



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111363701 B

(45) 授权公告日 2021.03.02

(21) 申请号 202010192129.2

(22) 申请日 2020.03.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111363701 A

(43) 申请公布日 2020.07.03

(83) 生物保藏信息
CGMCC No.18672 2019.10.12

(73) 专利权人 泸州正泰生物工程有限公司
地址 646100 四川省泸州市泸县玉蟾街道
明星路129号

(72) 发明人 张兴良

(74) 专利代理机构 北京慕达星云知识产权代理
事务所(特殊普通合伙)
11465

代理人 王敏

(51) Int.Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

A23K 10/18 (2016.01)

C12R 1/10 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103005159 A, 2013.04.03

CN 104771419 A, 2015.07.15

CN 108713558 A, 2018.10.30

高树峰. 发酵银杏叶制备新型生物饲料添加剂的研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库农业科技辑》.2015, (第04期), D050-7.

张洋等. 产黄酮银杏内共生真菌的分离及其发酵条件的优化.《工业微生物》.2015, 第45卷(第2期), 第1.1.1-2.3.2部分.

审查员 武雪梅

权利要求书1页 说明书6页

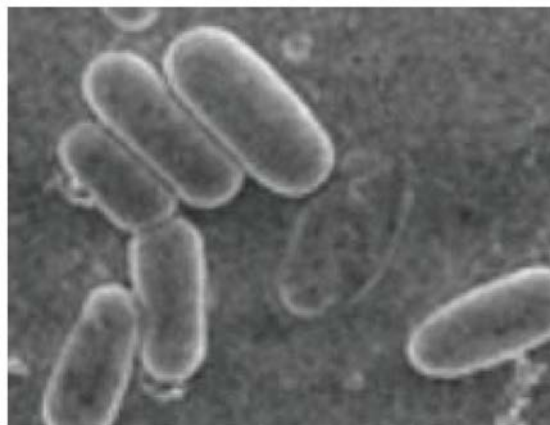
序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

一株耐热地衣芽孢杆菌及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一株耐热地衣芽孢杆菌及其应用,属于微生物发酵转化技术领域。本发明利用菌株LZZT-001发酵银杏叶制备银杏叶发酵微生物菌剂作为饲料添加剂使用,能够提高家畜与家禽的应激能力及抗病能力,促进生长;本发明制备的银杏叶发酵微生物菌剂作为饲料添加剂使用,具有绿色环保,性能优良等特点,具有较好的经济效益和社会效益。



1. 耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001制备的银杏叶发酵微生物菌剂作为育肥猪饲料添加剂的应用,其特征在於,所述银杏叶发酵微生物菌剂的添加量为基础日粮的0.30-0.60%;

所述耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001的保藏编号为CGMCC No.18672;

所述制备银杏叶发酵微生物菌剂的具体步骤如下:

(1) 将耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001进行菌种活化,活化后的菌种转接到种子培养液中,在30-50℃下振荡培养1-3d,振荡频率150-200rpm,获得种子液,种子液菌液浓度 $\geq 10^9$ CFU/ml;

(2) 向步骤(1)获得的种子液中添加银杏黄酮提取物发酵培养3-10h,获得发酵种子液;每升种子液中添加20-50mg银杏黄酮提取物,银杏黄酮提取物中总黄酮含量 $\geq 24\%$;

(3) 将步骤(2)获得的发酵种子液接种到固态基质中进行固态发酵培养,具体步骤如下:

①将发酵种子液接种到固态基质中,获得混合物;所述发酵种子液的接种量为固态基质的1-10%,所述发酵种子液的菌液浓度 $\geq 10^9$ CFU/ml;所述固态基质含有10-30%的粉碎银杏叶片,其余为农业有机废弃物;混合物的碳氮比为25-35:1,含水率为45%-65%,氧气含量为5%~14%;间隔2~5d搅拌1次;

②当堆温下降至45-50℃时,再次接种发酵种子液,接种量为固态基质的2-6%,控制堆温在65-75℃之间;

③堆积发酵10-20d后,风干堆积的物料,获得银杏叶发酵微生物菌剂;每kg银杏叶发酵微生物菌剂中银杏黄酮含量 $\geq 2g$;每g银杏叶发酵微生物菌剂中耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001含量 $\geq 10^9$ CFU。

2. 根据权利要求1所述的耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001制备的银杏叶发酵微生物菌剂作为育肥猪饲料添加剂的应用,其特征在於,步骤(1)所述菌种活化操作步骤如下:将保存的耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001接种在固体培养基上,培养温度为30-50℃。

3. 根据权利要求1所述的耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001制备的银杏叶发酵微生物菌剂作为育肥猪饲料添加剂的应用,其特征在於,步骤(1)所述种子培养液配方如下:可溶性淀粉3-5g,胰蛋白胨8-11g,氯化钠3-5g,加水至1000ml;pH为7.2-7.4。

