

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 01813977.9

[51] Int. Cl.

C12N 15/31 (2006.01)

C12P 13/08 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C07K 14/34 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 2 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 100368545C

[22] 申请日 2001.7.6 [21] 申请号 01813977.9

[30] 优先权

[32] 2000. 8. 10 [33] DE [31] 10039049.8

[32] 2001. 5. 31 [33] US [31] 09/867,537

[86] 国际申请 PCT/EP2001/007765 2001.7.6

[87] 国际公布 WO2002/012505 英 2002.2.14

[85] 进入国家阶段日期 2003.2.10

[73] 专利权人 德古萨股份公司

地址 德国杜塞尔多夫市

[72] 发明人 贝蒂娜·默克尔 卡罗琳·克罗伊策

[56] 参考文献

EP1108790A 2001.6.20

WO0100842A 2001.1.4

审查员 潘爱群

[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 21 页 附图 1 页

[54] 发明名称

编码 lysR3 基因的核苷酸序列

[57] 摘要

本发明涉及一种分离的多核苷酸，其包含选自如下一组的一种多核苷酸序列：a) 与编码包含 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列的多肽的多核苷酸至少 70% 相同的多核苷酸，b) 编码包含与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列至少 70% 相同的氨基酸序列的多肽的多核苷酸，c) 与 a) 或 b) 的多核苷酸互补的多核苷酸，以及 d) 包含 a), b) 或 c) 的多核苷酸序列的至少 15 个连续碱基的多核苷酸。本发明还涉及使用棒状细菌发酵生产 L-氨基酸的方法，所述细菌中至少 lysR3 基因是弱化的，本发明还涉及所述多核苷酸序列作为杂交探针的应用。

1、一种来自棒状细菌的分离的多核苷酸，其编码 *lysR3* 基因，所述多核苷酸选自：

- a) 编码由 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列所组成的多肽的多核苷酸，
 - b) 编码由与 SEQ ID NO: 2 的氨基酸序列至少 95% 相同的氨基酸序列所组成的多肽的多核苷酸，和
 - c) 与 a) 或 b) 的多核苷酸互补的多核苷酸，
- 所述多肽具有转录调节物 *LysR3* 的活性。

2、权利要求 1 的多核苷酸，其中所述多核苷酸是在棒状细菌中能复制的重组 DNA。

3、权利要求 1 的多核苷酸，其中所述多核苷酸是 RNA。

4、权利要求 2 的多核苷酸，其是能复制的 DNA，所述多核苷酸选自：

- (i) 如 SEQ ID NO: 1 所示的核苷酸序列，或
- (ii) 在遗传密码简并范围内相应于 (i) 序列的至少一个序列。

5、权利要求 2 的多核苷酸，其由 SEQ ID NO: 1 所示的核酸序列组成。

6、一种棒状细菌，其中 *lysR3* 基因被消除。

7、一种生产 L-赖氨酸和 L-缬氨酸的方法，该方法包括进行以下步骤：

- (a) 发酵生产所需 L-赖氨酸和 L-缬氨酸的细菌，该细菌中 *lysR3* 基因被消除，
- (b) 浓缩培养基或细菌细胞中的所需产物，及
- (c) 分离 L-赖氨酸和 L-缬氨酸。

8、权利要求 7 的方法，其中为生产 L-赖氨酸，发酵的细菌中选自以下一组的一或多个基因被同时过表达：

8.1 编码二氢-2, 6-吡啶二羧酸合酶的 *dapA* 基因，

8.2 编码烯醇化酶的 *eno* 基因,

8.3 编码 *zwf* 基因产物的 *zwf* 基因,

8.4 编码丙酮酸羧化酶的 *pyc* 基因,

8.5 编码赖氨酸输出的 *lysE* 基因。

9、权利要求 7 的方法, 其中选自以下一组的一或多个基因被同时弱化:

9.1 编码磷酸烯醇丙酮酸羧激酶的 *pck* 基因,

9.2 编码葡萄糖-6-磷酸异构酶的 *pgi* 基因,

9.3 编码丙酮酸氧化酶的 *poxB* 基因。

10、权利要求 7-9 中任一项权利要求的方法, 其中使用的是谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 或乳酸发酵短杆菌 (*Brevibacterium lactofermentum*) 的微生物。

11、一种杂交探针, 其由权利要求 1-4 中任一项的多核苷酸序列的至少 15 个连续碱基组成。

编码 lysR3 基因的核苷酸序列

本发明提供了来自棒状细菌 (coryneform bacteria) 的编码 lysR3 基因的核苷酸序列, 和通过弱化 lysR3 基因发酵生产氨基酸尤其 L-赖氨酸和 L-缬氨酸的方法。lysR3 基因编码 LysR3 蛋白, 其是 LysR 家族的一种转录调节物。

现有技术

L-氨基酸特别是 L-赖氨酸和 L-缬氨酸用于人用药物和制药工业, 食品工业, 特别是动物营养。

已知氨基酸可通过棒状细菌菌株, 尤其谷氨酸棒杆菌的发酵而生产。由于其极其重要性, 已持续进行改良生产方法的尝试。生产方法的改良可涉及发酵措施, 如搅拌和供氧, 或营养培养基的组成如发酵期间的糖浓度, 或例如通过离子交换层析对产物形式的加工方法, 或微生物本身的固有生产性质。

为改良这些微生物的生产性质, 可使用诱变, 选择及突变体选择等方法, 以此方法可获得对抗代谢物有抗性或重要的调节代谢物缺陷的并产生氨基酸的菌株。

一段时间以来, 重组 DNA 技术的方法也用于改良棒杆菌菌株生产 L-氨基酸的能力。

发明目的

本发明人的目的是为发酵生产氨基酸, 尤其 L-赖氨酸和 L-缬氨酸提供改良的新方法。

发明描述

本发明提供了来自棒状细菌的分离的多核苷酸, 其包含编码 lysR3 基因的多核苷酸序列, 所述多核苷酸选自:

- a) 与编码包含 SEQ ID NO:2 氨基酸序列的多肽的多核苷酸至

少 70% 相同的多核苷酸,

- b) 编码包含与 SEQ ID NO:2 氨基酸序列至少 70% 相同的氨基酸序列的多肽的多核苷酸,
- c) 与 a) 或 b) 多核苷酸互补的多核苷酸, 及
- d) 包含 a), b) 或 c) 多核苷酸序列的至少 15 个连续核苷酸的多核苷酸,

所述多肽优选具有转录调节物 LysR3 活性。

本发明还提供了上述多核苷酸, 其优选是一种能复制的 DNA, 包含:

- (i) SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列, 或
- (ii) 在遗传密码简并范围内相应于 (i) 序列的至少一个序列, 或
- (iii) 与 (i) 或 (ii) 序列的互补序列杂交的至少一个序列, 及任选地,
- (iv) (i) 中中性功能的有义突变。

本发明还提供了:

一种 DNA, 其是能复制的并包含 SEQ ID NO:1 所示核苷酸序列;

一种多核苷酸, 其编码包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列的多肽;

一种载体, 其含有本发明第 d 点的多核苷酸, 尤其是 pCR2.1lysR3int, 保藏在 DSMZ (德意志微生物保藏中心, 德国不伦瑞克); 及

棒状细菌, 其中 lysR3 基因中含有尤其是使用载体 pCR2.1lysR3int 进行的插入或缺失。

本发明还提供了多核苷酸, 其基本上包含一种多核苷酸序列, 所述多核苷酸可通过用具有相应于 SEQ ID NO: 1 所述多核苷酸或其片段的序列的探针杂交合适的基因文库, 并分离所述的 DNA 序列

来筛选获得，所述的文库包括具有相应于 SEQ ID NO: 1 所述多核苷酸序列的完整基因。

本发明的多核苷酸序列适用作 RNA、cDNA 和 DNA 的杂交探针，以分离编码 LysR3 蛋白的全长核酸或多核苷酸或基因，或分离与 lysR3 基因的序列具有高度序列相似性的核酸、多核苷酸或基因。

另外，含有本发明序列的多核苷酸还适用作引物，借助于其通过聚合酶链反应（PCR），可以制备编码 LysR3 蛋白的基因的 DNA。

作为探针或引物的这种寡核苷酸含有至少 30 个、优选至少 20 个、特别优选至少 15 个连续核苷酸。具有至少 40 或 50 个核苷酸的寡核苷酸也是合适的。

“分离的”是指从其天然环境中分离出来。

“多核苷酸”一般地涉及多聚核糖核苷酸和多聚脱氧核糖核苷酸，其可以是非修饰的 RNA 或 DNA，或修饰的 RNA 或 DNA。

“多肽”应理解为包含经肽键结合的两个或多个氨基酸的肽或蛋白质。

本发明的多肽包括 SEQ ID NO: 2 的多肽，特别是具有 LysR3 蛋白生物学活性的多肽，以及与 SEQ ID NO: 2 的多肽至少 70%，优选至少 80%，特别优选至少 90—95% 相同并具有所述活性的多肽。

本发明另外还提供了用尤其已生产氨基酸的棒状细菌发酵生产氨基酸尤其 L-赖氨酸和 L-缬氨酸的方法，在该棒状细菌中编码 lysR3 基因的核苷酸序列被弱化，尤其是被消除或低水平表达。

文中术语“弱化”是指微生物中由相应 DNA 编码的一或多种酶（蛋白质）的胞内活性的降低或消除，例如通过使用弱启动子或编码低活性相应酶的基因或等位基因，或失活相应基因或酶（蛋白质），及如果需要组合使用这些方法。

本发明的微生物可从葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、糖蜜、淀粉、纤维素或从甘油和乙醇中生产氨基酸特别是 L-赖氨酸和

L-缬氨酸。所述微生物可以是棒状细菌的代表菌，尤其是棒杆菌属。在棒杆菌属中尤其应提及的是谷氨酸棒杆菌，本领域技术人员已知其生产 L-氨基酸的能力。

适当的棒杆菌属，尤其谷氨酸棒杆菌菌株，是例如已知的野生型菌株：

谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032

醋谷棒杆菌 ATCC 15806

嗜乙酰乙酸棒杆菌 ATCC 13870

Corynebacterium melassecola ATCC 17965

嗜热产氨棒杆菌 FERM BP-1539

黄色短杆菌 ATCC 14067

乳发酵短杆菌 ATCC 13869 和

扩展短杆菌 ATCC 14020

或从中获得的生产 L-氨基酸的突变体或菌株，例如生产 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

谷氨酸棒杆菌 DM58-1

谷氨酸棒杆菌 DG52-5

谷氨酸棒杆菌 DSM 5714 和

谷氨酸棒杆菌 DSM 12866

或例如生产 L-缬氨酸的菌株：

谷氨酸棒杆菌 DSM 12455

谷氨酸棒杆菌 FERM-P 9325

乳发酵短杆菌 FERM-P 9324

乳发酵短杆菌 FERM-BP 1763。

本发明人已成功地从谷氨酸棒杆菌中分离编码 LysR3 蛋白的新 lysR3 基因，该蛋白是 LysR 家族的一种转录调节物。

为了分离谷氨酸棒杆菌的 lysR3 基因或其他基因，首先在大肠杆菌中建立这一微生物的基因文库。可根据通常已知的教材和手册建立基因文库。例如由 Winnacker 所著教材：基因与克隆，基因工程入门（Verlag Chamie, Weinheim, 德国，1990），或由 Sambrook 等所著手册：分子克隆实验手册（Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）。一非常熟知的基因文库是已由 Kohara 等（细胞 50, 495—508（1987））在 λ 载体中建立的 E. coli K-12 菌株 W3110 的基因文库。Bathe 等（分子及普通遗传学，252: 255—265, 1996）阐述了借助于粘粒载体 SuperCos I（Wahl 等，1987, Proceeding of the National Academy of Sciences USA, 84:2160-2164），在 E. coli K-12 菌株 NM554（Raleigh 等，1988, 核酸研究 16: 1563—1575）中建立的谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 的基因文库。Bormann 等（分子微生物学 6(3), 317-326）描述了用粘粒 pHC79（Hohn 和 Collins, 基因 11, 291—298(1980)）制备谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的基因文库。

