



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102796751 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 28

(21) 申请号 201210298493. 2

C12P 19/16(2006. 01)

(22) 申请日 2012. 08. 21

(71) 申请人 广西科学院

地址 530007 广西壮族自治区南宁市西乡塘
区大岭路 98 号

(72) 发明人 谢能中 黄日波 王青艳 秦艳
米慧芝 朱绮霞 申乃坤 朱婧
陆艳 曹薇 黎贞崇 陈东

(74) 专利代理机构 广西南宁公平专利事务所有
限责任公司 45104

代理人 黄永校

(51) Int. Cl.

C12N 15/56(2006. 01)

C12N 9/44(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页
序列表 2 页

(54) 发明名称

一种长野芽孢杆菌普鲁兰酶突变体 Pu1324
及其应用

(57) 摘要

一种长野芽孢杆菌普鲁兰酶突变体 Pu1324, 其获得方法是利用现代酶工程技术对来源于长野芽孢杆菌(*Pullulanibacillusnaganoensis*) 普鲁兰酶氨基酸序列进行分子改造, 通过 PCR 方法缺失原酶上的前 108 个氨基酸残基, 获得在大肠杆菌宿主中能够有效分泌表达的突变体 Pu1324。将其插入 pET-22b(+) 中构建重组载体, 导入大肠杆菌宿主进行分泌表达。该突变体基因比野生型基因小, 有利于质粒的稳定。与原酶相比, 突变体 Pu1324 在大肠杆菌宿主中能够有效分泌表达, 发酵液上清的酶活提高为原来的 24 倍, 胞内酶活则提高了 40%。采用本发明能够提高宿主的普鲁兰酶分泌表达量, 表达产物能够提高淀粉的水解效率。

1. 一种长野芽孢杆菌普鲁兰酶突变体基因 *puI324*, 其特征在于, 其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

2. 根据权利要求 1 所述的普鲁兰酶突变体基因 *puI324* 编码的蛋白质, 其特征在于, 由 818 个氨基酸组成, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

3. 根据权利要求 1 所述的普鲁兰酶突变体基因 *puI324*, 其特征在于, 该突变体是通过提取长野芽孢杆菌 (*Pullulanibacillus naganoensis*) ATCC 53909 基因组 DNA, 根据 Genbank 中已报道的基因序列为依据, 设计以下引物来获得缺失前 324 bp 碱基的突变体基因 *puI324* :

上游引物 F1 为 :GTAGAAATTCACCTGCTGTAAGTAACGC

下游引物 R1 为 :GTACTCGAGTTTACCATCAGATGGGCT 。

4. 根据权利要求 1 所述的普鲁兰酶突变体基因 *puI324* 编码的蛋白质在淀粉水解过程中的应用。

一种长野芽孢杆菌普鲁兰酶突变体 Pu1324 及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体是一种长野芽孢杆菌普鲁兰酶突变体 Pu1324 及其应用。

背景技术

[0002] 淀粉原料一般含有 60 ~ 90% 的支链淀粉,而支链淀粉所含的 4 ~ 6% 葡萄糖残基以 α -1,6-糖苷键连接。普鲁兰酶(Pullulanase, EC 3.2.1.41)是一种能够专一性切开支链淀粉分支点的 α -1,6-糖苷键,从而剪下整个侧枝,形成直链淀粉的解支酶,在改善淀粉酶对淀粉的作用效果、提高淀粉利用率、降低粮耗、提高产品质量及开发新产品方面具有相当巨大的价值,在食品、医药、纺织、生物能源等行业中有着非常重要的用途及良好的市场前景,例如可利用其生产高纯度葡萄糖和果糖、高麦芽糖浆、燃料乙醇,以及改性淀粉。

[0003] 近年来随着淀粉原料深加工工业的发展,要求酶制剂工业不断更新和完善酶的种类和性能,以满足工业生产的要求。我国自从七十年代开始便对普鲁兰酶进行研究开发,但由于酶活较低而仅限于实验室研究,目前普鲁兰酶是淀粉制糖酶系中唯一一种我国尚不能自主生产的产品。目前应用最广、产量最大的普鲁兰酶源自丹麦 Novo 公司,该公司所生产的普鲁兰酶是由嗜酸性普鲁兰芽孢杆菌(*Bacillus acidopullulyticus*)经深层发酵产生。此外,国外来源于产气克雷伯氏菌(*Klebsiella aerogenes*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和 *Bacillus deramificans* 的普鲁兰酶也得到了商业化生产。因此,我国在普鲁兰酶的研究上距离发达国家有很大差距,工业普鲁兰酶完全依赖进口,定价权掌握在少数外国公司手中,垄断的市场供应导致了国内普鲁兰酶高昂的销售价格,极大的限制了国内相关产业的发展。

