



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 116997655 A

(43) 申请公布日 2023. 11. 03

(21) 申请号 202280021948.8

(22) 申请日 2022.01.19

(30) 优先权数据

10-2021-0034544 2021.03.17 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.09.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2022/000971 2022.01.19

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/196919 KO 2022.09.22

(71) 申请人 大象株式会社

地址 韩国首尔

(72) 发明人 金纹廷 李东锡 尹宣竣 朴硕贤

朴俊炫

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

专利代理师 金世煜

(51) Int.Cl.

C12N 15/77 (2006.01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表4页

(54) 发明名称

L-瓜氨酸生产能力得到提高的谷氨酸棒状杆菌变异株及利用其的L-瓜氨酸的生产方法

(57) 摘要

本发明涉及L-瓜氨酸生产能力得到提高的谷氨酸棒状杆菌变异株及利用其的L-瓜氨酸的生产方法,上述谷氨酸棒状杆菌变异株通过由NCg12657基因表达的蛋白质的活性弱化或失活,从而降低副产物的生成,可以以高收率和高浓度生产L-瓜氨酸。

1. 一种谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 变异株, 其由NCg12657基因表达的蛋白质的活性弱化或失活而L-瓜氨酸生产能力得到提高。

2. 根据权利要求1所述的谷氨酸棒状杆菌变异株, 其中, 所述NCg12657基因由SEQ ID NO:1的碱基序列表示。

3. 根据权利要求1所述的谷氨酸棒状杆菌变异株, 其中, 所述由NCg12657基因表达的蛋白质的活性弱化或失活是NCg12657基因的全部或一部分插入、置换或缺失。

4. 一种L-瓜氨酸的生产方法, 包括以下步骤:

a) 在培养基中培养权利要求1的变异株的步骤; 以及

b) 从所述变异株或培养变异株的培养基中回收L-瓜氨酸的步骤。

L-瓜氨酸生产能力得到提高的谷氨酸棒状杆菌变异株及利用其的L-瓜氨酸的生产方法

技术领域

[0001] 本发明涉及L-瓜氨酸生产能力得到提高的谷氨酸棒状杆菌变异株及利用其的L-瓜氨酸的生产方法。

背景技术

[0002] L-瓜氨酸(L-Citrulline)是非必要氨基酸中的一种,已知瓜氨酸具有促进胺代谢、通过血管扩张改善血流、降低血压、神经传递、免疫力促进、消除活性氧等有用的作用。这样的瓜氨酸在精氨酸的生物合成过程中作为中间产物被合成。微生物中精氨酸的生物合成通过线形阶段和环形阶段两种不同途径,从L-谷氨酸(L-glutamate)经过8次酶阶段而形成。在线形阶段中,L-精氨酸是从L-谷氨酸经过N-乙酰谷氨酸(N-acetyl glutamate)、N-乙酰鸟氨酸(N-acetyl ornithine)、鸟氨酸(ornithine)、瓜氨酸(citrulline)、以及精氨基琥珀酸(argininosuccinate)而合成的。

[0003] L-瓜氨酸的生产通常是利用细菌或酵母等微生物的发酵进行生产的,为了提高在自然状态下获得的野生型菌株或其L-瓜氨酸生产能力,可以利用变形的变异株。近年来,为了改善L-瓜氨酸的生产效率,以多用于L-氨基酸和其它有用物质生产的大肠杆菌、棒状杆菌等微生物为对象适用基因重组技术,从而开发了具有优异的L-瓜氨酸生产能力的各种重组菌株或变异株及利用其的L-瓜氨酸的生产方法。根据韩国授权专利第10-1102263号和第10-1053429号,确认了通过增强或弱化与L-瓜氨酸生产有关的酶、转录因子等蛋白质的活性或表达,L-瓜氨酸生产能力得到了提高。因此,可以期待通过调节包括作用于L-瓜氨酸的生产途径的酶在内的各种蛋白质的活性或表达,同样可以调节L-瓜氨酸的生产量。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 韩国授权专利第10-1102263号

[0007] 韩国授权专利第10-1053429号

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供L-瓜氨酸生产能力得到提高的谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)变异株。

[0009] 另外,本发明的目的在于提供利用了上述变异株的L-瓜氨酸的生产方法。

[0010] 本发明的发明人为了利用谷氨酸棒状杆菌菌株来开发L-瓜氨酸生产能力得到提高的新型变异株而进行了研究,结果确认了在对参与L-瓜氨酸生物合成途径中作为副产物生产的6-乙酰鸟氨酸的生成的酶进行编码的NCg12657基因诱导变异或将NCg12657基因剔除时,其酶的活性弱化或失活,6-乙酰鸟氨酸的生产量显著减少,不仅如此,L-瓜氨酸的生产量增加,从而完成了本发明。