为在大肠杆菌中制备谷氨酸棒杆菌的基因文库，也可使用质粒如 pBR322（Bolivar, 生命科学 25, 807—818(1979)）或 pUC9（Viera 等，1982, 基因 19: 259—268）。合适的宿主尤其是限制和重组缺陷的大肠杆菌菌株，一个例子是菌株 DH5 α （Jeffrey H. Miller: “细菌遗传学短期教材，针对大肠杆菌和相关细菌的实验指导和手册”，冷泉港实验室出版社，1992）。

然后将借助于粘粒或其它 λ 载体克隆的长 DNA 片段，亚克隆入适于 DNA 测序的常规载体中。

DNA 测序方法参见于 Sanger 等（美国科学院院报 74:5463—

5467, 1977) 所述。

获得的 DNA 序列然后可以使用已知公式或序列分析程序加以检测, 如 Staden (核酸研究 14, 217-232 (1986)) 所述, Marck (核酸研究 16, 1829-1836 (1988)) 所述, 或 Butler 所述 GCG 程序 (生物化学分析方法 39, 74-97(1998))。

以此方式可获得编码 lysR3 基因的谷氨酸棒杆菌的新 DNA 序列, 示作 SEQ ID NO: 1, 是本发明的一部分。另外, 用前述方法从此 DNA 序列中也已衍生出相应蛋白质的氨基酸序列。所得 lysR3 基因产物的氨基酸序列以 SEQ ID NO: 2 表示。

通过遗传密码的简并性产生自 SEQ ID NO: 1 的编码 DNA 序列也是本发明的一部分。同样, 与 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 1 的部分杂交的 DNA 序列也是本发明的一部分。另外, 本领域技术人员已知, 蛋白质中的保守氨基酸置换如用丙氨酸置换甘氨酸, 或用谷氨酸置换天冬氨酸, 是有义突变, 其不引起所述蛋白质活性的任何改变, 即它们是中性的。另外, 已知在蛋白质 N 末端和/C 末端的变化基本不损害其功能而且甚至还稳定其功能。本领域技术人员可以找到关于这方面的信息, 参见 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)) 及熟知的遗传和分子生物学教材。以适当方式产生自 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列也是本发明的一部分。

最后, 使用得自 SEQ ID NO:1 的引物通过聚合酶链反应 (PCR) 产生的 DNA 序列是本发明的一部分。这种寡核苷酸典型地具有至少 15 个核苷酸。

通过杂交鉴别 DNA 序列的指导可见于 Boehringer Mannheim GmbH (德国曼海姆, 1993) 的“滤膜杂交的 DIG 系统使用指导”, 和 Liebl 等 (国际系统细菌学杂志 41:255-260(1991))。用聚合酶链

反应 (PCR) 扩增 DNA 序列的指导参见 Gait 的手册: 寡核苷酸合成实用方法 (IRL 出版社, 英国牛津, 1984) 及 Newton 和 Graham: PCR (Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 德国, 1994)。

本发明人发现, 在 *lysR3* 基因弱化后, 棒状细菌以改良方式生产氨基酸, 尤其 L-赖氨酸和 L-缬氨酸。

为获得弱化, 可降低或消除 *lysR3* 基因的表达或酶蛋白的催化活性。两种措施可任选地组合。

可通过适当控制培养或通过遗传修饰 (突变) 用于基因表达的信号结构而实现降低基因表达。用于基因表达的信号结构例如是阻遏基因、激活基因、操纵子、启动子、弱化子、核糖体结合位点、起始密码子和终止子。本领域技术人员可在如下文献中发现此方面的信息, 例如专利申请 WO96/15246, Boyd & Murphy (细菌学杂志 170: 5949(1988)), Voskuil & Chambliss (核酸研究 26: 3548(1998)), Jensen & Hammer (生物技术和生物工程 58: 191(1998)), Patek 等 (微生物学 142: 1297(1996)), Vasicova 等 (细菌学杂志 181: 6188 (1999)), 以及已知的遗传学和分子生物学教科书如 Knippers 的教科书 (分子遗传学, 第 6 版, Georg Thieme Verlag, 德国斯图加特, 1995), 或 Winnacker 的教科书 (基因和克隆, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 德国, 1990)。

导致酶蛋白催化活性的变化或降低的突变是现有技术中已知的, 可提及的例如 Qiu 和 Goodman 的论文 (生物化学杂志 272: 8611—8617(1997)), Sugimoto 等 (生物科学生物技术和生物化学 61: 1760—1762(1997)) 以及 Mockel (谷氨酸棒杆菌的苏氨酸脱水酶: 酶的变构调节和结构, Berichte des Forschungszentrums Julichs, Jul-2906, ISSN09442952, Julich, 德国, 1994)。综述可参见遗传学和分子生物学的已知教科书, 如 Hagemann 的教科书 ("Allgemeine Genetik", Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986)。

合适的突变是转换、颠换、插入和缺失。根据氨基酸置换对酶活性的影响，分别为错义突变或无义突变。在基因中插入或缺失至少一个碱基对（bp）导致移码突变，其结果是插入不正确的氨基酸或者翻译过早终止。缺失几个密码子典型地导致酶活性的完全丧失。产生此类突变的指导属于现有技术并可在遗传学和分子生物学的已知教科书中找到，如 Knippers 的教科书（分子遗传学，第 6 版，Georg Thieme Verlag，德国斯图加特，1995），Winnacker 的教科书（基因和克隆，VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim, 德国，1990）或 Hagemann 的教科书（“普通遗传学”，Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1986）。

