



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 119242549 B

(45) 授权公告日 2025.06.27

(21) 申请号 202411648915.3

C12N 15/52 (2006.01)

(22) 申请日 2024.11.19

C12N 15/54 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 15/77 (2006.01)

申请公布号 CN 119242549 A

C12P 21/02 (2006.01)

C07K 5/093 (2006.01)

(43) 申请公布日 2025.01.03

A23K 10/16 (2016.01)

(73) 专利权人 江南大学

C12R 1/15 (2006.01)

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

(56) 对比文件

CN 116676280 A, 2023.09.01

CN 1452659 A, 2003.10.29

(72) 发明人 徐美娟 饶志明 高惠 潘春丽
王守钢

审查员 马晓霞

(74) 专利代理机构 苏州市中南伟业知识产权代
理事务所(普通合伙) 32257
专利代理师 张静杰

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

权利要求书1页 说明书11页

序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

重组谷氨酸棒杆菌及其发酵生产谷胱甘肽的方法与应用

(57) 摘要

本发明涉及一种重组谷氨酸棒杆菌及其发酵生产谷胱甘肽的方法与应用。本发明所述重组谷氨酸棒杆菌是以谷氨酸棒杆菌为表达宿主;敲除半胱氨酸脱硫酶基因和谷氨酰转肽酶基因,过表达谷胱甘肽双功能酶突变体的基因;所述谷胱甘肽双功能酶突变体以氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示的谷胱甘肽双功能酶为亲本,将亲本谷胱甘肽双功能酶第11位点的组氨酸突变为脯氨酸、第239位点的天冬酰胺突变为谷氨酸。本发明优化5L发酵罐的温度、pH、补料浓度的发酵参数,重组谷氨酸棒杆菌CG05发酵液中谷胱甘肽最高产量为 25.78 ± 0.25 g/L (83.97 ± 0.81 mM),生物量 OD_{600} 为59.8,比优化前的CG05菌株发酵产量提高2.1倍,比出发菌株CG01产量提高5.7倍,转化率为83.97%。



1. 一种重组谷氨酸棒杆菌,其特征在于,所述重组谷氨酸棒杆菌是以谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)为表达宿主;敲除半胱氨酸脱硫酶基因和谷氨酰转肽酶基因,过表达谷胱甘肽双功能酶突变体的基因;

所述谷胱甘肽双功能酶突变体以氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示的谷胱甘肽双功能酶为亲本,将亲本谷胱甘肽双功能酶第11位点的组氨酸突变为脯氨酸、第239位点的天冬酰胺突变为谷氨酸。

2. 根据权利要求1所述的重组谷氨酸棒杆菌,其特征在于,所述半胱氨酸脱硫酶基因的上游500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO 4所示;所述半胱氨酸脱硫酶基因的下游500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO 5所示;所述谷氨酰转肽酶基因的上游500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO 6所示;所述谷氨酰转肽酶基因的下游500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO 7所示。

3. 根据权利要求1所述的重组谷氨酸棒杆菌,其特征在于,所述谷氨酸棒杆菌为谷氨酸棒杆菌*Corynebacterium glutamicum* E01。

4. 根据权利要求1所述的重组谷氨酸棒杆菌,其特征在于,所述谷胱甘肽双功能酶来源于乳链球菌。

5. 一种发酵生产谷胱甘肽的方法,其特征在于,以L-半胱氨酸和L-甘氨酸为底物,发酵体系中加入权利要求1-4任一项所述重组谷氨酸棒杆菌发酵生产谷胱甘肽。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述L-半胱氨酸的浓度为30 mM~100 mM;所述L-甘氨酸的浓度为30 mM~100 mM。

7. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述重组谷氨酸棒杆菌的接种量为0.5 mL-1 mL。

8. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述发酵体系中的发酵培养基包括:100 g/L-150 g/L葡萄糖,0.5 g/L-1 g/L K_2HPO_4 ,1 g/L-1.5 g/L $MgSO_4$,5g /L-10 g/L玉米浆,0.001 g/L-0.005 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$,0.001 g/L-0.005 g/L $MnSO_4 \cdot H_2O$,5 g/L-10 g/L尿素。

9. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述发酵的参数为:30°C~45°C,300 rpm~800 rpm,pH值为7.0~8.5条件下发酵培养24 h~60 h。

10. 权利要求1-4任一项所述重组谷氨酸棒杆菌在制备动物饲料中的应用。

重组谷氨酸棒杆菌及其发酵生产谷胱甘肽的方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其是指一种重组谷氨酸棒杆菌及其发酵生产谷胱甘肽的方法与应用。

背景技术

[0002] 谷胱甘肽通常由 γ -谷氨酰半胱氨酸合成酶(γ -GCS, EC 6.3.2.2, GSH I)和谷胱甘肽合成酶(GS, EC 6.3.2.3, GSH II)或双功能谷胱甘肽合成酶GshF催化合成,需要三种前体L-谷氨酸、L-半胱氨酸和L-甘氨酸合成,消耗两分子ATP。谷胱甘肽作为一种非蛋白硫醇类化合物,广泛应用于医药、食品、化妆品和保健品中,可用于稳定化学和生物试剂的色素。作为环境污染指标;它被用作食品添加剂,以延长肉类和水果的保质期,并以胶囊形式作为食品补充剂。近年来,谷胱甘肽的商业需求呈现出增长的总体趋势。