4. 根据权利要求1所述的耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001制备的银杏叶发酵微生物菌剂作为育肥猪饲料添加剂的应用,其特征在於,步骤(3)所述农业有机废弃物为麦麸、木屑、花生壳粉、糠醛、豆粕、糖渣中的至少一种。

一株耐热地衣芽孢杆菌及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物发酵转化技术领域,更具体的说是涉及一株耐热地衣芽孢杆菌及其应用。

背景技术

[0002] 银杏叶提取物的化学成分有黄酮类、萜类、内酯类、酚酸类、生物碱以及聚异戊二烯等化合物。黄酮类化合物在银杏叶中以两种形态存在:一是脂溶性黄酮,如黄酮苷元类物质;二是水溶性黄酮,如黄酮苷成分。天然植物茎叶中95%以上的黄酮是以糖苷形式存在的。大量文献资料报道,黄酮苷元清除人体氧自由基的生物活性明显优于其糖苷,并且仅有苷元型黄酮可以直接进入动物血液中被吸收利用。微生物水解酶处理植物组织有利于天然黄酮类物质的释放与转化, α -鼠李糖苷酶、 β -葡萄糖苷酶、木聚糖酶、纤维素酶、果胶酶、 α -淀粉酶等酶可以有效将糖苷型黄酮生物转化为苷元型黄酮。银杏叶提取物具有降低血糖血脂、抗氧化、消炎杀菌、提高免疫力的作用。由于动物养殖领域抗生素的滥用,导致临床耐药性的日益严重。开发新型的植物性抗菌药物替代传统抗菌药物是近年来饲料添加剂领域的热点之一。结合银杏资源的独特性,大力发展银杏叶提取物作为添加剂在养殖领域的应用,充分利用银杏叶提取物的生物学功能,可以改善目前养殖业存在的部分问题。

[0003] 因此,提供一株耐热地衣芽孢杆菌及其应用是本领域技术人员亟需解决的问题。

发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明提供了一株耐热地衣芽孢杆菌及其应用,将该耐热地衣芽孢杆菌制备成银杏叶发酵微生物菌剂,作为饲料添加剂添加到饲料中,能够提高畜禽日增重,降低腹泻率。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

[0006] 一株耐热地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*)菌株LZZT-001,其保藏编号为CGMCC No.18672;于2019年10月12日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(CGMCC)保藏;地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所;分类命名为地衣芽孢杆菌*Bacillus licheniformis*。

[0007] 耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001能够产生 β -葡萄糖苷酶和半乳糖苷酶。

[0008] 进一步,所述的一株耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001在制备银杏叶发酵微生物菌剂中的应用。

[0009] 进一步,制备银杏叶发酵微生物菌剂的具体步骤如下:

[0010] (1) 将耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001进行菌种活化,活化后的菌种转接到种子培养液中,在30-50°C下振荡培养1-3d,振荡频率150-200rpm,获得种子液,种子液菌液浓度 $\geq 10^9$ CFU/ml;种子液优选菌液浓度为 10^9-10^{10} CFU/ml。

[0011] (2) 向步骤(1)获得的种子液中添加银杏黄酮提取物发酵培养3-10h,使葡萄糖苷酶活性大于300单位/毫升,半乳糖苷酶活性大于50单位/毫升;获得发酵种子液;每升种子

液中添加20-50mg银杏黄酮提取物,银杏黄酮提取物中总黄酮含量 $\geq 24\%$;银杏黄酮提取物中优选总黄酮含量为24%。

[0012] (3) 将步骤(2)获得的发酵种子液接种到固态基质中进行固态发酵培养,具体步骤如下:

[0013] ①将发酵种子液接种到固态基质中,获得混合物;所述发酵种子液的接种量为固态基质的1-10%,所述发酵种子液的菌液浓度 $\geq 10^9$ CFU/ml,所述发酵种子液优选菌液浓度为 10^9-10^{10} CFU/ml;所述固态基质含有10-30%的粉碎银杏叶片,其余为农业有机废弃物;混合物的碳氮比为25-35:1,含水率为45%-65%,氧气含量为5%~14%;间隔2~5d搅拌1次;

[0014] ②当堆温下降至45-50℃时,再次接种发酵种子液,接种量为固态基质的2-6%,控制堆温在65-75℃之间;

[0015] ③堆积发酵10-20d后,风干堆积的物料,获得银杏叶发酵微生物菌剂;每kg银杏叶发酵微生物菌剂中银杏黄酮含量 ≥ 2 g,每kg银杏叶发酵微生物菌剂中优选银杏黄酮含量为2-3g;每g银杏叶发酵微生物菌剂中耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001含量 $\geq 10^9$ CFU,每g银杏叶发酵微生物菌剂中优选耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001含量为 10^9-10^{10} CFU。

