(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2018 年 2 月 1 日 (01.02.2018)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2018/018569 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 1/21 (2006.01) *C12R 1/15* (2006.01)
C12P 13/10 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2016/092179

(22) 国际申请日: 2016 年 7 月 29 日 (29.07.2016)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201610592588.3 2016年7月26日 (26.07.2016) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 饶志明(RAO, Zhiming); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。 满在伟(MAN, Zaiwei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。 徐美娟(XU, Meijuan); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。 杨套伟(YANG, Taowei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。 张显(ZHANG, Xian); 中国江苏省无锡市蠡湖大道1800号耿晓岳, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E501耿晓岳, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: METHOD FOR INCREASING PRODUCTION OF L-ARGININE BY KNOCKING-OUT FLAVOPROTEIN REDUCTASE

(54) 发明名称: 一种通过敲除黄素还原酶提高L-精氨酸产量的方法

(57) Abstract: Provided is a method for increasing production of an L-arginine by knocking-out a flavoprotein reductase. A *Corynebacterium crenatum* SDNN403 genome is used as a template. Overlap extension PCR is used to acquire a missing gene fragment of a flavoprotein reductase and form a connection to pK18mobsacB so as to obtain knock-out plasmids pK18mobsacB-Δfrd1 and pK18mobsacB-Δfrd2. The *Corynebacterium crenatum* SDNN403 is then subject to electrical transformation and undergoes two screening steps to obtain recombinant bacteria 403Δfrd1 and 403Δfrd2. A shake flask fermentation experiment found that knocking-out a flavoprotein reductase gene can significantly increase the production volume of an L-arginine.

(57) 摘要: 提供了一种通过敲除黄素还原酶提高L-精氨酸产量的方法。以钝齿棒杆菌SDNN403基因组为模板，通过重叠延伸PCR获取黄素还原酶基因缺失片段，并连接pK18mobsacB，得到敲除质粒pK18mobsacB-Δfrd1和pK18mobsacB-Δfrd2，通过电击转化钝齿棒杆菌SDNN403，二次筛选得到重组菌株403Δfrd1和403Δfrd2。摇瓶发酵发现，通过敲除黄素还原酶基因，L-精氨酸产量明显提高。

WO 2018/018569 A1

一种通过敲除黄素还原酶提高 L-精氨酸产量的方法

技术领域

本发明涉及一种通过敲除黄素还原酶提高 L-精氨酸产量的方法，属于微生物发酵生产氨基酸技术领域。

背景技术

L-精氨酸是人和动物体内的一种半必需氨基酸，是多种生物活性物质的合成前体，具有多种独特的生理和药理作用。随着对精氨酸的生物学功能不断地深入研究和了解，精氨酸在医药、食品、饲料工业上的用途越来越广泛。

L-精氨酸的生产方法有水解法和发酵法。我国现有的生产厂家目前大多仍主要采用蛋白质水解法来生产 L-精氨酸，该方法对环境污染严重且收率不高，不适用于大规模生产。发酵法生产 L-精氨酸工艺相对简单且对环境友好，具有很大的发展潜力。但是，国内以微生物发酵生产 L-精氨酸，产酸水平普遍较低，成本较高，生产水平和产量不能满足国内需求。因此，提高 L-精氨酸的发酵产酸水平和葡萄糖利用率非常重要。

Corynebacterium crenatum SDNN403（该菌株为本课题组多年研究，产用传统诱变方法获得一株菌株，保藏编号 CGMCC NO: 0890，专利号为：ZL 03112896.3），为高产 L-精氨酸 *C. crenatum*。前期工作中对该菌株的 L-精氨酸合成代谢途径进行了系统的分析。对 L-精氨酸合成代谢中的反馈抑制与反馈阻遏调控作用进行了研究，解除了菌株中的反馈抑制。同时对精氨酸合成的竞争旁路代谢关键酶基因进行敲除等代谢改造，在增强目标产物精氨酸合成途径关键酶基因簇表达的同时，削弱脯氨酸、谷氨酰胺等竞争支路途径的代谢流，最终使 L-谷氨酸分解代谢集中在 L-精氨酸的合成代谢流从而提高了精氨酸的产量。

