744-del-5F
[1864]	<400>	75
[1865]	ccgggatcc tctagagcag atgtgttgcg tctagc	36
[1866]	<210>	76
[1867]	<211>	26
[1868]	<212>	DNA
[1869]	<213>	人工序列
[1870]	<220>	
[1871]	<223>	0744-del-5R
[1872]	<400>	76
[1873]	ttgtcattta cctcctcgt aaatac	26
[1874]	<210>	77
[1875]	<211>	39
[1876]	<212>	DNA
[1877]	<213>	人工序列
[1878]	<220>	
[1879]	<223>	0744-del-3F
[1880]	<400>	77
[1881]	cgaggaggta aatgacaagg aagatgagtt gcctcaagg	39
[1882]	<210>	78
[1883]	<211>	36
[1884]	<212>	DNA
[1885]	<213>	人工序列
[1886]	<220>	
[1887]	<223>	0744-del-3R
[1888]	<400>	78
[1889]	gcaggtcgac tctagacaga ttaccgccca cctgag	36

[1890]	<210>	79
[1891]	<211>	238
[1892]	<212>	PRT
[1893]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[1894]	<400>	79
[1895]	Met Arg Ile Leu Pro Ile Gly Pro His Asp Glu Ile Ala Val Asn Gly	
[1896]	1	5 10 15
[1897]	Ser Ile Val Leu Leu Ser Glu His Asp Gly Asp Ile Val Ser Val Gly	
[1898]		20 25 30
[1899]	Pro Asp Leu Gly Thr Val Arg Val Thr Leu Glu Glu Ile Glu Ser Leu	
[1900]		35 40 45
[1901]	Gly Thr Pro Thr Ala Pro Arg Asp Leu Gly Ser Arg Glu Val Asp Ala	
[1902]		50 55 60
[1903]	Cys Val Ser Leu Leu Arg Asn Arg Glu Leu Val Arg Phe Asp Pro His	
[1904]	65	70 75 80
[1905]	Asp Gly Ser Glu Leu Thr Tyr Arg Glu His Ser Val Ala Tyr Gly Ala	
[1906]		85 90 95
[1907]	Ser Gly Lys Pro Leu Phe Pro Arg Leu Asp Pro Ala Val Ile Gly Ile	
[1908]		100 105 110
[1909]	Val Glu Leu Arg Gly Glu Asp Arg Leu Leu Leu Gly Met Asn Ala Gln	
[1910]		115 120 125
[1911]	Lys Arg Gln Arg Tyr Ser Leu Ile Ala Gly Tyr Val Ser His Gly Glu	
[1912]		130 135 140
[1913]	Ser Leu Glu Asp Ala Phe Thr Arg Glu Val Phe Glu Glu Ala Ala Arg	
[1914]	145	150 155 160
[1915]	Arg Val Ser Glu Ile Ser Tyr Val Ser Ser Gln Pro Trp Pro Ile Ser	
[1916]		165 170 175
[1917]	Gly Ser Leu Met Leu Gly Met Lys Gly Phe Thr Glu Asp Glu Leu Pro	
[1918]		180 185 190
[1919]	Gln Gly Val Thr Asp Gly Glu Leu Ala Glu Thr Ile Trp Ala Ser Pro	
[1920]		195 200 205
[1921]	Leu Asp Ile Ile Asp Arg Lys Ile Pro Ile Ala Pro Pro Gly Ser Ile	
[1922]		210 215 220
[1923]	Ala Tyr Asp Met Ile Asn Ala Trp Ala Arg Asp Lys Gln Asn	
[1924]	225	230 235
[1925]	<210>	80
[1926]	<211>	717
[1927]	<212>	DNA
[1928]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[1929]	<400>	80
[1930]	atgagaattc ttccattgg cccccacgat gaaatcgccg tcaacggatc aatagtcctt	60
[1931]	ctatccgagc acgatggaga catcgtatcg gtcggccccg acctcggcac ggtgcgcgtt	120



[1974]	210	215	220	
[1975]	Ala His Ala Leu Phe Thr Lys Pro Leu Val Val Ser Pro Lys Ser Thr			