[0003] 目前,Yang等人(*Applied Microbiology and Biotechnology* (2016), 100 (14), 6279-6289. 在加入80mMATP后,全细胞催化体系最终产生11.2g/L谷胱甘肽;Chen等人(*World Journal of Microbiology and Biotechnology* (2020), 36(8), 117.)通过系统探索发酵过程中温度、pH等因素,研究了一种基于氧化应激和能量代谢逐渐调节酵母谷胱甘肽合成的方法,谷胱甘肽积累量增加至5.76g/L,是对照组的2.84倍;Liu等人(*Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* (2019), 46(12), 1685-1695)在谷氨酸棒杆菌中利用GshF生产谷胱甘肽,改造关键前体L-半胱氨酸途径,发酵生产756mg/L谷胱甘肽;韦建国等人在发酵过程需要补加L-谷氨酸、L-甘氨酸和L-半胱氨酸三种氨基酸,利用重组谷氨酸棒杆菌合成谷胱甘肽,产量为24.95g/L,转化率为81.2% (中国专利,CN112646768A, 2021)。然而,谷胱甘肽合成酶在酶法合成中存在ATP能量供应和半衰期短的局限性,且化学合成不具有特异性,酵母中GSH对关键酶GSH I的反馈抑制、大肠杆菌对前体半胱氨酸耐受低等问题导致GSH产量和生产力通常相当低;同时,温度、pH、通气、搅拌等发酵参数也会影响产物谷胱甘肽的稳定;三种底物氨基酸的添加会造成成本高的问题。

[0004] 谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)是氨基酸发酵产业的核心菌株,具有良好的底物耐受性能力,由于具有生物安全(美国FDA认定为GRAS, Generally regarded as safe)、天然的L-谷氨酸(GSH前体)分泌菌株、底物谱广等优势,广泛应用于发酵法生产谷氨酸、赖氨酸和缬氨酸等。因此,底盘细胞的筛选、多模块代谢途径的重构和发酵参数的优化是提高谷胱甘肽生物合成的必要条件;开发一种提高食品安全菌株谷氨酸棒杆菌生产谷胱甘肽产量的方法,能够简化生产工艺、提高合成效率、降低生产成本,对谷胱甘肽的应用有重要的实践意义。此外,从微生物中获得的单细胞蛋白(SCP)作为继植物和昆虫蛋白之后具有巨大潜力,以谷氨酸棒状杆菌为基础的SCP可以作为动物饲料,支持猪的生长、改善动物肠道菌群;并具有抗肥胖的作用。

发明内容

[0005] 为解决上述技术问题,本发明提供了一种重组谷氨酸棒杆菌及其发酵生产谷胱甘

肽的方法与应用。本发明在谷氨酸棒杆菌E01中过表达来源乳链球菌的谷胱甘肽双功能酶GshF,发酵生产谷胱甘肽;通过定点突变,提高GshF的酶活,同时敲除关键代谢途径中的aceD、ggt基因,优化5L发酵罐的温度、pH、补料浓度的发酵参数。

[0006] 本发明通过构建一株能够高产谷胱甘肽的重组谷氨酸棒杆菌,并对该菌株进行氨基酸营养分析,开发其作为动物饲料中可替代蛋白的潜在价值。

[0007] 在本发明的一种实施方式中,所述乳链球菌来源的谷胱甘肽双功能酶GshF的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0008] 在本发明的一种实施方式中,所述重组大肠杆菌以大肠杆菌E.coli BL21 (DE3) 为宿主。

[0009] 本发明通过以下技术方案实现:

[0010] 本发明第一个目的是提供一种重组谷氨酸棒杆菌,所述重组谷氨酸棒杆菌是以谷氨酸棒杆菌为表达宿主;敲除半胱氨酸脱硫酶基因和谷氨酰转肽酶基因,过表达谷胱甘肽双功能酶突变体的基因;

[0011] 所述谷胱甘肽双功能酶突变体以氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示的谷胱甘肽双功能酶为亲本,将亲本谷胱甘肽双功能酶第11位点的组氨酸突变为脯氨酸、第239位点的天冬酰胺突变为谷氨酸。

[0012] 在本发明的一个实施例中,所述半胱氨酸脱硫酶基因的上游500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO 4所示;所述半胱氨酸脱硫酶基因的下游500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO 5所示;所述谷氨酰转肽酶基因的上游500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO 6所示;所述谷氨酰转肽酶基因的下游500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO 7所示。

[0013] 在本发明的一个实施例中,所述谷氨酸棒杆菌为谷氨酸棒杆菌Corynebacterium glutamicum E01。

[0014] 在本发明的一个实施例中,所述谷胱甘肽双功能酶来源于乳链球菌。

[0015] 本发明第二个目的是提供一种发酵生产谷胱甘肽的方法,以L-半胱氨酸和L-甘氨酸为底物,发酵体系中加入权利要求1-4任一项所述重组谷氨酸棒杆菌发酵生产谷胱甘肽。

[0016] 在本发明的一个实施例中,所述L-半胱氨酸的浓度为30mM~100mM;所述L-甘氨酸的浓度为30mM~100mM。

[0017] 在本发明的一个实施例中,所述重组谷氨酸棒杆菌的接种量为0.5mL-1mL。

[0018] 在本发明的一个实施例中,所述发酵体系中的发酵培养基包括:100g/L-150g/L葡萄糖,0.5g/L-1g/LK₂HPO₄,1g/L-1.5g/LMgSO₄,5g/L-10g/L玉米浆,0.001g/L-0.005g/LFeSO₄-7H₂O,0.001g/L-0.005g/LMnSO₄-H₂O,5g/L-10g/L尿素。

[0019] 在本发明的一个实施例中,所述发酵的参数为:30°C~45°C,300rpm~800rpm,pH值为7.0~8.5条件下发酵培养24h~60h。

[0020] 本发明第三个目的是提供所述重组谷氨酸棒杆菌在制备动物饲料中的应用。

[0021] 本发明的上述技术方案相比现有技术具有以下优点:

[0022] 本发明提供了一种重组谷氨酸棒杆菌及其发酵生产谷胱甘肽的方法与应用。本发明针对一种来源乳链球菌的谷胱甘肽双功能酶GshF进行组合突变,将11位点的组氨酸突变为脯氨酸,239位点的天冬酰胺突变为谷氨酸后,突变酶的比酶活为3.89U/mg,比突变前的酶活提高3.7倍,突变后的GshF_{H11P-N239E}显著提高了酶的催化活性。在一株高产L-谷氨酸的

谷氨酸棒杆菌E01菌株中过表达GshF_{H11P-N239E},发酵生产谷胱甘肽;同时对aceD、ggt基因进行敲除,优化5L发酵罐的温度、pH、补料浓度的发酵参数,重组谷氨酸棒杆菌CG05的谷胱甘肽最高产量为 25.78 ± 0.25 g/L (83.97 ± 0.81 mM),生物量OD₆₀₀为59.8,比优化前的CG05菌株发酵产量提高2.1倍,比出发菌株CG01产量提高5.7倍,转化率为83.97%。

[0023] 与先前生产谷胱甘肽的研究相比,本发明提供了一种谷氨酸棒杆菌生产谷胱甘肽的工程菌构建方法,且发酵过程中无需添加底物L-谷氨酸,降低了生产成本,转化率高,优化发酵参数后谷胱甘肽产量提高显著,这些策略为其他菌株发酵生产谷胱甘肽的代谢修饰和发酵参数的优化提供了有效的策略,对谷胱甘肽的发酵生产具有重要意义。

[0024] 将重组谷氨酸棒杆菌CG05制备为菌体蛋白,其中粗蛋白含量为65.6%,粗脂肪含量为3.1%,高于动物饲料中一些常见的添加物含量。丰富的支链氨基酸(19.51%)有利于提高运动能力和延缓疲劳,有利于动物的生长;含硫氨基酸(16.92%)有利于动物体内自由基平衡和稳定;同时,重组谷氨酸棒杆菌CG05菌体蛋白生物质具有15.04%的谷氨酸,该呈味物质可以提高动物的采食量,从而提高动物的生长性能。此外,重组谷氨酸棒杆菌CG05菌体蛋白中依旧存在1.12%的谷胱甘肽,可以提高动物体内的抗氧化作用,维持动物营养与免疫相关的重要生理功能。因此,重组谷氨酸棒杆菌CG05发酵生产谷胱甘肽,其菌体蛋白可作为动物饲料的营养添加剂,具有潜在的应用前景。

附图说明

[0025] 为了使本发明的内容更容易被清楚的理解,下面根据本发明的具体实施例并结合附图,对本发明作进一步详细的说明,其中,

[0026] 图1是本发明实施例6中CG01、CG02、CG04和CG05工程菌株发酵生产谷胱甘肽的生物量及产量;

[0027] 图2是本发明实施例7中CG05工程菌株发酵参数优化后生产谷胱甘肽的生物量及产量。

具体实施方式

[0028] 下面结合附图和具体实施例对本发明作进一步说明,以使本领域的技术人员可以更好地理解本发明并能予以实施,但所举实施例不作为对本发明的限定。

[0029] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法,所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0030] 下述实施例中涉及的谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)E01记载于公开号为CN103215198A的专利申请文本中。

[0031] 下述实施例中所涉及的培养基:

[0032] 谷氨酸棒杆菌感受态培养基:1%NaCl、1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物、0.3%甘氨酸、0.7%葡萄糖、0.1% tween-80。

[0033] LB液体培养基:1%NaCl、1%胰蛋白胨、0.5%酵母提取物。固体培养基加入2%的琼脂粉。

[0034] 谷氨酸棒杆菌BHI液体培养基:3.85%脑心浸液肉汤粉。

[0035] 谷氨酸棒杆菌发酵培养基:15%葡萄糖,0.1%K₂HPO₄,0.06%MgSO₄,0.5%玉米浆,

0.005%FeSO₄-7H₂O,0.005%MnSO₄-H₂O,0.7%尿素。

[0036] 下述实施例中所涉及的检测方法如下:

[0037] 利用生物传感分析仪(SBA-40ES,山东省科学院生物研究所)测定发酵液中葡萄糖的含量;利用分光光度计检测生物量OD₆₀₀;谷胱甘肽的含量通过HPLC(赛默飞)来测定,使用了C18色谱柱,流动相为体积分数为95%的磷酸盐水溶液,流速设置为1mL/min,柱温保持在30°C,在紫外波长210nm下定量检测。利用高效液相色谱法检测生物质的氨基酸组成,使用了C18色谱柱,流动相为体积分数为92%的乙酸钠水溶液和8%的甲醇乙腈溶液,流速设置为1mL/min,柱温保持在40°C,在紫外波长338nm下定量检测。GB/T6432测定生物质中的粗蛋白,GB5009.6—2016测定生物质中的粗脂肪。

[0038] 实施例1:谷胱甘肽双功能酶GshF的组合突变

[0039] (1)大肠杆菌感受态的制备

[0040] 将大肠杆菌E.coli BL21在无抗的LB平板上进行划线,37°C培养箱放置培养后挑取菌落接种于10mL的LB小瓶中培养12h,1%接种量转接至50mL的LB培养基瓶中,当菌体浓度达至0.4-0.6时,准备大肠感受态的制备。提前进行相关试剂及仪器的预冷处理,准备好氯化钙溶液、氯化钙和甘油混合溶液、1.5mL EP管以及50mL的离心管放置于冰上,离心机控温至4°C。将50mL的菌液在无菌操作台进行分装,离心(8000r·min⁻¹,5min),去掉上清。吸取5mL的氯化钙溶液进行吹吸悬浮,离心(8000r·min⁻¹,5min),去掉上清。吸取5mL的氯化钙和甘油混合溶液进行吹吸悬浮,分装至提前预冷装备好的EP管中,每管装100μL。