活性氧包括超氧阴离子 O_2^-、氢氧自由基 OH·和过氧化氢 H_2O_2 等，是生物有氧代谢过程中的副产物，对细胞具有很高的毒性。经过长期进化细胞已经形成一套抵抗活性氧毒害的作用体系，如超氧化物歧化酶可以将超氧阴离子 O_2^-转化为 H_2O_2，过氧化氢酶可以将 H_2O_2 分解成 H_2O 和 O_2。细胞产生活性氧后再进行分解是一种被动防御的过程，产生的活性氧不可能被立即清除干净，少量活性氧仍然可以与胞内物质发生反应，从而对细胞造成损伤。如果可以直接减少活性氧的合成，则可以从根本上降低活性氧对细胞的危害。

H_2O_2 作为细胞内活性氧的一种，具有很高的氧化活性和毒性。有报道指出黄素还原酶可以利用 NAD(P)H 将氧化型黄素 FMN、FAD 和核黄素还原为还原型黄素 $FMNH_2$、$FADH_2$ 和还原型核黄素，之后可以进一步催化将还原型黄素的电子转移给胞内其他电子受体。如果电

子受体为 O_2，则可能生成 H_2O_2。

对 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 的基因组检索发现基因 *cg1150*(基因组 NCBI Accession Number: BX927151)和基因 *cg3223*(基因组 NCBI Accession Number: BX927156)编码假定的 NADPH-依赖型 FMN 还原酶。但是，目前为止这两个基因的功能并不明确，还没有相关研究报道。

虽然目前已有报道对菌株的代谢途径进行改造以提高 L-精氨酸产量，但有必要开发新的方法以进一步促进 L-精氨酸的合成。

发明内容

为了解决上述问题，本发明提供了一种提高 L-精氨酸产量的方法。本发明鉴定了假定的 NADPH-依赖型 FMN 还原酶，分析了其最终催化产物，最终通过敲除 *C. crenatum* 中假定的 NADPH-依赖型 FMN 还原酶基因 *frd1* 和/或 *frd2* 促进了菌体生长和 L-精氨酸合成。

本发明的第一个目的一种 L-精氨酸产量提高的钝齿棒杆菌重组菌，所述重组菌是缺失了 NADPH-依赖型 FMN 还原酶基因 *frd1* 和/或 *frd2* 的钝齿棒杆菌。

在本发明的一种实施方式中，所述 NADPH-依赖型 FMN 还原酶基因 *frd1* 的氨基酸序列如 SEQ NO. 3 所示，核苷酸序列如 SEQ NO. 1 所示。

在本发明的一种实施方式中，所述 NADPH-依赖型 FMN 还原酶基因 *frd2* 的氨基酸序列如 SEQ NO. 4 所示，核苷酸序列如 SEQ NO. 2 所示。

在本发明的一种实施方式中，所述钝齿棒杆菌重组菌是将 *Corynebacterium crenatum* CGMCC NO: 0890 中的 NADPH-依赖型 FMN 还原酶基因敲除得到的。

在本发明的一种实施方式中，所述钝齿棒杆菌重组菌的构建方法是：以 *Corynebacterium crenatum* CGMCC NO: 0890 基因组为模板，获得 *frd1* 和/或 *frd2* 基因缺失片段，然后将获得的 *frd1* 和/或 *frd2* 基因缺失片段与 pK18*mobsac*B 线性化载体连接，并转入 *E.coli*，挑取阳性转化子，构建质粒 pK18*mobsac*B-Δ*frd1* 和/或 pK18*mobsac*B-Δ*frd2*；将 pK18*mobsac*B-Δ*frd1* 和/或 pK18*mobsac*B-Δ*frd2* 质粒电击转化 *Corynebacterium crenatum* CGMCC NO: 0890，先在含有卡那霉素的固体培养基平板上进行培养得到第一次同源重组转化子，再分别将目标转化子在含蔗糖的培养基中进行胁迫二次重组筛选，并对第二次同源重组转化子进行鉴定，鉴定正确的菌株命名为 403Δ*frd1*、403Δ*frd2*、403Δ*frd12*。

