



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111926002 B

(45) 授权公告日 2021.01.05

(21) 申请号 202010972530.8

C12N 15/60 (2006.01)

(22) 申请日 2020.09.16

C12N 15/70 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

C12N 1/21 (2006.01)

申请公布号 CN 111926002 A

C12P 13/22 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.11.13

审查员 张晓霞

(73) 专利权人 中国科学院天津工业生物技术研究所

地址 300308 天津市滨海新区空港经济区西七道32号

(72) 发明人 张大伟 丁冬芹 柏丹阳 朱亚如

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理事务所(普通合伙) 11400

代理人 欧阳石文

(51) Int. Cl.

C12N 9/88 (2006.01)

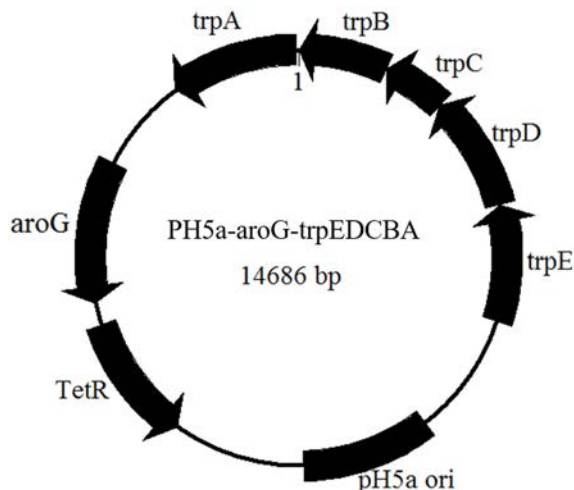
权利要求书1页 说明书7页  
序列表7页 附图3页

(54) 发明名称

TrpE的突变体及其在产L-色氨酸的基因工程菌中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种TrpE蛋白的突变体,及其在产L-色氨酸的基因工程菌中的应用。具体利用基因工程的手段解除L-色氨酸代谢分支途径关键基因TrpE的反馈抑制,获得L-色氨酸高产的基因工程菌。进一步地,通过过表达L-色氨酸代谢途径关键基因,提高前体物供给,去除途径中负调控因子,扩大L-色氨酸合成途径代谢流,以提高L-色氨酸的产量。



1. 产L-色氨酸的基因工程菌在生产L-色氨酸中的应用,其特征在于,所述产L-色氨酸的基因工程菌,其通过基因定点突变方法将出发细菌中的TrpE蛋白基因突变以解除L-色氨酸对TrpE的抑制作用,所述突变是将在TrpE蛋白中的A63位氨基酸残基替换为V;所述出发细菌中的TrpE蛋白基因编码的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示;其中所述的出发细菌是大肠杆菌。

2. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,所述出发细菌中的TrpE蛋白基因的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示。

3. 如权利要求1所述的应用,其特征在于,还通过基因工程技术在所述基因工程菌中过表达AroG, TrpE和PpsA,并对TrpR进行敲除。

4. 如权利要求1至3任一项所述的应用,其特征在于,通过对所述基因工程菌进行发酵,然后收集L-色氨酸。

## TrpE的突变体及其在产L-色氨酸的基因工程菌中的应用

### 技术领域

[0001] 本发明属于基因工程和微生物领域,具体涉及TrpE的突变体、以及产L-色氨酸的基因工程菌,其构建方法和在产L-色氨酸中的应用。

### 背景技术

[0002] L-色氨酸作为人体和动物八种必须氨基酸中第二大必需氨基酸,参与人体蛋白质合成和代谢网络调节,并广泛存在于自然界,同时也是芳香族氨基酸的重要成员之一。L-色氨酸是多种重要生物活性物质的前体,比如色素、5-羟基色胺、吲哚、生物碱和褪黑素等,广泛应用于医药、食品及饲料等行业。随着L-色氨酸国内外需求量的不断增加,使其成为重要的研究热点。L-色氨酸的生产方法有化学合成法、转化法和微生物发酵法。其中,微生物发酵法因其原料易得、廉价、终产物纯度高、易于提取和绿色环保等优点已被广泛应用于L-色氨酸的生产。大肠杆菌作为应用广泛的模式菌株,因其遗传背景清晰、遗传改造简单、繁殖较快及容易培养等优势,已被广泛应用于工业化商品的代谢工程改造中。

[0003] 随着基因重组技术的发展,利用基因工程手段改造L-色氨酸合成途径逐步发展起来。在不涉及化学诱变的情况下,赵志军等运用代谢工程的研究策略,在不产L-色氨酸的*E. coli* W3110的基础上,通过一系列的基因操作,使L-色氨酸的产量提高至17.7g/L(赵志军. L-色氨酸生产菌株的构建及代谢调控研究[D]. 无锡: 江南大学, 2011.)。2017年,Chen等通过基因工程纯理性改造的方法得到L-色氨酸工程菌株S028,发酵61h后,L-色氨酸产量达到了40.3g/L(Chen L et al., Applied microbiology and biotechnology, 2017, 101 (2): 559-568.)。在1993年,Syoji Azuma等在发酵培养时添加pluronic L-61使L-色氨酸结晶,从而使L-色氨酸产量达到了54.5g/L(Azuma S et al., Applied Microbiology and Biotechnology, 1993, 39(4-5): 471-476.)。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于通过基因工程的方法对细菌尤其大肠杆菌中L-色氨酸相关代谢途径基因进行改造,从而获得L-色氨酸生产菌株。

[0005] 本发明首先提供一种邻氨基苯甲酸合酶TrpE的突变体,以使得TrpE蛋白的催化口袋始终处于闭合状态,因而无论L-色氨酸是否存在,TrpE蛋白始终可以行使正常的催化功能生成邻氨基苯甲酸。优选地,其多肽氨基酸序列相对于野生型序列仅存在下述突变:第63位氨基酸A替换为V。优选地,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1。进一步提供编码所述的突变体的编码基因,以及含有所述的突变体的编码基因的重组宿主细胞。

[0006] 本发明进一步提供一种产L-色氨酸的基因工程菌,其中在出发细菌中的导入突变TrpE蛋白基因,以解除了L-色氨酸对TrpE的抑制作用,或者通过基因定点突变方法将出发细菌中的TrpE蛋白基因突变以解除L-色氨酸对TrpE的抑制作用。优选地,所述突变是将在TrpE蛋白中的A63位氨基酸残基替换为V,进一步的,所述出发细菌是大肠杆菌,更优选地,所述出发细菌是大肠杆菌菌株KW(Chen, Y et al. Journal of Industrial Microbiol &

