



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 88107740.2

[51]Int.Cl⁵

C12N 15 / 67

[45]授权公告日 1994 年 6 月 1 日

[24]颁证日 94.3.11

[21]申请号 88107740.2

[22]申请日 88.11.7

[30]优先权

[32]87.11.7 [33]JP[31]281826 / 87

[73]专利权人 株式会社资生堂

地址 日本东京都

[72]发明人 土师信一郎 伊福欧二 岸本治郎

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商

C12N 1 / 21

标事务所

代理人 辛敏忠

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 用具有低乙酸形成能力的微生物生产有用物质的方法

[57]摘要

本发明介绍了乙酸形成能力最多为野生型大肠杆菌的 1 / 5 的大肠杆菌, 和通过培养大肠杆菌至高密度生产有用物质并回收该物质的方法。

权利要求书

1.一种生产生物素、脱硫生物素的方法，其特征在于培养用携带编码生物素、脱硫生物素的遗传信息的重组质粒转化大肠杆菌 DRK. 3323 (CCTCC NO.M88121) 得到转化体，回收所产生的物质。

2.权利要求 1 的方法，其中在含有 1—10g/l 丙氨酸的培养基中培养大肠杆菌。

3.一种生产降钙素的方法，其特征在于培养用携带编码降钙素的遗传信息的重组质粒转化大肠杆菌 NA—75 (CCTCC NO.88123) 得到转化体，回收所产生的物质。

本发明涉及一种新型微生物，具体地说是大肠杆菌，与野生型大肠杆菌相比，该微生物的乙酸形成能力较低；本发明也涉及通过培养密度的该微生物而生产一种高产率的有用物质的方法。这里所用的“乙酸形成能力”、“形成乙酸的能力”等术语指在适宜的培养条件下培养大肠杆菌时按细菌干重计所积累乙酸的量。

利用化学方法合成象蛋白质或维生素等有用物质需要复杂的过程，因而花费过大。于是人们开始利用微生物发酵的方法生产这些物质。

生物素是一种动物、植物及微生物所必需的维生素，可用作饲料、输液等的添加剂。人们已指望通过这类发酵法获得生物素。日本未审专利公开 (Kokai) 号 61—202686、62—155081 以及 WO87101391 公开了利用经遗传工程技术改良的大肠杆菌菌株制备生物素的方法。

一般来说，当使用微生物生产该物质时，在带有分批进料培养物的液体培养基中产生高密度的微生物不失为一种有效方式，不管是从产物产量的增加来说，还是从发酵罐的有效利用及产物的有效回收来说，均是如此。对于大肠杆菌来说，通过高密度培养，可获得许多优点，尤其对于经遗传工程技术改良的大肠杆菌来说更是如此。但是，对于大肠杆菌来说，由于营养物的代谢而形成乙酸，且在液体培养基中大量积累，从而抑制了细胞的生长活性，难以实现高密度培养。能解决上述问题从而达到高密度培养的已知方法就是透析或过滤培养法，

它是通过透析或过滤液体培养基而从培养系统中除去形成的乙酸。

还有人建议给培养物加压，也就是使用纯氧气体而使液体培养基的溶解氧维持高浓度，从而抑制形成的乙酸量 (Matsui 等, Synopses of Presentations on Convention in 1986, Fermentation Engineering Association of Japan, P206)。

但不管怎样，透析或过滤培养必然带来一些问题，例如，必需使用排除设备，或进行复杂的设备检修，因而是经济的，或不实用的。而且，被大肠杆菌产生且已积累的某些有用物质（如生物素）会与乙酸一起被从液体培养物中透析或过滤掉，从而在回收该有用物质的步骤中必需处理大量的含有低浓度该物质的液体。使得进行高密度培养而获得的优越性几乎完全丧失。通过给培养物加压来培养高密度大肠杆菌使得培养过程中的控制或条件复杂化，且不易达到。

从不同于现有技术（即从对大肠杆菌进行遗传改良的角度）进行各种研究以弥补上述缺陷之后，本发明成功地获得了野生型大肠杆菌的人工突变菌株，该菌株显示了低乙酸合成能力，其合成能力仅为野生型的 1/5 或更少。本发明人发现，当使用该突变菌株生产有用物质时，能够很容易地达到高密度培养，而不会遇到形成的乙酸对生长活性的抑制，即使不使用特异的培养方法（如透析、过滤、培养物加压法等）时也是如此。而且，本发明人发现，这些突变菌株可被具有与有用物质的产生有关的遗传信息的重组质粒转化，例如，当将含有生物素操纵子的重组载体引入突变菌株且培养产生的菌株时，不仅该菌株的细胞能够达到高密度，其生长活性不被乙酸抑制，而且还能够维持该生长活性，从而使中间代谢物脱硫生物素 (dethiobiotin) 有效地代谢为生物素，极大地增加生物素的产量。而在常规的培养方法中，脱硫生物素是作为生物素生物合成的中间物保留和积累于液体培养基中的。另外，本发明人还发现，通过向液体培养物中加入预定量的丙氨酸可极大地增加所产生的脱硫生物素及生物素的产量。

