



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1989239 B

(45) 授权公告日 2013. 07. 10

(21) 申请号 200580024789. 3

C12N 15/54 (2006. 01)

(22) 申请日 2005. 05. 20

C12N 15/55 (2006. 01)

C12R 1/15 (2006. 01)

(30) 优先权数据

150672/2004 2004. 05. 20 JP

(56) 对比文件

JP 2001-161386 A, 2001. 06. 19, 权利要求 8 及说明书第 [0020], [0038], [0053]-[0056] 段.

JP 11-113588 A, 1999. 04. 27, 权利要求 1 和说明书第 [0011] 段.

(85) PCT 申请进入国家阶段日

2007. 01. 22

JP 07-304839 A, 1995. 11. 21, 全文.

WO 9906532 A, 1999. 02. 11, 全文.

(86) PCT 申请的申请数据

PCT/JP2005/009233 2005. 05. 20

(87) PCT 申请的公布数据

W02005/113745 JA 2005. 12. 01

审查员 于娜

(73) 专利权人 味之素株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 福井启太 中村纯 秋山嘉代

兎岛宏之

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴 巫肖南

(51) Int. Cl.

C12N 1/15 (2006. 01)

C12N 1/21 (2006. 01)

C12P 7/46 (2006. 01)

C12N 15/53 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书24页

序列表36页 附图7页

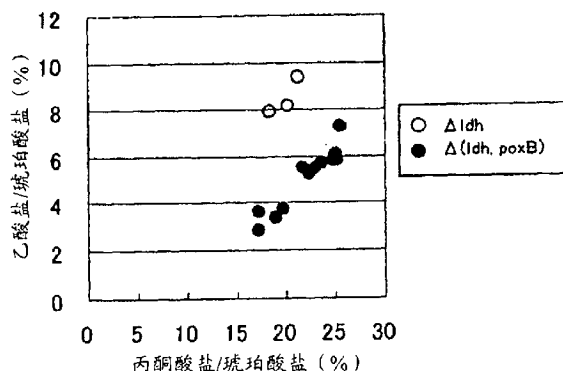
(54) 发明名称

生产琥珀酸的细菌和生产琥珀酸的方法

(57) 摘要

本发明涉及通过使用棒状细菌来生产琥珀酸,所述棒状细菌具有生产琥珀酸的能力,并经过修饰以使丙酮酸氧化酶的活性降低。

副产物 (丙酮酸盐和琥珀酸盐)



1. 具有生产琥珀酸的能力的棒状细菌,其中所述细菌已被修饰以使染色体上的丙酮酸氧化酶基因缺失;并且使乳酸脱氢酶的活性通过破坏染色体上的乳酸脱氢酶基因来完全消除。

2. 根据权利要求 1 的棒状细菌,其中丙酮酸氧化酶是如下面的 (A) 或 (B) 中所述的蛋白质:

(A) 具有 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列的蛋白质;或

(B) 在 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列中包含一个或几个氨基酸的取代、缺失、插入或添加,并具有丙酮酸氧化酶活性的蛋白质。

3. 根据权利要求 1 的棒状细菌,其中所述棒状细菌是谷氨酸棒杆菌或乳发酵短杆菌。

4. 根据权利要求 3 的棒状细菌,其中所述丙酮酸氧化酶基因是如下面的 (a) 或 (b) 中所述的 DNA:

(a) 包含 SEQ ID NO:48 中核苷酸编号 996-2732 的核苷酸序列的 DNA;或

(b) 在严格条件下与 SEQ ID NO:48 中核苷酸编号 996-2732 的核苷酸序列杂交或与由所述核苷酸序列制备的探针杂交、并且编码具有丙酮酸氧化酶活性的蛋白的 DNA。

5. 根据权利要求 1 的棒状细菌,其已被进一步修饰以使磷酸转乙酰酶、乙酸激酶和乙酰辅酶 A 水解酶中一种或多种的活性通过破坏染色体上编码磷酸转乙酰酶、乙酸激酶和乙酰辅酶 A 水解酶的基因中的一个或多个,通过将突变导入所述一个或多个基因,或通过修饰所述一个或多个基因的表达调控序列来降低。

6. 生产琥珀酸的方法,其包括:

使根据权利要求 1-5 中任一项的棒状细菌或其处理产物在厌氧条件下对含有碳酸根离子、碳酸氢根离子或二氧化碳的反应液体中的有机原料起作用以在反应液体中生产并积累琥珀酸;和

从所述反应液体中收集琥珀酸。

7. 生产含有琥珀酸的聚合物的方法,其包括通过权利要求 6 的方法生产琥珀酸和使所得到的琥珀酸聚合的步骤。

生产琥珀酸的细菌和生产琥珀酸的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及发酵工业,并涉及使用棒状细菌通过发酵方法有效生产琥珀酸的方法。

背景技术

[0002] 为了通过发酵生产含有琥珀酸的非氨基有机酸(non-amino organic acid),通常使用厌氧细菌,如那些属于厌氧螺菌属(*Anaerobiospirillum*)或放线杆菌属(*Actinobacillus*)的细菌(专利文献1或2,和非专利文献1)。厌氧细菌的使用使产物的收率提高,但所述细菌需要许多营养物用于增殖,并因此需要向培养基中加入大量的有机氮源如玉米浆(CSL)。大量有机氮源的加入不仅导致培养基成本的增加,而且也导致分离产物时纯化成本的增加,这是不经济的。

[0003] 此外,已知这样的方法,其包括在需氧条件下培养需氧细菌如棒状细菌以增殖细菌细胞,然后收集并洗涤所述细胞以使用它们作为静息细胞来生产琥珀酸而无需通氧气(专利文献3和4)。此方法是经济的,因为所述细菌细胞可在简单培养基中充分地生长,在所述简单培养基中加入少量的有机氮用于增殖细菌细胞,但就生产的琥珀酸的量、其浓度,及其每个细菌细胞的产率以及生产过程的简化等等而言,此方法仍然需要改进。

[0004] 此外,当在限氧条件下培养需氧细菌如棒状细菌时,除所需物质之外的有机酸如乳酸和乙酸作为副产物过量地积累,这导致细菌细胞的生长抑制和发酵中生产能力(productivity)的显著降低。此外,需要过量的反荷离子(counterion)以中和作为副产物生产的有机酸,由此造成浪费。为了解决这些问题,已通过使用乳酸脱氢酶活性降低的棒状细菌来实现作为副产物生产的乳酸的减少(专利文献5)。

背景技术

[0005] 然而,即使使用上述具有降低的乳酸脱氢酶活性的棒状细菌,也生产大量的乙酸作为副产物。作为解决在培养基中减少乙酸的问题的方法,已知在属于埃希氏菌属的细菌中增强乙酸同化基因(*aceP*)表达的方法(专利文献6),在属于埃希氏菌属的细菌中增强编码ACE蛋白的基因表达的方法(专利文献7),等等。那些方法旨在通过主动同化释放于培养基中的乙酸来减少乙酸作为副产物生产。同时,作为通过抑制乙酸在属于埃希氏菌属的细菌中的生物合成来抑制乙酸作为副产物生产的方法,已知使用其中磷酸乙酰转移酶和乳酸脱氢酶缺陷的大肠杆菌生产琥珀酸的方法(专利文献8)。

[0006] 生产作为担负在棒状细菌中同化乙酸的酶,已报道了乙酸激酶(*ack*)和磷酸转乙酰酶(*pta*)(非专利文献2)。在另一方面,假定不仅上述的酶,而且多种酶如丙酮酸氧化酶(专利文献9)、酰基磷酸酶、醛脱氢酶,和乙酰辅酶A水解酶是生产乙酸的原因,但是还不清楚对于合成乙酸有贡献的具体的酶。因此,还没有使用具有降低的乙酸生物合成酶活性的棒状细菌的菌株来生产琥珀酸的已知方法。

[0007] 丙酮酸氧化酶是一种由丙酮酸和水生产乙酸的酶(EC 1.2.2.2),而且已经公知使

用其中丙酮酸氧化酶缺陷的肠细菌 (enterobacteria) 来生产 L- 氨基酸的方法 (专利文献 10), 使用其中丙酮酸氧化酶缺陷的肠细菌来生产 D- 泛酸的方法 (专利文献 11), 和使用其中丙酮酸氧化酶缺陷的棒状细菌来生产 D- 泛酸的方法 (专利文献 12)。

[0008] 已经鉴定了谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 的丙酮酸氧化酶的基因序列, 并已知使用棒状细菌生产 L- 氨基酸的方法, 所述棒状细菌被修饰以使丙酮酸氧化酶基因的表达降低 (专利文献 13)。然而, 丙酮酸氧化酶在棒状细菌中对于琥珀酸-生物合成系统的贡献是未知的, 而且没有提供有关在厌氧条件下丙酮酸氧化酶基因的表达分析的报告。

[0009] 专利文献 1 : 美国专利 No. 5, 143, 833

[0010] 专利文献 2 : 美国专利 No. 5, 504, 004

[0011] 专利文献 3 : JP11-113588A

[0012] 专利文献 4 : JP11-196888A

[0013] 专利文献 5 : JP11-206385A

[0014] 专利文献 6 : JP06-14781A

[0015] 专利文献 7 : JP07-67683A

[0016] 专利文献 8 : WO 99/06532

[0017] 专利文献 9 : EP 1096013A

[0018] 专利文献 10 : WO 02/36797

[0019] 专利文献 11 : WO 02/072855

[0020] 专利文献 12 : WO 02/29020

[0021] 专利文献 13 : EP 1108790A

[0022] 非专利文献 1 : International Journal of Systematic Bacteriology, vol. 49, p207-216, 1999

[0023] 非专利文献 2 : Microbiology. 1999, Feb ; 145 (Pt 2) : 503-13

发明内容

[0024] 本发明的目的是提供能够有效生产琥珀酸生产的棒状细菌。

[0025] 本发明的发明人已进行了透彻的研究以解决上述问题, 结果, 他们发现, 通过降低丙酮酸氧化酶活性, 在棒状细菌中作为副产物的乙酸的产生减少了, 琥珀酸得到了高效生产, 因此实现了本发明。

[0026] 即, 本发明如下所示。

[0027] (1) 具有生产琥珀酸的能力的棒状细菌, 其中所述细菌已被修饰以使丙酮酸氧化酶的活性降低。

[0028] (2) 根据 (1) 的棒状细菌, 其中丙酮酸氧化酶是如下面的 (A) 或 (B) 中所述的蛋白质:

[0029] (A) 具有 SEQ ID NO : 49 的氨基酸序列的蛋白质; 或

[0030] (B) 在 SEQ ID NO : 49 的氨基酸序列中包含一个或几个氨基酸的取代、缺失、插入或添加, 并具有丙酮酸氧化酶活性的蛋白质。

[0031] (3) 根据 (1) 或 (2) 的棒状细菌, 其中所述丙酮酸氧化酶活性已通过破坏染色体上

的丙酮酸氧化酶基因来降低。

[0032] (4) 根据 (3) 的棒状细菌,其中所述丙酮酸氧化酶基因是如下面的 (a) 或 (b) 中所述的 DNA:

[0033] (a) 包含 SEQ ID NO:48 中核苷酸编号 996-2732 的核苷酸序列的 DNA;或

[0034] (b) 在严格条件下与 SEQ ID NO:48 中核苷酸编号 996-2732 的核苷酸序列或可由所述核苷酸序列制备的探针杂交,并且编码具有丙酮酸氧化酶活性的蛋白的 DNA。

[0035] (5) 根据 (1)-(4) 中任一项的棒状细菌,其已被进一步修饰以使磷酸转乙酰酶、乙酸激酶和乙酰辅酶 A 水解酶中一种或多种的活性降低。

[0036] (6) 根据 (1)-(5) 中任一项的棒状细菌,其中所述细菌已被进一步修饰以使乳酸脱氢酶的活性降低。

[0037] (7) 根据 (1)-(6) 中任一项的棒状细菌,其中所述细菌已被进一步修饰以使丙酮酸羧化酶的活性增加。

[0038] (8) 生产琥珀酸的方法,其包括:

[0039] 使根据 (1)-(7) 中任一项的棒状细菌或其处理产物对含有碳酸根离子、碳酸氢根离子或二氧化碳的反应液体中的有机原料起作用以在反应液体中生产并积累琥珀酸;和

[0040] 从所述反应液体中收集琥珀酸。

[0041] (9) 根据 (8) 的生产方法,其中使所述棒状细菌或其处理产物在厌氧条件下对所述有机原料起作用。

[0042] (10) 生产含有琥珀酸的聚合物的方法,其包括通过 (8) 或 (9) 的方法生产琥珀酸和使所得到的琥珀酸聚合的步骤。

附图说明

[0043] 图 1 显示构建质粒 pBS3 的步骤。

[0044] 图 2 显示构建质粒 pBS4S 的步骤。

[0045] 图 3 显示构建质粒 p Δ ldh56-1 的步骤。

[0046] 图 4 显示构建质粒 pBS4S:: Δ poxB 的步骤。

[0047] 图 5 是显示乙酸作为副产物在 poxB- 破坏的菌株和对照菌株中的比例的图。

[0048] 图 6 显示构建质粒 pBS5T:: Δ ack 的步骤。

[0049] 图 7 显示构建质粒 pBS5T:: Δ pta-ack 的步骤。

[0050] 图 8 显示构建质粒 pBS5T:: Δ poxB 的步骤。

[0051] 图 9 显示构建质粒 pBS4T:: Δ ach 的步骤。

[0052] 图 10 显示构建质粒 pBS5T:: Δ acp 的步骤。

[0053] 优选实施方案的描述

[0054] 在下文中,将详细描述本发明的实施方案。

[0055] <1> 本发明中将使用的棒状细菌

[0056] 在本发明中,术语“棒状细菌 (coryneform bacterium)”包括已被分类为短杆菌属 (Brevibacterium) 但现在分类为棒杆菌属 (Corynebacterium) 的细菌 (Int. J. Syst. Bacteriol., 41, 255 (1991)), 而且它也包括属于短杆菌属的细菌,其与棒杆菌属非常紧密地相关。所述棒状细菌的实例包括如下。

- [0057] 嗜乙酰乙酸棒杆菌 (*Corynebacterium acetoacidophilum*)
- [0058] 醋谷棒杆菌 (*Corynebacterium acetoglutamicum*)
- [0059] *Corynebacterium alkanolyticum*
- [0060] 美棒杆菌 (*Corynebacterium callunae*)
- [0061] 谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)
- [0062] 百合花棒杆菌 (*Corynebacterium lilium*)
- [0063] 栖废糖蜜棒杆菌 (*Corynebacterium melassecola*)
- [0064] *Corynebacterium thermoaminogenes*
- [0065] 力士棒杆菌 (*Corynebacterium herculis*)
- [0066] *Brevibacterium divaricatum*
- [0067] 黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*)
- [0068] *Brevibacterium immariophilum*
- [0069] 乳发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum*)
- [0070] 玫瑰色短杆菌 (*Brevibacterium roseum*)
- [0071] 解糖短杆菌 (*Brevibacterium saccharolyticum*)
- [0072] 生硫短杆菌 (*Brevibacterium thiogenitalis*)
- [0073] 产氨棒杆菌 (*Corynebacterium ammoniagenes*)
- [0074] *Brevibacterium album*
- [0075] *Brevibacterium selinum*
- [0076] 嗜氨微杆菌 (*Microbacterium ammoniophilum*)

[0077] 在本发明中,术语“生产琥珀酸的能力”指当培养本发明的棒状细菌时,在培养基中积累琥珀酸的能力。所述生产琥珀酸的能力可为棒状细菌固有的特点或通过培养 (breeding) 提供的特点。

[0078] 为了通过培养提供所述生产琥珀酸的能力,有已用于培养棒状细菌的适用方法,其包括获得代谢调节突变菌株,生产具有增强的生物合成酶用于所需物质的重组菌株等等 (Amino Acid Fermentation, Japan Scientific Societies Press, the first edition published on May 30, 1986, p77-100)。在这些方法中,可提供一种或两种或三种或更多特点,如代谢调节突变和所需物质的生物合成酶的增强。可将赋予的性质如代谢调节突变和生物合成酶的增强进行组合。生产琥珀酸的酶的实例包括如下所述的丙酮酸羧化酶。

[0079] 具有生产琥珀酸的能力的棒状细菌的特别优选的具体实例包括黄色短杆菌 MJ233 Δ 1dh 菌株,其具有减少的乳酸脱氢酶活性 (JP11-206385A),黄色短杆菌 MJ233/pPCPYC 菌株,其具有增强的丙酮酸羧化酶或磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶的活性 (WO 01/27258 和 JP11-196887A),黄色短杆菌 MJ233 (FERMBP-1497),黄色短杆菌 MJ233AB-41 (FERM BP-1498),产氨短杆菌 ATCC6872,谷氨酸棒杆菌 ATCC31831,和乳发酵短杆菌 ATCC13869。由于黄色短杆菌目前分类为谷氨酸棒杆菌 (Lielbl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W. 和 Schleifer, K. H., International Journal of Systematic Bacteriology, 1991, vol. 41, p255-260),上述的黄色短杆菌 MJ-233 菌株及其突变体 MJ-233AB-41 菌株被分别定义为与谷氨酸棒杆菌 MJ-233 菌株和谷氨酸棒杆菌 MJ-233AB-41 菌株相同的菌株。

[0080] <2> 构建本发明的棒状细菌

[0081] 本发明的棒状细菌具有上述的生产琥珀酸的能力并已被修饰以使丙酮酸氧化酶的活性降低。

[0082] 在本发明的棒状细菌的培养中,提供生产琥珀酸的能力和修饰以降低丙酮酸氧化酶 (1.2.2.2) 活性之中哪个首先进行没有优先选择。

[0083] 术语“丙酮酸氧化酶活性”指催化从丙酮酸和水生产乙酸的反应的活性。术语“被修饰以使丙酮酸氧化酶的活性降低”指丙酮酸氧化酶的活性与未修饰的菌株如野生型棒状细菌的比活 (specific activity) 相比降低。所述丙酮酸氧化酶活性与未修饰的菌株相比,优选每个细菌细胞降低至 50%或更低,更优选降低至 30%或更低,还更优选每个细菌细胞降低至 10%或更低。本文,用作对照的野生型棒状细菌的实例包括乳发酵短杆菌 ATCC13869(野生型菌株)和乳发酵短杆菌 Δ ldh 菌株(未修饰的菌株)。可根据 Chang Y. 等的方法 (Chang Y. 和 Cronan J.E. JR, J. Bacteriol. 151, 1279-1289 (1982)) 测定丙酮酸氧化酶的活性。棒状细菌具有上述活性的丙酮酸氧化酶的实例包括具有 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列的蛋白质。此外,只要蛋白具有丙酮酸氧化酶活性,它可为在 SEQ ID NO:49 的氨基酸序列中包含一个或几个氨基酸的取代、缺失、插入或添加的蛋白质。本文中,例如,术语“几个”指 2 至 20,优选 2 至 10,更优选 2 至 5。

[0084] 术语“被修饰以使丙酮酸氧化酶的活性降低”包括每个细胞丙酮酸氧化酶的分子数目的减少,每个分子的丙酮酸氧化酶活性的减少等等。具体地,可通过破坏在染色体上编码丙酮酸氧化酶的基因生产,修饰表达调控序列如启动子或 Shine-Dalgarno (SD) 序列等来获得。染色体上丙酮酸氧化酶基因的实例包括具有 SEQ ID NO:48 的核苷酸编号 996-2732 的核苷酸序列的 DNA。它也可在严格条件下与 SEQ ID NO:48 的核苷酸编号 996-2732 的核苷酸序列或可由所述核苷酸序列制备的探针杂交的 DNA,只要其编码具有丙酮酸氧化酶活性的蛋白。术语“严格条件”指所谓特异性杂合体形成而且非特异性杂合体不形成的条件。难以通过数值清楚地限定所述条件,但其实例包括在对应于 $1\times$ SSC, 0.1% SDS, 优选 $0.1\times$ SSC, 0.1% SDS 的盐浓度在 60℃ 含有一次,优选两次或三次洗涤的条件。

[0085] 例如,可通过基于在 GenBank 中登记的谷氨酸棒杆菌的序列 (GenBank 登录号 NC_003450 的 2776766-2778505 的互补链) 合成人工合成的寡核苷酸,并使用谷氨酸棒杆菌的染色体作为模板进行 PCR 来克隆,从而得到所述丙酮酸氧化酶基因 (在下文中,称为 poxB 基因)。此外,也可以使用棒状细菌的序列,所述棒状细菌如具有通过最近的基因组计划测定的核苷酸序列的乳发酵短杆菌。染色体 DNA 可由作为 DNA 供体的细菌通过,例如, Saito 和 Miura (H. Saito 和 K. Miura, Biophys. Acta, 72, 619 (1963), Experimental Manual for Biotechnology, edited by The Society for Biotechnology, Japan, p97-98, Baifukan Co., Ltd., 1992) 的方法等来制备。

[0086] 由此制备的 poxB 基因或其部分可用于基因破坏 (gene disruption)。用于基因破坏的基因只需要具有足够引起与棒状细菌的染色体上待破坏的 poxB 基因 (例如具有 SEQ ID NO:48 中核苷酸编号 996-2732 的核苷酸序列的基因) 发生同源重组的同源性,因此也可以使用同源基因。本文,所述足够引起同源重组的同源性优选为不低于 70%,更优选不低于 80%,还更优选不低于 90%,特别优选不低于 95%。此外,能与上述基因在严格条件下杂交的 DNA 可引起同源重组。术语“严格条件”指这样的条件,在该条件下形成所谓的特异性杂合体而不形成非特异性杂合体。难以通过数值清楚限定所述条件,但所述条件包括,例如

在对应于 $1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS, 优选 $0.1 \times \text{SSC}$, 0.1% SDS 的盐浓度在 60°C 含有一次, 优选两次或三次洗涤的条件。

[0087] 例如, 通过使用上述的基因制备了 *poxB* 基因的缺失型, 其通过缺失 *poxB* 基因的部分序列而被修饰以使不产生具有正常功能的丙酮酸氧化酶, 并且用含有所述基因的 DNA 转化棒状细菌以引起所述缺失型基因和染色体上基因之间的重组, 以由此破坏染色体上的 *poxB* 基因。已经建立了使用同源重组通过基因取代的所述基因破坏, 而且其实例包括使用线性 DNA 的方法和使用含有温度 - 敏感的复制起点质粒的方法 (美国专利 No. 6, 303, 383 或 JP05-007491A)。此外, 通过使用同源重组的基因取代的上述基因破坏也可使用在宿主中不具有复制能力的质粒来进行。

[0088] 例如, 按照如下的步骤可用 *poxB* 基因的缺失型取代宿主染色体上的 *poxB* 基因。首先, 通过插入温度 - 敏感的复制起点、*poxB* 基因的缺失型、编码果聚糖蔗糖酶 (levansucrase) 的 *sacB* 基因和对于药物如氯霉素有抗性的标记基因来制备用于重组的质粒。

[0089] 本文中, 编码果聚糖蔗糖酶的 *sacB* 基因是用于有效选择菌株的基因, 在所述菌株中已从染色体切除了载体部分 (Schafer, A. 等, Gene 145 (1994) 69-73)。即, 当果聚糖蔗糖酶在棒状细菌中表达时, 通过同化蔗糖生产的果聚糖对细菌起致死性作用, 所以所述细菌不能生长。因此, 如果将其中携带果聚糖蔗糖酶的载体保留在染色体上的细菌菌株在含有蔗糖的平板上培养时, 其不能生长。结果, 在含有蔗糖的平板上只有其中载体已被切除的细菌菌株可被选择。

[0090] 具有如下序列的每个基因可用作 *sacB* 基因或其同源基因。

[0091] 枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*): *sacB* GenBank 登录号 X02730 (SEQ IDNO: 41)

[0092] 解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*): *sacB* GenBank 登录号 X52988

[0093] 运动发酵单孢菌 (*Zymomonas mobilis*): *sacB* GenBank 登录号 L33402

[0094] 嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*): *surB* GenBank 登录号 U34874

[0095] 旧金山乳杆菌 (*Lactobacillus sanfranciscensis*): *frfA* GenBank 登录号 AJ508391

[0096] 木醋杆菌 (*Acetobacter xylinus*): *lsxA* GenBank 登录号 AB034152
Gluconacetobacter diazotrophicus: *lsdA* GenBank 登录号 L41732

[0097] 用上述重组质粒转化棒状细菌。可根据先前已报道的转化方法进行转化。所述方法的实例包括: 如报道用于大肠杆菌 K-12 的通过用氯化钙处理受体细菌的细胞来增加 DNA 的通透性的方法 (Mandel, M. 和 Higa, A., J. Mol. Biol., 53, 159 (1970)) 和, 如报道用于枯草芽孢杆菌的使用增殖细胞制备感受态细胞用于导入 DNA 的方法 (Duncan, C. H., Wilson, G. A 和 Young, F. E., Gene, 1, 153 (1977))。可替换地, 也可应用如报道用于枯草芽孢杆菌、放线菌和酵母的, 将重组 DNA 导入 DNA 受体细菌的细胞的方法 (Chang, S. 和 Choen, S. N., Molec. Gen. Genet., 168, 111 (1979); Bibb, M. J., Ward, J. M., 和 Hopwood, O. A., Nature, 274, 298 (1978); Hinnen, A., Hicks, J. B. 和 Fink, G. R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1929 (1978))。此外, 可通过电脉冲方法转化棒状细菌 (Sugimoto 等, JP02-207791A)。

[0098] 用于棒状细菌的温度-敏感型质粒的实例包括 p48K 和 pSFKT2 (JP2000-262288A), 和 pHSC4 (法国专利 No. 2667875 (1992) 和 JP05-7491A)。这些质粒至少在 25℃ 在棒状细菌中是可自主复制的, 但它们在 37℃ 是不能自主复制的。具有 pHSC4 的大肠杆菌 AJ12571 已经以登录号 FERM P-11763 于 1990 年 10 月 11 日保藏在通商产业省工业技术院生命工学工业技术研究所 (National Institute of Bioscience and Human-Technology, Agency of Industrial Science and Technology, Ministry of International Trade and Industry) (现在为, 独立行政法人 产业技术综合研究所 特许微生物保藏中心 (International Patent Organism Depositary, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology)) (Central 6, 1-1-1 Higashi, Tsukuba, Ibaraki, 305-5466 日本), 然后根据布达佩斯条约的规定, 于 1991 年 8 月 26 日以登录号 FERM BP-3524 转为国际保藏。

[0099] 将如上所述获得的转化体在温度敏感的复制起点不起作用的温度 (25℃) 培养, 以由此得到已导入质粒的菌株。将所述导入质粒的菌株在高温培养以切除温度-敏感的质粒, 并将所述细菌菌株铺在含有抗生素的平板上。所述温度-敏感的质粒不能在高温复制。因此, 其中质粒已被切除的细菌菌株不能在含有抗生素的平板上生长, 但是其中重组发生在所述质粒上的 *poxB* 基因和染色体上的 *poxB* 基因之间的细菌菌株以非常低的频率出现。

[0100] 在通过将所述重组 DNA 如上所述导入染色体而获得的菌株中, 重组发生在原始存在于染色体上的 *poxB* 基因序列, 并将染色体 *poxB* 基因和 *poxB* 基因的缺失形式的两个融合基因插入染色体以使重组 DNA 的其它部分 (载体部分、温度-敏感的复制起点和药物抗性标记) 存在所述融合基因之间。

[0101] 然后, 为了只将 *poxB* 基因的缺失型留在染色体 DNA 上, 将所述基因与载体部分 (温度敏感的复制起点和药物抗性标记) 一起从染色体上消除。此步骤导致其中正常 *poxB* 基因保留在染色体 DNA 上而 *poxB* 基因的缺失型被切除的情况, 或者正相反, 导致其中正常 *poxB* 基因被切除而 *poxB* 基因的缺失型保留在染色体 DNA 上的情况。在两种情况中, 当培养在允许温度-敏感的复制起点发挥功能的温度进行时, 被切割的 DNA 作为质粒保留在细胞中。然后, 当培养在不允许温度-敏感的复制起点发挥功能的温度进行时, 所述质粒上的 *poxB* 基因与所述质粒一起从细胞中消除。然后, 通过 PCR、Southern 杂交等选择其中 *poxB* 基因的缺失型保留在染色体上的菌株, 以由此得到其中 *poxB* 基因被破坏的菌株。

[0102] 在这样的情况中, 其中使用在棒状细菌中不具有复制能力的质粒替代上述温度-敏感的质粒, 也可以以类似的方式进行基因破坏。在棒状细菌中不具有复制能力的质粒优选为在大肠杆菌中具有复制能力的质粒, 其实例包括 pHSG299 (Takara Bio Inc.) 和 pHSG399 (Takara Bio Inc.)。

[0103] 同时, 降低丙酮酸氧化酶活性的方法的实例不仅包括上述的基因工程方法, 还包括含有如下步骤的方法: 用紫外照射或以通常用于突变的突变试剂, 如 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍 (NTG) 和亚硝酸来处理棒状细菌, 和选择丙酮酸氧化酶活性降低的细菌菌株。

[0104] 生产棒状细菌棒状细菌棒状细菌棒状细菌棒状细菌在本发明中, 更有效地使用经修饰以使除了上述丙酮酸氧化酶活性降低以外, 乳酸脱氢酶 (在下文中, 称为 LDH) 活性降低的细菌菌株。乳酸脱氢酶活性指通过使用 NADH 作为辅酶还原丙酮酸来催化反应以生产乳酸的活性。短语“乳酸脱氢酶活性降低”指与 LDH-未修饰的菌株相比 LDH 活性降低。所