Biotechnology, 2018, 45 (5): 357-367.)。

[0007] 优选的,所述基因工程菌中过表达AroG,和/或TrpE,和/或PpsA,和/或对TrpR进行了敲除。其中,过表达可以通过常规转化所述基因来实现,对TrpR进行敲除可以采用同源重组,基因编辑等方法来实现。更优选,所述基因工程菌中过表达AroG,TrpE,PpsA,并对TrpR进行了敲除。其中,通过携带有表达框的质粒导入基因工程菌以实现AroG,TrpE的过表达;通过所基因工程菌中的基因组上通过引入tac启动子以过表达*ppsA*基因,

[0008] 本发明还提供一种构建产L-色氨酸的基因工程菌的方法,其是出发细菌中的导入能够解除L-色氨酸对TrpE的抑制作用的突变的TrpE蛋白基因,优选地,所述突变是将在TrpE蛋白中的A63位氨基酸残基替换为V。

[0009] 更进一步地,还通过基因工程技术在基因工程菌中过表达AroG,和/或TrpE,和/或PpsA,和/或对TrpR进行了敲除。优选地,通过基因工程技术在基因工程菌中同时过表达AroG,TrpE,PpsA,并对TrpR进行了敲除。

[0010] 一个具体实施方式中,所述的构建L-色氨酸基因工程菌的方法,包括以下步骤:

[0011] 1) 大肠杆菌菌株KW中,导入含有基因*aroG*和*trpEDCBA*的重组质粒,构建菌株KBD1;

[0012] 2) 基因组上过表达*ppsA*基因,构建菌株KBD2;

[0013] 3) 敲除*trpR*基因;构建菌株KBD3;

[0014] 4) 在KBD3菌株中,通过置换邻氨基苯甲酸(ANTA)合酶TrpE第63位氨基酸残基A63为V,获得抗终产物色氨酸抑制突变体TrpE<sup>fbr</sup>,构建得菌株KBD4,其中突变的TrpE(A63V)的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的蛋白质;

[0015] 本发明进一步提供上述基因工程菌生产L-色氨酸的应用。具体地,通过对所述基因工程菌进行发酵,然后收集L-色氨酸的步骤,具体是从发酵上清液中收集L-色氨酸。其中将所述基因工程菌经过38-42h发酵培养后,从发酵液上清中收集L-色氨酸。更优选地,还包括纯化L-色氨酸的步骤。

[0016] 本发明通过上构建的基因工程菌,通过摇瓶发酵验证表明,通过引入TrpE(A63V)突变,解除终产物色氨酸对TrpE的反馈抑制,L-色氨酸的产量有明显提高,相比对照菌株KW,提升达到1.68倍。因此,利用本发明获得的基因工程菌进行发酵,可以获得产物L-色氨酸的有效积累,为L-色氨酸的产业化生产奠定了基础,具有较强的实用和应用价值。

## 附图说明

[0017] 图1:PH5a-*aroG*-*trpEDCBA*质粒图谱。

[0018] 图2:TrpE蛋白动力学模拟图。

[0019] 图3:L-色氨酸生产菌株摇瓶发酵结果。

## 具体实施方式

[0020] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。

[0021] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0022] 下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0023] 以下实施例中的定量试验,均设置三次重复实验,结果取平均值。

[0024] 突变体TrpE(A63V)的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

[0025] KW菌株记载于如下文献中:Chen, Y.et al. Rational design and analysis of an Escherichia coli strain for high-efficiency tryptophan production. Journal of Industrial Microbiol & Biotechnology, 45 (5), 357-367 (2018).

[0026] 实施例1、构建L-色氨酸生产菌株KBD1

[0027] L-色氨酸代谢途径是由葡萄糖进入胞内,经过糖酵解途径和磷酸戊糖途径分别合成L-色氨酸的两个重要前体物磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和赤藓糖4-磷酸(E4P),从而经DAHP合酶AroG缩合进入莽草酸途径最终生成分支酸。随后,分支酸经邻氨基苯甲酸合酶TrpE催化进入L-色氨酸分支合成途径,从而最终生成目标产物L-色氨酸。因此,为了构建L-色氨酸生产菌株,首先过表达了L-色氨酸合成途径中两个占据关键节点的酶AroG和TrpE。

[0028] PH5a-aroG-trpEDCBA质粒构建:以野生型大肠杆菌MG1655为模板,用引物aroG-F、aroG-R扩增带接头的aroG片段。以PH5a质粒做模板,PH5a-M-F、PH5a-M-R扩增带接头的PH5a-M片段。以aroG片段和PH5a-M片段为模板,aroG-F、PH5a-M-R引物扩增得到用于Gibson assembly的aroG-M-Gibson片段。以MG1655为模板,用引物trpEDCBA-F、trpEDCBA-R扩增带接头的trpEDCBA-Gibson片段。以PH5a-ver-F、PH5a-ver-R扩增带接头的质粒骨架,与上面的aroG-M-Gibson片段、trpEDCBA-Gibson片段通过Gibson assembly得到PH5a-aroG-trpEDCBA质粒,质粒图谱如图1所示。

[0029] 表1 构建L-色氨酸生产菌株KBD1所用到的引物

引物名称	核苷酸序列(5' -3')
引物aroG-F(SEQ ID NO:3)	CGCATCCGACAATTAAACCTTACCCGCGACGCGCTTTTA
引物aroG-R(SEQ ID NO:4)	TGGCAACACTGGAACAGACATGAATTATCAGAACGACGA
引物PH5a-M-F(SEQ ID NO:5)	CGTCGTTCTGATAATTCATGTCTGTTCCAGTGTGCCAT
引物PH5a-M-R(SEQ ID NO:6)	AGCGGCGACGCGCAGTTAATCCCACAGCCGCCAGTTCCG
引物trpEDCBA-F(SEQ ID NO:7)	GGAAGTGGCGGCTGTGGGATTAAGTGGCGGCGCGCCGCTT
引物trpEDCBA-R(SEQ ID NO:8)	ACAAAATTAGAGAATAACAATGCAAAACACAAAACCGAC
引物PH5a-ver-F(SEQ ID NO:9)	TCGGTTTTTGTGTTTGCATTGTTATTCTCTAATTTTGTT
引物PH5a-ver-R(SEQ ID NO:10)	AAAAGCGCGTCGCGGGTAAGGTTAATTGTCGGATGCGC

[0031] 把质粒PH5a-aroG-trpEDCBA化转入菌株KW,构建色氨酸生产菌株KBD1。本部分所用到的菌株及质粒如下:

[0032] 表2 构建L-色氨酸生产菌株KBD1所用菌株和质粒

菌株或质粒	相关性质
菌株MG1655	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> ilvG <sup>-</sup> rfb-50 rph-1
菌株KW	大肠杆菌W3110衍生菌株,L-色氨酸生产菌株
菌株KBD1	KW衍生菌株,KW菌株中过表达aroG和trpEDCBA
质粒PH5a	PH5a ori;Tet <sup>R</sup> ;Tac启动子
质粒PH5a-aroG-trpEDCBA	PH5a衍生质粒,过表达aroG, trpEDCBA

