



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110079566 A

(43)申请公布日 2019.08.02

(21)申请号 201910407560.1

(22)申请日 2019.05.16

(71)申请人 黑龙江伊品生物科技有限公司

地址 166200 黑龙江省大庆市杜尔伯特蒙古族自治县德力戈尔工业园区

(72)发明人 孟刚 周晓群 魏爱英 苏厚波  
马风勇 赵春光

(51)Int.Cl.

C12P 13/08(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12R 1/15(2006.01)

权利要求书1页 说明书19页

(54)发明名称

用改变ppc启动子的细菌发酵生产L-赖氨酸的方法

(57)摘要

本发明提供了发酵生产L-赖氨酸的方法,其包括改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因的启动子区域;和,用改造而得到的谷氨酸棒杆菌发酵生产L-赖氨酸。另外,本发明还提供了由该方法衍生的方法和应用,以及可以用在这些方法和应用中的谷氨酸棒杆菌、多核苷酸等。

1. 发酵生产L-赖氨酸的方法或者提高L-赖氨酸的发酵量的方法,其包括:

(1) 改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因的启动子区域,使该启动子区域缺失一个或几个核苷酸,优选在ppc基因的第-1位缺失一个核苷酸;和,

(2) 用步骤(1)改造而得到的谷氨酸棒杆菌发酵生产L-赖氨酸。

2. 改造获得的谷氨酸棒杆菌在发酵生产L-赖氨酸或者提高L-赖氨酸的发酵量中的应用,其中,所述改造获得是改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因的启动子区域,使该启动子区域缺失一个或几个核苷酸,优选在ppc基因的第-1位缺失一个核苷酸,而获得。

3. 改造谷氨酸棒杆菌的方法,其包括改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因的启动子区域,使该启动子区域缺失一个或几个核苷酸,优选在ppc基因的第-1位缺失一个核苷酸。

4. 权利要求1-3之任一所述的方法或应用,其中,野生型的ppc基因的启动子区域的核苷酸序列如SEQ ID NO:5的第2761-3360位的互补序列所示。

5. 权利要求1-3之任一所述的方法或应用,其中,野生型的ppc基因的启动子区域缺失一个核苷酸后的核苷酸序列如SEQ ID NO:6的第2761-3359位的互补序列所示。

6. 权利要求1-3之任一所述的方法或应用,其中步骤(1)进一步包括:改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因,使其编码的蛋白质的第482位发生突变,优选发生A482V突变。

7. 权利要求6所述的方法或应用,其中,野生型的ppc基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1的互补序列所示;和/或,野生型的ppc基因所编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

8. 权利要求6所述的方法或应用,其中,发生突变的ppc基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2的互补序列所示;和/或,发生突变的ppc基因所编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

9. 权利要求6所述的方法或应用,其中,改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因在改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因的启动子区域之前或之后,优选之后。

10. 权利要求3-9之任一所述的方法改造而得到的谷氨酸棒杆菌。

## 用改变ppc启动子的细菌发酵生产L-赖氨酸的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于氨基酸发酵领域,具体而言,本发明涉及发酵生产L-赖氨酸的方法及其衍生的方法和应用,和可以用在这些方法和应用中的细菌等。

[0002]

### 背景技术

[0003] 通过产L-赖氨酸的细菌(如,埃希氏菌属的大肠杆菌和棒杆菌属的杆状细菌)发酵来生产L-赖氨酸已经得到了产业化应用。这些细菌,可以是自然界分离的细菌,也可以是通过诱变或基因工程改造获得的细菌,或者两者兼而有之。

[0004] 现有文献中有报道ppc(磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶,phosphoenolpyruvate carboxylase)基因、其调控元件及其编码蛋白的增加、减少或突变等用于氨基酸(包括L-赖氨酸)生产中,例如,W00100844A2、W02005058945A2、EP0358940A1和JP1998165180A等,然而,突变后的调控元件的性质是难以预料的,相应地,其对L-赖氨酸生产的影响也难以预料,尤其是,近十多年来,对ppc基因及其调控元件的突变对L-赖氨酸生产的影响的新的研究已经越来越少,表明研究人员对是否有新的ppc基因及其调控元件的突变来改善L-赖氨酸生产的兴趣已经越来越小了。

[0005] 本发明人没有受到近十多年来的趋势影响,经过长期研究和实践,尤其凭借了一些运气,偶然发现对ppc基因调控元件的新的改造能够有助于提高谷氨酸棒杆菌发酵生产L-赖氨酸的产量。而且,该方法与现有改造的大量高产L-赖氨酸的谷氨酸棒杆菌的染色体改造位点没有冲突,可以叠加提高的效果,从而在实践上可用于谷氨酸棒杆菌发酵生产L-赖氨酸。

### 发明内容

[0006] 本发明要解决的技术问题在于提供新的发酵生产L-赖氨酸的方法及其相关的方法,包括相对于未改造谷氨酸棒杆菌提高L-赖氨酸的发酵生产量的方法,改造的谷氨酸棒杆菌在发酵生产L-赖氨酸中的应用,改造的谷氨酸棒杆菌在相对于未改造谷氨酸棒杆菌提高L-赖氨酸的发酵生产量的应用,和/或,改造谷氨酸棒杆菌的方法等。另外,本发明还提供了可以用于上述方法中的突变蛋白、多核苷酸、载体和/或谷氨酸棒杆菌等。

[0007] 具体而言,在第一方面,本发明提供了发酵生产L-赖氨酸的方法,其包括:

(1)改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因的启动子区域,使该启动子区域缺失一个或几个核苷酸;和,

(2)用步骤(1)改造而得到的谷氨酸棒杆菌发酵生产L-赖氨酸。

[0008] 在本文中,术语“改造”指的是相应被改造的对象发生变化,从而达到一定的效果。改造位于染色体上的基因或调控元件的手段包括但不限于,诱变、定点突变、和/或同源重组,优选是后两者。改造位于染色体上的基因或调控元件使得该基因或调控元件的核苷酸序列被添加、缺失或替换一个或多个核苷酸。这些技术手段广泛记载于分子生物学和

微生物学文献中,有许多甚至已经商品化了。在本发明的具体实施方式中,根据同源重组的原理,可以采用Addgene公司商品化的pKOV质粒系统来进行改造,也可以采用pK18mobsacB质粒系统来进行改造,改造谷氨酸棒杆菌染色体上的野生型的ppc基因和/或其调控元件。因此,在本文中,优选改造是通过同源重组进行的改造。

[0009] 本发明人经过长期研究发现,在谷氨酸棒杆菌中,使野生型的ppc基因启动子区域发生缺失,尤其是在对ppc基因改造的情况下,可以提高L-赖氨酸的。在本发明的具体实施方式中,改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因的启动子区域,在ppc基因的第-1位缺失一个核苷酸。基因的第-1位是基因编码区第一个密码子之前紧邻的一个核苷酸,这是本领域技术人员所熟知的。