述 LDH 活性比 LDH- 未修饰的菌株或野生型菌株降低, 并且优选每个细菌细胞降低至 50% 或更低, 更优选降低至 30% 或更低, 特别优选每个细菌细胞降低至 10% 或更低。LDH 活性可被完全消除。可通过以 L. Kanarek 等的方法 (L. Kanarek 和 R. L. Hill, J. Biol. Chem. 239, 4202 (1964)) 测定 LDH 活性来确定 LDH 活性的降低。可通过制备 LDH 活性降低并被修饰以使丙酮酸氧化酶活性降低的棒状细菌来获得本发明的棒状细菌。然而, 进行降低 LDH 活性的修饰和降低丙酮酸氧化酶活性的修饰的顺序没有偏好。作为 ldh 基因, 可使用, 例如, 具有以 SEQ ID NO :43 表示的序列的基因, 而基因破坏可以以与上述 poxB 基因的情况中类似的方式进行。

[0105] 在本发明中, 更有效地使用经修饰以使除了上述丙酮酸氧化酶活性降低以外, 磷酸转乙酰酶 (在下文中, 称为 PTA)、乙酸激酶 (在下文中, 称为 ACK) 和乙酰辅酶 A 水解酶 (ACH) 中任一种的活性降低的细菌菌株。更有效地使用经修饰以使两种或多种所述酶的活性降低的细菌菌株, 并特别有效地使用经修饰以使所有上述活性都降低的细菌菌株。更有效地使用还在酰基磷酸酶中具有缺陷的细菌菌株。

[0106] 在本发明中, 磷酸转乙酰酶 (PTA) 活性指通过将磷酸转移给乙酰辅酶 A 来催化反应以生产乙酰磷酸的活性。乙酸激酶 (ACK) 活性指催化反应以由乙酰磷酸和 ADP 生成乙酸的活性。乙酰辅酶 A 水解酶 (ACH) 活性指催化反应以由乙酰辅酶 A 和水生成乙酸的活性。酰基磷酸酶 (ACP) 活性指催化反应以由乙酰基磷酸生成磷酸和乙酸, 或羧酸和磷酸的活性。

[0107] 降低这些活性可通过破坏编码上述酶的基因, 或通过修饰表达调控序列如编码所述酶的基因的启动子和 Shine-Dalgarno (SD) 序列来实现。基因破坏可以以与上述破坏 poxB 基因的方法相同的方式进行。

[0108] 作为编码所述酶的基因, 例如, 可使用在 GenBank 中登记的谷氨酸棒杆菌的如下基因:

[0109] pta (磷酸乙酰转移酶) 基因: GenBank 登录号 NC_003450 的 NCg12657 (NC_003450 的核苷酸编号 2936506-2937891 的互补链) (SEQ ID NO :45 中核苷酸编号 956-1942)

[0110] ack (乙酸激酶) 基因: GenBank 登录号 NC_003450 的 NCg12656 (NC_003450 的核苷酸编号 2935313-2936506 的互补链) (SEQ ID NO :45 中核苷酸编号 1945-3135)。

[0111] ach (乙酰辅酶 A 水解酶) 基因: GenBank 登录号 NC_003450 的 NCg12480 (NC_003450 的核苷酸编号 2729376-2730884 的互补链) (SEQ ID NO :50)。

[0112] acp (酰基磷酸酶) 基因: GenBank 登录号 NC_003450 的 NCg11987 (NC_003450 的核苷酸编号 2183107-2183391 的互补链) (SEQ ID NO :52)。

[0113] 短语“磷酸转乙酰酶 (在下文中, 称为 PTA) 活性降低”指与 PTA- 未修饰的菌株相比 PTA 活性降低。所述 PTA 活性比 PTA- 未修饰的菌株或野生型菌株降低, 并且优选每个细菌细胞降低至 50% 或更低, 更优选降低至 30% 或更低, 特别优选每个细菌细胞降低至 10% 或更低。PTA 活性可被完全消除。PTA 活性的降低可通过以 Klotzsch 等的方法 (Klotzsch H. R., Meth Enzymol. 12, 381-386 (1969)) 测定 PTA 活性来确定。可通过构建 POXB 活性降低的棒状细菌并将其修饰以使 PTA 活性降低来得到 POXB 和 PTA 活性降低的棒状细菌。然而, 进行降低 PTA 活性的修饰和降低 POXB 活性的修饰的顺序没有偏好。

[0114] 短语“乙酸激酶 (在下文中, 称为 ACK) 活性降低”指与野生型菌株或 ACK- 未修饰的菌株相比 ACK 活性降低。所述 ACK 活性比 ACK- 未修饰的菌株或野生型菌株降低, 并且优

选与 ACK- 未修饰的菌株相比每个细菌细胞降低至 50% 或更低, 更优选降低至 30% 或更低, 特别优选降低至 10% 或更低。ACK 活性可被完全消除。ACK 活性的降低可通过以 Ramponi 等的方法 (Ramponi G., Meth. Enzymol. 42, 409-426 (1975)) 测定 ACK 活性来确定。可通过构建 POXB 活性降低的棒状细菌并将其修饰以使 ACK 活性降低来得到 POXB 和 ACK 活性降低的棒状细菌。然而, 进行降低 ACK 活性的修饰和降低 POXB 活性的修饰的顺序没有偏好。

[0115] 短语“乙酰辅酶 A 水解酶 (在下文中, 称为 ACH) 活性降低”指与野生型菌株或 ACH- 未修饰的菌株相比 ACH 活性降低。所述 ACH 活性比 ACH- 未修饰的菌株或野生型菌株降低, 并且优选与 ACH- 未修饰的菌株相比每个细菌细胞降低至 50% 或更低, 更优选降低至 30% 或更低, 特别优选降低至 10% 或更低。ACH 活性可被完全消除。ACH 活性的降低可通过以 Gergely, J. 等的方法 (Gergely, J., Hele, P. & Ramkrishnan, C. V. (1952) J. Biol. Chem. 198 ;p323-334) 测定 ACH 活性来确定。可通过构建 POXB 活性降低的棒状细菌并将其修饰以使 ACH 活性降低来得到 POXB 和 ACH 活性降低的棒状细菌。然而, 进行降低 ACH 活性的修饰和降低 POXB 活性的修饰的顺序没有偏好。

[0116] 短语“酰基磷酸酶 (在下文中, 称为 ACP) 活性降低”指与野生型菌株或 ACP- 未修饰的菌株相比 ACP 活性降低。所述 ACP 活性低于野生型菌株或 ACP- 未修饰的菌株, 并且优选与 ACP- 未修饰的菌株相比每个细菌细胞降低至 50% 或更低, 更优选降低至 30% 或更低, 特别优选降低至 10% 或更低。ACP 活性可被完全消除。ACP 活性的降低可通过以与用于 ACK 活性相同的方法 (Ramponi G., Meth. Enzymol. 42, 409-426 (1975)) 测定 ACP 活性来确定。可通过构建 FOXB 活性降低的棒状细菌并将其修饰以使 ACP 活性降低来得到 FOXB 和 ACP 活性降低的棒状细菌。然而, 没有偏好以进行降低 ACP 活性的修饰和降低 FOXB 活性的修饰。

[0117] 同时, 在本发明中, 可使用经修饰以使得除了 POXB 活性降低之外, 丙酮酸羧化酶 (在下文中, 称为 PC) 的活性增加的细菌。术语“丙酮酸羧化酶活性增加”指与野生型菌株或未修饰的菌株如亲代菌株相比 PC 活性增加。PC 活性可通过 Peters-Wendisch P. G 等的方法 (Peters-Wendisch P. G 等 Microbiology 143, 1095-1103 (1997)) 测定。

[0118] 作为编码用于本发明的方法中的 PC 蛋白的 PC 基因, 可采用其核苷酸序列已被测定的基因, 或根据下面描述的方法通过从微生物、动物、植物等的染色体分离编码具有 PC 活性的蛋白的 DNA 片段并测定其核苷酸序列而得到的基因。此外, 在测定核苷酸序列之后, 可使用根据所述序列合成的基因。例如, 可使用谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的丙酮酸羧化酶基因 (GenBank 登录号 NCg10659 基因 ;SEQ ID NO :46)。此外, 也可以使用由如下生物体得到的 PC 基因 :

[0119] 人 [Biochem. Biophys. Res. Comm. , 202, 1009-1014, (1994)]

[0120] 小鼠 [Proc. Natl. Acad. Sci. USA. , 90, 1766-1779, (1993)]

[0121] 大鼠 [GENE, 165, 331-332, (1995)]

[0122] 酵母 ; 酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) [Mol. Gen. Genet. , 229, 307-315, (1991)]

[0123] 粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) [DDBJ 登录号 ;D78170]

[0124] 嗜热脂肪芽孢杆菌 [GENE, 191, 47-50, (1997)]

[0125] *Rhizobium etli* [J. Bacteriol. , 178, 5960-5970, (1996)]

[0126] 可通过将 DNA 片段插入合适的表达质粒如 pUC118 (Takara Bio Inc.), 并导入合

适的宿主微生物如大肠杆菌 JM109 (Takara Bio Inc.) 来表达含有 PC 基因的 DNA 片段。表达的 PC 基因产物, 其为丙酮酸羧化酶, 可通过用如上所述的已知方法在转化体中测定 PC 活性, 然后将测定的 PC 活性与从非转化体菌株提取的粗酶溶液的 PC 活性进行比较来确认。将含有 PC 基因的 DNA 片段插入合适的质粒, 如含有至少在棒状细菌中负担质粒复制功能的基因的质粒载体, 由此可得到能够在棒状细菌中高表达 PC 的重组质粒。本文, 在该重组质粒中, 表达 PC 基因的启动子可为棒状细菌的启动子。然而, 不限于所述的启动子, 可使用任何启动子, 只要其具有能够启动 PC 基因转录的核苷酸序列。

[0127] 其中可导入 PC 基因的质粒载体没有限制, 只要它们含有至少在棒状细菌中负担复制功能的基因。其具体实例包括: JP03-210184A 中描述的质粒 pCRY30; JP02-72876A 和美国专利 No. 5, 185, 262 中描述的每个质粒 pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE 和 pCRY3KX; JP01-191686A 中描述的每个质粒 pCRY2 和 pCRY3; JP58-67679A 中描述的 pAM330; JP58-77895A 中描述的 pHM1519; JP58-192900A 中描述的每个质粒 pAJ655、pAJ611 和 pAJ1844; JP57-134500A 中描述的 pCG1; JP58-35197A 中描述的 pCG2; 和 JP57-183799A 中描述的每个质粒 pCGG4 和 pCG11。

[0128] 在这些质粒中, 在棒状细菌的宿主-载体系统中使用的质粒载体优选为那些具有在棒状细菌中负担质粒复制功能的基因, 和在棒状细菌中负担质粒稳定功能的基因的质粒载体。例如, 可优选使用质粒 pCRY30、pCRY21、pCRY2KE、pCRY2KX、pCRY31、pCRY3KE 和 pCRY3KX。

[0129] 可通过用重组载体转化棒状细菌, 例如乳发酵短杆菌 2256 菌株 (ATCC13869) 来得到具有增强的 PC 基因表达的棒状细菌, 所述重组载体通过将 PC 基因插入质粒载体的适当位点来制备, 所述质粒载体可在如上所述的需氧棒状细菌中复制。可通过, 例如电脉冲方法 (Res. Microbiol., Vol. 144, p. 181-185, 1993) 来进行转化。也可以通过在染色体上通过已知的同源重组方法以 PC 基因的导入、取代、扩增等增强基因表达来增加 PC 活性。通过破坏高表达 PC 基因的菌株中的 poxB 基因, 可得到 PC 活性增强而且丙酮酸氧化酶活性降低的细菌菌株。进行降低丙酮酸氧化酶活性的修饰和增强 PC 活性的修饰的顺序没有偏好。

[0130] 而且, 在本发明中, 已被修饰以使丙酮酸氧化酶、ACH、PTA 和 ACK 的活性降低, 并进一步修饰以使 LDH 活性降低和 PC 活性增加的细菌, 特别有效地用于生产物质, 尤其是生产琥珀酸。

[0131] <3> 使用本发明的细菌生产琥珀酸

[0132] 可通过在培养基中培养由此得到的棒状细菌以在培养基中制备并积累琥珀酸和从该培养基中收集琥珀酸来有效地制备琥珀酸。

[0133] 在制备琥珀酸的反应中一旦使用上述细菌, 可将在如琼脂培养基的固体培养基上经过斜面培养的细菌直接用于反应, 但可优选使用通过事先在液体培养基中培养上述细菌 (种子培养) 而得到的细菌。可通过将所述细菌在含有有机原料的培养基中增殖的同时使种子培养的细菌与有机物质反应来生产琥珀酸。此外, 也可通过收获已被增殖的细菌细胞, 然后将该细菌细胞与有机原料在含有有机原料的反应液中反应来生产琥珀酸。另外, 为了在本发明的方法中使用需氧棒状细菌的目的, 优选在普通需氧条件下培养该细菌后使用需氧棒状细菌用于反应。待用于培养的培养基可为通常用于培养微生物的任何培养基。例如, 可使用常规培养基, 其可通过将天然营养源如肉提取物、酵母提取物和蛋白胨加入由无

机盐如硫酸铵、磷酸钾和硫酸镁制成的组合物来制备。在培养后收获并使用细菌细胞的情况下,通过离心、膜分离等收获细菌细胞,然后用于反应。

[0134] 在本发明中,也可使用细菌细胞的处理产物(treated product)。例如,细菌细胞的处理产物包括固定的细菌细胞(其被固定在丙烯酰胺、角叉菜胶(carrageenan)或类似物上)、破坏的细菌细胞、其离心上清液或通过用硫酸铵或类似的处理而部分纯化上清液得到的级分。

[0135] 待用于本发明的制备方法的有机原料没有具体限制,只要它是可被本文所述的微生物同化以生产琥珀酸的碳源。通常,使用的可发酵碳水化合物包括:碳水化合物如半乳糖、乳糖、葡萄糖、果糖、甘油、蔗糖(sucrose)、蔗糖(saccharose)、淀粉和纤维素;多元醇如丙三醇、甘露醇、木糖醇和核糖醇。在这些物质中,优选葡萄糖、果糖和甘油,并特别优选葡萄糖。

[0136] 此外,也可使用糖化的淀粉液体、糖蜜等,其包含上述可发酵碳水化合物中的任一种。这些可发酵的碳水化合物中的任一种可单独使用或可组合使用。上述有机原料使用的浓度没有具体限制,但在不抑制琥珀酸生产的范围内尽可能地提高浓度是有利的。通常在有机原料以5%至30%(w/v),优选10%至20%的范围存在的条件下进行反应。可根据反应进程中上述有机原料的减少来额外地添加有机原料。

[0137] 含有有机原料的反应液体没有具体的限制。使用的反应液体可为水、缓冲液、培养基等等,但培养基是最优选的。反应液优选为含有氮源、无机盐等的反应液。本文,氮源没有具体的限制,只要它可被本文所述的微生物同化而制备琥珀酸。氮源的具体实例包括各种有机和无机的氮化合物,如铵盐、硝酸盐、脲、大豆水解物、酪蛋白水解物、蛋白胨、酵母提取物、肉提取物和玉米浆。无机盐的实例包括各种磷酸盐、硫酸盐和镁、钾、锰、铁、锌等的金属盐。此外,如果需要可加入促进细菌细胞生长的组分,其包括:维生素如生物素、泛酸、肌醇和尼克酸;核苷酸和氨基酸。另外,优选将适量的商业上可得到的消泡剂加入反应液以在反应时抑制起泡。

[0138] 可通过加入碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾、碳酸氢钾、碳酸镁、氢氧化钠、氢氧化钙、氢氧化镁等来调节反应液的pH。反应的pH通常为5至10,优选6至9.5,所以如果需要,在反应过程中用碱性物质、碳酸盐、尿素等将反应液的pH调节到上述范围内。

[0139] 培养基优选包含碳酸根离子、碳酸氢根离子或碳酸气(二氧化碳)。碳酸根离子或碳酸氢根离子由碳酸镁、碳酸钠、碳酸氢钠、碳酸钾或碳酸氢钾提供,其也可用作中和试剂。然而,如果需要,碳酸根离子或碳酸氢根离子也可由碳酸或重碳酸(bicarbonic acid),或其盐,或碳酸气提供。碳酸或重碳酸的盐的具体实例包括碳酸镁、碳酸铵、碳酸钠、碳酸钾、碳酸氢铵、碳酸氢钠和碳酸氢钾。此外,碳酸根离子或碳酸氢根离子以0.001至5M,优选0.1至3M,并更优选1至2M的浓度加入。当包含碳酸气时,所含有的碳酸气的量是每升液体50mg至25g,优选100mg至15g,并更优选150mg至10g。

[0140] 在反应中使用的细菌其生长的最佳温度通常为25℃至35℃的范围。在另一方面,反应时的温度通常为25℃至40℃的范围,优选30℃至37℃的范围。用于反应中的细菌细胞的量没有具体限制,但将其量调节到1至700g/L,优选10至500g/L,更优选20至400g/L的范围内。反应的时间优选为1至168小时,更优选3至72小时。

[0141] 一旦培养细菌,需要通过通气和搅拌供给氧气。在另一方面,制备琥珀酸的反应可

在通气和搅拌的条件下进行,或者可在既不通气又不供氧的厌氧条件下进行。本文,术语“厌氧条件”指进行反应的同时保持液体中的低溶氧。在此情况下,优选在 0 至 2ppm,优选 0 至 1ppm,而且更优选 0 至 0.5ppm 的溶氧条件进行反应。为此目的,可使用其中容器被密封以在无通气的条件下进行反应的方法;其中供给惰性气体如氮气以进行反应的方法;其中用含有碳酸气的惰性气体进行通气的方法;等等。

[0142] 可根据常规方法从反应液中分离和纯化在反应液(培养溶液)中积累的琥珀酸。具体来说,可通过离心、过滤等去除包含细菌细胞的固体物质,并用离子交换树脂等将溶液脱盐,然后进行结晶或柱色谱来从溶液中分离和纯化琥珀酸。

[0143] 在本发明中,通过如上所述的本发明的方法制备琥珀酸之后,使用得到的琥珀酸作为原料以制备含有琥珀酸的聚合物来进行聚合反应。含有琥珀酸的聚合物可为与其它聚合物原料的均聚物或共聚物。在近年来,环境-友好的工业产品正在增长,而通过使用植物来源的原料制备的聚合物已经引起关注。在本发明中生产的琥珀酸可被加工为聚合物如聚酯和聚酰胺然后使用。含有琥珀酸的聚合物的具体实例包括通过在二醇如丁二醇或乙二醇和琥珀酸之间聚合而得到的含有琥珀酸的聚酯,和通过在二胺如六亚甲基二胺和琥珀酸之间聚合而得到的含有琥珀酸的聚酰胺。

[0144] 此外,可通过本发明的制备方法得到的琥珀酸或含有琥珀酸的组合物可用作食品添加剂、药物、化妆品等等。

[0145] 实施例

[0146] 以下,将参考实施例进一步详细描述本发明。

[0147] 实施例 1

[0148] <1> 构建携带 sacB 基因的破坏载体

[0149] (A) 构建 pBS3

[0150] 使用枯草芽孢杆菌的染色体 DNA 作为模板以及 SEQ ID NOS:1 和 2 作为引物通过 PCR 获得 sacB 基因。使用 LA Taq(Takara Bio Inc.) 以如下方式进行 PCR:进行 94℃保温 5 分钟的一个循环,然后将 94℃变性 30 秒,49℃退火 30 秒和 72℃延伸 2 分钟的循环重复 25 次。通过常规方法纯化由此得到的 PCR 产物,然后用 BglII 和 BamHI 消化,然后变为平端。将片段插入已用 AvaII 消化并变为平端的 pHSG299 的位点。将大肠杆菌 JM109(Takara Bio Inc.) 的感受态细胞用于以此 DNA 进行转化,并将转化的细胞铺于含有 25 μg/ml 卡那霉素(在下文中,简称为 Km) 的 LB 培养基上,然后过夜培养。然后,挑取出现的菌落,并分离单菌落,由此获得转化体。从转化体中提取质粒,并将其中插入目的 PCR 产物的质粒命名为 pBS3。图 1 显示 pBS3 的构建步骤。

[0151] (B) 构建 pBS4S

[0152] 通过不引起氨基酸取代的交换 PCR 介导的核苷酸取代来破坏位于 pBS3 上的卡那霉素抗性基因序列的 SmaI 位点以获得质粒。首先,使用 pBS3 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:3 和 4 作为引物进行 PCR,由此得到卡那霉素抗性基因的 N-末端区的扩增产物。在另一方面,为了获得 Km 抗性基因的 C-末端区的扩增产物,使用 pBS3 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:5 和 6 作为引物进行 PCR。使用 Pyrobest DNA 聚合酶(Takara Bio Inc.) 以这样的方式进行 PCR:进行 98℃保温 5 分钟的一个循环,然后将 98℃变性 10 秒,57℃退火 30 秒和 72℃延伸 1 分钟的循环重复 25 次,由此得到 PCR 目的产物。SEQ ID NOS:4 和 5

相互部分地互补,而且序列中的 SmaI 位点被不引起氨基酸取代的核苷酸取代破坏。接着,为了获得其中 SmaI 位点破坏的突变卡那霉素抗性基因的片段,将上述卡那霉素抗性基因的 N-末端和 C-末端区的基因产物以大约等摩尔浓度混合,并使用所述基因产物的混合物作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NO:3 和 6 作为引物进行 PCR,以由此得到导入突变的 Km 抗性基因的扩增产物。使用 Pyrobest DNA 聚合酶 (Takara Bio Inc.) 以这样的方式进行 PCR:进行 98℃ 保温 5 分钟的一个循环,然后将 98℃ 变性 10 秒,57℃ 退火 30 秒和 72℃ 延伸 1.5 分钟的循环重复 25 次,由此得到 PCR 目的产物。

[0153] 通过常规方法纯化 PCR 产物,然后用 BanII 消化,然后插入上述 pBS3 的 BanII 位点。将大肠杆菌 JM109 (Takara Bio Inc.) 的感受态细胞用于以此 DNA 进行转化,并将转化的细胞铺于含有 25 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基上,然后过夜培养。然后,挑取出现的菌落,并分离单菌落,由此获得转化体。从转化体中提取质粒,并将其中插入目的 PCR 产物的质粒命名为 pBS4S。图 2 显示 pBS4S 的构建步骤。棒状细菌棒状细菌

[0154] 实施例 2

[0155] < 构建 LDH 基因破坏的菌株 >

[0156] (A) 克隆用于破坏乳酸脱氢酶基因的片段

[0157] 使用根据已被公开的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 (GenBank Database 登录号 NC_003450) 的基因的核苷酸序列 (GenBank Database 登录号 NC_003450 的 Ncg12810) 设计的合成 DNAs 作为引物通过交换 PCR 获得源自其 ORF 已缺失的乳发酵短杆菌 2256 菌株的乳酸脱氢酶基因 (在下文中,简称为 ldh 基因) 的片段。即,使用乳发酵短杆菌 2256 菌株的染色体 DNA 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:7 和 8 作为引物通过常规方法进行 PCR,由此得到 ldh 基因的 N-末端区的扩增产物。在另一方面,为了获得 ldh 基因 C-末端区的扩增产物,使用乳发酵短杆菌 2256 菌株的基因组 DNA 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:9 和 10 作为引物通过常规方法进行 PCR。SEQ ID NO:8 和 9 相互互补并具有缺失 ldh ORF 全序列的结构。

[0158] 乳发酵短杆菌 2256 菌株可由美国典型培养物保藏中心 (ATCC) (地址:ATCC, P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108, 美国) 得到。

[0159] 然后,为了获得其内部序列缺失的 ldh 基因的片段,将上述 ldh N-末端和 C-末端区的基因产物以大约等摩尔的浓度混合,并使用该基因产物的混合物作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:11 和 12 作为引物通过常规方法进行 PCR,由此得到导入突变的 ldh 基因的扩增产物。通过常规方法纯化由此得到的 PCR 产物然后用 SalI 消化,然后插入上述 pBS4S 的 SalI 位点。将大肠杆菌 JM109 (Takara Bio Inc.) 的感受态细胞用于以此 DNA 进行转化,并将转化的细胞铺于含有 100 μ M IPTG, 40 μ g/ml X-Gal, 和 25 μ g/ml Km 的 LB 培养基,然后过夜培养。之后,挑取呈现白色的菌落,并分离单菌落,由此得到转化体。从该转化体提取质粒,并将插入目的 PCR 产物的质粒命名为 p Δ ldh56-1。图 3 显示该质粒的构建步骤。

[0160] (B) 制备 ldh- 破坏的菌株

[0161] 由上述 (A) 得到的 p Δ ldh56-1 不包含能在棒状细菌的细胞中自主复制的区域。因此,当以此质粒转化棒状细菌时,其中将该质粒以同源重组整合入染色体的菌株出现转化体的频率非常低。使用高浓度的质粒 p Δ ldh56-1 通过电脉冲方法转化乳发酵短杆菌 2256

菌株,并将转化的细胞铺于含有 25 μ g/ml 卡那霉素的 CM-Dex 培养基 (5g/L 葡萄糖,10g/L 多肽,10g/L 酵母提取物,1g/L KH_2PO_4 ,0.4g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.01g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.01g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,3g/L 脲,1.2g/L 大豆水解物,pH 7.5(KOH)) 上,然后在 31.5°C 培养大约 30 小时。在培养基上生长的菌株在基因组上含有卡那霉素抗性基因和源自质粒的 sacB 基因,作为在质粒上的 1dh 基因片段和乳发酵短杆菌 2256 菌株的基因组上的 1dh 基因之间进行同源重组的结果。

[0162] 然后,将单交换重组体在 31.5°C 在不含有卡那霉素的 CM-Dex 液体培养基中培养过夜,并在合适的稀释后,将其铺于含有 10% 蔗糖而不含卡那霉素的 Dex-S10 培养基 (100g/L 蔗糖,10g/L 多肽,10g/L 酵母提取物,1g/L KH_2PO_4 ,0.4g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.01g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,0.01g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$,3g/L 脲,1.2g/L 大豆水解物,10 μ g/L 生物素,pH 7.5(KOH)) 上,然后在 31.5°C 培养大约 30 小时。结果,得到大约 50 个菌株,其被认为由于通过第二次同源重组消除 sacB 基因而成为蔗糖 - 不敏感的 (sucrose-insensitive)。

[0163] 所得到的菌株包括:其中 1dh 基因被由 p Δ 1dh56-1 得到的突变型替代的菌株;和其中 1dh 基因回复为野生型的菌株。1dh 基因是突变型还是野生型可通过直接将在 Dex-S10 琼脂培养基上培养得到的细菌菌株进行 PCR 并检测它们的 1dh 基因来容易地确认。在使用引物 (SEQ ID NOS:7 和 10) 扩增 1dh 基因的 PCR 分析中,将得到这样的 PCR 产物的菌株定义为 1dh- 破坏的菌株并用于如下实验,所述 PCR 产物的大小比使用 2256 菌株的染色体 DNA 作为模板通过 PCR 得到的产物的大小更小。作为通过上述方法分析蔗糖 - 不敏感的菌株的结果,选择只携带突变型基因的菌株并命名为 2256 Δ (1dh) 菌株。而且,将该菌株用作在如下实施例中进行修饰的亲代菌株。

[0164] 实施例 3

[0165] < 构建丙酮酸氧化酶基因 - 破坏的菌株 >

[0166] (A) 克隆破坏丙酮酸氧化酶基因的片段

[0167] 使用根据已被公开的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的基因的核苷酸序列 (GenBank Database 登录号 NC_003450 的 NCg12521) 设计的合成 DNAs 作为引物通过交换 PCR 获得其 ORF 已缺失的乳发酵短杆菌 2256 菌株的丙酮酸氧化酶基因 (在下文中,简称为 poxB 基因) 的片段。即,使用乳发酵短杆菌 2256 菌株的基因组 DNA 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:29 和 30 作为引物进行 PCR,由此得到 poxB 基因 N- 末端区的扩增产物。

[0168] 在另一方面,为了获得 poxB 基因 C- 末端区的扩增产物,使用乳发酵短杆菌 2256 的基因组 DNA 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:31 和 32 作为引物进行 PCR。SEQ ID NO:30 和 31 相互互补。使用 KOD-plus-(TOYOBO) 以这样的方式进行 PCR:进行 94°C 保温 2 分钟的一个循环,然后,对于 N- 末端和 C- 末端区,将 94°C 变性 10 秒,55°C 退火 30 秒和 68°C 延伸 40 秒的循环重复 30 次。然后,为了获得其内部序列缺失的 poxB 基因的片段,将上述 poxB 的 N- 末端和 C- 末端区的基因产物以大约等摩尔的浓度混合,并使用所述混合物作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:33 和 34 作为引物进行 PCR,由此得到导入突变的 poxB 基因的扩增产物。使用 KOD-plus-(TOYOBO) 以这样的方式进行 PCR:进行 94°C 保温 2 分钟的一个循环,然后将 94°C 变性 10 秒,55°C 退火 30 秒和 68°C 延伸 70 秒的循环重复 30 次,由此得到导入突变的 poxB 基因的扩增产物。

