

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710301188.3

[51] Int. Cl.

*C12N 15/55 (2006.01)*

*C12N 15/77 (2006.01)*

*C12N 9/14 (2006.01)*

*C12N 1/21 (2006.01)*

*C12P 13/08 (2006.01)*

*C12R 1/15 (2006.01)*

[43] 公开日 2008年7月30日

[11] 公开号 CN 101230355A

[22] 申请日 2004.12.17

[21] 申请号 200710301188.3

分案原申请号 200480036372.4

[30] 优先权

[32] 2003.12.18 [33] WO [31] PCT/IB2003/006456

[71] 申请人 巴斯福股份公司

地址 德国路德维希港

[72] 发明人 O·策尔德尔 C·克洛普罗格

H·施罗德 S·哈夫纳

B·克勒格尔 P·基弗

E·海因茨勒 C·维特曼

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书4页 说明书84页 附图6页

[54] 发明名称

通过发酵制备精细化学品的的方法

[57] 摘要

本发明描述了通过失调酶编码基因，即果糖-1,6-二磷酸酶编码基因增加从微生物，例如棒杆菌产生精细化学品，例如赖氨酸的方法。在优选实施方案中，本发明提供了通过增加果糖-1,6-二磷酸酶活性增加谷氨酸棒杆菌中赖氨酸产量的方法。本发明还提供了通过调节朝向草酰乙酸(OAA)的碳通量产生赖氨酸的新方法。在优选实施方案中，本发明提供了通过利用果糖或蔗糖作为碳源产生赖氨酸的方法。

1. 增加微生物中通过戊糖磷酸途径的代谢通量的方法，其包括在一定条件下培养包含经失调的基因的微生物使得通过戊糖磷酸途径的代谢通量增加。

2. 权利要求 1 的方法，其中将果糖或蔗糖用作碳源。

3. 权利要求 1 的方法，其中将果糖用作碳源。

4. 权利要求 1 的方法，其中所述基因是果糖-1,6-二磷酸酶。

5. 权利要求 4 的方法，其中果糖-1,6-二磷酸酶基因来自棒杆菌。

6. 权利要求 4 的方法，其中过表达果糖-1,6-二磷酸酶基因。

7. 权利要求 1 的方法，其中所述基因编码果糖-1,6-二磷酸酶。

8. 权利要求 7 的方法，其中果糖-1,6-二磷酸酶具有增加的活性。

9. 权利要求 1 的方法，其中所述微生物是革兰氏阳性微生物。

10. 权利要求 1 的方法，其中所述微生物属于棒杆菌属。

11. 权利要求 10 的方法，其中所述微生物是谷氨酸棒杆菌。

12. 权利要求 1 的方法，其中发酵所述微生物以产生精细化学品。

13. 权利要求 1 的方法，其中所述微生物还包含一种或多种额外的失调的基因。

14. 权利要求 13 的方法，其中所述一种或多种额外的失调的基因选自 ask 基因、dapA 基因、asd 基因、dapB 基因、ddh 基因、lysA 基因、lysE 基因、pycA 基因、zwf 基因、pepCL 基因、gap 基因、zwa1 基因、tkt 基因、tad 基因、mqo 基因、tpi 基因、pgk 基因、和 sigC 基因。

15. 权利要求 14 的方法，其中过表达所述一种或多种额外的失调的基因。

16. 权利要求 13 的方法，其中所述一种或多种额外的失调的基因编码选自抗反馈天冬氨酸激酶、二氢吡啶二羧酸合酶、天冬氨酸半醛脱氢酶、二氢吡啶二羧酸还原酶、二氨基庚二酸脱氢酶、二氨基庚二酸差向异构酶、赖氨酸输出蛋白、丙酮酸羧化酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸

羧化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、RPF 蛋白质前体、转酮酶、转醛酶、menaquinone 氧化还原酶、丙糖磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸激酶、和 RNA-聚合酶  $\sigma$  因子 sigC 的蛋白质。

17. 权利要求 16 的方法，其中所述蛋白质具有增加的活性。

18. 权利要求 13 的方法，其中所述一种或多种额外的失调的基因选自 pepCK 基因、mal E 基因、glgA 基因、pgi 基因、dead 基因、menE 基因、citE 基因、mike17 基因、poxB 基因、zwa2 基因、和 sucC 基因。

19. 权利要求 18 的方法，其中减弱、减小或抑制所述一种或多种额外的失调的基因。

20. 权利要求 13 的方法，其中所述一种或多种额外的失调的基因编码选自烯醇丙酮酸磷酸羧激酶、苹果酸酶、糖原合酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、依赖 ATP 的 RNA 解旋酶、邻-琥珀酰基苯甲酸-CoA 连接酶、柠檬酸裂合酶  $\beta$  链、转录调节子、丙酮酸脱氢酶、RPF 蛋白质前体、和琥珀酰 CoA 合成酶的蛋白质。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述蛋白质具有减小的活性。

22. 产生精细化学品的的方法，其包括：

a) 培养其中果糖-1,6-二磷酸酶被失调的微生物；和

b) 在培养基或者微生物的细胞中积累所述精细化学品，从而产生精细化学品。

23. 产生精细化学品的的方法，其包括在一定条件下培养其中至少一种戊糖磷酸生物合成途径基因或酶被失调的微生物从而产生精细化学品。

24. 权利要求 23 的方法，其中所述生物合成途径基因是果糖-1,6-二磷酸酶。

25. 权利要求 23 的方法，其中所述生物合成途径酶是果糖-1,6-二磷酸酶。

26. 权利要求 22 或 24 的方法，其中果糖-1,6-二磷酸酶表达增加。

27. 权利要求 22 或 25 的方法，其中果糖-1,6-二磷酸酶活性增加。

28. 权利要求 22 或 23 的方法，其还包括回收所述精细化学品。

29. 权利要求 22 或 23 的方法，其中失调一种或多种额外的基因。

30. 权利要求 29 的方法，其中所述一种或多种额外的失调的基因选自 ask 基因、dapA 基因、asd 基因、dapB 基因、ddh 基因、lysA 基因、lysE 基因、pycA 基因、zwf 基因、pepCL 基因、gap 基因、zwa1 基因、tkf 基因、tad 基因、mqo 基因、tpi 基因、pgk 基因、和 sigC 基因。

31. 权利要求 30 的方法，其中过表达所述一种或多种额外的失调的基因。

32. 权利要求 29 的方法，其中所述一种或多种额外的失调的基因编码选自抗反馈天冬氨酸激酶、二氢吡啶二羧酸合酶、天冬氨酸半醛脱氢酶、二氢吡啶二羧酸还原酶、二氨基庚二酸脱氢酶、二氨基庚二酸差向异构酶、赖氨酸输出蛋白、丙酮酸羧化酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、RPF 蛋白质前体、转酮酶、转醛酶、menaquinone 氧化还原酶、丙糖磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸激酶、和 RNA-聚合酶  $\sigma$  因子 sigC 的蛋白质。

33. 权利要求 32 的方法，其中所述蛋白质具有增加的活性。

34. 权利要求 29 的方法，其中所述一种或多种额外的失调的基因选自 pepCK 基因、mal E 基因、glgA 基因、pgi 基因、dead 基因、menE 基因、citE 基因、mike17 基因、poxB 基因、zwa2 基因、和 sucC 基因。

35. 权利要求 34 的方法，其中减弱、减小或抑制所述一种或多种额外的失调的基因。

36. 权利要求 29 的方法，其中所述一种或多种额外的失调的基因编码选自烯醇丙酮酸磷酸羧激酶、苹果酸酶、糖原合酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、依赖 ATP 的 RNA 解旋酶、邻-琥珀酰基苯甲酸-CoA 连接酶、柠檬酸裂合酶  $\beta$  链、转录调节子、丙酮酸脱氢酶、RPF 蛋白质前体、和琥珀酰 CoA 合成酶的蛋白质。

37. 权利要求 36 的方法，其中所述蛋白质具有减小的活性。

38. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述微生物是革兰氏阳性微生物。

39. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述微生物属于棒杆菌属。

40. 权利要求 39 的方法，其中所述微生物是谷氨酸棒杆菌。
41. 权利要求 22 或 23 的方法，其中所述精细化学品是赖氨酸。
42. 权利要求 41 的方法，其中以至少 100 g/L 的产率产生赖氨酸。
43. 权利要求 41 的方法，其中以至少 150 g/L 的产率产生赖氨酸。
44. 权利要求 22 或 23 的方法，其中将果糖或者蔗糖用作碳源。
45. 权利要求 22 或 23 的方法，其中将果糖用作碳源。
46. 权利要求 22 或 24 的方法，其中果糖-1,6-二磷酸酶包含 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列。
47. 权利要求 22 或 24 的方法，其中果糖-1,6-二磷酸酶编码包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的多肽。
48. 重组微生物，其具有失调的戊糖磷酸生物合成途径。
49. 重组微生物，包含失调的戊糖磷酸生物合成基因。
50. 权利要求 49 的重组微生物，其中所述失调的基因是果糖-1,6-二磷酸酶。
51. 权利要求 50 的重组微生物，其中果糖-1,6-二磷酸酶表达增加。
52. 权利要求 50 的重组微生物，其中所述果糖-1,6-二磷酸酶基因编码具有增加的活性的果糖-1,6-二磷酸酶蛋白质。
53. 权利要求 49 的重组微生物，其中所述微生物属于棒杆菌属。
54. 权利要求 53 的重组微生物，其中所述微生物是谷氨酸棒杆菌。
55. SEQ ID NO:1 的核苷酸序列编码的多肽，其中所述多肽具有果糖-1,6-二磷酸酶活性。

## 通过发酵制备精细化学品的的方法

### 发明背景

氨基酸赖氨酸的工业生产已经成为经济上重要的工业方法。赖氨酸在商业上用作动物饲料添加剂，因为它能够通过增加其他氨基酸的吸收提高饲料质量，还用于人类药物中，尤其作为灌注液的成分，并且用于制药工业中。

该赖氨酸的商业生产主要用革兰氏阳性谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) 和乳酸发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum*) 进行 (Kleemann, A., et. al., "Amino Acids," in ULLMANN'S ENCYCLOPEDIA OF INDUSTRIAL CHEMISTRY, vol. A2, pp.57-97, Weinham: VCH-Verlagsgesellschaft (1985)). 这些生物用于每年生产约 250,000 吨赖氨酸。大量研究着手分离产生更大量赖氨酸的突变的细菌菌株。用于氨基酸生产的微生物方法中的微生物分成 4 类：野生型菌株、营养突变体、调节突变体和营养缺陷型调节突变体 (K. Nakayama *et al.*, in *Nutritional Improvement of Food and Feed Proteins*, M. Friedman, ed., (1978), pp. 649-661)。棒杆菌 (*Corynebacterium*) 和相关生物的突变体使得能够通过直接发酵从廉价碳源，例如，糖蜜、乙酸和乙醇便宜地生产氨基酸。此外，通过发酵产生的氨基酸的立体特异性 (L 异构体) 使得该方法与合成方法相比是有利的。

提高赖氨酸的商业生产的效率的另一种方法是通过研究赖氨酸产生和通过戊糖磷酸途径的代谢通量之间的相关性。考虑到通过发酵方法生产赖氨酸的经济重要性，已经深入研究了赖氨酸合成的生物化学途径，显然是为了增加所产生的赖氨酸的总量和降低生产成本 (Sahm *et al.*, (1996) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 782:25-39 综述)。在来自葡萄糖的碳通量导向芳香族氨基酸

形成的代谢工程中已经取得了一定成功(Flores, N. *et al.*, (1996) *Nature Biotechnol.* 14:620-623)。当细胞吸收时,葡萄糖被磷酸化,同时消耗磷酸烯醇丙酮酸(磷酸转移酶系统) (Malin & Bourd, (1991) *Journal of Applied Bacteriology* 71, 517-523)并可以以葡萄糖-6-磷酸提供给细胞。磷酸转移酶系统(Shio *et al.*, (1990) *Agricultural and Biological Chemistry* 54, 1513-1519)和转化酶反应(Yamamoto *et al.*, (1986) *Journal of Fermentation Technology* 64, 285-291)将蔗糖转化成果糖和葡萄糖-6-磷酸。

在葡萄糖分解代谢期间,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(EC 1.1.14.9)和葡萄糖-6-磷酸异构酶(EC 5.3.1.9)竞争底物葡萄糖-6-磷酸。葡萄糖-6-磷酸异构酶催化糖酵解途径(EMP途径)的第一个反应步骤,即转化成果糖-6-磷酸。葡萄糖-6-磷酸脱氢酶催化戊糖磷酸循环的氧化部分的第一个反应步骤,即转化成6-磷酸葡糖酸内酯。

在戊糖磷酸循环的氧化部分,葡萄糖-6-磷酸被转化成核酮糖-5-磷酸,从而产生NADPH形式的还原等同物。随着戊糖磷酸循环进一步发展,戊糖磷酸、己糖磷酸和丙糖磷酸互变。例如在核苷酸生物合成中需要戊糖磷酸,例如,5-磷酸核糖-1-焦磷酸。5-磷酸核糖-1-焦磷酸还是芳香族氨基酸和L-组氨酸的前体。NADPH作为多种合成代谢生物合成中的还原等同物。从而,从草酰乙酸生物合成1分子赖氨酸消耗4分子NADPH。从而,向草酰乙酸(OAA)的碳通量与系统扰动无关而保持恒定(J. Vallino *et al.*, (1993) *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 633-646)。

## 发明概述

本发明至少部分基于发现了谷氨酸棒杆菌中戊糖磷酸途径的编码关键酶,例如果糖-1,6-二磷酸酶的基因,和发现例如,果糖-1,6-二磷酸酶的失调,例如,增加表达或者活性导致增加的赖氨酸产生。此外,发现在赖氨酸生产期间通过失调,例如增加果糖-1,6-二磷酸酶表达或者活性增加碳产量也导致增加的赖氨酸产生。在一个实施方案中,碳源是果糖或者蔗糖。因此,本发明提供了增加微生物,例如,谷氨酸棒杆菌产生赖氨酸的方法,

其中果糖或者蔗糖是底物。

因此，一方面，本发明提供了增加微生物中通过戊糖磷酸途径的代谢通量的方法，其包括在一定条件下培养包含失调的基因的微生物，从而通过戊糖磷酸途径的代谢通量增加。在一个实施方案中，发酵微生物以产生精细化学品，例如，赖氨酸。在另一实施方案中，将果糖或蔗糖用作碳源。在再一个实施方案中，所述基因是果糖-1,6-二磷酸酶。在相关实施方案中，果糖-1,6-二磷酸酶基因来自棒杆菌，例如，谷氨酸棒杆菌。在另一实施方案中，果糖-1,6-二磷酸酶基因被过表达。在再一个实施方案中，果糖-1,6-二磷酸酶基因编码的蛋白质具有增加的活性。

在另一实施方案中，所述微生物还包含一种或多种额外的失调基因。所述一种或多种额外的失调基因可以包括，但不限于，ask 基因、dapA 基因、asd 基因、dapB 基因、ddh 基因、lysA 基因、lysE 基因、pycA 基因、zwf 基因、pepCL 基因、gap 基因、zwa1 基因、tkt 基因、tad 基因、mqo 基因、tpi 基因、pgk 基因、和 sigC 基因。在另一具体实施方案中，所述基因可以过表达或者表达不足。此外，所述失调基因可以编码选自抗反馈天冬氨酸激酶、二氢吡啶二羧酸合酶、天冬氨酸半醛脱氢酶、二氢吡啶二羧酸还原酶、二氨基庚二酸脱氢酶、二氨基庚二酸差向异构酶、赖氨酸输出蛋白 (exporter)、丙酮酸羧化酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、RPF 蛋白质前体、转酮酶、转醛酶、menaquinone 氧化还原酶、丙糖磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸激酶、和 RNA-聚合酶  $\sigma$  因子 sigC。在具体实施方案中，所述蛋白质可以具有增加或者减小的活性。

根据本发明的方法，所述一种或多种额外的失调基因还可以包括，但不限于，pepCK 基因、mal E 基因、glgA 基因、pgi 基因、dead 基因、menE 基因、citE 基因、mike17 基因、poxB 基因、zwa2 基因、和 sucC 基因。在特定实施方案中，至少一种基因的表达受到上调、减弱、减小、下调或者抑制。此外，所述失调的基因可以编码选自烯醇丙酮酸磷酸羧激酶、苹果酸酶、糖原合酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、依赖 ATP 的 RNA 解旋酶、邻

-琥珀酰基苯甲酸-CoA 连接酶、柠檬酸裂合酶  $\beta$  链、转录调节子、丙酮酸脱氢酶、RPF 蛋白质前体、琥珀酰 CoA 合成酶的蛋白质。在特定实施方案中，所述蛋白质具有减小或者增加的活性。

在一个实施方案中，用于本发明方法的微生物属于棒杆菌属，例如，谷氨酸棒杆菌。

另一方面，本发明提供了产生精细化学品的的方法，其包括发酵其中果糖-1,6-二磷酸酶被失调的微生物并在培养基或者微生物的细胞中积累所述精细化学品，例如，赖氨酸，从而产生精细化学品。在一个实施方案中，所述方法包括回收所述精细化学品。在另一实施方案中，果糖-1,6-二磷酸酶被过表达。在再一个实施方案中，将果糖或者蔗糖用作碳源。

一方面，果糖-1,6-二磷酸酶来自谷氨酸棒杆菌并且包含 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列和 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列。

根据下面的详细描述和权利要求，本发明的其他特征和优点将是显而易见的。

## 附图简述

图 1: 是戊糖生物合成途径的图示。

图 2: 在用葡萄糖和果糖产生赖氨酸期间在谷氨酸棒杆菌 ATCC 21526 的追踪实验中通过 GC/MS 测量的所分泌的赖氨酸和海藻糖的相对质量同位素异构体(isotopomer)级分的比较。

图 3: 在用葡萄糖进行赖氨酸生产期间谷氨酸棒杆菌 ATCC 21526 的中心代谢中体内碳通量分布，对  $^{13}\text{C}$  追踪实验使用组合代谢物平衡的综合方法和同位素异构体建模，通过 GC/MS 分别对分泌的赖氨酸和海藻糖进行标记测量，从所得实验结果的最佳拟合估计所述体内碳通量分布。以正方形符号给出净通量，而对于可逆反应，通过对应黑框旁边的箭头指示净通量的方向。转醛酶、转酮酶和葡萄糖-6-磷酸异构酶通量下面的括号中的数字表示通量可逆性。所有通量都表示为平均比葡萄糖摄入速率( $1.77 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )的摩尔百分数。

图 4: 在用果糖进行赖氨酸生产期间谷氨酸棒杆菌 ATCC 21526 的中心代谢中体内碳通量分布, 对  $^{13}\text{C}$  追踪实验使用组合代谢物平衡的综合方法和同位素异构体建模, 通过 GC/MS 分别对分泌的赖氨酸和海藻糖进行标记测量, 从所得实验结果的最佳拟合估计所述体内碳通量分布。以正方形符号给出净通量, 而对于可逆反应, 通过对应黑框旁边的箭头指示净通量的方向。转醛酶、转酮酶和葡萄糖-6-磷酸异构酶通量下面的括号中的数字表示通量可逆性。所有通量都表示为平均比果糖摄入速率( $1.93 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )的摩尔百分数。

图 5: 用葡萄糖生长的(A)和果糖生长的(B)的产生赖氨酸的谷氨酸棒杆菌的中心代谢的代谢网络, 包括运输通量、合成代谢通量和中间代谢物库之间的通量。

## 发明详述

本发明至少部分基于编码戊糖磷酸途径的必需酶的基因, 例如, 谷氨酸棒杆菌基因的鉴定。本发明描述了方法, 其包括操作微生物, 例如谷氨酸棒杆菌中戊糖磷酸生物合成途径, 使得碳产量增加并且产生某些所希望的精细化学品, 例如, 赖氨酸, 例如, 以增加的产量产生。具体地, 本发明包括通过发酵具有失调的, 例如增加的果糖-1,6-二磷酸酶表达和活性的微生物, 例如, 谷氨酸棒杆菌来产生精细化学品, 例如赖氨酸的方法。在一个实施方案中, 将果糖或蔗糖用作微生物发酵中的碳源。已经确定果糖是从微生物产生精细化学品, 例如赖氨酸的效率较低的底物。然而, 本发明提供了优化微生物, 例如, 谷氨酸棒杆菌的赖氨酸产生的方法, 其中果糖或者蔗糖是底物。果糖-1,6-二磷酸酶表达和活性的失调, 例如增大导致通过戊糖磷酸途径的更高的通量, 导致增加的 NADPH 产生和增加的赖氨酸产量。

术语“戊糖磷酸途径”包括涉及用于生成或合成精细化学品, 例如, 赖氨酸的戊糖磷酸酶(例如, 编码生物合成酶的基因编码的多肽)、化合物(例如, 前体、底物、中间物或产物)、辅因子等等的途径。戊糖磷酸途径将葡

葡萄糖分子转化成生物化学上有用的更小的分子。

为了更容易理解本发明，此处首先定义一些术语。

术语“戊糖磷酸生物合成途径”包括涉及用于生成和合成精细化学品，例如，赖氨酸的戊糖磷酸生物合成基因、酶(例如，编码生物合成酶的基因编码的多肽)、化合物(例如，前体、底物、中间物或产物)、辅因子等等的途径。术语“戊糖磷酸生物合成途径”包括导致在微生物中(例如，体内)合成精细化学品，例如，赖氨酸的生物合成途径以及导致在体外合成精细化学品，例如，赖氨酸的生物合成途径。术语“戊糖磷酸生物合成途径蛋白质”或“戊糖磷酸生物合成途径酶”包括直接或间接涉及戊糖磷酸生物合成途径的那些肽、多肽、蛋白质、酶和其片段，例如，果糖-1,6-二磷酸酶。

术语“戊糖磷酸生物合成途径基因”包括编码直接或间接涉及戊糖磷酸生物合成途径的肽、多肽、蛋白质、和酶的那些基因和基因片段，例如，果糖-1,6-二磷酸酶基因。

术语“氨基酸生物合成途径基因”意在包括编码直接参与氨基酸合成的肽、多肽、蛋白质、和酶，例如，果糖-1,6-二磷酸酶的那些基因和基因片段。这些基因可以与在宿主细胞中天然发生的那些基因相同并且参与该宿主细胞中任意氨基酸，尤其赖氨酸的合成。

术语“赖氨酸生物合成途径基因”包括编码直接参与赖氨酸合成的肽、多肽、蛋白质、和酶，例如，果糖-1,6-二磷酸酶的那些基因和基因片段。这些基因可以与在宿主细胞中天然发生的那些基因相同并且参与该宿主细胞中赖氨酸的合成。备选地，可以存在此类基因的修饰或者突变，例如，所述基因可以含有不显著影响所编码的蛋白质的生物活性的修饰或突变。例如，通过诱变或者通过导入或者替代一个或多个核苷酸或者通过除去基因的非必需区来修饰天然基因。此类修饰可以容易地通过标准技术进行。

术语“赖氨酸生物合成途径蛋白质”意在包括直接参与赖氨酸合成的那些肽、多肽、蛋白质、酶和其片段。这些蛋白质可以与在宿主细胞中天然发生的那些蛋白质相同并且参与该宿主细胞中赖氨酸的合成。备选地，此类蛋白质可以存在修饰或者突变，例如，所述蛋白质可以含有不显著影响

该蛋白质的生物活性的修饰或突变。例如，通过诱变或者通过导入或者替代一个或多个氨基酸，优选通过保守氨基酸替代，或者通过除去蛋白质的非必需区来修饰天然蛋白质。此类修饰可以容易地通过标准技术进行。备选地，赖氨酸生物合成蛋白质可以与特定宿主细胞异源。此类蛋白质可以来自具有编码具有相同或相似的生物合成作用的蛋白质的基因的任意生物。

术语“碳通量”指相对于竞争途径向下进入特定代谢途径的葡萄糖分子数。具体地，微生物内增加的 NADPH 通过改变该生物的糖酵解和戊糖磷酸途径之间的碳通量分布来实现。

“果糖-1,6-二磷酸酶活性”包括如根据标准技术在体内或者体外测定的果糖-1,6-二磷酸酶蛋白质、多肽或者核酸分子发挥的活性。果糖-1,6-二磷酸酶参与许多不同的代谢途径并且在多数生物中发现。优选地，果糖-1,6-二磷酸酶活性包括催化果糖-1,6-二磷酸水解成果糖-6-磷酸。

术语“精细化学品”是本领域已知的并且包括生物产生的分子，它们应用于多种工业，如，但不限于，制药工业、农业和化妆品工业。此类化合物包括有机酸，如酒石酸、衣康酸和二氨基庚二酸、蛋白质原性的 (proteinogenic) 和非蛋白质原性的氨基酸、嘌呤和嘧啶碱基、核苷，和核苷酸(如 Kuninaka, A. (1996) *Nucleotides and related compounds*, p. 561-612, in *Biotechnology* vol. 6, Rehm *et al.*, eds. VCH: Weinheim, 和其中引用的参考文献中描述)、脂类、饱和和不饱和脂肪酸(例如，花生四烯酸)、二醇(例如，丙二醇和丁二醇)、糖(例如，透明质酸和海藻糖)、芳香族化合物(例如，芳香族胺、香草醛和靛蓝)、维生素和辅因子(如 Ullmann's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, vol. A27, "Vitamins", p. 443-613 (1996) VCH: Weinheim 和其中引用的参考文献; 和 Ong, A.S., Niki, E. & Packer, L. (1995) "Nutrition, Lipids, Health, and Disease" *Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological Associations in Malaysia, and the Society for Free Radical Research – Asia*, held Sept. 1-3, 1994 at Penang, Malaysia, AOCS Press, (1995)中描述)、酶、聚酮化合物

(Cane *et al.* (1998) *Science* 282: 63-68), 和 Gutcho (1983) *Chemicals by Fermentation*, Noyes Data Corporation, ISBN: 0818805086 和其中引用的参考文献中描述的所有其他化合物。在下面进一步说明这些精细化学品的某一些的代谢和用途。

### 氨基酸代谢和用途

氨基酸组成所有蛋白质的基本结构单位, 并且同样是所有生物中正常细胞功能必需的。术语“氨基酸”是本领域公知的。20种蛋白原性氨基酸作为蛋白质的结构单位, 其中它们通过肽键连接, 而非蛋白原性氨基酸(已知数百种)不是蛋白质中通常发现的(见 *Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, vol. A2, p. 57-97 VCH: Weinheim (1985))。氨基酸可以是 D-或者 L-光学构型, 然而 L-氨基酸通常是在天然发生的蛋白质中发现的唯一类型。已经良好表征了原核和真核细胞中 20 种蛋白原性氨基酸的每一种的生物合成和降解途径(见, 例如, *Stryer, L. Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> edition, pages 578-590 (1988))。“必需”氨基酸(组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸和缬氨酸)之所以如此命名是因为它们由于它们的生物合成的复杂性而通常是营养需要的, 容易通过简单的生物合成途径容易地转化成剩余的 11 种“非必需”氨基酸(丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、脯氨酸、丝氨酸和酪氨酸)。高级动物保留合成这些氨基酸中一些氨基酸的能力, 但是为了进行正常的蛋白质合成, 必须从食物提供必需氨基酸。

除了它们在蛋白质生物合成中的功能外, 这些氨基酸自身还是有趣的化学品, 并且许多氨基酸已经在食品、饲料、化学、化妆品、农业和制药工业中有多种应用。赖氨酸不仅是人, 而且是单胃动物如家禽和猪的营养中的重要氨基酸。谷氨酸最通常用作风味添加剂(谷氨酸单钠, MSG)并且如天冬氨酸、苯丙氨酸、甘氨酸和半胱氨酸一样广泛用于食品工业。甘氨酸、L-甲硫氨酸和色氨酸也用于制药工业。谷氨酰胺、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、组氨酸、精氨酸、脯氨酸、丝氨酸和丙氨酸用于制药和化妆品

工业。苏氨酸、色氨酸和 D/L-甲硫氨酸是常用的饲料添加剂。

(Leuchtenberger, W. (1996) *Amino acids – technical production and use*, p. 466-502 in Rehm *et al.* (eds.) *Biotechnology* vol. 6, chapter 14a, VCH: Weinheim). 此外, 已经发现这些氨基酸可以用作合成的氨基酸和蛋白质的合成前体, 所述合成的氨基酸和蛋白质为例如 N-乙酰基半胱氨酸、S-羧基甲基-L-半胱氨酸、(S)-5-羟基色氨酸和 *Ulmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, vol. A2, p. 57-97, VCH: Weinheim, 1985 中描述的其他氨基酸。

已经良好表征了能够产生这些天然氨基酸的生物, 如细菌中这些天然氨基酸的生物合成(细菌氨基酸生物合成和其调节的综述见 Umbarger, H.E.(1978) *Ann. Rev. Biochem.* 47: 533-606)。通过柠檬酸循环中的一种中间物  $\alpha$ -酮戊二酸的还原胺化合成谷氨酸。谷氨酰胺、脯氨酸和精氨酸每种都随后从谷氨酸产生。丝氨酸的生物合成是一个三步过程, 以 3-磷酸甘油酸(糖酵解中的中间物)开始, 氧化、转氨基作用、和水解步骤后产生该氨基酸。半胱氨酸和甘氨酸都从丝氨酸产生; 通过高丝氨酸与丝氨酸的缩合产生半胱氨酸, 在丝氨酸转羟甲基酶催化的反应中, 通过将侧链  $\beta$ -碳原子转移到四氢叶酸产生甘氨酸。在 9 步生物合成途径中从糖酵解和戊糖磷酸途径前体赤藓糖-4-磷酸和磷酸烯醇丙酮酸合成苯丙氨酸和酪氨酸, 它们的差别仅在预苯酸合成后的最后两步。色氨酸也从这两种最初分子产生, 但是它的合成是 11 步途径。在苯丙氨酸羟化酶催化的反应中, 也可以从缬氨酸合成酪氨酸。丙氨酸、缬氨酸和亮氨酸都是糖酵解的终产物丙酮酸的生物合成产物。从柠檬酸循环的中间物草酰乙酸形成天冬氨酸。天冬酰胺、甲硫氨酸、苏氨酸和赖氨酸都通过天冬氨酸的转化产生。异亮氨酸从苏氨酸形成。一种复杂的 9 步途径导致从活化的糖 5-磷酸核糖-1-焦磷酸产生组氨酸。

细胞的蛋白质合成需求过量的氨基酸不能储存, 并且被降解以提供细胞的主要代谢途径的中间物(综述见 Stryer, L. *Biochemistry* 3<sup>rd</sup> ed. Ch. 21 "Amino Acid Degradation and the Urea Cycle" p. 495-516 (1988))。尽管细

胞能够将不想要的氨基酸转化成有用的代谢中间物，但是在能量、前体分子和合成氨基酸所需的酶的方面，氨基酸产生是代价高昂的。从而，并不令人惊奇的是，氨基酸生物合成受到反馈抑制的调节，其中特定氨基酸的存在用于减慢或者完全停止它自身的产生(氨基酸生物合成途径中的反馈机制综述见 Stryer, L. *Biochemistry*, 3<sup>rd</sup> ed. Ch. 24: “Biosynthesis of Amino Acids and Heme” p. 575-600 (1988))。从而，任何特定氨基酸的输出受到细胞中存在的氨基酸的量的限制。

