(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119242547 A
(43)申请公布日 2025.01.03

(21)申请号 202411634667.7

(22)申请日 2024.11.15

(71)申请人 无锡晶海氨基酸股份有限公司
地址 214199 江苏省无锡市锡山区东港镇港下

(72)发明人 史一婷 周建龙 张玉华

(74)专利代理机构 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 23211
专利代理师 曹慧萍

(51)Int.Cl.
C12N 1/21(2006.01)
C12N 15/54(2006.01)
C12N 15/31(2006.01)
C12N 15/70(2006.01)
C12N 15/90(2006.01)
C12P 13/24(2006.01)
C12R 1/19(2006.01)

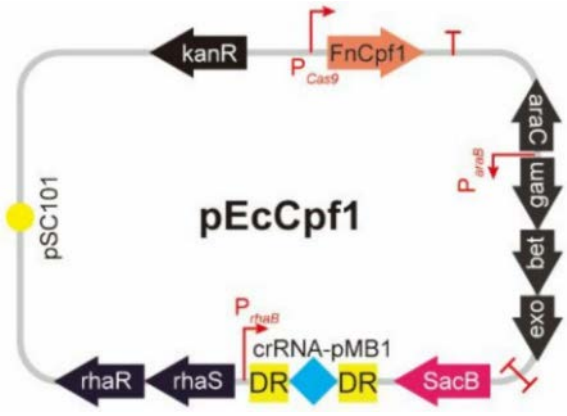
权利要求书1页 说明书10页
序列表（电子公布） 附图2页

(54)发明名称

一种提高L-组氨酸产量的大肠杆菌基因工程菌株的构建方法

(57)摘要

本发明公开了一种提高L-组氨酸产量的基因工程菌的构建方法，属于生物工程技术领域。以大肠杆菌为出发菌株在其基因组上整合和过表达透明颤菌血红蛋白基因，以增强氧气和ATP的有效供应，提高L-组氨酸的产量。该基因工程菌用于发酵法生产L-组氨酸，在摇瓶发酵48h，L-组氨酸的产量达到最高2.76g/L，相较于出发菌株，产量提高了52.49%。



CN 119242547 A

1.一种大肠杆菌基因工程菌,其特征在于,所述基因工程菌是在大肠杆菌中过表达有谷氨酸棒杆菌来源的多聚磷酸激酶CgPPK2和透明颤菌血红蛋白VHb,所述CgPPK2基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述VHb基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

2.根据权利要求1所述的基因工程菌,其特征在于,所述大肠杆菌为大肠杆菌B25。

3.一种大肠杆菌基因工程菌的构建方法,其特征在于,所述方法是以大肠杆菌为出发菌株,在所述出发菌株中过表达了谷氨酸棒杆菌来源的多聚磷酸激酶CgPPK2和透明颤菌血红蛋白VHb,所述CgPPK2基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述VHb基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

4.根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述CgPPK2基因和所述VHb基因分别整合在所述大肠杆菌的基因组ycgH和caiB基因位点。

5.根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述CgPPK2基因和所述VHb由强组成型启动子驱动表达;可选地,所述强组成型启动子为启动子trc。

6.一种生产组氨酸的方法,其特征在于,所述方法是利用权利要求1或2所述的基因工程菌进行发酵,合成组氨酸。

7.根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述方法是将权利要求1或2所述的基因工程菌的活化液接入发酵培养基中,进行发酵制备组氨酸。

8.根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述发酵培养基成分为葡萄糖30-40g/L、酵母膏1-5g/L、$(NH_4)_2SO_4$ 10-20g/L、$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1-5g/L、$MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 1-10mg/L、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1-10mg/L、$CaCO_3$ 20-30g/L、六偏磷酸钠1-10g/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1-5g/L。

9.根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述发酵参数为:在温度35.0-40.0℃、200-250rpm的条件下发酵36-60h。

10.权利要求1或2所述的基因工程菌,或者权利要求3～5任一项所述的方法,或者权利要求6～9任一项所述的方法在制备组氨酸或含组氨酸产品中的应用。

一种提高L-组氨酸产量的大肠杆菌基因工程菌株的构建方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种提高L-组氨酸产量的大肠杆菌基因工程菌株的构建方法,属于生物工程技术领域。

背景技术

[0002] L-组氨酸(L-histidine),也被称为L-α-氨基-β-咪唑丙酸,是侧链含有咪唑基的碱性氨基酸。分子式为C6H9N3O2,相对分子质量155.16。

[0003] 近些年来,L-组氨酸已被广泛应用于医药、食品以及饲料行业。L-组氨酸对生长、组织修复均有重要的作用,可以用于制备氨基酸输液以及综合氨基酸制剂,治疗溃疡、胃酸过多、风湿性关节炎等多种疾病。另外,L-组氨酸也可以作为多种药物的合成前体。L-组氨酸可以与β-丙氨酸组成肌肽,可用于合成治疗肾衰竭、动脉粥样硬化、老年性痴呆症等多种疾病的药物。