[0169] 通过常规方法纯化由此得到的 PCR 产物然后用 XbaI 消化,然后插入上述实施例

1(B) 构建的 pBS4S 中的 XbaI 位点。将大肠杆菌 JM109 (Takara BioInc.) 的感受态细胞用于以此 DNA 进行转化, 并将转化的细胞铺于含有 100 μ g/ml MIPTG, 40 μ g/ml X-Gal, 和 25 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基上, 然后过夜培养。之后, 挑取呈现白色的菌落, 并分离单菌落, 由此得到转化体。从该转化体提取质粒, 并将插入目的 PCR 产物的质粒命名为 pBS4S:: Δ poxB。图 4 显示 pBS4S:: Δ poxB 的构建步骤。

[0170] (B) 制备 poxB- 破坏的菌株

[0171] 由上述 (A) 得到的 pBS4S:: Δ poxB 不包含能在棒状细菌的细胞中自主复制的区域。因此, 当以此质粒转化棒状细菌时, 其中将该质粒以同源重组整合入染色体的菌株出现转化体的频率非常低。使用高浓度的质粒 pBS4S:: Δ poxB 通过电脉冲方法转化实施例 2 中制备的乳发酵短杆菌 2256 Δ (1dh) 菌株, 然后铺于含有 25 μ g/ml 卡那霉素的 CM-Dex 培养基上, 然后在 31.5°C 培养大约 30 小时。在培养基上生长的菌株在基因组上含有卡那霉素抗性基因和源自质粒的 sacB 基因, 作为在质粒上的 poxB 基因片段和乳发酵短杆菌 2256 Δ (1dh) 菌株的基因组上的 poxB 基因之间进行同源重组的结果。

[0172] 然后, 将单交换重组体在 31.5°C 在不含有卡那霉素的 CM-Dex 液体培养基中培养过夜, 并在合适的稀释后, 将其铺于含有 10% 蔗糖而不含卡那霉素的 Dex-S10 培养基上, 然后在 31.5°C 培养大约 30 小时。

[0173] 结果, 得到大约 30 个菌株, 其被认为由于通过第二次同源重组消除 sacB 基因而成为蔗糖 - 不敏感的。

[0174] 所得到的菌株包括: 其中 poxB 基因被由 pBS4S:: Δ poxB 得到的突变型替代的菌株; 和其中 poxB 基因回复为野生型的菌株。poxB 基因是突变型还是野生型可通过直接将在 Dex-S10 琼脂培养基上培养得到的细菌菌株进行 PCR 并检测它们的 poxB 基因来容易地确认。通过使用引物 (SEQ ID NOS:29 和 32) 进行 PCR 扩增的 poxB 基因的分析, 对于野生型应产生 2.4kb 的 DNA 片段, 而对于具有缺失区的突变型应产生 1.2kb 的 DNA 片段。作为通过上述方法分析蔗糖 - 不敏感的菌株的结果, 选择只携带突变型基因的菌株并命名为 2256 Δ (1dh, poxB) 菌株。本文中, 也将该菌株称为 poxB- 破坏的菌株。

[0175] 实施例 4

[0176] < 通过 poxB- 破坏的菌株制备琥珀酸 >

[0177] (A) 评价 poxB- 破坏的菌株的培养

[0178] 将乳发酵短杆菌 2256 Δ (1dh) 菌株和 2256 Δ (1dh, poxB) 菌株用于如下的培养以制备琥珀酸。将通过在 CM-Dex 平板培养基上培养得到的 2256 Δ (1dh) 菌株和 2256 Δ (1dh, poxB) 菌株的细菌细胞接种到 3ml 的种子培养基 (20g/L 葡萄糖, 4g/L 脲, 14g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5g/L $\text{LK}_2\text{H}_2\text{PO}_4$, 0.5g/L K_2HPO_4 , 0.5g/L $\text{LMgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.02g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 μ g/L 生物素, 200 μ g/L $\text{VB}_1 \cdot \text{HCl}$, 1g/L 酵母提取物和 1g/L 酪蛋白氨基酸; 不调 pH; 葡萄糖在单独灭菌后加入)。在需氧条件下在试管中在 31.5°C 进行振荡培养大约 16 小时。

[0179] 此后, 在试管中加入 3ml 主要发酵培养基 (main medium) A (100g/L 葡萄糖, 15g/L 亚硫酸钠和 71.4g/L MgCO_3)。为了避免通气, 将管用硅帽密封来进行琥珀酸生产培养。通过在 31.5°C 振荡大约 48 小时来进行培养, 并在培养基中的糖耗尽之前终止。

[0180] 在培养完成后, 通过在将培养基适当稀释后进行液相色谱来分析培养基中琥珀酸

和副产物乙酸的积累量。使用通过连续连接两个 Shim-packSCR-102H(Shimadzu) 而得到的柱子,并且通过使用 5mM 对甲苯磺酸 (p-toluene sulfonic acid) 在 40℃洗脱样品。通过使用含 5mM 对甲苯磺酸和 100 μM EDTA 的 20mM Bis-Tris 水溶液来中和洗脱液。借助 CDD-10AD(Shimadzu) 通过测定电导率 (electric conductivity) 来分别测定琥珀酸和乙酸。得到的结果显示在表 1 和图 5 中。

[0181] 在 2256 Δ (ldh, poxB) 菌株中,琥珀酸产量与亲代菌株 2256 Δ (ldh) 相等,但乙酸相对于琥珀酸的比例为 2256 Δ (ldh, poxB) 菌株的大约 1/3 至 2/3。这些结果说明消除或降低 poxB 活性对于在厌氧条件下减少乙酸是有效的。

[0182] 表 1. 通过 poxB- 破坏的菌株产生的琥珀酸和乙酸和丙酮酸。

[0183]

	琥珀酸 (g/L)	乙酸 (g/L)	丙酮酸 (g/L)	丙酮酸 / 琥珀酸 (%)	乙酸 / 琥珀酸 (%)
2256 Δ ldh	38.5	3.6	8.2	21.4	9.4
	45.1	3.6	8.2	18.3	7.9
	42.2	3.5	8.5	20.1	8.2
2256 Δ (ldh, poxB)	42.0	2.3	9.6	22.8	5.4
	42.4	2.2	9.5	22.4	5.2
	35.7	2.6	9.1	25.5	7.3
	38.4	2.3	9.6	25.1	6.1
	40.9	2.3	9.7	23.7	5.7
	49.1	1.9	9.7	19.8	3.8
	51.3	1.5	8.8	17.2	2.9
	48.3	1.6	9.2	19.0	3.4
	51.2	1.9	8.8	17.2	3.6
	38.4	2.2	9.7	25.2	5.8
	43.8	2.4	9.5	21.8	5.5
	37.9	2.2	9.4	24.9	5.9

[0184] 实施例 5

[0185] < 构建 poxB, pta, ack- 破坏的菌株和 poxB, pta, ack, ach- 破坏的菌株 >

[0186] (5-1)< 构建乙酸激酶基因 - 破坏的菌株 >

[0187] (A) 克隆破坏乙酸激酶基因的片段

[0188] 使用根据已被公开的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032(GenBank Database 登录号 NC_003450 的 NCgl 2656 ;SEQ ID NO :45) 的基因设计的合成 DNAs 作为引物通过交换 PCR 获得其 ORF 已缺失的乳发酵短杆菌 2256 菌株的乙酸激酶基因 (在下文中,简称为 ack 基因) 的片段。即,使用乳发酵短杆菌 2256 菌株的基因组 DNA 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS :13 和 14 作为引物进行 PCR,由此得到 ack 基因 N- 末端区的扩增产物。在另一方面,为了获得 ack 基因 C- 末端区的扩增产物,使用乳发酵短杆菌 2256 菌株的基因组 DNA 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS :15 和 16 作为引物进行 PCR。SEQ ID NO :14 和 15 相互部分互补。使用 KOD-plus-(TOYOBO) 以这样的方式进行 PCR :进行 94℃保温 2 分钟的一个

循环,然后,对于 N-末端区,将 94℃变性 10 秒,55℃退火 30 秒和 68℃延伸 30 秒的循环,而对于 C-末端区,将 94℃变性 10 秒,55℃退火 30 秒和 68℃延伸 2 分钟的循环,分别重复 30 次。然后,为了获得其内部序列缺失的 ack 基因的片段,将上述 ack 的 N-末端和 C-末端区的基因产物以大约等摩尔的浓度混合,并使用该基因产物的混合物作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:17 和 18 作为引物进行 PCR,由此得到导入突变的 ack 基因的扩增产物。使用 KOD-plus-(TOYOBO) 以这样的方式进行 PCR:进行 94℃保温 2 分钟的一个循环,然后将 94℃变性 10 秒,55℃退火 30 秒和 68℃延伸 2.5 分钟的循环重复 30 次,由此得到导入突变的目的 ack 基因的扩增产物。

[0189] 通过常规方法纯化由此得到的 PCR 产物然后用 XbaI 消化,然后插入上述 pBS5T 中的 XbaI 位点。将大肠杆菌 JM109 (Takara Bio Inc.) 的感受态细胞用于以此 DNA 进行转化,并将转化的细胞铺于含有 100 μM IPTG, 40 μg/ml X-Gal, 和 25 μg/ml 卡那霉素的 LB 培养基上,然后过夜培养。之后,挑取呈现白色的菌落,并分离单菌落,由此得到转化体。从该转化体提取质粒,并将插入目的 PCR 产物的质粒命名为 pBS5T::Δack。图 6 显示 pBS5T::Δack 的构建步骤。

[0190] (B) 制备 ack-破坏的菌株

[0191] 由上述 (A) 得到的 pBS5T::Δack 中用于棒状细菌的复制起点是温度-敏感的。即,该质粒在 25℃在棒状细菌中是可自主复制的,但在 31.5℃(或 34℃)是不能自主复制的。使用该质粒通过电脉冲方法转化乳发酵短杆菌 2256 Δ(1dh) 菌株,并将转化的细胞铺于含有 25 μg/ml 卡那霉素的 CM-Dex 培养基上,然后在 25℃培养 2 夜。分离出现的菌落,由此得到转化体。该转化体含有质粒。将该转化体在 34℃在不含卡那霉素的 CM-Dex 培养基中过夜培养,然后在适当稀释后,将其铺于含有 25 μg/ml 卡那霉素的 CM-Dex 培养基上,然后在 34℃培养大约 30 小时。在培养基上生长的菌株在基因组上含有卡那霉素抗性基因和源自质粒的 sacB 基因,作为在质粒上的 ack 基因片段和乳发酵短杆菌 2256 Δ(1dh) 菌株的基因组上的 ack 基因之间进行同源重组的结果。

[0192] 然后,将单交换重组体在 31.5℃在不含有卡那霉素的 CM-Dex 液体培养基中培养过夜,并在合适的稀释后,将其铺于含有 10%蔗糖而不含卡那霉素的 Dex-S10 培养基上,然后在 31.5℃培养大约 30 小时。结果,得到大约 50 个菌株,其被认为由于通过第二次同源重组消除 sacB 基因而成为蔗糖-不敏感的。

[0193] 所得到的菌株包括:其中 ack 基因被由 pBS5T::Δack 得到的突变型替代的菌株;和其中 ack 基因回复为野生型的菌株。ack 基因是突变型还是野生型可通过直接将在 Dex-S10 琼脂培养基上培养得到的细菌菌株进行 PCR 并检测其 ack 基因来容易地确认。通过使用引物 (SEQ ID NOS:13 和 16) 用于 PCR 扩增的 ack 基因的分析,对于野生型应得到 3.7kb 的 DNA 片段,而对于具有缺失区的突变型得到 2.5kb 的 DNA 片段。作为通过上述方法分析蔗糖-不敏感的菌株的结果,选择只携带突变型基因的菌株并命名为 2256 Δ(1dh, ack)。

[0194] (5-2) < 构建乙酸激酶基因-和磷酸转乙酰酶基因-破坏的菌株 >

[0195] (A) 克隆用于破坏乙酸激酶基因和磷酸转乙酰酶基因的片段

[0196] 乳发酵短杆菌 2256 菌株的乙酸激酶基因 (ack) 和磷酸转乙酰酶基因 (在下文中,称为 pta) 的 ORFs 具有操纵子结构,并可同时使两个 ORFs 具有缺陷。使用根据已公开的谷

氨酸棒杆菌 ATCC13032 (GenBank Database 登录号 NC_003450 的 NCg12656 和 2657 ;SEQ ID NO :45) 的基因的核苷酸序列设计的合成 DNAs 作为引物通过交换 PCR 获得这些基因片段。即,使用乳发酵短杆菌 2256 菌株的基因组 DNA 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS :19 和 20 作为引物进行 PCR,由此得到 pta 基因 N- 末端区的扩增产物。在另一方面,为了获得 ack 基因 C- 末端区的扩增产物,使用乳发酵短杆菌 2256 的基因组 DNA 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS :21 和 16 作为引物进行 PCR。SEQ ID NO :20 和 21 相互部分互补。使用 KOD-plus-(TOYOBO) 以这样的方式进行 PCR :进行 94℃ 保温 2 分钟的一个循环,然后,对于 N- 末端区,将 94℃ 变性 10 秒,55℃ 退火 30 秒和 68℃ 延伸 30 秒的循环,而对于 C- 末端区,将 94℃ 变性 10 秒,55℃ 退火 30 秒和 68℃ 延伸 2 分钟的循环,分别重复 30 次。

[0197] 然后,为了获得 pta 和 ack 中的内部序列缺失的 pta-ack 基因的片段,将上述 pta 的 N- 末端区和 ack 的 C- 末端区的基因产物以大约等摩尔的浓度混合,并使用该混合物作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS :22 和 18 作为引物进行 PCR,由此得到导入突变的 pta-ack 基因的扩增产物。使用 KOD-plus-(TOYOBO) 以这样的方式进行 PCR :进行 94℃ 保温 2 分钟的一个循环,然后将 94℃ 变性 10 秒,55℃ 退火 30 秒和 68℃ 延伸 2.5 分钟的循环重复 30 次,由此得到导入突变的 pta-ack 基因的扩增产物。通过常规方法纯化由此得到的 PCR 产物然后用 XbaI 消化,然后插入 pBS5T 中的 XbaI 位点。将大肠杆菌 JM109 (Takara Bio Inc.) 的感受态细胞用于以此 DNA 进行转化,并铺于含有 100 μ M IPTG, 40 μ g/ml X-Gal, 和 25 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基上,然后过夜培养。之后,挑取呈现白色的菌落,并分离单菌落,由此得到转化体。从该转化体提取质粒,并将插入目的 PCR 产物的质粒命名为 pBS5T:: Δ pta-ack。图 7 显示 pBS5T:: Δ pta-ack 的构建步骤。

[0198] (B) 制备 pta-ack- 破坏的菌株

[0199] 由上述 (A) 得到的 pBS5T:: Δ pta-ack 中用于棒状细菌的复制起点是温度 - 敏感的。即,该质粒在 25℃ 在棒状细菌中是可自主复制的,但在 31.5℃ (或 34℃) 是不能自主复制的。使用该质粒通过电脉冲方法转化乳发酵短杆菌 2256 Δ (ldh) 菌株,并将转化的细胞铺于含有 25 μ g/ml 卡那霉素的 CM-Dex 培养基上,然后在 25℃ 培养 2 夜。分离出现的菌落,以由此得到转化体。该转化体含有质粒。将该转化体在 34℃ 在不含卡那霉素的 CM-Dex 液体培养基上过夜培养,然后在适当稀释后,将其铺于含有 25 μ g/ml 卡那霉素的 CM-Dex 液体培养基上,然后在 34℃ 培养大约 30 小时。在培养基上生长的菌株在基因组上含有卡那霉素抗性基因和源自质粒的 sacB 基因,作为在质粒上的 pta-ack 基因片段和乳发酵短杆菌 2256 Δ (ldh) 菌株的基因组上的 pta-ack 基因之间进行同源重组的结果。

[0200] 然后,将单交换重组体在 31.5℃ 在不含有卡那霉素的 CM-Dex 液体培养基中培养过夜,并在合适的稀释后,将其铺于含有 10% 蔗糖而不含卡那霉素的 Dex-S10 培养基上,然后在 31.5℃ 培养大约 30 小时。结果,得到大约 50 个菌株,其被认为由于通过第二次同源重组消除 sacB 基因而成为蔗糖 - 不敏感的。

[0201] 所得到的菌株包括 :其中 pta 和 ack 基因被由 pBS5T:: Δ pta-ack 得到的突变型替代的菌株 ;和其中 pta 和 ack 基因回复为野生型的菌株。pta-ack 基因是突变型还是野生型可通过直接将在 Dex-S10 琼脂培养基上培养得到的细菌菌株进行 PCR 并检测其 pta 和 ack 基因来容易地确认。通过使用引物 (SEQ ID NOS :19 和 16) 用于 PCR 扩增的 pta-ack 基因的分析,对于野生型应得到 5.0kb 的 DNA 片段,而对于具有缺失区的突变型得到 2.7kb 的 DNA

片段。

[0202] 作为通过上述方法分析蔗糖 - 不敏感的菌株的结果,选择只携带突变型基因的菌株并命名为 2256 Δ (ldh,pta,ack)。

[0203] (5-3) < 构建乙酸激酶基因 -、磷酸转乙酰酶基因 -、丙酮酸氧化酶基因 - 破坏的菌株 >

[0204] (A) 克隆用于破坏丙酮酸氧化酶基因的片段

[0205] 使用根据已被公开的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 (GenBank Database 登录号 NC_003450 的 NCg12521 ;SEQ ID NO :48) 的基因的核苷酸序列设计的合成 DNAs 作为引物通过交换 PCR 获得其 ORF 已缺失的乳发酵短杆菌 2256 菌株的丙酮酸氧化酶基因 (在下文中,简称为 poxB 基因) 的片段。即,使用乳发酵短杆菌 2256 菌株的基因组 DNA 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS :23 和 24 作为引物进行 PCR,由此得到 poxB 基因 N- 末端区的扩增产物。

[0206] 在另一方面,为了获得 poxB 基因 C- 末端区的扩增产物,使用乳发酵短杆菌 2256 菌株的基因组 DNA 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS :25 和 26 作为引物进行 PCR。SEQ ID NO :24 和 25 相互互补。使用 KOD-plus-(TOYOBO) 以这样的方式进行 PCR :进行 94℃ 保温 2 分钟的一个循环,然后,对于 N- 末端区和 C- 末端区,将 94℃ 变性 10 秒,55℃ 退火 30 秒和 68℃ 延伸 40 秒的循环重复 30 次。然后,为了获得其内部序列缺失的 poxB 基因的片段,将上述 poxB 的 N- 末端和 C- 末端区的基因产物以大约等摩尔的浓度混合,并使用该混合物作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS :27 和 28 作为引物进行 PCR,由此得到导入突变的 poxB 基因的扩增产物。使用 KOD-plus-(TOYOBO) 以这样的方式进行 PCR :进行 94℃ 保温 2 分钟的一个循环,然后将 94℃ 变性 10 秒,55℃ 退火 30 秒和 68℃ 延伸 70 秒的循环重复 30 次,由此得到导入突变的目的 poxB 基因的扩增产物。

[0207] 通过常规方法纯化由此得到的 PCR 产物然后用 XbaI 消化,然后插入如上所述 pBS5T 的 XbaI 位点。将大肠杆菌 JM109 (Takara Bio Inc.) 的感受态细胞用于以此 DNA 进行转化,并将转化的细胞铺于含有 100 μ M IPTG, 40 μ g/ml X-Gal, 和 25 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基上,然后过夜培养。之后,挑取呈现白色的菌落,并分离单菌落,由此得到转化体。从该转化体提取质粒,并将插入目的 PCR 产物的质粒命名为 pBS5T:: Δ poxB。图 8 显示 pBS5T:: Δ poxB 的构建步骤。

[0208] (B) 制备 poxB- 破坏的菌株

[0209] 如上所述在实施例 5 (5-3) (A) 中得到的 pBS5T:: Δ poxB 中用于棒状细菌的复制起点是温度 - 敏感的。即,该质粒在 25℃ 在棒状细菌中是可自主复制的,但在 31.5℃ (或 34℃) 是不能自主复制的。使用该质粒通过电脉冲方法转化乳发酵短杆菌 2256 Δ (ldh,pta,ack) 菌株,并铺于含有 25 μ g/ml 卡那霉素的 CM-Dex 培养基上,然后在 25℃ 培养 2 夜。分离出现的菌落,以由此得到转化体。该转化体应含有所述质粒。

[0210] 将该转化体在 34℃ 在不含卡那霉素的 CM-Dex 液体培养基上过夜培养,然后在适当稀释后,将其铺于含有 25 μ g/ml 卡那霉素的 CM-Dex 培养基上,然后在 34℃ 培养大约 30 小时。在培养基上生长的菌株中,将卡那霉素抗性基因和源自质粒的 sacB 基因插入染色体,作为在质粒上的 poxB 基因片段和乳发酵短杆菌 2256 Δ (ldh,pta,ack) 菌株的基因组上的 poxB 基因之间进行同源重组的结果。

[0211] 然后,将单交换重组体在 31.5℃在不含有卡那霉素的 CM-Dex 液体培养基中培养过夜,并在合适的稀释后,将其铺于含有 10%蔗糖而不含卡那霉素的 Dex-S10 培养基上,然后在 31.5℃培养大约 30 小时。结果,得到大约 50 个菌株,其被认为由于通过第二次同源重组消除 sacB 基因而成为蔗糖 - 不敏感的。

[0212] 所得到的菌株包括:其中 poxB 基因被由 pBS5T:: Δ poxB 得到的突变型替代的菌株;和其中 poxB 基因回复为野生型的菌株。poxB 基因是突变型还是野生型可通过直接将在 Dex-S10 琼脂培养基中培养得到的细菌菌株进行 PCR 并检测其 poxB 基因来容易地确认。通过使用引物 (SEQ ID NOS:23 和 26) 用于 PCR 扩增的 poxB 基因的分析,对于野生型可检测到 2.4kb 的 DNA 片段,而对于具有缺失区的突变型检测到 1.2kb 的 DNA 片段。作为通过上述方法分析蔗糖 - 不敏感的菌株的结果,选择只携带突变型基因的菌株并命名为 2256 Δ (ldh, pta, ack, poxB)。本文中,也将该菌株称为 pta, ack, poxB- 破坏的菌株。

[0213] (5-4) < 构建 poxB, pta, ack, ach 基因 - 破坏的菌株 >

[0214] (A) 克隆用于破坏乙酰辅酶 A 水解酶基因的片段

[0215] 使用根据已被公开的谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 (GenBank Database 登录号 NC_003450 的 NCg12480 ;SEQ ID NO:50) 的基因的核苷酸序列设计的合成 DNAs 作为引物通过交换 PCR 获得其 ORF 已缺失的乳发酵短杆菌 2256 菌株的乙酰辅酶 A 水解酶基因 (在下文中,简称为 ach 基因) 的片段。即,使用乳发酵短杆菌 2256 菌株的基因组 DNA 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:35 和 36 作为引物进行 PCR,由此得到 ach 基因 C- 末端区的扩增产物。在另一方面,为了获得 ach 基因 N- 末端区的扩增产物,使用乳发酵短杆菌 2256 的基因组 DNA 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:37 和 38 作为引物进行 PCR。SEQ ID NO:36 和 37 相互互补。使用 KOD-plus-(TOYOBO) 以这样的方式进行 PCR:进行 94℃保温 2 分钟的一个循环,然后,对于 N- 末端区和 C- 末端区,将 94℃变性 10 秒,55℃退火 30 秒和 68℃延伸 50 秒的循环重复 30 次。然后,为了获得其内部序列缺失的 ach 基因的片段,将上述 ach 的 N- 末端和 C- 末端区的基因产物以大约等摩尔的浓度混合,并使用该混合物作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:39 和 40 作为引物进行 PCR,由此得到导入突变的 ach 基因的扩增产物。使用 KOD-plus-(TOYOBO) 以这样的方式进行 PCR:进行 94℃保温 2 分钟的一个循环,然后将 94℃变性 10 秒,55℃退火 30 秒和 68℃延伸 90 秒的循环重复 30 次,由此得到导入突变的 ach 基因的扩增产物。通过常规方法纯化由此得到的 PCR 产物然后用 XbaI 消化,然后插入如上所述在实施例 1 (B) 中构建的 pBS4S 的 XbaI 位点。将大肠杆菌 JM109 (Takara Bio Inc.) 的感受态细胞用于以此 DNA 进行转化,并铺于含有 100 μ M IPTG, 40 μ g/ml X-Gal, 和 25 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基上,然后过夜培养。之后,挑取呈现白色的菌落,并分离单菌落,由此得到转化体。从该转化体提取质粒,并将插入目的 PCR 产物的质粒命名为 pBS4S:: Δ ach。图 9 显示 pBS4S:: Δ ach 的构建步骤。

[0216] (B) 制备 ach- 破坏的菌株

[0217] 由上述 (A) 得到的 pBS4S:: Δ ach 不包含能在棒状细菌的细胞中自主复制的区域,因此,当以此质粒转化棒状细菌时,其中将该质粒以同源重组整合入染色体的菌株出现转化体的频率非常低。使用高浓度的质粒 pBS4S:: Δ ach 通过电脉冲方法转化乳发酵短杆菌 2256 Δ (ldh, pta, ack, poxB) 菌株和 2256 菌株,并铺于含有 25 μ g/ml 卡那霉素的 CM-Dex 培养基上,然后在 31.5℃培养大约 30 小时。在生长于培养基上菌株中,卡那霉素抗

性基因和源自质粒的 *sacB* 基因插在染色体上,作为在质粒上的 *ach* 基因片段和乳发酵短杆菌 2256 Δ (*ldh*) 菌株、2256 Δ (*ldh*, *pta*, *ack*) 菌株、2256 Δ (*ldh*, *pta*, *ack*, *poxB*) 菌株和 2256 Δ (*ldh*, *pta*, *ack*, *poxB*, *acp*) 菌株中每种基因组上的 *ach* 基因之间进行同源重组的结果。

[0218] 然后,将单交换重组体在 31.5°C 在不含有卡那霉素的 CM-Dex 液体培养基中培养过夜,并在合适的稀释后,将其铺于含有 10% 蔗糖而不含卡那霉素的 Dex-S10 培养基上,然后在 31.5°C 培养大约 30 小时。结果,得到大约 50 个菌株,其被认为由于通过第二次同源重组消除 *sacB* 基因而成为蔗糖 - 不敏感的。

[0219] 所得到的菌株包括:其中 *ach* 基因被由 pBS4S:: Δ *ach* 得到的突变型替代的菌株;和其中 *ach* 基因回复为野生型的菌株。*ach* 基因是突变型还是野生型可通过直接将在 Dex-S10 琼脂培养基上培养得到的细菌菌株进行 PCR 并检测 *ach* 基因来容易地确认。通过使用引物 (SEQ ID NOS:35 和 38) 用于 PCR 扩增的 *ach* 基因的分析,对于野生型应得到 2.9kb 的 DNA 片段,而对于具有缺失区的突变型得到 1.4kb 的 DNA 片段。作为通过上述方法分析蔗糖 - 不敏感的菌株的结果,选择只携带突变型基因的菌株并将由 2256 Δ (*ldh*, *pta*, *ack*, *poxB*) 得到的菌株命名为 2256 Δ (*ldh*, *pta*, *ack*, *poxB*, *ach*)。本文中,也将该菌株称为 *ach*, *pta*, *ack*, *poxB*- 破坏的菌株。

[0220] 实施例 6

[0221] < 构建酰基磷酸酶基因 - 破坏的菌株 >

[0222] (A) 克隆用于破坏酰基磷酸酶基因的片段

[0223] 使用根据核苷酸序列 (SEQ ID NO:52) 设计的合成 DNAs 作为引物通过交换 PCR 获得其 ORF 已缺失的乳发酵短杆菌 2256 菌株的酰基磷酸酶基因 (在下文中,称为 *acp* 基因) 的基因片段,所述核苷酸序列由通过基因组分析确定的乳发酵短杆菌 ATCC13869 菌株序列中的搜索得到作为与结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的 *acp* 基因具有高同源性的序列。即,使用乳发酵短杆菌 2256 菌株的基因组 DNA 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:54 和 55 作为引物进行 PCR,由此得到 *acp* 基因 C- 末端区的扩增产物。在另一方面,为了获得 *acp* 基因 N- 末端区的扩增产物,使用乳发酵短杆菌 2256 菌株的基因组 DNA 作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:56 和 57 作为引物进行 PCR。SEQ ID NO:55 和 56 相互互补。使用 KOD-plus-(TOYOBO) 以这样的方式进行 PCR:进行 94°C 保温 2 分钟的一个循环,然后,对于 N- 末端区和 C- 末端区,将 94°C 变性 10 秒,55°C 退火 30 秒和 68°C 延伸 35 秒的循环重复 30 次。然后,为了获得其内部序列缺失的 *acp* 基因的片段,将上述 *acp* 的 N- 末端和 C- 末端区的基因产物以大约等摩尔的浓度混合,并使用该混合物作为模板以及合成的 DNAs SEQ ID NOS:58 和 59 作为引物进行 PCR,由此得到导入突变的 *acp* 基因的扩增产物。使用 KOD-plus-(TOYOBO) 以这样的方式进行 PCR:进行 94°C 保温 2 分钟的一个循环,然后将 94°C 变性 10 秒,55°C 退火 30 秒和 68°C 延伸 60 秒的循环重复 30 次,由此得到导入突变的 *acp* 基因的扩增产物。

