[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12P 13/04
C12N 15/52
C12N 1/21
//(C12P13/04,C12R1:15)

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510054124.9

[43] 公开日 2005 年 10 月 12 日

[11] 公开号 CN 1680564A

[22] 申请日 2005.3.9
[21] 申请号 200510054124.9
[30] 优先权
[32] 2004.3.9 [33] DE [31] 102004011248.7
[71] 申请人 德古萨股份公司
地址 联邦德国杜塞尔多夫市
[72] 发明人 布丽吉特·巴瑟
[74] 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 林晓红
权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 1 页

[54] 发明名称 利用棒状杆菌生产 L-氨基酸的方法

[57] 摘要

本发明涉及生产 L-氨基酸的方法，其中进行了以下步骤：a)对产生所需 L-氨基酸的棒状杆菌进行发酵，所述棒状杆菌中至少编码转录调节子 TipA 的基因被弱化，b)浓缩培养基或细菌细胞中的所需 L-氨基酸，以及 c)分离该 L-氨基酸，并且任选地，所用的细菌中的所需 L-氨基酸的生物合成途径的其它基因被额外增强，或所用的细菌中的使所需 L-氨基酸形成减少的代谢途径至少部分被排除。

ISSN1008-4274

1. 通过发酵棒状杆菌生产 L-氨基酸的方法，其特征在于所用的细菌中的编码转录调节子 TipA 的核苷酸序列 (tipA) 被弱化，特别是被排除或以低水平表达。

2. 权利要求 1 的方法，其特征在于生产 L-赖氨酸。

3. 生产 L-氨基酸、特别是 L-赖氨酸的方法，其特征在于进行以下步骤：

a) 对产生所需 L-氨基酸的棒状杆菌进行发酵，该细菌中至少编码转录调节子 TipA 的基因被弱化；

b) 浓缩培养基或细菌细胞内的所需产物；以及

c) 分离所需的 L-氨基酸，其中在终产物中任选部分或全部地残留有发酵液和/或生物量的组分。

4. 权利要求 1 或 3 的方法，其特征在于所用的细菌中所需 L-氨基酸的生物合成途径中的其它基因被额外增强。

5. 权利要求 1 或 3 的方法，其特征在于所用的细菌中使所需 L-氨基酸形成减少的代谢途径至少部分被排除。

6. 权利要求 1 或 3 的方法，其特征在于编码转录调节子 TipA 的多核苷酸的表达被降低。

7. 权利要求 1 或 3 的方法，其特征在于由转录调节子 TipA 的核苷酸序列 (tipA) 所编码的多肽 (酶蛋白) 的调节性能被降低。

8. 权利要求 1 或 3 的方法，其特征在于，为了生产 L-赖氨酸，所发酵的棒状微生物中同时有选自以下组中的一或多个基因被增强，特别是被过表达：

8.1 编码具有反馈抗性的天冬氨酸激酶的 lysC 基因，

8.2 编码赖氨酸输出蛋白的 lysE 基因，

8.3 编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶的 gap 基因，

8.4 编码丙酮酸羧化酶的 pyc 基因，

8.5 编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的 zwf 基因，

8.6 编码苹果酸：醌氧化还原酶的 mqo 基因，

8.7 编码 Zwa1 蛋白的 zwa1 基因，

8.8 编码磷酸丙糖异构酶的 tpi 基因，

8.9 编码 3-磷酸甘油酸激酶的 pgk 基因，

8.10 编码二氢吡啶二羧酸合酶的 dapA 基因。

9. 权利要求 1 或 3 的方法，其特征在于，为了生产 L-氨基酸，所发酵的棒状微生物中同时有选自以下组中的一或多个基因被弱化：

9.1 编码分解代谢物调控蛋白 A 的 ccpA1 基因，

9.2 编码磷酸烯醇丙酮酸羧激酶的 pck 基因，

9.3 编码葡萄糖-6-磷酸异构酶的 pgi 基因，

9.4 编码丙酮酸氧化酶的 poxB 基因，

9.5 编码果糖二磷酸醛缩酶的 fda 基因，或

9.6 编码 Zwa2 蛋白的 zwa2 基因。

10. 权利要求 1 到 9 中任一项的方法，其特征在于使用谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 菌种的微生物。