[0004] 为了改变我国对进口产品的依赖,寻找一条国产化的道路,本研究使用酶工程技术开发有自主知识产权的高性能普鲁兰酶,并利用基因工程技术构建基因工程菌株进行分泌表达,为工业化大规模生产普鲁兰酶打下坚实基础。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种长野芽孢杆菌普鲁兰酶突变体 Pu1324 及其应用。

[0006] 本发明所述的新的普鲁兰酶突变体 Pu1324(SEQ ID NO. 2),其是通过分子改造长野芽孢杆菌普鲁兰酶基因(GenBank 序列号 JN872757.1)而得到的,具体是利用现代酶工程技术缺失野生型基因上的前 324 个碱基,改造得到一个新的普鲁兰酶突变体 Pu1324。与原酶相比,这个突变体在大肠杆菌宿主中能够有效分泌表达,发酵液上清是原酶的 24 倍,胞内酶活则提高了 40%,其性质有利于降低普鲁兰酶的生产成本,更加适合于工业化生产。

[0007] 一种长野芽孢杆菌普鲁兰酶突变体基因 *pu1324*,其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

[0008] 所述的普鲁兰酶突变体基因 *pu1324* 编码的蛋白质,由 818 个氨基酸组成,其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示。

[0009] 所述的普鲁兰酶突变体基因 *pu1324*, 该突变体是通过提取长野芽孢杆菌 (*Pullulanibacillus naganensis*) ATCC 53909 基因组 DNA, 根据 Genbank 中已报道的基因序列为依据, 设计以下引物来获得缺失前 324 bp 碱基的突变体基因 *pu1324* :

上游引物 F1 为 :GTAGAATTCACCTGCTGTAAGTAACGC

下游引物 R1 为 :GTACTCGAGTTTACCATCAGATGGGCT

所述的普鲁兰酶突变体基因 *pu1324* 编码的蛋白质在淀粉水解过程中的应用。

[0010] 本发明还涉及含有本发明普鲁兰酶突变体 Pu1324 的宿主。

[0011] 本发明所述的新的普鲁兰酶突变体 Pu1324, 该突变体酶在淀粉水解中的具有广泛的用途。

[0012] 其特殊在于与原酶相比, 突变体 Pu1324 在大肠杆菌宿主中能够有效的分泌表达, 发酵液上清的酶活提高为原来的 24 倍, 胞内酶活则提高了 40%。突变体基因 *pu1324* 比野生型基因小, 有利于质粒的稳定。

[0013] 本发明所述的新的普鲁兰酶突变体 Pu1324 的制备方法包括普鲁兰酶突变体基因 *pu1324* 的获得、普鲁兰酶突变体基因的表达、普鲁兰酶突变体酶活的测定等步骤, 具体如下:

(1) 普鲁兰酶突变体基因 *pu1324* 的获得

根据普鲁兰酶基因序列信息, 从原基因 (GenBank 序列号 JN872757. 1) 的 325 位碱基开始设计引物来进行改造。以长野芽孢杆菌基因组 DNA 为模版, 使用上游引物 F1 :5' - GTAGAATTCACCTGCTGTAAGTAACGC - 3' (SEQ ID NO. 1, 包含一个 *EcoR* I 酶切位点) 和下游引物 R1 :5' - GTACTCGAGTTTACCATCAGATGGGCT - 3' (SEQ ID NO. 2, 包含一个 *Xho* I 酶切位点), 通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增普鲁兰酶突变体基因。

[0014] (2) 重组质粒的构建与验证

用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 对普鲁兰酶突变体基因进行双酶切, 与同样经过双酶切的 pET-22b (+) 连接得到 pET22b-*pu1324*, 转化宿主 *E. coli* DH5 α , 提取重组质粒进行酶切验证, 并进一步进行 DNA 测序分析确定正确的转化子。

[0015] (3) 基因工程菌株的构建:

将验证正确的重组质粒转化 *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞 (CaCl₂ 化学法转化) 内, 利用菌落 PCR 的方法验证阳性转化子 *E. coli* BL21 (DE3) / pET22b-*pu1324*。经测定, 发酵液上清的粗酶液酶活力为野生型的 24 倍, 胞内酶活则提高了 40%。

[0016] 本发明的突出的实质性特点和技术效果在于:

[0017] 本发明利用现代酶工程技术缺失长野芽孢杆菌普鲁兰酶基因上的前 324 个碱基, 改造得到一个新的普鲁兰酶突变体 Pu1324。该突变体基因比野生型基因小, 有利于质粒的稳定。与原酶相比, 普鲁兰酶突变体 Pu1324 在大肠杆菌宿主中能够有效分泌表达, 发酵液上清的酶活提高为原来的 24 倍, 胞内酶活则提高了 40%, 其性质有利于降低普鲁兰酶的生产成本, 更加适合用于工业化生产。

具体实施方式

[0018] 本发明使用的长野芽孢杆菌菌种可以从菌种保藏中心购买, 也可以通过野外采集

或者其他途径获得。本发明采用的微生物培养、基因克隆、表达技术和相关的技术方案是本领域中常用的成熟技术,涉及的专业术语也是本领域中常见的专业术语,因此本发明的文本对于本领域的专业人员来说是显而易见的。下面结合实施例对本发明的技术内容作进一步说明,该实施例是说明性的,而不是限定性的,不能被解释为限定本发明的保护范围。

[0019] 下面将通过实施例对本发明作详细描述:

(1) 普鲁兰酶突变体基因 *pu1234* 和 *pu1324* 的获得

长野芽孢杆菌(*Pullulanibacillus naganensis*) ATCC 53909 从德国微生物菌种保藏中心购买,根据该菌的普鲁兰酶基因序列信息,分别从原基因的 235、325 位碱基开始设计引物:

上游引物 F2 :5' - GTAGAATTCCATCGATTTAAGCAAAGG - 3'

上游引物 F1 :5' - GTAGAATTCACCTGCTGTAAGTAACGC - 3'

下游引物 R1 :5' - GTACTCGAGTTTACCATCAGATGGGCT - 3'

其中上游引物包含一个 *EcoR* I 酶切位点(下划线),下游引物包含一个 *Xho* I 酶切位点(下划线)。以 *Pullulanibacillus naganensis* ATCC 53909 基因组为模版进行 PCR 扩增。反应体系为: ddH₂O 41.5 μL, 10×buffer 5 μL, dNTP (2.5 mmol/L) 1 μL, 上下游引物 (20 μmol/L) 各 0.5 μL, DNA 模板 1 μL, 高保真 DNA 聚合酶 0.5 μL。PCR 扩增条件为: 94° C 大变性 5 min, 94° C 变性 20 s, 61° C 退火 40 s, 72° C 延伸 3 min, 30 个循环, 最后 72° C 延伸 10 min。利用上游引物 F2 和下游引物 R1 可扩增得到 *pu1234* 基因, 而利用上游引物 F1 和下游引物 R1 可扩增得到 *pu1324* 基因。

[0020] 将所得到的扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,检测到扩增产物大小与目的基因片段大小完全吻合。PCR 产物用 DNA 纯化试剂盒(天根公司)进行纯化。具体步骤参考 DNA 产物纯化试剂盒说明书。用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 对纯化的普鲁兰酶突变体基因进行双酶切,与同样经过双酶切的 pET-22b(+) 连接得到 pET22b-*pu1234* 和 pET22b-*pu1324*, 转化宿主 *E. coli* DH5α, 提取重组质粒进行酶切验证,并进一步进行 DNA 测序分析确定正确的转化子。

[0021] 将验证正确的重组质粒转化 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞(CaCl₂ 化学法转化)内,利用菌落 PCR 的方法验证阳性转化子 *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*pu1234* 和 *E. coli* BL21(DE3)/pET22b-*pu1324*。将构建成功的基因工程菌株接种于 5 mL 液体 LB 培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素),37° C 培养 10 h。取 0.5 mL 的液体种子接种 50 mL 液体 LB 培养基(含 100 μg/mL 氨苄青霉素),37° C 培养 2-3 h,当 OD₆₂₀ 为 0.4 左右时,加入 1 mM IPTG,然后置于 37° C 进行诱导,时间 12 h。

