



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113785070 A

(43) 申请公布日 2021.12.10

| | |
|---|---|
| (21) 申请号 202180001841.2 | KCCM12586P 2019.09.02 |
| (22) 申请日 2021.01.21 | KCCM12587P 2019.09.02 |
| (30) 优先权数据 10-2020-0008025 2020.01.21 KR | (71) 申请人 CJ第一制糖株式会社 地址 韩国首尔 |
| (85) PCT国际申请进入国家阶段日 2021.07.12 | (72) 发明人 裴智妍 尹炳勋 权秀渊 金径林 金朱恩 卞效情 曹承铉 权娜罗 金亨俊 |
| (86) PCT国际申请的申请数据 PCT/KR2021/000823 2021.01.21 | (74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245 代理人 金德善 |
| (87) PCT国际申请的公布数据 WO2021/150029 KO 2021.07.29 | (51) Int.Cl. C12P 13/04 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01) C12R 1/15 (2006.01) |
| (83) 生物保藏信息 KCCM12580P 2019.09.02 KCCM12581P 2019.09.02 KCCM12582P 2019.09.02 KCCM12583P 2019.09.02 KCCM12584P 2019.09.02 KCCM12585P 2019.09.02 | 权利要求书1页 说明书36页 序列表15页 PCT/RO/134表6页 |

(54) 发明名称

利用含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的微生物产生L-氨基酸的方法

(57) 摘要

本公开涉及具有增加的L-氨基酸产生能力的棒杆菌属的微生物,其含有来源于乳杆菌属的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶。根据本公开,引入来源于德氏乳杆菌保加利亚亚种的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶,以通过NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的活性增加还原力,从而增加属于棒杆菌属的菌株的产生L-氨基酸的能力。

1. 产生L-氨基酸的方法,其包括:

在培养基中培养含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的棒杆菌属的微生物,所述NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列;以及

从所述培养的微生物或培养基中回收L-氨基酸。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述SEQ ID NO:1的所述氨基酸序列来源于德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述棒杆菌属的微生物是谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)。

4. 棒杆菌属的微生物,其具有增加的L-氨基酸产生能力,含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶,所述NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述SEQ ID NO:1的氨基酸序列来源于德氏乳杆菌保加利亚亚种。

6. 根据权利要求4所述的微生物,其中所述棒杆菌属的微生物是谷氨酸棒杆菌。

7. 含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的棒杆菌属的微生物产生L-氨基酸的用途,所述NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

利用含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的微生物产生L-氨基酸的方法

技术领域

[0001] 本公开涉及含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的具有增加的L-氨基酸产生能力的棒杆菌属的微生物,以及利用该微生物产生L-氨基酸的方法。

背景技术

[0002] 棒杆菌属(*Corynebacterium* sp.)的微生物是革兰氏阳性微生物,其常用于具有各种用途的物质(如饲料、药物、以及包括L-氨基酸和各种核酸的食品)的工业生产。近年来,已经从棒杆菌属微生物生产出二胺和酮酸。

[0003] 为了通过微生物发酵生产有用的产物,加强在微生物中目的产物的生物合成途径的同时,增加了对能量来源或还原力的要求。其中,NADPH(烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸)是提供还原力的必需要素。氧化型NADP⁺和还原型NADPH是体内电子转移物质,且参与各种合成过程。在中心代谢途径中,已知NADPH主要由1) 氧化戊糖磷酸途径和2) TCA途径的NADP-依赖性异柠檬酸脱氢酶(Icd基因)产生。另外,各种微生物具有苹果酸酶、葡萄糖脱氢酶和非磷酸化甘油醛-3-磷酸脱氢酶作为各种可替代途径以供应NADPH。

[0004] 进一步,无论中心代谢途径如何,NADPH产生酶包括转氢酶、铁氧还蛋白:NADP⁺氧化还原酶等(Spaans等人,2015,NADPH-generating systems in bacteria and archaea, *Front.Microbiol.*6:742)。

发明内容

[0005] [技术问题]

[0006] 本发明人已经进行了大量的努力以在产生氨基酸的微生物中增加每种氨基酸的生产,且结果,通过引入NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的各种研究,他们已经确认了在棒杆菌属的微生物中氨基酸及其前体的产生被增加了,从而完成了本公开。

[0007] [技术方案]

[0008] 本公开的目的是提供产生L-氨基酸的方法,其包括:在培养基中培养含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的棒杆菌属的微生物,NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列;以及从培养的微生物或培养基中回收L-氨基酸。

[0009] 本公开的另一目的是提供具有增加的L-氨基酸产生能力的棒杆菌属的微生物,其含有包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

[0010] 本公开的又一目的是提供含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的棒杆菌属的微生物的产生L-氨基酸的用途,NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0011] [有益效果]

[0012] 根据本公开,引入了来源于德氏乳杆菌保加利亚亚种(*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*)的编码gapN的基因,以通过gapN的活性增加还原力,从而

增加棒杆菌属的微生物产生L-氨基酸的能力。

具体实施方式

[0013] 下面将详细描述本公开。同时,本文公开的每个描述和实施方式也可应用于其它描述和实施方式。也就是说,本文公开的各种要素的所有组合都落入本公开的范围内。进一步,本公开的范围不受下面具体描述的限制。

[0014] 为了实现上述目的,本公开的一个方面是提供产生L-氨基酸的方法,其包括:在培养基中培养含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的棒杆菌属的微生物,甘油醛-3-磷酸脱氢酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列;以及从培养的微生物或培养基中回收L-氨基酸。

[0015] 在本公开中,术语“NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶”是指具有使用NADP作为辅酶将作为底物的甘油醛-3-磷酸转化成3-磷酸甘油酸酯的活性的多肽。NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的实例可包括来源于动物、植物和细菌的NADP依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶。具体地,NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶可以来源于细菌,更具体地,可来源于乳杆菌属(*Lactobacillus* sp.)和德氏乳杆菌保加利亚亚种。NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶可以是,例如,包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽。包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽可以与具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽或由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的多肽互换使用。

[0016] 在本公开中,SEQ ID NO:1是指具有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的氨基酸序列。具体地,SEQ ID NO:1可以是具有由gapN基因编码的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的多肽序列。为了本公开的目的,多肽可以来源于乳杆菌属,且具体地来自德氏乳杆菌保加利亚亚种,但不限于此,并且只要其具有与上述氨基酸相同的活性,可以不受限制地包括任何序列。SEQ ID NO:1的氨基酸序列是从已知数据库NIH GenBank获得的。另外,尽管在本公开中将具有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的多肽限定为具有SEQ ID NO:1氨基酸序列的多肽,但它不排除可能通过在SEQ ID NO:1氨基酸序列的上游或下游添加无意义的序列而发生的突变或可能自然发生的突变、或其沉默突变。对于本领域技术人员明显的是,与包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽具有相同或相应活性的任何多肽都可以落入本公开的具有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的多肽的范围。在具体实例中,本公开的具有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的多肽可以是具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的多肽,或者由与SEQ ID NO:1的氨基酸序列具有80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或更多的同源性或同一性的氨基酸序列组成的多肽。进一步,显然具有其中氨基酸序列的一部分被缺失、修饰、取代或添加的氨基酸序列的任何多肽,只要其包括具有这种同源性或同一性并表现出与上述多肽的效果相对应的效果的氨基酸序列,也可以落入本公开的修饰目标的多肽的范围。

[0017] 即,在本公开中,虽然其被描述为“由特定的SEQ ID NO的氨基酸序列组成的蛋白质或多肽”,但显然,只要该多肽具有与由相应的SEQ ID NO的氨基酸序列组成的多肽相同或相应的活性,在本公开中也可以使用在部分氨基酸序列中具有缺失、修饰、取代或添加的任何多肽。例如,显然,“由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的多肽”只要该多肽具有相同或相应的活性就可以落入“由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成的多肽”的范围内。

[0018] 在本公开中,编码NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的基因是gapN基因,且该基

因可以来源于细菌,且更具体地,来源于乳杆菌属微生物,但只要它是能够表达gapN基因的乳杆菌属的微生物,该微生物没有特别的限制。具体地,乳杆菌属的微生物可能是德氏乳杆菌保加利亚亚种。基因可以是编码SEQ ID NO:1的氨基酸序列的核苷酸序列,且更具体地,包括SEQ ID NO:2的核苷酸序列的序列,但不限于此。包括SEQ ID NO:2的核苷酸序列的多核苷酸可以与具有SEQ ID NO:2的核苷酸序列的多核苷酸和由SEQ ID NO:2的核苷酸序列组成的多核苷酸互换使用。

[0019] 如本文所用,术语“多核苷酸”——其指由通过共价键连接在长链上的核苷酸单体组成的核苷酸聚合物——意指至少具有一定长度的DNA或RNA链,且更具体地,是指编码修饰的多肽的多核苷酸片段。

[0020] 具体地,由于密码子简并性或考虑到其中待表达多肽的生物体中优选的密码子,本公开的多核苷酸可以在不改变多肽的氨基酸序列的范围内在编码区域中进行各种修饰。具体地,可以不受限制地包括编码包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的任何多核苷酸序列。

[0021] 另外,可以不受限制地包括可以由已知基因序列——例如,可以在严格条件下与全部或部分核苷酸序列互补的序列杂交以编码包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列的具有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的多肽的任何序列——制备的探针。术语“严格条件”是指允许多核苷酸之间特异性杂交的条件。这些条件被具体的公开于文献(参见J.Sambrook等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,2nd Edition,Cold Spring Harbor Laboratory press,Cold Spring Harbor,New York,1989;F.M.Ausubel et al.,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.,New York,9.50-9.51,11.7-11.8)中。例如,严格条件可以包括在具有高同源性或同一性(同源性或同一性是40%或更高、具体地90%或更高、更具体地95%或更高、更加具体是97%或更高、和仍更加具体地99%或更高)的基因之间进行杂交,而在具有低于上述同源性或同一性的同源性或同一性的基因之间不进行杂交的条件,或Southern杂交的洗涤条件,即,在对应于60°C,1×SSC和0.1%SDS;具体地,60°C,0.1×SSC和0.1%SDS;和更具体地68°C,0.1×SSC和0.1%SDS的盐浓度和温度下,洗涤一次,具体地,洗涤两次或三次。

[0022] 虽然根据杂交的严格程度,碱基之间的错配是可能的,但杂交要求两个核苷酸含有互补序列。术语“互补的”用于描述能够彼此杂交的核苷酸碱基之间的关系。例如,关于DNA,腺苷与胸腺嘧啶互补,以及胞嘧啶与鸟嘌呤互补。因此,本公开可包括与整个序列互补的分离的核酸片段以及实质上与其相似的核酸序列。

[0023] 具体地,可以在上述条件下使用包括在55°C的 T_m 值下的杂交步骤的杂交条件来检测具有同源性或同一性的多核苷酸。进一步, T_m 值可以是60°C、63°C或65°C,但不限于此,并且可以由本领域技术人员根据其目的适当地调节。

[0024] 杂交多核苷酸的适当严格程度取决于多核苷酸的长度和互补程度,并且这些参数在本领域是公知的(参见Sambrook等人)。

[0025] 如本文所用,术语“同源性”或“同一性”是指两个给定的氨基酸序列或核苷酸序列之间的相关程度,并且可以表示为百分比。术语“同源性”和“同一性”经常可以彼此互换使用。

[0026] 保守的多核苷酸或多肽的序列同源性或同一性可以通过标准比对算法来确定,并

且可以与由使用的程序建立的默认空位罚值 (default gap penalty) 一起使用。实质上,通常预期同源性或同一性序列可以与序列的整个长度的全部或至少约50%、60%、70%、80%、或90%在中等或高度严格的条件下杂交。也可以考虑,在杂交的多核苷酸中含有代替密码子的简并密码子的多核苷酸。

[0027] 例如,任意两个多核苷酸序列是否具有同源性、相似性、或同一性可通过已知的计算机算法(如“FASTA”程序(Pearson等人,(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444)利用默认参数来确定。可替代地,其可通过使用EMBOSS包的Needleman程序(EMBOSS:The European Molecular Biology Open Software Suite,Rice等人,2000,Trends Genet.16:276-277)(优选地,5.0.0或其更高版本)执行Needleman-Wunsch算法(Needleman and Wunsch,1970,J.Mol.Biol.48:443-453)来确定(GCG程序包(Devereux,J.等人,Nucleic Acids Research 12:387(1984))、BLASTP、BLASTN、FASTA(Atschul,S.F.,等人,J MOLEC BIOL 215:403(1990);Guide to Huge Computers,Martin J.Bishop,ed.,Academic Press,San Diego,1994,和CARILLO等人(1988)SIAMJ Applied Math 48:1073)。例如,同源性、相似性、或同一性可利用美国国家生物技术信息中心(NCBI)的BLAST或ClustalW来确定。

[0028] 多核苷酸或多肽的同源性、相似性、或同一性可通过利用,例如,Smith and Waterman,Adv.Appl.Math(1981)2:482中所公开的GAP计算机程序(如,Needleman等人,(1970),J Mol Biol.48:443)比较序列信息来确定。总之,GAP程序将同源性、相似性、或同一性定义为通过相似的比对符号(即,核苷酸或氨基酸)的数量除以两序列中较短者的符号总数而获得的值。用于GAP程序的默认参数可包括:(1)一元比较矩阵(含有用于同一性的值为1和用于非同一性的值为0)和如Schwartz and Dayhoff,eds.,Atlas Of Protein Sequence And Structure,National Biomedical Research Foundation,pp.353-358(1979)中公开的Gribskov等人,(1986)Nucl.Acids Res.14:6745的加权比较矩阵(或EDNAFULL取代矩阵(NCBI NUC4.4的EMBOSS版本));(2)每个空位的罚值为3.0,且每个空位中的每个符号为额外0.10罚值(或空位开放罚值(gap open penalty)为10和空位延伸罚值(gap extension penalty)为0.5);和(3)末端空位无罚值。

[0029] 进一步,任何两个多核苷酸或多肽序列是否彼此具有同源性、相似性或同一性可以通过在所定义的严格条件下在Southern杂交实验中比较序列来鉴定,并且所定义的适当杂交条件在相应技术的范围内,并且可以通过本领域技术人员所熟知的方法来确定(例如,J.Sambrook等人,Molecular Cloning,A Laboratory Manual,2nd Edition,Cold Spring Harbor Laboratory press,Cold Spring Harbor,New York,1989;F.M.Ausubel等人,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.,New York)。

[0030] 可以通过本领域已知的常规方法将编码NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的基因引入棒杆菌属的微生物中,并且可以在棒杆菌属的微生物中表达NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

[0031] 如本文所用,术语“待表达/正在表达”是指其中目标多肽被引入到微生物中或其中目标多肽被修饰以在微生物中被表达的状态。为了本公开的目的,“目标多肽”可以是上述NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶。

[0032] 具体地,如本文所用,术语“多肽的引入”意指微生物展示出微生物本来不具备的

目标多肽的活性。例如,可以意指将编码目标多肽的多核苷酸引入到微生物的染色体中,或者将含有编码目标多肽的多核苷酸的载体引入微生物中,且从而展示其活性。即使目标多肽已经存在于微生物中,由于将目标多肽引入到微生物中,多肽在微生物中的表达或活性与非修饰的微生物相比也可以被增加或增强。

[0033] 另外,如本文所用,术语“活性的增强”意指微生物中特定蛋白质的活性比其内源性活性或非修饰微生物中多肽的活性增强。如本文所用,术语“内源活性”是指在微生物的性状由于由自然或人为因素导致的遗传修饰而被改变时,亲本菌株在转化前本来具有的特定蛋白质的活性。

[0034] 具体地,活性的增强可以通过选自以下的一种或多种方法来实现:将多肽引入到微生物中的方法,增加编码多肽的基因的细胞内拷贝数的方法;将修饰引入到编码多肽的基因的表达调控序列中的方法;用具有强活性的序列置换编码多肽的基因的表达调控序列的方法,以及进一步将修饰引入到编码多肽的基因中使得多肽的活性被增强的方法,但不限于此。

[0035] 在上述中,将多肽引入到微生物中的方法或增加基因的细胞内拷贝数的方法可以通过使用载体将编码多肽的多核苷酸插入到微生物的染色体或质粒中来进行,但不特别限于此。具体地,方法可以通过引入载体来执行,载体可操作地连接到编码本公开的多肽的多核苷酸并且能够与宿主细胞无关地复制和发挥作用。可替代地,方法可以通过将载体引入到宿主细胞的染色体中来执行,载体能够将多核苷酸插入到宿主细胞的染色体中并可操作地与多核苷酸连接。多核苷酸插入到染色体中可以通过本领域已知的方法(例如,通过同源重组)来实现。

[0036] 接下来,可通过对核苷酸序列的缺失、插入、非保守或保守取代或其组合来诱导对序列的修饰,以进一步增强表达调控序列的活性,或者通过用具有更强活性的核酸序列置换多核苷酸序列,来进行对表达调控序列的修饰以增加多核苷酸的表达,但不特别限于此。表达调控序列可以包括但不特别限于启动子、操纵子序列、编码核糖体结合位点的序列、和调控转录和翻译终止的序列。

[0037] 具体地,强启动子(代替原始启动子)可与多核苷酸的表达单元的上游区域连接。强启动子的实例可以包括c j1至c j7启动子(韩国专利号10-0620092)、lac启动子、trp启动子、trc启动子、tac启动子、 λ 噬菌体PR启动子、PL启动子、tet启动子、gapA启动子、SPL7启动子、SPL13(sm3)启动子(韩国专利号10-1783170)、02启动子(韩国专利号10-1632642)、tkl启动子和yccA启动子,但不限于此。