### 维生素、辅因子和营养成分的代谢和用途

维生素、辅因子和营养成分包含高等动物不能合成因此必须摄取的另一组分子，虽然它们易于被其它生物如细菌合成。这些分子自身为生物活性物质或为在多种代谢途径中作为电子载体或中间体的生物活性物质的前体。除了它们的营养价值外，这些化合物作为着色剂、抗氧化剂和催化剂或其它操作辅助剂也具有重要的工业价值(这些化合物的结构、活性和工业应用的概述参见例如，Ullman's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, “Vitamins” vol. A27, p. 443-613, VCH: Weinheim, 1996.)。术语“维生素”为本领域已知的，并且包括生物行使正常功能所需但是该生物自身不能合成的营养物。维生素组可以包含辅因子和营养性化合物。术语“辅因子”包括进行正常酶促活性所需的非蛋白原性化合物。此类化合物可为有机的或无机的，本发明的辅因子分子优选是有机的。术语“营养成分”包括在植物和动物尤其是人中具有健康益处的食物补充物。此类分子的实例为维生素、抗氧化剂和某些脂类(如多不饱和脂肪酸)。

已大量描述了这些分子在可产生它们的生物如细菌中的生物合成

(Ullman's *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, “Vitamins” vol. A27, p. 443-613, VCH: Weinheim, 1996; Michal, G. (1999) *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, John Wiley & Sons; Ong, A.S., Niki, E. & Packer, L. (1995) “Nutrition, Lipids, Health, and Disease” *Proceedings of the UNESCO/Confederation of Scientific and Technological*

**Associations in Malaysia, and the Society for Free Radical Research – Asia, held Sept. 1-3, 1994 at Penang, Malaysia, AOCS Press: Champaign, IL X, 374 S).**

硫胺素(维生素 B<sub>1</sub>)由嘧啶和噻唑部分通过化学偶联产生。核黄素(维生素 B<sub>2</sub>)从鸟苷-5'-三磷酸(GTP)和核糖-5'-磷酸合成。核黄素又用于合成黄素单核苷酸(FMN)和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)。合起来称为‘维生素 B<sub>6</sub>’的化合物家族(例如,吡哆醇、吡哆胺、吡哆醛-5'-磷酸和商业上使用的维生素 B6 盐酸盐)均为共同结构单位 5-羟基-6-甲基吡啶的衍生物。泛酸(泛酸,(R)-(+)-N-(2,4-二羟基-3,3-二甲基-1-氧代丁基)-β-丙氨酸)可通过化学合成或发酵产生。泛酸生物合成的最后步骤由 β-丙氨酸和泛解酸的 ATP-驱动的缩合组成。负责转化为泛解酸、β-丙氨酸和泛酸缩合的生物合成步骤的酶是已知的。泛酸的代谢活性形式为辅酶 A, 其生物合成由 5 步酶促步骤进行。泛酸、吡哆醛-5'-磷酸、半胱氨酸和 ATP 为辅酶 A 的前体。这些酶不仅催化泛酸的形成, 而且催化(R)-泛解酸、(R)-pantolacton、(R)-泛醇(前维生素 B<sub>5</sub>)、泛酰巯基乙胺(及其衍生物)和辅酶 A 的产生。

已详细研究了微生物中生物素从前体分子庚二酰辅酶 A 的生物合成, 并鉴定了几种所涉及的基因。发现许多相应的蛋白质也参与 Fe-簇合成, 并且是 nifS 类蛋白质的成员。硫辛酸来自辛酸, 并在能量代谢中作为辅酶, 在能量代谢中硫辛酸成为丙酮酸脱氢酶复合体和 α-酮戊二酸脱氢酶复合体的一部分。叶酸盐为一组这样的物质, 其均为叶酸衍生物, 叶酸又来自 L-谷氨酸、对氨基-苯甲酸和 6-甲基蝶呤。已详细研究了某些微生物中始于代谢中间物鸟苷-5'-三磷酸(GTP)、L-谷氨酸和对氨基-苯甲酸的叶酸及其衍生物的生物合成。

类咕啉(如钴胺素且尤其是维生素 B<sub>12</sub>)和卟啉属于一组特征是四吡咯环体系的化学品。维生素 B<sub>12</sub> 的生物合成太复杂, 目前尚未完全表征, 但许多涉及的酶和底物现在是已知的。

烟酸(烟酸盐)和烟酰胺为吡啶衍生物, 其也称为‘烟酸’。烟酸为重要的辅酶 NAD(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸)和 NADP(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)

和它们的还原形式的前体。

这些化合物的大规模生产很大程度上依赖于无细胞的化学合成，虽然这些化学品中的一些如核黄素、维生素 B<sub>6</sub>、泛酸和生物素也已通过微生物的大规模培养产生。只有维生素 B<sub>12</sub> 是仅通过发酵产生的，因为其合成复杂。体外方法需要大量输入材料和时间，通常成本高昂。

### 嘌呤、嘧啶、核苷和核苷酸的代谢和用途

嘌呤和嘧啶代谢基因及它们相应的蛋白质为治疗肿瘤疾病和病毒感染的重要靶标。术语“嘌呤”或“嘧啶”包括构成核酸、辅酶和核苷酸的含氮碱基。术语“核苷酸”包括核酸分子的基本结构单位，其由含氮碱基、戊糖(对 RNA 而言，该糖为核糖，对 DNA 而言，该糖为 D-脱氧核糖)和磷酸组成。术语“核苷”包括作为核苷酸前体的分子，但其缺少核苷酸所具有的磷酸部分。通过抑制这些分子的生物合成，或抑制它们形成核酸分子的动员，可抑制 RNA 和 DNA 合成；通过以靶向癌性细胞的方式抑制这种活性，可抑制肿瘤细胞分裂和复制的能力。此外，有不形成核酸分子但作为能量贮存(即 AMP)或作为辅酶(即 FAD 和 NAD)的核苷酸。

一些出版物已描述了这些化学品通过影响嘌呤和 / 或嘧啶代谢对这些医学适应症的用途(例如 Christopherson, R.I. and Lyons, S.D. (1990)

“Potent inhibitors of *de novo* pyrimidine and purine biosynthesis as chemotherapeutic agents.” *Med. Res. Reviews* 10: 505-548)。对参与嘌呤和嘧啶代谢的酶的研究集中在研发可用作例如免疫抑制剂或抗增生剂的新药上(Smith, J.L., (1995) “Enzymes in nucleotide synthesis.” *Curr. Opin.*

*Struct. Biol.* 5: 752-757; (1995) *Biochem Soc. Transact.* 23: 877-902)。然而，嘌呤和嘧啶碱基、核苷和核苷酸具有其它应用：用作一些精细化学品(例如，硫胺素、S-腺苷-甲硫氨酸、叶酸盐或核黄素)生物合成的中间物，作为细胞的能量载体(例如，ATP 或 GTP)，和本身作为化学品，通常作为增味剂(例如，IMP 或 GMP)或用于一些医学应用(参见例如，Kuninaka, A. (1996) *Nucleotides and Related Compounds in Biotechnology* vol. 6,

Rehm *et al.*, eds. VCH: Weinheim, p. 561-612)。同样,参与嘌呤、嘧啶、核苷或核苷酸代谢的酶越来越多地用作靶标,研发了针对所述靶标的用于作物保护的化学品,包括杀真菌剂、除草剂和杀虫剂。

已经表征了这些化合物在细菌中的代谢(综述参见例如, Zalkin, H. and Dixon, J.E. (1992) “*de novo* purine nucleotide biosynthesis”, in: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology*, vol. 42, Academic Press:, p. 259-287; and Michal, G. (1999) “Nucleotides and Nucleosides”, Chapter 8 in: *Biochemical Pathways: An Atlas of Biochemistry and Molecular Biology*, Wiley: New York)。嘌呤代谢已是深入研究的主题,其对细胞的正常功能是必需的。高等动物中受损的嘌呤代谢可引起严重疾病,如痛风。嘌呤核苷酸从核糖-5-磷酸开始合成,经过一系列步骤,通过中间化合物肌苷-5'-磷酸 (IMP),产生鸟苷-5'-单磷酸(GMP)或腺苷-5'-单磷酸(AMP),由此易于形成用作核苷酸的三磷酸形式。这些化合物也用作能量储存,这样它们的降解可以为细胞内许多不同生物化学过程提供能量。嘧啶生物合成由从核糖-5-磷酸形成尿苷-5'-单磷酸(UMP)进行。UMP 又转化为胞苷-5'-三磷酸(CTP)。所有这些核苷酸的脱氧形式在一步还原反应中从核苷酸的二磷酸核糖形式产生为核苷酸的二磷酸脱氧核糖形式。磷酸化后,这些分子可参与 DNA 合成。

### 海藻糖代谢和用途

海藻糖由两个葡萄糖分子通过  $\alpha,\alpha$ -1,1 键结合组成。它通常用于食品工业作为甜味剂,作为干的或冷冻食品的添加剂,和用于饮料中。然而它在制药、化妆品和生物技术工业中也有应用(参见例如, Nishimoto *et al.*, (1998) U.S. Patent No. 5,759,610; Singer, M.A. and Lindquist, S. (1998) *Trends Biotech.* 16: 460-467; Paiva, C.L.A. and Panek, A.D. (1996) *Biotech. Ann. Rev.* 2: 293-314; and Shiosaka, M. (1997) *J. Japan* 172: 97-102)。海藻糖通过酶从许多微生物产生,并天然释放入周围培养基中,可用本领域已知的方法从培养基收集海藻糖。

## I. 重组微生物和培养微生物使得产生精细化学品的的方法

本发明的方法学描述了微生物，例如，重组微生物，其优选包括如本文描述的载体或者基因(例如，野生型和/或突变的基因)和/或以导致产生所希望的精细化学品，例如赖氨酸的方式培养。术语“重组的”微生物包括这样的微生物(例如，细菌、酵母细胞、真菌细胞等等)，其与它所来自的天然发生的微生物相比显示出改变的、修饰的或者不同的基因型和/或表型(例如，当遗传修饰影响微生物的编码核酸序列时)。优选地，本发明的“重组”微生物已经经基因工程化从而它过表达如本文描述的至少一种细菌基因或者基因产物，优选生物合成酶编码基因，例如，包括在如本文描述的重载体内的果糖-1,6-二磷酸酶的编码基因和/或生物合成酶，例如，从重组载体表达的果糖-1,6-二磷酸酶。技术人员将明白表达或过表达基因产物的微生物由于编码所述基因产物的核酸序列和/或基因的表达或者过表达而产生或过量产生所述基因产物。在一个实施方案中，重组微生物具有增加的生物合成酶，例如，果糖-1,6-二磷酸酶活性。

在本发明的一些实施方案中，除了果糖-1,6-二磷酸酶基因或酶之外，可以调节至少一种基因或蛋白质以便增强 L-氨基酸的产生。例如，生物合成途径，例如，糖酵解、糖回补、柠檬酸循环、戊糖磷酸循环，或者氨基酸输出的一种基因或者酶可以被失调。此外，可以失调调节基因或者蛋白质。

在多种实施方案中，可以增加基因的表达以增加该基因编码的蛋白质的细胞内活性或浓度，从而最终提高所希望的氨基酸的产量。本领域技术人员可以使用多种技术实现所希望的结果。例如，技术人员可以增加一种或多种基因的拷贝数、使用强启动子，和/或使用编码具有高活性的对应酶的基因或等位基因。使用本发明的方法，例如，特定基因的过表达、相应蛋白质的活性或浓度可以基于起始活性或浓度增加至少约 10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%、300%、400%、500%、1000%或 2000%。

在多种实施方案中，失调的基因可以包括，但不限于，至少一种下面

的基因或蛋白质:

- ask基因,其编码抗反馈天冬氨酸激酶(如国际公布号 WO2004069996 中公开);
- dapA 基因, 其编码二氢吡啶二羧酸合酶(如在国际公布号 WO200100843 中分别在 SEQ ID NOs:55 和 56 中公开);
- asd 基因, 其编码天冬氨酸半醛脱氢酶(如在欧洲公布号 1108790 中分别在 SEQ ID NOs:3435 和 6935 中公开);
- dapB 基因, 其编码二氢吡啶二羧酸还原酶(如在国际公布号 WO200100843 中分别在 SEQ ID NOs:35 和 36 中公开);
- ddh 基因, 其编码二氨基庚二酸脱氢酶(如在欧洲公布号 1108790 中分别在 SEQ ID NOs:3444 和 6944 中公开);
- lysA 基因, 其编码二氨基庚二酸差向异构酶(如在欧洲公布号 1108790 中分别在 SEQ ID NOs:3451 和 6951 中公开);
- lysE 基因, 其编码赖氨酸输出蛋白(如在欧洲公布号 1108790 中分别在 SEQ ID NOs:3455 和 6955 中公开);
- pycA 基因, 其编码丙酮酸羧化酶(如在欧洲公布号 1108790 中分别在 SEQ ID NOs: 765 和 4265 中公开);
- zwf 基因, 其编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(如在国际公布号 WO200100844 中分别在 SEQ ID NOs: 243 和 244 中公开);
- pepCL 基因, 其编码磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(如在欧洲公布号 1108790 中分别在 SEQ ID NOs:3470 和 6970 中公开);
- gap 基因, 其编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶(如在国际公布号 WO200100844 中分别在 SEQ ID NOs: 67 和 68 中公开);
- zwa1 基因, 其编码 RPF 蛋白质前体(如在欧洲公布号 1108790 中分别在 SEQ ID NOs: 917 和 4417 中公开);
- tkt 基因, 其编码转酮酶(如在国际公布号 WO200100844 中分别在 SEQ ID NOs: 247 和 248 中公开);
- tad 基因, 其编码转醛酶(如在国际公布号 WO200100844 中分别在

**SEQ ID NOs: 245 和 246 中公开);**

- **mgo 基因, 其编码 menaquinone 氧化还原酶(如在国际公布号 WO200100844 中分别在 SEQ ID NOs:569 和 570 中公开);**
- **tpi 基因, 其编码丙糖磷酸异构酶(如在国际公布号 WO200100844 中分别在 SEQ ID NOs: 61 和 62 中公开);**
- **pgk 基因, 其编码 3-磷酸甘油酸激酶(如在国际公布号 WO200100844 中分别在 SEQ ID NOs: 69 和 70 中公开); 和**
- **sigC 基因, 其编码 RNA-聚合酶  $\sigma$  因子 sigC(如在欧洲公布号 1108790 中分别在 SEQ ID NOs: 284 和 3784 中公开)。**

在特定实施方案中, 可以过表达所述基因和/或增加所述蛋白质的活性。

备选地, 在其他实施方案中, 可以减弱、减小或者抑制基因的表达以便减小, 例如, 消除该基因编码的蛋白质的细胞内活性或浓度, 从而最终提高所希望的氨基酸的产量。例如, 本领域技术人员可以使用弱启动子。备选地或者组合地, 技术人员可以使用编码具有低活性的对应酶的基因或者等位基因或者失活对应的基因或者酶。使用本发明的方法, 可以将对应蛋白质的活性或者浓度减小到野生型蛋白质的活性或浓度的约 0 到 50%、0 到 25%、0 到 10%、0 到 9%、0 到 8%、0 到 7%、0 到 6%、0 到 5%、0 到 4%、0 到 3%、0 到 2%或 0 到 1%。

在某些实施方案中, 失调的基因可以包括, 但不限于, 至少一种下面的基因或者蛋白质:

- **pepCK 基因, 其编码磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(如在国际公布号 WO200100844 中分别在 SEQ ID NOs: 179 和 180 中公开);**
- **malE 基因, 其编码苹果酸酶(如在欧洲公布号 1108790 中分别在 SEQ ID NOs: 3328 和 6828 中公开);**
- **glgA 基因, 其编码糖原合酶(如在欧洲公布号 1108790 中分别在 SEQ ID NOs: 1239 和 4739 中公开);**
- **pgi 基因, 其编码葡萄糖-6-磷酸异构酶(如在国际公布号**

- WO200100844 中分别在 SEQ ID NOs: 41 和 42 中公开);
- dead 基因, 其编码依赖 ATP 的 RNA 解旋酶(如在欧洲公布号 1108790 中分别在 SEQ ID NOs: 1278 和 4778 中公开);
  - menE 基因, 其编码邻-琥珀酰基苯甲酸-CoA 连接酶(如在欧洲公布号 1108790 中分别在 SEQ ID NOs: 505 和 4005 中公开);
  - citE 基因, 其编码柠檬酸裂合酶  $\beta$  链(如在国际公布号 WO200100844 中分别在 SEQ ID NOs: 547 和 548 中公开);
  - mike17 基因, 其编码转录调节物(如在欧洲公布号 1108790 中分别在 SEQ ID NOs: 411 和 3911 中公开);
  - poxB 基因, 其编码丙酮酸脱氢酶(如在国际公布号 WO200100844 中分别在 SEQ ID NOs: 85 和 86 中公开);
  - zwa2 基因, 其编码 RPF 蛋白质前体(在欧洲公布号 1106693 中公开);  
和
  - sucC 基因, 其编码琥珀酰辅酶 A 合成酶(如在欧洲公布号 1103611 中公开)。

在特定实施方案中, 可以减弱、减小或者抑制所述基因和/或减小所述蛋白质的活性。

术语“操作的微生物”包括已经工程化(例如, 基因工程化)或者修饰从而导致代谢途径的破坏或者改变以导致碳代谢的改变的微生物。当酶在代谢工程化的细胞中以比它在相当的野生型细胞中表达的水平更高的水平表达时, 该酶在代谢工程化的细胞中“过表达”。对于本发明, 在不内源表达特定酶的细胞中, 认为该酶在该细胞中的任何水平的表达都是该酶的“过表达”。过表达可以导致该基因所编码的蛋白质, 例如, 果糖-1,6-二磷酸酶的增加的活性。

此类微生物的修饰或者工程化可以根据本文描述的任意方法, 包括但不限于, 生物合成途径的失调和/或至少一种生物合成酶的过表达。“经操作的”酶(例如, “经操作的”生物合成酶)包括这样的酶, 其表达或者产生已经受到改变或者修饰从而例如与对应的野生型或者天然发生的酶相比, 该

酶的至少一种上游或下游前体、底物或者产物受到改变或修饰，例如，具有增加的活性。

术语“过表达的”或者“过表达”包括基因产物(例如，戊糖磷酸生物合成酶)以高于微生物的操作前或者没有操作的相当的微生物中该基因产物的表达水平的水平表达。在一个实施方案中，可以基因操作(例如，基因工程化)微生物以过表达一定水平的基因产物，该水平高于微生物的操作前或者没有操作的相当的微生物中该基因产物的表达水平。基因操作可以包括，但不限于，改变或者修饰与特定基因的表达相关的调节序列或者位点(例如，通过加入强启动子、诱导型启动子或者多个启动子或者通过除去调节序列从而表达是组成型的)，修饰特定基因的染色体位置，改变与特定基因相邻的核酸序列，如核糖体结合位点或者转录终止子，增加特定基因的拷贝数，修饰涉及特定基因的转录和/或特定基因产物的翻译的蛋白质(例如，调节蛋白质、抑制子、增强子、转录激活因子等等)，或者本领域常规的失调特定基因的表达的任何其他常规方法(包括但不限于使用反义核酸分子，例如，阻断抑制蛋白质的表达)。

在另一实施方案中，可以在身体上或者环境上操作微生物以过表达一定水平的基因产物，所述水平高于微生物的操作前或者没有操作的相当的微生物中该基因产物的表达水平。例如，可以将微生物用已知或者怀疑增加特定基因的转录和/或特定基因产物的翻译的试剂处理或者在该试剂存在下培养，从而增强或者增加转录和/或翻译。备选地，可以将微生物在选择用来增加特定基因的转录和/或特定基因产物的翻译的温度下培养，从而增强或者增加转录和/或翻译。

术语“失调的”或者“失调”包括改变或者修饰微生物中编码生物合成途径中一种酶的至少一种基因，从而该微生物中所述生物合成酶的水平或者活性受到改变或者修饰。优选地，改变或者修饰编码生物合成途径中一种酶的至少一种基因从而基因产物受到增强或增加，从而增强或增加基因产物的活性。短语“失调的途径”还可以包括生物合成途径，其中编码生物合成途径中一种酶的一种以上的基因受到改变或者修饰从而一种以上的生物

合成酶的水平或者活性受到改变或者修饰。“失调”微生物中途径的能力(例如,同时失调生物合成途径中一种以上的基因)由微生物的特定现象引起,其中一种以上的酶(例如,两种或三种生物合成酶)由称作“操纵子”的遗传物质的连续片段上相互相邻的基因编码。

术语“操纵子”包括基因表达的协调单位,其含有启动子和可能地调节元件,该调节元件与一种或多种,优选至少两种结构基因(例如,编码酶,例如生物合成酶的基因)结合。结构基因的表达可以例如,通过结合调节元件的调节蛋白质或者通过转录的抗终止来协调地调节。可以转录结构基因得到编码所有结构蛋白质的单个 mRNA。由于包括在操纵子中基因的协同调节,所以单个启动子和/或调节元件的改变或修饰可以导致操纵子编码的每种基因产物的改变或修饰。调节元件的改变或修饰可以包括,但不限于除去内源启动子和/或调节元件,加入强启动子、诱导型启动子或者多个启动子或者除去调节序列,从而基因产物的表达受到修饰,修饰操纵子的染色体位置,改变与操纵子相邻或者操纵子内的核酸序列,如核糖体结合位点,增加操纵子的拷贝数,修饰参与操纵子转录和/或操纵子的基因产物翻译的蛋白质(例如,调节蛋白质、抑制子、增强子、转录激活因子等等),或者本领域常规的失调基因表达的任何其他常规方法(包括但不限于使用反义核酸分子,例如,阻断抑制蛋白质的表达)。失调还可以包括改变一种或多种基因的编码区以产生例如,抗反馈或者具有更高或更低比活性的酶。

本发明的特别优选的“重组”微生物已经遗传工程化以过表达细菌来源的基因或者基因产物。术语“细菌来源的”或者“来自”例如细菌,包括在细菌中天然发现的基因或者细菌基因编码的基因产物(例如,由果糖-1,6-二磷酸酶编码)。

本发明的方法学还描述了过表达一种或多种基因,例如,果糖-1,6-二磷酸酶基因或者增加或增强果糖-1,6-二磷酸酶活性的重组微生物。本发明的特别优选的重组微生物(例如,谷氨酸棒杆菌、*Corynebacterium acetoglutamicum*,嗜乙酰乙酸棒杆菌(*Corynebacterium acetoacidophilum*)和 *Corynebacterium thermoaminogenes*)已经经基因工程化来过表达生物合

成酶(例如,果糖-1,6-二磷酸酶,SEQ ID NO:2的氨基酸序列,或者由SEQ ID NO:1的核酸序列编码)。

本发明的其他优选的“重组”微生物具有在戊糖磷酸途径中失调的酶。短语“具有失调的戊糖磷酸途径的微生物”包括在编码戊糖磷酸途径的酶的至少一种基因中具有改变或修饰或者在包括编码戊糖磷酸途径的酶的至少一种基因的操纵子中具有改变或修饰的微生物。优选的“具有失调的戊糖磷酸途径的微生物”已经经基因工程化来过表达棒杆菌(例如,谷氨酸棒杆菌)生物合成酶(例如,已经工程化来过表达果糖-1,6-二磷酸酶)。

在另一优选实施方案中,设计或工程化重组微生物从而过表达或者失调一种或多种戊糖磷酸生物合成酶。

在另一优选实施方案中,本发明的微生物过表达或者突变来自细菌的基因或者生物合成酶(例如,戊糖磷酸生物合成酶)。术语“细菌来源的“或者”来自”例如细菌包括细菌基因编码的基因产物(例如,果糖-1,6-二磷酸酶)。

在一个实施方案中,本发明的重组微生物是革兰氏阳性生物(例如,由于微生物周围存在革兰氏阳性细胞壁而保留碱性染料,例如,结晶紫的微生物)。在优选实施方案中,重组微生物是属于选自芽孢杆菌属(*Bacillus*)、短杆菌属(*Brevibacterium*)、棒杆菌属(*Corynebacterium*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、乳球菌属(*Lactococci*)和链霉菌属(*Streptomyces*)的属。在更优选的实施方案中,重组微生物是棒杆菌属。在另一优选的实施方案中,重组微生物选自谷氨酸棒杆菌、嗜乙酰乙酸棒杆菌、*Corynebacterium acetoacidophilum* 或 *Corynebacterium thermoaminogenes*。在尤其优选的实施方案中,重组微生物是谷氨酸棒杆菌。

本发明的一个重要方面涉及培养本文描述的重组微生物,从而产生所希望的化合物(例如,所希望的精细化学品)。术语“培养”包括保持和/或生长本发明的活的微生物(例如,保持和/或生长培养物或者菌株)。在一个实施方案中,在液体培养基中培养本发明的微生物。在另一实施方案中,在固体培养基或者半固体培养基中培养本发明的微生物。在优选实施方案中,

在包含对微生物的保持和/或培养必需或者有益的培养基(例如, 无菌的、液体培养基)中培养本发明的微生物。可以使用的碳源包括糖和碳水化合物, 例如, 葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、糖蜜、淀粉和纤维素, 油和脂肪, 如大豆油、向日葵油、花生油和椰子油, 脂肪酸, 如棕榈酸、硬脂酸和亚油酸, 醇, 例如甘油和乙醇, 和有机酸, 如乙酸。在优选实施方案中, 为果糖或蔗糖。这些物质可以单独使用或者作为混合物使用。

可以使用的氮源包含含氮的有机化合物, 如蛋白胨、酵母提取物、肉膏、麦芽膏、玉米浆、大豆粉和尿素或者无机化合物, 如硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵和硝酸铵。氮源可以单独或者作为混合物使用。可以使用的磷源是磷酸、磷酸二氢钾、或者磷酸氢二钾或者对应的含钠盐。培养基还必须还含有生长必需的金属盐, 如硫酸镁或者硫酸铁。最后, 除了上面陈述的物质, 还可以使用必需的生长促进物质, 如氨基酸和维生素。还可以向培养基中加入适宜的前体。所陈述的饲料物质可以作为一批加入培养物或者在培养期间适当加入。

优选地, 在受控的 pH 下培养本发明的微生物。术语“受控的 pH”包括导致产生所希望的精细化学品, 如赖氨酸的任意 pH。在一个实施方案中, 在约 7 的 pH 培养微生物。在另一实施方案中, 在 6.0 到 8.5 的 pH 培养微生物。可以通过本领域技术人员已知的任意多种方法保持所希望的 pH。例如, 碱性化合物, 如氢氧化钠、氢氧化钾、氨或者氨水, 或者酸性化合物, 如磷酸或硫酸可以用于适当控制培养物的 pH。

还适宜地, 在受控的通气下培养本发明的微生物。术语“受控的通气”包括足够的通气(例如, 氧气)以导致产生所希望的精细化学品, 例如, 赖氨酸。在一个实施方案中, 通过调节培养物中氧气水平, 例如, 通过调节培养基中溶解氧的量来控制通气。优选地, 通过搅拌培养物控制培养物的通气。通过螺旋桨或者类似的机械搅拌设备, 通过旋转或者摇动生长容器(例如, 发酵罐)或者通过多种泵动设备来提供搅拌。可以通过培养基(例如, 通过发酵混合物)通入无菌空气或者氧气进一步控制通气。还优选地, 在没有过多泡沫形成的条件下培养本发明的微生物(例如, 通过加入消泡剂, 如

脂肪酸聚乙二醇酯)。

此外，可以在受控的温度下培养本发明的微生物。术语“受控的温度”包括导致产生所希望的精细化学品，例如，赖氨酸的任意温度。在一个实施方案中，受控的温度包括 15°C 到 95°C 的温度。在另一实施方案中，受控的温度包括 15°C 到 70°C 的温度。优选的温度为 20°C 到 55°C，更优选 30°C 到 45°C 或者 30°C 到 50°C。

可以在液体培养基中并且优选连续或者间歇地通过常规培养方法培养(保持和/或生长)微生物，所述方法为诸如静止培养、试管培养、摇动培养(例如，旋转摇动培养、摇瓶培养等等)、通气旋动培养，或者发酵。在优选实施方案中，在摇瓶中培养微生物。在更优选的实施方案中，在发酵罐中培养微生物(例如，发酵方法)。本发明的发酵方法包括，但不限于分批、补料分批和连续发酵方法。短语“分批方法”或者“分批发酵”指封闭系统，其中在发酵开始时设置培养基、营养物、补充添加剂等等的组成并且在发酵期间它们不改变，然而，可以控制诸如 pH 和氧浓度的因素以防止过度培养基酸化和/或微生物死亡。短语“补料分批方法”或者“补料分批”发酵指分批发酵，只是随着发酵的进行加入(例如，以增量加入或者连续加入)一种或多种底物。短语“连续方法”或者“连续发酵”指一种系统，其中向发酵罐连续加入确定的发酵培养基并同时除去等量使用的或者“条件”培养基以回收所希望的精细化学品，如赖氨酸。已经研发了多种此类方法并且它们是本领域公知的。

短语“在一定条件下培养从而产生所希望的精细化学品，例如，赖氨酸”包括在适于或者足够得到产生所希望的精细化学品或者得到所产生的特定精细化学品，例如，赖氨酸的目的产量的条件(例如，温度、压力、pH、持续时间等等)下保持和/或生长微生物。例如，培养持续一定时间以产生所希望量的精细化学品(例如，赖氨酸)。优选地，培养持续一定时间以足够基本上达到该精细化学品的最大产量。在一个实施方案中，培养持续约 12 到 24 小时。在另一实施方案中，培养持续约 24 到 36 小时，36 到 48 小时，48 到 72 小时，72 到 96 小时，96 到 120 小时，120 到 144 小时，或

者大于 144 小时。在另一实施方案中，培养持续足够达到精细化学品的生产产量的时间，例如，培养细胞使得产生至少约 15 到 20 g/L 精细化学品，产生至少约 20 到 25 g/L 精细化学品，产生至少约 25 到 30 g/L 精细化学品，产生至少约 30 到 35 g/L 精细化学品，产生至少约 35 到 40 g/L 精细化学品，产生至少约 40 到 50 g/L 精细化学品，产生至少约 50 到 60 g/L 精细化学品，产生至少约 60 到 70 g/L 精细化学品，产生至少约 70 到 80 g/L 精细化学品，产生至少约 80 到 90 g/L 精细化学品，产生至少约 90 到 100 g/L 精细化学品，产生至少约 100 到 110 g/L 精细化学品，产生至少约 110 到 120 g/L 精细化学品，产生至少约 120 到 130 g/L 精细化学品，产生至少约 130 到 140 g/L 精细化学品，或产生至少约 140 到 160 g/L 精细化学品。在再一个实施方案中，在一定条件下培养微生物使得在约 24 小时、约 36 小时、约 40 小时、约 48 小时、约 72 小时、约 96 小时、约 108 小时、约 122 小时、或约 144 小时内产生精细化学品的优选的产率，例如，上面给出的范围内的产率。

本发明的方法学可以还包括回收所希望的精细化学品，例如，赖氨酸的步骤。术语“回收”所希望的精细化学品，例如，赖氨酸包括从培养基提取、收获、分离或者纯化所述化合物。可以根据本领域已知的任意常规分离或者纯化方法回收化合物，所述方法包括，但不限于，用常规树脂(例如，阴离子或者阳离子交换树脂、非离子吸附树脂，等等)处理，用常规吸附剂(例如，活性炭、硅酸、硅胶、纤维素、矾土，等等)处理、改变 pH、溶剂萃取(例如，用常规溶剂，如醇、乙酸乙酯、己烷等等)、透析、过滤、浓缩、结晶、重结晶、pH 调节、冻干等等。例如，可以通过首先从培养物除去微生物从培养基回收精细化学品，例如，赖氨酸。然后将培养基穿过阳离子交换树脂以除去不想要的阳离子，然后通过阴离子交换树脂以除去不想要的有机阴离子和比目的精细化学品(例如，赖氨酸)具有更强酸性的有机酸。