[0022] 本发明采用 DNS 试剂显色法测定普鲁兰酶活力。其原理为普鲁兰酶水解普鲁兰糖底物得到还原糖,还原糖与 DNS 试剂所含的 3,5-二硝基水杨酸共热后产生棕红色的络合物,在一定范围内其颜色的深浅与还原糖的量成正比。使用分光光度法测定吸光值即可计算出普鲁兰酶的活力。

[0023] 酶活测定的步骤为:取 1mL 发酵液 12,000r/min 离心 3min 得到上清酶液。于离心管中加入 100 μL 浓度为 1%(w/v)普鲁兰的乙酸钠缓冲液(100mM, pH4.75),然后加入 100 μL 上清酶液,60° C 水浴中保温 15min。冰浴终止反应,然后加入过量的 DNS (300 μL) 试剂,沸水浴显色 5min,冷却后测定 OD₅₄₀,即可计算出胞外酶活。菌体沉淀的菌体用 200 μL 无菌水

悬浮,加入适量Triton X-100和溶菌酶,37℃水浴30min,12,000r/min离心3min,取上清按上述方法分析胞内酶活。与原酶相比,普鲁兰酶突变体Pu1324在大肠杆菌宿主中能够有效的分泌表达,发酵液上清的酶活提高为原来的24倍,胞内酶活则提高了40%。

[0024] 在淀粉液化过程中,糖化酶则主要水解直链淀粉的 α -1,4-糖苷键。而普鲁兰酶能够专一性切开支链淀粉分支点的 α -1,6-糖苷键,从而剪下整个侧枝,形成直链淀粉便于其它淀粉酶对淀粉的作用效果,提高淀粉水解效率、降低能耗、提高产品质量及开发新产品方面具有较高的价值。在淀粉糖化过程中,适当稀释的糖化酶Dextrozyme DX催化反应0.5、1.0、1.5和2.0h,分别产生0.758、1.502、2.219和2.628g/L还原糖。当辅助加入普鲁兰酶突变体Pu1324,其它条件不变的情况下,产生的还原糖浓度提高至1.071、2.307、3.145和3.902g/L,水解效率提高幅度均大于40%。由此可见,辅助加入普鲁兰酶突变体Pu1324确实可以有效提高淀粉水解效率。

[0025] 该发明具有重要的经济效益,突变体的特殊性质有利于降低普鲁兰酶的生产成本,更加适合用于工业化生产。应该理解的是,对本领域技术人员来说,可以根据上述说明加以改进或变换,例如,所述的野生型普鲁兰酶除了来源于长野芽孢杆菌之外,还可以来源于产气克雷伯氏菌、枯草芽孢杆菌、巨大芽孢杆菌、短小芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、蜡状芽孢杆菌、*Bacillus deramificans*、*Bacillus acidopullulyticus*等菌株。所述的载体适于在枯草芽孢杆菌、地衣芽孢杆菌、毕赤酵母等宿主中表达。也可通过电转化法、原生质体转化法等将本发明的普鲁兰酶突变体转入原核或者真核宿主中,以实现普鲁兰酶突变体的表达。或者通过酶工程技术对突变体的氨基酸序列进行改造。而所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

[0026]

序列表

<110> 广西科学院

<120> 一种长野芽孢杆菌普鲁兰酶突变体Pu1324及其应用

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2457

<212> DNA

<213> 长野芽孢杆菌(*Pullulanibacillus naganoensis*)

<400> 1

```

cctgctgtaa gtaacgctta tttagatgct tccaaccaag tgttggtcaa gcttagccag      60
ccgtttactc ttggtgaagg ttcaagcggg tttacggttc atgatgacac agcaaataag      120
gatattccag ttacatctgt tagtgatgcc aatcaggtaa cggtgtttt agcagggtact      180
ttccagcata tttttggggg gagtgattgg gcaccggata atcacaatac tttactaaaa      240
aaggtgaata gcaatctcta tcaattttca ggaaatcttc ctgaaggaaa ctaccaatat      300
aaagtggctt taaatgatag ctggaataat ccgagctacc catctgataa cattaatttg      360
acagtgccag ctggtgggtgc ccatgttaca ttttcttata taccatccac ccatgctggt      420
tatgacacga ttaacaatcc taatgcggat ttacaagtag atagcagcgg tgttaagacg      480

