[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C12N 15/01
C12N 1/20 C12P 13/04
C12P 13/08
//(C12N1/20,C12R
1: 15,1: 13,1: 19)

[12]发明专利申请公开说明书

[21]申请号 00811098.0

[43]公开日 2002年9月4日

[11]公开号 CN 1367827A

[22]申请日 2000.8.1 [21]申请号 00811098.0
[30]优先权
[32]1999.8.2 [33]US [31]60/146,350
[86]国际申请 PCT/US00/20899 2000.8.1
[87]国际公布 WO01/09306 英 2001.2.8
[85]进入国家阶段日期 2002.1.30
[71]申请人 阿彻-丹尼尔斯-米德兰公司
地址 美国伊利诺斯
[72]发明人 H·J·刘 J·M·爱丁顿 杨月琴
R·丹西 S·斯维舍
毛维颖
[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 唐伟杰

权利要求书5页 说明书21页 附图页数2页

[54]发明名称 突变细菌株的L-赖氨酸生产

[57]摘要

本发明提供新的微生物、其制备方法和用于生产氨基酸的新工艺。对 亲本细菌株的诱变和对改良提余液抗性表型的筛选使得能够分离出产生 更大量氨基酸的、具有增强生长特性的菌株。本发明的微生物是从产氨基酸的亲本菌株例如棒杆菌属或短杆菌属制备的。尤其优选产生L-赖氨 酸的亲本菌株。

ISSN1008-4274

02.01.30

权 利 要 求 书

1. 制备具有改良的提余液抗性的产氨基酸菌株 B 的方法，包括:

(a)对亲本细菌株 A 进行诱变;

(b)用含有按硫酸铵含量计至少约 1%提余液的培养基接触所述经诱变的亲本菌株 A;

(c)筛选提余液抗性细菌株 B; 和

(d)测定所述提余液抗性细菌株 B 的氨基酸生产。

2. 权利要求 1 的方法，其中对所述亲本细菌株进行随机化学诱变。

3. 权利要求 1 的方法，其中所述亲本细菌株选自:

(a)棒杆菌属的种(Corynebacterium sp.);

(b)短杆菌属的种(Brevibacterium sp.);

(c)大肠杆菌(Escherichia coli); 和

(d)芽孢杆菌属的种(Bacillus sp.)。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述细菌株 B 产生选自下组的氨基酸:

(a)甘氨酸;

(b)丙氨酸;

(c)甲硫氨酸;

(d)苯丙氨酸;

(e)色氨酸;

(f)脯氨酸;

(g)丝氨酸;

(h)苏氨酸;

(i)半胱氨酸;

(j)酪氨酸;

(k)天冬酰胺;

(l)谷氨酰胺;
(m)天冬氨酸;
(n)谷氨酸;
(o)赖氨酸;
(p)精氨酸;
(q)组氨酸;
(r)异亮氨酸;
(s)亮氨酸; 和
(t)缬氨酸。

5. 权利要求 1 的方法，其中所述亲本细菌株是产 L-赖氨酸的棒杆菌属的种。

6. 通过如下方法制备的产氨基酸细菌株 B，在该方法中:
(a)对亲本细菌株 A 进行诱变;
(b)用含有按硫酸铵含量计至少约 1% 提余液的培养基接触该经诱变的亲本菌株;
(c)从所述经诱变的亲本菌株中筛选提余液抗性细菌株 B; 并
(d)测定所述细菌株 B 的氨基酸生产。

7. 权利要求 6 的细菌株，其中该亲本细菌株 A 选自:
(a)棒杆菌属的种;
(b)短杆菌属的种;
(c)大肠杆菌; 和
(d)芽孢杆菌属的种。

8. 权利要求 7 的细菌株，其中所述细菌株 B 产生选自下组的氨基酸:
(a)甘氨酸;
(b)丙氨酸;

(c)甲硫氨酸;

(d)苯丙氨酸;

(e)色氨酸;

(f)脯氨酸;

(g)丝氨酸;

(h)苏氨酸;

(i)半胱氨酸;

(j)酪氨酸;

(k)天冬酰胺;

(l)谷氨酰胺;

(m)天冬氨酸;

(n)谷氨酸;

(o)赖氨酸;

(p)精氨酸;

(q)组氨酸;

(r)异亮氨酸;

(s)亮氨酸; 和

(t)缬氨酸。

9. 棒杆菌属菌株，其在生长于含有至少约 1%提余液的培养基中时，24小时内产生至少约 10g/l L-赖氨酸。

10. 短杆菌属菌株，其在生长于含有至少约 1%提余液的培养基中时，24 小时内产生至少约 10g/l L-赖氨酸。

11. 产 L-赖氨酸的细菌株，其中所述菌株选自:

(a)NRRL B-30059;

(b)NRRL B-30060;

(c)NRRL B-30061;

(d)NRRL B-30062;

(e)NRRL B-30063; 和

(f)(a)、(b)、(c)、(d)或(e)的突变株。

12. 权利要求 11 的菌株，其中所述菌株是 NRRL B-30059。

13. 权利要求 11 的菌株，其中所述菌株是 NRRL B-30060。

14. 权利要求 11 的菌株，其中所述菌株是 NRRL B-30061。

15. 权利要求 11 的菌株，其中所述菌株是 NRRL B-30062。

16. 权利要求 11 的菌株，其中所述菌株是 NRRL B-30063。

17. 用于氨基酸生产的工艺，包括:

(a)在含有提余液的培养基中培养细菌 B，其中所述菌株是通过如下方法获得的:

(i) 选择产氨基酸的亲本细菌株 A;

(ii) 对所述亲本菌株进行诱变;

(iii) 从所述经诱变的亲本菌株中筛选具有改良的提余液抗性的细菌株 B; 和

(b)从该培养基中回收该氨基酸。

18. 权利要求 17 的工艺，其中培养基中提余液的浓度为按硫酸铵含量计至少约 1%。

19. 权利要求 17 的工艺，其中产生的 L-赖氨酸量为 24 小时内至少约 10 克/升 L-赖氨酸。

20. 权利要求 17 的工艺，其中提余液在培养基中的浓度为按硫酸铵含量计至少约 1%，而产生的 L-赖氨酸量为 24 小时内至少约 10 克/升 L-赖氨酸。

21. 权利要求 17 的工艺，其中该提余液的浓度为按硫酸铵含量计约 5%，而产生的 L-赖氨酸量为 24 小时内至少约 10 克/升 L-赖氨酸。

22. 权利要求 17 的工艺，其中细菌 B 选自:

(a)棒杆菌属的种;

(b)短杆菌属的种;

(c)大肠杆菌; 和

(d)芽孢杆菌属的种。

23. 权利要求 22 的工艺，其中细菌 B 是选自下组的棒杆菌属菌株:

(a)NRRL B-30059;

(b)NRRL B-30060;

(c)NRRL B-30061;

(d)NRRL B-30062;

