



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 109937257 B

(45) 授权公告日 2023. 06. 30

(21) 申请号 201780066708.9	(72) 发明人 B.米吉茨 C.罗切 P.凯利 朝里彩香 福井启太 户矢崎未来
(22) 申请日 2017.10.26	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 109937257 A	(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105 专利代理师 张文辉
(43) 申请公布日 2019.06.25	
(30) 优先权数据 62/413,056 2016.10.26 US	(51) Int.Cl. C12N 15/77 (2006.01) C12P 7/24 (2006.01) C12N 9/14 (2006.01) A23L 27/20 (2016.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2019.04.26	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/JP2017/038796 2017.10.26	(56) 对比文件 EP 1507008 A2,2005.02.16 CN 101255431 A,2008.09.03 WO 0220806 A1,2002.03.14
(87) PCT国际申请的公布数据 W02018/079684 EN 2018.05.03	
(73) 专利权人 味之素株式会社 地址 日本东京都	审查员 袁一方 权利要求书2页 说明书53页 序列表91页

(54) 发明名称

生产目标物质的方法

(57) 摘要

提供了用于生产目标物质诸如香草醛和香草酸的方法。通过使用具有目标物质生产能力的微生物从碳源或目标物质的前体生产目标物质，所述微生物已经以S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性得以增加的方式进行了修饰。

1. 一种生产目标物质的方法,所述方法包括以下步骤:
通过使用具有生产所述目标物质的能力的微生物来生产所述目标物质,
其中所述微生物是谷氨酸棒杆菌,
其中所述微生物已经以与未修饰的菌株相比通过增加编码S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的基因的表达使S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的活性得以增加的方式进行了修饰,
其中通过修饰基因的启动子来增加编码S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的基因的表达,
其中所述S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶是包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的蛋白质,
且
其中所述目标物质是香草醛或香草酸。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生产包括:
在含有碳源的培养基中培养所述微生物以在所述培养基中生产和积累所述目标物质。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述生产包括:
通过使用所述微生物来将所述目标物质的前体转化成所述目标物质。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述转化包括:
在含有所述前体的培养基中培养所述微生物以在所述培养基中生产和积累所述目标物质。
5. 根据权利要求3所述的方法,其中所述转化包括:
在反应混合物中允许所述微生物的细胞作用于所述前体以在所述反应混合物中生产和积累所述目标物质。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述细胞是存在于所述微生物的培养液中的细胞、从所述培养液中收集的细胞、存在于所述培养液的加工产物中的细胞、存在于收集的细胞的加工产物中的细胞,或这些的组合。
7. 根据权利要求3至6中任一项所述的方法,其中所述前体选自由以下组成的组:原儿茶酸、原儿茶醛和它们的组合。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,所述方法还包括收集所述目标物质。
9. 根据权利要求1至8中任一项所述的方法,其中所述S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶是由sahH基因编码的蛋白质。
10. 根据权利要求1-9中任一项所述的方法,其中所述微生物已经以与未修饰的菌株相比参与所述目标物质的生物合成的酶的活性得以增加的方式进行了进一步修饰。
11. 根据权利要求10的方法,其中所述参与目标物质的生物合成的酶选自由以下组成的组:3-脱氧-D-阿拉伯糖-庚酮糖酸7-磷酸合酶、3-脱氢奎尼酸合酶、3-脱氢奎尼酸脱水酶、3-脱氢莽草酸脱水酶、O-甲基转移酶、芳族醛氧化还原酶和它们的组合。
12. 根据权利要求1至11中任一项所述的方法,其中所述微生物已经以与未修饰的菌株相比磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的活性得以增加的方式进行了进一步的修饰。
13. 根据权利要求1至12中任一项所述的方法,其中所述微生物已经以与未修饰的菌株相比参与除所述目标物质以外的物质的副生产的酶的活性得以降低的方式进行了进一步的修饰。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述参与除目标物质以外的物质的副生产的酶选自由以下组成的组:香草酸脱甲基酶、原儿茶酸3,4-双加氧酶、醇脱氢酶、莽草酸脱氢酶

和它们的组合。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法,其中所述微生物已经以与未修饰的菌株相比L-半胱氨酸生物合成酶的活性得以增加的方式进行了进一步修饰。

16. 根据权利要求15所述的方法,其中所述L-半胱氨酸生物合成酶是由选自以下组成的组的基因编码的蛋白质:cysI基因、cysX基因、cysH基因、cysD基因、cysN基因、cysY基因、cysZ基因、fpr2基因和它们的组合。

17. 根据权利要求15或16所述的方法,其中通过增加由cysR基因编码的蛋白质的活性来增加L-半胱氨酸生物合成酶的活性。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中所述微生物已经以与未修饰的菌株相比由NCg12048基因编码的蛋白质的活性得以降低的方式进行了进一步的修饰。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的方法,其中所述微生物已经以与未修饰的菌株相比烯醇化酶的活性得以降低的方式进行了进一步修饰。

20. 一种生产香草醛的方法,所述方法包括:

通过权利要求1至19中任一项所述的方法来生产香草酸;和

将所述香草酸转化成香草醛。

生产目标物质的方法

发明领域

[0001] 本发明涉及通过使用微生物生产目标物质,诸如香草醛和香草酸的方法。

[0002] 发明背景

[0003] 香草醛是提供香草气味的主要成分,并且用作食品、饮料、香水等中的芳香物。香草醛通常通过从天然产物中提取或通过化学合成来生产。

[0004] 已经尝试在生产香草醛的方法中尝试生物工程技术,例如通过使用各种微生物与丁香油酚、异丁香油酚、阿魏酸、葡萄糖、香草酸、椰子壳等(Kaur B.and Chakraborty D., Biotechnological and molecular approaches for vanillin production:a review.Appl Biochem Biotechnol.2013Feb;169(4):1353-72)。另外,使用生物工程技术生产香草醛的其他方法包括以糖苷生产(W02013/022881和W02004/111254),使用香草醛合酶从阿魏酸生产香草醛(JP2015-535181),通过大肠杆菌发酵来生产香草酸,然后将香草酸酶促转化为香草醛(美国专利No.6,372,461)。

[0005] S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶是作为甲基化循环的SAM循环的酶,其催化水解S-腺苷-L-高半胱氨酸(SAH)以产生L-高半胱氨酸和腺苷的反应。S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的实例可以包括SahH蛋白,其由sahH基因编码。

[0006] 发明概述

[0007] 本发明描述了用于改善目标物质诸如香草醛和香草酸的生产的新技术,因此提供了用于有效生产目标物质的方法。

[0008] 本发明的一方面是通过以S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的活性得以增加的方式修饰微生物,微生物可以以显著改善的方式生产目标物质诸如香草酸。

[0009] 本发明的一方面提供了生产目标物质的方法,所述方法包括以下步骤:通过使用具有生产所述目标物质的能力的微生物来生产所述目标物质,其中所述微生物已经以与未修饰的菌株相比S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的活性得以增加的方式进行了修饰,且其中所述目标物质选自由以下组成的组:L-甲硫氨酸、需要S-腺苷甲硫氨酸来进行生物合成的代谢物和它们的组合。

[0010] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述生产包括:在含有碳源的培养基中培养所述微生物以在所述培养基中生产和积累所述目标物质。

[0011] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述生产包括:通过使用所述微生物来将所述目标物质的前体转化成所述目标物质。

[0012] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述转化包括:在含有所述前体的培养基中培养所述微生物以在所述培养基中生产和积累所述目标物质。

[0013] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述转化包括:在反应混合物中允许所述微生物的细胞作用于所述前体以在所述反应混合物中生产和积累所述目标物质。

[0014] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述细胞是存在于所述微生物的培养液中的细胞、从所述培养液中收集的细胞、存在于所述培养液的加工产物中的细胞、

存在于收集的细胞的加工产物中的细胞,或这些的组合。

[0015] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述前体选自由以下组成的组:原儿茶酸、原儿茶醛、L-色氨酸、L-组氨酸、L-苯丙氨酸、L-酪氨酸、L-精氨酸、L-鸟氨酸、甘氨酸和它们的组合。

[0016] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,所述方法还包括收集所述目标物质。

[0017] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶是由sahH基因编码的蛋白质。

[0018] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述sahH基因编码选自由以下组成的组的蛋白质:

[0019] (a) 包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列的蛋白质,

[0020] (b) 包含SEQ ID NO:145的氨基酸序列,且该氨基酸序列包含1至10个氨基酸残基的取代、缺失、插入和/或添加的蛋白质,且其中所述蛋白质具有S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性,和

[0021] (c) 包含与SEQ ID NO:145的氨基酸序列具有90%或更高的同一性的氨基酸序列的蛋白质,且其中所述蛋白质具有S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性。

[0022] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中通过增加编码S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的基因的表达来增加S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的活性。

[0023] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中通过增加所述基因的拷贝数和/或对所述基因的表达控制序列进行修饰来增加编码S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的基因的表达。

[0024] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述微生物是属于肠杆菌科的细菌、棒状杆菌细菌或酵母。

[0025] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述微生物是属于棒状杆菌属的细菌。

[0026] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述微生物是谷氨酸棒杆菌。

[0027] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述微生物是属于埃希氏菌属的细菌。

[0028] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述微生物是大肠杆菌。

[0029] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述代谢物选自由以下组成的组:香草醛、香草酸、褪黑激素、麦角硫因、麦根酸、阿魏酸、多胺、愈创木酚、4-乙烯基愈创木酚、4-乙基愈创木酚和肌酸。

[0030] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述微生物已经以与未修饰的菌株相比参与所述目标物质的生物合成的酶的活性得以增加的方式进行了进一步修饰。

[0031] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述参与目标物质的生物合成的酶选自由以下组成的组:3-脱氧-D-阿拉伯糖-庚酮糖酸7-磷酸合酶、3-脱氢奎尼酸合酶、3-脱氢奎尼酸脱水酶、3-脱氢莽草酸脱水酶、O-甲基转移酶、芳族醛氧化还原酶和它们的组合。

[0032] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述微生物已经以与未修饰的

菌株相比磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶的活性得以增加的方式进行了进一步的修饰。

[0033] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述微生物已经以与未修饰的菌株相比参与除所述目标物质以外的物质的副生产的酶的活性得以降低的方式进行了进一步的修饰。

[0034] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述参与除目标物质以外的物质的副生产的酶选自以下组成的组:香草酸脱甲基酶、原儿茶酸3,4-双加氧酶、醇脱氢酶、莽草酸脱氢酶和它们的组合。

[0035] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述微生物已经以与未修饰的菌株相比L-半胱氨酸生物合成酶的活性得以增加的方式进行了进一步修饰。

[0036] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述L-半胱氨酸生物合成酶是由选自以下组成的组的基因编码的蛋白质:cysI基因、cysX基因、cysH基因、cysD基因、cysN基因、cysY基因、cysZ基因、fpr2基因和它们的组合。

[0037] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中通过增加由cysR基因编码的蛋白质的活性来增加L-半胱氨酸生物合成酶的活性。

[0038] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述微生物已经以与未修饰的菌株相比由NCgl2048基因编码的蛋白质的活性得以降低的方式进行了进一步的修饰。

[0039] 本发明的另一方面提供了如上文描述的方法,其中所述微生物已经以与未修饰的菌株相比烯醇化酶的活性得以降低的方式进行了进一步修饰。

[0040] 本发明的另一方面提供了生产香草醛的方法,所述方法包括:通过如上文所述的方法来生产香草酸;和将所述香草酸转化成香草醛。

[0041] 发明详述

[0042] <1>微生物

[0043] 如本文所述的微生物是具有生产目标物质的能力的微生物,所述微生物已经以S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的活性得以增加的方式进行了修饰。生产目标物质的能力也可以称为“目标物质生产能力”。

[0044] <1-1>具有目标物质生产能力的微生物

[0045] 短语“具有目标物质生产能力的微生物”可以指能够生产目标物质的微生物。

[0046] 短语“具有目标物质生产能力的微生物”可以指在微生物用于发酵方法的情况下能够通过发酵生产目标物质的微生物。也就是说,短语“具有目标物质生产能力的微生物”可以指能够从碳源生产目标物质的微生物。具体而言,短语“具有目标物质生产能力的微生物”可以指当在含有碳源的培养基等培养基中培养时能够在培养基中以一定程度生产并积累目标物质,从而可以从培养基中收集目标物质的微生物。

[0047] 短语“具有目标物质生产能力的微生物”还可以指在将微生物用于生物转化方法的情况下能够通过生物转化生产目标物质的微生物。也就是说,短语“具有目标物质生产能力的微生物”可以指能够从目标物质的前体生产目标物质的微生物。具体而言,短语“具有目标物质生产能力的微生物”可以指当在含有目标物质的前体的培养基中培养时,能够在培养基中以一定程度生产并积累目标物质,从而可以从培养基中收集目标物质的微生物。具体而言,短语“具有目标物质生产能力的微生物”还可以指能够在被允许作用于反应混合物中的目标物质的前体时在反应混合物中以一定程度生产和积累目标物质,从而可以从反

应混合物中收集目标物质的微生物。

[0048] 具有目标物质生产能力的微生物可以是能够在培养基或反应混合物中以比用非修饰菌株可以获得的量更大的量生产和积累目标物质的微生物。非修饰的菌株也可以称为“非修饰的微生物的菌株”。短语“非修饰微生物的菌株”或“非修饰的菌株”可以指尚未以S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的活性得以增加的方式进行修饰的对照菌株。具有目标物质生产能力的微生物可以能够在培养基或反应混合物中以例如0.01g/L以上、0.05g/L以上或0.09g/L以上的量积累目标物质。

[0049] 目标物质可以选自L-甲硫氨酸和需要S-腺苷甲硫氨酸(SAM)进行生物合成的代谢物。需要SAM进行生物合成的代谢物的实例可以包括例如香草醛、香草酸、褪黑激素、麦角硫因、麦根酸、阿魏酸、多胺、愈创木酚、4-乙烯基愈创木酚、4-乙基愈创木酚和肌酸。微生物可以能够仅产生一种目标物质的能力,或者可以能够产生两种或更多种目标物质的能力。此外,微生物可以能够从目标物质的一种前体或目标物质的两种或更多种前体产生目标物质的能力。

[0050] 当目标物质是能够形成盐的化合物时,目标物质可以作为游离化合物,其盐或它们的混合物获得。也就是说,除非另有说明,术语“目标物质”可以指游离形式的目标物质、其盐或其混合物。盐的实例可以包括例如硫酸盐,盐酸盐,碳酸盐,铵盐,钠盐和钾盐。作为目标物质的盐,可以使用一种盐,或者可以组合使用两种或更多种盐。

[0051] 可以用作亲本菌株以构建如本文中描述的微生物的微生物没有特别限制。微生物的实例可以包括细菌和酵母。

[0052] 细菌的实例可以包括属于肠杆菌科的细菌和棒状杆菌细菌。

[0053] 属于肠杆菌科的细菌的实例可以包括属于埃希氏菌属、肠杆菌属(*Enterobacter*)、泛菌属(*Pantoea*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、沙雷菌属(*Serratia*)、欧文氏菌属(*Erwinia*)、发光杆菌属(*Photobacterium*)、普罗威登斯菌属(*Providencia*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、摩根菌属(*Morganella*)的细菌。具体地,可以使用根据用于NCBI(National Center for Biotechnology Information)数据库的分类学(ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?id=91347)分类为肠杆菌科的细菌。

[0054] 埃希氏菌属细菌没有特别限制,并且其实例可以包括根据微生物学领域技术人员已知的分类学分类为埃希氏菌属的细菌。埃希氏菌属细菌的实例可以包括例如记载于Neidhardt et al. (Backmann B.J., 1996, Derivations and Genotypes of some mutant derivatives of *Escherichia coli* K-12, pp. 2460-2488, 表1, 于F.D. Neidhardt (编), *Escherichia coli* and *Salmonella* Cellular and Molecular Biology/第二版, American Society for Microbiology Press, Washington, D.C.)工作中的那些细菌。埃希氏菌属细菌的实例可以包括例如大肠杆菌。大肠杆菌的具体实例可以包括大肠杆菌K-12菌株, 诸如W3110菌株(ATCC 27325)和MG1655菌株(ATCC 47076); 大肠杆菌K5菌株(ATCC 23506); 大肠杆菌B菌株, 诸如BL21(DE3)菌株; 以及其衍生菌株。

[0055] 肠杆菌属细菌没有特别限制,并且其实例可以包括根据微生物学领域技术人员已知的分类学分类为肠杆菌属的细菌。肠杆菌属细菌的实例可以包括例如聚团肠杆菌(*Enterobacter agglomerans*)和产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)。聚团肠杆菌的具体实例可以包括例如聚团肠杆菌ATCC 12287菌株。产气肠杆菌的具体实例可以包括例如产

气肠杆菌ATCC 13048菌株、NBRC 12010菌株(Biotechnol.Bioeng.,2007,Mar.27;98(2):340-348)和AJ110637菌株(FERM BP-10955)。肠杆菌属细菌的实例还可以包括例如记载于欧洲专利申请公开(EP-A)No.0952221中的菌株。另外,聚团肠杆菌还可以包括分类为成团泛菌(*Pantoea agglomerans*)的一些菌株。

[0056] 泛菌属细菌没有特别限制,并且其实例可以包括根据微生物学领域技术人员已知的分类学分类为泛菌属的细菌。泛菌属细菌的实例可以包括例如菠萝泛菌(*Pantoea ananatis*)、斯氏泛菌(*Pantoea stewartii*)、成团泛菌和柠檬泛菌(*Pantoea citrea*)。菠萝泛菌的具体实例可以包括例如菠萝泛菌LMG20103菌株、AJ13355菌株(FERM BP-6614)、AJ13356菌株(FERM BP-6615)、AJ13601菌株(FERM BP-7207)、SC17菌株(FERM BP-11091)、SC17(0)菌株(VKPM B-9246)和SC17sucA菌株(FERM BP-8646)。一些肠杆菌属细菌和欧文氏菌属细菌重新分类为泛菌属(Int.J.Syst.Bacteriol.,39,337-345(1989); Int.J.Syst.Bacteriol.,43,162-173(1993))。例如,基于16S rRNA等的核苷酸序列分析,一些聚团肠杆菌菌株最近重新分类为成团泛菌、菠萝泛菌、斯氏泛菌等(Int.J.Syst.Bacteriol.,39,337-345(1989))。泛菌属细菌可以包括如上文描述的新分类为泛菌属的那些细菌。

[0057] 欧文氏菌属细菌的实例可以包括解淀粉欧文氏菌(*Erwinia amylovora*)和胡萝卜软腐欧文氏菌(*Erwinia carotovora*)。克雷伯氏菌属细菌的实例可以包括植物克雷伯氏菌(*Klebsiella planticola*)。

[0058] 棒状杆菌细菌的实例可以包括属于棒杆菌属、短杆菌属(*Brevibacterium*)、细杆菌属(*Microbacterium*)等的细菌。

[0059] 此类棒状杆菌细菌的具体实例可以包括以下物种。

[0060] 嗜乙酰乙酸棒状杆菌(*Corynebacterium acetoacidophilum*)

[0061] 醋谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium acetoglutamicum*)

[0062] 解烷棒状杆菌(*Corynebacterium alkanolyticum*)

[0063] 帚石南棒状杆菌(*Corynebacterium callunae*)

[0064] 钝齿棒状杆菌(*Corynebacterium crenatum*)

[0065] 谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)

[0066] 百合棒杆菌(*Corynebacterium lilium*)

[0067] 栖糖蜜棒杆菌(*Corynebacterium melassecola*)

[0068] 热产氨棒状杆菌(*Corynebacterium thermoaminogenes*) (有效棒杆菌(*Corynebacterium efficiens*))

[0069] 力士棒杆菌(*Corynebacterium herculis*)

[0070] 二歧短杆菌(*Brevibacterium divaricatum*) (谷氨酸棒杆菌)

[0071] 黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*) (谷氨酸棒杆菌)

[0072] 未成熟短杆菌(*Brevibacterium immariophilum*)

[0073] 乳糖发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*) (谷氨酸棒杆菌)

[0074] 玫瑰色短杆菌(*Brevibacterium roseum*)

[0075] 解糖短杆菌(*Brevibacterium saccharolyticum*)

[0076] 硫殖短杆菌(*Brevibacterium thiogenitalis*)

- [0077] 产氨短杆菌 (*Corynebacterium ammoniagenes*) (*Corynebacterium stationis*)
- [0078] 白色短杆菌 (*Brevibacterium album*)
- [0079] 蜡状短杆菌 (*Brevibacterium cerinum*)
- [0080] 嗜氨细杆菌 (*Microbacterium ammoniaphilum*)
- [0081] 棒状杆菌细菌的具体实例可以包括以下菌株。
- [0082] 嗜乙酰乙酸棒杆菌 (*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC 13870
- [0083] 醋谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium acetoglutamicum*) ATCC 15806
- [0084] 解烷棒杆菌 (*Corynebacterium alkanolyticum*) ATCC 21511
- [0085] 帚石南棒杆菌 (*Corynebacterium callunae*) ATCC 15991
- [0086] 钝齿棒杆菌 (*Corynebacterium crenatum*) AS1.542
- [0087] 谷氨酸棒杆菌 ATCC 13020, ATCC 13032, ATCC 13060, ATCC 13869, FERM BP-734
- [0088] 百合棒杆菌 (*Corynebacterium lilium*) ATCC 15990
- [0089] 栖糖蜜棒杆菌 (*Corynebacterium melassecola*) ATCC 17965
- [0090] 有效棒杆菌 (*Corynebacterium efficiens*) (热产氨棒状杆菌 (*Corynebacterium thermoaminogenes*)) AJ12340 (FERM BP-1539)
- [0091] 力士棒杆菌 (*Corynebacterium herculis*) ATCC 13868
- [0092] 二歧短杆菌 (*Brevibacterium divaricatum*) (谷氨酸棒杆菌) ATCC 14020
- [0093] 黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) (谷氨酸棒杆菌) ATCC 13826, ATCC 14067, AJ12418 (FERM BP-2205)
- [0094] 未成熟短杆菌 (*Brevibacterium immariophilum*) ATCC 14068
- [0095] 乳糖发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum*) (谷氨酸棒杆菌) ATCC 13869
- [0096] 玫瑰色短杆菌 (*Brevibacterium roseum*) ATCC 13825
- [0097] 解糖短杆菌 (*Brevibacterium saccharolyticum*) ATCC 14066
- [0098] 硫殖短杆菌 (*Brevibacterium thiogenitalis*) ATCC 19240
- [0099] 产氨短杆菌 (*Corynebacterium ammoniagenes*) (停滞棒杆菌 (*Corynebacterium stationis*)) ATCC 6871, ATCC 6872
- [0100] 白色短杆菌 (*Brevibacterium album*) ATCC 15111
- [0101] 蜡状短杆菌 (*Brevibacterium cerinum*) ATCC 15112
- [0102] 嗜氨细杆菌 (*Microbacterium ammoniaphilum*) ATCC 15354
- [0103] 棒状杆菌细菌可以包括先前被分类为短杆菌属但目前并入棒状杆菌属中的细菌 (Int.J.Syst.Bacteriol., 41, 255 (1991))。此外, 停滞棒杆菌可以包括先前已被分类为产氨棒状杆菌, 但目前基于 16S rRNA 的核苷酸序列分析等重新分类为停滞棒杆菌的细菌 (Int.J.Syst.Evol.Microbiol., 60, 874-879 (2010))。
- [0104] 酵母可以是芽殖酵母或裂殖酵母。酵母可以是单倍体或二倍体以上的多倍体酵母。酵母的实例可包括属于酵母属 (*Saccharomyces*) 的酵母, 例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*), 属于毕赤酵母属 (*Pichia*) (其也可以称为 *Wickerhamomyces* 属) 的酵母, 如西弗毕赤酵母 (*Pichia ciferrii*), 赛道威毕赤酵母 (*Pichia sydowiorum*) 和巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*), 属于假丝酵母属 (*Candida*) 的酵母, 诸如实用假性酵母 (*Candida utilis*), 属于汉逊酵母属 (*Hansenula*) 的酵母, 如多形汉逊酵母 (*Hansenula polymorpha*)

和属于裂殖酵母(*Schizosaccharomyces*)的酵母,如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)。

[0105] 这些菌株可以从例如美国典型培养物保藏中心(地址:P.O.Box 1549,Manassas, VA 20108,United States of America;或atcc.org)获得。也就是说,注册号被赋予各自的菌株,并且菌株可以通过使用这些注册号订购(参见atcc.org)。美国典型培养物保藏中心的目录中列出了菌株的注册号。这些菌株也可以从例如菌株保藏的保藏所获得。

[0106] 微生物可以固有具有目标物质生产能力,或者可以已经以使它具有目标物质生产能力的方式进行了修饰。具有目标物质生产能力的微生物可以通过赋予如上所述的此类微生物以目标物质生产能力或增强如上提及的此类微生物的目标物质生产能力来获得。

[0107] 以下,说明赋予或提高目标物质生成能力的方法的具体实例。为了赋予或提高目标物质生产能力,下面举例说明的此类修饰可以独立使用,或者以适当组合使用。

[0108] 目标物质可以通过参与目标物质生物合成的酶的作用产生。此类酶也可以称为“目标物质生物合成酶”。因此,微生物可以具有目标物质生物合成酶。换言之,微生物可以具有编码目标物质生物合成酶的基因。此类基因也可以称为“目标物质生物合成基因”。微生物可以固有具有目标物质生物合成基因,或者可以已经引入了目标物质生物合成基因。本文解释了用于引入基因的方法。

[0109] 另外,通过提高目标物质生物合成酶的活性,可以改善微生物的目标物质生产能力。也就是说,赋予或提高目标物质生成能力的方法的实例可以包括提高目标物质生物合成酶的活性的方法。也就是说,微生物可以经修饰而使得增加了目标物质生物合成酶的活性。一种目标物质生物合成酶的活性可以得以增加,或者两种或更多种目标物质生物合成酶的活性可以得以增加。本文描述了用于增加蛋白质(诸如酶等)的活性的方法。通过例如增加编码蛋白质的基因的表达,可以提高蛋白质(诸如酶等)的活性。

[0110] 目标物质可以从例如碳源和/或目标物质的前体产生。因此,目标物质生物合成酶的实例可以包括例如催化从碳源和/或前体向目标物质转化的酶。例如,3-脱氢莽草酸可以通过部分莽草酸途径产生,其可以包括由3-脱氧-D-阿拉伯糖-庚酮糖酸7-磷酸合酶(DAHP合酶),3-脱氢奎尼酸合酶和3-脱氢奎尼酸脱水酶催化的步骤;可以通过3-脱氢莽草酸脱水酶(DHSD)的作用将3-脱氢莽草酸转化为原儿茶酸;可以通过O-甲基转移酶(OMT)或芳香醛氧化还原酶,诸如芳香羧酸还原酶,ACAR的作用将原儿茶酸分别转化为香草酸或原儿茶醛;以及可以通过ACAR或OMT的作用将香草酸或原儿茶醛转化为香草醛。也就是说,目标物质生物合成酶的具体实例可以包括例如DAHP合酶,3-脱氢奎尼酸合酶,3-脱氢奎尼酸脱水酶,DHSD,OMT和ACAR。

[0111] 术语“3-脱氧-D-阿拉伯糖-庚酮糖酸7-磷酸合酶(DAHP合酶)”可以指具有催化将D-赤藓糖-4-磷酸和磷酸烯醇丙酮酸转化成3-脱氧-D-阿拉伯糖-庚酮糖酸7-磷酸(DAHP)和磷酸的反应的活性的蛋白质(EC 2.5.1.54)。编码DAHP合酶的基因也可以称为“DAHP合酶基因”。DAHP合酶的实例可以包括分别由aroF、aroG和aroH基因编码的AroF、AroG和AroH蛋白。在这些中,AroG可以作为主要的DAHP合酶发挥功能。DAHP合酶诸如AroF、AroG和AroH蛋白的实例包括各种生物体如肠杆菌科(*Enterobacteriaceae*)细菌和棒状杆菌细菌的那些。DAHP合酶的具体实例可以包括大肠杆菌天然的AroF、AroG和AroH蛋白。大肠杆菌K-12 MG1655菌株天然的aroG基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,并且由该基因编码的AroG蛋白的氨

基酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0112] DAHP合酶活性可以通过例如将酶与底物,诸如D-赤藓糖-4-磷酸和磷酸烯醇丙酮酸温育并测量DAHP的酶和底物依赖性生成来测量。

[0113] 术语“3-脱氢奎尼酸合酶”可以指具有催化使DAHP脱磷酸化以产生3-脱氢奎宁酸的反应的活性的蛋白质(EC 4.2.3.4)。编码3-脱氢奎尼酸合酶的基因也可以称为“3-脱氢奎尼酸合酶基因”。3-脱氢奎尼酸合酶的实例可以包括由aroB基因编码的AroB蛋白。3-脱氢奎尼酸合酶如AroB蛋白的实例可以包括各种生物体如肠杆菌科细菌和棒状杆菌细菌天然的那些。3-脱氢奎尼酸合酶的具体实例可以包括大肠杆菌天然的AroB。大肠杆菌K-12 MG1655菌株天然的aroB基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:3所示,并且由该基因编码的AroB蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0114] 3-脱氢奎尼酸合酶活性可以通过例如将酶与底物,诸如DAHP温育并测量3-脱氢奎宁酸的酶和底物依赖性产生来测量。

[0115] 术语“3-脱氢奎尼酸脱水酶”可以指具有催化使3-脱氢奎宁酸脱水以生成3-脱氢莽草酸的反应的活性的蛋白质(EC 4.2.1.10)。编码3-脱氢奎尼酸脱水酶的基因也可以称为“3-脱氢奎尼酸脱水酶基因”。3-脱氢奎尼酸脱水酶的实例可以包括由aroD基因编码的AroD蛋白。3-脱氢奎尼酸脱水酶诸如AroD蛋白的实例可以包括各种生物体如肠杆菌科细菌和棒杆菌的那些。3-脱氢奎尼酸脱水酶的具体实例可以包括大肠杆菌天然的AroD蛋白。大肠杆菌K-12MG1655菌株天然的aroD基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:5所示,并且由该基因编码的AroD蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示。

[0116] 3-脱氢奎尼酸脱水酶活性可以通过例如将酶与底物,诸如3-脱氢奎宁酸温育并测量3-脱氢莽草酸的酶和底物依赖性产生来测量。

[0117] 术语“3-脱氢草酸脱水酶(DHSD)”可以指具有催化使3-脱氢莽草酸脱水以生成原儿茶酸的反应的活性的蛋白质(EC 4.2.1.118)。编码DHSD的基因也可以称为“DHSD基因”。DHSD的实例可以包括由asbF基因编码的AsbF蛋白。DHSD例如AsbF蛋白的实例包括各种生物体如苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*),粗糙脉孢菌(*Neurospora crassa*)和*Podospira pauciseta*天然的那些。苏云金芽孢杆菌BMB171菌株天然的asbF基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:7所示,并且由该基因编码的AsbF蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:8所示。

[0118] DHSD活性可以通过例如将酶与底物,诸如3-脱氢莽草酸温育并测量原儿茶酸的酶和底物依赖性产生来测量。

[0119] 编码莽草酸途径的酶如DAHP合酶,3-脱氢奎尼酸合酶和3-脱氢奎尼酸脱水酶的基因的表达受到酪氨酸阻遏物TyrR阻遏,所述TyrR其由tyrR基因编码。因此,莽草酸途径酶的活性也可以通过降低酪氨酸阻遏物TyrR的活性而增加。大肠杆菌K-12 MG1655菌株天然的tyrR基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:9所示,并且由该基因编码的TyrR蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[0120] 术语“O-甲基转移酶(OMT)”可以指具有在甲基供体存在下催化物质的羟基的甲基化反应的活性的蛋白质(EC 2.1.1.68等)。此活性也可以称为“OMT活性”。编码OMT的基因也可以称为“OMT基因”。根据在如本文中所述的方法中生产目标物质的特定生物合成途径,OMT可以具有需要的底物特异性。例如,当经由原儿茶酸向香草酸的转化生产目标物质时,

可以使用至少对原儿茶酸特异性的OMT。此外,例如,当经由原儿茶醛向香草醛的转化生产目标物质时,可以使用至少对原儿茶醛特异性的OMT。也就是说,具体地,术语“O-甲基转移酶(OMT)”可以指具有催化在存在甲基基团供体的情况下使原儿茶酸和/或原儿茶醛甲基化(即间位上的羟基基团的甲基化)以产生香草酸和/或香草醛的反应的活性的蛋白质。OMT可以对作为底物的原儿茶酸和原儿茶醛两者是特异性的,但不一定限于此。也就是说,可以采用具有所需底物特异性的OMT,这取决于在本发明的方法中生产目标物质的生物合成途径的类型。OMT通常可以使用原儿茶酸和原儿茶醛两者作为底物,但是不必然限于此。甲基基团供体的实例可以包括S-腺苷甲硫氨酸(SAM)。OMT的实例可以包括各种生物体天然的OMT,诸如智人(*Homo sapiens*) (Hs)天然的OMT(GenBank登录号NP_000745和NP_009294)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)天然的OMT(GenBank登录号NP_200227和NP_009294)、*Fragaria x ananassa*天然的OMT(GenBank登录号AAF28353)以及W02013/022881A1中示例的哺乳动物、植物和微生物的其他各种OMT。对于智人天然的OMT基因,已知四种转录物变体和两种OMT同种型。这四种转录物变体(转录物变体1-4, GenBank登录号NM_000754.3, NM_001135161.1, NM_001135162.1和NM_007310.2)的核苷酸序列显示为SEQ ID NO:11至14,较长OMT同种型(MB-COMT, GenBank登录号NP_000745.1)的氨基酸序列如SEQ ID NO:15所示,并且较短OMT同种型(S-COMT, GenBank登录号NP_009294.1)的氨基酸序列如SEQ ID NO:16所示。SEQ ID NO:16对应于截短了N端的50个氨基酸残基的SEQ ID NO:15。OMT的实例可以进一步包含拟杆菌门(*Bacteroidetes*)细菌,即属于拟杆菌门的细菌天然的OMT。拟杆菌门细菌的实例可以包括属于*Niastella*、*Terrimonas*、*Chitinophaga*等属的细菌(*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*(2007), 57, 1828-1833)。 *Niastella*细菌的实例可以包括*Niastella koreensis*。 *Niastella koreensis*天然的OMT基因的核苷酸序列以SEQ ID NO:130显示,并且由此基因编码的OMT的氨基酸序列以SEQ ID NO:131显示。

[0121] OMT还可以催化原儿茶酸和/或原儿茶醛的甲基化反应以产生异香草酸和/或异香草醛(即对位羟基的甲基化)作为副反应。OMT可以选择性催化间位羟基的甲基化的。表述“选择性催化间位羟基的甲基化”可以意味着OMT选择性地从原儿茶酸生成香草酸的OMT和/或选择性地从原儿茶醛生成香草醛的OMT。表述“从原儿茶酸选择性产生香草酸”可以表示当允许OMT作用于原儿茶酸时按摩尔比计, OMT产生香草酸的量为异香草酸的量的例如3倍或更多, 5倍或更多, 10倍或更多, 15倍或更多, 20倍或更多, 25倍或更多, 或30倍或更多。表述“从原儿茶酸选择性产生香草酸”也可以指当允许OMT作用于原儿茶酸时,按摩尔比计相对于香草酸和异香草酸的总量而言, OMT以例如60%以上, 65%以上, 70%以上, 75%以上, 80%以上, 85%以上, 90%以上, 或95%以上的量产生香草酸。也就是说,此比率(即香草酸相对于香草酸和异香草酸的总量的比率)也可以称为“VA/(VA+iVA)比率”。此外,表述“从原儿茶醛选择性产生香草酸”可以表示当允许OMT作用于原儿茶醛时按摩尔比计, OMT产生香草醛的量为异香草酸的量的例如3倍或更多, 5倍或更多, 10倍或更多, 15倍或更多, 20倍或更多, 25倍或更多, 或者30倍或更多。表述“从原儿茶醛选择性产生香草酸”也可以指当允许OMT作用于原儿茶醛时,按摩尔比计相对于香草醛和异香草醛的总量而言, OMT以例如60%以上, 65%以上, 70%以上, 75%以上, 80%以上, 85%以上, 90%以上, 或95%以上的量产生香草醛。也就是说,此比率(即香草醛相对于香草醛和异香草醛的总量的比率)也可以称为“Vn/(Vn+iVn)比率”。选择性催化间位羟基甲基化的OMT的实例可以包括本文所述的具有

“特定突变”的OMT。

[0122] 具有“特定突变”的OMT也可以称为“突变体OMT”。编码突变体OMT的基因也可以称为“突变体OMT基因”。

[0123] 不具有“特定突变”的OMT也可以称为“野生型OMT”。编码野生型OMT的基因也可以称为“野生型OMT基因”。本文中提及的术语“野生型”是为了方便将“野生型”OMT与“突变体”OMT区分开而使用,并且“野生型”OMT不限于作为天然物质获得的那些,并且可以包括任何没有“特定突变”的OMT。野生型OMT的实例可以包括例如上面例示的OMT。另外,上述例示的所有OMT保守变体应当认为包括在野生型OMT中,条件是此类保守变体不具有“特定突变”。

[0124] “特定突变”的实例可以包括W02013/022881A1中描述的突变体OMT中包含的突变。也就是说,“特定突变”的实例可以包括野生型OMT的198位亮氨酸残基(L198)被比亮氨酸残基的疏水性指数(hydrophobic index)具有更低疏水性指数(亲水性指数(hydrophathy index))的氨基酸残基取代的突变,以及野生型OMT的199位谷氨酸残基(E199)被在pH7.4具有中性或正侧链电荷的氨基酸残基取代的突变。突变体OMT可以具有这些突变中的一个或两者。

[0125] “比亮氨酸残基的疏水性指数具有更低疏水性指数(亲水指数)的氨基酸残基”的实例可以包括Ala,Arg,Asn,Asp,Cys,Glu,Gln,Gly,His,Lys,Met,Phe,Pro,Ser,Thr,Trp和Tyr。作为“比亮氨酸残基的疏水性指数具有更低疏水性指数(亲水指数)的氨基酸残基”,特别地优选选自Ala,Arg,Asn,Asp,Glu,Gln,Gly,His,Lys,Met,Pro,Ser,Thr,Trp和Tyr的氨基酸残基,并且Tyr是更具体的实例。

[0126] “在pH7.4具有中性或正侧链电荷的氨基酸残基”可以包括Ala,Arg,Asn,Cys,Gln,Gly,His,Ile,Leu,Lys,Met,Phe,Pro,Ser,Thr,Trp,Tyr和Val。作为“在pH7.4具有中性或正侧链电荷的氨基酸残基”,Ala和Gln是具体的实例。

[0127] 任意的野生型OMT中的“L198”和“E199”可以指“与以SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的第198位的亮氨酸残基对应的氨基酸残基”和“与以SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的第199位谷氨酸残基对应的氨基酸残基”。这些氨基酸残基的位置表示相对位置,并且其绝对位置可以由于氨基酸残基的缺失,插入,添加等而改变。例如,若在SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列中的位置X的N端侧的位置缺失或插入一个氨基酸残基,则原来在位置X处的氨基酸残基重新定位在位置X-1或X+1,但仍被认为是“与SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的X位的氨基酸残基对应的氨基酸残基”。此外,虽然“L198”和“E199”通常分别是亮氨酸残基和谷氨酸残基,但它们可以不是亮氨酸残基和谷氨酸残基。也就是说,当“L198”和“E199”分别不是亮氨酸残基和谷氨酸残基时,“特定突变”可以包括那些氨基酸残基各自被任何上述氨基酸残基替换的突变。

[0128] 在任意OMT的氨基酸序列中,哪个氨基酸残基为对应于“L198”或“E199”的氨基酸残基可以通过将任意OMT的氨基酸序列和SEQ ID NO:16的氨基酸序列比对确定。比对可以通过例如使用已知的基因分析软件来进行。此类软件的具体实例可以包括由Hitachi Solutions生产的DNASIS,Genetyx生产的GENETYX等(Elizabeth C.Tyler et al., Computers and Biomedical Research,24(1)72-96,1991;Barton GJ et al.,Journal of Molecular Biology,198(2),327-37,1987)。

[0129] “特定突变”的实例可以包括在以下氨基酸残基处的突变:D21,L31,M36,S42,L67,

Y90和P144。“特定突变”可以是一个氨基酸残基处的突变,或者可以是两个或更多个氨基酸残基处的突变组合。也就是说,“特定突变”可以包括例如以下氨基酸残基的一处或多处的突变:D21,L31,M36,S42,L67,Y90和P144。

[0130] 在上述用于定义氨基酸残基的表示法中,数字代表SEQ ID NO:131所示氨基酸序列中的位置,并且数字左侧的字母代表以SEQ ID NO:131所示的氨基酸序列中相应位置处的氨基酸残基,即相应位置处的修饰前的氨基酸残基。也就是说,例如,“D21”表示以SEQ ID NO:131所示的氨基酸序列中第21位的D(Asp)残基。任意野生型OMT中的这些氨基酸残基各自可以指“对应于以SEQ ID NO:131所示的氨基酸序列中指定氨基酸残基的氨基酸残基”。也就是说,例如,任意野生型OMT中的“D21”表示对应于以SEQ ID NO:131所示的氨基酸序列中第21位的D(Asp)残基的氨基酸残基。

[0131] 在上述每个突变中,修饰后的氨基酸残基可以是修饰前氨基酸残基以外的任何氨基酸残基。修饰后的氨基酸残基的实例可包括K(Lys),R(Arg),H(His),A(Ala),V(Val),L(Leu),I(Ile),G(Gly),S(Ser),T(Thr),P(Pro),F(Phe),W(Trp),Y(Tyr),C(Cys),M(Met),D(Asp),E(Glu),N(Asn)和Q(Gln),条件是修饰后的氨基酸残基不同于修饰前的氨基酸残基。作为修饰后的氨基酸残基,可以选择对于目标物质的生产有效的那些氨基酸残基,例如导致OMT的VA/(VA+iVA)比率和/或Vn/(Vn+iVn)比率增加的那些氨基酸残基。

[0132] “特定突变”的具体实例可以包括以下突变:D21Y,L31H,M36(K,V),S42C,L67F,Y90(A,C,G,S)和P144(E,G,S,V,Y)。也就是说,氨基酸残基D21,L31,M36,S42,L67,Y90和P144处的突变可以分别是例如突变D21Y,L31H,M36(K,V),S42C,L67F,Y90(A,C,G,S)和P144(E,G,S,V,Y)。“特定突变”可包括例如以下突变中的一种或多种:D21Y,L31H,M36(K,V),S42C,L67F,Y90(A,C,G,S)和P144(E,G,S,V,Y)。

[0133] 在上述用于定义突变的符号中,数字和数字左侧的字母与上文所述表示相同。在上述用于定义突变的表示法中,数字右侧的字母表示在相应位置处修饰后的氨基酸残基。也就是说,例如,“D21Y”表示用Y(Tyr)残基取代以SEQ ID NO:131所示氨基酸序列中第21位的D(Asp)残基的突变。另外,例如,M36(K,V)代表用K(Lys)或V(Val)残基取代以SEQ ID NO:131所示的氨基酸序列中第36位的M(Met)残基的突变。任意野生型OMT中的这些突变各自可以指“对应于以SEQ ID NO:131所示的氨基酸序列中的指示突变的突变”。“对应于以SEQ ID NO:131所示的氨基酸序列中X位氨基酸残基的突变的突变”应该读作对应于SEQ ID NO:131所示的氨基酸序列中X位的氨基酸残基的氨基酸残基处的突变。也就是说,例如,任意野生型OMT中的“D21Y”表示用于用Y(Tyr)替换对应于SEQ ID NO:131所示的氨基酸序列中第21位的D(Asp)残基的氨基酸残基的突变。

[0134] 突变组合的数目没有特别限制。突变组合的具体实例可包括D21Y/M36K/L67F,D21Y/M36K/L67F/Y90A,L31H/M36K/L67F/P144V,L31H/L67F/Y90A,M36K/S42C/L67F,M36K/L67F,M36K/L67F/Y90A,M36K/L67F/Y90A/P144E,M36K/L67F/Y90C,M36K/L67F/Y90C/P144V,M36K/L67F/Y90G,M36K/L67F/Y90S/P144G,M36K/L67F/P144S,M36K/L67F/P144Y,M36K/Y90A/P144V,M36K/P144E和M36V/L67F/P144S。也就是说,“特定突变”可以包括例如这些组合中的任何一种。

[0135] 在上述用于定义组合的符号中,数字和数字左侧和右侧的字母与上文所述表示相同。在上述用于定义组合的表示法中,一起记录并用“/”插入的两个或更多个突变表示双重

或更多重突变。也就是说,例如,“M36K/P144E”代表M36K和P144E的双重突变。

[0136] 关于“L198”或“E199”处突变的描述,例如用于定义其绝对位置的描述可以在必要修改后适用于其他“特定突变”,例如对应于D21,L31,M36,S42,L67,Y90和P144的氨基酸残基处的突变,条件是对于其他“特定突变”,SEQ ID NO:131中所示的氨基酸序列用作野生型OMT的参考序列。

[0137] 例如,可以通过修饰野生型OMT基因使得由其编码的OMT具有“特定突变”来获得突变体OMT基因。待修饰的野生型OMT基因可以通过例如从具有野生型OMT基因的生物体的克隆或化学合成来获得。此外,也可以不使用野生型OMT基因而获得突变体OMT基因。例如,可以通过化学合成直接获得突变体OMT基因。获得的突变OMT基因可以原样使用,或者在使用前进一步修饰。

[0138] 基因可以使用已知的方法进行修饰。例如,可以通过位点特异性诱变方法将目标突变引入DNA的靶位点中。位点特异性诱变方法的实例可以包括使用PCR的方法(Higuchi, R., 61, 于PCR Technology, Erlich, H.A. 编, Stockton Press (1989); Carter P., Meth. In Enzymol., 154, 382 (1987)); 以及使用噬菌体的方法(Kramer, W. and Frits, H.J., Meth. in Enzymol., 154, 350 (1987); Kunkel, T.A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367 (1987))。

[0139] 可以通过例如在SAM存在下将酶与底物,诸如原儿茶酸或原儿茶醛温育并测量相应产物,诸如香草酸或香草醛的酶和底物依赖性产生来测量OMT活性(WO2013/022881A1)。此外,通过在相同条件下测量相应副产物,诸如异香草酸或异香草醛的产生,并将副产物的产生与产物的产生进行比较,可以确定OMT是否选择性地生成产物。

[0140] 术语“芳族醛氧化还原酶(芳族羧酸还原酶;ACAR)”可以指具有催化在电子供体和ATP存在下还原香草酸和/或原儿茶酸的反应以产生香草醛和/或原儿茶醛的活性的蛋白质(EC 1.2.99.6等)。此活性也可以称为“ACAR活性”。编码ACAR的基因也可称为“ACAR基因”。ACAR通常可以使用香草酸和原儿茶酸两者作为底物,但不必限于此。也就是说,ACAR可以具有需要的底物特异性,这取决于在如本文所述的方法中生产目标物质的特定生物合成途径。例如,当通过香草酸向香草醛的转化来生产目标物质时,可以使用至少对香草酸特异性的ACAR。另外,例如,当通过原儿茶酸向原儿茶醛的转化来生产目标物质时,可以使用至少对原儿茶酸特异性的ACAR。电子供体的实例可以包括NADH和NADPH。ACAR的实例可以包括各种生物体如诺卡尔菌属种(*Nocardia* sp.)菌株NRRL 5646、放线菌属种(*Actinomyces* sp.)、热乙酸梭菌(*Clostridium thermoaceticum*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、甜瓜棒孢(*Corynespora melonis*)、云芝属种(*Coriolus* sp.)和链孢霉属种(*Neurospora* sp.)天然的ACAR(J. Biol. Chem., 2007, Vol. 282, No. 1, pp. 478-485)。诺卡尔菌属种菌株NRRL 5646已被分类为艾阿华诺卡氏菌(*Nocardia iowensis*)。ACAR的实例还可包括其他诺卡氏菌细菌,例如巴西诺卡氏菌(*Nocardia brasiliensis*)和伤口诺卡氏菌(*Nocardia vulneris*)的ACAR。巴西诺卡氏菌ATCC 700358天然的ACAR基因的核苷酸序列以SEQ ID NO:17显示,并且由此基因编码的ACAR的氨基酸序列以SEQ ID NO:18显示。巴西诺卡氏菌ATCC 700358天然的变体ACAR基因的实例的核苷酸序列以SEQ ID NO:19显示,并且由此基因编码的ACAR的氨基酸序列以SEQ ID NO:20显示。

[0141] ACAR活性可以通过例如在ATP和NADPH存在下将酶与底物,诸如香草酸或原儿茶酸一起温育,并且测量NADPH的酶和底物依赖性氧化来测量(J. Biol. Chem., 2007, Vol. 282,

No.1, pp.478-485中描述的方法的修改)。

[0142] 可以通过磷酸泛酰巯基乙胺化(phosphopantetheinylation)将ACAR变为活性酶(J.Biol.Chem.,2007,Vol.282,No.1,pp.478-485)。因此,ACAR活性也可以通过增加催化蛋白质的磷酸泛酰巯基乙胺化的酶(其也可以称为“磷酸泛酰巯基乙胺基化酶”)的活性来增加。也就是说,赋予或提高目标物质生产能力的方法的实例可以包括增加磷酸泛酰巯基乙胺基化酶的活性的方法。也就是说,微生物可以以使磷酸泛酰巯基乙胺基化酶的活性得以增加的方式进行了修饰。磷酸泛酰巯基乙胺基化酶的实例可以包括磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPT)。

[0143] 术语“磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(PPT)”可以指具有在磷酸泛酰巯基乙胺基供体存在下催化使ACAR磷酸泛酰巯基乙胺化的反应的活性的蛋白质。此活性也可以称为“PPT活性”。编码PPT的基因也可以称为“PPT基因”。磷酸泛酰巯基乙胺基供体的实例可以包括辅酶A(CoA)。PPT的实例可以包括EntD蛋白,其由entD基因编码。PPT例如EntD蛋白质的实例可以包括各种生物体天然的那些。PPT的具体实例可以包括大肠杆菌天然的EntD蛋白。大肠杆菌K-12 MG1655菌株的entD基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:21所示,并且由该基因编码的EntD蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:22所示。PPT的具体实例还可以包括巴西诺卡菌天然的PPT,皮疽诺卡菌(*Nocardia farcinica*) IFM10152天然的PPT(J.Biol.Chem.,2007,Vol.282,No.1,pp.478-485)和谷氨酸棒杆菌天然的PPT(App.Env.Microbiol.2009,Vol.75,No.9,pp.2765-2774)。谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株天然的PPT基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:23所示,并且由该基因编码的PPT的氨基酸序列如SEQ ID NO:24所示。

[0144] PPT活性可以基于例如在CoA存在下与ACAR温育时观察到的ACAR活性的增强来测量(J.Biol.Chem.,2007,Vol.282,No.1,pp.478-485)。

[0145] 褪黑激素可以从L-色氨酸生产。也就是说,目标物质生物合成酶的实例还可以包括例如L-色氨酸生物合成酶和催化L-色氨酸转化成褪黑激素的酶。L-色氨酸生物合成酶的实例可以包括芳香族氨基酸的常见生物合成酶,例如3-脱氧-D-阿拉伯糖庚酮糖酸-7-磷酸合酶(aroF, aroG, aroH), 3-脱氢喹啉合酶(aroB), 3-脱氢喹啉脱水酶(aroD), 莽草酸脱氢酶(aroE), 莽草酸激酶(aroK, aroL), 5-烯醇丙酮酰莽草酸-3-磷酸合酶(aroA)和分支酸合酶(aroC);以及邻氨基苯甲酸合酶(trpED)和色氨酸合酶(trpAB)。在酶的名称之后的括号中显示了编码酶的基因的名称的实例(这在下文也适用于相同的情况)。通过色氨酸5-羟化酶(EC 1.14.16.4), 5-羟色氨酸脱羧酶(EC 4.1.1.28), 芳烷基胺N-乙酰转移酶(AANAT; EC 2.3.1.87)和乙酰血清素O-甲基转移酶(EC 2.1.1.4)的作用, L-色氨酸可以依次转化为羟色氨酸, 5-羟色胺, N-乙酰血清素和褪黑激素。也就是说, 催化L-色氨酸转化为褪黑激素的酶的实例可以包括这些酶。值得注意的是, 乙酰血清素O-甲基转移酶是OMT的一个实例, 其催化使用SAM作为甲基供体使N-乙酰血清素甲基化以产生褪黑激素的反应。

[0146] 麦角硫因可以从L-组氨酸生产。也就是说, 目标物质生物合成酶的实例还可以包括例如L-组氨酸生物合成酶和催化L-组氨酸转化为麦角硫因的酶。L-组氨酸生物合成酶的实例可以包括ATP磷酸核糖基转移酶(hisG), 磷酸核糖基AMP环化水解酶(hisI), 磷酸核糖基-ATP焦磷酸水解酶(hisI), 磷酸核糖基亚胺甲基-5-氨基咪唑甲酰胺核苷酸异构酶(phosphoribosylformimino-5-aminoimidazole carboxamide ribotide isomerase)(hisA), 氨基转移酶(hisH), 磷酸组氨醇氨基转移酶(hisC), 组氨醇磷酸酶(hisB)和组氨醇

脱氢酶(hisD)。L-组氨酸可以通过分别由egtB、egtC、egtD和egtE基因编码的EgtB、EgtC、EgtD和EgtE蛋白的作用连续转化为组氨酸三甲基内盐(hercynine),hercynyl- γ -L-谷氨酰-L-半胱氨酸亚砷,hercynyl-L-半胱氨酸亚砷和麦角硫因。组氨酸三甲基内盐还可以通过由egt1基因编码的Egt1蛋白的作用转化为hercynyl-L-半胱氨酸亚砷。也就是说,催化L-组氨酸转化为麦角硫因的酶的实例可以包括这些酶。值得注意的是,EgtD是S-腺苷-1-甲硫氨酸(SAM)依赖性组氨酸N,N,N-甲基转移酶,其催化使用SAM作为甲基供体使组氨酸甲基化以产生组氨酸三甲基内盐的反应。

[0147] 愈创木酚可以从香草酸生产。因此,上述关于香草酸的目标物质生物合成酶的描述可以在必要修饰后适用于愈创木酚的目标物质生物合成酶。香草酸可以通过香草酸脱羧酶(VDC)的作用转化为愈创木酚。也就是说,目标物质生物合成酶的实例还可以包括VDC。

[0148] 阿魏酸、4-乙烯基愈创木酚和4-乙基愈创木酚可以从L-苯丙氨酸或L-酪氨酸生产。也就是说,目标物质生物合成酶的实例还可以包括例如L-苯丙氨酸生物合成酶,L-酪氨酸生物合成酶,以及催化L-苯丙氨酸或L-酪氨酸转化为阿魏酸,4-乙烯基愈创木酚或4-乙基愈创木酚的酶。L-苯丙氨酸生物合成酶的实例可包括上文例示的芳香族氨基酸的常见生物合成酶,以及分支酸变位酶(pheA),预苯酸脱水酶(pheA)和酪氨酸氨基转移酶(tryB)。分支酸变位酶和预苯酸脱水酶可以由pheA基因编码为双功能酶。L-酪氨酸生物合成酶的实例可以包括上文例示的芳香族氨基酸的常见生物合成酶,以及分支酸变位酶(tryA),预苯酸脱氢酶(tryA)和酪氨酸氨基转移酶(tryB)。分支酸变位酶和预苯酸脱氢酶可以由tryA基因编码为双功能酶。L-苯丙氨酸可以通过苯丙氨酸脱氢酶(PAL;EC 4.3.1.24)的作用转化为肉桂酸,然后通过肉桂酸4-羟化酶(C4H;EC 1.14.13.11)的作用转化为对香豆酸。此外,L-酪氨酸可通过酪氨酸脱氢酶(TAL;EC 4.3.1.23)的作用转化为对香豆酸。对香豆酸可以分别通过羟基肉桂酸3-羟化酶(C3H),O-甲基转移酶(OMT),阿魏酸脱羧酶(FDC)和乙烯基苯酚还原酶(VPR)的作用连续转化为咖啡酸,阿魏酸,4-乙烯基愈创木酚和4-乙基愈创木酚。也就是说,催化L-苯丙氨酸或L-酪氨酸转化为阿魏酸,4-乙烯基愈创木酚或4-乙基愈创木酚的酶的实例可以包括这些酶。为了生产阿魏酸,4-乙烯基愈创木酚或4-乙基愈创木酚,可以使用至少使用咖啡酸的OMT。

[0149] 多胺可以从L-精氨酸或L-鸟氨酸生产。也就是说,目标物质生物合成酶的实例还可包括,例如,L-精氨酸生物合成酶,L-鸟氨酸生物合成酶,以及催化L-精氨酸或L-鸟氨酸转化为多胺的酶。L-鸟氨酸生物合成酶的实例可包括N-乙酰谷氨酸合酶(argA),N-乙酰谷氨酸激酶(argB),N-乙酰谷氨酰磷酸还原酶(argC),乙酰鸟氨酸转氨酶(argD)和乙酰鸟氨酸脱乙酰酶(argE)。L-精氨酸生物合成酶的实例可包括上文例示的L-鸟氨酸生物合成酶,以及氨甲酰磷酸合成酶(carAB),鸟氨酸氨甲酰转移酶(argF,argI),精氨酸琥珀酸合成酶(argG),精氨酸琥珀酸裂合酶(argH)。L-精氨酸可以通过精氨酸脱羧酶(speA;EC 4.1.1.19)的作用转化为胍丁胺,然后通过胍丁胺尿素水解酶(speA;EC 4.1.1.19)的作用转化为腐胺。此外,L-鸟氨酸可以通过鸟氨酸脱羧酶(speC;EC 4.1.1.17)的作用转化为腐胺。腐胺可以通过亚精胺合酶(speE;EC 2.5.1.16)的作用转化为亚精胺,然后通过精胺合成酶(EC 2.5.1.22)的作用转化为精胺。胍丁胺也可以通过胍丁胺/三胺氨基丙基转移酶的作用转化为氨基丙基胍丁胺,然后通过氨基丙基胍丁胺尿素水解酶的作用转化为亚精胺。也就是说,催化L-精氨酸或L-鸟氨酸转化为多胺的酶的实例可以包括这些酶。值得注意的

是,亚精胺合酶,精胺合成酶和胍丁胺/三胺氨基丙基转移酶各自催化将来自脱羧的S-腺苷甲硫氨酸(dcSAM)(其可以通过脱羧作用从SAM产生)的丙胺基团转移到相应的底物中的反应。

[0150] 肌酸可以从L-精氨酸和甘氨酸生产。也就是说,目标物质生物合成酶的实例还可以包括例如L-精氨酸生物合成酶,甘氨酸生物合成酶和催化L-精氨酸和甘氨酸转化成肌酸的酶。可以将L-精氨酸和甘氨酸组合以通过精氨酸:甘氨酸脒基转移酶(AGAT,EC 2.1.4.1)的作用产生胍基乙酸(guanidinoacetate)和鸟氨酸;使用SAM作为甲基供体,可以通过胍基乙酸N-甲基转移酶(GAMT,EC 2.1.1.2)的作用使胍基乙酸甲基化以生成肌酸。也就是说,催化L-精氨酸和甘氨酸转化为肌酸的酶的实例可包括这些酶。

[0151] 麦根酸可以从SAM生产。也就是说,目标物质生物合成酶的实例还可以包括例如催化SAM转化为麦根酸的酶。可以通过烟草胺(nicotianamine)合酶(EC 2.5.1.43)的作用从三个SAM分子合成一个烟草胺分子。烟草胺可以通过烟草胺转氨酶(EC 2.6.1.80)、3''-脱氨基-3''-氧烟草胺(oxonicotianamine)还原酶(EC 1.1.1.285)和2'-脱氧麦根酸2'-双加氧酶(EC 1.14.11.24)的作用连续转化为3''-脱氨基-3''-氧烟草胺、2'-脱氧麦根酸和麦根酸。也就是说,催化SAM转化为麦根酸的酶的实例可以包括这些酶。

[0152] L-甲硫氨酸可以从L-半胱氨酸生产。也就是说,目标物质生物合成酶的实例还可以包括,例如,L-半胱氨酸生物合成酶和催化L-半胱氨酸转化为L-甲硫氨酸的酶。L-半胱氨酸生物合成酶的实例可包括本文中描述的CysIXHDNYZ蛋白、Fpr2蛋白和CysK蛋白。催化L-半胱氨酸转化为L-甲硫氨酸的酶的实例可包括胱硫醚-γ-合酶和胱硫醚-β-裂合酶。

[0153] 用于赋予或提高目标物质生产能力的方法的实例还可以包括提高目标物质以外物质,例如在生产目标物质期间作为中间产物生成的物质和用作目标物质前体的物质的摄取系统的活性的方法。也就是说,本发明的细菌可以以使此类摄取系统的活性得以增加的方式进行了修饰。术语“物质的摄取系统”可以指具有将来自细胞外部的物质掺入细胞的功能的蛋白质。此活性也可以称为“物质的摄取活性”。编码此类摄取系统的基因也可以称为“摄取系统基因”。此类摄取系统的实例可以包括香草酸摄取系统和原儿茶酸摄取系统。香草酸摄取系统的实例可以包括由vanK基因编码的VanK蛋白(M.T.Chaudhry,et al.,Microbiology,2007,153:857-865)。谷氨酸棒杆菌ATCC13869菌株天然的vanK基因(NCgl2302)的核苷酸序列如SEQ ID NO:25所示,并且由该基因编码的VanK蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:26所示。原儿茶酸摄取系统基因可以包括由pcaK基因编码的PcaK蛋白(M.T.Chaudhry,et al.,Microbiology,2007,153:857-865)。谷氨酸棒杆菌ATCC13869菌株天然的pcaK基因(NCgl11031)的核苷酸序列如SEQ ID NO:27所示,并且由该基因编码的PcaK蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:28所示。