[0038] 另外,虽然不特别限于此,但染色体上的多核苷酸序列的修饰可以通过核酸序列的缺失、插入、非保守或保守取代或其组合,诱导表达调控序列上的修饰,以进一步增强多核苷酸序列的活性,或者通过用修饰以具有更强活性的多核苷酸序列置换多核苷酸序列来进行。

[0039] 多肽活性的引入和增强可以是与野生型或非修饰微生物菌株中的多肽的活性或浓度相比,相应多肽的活性或浓度的增加,但不限于此。

[0040] 具体地,可以通过制备用于表达的含有编码NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的基因的重组载体,并将载体引入到棒杆菌属的微生物中,以产生转化的棒杆菌属的微生物,来实现NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的引入或增强。即,含有编码NADP-依赖性甘

油醛-3-磷酸脱氢酶的基因的微生物可以是通过以含有该基因的载体进行转化而产生的重组微生物,但不限于此。

[0041] 如本文所用,术语“载体”是指含有目标多肽的适当调控序列和核苷酸序列以在合适宿主中表达目标多肽的DNA产物。调控序列可包括能够启动转录的启动子、用于调控转录的任意操纵子序列、编码适当mRNA核糖体结合位点的序列、以及调控转录和翻译终止的序列。一旦转化到合适的宿主细胞中,载体可以独立于宿主基因组复制或发挥作用,或可以整合到宿主基因组本身中。

[0042] 只要本公开中使用的载体能在宿主细胞中复制,则对其没有特别限制,并且可以使用本领域已知的任何载体。常规使用的载体的实例可包括天然或重组质粒、黏粒、病毒和噬菌体。例如,作为噬菌体载体或黏粒载体,可以使用pWE15、M13、 λ EMBL3、 λ EMBL4、 λ FIXII、 λ DASHII、 λ ZAPII、 λ gt10、 λ gt11、MBL3、MBL4、IXII、ASHII、APII、t10、t11、Charon4A、和Charon21A;且作为质粒载体,可以使用基于pBR、pUC、pBluescriptII、pGEM、pTZ、pET、pMal、pQE、和pCL的那些。具体地,可以使用pDZ、pACYC177、pACYC184、pCL、pECCG117、pUC19、pBR322、pMW118、和pCC1BAC载体。

[0043] 用于表达NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的重组载体可以通过常规方法制备。即,它可以通过使用限制酶将NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的基因序列连接到适当的载体来制备。

[0044] 可以使用用于多肽表达的重组载体将编码目标多肽的多核苷酸插入到染色体中。将多核苷酸插入到染色体中可以通过本领域已知的任何方法(例如,通过同源重组)进行,但该方法不限于此。另外,载体可以进一步包括选择标记以确认插入到染色体中与否。选择标记用于选择用载体转化的细胞,即,用于确认目标核酸分子是否已经被插入,且可以使用提供可选择表型(如耐药性、营养缺陷型(辅源营养)、对细胞毒物的耐性、或表面多肽的表达)的标记。在被选择剂处理的情况下,只有表达选择标记的细胞才能存活或表达其它表型性状,且从而可以选择转化的细胞。

[0045] 如本文所用,术语“转化”是指将包括编码目标多肽的多核苷酸的载体引入到宿主细胞中,使得由多核苷酸编码的多肽可在宿主细胞中表达。只要转化的多核苷酸可以在宿主细胞中表达,转化的多核苷酸被整合到宿主细胞的染色体中并位于其中还是位于染色体外并不重要,且两种情况都可以被包括在内。进一步,多核苷酸可以包括编码目标蛋白的DNA和RNA。只要多核苷酸能够被引入到宿主细胞中并在其中表达,其可以以任何形式被引入。例如,可以以表达盒的形式将多核苷酸引入到宿主细胞中,表达盒是包括其自主表达所需的所有元件的基因构建体。表达盒一般可包括可操作地连接到多核苷酸的启动子、转录终止子、核糖体结合位点、和翻译终止子。表达盒可以是可自复制表达载体的形式。另外,多核苷酸可以原样被引入宿主细胞中并可操作地被连接到在宿主细胞中表达所需的序列,但不限于此。

[0046] 另外,如本文所用,术语“可操作地连接”意指基因序列功能连接到启动子序列,该启动子序列启动并介导编码本公开的目标多肽的多核苷酸的转录。

[0047] 转化本公开的载体的方法包括将核酸引入到细胞中的任何方法,并且可以通过根据宿主细胞选择本领域已知的合适的标准技术来进行。例如,方法可包括电穿孔、磷酸钙(CaHPO_4)沉淀、氯化钙(CaCl_2)沉淀、微注射、聚乙二醇(PEG)方法、DEAE-葡聚糖方法、阳离子

脂质体方法、和乙酸锂-DMSO方法等,但不限于此。

[0048] 为了本公开的目的,棒杆菌属的微生物——其被基因修饰以表达包括SEQ ID NO: 1的氨基酸序列的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶——可以是与非修饰的微生物相比具有增加的L-氨基酸产生能力的微生物。

[0049] 如本文所用,术语“产生L-氨基酸的微生物”或“产生L-氨基酸的棒杆菌属微生物”包括其中发生自然或人工遗传修饰的所有微生物或棒杆菌属的微生物,并且其作为由于外源基因的插入或内源性基因的活性增强或失活而具有特定减弱或增强机制的微生物,可以指为了产生期望的L-氨基酸而其中发生遗传突变或其中活性被增强的棒杆菌属的微生物。

[0050] 具体地,产生L-氨基酸的微生物可以是其中由于期望的L-氨基酸生物合成途径中涉及的部分多肽的活性增强或期望的L-氨基酸降解途径中涉及的部分多肽的活性减弱而增强期望的L-氨基酸产生能力的微生物。例如,微生物可以是其中天冬氨酸激酶(lysC)、高丝氨酸脱氢酶(hom)、L-苏氨酸脱水酶(ilvA)、2-异丙基苹果酸合酶(leuA)、乙酰乳酸合酶(ilvN)或/和高丝氨酸O-乙酰转移酶(metX)的活性被增强的微生物。另外,微生物可以包括,例如,基因或多肽,其被修饰以具有对反馈抑制的抗性以增强活性。进一步,微生物可以是,例如,具有减弱或失活各种基因或多肽(其降解期望的L-氨基酸)的活性。另外,微生物可以是,例如,由于随机突变而具有增加的L-氨基酸产生能力的微生物,但不限于此。即,微生物可以是其中通过增强期望的L-氨基酸生物合成途径中涉及的多肽活性或通过失活/减弱降解途径中涉及的多肽活性来增加期望的L-氨基酸的产生的微生物。

[0051] 如上所述,多肽活性的增强可以通过增加编码多肽的基因的细胞内拷贝数;通过将突变引入到编码多肽的染色体基因和/或其表达调控序列中;通过用具有强活性的序列置换编码多肽的染色体上的基因表达调控序列;通过将突变引入到在编码多肽的染色体上的基因的一部分中以增加多肽的表达或具有对反馈抑制的抗性;或其组合来实现,但不限于此。

[0052] 如本文所用,术语“多肽活性的减弱/失活”意指与非修饰的菌株相比,天然野生型菌株、亲本菌株或相应的多肽没有表达酶或多肽,或者即使表达了也没有活性或活性降低。此时,降低是包括以下情况的综合概念,其中由于编码多肽的基因突变、表达调控序列的修饰、或基因的部分或全部的缺失等,使多肽本身的活性与微生物本来具有的多肽的活性相比降低的情况;其中由于编码多肽的基因表达的抑制或翻译的抑制,与天然菌株或修饰前菌株相比,细胞内多肽活性的总体水平降低的情况;及其组合。在本公开中,可以通过应用本领域公知的各种方法来实现失活。方法的实例可以包括用于缺失编码多肽的基因的部分或全部的方法;用于修饰表达调控序列使得基因表达被降低的方法;用于修饰编码多肽的基因序列使得多肽活性被移除或减弱的方法;引入与编码多肽的基因的转录物互补结合的反义寡核苷酸(例如,反义RNA)的方法;在编码多肽的基因的Shine-Dalgarno序列上游参入(结合,부가)与Shine-Dalgarno序列互补的序列以形成二级结构,从而抑制核糖体附着的方法;和用于在编码多肽的基因的多核苷酸序列的开放阅读框(ORF)的3'端参入启动子以进行逆转录的逆转录工程(RTE)方法;及其组合。

[0053] 然而,作为上述方法的实例,本领域中已知的是用于增强或失活多肽的活性的方法和用于遗传操作的方法,并且可以通过应用各种已知的方法来制备产生L-氨基酸的微生物。

物。

[0054] 如上所述,为了本公开的目的,含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的产生L-氨基酸的棒杆菌属的微生物与非修饰野生型菌株或非修饰突变体相比,可以从培养基中的碳源过量地产生期望的L-氨基酸。在本公开中,“产生L-氨基酸的棒杆菌属的微生物”可与“具有L-氨基酸产生能力的棒杆菌属的菌株”或“产生L-氨基酸的棒杆菌属的菌株”互换使用。

[0055] 只要是能产生L-氨基酸的棒杆菌属的微生物,产生L-氨基酸的棒杆菌属微生物(其被修饰以表达具有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的活性的多肽)就不受限制。具体地,棒杆菌属的微生物可以是选自谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、产氨棒杆菌(*Corynebacterium ammoniagenes*)、克氏棒杆菌(*Corynebacterium crudilactis*)、荒漠棒杆菌(*Corynebacterium deserti*)、高效棒杆菌(*Corynebacterium efficiens*)、石南棒杆菌(*Corynebacterium callunae*)、停滞棒杆菌(*Corynebacterium stationis*)、单一棒杆菌(*Corynebacterium singulare*)、耐盐棒杆菌(*Corynebacterium halotolerans*)、纹带体棒杆菌(*Corynebacterium striatum*)、污染棒杆菌(*Corynebacterium pollutisoli*)、模拟棒杆菌(*Corynebacterium imitans*)、睾丸棒杆菌(*Corynebacterium testudinoris*)和微黄棒杆菌(*Corynebacterium flavescens*)中的任何一种或多种,且具体地,其可以是谷氨酸棒杆菌,但不限于此。

[0056] 产生L-氨基酸的棒杆菌属的微生物可能是重组微生物。重组微生物如上所述。

[0057] 如本文所用,术语“培养”意指使微生物在适当调控的环境条件下生长。本公开的培养过程可以根据本领域已知的合适的培养基中和培养条件下进行。这种培养过程可根据待选择的菌株由本领域技术人员容易地调节以使用。具体地,培养可以是分批培养、连续培养、和补料分批培养,但不限于此。

[0058] 如本文所使用的,术语“培养基”是指含有培养微生物所需的营养物质作为主要成分的物质混合物,且它提供营养物质和生长因子,以及生存和生长所必需的水。具体地,用于培养本公开的微生物的培养基和其它培养条件可以是用于常规微生物培养的任何培养基,而不受任何特别限制。然而,本公开的微生物可以在好氧条件下,在含有适当的碳源、氮源、磷源、无机化合物、氨基酸和/或维生素的常规培养基中,调节温度、pH等同时培养。具体地,用于棒杆菌属的菌株的培养基可以在文献(“Manual of Methods for General Bacteriology” by the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981))中找到。

[0059] 在本公开中,碳源可以包括碳水化合物,如葡萄糖、甘蔗糖、乳糖、果糖、蔗糖、麦芽糖等;糖醇类,如甘露醇、山梨醇等;有机酸,如丙酮酸、乳酸、柠檬酸等;和氨基酸,如谷氨酸、甲硫氨酸、赖氨酸等。另外,碳源可以包括天然有机营养物,如淀粉水解物、糖蜜、赤糖糊、米糠、木薯、甘蔗废糖蜜、玉米浆等)。具体地,可以使用碳水化合物,如葡萄糖和灭菌预处理糖蜜(即,转化为还原糖的糖蜜),且另外,可以不受限制地使用适量的各种其它碳源。这些碳源可以单独使用或以两种或更多种的组合使用,但不限于此。

[0060] 氮源可包括无机氮源,如氨、硫酸铵、氯化铵、醋酸铵、磷酸铵、碳酸铵、硝酸铵等;氨基酸,如谷氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺等;以及有机氮源,如蛋白胨、NZ-胺、肉提取物、酵母提取物、麦芽提取物、玉米浆、酪蛋白水解物、鱼或其分解产物、脱脂豆饼或其分解产物等。

这些氮源可以单独使用或以两种或更多种的组合使用,但不限于此。

[0061] 磷源可以包括磷酸二氢钾、磷酸氢二钾或相应的含钠盐等。无机化合物的实例可以包括氯化钠、氯化钙、氯化铁、硫酸镁、硫酸铁、硫酸锰、碳酸钙等。另外,还可以包括氨基酸、维生素和/或适当的前体。这些组成成分或前体可以分批培养或连续方式添加到培养基,但这些磷源不限于此。

[0062] 在本公开中,在微生物的培养期间,可以通过以适当的方式向培养基添加化合物(如氢氧化铵、氢氧化钾、氨、磷酸、硫酸等)来调节培养基的pH。另外,在培养期间,可以添加消泡剂(如脂肪酸聚乙二醇酯),以防止泡沫的产生。另外,为了维持培养基的好氧状态,可以向培养基中注入氧气或含氧气体;或者为了维持培养基的厌氧或微好氧状态,可以在不注入气体的情况下注入氮气、氢气或二氧化碳气体,但气体不限于此。

[0063] 培养基温度范围可为20℃至45℃,且具体地25℃至40℃,但不限于此。可以继续培养直到获得期望量的有用材料,且具体地10到160小时,但不限于此。

[0064] 通过培养产生的L-氨基酸可能被释放到培养基中,或可能不被释放而留在细胞中。

[0065] 在本公开的回收培养中产生的L-氨基酸的方法中,可以根据培养方法使用本领域已知的适当方法从培养液中收集期望的L-氨基酸。例如,可以使用诸如离心、过滤、离子交换层析、结晶和HPLC的方法,并且可以使用本领域已知的合适方法从培养基或微生物中回收期望的L-氨基酸。

[0066] 进一步,回收还可以进一步包括纯化过程,纯化过程可以使用本领域已知的适当方法来进行。因此,回收的L-氨基酸可以是处于纯化状态的或在含有L-氨基酸的微生物发酵液中(Introduction to Biotechnology and Genetic Engineering, A.J.Nair., 2008)。

[0067] 由根据本公开的产生L-氨基酸的方法产生的L-氨基酸不受类型的限制。即,可以从棒杆菌属的微生物中产生的L-氨基酸可以不受限制地包括任何L-氨基酸,也可以包括L-氨基酸的中间体。L-氨基酸可以是,例如,L-精氨酸、L-组氨酸、L-赖氨酸、L-天冬氨酸、L-谷氨酸、L-丝氨酸、L-苏氨酸、L-天冬酰胺、L-谷氨酰胺、L-酪氨酸、L-丙氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-缬氨酸、L-苯丙氨酸、L-甲硫氨酸、L-色氨酸、甘氨酸、L-脯氨酸和L-半胱氨酸,且具体地可以是L-赖氨酸、L-苏氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-缬氨酸、L-精氨酸和L-谷氨酸,但不限于此。L-氨基酸的中间体可以是,例如O-乙酰高丝氨酸,但不限于此。

[0068] 本公开的另一方面是提供具有增加的L-氨基酸产生能力的棒杆菌属的微生物,其含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶,NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0069] NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶、编码该酶的基因、其表达和棒杆菌属的微生物如上所述。

[0070] 在本公开中,含有编码NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的基因的棒杆菌属的微生物由于NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的表达,与非修饰的微生物相比,可以具有增加或改善的L-氨基酸产生能力。

[0071] 本公开的棒杆菌属的微生物是能够产生L-氨基酸的微生物,且不仅可以包括野生型微生物,也可以包括基因修饰以改善L-氨基酸产生能力的微生物。产生L-氨基酸的微生物如上所述。

[0072] 本公开的微生物是含有来源于乳杆菌属的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的重组微生物,并且与不含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的微生物相比,可以从培养基中的碳源过量地产生期望的L-氨基酸。重组微生物的增加的L-氨基酸产生能力可以用通过激活NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶而增加的还原力获得。即,通过将NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶引入到产生L-氨基酸的棒杆菌属的微生物中,NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶被激活,使得可以使用NADP代替NAD作为辅酶,且相应地可以增加NADPH的量,其然后可以在L-氨基酸的生物合成中被用于作为能量源的还原力。

[0073] 在本公开中,术语“非修饰的微生物”可指天然菌株本身、不含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的微生物、或未用含有编码NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的多核苷酸的载体转化的微生物,但不限于此。

[0074] L-氨基酸如上所述。

[0075] 其中通过引入根据本公开的编码NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的基因而增加L-氨基酸产生能力的棒杆菌属的微生物可以选自用保藏号KCCM12580P、保藏号KCCM12581P、保藏号KCCM12582P、保藏号KCCM12583P、保藏号KCCM12584P、保藏号KCCM12585P、保藏号KCCM12586P、或保藏号KCCM12587P保藏的棒杆菌属的微生物中的任何一种。

[0076] 本公开的又一方面提供含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的棒杆菌属的微生物产生L-氨基酸的用途,NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列。

[0077] NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶、编码该酶的基因、其表达、棒杆菌属的微生物、含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶(其包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列)的棒杆菌属的微生物、和L-氨基酸如上所述。

[0078] [实施本发明的方式]

