

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12P 13/00

C12N 15/11 C12N 15/31



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99120979.6

[45] 授权公告日 2003 年 11 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1128882C

[22] 申请日 1999.12.1 [21] 申请号 99120979.6

[30] 优先权

[32] 1998.12.1 [33] DE [31] 19855314.5

[71] 专利权人 底古萨股份公司

地址 德国杜塞尔多夫

[72] 发明人 M·里平 G·西尔巴赫

W·费弗勒 N·杜施

J·卡林诺夫斯基 A·普勒

审查员 王佩兰

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 周中琦

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 2 页

[54] 发明名称 用肠杆菌科菌株制备 D - 泛酸的发酵方法

[57] 摘要

本发明涉及通过产 D - 泛酸的肠杆菌科微生物的发酵制备 D - 泛酸的方法, 其特征在于: (a) 使用含有 pFV31 和/或 pFV202 的菌株, (b) 在所述微生物中扩增并具体地过量表达 panD 基因和选择性地其它编码天冬氨酸 - 1 - 脱羧酶的核苷酸序列, (c) 泛酸在培养基或微生物细胞中富集, 并且 (d) 分离合成的泛酸。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 通过产 D-泛酸的肠杆菌科微生物的发酵制备 D-泛酸的方法，其特征在于：

a) 使用含有 pFV31 和/或 pFV202 的菌株，
b) 用含有大肠杆菌(E. coli)或谷氨酸棒杆菌(C. glutamicum)的 panD 基因的质粒转化所述微生物，并且使所述基因在该微生物中过量表达，

c) 在培养基或微生物细胞中富集泛酸，并且

d) 分离合成的泛酸。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于使用含有可复制 DNA 的微生物，所述 DNA 的核苷酸序列编码来自棒杆菌的 panD。

3. 根据权利要求 2 所述的方法，其特征在于可复制 DNA 的特征是：

(i) SEQ ID No. 1 中所示的编码 panD 的核苷酸序列，或者

(ii) 由于遗传密码的简并性而对应于序列 (i) 的序列。

4. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的方法，其特征在于使用的微生物是 DSM12438。

5. 根据权利要求 1-3 中任一项所述的制备泛酸的方法，其特征在于进行下列步骤：

a) 对大肠杆菌微生物进行发酵，其中至少 panD 基因得到过量表达。

b) 在培养基或微生物细胞中富集泛酸，和

c) 分离泛酸。

6. 根据权利要求 5 所述的方法，其特征在于过量表达的基因来自棒杆菌属微生物。

用肠杆菌科菌株制备 D-泛酸的发酵方法

泛酸是应用于化妆品、医药、人类和动物营养的商业上重要的维生素。

泛酸可以通过化学合成来制备或通过生物技术在适当营养溶液中适当微生物的发酵来制备。化学合成中，DL-泛内酯 (pantolactone) 是重要的中间产物。它是在多步骤过程中从甲醛、异丁醛和氰化物制备的。在随后的步骤中，拆分此消旋混合物并用 β -丙氨酸缩合 D-泛内酯以得到 D-泛酸。

通过微生物发酵制备的优势是直接形成所需的 D-泛酸而无 L-泛酸。

正如 EP-A 0 493 060 中所示，不同种的细菌如大肠杆菌、产尿节杆菌、产红棒杆菌和产氨短杆菌以及酵母如 *Debaromyces castellii*。可以在含有葡萄糖、DL-泛解酸和 β -丙氨酸的营养溶液中合成 D-泛酸。EP-A 0 493 060 也表明，以大肠杆菌为例，在含有葡萄糖、DL-泛解酸和 β -丙氨酸的营养溶液中 D-泛酸的合成通过扩增质粒 pFV3 和 pFV5 中所含的泛酸生物合成基因得到增强。

EP-A 0 590 857 和 US 5, 518, 906 涉及从大肠杆菌菌株 IF003547 衍生的突变体如 FV5714、FV525、FV814、FV521、FV221、FV6051 和 FV5069，它们具有对各种抗代谢物如水杨酸、 α -丁泛解酸、 β -羟基天冬氨酸、O-甲基苏氨酸和 α -酮异戊酸的耐受性，并且在含有葡萄糖的营养溶液中合成泛解酸，在含有葡萄糖和 β -丙氨酸的营养溶液中合成 D-泛酸。

EP-A 0 590 857 也表明，在上述菌株中，质粒 pFV31 中所含的不确切特定泛酸生物合成基因得到扩增后，在含有葡萄糖的营养溶液中 D-泛解酸的产量以及含有葡萄糖和 β -丙氨酸的营养溶液中 D-泛酸的产量均有提高。