[0154] 可以根据例如已知方法(M.T.Chaudhry,et al.,Microbiology,2007.153:857-865)测量物质的摄取活性。

[0155] 用于赋予或提高目标物质生产能力的方法的实例还可以包括降低参与目标物质以外的物质的副生成的酶的活性的方法。除了目标物质以外的此类物质也可以称为“副产物”。此类酶也可以称为“副产物生成酶”。副产物生成酶的实例可以包括例如参与目标物质利用的酶和催化远离目标物质的生物合成途径分支的反应以产生除目标物质之外的物质的酶。本文描述了降低蛋白质诸如酶等的活性的方法。通过例如破坏编码蛋白质的基因可

以降低蛋白质诸如酶等的活性。例如,据报道,在棒状杆菌细菌中,香草醛按香草醛→香草酸→原儿茶酸的顺序代谢并利用(Current Microbiology,2005,Vol.51,pp.59-65)。也就是说,副产物生成酶的具体实例可以包括催化香草醛转化为原儿茶酸的酶和催化原儿茶酸进一步代谢的酶。此类酶的实例可以包括香草酸脱甲基酶,原儿茶酸3,4-双加氧酶,以及将原儿茶酸3,4-双加氧酶的反应产物进一步分解为琥珀酰-CoA和乙酰-CoA的各种酶(Appl.Microbiol.Biotechnol.,2012,Vol.95,p77-89)。此外,可以通过醇脱氢酶的作用将香草醛转化成香草醇(Kunjapur AM.et al.,J.Am.Chem.Soc.,2014,Vol.136,p11644-11654.;Hansen EH.et al.,App.Env.Microbiol.,2009,Vol.75,p2765-2774.)。也就是说,副产物生成酶的具体实例也可以包括醇脱氢酶(ADH)。此外,作为香草酸和香草醛生物合成途径中间体的3-脱氢莽草酸也可以通过莽草酸脱氢酶的作用转化为莽草酸。也就是说,副产物生成酶的具体实例还可以包括莽草酸脱氢酶。

[0156] 术语“香草酸脱甲基酶”可以指具有催化香草酸脱甲基化生成原儿茶酸的反应的活性的蛋白质。此活性也可以称为“香草酸脱甲基酶活性”。编码香草酸脱甲基酶的基因也可以称为“香草酸脱甲基酶基因”。香草酸脱甲基酶的实例可以包括由vanAB基因编码的VanAB蛋白(Current Microbiology,2005,Vol.51,pp.59-65)。vanA基因和vanB基因分别编码香草酸脱甲基酶的亚基A和亚基B。为了降低香草酸脱甲基酶活性,这两种vanAB基因可以被破坏等,或者两者中仅一种可以被破坏等。谷氨酸棒杆菌ATCC13869天然菌株的vanAB基因的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:29和31所示,并且由这些基因编码的VanAB蛋白的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:30和32所示。vanAB基因通常与vanK基因一起构成vanABK操纵子。因此,为了降低香草酸脱甲基酶活性,vanABK操纵子可以被完全破坏等(例如缺失)。在此类情况下,可以将vanK基因再引入宿主。例如,当使用存在于细胞外的香草酸,并且vanABK操纵子完全被破坏等(例如缺失)时,优选再引入vanK基因。

[0157] 香草酸脱甲基酶活性可以通过例如将酶与底物诸如香草酸温育并测量原儿茶酸的酶和底物依赖性产生来测量(J Bacteriol,2001,Vol.183,p3276-3281)。

[0158] 术语“原儿茶酸3,4-双加氧酶”可以指具有催化氧化原儿茶酸反应生成β-羧基-顺,顺-粘康酸的反应活性的蛋白质。此活性也可以称为“原儿茶酸3,4-双加氧酶活性”。编码原儿茶酸3,4-双加氧酶的基因也可以称为“原儿茶酸3,4-双加氧酶基因”。原儿茶酸3,4-双加氧酶的实例可以包括由pcaGH基因编码的PcaGH蛋白(Appl.Microbiol.Biotechnol.,2012,Vol.95,p77-89)。pcaG基因和pcaH基因分别编码原儿茶酸3,4-双加氧酶的α亚基和β亚基。为了降低原儿茶酸3,4-双加氧酶活性,这两种pcaGH基因可以被破坏等,或者两者中仅一种可以被破坏等。谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株天然的pcaGH基因的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:33和35所示,并且由这些基因编码的PcaGH蛋白的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:34和36所示。

[0159] 原儿茶酸3,4-双加氧酶活性可以通过例如将酶与底物诸如原儿茶酸温育并测量酶和底物依赖性氧消耗量来测量(Meth.Enz.,1970,Vol.17A,p526-529)。

[0160] 术语“醇脱氢酶(ADH)”可以指具有在电子供体存在下催化醛还原以产生醇的反应的活性的蛋白质(EC 1.1.1.1,EC 1.1.1.2,EC 1.1.1.71等)。此活性也可以称为“ADH活性”。编码ADH的基因也可以称为“ADH基因”。电子供体的实例可以包括NADH和NADPH。

[0161] 作为ADH,具有在电子供体存在下催化还原香草醛的反应以产生香草醇的活性的

ADH是一个特别的例子。该活性也可以特别称为“香草醇脱氢酶活性”。此外,具有香草醇脱氢酶活性的ADH也可以特别称为“香草醇脱氢酶”。作为ADH,具有催化在电子供体存在下还原香草醛以产生香草醇的反应的活性的ADH是具体的实例。此活性也可以特别称为“香草醇脱氢酶活性”。此外,具有香草醇脱氢酶活性的ADH也可以特别称为“香草醇脱氢酶”。

[0162] ADH的实例可以包括分别由yqhD基因,NCg10324基因,NCg10313基因,NCg12709基因,NCg10219基因和NCg12382基因编码的YqhD蛋白,NCg10324蛋白质,NCg10313蛋白质,NCg12709蛋白质,NCg10219蛋白质和NCg12382蛋白质。yqhD基因和NCg10324基因编码香草醇脱氢酶。yqhD基因可以在例如属于肠杆菌科的细菌,诸如大肠杆菌中找到。NCg10324基因,NCg10313基因,NCg12709基因,NCg10219基因和NCg12382基因可以例如在棒状杆菌细菌例如谷氨酸棒杆菌中找到。大肠杆菌K-12 MG1655菌株天然的yqhD基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:37所示,并且由此基因编码的YqhD蛋白的氨基酸序列以SEQ ID NO:38所示。谷氨酸棒杆菌ATCC13869菌株天然的NCg10324基因,NCg10313基因和NCg12709基因的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:39,41和43所示,并且由这些基因编码的蛋白质的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:40,42和44所示。谷氨酸棒杆菌ATCC 13032菌株天然的NCg10219基因和NCg12382基因的核苷酸序列分别如SEQ ID NO:45和47所示,并且由这些基因编码的蛋白质的氨基酸序列如SEQ ID NO:46和48所示。

[0163] 可以降低一种ADH的活性,或者可以降低两种或更多种ADH的活性。例如,可以降低诸如NCg10324蛋白质,NCg12709蛋白质和NCg10313蛋白质中的一种或多种的活性。特别地,可以至少降低NCg10324蛋白质的活性。

[0164] ADH活性可以通过例如在NADPH或NADH存在下将酶与底物(诸如醛,如香草醛)一起温育,并测量NADPH或NADH的酶和底物依赖性氧化来测量。

[0165] 术语“莽草酸脱氢酶”可以指具有催化在电子供体存在下还原3-脱氢莽草酸以产生莽草酸的反应的活性的蛋白质(EC 1.1.1.25)。该活性也可称为“莽草酸脱氢酶活性”。编码莽草酸脱氢酶的基因也可称为“莽草酸脱氢酶基因”。电子供体的实例可包括NADH和NADPH。莽草酸脱氢酶的实例可包括AroE蛋白,其由aroE基因编码。大肠杆菌K-12 MG1655菌株天然的aroE基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:49所示,并且由该基因编码的AroE蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:50所示。

[0166] 莽草酸脱氢酶活性可以通过例如在NADPH或NADH存在下将酶与底物诸如3-脱氢莽草酸一起温育,并测量NADPH或NADH的酶和底物依赖性氧化来测量。

[0167] 用于赋予或增强目标物质生产能力的方法的实例还可以包括增加L-半胱氨酸生物合成酶的活性的方法。

[0168] 术语“L-半胱氨酸生物合成酶”可以指参与L-半胱氨酸生物合成的蛋白质。编码L-半胱氨酸生物合成酶的基因也可称为“L-半胱氨酸生物合成基因”。L-半胱氨酸生物合成酶的实例可包括参与硫利用的蛋白质。参与硫利用的蛋白质的实例可包括CysIXHDNYZ蛋白质和Fpr2蛋白质,它们分别由cysIXHDNYZ基因和fpr2基因编码。CysIXHDNYZ蛋白特别涉及无机硫化物如硫酸盐和亚硫酸盐的还原。特别地,Fpr2蛋白可以参与电子转运以还原亚硫酸盐。L-半胱氨酸生物合成酶的实例还可包括O-乙酰丝氨酸(硫醇)-裂合酶。O-乙酰丝氨酸(硫醇)-裂合酶的实例可包括CysK蛋白,其由cysK基因编码。L-半胱氨酸生物合成酶的实例可包括各种生物体,例如肠杆菌科细菌和棒状杆菌细菌天然的那些。L-半胱氨酸生物合成

酶的具体实例可包括谷氨酸棒杆菌天然的CysIXHDNYZ蛋白,Fpr2蛋白和CysK蛋白。谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株天然的cysIXHDNYZ基因和fpr2基因的核苷酸序列分别以SEQ ID NOS:88,90,92,94,96,98,100,和102显示,并且这些基因编码的蛋白质的氨基酸序列分别以SEQ ID NOS:89,91,93,95,97,99,101和103显示。可以增加一种L-半胱氨酸生物合成酶的活性,或者可以增加两种或更多种L-半胱氨酸生物合成酶的活性。例如,可以增加CysIXHDNYZ蛋白、Fpr2蛋白和CysK蛋白中一种或多种的活性,或者可以增加CysIXHDNYZ蛋白和Fpr2蛋白中一种或多种的活性。

[0169] L-半胱氨酸生物合成酶的活性可以通过例如增加编码L-半胱氨酸生物合成酶的基因(例如cysIXHDNYZ基因、fpr2基因和cysK基因)的表达来增加。

[0170] L-半胱氨酸生物合成基因的表达可以通过例如修饰(例如增加或减少)基因表达调节物的活性来增加。也就是说,L-半胱氨酸生物合成基因的表达可以通过例如增加基因的正表达调节物(例如活化剂)的活性来增加。此外,L-半胱氨酸生物合成基因的表达可以通过例如降低基因的负表达调节物(例如阻遏物)的活性来增加。此类调节物也可称为“调节蛋白”。编码此类调节因子的基因也可称为“调节基因”。

[0171] 此类活化剂的实例可包括CysR和SsuR蛋白,它们分别由cysR和ssuR基因编码。CysR蛋白活性的增加可导致cysIXHDNYZ基因,fpr2基因和ssuR基因中一种或多种的表达增加。此外,SsuR蛋白活性的增加可以导致参与有机硫化物利用的基因表达增加。此类活化剂的实例可包括各种生物体,例如肠杆菌科细菌和棒状杆菌的那些活化剂。此类活化剂的具体实例可包括谷氨酸棒杆菌天然的CysR和SsuR蛋白。谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株天然的cysR基因(NCg10120)和ssuR基因的核苷酸序列分别以SEQ ID NO:104和106显示,并且由这些基因编码的蛋白质的氨基酸序列分别以SEQ ID NO:105和107显示。可以增加CysR蛋白和SsuR蛋白中的一种或两种的活性。例如,可以至少增加CysR蛋白的活性。可以通过例如增加编码活化剂的基因的表达来增加此类活化剂的活性。

[0172] 此类阻遏物的实例是McbR蛋白,其由mcbR基因编码。McbR蛋白活性降低可以导致cysR和ssuR基因中一种或多种的表达增加,从而可进一步导致cysIXHDNYZ基因和fpr2基因中一种或多种的表达增加。此类阻遏物的活性可以通过例如降低编码阻遏物的基因的表达或通过破坏编码阻遏物的基因来降低。

[0173] 也就是说,具体地,可以通过例如增加cysIXHDNYZ基因,fpr2基因,cysR基因和ssuR基因中的一种或多种的表达来增加L-半胱氨酸生物合成酶的活性。因此,短语“L-半胱氨酸生物合成酶的活性得以增加”可以表示例如cysIXHDNYZ基因,fpr2基因,cysR基因和ssuR基因中的一种或多种的表达得以增加。例如,可以至少增加cysR基因的表达。此外,例如,可以增加所有这些基因的表达。可以通过增加cysR基因的表达来增加cysIXHDNYZ基因,fpr2基因和ssuR基因中一种或多种的表达。

[0174] 用于赋予或增强目标物质生产能力的方法的实例可以进一步包括降低NCg12048蛋白活性的方法。

[0175] 术语“NCg12048蛋白”可以指由NCg12048基因编码的蛋白质。NCg12048蛋白的实例可以包括各种生物体,诸如肠杆菌科细菌和棒状杆菌细菌天然的蛋白。NCg12048蛋白的具体实例可以包括谷氨酸棒杆菌天然的NCg12048蛋白。谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株天然的NCg12048基因的核苷酸序列以SEQ ID NO:119显示,并且由此基因编码的蛋白质的氨基酸

序列以SEQ ID NO:120显示。顺便提及,关于本文中描述的保守变体,NCg12048蛋白的原始功能可以指具有以SEQ ID NO:120所示的氨基酸序列的蛋白质的功能,或者也可以指微生物中的蛋白质活性降低提供目标物质的生产增加的特性。

[0176] 用于赋予或增强目标物质生产能力的方法的实例还可以包括降低烯醇化酶活性的方法。

[0177] 术语“烯醇化酶”可以指具有催化将2-磷酸-D-甘油酸脱水以生成磷酸烯醇丙酮酸的反应的活性的蛋白质(EC 4.2.1.11)。此活性也可以称为“烯醇化酶活性”。烯醇化酶也可以称为“磷酸丙酮酸水合酶”。编码烯醇化酶的基因也可以称为“烯醇化酶基因”。烯醇化酶的实例可以包括Eno蛋白,其由eno基因编码。烯醇化酶诸如Eno蛋白的实例可以包括各种生物体,诸如肠杆菌科细菌和棒状杆菌细菌天然的蛋白。烯醇化酶的具体实例可以包括谷氨酸棒杆菌天然的Eno蛋白。谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株天然的eno基因(NCg10935)的核苷酸序列以SEQ ID NO:128显示,并且由此蛋白质编码的Eno蛋白的氨基酸序列以SEQ ID NO:129显示。

[0178] 烯醇化酶活性可以通过将酶与底物诸如2-磷酸-D-甘油酸一起温育,并且测量磷酸烯醇丙酮酸的酶和底物依赖性生成来测量。

[0179] 待修饰活性的蛋白质可以根据产生目标物质的生物合成途径的类型以及选定的微生物中固有存在的蛋白质的类型和活性来适当选择。例如,当通过原儿茶酸的生物转化生产香草醛时,可优选增强OMT,ACAR,PPT和原儿茶酸摄取系统中一种或多种的活性。此外,当通过原儿茶醛生物转化生产香草醛时,可以优选增强OMT的活性。

[0180] 用于育种出具有目标物质生产能力的微生物的基因和蛋白质可以分别具有例如上面列举的或其他已知的核苷酸序列和氨基酸序列。此外,用于育种出具有目标物质生产能力的微生物的基因和蛋白质可以是上面例示的基因和蛋白质的保守变体,例如分别具有上述例示或其他已知核苷酸序列和氨基酸序列的基因和蛋白质。具体地,例如,用于育种出具有目标物质生产能力的微生物的基因可以各自是编码蛋白质的基因,所述蛋白质具有上述例示的氨基酸序列或已知蛋白质的氨基酸序列但可以包含一个或几个位置处一个或几个氨基酸残基的取代、缺失、插入和/或添加,只要保持蛋白质的原始功能,即其酶活性,转运蛋白活性等即可。对于基因和蛋白质的保守变体,可以在必要修改后适用关于本文描述的S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因和S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的保守变体的描述。

[0181] <1-2>S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性的增加

[0182] 微生物可以以S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性得以增加的方式进行修饰。具体地,微生物可以以与未修饰的菌株相比S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性得以增加的方式进行修饰。通过以S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性得以增加的方式修饰微生物,可以改善微生物的目标物质生产能力,并且也就是说,可以增加通过使用微生物的目标物质生产。此外,通过以S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性得以增加的方式修饰微生物,可能改善微生物生成或再生SAM的能力。也就是说,具体地,微生物的目标物质生产能力的增加可以是由于微生物生成或再生SAM的能力增加所致。

[0183] 可以通过以S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性得以增加的方式修饰具有目标物质生产能力的微生物获得微生物。也可以通过以S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性得以增加的方式修饰微生物,然后对微生物赋予目标物质生产能力或增强微生物的目标物质生产能

力来获得微生物。另外,微生物可以是下述微生物,其由于增加S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性的修饰,或者由于增加S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性的修饰和赋予或增强目标物质生产能力的其他修饰的组合而获得了目标物质生产能力。可以以任意顺序进行构建微生物的修饰。

[0184] 术语“S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶”可以指具有催化水解S-腺苷-L-高半胱氨酸(SAH)以生成L-高半胱氨酸和腺苷的反应的活性的蛋白质(EC 3.3.1.1)。此活性也可以称为“S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性”。S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶也可以称为“腺苷高半胱氨酸酶”。编码S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的基因也可以称为“S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因”。S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的实例可以包括SahH蛋白,其由sahH基因编码。S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶诸如SahH蛋白的实例可以包括各种生物体诸如酵母、链霉菌细菌和棒状杆菌细菌天然的那些。S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的具体实例可以包括谷氨酸棒杆菌天然的SahH蛋白。谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株的sahH基因(NCg10719)的核苷酸序列以SEQ ID NO:144显示,并且由此基因编码的SahH蛋白的氨基酸序列以SEQ ID NO:145显示。

[0185] 也就是说,S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因可以是例如具有以SEQ ID NO:144所示的核苷酸序列的基因。此外,S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶可以是例如具有以SEQ ID NO:145所示的氨基酸序列的蛋白质。表述“基因或蛋白质具有核苷酸或氨基酸序列”涵盖当基因或蛋白质包含核苷酸或氨基酸序列时,以及当基因或蛋白质仅包含核苷酸或氨基酸序列时。

[0186] S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因可以是上文例示的任何S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因(例如sahH基因)的变体,只要保持其原始功能即可。类似地,S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶可以是上文例示的任何S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶(诸如SahH蛋白)的变体,只要保持其原始功能即可。保持其原始功能的变体也可以称为“保守变体”。用上述基因名称定义的基因和用上述蛋白质名称定义的蛋白质不仅可以分别包括上面例示的基因和蛋白质,还可以包括其保守变体。也就是说,例如,术语“sahH基因或NCg10719基因”不仅可以包括上面例示的sahH基因,例如具有以SEQ ID NO:144所示核苷酸序列的sahH基因,还可以包括其保守变体。类似地,术语“SahH蛋白或NCg10719蛋白”不仅可包括上文例示的SahH蛋白,例如具有以SEQ ID NO:145所示的氨基酸序列的Eno蛋白,还可包括其保守变体。保守变体的实例可包括例如上文例示的基因和蛋白质的同源物和人工修饰形式。

[0187] 表述“保持原始功能”指基因或蛋白质的变体具有对应于原始基因或蛋白质的功能(例如活性或性质)的功能(例如活性或性质)。当提到基因时,表述“保持原始功能”指该基因的变体编码保持原始功能的蛋白质。也就是说,当提及S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因时,表述“保持原始功能”指基因的变体编码S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶。当提及参与S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶时,表述“保持原始功能”指蛋白质的变体具有S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性。

[0188] S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性可以例如通过将酶与底物,诸如S-腺苷-L-高半胱氨酸和DTNB(5,5'-二硫代二(2-硝基苯甲酸)一起温育,并且于412nm测量产物(诸如高半胱氨酸)依赖性TNB(5-巯基-2-硝基苯甲酸)生成(J Mol Microbiol Biotechnol 2008,15:277-286)来测量。

[0189] 以下将解释保守变体的实例。

[0190] S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因同源物或S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶同源物可以使用上述例示的S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因的任何核苷酸序列或上文例示的S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的任何氨基酸序列作为查询序列通过例如BLAST搜索或FASTA搜索从公共数据库容易地获得。此外,S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因的同源物可以通过例如使用棒状杆菌细菌等生物体的染色体作为模板和基于上述例示的S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因的任何核苷酸序列制备的寡核苷酸作为引物的PCR获得。

[0191] S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因可以是编码蛋白质的基因,所述蛋白质具有任何上述氨基酸序列如以SEQ ID NO:145所示的氨基酸序列,且包括在一个或几个位置处一个或几个氨基酸残基的取代,缺失,插入和/或添加,只要保持原始功能即可。例如,编码的蛋白质可以具有延伸的或缺失的N端和/或C端。尽管以上使用的术语“一个或几个”所表示的数目可以随蛋白质的三维结构中的氨基酸残基的位置或氨基酸残基的类型而不同,具体而言,它例如为1至50,1至40,1至30,1至20,1至10,1至5,或1至3。

[0192] 一个或几个氨基酸残基的上述取代,缺失,插入和/或添加可以各自是保持蛋白质原始功能的保守突变。保守突变的典型实例是保守取代。若取代位点是芳香氨基酸,则保守取代是其中取代在Phe,Trp和Tyr之间相互发生的突变;若它是疏水性氨基酸,则保守取代是取代在Leu,Ile和Val之间相互发生的突变;若它是极性氨基酸;则保守取代是取代在Gln和Asn之间相互发生的突变;若它是碱性氨基酸,则保守取代是取代在Lys,Arg和His之间相互发生的突变;若它是酸性氨基酸,则保守取代是取代在Asp和Glu之间相互发生的突变;以及若它是具有羟基的氨基酸,则保守取代是取代在Ser和Thr之间相互发生的突变。认为是保守取代的取代的实例可以具体包括用Ser或Thr取代Ala,用Gln,His,或Lys取代Arg,用Glu,Gln,Lys,His,或Asp取代Asn,用Asn,Glu,或Gln取代Asp,用Ser或Ala取代Cys,用Asn,Glu,Lys,His,Asp,或Arg取代Gln,用Gly,Asn,Gln,Lys,或Asp取代Glu,用Pro取代Gly,用Asn,Lys,Gln,Arg,或Tyr取代His,用Leu,Met,Val,或Phe取代Ile,用Ile,Met,Val,或用Phe取代Leu,用Asn,Glu,Gln,His,或Arg取代Lys,用Ile,Leu,Val,或Phe取代Met,用Trp,Tyr,Met,Ile,或Leu取代Phe,用Thr或Ala取代Ser,用Ser或Ala取代Thr,用Phe或Tyr取代Trp,用His,Phe,或Trp取代Tyr,以及用Met,Ile,或Leu取代Val。此外,如上所述的氨基酸残基的此类取代,缺失,插入,添加等可以包括由于个体差异引起的天然存在的突变或者该基因来源的生物体的物种的差异(突变体或变体)。

[0193] 此外,S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因可以是编码与上述任何氨基酸序列的总氨基酸序列具有例如50%或更多,65%或更多,80%或更多,90%或更多,95%或更多,97%或更多,或99%或更多的同源性的氨基酸序列的蛋白质的基因,只要保持原始功能。另外,在本说明书中,“同源性”等同于“同一性”。

[0194] 此外,S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因可以是能够在严格条件下与可以从任何前述核苷酸序列,如以SEQ ID NOS:144所示的核苷酸序列制备的探针,例如与任何上述核苷酸序列的全部序列或部分序列互补的序列杂交的基因(例如DNA),只要保持原始功能。“严格条件”可以指形成所谓特异性杂合物,并且不形成非特异性杂合物的条件。严格条件的实例可以包括高度同源的DNA彼此杂交(例如,不小于50%,65%,或80%同源,不小于90%同源,不小于95%同源,不小于97%同源,或不小于99%同源的DNA彼此杂交,并且同源

性小于上述项的DNA不彼此杂交)的那些条件,或典型的Southern杂交的清洗条件,即在与1x SSC,0.1%SDS于60℃;0.1x SSC,0.1%SDS于60℃;或者0.1x SSC,0.1%SDS于68℃对应的盐浓度和温度清洗1次,或2或3次的条件。

[0195] 用于上述杂交的探针可以是与如上述的基因互补的序列的一部分。此类探针可以使用基于已知基因序列制备的寡核苷酸作为引物和含有任何上述基因的DNA片段作为模板通过PCR制备。作为探针,例如可以使用长度约300bp的DNA片段。当使用长度为约300bp的DNA片段作为探针时,具体地,杂交的清洗条件可以是例如50℃,2xSSC和0.1%SDS。

[0196] 此外,由于关于密码子简并性的性质随宿主而变化,S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因可以包括相应等同密码子对任意密码子的替换。也就是说,由于遗传密码的简并性,S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因可以是以上例示的任何S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因的变体。例如,S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶基因可以以使其根据选择的宿主中的密码子频率而具有最佳密码子的方式进行了修饰的基因。

[0197] 例如,可以通过数学算法来确定两个序列之间的序列同一性的百分比。此类数学算法的非限制性实例可以包括Myers and Miller(1988)CABIOS 4:11-17的算法、Smith et al(1981)Adv. Appl. Math. 2:482的局部同源性算法、Needleman and Wunsch(1970)J. Mol. Biol. 48:443-453的同源性比对算法、Pearson and Lipman(1988)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:2444-2448的同源性筛选方法和Karlin and Altschul(1990)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264的算法的修改形式,诸如记载于Karlin and Altschul(1993)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877的。

[0198] 通过使用基于此类数学算法的程序,可以进行用于确定序列同一性的序列比较和比对。该程序可以由计算机适当地执行。此类程序的实例可以包括但不限于PC/Gene程序的CLUSTAL(可从Intelligenetics, Mountain View, Calif. 获得), ALIGN程序(版本2.0)以及Wisconsin Genetics Software Package, 版本8(可从Genetics Computer Group(GCG), 575 Science Drive, Madison, Wis., USA 获得)的GAP, BESTFIT, BLAST, FASTA和TFASTA。使用这些程序的比对可以通过使用例如初始参数来进行。CLUSTAL程序充分记载于Higgins et al. (1988)Gene 73:237-244(1988), Higgins et al. (1989)CABIOS 5:151-153, Corpet et al. (1988)Nucleic Acids Res. 16:10881-90, Huang et al. (1992)CABIOS 8:155-65, 以及Pearson et al. (1994)Meth. Mol. Biol. 24:307-331。

[0199] 为了获得与靶核苷酸序列同源的核苷酸序列,具体而言,例如,可以通过使用BLASTN程序以100的得分和12的字长来进行BLAST核苷酸搜索。为了获得与靶蛋白质同源的氨基酸序列,特别地,例如可以通过以50的得分和3的字长使用BLASTX程序进行BLAST蛋白质搜索。关于BLAST核苷酸搜索和BLAST蛋白质搜索,参见ncbi.nlm.nih.gov。另外,为了比较目的,可以使用Gapped BLAST(BLAST 2.0)以获得包含缺口的比对。另外,可以使用PSI-BLAST来进行重复搜索以检测序列之间的远距离关系。关于Gapped BLAST和PSI-BLAST,参见Altschul et al. (1997)Nucleic Acids Res. 25:3389。当使用BLAST、Gapped BLAST或PSI-BLAST时,可以使用每个程序的初始参数(例如核苷酸序列的BLASTN和氨基酸序列的BLASTX)。比对也可以手动进行。

[0200] 两个序列之间的序列同一性计算为在比对两个序列以便彼此最大限度配合时两个序列中匹配的残基的比率。

[0201] 前述关于基因和蛋白质的保守变体的描述可以在必要修改后应用于任意蛋白质的变体,例如目标物质生物合成酶和编码它们的基因。

[0202] <1-3>增加蛋白质活性的方法

[0203] 以下,将解释用于增加蛋白质诸如S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性的方法。

[0204] 表述“蛋白质的活性得以增加”指与非修饰菌株相比,蛋白质的活性增加。具体而言,表述“蛋白质的活性得以增加”可以意味着与非修饰菌株相比,每细胞的蛋白质的活性增加。术语“非修饰菌株”或“非修饰的微生物的菌株”可以指尚未以增加目标蛋白质活性的方式进行修饰的对照菌株。非修饰菌株的实例可以包括野生型菌株和亲本菌株。非修饰菌株的具体实例可以包括微生物物种的相应类型菌株。非修饰菌株的具体实例还可以包括以上关于微生物描述所例示的菌株。也就是说,在一个实施方案中,与类型菌株,即微生物所属的物种的类型菌株相比,蛋白质的活性可以得以增加。在另一个实施方案中,与谷氨酸棒杆菌ATCC13869菌株相比,蛋白质的活性也可以得以增加。在另一个实施方案中,与谷氨酸棒杆菌ATCC13032菌株相比,蛋白质的活性也可以得以增加。在另一个实施方案中,与大肠杆菌K-12MG1655菌株相比,蛋白质的活性也可以得以增加。“蛋白质活性得以增加”的短语也可以表达为“蛋白质的活性得以增强”。更具体地说,表述“蛋白质的活性得以增加”可以意味着与非修饰菌株相比每细胞的蛋白质的分子数目增加,和/或蛋白质的每个分子的功能增加。也就是说,表述“蛋白质活性得以增加”中的术语“活性”不限于蛋白质的催化活性,而且还可以指编码蛋白质的基因的转录量(即mRNA的量),或蛋白质的翻译量(即蛋白质的量)。此外,“蛋白质的活性得以增加”的短语不仅包括当目标蛋白质的活性在固有具有目标蛋白质活性的菌株中增加时,而且还包括当将目标蛋白质的活性赋予不固有地具有目标蛋白质活性的菌株时。此外,只要蛋白质的活性最终得以增加,宿主中固有存在的目标蛋白质的活性可以弱化和/或消除,然后将适当类型的目标蛋白质赋予宿主。

[0205] 蛋白质活性增加的程度不受特别限制,只要蛋白质的活性与非修饰菌株相比增加即可。蛋白质的活性可以增加至例如非修饰菌株的蛋白质活性的1.2倍以上,1.5倍以上,2倍以上,或3倍以上。此外,当非修饰菌株不具有目标蛋白质的活性时,足够的是由于引入编码蛋白质的基因而产生蛋白质,并且例如,蛋白质可以以使其活性可以得到测量的程度生产。

[0206] 提高蛋白质活性的修饰可以通过例如增加编码该蛋白质的基因的表达来实现。短语“基因的表达得以增加”意指与非修饰菌株如野生型菌株和亲本菌株相比,基因的表达得以增加。具体而言,短语“基因表达得以增加”可以意味着每个细胞的基因表达量与非修饰菌株相比得以增加。更具体地,短语“基因表达得以增加”可以意味着基因的转录量(即mRNA的量)得以增加,和/或基因的翻译量(即从基因表达的蛋白质量)得以增加。“基因表达得以增加”的短语也称为“基因表达得以增强”。基因的表达可以增加至例如非修饰菌株的表达的1.2倍以上,1.5倍以上,2倍以上,或3倍以上。此外,“基因表达得以增加”的短语不仅可以包括当目标基因的表达量在固有表达目标基因的菌株中得以增加时,而且还包括当将基因引入到不固有地表达目标基因并在其中表达的菌株中时。也就是说,短语“基因表达得以增加”也可以意指例如,将目标基因引入不拥有该基因的菌株中并在其中表达。

[0207] 例如,可以通过增加基因的拷贝数来增加基因的表达。

[0208] 可以通过将基因引入宿主的染色体来增加基因的拷贝数。例如可以通过使用同源

重组 (Miller, J.H., Experiments in Molecular Genetics, 1972, Cold Spring Harbor Laboratory) 将基因引入染色体。使用同源重组的基因转移方法的实例可以包括使用线性 DNA 的方法, 诸如 Red 驱动的综合 (Datsenko, K.A., and Wanner, B.L., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 97:6640-6645 (2000)), 使用含有温度敏感性复制起点的质粒的方法, 使用能够接合转移的质粒的方法, 使用不具有在宿主中起作用的复制起点的自杀载体的方法, 使用噬菌体的转导方法。可以引入基因的仅一个拷贝, 或可以引入基因的两个或更多个拷贝。例如, 通过使用以染色体上的多个拷贝存在的序列作为靶标进行同源重组, 可以将多个拷贝的基因引入染色体。以多个拷贝存在于染色体上的此类序列的实例可以包括重复 DNA 和位于转座子两端的反向重复序列。或者, 可以通过使用染色体上的适当序列, 如对于产生目标物质不必要的基因作为靶标进行同源重组。另外, 也可以用转座子或 Mini-Mu (日本专利公开 (Kokai) No. 2-109985, 美国专利 No. 5,882,888, EP 805867 B1) 将基因随机引入染色体。

[0209] 可以通过使用具有与全部基因或其一部分互补的序列的探针进行 Southern 杂交、使用基于该基因序列制备的引物的 PCR 等确认靶基因对染色体的引入。

[0210] 此外, 通过将含有该基因的载体引入宿主中, 也可以增加基因的拷贝数。例如, 通过将含有靶基因的 DNA 片段与在宿主中起作用的载体连接以构建该基因的表达载体, 并用该表达载体转化宿主, 可以增加靶基因的拷贝数。可以通过例如使用具有靶基因的微生物的基因组 DNA 作为模板的 PCR 获得含有靶基因的 DNA 片段。作为载体, 可以使用宿主细胞中可自主复制的载体。该载体可以是多拷贝载体。此外, 载体可以具有用于选择转化体的标志物如抗生素抗性基因。此外, 载体可以具有用于表达引入的基因的启动子和/或终止子。载体可以是例如源自细菌质粒的载体, 源自酵母质粒的载体, 源自噬菌体的载体, 粘粒, 噬菌粒等。可在肠杆菌科细菌诸如大肠杆菌中自主复制的载体的具体实例可以包括例如 pUC19, pUC18, pHSG299, pHSG399, pHSG398, pBR322, pSTV29 (所有这些可购自 Takara Bio), pACYC184, pMW219 (NIPPON GENE), pTrc99A (Pharmacia), pPROK 系列载体 (Clontech), pKK233-2 (Clontech), pET 系列载体 (Novagen), pQE 系列载体 (QIAGEN), pCold TF DNA (TaKaRa), pACYC 系列载体, 和宽宿主范围的载体 RSF1010。可在棒状杆菌细菌中自主复制的载体的具体实例可以包括例如 pHM1519 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984)); pAM330 (Agric. Biol. Chem., 48, 2901-2903 (1984)); 通过改善这些质粒获得并具有药物抗性基因的质粒; 日本专利公开 (Kokai) No. 3-210184 中描述的质粒 pCRY30; 日本专利公开 (Kokai) No. 2-72876 和美国专利 No. 5,185,262 中描述的质粒 pCRY21, pCRY2KE, pCRY2KX, pCRY31, pCRY3KE 和 pCRY3KX; 日本专利公开 (Kokai) No. 1-191686 中描述的质粒 pCRY2 和 pCRY3; 日本专利公开 (Kokai) No. 58-192900 中描述的 pAJ655, pAJ611 和 pAJ1844; 日本专利公开 (Kokai) No. 57-134500 中描述的 pCG1; 日本专利公开 (Kokai) No. 58-35197 中描述的 pCG2; 日本专利公开 (Kokai) No. 57-183799 中描述的 pCG4 和 pCG11; 日本专利公开 (Kokai) No. 10-215883 中描述的 pVK7; W02007/046389 中描述的 pVK9; W02013/069634 中描述的 pVS7; 和日本专利公开 (Kokai) No. 9-070291 中描述的 pVC7。

[0211] 当引入基因时, 宿主可以表达基因是足够的。具体而言, 宿主中存在基因以便其在宿主中起作用的启动子的控制下表达是足够的。术语“在宿主中起作用的启动子”可以指在宿主中显示启动子活性的启动子。启动子可以是源自宿主的启动子或异源启动子。启动子

可以是待引入基因的天然启动子或另一基因的启动子。作为启动子,例如也可以使用如本文描述的更强的启动子。

[0212] 终止基因转录的终止子可以位于基因的下游。终止子没有特别限制,只要其在选择的宿主中起作用。终止子可以是源自宿主的终止子或异源终止子。终止子可以是待引入基因的天然终止子或另一基因的终止子。终止子的具体实例可以包括例如T7终止子、T4终止子、fd噬菌体终止子、tet终止子和trpA终止子。

[0213] 在“Fundamental Microbiology Vol.8, Genetic Engineering, KYORITSU SHUPPAN CO., LTD, 1987”中详细公开了可用于各种微生物中的载体,启动子和终止子,并且可以使用那些。

[0214] 此外,当引入两个或更多个基因时,基因各自可以由宿主表达是足够的。例如,所有基因可以由单个表达载体或染色体携带。此外,基因可以分别由两个或更多个表达载体携带,或者分开由单一或两个或更多个表达载体和染色体携带。也可以引入由两个或更多个基因构成的操纵子。“引入2个或更多个基因”的短语可以指例如引入编码2种或更多种蛋白质(酶等)的相应基因,引入编码构成单一蛋白质复合物(例如酶复合物)的2种或更多种亚基的相应基因以及它们的组合。

[0215] 待引入的基因没有特别限制,只要它编码在宿主中起作用的蛋白即可。待引入的基因可以是源自宿主的基因,或者可以是异源基因。可以例如使用基于该基因的核苷酸序列设计的引物,并使用具有该基因的生物体的基因组DNA,携带该基因的质粒等作为模板通过PCR获得待引入的基因。待引入的基因也可以完全合成,例如基于该基因的核苷酸序列(Gene, 60(1), 115-127(1987))。获得的基因可以原样使用,或者根据需要在修饰后使用。也就是说,可以通过修饰基因来获得基因的变体。基因可以通过已知技术进行修饰。例如,可以通过位点特异性突变方法将目标突变引入DNA的目标位点。也就是说,可以通过位点特异性突变方法修饰基因的编码区,使得编码蛋白的特定位点包括氨基酸残基的取代,缺失,插入和/或添加。位点特异性突变方法的实例可以包括利用PCR的方法(Higuchi, R., 61, 于PCR Technology, Erlich, H.A. Eds., Stockton Press (1989); Carter, P., Meth. in Enzymol., 154, 382(1987))和利用噬菌体的方法(Kramer, W. and Frits, H.J., Meth. 于Enzymol., 154, 350(1987); Kunkel, T.A. et al., Meth. in Enzymol., 154, 367(1987))。或者,可以完全合成基因的变体。

[0216] 另外,当蛋白质作为由多个亚基构成的复合物起作用时,可以修饰多个亚基的部分或全部,只要蛋白质的活性最终得以增加。也就是说,例如,当通过增加基因的表达来增加蛋白质的活性时,可以增强编码亚基的多个基因的部分或全部的表达。通常优选增强编码亚基的多个基因全部的表达。此外,构成该复合物的亚基可以源自单一种类的生物体或两种或更多种生物体,只要该复合物具有目标蛋白质的功能即可。也就是说,例如,可以将编码多个亚基的相同生物体的基因引入宿主,或者可以将编码多个亚基的不同生物体的基因引入宿主中。

[0217] 此外,可以通过改善基因的转录效率增加基因的表达。另外,通过提高基因的翻译效率也可以增加基因的表达。基因的转录效率和基因的翻译效率可以通过例如修饰基因的表达控制序列来改善。术语“表达控制序列”可以共同指影响基因表达的位点。表达控制序列的实例可以包括例如启动子, Shine-Dalgarno (SD) 序列(其也可以称为核糖体结合位点

(RBS))和RBS与起始密码子之间的间隔物区。可以通过使用启动子搜索载体或基因分析软件如GENETYX来鉴定表达控制序列。这些表达调控序列可以通过例如使用温度敏感性载体的方法或Red驱动整合方法(WO2005/010175)进行修饰。

[0218] 通过例如用更强的启动子替换染色体上的基因的启动子可以提高基因的转录效率。术语“更强的启动子”可以指与基因的固有的野生型启动子相比提供改善的基因转录的启动子。更强的启动子的实例可以包括例如已知的高表达启动子,诸如T7启动子、trp启动子、lac启动子、thr启动子、tac启动子、trc启动子、tet启动子、araBAD启动子、rpoH启动子、msrA启动子、Pml启动子(源自双歧杆菌属(*Bifidobacterium*))、PR启动子和PL启动子。在棒状杆菌细菌中可用的更强启动子的实例可以包括例如在棒状杆菌细菌中用乙酸、乙醇、丙酮酸等可诱导的人工修饰的P54-6启动子(*Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 674-679 (2000)), pta, aceA, aceB, adh, 和 amyE 启动子, cspB, SOD 和 tuf (EF-Tu) 启动子, 它们是能够在棒状杆菌细菌中提供大表达量的有力启动子(*Journal of Biotechnology*, 104 (2003) 311-323; *Appl. Environ. Microbiol.*, 2005Dec; 71 (12): 8587-96), P2启动子(SEQ ID NO: 108的位置942-1034)和P3启动子(SEQ ID NO: 111)以及lac启动子, tac启动子和trc启动子。此外,作为更强的启动子,通过使用各种报道基因也可以获得高活性类型的现有启动子。例如,通过使启动子区中的-35和-10区更接近共有序列,可以增强启动子的活性(WO00/18935)。高活性型启动子的实例可以包括各种tac样启动子(Katashkina JI et al., Russian Federation Patent Application No.2006134574)。在Goldstein et al. (*Prokaryotic Promoters in Biotechnology, Biotechnol. Annu. Rev.*, 1, 105-128 (1995))的论文等中描述了评估启动子强度的方法和强启动子的实例。

[0219] 例如,通过用更强的SD序列替换染色体上的基因的Shine-Dalgarno (SD) 序列(其也可以称为核糖体结合位点(RBS)),可以改善基因的翻译效率。术语“更强的SD序列”可以指与基因固有的野生型SD序列相比提供改善的mRNA翻译的SD序列。更强的SD序列的实例可以包括例如源自噬菌体T7的基因10的RBS(Olins P.O. et al, *Gene*, 1988, 73, 227-235)。此外,已知在RBS和起始密码子之间的间隔物区中,特别是在紧邻起始密码子上游的序列(5'-UTR)中,几个核苷酸的取代,插入或缺失显著影响mRNA的稳定性和翻译效率,因此,也可以通过修饰来改善基因的翻译效率。

[0220] 基因的翻译效率也可以通过例如修饰密码子来改善。例如,通过用更频繁使用的同义密码子取代基因中存在的稀有密码子,可以提高基因的翻译效率。也就是说,例如,基因可以以使该基因含有根据在选择的主宿中观察到的密码子频率的最佳密码子的方式进行了修饰。例如,可以通过用于将目标突变引入DNA的目标位点中的位点特异性突变方法替换密码子。或者,可以完全合成替换目标密码子的基因片段。“密码子选择数据库”(kazusa.or.jp/codon; Nakamura, Y. et al, *Nucl. Acids Res.*, 28, 292 (2000))中公开了各种生物体中的密码子的频率。

[0221] 此外,基因的表达还可以通过扩增增加基因表达的调节子或缺失或弱化减少基因表达的调节子来增加。

[0222] 可以独立使用或以任意组合使用如上所述用于增加基因表达的此类方法。

[0223] 此外,也可以通过例如增强酶的比活性来获得增加蛋白质活性的修饰。比活性的增强也可以包括对反馈抑制的脱敏。也就是说,当蛋白质被代谢物反馈抑制时,可以通过使

选择的宿主中的基因或蛋白质突变以对反馈抑制脱敏来增加蛋白质的活性。短语“对反馈抑制脱敏”可以包括消除反馈抑制,和弱化反馈抑制,除非另有叙述。此外,“对反馈抑制脱敏”的短语,即当反馈抑制得到消除或弱化时,也可以称为“对反馈抑制耐受”。通过例如搜索各种生物体可以获得显示增强的比活性的蛋白质。此外,通过向现有蛋白质中引入突变也可以获得高活性类型的固有蛋白质。待引入的突变可以是例如在蛋白质的一个或几个位置上一个或几个氨基酸残基的取代,缺失,插入和/或添加。可以通过例如如上所述的此类位点特异性突变方法来引入突变。突变也可以通过例如诱变处理来引入。诱变处理的实例可以包括X射线照射,紫外线照射和用突变剂如N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG),甲磺酸乙酯(EMS)和甲磺酸甲酯(MMS)处理。此外,可以通过用羟胺在体外直接处理DNA来诱导随机突变。比活性的增强可以独立使用,或者可以与如上述用于增强基因表达的此类方法任意组合使用。

[0224] 用于转化的方法不受特别限制,并且可以使用常规已知的方法。可以使用例如用氯化钙处理接受细胞以增加其对DNA的通透性的方法,其已经对大肠杆菌K-12菌株报道(Mandel,M.and Higa,A.,J.Mol.Biol.,1970,53,159-162),以及从生长阶段中的细胞制备感受态细胞,接着用DNA转化的方法,其已经对枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)报告(Duncan,C.H.,Wilson,G.A.and Young,F.E.,Gene,1977,1:153-167)。或者,可以使用使DNA-接受细胞变为原生质体或原生质球(其可以容易摄取重组DNA),接着将重组DNA引入DNA-接受细胞中的方法,已知该方法适用于枯草芽孢杆菌、放线菌和酵母(Chang,S.and Choen,S.N.,1979,Mol.Gen.Genet.,168:111-115;Bibb,M.J.,Ward,J.M.and Hopwood,O.A.,1978,Nature,274:398-400;Hinnen,A.,Hicks,J.B.and Fink,G.R.,1978,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,75:1929-1933)。此外,也可以使用对棒状杆菌细菌报告的电脉冲方法(日本专利公开(Kokai)No.2-207791)。

[0225] 可以通过测量蛋白质的活性来确认蛋白质活性的增加。

[0226] 通过确认编码蛋白质的基因的表达增加,也可以确认蛋白质活性的增加。可以通过确认基因转录量的增加或通过确认从该基因表达的蛋白质质量的增加来确认基因表达的增加。

[0227] 可以通过比较从基因转录的mRNA的量与非修饰菌株如野生型菌株或亲本菌株的mRNA量来确认基因转录量的增加。用于评估mRNA量的方法的实例可以包括Northern杂交,RT-PCR等(Sambrook,J.,et al.,Molecular Cloning A Laboratory Manual/第三版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor(USA),2001)。mRNA的量可以增加例如非修饰菌株的mRNA量的1.2倍以上,1.5倍以上,2倍以上或3倍以上。

[0228] 可以通过使用抗体的Western印迹法(Molecular Cloning,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor(USA),2001)来确认蛋白质质量的增加。蛋白质的量(诸如每细胞的蛋白质分子的数目)可以增加例如非修饰菌株的蛋白质质量的1.2倍以上,1.5倍以上,2倍以上或3倍以上。

[0229] 除增强S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性以外,上述提高蛋白质活性的方法可用于提高任意蛋白质如目标物质生物合成酶,磷酸泛酰巯基乙胺基化酶和物质摄取系统的活性,和增强任意基因如编码那些任意蛋白质的基因的表达。

[0230] <1-4>降低蛋白质活性的方法

[0231] 以下,将解释用于降低蛋白质的活性的方法。

[0232] 表述“蛋白质的活性得以降低”指与非修饰菌株相比蛋白质的活性得以降低。具体而言,表述“蛋白质的活性得以降低”可以意味着与非修饰菌株相比,每个细胞的蛋白质的活性得以降低。术语“非修饰菌株”可以指尚未以使目的蛋白质的活性得以降低的方式进行修饰的对照菌株。非修饰菌株的实例可以包括野生型菌株和亲本菌株。非修饰菌株的具体实例可以包括微生物物种的相应类型菌株。非修饰菌株的具体实例还可以包括以上关于微生物描述所例示的菌株。也就是说,在一个实施方案中,与类型菌株,即微生物所属的物种的类型菌株相比,可以降低蛋白质的活性。在另一个实施方案中,与谷氨酸棒杆菌ATCC 13869菌株相比,蛋白质的活性也可以得以降低。在另一个实施方案中,与谷氨酸棒杆菌ATCC 13032相比,蛋白质的活性也可以得以降低。另一个实施方案中,与大肠杆菌K-12 MG1655菌株相比,蛋白质的活性也可以得以降低。“蛋白质活性得以降低”的短语还可以包括当蛋白质的活性已经完全消失时。更具体地说,表述“蛋白质的活性得以降低”可以意味着与非修饰的菌株相比每个细胞的蛋白质的分子数目得以减少,和/或蛋白质的每个分子的功能得以降低。也就是说,表述“蛋白质的活性得以降低”中的术语“活性”不限于蛋白质的催化活性,而且还可以指编码蛋白质的基因的转录量(即mRNA的量)或蛋白质的翻译量(即蛋白质的量)。“每个细胞的蛋白质的分子数目得以减少”的短语还可以包括当完全不存在蛋白质时。“蛋白质的每个分子的功能得以降低”的短语也可以包括当每个蛋白质分子的功能完全消失时。蛋白质活性降低的程度没有特别限制,只要活性与非修饰菌株的活性相比降低即可。蛋白质的活性可以降低到例如非修饰菌株的蛋白质活性的50%或更少,20%或更少,10%或更少,5%或更少,或0%。

[0233] 可以通过例如减少编码蛋白质的基因的表达来实现用于降低蛋白质活性的修饰。短语“基因的表达得以降低”指与非修饰菌株如野生型菌株和亲本菌株相比,该基因的表达得以降低。具体而言,短语“基因表达得以降低”可以意味着与非修饰菌株相比,每个细胞的基因表达得以降低。更具体地说,短语“基因表达得以降低”可以意味着基因的转录量(即mRNA的量)得以减少,和/或基因的翻译量(即从基因表达的蛋白质量)得以减少。“基因表达得以降低”的短语也可以包括当基因完全不表达时。“基因表达得以降低”的短语也可以称为“基因表达得以弱化”。基因的表达可以降低到例如非修饰菌株的表达的50%或更少,20%或更少,10%或更少,5%或更少,或0%。

[0234] 基因表达的降低可以是例如由于转录效率降低,翻译效率降低或组合所致。可以通过修饰基因的表达控制序列诸如启动子,Shine-Dalgarno (SD) 序列(其也可以称为核糖体结合位点(RBS)),和基因的RBS和起始密码子之间的间隔物区来降低基因的表达。当修饰表达控制序列时,修饰表达控制序列的一个或多个核苷酸,两个或更多个核苷酸,或三个或更多个核苷酸。例如,通过用更弱的启动子替换染色体上基因的启动子,可以降低基因的转录效率。术语“更弱的启动子”可以指与基因固有的野生型启动子相比,提供基因的弱化转录的启动子。更弱启动子的实例可以包括例如诱导型启动子。也就是说,诱导型启动子可以在非诱导条件下,例如在不存在相应诱导物的情况下,起到更弱启动子的作用。更弱启动子的实例还可以包括例如P4和P8启动子(分别为SEQ ID NO:109的位置872-969和SEQ ID NO:110的位置901-1046)。此外,可以缺失表达控制序列的一部分或全部。基因的表达还可以通过例如操纵负责表达控制的因子来降低。负责表达控制的因子的实例可以包括负责转录或

翻译控制的低分子(诸如诱导剂,抑制剂等),负责转录或翻译控制的蛋白质(转录因子等),负责转录或翻译控制的核酸(诸如siRNA等),等等。此外,通过例如对基因的编码区引入降低基因表达的突变,也可以降低基因的表达。例如,通过用在宿主中不太频繁使用的同义密码子替换基因编码区中的密码子,可以降低基因的表达。此外,例如,如本文所述,基因表达可以由于基因的破坏而降低。

[0235] 用于降低蛋白质活性的修饰也可以通过例如破坏编码该蛋白质的基因来获得。短语“基因受到破坏”可以指基因以使得不产生通常可以起作用的蛋白质的方式进行了修饰。“不产生通常可以起作用的蛋白质”的短语可以包括当完全不从基因产生蛋白质时和当从基因产生每个分子的功能(例如活性或性质)得以降低或消除的蛋白质时。

[0236] 可以通过例如缺失染色体上的基因来获得基因的破坏。术语“基因的缺失”可以指基因编码区的部分或整个区域的缺失。此外,可以缺失包括染色体上基因的编码区上游和下游序列的整个基因。只要可以降低蛋白质的活性,待缺失的区域可以是任何区域,例如N端区域(即编码蛋白质的N端区域的区域),内部区域或C端区域(即编码蛋白质的C端区域的区域)。缺失更长的区域通常可以更确定地使基因失活。待缺失的区域可以是具有例如基因的编码区的总长度的10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、或95%以上的长度的区域。此外,优选的是,待缺失的区域的上游和下游序列的阅读框不相同。读码框的不一致性可以引起待缺失的区域下游的移码。

[0237] 例如,也可以通过对染色体上基因的编码区引入用于氨基酸取代的突变(错义突变),终止密码子的突变(无义突变),添加或缺失一个或两个核苷酸残基的突变(移码突变)等获得基因的破坏(Journal of Biological Chemistry,272:8611-8617(1997); Proceedings of the National Academy of Sciences,USA,95 5511-5515(1998); Journal of Biological Chemistry,26 116,20833-20839(1991))。

[0238] 也可以通过例如将另一个核苷酸序列插入到染色体上的基因的编码区中获得基因的破坏。插入的位点可以位于基因的任何区域中,并且插入更长的核苷酸序列通常可以更确定地使基因失活。优选的是插入位点上游和下游序列的阅读框不相同。读码框的不一致性可以引起待缺失的区域下游的移码。其他核苷酸序列没有特别限制,只要选择降低或消除所编码蛋白质活性的序列即可,并且其实例可以包括例如标志物基因如抗生素抗性基因,以及可用于产生目标物质的基因。

[0239] 特别地,可以以编码蛋白质的氨基酸序列得以缺失的方式进行基因的破坏。换言之,可以通过例如缺失蛋白质的氨基酸序列,特别地修饰基因以使该基因编码氨基酸序列得以的蛋白质来实现降低蛋白质活性的修饰。短语“蛋白质的氨基酸序列的缺失”可以指蛋白质的氨基酸序列的部分或整个区域的缺失。另外,短语“蛋白质的氨基酸序列的缺失”可以指原始氨基酸序列在蛋白质中消失,并且还可以包括当原始氨基酸序列变为另一个氨基酸序列时。也就是说,例如,通过移码改变为另一氨基酸序列的区域可以视为缺失区域。当蛋白质的氨基酸序列得以缺失时,通常缩短蛋白质的总长度,但也可以存在蛋白质的总长度没有改变或延长的情况。例如,通过缺失基因编码区的部分或整个区域,可以在编码的蛋白质中缺失由缺失区域编码的区域。另外,例如,通过将终止密码子引入基因的编码区中,可以在编码的蛋白质中缺失由引入位点的下游区域编码的区域。另外,例如,通过在基因的编码区中移码,可以在编码的蛋白质中缺失由移码区编码的区域。关于基因缺失中待缺失

区域的位置和长度的上述描述可以在必要修改后应用于缺失蛋白质氨基酸序列中待缺失区域的位置和长度。

[0240] 如上所述的染色体上基因的此类修饰可以如下获得:通过例如制备以使基因不能产生通常起作用的蛋白质的方式进行了修饰的破坏类型基因,并用含有破坏类型基因的重组DNA转化宿主以引起破坏类型基因和染色体上的野生型基因之间的同源重组,从而用该破坏类型基因取代染色体上的野生型基因。在该程序中,若重组DNA中包括根据宿主特征如营养缺陷选择的标志物基因,则操作变得更容易。破坏类型基因的实例可以包括编码区的部分或整个区域得以缺失的基因,包含错义突变的基因,包括无义突变的基因,包含移码突变的基因,以及包含转座子或标志物基因插入的基因。由破坏类型基因编码的蛋白质即使产生也具有与野生型蛋白质不同的构象,因此其功能得以降低或消除。已经建立了基于使用同源重组的基因取代的此类基因破坏,并且存在使用线性DNA的方法,诸如称为“Red驱动整合”的方法(Datsenko,K.A,and Wanner,B.L.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,97:6640-6645 (2000)),以及利用Red驱动整合与源自 λ 噬菌体的切除系统的组合的方法(Cho,E.H.,Gumport,R.I.,Gardner,J.F.,J.Bacteriol.,184:5200-5203 (2002))(参考W02005/010175),使用具有温度敏感性复制起点的质粒的方法,使用能够接合转移的质粒的方法,利用没有在宿主中起作用的复制起点的自杀载体的方法(美国专利号6,303,383,日本专利公开(Kokai)No.05-007491),等等。

[0241] 用于降低蛋白质活性的修饰也可以通过例如诱变处理来获得。诱变处理的实例包括X射线或紫外线的照射和用突变剂如N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG),甲磺酸乙酯(EMS)和甲磺酸甲酯(MMS)处理。

[0242] 如上文提及的用于降低蛋白质活性的此类方法可以独立使用或者以任意组合使用。

[0243] 当蛋白质作为由多个亚基构成的复合物起作用时,可以修饰多个亚基的部分或全部,只要蛋白质的活性最终得以降低。也就是说,例如,编码相应亚基的多个基因的部分或全部可以得以破坏等。此外,当蛋白质存在多种同工酶时,多种同工酶的部分或全部活性可以得以降低,只要蛋白质的活性最终得以降低。也就是说,例如,编码相应同工酶的多个基因的部分或全部可以得以破坏等。

[0244] 可以通过测量蛋白质的活性确认蛋白质活性的降低。

[0245] 蛋白质活性的降低也可以通过确认编码该蛋白质的基因的表达的降低来确认。基因表达的降低可以通过确认基因转录量的减少或从基因表达的蛋白质量的降低来确认。

[0246] 通过比较从基因转录的mRNA的量与非修饰菌株中观察到的量,可以确认基因转录量的降低。用于评估mRNA量的方法的实例可以包括Northern杂交,RT-PCR等(Molecular Cloning,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor(USA),2001)。mRNA的量可以降低到例如在非修饰菌株中观察到的量的50%或更少,20%或更少,10%或更少,5%或更少,或0%。

[0247] 通过使用抗体的Western印迹法(Molecular Cloning,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor(USA)2001)可以确认蛋白质量的减少。蛋白质的量(诸如每个细胞的蛋白质的分子数目)可以降低到例如在非修饰菌株中观察到的蛋白质量的50%或更少,20%或更少,10%或更少,5%或更少,或0%。

[0248] 可以根据用于破坏的手段通过确定基因的部分或全部的核苷酸序列,基因的限制酶图谱,全长等来确认基因的破坏。

[0249] 上述的降低蛋白质活性的方法还可以适用于任意蛋白质诸如副产物生成酶的活性降低,以及任意基因诸如编码那些任意蛋白的基因的表达降低。

[0250] <2>用于生产目标物质的方法

[0251] 如本文中描述的方法是通过使用如本文中描述的微生物生产目标物质的方法。

[0252] <2-1>发酵方法

[0253] 可以通过例如如本文中描述的微生物的发酵来生产目标物质。也就是说,如本文中描述的方法的实施方案可以通过发酵微生物来生产目标物质的方法。此实施方案也可以称为“发酵方法”。此外,通过发酵如本文中所述的微生物生产目标物质的步骤也可以称为“发酵步骤”。

[0254] 可以通过培养如本文中描述的微生物来进行发酵步骤。具体而言,在发酵方法中,可以从碳源生产目标物质。也就是说,发酵步骤可以是例如在培养基,诸如含有碳源的培养基中培养微生物以在培养基中生产和积累目标物质的步骤。也就是说,发酵方法可以是用于生产目标物质的方法,其包括以下步骤:例如在培养基,诸如含有碳源的培养基中培养微生物以在培养基中生产和积累目标物质的方法。此外,换言之,发酵步骤可以是例如通过使用微生物从碳源生产目标物质的步骤。

[0255] 待使用的培养基没有特别限制,只要微生物可以在其中增殖并产生目标物质即可。作为培养基,例如可以使用用于培养微生物诸如细菌和酵母的典型培养基。培养基可以根据需要含有碳源,氮源,磷酸盐源,硫源,以及其他培养基组分,如各种有机组分和无机组分。培养基成分的类型和浓度可以根据诸如选择的微生物的类型等各种条件适当确定。

[0256] 碳源没有特别限制,只要微生物可以利用它并产生目标物质即可。碳源的具体实例可以包括例如糖类,诸如葡萄糖,果糖,蔗糖,乳糖,半乳糖,木糖,阿拉伯糖,赤糖糊(blackstrap molasses),淀粉的水解物和生物质的水解物;有机酸如乙酸,柠檬酸,琥珀酸和葡糖酸;醇如乙醇,甘油和粗甘油;和脂肪酸。作为碳源,特别地,可以使用植物来源的材料。植物的实例可以包括例如玉米,稻,小麦,大豆,甘蔗,甜菜和棉。植物来源材料的实例可以包括例如器官,诸如根,茎,干,枝,叶,花和种子,包括它们的植物体和这些植物器官的分解产物。植物来源材料的在其使用时的形式没有特别限定,并且它们可以以诸如未加工产物,汁,研磨产物,纯化产物等任何形式使用。戊糖如木糖,己糖如葡萄糖或它们的混合物可从例如植物生物质获得并且得到使用。具体而言,可以通过将植物生物质进行处理,诸如蒸汽处理,浓酸水解,稀酸水解,纤维素酶等酶水解,碱处理而得到这些糖类。由于半纤维素与纤维素相比通常更容易水解,因此可预先水解植物生物质中的半纤维素以释放戊糖,然后可以水解纤维素以产生己糖。此外,木糖可以通过例如通过对微生物赋予用于将己糖如葡萄糖转化为木糖的途径从己糖转化供应。作为碳源,可以使用一种碳源,或者可以组合使用两种或更多种碳源。

[0257] 培养基中碳源的浓度没有特别限制,只要微生物可以增殖并产生目标物质即可。培养基中碳源的浓度可以在使得目标物质的生产不受抑制的范围内尽可能高。碳源在培养基中的初始浓度通常可以是例如通常5至30% (w/v),或10至20% (w/v)。此外,可以根据需要对培养基添加碳源。例如,可以与伴随发酵进展的碳源的减少或消减成比例地对培养基