[0079] 以下,将通过实施例详细描述本公开。然而,对于本公开所属领域的技术人员将明显的是,提供这些实施例仅用于示例目的,且本发明的范围并不意图限于此。

[0080] 实施例1-1.用于将德氏乳杆菌保加利亚亚种ATCC11842来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶(gapN(L))引入到棒杆菌属微生物的染色体上的转座子中的载体的制备

[0081] 选择德氏乳杆菌保加利亚亚种来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶作为对棒杆菌(*Corynebacterium*)具有高亲和力的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶。此后,为了增强其活性,进行了以下实验。

[0082] 从NIH GenBank获得了编码德氏乳杆菌保加利亚亚种ATCC11842来源的gapN的Ldb1179基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:1)和核苷酸序列(SEQ ID NO:2)。

[0083] 进一步,为了使用棒杆菌属微生物的转座子基因区域将Ldb1179基因引入到染色体中,各自制备了四种用于转化的载体,并使用了cj7(韩国专利号10-0620092)作为启动子。

[0084] 1-1-1) pDZ2457::P(cj7)-gapN(L)载体的制备

[0085] 基于作为模板的德氏乳杆菌保加利亚亚种ATCC11842菌株的染色体,使用SEQ ID NO:3和4的引物,通过将起始密码子TTG修饰为ATG,将Ldb1179基因扩增为约1.43kb的基因片段(表1)。此时,PCR通过重复30个循环(在95°C下变性30秒,在55°C下退火30秒,以及在72

℃下延伸1分30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,然后将约1.4kb的条带洗脱并纯化。进一步,使用SEQ ID NO:5和6的一对引物在相同条件下对cj7启动子区进行了PCR,以获得PCR产物。此时,PCR通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒)进行。对上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZ2457::P(cj7)-gapN(L)。

[0086] 使用载体以将gapN引入到赖氨酸、亮氨酸或乙酰高丝氨酸产生菌株中。

[0087] 1-1-2) pDZ1108::P(cj7)-gapN(L)载体的制备

[0088] 基于作为模板的德氏乳杆菌保加利亚亚种ATCC 11842菌株的染色体,使用SEQ ID NO:3和7的引物,通过将起始密码子TTG修饰为ATG,将Ldb1179基因扩增为约1.43kb的基因片段(表1)。此时,PCR通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸1分30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,然后将约1.4kb的条带洗脱并纯化。进一步,使用SEQ ID NO:8和6的一对引物在相同条件下对cj7启动子区进行了PCR,以获得PCR产物。此时,PCR通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒)进行。对上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZ1108::P(cj7)-gapN(L)。

[0089] 使用载体以将gapN引入到异亮氨酸或苏氨酸产生菌株中。

[0090] 1-1-3) pDZTn5::P(cj7)-gapN(L)载体的制备

[0091] 基于作为模板的德氏乳杆菌保加利亚亚种ATCC11842菌株的染色体,使用SEQ ID NO:3和10的引物,通过将起始密码子TTG修饰为ATG,将Ldb1179基因扩增为约1.43kb的基因片段(表1)。此时,PCR通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸1分30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,然后将约1.4kb的条带洗脱并纯化。进一步,使用SEQ ID NO:9和6的一对引物在相同条件下对cj7启动子区进行了PCR,以获得PCR产物。此时,PCR通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒)进行。对上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZTn5::P(cj7)-gapN(L)。

[0092] 使用载体以将gapN引入到缬氨酸或精氨酸产生菌株中。

[0093] 1-1-4) pDZ0286::P(cj7)-gapN(L)载体的制备

[0094] 基于作为模板的德氏乳杆菌保加利亚亚种ATCC11842菌株的染色体,使用SEQ ID NO:3和12的引物,通过将起始密码子TTG修饰为ATG,将Ldb1179基因扩增为约1.43kb的基因片段(表1)。此时,PCR通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸1分30秒)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,然后将约1.4kb的条带洗脱并纯化。进一步,使用SEQ ID NO:11和6的一对引物在相同条件下对cj7启动子区进行了PCR,以获得PCR产物。此时,PCR通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸30秒)进行。对上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZ0286::P(cj7)-gapN(L)。

[0095] 使用载体将gapN引入到谷氨酸产生菌株中。

[0096] [表1]

| SEQ ID NO: | 序列 (5'-3') |
|------------|---|
| 3 | CCCAACGAAAGGAAACACTCATGACAGAACACTATTTAAA |
| 4 | GCTTGTGAATAAGCCTGCCCTTAGTCTTCGATGTTGAAGACAACG |
| 5 | GATTCCAGGTTCCCTTAACCCAGAAACATCCCAGCGCTACT |
| 6 | TTTAAATAGTGTCTGTGCATGAGTGTTTCCTTTCGTTGGG |
| 7 | TTTCGTGCGAGTCTAGAAGTTTAGTCTTCGATGTTGAAGA |
| 8 | ACGAGGTCAGCATCTCGAGTAGAAACATCCCAGCGCTACT |
| 9 | CGCGGAAGTGTACTAGTAGAAACATCCCAGCGCTAC |
| 10 | GGAAGGATATCTCTAGAAGATAAAACGAAAGGCC |
| 11 | CCCTCCGGTTTAGTACTAGAAACATCCCAGCGCTA |
| 12 | CTCTCCTGTTTAGTACTTTAGTCTTCGATGTTGAAG |

[0098] 实施例1-2.用于将变异链球菌(Streptococcusmutans) ATCC25175来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶(gapN(S))引入到棒杆菌属微生物的染色体上的转座子中的载体的制备

[0099] 作为德氏乳杆菌保加利亚亚种ATCC11842来源的gapN的对照组,为了引入具有变异链球菌ATCC25175中的NADP依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的SMUFR 0590(韩国专利号10-1182033),进行了以下实验。

[0100] 从NIH GenBank获得了编码变异链球菌ATCC25175来源的gapN的SMUFR 0590基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:13)和核苷酸序列(SEQ ID NO:14),并制备了用于将通过cj7启动子表达的SMUFR 0590引入到转座子基因中的载体。

[0101] 如实施例1-1中,pDZ被作为用于转化的载体,且cj7被作为启动子。基于作为模板的pECCG122-Pcj7-gapN(韩国专利号10-1182033),使用SEQ ID NO:15和16的引物,将变异链球菌ATCC25175来源的SMUFR 0590基因扩增为约1.7kb的基因片段(表2)。此时,PCR通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸2分)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,然后将期望大小的条带洗脱并纯化。对上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZTn::P(cj7)-gapN(S)。

[0102] [表2]

| SEQ ID NO: | 序列 (5'-3') |
|------------|---|
| 15 | TAGATGTCGGGCCCATATGAGAAACATCCCAGCGCTACT |
| 16 | GCCAAAACAGCCTCGAGTTATTTGATATCAAATACGACGGATTTA |

[0104] 实施例1-3.用于将丙酮丁醇梭菌(Clostridiumacetobutylicum)来源的NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶(gapN(C))引入到棒杆菌属微生物的染色体上的转座子中的载体的制备

[0105] 作为德氏乳杆菌保加利亚亚种ATCC11842来源的gapN的对照组,为了引入具有丙酮丁醇梭菌中的NADP依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶活性的NCBI GenBank WP_010966919.1的gapN,进行了以下实验。

[0106] 从NCBI GenBank获得了丙酮丁醇梭菌来源的NCBI GenBank WP_010966919.1和NCBI GenBank NC_015687.1的gapN基因的氨基酸序列(SEQ ID NO:35)和核苷酸序列(SEQ ID NO:36),并制备了用于将通过cj7启动子表达的NCBI GenBank WP_010966919.1的gapN基因引入到转座子基因中的载体。

[0107] 如实施例1-1中,pDZ被用作用于转化的载体,且cj7被用作启动子。基于作为模板的丙酮丁醇梭菌的gDNA,使用SEQ ID NO:37和38的引物,将丙酮丁醇梭菌来源的NCBI GenBank WP_010966919.1的gapN基因扩增为约1.5kb的基因片段。另外,为了获得cj7启动子,基于作为模板的pECCG122-Pcj7-gapN(韩国专利号10-1182033),使用SEQ ID NO:15和39的引物,将gapN基因扩增为约400bp的基因片段。此时,PCR通过重复30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,以及在72℃下延伸2分钟)进行。将这个PCR产物在0.8%琼脂糖凝胶中进行电泳,然后将期望大小的条带洗脱并纯化。对上述获得的PCR产物进行融合克隆。使用In-Fusion®HD克隆试剂盒(Clontech)进行融合克隆。得到的质粒命名为pDZTn::P(cj7)-gapN(C)。

[0108] [表3]

| SEQ ID NO: | 序列(5'-3') |
|------------|---|
| 37 | ACCCAACGAAAGGAAACACTCatgtttgaaaatatatcatcaaa |
| 38 | GCCAAAACAGCCTCGAGttataggtttaaaactattgatt |
| 39 | tttgatgatatatattttcaaacatGAGTGTTCCTTTCGTTGGGT |

[0110] 实施例2-1.在L-赖氨酸产生菌株KCCM11016P中引入有gapN(L)、gapN(S)或gapN(C)的菌株的制备及其评价

[0111] 为了确认基于谷氨酸棒杆菌ATCC13032菌株,引入德氏乳杆菌保加利亚亚种或变异链球菌(S.mutans)来源的gapN对L-赖氨酸产生能力的效果,将实施例1-1-1中制备的质粒、实施例1-2中制备的质粒、和实施例1-3中制备的质粒通过电穿孔引入到谷氨酸棒杆菌KCCM11016P(韩国专利号10-0159812)中以获得转化突变型,并将转化突变型涂布在含有卡那霉素(25μg/mL)和X-gal(5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷)的BHIS平板培养基(37g/L脑心浸液、91g/L山梨醇、2%琼脂)上并培养以形成菌落。从由此形成的菌落中选择蓝色菌落,以选择引入有P(cj7)-gapN(L)、P(cj7)-gapN(S)、或P(cj7)-gapN(C)的菌株。

[0112] 由此选择的菌落分别命名为KCCM11016P:::P(cj7)-gapN(L)、KCCM11016P:::P(cj7)-gapN(S)、和KCCM11016P:::P(cj7)-gapN(C)。

[0113] 将制备的菌株按以下方式进行培养,以比较赖氨酸产生能力。将每种菌株接种到含有25mL的种子培养基(seed medium)的250mL角挡板烧瓶(corner-baffle flask)中,并在30℃下以200rpm振荡培养20小时。然后,将1mL的种子培养液接种到含有24mL的生产培养基(production medium)的250mL角挡板烧瓶中,并在32℃下以200rpm振荡培养72小时。种子培养基和生产培养基的组成如下所示。

[0114] <种子培养基(pH 7.0)>

[0115] 20g葡萄糖、10g蛋白胨、5g酵母提取物、1.5g尿素、4g KH₂PO₄、8g K₂HPO₄、0.5g MgSO₄·7H₂O、100μg生物素、1000μg硫胺素-HCl、2000μg泛酸钙、2000μg烟酰胺(基于1L的蒸馏水)

[0116] <生产培养基(pH 7.0)>

[0117] 100g葡萄糖、40g (NH₄)₂SO₄、2.5g大豆蛋白、5g玉米浆固形物 (corn steep solids)、3g尿素、1g KH₂PO₄、0.5g MgSO₄ · 7H₂O、100μg生物素、1000μg硫胺素-HCl、2000μg泛酸钙、3000μg烟酰胺、30g CaCO₃ (基于1L的蒸馏水)

[0118] 培养完成后,通过HPLC测定L-赖氨酸产生能力。对于每种被测菌株中的培养液中的L-赖氨酸的浓度和浓度增加率显示在表4中。

[0119] [表4]

| 菌株名称 | L-赖氨酸浓度 (g/L) | L-赖氨酸浓度增加率 (%) |
|---------------------------------|---------------|----------------|
| KCCM11016P | 43g/L | - |
| KCCM11016P::P (c j7) -gapN (S) | 50g/L | 16% |
| KCCM11016P:::P (c j7) -gapN (L) | 52g/L | 20% |
| KCCM11016P:::P (c j7) -gapN (C) | 47g/L | 9% |

[0121] 如表4中所示,确认了与L-赖氨酸产生菌株KCCM11016P相比,L-赖氨酸的浓度在KCCM11016P::P (c j7) -gapN (S) 中增加了约16%、在KCCM11016P:::P (c j7) -gapN (L) 中增加了约20%、以及在KCCM11016P:::P (c j7) -gapN (C) 中增加了约9%,其中KCCM11016P::P (c j7) -gapN (S)、KCCM11016P:::P (c j7) -gapN (L) 和在KCCM11016P:::P (c j7) -gapN (C) 中都引入有gapN基因。

[0122] KCCM11016P:::P (c j7) -gapN (L) 被命名为CA01-7528,并于2019年9月2日保藏于布达佩斯条约下的韩国微生物保藏中心 (Korean Culture Center of Microorganisms),保藏号为KCCM12585P。

[0123] 实施例2-2.在L-赖氨酸产生菌株KCCM11347P中引入有gapN (L)、gapN (S) 或gapN (C) 的菌株的制备及其评价

[0124] 为了在属于谷氨酸棒杆菌的其它赖氨酸产生菌株中确认赖氨酸产生能力,使用实施例1-1-1中制备的质粒、实施例1-2中制备的质粒、和实施例1-3中制备的质粒,与上述实施例2-1中相同的方式制备了引入到作为L-赖氨酸产生菌株的KCCM11347P (韩国专利号10-0073610) 中的菌株,并分别命名为KCCM11347P:::P (c j7) -gapN (L)、KCCM11347P::P (c j7) -gapN (S)、和KCCM11347P:::P (c j7) -gapN (C)。

[0125] 用与上述实施例2-1中相同的方式培养由此制备的菌株,并且培养完成后通过HPLC测定L-赖氨酸产生能力。对于每种被测菌株的培养液中的L-赖氨酸的浓度和浓度增加率显示在表5中。

[0126] [表5]

| 菌株名称 | L-赖氨酸浓度 (g/L) | L-赖氨酸浓度增加率 (%) |
|---------------------------------|---------------|----------------|
| KCCM11347P | 38g/L | - |
| KCCM11347P::P (c j7) -gapN (S) | 43g/L | 14% |
| KCCM11347P:::P (c j7) -gapN (L) | 45g/L | 19% |
| KCCM11347P:::P (c j7) -gapN (C) | 40g/L | 5% |

[0128] 如表5中所示,确认了与L-赖氨酸产生菌株KCCM11347P相比,L-赖氨酸的浓度在KCCM11347P::P (c j7) -gapN (S) 中增加了约14%、在KCCM11347P:::P (c j7) -gapN (L) 中增加了约19%、以及在KCCM11347P:::P (c j7) -gapN (C) 中增加了约5%,其中KCCM11347P::P (c j7) -gapN (S)、KCCM11347P:::P (c j7) -gapN (L) 和KCCM11347P:::P (c j7) -gapN (C) 中都引

入有gapN基因。

[0129] 实施例2-3.在L-赖氨酸产生菌株CJ3P中引入有gapN(L)、gapN(S)或gapN(C)的菌株的制备及其评价

[0130] 为了在属于谷氨酸棒杆菌的其它赖氨酸产生菌株中确认效果,使用实施例1-1-1中制备的质粒、实施例1-2中制备的质粒、和实施例1-3中制备的质粒,与上述实施例2-1中相同的方式制备了引入到作为L-赖氨酸产生菌株的谷氨酸棒杆菌CJ3P(Binder等人 Genome Biology 2012,13:R40)中的菌株,并分别命名为CJ3P::P(cj7)-gapN(L)、CJ3P::P(cj7)-gapN(S)和CJ3P::P(cj7)-gapN(C)。CJ3P菌株是基于已知技术通过将三种突变(pyc(Pro458Ser)、hom(Val159Ala)、lysC(Thr311Ile))引入到野生型菌株中具有L-赖氨酸产生能力的谷氨酸棒杆菌菌株。

[0131] 用与上述实施例2-1中相同的方式培养由此制备的菌株,并且培养完成后通过HPLC测定L-赖氨酸产生能力。对于每种被测菌株中的培养液中的L-赖氨酸的浓度和浓度增加率显示在表6中。

[0132] [表6]

[0133]

| 菌株名称 | L-赖氨酸浓度(g/L) | L-赖氨酸浓度增加率(%) |
|----------------------|--------------|---------------|
| CJ3P | 8.3g/L | - |
| CJ3P::P(cj7)-gapN(S) | 9.0g/L | 8% |
| CJ3P::P(cj7)-gapN(L) | 9.4g/L | 13% |
| CJ3P::P(cj7)-gapN(C) | 8.7g/L | 4% |

[0134] 如表6中所示,确认了与L-赖氨酸产生菌株CJ3P相比,L-赖氨酸的浓度在CJ3P::P(cj7)-gapN(S)中增加了约8%、在CJ3P::P(cj7)-gapN(L)中增加了约13%、以及在CJ3P::P(cj7)-gapN(C)中增加了约4%,其中CJ3P::P(cj7)-gapN(S)、CJ3P::P(cj7)-gapN(L)和在CJ3P::P(cj7)-gapN(C)中都引入有gapN基因。