本发明的第二个目的是提供一种合成 L-精氨酸的方法，所述方法是利用权利要求 1-5 任一所述的钝齿棒杆菌重组菌为生产菌株进行发酵培养。

在本发明的一种实施方式中，所述发酵是在 28~32℃下进行。

在本发明的一种实施方式中，用于发酵的发酵培养基成分：葡萄糖 120 g/L，玉米浆 40 g/L，生物素 8×10^{-5} g/L，组氨酸 5×10^{-4} g/L，硫酸锰 0.02 g/L，硫酸铵 20 g/L，硫酸镁 0.5 g/L，磷酸二氢钾 1.5 g/L，硫酸亚铁 0.02g/L。

本发明的第三个目的是提供一种通过敲除黄素还原酶促进 L-精氨酸合成的方法，所述方法是将钝齿棒杆菌的 NADPH-依赖型 FMN 还原酶基因敲除得到重组菌，以重组菌为生产菌株合成 L-精氨酸。

在本发明的一种实施方式中，所述 NADPH-依赖型 FMN 还原酶基因 *frd1*、*frd2* 的氨基酸序列分别如 SEQ NO. 3、SEQ NO. 4 所示。

所述钝齿棒杆菌为 *Corynebacterium crenatum* CGMCC NO: 0890。

本发明的第四个目的是提供所述重组菌生产得到的 L-精氨酸，以及重组菌在医药、食品、饲料工业上的应用。

本发明的有益效果：

本发明敲除 *frd1* 或者 *frd2* 基因，能够使菌株的 L-精氨酸产量分别提高 16.46%、3.16%。本发明的重组菌 403Δ*frd1*、403Δ*frd2* 发酵 60 h 后 L-精氨酸产量为 18.4 g/L、16.3 g/L。

具体实施方式

本发明所使用的菌株为 *Corynebacterium crenatum* SDNN403，是本实验室筛选得到的高产精氨酸突变菌株，保藏编号 CGMCC NO.0890，已经在专利号为：ZL 03112896.3 的专利文献中公开过了，是已知的生物材料。

实施例 1：假定的 NADPH-依赖型 FMN 还原酶 Frd181 和 Frd188 的纯化和功能鉴定

发明人对假定的 NADPH-依赖型 FMN 还原酶 Frd181 和 Frd188 进行了过表达、纯化和功能鉴定。具体如下：

（1）过表达和纯化

以 *C. crenatum* SDNN403（即 *Corynebacterium crenatum* CGMCC NO.0890）基因组为模板，利用 PCR 的方法引物扩增假定的 NADPH-依赖型 FMN 还原酶的编码基因 *frd1*(对应 *C. glutamicum* ATCC13032 基因 *cg3223*)和 *frd2*(对应 *C. glutamicum* ATCC13032 基因 *cg1150*)，引物序列如下（核苷酸序列分别如 SEQ ID NO:5~SEQ ID NO:8 所示）：

28a-*frd1*F：CCGGAATTCATGAAAATCGGCGTCATTCTAG

28a-*frd1*R：CCGCTCGAGTTAATCGCGGACAGCCGTTAGGAGGC

28a-*frd2*F：CCGGAATTCATGAGCAAGATCGCCATCATCAC

28a-*frd2*R：CCCAAGCTTTTAGACGTTTGCAGACTC

将获得的*frd1*和*frd2*基因片段与pET-28a线性化质粒连接，并热激转化*E.coli* BL21，挑取阳性转化子，获得重组菌BL21/pET-28a-*frd1*和BL21/pET-28a-*frd2*。诱导重组菌BL21/pET-28a-*frd1*和BL21/pET-28a-*frd2*过表达目标蛋白Frd181和Frd188。超声波细胞破碎后镍柱亲和层析纯化获得目标蛋白Frd181和Frd188。

