



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101939432 B

(45) 授权公告日 2013. 02. 13

(21) 申请号 200980103315. 6

(22) 申请日 2009. 01. 23

(30) 优先权数据

10-2008-0010073 2008. 01. 31 KR

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 07. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/KR2009/000382 2009. 01. 23

(87) PCT申请的公布数据

W02009/096690 KO 2009. 08. 06

(83) 生物保藏信息

KCCM10920P 2008. 01. 18

(73) 专利权人 CJ 第一制糖株式会社

地址 韩国首尔

(72) 发明人 金喆河 崔宗秀 林相曹 金亨俊
罗昭妍 田桂恒

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 赵蓉民

(51) Int. Cl.

C12N 15/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1539015 A, 2004. 10. 20, 全文.

CN 1367827 A, 2002. 09. 04, 全文.

Ishino et al. Nucleotide sequence of the meso-diaminopimelate D-dehydrogenase gene from *Corynebacterium glutamicum*. 《Nucleic Acids Research》. 1987, 第 15 卷 (第 9 期), 3917.

Schrumpf B et al. A Functionally split pathway for lysine synthesis in *corynebacterium glutamicum*. 《Journal of Bacteriology》. 1991, 第 173 卷 (第 14 期), 4510-4516.

Ishino et al. Nucleotide sequence of the meso-diaminopimelate D-dehydrogenase gene from *Corynebacterium glutamicum*. 《Nucleic Acids Research》. 1987, 第 15 卷 (第 9 期), 3917.

Bastian Blombach et al. Effect of pyruvate dehydrogenase complex deficiency on L-lysine production with *Corynebacterium glutamicum*. 《Applied Microbiology and Biotechnology》. 2007, 第 76 卷 (第 3 期), 615-623.

审查员 张丽颖

权利要求书 1 页 说明书 8 页

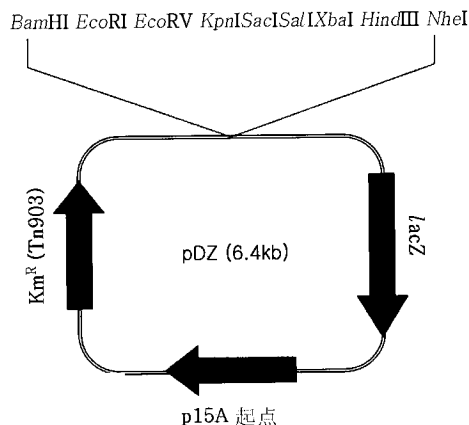
序列表 2 页 附图 1 页

(54) 发明名称

改进的启动子和用其产生 L-赖氨酸的方法

(57) 摘要

本发明公开了具有改进的启动子活性的被可操作地连接到编码二氨基庚二酸脱氢酶基因的谷氨酸棒杆菌来源的核酸分子, 包含该核酸分子的载体, 转化有该载体的转化体, 和利用该转化体产生 L-赖氨酸的方法。



1. 一种核酸分子,其具有改进的用于表达的启动子活性,由 SEQ ID NO. 2 的核苷酸序列组成,并且被可操作地连接到编码二氨基庚二酸脱氢酶的基因。
2. 一种载体,其包括权利要求 1 所述的核酸分子。
3. 一种转化体,其具有权利要求 2 所述的载体。
4. 根据权利要求 3 所述的转化体,其属于棒状杆菌属或短杆菌属。
5. 根据权利要求 3 所述的转化体,其被称为 CA01-0136,具有登录号 KCCM10920P。
6. 根据权利要求 3 所述的转化体,其中具有改进的启动子活性的权利要求 1 所述的核酸分子通过同源重组整合到转化体的基因组中。
7. 根据权利要求 3 所述的转化体,其具有权利要求 1 所述的分子,所述分子具有改进的启动子活性,所述分子被插入质粒。
8. 一种产生赖氨酸的方法,其包括步骤:
将包含权利要求 1 所述的核酸分子的载体转化至产赖氨酸微生物,得到转化体 ;和
发酵所述转化体,从而生产赖氨酸。

改进的启动子和用其产生 L- 赖氨酸的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及改进的启动子和用其产生 L- 赖氨酸的方法。更具体的是,本发明涉及谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 来源的显示改良启动子活性的被可操作地连接到编码二氨基庚二酸脱氢酶的基因的核酸分子;含有所述核酸分子的载体;所述载体被引入其中的转化体;和利用所述转化体产生 L- 赖氨酸的方法。

背景技术

[0002] 棒状细菌是传统工业微生物,其最广泛用于各种在动物饲料、药物和食品工业中有用的化学物质的产生,包括氨基酸,如 L- 赖氨酸、L- 苏氨酸、L- 精氨酸、L- 苏氨酸和谷氨酸,以及核酸相关物质。这些微生物是革兰氏阳性的且其生长需要生物素。它们通过劈裂 (snapping) 分裂,它们对其产生的代谢物的弱降解力可被有益利用。棒状细菌的代表性实例包括如谷氨酸棒杆菌的棒状杆菌属、如黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) 的短杆菌属、节杆菌某些种 (*Athrobacter* spp.) 和微杆菌某些种 (*Microbacterium* spp.) 等。

