

文章编号: 1673-1689(2011)04-0592-05

乳糖发酵短杆菌 *lysC* 突变对 L-赖氨酸积累的影响

董迅衍¹, 徐大庆¹, 李 烨¹, 李江华², 王小元^{* 1}

(1. 食品科学与技术国家重点实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘 要: 从一株乳糖发酵短杆菌 L-异亮氨酸生产菌中克隆出天冬氨酸激酶 AK-1 的编码基因 *lysC1*, 经 DNA 测序并与来自谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的野生型 *lysC* 比对发现其中有 2 个核苷酸 1186G 和 1187C 缺失, 造成翻译提前终止。AK-1 还有下列 2 个有效突变位点: Ala 279 Thr 和 Ser 317 Ala。 *lysC1* 在大肠杆菌 BL21 中的诱导表达量约为 *lysC* 的 1/4, 其表观比酶活也较低, 但对 L-苏氨酸和 L-赖氨酸协同反馈抑制不敏感。用大肠杆菌-黄色短杆菌穿梭表达载体 pDXW-8 将 *lysC1* 在野生型乳糖发酵短杆菌 ATCC13869 中诱导型表达, 经摇瓶发酵积累 L-赖氨酸 7.4 g/L, 在 3 L 发酵罐上达 40 g/L。

关键词: 乳糖发酵短杆菌; 天冬氨酸激酶; 抗反馈抑制; 发酵; L-赖氨酸

中图分类号: Q 933

文献标识码: A

The Effect of *LysC* on L-Lysine Accumulation in *Brevibacterium lactofermentum*

DONG Xun-yan¹, XU Da-qing¹, LI Ye¹, LI Jiang-hua², WANG Xiao-yuan^{* 1}

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The gene *lysC1* encoding aspartate kinase AK-1 from a *Brevibacterium lactofermentum* L-isoleucine producer was sequenced. Compared with the *lysC* from *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, there were deletions of two nucleotides 1186G and 1187C, leading to the pre-termination of translation. In addition, the following two mutated sites were also identified in *lysC1*: Ala 279 Thr and Ser 317 Ala. In *Escherichia coli* BL21, the expression level of *lysC1* was lower than that of *lysC* from *B. lactofermentum* ATCC13869. The AK-1 had a lower apparent value of specific activity than the wild type AK, but it was not sensitive to the feedback inhibition by the mixture of L-lysine and L-threonine. *lysC1* was cloned into an *E. coli*-*Brevibacterium flavum* shuttle expression vector pDXW-8 and transformed into wild type *B. lactofermentum* ATCC13869. The recombinant strain ATCC13869/pDXW-8-*lysC1* accumulated 7.5 g/L L-lysine after 90 h flask fermentation and 40 g/L after 72 h batch fermentation. These results would be very useful for constructing a genetically identified L-lysine producing strain with minimum genetic alterations.

收稿日期: 2010-03-25

基金项目: 国家 863 计划项目(2007AA02Z229 和 2007AA02Z230)。

* 通信作者: 王小元(1965-), 男, 山西垣曲人, 教授, 博士研究生导师, 主要从事微生物学研究。

Email: xiaoyuanwang@hotmail.com

Key words: *Brevibacterium lactofermentum*, aspartate kinase, feedback inhibition, fermentation, L-lysine

L-赖氨酸为高等动物必需的8种氨基酸之一,在饲料、食品、医药行业应用广泛,主要被用作动物饲料添加剂,是畜禽饲料的第一限制性氨基酸^[1]。以添加了赖氨酸的低蛋白质配方饲料作为畜禽日粮,不但可以节省饲养成本,增强动物的免疫功能,提高畜禽的生产性能;还可以缓解天然蛋白质的匮乏,减少动物氮的排放,从而使环境收益与经济收益相统一^[2]。