经过镍柱亲和层析纯化获得目标蛋白Frd181和Frd188，利用SDS-PAGE分析蛋白纯化情况，结果表明纯化效果较好。

（2）对蛋白Frd181和Frd188进行功能鉴定。

反应体系：0.1 M pH7.5 Tris-HCl，75 μM NAD(P)H，50 μM 黄素(FMN、FAD和核黄素)和适量酶液。通过测定OD_{340}的变化监测NAD(P)H的消耗情况。同时采用酚红-辣根过氧化物酶方法和生物传感分析仪测定反应体系中H_2O_2的生成情况。

对Frd181和Frd188进行功能鉴定的结果表明，Frd181在FMN和FAD存在条件下能够氧化NADPH，在FMN、FAD和核黄素存在条件下能够氧化NADH，并且在FAD和核黄素存在条件下具有很高的NADH氧化活性。Frd188在FMN和FAD存在条件下能够氧化NADPH和NADH。H_2O_2生成分析表明Frd181和Frd188催化反应体系中均有H_2O_2生成。以上结果表明Frd181和Frd188为产H_2O_2 NAD(P)H-依赖型黄素还原酶。

实施例2：基因敲除菌株的构建

以*C. crenatum* SDNN403基因组为模板，重叠延伸PCR方法获得*frd1*和*frd2*基因缺失片段，引物序列如下（核苷酸序列分别如SEQ ID NO:9~SEQ ID NO:16所示）：

Δ*frd1*-1：CCGGAATTCATGAAAATCGGCGTCATTCTAG

Δ*frd1*-2：GTTGGCAGCACCTGGAACAGTGG

Δ*frd1*-3：CCACTGTTCCAGGTGCTGCCAACGAAGGTGTCCGTGCTGTTGAGCAG

Δ*frd1*-4：CTAGTCTAGATTAATCGCGGACAGCCGTTAGGAGGC

Δ*frd2*-1：CCGGAATTCATGAGCAAGATCGCCATCATCAC

Δ*frd2*-2：CTGGCATTGCTTCGTCGAG

Δ*frd2*-3：CTCGACGAAGCAATGCCAGCAGATCGCACACGTTC

Δ*frd2*-4：CCCAAGCTTTTAGACGTTTGCAGACTC

将获得的*frd1*和*frd2*基因缺失片段与pK18*mobsac*B线性化载体连接，并转入*E.coli* JM109，挑取阳性转化子，构建质粒pK18*mobsac*B-Δ*frd1*和pK18*mobsac*B-Δ*frd2*。

将pK18*mobsac*B-Δ*frd1*和pK18*mobsac*B-Δ*frd2*质粒电击转化*C. crenatum* SDNN403，经1800 V，5 ms电击后涂布于含有LBG+ Km固体培养基平板上，30℃ 培养24~36 h，第一次

同源重组转化子长出。再分别将目标转化子在含蔗糖的培养基中进行胁迫二次重组筛选，最终在 LBG 平板上进行划线分离并挑取多个转化子，通过 PCR 对发生第二次同源重组的菌株进行回复野生型/基因缺失型的鉴定。鉴定正确的菌株分别命名为 403Δ*frd1* 和 403Δ*frd2*。在 403Δ*frd1* 菌株中继续敲除 *frd2* 基因，得到菌株 403Δ*frd12*。

实施例 3：*frd1* 或者 *frd2* 基因敲除对 L-精氨酸合成的影响

403Δ*frd1*、403Δ*frd2*、403Δ*frd12* 摇瓶发酵。发酵培养基成分：葡萄糖 120 g/L，玉米浆 40 g/L，生物素 8×10^{-5} g/L，组氨酸 5×10^{-4} g/L，硫酸锰 0.02 g/L，硫酸铵 20 g/L，硫酸镁 0.5 g/L，磷酸二氢钾 1.5 g/L，硫酸亚铁 0.02g/L。发酵温度为 30 ℃，摇床转速 220 r/min。发酵 60 h L-精氨酸产量 403Δ*frd1* 为 18.4 g/L，403Δ*frd2* 为 16.3 g/L，403Δ*frd12* 为 18.7 g/L。