[0041] (2)重组大肠杆菌E.coli/pET28a-GshF的构建

[0042] 根据NCBI网站公布的乳链球菌Streptococcus agalactiae来源的谷胱甘肽双功能酶GshF的基因序列(核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示),送至苏州金唯智公司合成获得。PCR程序为:95°C,10

[0043] min;95°C,30s;58°C,30s;72°C,1min;72°C,10min,循环30次。所得的gshF基因片段经纯化后分别与线性化质粒pET-28a(P1/P2)通过同源重组酶In-Fusion SnapAssemblyMasterMi(Takara)连接,转化入E.coliBL21(DE3)感受态细胞,得到转化子,将转化子涂布于含有浓度为50μg/mL卡那霉素的LB固体培养基中,37°C培养12h,挑取阳性菌落,以P3/P4为引物通过Taq DNA聚合酶对单菌落进行菌落PCR验证;带有目的条带大小的阳性单菌落接种于含有LB液体培养基的小瓶中培养12h后,提质粒,送金唯智公司测序正确,则重组大肠杆菌E.coli/pET28a-GshF构建成功。所涉及的引物序列如下:

[0044] p1:5'-caaatgggtcgcgatccgaattcgtgattattgatagactgctgcag-3'

[0045] p2:5'-ctggccaaactgttttctgaactgtaaaagcttgcggccgcactcgag-3'

[0046] P3:5'-agaggatcgagatctcgatccccgc-3'

[0047] P4:5'-atccggatatagtttctctctttca-3'

[0048] (3)重组大肠杆菌E.coli/pET28a-GshF_{H11P-N239E}的构建

[0049] 以pET28a-GshF为模板,分别以P5/P6为引物对11突变位点进行PCR扩增,转化入E.coliBL21(DE3)感受态细胞,得到转化子,将转化子涂布于含有浓度为50μg/mL卡那霉素的LB固体培养基中,37°C培养12h,挑取阳性菌落,以P3/P4为引物通过TaqDNA聚合酶对单菌落进行菌落PCR验证;带有目的条带大小的阳性单菌落接种于含有LB液体培养基的小瓶中培养12h后,提质粒,送金唯智公司测序,验证GshF的11突变位点突变成功,则单突变菌株

E.coli/pET28a-GshF_{H11P}构建成功。以pET28a-GshF_{H11P}为模板,分别以P7/P8为引物对239突变位点进行PCR扩增,转化入E.coliBL21(DE3)感受态细胞,得到转化子,将转化子涂布于含有浓度为50 μ g/mL卡那霉素的LB固体培养基中,37 $^{\circ}$ C培养12h,挑取阳性菌落,以P3/P4为引物通过Taq DNA聚合酶对单菌落进行菌落PCR验证;带有目的条带大小的阳性单菌落接种于含有LB液体培养基的小瓶中培养12h后,提质粒,送金唯智公司测序,验证GshF的239突变位点突变成功,则突变菌株E.coli/pET28a-GshF_{H11P-N239E}构建成功(组合突变后的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示)。

[0050] P5:5' -attgatagactgctgcagagaagcccaagccatctg-3'

[0051] P6:5' -gcagagaagcccaagccatctgccattctgcaagcca-3'

[0052] P7:5' -ctatactagcctgaaagattatgtggaagatctggaaa-3'

[0053] P8:5' -aagattatgtggaagatctggaaaatgcagtgaaaagt-3'

[0054] 实施例2:谷胱甘肽双功能酶和突变酶的诱导表达与酶活测定

[0055] 取实施例1构建成功的E.coli/pET28a-GshF和E.coli/pET28a-GshF_{H11P-N239E}的单菌落接种到10mL的LB液体培养基中,37 $^{\circ}$ C培养12h,1%接种量接种至50mL的LB液体培养基中,培养到OD₆₀₀约为0.8,加入IPTG,20 $^{\circ}$ C培养16h。PBS洗细胞洗三次,收集的菌体重新用PBS悬浮,超声破碎仪破碎细胞,大肠杆菌破1s停3s,共破15min。10000rpm离心,20min,取上清液跑蛋白胶。将粗酶液通过蛋白纯化镍柱进行纯化,纯酶跑蛋白胶验证,待用。

[0056] 分别将原始酶GshF和突变后的纯酶GshF_{H11P-N239E}加入100mM的Tris-HCl缓冲液中,缓冲液包含50mM L-谷氨酸、50mM L-半胱氨酸、50mM L-甘氨酸、100mM ATP。37 $^{\circ}$ C反应20min,加入10%三氯乙酸终止反应,10000rpm离心10min,测定上清液在305nm下的吸光度值。一个单位GshF酶活(1U)的定义是每分钟产生1 μ mol谷胱甘肽所需的酶量。

[0057] 实验结果如表1所示,原始酶的比酶活为1.05U/mg,将11位点的组氨酸突变为脯氨酸,239位点的天冬酰胺突变为谷氨酸后的突变酶比酶活为3.89U/mg,比突变前的酶活提高3.7倍,突变后的GshF_{H11P-N239E}显著提高了酶的催化活性。