[0011] 本发明的一个方式提供由NCg12657基因表达的蛋白质的活性弱化或失活而L-瓜

氨酸生产能力得到提高的谷氨酸棒状杆菌变异株。

[0012] 本发明中使用的“NCg12657基因”是指对L-瓜氨酸生物合成途径中以乙酰-CoA和磷酸(phosphate)为基质而生成乙酰鸟氨酸的前体即乙酰磷酸(acetyl phosphate)的酶(磷酸乙酰基转移酶(phosphate acetyltransferase))进行编码的基因。

[0013] 根据本发明的一具体例,上述NCg12657基因可以源于棒状杆菌(*Corynebacterium*)属菌株。具体而言,上述棒状杆菌属菌株可以为谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、克氏棒状杆菌(*Corynebacterium crudilactis*)、荒漠棒状杆菌(*Corynebacterium deserti*)、帚石南棒状杆菌(*Corynebacterium callunae*)、苏那棒状杆菌(*Corynebacterium suranareeae*)、润滑脂棒状杆菌(*Corynebacterium lubricantis*)、道桑棒状杆菌(*Corynebacterium doosanense*)、高效棒状杆菌(*Corynebacterium efficiens*)、乌氏棒状杆菌(*Corynebacterium uterequi*)、停滞棒状杆菌(*Corynebacterium stationis*)、帕氏棒状杆菌(*Corynebacterium pacaense*)、奇棒状杆菌(*Corynebacterium singulare*)、腐殖质还原棒状杆菌(*Corynebacterium humireducens*)、海洋棒状杆菌(*Corynebacterium marinum*)、耐盐棒状杆菌(*Corynebacterium halotolerans*)、蝶科棒状杆菌(*Corynebacterium spheniscorum*)、弗氏棒状杆菌(*Corynebacterium freiburgense*)、纹带棒状杆菌(*Corynebacterium striatum*)、犬棒状杆菌(*Corynebacterium canis*)、产氨棒状杆菌(*Corynebacterium ammoniagenes*)、肾棒状杆菌(*Corynebacterium renale*)、污染棒状杆菌(*Corynebacterium pollutisoli*)、亚胺棒状杆菌(*Corynebacterium imitans*)、里海棒状杆菌(*Corynebacterium caspium*)、睾丸棒状杆菌(*Corynebacterium testudinoris*)、假性棒状杆菌(*Corynebacterium pseudopelargi*)或者微黄棒状杆菌(*Corynebacterium flavescens*),但并不限于此。

[0014] 根据本发明的一具体例,上述NCg12657基因可以由SEQ ID NO:1的碱基序列表示。

[0015] 本发明中使用的“活性弱化”是指客体基因的表达量与原始的表达量相比减少。这样的活性的弱化包括以下情况:通过编码基因的核苷酸置换、插入、缺失或者它们的组合,蛋白质本身的活性与原始微生物具有的蛋白质的活性相比减少的情况,以及通过阻碍编码它的基因的表达或者阻碍翻译等,细胞内的整体酶活性程度与野生型菌株或转变前的菌株相比低的情况,也包括它们组合的情况。

[0016] 本发明中使用的“失活”是指以下情况:编码酶、转录因子、运输蛋白质等蛋白质的基因的表达与野生型菌株或转变前的菌株相比完全不表达的情况,或者即使表达也没有活性的情况。

[0017] 根据本发明的一具体例,由上述NCg12657基因表达的蛋白质的活性弱化或失活可以通过NCg12657基因的全部或一部分插入、置换、缺失或它们的组合。

[0018] 本发明中使用的“一部分”是指并非碱基序列或多核苷酸序列的全部,可以为1至300个,优选地,可以为1至100个,更优选地,可以为1至50个,但并不限于此。

[0019] 根据本发明的一具体例,由上述NCg12657基因表达的蛋白质的活性弱化或失活可以是对NCg12657基因的起始密码子诱导变异。

[0020] 更具体而言,上述NCg12657基因的起始密码子变异可以是NCg12657基因的起始密码子ATG置换为其它碱基,例如TTG、GTG。

[0021] 根据本发明的一实施例,将编码谷氨酸棒状杆菌菌株的NCg12657基因的SEQ ID NO:1碱基序列中的起始密码子由ATG被置换为TTG,从而获得了具有NCg12657基因的新型起始密码子的谷氨酸棒状杆菌变异株。这样的谷氨酸棒状杆菌变异株可以包含由SEQ ID NO:2碱基序列编码的NCg12657基因。