优选地，本发明的所希望的精细化学品是“提取的”、“分离的”或者“纯化的”从而所得制备物基本上没有其他组分(例如，没有培养基组分和/或发

酵副产物)。术语“基本上没有其他组分”包括所希望的化合物的制备物，其中所述化合物与产生该化合物的培养物的培养基组分或者副产物分离(例如，纯化或者部分纯化)。

在一个实施方案中，所述制备物具有大于约80%(按干重计)所希望的化合物(例如，小于约20%其他培养基组分或者发酵副产物)，更优选地大于约90%所希望的化合物(例如，小于约10%其他培养基组分或者发酵副产物)，更优选地大于约95%所希望的化合物(例如，小于约5%其他培养基组分或者发酵副产物)，最优选地大于约98-99%所希望的化合物(例如，小于约1-2%其他培养基组分或者发酵副产物)。

在备选方法中，例如，当微生物是生物学上无害(例如，安全)的时，不从微生物纯化所希望的精细化学品，例如，赖氨酸。例如，完整培养物(或者培养上清液)可以用作产物来源(例如，粗产物)。在一个实施方案中，不加修饰地使用培养物(或者培养上清液)。在另一实施方案中浓缩培养物(或培养上清液)。在再一个实施方案中，干燥或者冻干培养物(或培养上清液)。

## II. 独立于前体喂饲要求产生精细化学品的方法

取决于所操作的生物合成酶或者生物合成酶的组合，可能希望或者必须对本发明的微生物提供(例如，喂饲)至少一种戊糖磷酸途径生物合成前体从而产生精细化学品，例如，赖氨酸。术语“戊糖磷酸途径生物合成前体”或者“前体”包括试剂或者化合物，其当提供给或者接触微生物或者包括在微生物的培养基中时用于增强或者增加戊糖磷酸生物合成。在一个实施方案中，戊糖磷酸途径生物合成前体或者前体是葡萄糖。在另一实施方案中，戊糖磷酸途径生物合成前体是果糖。所加的葡萄糖或者果糖的量优选是导致培养基中足够增强微生物的生产力的浓度(例如，足够增强精细化学品，例如，赖氨酸的浓度)的量。本发明的戊糖磷酸生物合成前体可以以浓缩的溶液或者悬浮液(例如，在适宜的溶剂，如水或者缓冲液中)的形式或者固体形式(例如，粉末形式)加入。此外，本发明的戊糖磷酸生物合成前体可以在给定时间期间内作为一个等分试样、连续或者间歇地加入。

例如，当本发明的方法学用于产生高产率的精细化学品时，在本发明的戊糖磷酸生物合成方法学中提供戊糖磷酸生物合成前体导致高成本。因此，本发明的优选方法学描述了这样的微生物，它的至少一种生物合成酶或者生物合成酶的组合(例如，至少一种戊糖磷酸生物合成酶)受到操作从而以独立于前体饲料的方式产生赖氨酸或者其他所希望的精细化学品。短语“独立于前体饲料的方式”例如当涉及产生所希望的化合物的方法时包括产生所希望的化合物的方法或者方式，其不取决或者依赖于提供(例如，喂饲)给用于产生所希望的化合物的微生物的前体。例如，本发明方法学中描述的微生物可以用于以不需要喂饲前体葡萄糖或者果糖的方式产生精细化学品。

本发明的备选优选方法学描述了这样的微生物，它的至少一种生物合成酶或者生物合成酶的组合受到操作从而以基本上独立于前体饲料的方式产生L-赖氨酸或者其他精细化学品。短语“基本上独立于前体饲料的方式”包括产生所希望的化合物的方法，其较低程度地取决于或者依赖于对被利用的微生物提供(例如，喂饲)的前体。例如，本发明方法学中描述的微生物可以用于以实质性减小量的前体葡萄糖或者果糖的方式产生精细化学品。

以独立于前体饲料或者备选地，以基本上独立于前体饲料的方式产生所希望的精细化学品的优选方法包括培养微生物，该微生物已经受到操作(例如，设计的或者工程化的，例如，基因工程化的)从而至少一种戊糖磷酸生物合成酶的表达受到修饰。例如，在一个实施方案中，操作(例如，设计或者工程化)微生物使得至少一种戊糖磷酸生物合成酶的产生失调。在优选实施方案中，操作(例如，设计或者工程化)微生物使得它具有失调的生物合成途径，例如，如本文定义的失调的戊糖磷酸生物合成途径。在另一优选实施方案中，操作(例如，设计或者工程化)微生物使得过表达至少一种戊糖磷酸生物合成酶，例如，果糖-1,6-二磷酸酶。

### III. 高产率生产方法

本发明的尤其优选的实施方案是用于产生精细化学品，例如，赖氨酸的高产率生产方法，其包括在一定条件下培养所操作的微生物使得以显著高产率产生赖氨酸。术语“高产率生产方法”例如，用于产生精细化学品，例如，赖氨酸的高产率生产方法包括导致以升高或者高于相当的生产方法的通常水平的水平产生所希望的精细化学品。优选地，高产率生产方法导致以显著高产率产生所希望的化合物。短语“显著高产率”包括生产水平或者产率，其足够升高或者高于相当的生产方法通常的水平，例如，升高到足够商业化生产所希望的产物(例如，以商业上可行的成本生产产物)的水平。在一个实施方案中，本发明描述了产生赖氨酸的高产率生产方法，其包括在一定条件下培养受到操作的微生物使得以大于 2 g/L、10 g/L、15 g/L、20 g/L、25 g/L、30 g/L、35 g/L、40 g/L、45 g/L、50 g/L、55 g/L、60 g/L、65 g/L、70 g/L、75 g/L、80 g/L、85 g/L、90 g/L、95 g/L、100 g/L、110 g/L、120 g/L、130 g/L、140 g/L、150 g/L、160 g/L、170 g/L、180 g/L、190 g/L、或 200 g/L 的水平产生赖氨酸。

本发明还描述了产生所希望的精细化学品，例如，赖氨酸的高产率生产方法，其包括在一定条件下培养所操作的微生物使得在商业上希望的时间期限内产生足够升高水平的化合物。在代表性实施方案中，本发明描述了产生赖氨酸的高产率生产方法，其包括在一定条件下培养所操作的微生物使得在 5 小时内以大于 15-20 g/L 的水平产生赖氨酸。在另一实施方案中，本发明描述了产生赖氨酸的高产率生产方法，其包括在一定条件下培养所操作的微生物使得在 10 小时内以大于 25-40 g/L 的水平产生赖氨酸。在另一实施方案中，本发明描述了产生赖氨酸的高产率生产方法，其包括在一定条件下培养所操作的微生物使得在 20 小时内以大于 50-100 g/L 的水平产生赖氨酸。在另一实施方案中，本发明描述了产生赖氨酸的高产率生产方法，其包括在一定条件下培养所操作的微生物使得在 40 小时内以大于 140-160 g/L，例如大于 150 g/L 的水平产生赖氨酸。在另一实施方案中，本发明描述了产生赖氨酸的高产率生产方法，其包括在一定条件下培养所操作的微生物使得在 40 小时内以大于 130-160 g/L，例如，40 小时内大于

135、145 或 150 g/L 的水平产生赖氨酸。所包括的值和范围和/或本文所给出的范围内的中间值也意在本发明的范围内。例如, 在 40 小时内至少 140、141、142、143、144、145、146、147、148、149、和 150 g/L 的水平赖氨酸生产意在包括在 40 小时内 140-150 g/L 的范围内。在另一实例中, 140-145 g/L 或 145-150 g/L 的范围意在包括在 40 小时内 140-150 g/L 的范围内。此外, 技术人员将明白培养所操作的微生物以实现例如, “40 小时内 140-150 g/L” 的生产水平包括培养该微生物额外的时间期限(例如, 长于 40 小时的时间期限), 任选导致甚至更高产率的所产生的赖氨酸。

#### IV. 分离的核酸分子和基因

本发明的另一方面描述了用于本发明方法的分离的核酸分子, 其编码蛋白质(例如, 谷氨酸棒杆菌蛋白质), 例如, 棒杆菌戊糖磷酸生物合成酶(例如, 谷氨酸棒杆菌戊糖磷酸酶)。在一个实施方案中, 用于本发明方法的分离的核酸分子是果糖-1,6-二磷酸酶核酸分子。

术语“核酸分子”包括 DNA 分子(例如, 线性、环状、cDNA 或者染色体 DNA)和 RNA 分子(例如, tRNA、rRNA、mRNA)和使用核苷酸类似物产生的 DNA 或者 RNA 的类似物。核酸分子可以是单链或者双链的, 但是优选双链 DNA。术语“分离的”核酸分子包括这样的核酸分子, 其没有该核酸所来源的生物的染色体 DNA 中天然处于该核酸分子侧翼的序列(即, 位于该核酸分子的 5'和 3'末端的序列)。在多种实施方案中, 所分离的核酸分子可以含有该核酸所来源的生物的染色体 DNA 中天然处于该核酸分子侧翼的核苷酸序列的小于约 10 kb、5 kb、4kb、3kb、2kb、1 kb、0.5 kb、0.1 kb、50 bp、25 bp 或 10 bp。此外, “分离的”核酸分子, 如 cDNA 分子当通过重组技术产生时可以基本上没有其他细胞物质, 或者当化学合成时基本上没有化学前体或者其他化学品。

本文所用术语“基因”包括核酸分子(例如, DNA 分子或者其片段), 例如, 编码蛋白质或者 RNA 的核酸分子, 所述核酸分子在生物中通过基因间 DNA(即, 间插 DNA 或者间隔 DNA, 其天然位于该生物的染色体 DNA

中该基因的侧翼和/或分离基因)与另一个基因或者其他基因分开。基因可以直接合成酶或者其他蛋白质分子(例如,可以包含编码序列,例如,编码蛋白质的邻接的可读框(ORF))或者它可以自身在生物中是有功能的。生物中的基因可以在如本文定义的操纵子中聚簇,所述操纵子通过基因间 DNA 与其他基因和/或操纵子分开。操纵子中所含单个基因可以重叠,所述个体基因之间没有基因间 DNA。本文所用的“分离的基因”包括这样的基因,其基本上没有该基因所来源的生物的染色体 DNA 中该基因天然侧翼的序列(即,没有编码另一种或者不同的蛋白质或者 RNA 分子的相邻编码序列、相邻结构序列等等),分离的基因任选包括 5'和 3'调节序列,例如,启动子序列和/或终止子序列。在一个实施方案中,分离的基因包括蛋白质的主要编码序列(例如,编码棒杆菌蛋白质的序列)。在另一实施方案中,所分离的基因包括蛋白质的编码序列(例如,编码棒杆菌蛋白质)和来自该基因所来源的生物的染色体 DNA 的相邻 5'和/或 3'调节序列(例如,相邻的 5'和/或 3'棒杆菌调节序列)。优选地,分离的基因含有该基因所来源的生物的染色体 DNA 中该基因天然侧翼的核苷酸序列的小于约 10 kb、5 kb、2 kb、1 kb、0.5 kb、0.2 kb、0.1 kb、50 bp、25 bp 或 10 bp。

在一方面,本发明的方法描述了所分离的果糖-1,6-二磷酸酶核酸序列或者基因的用途。

在优选实施方案中,所述核酸或者基因来自芽孢杆菌(例如,为棒杆菌来源的)。术语“来自棒杆菌”或者“棒杆菌来源的”包括在棒杆菌属的微生物中天然发现的核酸或者基因。优选地,所述核酸或者基因来自选自谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、*Corynebacterium acetoglutamicum*、嗜乙酰乙酸棒杆菌或者 *Corynebacterium thermoaminogenes* 的微生物。在特别优选的实施方案中,所述核酸或者基因来自谷氨酸棒杆菌(例如,谷氨酸棒杆菌来源的)。在再一个优选的实施方案中,所述核酸或者基因是棒杆菌基因同源物(例如,来自不同于棒杆菌的种但是与本发明的棒杆菌基因,例如,棒杆菌果糖-1,6-二磷酸酶基因具有显著同源性)。

本发明的范围内包括细菌来源的核酸分子或基因和/或棒杆菌来源的核酸分子或者基因(例如,棒杆菌来源的核酸分子或者基因),例如,本发明人鉴定的基因,例如,棒杆菌或者谷氨酸棒杆菌果糖-1,6-二磷酸酶基因。本发明的范围内还包括细菌来源的核酸分子或者基因和/或棒杆菌来源的核酸分子或者基因(例如,谷氨酸棒杆菌来源的核酸分子或者基因)(例如,谷氨酸棒杆菌核酸分子或者基因),其与天然发生的细菌和/或棒杆菌核酸分子或者基因(例如,谷氨酸棒杆菌核酸分子或者基因)不同,例如,这样的核酸分子或者基因,其核酸发生替代、插入或者缺失但是编码与本发明的天然发生的基因产物实质上相似的蛋白质。在一个实施方案中,分离的核酸分子包含 SEQ ID NO:1 中给出的核苷酸序列,或者编码 SEQ ID NO:2 中给出的氨基酸序列。

在另一实施方案中,本发明的分离的核酸分子包含与 SEQ ID NO:1 给出的核苷酸序列具有至少约 60-65%, 优选至少约 70-75%, 更优选至少约 80-85%, 甚至更优选至少约 90-95% 或者以上同一性的核苷酸序列。在另一实施方案中,所分离的核酸分子在严格条件下与具有 SEQ ID NO:1 中给出的核苷酸序列的核酸分子杂交。此类严格条件是本领域技术人员已知的并且可以见 *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1-6.3.6。严格(例如,高严格性)杂交条件的非限制性实例是在 6X 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中约 45°C 杂交,然后在 0.2 X SSC, 0.1% SDS 中 50-65°C 下洗涤一次或多次。优选地,在严格条件下与 SEQ ID NO:1 的序列杂交的本发明的分离的核酸分子对应于天然发生的核酸分子。本文所用的“天然发生的”核酸分子指具有自然中发生的核苷酸序列的 RNA 或者 DNA 分子。

可以使用标准分子生物学技术和本文提供的序列信息分离本发明的核酸分子(例如,具有 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的核酸分子)。例如,可以使用标准杂交和克隆技术(例如 Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,

NY, 1989 中描述)或者通过聚合酶链式反应使用基于 SEQ ID NO:1 的序列设计的合成的寡核苷酸引物分离核酸分子。可以使用 cDNA、mRNA 或者备选地, 基因组 DNA 作为模板和适宜的寡核苷酸引物根据标准 PCR 扩增技术扩增本发明的核酸。在另一优选实施方案中, 本发明的分离的核酸分子包含与 SEQ ID NO:1 中所示核苷酸序列互补的核酸分子。

在另一实施方案中, 分离的核酸分子是或者包括果糖-1,6-二磷酸酶基因, 或者其部分或片段。在一个实施方案中, 分离的果糖-1,6-二磷酸酶核酸分子或者基因包含 SEQ ID NO:1 中给出的核苷酸序列(例如, 包含谷氨酸棒杆菌果糖-1,6-二磷酸酶核苷酸序列)。在另一实施方案中, 分离的果糖-1,6-二磷酸酶核酸分子或者基因包含编码 SEQ ID NO:2 中给出的氨基酸序列的核苷酸序列(例如, 编码谷氨酸棒杆菌果糖-1,6-二磷酸酶氨基酸序列)。在再一个实施方案中, 分离的果糖-1,6-二磷酸酶核酸分子或者基因编码具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的果糖-1,6-二磷酸酶蛋白质的同源物。本文所用术语“同源物”包括与本文描述的野生型蛋白质或者多肽的氨基酸序列有至少约 30-35%, 优选至少约 35-40%, 更优选至少约 40-50%, 甚至更优选至少约 60%、70%、80%、90%或以上同一性并且与所述野生型蛋白质或多肽有基本上等同的功能或者生物活性的蛋白质或多肽。例如, 果糖-1,6-二磷酸酶同源物与具有 SEQ ID NO:2 给出的氨基酸序列的蛋白质有至少约 30-35%, 优选至少约 35-40%, 更优选至少约 40-50%, 甚至更优选至少约 60%、70%、80%、90%或以上同一性并且与 SEQ ID NO:2 给出的氨基酸序列的蛋白质有基本上等同(即, 是功能等同物)的功能或者生物活性(例如, 具有基本上等同的泛酸激酶活性)。在优选实施方案中, 分离的果糖-1,6-二磷酸酶核酸分子或者基因包含编码 SEQ ID NO:2 中给出的多肽的核苷酸序列。在另一实施方案中, 分离的果糖-1,6-二磷酸酶核酸分子与具有 SEQ ID NO:1 中给出的核苷酸序列的核酸分子的全部或者部分杂交或者与具有编码具有 SEQ ID NOs:2 的氨基酸序列的多肽的核苷酸序列的核酸分子的全部或者部分杂交。此类杂交条件是本领域技术人员已知的并且可以见 *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel et al.,

eds., John Wiley & Sons, Inc. (1995),第 2,4 和 6 章。额外的严格条件可以见 *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Sambrook *et al.*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (1989),第 7、9 和 11 章。严格杂交条件的非限制性实例包括在 4X 氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中,约 65-70℃下杂交(或者在 4XSSC 加上 50% 甲酰胺中约 42-50℃下杂交),然后在 1XSSC 中,约 65-70℃下洗涤一次或多次。高严格杂交条件的优选的非限制性实例包括在 1XSSC 中,约 65-70℃下杂交(或者在 1XSSC 加上 50% 甲酰胺中约 42-50℃下杂交),然后在 0.3XSSC 中,约 65-70℃下洗涤一次或多次。较低严格杂交条件的优选的非限制性实例包括在 4XSSC 中,约 50-60℃下杂交(或者备选地在 6XSSC 加上 50% 甲酰胺中约 40-45℃下杂交),然后在 2XSSC 中,约 50-60℃下洗涤一次或多次。上面引用值(例如,65-70℃或者 42-50℃)的中间范围也包括在本发明内。在杂交和洗涤缓冲液中可以用 SSPE (1X SSPE 为 0.15 M NaCl, 10mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 和 1.25 mM EDTA, pH 7.4)代替 SSC (1X SSC 为 0.15 M NaCl 和 15 mM 柠檬酸钠),杂交完成后每次洗涤进行 15 分钟。预计长度小于 50 个碱基对的杂合分子的杂交温度应该低于该杂合分子的解链温度(T<sub>m</sub>)5-10℃,其中根据下面的等式确定 T<sub>m</sub>。对于长度小于 18 个碱基对的杂合分子, T<sub>m</sub>(°C) = 2(A + T 碱基数) + 4(G + C 碱基数)。对于长度为 18 到 49 个碱基对的杂合分子, T<sub>m</sub>(°C) = 81.5 + 16.6(log<sub>10</sub>[Na<sup>+</sup>]) + 0.41(%G+C) - (600/N), 其中 N 是杂合分子的碱基数, [Na<sup>+</sup>]是杂交缓冲液中钠离子浓度(1XSSC 的[Na<sup>+</sup>]=0.165 M)。本领域技术人员将认识到可以向杂交和/或洗涤缓冲液中加入额外的试剂以减小核酸分子与膜(例如,硝酸纤维素或者尼龙膜)的非特异杂交,所述试剂包括但不限于封闭剂(例如,BSA 或者鲑精或鲱精载体 DNA)、去污剂(例如,SDS)、螯合剂(例如,EDTA)、Ficoll、PVP 等等。当使用尼龙膜时,具体地,严格杂交条件的额外优选的、非限制性实例是在 0.25-0.5M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 7% SDS 中 65℃下杂交,然后在 0.02M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% SDS 中 65℃下洗涤一次或多次,见例如, Church and Gilbert (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:1991-1995,(或备选地, 0.2X SSC, 1% SDS)。在另一优选实施方案中,

分离的核酸分子包含与本文给出的果糖-1,6-二磷酸酶核苷酸序列互补的核苷酸序列(例如,为 SEQ ID NO:1 中给出的核苷酸序列的完整互补序列)。

可以使用标准分子生物学技术和本文提供的序列信息分离本发明的核酸分子(例如,果糖-1,6-二磷酸酶核酸分子或基因)。例如,可以使用标准杂交和克隆技术(例如 Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989* 中描述)或者通过聚合酶链式反应使用基于本文给出的果糖-1,6-二磷酸酶核苷酸序列或者其侧翼序列设计的合成的寡核苷酸引物分离核酸分子。可以使用 cDNA、mRNA 或者备选地,染色体 DNA 作为模板和适宜的寡核苷酸引物根据标准 PCR 扩增技术扩增本发明的核酸(例如,果糖-1,6-二磷酸酶核酸分子或者基因)。

本发明的再一个实施方案描述了突变的果糖-1,6-二磷酸酶核酸分子或者基因。本文所用短语“突变的核酸分子”或者“突变基因”包括核酸分子或者基因,其核苷酸序列包括至少一个改变(例如,替代、插入、缺失)使得该突变体编码的多肽或者蛋白质显示出与野生型核酸分子或基因编码的多肽或蛋白质不同的活性。优选地,突变核酸分子或突变基因(例如,突变的果糖-1,6-二磷酸酶基因)编码的多肽或蛋白质与野生型核酸分子或者基因编码的多肽或者蛋白质相比具有增加的活性(例如,具有增加的果糖-1,6-二磷酸酶活性),例如,当在相似条件下测定(例如,用相同温度下培养的微生物测定)时具有增加的活性。突变基因还可以具有相比野生型多肽的产量增加的水平。

本文所用的“增加的或增强的活性”或者“增加或增强的酶活性”是比野生型核酸分子或基因编码的多肽或者蛋白质的活性大至少 5%,优选比野生型核酸分子或基因编码的多肽或者蛋白质的活性大至少 10-25%以上,更优选至少 25-50%, 50-75% 或 75-100%的活性。上面引用的值的中间范围,例如, 75-85%、85-90%、90-95%也意在被本发明包括。可以根据公认的用于测量特定目的蛋白质的活性的测定法测定活性。可以直接测量或测定

活性，例如，测量从细胞分离或纯化的蛋白质的活性。备选地，可以测量或测定细胞内或者细胞外培养基中的活性。

技术人员将明白核酸或者基因序列中甚至单个替代(例如，一个碱基替代，其编码在对应氨基酸序列中改变的氨基酸)也可以显著影响与对应野生型多肽或蛋白质相比所编码的多肽或蛋白质的活性。本文定义的突变的核酸或者突变基因(例如，编码突变多肽或蛋白质)可容易地与编码如上述的蛋白质同源物的核酸或基因相区分，因为突变核酸或突变基因编码具有改变的活性的蛋白质或基因，任选地可以观察到表达所述突变基因或核酸或者产生所述突变蛋白质或多肽的微生物(即，突变微生物)与对应的表达野生型基因或核酸或者产生野生型蛋白质或多肽的对应微生物相比不同或者相异的表型。相比，蛋白质同源物具有相同或基本上相似的活性，任选地当在微生物中产生时，与表达野生型基因或核酸的对应微生物相比在表型上是难以识别的。因此，例如，不是核酸分子、基因、蛋白质或者多肽之间序列同一性程度用于区分同源物和突变体，而是所编码的蛋白质或多肽的活性区分同源物和突变体：例如具有低(例如，30-50%序列同一性)序列同一性的同源物仍然具有基本上等同的功能活性，例如，具有99%序列同一性的突变体仍然具有显著不同或者改变的功能活性。

## V. 重组核酸分子和载体

本发明还描述了重组核酸分子(例如，重组DNA分子)，其包括本文描述的核酸分子和/或基因(例如，分离的核酸分子和/或基因)，优选棒杆菌基因，更优选地，谷氨酸棒杆菌基因，甚至更优选地，谷氨酸棒杆菌果糖-1,6-二磷酸酶基因。

本发明还描述了载体(例如，重组载体)，其包括本文描述的核酸分子(例如，分离的或重组的核酸分子和/或基因)。具体地，描述了重组载体，其包括编码本文描述的细菌基因产物，优选棒杆菌基因产物，更优选谷氨酸棒杆菌基因产物(例如，戊糖磷酸酶，例如，果糖-1,6-二磷酸酶)的核酸序列。

术语“重组核酸分子”包括核酸分子(例如，DNA分子)，其已经经改变、

修饰或者工程化使得它在核苷酸序列上与该重组核酸分子所来源的天然核酸分子不同(例如,通过加入、缺失或替代一个或多个核苷酸)。优选地,重组核酸分子(例如,重组DNA分子)包括有效连接调节序列的本发明的分离的核酸分子或者基因(例如,分离的果糖-1,6-二磷酸酶基因)。

术语“重组载体”包括载体(例如,质粒、噬菌体、噬粒、病毒、粘粒或者其他纯化的核酸载体),其已经改变、修饰或者工程化使得它含有的核酸序列比该重组载体所来源的天然核酸分子中包括的核酸序列更大、更小或者与之不同。优选地,重组载体包括果糖-1,6-二磷酸酶基因或者包括该果糖-1,6-二磷酸酶基因的重组核酸分子,其有效连接调节序列,例如,启动子序列、终止子序列和/或人工核糖体结合位点(RBS)。

短语“有效连接调节序列”指目的核酸分子或基因的核苷酸序列以某种方式连接调节序列,所述方式允许表达(例如,增强的、增加的、组成性、基础的、减弱的、减小的或者抑制的表达)所述核苷酸序列,优选表达所述核苷酸序列编码的基因产物(例如,当重组核酸分子包括在本文定义的重组载体并且导入微生物时)。

术语“调节序列”包括影响(例如,调控或调节)其他核酸序列的表达的核酸序列。在一个实施方案中,调节序列相对于具体目的基因以与该调节序列和目的基因在自然中所呈现的位置和/或方向相似或相同的位置和/或方向(例如,以天然位置和/或方向)包括在重组核酸分子或者重组载体中。例如,目的基因可以包括在重组核酸分子或者重组载体中与调节序列有效连接,该调节序列伴随或者与天然生物中目的基因相邻(例如,有效连接“天然”调节序列,例如,连接“天然”启动子)。备选地,目的基因可以包括在重组核酸分子或重组载体中有效连接调节序列,该调节序列伴随或与天然生物中的另一种(例如,不同的)基因相邻。备选地,目的基因可以包括在重组核酸分子或重组载体中有效连接来自另一生物的调节序列。例如,来自其他微生物的调节序列(例如,其他细菌调节序列、噬菌体调节序列等等)可以有效连接特定目的基因。

在一个实施方案中,调节序列是非天然的或者非天然发生的序列(例

如,已经修饰、突变、替代、衍生、缺失的序列,包括化学合成的序列)。优选的调节序列包括启动子、增强子、终止信号、抗终止信号和其他表达控制元件(例如,阻抑物或者诱导物结合的序列和/或转录和/或翻译调节蛋白质的结合位点,例如,在转录的 mRNA 中)。此类调节序列例如描述于 Sambrook, J., Fritsh, E. F., and Maniatis, T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd, ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989*。调节序列包括指导微生物中核苷酸序列的组成型表达的调节序列(例如,组成型启动子和强组成型启动子)、指导微生物中核苷酸序列的诱导型表达的调节序列(例如,诱导型启动子,例如,木糖诱导型启动子)和减弱或抑制微生物中核苷酸序列表达的调节序列(例如,减弱信号或抑制序列)。本发明范围内还包括通过除去或者缺失调节序列调节目的基因的表达。例如,可以除去参与转录的负调节的序列使得目的基因的表达得到增强。

在一个实施方案中,本发明的重组核酸分子或者重组载体包括与启动子或者启动子序列有效连接的编码至少一种细菌基因产物(例如,戊糖磷酸生物合成酶,例如,果糖-1,6-二磷酸酶)的核酸序列或者基因。本发明的优选启动子包括棒杆菌启动子和/或噬菌体启动子(例如,感染棒杆菌的噬菌体)。在一个实施方案中,启动子是棒杆菌启动子,优选强棒杆菌启动子(例如,与棒杆菌中生物化学管家基因结合的启动子或者与棒杆菌中糖酵解途径基因结合的启动子)。在另一实施方案中,启动子是噬菌体启动子。

在另一实施方案中,本发明的重组核酸分子或者重组载体包括一种或多种终止序列(例如,转录终止序列)。术语“终止序列”包括用于终止基因的转录的调节序列。终止序列(或者串联转录终止子)还可以用于稳定 mRNA(例如,通过向 mRNA 加入结构),例如,以抵抗核酸酶。

在再一个实施方案中,本发明的重组核酸分子或者重组载体包括这样的序列,其允许检测含有所述序列的载体(即,可检测的和/或选择性标记),例如,克服营养缺陷性突变的序列,例如, *ura3* 或 *ilvE*、荧光标记,和/或比色标记(例如, *lacZ/β*-半乳糖苷酶),和/或抗生素抗性基因(例如, *amp*

或 *tet*)。

在再一个实施方案中，本发明的重组载体包括抗生素抗性基因。术语“抗生素抗性基因”包括提高或者赋予宿主生物(例如，芽孢杆菌)的抗生素抗性的序列。在一个实施方案中，抗生素抗性基因选自 *cat* (氯霉素抗性) 基因、*tet* (四环素抗性) 基因、*erm* (红霉素抗性) 基因、*neo* (新霉素抗性) 基因和 *spec* (大观霉素抗性) 基因。本发明的重组载体可以还包括同源重组序列(例如，设计用来允许目的基因重组到宿主生物的染色体的序列)。例如，*amyE* 序列可以用作重组到宿主染色体的同源性靶标。

本领域技术人员将还明白可以根据诸如将基因工程化的微生物的选择、所希望的基因产物的表达水平等等的因素定制载体的设计。

## VI. 分离的蛋白质

本发明的另一方面描述了分离的蛋白质(例如，分离的戊糖磷酸酶，例如，分离的果糖-1,6-二磷酸酶)。在一个实施方案中，蛋白质(例如，分离的戊糖磷酸生物合成酶，例如，分离的果糖-1,6-二磷酸酶)通过重组 DNA 技术产生并且可以通过适宜的纯化方案使用标准蛋白质纯化技术从本发明的微生物分离。在另一实施方案中，使用标准肽合成技术通过化学方法合成蛋白质。

“分离的”或者“纯化的”蛋白质(例如，分离的或纯化的生物合成酶)基本上无来自该蛋白质所来源的微生物的细胞材料或者其他污染性蛋白质，或者当化学合成时基本上无化学前体或者其他化学品。在一个实施方案中，分离或纯化的蛋白质具有小于约 30% (按干重计) 污染性蛋白质或者化学品，更优选小于约 20% 污染性蛋白质或者化学品，更优选小于约 10% 污染性蛋白质或者化学品，最优选小于约 5% 污染性蛋白质或者化学品。

在优选实施方案中，蛋白质或者基因产物来自棒杆菌(例如，棒杆菌来源的)。术语“来自棒杆菌”或者“棒杆菌来源的”包括棒杆菌基因编码的蛋白质或者基因产物。优选地，基因产物来自选自谷氨酸棒杆菌、

*Corynebacterium acetoglutamicum*、嗜乙酰乙酸棒杆菌或 *Corynebacterium*

*thermoaminogenes* 的微生物。在尤其优选的实施方案中，蛋白质或者基因产物来自谷氨酸棒杆菌(例如，谷氨酸棒杆菌来源的)。术语“来自谷氨酸棒杆菌”或者“谷氨酸棒杆菌来源的”包括谷氨酸棒杆菌基因编码的蛋白质或者基因产物。在再一个优选实施方案中，蛋白质或基因产物由棒杆菌基因同源物(例如，来自不同于棒杆菌的物种但是与本发明的棒杆菌基因，例如，棒杆菌果糖-1,6-二磷酸酶基因具有显著同源性的基因)编码。