另外，W097/10340 表明，通过利用质粒 pFV202 扩增 *ilvGM* 基因而提高缬氨酸生物合成酶—乙酰羟基羧酸合酶 II 的活性之后，含有葡萄糖

的营养溶液中泛解酸的产量以及含有葡萄糖和 β -丙氨酸的营养溶液中 D-泛酸的产量均有提高。

所述专利文件没有说明所述菌株在只含有葡萄糖或蔗糖作为底物的营养溶液中合成泛酸的含量。

发明目的

本发明人的目的是进一步改善合成泛酸的肠杆菌科、尤其是埃希氏菌属菌株。

发明详述

维生素泛酸是应用于化妆品、医药、人类和动物营养的商业上重要的产品。所以，对提供制备泛酸的改良方法有广泛兴趣。

当在下文中提到 D-泛酸、泛酸和泛酸盐时，它们应理解为不仅指游离酸也指 D-泛酸盐类如钙盐、钠盐、氨盐或钾盐。

本发明提供通过产 D-泛酸的肠杆菌科微生物的发酵制备 D-泛酸的方法，其特征在于：

a) 所述微生物含有质粒 pFV31 和/或 pFV202，优选 pFV31，并且

b) 在所述微生物中扩增并优选地过量表达 panD 基因和选择性地其它编码天冬氨酸-1-脱羧酶(E. C. 4. 1. 1. 11)的核苷酸序列。

优选的是使用带有其核苷酸序列编码源于大肠杆菌、尤其是棒杆菌的 panD 的 DNA 的微生物。所述 DNA 优选地是能复制的 DNA，其特征在于：

(i) SEQ ID No. 1 中所示的编码 panD 的核苷酸序列，或者

(ii) 它在遗传密码简并性区域内对应于序列 (i)，或者

(iii) 它与互补于序列 (i) 或 (ii) 的序列杂交，并且选择性地

(iv) 它携带 (i) 的中性意义突变。

发酵优选在只含有葡萄糖或蔗糖作为底物而无 β -丙氨酸和泛解酸的营养溶液中进行。

这就是怎样按照本发明提高泛酸产量。加入天冬氨酸、 β -丙氨酸、酮异戊酸、酮泛解酸或泛解酸和/或它们的盐类也是选择性有利的。

本文中术语“扩增”是指微生物中由适当 DNA 编码的一种或多种酶的细胞内活性例如通过增加基因拷贝数、使用强启动子或使用编码具有

高活性的适当酶的基因以及选择性地结合这些方法而得到提高。

本发明所提供的微生物可利用葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、糖蜜、淀粉或纤维素或利用甘油和乙醇合成泛酸。优选的是使用葡萄糖或蔗糖。所述微生物尤其是革兰氏阴性细菌如肠杆菌科的细菌。在此可特别提出的是埃希氏菌属和大肠杆菌种。大肠杆菌品种中所谓的 K-12 菌株如菌株 MG1655 或 W3110 [Neidhard 等: 大肠杆菌和沙门氏菌。细胞和分子生物学 (ASM Press, Washington DC)] 或大肠杆菌野生型菌株 IF03547 (发酵研究所, Osaka, Japan) 及其衍生的能合成泛酸的突变体都是适合的。这些菌株中尤其应提及的是以下几种: 3547/pFV31、5714/pFV31、525/pFV31、814/pFV31、521/pFV31、FV221/pFV31、FV6051/pFV31、FV5069/pFV31、FV5069/pFV202 以及那些通过传统突变、选择例如抗代谢物耐受性如叠氮胸腺嘧啶耐受性或硫代异亮氨酸耐受性以及筛选从其衍生而来的菌株。特别适合的菌株是 FV5069/pFV31 和 FV5069/pFV202, 它们依照布达佩斯条约的条款以 FERM BP 4395 和 FERM BP 5227 保藏 (参见 EP-A 0 590 857 和 WO 97/10340)。

扩增, 尤其是过量表达是通过增加适当基因的拷贝数或突变位于结构基因上游的启动子和调控区域来实现的。在结构基因上游掺入的表达盒以相同方式起作用。另外, 可诱导的启动子可以通过发酵增加 D-泛酸合成过程中的表达。延长 mRNA 寿命的方法也可提高表达。而且, 酶活性也通过防止酶蛋白的降解而得到提高。基因或基因构建体可以位于可变拷贝数的质粒中或在染色体整合并扩增。选择性地, 也可以通过改变培养基的成分和培养技术实现目的基因的过量表达。

本领域技术人员将尤其在 Chang 和 Cohen (细菌学杂志, 134, 1141-1156 (1978)), Hartley 和 Gregori (基因 13, 347-353, (1981)), Amann 和 Brosius (基因 40, 183-190 (1985)), de Broer 等 (美国国家科学院院报 80, 21-25 (1983)), LaVallie 等 (生物/技术 11, 187-193 (1993)), PCT/US97/13359, Llosa 等 (质粒 26, 222-224 (1991)), Quandt 和 Klipp (基因 80, 161-169 (1989)), Hamiton (细菌学杂志 171, 4617-4622 (1989)), Jensen 和 Hammer (生物技术和生物工程 58, 191-195