[0022] 另外,根据本发明的一具体例,由上述NCg12657基因表达的蛋白质的活性弱化或失活可以是剔除或缺失NCg12657基因。

[0023] 根据本发明的一实施例,使谷氨酸棒状杆菌菌株的NCg12657基因缺失,从而获得了一种与野生型谷氨酸棒状杆菌菌株或为了生产过量的瓜氨酸而已开发出的谷氨酸棒状杆菌变异株相比,不仅作为副产物的乙酰鸟氨酸的生产显著减少,而且L-瓜氨酸生产能力得到提高的谷氨酸棒状杆菌变异株。

[0024] 本发明中使用的“生产能力得到提高”是指与亲本菌株相比,L-瓜氨酸的生产率增加。上述亲本菌株是指成为变异的对象的野生型或变异株,包括直接成为变异的对象或通过重组的载体等转化的对象。在本发明中,亲本菌株可以是野生型谷氨酸棒状杆菌菌株或由野生型变异的菌株。

[0025] 根据本发明的一具体例,上述亲本菌株可以是谷氨酸棒状杆菌ATCC13032。

[0026] 根据本发明的一实施例,上述L-瓜氨酸生产能力得到提高的谷氨酸棒状杆菌变异株通过对NCg12657基因的起始密码子导入变异或者将NCg12657基因剔除,从而显示出与亲本菌株相比增加的L-瓜氨酸生产能力,特别是,与亲本菌株或已开发出的谷氨酸棒状杆菌变异株相比,L-瓜氨酸浓度增加5%以上,具体而言,增加5至50%,更具体而言,增加10至30%,这时作为副产物生产的6-乙酰鸟氨酸减少20%以上,具体而言,减少20至100%,更具体而言,减少30至100%。

[0027] 根据本发明的一具体例的谷氨酸棒状杆菌变异株可以通过包含亲本菌株中的NCg12657基因的起始密码子变异的变体的重组载体、或者缺失NCg12657基因的重组载体来实现。

[0028] 本发明中使用的“变体”是指参与L-瓜氨酸的生物合成的NCg12657基因的起始密码子由ATG被置换为TTG的基因变体。

[0029] 本发明中使用的“载体”作为可以在合适的宿主细胞中表达目标蛋白质的表达载体,是指为了表达基因插入物而包括可操作地连接的(operably linked)必需的调控元件的基因产物。在这里,“可操作地连接的”是指需要表达的基因与其调节序列彼此功能性地结合并以能够进行基因表达的方式连接,“调控元件”包括用于实施转录的启动子、用于调节转录的任意的操纵子序列、编码合适的mRNA核糖体结合位点的序列、以及调节转录和翻译的终止的序列。这样的载体包括质粒载体、粘粒载体、噬菌体载体、病毒载体等,但并不限于此。

[0030] 本发明中使用的“重组载体”在转化到合适的宿主细胞内后,可以与宿主细胞的基因组无关地进行复制,或者可以缝合于基因组其自身。这时,上述“合适的宿主细胞”能够进行载体的复制,可以包括作为开始复制的特定碱基序列的复制起点。

[0031] 本发明中使用的“转化”可以将基因导入宿主细胞内而使其在宿主细胞内表达,转化的基因只要可以在宿主细胞内表达,就可以包括插入宿主细胞的染色体内或者位于染色体外,没有限制。根据本发明的一具体例,转化的方法包括将核酸导入细胞内的任何方法,

可以根据宿主细胞选择如本领域的公知技术那样的适合的标准技术来实施。例如,可以通过电穿孔法(electroporation)、磷酸钙(CaPO_4)沉淀、氯化钙(CaCl_2)沉淀、显微注射法(microinjection)、聚乙二醇(PEG)法、DEAE-葡聚糖法、阳离子脂质体法和乙酸锂-DMSO法等,但并不限于此。根据本发明的一实施例,可以使用电穿孔法(van der Rest et al., Appl.Microbiol.Biotechnol.,52,541-545,1999)作为转化方法。

[0032] 上述宿主细胞包括在生物体内或试管内利用本发明的重组载体或多核苷酸转染、转化或感染的细胞。包含本发明的重组载体的宿主细胞为重组宿主细胞、重组细胞或重组微生物。

[0033] 另外,根据本发明的重组载体可以包括选择标记(selection marker),上述选择标记用于选择利用载体转化的转化体(宿主细胞),在经上述选择标记处理的培养基中只有表达选择标记的细胞可以生存,因此能够选择转化的细胞。作为代表性的例子,上述选择标记有卡那霉素、链霉素、氯霉素等,但并不限于此。