[0034] 实施例2、构建L-色氨酸生产菌株KBD2

[0035] PEP是L-色氨酸合成的一个重要前体物,而PEP合成酶PpsA可以将丙酮酸催化生成PEP,因此,为了提高PEP的供给,对PpsA进行了过表达。

[0036] cas9-ppsA质粒构建:以野生型大肠杆菌MG1655为模板,用引物ppsA-up-F、ppsA-up-R扩增带接头的ppsA-UP片段,用引物ppsA-down-F、ppsA-down-R扩增带接头的ppsA-Down片段。ppsA-UP片段和ppsA-Down片段通过组装成ppsA-UD片段。以cas9质粒为模板,用引物ppsA-N20-F、ppsA-ver-R扩增质粒骨架ppsA-ver1片段,用引物ppsA-ver-F、ppsA-N20-R扩增质粒骨架tnaA-ver2片段。质粒骨架ppsA-ver1、ppsA-ver2与上面的片段ppsA-UD通过Gibson assembly(Gibson assembly方法是Gibson等发明的将多个DNA片段在1次反应中实现分子间连接)得到cas9-ppsA质粒。

[0037] 表3 构建L-色氨酸生产菌株KBD2所用到的引物

引物名称	核苷酸序列(5' -3' )
引物 ppsA-up-F (SEQ ID NO: 11)	GAATCCATGGGCTGTTGAAAGCATAAATTA AAAACG
引物 ppsA-up-R (SEQ ID NO: 12)	TTAAACAAAATTATTGGGGAATTGTTATCCGCTCACAAATCCACACAT TATACGAGCCGATGATTAATTGTCAACGAACAATCCTTTTGTGATA
引物 ppsA-down-F (SEQ ID NO: 13)	ATTC CCAATAATTTTGT TTA ACTTTAAGAAGGAGATATACATATGTC CAACAATGGCTCGTCACCGCTCGTCTTTGGTATAACCAAC
引物 ppsA-down-R (SEQ ID NO: 14)	TCCAAGCTTCCATT CAGAAGGGAGTGTGATAATCC
引物 ppsA-ver-F (SEQ ID NO: 15)	TCGACACTCCCTTCTGAATGGAAGCTTGGATTCTC
引物 ppsA-ver-R (SEQ ID NO: 16)	AATTTATGCTTTCAACAGGCCCATGGATTCTC
引物 ppsA-N20-F (SEQ ID NO: 17)	TAGCCAACAATGGCTCGTCACCGCGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
引物 ppsA-N20-R (SEQ ID NO: 18)	CGCGGTGACGAGCCATTGTTGGCTAAGATCTGACTCCATAA

[0038] 在菌株KBD1的基因组上通过引入tac启动子过表达ppsA基因,构建色氨酸生产菌株KBD2。本部分所用到的菌株及质粒如下:

[0040] 表4 构建L-色氨酸生产菌株KBD2所用菌株和质粒

菌株或质粒	相关性质
菌株MG1655	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> ilvG <sup>-</sup> rfb-50 rph-1
菌株KBD1	KW衍生菌株,KW菌株中过表达aroG和trpEDCBA
菌株KBD2	KBD1衍生菌株,KBD1菌株中过表达ppsA
质粒CRISPR/Cas9	pSC101 ori;AMP <sup>R</sup> ;araBAD启动子
质粒cas9-ppsA	cas9衍生质粒,用于替换ppsA基因启动子为tac启动子

[0041] 实施例3、构建L-色氨酸生产菌株KBD3

[0042] TrpR调节因子参与色氨酸的生物合成、运输和调节。TrpR是色氨酸转录抑制因子,负调控trp调节子的表达,以响应细胞内色氨酸水平。TrpR通过干扰RNA聚合酶与启动子相互作用来抑制基因转录。当细胞内色氨酸浓度达到一定量时,即引发TrpR抑制多个基因的转录。因此,为了解除色氨酸的抑制作用,将TrpR进行了敲除。

[0043] cas9-trpR质粒构建:以野生型大肠杆菌MG1655为模板,用引物trpR-up-F、trpR-up-R扩增带接头的trpR-UP片段,用引物trpR-down-F、trpR-down-R扩增带接头的trpR-Down片段。trpR-UP片段和trpR-Down片段通过组装成trpR-UD片段。以cas9质粒为模板,用引物trpR-N20-F、trpR-ver-R扩增质粒骨架trpR-ver1片段,用引物trpR-ver-F、trpR-N20-

R扩增质粒骨架trpR-ver2片段。质粒骨架trpR-ver1、trpR-ver2与上面的片段trpR-UD通过Gibson assembly(Gibson assembly方法是Gibson等发明的将多个DNA片段在1次反应中实现分子间连接)得到cas9-trpR质粒。

[0045] 本部分所用引物如下:

[0046] 表5 构建L-色氨酸生产菌株KBD3所用到的引物

引物名称	核苷酸序列(5'-3')
引物trpR-up-F (SEQ ID NO:19)	AATCCATGGGCCTGTAGCAGCTTATAACGCCGGA
引物trpR-up-R (SEQ ID NO:20)	ATCAGGCCTACAAAAATATGTGCCATTGTTAGC
引物trpR-down-F (SEQ ID NO:21)	CAATGGCGACATATTTTTTGTAGGCCTGATAAGAC
引物trpR-down-R (SEQ ID NO:22)	CCAAGCTTCCATTCATGGTCCCGTGATGTCGCGT
引物trpR-ver-F (SEQ ID NO:23)	ACATCACGGGACCATGAATGGAAGCTTGGATTCTC
引物trpR-ver-R (SEQ ID NO:24)	GCGTTATAAGCTGCTACAGGCCCATGGATTCTTC
引物trpR-N20-F (SEQ ID NO:25)	GCCAGATGAGCGCGAAGCGTGTTTTAGAGCTAGAAATAGC
引物trpR-N20-R (SEQ ID NO:26)	ACGCTTCGCGCTCATCTGGCGCTAAGATCTGACTCCATAA

[0048] 在菌株KBD2中敲除调控因子*trpR*后,构建色氨酸生产菌株KBD3。本部分所用到的菌株及质粒如下:

[0049] 表6构建L-色氨酸生产菌株KBD3所用菌株和质粒

菌株或质粒	相关性质
菌株MG1655	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> ilvG <sup>-</sup> rfb-50 rph-1
菌株KBD2	KBD1衍生菌株,KBD1菌株中过表达 <i>ppsA</i>
菌株KBD3	KBD2衍生菌株,KBD2菌株中敲除 <i>tryR</i>
质粒CRISPR/Cas9	pSC101 ori;AMP <sup>R</sup> ;araBAD启动子
质粒cas9-trpR	cas9衍生质粒,用于敲除基因 <i>trpR</i>