[1976]	225	230	235	240
[1977]	Val Ala Val Glu Ser Asn Ser Asp Thr Ser Ala Ala Met Ala Val Met			
[1978]		245	250	255
[1979]	Asp Gly Phe Arg Pro Ile Pro Met Pro Pro Gly Ser Arg Val Glu Val			
[1980]		260	265	270
[1981]	Thr Arg Gly Glu Arg Pro Val Arg Trp Val Arg Leu Asp Ser Ser Pro			
[1982]		275	280	285
[1983]	Phe Thr Asp Arg Leu Val Ser Lys Leu Arg Leu Pro Val Thr Gly Trp			
[1984]	290	295	300	
[1985]	Arg Gly Pro Gln Lys Gln Ala Glu Asn Lys Asp Pro Arg Ser Ala Gly			
[1986]	305	310	315	320
[1987]	<210>	82		
[1988]	<211>	963		
[1989]	<212>	DNA		
[1990]	<213>	谷氨酸棒杆菌		
[1991]	<400>	82		
[1992]	atgactgcac ccacgaacgc tggggaactc aggcgagttt tgctggttcc acacaccggg	60		
[1993]	cgtttctcca atattgaatc cgccatcttg gcagccaagc tgctcgacga tgctggaatc	120		
[1994]	gatgtgaggg tgctgatcaa tgatgcagat gatccaattg cagagcactc cgtttttaggc	180		
[1995]	cgtttcaccc atgtcaggca cgctgcagac gccgctgacg gcgcagaact agttctgggtg	240		
[1996]	ctgggtggag atggcaccctt cctccgcgca gcagatatgg cccacgctgt tgatttgcct	300		
[1997]	gttctgggca tcaacctagg ccatgtggga ttcttgctg aatgggagtc tgactcaatt	360		
[1998]	gaagaggcac tcaaactgtg gatcgaccgc gattaccgta ttgaagatcg catgacctta	420		
[1999]	actgtcgttg tcttagacgg cgggtggagaa gaaatcggcc gaggctgggc tctcaatgag	480		
[2000]	gtcagtattg aaaacttaa cgcaggggga gtgctcgatg caaccctcga ggtagatgca	540		
[2001]	cgaccagttg cttcctttgg ttgcgatggc gtgctgattt ccacccaac cggctccacc	600		
[2002]	gcttatgcat ttccgccgg tggctctgta ctgtggccag aactcgatgc catcttgggtg	660		
[2003]	gttcttaata acgcccacgc gctgtttacc aaaccgctgg ttgtgagccc aaaatccacc	720		
[2004]	gtagctgtgg aatccaattc agatacttca gcagcgatgg ccgtcatgga tggtttccgt	780		
[2005]	cccattccta tgctccagg atcccgtgtt gaggtcacca ggggtgagcg tcccgtgcgt	840		
[2006]	tgggtgaggc ttgattcttc accgtttacc gaccgacttg tgagcaaatt aaggtcccc	900		
[2007]	gttaccggtt ggcggggtcc gcaaaaacag gcgaaaata aagatcccag gtcagcgggg	960		
[2008]	taa			963
[2009]	<210>	83		
[2010]	<211>	37		
[2011]	<212>	DNA		
[2012]	<213>	人工序列		
[2013]	<220>			
[2014]	<223>	NCg11358-F		
[2015]	<400>	83		

[2016]	aaggaaacac tgatatcatg actgcaccca cgaacgc	37
[2017]	<210> 84	
[2018]	<211> 35	
[2019]	<212> DNA	
[2020]	<213> 人工序列	
[2021]	<220>	
[2022]	<223> NCg11358-R	
[2023]	<400> 84	
[2024]	gccaaaacag cctcgagtta ccccgctgac ctggg	35
[2025]	<210> 85	
[2026]	<211> 319	
[2027]	<212> PRT	
[2028]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[2029]	<400> 85	
[2030]	Met Thr Ala Pro Thr Asn Ala Gly Glu Leu Arg Arg Val Leu Leu Val	