(1998)) 以及众所周知的遗传学和分子生物学书本中发现相关说明。

来自大肠杆菌的 panD 基因是已知的。Merkels 和 Nichols 已经发表其核苷酸序列 (FEMS Microbiology Letters 143, 247-252 (1996))。panD 基因可以使用众所周知的 PCR (聚合酶链反应) 方法或下述方法之一从大肠杆菌分离或制备。

从谷氨酸棒杆菌分离 panD 基因的第一个步骤是在大肠杆菌中构建此微生物的基因文库。基因文库的构建一般在众所周知的书本和手册中均有记录。可提及的例子是 Winnacker 的题为“从基因到克隆, 基因技术介绍” (Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1990) 的书本或 Sambrook 等题为“分子克隆, 实验手册” (冷泉港实验室出版社, 1989) 的手册。众所周知的基因文库是由 Kohara 等在 λ 载体中构建的大肠杆菌 K-12 菌株 W3110 的基因文库 (细胞 50, 495-508 (1987))。Bathe 等 (分子和普通遗传学 252, 255-265 (1996)) 描述了使用粘粒载体 SuperCos I (Watl 等, 美国国家科学院院报 84, 2160-2164 (1987)) 在大肠杆菌 K-12 菌株 NM554 (Raleigh 等, 核酸研究 16, 1563-1575 (1988)) 中构建的谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的基因文库。大肠杆菌中谷氨酸棒杆菌的基因文库也可以使用诸如 PBR322 (Bolivar, 生命科学 25, 807-818 (1979)) 或 PUC9 (Vieira 等, 基因 19, 259-268 (1982)) 的质粒得到构建。限制和重组缺陷性大肠杆菌是尤为适合的宿主, 菌株 DH5 α mcr 是由 Grant 等描述的例子 (美国国家科学院院报 87, 4645-4649 (1990))。

然后将基因文库通过转化 (Hanahan, 分子生物学杂志 166, 557-580 (1983)) 或电穿孔 (Tauch 等, FEMS Microbiological Letter 123, 343-347 (1994)) 转入指示菌株。指示菌株的鉴定性特征是其目的基因中有突变导致可检测的表型, 例如营养缺陷型。带有 panD 基因中突变的大肠杆菌突变体 DV9 (Vallari 和 Rock, 细菌学杂志 164, 136-142 (1985)), 在本发明的框架中尤其有利。用携带目的基因如 panD 基因的重组质粒转化指示菌株如 panD 突变体 DV9 并表达目的基因, 在适当特征如需要泛酸方面, 指示菌株变成原养型。

用此方法分离的基因或 DNA 片段可以通过如 Sanger 等所述的序列测

定(美国国家科学院院报, 74, 5463-5467 (1977))得到鉴定。

来自谷氨酸棒杆菌编码 panD 基因的新 DNA 序列以此方法获得, 为 SEQ ID No1, 它构成本发明的一部分。相应酶的氨基酸序列通过上述方法从所述 DNA 序列推导出来。panD 基因产物即 L-天冬氨酸-1-脱羧酶的氨基酸序列在 SEQ ID No. 2 中表示。

由于遗传密码的简并性而从 SEQ ID No. 1 得到的编码 DNA 序列也构成本发明的一部分。相似地, 与 SEQ ID No. 1 杂交的 DNA 序列构成本发明的一部分。而且, 本领域技术人员已知保守氨基酸互换如蛋白质中甘氨酸换成丙氨酸或天冬氨酸换成谷氨酸为有义突变, 这种突变不引起蛋白活性的基本改变, 即它们是中性的。也已知蛋白 N 和/或 C 末端的改变基本上不破坏其功能, 甚至可以稳定蛋白。

本领域技术人员将尤其在 Ben-Bassat 等(细菌学杂志 169, 751-757 (1987))、O' Regan 等(基因 77, 237-251 (1989))、Sahin-Toth 等(蛋白质科学 3, 240-247 (1994))、Hochuli 等(生物/技术 6, 1321-1325 (1988))以及众所周知的遗传学和分子生物学书本中发现这方面的信息。