因此，本发明涉及大肠杆菌，该大肠杆菌的特征在于其形成乙酸的能力最多为野生型大肠杆菌的 1/5。

本发明进一步涉及其特征在于其形成乙酸能力

最多为野生型大肠杆菌的 1/5 的大肠杆菌, 并且该大肠杆菌含有携带与有用物质的产生有关的遗传信息的重组质粒。

本发明也涉及生产有用物质的方法, 其特征在于培养高密度的大肠杆菌 (该大肠杆菌具有至多为野生型大肠杆菌 1/5 的形成乙酸能力, 且含有携带与有用物质的产生有关的遗传信息的重组质粒), 然后回收产生的有用物质。

图 1 表示了如实施例 3 所解释的 PXBA312 质粒的制备方法。本发明微生物的制备。

其形成乙酸能力至多为野生型大肠杆菌的 1/5 的大肠杆菌菌株 (下面称作 AD 突变株) 可通过下述方法获得: 对野生型大肠杆菌进行常规的诱变处理, 将产生的细菌细胞在合适的液体培养基中振荡培养, 然后测定液体培养基中细菌细胞的浓度以及所积累的乙酸量, 筛选乙酸形成能力为野生型大肠杆菌 1/5 的 AD 突变株。在一最佳实施方案中, 首先从经诱变处理而获得的细菌细胞中筛选氟乙酸钠抗性大肠杆菌突变株 (以下称作 FR 突变株), 然后从这些 FR 突变株中筛选乙酸形成能力比大肠杆菌低的菌株。这是因为, 在许多情况下低乙酸形成能力的大肠杆菌能够在 FR 突变株中发现。

具体地说, 首先将野生型大肠杆菌进行常规诱变处理, 例如用诱变剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍处理, 将产生的细胞用缓冲液适当稀释, 然后在含有氟乙酸钠及作为唯一碳源的脯氨酸的基本琼脂平板上进行培养, 再通过“钓取菌落法”分离产生的菌落, 它们为 FR 突变菌株。在合适的液体培养基中振荡培养分离出的 FR 突变菌株, 通过液相层析或使用酶反应的试剂盒 (F 试剂盒: Boehringer Mannheim Yamanouchi) 或其他类似方法测定每一培养基积累的乙酸量, 然后筛选并收集其乙酸形成能力至多为野生型大肠杆菌 1/5 的 AD 突变株。产生的该菌株具有低乙酸形成能力且对氟乙酸钠具有抗性。如果在溶解氧不可不足的条件于常规培养基中进行培养, 对于野生型大肠杆菌而言, 培养基中每份细菌干重所积累的乙酸量一般为 0.5—1.5, 而对本发明的 AD 突变株来说, 则为 0.1 或更少。每份细菌干重所积累的乙酸量为积累的乙酸量 (g/l) 除以细胞浓度 (g/l) 所得的商。

解除了生物素的反馈抑制的大肠杆菌株 (以下简称 DR 突变株) 可取代野生型大肠杆菌株, 用作进行同样的诱变处理亲代菌株, 以获得具有低乙酸形成能力且对氟乙酸钠具有抗性的突变株, 其生物素反馈抑制已被解除, 这种 DR 突变株包括大肠杆菌 DRK-332 (FERM BP-2113; 这里所引用的所有编号如“FERM-332”指发酵研究所 (FRI) 的保藏号, 该研究所为布达佩斯条约指定的国际保藏机构, 它是从最初保藏于作为日本国内保藏机构的 FRI 的 FERM P-8585 内部转换而来, 这里所用的编号, 如“FERM P”, 指作为国内保藏机构的 FRI 的编号)。按上述方法所获得的 AD 突变株可列举大肠杆菌 DRK-3323 (FERM BP-2116; FERM P-9675) 该菌株也已于 1988 年 11 月 4 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 其保藏编号为 CCTCC M88121。按照未审日本专利公开 (Kokai) 号 62-155081 所公开的方法, 可通过将自产生生物素的大肠杆菌分离的生物素操纵子插入一载体 DNA 而制备重组质粒, 这种重组质粒可包括例如 PKHN31 质粒。而且, 还可使该重组质粒的载体表型为四环素抗性, 以获得一种稳定的重组质粒, 它在随后的高密度培养时不被消失。

也可采用另一种方法获得含有重组质粒的 AD 突变株, 即通过常规方法 (如 Mandal M. 等 J. Mol. Biol., 53, 109 (1970) 上所公开的氯化钙法) 将如上述所获得的重组载体引入 AD 突变株, 再在琼脂培养基平板上培养产生的转化株, 由于其中载体的表型, 含有重组质粒的细菌细胞的菌落能够选择性地生长; 然后挑选该菌落。