[0003] L- 赖氨酸是商业上重要的 L- 氨基酸,由于其帮助机体吸收其它氨基酸的能力从而提高饲料质量而被用作动物营养的饲料添加剂。对于机体, L- 赖氨酸用作注射液成分,并且也发现在药物领域中的应用。因此, L- 赖氨酸的工业生产是经济上重要的工业方法。

[0004] 赖氨酸的产率与生物合成途径中的酶活性有关,该活性一般通过扩增赖氨酸生物合成途径中一个或多个基因或通过应用基因的修饰的启动子来增强。在其中赖氨酸生物合成相关基因被增强的棒状杆菌菌株和利用其进行 L- 赖氨酸生产是熟知的。例如,美国专利号 6, 746, 855 公开了通过发酵具有增强的 *lysE* 基因 (赖氨酸输出载体基因) 的产 L- 赖氨酸的棒状杆菌来产生 L- 赖氨酸的方法,其中另外地,选自 *dapA* 基因、*lysC* 基因、*pyc* 基因和 *dapB* 基因的基因被增强。美国专利号 6, 221, 636 公开了用包含编码天冬氨酸激酶的核苷酸序列和编码二氨基庚二酸脱羧酶的核苷酸序列的重组 DNA 转化的棒状杆菌,在编码天冬氨酸激酶的核苷酸序列中, L- 赖氨酸和 L- 苏氨酸的反馈抑制实质上降低了敏感性 (desensitized)。

[0005] 韩国专利号 10-0345592 描述了经修饰以消除 L- 赖氨酸反馈抑制的 *dapA* 和 *lysC* 被引入并且 *dapB* 和 *ddh* 基因被扩增的埃希氏菌属菌株 (*Escherichia* strain), 和利用其产生 L- 赖氨酸的方法。

[0006] 为了将棒状细菌发展为能够高滴度产生目标产物的变体,需要可选择性控制涉及代谢基因的基因或代谢工程技术。为此,重要的是修饰启动子的活性——为 RNA 聚合酶提供可靠的初始结合位点以控制被调节的基因转录的调节性 DNA 区域。

[0007] 在许多专利中发现源于棒状细菌的修饰的启动子。例如,名称为“Gene expression regulatory DNA”的美国专利号 5, 700, 661、名称为“DNA which regulates gene expression in coryneform bacteria”的美国专利号 5, 965, 391、名称为“Nucleotide sequences for transcriptional regulation in corynebacterium glutamicum”的美国专利号 7, 141, 388 和名称为“Novel L-lysine-inducible promoter”

的韩国专利号 10-0653742 描述了棒状杆菌的启动子, 名称为“Novel promoter nucleic acid originating from corynebacterium genus bacteria, expression cassette comprising the promoter and vector comprising the cassette, host cell comprising the vector and method for expressing a gene using the cell”的韩国专利公开号 10-2006-0068505 述及产氨棒状杆菌 (*Corynebacterium ammoniagenes*) 的启动子。

[0008] 但是, 迄今没有公开过这样的棒状细菌, 该棒状细菌在赖氨酸生物合成途径中发挥重要作用的 ddh (二氨基庚二酸脱氢酶) 活性上得到改进, 其具有所述 ddh 增强的启动子来置换宿主细胞基因组上的内源启动子。

发明内容

[0009] 技术问题

[0010] 本发明对 L- 赖氨酸的产生进行透彻而深入的研究, 发现当在棒状杆菌基因组中转化有在特定碱基处修饰的 ddh 基因启动子时, 棒状杆菌属微生物显示比内源活性改进的二氨基庚二酸脱氢酶活性。

[0011] 技术方案

[0012] 本发明的目的之一是提供源于谷氨酸棒杆菌的核酸分子, 其显示改进的启动子活性。

[0013] 本发明的另一目的是提供含有核酸分子的载体, 该核酸分子显示改进的启动子活性。

[0014] 本发明另一个目的是提供在其中锚定有 (anchored) 载体的转化体。

[0015] 本发明还另一个目的是提供通过发酵转化体产生 L- 赖氨酸的方法。

[0016] 有利效果

[0017] 当源于谷氨酸棒杆菌的表现改良的启动子活性的核酸分子被可操作地连接到 ddh 基因时, 根据本发明的谷氨酸棒杆菌比野生型启动子显示更高的启动子活性, 并因此可提高二氨基庚二酸脱氢酶的水平。因此, 用核酸分子转化的产赖氨酸菌株可高产率产生赖氨酸。

附图说明

[0018] 图 1 是显示整合到棒状杆菌基因组的载体 pDZ 遗传图谱的示意图。

[0019] 图 2 是显示用于启动子置换的载体 pDZ-ddhP1 的遗传图谱的示意图。

[0020] 最佳实施方式

[0021] 根据其一方面, 本发明涉及具有 SEQ ID NO. 2 核苷酸序列的谷氨酸棒杆菌来源的核酸分子, 其可操作地连接到编码二氨基庚二酸脱氢酶的基因, 并显示改进的启动子活性。