11. 棒状杆菌，其中至少编码转录调节子 TipA 的基因以弱化形式存在。

利用棒状杆菌生产 L-氨基酸的方法

技术领域

本发明提供了一种利用棒状杆菌 (Coryneform bacteria) 生产 L-氨基酸的方法、特别是生产 L-赖氨酸的方法，其中所述棒状杆菌中编码转录调节子 TipA 的 tipA 基因已经被弱化。

背景技术

L-氨基酸，特别是 L-赖氨酸已经被非常广泛地应用于人体医学、药品工业、食品工业以及动物饲料中。

已知通过发酵棒状杆菌菌株，特别是谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 可以生产氨基酸。因为它们的极为重要性，一直进行着改进生产方法的研究。对方法的改进可以涉及与发酵相关的措施，例如搅拌和氧供、或者培养基的组成、例如发酵过程中的糖浓度、或例如通过离子交换层析对产品形式的处理、或微生物本身的内在性能特点。

为了改进这些微生物的性能特点，使用了诱变、选择和突变体选择的方法。这些方法生成了具有抗抗代谢物 (例如赖氨酸类似物 S-(2-氨甲基)-半胱氨酸) 的抗性的、或对在调节上是具有重要意义的代谢物是营养缺陷型的、并产生 L-氨基酸的菌株。

这些年来，也已经利用重组 DNA 技术的方法通过扩增单个氨基酸生物合成基因以及研究对 L-氨基酸生成的影响来改进谷氨酸棒杆菌的产 L-氨基酸的菌株。

发明内容

发明者自我设定的目的是，为改进利用棒状杆菌经发酵生产 L-氨基酸，特别是 L-赖氨酸的方法提供新的基础。

本发明提供了一种利用棒状杆菌生产 L-氨基酸的方法，所述棒状杆菌中至少编码转录调节子 TipA 的核苷酸序列被弱化，特别是被排除或以低水平表达。

本发明进一步提供了一种生产 L-氨基酸的方法，其中进行了以下步骤：

a) 对产生 L-氨基酸的棒状杆菌进行发酵，所述棒状杆菌中至少编码转录调节子 TipA 的核苷酸序列被弱化，特别是被排除或以低水平表达；

b) 浓缩培养基或细菌细胞内的 L-氨基酸；以及

c) 分离所需的 L-氨基酸，其中在终产物中任选部分或全部地残留有发酵液和/或生物量的组分。

所用的棒状杆菌优选在编码转录调节子 TipA 的 tipA 基因被弱化之前已经能够产生 L-氨基酸，特别是 L-赖氨酸。

附图说明

图 1： 质粒 pCR2.1tipAint 的图谱

当数值代表着碱基对的数目时，数值是在测定结果的可重复性范围内所得到的近似数值。

所用的缩写和名称有以下意义：

KmR:	耐卡那霉素基因
EcoRI:	限制性内切酶 EcoRI 的切割位点
tipAint:	*tipA* 基因的内在片段
ColE1:	质粒 ColE1 的复制起始点

具体实施方式

已经发现在编码转录调节子 TipA 的 tipA 基因被弱化后，提高了棒状杆菌产生 L-氨基酸、特别是 L-赖氨酸的能力。

转录调节子是能通过所谓的螺旋-转角-螺旋基序的特殊蛋白结构与 DNA 结合的那些蛋白，并因此能增强或弱化其它基因的转录。已经发现谷氨酸棒杆菌的转录调节子 TipA 的功能是抑制对 L-氨基酸的生物合成、特别是 L-赖氨酸的生物合成中所涉及到的基因。弱化转录调节子 TipA 能提高相应的棒状杆菌对 L-赖氨酸的合成。

在专利申请 EP1108790 中可找到编码谷氨酸棒杆菌的转录调节子 TipA 的基因的核苷酸序列，它们是序列 no.2871 和序列 no.7068。

核苷酸序列也已经被储存于国立医学图书馆 (Bethesda, MD, USA) 的国立生物技术信息中心 (NCBI) 的数据库中，编号为 AX122955 和 AX127152。

根据本发明可使用在所引用的参考文献中所描述的编码转录调节子 TipA 的序列。也可以使用转录调节子 TipA 的等位基因，它们是由遗传密码子的简并或无功能改变的有义突变所形成的。