本发明的范围内包括细菌来源的蛋白质或者基因产物和/或棒杆菌来源的蛋白质或基因产物(例如，谷氨酸棒杆菌来源的基因产物)，其由天然发生的细菌和/或棒杆菌基因(例如，谷氨酸棒杆菌基因)编码，例如，由本发明鉴定的基因，例如，棒杆菌或者谷氨酸棒杆菌果糖-1,6-二磷酸酶基因编码。本发明的范围内还包括细菌来源的蛋白质或者基因产物和/或棒杆菌来源的蛋白质或基因产物(例如，谷氨酸棒杆菌来源的基因产物)，其由细菌和/或棒杆菌基因(例如，谷氨酸棒杆菌基因)编码，所述基因与天然发生的细菌和/或棒杆菌基因(例如，谷氨酸棒杆菌基因)不同，例如，具有突变、插入或缺失的核酸但是仍然编码与本发明的天然发生的基因产物基本上相似的蛋白质的基因。例如，公知本领域技术人员可以突变(替代)核酸，其由于遗传密码简并性而编码与天然发生的基因所编码的氨基酸相同的氨基酸。此外，公知本领域技术人员可以突变(例如，替代)编码保守氨基酸替代的核酸。还公知本领域技术人员可以在一定程度上替代、加入或缺失氨基酸而与天然发生的基因产物相比不实质性影响基因产物的功能，其每种情况都包括在本发明的范围内。

在优选实施方案中，本发明的分离的蛋白质(例如，分离的戊糖磷酸生物合成酶，例如，分离的果糖-1,6-二磷酸酶)具有 SEQ ID NO:2 中显示的氨基酸序列。在其他实施方案中，本发明的分离的蛋白质是如 SEQ ID NO:2 中给出的蛋白质的同源物(例如，包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列具有至少约 30-40%同一性，优选约 40-50%同一性，更优选约 50-60%同一性，甚至更优选约 60-70%，70-80%，80-90%，90-95%或以上同一性的氨基酸序列)，并且具有与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列编码的蛋白质的活性基本上

相似的活性。

为了确定两个氨基酸序列或者两个核酸的百分数同源性，为了最佳比较目的比对序列(例如，可以在第一个氨基酸或核酸序列中引入缺口以与第二个氨基酸或核酸序列最佳比对)。当第一个序列中的位置被第二个序列中对应位置上相同氨基酸残基或核苷酸占据时，那么这两个分子在该位置相同。两个序列之间百分数同一性是序列共有的相同位置数的函数(即，%同一性=相同位置数/位置总数×100)，优选考虑产生最佳比对必需的缺口数和所述缺口的大小。

可以使用数学算法完成两个序列之间序列的比较和百分数同源性的确定。用于比较序列的数学算法的优选的、非限制性实例是 Karlin and Altschul (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:2264-68，如在 Karlin and Altschul (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5873-77 中改进的算法。这种算法整合到 Altschul *et al.* (1990) *J. Mol. Biol.* 215:403-10 的 NBLAST 和 XBLAST 程序(版本 2.0)。可以用 NBLAST 程序，得分=100，字长=12 进行 BLAST 核苷酸搜索以得到与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。可以用 XBLAST 程序，得分=50，字长=3 进行 BLAST 蛋白质搜索来得到与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了得到用于比较目的的缺口比对，可以使用如 Altschul *et al.* (1997) *Nucleic Acids Research* 25(17):3389-3402 中利用的 Gapped BLAST。当利用 BLAST 和 Gapped BLAST 程序时，可以使用各自程序(例如，XBLAST 和 NBLAST)的默认参数。见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。用于序列比较的数学算法的另一优选的、非限制性实例是 Myers and Miller (1988) *Comput Appl Biosci.* 4:11-17 的算法。这种算法整合到 ALIGN 程序中，该程序例如可以在 GENESTREAM 网络服务器, IGH Montpellier, FRANCE (<http://vega.igh.cnrs.fr>) 或在 ISREC 服务器(<http://www.ch.embnet.org>)得到。当利用 ALIGN 程序比较氨基酸序列时，可以使用 PAM120 权重残基表，缺口长度罚分 12，和缺口罚分 4。

在另一优选实施方案中，可以使用 GCG 软件包(可以在

<http://www.gcg.com>得到)中的 GAP 程序, 使用 Blossom 62 矩阵或者 PAM250 矩阵, 和缺口权重 12、10、8、6 或 4 和长度权重 2、3 或 4 确定氨基酸序列之间的百分数同源性。在再一个优选实施方案中, 可以使用 GCG 软件包(可以在<http://www.gcg.com>得到)中的 GAP 程序, 使用缺口权重 50 和长度权重 3 确定两个核苷酸序列之间的百分数同源性。

通过下面的实施例进一步阐明本发明, 不应将这些实施例认为是限制。在本申请全文引用的所有参考文献、专利、序列列表、附图和公布的专利申请的内容引入本文作为参考。

## 实施例

### 一般方法:

**菌株:** 从美国典型培养物保藏中心(Manassas, USA)得到谷氨酸棒杆菌 ATCC 21526。在 L-苏氨酸限制期间由于协同的天冬氨酸激酶抑制, 该高丝氨酸营养缺陷型菌株分泌赖氨酸。预培养物生长在含有  $5 \text{ g L}^{-1}$  果糖或者葡萄糖的复合培养基中, 对于琼脂板, 该复合培养基还补加  $12 \text{ g L}^{-1}$  琼脂。对于产生用于追踪实验和追踪研究自身的接种物的细胞, 使用补加  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  泛酸钙·HCl 的基本培养基(Wittmann, C. and E. Heinzle. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68:5843-5859)。在该培养基中, 碳源葡萄糖或者果糖、必需氨基酸苏氨酸、甲硫氨酸和亮氨酸和柠檬酸的浓度如下面详细说明了改变。

**培养:** 预培养由三步组成, 其包括(i)用来自琼脂板的细胞作为接种物在复合培养基中起始培养, (ii)短暂培养以适应基本培养基, 和(iii)在具有升高浓度的必需氨基酸的基本培养基上延长培养。从琼脂板接种的预培养物在 100ml 带挡板的摇瓶中在 10ml 复合培养基上生长。通过离心( $8800 \text{ g}$ , 2 min,  $30^\circ\text{C}$ )收获细胞后, 将细胞接种到基本培养基, 并生长达到 2 的光密度以得到适于基本培养基的指数生长的细胞。之后通过离心( $8800 \text{ g}$ ,  $30^\circ\text{C}$ , 和 2 min)收获细胞, 包括使用无菌 0.9 % NaCl 的洗涤步骤。然后将它们接种到 50ml 带挡板的摇瓶中 6 ml 基本培养基中, 最初浓度为  $0.30 \text{ g L}^{-1}$  苏氨

酸、 $0.08 \text{ g L}^{-1}$  甲硫氨酸、 $0.20 \text{ g L}^{-1}$  亮氨酸，和  $0.57 \text{ g L}^{-1}$  柠檬酸。分别加入作为碳源的  $70 \text{ mM}$  葡萄糖或者  $80 \text{ mM}$  果糖。细胞生长到耗尽必需氨基酸，其通过 HPLC 分析检查。在生长期结束时，收获细胞，用无菌  $\text{NaCl}$  ( $0.9\%$ ) 洗涤。随后，将它们转移到  $25 \text{ ml}$  带挡板的摇瓶中的  $4 \text{ ml}$  基本追踪培养基中用于在产生赖氨酸的条件下进行代谢通量分析。追踪培养基不含有苏氨酸、甲硫氨酸、亮氨酸和柠檬酸的任一种。对于每种碳源，孵育两个平行的烧瓶，其分别含有 (i)  $40 \text{ mM}$   $[1-^{13}\text{C}]$  标记的底物，和 (ii)  $20 \text{ mM}$   $[^{13}\text{C}_6]$  标记的底物加上  $20 \text{ mM}$  天然标记的底物。所有培养都在旋转摇床 (Inova 4230, New Brunswick, Edison, NJ, USA) 上  $30^\circ\text{C}$  和  $150$  转/分钟下进行。

化学品:  $99\%$   $[1-^{13}\text{C}]$  葡萄糖、 $99\%$   $[1-^{13}\text{C}]$  果糖、 $99\%$   $[^{13}\text{C}_6]$  葡萄糖和  $99\%$   $[^{13}\text{C}_6]$  果糖从 Campro Scientific (Veenendaal, Netherlands) 购买。酵母提取物和胰蛋白胨从 Difco Laboratories (Detroit, Michigan USA) 得到。所有其他应用的化学品分别从 Sigma (St. Louis, MI USA), Merck (Darmstadt, Germany) 或 Fluka (Buchs, Switzerland) 得到，并且是分析级。

底物和产物分析: 通过使用光度计 (Marsha Pharmacia biotech, Freiburg, Germany) 测量  $660 \text{ nm}$  下的细胞密度 ( $\text{OD}_{660\text{nm}}$ ) 或者通过重量分析法确定细胞浓度。通过在室温下  $3700 \text{ g}$  离心  $10$  分钟从培养液收获  $10 \text{ ml}$  细胞，包括用水的洗涤步骤，来进行重量分析法。洗涤的细胞在  $80^\circ\text{C}$  干燥直到重量恒定。确定干燥细胞干重和  $\text{OD}_{660\text{nm}}$  之间的相关因子 ( $\text{g 生物量} / \text{OD}_{660\text{nm}}$ ) 为  $0.353$ 。

测定以  $16000 \text{ g}$  离心  $3$  分钟得到的培养上清液中胞外底物和产物的浓度。果糖、葡萄糖、蔗糖和海藻糖衍生成肟三甲基甲硅烷基衍生物后通过 GC 定量。为此，应用 HP 6890 气相色谱仪 (Hewlett Packard, Palo Alto, USA) 与 HP 5MS 柱 ( $5\%$  苯基-甲基-硅氧烷-二苯基二甲基聚硅氧烷,  $30 \text{ m} \times 250 \mu\text{m}$ , Hewlett Packard, Palo Alto, CA, USA), 和在  $70 \text{ eV}$  具有电子碰撞电离的四极质量选择性检测器 (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany)。样品制备包括培养上清液的冻干，溶解在吡啶中，和随后用羧胺和(三甲基甲硅烷基)三氟乙酰胺 (BSTFA) (Macherey & Nagel, Düren,

Germany)两步衍生糖(13, 14)。β-D-核糖用作定量的内标。所注射的样品体积为 0.2 μl。GC 分析的时间程序如下: 150°C (0 - 5 min), 8°C min<sup>-1</sup> (5 - 25 min), 310°C (25 - 35 min)。将氦气用作载体气体, 流速为 1.5 l min<sup>-1</sup>。入口温度为 310°C, 检测器温度为 320°C。通过 HPLC, 利用 Aminex-HPX-87H Biorad 柱 (300 x 7.8 mm, Hercules, CA, USA)检测乙酸、乳酸、丙酮酸、2-酮戊二酸和二羟基丙酮, 用 4mM 硫酸作为移动相, 流速为 0.8 ml min<sup>-1</sup>, 并在 210 nm 进行 UV-检测。通过酶测量(Boehringer, Mannheim, Germany)定量甘油。通过 HPLC(Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), 利用 Zorbax Eclipse-AAA 柱(150 x 4.6 mm, 5 μm, Agilent Technologies, Waldbronn Germany), 使用自动化在线衍生(*o*-phthalaldehyde +3-巯基丙酸)以 2 ml min<sup>-1</sup> 的流速和荧光检测来分析氨基酸。细节在使用手册中给出。将 α-氨基丁酸用作定量的内标。

<sup>13</sup>C 标记分析: 通过 GC-MS 定量培养上清液中赖氨酸和海藻糖的标记位型。从而确定单一质量同位素异构体(isotopomer)级分。在当前工作中, 将它们定义为 M<sub>0</sub> (未标记的质量同位素异构体级分的相对量), M<sub>1</sub> (单标记的质量同位素异构体级分的相对量)和更高标记的对应的术语。如以前描述的(Rubino, F. M. 1989. J. Chromatogr. 473:125-133)将赖氨酸转化成叔丁基-二甲基甲硅烷基(TBDMS)衍生物后进行赖氨酸的 GC-MS 分析。对于离子群 *m/z* 431-437 以选择性离子监视(SIM)模式进行质量同位素异构体分布的定量。该离子群对应于片段离子, 其由于从衍生残基失去叔丁基形成, 并且从而包括赖氨酸的完整碳骨架(Wittmann, C., M. Hans and E. Heinzle. 2002. Analytical Biochem. 307:379-382)。如以前描述的从海藻糖的三甲基甲硅烷基(TMS)衍生物确定海藻糖的标记位型(Wittmann, C., H. M. Kim and E. Heinzle. 2003. Metabolic flux analysis at miniaturized scale. submitted)。通过 *m/z* 361-367 的离子群估计海藻糖的标记位型, 所述离子群对应于含有海藻糖的完整单体单位的片段离子, 从而等于葡萄糖 6-磷酸的碳骨架。首先以扫描模式测量所有样品, 排除所分析的产物和其他样品组分之间的同量异序干扰。通过 SIM 进行的所有测量都以一式三份进行。

果糖上的追踪实验中单一质量同位素异构体级分的实验误差为对于 $[1-^{13}\text{C}]$ 果糖上的赖氨酸为 0.85% ( $M_0$ ), 0.16% ( $M_1$ ), 0.27% ( $M_2$ ), 0.35% ( $M_3$ ), 0.45% ( $M_4$ ), 对于 $[1-^{13}\text{C}]$ 果糖上的海藻糖为 0.87% ( $M_0$ ), 0.19% ( $M_1$ ), 0.44% ( $M_2$ ), 0.45% ( $M_3$ ), 0.88% ( $M_4$ ), 对于 50%  $[^{13}\text{C}_6]$ 果糖上的海藻糖为 0.44% ( $M_0$ ), 0.54% ( $M_1$ ), 0.34% ( $M_2$ ), 0.34% ( $M_3$ ), 0.19% ( $M_4$ ), 0.14% ( $M_5$ ) 和 0.52% ( $M_6$ )。葡萄糖追踪实验中 MS 测量的实验误差为对于 $[1-^{13}\text{C}]$ 葡萄糖上的赖氨酸为 0.47% ( $M_0$ ), 0.44% ( $M_1$ ), 0.21% ( $M_2$ ), 0.26% ( $M_3$ ), 0.77% ( $M_4$ ), 对于 $[1-^{13}\text{C}]$ 葡萄糖上的海藻糖为 0.71% ( $M_0$ ), 0.85% ( $M_1$ ), 0.17% ( $M_2$ ), 0.32% ( $M_3$ ), 0.46% ( $M_4$ ), 对于 50%  $[^{13}\text{C}_6]$ 葡萄糖上的海藻糖为 1.29% ( $M_0$ ), 0.50% ( $M_1$ ), 0.83% ( $M_2$ ), 0.84% ( $M_3$ ), 1.71% ( $M_4$ ), 1.84% ( $M_5$ ) 和 0.58% ( $M_6$ )。

代谢建模和参数估计: 所有代谢模拟都在个人计算机上进行。用 Matlab 6.1 和 Simulink 3.0 (Mathworks, Inc., Natick, MA USA) 实现产生赖氨酸的谷氨酸棒杆菌的代谢网络。软件实现包括 Simulink 中的同位素异构体模型用于计算网络中的  $^{13}\text{C}$  标记分布。对于参数估计, 同位素异构体模型与 Matlab 中的迭代优化算法结合。关于所应用的计算工具的细节在 Wittmann and Heinzle (Wittmann, C. and E. Heinzle. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68:5843-5859) 中给出。

代谢网络基于以前的工作并且包含糖酵解、戊糖磷酸途径(PPP)、三羧酸(TCA)循环、丙酮酸的回补羧化、赖氨酸和其他分泌产生的生物合成(表 1), 和中间前体向生物量的合成代谢通量。此外, 葡萄糖和果糖的吸收系统交替实现。葡萄糖的吸收涉及通过 PTS 磷酸化成葡萄糖 6-磷酸(Ohnishi, J., S. Mitsuhashi, M. Hayashi, S. Ando, H. Yokoi, K. Ochiai and M. A. Ikeda. 2002. Appl. Microbiol. Biotechnol. 58:217-223)。对于果糖, 考虑两种吸收系统: (i) 通过 PTS<sub>果糖</sub> 吸收并通过果糖 1,6-二磷酸酶将果糖转化成果糖 1-磷酸和(ii) 通过 PTS<sub>甘露糖</sub> 吸收导致果糖 6-磷酸(Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J. L. Guerquin-Kern, M. Cocaign-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. Eur. J. Biochem. 254:96-102)。此外, 将果糖-1,6-二磷酸酶应

用于该模型以允许在上面的糖酵解中两个方向的碳通量。认为可逆的反应是 PPP 中的转醛酶和转酮酶。此外，对于用葡萄糖进行的实验，认为葡萄糖 6-磷酸异构酶是可逆的，从而海藻糖标记灵敏地反映了该酶的可逆性。相比，不能在果糖上确定葡萄糖 6-磷酸酶异构酶的可逆性。在果糖-培养的细胞中，葡萄糖 6-磷酸仅从果糖 6-磷酸形成，导致两个库的相同的标记位型。因此，可逆的葡萄糖 6-磷酸异构酶对葡萄糖 6-磷酸和果糖 6-磷酸之间的互变不导致可以用于估计葡萄糖 6-磷酸异构酶可逆性的标记差异。赖氨酸和海藻糖的测量标记对于(i) 磷酸烯醇丙酮酸/丙酮酸和苹果酸/草酰乙酸的集中库 (lumped pools) 之间通量的可逆性和(ii)TCA 循环中苹果酸脱氢酶和延胡索酸水合酶的可逆性不敏感。因此，认为这些反应是不可逆的。在该研究中不能得到来自天然标记的和 $[^{13}\text{C}_6]$ 标记的底物混合物的丙氨酸的标记，其对于这些通量参数是敏感的。基于以前的结果，认为乙醛酸途径是不活动的(Wittmann, C. and E. Heinzle. 2002. Appl. Environ. Microbiol. 68:5843-5859)。

关于谷氨酸棒杆菌的生长、产物形成和生物量组成的化学计量数据以及所分泌的赖氨酸和海藻糖的质谱标记数据用于计算代谢通量分布。给出两个平行实验的赖氨酸和海藻糖的实验的( $M_{i, \text{exp}}$ ) 和模拟的( $M_{i, \text{calc}}$ )质量同位素异构体级分之间最小偏差的通量集合被认为是细胞内通量分布的最佳估计。如在附录中描述的，超定了葡萄糖生长的和果糖生长的细胞的两个网络。因此，至少平方方法是可能的。使用加权的最小平方和(SLS)的误差标准，其中  $S_{i, \text{exp}}$  是测量的标准差(Eq. 1)。

$$SLS = \sum_i \frac{(M_{i, \text{exp}} - M_{i, \text{calc}})^2}{S_{i, \text{exp}}^2} \quad (\text{方程 1})$$

应用多个参数初始化以研究所得通量分布是否代表总体最优值。对于所有菌株，赖氨酸产生期间的葡萄糖吸收通量设为 100%，并且将网络中其他通量给定为对葡萄糖吸收通量归一化的相对摩尔通量。

统计学估计：通过以前描述的 Monte-Carlo 方法(Wittmann, C. and E.

Heinzle. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5843-5859)进行所得代谢通量的统计学分析。对于每种菌株,通过100个参数估计试验(run)进行统计学分析,其中实验数据(包含所测量的质量同位素异构体比率和所测量的通量)统计学地改变。从所得数据计算单个参数的90%置信界限。

### 实施例 1: 通过谷氨酸棒杆菌用果糖和葡萄糖产生赖氨酸

在用葡萄糖和果糖的比较性分批培养中分析产生赖氨酸的谷氨酸棒杆菌的代谢通量。为此,将预生长的细胞转移到追踪培养基中并孵育约5小时。在追踪实验开始和结束时底物和产物的分析揭示两种碳源的显著差异。用葡萄糖共产生了11.1mM赖氨酸,而用果糖达到了仅8.6mM的较低浓度。在超过5小时的孵育期间,细胞浓度从 $3.9\text{ g L}^{-1}$ 增加到 $6.0\text{ g L}^{-1}$ (葡萄糖)和从 $3.5\text{ g L}^{-1}$ 增加到 $4.4\text{ g L}^{-1}$ (果糖)。由于苏氨酸和甲硫氨酸不存在于培养基这一事实,内部来源可能被细胞用于生物量合成。果糖上的平均比糖吸收速率( $1.93\text{ mmol g}^{-1}\text{ h}^{-1}$ )高于葡萄糖的( $1.71\text{ mmol g}^{-1}\text{ h}^{-1}$ )。如表1中描述的,果糖和葡萄糖之间谷氨酸棒杆菌 ATCC 21526 的所得产率显著不同。这涉及主要产物赖氨酸和多种副产物。对于赖氨酸,果糖上的产率为 $244\text{ mmol mol}^{-1}$ ,从而与葡萄糖上的产率( $281\text{ mmol mol}^{-1}$ )相比较低。此外,碳源对生物量产率有显著影响,与葡萄糖相比,使用果糖时生物量产率减小约50%。对二羟基丙酮、甘油和乳酸观察到碳源对副产物形成的最显著的影响。在果糖上,这些副产物的积累极大地增强。甘油的产率高10倍,而二羟基丙酮和乳酸分泌增加6倍。二羟基丙酮是果糖上的主要副产物。由于较低的生物量产率,果糖生长的细胞具有对合成代谢前体的显著减小的需要(表2)。

表 1:谷氨酸棒杆菌 ATCC 21526 从葡萄糖(左)和果糖(右)产生赖氨酸阶段中的生物量和代谢物。实验产率是对(i)40 mM [ $^{13}\text{C}$ ]标记的底物和(ii)20 mM [ $^{13}\text{C}_6$ ]标记的底物加上20mM天然标记的底物的两个平行孵育的平均值与两个孵育之间的对应偏差。所有产率都以( $\text{mmol 产物}(\text{mol})^{-1}$ )给出,但是生物量的产率除外,其以( $\text{mg 干燥生物量}(\text{mmol})^{-1}$ )给出。

产率	葡萄糖上的赖氨酸生产	果糖上的赖氨酸生产
生物量	54.1 ± 0.8	28.5 ± 0.0
赖氨酸	281.0 ± 2.0	244.4 ± 23.3
缬氨酸	0.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0
丙氨酸	0.1 ± 0.0	0.4 ± 0.1
甘氨酸	6.6 ± 0.0	7.1 ± 0.4
二羟基丙酮	26.3 ± 15.3	156.6 ± 25.8
甘油	3.8 ± 2.4	38.4 ± 3.9
海藻糖	3.3 ± 0.5	0.9 ± 0.1
α-酮戊二酸	1.6 ± 0.4	6.5 ± 0.3
乙酸	45.1 ± 0.3	36.2 ± 5.7
丙酮酸	1.2 ± 0.4	2.1 ± 0.5
乳酸	7.1 ± 1.7	38.3 ± 3.5

表 2. 谷氨酸棒杆菌 ATCC 21526 从葡萄糖(左)和果糖(右)产生赖氨酸阶段对细胞内代谢物的合成代谢需求。实验数据是(i)[1-<sup>13</sup>C]标记的底物和(ii)天然标记的和[<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]标记的底物的 1:1 混合物的两个平行孵育的平均值与两个孵育之间的偏差。

前体需求* mmol (mol 葡萄糖) <sup>-1</sup>	葡萄糖上的赖氨酸 生产	果糖上的赖氨酸 生产
葡萄糖 6-磷酸	11.09±0.16	5.84±0.05
果糖 6-磷酸	3.84±0.06	2.02±0.02
戊糖 5-磷酸	47.50±0.70	25.05±0.21
赤鲜糖-4-磷酸	14.50±0.22	7.64±0.06
甘油醛 3-磷酸	6.98±0.10	3.68±0.03
3-磷酸甘油酸	59.95±0.89	36.85±0.31
丙酮酸/磷酸烯醇丙酮酸	107.80±1.60	56.80±0.48
α-酮戊二酸	92.51±1.37	48.73±0.41

草酰乙酸	48.91±0.72	45.76±0.38
乙酰辅酶 A	135.30±2.00	71.25±0.60
二氨基庚二酸+赖氨酸**	18.83±0.28	9.92±0.08

\*) 前体需求的估计基于从每种菌株所得的实验生物量产率(表 1)和以前对谷氨酸棒杆菌测量的生物量组成(Marx, A., A. A. de Graaf, W. Wiechert, L. Eggeling and H. Sahm. 1996. *Biotechnol. Bioeng.* 49:111-129).

\*\*\*) 认为二氨基庚二酸和赖氨酸是不同的合成代谢前体。这是由于来自丙酮酸和草酰乙酸的合成代谢通量向二氨基庚二酸(细胞壁)和赖氨酸(蛋白质)的合成代谢通量除了对赖氨酸分泌通量有贡献还对通过赖氨酸生物合成途径的总的通量有贡献。

### 实施例 2: 手工检查追踪实验中 $^{13}\text{C}$ -标记位型

用 GC-MS 定量所分泌的赖氨酸和海藻糖的相对质量同位素异构体级分。这些质量同位素异构体级分对细胞内通量是灵敏的并且因此显示出所研究的生物系统的通量组(fluxome)的指纹。如图 2 中所示, 在谷氨酸棒杆菌的葡萄糖和果糖生长的细胞之间所分泌的赖氨酸和海藻糖的标记位型显著不同。对于所应用的追踪标记和两种测量的产物都发现了差异。这表明碳通量模式中实质性差异取决于应用的碳源。如前面显示的, 来自谷氨酸棒杆菌对  $[1-^{13}\text{C}]$  和  $[^{13}\text{C}_6]$  葡萄糖混合物的两个平行培养的质量同位素异构体级分几乎相同(Wittmann, C., H. M. Kim and E. Heinzle. 2003. *Metabolic flux analysis at miniaturized scale. submitted*). 因此, 所观察的差异与代谢通量中底物特异差异明显相关。

### 实施例 3: 细胞内通量的估计

所进行的研究的中心问题是在分别将葡萄糖和果糖作为碳源的赖氨酸生产期间谷氨酸棒杆菌的细胞内通量的比较研究。为此, 从追踪实验得到的实验数据用于计算每种底物的代谢通量分布, 使用如上描述的通量估计软件。通过使实验和理论质量同位素异构体级分之间的偏差最小进行参数

估计。所进行的方法利用优化的每步期间的代谢物平衡。这包括(i)关于产物分泌的化学计量数据(表 2)和(ii)对生物量前体的合成代谢需求的化学计量数据(表 3)。认为给出实验和模拟的标记位型之间的最小偏差的细胞内通量集合是细胞内通量分布的最佳估计。对于两种情况,用多个初始化值得到的相同的通量分布,提示鉴定了总体最小值。显然,实现了实验确定的和计算的质量同位素异构体比率之间的一致(表 4)。

表 3: 分别在葡萄糖和果糖上培养的产赖氨酸的谷氨酸棒杆菌 ATCC 21526 的相对质量同位素异构体级分。对于两种碳源, 对(i) [1-<sup>13</sup>C]标记的和(ii)天然 <sup>13</sup>C 标记的和 [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]标记的追踪底物进行两个平行的追踪实验。通过求解对应于通量的优化集合的数学模型(计算的)预测实验 GC/MS 数据(实验)和值。M<sub>0</sub> 表示未标记的质量同位素异构体级分的相对量, M<sub>1</sub> 是单标记的质量同位素异构体级分的相对量, 对应术语代表更高标记。

	赖氨酸 (用 [1- <sup>13</sup> C] 标记的底物)				海藻糖 (用 [1- <sup>13</sup> C] 标记的底物)				海藻糖 (用 50 % [ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ] 标记的底物)									
	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>0</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>	M <sub>4</sub>	M <sub>5</sub>	M <sub>6</sub>	
葡萄糖																		
实验值	0.234	0.360	0.247	0.110	0.037	0.110	0.551	0.216	0.094	0.023	0.271	0.114	0.087	0.115	0.069	0.066	0.279	
计算值	0.242	0.355	0.245	0.110	0.037	0.114	0.549	0.212	0.094	0.023	0.268	0.113	0.085	0.113	0.068	0.064	0.289	
果糖																		
实验值	0.133	0.316	0.304	0.162	0.062	0.212	0.412	0.244	0.092	0.030	0.141	0.103	0.104	0.250	0.133	0.110	0.159	
计算值	0.139	0.321	0.298	0.159	0.061	0.195	0.419	0.254	0.094	0.030	0.144	0.103	0.102	0.245	0.131	0.111	0.164	

#### 实施例 4: 赖氨酸产生期间果糖和葡萄糖上的代谢通量

在图(4,5)中显示了产生赖氨酸的谷氨酸棒杆菌葡萄糖和果糖上所得细胞内通量分布。显然,取决于所用的碳源,细胞内通量显著不同。对于葡萄糖,62%的碳通量流向 PPP,而仅 36%通向糖酵解链(图 4)。由于该相对高的量,PPP 酶葡萄糖 6-磷酸脱氢酶和 6-磷酸葡糖酸脱氢酶产生 124% NADPH。果糖的情况完全不同(图 5)。所进行的通量分析揭示用于果糖吸收的两种 PTS 的体内活性,而 92.3%被果糖特异性 PTS<sub>果糖</sub>吸收。7.7%的可比较的小级分的果糖被 PTS<sub>甘露糖</sub>吸收。从而,大部分果糖在果糖 1,6-二磷酸酶水平上进入糖酵解,而仅小部分在果糖 6-磷酸的上游通向糖酵解链。与葡萄糖生长的细胞相比,PPP 显示出仅 14.4%的显著降低的活性。葡萄糖 6-磷酸异构酶在两种碳源上以相反的方向运行。在葡萄糖生长的细胞中,36.2%的净通量从葡萄糖 6-磷酸流向果糖 6-磷酸,而关于果糖观察到 15.2%的逆向净通量。

对于果糖,通过葡萄糖 6-磷酸异构酶和 PPP 的通量为通过 PTS<sub>甘露糖</sub>的约两倍高。然而,这不是由于碳从果糖-1,6-二磷酸酶向果糖 6-磷酸的糖益生通量,其可以提供向 PPP 的额外的碳通量。实际上,通过催化该反应的果糖 1,6-二磷酸酶的通量为 0。负责向 PPP 的额外通量的代谢反应是 PPP 中可逆酶转醛酶和转酮酶。约 3.5%的该额外通量由转酮酶 2 提供,其将来自 PPP 的回收的碳返回到该途径。此外,通过转醛酶的作用,4.2%的通量朝向果糖 6-磷酸和 PPP。

取决于碳源,在丙酮酸节点周围也观察到产生赖氨酸的葡萄糖棒杆菌中完全不同的通量模式(图 4,5)。对于葡萄糖,向赖氨酸途径的通量为 30.0%,而对果糖发现 25.4%的较小通量。与果糖相比葡萄糖上升高的赖氨酸产率是该通量差异的主要原因,但是导致对用于细胞壁合成的二氨基庚二酸和用于蛋白质合成的赖氨酸合成的更高需求的更高的生物量产率也促进所述通量差异。使用葡萄糖的回补通量为 44.5%从而显著高于使用果糖的通量(33.5%)。这主要是由于赖氨酸产生对草酰乙酸的更高的需求,而且是由于使用葡萄糖时对草酰乙酸和 2-酮戊二酸的更高的合成代谢需求。另

一方面,使用葡萄糖时通过丙酮酸脱氢酶的通量(70.9%)低于使用果糖的通量(95.2%)。这减小了向 TCA 循环的碳通量,导致使用葡萄糖时通过 TCA 循环酶减小 30% 以上的通量(图 3, 4)。

通过 Monte-Carlo 方法对所得通量的统计学评估用于计算所确定的通量参数的 90% 置信区间。如表 5 中对多种关键通量所示,置信区间通常是窄的。作为实例,通过葡萄糖 6-磷酸脱氢酶的通量对于葡萄糖生长的细胞仅为 1.2%,对于果糖生长的细胞为 3.5%。因此所选方法允许精确的通量估计。可以推断对葡萄糖和果糖分别所观察到的通量差异明显是由应用的碳源导致的。