含有产生的重组质粒的 AD 突变株包括, 例如大肠杆菌 DRK-3323 (PXBA312) (FERM BP-2117; FERM P-9676)。

如果所需要的有用物质为人降钙素 (以下简称 hcT) 时, 可制备含有相应重组质粒的 AD 突变株。例如, 可从大肠杆菌 M15 (PZT 32) (FERM BP-2115; FERM P-9266) 分离出质粒 PZT 32, 这种大肠杆菌含有携带编码融合蛋白 (含有胶原酶断裂位点的 hcT-肽- β -半乳糖苷酶) 基因及 tac-启动子的重组质粒, 然后将其引入 AD 突变株, 如大肠杆菌 NA-75 (FERM BP-2105, 该菌株也已于 1988 年 11 月 4 日保藏于

中国典型培养物保藏中心 (CCTCC), 其保藏编号 CCTCC M88123)。从而获得大肠杆菌 NA-75 (PZT32.)。

如果需要其它的有用物质, 可从与所需物质的产生有关的基因及载体 DNA 制备重组 DNA, 然后将其引入 AD 突变株, 以获得所需的微生物。

高密度培养

按照本发明, 可很容易地将上面所制备的大肠杆菌培养至高密度, 而不会遇到乙酸对生长活性的抑制。

作为培养本发明的大肠杆菌的培养基, 可使用含有碳源、氮源和 / 或无机物的合成培养基, 也可使用天然培养基。可使用的碳源包括碳水化合物如葡萄糖、甘油、果糖、蔗糖、麦芽糖、淀粉、淀粉的水溶液、糖蜜或其类似物。可被利用的氮源包括氨、各种无机或有机铵盐 (如氯化铵、磷酸铵、硫酸铵或其类似物)、天然有机氮源 (如氨基酸、肉膏、酵母膏、玉米浸出液、酪蛋白水解物、脱脂大豆或其水解物) 或其类似物。许多天然氮源不仅含有氮源, 而且还含有碳源。可使用的无机物包括磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、硫酸镁、氯化镁、硫酸亚铁、氯化钙、氯化锌、硫酸铜、氯化锰、氯化钴、钼酸铵、硼酸或其类似物。

当给制备的微生物提供一种抗菌素性质时, 通过向培养基中加入相应的抗菌素可防止污染。

上述营养物可在培养之前以培养所需总量一次性加入。而某些营养物引起大肠杆菌生长活性或其它类似活性减少, 当使用这类物质时最好在培养前先向培养基中加进一部分, 然后在培养的过程中加进与生长所消耗的量相对应的剩余部分。

当利用本发明的微生物产生生物素时, 通过向培养基中加入丙氨酸可提高产量。所用的丙氨酸可为 D-化合物、L-化合物或 DL-化合物, 它们均具有相似的效果。从成本的角度考虑, DL-化合物更好。加到培养基中的丙氨酸量较好为 1—10g/l, 最好为 3—7g/l。如果其浓度超过 10g/l, 丙氨酸会引起细胞生长的抑制, 尤其是生物素的产率下降。丙氨酸可在培养前一次性加入, 或在培养过程中分批加入。

本发明的微生物表现出低乙酸形成能力, 而不受通气及搅拌条件的影响。因此, 不必象先有技术那样在培养基中维持高浓度的溶解氧, 以抑制乙酸

的积累, 但无论如何, 最好将溶解氧的浓度维持在 3—6ppm, 以使营养物充分代谢。培养温度最好为 20—38℃, 且培养过程中最好将 pH 值维持在基本中性。约 16—48 小时的培养时间通常是充分的。培养结束后, 细胞浓度的干重为 50g/l 或更大。

生物素的生产

通过将含有重组质粒 (通过将生物素操纵子插入载体 DNA 而制备) 的本发明大肠杆菌培养至如上所述的高密度, 就可产生大量的生物素。培养完成之后, 根据生物素的性质而采用与从天然材料中提取和纯化物质相类似的提取纯化方法, 可从液体培养基中提取和纯化生物素。从培养基中除去细菌细胞后, 生物素就可吸附于活性碳上, 然后通过离子交换树脂进行洗脱和纯化。也可直接用离子交换树脂处理培养物的过滤物而纯化生物素。从水或乙醇中重结晶后, 就可获得纯化的生物素。

