



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115851688 A

(43) 申请公布日 2023.03.28

(21) 申请号 202111117369.7

C12N 15/77 (2006.01)

(22) 申请日 2021.09.23

C12P 13/14 (2006.01)

C12R 1/15 (2006.01)

(71) 申请人 胡丹

地址 065001 河北省廊坊市经济技术开发
区华祥路102号塞纳荣府小区

(72) 发明人 宫卫波 赵津津 李岩

(74) 专利代理机构 北京路浩知识产权代理有限
公司 11002

专利代理师 黄爽

(51) Int. Cl.

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 9/90 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 15/61 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页
序列表9页

(54) 发明名称

一种TrpCF突变体及其应用

(57) 摘要

本发明涉及微生物技术领域,具体涉及一种TrpCF突变体及其应用。本发明提供一种trpCF突变体,所述突变体的氨基酸序列含有,如SEQ ID No.1所示氨基酸序列的第421位甘氨酸发生突变后的氨基酸序列。具体地,本发明提供的突变体的氨基酸序列含有,如SEQ ID No.1所示氨基酸序列的第421位由甘氨酸突变为L-丝氨酸或L-赖氨酸后的氨基酸序列。本发明提供的突变体能够合理弱化色氨酸合成途径,进而提高谷氨酸的产量和转化率,同时还能够保证菌株的生长性能。表达本发明所述突变体的重组微生物,具有较高的谷氨酸产量和糖酸转化率,同时菌株的生长性能良好。

1. trpCF突变体,其特征在于,所述突变体的氨基酸序列含有,如SEQ ID No.1所示氨基酸序列的第421位由甘氨酸突变为L-赖氨酸后的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的trpCF突变体,其特征在于,具有如SEQ ID No.3所示的氨基酸序列。

3. 编码权利要求1-2任一项所述的trpCF突变体的DNA分子。

4. 含有权利要求3所述的DNA分子的生物材料,所述生物材料为表达盒、载体或宿主细胞。

5. 权利要求1-2任一项所述的trpCF突变体、权利要求3所述的DNA分子或权利要求4所述的生物材料或如SEQ ID No.2所示的氨基酸序列在以下任一的应用:

(1) 提高重组微生物谷氨酸产量、转化率或生产强度;

(2) 减少重组微生物色氨酸积累。

6. 一种重组微生物,其特征在于,所述重组微生物较出发菌株的双功能吡啶-3-磷酸甘油合酶/磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶表达量和/或活性降低;

优选地,所述重组微生物表达权利要求1-2任一项所述trpCF突变体或所述重组微生物表达如SEQ ID No.3所示的氨基酸序列或所述重组微生物含有权利要求3所述的DNA分子。

7. 根据权利要求6所述的重组微生物,其特征在于,所述重组微生物为棒杆菌属细菌或短杆菌属细菌;

优选地,所述棒杆菌属细菌为谷氨酸棒杆菌、有效棒杆菌、钝齿棒杆菌、嗜热产氨棒杆菌或产氨棒杆菌。

8. 权利要求6-7任一项所述重组微生物的构建方法,其特征在于,包括,对出发菌株中的双功能吡啶-3-磷酸甘油合酶/磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶的编码基因进行一个或多个碱基的插入;

或将发菌株中双功能吡啶-3-磷酸甘油合酶/磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶的编码基因的转录和/或翻译调控元件替换为活性更低的调控元件;

优选地,将携带权利要求3所述DNA分子的重组质粒导入出发菌株中。

9. 权利要求6-7任一项所述重组微生物在以下任一中的应用:

(1) 谷氨酸生产;

(2) 提高谷氨酸产量;

(3) 提高谷氨酸生产中的糖酸转化率;

(4) 降低谷氨酸发酵生产中杂酸积累量。

10. 一种提高谷氨酸产量的方法,其特征在于,使用权利要求6-7任一项所述的重组微生物进行发酵培养。

一种TrpCF突变体及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及微生物技术领域,具体涉及一种TrpCF突变体及其应用。

背景技术

[0002] 谷氨酸,化学式为 $C_5H_9NO_4$,分子量为147.13,是一种酸性氨基酸。分子内含两个羧基,化学名称为 α -氨基戊二酸。谷氨酸是构成蛋白质的基本单位,是组成人体蛋白质的21种氨基酸之一。谷氨酸普遍采用谷氨酸棒状杆菌生产,而一水谷氨酸钠是一种食品添加剂,具有“鲜味”的味觉,是人类五种基本味觉之一。一水谷氨酸钠就是大名鼎鼎的味精。通过谷氨酸棒杆菌发酵,添加或限制一些物质,打开细胞膜上机械敏感通道,谷氨酸棒杆菌就会输出大量谷氨酸,这些物质包括生物素限制、添加Tween 40或青霉素。不过,随着研究的深入,这种以添加或限制物质控制机械敏感通道打开的方式已被淘汰。取而代之的是通过温度控制机械敏感通道开关。最近的研究表明,机械敏感通道MscCG的开放主要促进谷氨酸的外排,而不是其他氨基酸的外排。

[0003] 目前,L-谷氨酸最常用的生产方法为发酵法,主要以棒杆菌为生产菌发酵生产L-谷氨酸。但目前L-谷氨酸菌种的发酵杂氨基酸问题突出,不能得到很好的解决,影响了L-谷氨酸发酵的性能,对生产高品质的L-谷氨酸非常不利。

发明内容

[0004] 本发明的目的是提高重组微生物生产谷氨酸的产量,为了实现本发明的目的,本发明提供如下技术方案。

[0005] 第一方面,本发明提供一种trpCF突变体,所述突变体的氨基酸序列含有,如SEQ ID No.1所示氨基酸序列的第421位甘氨酸发生突变后的氨基酸序列。