然后用此方法分离和鉴定的基因可以单独或选择性地与其它基因结合在适当大肠杆菌菌株中表达。表达或过量表达基因的已知方法在于借助另外提供表达信号的质粒载体扩增基因。可能的质粒载体是那些能在适当微生物中复制的质粒载体。以大肠杆菌为例, 用于本发明的可能载体的例子是 pSC101 (Vocke 和 Bastia 美国国家科学院院报 80 (21), 6557-6561 (1983)) 或 pKK223-3 (Brosius 和 Holy, 美国国家科学院院报 81, 6929 (1984)) 或谷氨酸棒杆菌/大肠杆菌穿梭载体 pZ8-1 (EP 0 375 889)。这样的大肠杆菌菌株是包含质粒 pND-D1 和 pND-D2 的 FV5069/pFV31/pND-D1 和 FV5069/pFV31/pND-D2。质粒 pND-D1 是以质粒 pZ8-1 为基础携带来自大肠杆菌的 panD 基因的大肠杆菌-谷氨酸棒杆菌穿梭载体。质粒 pND-D2 是以质粒 pZ8-1 为基础携带来自谷氨酸棒杆菌的 panD 基因的大肠杆菌-谷氨酸棒杆菌穿梭载体。

对于本领域技术人员很明显, 赋予对代谢物和抗代谢物耐受性或防

止泛酸前体流失的染色体突变可以单独或一起与本发明所提供的方法有利地结合。

按照本发明制备的微生物可以通过分批方法、补料分批方法和重复补料分批方法连续或不连续培养用于泛酸生产。Chmiel 的书（生物加工技术 1. 生物工程介绍，Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991）或 Storhas 的书（生物反应器和外周设备，Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994）中提供了已知培养方法的总结。

欲使用的培养基必须适当地符合特定微生物的要求。不同微生物的培养基的描述可见于美国细菌学会的手册“普通细菌学方法手册”（Washington DC, USA, 1981）。可以使用的碳源是糖类和碳水化合物如葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、糖蜜、淀粉和纤维素，油和脂肪如大豆油、葵花子油、花生油和椰子脂肪，脂肪酸如棕榈酸、硬脂酸、亚油酸，酒精如甘油和乙醇以及有机酸如乙酸。这些物质可以单独或作为混合物使用。可以使用的氮源是有机含氮化合物如蛋白胨、酵母提取物、肉类抽提物、麦芽抽提物、玉米浆、大豆粉和尿素或无机化合物如硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵和硝酸铵。氮源可以单独或作为混合物使用。可以使用的磷源是磷酸二氢钾或磷酸氢二钾或相应的钠盐。培养基还必须含有金属盐如对于生长必需的硫酸镁或硫酸铁。最后，除了以上所述的物质，可以使用必要的促生长物质如氨基酸和维生素。如果需要，可以向培养基加入泛酸前体如天冬氨酸、 β -丙氨酸、酮异戊酸、酮泛解酸或泛解酸和/或选择性地它们的盐类。上述添加物可以一次全部加入培养物，也可在培养期间适当地加入。

培养基的 PH 值可以通过适当使用碱性化合物如氢氧化钠、氢氧化钾或氨或者酸性化合物如磷酸或硫酸来控制。泡沫形成可以使用消泡剂多聚脂肪酸甘油酯来控制。质粒的稳定性可以通过加入适当选择性作用物质如抗生素来维持。需氧条件通过向培养基输入氧气或含氧气体混合物如空气来保持。培养基的温度正常在 25℃-45℃，优选 30℃-37℃。持续培养直至泛酸合成达到最大值。此目标一般在 10 到 160 小时达到。

对于本领域技术人员很明显，具有高度 L-天冬氨酸-1-脱羧酶活性的

菌株也可用于从 L-天冬氨酸制备 β -丙氨酸。已知的发酵方法、酶转化反应或二者的结合都可用于此目的。

合成的泛酸浓度可用已知方法确定 (Velisek, 色谱科学 60, 515-560 (1992))。

下列微生物依照布达佩斯条约条款保藏于德意志微生物和细胞保藏中心 (DSMZ), Brunswick, Germany:

谷氨酸棒杆菌 ATCC13032/pND-D2 为 DSM12438

实施例

本发明借助以下实施例得到更详细的说明。

实施例 1 来自谷氨酸棒杆菌的 panD 基因的克隆和测序

1. panD 基因的克隆

按 Tauch 等所述的 (质粒 33, 168-179 (1995)) 从谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 分离染色体 DNA, 并用限制性酶 Sau3A (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany, 产品描述 Sau3A, 编号 27-0913-02) 部分切割。用 Nucleotrap 抽提试剂盒 (Macherey 和 Nagel, Düren, Germany; 目录号 740584) 分离大小范围 7-9kb 的 DNA 片段, 并将其连接入从 MBI Fermentas (Vilnius, Lithuania) 得到的载体 pUC19 (Norrander 等, 基因 26, 101-106 (1982)) 的磷酸化 BamHI 酶切位点。按 Sambrook 等所述的 (1989, 分子克隆: 实验手册, 冷泉港) 进行连接, DNA 混合物与 T4 连接酶 (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) 一起温育过夜。然后, 通过电穿孔 (Tauch, FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)) 将此连接混合物转入大肠杆菌 DH5 α mcr (Grant, 美国国家科学院院报 87, 4645-4649 (1990)) 中, 并将其涂在 LB 琼脂 (Lennox, 病毒学 1, 190 (1995)) +100 μ g/ml 青霉素上。37 $^{\circ}$ C 培养 24 小时后, 通过用 Birnboim 和 Doly 的碱裂解方法再分离质粒 DNA (核酸研究 7, 1513-1523 (1997)), 可以从转化子获得谷氨酸棒杆菌基因文库。通过电穿孔将此基因文库转入带有 panD 基因突变的大肠杆菌菌株 DV9 (Vallari 和 Rock, 细菌学杂志 164, 136-142 (1985)) 中。再生期后 (Tauch 等, FEMS Microbiological Letters 123, 343-347 (1994)), 用培养基 E (Vogel 和 Bonner, 生物化学杂志 218, 97-106

(1956)) 将此电穿孔混合物洗两次。介质 E 的组成见表 1。用这些细胞接种 250ml 锥形瓶中的 50ml 培养基 E + 100 μ g/ml 青霉素并于 39 $^{\circ}$ C 在 250rpm 的通气摇床中培养。培养两天后, 将细菌悬浮物稀释并在补加 100 μ g/ml 青霉素的 LB 琼脂 (Lennox, 病毒学 1, 190 (1995)) 上划线接种。

表 1

物质	每升含量	备注
K_2HPO_4	10g	
$NaNH_4HPO_4 \cdot 4H_2O$	3.5g	
柠檬酸	2g	
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2g	
葡萄糖	4g	分开灭菌
维生素 B1	0.2 μ g	无菌条件下过滤

分离称为 pNIC-1.3 的 DV9 转化子的质粒 DNA 并通过琼脂糖凝胶电泳 (Sambrook 等, 分子克隆: 实验手册 (1989), 冷泉港实验室出版社) 并与已知长度的标准 DNA 片段比较进行鉴定。质粒 pNIC-1.3 含有 7kbp 插入片段。pNIC-1.3 的互补能力通过 panD 突变体 DV9 的重新转化来检测。继而所得的转化子能在上述条件下于无 β -丙氨酸的培养基 E 中生长。

通过用限制性 BamHI (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany, 产品描述 BamHI, 编号 27-0868-03)、EcoRI (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany, 产品描述 EcoRI, 编号 27-0884-03) 和 BglII (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany, 产品描述 BglII, 编号 27-0946-02) 切割质粒 pNIC1.3, 接着与用适当限制性酶 (Sch öfer, 基因 145, 69-73 (1994)) 消化的载体 pK18mob 连接对 7Kb 插入片段进行亚克隆。通过电穿孔将得到的连接混合物转入大肠杆菌 panD 突变体 DV9; 按上述进行互补转化子的筛选, 此例中的琼脂平板含 50 μ g/ml 卡那霉素。分离互补单克隆的质粒并通过限制性分析进行鉴定选择此后称为 pNIC-10 的含有约 3kb DNA 插入序列的 EcoRI 亚克隆进行下列序列分析。

2. panD 基因的序列测定

为进行双链测序,用各种限制性酶切割 pNIC-10 的 3kb 片段,并将片段亚克隆入质粒 pUC19 或 pK18mob.按制造商的说明用 QIAGEN 质粒 Mini 试剂盒 (Qiagen, Inc., Chatsworth, Ca., USA) 分离用于测序的质粒 DNA,并且可以通过琼脂糖凝胶电泳确定质粒的大小。

测序按 Sanger 等的双脱氧链终止法 (美国国家科学院院报 74, 5463-5467 (1977)) 进行,并经 Zimmermann 等改良 (核酸研究 18, 1067 (1990)). 使用来自 Pharmacia 的 Cy5 自动测序试剂盒 (产品号 27-2690-02, Freiburg, Germany). 凝胶电泳分离和测序反应的分析用来自 Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Sweden) 的自动激光荧光 (A.L.F) 显示 DNA 测序仪,在长范围凝胶溶液聚丙烯酰胺 (FMC Bioproducts, Rockland, Me., USA) 上进行。然后对获得的原始序列资料用 97-0 版 Staden 软件包进行处理 (核酸研究 14, 217-231 (1986)). 所有 pNIC-10 亚克隆的各个序列都被整理到称为重叠群 13 的衔接的 3060bp 重叠群中。用 XNIP 软件 (Staden, 核酸研究 14, 217-231 (1986)) 对整个 DNA 片段进行计算机辅助的编码区分析,鉴定到 5 个开放读码框 (ORF)。图 1 表示重叠群 13 的限制性图谱和表示为 orf1-orf5 的 ORF 的位置。用可通过国家医学图书馆 (Bethesda, MD, USA) 的 NCBI 服务器的网上服务得到 BLAST 搜索程序 [Gish 和 States, Nature of Genetics 3, 266-272 (1993); Altschul 等, 分子生物学杂志 215, 403-410 (1990)] 进行同源性分析。重叠群 13 分析表明 orf-3 是 panD 基因。orf-3 以后称为 panD 基因。含有 panD 基因的 DNA 片段的核苷酸序列表示为 SEQ ID No. 1。从上述步骤得到的 panD 基因产物即 L-天冬氨酸-1-脱羧酶的氨基酸顺序表示为 SEQ ID No. 2。