[0034] 插入到本发明的转化用重组载体内的基因由于同源重组交叉而可以被置换到如棒状杆菌属菌株、大肠杆菌等微生物的宿主细胞内。

[0035] 根据本发明的一具体例,上述宿主细胞可以为棒状杆菌属菌株,例如,可以为谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)菌株。

[0036] 另外,本发明的另一方式提供L-瓜氨酸的生产方法,其包括以下步骤:a)在培养基中培养上述谷氨酸棒状杆菌变异株的步骤;以及b)从上述变异株或培养变异株的培养基中回收L-瓜氨酸的步骤。

[0037] 上述培养可以根据该领域中已知的合适的培养基和培养条件而进行,只要是本领域技术人员就可以容易地调整培养基和培养条件来使用。具体而言,上述培养基可以是液体培养基,但并不限于此。培养方法可以包括例如分批式培养(batch culture)、连续式培养(continuous culture)、补料分批式培养(fed-batch culture)或者它们的组合培养,但并不限于此。

[0038] 根据本发明的一具体例,上述培养基必须以合适的方式满足特定菌株的要求,可以由本领域技术人员适当地进行变更。关于棒状杆菌属菌株的培养基,可以参考公知的文献(Manual of Methods for General Bacteriology.American Society for Bacteriology.Washington D.C.,USA,1981),但并不限于此。

[0039] 根据本发明的一具体例,培养基中可以包含各种碳源、氮源和微量元素成分。作为可以使用的碳源,包括葡萄糖、蔗糖、乳糖、果糖、麦芽糖、淀粉、纤维素之类的糖及碳水化合物;大豆油、葵花籽油、蓖麻籽油、椰子油等油及脂肪;棕榈酸、硬脂酸、亚油酸之类的脂肪酸;甘油、乙醇之类的醇;乙酸之类的有机酸。这些物质可以单独使用或以混合物的形式使用,但并不限于此。作为可以使用的氮源,可以包括蛋白胨、酵母提取物、肉汤、麦芽提取物、玉米浆、豆粕和尿素或者无机化合物,例如,硫酸铵、氯化铵、磷酸铵、碳酸铵和硝酸铵。氮源同样可以单独使用或以混合物的形式使用,但并不限于此。作为可以使用的磷的供应源,可以包括磷酸二氢钾或磷酸氢二钾或相应的含钠的盐,但并不限于此。此外,培养基可以含有生长所需要的硫酸镁或硫酸铁之类的金属盐,但并不限于此。除此以外,可以包含氨基酸和维生素之类的必要生长物质。此外,可以使用合适培养基的前体。上述培养基或单个成分可以在培养过程中通过适当的方式,分批或连续添加到培养液中,但并不限定

于此。

[0040] 根据本发明的一具体例,在培养过程中,可以将氢氧化铵、氢氧化钾、氨、磷酸和硫酸之类的化合物以适当的方式添加到微生物培养液中来调整培养液的pH。此外,在培养过程中,可以使用脂肪酸聚乙二醇酯之类的消泡剂来抑制气泡产生。进一步而言,为了维持培养液的有氧状态,可以向培养液内注入氧气或者含氧气的气体(例如空气)。培养液的温度通常可以为20℃至45℃,例如,可以为25℃至40℃。培养时间可以持续到有用物质获得期望的生产量为止,例如,可以为10至160小时。

[0041] 根据本发明的一具体例,在上述从培养的变异株和培养变异株的培养基中回收L-瓜氨酸的步骤中,可以根据培养方法并利用该领域中公知的合适的方法,从培养基中收集或回收所生产的L-瓜氨酸。例如,可以使用离心分离、过滤、提取、喷雾、干燥、蒸发、沉淀、结晶化、电泳、分级溶解(例如,硫酸铵沉淀)、色谱法(例如,离子交换、亲和性、疏水性和尺寸排阻)等方法,但并不限于此。

[0042] 根据本发明的一具体例,在回收L-瓜氨酸的步骤中,可以将培养基低速离心分离而去除生物质,可以将得到的上清液通过离子交换色谱法而分离。

[0043] 根据本发明的一具体例,在上述回收L-瓜氨酸的步骤中,可以包括纯化L-瓜氨酸的工序。

[0044] 根据本发明的谷氨酸棒状杆菌变异株通过由NCg12657基因表达的蛋白质的活性弱化或失活,从而降低副产物的生成,可以以高收率和高浓度生产L-瓜氨酸。

具体实施方式

[0045] 下面,对本发明更详细地进行说明。但是,这样的说明只是为了帮助理解本发明而例示性地提出的,本发明的范围并不限于这样的例示性的说明。

[0046] 实施例1.谷氨酸棒状杆菌变异株的制造

[0047] 为了制造由NCg12657基因表达的蛋白质的活性弱化的谷氨酸棒状杆菌变异株,使用了谷氨酸棒状杆菌ATCC13032和E.coli DH5a(HIT Competent cellsTM,Cat No.RH618)。