[0022] 术语“启动子”如本文所用, 指含有 RNA 聚合酶初始结合位点并促进其下游特定基因转录的 DNA 区域。即, 启动子是非翻译核苷酸序列, 编码区域的上游, RNA 聚合酶结合于此从而起始基因转录, 并通常位于其调节的基因附近, 在同一条链上游 (接近正义链的 5' 区域)。

[0023] 来源于谷氨酸棒杆菌的具有启动子活性的本发明核酸分子可操作地连接到编码二氨基庚二酸脱氢酶的基因。ddh 基因编码二氨基庚二酸脱氢酶, 在棒状杆菌属的赖氨酸生

物合成途径中具有重要作用。

[0024] 术语“可操作地连接”，如本文所用，意指具有根据本发明所述启动子活性的核苷酸序列与启动子序列之间的连接，以这样的功能关系启动子可进行编码二氨基庚二酸脱氢酶的基因转录的起始或停止。即，当被可操作地连接到 *ddh* 基因时，具有根据本发明所述启动子活性的核苷酸序列可以控制 *ddh* 基因的转录活性。

[0025] 具有根据本发明所述启动子活性的核苷酸序列，其来源于谷氨酸棒杆菌野生型 *ddh* 基因启动子，经修饰以确保优于内源活性的酶活性。内源活性意思是野生型棒状细菌中的酶活性。确保更高启动子活性的修饰可利用本领域公知的技术实现，优选地通过删除、插入、非保守或保守取代或其组合来诱导 *ddh* 基因的启动子的核苷酸序列突变。

[0026] 具有根据本发明所述启动子活性的核酸分子可利用标准生物技术分离或制备。例如，可在适当引物存在下进行 PCR 来分离。可选地，可利用标准生物技术使用自动 DNA 合成器合成。在一个实施方式中，基于核苷酸序列 (SEQ ID NO. 1)——其含有获自 NIH GenBank 数据的 *ddh* 基因 (NCBI 基因 ID :NCg12528) 的启动子区域，合成了 4 个引物 (SEQ ID NOS. 3 ~ 6)。在引物存在下，以谷氨酸棒杆菌 KFCC10881 的基因组 DNA 用作模板进行 PCR 以提供含有启动子的核酸分子，该核酸分子在特定碱基位置 (SEQ ID NO. 2) 具有修饰。

[0027] 优选地，具有根据本发明所述谷氨酸棒杆菌启动子活性的核酸分子可用作原核生物尤其是大肠杆菌 (*E. coli*) 或棒状细菌基因表达的启动子。如本文所用，术语“棒状细菌”是指属于棒状杆菌属或短杆菌属的微生物。可用于本发明的棒状细菌的实例包括但不限于：谷氨酸棒杆菌 ATCC13032、热产氨棒状杆菌 (*Corynebacterium thermoaminogenes*) FERM BP-1539、黄色短杆菌 (*Brevibacterium flavum*) ATCC 14067、乳糖发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum*) ATCC13869 和产 L-氨基酸的突变体或源自其中的菌株，如谷氨酸棒杆菌 KFCC10881 和谷氨酸棒杆菌 KFCC11001，优选的是谷氨酸棒杆菌 KFCC 10881。

[0028] 根据其另一方面，本发明涉及载体，其中定位了具有改进的启动子活性的核酸分子。

[0029] 如本文所用，术语“载体”指 DNA 构建物，其中感兴趣基因可操作地连接到调节元件以致于该基因可在适当的其中锚定有载体的宿主中表达。调节元件包括起始转录的启动子、控制转录的操纵基因、编码 mRNA 核糖体结合位点的序列和控制转录和翻译终止的序列。

[0030] 只要可在宿主内复制，本领域所知的任何载体均可用于本发明而没有特别限制。例如，可用于本发明的载体可以是质粒、噬菌体颗粒或简单地是可能的基因组插入物，但不因此限制本发明。优选载体是 pACYC177 (New England Biolab, GenBank 登录号 X06402)。转化至合适的宿主后，载体可复制或与宿主基因组无关地发挥其功能或本身整合进基因组。

[0031] 更具体地，当根据本发明所述的载体被引入宿主细胞时，载体中具有启动子活性的核酸分子可与宿主基因组上内源 *ddh* 基因的启动子区域进行同源重组，引起载体整合至宿主细胞染色体中。因此，根据本发明所述的载体可进一步包括选择标记以指示载体在宿主染色体中的插入。适于指示用载体转化的细胞，即感兴趣基因是否插入宿主细胞基因组，选择标记可使细胞具有如下能力：药物抗性、细胞毒性剂抗性、营养缺陷型或如表面蛋白表达的可选择的表型表达。在选择性试剂存在下，转化细胞可被选择，因为只有表达选择标记