添加碳源。虽然可以暂时消减碳源,但是只要最终可以生产目标物质,可以优选以不消减碳源或不继续消减碳源的方式进行培养。

[0258] 氮源的具体实例可以包括例如铵盐如硫酸铵,氯化铵和磷酸铵,有机氮源如蛋白胨,酵母提取物,肉膏和大豆蛋白分解产物,氨和尿素。用于pH调节的氨气和氨水也可用作氮源。作为氮源,可以使用一种氮源,也可以组合使用两种或更多种的氮源。

[0259] 磷酸盐源的具体实例可以包括例如磷酸盐如磷酸二氢钾和磷酸氢二钾,以及磷酸聚合物如焦磷酸。作为磷酸盐源,可以使用一种磷酸盐源,或者可以组合使用两种或更多种磷酸盐源。

[0260] 硫源的具体实例可以包括例如无机硫化合物如硫酸盐,硫代硫酸盐和亚硫酸盐,以及含硫氨基酸如半胱氨酸,胱氨酸和谷胱甘肽。作为硫源,可以使用一种硫源,或者可以组合使用两种或更多种硫源。

[0261] 其他各种有机和无机组分的具体实例可以包括例如无机盐如氯化钠和氯化钾;微量金属如铁,锰,镁和钙;维生素如维生素B1,维生素B2,维生素B6,烟酸,烟酰胺和维生素B12;氨基酸;核酸;和含有这些的有机成分如蛋白胨,酪蛋白氨基酸,酵母提取物和大豆蛋白分解产物。作为其他各种有机和无机组分,可以使用一种组分,或者可以组合使用两种或更多种组分。

[0262] 此外,当使用需要营养物如氨基酸进行生长的营养缺陷型突变株时,优选培养基含有此类需要的营养物。此外,培养基可以含有用于生产目标物质的组分。此类组分的具体实例可以包括例如甲基供体例如SAM及其前体例如甲硫氨酸。

[0263] 培养条件没有特别限制,只要微生物可以增殖并且产生目标物质即可。培养可以用例如用于培养微生物诸如细菌和酵母的典型条件进行。培养条件可以根据诸如选择的微生物的种类等各种条件适当确定。

[0264] 培养可以通过使用液体培养基来进行。在培养时,例如,可以将诸如琼脂培养基等固体培养基上培养的微生物直接接种到液体培养基中,或者将在液体培养基中作为种子培养物培养的微生物接种到液体培养基中进行主要培养。也就是说,培养可以作为种子培养和主要培养分开进行。在此类情况下,种子培养和主要培养的培养条件可以是相同的或者可以是不相同。至少在主要培养过程中产生目标物质是足够的。培养开始时培养基中存在的微生物的量没有特别限制。例如,显示OD660为4-100的种子培养液可以在开始培养时以0.1-100质量%,或1-50质量%的量接种到用于主要培养的培养基中。

[0265] 培养可以以分批培养,补料分批培养,连续培养或这些的组合进行。在培养开始时使用的培养基也可以称为“起始培养基”。在补料分批培养或连续培养中添加到培养系统(例如发酵罐)的培养基也可以称为“补料培养基”。为了在补料分批培养或者连续培养中向培养系统添加补料培养基也可以称为“补料”。此外,当作为种子培养和主要培养分开进行培养时,种子培养和主要培养的培养方案可以相同或可以不同。例如,种子培养和主要培养两者都可以作为分批培养进行。或者,例如,种子培养可以作为分批培养进行,并且主要培养可以以补料分批培养或连续培养进行。

[0266] 各种组分诸如碳源可以存在于起始培养基,补料培养基或两者中。也就是说,各种组分诸如碳源可以在培养期间独立地或以任意组合的方式添加到培养基。这些组分可以添加一次或多次,或者可以连续添加。起始培养基中存在的组分的类型可以与补料培养基中

存在的组分的类型相同或不同。此外,起始培养基中存在的组分的浓度可以与补料培养基中存在的组分的浓度相同或不同。此外,可以使用两种或更多种含有不同类型和/或不同浓度组分的补料培养基。例如,当间歇进行两次或更多次补料时,补料培养基中存在的组分的类型和/或浓度对于每次补料可以是相同的或者可以是不同的。

[0267] 培养可以例如在需氧条件下进行。术语“需氧条件”可以指其中培养基中的溶解氧浓度为0.33ppm或更高,或1.5ppm或更高的条件。可以将氧浓度控制为例如饱和氧浓度的1-50%,或约5%。培养可以例如在通气或摇动下进行。培养基的pH值可以是例如3至10,或4.0至9.5。培养基的pH可以根据需要在培养过程中进行调整。培养基的pH可以通过使用各种碱性和酸性物质如氨气,氨水,碳酸钠,碳酸氢钠,碳酸钾,碳酸氢钾,碳酸镁,氢氧化钠,氢氧化钙和氢氧化镁来调节。培养温度可以是例如20至45℃,或25至37℃。培养时间可以是例如10至120小时。例如,可以继续培养直到培养基中存在的碳源被消耗,或者直到微生物的活性丧失。

[0268] 通过在诸如上文所述的条件下培养微生物,在培养基中积累目标物质。

[0269] 可以通过用于检测或鉴定化合物的已知方法来确认目标物质的产生。此类方法的实例可以包括例如HPLC, UPLC, LC/MS, GC/MS和NMR。这些方法可以独立使用,或者可以以适当的组合使用。这些方法也可以用于确定培养基中存在的各种组分的浓度。

[0270] 生产的目标物质可以适当收集。也就是说,发酵方法可以进一步包括收集目标物质的步骤。此步骤也可以称为“收集步骤”。收集步骤可以是培养肉汤,特别是从培养基中收集目标物质的步骤。目标物质可以通过用于分离和纯化化合物的已知方法收集。此类方法的实例可以包括例如离子交换树脂法,膜处理,沉淀,提取,蒸馏和结晶。具体地,目标物质也可以通过用有机溶剂如乙酸乙酯萃取或通过蒸汽蒸馏来收集。这些方法可以独立使用,或者可以以适当的组合使用。

[0271] 此外,当目标物质沉淀在培养基中时,它可以通过例如离心或过滤收集。在培养基中溶解的目标物质结晶后,可以将沉淀在培养基中的目标物质和溶解在培养基中的目标物质一起分离。

[0272] 除了目标物质之外,收集的目标物质可以包含例如微生物细胞,培养基组分,水分和微生物的副产物代谢物。收集的目标物质的纯度可以是例如30% (w/w) 或更高,50% (w/w) 或更高,70% (w/w) 或更高,80% (w/w) 或更高,90% (w/w) 或更高,或95% (w/w) 或更高。

[0273] <2-2>生物转化方法

[0274] 目标物质也可以通过例如使用如本文中所述的微生物的生物转化来产生。也就是说,如本文中所述的方法的另一个实施方案可以是使用微生物通过生物转化来生产目标物质的方法。该实施方案也可以称为“生物转化方法”。此外,使用微生物通过生物转化来生产目标物质的步骤也可以称为“生物转化步骤”。

[0275] 具体而言,在生物转化方法中,目标物质可以从目标物质的前体产生。更具体而言,在生物转化方法中,通过使用微生物,可以通过将目标物质的前体转化为目标物质来生产目标物质。也就是说,生物转化步骤可以通过使用微生物将目标物质的前体转化为目标物质的步骤。

[0276] 目标物质的前体也可以简称为“前体”。前体的实例可以包括下述物质,该物质向目标物质的转化包括需要SAM。前体的具体实例可以包括目标物质的生物合成途径的中间

体,如就目标物质生物合成酶的描述而言所述的那些,条件是中间体向目标物质的转化需要SAM。前体的更具体实例可以包括例如原儿茶酸,原儿茶醛,L-色氨酸,L-组氨酸,香草酸,苯甲酸,L-苯丙氨酸,L-酪氨酸,L-精氨酸,L-鸟氨酸和甘氨酸。原儿茶酸可以用作生产例如香草醛,香草酸或愈创木酚的前体。原儿茶醛可以用作生产例如香草醛的前体。L-色氨酸可以用作生产例如褪黑激素的前体。L-组氨酸可以用作生产例如麦角硫因的前体。L-苯丙氨酸和L-酪氨酸各自可以用作生产例如阿魏酸,4-乙烯基愈创木酚或4-乙基愈创木酚的前体。L-精氨酸和L-鸟氨酸各自可以用作生产例如多胺的前体。L-精氨酸和甘氨酸各自可以用作生产例如肌酸的前体。作为前体,可以使用一种前体,或者可以组合使用两种或更多种前体。在前体是可以形成盐的化合物的情况下,前体可以作为游离化合物,其盐或其混合物使用。也就是说,术语“前体”可以指游离形式的前体,其盐或其混合物,除非另有说明。盐的实例可以包括例如硫酸盐,盐酸盐,碳酸盐,铵盐,钠盐和钾盐。作为前体的盐,可以使用一种盐,或者可以组合使用两种或更多种盐。

[0277] 作为前体,可以使用商业产品,或者可以使用适当制备和获得的产品。也就是说,生物转化方法可以进一步包括生产前体的步骤。生产前体的方法没有特别限定,例如可以使用已知的方法。前体可以通过例如化学合成法,酶法,生物转化法,发酵法,提取方法或它们的组合来生产。也就是说,例如,目标物质的前体可以使用酶(该酶也可以称为“前体生物合成酶”)从其另外的前体产生,所述酶催化此类另外的前体转化成目标物质的前体。此外,例如,通过使用具有前体生产能力的微生物,可以从碳源或此类另外的前体生产目标物质的前体。短语“具有前体生产能力的微生物”可以指能够从碳源或其另外的前体生产目标物质的前体的微生物。例如,根据酶法或生物转化法生产原儿茶酸的方法的实例可以包括使用恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)KS-0180(日本专利公开(Kokai)No.7-75589)将对甲酚转化为原儿茶酸的方法,使用NADH依赖性对羟基苯甲酸羟化酶将对羟基苯甲酸转化为原儿茶酸的方法(日本专利公开(Kokai)No.5-244941),通过在含有对苯二甲酸的培养基中培养含有参与从对苯二甲酸生成原儿茶酸的反应的基因的转化体来生产原儿茶酸的方法(日本专利公开(Kokai)No.2007-104942),以及通过使用具有原儿茶酸生产能力并且具有原儿茶酸5-氧化酶活性降低或该活性缺乏的微生物从其前体生产原儿茶酸的方法(日本专利公开(Kokai)No.2010-207094)。此外,通过发酵生产原儿茶酸的方法的实例可以包括通过使用短杆菌属细菌和乙酸作为碳源生产原儿茶酸的方法(日本专利公开(Kokai)No.50-89592),通过使用引入有编码3-二氢莽草酸脱氢酶的基因的埃希氏菌属或克雷伯氏菌属细菌和葡萄糖作为碳源生产原儿茶酸的方法(美国专利号5,272,073)。此外,原儿茶醛可以通过根据使用ACAR的酶法或使用具有ACAR的微生物的生物转化法使用原儿茶酸作为前体生产。生产的前体可以原样或者根据需要进行适当的处理如浓缩,稀释,干燥,溶解,分馏,提取和纯化后用于生物转化方法。也就是说,作为前体,例如可以使用纯化至所需程度的纯化产物,或者可以使用含有前体的材料。含有前体的材料没有特别限制,只要微生物可以使用前体即可。含有前体的材料的具体实例可以包括通过培养具有前体生产能力的微生物获得的培养肉汤,与培养肉汤分离的培养上清液及其加工产物如其浓缩产物(如浓缩液体)和其干燥产物。

[0278] 在一个实施方案中,生物转化步骤可以通过例如培养如本文中所述的微生物来进行。该实施方案也可以称为“生物转化方法的第一实施方案”。也就是说,生物转化步骤可以

是例如在含有目标物质的前体的培养基中培养微生物以将该前体转化为目标物质的步骤。生物转化步骤具体可以是在含有目标物质的前体的培养基中培养微生物以在培养基中产生并积累目标物质的步骤。

[0279] 要使用的培养基没有特别限制,只要培养基含有目标物质的前体,并且微生物可以在其中增殖并产生目标物质。培养条件没有特别限制,只要微生物可以增殖并且产生目标物质即可。关于发酵方法所提及的文化的描述,诸如关于培养基和培养条件的描述可以在必要修改后适用于生物转化方法的第一实施方案中的培养,只是培养基在第一实施方案中含有前体。

[0280] 前体可以在整个培养期内存在在培养基中,或者可以在培养的部分时期期间存在在培养基中。也就是说,短语“在含有前体的培养基中培养微生物”并不一定意味着培养基在整个培养期内都存在前体。例如,从培养开始起培养基中可以存在或可以不存在前体。当在培养开始时培养基中不存在前体时,在培养开始后将前体添加到培养基。添加的时机可以根据诸如培养期的长度等各种条件适当确定。例如,在微生物充分生长后,可以将前体添加到培养基中。此外,在任何情况下,可以根据需要将前体添加到培养基。例如,可以与伴随目标物质生成的前体的减少或消减成比例地对培养基添加前体。用于将前体添加到培养基的方法没有特别限制。例如,可以通过将含有前体的补料培养基补料到培养基来将前体供应给培养基。此外,例如,如本文中所述的微生物和具有前体生产能力的微生物可以共培养以允许具有前体生产能力的微生物在培养基中产生前体,从而将前体添加到培养基。这些添加方法可以独立使用,或者可以以适当的组合使用。前体在培养基中的浓度没有特别限制,只要微生物可以使用该前体作为目标物质的原料即可。前体在培养基中的浓度例如可以为0.1g/L或更高,1g/L或更高,2g/L或更高,5g/L或更高,10g/L或更高,或者15g/L或更高,或者可以是200g/L或更低,100g/L或更低,50g/L或更低,或者20g/L或更低,或者可以在由其组合限定的范围内(按游离化合物的重量计)。在整个培养期内,前体可以以或不上文例示的范围内的浓度存在于培养基中。例如,在培养开始时前体可以以上文例示的范围内的浓度存在于培养基中,或者可以将其添加到培养基,从而在培养开始后获得上文例示的范围。在培养分别作为种子培养和主要培养进行的情况下,至少在主要培养期间产生目标物质是足够的。因此,足够的是至少在主要培养期间,即在主要培养的整个时期内或在主要培养的部分时期期间,培养基中存在前体,并且也就是说,在种子培养期间培养基中可以存在或可以不存在前体。在此类情况下,关于培养的术语,如“培养期(培养时期)”和“培养开始”可以理解为与主要培养有关的术语。

[0281] 在另一个实施方案中,生物转化步骤也可以通过例如使用如本文中所述的微生物的细胞来进行。该实施方案也可以称为“生物转化方法的第二实施方案”。也就是说,生物转化步骤可以是例如通过使用微生物的细胞将反应混合物中的目标物质的前体转化成目标物质的步骤。生物转化步骤具体可以是使微生物的细胞作用于反应混合物中的目标物质的前体以在反应混合物中生成并积累目标物质的步骤。通过使用此类细胞进行的生物转化步骤也可以称为“转化反应”。

[0282] 微生物的细胞可以通过培养微生物来获得。用于获得细胞的培养方法没有特别限制,只要微生物可以增殖即可。在用于获得细胞的培养时,前体可以存在或可以不存在于培养基中。此外,在用于获得细胞的培养时,培养基中可以产生或可以不产生目标物质。关于

发酵方法中所述的培养的描述,例如关于培养基和培养条件的描述可以在必要修改后应用于获得用于生物转化方法的第二实施方案的细胞的培养。

[0283] 细胞可以在存在于培养肉汤(具体是培养基)中时,或者在从培养肉汤(具体是培养基)中收集后用于转化反应。也可以根据需要在进行处理后将细胞用于转化反应。也就是说,细胞的实例可以包括含有细胞的培养肉汤,从培养肉汤中收集的细胞和其加工产物。换言之,细胞的实例可以包括存在于微生物的培养肉汤中的细胞,从培养肉汤中收集的细胞或存在于其加工产物中的细胞。加工产物的实例可以包括通过对细胞进行处理,特别地通过对含有细胞的培养肉汤或从培养肉汤中收集的细胞进行处理而获得的产物。这些形式的细胞可以独立使用,或者可以以适当的组合使用。

[0284] 从培养基中收集细胞的方法没有特别限制,例如可以使用已知的方法。此类方法的实例可以包括例如自发沉淀,离心和过滤。也可以使用絮凝剂。这些方法可以独立使用,或者可以以适当的组合使用。收集的细胞可以根据需要通过使用合适的培养基进行清洗。收集的细胞可以根据需要通过使用适当的培养基重悬浮。可用于清洗或悬浮细胞的培养基的实例可以包括例如水性介质(水性溶剂),如水和缓冲水溶液。

[0285] 细胞处理的实例可以包括例如稀释,冷凝,在载体如丙烯酰胺和角叉菜胶上固定化,冷冻和融化处理,以及增加细胞膜通透性的处理。例如,可以通过使用表面活性剂或有机溶剂来增加细胞膜的通透性。这些处理可以独立使用,或者可以以适当的组合使用。

[0286] 用于转化反应的细胞没有特别限制,只要细胞具有目标物质生产能力。优选细胞保持其代谢活性。短语“细胞保持其代谢活性”可以表示细胞具有利用碳源产生或再生产生目标物质所需物质的能力。此类物质的实例可以包括例如ATP,电子供体如NADH和NADPH,以及甲基供体如SAM。细胞可以具有或不具有增殖能力。

[0287] 转化反应可以在适当的反应混合物中进行。具体而言,转化反应可以通过使细胞和前体共存于适当的反应混合物中进行。转化反应可以通过分批方法进行或可以通过柱方法进行。在分批法的情况下,转化反应可以通过例如将微生物的细胞和前体混合在反应容器中所含的反应混合物中进行。转化反应可以静态进行,或者可以在搅拌或摇动反应混合物的情况下进行。在柱方法的情况下,转化反应可以通过例如使含有前体的反应混合物通过填充有固定化细胞的柱来进行。反应混合物的实例可以包括基于水性介质(水性溶剂)如水和水性缓冲液的那些。

[0288] 除了前体之外,反应混合物可以根据需要含有除前体之外的组分。除前体以外的成分的实例可以包括ATP,电子供体诸如NADH,NADPH,甲基供体诸如SAM,金属离子,缓冲剂,表面活性剂,有机溶剂,碳源,磷酸盐源,和其它各种培养基成分。也就是说,例如,含有前体的培养基也可以用作反应混合物。也就是说,关于生物转化方法的第一实施方案中提及的培养基的描述也可以在必要修改后适用于生物转化方法的第二实施方案中的反应混合物。存在于反应混合物中的组分的类型和浓度可以根据各种条件来确定,例如待使用的前体的类型和待使用的细胞的形式。

[0289] 转化反应的条件,诸如溶解氧浓度,反应混合物的pH,反应温度,反应时间,各种成分的浓度等没有特别限制,只要产生目标物质。转化反应可以用例如用于利用微生物细胞诸如静止细胞进行物质转化的典型条件来进行。转化反应的条件可以根据各种条件来确定,例如选择的微生物的类型。转化反应可以例如在需氧条件下进行。术语“需氧条件”可以

指其中反应混合物中的溶解氧浓度为0.33ppm或更高,或1.5ppm或更高的条件。氧浓度可以控制为例如饱和氧浓度的1-50%,或约5%。反应混合物的pH值通常可以是例如6.0至10.0,或6.5至9.0。反应温度可以是例如15至50℃,或15至45℃,或20至40℃。反应时间可以是例如5分钟至200小时。在柱方法的情况下,反应混合物的加载速率可以是例如使得反应时间落入上述例示的反应时间范围内的速率。此外,转化反应也可以在例如培养条件下进行,例如用于培养微生物诸如细菌和真菌的典型条件。在转化反应期间,细胞可以增殖或可以不增殖。也就是说,关于生物转化方法的第一实施方案的培养条件的描述也可以在必要修改后适用于生物转化方法的第二实施方案中转化反应的条件,只是细胞可以或不可在第二实施方案中增殖。在此类情况下,用于获得细胞的培养条件和转化反应的条件可以相同或不同。前体在反应混合物中的浓度例如可以为0.1g/L或更高,1g/L或更高,2g/L或更高,5g/L或更高,10g/L或更高,或者15g/L或更高,或者可以是200g/L或更低,100g/L或更低,50g/L或更低,或者20g/L或更低,或者可以在由其组合限定的范围内(按游离化合物的重量计)。例如,反应混合物中细胞的密度可以是1或更高,或者可以是300或更低,或者可以在其组合限定的范围内(按600nm的光密度(OD)计)。

[0290] 在转化反应期间,可以将细胞,前体和其他组分独立地或以其任何任意组合添加到反应混合物。例如,可以与伴随目标物质产生的前体的减少或消耗成比例将前体添加到反应混合物。这些组分可以添加一次或多次,或者可以连续添加。

[0291] 用于向反应混合物添加诸如前体的各种组分的方法没有特别限制。这些组分各自可以通过例如直接将它们加入到反应混合物中而添加到反应混合物中。此外,例如,可以将如本文中所述的微生物和具有前体生产能力的微生物共培养,以使具有前体生产能力的微生物在反应混合物中产生前体,从而将前体提供给反应混合物。此外,例如,组分如ATP,电子给体和甲基供体可以各自在反应混合物中产生或再生,可以在微生物的细胞中产生或再生,或者可以通过不同细胞之间的偶联反应产生或再生。例如,当微生物的细胞保持其代谢活性时,它们可以通过使用碳源在它们内部产生或再生诸如ATP,电子供体和甲基供体等组分。例如,具体地,微生物可以具有增强的SAM生成或再生能力,并且其生成或再生的SAM可以用于转化反应。SAM的生成或再生可以与用于生成或再生SAM的任何其他方法组合而得到进一步增强。另外,ATP生成或再生方法的实例可以包括例如通过使用棒状杆菌属细菌从碳源提供ATP的方法(Hori,H.et al.,Appl.Microbiol.Biotechnol.,48(6):693-698(1997)),通过使用酵母细胞和葡萄糖再生ATP的方法(Yamamoto,S et al.,Biosci.Biotechnol.Biochem.,69(4):784-789(2005)),使用磷酸烯醇丙酮酸和丙酮酸激酶再生ATP的方法(C.Aug'e and Ch.Gautheron,Tetrahedron Lett.,29:789-790(1988)),以及通过使用多磷酸和多磷酸激酶再生ATP的方法(Murata,K.et al.,Agric.Biol.Chem.,52(6):1471-1477(1988))。

[0292] 此外,反应条件可以从转化反应的开始至结束是恒定的,或者它们可以在转化反应期间改变。表述“反应条件在转化反应期间改变”不仅可以包括当反应条件在时间上改变时,而且还包括当反应条件在空间上改变时。表述“反应条件在空间上改变”表示例如当通过柱法进行转化反应时,反应温度和孔密度等反应条件随流动中的位置而不同。

[0293] 通过进行如上所述的生物转化步骤,获得培养肉汤(具体地培养基)或含有目标物质的反应混合物。目标物质的产生和目标物质的收集的确认可以以与上述发酵方法相同的

方式进行。也就是说,生物转化方法可以进一步包括收集步骤,例如从培养肉汤(具体地培养基)或反应混合物中收集目标物质的步骤。除了目标物质之外,收集的目标物质可以包含例如微生物细胞,培养基组分,反应混合物组分,水分和微生物的副产物代谢物。收集的目标物质的纯度可以是,例如,30% (w/w)或更高,50% (w/w)或更高,70% (w/w)或更高,80% (w/w)或更高,90% (w/w)或更高,或95% (w/w)或更高。

[0294] <2-3>生产香草醛和其他目标物质的方法

[0295] 当通过使用如本文所述的微生物,即通过发酵方法或生物转化方法生产目标物质时,由此产生的目标物质可以进一步转化为另一种目标物质。因此,本发明提供了制备第二目标物质,即目标物质B的方法,所述方法包括以下步骤:通过使用微生物,即通过发酵方法或生物转化方法产生第一目标物质,即目标物质A,并且将由此产生的第一目标物质A转化为第二目标物质B。

[0296] 例如,当通过使用如本文所述的微生物,即通过发酵方法或生物转化方法生产香草酸时,由此产生的香草酸可以进一步转化为香草醛。因此,本发明提供了生产香草醛的方法,其包括通过使用微生物,即通过发酵方法或生物转化方法生产香草酸,并将由此产生的香草酸转化为香草醛的步骤。该方法也可以称为“香草醛生产方法”。

[0297] 通过使用微生物产生的香草酸可以原样用于转化成香草醛,或者在根据需要进行适当的处理如浓缩,稀释,干燥,溶解,分馏,提取和纯化之后用于转化成香草醛。也就是说,作为香草酸,例如,可以使用纯化至期望程度的纯化产物,或者可以使用含有香草酸的物质。含有香草酸的物质没有特别限制,只要催化转化的组分(例如微生物和酶)可以使用香草酸。含有香草酸的材料的实例可以包括含有香草酸的培养肉汤或反应混合物,从培养肉汤或反应混合物中分离的上清液,及其加工产物,如浓缩产物,如其浓缩液及其干燥产物。

[0298] 将香草酸转化为香草醛的方法没有特别限制。

[0299] 可以通过例如使用具有ACAR的微生物的生物转化方法将香草酸转化为香草醛。具有ACAR的微生物可以以S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性得以增加的方式或者可以不以S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性得以降低的方式进行修饰。关于如本文所述的微生物的描述可以在必要的修改后适用于具有ACAR的微生物,只是具有ACAR的微生物可以以使S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性得以增加的方式进行修饰或可以不以S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶活性得以降低的方式进行修饰。具有ACAR的微生物可以以ACAR、PPT和香草酸摄取系统中的一种或多种的活性得以增强的方式进行修饰。另外,关于使用微生物生产目标物质的生物转化方法的描述可以在必要的修改后适用于使用具有ACAR的微生物将香草酸转化为香草醛的生物转化方法。

[0300] 也可以例如通过使用ACAR的酶方法将香草酸转化成香草醛。

[0301] ACAR可以通过允许具有ACAR基因的宿主表达ACAR基因来生成。ACAR也可以用无细胞蛋白质表达系统来生成。

[0302] 具有ACAR基因的宿主也可以称为“具有ACAR的宿主”。具有ACAR基因的宿主可以是固有地具有ACAR基因的宿主,或者可以是经修饰而具有ACAR基因的宿主。固有地具有ACAR基因的宿主的实例可以包括衍生出上述示例的ACAR的生物体。经修饰而具有ACAR基因的宿主的实例可以包括已经引入有ACAR基因的宿主。此外,固有地具有ACAR基因的宿主可以以

ACAR得以增加的方式进行修饰。用于表达ACAR的宿主不受特别限制,只要宿主可以表达可以起作用的ACAR即可。宿主的实例可以包括例如,微生物,如细菌和酵母(真菌),植物细胞,昆虫细胞和动物细胞。

[0303] 可以通过培养具有ACAR基因的宿主来表达ACAR基因。培养方法没有特别限制,只要具有ACAR基因的宿主可以增殖并表达ACAR即可。关于发酵方法培养的描述可以在必要的修改后适用于具有ACAR基因的宿主的培养。必要时,可以诱导ACAR基因的表达。作为培养的结果,可以获得含有ACAR的培养肉汤。ACAR可以在宿主细胞和/或培养基中积累。

[0304] 在宿主细胞,培养基等中包含的ACAR可以原样用于酶促反应,或者自其纯化的ACAR可以用于酶促反应。可以进行纯化到期望的程度。也就是说,作为ACAR,可以使用纯化的ACAR,或者可以使用含有ACAR的级分。此类级分没有特别限制,只要其中含有的ACAR可以作用于香草酸即可。此类级分的实例可以包括具有ACAR基因的宿主的培养肉汤,即具有ACAR的宿主;从培养肉汤中收集细胞;细胞的加工产物,如细胞破碎物,细胞裂解物,细胞提取物和固定化细胞,如用丙烯酰胺,角叉菜胶等固定化的细胞;从培养肉汤中收集的培养物上清液;其部分纯化产物,例如粗产物;及其组合。这些级分可以独立使用或与纯化的ACAR组合使用。

[0305] 酶促反应可以通过允许ACAR作用于香草酸来进行。酶促反应的条件没有特别限制,只要产生香草醛即可。酶促反应可以用例如用于使用酶或微生物细胞如静息细胞进行物质转化的典型条件进行。例如,关于生物转化方法的第二实施方案中的转化反应的描述也可以在必要的修改后适用于香草醛生产方法中的酶促反应。

[0306] 通过进行如上所述的转化获得含有香草醛的反应混合物。香草醛的产生和香草醛的收集的确认可以以与上述发酵方法相同的方式进行。也就是说,香草醛生产方法可以进一步包括从反应混合物中收集香草醛的步骤。除香草醛外,收集的香草醛可以含有例如微生物细胞,培养基组分,反应混合物组分,ACAR,水分和微生物的副产物代谢物。收集的香草醛的纯度可以是例如30% (w/w)或更高,50% (w/w)或更高,70% (w/w)或更高,80% (w/w)或更高,90% (w/w)或更高,或95% (w/w)更高。

[0307] 香草酸也可以通过例如使用具有VDC的微生物的生物转化方法或使用VDC的酶促方法转化为愈创木酚。阿魏酸可以通过例如使用具有FDC的微生物的生物转化方法或使用FDC的酶促方法转化为4-乙烯基愈创木酚。4-乙烯基愈创木酚可以通过例如使用具有VPR的微生物的生物转化方法或使用VPR的酶促方法转化为4-乙基愈创木酚。通过这些方法的组合,阿魏酸也可以转化为4-乙基愈创木酚。具体地,阿魏酸可以通过例如与VPR或具有VPR的微生物组合同时或依次使用FDC或具有FDC的微生物,或使用具有FDC和VPR两者的微生物转化为4-乙基愈创木酚。关于香草醛生产方法的上述描述可以在必要的修改后适用于生产其他目标物质的方法。

实施例

[0308] 下文,将参考以下非限制性实施例更具体地解释本发明。

[0309] 在本实施例中,从作为亲本菌株的谷氨酸棒杆菌2256菌株(ATCC 13869)构建具有编码S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的NCg10719基因(sahH)的增强表达的菌株,并且用构建的菌株进行香草酸生产。

[0310] <1>香草酸脱甲基酶基因缺陷的菌株(FKS0165菌株)的构建

[0311] 已经报道了在棒状杆菌细菌中,香草醛按香草醛→香草酸→原儿茶酸的顺序代谢,并利用(Current Microbiology,2005,Vol.51,pp.59-65)。从香草酸到原儿茶酸的转化反应由香草酸脱甲基酶催化。vanA基因和vanB基因分别编码香草酸脱甲基酶的亚基A和亚基B。vanK基因编码香草酸摄取系统,并与vanAB基因一起构成vanABK操纵子(M.T.Chaudhry,et al.,Microbiology,2007,153:857-865)。因此,首先通过缺失vanABK操纵子从谷氨酸棒杆菌2256菌株构建目标物质诸如香草醛和香草醛利用能力缺陷的菌株(FKS0165菌株)。程序如下所示。

[0312] <1-1>用于缺失vanABK基因的质粒pBS4S Δ vanABK56的构建

[0313] 通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板,和SEQ ID NO:51和52的合成DNA作为引物进行PCR,以获得含有vanA基因的N端侧编码区的PCR产物。分别通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板和SEQ ID NO:53和54的合成DNA作为引物进行PCR,以获得含有vanK基因的C端侧编码区的PCR产物。SEQ ID NO:52和53的序列彼此部分互补。然后,以近似等摩尔量混合含有vanA基因的N端侧编码区的PCR产物和含有vanK基因的C端侧编码区的PCR产物,并通过使用In Fusion HD克隆试剂盒(Clontech)将其插入用BamHI和PstI处理的pBS4S载体(W02007/046389)中。利用该DNA,转化大肠杆菌JM109的感受态细胞(Takara Bio),并且将细胞应用于含有100μM IPTG,40μg/mL X-Gal和40μg/mL卡那霉素的LB培养基,并培养过夜。然后,挑取出现的白色菌落,并且分离成单菌落以获得转化体。从所获得的转化体中提取质粒,并将插入了靶PCR产物的质粒命名为pBS4S Δ vanABK56。

[0314] <1-2>FKS0165菌株的构建

[0315] 上面获得的pBS4S Δ vanABK56不含能使质粒在棒状杆菌细菌细胞中自主复制的区域。因此,若用该质粒转化棒状杆菌细菌,则通过同源重组将该质粒掺入基因组中的菌株作为转化体出现,尽管它以非常低的频率发生。因此,通过电脉冲法将pBS4S Δ vanABK56导入谷氨酸棒杆菌2256菌株。将细胞应用于含有25μg/mL卡那霉素的CM-Dex琼脂培养基(5g/L葡萄糖、10g/L聚脲、10g/L酵母提取物、1g/L KH_2PO_4 、0.4g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3g/L尿素、1.2g/L大豆水解物、10μg/L生物素、15g/L琼脂,用NaOH调节到pH 7.5),并在31.5℃培养。通过PCR确认生长的菌株是一次重组菌株,其中通过同源重组将pBS4S Δ vanABK56掺入基因组中。此一次重组的菌株具有野生型vanABK基因和缺陷型vanABK基因两者。

[0316] 将一次重组菌株在CM-Dex液体培养基(与CM-Dex琼脂培养基具有相同的组成,只是它不含琼脂)中培养过夜,并将该培养肉汤应用于S10琼脂培养基(100g/L蔗糖,10g/L聚脲,10g/L酵母提取物,1g/L KH_2PO_4 ,0.4g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.01g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.01g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 4-5\text{H}_2\text{O}$,3g/L尿素,1.2g/L大豆蛋白水解物溶液,10μg/L生物素,20μg/L琼脂,用NaOH调节至pH7.5,并在120℃高压灭菌20分钟),并在31.5℃培养。在出现的菌落中,在CM-Dex琼脂培养基上纯化显示卡那霉素易感性的菌株。通过从纯化的菌株中制备基因组DNA,并使用它用SEQ ID NO:55和56的合成DNA作为引物进行PCR,确认了vanABK基因的缺失,并将该菌株命名为FKS0165菌株。

[0317] <2>醇脱氢酶同源基因缺陷菌株(FKFC14菌株)的构建

[0318] 随后,通过使用谷氨酸棒杆菌菌株FKS0165作为亲本株,通过以下程序构建菌株

FKFC14, 其是醇脱氢酶同源基因 (即NCg10324基因 (adhC)、NCg10313基因 (adhE)、和NCg12709gene (adhA)) 缺陷的。

[0319] <2-1>FKFC5菌株 (FKS0165 Δ NCg10324菌株) 的构建

[0320] <2-1-1>用于缺失NCg10324基因的质粒pBS4S Δ 2256adhC的构建

[0321] 通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板, 和SEQ ID NO: 57和58的合成DNA作为引物进行PCR, 以获得含有NCg10324基因的N端侧编码区的PCR产物。分别通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板, 和SEQ ID NO: 59和60的合成DNA作为引物进行PCR, 以获得含有NCg10324基因的C端侧编码区的PCR产物。SEQ ID NO: 58和59的序列彼此部分互补。然后, 将约等摩尔量的含有NCg10324基因的N端侧编码区的PCR产物和含有NCg10324基因的C端侧编码区的PCR产物混合, 并通过使用In Fusion HD克隆试剂盒 (Clontech) 插入已经用BamHI和PstI处理的pBS4S载体 (W02007/046389) 中。利用该DNA, 转化大肠杆菌JM109的感受态细胞 (Takara Bio), 并且将细胞应用于含有100 μ M IPTG, 40 μ g/mL X-Gal和40 μ g/mL卡那霉素的LB培养基, 并培养过夜。然后, 挑取出现的白色菌落, 分离成单菌落以获得转化体。从所获得的转化体中提取质粒, 并将其中插入了靶PCR产物的质粒命名为pBS4S Δ 2256adhC。

[0322] <2-1-2>FKFC5菌株 (FKS0165 Δ NCg10324菌株) 的构建

[0323] 由于上述获得的pBS4S Δ 2256adhC不含使质粒能够在棒状杆菌细菌细胞中自主复制的区域, 若用该质粒转化棒状杆菌细菌, 则通过同源重组将该质粒掺入基因组中的菌株作为转化体出现, 尽管它以非常低的频率发生。因此, 通过电脉冲法将pBS4S Δ 2256adhC导入谷氨酸棒杆菌FKS0165菌株。将细胞应用于含有25 μ g/mL卡那霉素的CM-Dex琼脂培养基, 并在31.5 $^{\circ}$ C培养。通过PCR确认, 生长的菌株是通过同源重组将pBS4S Δ 2256adhC掺入基因组中的一次重组菌株。此一次重组菌株具有野生型NCg10324基因和缺陷型NCg10324基因两者。

[0324] 将一次重组的菌株在CM-Dex液体培养基中培养过夜, 将培养肉汤应用到S10琼脂培养基, 并在31.5 $^{\circ}$ C进行培养。在出现的菌落中, 在CM-Dex琼脂培养基上纯化显示卡那霉素易感性的菌株。从纯化的菌株制备基因组DNA, 并用SEQ ID NO: 61和62的合成DNA作为引物进行PCR以确认NCg10324基因的缺失, 并将该菌株命名为FKFC5菌株。

[0325] <2-2>FKFC11菌株 (2256 Δ vanABK Δ NCg10324 Δ NCg10313菌株) 的构建

[0326] <2-2-1>用于缺失NCg10313基因的质粒pBS4S Δ 2256adhE的构建

[0327] 通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板和SEQ ID NO: 63和64的合成DNA作为引物进行PCR, 以获得含有NCg10313基因的N端侧编码区的PCR产物。分别通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA为模板和SEQ ID NO: 65和66的合成DNA为引物进行PCR, 以获得含有NCg10313基因的C端侧编码区的PCR产物。SEQ ID NO: 64和65的序列彼此部分互补。然后, 将约等摩尔量的含有NCg10313基因的N端侧编码区的PCR产物和含有NCg10313基因的C端侧编码区的PCR产物混合, 并通过使用In Fusion HD克隆试剂盒 (Clontech) 将其插入用BamHI和PstI处理的pBS4S载体 (W02007/046389) 中。利用该DNA, 转化大肠杆菌JM109的感受态细胞 (Takara Bio), 并且将细胞应用于含有100 μ M IPTG, 40 μ g/mL X-Gal和40 μ g/mL卡那霉素的LB培养基, 并培养过夜。然后, 挑取出现的白色菌落, 并且分离成单菌落以获得转化体。从获得的转化体中提取质粒, 并将其中插入了靶PCR产物的质粒

命名为pBS4S Δ 2256adhE。

[0328] <2-2-2>FKFC11菌株(2256 Δ vanABK Δ NCg10324 Δ NCg10313株)的构建

[0329] 由于上述获得的pBS4S Δ 2256adhE不含有使质粒能够在棒状杆菌细菌细胞中的自主复制的区域,若用该质粒转化棒状杆菌,则通过同源重组将该质粒掺入基因组中的菌株作为转化体出现,但它在非常低的频率发生。因此,通过电脉冲方法将pBS4S Δ 2256adhE导入谷氨酸棒杆菌FKFC5菌株。将细胞应用于含有25 μ g/mL卡那霉素的CM-Dex琼脂培养基,并在31.5 $^{\circ}$ C下培养。通过PCR证实,生长的菌株是一次重组菌株,其中通过同源重组将pBS4S Δ 2256adhE掺入基因组中。此一次重组菌株具有野生型NCg10313基因和缺陷型NCg10313基因两者。

[0330] 将一次重组的菌株在CM-Dex液体培养基中培养过夜,将培养肉汤应用到S10琼脂培养基上,并在31.5 $^{\circ}$ C进行培养。在出现的菌落中,显示卡那霉素易感性的菌株在CM-Dex琼脂培养基上纯化。从纯化的菌株制备基因组DNA,并使用SEQ ID NO:67和68的合成DNA作为引物进行PCR以确认NCg10313基因的缺失,并将该菌株命名为FKFC11菌株。

[0331] <2-3>FKFC14菌株(2256 Δ vanABK Δ NCg10324 Δ NCg10313 Δ NCg12709株)的构建

[0332] <2-3-1>用于缺失NCg12709基因的质粒pBS4S Δ 2256adhA的构建

[0333] 通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板和SEQ ID NO:69和70的合成DNA作为引物进行PCR以获得含有NCg12709基因的N端侧编码区的PCR产物。分别通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA为模板和SEQ ID NO:71和72的合成DNA作为引物进行PCR,以得到含有NCg12709基因的C端侧编码区的PCR产物。SEQ ID NO:70和71的序列彼此部分互补。然后,将约等摩尔量的含有NCg12709基因的N端侧编码区的PCR产物和含有NCg12709基因的C端侧编码区的PCR产物混合,并通过使用In Fusion HD克隆试剂盒(Clontech)插入到用BamHI和PstI处理的pBS4S载体中。利用该DNA,转化大肠杆菌JM109的感受态细胞(Takara Bio),并且将细胞应用于含有100 μ M IPTG,40 μ g/mL X-Gal和40 μ g/mL卡那霉素的LB培养基,并培养过夜。然后,挑取出现的白色菌落,并且分离成单菌落以获得转化体。从获得的转化体中提取质粒,并将其中插入了靶PCR产物的质粒命名为pBS4S Δ 2256adhA。

[0334] <2-3-2>FKFC14菌株(2256 Δ vanABK Δ NCg10324 Δ NCg10313 Δ NCg12709菌株)的构建

[0335] 由于上文获得的pBS4S Δ 2256adhA不含能够使质粒在棒状杆菌细菌细胞中自主复制的区域,若用该质粒转化棒状杆菌,则通过同源重组将该质粒掺入基因组的菌株作为转化体出现,但它在非常低的频率发生。因此,通过电脉冲法将pBS4S Δ 2256adhA导入谷氨酸棒杆菌FKFC11菌株。将细胞应用于含有25 μ g/mL卡那霉素的CM-Dex琼脂培养基,并在31.5 $^{\circ}$ C培养。通过PCR确认,生长的菌株是通过同源重组将pBS4S Δ 2256adhA掺入基因组中的一次重组菌株。该一次重组菌株具有野生型NCg12709基因和缺陷型NCg12709基因两者。

[0336] 将一次重组的菌株在CM-Dex液体培养基中培养过夜,将培养肉汤应用到S10琼脂培养基上,并在31.5 $^{\circ}$ C进行培养。在出现的菌落中,显示卡那霉素易感性的菌株在CM-Dex琼脂培养基上纯化。从纯化的菌株制备基因组DNA,并用SEQ ID NO:73和74的合成DNA作为引物进行PCR以确认NCg12709基因的缺失,并将该菌株命名为FKFC14菌株。

[0337] <3>原儿茶酸双加氧酶基因缺陷菌株(FKFC14 Δ pcaGH菌株)的构建

[0338] 随后,通过使用谷氨酸棒杆菌FKFC14菌株作为亲本菌株,通过外包构建菌株FKFC14 Δ pcaGH,其是编码原儿茶酸3,4-双加氧酶的 α 亚基和 β 亚基的NCg12314基因(pcaG)和NCg12315基因(pcaH)缺陷的。也可以经由以下程序构建FKFC14 Δ pcaGH菌株。

[0339] <3-1>用于缺失NCg12314和NCg12315基因的质粒pBS4S Δ 2256pcaGH的构建

[0340] NCg12314和NCg12315基因彼此相邻,因此可以一起缺失这些基因。通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板,和SEQ ID NO:75和76的合成DNA作为引物进行PCR以获得含有NCg12315基因的上游区的PCR产物。分别通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板和SEQ ID NO:77和78的合成DNA作为引物进行PCR,以获得含有NCg12314基因的下游区的PCR产物。SEQ ID NO:76和77的序列彼此部分互补。然后,混合近似等摩尔量的含有NCg12315基因的上游区的PCR产物和含有NCg12314基因的下游区的PCR产物,并通过使用In Fusion HD克隆试剂盒(Clontech)将其插入用BamHI和PstI处理的pBS4S载体(W02007/046389)中。利用该DNA,转化大肠杆菌JM109的感受态细胞(Takara Bio),并且将细胞应用于含有100 μ M IPTG,40 μ g/mL X-Gal和40 μ g/mL卡那霉素的LB培养基,并培养过夜。然后,挑取出现的白色菌落,并且分离成单菌落以获得转化体。从所获得的转化体中提取质粒,并将插入了靶PCR产物的质粒命名为pBS4S Δ 2256pcaGH。

[0341] <3-2>FKFC14 Δ pcaGH菌株的构建

[0342] 由于上面获得的pBS4S Δ 2256pcaGH不含能使质粒在棒状杆菌细菌细胞中自主复制的区域,若用该质粒转化棒状杆菌细菌,则通过同源重组将该质粒掺入基因组中的菌株作为转化体出现,尽管它以非常低的频率发生。因此,通过电脉冲法将pBS4S Δ 2256pcaGH导入谷氨酸棒杆菌FKFC14菌株。将细胞应用于含有25 μ g/mL卡那霉素的CM-Dex琼脂培养基,并在31.5 $^{\circ}$ C培养。通过PCR确认生长的菌株是一次重组菌株,其中通过同源重组将pBS4S Δ 2256pcaGH掺入基因组中。此一次重组的菌株具有野生型NCg12314和NCg12315基因,和缺陷型NCg12314和NCg12315基因两者。

[0343] 将一次重组菌株在CM-Dex液体培养基中培养过夜,并将该培养基应用于S10琼脂培养基,并在31.5 $^{\circ}$ C培养。在出现的菌落中,在CM-Dex琼脂培养基上纯化显示卡那霉素易感性的菌株。通过从纯化的菌株中制备基因组DNA,并使用它用SEQ ID NO:79和80的合成DNA作为引物进行PCR,确认了NCg12314和NCg12315基因的缺失,并将该菌株命名为FKFC14 Δ pcaGH菌株。

[0344] <4>Ep2_0055菌株(FKFC14 Δ pcaGH P2::NCg10120 P8::NCg12048 P4::NCg10935菌株P3::NCg10719)的构建

[0345] <4-1>Ap1_0007菌株(FKFC14 Δ pcaGH P2::NCg10120菌株)的构建

[0346] 随后,通过使用谷氨酸棒杆菌FKFC14 Δ pcaGH菌株作为亲本菌株,通过外包构建菌株Ap1_0007,其中编码Crp家族表达调节蛋白的NCg10120基因(cysR)的启动子区已经用P2启动子替换以增强此基因的表达。此菌株中含有P2启动子的基因组区域的核苷酸序列以SEQ ID NO:108显示,其中位置942-1034对应于P2启动子。也可以经由以下程序构建Ap1_0007菌株。

[0347] <4-1-1>用于替换NCg10120基因启动子的质粒pBS4SP2::NCg10120的构建

[0348] 通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板,和SEQ ID NO:81和82的合成DNA作为引物进行PCR以获得含有NCg10120基因的上游区的PCR产物。分别通过使用谷

氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板和SEQ ID NO:83和84的合成DNA作为引物进行PCR,以获得含有NCg10120基因的下游区的PCR产物。另外,通过人工基因合成获得含有P2启动子区的SEQ ID NO:85的DNA片段。然后,通过使用SEQ ID NO:85的DNA片段作为模板,和SEQ ID NO:86和87的合成DNA作为引物进行PCR,以获得含有P2启动子的PCR产物。SEQ ID NO:82和86的序列彼此部分互补,并且SEQ ID NO:83和87的序列彼此部分互补。然后,混合近似等摩尔量的含有NCg10120基因的上游区的PCR产物、含有NCg10120基因的N端侧编码区的PCR产物和含有P2启动子的PCR产物,并通过使用In Fusion HD克隆试剂盒(Clontech)将其插入用BamHI和PstI处理的pBS4S载体(W02007/046389)中。利用该DNA,转化大肠杆菌JM109的感受态细胞(Takara Bio),并且将细胞应用于含有100 μ M IPTG,40 μ g/mL X-Gal和40 μ g/mL卡那霉素的LB培养基,并培养过夜。然后,挑取出现的白色菌落,并且分离成单菌落以获得转化体。从所获得的转化体中提取质粒,并将插入了靶PCR产物的质粒命名为pBS4SP2::NCg10120。

[0349] <4-1-2>Ap1_0007菌株的构建

[0350] 由于上面获得的pBS4SP2::NCg10120不含能使质粒在棒状杆菌细菌细胞中自主复制的区域,若用该质粒转化棒状杆菌细菌,则通过同源重组将该质粒掺入基因组中的菌株作为转化体出现,尽管它以非常低的频率发生。因此,通过电脉冲法将pBS4SP2::NCg10120导入谷氨酸棒杆菌FKFC14 Δ pcaGH菌株。将细胞应用于含有25 μ g/mL卡那霉素的CM-Dex琼脂培养基,并在31.5 $^{\circ}$ C培养。通过PCR确认生长的菌株是一次重组菌株,其中通过同源重组将pBS4SP2::NCg10120掺入基因组中。

[0351] 将一次重组菌株在CM-Dex液体培养基中培养过夜,并将该培养基应用于S10琼脂培养基,并在31.5 $^{\circ}$ C培养。在出现的菌落中,在CM-Dex琼脂培养基上纯化显示卡那霉素易感性的菌株。通过从纯化的菌株中制备基因组DNA,并用于进行核苷酸序列分析以确认P2启动子位于NCg10120基因上游,并且该菌株命名为Ap1_0007菌株。

[0352] <4-2>Bp1_0112菌株(FKFC14 Δ pcaGH P2::NCg10120 P8::NCg12048菌株)的构建

[0353] 随后,通过使用谷氨酸棒杆菌Ap1_0007菌株作为亲本菌株,通过外包构建菌株Bp1_0112,其中NCg12048基因的启动子区已经用P8启动子替换以弱化此基因的表达。此菌株中含有P8启动子的基因组区的核苷酸序列以SEQ ID NO:110显示,其中位置901-1046对应于P8启动子。Bp1_0112菌株也可以经由以下程序构建。

[0354] <4-2-1>用于替换NCg12048基因启动子的质粒pBS4SP8::NCg12048的构建

[0355] 通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板,和SEQ ID NO:112和113的合成DNA作为引物进行PCR,以获得含有NCg12048基因的上游区的PCR产物。分开通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板,和SEQ ID NO:114和115的合成DNA作为引物进行PCR,以获得含有NCg12048基因的N端侧编码区的PCR产物。另外,通过人工基因合成获得含有P8启动子区的SEQ ID NO:116的DNA片段。然后,通过使用SEQ ID NO:116的DNA片段作为模板,和SEQ ID NO:117和118的合成DNA作为引物进行PCR,以获得含有P8启动子的PCR产物。SEQ ID NO:113和117的序列彼此部分互补,并且SEQ ID NO:114和118的序列彼此部分互补。然后,混合近似等摩尔量的含有NCg12048基因的上游区的PCR产物、含有NCg12048基因的N端侧编码区的PCR产物和含有P8启动子的PCR产物,并通过使用In Fusion HD克隆试剂盒(Clontech)将其插入用BamHI和PstI处理的pBS4S载体(W02007/046389)中。利用该

DNA,转化大肠杆菌JM109的感受态细胞(Takara Bio),并且将细胞应用于含有100 μ M IPTG, 40 μ g/mL X-Gal和40 μ g/mL卡那霉素的LB培养基,并培养过夜。然后,挑取出现的白色菌落,并且分离成单菌落以获得转化体。从所获得的转化体中提取质粒,并将插入了靶PCR产物的质粒命名为pBS4SP8::NCg12048。

[0356] <4-2-2>Bp1_0112菌株的构建

[0357] 由于上面获得的pBS4SP8::NCg12048不含能使质粒在棒状杆菌细菌细胞中自主复制的区域,若用该质粒转化棒状杆菌细菌,则通过同源重组将该质粒掺入基因组中的菌株作为转化体出现,尽管它以非常低的频率发生。因此,通过电脉冲法将pBS4SP8::NCg12048导入谷氨酸棒杆菌Ap1_0007菌株。将细胞应用于含有25 μ g/mL卡那霉素的CM-Dex琼脂培养基,并在31.5 $^{\circ}$ C培养。通过PCR确认生长的菌株是一次重组菌株,其中通过同源重组将pBS4SP8::NCg12048掺入基因组中。

[0358] 将一次重组菌株在CM-Dex液体培养基中培养过夜,将该培养培养基应用于S10琼脂培养基,并在31.5 $^{\circ}$ C培养。在出现的菌落中,在CM-Dex琼脂培养基上纯化显示卡那霉素易感性的菌株。通过从纯化的菌株中制备基因组DNA,并用于进行核苷酸序列分析以确认P8启动子位于NCg12048基因上游,并且该菌株命名为Bp1_0112菌株。

[0359] <4-3>Dp2_0340菌株(FKFC14 Δ pcaGH P2::NCg10120 P8::NCg12048 P4::NCg10935菌株)的构建

[0360] 随后,通过使用谷氨酸棒杆菌Bp1_0112菌株作为亲本菌株,通过外包构建菌株Dp2_0340,其中编码烯醇化酶的NCg10935基因(eno)的启动子区已经用P4启动子替换以弱化此基因的表达。此菌株中含有P4启动子的基因组区域的核苷酸序列以SEQ ID NO:109显示,其中位置872-969对应于P4启动子。Dp2_0340菌株也可以经由以下程序构建。

[0361] <4-3-1>用于替换NCg10935基因启动子的质粒pBS4SP4::NCg10935的构建

[0362] 通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板,和SEQ ID NO:121和122的合成DNA作为引物进行PCR以获得含有NCg10935基因的上游区的PCR产物。分别通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板和SEQ ID NO:123和124的合成DNA作为引物进行PCR,以获得含有NCg10935基因的N端侧编码区的PCR产物。另外,通过人工基因合成获得含有P4启动子区的SEQ ID NO:125的DNA片段。然后,通过使用SEQ ID NO:125的DNA片段作为模板和SEQ ID NO:126和127的合成DNA作为引物进行PCR,以获得含有P4启动子的PCR产物。SEQ ID NO:122和126的序列彼此部分互补,并且SEQ ID NO:123和127的序列彼此部分互补。然后,混合近似等摩尔量的含有NCg10935基因的上游区的PCR产物、含有NCg10935基因的N端侧编码区的PCR产物和含有P4启动子的PCR产物,并通过使用In Fusion HD克隆试剂盒(Clontech)将其插入用BamHI和PstI处理的pBS4S载体(W02007/046389)中。利用该DNA,转化大肠杆菌JM109的感受态细胞(Takara Bio),并且将细胞应用于含有100 μ M IPTG, 40 μ g/mL X-Gal和40 μ g/mL卡那霉素的LB培养基,并培养过夜。然后,挑取出现的白色菌落,并且分离成单菌落以获得转化体。从所获得的转化体中提取质粒,并将插入了靶PCR产物的质粒命名为pBS4SP4::NCg10935。

[0363] <4-3-2>Dp2_0340菌株的构建

[0364] 由于上面获得的pBS4SP4::NCg10935不含能使质粒在棒状杆菌细菌细胞中自主复制的区域,若用该质粒转化棒状杆菌细菌,则通过同源重组将该质粒掺入基因组中的菌株

作为转化体出现,尽管它以非常低的频率发生。因此,通过电脉冲法将pBS4SP4::NCg10935导入谷氨酸棒杆菌Bp1_0112菌株。将细胞应用于含有25μg/mL卡那霉素的CM-Dex琼脂培养基,并在31.5℃培养。通过PCR确认生长的菌株是一次重组菌株,其中通过同源重组将pBS4SP4::NCg10935掺入基因组中。

[0365] 将一次重组菌株在CM-Dex液体培养基中培养过夜,将该培养培养基应用于S10琼脂培养基,并在31.5℃培养。在出现的菌落中,在CM-Dex琼脂培养基上纯化显示卡那霉素易感性的菌株。通过从纯化的菌株中制备基因组DNA,并用于进行核苷酸序列分析以确认P4启动子位于NCg10935基因上游,并且该菌株命名为Dp2_0340菌株。

[0366] <4-4>Ep2_0055菌株(FKFC14 Δ *pcaGH* P2::NCg10120 P8::NCg12048 P4::NCg10935P3::NCg10719菌株)的构建

[0367] 随后,通过使用谷氨酸棒杆菌Dp2_0340菌株作为亲本菌株,通过外包构建菌株Ep2_0055,其中编码S-腺苷-L-高半胱氨酸水解酶的NCg10719基因(*sahH*)的启动子区已经用P3启动子替换。P3启动子的核苷酸序列以SEQ ID NO:111显示。也可以经由以下程序构建Ep2_0055菌株。

[0368] <4-4-1>用于替换NCg10719基因启动子的质粒pBS4SP3::NCg10719的构建

[0369] 通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板,和SEQ ID NO:138和139的合成DNA作为引物进行PCR以获得含有NCg10719基因的上游区的PCR产物。分别通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板和SEQ ID NO:140和141的合成DNA作为引物进行PCR,以获得含有NCg10719基因的N端侧编码区的PCR产物。另外,通过人工基因合成获得含有P3启动子区的SEQ ID NO:111的DNA片段。然后,通过使用SEQ ID NO:111的DNA片段作为模板,和SEQ ID NO:142和143的合成DNA作为引物进行PCR,以获得含有P3启动子的PCR产物。SEQ ID NO:139和142的序列彼此部分互补,并且SEQ ID NO:140和143的序列彼此部分互补。然后,混合近似等摩尔量的含有NCg10719基因的上游区的PCR产物、含有NCg10719基因的N端侧编码区的PCR产物和含有P3启动子的PCR产物,并通过使用In Fusion HD克隆试剂盒(Clontech)将其插入用BamHI和PstI处理的pBS4S载体(W02007/046389)中。利用该DNA,转化大肠杆菌JM109的感受态细胞(Takara Bio),并且将细胞应用于含有100μM IPTG,40μg/mL X-Gal和40μg/mL卡那霉素的LB培养基,并培养过夜。然后,挑取出现的白色菌落,并且分离成单菌落以获得转化体。从所获得的转化体中提取质粒,并将插入了靶PCR产物的质粒命名为pBS4SP3::NCg10719。

[0370] <4-4-2>Ep2_0055菌株的构建

[0371] 由于上面获得的pBS4SP3::NCg10719不含能使质粒在棒状杆菌细菌细胞中自主复制的区域,若用该质粒转化棒状杆菌细菌,则通过同源重组将该质粒掺入基因组中的菌株作为转化体出现,尽管它以非常低的频率发生。因此,通过电脉冲法将pBS4SP3::NCg10719导入谷氨酸棒杆菌Dp2_0340菌株。将细胞应用于含有25μg/mL卡那霉素的CM-Dex琼脂培养基,并在31.5℃培养。通过PCR确认生长的菌株是一次重组菌株,其中通过同源重组将pBS4SP3::NCg10719掺入基因组中。

[0372] 将一次重组菌株在CM-Dex液体培养基中培养过夜,并将该培养培养基应用于S10琼脂培养基,并在31.5℃培养。在出现的菌落中,在CM-Dex琼脂培养基上纯化显示卡那霉素易感性的菌株。通过从纯化的菌株中制备基因组DNA,并使用它进行核苷酸序列分析以确认

P3启动子位于NCg10719基因上游,并将该菌株命名为Ep2_0055菌株。

[0373] <5>用于表达OMT基因的质粒的构建

[0374] <5-1>用于表达*Niastella koreensis*的OMT基因的质粒pVK9::PcspB-omt35的构建

[0375] 通过外包获得质粒pVK9::PcspB-omt35。质粒pVK9::PcspB-omt35含有针对谷氨酸棒杆菌的密码子选择进行密码子优化的*Niastella koreensis*的OMT基因。此基因也可以称为“omt35基因”,并且由此基因编码的OMT也可以称为“OMT35”。omt35基因的核苷酸序列以SEQ ID NO:135显示,并且OMT35的氨基酸序列以SEQ ID NO:131显示。质粒pVK9::PcspB-omt35也可以经由以下程序构建。

[0376] 通过使用谷氨酸棒杆菌2256菌株的基因组DNA作为模板,和SEQ ID NO:132和133的合成DNA作为引物进行PCR以获得含有cspB基因的启动子区和SD序列的PCR产物。分开地通过人工基因合成获得含有omt35基因的ORF的SEQ ID NO:134的DNA片段。然后,通过使用In Fusion HD克隆试剂盒(Clontech)将PCR产物和DNA片段插入用BamHI和PstI处理的pVK9载体(W02007/046389)中。利用该DNA,转化大肠杆菌JM109的感受态细胞(Takara Bio),并且将细胞应用于含有100μM IPTG,40μg/mL X-Gal和25μg/mL卡那霉素的LB培养基,并培养过夜。然后,挑取出现的白色菌落,并且分离成单菌落以获得转化体。从所获得的转化体中提取质粒,并将插入了靶PCR产物的质粒命名为pVK9::PcspB-omt35。

[0377] <5-2>用于表达*Niastella koreensis*的突变体OMT基因的质粒pVK9::PcspB-omt202的构建

[0378] 通过外包获得质粒pVK9::PcspB-omt202。质粒pVK9::PcspB-omt202含有编码对应于OMT35的突变体OMT的突变体OMT基因,条件是第36位的甲硫氨酸残基(M)已经由于从ATG至AAG的密码子变化而替换为赖氨酸残基(K)。此突变体OMT基因也称为“omt202基因”,并且此突变体OMT也可以称为“Omt202”。质粒pVK9::PcspB-omt202也可以经由以下程序构建。

[0379] 通过使用QuikChange定点诱变试剂盒(Agilent Technologies)进行突变的引入。也就是说,通过使用质粒pVK9::PcspB-omt35作为模板和SEQ ID NO:136和137的合成DNA作为引物用Pfu Ultra DNA聚合酶进行PCR。然后,用DpnI处理PCR产物以消化模板。利用此DNA,转化XL1-Blue超感受态细胞,并且将细胞应用于含有25μg/mL卡那霉素的LB培养基,并且培养过夜。然后,挑出出现的菌落,并且分成单菌落以获得转化体。从获得的转化体提取质粒,确认其核苷酸序列,并且插入有目标突变的质粒命名为pVK9::PcspB-omt202。