对照实施例：*C. crenatum* SDNN403 摇瓶发酵，发酵培养基成分与发酵条件同实施例 3。发酵 60 h L-精氨酸产量为 15.8 g/L。

以上数据说明，敲除 *frd1* 和/或者 *frd2* 基因，能够使菌株的 L-精氨酸产量分别提高 16.46%、3.16%。

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。

序列表

<110> 江南大学

<120> 一种通过敲除黄素还原酶提高L-精氨酸产量的方法

<160> 16

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 546
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 1

atgaaaatcg gcgtcattct aggaagtatc cgcgagggtc ggttcggtgc aggtgttgcc 60
gattgggtca tggaacaagt cgcagcatat gctgcccccg atgcggagtt tgaactccta 120
gaccttaaat ctttcaatgt tccactgttg gaatccgcca ctgttccagg tgctgccaac 180
aaacaatacg acgatccgca ggtcactgcc tggtctaaag ccatcgatgc ctgtgacgcc 240
tttatttttca tcacccccga gtacaaccac ggtgtacccg gcgcgttcaa aaatgccttc 300
gatgtcttag gcaatgagtg gcaaaacaaa gttgtcgctt tcgtttccta tggtgcagct 360
gaaggtgtcc gtgctgttga gcagtggcgc caaattgtcg gaaacttcaa tatttttgat 420
atccgcagcc aggtaacttt ttccaccttc actgaaaata aagacggcgc gtttagcccc 480
aacgaacgcc gcgccggtga attagacagg ctgcttgaca gcctcctaac ggctgtccgc 540
gattaa 546