[0051] 实施例4、构建L-色氨酸生产菌株KBD4

[0052] ANTA合酶TrpE将莽草酸途径衍生而来的分支酸和谷氨酰胺催化生成邻氨基苯甲酸,此反应为色氨酸末端分支途径的第一步反应。但是,TrpE受到终产物色氨酸的抑制作用,即生成一定量的色氨酸后,其会抑制TrpE酶的活性,从而阻碍更多色氨酸的生成,这在很大程度上导致了色氨酸产量无法提升。

[0053] 为了探究L-色氨酸对TrpE蛋白的抑制机理,对TrpE蛋白在L-色氨酸缺失及存在的情况下,分别进行了动力学模拟。结果如图2所示,在L-色氨酸不存在的情况下,TrpE蛋白的催化口袋处于正常状态,即闭合状态(灰色)。当L-色氨酸存在时,它可以结合到TrpE蛋白中,从而引起TrpE蛋白的结构发生变化并导致其催化口袋由闭合状态转变为张开状态(灰白)。在张开状态下,TrpE蛋白无法结合底物分支酸,从而阻碍了其催化功能,无法生成邻氨基苯甲酸。当在TrpE蛋白中的A63位氨基酸引入V,通过动力学模拟,无论有无L-色氨酸存在,TrpE蛋白的催化口袋始终处于闭合状态。也就是说,无论L-色氨酸是否存在,TrpE蛋白始终可以行使正常的催化功能生成邻氨基苯甲酸。因此,为了解除终产物色氨酸对TrpE的抑制作用,在TrpE的A63位残基引入了V。突变体TrpE(A63V)的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。本实施例中采用的其编码基因的核苷酸序列如SEQ ID NO:2所示

[0054] PH5a-aroG-trpE<sup>fbr</sup>DCBA质粒构建:以质粒PH5a-aroG-trpEDCBA为模板,用引物

trpE-M1-F、trpE-M1-R扩增带接头的trpE1-Gibson片段。以质粒PH5a-aroG-trpEDCBA为模板,用引物trpE-M2-F、trpE-M2-R扩增带接头的trpE2-Gibson片段,与上面的trpE1-Gibson片段通过Gibson assembly得到PH5a-aroG<sup>fbr</sup>-trpE<sup>fbr</sup>DCBA质粒。

[0055] 本部分所用引物如下:

[0056] 表7 构建L-色氨酸生产菌株KBD4所用到的引物

引物名称	核苷酸序列(5' -3')
引物trpE-M1-F (SEQ ID NO:27)	GCTGCGCATTACAGTTTTAGGTGACACTGTCACAA
引物trpE-M1-R (SEQ ID NO:28)	CGCCCCAGCTCATCAGGTCAGCGAGATATTGTGGG
引物trpE-M2-F (SEQ ID NO:29)	CCACAATATCTCGCTGACCTGATGAGCTGGGGCGC
引物trpE-M2-R (SEQ ID NO:30)	CAGTGTACCTAAAACCTGTAATGCGCAGCGCACTG

[0058] 把质粒PH5a-aroG-trpE<sup>fbr</sup>DCBA导入菌株KW中,或者在菌株KBD1基础上,把质粒PH5a-aroG-trpE<sup>fbr</sup>DCBA替换掉菌株KBD3中的PH5a-aroG-trpEDCBA质粒,得到菌株KBD4(即事先不加抗生素培养菌株KBD3,使其丢失其中的质粒PH5a-aroG-trpEDCBA,然后再导入PH5a-aroG-trpE<sup>fbr</sup>DCBA质粒,本实施例采用后者,由于前已有菌株KBD3这种材料)。本部分所用到的菌株及质粒如下:

[0059] 表8 构建L-色氨酸生产菌株KBD4所用菌株和质粒

菌株或质粒	相关性质
菌株MG1655	F <sup>-</sup> λ <sup>-</sup> ilvG <sup>-</sup> rfb-50 rph-1
菌株KBD3	KBD2衍生菌株,KBD2菌株中敲除tryR
菌株KBD4	KBD3衍生菌株,含有质粒PH5a-aroG-trpE <sup>fbr</sup> DCBA
质粒PH5a-aroG-trpE <sup>fbr</sup> DCBA	PH5a-aroG-trpEDCBA衍生质粒,突变TrpE的A63位氨基酸为V

[0061] 实施例5、L-色氨酸生产菌株的制备L-色氨酸

[0062] 1、L-色氨酸生产菌株的的发酵

[0063] 大肠杆菌L-色氨酸生产菌株KW和KBD1-KBD4摇瓶发酵工艺如下:

[0064] (1)斜面活化培养:从-80°C冰箱取出保藏菌种划线于含有四环素抗性的固体培养基,37°C培养12-18h。

[0065] (2)种子培养:用接种环从新鲜活化斜面上挑取单菌落于种子基本培养基中(500mL三角瓶中装50mL LB培养基,封口膜封口),37°C、220r/min振荡培养6-8h至OD<sub>600</sub>约为2-3。

[0066] (3)摇瓶分批发酵培养:将种子培养液按10%的接种量接入含有四环素抗性发酵基本培养基中(500mL三角瓶,装液量为50mL,封口膜封口),37°C、220r/min振荡培养进行L-色氨酸分批发酵36-42h。摇瓶发酵培养基表15:

[0067] 表9 L-色氨酸发酵培养基配方

培养基成分	含量
葡萄糖	20g/L
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10g/L
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5g/L
yeast	2g/L
mops	0.4M



MgSO <sub>4</sub>	5g/L
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	15mg/L
Sodium citrate	0.5g/L
VB1	100mg/L
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	4mg/L
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	4mg/L
MnSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	15mg/L

[0069] 2、发酵菌株高效液相色谱法(HPLC)检测

[0070] 将发酵液在冷冻离心机中5500rpm/min离心15-20min,收集上清,上清经0.22μm滤膜过滤后做HPLC检测。

[0071] HPLC条件为:色谱柱为ZORBAX Eclipse AAA(氨基酸分析)色谱柱,流动相A:40mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7.8, 流动相B:甲醇:乙腈:水=45:45:10, v/v/v。洗脱梯度为0-1min, 100% A; 9.8min:43% A+57% B; 10min:100% B; 12min:100% B; 12.5min:100% A。流速2.0mL/min, 串联连接RID、VWD检测器, 检测池温度控制在40°C, 进样量为10μL, 分析时间26min, 紫外检测波长338nm。

[0072] 3、L-色氨酸生产菌株KW和KBD1-KBD4发酵结果及分析

[0073] 菌株KW、KBD1-KBD4在经过38-42h发酵培养后,对发酵液上清进行了HPLC检测,结果如图3所示。由发酵结果可以看出,在菌株KW的基础上,引入DAHP合酶AroG和邻氨基苯甲酸合酶TrpE后,菌株KBD1生产色氨酸的能力在KW菌株的基础上提高了38%,L-色氨酸产量达到了0.32g/L。在此基础上,过表达PpsA,并敲除TrpR后,菌株KBD3的色氨酸产量进一步提高到0.44g/L。由此可以看出,提高前体物PEP的供给和去除色氨酸负调控因子后,L-色氨酸合成途径效率确实有所提高。最后,通过引入TrpE (A63V)突变,解除终产物色氨酸对TrpE的反馈抑制,L-色氨酸的产量提高到0.62g/L,相比对照菌株KW,提升了1.68倍。