[0004] 合成L-组氨酸的传统方法主要是蛋白水解法,但其生产量取决于大豆、淀粉等富含天然蛋白质的原料的可用性,生产量较低。微生物发酵法是目前生产L-组氨酸的主流方法,常用于生产L-组氨酸的微生物主要包括谷氨酸棒状杆菌、大肠杆菌和粘质沙雷氏菌。大肠杆菌作为模式菌株,其遗传背景清晰、生长较快且基因操作手段成熟。所以大肠杆菌可作为理想宿主来进行发酵生产L-组氨酸。

[0005] 在大肠杆菌中,L-组氨酸的合成以葡萄糖为原料,以腺苷三磷酸(ATP)和5-磷酸核糖焦磷酸(PRPP)为前体物,通过十步催化反应而合成。首先ATP磷酸核糖转移酶(由HisG基因编码)催化PRPP的C1与ATP的N1相连,脱去焦磷酸后开环,分解,放出5-氨基咪唑-4-氨甲酰核苷酸(AICAR),用于嘌呤合成。留下的咪唑甘油磷酸经氧化、转氨、脱磷酸形成组氨醇,氧化生成组氨酸。由ATP磷酸核糖转移酶催化的反应是L-组氨酸合成路径的限速步骤。

[0006] 当前文献报道L-组氨酸发酵法最高产量是天科大谢希贤老师2020年发表的文章,展示了通过基因改造野生型大肠杆菌提高组氨酸产量的工作。最终,改造后的菌株HW6-3能够产生11.8g/L的组氨酸。并在5L发酵罐补料分批发酵下生产出66.5g/L的组氨酸。

[0007] 组氨酸生产菌B25是以BL21(DE3)为出发菌,做了以下改造:用人工的开放阅读框(hisL′-λattB′-trpE)替换了L-组氨酸操纵子的前导区hisL,解除了hisL的反馈抑制;过表达关键酶hisG(S.marcescens来源);过表达Prs(S.marcescens来源),增强前体物质PRPP的合成。然而,在ATP和PRPP两个前体物质中,B25菌株的ATP合成没有被增强。而且在组氨酸发酵,尤其是大罐的生产中,溶氧条件是比较差的,氧气的利用率较低,这又进一步限制了ATP的合成。

[0008] 因此现有技术中,ATP供应不足和氧气的利用率不高仍然是对L-组氨酸的合成产生限制的关键因素。

发明内容

[0009] 针对上述现有技术的不足,本发明阐述了一种提高L-组氨酸产量的大肠杆菌基因

工程菌株的构建方法,目的在于通过过表达CgPPK2和VHb来提高L-组氨酸产量。

[0010] 本发明提供的第一个技术方案为一种大肠杆菌基因工程菌,所述基因工程菌是在大肠杆菌中过表达有谷氨酸棒杆菌来源的多聚磷酸激酶CgPPK2和透明颤菌血红蛋白VHb。

[0011] 在某些实施方式中,所述CgPPK2基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述VHb基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0012] 在某些实施方式中,所述CgPPK2基因和所述VHb基因分别整合在所述大肠杆菌的基因组ycgH和caiB基因位点。

[0013] 在某些实施方式中,所述大肠杆菌为大肠杆菌B25。

[0014] 在某些实施方式中,所述大肠杆菌B25为以大肠杆菌BL21(DE3)为出发菌株,用开放阅读框(hisL′-λattB′-trpE)替换了L-组氨酸操纵子的前导区hisL,解除了hisL的反馈抑制;过表达关键酶hisG(S.marcescens来源);过表达Prs(S.marcescens来源),增强前体物质PRPP的合成。

[0015] 本发明提供的第二个技术方案为一种大肠杆菌基因工程菌的构建方法,所述方法是以大肠杆菌为出发菌株,在所述出发菌株中过表达了谷氨酸棒杆菌来源的多聚磷酸激酶CgPPK2和透明颤菌血红蛋白VHb。

[0016] 在某些实施方式中,所述CgPPK2基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:1所示,所述VHb基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示。

[0017] 在某些实施方式中,所述CgPPK2基因和所述VHb基因分别整合在所述大肠杆菌的基因组ycgH和caiB基因位点。

[0018] 优选地,所述CgPPK2基因和所述VHb基因分别采用CRISPR介导的基因编辑技术整合至所述大肠杆菌的基因组上。

[0019] 在某些实施方式中,所述CgPPK2基因和所述VHb由强组成型启动子驱动表达;可选地,所述强组成型启动子为启动子trc,核苷酸序列如SEQ ID NO:3。

[0020] 本发明提供的第三个技术方案为一种生产组氨酸的方法,所述方法是利用第一个技术方案所述的基因工程菌进行发酵,合成组氨酸。

[0021] 在某些实施方式中,所述方法是将第一个技术方案所述的基因工程菌的活化液接入发酵培养基中,进行发酵制备组氨酸。

[0022] 在某些实施方式中,所述发酵培养基成分为葡萄糖30-40g/L、酵母膏1-5g/L、$(NH_4)_2SO_4$10-20g/L、$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1-5g/L、$MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 1-10mg/L、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1-10mg/L、$CaCO_3$20-30g/L、六偏磷酸钠1-10g/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1-5g/L。