[0135] 实施例2-4.在L-赖氨酸产生菌株KCCM10770P中引入有gapN(L)、gapN(S)或gapN(C)菌株的制备及其评价

[0136] 为了在属于谷氨酸棒杆菌的其它赖氨酸产生菌株中确认效果,使用实施例1-1-1中制备的质粒、实施例1-2中制备的质粒、和实施例1-3中制备的质粒,与上述实施例2-1中相同的方式制备了引入到谷氨酸棒杆菌KCCM10770P(韩国专利号10-0924065)——其是其中赖氨酸生物合成途径已被增强的L-赖氨酸产生菌株——中的菌株,并分别命名为KCCM10770P::P(cj7)-gapN(L)、KCCM10770P::P(cj7)-gapN(S)、和KCCM10770P::P(cj7)-gapN(C)。KCCM10770P菌株是L-赖氨酸产生菌株,其在构成赖氨酸生物合成途径的基因中具有aspB(编码天冬氨酸氨基转移酶的基因)、lysC(编码天冬氨酸激酶的基因)、asd(编码天冬氨酸-半醛脱氢酶的基因)、dapA(编码二氢吡啶二羧酸合酶的基因)、dapB(编码二氢吡啶二羧酸还原酶的基因)、和lysA(编码二氨基庚二酸脱羧酶的基因),即,6种基因在染色体上各自具有2个拷贝的菌株。

[0137] 以与上述实施例2-1中相同的方式培养由此制备的菌株,并且培养完成后通过HPLC测定L-赖氨酸产生能力。对于每种被测菌株的培养液中的L-赖氨酸的浓度和浓度增加率显示在表7中。

[0138] [表7]

| [0139] | 菌株名称 | L-赖氨酸浓度 (g/L) | L-赖氨酸浓度增加率 (%) |
|--------|----------------------------|---------------|----------------|
| | KCCM10770P | 48g/L | - |
| | KCCM10770P::P(cj7)-gapN(S) | 56g/L | 17% |
| | KCCM10770P::P(cj7)-gapN(L) | 60g/L | 25% |
| | KCCM10770P::P(cj7)-gapN(C) | 53g/L | 10% |

[0140] 如表7中所示,确认了与L-赖氨酸产生菌株KCCM10770P相比,L-赖氨酸的浓度在KCCM10770P::P(cj7)-gapN(S)中增加了约17%、在KCCM10770P::P(cj7)-gapN(L)中增加了约25%、以及在KCCM10770P::P(cj7)-gapN(C)中增加了约10%,其中KCCM10770P::P(cj7)-gapN(S)、KCCM10770P::P(cj7)-gapN(L)和在KCCM10770P::P(cj7)-gapN(C)中都引入有gapN基因。

[0141] 从上述实施例2-1至2-4的结果中发现了,在不同科(계열)的多种产生L-赖氨酸的谷氨酸棒杆菌菌株中,德氏乳杆菌保加利亚亚种来源的gapN的引入对L-赖氨酸产生是有效的。进一步,确认了与引入有已知韩国专利号10-1182033的变异链球菌来源的gapN的菌株和引入有已知NCBI GenBank WP_010966919.1的丙酮丁醇梭菌来源的gapN的菌株相比,引入有德氏乳杆菌保加利亚亚种来源的gapN的菌株显示了增加的L-赖氨酸产生能力。

[0142] 实施例3-1.在L-苏氨酸产生菌株中引入有gapN(L)或gapN(S)的菌株的制备及其评价

[0143] 通过基于谷氨酸棒杆菌ATCC13032(以下称为WT)菌株引入lysC(L377K)变体(韩国专利号10-2011994)和hom(R398Q)变体(韩国专利号10-1947959),制备了L-苏氨酸产生菌株。将实施例1-1-2中制备的质粒和实施例1-2中制备的质粒引入到这些菌株中,与上述实施例2-1中相同的方式制备菌株,并比较了苏氨酸产生能力。

[0144] 为了制备用于引入lysC(L377K)的载体,基于作为模板的WT染色体,使用SEQ ID NOS:17和18的引物或SEQ ID NOS:19和20的引物进行了PCR。PCR通过在95°C下变性5分钟,然后30个循环(在95°C下变性30秒,在55°C下退火30秒,和在72°C下聚合30秒),然后在72°C下聚合7分钟来进行。结果,在lysC基因突变周围获得了5'上游区(상단부위)的509bp的DNA片段和3'下游区(하단부위)的520bp的DNA片段。

[0145] 使用两个扩增的DNA片段作为模板,使用SEQ ID NOS:17和20的引物,在PCR条件(在95°C下变性5分钟,然后30个循环(在95°C下变性30秒,在55°C下退火30秒,和在72°C下聚合60秒),以及然后72°C下聚合7分钟)下进行了PCR。结果,扩增了含有编码天冬氨酸激酶变体(其中第377个亮氨酸被赖氨酸取代)的lysC基因突变的1011bp的DNA片段。

[0146] 将不能在谷氨酸棒杆菌中复制的pDZ载体(韩国专利号0924065)和1011bp的DNA片段用限制酶XbaI处理,使用DNA连接酶连接,以及然后克隆以获得质粒,其命名为pDZ-lysC(L377K)。

[0147] 将以上获得的pDZ-lysC(L377K)载体通过电穿孔引入到WT菌株中,以及然后在含有25mg/L的卡那霉素的选择培养基中获得了转化菌株。通过二次交换(重组,cross-over),获得了WT::lysC(L377K)(其中通过插入在染色体上的DNA片段将核苷酸突变引入到lysC基因中的菌株)。

[0148] [表8]

| [0149] | SEQ ID NO: | 序列 (5'-3') |
|--------|------------|--------------------------------|
| | 17 | TCCTCTAGAGCTGCGCAGTGTGAATACG |
| | 18 | TGGAAATCTTTTCGATGTTACGTTGACAT |
| | 19 | ACATCGAAAAGATTTCCACCTCTGAGATTC |
| | 20 | GACTCTAGAGTTCACCTCAGAGACGATTA |

[0150] 另外,为了制备用于引入hom (R398Q)的载体,基于作为模板的WT基因组DNA,使用SEQ ID NOS:21和22的引物以及SEQ ID NOS:23和24的引物进行了PCR。在PCR条件(在95℃下变性5分钟,然后30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,和在72℃下聚合30秒),以及然后在72℃下聚合7分钟)下进行了PCR。结果,获得了在hom基因突变周围的5'上游区的290bp的DNA片段和3'下游区的170bp的DNA片段。使用两个扩增的DNA片段作为模板,使用SEQ ID NOS:21和24的引物,在95℃下变性5分钟,然后30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,和在72℃下聚合30秒),以及然后在72℃下聚合7分钟的条件进行了PCR。结果,扩增了含有hom基因突变的440bp的DNA片段。

[0151] [表9]

| [0152] | SEQ ID NO: | 序列 (5'-3') |
|--------|------------|--------------------------------|
| | 21 | TCCTCTAGACTGGTCGCCTGATGTTCTAC |
| | 22 | CTCTTCCTGTTGGATTGTAC |
| | 23 | GTACAATCCAACAGGAAGAG |
| | 24 | GACTCTAGATTAGTCCCTTTTCGAGGCGGA |

[0153] 用限制酶XbaI处理以上使用的pDZ载体和440bp的DNA片段,使用DNA连接酶连接,以及然后克隆以获得质粒,其命名为pDZ-hom (R398Q)。

[0154] 将以上获得的pDZ-hom (R398Q)载体通过电穿孔引入到WT::lysC (L377K)菌株中,以及然后在含有25mg/L的卡那霉素的选择培养基中获得了转化菌株。通过二次交换,获得了WT::lysC (L377K)-hom (R398Q) (其中通过插入在染色体上的DNA片段将核苷酸突变引入到hom基因中的菌株)。

[0155] 通过将实施例1-1-2中制备的质粒和实施例1-2中制备的质粒引入到WT::lysC (L377K)-hom (R398Q)菌株中,与上述实施例2-1中相同的方式制备了菌株,并分别命名为WT::lysC (L377K)-hom (R398Q)::P (cj7)-gapN (L)和WT::lysC (L377K)-hom (R398Q)::P (cj7)-gapN (S)。

[0156] 用与上述实施例2-1中相同的方式培养由此制备的菌株,并在培养完成后比较了L-苏氨酸产生能力。在对每种被测菌株的培养液中的L-苏氨酸的浓度和浓度增加率显示在表10中。

[0157] [表10]

| 菌株名称 | L-苏氨酸浓度(g/L) | L-苏氨酸浓度增加率(%) |
|--|--------------|---------------|
| WT::lysC(L377K)-hom(R398Q) | 1.21 g/L | - |
| WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S) | 1.39 g/L | 15% |
| WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L) | 1.48 g/L | 22% |

[0159] 如表10中所示,确认了与WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)相比,L-苏氨酸浓度在WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S)中增加了约15%且在WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)中增加了约22%,其中WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S)和WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)中都引入有gapN基因。

[0160] WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)被命名为CA09-0906,并于2019年9月2日保藏于布达佩斯条约下的韩国微生物保藏中心,保藏号为KCCM12586P。

[0161] 实施例3-2.在L-苏氨酸产生菌株KCCM11222P中引入有gapN(L)或gapN(S)的菌株的制备及其评价

[0162] 通过将实施例1-1-2中制备的质粒和实施例1-2中制备的质粒引入到作为L-苏氨酸产生菌株的谷氨酸棒杆菌KCCM11222P(WO 2013/081296)中,与上述实施例2-1中相同的方式制备了菌株,并分别命名为KCCM11222P::P(cj7)-gapN(L)和KCCM11222P::P(cj7)-gapN(S)。

[0163] 以与上述实施例2-1中相同的方式培养由此制备的菌株,并在培养完成后比较L-苏氨酸产生能力。对于每种被测菌株的培养液中的L-苏氨酸的浓度和浓度增加率显示在表11中。

[0164] [表11]

| 菌株名称 | L-苏氨酸浓度(g/L) | L-苏氨酸浓度增加率(%) |
|----------------------------|--------------|---------------|
| KCCM11222P | 3.6g/L | - |
| KCCM11222P::P(cj7)-gapN(S) | 4.1g/L | 14% |
| KCCM11222P::P(cj7)-gapN(L) | 4.3g/L | 20% |

[0166] 如表11中所示,确认了与L-苏氨酸产生菌株KCCM11222P相比,L-苏氨酸浓度在KCCM11222P::P(cj7)-gapN(S)中增加了约14%且在KCCM11222P::P(cj7)-gapN(L)中增加了约20%,其中KCCM11222P::P(cj7)-gapN(S)和KCCM11222P::P(cj7)-gapN(L)中都引入有gapN基因。

[0167] 从上述实施例获得的结果表明,在属于棒杆菌属的L-苏氨酸产生菌株中,引入德氏乳杆菌保加利亚亚种来源的gapN对L-苏氨酸产生是有效的。

[0168] 实施例4-1.在L-异亮氨酸产生菌株中引入有gapN(L)或gapN(S)菌株的制备及其评价

[0169] 为了确认基于谷氨酸棒杆菌ATCC13032(以下称为WT)菌株,引入德氏乳杆菌保加利亚亚种或变异链球菌来源的gapN对L-异亮氨酸产生能力的效果,通过引入ilvA的突变(ilvA(V323A);S.Morbach等人,Appl. Environ. Microbiol., 62(12):4345-4351,1996),制备了具有增强的L-异亮氨酸产生能力的菌株,ilvA是已知编码L-苏氨酸脱水酶的基因。

[0170] 围绕突变位点设计了用于扩增5'上游区的引物对 (SEQ ID NOS:25和26) 和用于扩增3'下游区的引物对 (SEQ ID NOS:27和28), 以制备用于引入基于ilvA基因的突变的载体。SEQ ID NOS:25和28的引物在每个端被插入有BamHI限制酶位点 (由下划线表示), 并将SEQ ID NOS:26和27的引物设计为彼此交换, 以使核苷酸取代突变 (由下划线表示) 位于设计的位点上。

[0171] [表12]

| SEQ ID NO: | 序列 (5'-3') |
|------------|---|
| 25 | ACGGAT <u>CCC</u> CAGACTCCAAAGCAAAGCG |
| 26 | ACACCACGGCAGAA <u>CC</u> AGGTGCAAAGGACA |
| 27 | CTGGTCTG <u>CCG</u> TGGTGTGCATCATCTCTG |
| 28 | ACGGATCCAACCAA <u>ACT</u> TGCTCACACTC |

[0173] 基于作为模板的WT染色体, 使用SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的引物进行了PCR。在PCR条件 (在95°C下变性5分钟, 然后30个循环 (在95°C下变性30秒, 在55°C下退火30秒, 和在72°C下聚合60秒), 以及然后72°C下聚合7分钟) 下进行了PCR。结果是, 在ilvA基因的突变周围获得了在5'上游区的627bp的DNA片段和在3'下游区的608bp的DNA片段。

[0174] 使用两个扩增的DNA片段作为模板, 使用SEQ ID NOS:25和28的引物, 在95°C下变性5分钟, 然后30个循环 (在95°C下变性30秒, 在55°C下退火30秒, 和在72°C下聚合60秒), 以及然后在72°C下聚合7分钟的条件进行了PCR。结果, 扩增了含有编码ilvA变体 (其中在第323位缬氨酸被丙氨酸取代) 的ilvA基因突变的1217bp的DNA片段。

[0175] 用限制酶BamHI处理了pECCG117 (韩国专利号10-0057684) 和1011bp的DNA片段, 使用DNA连接酶连接, 以及然后克隆以获得质粒, 其命名为pECCG117-ilvA (V323A)。

[0176] 通过将pECCG117-ilvA (V323A) 载体引入到实施例3-1的WT::lysC (L377K) -hom (R398Q)::P (cj7) -gapN (L) 和WT::lysC (L377K) -hom (R398Q)::P (cj7) -gapN (S) 中, 制备了其中引入了ilvA (V323A) 突变的菌株。另外, 制备了其中只将ilvA (V323A) 突变引入到WT::lysC (L377K) -hom (R398Q) 中的菌株作为对照。

[0177] 与上述实施例2-1中相同的方式培养由此制备的菌株, 以比较L-异亮氨酸产生能力。对于每种被测菌株的培养液中的L-异亮氨酸的浓度和浓度增加率显示在表13中。

[0178] [表13]

| 菌株名称 | L-异亮氨酸浓度 (g/L) | L-异亮氨酸浓度增加率(%) |
|---|----------------|----------------|
| WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)/pECCG117-ilvA (V323A) | 4.3 g/L | - |
| [0179] WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S) /pECCG117-ilvA(V323A) | 5.1 g/L | 18% |
| WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L) /pECCG117-ilvA(V323A) | 5.6 g/L | 30% |

[0180] 如表13中所示, 确认了与WT::lysC (L377K) -hom (R398Q) /pECCG117-ilvA (V323A) 相比, L-异亮氨酸的浓度在WT::lysC (L377K) -hom (R398Q)::P (cj7) -gapN (S) /pECCG117-ilvA (V323A) 中增加了约18.6%, 且在WT::lysC (L377K) -hom (R398Q)::P (cj7) -gapN (L) /

pECCG117-ilvA (V323A) 中增加了约30%，其中WT::lysC (L377K) -hom (R398Q) ::P (cj7) -gapN (S) /pECCG117-ilvA (V323A) 和WT::lysC (L377K) -hom (R398Q) ::P (cj7) -gapN (L) /pECCG117-ilvA (V323A) 都引入有gapN基因。

[0181] WT::lysC (L377K) -hom (R398Q) ::P (cj7) -gapN (L) /pECCG117-ilvA (V323A) 被命名为CA10-3108,并于2019年9月2日保藏于布达佩斯条约下的韩国微生物保藏中心,保藏号为KCCM12582P。

[0182] 实施例4-2.在L-异亮氨酸产生菌株KCCM11248P中引入有gapN (L) 或gapN (S) 的菌株的制备及其评价

[0183] 通过将实施例1-1-2和实施例1-2中制备的质粒引入到作为L-异亮氨酸产生菌株的谷氨酸棒杆菌KCCM11248P (韩国专利号10-1335789) 中,以与上述实施例2-1中相同的方式制备了菌株,并分别命名为KCCM11248P::P (cj7) -gapN (L) 和KCCM11248P::P (cj7) -gapN (S)。

[0184] 用与上述实施例2-1相同的方式培养由此制备的菌株,并比较了L-异亮氨酸产生能力。培养完成后,通过HPLC测定了L-异亮氨酸产生能力,且对每种被测菌株的培养液中的L-异亮氨酸的浓度和浓度增加率显示在表14中。

[0185] [表14]

| 菌株名称 | L-异亮氨酸浓度 (g/L) | L-异亮氨酸浓度增加率 (%) |
|-------------------------------|----------------|-----------------|
| KCCM11248P | 1.3g/L | - |
| KCCM11248P::P (cj7) -gapN (S) | 1.8g/L | 38% |
| KCCM11248P::P (cj7) -gapN (L) | 2.1g/L | 61.5% |

[0187] 如表14中所示,确认了与L-异亮氨酸产生菌株KCCM11248P相比,L-异亮氨酸的浓度在KCCM11248P::P (cj7) -gapN (S) 中增加了约38%,且在KCCM11248P::P (cj7) -gapN (L) 中增加了约61.5%,其中KCCM11248P::P (cj7) -gapN (S) 和KCCM11248P::P (cj7) -gapN (L) 都引入有gapN基因。

[0188] 从实施例获得的结果表明,在属于棒杆菌属的L-异亮氨酸产生菌株中,引入德氏乳杆菌保加利亚亚种来源的gapN对L-异亮氨酸的产生是有效的。

[0189] 实施例5-1.在L-亮氨酸产生菌株中引入有gapN (L) 或gapN (S) 的菌株的制备及其评价

[0190] 为了确认基于谷氨酸棒杆菌ATCC13032菌株,引入德氏乳杆菌保加利亚亚种或变异链球菌来源的gapN对L-亮氨酸产生能力的效果,通过引入leuA合酶 (leuA (R558H, G561D); 韩国申请公开号2018-0077008) 的突变,制备了具有增强的L-亮氨酸产生能力的菌株,leuA合酶是已知编码2-异丙基苹果酸合酶的基因。