的细胞存活或显示另一表型。优选地,载体可包括 lacZ 基因作为选择标记。

[0032] 在本发明的实施方式中,构建载体以含有活性改进的修饰的 ddh 启动子,其可通过同源重组取代谷氨酸棒杆菌的内源 ddh 启动子。为此,首先,将用于大肠杆菌克隆的载体 pACYC177 用限制酶消化并用 Klenow 片段平端化。分别地,包括 lacZ 基因及其启动子的核苷酸序列通过 PCR 从大肠杆菌 K12W3110 的基因组 DNA 扩增。由此获得的这两个 DNA 片段相互连接得到环状核酸分子,接着将其内包含多个限制酶位点的连接序列插入环状核酸分子中,以提供载体 pDZ(图 1),用于插入棒状杆菌染色体。其后,在特定碱基处修饰以表现高活性的 ddh 基因启动子被插入至 pDZ 载体的连接序列,以提供包括核苷酸序列 SEQ ID NO. 2 的载体 pDZ-ddhP1(图 2)。

[0033] 根据其中另一方面,本发明涉及其中锚定有载体的转化体。

[0034] 术语“转化”,如本文所用,指外源 DNA 物质引入宿主细胞,其中外源 DNA 物质可作为独立于宿主基因组或整合到宿主基因组中的元件复制。由于载体转化至宿主细胞,转化体以质粒的形式锚定有载体,或在具有启动子活性的核苷酸序列与宿主细胞基因组上 ddh 基因的内源启动子进行同源重组后,载体整合进宿主细胞染色体。

[0035] 只要用于将本发明所述的载体引入宿主细胞,任何技术可用于本发明。取决于宿主细胞,可选择适当的标准技术,例如电穿孔、磷酸钙 (CaPO4) 沉淀、氯化钙 (CaCl2) 沉淀、显微注射、聚乙二醇 (PEG) 技术、DEAE-葡聚糖技术、阳离子脂质体技术和醋酸锂-DMSO 技术。

[0036] 使用高效摄取和表达外源 DNA 物质的宿主细胞是有用的,其可适用于包括原核生物和真核生物在内的所有微生物。优选地,可使用大肠杆菌或棒状细菌,更优选地是谷氨酸棒杆菌 KFCC10881。

[0037] 在用本发明所述的载体转化的细胞中,具有改良活性的改良启动子通过同源重组取代了内源启动子,加强了 ddh 基因的 mRNA 水平。因此,转化体比野生型具有更高的二氨基庚二酸脱氢酶活性。

[0038] 在本发明的一个实施方式中,载体 pDZ-lysCP1——其中包含具有本发明所述的核苷酸序列 SEQ ID NO. 2 的启动子——被转化至谷氨酸棒杆菌 KFCC10881 以得到转化体 (KFCC10881-ddhP1),命名为

CA01-0136, 其显示改进的二氨基庚二酸脱氢酶活性, 然后该转化体于
2008 年 1 月 18 日以编号 KCCM10920P 被保藏于韩国微生物保藏中心
(the Korean Culture Center of Microorganisms) (下文称“KCCM”)。

[0039] 根据其另一方面,本发明涉及包括转化体发酵的赖氨酸产生方法。

[0040] 与野生型相比,根据本发明所述的转化体在二氨基庚二酸脱氢酶活性上有所改良。因为二氨基庚二酸脱氢酶是赖氨酸生物合成途径中最重要的酶,所以转化体的发酵引起赖氨酸较高产率的产生。

[0041] 在本发明中,可利用公知方法进行转化体的发酵,并可适当地控制发酵条件,包括温度、时间、pH 等。以下文件提供了发酵的详细描述 [Chmiel ;Bioprozesstechnik 1.Einführung in die Bioverfahrenstechnik(Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991), 以及 Storhas ;Bioreaktoren undperiphere Einrichtungen(Vieweg Verlag,

Braunschweig/Wiesbaden, 1994)]。发酵可通过分批培养、连续培养或补料分批培养实现。优选地,补料分批或重复补料分批方法用于发酵的连续方式,但本发明不限于此。

[0042] 用于发酵,培养基必须满足所用菌株的需要。适用于培养各种微生物的培养基是本领域公知的(如,来自 American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) 的“Manual of Methods for General Bacteriology”)。培养基可包含如碳源糖(saccharides)和碳水化合物(carbohydrates)(如葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、糖蜜、淀粉和纤维素),脂质和脂肪(如豆油、葵花籽油、花生油和椰子油),脂肪酸(如棕榈酸、硬脂酸、蓖麻酸(rinoleic acid)),醇(如甘油和乙醇)和有机酸(如醋酸)。这些物质可分别使用或组合使用。作为氮源,含氮有机化合物(如蛋白胨、酵母提取物、肉汤、麦芽汁、玉米浆、豆粕和尿素)或含氮无机化合物(如硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵和硝酸铵)可分别使用或组合使用。用于培养基的磷源的实例包括磷酸氢二钾、磷酸二氢钾和相应的钠盐。

[0043] 另外,培养基可包含细胞生长必需的金属盐(如硫酸镁或硫酸铁),并可补充必需营养物如氨基酸和维生素以刺激生长。此外,可向培养基添加适当的前体。可一次一起或在发酵过程中分别添加营养物和添加剂。