(e)NRRL B-30063; 和

(f)(a)、(b)、(c)、(d)或(e)的突变株。

02.01.30

说　明　书

突变细菌株的L-赖氨酸生产

发明背景

发明领域

本发明涉及微生物学和微生物遗传学领域。更具体地，本发明涉及在氨基酸的发酵生产中有用的新菌株、方法和工艺。

相关技术

在意识到棒杆菌(Corynebacterium)可用于氨基酸的发酵生产(S. Kinoshita等，国际酶化学讨论会的会报(Proceedings of International Symposium on Enzyme Chemistry) 2:464-468 (1957))之后，工业生产L-赖氨酸成为经济上重要的工业生产方法。商业生产这种必需氨基酸主要是利用革兰氏阳性菌谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum)、黄色短杆菌(Brevibacterium flavum)和乳发酵短杆菌(Brevibacterium lactofermentum)来实现的(Kleemann, A.等，“氨基酸(Amino Acids)”，《Ullmann氏工业化学百科全书》(ULLMANN'S ENCYCLOPEDIA OF INDUSTRIAL CHEMISTRY)，第2卷，第57-97页，Weinham: VCH-Verlagsgesellschaft (1985))。目前，这些生物每年产生约250,000吨L-赖氨酸。

通过分离产生更大量L-赖氨酸的突变菌株可以增加商业生产L-赖氨酸的效率。在生产氨基酸的微生物工艺中使用的微生物可划分为4类：野生型菌株、营养突变株、调节突变株(regulatory mutant)和营养缺陷型调节突变株(K. Nakayama等，《食物和食用蛋白质的营养改良》(Nutritional Improvement of Food and Feed Proterins)，M. Friedman编，(1978)，第649-661页)。棒杆菌和相关生物的突变株使得可以廉价地从便宜的碳源如糖蜜(mollasses)、乙酸和乙醇通过直接发酵生产氨基酸。此外，通过发酵产生的氨基酸的立体专一性(L型异构体)使得该方法

优于合成方法。

考虑到通过发酵方法生产 L-赖氨酸在经济上的重要性，明显地为了增加产生的 L-赖氨酸的总量和降低生产成本，目前已对赖氨酸合成的生物化学途径进行了深入研究（最近 Sahm 等，Ann. N. Y. Acad. Sci. 782: 25-39 (1996)对此作了综述）。L-天冬氨酸是进入赖氨酸途径的开端（见图 1），其本身通过草酰乙酸的转氨基作用产生。谷氨酸棒杆菌的特殊性质在于它能通过两个不同的途径，即通过涉及琥珀酰化中间物的反应或通过二氨基庚二酸脱氢酶介导的单一反应，将赖氨酸的中间物哌啶 2,6-二羧酸转化为二氨基庚二酸。总的来说，可在两点上调节进入该途径的碳流：首先，通过 L-苏氨酸和 L-赖氨酸水平对天冬氨酸激酶的反馈抑制；其次，通过对二氢吡啶二羧酸合成酶水平的控制。由此，可以通过下调和增加这两个酶的活性在棒杆菌中增加 L-赖氨酸的产生。

除了导致 L-赖氨酸合成的生化途径外，近来的证据指出 L-赖氨酸向细胞外培养基中的运输是开发超量产生赖氨酸的谷氨酸棒杆菌菌株的另一考虑因素。Kramer 和同事的研究指出，由于膜渗漏造成的赖氨酸向细胞外的被动运输不是赖氨酸外流的唯一解释；他们的数据提示了具有如下性质的特殊载体：(1)该转运蛋白对赖氨酸具有相当高的 Km 值(20mM)；(2)该转运蛋白是 OH^- 同向转运系统（摄取系统是 H^+ 反向转运系统）；和(3)该转运蛋白带正电荷，而且膜电位刺激分泌(S. Broer 和 R. Kramer, Eur. J. Biochem. 202:137-143 (1991))。

本领域已知几种利用分离出的具有营养缺陷或抗性性质的各种菌株生产 L-赖氨酸的发酵方法：美国专利 2,979,439 公开了需要高丝氨酸（或甲硫氨酸和苏氨酸）的突变株；美国专利 3,700,557 公开了对苏氨酸、甲硫氨酸、精氨酸、组氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸、胱氨酸或半胱氨酸有营养需求的突变株；美国专利 3,707,441 公开了对赖氨酸类似物具有抗性的突变株；美国专利 3,687,810 公开了能够产生 L-赖氨酸并具有杆菌肽、青霉素 G 或多粘菌素抗性的突变株；美国专利 3,708,395 公开了对高丝氨酸、苏氨酸、苏氨酸和甲硫氨酸、亮氨酸、异亮氨酸或它们的混合物具有营养需求并对赖氨酸、苏氨酸、异亮氨酸或其类似物

具有抗性的突变株；美国专利 3,825,472 公开了对赖氨酸类似物具有抗性的突变株；美国专利 4,169,763 公开了产生 L-赖氨酸并对至少一种天冬氨酸类似物和磺胺类药剂具有抗性的棒杆菌属突变菌株；美国专利 5,846,790 公开了在缺少任何的生物素作用抑制剂的情况下能够产生 L-谷氨酸和 L-赖氨酸的突变菌株；美国专利 5,650,304 公开了对 4-N-(D-丙氨酰基)-2,4-二氨基-2,4-二脱氧-L-阿拉伯醣 2,4-二脱氧-L-阿拉伯醣或其衍生物具有抗性的、产 L-赖氨酸的棒杆菌属或短杆菌属菌株。

在利用棒杆菌发酵生产 L-赖氨酸的领域中，更近来的发展涉及到采用分子生物学技术增加赖氨酸的生产。提供以下实例作为此领域的例证：美国专利申请 4,560,654 和 5,236,831 公开了通过用重组 DNA 分子转化对 S-(2-氨基乙基)-半胱氨酸敏感的宿主棒杆菌属或短杆菌属微生物获得的产 L-赖氨酸突变菌株，在所述重组 DNA 分子中赋予 S-(2-氨基乙基)-半胱氨酸抗性和赖氨酸生产能力的 DNA 片段被插入载体 DNA 中；美国专利申请 5,766,925 公开了通过在具有渗漏型高丝氨酸脱氢酶的棒杆菌属细菌或高丝氨酸脱氢酶基因缺陷型棒杆菌属细菌的染色体 DNA 中整合编码天冬氨酸激酶的基因产生的突变菌株，其中所述天冬氨酸激酶来源于棒杆菌并对 L-赖氨酸和 L-苏氨酸的反馈抑制不敏感。

可以对打算利用细菌突变株的许多方法进行设计，以便减弱细菌的生长并由此通过补加其它营养物质来增加氨基酸的产量。通常，设计用以提高来自底物（例如葡萄糖）的氨基酸产量百分数的突变株也将丧失如同其野生型菌株一样的极强生长能力。除了导致氨基酸产量的整体下降外，这些突变株还需要更多的营养物质来支持其生长，这就会显著地增加生产的成本。

因此，开发能够以低生产成本最大化地产生特定氨基酸的新的产氨基酸细菌株是本领域中一直存在的需要。鉴于这些问题，一种可替代的方法包含采用特殊的突变株和培养基以增加生产力并降低成本。

发明概述

广义上，本发明提供具有改良的提余液（raffinate）抗性和改良的

生长性质的新微生物，这使得可以产生更大产量的氨基酸。

本发明的第一个目的是提供制备产氨基酸能力增强的微生物的新方法。在本发明的第一个实施方案中，提供制备新菌株的方法，该方法通过诱变产氨基酸的亲本细菌株，然后筛选具有改良提余液抗性的本发明菌株来实现。在本发明的一个更为具体的实施方案中，这些方法涉及产氨基酸的亲本细菌株例如棒杆菌（Corynebacterium）和短杆菌（Brevibacterium）。一个尤其有利的实施方案涉及制备具有改良提余液抗性的产氨基酸细菌株的方法，该细菌株是产L-赖氨酸的短杆菌属菌株。