<210> 2
<211> 181
<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 2

Met Lys Ile Gly Val Ile Leu Gly Ser Ile Arg Glu Gly Arg Phe Gly
1 5 10 15

Ala Gly Val Ala Asp Trp Val Met Glu Gln Val Ala Ala Tyr Ala Ala
20 25 30

Pro Asp Ala Glu Phe Glu Leu Leu Asp Leu Lys Ser Phe Asn Val Pro
35 40 45

Leu Leu Glu Ser Ala Thr Val Pro Gly Ala Ala Asn Lys Gln Tyr Asp
50 55 60

Asp Pro Gln Val Thr Ala Trp Ser Lys Ala Ile Asp Ala Cys Asp Ala
65 70 75 80

Phe Ile Phe Ile Thr Pro Glu Tyr Asn His Gly Val Pro Gly Ala Phe
85 90 95

Lys Asn Ala Phe Asp Val Leu Gly Asn Glu Trp Gln Asn Lys Val Val
100 105 110

Ala Phe Val Ser Tyr Gly Ala Ala Glu Gly Val Arg Ala Val Glu Gln
115 120 125

Trp Arg Gln Ile Val Gly Asn Phe Asn Ile Phe Asp Ile Arg Ser Gln
130 135 140

Val Thr Phe Ser Thr Phe Thr Glu Asn Lys Asp Gly Ala Phe Ser Pro
145 150 155 160

Asn Glu Arg Arg Ala Gly Glu Leu Asp Arg Leu Leu Asp Ser Leu Leu
165 170 175

Thr Ala Val Arg Asp
180

<210> 3

<211> 567

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

atgagcaaga tcgccatcat caccggttcc acccgcccag gccgcgtcaa cattgacgta 60

gccaactggg ttctcgagcg cgcacaagag cgcaacgatg cacagtacga gctcgttgat 120

atcgccgatt tcaacttccc cgtcctcgac gaagcaatgc cagccggcta cggccagtat 180

gcaaacgagc acaccaaggc atgggcagca aagatcgcag aatttgatgg cttcatcttt 240

gttaccggcg aatacaacca ctccgtccca gcagcactaa ccaacgccct ttcctacctc 300

tccgcagagt ggaacaacaa ggctgcaggc atcgtctcct acggctccgc aatgggcgtt 360

cgcgcagctg agcacctccg cggcatcctt tccgagcttc agatcgcaca cgttcaaaag 420

accggcctgc tgagcatctt caccgacttc gaatacccta acttcaagcc ttccgagcag 480

ggcatctcct ctgtggacgc tatgcttgag cagcttgttg tctggaccaa ggcaatgtcc 540

accattcgtg agtctgcaaa cgtctaa 567

<210> 4

<211> 188

<212> PRT

<213> 人工序列

<400> 4

Met Ser Lys Ile Ala Ile Ile Thr Gly Ser Thr Arg Pro Gly Arg Val

1 5 10 15

Asn Ile Asp Val Ala Asn Trp Val Leu Glu Arg Ala Gln Glu Arg Asn

20 25 30

Asp Ala Gln Tyr Glu Leu Val Asp Ile Ala Asp Phe Asn Phe Pro Val

35 40 45

Leu Asp Glu Ala Met Pro Ala Gly Tyr Gly Gln Tyr Ala Asn Glu His

50 55 60

Thr Lys Ala Trp Ala Ala Lys Ile Ala Glu Phe Asp Gly Phe Ile Phe

65 70 75 80

Val Thr Gly Glu Tyr Asn His Ser Val Pro Ala Ala Leu Thr Asn Ala

85 90 95

Leu Ser Tyr Leu Ser Ala Glu Trp Asn Asn Lys Ala Ala Gly Ile Val

100 105 110

Ser Tyr Gly Ser Ala Met Gly Val Arg Ala Ala Glu His Leu Arg Gly

115 120 125

Ile Leu Ser Glu Leu Gln Ile Ala His Val Gln Lys Thr Gly Leu Leu

130 135 140

Ser Ile Phe Thr Asp Phe Glu Tyr Pro Asn Phe Lys Pro Ser Glu Gln

145 150 155 160

Gly Ile Ser Ser Val Asp Ala Met Leu Glu Gln Leu Val Val Trp Thr

165 170 175

Lys Ala Met Ser Thr Ile Arg Glu Ser Ala Asn Val

180 185

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

ccggaattca tgaaaatcgg cgtcattcta g 31

<210> 6

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

ccgctcgagt taatcgcgga cagccgttag gaggc 35

<210> 7

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

ccggaattca tgagcaagat cgccatcatc ac 32

<210> 8

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

cccaagcttt tagacgtttg cagactc 27

<210> 9

<211> 31

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

ccggaattca tgaaaatcgg cgtcattcta g 31

<210> 10

<211> 23

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

gttggcagca cctggaacag tgg 23

<210> 11

<211> 47

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 11

ccactgttcc aggtgctgcc aacgaaggtg tccgtgctgt tgagcag 47

<210> 12

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

ctagtctaga ttaatcgcgg acagccgtta ggaggc 36

<210> 13

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 13

ccggaattca tgagcaagat cgccatcatc ac 32

<210> 14

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 14

ctggcattgc ttcgtcgag 19

<210> 15

<211> 35

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 15

ctcgacgaag caatgccagc agatcgcaca cgttc 35

<210> 16

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 16

cccaagcttt tagacgtttg cagactc 27

权 利 要 求 书

1. 一种钝齿棒杆菌重组菌，其特征在于，所述重组菌是缺失了 NADPH-依赖型 FMN 还原酶基因 *frd1* 和/或 *frd2* 的钝齿棒杆菌。

2. 根据权利要求 1 所述的钝齿棒杆菌重组菌，其特征在于，所述 NADPH-依赖型 FMN 还原酶基因 *frd1*、*frd2* 的氨基酸序列分别如 SEQ NO. 3、SEQ NO. 4 所示。

3. 根据权利要求 1 所述的钝齿棒杆菌重组菌，其特征在于，所述钝齿棒杆菌重组菌是将 *Corynebacterium crenatum* CGMCC NO: 0890 中的 NADPH-依赖型 FMN 还原酶基因敲除得到的。

4. 根据权利要求 1 所述的钝齿棒杆菌重组菌，其特征在于，所述 NADPH-依赖型 FMN 还原酶基因 *frd1*、*frd2* 的的核苷酸序列分别如 SEQ NO. 1 或者 SEQ NO. 2 所示。