[0044] 培养基的 pH 可用碱性化合物(如氢氧化钠、氢氧化钾或氨水)或酸性化合物(如磷酸或硫酸)调节。培养基中泡沫的生成可用消泡剂如聚乙二醇脂肪酸酯抑制。可通过在其中引入氧气或含氧气体混合物将培养基保持在有氧条件下。对于培养温度,通常在 20°C 到 45°C 之间,优选地在 25°C 到 40°C 之间。发酵连续进行直到产生 L-氨基酸的最大量。在这方面,可在 10 到 160 小时内完成。L-赖氨酸产生后,L-赖氨酸可输出至培养基或可保持在细胞内。

[0045] 可选地,本发明所述赖氨酸的产生方法可进一步包括收集产生的赖氨酸。可利用公知方法从培养基或细胞分离 L-赖氨酸。用于本发明的收集方法的实例包括过滤、阴离子交换层析、结晶和 HPLC,但不限于此。

[0046] 通过以下描述的实例可获得对本发明更好的理解,但其意图不是限制本发明。

[0047] 发明方式

[0048] 在以下实施例中,构建了重组载体以包含谷氨酸棒杆菌 ddh 基因的启动子,其经修饰而具有改进的活性。重组载体被转化至谷氨酸棒杆菌 KFCC10881,其中修饰的 ddh 启动子随即通过与内源启动子的同源重组整合至细胞基因组,产生能高产率产生赖氨酸的新菌株。

[0049] 从谷氨酸棒杆菌野生型菌株(ATCC13032)经人工诱变,用于本发明的谷氨酸棒杆菌 KFCC10881 对 S-(2-氨基乙基)半胱氨酸(下文称“AEC”提及)和高丝氨酸渗漏具有抗性(韩国专利号 0159812 和 0397322)。

[0050] 实施例 1:包含改良启动子的重组载体的构建

[0051] (1) 用于整合到基因组的载体构建(pDZ)

[0052] 在该实施例中,pDZ——要整合到棒状杆菌基因组的载体——在用于大肠杆菌的载体 pACYC177(New England Biolab, GenBank accession #X06402)的基础上构建。

[0053] 经 *AcuI* 和 *BanI* 处理后,用 Klenow 片段将 pACYC177 载体平端化。用作选择标记,源自大肠杆菌的 *lacZ* 基因的制备是通过 PCR 扩增包括该基因及其启动子的大肠杆菌

K12W3110 的基因组 DNA,接着分别用 T4DNA 聚合酶和多核苷酸激酶处理 PCR 产物以在 5' 端磷酸化并使其相对端平端化而进行的。由此获得的这两个 DNA 片段相互连接得到环状核酸分子,然后插入包含多个限制酶位点的人工合成的连接序列以提供用于插入棒状杆菌染色体的载体 pDZ。在图 1 中,用于整合到棒状杆菌染色体中的 pDZ 载体被示意性说明。

[0054] (2) 包含 ddh 基因改良启动子的载体的构建

[0055] 在该实施例中,构建了重组载体以包含产赖氨酸的菌株谷氨酸棒杆菌 ddh 基因的改良启动子。

[0056] 在 NIH GenBank 数据的基础上,首先获得包括 ddh 基因启动子区域 (NCBI ID No. NCg12528) 的核苷酸序列 (SEQ ID NO. 1)。由此核苷酸序列制备在特定碱基位置突变的 DNA 片段。各个修饰的启动子序列基于微生物中发现的常见共有启动子序列来设计。

[0057] 用于修饰启动子序列的制备,基于碱基序列合成了四条引物 (SEQ ID NOS. 3 ~ 6, 表 1)。

[0058] 表 1

[0059]

引物	核苷酸序列	SEQ ID NO.
ddh/PF	CCG GGG ATC CTC TAG AGT GCG TGG CGA GTT TTA CAA AG	3
ddh/PR	GCA GGT CGA CTC TAG AGG CGA ACT GCG CGA ACT TTG G	4
ddh/P1F	TAT GCA TTG TGG TAA GCT CG	5
ddh/P1R	CGA GCT TAC CAC AAT GCA TA	6
ddh/P1mut	CTA AGT ATG CAT TGT	7

[0060] 通过 PCR, 利用表 1 所示的引物组, 在 Pfu Ultra™ 高保真性 DNA 聚合酶 (Stratagene) 存在下, 以谷氨酸棒杆菌 KFCC10881 的基因组 DNA 作为模板制备谷氨酸棒杆菌 ddh 基因的启动子序列。以在 96℃ 变性 30 秒, 在 53℃ 退火 30 秒和在 72℃ 延伸 30 秒的 30 个循环进行 PCR。由此, PCR 产物为 300bp 长的 DNA 片段, 置换部分位于一个末端区域。用一组引物 SEQ ID NOS. 3 和 6 扩增 ddhP1-1, 用一组引物 SEQ ID NOS. 5 和 4 扩增 ddhP1-2。用 XbaI 消化 PCR 产物并用 In-fusion CloningKit (TAKARA) 将其克隆至 pDZ 以获得重组载体 pDZ-ddhP1。