[0058] 表1原始酶及突变酶的比酶活

	突变点	比酶活 (U/mg)
[0059]	原始酶	1.05
	H11P-N239E	3.89

[0060] 实施例3:重组谷氨酸棒杆菌Cg/pXMJ-19-GshF和Cg/pXMJ-19-GshF_{H11P-N239E}的构建

[0061] (1) 谷氨酸棒杆菌感受态的制备

[0062] 挑取谷氨酸棒杆菌E01接种于10mLBHI液体培养基,30 $^{\circ}$ C摇床培养24h,取培养后的菌液转入含BHI感受态培养基中,使得初始细胞OD₆₀₀达到0.3。30 $^{\circ}$ C,200rpm条件下培养到细胞OD₆₀₀达到1.0。细胞培养结束后将菌液预冷30min,然后离心收集菌体。用预冷的10%甘油洗涤菌体3次,最后用1mL 10%甘油重悬细胞,用1.5mL管分装,每管100 μ L直接用于电转化。

[0063] (2) 过表达质粒pXMJ-19-GshF和pXMJ-19-GshF_{H11P-N239E}的构建

[0064] gshF和gshF_{H11P-N239E}基因片段经纯化后分别与线性化质粒pXMJ-19(P9/P10)通过

同源重组酶In-Fusion SnapAssembly MasterMi (Takara)连接,转化入E.coliBL21 (DE3)感受态细胞,得到转化子,将转化子涂布于含有浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的氯霉素的LB固体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养12h,挑取阳性菌落,以P11/P12为引物通过Taq DNA聚合酶对单菌落进行菌落PCR验证;带有目的条带大小的阳性单菌落接种于含有LB液体培养基的小瓶中培养12h后,提质粒,送金唯智公司测序正确,则pXMJ-19-GshF和pXMJ-19-GshF_{H11P-N239E}质粒构建成功。所涉及的引物序列如下:

[0065] P9:5' -acacaggaacagaattaattaagctt-3'

[0066] P10:5' -gcatgcctgcaggtcgactctagag-3'

[0067] P11:5' -ctggcaaatattctgaaatgagctg-3'

[0068] P12:5' -gcagttccctactctcgcag-3'

[0069] (3) 重组谷氨酸棒杆菌Cg/pXMJ-19-GshF (CG01) 和Cg/pXMJ-19-GshF_{H11P-N239E} (CG02)的构建

[0070] 将步骤(2)所得到的pXMJ-19-GshF和pXMJ-19-GshF_{H11P-N239E}质粒分别电转至谷氨酸棒杆菌E01感受态细胞中,得到转化子,并将转化子涂布于含有浓度为20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 氯霉素抗性BHI固体培养基,30 $^{\circ}\text{C}$ 培养2-4天,挑取阳性菌落,以P3/P4为引物通过Taq DNA聚合酶对单菌落进行菌落PCR验证;带有目的条带大小的阳性单菌落则表示该重组菌株Cg/pXMJ-19-GshF (CG01) 和Cg/pXMJ-19-GshF_{H11P-N239E} (CG02) 构建成功。

[0071] 实施例4:重组谷氨酸棒杆菌C.g _{ΔaceD} (CG03)的构建

[0072] (1) 敲除质粒PK18-aceD_{上500bp}-aceD_{下500bp}的构建

[0073] 为减少底物L-半胱氨酸的降解,敲除谷氨酸棒杆菌基因组中的半胱氨酸脱硫酶aceD基因。根据NCBI中谷氨酸棒杆菌全基因组核酸序列中aceD的上下游500bp,设计引物P13/P14和P15/P16获得aceD_{上500bp}和aceD_{下500bp}(aceD上下游500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO.4、SEQ ID NO.5所示),所得到的基因片段融合后与线性化质粒pK18mobsacB(P17/P18),通过同源重组酶In-Fusion SnapAssembly MasterMi (Takara)连接,转化入E.coli BL21 (DE3)感受态细胞,得到转化子,将转化子涂布于含有浓度为50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 卡那霉素的LB固体培养基中,37 $^{\circ}\text{C}$ 培养12h,挑取阳性菌落,以P19/P20为引物通过Taq DNA聚合酶对单菌落进行菌落PCR验证;带有目的条带大小的阳性单菌落接种于含有LB液体培养基的小瓶中培养12h后,提质粒,送金唯智公司测序正确,则PK18-aceD_{上500bp}-aceD_{下500bp}质粒构建成功。所涉及的引物序列如下:

[0074] P13:5' -Gtgggtgatcgatggcgctcagct-3'

[0075] P14:5' -Acctgcccgcggttgaaggaagca-3'

[0076] P15:5' -Ataatgagtaaaaagtctgtcctg-3'

[0077] P16:5' -gtcggtagccaagttggatggcgc-3'

[0078] P17:5' -acagctatgacatgattacgaattcgtgggtggatcgatggcgctcagc-3'

[0079] P18:5' -gtcggtagccaagttggatggcgcgaagcttggcactggcgcgctcgt-3'

[0080] P19:5' -ccgactggaaagcgggcagtgagc-3'

[0081] P20:5' -attaagttgggtaacgccagggtt-3'

[0082] (2) 重组谷氨酸棒杆菌C.g _{ΔaceD} (CG02)的构建

[0083] 将步骤(1)所得到的PK18-aceD_{上500bp}-aceD_{下500bp}质粒电转至谷氨酸棒杆菌E01感受

态细胞中,得到转化子,并将转化子涂布于含有浓度为50 μ g/mL卡那霉素抗性BHI固体培养基,30 $^{\circ}$ C培养2-4天,挑取阳性菌落,以P11/P12为引物通过Taq DNA聚合酶对单菌落进行菌落PCR验证;带有目的条带大小的阳性单菌落则表示该重组菌株C.g/PK18-aceD_{上500bp}-aceD_{下500bp}构建成功。再将正确的转化子接种于不含卡那霉素的种子液体中进行筛选,稀释涂布于含10%蔗糖的种子培养基中可诱导发生第二轮同源重组,最终通过测序验证证明aceD基因敲除成功,敲除菌株C.g _{Δ aceD}(CG03)构建成功。