5. 一种合成 L-精氨酸的方法，其特征在于，所述方法是利用权利要求 1-5 任一所述的钝齿棒杆菌重组菌为生产菌株进行发酵培养。

6. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于，所述发酵是在 28~32℃下进行；用于发酵的发酵培养基成分：葡萄糖 120 g/L，玉米浆 40 g/L，生物素 8×10^{-5} g/L，组氨酸 5×10^{-4} g/L，硫酸锰 0.02 g/L，硫酸铵 20 g/L，硫酸镁 0.5 g/L，磷酸二氢钾 1.5 g/L，硫酸亚铁 0.02g/L。

7. 一种通过敲除黄素还原酶促进 L-精氨酸合成的方法，其特征在于，所述方法是将钝齿棒杆菌的 NADPH-依赖型 FMN 还原酶基因 *frd1* 和/或 *frd2* 敲除得到重组菌，以重组菌为生产菌株合成 L-精氨酸。

8. 根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述 NADPH-依赖型 FMN 还原酶基因 *frd1*、*frd2* 的的氨基酸序列分别如 SEQ NO. 3、SEQ NO. 4 所示。

9. 根据权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述钝齿棒杆菌为 *Corynebacterium crenatum* CGMCC NO: 0890。

10. 权利要求 1-4 任一所述的钝齿棒杆菌重组菌在医药、食品或者饲料工业上的应用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/092179

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21 (2006.01) i; C12P 13/10 (2006.01) i; C12R 1/15 (2006.01) n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, C12P, C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CNABS, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ: flavin reductase, riboflavin-5-phosphate, arginine, synthesis, FMN reductase, Corynebacterium crenatum, flavin mononucleotide, fmn, NADPH, searching on SEQ ID NOs: 1-4, inventors and applicants

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 1441055 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 10 September 2003 (10.09.2003) see claims 1-4	1-10
Y	TAO, Shuai. "Proteomic Research of L-arginine Hyper Producing Corynebacterium Crenatum in Different Oxygen-supplying Strategy" China Master's Theses Full-text Database (Electronic Journal) Engineering Technology I, 2011, no. 8, pages B018-46, 31 August 2011 (31.08.2011), ISSN: 1674-0246, see the abstract and introduction	1-10
Y	"GENBANK ACCESSION NUMBER: WP-003857758.1" GENBANK, 07 June 2015 (07.06.2015), see sequence and relevant information	2, 4-6, 8, 10 (all partly)
Y	"GENBANK ACCESSION NUMBER: WP-003856821.1" GENBANK, 07 June 2015 (07.06.2015), see sequence and relevant information	2, 4-6, 8, 10 (all partly)

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
11 April 2017	03 May 2017
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer SUN, Yanke Telephone No. (86-10) 62088439

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/092179

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0007476 B1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 24 March 1982 (24.03.1982) see the whole document	1-10
A	WO 0144447 A1 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG et al.) 21 June 2001 (21.06.2001) see the whole document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/092179

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing filed or furnished:

   a. (means)

   ☐ on paper

   ☒ in electronic form

   b. (time)

   ☐ in the international application as filed

   ☒ together with the international application in electronic form

   ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/092179

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1441055 A	10 September 2003	CN 1169946 C	06 October 2004
EP 0007476 B1	24 March 1982	AU 4839179 A	07 February 1980
		DD 145325 A5	03 December 1980
		EP 0007476 A1	06 February 1980
		AT A440279 A	15 January 1981
		CA 1131109 A	07 September 1982
		JP S5728278 B2	15 June 1982
		US 4278760 A	14 July 1981
		AT 363616 B	25 August 1981
		JP S5521800 A	16 February 1980
		AU 513731 B2	18 December 1980
		DE 2833723 A1	21 February 1980
WO 0144447 A1	21 June 2001	CN 1409759 A	09 April 2003
		EP 1238062 A1	11 September 2002
		AR 026939 A1	05 March 2003
		AU 772124 B2	08 April 2004
		IL 150084 D0	01 December 2002
		EA 004942 B1	28 October 2004
		AU 1707801 A	25 June 2001
		JP 2003516749 A	20 May 2003
		CA 2393910 A1	21 June 2001
		BR 0017024 A	07 January 2003
		HU 0203807 A2	28 February 2003
		MX PA02005868 A	23 October 2002
		EA 200200634 A1	26 December 2002
		HU 0203807 A3	28 October 2004