本发明的另一目的涉及具有改良提余液抗性和改良生长特性的、产生更大量氨基酸的新细菌株。在第一个实施方案中，通过如下方法制备本发明细菌株，其中对亲本细菌株进行诱变然后筛选具有改良的提余液抗性、改良的生长特性和氨基酸生产增加的突变后代细菌。一个更为具体的实施方案涉及具有改良的提余液抗性、改良的生长特性和氨基酸生产增加的新棒杆菌属或短杆菌属微生物。本发明尤其有利的实施方案涉及产生大量L-赖氨酸的短杆菌。最为有利的实施方案涉及菌株ADM L63.148 (NRRL B-30059)、ADM L64.132 (NRRL B-30060)、ADM L69.53 (NRRL B-30061)、ADM L69.74 (NRRL B-30062)、和ADM L69.100 (NRRL B-30063)、或它们的突变株。

本发明的第三个目的是提供生产氨基酸的工艺，包括步骤：(a)在含有提余液的培养基中培养细菌和(b)从该培养基中回收氨基酸。在一个优选实施方案中，步骤(a)的培养细菌是通过如下方法获得的，在该方法中对产氨基酸的亲本细菌株进行诱变并筛选具有改良的提余液抗性、改良的生长特性和氨基酸生产增加的后代。有利的实施方案涉及利用棒杆菌或短杆菌生产氨基酸的工艺。氨基酸生产工艺的本发明尤其有利的实施方案利用产L-赖氨酸的短杆菌。

应当理解，前述一般描述和之后的详细描述仅是示例性和解释性的，旨在对要求保护的本发明作进一步解释。

附图简述

图 1. A）棒杆菌中导致 L-赖氨酸产生的生化途径的示意图；B）棒杆菌中导致 L-异亮氨酸产生的生化途径的示意图。

优选实施方案的详述

1. 定义

为了清晰和一致地理解说明书和权利要求，包括给定这些术语的范围，提供以下定义。

高产衍生物：本文所用该术语是指当与其来源的亲本菌株比较时从右旋糖产生更高产量的特定氨基酸的微生物菌株。

突变：本文所用该术语是指目的核苷酸序列中的单碱基改变、插入或缺失。

操纵子：本文所用该术语是指细菌基因表达和调节的单元，包括结构基因和 DNA 中的调节元件。

亲本菌株：本文所用该术语是指接受某种形式的诱变以产生本发明微生物的微生物菌株。

表型：本文所用该术语是指取决于微生物遗传组成的可见物理特性。

提余液：本文所用该术语是指来自用于回收赖氨酸的离子交换操作的废液产品。提余液含有大量硫酸铵、L-赖氨酸、其它氨基酸、盐、和糖如异麦芽糖。采用热处理灭菌含提余液的培养基产生抑制培养物生长的氨基酸衍生物和其它代谢拮抗剂。

经热灭菌含提余液的培养基可以用于筛选对其中所含抑制培养物生长的氨基酸衍生物具有抗性；对其中所含抑制培养物生长的代谢抑制剂具有抗性；和/或对其中所含抑制培养物生长的赖氨酸降解产物和/或赖氨酸前体具有抗性的微生物，例如短杆菌或棒杆菌。

相对生长：本文所用该术语是指在一段规定时间期限内采用规定培养基通过直接比较亲本菌株和后代菌株的生长以提供对生长的评价的测量法。

诱变：本文所用该术语是指用于在 DNA 中产生突变的方法。采用“随机”诱变，突变的确切位点是不可预测的，即可以发生在微生物基因组

中的任何位置，而且造成该突变的原因是由放射或化学处理等因素引起的物理破坏。

2. 亲本细菌株的诱变

本发明提供制备产生大量氨基酸并具有改良提余液抗性的微生物的方法。通过研究，现已发现可以用提余液，即来自赖氨酸回收中离子交换操作的废液产品，替代生长和氨基酸生物合成所必需的硫酸铵。提余液含有大量硫酸铵、L-赖氨酸、其它氨基酸、盐、和糖如异麦芽糖。然而，在热处理灭菌培养基的过程中，提余液培养基会产生大量抑制培养物生长的氨基酸衍生物和其它代谢拮抗剂。为了克服此问题，我们设计了一种方法来筛选能够抵抗培养基中高水平的提余液并能增加其氨基酸产量的菌株。

本发明的细菌株优选通过诱变亲本细菌株然后筛选改良的提余液抗性表型来制备。亲本微生物可以选自本领域已知的对于氨基酸的发酵生产有用的任何生物；有利的亲本微生物是产生氨基酸的棒杆菌和短杆菌，最为尤其有利的生物是产 L-赖氨酸的棒杆菌和短杆菌。

在第一实施方案中，本发明提供制备具有改良提余液抗性的产氨基酸细菌株的方法，包括:

(a) 对亲本细菌株 A 进行诱变;

(b) 用含有按硫酸铵含量计至少约 1% 提余液的培养基接触所述经诱变的亲本菌株 A;

(c) 选择提余液抗性细菌株 B; 和

(d) 测定所述提余液抗性细菌株 B 的 L-赖氨酸生产。

亲本菌株的诱变可以采用本领域已知的任何随机诱变技术来进行，这些技术包括但不限于放射和化学方法。尤其优选随机化学诱变，最优选采用适合药剂如 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG)进行的诱变。

用于诱变和新细菌株筛选的一般方法是本领域所熟知的，描述于例如 J.H. Miller, 分子遗传学实验(Experiments in Molecular Genetics), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 纽约

(1972); J.H. Miller, 细菌遗传学短教程(A Short Course in Bacterial Genetics), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 纽约(1992); M. Singer 和 P. Berg, 基因和基因组(Genes & Genomes), University Science Books, Mill Valley, California (1991); J. Sambrook, E.F. Fritsch 和 T. Maniatis, 分子克隆: 实验室手册(Molecular Cloning: A Laboratory Manual), 第2版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, 纽约(1989); P.B. Kaufman 等, 生物学和医学中的分子和细胞方法手册(Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine), CRC Press, Boca Raton, Florida (1995); 植物分子生物学和生物技术中的方法 (Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology), B.R. Glick 和 J.E. Thompson 编, CRC Press, Florida (1993); 和 P.F. Smith-Keary, 大肠杆菌的分子遗传学(Molecular Genetics of Escherichia coli), The Guilford Press, 纽约, NY (1989)。

本发明菌株具有改良的提余液抗性表型, 该抗性表型是由所用选择培养基中按硫酸铵含量度量的提余液浓度确定的。在第一实施方案中, 可以在含有至少约 1%提余液的培养基中进行表型筛选。在一个最优选的实施方案中, 本发明微生物是在含有约 5%提余液的培养基中选择的。其它实例包括将含有至少约 2%、3%、4%、5%、6%、7%和 8%提余液的培养基用于改良提余液抗性菌株的筛选。

广义上, 本发明提供具有改良提余液抗性和改良生长特性、并能够产生更高产量氨基酸的新微生物。本发明方法、工艺或微生物的一个重要要素或性质与提余液抗性有关。

氨基酸发酵生产领域的技术人员熟知本文所用术语“提余液”。然而, 为了更为全面地详细描述申请人的发明, 本文提供了提余液的定义和其制备方法。

术语“提余液”与化学工程领域中的液-液提取领域有极为紧密的联系。该术语在溶剂精制中定义为“被处理的液体混合物中未被选择性溶剂溶解并且未被除去的那部分”(科学和技术术语词典(Dictionary of