[0010] 野生型的ppc基因的启动子区域的核苷酸序列如SEQ ID NO:5的第2761-3360位的互补序列所示,野生型的ppc基因的启动子区域缺失一个核苷酸后的核苷酸序列如SEQ ID NO:6的第2761-3359位的互补序列所示,在本发明的具体实施方式中,用后者的核苷酸序列取代前者的核苷酸序列,实施改造。

[0011] 相应地,本发明还提供了其他的应用或方法。例如,在第二方面,本发明提供了提高L-赖氨酸的发酵量的方法,其包括:

(1)改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因的启动子区域,使该启动子区域缺失一个或几个核苷酸,优选在ppc基因的第-1位缺失一个核苷酸;和,

(2)用步骤(1)改造而得到的谷氨酸棒杆菌发酵生产L-赖氨酸。

[0012] L-赖氨酸作为细菌的重要代谢产物,大多数细菌或多或少都能够发酵产生一定量的L-赖氨酸,尤其是谷氨酸棒杆菌。尽管低产L-赖氨酸的细菌不适合有经济效益地生产L-赖氨酸,但是通过本发明的方法,仍旧能提高L-赖氨酸的发酵量,仍旧可以供对经济效益不敏感的地方使用。当然,在本文中,优选细菌是高产L-赖氨酸的细菌。通过本发明的方法,可以进一步提高其产量。另外,在本发明的方法或应用中,除了改造细菌染色体上ppc基因和/或其调控元件以外,可以不再进行其他改造,当然也可以进行其他改造。

[0013] 又如,在第三方面,本发明提供了改造获得的谷氨酸棒杆菌在发酵生产L-赖氨酸中的应用,其中,所述改造获得是改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因的启动子区域,使该启动子区域缺失一个或几个核苷酸,优选在ppc基因的第-1位缺失一个核苷酸,而获得。

[0014] 改造获得的谷氨酸棒杆菌可以单独应用于发酵生产L-赖氨酸中,也可以和其他产L-赖氨酸的细菌混合发酵生产L-赖氨酸,或者以其他方式应用于发酵生产L-赖氨酸中。在本文中,如无特别限定(如未以“改造获得”来限定),术语“谷氨酸棒杆菌”是未改造或改造前的谷氨酸棒杆菌,其染色体的ppc基因及该基因座位前后的调控元件是野生型的。

[0015] 还如,在第四方面,本发明提供了改造获得的谷氨酸棒杆菌在提高L-赖氨酸的发酵量中的应用,其中,所述改造获得是改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因的启动子区域,使该启动子区域缺失一个或几个核苷酸,优选在ppc基因的第-1位缺失一个核苷酸,而获得。

[0016] 在本文中,谷氨酸棒杆菌可以是产L-赖氨酸的谷氨酸棒杆菌。诸如北京棒杆菌,其特性,尤其是野生型的ppc基因及其前后的调控元件,与谷氨酸棒杆菌基本相同,因此也可以纳入本发明的谷氨酸棒杆菌的范围内。

[0017] 更本质地,在第五方面,本发明提供了改造谷氨酸棒杆菌的方法,其包括改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因的启动子区域,使该启动子区域缺失一个或几个核苷酸。

[0018] 本发明第五方面的方法改造而获得的谷氨酸棒杆菌能够用于发酵生产或产生L-赖氨酸。因此,在第六方面,本发明提供了本发明第五方面的方法改造而获得的谷氨酸棒杆菌。

[0019] 优选在本发明中,步骤(1)进一步包括:改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因,使其编码的蛋白质的第482位发生突变。在本发明的具体实施方式中,野生型的ppc基因编码的蛋白质的第482位发生A482V突变,即丙氨酸残基(A1a)被取代为缬氨酸残基(Va1)。

[0020] 野生型的ppc基因所编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示,在本发明的具体实施方式中,野生型的ppc基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1的互补序列所示。另外,发生突变的ppc基因所编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,在本发明的具体实施方式中,发生突变的ppc基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2的互补序列所示。

[0021] 在本发明的具体实施方式中,用如SEQ ID NO:2的互补序列所示的核苷酸序列取代谷氨酸棒杆菌染色体上的如SEQ ID NO:1的互补序列所示的核苷酸序列,实施进一步的改造。

[0022] 改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因在改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因的启动子区域的同时、之前或之后。在本发明的具体实施方式中,改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因实施在改造谷氨酸棒杆菌染色体上野生型的ppc基因的启动子区域之后。

[0023] 另外,本发明还提供了可以用于上述方法中的中间产物,如突变蛋白、多核苷酸和/或载体等物质,以及它们的应用等。例如,在第七方面,本发明提供了突变蛋白,其氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示。

[0024] 在第八方面,本发明提供了多核苷酸,其编码本发明第七方面的蛋白。在本发明的具体实施方式中,本发明第八方面的多核苷酸的核苷酸序列如SEQ ID NO:2的互补序列所示。

[0025] 在第九方面,本发明提供了载体,其包含本发明第八方面的多核苷酸。

[0026] 另外,在第十方面本发明提供了多核苷酸,其核苷酸序列如SEQ ID NO:6的第2761-3359位的互补序列所示。该多核苷酸是野生型ppc基因的第-1位缺失一个核苷酸而得到的启动子区域,其不同于野生型的ppc基因的启动子区域。

[0027] 相应地,在第十一方面,本发明提供了载体,其包含本发明第十方面的多核苷酸。

[0028] 在第十一方面,本发明提供了本发明第七方面的突变蛋白和/或本发明第八和/或第十方面的多核苷酸和/或本发明第九和/或第十一方面的载体在本发明第一、二、三和/或四方面的方法或应用中的应用。即在本发明第一、二、三和/或四方面的方法或应用中,使用了本发明提供了本发明第七方面的突变蛋白和/或本发明第八和/或第十方面的多核苷酸和/或本发明第九和/或第十一方面的载体。

[0029] 在第十二方面,本发明提供了本发明第七方面的突变蛋白和/或本发明第八和/或第十方面的多核苷酸和/或本发明第九和/或第十一方面的载体在制备本发明第五方面的

谷氨酸棒杆菌中的应用。即在制备本发明第五方面的谷氨酸棒杆菌的过程中,使用了本发明第七方面的突变蛋白和/或本发明第八和/或第十方面的多核苷酸和/或本发明第九和/或第十一方面的载体。

[0030] 本发明的有益效果在于,开辟并且实践证明了新的提高L-赖氨酸的发酵量的方式,而且与现有改造的大量高产L-赖氨酸的谷氨酸棒杆菌的染色体改造位点没有冲突,应用在现有高产L-赖氨酸的谷氨酸棒杆菌上观察到了可以进一步提高产量的效果,从而在实践上可用于谷氨酸棒杆菌发酵生产L-赖氨酸,便于推广应用。

[0031] 为了便于理解,以下将通过具体的实施例对本发明进行详细地描述。需要特别指出的是,这些描述仅仅是示例性的描述,并不构成对本发明范围的限制。依据本说明书的论述,本发明的许多变化、改变对所属领域技术人员来说都是显而易见的。

[0032] 另外,本发明引用了公开文献,这些文献是为了更清楚地描述本发明,它们的全文内容均纳入本文进行参考,就好像它们的全文已经在本文中重复叙述过一样。

[0033]