[0001]	序列表															
[0002]	<110>	中国科学院天津工业生物技术研究所														
[0003]	<120>	TrpE的突变体及其在产L-色氨酸基因工程菌中的应用														
[0004]	<160>	30														
[0005]	<170>	SIPOSequenceListing 1.0														
[0006]	<210>	1														
[0007]	<211>	520														
[0008]	<212>	PRT														
[0009]	<213>	Escherichia coli														
[0010]	<400>	1														
[0011]	Met	Gln	Thr	Gln	Lys	Pro	Thr	Leu	Glu	Leu	Leu	Thr	Cys	Glu	Gly	Ala
[0012]	1			5					10					15		
[0013]	Tyr	Arg	Asp	Asn	Pro	Thr	Ala	Leu	Phe	His	Gln	Leu	Cys	Gly	Asp	Arg
[0014]			20					25					30			
[0015]	Pro	Ala	Thr	Leu	Leu	Leu	Glu	Ser	Ala	Asp	Ile	Asp	Ser	Lys	Asp	Asp
[0016]			35				40					45				
[0017]	Leu	Lys	Ser	Leu	Leu	Leu	Val	Asp	Ser	Ala	Leu	Arg	Ile	Thr	Val	Leu
[0018]		50					55					60				
[0019]	Gly	Asp	Thr	Val	Thr	Ile	Gln	Ala	Leu	Ser	Gly	Asn	Gly	Glu	Ala	Leu
[0020]	65				70					75				80		
[0021]	Leu	Ala	Leu	Leu	Asp	Asn	Ala	Leu	Pro	Ala	Gly	Val	Glu	Ser	Glu	Gln
[0022]				85					90					95		
[0023]	Ser	Pro	Asn	Cys	Arg	Val	Leu	Arg	Phe	Pro	Pro	Val	Ser	Pro	Leu	Leu
[0024]			100					105						110		
[0025]	Asp	Glu	Asp	Ala	Arg	Leu	Cys	Ser	Leu	Ser	Val	Phe	Asp	Ala	Phe	Arg
[0026]			115					120					125			
[0027]	Leu	Leu	Gln	Asn	Leu	Leu	Asn	Val	Pro	Lys	Glu	Glu	Arg	Glu	Ala	Met
[0028]		130						135					140			
[0029]	Phe	Phe	Gly	Gly	Leu	Phe	Ser	Tyr	Asp	Leu	Val	Ala	Gly	Phe	Glu	Asp
[0030]	145				150					155				160		
[0031]	Leu	Pro	Gln	Leu	Ser	Ala	Glu	Asn	Asn	Cys	Pro	Asp	Phe	Cys	Phe	Tyr
[0032]				165						170				175		
[0033]	Leu	Ala	Glu	Thr	Leu	Met	Val	Ile	Asp	His	Gln	Lys	Lys	Ser	Thr	Arg
[0034]			180							185				190		
[0035]	Ile	Gln	Ala	Ser	Leu	Phe	Ala	Pro	Asn	Glu	Glu	Glu	Lys	Gln	Arg	Leu
[0036]			195							200				205		
[0037]	Thr	Ala	Arg	Leu	Asn	Glu	Leu	Arg	Gln	Gln	Leu	Thr	Glu	Ala	Ala	Pro
[0038]		210								215				220		
[0039]	Pro	Leu	Pro	Val	Val	Ser	Val	Pro	His	Met	Arg	Cys	Glu	Cys	Asn	Gln
[0040]	225				230						235			240		
[0041]	Ser	Asp	Glu	Glu	Phe	Gly	Gly	Val	Val	Arg	Leu	Leu	Gln	Lys	Ala	Ile

[0042]		245		250		255
[0043]	Arg Ala Gly Glu Ile Phe Gln Val Val Pro Ser Arg Arg Phe Ser Leu					
[0044]		260		265		270
[0045]	Pro Cys Pro Ser Pro Leu Ala Ala Tyr Tyr Val Leu Lys Lys Ser Asn					
[0046]		275		280		285
[0047]	Pro Ser Pro Tyr Met Phe Phe Met Gln Asp Asn Asp Phe Thr Leu Phe					
[0048]		290		295		300
[0049]	Gly Ala Ser Pro Glu Ser Ser Leu Lys Tyr Asp Ala Thr Ser Arg Gln					
[0050]		305		310		315
[0051]	Ile Glu Ile Tyr Pro Ile Ala Gly Thr Arg Pro Arg Gly Arg Arg Ala					
[0052]		325		330		335
[0053]	Asp Gly Ser Leu Asp Arg Asp Leu Asp Ser Arg Ile Glu Leu Glu Met					
[0054]		340		345		350
[0055]	Arg Thr Asp His Lys Glu Leu Ser Glu His Leu Met Leu Val Asp Leu					
[0056]		355		360		365
[0057]	Ala Arg Asn Asp Leu Ala Arg Ile Cys Thr Pro Gly Ser Arg Tyr Val					
[0058]		370		375		380
[0059]	Ala Asp Leu Thr Lys Val Asp Arg Tyr Ser Tyr Val Met His Leu Val					
[0060]		385		390		395
[0061]	Ser Arg Val Val Gly Glu Leu Arg His Asp Leu Asp Ala Leu His Ala					
[0062]		405		410		415
[0063]	Tyr Arg Ala Cys Met Asn Met Gly Thr Leu Ser Gly Ala Pro Lys Val					
[0064]		420		425		430
[0065]	Arg Ala Met Gln Leu Ile Ala Glu Ala Glu Gly Arg Arg Arg Gly Ser					
[0066]		435		440		445
[0067]	Tyr Gly Gly Ala Val Gly Tyr Phe Thr Ala His Gly Asp Leu Asp Thr					
[0068]		450		455		460
[0069]	Cys Ile Val Ile Arg Ser Ala Leu Val Glu Asn Gly Ile Ala Thr Val					
[0070]		465		470		475
[0071]	Gln Ala Gly Ala Gly Val Val Leu Asp Ser Val Pro Gln Ser Glu Ala					
[0072]		485		490		495
[0073]	Asp Glu Thr Arg Asn Lys Ala Arg Ala Val Leu Arg Ala Ile Ala Thr					
[0074]		500		505		510
[0075]	Ala His His Ala Gln Glu Thr Phe					
[0076]		515		520		
[0077]	<210> 2					
[0078]	<211> 1563					
[0079]	<212> DNA					
[0080]	<213> Escherichia coli					
[0081]	<400> 2					
[0082]	atgcaaacac aaaaaccgac tctcgaactg ctaacctgcg aaggcgctta tcgcgacaat 60					
[0083]	cccaccgcgc tttttcacca gttgtgtggg gatcgtccgg caacgctget gctggaatcc 120					