下面通过实施例进一步说明本发明, 但并不限制本发明。

实施例 1 AD 突变菌株的制备

在 L-培养基 (10g/l 胨, 5g/l 酵母膏, 1g/l 葡萄糖, 5g/l 氯化钠, 调至 pH7.2) 中, 于 37℃ 将大肠杆菌 W3110 菌株 (IFO 12713) 振荡培养 3 小时。在对数生长期收集细菌细胞, 洗涤后悬浮在含有 100μg/ml N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍的 TM 缓冲液 (0.61% tris-碱, 0.5% 马来酸, pH 值调至 6.0) 中, 让其在 37℃ 维持 30 分钟以进行诱变。收集和洗涤之后, 将细胞放至 L 培养基中, 于 37℃ 进行复原培养 3 小时。收集并洗涤细胞后, 悬浮于灭菌水中, 至约 10⁷ 个细胞/毫升。以每平皿 0.1 毫升的量将悬浮液涂布于含有 5g/l 氟乙酸钠的脯氨酸基本琼脂平板 (1g/l 脯氨酸, 4g/l 硫酸铵, 2g/l 磷酸二氢钾, 1g/l 磷酸氢二钾, 0.1g/l 七水硫酸镁, 5g/l 氯化钠, 15g/l 琼脂), 于 37℃ 培养 48 小时。用钩取菌落法分离形成的菌落, 其为 FR 突变菌株。由于获得抗性的机制不同, FR 突变株中包括 AD 突变株。与亲代菌株及具有不变的乙酸形成能力的菌株相比, AD 突变株的乙酸形成能力降低。

为了比较分离的 FR 突变株及亲代菌株 W3110 的乙酸形成能力, 在一含有 50ml 用于试验乙酸形成能力的培养基 (5g/l 硫酸铵, 13.2g/l NaH₂PO₄ · 12H₂O, 1.8g/l K₂HPO₄, 1g/l MgSO₄

• 7H₂O, 10g/l 胨, 10g/l 酵母膏, 10g/l 葡萄糖) 的 500ml Sakaguchi 摇瓶中, 于 37℃ 将细胞振荡培养 24 小时。振荡速度为 120 次/分。培养完成之后, 用分光光度计测定每一液体培养基在波长 660nm 处的光密度 (OD₆₆₀)。然后根据在细胞干重及 OD₆₆₀ 之间制备的标准曲线, 将其换算成细胞浓度 (g/l)。离心细胞, 通过利用酶反应的定量分析试剂盒 (F 试剂盒, Boeringer Mannheim Yamanouchi) 测定每一培养物上清液中的乙酸量, 获得乙酸形成能力至多为亲代菌株 1/5 的 AD 突变株 NA-75 (FERM BP-2105)。对亲代菌株 W3110 及 AD 突变株 NA-75 的乙酸形成能力进行比较的结果列于表 1。(表 1 见文后)

实例 2

由消除了生物素反馈抑制的大肠杆菌

制备 AD 突变株

消除了生物素反馈抑制的大肠杆菌 DRK-332 (FERM BP-2113) 在 L-培养基 (10g/l 胨, 5g/l 酵母膏, 1g/l 葡萄糖, 5g/l 氯化钠, 调 pH 至 7.2) 中于 37℃ 振荡培养 3 小时。收集对数生长期的细菌细胞; 洗涤, 然后是悬浮于含有 100μg/ml N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍的 TM 缓冲液 (0.61% 三羟甲基氨基甲烷碱, 0.5% 马来酸; 调 pH 至 6.0) 中, 并置于 37℃ 下诱变 30 分钟。收集并洗涤细胞后, 将细胞放入 L-培养基, 于 37℃ 进行 3 小时恢复培养。收集细胞, 洗涤, 然后悬浮于灭菌水中至大约 10⁷ 个细胞/ml。将该悬浮液涂布于含有 5g/l 氟代乙酸钠的脯氨酸基本琼脂平板 (1g/l 脯氨酸, 4g/l 硫酸铵, 2g/l 磷酸二氢钾, 1g/l 磷酸氢二钾, 0.1g/l 硫酸镁 • 7H₂O, 5g/l 氯化钠, 15g/l 琼脂) 上, 涂布量为 0.1ml/培养皿, 并于 37℃ 培养 48 小时。钓取长出的菌落, 作为 FR 突变株。由于获得抗性的机制不同, FR 突变株包括形成乙酸能力比亲株低的 AD 突变株和乙酸形成能力无变化的菌株。

为了比较分离的 FR 突变株和亲株 DRK-332 的乙酸形成能力, 在一个含有 10ml 或 100ml 检测其乙酸形成能力的培养基 (5g/l 硫酸铵, 13.2g/l 磷酸二氢钠 • 12H₂O, 1.8g/l 磷酸氢二钾, 1g/l 硫酸镁 • 7H₂O, 10g/l 胨, 10g/l 酵母膏, 10g/l 葡萄糖) 的 500ml 坂口烧瓶中于 37℃ 振荡培养细胞 24 小时。振荡速度为 120 冲程/分