[0016] 30-50℃为耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001的适宜培养温度,菌株LZZT-001在60-80℃的高温条件下也能存活;当堆温在65-75℃之间时,不影响菌株LZZT-001的活性。

[0017] 进一步,步骤(1)所述菌种活化操作步骤如下:将保存的耐热地衣芽孢杆菌LZZT-001接种在固体培养基上,培养温度为30-50℃。

[0018] 进一步,步骤(1)所述种子培养液配方如下:可溶性淀粉3-5g,胰蛋白胨8-11g,氯化钠3-5g,加水至1000ml;pH为7.2-7.4。

[0019] 进一步,步骤(3)所述农业有机废弃物为麦麸、木屑、花生壳粉、糠醛、豆粕、糖渣中的至少一种。

[0020] 所述的银杏叶发酵微生物菌剂作为饲料添加剂的应用,所述银杏叶发酵微生物菌剂的添加量为基础日粮的0.30-0.60%。

[0021] 经由上述的技术方案可知,与现有技术相比,本发明公开提供了一株耐热地衣芽孢杆菌及其应用,利用菌株LZZT-001发酵银杏叶制备的银杏叶发酵微生物菌剂作为饲料添加剂使用,是综合了益生菌及中药有效成分的高效微生物菌剂,具有消炎杀菌和促生长的作用;本发明利用具有多种水解酶的活性菌株LZZT-001,以银杏叶为发酵底物通过固态发酵技术开发的银杏叶发酵微生物菌剂既含有生物活性成分,又富含益生菌或饲料复合酶,能作为促生长剂和抗生素的替代品广泛用于猪、鸡、牛、鱼、虾等多种畜禽及水产动物,并降低腹泻率;本发明制备的银杏叶发酵微生物菌剂作为饲料添加剂使用,具有绿色环保,性能优良等特点,具有较好的经济效益和社会效益。

附图说明

[0022] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据提供的附图获得其他的附图。

[0023] 图1附图为本发明菌株LZZT-001系统进化树;

[0024] 图2附图为本发明LZZT-001菌株的形态特征。

具体实施方式

[0025] 下面将结合本发明实施例中的附图,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0026] 实施例1地衣芽孢杆菌LZZT-001的分离与鉴定

[0027] 采集银杏叶片,用试管刷清理叶片表面的土壤及灰尘,剪除坏死组织,切成大小合适的材料,用75%酒精棉球快速擦拭组织表面,并用酒精灯焰快速烤干组织表面残留乙醇;自然风干1天左右后用于分离银杏叶内生菌的分离。分离前需进行表面消毒,消毒前用大量清水洗净外植体表面尘土并用滤纸吸干,表面消毒程序为:1) 99% (V/V) 乙醇浸泡消毒1min;2) 3.125% (有效氯/V) NaClO浸泡消毒6min;3) 99% (V/V) 乙醇浸泡消毒30s;4) 无菌水反复漂洗4-6遍。随后在无菌条件下,将表面消毒后的银杏叶片用手术刀将其切成1-2cm×1-2cm的小段或薄片,用无菌镊子夹取接种于分离培养基上,每个培养皿均匀接种8-10个植物样本。分离培养基采用腐殖酸维生素琼脂(HVA)培养基(NaH₂PO₄0.5g, KCl 1.7g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, CaCO₃0.02g, FeSO₄·7H₂O 0.01g, 腐殖酸1.0g, 核黄素0.5mg, 硫胺素0.5mg, 烟酸0.5mg, 生物素0.25mg, 肌醇0.5mg, VB₆0.5mg, 对氨基苯甲酸0.5mg, 泛酸0.5mg, 琼脂15.0g, 蒸馏水1000mL, pH 7.2)。37℃培养箱中培养约3天后,挑取新生长出的细菌菌落于TSB固体培养基(胰蛋白胨15.0g, 大豆蛋白胨5.0g, NaCl 5.0g, 琼脂18.0g, 蒸馏水1000mL, pH 7.2)上进行划线纯化。分离挑取的微生物经过菌落形态、革兰氏染色方法初步排重后接种于筛选培养基(银杏叶提取物5g/L, 琼脂20g/L, 硫酸镁0.5g/L, 磷酸二氢钾10g/L, 栀子苷0.1g/L, 谷氨酸钠10g/L, 硫酸铵2g/L), 利用微生物产β-葡萄糖苷酶水解培养基中的栀子苷产生栀子苷元, 与谷氨酸钠结合形成蓝色栀子苷蓝的特征, 获得一株生长旺盛, 革兰氏染色阳性的菌株。以所获菌株DNA为模板, 选用引物(27f): 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', SEQ ID NO.1; 和引物(1492r): 5'-GGTTACCTGTACACTT-3', SEQ ID NO.2; PCR扩增其16S rDNA序列。PCR反应程序为: 95℃预变性5分钟, 95℃变性35秒, 55℃退火30秒, 72℃延伸60秒, 35个循环。获得的16S rDNA基因序列通过NCBI Genbank数据库进行比对, 与菌株*Bacillus licheniformis*的相似性最高, 同源率为99.4%; 结果见图1。结合菌株的生长特征, 将该菌株鉴定为*Bacillus licheniformis*, 命名为LZZT-001, 形态特征见图2; 并于2019年10月12日保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号, 中国科学院微生物研究所, 邮编100101)保藏, 分类命名为地衣芽孢杆菌*Bacillus licheniformis*, 保藏编号为CGMCC No.18672。