下面所提及的任何 L-氨基酸或氨基酸指的是一种或多种氨基酸，包括它们的盐，这些氨基酸选自 L-天冬酰胺、L-苏氨酸、L-丝氨酸、L-谷氨酸、L-甘氨酸、L-丙氨酸、L-半胱氨酸、L-缬氨酸、L-甲硫氨酸、L-异亮氨酸、L-亮氨酸、L-酪氨酸、L-苯丙氨酸、L-组氨酸、L-赖氨酸、L-色氨酸和 L-精氨酸。L-赖氨酸是特别优选的。

下面所提及的任何 L-赖氨酸或赖氨酸指的不仅是碱还是盐，例如赖氨酸盐酸盐或赖氨酸硫酸盐。

在权利要求书中可找到优选的具体实施方案。

名词“弱化”在本文中指的是通过例如使用弱启动子或使用编码低水平活性的相应酶的基因或等位基因，或通过使得相应的基因或酶 (蛋白)

失活，以及这些措施的任意组合来降低或排除微生物内相应 DNA 所编码的一种或多种酶 (蛋白) 的细胞内活性。

通过弱化措施，相应蛋白的活性或浓度通常被降低到野生型蛋白的活性或浓度、或初始微生物内蛋白的活性或浓度的 0 到 75%, 0 到 50%、0 到 25%、0 到 10%或 0 到 5%。

通过 1 维和 2 维蛋白凝胶分离以及随后用相应的评估软件对凝胶上的蛋白浓度的光学识别可以测定出蛋白浓度的降低。对棒状杆菌而言，制备蛋白凝胶以及识别蛋白的常用方法是 Hermann 等 (Electrophoresis，22：1712-23 (2001)) 所描述的方法。

通过利用针对所测定蛋白的特异抗体的 Western 印迹杂交 (Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) 以及随后利用适当的浓度测定软件的光学评估 (Lohaus and Meyer (1998) Biospektrum 5:32-39; Lottspeich (1999) Angewandte Chemie 111:2630-2647) 也可以分析蛋白浓度。通过 DNA 条带迁移测定法 (也被称为凝胶阻留法) 可以测定出 DNA 结合蛋白的活性 (Wilson *et al.* (2001) Journal of Bacteriology 183:2151-2155)。利用各种已被很好描述的报告子基因测定法 (Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) 可以测定出 DNA 结合蛋白对其它基因表达的影响。

本发明所提供的微生物能从葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、糖蜜、淀粉 、纤维素或从甘油和乙醇生成氨基酸。它们可以是棒状杆菌的代表菌属，特别是棒状杆菌属 (genus Corynebacterium)。对于棒状杆菌属而言，特别要提及的是它的谷氨酸棒状杆菌种，本领域人员已知它的产生 L-氨基酸的能力。

棒状杆菌属的适宜菌株，特别是谷氨酸棒杆菌的适宜菌株具体的是已知的野生型菌株

谷氨酸棒杆菌 ATCC13032

醋谷棒杆菌 (*Corynebacterium acetoglutamicum*) ATCC15806

嗜乙酰乙酸棒杆菌 (*Corynebacterium acetoacidophilum*) ATCC13870

Corynebacterium melassecola ATCC17965

Corynebacterium thermoaminogenes FERM BP-1539

黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) ATCC14067

乳发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869 和

百合花棒杆菌 (*Brevibacterium divaricatum*) ATCC14020，

以及由它们所生成的产 L-氨基酸的突变体及菌株，例如产 L-赖氨酸的菌株

谷氨酸棒杆菌 FERM-P 1709

黄色短杆菌 FERM-P 1708

乳发酵短杆菌 FERM-P 1712

谷氨酸棒杆菌 FERM-P 6463

谷氨酸棒杆菌 FERM-P 6464 以及

谷氨酸棒杆菌 DSM 5715。

为了实现弱化，编码转录调节子 TipA 的基因或基因产物的调节性能都可以被降低或排除。可以任意组合这两种措施。

通过进行适当方式的培养或通过对基因表达的信号结构的遗传学改变 (突变) 可以降低基因表达。基因表达的信号结构例如是抑制基因、活化基因、操纵子、弱化子、核糖体结合位点、起始密码子和终止子。本领域人员将在例如专利申请 WO 96/15246、Boyd 和 Murphy (Journal of Bacteriology 170: 5949 (1988))、Voskuil 和 Chambliss (Nucleic Acids Research 26: 3548 (1998)、Jensen 和 Hammer (Biotechnology and Bioengineering 58: 191 (1998))、Pátek 等 (Microbiology 142: 1297 (1996))