### 具体实施方式

[0034] 以下通过实施例进一步说明本发明的内容。如未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段和市售的常用仪器、试剂,可参见《分子克隆实验指南(第3版)》(科学出版社)、《微生物学实验(第4版)》(高等教育出版社)以及相应仪器和试剂的厂商说明书等参考。

[0035] 实施例1 包含点缺失的*NCg11523*基因启动子的转化载体pK18-*NCg11523*的构建

根据NCBI公布的谷氨酸棒杆菌ATCC13032的基因组序列,合成两对扩增*NCg11523*基因启动子区片段(包含启动子和编码区的核苷酸序列如SEQ ID NO:5的互补序列所示,或可登陆[https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/\\*term=NCg11523](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/*term=NCg11523)获取)的引物,以通过等位基因置换在菌株YPL-4染色体上的野生型的*NCg11523*基因启动子区-1位敲除一个碱基(包含启动子和编码区的核苷酸序列如SEQ ID NO:6的互补序列所示)。引物设计如下(上海 invitrogen公司合成):

P1': 5' CCGGAATTC GTGATGCGACGGCGGATGT 3' (EcoR I)  
 P2': 5' CTCAATGTGAAAGAGTGTTTAAAGTAGTTAATGACTGA 3'  
 P3': 5' TCAGTCATTAACACTTTAAACACTCTTTCACATTGAG 3'  
 P4': 5' CCCAAGCTT CGTTGGTGAGCCACTGGAAAT 3' (Hind III)

以谷氨酸棒杆菌ATCC13032为模板,分别以引物P1' /P2' 及P3' /P4',进行PCR扩增,获得两条含有*NCg11523*基因启动子区分离的DNA片段,大小分别为586bp及554bp。再用引物P1' /P4' 进行OVERLAP PCR得到整个等位替换的片段1100bp,片段包含*NCg11523*基因的完整启动子区,且片段两端分别含有Hind III和EcoRI酶切位点,此DNA片段导致野生型*NCg11523*基因的启动子-1区点缺失。PCR反应结束后,对扩增的产物进行琼脂糖凝胶电泳,采用柱式DNA凝胶回收试剂盒进行纯化所需要的DNA片段,将片段双酶切(EcoRI/ Hind III)后回收,与同样双酶切(EcoRI/ Hind III)后的穿梭质粒pk18mobsacB质粒相连接,获得等位替换质粒pK18-*NCg11523*,该质粒上含有卡那霉素抗性标记。

[0036] 实施例2 包含点缺失的*NCg11523*基因启动子的菌株的构建

将实施例1获得的质粒pK18- NCg11523电转化入赖氨酸生产菌(谷氨酸棒杆菌)专利菌株YPL-4(即YP97136)中(其构建方法可参见W02014121669A1;经测序确认该菌株染色体上保留有野生型的NCg11523基因及其启动子),对培养产生的单菌落分别通过引物P1'/M13F进行鉴定,能扩增出1100bp大小条带的菌株为阳性菌株。将阳性菌株在含12%蔗糖的培养基上培养,对培养产生的单菌落分别在含有卡那霉素和不含卡那霉素的培养基上培养,在不含卡那霉素的培养基上生长,而在含卡那霉素的培养基上不生长的菌株进一步采用如下引物(上海invitrogen公司合成)进行PCR鉴定:

P5': 5' CCAGGTTAGCCAGCAGAGC 3'

P6:' 5' TTGATGAGCCCATGAAAGC 3'

上述PCR扩增产物通过高温变性、冰浴后进行sscp电泳(以质粒pK18- NCg11523扩增片段为阳性对照,野生型扩增片段为阴性对照,水作为空白对照),由于片段结构不同,电泳位置不同,因此片段电泳位置与阴性对照片段位置不一致且与阳性对照片段位置一致的菌株为等位替换成功的菌株。再次通过PCR扩增阳性菌株目的片段,并连接到PMD19-T载体,并测序,通过序列比对,碱基序列发生突变的序列验证菌株的等位替换成功,并被命名为YPL-4-001。

[0037] 实施例3 包含点突变的NCg11523基因的转化载体pK18-NCg11523<sup>A482V</sup>的构建

根据NCBI公布的谷氨酸棒杆菌ATCC13032的基因组序列,合成两对扩增NCg11523基因编码区(其核苷酸序列如SEQ ID NO:1的互补序列所示,所编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示)片段的引物,以通过等位基因置换在菌株YPL-4染色体上的野生型NCg11523基因编码区中引入A482V点突变(其核苷酸序列如SEQ ID NO:2的互补序列所示,所编码的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示)。引物设计如下(上海invitrogen公司合成):

P1: 5' CGCGGATCCCCTGGGCTGGGCAAGAATC 3' (BamH I)

P2: 5' CCGAATTTCTTAACAACCTCCGACGCGGTG 3'

P3: 5' CACCGCGTCGGAGGTTGTTA AGAAATTCGG 3'

P4: 5' ACGCGTCGACCTGTCGGACCGCATGAATA 3' (Sal I)

以谷氨酸棒杆菌ATCC13032为模板,分别以引物P1/P2及P3/P4,进行PCR扩增,获得两条含有NCg11523基因部分编码区(ORF)分离的DNA片段,大小分别为472bp及572bp。再用引物P1/P4进行OVERLAP PCR得到整个等位替换的片段1044bp,片段包含NCg11523基因的部分编码区,且片段两端分别含有BamH I和Sal I酶切位点,此DNA片段导致野生型NCg11523基因的第1445位的核苷酸改变,最终导致编码蛋白的第482位氨基酸由丙氨酸(A)被缬氨酸(V)所取代。PCR反应结束后,对扩增的产物进行琼脂糖凝胶电泳,采用柱式DNA凝胶回收试剂盒进行纯化所需要的DNA片段,将片段双酶切(BamH I / Sal I)后回收,与同样双酶切(BamH I / Sal I)后的穿梭质粒pk18mobsacB质粒相连接,获得等位替换质粒pK18-NCg11523<sup>A482V</sup>,该质粒上含有卡那霉素抗性标记。

[0038] 实施例4 包含点突变的NCg11523<sup>A482V</sup>基因编码区的菌株的构建

将实施例1获得的质粒pK18- NCg11523<sup>A482V</sup>电转化入实施例2获得的YPL-4-001,对培养产生的单菌落分别通过引物P1/M13F进行鉴定,能扩增出1100bp大小条带的菌株为阳性菌株。将阳性菌株在含12%蔗糖的培养基上培养,对培养产生的单菌落分别在含有卡那霉素和不含卡那霉素的培养基上培养,在不含卡那霉素的培养基上生长,而在含卡那霉素的培

培养基上不生长的菌株进一步采用如下引物(上海invitrogen公司合成)进行PCR鉴定:

P5: 5' GGAG GTAGTTGCGGTAGAG 3'

P6: 5' TTCAGATGAATACAGCGAGGTC 3'