Scientific and Technical Terms), Sybil P. Parker 编, McGraw-Hill (1989))。本文所用该术语与氨基酸分离过程中离子交换层析的应用相关。以与液-液抽取方法类似的方式，与离子交换层析相连使用的术语提余液是指液体混合物中未被层析树脂选择性结合的那部分。更具体地，与氨基酸的发酵生产相联系的提余液是指细胞培养基中未与层析柱结合的那部分；提余液是氨基酸的离子交换层析纯化过程中产生的液体培养基流出废液产品。典型地，本文所用提余液是指在初次对生长培养基使用离子交换树脂后产生的第一道废液产品。

多种离子交换层析方法可以用于氨基酸的纯化。典型地，利用阳离子交换树脂纯化赖氨酸。可以利用固定床或模拟移动床树脂进行离子交换层析。例如，Van Walsern 和 Thompson 描述了用于分离赖氨酸的模拟移动床技术(Van Walsem, H.J. 和 Thompson, M.C., 生物技术杂志(J. Biotechnology) 59:127-132 (1997))；美国专利 4,714,767 和 5,684,190 描述了固定床层析技术在氨基酸纯化中的使用，而且 Wolfgang 和 Prior 利用环状层析在糖的分离中实现了连续操作模式(Wolfgang, J. 和 Prior, A., 分离科学和技术(Separation Science and Technology) 32:71-82 (1997))。因此，产生提余液的具体层析方法可以不同，但定义提余液的基本原则保持不变。

仅为了举例的目的，申请人在实施例 5 中提供了用作细胞生长培养基补加物的提余液的制备细节。本领域的技术人员将明了，提余液可以根据从中分离提余液的发酵培养基中产生的具体氨基酸来定性表征；例如，当提余液分离自赖氨酸发酵培养基时可以将其称作赖氨酸提余液，当分离自甘氨酸发酵培养基时称作甘氨酸提余液，当分离自异亮氨酸发酵培养基时可以称作异亮氨酸提余液，等等。本领域的技术人员将容易明了，当本文采用一般术语提余液时，所选提余液的具体类型将取决于实施者的设计。

本文提供的实例用于对提余液，尤其是赖氨酸提余液的制备进行举例说明。对于本领域技术人员而言，很明显可以利用其它方法产生提余液。

3. 本发明改良的提余液抗性菌株

本发明的另一目的涉及具有改良的提余液抗性的产氨基酸微生物。本领域技术人员将明了，可以筛选对任何特定类型的提余液，例如甘氨酸提余液、缬氨酸提余液、异亮氨酸提余液、赖氨酸提余液等，具有改良抗性的此类微生物。在一个尤其优选的实施方案中，该微生物具有改良的赖氨酸提余液抗性。

在本发明的一个具体实施方案中，该提余液抗性微生物是通过如下方法制备的，在该方法中:

(a) 对亲本细菌株 A 进行诱变;

(b) 用含有按硫酸铵含量计至少约 1% 提余液的培养基接触该诱变亲本菌株 A;

(c) 选择提余液抗性细菌株 B; 和

(d) 测定所述提余液抗性细菌株 B 的氨基酸生产。

对亲本细菌株的选择、诱变和对具有改良提余液抗性的本发明微生物的筛选可以按前述进行。

本发明更为具体的实施方案涉及棒杆菌或短杆菌; 尤其有利的是产 L-赖氨酸的棒杆菌或短杆菌。

本发明还提供当生长在含有至少约 1% 提余液的培养基中时每 24 小时内每升产生至少约 10g L-赖氨酸的棒杆菌菌株。

本发明尤其有利的实施方案涉及产 L-赖氨酸的棒杆菌属菌株，其中所述菌株选自: NRRL B-30059、NRRL B-30060、NRRL B-30061、NRRL B-30062、NRRL B-30063 和它们的突变株。

4. 氨基酸的生产和纯化

本发明的其它实施方案涉及在含有提余液的培养基中生产氨基酸的工艺。这些工艺包括(a) 培养改良提余液抗性细菌株和(b)从培养基中回收氨基酸。

在第一个具体实施方案中，本发明提供氨基酸生产工艺，包括:

(a) 在含有提余液的培养基中培养细菌株 B，其中所述菌株是通过如

下方法获得的:

(i) 选择产生氨基酸的亲本细菌株 A;

(ii) 对所述亲本菌株 A 进行诱变;

(iii) 筛选具有改良的提余液抗性的细菌株 B; 和

(b) 从该培养基中回收氨基酸。

对亲本菌株的选择、诱变和对具有改良提余液抗性的本发明微生物的筛选可以按前述进行。

在本发明优选实施方案中，其它工艺涉及选自产 L-赖氨酸的棒杆菌属和短杆菌属微生物的亲本菌株，本发明的一个最优选实施方案涉及产 L-赖氨酸的短杆菌属亲本菌株。

本发明工艺还可以随培养本发明微生物的具体方法而改变。因此，有多种本领域已知的发酵技术可以用于本发明的氨基酸生产工艺中。

适合碳源的示例性例子包括，但不限于: 糖，如葡萄糖、果糖、蔗糖、淀粉水解物、纤维素水解物和糖蜜; 有机酸，如乙酸、丙酸、甲酸、苹果酸、柠檬酸、和反丁烯二酸; 和醇，如甘油。

适合氮源的示例性例子包括，但不限于: 氨，包括氨气和氨水; 无机或有机酸的铵盐，如氯化铵、磷酸铵、硫酸铵和乙酸铵; 和其它含氮物，包括肉膏、胨、玉米浆、酪蛋白水解物、豆饼水解物和酵母提取物。

一般地，氨基酸可以在发酵工艺如分批型或补料分批型发酵工艺中根据本发明商业性地生产。在分批型发酵中，在发酵开始时加入所有养料。在补料分批或持续补料分批型发酵中，从发酵一开始或在培养物达到某个时期后，或当供给的一或多种养料从培养液中被耗尽时，向培养物中连续不断地供给一或多种养料。持续单批的补料分批型发酵的变体是重复补料分批或补充 - 抽取式(fill-and-draw)发酵，其中在持续补给养料不时地（例如发酵罐装满时）移出发酵罐中的部分内容物。以此方式，可以更长时间地持续进行发酵。

另一发酵类型，即连续发酵或恒化培养，采用连续补给全部培养基的形式进行，并同时连续不断地或半连续地抽取培养物液体以便发酵罐中的培养液体积大约保持恒定。连续发酵在原则上可以维持无限长的时间。

在分批发酵中，生物体一直生长至培养基中的一种必需养料耗竭时，或直到发酵条件变得不利（例如，pH 降低至对微生物生长产生抑制的值）为止。在补料分批发酵中，通常采取措施（例如通过采用 pH 控制）以维持有利的生长条件，并通过向培养物中补加一或多种必需养料防止这些养料的耗竭。微生物将以养料补给速度所规定的生长速度持续生长。一般单纯一种养料，极常见的是碳源，即可限制生长。相同的原理被应用到连续发酵中，通常在供给的培养基中一种养料是受限的，而其它所有养料均过剩。受限的养料将在培养物液体中以极低的浓度，常常是无法测量到的低浓度，存在。可以采用不同类型的营养限制。最常采用的是碳源限制。其它例子有氮源造成的限制、氧造成的限制、特殊养料如维生素或氨基酸（当微生物是该化合物的营养缺陷型时）造成的限制、硫造成的限制和磷造成的限制。