[0380] <6>香草酸生产菌株的构建

[0381] 通过外包构建谷氨酸棒杆菌Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt35菌株(其含有质粒pVK9::PcspB-omt35)。通过外包构建谷氨酸棒杆菌Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt202和Ep2_0055/pVK9::PcspB-omt202菌株(其含有质粒pVK9::PcspB-omt202)。这些菌株也可以经由以下程序构建。

[0382] 通过电穿孔将质粒pVK9::PcspB-omt35导入谷氨酸棒杆菌Dp2_0340菌株中。将细胞应用于含有25μg/mL卡那霉素的CM-Dex琼脂培养基,并且于31.5℃培养。在相同的琼脂培养基上纯化培养的菌株,并且命名为Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt35。类似地,将质粒pVK9::PcspB-omt202引入谷氨酸棒杆菌Dp2_0340和Ep2_0055菌株,并且将获得的菌株分别命名为Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt202和Ep2_0055/pVK9::PcspB-omt202。

[0383] 将这些菌株各自接种到试管中存在的4mL含有25 μ g/mL卡那霉素的CM-Dex w/o mameno培养基(5g/L葡萄糖、10g/L聚脲、10g/L酵母提取物、1g/L KH_2PO_4 、0.4g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、3g/L尿素、10 μ g/L生物素,用KOH调节到pH 7.5)中,并且于31.5 $^{\circ}\text{C}$ 在摇动的情况下培养约16小时。将获得的培养肉汤的0.9mL等分试样与0.6mL 50%甘油水溶液混合以获得甘油储液,并且于-80 $^{\circ}\text{C}$ 贮存。

[0384] <7>谷氨酸棒杆菌Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt202和Ep2_0055/pVK9::PcspB-omt202菌株的香草酸生产

[0385] 将Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt202和Ep2_0055/pVK9::PcspB-omt202菌株的甘油储液的各5 μ L等分试样接种到试管中存在的4mL含有25 μ g/mL卡那霉素的CM-Dex w/o mameno培养基,并且于31.5 $^{\circ}\text{C}$ 在摇动的情况下培养20小时作为预培养物。将获得的预培养物肉汤的0.5mL等分试样接种到具有挡板的锥形瓶中存在的50mL含有25 μ g/mL卡那霉素的CM-Dex w/o mameno培养基,并且于31.5 $^{\circ}\text{C}$ 在摇动的情况下培养20小时。以8000rpm将获得的培养物肉汤离心5分钟,除去上清液,并且在经灭菌的生理盐水中悬浮细胞。测量细胞悬浮液的光密度(OD),并且用生理盐水稀释细胞悬浮液以获得600nm处的OD为50。将稀释的细胞悬浮液的5mL等分试样接种到具有挡板的锥形瓶中存在的20mL含有25 μ g/mL卡那霉素的香草酸生产培养基(75g/L葡萄糖、0.6g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、6.3g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2.5g/L KH_2PO_4 、12.5mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、12.5mg/L $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、2.5g/L酵母提取物、150 μ g/L维生素B1、150 μ g/L生物素、6.9g/L原儿茶酸,用KOH调节到pH 7,然后与37.5g/L CaCO_3 (用180 $^{\circ}\text{C}$ 的热空气灭菌3小时)混合)中,并且于31.5 $^{\circ}\text{C}$ 在摇动的情况下培养24小时。

[0386] 在培养开始和完成时,通过外包分析培养基中葡萄糖、原儿茶酸和香草酸的浓度。也可以经由以下程序分析这些浓度。

[0387] 用Biotech分析仪AS-310(Sakura SI)分析培养基中的葡萄糖浓度。也通过使用超高效液相层析NEXERA X2系统(SHIMADZU)用以下条件分析培养基中的原儿茶酸和香草酸浓度。

[0388] UPLC分析条件:

[0389] 柱:KINETEX 2.6 μ m XB-C18,150x 30mm(Phenomenex)

[0390] 炉温度:40 $^{\circ}\text{C}$

[0391] 流动相(A):0.1%三氟乙酸

[0392] 流动相(B):0.1%三氟乙酸/80%乙腈

[0393] 梯度程度(时间,A(%),B(%)):(0,90,10) $\rightarrow$ (3,80,20)

[0394] 流速:1.5ml/min

[0395] 表1中显示了结果。对Ep2_0055/pVK9::PcspB-omt202菌株观察到的培养基中的香草酸浓度是对Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt202菌株观察到的培养基中的香草酸浓度的约1.3倍。

[0396] [表1]

[0397] 表1:谷氨酸棒杆菌香草酸生产菌株的香草酸生产

		培养开始时	
[0398]	菌株	葡萄糖浓度 (g/L)	原儿茶酸浓度 (mg/L)
	Dp2_0340/ pVK9::PcspB-omt202	64.6 ± 0.94	5318 ± 14.7
	Ep2_0055/ pVK9::PcspB-omt202	61.2 ± 0.11	5005 ± 3.49

		培养完成时		
[0399]	菌株	残留的葡萄糖 的浓度 (g/L)	残留的原儿茶酸 的浓度(mg/L)	生成的香草 酸的浓度 (mg/L)
	Dp2_0340/ pVK9::PcspB-omt202	29.5 ± 0.51	4466 ± 23.3	428 ± 6.1
	Ep2_0055/ pVK9::PcspB-omt202	25.4 ± 0.88	3891 ± 23.8	569 ± 7.4

[0400] <8>通过定量PCR分析NCg10719基因(sahH)的表达量

[0401] 随后,通过定量PCR分析Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt35和Ep2_0055/pVK9::PcspB-omt202菌株中的NCg10719基因(sahH)表达量。

[0402] <8-1>RNA的制备

[0403] Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt35和Ep2_0055/pVK9::PcspB-omt202菌株各自通过实施例<7>中描述的方法培养,将含有细胞的培养肉汤的250μL等分试样与500μL RNA Protect Bacteria Reagent(QIAGEN)混合,并且于-80℃贮存,所述培养肉汤在培养开始后5小时获得。于室温融化冷冻的混合物,与200μL含有溶菌酶的TE缓冲液(10mM Tris,1mM EDTA,pH 8.0)以及与10μL蛋白酶K(20mg/mL)一起添加,混合,然后于室温温育40分钟。使用RNeasy Mini试剂盒(QIAGEN)进行以下程序。将经处理的产物与700μL含有1%2-巯基乙醇的RLT缓冲液一起添加,混合,并且离心以获得上清液。将上清液与500μL乙醇一起添加,混合,并且应用到试剂盒中包含柱,并且将柱离心。用350μL RW1缓冲液清洗柱,然后将80μL DNA酶I溶液添加到柱以于室温进行DNA酶处理15分钟。此外,用350μL RW1缓冲液清洗柱,并且用500μL RPE缓冲液清洗两次,并且用无RNA酶的灭菌水洗脱以获得RNA。使用NanoDrop(Thermo Fisher Scientific)量化获得的RNA,并且使用BioAnalyser(Agilent Technologies)用RNA 6000Nano试剂盒(Agilent Technologies)通过进行电泳分析以确认获得的RNA具有足够的纯度。

[0404] <8-2>通过反向转录合成cDNA

[0405] 使用具有gDNA Eraser的PrimeScript RT试剂试剂盒(TAKARA BIO)进行逆转录。

将1μg RNA等分试样与1μL gDNA Eraser和2μL 5×DNA Eraser缓冲液一起添加,用直至总体积10μL的灭菌水稀释,并且于42℃温育2min以降解染色体DNA。将所得的混合物与4μL 5×PrimeScript Buffer2、1μL PrimeScript RT酶混合物I、1μL RT引物混合物和4μL灭菌水进一步一起添加,于37℃温育15分钟和85℃温育5秒以获得cDNA。

[0406] <8-3>定量PCR

[0407] 用以下程序从cDNA扩增NCg10719基因(sahH)作为靶基因:2μL cDNA、10μL Power SYBR Green PCR主混合物(Life Technologies)、SEQ ID NO:146和147的引物(各500nM,作为终浓度),并且混合灭菌水以获得总体积20μL;使用7000实时PCR系统(Applied Bio Systems)以95℃变性10分钟,接着95℃达15秒和60℃达1min的40个循环进行PCR。另外,由于Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt35和Ep2_0055/pVK9::PcspB-omt202菌株含有不同物种OMT基因,对于评估OMT差异对基因表达的影响,用与用于靶基因扩增的程序相同的程序从cDNA扩增NCg10935基因(eno),只是使用SEQ ID NO:148和149的引物。另外,使用与用于靶基因扩增的程序相同的程序从cDNA扩增16S rRNA基因作为持家基因,只是使用2μL 32倍稀释的cDNA作为模板并且使用SEQ ID NO:150和151。在扩增反应后,PCR产物进行熔解曲线分析以确认PCR产物的一致性。此外,通过琼脂糖凝胶电泳分析PCT产物以确认PCR产物具有用使用的引物可获得的长度。

[0408] <8-4>表达量的分析

[0409] 使用 $\Delta\Delta Ct$ 方法(METHODS, 25, 402(2001))来分析NCg10719基因(sahH)NCg10935基因(eno)的表达量。提供通过从NCg10719基因(sahH)或NCg10935基因(eno)的Ct值扣除持家基因的Ct值获得的数值作为 ΔCt 值。然而,由于使用32倍稀释(即 2^5 倍稀释)的cDNA作为扩增持家基因的模板,作为持家基因的Ct值,使用通过将5加到实际测量的持家基因的 ΔCt 值获得的值。提供通过从Ep2_0055/pVK9::PcspB-omt202菌株的 ΔCt 值扣除Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt35菌株的 ΔCt 值获得的数值作为 $\Delta\Delta Ct$ 值。基于Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt35菌株的Ep2_0055/pVK9::PcspB-omt202中的NCg10719基因(sahH)或NCg10935基因(eno)的相对表达量作为 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算。

[0410] 表2中显示了结果。Ep2_0055/pVK9::PcspB-omt202菌株中的NCg10719基因(sahH)的相对量是Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt35菌株中的NCg10719基因(sahH)的相对量的约11倍。比较而言,Ep2_0055/pVK9::PcspB-omt202菌株中NCg10935基因(eno)的表达量几乎等于Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt35菌株中的NCg10935基因(eno)的表达量,因此认为OMT的差异不影响基因表达。

[0411] [表2]

[0412] 表2:sahH和eno基因的相对表达量

Strain	Relative expression amount	
	<i>eno</i>	<i>sahH</i>
Dp2_0340/pVK9::PcspB-omt35	1.0	1.0
Ep2_0055/pVK9::PcspB-omt202	1.1	11

[0414] [工业适用性]

[0415] 根据本发明,微生物用于生产目标物质,诸如香草醛和香草酸的能力可以得到改善,并且可以有效生产目标物质。

[0416] <序列表的解释>

[0417] SEQ ID NOS:

[0418] 1:大肠杆菌MG1655的aroG基因的核苷酸序列

[0419] 2:大肠杆菌MG1655的AroG蛋白的氨基酸序列

[0420] 3:大肠杆菌MG1655的aroB基因的核苷酸序列

[0421] 4:大肠杆菌MG1655的AroB蛋白的氨基酸序列

[0422] 5:大肠杆菌MG1655的aroD基因的核苷酸序列

[0423] 6:大肠杆菌MG1655的AroD蛋白的氨基酸序列

[0424] 7:苏云金芽孢杆菌BMB171的asbF基因的核苷酸序列

[0425] 8:苏云金芽孢杆菌BMB171的AsbF蛋白的氨基酸序列

[0426] 9:大肠杆菌MG1655的tyrR基因的核苷酸序列

[0427] 10:大肠杆菌MG1655的TyrR蛋白的氨基酸序列

[0428] 11-14:智人OMT基因的转录物变体1至4的核苷酸序列

[0429] 15:智人OMT同种型(MB-COMT)的氨基酸序列

[0430] 16:智人OMT同种型(S-COMT)的氨基酸序列

[0431] 17:巴西诺卡菌的ACAR基因的核苷酸序列

[0432] 18:巴西诺卡菌的ACAR蛋白的氨基酸序列

[0433] 19:巴西诺卡菌的ACAR基因的核苷酸序列

[0434] 20:巴西诺卡菌的ACAR蛋白的氨基酸序列

[0435] 21:大肠杆菌MG1655的entD基因的核苷酸序列

[0436] 22:大肠杆菌MG1655的EntD蛋白的氨基酸序列

[0437] 23:谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的PPT基因的核苷酸序列

[0438] 24:谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的PPT蛋白的氨基酸序列

[0439] 25:谷氨酸棒杆菌256(ATCC 13869)的vanK基因的核苷酸序列

[0440] 26:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的VanK蛋白的氨基酸序列

[0441] 27:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的pcaK基因的核苷酸序列

[0442] 28:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的PcaK蛋白的氨基酸序列

[0443] 29:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的vanA基因的核苷酸序列

[0444] 30:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的VanA蛋白的氨基酸序列

[0445] 31:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的vanB基因的核苷酸序列

[0446] 32:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的VanB蛋白的氨基酸序列

[0447] 33:谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的pcaG基因的核苷酸序列

[0448] 34:谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的PcaG蛋白的氨基酸序列

[0449] 35:谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的pcaH基因的核苷酸序列

[0450] 36:谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的PcaH蛋白的氨基酸序列

[0451] 37:大肠杆菌MG1655的yqhD基因的核苷酸序列

[0452] 38:大肠杆菌MG1655的YqhD蛋白的氨基酸序列

- [0453] 39:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的NCg10324基因的核苷酸序列
- [0454] 40:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的NCg10324蛋白的氨基酸序列
- [0455] 41:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的NCg10313基因的核苷酸序列
- [0456] 42:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的NCg10313蛋白的氨基酸序列
- [0457] 43:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的NCg12709基因的核苷酸序列
- [0458] 44:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的NCg12709蛋白的氨基酸序列
- [0459] 45:谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的NCg10219基因的核苷酸序列
- [0460] 46:谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的NCg10219蛋白的氨基酸序列
- [0461] 47:谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的NCg12382基因的核苷酸序列
- [0462] 48:谷氨酸棒杆菌ATCC 13032的NCg12382蛋白的氨基酸序列
- [0463] 49:大肠杆菌MG1655的aroE基因的核苷酸序列
- [0464] 50:大肠杆菌MG1655的AroE蛋白的氨基酸序列
- [0465] 51-84:引物
- [0466] 85:含有P2启动子区的DNA片段的核苷酸序列
- [0467] 86和87:引物
- [0468] 88:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的cysI基因的核苷酸序列
- [0469] 89:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的CysI蛋白的氨基酸序列
- [0470] 90:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的cysX基因的核苷酸序列
- [0471] 91:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的CysX蛋白的氨基酸序列
- [0472] 92:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的cysH基因的核苷酸序列
- [0473] 93:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的CysH蛋白的氨基酸序列
- [0474] 94:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的cysD基因的核苷酸序列
- [0475] 95:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的CysD蛋白的氨基酸序列
- [0476] 96:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的cysN基因的核苷酸序列
- [0477] 97:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的CysN蛋白的氨基酸序列
- [0478] 98:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的cysY基因的核苷酸序列
- [0479] 99:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的CysY蛋白的氨基酸序列
- [0480] 100:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的cysZ基因的核苷酸序列
- [0481] 101:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的CysZ蛋白的氨基酸序列
- [0482] 102:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的fpr2基因的核苷酸序列
- [0483] 103:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的Fpr2蛋白的氨基酸序列
- [0484] 104:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的cysR基因的核苷酸序列
- [0485] 105:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的CysR蛋白的氨基酸序列
- [0486] 106:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的ssuR基因的核苷酸序列
- [0487] 107:谷氨酸棒杆菌2256(ATCC 13869)的SsuR蛋白的氨基酸序列
- [0488] 108:含有P2启动子的核苷酸序列
- [0489] 109:含有P4启动子的核苷酸序列
- [0490] 110:含有P6启动子的核苷酸序列
- [0491] 111:含有P8启动子的核苷酸序列

- [0492] 112-115: 引物
- [0493] 116: 含有P8启动子区的DNA片段的核苷酸序列
- [0494] 117和118: 引物
- [0495] 119: 谷氨酸棒杆菌2256 (ATCC 13869) 的NCg12048基因的核苷酸序列
- [0496] 120: 谷氨酸棒杆菌2256 (ATCC 13869) 的NCg12048蛋白的氨基酸序列
- [0497] 121-124: 引物
- [0498] 125: 含有P4启动子区的DNA片段的核苷酸序列
- [0499] 126和127: 引物
- [0500] 128: 谷氨酸棒杆菌2256 (ATCC 13869) 的eno基因的核苷酸序列
- [0501] 129: 谷氨酸棒杆菌2256 (ATCC 13869) 的Eno蛋白的氨基酸序列
- [0502] 130: *Niastella koreensis* 的OMT基因的核苷酸序列
- [0503] 131: *Niastella koreensis* 的OMT基因的氨基酸序列
- [0504] 132和133: 引物
- [0505] 134: 含有omt35基因的DNA片段的核苷酸序列
- [0506] 135: omt35基因的核苷酸序列 (*Niastella koreensis* 的经密码子优化的OMT基因)
- [0507] 136-143: 引物
- [0508] 144: 谷氨酸棒杆菌2256 (ATCC 13869) 的sahH基因的核苷酸序列
- [0509] 145: 谷氨酸棒杆菌2256 (ATCC 13869) 的SahH蛋白的氨基酸序列
- [0510] 146-151: 引物

[0001]	序列表
[0002]	<110> 味之素株式会社
[0003]	<120> 生产目标物质的方法
[0004]	<130> D888-16117
[0005]	<150> US62/413056
[0006]	<151> 2016-10-26
[0007]	<160> 151
[0008]	<170> PatentIn version 3.5
[0009]	<210> 1
[0010]	<211> 1053
[0011]	<212> DNA
[0012]	<213> 大肠杆菌
[0013]	<400> 1
[0014]	atgaattatc agaacgacga tttacgcac aaagaaatca aagagttact tcctcctgtc 60
[0015]	gcattgctgg aaaaattccc cgctactgaa aatgccgcga atacggttgc ccatgcccga 120
[0016]	aaagcgatcc ataagatcct gaaagtaat gatgatcgcc tgttggttgt gattggccca 180
[0017]	tgctcaattc atgatcctgt cgcggcaaaa gagtatgcca ctcgcttgcg ggcgctgcgt 240
[0018]	gaagagctga aagatgagct ggaaatcgta atgcgcgtct attttgaaaa gccgcgtacc 300
[0019]	acggtgggct ggaaagggt gattaacgat ccgcataatg ataataagctt ccagatcaac 360
[0020]	gacggtctgc gtatagcccg taaattgctg cttgatatta acgacagcgg tctgccagcg 420
[0021]	gcaggtgagt ttctcgatat gatcacccca caatatctcg ctgacctgat gagctggggc 480
[0022]	gcaattggcg cacgtaccac cgaatcgag gtgcaccgcg aactggcatc agggctttct 540
[0023]	tgctccgctg gcttcaaaaa tggcaccgac ggtacgatta aagtggctat cgatgccatt 600
[0024]	aatgccgcg gtgcgccga ctgcttctg tccgtaacga aatgggggca ttcggcgatt 660
[0025]	gtgaatacca gcgtaaacgg cgattgccat atcattctgc gcggcggtaa agagcctaac 720
[0026]	tacagcgca agcacgttgc tgaagtgaag gaagggtga acaaagcagg cctgccagca 780
[0027]	caggtgatga tcgatttcag ccatgctaac tcgtccaaac aattcaaaaa gcagatggat 840
[0028]	gtttgtgctg acgtttgcca gcagattgcc ggtggcgaaa aggccattat tggcgtgatg 900
[0029]	gtggaaagcc atctggtgga aggcaatcag agcctcgaga gcggggagcc gctggcctac 960
[0030]	ggtaagagca tcaccgatgc ctgcatcggc tgggaagata ccgatgctct gttacgtcaa 1020
[0031]	ctggcgaatg cagtaaaagc gcgtcgcggg taa 1053
[0032]	<210> 2
[0033]	<211> 350
[0034]	<212> PRT
[0035]	<213> 大肠杆菌
[0036]	<400> 2
[0037]	Met Asn Tyr Gln Asn Asp Asp Leu Arg Ile Lys Glu Ile Lys Glu Leu
[0038]	1 5 10 15
[0039]	Leu Pro Pro Val Ala Leu Leu Glu Lys Phe Pro Ala Thr Glu Asn Ala
[0040]	20 25 30
[0041]	Ala Asn Thr Val Ala His Ala Arg Lys Ala Ile His Lys Ile Leu Lys

[0042]	35	40	45
[0043]	Gly Asn Asp Asp Arg Leu Leu Val Val Ile Gly Pro Cys Ser Ile His		
[0044]	50	55	60
[0045]	Asp Pro Val Ala Ala Lys Glu Tyr Ala Thr Arg Leu Leu Ala Leu Arg		
[0046]	65	70	75
[0047]	Glu Glu Leu Lys Asp Glu Leu Glu Ile Val Met Arg Val Tyr Phe Glu		
[0048]	85	90	95
[0049]	Lys Pro Arg Thr Thr Val Gly Trp Lys Gly Leu Ile Asn Asp Pro His		
[0050]	100	105	110
[0051]	Met Asp Asn Ser Phe Gln Ile Asn Asp Gly Leu Arg Ile Ala Arg Lys		
[0052]	115	120	125
[0053]	Leu Leu Leu Asp Ile Asn Asp Ser Gly Leu Pro Ala Ala Gly Glu Phe		
[0054]	130	135	140
[0055]	Leu Asp Met Ile Thr Pro Gln Tyr Leu Ala Asp Leu Met Ser Trp Gly		
[0056]	145	150	155
[0057]	Ala Ile Gly Ala Arg Thr Thr Glu Ser Gln Val His Arg Glu Leu Ala		
[0058]	165	170	175
[0059]	Ser Gly Leu Ser Cys Pro Val Gly Phe Lys Asn Gly Thr Asp Gly Thr		
[0060]	180	185	190
[0061]	Ile Lys Val Ala Ile Asp Ala Ile Asn Ala Ala Gly Ala Pro His Cys		
[0062]	195	200	205
[0063]	Phe Leu Ser Val Thr Lys Trp Gly His Ser Ala Ile Val Asn Thr Ser		
[0064]	210	215	220
[0065]	Gly Asn Gly Asp Cys His Ile Ile Leu Arg Gly Gly Lys Glu Pro Asn		
[0066]	225	230	235
[0067]	Tyr Ser Ala Lys His Val Ala Glu Val Lys Glu Gly Leu Asn Lys Ala		
[0068]	245	250	255
[0069]	Gly Leu Pro Ala Gln Val Met Ile Asp Phe Ser His Ala Asn Ser Ser		
[0070]	260	265	270
[0071]	Lys Gln Phe Lys Lys Gln Met Asp Val Cys Ala Asp Val Cys Gln Gln		
[0072]	275	280	285
[0073]	Ile Ala Gly Gly Glu Lys Ala Ile Ile Gly Val Met Val Glu Ser His		
[0074]	290	295	300
[0075]	Leu Val Glu Gly Asn Gln Ser Leu Glu Ser Gly Glu Pro Leu Ala Tyr		
[0076]	305	310	315
[0077]	Gly Lys Ser Ile Thr Asp Ala Cys Ile Gly Trp Glu Asp Thr Asp Ala		
[0078]	325	330	335
[0079]	Leu Leu Arg Gln Leu Ala Asn Ala Val Lys Ala Arg Arg Gly		
[0080]	340	345	350
[0081]	<210> 3		
[0082]	<211> 1089		
[0083]	<212> DNA		

[0084]	<213> 大肠杆菌	
[0085]	<400> 3	
[0086]	atggagagga ttgtcgttac tctcggggaa cgtagttacc caattacat cgcattcgtt 60	
[0087]	ttgtttaatg aaccagcttc attcttaccg ctgaaatcgg gcgagcaggt catgttggtc 120	
[0088]	accaacgaaa ccctggctcc tctgtatctc gataaggtcc gcggcgctact tgaacaggcg 180	
[0089]	ggtgttaacg tcgatagcgt tctcctccct gacggcgagc agtataaaaag cctggctgta 240	
[0090]	ctcgataccg tctttacggc gttgttacia aaaccgcatg gtgcgatac tacgctgggt 300	
[0091]	gcgcttggtg gcggcgtagt gggcgatctg accggcttcg cgccggcgag ttatcagcgc 360	
[0092]	ggtgtccgtt tcattcaagt cccgacgacg ttactgtcgc aggtcgattc ctccgttggtc 420	
[0093]	ggcaaaactg cggtaacca tcccctcggg aaaaacatga ttggcgcggt ctaccaacct 480	
[0094]	gcttcagtgg tggtagatct cgactgtctg aaaacgcttc ccccgctga gttagcgtcg 540	
[0095]	gggctggcag aagtcacaa atacggcatt attcttgacg gtgcgttttt taactggctg 600	
[0096]	gaagagaatc tggatgcgtt gttgcgtctg gacggtccgg caatggcgta ctgtattcgc 660	
[0097]	cgttgttgtg aactgaaggc agaagttgtc gccgccgacg agcgcgaaac cgggttacgt 720	
[0098]	gctttactga atctgggaca cacctttggt catgccattg aagctgaaat ggggtatggc 780	
[0099]	aattggttac atggtgaagc ggtcgtcgcg ggtatggtga tggcgcgcg gcgctcgaa 840	
[0100]	cgtctcgggc agtttagttc tgccgaaacg cagcgtatta taacctgct caagcgggt 900	
[0101]	gggttaccgg tcaatgggccc gcgcgaaatg tccgcgcagg cgtatttacc gcatatgctg 960	
[0102]	cgtgacaaga aagtccttgc gggagagatg cgcttaattc ttccgttggtc aattggtgaa 1020	
[0103]	agtgaagttc gcagcggcgt ttgcacgag cttgttctta acgccattgc cgattgtcaa 1080	
[0104]	tcagcgtaa	1089
[0105]	<210> 4	
[0106]	<211> 362	
[0107]	<212> PRT	
[0108]	<213> 大肠杆菌	
[0109]	<400> 4	
[0110]	Met Glu Arg Ile Val Val Thr Leu Gly Glu Arg Ser Tyr Pro Ile Thr	
[0111]	1 5 10 15	
[0112]	Ile Ala Ser Gly Leu Phe Asn Glu Pro Ala Ser Phe Leu Pro Leu Lys	
[0113]	20 25 30	
[0114]	Ser Gly Glu Gln Val Met Leu Val Thr Asn Glu Thr Leu Ala Pro Leu	
[0115]	35 40 45	
[0116]	Tyr Leu Asp Lys Val Arg Gly Val Leu Glu Gln Ala Gly Val Asn Val	
[0117]	50 55 60	
[0118]	Asp Ser Val Ile Leu Pro Asp Gly Glu Gln Tyr Lys Ser Leu Ala Val	
[0119]	65 70 75 80	
[0120]	Leu Asp Thr Val Phe Thr Ala Leu Leu Gln Lys Pro His Gly Arg Asp	
[0121]	85 90 95	
[0122]	Thr Thr Leu Val Ala Leu Gly Gly Gly Val Val Gly Asp Leu Thr Gly	
[0123]	100 105 110	
[0124]	Phe Ala Ala Ala Ser Tyr Gln Arg Gly Val Arg Phe Ile Gln Val Pro	
[0125]	115 120 125	

[0126]	Thr Thr Leu Leu Ser Gln Val Asp Ser Ser Val Gly Gly Lys Thr Ala		
[0127]	130	135	140
[0128]	Val Asn His Pro Leu Gly Lys Asn Met Ile Gly Ala Phe Tyr Gln Pro		
[0129]	145	150	155
[0130]	Ala Ser Val Val Val Asp Leu Asp Cys Leu Lys Thr Leu Pro Pro Arg		
[0131]	165	170	175
[0132]	Glu Leu Ala Ser Gly Leu Ala Glu Val Ile Lys Tyr Gly Ile Ile Leu		
[0133]	180	185	190
[0134]	Asp Gly Ala Phe Phe Asn Trp Leu Glu Glu Asn Leu Asp Ala Leu Leu		
[0135]	195	200	205
[0136]	Arg Leu Asp Gly Pro Ala Met Ala Tyr Cys Ile Arg Arg Cys Cys Glu		
[0137]	210	215	220
[0138]	Leu Lys Ala Glu Val Val Ala Ala Asp Glu Arg Glu Thr Gly Leu Arg		
[0139]	225	230	235
[0140]	Ala Leu Leu Asn Leu Gly His Thr Phe Gly His Ala Ile Glu Ala Glu		
[0141]	245	250	255
[0142]	Met Gly Tyr Gly Asn Trp Leu His Gly Glu Ala Val Ala Ala Gly Met		
[0143]	260	265	270
[0144]	Val Met Ala Ala Arg Thr Ser Glu Arg Leu Gly Gln Phe Ser Ser Ala		
[0145]	275	280	285
[0146]	Glu Thr Gln Arg Ile Ile Thr Leu Leu Lys Arg Ala Gly Leu Pro Val		
[0147]	290	295	300
[0148]	Asn Gly Pro Arg Glu Met Ser Ala Gln Ala Tyr Leu Pro His Met Leu		
[0149]	305	310	315
[0150]	Arg Asp Lys Lys Val Leu Ala Gly Glu Met Arg Leu Ile Leu Pro Leu		
[0151]	325	330	335
[0152]	Ala Ile Gly Lys Ser Glu Val Arg Ser Gly Val Ser His Glu Leu Val		
[0153]	340	345	350
[0154]	Leu Asn Ala Ile Ala Asp Cys Gln Ser Ala		
[0155]	355	360	
[0156]	<210> 5		
[0157]	<211> 759		
[0158]	<212> DNA		
[0159]	<213> 大肠杆菌		
[0160]	<400> 5		
[0161]	atgaaaaccg taactgtaaa agatctcgtc attggtacgg gcgcacctaa aatcatcgtc	60	
[0162]	tcgctgatgg cgaaagatat cgccagcgtg aaatccgaag ctctcgcccta tcgtgaagcg	120	
[0163]	gactttgata ttctggaatg gcgtgtggac cactatgccg acctctccaa tgtggagtct	180	
[0164]	gtcatggcgg cagcaaaaat tctccgtgag accatgccag aaaaaccgct gctgtttacc	240	
[0165]	ttccgcagtg ccaaagaagg cggcgagcag gcgatttcca ccgaggctta tattgcactc	300	
[0166]	aatcgtgcag ccatcgacag cggcctggtt gatatgatcg atctggagtt atttaccggt	360	
[0167]	gatgatcagg ttaaagaaac cgtcgcctac gccacgcgc atgatgtgaa agtagtcatg	420	

[0168] tccaaccatg acttccataa aacgccggaa gccgaagaaa tcattgcccg tctgcgcaaa 480
 [0169] atgcaatcct tcgacgccga tatttctaag attgcgctga tgccgcaaag taccagcgat 540
 [0170] gtgtgtacgt tgcttgccgc gacctggag atgcaggagc agtatgccga tcgtccaatt 600
 [0171] atcacgatgt cgatggcaaa aactggcgta atttctcgtc tggctggtga agtatttggc 660
 [0172] tcggcggcaa cttttggtgc ggtaaaaaaa gcgtctgcgc cagggcaaat ctcggtaaat 720
 [0173] gatttgcgca cggtattaac tattttacac caggcataa 759
 [0174] <210> 6
 [0175] <211> 252
 [0176] <212> PRT
 [0177] <213> 大肠杆菌
 [0178] <400> 6
 [0179] Met Lys Thr Val Thr Val Lys Asp Leu Val Ile Gly Thr Gly Ala Pro
 [0180] 1 5 10 15
 [0181] Lys Ile Ile Val Ser Leu Met Ala Lys Asp Ile Ala Ser Val Lys Ser
 [0182] 20 25 30
 [0183] Glu Ala Leu Ala Tyr Arg Glu Ala Asp Phe Asp Ile Leu Glu Trp Arg
 [0184] 35 40 45
 [0185] Val Asp His Tyr Ala Asp Leu Ser Asn Val Glu Ser Val Met Ala Ala
 [0186] 50 55 60
 [0187] Ala Lys Ile Leu Arg Glu Thr Met Pro Glu Lys Pro Leu Leu Phe Thr
 [0188] 65 70 75 80
 [0189] Phe Arg Ser Ala Lys Glu Gly Gly Glu Gln Ala Ile Ser Thr Glu Ala
 [0190] 85 90 95
 [0191] Tyr Ile Ala Leu Asn Arg Ala Ala Ile Asp Ser Gly Leu Val Asp Met
 [0192] 100 105 110
 [0193] Ile Asp Leu Glu Leu Phe Thr Gly Asp Asp Gln Val Lys Glu Thr Val
 [0194] 115 120 125
 [0195] Ala Tyr Ala His Ala His Asp Val Lys Val Val Met Ser Asn His Asp
 [0196] 130 135 140
 [0197] Phe His Lys Thr Pro Glu Ala Glu Glu Ile Ile Ala Arg Leu Arg Lys
 [0198] 145 150 155 160
 [0199] Met Gln Ser Phe Asp Ala Asp Ile Pro Lys Ile Ala Leu Met Pro Gln
 [0200] 165 170 175
 [0201] Ser Thr Ser Asp Val Leu Thr Leu Leu Ala Ala Thr Leu Glu Met Gln
 [0202] 180 185 190
 [0203] Glu Gln Tyr Ala Asp Arg Pro Ile Ile Thr Met Ser Met Ala Lys Thr
 [0204] 195 200 205
 [0205] Gly Val Ile Ser Arg Leu Ala Gly Glu Val Phe Gly Ser Ala Ala Thr
 [0206] 210 215 220
 [0207] Phe Gly Ala Val Lys Lys Ala Ser Ala Pro Gly Gln Ile Ser Val Asn
 [0208] 225 230 235 240
 [0209] Asp Leu Arg Thr Val Leu Thr Ile Leu His Gln Ala

[0210]	245	250
[0211]	<210> 7	
[0212]	<211> 843	
[0213]	<212> DNA	
[0214]	<213> 苏云金芽孢杆菌	
[0215]	<400> 7	
[0216]	atgaaatatt cgctatgtac catttcattt cgtcatcaat taatttcatt tactgatatt	60
[0217]	gttcaatttg catatgaaaa cggttttgaa ggaattgaat tatgggggac gcatgcacaa	120
[0218]	aatttgtaca tgcaagaacg tgaaacgaca gaacgagaat tgaattttct aaaggataaa	180
[0219]	aacttagaaa ttacgatgat aagtgattac ttagatatat cattatcagc agattttgaa	240
[0220]	aaaacgatag agaaaagtga acaacttgta gtactagcta attggtttaa tacgaataaa	300
[0221]	attcgcacgt ttgctgggca aaaagggagc aaggacttct cggaacaaga gagaaaagag	360
[0222]	tatgtgaagc gaatacgtaa gatttgtgat gtgtttgctc agaacaatat gtatgtgctg	420
[0223]	ttagaaacac atccaatac actaacggac acattgcctt ctactataga gttattagaa	480
[0224]	gaagtaaacc atccgaattt aaaaataaat cttgattttc ttcatatatg ggagtctggc	540
[0225]	gcagatccaa tagacagttt ccatcgatta aagccgtgga cactacatta ccattttaag	600
[0226]	aatatatctt cagcggatta tttgcatgtg tttgaaccta ataatgtata tgctgcagca	660
[0227]	ggaagtcgta taggtatggt tccgttatit gaaggtattg taaattatga tgagattatt	720
[0228]	caggaagtga gaaatacggg tctttttgct tccttagaat ggtttggaca taattcaaaa	780
[0229]	gagatattaa aagaagaaat gaaagtatta ataaatagaa aattagaagt agtaacttcg	840
[0230]	taa	843
[0231]	<210> 8	
[0232]	<211> 280	
[0233]	<212> PRT	
[0234]	<213> 苏云金芽孢杆菌	
[0235]	<400> 8	
[0236]	Met Lys Tyr Ser Leu Cys Thr Ile Ser Phe Arg His Gln Leu Ile Ser	
[0237]	1 5 10 15	
[0238]	Phe Thr Asp Ile Val Gln Phe Ala Tyr Glu Asn Gly Phe Glu Gly Ile	
[0239]	20 25 30	
[0240]	Glu Leu Trp Gly Thr His Ala Gln Asn Leu Tyr Met Gln Glu Arg Glu	
[0241]	35 40 45	
[0242]	Thr Thr Glu Arg Glu Leu Asn Phe Leu Lys Asp Lys Asn Leu Glu Ile	
[0243]	50 55 60	
[0244]	Thr Met Ile Ser Asp Tyr Leu Asp Ile Ser Leu Ser Ala Asp Phe Glu	
[0245]	65 70 75 80	
[0246]	Lys Thr Ile Glu Lys Ser Glu Gln Leu Val Val Leu Ala Asn Trp Phe	
[0247]	85 90 95	
[0248]	Asn Thr Asn Lys Ile Arg Thr Phe Ala Gly Gln Lys Gly Ser Lys Asp	
[0249]	100 105 110	
[0250]	Phe Ser Glu Gln Glu Arg Lys Glu Tyr Val Lys Arg Ile Arg Lys Ile	
[0251]	115 120 125	

[0252]	Cys Asp Val Phe Ala Gln Asn Asn Met Tyr Val Leu Leu Glu Thr His	
[0253]	130	140
[0254]	Pro Asn Thr Leu Thr Asp Thr Leu Pro Ser Thr Ile Glu Leu Leu Glu	
[0255]	145	155
[0256]	Glu Val Asn His Pro Asn Leu Lys Ile Asn Leu Asp Phe Leu His Ile	
[0257]	165	175
[0258]	Trp Glu Ser Gly Ala Asp Pro Ile Asp Ser Phe His Arg Leu Lys Pro	
[0259]	180	190
[0260]	Trp Thr Leu His Tyr His Phe Lys Asn Ile Ser Ser Ala Asp Tyr Leu	
[0261]	195	205
[0262]	His Val Phe Glu Pro Asn Asn Val Tyr Ala Ala Ala Gly Ser Arg Ile	
[0263]	210	220
[0264]	Gly Met Val Pro Leu Phe Glu Gly Ile Val Asn Tyr Asp Glu Ile Ile	
[0265]	225	235
[0266]	Gln Glu Val Arg Asn Thr Asp Leu Phe Ala Ser Leu Glu Trp Phe Gly	
[0267]	245	255
[0268]	His Asn Ser Lys Glu Ile Leu Lys Glu Glu Met Lys Val Leu Ile Asn	
[0269]	260	270
[0270]	Arg Lys Leu Glu Val Val Thr Ser	
[0271]	275	280
[0272]	<210> 9	
[0273]	<211> 1542	
[0274]	<212> DNA	
[0275]	<213> 大肠杆菌	
[0276]	<400> 9	
[0277]	atgcgtctgg aagtcttttg tgaagaccga ctcggtctga cccgcgaatt actcgatcta	60
[0278]	ctcgtgctaa gaggcattga tttacgcggt attgagattg atccattgg gcgaatctac	120
[0279]	ctcaattttg ctgaactgga gtttgagagt ttcagcagtc tgatggccga aatacgccgt	180
[0280]	attgcgggtg ttaccgatgt gcgtactgtc ccgtggatgc cttccgaacg tgagcatctg	240
[0281]	gcgttgagcg cgttactgga ggcgttgccct gaacctgtgc tctctgtcga tatgaaaagc	300
[0282]	aaagtggata tggcgaaccc ggcgagctgt cagctttttg ggcaaaaatt ggatcgccctg	360
[0283]	cgcaaccata ccgccgcaca attgattaac ggctttaatt ttttacgttg gctggaaagc	420
[0284]	gaaccgcaag attcgcataa cgagcatgtc gttattaatg ggcagaattt cctgatggag	480
[0285]	attacgcctg tttatcttca ggatgaaaat gatcaacacg tcctgaccgg tgcggtggtg	540
[0286]	atgttgcat caacgattcg tatgggccgc cagttgcaaa atgtcgccgc ccaggacgtc	600
[0287]	agcgccctca gtcaaattgt cgccgtcagc ccgaaaatga agcatgttgt cgaacaggcg	660
[0288]	cagaaactgg cgatgctaag cgcgccgtg ctgattacgg gtgacacagg tacaggtaaa	720
[0289]	gatctctttg cctacgcctg ccatcaggca agccccagag cgggcaaacc ttacctggcg	780
[0290]	ctgaactgtg cgtctatacc ggaagatgcg gtcgagagt aactgtttgg tcatgctccg	840
[0291]	gaagggaaga aaggattctt tgagcaggcg aacggtggtt cggtgctgtt ggatgaaata	900
[0292]	ggggaaatgt caccacgat gcaggcgaat ttactgcgtt tccttaatga tggcactttc	960
[0293]	cgtcgggttg gcgaagacca tgaggtgcat gtcgatgtgc gggtgatttg cgctacgcag	1020

[0294]	aagaatctgg tcgaactggt gcaaaaaggc atgttcctg aagatctcta ttatcgtctg	1080
[0295]	aacgtgttga cgctcaatct gccgccgcta cgtgactgtc cgcaggacat catgccgtta	1140
[0296]	actgagctgt tcgtcgcccg ctttgccgac gagcagggcg tgccgcgtcc gaaactggcc	1200
[0297]	gctgacctga atactgtact tacgcgttat gcgtggccgg gaaatgtgcg gcagttaaag	1260
[0298]	aacgtatct atcgcgact gacacaactg gacggttatg agctgcgtcc acaggatatt	1320
[0299]	ttgttgccgg attatgacgc cgcaacggta gccgtggcg aagatgcgat ggaaggttcg	1380
[0300]	ctggacgaaa tcaccagccg ttttgaacgc tcggtattaa cccagcttta tcgcaattat	1440
[0301]	cccagcacgc gcaaaactggc aaaacgtctc ggcgtttcac ataccgcgat tgccaataag	1500
[0302]	ttgcgggaat atggtctgag tcagaagaag aacgaagagt aa	1542
[0303]	<210> 10	
[0304]	<211> 513	
[0305]	<212> PRT	
[0306]	<213> 大肠杆菌	
[0307]	<400> 10	
[0308]	Met Arg Leu Glu Val Phe Cys Glu Asp Arg Leu Gly Leu Thr Arg Glu	
[0309]	1 5 10 15	
[0310]	Leu Leu Asp Leu Leu Val Leu Arg Gly Ile Asp Leu Arg Gly Ile Glu	
[0311]	20 25 30	
[0312]	Ile Asp Pro Ile Gly Arg Ile Tyr Leu Asn Phe Ala Glu Leu Glu Phe	
[0313]	35 40 45	
[0314]	Glu Ser Phe Ser Ser Leu Met Ala Glu Ile Arg Arg Ile Ala Gly Val	
[0315]	50 55 60	
[0316]	Thr Asp Val Arg Thr Val Pro Trp Met Pro Ser Glu Arg Glu His Leu	
[0317]	65 70 75 80	
[0318]	Ala Leu Ser Ala Leu Leu Glu Ala Leu Pro Glu Pro Val Leu Ser Val	
[0319]	85 90 95	
[0320]	Asp Met Lys Ser Lys Val Asp Met Ala Asn Pro Ala Ser Cys Gln Leu	
[0321]	100 105 110	
[0322]	Phe Gly Gln Lys Leu Asp Arg Leu Arg Asn His Thr Ala Ala Gln Leu	
[0323]	115 120 125	
[0324]	Ile Asn Gly Phe Asn Phe Leu Arg Trp Leu Glu Ser Glu Pro Gln Asp	
[0325]	130 135 140	
[0326]	Ser His Asn Glu His Val Val Ile Asn Gly Gln Asn Phe Leu Met Glu	
[0327]	145 150 155 160	
[0328]	Ile Thr Pro Val Tyr Leu Gln Asp Glu Asn Asp Gln His Val Leu Thr	
[0329]	165 170 175	
[0330]	Gly Ala Val Val Met Leu Arg Ser Thr Ile Arg Met Gly Arg Gln Leu	
[0331]	180 185 190	
[0332]	Gln Asn Val Ala Ala Gln Asp Val Ser Ala Phe Ser Gln Ile Val Ala	
[0333]	195 200 205	
[0334]	Val Ser Pro Lys Met Lys His Val Val Glu Gln Ala Gln Lys Leu Ala	
[0335]	210 215 220	

[0336]	Met Leu Ser Ala Pro Leu Leu Ile Thr Gly Asp Thr Gly Thr Gly Lys
[0337]	225 230 235 240
[0338]	Asp Leu Phe Ala Tyr Ala Cys His Gln Ala Ser Pro Arg Ala Gly Lys
[0339]	245 250 255
[0340]	Pro Tyr Leu Ala Leu Asn Cys Ala Ser Ile Pro Glu Asp Ala Val Glu
[0341]	260 265 270
[0342]	Ser Glu Leu Phe Gly His Ala Pro Glu Gly Lys Lys Gly Phe Phe Glu
[0343]	275 280 285
[0344]	Gln Ala Asn Gly Gly Ser Val Leu Leu Asp Glu Ile Gly Glu Met Ser
[0345]	290 295 300
[0346]	Pro Arg Met Gln Ala Lys Leu Leu Arg Phe Leu Asn Asp Gly Thr Phe
[0347]	305 310 315 320
[0348]	Arg Arg Val Gly Glu Asp His Glu Val His Val Asp Val Arg Val Ile
[0349]	325 330 335
[0350]	Cys Ala Thr Gln Lys Asn Leu Val Glu Leu Val Gln Lys Gly Met Phe
[0351]	340 345 350
[0352]	Arg Glu Asp Leu Tyr Tyr Arg Leu Asn Val Leu Thr Leu Asn Leu Pro
[0353]	355 360 365
[0354]	Pro Leu Arg Asp Cys Pro Gln Asp Ile Met Pro Leu Thr Glu Leu Phe
[0355]	370 375 380
[0356]	Val Ala Arg Phe Ala Asp Glu Gln Gly Val Pro Arg Pro Lys Leu Ala
[0357]	385 390 395 400
[0358]	Ala Asp Leu Asn Thr Val Leu Thr Arg Tyr Ala Trp Pro Gly Asn Val
[0359]	405 410 415
[0360]	Arg Gln Leu Lys Asn Ala Ile Tyr Arg Ala Leu Thr Gln Leu Asp Gly
[0361]	420 425 430
[0362]	Tyr Glu Leu Arg Pro Gln Asp Ile Leu Leu Pro Asp Tyr Asp Ala Ala
[0363]	435 440 445
[0364]	Thr Val Ala Val Gly Glu Asp Ala Met Glu Gly Ser Leu Asp Glu Ile
[0365]	450 455 460
[0366]	Thr Ser Arg Phe Glu Arg Ser Val Leu Thr Gln Leu Tyr Arg Asn Tyr
[0367]	465 470 475 480
[0368]	Pro Ser Thr Arg Lys Leu Ala Lys Arg Leu Gly Val Ser His Thr Ala
[0369]	485 490 495
[0370]	Ile Ala Asn Lys Leu Arg Glu Tyr Gly Leu Ser Gln Lys Lys Asn Glu
[0371]	500 505 510
[0372]	Glu
[0373]	<210> 11
[0374]	<211> 2304
[0375]	<212> DNA
[0376]	<213> 智人
[0377]	<400> 11

[0378]	cggcctgcgt ccgccaccgg aagcgccctc ctaatccccg cagcgccacc gccattgccg	60
[0379]	ccatcgtcgt ggggcttctg gggcagctag ggctgcccgc cgcgctgcct gcgccggacc	120
[0380]	ggggcgggtc cagtccccgg cgggcccgtc cgggagagaa ataacatctg ctttgctgcc	180
[0381]	gagctcagag gagacccag acccctccc cagccagagg gctggagcct gctcagaggt	240
[0382]	gctttgaaga tgccggaggc cccgcctctg ctgttggcag ctgtgttgct gggcctggtg	300
[0383]	ctgctggtgg tgctgtgct gcttctgagg cactggggct ggggcctgtg ccttatcggc	360
[0384]	tggaacgagt tcatctgca gcccattcac aacctgctca tgggtgacac caaggagcag	420
[0385]	cgcacctga accacgtgct gcagcatgcg gagcccggga acgcacagag cgtgctggag	480
[0386]	gccattgaca cctactgca gcagaaggag tgggcatga acgtgggcga caagaaaggc	540
[0387]	aagatcgtag acgccgtgat tcaggagcac cagccctccg tgctgctgga gctgggggcc	600
[0388]	tactgtggct actcagctgt gcgcatggcc cgcctgctgt caccaggggc gaggtcatc	660
[0389]	accatcgaga tcaacccga ctgtgccgc atcaccagc ggatggtgga ttctgctggc	720
[0390]	gtgaaggaca aggtcacct tgtggttga gcgtcccagg acatcatccc ccagctgaag	780
[0391]	aagaagtatg atgtggacac actggacatg gtcttctctg accactggaa ggaccggtac	840
[0392]	ctgccggaca cgcttctctt ggaggaatgt ggcctgctgc ggaaggggac agtgctactg	900
[0393]	gctgacaacg tgatctgcc aggtgcgcca gacttcttag cacacgtgcg cgggagcagc	960
[0394]	tgctttgagt gcacacacta ccaatcgctt ctggaataca gggaggtggt ggacggcctg	1020
[0395]	gagaaggcca tctacaagg cccaggcagc gaagcagggc cctgactgcc ccccgggccc	1080
[0396]	ccctctcggg ctctctcacc cagcctggta ctgaaggctc cagacgtgct cctgctgacc	1140
[0397]	ttctgcgget ccgggctgtg tcctaaatgc aaagcacacc tcggccgagg cctgcgccct	1200
[0398]	gacatgctaa cctctctgaa ctgcaacact ggattgttct tttttaagac tcaatcatga	1260
[0399]	cttctttact aacactggct agctatatta tcttatatac taatatcatg ttttaaaaat	1320
[0400]	ataaaataga aattaagaat ctaaataatt agatataact cgacttagta catccttctc	1380
[0401]	aactgccatt cccctgctgc ccttgacttg ggcacaaac attcaaagct ccccttgacg	1440
[0402]	gacgctaacg ctaagggcgg gccccctagc tggttggtt ctgggtggca cgcctggccc	1500
[0403]	actggcctcc cagccacagt ggtgcagagg tcagccctcc tgcagctagg ccaggggcac	1560
[0404]	ctgttagccc catggggacg actgccggcc tgggaaacga agaggagtca gccagcattc	1620
[0405]	acacctttct gaccaagcag gcgctgggga caggtggacc ccgagcagc accagcccct	1680
[0406]	ctgggcccc a tgtggcacag agtggaaagca tctcttccc tactccccac tgggccttgc	1740
[0407]	ttacagaaga ggcaatggct cagaccagct cccgcacccc tgtagtgtgc tccctggccc	1800
[0408]	atgagtgagg atgcagtgt ggtttctgcc cacctacacc tagagctgtc cccatctcct	1860
[0409]	ccaaggggtc agactgctag ccacctcaga ggctccaagg gccagttcc caggcccagg	1920
[0410]	acaggaatca accctgtgct agctgagttc acctgcaccg agaccagccc ctagccaaga	1980
[0411]	ttctactcct gggctcaagg cctggctagc cccagccag cccactccta tggatagaca	2040
[0412]	gaccagttag cccaagtgga caagtttggg gccaccagg gaccagaaac agagcctctg	2100
[0413]	caggacacag cagatgggca cctgggacca cctccacca gggccctgcc ccagacgcgc	2160
[0414]	agaggcccga cacaaggag aagccagcca cttgtgccag acctgagtgg cagaaagcaa	2220
[0415]	aaagtctctt tgctgcttta atttttaaat tttcttaca aaatttaggt gtttaccat	2280
[0416]	agtcttattt tggttattt ttaa	2304
[0417]	<210> 12	
[0418]	<211> 2262	
[0419]	<212> DNA	

[0420]	<213> 智人	
[0421]	<400> 12	
[0422]	ctccccacggg aggagcaaga acacagaaca gagggggcaa gacagctcca ccaggagtca	60
[0423]	ggagtgaatc ccctctggga acgaggcact aggaagaaga acttccagcc caggagaaat	120
[0424]	aacatctgct ttgctgccga gctcagagga gacccagac ccctcccga gccagagggc	180
[0425]	tggagcctgc tcagaggtgc tttgaagatg ccggaggccc cgcctctgct gttggcagct	240
[0426]	gtgttgctgg gcctggtgct gctggtggtg ctgctgctgc ttctgaggca ctggggctgg	300
[0427]	ggcctgtgcc ttatcggtg gaacgagttc atcctgcagc ccatccacaa cctgctcatg	360
[0428]	ggtgacacca aggagcagcg catcctgaac cacgtgctgc agcatgcgga gcccgggaac	420
[0429]	gcacagagcg tgctggaggc cattgacacc tactgcgagc agaaggagtg ggccatgaac	480
[0430]	gtgggcgaca agaaaggcaa gatcgtggac gccgtgattc aggagcacca gccctccgtg	540
[0431]	ctgctggagc tgggggccta ctgtggctac tcagctgtgc gcatggccc cctgctgtca	600
[0432]	ccagggcgga ggctcatcac catcgagatc aaccccgact gtgccgcat caccagcgg	660
[0433]	atggtggatt tcgctggcgt gaaggacaag gtcacccttg tggttggagc gtcccaggac	720
[0434]	atcatccccc agctgaagaa gaagtatgat tggacacac tggacatggt ctccctcgac	780
[0435]	cactggaagg accggtacct gccggacagc ctctcttgg aggaatgtgg cctgctgcgg	840
[0436]	aaggggacag tgctactggc tgacaacgtg atctgcccag gtgcgccaga ctccctagca	900
[0437]	cacgtgcgcg ggagcagctg ctttgagtgc acacactacc aatcgttcct ggaatacagg	960
[0438]	gaggtggtgg acggcctgga gaaggccatc tacaagggcc caggcagcga agcaggggcc	1020
[0439]	tgactgcccc cccggcccc ctctcgggct ctctcaccca gcctggtaact gaaggtgcca	1080
[0440]	gacgtgctcc tgctgacctt ctgcggctcc gggctgtgtc ctaaagcaa agcacacctc	1140
[0441]	ggccgaggcc tgcgccctga catgctaacc tctctgaact gcaacactgg attgttcttt	1200
[0442]	tttaagactc aatcatgact tctttactaa cactggctag ctatattatc ttatatacta	1260
[0443]	atatcatgtt ttaaaaatat aaaatagaaa ttaagaatct aaatatattag atataactcg	1320
[0444]	acttagtaca tccttctcaa ctgccattcc cctgctgccc ttgacttggg caccaaacat	1380
[0445]	tcaaagctcc ccttgacgga cgctaacgct aagggcgggg cccttagctg gctgggttct	1440
[0446]	gggtggcacg cctggcccac tggcctccca gccacagtgg tgcagaggtc agccctcctg	1500
[0447]	cagctaggcc aggggcacct gttagcccca tggggacgac tgccggcctg ggaaacgaag	1560
[0448]	aggagtcagc cagcattcac acctttctga ccaagcaggc gctggggaca ggtggacccc	1620
[0449]	gcagcagcac cagccccctc gggccccatg tggcacagag tggaagcatc tccttcctta	1680
[0450]	ctccccactg ggccttgctt acagaagagg caatggctca gaccagctcc cgcacccctg	1740
[0451]	tagttgcctc cctggcccat gagtgaggat gcagtgtggt tttctgccc cctacaccta	1800
[0452]	gagctgtccc catctcctcc aaggggtcag actgctagcc acctcagagg ctccaagggc	1860
[0453]	ccagttccca ggcccaggac aggaatcaac cctgtgctag ctgagttcac ctgcaccgag	1920
[0454]	accagcccct agccaagatt ctactcctgg gctcaaggcc tggctagccc ccagccagcc	1980
[0455]	cactcctatg gatagacaga ccagttagcc caagtggaca agtttggggc caccagggga	2040
[0456]	ccagaaacag agcctctgca ggacacagca gatgggcacc tgggaccacc tccaccagg	2100
[0457]	gccctgcccc agacgcgag agggccgaca caaggagaa gccagccact tgtgccagac	2160
[0458]	ctgagtggca gaaagcaaaa agttcctttg ctgctttaat ttttaattt tcttacaaaa	2220
[0459]	atttaggtgt ttaccaatag tcttattttg gcttattttt aa	2262
[0460]	<210> 13	
[0461]	<211> 2279	

[0462]	<212> DNA	
[0463]	<213> 智人	
[0464]	<400> 13	
[0465]	tggagataac acggatcgct gtgtacactg tgtgctccgg ttgttgcatc cgagggttga	60
[0466]	tcggatgggtg gttcccatcc agatccaagt cctggcccct gatcacagag aaacacagct	120
[0467]	ggacattaaa gtgaaataac atctgctttg ctgccgagct cagaggagac cccagacccc	180
[0468]	tcccgcagcc agagggtg agcctgctca gaggtgcttt gaagatgccg gaggccccgc	240
[0469]	ctctgctgtt ggcagctgtg ttgctgggcc tggctgctgt ggtggtgctg ctgctgcttc	300
[0470]	tgaggcactg gggctggggc ctgtgcctta tcggctggaa cgagttcatc ctgcagccca	360
[0471]	tccacaacct gctcatgggt gacaccaagg agcagcgcat cctgaaccac gtgctgcagc	420
[0472]	atgcggagcc cgggaacgca cagagcgtgc tggaggccat tgacacctac tgcgagcaga	480
[0473]	aggagtgggc catgaacgtg ggcgacaaga aaggcaagat cgtggacgcc gtgattcagg	540
[0474]	agcaccagcc ctccgtgctg ctggagctgg gggcctactg tggctactca gctgtgcgca	600
[0475]	tggcccgccct gctgtcacca ggggcgaggc tcatcaccat cgagatcaac cccgactgtg	660
[0476]	ccgccatcac ccagcggatg gtggatttcg ctggcgtgaa ggacaaggtc acccttgttg	720
[0477]	ttggagcgtc ccaggacatc atccccagc tgaagaagaa gtatgatgtg gacacactgg	780
[0478]	acatggtctt cctcgaccac tgggaaggacc ggtacctgcc ggacacgctt ctcttggagg	840
[0479]	aatgtggcct gctgcggaag gggacagtgc tactggctga caacgtgatc tgcccaggtg	900
[0480]	cgccagactt cctagcacac gtgcgcggga gcagctgctt tgagtgcaca cactaccaat	960
[0481]	cgttcctgga atacaggag gtggtggacg gcctggagaa ggccatctac aaggggccag	1020
[0482]	gcagcgaagc agggccctga ctgccccccc ggccccctc tcgggctctc tcaccagcc	1080
[0483]	tggtactgaa ggtgccagac gtgctcctgc tgacctctg cggctccggg ctgtgtccta	1140
[0484]	aatgcaaagc acacctcggc cgaggcctgc gccctgacat gctaacctct ctgaactgca	1200
[0485]	acactggatt gttctttttt aagactcaat catgacttct ttactaacac tggctagcta	1260
[0486]	tattatctta tatactaata tcatgtttta aaaatataaa atagaaatta agaattctaaa	1320
[0487]	tatttagata taactcgact tagtacatcc ttctcaactg ccattcccct gctgcccttg	1380
[0488]	acttgggcac caaacattca aagctcccct tgacggacgc taacgctaag ggcggggccc	1440
[0489]	ctagctggct gggttctggg tggcacgcct ggccccactg cctcccagcc acagtgtg	1500
[0490]	agaggtcagc cctcctgcag ctaggccagg ggcacctgtt agcccatgg ggacgactgc	1560
[0491]	cggcctggga aacgaagagg agtcagccag cattcacacc tttctgacca agcaggcgct	1620
[0492]	ggggacaggt ggaccccga gcagcaccag cccctctggg ccccatgtgg cacagagtgg	1680
[0493]	aagcatctcc ttccctactc cccactgggc cttgcttaca gaagaggcaa tggctcagac	1740
[0494]	cagctccccg atccctgtag ttgcctccct ggcccatgag tgaggatgca gtgctggttt	1800
[0495]	ctgcccacct acacctagag ctgtccccat ctctccaag gggtcagact gctagccacc	1860
[0496]	tcagaggctc caaggccca gttcccaggc ccaggacagg aatcaaccct gtgctagctg	1920
[0497]	agttcacctg caccgagacc agccccctagc caagattcta ctctgggct caaggcctgg	1980
[0498]	ctagcccccga gccagcccac tcctatggat agacagacca gtgagcccaa gtggacaagt	2040
[0499]	ttggggccac ccagggacca gaaacagagc ctctgcagga cacagcagat gggcacctgg	2100
[0500]	gaccacctcc acccagggcc ctgcccaga cgcgcagagg cccgacacaa gggagaagcc	2160
[0501]	agccacttgt gccagacctg agtggcagaa agcaaaaagt tcctttgctg ctttaatttt	2220
[0502]	taaattttct taaaaaatt tagtgtttta ccaatagtct tattttggct tatttttaa	2279
[0503]	<210> 14	