钟。通气条件随所用两种培养基量的不同 (100ml 或 10ml) 而变化。培养完成后, 用分光光度计测量各培养液在 660nm 波长处的光密度 (OD₆₆₀), 然后根据以细胞干重对 OD₆₆₀ 所制成的标准曲线换算成细胞浓度 (g/l)。将细胞离心, 用进行酶反应所用的定量分析试剂盒 (F 试剂盒; Boeringer Mannheim Yamanouchi) 测定各培养液上清液中乙酸的量, 所获得的 AD 突变株 DRK-3323 (FERM BP-2116) 的乙酸盐形成能力比亲株小 1/5。亲株 DRK-332 和 AD 突变株 DRK-3323 的乙酸形成能力的对比结果示于表 2。从表 2 可明显看出, AD 突变株 DRK-3323 不受通气条件的影响, 甚至在通气条件差 (溶解氧不足) 情况下, 乙酸累积量/细菌干重也小于 0.25。(表 2 见文后)

实例 3

含有携带生物素操纵子的重组质粒的

AD 突变株的制备

(1) 载体 DNA 的制备

含有质粒 PBR322 的大肠杆菌 K-12 株 (Peden K., Gene, 22, 277, 1983) 在 LB 培养基 (1% Bacto, 胰胨 (Difco 生产), 0.5% Bacto 酵母膏 (Difco 生产), 1% 氯化钠; 用氢氧化钠调 pH 至 7.2) 中于 37℃ 振荡培养一天, 得到细胞, 然后用碱溶法 (Birnboim, H.C. et al, Nucl. Acid Res., 7, 1513, 1979) 得到质粒 DNA PBR322。

如图 1 所示, 用两种限制性核酸内切酶 Pvu II 和 Bal I 酶解所得质粒 DNA PBR322 (1μg), 通过 1% 低胶凝温度琼脂糖凝胶 (VII 型, Sigma 生产) 电泳处理, 然后用溴化乙锭染色。切下 DNA 片段 (约 3.7Kb), 于 70℃ 加热 5 分钟。加入几乎等量的用 TE 缓冲液 (10mM 三羟甲基氨基甲烷盐酸缓冲液, pH8.0, 1mMEDTA) 饱和的苯酚, 彻底混匀, 离心, 得到水相, 向水相中, 加入两体积乙醇, 沉淀的载体 DNA 片段用 DNA 连接试剂盒 (TaKara Shuzo 生产) 连接。

用所得重组 DNA 溶液转化大肠杆菌 M15 (Δ (lac-Pro), thi, φ80d, lacZM15, ara, rpsL, recA,) (从 Pharmacia 获得)。用氯化钙法进行转化。通过在含有 50μg/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基 (1% Bacto 胰胨 (Difco 生产), 0.5% Bacto 酵母膏 (Difco 生产), 1% 氯化钠,

1.5%琼脂,用氢氧化钠调pH至7.2)的平板上培养,得到转化株大肠杆菌M15(PBRR—B4)。

在含有50ug/ml氨苄青霉素的LB培养基上培养大肠杆菌M15(PBRR—B4),并用上述碱溶法获取质粒PBRR—B4。

用两种限制性核酸内切酶EcoR I和Pst I酶解所得质粒PBRR—B4(1ug),并用1%低胶凝温度琼脂糖电泳处理。这样,如上所述分离得到一DNA片段(大约3.0Kb)。

另一方面,用两种限制性核酸内切酶EcoR I和Pst I酶解质粒DNA PUC13(得自Pharmacia)(2ug),经15%聚丙烯酰胺凝胶(Nakarai生产)电泳处理,然后用溴化乙锭染色。切下一DNA片段(大约40b)并在Dounce均化器(Wheaton Scientific生产)中用0.5M乙酸铵(含有1mM EDTA)和等量用TE缓冲液饱和的苯酚溶液使之均化,彻底混匀后,离心,得到水相。向水相中加入两体积乙醇,离心后,分离出沉淀的DNA片段。

如上得到的两种DNA片段用DNA连接试剂盒(Takara Shuzo生产)连接。

按照上述氯化钙法,用所得连接溶液转化大肠杆菌M15菌株,让生长于含有10ug/ml四环素的LB琼脂平板上的菌落在含有10ug/ml四环素的LB培养基中充分生长,按如上所述的碱溶法得到质粒DNA PBM16。

(2) 带有生物素操纵子的重组质粒的制备

将含有重组质粒的大肠杆菌DRK—332(PKHN31)(FERM BP—2114, FERM P—8586),其中的重组质粒是通过将在日本未审查专利公开号(Kokai) 62—155081中公开的生物素操纵子插入到载体DNA中制成的,在含有50ug/ml氨苄青霉素的LB培养基中的培养,用如上所述的碱溶法分离出质粒DNA PKHN31。