[0006] 本发明提供的trpCF突变体为双功能吡哆-3-磷酸甘油合酶/磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶突变体。本发明在研发过程中发现,减弱色氨酸合成,能够增强中心代谢途径的代谢流能力,为谷氨酸等经由TCA循环的代谢产物的合成提供更充足的碳流量,进而提高其产量,但是,色氨酸的合成途径的过度弱化会对菌株的生长和代谢造成显著的不利影响,反而会降低菌株的生长和目标产物的生产性能。因此,一定程度地减弱色氨酸途径,促进菌株的生长和目标产物生产的平衡,才能够显著提高菌株对于目标产物的生产性能。本发明发现了两种异构酶突变体,这两个突变体能够一定程度地降低异构酶的活性,能够合理地减弱色氨酸途径的代谢流量,在保证菌株生长性能的同时,降低色氨酸等杂酸的积累,且显著提高谷氨酸等经由TCA循环的代谢产物的产量和转化率。

[0007] 具体地,本发明所述trpCF突变体的氨基酸序列含有,如SEQ ID No.1所示氨基酸序列的第421位由甘氨酸突变为L-丝氨酸或L-赖氨酸后的氨基酸序列;

[0008] 优选地,所述trpCF突变体具有如SEQ ID No.2或SEQ ID No.3所示的氨基酸序列。

[0009] 本领域技术人员应该理解,在上述trpCF突变体氨基酸序列的N端或C端添加标签蛋白或将其与其他蛋白进行融合形成融合蛋白,在不改变上述突变蛋白本身的活性的情况

下,上述添加标签的蛋白或融合蛋白也在本发明的保护范围内。

[0010] 第二方面,本发明提供编码上述的trpCF突变体的DNA分子。所述DNA分子具有如SEQ ID NO.13或SEQ ID NO.14所示的核苷酸序列。具体地,SEQ ID NO.13或SEQ ID NO.14所示的核苷酸序列除了含有编码上述trpCF突变体的核酸,还包含上游同源臂及外侧鉴定引物部分的核酸。

[0011] 第三方面,本发明请求保护含有上述的DNA分子的生物材料,所述生物材料为表达盒、载体或宿主细胞。

[0012] 所述表达盒为在所述核酸的上游或下游连接用于驱动其转录、表达的元件得到的重组核酸分子。

[0013] 所述载体可为表达载体或克隆载体,包括但不限于质粒载体、噬菌体载体、转座子等。

[0014] 所述宿主细胞包括但不限于微生物细胞。

[0015] 根据本领域技术人员的理解,本发明还请求保护,上述的trpCF突变体或上述的DNA分子或上述的生物材料在以下任一的应用:

[0016] (1) 提高重组微生物谷氨酸产量、转化率或生产强度;

[0017] (2) 减少重组微生物色氨酸积累。

[0018] 第四方面,基于上述trpCF突变体或上述DNA分子,本发明提供一种重组微生物,所述重组微生物较出发菌株的双功能吡哆-3-磷酸甘油合酶/磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶表达量和/或活性降低;

[0019] 优选地,所述重组微生物表达上述trpCF突变体或所述重组微生物含有上述的DNA分子。

[0020] 具体地,作为本发明的一种实施方式,所述重组微生物表达所述异构酶突变体,且不表达其出发菌株所具有的异构酶。

[0021] 作为另一种实施方式,本发明提供一种重组微生物,该重组微生物表达所述trpCF异构酶突变体,且不表达其出发菌株所具有的trpCF异构酶。

[0022] 优选地,所述重组微生物中编码异构酶的基因突变为编码上述trpCF突变体的基因。

[0023] 本发明所提供的重组微生物为棒杆菌属细菌或短杆菌属细菌;

[0024] 优选地,所述棒杆菌属细菌为谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)、有效棒杆菌(*Corynebacterium efficiens*)、钝齿棒杆菌(*Corynebacterium crenatum*)、嗜热产氨棒杆菌(*Corynebacterium thermoaminogenes*)或产氨棒杆菌(*Corynebacterium aminogenes*);

[0025] 所述短杆菌属细菌为黄色短杆菌(*Brevibacterium flavum*)或乳糖发酵短杆菌(*Brevibacterium lactofermentum*)。

[0026] 更优选地,所述重组微生物构建的出发菌株为能够积累谷氨酸的棒杆菌属细菌。

[0027] 作为本发明的优选实施方式,所述重组微生物构建的出发菌株为能够积累谷氨酸的谷氨酸棒杆菌。

[0028] 所述出发菌株为保藏编号为CGMCC No.11941的谷氨酸棒杆菌MHZ-0112-8。

[0029] 谷氨酸棒杆菌MHZ-0112-8的纯培养物已经于2015年12月25日保藏于中国微生物

菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),保藏编号为CGMCC No.11941。本发明所提及的谷氨酸棒杆菌MHZ-0112-8(CGMCC No.11941)已在中国专利公布号CN 105695383 A中公开。

[0030] 第五方面,本发明提供上述重组微生物的构建方法,包括,对出发菌株中的双功能吡啶-3-磷酸甘油合酶/磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶的编码基因进行一个或多个碱基的插入;

[0031] 或将发菌株中双功能吡啶-3-磷酸甘油合酶/磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶的编码基因的转录和/或翻译调控元件替换为活性更低的调控元件;

[0032] 优选地,将携带上述DNA分子的重组质粒导入出发菌株中。所述重组质粒为可在菌体中发生同源重组的质粒,将质粒上的蛋白突变体的编码基因与染色体上的同源基因进行交换。

[0033] 进一步,所述构建方法包括:

[0034] (1) 构建含有编码所述异构酶突变体的基因的重组质粒;

[0035] (2) 将重组质粒转化出发菌株,用含抗生素的选择培养基筛选转化子;

[0036] (3) 在阳性转化子中筛选发生目标突变的重组微生物。

[0037] 根据本领域技术人员的理解,本发明还请求保护上述重组微生物在以下任一中的应用:

[0038] (1) 谷氨酸生产;