在谷氨酸棒杆菌中突变基因的一般方法是基因破坏和基因置换方法，如 Schwarzer 和 Puhler 所述（生物/技术 9，84—87（1991））。

在基因破坏方法中，将所述基因编码区的中心部分克隆在质粒载体中，所述载体能在宿主中复制（典型在大肠杆菌中复制），但在谷氨酸棒杆菌中不能复制。适当的载体例如 pSUP301（Simon 等，生物/技术 1，784—791（1983）），pK18mob 或 pK19mob（Schafer 等，基因 145，69—73（1994）），pK18mobsacB 或 pK19mobsacB（Jager 等，细菌学杂志 174：5462—65（1992）），pGEM-T（Promega 公司，Madison, Wis., 美国），pCR2.1-TOPO（Shuman（1994）），生物化学杂志 269:32678—84；美国专利 No.5487993），pCR®Blunt（Invitrogen，Groningen，Netherlands；Bernard 等，分子生物学杂志 234:534—541（1993））或 pEM1（Schrumpf 等，1991，细菌学杂志 173:4510—4516）。然后将含有所述基因编码区中心部分的质粒载体通过接合或转化移至所需谷氨酸棒杆菌菌株中。接合方法例如 Schafer 等（应用和环境微生物学 60，756—759（1994））所述。转化方法例如 Thierbach 等（应用微生物学及生物技术学 29，356—362（1988）），Dunican 和 Shivnan（生物/技术 7，1067—1070（1989））及 Tauch 等（FEMS 微生物学通信 123，343—347（1994））所述。在通过“交换”同源重

组后，相应基因的编码区被载体序列间断，并获得两个不完整的等位基因，一个缺失 3'末端，一个缺失 5'末端。这个方法例如已经由 Fitzpatrick 等使用，以消除谷氨酸棒杆菌中的 *recA* 基因（应用微生物学和生物技术 42，575—580(1994)）。

图 1 示出质粒载体 pCR2.1lysR3int，利用其可破坏或消除 *lysR3* 基因。

在基因置换方法中，突变例如缺失，插入或碱基置换是在体外在相应基因中产生的。然后将产生的等位基因克隆入在谷氨酸棒杆菌中不复制的载体中，然后将其通过转化或接合移至所需谷氨酸棒杆菌宿主中。在通过实现整合的第一次“交换”事件，及实现靶基因或靶序列中的切除的第二次“交换”事件的同源重组后，实现掺入突变体或等位基因。这种方法例如已经由 Peters-Wendisch 等使用，以通过缺失而消除谷氨酸棒杆菌中的 *pyc* 基因（微生物学 144，915—927（1998））。

以此方式可以在 *lysR3* 基因中掺入缺失，插入或碱基置换。

另外，除了 *lysR3* 基因的弱化之外，特定生物合成途径、糖酵解、回补代谢、柠檬酸循环或氨基酸输出的一或多种酶的增强特别是过表达，对 L-氨基酸尤其 L-赖氨酸和 L-缬氨酸的生产也可以是有利的。

因此，例如为生产 L-赖氨酸，选自以下的一或多种基因可以同时增强尤其过表达：

- 编码二氢-2，6-吡啶二羧酸合酶的 *dapA* 基因（EP-B-0197335），
- 编码烯醇化酶的 *eno* 基因（DE:19947791.4），
- 编码 *zwf* 基因产物的 *zwf* 基因（JP-A-09224661），
- 编码丙酮酸羧化酶的 *pyc* 基因（Peters-Wendisch 等，微生物学 144,915—927（1998）），

- 编码赖氨酸输出的 *lysE* 基因 (DE-A-19548222)。

为生产氨基酸尤其 L-赖氨酸, 除了弱化 *lysR3* 基因之外, 同时弱化选自以下的一或多种基因也是有益的:

- 编码磷酸烯醇丙酮酸羧激酶的 *pck* 基因 (DE19950409.1, DSM13047),
- 编码编码葡萄糖-6-磷酸异构酶的 *pgi* 基因 (US09/396478, DSM12969),
- 编码丙酮酸氧化酶的 *poxB* 基因 (DE:19951975.7, DSM13114)。

因此, 例如为生产 L-缬氨酸, 选自以下的一或多种基因可以同时过表达:

- 编码乙酰羟酸合酶的 *ilvBN* 基因 (Keilhauer 等, (1993), 细菌学杂志 175:5595-5603), 或
- 编码二羟酸脱水酶的 *ilvD* 基因 (Sahm 和 Eggeling (1999), 应用和环境微生物学 65:1973-1979), 或
- 编码苹果酸: 醌氧化还原酶的 *mgo* 基因 (Molenaar 等, 欧洲生物化学杂志 254, 395-403 (1998))。

另外, 除 *lysR3* 基因的弱化之外, 抑制非所需的二级反应对氨基酸尤其 L-赖氨酸和 L-缬氨酸的生产也是有益的 (Nakayama: “生产氨基酸的微生物的育种”, 微生物产物的过量产生, Krumphanzl, Sikyta, Vanek (编辑), 学术出版社, 伦敦, 英国, 1982)。

本发明还提供了根据本发明制备的微生物, 其可连续培养或在分批方法, 或在补料分批法或重复补料分批法中分批培养以生产 L-氨基酸尤其 L-赖氨酸和 L-缬氨酸。已知的培养法由 Chmiel (生物方法技术学 1, 生物工程入门, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991) 所著教材, 或由 Storhas(生物反应器及外周设备, Vieweg Verlag, Brunswick/Wiesbaden, 1994)所著教材中所述。

所用培养基必须以适当方式符合特定菌株的需求, 关于各种微

生物培养基的阐述见于,美国细菌学会的“细菌学通用方法手册”(华盛顿 D.C., USA, 1981)。可使用的碳源包括糖及碳水化合物,例如葡萄糖,蔗糖,乳糖,果糖,麦芽糖,糖蜜,淀粉和纤维素,油和脂肪如豆油,葵花油,落花生油和椰子油,脂肪酸如棕榈酸,硬脂酸和亚油酸,醇如甘油和乙醇,及有机酸如乙酸,这些物质可单独或混合使用。