[0191] 具体地,将上述专利中制备的重组质粒pDZ-leuA (R558H, G561D) 通过电穿孔引入到WT菌株中,以及然后在含有25mg/L的卡那霉素的培养基中选择。通过二次交换,获得了WT::leuA (R558H, G561D) (其中通过插入在染色体上的DNA片段将核苷酸突变引入到leuA基因中的菌株),其命名为CJL8001。

[0192] 通过将实施例1-1-1中制备的质粒和实施例1-2中制备的质粒引入到具有L-亮氨酸产生能力的谷氨酸棒杆菌CJL8001中,以与上述实施例2-1中相同的方式制备了菌株,并分别命名为CJL8001::P (cj7) -gapN (S) 和CJL8001::P (cj7) -gapN (L)。

[0193] 将由此制备的菌株按以下方式进行培养,以比较L-亮氨酸产生能力。每种菌株在营养培养基中継代培养,以及然后接种到含有25mL的生产培养基的250mL的角挡板烧瓶中,并在30℃下以200rpm振荡培养72小时。然后,通过HPLC分析了L-亮氨酸的浓度,且分析的L-亮氨酸的浓度及浓度增加率显示在表15中。

[0194] <营养培养基 (pH 7.2)>

[0195] 10g葡萄糖、5g肉提取物、10g聚蛋白胨、2.5g氯化钠、5g酵母提取物、20g琼脂、2g尿素(基于1L的蒸馏水)

[0196] <生产培养基 (pH 7.0)>

[0197] 50g葡萄糖、20g硫酸铵、20g玉米浆固形物、1g K_2HPO_4 、0.5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、100 μ g生物素、1mg硫胺素-HCl、15g碳酸钙(基于1L的蒸馏水)

[0198] [表15]

| 菌株名称 | L-亮氨酸浓度 (g/L) | L-亮氨酸浓度增加率 (%) |
|-------------------------|---------------|----------------|
| CJL8001 | 3.4g/L | - |
| CJL8001::P(cj7)-gapN(S) | 3.9g/L | 15% |
| CJL8001::P(cj7)-gapN(L) | 4.1g/L | 21% |

[0200] 如表15中所示,确认了与L-亮氨酸产生菌株CJL8001相比,L-亮氨酸的浓度在CJL8001::P(cj7)-gapN(S)中增加了约15%且在CJL8001::P(cj7)-gapN(L)中增加了约21%,其中CJL8001::P(cj7)-gapN(S)和CJL8001::P(cj7)-gapN(L)都引入了gapN基因。

[0201] CJL8001::P(cj7)-gapN(L)被命名为CA13-8102,并于2019年9月2日保藏于布达佩斯条约下的韩国微生物保藏中心,保藏号为KCCM12583P。

[0202] 实施例5-2:在L-亮氨酸产生菌株KCCM11661P和KCCM11662P中引入有gapN(L)或gapN(S)的菌株的制备及其评价

[0203] 通过将实施例1-1-1中制备的质粒和实施例1-2中制备的质粒引入到作为L-亮氨酸产生菌株的谷氨酸棒杆菌KCCM11661P(韩国专利号10-1851898)和KCCM11662P(韩国专利号10-1796830)中,与上述实施例2-1中相同的方式制备了菌株,并命名为KCCM11661P::P(cj7)-gapN(L)、KCCM11661P::P(cj7)-gapN(S)、KCCM11662P::P(cj7)-gapN(L)、和KCCM11662P::P(cj7)-gapN(S)。

[0204] 以与实施例5-1中相同的方式培养了由此制备的菌株,且培养完成后,比较了L-亮氨酸产生能力。各菌株中产生的L-亮氨酸的浓度和浓度增加率显示在下表16中。

[0205] [表16]

| 菌株名称 | L-亮氨酸浓度 (g/L) | L-亮氨酸浓度增加率 (%) |
|----------------------------|---------------|----------------|
| KCCM11661P | 2.7g/L | - |
| KCCM11661P::P(cj7)-gapN(S) | 2.8g/L | 4% |
| KCCM11661P::P(cj7)-gapN(L) | 3.0g/L | 11% |
| KCCM11662P | 3.0g/L | - |
| KCCM11662P::P(cj7)-gapN(S) | 3.1g/L | 3% |
| KCCM11662P::P(cj7)-gapN(L) | 3.3g/L | 11% |

[0207] 如表16中所示,确认了与L-亮氨酸产生菌株KCCM11661P和KCCM11662P相比,L-亮氨酸的浓度在KCCM11661P::P(cj7)-gapN(S)和KCCM11662P::P(cj7)-gapN(S)中增加了约

4%，且在KCCM11661P::P(cj7)-gapN(L)和KCCM11662P::P(cj7)-gapN(L)中增加了约11%，其中KCCM11661P::P(cj7)-gapN(S)、KCCM11662P::P(cj7)-gapN(S)、KCCM11661P::P(cj7)-gapN(L)和KCCM11662P::P(cj7)-gapN(L)都引入有gapN基因。

[0208] 从实施例获得的结果表明，在属于棒杆菌属的L-亮氨酸产生菌株中，引入德氏乳杆菌保加利亚亚种来源的gapN对L-亮氨酸的产生是有效的。

[0209] 实施例6-1. 在L-缬氨酸产生菌株中引入有gapN(L)或gapN(S)的菌株的制备及其评价

[0210] 为了确认引入德氏乳杆菌保加利亚亚种或变异链球菌来源的gapN对L-缬氨酸产生能力的效果，通过将一种突变(ilvN(A42V); Biotechnology and Bioprocess Engineering, June 2014, Volume 19, Issue 3, pp. 456-467)引入到野生型谷氨酸棒杆菌ATCC13869菌株中制备了具有L-缬氨酸产生能力的变体，且得到的重组菌株被命名为谷氨酸棒杆菌CJ8V。

[0211] 具体地，以野生型谷氨酸棒杆菌ATCC13869菌株的基因组DNA作为模板进行了PCR。为了制备用于将A42V突变引入到ilvN基因中的载体，使用SEQ ID NOS:29和30的引物对以及SEQ ID NOS:31和32的引物对获得了基因片段(A和B)。在PCR条件(在94℃下变性5分钟，然后30个循环(在94℃下变性30秒，在55℃下退火30秒，和在72℃下聚合60秒)，以及然后72℃下聚合7分钟)下进行了PCR。

[0212] 结果，片段A和B均获得了537bp的多核苷酸。基于作为模板的两个片段，使用SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:32的引物，进行了重叠PCR(Overlapping PCR)，以获得1044bp的DNA片段。

[0213] 将由此获得的1044bp DNA片段和以上使用的pDZ载体用限制酶XbaI处理，使用连接酶连接，以及然后克隆以获得质粒，其命名为pDZ-ilvN(A42V)。

[0214] [表17]

| SEQ ID NO: | 序列 (5'-3') |
|------------|-----------------------------------|
| 29 | AATTTCTAGAGGCAGACCCTATTCTATGAAGG |
| 30 | AGTGTTTCGGTCTTTACAGACACGAGGGAC |
| 31 | GTCCCTCGTGTCTGTAAAGACCGAAACACT |
| 32 | AATTTCTAGACGTGGGAGTGTCACCTCGCTTGG |

[0217] 将由此制备的重组质粒pDZ-ilvN(A42V)通过电穿孔引入到野生型谷氨酸棒杆菌ATCC13869菌株中，以及然后在含有25mg/L的卡那霉素的选择培养基中获得了转化菌株。基于其中完成了第二次重组的转化的谷氨酸棒杆菌菌株，使用SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:32的引物通过PCR扩增了基因片段，以及然后通过基因测序确认了引入有突变的菌株。获得的重组菌株命名为谷氨酸棒杆菌CJ8V。

[0218] 最后，通过将实施例1-1-3中制备的质粒和实施例1-2中制备的质粒引入到具有L-缬氨酸产生能力的谷氨酸杆菌CJ8V中，以与上述实施例2-1中相同的方式制备了菌株，并分别命名为CJ8V::P(cj7)-gapN(L)和CJ8V::Pcj7-gapN(S)。按以下方式对由此制备的菌株进行培养，以比较L-缬氨酸产生能力。

[0219] 每种菌株在营养培养基中継代培养，以及然后接种到含有25mL的生产培养基的

250mL角挡板烧瓶中,并在30°C下以200rpm振荡培养72小时。然后,通过HPLC分析了L-缬氨酸浓度,以及分析的L-缬氨酸浓度及浓度增加率显示在表18中。

[0220] <营养培养基 (pH 7.2)>

[0221] 10g葡萄糖、5g肉提取物、10g聚蛋白胨、2.5g氯化钠、5g酵母提取物、20g琼脂、2g尿素(基于1L的蒸馏水)

[0222] <生产培养基 (pH 7.0)>

[0223] 100g葡萄糖、40g硫酸铵、2.5g大豆蛋白、5g玉米浆固形物、3g尿素、1g K_2HPO_4 、0.5g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、100 μ g生物素、1mg硫胺素-HCl、2mg泛酸钙、3mg烟酰胺、30g碳酸钙(基于1L的蒸馏水)

[0224] [表18]

| 菌株名称 | L-缬氨酸浓度 (g/L) | L-缬氨酸浓度增加率 (%) |
|---------------------|---------------|----------------|
| CJ8V | 3.4g/L | - |
| CJ8V-Pc j7/gapN (S) | 3.8g/L | 12% |
| CJ8V-Pc j7/gapN (L) | 4.0g/L | 18% |

[0226] 如表18中所示,确认了CJ8V-Pc j7/gapN (L) 和CJ8V-Pc j7/gapN (S) 菌株的L-缬氨酸产生能力与对照相比分别增加了18%和12%。

[0227] 结果,确认了在属于棒杆菌属的L-缬氨酸产生菌株中,引入德氏乳杆菌保加利亚亚种或变异链球菌来源的gapN基因能改善L-缬氨酸产生能力。

[0228] CJ8V-Pc j7/gapN (L) 被命名为CA08-2038,并于2019年9月2日保藏于布达佩斯条约下的韩国微生物保藏中心,保藏号为KCCM12581P。

[0229] 实施例6-2.在L-缬氨酸产生菌株KCCM11201P中引入有gapN (L) 或gapN (S) 的菌株的制备及其评价

[0230] 通过将实施例1-1-3中制备的质粒和实施例1-2中制备的质粒引入到作为L-缬氨酸产生菌株的谷氨酸棒杆菌KCCM11201P(韩国专利号10-1117022)中,与上述实施例2-1中相同的方式制备了菌株,并分别命名为KCCM11201P::P(cj7)-gapN(L) 和KCCM11201P::P(cj7)-gapN(S)。

[0231] 为了比较L-缬氨酸产生能力,用与实施例6-1中相同的方式培养了由此制备的菌株。然后,对L-缬氨酸的浓度进行分析,且分析的L-缬氨酸的浓度和浓度增加率显示在表19中。

[0232] [表19]

| 菌株名称 | L-缬氨酸浓度 (g/L) | L-缬氨酸浓度增加率 (%) |
|----------------------------|---------------|----------------|
| KCCM11201P | 2.8g/L | - |
| KCCM11201P::P(cj7)-gapN(S) | 3.3g/L | 17% |
| KCCM11201P::P(cj7)-gapN(L) | 3.7g/L | 32% |

[0234] 如表19中所示,确认了KCCM11201P::P(cj7)-gapN(L) 和KCCM11201P::P(cj7)-gapN(S) 菌株的L-缬氨酸产生能力与对照相比分别增加了32.1%和17.9%。

[0235] 结果,在属于棒杆菌属的L-缬氨酸产生菌株中,引入德氏乳杆菌保加利亚亚种或变异链球菌来源的gapN基因能改善L-缬氨酸产生能力。

[0236] 实施例7-1.在L-精氨酸产生菌株中引入有gapN (L) 或gapN (S) 的菌株的制备及其

评价

[0237] 为了确认引入德氏乳杆菌保加利亚亚种或变异链球菌来源的gapN,对L-精氨酸产生能力的效果,通过将实施例1-1-3中制备的质粒和实施例1-2中制备的质粒引入到野生型谷氨酸棒杆菌ATCC21831菌株中,与上述实施例2-1中相同的方式制备了菌株,并分别命名为ATCC21831::P(cj7) gapN(L)和ATCC21831::P(cj7)-gapN(S)。

[0238] 将由此制备的菌株按以下方式进行培养,以比较L-精氨酸产生能力。每种菌株在营养培养基中継代培养,以及然后接种到含有25mL的种子培养基的250mL的角挡板烧瓶中,且在30℃下以200rpm振荡培养20小时。然后,将1mL种子培养液接种到含有24mL生产培养基的250mL的角挡板烧瓶中,并在30℃下以200rpm振荡培养72小时。营养培养基、种子培养基和生产培养基的组成如下所示。培养完成后,通过HPLC测定L-精氨酸的产生量,且分析的L-精氨酸的浓度和浓度增长率显示在下表20中。

[0239] <营养培养基(pH 7.2)>

[0240] 10g葡萄糖、5g肉提取物、10g聚蛋白胨、2.5g氯化钠、5g酵母提取物、20g琼脂、2g尿素(基于1L的蒸馏水)

[0241] <种子培养基(pH 7.0)>

[0242] 20g蔗糖、10g蛋白胨、5g酵母提取物、1.5g尿素、4g KH_2PO_4 、8g K_2HPO_4 、0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100 μg 生物素、1mg硫胺素-HCl、2mg泛酸钙、2mg烟酰胺(基于1L的蒸馏水)

[0243] <生产培养基(pH 7.0)>

[0244] 蔗糖6%、硫酸铵3%、 KH_2PO_4 0.1%、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%、CSL(玉米浆固形物)1.5%、NaCl 1%、酵母提取物0.5%、生物素100mg/L(基于1L的蒸馏水)

[0245] [表20]

| 菌株名称 | L-精氨酸浓度(g/L) | L-精氨酸浓度增加率(%) |
|---------------------------|--------------|---------------|
| ATCC21831 | 4.1g/L | - |
| ATCC21831::P(cj7)-gapN(S) | 4.6g/L | 12% |
| ATCC21831::P(cj7)-gapN(L) | 4.9g/L | 19% |

[0247] 如表20中所示,ATCC21831::P(cj7)-gapN(L)和ATCC21831::P(cj7)-gapN(S)菌株的L-精氨酸产生能力与对照相比分别增加了19.5%和12.1%。

[0248] ATCC21831::P(cj7)-gapN(L)被命名为CA06-2951,并于2019年9月2日保藏于布达佩斯条约下的韩国微生物保藏中心,保藏号为KCCM12580P。

[0249] 结果,确认了在属于棒杆菌属的L-精氨酸产生菌株中,引入德氏乳杆菌保加利亚亚种或变异链球菌来源的gapN基因能改善L-精氨酸产生能力。

[0250] 实施例7-2.在L-精氨酸产生菌株KCCM10741P中引入有gapN(L)或gapN(S)的菌株的制备及其评价

[0251] 通过将实施例1-1-3中制备的质粒和实施例1-2中制备的质粒引入到作为L-精氨酸产生菌株的谷氨酸棒杆菌KCCM10741P(韩国专利号10-0791659)中,与上述实施例2-1中相同的方式制备了菌株,并分别命名为KCCM10741P::P(cj7)-gapN(L)和KCCM10741P::P(cj7)-gapN(S)。

[0252] 为了比较L-精氨酸产生能力,与实施例7-1中相同的方式培养了由此制备的菌株。然后,对L-精氨酸的浓度进行分析,且分析的L-精氨酸的浓度和浓度增加率显示在表21

中。

[0253] [表21]

| 菌株名称 | L-精氨酸浓度 (g/L) | L-精氨酸浓度增加率 (%) |
|----------------------------|---------------|----------------|
| KCCM10741P | 3.1g/L | - |
| KCCM10741P::P(cj7)-gapN(S) | 3.4g/L | 9% |
| KCCM10741P::P(cj7)-gapN(L) | 3.8g/L | 22% |

[0255] 如表21中所示,确认了KCCM10741P::P(cj7)-gapN(L)和KCCM10741P::P(cj7)-gapN(S)菌株的L-精氨酸产生能力与对照相比分别增加了22.6%和9.7%。

[0256] 结果,确认了在属于棒杆菌属的L-精氨酸产生菌株中,引入德氏乳杆菌保加利亚亚种或变异链球菌来源的gapN基因能改善L-精氨酸产生能力。

[0257] 实施例8-1.在O-乙酰高丝氨酸产生菌株中引入有gapN(L)或gapN(S)的菌株的制备及其评价

[0258] 通过将实施例1-1-1中制备的质粒和实施例1-2中制备的质粒引入到野生型谷氨酸棒杆菌ATCC13032菌株中,与上述实施例2-1中相同的方式制备了菌株,并分别命名为ATCC13032::P(cj7)-gapN(L)和ATCC13032::P(cj7)-gapN(S)。按以下方式培养由此制备的菌株,以比较O-乙酰高丝氨酸产生能力。

[0259] 将每种菌株接种到含有25mL的种子培养基的250mL角挡板烧瓶中,并在30℃下以200rpm振荡培养20小时。然后,将1mL种子培养液接种到含有24mL生产培养基的250mL角挡板烧瓶中,且在30℃下以200rpm振荡培养48小时。种子培养基和生产培养基的组成如下所示。