[0504]	<211> 2035
[0505]	<212> DNA
[0506]	<213> 智人
[0507]	<400> 14
[0508]	gctgttggca gctgtgttgc tgggcctggt gctgctggtg gtgctgctgc tgcttctgag 60
[0509]	gcactggggc tggggcctgt gccttatcgg ctggaacgag ttcactctgc agcccatcca 120
[0510]	caacctgctc atgggtgaca ccaaggagca gcgcactctg aaccacgtgc tgcagcatgc 180
[0511]	ggagcccgga aacgcacaga gcgtgctgga ggccattgac acctactgcg agcagaagga 240
[0512]	gtgggccatg aacgtgggcg acaagaaagg caagatcgtg gacgccgtga ttcaggagca 300
[0513]	ccagccctcc gtgctgctgg agctgggggc ctactgtggc tactcagctg tgcgcatggc 360
[0514]	ccgcctgctg tcaccagggg cgaggctcat caccatcgag atcaaccccg actgtgccgc 420
[0515]	catcaccag cggtatggtg atttcgctgg cgtgaaggac aaggtcacc ttgtggttgg 480
[0516]	agcgtcccag gacatcatcc cccagctgaa gaagaagtat gatgtggaca cactggacat 540
[0517]	ggtcttctc gaccactgga aggaccggtg cctgccggac acgcttctct tggaggaatg 600
[0518]	tggcctgctg cggaagggga cagtgtact ggctgacaac gtgatctgcc caggtgcgcc 660
[0519]	agacttcta gcacacgtgc gcgggagcag ctgctttgag tgcacacact accaatcgtt 720
[0520]	cctggaatac agggaggtgg tggacggcct ggagaaggcc atctacaagg gccaggcag 780
[0521]	cgaagcaggg ccctgactgc ccccccggcc cccctctcgg gctctctcac ccagcctggt 840
[0522]	actgaaggtg ccagacgtgc tcctgctgac cttctgcggc tccgggctgt gtcctaaatg 900
[0523]	caaagcacac ctggccgag gcctgcgcc tgacatgcta acctctctga actgcaacac 960
[0524]	tggattgttc ttttttaaga ctcaatcatg atttctttac taacactggc tagctatatt 1020
[0525]	atcttatata ctaatatcat gttttaaaa tataaaatag aaattaagaa tctaaatatt 1080
[0526]	tagatataac tcgacttagt acatccttct caactgccat tcccctgctg cccttgactt 1140
[0527]	gggcacaaa cattcaaagc tcccctgac ggacgctaac gctaaggcg gggcccctag 1200
[0528]	ctggctgggt tctgggtggc acgcctggcc cactggcctc ccagccacag tgggtgcagag 1260
[0529]	gtcagccctc ctgcagctag gccaggggca cctgttagcc ccatggggac gactgccggc 1320
[0530]	ctgggaaacg aagaggagtc agccagcatt cacaccttc tgaccaagca ggcgctgggg 1380
[0531]	acaggtggac cccgcagcag caccagcccc tctgggcccc atgtggcaca gagtggaaag 1440
[0532]	atctccttcc ctactcccca ctgggccttg cttacagaag aggcaatggc tcagaccagc 1500
[0533]	tcccgcatec ctgtagttgc ctccctggcc catgagttag gatgcagtgc tggtttctgc 1560
[0534]	ccacctacac ctagagctgt ccccatctcc tccaagggtg cagactgcta gccacctcag 1620
[0535]	aggctccaag ggcccagttc ccaggcccag gacaggaatc aaccctgtgc tagctgagtt 1680
[0536]	cacctgcacc gagaccagcc cctagccaag attctactcc tgggctcaag gcctggctag 1740
[0537]	ccccagecca gccactcct atggatagac agaccagtga gccaagtgg acaagtttgg 1800
[0538]	ggccaccag ggaccagaaa cagagcctct gcaggacaca gcagatgggc acctgggacc 1860
[0539]	acctccacc agggccctgc ccagacgcg cagaggcccg acacaaggga gaagccagcc 1920
[0540]	acttgtgcca gacctgagtg gcagaaagca aaaagttcct ttgctgcttt aatttttaaa 1980
[0541]	ttttcttaca aaaatttagg tgttttacca tagtcttatt ttggcttatt ttttaa 2035
[0542]	<210> 15
[0543]	<211> 271
[0544]	<212> PRT
[0545]	<213> 智人

[0546]	<400> 15
[0547]	Met Pro Glu Ala Pro Pro Leu Leu Leu Ala Ala Val Leu Leu Gly Leu
[0548]	1 5 10 15
[0549]	Val Leu Leu Val Val Leu Leu Leu Leu Arg His Trp Gly Trp Gly
[0550]	20 25 30
[0551]	Leu Cys Leu Ile Gly Trp Asn Glu Phe Ile Leu Gln Pro Ile His Asn
[0552]	35 40 45
[0553]	Leu Leu Met Gly Asp Thr Lys Glu Gln Arg Ile Leu Asn His Val Leu
[0554]	50 55 60
[0555]	Gln His Ala Glu Pro Gly Asn Ala Gln Ser Val Leu Glu Ala Ile Asp
[0556]	65 70 75 80
[0557]	Thr Tyr Cys Glu Gln Lys Glu Trp Ala Met Asn Val Gly Asp Lys Lys
[0558]	85 90 95
[0559]	Gly Lys Ile Val Asp Ala Val Ile Gln Glu His Gln Pro Ser Val Leu
[0560]	100 105 110
[0561]	Leu Glu Leu Gly Ala Tyr Cys Gly Tyr Ser Ala Val Arg Met Ala Arg
[0562]	115 120 125
[0563]	Leu Leu Ser Pro Gly Ala Arg Leu Ile Thr Ile Glu Ile Asn Pro Asp
[0564]	130 135 140
[0565]	Cys Ala Ala Ile Thr Gln Arg Met Val Asp Phe Ala Gly Val Lys Asp
[0566]	145 150 155 160
[0567]	Lys Val Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Gln Asp Ile Ile Pro Gln Leu
[0568]	165 170 175
[0569]	Lys Lys Lys Tyr Asp Val Asp Thr Leu Asp Met Val Phe Leu Asp His
[0570]	180 185 190
[0571]	Trp Lys Asp Arg Tyr Leu Pro Asp Thr Leu Leu Leu Glu Glu Cys Gly
[0572]	195 200 205
[0573]	Leu Leu Arg Lys Gly Thr Val Leu Leu Ala Asp Asn Val Ile Cys Pro
[0574]	210 215 220
[0575]	Gly Ala Pro Asp Phe Leu Ala His Val Arg Gly Ser Ser Cys Phe Glu
[0576]	225 230 235 240
[0577]	Cys Thr His Tyr Gln Ser Phe Leu Glu Tyr Arg Glu Val Val Asp Gly
[0578]	245 250 255
[0579]	Leu Glu Lys Ala Ile Tyr Lys Gly Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro
[0580]	260 265 270
[0581]	<210> 16
[0582]	<211> 221
[0583]	<212> PRT
[0584]	<213> 智人
[0585]	<400> 16
[0586]	Met Gly Asp Thr Lys Glu Gln Arg Ile Leu Asn His Val Leu Gln His
[0587]	1 5 10 15

[0588]	Ala Glu Pro Gly Asn Ala Gln Ser Val Leu Glu Ala Ile Asp Thr Tyr		
[0589]	20	25	30
[0590]	Cys Glu Gln Lys Glu Trp Ala Met Asn Val Gly Asp Lys Lys Gly Lys		
[0591]	35	40	45
[0592]	Ile Val Asp Ala Val Ile Gln Glu His Gln Pro Ser Val Leu Leu Glu		
[0593]	50	55	60
[0594]	Leu Gly Ala Tyr Cys Gly Tyr Ser Ala Val Arg Met Ala Arg Leu Leu		
[0595]	65	70	75
[0596]	Ser Pro Gly Ala Arg Leu Ile Thr Ile Glu Ile Asn Pro Asp Cys Ala		
[0597]	85	90	95
[0598]	Ala Ile Thr Gln Arg Met Val Asp Phe Ala Gly Val Lys Asp Lys Val		
[0599]	100	105	110
[0600]	Thr Leu Val Val Gly Ala Ser Gln Asp Ile Ile Pro Gln Leu Lys Lys		
[0601]	115	120	125
[0602]	Lys Tyr Asp Val Asp Thr Leu Asp Met Val Phe Leu Asp His Trp Lys		
[0603]	130	135	140
[0604]	Asp Arg Tyr Leu Pro Asp Thr Leu Leu Leu Glu Glu Cys Gly Leu Leu		
[0605]	145	150	155
[0606]	Arg Lys Gly Thr Val Leu Leu Ala Asp Asn Val Ile Cys Pro Gly Ala		
[0607]	165	170	175
[0608]	Pro Asp Phe Leu Ala His Val Arg Gly Ser Ser Cys Phe Glu Cys Thr		
[0609]	180	185	190
[0610]	His Tyr Gln Ser Phe Leu Glu Tyr Arg Glu Val Val Asp Gly Leu Glu		
[0611]	195	200	205
[0612]	Lys Ala Ile Tyr Lys Gly Pro Gly Ser Glu Ala Gly Pro		
[0613]	210	215	220
[0614]	<210> 17		
[0615]	<211> 3453		
[0616]	<212> DNA		
[0617]	<213> 巴西诺卡菌		
[0618]	<400> 17		
[0619]	ttgttcgccg aggacgagca ggtgaaagcc gcggtgccgg accaggaggt ggtcgaggcg	60	
[0620]	atccgggcgc ccggcctgcg cctggcacag atcatggcca ccgtgatgga gcgctatgcg	120	
[0621]	gaccgccccg cgggtgggaca gcgggagcgc gagccgggtca ccgagagcgg tcgcaccacc	180	
[0622]	ttccggctgc tcccgaatt cgagaccctg acctaccgcg agctgtgggc gcgcgtccgc	240	
[0623]	gcggtggccg ccgcgtggca cggagatgcc gaaaggcctt tgcgggcccgg ggatttcgtt	300	
[0624]	gctctgctgg gtttcgccgg catcgattac ggcaccctcg atctcgcgaa catccatctc	360	
[0625]	ggctcgtca cgggtccgct gcaatccggc gccacggccc cgcaactcgc cgcgatactg	420	
[0626]	gccgagacca cgccccgggt gctggccgcg acaccgacc atctcgatat cgccgtcgaa	480	
[0627]	ttgctgaccg ggggagcctc gccggaacgg ctggtggtat tcgactaccg ccccgcgga	540	
[0628]	gacgatcacc gggcggcgct cgagtcgcg cgacagcggg tgagcgacgc gggcagtgcg	600	
[0629]	gtggtggtcg agacgtcga cgcggtccgc gcccgcgga gcgaattgcc ggccgccccg	660	

[0630]	ctgttcgttc ccgccgcgga cgaggacccg ctggctctgc tcatctacac ctccggcagc	720
[0631]	accggcacgc ctaagggcgc catgtacacc gaaagactga accgcacgac gtggctgagc	780
[0632]	ggggcgaaag gcgtcggcct cacgctcggc tacatgccga tgagtcatat tgccgggcgg	840
[0633]	gcctcgttcg ccggtgtgct ggcccgcggc ggcacggtct acttcaccgc ccgcagcgat	900
[0634]	atgtcgacgc tgttcgaaga tctggccctg gtgcggccga ccgagatgtt cttcgtccc	960
[0635]	cgcgtgtgcg acatgatctt ccagcgctat caggccgaac tgtcgcggcg cgcgcccgcc	1020
[0636]	gcggccgcga gcccgaact cgagcaggaa ctgaagaccg aactgcgctt gtccgcggtc	1080
[0637]	ggggaccgct tactcggggc gatcgcgggc agcgcgccgc tgtcggccga gatgcgggag	1140
[0638]	ttcatggagt cgctgctgga tctggaactg cacgacggct acggctcgac cgaggcgggt	1200
[0639]	atcggcgtag tgcaagacaa tatcgtccag cgtccgccgg tcatcgatta caagctcgtc	1260
[0640]	gacgtgccgg aattgggcta cttccggacg gaccagccgc atcccccgcg tgagttgctg	1320
[0641]	ttgaaaaccg aagggatgat tccgggctac ttccggcggc ccgaggtgac cgcggagatc	1380
[0642]	ttcgacgagg acggtttcta caggaccggt gacatcgtcg ccgaactcga accggatcgg	1440
[0643]	ctgatctacc tggaccgccg caacaatgtg ctgaaactgg cccagggcga gttcgtcacg	1500
[0644]	gtcggccatc tggaagcggg gttcgcgacc agtccgctga tccggcagat ctacatctac	1560
[0645]	ggcaacagcg agcgtcgtt cctgctggcg gtgatcgtgc ccaccgcgga cgcgtggcc	1620
[0646]	gacggtgtca ccgacgcgt gaacacggcg ctgaccgaat ccttgcgaca gctcgcgaaa	1680
[0647]	gaagccgggc tgcaatccta tgagctgccg cgcgagttcc tggtcgaaac cgaaccgttc	1740
[0648]	accgtcgaga acggtctgct ctccggtatc gcgaaactgt tgcggcccaa gctcaaggag	1800
[0649]	cactacggcg agcactcga gcagctgtac cgcgatatcg aggcgaaccg caacgacgag	1860
[0650]	ctgatcgagc tgcggcgcac cgcggccgag ctgccggtgc tcgaaaccgt cacgcgggct	1920
[0651]	gcacgttcga tgctcgact ggccgcgtcg gagttgcggc cggacgcgca tttcaccgat	1980
[0652]	ctcggcggtg attcactgtc cgcgtctcg ttttcgacct tgctgcagga catgctcgag	2040
[0653]	gtcgaggtcc cggtcggtgt catcgtgagc cccgccaact cgctcgccga tctggcgaaa	2100
[0654]	tacatcgagg ccgaacggca ttccgggggtg cggcgccga gcctgatctc ggtgcacggt	2160
[0655]	cccggcaccg agatccgtgc cgccgatctc accctggaca agttcatcga cgagcgcacc	2220
[0656]	ctcgtgccg cgaaagcggg tccggcccg cggcccagg cgcagaccgt cctgctcacc	2280
[0657]	ggggcgaaac gctatctcgg ccgcttcctg tgcctggaat ggctgcagcg actggaccag	2340
[0658]	accggcgga cgttggtctg catcgtgcgc ggtaccgacg cggccgccgc gcggaagcgc	2400
[0659]	ctggatgcgg tgttcgacag cggatgacg gagctgctcg accactaccg gaagctggcc	2460
[0660]	gccgagcacc tcgaggtgct cgcggcgcat atcggcgacc cgaatctcgg cctggacgaa	2520
[0661]	gcgacttggc agcggctcgc cgcgaccgtc gacctgatcg tgcacccgc cgccctcgtc	2580
[0662]	aaccatgtgc tgccgtacag ccagctgttc gggccgaatg tggtcggcac cgccgagatc	2640
[0663]	atccggtggt ccatcaccga gcgccgtaag cccgtgacgt acctgtcgac ggtcgcgggtg	2700
[0664]	gccgcacagg tcgatccgc cggttcgac gaggagcgcg atatccggga gatgagcgcg	2760
[0665]	gtgcgtcca tcgacgccg gtacgcgaac ggttacggca acagcaagtg ggccggcgag	2820
[0666]	gtgctgctgc gcgaggccca tgatctgtgc gggctgccg tcgccgtgtt ccgctcggac	2880
[0667]	atgatcctgg cgcacagcaa atacgtcggc cagctcaacg tccccgatgt gttcaccggg	2940
[0668]	ctcatcctga gcctggcgt caccggcacc gcaccgtatt cgttctacgg gacggacagc	3000
[0669]	gccgggcagc gcaggcgggc cactacgac ggtctgccc ccgatttcgt cgccgaggcg	3060
[0670]	atcaccaccc tcggcgcgcg agccgagtcg gggttccata cctacgacgt gtggaacccg	3120
[0671]	tacgacgacg gcattctgct ggacgaattc gtcgactggc tcggcgattt cggcgtgccg	3180

[0672]	atccagcgga tcgacgacta cgacgaatgg ttccggcggtt tcgagaccgc gatccgcgcg	3240
[0673]	ctgcccgaag agcagcgaga tgcttcgctg ctaccgctgc tggacgcaca ccggcggcca	3300
[0674]	ctgcgcgagg tgcgcggttc gctgttgccc gccagaact tccaggcggc ggtgcagtcc	3360
[0675]	gcgcggatcg gccccgatca ggacatcccg catctttccc cgcagttgat cgacaagtac	3420
[0676]	gtcaccgacc tgcgccacct cggcctgctc tga	3453
[0677]	<210> 18	
[0678]	<211> 1150	
[0679]	<212> PRT	
[0680]	<213> 巴西诺卡菌	
[0681]	<400> 18	
[0682]	Met Phe Ala Glu Asp Glu Gln Val Lys Ala Ala Val Pro Asp Gln Glu	
[0683]	1 5 10 15	
[0684]	Val Val Glu Ala Ile Arg Ala Pro Gly Leu Arg Leu Ala Gln Ile Met	
[0685]	20 25 30	
[0686]	Ala Thr Val Met Glu Arg Tyr Ala Asp Arg Pro Ala Val Gly Gln Arg	
[0687]	35 40 45	
[0688]	Ala Ser Glu Pro Val Thr Glu Ser Gly Arg Thr Thr Phe Arg Leu Leu	
[0689]	50 55 60	
[0690]	Pro Glu Phe Glu Thr Leu Thr Tyr Arg Glu Leu Trp Ala Arg Val Arg	
[0691]	65 70 75 80	
[0692]	Ala Val Ala Ala Ala Trp His Gly Asp Ala Glu Arg Pro Leu Arg Ala	
[0693]	85 90 95	
[0694]	Gly Asp Phe Val Ala Leu Leu Gly Phe Ala Gly Ile Asp Tyr Gly Thr	
[0695]	100 105 110	
[0696]	Leu Asp Leu Ala Asn Ile His Leu Gly Leu Val Thr Val Pro Leu Gln	
[0697]	115 120 125	
[0698]	Ser Gly Ala Thr Ala Pro Gln Leu Ala Ala Ile Leu Ala Glu Thr Thr	
[0699]	130 135 140	
[0700]	Pro Arg Val Leu Ala Ala Thr Pro Asp His Leu Asp Ile Ala Val Glu	
[0701]	145 150 155 160	
[0702]	Leu Leu Thr Gly Gly Ala Ser Pro Glu Arg Leu Val Val Phe Asp Tyr	
[0703]	165 170 175	
[0704]	Arg Pro Ala Asp Asp Asp His Arg Ala Ala Leu Glu Ser Ala Arg Arg	
[0705]	180 185 190	
[0706]	Arg Leu Ser Asp Ala Gly Ser Ala Val Val Val Glu Thr Leu Asp Ala	
[0707]	195 200 205	
[0708]	Val Arg Ala Arg Gly Ser Glu Leu Pro Ala Ala Pro Leu Phe Val Pro	
[0709]	210 215 220	
[0710]	Ala Ala Asp Glu Asp Pro Leu Ala Leu Leu Ile Tyr Thr Ser Gly Ser	
[0711]	225 230 235 240	
[0712]	Thr Gly Thr Pro Lys Gly Ala Met Tyr Thr Glu Arg Leu Asn Arg Thr	
[0713]	245 250 255	

[0714]	Thr Trp Leu Ser Gly Ala Lys Gly Val Gly Leu Thr Leu Gly Tyr Met		
[0715]		260	265
[0716]	Pro Met Ser His Ile Ala Gly Arg Ala Ser Phe Ala Gly Val Leu Ala		270
[0717]		275	280
[0718]	Arg Gly Gly Thr Val Tyr Phe Thr Ala Arg Ser Asp Met Ser Thr Leu		285
[0719]		290	295
[0720]	Phe Glu Asp Leu Ala Leu Val Arg Pro Thr Glu Met Phe Phe Val Pro		300
[0721]		305	310
[0722]	Arg Val Cys Asp Met Ile Phe Gln Arg Tyr Gln Ala Glu Leu Ser Arg		315
[0723]		325	330
[0724]	Arg Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ser Pro Glu Leu Glu Gln Glu Leu Lys		335
[0725]		340	345
[0726]	Thr Glu Leu Arg Leu Ser Ala Val Gly Asp Arg Leu Leu Gly Ala Ile		350
[0727]		355	360
[0728]	Ala Gly Ser Ala Pro Leu Ser Ala Glu Met Arg Glu Phe Met Glu Ser		365
[0729]		370	375
[0730]	Leu Leu Asp Leu Glu Leu His Asp Gly Tyr Gly Ser Thr Glu Ala Gly		380
[0731]		385	390
[0732]	Ile Gly Val Leu Gln Asp Asn Ile Val Gln Arg Pro Pro Val Ile Asp		395
[0733]		405	410
[0734]	Tyr Lys Leu Val Asp Val Pro Glu Leu Gly Tyr Phe Arg Thr Asp Gln		415
[0735]		420	425
[0736]	Pro His Pro Arg Gly Glu Leu Leu Leu Lys Thr Glu Gly Met Ile Pro		430
[0737]		435	440
[0738]	Gly Tyr Phe Arg Arg Pro Glu Val Thr Ala Glu Ile Phe Asp Glu Asp		445
[0739]		450	455
[0740]	Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Asp Ile Val Ala Glu Leu Glu Pro Asp Arg		460
[0741]		465	470
[0742]	Leu Ile Tyr Leu Asp Arg Arg Asn Asn Val Leu Lys Leu Ala Gln Gly		475
[0743]		485	490
[0744]	Glu Phe Val Thr Val Ala His Leu Glu Ala Val Phe Ala Thr Ser Pro		495
[0745]		500	505
[0746]	Leu Ile Arg Gln Ile Tyr Ile Tyr Gly Asn Ser Glu Arg Ser Phe Leu		510
[0747]		515	520
[0748]	Leu Ala Val Ile Val Pro Thr Ala Asp Ala Leu Ala Asp Gly Val Thr		525
[0749]		530	535
[0750]	Asp Ala Leu Asn Thr Ala Leu Thr Glu Ser Leu Arg Gln Leu Ala Lys		540
[0751]		545	550
[0752]	Glu Ala Gly Leu Gln Ser Tyr Glu Leu Pro Arg Glu Phe Leu Val Glu		555
[0753]		565	570
[0754]	Thr Glu Pro Phe Thr Val Glu Asn Gly Leu Leu Ser Gly Ile Ala Lys		575
[0755]		580	585
			590

[0756]	Leu	Leu	Arg	Pro	Lys	Leu	Lys	Glu	His	Tyr	Gly	Glu	Arg	Leu	Glu	Gln
[0757]				595				600					605			
[0758]	Leu	Tyr	Arg	Asp	Ile	Glu	Ala	Asn	Arg	Asn	Asp	Glu	Leu	Ile	Glu	Leu
[0759]			610					615					620			
[0760]	Arg	Arg	Thr	Ala	Ala	Glu	Leu	Pro	Val	Leu	Glu	Thr	Val	Thr	Arg	Ala
[0761]			625					630					635			640
[0762]	Ala	Arg	Ser	Met	Leu	Gly	Leu	Ala	Ala	Ser	Glu	Leu	Arg	Pro	Asp	Ala
[0763]					645					650					655	
[0764]	His	Phe	Thr	Asp	Leu	Gly	Gly	Asp	Ser	Leu	Ser	Ala	Leu	Ser	Phe	Ser
[0765]				660					665						670	
[0766]	Thr	Leu	Leu	Gln	Asp	Met	Leu	Glu	Val	Glu	Val	Pro	Val	Gly	Val	Ile
[0767]				675					680						685	
[0768]	Val	Ser	Pro	Ala	Asn	Ser	Leu	Ala	Asp	Leu	Ala	Lys	Tyr	Ile	Glu	Ala
[0769]				690					695						700	
[0770]	Glu	Arg	His	Ser	Gly	Val	Arg	Arg	Pro	Ser	Leu	Ile	Ser	Val	His	Gly
[0771]				705					710					715		720
[0772]	Pro	Gly	Thr	Glu	Ile	Arg	Ala	Ala	Asp	Leu	Thr	Leu	Asp	Lys	Phe	Ile
[0773]					725					730					735	
[0774]	Asp	Glu	Arg	Thr	Leu	Ala	Ala	Ala	Lys	Ala	Val	Pro	Ala	Ala	Pro	Ala
[0775]				740						745					750	
[0776]	Gln	Ala	Gln	Thr	Val	Leu	Leu	Thr	Gly	Ala	Asn	Gly	Tyr	Leu	Gly	Arg
[0777]				755						760					765	
[0778]	Phe	Leu	Cys	Leu	Glu	Trp	Leu	Gln	Arg	Leu	Asp	Gln	Thr	Gly	Gly	Thr
[0779]				770					775						780	
[0780]	Leu	Val	Cys	Ile	Val	Arg	Gly	Thr	Asp	Ala	Ala	Ala	Ala	Arg	Lys	Arg
[0781]				785						790					795	800
[0782]	Leu	Asp	Ala	Val	Phe	Asp	Ser	Gly	Asp	Pro	Glu	Leu	Leu	Asp	His	Tyr
[0783]					805					810					815	
[0784]	Arg	Lys	Leu	Ala	Ala	Glu	His	Leu	Glu	Val	Leu	Ala	Gly	Asp	Ile	Gly
[0785]				820						825					830	
[0786]	Asp	Pro	Asn	Leu	Gly	Leu	Asp	Glu	Ala	Thr	Trp	Gln	Arg	Leu	Ala	Ala
[0787]				835						840					845	
[0788]	Thr	Val	Asp	Leu	Ile	Val	His	Pro	Ala	Ala	Leu	Val	Asn	His	Val	Leu
[0789]				850						855					860	
[0790]	Pro	Tyr	Ser	Gln	Leu	Phe	Gly	Pro	Asn	Val	Val	Gly	Thr	Ala	Glu	Ile
[0791]				865						870					875	880
[0792]	Ile	Arg	Leu	Ala	Ile	Thr	Glu	Arg	Arg	Lys	Pro	Val	Thr	Tyr	Leu	Ser
[0793]					885						890				895	
[0794]	Thr	Val	Ala	Val	Ala	Ala	Gln	Val	Asp	Pro	Ala	Gly	Phe	Asp	Glu	Glu
[0795]				900							905				910	
[0796]	Arg	Asp	Ile	Arg	Glu	Met	Ser	Ala	Val	Arg	Ser	Ile	Asp	Ala	Gly	Tyr
[0797]				915							920				925	

[0798]	Ala Asn Gly Tyr Gly Asn Ser Lys Trp Ala Gly Glu Val Leu Leu Arg
[0799]	930 935 940
[0800]	Glu Ala His Asp Leu Cys Gly Leu Pro Val Ala Val Phe Arg Ser Asp
[0801]	945 950 955 960
[0802]	Met Ile Leu Ala His Ser Lys Tyr Val Gly Gln Leu Asn Val Pro Asp
[0803]	965 970 975
[0804]	Val Phe Thr Arg Leu Ile Leu Ser Leu Ala Leu Thr Gly Ile Ala Pro
[0805]	980 985 990
[0806]	Tyr Ser Phe Tyr Gly Thr Asp Ser Ala Gly Gln Arg Arg Arg Ala His
[0807]	995 1000 1005
[0808]	Tyr Asp Gly Leu Pro Ala Asp Phe Val Ala Glu Ala Ile Thr Thr
[0809]	1010 1015 1020
[0810]	Leu Gly Ala Arg Ala Glu Ser Gly Phe His Thr Tyr Asp Val Trp
[0811]	1025 1030 1035
[0812]	Asn Pro Tyr Asp Asp Gly Ile Ser Leu Asp Glu Phe Val Asp Trp
[0813]	1040 1045 1050
[0814]	Leu Gly Asp Phe Gly Val Pro Ile Gln Arg Ile Asp Asp Tyr Asp
[0815]	1055 1060 1065
[0816]	Glu Trp Phe Arg Arg Phe Glu Thr Ala Ile Arg Ala Leu Pro Glu
[0817]	1070 1075 1080
[0818]	Lys Gln Arg Asp Ala Ser Leu Leu Pro Leu Leu Asp Ala His Arg
[0819]	1085 1090 1095
[0820]	Arg Pro Leu Arg Ala Val Arg Gly Ser Leu Leu Pro Ala Lys Asn
[0821]	1100 1105 1110
[0822]	Phe Gln Ala Ala Val Gln Ser Ala Arg Ile Gly Pro Asp Gln Asp
[0823]	1115 1120 1125
[0824]	Ile Pro His Leu Ser Pro Gln Leu Ile Asp Lys Tyr Val Thr Asp
[0825]	1130 1135 1140
[0826]	Leu Arg His Leu Gly Leu Leu
[0827]	1145 1150
[0828]	<210> 19
[0829]	<211> 3501
[0830]	<212> DNA
[0831]	<213> 巴西诺卡菌
[0832]	<400> 19
[0833]	atggcgactg attcgcaag cgatcggtc cggcgctcga ttgcacagtt gttcgccgag 60
[0834]	gacgagcagg tgaaagccgc ggtgccggac caggaggtgg tcgaggcgat ccgggcgccc 120
[0835]	ggcctgcgcc tggcacagat catggccacc gtgatggagc gctatgcgga ccgcccgcg 180
[0836]	gtgggacagc gggcgagcga gccggtcacc gagagcggtc gcaccacctt ccggtgtctc 240
[0837]	ccggaattcg agaccctgac ctaccgcgag ctgtgggcgc gcgtccgcgc ggtggccgcc 300
[0838]	gcgtggcacg gagatgccga aaggcctttg cgggccgggg atttcgttgc tctgtctgggt 360
[0839]	ttcgccggca tcgattacgg caccctcgat ctgcgaaca tccatctcgg cctcgtcacg 420

[0840]	gtgccgctgc aatccggcgc cacggccccc caactcgccg cgatcctggc cgagaccacg	480
[0841]	ccccgggtgc tggccgcgac acccgaccat ctcgatatcg ccgtcgaatt gctgaccggg	540
[0842]	ggagcctcgc cggaacggct ggtgggtattc gactaccgcc ccgcggacga cgatcaccgg	600
[0843]	gcggcgctcg agtccgcgcg cagacggttg agcgacgcgg gcagtgcggt ggtggctcag	660
[0844]	acgtctcgacg cggctccgcgc ccgcggcagc gaattgccgg ccgcgccgct gttcgttccc	720
[0845]	gccgcggacg aggacccgct ggctctgctc atctacacct ccggcagcac cggcacgcct	780
[0846]	aagggcgcca tgtacaccga aagactgaac cgcacgacgt ggctgagcgg ggcgaaaggc	840
[0847]	gtcggcctca cgctcggtca catgccgatg agtcatattg ccgggcgggc ctctgttcgc	900
[0848]	ggtgtgctgg cccgcggcgg cacggtctac ttcaccgccc gcagcgatat gtcgacgctg	960
[0849]	ttcgaagatc tggccctggg gcggccgacc gagatgttct tcgtcccgcg cgtgtgcgac	1020
[0850]	atgatcttcc agcgtatca ggccgaactg tcgcggcgcg cccccccg gcgcgcgacg	1080
[0851]	ccggaactcg agcaggaact gaagaccgaa ctgcgcttgt ccgcggtcgg ggaccgctta	1140
[0852]	ctcggggcga tcgcgggcag cgcgccgtg tcggccgaga tgcgggagtt catggagtgc	1200
[0853]	ctgctggatc tggaactgca cgacggctac ggctcgaccg aggcgggtat cggcgtactg	1260
[0854]	caagacaata tcgtccagcg tccgccggtc atcgattaca agctcgtcga cgtgccggaa	1320
[0855]	ttgggtact tccggacgga ccagccgat cccgcggtg agttgctgtt gaaaaccgaa	1380
[0856]	gggatgattc cgggctactt ccggcggccc gaggtgaccg cggagatctt cgacgaggac	1440
[0857]	ggtttctaca ggaccggtga catcgtgcc gaactcgaac cggatcggct gatctacctg	1500
[0858]	gaccgccgca acaatgtgct gaaactggcc cagggcgagt tcgtcacggt cgcccatctg	1560
[0859]	gaagcgggtg tcgcgaccag tccgctgatc cggcagatct acatctacgg caacagcgag	1620
[0860]	cgctcgttcc tgctggcggg gatcgtgcc accgcggacg cgctggccga cgggtgtcacc	1680
[0861]	gacgcgctga acacggcgt gaccgaatcc ttgcgacagc tcgcgaaaga agccgggctg	1740
[0862]	caatcctatg agctgccgcg cgagttctg tcgaaaccg aaccgttcac cgtcgagaac	1800
[0863]	ggtctgctct ccggtatcgc gaaactgttg cggcccaagc tcaaggagca ctacggcgag	1860
[0864]	cgactcgagc agctgtaccg cgatatcgag gcgaaccgca acgacgagct gatcgagctg	1920
[0865]	cggcgcaccg cggccgagct gccggtgctc gaaaccgtca cgcgggctgc acgttcgatg	1980
[0866]	ctcggactgg ccgcgtcgga gttgcggccg gacgcgcatt tcaccgatct cggcgggtgat	2040
[0867]	tactgtccg cgctgtcggt ttcgacctg ctgcaggaca tgctcgaggt cgaggtccc	2100
[0868]	gtcgggtgca tcgtgagccc cgccaactcg ctgcgcgac tggcgaaata catcgaggcc	2160
[0869]	gaacggcatt cgggggtgcg gcggccgagc ctgatctcgg tgcacggtcc cggcaccgag	2220
[0870]	atccgtgccg ccgatctcac cctggacaag ttcatcgacg agcgcaccct cgctgccgcg	2280
[0871]	aaagcggttc cggccgcgcc ggcccaggcg cagaccgtcc tgctcaccgg ggcgaacggc	2340
[0872]	tatctcggcc gcttctgtg cctggaatgg ctgcagcgac tggaccagac cggcggcacg	2400
[0873]	ctggtctgca tcgtgcgcgg taccgacgcg gccgccgcgc ggaagcgct ggatgcggtg	2460
[0874]	ttcgacagcg gtgatccgga gctgctcgac cactaccgga agctggccgc cgagcacctc	2520
[0875]	gagtgctcgc cgggcgatat cggcgaccgc aatctcggcc tggacgaagc gacttggcag	2580
[0876]	cggctcgccg cgaccgtcga cctgatcgtg caccgcccg ccctcgtcaa ccatgtgctg	2640
[0877]	ccgtacagcc agctgttcgg gccgaatgtg gtcggcaccg ccgagatcat ccggtggcc	2700
[0878]	atcaccgagc gccgtaagcc cgtgacgtac ctgtcgacgg tcgcgggtggc cgcacaggtc	2760
[0879]	gatcccgcgc gcttcgacga ggagcgcgat atccgggaga tgagcgcggt gcgctccatc	2820
[0880]	gacgccgggt acgcgaacgg ttacggcaac agcaagtggg ccggcgaggt gctgctgcgc	2880
[0881]	gaggcccatg atctgtcgg gctgccggtc gccgtgttcc gctcgacat gatcctggcg	2940

[0882] cacagcaaat acgtcgggtca gctcaacgtc cccgatgtgt tcacccggct catcctgagc 3000
 [0883] ctggcgctca cgggcatcgc accgtattcg ttctacggga cggacagcgc cgggcagcgc 3060
 [0884] aggcgggccc actacgacgg tctgccccgc gatttcgtcg ccgaggcgat caccaccctc 3120
 [0885] ggcgcgcgag ccgagtcggg gttccatacc tacgacgtgt ggaacccgta cgacgacggc 3180
 [0886] atctcgctgg acgaattcgt cgactggctc ggcgatttcg gcgtgccgat ccagcggatc 3240
 [0887] gacgactacg acgaatggtt ccggcgtttc gagaccgcga tccgcgcgct gcccgaaaag 3300
 [0888] cagcgcgatg cttcgctgct accgctgctg gacgcacacc ggcgggccact gcgcgcggtg 3360
 [0889] cgcggttcgc tgttccccgc caagaacttc caggcggcgg tgcagtccgc gcggatcggc 3420
 [0890] cccgatcagg acatccccga tctttccccg cagttgatcg acaagtacgt caccgacctg 3480
 [0891] cgccacctcg gcctgctctg a 3501
 [0892] <210> 20
 [0893] <211> 1166
 [0894] <212> PRT
 [0895] <213> 巴西诺卡菌
 [0896] <400> 20
 [0897] Met Ala Thr Asp Ser Arg Ser Asp Arg Leu Arg Arg Arg Ile Ala Gln
 [0898] 1 5 10 15
 [0899] Leu Phe Ala Glu Asp Glu Gln Val Lys Ala Ala Val Pro Asp Gln Glu
 [0900] 20 25 30
 [0901] Val Val Glu Ala Ile Arg Ala Pro Gly Leu Arg Leu Ala Gln Ile Met
 [0902] 35 40 45
 [0903] Ala Thr Val Met Glu Arg Tyr Ala Asp Arg Pro Ala Val Gly Gln Arg
 [0904] 50 55 60
 [0905] Ala Ser Glu Pro Val Thr Glu Ser Gly Arg Thr Thr Phe Arg Leu Leu
 [0906] 65 70 75 80
 [0907] Pro Glu Phe Glu Thr Leu Thr Tyr Arg Glu Leu Trp Ala Arg Val Arg
 [0908] 85 90 95
 [0909] Ala Val Ala Ala Ala Trp His Gly Asp Ala Glu Arg Pro Leu Arg Ala
 [0910] 100 105 110
 [0911] Gly Asp Phe Val Ala Leu Leu Gly Phe Ala Gly Ile Asp Tyr Gly Thr
 [0912] 115 120 125
 [0913] Leu Asp Leu Ala Asn Ile His Leu Gly Leu Val Thr Val Pro Leu Gln
 [0914] 130 135 140
 [0915] Ser Gly Ala Thr Ala Pro Gln Leu Ala Ala Ile Leu Ala Glu Thr Thr
 [0916] 145 150 155 160
 [0917] Pro Arg Val Leu Ala Ala Thr Pro Asp His Leu Asp Ile Ala Val Glu
 [0918] 165 170 175
 [0919] Leu Leu Thr Gly Gly Ala Ser Pro Glu Arg Leu Val Val Phe Asp Tyr
 [0920] 180 185 190
 [0921] Arg Pro Ala Asp Asp Asp His Arg Ala Ala Leu Glu Ser Ala Arg Arg
 [0922] 195 200 205
 [0923] Arg Leu Ser Asp Ala Gly Ser Ala Val Val Val Glu Thr Leu Asp Ala

[0924]	210	215	220
[0925]	Val Arg Ala Arg Gly Ser Glu Leu Pro Ala Ala Pro Leu Phe Val Pro		
[0926]	225	230	235 240
[0927]	Ala Ala Asp Glu Asp Pro Leu Ala Leu Leu Ile Tyr Thr Ser Gly Ser		
[0928]		245	250 255
[0929]	Thr Gly Thr Pro Lys Gly Ala Met Tyr Thr Glu Arg Leu Asn Arg Thr		
[0930]		260	265 270
[0931]	Thr Trp Leu Ser Gly Ala Lys Gly Val Gly Leu Thr Leu Gly Tyr Met		
[0932]		275	280 285
[0933]	Pro Met Ser His Ile Ala Gly Arg Ala Ser Phe Ala Gly Val Leu Ala		
[0934]	290	295	300
[0935]	Arg Gly Gly Thr Val Tyr Phe Thr Ala Arg Ser Asp Met Ser Thr Leu		
[0936]	305	310	315 320
[0937]	Phe Glu Asp Leu Ala Leu Val Arg Pro Thr Glu Met Phe Phe Val Pro		
[0938]		325	330 335
[0939]	Arg Val Cys Asp Met Ile Phe Gln Arg Tyr Gln Ala Glu Leu Ser Arg		
[0940]		340	345 350
[0941]	Arg Ala Pro Ala Ala Ala Ala Ser Pro Glu Leu Glu Gln Glu Leu Lys		
[0942]		355	360 365
[0943]	Thr Glu Leu Arg Leu Ser Ala Val Gly Asp Arg Leu Leu Gly Ala Ile		
[0944]		370	375 380
[0945]	Ala Gly Ser Ala Pro Leu Ser Ala Glu Met Arg Glu Phe Met Glu Ser		
[0946]	385	390	395 400
[0947]	Leu Leu Asp Leu Glu Leu His Asp Gly Tyr Gly Ser Thr Glu Ala Gly		
[0948]		405	410 415
[0949]	Ile Gly Val Leu Gln Asp Asn Ile Val Gln Arg Pro Pro Val Ile Asp		
[0950]		420	425 430
[0951]	Tyr Lys Leu Val Asp Val Pro Glu Leu Gly Tyr Phe Arg Thr Asp Gln		
[0952]		435	440 445
[0953]	Pro His Pro Arg Gly Glu Leu Leu Lys Thr Glu Gly Met Ile Pro		
[0954]		450	455 460
[0955]	Gly Tyr Phe Arg Arg Pro Glu Val Thr Ala Glu Ile Phe Asp Glu Asp		
[0956]	465	470	475 480
[0957]	Gly Phe Tyr Arg Thr Gly Asp Ile Val Ala Glu Leu Glu Pro Asp Arg		
[0958]		485	490 495
[0959]	Leu Ile Tyr Leu Asp Arg Arg Asn Asn Val Leu Lys Leu Ala Gln Gly		
[0960]		500	505 510
[0961]	Glu Phe Val Thr Val Ala His Leu Glu Ala Val Phe Ala Thr Ser Pro		
[0962]		515	520 525
[0963]	Leu Ile Arg Gln Ile Tyr Ile Tyr Gly Asn Ser Glu Arg Ser Phe Leu		
[0964]		530	535 540
[0965]	Leu Ala Val Ile Val Pro Thr Ala Asp Ala Leu Ala Asp Gly Val Thr		

[0966]	545	550	555	560
[0967]	Asp Ala Leu Asn Thr Ala Leu Thr Glu Ser Leu Arg Gln Leu Ala Lys			
[0968]		565	570	575
[0969]	Glu Ala Gly Leu Gln Ser Tyr Glu Leu Pro Arg Glu Phe Leu Val Glu			
[0970]		580	585	590
[0971]	Thr Glu Pro Phe Thr Val Glu Asn Gly Leu Leu Ser Gly Ile Ala Lys			
[0972]		595	600	605
[0973]	Leu Leu Arg Pro Lys Leu Lys Glu His Tyr Gly Glu Arg Leu Glu Gln			
[0974]	610	615	620	
[0975]	Leu Tyr Arg Asp Ile Glu Ala Asn Arg Asn Asp Glu Leu Ile Glu Leu			
[0976]	625	630	635	640
[0977]	Arg Arg Thr Ala Ala Glu Leu Pro Val Leu Glu Thr Val Thr Arg Ala			
[0978]		645	650	655
[0979]	Ala Arg Ser Met Leu Gly Leu Ala Ala Ser Glu Leu Arg Pro Asp Ala			
[0980]		660	665	670
[0981]	His Phe Thr Asp Leu Gly Gly Asp Ser Leu Ser Ala Leu Ser Phe Ser			
[0982]		675	680	685
[0983]	Thr Leu Leu Gln Asp Met Leu Glu Val Glu Val Pro Val Gly Val Ile			
[0984]	690	695	700	
[0985]	Val Ser Pro Ala Asn Ser Leu Ala Asp Leu Ala Lys Tyr Ile Glu Ala			
[0986]	705	710	715	720
[0987]	Glu Arg His Ser Gly Val Arg Arg Pro Ser Leu Ile Ser Val His Gly			
[0988]		725	730	735
[0989]	Pro Gly Thr Glu Ile Arg Ala Ala Asp Leu Thr Leu Asp Lys Phe Ile			
[0990]		740	745	750
[0991]	Asp Glu Arg Thr Leu Ala Ala Ala Lys Ala Val Pro Ala Ala Pro Ala			
[0992]		755	760	765
[0993]	Gln Ala Gln Thr Val Leu Leu Thr Gly Ala Asn Gly Tyr Leu Gly Arg			
[0994]	770	775	780	
[0995]	Phe Leu Cys Leu Glu Trp Leu Gln Arg Leu Asp Gln Thr Gly Gly Thr			
[0996]	785	790	795	800
[0997]	Leu Val Cys Ile Val Arg Gly Thr Asp Ala Ala Ala Ala Arg Lys Arg			
[0998]		805	810	815
[0999]	Leu Asp Ala Val Phe Asp Ser Gly Asp Pro Glu Leu Leu Asp His Tyr			
[1000]		820	825	830
[1001]	Arg Lys Leu Ala Ala Glu His Leu Glu Val Leu Ala Gly Asp Ile Gly			
[1002]		835	840	845
[1003]	Asp Pro Asn Leu Gly Leu Asp Glu Ala Thr Trp Gln Arg Leu Ala Ala			
[1004]		850	855	860
[1005]	Thr Val Asp Leu Ile Val His Pro Ala Ala Leu Val Asn His Val Leu			
[1006]	865	870	875	880
[1007]	Pro Tyr Ser Gln Leu Phe Gly Pro Asn Val Val Gly Thr Ala Glu Ile			

[1008]		885		890		895
[1009]	Ile Arg Leu Ala Ile Thr Glu Arg Arg Lys Pro Val Thr Tyr Leu Ser					
[1010]		900		905		910
[1011]	Thr Val Ala Val Ala Ala Gln Val Asp Pro Ala Gly Phe Asp Glu Glu					
[1012]		915		920		925
[1013]	Arg Asp Ile Arg Glu Met Ser Ala Val Arg Ser Ile Asp Ala Gly Tyr					
[1014]		930		935		940
[1015]	Ala Asn Gly Tyr Gly Asn Ser Lys Trp Ala Gly Glu Val Leu Leu Arg					
[1016]		945		950		955
[1017]	Glu Ala His Asp Leu Cys Gly Leu Pro Val Ala Val Phe Arg Ser Asp					
[1018]		965		970		975
[1019]	Met Ile Leu Ala His Ser Lys Tyr Val Gly Gln Leu Asn Val Pro Asp					
[1020]		980		985		990
[1021]	Val Phe Thr Arg Leu Ile Leu Ser Leu Ala Leu Thr Gly Ile Ala Pro					
[1022]		995		1000		1005
[1023]	Tyr Ser Phe Tyr Gly Thr Asp Ser Ala Gly Gln Arg Arg Arg Ala					
[1024]		1010		1015		1020
[1025]	His Tyr Asp Gly Leu Pro Ala Asp Phe Val Ala Glu Ala Ile Thr					
[1026]		1025		1030		1035
[1027]	Thr Leu Gly Ala Arg Ala Glu Ser Gly Phe His Thr Tyr Asp Val					
[1028]		1040		1045		1050
[1029]	Trp Asn Pro Tyr Asp Asp Gly Ile Ser Leu Asp Glu Phe Val Asp					
[1030]		1055		1060		1065
[1031]	Trp Leu Gly Asp Phe Gly Val Pro Ile Gln Arg Ile Asp Asp Tyr					
[1032]		1070		1075		1080
[1033]	Asp Glu Trp Phe Arg Arg Phe Glu Thr Ala Ile Arg Ala Leu Pro					
[1034]		1085		1090		1095
[1035]	Glu Lys Gln Arg Asp Ala Ser Leu Leu Pro Leu Leu Asp Ala His					
[1036]		1100		1105		1110
[1037]	Arg Arg Pro Leu Arg Ala Val Arg Gly Ser Leu Leu Pro Ala Lys					
[1038]		1115		1120		1125
[1039]	Asn Phe Gln Ala Ala Val Gln Ser Ala Arg Ile Gly Pro Asp Gln					
[1040]		1130		1135		1140
[1041]	Asp Ile Pro His Leu Ser Pro Gln Leu Ile Asp Lys Tyr Val Thr					
[1042]		1145		1150		1155
[1043]	Asp Leu Arg His Leu Gly Leu Leu					
[1044]		1160		1165		
[1045]	<210> 21					
[1046]	<211> 621					
[1047]	<212> DNA					
[1048]	<213> 大肠杆菌					
[1049]	<400> 21					

[1050] atgaaaacta cgcatacctc cctccccttt gccggacata cgctgcattt tgttgagttc 60
 [1051] gatccggcga atttttgtga gcaggattta ctctggctgc cgactacgc acaactgcaa 120
 [1052] cacgtcggac gtaaacgtaa aacagagcat ttagccggac ggatcgctgc tgtttatgct 180
 [1053] ttgcgggaat atggctataa atgtgtgccc gcaatcggcg agctacgcca acctgtctgg 240
 [1054] cctgcggagg tatacggcag tattagccac tgtgggacta cggcattagc cgtggtatct 300
 [1055] cgtcaaccga ttggcattga tatagaagaa attttttctg taaaaccgc aagagaattg 360
 [1056] acagacaaca ttattacacc agcggaaacac gagcgactcg cagactgcgg tttagccttt 420
 [1057] tctctggcgc tgacactggc attttccgcc aaagagagcg catttaagc aagttagatc 480
 [1058] caaactgatg caggttttct ggactatcag ataattagct ggaataaaca gcaggtcatc 540
 [1059] attcatcgctg agaatgagat gtttgcgtg cactggcaga taaaagaaaa gatagtcata 600
 [1060] acgtgtgcc aacacgatta a 621
 [1061] <210> 22
 [1062] <211> 206
 [1063] <212> PRT
 [1064] <213> 大肠杆菌
 [1065] <400> 22
 [1066] Met Lys Thr Thr His Thr Ser Leu Pro Phe Ala Gly His Thr Leu His
 [1067] 1 5 10 15
 [1068] Phe Val Glu Phe Asp Pro Ala Asn Phe Cys Glu Gln Asp Leu Leu Trp
 [1069] 20 25 30
 [1070] Leu Pro His Tyr Ala Gln Leu Gln His Ala Gly Arg Lys Arg Lys Thr
 [1071] 35 40 45
 [1072] Glu His Leu Ala Gly Arg Ile Ala Ala Val Tyr Ala Leu Arg Glu Tyr
 [1073] 50 55 60
 [1074] Gly Tyr Lys Cys Val Pro Ala Ile Gly Glu Leu Arg Gln Pro Val Trp
 [1075] 65 70 75 80
 [1076] Pro Ala Glu Val Tyr Gly Ser Ile Ser His Cys Gly Thr Thr Ala Leu
 [1077] 85 90 95
 [1078] Ala Val Val Ser Arg Gln Pro Ile Gly Ile Asp Ile Glu Glu Ile Phe
 [1079] 100 105 110
 [1080] Ser Val Gln Thr Ala Arg Glu Leu Thr Asp Asn Ile Ile Thr Pro Ala
 [1081] 115 120 125
 [1082] Glu His Glu Arg Leu Ala Asp Cys Gly Leu Ala Phe Ser Leu Ala Leu
 [1083] 130 135 140
 [1084] Thr Leu Ala Phe Ser Ala Lys Glu Ser Ala Phe Lys Ala Ser Glu Ile
 [1085] 145 150 155 160
 [1086] Gln Thr Asp Ala Gly Phe Leu Asp Tyr Gln Ile Ile Ser Trp Asn Lys
 [1087] 165 170 175
 [1088] Gln Gln Val Ile Ile His Arg Glu Asn Glu Met Phe Ala Val His Trp
 [1089] 180 185 190
 [1090] Gln Ile Lys Glu Lys Ile Val Ile Thr Leu Cys Gln His Asp
 [1091] 195 200 205

[1092]	<210> 23
[1093]	<211> 654
[1094]	<212> DNA
[1095]	<213> 谷氨酸棒杆菌
[1096]	<400> 23
[1097]	atgctggatg agtcctttgtt tccaaattcg gcaaagtttt ctttcattaa aactggcgat 60
[1098]	gctgttaatt tagaccatit ccatcagttg catccgttgg aaaaggcact ggtagcgcac 120
[1099]	tcggttgata ttagaaaagc agagtttggg gatgccaggt ggtgtgcaca tcaggcactc 180
[1100]	caagctttgg gacgagatag cggatgatccc attttgcgtg gggaacgagg aatgccattg 240
[1101]	tggccttctt cgggtgtctg ttcatgacc cactactgac gattccgagc tgctgttgtg 300
[1102]	gcgccacgat tgttgggtgc ttctatggga ttggatgccg aacctgcgga gccgttgccc 360
[1103]	aaggatgttt tgggttcaat cgctcgggtg ggggagattc ctcaacttaa gcgcttgagg 420
[1104]	gaacaagggtg tgcactgcgc ggatcgctg ctgttttgtg ccaaggaagc aacatacaaa 480
[1105]	gcgtggttcc cgctgacgca taggtggctt ggttttgaac aagctgagat cgacttgctg 540
[1106]	gatgatggca cttttgtgtc ctatttctg gttcgaccaa ctccagtgc gtttatttca 600
[1107]	ggtaaatggg tactgcgtga tggttatgtc atagctgcga ctgcagtgc ttga 654
[1108]	<210> 24
[1109]	<211> 217
[1110]	<212> PRT
[1111]	<213> 谷氨酸棒杆菌
[1112]	<400> 24
[1113]	Met Leu Asp Glu Ser Leu Phe Pro Asn Ser Ala Lys Phe Ser Phe Ile
[1114]	1 5 10 15
[1115]	Lys Thr Gly Asp Ala Val Asn Leu Asp His Phe His Gln Leu His Pro
[1116]	20 25 30
[1117]	Leu Glu Lys Ala Leu Val Ala His Ser Val Asp Ile Arg Lys Ala Glu
[1118]	35 40 45
[1119]	Phe Gly Asp Ala Arg Trp Cys Ala His Gln Ala Leu Gln Ala Leu Gly
[1120]	50 55 60
[1121]	Arg Asp Ser Gly Asp Pro Ile Leu Arg Gly Glu Arg Gly Met Pro Leu
[1122]	65 70 75 80
[1123]	Trp Pro Ser Ser Val Ser Gly Ser Leu Thr His Thr Asp Gly Phe Arg
[1124]	85 90 95
[1125]	Ala Ala Val Val Ala Pro Arg Leu Leu Val Arg Ser Met Gly Leu Asp
[1126]	100 105 110
[1127]	Ala Glu Pro Ala Glu Pro Leu Pro Lys Asp Val Leu Gly Ser Ile Ala
[1128]	115 120 125
[1129]	Arg Val Gly Glu Ile Pro Gln Leu Lys Arg Leu Glu Glu Gln Gly Val
[1130]	130 135 140
[1131]	His Cys Ala Asp Arg Leu Leu Phe Cys Ala Lys Glu Ala Thr Tyr Lys
[1132]	145 150 155 160
[1133]	Ala Trp Phe Pro Leu Thr His Arg Trp Leu Gly Phe Glu Gln Ala Glu

[1134]	165	170	175
[1135]	Ile Asp Leu Arg Asp Asp Gly Thr Phe Val Ser Tyr Leu Leu Val Arg		
[1136]	180	185	190
[1137]	Pro Thr Pro Val Pro Phe Ile Ser Gly Lys Trp Val Leu Arg Asp Gly		
[1138]	195	200	205
[1139]	Tyr Val Ile Ala Ala Thr Ala Val Thr		
[1140]	210	215	
[1141]	<210> 25		
[1142]	<211> 1428		
[1143]	<212> DNA		
[1144]	<213> 谷氨酸棒杆菌		
[1145]	<400> 25		
[1146]	atgcgcctgc gtgtctcgag tagtctcctc cccttcctcg tccccaacct cgaccattac	60	
[1147]	ggtcgcccctc tcctaaagga gcctggcatg gatatccgcc aaacaattaa cgacacagca	120	
[1148]	atgtcgagat atcagtgggt cattgtatct atcgcagtc tgctcaacgc actggacggc	180	
[1149]	tttgatgtcc tcgccatgtc ttttactgcg aatgcagtga ccgaagaatt tggactgagt	240	
[1150]	ggcagccagc ttggtgtgct gctgagttcc gcgctgttcg gcatgaccgc tggatctttg	300	
[1151]	ctgttcggtc cgatcggatga ccgtttcggc cgtaagaatg ccctgatgat cgcgctgctg	360	
[1152]	ttcaacgtgg tgggattggg attgtccgcc accgcgcagt ccgcaggcca gttgggcgtg	420	
[1153]	tggcgtttga tcaactggtat cggcatcggc ggaatcctcg cctgcatcac agtgggtgatc	480	
[1154]	agtgagttct ccaacaacaa aaaccgcggc atggccatgt ccatctacgc tgctggttac	540	
[1155]	ggcatcggcg cgtccttggg cggattcggc gcagcgcagc tcatcccaac atttgatgg	600	
[1156]	cgctccgtgt tcgcagccgg tcgcatcgca actggtatcg ccaccatcgc tactttcttc	660	
[1157]	ttcctgccag aatccgttga ttggtgagc actcgccgcc ctgcgggcgc tcgcgacaag	720	
[1158]	atcaattaca ttgcgcgcc cctgggcaaa gtcggtacct ttgagcttcc aggcgaacaa	780	
[1159]	agcttgcga cgaaaaaagc cggctctcaa tcgtatgcag tgctcgtaa caaagagaac	840	
[1160]	cgtggaacca gcatcaagct gtgggttcg ttcggcatcg tgatgttcgg cttctacttc	900	
[1161]	gccaacactt ggaccccgaa gctgctcgtg gaaaccgaa tgtcagaaca gcagggcac	960	
[1162]	atcggtgggt tgatgtgtc catgggtgga gcatcgggt cctgcteta cggtttctc	1020	
[1163]	accaccaagt tcagctcccg aaacacactg atgacctca tgggtgctgc cggcctgacg	1080	
[1164]	ctgatcctgt tcatttctc cacctctgtt ccatccatcg cgtttgccag cggcggtgtc	1140	
[1165]	gtgggcatgc tgatcaatgg ttgtgtggct ggtctgtaca ccctgtcccc acagctgtac	1200	
[1166]	tccgctgaag tacgcaccac tgggtgtggc gctgcgattg gtatgggtcg tgctgggtgcg	1260	
[1167]	atttccgcgc cactgctggt gggtagcctg ctggattctg gctggtcccc aacgcagctg	1320	
[1168]	tatgttggtg tggcagtgat tgttattgcc ggtgcaaccg cattgattgg gatgcgcact	1380	
[1169]	caggcagtag ccgtcgaaaa gcagcctgaa gccctagcga ccaaatag	1428	
[1170]	<210> 26		
[1171]	<211> 475		
[1172]	<212> PRT		
[1173]	<213> 谷氨酸棒杆菌		
[1174]	<400> 26		
[1175]	Met Arg Leu Arg Val Ser Ser Ser Leu Leu Pro Phe Leu Val Pro Asn		

[1176]	1	5	10	15
[1177]	Leu Asp His Tyr Gly Arg Pro Leu Leu Lys Glu Pro Gly Met Asp Ile			
[1178]	20	25	30	
[1179]	Arg Gln Thr Ile Asn Asp Thr Ala Met Ser Arg Tyr Gln Trp Phe Ile			
[1180]	35	40	45	
[1181]	Val Phe Ile Ala Val Leu Leu Asn Ala Leu Asp Gly Phe Asp Val Leu			
[1182]	50	55	60	
[1183]	Ala Met Ser Phe Thr Ala Asn Ala Val Thr Glu Glu Phe Gly Leu Ser			
[1184]	65	70	75	80
[1185]	Gly Ser Gln Leu Gly Val Leu Leu Ser Ser Ala Leu Phe Gly Met Thr			
[1186]	85	90	95	
[1187]	Ala Gly Ser Leu Leu Phe Gly Pro Ile Gly Asp Arg Phe Gly Arg Lys			
[1188]	100	105	110	
[1189]	Asn Ala Leu Met Ile Ala Leu Leu Phe Asn Val Val Gly Leu Val Leu			
[1190]	115	120	125	
[1191]	Ser Ala Thr Ala Gln Ser Ala Gly Gln Leu Gly Val Trp Arg Leu Ile			
[1192]	130	135	140	
[1193]	Thr Gly Ile Gly Ile Gly Gly Ile Leu Ala Cys Ile Thr Val Val Ile			
[1194]	145	150	155	160
[1195]	Ser Glu Phe Ser Asn Asn Lys Asn Arg Gly Met Ala Met Ser Ile Tyr			
[1196]	165	170	175	
[1197]	Ala Ala Gly Tyr Gly Ile Gly Ala Ser Leu Gly Gly Phe Gly Ala Ala			
[1198]	180	185	190	
[1199]	Gln Leu Ile Pro Thr Phe Gly Trp Arg Ser Val Phe Ala Ala Gly Ala			
[1200]	195	200	205	
[1201]	Ile Ala Thr Gly Ile Ala Thr Ile Ala Thr Phe Phe Phe Leu Pro Glu			
[1202]	210	215	220	
[1203]	Ser Val Asp Trp Leu Ser Thr Arg Arg Pro Ala Gly Ala Arg Asp Lys			
[1204]	225	230	235	240
[1205]	Ile Asn Tyr Ile Ala Arg Arg Leu Gly Lys Val Gly Thr Phe Glu Leu			
[1206]	245	250	255	
[1207]	Pro Gly Glu Gln Ser Leu Ser Thr Lys Lys Ala Gly Leu Gln Ser Tyr			
[1208]	260	265	270	
[1209]	Ala Val Leu Val Asn Lys Glu Asn Arg Gly Thr Ser Ile Lys Leu Trp			
[1210]	275	280	285	
[1211]	Val Ala Phe Gly Ile Val Met Phe Gly Phe Tyr Phe Ala Asn Thr Trp			
[1212]	290	295	300	
[1213]	Thr Pro Lys Leu Leu Val Glu Thr Gly Met Ser Glu Gln Gln Gly Ile			
[1214]	305	310	315	320
[1215]	Ile Gly Gly Leu Met Leu Ser Met Gly Gly Ala Phe Gly Ser Leu Leu			
[1216]	325	330	335	
[1217]	Tyr Gly Phe Leu Thr Thr Lys Phe Ser Ser Arg Asn Thr Leu Met Thr			