上述PCR扩增产物通过高温变性、冰浴后进行sscp电泳(以质粒pK18- NCg11523扩增片段为阳性对照,野生型扩增片段为阴性对照,水作为空白对照),由于片段结构不同,电泳位置不同,因此片段电泳位置与阴性对照片段位置不一致且与阳性对照片段位置一致的菌株为等位替换成功的菌株。再次通过PCR扩增阳性菌株目的片段,并连接到PMD19-T载体,并测序,通过序列比对,碱基序列发生突变的序列验证菌株的等位替换成功,并被命名为YPL-4-002。

#### [0039] 实施例5 赖氨酸发酵实验

将实施例4构建的菌株和原始菌株在BLBIO-5GC-4-H型号的发罐(购自上海百仑生物科技有限公司)中以表1所示的培养基和表2所示的过程进行发酵实验。每个菌株重复三次,结果如表3所示。

#### [0040] 表1 发酵培养基配方

品名	配比
淀粉水解糖	30g/l
硫酸铵	12g/L
硫酸镁	0.87g/l
糖蜜	20g/l
酸化玉米浆	3ml/l
磷酸	0.4ml/l
氯化钾	0.53g/l
消泡剂(2%泡敌)	4ml/L
硫酸亚铁	120mg/l
硫酸锰	120mg/l
烟酰胺	42mg/l
泛酸钙	6.3mg/l
VB1	6.3mg/l
铜、锌盐溶液	0.6g/L
生物素	0.88mg/L

表2 发酵过程



校正	温度 37℃、风量 4L/min、转速 1000rpm、罐压 0mpa, 5min DO100% 后标定		
接种量	300ml	培养温度℃	37℃
pH 值	pH6.9±0.05	溶氧 DO	10—30%
初始条件	温度 37℃、PH 值 6.9、罐压 0mpa、风量 3L/min, 转速 550rpm		
全程控制	1、溶氧 < 30% 时, 依次提转速 750rpm→800rpm→风量 4L/min→850rpm→950rpm; 2、发酵 6h 提罐压 0.01Mpa; 12h 提罐压 0.02Mpa→0.03Mpa→0.04Mpa→0.05Mpa。		
残糖控制	F12h 前 0.1-0.2%; F12h 后结合 DO 要求控制残糖 0.1--0.05%。		
氨氮控制	F12h 前 0.1—0.15; F12—F32h 0.15—0.25; F32h 后 0.1—0.15		
流加物料	25%氨水、70%浓糖、50%硫酸、10%泡敌		
周期	48h 左右		

表3 赖氨酸发酵实验结果

菌种	赖氨酸产量 (%)	转化率 (%)
YPL-4	18.8	64.1
YPL-4	18.6	63.9
YPL-4	18.8	63.7
均值	18.8	63.9
YPL-4-002	20.4	64.3
YPL-4-002	20.6	64.2
YPL-4-002	20.5	64.4
均值	20.5	64.3

结果如表3所示,对谷氨酸棒杆菌中NCg11523<sup>A482V</sup>进行点突变和对谷氨酸棒杆菌中NCg11523基因(启动子)-1处碱基进行敲除,有助于L-赖氨酸产量的提高。

## [0041] 序列表

- <110> 黑龙江伊品生物科技有限公司
- <120> 用改变ppc启动子的细菌发酵生产L-赖氨酸的方法
- <130> CN
- <160> 6
- <170> PatentIn version 3.5
- <210> 1
- <211> 2760

<212> DNA

<213> 谷氨酸棒杆菌

<400> 1

```

ctagccggag ttgcgcagcg cagtggaaag accgttcatg gtcagctgaa tgttgcggga      60
cacttgctcg ctttggtcgc cttttcggta gcgtcgcac atctctacct ggatcacggt      120
gagtggaaagc aggtaggggt atcggcgcgt gacagagcgt gcgagaagtg gtttgcacac      180
aagcagatca tcagagccgg tgattacgca gaacatcttc ttggtcagga agtactcctc      240
gcggatgacg gaatagactc gctcggctac ttccgtatct gggatcaggt ctgcgtagag      300
ctttgccaaa cgcagctctg ccttggacat cacctgagcc atgttatcca aactgaggt      360
gaaaaatggc caggactcat tgagtgtttg cagctcggca atgcgttggg tggcctgctc      420
cccttcgcca atccactget ctaatgcggt tccgacacca aaccagcctg gcagcatgac      480
acgagactgt gaccagctga gcacccatgg gatggctcgc aaatcttcca ccgaggaggt      540
ctgcttgctg gaggaaggcc tggatccgat gttgagggat ccaatctcct gcagcggcgt      600
ggactgggtg aagtaatcga tgaagcctt atcctcgtgc accaaggagg cgtacttctt      660
caagctgagc tcagagatct cactcatgat gtcgtacgcg cgttggtgat cggtagtctc      720
ggagacgtcg agaagcgatg cctcaagcgt ggctgagacc agggcttcga ggtttcggcg      780
cgcggtttcg gggttgccgt acttagcggg gatgatctcg ccctgctcgg tgatgcgcac      840
ggaaccttgg acagcccccc tgggctgggc aagaatcgcg tcgtaggaag gtccgccacc      900
gcggccgacg gtgccaccac ggccgtggaa caggcgaagc ttgaccccg ctagcggca      960
tagttcgacg agctgcagtt ccgcgtcgta aagcggcagc tttgcggaga aatatccgcc      1020
atccttggtg gaatcggagt aaccgagcat gacttctcgt acgttgctgc gctgcaggag      1080
gtagttgcgg tagagatcaa tttccacag ttctcagagg attccggcgc cggcctggag      1140
atcttcgatg gtttcgaaca gtgggatgac atcgacgggt ccgcgtgggt tgctgccggt      1200
ggctgcgatg agtccgaatt ccttagcaa caccatcggc tcgagcaca cggtgaccga      1260
tgatgccatg gagatgatgc agtgaggcac catccgtggc ccgaatttct taacagcctc      1320
cgacgcggtg cggaagatgc cgagctcgcg gtcggtgacc tcgctgtatt catctgaacc      1380
gtgcgggatc agcggacgag ggctgcgcag ttcttcagc agcacctcaa gcttctctgc      1440
ttcagacagc tcgcggtagt ttgcggtgac ttgggcgcgt tcgaaaagct cggtaggac      1500
gtcctcgtag ctttcggagt tttggcgcag atccagtgcg taaaggttga atccaaagct      1560
ctcgatggca gaaatcagca cagacaaacg atcatcgca atgagaacgt ccttgattc      1620
acgcagagaa tgatcaatgg tcaacgcac gtttaagaat tcttcggag atgcgtatgg      1680
agtaaagacc ttgaaccaca cgccctcaac ggcgtctcgc ccgatcagct cggcctcgt      1740
cgcgaggata cgtccgcgaa cgccatggac ggcgcgtcga taaggctcat ccacgcggct      1800
tggcacgtcg ttgtgccctg catctgccag cgcaagcagc tgcggggtga cttattcat      1860
gcggtccgac aggctgagct catgctcag ggaatgcagc tggcgtgcat agtacttgag      1920
cacggtttcc gcagcgcggt gagtgaata ctcaactgtt tccgcggtga cataagggtt      1980
accgtcgtgg tctccaccaa tccaggaacc tggcttgacc acggcttca aaggaacacc      2040
ctcgcgaaa cgctcacgaa gctcaacagc cacatcacgg ttgatactg gaatctcttc      2100
caaaaggctc agctttagt agcgcagccc tacttcgatc tcgtcctcga tacgtgggcg      2160