[0084] 实施例5:重组谷氨酸棒杆菌C.g _{Δ aceD Δ ggt}/pXMJ-19-GshF(CG04)和C.g _{Δ aceD Δ ggt}/pXMJ-19-GshF_{H11P-N239E}(CG05)的构建

[0085] (1) 敲除质粒PK18-ggt_{上500bp}-ggt_{下500bp}的构建

[0086] 为减少产物谷胱甘肽的降解,敲除谷氨酸棒杆菌基因组中的谷氨酰转肽酶ggt基因。根据NCBI中谷氨酸棒杆菌全基因组核酸序列中ggt的上下游500bp,设计引物P21/P22和P23/P24获得ggt_{上500bp}和ggt_{下500bp}(ggt上下游500bp的核苷酸序列如SEQ ID NO.6、SEQ ID NO.7所示),所得到的基因片段融合后与线性化质粒pK18mobsacB(P25/P26),通过同源重组酶In-Fusion Snap Assembly MasterMi(Takara)连接,转化入E.coli BL21(DE3)感受态细胞,得到转化子,将转化子涂布于含有浓度为50 μ g/mL卡那霉素的LB固体培养基中,37 $^{\circ}$ C培养12h,挑取阳性菌落,以P19/P20为引物通过Taq DNA聚合酶对单菌落进行菌落PCR验证;带有目的条带大小的阳性单菌落接种于含有LB液体培养基的小瓶中培养12h后,提质粒,送金唯智公司测序正确,则PK18-ggt_{上500bp}-ggt_{下500bp}质粒构建成功。所涉及的引物序列如下:

[0087] P21:5'-ttatgcagccaagaggtggctcgg-3'

[0088] P22:5'-aaagttccttgataggctcgagag-3'

[0089] P23:5'-ttagcgcgcagaccacgctgacca-3'

[0090] P24:5'-tgaccatcgcgatcttctggcgca-3'

[0091] P25:5'-tgaccatcgcgatcttctggcgcaagcttggcactggccgctcgtttt-3'

[0092] P26:5'-cagctatgacatgattacgaattcttatgcagccaagaggtggctcgg-3'

[0093] (2) 重组谷氨酸棒杆菌C.g _{Δ aceD Δ ggt}的构建

[0094] 将步骤(1)所得到的PK18-aceD_{上500bp}-aceD_{下500bp}质粒电转至谷氨酸棒杆菌C.g _{Δ aceD}的感受态细胞中,得到转化子,并将转化子涂布于含有浓度为50 μ g/mL卡那霉素抗性BHI固体培养基,30 $^{\circ}$ C培养2-4天,挑取阳性菌落,以P11/P12为引物通过Taq DNA聚合酶对单菌落进行菌落PCR验证;带有目的条带大小的阳性单菌落则表示该重组菌株C.g _{Δ aceD}/PK18-ggt_{上500bp}-ggt_{下500bp}构建成功。再将正确的转化子接种于不含卡那霉素的种子液体中进行筛选,稀释涂布于含10%蔗糖的种子培养基中可诱导发生第二轮同源重组,最终通过测序验证证明ggt基因敲除成功,敲除菌株C.g _{Δ aceD Δ ggt}构建成功。

[0095] (3) 重组谷氨酸棒杆菌C.g _{Δ aceD Δ ggt}/pXMJ-19-GshF(CG04)和C.g _{Δ aceD Δ ggt}/pXMJ-19-GshF_{H11P-N239E}(CG05)的构建

[0096] 将上述得到的pXMJ-19-GshF和pXMJ-19-GshF_{H11P-N239E}质粒分别电转至谷氨酸棒杆菌C.g _{Δ aceD Δ ggt}的感受态细胞中,得到转化子,并将转化子涂布于含有浓度为20 μ g/mL氯霉素抗性BHI固体培养基,30 $^{\circ}$ C培养2-4天,挑取阳性菌落,以P11/P12为引物通过Taq DNA聚合酶对单菌落进行菌落PCR验证;带有目的条带大小的阳性单菌落则表示该重组菌株C.g _{Δ aceD Δ ggt}/pXMJ-19-GshF(CG04)和C.g _{Δ aceD Δ ggt}/pXMJ-19-GshF_{H11P-N239E}(CG05)构建成功。

[0097] 实施例6:重组谷氨酸棒杆菌发酵生产谷胱甘肽

[0098] 1、菌种:以重组菌谷氨酸棒杆菌CG01、CG02、CG04和CG05进行谷胱甘肽的发酵生产。

[0099] 2、发酵培养基:100g/L-150g/L葡萄糖,0.5g/L-1g/LK₂HPO₄,1g/L-1.5g/LMgSO₄,5g/L-10g/L玉米浆,0.001g/L-0.005g/LFeSO₄-7H₂O,0.001g/L-0.005g/LMnSO₄-H₂O,5g/L-10g/L尿素。。

[0100] 3、谷氨酸棒杆菌发酵培养:利用接种环分别将CG01、CG02、CG04和CG05菌株划线于种子培养基固体平板中,将平板置于30°C恒温培养箱中培养至长出单菌落,接种至一级种子BHI液体培养基中,30°C,120rpm培养至对数生长中期,按照0.5mL-1mL接种量接种至100mL的二级种子的发酵培养基中,30°C,120rpm进行发酵培养。