可使用的氮源包括含氮的有机化合物如胨,酵母提取物,肉膏,麦芽提取物,玉米浸液、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。这些氮源可单独或混合使用。

可使用的磷源包括磷酸,磷酸二氢钾或磷酸氢二钾,或相应钠盐。另外培养基还必须含有为生长所需的金属盐如硫酸镁或硫酸铁。最后,除了上述物质之外,可使用生长必需物质如氨基酸和维生素,此外,可将适当前体加入培养基中。上述物质可以单批形式或在培养期间以适当方式加入培养物中。

可以适当方式加入碱性化合物如 NaOH, KOH, 氨或氨水,或酸性化合物如磷酸或硫酸,以调节培养物的 pH 值,抗泡沫剂例如脂肪酸聚乙二醇酯可用于控制泡沫产生。适当的选择性作用物质例如抗生素,可加入培养基中以保持质粒的稳定性。氧气或含氧混合气,例如空气,可充入培养物中以保持有氧条件。培养温度通常在 20℃~45℃,优选 25℃~40℃,持续培养直至所需产物形成最大量。此目的通常在 10~160 小时范围达到。

L-氨基酸的分析方法是现有技术中已知的,分析可如 Speckman 等(分析化学, 30, (1958), 1190)所述通过阴离子交换层析,随后经茚三酮衍生化作用进行,或通过反相 HPLC,如 Lindroth 等(分析化学(1979)51:1167-1174)进行。

以下微生物根据布达佩斯条约,保藏在德意志微生物保藏中心(DSMZ, 不伦瑞克, 德国):

• 大肠杆菌菌株 TOP10F/pCR2.1lysR3int, 保藏号 DSM 13618。

本发明的方法用于发酵生产氨基酸, 尤其 L-赖氨酸和 L-缬氨酸。

本发明借助于以下提供的实施例得以更详述阐述。

从大肠杆菌中分离质粒 DNA 及所有的限制、Klenow 处理和碱性磷酸酶处理方法, 均如 Sambrook 等所述进行 (分子克隆实验手册, 1989, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, N.Y.美国)。大肠杆菌的转化方法也见于这本手册。

常用的培养基如 LB 培养基或 TY 培养基的组分也来自 Sambrook 等所著手册。

实施例 1 制备谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 的基因组粘粒基因文库

如 Tauch 等 (1995, 质粒 33: 168—179) 所述分离谷氨酸棒杆菌 ATCC13032 的染色体 DNA 并用限制性内切酶 Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, 德国, 产品描述 Sau3AI, 编码 27—0913—02) 部分酶切。用虾碱性磷酸酶 (Roche Molecular Biochemicals, 德国曼海姆, 产品描述 SAP, 编号 1758250) 将 DNA 片段去磷酸化。将得自 Stratagene 公司 (La Jolla, USA, 产品描述 SuperCos1 粘粒载体试剂盒, 编号 251301) 的粘粒载体 SuperCos1 (Wahl 等(1987)美国科学院院报 84: 2160—2164) 的 DNA, 用限制性内切酶 XbaI (Amersham Pharmacia, Freiburg, 德国, 产品描述 XbaI, 编号 27—0948—02) 酶切并类似地用虾碱性磷酸酶去磷酸化。

粘粒 DNA 然后用限制性内切酶 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, 德国, 产品描述 BamHI, 编号 27—0868—04) 酶切。将以此方式处理的粘粒 DNA 与处理的 ATCC13032 DNA 片段混合, 并用 T4 DNA 连接酶 (Amersham Pharmacia, Freiburg, 德国, 产品描述 T4—DNA—连接酶, 编号 27—0870—04) 处理。连接混合物然后用

Gigapack II XL 包装提取物 (Stratagene, La Jolla, USA, 产品描述 Gigapack II XL 包装提取物, 编号 200217) 包装进噬菌体中。

为感染大肠杆菌菌株 NM554 (Raleigh 等, 1988, 核酸研究 16: 1563—1575), 将细胞置于 10mM MgSO_4 并与噬菌体悬浮液混合。如 Sambrook 等 (1989, 分子克隆实验手册, 冷泉港) 所述进行粘粒文库的感染和滴定, 细胞在含 100 μg /ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂 (Lennox, 1955, 病毒学, 1: 190) 上铺板。在 37 $^{\circ}\text{C}$ 保温过夜后, 选择重组克隆。

实施例 2 lysR3 基因的分离和测序

用 Qiaprep Spin 微量制备试剂盒 (产品号 27106, Qiagen, Hilden, 德国) 根据厂商指导分离一个菌落的粘粒 DNA, 并用限制性内切酶 Sau3AI (Amersham Pharmacia, Freiburg, 德国, 产品描述 Sau3AI, 编号 27-0913-02) 部分酶切。用虾碱性磷酸酶 (Roche Molecular Biochemicals, 德国曼海姆, 产品描述 SAP, 编号 1758250) 将 DNA 片段去磷酸化。凝胶电泳分离后, 用 QiaExII 凝胶提取试剂盒 (产品号 20021, Qiagen, Hilden, 德国) 分离大小范围为 1500—2000bp 的粘粒片段。

得自 Invitrogen 公司 (Groningen, 荷兰, 产品描述 Zero 背景克隆试剂盒, 产品号 K2500-01) 的测序载体 pZero-1 的 DNA 用限制性内切酶 BamHI (Amersham Pharmacia, Freiburg, 德国, 产品描述 BamHI, 产品号 27-0868-04) 酶切。如 Sambrook 等 (1989, 分子克隆实验手册, 冷泉港) 所述进行粘粒片段在测序载体 pZero-1 中的连接, DNA 混合物与 T4 连接酶 (Pharmacia Biotech, Freiburg, 德国) 保温过夜。然后将这一连接混合物电穿孔 (Tauch 等, 1994, FEMS 微生物学通信, 123: 343—7) 进大肠杆菌菌株 DH5 α MCR (Grant, 1990, 美国科学院院报 87: 4645—4649) 并在含有 50 μg /ml 的 zeocin 的 LB