必须注意到使用果糖时  $1.93 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  的平均特异底物吸收稍高于对葡萄糖发现的  $1.77 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ 。由于该原因,以  $\text{mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$  表达的绝对细胞内通量与上面讨论的相对通量关于葡萄糖稍微增加。然而,分别使用果糖和葡萄糖时产生赖氨酸的谷氨酸棒杆菌的通量分布如此完全不同以致上面作出的所有比较也适用于绝对碳通量。

表 4: 通过  $^{13}\text{C}$  追踪研究用质谱法和代谢物平衡对生长在果糖(左)和葡萄糖(右)上的产生赖氨酸的谷氨酸棒杆菌 ATCC 21526 的代谢通量的统计学评估: 通过包括 100 个独立的参数估计试验的 Monte-Carlo 方法对每种底物用统计学不同的实验数据得到关键通量参数的 90% 置信区间。

通量参数	葡萄糖	果糖
净通量		
PTS <sub>果糖</sub> 的果糖吸收	-	[90.0 96.1]
PTS <sub>甘露糖</sub> 的果糖吸收	-	[3.9 10.0]
葡萄糖 6-磷酸异构酶	[35.7 36.8]	[13.4 16.9]
磷酸果糖激酶	[35.7 36.8]	-
果糖 1,6-二磷酸酶*	-	[-2.1 3.4]
果糖 1,6-二磷酸酶醛缩酶	[73.7 73.8]	[91.7 92.9]
果糖 6-磷酸脱氢酶	[62.5 63.7]	[12.6 16.1]
转醛酶	[19.4 19.8]	[3.6 4.1]

转酮酶 1	[19.4 19.8]	[3.6 4.1]
转酮酶 2	[17.9 18.3]	[2.9 4.0]
甘油醛 3-磷酸脱氢酶	[158.1 164.5]	[163.3 174.6]
丙酮酸激酶	[156.2 167.4]	[158.9 168.2]
丙酮酸脱氢酶	[69.5 72.5]	[87.1 102.3]
丙酮酸羧化酶	[43.7 44.8]	[29.9 37.3]
柠檬酸合酶	[51.2 54.8]	[76.5 91.5]
异柠檬酸脱氢酶	[51.2 54.8]	[76.5 91.5]
酮戊二酸脱氢酶	[41.6 45.6]	[70.9 86.0]
天冬氨酸激酶	[29.6 30.3]	[21.8 29.2]
通量可逆性**		
葡萄糖 6-磷酸异构酶	[4.5 5.1]	-
转醛酶	[4.3 4.9]	[14.5 18.2]
转酮酶 1	[0.0 0.0]	[0.0 0.1]
转酮酶 2	[0.4 0.6]	[0.0 0.1]

\* 较低的置信边界的负通量等于逆方向的正通量(通过磷酸果糖激酶)。

\*\* 将通量可逆性定义为返回通量与净通量的比率。

### 实施例 I-IV 的讨论:

#### A. 底物特异培养物特征

用果糖和葡萄糖分别培养产生赖氨酸的谷氨酸棒杆菌揭示生长和产物形成强烈依赖于所使用的碳源。以前也报导谷氨酸棒杆菌的另一种菌株对果糖培养显著降低的赖氨酸和生物量产率,其中与葡萄糖相比,赖氨酸和生物量产率分别小 30% 和 20% (Kiefer, P., E. Heinzle and C. Wittmann. 2002. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28:338-43)。与葡萄糖相比,在果糖上培养谷氨酸棒杆菌和栖糖蜜棒杆菌与更高的二氧化碳产生速率有关 (Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J. L. Guerquin-Kern, M. Coccagn-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. *Eur. J. Biochem.* 254:96-102;

Kiefer, P., E. Heinzle and C. Wittmann. 2002. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28:338-43)。这与在本工作中对于该碳源观察到的通过 TCA 循环的升高的通量一致。对副产物也观察到底物特异性差异。与葡萄糖相比使用果糖时海藻糖的形成较低。这可能与葡萄糖和果糖进入糖酵解的不同入口点有关(Kiefer, P., E. Heinzle and C. Wittmann. 2002. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28:338-43)。考虑到谷氨酸棒杆菌中的吸收系统,葡萄糖的利用导致形成海藻糖前体葡萄糖 6-磷酸,而果糖被转化到果糖 1,6-二磷酸酶并从而从葡萄糖 6-磷酸进入中心代谢下游(Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J. L. Guerquin-Kern, M. Coccagn-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. *Eur. J. Biochem.* 254:96-102)。当将果糖用作碳源时,其他副产物,如二羟基丙酮、甘油和乳酸强烈增加。从赖氨酸产生的观点,这不是所希望的,因为大部分碳从中心代谢撤出而形成副产物。使用果糖时该特定底物吸收( $1.93 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )高于使用葡萄糖的( $1.77 \text{ mmol g}^{-1} \text{ h}^{-1}$ )。该结果与以前对指数生长的栖糖蜜棒杆菌 ATCC 17965 进行的研究不同(Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J. L. Guerquin-Kern, M. Coccagn-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. *Eur. J. Biochem.* 254:96-102),在所述研究中观察到对果糖和葡萄糖的类似的特异吸收速率。在我们的研究中观察到的对果糖的较高吸收速率可能是由于所研究的菌株不同这一事实。栖糖蜜棒杆菌和谷氨酸棒杆菌是相关的种,但是在某些代谢性质上可能不同。在当前工作中研究的菌株以前通过经典菌株优化得到。这可能导入了影响底物吸收的突变。另一种解释是培养条件的不同。在受限制的生长和赖氨酸产生条件下果糖可能被更有效地利用。

## B. 代谢通量分布

在葡萄糖和果糖上产生赖氨酸的谷氨酸棒杆菌的所得细胞内通量分布揭示了巨大差异。对所得通量的统计学评估揭示了窄的 90% 置信区间,从而所观察到的通量差异可以清楚地归因于应用的碳源。最显著的差异之一涉及糖酵解和 PPP 之间的通量分配。使用葡萄糖时,62.3%的碳通入 PPP。

产生赖氨酸的谷氨酸棒杆菌的 PPP 对该底物的优势以前已经在不同研究中观察到 (Marx, A., A. A. de Graaf, W. Wiechert, L. Eggeling and H. Sahm. 1996. *Biotechnol. Bioeng.* 49:111-129; Wittmann, C. and E. Heinzle. 2001. *Eur. J. Biochem.* 268:2441-2455; Wittmann, C. and E. Heinzle. 2002. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5843-5859)。使用果糖时, 进入 PPP 的通量减小到 14.4%。如通过所进行的代谢通量分析鉴定的, 这主要是由于果糖在果糖 1,6-二磷酸水平上的入口和果糖-1,6-二磷酸酶的失活之间的不利组合。所观察到的果糖-1,6-二磷酸酶的失活与分别在果糖和葡萄糖上指数生长期间栖糖蜜棒杆菌 ATCC 17965 的酶测量非常一致 (Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J. L. Guerquin-Kern, M. Cocaign-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. *Eur. J. Biochem.* 254:96-102)。

令人惊奇地, 当在果糖上培养谷氨酸棒杆菌时, 通过葡萄糖 6-磷酸异构酶和 PPP 的通量为通过 PTS<sub>甘露糖</sub> 的通量的约两倍高。由于果糖-1,6-二磷酸酶的失活, 这不是由糖异生通量导致的。事实上, 谷氨酸棒杆菌具有通过果糖 6-磷酸、葡萄糖 6-磷酸和核糖 5-磷酸的操作代谢循环。由转酮酶 2 提供进入 PPP 的额外通量, 转酮酶 2 将来自 PPP 的碳回收进入该途径, 并且通过转醛酶的作用 (其将甘油醛 3-磷酸重定向到 PPP), 从而绕过糖异生。该循环活性可以帮助细胞克服使用果糖时的 NADPH 限制。对于生长在果糖上的谷氨酸棒杆菌, 到达葡萄糖 6-磷酸的显著减小的通量也可以解释该底物上海藻糖的形成减少 (Kiefer, P., E. Heinzle and C. Wittmann. 2002. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 28:338-43)。取决于碳源, 葡萄糖 6-磷酸异构酶以相反方向运行。在葡萄糖上生长时, 净通量从葡萄糖 6-磷酸导入果糖 6-磷酸, 而在果糖上观察到逆的净通量。这强调了谷氨酸棒杆菌中该酶的可逆性对于代谢灵活性的重要性。

### C. NADPH 代谢

下面的计算提供了产生赖氨酸的谷氨酸棒杆菌在果糖和葡萄糖上 NADH 代谢的比较。从估计的通过葡萄糖 6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱

氢酶、和异柠檬酸脱氢酶的通量计算 NADPH 的总体供应。在葡萄糖上, PPP 酶葡萄糖 6-磷酸脱氢酶(62.0 %)和果糖 6-磷酸脱氢酶(62.0 %)提供了主要部分的 NADPH。异柠檬酸脱氢酶(52.9 %)仅有小程度的贡献。在果糖上观察到 PPP 和 TCA 循环对 NADPH 供应的完全不同的贡献, 其中异柠檬酸脱氢酶(83.3 %)是 NADPH 的主要来源。在果糖上葡萄糖 6-磷酸脱氢酶(14.4 %)和果糖 6-磷酸脱氢酶(14.4 %)产生较少的 NADPH。NADPH 是生长和形成赖氨酸所需的。从  $11.51 \text{ mmol NADPH (g 生物量)}^{-1}$  的化学计量需求和本工作的实验生物量产率(表 1)计算生长所需的 NADPH, 认为所述化学计量需求对于葡萄糖和果糖是相同的(Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J. L. Guerquin-Kern, M. Cocaign-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. *Eur. J. Biochem.* 254:96-102)。对于在葡萄糖上生物量产生, 谷氨酸棒杆菌消耗了 62.3 %的 NADPH, 其与作为碳源的果糖(32.8 %)相比高得多。从所估计的向赖氨酸的通量(表 1)和  $4 \text{ mol (mol 赖氨酸)}^{-1}$  的对应的化学计量 NADPH 需求确定产物合成所需的 NADPH 的量。该量对于从葡萄糖产生赖氨酸为 112.4 %, 对于从果糖产生赖氨酸为 97.6 %。与果糖相比(112.1 %), 葡萄糖上总体 NADPH 供应显著更高(176.9 %), 这可能主要规因于葡萄糖上增加的 PPP 通量。葡萄糖上 NADPH 平衡接近关闭。相比, 在果糖上观察到 NADPH 的非常明显的缺乏(18.3 %)。这对除了上面提到的葡萄糖 6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶和异柠檬酸脱氢酶之外, 还对催化可以提供 NADPH 的代谢反应的酶带来了问题。可能的候选者似乎是依赖 NADPH 的苹果酸酶。与葡萄糖生长的细胞相比, 以前在果糖上生长的栖糖蜜棒杆菌上检测到该酶增加的比活性(Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J. L. Guerquin-Kern, M. Cocaign-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. *Eur. J. Biochem.* 254:96-102)。然而, 通过该特定酶的通量不能通过本工作中的实验设置解决。假设苹果酸酶作为遗漏的产生 NADPH 的酶, 那么 18.3 %的通量将足够提供似乎遗漏的 NADPH。用葡萄糖作为碳源对谷氨酸棒杆菌的详细通量研究没有揭示苹果酸酶的显著活性。(Petersen, S., A. A. de Graaf, L. Eggeling, M. Möllney, W. Wiechert

and H. Sahm. 2000. *J. Biol. Chem.* 75:35932-35941)。然而，对果糖的情况可能与该酶的升高的体内活性关联。

#### D. NADH 代谢

在果糖上，谷氨酸棒杆菌揭示了形成 NADH 的酶的增加的活性。在果糖上，甘油醛 3-磷酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶、2-酮戊二酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶形成 421.2 % NADH。在葡萄糖上，NADH 产生仅为 322.4 %。此外，在果糖上合成代谢的 NADH 需求显著低于葡萄糖上的。与减小的代谢需求偶联的显著增强的 NADH 产生可以导致增加的 NADH/NAD 比率。对于栖糖蜜棒杆菌，以前表明与葡萄糖相比果糖导致增加的 NADH/NAD 比率(Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J. L. Guerquin-Kern, M. Coccagn-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. *Eur. J. Biochem.* 254:96-102)。这对果糖上赖氨酸产生期间 NADH 产生机制带来了问题。果糖生长的细胞显示出二羟基丙酮、甘油和乳酸的增强的分泌。二羟基丙酮和甘油的增加的形成可以是由于较高的 NADH/NAD 比率。以前表明 NADH 抑制甘油醛脱氢酶，从而二羟基丙酮和甘油的过剩可能与该酶的通量能力的减小有关。二羟基丙酮向甘油的还原可以还受到高 NADH/NAD 比率的支持并且从而促进过量 NADH 的再生。需要 NADH 的从丙酮酸形成乳酸也具有与甘油生成相似的背景。与指数生长相比，在赖氨酸产生条件下 NADH 过量可能甚至更高，所述 NADH 过量的特征是相对高的 TCA 循环活性和减小的生物量产率。

#### E. 果糖上产生赖氨酸的谷氨酸棒杆菌优化的潜在靶标

基于所得通量图式，可以确定用于果糖上产生赖氨酸的谷氨酸棒杆菌优化的一些潜在靶标。中心点是 NADPH 的提供。果糖-1,6-二磷酸酶是增加 NADPH 供应的一个靶标。它的活性的失调，例如，增加导致通过 PPP 的更高的通量，导致增加的 NADPH 产生和增加的赖氨酸产率。通过果糖 1,6-二磷酸酶的扩增增加通过 PPP 的通量对于芳香族氨基酸产生也是有益

的(Ikeda, M. 2003. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 79: 1-36)。从赖氨酸产生的观点, 在果糖上生长期间果糖 1,6-二磷酸酶的失活是有害的但是不是令人惊奇的, 因为在糖上生长期间不需要该糖异生酶并且其可能受到抑制。在原核生物中, 该酶处于例如, 果糖 1,6-二磷酸酶、果糖-2,6 二磷酸酶、金属离子和 AMP 的有效代谢控制下(Skrypal, I. G. and O. V. Iastrebova. 2002. *Mikrobiol Z.* 64:82-94)。已知谷氨酸棒杆菌可以生长在乙酸上(Wendisch, V. F., A. A. de Graaf, H. Sahm H. and B. Eikmans. 2000. *J. Bacteriol.* 182:3088-3096), 而该酶对于保持糖异生是必需的。增加通过 PPP 的通量的另一个潜在靶标对于果糖吸收是 PTS。修饰 PTS<sub>果糖</sub>和 PTS<sub>甘露糖</sub>之间的通量分配可以产生更高比例的果糖, 其在果糖 6-磷酸水平上进入并从而导致增加的 PPP 通量。可能对果糖上 NADPH 供应有很大贡献的苹果酸酶的额外扩增可以是有趣的靶标。

另一个瓶颈包含二羟基丙酮、甘油和乳酸的强烈分泌。二羟基丙酮和甘油的形成可以受到对应酶的失调(例如, 缺失)的阻断。二羟基丙酮磷酸向二羟基丙酮的转化可以由对应的磷酸酶催化。然而在谷氨酸棒杆菌中还没有注解二羟基丙酮磷酸酶(见 National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy website: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>)。该反应还可以由激酶, 例如, 甘油激酶催化。当前谷氨酸棒杆菌的基因组数据库中的两个条目涉及二羟基丙酮激酶(见 National Center for Biotechnology Information (NCBI) Taxonomy website: <http://www3.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/>)。

还可以通过乳酸脱氢酶的失调, 例如, 敲除来避免乳酸分泌。因为甘油和乳酸形成对于 NADH 再生是重要的, 所以不能排除对该生物的总体性能的负影响。对于如以前推测的通过下游糖酵解链的碳通量受到甘油醛 3-磷酸脱氢酶的能力的限制的情况(Dominguez, H., C. Rollin, A. Guyonvarch, J. L. Guerquin-Kern, M. Cocaign-Bousquet and N. D. Lindley. 1998. *Eur. J. Biochem.* 254:96-102), 二羟基丙酮和甘油产生的抑制可以最终导致果糖-1,6-二磷酸酶的激活和通过 PPP 的碳通量的再定向。

应该注意在谷氨酸棒杆菌的培养期间二羟基丙酮没有被再利用并且从而关于产物合成表现出浪费的碳，而对于乳酸不是这样的情况 (Cocaign-Bousquet, M. and N. D. Lindley. 1995. *Enz. Microbiol. Technol.* 17:260-267)。

在一个实施方案中，一种或多种上面的基因组合的失调可用于产生精细化学品，例如，赖氨酸。

此外，蔗糖也可以用作通过谷氨酸棒杆菌产生赖氨酸的碳源，例如，结合使用本发明的方法。蔗糖是糖蜜中的主要碳源。如以前表明的，蔗糖的果糖单位在果糖 1,6-二磷酸酶水平进入糖酵解 (Dominguez, H. and N. D. Lindley. 1996. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:3878-3880)。因此，该部分蔗糖分子-假定无活性的果糖-1,6-二磷酸酶-可能不进入 PPP，从而可以限制产生赖氨酸的菌株中 NADPH 供应。

#### 实施例 5: 构建质粒 pCIS lysC

菌株构建的第一步要求谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 中 lysC 野生型基因的等位基因置换。在等位基因置换中，进行 lysC 基因中的核苷酸置换，从而通过 Ile 置换 311 位中的氨基酸 Thr。使用来自 ATCC13032 的染色体 DNA 作为模板开始并使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO:3 和 SEQ ID NO:4 进行 PCR 反应，通过使用 Pfu Turbo PCR 系统 (Stratagene USA) 按照生产商的使用说明扩增 lysC。根据 Tauch et al. (1995) *Plasmid* 33:168-179 或 Eikmanns et al. (1994) *Microbiology* 140:1817-1828 从谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 制备染色体 DNA。所扩增的片段的 5' 末端是 SalI 限制性切割位点，3' 末端是 MluI 限制性切割位点。克隆前，将扩增的片段通过这两种限制酶消化并使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) 纯化。

SEQ ID NO:3

5'-GAGAGAGAGACGCGTCCCAGTGGCTGAGACGCATC-3'

**SEQ ID NO:4****5'-CTCTCTCTGTCGACGAATTCAATCTTACGGCCTG-3'**

将所得多核苷酸克隆到整合 SacB 的 pCLIK5 MCS 中的 SalI 和 MluI 限制性切割位点中并且在下文中称作 pCIS (SEQ ID NO: 5) 并且转化到大肠杆菌 XL-1 blue 中。通过在含有卡那霉素(20 µg/mL) 的 LB 琼脂(Lennox, 1955, Virology, 1:190)上平板接种得到一组携带质粒的细胞。分离质粒并通过测序验证预期的核苷酸序列。根据 Qiagen 公司的方法并使用该公司的材料进行质粒 DNA 的制备。根据 Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 进行测序反应。通过 ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)分离测序反应物并分析。所得质粒 pCIS lysC 列出为 SEQ ID NO:6。

**实施例 6: 来自谷氨酸棒杆菌的 lysC 基因的诱变**

使用 QuickChange 试剂盒 (公司: Stratagene/USA)按照生产商的使用说明进行来自谷氨酸棒杆菌的 lysC 基因的定向诱变。用质粒 pCIS lysC, SEQ ID NO:6 进行诱变。合成下面的寡核苷酸引物用于通过使用 QuickChange 方法(Stratagene)用 311ile 替代 thr 311:

**SEQ ID NO:7****5'-CGGCACCACCGACATCATCTTCACCTGCCCTCGTTCCG -3'****SEQ ID NO:8****5'-CGGAACGAGGGCAGGTGAAGATGATGTCGGTGGTGCCG  
-3'**

QuickChange 反应中这些寡核苷酸引物的使用导致 lysC 基因(SEQ ID NO:9)中 932 位核苷酸的替代(从 C 到 T)。在大肠杆菌 XL1-blue 中转化和

质粒制备后，通过[a]测序反应证实了 *lysC* 基因中所得氨基酸替代 Thr311Ile。将该质粒命名为 pCIS *lysC thr311ile* 并列出于 SEQ ID NO:10。

通过如 Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 中描述的电穿孔将质粒 pCIS *lysC thr311ile* 在谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 中转化。在 DE 10046870 中描述了该方案的修改。使用标准方法，通过如 Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor 中描述的 DNA 印迹和杂交检查个体转化体的 *lysC* 基因座的染色体排列。从而确定所涉及的转化体是通过在 *lysC* 基因座通过同源重组整合所转化的质粒的转化体。在不含抗生素的培养基中过夜生长这些菌落后，将细胞在蔗糖 CM 琼脂培养基(10%蔗糖)上平板接种并在 30°C 孵育 24 小时。因为载体 pCIS *lysC thr311ile* 中所含 *sacB* 基因将蔗糖转化成毒性产物，所有只有通过野生型 *lysC* 基因和突变基因 *lysC thr311ile* 之间第二次同源重组步骤缺失 *sacB* 基因的那些菌落可以生长。在同源重组期间，所述野生型基因或者突变的基因与 *sacB* 基因一起可以被缺失。如果 *sacB* 基因与野生型一起被除去，那么得到突变的转化体。

挑选生长的菌落并检查卡那霉素敏感表型。具有缺失的 *SacB* 基因的克隆必须同时显示出卡那霉素敏感生长行为。在摇瓶中研究此类卡那霉素敏感克隆的赖氨酸生产力(见实施例 6)。为了比较，采用未处理的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032。选择与对照相比具有升高的赖氨酸产量的克隆，回收染色体 DNA，并通过 PCR 反应扩增 *lysC* 基因的对应区并测序。将具有升高的赖氨酸合成和在 932 位检测到 *lysC* 中突变的性质的一个此类克隆称作 ATCC13032 *lysCfbr*。

#### 实施例 7: 制备质粒 pK19 mob *sacB* Peftu 果糖-1,6-二磷酸酶

根据 Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 或 Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 从谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 制备染色体 DNA。

PCR1:使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO 11 和 SEQ ID NO 12, 染色体

DNA 作为模板, 和 Pfu Turbo 聚合酶(公司: Stratagene), 通过使用聚合酶链式反应(PCR)根据如 Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 中描述的标准方法扩增位于延伸因子 TU 的起始密码子上游的区域。

**SEQ ID NO 11**

**5'- TGGCCGTTACCCTGCGAATG -3'**

和

**SEQ ID NO 12**

**5'- TGTATGTCCTCCTGGACTTC -3'**

使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg)根据生产商的使用说明纯化约 200 bp 大小的所得 DNA 片段。

PCR2:使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO 13 和 SEQ ID NO 14, 染色体 DNA 作为模板, 和 Pfu Turbo 聚合酶(公司: Stratagene), 通过使用聚合酶链式反应(PCR)根据如 Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 中描述的标准方法扩增果糖-1,6-二磷酸酶的基因的 5'区。

**SEQ ID NO 13**

**5'-**

**GAAGTCCAGGAGGACATACAATGAACCTAAAGAACCCCGA -3'**

和

**SEQ ID NO 14**

**5'- ATCTACGTCGACCCAGGATGCCCTGGATTTC -3'**

使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham

Pharmacia, Freiburg)根据生产商的使用说明纯化约 740 bp 大小的所得 DNA 片段。

**PCR3:** 使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO 15 和 SEQ ID NO 16, 染色体 DNA 作为模板, 和 Pfu Turbo 聚合酶(公司: Stratagene), 通过使用聚合酶链式反应(PCR)根据如 Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 中描述的标准方法扩增果糖-1,6-二磷酸酶的起始密码子的上游区。

**SEQ ID NO 15**

**5'- TATCAACGCGTTCTTCATCGGTAGCAGCACC -3'**

和

**SEQ ID NO 16**

**5'- CATTCGCAGGGTAACGGCCACTGAAGGGCCTCCTGGG -3'**

使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg)根据生产商的使用说明纯化约 720 bp 大小的所得 DNA 片段。

**PCR4:** 使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO 17 和 SEQ ID NO 14, 来自 PCR1 和 2 的 PCR 产物作为模板, 和 Pfu Turbo 聚合酶(公司: Stratagene), 通过使用聚合酶链式反应(PCR)根据如 Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 中描述的标准方法进行融合 PCR。使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg)根据生产商的使用说明纯化约 920 bp 大小的所得 DNA 片段。

**PCR5:** 使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO 15 和 SEQ ID NO 14, 来自 PCR3 和 4 的 PCR 产物作为模板, 和 Pfu Turbo 聚合酶(公司: Stratagene), 通过使用聚合酶链式反应(PCR)根据如 Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 中描述的标准方法进

行融合 PCR。

使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg)根据生产商的使用说明纯化约 1640 bp 大小的所得 DNA 片段。之后, 将其使用限制酶 MluI 和 Sall (Roche Diagnostics, Mannheim)切割并使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit 纯化 DNA 片段。

将载体 pCIS 用限制酶 MluI 和 Sall 切割并且电泳分离后通过使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit 分离 4.3 kb 大小的片段。

通过使用 Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim)根据生产商的使用说明将载体片段与来自 PCR5 的 PCR 片段连接在一起, 并且根据如 Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))中描述的标准方法在感受态大肠杆菌 XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA)中转化连接批。通过在含有卡那霉素(20 µg/mL)的 LB 琼脂(Lennox, 1955, Virology, 1:190)上平板接种选择携带质粒的细胞。

根据 Qiagen 公司的方法并使用该公司的材料进行质粒 DNA 的制备。根据 Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 进行测序反应。通过 ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)分离测序反应物并分析。

所得质粒 pCIS Peftu 果糖-1,6-二磷酸酶列出为 SEQ ID NO:17。

#### 实施例 8: 赖氨酸的产生

通过如 Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 中描述的电穿孔将质粒 pCIS Peftu 果糖-1,6-二磷酸酶在谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 中转化。在 DE 10046870 中描述了该方案的修改方案。使用标准方法, 通过如 Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor 中描述的 DNA 印迹和杂交检查个体转化体的果糖-1,6-二磷酸酶基因座的染色体排列。从而确定转化体包

括在果糖-1,6-二磷酸酶基因座通过同源重组整合所转化的质粒的转化体。在不含抗生素的培养基中过夜生长这些菌落后，将细胞在蔗糖 CM 琼脂培养基(10%蔗糖)上平板接种并在 30℃ 孵育 24 小时。

因为载体 pCIS Peftu 果糖-1,6-二磷酸酶中所含 sacB 基因将蔗糖转化成毒性产物，所有只有通过野生型果糖-1,6-二磷酸酶基因和 Peftu 果糖-1,6-二磷酸酶融合之间通过第二次同源重组步骤缺失 sacB 基因的那些菌落可以生长。在同源重组期间，所述野生型基因或者融合物与 sacB 基因一起可以被缺失。如果 sacB 基因与野生型一起被除去，那么得到突变的转化体。

挑选生长的菌落并检查卡那霉素敏感表型。具有缺失的 SacB 基因的克隆必须同时显示出卡那霉素敏感生长行为。通过聚合酶链式反应(PCR)检查是否已经发生了所希望的 Peftu 启动子对天然启动子的替代。对于该分析，从起始菌株和所得克隆分离染色体 DNA。为此，用牙签从琼脂板除去各自克隆并将其悬浮在 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O 中并在 95℃ 沸腾长达 10 分钟。在每种情况中，10  $\mu$ L 所得溶液用作 PCR 中的模板。将与 Peftu 启动子和果糖-1,6-二磷酸酶基因同源的寡核苷酸用作引物。如下选择 PCR 条件：最初变性：95℃ 5 分钟；95℃ 变性 30 秒；55℃ 杂交 30 秒；72℃ 扩增 2 分钟；30 个循环；72℃ 下最后延伸 5 分钟。在使用起始菌株的 DNA 的批中，由于寡核苷酸的选择，不能形成 PCR 产物。仅通过 Peftu 通过第二次重组完成天然启动子的替代的 4 个克隆具有所预期的大小为 340 bp 的带。总之，在所测试的克隆中，2 个克隆是阳性的。将所述克隆命名为 ATCC13032 lysCfbr Peftu 果糖-1,6-二磷酸酶 1 和 2。

为了研究 Peftu 果糖-1,6-二磷酸酶构建体对赖氨酸产生的影响，将菌株 ATCC13032, ATCC13032 lysCfbr, 和 ATCC13032 lysCfbr Peftu 果糖-1,6-二磷酸酶 1 培养在 CM 板(10.0 g/L D-葡萄糖, 2.5 g/L NaCl, 2.0 g/L 尿素, 10.0 g/L 细菌用蛋白胨(Difco), 5.0 g/L 酵母提取物(Difco), 5.0 g/L 牛肉膏 (Difco), 22.0 g/L 琼脂(Difco), 高压灭菌 (20 min. 121℃))上在 30℃ 培养 2 天。随后，从平板刮除细胞并重悬浮在盐水中。对于主要培养物，

将 10 mL 培养基 I 和 0.5g 高压灭菌的  $\text{CaCO}_3$  (Riedel de Haen) 与细胞悬浮物接种在 100mL 锥形瓶中直到 OD600 为 1.5 并在 Infors AJ118 型 (公司: Infors, Bottmingen, Switzerland)[摇动培养箱]上以 220 转/分钟孵育 39 小时。随后, 确定培养基中分离的赖氨酸浓度。

**培养基 I:**

40 g/L 蔗糖

60 g/L 糖蜜 (相对于 1000 % 糖含量计算)

10 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.4 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.6 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0.3 mg/L 硫胺素\*HCl

1 mg/L 生物素(来自用  $\text{NH}_4\text{OH}$  调节到 pH 8.0 的 1 mg/mL 无菌过滤的贮存液)

2 mg/L  $\text{FeSO}_4$

2 mg/L  $\text{MnSO}_4$

用  $\text{NH}_4\text{OH}$  调节到 pH 7.8, 高压灭菌 (121°C, 20 min)。

此外, 将来自贮存液(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  无菌过滤)的维生素 B12(羟钴氨素, Sigma Chemicals)加入直到终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

在 Agilent 1100 Series LC System HPLC 系统上根据 Agilent 的高压液相层析进行氨基酸浓度的测定。用邻苯二醛进行柱前衍生允许定量所形成的氨基酸; 用 Hypersil AA 柱(Agilent)进行氨基酸混合物的分离。

**实施例 9: 制备质粒 pCIS Psod 果糖-1,6-二磷酸酶**

根据 Tauch et al. (1995) Plasmid 33:168-179 和 Eikmanns et al. (1994) Microbiology 140:1817-1828 从谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 制备染色体 DNA。

PCR1:使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO 18 和 SEQ ID NO 19, 染色体 DNA 作为模板, 和 Pfu Turbo 聚合酶(公司: Stratagene), 通过使用聚合酶

链式反应(PCR)根据如 Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 中描述的标准方法扩增位于超氧化物歧化酶的起始密码子上游的区域。

**SEQ ID NO 18**

**5'- TAGCTGCCAATTATTCCGGG-3'**

和

**SEQ ID NO 19**

**5'- GGGTAAAAAATCCTTTCGTA -3'**

使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg)根据生产商的使用说明纯化约 200 bp 大小的所得 DNA 片段。

PCR2:使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO 20 和 SEQ ID NO 21, 染色体 DNA 作为模板, 和 Pfu Turbo 聚合酶(公司: Stratagene), 通过使用聚合酶链式反应(PCR)根据如 Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 中描述的标准方法扩增果糖-1,6-二磷酸酶的基因的 5' 区。

**SEQ ID NO 20**

**5'- CCCGGAATAATTGGCAGCTACTGAAGGGCCTCCTGGG  
-3'**

和

**SEQ ID NO 21**

**5'- TATCAACGCGTTCTTCATCGGTAGCAGCACC -3'**

使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg)根据生产商的使用说明纯化约 720 bp 大小的所得

DNA 片段。

**PCR3:**使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO 22 和 SEQ ID NO 23, 染色体 DNA 作为模板, 和 Pfu Turbo 聚合酶(公司: Stratagene), 通过使用聚合酶链式反应(PCR)根据如 Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 中描述的标准方法扩增果糖-1,6-二磷酸酶的起始密码子上游的区域。