[0061] 图 2 是包含整合到棒状杆菌基因组中的启动子序列 SEQ ID NO. 2 的载体 pDZ-ddhP1 的图谱。

[0062] 实施例 2: 重组载体在谷氨酸棒杆菌菌株中的引入

[0063] 在该实施例中, 将上述制备的重组载体引入至产赖氨酸的菌株谷氨酸棒杆菌 KFCC-10881, 以使载体上修饰的 ddh 启动子序列通过与基因组上内源 ddh 启动子同源重组被整合到细胞基因组中。

[0064] 为此,利用电穿孔方法(基于 Appl. Microbiol. Biotechnol. (1999) 52 :541-545)将包含与修饰启动子序列相应的 DNA 片段的重组载体 pDZ-ddhP1 转化到谷氨酸棒杆菌 KFCC10881 中,接着在含有 25mg/L 量的卡那霉素的选择培养基上选择转化体,其中修饰的启动子通过与内源启动子同源重组整合到基因组中。

[0065] 通过在含有 X-gal (5-溴-4-氯-3-吲哚基- β -D-半乳糖苷)平板上蓝色的出现鉴定载体成功插入基因组。载体整合到基因组中的单交换体在营养肉汤中搅拌培养(30℃, 8 小时),然后在涂布于含有 X-gal 的平板之前,将培养物稀释到浓度 10^{-4} 到 10^{-10} 。当生长在平板上的大多数克隆呈现蓝色时,只有少部分克隆体保持白色。选择白色的克隆体为双交换型克隆体,其锚定有在特定碱基位置处突变的 ddh 启动子。为了确证,通过 PCR 和碱基测序来检测所选菌株的碱基置换。利用一组引物 SEQ IDNOS. 4 和 7,通过 PCR 和碱基测序对 pDZ-ddhP1 转化的菌株进行启动子碱基置换检测。

[0066] 最终,通过双交换体确定产赖氨酸的菌株谷氨酸棒杆菌 KFCC10881-ddhP1,其中在特定碱基位突变的 ddh 启动子整合到基因组中。

[0067] 实施例 3:ddh 启动子-改良菌株的二氨基庚二酸脱氢酶活性检测

[0068] 培养母菌株谷氨酸棒杆菌 KFCC10881 和实施例 2 中最终制备的产 L-赖氨酸的菌株谷氨酸棒杆菌 KFCC10881-ddhP1,从培养物中分离蛋白质并如下检测二氨基庚二酸脱氢酶活性。

[0069] 将生长到对数期的各个培养物接种到 50mL 的如下种子培养基 (I),达到 OD_{600} 值为 0.3,然后培养直到在 600nm 的光密度达到约 15。离心收集后(5,000rpm,15 分钟),用 20mM Tris HCl (pH 8.0) 洗涤细胞 2 次,悬浮于相同的缓冲液中以使在 610nm 的光吸收达到浊度 160。在以 1.25g/1.5ml 悬浮液添加玻璃珠的玻璃搅拌器中破碎细胞 6 分钟。离心后(15,000rpm,20 分钟),通过 Bradford 法 (Bradford, M. M1976. Anal. Biochem. 72 :248-254) 定量测定上清液的蛋白质含量,并将上清液用作测定二氨基庚二酸脱氢酶活性的粗蛋白质溶液。

[0070] 为了量化二氨基庚二酸脱氢酶活性,将约 0.01mL 的粗蛋白质溶液与含有 0.2M 甘氨酸 /NaOH (pH 10.5)、2mM NADP 和 4mM 内消旋-二氨基庚二酸盐的反应液混合,得到总体积 1mL,并使其在 25℃ 反应 10 分钟,期间监测其在 340nm 的吸光度。二氨基庚二酸脱氢酶活性定义为 1mg 蛋白质每分钟减少的 NADPH 的微摩尔数 (μ moles) 并以单位 (U) 表示。

[0071] 观察到谷氨酸棒杆菌 KFCC10881-ddhP1 具有高于母菌株 KFCC1088123.2 倍的二氨基庚二酸脱氢酶活性(表 2)。

[0072] 表 2

[0073]

菌株	二氨基庚二酸脱氢酶 (U)	倍数
KFCC10881	25.2	1
KFCC10881-ddhP1	548.5	23.2

[0074] * 种子培养基 (I) (pH 7.0)

[0075] 葡萄糖 20g、蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、 $(NH_4)_2SO_4$ 45g、尿素 1.5g、 KH_2PO_4 4g、

K_2HPO_4 8g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g、生物素 150 μ g、盐酸硫胺 1500 μ g、泛酸钙 3000 μ g、烟碱酰胺 3000 μ g(每升蒸馏水)

[0076] 实施例 4:ddh 启动子-改良菌株的赖氨酸的产生

[0077] 将母菌株谷氨酸棒杆菌 KFCC10881 和实施例 2 中制备的产 L-赖氨酸的菌株谷氨酸棒杆菌 KFCC10881-ddhP1 发酵以产生 L-赖氨酸,如下。