[0048] 上述谷氨酸棒状杆菌ATCC13032在CM-肉汤(CM-broth)培养基(pH6.8)中以30℃的温度进行了培养,上述CM-肉汤培养基的组成是在1L的蒸馏水中有5g的葡萄糖、2.5g的NaCl、5.0g的酵母提取物、1.0g的尿素(urea)、10.0g的聚蛋白胨和5.0g的牛肉(beef)提取物。

[0049] 上述E.coli DH5a在LB培养基上以37℃的温度进行了培养,上述LB培养基的组成是在1L的蒸馏水中有10.0g的胰蛋白胨、10.0g的NaCl和5.0g的酵母提取物。

[0050] 抗生素卡那霉素(kanamycin)使用了Sigma公司的制品,DNA测序分析委托马克罗基因株式会社进行了分析。

[0051] 1-1.重组载体的制作

[0052] 利用Wizard基因组DNA纯化试剂盒(Wizard Genomic DNA Purification Kit)(Promega,美国)从谷氨酸棒状杆菌ATCC13032中提取染色体DNA后,将其作为模板,利用引物1和2以及引物3和4的组合,分别实施PCR。将由此得到的PCR产物再次利用引物1和4的组合,通过交叉(crossover)PCR扩增后,在重组载体pK19mobSacB的限制酶HindIII、XbaI位置插入。将其命名为载体pK19ms/NCg12657(A1T)。在制作上述载体的过程中使用了下述表1的

引物。

[0053] [表1]

[0054]	引物	引物序列(5'→3')	序列号
	引物1	ctatgaccatgattacgccacagtggagaacacgatcgcg	3
	引物2	gaggtcgggtgtgtcagacaaacatcgccctttctaatttca	4
	引物3	tgaaattagaaaggcgatgtttgtctgacacaccgacctc	5
	引物4	gctcgggtacccggggatcctcggcgctcgccgttgtggacc	6

[0055] 利用以上的引物并在以下的条件下实施PCR。利用热循环仪(Thermocycler)(TP600, TAKARA BIO Inc., 日本), 在添加有各个三磷酸脱氧核苷酸(dATP、dCTP、dGTP、dTTP) 100μM的反应液中, 将1pM的寡核苷酸、10ng的谷氨酸棒状杆菌(*C. glutamicum*) ATCC13032的染色体DNA用作模板(template), 在1单位的PrimeSTAR Max DNA Polymerase (Takara, 日本) 的存在下, 实施例25~30周期(cycle)。PCR实施条件是在(i) 变性(denaturation)步骤: 在94℃30秒, (ii) 退火(annealing)步骤: 在58℃30秒, 以及(iii) 延伸(extension)步骤: 在72℃1~2分钟(每1kb赋予2分钟的聚合时间)的条件下实施的。

[0056] 利用自组装克隆(self-assembly cloning), 将如上所述制造的基因片段克隆到pK19mobSacB载体中。将上述载体转化到大肠杆菌(*E. coli*) DH5a中, 涂抹在含有50μg/ml的卡那霉素的LB-琼脂板上, 在37℃培养24小时。分离最终形成的菌落, 确认插入物(insert)是否正确存在于载体后, 分离该载体, 用于谷氨酸棒状杆菌菌株的重组。

[0057] 作为上述方法中共同进行的过程, 该基因的扩增是由谷氨酸棒状杆菌ATCC13032 genomic DNA用PCR方法进行扩增的, 根据策略, 通过自组装克隆(self-assembled cloning)方法插入到pK19mobSacB载体中, 并在*E. coli* DH5a中选择。这时, 为了将扩增的基因插入pK19mobSacB载体, 根据供给的缓冲液和方案使用了DNA连接试剂盒(DNA ligation kit) (Takara, 日本) 和限制酶HindIII、XbaI (NEB, 美国)。