**SEQ ID NO 22**

**5'-**

**TACGAAAGGATTTTTTACCCATGAACCTAAAGAACCCCGA -3'**

**和**

**SEQ ID NO 23**

**5'- ATCTACGTCGACCCAGGATGCCCTGGATTTC -3'**

使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg)根据生产商的使用说明纯化约 740 bp 大小的所得 DNA 片段。

**PCR4:** 使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO 18 和 SEQ ID NO 23, 来自 PCR1 和 3 的 PCR 产物作为模板, 和 Pfu Turbo 聚合酶(公司: Stratagene), 通过使用聚合酶链式反应(PCR)根据如 Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 中描述的标准方法进行融合 PCR。使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg)根据生产商的使用说明纯化约 930 bp 大小的所得 DNA 片段。

**PCR5:** 使用寡核苷酸引物 SEQ ID NO 21 和 SEQ ID NO 23, 来自 PCR2 和 4 的 PCR 产物作为模板, 和 Pfu Turbo 聚合酶(公司: Stratagene), 通过使用聚合酶链式反应(PCR)根据如 Innis et al. (1990) PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, Academic Press 中描述的标准方法进

行融合 PCR。

使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg)根据生产商的使用说明纯化约 1650 bp 大小的所得 DNA 片段。之后, 将其使用限制酶 MluI 和 SalI (Roche Diagnostics, Mannheim)切割并使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit 纯化 DNA 片段。

将载体 pCIS 用限制酶 MluI 和 SalI 切割并且电泳分离后通过使用 GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit 分离 4.3 kb 大小的片段。

通过使用 Rapid DNA Ligation Kit (Roche Diagnostics, Mannheim)根据生产商的使用说明将载体片段与来自 PCR5 的 PCR 片段连接在一起, 并且根据如 Sambrook et al. (Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, (1989))中描述的标准方法在感受态大肠杆菌 XL-1 Blue (Stratagene, La Jolla, USA)中转化连接批。通过在含有卡那霉素(20 µg/mL)的 LB 琼脂(Lennox, 1955, Virology, 1:190)上平板接种筛选携带质粒的细胞。

根据 Qiagen 公司的方法并使用该公司的材料进行质粒 DNA 的制备。根据 Sanger et al. (1977) Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74:5463-5467 进行测序反应。通过 ABI Prism 377 (PE Applied Biosystems, Weiterstadt)分离测序反应物并分析。

所得质粒 pCIS Psod 果糖-1,6-二磷酸酶列出为 SEQ ID NO:24。

#### 实施例 10: 赖氨酸的产生

通过如 Liebl, et al. (1989) FEMS Microbiology Letters 53:299-303 中描述的电穿孔将质粒 pCIS Psod 果糖-1,6-二磷酸酶在谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 中转化。在 DE 10046870 中描述了该方案的改进方案。使用标准方法, 通过如 Sambrook et al. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor 中描述的 DNA 印迹和杂交检查个体转化体的果糖-1,6-二磷酸酶基因座的染色体排列。从而确定转化体包

含在果糖-1,6-二磷酸酶基因座通过同源重组整合所转化的质粒的转化体。在不含抗生素的培养基中过夜生长这些菌落后，将细胞在蔗糖 CM 琼脂培养基(10%蔗糖)上平板接种并在 30℃ 孵育 24 小时。

因为载体 pCIS Psod 果糖-1,6-二磷酸酶中所含 sacB 基因将蔗糖转化成毒性产物，所有只有在野生型果糖-1,6-二磷酸酶基因和 Psod 果糖-1,6-二磷酸酶融合之间通过第二次同源重组步骤缺失 sacB 基因的那些菌落可以生长。在同源重组期间，所述野生型基因或者融合物与 sacB 基因一起可以被缺失。如果 sacB 基因与野生型一起被除去，那么得到突变的转化体。

挑选生长的菌落并检查卡那霉素敏感表型。具有缺失的 SacB 基因的克隆必须同时显示出卡那霉素敏感生长行为。通过聚合酶链式反应(PCR)检查是否已经发生了所希望的 Psod 启动子对天然启动子的替代。对于该分析，从起始菌株和所得克隆分离染色体 DNA。为此，用牙签从琼脂板除去各自克隆并将其悬浮在 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O 中并在 95℃ 沸腾长达 10 分钟。在每种情况中，10  $\mu$ L 所得溶液用作 PCR 中的模板。将与 Psod 启动子和果糖-1,6-二磷酸酶基因同源的寡核苷酸用作引物。如下选择 PCR 条件：最初变性：95℃ 5 分钟；95℃ 变性 30 秒；55℃ 杂交 30 秒；72℃ 扩增 2 分钟；30 个循环；72℃ 下最后延伸 5 分钟。在使用起始菌株的 DNA 的批中，由于寡核苷酸的选择，不能形成 PCR 产物。仅通过 Psod 通过第二次重组完成天然启动子的替代的 3 个克隆具有所预期的大小为 350 bp 的带。总之，在所测试的克隆中，3 个克隆是阳性的。将所述克隆命名为 ATCC13032 lysCfbr Psod 果糖-1,6-二磷酸酶 1、2，和 3。

为了研究 Psod 果糖-1,6-二磷酸酶构建体对赖氨酸生产的影响，将菌株 ATCC13032, ATCC13032 lysCfbr, 和 ATCC13032 lysCfbr Psod 果糖-1,6-二磷酸酶 1 培养在 CM 板(10.0 g/L D-葡萄糖, 2.5 g/L NaCl, 2.0 g/L 尿素, 10.0 g/L 细菌用蛋白胨(Difco), 5.0 g/L 酵母提取物(Difco), 5.0 g/L 牛肉膏 (Difco), 22.0 g/L 琼脂(Difco), 高压灭菌 (20 min. 121℃))上在 30℃ 培养 2 天。随后，从平板刮除细胞并重悬浮在盐水中。对于主要培养物，将 10 mL 培养基 I 和 0.5g 高压灭菌的 CaCO<sub>3</sub> (Riedel de Haen)与细胞悬浮物

接种在 100mL 锥形瓶中直到 OD600 为 1.5 并在 Infors AJ118 型 (公司: Infors, Bottmingen, Switzerland)[摇动培养箱]上以 220 转/分钟孵育 39 小时。随后, 确定培养基中分离的赖氨酸浓度。

**培养基 I:**

40 g/L 蔗糖

60 g/L 糖蜜 (相对于 1000 % 糖含量计算)

10 g/L  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

0.4 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

0.6 g/L  $\text{KH}_2\text{PO}_4$

0.3 mg/L 硫胺素\*HCl

1 mg/L 生物素(来自用  $\text{NH}_4\text{OH}$  调节到 pH 8.0 的 1 mg/mL 无菌过滤的贮存液)

2 mg/L  $\text{FeSO}_4$

2 mg/L  $\text{MnSO}_4$

用  $\text{NH}_4\text{OH}$  调节到 pH 7.8, 高压灭菌 (121°C, 20 min)。

此外, 将来自贮存液(200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  无菌过滤)的维生素 B12(羟钴氨素, Sigma Chemicals)加入直到终浓度为 100  $\mu\text{g}/\text{L}$ 。

在 Agilent 1100 Series LC System HPLC 系统上根据 Agilent 的高压液相层析进行氨基酸浓度的测定。用邻苯二醛进行柱前衍生允许定量所形成的氨基酸; 用 Hypersil AA 柱(Agilent)进行氨基酸混合物的分离。

**等同方案**

本领域技术人员将认识到或者使用不过仅仅一种常规实验方法就能够确定本文描述的本发明的特定实施方案的许多等同方案。此类等同方案意在下面的权利要求书包括。

## 序 列 表

<110>巴斯福股份公司

<120>通过发酵制备精细化学品的方法

<130> BGI-158PC2

<150> PCT/IB2003/006456

<151> 2003-12-18

<160> 24

<170> FastSEQ for Windows 版本 4.0

<210> 1

<211> 1070

<212> DNA

<213> 谷氨酸棒杆菌

<220>

<221> CDS

<222> (22)...(1029)

<400> 1

```

gtgccccagg aggcccttca g atg aac cta aag aac ccc gaa acg cca gac 51
                               Met Asn Leu Lys Asn Pro Glu Thr Pro Asp
                               1           5           10

cgt aac ctt gct atg gag ctg gtg cga gtt acg gaa gca gct gca ctg 99
Arg Asn Leu Ala Met Glu Leu Val Arg Val Thr Glu Ala Ala Ala Leu
          15           20           25

gct tct gga cgt tgg gtt gga cgt ggc atg aag aat gaa ggc gac ggt 147
Ala Ser Gly Arg Trp Val Gly Arg Gly Met Lys Asn Glu Gly Asp Gly
          30           35           40

gcc gct gtt gac gcc atg cgc cag ctc atc aac tca gtg acc atg aag 195
Ala Ala Val Asp Ala Met Arg Gln Leu Ile Asn Ser Val Thr Met Lys
          45           50           55

ggc gtc gtt gtt atc ggc gag ggc gaa aaa gac gaa gct cca atg ctg 243
Gly Val Val Val Ile Gly Glu Gly Glu Lys Asp Glu Ala Pro Met Leu
          60           65           70

tac aac ggc gaa gag gtc gga acc ggc ttt gga cct gag gtt gat atc 291
Tyr Asn Gly Glu Glu Val Gly Thr Gly Phe Gly Pro Glu Val Asp Ile
          75           80           85

gca gtt gac cca gtt gac ggc acc acc ctg atg gct gag ggt cgc ccc 339
Ala Val Asp Pro Val Asp Gly Thr Thr Leu Met Ala Glu Gly Arg Pro
          95           100          105

aac gca att tcc att ctc gca gct gca gag cgt ggc acc atg tac gat 387
Asn Ala Ile Ser Ile Leu Ala Ala Ala Glu Arg Gly Thr Met Tyr Asp
          110          115          120

cca tcc tcc gtc ttc tac atg aag aag atc gcc gtg gga cct gag gcc 435
Pro Ser Ser Val Phe Tyr Met Lys Lys Ile Ala Val Gly Pro Glu Ala

```

125	130	135	
gca ggc aag atc gac atc gaa gct cca gtt gcc cac aac atc aac gcg Ala Gly Lys Ile Asp Ile Glu Ala Pro Val Ala His Asn Ile Asn Ala 140 145 150			483
gtg gca aag tcc aag gga atc aac cct tcc gac gtc acc gtt gtc gtg Val Ala Lys Ser Lys Gly Ile Asn Pro Ser Asp Val Thr Val Val Val 155 160 165 170			531
ctt gac cgt cct cgc cac atc gaa ctg atc gca gac att cgt cgt gca Leu Asp Arg Pro Arg His Ile Glu Leu Ile Ala Asp Ile Arg Arg Ala 175 180 185			579
ggc gca aag gtt cgt ctc atc tcc gac ggc gac gtt gca ggt gca gtt Gly Ala Lys Val Arg Leu Ile Ser Asp Gly Asp Val Ala Gly Ala Val 190 195 200			627
gca gca gct cag gat tcc aac tcc gtg gac atc atg atg ggc acc ggc Ala Ala Ala Gln Asp Ser Asn Ser Val Asp Ile Met Met Gly Thr Gly 205 210 215			675
gga acc cca gaa ggc atc atc act gcg tgc gcc atg aag tgc atg ggt Gly Thr Pro Glu Gly Ile Ile Thr Ala Cys Ala Met Lys Cys Met Gly 220 225 230			723
ggc gaa atc cag ggc atc ctg gcc cca atg aac gat ttc gag cgc cag Gly Glu Ile Gln Gly Ile Leu Ala Pro Met Asn Asp Phe Glu Arg Gln 235 240 245 250			771
aag gca cac gac gct ggt ctg gtt ctt gat cag gtt ctg cac acc aac Lys Ala His Asp Ala Gly Leu Val Leu Asp Gln Val Leu His Thr Asn 255 260 265			819
gat ctg gtg agc tcc gac aac tgc tac ttc gtg gca acc ggt gtg acc Asp Leu Val Ser Ser Asp Asn Cys Tyr Phe Val Ala Thr Gly Val Thr 270 275 280			867
aac ggt gac atg ctc cgt ggc gtt tcc tac cgc gca aac ggc gca acc Asn Gly Asp Met Leu Arg Gly Val Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Ala Thr 285 290 295			915
acc cgt tcc ctg gtt atg cgc gca aag tca ggc acc atc cgc cac atc Thr Arg Ser Leu Val Met Arg Ala Lys Ser Gly Thr Ile Arg His Ile 300 305 310			963
gag tct gtc cac cag ctg tcc aag ctg cag gaa tac tcc gtg gtt gac Glu Ser Val His Gln Leu Ser Lys Leu Gln Glu Tyr Ser Val Val Asp 315 320 325 330			1011
tac acc acc gcg acc taa gagctcttag ttcgaaaaac cgccggccat Tyr Thr Thr Ala Thr * 335			1059
tgtggtcggc g			1070

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 335

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 谷氨酸棒杆菌

&lt;400&gt; 2

```

Met Asn Leu Lys Asn Pro Glu Thr Pro Asp Arg Asn Leu Ala Met Glu
 1          5          10          15
Leu Val Arg Val Thr Glu Ala Ala Ala Leu Ala Ser Gly Arg Trp Val
 20          25          30
Gly Arg Gly Met Lys Asn Glu Gly Asp Gly Ala Ala Val Asp Ala Met
 35          40          45
Arg Gln Leu Ile Asn Ser Val Thr Met Lys Gly Val Val Val Ile Gly
 50          55          60
Glu Gly Glu Lys Asp Glu Ala Pro Met Leu Tyr Asn Gly Glu Glu Val
 65          70          75          80
Gly Thr Gly Phe Gly Pro Glu Val Asp Ile Ala Val Asp Pro Val Asp
 85          90          95
Gly Thr Thr Leu Met Ala Glu Gly Arg Pro Asn Ala Ile Ser Ile Leu
 100         105         110
Ala Ala Ala Glu Arg Gly Thr Met Tyr Asp Pro Ser Ser Val Phe Tyr
 115         120         125
Met Lys Lys Ile Ala Val Gly Pro Glu Ala Ala Gly Lys Ile Asp Ile
 130         135         140
Glu Ala Pro Val Ala His Asn Ile Asn Ala Val Ala Lys Ser Lys Gly
 145         150         155         160
Ile Asn Pro Ser Asp Val Thr Val Val Val Leu Asp Arg Pro Arg His
 165         170         175
Ile Glu Leu Ile Ala Asp Ile Arg Arg Ala Gly Ala Lys Val Arg Leu
 180         185         190
Ile Ser Asp Gly Asp Val Ala Gly Ala Val Ala Ala Ala Gln Asp Ser
 195         200         205
Asn Ser Val Asp Ile Met Met Gly Thr Gly Gly Thr Pro Glu Gly Ile
 210         215         220
Ile Thr Ala Cys Ala Met Lys Cys Met Gly Gly Glu Ile Gln Gly Ile
 225         230         235         240
Leu Ala Pro Met Asn Asp Phe Glu Arg Gln Lys Ala His Asp Ala Gly
 245         250         255
Leu Val Leu Asp Gln Val Leu His Thr Asn Asp Leu Val Ser Ser Asp
 260         265         270
Asn Cys Tyr Phe Val Ala Thr Gly Val Thr Asn Gly Asp Met Leu Arg
 275         280         285
Gly Val Ser Tyr Arg Ala Asn Gly Ala Thr Thr Arg Ser Leu Val Met
 290         295         300
Arg Ala Lys Ser Gly Thr Ile Arg His Ile Glu Ser Val His Gln Leu
 305         310         315         320
Ser Lys Leu Gln Glu Tyr Ser Val Val Asp Tyr Thr Thr Ala Thr
 325         330         335

```

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 35

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的构建体

&lt;400&gt; 3

gagagagaga cgcgccccag tggctgagac gcatc

35

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 34

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 合成的构建体

&lt;400&gt; 4

ctctctctgt cgacgaattc aatottacgg cctg

34

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 4323

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 谷氨酸棒杆菌

&lt;400&gt; 5

```

tcgagaggcc tgacgtcggg cccggtaocca cgcgtcatat gactagtctg gacctagggg 60
tategtcgac atcgatgctc ttctgcggtta attaacaatt gggatcctct agaccgggga 120
tttaaatecgc tagcgggctg ctaaaggaag cggaacacgt agaaagccag tccgcagaaa 180
cgggtgctgac cccggatgaa tgtcagctac tgggctatct ggacaaggga aaacgcaagc 240
gcaaagagaa agcaggtagc ttgcagtggg cttacatggc gatagctaga ctgggagggt 300
ttatggacag caagcgaacc ggaattgcc a gctggggcgc cctctggtaa ggttgggaag 360
ccctgcaaag taaactggat ggctttcttg ccgccaagga tctgatggcg caggggatca 420
agatctgatc aagagacagg atgaggatcg tttcgcata ga ttgaacaaga tggattgcac 480
gcaggttctc cggccgcttg ggtggagagg ctattcggct atgactgggc acaacagaca 540
atcggctgct ctgatgccgc cgtgttccgg ctgtcagcgc agggggcggc ggttcttttt 600
gtcaagaccg acctgtccgg tgcctgaat gaactgcagg acgaggcagc gcggctatcg 660
tggctggcca cgacgggctg tccttgcgca gctgtgctcg acgttgtcac tgaagcggga 720
agggatggc tgctattggg cgaagtgcg gggcaggatc tcctgtcatc tcacctgtct 780
cctgocgaga aagtatccat catggctgat gcaatgcggc ggctgcatac gcttgatccg 840
gtacctgcc cattcgacca ccaagcgaaa catcgcacag agcagacagc tactcggatg 900
gaagccggtc ttgtcgatca ggatgatctg gacgaagagc atcaggggct cgcgccagcc 960
gaactgttcg ccaggetcaa ggcgcgcgatg cccgacggcg aggatctcgt cgtgacccat 1020
ggcgatgcct gcttgccgaa tatcatggtg gaaaatggcc gcttttctgg attcatcgac 1080
tgtggccggc tgggtgtggc ggaccgctat caggacatag cgttggctac ccgtgatatt 1140
gctgaagagc ttggcggcga atgggctgac cgcttctcgt tgctttacgg tatcgccgct 1200
cccgattcgc agcgcacgc cttctatcgc cttcttgacg agttcttctg agcgggactc 1260
tggggttcga aatgaccgac caagcgaagc ccaacctgcc atcacgagat ttcgattcca 1320
ccgcccctt ctatgaaagg ttgggcttcg gaatcgtttt ccgggacgcc ggctggatga 1380
tctccagcg cggggatctc atgctggagt tcttcgcca cgctagcggc gcgcccggcg 1440
gcccgggtg aaataccgca cagatgcgta aggagaaaat accgcatcag gcgctcttcc 1500
gcttctcgc tcaactgact gctgcgctcg gtcgttcggc tgcggcgagc ggtatcagct 1560
caactcaaag cggtaatacg gttatccaca gaatcagggg ataacgcagg aaagaacatg 1620
tgagcaaaaag gccagcaaaa ggccaggaac cgtaaaaagg ccgcgttctt ggcgtttttc 1680
cataggctcc gccccctga cgaagcacc aaaaatcgac gctcaagtca gaggtggcga 1740
aaccgcagag gactataaag ataccaggcg tttcccctg gaagctccct cgtgcgctct 1800
cctgttccga cctgcccgt taccggatac ctgtccgctt ttctccctc ggaagcgtg 1860
gcgctttctc atagctcacg ctgtaggtat ctcagttcgg tgtaggtcgt tcgctccaag 1920
ctgggctgtg tgcacgaacc ccccgttcag cccgaccgct gcgccttatc cggtaactat 1980
cgtcttgagt ccaaccgggt aagacacgac ttatcgccac tggcagcagc cactggtaac 2040
aggattagca gagcagggta tgtaggcggg gctacagagt tcttgaagtg gtggcctaac 2100
tacggctaca ctagaaggac agtatttggg atctgcgctc tgctgaagcc agttacctc 2160
ggaaaaagag ttggtagctc ttgatccggc aaacaaacca ccgctggtag cgggtggttt 2220
tttgtttgca agcagcagat tacgcgcaga aaaaaaggat ctcaagaaga tcctttgatc 2280
ttttctacgg ggtctgacgc tcagtggaac gaaaactcac gtttaaggat tttggctcatg 2340
agattatcaa aaaggatctt cacctagatc cttttaaagg ccggccgcgg ccgcatcgg 2400
cattttcttt tgcgttttta tttgttaact gtttaattgtc cttgttcaag gatgctgtct 2460
ttgacaacag atgttttctt gcctttgatg ttcagcagga agctcggcgc aaacgttgat 2520
tgtttgtctg cgtagaatcc tctgtttgtc atatagcttg taatcacgac attgtttcct 2580
ttcgcttgag gtacagcgaa gtgtgagtaa gtaaaaggta catcgtagg atcaagatcc 2640
atttttaaca caaggccagt tttgttcagc ggcttgtatg ggccagttaa agaattagaa 2700
acataaccaa gcatgtaaat atcgtagac gtaatgccgt caatcgtcat ttttgatccg 2760
cgggagtcag tgaacaggta ccatttgccg ttcattttaa agacgttcgc gcgttcaatt 2820
tcatctgtta ctgtgttaga tgcaatcagc ggtttcatca cttttttcag tgtgtaatca 2880

```

```

tcgtttagct caatcatacc gagagcgccg tttgctaact cagccgtgcg ttttttatcg 2940
ctttgcagaa gtttttgact ttcttgacgg aagaatgatg tgcttttgcc atagtatgct 3000
ttgttaaata aagattcttc gccttgtag ccactctcag ttccagtgtt tgcttcaaat 3060
actaagtatt tgtggccttt atcttctacg tagtgaggat ctctcagcgt atgggtgtcg 3120
cctgagctgt agttgccttc atcgatgaac tgctgtacat tttgatacgt ttttccgtca 3180
ccgtcaaaga ttgatttata atcctctaca ccgttgatgt tcaaagagct gtctgatgct 3240
gatacgttaa cttgtgcagt tgctcaggtt gtttgccgt aatgtttacc ggagaaatca 3300
gtgtagaata aacggatttt tccgtcagat gtaaagtggg ctgaacctga ccattcttgt 3360
gtttggctct ttaggataga atcatttgca tcgaatttgt cgtgtcttt aaagacgagg 3420
ccagcgtttt tccagctgct aatagaagtt tcgccgactt tttgatagaa catgtaaate 3480
gatgtgtcat ccgcatTTTT aggatctccg gctaatagca agacgatgtg gtagccgtga 3540
tagtttgca cagtgccgtc agcgttttgt aatggccagc tgtcccaaac gtccaggcct 3600
tttgcagaag agataTTTT aattgtggac gaatcaaatt cagaaacttg atatTTTTca 3660
tttttttgct gttcagggat ttgcagcata tcatggcgtg taatatggga aatgccgtat 3720
gtttccttat atggcttttg gttcgtttct ttcgcaaacg cttgagttgc gcctcctgcc 3780
agcagtgcgg tagtaaagggt taatactggt gcttgTTTTg caaactttt gatgttcatc 3840
gttcatgtct ccttttttat gtactgtggt agcggctctc ttcttccagc cctcctgttt 3900
gaagatggca agttagttac gcacaataaa aaaagaccta aaatatgtaa ggggtgacgc 3960
caaagtatac actttgccct ttacacattt taggtcttgc ctgctttatc agtaacaaac 4020
ccgcgcgatt tacttttcca cctcattcta ttagactctc gtttggtatt caactgttct 4080
attttctct tttgtttgat agaaaatcat aaaaggattt gcagactacg ggcctaaga 4140
actaaaaaat ctatctgttt cttttcattc tctgtatttt ttatagttt tgttgcatgg 4200
gcataaagtt gcctttttaa tcacaattca gaaaatatca taatatctca tttcactaaa 4260
taatagttaa cggcaggtat atgtgatggg ttaaaaagga tcggcgcccg ctcgatttaa 4320
atc 4323

```

<210> 6

<211> 5860

<212> DNA

<213> 谷氨酸棒杆菌

<400> 6

```

cccggtacca cgcgtcccag tggtgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60
agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagttat aaaggtagag ttgagcgggt 120
aactgtcagc acgtagatcg aaagggtcac aaagggtggc ctggtcgtac agaaatatgg 180
cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcac tagaaacgct gctgaacgga tcggtgccac 240
caagaaggct ggaaatgatg tcgtggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360
cctgactgct ggtgagcgtg tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg 420
cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctggtgtg ctaccaccg agcgcaccgg 480
aaacgcacgc attgttgatg tcaactccagg tcgtgtgctg gaagcactcg atgagggcaa 540
gatctgcatt gttgctggtt tccaggggtg taataaagaa acccgcgatg taccacggtt 600
gggtcgtggt ggttctgaca ccaactgcagt tgcttggca gctgctttga acgctgatgt 660
gtgtgagatt tactcggacg ttgacgggtg gtataccgct gaccgcgca tcgttcctaa 720
tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcca agaaatgctg gaacttgctg ctggtggctc 780
caagatTTTT gtgctgcgca gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttccgct 840
acgctcgtct tatagtaatg atcccggcac tttgattgcc ggctctatgg aggatattcc 900
tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960
tctgggtatt tccgataaag caggcgaggc tgcaagggtt tccggtgctg tggctgatgc 1020
agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaaccaccga 1080
catcaccttc acctgccctc gttccgacgg ccgcccgcgg atggagatct tgaagaagct 1140
tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggctcggca aagtctccct 1200
cgtgggtgct ggcatgaagt ctaccaccag tgttaccgca gagttcatgg aagctctgct 1260
ccagtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgtattt ccgtgctgat 1320
ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctggcggg 1380
cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agttttaaag gtagtatttt 1440
acaatgacca ccaatcgcagt tgttggtgca accggccagg tcggccagggt tatgcgacc 1500
cttttggaag agcgcgaattt cccagctgac actgttctgt tctttgcttc cccacgttcc 1560
gcaggccgta agattgaatt cgtcgacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620
atcctctaga cccgggattt aatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680
aagccagtcc gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740

```

caagggaaaa	cgcaagcgca	aagagaaagc	aggtagcttg	cagtgggctt	acatggcgat	1800
agctagactg	ggcggtttta	tggacagcaa	gcgaaccgga	attgccagct	ggggcgccct	1860
ctggtaaggt	tgggaagccc	tgcaaagtaa	actggatggc	tttcttgccg	ccaaggatct	1920
gatggcgag	gggatcaaga	tctgatcaag	agacaggatg	aggatcgttt	cgcatgattg	1980
aacaagatgg	attgcacgca	ggttctccgg	ccgcttgggt	ggagaggcta	ttcggctatg	2040
actgggcaca	acagacaatc	ggctgctctg	atgcccgctg	gttccggctg	tcagcgagc	2100
ggcggccggt	tctttttgtc	aagaccgacc	tgtccgggtg	cctgaatgaa	ctgcaggacg	2160
aggcagcgcg	gctatcgtgg	ctggccacga	cgggcttcc	ttgcgagct	gtgctcgacg	2220
ttgtcactga	agcgggaagg	gactggctgc	tattgggoga	agtgccgggg	caggatctcc	2280
tgtcatctca	ccttgctcct	gccgagaaag	tatccatcat	ggctgatgca	atgcggcggc	2340
tgcatacgct	tgatccggct	acctgcccac	tcgaccacca	agcgaacat	cgcatcgagc	2400
gagcacgtac	tcggatggaa	gccggctctg	tcgatcagga	tgatctggac	gaagagcatc	2460
aggggctcgc	gccagccgaa	ctgttcgcca	ggctcaaggc	gcgcatgcc	gacggcgagg	2520
atctcgtcgt	gacctatggc	gatgcctgct	tgccgaatat	catggtggaa	aatggccgct	2580
tttctggatt	catcgactgt	ggccggctgg	gtgtggcgga	ccgctatcag	gacatagcgt	2640
tggctacccg	tgatattgct	gaagagcttg	gcggcgaatg	ggctgaccgc	ttcctcgtgc	2700
tttacggtat	cgccgctccc	gattcgcagc	gcatcgcctt	ctatcgcctt	cttgacgagt	2760
tcttctgagc	gggactctgg	ggttcgaaat	gaccgaccaa	gcgacgcca	acctgccatc	2820
acgagatttc	gattccaccg	ccgccttcta	tgaaagggtg	ggcttcggaa	tcgttttccg	2880
ggacgccggc	tgatgatccc	tcagcgcgg	ggatctcatg	ctggagtctt	tcgcccacgc	2940
tagcggcgcg	ccggccggcc	cggtgtgaaa	taccgcacag	atgcgtaagg	agaaaatacc	3000
gcatacggcg	ctcttcgctc	tcctcgctca	ccgctcgtct	gcgctcggtc	gttcgggtgc	3060
ggcgagcggg	atcagctcac	tcaaaggcgg	taatacgggt	atccacagaa	tcaggggata	3120
acgcaggaaa	gaacatgtga	gcaaaaggcc	agcaaaaggc	caggaaccgt	aaaaaggccg	3180
cgttgctggc	gtttttccat	aggctccgcc	cccctgacga	gcatcacaaa	aatcgacgct	3240
caagtcaag	gtggcgaaac	ccgacaggac	tataaagata	ccaggcggtt	ccccctggaa	3300
gctccctcgt	gcgctctcct	gttccgaccc	tgccgcttac	cggatacctg	tcgcctttc	3360
tccttccggg	aagcgtggcg	ctttctcata	gctcacgctg	taggtatctc	agttcgggtg	3420
aggtcgttcg	ctccaagctg	ggctgtgtgc	acgaaccccc	cgttcagccc	gaccgctcgc	3480
ccttatccgg	taactatcgt	cttgagtcca	acccggttaag	acacgactta	tcgccactgg	3540
cagcagccac	tggtaacagg	attagcagag	cgaggtatgt	aggcgggtgct	acagagttct	3600
tgaagtgggtg	gcctaactac	ggctacacta	gaaggacagt	atgttggtatc	tgcgctctgc	3660
tgaagccagt	taccttcgga	aaaagagttg	gtagctcttg	atccggcaaa	caaaccaccg	3720
ctggtagcgg	tggttttttt	gtttgcaagc	agcagattac	gcgcagaaaa	aaaggatctc	3780
agaagatcc	tttgatcttt	tctacggggt	ctgacgctca	gtggaacgaa	aactcacggt	3840
aagggatttt	ggtcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaaggccg	3900
gccgcggcgg	ccatcggcac	tttcttttgc	gtttttatct	gttaactggt	aattgtcctt	3960
gttcaaggat	gctgtctttg	acaacagatg	tttcttggcc	tttgatgttc	agcaggaagc	4020
tcggcgcaaaa	cgttgattgt	ttgtctgcgt	agaatcctct	gtttgtcata	tagcttgtaa	4080
tcacgacatt	gtttcctttc	gcttgaggta	cagcgaagtg	tgagtaagta	aaggttacat	4140
cgttaggatc	aagatccatt	tttaacacaa	ggccagtttt	gttcagcggc	ttgatgggc	4200
cagttaaaga	attagaaaca	taaccaagca	tgtaaataatc	gttagacgta	atgccgtcaa	4260
tcgtcattht	tgatccgcgg	gagtcagtga	acaggtaacca	tttgccgttc	atthttaaaga	4320
cgttcgcgcg	ttcaatthca	tctgttactg	tgttagatgc	aatcagcggg	ttcatcactt	4380
ttttcagtg	gtaatcatcg	tttagctcaa	tcataccgag	agcgcggttt	gctaactcag	4440
ccgtgcgtht	tttatcgctt	tcgagaagtt	tttgactttc	ttgacggaag	aatgatgtgc	4500
ttttgccata	gtatgcttht	ttaaataaag	attcttcgcc	ttggtagcca	tcttcagtht	4560
cagtgthtgc	ttcaaatact	aagtattht	ggcctthtacc	ttctacgtag	tgaggatctc	4620
tcagcgtatg	gttgctgcct	gagctgtagt	tgcttccatc	gatgaactgc	tgtacattht	4680
gatacgttht	tcgctcaccg	tcaaagattg	atthtataatc	ctctacaccg	ttgatgttca	4740
aagagctgtc	tgatgctgat	acgttaactt	gtgcagtht	cagtgtht	ttgccgtaat	4800
gtttaccgga	gaaatcagtg	tagaataaac	ggatthtcc	gtcagatgta	aatgtggctg	4860
aacctgacca	ttctgtgtt	tggtcttht	ggatagaatc	atthtgcacg	aatthtgcgc	4920
tgtctthttaa	gacgcggcca	gcgtthtcc	agctgtcaat	agaagtht	ccgacttht	4980
gatagaacat	gtaaatcgat	gtgtcatccg	cattthtagg	atctccggct	aatgcaaaga	5040
cgatgtggta	cccgtgatag	tttgcgacag	tgccgtcagc	gtthtgtaat	ggccagctgt	5100
cccaaaccgtc	caggccttht	gcagaagaga	tatthttaat	tgtggacgaa	tcaaattcag	5160
aaacttgata	ttthtcattht	ttthtgcgtt	cagggattht	cagcatatca	tggcgtgtaa	5220
tatgggaaat	gccgtatgtt	tccttatatg	gctthtgggt	cgthtcttht	gcaaaccgtt	5280
gagthtgcgc	tcctgccagc	agtgcggtag	taaagtht	tactgttgct	tgthtthtcaa	5340
actthttht	gttcatcgtt	catgtctcct	ttthtatgta	ctgtgttagc	ggtctgcttc	5400

```

ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460
tatgtaaggg gtgacgccaa agtatacact ttgcccttta cacatttttag gtcttgcctg 5520
ctttatcagt aacaaaccog cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcggt 5580
tggattgcaa ctggtctatt ttccctcttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640
gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttcatctctt gtatTTTTTA 5700
tagtttctgt tgcatgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760
tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820
gcggccgctc gatttaaate tcgagaggcc tgacgtcggg 5860