[0039] (2) 提高谷氨酸产量;

[0040] (3) 提高谷氨酸生产中的糖酸转化率;

[0041] (4) 降低谷氨酸发酵生产中杂酸积累量。

[0042] 第六方面,本发明提供一种提高谷氨酸产量的方法,使用上述的重组微生物进行发酵培养。

[0043] 发酵培养中,所用种子培养基包括如下组分:玉米浆5%,葡萄糖2%,硫酸铵2%,硫酸镁0.05%,磷酸二氢钾0.2%,尿素0.1%,CaCO₃ 0.5%,pH 7.0。

[0044] 所用发酵培养基包括如下组分:玉米浆2%,葡萄糖12.0%,硫酸铵5%,硫酸镁0.05%,磷酸二氢钾0.2%,CaCO₃ 4%,pH 7.0。

[0045] 具体地,所述生产谷氨酸的方法包括:将所述重组微生物接种至斜面培养基进行斜面培养,挑取斜面培养基上的菌苔接种至种子培养基进行种子培养,然后将种子培养物转入发酵培养基进行发酵。

[0046] 在一些实施方案中,所用斜面培养基为:酵母粉5g/L,牛肉膏10g/L,蛋白胨10g/L,氯化钠10g/L,琼脂粉2.5g/L,pH 7.0-7.2。

[0047] 所述斜面培养为在30-32℃下培养20-25h。

[0048] 在一些实施方案中,所用种子培养基为:玉米浆5%,葡萄糖2%,硫酸铵2%,硫酸镁0.05%,磷酸二氢钾0.2%,尿素0.1%,CaCO₃ 0.5%,pH 7.0。

[0049] 所述种子培养为在30-32℃下振荡培养至对数生长中后期,培养时间为10-14h。

[0050] 在一些实施方案中,所用发酵培养基为:玉米浆2%,葡萄糖12.0%,硫酸铵5%,硫酸镁0.05%,磷酸二氢钾0.2%,CaCO₃ 4%,pH 7.0。

[0051] 所述发酵为30-32℃下,振荡培养12-20h。

[0052] 本发明所提供的生产谷氨酸的方法,降低了谷氨酸发酵生产中杂酸的积累量,提高了谷氨酸的产量。因此本发明相当于提供了降低谷氨酸发酵生产中杂酸积累的方法。

[0053] 本发明的有益效果至少在于:

[0054] 本发明提供的异构酶突变体的酶活性降低,能够合理弱化莽草酸合成途径的代谢流,降低色氨酸的积累,增强中心代谢途径的代谢流能力,进而提高谷氨酸的产量和转化率,同时还能够保证菌株的生长性能。本发明还提供表达该异构酶突变体的重组微生物,该重组微生物的谷氨酸发酵生产性能显著提高,具有较高的谷氨酸产量和糖酸转化率。

具体实施方式

[0055] 以下实例用于说明本发明,但不用来限制本发明的范围。在不背离本发明精神和实质的情况下,对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换,均属于本发明的保护范围。

[0056] 若未特别指明,本发明实例中所用的实验材料、试剂、仪器等均可市售获得;若未具体指明,本发明实例中所有的技术手段均为本领域技术人员所熟知的常规手段。本发明实施例中所用引物名称及序列如表1所示。

[0057] 表1引物序列

引物	序列(由上至下依次为)
A1-trpCF-U-F	Cagtccaagcttgattcgtgagcactaccagccgg (SEQ ID No.4)
[0058] A2-trpCF-U-R	ctgcgcagcgtgtgccggagagatgcTtcccgcgagcaaagactttgccttcacagcggc (SEQ ID No.5)
A3-trpCF-D-F	gccgctgtgaaggcaaagtctttgctcgcgggaAgcatctctccggacaacgctgcgcag (SEQ ID No.6)
A4-trpCF-D-R	ggtaccgggggatcctctagattgtgtgcaccgccgtggacgagg (SEQ ID No.7)
A5-trpCF-T-F	aagcacaagagatcgattact (SEQ ID No.8)
[0059] A6-trpCF-T-R	caccgaagtatgcaggtagcagc (SEQ ID No.9)
A7-trpCF-T-F	gccgctgtgaaggcaaagtctttgctcgcgggaA (SEQ ID No.10)
P82	CTCGTATGTTGTGTGGAATTGTG (SEQ ID No.11)
P85	CGCCCTGAGTGCTTGCGGCA (SEQ ID No.12)

[0060] 出发菌株MHZ-0112-8为谷氨酸棒杆菌,谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)MHZ-0112-8的纯培养物已经于2015年12月25日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心(简称CGMCC,地址:北京市朝阳区北辰西路1号院3号,中国科学院微生物研究所,邮编100101),保藏编号为CGMCC No.11941。

[0061] 本发明所提及的谷氨酸棒杆菌MHZ-0112-8(CGMC No.11941)已在中国专利公布号CN 105695383 A中公开。

[0062] 实施例1

[0063] MHZ-0112-8菌株先用吡啶黄诱变,将处于对数期的菌体离心,用磷酸缓冲液(0.1mol/L,pH 7.0)洗涤两次,将菌体重悬浮于含一定浓度的吡啶黄的0.1mol/L磷酸缓冲液(pH 7.0)中,使其最终浓度为0.2mg/mL,在37°C的摇床上振荡处理4h后得到的诱变菌液,稀释涂布于溴甲酚紫平板,31.5°C培养36h得到200株变色圈大的菌株,再经过TLC法复筛以及摇瓶验证结合HPLC筛选得到高产谷氨酸菌株MHZ-0112-Z0,MHZ-0112-Z1。

[0064] 将获得的MHZ-0112-Z0、MHZ-0112-Z1在脑心浸液固体培养基上活化,31.5°C培养16-20h;将菌体从平板上刮下一环,接种于30mL的种子培养基中31.5°C,220rpm下振荡培养至对数生长中后期,培养时间为12h。2mL种子液转接到20mL的发酵培养基31.5°C,220rpm振荡培养16h。