[0260] <种子培养基 (pH 7.0)>

[0261] 20g葡萄糖、10g蛋白胨、5g酵母提取物、1.5g尿素、4g KH_2PO_4 、8g K_2HPO_4 、0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100μg生物素、1000μg硫酸素HCl、2000μg泛酸钙、2000μg烟酰胺(基于1L的蒸馏水)

[0262] <生产培养基 (pH 7.0)>

[0263] 50g葡萄糖、12.5g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、2.5g大豆蛋白、5g玉米浆固形物、3g尿素、1g KH_2PO_4 、0.5g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、100μg生物素、1000μg硫酸素-HCl、2000μg泛酸钙、3000μg烟酰胺、30g CaCO_3 (基于1L的蒸馏水)

[0264] 培养完成后,通过HPLC测定O-乙酰高丝氨酸产生能力。对于每种被测菌株的培养液中的O-乙酰高丝氨酸的浓度和浓度增加率显示在下表22中。

[0265] [表22]

| 菌株名称 | O-乙酰高丝氨酸浓度 (g/L) | O-乙酰高丝氨酸浓度增加率 (%) |
|---------------------------|------------------|-------------------|
| ATCC13032 | 0.3g/L | - |
| ATCC13032::P(cj7)-gapN(S) | 0.4g/L | 33% |
| ATCC13032::P(cj7)-gapN(L) | 0.5g/L | 67% |

[0267] 如表22中所示,确认了与野生型ATCC13032菌株相比,O-乙酰高丝氨酸浓度在ATCC13032::P(cj7)-gapN(S)中增加了约33%,且在ATCC13032::P(cj7)-gapN(L)中增加了约67%,其中ATCC13032::P(cj7)-gapN(S)和ATCC13032::P(cj7)-gapN(L)都引入了gapN基因。

[0268] ATCC13032::P(cj7)-gapN(L)被命名为CM04-0531,并于2019年9月2日保藏于布达佩斯条约下的韩国微生物保藏中心,保藏号为KCCM12584P。

[0269] 实施例8-2.在产生O-乙酰高丝氨酸的谷氨酸棒杆菌中引入有德氏乳杆菌保加利亚亚种来源的gapN(L)或变异链球菌来源的gapN(S)的菌株的制备及其评价

[0270] 为了确认引入德氏乳杆菌保加利亚亚种或变异链球菌来源的gapN,对谷氨酸棒杆菌的O-乙酰基高丝氨酸产生能力的效果,增强了谷氨酸棒杆菌的自体高丝氨酸O-乙酰基转移酶的活性。

[0271] 为了扩增编码O-乙酰高丝氨酸转移酶(MetX)的基因,基于报道的野生型(WT)来源的序列,设计了SEQ ID NOS:33和34的引物,用于从启动子区(位于起始密码子上游约300bp)扩增到终止子区(位于终止密码子下游约100bp)。将BamHI限制酶位点插入到SEQ ID NOS:33和34的引物中的每个的两端,在PCR条件(在95℃下变性5分钟,然后30个循环(在95℃下变性30秒,在55℃下退火30秒,和在72℃下聚合30秒),以及然后在72℃下聚合7分钟)下进行了PCR。结果,在metX基因的编码区中获得了1546bp的DNA片段。用限制酶BamHI处理了pECCG117载体(韩国专利号10-0057684)和metX DNA片段,使用DNA连接酶连接,并克隆以获得被命名为pECCG117-metX WT的质粒。

[0272] [表23]

| SEQ ID NO: | 序列(5'-3') |
|------------|-------------------------------|
| 33 | GGATCCCCTCGTTGTTACCCAGCAACC |
| 34 | GGATCCCAAAGTCACAACACTTATGTTAG |

[0274] 通过将pECCG117-metX WT引入到上述实施例3-1的WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)和WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S)菌株中,制备了其中谷氨酸棒杆菌的自体metX过表达的菌株。进一步,将相同的载体引入到WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)中作为对照。

[0275] 以与实施例8-1的烧瓶培养方法相同的方式培养了由此制备的菌株,以分析培养液中O-乙酰高丝氨酸的浓度和浓度增加率。结果显示在表24中。

[0276] [表24]

| 菌株名称 | O-乙酰高丝氨酸浓度(g/L) | O-乙酰高丝氨酸浓度增加率(%) |
|---|-----------------|------------------|
| WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)/pECCG117-metX WT | 2.0 g/L | - |
| WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S)/pECCG117-metX WT | 2.7 g/L | 35% |
| WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)/pECCG117-metX WT | 3.1 g/L | 55% |

[0278] 如表24中所示,确认了与WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)/pECCG117-metX WT相比,O-乙酰高丝氨酸的浓度在WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S)/pECCG117-metX WT中增加了约35%,且在WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)/pECCG117-metX WT中增加了约55%,其中WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(S)/pECCG117-metX和WT::lysC(L377K)-hom(R398Q)::P(cj7)-gapN(L)/pECCG117-metX

WT都引入了gapN基因。

[0279] 从实施例获得的结果表明,在属于棒杆菌属的野生型菌株中,引入德氏乳杆菌保加利亚亚种来源的gapN对O-乙酰高丝氨酸产生是有效的。

[0280] 实施例9-1.在谷氨酸产生菌株中引入有gapN(L)或gapN(S)的菌株的制备及其评价

[0281] 为了确认引入德氏乳杆菌保加利亚亚种或变异链球菌来源的gapN,对谷氨酸产生能力的效果,基于野生型谷氨酸棒杆菌ATCC13869菌株通过引入实施例1-1-4中制备的质粒和实施例1-2中制备的质粒,以与上述实施例2-1中相同的方式制备了菌株,并分别命名为ATCC13869::P(cj7)-gapN(L)和ATCC13869::P(cj7)-gapN(S)。

[0282] 每种菌株接种到含有25mL种子培养基的250mL角挡板烧瓶中,并在30℃下以200rpm振荡培养20小时。然后,将1mL种子培养液接种到含有25mL生产培养基的250mL角挡板烧瓶中,并在30℃下以200rpm振荡培养40小时。培养在生物素限制条件下进行。培养完成后,通过HPLC测定了L-谷氨酸的浓度和浓度增加率,且测定结果显示在下表25中。

[0283] <种子培养基(pH 7.2)>

[0284] 葡萄糖1%、肉提取物0.5%、聚蛋白胨1%、氯化钠0.25%、酵母提取物0.5%、琼脂2%、尿素0.2%

[0285] <生产培养基>

[0286] 粗糖6%、碳酸钙5%、硫酸铵2.25%、 KH_2PO_4 0.1%、硫酸镁0.04%、硫酸铁10mg/L、硫胺素-HCl 0.2mg/L

[0287] [表25]

| 菌株名称 | L-谷氨酸浓度(g/L) | L-谷氨酸浓度增加率(%) |
|---------------------------|--------------|---------------|
| ATCC13869 | 0.5g/L | - |
| ATCC13869::P(cj7)-gapN(S) | 0.8g/L | 60% |
| ATCC13869::P(cj7)-gapN(L) | 0.9g/L | 80% |

[0289] 如表25中所示,确认了与野生型ATCC13869菌株相比,谷氨酸的浓度在ATCC13869::P(cj7)-gapN(S)中增加了约60%,且在ATCC13869::P(cj7)-gapN(L)中增加了约80%,其中ATCC13869::P(cj7)-gapN(S)和ATCC13869::P(cj7)-gapN(L)都引入了gapN基因。

[0290] ATCC13869::P(cj7)-gapN(L)被命名为CA02-1360,并于2019年9月2日保藏于布达佩斯条约下的韩国微生物保藏中心,保藏号为KCCM12587P。

[0291] 实施例9-2.在谷氨酸产生菌株KFCC11074中引入有gapN(L)或gapN(S)的菌株的制备及其评价

[0292] 通过将实施例1-1-4中制备的质粒和实施例1-2中制备的质粒引入到作为L-谷氨酸产生菌株的谷氨酸棒杆菌KFCC11074菌株(韩国专利号10-0292299)中,以与上述实施例2-1中相同的方式制备了菌株,并分别命名为KFCC11074::P(cj7)-gapN(L)和KFCC11074::P(cj7)-gapN(S)。

[0293] 以与实施例10-1中相同的方式培养了由此制备的菌株,以比较L-谷氨酸产生能力。培养完成后,对L-谷氨酸浓度进行了分析,且分析的L-谷氨酸的浓度和浓度增加率显示在表26中。

[0294] [表26]

| | 菌株名称 | L-谷氨酸浓度 (g/L) | L-谷氨酸浓度增加率(%) |
|--------|---------------------------|---------------|---------------|
| [0295] | KFCC11074 | 11.8 g/L | - |
| | KFCC11074::P(cj7)-gapN(S) | 14.5 g/L | 22% |
| [0296] | KFCC11074::P(cj7)-gapN(L) | 16.2 g/L | 37% |

[0297] 如表26中所示,确认了与KFCC11074相比,谷氨酸的浓度在KFCC11074::P(cj7)-gapN(S)中增加了约22.9%,且在KFCC11074::P(cj7)-gapN(L)中增加了约37.3%,其中KFCC11074::P(cj7)-gapN(S)和KFCC11074::P(cj7)-gapN(L)都引入了gapN基因。

[0298] 结果,在属于棒杆菌属的L-谷氨酸产生菌株中,引入德氏乳杆菌保加利亚亚种或变异链球菌来源的gapN基因能改善L-谷氨酸产生能力。

[0299] 总之,从实施例1至9获得的结果表明,引入德氏乳杆菌保加利亚亚种或变异链球菌来源的gapN基因能改善属于棒杆菌属的L-谷氨酸产生菌株中的L-氨基酸产生能力,且特别地,确认了与引入变异链球菌来源的gapN基因相比,引入德氏乳杆菌保加利亚亚种来源的gapN基因显示了更优的L-氨基酸产生能力。

[0300] 本公开所属领域的普通技术人员将认识到,本公开可以在不脱离其精神或必要特征的情况下以其它具体形式呈现。所描述的实施方式在所有方面仅被认为是说明性的而不是限制性的。因此,本公开的范围由所附权利要求而不是由前述描述来指示。在权利要求的等效性的含义和范围内的所有变化都将包含在本公开的范围內。

**关于用于专利步骤的微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约
国际形式**

至: CJ 第一制糖株式会社
CJ 第一制糖中心
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, 首尔 100-400, 大韩民国

由由本页底部确定的国际保藏机构依照第 7.1 条发布的原始保藏接收证明

[0301]

| | |
|---|--|
| I. 微生物鉴定 | |
| 由保藏人提供的标识参考: 谷氨酸棒杆菌 CA06-2951 | 由国际保藏机构提供的登记号: KCCCM12580P |
| II. 科学描述和/或建议的分类学名称 | |
| 如上 I 标识的微生物带有: <input type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用, 用叉号标记) | |
| III. 收到和接收 | |
| 该国际保藏机构接收如上 I 标识的微生物, 其于 2019 年 9 月 2 日收到。(原始保藏日) ¹ | |
| IV. 变换请求的接收 | |
| 该国际保藏机构于接收如上 I 标识的微生物, 并且其于收到将原始保藏变换为根据布达佩斯条约的保藏的请求。 | |
| V. 国际保藏机构 | |
| 名称: 韩国微生物保藏中心 地址: Yurim B/D, 45, Hongjenac-2ga-gil Seodaemun-gu 首尔 03641 大韩民国 | 具有代表该国际保藏机构的权利的自然人或授权官员签名(盖章): 日期: 2019 年 9 月 2 日 |

证明上述翻译与原文无误

2021 年 1 月 20 日

专利代理人 Son Min 印

**关于用于专利步骤的微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约
国际形式**

至: CJ 第一制糖株式会社
CJ 第一制糖中心
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, 首尔 100-400, 大韩民国

由由本页底部确定的国际保藏机构依照第 7.1 条发布的原始保藏接收证明

[0302]

| | |
|---|--|
| I. 微生物鉴定 | |
| 由保藏人提供的标识参考: 谷氨酸棒杆菌 CA08-2038 | 由国际保藏机构提供的登记号: KCCM12581P |
| II. 科学描述和/或建议的分类学名称 | |
| 如上 I 标识的微生物带有: <input type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用, 用叉号标记) | |
| III. 收到和接收 | |
| 该国际保藏机构接收如上 I 标识的微生物, 其于 2019 年 9 月 2 日收到。(原始保藏日) ¹ | |
| IV. 变换请求的接收 | |
| 该国际保藏机构于接收如上 I 标识的微生物, 并且其于收到将原始保藏变换为根据布达佩斯条约的保藏的请求。 | |
| V. 国际保藏机构 | |
| 名称: 韩国微生物保藏中心 地址: Yurim B/D, 45, Hongjenac-2ga-gil Seodaemun-gu 首尔 03641 大韩民国 | 具有代表该国际保藏机构的权利的自然人或授权官员签名(盖章): 日期: 2019 年 9 月 2 日 |

证明上述翻译与原文无误

2021 年 1 月 20 日

专利代理人 Son Min 印

**关于用于专利步骤的微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约
国际形式**

至: CJ 第一制糖株式会社
CJ 第一制糖中心
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, 首尔 100-400, 大韩民国

由由本页底部确定的国际保藏机构依照第 7.1 条发布的原始保藏接收证明

[0303]

| | |
|---|--|
| I. 微生物鉴定 | |
| 由保藏人提供的标识参考: 谷氨酸棒杆菌 CA10-3108 | 由国际保藏机构提供的登记号: KCCM12582P |
| II. 科学描述和/或建议的分类学名称 | |
| 如上 I 标识的微生物带有: <input type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用, 用叉号标记) | |
| III. 收到和接收 | |
| 该国际保藏机构接收如上 I 标识的微生物, 其于 2019 年 9 月 2 日收到。(原始保藏日) ¹ | |
| IV. 变换请求的接收 | |
| 该国际保藏机构于接收如上 I 标识的微生物, 并且其于收到将原始保藏变换为根据布达佩斯条约的保藏的请求。 | |
| V. 国际保藏机构 | |
| 名称: 韩国微生物保藏中心 地址: Yurim B/D, 45,Hongjenae-2ga-gil Seodaemun-gu 首尔 03641 大韩民国 | 具有代表该国际保藏机构的权利的自然人或授权官员签名(盖章): 日期: 2019 年 9 月 2 日 |

证明上述翻译与原文无误

2021 年 1 月 20 日

专利代理人 Son Min 印

**关于用于专利步骤的微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约
国际形式**

至: CJ 第一制糖株式会社
CJ 第一制糖中心
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, 首尔 100-400, 大韩民国

由由本页底部确定的国际保藏机构依照第 7.1 条发布的原始保藏接收证明

[0304]

| | |
|---|---|
| I. 微生物鉴定 | |
| 由保藏人提供的标识参考: 谷氨酸棒杆菌 CA13-8102 | 由国际保藏机构提供的登记号: KCCM12583P |
| II. 科学描述和/或建议的分类学名称 | |
| 如上 I 标识的微生物带有: <input type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用, 用叉号标记) | |
| III. 收到和接收 | |
| 该国际保藏机构接收如上 I 标识的微生物, 其于 2019 年 9 月 2 日收到。(原始保藏日) ¹ | |
| IV. 变换请求的接收 | |
| 该国际保藏机构于接收如上 I 标识的微生物, 并且其于收到将原始保藏变换为根据布达佩斯条约的保藏的请求。 | |
| V. 国际保藏机构 | |
| 名称: 韩国微生物保藏中心 地址: Yurim B/D, 45, Hongjengae-2ga-gil Seodaemun-gu 首尔 03641 大韩民国 | 具有代表该国际保藏机构的权利的自然人或授权官员签名 (盖章): 日期: 2019 年 9 月 2 日 |

证明上述翻译与原文无误

2021 年 1 月 20 日

专利代理人 Son Min 印

**关于用于专利步骤的微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约
国际形式**

至: CJ 第一制糖株式会社
CJ 第一制糖中心
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, 首尔 100-400, 大韩民国

由由本页底部确定的国际保藏机构依照第 7.1 条发布的原始保藏接收证明

[0305]

| | |
|---|--|
| I. 微生物鉴定 | |
| 由保藏人提供的标识参考: 谷氨酸棒杆菌 CA04-0531 | 由国际保藏机构提供的登记号: KCCCM12584P |
| II. 科学描述和/或建议的分类学名称 | |
| 如上 I 标识的微生物带有: <input type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用, 用叉号标记) | |
| III. 收到和接收 | |
| 该国际保藏机构接收如上 I 标识的微生物, 其于 2019 年 9 月 2 日收到。(原始保藏日) ¹ | |
| IV. 变换请求的接收 | |
| 该国际保藏机构于接收如上 I 标识的微生物, 并且其于收到将原始保藏变换为根据布达佩斯条约的保藏的请求。 | |
| V. 国际保藏机构 | |
| 名称: 韩国微生物保藏中心 地址: Yurim B/D, 45, Hongjenac-2ga-gil Seodaemun-gu 首尔 03641 大韩民国 | 具有代表该国际保藏机构的权利的自然人或授权官员签名(盖章): 日期: 2019 年 9 月 2 日 |

证明上述翻译与原文无误

2021 年 1 月 20 日

专利代理人 Son Min 印

**关于用于专利步骤的微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约
国际形式**

至: CJ 第一制糖株式会社
CJ 第一制糖中心
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, 首尔 100-400, 大韩民国