```

ggccacacga atcaacgcgg tctgccacaa aatggtgatg cgacggcgga tgttcttctc 2220  
 gatctcatcc aacttgcttt gcgtacgagc gtaggctcc gcagactgca aagcgtggcg 2280  
 ttcacgcatg tgggtgggtga tccacttttg cgcatcaaaa acagtgcggc ggcgagtctc 2340  
 agttgggtgc gcagtcagaa ccggcgccac ctacagcattg cgcagcacat cggccacagc 2400  
 ttctgcgcca acattgccct cattgagttt cagccagggtg gcatcaagag tgctgtccgg 2460  
 aggggtgtcg cctgcatcga gagcctgttc acgaagctct tcatcgtaga ggtcttccgc 2520  
 caggttagcc agcagagcga agtgggaaaa tgcgcgagca atcgggtgtt ccttggctgg 2580  
 agtaatgccg tcgaaaacct gaaccaggct atccatttcg gcgttgccct tggcgatata 2640  
 aaaagaagtc aggcgcgctt gttcgaccag ttataaacc tcctggcctt cttgttccgc 2700  
 aattacctca ccgaggattt gaccgaggaa cctgatgtca tcgcgtaaaa aatcagtcata 2760

<210> 2

<211> 2760

<212> DNA

<213> 谷氨酸棒杆菌

<400> 2

ctagccggag ttgcgcagcg cagtggaaag accgttcatg gtcagctgaa tgttgcggga 60  
 cacttgctcg ctttggctcg cttttcggta gcgtcgcata atctctacct ggatcacgtt 120  
 gagtggaaagc aggtaggggt atcggcgcgt gacagagcgt gcgagaagtg ggttgtcatc 180  
 aagcagatca tcagagccgg tgattacgca gaacatcttc ttggtcagga agtactcctc 240  
 gcggatgacg gaatagactc gctcggctac ttccgtatct gggatcaggt ctgcgtagag 300  
 ctttgccaaa cgcagctctg ccttggacat cacctgagcc atgttatcca aactgaggt 360  
 gaaaaatggc caggactcat tgagtgtttg cagctcggca atgcgttggg tggcctgctc 420  
 cccttcgcca atccactgct ctaatgcggt tccgacacca aaccagcctg gcagcatgac 480  
 acgagactgt gaccagctga gcacccatgg gatggctcgc aatcttcca ccgaggaggt 540  
 ctgcttgcgt gaggaaggcc tggatccgat gttgagggat ccaatctcct gcagcggcgt 600  
 ggactgggtg aagtaatcga tgaagccttg atcctcgtgc accaaggagg cgtacttctt 660  
 caagctgagc tcagagatct cactcatgat gtcgtacgcg cgttggatgat cggtagtctc 720  
 ggagacgtcg agaagcgat cctcaagcgt ggctgagacc agggcttca ggtttcggcg 780  
 cgcggtttcg gggttgccgt acttagcgga gatgatctcg ccctgctcgg tgatgcgcac 840  
 ggaaccttgg acagccccc tgggctgggc aagaatcgcg tcgtaggaag gtccgccacc 900  
 gcggccgacg gtgccaccac ggccgtggaa caggcgaagc ttgaccccgg ctgatcggca 960  
 tagttcgacg agctgcagtt ccgcgtcgta aagcggccag tttgcggaga aatatccgcc 1020  
 atccttgttg gaatcggagt aaccgagcat gacttcttgg acgttgtcgc gctgcaggag 1080  
 gtagtgcgg tagagatcaa ttttccacag ttcgtcagag attccggcgc cggcctggag 1140  
 atcttcgatg gtttcgaaca gtgggatgac atcgacggtg ccgcgtgggt tgtcgcctt 1200  
 ggctgcgatg agtccgaatt cctttagcaa caccatcggc tcgagcacat cggtagccga 1260  
 tgatgcatg gagatgatgc agtgaggcac catccgtggc ccgaatttct taacaacctc 1320  
 cgacgcggtg cggaaagatgc cgagctcgcg gtcggtgacc tcgctgtatt catctgaacc 1380  
 gtgcgggatc agcggacgag ggctgcgcag ttccttcagc agcacctcaa gcttctctgc 1440



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

	405	410	415
Ser Tyr Glu Asp Val Leu Thr Glu Leu Phe Glu Arg Ala Gln Val Thr			
	420	425	430
Ala Asn Tyr Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Lys Leu Glu Val Leu Leu			
	435	440	445
Lys Glu Leu Arg Ser Pro Arg Pro Leu Ile Pro His Gly Ser Asp Glu			
	450	455	460
Tyr Ser Glu Val Thr Asp Arg Glu Leu Gly Ile Phe Arg Thr Ala Ser			
465	470	475	480
Glu Ala Val Lys Lys Phe Gly Pro Arg Met Val Pro His Cys Ile Ile			
	485	490	495
Ser Met Ala Ser Ser Val Thr Asp Val Leu Glu Pro Met Val Leu Leu			
	500	505	510
Lys Glu Phe Gly Leu Ile Ala Ala Asn Gly Asp Asn Pro Arg Gly Thr			
	515	520	525
Val Asp Val Ile Pro Leu Phe Glu Thr Ile Glu Asp Leu Gln Ala Gly			
	530	535	540
Ala Gly Ile Leu Asp Glu Leu Trp Lys Ile Asp Leu Tyr Arg Asn Tyr			
545	550	555	560
Leu Leu Gln Arg Asp Asn Val Gln Glu Val Met Leu Gly Tyr Ser Asp			
	565	570	575
Ser Asn Lys Asp Gly Gly Tyr Phe Ser Ala Asn Trp Ala Leu Tyr Asp			
	580	585	590
Ala Glu Leu Gln Leu Val Glu Leu Cys Arg Ser Ala Gly Val Lys Leu			
	595	600	605
Arg Leu Phe His Gly Arg Gly Gly Thr Val Gly Arg Gly Gly Gly Pro			
	610	615	620
Ser Tyr Asp Ala Ile Leu Ala Gln Pro Arg Gly Ala Val Gln Gly Ser			
625	630	635	640
Val Arg Ile Thr Glu Gln Gly Glu Ile Ile Ser Ala Lys Tyr Gly Asn			
	645	650	655
Pro Glu Thr Ala Arg Arg Asn Leu Glu Ala Leu Val Ser Ala Thr Leu			
	660	665	670
Glu Ala Ser Leu Leu Asp Val Ser Glu Leu Thr Asp His Gln Arg Ala			
	675	680	685
Tyr Asp Ile Met Ser Glu Ile Ser Glu Leu Ser Leu Lys Lys Tyr Ala			
	690	695	700
Ser Leu Val His Glu Asp Gln Gly Phe Ile Asp Tyr Phe Thr Gln Ser			
705	710	715	720