[0224] 通过常规方法纯化由此得到的 PCR 产物然后用 *Xba*I 消化,然后插入如上所述 pBS5T 的 *Xba*I 位点。将大肠杆菌 JM109 (Takara Bio Inc.) 的感受态细胞用于以此 DNA 进行转化,并铺于含有 100 μ M IPTG, 40 μ g/ml X-Gal, 和 25 μ g/ml 卡那霉素的 LB 培养基上,然后过夜培养。之后,挑取呈现白色的菌落,并分离单菌落,由此得到转化体。从该转化体

提取质粒,并将插入目的 PCR 产物的质粒命名为 pBS5T:: Δ acp。图 10 显示 pBS5T:: Δ acp 的构建步骤。

[0225] (B) 制备 acp- 破坏的菌株

[0226] 由上述 (A) 得到的 pBS5T:: Δ acp 不包含能在棒状细菌的细胞中自主复制的区域,因此,当以此质粒转化棒状细菌时,其中将该质粒以同源重组整合入染色体的菌株出现转化体的频率非常低。使用高浓度的质粒 pBS5T:: Δ acp 通过电脉冲方法转化乳发酵短杆菌 2256 Δ (ldh, pta, ack, poxB) 菌株,并铺于含有 25 μ g/ml 卡那霉素的 CM-Dex 培养基上,然后在 31.5 $^{\circ}$ C 培养大约 30 小时。在培养基上生长的菌株中,卡那霉素抗性基因和源自质粒的 sacB 基因插在染色体上,作为在质粒上的 acp 基因片段和乳发酵短杆菌 2256 Δ (ldh, pta, ack, poxB) 菌株的基因组上的 acp 基因之间进行同源重组的结果。

[0227] 然后,将单交换重组体在 31.5 $^{\circ}$ C 在不含有卡那霉素的 CM-Dex 液体培养基中培养过夜,并在合适的稀释后,将其铺于含有 10% 蔗糖而不含卡那霉素的 Dex-S10 培养基上,然后在 31.5 $^{\circ}$ C 培养大约 30 小时。结果,得到大约 50 个菌株,其被认为由于通过第二次同源重组消除 sacB 基因而成为蔗糖 - 不敏感的。

[0228] 所得到的菌株包括:其中 acp 基因被由 pBS5T:: Δ acp 得到的突变型替代的菌株;和其中 acp 基因回复为野生型的菌株。acp 基因是突变型还是野生型可通过直接将在 Dex-S10 琼脂培养基上培养得到的细菌菌株进行 PCR 并检测 acp 基因来容易地确认。通过使用引物 (SEQ ID NOS:54 和 57) 用于 PCR 扩增的 acp 基因的分析,对于野生型应得到 1.3kb 的 DNA 片段,而对于具有缺失区的突变型得到 1.0kb 的 DNA 片段。作为通过上述方法分析蔗糖 - 不敏感的菌株的结果,选择只携带突变型基因的菌株并命名为 2256 Δ (ldh, pta, ack, poxB, acp) 菌株。

[0229] 实施例 7

[0230] <7-1> 评价 ach, pta, ack, poxB- 破坏的菌株和 pta, ack, poxB- 破坏的菌株的培养

[0231] 将乳发酵短杆菌 2256 Δ (ldh) 菌株、2256 Δ (ldh, pta-ack, poxB) 菌株和 2256 Δ (ldh, pta-ack, poxB, ach) 菌株用于如下的培养以生产琥珀酸。将通过在 CM-Dex 平板培养基上培养得到的 2256 Δ (ldh) 菌株、2256 Δ (ldh, pta-ack, poxB) 菌株和 2256 Δ (ldh, pta-ack, poxB, ach) 菌株的细菌细胞接种到 3ml 的种子培养基 B(10g/L 葡萄糖, 2.5g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.5g/L KH_2PO_4 , 0.25g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2g/L 脲, 0.01g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 50 μ g/L 生物素, 100 μ g/L VB1.HCl, 15mg/L 原儿茶酸 (protocatechuic acid), 0.02mg/L CuSO_4 , 和 10mg/L CaCl_2 , 及 pH 7.0 (KOH))。在需氧条件下在试管中在 31.5 $^{\circ}$ C 进行振荡培养大约 15 小时。

[0232] 此后,在试管中加入 3ml 主要发酵培养基 (main medium) B(70g/L 葡萄糖, 5g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2g/L KH_2PO_4 , 3g/L 脲, 0.01g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.01g/L $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 200 μ g/L 生物素, 200 μ g/L VB1.HCl, 40g/L MOPS, 50g/L MgCO_3 , 及 pH 6.8 (NaOH))。为了避免通气,将管用硅帽密封来进行琥珀酸生产培养。通过在 31.5 $^{\circ}$ C 振荡大约 24 小时来进行培养,并在培养基中的糖耗尽之前终止。

[0233] 在培养完成后,将培养基适当稀释后通过液相色谱来分析培养基中琥珀酸和副产物乙酸的积累量。使用通过连续连接两个 Shim-pack SCR-102H (Shimadzu) 而得到的

柱子,并且通过使用 5mM 对甲苯磺酸 (p-toluene sulfonicacid) 在 40℃洗脱样品。通过使用含 5mM 对甲苯磺酸和 100 μ M EDTA 的 20mM Bis-Tris 水溶液来中和洗脱液。借助 CDD-10AD(Shimadzu) 通过测定电导率 (electric conductivity) 来分别测定琥珀酸和乙酸。得到的结果显示在表 2 中。

[0234] 与对照 2256 Δ 1dh 菌株相比,2256 Δ (1dh, pta-ack, poxB) 菌株中的乙酸急剧减少,而且 2256 Δ (1dh, pta, ack, ach, poxB) 菌株中的乙酸与 2256 Δ (1dh, pta, ack, poxB) 菌株相比进一步减少,即,减少大约 40%。这些结果说明同时消除或减少 poxB、pta-ack 和 ach 的全部活性或活性中任一种对于减少乙酸是有效的。

[0235] 表 2. 在 ACH、PTA、ACK 和 POXB 已联合破坏的菌株中生产琥珀酸和乙酸的产生。

[0236]

菌株	OD _{620nm} (×51)	消耗的糖 (g/L)	琥珀酸的收率 (%)	乙酸 (/ 琥珀酸, %)
2256 Δ 1dh	0.342	31.8	57.3	11.9
2256 Δ (1dh, pta, ack, poxB)	0.382	36.6	56.2	8.4
2256 Δ (1dh, pta, ack, poxB, ach)	0.372	39.8	56.1	3.6

[0237] <7-2> 评价 pta, ack, poxB, acp- 破坏的菌株的培养

[0238] 将乳发酵短杆菌 2256 Δ (1dh) 菌株、2256 Δ (1dh, pta, ack, poxB) 菌株和 2256 Δ (1dh, pta-ack, poxB, acp) 菌株用于如下的培养以生产琥珀酸。将通过在 CM-Dex 平板培养基上培养得到的 2256 Δ (1dh) 菌株、2256 Δ (1dh, pta, ack, poxB) 菌株和 2256 Δ (1dh, pta-ack, poxB, acp) 菌株的细菌细胞接种到 3ml 的上述种子培养基 B 中。在需氧条件下在试管中在 31.5℃进行振荡培养大约 15 小时。

[0239] 此后,在试管中加入 3ml 上述的发酵培养基 B。为了避免通气,将管用硅帽密封来进行琥珀酸生产培养。通过在 31.5℃振荡大约 24 小时来进行培养,并在培养基中的糖耗尽之前终止。

[0240] 在培养完成后,将培养基适当稀释后通过液相色谱来分析培养基中琥珀酸和副产物乙酸的积累量。使用通过连续连接两个 Shim-pack SCR-102H(Shimadzu) 而得到的柱子,并且通过使用 5mM 对甲苯磺酸在 40℃洗脱样品。通过使用含 5mM 对甲苯磺酸和 100 μ M EDTA 的 20mM Bis-Tris 水溶液来中和洗脱液。借助 CDD-10AD (Shimadzu) 通过测定电导率来分别测定琥珀酸和副产物乙酸。得到的结果显示在表 3 中。

[0241] 表 3. 在 pta、ack、poxB 和 acp 已联合破坏的菌株中琥珀酸和乙酸的产生

[0242]

菌株	OD ₆₂₀ (×51)	消耗的糖 (g/L)	琥珀酸的收率 (%)	乙酸 (/ 琥珀酸, %)
2256 Δ ldh	0.333	45.9	49.2	10.4
2256 Δ (ldh, pta, ack, poxB)	0.307	40.7	45.2	8.9
2256 Δ (ldh, pta, ack, poxB, acp)	0.341	44.3	46.0	8.8

[0243] 结果,即使当 ACH 活性不像上述 (C) 中降低或消除时,通过降低或消除 PTA、ACK 和 POXB 的全部活性,乙酸相对于琥珀酸的比例轻微减少。在另一方面,降低或消除 ACP 活性对于乙酸和琥珀酸的生产几乎没有影响。

[0244] 工业适用性

[0245] 本发明用于琥珀酸的发酵生产。生产琥珀酸用作生物可降解聚合物、食品、药物、化妆品等的原料。

[0001]

序列表

<110>	味之素株式会社(Ajinomoto Co., Inc) 三菱化学株式会社(Mitsubishi Chemical Corporation)	
<120>	生产琥珀酸的细菌和生产琥珀酸的方法	
<130>	C438-C5047	
<150>	JP 2004-150672	
<151>	2004-05-20	
<160>	61	
<170>	PatentIn version 3.1	
<210>	1	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	1	
	cgggatcctt tttaaccat caca	24
<210>	2	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	2	
	gaagatcttc aaaaggtag gaatacgt	29
<210>	3	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	3	
	ccttttgaag atcgaccagt tgg	23
<210>	4	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	

[0002]

<400> 4	
tacctggaat gctgttttcc cagggatcgc agtggtagt aacc	44
<210> 5	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 5	
cctgggaaaa cagcattcca ggtattag	28
<210> 6	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 6	
tgcaggtcga ctctagagga tcc	23
<210> 7	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 7	
cactgcacgg ccctgcgaac	20
<210> 8	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 8	
gcgccaactag gcgcaaaaa ttctgattt ccctaaccgg ac	42
<210> 9	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	

[0003]

<223> 引物	
<400> 9 gtccggtttag ggaaatcagg aatttttggc gcctagttag cg	42
<210> 10 <211> 20 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 引物	
<400> 10 tgtgggccctt cggcgaggac	20
<210> 11 <211> 26 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 引物	
<400> 11 gagtcgaccg caccatatt ttcata	26
<210> 12 <211> 28 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 引物	
<400> 12 tggtcgacgt gaatgctcgg cgggatcc	28
<210> 13 <211> 24 <212> DNA <213> 人工的	
<220> <223> 引物	
<400> 13 cttccatctt cctcatggtg ctgc	24
<210> 14 <211> 44 <212> DNA <213> 人工的	

[0004]

<220>		
<223>	引物	
<400>	14	
ccaggagagc taagcgaact ccattagctg cgtcctcctg cctg		44
<210>	15	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	15	
caggcaggag gacgcageta atggagttcg cttagctctc ctgg		44
<210>	16	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	16	
gcgtctagac ctttaggagt gcgatgtccc c		31
<210>	17	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	17	
gcgtctagac gactgtgctg ttaacccgaa ccc		33
<210>	18	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	18	
gcgtctagag agttaggccc ttagaagcga ttc		33
<210>	19	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工的	

[0005]

<220>		
<223>	引物	
<400>	19	
gctcaaagcg tgggaattgag atcg		24
<210>	20	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	20	
ccaggagagc taagcgaact ttcggcgctc atgactggtt cg		42
<210>	21	
<211>	42	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	21	
cgaaccagtc atgagcgccg aaagttcgct tagctctcct gg		42
<210>	22	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	22	
gcgtctagag tacgcaaggc ggacgaacgc		30
<210>	23	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	23	
gccttgatat cticcgcga acc		23
<210>	24	
<211>	47	
<212>	DNA	

[0006]

<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 24	
cttgtgggtcc tggaaacaca caccgaagtg aatttcgcag agattgc	47
<210> 25	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 25	
cgcaatctct gcgaaattca ctctgggtgtg tgtttccagg accacaag	48
<210> 26	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 26	
ggtttctcgg ggtctaaacc gg	22
<210> 27	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 27	
gggaatctag accacgcca tggaaatttc tcc	33
<210> 28	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 28	
gggaatctag acgtgacaag atctggcgaa atcgc	35
<210> 29	
<211> 23	

[0007]

<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 29	
gccttgatat cttcccgcaa acc	23
<210> 30	
<211> 47	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 30	
cttgtgggcc tggaaacaca caccgaagtg aatttcgcag agattgc	47
<210> 31	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 31	
cgcattctct gcgaaattca cttegggtg tggtttccagg accacaag	48
<210> 32	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 32	
ggtttctcgg ggtctaaacc gg	22
<210> 33	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工的	
<220>	
<223> 引物	
<400> 33	
gggaattctag accacgcca tggaaatttc tcc	33
<210> 34	

[0008]

<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	34	
	gggaatctag acgtgacaag atctggcgaa atcgc	35
<210>	35	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	35	
	gcttctgcgc aaagcaagcc tccg	24
<210>	36	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	36	
	gtccgattac ctgaggaggt attcccatga aggcataagt tttttcttgg	50
<210>	37	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	37	
	ccaagaaaaa acctatgcct tcatgggaat acctcctcag gtaatcggac	50
<210>	38	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	38	
	ggtcatgtgc atggttttct cattgc	26

[0009]

<210>	39	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	39	
	ggcctctaga cctgcaccga tcaggatgag tgg	33
<210>	40	
<211>	35	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	40	
	gcgctctaga ctcaacaaga gcacgcgcag tcacc	35
<210>	41	
<211>	2014	
<212>	DNA	
<213>	枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(464)..(1885)	
<223>		
<400>	41	
	gaccccttttt aacccatcac atatacctgc cgttcactat tatttagtga aatgagatat	60
	tatgatatttt tctgaattgt gattaaaaag gcaactttat gcccattgcaa cagaaactat	120
	aaaaaataca gagaatgaaa agaaacagat agatttttta gttcttttagg cccgtagtct	180
	gcaaatcctt ttatgatattt ctatcaaaca aaagaggaaa atagaccagt tgcaatccaa	240
	acgagagtct aatagaatga ggtcgaaaag taaatcgcg gggtttgtta ctgataaagc	300
	aggcaagacc taaaatgtgt aaaggcaca gtgtatactt tggcgtcacc ccttacatat	360
	tttaggtctt tttttattgt gcgtaactaa cttgccatct tcaaacagga gggtggaag	420
	aagcagaccg ctaacacagt acataaaaaa ggagacatga acg atg aac atc aaa	475
		Met Asn Ile Lys
		1
	aag ttt gca aaa caa gca aca gta tta acc ttt act acc gca ctg ctg	523
	Lys Phe Ala Lys Gln Ala Thr Val Leu Thr Phe Thr Thr Ala Leu Leu	
	5 10 15 20	
	gca gga ggc gca act caa gcg ttt gcg aaa gaa acg aac caa aag cca	571
	Ala Gly Gly Ala Thr Gln Ala Phe Ala Lys Glu Thr Asn Gln Lys Pro	
	25 30 35	
	tat aag gaa aca tac ggc att tcc cat att aca cgc cat gat atg ctg	619
	Tyr Lys Glu Thr Tyr Gly Ile Ser His Ile Thr Arg His Asp Met Leu	
	40 45 50	
	caa atc cct gaa cag caa aaa aat gaa aaa tat caa gtt cct gaa ttc	667
	Gln Ile Pro Glu Gln Gln Lys Asn Glu Lys Tyr Gln Val Pro Glu Phe	
	55 60 65	
	gat tcg tcc aca att aaa aat atc tct tct gca aaa ggc ctg gac gtt	715
	Asp Ser Ser Thr Ile Lys Asn Ile Ser Ser Ala Lys Gly Leu Asp Val	

[0010]

70	75	80	
tgg gac agc tgg cca tta caa aac gct gac ggc act gtc gca aac tat			763
Trp Asp Ser Trp Pro Leu Gln Asn Ala Asp Gly Thr Val Ala Asn Tyr			
85	90	95	100
cac ggc tac cac atc gtc ttt gca tta gcc gga gat cct aaa aat gcg			811
His Gly Tyr His Ile Val Phe Ala Leu Ala Gly Asp Pro Lys Asn Ala			
105	110	115	
gat gac aca tcg att tac atg ttc tat caa aaa gtc ggc gaa act tct			859
Asp Asp Thr Ser Ile Tyr Met Phe Tyr Gln Lys Val Gly Glu Thr Ser			
120	125	130	
att gac agc tgg aaa aac gct ggc cgc gtc ttt aaa gac agc gac aaa			907
Ile Asp Ser Trp Lys Asn Ala Gly Arg Val Phe Lys Asp Ser Asp Lys			
135	140	145	
ttc gat gca aat gat tct atc cta aaa gac caa aca caa gaa tgg tca			955
Phe Asp Ala Asn Asp Ser Ile Leu Lys Asp Gln Thr Gln Glu Trp Ser			
150	155	160	
ggt tca gcc aca ttt aca tct gac gga aaa atc cgt tta ttc tac act			1003
Gly Ser Ala Thr Phe Thr Ser Asp Gly Lys Ile Arg Leu Phe Tyr Thr			
165	170	175	180
gat ttc tcc ggt aaa cat tac ggc aaa caa aca ctg aca act gca caa			1051
Asp Phe Ser Gly Lys His Tyr Gly Lys Gln Thr Leu Thr Thr Ala Gln			
185	190	195	
ggt aac gta tca gca tca gac agc tct ttg aac atc aac ggt gta gag			1099
Val Asn Val Ser Ala Ser Asp Ser Ser Leu Asn Ile Asn Gly Val Glu			
200	205	210	
gat tat aaa tca atc ttt gac ggt gac gga aaa acg tat caa aat gta			1147
Asp Tyr Lys Ser Ile Phe Asp Gly Asp Gly Lys Thr Tyr Gln Asn Val			
215	220	225	
cag cag ttc atc gat gaa ggc aac tac agc tca ggc gac aac cat acg			1195
Gln Gln Phe Ile Asp Glu Gly Asn Tyr Ser Ser Gly Asp Asn His Thr			
230	235	240	
ctg aga gat cct cac tac gta gaa gat aaa ggc cac aaa tac tta gta			1243
Leu Arg Asp Pro His Tyr Val Glu Asp Lys Gly His Lys Tyr Leu Val			
245	250	255	260
ttt gaa gca aac act gga act gaa gat ggc tac caa ggc gaa gaa tct			1291
Phe Glu Ala Asn Thr Gly Thr Glu Asp Gly Tyr Gln Gly Glu Glu Ser			
265	270	275	
tta ttt aac aaa gca tac tat ggc aaa agc aca tca ttc ttc cgt caa			1339
Leu Phe Asn Lys Ala Tyr Tyr Gly Lys Ser Thr Ser Phe Phe Arg Gln			
280	285	290	
gaa agt caa aaa ctt ctg caa agc gat aaa aaa cgc acg gct gag tta			1387
Glu Ser Gln Lys Leu Leu Gln Ser Asp Lys Lys Arg Thr Ala Glu Leu			
295	300	305	
gca aac ggc gct ctc ggt atg att gag cta aac gat gat tac aca ctg			1435
Ala Asn Gly Ala Leu Gly Met Ile Glu Leu Asn Asp Asp Tyr Thr Leu			
310	315	320	
aaa aaa gtg atg aaa ccg ctg att gca tct aac aca gta aca gat gaa			1483
Lys Lys Val Met Lys Pro Leu Ile Ala Ser Asn Thr Val Thr Asp Glu			
325	330	335	340
att gaa cgc gcg aac gtc ttt aaa atg aac ggc aaa tgg tac ctg ttc			1531
Ile Glu Arg Ala Asn Val Phe Lys Met Asn Gly Lys Trp Tyr Leu Phe			
345	350	355	
act gac tcc cgc gga tca aaa atg acg att gac ggc att acg tct aac			1579
Thr Asp Ser Arg Gly Ser Lys Met Thr Ile Asp Gly Ile Thr Ser Asn			
360	365	370	
gat att tac atg ctt ggt tat gtt tct aat tct tta act ggc cca tac			1627
Asp Ile Tyr Met Leu Gly Tyr Val Ser Asn Ser Leu Thr Gly Pro Tyr			
375	380	385	
aag ccg ctg aac aaa act ggc ctt gtg tta aaa atg gat ctt gat cct			1675

[0011]

```

Lys Pro Leu Asn Lys Thr Gly Leu Val Leu Lys Met Asp Leu Asp Pro
390                      395                      400
aac gat gta acc ttt act tac tca cac ttc gct gta cct caa gcg aaa    1723
Asn Asp Val Thr Phe Thr Tyr Ser His Phe Ala Val Pro Gln Ala Lys
405                      410                      415                      420
gga aac aat gtc gtg att aca agc tat atg aca aac aga gga ttc tac    1771
Gly Asn Asn Val Val Ile Thr Ser Tyr Met Thr Asn Arg Gly Phe Tyr
                      425                      430                      435
gca gac aaa caa tca acg ttt gcg cca agc ttc ctg ctg aac atc aaa    1819
Ala Asp Lys Gln Ser Thr Phe Ala Pro Ser Phe Leu Leu Asn Ile Lys
                      440                      445                      450
ggc aag aaa aca tct gtt gtc aaa gac agc atc ctt gaa caa gga caa    1867
Gly Lys Lys Thr Ser Val Val Lys Asp Ser Ile Leu Glu Gln Gly Gln
                      455                      460                      465
tta aca gtt aac aaa taa aaacgcaaaa gaaaatgccg atatcctatt    1915
Leu Thr Val Asn Lys
470
ggcattttct tttattttct atcaacataa aggtgaatcc catatgaact atataaaagc    1975
aggcaaatgg ctaaccgtat tcctaaccit ttgaagatc    2014

```

<210> 42
 <211> 473
 <212> PRT
 <213> 枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)

```

<400> 42
Met Asn Ile Lys Lys Phe Ala Lys Gln Ala Thr Val Leu Thr Phe Thr
1                      5                      10                      15
Thr Ala Leu Leu Ala Gly Gly Ala Thr Gln Ala Phe Ala Lys Glu Thr
                      20                      25                      30
Asn Gln Lys Pro Tyr Lys Glu Thr Tyr Gly Ile Ser His Ile Thr Arg
                      35                      40                      45
His Asp Met Leu Gln Ile Pro Glu Gln Gln Lys Asn Glu Lys Tyr Gln
                      50                      55                      60
Val Pro Glu Phe Asp Ser Ser Thr Ile Lys Asn Ile Ser Ser Ala Lys
65                      70                      75                      80
Gly Leu Asp Val Trp Asp Ser Trp Pro Leu Gln Asn Ala Asp Gly Thr
                      85                      90                      95
Val Ala Asn Tyr His Gly Tyr His Ile Val Phe Ala Leu Ala Gly Asp
                      100                     105                     110
Pro Lys Asn Ala Asp Asp Thr Ser Ile Tyr Met Phe Tyr Gln Lys Val
                      115                     120                     125
Gly Glu Thr Ser Ile Asp Ser Trp Lys Asn Ala Gly Arg Val Phe Lys
130                     135                     140
Asp Ser Asp Lys Phe Asp Ala Asn Asp Ser Ile Leu Lys Asp Gln Thr
145                     150                     155                     160
Gln Glu Trp Ser Gly Ser Ala Thr Phe Thr Ser Asp Gly Lys Ile Arg
                      165                     170                     175
Leu Phe Tyr Thr Asp Phe Ser Gly Lys His Tyr Gly Lys Gln Thr Leu
                      180                     185                     190
Thr Thr Ala Gln Val Asn Val Ser Ala Ser Asp Ser Ser Leu Asn Ile
                      195                     200                     205
Asn Gly Val Glu Asp Tyr Lys Ser Ile Phe Asp Gly Asp Gly Lys Thr
210                     215                     220
Tyr Gln Asn Val Gln Gln Phe Ile Asp Glu Gly Asn Tyr Ser Ser Gly
225                     230                     235                     240
Asp Asn His Thr Leu Arg Asp Pro His Tyr Val Glu Asp Lys Gly His
                      245                     250                     255

```

[0012]

Lys Tyr Leu Val Phe Glu Ala Asn Thr Gly Thr Glu Asp Gly Tyr Gln
 260 265 270
 Gly Glu Glu Ser Leu Phe Asn Lys Ala Tyr Tyr Gly Lys Ser Thr Ser
 275 280 285
 Phe Phe Arg Gln Glu Ser Gln Lys Leu Leu Gln Ser Asp Lys Lys Arg
 290 295 300
 Thr Ala Glu Leu Ala Asn Gly Ala Leu Gly Met Ile Glu Leu Asn Asp
 305 310 315 320
 Asp Tyr Thr Leu Lys Lys Val Met Lys Pro Leu Ile Ala Ser Asn Thr
 325 330 335
 Val Thr Asp Glu Ile Glu Arg Ala Asn Val Phe Lys Met Asn Gly Lys
 340 345 350
 Trp Tyr Leu Phe Thr Asp Ser Arg Gly Ser Lys Met Thr Ile Asp Gly
 355 360 365
 Ile Thr Ser Asn Asp Ile Tyr Met Leu Gly Tyr Val Ser Asn Ser Leu
 370 375 380
 Thr Gly Pro Tyr Lys Pro Leu Asn Lys Thr Gly Leu Val Leu Lys Met
 385 390 395 400
 Asp Leu Asp Pro Asn Asp Val Thr Phe Thr Tyr Ser His Phe Ala Val
 405 410 415
 Pro Gln Ala Lys Gly Asn Asn Val Val Ile Thr Ser Tyr Met Thr Asn
 420 425 430
 Arg Gly Phe Tyr Ala Asp Lys Gln Ser Thr Phe Ala Pro Ser Phe Leu
 435 440 445
 Leu Asn Ile Lys Gly Lys Lys Thr Ser Val Val Lys Asp Ser Ile Leu
 450 455 460
 Glu Gln Gly Gln Leu Thr Val Asn Lys
 465 470

<210> 43
 <211> 2820
 <212> DNA
 <213> 谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum)

<220>
 <221> CDS
 <222> (898)..(1854)
 <223>

<400> 43
 tgcagaatta tgcaagatgc gccgcaacaa aacgcgatcg gccaaagtca aagtgggtcaa 60
 tgtaatgacc gaaaccgctg cgatgaaact tatccacggc ggtaaaaacc tctcaattag 120
 gagcttgacc tcattaatac tgtgctgggt taattcgccg gtgatcagca gcgcgccgta 180
 ccccaagggtg ccgacactaa tgcccgcgat cgtctccttc ggtccaaaat tcttctgccc 240
 aatcagccgg atttgggtgc gatgcctgat caatcccaca accgtgggtg tcaacgtgat 300
 ggccaccagt gcgatgtggg tggcgttgta aattttcctg gatacccgcc ggttgggtct 360
 ggggaggatc gattggattc ccgtcgtgct cgcgatcccc accgcttgta aaacagccag 420
 gtttagcagcc gtaacccacc acggttccgg caacaatgac ggcgagagag cccaccacat 480
 tgcgatttcc gtcgagataa agccagcgcc catatttgca gggaggattc gcctgcggtt 540
 tggcgacatt cggatccccg gaactagctc tgcaatgacc tgcgcgccga gggaggcgag 600
 gtgggtggca ggttttagtg cgggtttaag cgttgccagg cgagtgggtg gcagagacgc 660
 tagtctgggg agcgaacca tattgagtca tcttggcaga gcatgcacaa ttctgcaggg 720
 cataggttgg ttttgcctga ttacaatgt gattttttca acaaaaataa cacttgggtc 780
 gaccacattt teggacataa tegggcataa ttaaagggtg aacaaggaa tccgggcaca 840
 agctcttgct gattttctga gctgctttgt ggggtgtccg gttagggaat tcaggaa 897
 gtg gga tgg aaa atg aaa gaa acc gtc ggt aac aag att gtc ctc att 945
 Val Gly Ser Lys Met Lys Glu Thr Val Gly Asn Lys Ile Val Leu Ile
 1 5 10 15