[0028] 实施例2菌株LZZT-001菌剂的制备

[0029] 将4℃保存的本发明生产菌株LZZT-001斜面转接至TSB培养基平板上, 在30-50℃下培养, 然后转接至装有2L TSB液体培养基的5L三角瓶中, 在振荡器上30-50℃, 转速150-220转/分钟下震荡培养1天, OD₆₀₀大于2.0时, 停止培养, 此为摇瓶种子液。

[0030] 将摇瓶种子液按液体培养基体积比的0.1-1%接种至含有TSB液体培养基的发酵种子罐中进行发酵培养。发酵条件是温度35-38℃, 通气搅拌, 通气量为0.45m³/L.min, 搅拌

速度为150-220转/分钟,培养1-2天后,检测OD600大于2.0,停止培养,获得种子罐种子液。

[0031] 将种子罐种子液按液体培养基体积比的0.1-1%接种至含有TSB液体培养基的发酵罐中进行发酵培养。发酵条件是温度35-38℃,通气搅拌,通气量为0.45m³/L.min,搅拌速度为150-220转/分钟,培养1-2天后,检测OD600大于3,停止培养,此为发酵菌液。

[0032] 发酵液分装成为液体菌剂,发酵液经板框或离心方式脱水,经过喷雾干燥可以得到菌粉剂。

[0033] 实施例3菌株LZZT-001耐高温葡萄糖苷酶活性检测及其基因序列

[0034] 采用DNS法测定菌株LZZT-001葡萄糖苷酶活性,800μL的0.05mol/L甘氨酸-氢氧化钠缓冲液(pH 9.0)和100μL 45mmol/L pNPG在45℃条件下预热5分钟,加入100μL实施例2制备的发酵菌液,反应10分钟,加入2mol/L Na₂CO₃溶液2mL终止酶反应,再加入10mL蒸馏水混匀,取适量反应液加入比色皿中,在波长405nm处测定OD值,根据标准曲线测算葡萄糖苷酶活性。α-葡萄糖苷酶活力单位(U)定义为在最适反应条件下,每分钟催化1μmol底物pNPG转化为产物pNP所需的酶量。采用α-葡萄糖苷酶特征性引物agf:5'-ATGAAATTTTCAGACGGCTA-3',SEQ ID NO.3;和agr:5'-TTAGAAAAAATGAAGACATCCC-3',SEQ ID NO.4,扩增,并以菌株LZZT-001DNA为模板,进行PCR扩增反应,PCR反应程序为:95℃预变性5分钟,95℃变性30秒,54℃退火30秒,72℃延伸90秒,35个循环,72℃延伸10分钟,通过电泳检测得到约2.3kb大小的核苷酸片段,测序并将在NCBI GeneBank数据库运用Blast程序进行序列比对,获得该序列片段编码α-葡萄糖苷酶基因,其基因序列见SEQ ID NO.5。

[0035] 实施例4菌株LZZT001半乳糖苷酶活性检测及其相关基因序列

[0036] 在45℃预热2min后,取100μL实施例2制备的发酵菌液和100μL的pNPG溶液(10mmol/L)混合,相应温度下反应10min,加入800μL 0.5mol/L的Na₂CO₃溶液终止反应,混匀后取200μL加入到96孔板中,用酶标仪测波长405nm处吸光度值,代入预先用对硝基苯(pNP)测定的标准曲线回归方程,得出α-半乳糖苷酶的活力值。α-半乳糖苷酶活力定义:一定条件下,每分钟水解pNPG产生1μmol的pNP所需的酶量定义为1个α-半乳糖苷酶活力单位(U)。以半乳糖苷酶特异性引物galactosidase-F:5'-ATGGTCAAACCGTATCCCC-3',SEQ ID NO.6;和galactosidase-R:5'-CTAGGCTTTGCGGCTTCTC-3',SEQ ID NO.7;并以菌株LZZT-001DNA为模板,进行PCR扩增反应,PCR反应程序为:95℃预变性5分钟,95℃变性30秒,55℃退火45秒,72℃延伸90秒,35个循环,72℃延伸10分钟,通过电泳检测得到约2.0kb大小的核苷酸片段,测序并将在NCBI GeneBank数据库运用Blast程序进行序列比对,获得该序列片段编码半乳糖苷酶基因,其基因序列见SEQ ID NO.8。