[0065] 对MHZ-0112-Z0发酵液中谷氨酸以及杂酸进行液相色谱检测发现,谷氨酸的产量从34.2g/L提升至35.9g/L,除了谷氨酸的产量明显提升外,转化率提高了1.1%。色氨酸的含量降低至0.036g/L,对MHZ-0112-Z1发酵液中谷氨酸以及杂酸进行液相色谱检测发现,谷氨酸的产量从34.2g/L提升至35.6g/L,除了谷氨酸的产量明显提升外,转化率提高了1.0%。色氨酸的含量降低至0.038g/L(表2)。

[0066] 表2诱变菌株谷氨酸及色氨酸的产量

[0067]

菌株	OD ₆₀₀ (×100)	Glu(g/L)	转化率%	Trp(g/L)
MHZ-0112-8	0.421±0.012	34.2±0.21	58.3±0.12	0.41±0.021
MHZ-0112-Z0	0.411±0.005	35.9±0.13	59.4±0.03	0.036±0.005
MHZ-0112-Z1	0.412±0.003	35.6±0.21	59.3±0.06	0.038±0.003

[0068] 利用比较基因组学分析诱变菌株MHZ-0112-Z0、MHZ-0112-Z1和出发菌株MHZ-0112-8,发现色氨酸合成途径基因:双功能吡喹-3-磷酸甘油合酶/磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶基因发生突变,双功能吡喹-3-磷酸甘油合酶/磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶第421位氨基酸发生突变。上述突变导致异构酶的活性降低。该突变导致色氨酸在细胞内积累减少,从而增强中心代谢途径的代谢流能力,为谷氨酸合成提供充足的碳流量,进而提高谷氨酸的产量。

[0069] 实施例2质粒pK18-trpCF^{G421S}的构建和重组菌株MHZ-0112-8-trpCF^{G421S}的构建

[0070] 本实施例提供重组菌株MHZ-0112-8-trpCF^{G421S}的构建,具体步骤如下:

[0071] 利用Phusion超保真聚合酶(New England BioLabs),以谷氨酸棒杆菌MHZ-0112-8的基因组为模板,以A1-trpCF-U-F/A2-trpCF-U-R为引物,制备重组片段UP,以A3-trpCF-D-F/A4-trpCF-D-R为引物,制备重组片段DN,所得片段经琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根)纯化,随后以UP、DN为模板,以A1-trpCF-U-F/A4-trpCF-D-R为引物制备重组片段,所得重组片段经琼脂糖凝胶回收试剂盒(天根)纯化,然后利用HindIII/XbaI进行消化,同时将pK18-mobsacB利用HindIII/XbaI进行消化,并用T4DNA连接酶(TransGen Biotech)将片段与载体进行连接,转化Trans1T1感受态细胞(TransGen Biotech),挑取卡那抗性克隆,HindIII/XbaI酶切鉴定得到片段插入pK18mobsacB的阳性克隆,进一步通过用P82/P85引物测序(Invitrogen公司)鉴定插入的片段正确。将所得到的质粒命名为pK18-trpCF^{G421S}。将pK18-trpCF^{G421S}转入谷氨酸棒杆菌MHZ-0112-8中,在含有15mg/L的卡那霉素的选择培养基上选择交换重组子。培养的温度为33°C,倒置培养。将筛得的转化子过夜培养于普通液体脑心浸液

培养基中,培养温度为33℃,回转摇床220rpm振荡培养。此培养过程中,转化子发生第二次重组,通过基因交换将载体序列从基因组中除去。将培养物做连续梯度稀释(10^{-2} 连续稀释至 10^{-4}),稀释液涂布在含有10%蔗糖的普通固体脑心浸液培养基上,33℃静置培养48h。将所筛选出的菌株进一步进行表型验证,挑选Kan^S的重组子利用A7-trpCF-T-F/A4-trpCF-D-R验证点突变重组子,通过摸索退火温度,获得含点突变的重组子,将得到的阳性重组子用A5-trpCF-T-F/A6-trpCF-T-R扩增测序,验证筛选完成后,将目的突变菌株命名为MHZ-0112-20。

[0072] 实施例3MHZ-0112-8-trpCF^{G421S}(MHZ-0112-20)突变菌株生产L-谷氨酸的性能

[0073] 本实施例对实施例2得到的突变菌株生产L-谷氨酸的能力进行鉴定。

[0074] 本实施例所用种子活化培养基为:酵母提取物1%,蛋白胨1%,氯化钠0.5%,葡萄糖0.5%,琼脂2%,pH 7.0。

[0075] 所用种子培养基为:玉米浆5%,葡萄糖2%,硫酸铵2%,硫酸镁0.05%,磷酸二氢钾0.2%,尿素0.1%,CaCO₃ 0.5%,pH 7.0。

[0076] 所用发酵培养基为:玉米浆2%,葡萄糖12.0%,硫酸铵5%,硫酸镁0.05%,磷酸二氢钾0.2%,CaCO₃ 4%,pH 7.0。

[0077] (1) 种子培养:挑取MHZ-0112-8、MHZ-0112-8-trpCF^{G421S}斜面种子1环接至装有20mL种子培养基的500mL三角瓶中,33℃,220r/min振荡培养16-22h;

[0078] (2) 发酵培养:将2mL种子液接种至装有20mL发酵培养基的500mL三角瓶中,33℃、220r/min振荡培养72h。

[0079] (3) 取1mL发酵液离心(12000rpm,2min),收集上清液,用HPLC检测工程菌与对照菌发酵液中的L-谷氨酸含量,其浓度如表3表示。

[0080] 表3突变菌株谷氨酸和色氨酸含量检测

菌株	OD ₆₀₀ (×100)	Glu(g/L)	转化率%	Trp(g/L)
MHZ-0112-8	0.421±0.017	34.3±0.12	58.2±0.10	0.42±0.12
MHZ-0112-20	0.411±0.022	35.5±0.08	59.3±0.08	0.016±0.012