Thr Pro Leu Gln Glu Ile Gly Ser Leu Asn Ile Gly Ser Arg Pro Ser  
 725 730 735  
 Ser Arg Lys Gln Thr Ser Ser Val Glu Asp Leu Arg Ala Ile Pro Trp  
 740 745 750  
 Val Leu Ser Trp Ser Gln Ser Arg Val Met Leu Pro Gly Trp Phe Gly  
 755 760 765  
 Val Gly Thr Ala Leu Glu Gln Trp Ile Gly Glu Gly Glu Gln Ala Thr  
 770 775 780  
 Gln Arg Ile Ala Glu Leu Gln Thr Leu Asn Glu Ser Trp Pro Phe Phe  
 785 790 795 800  
 Thr Ser Val Leu Asp Asn Met Ala Gln Val Met Ser Lys Ala Glu Leu  
 805 810 815  
 Arg Leu Ala Lys Leu Tyr Ala Asp Leu Ile Pro Asp Thr Glu Val Ala  
 820 825 830  
 Glu Arg Val Tyr Ser Val Ile Arg Glu Glu Tyr Phe Leu Thr Lys Lys  
 835 840 845  
 Met Phe Cys Val Ile Thr Gly Ser Asp Asp Leu Leu Asp Asp Asn Pro  
 850 855 860  
 Leu Leu Ala Arg Ser Val Gln Arg Arg Tyr Pro Tyr Leu Leu Pro Leu  
 865 870 875 880  
 Asn Val Ile Gln Val Glu Met Met Arg Arg Tyr Arg Lys Gly Asp Gln  
 885 890 895  
 Ser Glu Gln Val Ser Arg Asn Ile Gln Leu Thr Met Asn Gly Leu Ser  
 900 905 910  
 Thr Ala Leu Arg Asn Ser Gly  
 915  
 <210> 4  
 <211> 919  
 <212> PRT  
 <213> 谷氨酸棒杆菌  
 <400> 4  
 Met Thr Asp Phe Leu Arg Asp Asp Ile Arg Phe Leu Gly Gln Ile Leu  
 1 5 10 15  
 Gly Glu Val Ile Ala Glu Gln Glu Gly Gln Glu Val Tyr Glu Leu Val  
 20 25 30  
 Glu Gln Ala Arg Leu Thr Ser Phe Asp Ile Ala Lys Gly Asn Ala Glu  
 35 40 45  
 Met Asp Ser Leu Val Gln Val Phe Asp Gly Ile Thr Pro Ala Lys Ala  
 50 55 60





370	375	380
Val Leu Ile Ala Asp Asp Arg Leu Ser Val Leu Ile Ser Ala Ile Glu		
385	390	395
Ser Phe Gly Phe Asn Leu Tyr Ala Leu Asp Leu Arg Gln Asn Ser Glu		
	405	410
Ser Tyr Glu Asp Val Leu Thr Glu Leu Phe Glu Arg Ala Gln Val Thr		
	420	425
Ala Asn Tyr Arg Glu Leu Ser Glu Ala Glu Lys Leu Glu Val Leu Leu		
	435	440
Lys Glu Leu Arg Ser Pro Arg Pro Leu Ile Pro His Gly Ser Asp Glu		
	450	455
Tyr Ser Glu Val Thr Asp Arg Glu Leu Gly Ile Phe Arg Thr Ala Ser		
465	470	475
Glu Val Val Lys Lys Phe Gly Pro Arg Met Val Pro His Cys Ile Ile		
	485	490
Ser Met Ala Ser Ser Val Thr Asp Val Leu Glu Pro Met Val Leu Leu		
	500	505
Lys Glu Phe Gly Leu Ile Ala Ala Asn Gly Asp Asn Pro Arg Gly Thr		
	515	520
Val Asp Val Ile Pro Leu Phe Glu Thr Ile Glu Asp Leu Gln Ala Gly		
	530	535
Ala Gly Ile Leu Asp Glu Leu Trp Lys Ile Asp Leu Tyr Arg Asn Tyr		
545	550	555
Leu Leu Gln Arg Asp Asn Val Gln Glu Val Met Leu Gly Tyr Ser Asp		
	565	570
Ser Asn Lys Asp Gly Gly Tyr Phe Ser Ala Asn Trp Ala Leu Tyr Asp		
	580	585
Ala Glu Leu Gln Leu Val Glu Leu Cys Arg Ser Ala Gly Val Lys Leu		
	595	600
Arg Leu Phe His Gly Arg Gly Gly Thr Val Gly Arg Gly Gly Gly Pro		
	610	615
Ser Tyr Asp Ala Ile Leu Ala Gln Pro Arg Gly Ala Val Gln Gly Ser		
625	630	635
Val Arg Ile Thr Glu Gln Gly Glu Ile Ile Ser Ala Lys Tyr Gly Asn		
	645	650
Pro Glu Thr Ala Arg Arg Asn Leu Glu Ala Leu Val Ser Ala Thr Leu		
	660	665
Glu Ala Ser Leu Leu Asp Val Ser Glu Leu Thr Asp His Gln Arg Ala		
	675	680
		685

Tyr Asp Ile Met Ser Glu Ile Ser Glu Leu Ser Leu Lys Lys Tyr Ala  
 690 695 700  
 Ser Leu Val His Glu Asp Gln Gly Phe Ile Asp Tyr Phe Thr Gln Ser  
 705 710 715 720  
 Thr Pro Leu Gln Glu Ile Gly Ser Leu Asn Ile Gly Ser Arg Pro Ser  
 725 730 735  
 Ser Arg Lys Gln Thr Ser Ser Val Glu Asp Leu Arg Ala Ile Pro Trp  
 740 745 750  
 Val Leu Ser Trp Ser Gln Ser Arg Val Met Leu Pro Gly Trp Phe Gly  
 755 760 765  
 Val Gly Thr Ala Leu Glu Gln Trp Ile Gly Glu Gly Glu Gln Ala Thr  
 770 775 780  
 Gln Arg Ile Ala Glu Leu Gln Thr Leu Asn Glu Ser Trp Pro Phe Phe  
 785 790 795 800  
 Thr Ser Val Leu Asp Asn Met Ala Gln Val Met Ser Lys Ala Glu Leu  
 805 810 815  
 Arg Leu Ala Lys Leu Tyr Ala Asp Leu Ile Pro Asp Thr Glu Val Ala  
 820 825 830  
 Glu Arg Val Tyr Ser Val Ile Arg Glu Glu Tyr Phe Leu Thr Lys Lys  
 835 840 845  
 Met Phe Cys Val Ile Thr Gly Ser Asp Asp Leu Leu Asp Asp Asn Pro  
 850 855 860  
 Leu Leu Ala Arg Ser Val Gln Arg Arg Tyr Pro Tyr Leu Leu Pro Leu  
 865 870 875 880  
 Asn Val Ile Gln Val Glu Met Met Arg Arg Tyr Arg Lys Gly Asp Gln  
 885 890 895  
 Ser Glu Gln Val Ser Arg Asn Ile Gln Leu Thr Met Asn Gly Leu Ser  
 900 905 910  
 Thr Ala Leu Arg Asn Ser Gly  
 915