[0101] 4、5L发酵罐发酵生产谷胱甘肽:分别将CG01、CG02、CG04和CG05的二级种子液以200mL-400mL的转接量转接到5L发酵培养基中,以30°C,300rpm~800rpm,通气量2L/min~4L/min,pH7.0的条件下发酵72h。其中在培养12h时添加终浓度为0.5mM的IPTG进行诱导,发酵的24h补加30mM~100mM的L-半胱氨酸和L-甘氨酸(谷氨酸棒杆菌E01为L-谷氨酸的优势生产菌株,所以发酵中不需要补加L-谷氨酸)。每12h取样,利用分光光度计测定生物量(OD₆₀₀)。HPLC法测定发酵液中谷胱甘肽的浓度。实验结果见图1和表2所示:

[0102] 表2CG01、CG02、CG04和CG05工程菌株发酵生产谷胱甘肽的生物量及产量

	菌株	生物量 OD ₆₀₀	谷胱甘肽产量 (g/L)
[0103]	CG01	45.4	4.56±0.13
	CG02	51.8	6.56±0.26
	CG04	40.7	8.13±0.20
	CG05	48.1	12.56±0.32

[0104] 由图1和表2可以看出,未被敲除aceD和ggt基因的CG01菌株,过表达谷胱甘肽双功能酶GshF后,发酵法生产谷胱甘肽最高产量为48h的4.56±0.13g/L,生物量OD₆₀₀为45.4;而过表达突变酶GshF_{H11P-N239E}后,发酵法生产谷胱甘肽最高产量为48h的6.56±0.26g/L,生物量OD₆₀₀略微提高,为51.8,产量比CG01提高了1.4倍。敲除aceD和ggt基因,并过表达谷胱甘肽双功能酶GshF后,CG04菌株发酵生产谷胱甘肽最高产量为48h的8.13±0.20g/L,生物量OD₆₀₀有所下降,为40.7;敲除aceD和ggt基因,并过表达突变酶GshF_{H11P-N239E}后,CG05菌株发酵生产谷胱甘肽产量提高到12.56±0.32g/L,产量比CG04提高了1.5倍,生物量OD₆₀₀提高到48.1。总的来说,在敲除aceD和ggt基因,并过表达突变酶GshF_{H11P-N239E}后,工程菌株CG05发酵法生产谷胱甘肽的产量提高显著,比出发菌株CG01菌株产量提高2.8倍,突变酶GshF_{H11P-N239E}的催化效率增强。

[0105] 实施例7:重组谷氨酸棒杆菌CG05菌体蛋白的制备及其营养特性分析

[0106] 1、菌种:以重组菌谷氨酸棒杆菌CG05进行谷胱甘肽的发酵生产,优化发酵参数。培

培养基与发酵培养与实施例6相同。

[0107] 2、发酵罐的发酵参数：将CG05的二级种子液以200mL-400mL的转接量转接到5L发酵培养基中，以300rpm~800rpm，通气量2L/min~4L/min的条件下发酵72h，其中在培养12h时添加终浓度为0.5mM的IPTG进行诱导。对发酵的pH、温度以及发酵底物的补加时间进行优化，发酵参数优化的具体内容为：发酵过程中pH控制在7.0~8.5之间，温度控制在30°C~45°C之间，发酵的24h~60h内补加的底物浓度为30mM~100mM的L-半胱氨酸和L-甘氨酸（pH、温度以及发酵底物的控制和补加均为动态的过程）。每12h取样，利用分光光度计测定生物量（OD₆₀₀）。

[0108] 3、单细胞原料制备：HPLC法测定发酵上清液中谷胱甘肽的浓度，同时离心收集菌体，无菌水洗涤，将收集到的菌体进一步冷冻干燥，研磨得到粉末状生物质即作为单细胞菌体蛋白原料。实验结果见图2和表3：

[0109] 表3CG05菌株发酵参数优化后的生物量及生产谷胱甘肽的能力

	时间 h	生物量 OD ₆₀₀	谷胱甘肽产量 (g/L)
[0110]	48	59.8	25.78±0.25

[0111] 由图2和表3可以看出，为进一步提高谷胱甘肽产量，对发酵参数进行优化。在30°C~45°C，pH值为7.0~8.5，24h~60h内补加30mM~100mM的L-半胱氨酸和L-甘氨酸，5L发酵罐发酵48h后，上清发酵液中重组谷氨酸棒杆菌CG05的谷胱甘肽最高产量为25.78±0.25g/L（83.97±0.81mM），生物量OD₆₀₀为59.8，比优化前的CG05菌株发酵产量提高2.1倍，比出发菌株CG01产量提高5.7倍。转化率以底物L-半胱氨酸来计算，由此得到CG05工程菌株的转化率为83.97%。

[0112] 本发明重组谷氨酸棒杆菌CG05菌体蛋白的营养成分如表4所示，其中，粗蛋白含量65.6%，粗脂肪含量3.1%。谷氨酸棒杆菌CG05菌体中的粗蛋白含量高于动物饲料中常见的添加物含量（全棉籽：23%；大豆壳：13%；玉米秸秆：5%~9%）（数据来源：中国饲料成分及营养价值表（2022年第33版））；粗脂肪含量高于小麦（1.7%）、大豆粕（1.9%）等饲料原料（数据来源：中国饲料成分及营养价值表（2022年第33版））。因此，重组谷氨酸棒杆菌CG05的菌体蛋白不仅可作为优质的替代蛋白原料，同时也是优质脂肪的来源。

[0113] 表4CG05菌株蛋白营养成分分析

	氨基酸	生物质/100g (g)
[0114]	粗蛋白	65.6
	粗脂肪	3.1

[0115] 重组谷氨酸棒杆菌CG05的质量由蛋白质含量和构成蛋白质的氨基酸组成决定，特别是必需氨基酸的含量决定，表5为重组谷氨酸棒杆菌CG05菌体蛋白的氨基酸分析结果。必需氨基酸共有9种，即赖氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、缬氨酸和组氨酸。重组谷氨酸棒杆菌CG05含有所有必需氨基酸，占总氨基酸含量的42.34%，高于FAO/WHO标准规定的40%。大豆是饲料中常见的添加物质，表5列出了大豆的氨基酸含量