[0084]	gcagatatcg acagcaaaga tgatttaaaa agcctgctgc tggtagacag tgcgctgcgc	180
[0085]	attacagttt taggtgacac tgtcacaatc caggcacttt ccggcaacgg cgaagccctc	240
[0086]	ctggcactac tggataacgc cctgctgcg ggtgtggaaa gtgaacaatc accaaactgc	300
[0087]	cgtgtgctgc gcttcccccc tgtcagtcca ctgctggatg aagacgccc cttatgctcc	360
[0088]	ctttcggttt ttgacgcttt ccgtttattg cagaatctgt tgaatgtacc gaaggaagaa	420
[0089]	cgagaagcca tgttcttcgg cggcctgttc tcttatgacc ttgtggcggg atttgaagat	480
[0090]	ttaccgcaac tgtcagcggg aaataactgc cctgatttct gtttttatct cgctgaaacg	540
[0091]	ctgatggatg ttgaccatca gaaaaaaaa acccgtattc aggccagcct gtttgctccg	600
[0092]	aatgaagaag aaaaacaacg tctcactgct cgcctgaacg aactacgtca gcaactgacc	660
[0093]	gaagccgcgc cgccgctgcc agtgggttcc gtgccgcata tgcgttgtga atgtaatcag	720
[0094]	agcgatgaag agttcgggtg cgtagtgcgt ttgttgcaaa aagcgattcg cgctggagaa	780
[0095]	atthccagg tggtgccatc tcgccgttcc tctctgcct gcccgtcacc gctggcggcc	840
[0096]	tattacgtgc tgaaaaagag taatcccagc ccgtacatgt tttttatgca ggataatgat	900
[0097]	ttcacctat ttggcgcgtc gccggaaagc tcgctcaagt atgatgccac cagccgccag	960
[0098]	attgagatct acccgattgc cggaacacgc ccacgcggtc gtcgcgccga tggttcactg	1020
[0099]	gacagagatc tcgacagccg tattgaaactg gaaatgcgta ccgatcataa agagctgtct	1080
[0100]	gaacatctga tgctggttga tctcgcccgt aatgatctgg cacgcatttg ccccccggc	1140
[0101]	agccgctacg tcgccgatct caccaaagtt gaccgttatt cctatgtgat gcacctcgtc	1200
[0102]	tctcgcttag tcggcgaact gcgtcacgat cttgacgcc tgcacgctta tcgcgctgt	1260
[0103]	atgaatatgg ggacgttaag cgggtgcgcc aaagtacgct ctatgcagtt aattgccgag	1320
[0104]	gcggaaggtc gtcgccggc cagctacggc ggcgcggtag gttatttca cgcgcatggc	1380
[0105]	gatctcgaca cctgcattgt gatccgctcg gcgctggtgg aaaacggtat cgccaccgtg	1440
[0106]	caagcgggtg ctggtgtagt ccttgattct gttccgcagt cggaagccga cgaaaccctg	1500
[0107]	aacaaagccc gcgctgtact gcgcgtatt gccaccgcgc atcatgcaca ggagactttc	1560
[0108]	tga	1563
[0109]	<210> 3	
[0110]	<211> 39	
[0111]	<212> DNA	
[0112]	<213> 人工序列()	
[0113]	<400> 3	
[0114]	cgcatccgac aattaaacct tacccgcgac gcgctttta	39
[0115]	<210> 4	
[0116]	<211> 39	
[0117]	<212> DNA	
[0118]	<213> 人工序列()	
[0119]	<400> 4	
[0120]	tggcaaacact ggaacagaca tgaattatca gaacgacga	39
[0121]	<210> 5	
[0122]	<211> 39	
[0123]	<212> DNA	
[0124]	<213> 人工序列()	
[0125]	<400> 5	

[0126]	cgtcgttctg ataattcatg tctgttccag tgttgccat	39
[0127]	<210> 6	
[0128]	<211> 39	
[0129]	<212> DNA	
[0130]	<213> 人工序列()	
[0131]	<400> 6	
[0132]	agcggcgacg cgcagttaat cccacagccg ccagttccg	39
[0133]	<210> 7	
[0134]	<211> 39	
[0135]	<212> DNA	
[0136]	<213> 人工序列()	
[0137]	<400> 7	
[0138]	ggaactggcg gctgtgggat taactgcgcg tcgccgctt	39
[0139]	<210> 8	
[0140]	<211> 39	
[0141]	<212> DNA	
[0142]	<213> 人工序列()	
[0143]	<400> 8	
[0144]	acaaaattag agaataacaa tgcaaacaca aaaaccgac	39
[0145]	<210> 9	
[0146]	<211> 39	
[0147]	<212> DNA	
[0148]	<213> 人工序列()	
[0149]	<400> 9	
[0150]	tcggtttttg tgtttgcatt gttattctct aattttgtt	39
[0151]	<210> 10	
[0152]	<211> 39	
[0153]	<212> DNA	
[0154]	<213> 人工序列()	
[0155]	<400> 10	
[0156]	aaaagcgcgt cgcggttaag gtttaattgt cggatgcgc	39
[0157]	<210> 11	
[0158]	<211> 37	
[0159]	<212> DNA	
[0160]	<213> 人工序列()	
[0161]	<400> 11	
[0162]	gaatccatgg gcctgttgaa agcataaatt aaaaacg	37
[0163]	<210> 12	
[0164]	<211> 48	
[0165]	<212> DNA	
[0166]	<213> 人工序列()	
[0167]	<400> 12	