```

<210> 7  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的构建体

<400> 7  
cggcaccacc gacatcatct tcacctgcc tcggttccg 38

<210> 8  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成的构建体

<400> 8  
cggaacgagg gcaggtgaag atgatgtcgg tgggtgccg 38

<210> 9  
<211> 1263  
<212> DNA  
<213> 谷氨酸棒杆菌

<400> 9  
gtggccctgg tcgtacagaa atatggcggg tcctcgcttg agagtgcgga acgcattaga 60  
aacgtcgtctg aacggatcgt tgccaccaag aaggctggaa atgatgtcgt ggttgtctgc 120  
tccgcaatgg gagacaccac ggatgaactt ctagaacttg cagcggcagt gaatcccgtt 180  
ccgccagctc gtgaaatgga tatgctcctg actgctggtg agcgtatttc taacgctctc 240  
gtcgcctatgg ctattgagtc ccttggcgca gaagcccaat ctttcacggg ctctcaggct 300  
ggtgtgctca ccaccgagcg ccacggaaac gcacgcattg ttgatgtcac tccaggctcg 360  
gtgctgtaag cactcgatga gggcaagatc tgcatgttg ctggtttcca ggtgttaat 420  
aaagaaacc cgcgatgtcac cacgttgggt cgtgggtggt ctgacaccac tgcagttgcg 480  
ttggcagctg ctttgaacgc tgatgtgtgt gagatttact cggacgttga cgggtgtgat 540  
accgctgacc cgcgcacatgt tccaatgca cagaagctgg aaaagctcag cttcgaagaa 600  
atgctggaac ttgctgctgt tggctccaag attttgggtc tgcgcagtgt tgaatacgtc 660  
cgtgcattca atgtgccact tcgcgtacgc tcgtcttata gtaatgatcc cggcactttg 720  
attgccggct ctatggagga tattcctgtg gaagaagcag tccttaccgg tctcgaacc 780  
gacaagtccg aagccaaagt aaccgttctg ggtatttccg ataagccagg cgaggctgcg 840  
aaggttttcc gtgctgtggc tgatgcagaa atcaacattg acatggttct gcagaacgtc 900  
tcttctgtag aagacggcac caccgacatc accttcacct gccctcgttc gcacggccgc 960  
cgcgcgatgg agatcttgaa gaagcttcag gttcagggca actggacca tgtgctttac 1020  
gacgaccagg tcggcaaagt ctccctcgtg ggtgctggca tgaagtctca cccaggtgtt 1080  
accgcagagt tcatggaagc tctgcgcgat gtcaacgtga acatcgaatt gatttccacc 1140  
tctgagattc gtatttccgt gctgatccgt gaagatgatc tggatgctgc tgcacgtgca 1200  
ttgcatgagc agttccagct gggcggcgaa gacgaagccg tcgtttatgc aggcaccgga 1260

cgc

1263

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 5860

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 谷氨酸棒杆菌

&lt;400&gt; 10

```

cccggtagca cgcgtocag tggctgagac gcatccgcta aagccccagg aaccctgtgc 60
agaaagaaaa cactcctctg gctaggtaga cacagtttat aaaggtagag ttgagcgggt 120
aactgtcagc acgtagatcg aaaggtgcac aaaggtggcc ctggtcgtac agaaatatgg 180
cggttcctcg cttgagagtg cggaacgcat tagaaacgtc gctgaacgga tcgttgccac 240
caagaaggct ggaaatgatg tcgtggttgt ctgctccgca atgggagaca ccacggatga 300
acttctagaa cttgcagcgg cagtgaatcc cgttccgcca gctcgtgaaa tggatatgct 360
cctgactgct ggtgagcgtg tttctaacgc tctcgtcgcc atggctattg agtcccttgg 420
cgcagaagcc caatctttca cgggctctca ggctgggtgtg ctaccaccg agcgcacagg 480
aaacgcacgc attgtttgatg tcaactccagg tcgtgtgcgt gaagcactcg atgagggcaa 540
gatctgcatt gttgctgggt tccagggtgt taataaagaa acccgcatg tcaccacggt 600
gggtcgtggg ggttctgaca ccactgcagt tgcgttggca gctgcttga acgctgatgt 660
gtgtgagatt tactcggacg ttgacgggtg gtataccgct gaccgcgca tcgttcctaa 720
tgcacagaag ctggaaaagc tcagcttcca agaaatgctg gaacttgctg ctggtggctc 780
caagattttg gtgctgcgca gtgttgaata cgctcgtgca ttcaatgtgc cacttcgctg 840
acgctcgtct tatagtaatg atccccggac tttgattgcc ggctctatgg aggatattcc 900
tgtggaagaa gcagtcctta ccggtgtcgc aaccgacaag tccgaagcca aagtaaccgt 960
tctgggtatt tccgataagc caggcagggc tgcgaagggt tccggtcgt tggctgatgc 1020
agaaatcaac attgacatgg ttctgcagaa cgtctcttct gtagaagacg gcaccaccga 1080
catcatcttc acctgccttc gttccgacgg ccgcccgcg atggagatct tgaagaagct 1140
tcaggttcag ggcaactgga ccaatgtgct ttacgacgac caggtcggca aagtctccct 1200
cgtgggtgct ggcatgaagt ctcaaccagg tgttaccgca gaggctcatg aagctctgct 1260
cgatgtcaac gtgaacatcg aattgatttc cacctctgag attcgtattt ccgtgctgat 1320
ccgtgaagat gatctggatg ctgctgcacg tgcattgcat gagcagttcc agctgggagg 1380
cgaagacgaa gccgtcgttt atgcaggcac cggacgctaa agttttaaag gtagtattt 1440
acaatgacca ccatcgcagt tgttgggtgca accggccagg tcggccagg tatgcccacc 1500
cttttgaag agcgcattt cccagctgac actggtcgtt tctttgcttc cccacgttcc 1560
gcaggccgta agattgaatt cgtcgcacatc gatgctcttc tgcgttaatt aacaattggg 1620
atcctctaga cccgggattt aaatcgctag cgggctgcta aaggaagcgg aacacgtaga 1680
aagccagtcg gcagaaacgg tgctgacccc ggatgaatgt cagctactgg gctatctgga 1740
caaggaaaa cgcaagcgca aagagaaagc aggtagcttg cagtgggctt acatggcgt 1800
agctagatga ggcggtttta tggacagcaa gcgaaccgga attgccagct gggcgccct 1860
ctggtaaggt tgggaagccc tgcaaagtaa actggatggc tttcttgccg ccaagatct 1920
gatggcgcag gggatcaaga tctgatcaag agacaggatg aggatcgttt cgcgatgtg 1980
aacaagatgg attgcacgca ggttctccgg ccgcttgggt ggagaggcta ttcggctatg 2040
actgggcaca acagacaatc ggctgctctg atgccgccgt gttccgctg tcagcgcagg 2100
ggcgcgccgt tctttttgtc aagaccgacc tgtccggtgc cctgaatgaa ctgcaggacg 2160
aggcagcgcg gctatcgtgg ctggccacga cgggcttcc ttgcccagct gtgctcagc 2220
ttgtcactga agcgggaagg gactggctgc tattgggcca agtgccgggg caggatctcc 2280
tgtcatctca ctttgcctct gccgagaaag tatccatcat ggctgatgca atgcccggc 2340
tgcatacgtc tgatccggct acctgcccac tcgaccacca agcgaacat cgcacagc 2400
gagcacgtac tcggatggaa gccggctctt tcgatcagga tgatctggac gaagagcatc 2460
aggggctcgc gccagccgaa ctggtcggca ggctcaaggc gcgcatgcc gacggcagg 2520
atctcgtcgt gacctatggc gatgcctgct tgccgaatat catggtggaa aatggccgct 2580
tttctggatt catcgaactg ggccggctgg gtgtggcgga ccgctatcag gacatagcgt 2640
tggctaccgg tgatattgct gaagagcttg gcggcgaatg ggctgaccgc ttctcgtg 2700
tttacgggat cgccgctccc gattcgcagc gcatcgctt ctatcgctt cttgacgagt 2760
tcttctgagc gggactctgg ggttcgaaat gaccgaccaa gcgacgccc acctgccatc 2820
accagatttc gatccaccg ccgccttcta tgaaagttg ggcttcgaa tcgtttccg 2880
ggacgcccgc tggatgacc tccagcgcg gcatctcatg ctggagttct tcgcccacgc 2940
tagcggcgcg ccggccggcc cgggtgtaaa taccgcacag atgcgtaagg agaaaatacc 3000
gcatcaggcg ctcttccgct tcctcgtcca ctgactcgt gcgctcggtc gttcggctgc 3060
ggcagcgggt atcagctcac tcaaaggcgg taatacgggt atccacagaa tcaggggata 3120
acgcaggaaa gaacatgtga gcaaaaaggc agcaaaaagg caggaaccgt aaaaaggccg 3180

```

```

cgttgctggc gtttttccat aggctccgcc cccctgacga gcatcacaaa aatcgacgct 3240
caagtcaagag gtggcgaaac ccgacaggac tataaagata ccaggcgttt ccccctggaa 3300
gctccctcgt gcgctctcct gttccgacce tgccgcttac cggatacctg tccgcctttc 3360
tcccttcggg aagcgtggcg ctttctcata gctcacgctg taggtatctc agttcgggtg 3420
aggtcgttcg ctccaagctg ggctgtgtgc acgaaccccc cgttcagccc gaccgctgcg 3480
ccttatccgg taactatcgt cttgagtcca acccggtgta acacgactta tcgccactgg 3540
cagcagccac tggtaacagg attagcagag cgaggatgt aggcggtgct acagagttct 3600
tgaagtggtg gcctaactac ggctacacta gaaggacagt atttggtatc tgcgctctgc 3660
tgaagccagt taccttcgga aaaagagttg gtagctcttg atccggcaaa caaaccaccg 3720
ctggtagcgg tggttttttt gtttgcaagc agcagattac gcgcagaaaa aaaggatctc 3780
aagaagatcc tttgatcttt tctacggggt ctgacgctca gtggaacgaa aactcacgtt 3840
aagggatttt ggtcatgaga ttatcaaaaa ggatcttcac ctagatcctt ttaaaggccg 3900
gccgcggccg ccatcggcat tttcttttgc gtttttattt gttactggtt aattgtcctt 3960
gttcaaggat gctgtctttg acaacagatg tttctttgcc tttgatgttc agcaggaagc 4020
tcggcgcaaa cgttgattgt ttgtctgcgt agaatcctct gtttgtcata tagcttghaa 4080
tcacgacatt gtttcctttc gcttgaggta cagcgaagtg tgagtaagta aaggttacat 4140
cgttaggatc aagatccatt ttaacacaa ggccagtttt gttcagcggc ttgtatgggc 4200
cagttaaaga attagaaaca taaccaagca tgtaaataatc gttagacgta atgccgtcaa 4260
tcgtcatttt tgatccgcgg gagtcagtga acaggtacca tttgccgttc attttaaaga 4320
cgttcgcgcg ttcaatttca tctgttactg tgttagatgc aatcagcggg ttcactactt 4380
ttttcagtggt gtaatcatcg tttagctcaa tcataccgag agcgcctgtt gctaactcag 4440
ccgtgcggtt tttatcgctt tgcagaagtt tttgactttc ttgacggaag aatgatgtgc 4500
ttttgccata gtatgctttg ttaaataaag attcttcgcc ttggtagcca tcttcagttc 4560
cagtgtttgc ttcaaatact aagtatttgt ggcctttatc ttctacgtag tgaggatctc 4620
tcagcgtatg gttgtcgctt gagctgtagt tgccttcacg gatgaactgc tgtacatttt 4680
gatacgtttt tccgtcaccg tcaaagattg atttataatc ctctacaccg ttgatgttca 4740
aagagctgtc tgatgctgat acgttaactt gtgcagttgt cagtgtttgt ttgccgtaat 4800
gtttaccgga gaaatcagtg tagaataaac ggatttttcc gtcagatgta aatgtggctg 4860
aacctgacca ttcttgtggt tggcttttta ggatagaatc atttgcatcg aatttgcgc 4920
tgtctttaa gacgcggcca gcgtttttcc agctgtcaat agaagtttcg ccgacttttt 4980
gatagaacat gtaaatcgat gtgtcatccg catttttagg atctccggct aatgcaaaga 5040
cgatgtggta gccgtgatag tttgcgacag tgccgtcagc gttttgtaat ggccagctgt 5100
cccaaacgtc caggcctttt gcagaagaga tatttttaat tgtggacgaa tcaaattcag 5160
aaacttgata tttttcattt ttttgctggt cagggatttg cagcatatca tggcgtgtaa 5220
tatgggaaat gccgtatggt tccttatatg gcttttgggt cgtttctttc gcaaacgctt 5280
gagttgcgcc tccctgccagc agtgcggtag taaaggttaa tactgttgc tgttttgcaa 5340
actttttgat gttcatcgtt catgtctcct tttttatgta ctgtgttagc ggtctgcttc 5400
ttccagccct cctgtttgaa gatggcaagt tagttacgca caataaaaaa agacctaaaa 5460
tatgtaaggg gtgacgcaa agtatacact ttgcccttta cacattttag gtcttgctg 5520
ctttatcagt aacaaacccg cgcgatttac ttttcgacct cattctatta gactctcggt 5580
tggattgcaa ctggtctatt ttctctttt gtttgataga aaatcataaa aggatttgca 5640
gactacgggc ctaaagaact aaaaaatcta tctgtttctt ttattctct gtatttttta 5700
tagtttctgt tgcattgggca taaagttgcc tttttaatca caattcagaa aatatcataa 5760
tatctcattt cactaaataa tagtgaacgg caggtatatg tgatgggtta aaaaggatcg 5820
gcggccgctc gatttaaact tcgagagcc tgacgtcggg 5860

```

<210> 11

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 11

tgcccgttac cctgcgaatg

20

<210> 12

<211> 20

<212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成的构建体  
  
 <400> 12  
 tgtatgtcct cctggacttc 20  
  
 <210> 13  
 <211> 40  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成的构建体  
  
 <400> 13  
 gaagtcagg aggacataca atgaacctaa agaaccccga 40  
  
 <210> 14  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成的构建体  
  
 <400> 14  
 atctactcgc acccaggatg ccctggattt c 31  
  
 <210> 15  
 <211> 31  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成的构建体  
  
 <400> 15  
 tatcaacgcg ttcttcatcg gtagcagcac c 31  
  
 <210> 16  
 <211> 37  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 合成的构建体  
  
 <400> 16  
 cattcgcagg gtaacggcca ctgaagggcc tcctggg 37  
  
 <210> 17  
 <211> 5928  
 <212> DNA  
 <213> 谷氨酸棒杆菌  
  
 <400> 17

tcgagaggcc	tgacgtcggg	cccggtagca	cgcggttctt	atcggtagca	gcacccgaga	60
ccatgacgcg	ggcatcgccc	agatccatca	cacgcagatc	acgcacatca	gattcctgtg	120
aggtgtaaat	tcccacgtcg	tggccatcaa	gatcataaga	ctcagaaaga	tcacgccagc	180
gagtatcata	accagccaca	gcatacctca	cggtttcacc	agtttgagtg	agctgaatat	240
agccctcatc	tgcggtgaca	tatccaacta	cagatgccgg	ggtgtcatcc	accatggtgc	300
gtcgagctga	atthgtggtc	cagccttcag	gagtttccgg	caacctagtt	gcatgatcag	360
tcattgcgcg	cgcttccatt	gacataaaag	tggaagcatc	aacttcaggt	acctgcccac	420
tttcagggga	tcctgtattg	aaagaacaca	ttcccgtgaa	tcccaccgct	accaacatga	480
tgatcgcgga	gactaccaac	gagataatca	tgtctcgact	gccatcaaaa	atthtcggtc	540
gtttctcagc	caccgcgcta	gtatgtcagc	agtttggtac	gaaaccccct	tttgggtgtc	600
cagaatccaa	aattccgggc	acaaaagtgc	aacaatagat	gacgtgcggg	ttgatacagc	660
ccaagcgccg	atacatttat	aatgcgcta	gatacgtgca	acccacgtaa	ccaggtcaga	720
tcaagtgcc	caggaggccc	ttcagtgccc	gttaccctgc	gaatgtccac	agggtagctg	780
gtagtttgaa	aatcaacgcc	gttgccctta	ggattcagta	actggcacat	tttgtaatgc	840
gctagatctg	tgtgctcagt	cttccaggct	gcttatcaca	gtgaaagcaa	aaccaattcg	900
tggctgcgaa	agtcgtagcc	accacgaagt	ccaggaggac	atacaatgaa	cctaagaac	960
cccgaacgc	cagaccgtaa	ccttgctatg	gagctggtgc	gagttacgga	agcagctgca	1020
ctggcttctg	gacgtttggg	tggacgtggc	atgaagaatg	aaggcgacgg	tgccgctgtt	1080
gacgccatgc	gccagctcat	caactcagtg	accatgaagg	gcgtcgttgt	tatcggcgag	1140
ggcgaaaaag	acgaagctcc	aatgctgtac	aacggcgaag	aggtcggaac	cggctttgga	1200
cctgaggttg	atatcgcagt	tgaccagtt	gacggcacca	ccctgatggc	tgagggtcgc	1260
cccaacgcaa	tttccattct	cgcagctgca	gagcgtggca	ccatgtacga	tccatctctc	1320
gtcttctaca	tgaagaagat	cgccgtggga	cctgaggccg	caggcaagat	cgacatcgaa	1380
gctccagttg	cccacaacat	caacgcggtg	gcaaagtcca	aggaatcaa	cccttccgac	1440
gtcacccgtg	tcgtgcttga	ccgtcctcgc	cacatcgaac	tgatcgcaga	cattcgtcgt	1500
gcaggcgcaa	aggttcgtct	catctccgac	ggcgacgttg	caggtgcagt	tgcagcagct	1560
caggattcca	actccgtgga	catcatgatg	ggcaccggcg	gaaccccaga	aggcatcatc	1620
actgcgtgcg	ccatgaagtg	catgggtggc	gaaatccagg	gcatcctggg	tcgacatcga	1680
tgctcttctg	cgtaatttaa	caattgggat	cctctagacc	cgggatttaa	atcgctagcg	1740
ggctgctaaa	ggaagcggaa	cacgtagaaa	gccagtccgc	agaaacggtg	ctgaccccgg	1800
atgaatgtca	gctactgggc	tatctggaca	agggaaaacg	caagcgcaa	gagaaagcag	1860
gtagcttgca	gtgggcttac	atggcgatag	ctagactggg	cggttttatg	gacagcaagc	1920
gaaccggaat	tgccagctgg	ggcgccctct	ggtaagggtg	ggaagccctg	caaagtaaac	1980
tggatggctt	tcttgccgcc	aaggatctga	tggcgcaggg	gatcaagatc	tgatcaagag	2040
acaggatgag	gatcgtttct	catgattgaa	caagatggat	tgacgcaggg	ttctccggcc	2100
gcttgggtgg	agaggctatt	cggctatgac	tgggcacaa	agacaatcgg	ctgctctgat	2160
gccgccgtgt	tccggctgtc	agcgcagggg	cgcccggttc	tttttgtcaa	gaccgacctg	2220
tccggtgccc	tgaatgaact	gcaggacgag	gcagcgcggc	tatcgtggct	ggccacgacg	2280
tcgggttctt	gcgcagctgt	gctcgcagtt	gtcactgaa	cgggaaggga	ctggctgcta	2340
ttgggcgaag	tgccggggca	ggatctcctg	tcactcacc	ttgctcctgc	cgagaaagta	2400
tccatcatgg	ctgatgcaat	cgcgcgctg	catacgtctg	atccggctac	ctgcccattc	2460
gaccaccaag	cgaaacatcg	catcgagcga	gcacgtactc	ggatggaagc	cggctctgtc	2520
gatcaggatg	atctggacga	agagcatcag	gggctcgcgc	cagccgaact	gttcgccagg	2580
ctcaaggcgc	gcatgcccga	cggcgaggat	ctcgtcgtga	cccatggcga	tgcttctgtg	2640
ccgaatatca	tgggtgaaaa	tggccgcttt	tctggattca	tcgactgtgg	ccggctgggt	2700
gtggcggacc	gctatcagga	catagcgttg	gctacccgtg	atattgctga	agagcttggc	2760
ggcgaatggg	ctgaccgctt	cctcgtgctt	tacggtatcg	ccgtcccga	ttcgcagcgc	2820
atcgccttct	atcgccttct	tgacgagttc	ttctgagcgg	gactctgggg	ttcgaatga	2880
ccgaccaagc	gacgcccac	ctgccatcac	gagatttca	ttccaccgcc	gccttctatg	2940
aaaggttggg	cttcggaatc	gttttccggg	acgcccgtg	gatgatcctc	cagcgcgggg	3000
atctcatgct	ggagttcttc	gcccacgcta	gcggcgcgcc	ggccggcccg	gtgtgaaata	3060
ccgcacagat	gogtaaggag	aaaataccgc	atcaggcgct	cttccgcttc	ctcgtcact	3120
gactcgtctg	gctcggctgt	tccgctgcgg	cgagcgggat	cagctcactc	aaaggcggta	3180
atcaggttat	ccacagaatc	aggggataac	gcaggaaaga	acatgtgagc	aaaaggccag	3240
caaaaggcca	ggaaccgtaa	aaaggccgct	ttgctggcgt	ttttccatag	gctccgcccc	3300
cctgacgagc	atcacaaaa	tcgacgctca	agtcagaggt	ggcgaaccc	gacagactca	3360
taaagatacc	aggctttcc	ccctggaagc	tcctcctgct	gctctcctgt	ttccgacctg	3420
ccgcttaccg	gatacctgtc	cgcttctctc	ccttcgggaa	gcgtggcgct	ttctcatagc	3480
tcacgctgta	ggatctctcag	ttcgggtgag	gtcgttcgct	ccaagctggg	ctgtgtgcac	3540
gaaccccccg	ttcagcccga	ccgctgcgcc	ttatccggta	actatcgtct	tgagtccaac	3600
ccggtaagac	acgacttatc	gccactggca	gcagccactg	gtaacaggat	tagcagagcg	3660

```

aggatgtag gcggtgctac agagtcttg aagtgggag ctaactacgg ctacactaga 3720
aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcgaaa aagagttggt 3780
agctcttgat ccggcaaaaca aaccaccgct ggtagcggtg gttttttgt ttgcaagcag 3840
cagattacgc gcagaaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc tacggggctt 3900
gacgctcagt ggaacgaaaaa ctacagttaa gggattttg tcatgagatt atcaaaaagg 3960
atcttcacct agatcctttt aaaggccggc cgcggccgcc atcggcattt tcttttgctg 4020
ttttatgtg taactgttaa ttgtccttgt tcaaggatgc tgtctttgac aacagatggt 4080
ttcttgctt tgatgttcag caggaagctc ggcgcaaacy ttgattgttt gtctgctgag 4140
aatcctctgt ttgtcatata gcttgtaatc acgacattgt ttcctttcgc ttgaggtaca 4200
gogaagtgtg agtaagtaaa ggttacatcg ttaggatcaa gatccatttt taacaagaag 4260
ccagttttgt tcagcggctt gtatgggcca gttaaagaat tagaaacata accaagcatg 4320
taaatatcgt tagacgtaat gccgtcaatc gtcatttttg atccgcggga gtcagtgaac 4380
aggataccatt tgccgttcat tttaaagacg ttcgcgcggt caatttcac tgttactgtg 4440
ttagatgcaa tcagcgggtt catcactttt ttcagtgtgt aatcatcgtt tagctcaatc 4500
ataccgagag cgccgtttgc taactcagcc gtgcgttttt tatcgctttg cagaagtttt 4560
tgactttctt gacggaagaa tgatgtgctt ttgccatagt atgctttgtt aaataaagat 4620
tcttcgctt ggtagccatc ttcagttcca gtgtttgctt caaataactaa gtatttgtgg 4680
cctttatctt ctacgtagtg aggatctctc agcgtatggt tgtcgcctga gctgtagttg 4740
ccttcacoga tgaactgctg tacattttga tacgtttttc cgtcaccgctc aaagattgat 4800
ttataatcct ctacaccgtt gatgttcaaa gagctgtctg atgctgatac gtttaacttgt 4860
gcagttgtca gtgtttggtt gccgtaatgt ttaccggaga aatcagtgtg gaataaacgg 4920
atctttcogt cagatgtaaa tgtggctgaa cctgaccatt cttgtgtttg gtcttttagg 4980
atagaatcat ttgcatcgaa tttgtcgtg tctttaaaga cgcggccagc gtttttccag 5040
ctgtcaatag aagtttcgcc gactttttga tagaacatgt aaatcgatgt gtcacccgca 5100
tttttaggat ctccggctaa tgcaaagacg atgtggtagc cgtgatagtt tgcgacagtg 5160
ccgtcagcgt ttgtaatgg ccagctgtcc caaacgtcca ggccttttgc agaagagata 5220
tttttaattg tggacgaatc aaattcagaa acttgatatt tttcattttt ttgctgttca 5280
gggatttgca gcataatcatg gcgtgtaata tgggaaatgc cgtatgtttc cttatatggc 5340
ttttggttgc tttctttcgc aaacgcttga gttgcgctc ctgccagcag tgcggtagta 5400
aaggtttaata ctgttgcttg ttttgcaaac tttttgatgt tcatcgttca tgtctccttt 5460
tttatgtact gtgttagcgg tctgcttctt ccagccctcc tgtttgaaga tggcaagtta 5520
gttacgcaca ataaaaaaag acctaaaata tgtaaggggt gacgcaaag tatacacttt 5580
gccctttaca catttttaggt cttgcctgct ttatcagtaa caaacccgcg cgatttactt 5640
ttcgacctca ttctattaga ctctcgtttg gattgcaact ggtctatttt cctcttttgt 5700
ttgatagaaa atcataaaag gatttgcaga ctacggcct aaagaactaa aaaatctatc 5760
tgtttctttt cattctctgt attttttata gtttctgttg catgggcata aagttgctt 5820
tttaatcaca attcagaaaa tatcataata tctcatttca ctaaataata gtgaacggca 5880
ggtatatgtg atgggttaaa aaggatcggc ggccgctcga tttaaatc 5928