回收和纯化氨基酸（尤其是 L-赖氨酸）的方法是本领域技术人员熟知的。典型地，可以在离心和过滤除去细胞后，通过阳离子交换从生长培养基中回收氨基酸。美国专利 5,684,190 描述了对 L-赖氨酸等氨基酸的回收，该回收涉及到(1) 在低于该氨基酸等电点的 pH 下将含有氨基酸的水性溶液通过第一个阳离子交换树脂以使该氨基酸吸附在树脂上，随后通过采用氢氧化铵增加 pH 以洗脱该氨基酸，产生第一溶液；和(2) 以相似的方式将此第一溶液通过第二个阳离子交换树脂以进一步清除杂质。

另一个例子可参见美国专利 4,714,767，该专利提供了一种采用系列阳离子交换树脂塔以从水性溶液中分离碱性氨基酸的方法。该方法包括依次的重复吸附和洗脱步骤，其中用于这些吸附和洗脱步骤的洗涤水是通过在随后的循环中重新循环从前一个塔的吸附步骤或洗脱步骤中排出的液体的较后部分而产生的。

从这些阳离子交换分离程序获得的洗脱物可以通过蒸发浓缩，此外蒸发还可以除去氨。然后可以采用盐酸从溶液中结晶氨基酸，产生例如 L-赖氨酸·HCl·$2H_2O$。在离心或过滤后，干燥此分离的 L-赖氨酸晶体。

实施例

实施例 1

诱变、筛选和选择

具有改良提余液抗性的微生物

对其生长受到较高浓度提余液抑制的产赖氨酸菌株如 T125、L58.23 和 96T116 进行诱变，然后回收对较高浓度提余液表现出抗性的突变株。为了进行诱变，在 B 培养基(表 1)中将细菌培养物培养至对数中期，通过离心沉淀后在 15ml 聚丙烯锥形管中将之重悬在 2ml 过滤除菌的 TM 缓冲液(Tris·HCl 6.0g/L，顺丁烯二酸 5.8g/L，$(NH_4)_2SO_4$ 1.0g/L，$Ca(NO_3)_2$ 5mg/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1g/L，$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.25mg/L，采用 KOH 调节至 pH 6.0)中。将此 2ml 细胞悬浮物与 50μl 5.0mg/L N'-硝基-N-亚硝基胍(NTG)混合，然后 30℃孵育 30 分钟。作为对照，以相似方式对未经处理的细胞悬浮物进行孵育以估计杀伤率。孵育后，向每个管中加入 10ml TM 缓冲液，并通过离心沉淀细胞，在 TM 缓冲液中洗涤细胞两次，然后将细胞重悬在 4.0ml 采用 KOH 调节至 pH 7.2 的 0.1M NaH_2PO_4（磷酸缓冲液）中。将洗涤过的细胞悬液在磷酸缓冲液中作进一步稀释，并将部分涂布在 A 培养基(表 1)平板上。30℃孵育 4-6 天后，挑取生长在 A 培养基琼脂上的菌落，并在摇瓶和发酵罐中测试其从右旋糖产生 L-赖氨酸的改良潜能。

实施例 2

菌株在提余液培养基中的生长

对于每种被测试菌株(表 2)，将 0.1ml 的冷冻培养物接种在含有 20ml 提余液培养基 C（表 1）的 250ml 带挡板瓶中，然后 30℃以 240 rpm 孵育 18 个小时。孵育后，取出 50μl 培养物，并按 1:100 的比例稀释在 0.1N HCl 溶液中。采用分光光度计测量该稀释样品在 660nm 的光密度(OD)。结果显示在表 2 中。在提余液培养基 C 中，具有改良提余液抗性(RF)的所有菌株，即 L63.148、L64.132、L69.53 和 L69.74，均比其亲本菌株，即 108T125、LS8.23 和 96T116，生长更好（更高的 OD）。

实施例 3

摇瓶发酵中右旋糖的消耗、生长、和赖氨酸的产生

对于每种菌株，将 0.1 ml 冷冻培养物接种在含有 20ml 种子培养基 C 的 250ml 带挡板瓶中，30℃以 240 rpm 孵育 18 小时。将 2ml 种子培养物接种在含有 20ml 发酵培养基 D 的 250ml 带挡板瓶中。然后在 30℃以 240 rpm 对这些摇瓶振摇 24 小时。发酵 24 小时后，取出样品用于分析。为了测量右旋糖的浓度，取出 100μl 样品，用去离子(DI)水按 1:50 稀释，然后采用 YSI 生化分析仪(Yellow Springs Instrument Co. Inc.)进行测量。用 HPLC 测定 L－赖氨酸的浓度。按实施例 2 所述进行光密度测量以检测生长。结果显示在表 3 中；所有提余液抗性菌株，L63.148、L64.132、L69.53 和 L69.74，均比其亲本菌株，108T125、L58.23 和 96T116，生长更好、更为有效地利用右旋糖、和产生更多的 L-赖氨酸。

实施例 4

在小规模的发酵罐中的生长和 L-赖氨酸产生

采用一种两阶段接种方法设置小规模的发酵。第一阶段培养基由 50.0g/l 蔗糖、3.0g/l K_2HPO_4、3.0g/l 尿素、0.5g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$、30.0g/l 豆蛋白胨、5.0g/l 酵母提取物、0.765mg/l 生物素、3.0mg/l 盐酸硫胺素、和 0.125g/l 烟酰胺组成。采用培养物接种含有 500ml 该培养基的 2 升带挡板摇瓶，30℃以 250 rpm 孵育 19 小时。此时，采用 22.5ml 该成熟的第一培养物接种第二阶段接种培养基。

在 6.6 升发酵罐中采用 3000ml 培养基制备第二阶段接种物。该培养基配方是 20.0g/l (db) 玉米浆、10.0g/l 提余液形式的硫酸铵、12.0mg/l $MnSO_4 \cdot H_2O$、3.0gml/l 生物素、3.0g/l 盐酸硫胺素、125mg/l 烟酰胺、0.5mls/l 消泡剂、和 60g/l 右旋糖，其以 360g/l 溶液的形式单独灭菌后临接种前加入发酵罐中。发酵罐在 32℃、1.2vvm 空气、600 rpm、和 7.2 的 pH 控制点下进行操作。pH 的控制通过加入 NH_3 或 NH_4OH 来实现。18－20 小时后，接种物被认为成熟，然后用于接种生产阶段的容器。

生产阶段培养基由 40g/l (db) 玉米浆、20g/l 提余液形式的硫酸铵、

12.0mg/l $MnSO_4 \cdot H_2O$、0.75mls/l 消泡剂、和 12g/l 右旋糖，其以 250g/l 溶液的形式单独灭菌后在临接种前加入。培养基配方是以包括 500ml 成熟的第二阶段培养液作为接种物的 2.1 升初始体积为基础的。操作参数如下：32℃、2.1 vvm 空气、和 7.2 的起始及控制点 pH。再次用 NH_3 或 NH_4OH 进行 pH 控制。最初以 600 rpm 振摇，在第 9 小时培养时间时增加至 700rpm，在第 19 小时的培养时间时增加至 900 rpm。根据由于右旋糖消耗引起的 pH 增加所指示的，按需要补加右旋糖和硫酸铵的混合物进行发酵。补料的制备方式是：单独灭菌 2310g 右旋糖 + 800mls 水以及含有总共 176g 硫酸铵的提余液量，然后在冷却至室温后合并这两种溶液。总的发酵时间为 48 小时。容器大小与产生第二阶段接种物所用的相同。