实施例 2 构建表达 panD 基因的载体

使用聚合酶链反应 (PCR) 和合成的寡聚核苷酸扩增来自谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌的 panD 泛酸生物合成基因。用来自 Gibco-BRL (Eggestein, Germany) 的 Taq DNA 聚合酶在 PCT-100 热循环仪 (MJ Research Inc., Watertown, Mass., USA) 中进行 PCR 实验。于 94℃ 2 分钟的一次变性步骤后,接着是于 94℃ 90 秒的变性步骤、于引物依赖温度 $T=(2AT+4GC)$

-5°C (Suggs 等, 1981, 683-693 页, 于: D. D. Brown 和 C. F. Fox(编), 使用纯化基因的发育生物学. Academic Press, New York, USA) 90 秒的退火步骤, 于 72°C 90 秒的延伸反应。最后三个步骤循环重复 35 次, 反应以 72°C 10 分钟的延伸反应结束。通过琼脂糖凝胶电泳对它们进行检测后, 按厂商说明将以此方法扩增的产物与载体 pCR[®]2.1[原始 TA 克隆试剂盒, Invitrogen(Leek, The Netherlands), 产品描述原始 TA 克隆试剂盒, 目录号 KNM2030-01]连接, 然后转化入大肠杆菌菌种 TOP10F'。通过在含有 100 μg/ml 氨苄青霉素和 40 μg/ml X-Gal (5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-半乳糖苷) 的 LB 琼脂板上培养进行转化子的筛选。

从来自谷氨酸棒杆菌 ATCC13032(图 2) 和大肠杆菌 K12(W. K. Merkel 和 B. P. Nichols, 1993, 基因库:L17086) 的 panD 泛酸生物合成基因合成 PCR 引物。选择这些引物以使扩增的片段含有这些基因及其固有的核糖体结合位点, 但不含有可能的启动子区。另外, 插入适当限制性酶切位点以便克隆入目的载体。下面表 2 中列出了 PCR 引物、插入的切割位点(序列下划线)和扩增的基因(以 bp 表示的片段长度在括号中给出)的序列。

表 2

引物	具有限制性酶切位点的序列	产物	质粒
panD-Ec1	5' - <u>GAATTC</u> GACAGGGTAGAAAGGTAGA-3' EcoRI	panD _{E.c.}	pND-D1
panD-Ec2	5' - <u>AGATCT</u> GGGATAACAATCAAGCAACC-3' BglII		
panD-Cg1	5' -CATCTCACGCTAT <u>GAATTCT</u> -3' EcoRI	panD _{C.g.}	pND-D2
panD-Cg2	5' -ACGAGGCCTGCAGCAATA-3' PstI		

图 2 中所示的大肠杆菌-谷氨酸棒杆菌穿梭表达载体 pZ8-1 (EP 0 375 889) 用作在谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌中表达的基本载体。以前克隆入载体 pCR[®] 2.1 的 panD_{C.g.} 扩增的产物通过引物插入的限制性酶切位点与相似处理的表达载体 pZ8-1 连接, 并由此在该质粒中的 tac 启动子的控制之下。将 panD_{E.c.} 扩增的产物作为 EcoRI -BglII 片段克隆入载体 pZ8-1 的

相容 EcoR I -BamH I 限制性末端。按这种方法构建的表达质粒的相应名称在表 2 中表示。panD_{E.c.} 和 panD_{C.g.} 的克隆策略在图 2 中表示。表达载体的正确克隆通过相应插入片段的测序来检测。

将质粒 pND-1 和 pND-2 转化入大肠杆菌 FV5069/pFV31, 并在 LB 琼脂糖 (Lennox, 病毒学 1, 190 (1955)) +50 μ g/ml 卡那霉素上选择转化子。获得的菌株称为 FV5069/pFV31/pND-D1 和 FV5069/pFV31/pND-D2。