[0013]

ggc gca gga gat gtt gga gtt gca tac gca tac gca ctg atc aac cag	993
Gly Ala Gly Asp Val Gly Val Ala Tyr Ala Tyr Ala Leu Ile Asn Gln	
20 25 30	
ggc atg gca gat cac ctt gcg atc atc gac atc gat gaa aag aaa ctc	1041
Gly Met Ala Asp His Leu Ala Ile Ile Asp Ile Asp Glu Lys Lys Leu	
35 40 45	
gaa ggc aac gtc atg gac tta aac cat ggt gtt gtg tgg gcc gat tcc	1089
Glu Gly Asn Val Met Asp Leu Asn His Gly Val Val Trp Ala Asp Ser	
50 55 60	
cgc acc cgc gtc acc aag ggc acc tac gct gac tgc gaa gac gca gcc	1137
Arg Thr Arg Val Thr Lys Gly Thr Tyr Ala Asp Cys Glu Asp Ala Ala	
65 70 75 80	
atg gtt gtc att tgt gcc ggc gca gcc caa aag cca ggc gag acc cgc	1185
Met Val Val Ile Cys Ala Gly Ala Ala Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg	
85 90 95	
ctc cag ctg gtg gac aaa aac gtc aag att atg aaa tcc atc gtc ggc	1233
Leu Gln Leu Val Asp Lys Asn Val Lys Ile Met Lys Ser Ile Val Gly	
100 105 110	
gat gtc atg gac agc gga ttc gac ggc atc ttc ctc gtg gcg tcc aac	1281
Asp Val Met Asp Ser Gly Phe Asp Gly Ile Phe Leu Val Ala Ser Asn	
115 120 125	
cca gtg gat atc ctg acc tac gca gtg tgg aaa ttc tcc ggc ttg gaa	1329
Pro Val Asp Ile Leu Thr Tyr Ala Val Trp Lys Phe Ser Gly Leu Glu	
130 135 140	
tgg aac cgc gtg atc ggc tcc gga act gtc ctg gac tcc gct cga ttc	1377
Trp Asn Arg Val Ile Gly Ser Gly Thr Val Leu Asp Ser Ala Arg Phe	
145 150 155 160	
cgc tac atg ctg ggc gaa ctc tac gaa gtg gca cca agc tcc gtc cac	1425
Arg Tyr Met Leu Gly Glu Leu Tyr Glu Val Ala Pro Ser Ser Val His	
165 170 175	
gcc tac atc atc ggc gaa cac ggc gac act gaa ctt cca gtc ctg tcc	1473
Ala Tyr Ile Ile Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Leu Ser	
180 185 190	
tcc gcg acc atc gca ggc gta tcg ctt agc cga atg ctg gac aaa gac	1521
Ser Ala Thr Ile Ala Gly Val Ser Leu Ser Arg Met Leu Asp Lys Asp	
195 200 205	
cca gag ctt gag ggc cgt cta gag aaa att ttc gaa gac acc cgc gac	1569
Pro Glu Leu Glu Gly Arg Leu Glu Lys Ile Phe Glu Asp Thr Arg Asp	
210 215 220	
gct gcc tat cac att atc gac gcc aag ggc tcc act tcc tac ggc atc	1617
Ala Ala Tyr His Ile Ile Asp Ala Lys Gly Ser Thr Ser Tyr Gly Ile	
225 230 235 240	
ggc atg ggt ctt gct cgc atc acc cgc gca atc ctg cag aac caa gac	1665
Gly Met Gly Leu Ala Arg Ile Thr Arg Ala Ile Leu Gln Asn Gln Asp	
245 250 255	
gtt gca gtc cca gtc tct gca ctg etc cac ggt gaa tac ggt gag gaa	1713
Val Ala Val Pro Val Ser Ala Leu Leu His Gly Glu Tyr Gly Glu Glu	
260 265 270	
gac atc tac atc ggc acc cca gct gtg gtg aac cgc cga ggc atc cgc	1761
Asp Ile Tyr Ile Gly Thr Pro Ala Val Val Asn Arg Arg Gly Ile Arg	
275 280 285	
cgc gtt gtc gaa cta gaa atc acc gac cac gag atg gaa cgc ttc aag	1809
Arg Val Val Glu Leu Glu Ile Thr Asp His Glu Met Glu Arg Phe Lys	
290 295 300	
cat tcc gca aat acc ctg cgc gaa att cag aag cag ttc ttc taa	1854
His Ser Ala Asn Thr Leu Arg Glu Ile Gln Lys Gln Phe Phe	
305 310 315	
atctttggcg cctagttggc gacgcaagtg ttctattgga acacttgcgc tgccaacttt	1914
ttggtttacg ggcacaatga aactgttggga tggaatttag agtgtttgta gcttaaggag	1974

[0014]

```

ctcaaatgaa tgagtttgac caggacattc tccaggagat caagactgaa ctcgacgagt 2034
taattctaga acttgatgag gtgacacaaa ctcacagega ggccatcgga caggtctccc 2094
caaccattta cgttgggtgcc cgcaacctca tgcattacgc gcattcttgc accaaagacc 2154
tccgtggcct gcagcaacgc ctctctcttg tgggagctac ccgcttgact accaccgaac 2214
cagcagtgca ggcccgcctc aaggccgccc gcaatgttat cggagctttc gcaggtgaag 2274
gcccacttta tccacctca gatgtcgtcg atgccttcga agatgccgat gagattctcg 2334
acgagcacgc cgaatttctc cttggcgaac cctaccgga tactccatcc tgcattatgg 2394
tcacctgtgc caccgaagcc gccaccgaca ttgaacttgt ccgtggttc gccaaaagcg 2454
gcatgaatct agctcgatc aactgtgcac acgacgatga aaccgtctgg aagcagatga 2514
tcgacaacgt ccacaccgtt gcagaagaag ttggccggga aatccgcgtc agcatggacc 2574
tcgccggacc aaaagtacgc accggcgaaa tcgccccagg cgcagaagta ggtcgcgcac 2634
gagtaacccg cgacgaaacc gaaaaagtac tgacgccgcg aaaactgtgg atcaccgccc 2694
acggctccga accagtccca gcccccgaaa gcctgcccg tcgccccgct ctgccgattg 2754
aagtcacccc agaatgggtc gacaaactag aaatcgcgag cgtcatcaac gtcccagaca 2814
cccgcg 2820

```

<210> 44
 <211> 318
 <212> PRT
 <213> 谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum)

<400> 44
 Val Gly Ser Lys Met Lys Glu Thr Val Gly Asn Lys Ile Val Leu Ile
 1 5 10 15
 Gly Ala Gly Asp Val Gly Val Ala Tyr Ala Tyr Ala Leu Ile Asn Gln
 20 25 30
 Gly Met Ala Asp His Leu Ala Ile Ile Asp Ile Asp Glu Lys Lys Leu
 35 40 45
 Glu Gly Asn Val Met Asp Leu Asn His Gly Val Val Trp Ala Asp Ser
 50 55 60
 Arg Thr Arg Val Thr Lys Gly Thr Tyr Ala Asp Cys Glu Asp Ala Ala
 65 70 75 80
 Met Val Val Ile Cys Ala Gly Ala Ala Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg
 85 90 95
 Leu Gln Leu Val Asp Lys Asn Val Lys Ile Met Lys Ser Ile Val Gly
 100 105 110
 Asp Val Met Asp Ser Gly Phe Asp Gly Ile Phe Leu Val Ala Ser Asn
 115 120 125
 Pro Val Asp Ile Leu Thr Tyr Ala Val Trp Lys Phe Ser Gly Leu Glu
 130 135 140
 Trp Asn Arg Val Ile Gly Ser Gly Thr Val Leu Asp Ser Ala Arg Phe
 145 150 155 160
 Arg Tyr Met Leu Gly Glu Leu Tyr Glu Val Ala Pro Ser Ser Val His
 165 170 175
 Ala Tyr Ile Ile Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Leu Ser
 180 185 190
 Ser Ala Thr Ile Ala Gly Val Ser Leu Ser Arg Met Leu Asp Lys Asp
 195 200 205
 Pro Glu Leu Glu Gly Arg Leu Glu Lys Ile Phe Glu Asp Thr Arg Asp
 210 215 220
 Ala Ala Tyr His Ile Ile Asp Ala Lys Gly Ser Thr Ser Tyr Gly Ile
 225 230 235 240
 Gly Met Gly Leu Ala Arg Ile Thr Arg Ala Ile Leu Gln Asn Gln Asp
 245 250 255
 Val Ala Val Pro Val Ser Ala Leu Leu His Gly Glu Tyr Gly Glu Glu
 260 265 270
 Asp Ile Tyr Ile Gly Thr Pro Ala Val Val Asn Arg Arg Gly Ile Arg
 275 280 285

[0015]

Arg Val Val Glu Leu Glu Ile Thr Asp His Glu Met Glu Arg Phe Lys
 290 295 300
 His Ser Ala Asn Thr Leu Arg Glu Ile Gln Lys Gln Phe Phe
 305 310 315

<210> 45
 <211> 4200
 <212> DNA
 <213> 谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)

<220>
 <221> CDS
 <222> (956)..(1942)
 <223>

<220>
 <221> CDS
 <222> (1945)..(3135)
 <223>

<400> 45
 cctgctggac ctgcaccgac aacggcaaca cgcaaagggc gagacatata aagttcgatt 60
 ccttaaaggg gtctataaaa atgtggagta tgtgagcggg gggtccactt gtagattcga 120
 ctccatcgg ggtgcgactg ctaatggtgc cctgctatca accctccatg atacgtggta 180
 agtgcagact aataaaggcc agtcggggag tattgggggc ttgctgggg tcagatttgt 240
 cacgctgcgc gctttcatag accccattaa tgggggggtga agagctgtaa agtaccgcta 300
 aaaactttgc aaagggtgct tcgcaacttg taaccgctcc gtattgtttt ctacggcaat 360
 aagcatttgt gctgctcaaa gcgtggaatt gagatcggtt tgaaaattac aaaataaaac 420
 ttgcaaaacc ggctgtacg caaggcggac gaacgctaaa ctatgtaaga aatcacaacc 480
 tccccctatt agtgcagga ggcacaagcc tgaagtgtca tcaatgagaa ggttcagget 540
 gaaattagaa aggcgatgta tgtctgacac accgacctca gctctgatca ccacggtaaa 600
 ccgcagcttc gatggattcg atttgaaga agtagcagca gaccttggag ttcggctcac 660
 ctacctcccc gacgaagaac tagaagtatc caaagttctc gcggcggacc tcctcgctga 720
 ggggccagct ctcatcatcg gtgtaggaaa cacgttttgc gacggccagg tcggcgctgc 780
 cctcgggctc ccagtgtctac tgcgtgtaga caagcaagge aagcacgttg ctcttgctcg 840
 caccacagga aacaatgccg gcgcagttgt tgcagcagca ttaccgctg aacaagagcc 900
 aatgccggat aagctgcgca aggctgtgcg caaccacagc aacctgaac cagtc atg 958
 Met
 1
 agc gcc gaa ctc ttt gaa aac tgg ctg ctc aag cgc gca cgc gca gag 1006
 Ser Ala Glu Leu Phe Glu Asn Trp Leu Leu Lys Arg Ala Arg Ala Glu
 5 10 15
 cac tcc cac att gtg ctg cca gaa ggt gac gac gac cgc atc ttg atg 1054
 His Ser His Ile Val Leu Pro Glu Gly Asp Asp Asp Arg Ile Leu Met
 20 25 30
 gct gcc cac cag ctg ctt gat caa gac atc tgt gac atc acg atc ctg 1102
 Ala Ala His Gln Leu Leu Asp Gln Asp Ile Cys Asp Ile Thr Ile Leu
 35 40 45
 ggc gat cca gta aag atc aag gag cgc gct acc gaa ctt ggc ctg cac 1150
 Gly Asp Pro Val Lys Ile Lys Glu Arg Ala Thr Glu Leu Gly Leu His
 50 55 60 65
 ctt aac act gca tac ctg gtc aat ccg ctg aca gat cct cgc ctg gag 1198
 Leu Asn Thr Ala Tyr Leu Val Asn Pro Leu Thr Asp Pro Arg Leu Glu
 70 75 80
 gaa ttc gcc gaa caa ttc gcg gag ctg cgc aag tca aag agc gtc act 1246
 Glu Phe Ala Glu Gln Phe Ala Glu Leu Arg Lys Ser Lys Ser Val Thr
 85 90 95
 atc gat gaa gcc cgc gaa atc atg aag gat att tcc tac ttc ggc acc 1294

[0016]

Ile	Asp	Glu	Ala	Arg	Glu	Ile	Met	Lys	Asp	Ile	Ser	Tyr	Phe	Gly	Thr				
100					105					110									
atg	atg	gtc	cac	aac	ggc	gac	gcc	gac	gga	atg	gta	tcc	ggt	gca	gca	1342			
Met	Met	Val	His	Asn	Gly	Asp	Ala	Asp	Gly	Met	Val	Ser	Gly	Ala	Ala				
115					120					125									
aac	acc	acc	gca	cac	acc	att	aag	cca	agc	ttc	cag	atc	atc	aaa	act	1390			
Asn	Thr	Thr	Ala	His	Thr	Ile	Lys	Pro	Ser	Phe	Gln	Ile	Ile	Lys	Thr				
130					135					140					145				
gtt	cca	gaa	gca	tcc	gtc	gtt	tct	tcc	atc	ttc	ctc	atg	gtg	ctg	cgc	1438			
Val	Pro	Glu	Ala	Ser	Val	Val	Ser	Ser	Ile	Phe	Leu	Met	Val	Leu	Arg				
150					155					160									
ggg	cga	ctg	tgg	gca	ttc	ggc	gac	tgt	gct	gtt	aac	ccg	aac	cca	act	1486			
Gly	Arg	Leu	Trp	Ala	Phe	Gly	Asp	Cys	Ala	Val	Asn	Pro	Asn	Pro	Thr				
165					170					175									
gct	gaa	cag	ctt	ggt	gaa	atc	gcc	gtt	gtg	tca	gca	aaa	act	gca	gca	1534			
Ala	Glu	Gln	Leu	Gly	Glu	Ile	Ala	Val	Val	Ser	Ala	Lys	Thr	Ala	Ala				
180					185					190									
caa	ttt	ggc	att	gat	cct	cgc	gta	gcc	atc	ttg	tcc	tac	tcc	act	ggc	1582			
Gln	Phe	Gly	Ile	Asp	Pro	Arg	Val	Ala	Ile	Leu	Ser	Tyr	Ser	Thr	Gly				
195					200					205									
aac	tcc	ggc	gga	ggc	tca	gat	gtg	gat	cgc	gcc	atc	gac	gct	ctt	gca	1630			
Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Asp	Val	Asp	Arg	Ala	Ile	Asp	Ala	Leu	Ala				
210					215					220					225				
gaa	gca	cgc	cga	ctt	aac	cca	gaa	cta	tgc	gtc	gat	gga	cca	ctt	cag	1678			
Glu	Ala	Arg	Arg	Leu	Asn	Pro	Glu	Leu	Cys	Val	Asp	Gly	Pro	Leu	Gln				
230					235					240									
ttc	gac	gcc	gcc	gtc	gac	ccg	ggt	gtg	gcg	cgc	aag	aag	atg	cca	gac	1726			
Phe	Asp	Ala	Ala	Val	Asp	Pro	Gly	Val	Ala	Arg	Lys	Lys	Met	Pro	Asp				
245					250					255									
tct	gac	gtc	gct	ggc	cag	gca	aat	gtg	ttt	atc	ttc	cct	gac	ctg	gaa	1774			
Ser	Asp	Val	Ala	Gly	Gln	Ala	Asn	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Asp	Leu	Glu				
260					265					270									
gcc	gga	aac	atc	ggc	tac	aaa	act	gca	caa	cgc	acc	ggt	cac	gcc	ctg	1822			
Ala	Gly	Asn	Ile	Gly	Tyr	Lys	Thr	Ala	Gln	Arg	Thr	Gly	His	Ala	Leu				
275					280					285									
gca	gtt	ggt	ccg	att	ctg	cag	ggc	cta	aac	aaa	cca	gtc	aac	gac	ctt	1870			
Ala	Val	Gly	Pro	Ile	Leu	Gln	Gly	Leu	Asn	Lys	Pro	Val	Asn	Asp	Leu				
290					295					300					305				
tcc	cgt	ggc	gca	aca	gtc	cct	gac	atc	gtc	aac	aca	gta	gcc	atc	aca	1918			
Ser	Arg	Gly	Ala	Thr	Val	Pro	Asp	Ile	Val	Asn	Thr	Val	Ala	Ile	Thr				
310					315					320									
gca	att	cag	gca	gga	gga	cgc	agc	ta	atg	gca	ttg	gca	ctt	gtt	ttg	1965			
Ala	Ile	Gln	Ala	Gly	Gly	Arg	Ser		Met	Ala	Leu	Ala	Leu	Val	Leu				
325					330					335									
aac	tcc	ggt	tca	tct	tcc	atc	aaa	ttc	cag	ctg	gtc	aac	ccc	gaa	aac	2013			
Asn	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Ile	Lys	Phe	Gln	Leu	Val	Asn	Pro	Glu	Asn				
340					345					350									
tct	gcc	atc	gac	gag	cca	tat	gtt	tct	ggt	ctt	gtg	gag	cag	att	ggt	2061			
Ser	Ala	Ile	Asp	Glu	Pro	Tyr	Val	Ser	Gly	Leu	Val	Glu	Gln	Ile	Gly				
355					360					365									
gag	cca	aac	ggc	cgc	atc	gta	ctc	aaa	ata	gag	ggt	gaa	aaa	tat	acc	2109			
Glu	Pro	Asn	Gly	Arg	Ile	Val	Leu	Lys	Ile	Glu	Gly	Glu	Lys	Tyr	Thr				
370					375					380									
cta	gag	aca	ccc	atc	gca	gat	cac	tcc	gaa	ggc	cta	aac	ctg	gcg	ttc	2157			
Leu	Glu	Thr	Pro	Ile	Ala	Asp	His	Ser	Glu	Gly	Leu	Asn	Leu	Ala	Phe				
385					390					395					400				
gat	ctc	atg	gac	cag	cac	aac	tgt	ggt	cct	tcc	caa	ctg	gaa	atc	acc	2205			
Asp	Leu	Met	Asp	Gln	His	Asn	Cys	Gly	Pro	Ser	Gln	Leu	Glu	Ile	Thr				
405					410					415									

[0017]

gca gtt gga cac cgc gtg gtc cac ggc gga atc ttg ttc tcc gca ccg	2253
Ala Val Gly His Arg Val Val His Gly Gly Ile Leu Phe Ser Ala Pro	
420 425 430	
gaa ctt atc act gat gaa atc gtg gaa atg atc cgc gat ctc att cca	2301
Glu Leu Ile Thr Asp Glu Ile Val Glu Met Ile Arg Asp Leu Ile Pro	
435 440 445	
ctc gca cca ctg cac aac cct gca aac gtt gac ggc att gat gtt gct	2349
Leu Ala Pro Leu His Asn Pro Ala Asn Val Asp Gly Ile Asp Val Ala	
450 455 460	
cga aaa att ctc ccc gat gtc cca cac gta gct gtc ttt gac acc ggt	2397
Arg Lys Ile Leu Pro Asp Val Pro His Val Ala Val Phe Asp Thr Gly	
465 470 475 480	
ttc ttc cac tca ctt cca cca gca gct gcg ctg tat gcc atc aac aag	2445
Phe Phe His Ser Leu Pro Pro Ala Ala Ala Leu Tyr Ala Ile Asn Lys	
485 490 495	
gat gtc gca gct gaa cac gga atc agg cgc tat ggt ttc cac ggc acc	2493
Asp Val Ala Ala Glu His Gly Ile Arg Arg Tyr Gly Phe His Gly Thr	
500 505 510	
tcc cat gaa ttt gtg tcc aag cgc gtg gtg gaa att ctg gaa aag ccc	2541
Ser His Glu Phe Val Ser Lys Arg Val Val Glu Ile Leu Glu Lys Pro	
515 520 525	
acc gaa gac atc aac acc atc acc ttc cac ctg ggc aac ggc gca tcc	2589
Thr Glu Asp Ile Asn Thr Ile Thr Phe His Leu Gly Asn Gly Ala Ser	
530 535 540	
atg gct gct gtt caa ggt ggc cgt gcg gta gat act tcc atg ggt atg	2637
Met Ala Ala Val Gln Gly Gly Arg Ala Val Asp Thr Ser Met Gly Met	
545 550 555 560	
aca cct ctc gcg ggc ctt gtc atg ggt acc cga agc ggt gac att gat	2685
Thr Pro Leu Ala Gly Leu Val Met Gly Thr Arg Ser Gly Asp Ile Asp	
565 570 575	
cca ggt atc gtc ttc cac ctt tcc cgc acc gct ggc atg agc atc gat	2733
Pro Gly Ile Val Phe His Leu Ser Arg Thr Ala Gly Met Ser Ile Asp	
580 585 590	
gag atc gat aat ctg ctg aac aaa aag tcg ggt gta aag gga ctt tcc	2781
Glu Ile Asp Asn Leu Leu Asn Lys Lys Ser Gly Val Lys Gly Leu Ser	
595 600 605	
ggt gtt aat gat ttc cgt gaa ctg cgg gaa atg atc gac aac aat gat	2829
Gly Val Asn Asp Phe Arg Glu Leu Arg Glu Met Ile Asp Asn Asn Asp	
610 615 620	
caa gat gcc tgg tcc gcg tac aac att tac ata cac caa ctc cgc cgc	2877
Gln Asp Ala Trp Ser Ala Tyr Asn Ile Tyr Ile His Gln Leu Arg Arg	
625 630 635 640	
tac ctc ggt tcc tac atg gig gca ctg gga cgg gta gac acc atc gtg	2925
Tyr Leu Gly Ser Tyr Met Val Ala Leu Gly Arg Val Asp Thr Ile Val	
645 650 655	
ttc acc gcc ggt gtc ggt gaa aat gcc cag ttt gtc cgt gag gat gcc	2973
Phe Thr Ala Gly Val Gly Glu Asn Ala Gln Phe Val Arg Glu Asp Ala	
660 665 670	
ttg gca ggt ttg gaa atg tac gga att gag atc gat cca gag cgt aac	3021
Leu Ala Gly Leu Glu Met Tyr Gly Ile Glu Ile Asp Pro Glu Arg Asn	
675 680 685	
gca ttg cca aac gat ggt cct cga ttg att tcc acc gat gcc tcc aag	3069
Ala Leu Pro Asn Asp Gly Pro Arg Leu Ile Ser Thr Asp Ala Ser Lys	
690 695 700	
gtg aag gtg ttt gtt att cca act aat gaa gag tta gct atc gct agg	3117
Val Lys Val Phe Val Ile Pro Thr Asn Glu Glu Leu Ala Ile Ala Arg	
705 710 715 720	
tac gcg gtg aag ttc gct tagctctcct ggtaggac caccacaaat	3165
Tyr Ala Val Lys Phe Ala	

[0018]

725

```

cgctctgac agcgggtttg tgggtgattt ttgcgtttt aaggggtgaa actgcacgga 3225
tccaccacag atcccagttt tcctttggaa cgtggtggat ccttgccctg gagcttcaca 3285
ggaatcgctt gttggccctt agacctcttg gggttgcgaa ttttcgtccc caccgaacat 3345
taaaaggccg gttttggtcg aaaatttgct ctaacacctt gctattatgc gaatattcgt 3405
tcatttcct cgaattccag caaccgtaa cgagaagttg aacaggaaac ctgcagtaac 3465
cccgcagaaa tcacatcagc cccaattgtc ccaaaagtaa ctccccaga atcgcttcta 3525
agggcctaac tcgcccacag tcaactagg ggacatcgca ctctaaagg cccttaaatc 3585
gccacctacc aaatagcccc aagtcaaac agctagaacc aactcagtgg ccgcacggca 3645
ttcgccatat ccacaagtgc gtaacgggtg tgcgggaacg gtgcagaacg tgcctgaatg 3705
cggagtgctt cggagatgcc ggtgcgcagg cctttttggg agaacgggta ttcaaacaaa 3765
gggttcgcgg aggcggaagc tttagatttt cgctctcgaa gccagctgag gcctgccgac 3825
atgatggcaa ttttgatttg gttgaagcgg gtttcgtttg tggggatttc ggtgagtcgg 3885
cgggcagccc gtccgatgcg ggattcactc aaattggagc tgaccagcaa caagatggtg 3945
gtgagggtgg ccattcggtg gtggglggat gattggggga gtttgtctag ggcttgact 4005
gcgagttcga tttggttttc ggccatgagt tggcgggcga gcccgaacgc ggaggacacg 4065
gtggtggggt tggttgccc gacaagtgcg tagaggcgca gtgaatggaa gcggactacg 4125
tgtgggtcgc tggagatgtg ggaccaggtg tcgtgagtg attcgaaggc ggaggcgctc 4185
aggtcttcga aatct 4200

```

<210> 46
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutanicum*)

<400> 46

```

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

```

[0019]

Asp Ser Asp Val Ala Gly Gln Ala Asn Val Phe Ile Phe Pro Asp Leu
 260 265 270
 Glu Ala Gly Asn Ile Gly Tyr Lys Thr Ala Gln Arg Thr Gly His Ala
 275 280 285
 Leu Ala Val Gly Pro Ile Leu Gln Gly Leu Asn Lys Pro Val Asn Asp
 290 295 300
 Leu Ser Arg Gly Ala Thr Val Pro Asp Ile Val Asn Thr Val Ala Ile
 305 310 315 320
 Thr Ala Ile Gln Ala Gly Gly Arg Ser
 325

<210> 47

<211> 397

<212> PRT

<213> 谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)

<400> 47

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

[0020]

	325	330	335
Gln Phe Val Arg Glu Asp Ala Leu Ala Gly Leu Glu Met Tyr Gly Ile			
	340	345	350
Glu Ile Asp Pro Glu Arg Asn Ala Leu Pro Asn Asp Gly Pro Arg Leu			
	355	360	365
Ile Ser Thr Asp Ala Ser Lys Val Lys Val Phe Val Ile Pro Thr Asn			
	370	375	380
Glu Glu Leu Ala Ile Ala Arg Tyr Ala Val Lys Phe Ala			
385	390	395	
<210>	48		
<211>	3780		
<212>	DNA		
<213>	谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum)		
<220>			
<221>	CDS		
<222>	(996)..(2735)		
<223>			
<400>	48		
taatgaggaa aaccgaaccc caccagaaga attccaacag cgcaccacca atgatcgggc			60
ctgccgcagc gccaagaatt gccacggaac cccaaatacc aattgcagtg ttgcgtcac			120
gctcctcctc aaacgtaatg cggatcagag ccaaggttgc aggcctcctc gttgccgcac			180
cgatgccaa gaaagctctc gcagcaacaa gagccacgc agttggagca aacgcagcac			240
caagtgaagc gattccgaaa atgctcaagc ccatgaggaa catccggcgg tggccgattt			300
tgtcacccaa agtgccggta cccaaaagaa ggcccgccat gagcagggga tatgcgttga			360
tgatccacaa cgcttgggtt tcggtggctg cgagctgttc acgcagcaga gggagtgcgg			420
tgtagagaat cgagttgtct acaccgatca gaaagagacc accgctgata acggcgagga			480
aagcccaacg ttgggttttc gtaggcgtt gcgcctgtaa ggtttctgaa gtcattggatc			540
gtaactgtaa cgaatggicg gtacagttaac aactcttttg ttggtgtttt agaccacggc			600
gctgtgtggc gatttaagac gtcggaaatc gtaggggact gtcagcgttg gtcgggttct			660
ttgaggcgtc tagaggcgat tctgtgaggt cactttttgt ggggtcgggg tctaaatttg			720
gccagtttcc gaggcgacca gacaggcgtg cccacgatgt ttaaataggc gatcgggtggg			780
catctgtgtt tggtttcgac gggtgaaac caaaccagac tgcccagcaa cgacggaaat			840
cccaaaagtg ggcattccctg ttigtaccg agtaccacc cgggcctgaa actccctggc			900
aggcgggcga agcgtggcaa caactggaat ttaagagcac aattgaagtc gcaccaagtt			960
aggcaacaca atagccataa cgttagggag ttacg atg gca cac agc tac gca			1013
		Met Ala His Ser Tyr Ala	
		1 5	
gaa caa tta att gac act ttg gaa gct caa ggt gtg aag cga att tat			1061
Glu Gln Leu Ile Asp Thr Leu Glu Ala Gln Gly Val Lys Arg Ile Tyr			
	10	15	20
ggt ttg gtg ggt gac agc ctt aat ccg atc gtg gat gct gtc cgc caa			1109
Gly Leu Val Gly Asp Ser Leu Asn Pro Ile Val Asp Ala Val Arg Gln			
	25	30	35
tca gat att gag tgg gtg cac gtt cga aat gag gaa gcg gcg gcg ttt			1157
Ser Asp Ile Glu Trp Val His Val Arg Asn Glu Glu Ala Ala Ala Phe			
	40	45	50
gca gcc ggt gcg gaa tcg ttg atc act ggg gag ctg gca gta tgt gct			1205
Ala Ala Gly Ala Glu Ser Leu Ile Thr Gly Glu Leu Ala Val Cys Ala			
	55	60	65
gct tct tgt ggt cct gga aac aca cac ctg att cag ggt ctt tat gat			1253
Ala Ser Cys Gly Pro Gly Asn Thr His Leu Ile Gln Gly Leu Tyr Asp			
	75	80	85
tcg cat cga aat ggt gcg aag gtg ttg gcc atc gct agc cat att ccg			1301
Ser His Arg Asn Gly Ala Lys Val Leu Ala Ile Ala Ser His Ile Pro			
	90	95	100