[0023] 在某些实施方式中,所述发酵参数为:在温度35.0-40.0℃、200-250rpm的条件下发酵36-40h。

[0024] 本发明提供的第四个技术方案为第一个技术方案所述的基因工程菌,或者第二个技术方案所述的方法,或者第三个技术方案所述的方法在制备组氨酸或含组氨酸产品中的应用。

[0025] 本发明的技术效果如下:

[0026] 本发明通过在大肠杆菌中过表达CgPPK2和VHb基因,既保证了充足的ATP供应,又能从分子水平上提高VHb基因克隆菌对氧气的利用率,进而提升基因工程菌的L-组氨酸的产量,产量最终达到2.76g/L,相比于出发菌株提高了52.49%。

附图说明

[0027] 图1为pEcCpf1质粒图谱。

[0028] 图2为pcrEG质粒图谱。

[0029] 图3为组氨酸标品的HPLC图。组氨酸保留时间为4.147min。

[0030] 图4为摇瓶发酵样品液的HPLC图。组氨酸保留时间为4.159min。

[0031] 图5为摇瓶发酵实验结果。

具体实施方式

[0032] 以下对本发明的优选实施例进行说明,应当理解实施例是为了更好地解释本发明,不用于限制本发明。

[0033] 实施例中采用的原料:

[0034] 1、大肠杆菌B25以BL21(DE3)为出发菌株,解除hisL的反馈抑制,即用人工的开放阅读框(hisL′-λattB′-trpE)替换BL21(DE3)L-组氨酸操纵子的前导区hisL;过表达关键酶hisG(S.marcescens来源);过表达Prs(S.marcescens来源),增强前体物质5-磷酸核糖-1-焦磷酸(PRPP)的合成。(已公开于《代谢工程改造大肠杆菌合成L-组氨酸》李梦莹,吕雪芹,刘延峰,李江华,堵国成,吴剑荣,刘龙。)

[0035] 2、使用的质粒来源:

[0036] 本发明中采用的基因编辑方法和工具质粒pEcCpf1/pcrEG参照文献(Xuewen Zhu,Yaokang Wu,et al.Combining CRISPR-Cpf1and Recombineering Facilitates Fast and Efficient Genome Editing in Escherichia coli,ACS Synthetic Biology,Volume 11,Issue 5,2022)。其中pEcCpf1(卡那霉素抗性,如图1所示)携带λ-Red重组系统及Cpf1蛋白表达系统,pcrEG(大观霉素抗性,如图2所示)通过构建,携带相应的靶序列和目的基因。

[0037] 实施例中涉及的引物:

[0038] 表1本发明涉及的引物序列

[0039]

引物名称	引物序列
N23-ycgH-F	AGATCCGATAGTGACAGTTGGCGTTTG
N23-ycgH-R	AATTCAAACGCCAACTGTCACTATCGG
N23-caiB-F	AGATGGTAATGCCCACCAGTTCCATCA
N23-caiB-R	AATTTGATGGAACTGGTGGGCATTACC
N23-xylG-F	AGATCTGCTCAGTTAATGAGGCTGTCG
N23-xylG-R	AATTCGACAGCCTCATTAACTGAGCAG
pcrEG-F	ACGTTAATAAGGCCAAGCTAACTAAGT
pcrEG-R	CTACAAATAACGAACGGCAGATCAG
ycgH-up-F	TAGCTTGGCCTTATTAACGTCGTCCGACTCTATTCTAAATGGAGC
ycgH-up-R	TCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAACAGCTGTTATCCTCCTCATTCACT
ycgH-down-F	CCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGAATATACGTGGATCTTCCAGCCAC
ycgH-down-R	CTGCCGTTCGTTATTTGTAGACTGAATCAGGTTTGCGCTAAAG
caiB-up-F	TAGCTTGGCCTTATTAACGTATCTGGATCGAGAACGTCGC
caiB-up-R	TCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAACCCATACGCAGCATCACTTC
caiB-down-F	CCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGATCCACCGTATCGAATGCCC
caiB-down-R	CTGCCGTTCGTTATTTGTAGGCAAGATCGTCCCACATTTGAC
xylG-up-F	TAGCTTGGCCTTATTAACGTGTGAATGAATTGGCTTAGGTG

[0040]