以及熟知的遗传学及分子生物学教科书、例如 Knippers 的教科书 ("Molekulare Genetik", 6th edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1995) 或 Winnacker 的教科书 ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1990) 中找到相关信息。

特异地降低基因表达的另一种方法是反义技术，其中将短脱氧寡核苷酸或载体引入到靶细胞内，以合成更长的反义 RNA。反义 RNA 能与特定的 mRNA 的互补部分结合并降低它们的稳定性或阻断它们的转录能力。本领域人员将在 Srivastava 等 (Applied Environmental Microbiology 2000 Oct; 66 (10): 4366-4371) 中找到实例。

从现有技术中已知能导致酶蛋白的催化性能改变或降低的突变，可提及的实例包括 Qiu 和 Goodman (Journal of Biological Chemistry 272: 8611-8617 (1997)) 、 Sugimoto 等 (Bioscience Biotechnology and Biochemistry 61: 1760-1762 (1997))以及 Möckel ("Die Threonindehydratase aus Corynebacterium glutamicum: Aufhebung der allosterischen Regulation und Struktur des Enzyms", Berichte des Forschungszentrums Jülich, Jül-2906, ISSN09442952, Jülich, Germany, 1994) 的研究。在已知的遗传学和分子生物学教科书中可以找到摘要，例如 Hagemann 的教科书 ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986)。

突变可以是转换、颠换、插入和缺失。依赖于氨基酸取代对酶活性的影响，可以使用名词反义突变或无义突变。基因中的至少一个碱基对的插入或缺失将导致移码突变，这将造成不正确的氨基酸被掺入或翻译被过早地中断。一些密码子的缺失通常造成酶活性的完全丧失。对生成这些突变的说明形成了现有技术的一部分并能在遗传学和分子生物学教科书中找到，例如 Knippers 的教科书 ("Molekulare Genetik", 6th edition, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, Germany, 1995)、Winnacker 的教科书 ("Gene und Klone", VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, Germany, 1990) 或

Hagemann 的教科书 ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986)。

使得谷氨酸棒杆菌的基因产生突变的常用方法是 Schwarzer 和 Pühler (Bio/Technology 9, 84–87 (1991)) 所描述的基因打断和基因取代的方法。

在基因打断的方法中，将目标基因的编码区的中心部分克隆到能在宿主 (常为大肠杆菌) 中但不能在谷氨酸棒杆菌中被复制的质粒载体中。适宜的载体为例如 pSUP301 (Simon *et al.*, Bio/Technology 1, 784-791 (1983))、pK18mob 或 pK19mob (Schäfer *et al.*, Gene 145, 69-73 (1994))、pK18mobsacB 或 pK19mobsacB (Jäger *et al.*, Journal of Bacteriology 174: 5462-65 (1992))、pGEM-T (Promega corporation, Madison, WI, USA)、pCR2.1-TOPO (Shuman (1994). Journal of Biological Chemistry 269:32678-84; US Patent 5,487,993)、pCR®Blunt (Invitrogen, Groningen, Netherlands; Bernard *et al.*, Journal of Molecular Biology, 234: 534-541 (1993)) 或 pEM1 (Schrumpf *et al.*, 1991, Journal of Bacteriology 173:4510-4516)。然后将含有基因的表达区域的中心部分的质粒载体通过接合或转化转移到所需的谷氨酸棒杆菌菌株中。例如在 Schäfer 等 (Applied and Environmental Microbiology 60, 756-759 (1994)) 中描述了接合的方法。例如在 Thierbach 等 (Applied Microbiology and Biotechnology 29, 356-362 (1988))、Dunican 和 Shivnan (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) 以及 Tauch 等 (FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) 中描述了转化的方法。经发生交叉互换的同源重组后，载体序列打断了目标基因的编码区域，得到了两个相应地缺少 3'及 5'末端的不完全的等位基因。例如 Fitzpatrick 等 (Applied Microbiology and Biotechnology 42, 575-580 (1994)) 已经用这个方法排除了谷氨酸棒杆菌的 recA 基因。