琼脂 (Lennox, 1955, 病毒学, 1: 190) 上铺板。

重组克隆的质粒制备用 Biorobot 9600(产品号 900200, Qiagen, Hilden, 德国)进行。测序用 Zimmeermann 等 (1990, 核酸研究 18: 1067) 改良的 Sanger 等 (1977, 美国科学院院报 74: 5463—5467) 的双脱氧链终止法进行。使用得自 PE 应用生物系统公司 (产品号 403044, Weiterstadt, 德国) 的“RR 罗丹明终止循环测序试剂盒”。在带有购自 PE 应用生物系统公司 (Weiterstadt, 德国) 的“ABI Prism 377”测序仪的“Rotiphoresis NF 丙烯酰胺/双丙烯酰胺”凝胶 (29: 1) (产品号 A124.1, Roth, Karlsruhe, 德国) 中进行凝胶电泳分离和序列分析。

得到的原始序列资料然后用 Staden 程序包 (1986, 核酸研究, 14: 217—231) 版本 97—0 处理。pZero-1 衍生物的各个序列组装成连续重叠群。用 XNIP 程序 (Staden, 1986, 核酸研究, 14: 217—231) 制备计算机辅助编码区分析。同源性分析用“BLAST 搜索程序” (Altschul 等, 1997, 核酸研究, 25: 3389—3402) 对“国家生物技术信息中心” (NCBI, Bethesda, MD, USA) 的非冗余数据库进行。

获得的核苷酸序列如 SEQ ID NO: 1 所示。对该核苷酸序列的分析显示一 633 碱基对的开放读框, 其被称为 lysR3 基因。lysR3 基因编码 210 个氨基酸的多肽。

实施例 3 用于 lysR3 基因的整合诱变的整合载体的制备

用 Eikmanns 等的方法 (微生物学 140: 1817—1828(1994)) 从菌株 ATCC 13032 中分离染色体 DNA。基于实施例 2 已知的谷氨酸棒杆菌的 lysR3 基因的序列, 选择如下寡核苷酸进行聚合酶链反应:

lysR3intA:

5'-GAT GTG GTG TTG ATG GAT CT-3'

lysR3intB:

5'-TCA ATT TCT CTG GCA CTG AG-3'。

所述引物由 MWG 生物技术公司 (Ebersberg, 德国) 合成, 根据 Innis 等的标准 PCR 方法 (PCR 方案, 方法和应用指南, 1990, 学术出版社), 用来自曼海姆宝灵格公司的 Pwo 聚合酶进行 PCR 反应。借助于聚合酶链反应, 分离了 lysR3 基因的一个 323bp 长的内部片段, 示作 SEQ ID NO:3。

用来自 Invitrogen 公司的 TOPO TA 克隆试剂盒 (Carsbad, CA, USA; 目录号 K4500-01), 将扩增的 DNA 片段连接进载体 pCR2.1-TOPO (Mead 等,(1991)生物/技术 9: 657-663) 中。

然后将这一连接混合物转化进大肠杆菌菌株 TOP10F (Hanahan, DNA 克隆实用方法, 卷 I, IRL 出版社, Oxford, 华盛顿特区, 美国, 1985)。通过将转化混合物在补加 25mg/l 卡那霉素的 LB 琼脂 (Sambrook 等, 分子克隆实验手册, 第 2 版, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约, 1989) 上铺板, 选择携带质粒的细胞。用来自 Qiagen 的 QIAprep Spin Miniprep 试剂盒从转化子中分离质粒 DNA, 并用限制酶 EcoRI 限制消化及琼脂糖凝胶电泳 (0.8%) 而证实。质粒命名为 pCR2.1lysR3int。

实施例 4 lysR3 基因在赖氨酸生产菌株 DSM 5715 和缬氨酸生产菌株 FERM BP-1763 中的整合诱变

根据 Tauch 等的电穿孔方法 (FEMS 微生物学通信 123: 343-347(1994)), 将实施例 3 中的载体 pCR2.1lysR3int 电穿孔进谷氨酸棒杆菌 DSM 5715 和乳发酵短杆菌 FERM BP-1763 中。菌株 DSM5715 是 AEC 抗性赖氨酸生产菌 (EP-B-435132)。菌株 FERM BP-1763 是需要异亮氨酸和甲硫氨酸的缬氨酸生产菌 (US-A-5188948)。载体 pCR2.1lysR3int 在 DSM 5715 或 FERM BP-1763 中不能独立复制, 只有在其整合进 DSM5715 或 FERM BP-1763 的染色体中后才能在细

胞中保持。通过将电穿孔混合物在补加 15mg/l 卡那霉素的 LB 琼脂 (Sambrook 等, 分子克隆实验手册, 第 2 版, 冷泉港实验室出版社, 冷泉港, 纽约, 1989) 上铺板, 选择携带整合进染色体的 pCR2.1lysR3int 的克隆。

通过用来自宝灵格公司的 Dig 杂交试剂盒, 根据宝灵格曼海姆有限公司的“用于滤膜杂交的 DIG 系统用户指南”(曼海姆, 德国, 1993) 的方法标记 lysR3int 片段, 以检测整合已经发生。根据 Eikmanns 等的方法 (微生物学 140: 1817—1828(1994)), 从潜在整合子中分离染色体 DNA, 并分别用限制酶 SalI, SacI 和 HindIII 切割。经琼脂糖凝胶电泳分离得到的片段, 并用来自宝灵格公司的 Dig 杂交试剂盒在 68℃ 杂交。实施例 3 中的质粒 pCR2.1lysR3int 已插入 DSM5715 和 FERM BP-1763 染色体中的染色体 lysR3 基因内。该菌株命名为 DSM5715::pCR2.1lysR3int 和 FERM BP-1763::pCR2.1lysR3int。

实施例 5 L-赖氨酸和 L-缬氨酸的生产

实施例 4 中获得的谷氨酸棒杆菌菌株 DSM5715::pCR2.1lysR3int 和乳发酵短杆菌 FERM BP-1763::pCR2.1lysR3int 在适于生产 L-赖氨酸和 L-缬氨酸的营养培养基中培养, 并确定培养物上清中的 L-赖氨酸和 L-缬氨酸含量。