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/092179

A. 主题的分类

C12N 1/21(2006.01)i; C12P 13/10(2006.01)i; C12R 1/15(2006.01)n

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N, C12P, C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

数据库：DWPI, SIPOABS, CPRSABS, CNABS, PUBMED, GENBANK+EMBL+DDBJ 检索词：黄素还原酶，钝齿棒杆菌，FMN还原酶，核黄素-5-磷酸，精氨酸，合成，FMN reductase，Corynebacterium crenatum, flavin mononucleotide, fmn, NADPH, 对SEQ ID NOs：1-4进行检索，对发明人和申请人进行检索

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 1441055 A (江南大学) 2003年 9月 10日 (2003 - 09 - 10) 参见权利要求1-4	1-10
Y	陶帅. "高产L-精氨酸的钝齿棒杆菌在不同供氧条件的差异蛋白质组学的研究" 中国优秀硕士学位论文全文数据库（电子期刊）工程科技Ⅰ辑2011年第8期，第B018-46页，2011年 8月 31日 (2011 - 08 - 31)， ISSN：1674-0246， 参见摘要和绪论	1-10
Y	"GENBANK登录号：WP_003857758.1" GENBANK, 2015年 6月 7日 (2015 - 06 - 07)， 参见序列及相关信息	2，4-6，8，10（均为部分）
Y	"GENBANK登录号：WP_003856821.1" GENBANK, 2015年 6月 7日 (2015 - 06 - 07)， 参见序列及相关信息	2，4-6，8，10（均为部分）
A	EP 0007476 B1 (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH) 1982年 3月 24日 (1982 - 03 - 24) 参见全文	1-10

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2017年 4月 11日	2017年 5月 3日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 孙彦珂 电话号码 (86-10)62088439

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	WO 0144447 A1 (SYNGENTA PARTICIPATIONS AG等) 2001年 6月 21日 (2001-06-21) 参见全文	1-10

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2016/092179

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何对要求保护的发明必要的核苷酸和/或氨基酸序列，国际检索是在下列基础上进行的：

a. (提交提供)

☐ 纸件形式

☑ 电子形式

b. (提交时间)

☐ 含在申请提交时的国际申请中

☑ 以电子形式与国际申请一起提交

☐ 为检索之用随后提交本单位

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的申请中的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2016/092179

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	1441055	A	2003年 9月 10日	CN	1169946	C	2004年 10月 6日
EP	0007476	B1	1982年 3月 24日	AU	4839179	A	1980年 2月 7日
				DD	145325	A5	1980年 12月 3日
				EP	0007476	A1	1980年 2月 6日
				AT	A440279	A	1981年 1月 15日
				CA	1131109	A	1982年 9月 7日
				JP	S5728278	B2	1982年 6月 15日
				US	4278760	A	1981年 7月 14日
				AT	363616	B	1981年 8月 25日
				JP	S5521800	A	1980年 2月 16日
				AU	513731	B2	1980年 12月 18日
				DE	2833723	A1	1980年 2月 21日
WO	0144447	A1	2001年 6月 21日	CN	1409759	A	2003年 4月 9日
				EP	1238062	A1	2002年 9月 11日
				AR	026939	A1	2003年 3月 5日
				AU	772124	B2	2004年 4月 8日
				IL	150084	D0	2002年 12月 1日
				EA	004942	B1	2004年 10月 28日
				AU	1707801	A	2001年 6月 25日
				JP	2003516749	A	2003年 5月 20日
				CA	2393910	A1	2001年 6月 21日
				BR	0017024	A	2003年 1月 7日
				HU	0203807	A2	2003年 2月 28日
				MX	PA02005868	A	2002年 10月 23日
				EA	200200634	A1	2002年 12月 26日
				HU	0203807	A3	2004年 10月 28日