[0058] 1-2. 变异株的制造

[0059] 利用上述pK19ms/NCg12657(A1T)载体制造了作为谷氨酸棒状杆菌变异株的CT2菌株。

[0060] 以上述载体的最终浓度成为1μg/μl以上的方式准备, 对谷氨酸棒状杆菌ATCC13032使用电穿孔法(参考文献[Tauch et al., FEMS Microbiology letters 123 (1994) 343-347])而诱导了1次重组。这时, 将电穿孔的菌株涂抹在2YT-Km固体培养基(含有16g/L的胰蛋白胍(Tryptone)、10g/L的酵母提取物(Yeast extract)、5g/L的NaCl、1.5%的琼脂和30μg/ml的卡那霉素)上。在30℃培养2天而得到了菌落。在诱导了1次同源重组的菌落中选择经确认使用上述表1的引物1和4并用与上述1-1相同的条件通过PCR扩增的菌落作为1次重组株, 在2YT液体培养基(含有16g/L的胰蛋白胍(Tryptone)、10g/L的酵母提取物(Yeast extract)和5g/L的NaCl)中培养12小时后, 涂抹在2YT-10%蔗糖(sucrose)固体培养基(含有16g/L的胰蛋白胍(Tryptone)、10g/L的酵母提取物(Yeast extract)、5g/L的NaCl、1.5%的琼脂和100g/L的蔗糖(sucrose))上, 诱导2次同源重组, 剔除了抗生素标记。最终选择了对卡那霉素没有抗性并且可在10%蔗糖(sucrose)培养基中生长的菌株, 然后通过碱基序列分析确认了是否对NCg12657基因的起始密码子导入了变异(参照文献[Schafer et al., Gene 145(1994) 69-73])。最终获得了导入了变异NCg12657基因的谷氨

酸棒状杆菌变异株(CT2)。

[0061] 实施例2. 谷氨酸棒状杆菌变异株的制造

[0062] 为了制造NCg12657基因缺失的谷氨酸棒状杆菌变异株,使用了野生型谷氨酸棒状杆菌ATCC13032和E.coli DH5a。

[0063] 上述谷氨酸棒状杆菌ATCC13032、E.coli DH5a和抗生素与实施例1中使用的相同。

[0064] 2-1. 载体的制作

[0065] 使用引物5和6代替引物1和2,使用引物7和8代替引物3和4,除此以外,通过与实施例1相同的方法制作了载体。将所制作的载体命名为pK19ms/ Δ NCg12657,制作其的过程中使用了下述表2的引物。

[0066] [表2]

引物	引物序列(5'→3')	序列号
引物5	ctatgaccatgattacgccacagtggagaacacgatcgcg	7
引物6	caaaacaagtgccaatgccaacatcgccctttctaatttca	8
引物7	tgaatttagaaaggcgatgttggcattggcacttggtttg	9
引物8	gctcggtacccggggatcctatcgatgctcatgccagcgg	10

[0068] 2-2. 变异株的制造

[0069] 使用pK19ms/ β 载体代替pK19ms/NCg12657(A1T)载体,除此以外,通过与实施例1相同的方法制造了作为谷氨酸棒状杆菌变异株的CT3菌株。最终选择了对卡那霉素没有抗性并且可在10%蔗糖(sucrose)培养基中生长的菌株,然后使用上述表2的引物5和8并用与实施例1相同的条件实施PCR,最终确认了是否剔除了NCg12657基因,将NCg12657基因缺失的菌株命名为CT3。

[0070] 比较例1. 谷氨酸棒状杆菌变异株

[0071] 为了生产过量的瓜氨酸,使用了鸟氨酸氨基甲酰转移酶和氨基甲酰磷酸合成酶的活性增强的谷氨酸棒状杆菌变异株(参照韩国专利申请第10-2019-0151321号,以下称为“CT1”)。

[0072] 确认了CT1菌株与作为亲本菌株使用的谷氨酸棒状杆菌ATCC13032相比L-生产量和发酵收率增加。

[0073] 实验例1. 变异株的L-瓜氨酸生产率确认

[0074] 比较了实施例1和2中制造的NCg12657基因变异株(CT2和CT3菌株)和比较例1的CT1菌株之间的L-瓜氨酸生产率。

[0075] 将各菌株接种到瓜氨酸种子培养基中,在30℃培养10小时后,将250mL的培养液接种到5L培养器培养基中。初始培养基中包含的糖全部耗尽时,投入另外的培养基。本实验中使用的培养基的组成如下述表3所示。培养结束后,将培养液用蒸馏水稀释100倍,用0.45 μ m过滤器过滤后,利用安装有柱(Dionex IonPacTM CS12A)和紫外线检测仪(195nm)的高效液相色谱(HPLC)测定了培养液内菌株生产的L-瓜氨酸和作为副产物的6-乙酰鸟氨酸的浓度,将其结果示于下述表4。