<210> 5

<211> 3360

<212> DNA

<213> 谷氨酸棒杆菌

<400> 5

ctagccggag ttgcgcagcg cagtggaaag accgttcatg gtcagctgaa tgttgcggga 60  
 cacttgctcg ctttggtcgc cttttcggtg gcgtcgcac atctctacct ggatcacgtt 120  
 gagtggaaagc aggtaggggt atcggcgcgt gacagagcgt gcgagaagtg gttgtcatc 180  
 aagcagatca tcagagccgg tgattacgca gaacatcttc ttggtcagga agtactcctc 240

gcggatgacg	gaatagactc	gctcggctac	ttccgtatct	gggatcaggt	ctgcgtagag	300
ctttgcaaaa	cgcagctctg	ccttggacat	cacctgagcc	atgttatcca	acactgaggt	360
gaaaaatggc	caggactcat	tgagtgtttg	cagctcggca	atgcgttggg	tggcctgctc	420
cccttcgcca	atccactgct	ctaatacggt	tccgacacca	aaccagcctg	gcagcatgac	480
acgagactgt	gaccagctga	gcacccatgg	gatggctcgc	aaatcttcca	ccgaggaggt	540
ctgcttgctg	gaggaaggcc	tggatccgat	gttgagggat	ccaatctcct	gcagcggcgt	600
ggactgggtg	aagtaatcga	tgaagccttg	atcctcgtgc	accaaggagg	cgtacttctt	660
caagctgagc	tcagagatct	cactcatgat	gtcgtacgcg	cgttggtgat	cggtgagttc	720
ggagacgtcg	agaagcgatg	cctcaagcgt	ggctgagacc	agggcttcga	ggtttcggcg	780
cgcggtttcg	gggttgccgt	acttagcggg	gatgatctcg	ccctgctcgg	tgatgcgcac	840
ggaaccttgg	acagccccc	tgggctgggc	aagaatcgcg	tcgtaggaag	gtccgccacc	900
gcggccgacg	gtgccaccac	ggcctgggaa	caggcgaagc	ttgaccccg	ctgatcggca	960
tagttcgacg	agctgcagtt	ccgcgtcgta	aagcggccag	tttgccgaga	aatatccgcc	1020
atccttggtg	gaatcggagt	aaccgagcat	gacttctctg	acgttgctgc	gctgcaggag	1080
gtagttgcgg	tagagatcaa	ttttccacag	ttcgtcaggg	attccggcgc	cgccctggag	1140
atcttcgatg	gtttcgaaca	gtgggatgac	atcgacggtg	ccgcgtgggt	tgctgccggt	1200
ggctgcgatg	agtcggaatt	ccttgagcaa	caccatcggc	tcgagcacat	cggtgaccga	1260
tgatgccatg	gagatgatgc	agtgaggcac	catccgtggc	ccgaatttct	taacagcctc	1320
cgacgcggtg	cggaagatgc	cgagctcgcg	gtcggtgacc	tcgctgtatt	catctgaacc	1380
gtgcgggatc	agcggacgag	ggctgcgcag	ttccttcagc	agcacctcaa	gcttctctgc	1440
ttcagacagc	tcgcggtagt	ttgcggtgac	ttgggcgcgt	tcgaaaagct	cggtgaggac	1500
gtcctcgtag	ctttcggagt	tttggcgcag	atccagtgcg	taaaggttga	atccaaagct	1560
ctcgatggca	gaaatcagca	cagacaaacg	atcatcggca	atgagaacgt	ccttgatttc	1620
acgcagagaa	tgatcaatgg	tcaacgcata	gtttaagaat	tcttccggag	atgcgtatgg	1680
agtaaagacc	ttgaaccaca	cgccctcaac	ggcgtcctcg	ccgatcagct	cgcccgctct	1740
cgcgaggata	cgtccgcgaa	cgccatggac	ggcgcgtcga	taaggctcat	ccacgcggct	1800
tggcacgtcg	ttgtgccctg	catctgccag	cgcaagcagc	tgccgggtga	ccttattcat	1860
gcggtccgac	aggctgagct	catgctcagc	ggaatgcagc	tggcgtgcat	agtacttgag	1920
cacggtttcc	gcagcgcggt	gagtggaata	ctcaactggt	tccgcggtga	cataagggtt	1980
accgtcgtgg	tctccaccaa	tccaggaacc	tggttgacc	acgggcttca	aaggaacacc	2040
ctcgcgcaaa	cgctcacgaa	gctcaacagc	caatacagc	ttgatacgtg	gaatctcttc	2100
caaaaaggctc	agcttgtagt	agcgcagccc	tacttcgata	tcgtcctcga	tacgtgggcg	2160
ggccacacga	atcaacgcgg	tctgccacaa	aatggtgatg	cgacggcgga	tgttcttctc	2220
gatctcatcc	aacttgcttt	gcgtacgagc	ggtaggtctc	gcagactgca	aagcgtggcg	2280
ttcacgcatg	tgggtggtga	tccacttttg	cgcatcaaaa	acagtgcggc	ggcgagtctc	2340
agttgggtgc	gcagtcagaa	ccggcgccac	ctcagcattg	cgcagcacat	cgccacagc	2400
ttctgcgcca	acattgcctt	cattgagttt	cagccaggtg	gcatcaagag	tgctgtccgg	2460
aggggtgtcg	cctgcatcga	gagcctgttc	acgaagctct	tcatacgtaga	ggtcttccgc	2520
caggttagcc	agcagagcga	agtgggaaaa	tgcgcgagca	atcgggtgtg	ccttggtctg	2580

agtaatgccg tcgaaaacct gaaccaggct atccatttcg gcgttgccct tggcgatata 2640  
 aaaagaagtc aggcgcgctt gttcgaccag ttcataaacc tcctggcctt cttgttccgc 2700  
 aattacctca ccgaggattt gaccgaggaa cctgatgtca tcgcgtaaaa aatcagtcac 2760  
 taactacttt aacactctt tcacattgag ggtgttggcg tgcattgagat aaaaaatcac 2820  
 ccagcaaaac aggtgtttag ctgggcgatt gatttcgatg gctttcatgg gctcatcaaa 2880  
 accgcacttc tacagtgcct gtgctttaag gctgtgcttt aaggctgtgc tttaaagctc 2940  
 tgtactttta gcaacgctcg cagcgttggc agccagcttg gcgaatgctt caccgtcgag 3000  
 ggaagcgcca ccgacaagtc cgccgtcgac gtcaggctga ccgacgatct cagcgacggt 3060  
 ttctgcctta acagaaccac cgtaaagaat acgcaggccc tcagcgacct cgtcgccctgc 3120  
 aagctccacg atcagaccgc gगतगcctt gcacacttc tgagcgtcag ctgcggaagc 3180  
 aaccttaccg gtgccgatag cccacactgg ctatacgcg ataacgggtg tggccagctc 3240  
 agcagcatcc agccagcaa gggacttac ggtctgctcg acgacgtact caacgtgggt 3300  
 gccagcttca cggatttcca gtggtcacc aacgcagacg atcgggctga tgccgttggg 3360