目前,L-赖氨酸主要采用微生物直接发酵法生产,生产菌种多为棒状杆菌,其中以亲缘关系相近的谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、黄色短杆菌(*Brevibacterium f lavum*)、乳糖发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*)为主。这些菌株属格兰氏阳性菌株,由于其天冬氨酸族氨基酸(包括:赖氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、异亮氨酸)合成途径上不存在同功酶,调控机制相对简单,因此适合用于天冬氨酸族氨基酸生产菌种的选育与构建。天冬氨酸激酶(aspartate kinase, AK)是天冬氨酸族氨基酸合成途径上第一个关键酶,起控制进入天冬氨酸族氨基酸合成途径总碳流量的作用。L-天冬氨酸经天冬氨酸激酶和天冬氨酸半醛脱氢酶两步酶催化反应后,即进入L-赖氨酸合成支路:经7步(有机氮源情况下)或者4步(NH_4^+ 存在时)酶催化反应最终生成L-赖氨酸^[3]。AK由*lysC*基因编码,野生型受终产物L-赖氨酸和L-苏氨酸的协同反馈抑制。通过对一些经传统育种方法选育得到的赖氨酸生产菌进行组学研究分析,发现AK是该合成途径上影响赖氨酸产量的3个关键酶之一^[4,5]。

作者从一株乳糖发酵短杆菌L-异亮氨酸生产菌中克隆到一个编码抗反馈抑制AK-1的基因*lysC1*,测序确定了其中的突变位点。将*lysC1*转入野生型乳糖发酵短杆菌ATCC 13869中表达,发酵实验结果表明L-赖氨酸产量大幅提高。本研究为构建具有最少突变位点、遗传背景明确、生长旺盛的优势L-赖氨酸生产菌株提供了一定的参考依据,也为构建其他天冬氨酸族氨基酸生产菌株提供了重要信息。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 乳糖发酵短杆菌ATCC 13869购自美国标准生物品收藏中心(ATCC);大肠杆菌

(*Escherichia coli*) JM 109、BL 21,乳糖发酵短杆菌L-异亮氨酸生产菌以及质粒pET 28a由本实验室保藏;大肠杆菌黄色短杆菌穿梭表达载体pDXW-8:作者所在实验室构建^[6]。

1.1.2 主要试剂和仪器 限制性内切酶、T4 DNA连接酶、DNA Marker和ATP:上海生工生物工程有限公司产品;PrimeStar DNA聚合酶和PCR试剂:TaKaRa宝生物公司产品;引物合成:上海生工生物工程技术服务有限公司产品;琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒和基因组提取试剂盒:北京天根生化科技有限公司产品;质粒小量制备试剂盒:Bio Basic Inc产品;IPTG:Sigma公司产品;酵母粉和胰蛋白胨:Oxoid公司产品;其余试剂均为国产或进口分析纯。

PCR仪:Eppendorf AG产品;电泳仪:北京六一公司产品;紫外分光光度计:日本岛津产品;电转仪:BioRad公司产品;核酸蛋白定量仪:Gene Quant公司产品;高压细胞破碎仪:Constant Systems公司产品;高效液相色谱:Agilent公司产品;3 L发酵罐:New Brunswick Scientific公司产品。

1.1.3 培养基 大肠杆菌用LB培养基;乳糖发酵短杆菌ATCC 13869用添加了质量分数0.5%葡萄糖的LB培养基;乳糖发酵短杆菌L-异亮氨酸生产菌用添加了质量分数0.5%葡萄糖和0.5%牛肉浸膏的LB培养基。种子培养基各组成质量分数分别为:葡萄糖2.5%,尿素0.125%,玉米浆2.0%, KH_2PO_4 0.1%, MgSO_4 0.05%,pH 7.0。发酵培养基组成质量分数分别为:葡萄糖8%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3.5%,玉米浆2.0%, KH_2PO_4 0.1%, MgSO_4 0.1%, CaCO_3 3.0%,pH 7.0。