[2031]	1 5 10 15	
[2032]	Pro His Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Glu Ser Ala Ile Leu Ala Ala	
[2033]	20 25 30	
[2034]	Lys Leu Leu Asp Asp Ala Gly Ile Asp Val Arg Val Leu Ile Asn Asp	
[2035]	35 40 45	
[2036]	Ala Asp Asp Pro Ile Ala Glu His Pro Val Leu Gly Arg Phe Thr His	
[2037]	50 55 60	
[2038]	Val Arg His Ala Ala Asp Ala Ala Asp Gly Ala Glu Leu Val Leu Val	
[2039]	65 70 75 80	
[2040]	Leu Gly Gly Asp Gly Thr Phe Leu Arg Ala Ala Asp Met Ala His Ala	
[2041]	85 90 95	
[2042]	Val Asp Leu Pro Val Leu Gly Ile Asn Leu Gly His Val Gly Phe Leu	
[2043]	100 105 110	
[2044]	Ala Glu Trp Glu Ser Asp Ser Leu Glu Glu Ala Leu Lys Arg Val Ile	
[2045]	115 120 125	
[2046]	Asp Arg Asp Tyr Arg Ile Glu Asp Arg Met Thr Leu Thr Val Val Val	
[2047]	130 135 140	
[2048]	Leu Asp Gly Gly Gly Glu Glu Ile Gly Arg Gly Trp Ala Leu Asn Glu	
[2049]	145 150 155 160	
[2050]	Val Ser Ile Glu Asn Leu Asn Arg Arg Gly Val Leu Asp Ala Thr Leu	
[2051]	165 170 175	
[2052]	Glu Val Asp Ala Arg Pro Val Ala Ser Phe Gly Cys Asp Gly Val Leu	
[2053]	180 185 190	
[2054]	Ile Ser Thr Pro Thr Gly Ser Thr Ala Tyr Ala Phe Ser Ala Gly Gly	
[2055]	195 200 205	
[2056]	Pro Val Leu Trp Pro Glu Leu Asp Ala Ile Leu Val Val Pro Asn Asn	
[2057]	210 215 220	

[2058]	Ala His Ala Leu Phe Thr Lys Pro Leu Val Val Ser Pro Lys Ser Thr	
[2059]	225	230 235 240
[2060]	Val Ala Val Glu Ser Asn Ser Asp Thr Ser Ala Ala Met Ala Val Met	
[2061]		245 250 255
[2062]	Asp Gly Phe Arg Pro Ile Pro Met Pro Pro Gly Ser Arg Val Glu Val	
[2063]		260 265 270
[2064]	Thr Arg Gly Glu Arg Pro Val Arg Trp Val Arg Leu Asp Ser Ser Pro	
[2065]		275 280 285
[2066]	Phe Thr Asp Arg Leu Val Ser Lys Leu Arg Leu Pro Val Thr Gly Trp	
[2067]		290 295 300
[2068]	Arg Gly Pro Gln Lys Gln Ala Glu Asn Lys Asp Pro Arg Ser Ala	
[2069]		305 310 315
[2070]	<210>	86
[2071]	<211>	963
[2072]	<212>	DNA
[2073]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[2074]	<400>	86
[2075]	atgactgcac ccacgaacgc tggggaactc aggcgagttt tgctggttcc acacaccggg	60
[2076]	cgttcttcca atattgaatc cgccatcttg gcagccaagc tgctcgacga tgctggaatc	120
[2077]	gatgtgaggg tgctgatcaa tgatgcagat gatccaattg cagagcacc cgtttttaggc	180
[2078]	cgtttcaccc atgtcagga cgctgccgac gctgctgac gcgcagaact agttctgggtg	240
[2079]	ctgggtggag atggcacctt cctccgcgca gcagatatgg cccacgctgt tgatttgctt	300
[2080]	gttctgggca tcaacctagg ccatgtggga ttcttggctg aatgggagtc tgactcaact	360