在基因取代方法中，在体外生成目标基因的突变，例如缺失、插入或碱基取代。将所形成的等位基因依次地克隆到不能在谷氨酸棒杆菌中

复制的载体中，然后通过转化或接合将载体转移到所需的谷氨酸棒杆菌宿主中。经实现整合的第一次交叉互换以及实现靶基因或靶序列内切割的适宜的第二次交叉互换的同源重组后，获得突变或等位基因的组合。例如 Peters-Wendisch 等 (Microbiology 144, 915-927 (1998)) 已经用这个方法通过缺失来排除谷氨酸棒杆菌的 pyc 基因。

通过这个方法将缺失、插入或碱基取代组合到编码转录调节子 TipA 的基因中是有可能的。

除了弱化编码转录调节子 TipA 的基因外，增强特别是过表达目标生物合成途径、糖酵解、补缺途径、三羧酸循环、戊糖磷酸循环、氨基酸输出中的一种或多种酶以及任选地调节蛋白，对于 L-氨基酸的生产也是有利的。

名词“强化”或“增强”在本文中指的是通过例如增加基因或基因群的拷贝数目、使用强启动子或编码高水平活性的相应酶或蛋白的基因、以及这些措施的任意组合来增强微生物内的相应 DNA 所编码的一种或多种酶或蛋白的细胞内活性。

相对于野生型蛋白的活性或浓度或相对于起始微生物内的蛋白的活性或浓度，通过强化措施特别是过表达措施，相应蛋白的活性或浓度通常至少增加到 10%、25%、50%、75%、100%、150%、200%、300%、400%或 500%，最大到 1000%或 2000%。

通常优选使用内源性基因。术语“内源性基因”或“内源性核苷酸序列”被理解为指的是在一个物种的群体中所存在的基因或核苷酸序列。

因此，对于 L-赖氨酸的合成，除了弱化编码转录调节子 TipA 的基因外，也可增强特别是过表达选自以下组的一种或多种基因：

- 编码反馈抗性天冬氨酸激酶的 lysC 基因 (编号 No. P26512，EP-B-0387527；EP-A-0699759；WO 00/63388)，
- 同时，编码赖氨酸输出蛋白的 lysE 基因 (DE-A-195 48 222)，

- 编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶的 gap 基因 (Eikmanns (1992). Journal of Bacteriology 174:6076-6086)，
- 编码丙酮酸羧化酶的 pyc 基因(EP-A-1083225)，
- 编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的 zwf 基因 (JP-A-09224661, WO 01/70995)，
- 编码苹果酸：醌氧化还原酶的 mqo 基因 (Molenaar *et al.*, European Journal of Biochemistry 254, 395-403 (1998); EP-A-1038969)，
- 编码 Zwa1 蛋白的 zwa1 基因 (DE: 19959328.0, DSM 13115; EP-A-1111062)，
- 编码磷酸丙糖异构酶的 tpi 基因 (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086)，
- 编码 3-磷酸甘油酸激酶的 pgk 基因 (Eikmanns (1992), Journal of Bacteriology 174:6076-6086)，
- 编码二氢吡啶二羧酸合酶 (dihydrodipicolinate synthase) 的 dapA 基因 (EP-B 0 197 335)。

除了弱化编码转录调节子 TipA 的基因外，同时弱化特别是降低一种或多种选自以下一组的基因的表达对于氨基酸的合成、特别是 L-赖氨酸的合成也可能是有利的：

- 编码分解代谢物调控蛋白 A 的 ccpA1 基因 (EP1311685)，
- 编码磷酸烯醇丙酮酸羧激酶的 pck 基因 (DSM 13047, EP-A-1094111)，
- 编码葡萄糖-6-磷酸异构酶的 pgi 基因 (DSM 12969, EP-A-1087015, WO 01/07626)，
- 编码丙酮酸氧化酶的 poxB 基因 (DSM 13114, EP-A-1096013)，

- 编码果糖二磷酸醛缩酶的 fda 基因 (Mol. Microbiol. 3 (11), 1625-1637 (1989); ACCESSION Number X17313)，
- 编码 Zwa2 蛋白的 zwa2 基因 (DSM 13113, EP-A-1106693)。