[0021]

agt gcc cag att ggt tgc acg ttc ttc cag gaa acg cat ccg gag att Ser Ala Gln Ile Gly Ser Thr Phe Phe Gln Glu Thr His Pro Glu Ile 105 110 115	1349
ttg ttt aag gaa tgc tct ggt tac tgc gag atg gtg aat ggt ggt gag Leu Phe Lys Glu Cys Ser Gly Tyr Cys Glu Met Val Asn Gly Gly Glu 120 125 130	1397
cag ggt gaa cgc att ttg cat cac gcg att cag tcc acc atg gcg ggt Gln Gly Glu Arg Ile Leu His His Ala Ile Gln Ser Thr Met Ala Gly 135 140 145 150	1445
aaa ggt gtg tgc gtg gta gtg att cct ggt gat atc gct aag gaa gac Lys Gly Val Ser Val Val Ile Pro Gly Asp Ile Ala Lys Glu Asp 155 160 165	1493
gca ggt gac ggt act tat tcc aat tcc act att tct tct ggc act cct Ala Gly Asp Gly Thr Tyr Ser Asn Ser Thr Ile Ser Ser Gly Thr Pro 170 175 180	1541
gtg gtg ttc ccg gat cct act gag gct gca gcg ctg gtg gag gcg att Val Val Phe Pro Asp Pro Thr Glu Ala Ala Ala Leu Val Glu Ala Ile 185 190 195	1589
aac aac gct aag tct gtc act ttg ttc tgc ggt gcg ggc gtg aag aat Asn Asn Ala Lys Ser Val Thr Leu Phe Cys Gly Ala Gly Val Lys Asn 200 205 210	1637
gct cgc gcg cag gtg ttg gag ttg gcg gag aag att aaa tca ccg atc Ala Arg Ala Gln Val Leu Glu Leu Ala Glu Lys Ile Lys Ser Pro Ile 215 220 225 230	1685
ggg cat gcg ctg ggt ggt aag cag tac atc cag cat gag aat ccg ttt Gly His Ala Leu Gly Gly Lys Gln Tyr Ile Gln His Glu Asn Pro Phe 235 240 245	1733
gag gtc ggc atg tct ggc ctg ctt ggt tac ggc gcc tgc gtg gat gcg Glu Val Gly Met Ser Gly Leu Leu Gly Tyr Gly Ala Cys Val Asp Ala 250 255 260	1781
tcc aat gag gcg gat ctg ctg att cta ttg ggt acg gat ttc cct tat Ser Asn Glu Ala Asp Leu Leu Ile Leu Leu Gly Thr Asp Phe Pro Tyr 265 270 275	1829
tct gat ttc ctt cct aaa gac aac gtt gcc cag gtg gat atc aac ggt Ser Asp Phe Leu Pro Lys Asp Asn Val Ala Gln Val Asp Ile Asn Gly 280 285 290	1877
gcg cac att ggt cga cgt acc acg gtg aag tat ccg gtg acc ggt gat Ala His Ile Gly Arg Arg Thr Thr Val Lys Tyr Pro Val Thr Gly Asp 295 300 305 310	1925
gtt gct gca aca atc gaa aat att ttg cct cat gtg aag gaa aaa aca Val Ala Ala Thr Ile Glu Asn Ile Leu Pro His Val Lys Glu Lys Thr 315 320 325	1973
gat cgt tcc ttc ctt gat cgg atg ctc aag gca cac gag cgt aag ttg Asp Arg Ser Phe Leu Asp Arg Met Leu Lys Ala His Glu Arg Lys Leu 330 335 340	2021
agc tgc gtg gta gag acg tac aca cat aac gtc gag aag cat gtg cct Ser Ser Val Val Glu Thr Tyr Thr His Asn Val Glu Lys His Val Pro 345 350 355	2069
att cac cct gaa tac gtt gcc tct att ttg aac gag ctg gcg gat aag Ile His Pro Glu Tyr Val Ala Ser Ile Leu Asn Glu Leu Ala Asp Lys 360 365 370	2117
gat gcg gtg ttt act gtg gat acc ggc atg tgc aat gtg tgg cat gcg Asp Ala Val Phe Thr Val Asp Thr Gly Met Cys Asn Val Trp His Ala 375 380 385 390	2165
agg tac atc gag aat ccg gag gga acg cgc gac ttt gtg ggt tca ttc Arg Tyr Ile Glu Asn Pro Glu Gly Thr Arg Asp Phe Val Gly Ser Phe 395 400 405	2213
cgc cac ggc acg atg gct aat gcg ttg cct cat gcg att ggt gcg caa Arg His Gly Thr Met Ala Asn Ala Leu Pro His Ala Ile Gly Ala Gln	2261

[0022]

410	415	420	
agt gtt gat cga aac cgc cag gtg atc gcg atg tgt ggc gat ggt ggt			2309
Ser Val Asp Arg Asn Arg Gln Val Ile Ala Met Cys Gly Asp Gly Gly			
425	430	435	
ttg ggc atg ctg ctg ggt gag ctt ctg acc gtt aag ctg cac caa ctt			2357
Leu Gly Met Leu Leu Gly Glu Leu Leu Thr Val Lys Leu His Gln Leu			
440	445	450	
ccg ctg aag gct gtg gtg ttt aac aac agt tct ttg ggc atg gtg aag			2405
Pro Leu Lys Ala Val Val Phe Asn Asn Ser Ser Leu Gly Met Val Lys			
455	460	465	470
ttg gag atg ctc gtg gag gga cag cca gaa ttt ggt act gac cat gag			2453
Leu Glu Met Leu Val Glu Gly Gln Pro Glu Phe Gly Thr Asp His Glu			
475	480	485	
gaa gtg aat ttc gca gag att gcg gcg gct gcg ggt atc aaa tcg gta			2501
Glu Val Asn Phe Ala Glu Ile Ala Ala Ala Ala Gly Ile Lys Ser Val			
490	495	500	
cgc atc acc gat ccg aag aaa gtt cgc gag cag cta gct gag gca ttg			2549
Arg Ile Thr Asp Pro Lys Lys Val Arg Glu Gln Leu Ala Glu Ala Leu			
505	510	515	
gca tat cct gga cct gta ctg atc gat atc gtc acg gat cct aat gcg			2597
Ala Tyr Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile Val Thr Asp Pro Asn Ala			
520	525	530	
ctg tcg atc cca cca acc atc acg tgg gaa cag gtc atg gga ttc agc			2645
Leu Ser Ile Pro Pro Thr Ile Thr Trp Glu Gln Val Met Gly Phe Ser			
535	540	545	550
aag gcg gcc acc cga acc gtc ttt ggt gga gga gta gga gcg atg atc			2693
Lys Ala Ala Thr Arg Thr Val Phe Gly Gly Val Gly Ala Met Ile			
555	560	565	
gat ctg gcc cgt tcg aac ata agg aat att cct act cca tga			2735
Asp Leu Ala Arg Ser Asn Ile Arg Asn Ile Pro Thr Pro			
570	575		
tgattgatac acctgctgtt ctcatlgacc gcgagcgctt aactgccaac atttccagga			2795
tgccagctca cgcgggtgcc catgagattg cctgcgtcc gcatgtgaaa acgcacaaaa			2855
tcattgaaat tgcgcagatg caggtegacg ccggtgcccg agggatcacc tgcgcaacca			2915
ttggcgaggc ggaaattttt gcgcgcgcag gttttacgga catctttatt gcataatccg			2975
tgtatctaac cgatcatgca gtgcaacgcc tgaacgcgat ccccgagaaa atttccattg			3035
gcgtggattc ggtagagatg gcacaggcca cggcggggtt gcgggaagat atcaaggctc			3095
tgattgaagt ggattcggga catcgtagaa gtggagtac ggcgactgct tcagaattga			3155
gtcagatccg cgaggcgctg ggcagcaggt atgcaggagt gtttactttt cctgggcatt			3215
cttalggccc gggaatgggt gagcaggcag cagctgatga gcttcaggct ctaacaaca			3275
gcgtccagcg acttgctggc ggcctgactt ctggcggttc ctgcgcgtct gcgcagtta			3335
cagacgcaat cgatgagatg cgaccaggcg tgtatgtgtt taacgattcc cagcagatca			3395
cctcgggagc atgcactgag aagcagggtg caatgacggt gctgtctact gtggtcagcc			3455
gaaatgtgtc agatcgtcgg atcatttttg atgcgggac caaaatcctc agcactgata			3515
aaccagcatg gattgatggc aatggttttg ttctggggaa tcctgaagcc cgaatctctg			3575
ctttgtcgga gcatcacgca accattttct ggccagataa agtgetactt ccagtaatcg			3635
gggagcagct caacatcgtg cccaaccatg cctgcaacgt gattaatttg gtggatgagg			3695
tctacgttcg ggaagccgat ggcactttcc gtacctggaa gtagttgcc cgcggcagaa			3755
acaattaggg aaacctcttg acctt			3780

<210> 49

<211> 579

<212> PRT

<213> 谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum)

<400> 49

Met Ala His Ser Tyr Ala Glu Gln Leu Ile Asp Thr Leu Glu Ala Gln

1

5

10

15

[0023]

Gly	Val	Lys	Arg	Ile	Tyr	Gly	Leu	Val	Gly	Asp	Ser	Leu	Asn	Pro	Ile
			20				25						30		
Val	Asp	Ala	Val	Arg	Gln	Ser	Asp	Ile	Glu	Trp	Val	His	Val	Arg	Asn
		35					40					45			
Glu	Glu	Ala	Ala	Ala	Phe	Ala	Ala	Gly	Ala	Glu	Ser	Leu	Ile	Thr	Gly
		50					55					60			
Glu	Leu	Ala	Val	Cys	Ala	Ala	Ser	Cys	Gly	Pro	Gly	Asn	Thr	His	Leu
65				70					75					80	
Ile	Gln	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ser	His	Arg	Asn	Gly	Ala	Lys	Val	Leu	Ala
			85						90					95	
Ile	Ala	Ser	His	Ile	Pro	Ser	Ala	Gln	Ile	Gly	Ser	Thr	Phe	Phe	Gln
			100					105						110	
Glu	Thr	His	Pro	Glu	Ile	Leu	Phe	Lys	Glu	Cys	Ser	Gly	Tyr	Cys	Glu
		115					120					125			
Met	Val	Asn	Gly	Gly	Glu	Gln	Gly	Glu	Arg	Ile	Leu	His	His	Ala	Ile
		130					135					140			
Gln	Ser	Thr	Met	Ala	Gly	Lys	Gly	Val	Ser	Val	Val	Val	Ile	Pro	Gly
145				150					155					160	
Asp	Ile	Ala	Lys	Glu	Asp	Ala	Gly	Asp	Gly	Thr	Tyr	Ser	Asn	Ser	Thr
			165						170					175	
Ile	Ser	Ser	Gly	Thr	Pro	Val	Val	Phe	Pro	Asp	Pro	Thr	Glu	Ala	Ala
			180					185						190	
Ala	Leu	Val	Glu	Ala	Ile	Asn	Asn	Ala	Lys	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Cys
		195					200					205			
Gly	Ala	Gly	Val	Lys	Asn	Ala	Arg	Ala	Gln	Val	Leu	Glu	Leu	Ala	Glu
		210					215				220				
Lys	Ile	Lys	Ser	Pro	Ile	Gly	His	Ala	Leu	Gly	Gly	Lys	Gln	Tyr	Ile
225				230					235					240	
Gln	His	Glu	Asn	Pro	Phe	Glu	Val	Gly	Met	Ser	Gly	Leu	Leu	Gly	Tyr
			245						250					255	
Gly	Ala	Cys	Val	Asp	Ala	Ser	Asn	Glu	Ala	Asp	Leu	Leu	Ile	Leu	Leu
		260						265						270	
Gly	Thr	Asp	Phe	Pro	Tyr	Ser	Asp	Phe	Leu	Pro	Lys	Asp	Asn	Val	Ala
		275						280				285			
Gln	Val	Asp	Ile	Asn	Gly	Ala	His	Ile	Gly	Arg	Arg	Thr	Thr	Val	Lys
		290					295					300			
Tyr	Pro	Val	Thr	Gly	Asp	Val	Ala	Ala	Thr	Ile	Glu	Asn	Ile	Leu	Pro
305				310					315					320	
His	Val	Lys	Glu	Lys	Thr	Asp	Arg	Ser	Phe	Leu	Asp	Arg	Met	Leu	Lys
			325						330					335	
Ala	His	Glu	Arg	Lys	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Glu	Thr	Tyr	Thr	His	Asn
		340						345						350	
Val	Glu	Lys	His	Val	Pro	Ile	His	Pro	Glu	Tyr	Val	Ala	Ser	Ile	Leu
		355					360					365			
Asn	Glu	Leu	Ala	Asp	Lys	Asp	Ala	Val	Phe	Thr	Val	Asp	Thr	Gly	Met
		370					375					380			
Cys	Asn	Val	Trp	His	Ala	Arg	Tyr	Ile	Glu	Asn	Pro	Glu	Gly	Thr	Arg
385				390					395					400	
Asp	Phe	Val	Gly	Ser	Phe	Arg	His	Gly	Thr	Met	Ala	Asn	Ala	Leu	Pro
			405						410					415	
His	Ala	Ile	Gly	Ala	Gln	Ser	Val	Asp	Arg	Asn	Arg	Gln	Val	Ile	Ala
		420						425						430	
Met	Cys	Gly	Asp	Gly	Gly	Leu	Gly	Met	Leu	Leu	Gly	Glu	Leu	Leu	Thr
		435						440				445			
Val	Lys	Leu	His	Gln	Leu	Pro	Leu	Lys	Ala	Val	Val	Phe	Asn	Asn	Ser
		450					455					460			
Ser	Leu	Gly	Met	Val	Lys	Leu	Glu	Met	Leu	Val	Glu	Gly	Gln	Pro	Glu
465				470					475					480	
Phe	Gly	Thr	Asp	His	Glu	Glu	Val	Asn	Phe	Ala	Glu	Ile	Ala	Ala	Ala

[0024]

	485	490	495
Ala Gly Ile Lys Ser Val Arg Ile Thr Asp Pro Lys Lys Val Arg Glu			
	500	505	510
Gln Leu Ala Glu Ala Leu Ala Tyr Pro Gly Pro Val Leu Ile Asp Ile			
	515	520	525
Val Thr Asp Pro Asn Ala Leu Ser Ile Pro Pro Thr Ile Thr Trp Glu			
	530	535	540
Gln Val Met Gly Phe Ser Lys Ala Ala Thr Arg Thr Val Phe Gly Gly			
	545	550	555
Gly Val Gly Ala Met Ile Asp Leu Ala Arg Ser Asn Ile Arg Asn Ile			
	565	570	575
Pro Thr Pro			

<210> 50
 <211> 3600
 <212> DNA
 <213> 谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)

<220>
 <221> CDS
 <222> (1037)..(2545)
 <223>

<400> 50
 gaagcgctac ggacttcgcg ccggcgctcga cagcaatgcg tccagcatcc aagtgagtat 60
 ggtgctcatc atcaatacca acgcggaact tcacgcgtcac cggaaigtcc gtgccttccg 120
 tagccttcac agccgcggaa acgatgtttt caaacaacgc gcgcttgtaa ggaatcgacg 180
 aaccgccacc ccggcgcgctg accttggaa ccgggcagcc aaagttcata tcaatatgat 240
 ccgccaaagt ttcatacaac atcatcttcg ccgcttcgta ggtgtacttc ggttcaaccg 300
 tgtacagctg caagcttcgg ggaatttcac ccggcgcgaa ggtggtcatg tgcattggtt 360
 tctcattgcg ctcaacaaga gcacgcgcag tcaccatttc acagacgtac agccccgaga 420
 ttgttcccg tgcgttcatt tctgttcac ggcacagcgt gcgaaagca acgttggtta 480
 caccagccat gggggctaga accacagggg aggcaggtc aaaggggccg atttttaaag 540
 tcacctaaact attgtcccc gtgaatcagg ttggcaaaa tatttgaagc aaattgtgag 600
 cagggcgcaa ctaggaaagt ggtgtgcttt cactttttgg gggctggggt tgggttaagc 660
 ttccggggct ctagggttgg tctgagcttt attcctgggc ttgggaggc ttgcaaacag 720
 ggggcattgc aatttggggg taatgctggg ccttgaaatc ccactatcac agatagtatt 780
 cgggcatttc ctgtcacgat ggtttatcct tgggacacaa catcaaagtg ggtatcatca 840
 tatgtctccg gttgaagtga cctatctgaa aagattggtc gaaccttgaa gcaatggtgt 900
 gaactgcgtt aacgaatttt gtcggacgtt aaaatggtcg cattctgctt gctgaagtgg 960
 cacacctatg tgttctgctt gggtatagca gtgcgggaaa aattgaaaa agtccgatta 1020
 cctgaggagg tattca atg tct gat cgc att gct tca gaa aag ctg cgc tcc 1072
 Met Ser Asp Arg Ile Ala Ser Glu Lys Leu Arg Ser
 1 5 10
 aag ctc atg tcc gcc gac gag gcg gca cag ttt gtt aac cac ggt gac 1120
 Lys Leu Met Ser Ala Asp Glu Ala Ala Gln Phe Val Asn His Gly Asp
 15 20 25
 aag gtt ggt ttc tcc ggc ttc acc ggc gct ggc tac cca aag gca ctg 1168
 Lys Val Gly Phe Ser Gly Phe Thr Gly Ala Gly Tyr Pro Lys Ala Leu
 30 35 40
 cct acg gca atc gct aac cgg gct aaa gaa gca cac ggt gca ggc aac 1216
 Pro Thr Ala Ile Ala Asn Arg Ala Lys Glu Ala His Gly Ala Gly Asn
 45 50 55 60
 gac tac gca atc gac ctg ttc act ggc gca tcg acc gcc cct gac tgc 1264
 Asp Tyr Ala Ile Asp Leu Phe Thr Gly Ala Ser Thr Ala Pro Asp Cys
 65 70 75
 gat ggc gta ctt gca gaa gct gac gct atc cgc tgg cgc atg cca tac 1312

[0025]

Asp Gly Val Leu Ala Glu Ala Asp Ala Ile Arg Trp Arg Met Pro Tyr	
80 85 90	
gca tct gat cca atc atg cgt aac aag atc aac tcc ggc tcc atg gga	1360
Ala Ser Asp Pro Ile Met Arg Asn Lys Ile Asn Ser Gly Ser Met Gly	
95 100 105	
tac tcc gat atc cac ctg tcc cac tcc ggc cag cag gtt gaa gag ggc	1408
Tyr Ser Asp Ile His Leu Ser His Ser Gly Gln Gln Val Glu Glu Gly	
110 115 120	
ttc ttc ggc cag ctc aac gta gct gtc att gaa atc acc cgc atc act	1456
Phe Phe Gly Gln Leu Asn Val Ala Val Ile Glu Ile Thr Arg Ile Thr	
125 130 135 140	
gaa gag ggc tac atc atc cct tct tcc tcc gtg ggt aac aac gtt gag	1504
Glu Glu Gly Tyr Ile Ile Pro Ser Ser Ser Val Gly Asn Asn Val Glu	
145 150 155	
tgg ctc aac gct gca gag aag gtc atc ctc gag gtt aac tct tgg cag	1552
Trp Leu Asn Ala Ala Glu Lys Val Ile Leu Glu Val Asn Ser Trp Gln	
160 165 170	
tct gaa gac ctc gaa ggt atg cac gac atc tgg tct gtt cct gcc ctg	1600
Ser Glu Asp Leu Glu Gly Met His Asp Ile Trp Ser Val Pro Ala Leu	
175 180 185	
cca aac cgc att gcc gtg cca atc aac aag cca ggc gac cgc atc ggt	1648
Pro Asn Arg Ile Ala Val Pro Ile Asn Lys Pro Gly Asp Arg Ile Gly	
190 195 200	
aag acc tac atc gag ttc gac acc gac aag gtt gtt gct gtt gtt gag	1696
Lys Thr Tyr Ile Glu Phe Asp Thr Asp Lys Val Val Ala Val Val Glu	
205 210 215 220	
acc aac acc gca gac cgc aac gca cca ttc aag cct gtc gac gac atc	1744
Thr Asn Thr Ala Asp Arg Asn Ala Pro Phe Lys Pro Val Asp Asp Ile	
225 230 235	
tct aag aag atc gct ggc aac ttc ctc gac ttc ctg gaa agc gaa gtt	1792
Ser Lys Lys Ile Ala Gly Asn Phe Leu Asp Phe Leu Glu Ser Glu Val	
240 245 250	
gct gca ggt cgc ctg tcc tac gac ggc tac atc atg cag tcc ggc gtg	1840
Ala Ala Gly Arg Leu Ser Tyr Asp Gly Tyr Ile Met Gln Ser Gly Val	
255 260 265	
ggc aac gtg cca aac gcg gtg atg gca ggc ctg ctg gaa tcc aag ttt	1888
Gly Asn Val Pro Asn Ala Val Met Ala Gly Leu Leu Glu Ser Lys Phe	
270 275 280	
gag aac atc cag gcc tac acc gaa gtt atc cag gac ggc atg gtg gac	1936
Glu Asn Ile Gln Ala Tyr Thr Glu Val Ile Gln Asp Gly Met Val Asp	
285 290 295 300	
ctc atc gac gcc ggc aag atg acc gtt gca tcc gca act tcc ttc tcc	1984
Leu Ile Asp Ala Gly Lys Met Thr Val Ala Ser Ala Thr Ser Phe Ser	
305 310 315	
ctg tct cct gag tac gca gag aag atg aac aac gag gct aag cgt tac	2032
Leu Ser Pro Glu Tyr Ala Glu Lys Met Asn Asn Glu Ala Lys Arg Tyr	
320 325 330	
cgc gag tcc att atc ctg cgc cca cag cag atc tct aac cac cca gag	2080
Arg Glu Ser Ile Ile Leu Arg Pro Gln Gln Ile Ser Asn His Pro Glu	
335 340 345	
gtc atc cgc cgc gtt ggc ctg atc gcc acc aac ggt ctc atc gag gct	2128
Val Ile Arg Arg Val Gly Leu Ile Ala Thr Asn Gly Leu Ile Glu Ala	
350 355 360	
gac att tac ggc aac gtc aac tcc acc aac gtt tct ggc tcc cgc gtc	2176
Asp Ile Tyr Gly Asn Val Asn Ser Thr Asn Val Ser Gly Ser Arg Val	
365 370 375 380	
atg aac ggc atc ggc ggc tcc ggc gac ttc acc cgt aac ggc tac atc	2224
Met Asn Gly Ile Gly Gly Ser Gly Asp Phe Thr Arg Asn Gly Tyr Ile	
385 390 395	

[0026]

```

tcc agc ttc atc acc cct tca gag gca aag ggc ggc gca atc tct gcg 2272
Ser Ser Phe Ile Thr Pro Ser Glu Ala Lys Gly Gly Ala Ile Ser Ala
400 405 410
atc gtt cct ttc gca tcc cac atc gac cac acc gag cac gat gtc atg 2320
Ile Val Pro Phe Ala Ser His Ile Asp His Thr Glu His Asp Val Met
415 420 425
gtt gtt atc tct gag tac ggt tac gca gac ctt cgt ggt ctg gct cca 2368
Val Val Ile Ser Glu Tyr Gly Tyr Ala Asp Leu Arg Gly Leu Ala Pro
430 435 440
cgt gag cgc gtt gcc aag atg atc ggc ctg gct cac cct gat tac cgc 2416
Arg Glu Arg Val Ala Lys Met Ile Gly Leu Ala His Pro Asp Tyr Arg
445 450 455 460
cca ctg ctc gag gag tac tac gct cgc gca acc tcc ggt gac aac aag 2464
Pro Leu Leu Glu Glu Tyr Tyr Ala Arg Ala Thr Ser Gly Asp Asn Lys
465 470 475
tac atg cag acc cct cat gat ctt gca acc gcg ttt gat ttc cac atc 2512
Tyr Met Gln Thr Pro His Asp Leu Ala Thr Ala Phe Asp Phe His Ile
480 485 490
aac ctg gct aag aac ggc tcc atg aag gca taa gttttttctt ggtttagaaa 2565
Asn Leu Ala Lys Asn Gly Ser Met Lys Ala
495 500
ccgccgcctc gacaacattt cgaggcggcg gtttctttta ttacctgggt tttgagcggt 2625
aaattagacc aggtcaggct agtgtttggg agctaattga gggcgatttt aataaggccg 2685
gtgccatgta ctaatatggt ctgagttggg cctatagctc agttggtaga gctacggact 2745
tttaatecgc aggtcttggg ttcgagtcgc aatgggceca catcttaagt acccctgttt 2805
tggagaatgc tccgagccag gggtaacttt cttttctca cacacagtag ctgctgagaa 2865
aaatgaagac cttttgttag gttgggagta tgaccaaccc atacgaggcc ttcataccgc 2925
tcaagcatgc tacggggatt gaaccgcgac acacctttg ggaatgggaa aacaaaagg 2985
ttcacattgc aaggagacgt cgagaagcgc ccgtccgcgt tatcgtgggt catgggctag 3045
gcacccatag tggcgccctc tggccctcgc tcgcggccat tgagggcgcg gacctgcgcg 3105
cgatcgacct gctaaaaact ccgctttaag acgattggct gcgctttta gaatcttca 3165
tctcttcga agacgacggt cggccactca tcttgatcgg tgcaggcacc ggaggttgc 3225
tttgcgcaga agctgcacac cgcacaggac tggtcgcaca cgtcattgcc acctgectgc 3285
tcaacccctc cgaccagccg acgcgccggg cactgttcag gttttaccg ctgactcggt 3345
tgatccaagg ccgcttgccg aaccgcgaaa ttcccgtag cagagtgtg aacttcagca 3405
aatcagccg cagcccagcc ctgagcaaat tgtgcgcggc cgatgaattt agcggagcat 3465
ccaaaataac ctgggttttc ctgcgctcat atgtgcaaca caaggccaaa ctgggtgcag 3525
ttcccgctac tctgatgcac cctgaccacg acctctgac tcccggttag ctgactctgc 3585
gtacgctttc gcgcc 3600

```

<210> 51

<211> 502

<212> PRT

<213> 谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum)

<400> 51

```

Met Ser Asp Arg Ile Ala Ser Glu Lys Leu Arg Ser Lys Leu Met Ser
1 5 10 15
Ala Asp Glu Ala Ala Gln Phe Val Asn His Gly Asp Lys Val Gly Phe
20 25 30
Ser Gly Phe Thr Gly Ala Gly Tyr Pro Lys Ala Leu Pro Thr Ala Ile
35 40 45
Ala Asn Arg Ala Lys Glu Ala His Gly Ala Gly Asn Asp Tyr Ala Ile
50 55 60
Asp Leu Phe Thr Gly Ala Ser Thr Ala Pro Asp Cys Asp Gly Val Leu
65 70 75 80
Ala Glu Ala Asp Ala Ile Arg Trp Arg Met Pro Tyr Ala Ser Asp Pro
85 90 95

```

[0027]

```

Ile Met Arg Asn Lys Ile Asn Ser Gly Ser Met Gly Tyr Ser Asp Ile
      100                      105                      110
His Leu Ser His Ser Gly Gln Gln Val Glu Glu Gly Phe Phe Gly Gln
      115                      120                      125
Leu Asn Val Ala Val Ile Glu Ile Thr Arg Ile Thr Glu Glu Gly Tyr
      130                      135                      140
Ile Ile Pro Ser Ser Ser Val Gly Asn Asn Val Glu Trp Leu Asn Ala
      145                      150                      155                      160
Ala Glu Lys Val Ile Leu Glu Val Asn Ser Trp Gln Ser Glu Asp Leu
      165                      170                      175
Glu Gly Met His Asp Ile Trp Ser Val Pro Ala Leu Pro Asn Arg Ile
      180                      185                      190
Ala Val Pro Ile Asn Lys Pro Gly Asp Arg Ile Gly Lys Thr Tyr Ile
      195                      200                      205
Glu Phe Asp Thr Asp Lys Val Val Ala Val Val Glu Thr Asn Thr Ala
      210                      215                      220
Asp Arg Asn Ala Pro Phe Lys Pro Val Asp Asp Ile Ser Lys Lys Ile
      225                      230                      235                      240
Ala Gly Asn Phe Leu Asp Phe Leu Glu Ser Glu Val Ala Ala Gly Arg
      245                      250                      255
Leu Ser Tyr Asp Gly Tyr Ile Met Gln Ser Gly Val Gly Asn Val Pro
      260                      265                      270
Asn Ala Val Met Ala Gly Leu Leu Glu Ser Lys Phe Glu Asn Ile Gln
      275                      280                      285
Ala Tyr Thr Glu Val Ile Gln Asp Gly Met Val Asp Leu Ile Asp Ala
      290                      295                      300
Gly Lys Met Thr Val Ala Ser Ala Thr Ser Phe Ser Leu Ser Pro Glu
      305                      310                      315                      320
Tyr Ala Glu Lys Met Asn Asn Glu Ala Lys Arg Tyr Arg Glu Ser Ile
      325                      330                      335
Ile Leu Arg Pro Gln Gln Ile Ser Asn His Pro Glu Val Ile Arg Arg
      340                      345                      350
Val Gly Leu Ile Ala Thr Asn Gly Leu Ile Glu Ala Asp Ile Tyr Gly
      355                      360                      365
Asn Val Asn Ser Thr Asn Val Ser Gly Ser Arg Val Met Asn Gly Ile
      370                      375                      380
Gly Gly Ser Gly Asp Phe Thr Arg Asn Gly Tyr Ile Ser Ser Phe Ile
      385                      390                      395                      400
Thr Pro Ser Glu Ala Lys Gly Gly Ala Ile Ser Ala Ile Val Pro Phe
      405                      410                      415
Ala Ser His Ile Asp His Thr Glu His Asp Val Met Val Val Ile Ser
      420                      425                      430
Glu Tyr Gly Tyr Ala Asp Leu Arg Gly Leu Ala Pro Arg Glu Arg Val
      435                      440                      445
Ala Lys Met Ile Gly Leu Ala His Pro Asp Tyr Arg Pro Leu Leu Glu
      450                      455                      460
Glu Tyr Tyr Ala Arg Ala Thr Ser Gly Asp Asn Lys Tyr Met Gln Thr
      465                      470                      475                      480
Pro His Asp Leu Ala Thr Ala Phe Asp Phe His Ile Asn Leu Ala Lys
      485                      490                      495
Asn Gly Ser Met Lys Ala
      500

```

<210> 52

<211> 2100

<212> DNA

<213> 谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum)

[0028]