```

gatctcgtgg cggttactct tggagaaaat cctgatgtaa gccataacct gtccattcaa 540
acagaggact atcaggcagg acaggctcata cctcgtaagg tgcttgattc atcccagtac 600
tactattccg gagatgatct cgggaatacc tatacaaaga atgcaactac ctttaaggtc 660
tgggcgccta catccactca agtaaattgtc cttctttata atagtgcac cggcgcggta 720
actaaaacgg ttccaatgac cgcacagggc catggtgtat gggagcaac agtcaaccaa 780
gaccttgaaa attggtatta catgtatgag gtaacaggac aaggctcaac ccgaacggct 840
gttgatccgt atgcaacagc tattgcacca aacggaacga gaggcattgat tgtggacct 900
gccaaaacag acccggccgg atgggagagt gacaaacata ttacgcaaaa gaatatagaa 960
gatgaagtca tctatgaaat ggatgttcgt gacttttcca tcgactctaa ttcgggtatg 1020
aaaaataaag gaaagtattt ggcacttaca gaaaaaggaa ctaaaggccc tgacaatgta 1080
aagacagggg tagattcctt aaaacaactt gggattactc atgttcagct tcagcctggt 1140
ttcgcattta atagtgtcaa tgaaaacgat ccaactcaat ataattgggg ttatgaccct 1200
cgcaactaca atgttcctga gggacaatat gctactaatg caaacggaac aactcggatt 1260
aaagagttta aggaaatggt tctttcactc catcaggacc acattggggg taatatggat 1320
gttgtttata atcatacctt tgccacgcaa atctctgact tcgataagat tgtgccagaa 1380
tattactacc gcacggatga tgctggtaac tacactaacg gctcaggtaac tggaaacgaa 1440
atcgcagccg aaagaccaat ggttcaaaaa tttattatcg attcacttaa gttttgggtc 1500
aatgagtacc acgttgacgg tttccgtttt gacttaatgg cgttgcttgg aaaagataca 1560
atgtctaaag ctgccacgca gcttcatgcc attgatccag gaattgctct ctacggtgag 1620
ccatggacag gaggaacatc cgcgctgcca gccgatcagc ttttaacaaa aggagctcaa 1680
aaaggcatgg gagggtgtgt atttaatgac aatctgcgaa acggtttgga cggcagtgtc 1740
tttgattcat ctgctcaagg ttttgcgaca ggtgctactg gtttaacgga tgctattaaa 1800
aatggagtgg aaggaagtat taatgacttc accgcttcac cagcgcagac gatcaactat 1860
gtcacaagtc atgataacta taccctttgg gacaagattg cccaaagcaa tccaaacgat 1920
tctgaagcgg atcgaattaa aatggatgag ctgctcaag cgatcgtcat gacctcacia 1980
ggcattcctt tcatgcaggg cggggaagaa atgcttcgta cgaaaggcgg caacgacaat 2040
agctataatg ctggatgatgt agtgaacgag tttgattgga gcagaaaagc tcaatatcca 2100
gatgttttca attattatag cgggctgatt catcttcgct ttgatcacc agccttcgct 2160
atgacgacag ctaatgaaat caatagccac ctccaattcc taaatagccc agagaacaca 2220
gtggcctatg aattatctga tcatgcaaat aaagatacat ggggtaatat tgtggttatt 2280
tataatccaa ataaaacggc agaaaccatt aatttgccaa gcgggaaatg ggaaatcaat 2340
gcgacgagcg gtaagggtgg agaatccaca cttggtaag cagagggcag tgttcaagtt 2400
ccaggcatat ctatgatgat tcttcatcaa gaagtaagcc catctgatgg taaatag 2457

<210> 2

<211> 818

<212> PRT

<213> 长野芽孢杆菌(*Pullulanibacillus naganoensis*)