[0168]	ttaaacaaaa ttattgggga attggtatcc gtcacaatt ccacacat	48
[0169]	<210> 13	
[0170]	<211> 89	
[0171]	<212> DNA	
[0172]	<213> 人工序列()	
[0173]	<400> 13	
[0174]	attcccacat aatdddgttt aactttaaga aggagatata catatgtcca acaatggctc	60
[0175]	gtcaccgctc gtgctttgtt ataaccaacp psup0gaatc catgggctg ttgaaagcat	120
[0176]	aaattaaaaa cgppsup0tt aaacaaaatt attggggaat tgttatccgc tcacaattcc	180
[0177]	acacattata cgagccgatg attaatgtc aacgaacaat cttttgtga tappsdwn0	240
[0178]	attcccacat aatdddgttt aactttaaga aggagatata catatgtcca acaatggctc	300
[0179]	gtcaccgctc gtgctttgtt ataaccaacp psdwn0tcc aagcttccat tcagaaggga	360
[0180]	gtgtcgataa tccppsver0 tcgacactcc cttctgaatg gaagcttga ttctcpsve	420
[0181]	r0aattdatg ctttcaacag gcccatgat tcttcpps0t agccaacaat ggctcgtcac	480
[0182]	cgcgttttag agctagaaat agcpps0cgc ggtgacgagc cattgttggc taagatctga	540
[0183]	ctccataa	548
[0184]	<210> 14	
[0185]	<211> 36	
[0186]	<212> DNA	
[0187]	<213> 人工序列()	
[0188]	<400> 14	
[0189]	tccaagcttc cattcagaag ggagtgtcga taatcc	36
[0190]	<210> 15	
[0191]	<211> 35	
[0192]	<212> DNA	
[0193]	<213> 人工序列()	
[0194]	<400> 15	
[0195]	tcgacactcc cttctgaatg gaagcttga ttctc	35
[0196]	<210> 16	
[0197]	<211> 33	
[0198]	<212> DNA	
[0199]	<213> 人工序列()	
[0200]	<400> 16	
[0201]	aattdatgct ttcaacagc ccatggattc ttc	33
[0202]	<210> 17	
[0203]	<211> 44	
[0204]	<212> DNA	
[0205]	<213> 人工序列()	
[0206]	<400> 17	
[0207]	tagccaacaa tggtcgtca ccgctttta gagctagaaa tagc	44
[0208]	<210> 18	
[0209]	<211> 41	

[0210]	<212> DNA	
[0211]	<213> 人工序列()	
[0212]	<400> 18	
[0213]	cgcggtgacg agccattggt ggctaagatc tgactccata a	41
[0214]	<210> 19	
[0215]	<211> 34	
[0216]	<212> DNA	
[0217]	<213> 人工序列()	
[0218]	<400> 19	
[0219]	aatccatggg cctgtagcag cttataacgc cgga	34
[0220]	<210> 20	
[0221]	<211> 35	
[0222]	<212> DNA	
[0223]	<213> 人工序列()	
[0224]	<400> 20	
[0225]	atcaggccta caaaaaatat gtcgccattg ttagc	35
[0226]	<210> 21	
[0227]	<211> 35	
[0228]	<212> DNA	
[0229]	<213> 人工序列()	
[0230]	<400> 21	
[0231]	caatggcgac atatTTTTTg taggcctgat aagac	35
[0232]	<210> 22	
[0233]	<211> 34	
[0234]	<212> DNA	
[0235]	<213> 人工序列()	
[0236]	<400> 22	
[0237]	ccaagcttcc attcatggtc ccgtgatgtc gcgt	34
[0238]	<210> 23	
[0239]	<211> 35	
[0240]	<212> DNA	
[0241]	<213> 人工序列()	
[0242]	<400> 23	
[0243]	acatcacggg accatgaatg gaagcttggga ttctc	35
[0244]	<210> 24	
[0245]	<211> 34	
[0246]	<212> DNA	
[0247]	<213> 人工序列()	
[0248]	<400> 24	
[0249]	gcgttataag ctgctacagg cccatggatt cttc	34
[0250]	<210> 25	
[0251]	<211> 40	

[0252]	<212>	DNA	
[0253]	<213>	人工序列()	
[0254]	<400>	25	
[0255]		gccagatgag cgcaagcgt gttttagagc tagaaatagc	40
[0256]	<210>	26	
[0257]	<211>	40	
[0258]	<212>	DNA	
[0259]	<213>	人工序列()	
[0260]	<400>	26	
[0261]		acgcttcgcg ctcatctggc gctaagatct gactccataa	40
[0262]	<210>	27	
[0263]	<211>	35	
[0264]	<212>	DNA	
[0265]	<213>	人工序列()	
[0266]	<400>	27	
[0267]		gctgcgcatt acagttttag gtgacaactgt cacaa	35
[0268]	<210>	28	
[0269]	<211>	35	
[0270]	<212>	DNA	
[0271]	<213>	人工序列()	
[0272]	<400>	28	
[0273]		cgccccagct catcaggtca gcgagatatt gtggg	35
[0274]	<210>	29	
[0275]	<211>	35	
[0276]	<212>	DNA	
[0277]	<213>	人工序列()	
[0278]	<400>	29	
[0279]		ccacaatatc tcgctgacct gatgagctgg ggcgc	35
[0280]	<210>	30	
[0281]	<211>	35	
[0282]	<212>	DNA	
[0283]	<213>	人工序列()	
[0284]	<400>	30	
[0285]		cagtgtcacc taaaactgta atgcgcagcg cactg	35