[0082] 表3结果显示,出发菌株MHZ-0112-8的L-谷氨酸积累量为34.3g/L,而本发明的工程菌MHZ-0112-8-trpCF^{G421S}(MHZ-0112-20)的L-谷氨酸产量为35.5g/L,由此可见trpCF^{G421S}突变利于L-谷氨酸的积累。

[0083] 表3中OD₆₀₀是稀释100倍的培养液在600nm的浊度并表示细胞量,Glu(g/L)表示积累的L-谷氨酸的量,Trp(g/L)表示积累的L-色氨酸的量,在重组菌中TrpCF的第421位氨基酸由甘氨酸突变为L-丝氨酸,具体为密码子由GGC突变为AGC,色氨酸从0.42g/L减少到0.016g/L,而谷氨酸从34.3g/L提高到35.5g/L,转化率提高1.1%。

[0084] 表3结果表明,适当弱化色氨酸合成途径可以有效减少谷氨酸生产菌种中杂酸的产生,提高谷氨酸的转化率。

[0085] 实施例4重组菌株MHZ-0112-8-trpCF^{G421K}(MHZ-0112-21)的构建

[0086] 鉴于双功能吡啶-3-磷酸甘油合酶/磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶第421位氨基酸由甘氨酸(G)突变为L-丝氨酸(S),L-谷氨酸产量有提升。本实施例采用实施例2方法,将双功能吡啶-3-磷酸甘油合酶/磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶第421位氨基酸由甘氨酸(G)突变为L-赖氨酸(K)。菌株构建方法参考实施例2,突变菌株发酵结果如表4:

[0087] 表4突变菌株谷氨酸和杂酸含量检测

菌株	OD ₆₀₀ (×100)	Glu (g/L)	糖酸转化率%	Trp (g/L)
MHZ-0112-8	0.452±0.031	35.1±0.2	58.4±0.08	0.55±0.021
MHZ-0112-21	0.441±0.023	36.2±0.3	59.3±0.11	0.21±0.018

[0089] 表4中OD₆₀₀是稀释200倍的培养液在600nm的浊度并表示细胞量,Glu(g/L)表示积累的L-谷氨酸的量,Trp(g/L)表示积累的L-色氨酸的量,在MHZ-0112-21中TrpCF的第421位氨基酸由甘氨酸突变为L-赖氨酸,具体为密码子由GGC突变为AAG,色氨酸从0.55g/L减少到0.21g/L,而谷氨酸从35.1g/L提高到36.2g/L,转化率提高0.9%。以上结果表明,适当弱化色氨酸合成途径可以有效减少谷氨酸生产菌种中杂酸的产生,提高谷氨酸的转化率。

[0090] 发酵结果表明,双功能吡啶-3-磷酸甘油合酶/磷酸核糖邻氨基苯甲酸异构酶第421位氨基酸由甘氨酸(G)突变为L-赖氨酸(K)或L-丝氨酸(S)后,谷氨酸产量均有提升。显而易见,可将该突变用于其他谷氨酸棒杆菌、大肠杆菌等宿主菌中,应用于以谷氨酸为前体的衍生物的生产,例如L-精氨酸、L-脯氨酸、L-组氨酸、L-谷氨酰胺等。