1.2 方法

1.2.1 菌体培养及发酵 大肠杆菌培养温度为37℃,乳糖发酵短杆菌为30℃;需要时,在培养基中添加30 mg/L卡那霉素。

发酵种子培养:挑一满环新鲜斜面上的菌体接种至种子培养基,在30℃,250 r/min条件下培养15 h。种子液按质量分数8%接种量转接发酵培养基。

摇瓶发酵:装液量为50 mL/500 mL;分别于接种后27、51、75 h共3个时间点添加IPTG(终浓度为30 $\mu\text{mol/L}$)诱导。

上罐:装液量为罐体积的60%;分别于接种后18、36、54 h共3个时间点添加IPTG(终浓度为30

$\mu\text{mol/L}$) 诱导^[7]。罐上溶氧控制为初期 30%, 对数生长期 50%, 稳定期 30%。流加体积分数 25% 氨水和 2 mol/L HCl 以控制 pH 值在 7.0。流加葡萄糖以维持糖质量浓度在 10~15 g/L^[8]。

1.2.2 PCR 扩增 *lysC* 和 *lysC1* 根据谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 *lysC* 基因的上下游序列设计两套 PCR 引物, F1/R1 和 F2/R2, 分别用于在载体 pET28a 和 pDXW-8 中表达。正向引物 F1 的序列为: 5'-ACTAGAATTCTGCGCCCTGGTCTGACAGAAATA-3', 其中下划线表示 EcoRⅠ酶切位点; 反向引物 R1 的序列为: 5'-ACTAGCGGCGCGCGTCCGGTGCCTGCATAAA-3', 其中下划线表示 NotⅠ位点。正向引物 F2 的序列为: 5'-AGTCGAATTCA GAAGGAGTTTACCGTGGCCTGGTCTGACAGAA-3', 其中下划线表示 EcoRⅠ酶切位点, 斜体字表示 SD 序列, 黑体表示间隔序列; 下游引物 R2 的序列为: 5'-ACTAGCGCGCGCTTAGCGTCCGGTGCCTGCATAAA-3', 其中下划线表示 NotⅠ位点。以乳糖发酵短杆菌 ATCC13869 基因组为模板 PCR 扩增野生型 *lysC*; 以 L-异亮氨酸生产菌基因组为模板, PCR 扩增突变型 *lysC1*。

PCR 扩增条件: 首先在 95 °C 预变性 5 min; 接着进行 35 个循环(95 °C 30 s, 65 °C 15 s, 72 °C 2 min); 最后在 72 °C 延伸 10 min。PCR 产物通过胶回收纯化。

1.2.3 构建表达质粒和重组菌 首先用限制性内切酶 EcoRⅠ和 NotⅠ分别对基因 *lysC*、*lysC1* 和载体 pET28a、pDXW-8 进行处理, 将处理后的载体与基因片段用 T4 DNA 连接酶连接, 将连接混合物转化大肠杆菌 JM109, 筛选阳性克隆。将筛选得到的 pET28a-*lysC* 和 pET28a-*lysC1* 分别转入大肠杆菌 BL21, 得到转化子; 将筛选得到的 pDXW-8-*lysC1* 和 pDXW-8 分别转入乳糖发酵短杆菌 ATCC13869, 得到转化子。大肠杆菌用 CaCl_2 法转化, 乳糖发酵短杆菌用电转化方法转化^[6]; 均用卡那霉素抗性平板筛选阳性克隆。其中, pET28a-*lysC1* 中 *lysC1* 的序列由上海生工生物工程技术服务有限公司测定。

1.2.4 粗酶液制备 分别挑取大肠杆菌 BL21/pET28a-*lysC* 和 BL21/pET28a-*lysC1* 在新鲜平板上的单菌落接种至 LB 液体培养基, 在 37 °C 和 200 r/min 过夜培养。按体积分数 1% 接种量转接新的 LB 液体培养基, 培养至 A_{600} 为 0.6, 添加 IPTG(终浓度为 1 mmol/L) 诱导表达, 继续培养 5 h, 收集菌