<400> 2

PAVSNAYLDA SNQVLVKLSQ PFTLGEGSSG FTVHDDTANK DIPVTSVSDA NQVTAVLAGT 60

FQHIFGGSDW APDNHNTLLK KVNSNLYQFS GNLPEGNYQY KVALNDSWNN PSYPSDNINL	120
TVPAGGAHVT FSYIPSTHAV YDTINNPAD LQVDSSGVKT DLVAVTLGEN PDVSHTLSIQ	180
TEDYQAGQVI PRKVLDSQY YSGDDLGN YTKNATTFKV WAPTSTQVNV LLYNSATGAV	240
TKTVPMASG HGVWEATVNQ DLENWYYMYE VTGQGSTRTA VDPYATAIAP NGTRGMIVDL	300
AKTDPAGWES DKHITPKNIE DEVIYEMDVR DFSIDSNSGM KNKGKYLALT EKGTKGPDNV	360
KTGVDSLKQL GITHVQLQPV FAFNSVNEND PTQYNWGYDP RNYNVPEGQY ATNANGTTRI	420
KEFKEMVLSL HQDHIGVNMD VVYNHTFATQ ISDFDKIVPE YYYRTDDAGN YTNGSGTGNE	480
IAAERPMVQK FIIDSLKFWV NEYHVDGFRF DLMALLGKDT MSKAATQLHA IDPGIALYGE	540
PWTGGTSALP ADQLLTKGAQ KGMGVAVFND NLRNGLDGSV FDSSAQGFAT GATGLTDAIK	600
NGVEGSINDF TASPGETINY VTSHDNYTLW DKIAQSNPND SEADRIKMDE LAQAIVMTSQ	660
GIPFMQGGEE MLRTKGGNDN SYNAGDVVNE FDWSRKAQYP DVFNYYSGLI HLRLDHPAFR	720
MTTANEINSH LQFLNSPENT VAYELSDHAN KDTWGNIVVI YNPNKTAETI NLPSGKWEIN	780
ATSGKVGEST LGQAEGSVQV PGISMMILHQ EVSPSDGK	818

[0001]

序列表

<110> 广西科学院

<120> 一种长野芽孢杆菌普鲁兰酶突变体 Pul324 及其应用

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 2457

<212> DNA

<213> 长野芽孢杆菌 (*Pullulanibacillus naganensis*)

<400> 1

cctgctgtaa gtaacgetta tttagatgct tccaaccaag tgttgggtaa gcttagccag	60
cogtttactc ttggtgaagg ttcaagcggg tttacgggtc atgatgacac agcaaataag	120
gatattccag ttacatctgt tagtgatgcc aatcaggtaa cggctgtttt agcagggtact	180
ttccagcata tttttggggg gagtgattgg gcaccggata atcacaatac tttactaaaa	240
aagggtgaata gcaatctcta tcaattttca ggaaatcttc ctgaaggaaa ctaccaatat	300
aaagtggcct taaatgatag ctggaataat cggagctacc catotgataa cattaatttg	360
acagtgccag ctgggtggtc ccatgttaca ttttcttata taccatccac ccatgctggt	420
tatgacacga ttaacaatcc taatgoggat ttacaagtag atagcagcgg tgттаagacg	480
gatctcgtgg cggttactct tggagaaaat cctgatgtaa gccataccct gtccattcaa	540
acagaggact atcaggcagg acaggtoata cctcgtaagg tgcttgatc atcccagtac	600
tactattccg gagatgatct cgggaatacc tatacaaaga atgcaactac ctttaaggtc	660
tgggcgccta catccactca agtaaatgtc cttctttata atagtgaac cggcgcggta	720
actaaaacgg ttccaatgac cgcacagggc catgggtgat gggaagcaac agtcaaccaa	780
gaccttgaat attggtatta catgtatgag gtaacaggac aaggctcaac ccgaacggct	840
gttgatccgt atgcaacagc tattgcacca aacggaacga gaggcagat tgtggacct	900
gccaaaacag acccggcogg atgggagagt gacaaacata ttacgccaaa gaatatagaa	960
gatgaagtca tctatgaaat ggatgttcgt gacttttcca togactotaa ttogggtatg	1020
aaaaataaag gaaagtattt ggcacttaca gaaaaaggaa ctaaaggccc tgacaatgta	1080
aagacagggg tagattcctt aaaacaactt gggattactc atgttcagct tcagcctggt	1140
ttogcattta atagtgtcaa tgaaaacgat ccaactcaat ataattgggg ttatgacct	1200
cgcaactaca atgttcctga gggacaatat gctactaatg caaacggaac aactcggatt	1260
aaagagttta aggaaatggt tctttcactc catcaggacc acattggggg taatatggat	1320
gttgtttata atcatacctt tgccaogcaa atctctgact togataagat tgtgccagaa	1380
tattactacc gcacggatga tgctggtaac tacactaacg gctcaggtag tggaaacgaa	1440
atcgcagcgg aaagaccaat ggttcaaaaa tttattatcg attcaactaa gttttgggtc	1500
aatgagtacc acgttgacgg tttcogtttt gacttaatgg cgttgcttgg aaaagataca	1560
atgtctaaag ctgccacgca gcttcacgac attgatccag gaattgctct ctacgggtgag	1620
ccatggacag gaggaacatc cgcgctgcca gccgatcagc ttttaacaaa aggagctcaa	1680
aaaggcatgg gagtggtgtt atttaatgac aatctgcgaa aoggtttgga oggcagtgct	1740
tttgattcat ctgctcaagg ttttgcgaca ggtgctactg gtttaacgga tgctatataa	1800