[1218]	340	345	350
[1219]	Phe Met Val Leu Ser Gly Leu Thr Leu Ile Leu Phe Ile Ser Ser Thr		
[1220]	355	360	365
[1221]	Ser Val Pro Ser Ile Ala Phe Ala Ser Gly Val Val Val Gly Met Leu		
[1222]	370	375	380
[1223]	Ile Asn Gly Cys Val Ala Gly Leu Tyr Thr Leu Ser Pro Gln Leu Tyr		
[1224]	385	390	395
[1225]	Ser Ala Glu Val Arg Thr Thr Gly Val Gly Ala Ala Ile Gly Met Gly		
[1226]	405	410	415
[1227]	Arg Val Gly Ala Ile Ser Ala Pro Leu Leu Val Gly Ser Leu Leu Asp		
[1228]	420	425	430
[1229]	Ser Gly Trp Ser Pro Thr Gln Leu Tyr Val Gly Val Ala Val Ile Val		
[1230]	435	440	445
[1231]	Ile Ala Gly Ala Thr Ala Leu Ile Gly Met Arg Thr Gln Ala Val Ala		
[1232]	450	455	460
[1233]	Val Glu Lys Gln Pro Glu Ala Leu Ala Thr Lys		
[1234]	465	470	475
[1235]	<210> 27		
[1236]	<211> 1296		
[1237]	<212> DNA		
[1238]	<213> 谷氨酸棒杆菌		
[1239]	<400> 27		
[1240]	gtgtcaacga ccacccaac ccgcgcaacc aaaagtgtcg gaacagttct cgcactcctg	60	
[1241]	tggttcgcaa ttgtcctcga cggctttgac ctagtcgtcc tgggcgcaac aatcccgtcc	120	
[1242]	atgtctggagg atcccgcgtg ggatctcact gctggacagg ccacacagat ttccaccatc	180	
[1243]	ggcctcgtcg gcatgaccat cggcgcaactg accattggtt tcttaactga ccgtctgggt	240	
[1244]	cgacgccgcg tcatgctgtt ctctgtggca gtgttttctg tattcacctt cctgctggca	300	
[1245]	ttcaccacca acgtccagct cttcagcctg tggcgtttcc tcgcaggtgt tggccttggt	360	
[1246]	ggagcactcc ccaccgcaat tgccatggtg accgagtttc gcccggcac caaagcgggc	420	
[1247]	tctgcatcaa ctacctgat gaccggatac cacgtcgggg cagtagcaac cgctttcctt	480	
[1248]	ggtctcttcc ttatcgacgg ctttggttgg cactccatgt tcatcgcagg cgctgtgcca	540	
[1249]	ggactactcc tgctgccact gctgtatttc ttccttcag aatccccgca gtacctcaaa	600	
[1250]	atctccggca agttggatga ggcgaggca gttgcagcat cttatggact ttccctggat	660	
[1251]	gatgatcttg atcggaaca cgaagaagaa cttggcgagt cctcctcact ttcttcctg	720	
[1252]	ttcaagccct cgttcgccg caacaccctg gcgatttggg gcacctcatt catgggactc	780	
[1253]	ctcctgggtct acggcctgaa cacatggctg ccacaaatca tgcgccaagc agactacgac	840	
[1254]	atgggtaact ccctgggctt cctcatggtt cttaacatcg gcgcagtgat cggcctttat	900	
[1255]	attgcagggc gaattgccga taagaactcc cctcgcaaaa cagcactcgt atggttcgtg	960	
[1256]	ttctctgcat ttttcctcgc actacttget gtccggatgc cactgatcgg tctgtatggc	1020	
[1257]	atcgtgctgc tcaccggcat ctttgtgttc agctcccagg tactcatcta cgccttcgtt	1080	
[1258]	ggtgagaatc accctgcca gatgcgtgca actgccatgg gattctccgc aggaattggt	1140	
[1259]	cgctcggcg cgatctcggg tccgttctg ggcgccctgc ttgtcagtgc caaccttget	1200	

[1260]	tacccatggg gcttcttcgc cttcgtcggc gttggactgc tgggcgcgct gattttctcc	1260
[1261]	gcatacgaaga ctctgaggca tcgcgagaac gcttag	1296
[1262]	<210> 28	
[1263]	<211> 431	
[1264]	<212> PRT	
[1265]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[1266]	<400> 28	
[1267]	Met Ser Thr Thr Thr Pro Thr Arg Ala Thr Lys Ser Val Gly Thr Val	
[1268]	1 5 10 15	
[1269]	Leu Ala Leu Leu Trp Phe Ala Ile Val Leu Asp Gly Phe Asp Leu Val	
[1270]	20 25 30	
[1271]	Val Leu Gly Ala Thr Ile Pro Ser Met Leu Glu Asp Pro Ala Trp Asp	
[1272]	35 40 45	
[1273]	Leu Thr Ala Gly Gln Ala Thr Gln Ile Ser Thr Ile Gly Leu Val Gly	
[1274]	50 55 60	
[1275]	Met Thr Ile Gly Ala Leu Thr Ile Gly Phe Leu Thr Asp Arg Leu Gly	
[1276]	65 70 75 80	
[1277]	Arg Arg Arg Val Met Leu Phe Ser Val Ala Val Phe Ser Val Phe Thr	
[1278]	85 90 95	
[1279]	Leu Leu Leu Ala Phe Thr Thr Asn Val Gln Leu Phe Ser Leu Trp Arg	
[1280]	100 105 110	
[1281]	Phe Leu Ala Gly Val Gly Leu Gly Gly Ala Leu Pro Thr Ala Ile Ala	
[1282]	115 120 125	
[1283]	Met Val Thr Glu Phe Arg Pro Gly Thr Lys Ala Gly Ser Ala Ser Thr	
[1284]	130 135 140	
[1285]	Thr Leu Met Thr Gly Tyr His Val Gly Ala Val Ala Thr Ala Phe Leu	
[1286]	145 150 155 160	
[1287]	Gly Leu Phe Leu Ile Asp Gly Phe Gly Trp His Ser Met Phe Ile Ala	
[1288]	165 170 175	
[1289]	Gly Ala Val Pro Gly Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Tyr Phe Phe Leu	
[1290]	180 185 190	
[1291]	Pro Glu Ser Pro Gln Tyr Leu Lys Ile Ser Gly Lys Leu Asp Glu Ala	
[1292]	195 200 205	
[1293]	Gln Ala Val Ala Ala Ser Tyr Gly Leu Ser Leu Asp Asp Asp Leu Asp	
[1294]	210 215 220	
[1295]	Arg Glu His Glu Glu Glu Leu Gly Glu Ser Ser Ser Leu Ser Ser Leu	
[1296]	225 230 235 240	
[1297]	Phe Lys Pro Ser Phe Arg Arg Asn Thr Leu Ala Ile Trp Gly Thr Ser	
[1298]	245 250 255	
[1299]	Phe Met Gly Leu Leu Leu Val Tyr Gly Leu Asn Thr Trp Leu Pro Gln	
[1300]	260 265 270	
[1301]	Ile Met Arg Gln Ala Asp Tyr Asp Met Gly Asn Ser Leu Gly Phe Leu	

[1302]	275	280	285
[1303]	Met Val Leu Asn Ile Gly Ala Val Ile Gly Leu Tyr Ile Ala Gly Arg		
[1304]	290	295	300
[1305]	Ile Ala Asp Lys Asn Ser Pro Arg Lys Thr Ala Leu Val Trp Phe Val		
[1306]	305	310	315
[1307]	Phe Ser Ala Phe Phe Leu Ala Leu Leu Ala Val Arg Met Pro Leu Ile		
[1308]	325	330	335
[1309]	Gly Leu Tyr Gly Ile Val Leu Leu Thr Gly Ile Phe Val Phe Ser Ser		
[1310]	340	345	350
[1311]	Gln Val Leu Ile Tyr Ala Phe Val Gly Glu Asn His Pro Ala Lys Met		
[1312]	355	360	365
[1313]	Arg Ala Thr Ala Met Gly Phe Ser Ala Gly Ile Gly Arg Leu Gly Ala		
[1314]	370	375	380
[1315]	Ile Ser Gly Pro Leu Leu Gly Gly Leu Leu Val Ser Ala Asn Leu Ala		
[1316]	385	390	395
[1317]	Tyr Pro Trp Gly Phe Phe Ala Phe Ala Gly Val Gly Leu Leu Gly Ala		
[1318]	405	410	415
[1319]	Leu Ile Phe Ser Ala Ser Lys Thr Leu Arg His Arg Glu Asn Ala		
[1320]	420	425	430
[1321]	<210> 29		
[1322]	<211> 1131		
[1323]	<212> DNA		
[1324]	<213> 谷氨酸棒杆菌		
[1325]	<400> 29		
[1326]	atgacactgt ccgaacgcaa gctcaccacc accgccaaga ttcttcccca cccactcaac	60	
[1327]	gcctggtacg tcgccgttg ggattatgaa gtcacatcta aaaagcccat ggccaggaca	120	
[1328]	atgccaaaca aaccactcgc tttgtaccgc accaaagatg gccgagccgt tgcccttgca	180	
[1329]	gacgcctgct ggcaccgcct cgcaccgcta tccaagggaa aactcgtggg cacagacgga	240	
[1330]	atccaatgcc cttatcacgg cttggagtac aactccgcgg gccgctgcat gaaaatgccc	300	
[1331]	gcgcaggaaa cctcaaccc gtcagcagcc gtcaactcct acccctggtt ggaagccac	360	
[1332]	cgttttgtgt ggggtgtggc gggcgatccc acattggcag atcccacca agtaccgat	420	
[1333]	atgcaccaga tgagccaccc cgaatgggca ggcatggac gcaccatctc cgctgactgc	480	
[1334]	aactaccaat tagtgetgga caacttgatg gacctaccc acgaagaatt cgtgcactcc	540	
[1335]	tccagcatcg gccaaagacga acttagtgaa tcagagtctg tggtcacca cactgaagat	600	
[1336]	tccgtgacgg tccccgtg gatgcatgac atagatgcac caccgttttg gcaaaagaac	660	
[1337]	atgaatgata agttcccagg atttgaaggc aaggtggatc gttggcagat catccactac	720	
[1338]	tactaccctt ccaccatctg cattgatgtt ggtgtagcaa aggctggaac cggcgcgcag	780	
[1339]	gaaggcgacc gcagccaggc cgttaatggg tatgtaatga acaccattac ccagattca	840	
[1340]	gatcgttctt ctactactt ctgggcattc atgcgcaact accgcctgga aagccaaacc	900	
[1341]	atcaccaccc agctgcgcga cgggtgatcc ggtgtattca aagaagacga agacatgctg	960	
[1342]	accgctcagc aagatgccat cgacgccaac accgactatg agttttacag cctcaacatt	1020	
[1343]	gatgccggtg gcatgtgggt gcgccgaatc ctgaggaag cactctccaa ggaaggccga	1080	

[1344]	ctggatatcc ccaccacatt ccccgcgca acaccgaagc cggaggcata a	1131
[1345]	<210> 30	
[1346]	<211> 376	
[1347]	<212> PRT	
[1348]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[1349]	<400> 30	
[1350]	Met Thr Leu Ser Glu Arg Lys Leu Thr Thr Thr Ala Lys Ile Leu Pro	
[1351]	1 5 10 15	
[1352]	His Pro Leu Asn Ala Trp Tyr Val Ala Ala Trp Asp Tyr Glu Val Thr	
[1353]	20 25 30	
[1354]	Ser Lys Lys Pro Met Ala Arg Thr Ile Ala Asn Lys Pro Leu Ala Leu	
[1355]	35 40 45	
[1356]	Tyr Arg Thr Lys Asp Gly Arg Ala Val Ala Leu Ala Asp Ala Cys Trp	
[1357]	50 55 60	
[1358]	His Arg Leu Ala Pro Leu Ser Lys Gly Lys Leu Val Gly Thr Asp Gly	
[1359]	65 70 75 80	
[1360]	Ile Gln Cys Pro Tyr His Gly Leu Glu Tyr Asn Ser Ala Gly Arg Cys	
[1361]	85 90 95	
[1362]	Met Lys Met Pro Ala Gln Glu Thr Leu Asn Pro Ser Ala Ala Val Asn	
[1363]	100 105 110	
[1364]	Ser Tyr Pro Val Val Glu Ala His Arg Phe Val Trp Val Trp Leu Gly	
[1365]	115 120 125	
[1366]	Asp Pro Thr Leu Ala Asp Pro Thr Gln Val Pro Asp Met His Gln Met	
[1367]	130 135 140	
[1368]	Ser His Pro Glu Trp Ala Gly Asp Gly Arg Thr Ile Ser Ala Asp Cys	
[1369]	145 150 155 160	
[1370]	Asn Tyr Gln Leu Val Leu Asp Asn Leu Met Asp Leu Thr His Glu Glu	
[1371]	165 170 175	
[1372]	Phe Val His Ser Ser Ser Ile Gly Gln Asp Glu Leu Ser Glu Ser Glu	
[1373]	180 185 190	
[1374]	Phe Val Val Thr His Thr Glu Asp Ser Val Thr Val Thr Arg Trp Met	
[1375]	195 200 205	
[1376]	His Asp Ile Asp Ala Pro Pro Phe Trp Gln Lys Asn Met Asn Asp Lys	
[1377]	210 215 220	
[1378]	Phe Pro Gly Phe Glu Gly Lys Val Asp Arg Trp Gln Ile Ile His Tyr	
[1379]	225 230 235 240	
[1380]	Tyr Tyr Pro Ser Thr Ile Cys Ile Asp Val Gly Val Ala Lys Ala Gly	
[1381]	245 250 255	
[1382]	Thr Gly Ala Gln Glu Gly Asp Arg Ser Gln Gly Val Asn Gly Tyr Val	
[1383]	260 265 270	
[1384]	Met Asn Thr Ile Thr Pro Asp Ser Asp Arg Ser Ser His Tyr Phe Trp	
[1385]	275 280 285	

[1386]	Ala Phe Met Arg Asn Tyr Arg Leu Glu Ser Gln Thr Ile Thr Thr Gln		
[1387]	290	295	300
[1388]	Leu Arg Asp Gly Val Ser Gly Val Phe Lys Glu Asp Glu Asp Met Leu		
[1389]	305	310	315 320
[1390]	Thr Ala Gln Gln Asp Ala Ile Asp Ala Asn Thr Asp Tyr Glu Phe Tyr		
[1391]	325	330	335
[1392]	Ser Leu Asn Ile Asp Ala Gly Gly Met Trp Val Arg Arg Ile Leu Glu		
[1393]	340	345	350
[1394]	Glu Ala Leu Ser Lys Glu Gly Arg Leu Asp Ile Pro Thr Thr Phe Pro		
[1395]	355	360	365
[1396]	Arg Ala Thr Pro Lys Pro Glu Ala		
[1397]	370	375	
[1398]	<210> 31		
[1399]	<211> 978		
[1400]	<212> DNA		
[1401]	<213> 谷氨酸棒杆菌		
[1402]	<400> 31		
[1403]	atgaactcgc aatggcaaga tgcacatgtt gtttccagcg aaatcatcgc tgcagacatt	60	
[1404]	cgacgaatag aactatcccc gaaatttgcg attccagtaa aacccggcga acatctcaag	120	
[1405]	atcatgggtgc ccctaaaaac tggacaggaa aagagatcgt actccatcgt tgacgctcgt	180	
[1406]	cacgacggtt cgactctcgc cctgagcgta ctcaaaacca gaaactcccc tggaggatct	240	
[1407]	gagttcatgc atacgttcg agctggagac acagttactg tctccaggcc gtctcaggat	300	
[1408]	tttctctctcc gcgtgggtgc gcctgagtat gtacttgttg ccggcggaat tggaatcaca	360	
[1409]	gcatccggtt caatggcatc tttattaaag aaattgggag caaactaccg cattcatttc	420	
[1410]	gcagcacgca gccttgatgc catggcttac aaagatgagc tcgtggcaga acacggcgac	480	
[1411]	aagtcgcacc tgcactaga ttctgaagge accaccatcg atgtcccage attgatcgaa	540	
[1412]	accttaaacc cccacactga gctttatatg tgcggcccca tccgcttgat ggatgccatc	600	
[1413]	cggcgcgcat ggaacacccg cggacttgac cccaccaatc tgcgtttcga aacgtttgga	660	
[1414]	aacagtggat ggttctcccc agaggttttc cacatccaag taccagagct ggggcttcac	720	
[1415]	gccacagtca acaaggatga aagcatgctg gaggtttgc aaaaggctgg ggcgaaatag	780	
[1416]	atgtttgatt gtcgaaaagg cgaatgtggt ttgtgccagg ttcgcgttct agaagtcgat	840	
[1417]	ggccaggttg atcaccgcga tgtgttcttc tctgatcgtc aaaaagaatc cgacgcaaag	900	
[1418]	gcatgcgcct gcgtgtctcg agtagtctcc tccccttcct cgtccccaac ctgcaccatt	960	
[1419]	acggtcgecc tctcctaa	978	
[1420]	<210> 32		
[1421]	<211> 325		
[1422]	<212> PRT		
[1423]	<213> 谷氨酸棒杆菌		
[1424]	<400> 32		
[1425]	Met Asn Ser Gln Trp Gln Asp Ala His Val Val Ser Ser Glu Ile Ile		
[1426]	1	5	10 15
[1427]	Ala Ala Asp Ile Arg Arg Ile Glu Leu Ser Pro Lys Phe Ala Ile Pro		

[1428]	20	25	30
[1429]	Val Lys Pro Gly Glu His Leu Lys Ile Met Val Pro Leu Lys Thr Gly		
[1430]	35	40	45
[1431]	Gln Glu Lys Arg Ser Tyr Ser Ile Val Asp Ala Arg His Asp Gly Ser		
[1432]	50	55	60
[1433]	Thr Leu Ala Leu Ser Val Leu Lys Thr Arg Asn Ser Arg Gly Gly Ser		
[1434]	65	70	75
[1435]	Glu Phe Met His Thr Leu Arg Ala Gly Asp Thr Val Thr Val Ser Arg		
[1436]	85	90	95
[1437]	Pro Ser Gln Asp Phe Pro Leu Arg Val Gly Ala Pro Glu Tyr Val Leu		
[1438]	100	105	110
[1439]	Val Ala Gly Gly Ile Gly Ile Thr Ala Ile Arg Ser Met Ala Ser Leu		
[1440]	115	120	125
[1441]	Leu Lys Lys Leu Gly Ala Asn Tyr Arg Ile His Phe Ala Ala Arg Ser		
[1442]	130	135	140
[1443]	Leu Asp Ala Met Ala Tyr Lys Asp Glu Leu Val Ala Glu His Gly Asp		
[1444]	145	150	155
[1445]	Lys Leu His Leu His Leu Asp Ser Glu Gly Thr Thr Ile Asp Val Pro		
[1446]	165	170	175
[1447]	Ala Leu Ile Glu Thr Leu Asn Pro His Thr Glu Leu Tyr Met Cys Gly		
[1448]	180	185	190
[1449]	Pro Ile Arg Leu Met Asp Ala Ile Arg Arg Ala Trp Asn Thr Arg Gly		
[1450]	195	200	205
[1451]	Leu Asp Pro Thr Asn Leu Arg Phe Glu Thr Phe Gly Asn Ser Gly Trp		
[1452]	210	215	220
[1453]	Phe Ser Pro Glu Val Phe His Ile Gln Val Pro Glu Leu Gly Leu His		
[1454]	225	230	235
[1455]	Ala Thr Val Asn Lys Asp Glu Ser Met Leu Glu Ala Leu Gln Lys Ala		
[1456]	245	250	255
[1457]	Gly Ala Asn Met Met Phe Asp Cys Arg Lys Gly Glu Cys Gly Leu Cys		
[1458]	260	265	270
[1459]	Gln Val Arg Val Leu Glu Val Asp Gly Gln Val Asp His Arg Asp Val		
[1460]	275	280	285
[1461]	Phe Phe Ser Asp Arg Gln Lys Glu Ser Asp Ala Lys Ala Cys Ala Cys		
[1462]	290	295	300
[1463]	Val Ser Arg Val Val Ser Ser Pro Ser Ser Pro Thr Ser Thr Ile		
[1464]	305	310	315
[1465]	Thr Val Ala Leu Ser		
[1466]	325		
[1467]	<210> 33		
[1468]	<211> 615		
[1469]	<212> DNA		

[1470]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[1471]	<400> 33	
[1472]	atgattgata caggaagaa cggcgagttc cgctacgagc agtcgaatat catcgatcag	60
[1473]	aacgaagccg agttcggcat cactccitca cagaccgtgg gcccttacgt ccacatcggt	120
[1474]	ttgacccttg aaggtgcgga gcatctcgtg gagccaggtt cggaaggcgc ggtgtccttt	180
[1475]	actgtttccg caactgatgg caacggcgac cccatcgagg atgccatgtt tgaactgtgg	240
[1476]	caggccgatc cagagggcat ccacaactct gatttggatc caaacgcac agcaccagca	300
[1477]	accgcagatg gcttccgagg gcttggtcgc gcgatggcaa acgcgcaggg tgaggcaacg	360
[1478]	ttcaccactt tggttccggg agcattcgca gatgaggcac cacacttcaa ggttgggtgtg	420
[1479]	ttcgccctg gcatgctgga gcgtctgtac actcgcgcat acctgccaga cgccgatttg	480
[1480]	agcaccgacc cagttttggc tgttggtccca gctgatcgac gtgacctcct ggtggctcaa	540
[1481]	aagaccgatg atggattccg cttcgacatc actgtccagg ctgaagacaa tgaacccca	600
[1482]	ttttttggac tctaa	615
[1483]	<210> 34	
[1484]	<211> 204	
[1485]	<212> PRT	
[1486]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[1487]	<400> 34	
[1488]	Met Ile Asp Thr Gly Lys Asn Gly Glu Phe Arg Tyr Glu Gln Ser Asn	
[1489]	1 5 10 15	
[1490]	Ile Ile Asp Gln Asn Glu Ala Glu Phe Gly Ile Thr Pro Ser Gln Thr	
[1491]	20 25 30	
[1492]	Val Gly Pro Tyr Val His Ile Gly Leu Thr Leu Glu Gly Ala Glu His	
[1493]	35 40 45	
[1494]	Leu Val Glu Pro Gly Ser Glu Gly Ala Val Ser Phe Thr Val Ser Ala	
[1495]	50 55 60	
[1496]	Thr Asp Gly Asn Gly Asp Pro Ile Ala Asp Ala Met Phe Glu Leu Trp	
[1497]	65 70 75 80	
[1498]	Gln Ala Asp Pro Glu Gly Ile His Asn Ser Asp Leu Asp Pro Asn Arg	
[1499]	85 90 95	
[1500]	Thr Ala Pro Ala Thr Ala Asp Gly Phe Arg Gly Leu Gly Arg Ala Met	
[1501]	100 105 110	
[1502]	Ala Asn Ala Gln Gly Glu Ala Thr Phe Thr Thr Leu Val Pro Gly Ala	
[1503]	115 120 125	
[1504]	Phe Ala Asp Glu Ala Pro His Phe Lys Val Gly Val Phe Ala Arg Gly	
[1505]	130 135 140	
[1506]	Met Leu Glu Arg Leu Tyr Thr Arg Ala Tyr Leu Pro Asp Ala Asp Leu	
[1507]	145 150 155 160	
[1508]	Ser Thr Asp Pro Val Leu Ala Val Val Pro Ala Asp Arg Arg Asp Leu	
[1509]	165 170 175	
[1510]	Leu Val Ala Gln Lys Thr Asp Asp Gly Phe Arg Phe Asp Ile Thr Val	
[1511]	180 185 190	

[1512]	Gln Ala Glu Asp Asn Glu Thr Pro Phe Phe Gly Leu	
[1513]	195	200
[1514]	<210> 35	
[1515]	<211> 693	
[1516]	<212> DNA	
[1517]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[1518]	<400> 35	
[1519]	atggacatcc cacacttcgc cccgacggga ggccaataact cccactgca cttcccggag	60
[1520]	taccggacca ccatcaagcg caaccaagc aacgatctca tcatggttcc tagtcgcctc	120
[1521]	ggcgagtcca cgggacctgt cttcggcgac cgcgacttgg gagacatcga caacgacatg	180
[1522]	accaaggtga acggtggcga ggctatcggc cagcgcactct tcgttcacgg ccgtgtcctc	240
[1523]	ggtttcgatg gcaagccagt tccgcacacc ttggtcgagg cgtggcaggc aaacgccgca	300
[1524]	ggccgttacc gccacaagaa tgactcctgg ccagcgccac tggatccaca cttcaacggt	360
[1525]	gttgacgta ctctaccga caaggacggc cagtaccact tctggaccgt tatgccaggt	420
[1526]	aattaccctt ggggtaacca ccacaacgca tggcgcccgg cgcacattca cttctcgctc	480
[1527]	tatggtcgtc agtttacgga gcgtctggtc acccagatgt acttcccga cgatccattg	540
[1528]	ttcttcagg atccgatcta caacgcggtg ccaaagggtg cacgtgagcg catgatcgca	600
[1529]	acgttcgact atgacgagac ccgtgaaaac ttcgcgcttg gttacaagtt cgacatcgtc	660
[1530]	cttcgtggcc gcaacgccac cccatttgag taa	693
[1531]	<210> 36	
[1532]	<211> 230	
[1533]	<212> PRT	
[1534]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[1535]	<400> 36	
[1536]	Met Asp Ile Pro His Phe Ala Pro Thr Gly Gly Glu Tyr Ser Pro Leu	
[1537]	1 5 10 15	
[1538]	His Phe Pro Glu Tyr Arg Thr Thr Ile Lys Arg Asn Pro Ser Asn Asp	
[1539]	20 25 30	
[1540]	Leu Ile Met Val Pro Ser Arg Leu Gly Glu Ser Thr Gly Pro Val Phe	
[1541]	35 40 45	
[1542]	Gly Asp Arg Asp Leu Gly Asp Ile Asp Asn Asp Met Thr Lys Val Asn	
[1543]	50 55 60	
[1544]	Gly Gly Glu Ala Ile Gly Gln Arg Ile Phe Val His Gly Arg Val Leu	
[1545]	65 70 75 80	
[1546]	Gly Phe Asp Gly Lys Pro Val Pro His Thr Leu Val Glu Ala Trp Gln	
[1547]	85 90 95	
[1548]	Ala Asn Ala Ala Gly Arg Tyr Arg His Lys Asn Asp Ser Trp Pro Ala	
[1549]	100 105 110	
[1550]	Pro Leu Asp Pro His Phe Asn Gly Val Ala Arg Thr Leu Thr Asp Lys	
[1551]	115 120 125	
[1552]	Asp Gly Gln Tyr His Phe Trp Thr Val Met Pro Gly Asn Tyr Pro Trp	
[1553]	130 135 140	

[1554]	Gly Asn His His Asn Ala Trp Arg Pro Ala His Ile His Phe Ser Leu	
[1555]	145	150 155 160
[1556]	Tyr Gly Arg Gln Phe Thr Glu Arg Leu Val Thr Gln Met Tyr Phe Pro	
[1557]	165	170 175
[1558]	Asn Asp Pro Leu Phe Phe Gln Asp Pro Ile Tyr Asn Ala Val Pro Lys	
[1559]	180	185 190
[1560]	Gly Ala Arg Glu Arg Met Ile Ala Thr Phe Asp Tyr Asp Glu Thr Arg	
[1561]	195	200 205
[1562]	Glu Asn Phe Ala Leu Gly Tyr Lys Phe Asp Ile Val Leu Arg Gly Arg	
[1563]	210	215 220
[1564]	Asn Ala Thr Pro Phe Glu	
[1565]	225	230
[1566]	<210> 37	
[1567]	<211> 1164	
[1568]	<212> DNA	
[1569]	<213> 大肠杆菌	
[1570]	<400> 37	
[1571]	atgaacaact ttaatctgca caccccaacc cgcattctgt ttggtaaagg cgcaatcgct	60
[1572]	ggtttacgcg aacaaattcc tcacgatgct cgcgtattga ttacctacgg cggcggcagc	120
[1573]	gtgaaaaaaa ccggcgttct cgatcaagtt ctggatgccc tgaaaggcat ggacgtgctg	180
[1574]	gaatttggcg gtattgagcc aaaccgcgct tatgaaacgc tgatgaacgc cgtgaaactg	240
[1575]	gttcgcgaac agaaagtac tttcctgctg gcggttggcg gcggttctgt actggacggc	300
[1576]	accaaattta tcgccgcagc ggctaactat ccgaaaata tcgatccgtg gcacattctg	360
[1577]	caaacggcg gtaaagagat taaaagcgcc atcccgatgg gctgtgtgct gacgtgcca	420
[1578]	gcaaccggtt cagaatccaa cgcaggcgcg gtgatctccc gtaaaaccac aggcgacaag	480
[1579]	caggcgttcc attctgccc tggttcagcg gtatttgccg tgctcgatcc ggtttatacc	540
[1580]	tacaccctgc cgccgcgtca ggtggctaac ggcgtagtgg acgcctttgt acacaccgtg	600
[1581]	gaacagtatg ttaccaaac ggttgatgcc aaaattcagg accgtttcgc agaaggcatt	660
[1582]	ttgtgacgc taatcgaaga tggtcgaaa gcctgaaag agccagaaaa ctacgatgtg	720
[1583]	cgcgccaacg tcatgtgggc ggcgactcag gcgctgaacg gtttgattgg cgctggcgta	780
[1584]	ccgcaggact gggcaacgca tatgtcgggc cacgaactga ctgcgatgca cggctctggat	840
[1585]	cacgcgcaaa cactggctat cgtcctgcct gcaactgtga atgaaaaacg cgataccaag	900
[1586]	cgcgctaagc tgctgcaata tgctgaacgc gtctggaaca tcaactgaagg ttccgatgat	960
[1587]	gagcgatttg acgcccgat tgccgcaacc cgcaatttct ttgagcaatt aggcgtgccg	1020
[1588]	accacctct ccgactacgg tctggacggc agctccatcc cggctttgct gaaaaaactg	1080
[1589]	gaagagcacg gcatgacca actgggcgaa aatcatgaca ttacgttgga tgtcagccgc	1140
[1590]	cgtatatacg aagccgcccg ctaa	1164
[1591]	<210> 38	
[1592]	<211> 387	
[1593]	<212> PRT	
[1594]	<213> 大肠杆菌	
[1595]	<400> 38	

[1596]	Met Asn Asn Phe Asn Leu His Thr Pro Thr Arg Ile Leu Phe Gly Lys
[1597]	1 5 10 15
[1598]	Gly Ala Ile Ala Gly Leu Arg Glu Gln Ile Pro His Asp Ala Arg Val
[1599]	20 25 30
[1600]	Leu Ile Thr Tyr Gly Gly Gly Ser Val Lys Lys Thr Gly Val Leu Asp
[1601]	35 40 45
[1602]	Gln Val Leu Asp Ala Leu Lys Gly Met Asp Val Leu Glu Phe Gly Gly
[1603]	50 55 60
[1604]	Ile Glu Pro Asn Pro Ala Tyr Glu Thr Leu Met Asn Ala Val Lys Leu
[1605]	65 70 75 80
[1606]	Val Arg Glu Gln Lys Val Thr Phe Leu Leu Ala Val Gly Gly Gly Ser
[1607]	85 90 95
[1608]	Val Leu Asp Gly Thr Lys Phe Ile Ala Ala Ala Asn Tyr Pro Glu
[1609]	100 105 110
[1610]	Asn Ile Asp Pro Trp His Ile Leu Gln Thr Gly Gly Lys Glu Ile Lys
[1611]	115 120 125
[1612]	Ser Ala Ile Pro Met Gly Cys Val Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gly Ser
[1613]	130 135 140
[1614]	Glu Ser Asn Ala Gly Ala Val Ile Ser Arg Lys Thr Thr Gly Asp Lys
[1615]	145 150 155 160
[1616]	Gln Ala Phe His Ser Ala His Val Gln Pro Val Phe Ala Val Leu Asp
[1617]	165 170 175
[1618]	Pro Val Tyr Thr Tyr Thr Leu Pro Pro Arg Gln Val Ala Asn Gly Val
[1619]	180 185 190
[1620]	Val Asp Ala Phe Val His Thr Val Glu Gln Tyr Val Thr Lys Pro Val
[1621]	195 200 205
[1622]	Asp Ala Lys Ile Gln Asp Arg Phe Ala Glu Gly Ile Leu Leu Thr Leu
[1623]	210 215 220
[1624]	Ile Glu Asp Gly Pro Lys Ala Leu Lys Glu Pro Glu Asn Tyr Asp Val
[1625]	225 230 235 240
[1626]	Arg Ala Asn Val Met Trp Ala Ala Thr Gln Ala Leu Asn Gly Leu Ile
[1627]	245 250 255
[1628]	Gly Ala Gly Val Pro Gln Asp Trp Ala Thr His Met Leu Gly His Glu
[1629]	260 265 270
[1630]	Leu Thr Ala Met His Gly Leu Asp His Ala Gln Thr Leu Ala Ile Val
[1631]	275 280 285
[1632]	Leu Pro Ala Leu Trp Asn Glu Lys Arg Asp Thr Lys Arg Ala Lys Leu
[1633]	290 295 300
[1634]	Leu Gln Tyr Ala Glu Arg Val Trp Asn Ile Thr Glu Gly Ser Asp Asp
[1635]	305 310 315 320
[1636]	Glu Arg Ile Asp Ala Ala Ile Ala Ala Thr Arg Asn Phe Phe Glu Gln
[1637]	325 330 335

[1638]	Leu Gly Val Pro Thr His Leu Ser Asp Tyr Gly Leu Asp Gly Ser Ser	
[1639]	340	345 350
[1640]	Ile Pro Ala Leu Leu Lys Lys Leu Glu Glu His Gly Met Thr Gln Leu	
[1641]	355	360 365
[1642]	Gly Glu Asn His Asp Ile Thr Leu Asp Val Ser Arg Arg Ile Tyr Glu	
[1643]	370	375 380
[1644]	Ala Ala Arg	
[1645]	385	
[1646]	<210> 39	
[1647]	<211> 1062	
[1648]	<212> DNA	
[1649]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[1650]	<400> 39	
[1651]	atgagcatcc aagtaaaagc actccagaaa accggccccc aagcaccttt cgaggtcaaa	60
[1652]	atcattgagc gtcgtgagcc tcgcgtgac gacgtagtta tcgacatcaa agctgccggc	120
[1653]	atctgccaca gcgatatcca caccatccgc aacgaatggg gcgaggcaca cttcccgtc	180
[1654]	accgtcggcc acgaaatgc aggcgttgtc tctgcggtg gctccgatgt aaccaagtgg	240
[1655]	aaagtcggcg accgcgttg cgctcggtgc ctagttaact cctgcggcga atgtgaacag	300
[1656]	tgtgtcgcgg gatttgaaaa caactgcctt cgcggaacg tcggaacct caactccgac	360
[1657]	gacgtcgacg gcaccatcac gcaaggtagc tacgccgaaa aggtagtgg caacgaacgt	420
[1658]	ttcctctgca gcatccaga ggaactcgac ttcatgtcg cagcaccact gctgtgcga	480
[1659]	ggcatcacca cctactcccc gatcgctgc tggaacgta aagaaggcga caaagtagca	540
[1660]	gtcatgggccc tcggcgggct cggccacatg ggtgtccaaa tcgccgcagc caaggcgct	600
[1661]	gacgttacgg ttctgtccc ttccctgcgc aaggctgaac ttgccaagga actcggcgca	660
[1662]	gctcgacgc ttgcgaactc tgatgaggat ttcttcaccg aacacgccgg tgaattcgac	720
[1663]	ttcatcctca acaccattag cgcattccat ccagtcgaca agtacctgag ctttctcaag	780
[1664]	ccacacggtg tcatggctgt tgctggtctg ccaccagaga agcagccact gagcttcggt	840
[1665]	gcgctcatcg gcggcgaaa agtcctcacc ggatccaaca ttggcggcat ccctgaaacc	900
[1666]	caggaaatgc tcgactctg tgcaaaacac ggctcggcg cgatgatcga aactgtcggc	960
[1667]	gtcaacgatg ttgatgcagc ctacgaccgc gttgttgccg gcgacgttca gttccgcgtt	1020
[1668]	gtcattgata ctgcttcgtt tgcagaggta gagcggttt ag	1062
[1669]	<210> 40	
[1670]	<211> 353	
[1671]	<212> PRT	
[1672]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[1673]	<400> 40	
[1674]	Met Ser Ile Gln Val Lys Ala Leu Gln Lys Thr Gly Pro Glu Ala Pro	
[1675]	1	5 10 15
[1676]	Phe Glu Val Lys Ile Ile Glu Arg Arg Glu Pro Arg Ala Asp Asp Val	
[1677]	20	25 30
[1678]	Val Ile Asp Ile Lys Ala Ala Gly Ile Cys His Ser Asp Ile His Thr	
[1679]	35	40 45

[1680]	Ile Arg Asn Glu Trp Gly Glu Ala His Phe Pro Leu Thr Val Gly His
[1681]	50 55 60
[1682]	Glu Ile Ala Gly Val Val Ser Ala Val Gly Ser Asp Val Thr Lys Trp
[1683]	65 70 75 80
[1684]	Lys Val Gly Asp Arg Val Gly Val Gly Cys Leu Val Asn Ser Cys Gly
[1685]	85 90 95
[1686]	Glu Cys Glu Gln Cys Val Ala Gly Phe Glu Asn Asn Cys Leu Arg Gly
[1687]	100 105 110
[1688]	Asn Val Gly Thr Tyr Asn Ser Asp Asp Val Asp Gly Thr Ile Thr Gln
[1689]	115 120 125
[1690]	Gly Gly Tyr Ala Glu Lys Val Val Val Asn Glu Arg Phe Leu Cys Ser
[1691]	130 135 140
[1692]	Ile Pro Glu Glu Leu Asp Phe Asp Val Ala Ala Pro Leu Leu Cys Ala
[1693]	145 150 155 160
[1694]	Gly Ile Thr Thr Tyr Ser Pro Ile Ala Arg Trp Asn Val Lys Glu Gly
[1695]	165 170 175
[1696]	Asp Lys Val Ala Val Met Gly Leu Gly Gly Leu Gly His Met Gly Val
[1697]	180 185 190
[1698]	Gln Ile Ala Ala Ala Lys Gly Ala Asp Val Thr Val Leu Ser Arg Ser
[1699]	195 200 205
[1700]	Leu Arg Lys Ala Glu Leu Ala Lys Glu Leu Gly Ala Ala Arg Thr Leu
[1701]	210 215 220
[1702]	Ala Thr Ser Asp Glu Asp Phe Phe Thr Glu His Ala Gly Glu Phe Asp
[1703]	225 230 235 240
[1704]	Phe Ile Leu Asn Thr Ile Ser Ala Ser Ile Pro Val Asp Lys Tyr Leu
[1705]	245 250 255
[1706]	Ser Leu Leu Lys Pro His Gly Val Met Ala Val Val Gly Leu Pro Pro
[1707]	260 265 270
[1708]	Glu Lys Gln Pro Leu Ser Phe Gly Ala Leu Ile Gly Gly Gly Lys Val
[1709]	275 280 285
[1710]	Leu Thr Gly Ser Asn Ile Gly Gly Ile Pro Glu Thr Gln Glu Met Leu
[1711]	290 295 300
[1712]	Asp Phe Cys Ala Lys His Gly Leu Gly Ala Met Ile Glu Thr Val Gly
[1713]	305 310 315 320
[1714]	Val Asn Asp Val Asp Ala Ala Tyr Asp Arg Val Val Ala Gly Asp Val
[1715]	325 330 335
[1716]	Gln Phe Arg Val Val Ile Asp Thr Ala Ser Phe Ala Glu Val Glu Ala
[1717]	340 345 350
[1718]	Val
[1719]	<210> 41
[1720]	<211> 1113
[1721]	<212> DNA

[1722]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[1723]	<400> 41	
[1724]	gtgtccatga gcaactgtcgt gcctggaatt gtcgccctgt ccaagggggc accggtagaa	60
[1725]	aaagtaaacg ttgttgcccc tgatccaggt gctaacgatg tcatcgtcaa gattcaggcc	120
[1726]	tgcgggtgtgt gccacaccga cttggcctac cgcgatggcg atatttcaga tgagttccct	180
[1727]	tacctcctcg gccacgaggc agcaggtatt gttgaggagg taggcgagtc cgtcacccac	240
[1728]	gttgaggteg gcgatttcgt catcttgaac tggcgtgcag tgtgcggcga gtgccgtgca	300
[1729]	tgtaagaagg gcgagccaaa gtactgcttt aacaccaca acgcatctaa gaagatgacc	360
[1730]	ctggaagacg gcaccgagct gtccccagca ctgggtattg gcgcgttctt ggaaaagacc	420
[1731]	ctggtccacg aaggccagtg caccaaggtt aaccctgagg aagatccagc agcagctggc	480
[1732]	cttctgggtt gcggcatcat ggcaggtctt ggtgctgcgg taaacaccgg tgatattaag	540
[1733]	cgcggcgagt ccgtggcagt cttcggcctt ggtggcgtgg gcatggcagc tattgctggc	600
[1734]	gccaaagattg ctggtgcac gaagattatt gctgttgata tcgatgagaa gaagttggag	660
[1735]	tgggcgaagg aattcggcgc aaccacacc attaatcct ctggtcttgg tggcgagggt	720
[1736]	gatgcctctg aggtcgtggc aaaggttcgt gagctcactg atggtttcgg tactgacgtc	780
[1737]	tccatcgatg cggtaggcat catgccgacc tggcagcagg cgttttactc ccgtgatcat	840
[1738]	gcaggccgca tggatgatgt gggcgttcca aacctgacgt ctgcgtaga tgttctgcg	900
[1739]	attgattttt acggtcgcgg tggctctgtg cgccctgcat ggtacggcga ctgcctgcct	960
[1740]	gagcgtgatt tcccaactta tgtggatctg cacctgcagg gtcgtttccc gctggataag	1020
[1741]	tttgtttctg agcgtattgg tcttgatgat gttgaagagg ctttcaacac catgaaggct	1080
[1742]	ggcgacgtgc tgcgttctgt ggtggagatc taa	1113
[1743]	<210> 42	
[1744]	<211> 370	
[1745]	<212> PRT	
[1746]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[1747]	<400> 42	
[1748]	Met Ser Met Ser Thr Val Val Pro Gly Ile Val Ala Leu Ser Lys Gly	
[1749]	1 5 10 15	
[1750]	Ala Pro Val Glu Lys Val Asn Val Val Val Pro Asp Pro Gly Ala Asn	
[1751]	20 25 30	
[1752]	Asp Val Ile Val Lys Ile Gln Ala Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu	
[1753]	35 40 45	
[1754]	Ala Tyr Arg Asp Gly Asp Ile Ser Asp Glu Phe Pro Tyr Leu Leu Gly	
[1755]	50 55 60	
[1756]	His Glu Ala Ala Gly Ile Val Glu Glu Val Gly Glu Ser Val Thr His	
[1757]	65 70 75 80	
[1758]	Val Glu Val Gly Asp Phe Val Ile Leu Asn Trp Arg Ala Val Cys Gly	
[1759]	85 90 95	
[1760]	Glu Cys Arg Ala Cys Lys Lys Gly Glu Pro Lys Tyr Cys Phe Asn Thr	
[1761]	100 105 110	
[1762]	His Asn Ala Ser Lys Lys Met Thr Leu Glu Asp Gly Thr Glu Leu Ser	
[1763]	115 120 125	

[1764]	Pro Ala Leu Gly Ile Gly Ala Phe Leu Glu Lys Thr Leu Val His Glu		
[1765]	130	135	140
[1766]	Gly Gln Cys Thr Lys Val Asn Pro Glu Glu Asp Pro Ala Ala Ala Gly		
[1767]	145	150	155 160
[1768]	Leu Leu Gly Cys Gly Ile Met Ala Gly Leu Gly Ala Ala Val Asn Thr		
[1769]	165	170	175
[1770]	Gly Asp Ile Lys Arg Gly Glu Ser Val Ala Val Phe Gly Leu Gly Gly		
[1771]	180	185	190
[1772]	Val Gly Met Ala Ala Ile Ala Gly Ala Lys Ile Ala Gly Ala Ser Lys		
[1773]	195	200	205
[1774]	Ile Ile Ala Val Asp Ile Asp Glu Lys Lys Leu Glu Trp Ala Lys Glu		
[1775]	210	215	220
[1776]	Phe Gly Ala Thr His Thr Ile Asn Ser Ser Gly Leu Gly Gly Glu Gly		
[1777]	225	230	235 240
[1778]	Asp Ala Ser Glu Val Val Ala Lys Val Arg Glu Leu Thr Asp Gly Phe		
[1779]	245	250	255
[1780]	Gly Thr Asp Val Ser Ile Asp Ala Val Gly Ile Met Pro Thr Trp Gln		
[1781]	260	265	270
[1782]	Gln Ala Phe Tyr Ser Arg Asp His Ala Gly Arg Met Val Met Val Gly		
[1783]	275	280	285
[1784]	Val Pro Asn Leu Thr Ser Arg Val Asp Val Pro Ala Ile Asp Phe Tyr		
[1785]	290	295	300
[1786]	Gly Arg Gly Gly Ser Val Arg Pro Ala Trp Tyr Gly Asp Cys Leu Pro		
[1787]	305	310	315 320
[1788]	Glu Arg Asp Phe Pro Thr Tyr Val Asp Leu His Leu Gln Gly Arg Phe		
[1789]	325	330	335
[1790]	Pro Leu Asp Lys Phe Val Ser Glu Arg Ile Gly Leu Asp Asp Val Glu		
[1791]	340	345	350
[1792]	Glu Ala Phe Asn Thr Met Lys Ala Gly Asp Val Leu Arg Ser Val Val		
[1793]	355	360	365
[1794]	Glu Ile		
[1795]	370		
[1796]	<210> 43		
[1797]	<211> 1047		
[1798]	<212> DNA		
[1799]	<213> 谷氨酸棒杆菌		
[1800]	<400> 43		
[1801]	gtgagtttta tgaccactgc tgcaccccaa gaatttaccg ctgctgttgt tgaaaaattc	60	
[1802]	ggatcatgacg tgaccgtgaa ggatattgac cttccaaagc cagggccaca ccaggcattg	120	
[1803]	gtgaaggtac tcacctccgg catctgccac accgacctcc acgccttgga gggcgattgg	180	
[1804]	ccagtaaagc cggaaccacc attcgtacca ggacacgaag gtgtaggtga agttgttgag	240	
[1805]	ctcggaccag gtgaacacga tgtgaaggtc ggcgatattg tcggcaatgc gtggctctgg	300	

[1806]	tcagcgtgcg gcacctgcga atactgcac acaggcaggg aaactcagt taacgaagct	360
[1807]	gagtacggtg gctacacca aatggatcc ttggccagt acatgctggt ggataccca	420
[1808]	tacgccgtc gcaccccaga cggcgtggac tacctcgaag cagcgccaat tctgtgtgca	480
[1809]	ggcgtgactg tctacaaggc actcaaagtc tctgaaaccc gcccgggcca attcatggtg	540
[1810]	atctccggtg tcggcggact tggccacac gcagtccaat acgcagcggc gatgggcatg	600
[1811]	cgtgtcattg cggtagatat tgccgaggac aagctggaac ttgcccgtaa gcacggtgcg	660
[1812]	gaatttaccg tgaatgcgcg taatgaagat ccaggcgaag ctgtacagaa gtacaccaac	720
[1813]	ggtggcgcac acggcgtgct tgtgactgca gttcacgagg cagcattcgg ccaggcactg	780
[1814]	gatatggctc gacgtgcagg aacaattgtg ttcaacggtc tgccaccggg agagtccca	840
[1815]	gcacccgtgt tcaacatcgt attcaaggc ctgaccatcc gtggatccct cgtgggaacc	900
[1816]	cgccaagact tgccgaagc gctcgatttc ttgcacgcg gactaatcaa gccaacctg	960
[1817]	agtgagtgt cctcgatga ggtcaatgga gttcttgacc gcacgcgaaa cggcaagatc	1020
[1818]	gatggtcgtg tgccgattcg tttctaa	1047
[1819]	<210> 44	
[1820]	<211> 348	
[1821]	<212> PRT	
[1822]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[1823]	<400> 44	
[1824]	Met Ser Phe Met Thr Thr Ala Ala Pro Gln Glu Phe Thr Ala Ala Val	
[1825]	1 5 10 15	
[1826]	Val Glu Lys Phe Gly His Asp Val Thr Val Lys Asp Ile Asp Leu Pro	
[1827]	20 25 30	
[1828]	Lys Pro Gly Pro His Gln Ala Leu Val Lys Val Leu Thr Ser Gly Ile	
[1829]	35 40 45	
[1830]	Cys His Thr Asp Leu His Ala Leu Glu Gly Asp Trp Pro Val Lys Pro	
[1831]	50 55 60	
[1832]	Glu Pro Pro Phe Val Pro Gly His Glu Gly Val Gly Glu Val Val Glu	
[1833]	65 70 75 80	
[1834]	Leu Gly Pro Gly Glu His Asp Val Lys Val Gly Asp Ile Val Gly Asn	
[1835]	85 90 95	
[1836]	Ala Trp Leu Trp Ser Ala Cys Gly Thr Cys Glu Tyr Cys Ile Thr Gly	
[1837]	100 105 110	
[1838]	Arg Glu Thr Gln Cys Asn Glu Ala Glu Tyr Gly Gly Tyr Thr Gln Asn	
[1839]	115 120 125	
[1840]	Gly Ser Phe Gly Gln Tyr Met Leu Val Asp Thr Arg Tyr Ala Ala Arg	
[1841]	130 135 140	
[1842]	Ile Pro Asp Gly Val Asp Tyr Leu Glu Ala Ala Pro Ile Leu Cys Ala	
[1843]	145 150 155 160	
[1844]	Gly Val Thr Val Tyr Lys Ala Leu Lys Val Ser Glu Thr Arg Pro Gly	
[1845]	165 170 175	
[1846]	Gln Phe Met Val Ile Ser Gly Val Gly Gly Leu Gly His Ile Ala Val	
[1847]	180 185 190	

[1848]	Gln Tyr Ala Ala Ala Met Gly Met Arg Val Ile Ala Val Asp Ile Ala	
[1849]	195	200 205
[1850]	Glu Asp Lys Leu Glu Leu Ala Arg Lys His Gly Ala Glu Phe Thr Val	
[1851]	210	215 220
[1852]	Asn Ala Arg Asn Glu Asp Pro Gly Glu Ala Val Gln Lys Tyr Thr Asn	
[1853]	225	230 235 240
[1854]	Gly Gly Ala His Gly Val Leu Val Thr Ala Val His Glu Ala Ala Phe	
[1855]	245	250 255
[1856]	Gly Gln Ala Leu Asp Met Ala Arg Arg Ala Gly Thr Ile Val Phe Asn	
[1857]	260	265 270
[1858]	Gly Leu Pro Pro Gly Glu Phe Pro Ala Ser Val Phe Asn Ile Val Phe	
[1859]	275	280 285
[1860]	Lys Gly Leu Thr Ile Arg Gly Ser Leu Val Gly Thr Arg Gln Asp Leu	
[1861]	290	295 300
[1862]	Ala Glu Ala Leu Asp Phe Phe Ala Arg Gly Leu Ile Lys Pro Thr Val	
[1863]	305	310 315 320
[1864]	Ser Glu Cys Ser Leu Asp Glu Val Asn Gly Val Leu Asp Arg Met Arg	
[1865]	325	330 335
[1866]	Asn Gly Lys Ile Asp Gly Arg Val Ala Ile Arg Phe	
[1867]	340	345
[1868]	<210> 45	
[1869]	<211> 1020	
[1870]	<212> DNA	
[1871]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[1872]	<400> 45	
[1873]	atgccccaaat acattgccat gcaggtatcc gaatccggtg caccgttagc cgccaatctc	60
[1874]	gtgcaacctg ctccgttgaa atcgaggga gtccgcgtgg aaatcgctgc tagtggtgtg	120
[1875]	tgccatgcag atattggcac ggcagcagca tcggggaagc acactgtttt tcctgttacc	180
[1876]	cctggtcatg agattgcagg aaccatcgcg gaaattggtg aaaacgtatc tcggtggacg	240
[1877]	gttggtgatc gcgttgcaat cggttggttt ggtggcaatt gcggtgactg cgctttttgt	300
[1878]	cgtgcagggtg atcctgtgca ttgcagagag cggaagattc ctggcgtttc ttatgcgggt	360
[1879]	ggttgggcac agaattattgt tgttccagcg gaggtccttg ctgcgattcc agatggcatg	420
[1880]	gacttttacg aggccgcccc gatgggctgc gcagggtgta caacattcaa tgcgttgcca	480
[1881]	aacctgaagc tggatcccg tgcggctgtc gcggtctttg gaatcgccgg tttagtgcgc	540
[1882]	ctagctattc agtttgctgc gaaaatgggt tatcgaacca tcaccatgcg ccgcggttta	600
[1883]	gagcgtgagg agctagctag gcaactggc gccaccact acatcgatag caatgatctg	660
[1884]	cacctggcc aggcgttatt tgaactggc ggggctgact tgatcttgc tactgcgtcc	720
[1885]	accacggagc ctctttcgga gttgtctacc ggtctttcta ttggcgggca gtaaccatt	780
[1886]	atcggagttg atgggggaga tatcacggt tcggcagccc aattgatgat gaaccgtcag	840
[1887]	atcatcacag gtcacctcac tggaagtgcg aatgacacgg aacagactat gaaatttgct	900
[1888]	catctccatg gcgtgaaacc gcttattgaa cggatgcctc tcgatcaagc caacgaggct	960
[1889]	attgcacgta tttcagctgg taaaccacgt ttccgtattg tcttgagacc gaattcataa	1020

[1890]	<210>	46
[1891]	<211>	339
[1892]	<212>	PRT
[1893]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[1894]	<400>	46
[1895]	Met Pro Lys Tyr Ile Ala Met Gln Val Ser Glu Ser Gly Ala Pro Leu	
[1896]	1	5 10 15
[1897]	Ala Ala Asn Leu Val Gln Pro Ala Pro Leu Lys Ser Arg Glu Val Arg	
[1898]	20	25 30
[1899]	Val Glu Ile Ala Ala Ser Gly Val Cys His Ala Asp Ile Gly Thr Ala	
[1900]	35	40 45
[1901]	Ala Ala Ser Gly Lys His Thr Val Phe Pro Val Thr Pro Gly His Glu	
[1902]	50	55 60
[1903]	Ile Ala Gly Thr Ile Ala Glu Ile Gly Glu Asn Val Ser Arg Trp Thr	
[1904]	65	70 75 80
[1905]	Val Gly Asp Arg Val Ala Ile Gly Trp Phe Gly Gly Asn Cys Gly Asp	
[1906]	85	90 95
[1907]	Cys Ala Phe Cys Arg Ala Gly Asp Pro Val His Cys Arg Glu Arg Lys	
[1908]	100	105 110
[1909]	Ile Pro Gly Val Ser Tyr Ala Gly Gly Trp Ala Gln Asn Ile Val Val	
[1910]	115	120 125
[1911]	Pro Ala Glu Ala Leu Ala Ala Ile Pro Asp Gly Met Asp Phe Tyr Glu	
[1912]	130	135 140
[1913]	Ala Ala Pro Met Gly Cys Ala Gly Val Thr Thr Phe Asn Ala Leu Arg	
[1914]	145	150 155 160
[1915]	Asn Leu Lys Leu Asp Pro Gly Ala Ala Val Ala Val Phe Gly Ile Gly	
[1916]	165	170 175
[1917]	Gly Leu Val Arg Leu Ala Ile Gln Phe Ala Ala Lys Met Gly Tyr Arg	
[1918]	180	185 190
[1919]	Thr Ile Thr Ile Ala Arg Gly Leu Glu Arg Glu Glu Leu Ala Arg Gln	
[1920]	195	200 205
[1921]	Leu Gly Ala Asn His Tyr Ile Asp Ser Asn Asp Leu His Pro Gly Gln	
[1922]	210	215 220
[1923]	Ala Leu Phe Glu Leu Gly Gly Ala Asp Leu Ile Leu Ser Thr Ala Ser	
[1924]	225	230 235 240
[1925]	Thr Thr Glu Pro Leu Ser Glu Leu Ser Thr Gly Leu Ser Ile Gly Gly	
[1926]	245	250 255
[1927]	Gln Leu Thr Ile Ile Gly Val Asp Gly Gly Asp Ile Thr Val Ser Ala	
[1928]	260	265 270
[1929]	Ala Gln Leu Met Met Asn Arg Gln Ile Ile Thr Gly His Leu Thr Gly	
[1930]	275	280 285
[1931]	Ser Ala Asn Asp Thr Glu Gln Thr Met Lys Phe Ala His Leu His Gly	

[1932]	290	295	300
[1933]	Val Lys Pro Leu Ile Glu Arg Met Pro Leu Asp Gln Ala Asn Glu Ala		
[1934]	305	310	315
[1935]	Ile Ala Arg Ile Ser Ala Gly Lys Pro Arg Phe Arg Ile Val Leu Glu		
[1936]		325	330
[1937]	Pro Asn Ser		335
[1938]	<210> 47		
[1939]	<211> 879		
[1940]	<212> DNA		
[1941]	<213> 谷氨酸棒杆菌		
[1942]	<400> 47		
[1943]	atgcaaaccc ttgctgctat tgttcgtgcc acgaagcaac cttttgagat caccaccatt	60	
[1944]	gatctggatg caccacgacc agatgaagtt caaatccgtg ttattgctgc cggagtgcgc	120	
[1945]	cacactgacg caattgttcg tgatcagatt tacccaactt ttcttcccgc agttttcggc	180	
[1946]	cacgaaggcg cggagtagt tgtcgccgtg ggttctgcag tcacctcggg gaaaccagat	240	
[1947]	gacaaggtag tgctgggatt caactcttgt ggccagtgt tgaagtgttt gggcggtaag	300	
[1948]	cctgcgtact gtgagaaatt ctatgaccgc aacttcgcat gcacccgcga tgccgggcac	360	
[1949]	actactttgt ttaccctgac aacaaaagag caggcagagg ccatcatcga cacccttgat	420	
[1950]	gatgttttct acgatgcgga tgcgggttgc ctggcatacc cagcaactcc cccagaggct	480	
[1951]	tcgggagtaa gcgtgttggg tgtcgccgtg ggtacctctg atctcccca agcaaaggaa	540	
[1952]	gcactacaca ctgcctccta cttggggcgc tccacctcac tgattgttga ttttgagtg	600	
[1953]	gctggcatcc accgcctgct ttcatacgaa gaagaactcc gcgctgcggg cgtgctcatc	660	
[1954]	gttgcgcgtg gaatggatgg tgcgctaccc ggagttgtcg caggcttagt gtccgcacct	720	
[1955]	gtcgtgcgac tgccaacctc cgtgggatac ggcgaggtg ctggaggaat cgcaccactt	780	
[1956]	ctgaccatgc ttaacgcctg cgcgccggga gttggagtgg tcaacattga taacggctat	840	
[1957]	ggagcaggac acctggctgc gcagattgcg gcgaggtaa	879	
[1958]	<210> 48		
[1959]	<211> 292		
[1960]	<212> PRT		
[1961]	<213> 谷氨酸棒杆菌		
[1962]	<400> 48		
[1963]	Met Gln Thr Leu Ala Ala Ile Val Arg Ala Thr Lys Gln Pro Phe Glu		
[1964]	1	5	10
[1965]	Ile Thr Thr Ile Asp Leu Asp Ala Pro Arg Pro Asp Glu Val Gln Ile		15
[1966]		20	25
[1967]	Arg Val Ile Ala Ala Gly Val Arg His Thr Asp Ala Ile Val Arg Asp		30
[1968]		35	40
[1969]	Gln Ile Tyr Pro Thr Phe Leu Pro Ala Val Phe Gly His Glu Gly Ala		45
[1970]		50	55
[1971]	Gly Val Val Val Ala Val Gly Ser Ala Val Thr Ser Val Lys Pro Asp		60
[1972]		65	70
[1973]	Asp Lys Val Val Leu Gly Phe Asn Ser Cys Gly Gln Cys Leu Lys Cys		75
			80

[1974]	85	90	95
[1975]	Leu Gly Gly Lys Pro Ala Tyr Cys Glu Lys Phe Tyr Asp Arg Asn Phe		
[1976]	100	105	110
[1977]	Ala Cys Thr Arg Asp Ala Gly His Thr Thr Leu Phe Thr Arg Ala Thr		
[1978]	115	120	125
[1979]	Lys Glu Gln Ala Glu Ala Ile Ile Asp Thr Leu Asp Asp Val Phe Tyr		
[1980]	130	135	140
[1981]	Asp Ala Asp Ala Gly Phe Leu Ala Tyr Pro Ala Thr Pro Pro Glu Ala		
[1982]	145	150	155
[1983]	Ser Gly Val Ser Val Leu Val Val Ala Ala Gly Thr Ser Asp Leu Pro		
[1984]	165	170	175
[1985]	Gln Ala Lys Glu Ala Leu His Thr Ala Ser Tyr Leu Gly Arg Ser Thr		
[1986]	180	185	190
[1987]	Ser Leu Ile Val Asp Phe Gly Val Ala Gly Ile His Arg Leu Leu Ser		
[1988]	195	200	205
[1989]	Tyr Glu Glu Glu Leu Arg Ala Ala Gly Val Leu Ile Val Ala Ala Gly		
[1990]	210	215	220
[1991]	Met Asp Gly Ala Leu Pro Gly Val Val Ala Gly Leu Val Ser Ala Pro		
[1992]	225	230	235
[1993]	Val Val Ala Leu Pro Thr Ser Val Gly Tyr Gly Ala Gly Ala Gly Gly		
[1994]	245	250	255
[1995]	Ile Ala Pro Leu Leu Thr Met Leu Asn Ala Cys Ala Pro Gly Val Gly		
[1996]	260	265	270
[1997]	Val Val Asn Ile Asp Asn Gly Tyr Gly Ala Gly His Leu Ala Ala Gln		
[1998]	275	280	285
[1999]	Ile Ala Ala Arg		
[2000]	290		
[2001]	<210> 49		
[2002]	<211> 819		
[2003]	<212> DNA		
[2004]	<213> 大肠杆菌		
[2005]	<400> 49		
[2006]	atggaaacct atgctgtttt tggtaatccg atagcccaca gcaaategcc attcattcat 60		
[2007]	cagcaatttg ctcagcaact gaatattgaa catccctatg ggcgcggtgtt ggcacccatc 120		
[2008]	aatgatttca tcaacacact gaacgccttc tttagtgtctg gtggtaaagg tgcgaatgtg 180		
[2009]	acgggtgcctt ttaaagaaga ggcttttgcc agagcggatg agcttactga acgggcagcg 240		
[2010]	ttggctggtg ctgttaatac cctcatgcgg ttagaagatg gacgcctgct gggtgacaat 300		
[2011]	accgatggtg taggcttggt aagcgatctg gaacgtctgt cttttatccg ccctgggtta 360		
[2012]	cgtattctgc ttatcggcgc tgggtggagca tctcgcggcg tactactgcc actcctttcc 420		
[2013]	ctggactgtg cggtgacaat aactaatcgg acggtatccc gcgcggaaga gttggctaaa 480		
[2014]	ttgtttgcgc aactggcag tattcaggcg ttgagtatgg acgaactgga aggtcatgag 540		
[2015]	tttgatctca ttattaatgc aacatccagt ggcacatcgtg gtgatattcc ggcatcccg 600		