体, 离心, 弃上清。菌体用缓冲液(20 mmol/L TrisCl, 500 mmol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 150 mmol/L NaCl)^[9] 重悬, 洗涤, 离心后再重悬于 3 倍菌体体积的缓冲液, 用高压细胞破碎仪破碎。在 12 000 r/min 离心 30 min, 取上清, 用同样缓冲液进行透析后, 超滤浓缩, 即得粗酶液。粗酶液中蛋白采用 Bradford 法定量, 以小牛血清蛋白为标准。

1.2.5 AK 酶活测定 采用 0.7 mL 的反应体系, 其中含有 10 mmol/L MgSO_4 , 10 mmol/L L-天冬氨酸, 10 mmol/L ATP, 0.6 mol/L 羟胺和适量粗酶液。从加入酶液开始计时, 在 30 °C 反应 1 h 后, 加入 0.7 mL 反应终止液(质量分数 10% $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 体积分数 3.3% 三氯乙酸, 0.7 mol/L HCl), 离心, 取上清液在 540 nm 紫外波长下测吸光值($\epsilon = 600 \text{ L}/(\text{cm} \cdot \text{mol})$)^[9]。以加入酶液后立即加反应终止液为空白对照; 以不外加底物天冬氨酸作为参照, 监测透析是否完全。鉴定抗反馈抑制特性时, 在反应体系中分别添加 5 mmol/L L-苏氨酸、L-赖氨酸、L-苏氨酸和 L-赖氨酸。单位比酶活(U) 定义为: 1 mg 酶蛋白在 1 min 内催化足量底物生成 1 μmol 产物。

1.2.6 乳糖发酵短杆菌菌体量的测定 吸取 0.1 mL 的发酵液, 加入 5 mL 蒸馏水稀释, 采用紫外分光光度计测定 562 nm 波长下的吸光度。

1.2.7 氨基酸含量测定 采用高效液相色谱系统(HPLC)自动柱前衍生化法测定。所用色谱柱为 Agilent Eclipse-AAA 柱。采用流动相组成为水相(1 L): 4.52 g 无水乙酸钠, 200 μL 三乙胺, 5 mL 四氢呋喃, pH 7.2; 有机相(1 L): 4.52 g 无水乙酸钠, 400 mL 甲醇, 400 mL 乙腈。色谱条件: 柱温 40 °C, 流量 1.0 mL/min, DAD 检测器。

2 结果与讨论

2.1 *lysC* 和 *lysC1* 的 PCR 扩增及其表达质粒的构建

以乳糖发酵短杆菌 ATCC13869 和 L-异亮氨酸生产菌基因组为模板, 用引物 F1/R1 分别扩增出 *lysC* 和 *lysC1* (1 266 bp)。以 L-异亮氨酸生产菌基因组为模板, 用引物 F2/R2 扩增出 *lysC1*。经琼脂糖凝胶电泳检测, 在 1 000~1 500 bp 间有目的条带。将从大肠杆菌 JM109 阳性克隆提出的质粒 pET28a-*lysC*、pET28a-*lysC1*、pDXW-8-*lysC1* 用 EcoRⅠ酶切验证, 通过琼脂糖凝胶电泳验证了质粒大小, 通过测序得到基因序列。