[0037] 实施例5利用菌株LZZT-001菌剂固态发酵银杏叶制备高效饲料添加剂

[0038] 将30%粉碎后的银杏叶与60%麦麸、10%豆粕混匀;调节水分和增加孔隙度。反应器有效容积500升,堆料重200kg,碳氮比≈30,含水率为45-65%左右,有机物含量为60%左右。按3%的比例接种LZZT-001菌剂,采用强制通风好氧发酵技术,每隔1-2天翻堆1次,堆积发酵10-20天。堆积发酵后,翻堆于室温风干或至于60℃烘干,粉碎后采用筛分机筛分,包装获得银杏叶发酵微生物菌剂,作为饲料添加剂产品使用。

[0039] 实施例6饲料添加剂中银杏黄酮含量的检测

[0040] 从银杏叶发酵微生物菌剂中取样,每次称取1克,粉碎,用10ml无水乙醇提取(料液比1:10)2个小时,然后滤纸抽滤,并采用减压蒸馏方式浓缩样品,所得到的浓缩液过D101大

孔树脂进行吸附,接着用乙醇将黄酮物质从树脂上洗脱下来,减压蒸馏后所得浓缩样品用丁二醇溶解。采用HPLC法检测银杏黄酮,检测参数为:色谱柱为Intersil ODS-34.6×150mm;柱温为25℃;流速为1mL/min;流动相为甲醇:0.04mol/L磷酸(50:50,V/V);检测波长为360nm。以槲皮素、山柰素、异鼠李素为对照品。总黄酮=(槲皮素含量+山柰素含量+异鼠李素含量)×2.51,测得的银杏总黄酮含量在5.3-6.5mg/g之间。

[0041] 实施例7饲料添加剂中银杏黄酮苷元含量的检测

[0042] 从银杏叶发酵微生物菌剂中取样,每次称取1克,粉碎,用10ml无水乙醇提取(料液比1:10)2个小时,然后滤纸抽滤,并采用减压蒸馏方式浓缩样品,所得到的浓缩液过D101大孔树脂进行吸附,接着用乙醇将黄酮物质从树脂上洗脱下来,减压蒸馏后所得浓缩样品用丁二醇溶解。银杏黄酮苷高效液相色谱检测条件:以1%甲酸(A)和甲醇(B)为流动相进行梯度洗脱,洗脱顺序如表1所示,流速0.5mL/min,进样量5μL,柱温30℃,检测波长360nm,C18反相色谱柱(4μm,3.9mm×150mm)。

[0043] 表1银杏黄酮苷元液相检测梯度洗脱程序

[0044]

时间	1%甲酸	甲醇
0分钟	70%	30%
3分钟	65%	35%
9分钟	65%	35%
14分钟	60%	40%
16分钟	50%	50%
18分钟	35%	65%
20分钟	25%	75%
23分钟	0%	100%

[0045] 以银杏黄酮的主要成分芦丁的水解产物槲皮素为主要控制标准,在液相保留时间21.12分钟时出现槲皮素的洗脱峰时可以认为银杏黄酮通过固态发酵部分水解。

[0046] 实施例8发酵银杏饲料添加剂对育肥猪生长促进的应用

[0047] 将根据实施例5所述方法制备的银杏叶发酵微生物菌剂作为饲料添加剂分别以0.30-0.60%添加到基础日粮中,采用两组实验组和对照组饲喂生长猪,观察和记录其生长情况。饲喂对象选择体重在25kg左右的健康生长猪,共30头,将其随机分为3组,每组10头,分别给2组生长猪饲喂制备含有0.30-0.60%银杏叶发酵微生物菌剂饲料添加剂的饲料,另一组作为对照,饲喂不添加银杏叶发酵微生物菌剂饲料添加剂的饲料,饲喂时间为21天。试验期间保持各组猪的饲养环境一致,采食、饮水等都保持一致,每天对各组猪进行空腹称重,计算各组猪的平均日增重和腹泻率。试验结果如表2所示。

[0048]

组别	初重(kg/头)	末重(kg/头)	日增重(g/头)	腹泻率/%
实验组1	25.34	44.01	889.05	1.01
实验组2	25.23	43.89	888.57	2.32
对照组	25.16	42.10	806.67	10.53

[0049] 表2中的初重与末重为试验第一天和最后一天各组猪的平均体重,日增重和日采食量为各组猪每天、每头的平均增重量和平均采食量。由试验结果可见,本发明各实施例制备的生长猪饲料均显著降低了生长猪的腹泻率($P < 0.05$),实验组生长猪的日增重显著高

于对照组 ($P < 0.05$), 证明本发明添加银杏叶发酵微生物菌剂作为饲料添加剂的生长猪饲料能够显著减少猪只腹泻的情况, 有利于提高猪只的抗病能力和消化吸收率, 促进猪只生长。