[2016]	tcatacgtca ttcatccagg catttattgc tatgacatgt tctatcagaa aggaaaaact	660
[2017]	ccttttctgg catggtgtga gcagcgaggc tcaaagcgta atgctgatgg tttaggaatg	720
[2018]	ctgggtgcac aggcggtca tgcctttctt ctctggcacg gtgttctgcc tgacgtagaa	780
[2019]	ccagtataa agcaattgca ggaggaattg tccgcgtga	819
[2020]	<210> 50	
[2021]	<211> 272	
[2022]	<212> PRT	
[2023]	<213> 大肠杆菌	
[2024]	<400> 50	
[2025]	Met Glu Thr Tyr Ala Val Phe Gly Asn Pro Ile Ala His Ser Lys Ser	
[2026]	1 5 10 15	
[2027]	Pro Phe Ile His Gln Gln Phe Ala Gln Gln Leu Asn Ile Glu His Pro	
[2028]	20 25 30	
[2029]	Tyr Gly Arg Val Leu Ala Pro Ile Asn Asp Phe Ile Asn Thr Leu Asn	
[2030]	35 40 45	
[2031]	Ala Phe Phe Ser Ala Gly Gly Lys Gly Ala Asn Val Thr Val Pro Phe	
[2032]	50 55 60	
[2033]	Lys Glu Glu Ala Phe Ala Arg Ala Asp Glu Leu Thr Glu Arg Ala Ala	
[2034]	65 70 75 80	
[2035]	Leu Ala Gly Ala Val Asn Thr Leu Met Arg Leu Glu Asp Gly Arg Leu	
[2036]	85 90 95	
[2037]	Leu Gly Asp Asn Thr Asp Gly Val Gly Leu Leu Ser Asp Leu Glu Arg	
[2038]	100 105 110	
[2039]	Leu Ser Phe Ile Arg Pro Gly Leu Arg Ile Leu Leu Ile Gly Ala Gly	
[2040]	115 120 125	
[2041]	Gly Ala Ser Arg Gly Val Leu Leu Pro Leu Leu Ser Leu Asp Cys Ala	
[2042]	130 135 140	
[2043]	Val Thr Ile Thr Asn Arg Thr Val Ser Arg Ala Glu Glu Leu Ala Lys	
[2044]	145 150 155 160	
[2045]	Leu Phe Ala His Thr Gly Ser Ile Gln Ala Leu Ser Met Asp Glu Leu	
[2046]	165 170 175	
[2047]	Glu Gly His Glu Phe Asp Leu Ile Ile Asn Ala Thr Ser Ser Gly Ile	
[2048]	180 185 190	
[2049]	Ser Gly Asp Ile Pro Ala Ile Pro Ser Ser Leu Ile His Pro Gly Ile	
[2050]	195 200 205	
[2051]	Tyr Cys Tyr Asp Met Phe Tyr Gln Lys Gly Lys Thr Pro Phe Leu Ala	
[2052]	210 215 220	
[2053]	Trp Cys Glu Gln Arg Gly Ser Lys Arg Asn Ala Asp Gly Leu Gly Met	
[2054]	225 230 235 240	
[2055]	Leu Val Ala Gln Ala Ala His Ala Phe Leu Leu Trp His Gly Val Leu	
[2056]	245 250 255	
[2057]	Pro Asp Val Glu Pro Val Ile Lys Gln Leu Gln Glu Glu Leu Ser Ala	

[2058]	260	265	270
[2059]	<210> 51		
[2060]	<211> 35		
[2061]	<212> DNA		
[2062]	<213> 人工序列		
[2063]	<220>		
[2064]	<223> 引物		
[2065]	<400> 51		
[2066]	cggtacccgg ggatccttac ttccgcgtat ccaac 35		
[2067]	<210> 52		
[2068]	<211> 41		
[2069]	<212> DNA		
[2070]	<213> 人工序列		
[2071]	<220>		
[2072]	<223> 引物		
[2073]	<400> 52		
[2074]	ctaggaatcg cggccggtga actcctaaag aactatataa c 41		
[2075]	<210> 53		
[2076]	<211> 20		
[2077]	<212> DNA		
[2078]	<213> 人工序列		
[2079]	<220>		
[2080]	<223> 引物		
[2081]	<400> 53		
[2082]	ggccgcgatt cctagcatgc 20		
[2083]	<210> 54		
[2084]	<211> 35		
[2085]	<212> DNA		
[2086]	<213> 人工序列		
[2087]	<220>		
[2088]	<223> 引物		
[2089]	<400> 54		
[2090]	ccaagcttgc atgccagtca tcatcaacgg tgccg 35		
[2091]	<210> 55		
[2092]	<211> 21		
[2093]	<212> DNA		
[2094]	<213> 人工序列		
[2095]	<220>		
[2096]	<223> 引物		
[2097]	<400> 55		
[2098]	atctccgcag aagacgtact g 21		
[2099]	<210> 56		

[2100]	<211> 20
[2101]	<212> DNA
[2102]	<213> 人工序列
[2103]	<220>
[2104]	<223> 引物
[2105]	<400> 56
[2106]	tccgatcatg tatgacctcc 20
[2107]	<210> 57
[2108]	<211> 36
[2109]	<212> DNA
[2110]	<213> 人工序列
[2111]	<220>
[2112]	<223> 引物
[2113]	<400> 57
[2114]	cggtagcccg ggatcgcat agtgcttcca acgctc 36
[2115]	<210> 58
[2116]	<211> 36
[2117]	<212> DNA
[2118]	<213> 人工序列
[2119]	<220>
[2120]	<223> 引物
[2121]	<400> 58
[2122]	tagtccact caagattcct cgatattacc tacagg 36
[2123]	<210> 59
[2124]	<211> 20
[2125]	<212> DNA
[2126]	<213> 人工序列
[2127]	<220>
[2128]	<223> 引物
[2129]	<400> 59
[2130]	tcttgagtgg agctagggcc 20
[2131]	<210> 60
[2132]	<211> 37
[2133]	<212> DNA
[2134]	<213> 人工序列
[2135]	<220>
[2136]	<223> 引物
[2137]	<400> 60
[2138]	ccaagcttgc atgcccata agagcccagg agctctc 37
[2139]	<210> 61
[2140]	<211> 23
[2141]	<212> DNA

- [2142] <213> 人工序列
[2143] <220>
[2144] <223> 引物
[2145] <400> 61
[2146] cgccgcaaag tccaaataga aag 23
[2147] <210> 62
[2148] <211> 20
[2149] <212> DNA
[2150] <213> 人工序列
[2151] <220>
[2152] <223> 引物
[2153] <400> 62
[2154] ggattcttcc tgaactcagc 20
[2155] <210> 63
[2156] <211> 36
[2157] <212> DNA
[2158] <213> 人工序列
[2159] <220>
[2160] <223> 引物
[2161] <400> 63
[2162] cggtaccggg ggatcgggct cgtcctgaaa ttgcac 36
[2163] <210> 64
[2164] <211> 35
[2165] <212> DNA
[2166] <213> 人工序列
[2167] <220>
[2168] <223> 引物
[2169] <400> 64
[2170] tccgtcgtga gccatgttgt gcccacgaga ctacc 35
[2171] <210> 65
[2172] <211> 20
[2173] <212> DNA
[2174] <213> 人工序列
[2175] <220>
[2176] <223> 引物
[2177] <400> 65
[2178] atggetcacg acggattgcg 20
[2179] <210> 66
[2180] <211> 36
[2181] <212> DNA
[2182] <213> 人工序列
[2183] <220>

[2184]	<223> 引物
[2185]	<400> 66
[2186]	ccaagcttgc atgcccgggtt gcagccttca taaacg 36
[2187]	<210> 67
[2188]	<211> 21
[2189]	<212> DNA
[2190]	<213> 人工序列
[2191]	<220>
[2192]	<223> 引物
[2193]	<400> 67
[2194]	agaccaatga gtaccaacc g 21
[2195]	<210> 68
[2196]	<211> 20
[2197]	<212> DNA
[2198]	<213> 人工序列
[2199]	<220>
[2200]	<223> 引物
[2201]	<400> 68
[2202]	tcagcgtctg gctcagctac 20
[2203]	<210> 69
[2204]	<211> 36
[2205]	<212> DNA
[2206]	<213> 人工序列
[2207]	<220>
[2208]	<223> 引物
[2209]	<400> 69
[2210]	cggtacccgg ggatcaaccc cagctcaaatt aacacc 36
[2211]	<210> 70
[2212]	<211> 37
[2213]	<212> DNA
[2214]	<213> 人工序列
[2215]	<220>
[2216]	<223> 引物
[2217]	<400> 70
[2218]	tttcaacaca atccgtcctt ctcgcttga ttacttg 37
[2219]	<210> 71
[2220]	<211> 23
[2221]	<212> DNA
[2222]	<213> 人工序列
[2223]	<220>
[2224]	<223> 引物
[2225]	<400> 71

[2226] cggattgtgt tgaaattgct ctg 23
[2227] <210> 72
[2228] <211> 35
[2229] <212> DNA
[2230] <213> 人工序列
[2231] <220>
[2232] <223> 引物
[2233] <400> 72
[2234] ccaagcttgc atgcctcacc acgggaatct tcagg 35
[2235] <210> 73
[2236] <211> 20
[2237] <212> DNA
[2238] <213> 人工序列
[2239] <220>
[2240] <223> 引物
[2241] <400> 73
[2242] ccggactggg gtgtgttttg 20
[2243] <210> 74
[2244] <211> 20
[2245] <212> DNA
[2246] <213> 人工序列
[2247] <220>
[2248] <223> 引物
[2249] <400> 74
[2250] cccggaaaat acggtatagc 20
[2251] <210> 75
[2252] <211> 35
[2253] <212> DNA
[2254] <213> 人工序列
[2255] <220>
[2256] <223> 引物
[2257] <400> 75
[2258] ccaagcttgc atgccccatc gcattgccga aaagc 35
[2259] <210> 76
[2260] <211> 35
[2261] <212> DNA
[2262] <213> 人工序列
[2263] <220>
[2264] <223> 引物
[2265] <400> 76
[2266] aaagatcggg tcaatgcagt tcgcggggcg aacat 35
[2267] <210> 77

[2268]	<211> 35
[2269]	<212> DNA
[2270]	<213> 人工序列
[2271]	<220>
[2272]	<223> 引物
[2273]	<400> 77
[2274]	cgccccgcga actgcattga cccgatcttt atacc 35
[2275]	<210> 78
[2276]	<211> 35
[2277]	<212> DNA
[2278]	<213> 人工序列
[2279]	<220>
[2280]	<223> 引物
[2281]	<400> 78
[2282]	cggtacccgg ggatcaacgt tgacggtgat gccat 35
[2283]	<210> 79
[2284]	<211> 25
[2285]	<212> DNA
[2286]	<213> 人工序列
[2287]	<220>
[2288]	<223> 引物
[2289]	<400> 79
[2290]	gaaatgtcat acttcagcca tcagg 25
[2291]	<210> 80
[2292]	<211> 25
[2293]	<212> DNA
[2294]	<213> 人工序列
[2295]	<220>
[2296]	<223> 引物
[2297]	<400> 80
[2298]	tgcgagtgat gaaatcctga aactt 25
[2299]	<210> 81
[2300]	<211> 35
[2301]	<212> DNA
[2302]	<213> 人工序列
[2303]	<220>
[2304]	<223> 引物
[2305]	<400> 81
[2306]	ccaagcttgc atgcctttcg cggtgaatca accca 35
[2307]	<210> 82
[2308]	<211> 35
[2309]	<212> DNA

- [2310] <213> 人工序列
- [2311] <220>
- [2312] <223> 引物
- [2313] <400> 82
- [2314] caggtcaaag ctaaggcatt gtctgtaaat gggca 35
- [2315] <210> 83
- [2316] <211> 35
- [2317] <212> DNA
- [2318] <213> 人工序列
- [2319] <220>
- [2320] <223> 引物
- [2321] <400> 83
- [2322] ctaaggggtt tagcaatgcc caatcaggcc cactt 35
- [2323] <210> 84
- [2324] <211> 35
- [2325] <212> DNA
- [2326] <213> 人工序列
- [2327] <220>
- [2328] <223> 引物
- [2329] <400> 84
- [2330] cggtaccgg ggatcttagg gtacgagggt aagtg 35
- [2331] <210> 85
- [2332] <211> 93
- [2333] <212> DNA
- [2334] <213> 人工序列
- [2335] <220>
- [2336] <223> DNA fragment of P2 启动子
- [2337] <400> 85
- [2338] cttagctttg acctgcacaa atagttgcaa attgtccac atacacataa agtagcttgc 60
- [2339] gtatttaaaa ttatgaacct aaggggttta gca 93
- [2340] <210> 86
- [2341] <211> 35
- [2342] <212> DNA
- [2343] <213> 人工序列
- [2344] <220>
- [2345] <223> 引物
- [2346] <400> 86
- [2347] atttacagac aatgccttag ctttgacctg cacaa 35
- [2348] <210> 87
- [2349] <211> 31
- [2350] <212> DNA
- [2351] <213> 人工序列

[2352]	<220>	
[2353]	<223>	引物
[2354]	<400>	87
[2355]	ggcctgattg ggcattgcta aaccccttag g	31
[2356]	<210>	88
[2357]	<211>	1686
[2358]	<212>	DNA
[2359]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[2360]	<400>	88
[2361]	atgacaacaa ccaccggaag tgccccggcca gcacgtgccg ccaggaagcc taagccccgaa	60
[2362]	ggccaatgga aaatcgacgg caccgagccg cttaaccatg ccgaggaaat taagcaagaa	120
[2363]	gaaccgcgtt ttgctgtcaa gcagcgggtc attgatattt actccaagca gggtttttct	180
[2364]	tccattgcac cggatgacat tgccccacgc tttaagtggg tgggcattta caccagcgt	240
[2365]	aagcaggatc tgggcgggtga actgaccggg cagcttcctg atgatgagct gcaggatgag	300
[2366]	tacttcatga tgcgtgtgcg tttttagtgg ggactggctt cccctgagcg cctgctgcc	360
[2367]	gtgggtgaaa tttctaggga ttatgtcgt tccaccgcgg acttcaccga ccgccagaac	420
[2368]	attcagctgc actggattcg tattgaagat gtgcctgcga tctgggagaa gctagaaacc	480
[2369]	gtcggactgt ccaccatgct tggttgcggg gacgttcac gtgttatctt gggctcccca	540
[2370]	gtttctggcg tagctgctga agagctgac gatgccaccc cggctatcga tgcgattcgt	600
[2371]	gagcgctacc tagacaagga agagttccac aaccttcctc gtaagtttaa gactgctatc	660
[2372]	actggcaacc agcgcagga tgttaccac gaaatccagg acgtttcctt cgttccttcg	720
[2373]	attcaccag aattcggccc aggattgag tgctttgtgg gcggcggcct gtccaccaac	780
[2374]	ccaatgcttg ctcagccact tggttcttgg attccacttg atgaggttc agaagtgtgg	840
[2375]	gctggcgtcg ccggaatttt ccgcgactac ggcttccgac gcctgcgtaa ccgtgctcgc	900
[2376]	ctcaagttct tgggtggcaca gtgggtatt gagaagttcc gtgaagttct tgagaccgaa	960
[2377]	tacctcgagc gcaagctgat tgatggccca gttgttacca ccaacctgg ctaccgtgac	1020
[2378]	cacattggca ttcaccaca aaaggacggc aagttctacc tcggtgtgaa gccaacgtt	1080
[2379]	ggacacacca ccggtgagca gctcattgcc attgctgatg ttgcagaaaa gcacggcatc	1140
[2380]	accaggattc gtaccacggc ggaaaaggaa ctgctcttcc tcgatattga gcgagagaa	1200
[2381]	cttactaccg ttgcacgtga cctggatgaa atcggactgt actcttcacc ttccgagttc	1260
[2382]	cgccgcggca tcatttctg caccggcttg gagttctgca agcttgcgca cgcaaccacc	1320
[2383]	aagtcacgag caattgagct tgtggacgaa ctggaagagc gactcggcga tttggatgtt	1380
[2384]	cccatcaaga ttgccctgaa cggttgccct aactcttggt cagcaccca ggtttccgac	1440
[2385]	atcggattca aggacagac cgtcactgat gctgacggca accgcgttga aggtttccag	1500
[2386]	gttcacctgg gcggttccat gaacttgat ccaaacttcg gacgcaagct caaggccac	1560
[2387]	aaggttattg ccgatgaagt gggagagtac gtcactcgcg ttgttaccga cttcaaggaa	1620
[2388]	cagcggcacg aggacgagca cttccgcgat tgggtccagc gggccgctga ggaagatttg	1680
[2389]	gtgtga	1686
[2390]	<210>	89
[2391]	<211>	561
[2392]	<212>	PRT
[2393]	<213>	谷氨酸棒杆菌

[2394]	<400> 89
[2395]	Met Thr Thr Thr Thr Gly Ser Ala Arg Pro Ala Arg Ala Ala Arg Lys
[2396]	1 5 10 15
[2397]	Pro Lys Pro Glu Gly Gln Trp Lys Ile Asp Gly Thr Glu Pro Leu Asn
[2398]	20 25 30
[2399]	His Ala Glu Glu Ile Lys Gln Glu Glu Pro Ala Phe Ala Val Lys Gln
[2400]	35 40 45
[2401]	Arg Val Ile Asp Ile Tyr Ser Lys Gln Gly Phe Ser Ser Ile Ala Pro
[2402]	50 55 60
[2403]	Asp Asp Ile Ala Pro Arg Phe Lys Trp Leu Gly Ile Tyr Thr Gln Arg
[2404]	65 70 75 80
[2405]	Lys Gln Asp Leu Gly Gly Glu Leu Thr Gly Gln Leu Pro Asp Asp Glu
[2406]	85 90 95
[2407]	Leu Gln Asp Glu Tyr Phe Met Met Arg Val Arg Phe Asp Gly Gly Leu
[2408]	100 105 110
[2409]	Ala Ser Pro Glu Arg Leu Arg Ala Val Gly Glu Ile Ser Arg Asp Tyr
[2410]	115 120 125
[2411]	Ala Arg Ser Thr Ala Asp Phe Thr Asp Arg Gln Asn Ile Gln Leu His
[2412]	130 135 140
[2413]	Trp Ile Arg Ile Glu Asp Val Pro Ala Ile Trp Glu Lys Leu Glu Thr
[2414]	145 150 155 160
[2415]	Val Gly Leu Ser Thr Met Leu Gly Cys Gly Asp Val Pro Arg Val Ile
[2416]	165 170 175
[2417]	Leu Gly Ser Pro Val Ser Gly Val Ala Ala Glu Glu Leu Ile Asp Ala
[2418]	180 185 190
[2419]	Thr Pro Ala Ile Asp Ala Ile Arg Glu Arg Tyr Leu Asp Lys Glu Glu
[2420]	195 200 205
[2421]	Phe His Asn Leu Pro Arg Lys Phe Lys Thr Ala Ile Thr Gly Asn Gln
[2422]	210 215 220
[2423]	Arg Gln Asp Val Thr His Glu Ile Gln Asp Val Ser Phe Val Pro Ser
[2424]	225 230 235 240
[2425]	Ile His Pro Glu Phe Gly Pro Gly Phe Glu Cys Phe Val Gly Gly Gly
[2426]	245 250 255
[2427]	Leu Ser Thr Asn Pro Met Leu Ala Gln Pro Leu Gly Ser Trp Ile Pro
[2428]	260 265 270
[2429]	Leu Asp Glu Val Pro Glu Val Trp Ala Gly Val Ala Gly Ile Phe Arg
[2430]	275 280 285
[2431]	Asp Tyr Gly Phe Arg Arg Leu Arg Asn Arg Ala Arg Leu Lys Phe Leu
[2432]	290 295 300
[2433]	Val Ala Gln Trp Gly Ile Glu Lys Phe Arg Glu Val Leu Glu Thr Glu
[2434]	305 310 315 320
[2435]	Tyr Leu Glu Arg Lys Leu Ile Asp Gly Pro Val Val Thr Thr Asn Pro

[2436]	325	330	335
[2437]	Gly Tyr Arg Asp His Ile Gly Ile His Pro Gln Lys Asp Gly Lys Phe		
[2438]	340	345	350
[2439]	Tyr Leu Gly Val Lys Pro Thr Val Gly His Thr Thr Gly Glu Gln Leu		
[2440]	355	360	365
[2441]	Ile Ala Ile Ala Asp Val Ala Glu Lys His Gly Ile Thr Arg Ile Arg		
[2442]	370	375	380
[2443]	Thr Thr Ala Glu Lys Glu Leu Leu Phe Leu Asp Ile Glu Arg Glu Asn		
[2444]	385	390	395
[2445]	Leu Thr Thr Val Ala Arg Asp Leu Asp Glu Ile Gly Leu Tyr Ser Ser		
[2446]	405	410	415
[2447]	Pro Ser Glu Phe Arg Arg Gly Ile Ile Ser Cys Thr Gly Leu Glu Phe		
[2448]	420	425	430
[2449]	Cys Lys Leu Ala His Ala Thr Thr Lys Ser Arg Ala Ile Glu Leu Val		
[2450]	435	440	445
[2451]	Asp Glu Leu Glu Glu Arg Leu Gly Asp Leu Asp Val Pro Ile Lys Ile		
[2452]	450	455	460
[2453]	Ala Leu Asn Gly Cys Pro Asn Ser Cys Ala Arg Thr Gln Val Ser Asp		
[2454]	465	470	475
[2455]	Ile Gly Phe Lys Gly Gln Thr Val Thr Asp Ala Asp Gly Asn Arg Val		
[2456]	485	490	495
[2457]	Glu Gly Phe Gln Val His Leu Gly Gly Ser Met Asn Leu Asp Pro Asn		
[2458]	500	505	510
[2459]	Phe Gly Arg Lys Leu Lys Gly His Lys Val Ile Ala Asp Glu Val Gly		
[2460]	515	520	525
[2461]	Glu Tyr Val Thr Arg Val Val Thr His Phe Lys Glu Gln Arg His Glu		
[2462]	530	535	540
[2463]	Asp Glu His Phe Arg Asp Trp Val Gln Arg Ala Ala Glu Glu Asp Leu		
[2464]	545	550	555
[2465]	Val		
[2466]	<210> 90		
[2467]	<211> 249		
[2468]	<212> DNA		
[2469]	<213> 谷氨酸棒杆菌		
[2470]	<400> 90		
[2471]	gtgagtcttc ggaggaaacc caatccaac cgcaaccacc ctctgtactg cccatactgc	60	
[2472]	gcgggagaag ttcttttccc cgatgagcaa acagaattcg cgtggttg tgcggttg	120	
[2473]	accagagttt ttgaagtga atatcacggc caggacgatc cagtgcacag gccagcacca	180	
[2474]	gcaaagtcca catcgcaagc attaaaagaa tctctcgaaa gacacaaaag aggtgagtcg	240	
[2475]	caacaatga		249
[2476]	<210> 91		
[2477]	<211> 82		

[2478]	<212> PRT	
[2479]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[2480]	<400> 91	
[2481]	Met Ser Leu Arg Arg Lys Pro Asn Pro Asn Arg Asn His Pro Leu Tyr	
[2482]	1 5 10 15	
[2483]	Cys Pro Tyr Cys Ala Gly Glu Val Leu Phe Pro Asp Glu Gln Thr Glu	
[2484]	20 25 30	
[2485]	Phe Ala Trp Leu Cys Ala Asp Cys Thr Arg Val Phe Glu Val Lys Tyr	
[2486]	35 40 45	
[2487]	His Gly Gln Asp Asp Pro Val His Arg Pro Ala Pro Ala Lys Ser Thr	
[2488]	50 55 60	
[2489]	Ser Gln Ala Leu Lys Glu Ser Leu Glu Arg His Lys Arg Gly Glu Ser	
[2490]	65 70 75 80	
[2491]	Gln Gln	
[2492]	<210> 92	
[2493]	<211> 786	
[2494]	<212> DNA	
[2495]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[2496]	<400> 92	
[2497]	atgagctttc aactagttaa cgccctgaaa aatactggtt cggtaaaaga tcccagagatc	60
[2498]	tcacccgaag gacctcgac gaccacaccg ttgtcaccag aggtagcaaa acacaacgag	120
[2499]	gaactcgtcg aaaagcatgc tgctgcgttg tatgacgcca gcgcgcaaga gatcctggaa	180
[2500]	tggacagccg agcacacgcc gggcgctatt gcagtgcct tgagcatgga aaacaccgtg	240
[2501]	ctggcggagc tggtgcgcgc gcacctgcc gaagctgatt tcctcttttt ggacaccggt	300
[2502]	taccacttca aggaaactct tgaagttgcc cgccaggtag atgagcgta tccccagaag	360
[2503]	cttgcaccg cgctgccaat cctcaagcgc acggagcagg attccattta tggctctaac	420
[2504]	ctgtaccgca gcaaccacgc ggcgtgctgc cgaatgcgca aagttgaacc gctggcggcg	480
[2505]	tcgttaagcc catacgttg ctggatcacc ggcctgcgcc gcgctgatgg cccaaccctg	540
[2506]	gctcaagccc ctgcgtgtag cttggatgcc accggcaggc tcaagatttc tccaattatc	600
[2507]	acctggteat tggaggaaac caacgagttc attgcggaca acaacctcat cgatcaccca	660
[2508]	cttaccatc agggttatcc atcaattgga tgcgaaacct gcacccttcc tgttgctgaa	720
[2509]	ggacaagacc ctagggcccg ccgttgggct ggaaacgcca agacagaatg cggacttcac	780
[2510]	tcatga	786
[2511]	<210> 93	
[2512]	<211> 261	
[2513]	<212> PRT	
[2514]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[2515]	<400> 93	
[2516]	Met Ser Phe Gln Leu Val Asn Ala Leu Lys Asn Thr Gly Ser Val Lys	
[2517]	1 5 10 15	
[2518]	Asp Pro Glu Ile Ser Pro Glu Gly Pro Arg Thr Thr Thr Pro Leu Ser	
[2519]	20 25 30	

[2520]	Pro Glu Val Ala Lys His Asn Glu Glu Leu Val Glu Lys His Ala Ala	
[2521]	35	40
[2522]	Ala Leu Tyr Asp Ala Ser Ala Gln Glu Ile Leu Glu Trp Thr Ala Glu	
[2523]	50	55
[2524]	His Thr Pro Gly Ala Ile Ala Val Thr Leu Ser Met Glu Asn Thr Val	
[2525]	65	70
[2526]	Leu Ala Glu Leu Ala Ala Arg His Leu Pro Glu Ala Asp Phe Leu Phe	
[2527]	85	90
[2528]	Leu Asp Thr Gly Tyr His Phe Lys Glu Thr Leu Glu Val Ala Arg Gln	
[2529]	100	105
[2530]	Val Asp Glu Arg Tyr Ser Gln Lys Leu Val Thr Ala Leu Pro Ile Leu	
[2531]	115	120
[2532]	Lys Arg Thr Glu Gln Asp Ser Ile Tyr Gly Leu Asn Leu Tyr Arg Ser	
[2533]	130	135
[2534]	Asn Pro Ala Ala Cys Cys Arg Met Arg Lys Val Glu Pro Leu Ala Ala	
[2535]	145	150
[2536]	Ser Leu Ser Pro Tyr Ala Gly Trp Ile Thr Gly Leu Arg Arg Ala Asp	
[2537]	165	170
[2538]	Gly Pro Thr Arg Ala Gln Ala Pro Ala Leu Ser Leu Asp Ala Thr Gly	
[2539]	180	185
[2540]	Arg Leu Lys Ile Ser Pro Ile Ile Thr Trp Ser Leu Glu Glu Thr Asn	
[2541]	195	200
[2542]	Glu Phe Ile Ala Asp Asn Asn Leu Ile Asp His Pro Leu Thr His Gln	
[2543]	210	215
[2544]	Gly Tyr Pro Ser Ile Gly Cys Glu Thr Cys Thr Leu Pro Val Ala Glu	
[2545]	225	230
[2546]	Gly Gln Asp Pro Arg Ala Gly Arg Trp Ala Gly Asn Ala Lys Thr Glu	
[2547]	245	250
[2548]	Cys Gly Leu His Ser	255
[2549]	260	
[2550]	<210> 94	
[2551]	<211> 954	
[2552]	<212> DNA	
[2553]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[2554]	<400> 94	
[2555]	ttgggctgga aacgccaaga cagaatgcgg acttcactca tgaccacaac cgttgcatca	60
[2556]	gaactttccc cacaccttaa agatcttgaa aatgaatcca tccacatcct ccgcgaggtg	120
[2557]	gctggccagt ttgataaggt cggcctgctg ttttcggcgg gtaaggattc cgtcgtggtg	180
[2558]	tacgagcttg cgcgcgcgcg tttcgtccca gctaactgc cttttgaatt gctgcacgtg	240
[2559]	gacaccggcc acaacttccc agaggttttg gaattccgcg acaacctggt ggagcgcacc	300
[2560]	ggcgcccgcc tgcgcgtagc taaagtccag gactggatcg atcgcggtga cctgcaggaa	360
[2561]	cgcccagacg gcacccgcaa cccactgcag actgtccett tgggtggagac catcgctgag	420

[2562] cagggctacg acgccgtgct tgggtggcgt cgccgcgatg aggagcgtgc ccgcgccaag 480
 [2563] gagcgtgtgt tctctgtgcg tgactccttc ggtggttggg atccacgccg tcagcgccca 540
 [2564] gagctgtgga ccctctacaa cgggtggccac ctgccaggcg aaaacatccg tgttttccca 600
 [2565] atctccaact ggactgaagc tgacatctgg gagtacatcg gcgcccgtgg catcgaactt 660
 [2566] ccaccgatct acttctccca cgaccgcgaa gttttcgagc gcgacggcat gtggctgacc 720
 [2567] gcaggcgagt ggggtggacc aaagaaggcg gaggagatcg tcaccaagac tgtccgctac 780
 [2568] cgcaccgtcg gcgatatgtc ctgcaccggg gctgtgctct cagaagcccg caccattgac 840
 [2569] gatgtgatcg aagagatgc cactccacc cttaccgaac gtggcgcaac ccgcgccgat 900
 [2570] gaccgcctca gcgaatccgc aatggaagac cgcaagaagg aaggctactt ctga 954
 [2571] <210> 95
 [2572] <211> 317
 [2573] <212> PRT
 [2574] <213> 谷氨酸棒杆菌
 [2575] <400> 95
 [2576] Met Gly Trp Lys Arg Gln Asp Arg Met Arg Thr Ser Leu Met Thr Thr
 [2577] 1 5 10 15
 [2578] Thr Val Ala Ser Glu Leu Ser Pro His Leu Lys Asp Leu Glu Asn Glu
 [2579] 20 25 30
 [2580] Ser Ile His Ile Leu Arg Glu Val Ala Gly Gln Phe Asp Lys Val Gly
 [2581] 35 40 45
 [2582] Leu Leu Phe Ser Gly Gly Lys Asp Ser Val Val Val Tyr Glu Leu Ala
 [2583] 50 55 60
 [2584] Arg Arg Ala Phe Ala Pro Ala Asn Val Pro Phe Glu Leu Leu His Val
 [2585] 65 70 75 80
 [2586] Asp Thr Gly His Asn Phe Pro Glu Val Leu Glu Phe Arg Asp Asn Leu
 [2587] 85 90 95
 [2588] Val Glu Arg Thr Gly Ala Arg Leu Arg Val Ala Lys Val Gln Asp Trp
 [2589] 100 105 110
 [2590] Ile Asp Arg Gly Asp Leu Gln Glu Arg Pro Asp Gly Thr Arg Asn Pro
 [2591] 115 120 125
 [2592] Leu Gln Thr Val Pro Leu Val Glu Thr Ile Ala Glu Gln Gly Tyr Asp
 [2593] 130 135 140
 [2594] Ala Val Leu Gly Gly Ala Arg Arg Asp Glu Glu Arg Ala Arg Ala Lys
 [2595] 145 150 155 160
 [2596] Glu Arg Val Phe Ser Val Arg Asp Ser Phe Gly Gly Trp Asp Pro Arg
 [2597] 165 170 175
 [2598] Arg Gln Arg Pro Glu Leu Trp Thr Leu Tyr Asn Gly Gly His Leu Pro
 [2599] 180 185 190
 [2600] Gly Glu Asn Ile Arg Val Phe Pro Ile Ser Asn Trp Thr Glu Ala Asp
 [2601] 195 200 205
 [2602] Ile Trp Glu Tyr Ile Gly Ala Arg Gly Ile Glu Leu Pro Pro Ile Tyr
 [2603] 210 215 220

[2604]	Phe Ser His Asp Arg Glu Val Phe Glu Arg Asp Gly Met Trp Leu Thr	
[2605]	225	230 235 240
[2606]	Ala Gly Glu Trp Gly Gly Pro Lys Lys Gly Glu Glu Ile Val Thr Lys	
[2607]	245	250 255
[2608]	Thr Val Arg Tyr Arg Thr Val Gly Asp Met Ser Cys Thr Gly Ala Val	
[2609]	260	265 270
[2610]	Leu Ser Glu Ala Arg Thr Ile Asp Asp Val Ile Glu Glu Ile Ala Thr	
[2611]	275	280 285
[2612]	Ser Thr Leu Thr Glu Arg Gly Ala Thr Arg Ala Asp Asp Arg Leu Ser	
[2613]	290	295 300
[2614]	Glu Ser Ala Met Glu Asp Arg Lys Lys Glu Gly Tyr Phe	
[2615]	305	310 315
[2616]	<210> 96	
[2617]	<211> 1302	
[2618]	<212> DNA	
[2619]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[2620]	<400> 96	
[2621]	atgactgctc caaccttgaa taaagcatcc gaaaagattg catcacgcga gacccttcgt	60
[2622]	ctgtgcaccg caggttccgt agatgatggc aagtccacct tcgtcggccg cctcctgcac	120
[2623]	gacaccaagt ctgtttctgc tgatcagcta gtttccgtag agcgcacctc cgccgaccgc	180
[2624]	ggcttcgaag gctcgcacct gtccctcctc gtgcacggcc tgcgcgccga gcgtgagcag	240
[2625]	ggcatcacca tcgacgttgc ctaccgctac ttgcgcactg acaagcgcac cttcatcctg	300
[2626]	gctgacaccc caggccacgt gcagtacacc cgcaacaccg tcaccggcgt ctccacctcc	360
[2627]	caggttgtag ttttgcttgt cgacgcccgc cagggcgtcg tcgagcagac ccgccgccac	420
[2628]	ctgtccgtat cggccctgct gggcgtgcgc acggtgatcc tcgcagtcaa caaaattgac	480
[2629]	cttgttgatt acagcgaaga agtcttccgc aacattgaaa aagaattcgt ttctttggct	540
[2630]	tccgcttttag atgtcaccga caccacgtc gttccgatct ccgcactcaa gggcgacaac	600
[2631]	gttcgagaac cttccacca catggactgg tacgcgggac caaccgtgct ggaaatcctg	660
[2632]	gaaaacgttg aagtttcccg cggcgtgca cagcactgg gtttccgtt cccaatccag	720
[2633]	tacgtcatcc gcgagcacgc aaccgattac cgcggctacg ccggcaccat caacgtgggt	780
[2634]	tccatctccg tgggcgatac cgtgcaccta cctgaaggcc gcaccacca ggtaaccac	840
[2635]	atcgattccg ctgacggatc cctccaaacc gcatcagttg gagaagccgt tgtcctgcgc	900
[2636]	ctagcccagg aaatcgacct catccgcggc gaactcatcg caggctccga tcgcccagaa	960
[2637]	tccgttcgtt cttcaacgc cactgtcgtt ggtctagcag atgcactat caaaccaggt	1020
[2638]	gcagcagtca aggtccgcta cggcaccgag ctggtccgcg gacgcgtcgc agccatcgaa	1080
[2639]	cgagtcctcg acatcgacgg cgtcaacgac aacgaagcac cagaaacctc cggcctcaac	1140
[2640]	gacatcgcg cagtgcgcat cgatgttgca ggtgaattgg aagttgaaga ttacgtgct	1200
[2641]	cgtggcgcaa ttggctcctt cttcttatac gatcaatcct ccggcgacac cctcgtgcc	1260
[2642]	ggtttggttg gccaccgct acgcaataac tggtcgatct ag	1302
[2643]	<210> 97	
[2644]	<211> 433	
[2645]	<212> PRT	

[2646]	<213> 谷氨酸棒杆菌															
[2647]	<400> 97															
[2648]	Met	Thr	Ala	Pro	Thr	Leu	Asn	Lys	Ala	Ser	Glu	Lys	Ile	Ala	Ser	Arg
[2649]	1				5					10					15	
[2650]	Glu	Thr	Leu	Arg	Leu	Cys	Thr	Ala	Gly	Ser	Val	Asp	Asp	Gly	Lys	Ser
[2651]				20					25					30		
[2652]	Thr	Phe	Val	Gly	Arg	Leu	Leu	His	Asp	Thr	Lys	Ser	Val	Leu	Ala	Asp
[2653]			35					40					45			
[2654]	Gln	Leu	Ala	Ser	Val	Glu	Arg	Thr	Ser	Ala	Asp	Arg	Gly	Phe	Glu	Gly
[2655]		50					55					60				
[2656]	Leu	Asp	Leu	Ser	Leu	Leu	Val	Asp	Gly	Leu	Arg	Ala	Glu	Arg	Glu	Gln
[2657]	65				70					75					80	
[2658]	Gly	Ile	Thr	Ile	Asp	Val	Ala	Tyr	Arg	Tyr	Phe	Ala	Thr	Asp	Lys	Arg
[2659]				85					90					95		
[2660]	Thr	Phe	Ile	Leu	Ala	Asp	Thr	Pro	Gly	His	Val	Gln	Tyr	Thr	Arg	Asn
[2661]			100					105					110			
[2662]	Thr	Val	Thr	Gly	Val	Ser	Thr	Ser	Gln	Val	Val	Val	Leu	Leu	Val	Asp
[2663]			115					120					125			
[2664]	Ala	Arg	His	Gly	Val	Val	Glu	Gln	Thr	Arg	Arg	His	Leu	Ser	Val	Ser
[2665]		130					135					140				
[2666]	Ala	Leu	Leu	Gly	Val	Arg	Thr	Val	Ile	Leu	Ala	Val	Asn	Lys	Ile	Asp
[2667]	145					150				155					160	
[2668]	Leu	Val	Asp	Tyr	Ser	Glu	Glu	Val	Phe	Arg	Asn	Ile	Glu	Lys	Glu	Phe
[2669]				165					170				175			
[2670]	Val	Ser	Leu	Ala	Ser	Ala	Leu	Asp	Val	Thr	Asp	Thr	His	Val	Val	Pro
[2671]			180						185				190			
[2672]	Ile	Ser	Ala	Leu	Lys	Gly	Asp	Asn	Val	Ala	Glu	Pro	Ser	Thr	His	Met
[2673]		195					200						205			
[2674]	Asp	Trp	Tyr	Ala	Gly	Pro	Thr	Val	Leu	Glu	Ile	Leu	Glu	Asn	Val	Glu
[2675]		210					215					220				
[2676]	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Ala	His	Asp	Leu	Gly	Phe	Arg	Phe	Pro	Ile	Gln
[2677]	225				230					235					240	
[2678]	Tyr	Val	Ile	Arg	Glu	His	Ala	Thr	Asp	Tyr	Arg	Gly	Tyr	Ala	Gly	Thr
[2679]				245					250				255			
[2680]	Ile	Asn	Ala	Gly	Ser	Ile	Ser	Val	Gly	Asp	Thr	Val	His	Leu	Pro	Glu
[2681]			260						265				270			
[2682]	Gly	Arg	Thr	Thr	Gln	Val	Thr	His	Ile	Asp	Ser	Ala	Asp	Gly	Ser	Leu
[2683]			275					280					285			
[2684]	Gln	Thr	Ala	Ser	Val	Gly	Glu	Ala	Val	Val	Leu	Arg	Leu	Ala	Gln	Glu
[2685]		290					295					300				
[2686]	Ile	Asp	Leu	Ile	Arg	Gly	Glu	Leu	Ile	Ala	Gly	Ser	Asp	Arg	Pro	Glu
[2687]	305				310					315					320	

[2688]	Ser Val Arg Ser Phe Asn Ala Thr Val Val Gly Leu Ala Asp Arg Thr		
[2689]		325	330 335
[2690]	Ile Lys Pro Gly Ala Ala Val Lys Val Arg Tyr Gly Thr Glu Leu Val		
[2691]		340	345 350
[2692]	Arg Gly Arg Val Ala Ala Ile Glu Arg Val Leu Asp Ile Asp Gly Val		
[2693]		355	360 365
[2694]	Asn Asp Asn Glu Ala Pro Glu Thr Tyr Gly Leu Asn Asp Ile Ala His		
[2695]		370	375 380
[2696]	Val Arg Ile Asp Val Ala Gly Glu Leu Glu Val Glu Asp Tyr Ala Ala		
[2697]		385	390 395 400
[2698]	Arg Gly Ala Ile Gly Ser Phe Leu Leu Ile Asp Gln Ser Ser Gly Asp		
[2699]		405	410 415
[2700]	Thr Leu Ala Ala Gly Leu Val Gly His Arg Leu Arg Asn Asn Trp Ser		
[2701]		420	425 430
[2702]	Ile		
[2703]	<210> 98		
[2704]	<211> 900		
[2705]	<212> DNA		
[2706]	<213> 谷氨酸棒杆菌		
[2707]	<400> 98		
[2708]	ttggctcctt cttcttatac gatcaatcct ccggcgacac cctcgctgcc ggtttggttg	60	
[2709]	gccaccgcct acgcaataac tggatgatct agaccagtgt ctgtgaaggc aaggtgccgg	120	
[2710]	cttagatgcc ggcgccatgc ctacatccag ctaagacccc ctttaggaca cctcatgatt	180	
[2711]	cccttgatta cgctttccca cggttccgc aaaaagtccg cagctgcagg tattactgcg	240	
[2712]	ctgactcatg aggccggacg aatgctggaa acaccagccg tggaagcgca tttagagctt	300	
[2713]	gctgaacctt cccttgatca gggtgtggca acgctcagtg cggaaggcgt aaccagggca	360	
[2714]	gcgttggttc ctttgcgtt tagcaatgcg tatcacgcaa agattgacgt tcctgaggca	420	
[2715]	gtaaaagatg cttcagaaaa gtatggtgtg gaacttctcg tgggtccgca tttgggcact	480	
[2716]	ggctccgatg tagccagcgt gcttgccgag cggttgcgtg cggacgcccc cacagatgcc	540	
[2717]	catgtgattt tgtattccgt tggcagctca cacgtgtccg ccaatgaatc agtcacgat	600	
[2718]	cttgcccaca ccattgctct cctcactggc ttttcggttg aggtggtgcc cgctaccggt	660	
[2719]	gggccaggtg ccggcggcgc cggagtaata gaggtggcct cgaaacacaa ggccgtccac	720	
[2720]	atcctgccgc tgtttgttac ggaaggtttg ctgctggatc gggttattga tcaatccgcc	780	
[2721]	aacatgcag ctgccaccg cagcaacttt acctattccg aaccctaac tactgacctc	840	
[2722]	gcaccacttg ttgcagcccc ttaccacgct gcattgagcg cactgctggc acatatctaa	900	
[2723]	<210> 99		
[2724]	<211> 299		
[2725]	<212> PRT		
[2726]	<213> 谷氨酸棒杆菌		
[2727]	<400> 99		
[2728]	Met Ala Pro Ser Phe Leu Ser Ile Asn Pro Pro Ala Thr Pro Ser Leu		
[2729]	1	5	10 15

[2730]	Pro Val Trp Leu Ala Thr Ala Tyr Ala Ile Thr Gly Arg Ser Arg Pro
[2731]	20 25 30
[2732]	Val Ala Val Lys Ala Arg Cys Arg Leu Arg Cys Arg Arg Leu Ala Tyr
[2733]	35 40 45
[2734]	Ile Gln Leu Arg Pro Pro Leu Gly His Leu Met Ile Pro Leu Ile Thr
[2735]	50 55 60
[2736]	Leu Ser His Gly Ser Arg Lys Lys Ser Ala Ala Ala Gly Ile Thr Ala
[2737]	65 70 75 80
[2738]	Leu Thr His Glu Ala Gly Arg Met Leu Glu Thr Pro Ala Val Glu Ala
[2739]	85 90 95
[2740]	His Leu Glu Leu Ala Glu Pro Ser Leu Asp Gln Val Val Ala Thr Leu
[2741]	100 105 110
[2742]	Ser Ala Glu Gly Val Thr Arg Ala Ala Leu Val Pro Leu Leu Phe Ser
[2743]	115 120 125
[2744]	Asn Ala Tyr His Ala Lys Ile Asp Val Pro Glu Ala Val Lys Asp Ala
[2745]	130 135 140
[2746]	Ser Glu Lys Tyr Gly Val Glu Leu Leu Val Gly Pro His Leu Gly Thr
[2747]	145 150 155 160
[2748]	Gly Ser Asp Val Ala Ser Val Leu Ala Gln Arg Leu Arg Ala Asp Ala
[2749]	165 170 175
[2750]	Pro Thr Asp Ala His Val Ile Leu Tyr Ser Val Gly Ser Ser His Val
[2751]	180 185 190
[2752]	Ser Ala Asn Glu Ser Val Ile Asp Leu Ala His Thr Ile Ala Leu Leu
[2753]	195 200 205
[2754]	Thr Gly Phe Ser Val Glu Val Val Pro Ala Thr Gly Gly Pro Gly Ala
[2755]	210 215 220
[2756]	Gly Gly Ala Gly Val Ile Glu Val Ala Ser Lys His Lys Ala Val His
[2757]	225 230 235 240
[2758]	Ile Leu Pro Leu Phe Val Thr Glu Gly Leu Leu Leu Asp Arg Val Ile
[2759]	245 250 255
[2760]	Asp Gln Ser Ala Asn Ile Ala Ala Ala Thr Gly Thr Asn Phe Thr Tyr
[2761]	260 265 270
[2762]	Ser Glu Pro Leu Thr Thr Asp Leu Ala Pro Leu Val Ala Ala Arg Tyr
[2763]	275 280 285
[2764]	His Ala Ala Leu Ser Ala Leu Leu Ala His Ile
[2765]	290 295
[2766]	<210> 100
[2767]	<211> 930
[2768]	<212> DNA
[2769]	<213> 谷氨酸棒杆菌
[2770]	<400> 100
[2771]	atgcagacat taatctttat cgccattgca ggcgtcgcag cacagcttgt tgatggcggc 60

[2772]	ctcggcatgg ggttcggcgt cacctcaacc accatcctca tcatgctcgc aggttttaggc	120
[2773]	cctgcgcagg catccgccgt cgtgcacacc gcagaggttg gaaccacatt agttttctggt	180
[2774]	ttaagccact ggaaatttgg caacgtggat tggaaagtag ttgtccggt cggtatcccc	240
[2775]	ggcgtatcgc gcgcatttgc tggcgtacc ttcttgtcca atatttccac cgaagcagca	300
[2776]	gcaccgatca cctccctgat tcttgccctg atcggcatga acctagtctg gcgattcagc	360
[2777]	aagggacgca tccgccgca ctattccgat cgcccgca gcaagggatt cctcggcgga	420
[2778]	ctcggatttg tcggtggtt cgttgacgcg tccggtggcg gcggtgggg tccagtgacc	480
[2779]	acctctacgc tgctgtcttt gggacgcacc gaaccccgca aagtagtcgg caccgtcaac	540
[2780]	accgcagaat tcttagtctc cctagccgca acattgggct tcgtcgtggg actgtgggat	600
[2781]	gacctagtag ctaacctctc tgcagtctc gcgttgctca tcggcggcgc aatcgagca	660
[2782]	ccaatcgcg cctggatgat ctctcgcgtt aatgcaaccg tcctcggcgg cttcgtgggc	720
[2783]	accctgattg tcacactgaa cctgcaaaag gtgctcaatg tggttggcct tgatttcac	780
[2784]	cccaccggcc tcgtccaggt caccgtctc ctcatcgcc tgccgctgac gtacctcggc	840
[2785]	ttccgccgt accgcaaaaa cctcctcaac gaaaccatct ccagcgaggt tgtctccgaa	900
[2786]	ccacaggac aaaagattaa agctcttaa	930
[2787]	<210>	101
[2788]	<211>	309
[2789]	<212>	PRT
[2790]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[2791]	<400>	101
[2792]	Met Gln Thr Leu Ile Phe Ile Ala Ile Ala Gly Val Ala Ala Gln Leu	
[2793]	1 5 10 15	
[2794]	Val Asp Gly Gly Leu Gly Met Gly Phe Gly Val Thr Ser Thr Thr Ile	
[2795]	20 25 30	
[2796]	Leu Ile Met Leu Ala Gly Leu Gly Pro Ala Gln Ala Ser Ala Val Val	
[2797]	35 40 45	
[2798]	His Thr Ala Glu Val Gly Thr Thr Leu Val Ser Gly Leu Ser His Trp	
[2799]	50 55 60	
[2800]	Lys Phe Gly Asn Val Asp Trp Lys Val Val Val Arg Leu Gly Ile Pro	
[2801]	65 70 75 80	
[2802]	Gly Ala Ile Gly Ala Phe Ala Gly Ala Thr Phe Leu Ser Asn Ile Ser	
[2803]	85 90 95	
[2804]	Thr Glu Ala Ala Ala Pro Ile Thr Ser Leu Ile Leu Ala Leu Ile Gly	
[2805]	100 105 110	
[2806]	Met Asn Leu Val Trp Arg Phe Ser Lys Gly Arg Ile Arg Arg Asp Tyr	
[2807]	115 120 125	
[2808]	Ser Asp Arg Pro His Ser Lys Gly Phe Leu Gly Gly Leu Gly Ile Val	
[2809]	130 135 140	
[2810]	Gly Gly Phe Val Asp Ala Ser Gly Gly Gly Gly Trp Gly Pro Val Thr	
[2811]	145 150 155 160	
[2812]	Thr Ser Thr Leu Leu Ser Leu Gly Arg Thr Glu Pro Arg Lys Val Val	
[2813]	165 170 175	

[2814]	Gly Thr Val Asn Thr Ala Glu Phe Leu Val Ser Leu Ala Ala Thr Leu	
[2815]	180	185 190
[2816]	Gly Phe Val Val Gly Leu Trp Asp Asp Leu Val Ala Asn Leu Ser Ala	
[2817]	195	200 205
[2818]	Val Leu Ala Leu Leu Ile Gly Gly Ala Ile Ala Ala Pro Ile Gly Ala	
[2819]	210	215 220
[2820]	Trp Met Ile Ser Arg Val Asn Ala Thr Val Leu Gly Gly Phe Val Gly	
[2821]	225	230 235 240
[2822]	Thr Leu Ile Val Thr Leu Asn Leu Pro Lys Val Leu Asn Val Val Gly	
[2823]	245	250 255
[2824]	Leu Asp Phe Ile Pro Thr Gly Leu Val Gln Val Thr Val Leu Leu Ile	
[2825]	260	265 270
[2826]	Gly Leu Pro Leu Thr Tyr Leu Gly Phe Arg Arg Tyr Arg Lys Asn Leu	
[2827]	275	280 285
[2828]	Leu Asn Glu Thr Ile Ser Ser Glu Val Val Ser Glu Pro Gln Gly Gln	
[2829]	290	295 300
[2830]	Lys Ile Lys Ser Ser	
[2831]	305	
[2832]	<210> 102	
[2833]	<211> 1374	
[2834]	<212> DNA	
[2835]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[2836]	<400> 102	
[2837]	atgacaactc ccctgcgcgt agccatcatc ggagctggcc ctgctggcat ttacgcatcc	60
[2838]	gacctcctca tccgcaatga agagcgcgaa gtgttcgttg accttttcga gcaaatgcct	120
[2839]	gcaccgttcg gactcatccg ttacggcggt gcaccagacc acccacgcat caagggcac	180
[2840]	gttaagtccc tgcacaacgt gttggacaag ccacgcctgc gcctgctcgg caacattgaa	240
[2841]	atcggaag acatcacctg cgaagaactc cgcgactact acgacgcagt tgtcttctcc	300
[2842]	accggtgcag ttgcagaccg cgacctcaac atccccgaa ttgaagcaga aggttccttc	360
[2843]	ggtgccggcg agttcgttg cttctacgac ggcaaccac gcttcgagcg ctctgggat	420
[2844]	ctgtctgcac agtccgtcgc tggtatcggc gttggtaacg tcggcctcga tgtagccgc	480
[2845]	atcctggcta agacaggcga cgagctcaaa gtcaccgaaa tttccgacaa cgtctacgac	540
[2846]	tcctcaaag aaaacaagc cactgaagta cacgttttcg gacgtcgtgg ccagcacag	600
[2847]	gtcaagtcca cccacagga actcaaagaa ctgaccact cccaccat caacgtggt	660
[2848]	gttgaccag aagacatcga ctacgacgc gcctccgaag aagcccgcc cgcattccaa	720
[2849]	tcacaggacc tggctgcca gatcctggaa cagtacgaa tccgcgagcc aaaggacgt	780
[2850]	ccgcacaccc tgcagatcca cctcttgaa aaccagttg aggttcttca aaaggacgc	840
[2851]	aaggtgttg gcctgcgcac cgaacgcacc gcgtcgcac gcaacggtg cgtaaagcg	900
[2852]	accggcgaat tcaaggactg gccagttcag gctgtctacc gcgcagtcg ctacaagtcc	960
[2853]	gacccatcg acggcgtccc attcgatggg aacaagcac tcatccctaa tgacggcgga	1020
[2854]	catgtcctca ccgtccagg tgcagagcca gtaccaggcc tctacgccac cggctggatc	1080
[2855]	aagcgtggac caatcggct gatcggcaac accaagtctg atgccaagga aaccaccgac	1140

[2856]	atcctcatca aggatgccgt caccggtgta cttgaagccc caaagcacca gggcgaagaa	1200
[2857]	gccatcatcg agcttctcga ttcccgcaac atcccattca ccacctggga aggctggtac	1260
[2858]	aaactcgacg cagcagagcg cgcactcggg gaagccgaag gccgcgagcg caagaagatt	1320
[2859]	gttgattggg aagaaatggt ccgccaggcc cgcgaagctc cagcaattgt ctaa	1374
[2860]	<210>	103
[2861]	<211>	457
[2862]	<212>	PRT
[2863]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[2864]	<400>	103
[2865]	Met Thr Thr Pro Leu Arg Val Ala Ile Ile Gly Ala Gly Pro Ala Gly	
[2866]	1 5 10 15	
[2867]	Ile Tyr Ala Ser Asp Leu Leu Ile Arg Asn Glu Glu Arg Glu Val Phe	
[2868]	20 25 30	
[2869]	Val Asp Leu Phe Glu Gln Met Pro Ala Pro Phe Gly Leu Ile Arg Tyr	
[2870]	35 40 45	
[2871]	Gly Val Ala Pro Asp His Pro Arg Ile Lys Gly Ile Val Lys Ser Leu	
[2872]	50 55 60	
[2873]	His Asn Val Leu Asp Lys Pro Arg Leu Arg Leu Leu Gly Asn Ile Glu	
[2874]	65 70 75 80	
[2875]	Ile Gly Lys Asp Ile Thr Val Glu Glu Leu Arg Asp Tyr Tyr Asp Ala	
[2876]	85 90 95	
[2877]	Val Val Phe Ser Thr Gly Ala Val Ala Asp Arg Asp Leu Asn Ile Pro	
[2878]	100 105 110	
[2879]	Gly Ile Glu Ala Glu Gly Ser Phe Gly Ala Gly Glu Phe Val Gly Phe	
[2880]	115 120 125	
[2881]	Tyr Asp Gly Asn Pro Arg Phe Glu Arg Ser Trp Asp Leu Ser Ala Gln	
[2882]	130 135 140	
[2883]	Ser Val Ala Val Ile Gly Val Gly Asn Val Gly Leu Asp Val Ala Arg	
[2884]	145 150 155 160	
[2885]	Ile Leu Ala Lys Thr Gly Asp Glu Leu Lys Val Thr Glu Ile Ser Asp	
[2886]	165 170 175	
[2887]	Asn Val Tyr Asp Ser Leu Lys Glu Asn Lys Ala Thr Glu Val His Val	
[2888]	180 185 190	
[2889]	Phe Gly Arg Arg Gly Pro Ala Gln Val Lys Phe Thr Pro Gln Glu Leu	
[2890]	195 200 205	
[2891]	Lys Glu Leu Asp His Ser Pro Thr Ile Asn Val Val Val Asp Pro Glu	
[2892]	210 215 220	
[2893]	Asp Ile Asp Tyr Asp Gly Ala Ser Glu Glu Ala Arg Arg Ala Ser Lys	
[2894]	225 230 235 240	
[2895]	Ser Gln Asp Leu Val Cys Gln Ile Leu Glu Gln Tyr Ala Ile Arg Glu	
[2896]	245 250 255	
[2897]	Pro Lys Asp Ala Pro His Thr Leu Gln Ile His Leu Phe Glu Asn Pro	

[2898]	260	265	270
[2899]	Val Glu Val Leu Gln Lys Asp Gly Lys Val Val Gly Leu Arg Thr Glu		
[2900]	275	280	285
[2901]	Arg Thr Ala Leu Asp Gly Asn Gly Gly Val Asn Gly Thr Gly Glu Phe		
[2902]	290	295	300
[2903]	Lys Asp Trp Pro Val Gln Ala Val Tyr Arg Ala Val Gly Tyr Lys Ser		
[2904]	305	310	315
[2905]	Asp Pro Ile Asp Gly Val Pro Phe Asp Gly Asn Lys His Val Ile Pro		
[2906]	325	330	335
[2907]	Asn Asp Gly Gly His Val Leu Thr Ala Pro Gly Ala Glu Pro Val Pro		
[2908]	340	345	350
[2909]	Gly Leu Tyr Ala Thr Gly Trp Ile Lys Arg Gly Pro Ile Gly Leu Ile		
[2910]	355	360	365
[2911]	Gly Asn Thr Lys Ser Asp Ala Lys Glu Thr Thr Asp Ile Leu Ile Lys		
[2912]	370	375	380
[2913]	Asp Ala Val Thr Gly Val Leu Glu Ala Pro Lys His Gln Gly Glu Glu		
[2914]	385	390	395
[2915]	Ala Ile Ile Glu Leu Leu Asp Ser Arg Asn Ile Pro Phe Thr Thr Trp		
[2916]	405	410	415
[2917]	Glu Gly Trp Tyr Lys Leu Asp Ala Ala Glu Arg Ala Leu Gly Glu Ala		
[2918]	420	425	430
[2919]	Glu Gly Arg Glu Arg Lys Lys Ile Val Asp Trp Glu Glu Met Val Arg		
[2920]	435	440	445
[2921]	Gln Ala Arg Glu Ala Pro Ala Ile Val		
[2922]	450	455	
[2923]	<210> 104		
[2924]	<211> 1173		
[2925]	<212> DNA		
[2926]	<213> 谷氨酸棒杆菌		
[2927]	<400> 104		
[2928]	ttgtctatga ttggctatgg tttacctatg cccaatcagg cccacttctc tgcgtccttt 60		
[2929]	gcccggccct ctaccccggc tgcaaagtgc atgcaccata tccgcctcgg ccagcaactc 120		
[2930]	attagaaatg agctggtcga ggccacaggt ctgtcccaac cgactgtcac ccgcgcagtc 180		
[2931]	accgctttta tgcaggcagg tttggttcgt gaacgccctg atctcacact ctcatcgggc 240		
[2932]	cctggtcgtc ccaatatcc tctagaactc gctccaagtc catggattca tgcaggcgtg 300		
[2933]	gcaatcggca ccaagtcttc ctacgtcgtt ttgtttgata ccaagggtcg cacccttcgt 360		
[2934]	gatgccatac tggaatctc agcagctgat ttagatccag acaccttcac cgaacacctc 420		
[2935]	atcgtcgttg tcaaccgct caccactggc cttgatctac cactggtagg tattggtgtg 480		
[2936]	gctacctcag gaaaagtcac caacgcgggc gttgtcaccg caagcaactt gggctgggat 540		
[2937]	ggcgttgata tcgccggccg tctgaactac caattcagcg ttccagcaac cgtggcatca 600		
[2938]	gcaattcctg ccatcgcagc ttctgaactg caggcttccc cacttcccca ccctgagcag 660		
[2939]	ccaactccca tcacctgac cttctacgcc gatgactctg tgggcgcggc ctacagcaat 720		