[0002]

aatggagttg	aaggaagtat	taatgacttc	accgcttcac	caggcgagac	gatcaactat	1860
gtcacaagtc	atgataacta	taccctttgg	gacaagattg	cccaaagcaa	tccaaacgat	1920
tctgaagcgg	atogaattaa	aatggatgag	ctcgctcaag	cgatcgatcat	gacctcacia	1980
ggcattcctt	tcatgcaggg	cggggaagaa	atgcttcgta	cgaaaggcgg	caacgacaat	2040
agctataatg	ctggtgatgt	agtgaacgag	tttgattgga	gcagaaaagc	tcaatatcca	2100
gatgttttca	attattatag	cgggctgatt	catcttcgtc	ttgatcacc	agccttccgc	2160
atgacgacag	ctaataaat	caatagccac	ctccaattcc	taaataagcc	agagaacaca	2220
gtggcctatg	aattatctga	tcatgcaaat	aaagatacat	gggtaatat	tgtggttatt	2280
tataatccaa	ataaaaaggg	agaaaccatt	aatttgccaa	gcgggaaatg	ggaaatcaat	2340
gcgacgagcg	gtaaggtggg	agaatccaca	cttggtcaag	cagagggcag	tgttcaagtt	2400
ccaggcatat	ctatgatgat	tcttcatcaa	gaagtaagcc	catctgatgg	taaataag	2457

<210> 2

<211> 818

<212> PRT

<213> 长野芽孢杆菌 (*Pullulanibacillus naganoensis*)

<400> 2

PAVSNAYLDA	SNQVLVKLSQ	PFTLGEGSSG	FTVHDDTANK	DIPVTSVSDA	NQVTAVLAGT	60
FQHIFGGSDW	APDNHNTLLK	KVNSNLYQFS	GNLPEGNYQY	KVALNDSWNN	PSYPSDNINL	120
TVPAGGAHVT	FSYIPSTHAV	YDTINNPAD	LQVDSSGVKT	DLVAVTLGEN	PDVSHTLSIQ	180
TEDYQAGQVI	PRKVLDSQY	YYSGDDLGN	YTKNATTFKV	WAPTSTQVNV	LLYNSATGAV	240
TKTVPMTASG	HGVWEATVNQ	DLENWYMYE	VTGQGSTRTA	VDPYATAIAP	NGTRGMIVDL	300
AKTDPAGWES	DKHITPKNIE	DEVIYEMDVR	DFSIDSNSGM	KNKGKYLALT	EKGTKGPDNV	360
KTGVDSLKQL	GITHVQLQPV	FAFNSVNEND	PTQYNWGYDP	RNYNVPEGQY	ATNANGTTRI	420
KEFKEMVLSL	HQDHIGVNMD	VVYNHTFATQ	ISDFDKIVPE	YYYRTDDAGN	YTNGSGTGNE	480
IAAERPMVQK	FIIDSLKFWV	NEYHVDGFRF	DLMALLGKDT	MSKAATQLHA	IDPGIALYGE	540
PWTGGTSALP	ADQLLTKGAQ	KMGVAVFND	NLRNGLDGSV	FDSSAQGFAT	GATGLTDAIK	600
NGVEGSINDF	TASPGETINY	VTSHDNYTLW	DKIAQSNPND	SEADRIKMDE	LAQAIVMTSQ	660
GIPFMQGGEE	MLRTKGGNDN	SYNAGDVVNE	FDWSRKAQYP	DVFNYYSGLI	HLRLDHPAFR	720
MTTANEINSH	LQFLNSPENT	VAYELSDHAN	KDTWGNIVVI	YNPNKTAETI	NLPSGKWEIN	780
ATSGKVGEST	LGQAEGSVQV	PGISMILHQ	EVSPSDGK			818