用限制性核酸内切酶Hind III酶解所得的质粒DNA PKHN31(1ug),在65℃下热处理10分钟,并通过乙醇沉淀回收之。

将所得DNA片段加到大肠杆菌DNA聚合酶缓冲液(500mM三羟甲基氨基甲烷盐酸盐,pH7.5,67mM MgCl₂,10mM 巯基乙醇)中,然后,加入dCTP, dATP, dTTP和dGTP(分别为500uM)及DNA聚合酶Klenow片段。在

37℃下反应30分钟。通过在65℃加热10分钟终止反应,并通过乙醇沉淀回收DNA。然而通过DNA连接试剂盒(Takara Shuzo生产)将5'—磷酸化XbaI连接子连接到所得DNA片段的末端,并通过乙醇沉淀回收所得DNA。所得DNA用限制性核酸内切酶XbaI酶解,经1%低胶凝温度琼脂糖凝胶电泳处理,用溴化乙锭染色,然后如上所述分离出DNA片段(大约6.0Kb)。

另一方面,用限制性核酸内切酶XbaI酶解载体DNA pBM16(1ug),于65℃热处理10分钟,并通过乙醇沉淀回收之。

通过DNA连接试剂盒(Takara Shuzo生产)连接如上所得到的两种DNA片段。用所得连接溶液转化大肠杆菌BR—4生物素营养缺陷型菌株(由日本未审查专利公开(Kokai)号62—155081中公开的大肠杆菌JA221(recA, hsdM, hsdR, lcuB, trp△E, lacY)诱变产生)。生长在无生物素基本琼脂平板(0.5%葡萄糖,0.4%硫酸铵,0.2%磷酸二氢钾,0.01%磷酸氢二钾,0.4%无维生素酪蛋白水解物,1.5%琼脂)上的菌落在含有10ug/ml四环素的LB培养基中充分生长,通过上述碱溶法获得质粒DNA pxB312。

(3) 用含有生物素操纵子的重组质粒转化

大肠杆菌AD突变株

按照上述氯化钙法,用如上获得的重组质粒pXB312转化大肠杆菌DRK—3323。分离在含有10ug/ml四环素的LB琼脂平板上长出的菌落,得到大肠杆菌DRK—3323(pXB312)(FERM BP—2117)

实例4

作为预培养物,用铂环将来自维持琼脂平板培养物的表3所列菌株接种到(培养基(10g/l肽,5g/l酵母膏,1g/l葡萄糖,5g/l氯化钠;调至pH7.0;当菌株含有重组质粒时,还包含20ug/ml四环素)中,并于37℃培养8—12小时。将50ml所得的预培养物装入微型发酵罐(Marubishi Bioengineering Co., Ltd., MD—300, SL),罐中含有1700ml组成如下所述的培养基A,在37℃下进行主要培养。使用pH控制器,用12%氨水调pH值至7。也通过加入氨水提供无机氮源。用一个溶解氧电极测量溶解氧在培养液中的浓度。将纯氧与通入的空气混合可调节该浓

度, 以便不降低到 3ppm 或更低. 搅拌速率为 500rpm, 通气量为 1V.V.m. 由于当培养液中葡萄糖的浓度为 0 左右时, 会出现溶解氧的浓度突然增加的现象, 所以用上述现象作为指示剂, 通过加进具有下列组成的葡萄糖溶液 A 维持培养液中葡萄糖的浓度为 1—5g/l. 培养 24 小时的结果示于表 3.

培养基 A	(g/l)
磷酸二钠(12H ₂ O)	17.6
磷酸钾	2.4
硫酸铵	1.0
酵母膏	10.0
胨	10.0
硫酸亚铁(7H ₂ O)	0.1
氯化钙(2H ₂ O)	0.05
氯化镁(4H ₂ O)	0.05
硫酸镁(7H ₂ O)	0.1
葡萄糖	5.0
供给葡萄糖溶液 A	(g/l)
葡萄糖	750.0
硫酸镁(7H ₂ O)	5.0
(表 3 见文后)	

实例 5

作为预培养物, 用铂环将来自维持琼脂平板培养物的表 4 所列菌株接种到 L 培养基 (10g/l 胨, 5g/l 酵母膏, 1g/l 葡萄糖, 5g/l 氯化钠, 20mg/ml 四环素, 调至 pH7.0) 中, 于 37℃ 培养 8—12 小时. 然后将 50ml 所得预培养物装入含有 1700ml 组成如下所述的培养基 B 的微型发酵罐 (Marubishi Bioengineering Co., Ltd., MD—300, 5l) 中并于 37℃ 进行主要培养. 使用 pH 控制剂, 用 12% 氨水调 pH 值至 7. 通过将纯氧与通入的空气混合调节溶解氧的浓度, 以便不降低到 3ppm 或更低. 搅拌速率为 500rpm, 通气量为 1V.V.m. 由于当培养液中葡萄糖的浓度为 0 左右时, 会出现溶解氧的浓度突然增加的现象, 所以用上述现象作为指示剂, 通过加进具有下列组成的葡萄糖溶液 B 维持培养液中葡萄糖的浓度为 1—5g/l. 培养 24 小时的结果示于表 4. 通过用植物乳杆菌 (ATCC 8014) 和酿酒酵母 (ATCC 7754) 进行生物测定, 和利用抗生物素蛋白的比色法, 对培养液中