实施例 3 从大肠杆菌 FV5069/pFV31 衍生的不同菌株的泛酸合成

通过植物乳杆菌泛酸分析对 D-泛酸进行定量 (测试菌株: 植物乳杆菌 ATCC8014, 目录号 3211-30-3; 培养基: Bacto 泛酸分析培养基 (DIFCO Laboratories, Michigan, USA, 目录号 0604-15-3)。这种指示性菌株只能在含有泛酸的指示培养基中生长, 并表现可用分光计测量的细菌生长与培养基泛酸浓度之间的线性依赖关系。用泛酸的高钙盐 (hemicalcium) (Sigma, 产品号 P 2250) 进行校准。于 580nm 测量波长在 LKB Biochrom 光度计 (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) 上测定光密度 (OD₅₈₀)。

大肠杆菌菌株 FV5069/pFV31、FV5069/pFV31/pND-D1 和 FV5069/pFV31/pND-D2 的泛酸合成用葡萄糖或蔗糖作为底物来测定。所用的测试培养基是含有作为底物的 4g/l 葡萄糖或 4g/l 蔗糖的培养基 E, 对于菌株 FV5069/pFV31/pND-D1 和 FV5069/pFV31/pND-D2, 补加 50 μ g/ml 卡那霉素。用相同培养基中 OD₅₈₀ 为 0.1 的 16 小时培养物接种 500ml 锥形瓶中的 50ml 测试培养基。于 37°C 和 250rpm 培养这些培养物 72 小时后, 通过于 5000 \times g 离心 10 分钟沉淀细胞, 将获得的无细胞上清过滤除菌并于 4°C 保存直到对泛酸进行定量。

按 DIFCO 手册 (第 10 版, 1100-1102 页; Michigan, USA) 中说明的方法, 用植物乳杆菌 ATCC8014 对培养物上清中的 D-泛酸进行定量。这些测量结果在表 3 和表 4 中表示。

表 3 用葡萄糖作为底物积累泛酸

菌株	基因	泛酸 ($\mu\text{g/ml}$)
FV5069/pFV31	-	2
FV5069/pFV31/pND-D1	panD _{E.c.}	24
FV5069/pFV31/pND-D2	panD _{C.g.}	58

表 4 用蔗糖作为底物积累泛酸

菌株	基因	泛酸 ($\mu\text{g/ml}$)
FV5069/pFV31	-	2
FV5069/pFV31/pND-D1	panD _{E.c.}	47
FV5069/pFV31/pND-D2	panD _{C.g.}	69

附图

附加下列附图:

图 1: 含有 orf-1 到 orf-5 的重叠群 13 的图谱

图 2: 质粒 pZ8-1 的图谱以及质粒 pND-D1 和 pND-D2 的克隆策略

附图中所用的缩写如下定义:

T1T2: rrnB 基因的转录终止子

Ptac: tac 启动子

panD: panD 基因的编码区

rep-C. g.: 在谷氨酸棒杆菌中复制的 DNA 区域

oriV-E. c.: 用于向大肠杆菌无性转移的起始点

kan: 卡那霉抗性基因

EcoRI: 限制性酶 EcoRI 的酶切位点

E: 限制性酶 EcoRI 的酶切位点

BamHI: 限制性酶 BamHI 的酶切位点

B: 限制性酶 BamHI 的酶切位点

BglIII:	限制性酶 BglIII 的酶切位点
ClaI:	限制性酶 ClaI 的酶切位点
H:	限制性酶 HindIII 的酶切位点
P:	限制性酶 PstI 的酶切位点
PstI:	限制性酶 PstI 的酶切位点
SalI:	限制性酶 SalI 的酶切位点
ScaI:	限制性酶 ScaI 的酶切位点
SphI:	限制性酶 SphI 的酶切位点
X:	限制性酶 XhoI 的酶切位点
XhoI:	限制性酶 XhoI 的酶切位点

序列表

(1) 基本信息

(i) 申请人:

(A) 名称: Degussa Aktiengesellschaft

(B) 街道: Weissfrauenstr. 9

(C) 城市: Frankfurt am Main

(D) 地区: Hessen

(E) 国家: 德国

(F) 邮政编号: D-60311

(ii) 发明名称: 用肠杆菌科菌株制备 D-泛酸的发酵方法

(iii) 序列数: 2

(iv) 计算机可读形式:

(A) 介质类型: 软盘

(B) 计算机: IBM PC 兼容机

(C) 操作系统: PC-DOS/MS-DOS

(D) 软件: PatentIn Release #1.0, 版本#1.30(EPA)

(2) 关于 SEQ ID NO:1 的信息:

(i) 序列特征

(A) 长度: 540 个碱基对

(B) 类型: 核苷酸

(C) 链型: 双链

(D) 拓扑结构: 线型

(ii) 分子类型: 基因组 DNA

(iii) 假设: 否

(iii) 反义: 否

(vi) 来源:

(A) 生物: 谷氨酸棒杆菌

(B)菌株: ATCC13032**(ix) 特征:****(A) 名称/关键: CDS****(B) 位置: 77..484****(C) 其它信息: /密码_起始=77****/EC_号=4.1.1.11****/产品=“L-天冬氨酸-1-脱羧酶”****/基因=“panD”****(xi) 序列描述: SEQ ID NO:1:**

```

AATATTCCTT TCCTTGTCAT CTCACGCTAT GATTTCATAA ACTTGCAGGA CAACCCCCAT      60
AAGGACACCA CAGGAC ATG CTG CGC ACC ATC CTC GGA AGT AAG ATT CAC      109
      Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His
          1             5             10
CGA GCC ACT GTC ACT CAA GCT GAT CTA GAT TAT GTT GGC TCT GTA ACC      157
Arg Ala Thr Val Thr Gln Ala Asp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr
          15             20             25
ATC GAC GCC GAC CTG GTT CAC GCC GCC GGA TTG ATC GAA GGC GAA AAA      205
Ile Asp Ala Asp Leu Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys
          30             35             40
GTT GCC ATC GTA GAC ATC ACC AAC GGC GCT CGT CTG GAA ACT TAT GTC      253
Val Ala Ile Val Asp Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val
          45             50             55
ATT GTG GGC GAC GCC GGA ACG GGC AAT ATT TGC ATC AAT GGT GCC GCT      301
Ile Val Gly Asp Ala Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala
          60             65             70             75
GCA CAC CTT ATT AAT CCT GGC GAT CTT GTG ATC ATC ATG AGC TAC CTT      349
Ala His Leu Ile Asn Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu
          80             85             90
CAG GCA ACT GAT GCG GAA GCC AAG GCG TAT GAG CCA AAG ATT GTG CAC      397
Gln Ala Thr Asp Ala Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His
          95             100             105
GTG GAC GCC GAC AAC CGC ATC GTT GCG CTC GGC AAC GAT CTT GCG GAA      445
Val Asp Ala Asp Asn Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu
          110             115             120
GCA CTA CCT GGA TCC GGG CTT TTG ACG TCG AGA AGC ATT TAGCGTTTTA      494
Ala Leu Pro Gly Ser Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile
          125             130             135
GCTCGCCAAT ATTGCTGCCG GCCTCGTTGA AAATGGTCAT GGTGGC      540

```

(2) 关于 SEQ ID NO:2 的信息:**(i) 序列特征****(A) 长度: 136 个氨基酸****(B) 类型: 氨基酸****(D) 拓扑结构: 线型****(ii) 分子类型: 蛋白质****(xi) 序列描述: SEQ ID NO:2:**

```

Met Leu Arg Thr Ile Leu Gly Ser Lys Ile His Arg Ala Thr Val Thr
 1           5           10           15
Gln Ala Asp Leu Asp Tyr Val Gly Ser Val Thr Ile Asp Ala Asp Leu
          20           25           30
Val His Ala Ala Gly Leu Ile Glu Gly Glu Lys Val Ala Ile Val Asp
          35           40           45
Ile Thr Asn Gly Ala Arg Leu Glu Thr Tyr Val Ile Val Gly Asp Ala
          50           55           60
Gly Thr Gly Asn Ile Cys Ile Asn Gly Ala Ala Ala His Leu Ile Asn
 65           70           75           80
Pro Gly Asp Leu Val Ile Ile Met Ser Tyr Leu Gln Ala Thr Asp Ala
          85           90           95
Glu Ala Lys Ala Tyr Glu Pro Lys Ile Val His Val Asp Ala Asp Asn
          100          105          110
Arg Ile Val Ala Leu Gly Asn Asp Leu Ala Glu Ala Leu Pro Gly Ser
          115          120          125
Gly Leu Leu Thr Ser Arg Ser Ile
          130          135

```

图 1

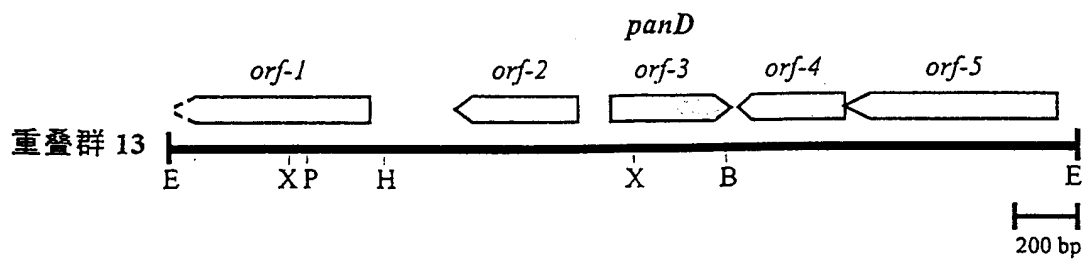


图 2