由由本页底部确定的国际保藏机构依照第 7.1 条发布的原始保藏接收证明

[0306]

| | |
|---|--|
| I. 微生物鉴定 | |
| 由保藏人提供的标识参考: 谷氨酸棒杆菌 CA01-7528 | 由国际保藏机构提供的登记号: KCCCM12585P |
| II. 科学描述和/或建议的分类学名称 | |
| 如上 I 标识的微生物带有: <input type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用, 用叉号标记) | |
| III. 收到和接收 | |
| 该国际保藏机构接收如上 I 标识的微生物, 其于 2019 年 9 月 2 日收到。(原始保藏日) ¹ | |
| IV. 变换请求的接收 | |
| 该国际保藏机构于接收如上 I 标识的微生物, 并且其于收到将原始保藏变换为根据布达佩斯条约的保藏的请求。 | |
| V. 国际保藏机构 | |
| 名称: 韩国微生物保藏中心 地址: Yurim B/D, 45, Hongjenac-2ga-gil Seodaemun-gu 首尔 03641 大韩民国 | 具有代表该国际保藏机构的权利的自然人或授权官员签名(盖章): 日期: 2019 年 9 月 2 日 |

证明上述翻译与原文无误

2021 年 1 月 20 日

专利代理人 Son Min 印

**关于用于专利步骤的微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约
国际形式**

至: CJ 第一制糖株式会社
CJ 第一制糖中心
330, DONGHO-RO,
JUNG-GU, 首尔 100-400, 大韩民国

由由本页底部确定的国际保藏机构依照第 7.1 条发布的原始保藏接收证明

[0307]

| | |
|---|---|
| I. 微生物鉴定 | |
| 由保藏人提供的标识参考: 谷氨酸棒杆菌 CA09-0906 | 由国际保藏机构提供的登记号: KCCM12586P |
| II. 科学描述和/或建议的分类学名称 | |
| 如上 I 标识的微生物带有: <input type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用, 用叉号标记) | |
| III. 收到和接收 | |
| 该国际保藏机构接收如上 I 标识的微生物, 其于 2019 年 9 月 2 日收到。(原始保藏日) ¹ | |
| IV. 变换请求的接收 | |
| 该国际保藏机构于接收如上 I 标识的微生物, 并且其于收到将原始保藏变换为根据布达佩斯条约的保藏的请求。 | |
| V. 国际保藏机构 | |
| 名称: 韩国微生物保藏中心 地址: Yurim B/D, 45, Hongjienae-2ga-gil Seodaemun-gu 首尔 03641 大韩民国 | 具有代表该国际保藏机构的权利的自然人或授权官员签名 (盖章): 日期: 2019 年 9 月 2 日 |

证明上述翻译与原文无误

2021 年 1 月 20 日

专利代理人 Son Min 印

关于用于专利步骤的微生物保藏的国际承认的布达佩斯条约

国际形式

至: CJ 第一制糖株式会社
 CJ 第一制糖中心
 330, DONGHO-RO,
 JUNG-GU, 首尔 100-400, 大韩民国

由由本页底部确定的国际保藏机构依照第 7.1 条发布的原始保藏接收证明

[0308]

| | |
|---|---|
| I. 微生物鉴定 | |
| 由保藏人提供的标识参考: 谷氨酸棒杆菌 CA02-1360 | 由国际保藏机构提供的登记号: KCCM12587P |
| II. 科学描述和/或建议的分类学名称 | |
| 如上 I 标识的微生物带有: <input type="checkbox"/> 科学描述 <input type="checkbox"/> 建议的分类学名称 (如果适用, 用叉号标记) | |
| III. 收到和接收 | |
| 该国际保藏机构接收如上 I 标识的微生物, 其于 2019 年 9 月 2 日收到。(原始保藏日) ¹ | |
| IV. 变换请求的接收 | |
| 该国际保藏机构于接收如上 I 标识的微生物, 并且其于收到将原始保藏变换为根据布达佩斯条约的保藏的请求。 | |
| V. 国际保藏机构 | |
| 名称: 韩国微生物保藏中心 地址: Yurim B/D, 45,Hongjenac-2ga-gil Seodaemun-gu 首尔 03641 大韩民国 | 具有代表该国际保藏机构的权利的自然人或授权官员签名 (盖章): 日期: 2019 年 9 月 2 日 |

证明上述翻译与原文无误

2021 年 1 月 20 日

专利代理人 Son Min 印

- <110> CJ第一制糖株式会社
 <120> 利用含有NADP-依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶的微生物产生L-氨基酸的方法
 <130> OPA20125
 <150> KR 10-2020-0008025
 <151> 2020-01-21
 <160> 39
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 476
 <212> PRT
 <213> 未知
 <220>
 <223> 德氏乳杆菌保加利亚亚种 gapN 氨基酸
 <400> 1

```

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

Phe Ala Glu Ala Gly Leu Pro Ala Gly Val Phe Asn Thr Ile Thr Gly
 195 200 205
 Arg Gly Arg Val Ile Gly Asp Tyr Ile Val Glu His Pro Ala Val Asn
 210 215 220
 Phe Ile Asn Phe Thr Gly Ser Ser Ala Val Gly Lys Asn Ile Gly Lys
 225 230 235 240
 Leu Ala Gly Met Arg Pro Ile Met Leu Glu Leu Gly Gly Lys Asp Ala
 245 250 255
 Ala Ile Val Leu Glu Asp Ala Asp Leu Asp Leu Thr Ala Lys Asn Ile
 260 265 270
 Val Ala Gly Ala Phe Gly Tyr Ser Gly Gln Arg Cys Thr Ala Val Lys
 275 280 285
 Arg Val Leu Val Met Asp Ser Val Ala Asp Glu Leu Val Glu Lys Val
 290 295 300
 Thr Ala Leu Ala Lys Asp Leu Thr Val Gly Ile Pro Glu Glu Asp Ala
 305 310 315 320
 Asp Ile Thr Pro Leu Ile Asp Thr Lys Ser Ala Asp Tyr Val Gln Gly
 325 330 335
 Leu Ile Glu Glu Ala Ala Glu Lys Gly Ala Lys Pro Leu Phe Asp Phe
 340 345 350
 Lys Arg Glu Gly Asn Leu Ile Tyr Pro Met Val Met Asp Gln Val Thr
 355 360 365
 Thr Asp Met Arg Leu Ala Trp Glu Glu Pro Phe Gly Pro Val Leu Pro
 370 375 380
 Phe Ile Arg Val Lys Ser Ala Asp Glu Ala Val Met Ile Ala Asn Glu
 385 390 395 400
 Ser Glu Tyr Gly Leu Gln Ser Ser Val Phe Ser Arg Asn Phe Glu Lys
 405 410 415
 Ala Phe Ala Ile Ala Gly Lys Leu Glu Val Gly Thr Val His Ile Asn
 420 425 430
 Asn Lys Thr Gln Arg Gly Pro Asp Asn Phe Pro Phe Leu Gly Val Lys
 435 440 445
 Ser Ser Gly Ala Gly Val Gln Gly Val Lys Tyr Ser Ile Gln Ala Met
 450 455 460
 Thr Arg Val Lys Ser Val Val Phe Asn Ile Glu Asp
 465 470 475
 <210> 2
 <211> 1431
 <212> DNA

| | | |
|-------|--|------|
| <213> | 未知 | |
| <220> | | |
| <223> | 德氏乳杆菌保加利亚亚种 gapN 核苷酸 | |
| <400> | 2 | |
| | atgacagaac actattttaa ctatgtcaat ggcgaatggc gggactccgc tgacgcgatt | 60 |
| | gaaatthttcg aaccagcaac tggcaagtcc ctgggtactg tacctgccat gtcccacgaa | 120 |
| | gacgtggact acgtaatgaa cagcgccaaa aaggcccttc cagcctggcg ggcctctca | 180 |
| | tacgttgaac gggccgcata cttgcaaaag gcagcggaca tcctttaccg agatgctgaa | 240 |
| | aagatcgggt ctacctgtc caaggaaatc gccaaaggcc tcaagtctc tatcggcgaa | 300 |
| | gtaaccggga cggcggaaat cgttgaatac acggccaagg tcggcgtaac tttggacggg | 360 |
| | gaagtcatgg agggcggcaa ctttgaagcg gcaagcaaga acaagttggc tgttgtccgc | 420 |
| | cgggaaccag tcggcctggt tttggcaatt tcaccttca actaccggg taacctggcc | 480 |
| | ggctcaaaga tcgcgcctgc tttgatgggc gggaacgtgg tggccttcaa gccccgaca | 540 |
| | caagggtcaa tctccggtct gcttttggcc aaggccttc cgaagctgg cctgccagcc | 600 |
| | ggcgtcttca acaccattac cggccggggt cgggttatcg gcgactacat cgttgaacac | 660 |
| | ccggcagtca acttcatcaa cttcaccggg tccagtgtg tcggcaagaa catcggcaaa | 720 |
| | ctggccggga tcggccgat tatgttgaa cttggcggca aggacgcggc catcgtcttg | 780 |
| | gaagacgctg acttggacct gacggccaag aacatcgttg ccggcgcctt tggctactcc | 840 |
| | ggccagcgtt gtaccgccgt taagcgggt ctggtcatgg acagcgtggc tgacgaattg | 900 |
| | gttgaaaagg tgactgcttt ggccaaggat ttgacggtcg ggataccaga agaggatgcc | 960 |
| | gacatcactc ctttgatcga cactaagtct gccgactacg tacaaggctt aattgaagaa | 1020 |
| | gccgcagaaa agggcgctaa gcctttgttt gacttcaagc gcgaaggcaa cctgatctac | 1080 |
| | ccaatggtca tggaccaagt gacgactgac atgcgcctgg cctgggaaga accatttggg | 1140 |
| | ccagtattgc cattcatccg cgtcaagtca gctgacgaag ctgtcatgat tgccaatgaa | 1200 |
| | tcagaatacg gccttcaaag ctccgtcttc tcacggaact ttgaaaagc ctttgccatt | 1260 |
| | gcaggaaaat tggaagtggg cacggtccac atcaacaaca agacccaaag aggtccggac | 1320 |
| | aacttcccat tcctgggcgt aaagagctca ggggcaggcg tacagggggt caagtactcc | 1380 |
| | attcaagcca tgaccgggt caagtccgtt gtcttcaaca tcgaagacta a | 1431 |
| <210> | 3 | |
| <211> | 40 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | gapN F | |
| <400> | 3 | |
| | cccaacgaaa ggaaacactc atgacagaac actattttaa | 40 |
| <210> | 4 | |
| <211> | 45 | |
| <212> | DNA | |

| | | |
|-------|---|----|
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | gapN R | |
| <400> | 4 | |
| | gcttgtgaat aagcctgccc ttagtcttcg atgttgaaga caacg | 45 |
| <210> | 5 | |
| <211> | 40 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | Pcj7 F | |
| <400> | 5 | |
| | gattccaggt tccttaacce agaaacatcc cagcgctact | 40 |
| <210> | 6 | |
| <211> | 40 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | Pcj7 R | |
| <400> | 6 | |
| | tttaaatagt gttctgtcat gagtgtttcc ttcggtggg | 40 |
| <210> | 7 | |
| <211> | 40 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | Ldb1179 R | |
| <400> | 7 | |
| | tttcgtgcga gtctagaagt ttagtcttcg atgttgaaga | 40 |
| <210> | 8 | |
| <211> | 40 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | Pcj7_2 F | |
| <400> | 8 | |
| | acgaggtcag catctcgagt agaaacatcc cagcgctact | 40 |
| <210> | 9 | |
| <211> | 36 | |

| | | |
|-------|--|----|
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | Pcj7_3 F | |
| <400> | 9 | |
| | cgcggaactg tactagtaga aacatcccag cgctac | 36 |
| <210> | 10 | |
| <211> | 34 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | Ldb1179_2 R | |
| <400> | 10 | |
| | ggaaggatat ctctagaaga taaaacgaaa ggcc | 34 |
| <210> | 11 | |
| <211> | 36 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | Pcj7_4 F | |
| <400> | 11 | |
| | cccttccggg ttagtactag aaacatccca gcgcta | 36 |
| <210> | 12 | |
| <211> | 37 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | Ldb1179_3 R | |
| <400> | 12 | |
| | ctcttcctgt ttagtacttt agtcttcgat gttgaag | 37 |
| <210> | 13 | |
| <211> | 475 | |
| <212> | PRT | |
| <213> | 未知 | |
| <220> | | |
| <223> | 变异链球菌 gapN 氨基酸 | |
| <400> | 13 | |
| | Met Thr Lys Gln Tyr Lys Asn Tyr Val Asn Gly Glu Trp Lys Leu Ser | |
| | 1 5 10 15 | |

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

| | | | | |
|--|----------------|-----|-----|-----|
| | 325 | 330 | 335 | |
| Leu Ile Asn Asp Ala Asn Asp Lys Gly Ala Ala Ala Leu Thr Glu Ile | | | | |
| | 340 | 345 | 350 | |
| Lys Arg Glu Gly Asn Leu Ile Cys Pro Ile Leu Phe Asp Lys Val Thr | | | | |
| | 355 | 360 | 365 | |
| Thr Asp Met Arg Leu Ala Trp Glu Glu Pro Phe Gly Pro Val Leu Pro | | | | |
| | 370 | 375 | 380 | |
| Ile Ile Arg Val Thr Ser Val Glu Glu Ala Ile Glu Ile Ser Asn Lys | | | | |
| 385 | 390 | 395 | 400 | |
| Ser Glu Tyr Gly Leu Gln Ala Ser Ile Phe Thr Asn Asp Phe Pro Arg | | | | |
| | 405 | 410 | 415 | |
| Ala Phe Gly Ile Ala Glu Gln Leu Glu Val Gly Thr Val His Ile Asn | | | | |
| | 420 | 425 | 430 | |
| Asn Lys Thr Gln Arg Gly Thr Asp Asn Phe Pro Phe Leu Gly Ala Lys | | | | |
| | 435 | 440 | 445 | |
| Lys Ser Gly Ala Gly Ile Gln Gly Val Lys Tyr Ser Ile Glu Ala Met | | | | |
| | 450 | 455 | 460 | |
| Thr Thr Val Lys Ser Val Val Phe Asp Ile Lys | | | | |
| 465 | 470 | 475 | | |
| <210> | 14 | | | |
| <211> | 1428 | | | |
| <212> | DNA | | | |
| <213> | 未知 | | | |
| <220> | | | | |
| <223> | 变异链球菌 gapN 核苷酸 | | | |
| <400> | 14 | | | |
| atgacaaaac aatataaaaa ttatgtcaat ggcgagtgga agctttcaga aatgaaatt | | | | 60 |
| aaaatctacg aaccggccag tggagctgaa ttgggttcag ttccagcaat gactactgaa | | | | 120 |
| gaagtagatt atgtttatgc ttcagccaag aaagctcaac cagcttggcg atcactttca | | | | 180 |
| tacatagaac gtgctgcta ccttcacaag gtagcagata ttttgatgcg tgataaagaa | | | | 240 |
| aaaataggtg ctgttcttc caaagagggt gctaaagggt ataatcagc agtcagcgaa | | | | 300 |
| gttggttcgta ctgcagaaat cattaattat gcagctgaag aaggccttcg tatggaaggt | | | | 360 |
| gaagtccttg aaggcggcag ttttgaagca gccagcaaga aaaaattgc cgttgttcgt | | | | 420 |
| cgtgaaccag taggtcttgt attagetatt tcaccattta actaccctgt taacttgga | | | | 480 |
| ggttcgaaaa ttgcaccggc tcttattgcg ggaaatgta ttgcttttaa accaccgacg | | | | 540 |
| caaggatcaa tctcaggget cttacttget gaagcatttg ctgaagctgg acttctgca | | | | 600 |
| ggtgtcttta ataccattac aggtcgtggt tctgaaattg gagactatat tgtagaacat | | | | 660 |
| caagccgtta actttatcaa ttttactggt tcaacaggaa ttggggaacg tattggcaaa | | | | 720 |
| atggctggta tgcgtccgat tatgcttgaa ctcggtggaa aagattcagc catcgttctt | | | | 780 |

| | |
|--|------|
| gaagatgcag accttgaatt gactgctaaa aatattattg caggtgcttt tggttattca | 840 |
| ggccaacgct gtacagcagt taaacgtgtt cttgtgatgg aaagtgttgc tgatgaactg | 900 |
| gtcgaaaaaa tccgtgaaaa agttcttgca ttaacaattg gtaatccaga agacgatgca | 960 |
| gatattacac cgttgattga tacaaaaatca gctgattatg tagaaggtct tattaatgat | 1020 |
| gccaatgata aaggagccgc tgcccttact gaaatcaaac gtgaaggtaa tcttatctgt | 1080 |
| ccaatcctct ttgataaggt aacgacagat atgcgtcttg cttgggaaga accatttggt | 1140 |
| cctgttcttc cgatcattcg tgtgacatct gtagaagaag ccattgaaat ttctaacaaa | 1200 |
| tcggaatatg gacttcaggc ttctatcttt acaaatgatt tcccacgcg ttttggtatt | 1260 |
| gctgagcagc ttgaagttgg tacagttcat atcaataata agacacagcg cggcacggac | 1320 |
| aacttcccat tcttaggggc taaaaaatca ggtgcaggta ttcaaggggt aaaatattct | 1380 |
| attgaagcta tgacaactgt taaatccgtc gtatttgata tcaaataa | 1428 |
| <210> 15 | |
| <211> 40 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> Pcj7-gapN1 F | |
| <400> 15 | |
| tagatgtcgg gcccataatg agaaacatcc cagcgtact | 40 |
| <210> 16 | |
| <211> 45 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> Pcj7-gapN1 R | |
| <400> 16 | |
| gccaanaacag cctcgagtta tttgatatca aatagcaggg attta | 45 |
| <210> 17 | |
| <211> 29 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |
| <220> | |
| <223> lysC-1 F | |
| <400> 17 | |
| tcctctagag ctgcgcagtg ttgaatacg | 29 |
| <210> 18 | |
| <211> 30 | |
| <212> DNA | |
| <213> 人工序列 | |

| | | |
|-------|-----------------------------------|----|
| <220> | | |
| <223> | lysC-1 R | |
| <400> | 18 | |
| | tggaaatcctt ttcgatgttc acgttgacat | 30 |
| <210> | 19 | |
| <211> | 30 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | lysC-2 F | |
| <400> | 19 | |
| | acatcgaaaa gatttccacc tetgagatc | 30 |
| <210> | 20 | |
| <211> | 29 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | lysC-2 R | |
| <400> | 20 | |
| | gactctagag ttcacctcag agacgatta | 29 |
| <210> | 21 | |
| <211> | 29 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | Hom-1 F | |
| <400> | 21 | |
| | tcctctagac tggtcgcctg atgttctac | 29 |
| <210> | 22 | |
| <211> | 20 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | Hom-1 R | |
| <400> | 22 | |
| | ctcttctctgt tggattgtac | 20 |
| <210> | 23 | |
| <211> | 20 | |
| <212> | DNA | |

| | | |
|-------|----------------------------------|----|
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | Hom-2 F | |
| <400> | 23 | |
| | gtacaatcca acaggaagag | 20 |
| <210> | 24 | |
| <211> | 29 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | Hom-2 R | |
| <400> | 24 | |
| | gactctagat tagtcccttt cgaggcgga | 29 |
| <210> | 25 | |
| <211> | 28 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | ilvA-1 F | |
| <400> | 25 | |
| | acggatccca gactccaaag caaaagcg | 28 |
| <210> | 26 | |
| <211> | 30 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | ilvA-1 R | |
| <400> | 26 | |
| | acaccacggc agaaccaggt gcaaaggaca | 30 |
| <210> | 27 | |
| <211> | 30 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | ilvA-2 F | |
| <400> | 27 | |
| | ctggttctgc cgtggtgtgc atcatctctg | 30 |
| <210> | 28 | |
| <211> | 28 | |

| | | |
|-------|-------------------------------------|----|
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | ilvA-2 R | |
| <400> | 28 | |
| | acggatccaa ccaaacttgc tcacactc | 28 |
| <210> | 29 | |
| <211> | 32 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | ilvN-1 F | |
| <400> | 29 | |
| | aatttctaga ggcagaccct attctatgaa gg | 32 |
| <210> | 30 | |
| <211> | 30 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | ilvN-1 R | |
| <400> | 30 | |
| | agtgtttcgg tctttacaga cacgaggac | 30 |
| <210> | 31 | |
| <211> | 30 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | ilvN-2 F | |
| <400> | 31 | |
| | gtccctcgtg tctgtaaaga ccgaaacact | 30 |
| <210> | 32 | |
| <211> | 32 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | ilvN-2 R | |
| <400> | 32 | |
| | aatttctaga cgtgggagtg tcactcgctt gg | 32 |
| <210> | 33 | |

| | | |
|-------|--|----|
| <211> | 28 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | MetX F | |
| <400> | 33 | |
| | ggatcccctc gttgttcacc cagcaacc | 28 |
| <210> | 34 | |
| <211> | 30 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | MetX R | |
| <400> | 34 | |
| | ggatcccaaa gtcacaacta cttatgttag | 30 |
| <210> | 35 | |
| <211> | 482 | |
| <212> | PRT | |
| <213> | 未知 | |
| <220> | | |
| <223> | 丙酮丁醇梭菌 gapN 氨基酸 | |
| <400> | 35 | |
| | Met Phe Glu Asn Ile Ser Ser Asn Gly Val Tyr Lys Asn Leu Phe Asp | |
| | 1 5 10 15 | |
| | Gly Lys Trp Val Glu Ser Lys Thr Asn Lys Thr Ile Glu Thr His Ser | |
| | 20 25 30 | |
| | Pro Tyr Asp Gly Ser Leu Ile Gly Lys Val Gln Ala Leu Ser Lys Glu | |
| | 35 40 45 | |
| | Glu Val Asp Glu Ile Phe Lys Ser Ser Arg Thr Ala Gln Lys Lys Trp | |
| | 50 55 60 | |
| | Gly Glu Thr Pro Ile Asn Glu Arg Ala Arg Ile Met Arg Lys Ala Ala | |
| | 65 70 75 80 | |
| | Asp Ile Leu Asp Asp Asn Ala Glu Tyr Ile Ala Lys Ile Leu Ser Asn | |
| | 85 90 95 | |
| | Glu Ile Ala Lys Asp Leu Lys Ser Ser Leu Ser Glu Val Lys Arg Thr | |
| | 100 105 110 | |
| | Ala Asp Phe Ile Arg Phe Thr Ala Asn Glu Gly Thr His Met Glu Gly | |
| | 115 120 125 | |
| | Glu Ala Ile Asn Ser Asp Asn Phe Pro Gly Ser Lys Lys Asp Lys Leu | |

| | | |
|---|-----|-----|
| 130 | 135 | 140 |
| Ser Leu Val Glu Arg Val Pro Leu Gly Ile Val Leu Ala Ile Ser Pro | | |
| 145 | 150 | 155 |
| Phe Asn Tyr Pro Val Asn Leu Ser Gly Ser Lys Val Ala Pro Ala Leu | | |
| | 165 | 170 |
| Ile Ala Gly Asn Ser Val Val Leu Lys Pro Ser Thr Thr Gly Ala Ile | | |
| | 180 | 185 |
| Ser Ala Leu His Leu Ala Glu Ile Phe Asn Ala Ala Gly Leu Pro Ala | | |
| | 195 | 200 |
| Gly Val Leu Asn Thr Val Thr Gly Lys Gly Ser Glu Ile Gly Asp Tyr | | |
| | 210 | 220 |
| Leu Ile Thr His Glu Glu Val Asn Phe Ile Asn Phe Thr Gly Ser Ser | | |
| 225 | 230 | 235 |
| Ala Val Gly Lys His Ile Ser Lys Ile Ala Gly Met Ile Pro Met Val | | |
| | 245 | 250 |
| Leu Glu Leu Gly Gly Lys Asp Ala Ala Ile Val Leu Glu Asp Ala Asn | | |
| | 260 | 265 |
| Leu Glu Thr Thr Ala Lys Ser Ile Val Ser Gly Ala Tyr Gly Tyr Ser | | |
| | 275 | 280 |
| Gly Gln Arg Cys Thr Ala Val Lys Arg Val Leu Val Met Asp Lys Val | | |
| | 290 | 295 |
| Ala Asp Glu Leu Val Glu Leu Val Thr Lys Lys Val Lys Glu Leu Lys | | |
| 305 | 310 | 315 |
| Val Gly Asn Pro Phe Asp Asp Val Thr Ile Thr Pro Leu Ile Asp Asn | | |
| | 325 | 330 |
| Lys Ala Ala Asp Tyr Val Gln Thr Leu Ile Asp Asp Ala Ile Glu Lys | | |
| | 340 | 345 |
| Gly Ala Thr Leu Ile Val Gly Asn Lys Arg Lys Glu Asn Leu Met Tyr | | |
| | 355 | 360 |
| Pro Thr Leu Phe Asp Asn Val Thr Ala Asp Met Arg Ile Ala Trp Glu | | |
| | 370 | 375 |
| Glu Pro Phe Gly Pro Val Leu Pro Ile Ile Arg Val Lys Ser Met Asp | | |
| 385 | 390 | 395 |
| Glu Ala Ile Glu Leu Ala Asn Arg Ser Glu Tyr Gly Leu Gln Ser Ala | | |
| | 405 | 410 |
| Val Phe Thr Glu Asn Met His Asp Ala Phe Tyr Ile Ala Asn Lys Leu | | |
| | 420 | 425 |
| Asp Val Gly Thr Val Gln Val Asn Asn Lys Pro Glu Arg Gly Pro Asp | | |
| | 435 | 440 |
| | | 445 |

His Phe Pro Phe Leu Gly Thr Lys Ser Ser Gly Met Gly Thr Gln Gly
 450 455 460
 Ile Arg Tyr Ser Ile Glu Ala Met Thr Arg His Lys Ser Ile Val Leu
 465 470 475 480

Asn Leu

<210> 36

<211> 1449

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<223> 丙酮丁醇梭菌 gapN 核苷酸

<400> 36