[0050] 对所公开的实施例的上述说明, 使本领域专业技术人员能够实现或使用本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的专业技术人员来说将是显而易见的, 本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下, 在其它实施例中实现。因此, 本发明将不会被限制于本文所示的这些实施例, 而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 泸州正泰生物工程有限公司
- [0003] <120> 一株耐热地衣芽孢杆菌及其应用
- [0004] <160> 8
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 20
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> Artificial Sequence
- [0010] <400> 1
- [0011] agagtttgat cctggctcag 20
- [0012] <210> 2
- [0013] <211> 19
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> Artificial Sequence
- [0016] <400> 2
- [0017] ggttaccttg ttacgactt 19
- [0018] <210> 3
- [0019] <211> 20
- [0020] <212> DNA
- [0021] <213> Artificial Sequence
- [0022] <400> 3
- [0023] atgaaatddd cagacggcta 20
- [0024] <210> 4
- [0025] <211> 23
- [0026] <212> DNA
- [0027] <213> Artificial Sequence
- [0028] <400> 4
- [0029] ttagaaaaaa atgaagacat ccc 23
- [0030] <210> 5
- [0031] <211> 2310
- [0032] <212> DNA
- [0033] <213> Artificial Sequence
- [0034] <400> 5
- [0035] atgaaatddd cagacggcta ctggctgacg cgcgaaggat atcacatcaa cacgccaaaa 60
- [0036] gaagcctacg accgaatgat tgatcagcaa tcattgactg tatacgggcc tgtcaaagcg 120
- [0037] gttcaaaaagc gcggggacac gctggacacc cgcgatgctca ccgtcagatt ttcgagtcct 180
- [0038] cttgaagacg tgatccgtgt gcaagtgtcc cattttcaag gggaaacgcc tcgcaagccc 240
- [0039] gagtttcagc tggatatgac agacgttgag ccggttatct ccgaacaaga tgatgcgctg 300
- [0040] accttccaaa gcggcagcct gtgcgttgag gtgagcaaaa gcggttggcg ctaccaattt 360
- [0041] tcacgtgatg gacagagcct gaccgcaagc gaatcgaata gcctcgccta taccagcagc 420

[0042]	aatgacgggc gcacctttat gagggaacag ctcaacatcg gcgtcggcga attgatctac	480
[0043]	ggtctcggcg agcgttttac ggcattcgtg aaaaacggcc aaaccgtaga catctggaat	540
[0044]	caggacggcg gcacaagcac ggagcaggcg tataaaaaatg tgccgttcta tttgtcaaac	600
[0045]	aaagggtacg gtgtttttgt caatcatccc gagctcgttt cgtatgaaat cggttctgaa	660
[0046]	gtcgtatcca aagcgcagtt ttcggtcga ggggaaacgc ttgactatth tatcatcagc	720
[0047]	ggtgctgaac cgaaggatgt tttgaaacgc tatgcgtcgt taacgggaaa accggcgctt	780
[0048]	ccccggcct ggtctttcgg cctctggtg tccacatcgt ttacaaccga ctattctgag	840
[0049]	gaaaccgtga cccgtttcat cgacgggatg accgaacgc gcaccccgt cagcgtgttt	900
[0050]	cattttgact gcttctggat gaaagaatth gaatggtgca atttcgaatg ggatgaacga	960
[0051]	tattttaagc agcctgaagc tatgctcagc cgcctgaaag ataaggggtt gaaaatatgc	1020
[0052]	gtctggatca acccttacct cgcccaaaaa tcgaagcttt ttcaggaagg aaaagaacac	1080
[0053]	ggctactttt taaaaaacag ccgggggatg gtgtggcagt gggaccggtg gcaggccggc	1140
[0054]	atggcaatcg tcgacttca caatcgaaaa gcgcgtgact ggtattgttc aaaacttgaa	1200
[0055]	agcctgctcg acatggcgt cgactgttc aagaccgatt tcggagaacg gattccgaga	1260
[0056]	gacgcggttt actttgacgg atcagacccc gacagaatgc acaattatta ttcctttta	1320
[0057]	tacaacaaaa ccgtatttga cctgttgaag caaaagcgc gcgaacggga agcggctcgtg	1380
[0058]	tttgaaggt cggcgacggc cggaggccag caatttccc tacactggg cggggattgt	1440
[0059]	tttgccagct atgattcaat ggctgaaagc cttcgcggcg gcctgtcgt ttcctttca	1500
[0060]	ggcttcggct tctggagcca cgatatcggc ggatttgaaa gcacggcaac agccgattg	1560
[0061]	tataagcgt ggaccgatt cggcctctt tcgacgcaca gccgctgca cgggagcga	1620
[0062]	tcatatcggc ttccgtggt gtttgacga gaagcggcc atgtgatgc gtattttgtc	1680
[0063]	aaactgaagc acaggctgat gccttattg tacgccgcc cgcataagc gcacgctgaa	1740
[0064]	ggcattccga tgatgcggc gatgctctc gaatttccc gggacaacac ttgccactgg	1800
[0065]	cttgacagac agtacctgct cggcgggaaga ctctctcgc ctcccgttt tcaggaagac	1860
[0066]	ggcgttgcc gttattatth gccaaaagc acctggacac accttttgac gggaaaagag	1920
[0067]	acggaaggcg gagaatgaa agaagaacag tacgggtata tggggcttc cctgttcgtc	1980
[0068]	agggaaaata cgctgctgcc gctcggcag gaatccggc gacctgatta tgattatctc	2040
[0069]	gacggtgta cgttctgcct ttaccaatta aaagacggc gcacagccga acagacgatt	2100
[0070]	tacaatgaaa agtgcgaagc aatgacagc agagcttca ggcatgaaa tacgattact	2160
[0071]	gtgaaaaca caggcgtcca aaagaaatg aagctgctc tccgcgatct gtctgtcact	2220
[0072]	tctgtcataa acggcgcagc ggaagcgtt caggaggaa cagcaattca gccaaaagaa	2280
[0073]	aaggaccggg atgtcttcat tttttctaa	2310
[0074]	<210>	6
[0075]	<211>	20
[0076]	<212>	DNA
[0077]	<213>	Artificial Sequence
[0078]	<400>	6
[0079]	atggtcaaac cgtatcccc	20
[0080]	<210>	7
[0081]	<211>	19
[0082]	<212>	DNA
[0083]	<213>	Artificial Sequence