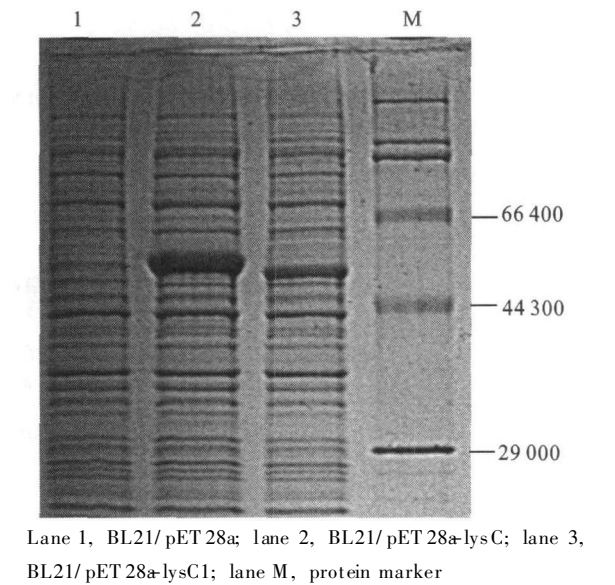
2.2 *lysC1* 的突变位点

共随机选取 6 个大肠杆菌 JM109 阳性克隆, 从

中提取质粒进行测序。测得的 *lysC1* 序列一致。通过 Blast 比对, 发现 *lysC1* 与谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 *lysC* 有 22 个碱基差异, 导致 2 个有义氨基酸突变位点 Ala 279 Thr 和 Ser 317 Ala。此外, *lysC* 基因的 1186G 和 1187C 在 *lysC1* 中缺失。

2.3 *lysC* 和 *lysC1* 在 *E. coli* BL21 中的诱导表达

以 pET 28a 为载体, *lysC* 和 *lysC1* 均可以在大肠杆菌 BL21 中进行诱导表达。如图 1 所示, 在相对分子质量 44 300~ 66 400 间可见清晰表达条带, 野生型 AK 与文献报道一致^[10], *lysC1* 表达的 AK-1 与预测蛋白质大小吻合。加上载体 N 端和 C 端的 His-Tag, AK 大小为 49 200; 加上载体 N 端的 His-Tag, AK-1 大小为 46 000。AK 的表达量明显高于 AK-1, 约是 4 倍关系。这可能因为 *lysC1* 的高拷贝数表达造成了胞内中间代谢产物的过量积累, 影响细胞生长, 进而影响了 *lysC1* 的表达^[11]。



Lane 1, BL21/pET 28a; lane 2, BL21/pET 28a-lysC; lane 3, BL21/pET 28a-lysC1; lane M, protein marker
图 1 *lysC* 和 *lysC1* 在大肠杆菌 BL21 中的诱导表达
Fig. 1 Expression of *lysC* and *lysC1* in *E. coli* BL21 after IPTG induction

2.4 野生型 AK 和突变型 AK-1 的酶活比较

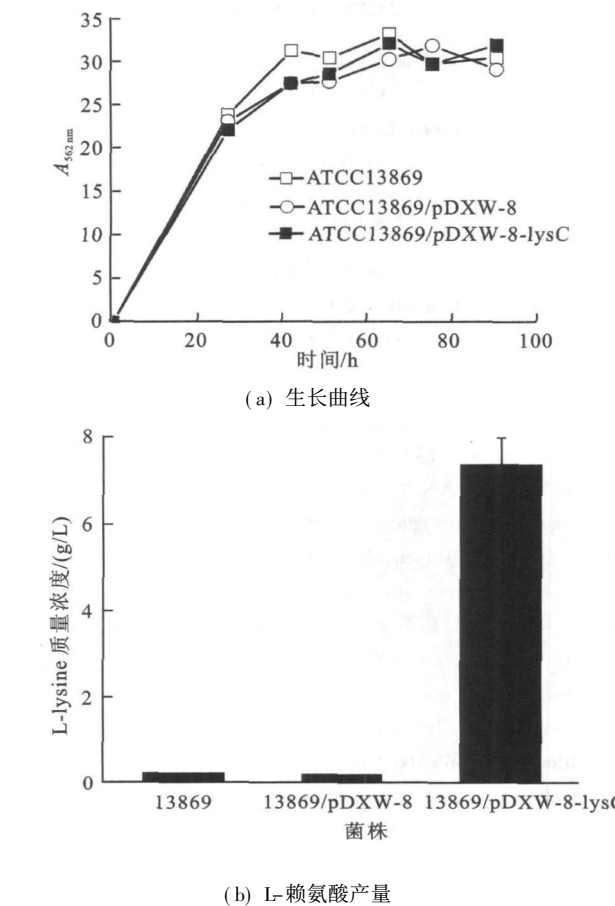
无抑制剂存在的情况下, 测得的突变型 AK-1 酶活低于野生型 AK(表 1); 但由于 AK-1 在大肠杆菌 BL21 中的诱导表达量约为 AK 的 1/4, 所以以粗酶液总蛋白质定量测得的表观比酶活($\mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{mg}$ 总蛋白质)并不能说明 AK-1 活性低于 AK。