[2081]	gaagaggcac tcaaacgtgt gatcgaccgc gattaccgta ttgaagatcg catgacctta	420
[2082]	actgtcgttg tcttagacgg cgggtggagaa gaaatcgcc gaggctgggc tctcaatgag	480
[2083]	gtcagtattg aaaacttaa ccgcagggga gtgctcgatg caaccctcga ggtagatgca	540
[2084]	cgaccagttg ctctcttgg ttgcatggc gtgctgatt ccacccaac cggctccacc	600
[2085]	gcttatgcat tttccgccg tggtctgta ctgtggccag aactcgatgc catcttgggtg	660
[2086]	gttctaata acgcccacgc gctgtttacc aaaccgctgg ttgtgagccc aaaatccacc	720
[2087]	gtagctgtgg aatccaattc agatacttca gcagcgatgg ccgtcatgga tggtttccgt	780
[2088]	cccattccta tgctccagg atcccggtt gaggtcacca ggggtgagcg tcccgtgcgt	840
[2089]	tggtgagggc ttgattcttc accgtttacc gaccgacttg tgagcaaatt aaggctcccc	900
[2090]	gttaccgggtt ggccgggtcc gcaaaaacag gcgaaaata aagatcccag gtcagcgggg	960
[2091]	taa	963
[2092]	<210>	87
[2093]	<211>	494
[2094]	<212>	PRT
[2095]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[2096]	<400>	87
[2097]	Met Thr Ser Glu Thr Leu Gln Ala Gln Ala Pro Thr Lys Thr Gln Arg	
[2098]	1	5 10 15
[2099]	Trp Ala Phe Leu Ala Val Ile Ser Gly Gly Leu Phe Leu Ile Gly Val	

[2100]	20	25	30
[2101]	Asp Asn Ser Ile Leu Tyr Thr Ala Leu Pro Leu Leu Arg Glu Gln Leu		
[2102]	35	40	45
[2103]	Ala Ala Thr Glu Thr Gln Ala Leu Trp Ile Ile Asn Ala Tyr Pro Leu		
[2104]	50	55	60
[2105]	Leu Met Ala Gly Leu Leu Leu Gly Thr Gly Thr Leu Gly Asp Lys Ile		
[2106]	65	70	75
[2107]	Gly His Arg Arg Met Phe Leu Met Gly Leu Ser Ile Phe Gly Ile Ala		
[2108]	85	90	95
[2109]	Ser Leu Gly Ala Ala Phe Ala Pro Thr Ala Trp Ala Leu Val Ala Ala		
[2110]	100	105	110
[2111]	Arg Ala Phe Leu Gly Ile Gly Ala Ala Thr Met Met Pro Ala Thr Leu		
[2112]	115	120	125
[2113]	Ala Leu Ile Arg Ile Thr Phe Glu Asp Glu Arg Glu Arg Asn Thr Ala		
[2114]	130	135	140
[2115]	Ile Gly Ile Trp Gly Ser Val Ala Ile Leu Gly Ala Ala Ala Gly Pro		
[2116]	145	150	155
[2117]	Ile Ile Gly Gly Ala Leu Leu Glu Phe Phe Trp Trp Gly Ser Val Phe		
[2118]	165	170	175
[2119]	Leu Ile Asn Val Pro Val Ala Val Ile Ala Leu Ile Ala Thr Leu Phe		
[2120]	180	185	190
[2121]	Val Ala Pro Ala Asn Ile Ala Asn Pro Ser Lys His Trp Asp Phe Leu		
[2122]	195	200	205
[2123]	Ser Ser Phe Tyr Ala Leu Leu Thr Leu Ala Gly Leu Ile Ile Thr Ile		
[2124]	210	215	220
[2125]	Lys Glu Ser Val Asn Thr Ala Arg His Met Pro Leu Leu Leu Gly Ala		
[2126]	225	230	235
[2127]	Val Ile Met Leu Ile Ile Gly Ala Val Leu Phe Ser Ser Arg Gln Lys		
[2128]	245	250	255
[2129]	Lys Ile Glu Glu Pro Leu Leu Asp Leu Ser Leu Phe Arg Asn Arg Leu		
[2130]	260	265	270