[0084] <400> 7
 [0085] ctaggctttg cggettctc 19
 [0086] <210> 8
 [0087] <211> 2073
 [0088] <212> DNA
 [0089] <213> Artificial Sequence
 [0090] <400> 8
 [0091] atggtcaaac cgtatcccc gatcagccgg aaagttcccc gactattgca tggagccgat 60
 [0092] tacaacctg atcaatggct taaatatccg gacgttttaa aagaagatat ccgcctgatg 120
 [0093] aagctgtccc gctgcaatgt gatgtctgtc ggcattttct catgggttcc gctcagacct 180
 [0094] gaagaaggaa gttttacatt tgattggctc gatcaggttc ttgatacttt caaggaaaac 240
 [0095] ggaatttatg cgttcttggc tacaccgagc ggtgccagac cggcttggat gtccaaaaag 300
 [0096] tatcccagg tgctgagaac ggagcgcaac cggatcagaa accttcacgg aaagcggcac 360
 [0097] aatcattgct atacgtgcc tgtctaccgc aggaaaacgg cgattataaa cggaaggctt 420
 [0098] gcggagcgt atgcgcatca cccggctgtc atcggctgac atatctccaa tgaatacggc 480
 [0099] ggagagtgtc attgtgaact ttgccaagat aagttcagag agtggctgct cgcgaaatat 540
 [0100] aaaacgctgg accgccttaa ccatgcatgg tggacatcgt tttggagcca cacctataca 600
 [0101] gattgggacg agatcgagtc gccggctccg cacggcgagg atgccgttca cggcttgaat 660
 [0102] ttggactgga agcggtttgt cacagatcag acggttgatt tttgccgca tgaaatgcc 720
 [0103] catgtccgtt cttttaacct tgaactgcc gtgacgacga attttatggg aacgtatgcc 780
 [0104] ggattgaatt attggaagt tgcgatttg cttgatgtca tctcgtggga ttcttatccg 840
 [0105] gcatggcaca acagccggca ggaagacagc cggcttggag ccgatattgc ttttgttcat 900
 [0106] gatacaatc ggtctcttaa aggcggccgg ccgttcatgc tgatggaaag tacgccgagc 960
 [0107] atgacgaact ggcaggacgt cagcaagctg aagcgcgccg gtatgcacga attgtcatca 1020
 [0108] ttacaggcag tcgctcacgg atcggacact gttcagtatt ttcaatggcg gaaaagccgc 1080
 [0109] ggctcaagcg aaaagtttca tggggcagtc gttgatcatg cgggatcaga gcatacgcgc 1140
 [0110] gtttccagg aagtaaaaa acttggggaa aagctcгаа aacttgagga tgcgcagga 1200
 [0111] acgacagtcg aaccgaggc cgcgattata tttgactggg agaatcgtg ggccttggaa 1260
 [0112] gacgcccaag gtccgcgcaa tatcgcatg cattatgaac ggacagccaa atcgttttat 1320
 [0113] gaaccgtttt ggcgtgaagg tgtaccggtt gatgtgattc atatggagc cgatttctcc 1380
 [0114] cgctataagc ttttggctgc cccgatgctc tacatgctga aagaaggcac cgccgaaagg 1440
 [0115] attgaacagt tcgttcaaaa aggggttaca tttgtcgcca cttattggtc gggcattgtc 1500
 [0116] aatgagaatg atcttgtgtt cttgggaggg tttcctggag gcttaagaaa aacgctcggc 1560
 [0117] atttgtctg aggagatcga tgcgcttcat gacggacaga aaaatacgat tgtgctggat 1620
 [0118] gcagataacc ggctcgggtt aagcgggagc tatgaaacca gcgagctttg cgacctgatt 1680
 [0119] cattagaag gagccgaagc gctcgtctg tacggggaag atttttacgc gggctcggcc 1740
 [0120] gcgctgacgg tcaatttgtt cggagacggg aaggcctact atatcgttc aaggaatgag 1800
 [0121] gcggcgttcc aagaggcgtt tatatcgagg ctcatgaaag agtgcgggat tgccaaagt 1860
 [0122] ctgatacag agcttccgaa aggcgtcacc gccagctcc gcacagacgg ccgccacgat 1920
 [0123] tatatttctg tgatgaattt tacagcggaa aaccgcacgg tctcgttcc ggaagaaca 1980
 [0124] tatacggacg tcttaaaagg aaccggaaa aaaggcgtc tcaaactggt tccatacgg 2040
 [0125] acgagcattt tgcggagaag ccgcaaagcc tag 2073