[2940]	gatttgggag tacatgtcat tggaccactg gctacaactc gtggatcagg tttggatact	780
[2941]	ttgggcatgg ctgctgaaga tgcgctgagc acccaagggt tcttaagcag ggtttctgat	840
[2942]	cagggtatct ttgccaacag ccttggtgag ctagtcacca ttgctaaaga caatgaaacc	900
[2943]	gcacgggaat tcctcaacga tcgcgcgacc ctgctggctc aactgcccgc agaagctgct	960
[2944]	gaaacagtta agccatccac cctggttctc tcgggatcgg cgttttccga agatccacaa	1020
[2945]	ggtcggttgg tgttcgcttc ccaattgaag aaggaatacg acgcagacat tgagctccgc	1080
[2946]	ttgatcccca cccaccgga aatgtccgc gcagcagctc gcgcagtcgc acttgatcga	1140
[2947]	ctactcaacg agccacttac cctcgtagcc taa	1173
[2948]	<210>	105
[2949]	<211>	390
[2950]	<212>	PRT
[2951]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[2952]	<400>	105
[2953]	Leu Ser Met Ile Gly Tyr Gly Leu Pro Met Pro Asn Gln Ala His Phe	
[2954]	1 5 10 15	
[2955]	Ser Ala Ser Phe Ala Arg Pro Ser Thr Pro Ala Ala Lys Cys Met His	
[2956]	20 25 30	
[2957]	His Ile Arg Leu Gly Gln Gln Leu Ile Arg Asn Glu Leu Val Glu Ala	
[2958]	35 40 45	
[2959]	Thr Gly Leu Ser Gln Pro Thr Val Thr Arg Ala Val Thr Ala Leu Met	
[2960]	50 55 60	
[2961]	Gln Ala Gly Leu Val Arg Glu Arg Pro Asp Leu Thr Leu Ser Ser Gly	
[2962]	65 70 75 80	
[2963]	Pro Gly Arg Pro Asn Ile Pro Leu Glu Leu Ala Pro Ser Pro Trp Ile	
[2964]	85 90 95	
[2965]	His Ala Gly Val Ala Ile Gly Thr Lys Ser Ser Tyr Val Ala Leu Phe	
[2966]	100 105 110	
[2967]	Asp Thr Lys Gly Arg Thr Leu Arg Asp Ala Ile Leu Glu Ile Ser Ala	
[2968]	115 120 125	
[2969]	Ala Asp Leu Asp Pro Asp Thr Phe Ile Glu His Leu Ile Ala Gly Val	
[2970]	130 135 140	
[2971]	Asn Arg Leu Thr Thr Gly Leu Asp Leu Pro Leu Val Gly Ile Gly Val	
[2972]	145 150 155 160	
[2973]	Ala Thr Ser Gly Lys Val Thr Asn Ala Gly Val Val Thr Ala Ser Asn	
[2974]	165 170 175	
[2975]	Leu Gly Trp Asp Gly Val Asp Ile Ala Gly Arg Leu Asn Tyr Gln Phe	
[2976]	180 185 190	
[2977]	Ser Val Pro Ala Thr Val Ala Ser Ala Ile Pro Ala Ile Ala Ala Ser	
[2978]	195 200 205	
[2979]	Glu Leu Gln Ala Ser Pro Leu Pro His Pro Glu Gln Pro Thr Pro Ile	
[2980]	210 215 220	
[2981]	Thr Leu Thr Phe Tyr Ala Asp Asp Ser Val Gly Ala Ala Tyr Ser Asn	

[2982]	225	230	235	240
[2983]	Asp Leu Gly Val His Val Ile Gly Pro Leu Ala Thr Thr Arg Gly Ser			
[2984]		245	250	255
[2985]	Gly Leu Asp Thr Leu Gly Met Ala Ala Glu Asp Ala Leu Ser Thr Gln			
[2986]		260	265	270
[2987]	Gly Phe Leu Ser Arg Val Ser Asp Gln Gly Ile Phe Ala Asn Ser Leu			
[2988]		275	280	285
[2989]	Gly Glu Leu Val Thr Ile Ala Lys Asp Asn Glu Thr Ala Arg Glu Phe			
[2990]		290	295	300
[2991]	Leu Asn Asp Arg Ala Thr Leu Leu Ala His Thr Ala Ala Glu Ala Ala			
[2992]	305	310	315	320
[2993]	Glu Thr Val Lys Pro Ser Thr Leu Val Leu Ser Gly Ser Ala Phe Ser			
[2994]		325	330	335
[2995]	Glu Asp Pro Gln Gly Arg Leu Val Phe Ala Ser Gln Leu Lys Lys Glu			
[2996]		340	345	350
[2997]	Tyr Asp Ala Asp Ile Glu Leu Arg Leu Ile Pro Thr His Arg Glu Asn			
[2998]		355	360	365
[2999]	Val Arg Ala Ala Ala Arg Ala Val Ala Leu Asp Arg Leu Leu Asn Glu			
[3000]		370	375	380
[3001]	Pro Leu Thr Leu Val Pro			
[3002]	385	390		
[3003]	<210> 106			
[3004]	<211> 1074			
[3005]	<212> DNA			
[3006]	<213> 谷氨酸棒杆菌			
[3007]	<400> 106			
[3008]	gtgttcatgc ttgcacagcg aacactcccc attcacatca ccgcccccca cctgcccgtc	60		
[3009]	gcgcgcgtat ttcaccaaatt tcgcgccaca gacgccgac gcacctcgct gcaacgcgat	120		
[3010]	cttgaactct cccaagctgg catcactcgg catgtatcag cgtttattga tgcaggtctc	180		
[3011]	gtggaggaaa cccgagtgga ttccggggcg cgctcggggc gaccgcgcac aaaattaggc	240		
[3012]	atcgacggcc gccatctcac cgcctgggga gtgcacattg gcctgcgcag cacggatttt	300		
[3013]	gcggtgtgcg atttagccgg ccgagtgatt aggtatgagc gcgtggacca tgaagtttca	360		
[3014]	cactccacgc cgtcggaac gctgaatttt gtgcacata ggttacaaac attgagcgcc	420		
[3015]	ggcttgcccg agccccgaa tgtgggcgtg gcattatctg cccacttaag cgccaacggc	480		
[3016]	accgtcactt ccgaagatta tggctggtca gaggtggaaa ttgggataca cctccccttc	540		
[3017]	cccgccacca tcggatcagg tgttcgcg atggccggtt cggaattat caacgcgcca	600		
[3018]	ctgacccaat ccacgcagtc cacgtgtat ttctacgcc gcgaaatggt ctcccacgcc	660		
[3019]	tggattttca acggcgtgt ccaccgcccc aacagcgcc gcacgccgac ggcgttcgga	720		
[3020]	aatacaata cttaaaaga tgcttttcga cgtggactca caccaacaac tttctccgat	780		
[3021]	ttagtccaac tctccacac caaccgctt gcccgacaga tcctcaacga gcgcgcccac	840		
[3022]	aaacttgccg acgccgaac caccgccgtt gatgtgtcg accccgaagc cgctcgtcttc	900		
[3023]	gccggcgaag cttcaccct ggatccgga actcttcgca ttgtggtgac ccagctccga	960		

[3024]	gcaaacaccg gcagccaact gagaatccaa cgcgcagacg cccacattct ccgcaccgcg	1020
[3025]	gccatccagg tggcgtgca tccgatccgt caagatccgt tagcatttgt gtaa	1074
[3026]	<210> 107	
[3027]	<211> 357	
[3028]	<212> PRT	
[3029]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[3030]	<400> 107	
[3031]	Met Phe Met Leu Ala Gln Arg Thr Leu Pro Ile His Ile Thr Ala Pro	
[3032]	1 5 10 15	
[3033]	His Leu Pro Val Ala Arg Val Phe His Gln Ile Arg Ala Thr Asp Ala	
[3034]	20 25 30	
[3035]	Asp Arg Thr Ser Leu Gln Arg Asp Leu Glu Leu Ser Gln Ala Gly Ile	
[3036]	35 40 45	
[3037]	Thr Arg His Val Ser Ala Leu Ile Asp Ala Gly Leu Val Glu Glu Thr	
[3038]	50 55 60	
[3039]	Arg Val Asp Ser Gly Ala Arg Ser Gly Arg Pro Arg Thr Lys Leu Gly	
[3040]	65 70 75 80	
[3041]	Ile Asp Gly Arg His Leu Thr Ala Trp Gly Val His Ile Gly Leu Arg	
[3042]	85 90 95	
[3043]	Ser Thr Asp Phe Ala Val Cys Asp Leu Ala Gly Arg Val Ile Arg Tyr	
[3044]	100 105 110	
[3045]	Glu Arg Val Asp His Glu Val Ser His Ser Thr Pro Ser Glu Thr Leu	
[3046]	115 120 125	
[3047]	Asn Phe Val Ala His Arg Leu Gln Thr Leu Ser Ala Gly Leu Pro Glu	
[3048]	130 135 140	
[3049]	Pro Arg Asn Val Gly Val Ala Leu Ser Ala His Leu Ser Ala Asn Gly	
[3050]	145 150 155 160	
[3051]	Thr Val Thr Ser Glu Asp Tyr Gly Trp Ser Glu Val Glu Ile Gly Ile	
[3052]	165 170 175	
[3053]	His Leu Pro Phe Pro Ala Thr Ile Gly Ser Gly Val Ala Ala Met Ala	
[3054]	180 185 190	
[3055]	Gly Ser Glu Ile Ile Asn Ala Pro Leu Thr Gln Ser Thr Gln Ser Thr	
[3056]	195 200 205	
[3057]	Leu Tyr Phe Tyr Ala Arg Glu Met Val Ser His Ala Trp Ile Phe Asn	
[3058]	210 215 220	
[3059]	Gly Ala Val His Arg Pro Asn Ser Gly Arg Thr Pro Thr Ala Phe Gly	
[3060]	225 230 235 240	
[3061]	Asn Thr Asn Thr Leu Lys Asp Ala Phe Arg Arg Gly Leu Thr Pro Thr	
[3062]	245 250 255	
[3063]	Thr Phe Ser Asp Leu Val Gln Leu Ser His Thr Asn Pro Leu Ala Arg	
[3064]	260 265 270	
[3065]	Gln Ile Leu Asn Glu Arg Ala His Lys Leu Ala Asp Ala Val Thr Thr	

[3066]	275	280	285
[3067]	Ala Val Asp Val Val Asp Pro Glu Ala Val Val Phe Ala Gly Glu Ala		
[3068]	290	295	300
[3069]	Phe Thr Leu Asp Pro Glu Thr Leu Arg Ile Val Val Thr Gln Leu Arg		
[3070]	305	310	315
[3071]	Ala Asn Thr Gly Ser Gln Leu Arg Ile Gln Arg Ala Asp Ala His Ile		
[3072]	325	330	335
[3073]	Leu Arg Thr Ala Ala Ile Gln Val Ala Leu His Pro Ile Arg Gln Asp		
[3074]	340	345	350
[3075]	Pro Leu Ala Phe Val		
[3076]	355		
[3077]	<210> 108		
[3078]	<211> 2180		
[3079]	<212> DNA		
[3080]	<213> 人工序列		
[3081]	<220>		
[3082]	<223> 启动子 P2		
[3083]	<400> 108		
[3084]	tttcgcggtg aatcaaccca cccgaacggc gatccttcga agtattttgc cgattgatca	60	
[3085]	attagcgctg gcaacatcac tgaatatgct gtcctatgcag accggcgcaa tcgttggccc	120	
[3086]	gctgatcgca ggtgcgttga ttccgctgat cggtttcggg tggctgtatt tccttgatgt	180	
[3087]	tgtctccatc atccccacac tgtgggctgt atggctactg ccttcaatca agccatccgg	240	
[3088]	caaggtcatg aaggccggtt tcgccagtgt ggtggatggc ctgaagtatt tggctggcca	300	
[3089]	acccgtgttg ttgatggatga tggctgtgga tcttatcgcc atgattttcg gcatgccacg	360	
[3090]	tgcgctttac ccgagatcg cggaagtga cttcggttgt ggtgacgccg gtgcaacgat	420	
[3091]	gctggcggtt atgtactcat ccatggctgt tggcgagatt cttggcgccg tgctgtctgg	480	
[3092]	ttgggtttcc cggattagcc gccagggtgt tgcagtttat tggatcatca tcgcctgggg	540	
[3093]	cgcagccgtt gctttgggtg gcgtagcaat tggtgtcagc cccggcgctg tgaccgcgtg	600	
[3094]	ggcgtggatg ttcatcatca tgatggctat tggatggcatg gctgacatgt ttagctcggc	660	
[3095]	tggtcgaaat gctattttgc agcagctctg agcggaaat gtgcagggcc gaatccaagg	720	
[3096]	tgtgtggatc atcgctgtgg tgggtggacc tcgttttagct gacgtccttc acggttgggc	780	
[3097]	cgctgagccc ttgggtgcag gttggacggt attatggggc ggagtagcgg tggttgtact	840	
[3098]	cactgcaatt tgtatgggtg cggatgcctaa attctggaaa tacgagaaac caaaaattac	900	
[3099]	cggcatctaa atacttatcc atgcccattt acagacaatg ccttagcttt gacctgcaca	960	
[3100]	aatagttgca aattgtccca catacacata aagtagcttg cgtattttaa attatgaacc	1020	
[3101]	taaggggttt agcaatgccc aatcaggccc acttctctgc gtcctttgcc cgcccctcta	1080	
[3102]	ccccggctgc aaagtgcatt caccatatcc gcctcgccca gcaactcatt agaaatgagc	1140	
[3103]	tggatcagggc cacaggtctg tcccaaccga ctgtcaccgg cgcagtcacc gctttaatgc	1200	
[3104]	aggcaggttt ggttcgtgaa cgccctgacg tcacactctc atcgggccct ggtcgtccca	1260	
[3105]	atatcctctc agaactcgct ccaagtccat ggattcatgc aggcgtggca atcggcacca	1320	
[3106]	agtcctccta cgctcgcttg tttgatacca agggctgcac ccttcgtgat gccatactgg	1380	
[3107]	aaatctcagc agctgattta gatccagaca cttcatcga acacctcgc gctgggtgtca	1440	

[3108]	accgcctcac cactggtctt gatctaccac tggtaggtat tgggtgtggct acctcaggaa	1500
[3109]	aagtcaccaa cgcgggcggt gtcaccgcaa gcaacttggg ctgggatggc gttgatatcg	1560
[3110]	ccggccgtct gaactaccaa ttacagcttc cagcaaccgt ggcatcagca attcctgcc	1620
[3111]	tcgcagcttc tgaactgcag gcttccccac ttccccaccc tgagcagcca actcccatca	1680
[3112]	ccttgacctt ctacgccgat gactctgtgg gcgcggccta cagcaatgat ttgggagtac	1740
[3113]	atgtcattgg accactggct acaactcgtg gatcaggttt ggatactttg ggcatggctg	1800
[3114]	ctgaagatgc gctgagcacc caaggtttct taagcagggt ttctgatcag ggtatctttg	1860
[3115]	ccaacagcct tggtagccta gtcaccattg ctaaagacaa tgaaaccgca cgggaattcc	1920
[3116]	tcaacgatcg cgcgacctg ctggctcaca ctgccgcaga agctgctgaa acagttaagc	1980
[3117]	catccaccct ggttctctcg ggatcggcgt tttccgaaga tccacaaggt cggttggtgt	2040
[3118]	tcgcttccca attgaagaag gaatacgacg cagacattga gctccgcttg atccccaccc	2100
[3119]	accgggaaaa tgtccgcga gcagctcgcg cagtcgcaact tgatcgacta ctcaacgagc	2160
[3120]	cattaccct cgtaccctaa	2180
[3121]	<210> 109	
[3122]	<211> 2247	
[3123]	<212> DNA	
[3124]	<213> 人工序列	
[3125]	<220>	
[3126]	<223> 启动子 P4	
[3127]	<400> 109	
[3128]	ccctcatgag ttccaggggt agaaaagcaa tgggatttgg atgcggttcg gttttggccg	60
[3129]	tcatcatggt tatctcattt gttggatggg cgcttagctt catggatgga acggcaccta	120
[3130]	ttcgccaaact ccagcaaatc cctgaagatg ttccgccggc gcgtggtgta gaagtccgc	180
[3131]	aaattgatac aggggcagat ggacgcacgt cagatcattt gcgttttttg gcggaaccaa	240
[3132]	ttgtcaaga tgctggtgtg tccgtcaag cgattgcggc ttatggaaac gcagagctca	300
[3133]	ttgcgagtac tgctggcct ggctgcaatc tggggtggaa taccttgga ggtatcgcc	360
[3134]	aggtggaaac ccgtcacggt acctacaacg gcaaaatgtt cgggggcagt tccctggatg	420
[3135]	aaaatggagt tgcaaccct ccaatcatcg gcgttccact tgatggttca ccggggtttg	480
[3136]	cggaaattcc cgacactgat ggtggggaat tagatggcga tactgaatat gatcgcgcg	540
[3137]	taggtcccat gcagttcatt ccgaaacgt ggcgacttat gggattggat gcaaacggtg	600
[3138]	atggggtagc ggaccccaac caaattgatg acgcagcatt gagtgccgca aacctgttgt	660
[3139]	gttccaacga tcgtgacttg tccactcctg aaggatggac cgcagctgtt cattcttaca	720
[3140]	acatgtctaa tcagtatttg atggacgttc gagatgctgc cgcgtcctac gctttacgac	780
[3141]	agccggcgat ctaaaactta acaagcgcaa cccccgaaa tgtgagatta tgtccggtcg	840
[3142]	gacacgtgcg ggctggggat atgggtagtt taataaattt ataccacaca gtctattgca	900
[3143]	atagaccaag ctgttcagta ggggtgcatg gagaagaatt tcctaataaa aactcttaag	960
[3144]	gacctccaag tggtgaaat catgcacgta ttgctcgcg aaattctcga ctcccgggt	1020
[3145]	aacccaaccg tcagagcaga ggttttcctt gatgacggtt cccacggtgt cgcaggtgtt	1080
[3146]	ccatccggcg catccaccgg cgtccacgag gctcatgagc tgctgacgg tggcgatcgc	1140
[3147]	tacctgggca agggcgtttt gaaggcagtt gaaaacgtca acgaagaaat cggcgacgag	1200
[3148]	ctcgtggcc tagaggctga cgatcagcgc ctcatcgacg aagcaatgat caagcttgat	1260
[3149]	ggcaccgcca acaagtcccg cctgggtgca aacgcaatcc ttggtgtttc catggctgtt	1320

[3150]	gcaaaggctg ctgctgattc cgcaggcctc ccaactgttc gctacatcgg tggaccaaac	1380
[3151]	gcacacgttc ttccagttcc aatgatgaac atcatcaacg gtggcgctca cgctgactcc	1440
[3152]	ggtgttgacg ttccaggaatt catgatcgct ccaatcggtg cagagacctt ctctgagget	1500
[3153]	ctccgcaacg gcgcagaggt ctaccacgca ctgaagtccg tcatcaagga aaagggcctg	1560
[3154]	tccaccggac ttggcgatga gggcggttc gctccttcg tcggctccac ccgtgaggct	1620
[3155]	cttgacctta tcgttgaggc aatcgagaag gctggcttca cccaggcaa ggacatcgct	1680
[3156]	cttgccttg acgttgcttc ctctgagttc ttcaaggacg gcacctacca cttcgaaggt	1740
[3157]	ggccagcact ccgcagctga gatggcaaac gtttacgtg agctcggtga cgcgtacca	1800
[3158]	atcgtctcca tcgaggacct actgcaggaa gatgactggg agggttacac caacctcacc	1860
[3159]	gcaaccatcg gcgacaaggt tcagatcggt ggcgacgact tcttcgtcac caacctgag	1920
[3160]	cgctgaagg agggcatcgc taagaaggct gccaaactca tcttggttaa ggtgaaccag	1980
[3161]	atcggtagcc tcaccgagac ctctgacgtg gtcgacatgg ctcaccgcgc aggtacacc	2040
[3162]	tccatgatgt cccaccgttc cggtagacc gaggacacca ccattgctga cctcgagtt	2100
[3163]	gcactcaact gtggccagat caagactggt gctccagcac gttccgaccg tgctgcaaag	2160
[3164]	tacaaccagc ttctccgcat cgagcagttg cttggcgacg ccggcgtcta cgcaggtcgc	2220
[3165]	agcgcattcc cacgtttca gggctaa	2247
[3166]	<210> 110	
[3167]	<211> 2192	
[3168]	<212> DNA	
[3169]	<213> 人工序列	
[3170]	<220>	
[3171]	<223> 启动子 P8	
[3172]	<400> 110	
[3173]	tcaccgagtc tttgatcaag ggtggcgctt ttgactccct tggacacgca cgaaaaggcc	60
[3174]	tcatgctggt ctctgaagat gccgttgatt ccgtcatcgc taccaaaaaa gctgctgaca	120
[3175]	agggacaatt tgatctcttt gcagctttcg actcggataa caacgacgat gtggcaagtt	180
[3176]	tcttcagat caccgttcct gatgacgaat gggaccgtaa gcatgagctc gactcgagc	240
[3177]	gagaaatgct gggctctgtat gtttctggac acccactcga tggctatgaa gatgccattg	300
[3178]	ctgcccagggt tgatacagca ctgaccacca ttgttgccg tgaactcaag cacggcgag	360
[3179]	aagtgaccgt ggggtggcatt atctctggtg tggatcgacg gttctccaag aaggacggtt	420
[3180]	ccccttgggc gattgtcacc attgaagatc acaacggcgc gtccgttgaa ttgttggtct	480
[3181]	tcaacaaggt gtattccatc gttggatcca tgattgtgga agacaacatc attttgcca	540
[3182]	aggcacacat ctccattcga gatgatcgta tgagcctttt ctgtgatgat ctccgcgttc	600
[3183]	cagagcttgg gccaggaaac gggcaaggac ttccgcttcg tttgtccatg cgtactgatc	660
[3184]	agtgcaccat gtccaacatt gccaaagtca agcaggtgct ggtggacaac aagggtgaat	720
[3185]	ctgatgtgta cctcaatttg atcgatgggg ataactccac ggtcatgatt ttgggtgatc	780
[3186]	acttaagagt caaccgatcc gcaagtttga tggcgacct caaggcaacg atggggccag	840
[3187]	gcacctcgg ttaatcacat cacactggga ttaccccggt taggggtgaa aaccggaatg	900
[3188]	tggtataaac ttttgaaac ttaagttacc tttaatcgga aacttattga attcgggtga	960
[3189]	ggcaactgca actctggact taaagcatga gccagaaccg catcaggacc actcacgttg	1020
[3190]	gttccttgcc ccgtaccca gagctacttg atgcaaacat caagcgctct aacggtgaga	1080
[3191]	ttggggagga ggaattcttc cagatcctgc agtcttctgt agatgacgtg atcaagcgcc	1140

[3192]	aggttgacct gggtatcgac atcctcaacg agggcgaata cggccacgtc acctccggtg	1200
[3193]	cagttgactt cggatcatgg tggaactact ctttaccctg cctgggcgga ctgaccatga	1260
[3194]	ccgataccga ccgttgggca agccaggaag cagtgcgttc cacccttggc aacatcaagc	1320
[3195]	tgaccagctt ctctgatcgt cgcgaccgag cattgttcag cgaagcatac gaggatccag	1380
[3196]	tatctggcat cttcaccggc cgcgcttctg tgggcaacct agagttcacc ggacctatta	1440
[3197]	cctacattgg ccaggaagaa actcagacgg atgttgatct gctgaagaag ggcataaacg	1500
[3198]	cagcgggagc taccgacggc ttctgttcag cactatcccc aggatctgca gctcgattga	1560
[3199]	ccaacaagtt ctacgacact gatgaagaag tcgtcgcagc atgtgccgat gcgctttccc	1620
[3200]	aggaatacaa gatcatcacc gatgcaggtc tgaccgttca gctcgacgca ccggacttgg	1680
[3201]	cagaagcatg ggatcagatc aaccagagc caagcgtgaa ggattactta gactggatcg	1740
[3202]	gtacacgcat cgatgccatc aacagtgcag tgaaggccct tccaaaggaa cagaccgcc	1800
[3203]	tgcacatctg ctggggctct tggcacggac cacacgtcac tgacatccca ttcggtgaca	1860
[3204]	tcattggtga gatcctgcgc gcagaggtcg gtggttctc cttcgaaggc gcatctcctc	1920
[3205]	gtcacgcaca cgagtggcgt gtatgggaag aaaacaagct tcctgaaggc tctgttatct	1980
[3206]	acctggtgt tgtgtctcac tccatcaacg ctgtggagca cccacgcctg gttgctgac	2040
[3207]	gtatcgttca gttcgccaag cttgttggcc ctgagaacgt cattgcgtcc actgactgtg	2100
[3208]	gtctgggagg acgtctgcat tcccagatcg catgggcaaa gctggagtcc ctagtagagg	2160
[3209]	gcgctcgcac tgcatcaaag gaactgttct aa	2192
[3210]	<210>	111
[3211]	<211>	97
[3212]	<212>	DNA
[3213]	<213>	人工序列
[3214]	<220>	
[3215]	<223>	启动子 P3
[3216]	<400>	111
[3217]	tgccgtttct cgcgttgtgt gtggtactac gtggggacct aagcgtgtaa gatggaaacg	60
[3218]	tctgtatcgg ataagtagcg aggagtgttc gttaaaa	97
[3219]	<210>	112
[3220]	<211>	35
[3221]	<212>	DNA
[3222]	<213>	人工序列
[3223]	<220>	
[3224]	<223>	引物
[3225]	<400>	112
[3226]	ccaagcttgc atgcctcacc gagtctttga tcaag	35
[3227]	<210>	113
[3228]	<211>	35
[3229]	<212>	DNA
[3230]	<213>	人工序列
[3231]	<220>	
[3232]	<223>	引物
[3233]	<400>	113

[3234]	caaaagtttt agccacattc gggttttcac cccta 35
[3235]	<210> 114
[3236]	<211> 35
[3237]	<212> DNA
[3238]	<213> 人工序列
[3239]	<220>
[3240]	<223> 引物
[3241]	<400> 114
[3242]	ctctggactt aaagcatgag ccagaaccgc atcag 35
[3243]	<210> 115
[3244]	<211> 35
[3245]	<212> DNA
[3246]	<213> 人工序列
[3247]	<220>
[3248]	<223> 引物
[3249]	<400> 115
[3250]	cggtagccgg ggatcttaga acagttcctt tgatg 35
[3251]	<210> 116
[3252]	<211> 87
[3253]	<212> DNA
[3254]	<213> 人工序列
[3255]	<220>
[3256]	<223> P8 启动子的DNA片段
[3257]	<400> 116
[3258]	gtggctaaaa cttttggaaa cttaagttac ctttaatcgg aaacttattg aattcgggtg 60
[3259]	aggcaactgc aactctggac ttaaagc 87
[3260]	<210> 117
[3261]	<211> 35
[3262]	<212> DNA
[3263]	<213> 人工序列
[3264]	<220>
[3265]	<223> 引物
[3266]	<400> 117
[3267]	gtgaaaaccc gaatgtggct aaaacttttg gaaac 35
[3268]	<210> 118
[3269]	<211> 35
[3270]	<212> DNA
[3271]	<213> 人工序列
[3272]	<220>
[3273]	<223> 引物
[3274]	<400> 118
[3275]	gcggttctgg ctcatgcttt aagtccagag ttgca 35

[3276]	<210> 119
[3277]	<211> 1206
[3278]	<212> DNA
[3279]	<213> 谷氨酸棒杆菌
[3280]	<400> 119
[3281]	atgagccaga accgcatcag gaccactcac gttggttcct tgccccgtac cccagagcta 60
[3282]	cttgatgcaa acatcaagcg ttctaacggt gagattgggg aggaggaatt cttccagatt 120
[3283]	ctgcagtctt ctgtagatga cgtgatcaag cgccaggttg acctgggtat cgacatcctt 180
[3284]	aacgagggcg aatacggccg cgtcacctcc ggtgcagttg acttcggtgc atggtggaac 240
[3285]	tactccttca cccgcctggg cggactgacc atgaccgata ccgaccgttg ggcaagccag 300
[3286]	gaagcagtgc gttccacccc tggcaacatc aagctgacca gtttctctga tcgtcgcgac 360
[3287]	cgcgcattgt tcagcgaagc atacgaggat ccagtatctg gcattctcac cggtcgcgct 420
[3288]	tctgtgggca acccagagtt caccggacct attacctaca ttggccagga agaaactcag 480
[3289]	acggatgttg atctgctgaa gaaggcatg aacgcagcgg gagctaccga cggcttcgtt 540
[3290]	gcagcactat ccccaggatc tgcagctcga ttgaccaaca agttctacga cactgatgaa 600
[3291]	gaagtcgtcg cagcatgtgc tgatgcgctt tcccaggaat acaagatcat caccgatgca 660
[3292]	ggtctgaccg ttcagctcga cgcaccggac ttggcagaag catgggatca gatcaacca 720
[3293]	gagccaagcg tgaaggatta cttggactgg atcggtagac gcattgatgc catcaacagt 780
[3294]	gcagtgaagg gccttccaaa ggaacagacc cgcctgcaca tctgctgggg ctcttggcac 840
[3295]	ggaccacacg tactgacat cccattcggt gacatcattg gtgagatcct gcgcgcagag 900
[3296]	gtcgttggtt tctccttga aggcgcacct cctcgtcacg cacacgagtg gcgtgtatgg 960
[3297]	gaagaaaaca agcttcctga aggtctgtt atctaccctg gtgttgtgtc tactccatc 1020
[3298]	aacgtgttgg agcaccacg cctggttgcg gatcgtatcg ttcagttcgc caagcttgtt 1080
[3299]	ggcctgaga acgtcattgc gtccactgac tgtggtcttg gcggacgtct gcattcccag 1140
[3300]	atcgcattggg caaagctgga gtccctagta gagggcgctc gcattgcac aaaggaactg 1200
[3301]	ttctaa 1206
[3302]	<210> 120
[3303]	<211> 401
[3304]	<212> PRT
[3305]	<213> 谷氨酸棒杆菌
[3306]	<400> 120
[3307]	Met Ser Gln Asn Arg Ile Arg Thr Thr His Val Gly Ser Leu Pro Arg
[3308]	1 5 10 15
[3309]	Thr Pro Glu Leu Leu Asp Ala Asn Ile Lys Arg Ser Asn Gly Glu Ile
[3310]	20 25 30
[3311]	Gly Glu Glu Glu Phe Phe Gln Ile Leu Gln Ser Ser Val Asp Asp Val
[3312]	35 40 45
[3313]	Ile Lys Arg Gln Val Asp Leu Gly Ile Asp Ile Leu Asn Glu Gly Glu
[3314]	50 55 60
[3315]	Tyr Gly His Val Thr Ser Gly Ala Val Asp Phe Gly Ala Trp Trp Asn
[3316]	65 70 75 80
[3317]	Tyr Ser Phe Thr Arg Leu Gly Gly Leu Thr Met Thr Asp Thr Asp Arg

[3318]	85	90	95
[3319]	Trp Ala Ser Gln Glu Ala Val Arg Ser Thr Pro Gly Asn Ile Lys Leu		
[3320]	100	105	110
[3321]	Thr Ser Phe Ser Asp Arg Arg Asp Arg Ala Leu Phe Ser Glu Ala Tyr		
[3322]	115	120	125
[3323]	Glu Asp Pro Val Ser Gly Ile Phe Thr Gly Arg Ala Ser Val Gly Asn		
[3324]	130	135	140
[3325]	Pro Glu Phe Thr Gly Pro Ile Thr Tyr Ile Gly Gln Glu Glu Thr Gln		
[3326]	145	150	155
[3327]	Thr Asp Val Asp Leu Leu Lys Lys Gly Met Asn Ala Ala Gly Ala Thr		
[3328]	165	170	175
[3329]	Asp Gly Phe Val Ala Ala Leu Ser Pro Gly Ser Ala Ala Arg Leu Thr		
[3330]	180	185	190
[3331]	Asn Lys Phe Tyr Asp Thr Asp Glu Glu Val Val Ala Ala Cys Ala Asp		
[3332]	195	200	205
[3333]	Ala Leu Ser Gln Glu Tyr Lys Ile Ile Thr Asp Ala Gly Leu Thr Val		
[3334]	210	215	220
[3335]	Gln Leu Asp Ala Pro Asp Leu Ala Glu Ala Trp Asp Gln Ile Asn Pro		
[3336]	225	230	235
[3337]	Glu Pro Ser Val Lys Asp Tyr Leu Asp Trp Ile Gly Thr Arg Ile Asp		
[3338]	245	250	255
[3339]	Ala Ile Asn Ser Ala Val Lys Gly Leu Pro Lys Glu Gln Thr Arg Leu		
[3340]	260	265	270
[3341]	His Ile Cys Trp Gly Ser Trp His Gly Pro His Val Thr Asp Ile Pro		
[3342]	275	280	285
[3343]	Phe Gly Asp Ile Ile Gly Glu Ile Leu Arg Ala Glu Val Gly Gly Phe		
[3344]	290	295	300
[3345]	Ser Phe Glu Gly Ala Ser Pro Arg His Ala His Glu Trp Arg Val Trp		
[3346]	305	310	315
[3347]	Glu Glu Asn Lys Leu Pro Glu Gly Ser Val Ile Tyr Pro Gly Val Val		
[3348]	325	330	335
[3349]	Ser His Ser Ile Asn Ala Val Glu His Pro Arg Leu Val Ala Asp Arg		
[3350]	340	345	350
[3351]	Ile Val Gln Phe Ala Lys Leu Val Gly Pro Glu Asn Val Ile Ala Ser		
[3352]	355	360	365
[3353]	Thr Asp Cys Gly Leu Gly Gly Arg Leu His Ser Gln Ile Ala Trp Ala		
[3354]	370	375	380
[3355]	Lys Leu Glu Ser Leu Val Glu Gly Ala Arg Ile Ala Ser Lys Glu Leu		
[3356]	385	390	395
[3357]	Phe		
[3358]	<210> 121		
[3359]	<211> 35		

- [3360] <212> DNA
[3361] <213> 人工序列
[3362] <220>
[3363] <223> 引物
[3364] <400> 121
[3365] ccaagcttgc atgccccctc atgagttcag gggtt 35
[3366] <210> 122
[3367] <211> 35
[3368] <212> DNA
[3369] <213> 人工序列
[3370] <220>
[3371] <223> 引物
[3372] <400> 122
[3373] tggtataaat ttattaaact acccatatcc ccagc 35
[3374] <210> 123
[3375] <211> 35
[3376] <212> DNA
[3377] <213> 人工序列
[3378] <220>
[3379] <223> 引物
[3380] <400> 123
[3381] cttaaggacc tccaagtggc tgaaatcatg cacgt 35
[3382] <210> 124
[3383] <211> 35
[3384] <212> DNA
[3385] <213> 人工序列
[3386] <220>
[3387] <223> 引物
[3388] <400> 124
[3389] cggtaccgg ggatcttagc cctgaaagcg tggga 35
[3390] <210> 125
[3391] <211> 98
[3392] <212> DNA
[3393] <213> 人工序列
[3394] <220>
[3395] <223> P4 启动子的DNA片段
[3396] <400> 125
[3397] aataaattta taccacacag tctattgcaa tagaccaagc tgttcagtag ggtgcatggg 60
[3398] agaagaattt cctaataaaa actcttaagg acctcaa 98
[3399] <210> 126
[3400] <211> 35
[3401] <212> DNA

[3402]	<213> 人工序列	
[3403]	<220>	
[3404]	<223> 引物	
[3405]	<400> 126	
[3406]	ggatatgggt agtttaataa atttatacca cacag	35
[3407]	<210> 127	
[3408]	<211> 35	
[3409]	<212> DNA	
[3410]	<213> 人工序列	
[3411]	<220>	
[3412]	<223> 引物	
[3413]	<400> 127	
[3414]	catgatttca gccacttga ggtccttaag agttt	35
[3415]	<210> 128	
[3416]	<211> 1278	
[3417]	<212> DNA	
[3418]	<213> 谷氨酸棒杆菌	
[3419]	<400> 128	
[3420]	gtggctgaaa tcatgcacgt attcgctcgc gaaattctcg actcccgcg	60
[3421]	gtcgaggcag aggttttctt tgatgacgggt tcccacgggtg tgcaggtgt tccatccggc	120
[3422]	gcatccaccg gcgtccacga ggctcatgag ctgcgtgacg gtggcgatcg ctacctgggc	180
[3423]	aaggcggttt tgaaggcagt tgaaaacgtc aacgaagaaa tcggcgacga gctcgctggc	240
[3424]	ctagaggctg acgatcagcg cctcatcgac gaagcaatga tcaagcttga tggcacggcc	300
[3425]	aacaagtccc gcctgggtgc aaacgcaatc cttgggtgtt ccatggctgt tgcaaaggct	360
[3426]	gctgctgatt ccgcaggcct cccactgttc cgctacatcg gtggaccaa cgcacacgtt	420
[3427]	cttccagttc caatgatgaa catcatcaac ggtggcgctc acgctgactc cgggtgttgac	480
[3428]	gttcaggaat tcatgatcgc tccaatcggg gcagagacct tctctgaggc tctccgaac	540
[3429]	ggcgacagagg tctaccacgc actgaagtcc gtcataagg aaaaggcct gtccaccgga	600
[3430]	cttggcgatg agggcggtt cgctccttcc gtcggtcca cccgtgaggc tcttgacctt	660
[3431]	atcgttgagg caatcgagaa ggctggcttc accccaggca aggacatcg tcttgctctg	720
[3432]	gacgttgctt cctctgagtt cttcaaggac ggcacctacc acttcgaagg tggccagcac	780
[3433]	tccgcagctg agatggcaaa cgtttacgct gagctcgttg acgcgtacct aatcgtctcc	840
[3434]	atcaggacc cactgcagga agatgactgg gagggttaca ccaacctcac cgcaaccatc	900
[3435]	ggcgacaagg ttcagatcgt tggcgacgac ttcttcgtca ccaacctga gcgcctgaag	960
[3436]	gaggcgatcg ctaagaaggc tgccaactcc atcctgggta aggtgaacca gatcggtacc	1020
[3437]	ctcaccgaga ccttcgacgc tgctgacatg gtcaccgcg caggctacac ctccatgatg	1080
[3438]	tcccaccgtt ccggtgagac cgaggacacc accattgctg acctcgcagt tgcaactaac	1140
[3439]	tgtggccaga tcaagactgg tgctccagca cgttccgacc gtgtcgcaaa gtacaaccag	1200
[3440]	cttctccgca tcgagcagtt gcttggcgac gccggcgctc acgcaggtcg cagcgcatc	1260
[3441]	ccacgctttc agggttaa	1278
[3442]	<210> 129	
[3443]	<211> 425	

[3444]	<212> PRT															
[3445]	<213> 谷氨酸棒杆菌															
[3446]	<400> 129															
[3447]	Met	Ala	Glu	Ile	Met	His	Val	Phe	Ala	Arg	Glu	Ile	Leu	Asp	Ser	Arg
[3448]	1				5					10					15	
[3449]	Gly	Asn	Pro	Thr	Val	Glu	Ala	Glu	Val	Phe	Leu	Asp	Asp	Gly	Ser	His
[3450]					20					25					30	
[3451]	Gly	Val	Ala	Gly	Val	Pro	Ser	Gly	Ala	Ser	Thr	Gly	Val	His	Glu	Ala
[3452]					35					40					45	
[3453]	His	Glu	Leu	Arg	Asp	Gly	Gly	Asp	Arg	Tyr	Leu	Gly	Lys	Gly	Val	Leu
[3454]					50					55					60	
[3455]	Lys	Ala	Val	Glu	Asn	Val	Asn	Glu	Glu	Ile	Gly	Asp	Glu	Leu	Ala	Gly
[3456]	65					70					75					80
[3457]	Leu	Glu	Ala	Asp	Asp	Gln	Arg	Leu	Ile	Asp	Glu	Ala	Met	Ile	Lys	Leu
[3458]					85					90					95	
[3459]	Asp	Gly	Thr	Ala	Asn	Lys	Ser	Arg	Leu	Gly	Ala	Asn	Ala	Ile	Leu	Gly
[3460]					100					105					110	
[3461]	Val	Ser	Met	Ala	Val	Ala	Lys	Ala	Ala	Ala	Asp	Ser	Ala	Gly	Leu	Pro
[3462]					115					120					125	
[3463]	Leu	Phe	Arg	Tyr	Ile	Gly	Gly	Pro	Asn	Ala	His	Val	Leu	Pro	Val	Pro
[3464]					130					135					140	
[3465]	Met	Met	Asn	Ile	Ile	Asn	Gly	Gly	Ala	His	Ala	Asp	Ser	Gly	Val	Asp
[3466]	145					150					155					160
[3467]	Val	Gln	Glu	Phe	Met	Ile	Ala	Pro	Ile	Gly	Ala	Glu	Thr	Phe	Ser	Glu
[3468]					165					170						175
[3469]	Ala	Leu	Arg	Asn	Gly	Ala	Glu	Val	Tyr	His	Ala	Leu	Lys	Ser	Val	Ile
[3470]					180					185					190	
[3471]	Lys	Glu	Lys	Gly	Leu	Ser	Thr	Gly	Leu	Gly	Asp	Glu	Gly	Gly	Phe	Ala
[3472]					195					200					205	
[3473]	Pro	Ser	Val	Gly	Ser	Thr	Arg	Glu	Ala	Leu	Asp	Leu	Ile	Val	Glu	Ala
[3474]					210					215					220	
[3475]	Ile	Glu	Lys	Ala	Gly	Phe	Thr	Pro	Gly	Lys	Asp	Ile	Ala	Leu	Ala	Leu
[3476]	225					230					235					240
[3477]	Asp	Val	Ala	Ser	Ser	Glu	Phe	Phe	Lys	Asp	Gly	Thr	Tyr	His	Phe	Glu
[3478]					245					250					255	
[3479]	Gly	Gly	Gln	His	Ser	Ala	Ala	Glu	Met	Ala	Asn	Val	Tyr	Ala	Glu	Leu
[3480]					260					265					270	
[3481]	Val	Asp	Ala	Tyr	Pro	Ile	Val	Ser	Ile	Glu	Asp	Pro	Leu	Gln	Glu	Asp
[3482]					275					280					285	
[3483]	Asp	Trp	Glu	Gly	Tyr	Thr	Asn	Leu	Thr	Ala	Thr	Ile	Gly	Asp	Lys	Val
[3484]					290					295					300	
[3485]	Gln	Ile	Val	Gly	Asp	Asp	Phe	Phe	Val	Thr	Asn	Pro	Glu	Arg	Leu	Lys

[3486]	305	310	315	320
[3487]	Glu Gly Ile Ala Lys Lys Ala Ala Asn Ser Ile Leu Val Lys Val Asn			
[3488]		325	330	335
[3489]	Gln Ile Gly Thr Leu Thr Glu Thr Phe Asp Ala Val Asp Met Ala His			
[3490]		340	345	350
[3491]	Arg Ala Gly Tyr Thr Ser Met Met Ser His Arg Ser Gly Glu Thr Glu			
[3492]		355	360	365
[3493]	Asp Thr Thr Ile Ala Asp Leu Ala Val Ala Leu Asn Cys Gly Gln Ile			
[3494]		370	375	380
[3495]	Lys Thr Gly Ala Pro Ala Arg Ser Asp Arg Val Ala Lys Tyr Asn Gln			
[3496]	385	390	395	400
[3497]	Leu Leu Arg Ile Glu Gln Leu Leu Gly Asp Ala Gly Val Tyr Ala Gly			
[3498]		405	410	415
[3499]	Arg Ser Ala Phe Pro Arg Phe Gln Gly			
[3500]		420	425	
[3501]	<210> 130			
[3502]	<211> 666			
[3503]	<212> DNA			
[3504]	<213> Niastella koreensis			
[3505]	<400> 130			
[3506]	atgaataatc aaatttttga atccgttgac cattatatca gcgatttact gggttacgaa	60		
[3507]	gacgatgcat tgcttgccgc caccaattca ttagccgaag caggcatgcc tgccatcagc	120		
[3508]	gtatcaccca accagggcaa gtttctgcaa ttactggccc aattgtgcca ggcaaaaaat	180		
[3509]	atcctggagc tgggcacact ggcaggtac agcaccattt ggatggccc ggccttacc	240		
[3510]	aaaaacggcc ggctcatcac cttgaatat gaccccaaac atgcggccgt tgcacaaaaa	300		
[3511]	aatatcgacc gggccggcct tacttcacaa gtacagatca gaaccggtaa agcaattgac	360		
[3512]	atattaccgc aattagtgga agaaggcgcc ggacctttg atatgatctt tatcgatgcc	420		
[3513]	gataaaccac cttacaccga atattttcaa tgggcgcttc ggttatcacg tcccgggtaca	480		
[3514]	ctcatcgtag cgcataatgt gatccgtgat ggcaaagtgc tggatgaaaa cagtacggag	540		
[3515]	cctgctgtac agggcgcaag acgtttcaat gccatgctgg gcgccaatac cgccgttgac	600		
[3516]	gccaccattc ttcaaatggt aggtgtaaaa gaatacgaatg gaatggcttt ggccatagta	660		
[3517]	aaataa			666
[3518]	<210> 131			
[3519]	<211> 221			
[3520]	<212> PRT			
[3521]	<213> Niastella koreensis			
[3522]	<400> 131			
[3523]	Met Asn Asn Gln Ile Phe Glu Ser Val Asp His Tyr Ile Ser Asp Leu			
[3524]	1	5	10	15
[3525]	Leu Gly Tyr Glu Asp Asp Ala Leu Leu Ala Ala Thr Asn Ser Leu Ala			
[3526]		20	25	30
[3527]	Glu Ala Gly Met Pro Ala Ile Ser Val Ser Pro Asn Gln Gly Lys Phe			

[3528]	35	40	45
[3529]	Leu Gln Leu Leu Ala Gln Leu Cys Gln Ala Lys Asn Ile Leu Glu Leu		
[3530]	50	55	60
[3531]	Gly Thr Leu Ala Gly Tyr Ser Thr Ile Trp Met Ala Arg Ala Leu Pro		
[3532]	65	70	75
[3533]	Lys Asn Gly Arg Leu Ile Thr Leu Glu Tyr Asp Pro Lys His Ala Ala		
[3534]	85	90	95
[3535]	Val Ala Gln Lys Asn Ile Asp Arg Ala Gly Leu Thr Ser Gln Val Gln		
[3536]	100	105	110
[3537]	Ile Arg Thr Gly Lys Ala Ile Asp Ile Leu Pro Gln Leu Val Glu Glu		
[3538]	115	120	125
[3539]	Gly Ala Gly Pro Phe Asp Met Ile Phe Ile Asp Ala Asp Lys Pro Pro		
[3540]	130	135	140
[3541]	Tyr Thr Glu Tyr Phe Gln Trp Ala Leu Arg Leu Ser Arg Pro Gly Thr		
[3542]	145	150	155
[3543]	Leu Ile Val Ala Asp Asn Val Ile Arg Asp Gly Lys Val Leu Asp Glu		
[3544]	165	170	175
[3545]	Asn Ser Thr Glu Pro Ala Val Gln Gly Ala Arg Arg Phe Asn Ala Met		
[3546]	180	185	190
[3547]	Leu Gly Ala Asn Thr Ala Val Asp Ala Thr Ile Leu Gln Met Val Gly		
[3548]	195	200	205
[3549]	Val Lys Glu Tyr Asp Gly Met Ala Leu Ala Ile Val Lys		
[3550]	210	215	220
[3551]	<210> 132		
[3552]	<211> 50		
[3553]	<212> DNA		
[3554]	<213> 人工序列		
[3555]	<220>		
[3556]	<223> 引物		
[3557]	<400> 132		
[3558]	catgattacg ccaagcttgc atgccaaatt cctgtgatta gctgatttag 50		
[3559]	<210> 133		
[3560]	<211> 50		
[3561]	<212> DNA		
[3562]	<213> 人工序列		
[3563]	<220>		
[3564]	<223> 引物		
[3565]	<400> 133		
[3566]	cggattcgaa gatctggttg ttcatagagg cgaaggctcc ttgaataggt 50		
[3567]	<210> 134		
[3568]	<211> 778		
[3569]	<212> DNA		

[3570]	<213> Niastella koreensis	
[3571]	<400> 134	
[3572]	atgaacaacc agatcttga atccgtcgat cactatattt ctgatcttct gggctacgag	60
[3573]	gatgatgcgc ttttgccgc cactaattcc ctggccgagg caggtatgcc ggctattagc	120
[3574]	gtttccccga accagggcaa atttttgcaa ctgctggccc aactttgcca agccaaaaac	180
[3575]	attttggagc ttggtacgtt ggccggctat tcgaccatct ggatggctcg cgctctcccc	240
[3576]	aagaacggcc gccttatcac cctggaatac gatccgaagc atgccgcggt agctcagaag	300
[3577]	aacattgatc gcgctggctt gaccagccaa gtgcaaatcc gcacgggtaa agcaatcgac	360
[3578]	atcctgccgc agctgggtga ggagggtgcc ggtccatttg atatgatctt cattgatgcc	420
[3579]	gataagcccc catacaccga atacittcaa tgggctctgc gactgtcccgc ccccggcact	480
[3580]	ctcatcgctc cggataatgt catccgcgat ggaaaggtgc tggacgaaaa ctccaccgag	540
[3581]	cctgccgtcc aaggtgcccgc ccgttttaat gccatgctcg gtgctaatac ggcagttgac	600
[3582]	gcaaccatcc tccaaatggt gggcgtgaaa gactacgacg gcatggcgct ggccatcggt	660
[3583]	aagtaaaagc ttgcggccgc actcgagcac caccaccacc accactgaga tccggctgct	720
[3584]	aacaaagccc gaaaggaagc tgagttggct gctgccaccg ctgagcaata actagcat	778
[3585]	<210> 135	
[3586]	<211> 666	
[3587]	<212> DNA	
[3588]	<213> Niastella koreensis	
[3589]	<400> 135	
[3590]	atgaacaacc agatcttga atccgtcgat cactatattt ctgatcttct gggctacgag	60
[3591]	gatgatgcgc ttttgccgc cactaattcc ctggccgagg caggtatgcc ggctattagc	120
[3592]	gtttccccga accagggcaa atttttgcaa ctgctggccc aactttgcca agccaaaaac	180
[3593]	attttggagc ttggtacgtt ggccggctat tcgaccatct ggatggctcg cgctctcccc	240
[3594]	aagaacggcc gccttatcac cctggaatac gatccgaagc atgccgcggt agctcagaag	300
[3595]	aacattgatc gcgctggctt gaccagccaa gtgcaaatcc gcacgggtaa agcaatcgac	360
[3596]	atcctgccgc agctgggtga ggagggtgcc ggtccatttg atatgatctt cattgatgcc	420
[3597]	gataagcccc catacaccga atacittcaa tgggctctgc gactgtcccgc ccccggcact	480
[3598]	ctcatcgctc cggataatgt catccgcgat ggaaaggtgc tggacgaaaa ctccaccgag	540
[3599]	cctgccgtcc aaggtgcccgc ccgttttaat gccatgctcg gtgctaatac ggcagttgac	600
[3600]	gcaaccatcc tccaaatggt gggcgtgaaa gactacgacg gcatggcgct ggccatcggt	660
[3601]	aagtaa	666
[3602]	<210> 136	
[3603]	<211> 33	
[3604]	<212> DNA	
[3605]	<213> 人工序列	
[3606]	<220>	
[3607]	<223> 引物	
[3608]	<400> 136	
[3609]	ctggccgagg caggtaagcc ggctattagc gtt	33
[3610]	<210> 137	
[3611]	<211> 33	

[3612]	<212> DNA
[3613]	<213> 人工序列
[3614]	<220>
[3615]	<223> 引物
[3616]	<400> 137
[3617]	aacgctaata gccggcttac ctgcctcggc cag 33
[3618]	<210> 138
[3619]	<211> 35
[3620]	<212> DNA
[3621]	<213> 人工序列
[3622]	<220>
[3623]	<223> 引物
[3624]	<400> 138
[3625]	ccaagcttgc atgccggtag gtggcgtatc agact 35
[3626]	<210> 139
[3627]	<211> 35
[3628]	<212> DNA
[3629]	<213> 人工序列
[3630]	<220>
[3631]	<223> 引物
[3632]	<400> 139
[3633]	acgcgagaaa cggcactagt tgagggcctc taaat 35
[3634]	<210> 140
[3635]	<211> 35
[3636]	<212> DNA
[3637]	<213> 人工序列
[3638]	<220>
[3639]	<223> 引物
[3640]	<400> 140
[3641]	gagtgttcgt taaaaatggc acaggttatg gactt 35
[3642]	<210> 141
[3643]	<211> 35
[3644]	<212> DNA
[3645]	<213> 人工序列
[3646]	<220>
[3647]	<223> 引物
[3648]	<400> 141
[3649]	cggtacccgg ggatcttagt agcggtagtg ctccg 35
[3650]	<210> 142
[3651]	<211> 35
[3652]	<212> DNA
[3653]	<213> 人工序列

[3654]	<220>	
[3655]	<223>	引物
[3656]	<400>	142
[3657]	gaggccctca actagtgccg tttctcgcgt tgtgt 35	
[3658]	<210>	143
[3659]	<211>	35
[3660]	<212>	DNA
[3661]	<213>	人工序列
[3662]	<220>	
[3663]	<223>	引物
[3664]	<400>	143
[3665]	cataacctgt gccattttta acgaacactc ctcgc 35	
[3666]	<210>	144
[3667]	<211>	1437
[3668]	<212>	DNA
[3669]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[3670]	<400>	144
[3671]	atggcacagg ttatggactt caaggttgcg gatctttcac tagcagaggc aggacgtcac 60	
[3672]	cagattcgtc ttgcagagta tgagatgccg ggtctcatgc agttgcgcaa ggaattcgca 120	
[3673]	gacgagcagc ctttgaaggg cgcccgaatt gctggttcca tccacatgac ggtccagacc 180	
[3674]	gccgtgctta ttgagaccct cactgctttg ggcgtgagg ttcgttgggc ttcttgcaac 240	
[3675]	attttctcca cccaggatga ggctgcagcg gctatcgttg tcggctccgg caccgtcgaa 300	
[3676]	gagccagctg gtgttccagt attcgcgtgg aagggtgagt cactggagga gtactggtgg 360	
[3677]	tgcatcaacc agatcttcag ctggggcgat gagctgcaa acatgatcct cgacgacggc 420	
[3678]	ggtgacgcca ccatggctgt tattcgcggc cgcaataac agcaggctgg tctggttcca 480	
[3679]	ccagcagagg ccaacgattc cgatgagtac atcgcattct tgggcatgct gcgtgaggtt 540	
[3680]	cttgctgcag agcctggcaa gtggggcaag atcgtgagg ccgttaaggg tgtcaccgag 600	
[3681]	gaaaccacca ccggtgtgca ccgcctgtac cacttcgttg aagaaggcgt actgcctttc 660	
[3682]	ccagcgatga acgtcaacga cgctgtcacc aagtccaagt ttgataacaa gtacggcacc 720	
[3683]	cgccactccc tgatcgacgg catcaaccgc gccaccgaca tgctcatggg cggcaagaac 780	
[3684]	gtgcttgtct gcggttacgg tgatgtcggc aagggtcgcg ctgaggtttt cgacggccag 840	
[3685]	ggcgtcgcg tcaaggtcac cgaagctgac ccaatcaacg ctcttcaggc tctgatggat 900	
[3686]	ggctactctg tggtcaccgt tgatgaggcc atcaggagcg ccgacatcgt gatcaccgcg 960	
[3687]	accgtaaca aggacatcat ttcttctcag cagatgtca agatgaagga tcacgtcttg 1020	
[3688]	ctgggcaaca tcggtcactt tgataatgag atcgatatgc attccctggt gcaccgcgac 1080	
[3689]	gacgtacccc gcaccacgat caagccacag gtcgacgagt tcaccttctc caccggtcgc 1140	
[3690]	tccatcatcg tgctgtctga aggccgtctg ctaaaccttg gcaacgccac cggacaccca 1200	
[3691]	tcatttgtca tgtccaactc tttcgccgat cagaccattg cgcagatcga actgttccaa 1260	
[3692]	aacgaaggac agtacgagaa cgaggtctac cgtctgccta aggttctcga cgaaaagggtg 1320	
[3693]	gcacgcatcc acgttgaggc tctcggcggc cagctcaccg aactgaccaa ggagcaggct 1380	
[3694]	gagtacatcg gcgttgacgt tgcaggcca ttcaagccgg agcactaccg ctactaa 1437	
[3695]	<210>	145

[3696]	<211>	478
[3697]	<212>	PRT
[3698]	<213>	谷氨酸棒杆菌
[3699]	<400>	145
[3700]	Met Ala Gln Val Met Asp Phe Lys Val Ala Asp Leu Ser Leu Ala Glu	
[3701]	1	5 10 15
[3702]	Ala Gly Arg His Gln Ile Arg Leu Ala Glu Tyr Glu Met Pro Gly Leu	
[3703]	20	25 30
[3704]	Met Gln Leu Arg Lys Glu Phe Ala Asp Glu Gln Pro Leu Lys Gly Ala	
[3705]	35	40 45
[3706]	Arg Ile Ala Gly Ser Ile His Met Thr Val Gln Thr Ala Val Leu Ile	
[3707]	50	55 60
[3708]	Glu Thr Leu Thr Ala Leu Gly Ala Glu Val Arg Trp Ala Ser Cys Asn	
[3709]	65	70 75 80
[3710]	Ile Phe Ser Thr Gln Asp Glu Ala Ala Ala Ile Val Val Gly Ser	
[3711]	85	90 95
[3712]	Gly Thr Val Glu Glu Pro Ala Gly Val Pro Val Phe Ala Trp Lys Gly	
[3713]	100	105 110
[3714]	Glu Ser Leu Glu Glu Tyr Trp Trp Cys Ile Asn Gln Ile Phe Ser Trp	
[3715]	115	120 125
[3716]	Gly Asp Glu Leu Pro Asn Met Ile Leu Asp Asp Gly Gly Asp Ala Thr	
[3717]	130	135 140
[3718]	Met Ala Val Ile Arg Gly Arg Glu Tyr Glu Gln Ala Gly Leu Val Pro	
[3719]	145	150 155 160
[3720]	Pro Ala Glu Ala Asn Asp Ser Asp Glu Tyr Ile Ala Phe Leu Gly Met	
[3721]	165	170 175
[3722]	Leu Arg Glu Val Leu Ala Ala Glu Pro Gly Lys Trp Gly Lys Ile Ala	
[3723]	180	185 190
[3724]	Glu Ala Val Lys Gly Val Thr Glu Glu Thr Thr Thr Gly Val His Arg	
[3725]	195	200 205
[3726]	Leu Tyr His Phe Ala Glu Glu Gly Val Leu Pro Phe Pro Ala Met Asn	
[3727]	210	215 220
[3728]	Val Asn Asp Ala Val Thr Lys Ser Lys Phe Asp Asn Lys Tyr Gly Thr	
[3729]	225	230 235 240
[3730]	Arg His Ser Leu Ile Asp Gly Ile Asn Arg Ala Thr Asp Met Leu Met	
[3731]	245	250 255
[3732]	Gly Gly Lys Asn Val Leu Val Cys Gly Tyr Gly Asp Val Gly Lys Gly	
[3733]	260	265 270
[3734]	Cys Ala Glu Ala Phe Asp Gly Gln Gly Ala Arg Val Lys Val Thr Glu	
[3735]	275	280 285
[3736]	Ala Asp Pro Ile Asn Ala Leu Gln Ala Leu Met Asp Gly Tyr Ser Val	
[3737]	290	295 300

[3738]	Val Thr Val Asp Glu Ala Ile Glu Asp Ala Asp Ile Val Ile Thr Ala
[3739]	305 310 315 320
[3740]	Thr Gly Asn Lys Asp Ile Ile Ser Phe Glu Gln Met Leu Lys Met Lys
[3741]	325 330 335
[3742]	Asp His Ala Leu Leu Gly Asn Ile Gly His Phe Asp Asn Glu Ile Asp
[3743]	340 345 350
[3744]	Met His Ser Leu Leu His Arg Asp Asp Val Thr Arg Thr Thr Ile Lys
[3745]	355 360 365
[3746]	Pro Gln Val Asp Glu Phe Thr Phe Ser Thr Gly Arg Ser Ile Ile Val
[3747]	370 375 380
[3748]	Leu Ser Glu Gly Arg Leu Leu Asn Leu Gly Asn Ala Thr Gly His Pro
[3749]	385 390 395 400
[3750]	Ser Phe Val Met Ser Asn Ser Phe Ala Asp Gln Thr Ile Ala Gln Ile
[3751]	405 410 415
[3752]	Glu Leu Phe Gln Asn Glu Gly Gln Tyr Glu Asn Glu Val Tyr Arg Leu
[3753]	420 425 430
[3754]	Pro Lys Val Leu Asp Glu Lys Val Ala Arg Ile His Val Glu Ala Leu
[3755]	435 440 445
[3756]	Gly Gly Gln Leu Thr Glu Leu Thr Lys Glu Gln Ala Glu Tyr Ile Gly
[3757]	450 455 460
[3758]	Val Asp Val Ala Gly Pro Phe Lys Pro Glu His Tyr Arg Tyr
[3759]	465 470 475
[3760]	<210> 146
[3761]	<211> 20
[3762]	<212> DNA
[3763]	<213> 人工序列
[3764]	<220>
[3765]	<223> 引物
[3766]	<400> 146
[3767]	gtccaactct ttcgccgatc 20
[3768]	<210> 147
[3769]	<211> 20
[3770]	<212> DNA
[3771]	<213> 人工序列
[3772]	<220>
[3773]	<223> 引物
[3774]	<400> 147
[3775]	gagaacctta ggcagacggt 20
[3776]	<210> 148
[3777]	<211> 20
[3778]	<212> DNA
[3779]	<213> 人工序列

[3780]	<220>
[3781]	<223> 引物
[3782]	<400> 148
[3783]	caatcgagaa ggctggcttc 20
[3784]	<210> 149
[3785]	<211> 20
[3786]	<212> DNA
[3787]	<213> 人工序列
[3788]	<220>
[3789]	<223> 引物
[3790]	<400> 149
[3791]	gtgccgtcct tgaagaactc 20
[3792]	<210> 150
[3793]	<211> 20
[3794]	<212> DNA
[3795]	<213> 人工序列
[3796]	<220>
[3797]	<223> 引物
[3798]	<400> 150
[3799]	aggtggggat gacgtcaaatt 20
[3800]	<210> 151
[3801]	<211> 20
[3802]	<212> DNA
[3803]	<213> 人工序列
[3804]	<220>
[3805]	<223> 引物
[3806]	<400> 151
[3807]	gaactgaggc cggctttaag 20