<220>	
<221>	CDS
<222>	(850)..(1134)
<223>	
<400>	52
ggccgattcc gaaggaaatc gcacgcctgg attttgataa cggatgacca aacgcagcag	60
ctcctgttcc aggtttgagc ccatttatgc ccaaagagca ggcaattgag cggcttttag	120
agatcatgag acagaacctg ctgctgcctt ttgagatcga ggtgccggag aaaattcagc	180
gggaagcaact gagggatttc acggcggaac ctcaattggg ttccaccgtg ggcgtgata	240
tttttgatgc attgcaaatg gctgttgggg tgggtgcggg aagcgcgaag agcaattggc	300
gcaaatgggg agcgttttgt gtgggggctg cagctttgac cgtcgcaacg ggtggttgg	360
ctttggcggc tgtgccgact gttgctggag tagccactgt tgccctgaca ctgcagcat	420
ttggtccagg tgggatgatg ggcggtttgg tcaactgcagg aacactgctc acagtgtgtg	480
gcccagtttt aaccgctggg gtgttgagct cggatgaacac cacggaagag atcgaagcgc	540
tcgttgtaca gaagctaagt ttgctatatt tgtggcagcg ccatgagata gatagaactc	600
atgaggtgtg ggaagaattc gcggaggcag aacgtctgat tgtgcgggag cacacgcgtg	660
tgaataacgt gtcgatagat tcttcgcca ttttgaaagc ttctgagcag cagcgttcga	720
ctattgagcg ggcgttgaag tatttgagcg atcatgggat ggaacctggc tggtttgaag	780
aactcgacc accagccca acaccgttc taaaactcgc ggctaagaaa actgattagg	840
agaaacaca atg gag aaa gtt cgt ctg act gct ttt gtt cat ggt cat gtc	891
Met Glu Lys Val Arg Leu Thr Ala Phe Val His Gly His Val	
1 5 10	
cag ggc gtg ggt ttt cga tgg tgg act acc tcg cag gca cga gaa tta	939
Gln Gly Val Gly Phe Arg Trp Trp Thr Thr Ser Gln Ala Arg Glu Leu	
15 20 25 30	
aaa ctt gca ggt tct gcc agt aat tta agt gac ggc cgg gtg tgc gtg	987
Lys Leu Ala Gly Ser Ala Ser Asn Leu Ser Asp Gly Arg Val Cys Val	
35 40 45	
ggt gct gaa ggg cca caa aca cag tgc gaa gaa ctg ctg aga agg ttg	1035
Val Ala Glu Gly Pro Gln Thr Gln Cys Glu Glu Leu Leu Arg Arg Leu	
50 55 60	
aag gaa aac ccc agc tcg tat cgc aga cca ggt cat gtg gac aca gtt	1083
Lys Glu Asn Pro Ser Ser Tyr Arg Arg Pro Gly His Val Asp Thr Val	
65 70 75	
att gag caa tgg ggc gag ccg cgt gac gtt gaa ggc ttt gtg gag cgc	1131
Ile Glu Gln Trp Gly Glu Pro Arg Asp Val Glu Gly Phe Val Glu Arg	
80 85 90	
tag actttaacc cgttatgtat ttgaaatcgt tgacgtcaa ggggtttaag	1184
tctttcgcgt ctgcgacgac cctgaaattt gagccaggca tttgtgccgt ggtgggtccg	1244
aatggttcag gcaaatccaa tgtgtttgat gcgctggcct gggtgatggg tgaaggttct	1304
gcgaagacct tgcgtggcgg caaaatggaa gatgtcattt ttgctggcgc gggcgatcgt	1364
aaaccgttgg gtgcgcgaga agtcacgtg accattgata actctgatgg cgcactgccc	1424
attgagtaca ccgaagtgtc ggtgaccaga cggatgttcc gtgatgtgac aagtgaatat	1484
gagateaatg gggcgaaagc tcgattgatg gatattccagg agctgtttgc ggataaccgtt	1544
attggccgtg aaatgcacat catggtgggg cagggaagc tcgcagagat tttggagtcc	1604
cgccccgaag agcgcgcgag gtatatcgaa gaagctgcgg gtgtgtctca gcaccggcgc	1664
aggaaagaaa aggcgcagcg caaacttcag ggcattgcagg tcaatcttga tcgtttgcag	1724
gatctgacct atgagttggc caagcagctc aagccgttgg ctaggcaggc ggaagcagcg	1784
cagcgtgcgg cgacggtgca ggcgtgattg cgtgatgcgc gtttccagat tgcgtgcttt	1844
gagatcgtga agctctcgga aaagctggaa acctctactg agcgcgagaa aatgattcgt	1904
gagcaggcgg aagcagcaca agagcagctg gaagaagcca ccacaactca gatggaagtg	1964
gagatggagt tggcggagat cactccgcag gctgaagctg cgcaacagtt gtggtttgat	2024
ttgtcttcgc tggctgagcg ggtgtcgcca acgatgcgta ttgctgcaga ccgtgcgagt	2084
tcagggtgcc cggatg	2100
<210>	53
<211>	94

[0029]

<212> PRT
<213> 谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)

<400> 53
Met Glu Lys Val Arg Leu Thr Ala Phe Val His Gly His Val Gln Gly
1 5 10 15
Val Gly Phe Arg Trp Trp Thr Thr Ser Gln Ala Arg Glu Leu Lys Leu
20 25 30
Ala Gly Ser Ala Ser Asn Leu Ser Asp Gly Arg Val Cys Val Val Ala
35 40 45
Glu Gly Pro Gln Thr Gln Cys Glu Glu Leu Leu Arg Arg Leu Lys Glu
50 55 60
Asn Pro Ser Ser Tyr Arg Arg Pro Gly His Val Asp Thr Val Ile Glu
65 70 75 80
Gln Trp Gly Glu Pro Arg Asp Val Glu Gly Phe Val Glu Arg
85 90

<210> 54
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

<400> 54
cagcttcttc gatatacgct cgcc 24

<210> 55
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

<400> 55
ctgattagga gaaacacaat ggaggtggag cgctagactt taaccc 46

<210> 56
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 引物

<400> 56
gggttaaagt ctagcgtcc acctccattg tgtttctcct aatcag 46

<210> 57
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工的

[0030]

<220>		
<223>	引物	
<400>	57	
	gctgcagctt tgaccgctgc aacgg	25
<210>	58	
<211>	33	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	58	
	gggaatctag acccaccatg atgtgcattt cac	33
<210>	59	
<211>	34	
<212>	DNA	
<213>	人工的	
<220>		
<223>	引物	
<400>	59	
	gggaatctag agttgctgga gtagccactg ttgc	34
<210>	60	
<211>	3423	
<212>	DNA	
<213>	谷氨酸棒杆菌(Corynebacterium glutamicum)	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(1).. (3423)	
<223>		
<400>	60	
	gtg tgc act cac aca tct tca acg ctt cca gca ttc aaa aag atc ttg	48
	Val Ser Thr His Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ala Phe Lys Lys Ile Leu	
	1 5 10 15	
	gta gca aac cgc ggc gaa atc gcg gtc cgt gct ttc cgt gca gca ctc	96
	Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Val Arg Ala Phe Arg Ala Ala Leu	
	20 25 30	
	gaa acc ggt gca gcc acg gta gct att tac ccc cgt gaa gat cgg gga	144
	Glu Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala Ile Tyr Pro Arg Glu Asp Arg Gly	
	35 40 45	
	tca ttc cac cgc tct ttt gct tct gaa gct gtc cgc att ggt acc gaa	192
	Ser Phe His Arg Ser Phe Ala Ser Glu Ala Val Arg Ile Gly Thr Glu	
	50 55 60	
	ggc tca cca gtc aag gcg tac ctg gac atc gat gaa att atc ggt gca	240
	Gly Ser Pro Val Lys Ala Tyr Leu Asp Ile Asp Glu Ile Ile Gly Ala	
	65 70 75 80	
	gct aaa aaa gtt aaa gca gat gcc att tac ccg gga tac ggc ttc ctg	288
	Ala Lys Lys Val Lys Ala Asp Ala Ile Tyr Pro Gly Tyr Gly Phe Leu	

[0031]

85	90	95	
tct gaa aat gcc cag ctt gcc cgc gag tgt gcg gaa aac ggc att act			336
Ser Glu Asn Ala Gln Leu Ala Arg Glu Cys Ala Glu Asn Gly Ile Thr			
100	105	110	
ttt att ggc cca acc cca gag gtt ctt gat ctc acc ggt gat aag tct			384
Phe Ile Gly Pro Thr Pro Glu Val Leu Asp Leu Thr Gly Asp Lys Ser			
115	120	125	
cgc gcg gta acc gcc gcg aag aag gct ggt ctg cca gtt ttg gcg gaa			432
Arg Ala Val Thr Ala Ala Lys Lys Ala Gly Leu Pro Val Leu Ala Glu			
130	135	140	
tcc acc ccg agc aaa aac atc gat gag atc gtt aaa agc gct gaa ggc			480
Ser Thr Pro Ser Lys Asn Ile Asp Glu Ile Val Lys Ser Ala Glu Gly			
145	150	155	
cag act tac ccc atc ttt gtg aag gca gtt gcc ggt ggt ggc gga cgc			528
Gln Thr Tyr Pro Ile Phe Val Lys Ala Val Ala Gly Gly Gly Gly Arg			
165	170	175	
ggt atg cgt ttt gtt gct tca cct gat gag ctt cgc aaa tta gca aca			576
Gly Met Arg Phe Val Ala Ser Pro Asp Glu Leu Arg Lys Leu Ala Thr			
180	185	190	
gaa gca tct cgt gaa gct gaa gcg gct ttc ggc gat ggc gcg gta tat			624
Glu Ala Ser Arg Glu Ala Glu Ala Ala Phe Gly Asp Gly Ala Val Tyr			
195	200	205	
gtc gaa cgt gct gtg att aac cct cag cat att gaa gtg cag atc ctt			672
Val Glu Arg Ala Val Ile Asn Pro Gln His Ile Glu Val Gln Ile Leu			
210	215	220	
ggc gat cac act gga gaa gtt gta cac ctt tat gaa cgt gac tgc tca			720
Gly Asp His Thr Gly Glu Val Val His Leu Tyr Glu Arg Asp Cys Ser			
225	230	235	
ctg cag cgt cgt cac caa aaa gtt gtc gaa att gcg cca gca cag cat			768
Leu Gln Arg Arg His Gln Lys Val Val Glu Ile Ala Pro Ala Gln His			
245	250	255	
ttg gat cca gaa ctg cgt gat cgc att tgt gcg gat gca gta aag ttc			816
Leu Asp Pro Glu Leu Arg Asp Arg Ile Cys Ala Asp Ala Val Lys Phe			
260	265	270	
tgc cgc tcc att ggt tac cag ggc gcg gga acc gtg gaa ttc ttg gtc			864
Cys Arg Ser Ile Gly Tyr Gln Gly Ala Gly Thr Val Glu Phe Leu Val			
275	280	285	
gat gaa aag ggc aac cac gtc ttc atc gaa atg aac cca cgt atc cag			912
Asp Glu Lys Gly Asn His Val Phe Ile Glu Met Asn Pro Arg Ile Gln			
290	295	300	
gtt gag cac acc gtg act gaa gaa gtc acc gag gtg gac ctg gtg aag			960
Val Glu His Thr Val Thr Glu Glu Val Thr Glu Val Asp Leu Val Lys			
305	310	315	
gcg cag atg cgc ttg gct gct ggt gca acc ttg aag gaa ttg ggt ctg			1008
Ala Gln Met Arg Leu Ala Ala Gly Ala Thr Leu Lys Glu Leu Gly Leu			
325	330	335	
acc caa gat aag atc aag acc cac ggt gca gca ctg cag tgc cgc atc			1056
Thr Gln Asp Lys Ile Lys Thr His Gly Ala Ala Leu Gln Cys Arg Ile			
340	345	350	
acc acg gaa gat cca aac aac ggc ttc cgc cca gat acc gga act atc			1104
Thr Thr Glu Asp Pro Asn Asn Gly Phe Arg Pro Asp Thr Gly Thr Ile			
355	360	365	
acc gcg tac cgc tca cca ggc gga gct ggc gtt cgt ctt gac ggt gca			1152
Thr Ala Tyr Arg Ser Pro Gly Gly Ala Gly Val Arg Leu Asp Gly Ala			
370	375	380	
gct cag ctc ggt ggc gaa atc acc gca cac ttt gac tcc atg ctg gtg			1200
Ala Gln Leu Gly Gly Glu Ile Thr Ala His Phe Asp Ser Met Leu Val			
385	390	395	
aaa atg acc tgc cgt ggt tcc gac ttt gaa act gct gtt gct cgt gca		400	1248

[0032]

Lys Met Thr Cys Arg Gly Ser Asp Phe Glu Thr Ala Val Ala Arg Ala	
405 410 415	
cag cgc gcg ttg gct gag ttc acc gtg tct ggt gtt gca acc aac att	1296
Gln Arg Ala Leu Ala Glu Phe Thr Val Ser Gly Val Ala Thr Asn Ile	
420 425 430	
ggg ttc ttg cgt gcg ttg ctg cgg gaa gag gac ttc act tcc aag cgc	1344
Gly Phe Leu Arg Ala Leu Leu Arg Glu Glu Asp Phe Thr Ser Lys Arg	
435 440 445	
atc gcc acc gga ttc att gcc gat cac ceg cac ctc ctt cag gct cca	1392
Ile Ala Thr Gly Phe Ile Ala Asp His Pro His Leu Leu Gln Ala Pro	
450 455 460	
cct gct gat gat gag cag gga cgc atc ctg gat tac ttg gca gat gtc	1440
Pro Ala Asp Asp Glu Gln Gly Arg Ile Leu Asp Tyr Leu Ala Asp Val	
465 470 475 480	
acc gtg aac aag cct cat ggt gtg cgt cca aag gat gtt gca gct cct	1488
Thr Val Asn Lys Pro His Gly Val Arg Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro	
485 490 495	
atc gat aag ctg cct aac atc aag gat ctg cca ctg cca cgc ggt tcc	1536
Ile Asp Lys Leu Pro Asn Ile Lys Asp Leu Pro Leu Pro Arg Gly Ser	
500 505 510	
cgt gac cgc ctg aag cag ctt ggc cca gcc gcg ttt gct cgt gat ctc	1584
Arg Asp Arg Leu Lys Gln Leu Gly Pro Ala Ala Phe Ala Arg Asp Leu	
515 520 525	
cgt gag cag gac gca ctg gca gtt act gat acc acc ttc cgc gat gca	1632
Arg Glu Gln Asp Ala Leu Ala Val Thr Asp Thr Thr Phe Arg Asp Ala	
530 535 540	
cac cag tct ttg ctt gcg acc cga gtc cgc tca ttc gca ctg aag cct	1680
His Gln Ser Leu Leu Ala Thr Arg Val Arg Ser Phe Ala Leu Lys Pro	
545 550 555 560	
gcg gca gag gcc gtc gca aag ctg act cct gag ctt ttg tcc gtg gag	1728
Ala Ala Glu Ala Val Ala Lys Leu Thr Pro Glu Leu Leu Ser Val Glu	
565 570 575	
gcc tgg ggc ggc gcg acc tac gat gtg gcg atg cgt ttc ctc tti gag	1776
Ala Trp Gly Gly Ala Thr Tyr Asp Val Ala Met Arg Phe Leu Phe Glu	
580 585 590	
gat ccg tgg gac agg ctc gac gag ctg cgc gag gcg atg ccg aat gta	1824
Asp Pro Trp Asp Arg Leu Asp Glu Leu Arg Glu Ala Met Pro Asn Val	
595 600 605	
aac att cag atg ctg ctt cgc ggc cgc aac acc gtg gga tac acc ccg	1872
Asn Ile Gln Met Leu Leu Arg Gly Arg Asn Thr Val Gly Tyr Thr Pro	
610 615 620	
tac cca gac tcc gtc tgc cgc gcg ttt gtt aag gaa gct gcc agc tcc	1920
Tyr Pro Asp Ser Val Cys Arg Ala Phe Val Lys Glu Ala Ala Ser Ser	
625 630 635 640	
ggc gtg gac atc ttc cgc atc ttc gac gcg ctt aac gac gtc tcc cag	1968
Gly Val Asp Ile Phe Arg Ile Phe Asp Ala Leu Asn Asp Val Ser Gln	
645 650 655	
atg cgt cca gca atc gac gca gtc ctg gag acc aac acc gcg gta gcc	2016
Met Arg Pro Ala Ile Asp Ala Val Leu Glu Thr Asn Thr Ala Val Ala	
660 665 670	
gag gtg gct atg gct tat tct ggt gat ctc tct gat cca aat gaa aag	2064
Glu Val Ala Met Ala Tyr Ser Gly Asp Leu Ser Asp Pro Asn Glu Lys	
675 680 685	
ctc tac acc ctg gat tac tac cta aag atg gca gag gag atc gtc aag	2112
Leu Tyr Thr Leu Asp Tyr Tyr Leu Lys Met Ala Glu Glu Ile Val Lys	
690 695 700	
tct ggc gct cac atc ttg gcc att aag gat atg gct ggt ctg ctt cgc	2160
Ser Gly Ala His Ile Leu Ala Ile Lys Asp Met Ala Gly Leu Leu Arg	
705 710 715 720	

[0033]

cca gct gcg gta acc aag ctg gtc acc gca ctg cgc cgt gaa ttc gat	2208
Pro Ala Ala Val Thr Lys Leu Val Thr Ala Leu Arg Arg Glu Phe Asp	
725 730 735	
ctg cca gtg cac gtg cac acc cac gac act gcg ggt ggc cag ctg gca	2256
Leu Pro Val His Val His Thr His Asp Thr Ala Gly Gly Gln Leu Ala	
740 745 750	
acc tac ttt gct gca gct caa gct ggt gca gat gct gtt gac ggt gct	2304
Thr Tyr Phe Ala Ala Ala Gln Ala Gly Ala Asp Ala Val Asp Gly Ala	
755 760 765	
tcc gca cca ctg tct ggc acc acc tcc cag cca tcc ctg tct gcc att	2352
Ser Ala Pro Leu Ser Gly Thr Thr Ser Gln Pro Ser Leu Ser Ala Ile	
770 775 780	
gtt gct gca ttc gcg cac acc cgt cgc gat acc ggt ttg agc ctc gag	2400
Val Ala Ala Phe Ala His Thr Arg Arg Asp Thr Gly Leu Ser Leu Glu	
785 790 795 800	
gct gtt tct gac ctc gag ccg tac tgg gaa gca gtg cgc gga ctg tac	2448
Ala Val Ser Asp Leu Glu Pro Tyr Trp Glu Ala Val Arg Gly Leu Tyr	
805 810 815	
ctg cca ttt gag tct gga acc cca ggc cca acc ggt cgc gtc tac cgc	2496
Leu Pro Phe Glu Ser Gly Thr Pro Gly Pro Thr Gly Arg Val Tyr Arg	
820 825 830	
cac gaa atc cca ggc gga cag ttg tcc aac ctg cgt gca cag gcc acc	2544
His Glu Ile Pro Gly Gly Gln Leu Ser Asn Leu Arg Ala Gln Ala Thr	
835 840 845	
gca ctg ggc ctt gcg gat cgt ttc gaa ctc atc gaa gac aac tac gca	2592
Ala Leu Gly Leu Ala Asp Arg Phe Glu Leu Ile Glu Asp Asn Tyr Ala	
850 855 860	
gcc gtt aat gag atg ctg gga cgc cca acc aag gtc acc cca tcc tcc	2640
Ala Val Asn Glu Met Leu Gly Arg Pro Thr Lys Val Thr Pro Ser Ser	
865 870 875 880	
aag gtt gtt ggc gac ctc gca ctc cac ctc gtt ggt gcg ggt gtg gat	2688
Lys Val Val Gly Asp Leu Ala Leu His Leu Val Gly Ala Gly Val Asp	
885 890 895	
cca gca gac ttt gct gcc gat cca caa aag tac gac atc cca gac tct	2736
Pro Ala Asp Phe Ala Ala Asp Pro Gln Lys Tyr Asp Ile Pro Asp Ser	
900 905 910	
gtc atc gcg ttc ctg cgc ggc gag ctt ggt aac cct cca ggt ggc tgg	2784
Val Ile Ala Phe Leu Arg Gly Glu Leu Gly Asn Pro Pro Gly Gly Trp	
915 920 925	
cca gag cca ctg cgc acc cgc gca ctg gaa ggc cgc tcc gaa ggc aag	2832
Pro Glu Pro Leu Arg Thr Arg Ala Leu Glu Gly Arg Ser Glu Gly Lys	
930 935 940	
gca cct ctg acg gaa gtt cct gag gaa gag cag gcg cac ctc gac gct	2880
Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro Glu Glu Glu Gln Ala His Leu Asp Ala	
945 950 955 960	
gat gat tcc aag gaa cgt cgc aat agc ctc aac cgc ctg ctg ttc ccg	2928
Asp Asp Ser Lys Glu Arg Arg Asn Ser Leu Asn Arg Leu Leu Phe Pro	
965 970 975	
aag cca acc gaa gag ttc ctc gag cac cgt cgc cgc ttc ggc aac acc	2976
Lys Pro Thr Glu Glu Phe Leu Glu His Arg Arg Arg Phe Gly Asn Thr	
980 985 990	
tct gcg ctg gat gat cgt gaa ttc ttc tac ggc ctg gtc gaa ggc cgc	3024
Ser Ala Leu Asp Asp Arg Glu Phe Phe Tyr Gly Leu Val Glu Gly Arg	
995 1000 1005	
gag act ttg atc cgc ctg cca gat gtg cgc acc cca ctg ctt gtt	3069
Glu Thr Leu Ile Arg Leu Pro Asp Val Arg Thr Pro Leu Leu Val	
1010 1015 1020	
cgc ctg gat gcg atc tct gag cca gac gat aag ggt atg cgc aat	3114
Arg Leu Asp Ala Ile Ser Glu Pro Asp Asp Lys Gly Met Arg Asn	

[0034]

1025	1030	1035	
gtt gtg gcc aac gtc aac ggc	cag atc cgc cca atg	cgt gtg cgt	3159
Val Val Ala Asn Val Asn Gly	Gln Ile Arg Pro Met	Arg Val Arg	
1040	1045	1050	
gac cgc tcc gtt gag tct gtc	acc gca acc gca gaa	aag gca gat	3204
Asp Arg Ser Val Glu Ser Val	Thr Ala Thr Ala Glu	Lys Ala Asp	
1055	1060	1065	
tcc tcc aac aag ggc cat gtt	gct gca cca ttc gct	ggg gtt gtc	3249
Ser Ser Asn Lys Gly His Val	Ala Ala Pro Phe Ala	Gly Val Val	
1070	1075	1080	
acc gtg act gtt gct gaa ggt	gat gag gtc aag gct	gga gat gca	3294
Thr Val Thr Val Ala Glu Gly	Asp Glu Val Lys Ala	Gly Asp Ala	
1085	1090	1095	
gtc gca atc atc gag gct atg	aag atg gaa gca aca	atc act gct	3339
Val Ala Ile Ile Glu Ala Met	Lys Met Glu Ala Thr	Ile Thr Ala	
1100	1105	1110	
tct gtt gac ggc aaa atc gat	cgc gtt gtg gtt cct	gct gca acg	3384
Ser Val Asp Gly Lys Ile Asp	Arg Val Val Val Pro	Ala Ala Thr	
1115	1120	1125	
aag gtg gaa ggt ggc gac ttg	atc gtc gtc gtt tcc	taa	3423
Lys Val Glu Gly Gly Asp Leu	Ile Val Val Val Ser		
1130	1135	1140	

<210> 61
 <211> 1140
 <212> PRT
 <213> 谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutanicum*)

<400> 61
 Val Ser Thr His Thr Ser Ser Thr Leu Pro Ala Phe Lys Lys Ile Leu
 1 5 10 15
 Val Ala Asn Arg Gly Glu Ile Ala Val Arg Ala Phe Arg Ala Ala Leu
 20 25 30
 Glu Thr Gly Ala Ala Thr Val Ala Ile Tyr Pro Arg Glu Asp Arg Gly
 35 40 45
 Ser Phe His Arg Ser Phe Ala Ser Glu Ala Val Arg Ile Gly Thr Glu
 50 55 60
 Gly Ser Pro Val Lys Ala Tyr Leu Asp Ile Asp Glu Ile Ile Gly Ala
 65 70 75 80
 Ala Lys Lys Val Lys Ala Asp Ala Ile Tyr Pro Gly Tyr Gly Phe Leu
 85 90 95
 Ser Glu Asn Ala Gln Leu Ala Arg Glu Cys Ala Glu Asn Gly Ile Thr
 100 105 110
 Phe Ile Gly Pro Thr Pro Glu Val Leu Asp Leu Thr Gly Asp Lys Ser
 115 120 125
 Arg Ala Val Thr Ala Ala Lys Lys Ala Gly Leu Pro Val Leu Ala Glu
 130 135 140
 Ser Thr Pro Ser Lys Asn Ile Asp Glu Ile Val Lys Ser Ala Glu Gly
 145 150 155 160
 Gln Thr Tyr Pro Ile Phe Val Lys Ala Val Ala Gly Gly Gly Gly Arg
 165 170 175
 Gly Met Arg Phe Val Ala Ser Pro Asp Glu Leu Arg Lys Leu Ala Thr
 180 185 190
 Glu Ala Ser Arg Glu Ala Glu Ala Ala Phe Gly Asp Gly Ala Val Tyr
 195 200 205
 Val Glu Arg Ala Val Ile Asn Pro Gln His Ile Glu Val Gln Ile Leu
 210 215 220
 Gly Asp His Thr Gly Glu Val Val His Leu Tyr Glu Arg Asp Cys Ser

[0035]

225	230	235	240
Leu Gln Arg Arg His	Gln Lys Val Val Glu Ile Ala Pro Ala Gln His		
245	250	255	
Leu Asp Pro Glu Leu Arg Asp Arg Ile Cys Ala Asp Ala Val Lys Phe			
260	265	270	
Cys Arg Ser Ile Gly Tyr Gln Gly Ala Gly Thr Val Glu Phe Leu Val			
275	280	285	
Asp Glu Lys Gly Asn His Val Phe Ile Glu Met Asn Pro Arg Ile Gln			
290	295	300	
Val Glu His Thr Val Thr Glu Glu Val Thr Glu Val Asp Leu Val Lys			
305	310	315	320
Ala Gln Met Arg Leu Ala Ala Gly Ala Thr Leu Lys Glu Leu Gly Leu			
325	330	335	
Thr Gln Asp Lys Ile Lys Thr His Gly Ala Ala Leu Gln Cys Arg Ile			
340	345	350	
Thr Thr Glu Asp Pro Asn Asn Gly Phe Arg Pro Asp Thr Gly Thr Ile			
355	360	365	
Thr Ala Tyr Arg Ser Pro Gly Gly Ala Gly Val Arg Leu Asp Gly Ala			
370	375	380	
Ala Gln Leu Gly Gly Glu Ile Thr Ala His Phe Asp Ser Met Leu Val			
385	390	395	400
Lys Met Thr Cys Arg Gly Ser Asp Phe Glu Thr Ala Val Ala Arg Ala			
405	410	415	
Gln Arg Ala Leu Ala Glu Phe Thr Val Ser Gly Val Ala Thr Asn Ile			
420	425	430	
Gly Phe Leu Arg Ala Leu Leu Arg Glu Glu Asp Phe Thr Ser Lys Arg			
435	440	445	
Ile Ala Thr Gly Phe Ile Ala Asp His Pro His Leu Leu Gln Ala Pro			
450	455	460	
Pro Ala Asp Asp Glu Gln Gly Arg Ile Leu Asp Tyr Leu Ala Asp Val			
465	470	475	480
Thr Val Asn Lys Pro His Gly Val Arg Pro Lys Asp Val Ala Ala Pro			
485	490	495	
Ile Asp Lys Leu Pro Asn Ile Lys Asp Leu Pro Leu Pro Arg Gly Ser			
500	505	510	
Arg Asp Arg Leu Lys Gln Leu Gly Pro Ala Ala Phe Ala Arg Asp Leu			
515	520	525	
Arg Glu Gln Asp Ala Leu Ala Val Thr Asp Thr Thr Phe Arg Asp Ala			
530	535	540	
His Gln Ser Leu Leu Ala Thr Arg Val Arg Ser Phe Ala Leu Lys Pro			
545	550	555	560
Ala Ala Glu Ala Val Ala Lys Leu Thr Pro Glu Leu Leu Ser Val Glu			
565	570	575	
Ala Trp Gly Gly Ala Thr Tyr Asp Val Ala Met Arg Phe Leu Phe Glu			
580	585	590	
Asp Pro Trp Asp Arg Leu Asp Glu Leu Arg Glu Ala Met Pro Asn Val			
595	600	605	
Asn Ile Gln Met Leu Leu Arg Gly Arg Asn Thr Val Gly Tyr Thr Pro			
610	615	620	
Tyr Pro Asp Ser Val Cys Arg Ala Phe Val Lys Glu Ala Ala Ser Ser			
625	630	635	640
Gly Val Asp Ile Phe Arg Ile Phe Asp Ala Leu Asn Asp Val Ser Gln			
645	650	655	
Met Arg Pro Ala Ile Asp Ala Val Leu Glu Thr Asn Thr Ala Val Ala			
660	665	670	
Glu Val Ala Met Ala Tyr Ser Gly Asp Leu Ser Asp Pro Asn Glu Lys			
675	680	685	
Leu Tyr Thr Leu Asp Tyr Tyr Leu Lys Met Ala Glu Glu Ile Val Lys			
690	695	700	