[2131]	Phe Leu Gly Gly Val Val Ala Ala Gly Met Ala Met Phe Thr Val Ser		
[2132]	275	280	285
[2133]	Gly Leu Glu Met Thr Thr Ser Gln Arg Phe Gln Leu Ser Val Gly Phe		
[2134]	290	295	300
[2135]	Thr Pro Leu Glu Ala Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Ala Leu Gly Ser		
[2136]	305	310	315
[2137]	Phe Pro Met Ser Ile Ile Gly Gly Ala Asn Leu His Arg Trp Gly Phe		
[2138]	325	330	335
[2139]	Lys Pro Leu Ile Ser Gly Gly Phe Ala Ala Thr Ala Val Gly Ile Ala		
[2140]	340	345	350
[2141]	Leu Cys Ile Trp Gly Ala Thr His Thr Asp Gly Leu Pro Phe Phe Ile		

[2142]	355	360	365
[2143]	Ala Gly Leu Phe Phe Met Gly Ala Gly Ala Gly Ser Val Met Ser Val		
[2144]	370	375	380
[2145]	Ser Ser Thr Ala Ile Ile Gly Ser Ala Pro Val Arg Lys Ala Gly Met		
[2146]	385	390	395 400
[2147]	Ala Ser Ser Ile Glu Glu Val Ser Tyr Glu Phe Gly Thr Leu Leu Ser		
[2148]	405	410	415
[2149]	Val Ala Ile Leu Gly Ser Leu Phe Pro Phe Phe Tyr Ser Leu His Ala		
[2150]	420	425	430
[2151]	Pro Ala Glu Val Ala Asp Asn Phe Ser Ala Gly Val His His Ala Ile		
[2152]	435	440	445
[2153]	Asp Gly Asp Ala Ala Arg Ala Ser Leu Asp Thr Ala Tyr Ile Asn Val		
[2154]	450	455	460
[2155]	Leu Ile Ile Ala Leu Val Cys Ala Val Ala Ala Ala Leu Ile Ser Ser		
[2156]	465	470	475 480
[2157]	Tyr Leu Phe Arg Gly Asn Pro Lys Gly Ala Asn Asn Ala His		
[2158]	485	490	
[2159]	<210>	88	
[2160]	<211>	177	
[2161]	<212>	PRT	
[2162]	<213>	谷氨酸棒杆菌	
[2163]	<400>	88	
[2164]	Met Arg Thr Ser Lys Lys Glu Met Ile Leu Arg Thr Ala Ile Asp Tyr		
[2165]	1	5	10 15
[2166]	Ile Gly Glu Tyr Ser Leu Glu Thr Leu Ser Tyr Asp Ser Leu Ala Glu		
[2167]	20	25	30
[2168]	Ala Thr Gly Leu Ser Lys Ser Gly Leu Ile Tyr His Phe Pro Ser Arg		
[2169]	35	40	45
[2170]	His Ala Leu Leu Leu Gly Met His Glu Leu Leu Ala Asp Asp Trp Asp		
[2171]	50	55	60
[2172]	Lys Glu Leu Arg Asp Ile Thr Arg Asp Pro Glu Asp Pro Leu Glu Arg		
[2173]	65	70	75 80
[2174]	Leu Arg Ala Val Val Val Thr Leu Ala Glu Asn Val Ser Arg Pro Glu		
[2175]	85	90	95
[2176]	Leu Leu Leu Leu Ile Asp Ala Pro Ser His Pro Asp Phe Leu Asn Ala		
[2177]	100	105	110
[2178]	Trp Arg Thr Val Asn His Gln Trp Ile Pro Asp Thr Asp Asp Leu Glu		
[2179]	115	120	125
[2180]	Asn Asp Ala His Lys Arg Ala Val Tyr Leu Val Gln Leu Ala Ala Asp		
[2181]	130	135	140
[2182]	Gly Leu Phe Val His Asp Tyr Ile His Asp Asp Val Leu Ser Lys Ser		
[2183]	145	150	155 160

---

[2184] Lys Arg Gln Ala Met Leu Glu Thr Ile Leu Glu Leu Ile Pro Ser Gln  
[2185] 165 170 175  
[2186] Thr