	GAG
xylG-up-R	TCCACACATTATACGAGCCGGATGATTAATTGTCAACAAGT GCCTTGGCAATTTCAACC
xylG-down-F	CCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTGT GGATATTATTCGCGATCTACAACAGC
xylG-down-R	CTGCCGTTCGTTATTTGTAGGCGCTTTCTGTCTTCGGGTA
CgPPK2-F	CGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTT CACACAGGAAACAGACCATGGTGGGTAAACTTCCCAT
CgPPK2-R	CGTTTAGAGGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTCACTCACCAA TCTGATCGCGCC
VHb-F	CGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTT CACACAGGAAACAGACCATGTTAGACCAGCAAACCAT
VHb-R	CGTTTAGAGGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTATTCAACCG CTTGAGCGT
BacA-F	CGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTT CACACAGGAAACAGACCATGCTGGATCAGCGCACCAT
BacA-R	CGTTTAGAGGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTTGCTGCGGC TTTCATAAATTTCTT
Hb-F	CGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTT CACACAGGAAACAGACCATGCTGGATCAGAAAACCATT
Hb-R	CGTTTAGAGGCCCCAAGGGGTTATGCTAGTTTGCGGGTTT CATAAATTTC
HP-F	CGGCTCGTATAATGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTT CACACAGGAAACAGACCATGCTGAACCAGAAAACCATT
HP-R	CGTTTAGAGGCCCCAAGGGGTTATGCTAGCAGGGTCTGAT GAATCTGGT

[0041] 实施例1过表达CgPPK2重组大肠杆菌菌株的构建

[0042] 将CgPPK2连接trc启动子分别整合在ycgH、caiB、xylG的基因位点,下面以ycgH位点为例,说明构建步骤,其余位点与之类似。

[0043] 以下步骤中,卡那霉素浓度为50μg/mL,大观霉素浓度为80μg/mL。LB培养基配方为蛋白胨10.0g/L、酵母提取物5.0g/L、氯化钠10.0g/L。培养温度为37℃。

[0044] 1.1pcrEG质粒的构建

[0045] 构建质粒pcrEG的目的是为了转录相应的gRNA,从而与Cpf1蛋白形成的复合体,通过碱基配对识别基因组上的靶位点,实现目的DNA双链断裂。并通过目的基因两端的同源臂进行同源重组,将目的基因整合到基因组上。构建方法如下。

[0046] 1.1.1N23靶序列设计

[0047] 使用CRISPR RGEN Tools设计靶序列(PAM:TTV或TTTV)。然后合成引物(本文所述引物均从上海生工生物工程股份有限公司订购),序列为:5’-酶切位点-N23靶序列-3’,及

其反向互补的引物,得到N23-ycgH-F和N23-ycgH-R(见表1),两条引物通过单链DNA的缓慢退火得到靶序列DNA片段。

[0048] 1.1.2pcrEG-N23(ycgH)质粒的构建

[0049] 首先,使用BsaI(购于南京诺唯赞技术股份有限公司)对质粒pcrEG(进行酶切及跑胶回收,得到线性化的载体。

[0050] 其次,通过T4连接酶(购于上海生工生物工程股份有限公司)对线性化的载体及1.1.1中得到的靶序列片段进行连接。然后,将连接体系通过化学转化至感受态DH5α,转化步骤如下:

[0051] (1)取感受态细胞置于冰上解冻。

[0052] (2)向感受态中加入DNA,其体积不超过感受态体积的10%,轻弹混匀,在冰浴静置30min。(3)将离心管42℃水浴60-90s,快速转移到冰浴中,静置冷却2-3min。

[0053] (4)向离心管中加入900μL LB培养基,37℃150rpm孵育45-60min。

[0054] (5)取适量感受态细胞涂布于带相应抗生素的LB平板上,37℃过夜培养。

[0055] 最后,挑取单克隆进行菌落PCR验证,得到阳性克隆并测序确认,获得pcrEG-N23质粒。1.1.3pcrEG-N23-CgPPK2质粒的构建

[0056] 首先,上述得到的pcrEG-N23质粒通过引物pcrEG-F/pcrEG-R反扩得到线性化载体。同源臂通过表1的引物ycgH-up-F/ycgH-up-R和ycgH-down-F/ycgH-down-R,以B25基因组为模板扩增获得。基因CgPPK2通过引物CgPPK2-F/CgPPK2-R扩增得到。启动子(核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示)和终止子(核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示)通过引物连接到CgPPK2和上下同源臂片段上。

[0057] 其次,上述PCR扩增得到的载体和片段通过一步克隆试剂盒(购于南京诺唯赞技术股份有限公司)进行连接。然后,将连接体系通过化学转化至感受态DH5α(转化方法同1.1.2)。

[0058] 最后,挑取单克隆进行菌落PCR验证,得到阳性克隆并测序确认,获得pcrEG-N23-CgPPK2质粒。

[0059] 1.2基因编辑步骤

[0060] 1.2.1质粒pEcCpf1的转化

[0061] 首先将待编辑的B25菌株制成大肠感受态,感受态制备方法如下:

[0062] (1)前一天挑取单菌落(或直接用-80℃保存的菌液100μL),接入5mL LB培养基中37℃摇床过夜培养(约12-16小时)。

[0063] (2)取2mL过夜培养物转接于100ml LB培养基中,在37℃摇床上220rpm振荡培养约2.5-3小时,检测OD_{600}在0.5±0.1时,将菌液分装于50mL离心管,每管25mL菌液,冰上预冷10min。