[0036]

Ser Gly Ala His Ile Leu Ala Ile Lys Asp Met Ala Gly Leu Leu Arg			
705	710	715	720
Pro Ala Ala Val Thr Lys Leu Val Thr Ala Leu Arg Arg Glu Phe Asp			
	725	730	735
Leu Pro Val His Val His Thr His Asp Thr Ala Gly Gly Gln Leu Ala			
	740	745	750
Thr Tyr Phe Ala Ala Ala Gln Ala Gly Ala Asp Ala Val Asp Gly Ala			
	755	760	765
Ser Ala Pro Leu Ser Gly Thr Thr Ser Gln Pro Ser Leu Ser Ala Ile			
	770	775	780
Val Ala Ala Phe Ala His Thr Arg Arg Asp Thr Gly Leu Ser Leu Glu			
785	790	795	800
Ala Val Ser Asp Leu Glu Pro Tyr Trp Glu Ala Val Arg Gly Leu Tyr			
	805	810	815
Leu Pro Phe Glu Ser Gly Thr Pro Gly Pro Thr Gly Arg Val Tyr Arg			
	820	825	830
His Glu Ile Pro Gly Gly Gln Leu Ser Asn Leu Arg Ala Gln Ala Thr			
	835	840	845
Ala Leu Gly Leu Ala Asp Arg Phe Glu Leu Ile Glu Asp Asn Tyr Ala			
	850	855	860
Ala Val Asn Glu Met Leu Gly Arg Pro Thr Lys Val Thr Pro Ser Ser			
865	870	875	880
Lys Val Val Gly Asp Leu Ala Leu His Leu Val Gly Ala Gly Val Asp			
	885	890	895
Pro Ala Asp Phe Ala Ala Asp Pro Gln Lys Tyr Asp Ile Pro Asp Ser			
	900	905	910
Val Ile Ala Phe Leu Arg Gly Glu Leu Gly Asn Pro Pro Gly Gly Trp			
	915	920	925
Pro Glu Pro Leu Arg Thr Arg Ala Leu Glu Gly Arg Ser Glu Gly Lys			
	930	935	940
Ala Pro Leu Thr Glu Val Pro Glu Glu Glu Gln Ala His Leu Asp Ala			
945	950	955	960
Asp Asp Ser Lys Glu Arg Arg Asn Ser Leu Asn Arg Leu Leu Phe Pro			
	965	970	975
Lys Pro Thr Glu Glu Phe Leu Glu His Arg Arg Arg Phe Gly Asn Thr			
	980	985	990
Ser Ala Leu Asp Asp Arg Glu Phe Phe Tyr Gly Leu Val Glu Gly Arg			
	995	1000	1005
Glu Thr Leu Ile Arg Leu Pro Asp Val Arg Thr Pro Leu Leu Val			
	1010	1015	1020
Arg Leu Asp Ala Ile Ser Glu Pro Asp Asp Lys Gly Met Arg Asn			
	1025	1030	1035
Val Val Ala Asn Val Asn Gly Gln Ile Arg Pro Met Arg Val Arg			
	1040	1045	1050
Asp Arg Ser Val Glu Ser Val Thr Ala Thr Ala Glu Lys Ala Asp			
	1055	1060	1065
Ser Ser Asn Lys Gly His Val Ala Ala Pro Phe Ala Gly Val Val			
	1070	1075	1080
Thr Val Thr Val Ala Glu Gly Asp Glu Val Lys Ala Gly Asp Ala			
	1085	1090	1095
Val Ala Ile Ile Glu Ala Met Lys Met Glu Ala Thr Ile Thr Ala			
	1100	1105	1110
Ser Val Asp Gly Lys Ile Asp Arg Val Val Val Pro Ala Ala Thr			
	1115	1120	1125
Lys Val Glu Gly Gly Asp Leu Ile Val Val Val Ser			
	1130	1135	1140

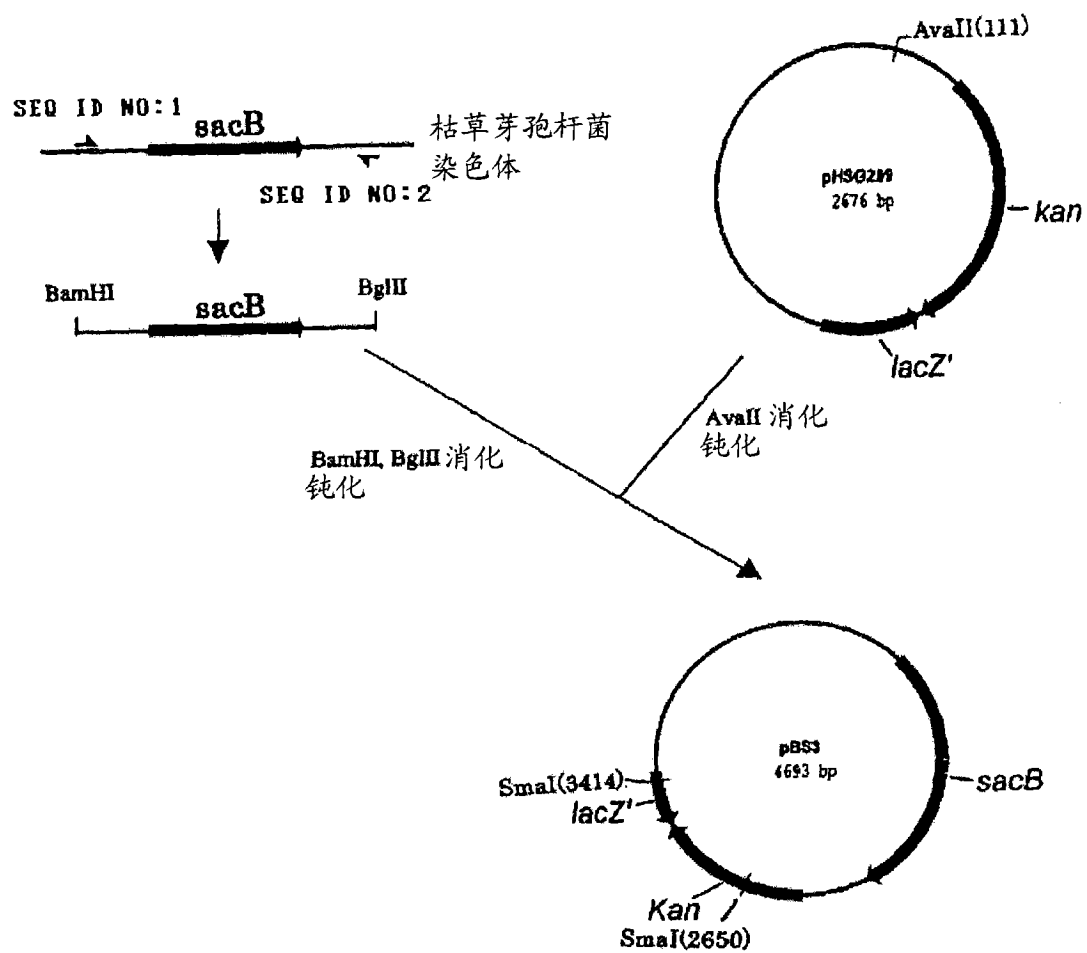


图 1

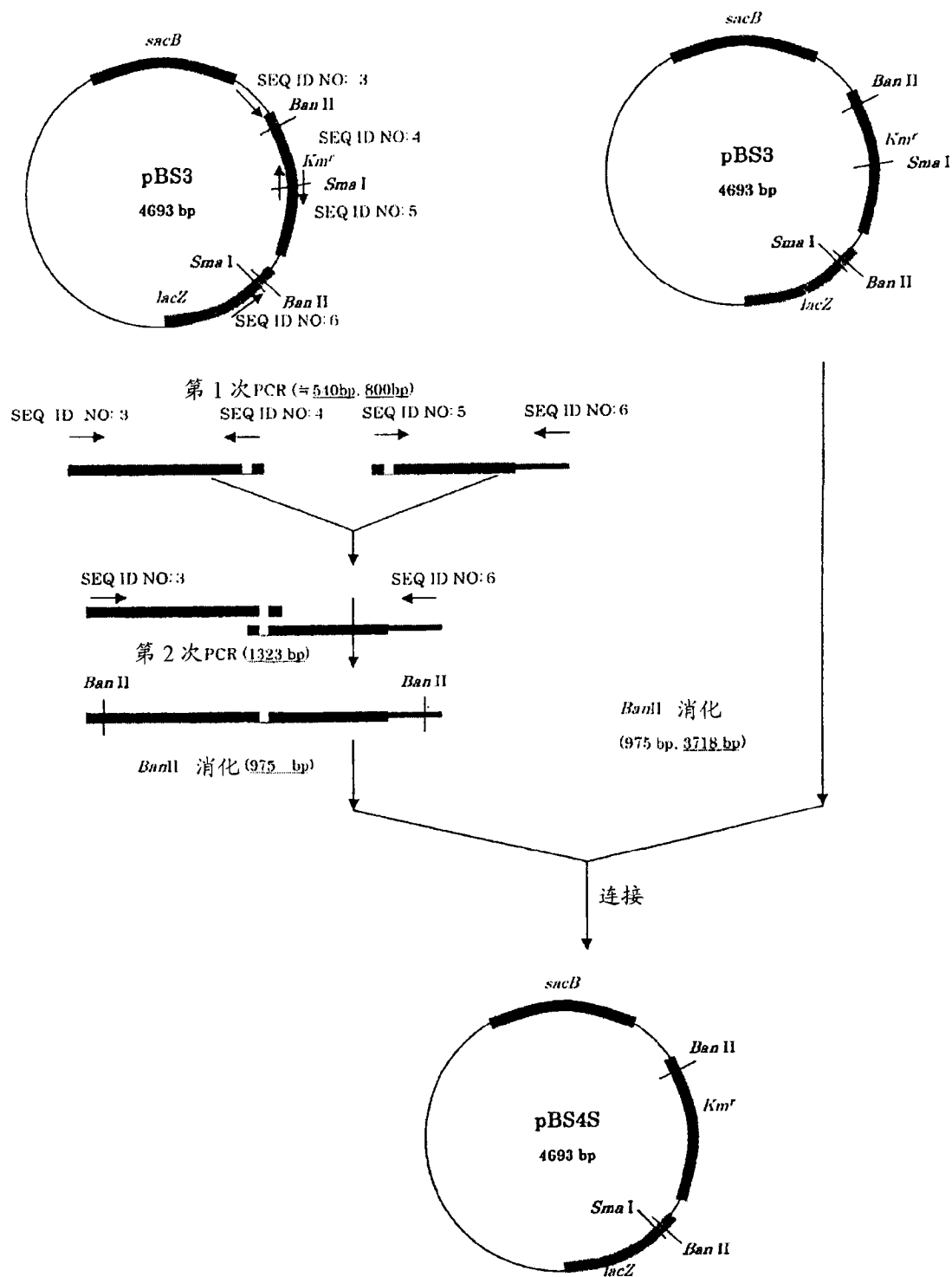


图 2

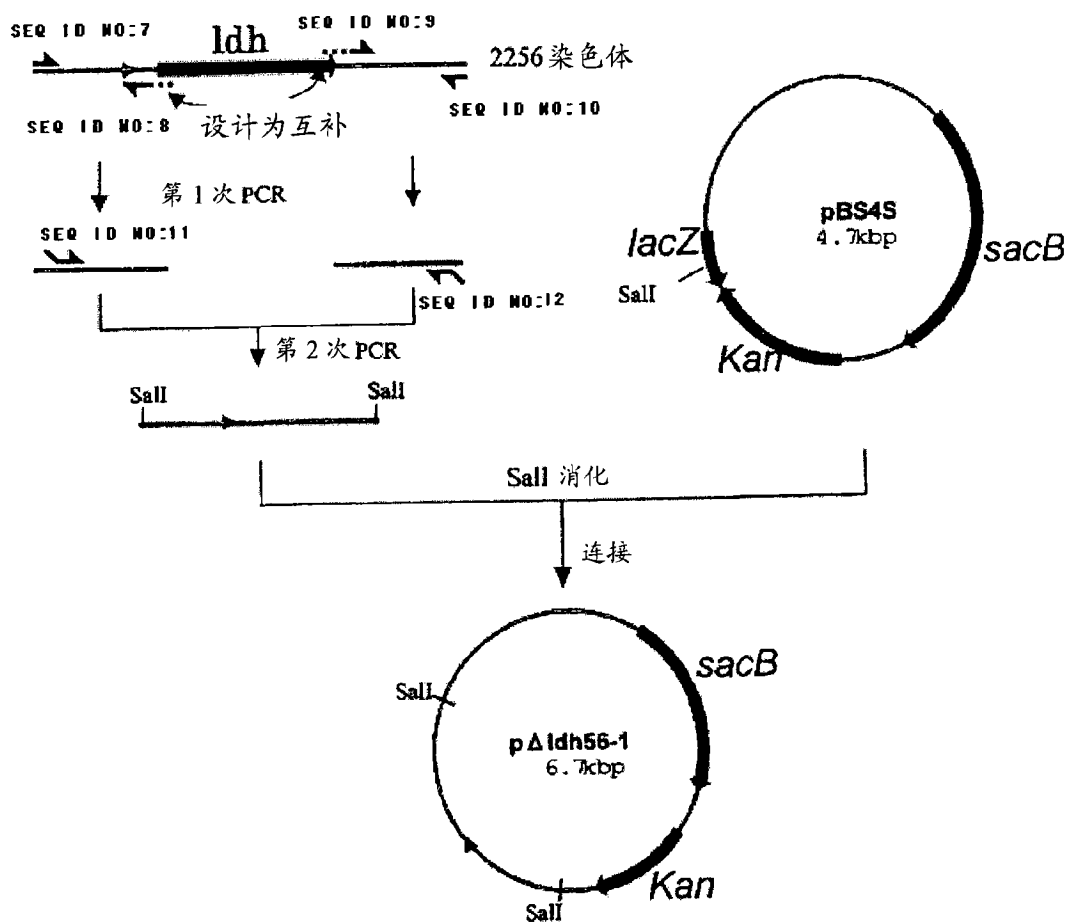


图 3

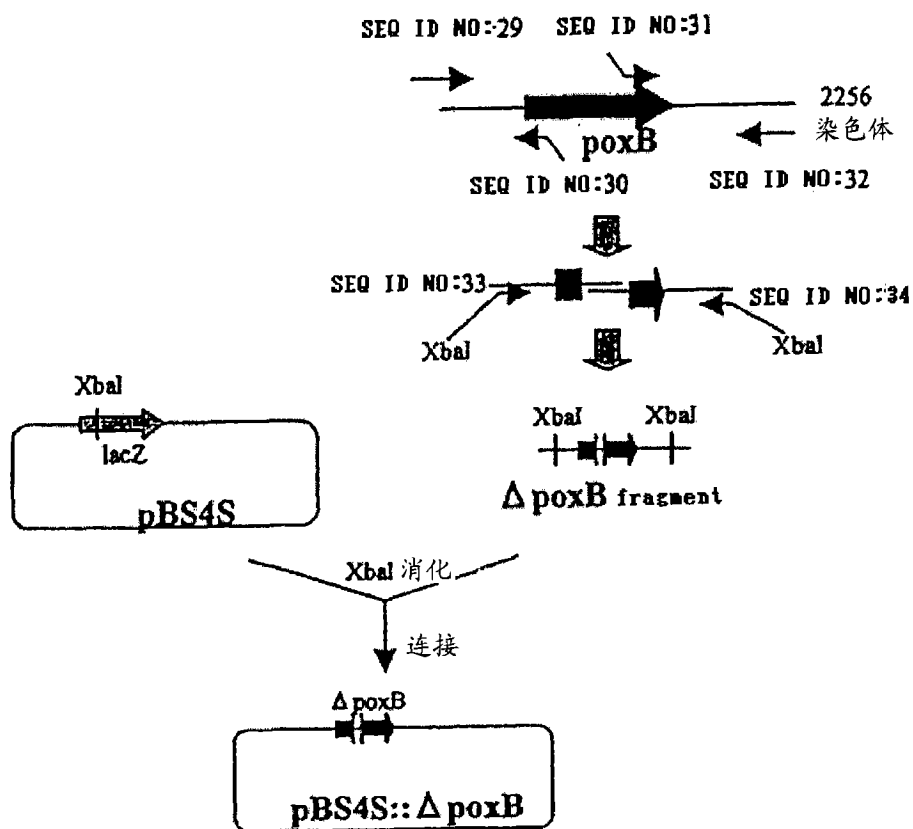


图 4

副产物 (丙酮酸盐和琥珀酸盐)

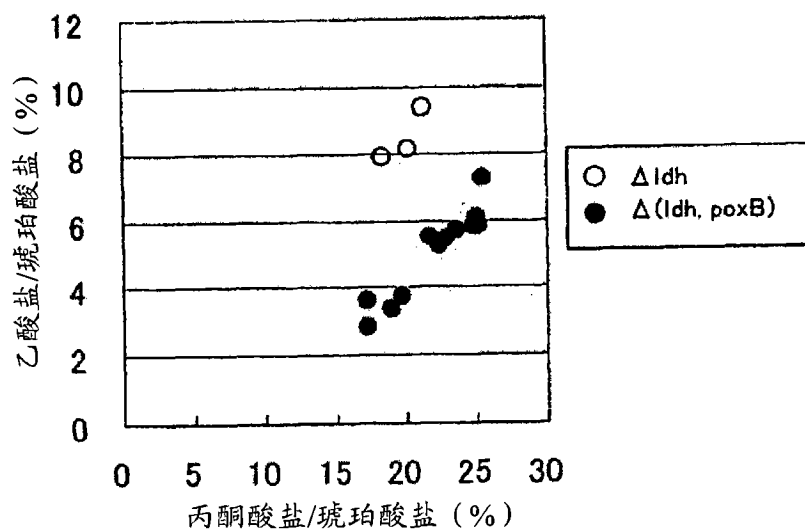


图 5

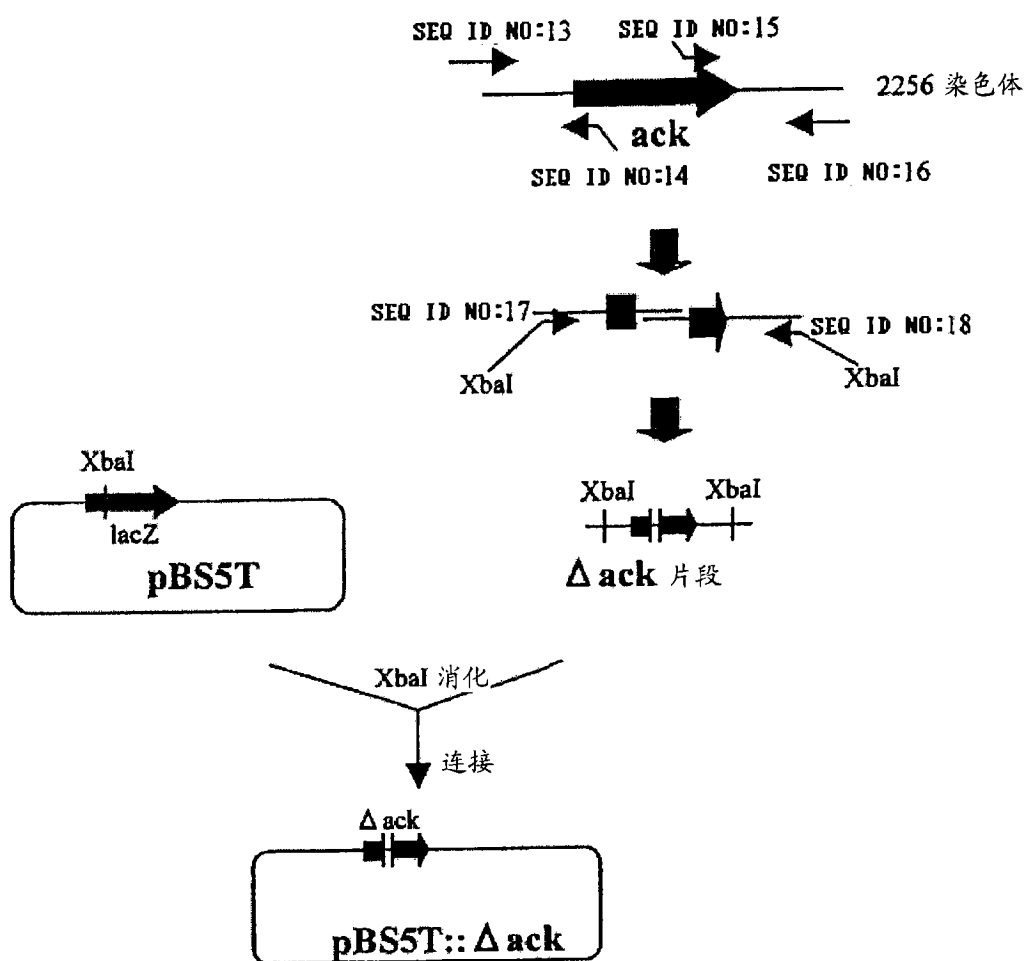


图 6

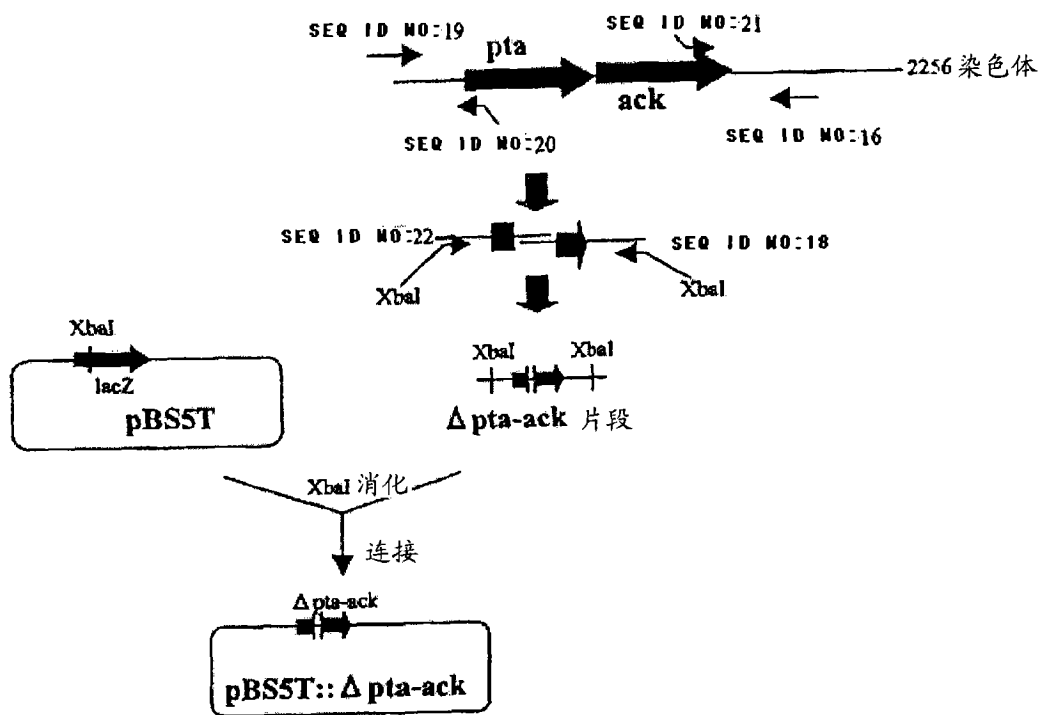


图 7

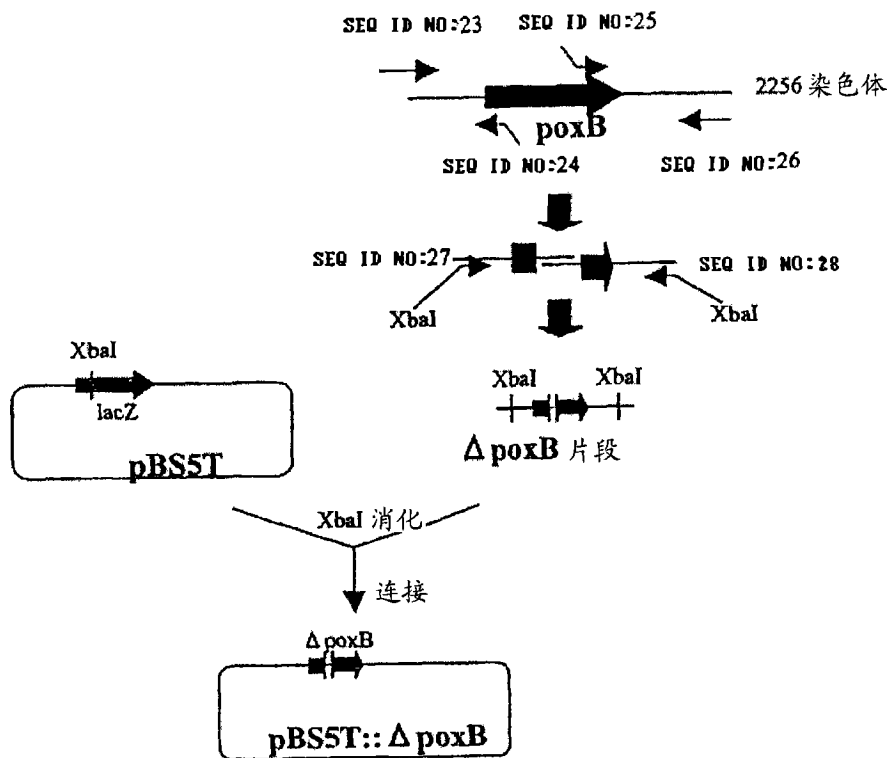


图 8

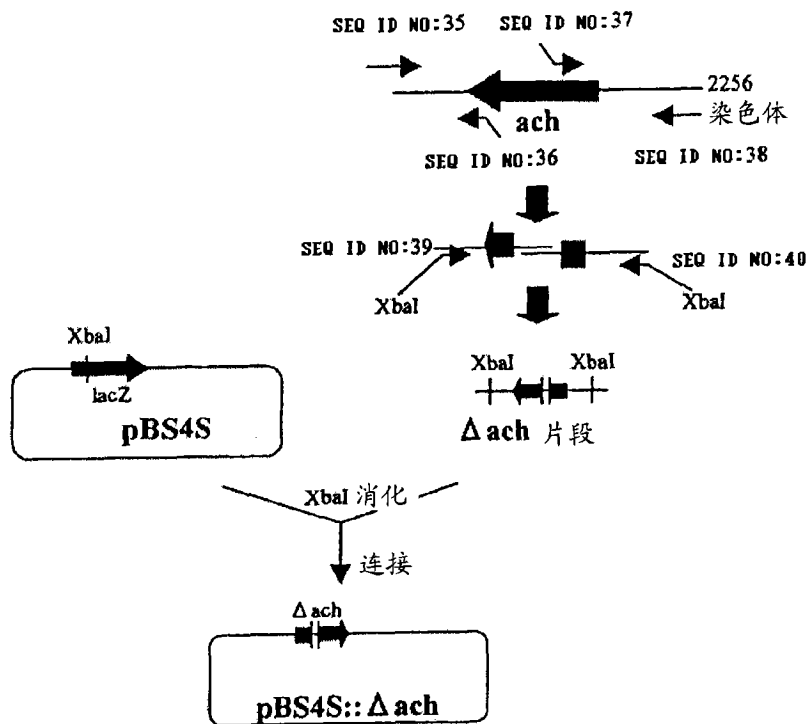


图 9

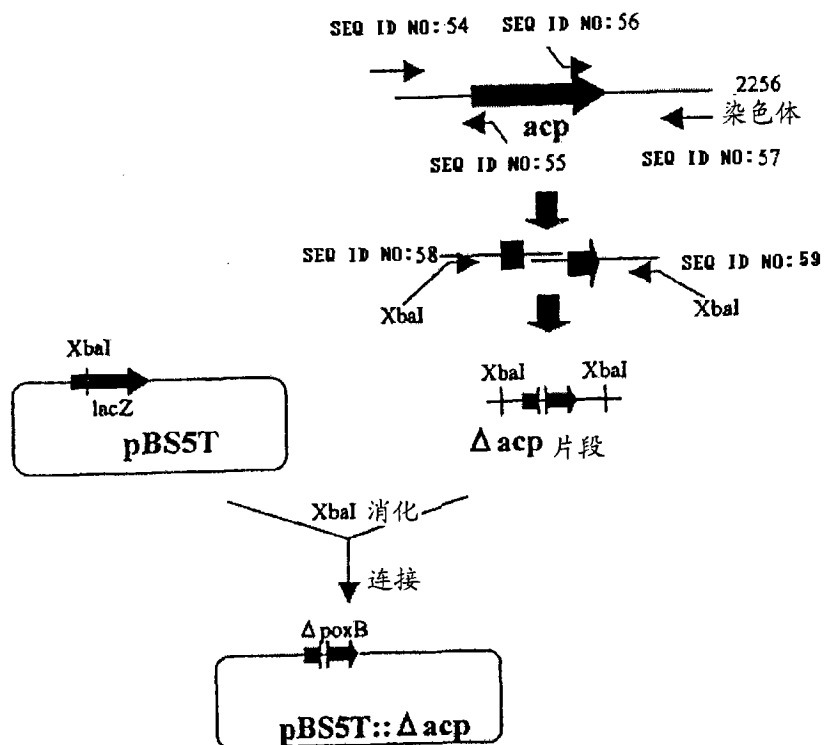


图 10