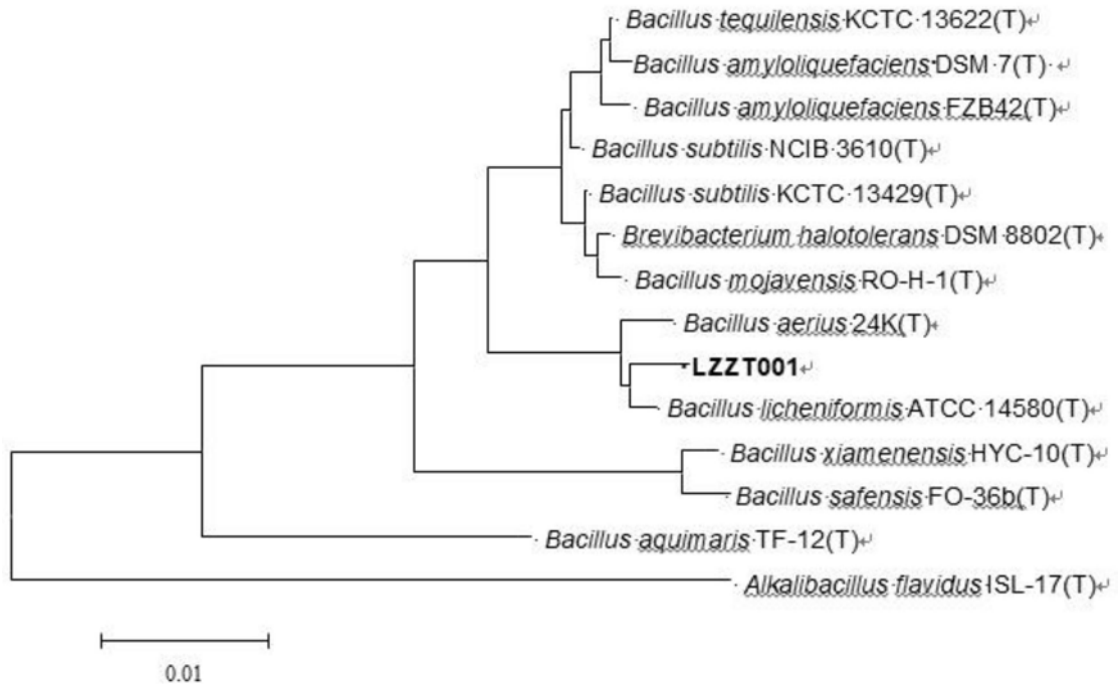


图1

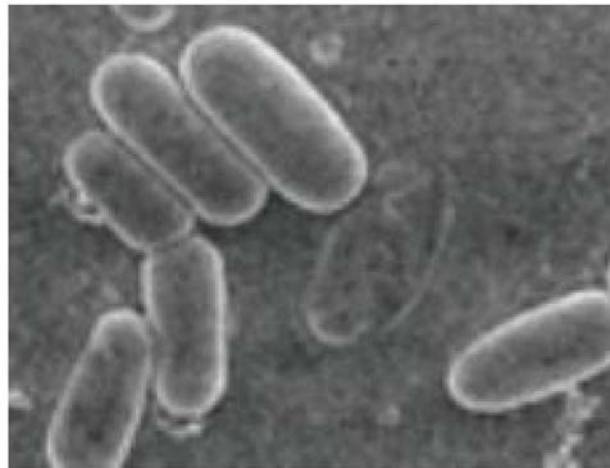


图2