[0064] (3)4℃下4000rpm离心10min。

[0065] (4)弃上清,每管加入10mL预冷的0.1M $CaCl_2$溶液,用移液枪轻轻上下吸动打匀,使细胞重新悬浮,在冰上放置10-20min。

[0066] (5)4℃下4000rpm离心10min。

[0067] (6)重复(4)-(5)。

[0068] (7)弃上清,每管加入含15%甘油的预冷0.1M $CaCl_2$溶液1mL,用移液枪轻轻上下

混匀,使细胞重新悬浮,100μL/管冰上分装至1.5ml离心管中,封口并标记,-80℃贮存备用。

[0069] 将质粒pEcCpf1(100-200ng)转入制作的B25感受态中(转化方法同1.1.2),得到包含pEcCpf1的B25菌株。

[0070] 1.2.2质粒pcrEG-N23-CgPPK2的转化

[0071] 然后将含有pEcCpf1的大肠杆菌B25菌株制备成感受态细胞(制作方法同1.2.1,区别是在100mL LB中培养时需加入卡那霉素以维持pEcCpf1的稳定性,并在OD_{600}达到0.3时加入10mM阿拉伯糖以诱导λ-Red重组酶的表达)。制备好的感受态细胞可直接用于转化,也可保存于-80℃冰箱备用。

[0072] 然后将500～1000ng质粒pcrEG-N23-CgPPK2转入1.2.1中构建的含有pEcCpf1的B25菌株中(转化方法同1.1.2,区别在于孵育时间为1～1.5h)。

[0073] 1.2.3菌落验证

[0074] 利用菌落PCR及测序对阳性菌落进行筛选,得到CgPPK2成功整合B25基因组上的菌株。

[0075] 1.3质粒的丢失

[0076] 将质粒丢失之后才能进行下一轮基因编辑,步骤如下。

[0077] 1.3.1丢失pcrEG-N23-CgPPK2质粒

[0078] 挑取确认的Ec01菌落在2mL含有50μg/mL卡那霉素和L-鼠李糖(10mM)的LB培养基中37℃下培养过夜。次日将培养物划线于含有50μg/mL卡那霉素的平板上,37℃培养过夜,挑取单菌落在含有50μg/mL卡那霉素和100μg/mL大观霉素的LB平板上划线,对大观霉素敏感但对卡那霉素不敏感的单菌落就是成功丢失pcrEG-N23-CgPPK2质粒的菌落。

[0079] 1.3.2丢失pEcCpf1质粒

[0080] 将丢pcrEG-N23-CgPPK2质粒的菌落继续在2mL含5g/L葡萄糖的LB培养基中在37℃培养12-16h。然后将菌液划线接种于含有5g/L葡萄糖和10g/L蔗糖的平板上,37℃培养过夜,挑取单菌落在含有和不含50μg/mL卡那霉素的LB平板上筛选。对卡那霉素敏感的菌落就是丢失了pEcCpf1质粒的菌落,即Ec01菌株。

[0081] 按照同样的方法,将CgPPK2整合到caiB和xylG位点,获得的菌株分别命名为Ec02和Ec03。

[0082] 实施例2:过表达CgPPK2菌株进行摇瓶发酵,比较L-组氨酸的产量

[0083] 2.1摇瓶发酵方法

[0084] 种子培养:种子所用培养基为LB培养基,配方为蛋白胨10.0g/L、酵母提取物5.0g/L、氯化钠10.0g/L,划平板培养24h,挑单菌落到装有25mL LB培养基的250mL摇瓶中,培养10-12h,至OD_{600}=5.0±1.0。

[0085] 摇瓶发酵:发酵所用培养基成分为葡萄糖40g/L、酵母膏2g/L、$(NH_4)_2SO_4$ 16g/L、$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1g/L、$MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 5mg/L、$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 5mg/L、$CaCO_3$ 30g/L、六偏磷酸钠5g/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1g/L。每个菌株做3个平行,每瓶250mL摇瓶装液量15mL。在温度37.0℃、220rpm的条件下发酵48h。

[0086] 2.2组氨酸产量检测方法

[0087] 用高效液相色谱方法对组氨酸含量进行测定。

[0088] 组氨酸标准品的配制:称取组氨酸置于25mL容量瓶中,用0.1N HCl填充一半体积,

并振摇或超声直至溶解。然后用水定容至刻度,使组氨酸母液的浓度为10nmol/μL,-20℃保存,使用时用水稀释。

[0089] 所用仪器为安捷伦HPLC(1260型号);柱温箱温度:40℃;色谱柱:安捷伦AdvanceBio AAA色谱柱(4.6×100mm);衍生化试剂:硼酸盐缓冲液、OPA和FMOC(均购买于安捷伦),通过自动液体进样器在线衍生;流动相A:10mM Na_2HPO_4和10mM $Na_2B_4O_7$,pH 8.2,流动相B:乙腈:甲醇:水(45:45:10,v:v:v);梯度洗脱程序见表2;流速1.5mL/min;二极管阵列检测器(DAD)检测,波长为262nm。图3为组氨酸标品的HPLC图。组氨酸保留时间为4.147min。

[0090] 表2HPLC流动相梯度洗脱程序

[0091]