的生物素和脱硫生物素进行定量分析. 表 4 表明当用质粒 PxBA312 从亲株 DRK—332 转化菌株 DRK—332 (PxBA—33) 时, 乙酸大量积累, 细胞浓度低, 生物素产率为 40mg/l, 中间产物脱硫生物素的累积量为 83mg/l, 而对于本发明的菌株 DRK—3323 (PXBA312), 乙酸累积量低到 6g/l, 细胞浓度为 65g/l, 脱硫生物素被有效地代谢为生物素, 并且生物素产率达 105mg/l.

培养基 B	(g/l)
磷酸二钠(12H ₂ O)	17.6
磷酸二钾	2.4
硫酸铵	1.0
酵母膏	10.0
胨	10.0
dl—丙氨酸	3.0
硫酸亚铁(7H ₂ O)	0.1
氯化钙(2H ₂ O)	0.05
氯化镁(4H ₂ O)	0.05
硫酸镁(7H ₂ O)	0.1
葡萄糖	5.0
供给葡萄糖溶液 B	(g/l)
葡萄糖	750.0
硫酸镁(7H ₂ O)	5.0
dl—丙氨酸	7.0

(表 4 见文后)

实例 6

含有携带 hcT—lac' Z 融合基因的重组质粒的 AD 突变株的制备

在含有 50ug/ml 氨苄青霉素的 LB 培养基中充分培养大肠杆菌 M15 (PZT32) (FERM BP—2115). 该菌株含有编码融合蛋白基因的重组质粒 (融合蛋白为含有胶原酶切点的 hcT—肽—β—半乳糖苷酶) (在日本未审查专利公开号 (Kokai) 63—226288 中公开), 和作为表达启动子的得自质粒 PKK223—3 (Pharmacia 生产) 的 tac 启动子, 按如上所述的碱溶法分离出质粒 DNA PZT32. 按上述氯化钙法用所得质粒 DNA PZT32 转化大肠杆菌 NA75. 生长于含有 50ug/ml 氨苄青霉素 LB 琼脂平板上的菌落经分离得到大肠杆菌 NA75 (PZT32).

实例 7

作为预培养物,用铂环将来自维持琼脂平板培养物的表5所列菌株接到L培养基(10g/1脉, 5g/1酵母膏, 1g/1葡萄糖, 5g/1氯化钠, 50mg/1氨基青霉素,调至pH7.0)中并于37℃培养8—12小时。然后将50ml所得预培养物装入含有1700ml上述培养基A的微型发酵罐(Marubishi Bioengineering Co., Ltd., MD—300, 5l)中并于37℃进行主要培养。使用pH控制剂,用12%氨水调pH至7。通过将纯氧与通入的空气混合调节溶解氧的浓度,以便不降低到3ppm或更低。搅拌速率为500rpm,通气量为1V.V.m..由于当培养液中葡萄糖的浓度为0左右时,会出现溶解氧的浓度突然增加的现象,所以用上述现象作为指示剂,通过加进上述葡萄糖溶液A维持培养液中葡萄糖的浓度为1—5g/1。当在培养过程中,培养液中乙酸的累积量为3—4g/1,因而细胞的生长活性开始下降时,通过加入0.25g/1异丙基— β -D-硫代—吡喃半乳糖苷(IPTG)表达hcT—lac'Z融合蛋白。在大肠杆菌M15(PZT32)菌杆培养开始9小时后,或在大肠杆菌NA75(PZT32)菌株培养开始14小时后,加入IPTG,进而继续培养并在24小时后完成,通过离心从培养液中回收细菌细胞,用灭菌水洗涤,悬浮于10mM三羟甲基氨基甲烷盐酸(pH8.0)—1mM EDTA—0.1mM DTT中,并用X—压榨机(ABBIOX生产)破碎细胞。离心得到上清液,用作细胞提取物。

对于细胞提取物,进行如下定量分析试验:

(1) 人降钙素的测定

使用降钙素试验盒“Dai ichi”(Dai ichi Radioisotope Laboratories生产),通过放射性免疫测定法进行测定,按照试剂盒所给说明进行试验。

(2) β -半乳糖苷酶的测定

用邻-硝基苯基吡喃半乳糖苷作为底物,按照Miller法(Miller, J.H., Exp.Mol.Gen, Cold Spring Harbor Lab.Press Cold Spring Harbor, N.Y.P352, 1972)测定该酶。在28℃下1分钟内降解1毫微摩尔ONPG所需的酶活性被定为1个单位。