[0078] 将谷氨酸棒杆菌 KFCC10881 和 KFCC10881-ddhP1 接种至 250mL 弯头-挡板瓶中,各瓶包含 25mL 如下的种子培养基 (II),在 30℃以 200rpm 振荡培养 20 小时。向 250mL 弯头-挡板瓶中的 24mL 如下的产生培养基中加入 1mL 种子培养物,接着在 30℃振荡 (200rpm) 培养 120 小时。

[0079] 培养完成后,进行 HPLC 分析以确定菌株产生的 L-赖氨酸的量。谷氨酸棒杆菌 KFCC10881 和 KFCC10881-ddhP1 的培养物中 L-赖氨酸的浓度总结在表 3 中,如下。

[0080] 表 3

菌株	赖氨酸 (g/l)		
	第 1 批	第 2 批	第 3 批
KFCC10881	43.2	42.5	42.5
KFCC10881-ddhP1	44.2	44.2	44.1

[0082] * 种子培养基 (II) (pH 7.0)

[0083] 原糖 20g、蛋白胨 10g、酵母提取物 5g、尿素 1.5g、 KH_2PO_4 4g、 K_2HPO_4 8g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g、生物素 100 μ g、盐酸硫胺 1000 μ g、泛酸钙 2000 μ g、烟碱酰胺 2000 μ g(每升蒸馏水)

[0084] * 产生培养基 (pH 7.0)

[0085] 葡萄糖 100g、 $(NH_4)_2SO_4$ 40g、大豆蛋白质 2.5g、玉米浆固体 5g、尿素 3g、 KH_2PO_4 1g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5g、生物素 100 μ g、氯化硫胺 1000 μ g、泛酸钙 2000 μ g、烟碱酰胺 3000 μ g、 $CaCO_3$ 30g(每升蒸馏水)

[0086] 如表 3 所示,发现二氨基庚二酸脱氢酶活性约 23 倍提高的谷氨酸棒杆菌 KFCC-ddhP1 与母菌株 KFCC10881 相比赖氨酸产率增加约 3%。

[0087] 【工业应用性】

[0088] 如上所述,根据本发明的谷氨酸棒杆菌来源的具有比野生型更高启动子活性的核酸分子可提高二氨基庚二酸脱氢酶的活性,从而增加赖氨酸的生物合成效率。因此,锚定有改良启动子的菌株可高产率生成工业上重要的氨基酸 L-赖氨酸。

[0001]

<110> CJ 第一制糖株式会社

<120> 改进的启动子和用其产生L-赖氨酸的方法

<130> OPA09004

<150> KR10-2008-0010073

<151> 2008-01-31

<160> 7

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 603

<212> DNA

<213> 谷氨酸棒杆菌

<220>

<221> 基因

<222> (1)..(603)

<223> ddh启动子和ddh基因的某部分

```

<400>      1
gccgtgctg gcgagtttta caaagaaccc cacatcatca atgcctaaat ggcggtatt      60
ttcatccaaa cccaaccg cg catcattcca atgctgatcc accccatccg gataaaccac      120
catgaacggc aacggatcaa aagtcctgtt ggtgaagctg cgcacacag atcctgactg      180
ctgggagcca tgaaaataga tcagcgcatc cgtggtggaa ccaaaaggct caacaatacg      240
aaacgttcgc ttctggctct gatgaaagag atgtccctga atcatcatct aagtatgcat      300
ctcggttaagc tcgaccagga cagtgccacc acaatttttg aggattacaa gaacatgacc      360
aacatccg cg tagctatcgt gggctacgga aacctgggac gcagcgctga aaagcttatt      420
gccaaagcagc ccgacatgga ccttgtagga atcttctcgc gccggggccac cctcgacaca      480
aagacgccag tctttgatgt cgcgcacgtg gacaagcacg ccgacgacgt ggacgtgctg      540
ttcctgtgca tgggctccgc caccgacatc cctgagcagg caccaaagtt cgcgcagttc      600
gcc                                                    603
  
```

<210> 2

<211> 603

<212> DNA

<213> 谷氨酸棒杆菌

<220>

<221> 基因

<222> (1)..(603)

<223> ddhP1启动子和ddh基因的某部分

```

<400>      2
gccgtgctlg gcgagtttta caaagaaccc cacatcatca atgcctaaat ggcggtatt      60
ttcatccaaa cccaaccg cg catcattcca atgctgatcc accccatccg gataaaccac      120
catgaacggc aacggatcaa aagtcctgtt ggtgaagctg cgcacacag atcctgactg      180
ctgggagcca tgaaaataga tcagcgcatc cgtggtggaa ccaaaaggct caacaatacg      240
aaacgttcgc ttctggctct gatgaaagag atgtccctga atcatcatct aagtatgcat      300
tgtggttaagc tcgaccagga cagtgccacc acaatttttg aggattacaa gaacatgacc      360
aacatccg cg tagctatcgt gggctacgga aacctgggac gcagcgctga aaagcttatt      420
gccaaagcagc ccgacatgga ccttgtagga atcttctcgc gccggggccac cctcgacaca      480
  