在小规模发酵中比较亲本菌株与上述分离物的实验结果显示在表 4 中。

实施例 5

提余液的制备

如前所述，提余液可以根据从中分离提余液的发酵培养基中产生的具体氨基酸来定性表征。此处提供的此实施例是用于制备赖氨酸提余液的。然而，本领域技术人员将明了，其它类型的提余液，例如缬氨酸或异亮氨酸提余液等，可以通过简单地以适合的发酵培养基如缬氨酸或异亮氨酸发酵培养基等开始，按相似的方式产生。

作为制备赖氨酸提余液的第一个步骤，将赖氨酸发酵生长培养基稀释到 65.5 g/l 的赖氨酸浓度。经超滤产生 40.3 g/l 赖氨酸浓度的透过物后，将该透过物浓缩到 123 g/l 赖氨酸，总固体浓度为 207 g/l。

然后将透过浓缩物添加到层析分离系统，如 Advanced Seperation Technologies Incorporated (St. Petersburg, FL)制造的 I-SEP 或 C-SEP 中。离子交换层析分离系统是本领域通常知道的，实例参见美国专利 4,808,317 和 4,764,276，这些文献以参考文献形式并入本文。由此获得的废流出液被认为是“稀释的赖氨酸提余液”溶液。该稀释的赖氨酸提余液溶液具有 5.1 的 pH，并含有 34.3g/l 硫酸铵和 2.8g/l 赖氨酸，总

固体水平为 67g/l。

将此稀释的赖氨酸提余液溶液浓缩至 295g/l 总固体。经测定的此“浓缩赖氨酸提余液”溶液的成分包括：137.9g/l 硫酸铵、14.8g/l 赖氨酸、8.7g/l 缬氨酸、8.1g/l 丙氨酸、2.4g/l 乳酸和 2.2g/l 乙酸。将此浓缩赖氨酸提余液溶液用于培养基的制备。

表

实施例部分中引用了下列表格。

表 1

实施例 1、2 和 3 中所用培养基

成分(量/L)	A	B	C	D
葡萄糖	20g		30g	68g
蔗糖		50g		
L-丙氨酸	0.5g	0.5g		
L-甲硫氨酸	0.5g	0.5g		
L-苏氨酸	0.25g	0.25g		
生物素	0.05mg	0.756mg	0.003g	0.405mg
硫胺素	0.2mg	0.003g	0.003g	
烟酰胺	0.05g	0.125g	0.125g	
Polypetone Peptone (BBL)		20g		
牛肉膏(BBL)		5g		
玉米浆[1]			20g	
提余液[2]	60g		10g	40g
尿素	2.5g	3g		50g
硫酸铵	10g			
K_2HPO_4		3g		
KH_2PO_4	1g			
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.4g	0.5g		
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.01g		0.01g	0.01g
NaCl	1g			
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.01g			
$CaCO_3$			50g	50g
琼脂	15g			
pH (高压灭菌前)	7.2	7.3	7.4	7.4

1. 玉米浆的量以每升培养基中干固体的克数来表示。

2. 提余液的量以每升培养基中硫酸铵的克数来表示。

表 2

菌株在含有提余液的培养基 C 中的生长

菌株	108T125	L63.148	L58.23	L64.132	96T116	L69.53	L69.74
类型	野生型[1]	RF[2]	野生型	RF	野生型	RF	RF
OD_{660}	15.9	27.4	27.1	34.5	22.2	31.6	30.3

1. 菌株 108T125、L58.23 和 96T116 是用于产生本发明改良提余液抗性菌株的亲本野生型菌株。
2. 菌株 L63.148、L64.123、L69.53 和 L69.74 是来源于其上述野生型亲本菌株的改良提余液抗性(RF)菌株。

表 3

在培养基 D 中经 24 小时摇瓶发酵后

菌株的右旋糖消耗(Dex)、生长(OD_{660})、和赖氨酸生产(Lys)

菌株	108T125	L63.148	L58.23	L64.132	96T116	L69.53	L69.74
类型	野生型	RF	野生型	RF	野生型	RF	RF
Dex, g/l	25.9	66.7	40.6	68.8	45.8	78.8	76.6
OD_{660}	20.5	43.2	26.3	47.9	30.5	47.4	42.8
Lys, g/l	9.4	18.8	14.1	23.3	15.5	24.6	23.2

表 4

6.6 升发酵罐中亲本和后代的

生长(OD660)和 L-赖氨酸生产的比较

菌株		OD @ 660nm	总产量[1]	g 赖氨酸/升/小时[2]
96T116	野生型	83.8	583g	5.78
L69.53	RF	112.5	776g	7.70
L69.74	RF	122.4	807g	8.01
L69.100	RF	93.3	745g	7.48

1. 总产量是指收获的发酵罐中赖氨酸的总克数。
2. 基于初始的 2.1 升体积进行计算。

02.01.30

关于保藏的微生物的说明

（PCT 实施细则第 13 条之二）

A. 以下所作的说明涉及说明书第 **4** 页第 **15** 行所指的微生物。	
B. 保藏物的标识	更多的保藏物标识见附页□
保藏单位名称： **农业研究机构保藏中心（NRRL）**	
保藏单位地址（包括邮政编码和国家）： **1815 N. University Street** **Peoria, Illinois 61604** **美国**	
保藏日期：**1998** 年 **10** 月 **14** 日	保藏编号：**NRRL B-30059**
C. 其它说明（如果不适用则留空）	该信息续在附页上□
棒杆菌属的种 ADM L63.148（Corynebacterium sp. ADM L63.148） 对于欧洲专利寻求保护的那些指定国，直到在该欧洲专利授权的记述公开以后，或该申请被驳回或撤回或视为撤回之日以后，才可获得此保藏微生物的样品，并且仅将该样品给予需要该样品的人所指定的专家(EPC 实施细则第 28 条之(4))。	
D. 本说明所适用的指定国（如果本说明不用于所有指定国）	
E. 单独提交的说明（如果不适用则留空）	
以下说明以后将提交给国际局（指明说明的一般性质，如“保藏编号”）	

本栏由受理局填写	本栏由国际局填写
☒本页和国际申请一起收到	☒国际局于以下日期收到本页： **2000** 年 **8** 月 **24** 日
核准人签字	核准人签字

PCT/RO/134 表(1992 年 7 月)

02.01.30

关于保藏的微生物的说明

（PCT 实施细则第 13 条之二）

A. 以下所作的说明涉及说明书第 4 页第 16 行所指的微生物。

B. 保藏物的标识　　更多的保藏物标识见附页□

保藏单位名称：

农业研究机构保藏中心（NRRL）

保藏单位地址（包括邮政编码和国家）：

1815 N. University Street
Peoria, Illinois 61604
美国

保藏日期：**1998 年 10 月 14 日**	保藏编号：**NRRL B-30060**

C. 其它说明（如果不适用则留空）　　该信息续在附页上□

棒杆菌属的种 ADM L64.132（Corynebacterium sp. ADM L64.132）

对于欧洲专利寻求保护的那些指定国，直到在该欧洲专利授权的记述公开以后，或该申请被驳回或撤回或视为撤回之日以后，才可获得此保藏微生物的样品，并且仅将该样品给予需要该样品的人所指定的专家(EPC 实施细则第 28 条之(4))。