[0091] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

序列表

<110> 胡丹

<120> 一种TrpCF突变体及其应用

<130> KHP211117885.4

<160> 14

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 474

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

Met Thr Ser Asn Asn Leu Pro Thr Val Leu Glu Ser Ile Val Glu Gly
1           5           10           15
Arg Arg Gly His Leu Glu Glu Ile Arg Ala Arg Ile Ala His Val Asp
           20           25           30
Val Asp Ala Leu Pro Lys Ser Thr Arg Ser Leu Phe Asp Ser Leu Asn
           35           40           45
Gln Gly Arg Gly Gly Ala Arg Phe Ile Met Glu Cys Lys Ser Ala Ser
           50           55           60
Pro Ser Leu Gly Met Ile Arg Glu His Tyr Gln Pro Gly Glu Ile Ala
65           70           75           80
Arg Val Tyr Ser Arg Tyr Ala Ser Gly Ile Ser Val Leu Cys Glu Pro
           85           90           95
Asp Arg Phe Gly Gly Asp Tyr Asp His Leu Ala Thr Val Ala Ala Thr
           100          105          110
Ser His Leu Pro Val Leu Cys Lys Asp Phe Ile Ile Asp Pro Val Gln
           115          120          125
Val His Ala Ala Arg Tyr Phe Gly Ala Asp Ala Ile Leu Leu Met Leu
           130          135          140
Ser Val Leu Asp Asp Glu Glu Tyr Ala Ala Leu Ala Ala Glu Ala Ala
145          150          155          160
Arg Phe Asp Leu Asp Ile Leu Thr Glu Val Ile Asp Glu Glu Glu Val
           165          170          175
Ala Arg Ala Ile Lys Leu Gly Ala Lys Ile Phe Gly Val Asn His Arg
           180          185          190
Asn Leu His Asp Leu Ser Ile Asp Leu Asp Arg Ser Arg Arg Leu Ser
           195          200          205
Lys Leu Ile Pro Ala Asp Ala Val Leu Val Ser Glu Ser Gly Val Arg

```

210	215	220
Asp Thr Glu Thr Val Arg Gln Leu Gly Gly His Ser Asn Ala Phe Leu		
225	230	235
Val Gly Ser Gln Leu Thr Ser Gln Glu Asn Val Asp Leu Ala Ala Arg		
	245	250
Glu Leu Val Tyr Gly Pro Asn Lys Val Cys Gly Leu Thr Ser Pro Ser		
	260	265
Ala Ala Gln Thr Ala Arg Ala Ala Gly Ala Val Tyr Gly Gly Leu Ile		
	275	280
Phe Glu Glu Ala Ser Pro Arg Asn Val Ser Arg Glu Thr Ser Gln Lys		
290	295	300
Ile Ile Ala Ala Glu Pro Asn Leu Arg Tyr Val Ala Val Ser Arg Arg		
305	310	315
Thr Ser Gly Tyr Lys Asp Leu Leu Val Asp Gly Ile Phe Ala Val Gln		
	325	330
Ile His Ala Pro Leu Gln Gly Ser Val Glu Ala Glu Lys Ala Leu Ile		
	340	345
Ala Ala Val Arg Glu Glu Val Gly Pro Gln Val Gln Val Trp Arg Ala		
	355	360
Ile Ser Met Ser Ser Pro Leu Gly Ala Glu Val Ala Ala Ala Val Glu		
370	375	380
Gly Asp Val Asp Lys Leu Ile Leu Asp Ala His Glu Gly Gly Ser Gly		
385	390	395
Glu Val Phe Asp Trp Ala Thr Val Pro Ala Ala Val Lys Ala Lys Ser		
	405	410
Leu Leu Ala Gly Gly Ile Ser Pro Asp Asn Ala Ala Gln Ala Leu Ala		
	420	425
Val Gly Cys Ala Gly Leu Asp Ile Asn Ser Gly Val Glu Tyr Pro Ala		
	435	440
Gly Ala Gly Thr Trp Ala Gly Ala Lys Asp Ala Gly Ala Leu Leu Lys		
	450	455
Ile Phe Ala Thr Ile Ser Thr Phe His Tyr		
465	470	
<210> 2		
<211> 474		
<212> PRT		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<400> 2		
Met Thr Ser Asn Asn Leu Pro Thr Val Leu Glu Ser Ile Val Glu Gly		

1	5	10	15
Arg Arg Gly His Leu Glu Glu Ile Arg Ala Arg Ile Ala His Val Asp			
	20	25	30
Val Asp Ala Leu Pro Lys Ser Thr Arg Ser Leu Phe Asp Ser Leu Asn			
	35	40	45
Gln Gly Arg Gly Gly Ala Arg Phe Ile Met Glu Cys Lys Ser Ala Ser			
	50	55	60
Pro Ser Leu Gly Met Ile Arg Glu His Tyr Gln Pro Gly Glu Ile Ala			
65	70	75	80
Arg Val Tyr Ser Arg Tyr Ala Ser Gly Ile Ser Val Leu Cys Glu Pro			
	85	90	95
Asp Arg Phe Gly Gly Asp Tyr Asp His Leu Ala Thr Val Ala Ala Thr			
	100	105	110
Ser His Leu Pro Val Leu Cys Lys Asp Phe Ile Ile Asp Pro Val Gln			
	115	120	125
Val His Ala Ala Arg Tyr Phe Gly Ala Asp Ala Ile Leu Leu Met Leu			
	130	135	140
Ser Val Leu Asp Asp Glu Glu Tyr Ala Ala Leu Ala Ala Glu Ala Ala			
145	150	155	160
Arg Phe Asp Leu Asp Ile Leu Thr Glu Val Ile Asp Glu Glu Glu Val			
	165	170	175
Ala Arg Ala Ile Lys Leu Gly Ala Lys Ile Phe Gly Val Asn His Arg			
	180	185	190
Asn Leu His Asp Leu Ser Ile Asp Leu Asp Arg Ser Arg Arg Leu Ser			
	195	200	205
Lys Leu Ile Pro Ala Asp Ala Val Leu Val Ser Glu Ser Gly Val Arg			
	210	215	220
Asp Thr Glu Thr Val Arg Gln Leu Gly Gly His Ser Asn Ala Phe Leu			
225	230	235	240
Val Gly Ser Gln Leu Thr Ser Gln Glu Asn Val Asp Leu Ala Ala Arg			
	245	250	255
Glu Leu Val Tyr Gly Pro Asn Lys Val Cys Gly Leu Thr Ser Pro Ser			