时间(min)	A(%)	B(%)
0.35	98	2
13.4	43	57
13.5	0	100
15.7	0	100
15.8	98	2

[0092]

20	98	2

[0093] 2.3摇瓶发酵结果

[0094] 发酵48h后取样测发酵液菌体密度OD值和组氨酸产量(图4为摇瓶发酵样品液的HPLC图。组氨酸保留时间为4.159min)。发酵液稀释或不稀释经10000rpm离心5min,取上清稀释后,用0.22μm滤膜过滤后上样,计算得到产量结果如表3。

[0095] 表3过表达CgPPK2菌株摇瓶发酵组氨酸产量和相应菌液OD_{600}

[0096]

菌株编号	基因型	L-组氨酸产量 (g/L±标准偏差)	菌液 (OD_{600} ±标准偏差)
B25	出发菌	1.81±0.08	23.85±1.45
Ec01	B25 过表达 CgPPK2(ycgH 位点)	2.09±0.13	22.59±1.02
Ec02	B25 过表达 CgPPK2(caiB 位点)	2.01±0.11	22.87±0.84
Ec03	B25 过表达 CgPPK2(xylG 位点)	1.95±0.15	23.26±1.22

[0097] 如图5所示,从发酵产量来看,与同出发菌株B25相比,构建的Ec01、Ec02和Ec03的L-组氨酸产量均有所提高,说明过表达CgPPK2对组氨酸的生产有帮助,最终达到2.09g/L,提高了15.47%。通过发酵结束时OD_{600}可以看出,过表达CgPPK2对OD_{600}的影响不大。

[0098] 实施例3:过表达VHb重组大肠杆菌菌株的构建

[0099] 将VHb连接trc启动子整合到Ec01的caiB和xylG位点,方法与实施例1基本一致,以caiB位点为例,具体步骤如下:

[0100] 靶序列设计方法同实施例1中的1.1.1,不同的是整合位点为caiB位点,设计得到的引物为N23-caiB-F/N23-caiB-R(见表1),两条引物通过单链DNA的缓慢退火得到靶序列DNA片段。pcrEG-N23(caiB)质粒的构建方法同实施例1中的1.1.2,不同的是对线性化的

pcrEG载体与2.1.1中得到的靶序列片段进行连接,然后转化和验证得到pcrEG-N23(caiB)质粒。

[0101] pcrEG-N23-VHb质粒的构建方法同实施例1中的1.1.3,同源臂通过引物caiB-up-F/caiB-up-R和caiB-down-F/caiB-down-R,以B25基因组为模板扩增获得。基因VHb通过基因合成得到,并用VHb-F/VHb-R引物进行扩增,用于后续连接。启动子和终止子通过引物PCR时连接到VHb和上下同源臂片段上,片段进行连接。

[0102] 转化和验证得到pcrEG-N23-VHb质粒。

[0103] 根据实施例1中的1.2的步骤,将pEcCpf1和pcrEG-N23-VHb质粒陆续转化到Ec01的菌株中,通过验证,筛选得到同时整合CgPPK2和VHb的菌株,命名为Ec04。

[0104] 按照同样的方法,将VHb整合到Ec01的xylG位点获得的菌株命名为Ec05。

[0105] 实施例4:过表达VHb的菌株进行摇瓶发酵,比较L-组氨酸的产量

[0106] 对实施例3中构建的菌株进行摇瓶发酵并检测产量,发酵和检测方法与实施例2一致。结果见表4。

[0107] 表4过表达VHb的菌株摇瓶发酵组氨酸产量和相应菌液OD_{600}

[0108]

菌株编号	基因型	L-组氨酸产量 (g/L±标准偏差)	菌液 (OD_{600} ±标准偏差)
B25	出发菌	1.81±0.08	23.85±1.45
Ec01	B25 过表达 CgPPK2（ycgH 位点）	2.09±0.13	22.59±1.02
Ec04	Ec01 过表达 VHb（caiB 位点）	2.76±0.10	28.68±0.88
Ec05	Ec01 过表达 VHb（xylG 位点）	2.34±0.26	26.13±1.65

[0109] 从发酵产量来看,与Ec01相比,构建的Ec04和Ec05的L-组氨酸产量均有所提高,说明过表达VHb对组氨酸的生产有帮助。最终Ec05的L-组氨酸产量最高,达到2.76g/L,相比于B25提高了52.49％。通过发酵结束时OD_{600}可以看出,过表达CgPPK2对OD_{600}的影响不大,过表达VHb后,菌体OD_{600}有明显提高,说明增加氧气的供应对菌体的生长也有帮助。

[0110] 实施例5:使用不同启动子过表达VHb对L-组氨酸产量的影响

[0111] 分别使用VHb本身的启动子(Pvgb,核苷酸序列如SEQ ID NO.5所示),tac启动子(核苷酸序列如SEQ ID NO.6所示),trc启动子去表达VHb,整合到Ec01的ycgH位点,构建方法与实施例3一致,摇瓶发酵方法与实施例2一致,得到的发酵产量如表5。发现三种启动子对组氨酸的产量都有提高,其中使用trc启动子表达VHb,L-组氨酸产量最高,达到2.76g/L。