为此, 首先在 33℃ 在具有合适抗生素的琼脂板 (具有卡那霉素 (25mg/l) 的脑心琼脂) 上培养菌株 24 小时。从这些琼脂板培养物开始, 接种预培养物 (10ml 培养基于 100ml 锥形瓶)。用于预培养的培养基是完全培养基 CgIII。

培养基 CgIII

NaCl	2.5g/l
Bacto-肽胨	10g/l
Bacto-酵母膏	10g/l

葡萄糖（单独高压灭菌） 2%(w/v)

pH 调节为 7.4。

向此培养基中加入卡那霉素(25mg/l)。在摇床上于 33℃ 以 240rpm 振荡培养预培养物 24 小时。以此预培养物接种主培养物，从而主培养物的起始光密度（OD，660nm）是 0.1。培养基 MM 用作主培养基。

培养基 MM:

CSL（玉米浆） 5g/l

MOPS(吗啉代丙磺酸) 20g/l

葡萄糖（单独高压灭菌） 50g/l

盐:

(NH₄)₂SO₄ 25g/l

KH₂PO₄ 0.1g/l

MgSO₄·7H₂O 1.0g/l

CaCl₂·2H₂O 10mg/l

FeSO₄·7H₂O 10mg/l

MnSO₄·H₂O 5.0mg/l

生物素（过滤灭菌） 0.3mg/l

硫胺素·HCl（过滤灭菌） 0.2mg/l

CaCO₃ 25g/l

用氨水将 CSL，MOPS 和盐溶液调至 pH7 并高压灭菌。然后加入无菌的底物和维生素溶液，并加入干态高压灭菌的 CaCO₃。针对培养 DSM5715，在培养基中额外加入 0.1g/l 亮氨酸。针对培养 FERM BP-1763，在所述培养基中额外加入 0.1g/l 异亮氨酸和 0.1g/l 甲硫氨酸。

以在具有档板的 100ml 锥形瓶中的 10ml 体积进行培养，加入卡那霉素（25mg/l）。在 33℃ 和 80% 大气湿度下进行培养。

72 小时后, 用 Biomek1000 (Beckmann 仪器有限公司, 慕尼黑) 确定在 660nm 测量波长的 OD。用 Eppendorf-BioTronik 公司的氨基酸分析仪 (汉堡, 德国), 经离子交换层析和用茚三酮检测柱后衍生化而确定形成的 L-赖氨酸和 L-缬氨酸的数量。

所得结果示于表 1 和 2。

表 1

菌株	OD (660nm)	赖氨酸 HCl g/L
DSM5715	7.5	13.01
DSM5715::pCR2.1lysR3int	7.6	15.04

表 2

菌株	OD (660nm)	缬氨酸 g/L
FERM BP-1763	12.1	7.49
FERM BP-1763::pCR2.1lysR3int	12.5	8.67

附图简述

图 1: 质粒 pCR2.1lysR3int 图谱。

图中所采用的缩写和符号有如下含义:

KmR: 卡那霉素抗性

EcoRI: 限制酶 EcoRI 的酶切位点

lysR3int: lysR3 基因的内部片段

ColE1 ori: 质粒 ColE1 的复制源点

序列表

<110> 德古萨股份公司

<120> 编码lysR3基因的核苷酸序列

<130> 000183 BT

<140>

<141>

<160> 3

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 1032

<212> DNA

<213> Corynebacterium glutamicum

<220>

<221> CDS

<222> (201)..(830)

<223> lysR3基因

<400> 1

```

gatgatcaaaa tacttctaga tgtcatcgat aatgggcagg gatttgatgt ggcagaagtg 60
atccgtaaaaa aatccattgg actgccacaca gcgcaacgcc gggctgaag gctgggcgga 120
acaataatta ttgaatctac aatcggatcg ggaactggaa tttccgccc tttccctat 180
ccacaaaagg accaagataa gtg atc cgt att ctg ttg gct gat gat cat ccc 233
                    Met Ile Arg Ile Leu Leu Ala Asp Asp His Pro
                      1             5             10

gtt gtt cgc gca ggc ctt gcc tcc ttg ctg gtg agt gaa gat gat ttt 281
Val Val Arg Ala Gly Leu Ala Ser Leu Leu Val Ser Glu Asp Asp Phe
                15             20             25

gag ata gtg gac atg gtg ggc acc cca gat gat gcc gtt gcg cgc gcc 329
Glu Ile Val Asp Met Val Gly Thr Pro Asp Asp Ala Val Ala Arg Ala
                30             35             40

gcg gaa ggc ggg gtg gat gtg gtg ttg atg gat ctg cgt ttt ggt gat 377
Ala Glu Gly Gly Val Asp Val Val Leu Met Asp Leu Arg Phe Gly Asp
                45             50             55

caa cca ggc atc gag gtc gcc ggc ggg gta gag gca acg cgt cgc atc 425
Gln Pro Gly Ile Glu Val Ala Gly Gly Val Glu Ala Thr Arg Arg Ile
                60             65             70             75

cgt gcg ctg gac aac ccg cca cag gta ctg gtg gtg acc aac tac tcc 473
Arg Ala Leu Asp Asn Pro Pro Gln Val Leu Val Val Thr Asn Tyr Ser
                80             85             90

aca gac ggc gat gtg gtg ggc gca gta tct gct ggt gcc gtg ggg tat 521
Thr Asp Gly Asp Val Val Gly Ala Val Ser Ala Gly Ala Val Gly Tyr
                95             100             105

ttg ctc aaa gat agc tcc cca gaa gat ctc att gcc ggt gtt cgc gat 569
Leu Leu Lys Asp Ser Ser Pro Glu Asp Leu Ile Ala Gly Val Arg Asp
                110             115             120