在 5 mmol/L 抑制剂存在时, AK 轻度受赖氨酸抑制, 几乎不受苏氨酸抑制, 但受赖氨酸和苏氨酸协同反馈抑制; AK-1 受赖氨酸抑制程度较野生型轻, 不受苏氨酸抑制, 33% 酶活受赖氨酸、苏氨酸协同反馈抑制。

表 1 AK 和 AK-1 的比酶活				
Tab. 1 Specific activities of AK and AK-1				
抑制剂	AK		AK-1	
	比酶活/U	残余酶活/%	比酶活/U	残余酶活/%
None	12.87	100	8.34	100
5 mmol/L Lys	9.21	72	6.76	81
5 mmol/L Thr	11.60	90	8.92	107
5 mmol/L Lys & 5 mmol/L Thr	2.22	17	5.56	67

2.5 过表达 *lysC1* 对乳糖发酵短杆菌 L-赖氨酸积累的影响

以大肠杆菌-黄色短杆菌穿梭质粒 pDXW-8 为载体, 在乳糖发酵短杆菌 ATCC13869 中过表达 *lysC1*, 通过发酵实验研究其对菌株产酸的影响。



(a) 生长曲线
(b) L-赖氨酸产量
图 2 乳糖发酵短杆菌摇瓶发酵 90 h 对产酸影响
Fig. 2 90 h flask fermentation of *B. lactofermentum* strains

如图 2(a) 所示, 在摇瓶发酵过程中, 重组菌与出发菌株以及转入空质粒的对照菌株生长情况相近, 无明显受阻现象, 说明质粒的转入及 *lysC1* 的过表达未对细胞造成大的负担。发酵 90 h 后, 用

HPLC 分析检测发酵液中氨基酸的种类与含量,发现 L-赖氨酸积累量增长最大,达到 7.4 g/L,分别是初始菌株 ATCC13869 和对照菌株 ATCC13869/pDXW-8 的 37 和 49 倍(图 2(b))。而发酵液中丙氨酸的含量明显下降,从 3.44 g/L 降至 1.95 g/L,说明 lysC1 的过表达有效地将中心碳代谢流引入了天冬氨酸族赖氨酸合成途径。此重组菌在 3 L 发酵罐上,发酵 72 h 后,产 L-赖氨酸可达 40 g/L。

3 结 语

AK 是整个天冬氨酸族氨基酸合成途径上第一个关键酶,控制着用于合成天冬氨酸族氨基酸的碳流量,对于构建 L-赖氨酸、L-甲硫氨酸、L-苏氨酸、L-异亮氨酸高产菌株都具有重要意义。作者从一株乳糖发酵短杆菌 L-异亮氨酸生产菌中克隆到一

个编码抗反馈抑制 AK-1 的 lysC1 基因,经测序比对,发现了新的与抗反馈抑制特性相关的突变位点。AK-1 部分解除了 L-苏氨酸和 L-赖氨酸的协同反馈抑制。而野生型 AK 受抑制情况与文献报道一致:受苏氨酸和赖氨酸协同反馈抑制,略受赖氨酸抑制,几乎不受苏氨酸抑制^[13]。在乳糖发酵短杆菌 ATCC13869 中,利用中等拷贝数的大肠杆菌黄色短杆菌穿梭质粒 pDXW-8 过表达 lysC1, L-赖氨酸产量可达 40 g/L,而经多轮诱变得到的 L-赖氨酸生产菌的最高产量仅为 77~82 g/L^[14]。这充分说明本研究发现的突变位点在 L-赖氨酸合成中起着十分重要的作用。这些突变与已报道的与 AK 抗反馈抑制有关的突变位点 Ser 381 Phe、Thr 311 Ile、Ser 301 Tyr/Phe 和 Thr 279 Pro^[3, 10, 12]为构建具有遗传背景明确的赖氨酸高产菌奠定了基础。