D. 本说明所适用的指定国（如果本说明不用于所有指定国）

E. 单独提交的说明（如果不适用则留空）

以下说明以后将提交给国际局（指明说明的一般性质，如“保藏编号”）

本栏由受理局填写	本栏由国际局填写
☒本页和国际申请一起收到	☒国际局于以下日期收到本页： **2000 年 8 月 24 日**
核准人签字	核准人签字

PCT/RO/134 表(1992 年 7 月)

02.01.30

关于保藏的微生物的说明

（PCT 实施细则第 13 条之二）

A. 以下所作的说明涉及说明书第 **4** 页第 **16** 行所指的微生物。

B. 保藏物的标识　　更多的保藏物标识见附页□

保藏单位名称：

农业研究机构保藏中心（NRRL）

保藏单位地址（包括邮政编码和国家）：

1815 N. University Street
Peoria, Illinois 61604
美国

保藏日期：**1998** 年 **10** 月 **14** 日	保藏编号：**NRRL B-30061**

C. 其它说明（如果不适用则留空）　　该信息续在附页上□

棒杆菌属的种 ADM L69.53（Corynebacterium sp. ADM L69.53）

对于欧洲专利寻求保护的那些指定国，直到在该欧洲专利授权的记述公开以后，或该申请被驳回或撤回或视为撤回之日以后，才可获得此保藏微生物的样品，并且仅将该样品给予需要该样品的人所指定的专家(EPC 实施细则第 28 条之(4))。

D. 本说明所适用的指定国（如果本说明不用于所有指定国）

E. 单独提交的说明（如果不适用则留空）

以下说明以后将提交给国际局（指明说明的一般性质，如“保藏编号”）

本栏由受理局填写	本栏由国际局填写
☒本页和国际申请一起收到	☒国际局于以下日期收到本页： **2000** 年 **8** 月 **24** 日
核准人签字	核准人签字

PCT/RO/134 表(1992 年 7 月)

02.01.30

关于保藏的微生物的说明

（PCT 实施细则第 13 条之二）

A. 以下所作的说明涉及说明书第 4 页第 17 行所指的微生物。

B. 保藏物的标识　　更多的保藏物标识见附页☐

保藏单位名称：

农业研究机构保藏中心（NRRL）

保藏单位地址（包括邮政编码和国家）：

1815 N. University Street
Peoria, Illinois 61604
美国

保藏日期：**1998 年 10 月 14 日**	保藏编号：**NRRL B-30062**

C. 其它说明（如果不适用则留空）　　该信息续在附页上☐

棒杆菌属的种 ADM L69.74（Corynebacterium sp. ADM L69.74）

对于欧洲专利寻求保护的那些指定国，直到在该欧洲专利授权的记述公开以后，或该申请被驳回或撤回或视为撤回之日以后，才可获得此保藏微生物的样品，并且仅将该样品给予需要该样品的人所指定的专家(EPC 实施细则第 28 条之(4))。

D. 本说明所适用的指定国（如果本说明不用于所有指定国）

E. 单独提交的说明（如果不适用则留空）

以下说明以后将提交给国际局（指明说明的一般性质，如“保藏编号”）

本栏由受理局填写	本栏由国际局填写
☒本页和国际申请一起收到	☒国际局于以下日期收到本页： **2000 年 8 月 24 日**
核准人签字	核准人签字

PCT/RO/134 表(1992 年 7 月)

02.01.30

关于保藏的微生物的说明

（PCT 实施细则第 13 条之二）

A. 以下所作的说明涉及说明书第 4 页第 17 行所指的微生物。

B. 保藏物的标识　　更多的保藏物标识见附页□

保藏单位名称：

农业研究机构保藏中心（NRRL）

保藏单位地址（包括邮政编码和国家）：

1815 N. University Street
Peoria, Illinois 61604
美国

保藏日期：**1998** 年 **10** 月 **14** 日	保藏编号：**NRRL B-30063**

C. 其它说明（如果不适用则留空）　　该信息续在附页上□

棒杆菌属的种 ADM L69.100（Corynebacterium sp. ADM L69.100）

对于欧洲专利寻求保护的那些指定国，直到在该欧洲专利授权的记述公开以后，或该申请被驳回或撤回或视为撤回之日以后，才可获得此保藏微生物的样品，并且仅将该样品给予需要该样品的人所指定的专家(EPC 实施细则第 28 条之(4))。

D. 本说明所适用的指定国（如果本说明不用于所有指定国）

E. 单独提交的说明（如果不适用则留空）

以下说明以后将提交给国际局（指明说明的一般性质，如“保藏编号”）

本栏由受理局填写	本栏由国际局填写
☒本页和国际申请一起收到	☒国际局于以下日期收到本页： 2000 年 **8** 月 **24** 日
核准人签字	核准人签字

PCT/RO/134 表(1992 年 7 月)