[0112] 表5使用不同启动子过表达VHb的摇瓶发酵组氨酸产量和相应菌液OD_{600}

[0113]

启动子	基因型	L-组氨酸产量 (g/L±标准偏差)	菌液 (OD_{600} ±标准偏差)
-	Ec01	2.09±0.13	22.59±1.02
vgb	Ec01,Pvgb-VHb	2.24±0.19	22.35±1.58
tac	Ec01,Ptac-VHb	2.68±0.06	24.37±1.22
trc	Ec01,Ptrc-VHb（Ec04）	2.76±0.10	28.68±0.88

[0114] 实施例6:过表达VHb同源蛋白对L-组氨酸产量的影响

[0115] 比较另外三种不同的VHb同源蛋白对L-组氨酸产量的影响,分别是来自Clostridium paraputrificum的BacA(WP_027099064.1),来自Clostridium sp.CAG:221的Hb(CDB15533.1),来自Intestinibacter bartlettii DORA_8_9的HP(ETI93048.1)。均使用trc启动子,整合到Ec01的ycgH位点,构建方法与实施例3一致,摇瓶发酵方法与实施例2一致,得到的发酵产量如表6。发现过表达BacA反而产量降低了,过表达Hb和HP产量稍有提高,过表达VHb的菌株L-组氨酸产量最高,达到2.76g/L。

[0116] 表6过表达VHb同源蛋白的摇瓶发酵组氨酸产量和相应菌液OD_{600}

[0117]

蛋白名称	基因型	L-组氨酸产量 (g/L±标准偏差)	菌液 (OD_{600} ±标准偏差)
-	Ec01	2.09±0.13	22.59±1.02
VHb	Ec01,Ptrc-VHb（Ec04）	2.76±0.10	28.68±0.88
BacA	Ec01,Ptrc-BacA	1.76±0.24	20.24±1.46
Hb	Ec01,Ptrc-Hb	2.35±0.09	29.54±0.97
HP	Ec01,Ptrc-HP	2.26±0.18	27.44±1.34

[0118] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

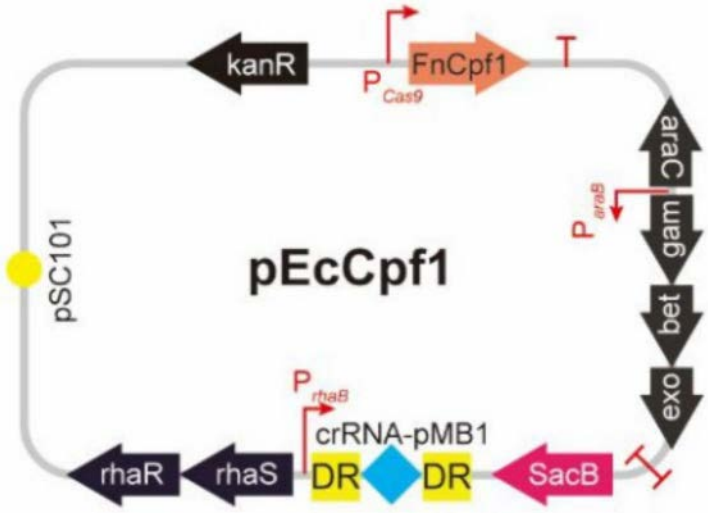

kanR
P Cas9
FnCpf1
araC
P araB
gam
bet
exo
pSC101
pEcCpf1
P rhaB
crRNA-pMB1
rhaR
rhaS
DR
DR
SacB

图1

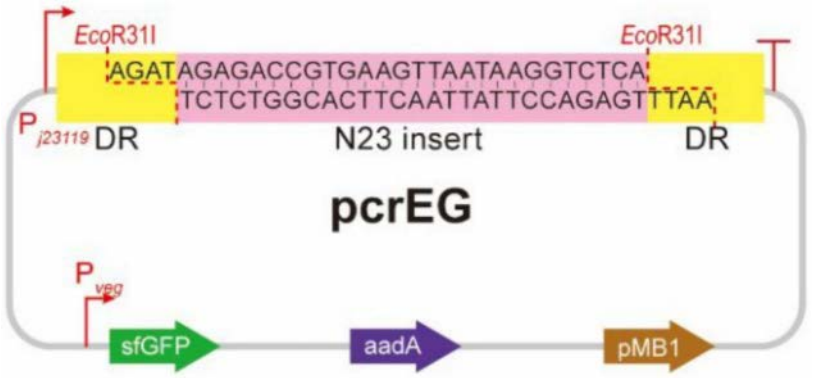

EcoR31I
EcoR31I
AGATAGAGACCGTGAAGTTAATAAGGTCTCA
TCTCTGGCACTTCAATTATTCCAGAGTTTAA
P j23119
DR
N23 insert
DR
pcrEG
P veg
sfGFP
aadA
pMB1