最后，除了弱化编码转录调节子 TipA 的基因外，去除不必要的继发反应对于氨基酸的合成可能是有利的 (Nakayama: "Breeding of Amino Acid Producing Microorganisms"，in: Overproduction of Microbial Products, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (eds.), Academic Press, London, UK, 1982)。

本发明也提供了根据本发明所生成的微生物，为了合成 L-氨基酸的目的，通过分批法或通过补料分批或重复补料分批法可以连续地或不连续地生成微生物。在 Chmiel 的教科书 (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag，Stuttgart, 1991)) 或 Storhas 的教科书 (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) 中都描述了已知的培养方法的概述。

所用的培养基必须以适当的形式符合目标菌株的要求。在美国细菌学学会的手册“Manual of Methods for General Bacteriology” (Washington D.C., USA, 1981) 中可以找到各种微生物的培养基的叙述。

糖和碳水化合物例如葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、糖蜜、淀粉和纤维素，油和脂肪例如豆油、葵花油、花生油和椰子油，脂肪酸例如棕榈油、硬脂酸和亚油酸，醇例如甘油和乙醇，以及有机酸例如乙酸都可以作为碳源。可以单独或以混合物的形式使用这些物质。

有机含氮化合物例如蛋白胨、酵母浸膏、肉浸膏、麦精浸膏、玉米浸液、豆粉和尿素，或无机化合物例如硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵和硝酸铵都可以作为氮源。可以单独地或以混合物的形式使用氮源。

可以用做为磷源的是磷酸、磷酸二氢钾或磷酸氢二钾或相应的含钠的盐。培养基也必须包含金属，例如硫酸镁或硫酸铁，它们对于生长是必需的。最后除了上述的物质外，还可以使用必需生长物质，例如氨基

酸和维生素。可以单次将所述的物质加入到培养基中，或在培养期间适当地补料这些物质。

为了控制培养基的 pH 值，恰当地使用碱性化合物例如氢氧化钠、氢氧化钾、氨或氨水，或酸性化合物例如磷酸或硫酸。为了控制泡沫的发生，可以使用消泡剂例如脂肪酸聚乙二醇酯。为了保持质粒的稳定性，可以将具有选择活性的适宜物质例如抗生素加入到培养基中。为了保持有氧条件，可将氧气或含有氧气的气体混合物例如空气引入到培养基中。培养温度通常是从 20°C 到 45°C，以及优选的从 25°C 到 40°C。持续培养直到已经形成最大量的所需产物。通常在从 10 个小时到 160 个小时的间期内实现这个目标。

从现有技术中可知测定 L-氨基酸的方法。可以如在 Spackman 等 (Analytical Chemistry, 30, (1958), 1190) 中所描述的利用阴离子交换层析以及随后的水合茚三酮衍生作用进行分析，或可以通过如在 Lindroth 等 (Analytical Chemistry (1979) 51: 1167-1174) 中所描述的反相 HPLC 进行分析。

根据布达佩斯条约，将以下微生物以纯培养物的形式于 2002 年 2 月 15 日储存于德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ, Braunschweig, Germany)：

- 大肠杆菌 (Escherichia coli) Top10/pCR2.1tipAint，编号为 DSM 14816。

下面以实施例的方式更具体地描述本发明。

实施例 1. 制备用于 tipA 基因的整合诱变的整合载体

通过 Eikmanns 等 (Microbiology 140: 1817–1828 (1994)) 的方法从 ATCC 13032 菌株中分离得到染色体 DNA。

根据谷氨酸棒杆菌的 tipA 基因的已知序列，选择以下的寡核苷酸用于聚合酶链反应：

tipA-int1：

5' CGC CTT TAC ACA GAA GAC G 3'

tipA-int2：

5' GTG TAC CAC TGA CCG ATG C 3'

用 MWG Biotech (Ebersberg, Germany) 合成所示的引物，根据 Innis 等 (PCR Protocols. A Guide to Methods and Applications, 1990, Academic Press) 的标准 PCR 方法，利用 Boehringer Mannheim (Germany, product description Taq DNA polymerase, Product No. 1 146 165) 的 Taq 聚合酶进行 PCR 反应。在聚合酶链反应的帮助下，引物容许扩增具有 482 个碱基对的 tipA 基因的内在片段。通过 0.8%琼脂糖凝胶电泳研究所扩增的产物。