(数据来源:美国农业部食品数据库,NDB Number:16119),与大豆相比,CG05中支链氨基酸(亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)含量为19.51%,高于大豆(17%),补充支链氨基酸可以提高运动能力和延缓疲劳,有利于动物的生长。CG05中含硫氨基酸(甲硫氨酸、半胱氨酸)含量为16.92%,显著高于大豆的2.80%,含硫氨基酸有利于动物体内自由基平衡和稳定;同时,重组谷氨酸棒杆菌CG05菌体蛋白生物物质具有较高含量的呈味物质,如谷氨酸(15.04%),可以提高动物的采食量,从而提高动物的生长性能。此外,重组谷氨酸棒杆菌CG05菌体蛋白中依旧存在1.12%的谷胱甘肽,可以提高动物体内的抗氧化作用,维持动物营养与免疫相关的重要生理功能。因此,重组谷氨酸棒杆菌CG05发酵生产谷胱甘肽,其菌体蛋白可作为动物饲料的营养添加剂,具有潜在的应用前景。

[0116] 表5CG05菌体蛋白的氨基酸含量分析

氨基酸		含量 (g/100g 粗蛋白)	
		CG05 菌体蛋白	大豆
必需氨基酸	苏氨酸	3.02	1.95
	缬氨酸	5.63	2.24
	异亮氨酸	3.5	2.18
	亮氨酸	6.06	3.66
	苯丙氨酸	3.01	2.35
	赖氨酸	4.96	2.99
	组氨酸	2.02	1.21
	甲硫氨酸	4.28	0.61
	色氨酸	0.48	0.65
	[0117]	精氨酸	4.47
丝氨酸		2.39	2.6
谷氨酸		15.04	8.7
半胱氨酸/胱氨酸		8.89	0.72
甘氨酸		7.58	2.08
丙氨酸		3.03	2.12
脯氨酸		1.01	2.63
天冬氨酸		1.55	5.65
酪氨酸		0.93	1.7
		谷胱甘肽	1.12

[0118] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,并非对实施方式的限定。对于

所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引申出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

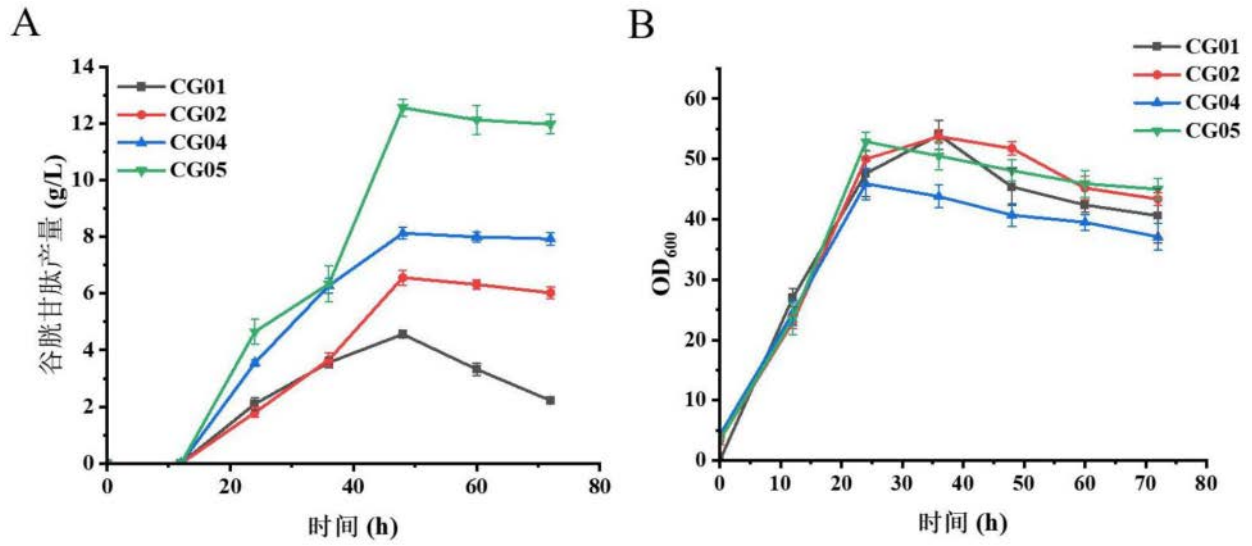


图1

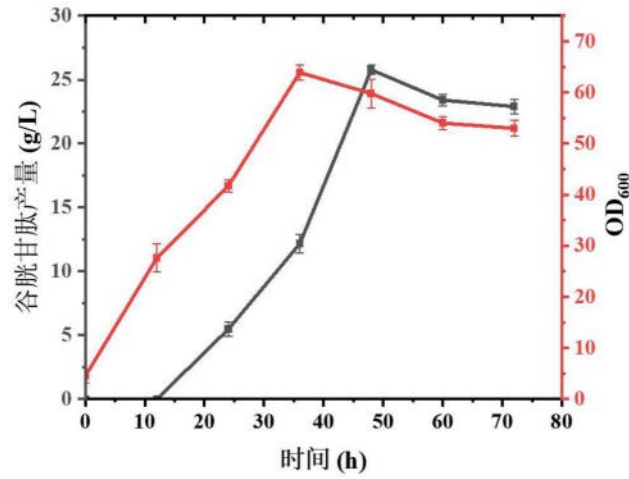


图2