```

[0002]

aagacgccag tctttgatgt cgccgacgtg gacaagcacg ccgacgacgt ggacgtgctg	540
ttcctgtgca tgggctccgc caccgacatc cctgagcagg caccaaagtt cgcgcagttc	600
gcc	603
<210> 3	
<211> 38	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物ddh/PF	
<400> 3	38
ccgggggatcc tctagagtgc gtggcgagtt ttacaaag	
<210> 4	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物ddh/PR	
<400> 4	37
gcaggtcgac tctagaggcg aactgcgcga actttgg	
<210> 5	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物ddh/P1F	
<400> 5	20
tatgcattgt ggtaagctcg	
<210> 6	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物ddh/P1R	
<400> 6	20
cgagcttacc acaatgcata	
<210> 7	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物ddh/P1mut	
<400> 7	15
ctaagtatgc attgt	

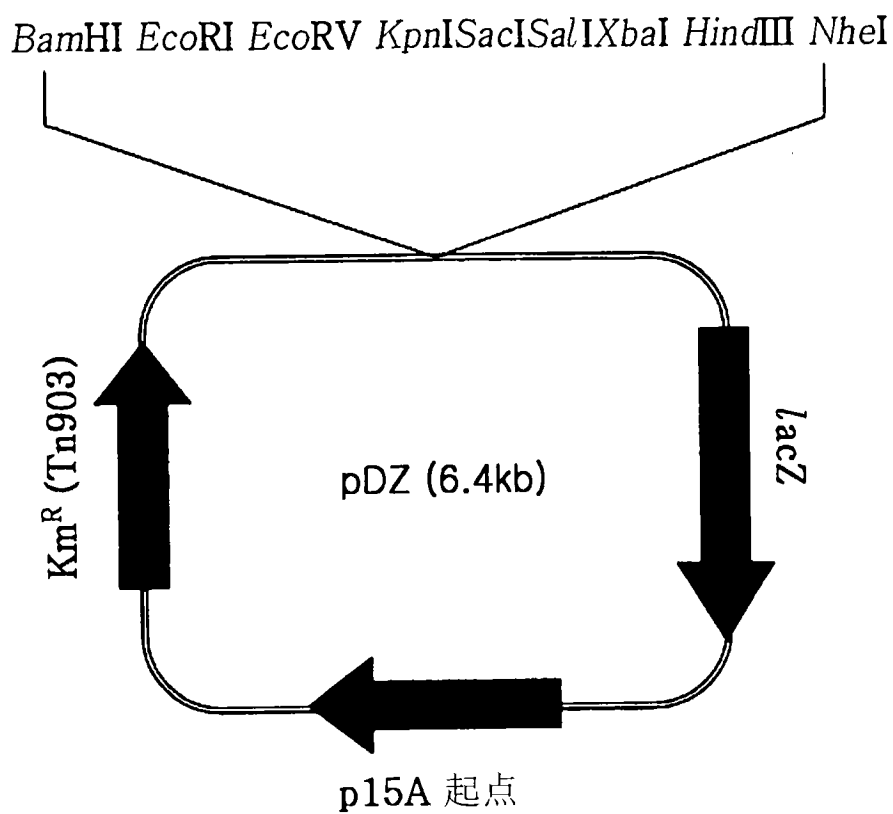


图 1

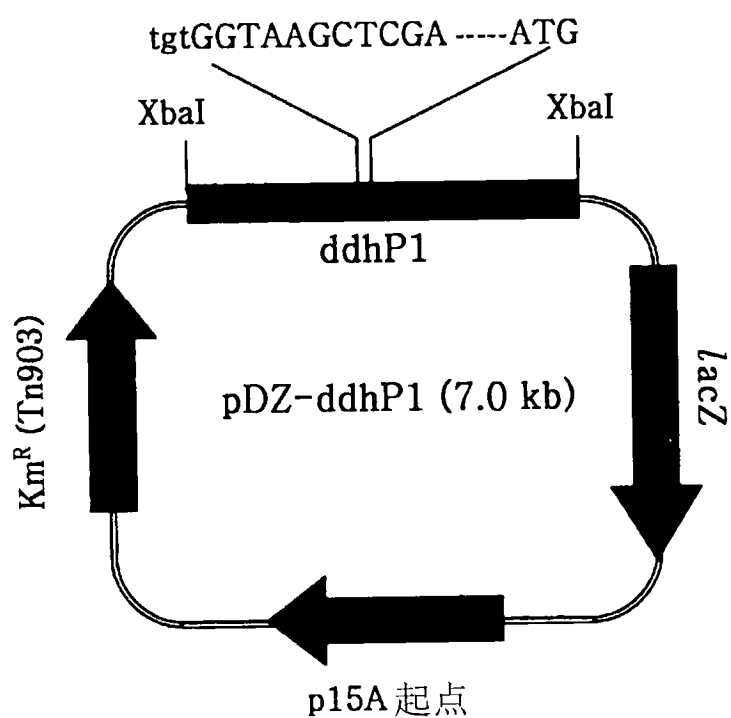


图 2