说 明 书 附 图

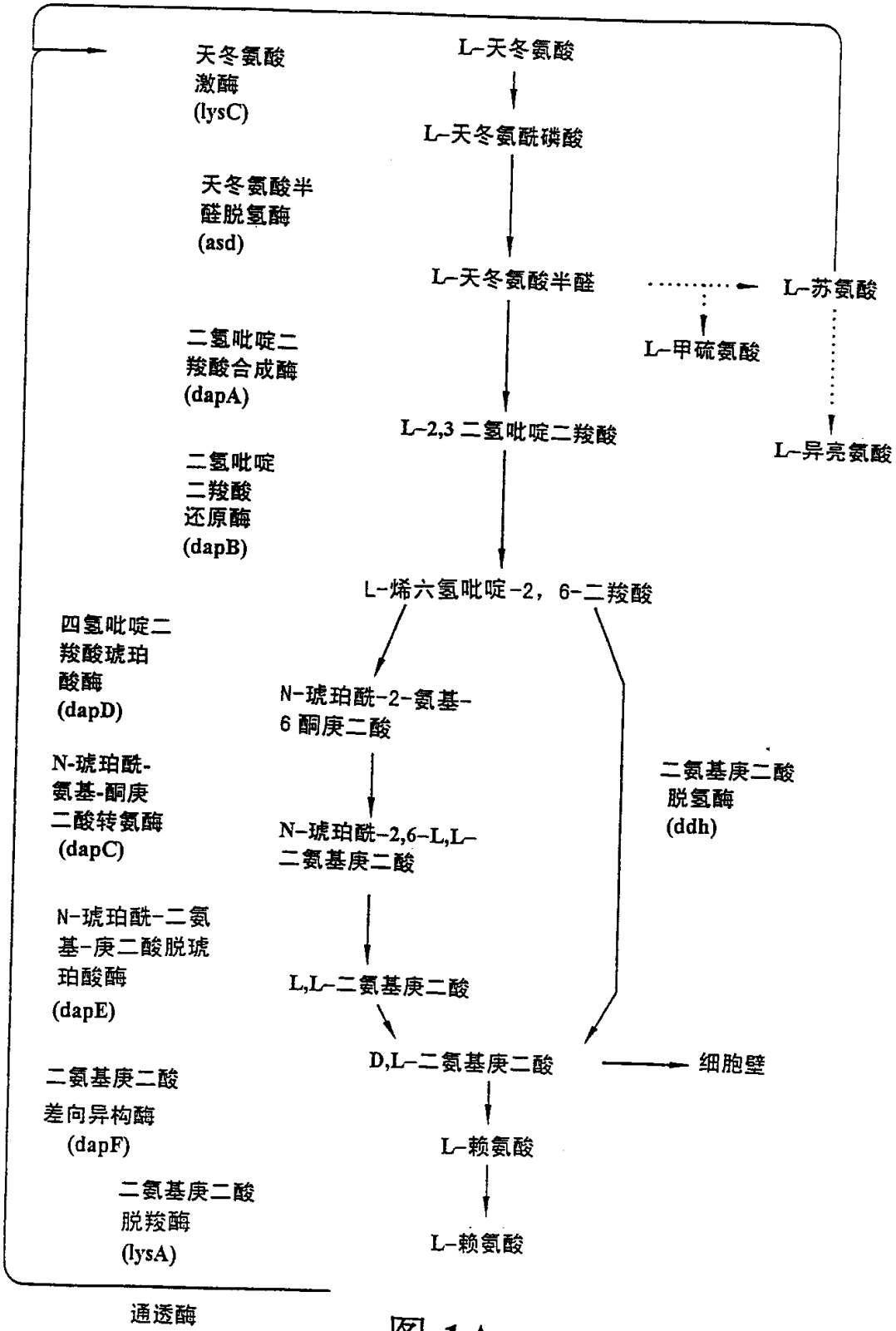

L-天冬氨酸
天冬氨酸激酶 (lysC)
L-天冬氨酰磷酸
天冬氨酸半醛脱氢酶 (asd)
L-天冬氨酸半醛
L-苏氨酸
L-甲硫氨酸
二氢吡啶二羧酸合成酶 (dapA)
L-2,3 二氢吡啶二羧酸
L-异亮氨酸
二氢吡啶二羧酸还原酶 (dapB)
L-烯六氢吡啶-2，6-二羧酸
四氢吡啶二羧酸琥珀酸酶 (dapD)
N-琥珀酰-2-氨基-6 酮庚二酸
N-琥珀酰-氨基-酮庚二酸转氨酶 (dapC)
二氨基庚二酸脱氢酶 (ddh)
N-琥珀酰-2,6-L,L-二氨基庚二酸
N-琥珀酰-二氨基-庚二酸脱琥珀酸酶 (dapE)
L,L-二氨基庚二酸
D,L-二氨基庚二酸
细胞壁
二氨基庚二酸差向异构酶 (dapF)
L-赖氨酸
二氨基庚二酸脱羧酶 (lysA)
L-赖氨酸
通透酶

图 1A

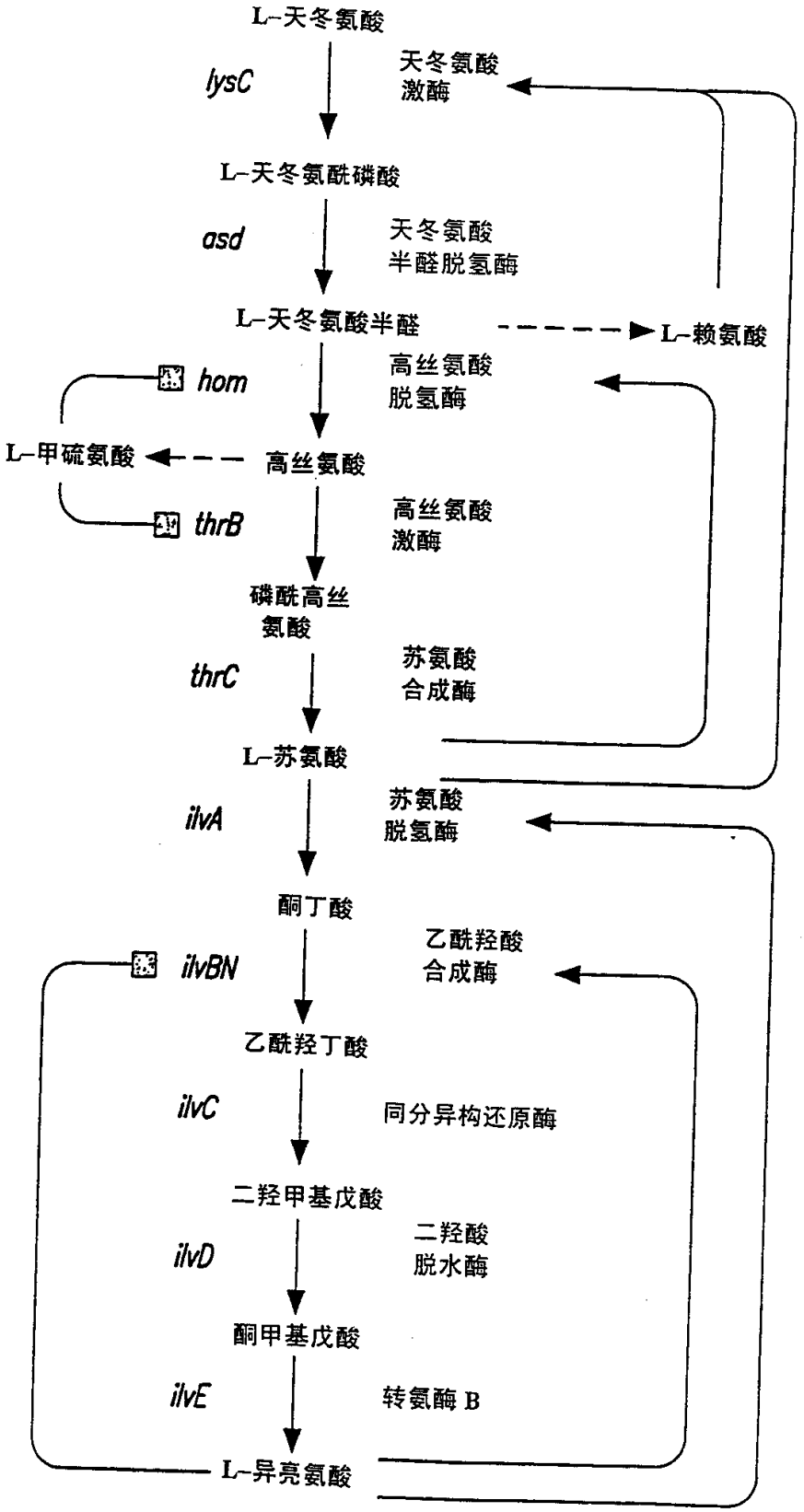

L-天冬氨酸
lysC
天冬氨酸
激酶
L-天冬氨酰磷酸
asd
天冬氨酸
半醛脱氢酶
L-天冬氨酸半醛
L-赖氨酸
hom
高丝氨酸
脱氢酶
L-甲硫氨酸
高丝氨酸
thrB
高丝氨酸
激酶
磷酰高丝
氨酸
thrC
苏氨酸
合成酶
L-苏氨酸
ilvA
苏氨酸
脱氢酶
酮丁酸
ilvBN
乙酰羟酸
合成酶
乙酰羟丁酸
ilvC
同分异构还原酶
二羟甲基戊酸
ilvD
二羟酸
脱水酶
酮甲基戊酸
ilvE
转氨酶 B
L-异亮氨酸

图 1B