利用 Invitrogen 公司的 TOPO TA 克隆试剂盒 (Carlsbad, CA, USA; Catalog Number K4500-01) 将所扩增的 DNA 片段连接到载体 pCR2.1-TOPO (Mead *et al.* (1991), Bio/Technology 9:657-663) 上。

然后用连接产物电穿孔转化大肠杆菌菌株 TOP10 (Hanahan, in: DNA Cloning. A practical approach. Vol. I. IRL-Press, Oxford, Washington DC, USA, 1985)。通过将转化产物平板培养在加有 50mg/l 卡那霉素的 LB 琼脂上进行对携带有质粒的细胞的选择 (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)。用 Qiagen 的 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒从转化细胞中分离得到质粒 DNA，并通过限制性内切酶 EcoRI 的限制性内切以及随后的琼脂糖凝胶电泳 (0.8%) 测定质粒 DNA。质粒被命名为 pCR2.1tipAint，并显示于图 1 中。

根据布达佩斯条约，将以下微生物以纯培养物的形式于 2002 年 2 月 15 日储存于德国微生物菌种保藏中心 (DSMZ, Braunschweig, Germany)：

- 大肠杆菌 Top10/pCR2.1tipAint，编号为 DSM 14816。

实施例 2. 对 DSM 5715 菌株中的 tipA 基因的整合诱变

通过 Tauch 等 (FEMS Microbiological Letters, 123:343-347 (1994)) 的方法将实施例 1 中所述的载体 pCR2.1tipAint 电穿孔到谷氨酸棒杆菌 DSM 5715 中。菌株 DSM 5715 是耐 AEC 的产赖氨酸菌株，在 EP-B-0435132 中描述了该菌株。载体 pCR2.1tipAint 在 DSM 5715 中不能独立地复制，只有它已经被整合到 DSM 5715 的染色体中时，它才被保留于细胞内。通过将电穿孔产物平板培养在加有 15mg/l 卡那霉素的 LB 琼脂上来实现对具有 pCR2.1tipAint 整合于染色体的克隆的选择 (Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989)。

所选择的在 DSM5715 的染色体 tipA 基因内插入有质粒 pCR2.1tipAint 的耐卡那霉素的克隆被称为 DSM5715::pCR2.1tipAint。

实施例 3. 赖氨酸的生产

将在实施例 2 中得到的谷氨酸棒杆菌菌株 DSM5715::pCR2.1tipAint 培养在适合于产生赖氨酸的营养培养基中，并测定培养物上清液的赖氨酸成分。

为此，首先将菌株在具有适当抗生素的琼脂平皿 (具有卡那霉素 (25mg/l) 的脑-心琼脂) 上 33°C 培养 24 个小时。从该琼脂平皿培养开始，接种预培养物 (100ml 锥形瓶中的 10ml 培养基)。将 CgIII 完全培养基用做为预培养物的培养基。

CgIII 培养基

氯化钠	2.5 g/l
细菌用蛋白胨	10 g/l
细菌用酵母浸膏	10 g/l

葡萄糖 (分别高压灭菌)	2% (w/v)
pH 值被调整到 pH 7.4	

将卡那霉素 (25mg/l) 加入到其中。将预培养物在振荡器 (240rpm) 上 33°C 孵育 16 个小时。从该预培养物中接种主培养物，使得主培养物的初始 OD (660nm) 为 0.1 OD。将 MM 培养基用做为主培养物的培养基。

MM 培养基

CSL (玉米浆)	5 g/l
MOPS (吗啉基丙磺酸)	20 g/l
葡萄糖 (分别高压灭菌)	50 g/l
盐:	
$(NH_4)_2SO_4$	25 g/l
KH_2PO_4	0.1 g/l
$MgSO_4 * 7 H_2O$	1.0 g/l
$CaCl_2 * 2 H_2O$	10 mg/l
$FeSO_4 * 7 H_2O$	10 mg/l
$MnSO_4 * H_2O$	5.0 mg/l
生物素 (过滤除菌)	0.3 mg/l
硫胺素 * HCl (过滤除菌)	0.2 mg/l
亮氨酸 (过滤除菌)	0.1 g/l
$CaCO_3$	25 g/l