	260	265	270
Ala Ala Gln Thr Ala Arg Ala Ala Gly Ala Val Tyr Gly Gly Leu Ile			
	275	280	285
Phe Glu Glu Ala Ser Pro Arg Asn Val Ser Arg Glu Thr Ser Gln Lys			
	290	295	300
Ile Ile Ala Ala Glu Pro Asn Leu Arg Tyr Val Ala Val Ser Arg Arg			
305	310	315	320

Thr Ser Gly Tyr Lys Asp Leu Leu Val Asp Gly Ile Phe Ala Val Gln
 325 330 335
 Ile His Ala Pro Leu Gln Gly Ser Val Glu Ala Glu Lys Ala Leu Ile
 340 345 350
 Ala Ala Val Arg Glu Glu Val Gly Pro Gln Val Gln Val Trp Arg Ala
 355 360 365
 Ile Ser Met Ser Ser Pro Leu Gly Ala Glu Val Ala Ala Ala Val Glu
 370 375 380
 Gly Asp Val Asp Lys Leu Ile Leu Asp Ala His Glu Gly Gly Ser Gly
 385 390 395 400
 Glu Val Phe Asp Trp Ala Thr Val Pro Ala Ala Val Lys Ala Lys Ser
 405 410 415
 Leu Leu Ala Gly Ser Ile Ser Pro Asp Asn Ala Ala Gln Ala Leu Ala
 420 425 430
 Val Gly Cys Ala Gly Leu Asp Ile Asn Ser Gly Val Glu Tyr Pro Ala
 435 440 445
 Gly Ala Gly Thr Trp Ala Gly Ala Lys Asp Ala Gly Ala Leu Leu Lys
 450 455 460
 Ile Phe Ala Thr Ile Ser Thr Phe His Tyr
 465 470
 <210> 3
 <211> 474
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <400> 3
 Met Thr Ser Asn Asn Leu Pro Thr Val Leu Glu Ser Ile Val Glu Gly
 1 5 10 15
 Arg Arg Gly His Leu Glu Glu Ile Arg Ala Arg Ile Ala His Val Asp
 20 25 30
 Val Asp Ala Leu Pro Lys Ser Thr Arg Ser Leu Phe Asp Ser Leu Asn
 35 40 45
 Gln Gly Arg Gly Gly Ala Arg Phe Ile Met Glu Cys Lys Ser Ala Ser
 50 55 60
 Pro Ser Leu Gly Met Ile Arg Glu His Tyr Gln Pro Gly Glu Ile Ala
 65 70 75 80
 Arg Val Tyr Ser Arg Tyr Ala Ser Gly Ile Ser Val Leu Cys Glu Pro
 85 90 95
 Asp Arg Phe Gly Gly Asp Tyr Asp His Leu Ala Thr Val Ala Ala Thr
 100 105 110

Ser His Leu Pro Val Leu Cys Lys Asp Phe Ile Ile Asp Pro Val Gln
 115 120 125
 Val His Ala Ala Arg Tyr Phe Gly Ala Asp Ala Ile Leu Leu Met Leu
 130 135 140
 Ser Val Leu Asp Asp Glu Glu Tyr Ala Ala Leu Ala Ala Glu Ala Ala
 145 150 155 160
 Arg Phe Asp Leu Asp Ile Leu Thr Glu Val Ile Asp Glu Glu Glu Val
 165 170 175
 Ala Arg Ala Ile Lys Leu Gly Ala Lys Ile Phe Gly Val Asn His Arg
 180 185 190
 Asn Leu His Asp Leu Ser Ile Asp Leu Asp Arg Ser Arg Arg Leu Ser
 195 200 205
 Lys Leu Ile Pro Ala Asp Ala Val Leu Val Ser Glu Ser Gly Val Arg
 210 215 220
 Asp Thr Glu Thr Val Arg Gln Leu Gly Gly His Ser Asn Ala Phe Leu
 225 230 235 240
 Val Gly Ser Gln Leu Thr Ser Gln Glu Asn Val Asp Leu Ala Ala Arg
 245 250 255
 Glu Leu Val Tyr Gly Pro Asn Lys Val Cys Gly Leu Thr Ser Pro Ser
 260 265 270
 Ala Ala Gln Thr Ala Arg Ala Ala Gly Ala Val Tyr Gly Gly Leu Ile
 275 280 285
 Phe Glu Glu Ala Ser Pro Arg Asn Val Ser Arg Glu Thr Ser Gln Lys
 290 295 300
 Ile Ile Ala Ala Glu Pro Asn Leu Arg Tyr Val Ala Val Ser Arg Arg
 305 310 315 320
 Thr Ser Gly Tyr Lys Asp Leu Leu Val Asp Gly Ile Phe Ala Val Gln
 325 330 335
 Ile His Ala Pro Leu Gln Gly Ser Val Glu Ala Glu Lys Ala Leu Ile
 340 345 350
 Ala Ala Val Arg Glu Glu Val Gly Pro Gln Val Gln Val Trp Arg Ala
 355 360 365
 Ile Ser Met Ser Ser Pro Leu Gly Ala Glu Val Ala Ala Ala Val Glu
 370 375 380
 Gly Asp Val Asp Lys Leu Ile Leu Asp Ala His Glu Gly Gly Ser Gly
 385 390 395 400
 Glu Val Phe Asp Trp Ala Thr Val Pro Ala Ala Val Lys Ala Lys Ser
 405 410 415
 Leu Leu Ala Gly Lys Ile Ser Pro Asp Asn Ala Ala Gln Ala Leu Ala

420	425	430
Val Gly Cys Ala Gly Leu Asp Ile Asn Ser Gly Val Glu Tyr Pro Ala		
435	440	445
Gly Ala Gly Thr Trp Ala Gly Ala Lys Asp Ala Gly Ala Leu Leu Lys		
450	455	460
Ile Phe Ala Thr Ile Ser Thr Phe His Tyr		
465	470	
<210> 4		
<211> 36		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<400> 4		
cagtgccaaag cttgattcgt gagcactacc agccgg 36		
<210> 5		
<211> 60		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<400> 5		
ctgcgcagcg ttgtccggag agatgcttcc cgcgagcaaa gactttgcct tcacagcggc 60		
<210> 6		
<211> 60		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<400> 6		
gccgctgtga aggcaaagtc ttgtctcgcg ggaagcatct ctccggacaa cgctgcgcag 60		
<210> 7		
<211> 45		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<400> 7		
ggtacccggg gatcctctag attgtgtgca ccgccgtgga cgagg 45		
<210> 8		
<211> 22		
<212> DNA		
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
<400> 8		
aagcacgaag agatcgatta ct 22		
<210> 9		
<211> 23		

<212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 9
 caccgaagta tgcaggtagc agc 23
 <210> 10
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 10
 gccgctgtga aggcaaagtc tttgctcgcg ggaa 34