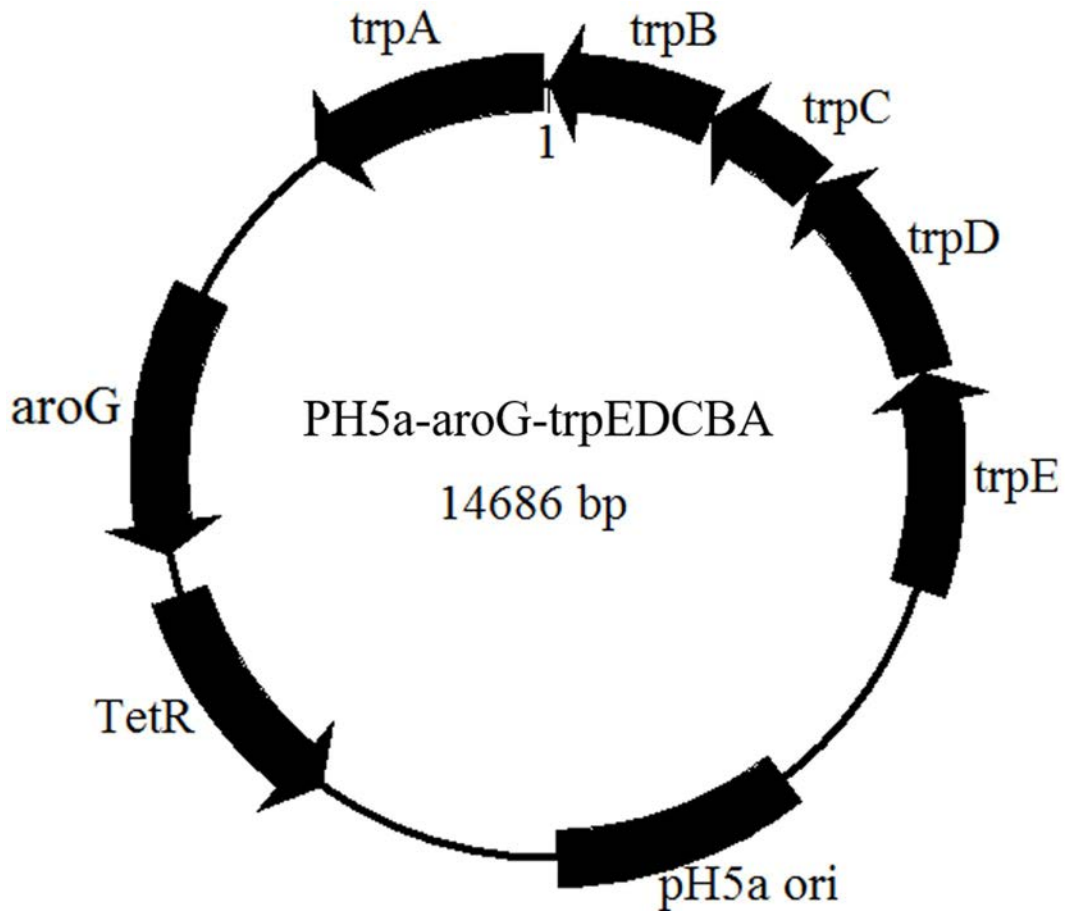


图1

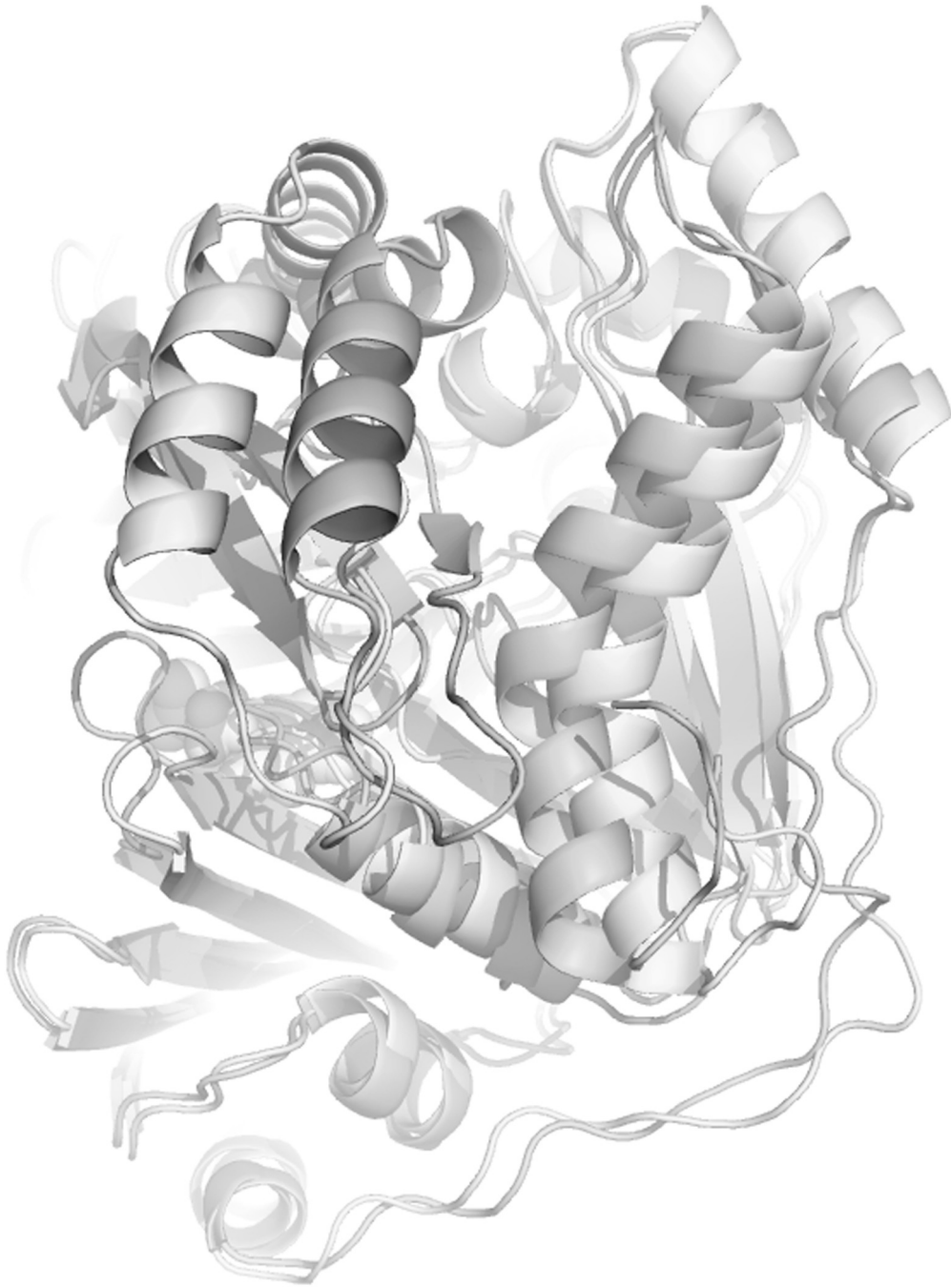


图2

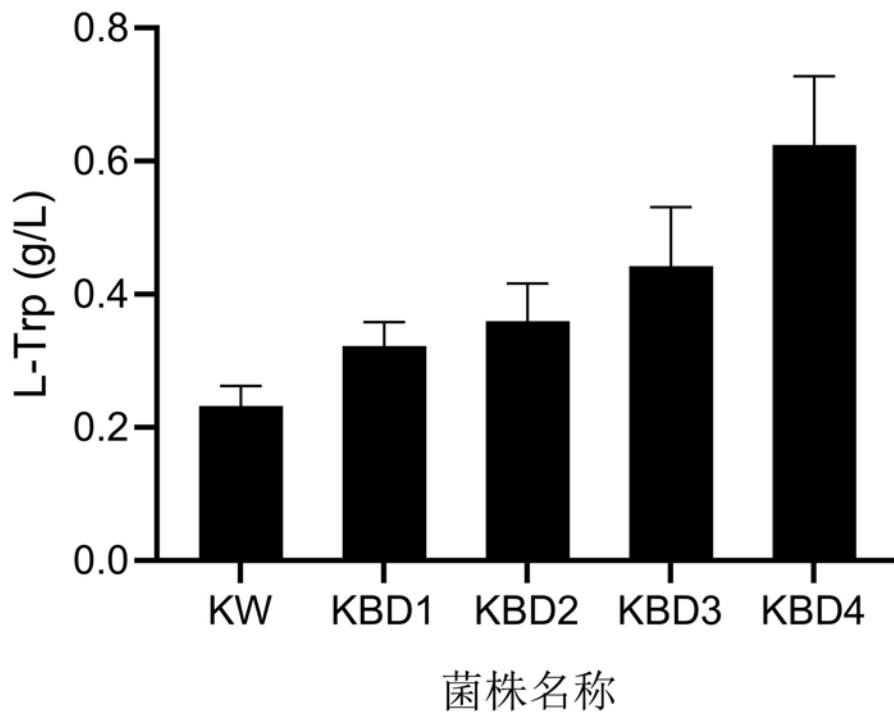


图3