```

atgtttgaaa atatatcatc aaatggagtt tataaaaatc ttttgatgg aaaatggggtt      60
gaaagtaaga caaataaaac catagaaacg cattctcctt atgatggaag ttttaattgga      120
aaagttcagg ccttatcaaa agaggaagtt gatgagattt ttaaagttc aagaacagct      180
cagaaaaaat ggggtgaaac tccaataaat gagcgtgcta gaatcatgcg taaagcagct      240
gatatactag atgataacgc agaatatata gcaaaaattc tttcaaatga gatagcaaaa      300
gatttaaaat cttctctttc agaagtaaaa agaacagctg attttataag atttacagct      360
aatgaaggta ctcatatgga aggagaagct attaactcag ataattttcc tggttctaaa      420
aaagataaac tttctctagt tgaaagagtt ctttaggaa tagttttagc tatatctcct      480
tttaattatc ctgtaaactt ttctgggtct aaggttgctc cagcacttat agctggaaat      540
agtgttgttt taaaacctc tacaactggg gctataagcg cacttcatct tgcagaaatt      600
tttaatgcag ctggctctcc agcagggtgt taaacactg taacaggaaa agggctctgaa      660
ataggcgatt atttaattac ccatgaagaa gtaaacttta ttaactttac gggaagctct      720
gctgtaggta agcatattc aaaaatagct ggaatgatac ctatggttct tgagcttggt      780
ggtaaagatg ctgctatagt tctcgaagat gccaatcttg aaacaacagc taaaagcata      840
gtatctggag catatggata ctccggccaa aggtgtactg ctgtaaaaag agttcttgta      900
atggataaag tagctgatga attagttgaa ctgtttacaa aaaaagttaa agaattaaag      960
gtaggtaatc cttttgatga tgttacaata acccactta tagacaacaa ggcagcagat     1020
tatgttcaaa ctctcattga cgacgtatc gaaaagggtg caactcttat cgttggaat     1080
aagcgtaaag aaaatttaat gtatcctact ttatttgata atgtaactgc tgatatgcgt     1140
attgcttggg aagaaccatt tggaccagtt ttacctatta ttcgtgtaaa aagcatggat     1200
gaagcaatag aattagcaaa tagatctgaa tatggtcttc aatctgcagt atttactgaa     1260
aatatgcatg atgcctttta tattgccaat aaattagatg ttggaactgt tcaagtaaat     1320
aataagcctg aaagaggccc agatcacttc ccattccttg gaacaaagtc atcaggtatg     1380
ggcactcaag gaattcgata cagtatagag gcaatgacaa ggcataaatc aatagtttta     1440
aacctataa
    
```

<210> 37

<211> 44

| | | |
|-------|--|----|
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | gapN F | |
| <400> | 37 | |
| | acccaacgaa aggaaacact catgtttgaa aatatatcat caaa | 44 |
| <210> | 38 | |
| <211> | 40 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | gapN R | |
| <400> | 38 | |
| | gccaaaacag cctcgagtta taggtttaa actattgatt | 40 |
| <210> | 39 | |
| <211> | 44 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | 人工序列 | |
| <220> | | |
| <223> | gapN R | |
| <400> | 39 | |
| | tttgatgata tattttcaaa catgagtgtt tccttcggt gggt | 44 |

关于微生物保藏の説明

| | |
|------------------------|-------------------------|
| 申请人或代理人档案号 Z210489CPCN | 国际申请号 PCT/KR2021/000823 |
|------------------------|-------------------------|

关于微生物保藏の説明

(专利合作条约实施细则 13 之 2)

| | |
|---|---|
| 微生物保藏の説明 | |
| A.对说明书第 28 页, 第 21 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的説明 | |
| B. 保藏事項 | 更多的保藏在附加页説明 <input checked="" type="checkbox"/> |
| 保藏单位名称KCCM-韩国微生物保藏中心 | |
| 保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国 | |
| 保藏日期 2019-09-02 | 保藏号 KCCM12580P |
| C.补充説明 (必要时) | 更多信息在附加页中 <input checked="" type="checkbox"/> |
| , | |
| D.本説明是为下列指定国作的 (如果説明不是为所有指定国而作的) 所有指定国 | |
| E.补充説明 (必要时) 下列説明将随后向国际局提供 (写出説明的类别, 例如: “保藏的编号”) , | |

[0001]

| |
|--|
| 由受理局填写 |
| <input type="checkbox"/> 本页已经和国际申请一起收到 |
| 授权官员 |

| |
|------------------------------------|
| 由国际局填写 |
| <input type="checkbox"/> 国际局收到本页日期 |
| 授权官员 |

| | |
|---|---|
| 微生物保藏(2) | |
| A.对说明书第 27 页, 第 2 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明 | |
| B. 保藏事项 | 更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/> |
| 保藏单位名称KCCM-韩国微生物保藏中心 | |
| 保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国 | |
| 保藏日期 2019-09-02 | 保藏号 KCCM12581P |
| C.补充说明(必要时) | 更多信息在附加页中 <input checked="" type="checkbox"/> |
| , | |
| D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的) 所有指定国 | |
| E.补充说明(必要时) 下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”) , | |
| 微生物保藏(3) | |
| A.对说明书第 22 页, 第 27 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明 | |
| B. 保藏事项 | 更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/> |
| 保藏单位名称KCCM-韩国微生物保藏中心 | |
| 保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国 | |
| 保藏日期 2019-09-02 | 保藏号 KCCM12582P |
| C.补充说明(必要时) | 更多信息在附加页中 <input checked="" type="checkbox"/> |

[0002]

[0003]

| | |
|---|---|
| , | |
| D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的) | |
| 所有指定国 | |
| E.补充说明(必要时) | |
| 下列说明将随后向国际局提供(写出说明的类别,例如:“保藏的编号”) | |
| , | |
| 微生物保藏(4) | |
| A.对说明书第 24 页,第 20 行所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明 | |
| B. 保藏事项 | 更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/> |
| 保藏单位名称KCCM-韩国微生物保藏中心 | |
| 保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国 | |
| 保藏日期 2019-09-02 | 保藏号 KCCM12583P |
| C.补充说明(必要时) | 更多信息在附加页中 <input checked="" type="checkbox"/> |
| , | |
| D.本说明是为下列指定国作的(如果说明不是为所有指定国而作的) | |
| 所有指定国 | |
| E.补充说明(必要时) | |

[0004]

| | |
|---|---|
| 下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） , | |
| 微生物保藏(5) | |
| A.对说明书第 <u>30</u> 页, 第 <u>11</u> 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明 | |
| B. 保藏事项 | 更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/> |
| 保藏单位名称KCCM-韩国微生物保藏中心 | |
| 保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国 | |
| 保藏日期 2019-09-02 | 保藏号 KCCM12584P |
| C.补充说明（必要时） | 更多信息在附加页中 <input checked="" type="checkbox"/> |
| , | |
| D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的） 所有指定国 | |
| E.补充说明（必要时） 下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） , | |
| 微生物保藏(6) | |
| A.对说明书第 <u>16</u> 页, 第 <u>6</u> 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明 | |
| B. 保藏事项 | 更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/> |
| 保藏单位名称KCCM-韩国微生物保藏中心 | |

[0005]

| | |
|--|----------------|
| 保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国 | |
| 保藏日期 2019-09-02 | 保藏号 KCCM12585P |
| C. 补充说明 (必要时) 更多信息在附加页中 <input checked="" type="checkbox"/> | |
| , | |
| D. 本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的) 所有指定国 | |
| E. 补充说明 (必要时) 下列说明将随后向国际局提供 (写出说明的类别, 例如: “保藏的编号”) , | |
| 微生物保藏 (7) | |
| A. 对说明书第 20 页, 第 20 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明 | |
| B. 保藏事项 更多的保藏在附加页说明 <input checked="" type="checkbox"/> | |
| 保藏单位名称 KCCM-韩国微生物保藏中心 | |
| 保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国 | |
| 保藏日期 2019-09-02 | 保藏号 KCCM12586P |
| C. 补充说明 (必要时) 更多信息在附加页中 <input checked="" type="checkbox"/> | |
| , | |
| D. 本说明是为下列指定国作的 (如果说明不是为所有指定国而作的) | |

[0006]

| | |
|---|--------------------------------------|
| 所有指定国 | |
| E.补充说明（必要时） | |
| 下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） , | |
| 微生物保藏(8) | |
| A.对说明书第 32 页, 第 16 行 所述的已保藏的微生物或其他生物材料的说明 | |
| B. 保藏事项 | 更多的保藏在附加页说明 <input type="checkbox"/> |
| 保藏单位名称KCCM-韩国微生物保藏中心 | |
| 保藏单位地址 (包括邮政编码和国名) 韩国 | |
| 保藏日期 2019-09-02 | 保藏号 KCCM12587P |
| C.补充说明（必要时） | 更多信息在附加页中 <input type="checkbox"/> |
| , | |
| D.本说明是为下列指定国作的（如果说明不是为所有指定国而作的） | |
| 所有指定国 | |
| E.补充说明（必要时） | |
| 下列说明将随后向国际局提供（写出说明的类别，例如：“保藏的编号”） , | |