```

```

gcc gcg cgg gga gaa tca gtg ctt tca aag cag gtc gcc agc aag atc 617
Ala Ala Arg Gly Glu Ser Val Leu Ser Lys Gln Val Ala Ser Lys Ile
125 130 135

atg ggg cgg atg aac aac ccc atg act gct ctc agt gcc aga gaa att 665
Met Gly Arg Met Asn Asn Pro Met Thr Ala Leu Ser Ala Arg Glu Ile
140 145 150 155

gaa gtg ctg tcc ttg gtg gcg caa ggg caa agc aat aga gaa atc gcc 713
Glu Val Leu Ser Leu Val Ala Gln Gly Gln Ser Asn Arg Glu Ile Gly
160 165 170

aag aaa ctt ttc ctc act gag gcc acg gtg aaa agt cac atg ggg cat 761
Lys Lys Leu Phe Leu Thr Glu Ala Thr Val Lys Ser His Met Gly His
175 180 185

gtg ttc aac aag ctg gat gtc acc tct aga aca gct gcg gta gct gaa 809
Val Phe Asn Lys Leu Asp Val Thr Ser Arg Thr Ala Ala Val Ala Glu
190 195 200

gcc aga cag cgc gga att atc tagacgcaca cgtgttggtgta accgatcaca 860
Ala Arg Gln Arg Gly Ile Ile
205 210

ccagcgcacg ctgctaattct tcaactccatg aacaagggtgc agcgcagggtc actgatggcg 920

ttgtgcatga cggtggcatt tgctggagga agcctgaccg cgtgcacacc tcgtcctgat 980

accgcagacc ccatcgcaga ggaattcctt caagcttgagg catcgcaaga tt 1032

<210> 2
<211> 210
<212> PRT
<213> Corynebacterium glutamicum

<400> 2
Met Ile Arg Ile Leu Leu Ala Asp Asp His Pro Val Val Arg Ala Gly
1 5 10 15

Leu Ala Ser Leu Leu Val Ser Glu Asp Asp Phe Glu Ile Val Asp Met
20 25 30

Val Gly Thr Pro Asp Asp Ala Val Ala Arg Ala Ala Glu Gly Gly Val
35 40 45

Asp Val Val Leu Met Asp Leu Arg Phe Gly Asp Gln Pro Gly Ile Glu
50 55 60

Val Ala Gly Gly Val Glu Ala Thr Arg Arg Ile Arg Ala Leu Asp Asn
65 70 75 80

Pro Pro Gln Val Leu Val Val Thr Asn Tyr Ser Thr Asp Gly Asp Val
85 90 95

Val Gly Ala Val Ser Ala Gly Ala Val Gly Tyr Leu Leu Lys Asp Ser
100 105 110

Ser Pro Glu Asp Leu Ile Ala Gly Val Arg Asp Ala Ala Arg Gly Glu
115 120 125

Ser Val Leu Ser Lys Gln Val Ala Ser Lys Ile Met Gly Arg Met Asn

```

130	135	140
Asn Pro Met Thr Ala Leu Ser Ala Arg Glu Ile Glu Val Leu Ser Leu 145	150	155 160
Val Ala Gln Gly Gln Ser Asn Arg Glu Ile Gly Lys Lys Leu Phe Leu 165	170	175
Thr Glu Ala Thr Val Lys Ser His Met Gly His Val Phe Asn Lys Leu 180	185	190
Asp Val Thr Ser Arg Thr Ala Ala Val Ala Glu Ala Arg Gln Arg Gly 195	200	205
Ile Ile 210		

<210> 3
 <211> 323
 <212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum*

<220>
 <223> lysR3int

<400> 3
 gatgtggtgt tgatggatct gcgttttggg gatcaaccag gcatcgaggt cgccggcgagg 60
 gtagaggcaa cgcgtcgcat ccgtgcgctg gacaaccgc cacagggtact ggtggtgacc 120
 aactactcca cagacggcga tgtggtgggc gcagtatctg ctggtgccgt ggggtatttg 180
 ctcaaagata gctccccaga agatctcatt gccggtgttc gcgatgccgc gcggggagaa 240
 tcagtgcctt caaagcaggt cgccagcaag atcatggggc ggatgaacaa ccccatgact 300
 gctctcagtg ccagagaaat tga 323

pCR2.1lysR3int的质粒图谱

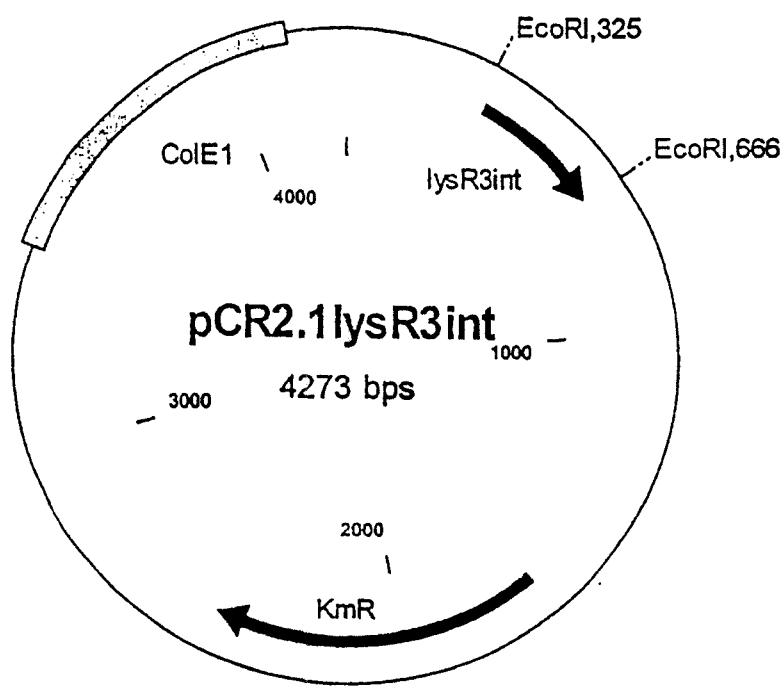


图1