[0076] [表3]

	组成 (/L)
瓜氨酸种子培养基	葡萄糖 2.67%, YPA 3.14%, KH_2PO_4 0.1%, K_2HPO_4 0.1%, MnSO_4 10 ppm, FeSO_4 10 ppm, 生物素 100 ug/L, 硫胺素-HCl 200 ug/L
[0077] 5L培养器培养基	葡萄糖 8%, MgSO_4 0.08%, FeSO_4 16 ppm, MnSO_4 8 ppm, CuSO_4 1.6 ppm, ZnSO_4 1.6 ppm, CaCl_2 32 ppm, 生物素 160 ppb, 硫胺素-HCl 8 ppm, HVP 0.4%, NaCl 0.08%, KH_2PO_4 0.22%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.4%
另外的培养基	葡萄糖 52%, MgSO_4 0.1%, CaCl_2 120 ppm, 生物素 160 ppb, 硫胺素-HCl 16 ppm, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 0.08%, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4.4%

[0078] [表4]

[0079]	菌株	L-瓜氨酸(%)	6-乙酰鸟氨酸(%)
	CT1	9.73	1.21
	CT2	11.46	0.38
	CT3	10.92	0.01

[0080] 如上述表4所示,确认了NCg12657基因编码的酶的活性弱化的谷氨酸棒状杆菌变异株CT2和NCg12657基因缺失的谷氨酸棒状杆菌变异株CT3与已开发出的变异株CT1相比,作为副产物的6-乙酰鸟氨酸的生产分别减少了约69%、99%,L-瓜氨酸的生产率分别增加了约17.8%、12.2%。通过这样的结果,可知通过由NCg12657基因表达的蛋白质的活性弱化或失活,从而副产物的生成显著减少,不仅如此,菌株的L-瓜氨酸生产能力得到提高,可以生产高纯度的L-瓜氨酸。

[0081] 到目前为止,对本发明围绕其优选实施例进行了研究。本发明所属技术领域的技术人员可以理解本发明在不脱离本发明的本质性的特性的范围内可以以变形的形态实现。因此,公开的实施例应从说明性的角度进行考虑,而不是从限制性的角度进行考虑。本发明的范围显示在权利要求书中而不是上述的说明中,并且应被解释为在与其等同范围内的所有的差异包括在本发明中。

<110>	大象株式会社	
<120>	L-瓜氨酸生产能力得到提高的谷氨酸棒状杆菌变异株及利用其的L-瓜氨酸的生产方法	
<130>	BPX221001PCT	
<150>	KR 10-2021-0034544	
<151>	2021-03-17	
<160>	10	
<170>	KoPatentIn 3.0	
<210>	1	
<211>	1386	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	NCg12657 基因	
<400>	1	
atgtctgaca caccgacctc agctctgatc accacggtca accgcagctt cgatggattc		60
gatttggaag aagtagcagc agaccttgga gttcggctca cctacctgcc cgacgaagaa		120
ctagaagtat ccaaagttct cgcggcggac ctctcgtg aggggccagc tctcatcatc		180
ggtgtaggaa acacgttttt cgacgccag gtcccgctg ccctcggcgt cccagtgcta		240
ctgctggtag acaagcaagg caagcacgtt gctcttgctc gcaccaggt aaacaatgcc		300
ggcgagttg ttgcagcagc atttaccgct gaacaagagc caatgccgga taagctgcgc		360
aaggctgtgc gcaaccacag caacctcgaa ccagtcatga gcgccgaact ctttgaaaac		420
tggctgctca agcgcgcacg cgcagagcac tcccacattg tgctgccaga aggtgacgac		480
gaccgcatct tgatggctgc ccaccagctg ctgatcaag acatctgtga catcacgac		540
ctgggcgatc cagtaaagat caaggagcgc gctaccgaac ttggcctgca ccttaacact		600
gcataacctgg tcaatccgct gacagatcct cgcctggagg aattcgccga acaattcgcg		660
gagctgcgca agtcaaagag cgtcactatc gatgaagccc gcgaaatcat gaagatatt		720
tcctacttcg gcaccatgat ggtccacaac ggcgacgccg acggaatggt atccggtgca		780
gcaaacacca ccgcacacac cattaagcca agcttccaga tcatcaaaac tgttccagaa		840
gcatccgtcg tttcttccat ctctctcatg gtgctgcgcg ggcgactgtg ggcattcggc		900
gactgtgctg ttaacccgaa cccaactgct gaacagcttg gtgaaatcgc cgttgtgtca		960
gcaaaaactg cagcacaatt tggcattgat cctcgcgtag ccattctgtc ctactccact		1020
ggcaactccg gcggaggtc agatgtggat cgcgccatcg acgctcttgc agaagcacgc		1080
cgacttaacc cagaactatg cgtcgatgga ccacttcagt tcgacgccgc cgtcgacccg		1140
ggtgtggcgc gcaagaagat gccagactct gacgtcgtg gccaggcaaa tgtgtttatc		1200
ttccctgacc tggaagccgg aaacatcggc taaaaactg cacaacgcac cgttcacgcc		1260
ctggcagttg gtccgattct gcagggccta acaaaccag tcaacgacct ttcccgtggc		1320
gcaacagtcc ctgacatcgt caacacagta gccatcacag caattcaggc aggaggacgc		1380