<210> 6

<211> 3359

<212> DNA

<213> 谷氨酸棒杆菌

<400> 6

ctagccggag ttgvcagcg cagtggaaag accgttcatg gtcagctgaa tgttvcggga 60  
 cacttgctcg ctttggctgc cttttcgta gcgtcgcac atctctacct ggatcacgtt 120  
 gagtggaaagc aggtaggggt atcggcgtg gacagagcgt gcgagaagtg gttgtcacc 180  
 aagcagatca tcagagccgg tgattacgca gaacatctt ttggtcagga agtactctc 240  
 gcggatgacg gaatagactc gctcggctac ttccgtatct gggatcaggt ctgcgtagag 300  
 ctttgccaaa cgcagctctg ctttgacat cacctgagcc atgttatcca aactgaggt 360  
 gaaaaatggc caggactcat tgagtgtttg cagctcggca atgcgttggg tggcctgctc 420  
 cccttcgcca atccactgct ctaatvcggt tccgacacca aaccagcctg gcagcatgac 480  
 acgagactgt gaccagctga gcacctagg gatggctcgc aatcttcca ccgaggaggt 540  
 ctgcttgctg gaggaaggcc tggatccgat gttgaggat ccaatctcct gcagcggcgt 600  
 ggactgggtg aagtaatcga tgaagcctt atctcgtgc accaaggagg cgtacttctt 660  
 caagctgagc tcagagatct cactcatgat gtcgtacgcg cgttggatgat cggtagttc 720  
 ggagacgtcg agaagcgtg cctcaagcgt ggctgagacc agggcttca ggtttcggcg 780  
 cgcggtttcg gggttgccg acttagcggg gatgatctcg cctgctcgg tgatvcgcac 840  
 ggaaccttgg acagccccc tgggctgggc aagaatcgcg tcgtaggaag gtccgccacc 900  
 gcggccgacg gtgccaccac ggccgtggaa caggcgaagc ttgaccccg ctgatcggca 960  
 tagttcgacg agctgcagtt ccgcgtcgt aagcgcacc tttvcggaga aatatccgc 1020  
 atccttgttg gaatcggagt aaccgagcat gacttcttg acgttvtcgc gctvcaggag 1080  
 gtagttvcgg tagagatcaa tttccacag ttcgtcagg attccggcgc cggcctggag 1140  
 atcttcgatg gtttcgaaca gtgggatgac atcagcgggt ccgcgtgggt tvtcgcctt 1200  
 ggctvcgatg agtccgaatt cttgagcaa caccatcgc tcgagcacc cggtagccga 1260

tgatgccatg	gagatgatgc	agtgaggcac	catccgtggc	ccgaatttct	taacagcctc	1320
cgacgcggtg	cggaagatgc	cgagctcgcg	gtcggtgacc	tcgctgtatt	catctgaacc	1380
gtgcgggatc	agcggacgag	ggctgcgcag	ttccttcagc	agcacctcaa	gcttctctgc	1440
ttcagacagc	tcgcggtagt	ttgcggtgac	ttgggcgcgt	tcgaaaagct	cggtgaggac	1500
gtcctcgtag	ctttcggagt	tttggcgcag	atccagtgcg	taaaggttga	atccaaagct	1560
ctcgatggca	gaaatcagca	cagacaaacg	atcatcgcca	atgagaacgt	ccttggattc	1620
acgcagagaa	tgatcaatgg	tcaacgcata	gtttaagaat	tcttccggag	atgcgtatgg	1680
agtaaagacc	ttgaaccaca	cgccctcaac	ggcgtcctcg	ccgatcagct	cggccgtcgt	1740
cgcgaggata	cgcccgcaa	cgccatggac	ggcgcgtcga	taaggctcat	ccacgcggct	1800
tgccacgtcg	ttgtgcctg	catctgccag	cgcaagcagc	tcgggggtga	ccttattcat	1860
gcggtccgac	aggtgagct	catgctcgag	ggaatgcagc	tgccgtgcat	agtacttgag	1920
cacggtttcc	gcagcgcggt	gagtggaata	ctcaactggt	tccgcgggtga	cataagggtt	1980
accgtcgtgg	tctccaccaa	tccaggaacc	tggttgacc	acgggcttca	aaggaacacc	2040
ctcgccgaaa	cgctcacgaa	gctcaacagc	cacatcacgg	ttgatacgtg	gaatctcttc	2100
caaaaggctc	agctttagt	agcgcagccc	tacttcgata	tcgtcctcga	tacgtgggcg	2160
ggccacacga	atcaacgcgg	tctgccacaa	aatggtgatg	cgacggcggg	tgttcttctc	2220
gatctcatcc	aacttgcttt	gcgtacgagc	ggtaggctcc	gcagactgca	aagcgtggcg	2280
ttcacgcatg	tggttggtga	tccacttttg	cgcatcaaaa	acagtgcggc	ggcgagtctc	2340
agttgggtgc	gcagtcagaa	ccggcgccac	ctcagcattg	cgcagcacat	cggccacagc	2400
ttctgcgcca	acattgccct	cattgagttt	cagccaggtg	gcatcaagag	tgctgtccgg	2460
aggggtgtcg	cctgcatcga	gagcctgttc	acgaagctct	tcatacgtaga	ggtcttccgc	2520
caggttagcc	agcagagcga	agtgggaaaa	tgccgcgagca	atcgggtgtg	ccttggctgg	2580
agtaatgccg	tcgaaaacct	gaaccaggct	atccatttcg	gcgttgccct	tgccgatatc	2640
aaaagaagtc	aggcgcgctt	gttcgaccag	ttcataaacc	tcttgccctt	cttgttccgc	2700
aattacctca	ccgaggattt	gaccgaggaa	cctgatgtca	tcgcgtaaaa	aatcagtcac	2760
aactacttta	aacactcttt	cacattgagg	gtgttggcgt	gcatgagata	aaaaatcacc	2820
cagcaaaaaca	ggtgttttagc	tgggcgattg	atttcgatgg	ctttcatggg	ctcatcaaaa	2880
ccgcacttct	acagtgcttg	tgctttaagg	ctgtgcttta	aggctgtgct	ttaaagctct	2940
gtactttaag	caacgctcgc	agcgttggca	gccagcttgg	cgaatgcttc	accgtcgagg	3000
gaagcggcac	cgacaagtc	gccgtcgacg	tcaggctgac	cgacgatctc	agcgacggtt	3060
tctgccttaa	cagaaccacc	gtaaagaata	cgcaggccct	cagcgacctc	gtcgccctgca	3120
agctccacga	tcagaccgcg	gatagccttg	cacacttctc	gagcgtcagc	tgccggaagca	3180
accttaccgg	tgccgatagc	ccacactggc	tcatacgcga	taacggtgtt	ggccagctca	3240
gcagcatcca	ggccagcaag	ggacttacgg	gtctgctcga	cgacgtactc	aacgtgggtg	3300
ccagcttcac	ggatttccag	tggetcacca	acgcagacga	tcgggctgat	gccgttggg	3359