 <210> 11
 <211> 23
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 11
 ctcgtatggt gtgtggaatt gtg 23
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 12
 cgccctgagt gcttgcggca 20
 <210> 13
 <211> 1662
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <400> 13
 ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaa acgacggcca gtgccaagct 60
 tgattcgtga gcactaccag ccgggtgaaa tcgctcgcgt gtactctcgc tacgccagcg 120
 gcatttccgt gctgtgcgag ccggatcggt ttgggtggcga ttacgatcac ctgctaccg 180
 ttgccgctac ctctcatctt ccggtgctgt gcaaagactt catcattgat cctgtccagg 240
 tacacgcggc gcgttacttt ggtgctgatg ccatectgct catgctctct gtgcttgatg 300
 atgaagagta cgcagcactc gctgccgagg ctgcgcggtt tgatctggat atcctcaccg 360
 aggttattga tgaggaggaa gtcgccccgc ccatcaagct gggtgcaag atctttggcg 420
 tcaaccaccg caacctgcat gatctgtcca ttgatttga tcgttcacgt cgctgtcca 480
 agctcattcc agcagatgcc gtgctcgtgt ctgagctcgg cgtgcgcgat accgaaaccg 540
 tccgccagct aggtgggca cccaatgcat tctcgttgg ctcccagctg accagccagg 600
 aaaacgtcga tctggcagcc cgcaattgg tctacggccc caacaaagtc tgcggactca 660
 cctcaccaag tgcagcacia accgctcgcg cagcgggtgc ggtctacggc gggctcatct 720

tcgaagaggc atcgccacgt aatgtttcac gtgaaacatc gcaaaaaatc atcgccgcag 780
 agcccaacct gcgctacgtc gcggtcagcc gtcgcacctc cgggtacaag gatttgcttg 840
 tcgacggcat cttcgccgta caaatccacg cccactgca gggcagcgtc gaagcagaaa 900
 aggcaattgat cgccgccgtt cgtgaagagg ttggaccgca ggtccaggtc tggcgcgcga 960
 tctcgatgtc cagccccttg ggggctgaag tggcagctgc ggtggagggt gacgtcgata 1020
 agctaattct tgatgccccat gaaggtggca gcggggaagt attcgactgg gctacggtgc 1080
 cgcccgctgt gaaggcaaaag tctttgctcg cgggaagcat ctctccggac aacgctgcgc 1140
 aggcaactgc tgtgggctgc gcaggttttag acatcaactc tggcgtggaa taccgcccgc 1200
 gtgcaggcac gtgggctggg gcgaaagatg ccggcgcgct gctgaaaatt ttcgcgacca 1260
 tctccacatt ccattactaa aggttttaaat aggatcatga ctgaaaaaga aaacttgggc 1320
 ggctccacgc tgctacctgc ataactcgggt gaattcggcg gccagttcgt cgcggaatcc 1380
 ctctgcctg ctctcgacca gctggagaag gccttcgctg acgcgacca cagcccagag 1440
 ttccgcgaag aactcggcgg ctacctcgc gattatctcg gccgccaac cccgctgacc 1500
 gaatgctcca acctgccact cgcaggcgaa ggcaaaggct ttgcgcggat ctctctcaag 1560
 cgcgaagacc tcgtccacgg cgggtcacac aatctagagg atccccgggt accgagctcg 1620
 aattcgtaat catggtcata gctgtttcct gtgtgaaatt gt 1662

<210> 14

<211> 1662

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 14

ttgggtaacg ccagggtttt cccagtcacg acgttgtaa acgacggcca gtgccaagct 60
 tgattcgtga gcactaccag ccgggtgaaa tcgctcgcgt gtactctcgc tacgccagcg 120
 gcatttccgt gctgtgcgag ccggatcgtt ttggtggcga ttacgatcac ctcgctaccg 180
 ttgccgctac ctctcatctt ccggtgctgt gcaaagactt catcattgat cctgtccagg 240
 tacacgcggc gcgttacttt ggtgctgatg ccatcctgct catgctctct gtgcttgatg 300
 atgaagagta cgcagcactc gctgccgagg ctgcgcgttt tgatctggat atcctcaccg 360
 aggttattga tgaggaggaa gtcgcccgcg ccatcaagct ggggtgcaag atctttggcg 420
 tcaaccaccg caacctgcat gatctgtcca ttgatttggg tcgttcacgt cgcctgtcca 480
 agctcattcc agcagatgcc gtgctcgtgt ctgagtctgg cgtgcgcgat accgaaaccg 540
 tccgccagct aggtgggcac tccaatgcat tctcgttgg ctcccagctg accagccagg 600
 aaaacgtcga tctggcagcc cgcgaattgg tctacggccc caacaaagtc tgcggactca 660
 cctcaccaag tgcagcacia accgctcgcg cagcgggtgc ggtctacggc gggctcatct 720
 tcgaagaggc atcgccacgt aatgtttcac gtgaaacatc gcaaaaaatc atcgccgcag 780
 agcccaacct gcgctacgtc gcggtcagcc gtcgcacctc cgggtacaag gatttgcttg 840
 tcgacggcat cttcgccgta caaatccacg cccactgca gggcagcgtc gaagcagaaa 900
 aggcaattgat cgccgccgtt cgtgaagagg ttggaccgca ggtccaggtc tggcgcgcga 960
 tctcgatgtc cagccccttg ggggctgaag tggcagctgc ggtggagggt gacgtcgata 1020
 agctaattct tgatgccccat gaaggtggca gcggggaagt attcgactgg gctacggtgc 1080

cggccgctgt gaaggcaaag tctttgctcg cgggaaagat ctctccggac aacgctgcgc 1140
aggcactcgc tgtgggctgc gcaggttag acatcaactc tggcgtggaa taccgccc 1200
gtgcaggcac gtgggctggg gcgaaagatg ccggcgcgct gctgaaaatt ttcgaccca 1260
tctccacatt ccattactaa aggtttaaag aggatcatga ctgaaaaaga aaacttgggc 1320
ggctccacgc tgctacctgc atacttcggt gaattcggcg gccagttcgt cgcggaatcc 1380
ctcctgcctg ctctcgacca gctggagaag gccttcggtg acgacacaa cagcccagag 1440
ttccggaag aactcggcgg ctacctcgc gattatctcg gccgccaac cccgctgacc 1500
gaatgctcca acctgccact cgcaggcgaag ggcaaaggct ttgcgaggat cttcctcaag 1560
cgcaagacc tcgtccacgg cggcgcacac aatctagagg atccccgggt accgagctcg 1620
aatcgtaat catggtcata gctgttctct gtgtgaaatt gt 1662