agctaa		1386
<210>	2	
<211>	1386	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	NCg12657 基因 - 用TTG置换ATG	
<400>	2	
ttgtctgaca caccgacctc agctctgate accacggtca accgcagctt cgatggattc		60
gattttggaag aagtagcagc agaccttgga gttegggtca cctacctgcc cgacgaagaa		120
ctagaagtat ccaaagttct cgcgggcgac ctctctgctg aggggccagc tctcatcatc		180
ggtgtaggaa acacgttttt cgacgcccag gtcgccgctg cctcggcgt cccagtgcta		240
ctgctggtag acaagcaagg caagcacgtt gctcttgctc gcacccaggt aaacaatgcc		300
ggcgagcttg ttgcagcagc atttaccgct gaacaagagc caatgccgga taagctgcgc		360
aaggctgtgc gcaaccacag caacctcgaa ccagtcatga gcgccgaact ctttgaaaac		420
tggtctgtca agcgcgcacg cgagagcac tcccacattg tgctgccaga aggtgacgac		480
gaccgcatct tgatggctgc ccaccagctg cttgatcaag acatctgtga catcacgac		540
ctgggcgatc cagtaaagat caaggagcgc gctaccgaac ttggcctgca ccttaacact		600
gcataacctg tcaatccgct gacagatcct cgcttgagg aattcgccga acaattcgcg		660
gagctgcgca agtcaaagag cgtcactatc gatgaagccc gcgaaatcat gaaggatatt		720
tcctacttcg gcaccatgat ggtccacaac ggcgacgccg acggaatggt atccggtgca		780
gcaaacacca ccgcacacac cattaagcca agcttcaga tcatcaaac tgttccagaa		840
gcatccgtcg tttcttccat cttcctcatg gtgctgcgcg ggcgactgtg ggcattcggc		900
gactgtgctg ttaacccgaa cccaactgct gaacagcttg gtgaaatcgc cgttgtgtca		960
gcaaaaactg cagcacaatt tggcattgat cctcgcttag ccatcttgct ctactccact		1020
ggcaactccg gcggaggctc agatgtggat cgcgccatcg acgctcttgc agaagcacgc		1080
cgacttaacc cagaactatg cgtcgatgga ccacttcagt tcgacgccgc cgtcgacccg		1140
ggtgtggcgc gcaagaagat gccagactct gacgtcgtg gccaggcaaa tgtgtttatc		1200
ttccctgacc tggaagccgg aaacatcggc taaaaactg cacaacgcac cggtcacgcc		1260
ctggcagttg gtccgattct gcagggccta aacaaaccag tcaacgacct ttcccgtagc		1320
gcaacagtcc ctgacatcgt caacacagta gccatcacag caattcaggc aggaggacgc		1380
agctaa		1386
<210>	3	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 1	
<400>	3	

ctatgaccat gattacgcca cagtggagaa cacgacgcg	40
<210> 4	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 2	
<400> 4	
gaggtcggtg tgtcagacaa acatcgcctt tetaatttca	40
<210> 5	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 3	
<400> 5	
tgaaattaga aaggcgatgt ttgtctgaca caccgacctc	40
<210> 6	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 4	
<400> 6	
gctcgggtacc cggggatcct cggcgtcgcc gttgtggacc	40
<210> 7	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 5	
<400> 7	
ctatgaccat gattacgcca cagtggagaa cacgacgcg	40
<210> 8	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物 6	

<400>	8	
caaaacaagt gccaatgcca acatcgcctt tctaatttca		40
<210>	9	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 7	
<400>	9	
tgaaattaga aaggcgatgt tggcattggc acttgttttg		40
<210>	10	
<211>	40	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	引物 8	
<400>	10	
gctcgggtacc cggggatcct atcgatgctc atgccagcgg		40