(3) 蛋白质的测定

使用Lowry法(Lowry, O.H.J.Riol.Chem.,

193, 265, 1951),用牛血清白蛋白(Sigma生产, 馏分V)制备标准曲线。

结果示于表5。(表5见文后)。

按照纯化蛋白所用的常规方法,用 β -半乳糖苷酶的活性作为指示剂,使产生并积累的融合蛋白(含有胶原酶切点的hcT—肽— β -半乳糖苷糖)纯化,并通过日本未审查专利公开号(KoKai)63—226288中公开的方法,用胶原酶酶解。通过HPLC分离出C末端为甘氨酸的hCT。C—末端为甘氨酸的hCT可通过与C—末端酰胺化酶反应转化为hCT(Bradary, A.F. et al, Nature, 298, 686, 1982),转化的hCT可有效地用作药物。

工业适用性

本发明的新微生物乙酸形成能力低,最多为野生型的1/5,因而不易用乙酸抑制细菌细胞的生长,可将细胞培养至高密度,从而以相当高的产率获得有用物质。当用本发明的微生物发酵生产生物素时,其产率比先有技术有明显提高,此外,通过在含有丙氨酸的培养基中培养,可进一步提高产率。

虽然已用具体的实施方案描述了本发明,但对本领域的专业人员来说,在本发明的宗旨,范围和概念之内可做各种改进。

有关微生物储存

国际储存机构: 工业科技厅, 发酵研究所

地址: 1—3 Higashi 1 Chome, Tsukuba—Shi, Ibaraki—Ken, 305, Japan

储存号和储存目:

1.FERM BP—2105: 1988年10月17日

2.FERM BP—2113: 1985年12月26日(从1985年12月26日储存的FERM P—8585转移)

3.FERM BP—2114: 1985年12月26日(从1985年12月26日储存的FERM P—8586转移)

4.FERM BP—2115: 1987年3月12日(从1987年3月12日储存的FERM P—9266转移)

5.FERM BP—2116: 1987年 10月 28日 (从
1987年 10月 28日储存
的 FERM—P—9675 转
移)

6.FERM BP—2117: 1987年 10月 28日 (从
1987年 10月 28日储存
的 FERM P—9676 转
移)

表 1

菌 株	细胞浓度 (g / l)	乙酸的 累积量 (g / l)	乙酸的 细菌干重 累积量
亲 株 大肠杆菌 W3110 (IFO 12713)	5.1	4.5	0.88
AD 突变株 大肠杆菌 NA—75 (FERM BP—2105)	4.5	0.4	0.09

表 2

菌 株		亲 株 大肠杆菌 DRK-332 (FERM BP-2113)	AD 突变株 大肠杆菌 DRK-3323 (FERM BP-2116)
在低通气条 件下培养*1	细胞浓度 (g / l)	2.0	2.5
	乙酸累积量 (g / l)	4.5	0.6
	乙酸累 积量 细菌干重	2.25	0.24
在高通气条 件下培养*2	细胞浓度 (g / l)	2.2	5.8
	乙酸累积量 (g / l)	3.3	0.5
	乙酸累 积量 / 细菌干重	1.50	0.09

* 1: 500ml 培养瓶中装有 100ml 培养基。

* 2: 500ml 培养瓶中装有 10ml 培养基。

表 3

菌 株	大肠杆菌 DRK-332 (FERM BP-2113)	大肠杆菌 DRK-332 (pxBA312)	大肠杆菌 DRK-3323 (FFRM BP-2116)	大肠杆菌 DRK-3323 (PXBA312) (FERM BP-2117)
细胞浓度 (g/l)	31	25	73	62
乙酸的累积量 (g/l)	16	15	5	4
乙酸累 积量/细菌干重	0.52	0.6	0.07	0.06
脱硫生物素累积 量(mg/l)	2	23	2	10
生物素产率 (mg/l)	2	21	5	52

表 4

菌 株	大肠杆菌 DRK-332 (PXBA312)	大肠杆菌 DRK-3323 (PXBA312) (FERM BP-2117)
细胞浓度 (g/l)	27	65
乙酸的累积量 (g/l)	17	6
乙酸累 积量/细菌干重	0.63	0.09
脱硫生物素的累积量 (mg/l)	83	15
生物素产率 (mg/l)	40	105

表 5

菌 株	M15 (PZT32) (FERM BP-2115)	NA-75 (PZT32)
细胞浓度 (g/l)	19	56
乙酸累积量 (g/l)	13.0	5.4
乙酸累 积量/细菌干重	0.68	0.10
细 胞 降钙素 提取物(mg/l)	57	185
β -半乳糖 苷酶 (U/mg 蛋白)	60.00	68.000

说明书附图