参考文献(References):

- [1] 田金宝, 贾晓波, 杨志恒, 等. L-赖氨酸的应用、生产及市场展望[J]. 氨基酸和生物资源, 2004, 26(1): 44-46.
TIAN Jin-bo, JIA Xiao-bo, YANG Zhi-hen, et al. Application, production and market expectation of L-lysine[J]. **Amino Acids & Biotic Resources**, 2004, 26(1): 44-46. (in Chinese)
- [2] 任建民, 刘强. 赖氨酸营养研究进展[J]. 动物营养, 2009(3): 13-15.
REN Jian-min, LIU Qiang. Advances in researches on the nutritional values of lysine[J]. **Animal Nutrition**, 2009(3): 13-15. (in Chinese)
- [3] Graaf A, Eggeling L, Sahm H. Metabolic engineering for L-lysine production by *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Adv Biochem Eng Biot**, 2001, 73: 9-29.
- [4] Ohnishi J, Mitsuhashi S, Hayashi M, et al. A novel methodology employing *Corynebacterium glutamicum* genome information to generate a new L-lysine-producing mutant[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2002, 58: 217-223.
- [5] Ikeda M, Ohnishi J, Hayashi M, et al. A genome-based approach to create a minimally mutated *Corynebacterium glutamicum* strain for efficient L-lysine production[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2006, 33: 610-615.
- [6] XU D Q, TAN Y Z, HUAN X J, et al. Construction of a novel shuttle vector for use in *Brevibacterium flavum*, an industrial amino acid producer[J]. **J Microbiol Meth**, 2010, 80: 86-92.
- [7] Colon G E, Jøtten M S, Nguyen T T, et al. Effect of inducible thrB expression on amino acid production in *Corynebacterium lactofermentum* ATCC 21799[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1994, 61: 74-78.
- [8] 张伟国. L-赖氨酸发酵的研究[J]. 发酵科技通讯, 2005, 34(1).
ZHANG Wei-guo. Research on L-lysine fermentation[J]. **Fermentation Technology Communication**, 2005, 34(1). (in Chinese)
- [9] Kato C, Kurihara T, Kobashi N, et al. Conversion of feedback regulation in aspartate kinase by domain exchange[J]. **Biochem Bioph Res Co**, 2004, 316: 802-808.
- [10] Kalinowski J, Cremer J, Bachmann B, et al. Genetic and biochemical analysis of the aspartokinase from *Corynebacterium glutamicum*[J]. **Mol Microbiol**, 2006, 5(5): 1197-1204.
- [11] Cremer J, Eggeling L, Sahm H. Control of the lysine biosynthetic sequence in *Corynebacterium glutamicum* as analyzed by overexpression of the individual corresponding genes[J]. **Appl Environ Microbiol**, 1991, 57: 1746-1752.
- [12] LU JH, Liao CC. Site-directed mutagenesis of the aspartokinase gene *lysC* and its characterization in *Brevibacterium flavum*[J]. **Lett Appl Microbiol**, 1997, 24: 211-213.
- [13] Shio I, Miyajima R. Concerted inhibition and its reversal by end products of aspartate kinase in *Brevibacterium flavum*[J]. **J. Biochem**, 1969, 64: 849-859.
- [14] 张伟国, 顾正华. L-赖氨酸高产菌选育的研究[J]. 食品与发酵工业, 2001, 27(8): 17-20.
ZHANG Wei-guo, GU Zheng-hua. Breeding of L-lysine producing mutant[J]. **Food and Fermentation Industries**, 2001, 27(8): 17-20. (in Chinese)