图2

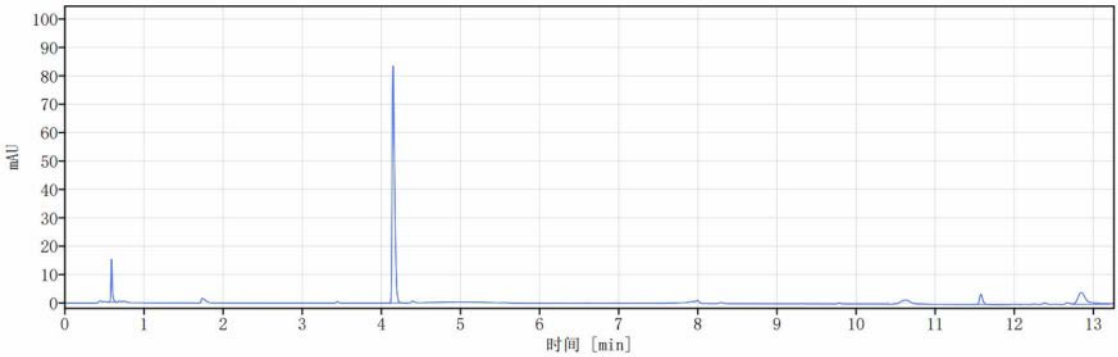

mAU
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
时间 [min]

图3

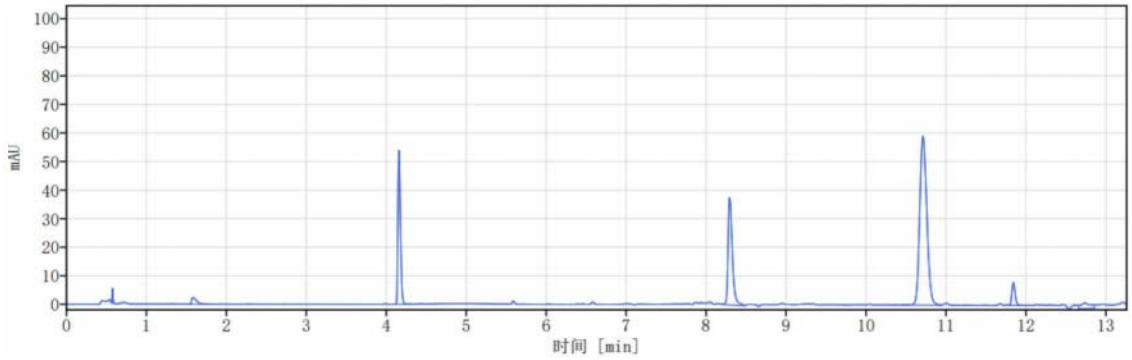


图4

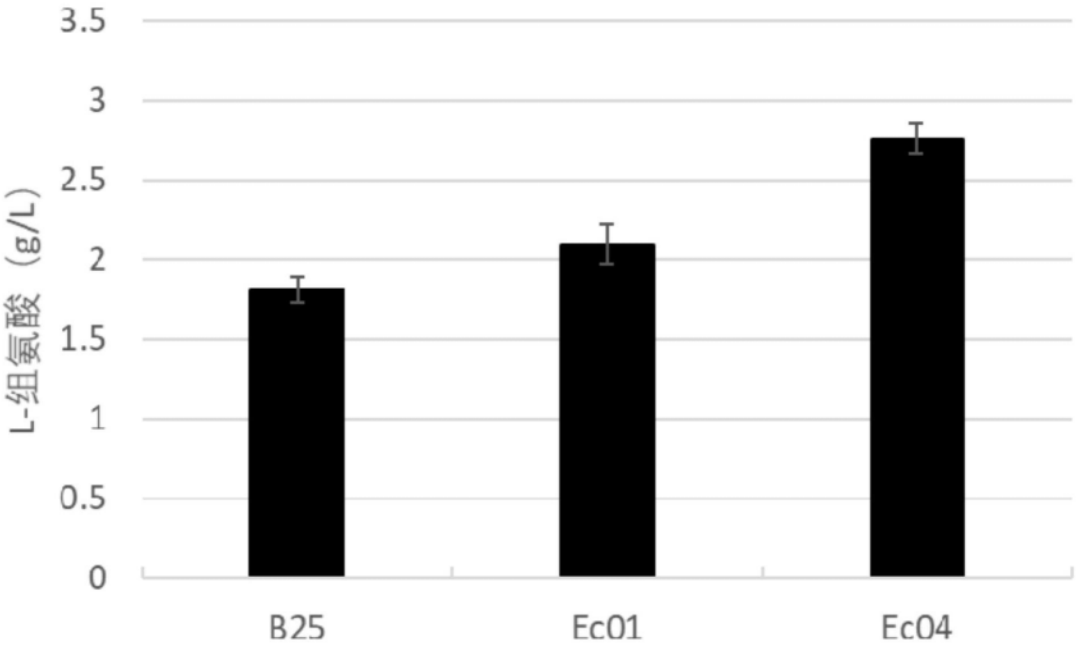


图5