```

<210> 18

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 18

tagctgcaaa ttattccggg

20

<210> 19

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的构建体

<400> 19 gggtaaaaaa tcctttcgta	20
<210> 20 <211> 37 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的构建体	
<400> 20 cccgaataa ttggcagcta ctgaagggcc tcctggg	37
<210> 21 <211> 31 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的构建体	
<400> 21 tatcaacgcg ttcttcatcg gtagcagcac c	31
<210> 22 <211> 40 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的构建体	
<400> 22 tacgaaagga ttttttacc c atgaacctaa agaaccccga	40
<210> 23 <211> 31 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的构建体	
<400> 23 atctacgtcg acccaggatg ccctggattt c	31
<210> 24 <211> 5920 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 合成的构建体	
<400> 24 cgcgttcttc atcggtagca gcacccgaga ccatgacgcg ggcacgccc agatccatca 60 cacgcagatc acgcacatca gattcctgtg aggtgtaa at tcccacgtcg tggccatcaa 120 gatcataaga ctcagaaaga tcacgccagc gagtatcata accagccaca gcacccctcaa 180 cggtttcacc agtttgagtg agctgaatat agccctcatc tgcggtgaca tatccaacta 240	

cagatgccgg	ggtgtcatcc	accatggtgc	gtcagactga	attdtgggtc	cagccttcag	300
gagtttccgg	caacctagtt	gcatgatcag	tcattgvcgg	cgcttccatt	gacataaaaag	360
tggaagcatc	aacttcagggt	acctgcccac	tttcaggvga	tcctgtattg	aaagaacaca	420
ttcccgtgaa	teccaccgct	accaacatga	tgatcvcgga	gactaccaac	gagataatca	480
tgtctcgact	gccatcaaaa	attdtvcggtc	gttdtvcagc	caccvcgcta	gtatgtcacg	540
agtttggtag	gaaacccctt	tttgggtgtc	cagaatccaa	aattccgggc	acaaaagtgc	600
aacaatagat	gacgtvcggg	ttgatacagc	ccaagvcgcc	atacatttat	aatvcgvccta	660
gatacgtgca	accacgtaa	ccaggtcaga	tcaagtgvcc	caggaggccc	ttcagtagct	720
gccaattatt	ccgggcttgt	gaccvcgctac	ccgataaata	ggtvcggtga	aaaatttvcgt	780
tgcaatatca	acaaaaaggc	ctatcattgg	gaggtgtvcg	accaagtact	tttvcgaaagc	840
gccatctgac	ggattdtcaa	aagatgtata	tgctvcggtgc	ggaaacctac	gaaaggattt	900
tttaccatg	aacctaaaga	acccvgaaac	gccagaccgt	aaccttgcta	tggagctvgt	960
gvcgattacg	gaagvcagctg	cactvggcttc	tggacgttgg	gttggacgtg	gcatgaagaa	1020
tgaaggvcgac	ggtgvccgctg	ttgacgvccat	gvcgacgctc	atcaactcag	tgaccatgaa	1080
gggvcgtvcgtt	gttatvcggcg	agggvcgaaaa	agacvgaagct	ccaatvcgtgt	acaacvggvcga	1140
agaggtvcgga	accvgcttvtg	gacctgaggt	tgatatvcgca	gttgvacccag	ttgacvggvcac	1200
caccctgatg	gctgagvggtc	gccccaacvcg	aattdtccatt	ctvcgvcagctg	cagagvcgtvg	1260
caccatgtac	gatccatcct	ccgtcttcta	catvgaagaag	atvcgvcgtvg	gacctgagggc	1320
vcgagvgaag	atvcgacatcg	agctccaggt	tgccccacaa	atcaacvcgvcg	tggcaaaagtc	1380
caaggvgaatc	aaccttccg	acgtcacccgt	tgctvcgtcct	gacctvcctc	gcccacatcga	1440
actgatvcgca	gacattvcgtc	gtvcagvgcgc	aaagvtcctg	ctcatctccg	acvggvcagct	1500
tvcaggtgca	gttvcagvcag	ctcagvgattc	caactccgtg	gacatcatga	tgggvcaccvg	1560
vcggaacccca	gaagvcatca	tcactvcggtg	vcgcatvgaag	tgcatvggtg	vcgaaatcca	1620
gggcatcctg	ggtvcgacatc	gatgctcttc	tvcgvttaatt	aacaattvggg	atcctctaga	1680
cccvggattt	aaatvcgctag	vcggctgcta	aagvgaagvcg	aacacvtaga	aagccagvtcc	1740
vcgaaacvcg	tvcgtgacccc	ggatvgaatgt	cagctactvg	gctatctvga	caagvggaaaa	1800
vcgaaagvcgca	aagagaaagc	aggtagcttvg	cagvtvggctt	acatvgvcgat	agctagactg	1860
ggvcgvtttta	tggacagcaa	vcgaaacvcgga	atvgccagct	gggvcgvcct	ctvggtaaggt	1920
tggvgaagccc	tgcaaagtaa	actvggatvgc	tttcttvgccg	ccaagvatct	gatvgvcgvcag	1980
gggatcaaga	tctgatcaag	agacagvgatg	agvatvcgttt	vcgcatvatg	aacaagvatg	2040
atvgcacvcgca	ggttctccvg	ccgcttvgggt	ggagagvgcta	ttvcggtatg	actvggvcaca	2100
acagacaatc	ggctgctctg	atvgccvcgct	gttccvgctg	tcagvcgvcagg	ggvcgcccvggt	2160
tctttttgtc	aagaccvgacc	tgtccvggtgc	cctvgaatvga	ctvcagvgagc	agvgcagvcgvc	2220
gctatvcgtvg	ctvggvcacvga	vcggvcgvtcc	ttvcgvcagct	gtgctvcgacg	ttgtcactvga	2280
agvcgvgaaag	gactvggtvcg	tattvggvcga	agvtgcccvgg	cagvatctcc	tgtcatctca	2340
ccttgcctcct	vcgvcgaaag	tatccatcat	ggctvatvcga	atvgcvgvcgvc	tgcatacvctg	2400
tgatccvggct	acctvgcccac	tcgaccacca	agvcgaaacat	vcgcatvcgagc	gagcacvtac	2460
tcvgatvggaa	gvcggtcttvg	tcgatvcagvga	tgatctvggac	gaagagvcatc	agvggvcctvcg	2520
gccagvcgcaa	ctgttvcgcca	ggctcaagvc	vcgvcatvgccc	gacvggvcgag	atctvcgtvcgt	2580
gacctatvgc	gatvgcctgct	tvcgccaatat	catvggtvggaa	aatvggvcgct	tttctvggatt	2640
catvcgactgt	ggvcgvcctvg	gtgtvggvcgga	ccgctatvcag	gacatagvcgt	tvggctacccg	2700
tgatattvgct	gaagagvcctg	vcgvcggaatg	ggctgacvcg	ttcctvcgtgc	tttacvggtat	2760
vcgvcgctccc	gattvcgvcagc	gcatvcgctt	ctatvcgctt	cttgcagag	tcttctvgagc	2820
gggactctvg	ggttvcgaaat	gaccvcgacaa	vcgvcagvccca	acctvgccatc	acgagattdc	2880
gattccaccg	ccvcgcttcta	tgaaagvtg	ggcttvcgga	tcgtdtccg	ggacvcgccc	2940
tggatvatcc	tcagvcgvcg	ggatctcatg	ctvggagvtct	tcgcccacvcg	tagvcgvcgvcg	3000
ccvggvcgvc	vcggtgtgaaa	taccvcgacag	atvcgvtaaag	agaaaatacc	gcatcagvgc	3060
ctcttccgct	tctvcgctca	ctgactvcgct	vcgctvcggtc	gttvcggtvcg	ggvcgagvcggt	3120
atcagctcac	tcaaagvcgvc	taatavcggtt	atccacagaa	tcagvggata	acvcgagvaa	3180
gaacatvtgga	gcaaaaagvc	agcaaaaagvc	cagvgaaccgt	aaaaagvcgvc	vcgtdtvcgtvg	3240
gttdtccat	aggtccgvc	cccctgacvga	gcatcacaaa	aatvcgvcgct	caagtcagag	3300
gtvgcgaaac	vcgacagvc	tataaaagata	ccagvcgtdt	cccctvggaa	gctccctvcgt	3360
vcgctctcct	gttccgacc	tgcvcgcttac	vcgatacctg	tcgvcctttc	tccctvcgvcg	3420
aagvcgtvgvc	cttdtvcata	gctvcagvcgtg	tagvtatctc	agtdvcggtg	aggtvcgttvcg	3480
ctccaagvcg	ggtvcgtgtgc	acvgaaccccc	vcgtdcagccc	gacvcgctvcg	ccttatccvg	3540
taactatvcgt	cttgcagvtca	acctvggtaag	acacgactta	tcgcccactvg	cagvcagvcac	3600
tggtaacagvc	attagvcagag	vcgagvtatgt	agvgcgtgtct	acagagvtct	tgaagvtvggtg	3660
gcctaactac	ggctacacta	gaagvcagvt	attdtvggtatc	tcgvcctctvcg	tgaagvcagvt	3720
taccttvcgga	aaaagagvtg	gtagctcttvg	atccvgcaaaa	caaaccaccg	ctvggtagvcg	3780
tvgtdttdttd	gttdtvcagagc	agvcagattac	vcgvcagaaaa	aaagvatctc	aagaagvatcc	3840
tttgcattt	tctacvgggt	ctgacvcgctca	gtvggaacvga	aactcagvt	aagvggatttd	3900

ggatcatgaga	ttatcaaaaa	ggatcttcac	ctagatcctt	ttaaaggccg	gccgogggccg	3960
ccatcggcatt	tttcttttgc	gtttttatct	gttaactggt	aattgtcctt	gttcaaggat	4020
gctgtctttg	acaacagatg	ttttcttgcc	tttgatgttc	agcaggaagc	tcggcgcaaa	4080
cgttgattgt	ttgtctgctg	agaatcctct	gtttgtcata	tagcttgtaa	tcacgacatt	4140
gtttcctttc	gcttgaggta	cagcgaagtg	tgagtaagta	aaggttacat	cgttaggatc	4200
aagatccatt	tttaacacaa	ggccagtttt	gttcagcggc	ttgtatgggc	cagttaaaga	4260
attagaaaca	taaccaagca	tgtaaatact	gttagacgta	atgccgtcaa	tcgtcatttt	4320
tgatccgcgg	gagtcagtg	acaggtacca	tttgccgttc	attttaaga	cgttcgcgcg	4380
ttcaatttca	tctgttactg	tgtagatgc	aatcagcggg	ttcatcactt	ttttcagtg	4440
gtaatcatcg	tttagctcaa	tcataccgag	agcgcggtt	gctaactcag	ccgtgcggtt	4500
tttatcgctt	tgcagaagtt	tttgactttc	ttgacggaag	aatgatgtgc	ttttgccata	4560
gtatgctttg	ttaaataaag	attcttcgcc	ttggtagcca	tcttcagttc	cagtgtttgc	4620
ttcaataact	aagtatttgt	ggcctttatc	ttctacgtag	tgaggatctc	tcagcgtatg	4680
gttgctgcct	gagctgtagt	tgcttctatc	gatgaactgc	tgtacatttt	gatacgtttt	4740
tccgtcaccg	tcaaagattg	atttataatc	ctctacaccg	ttgatgttca	aagagctgtc	4800
tgatgctgat	acgttaactt	gtgcagttgt	cagtgtttgt	ttgccgtaat	gtttaccgga	4860
gaaatcagtg	tagaataaac	ggatttttcc	gtcagatgta	aatgtggctg	aacctgacca	4920
ttcttgtgtt	tggcttttta	ggatagaatc	atttgcatcg	aatgtgtcgc	tgtctttaaa	4980
gacgcggcca	gcgtttttcc	agctgtcaat	agaagtttcg	ccgacttttt	gatagaacat	5040
gtaaactgat	gtgtcatccg	catttttagg	atctccggct	aatgcaaaga	cgatgtggta	5100
gccgtgatag	tttgcgacag	tgccgtcagc	gttttgtaat	ggccagctgt	cccaaaccgtc	5160
caggcctttt	gcagaagaga	tatttttaat	tgtggacgaa	tcaaattcag	aaacttgata	5220
tttttcattt	ttttgctgtt	cagggatttg	cagcatatca	tggcgtgtaa	tatgggaaat	5280
gccgtatggt	tccttatatg	gcttttggtt	cgtttctttc	gcaaaccgctt	gagttgcgcc	5340
tcctgccagc	agtgcggtag	taaaggttaa	tactgttgct	tgttttgcaa	actttttgat	5400
gttcatcggt	catgtctcct	tttttatgta	ctgtgttagc	ggtctgcttc	ttcagccct	5460
cctgtttgaa	gatggcaagt	tagttacgca	caataaaaaa	agacctaaaa	tatgtaaggg	5520
gtgacgcaa	agtatacact	ttgcccttta	cacattttag	gtcttgctcg	ctttatcagt	5580
aacaaaccgg	cgcgatttac	ttttcgacct	cattctatta	gactctcggt	tggattgcaa	5640
ctggtctatt	ttcctctttt	gtttgataga	aatcataaa	aggatttgca	gactacgggc	5700
ctaaagaact	aaaaaatcta	tctgtttctt	ttcattctct	gtatttttta	tagttttctgt	5760
tgcatgggca	taaagttgcc	tttttaatca	caattcagaa	aatatcataa	tatctcattt	5820
cactaaataa	tagtgaacgg	caggatatatg	tgatgggtta	aaaaggatcg	gcggccgctc	5880
gattttaaate	tcgagagggc	tgacgtcggg	cccggtagca			5920

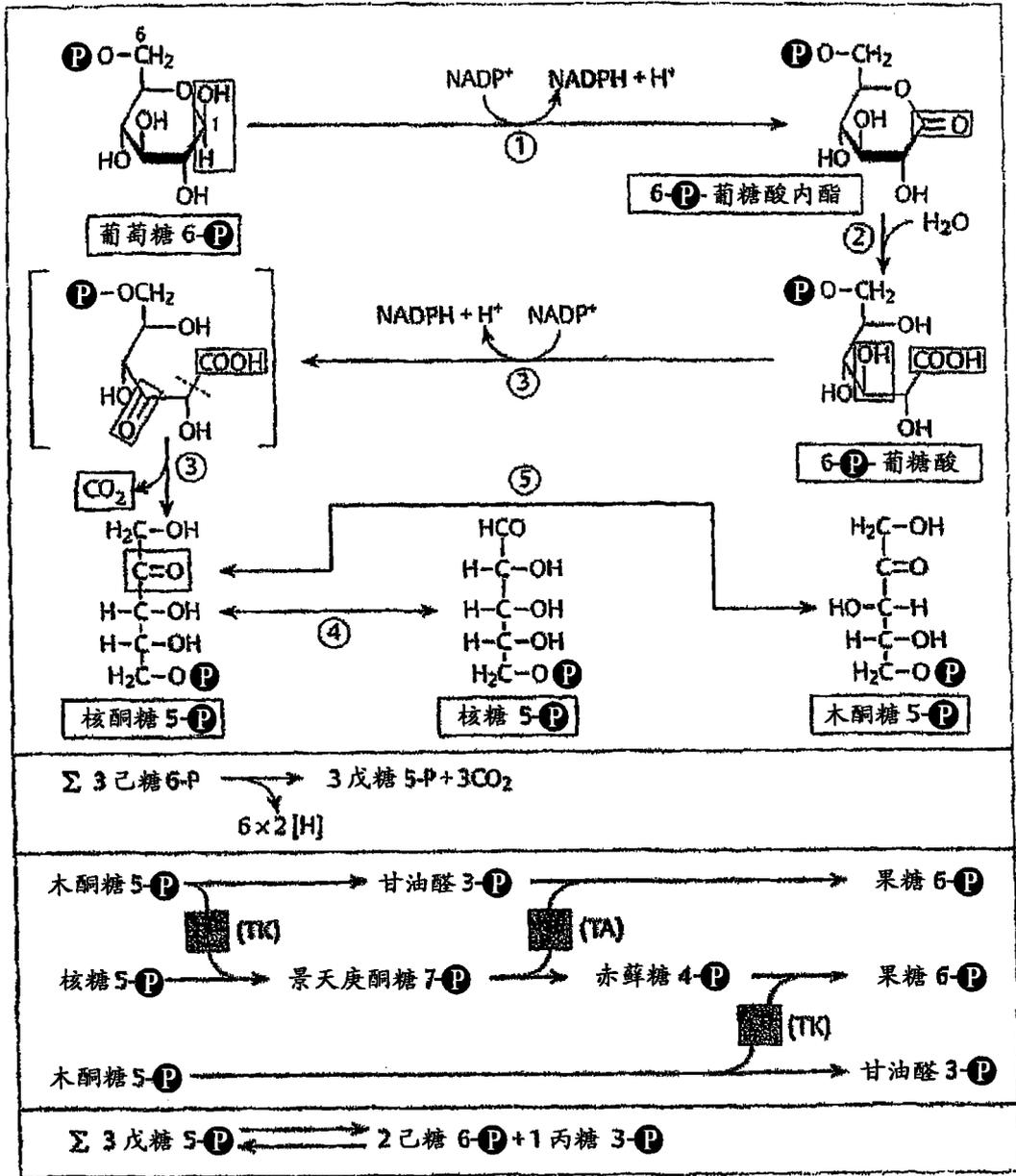


图 1

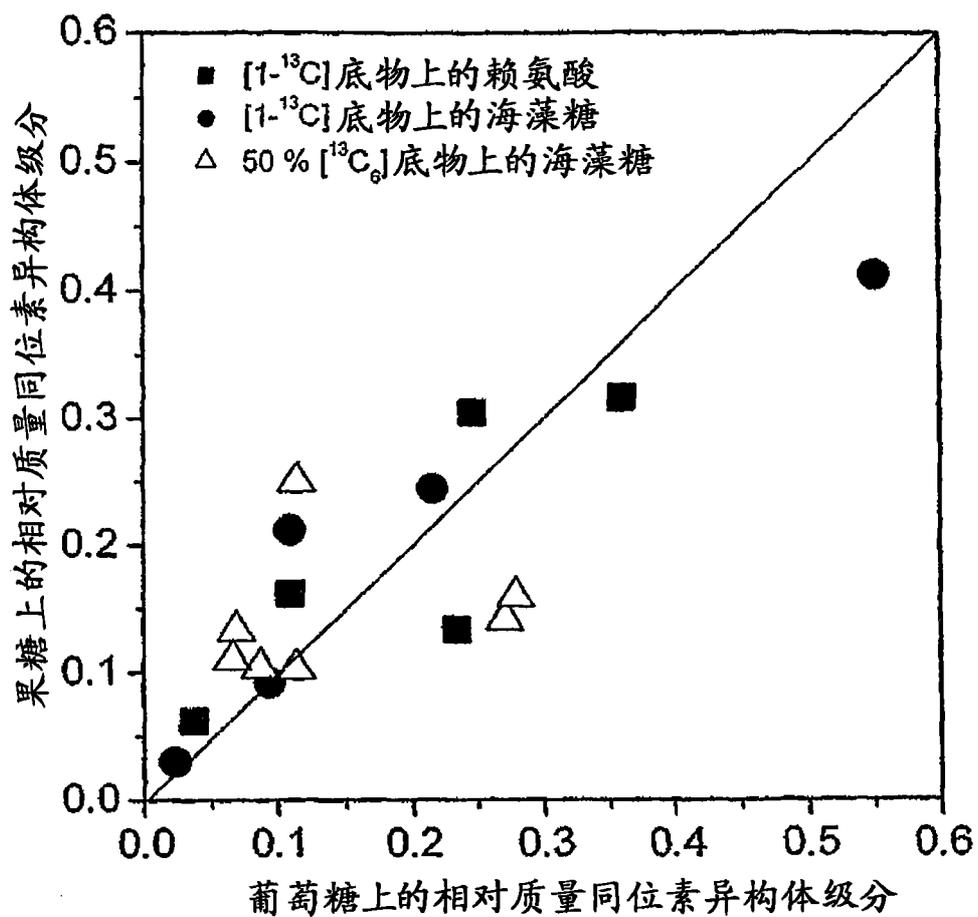


图 2

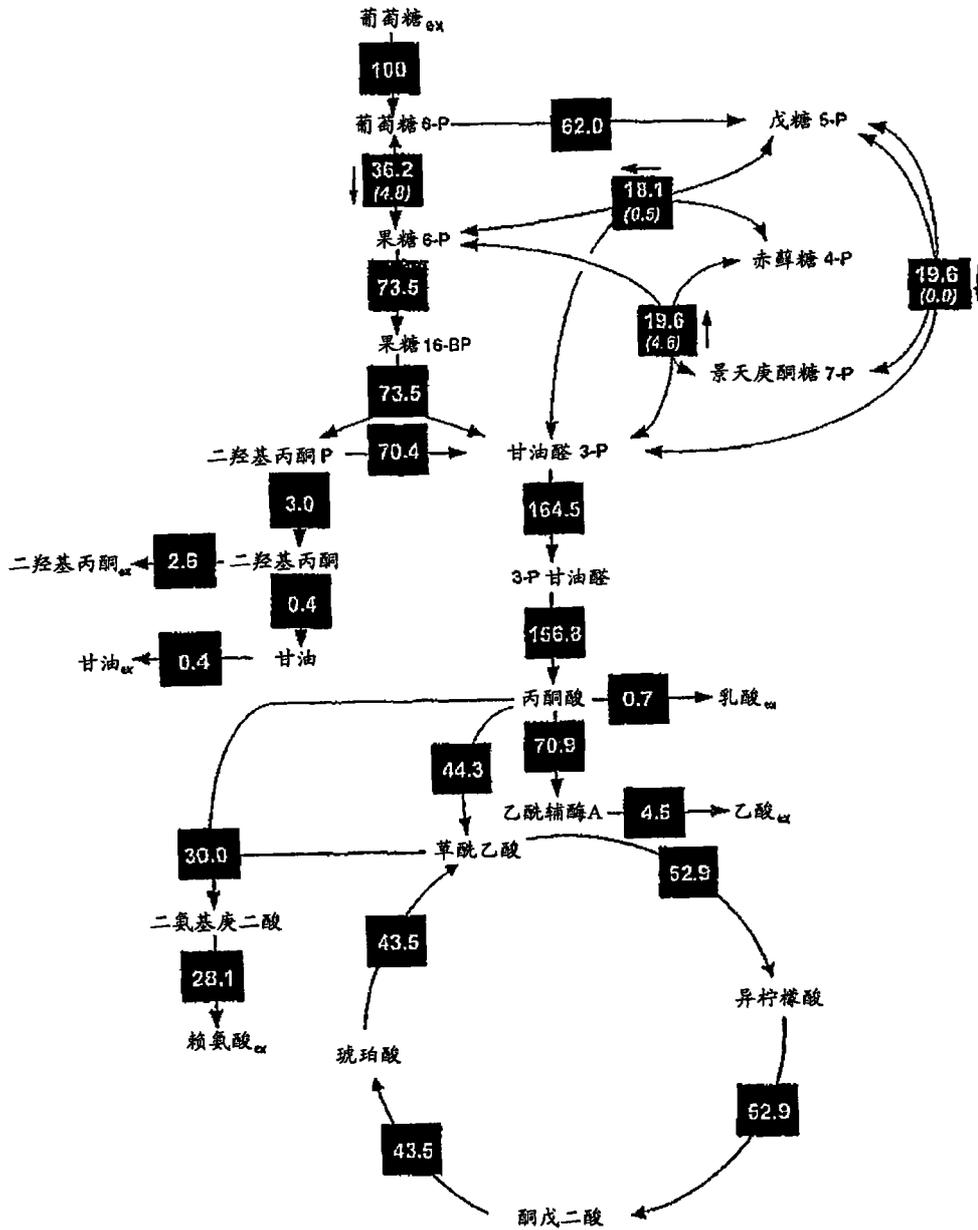


图 3

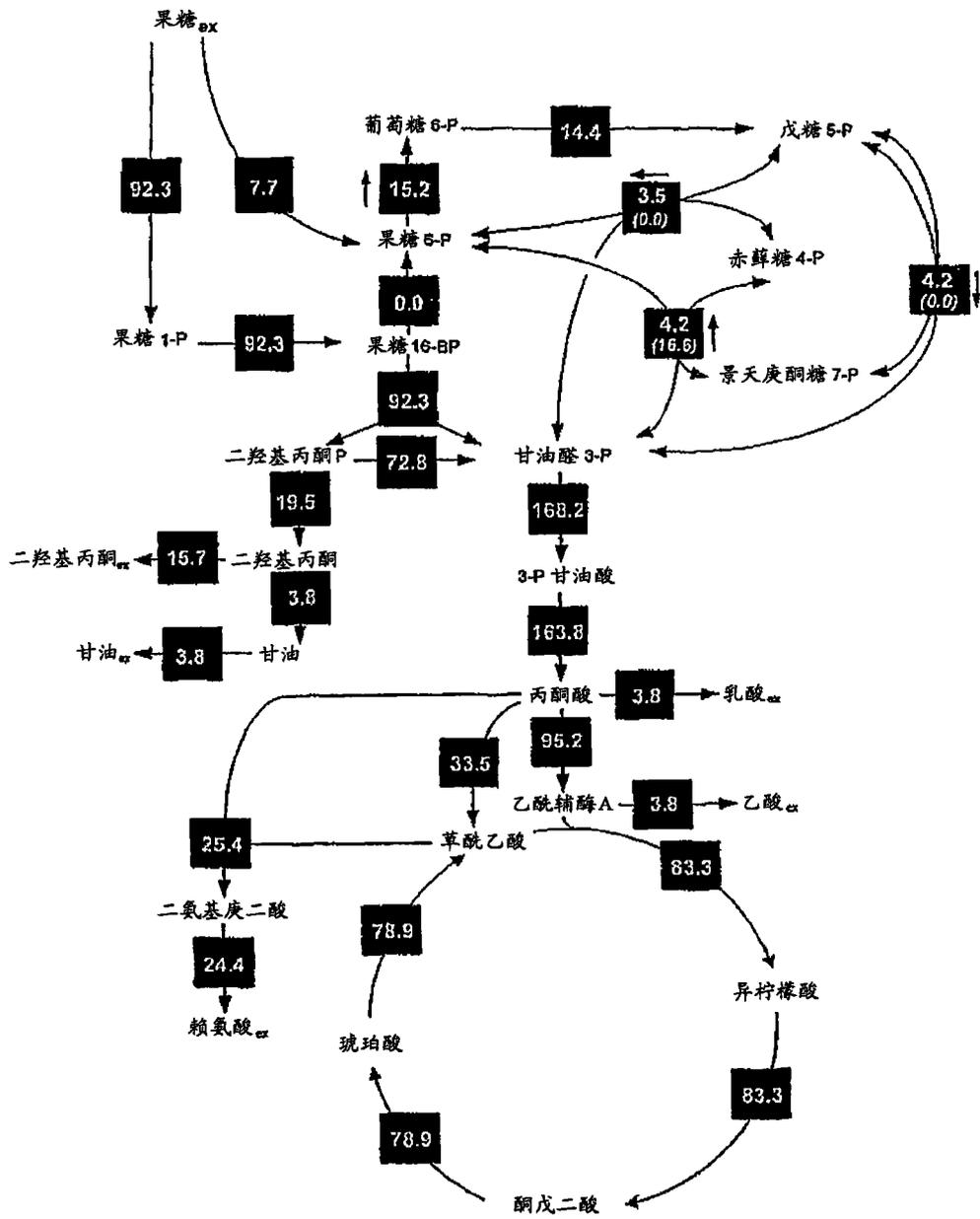


图 4

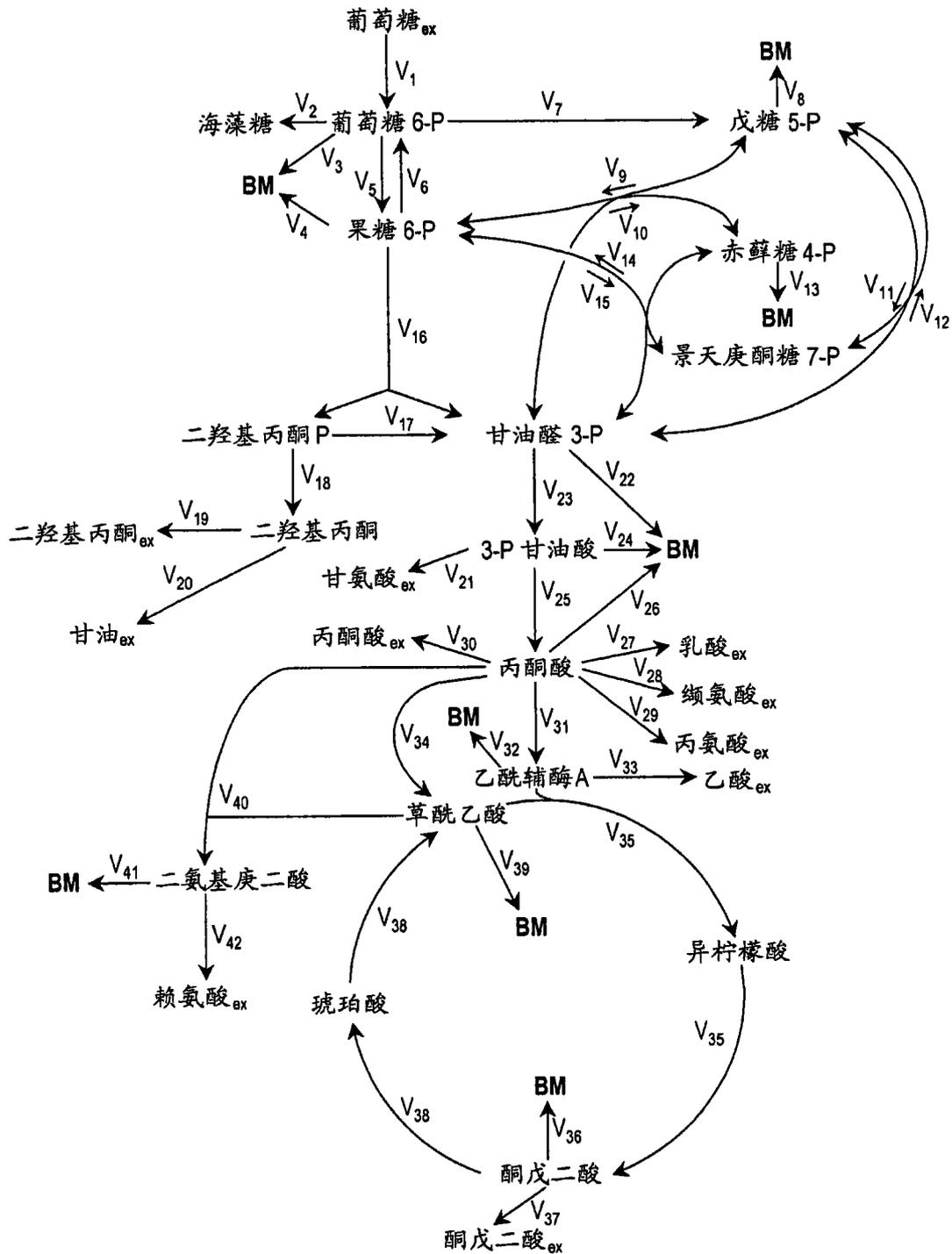


图 5 A

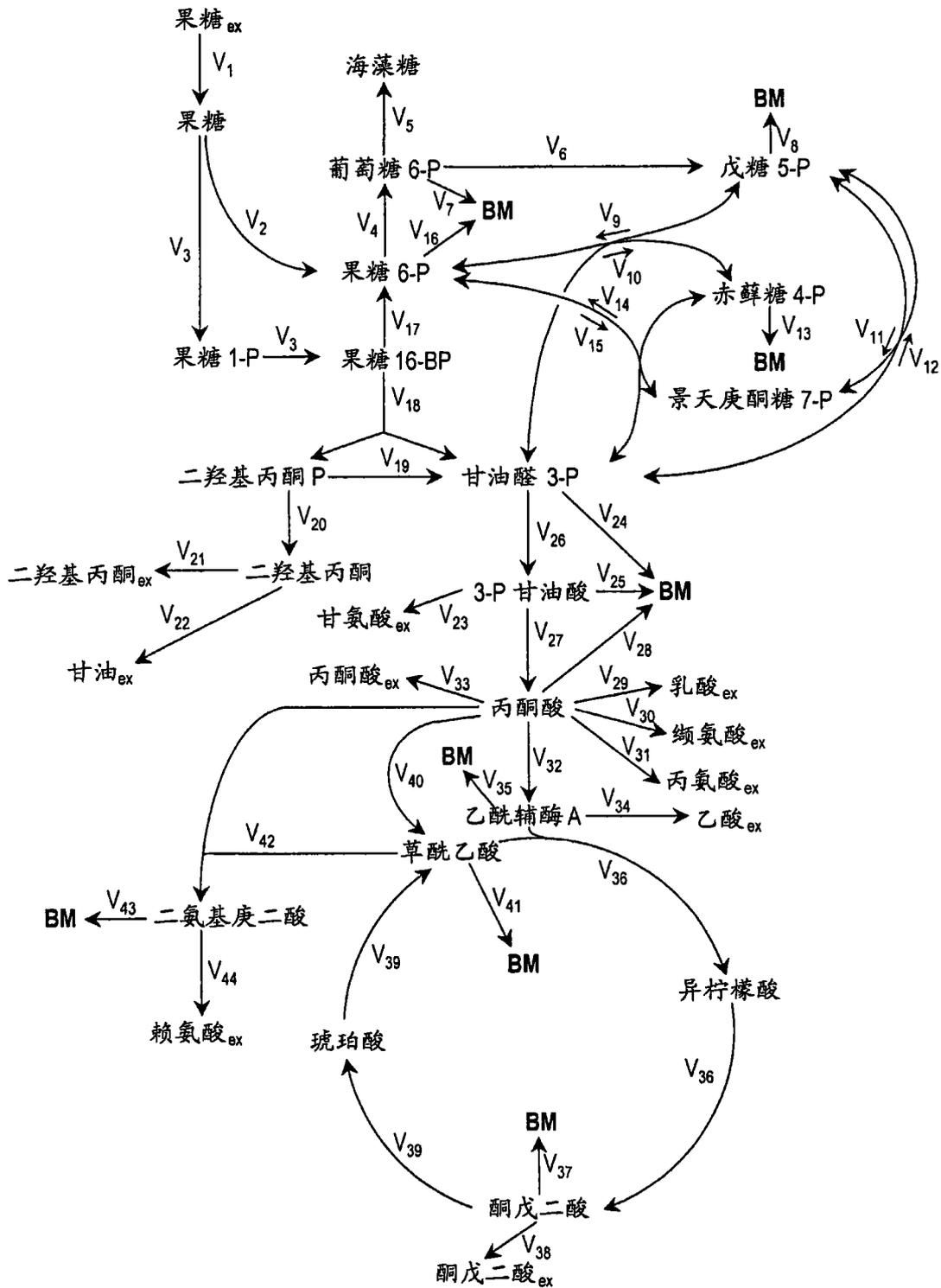


图 5 B