用氨水将 CSL、MOPS 和盐溶液的 pH 值调整到 pH 7，并高压灭菌。然后加入无菌的底物和微生物溶液，以及干燥的经高压灭菌的 $CaCO_3$。

在 100ml 带有挡板的锥形瓶中进行体积为 10ml 的培养。加入卡那霉素 (25mg/l)。在 33°C 和 80%湿度下进行培养。

72 个小时后，利用 Biomek 1000 (Beckmann Instruments GmbH, Munich) 在 660nm 测定波长测定 OD。利用来自 Eppendorf-BioTronik (Hamburg, Germany) 的氨基酸分析仪通过离子交换层析以及以水合茚三酮进行柱后衍生化检测来测定已经形成的赖氨酸的量。测定的结果显示于表 1。

表 1

菌株	OD (660 nm)	盐酸赖氨酸 (g/l)
DSM5715	8.2	13.6
DSM5715::pCR2.1tipAint	10.5	15.1

序列表

<110> 德古萨股份公司

<120> 利用棒状杆菌生产L-氨基酸的方法

<130> 020077 BT

<160> 2

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 19
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> Primer tipA-int1

<400> 1
cgcctttaca cagaagacg 19

<210> 2
<211> 19
<212> DNA
<213> Corynebacterium glutamicum

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(19)
<223> Primer tipA-int2

<400> 2
gtgtaccact gaccgatgc 19

质粒 pCR2.1tipAint

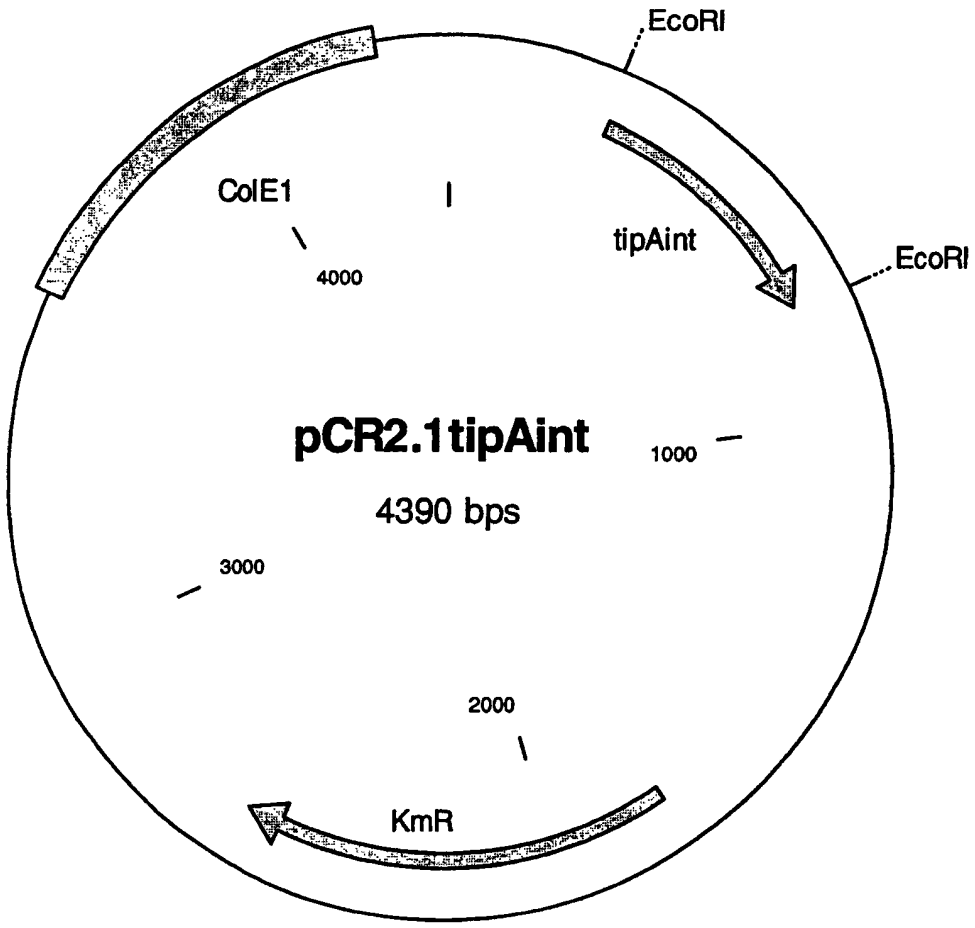


图1