



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104498394 B

(45)授权公告日 2018.03.16

(21)申请号 201410709273.3

C12P 19/26(2006.01)

(22)申请日 2014.11.27

C12R 1/125(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104498394 A

(56)对比文件

CN 103060252 A,2013.04.24,

CN 102978149 A,2013.03.20,

(43)申请公布日 2015.04.08

Yanfeng Liu et al..Modular

(73)专利权人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号

pathwayengineeringof Bacillus subtilis for improved N-acetylglucosamine production.《Metabolic Engineering》.2014,全文,特别是表1.

(72)发明人 陈坚 刘龙 堵国成 李江华

马文龙 刘延峰 朱妍萩 顾洋

张显.高产乙偶姻枯草芽孢杆菌的代谢工程改造.《中国博士学位论文全文数据库 基础科学辑》.2014,摘要,正文第37页4.1节、第39页4.2.6节、第50页4.4.1节、第52页5.1节.

(74)专利代理机构 北京爱普纳杰专利代理事务所(特殊普通合伙) 11419

代理人 张勇

审查员 管冰

(51)Int.Cl.

C12N 1/20(2006.01)

C12N 15/75(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

序列表4页

(54)发明名称

一种乙酰氨基葡萄糖产量提高的重组枯草芽孢杆菌

(57)摘要

本发明公开了一种乙酰氨基葡萄糖产量提高的重组枯草芽孢杆菌,属于遗传工程领域。本发明是以重组枯草芽孢杆菌BSGN6-P_{xy1A}-g1mS作为出发菌株,通过同源重组敲除α-乙酰乳酸合成酶编码基因和α-乙酰乳酸脱羧酶编码基因,阻断了宿主菌由丙酮酸生成乙偶姻和2,3-丁二醇的途径。在已敲除alsS和alsD的宿主菌内,过量表达来源于酿酒酵母的氨基葡萄糖乙酰化酶编码基因,加强乙酰氨基葡萄糖合成途径,提高了重组枯草芽孢杆菌中乙酰氨基葡萄糖的产量,达到38.46g/L,为进一步代谢工程改造枯草芽孢杆菌生产氨基葡萄糖奠定了基础。

1. 一种乙酰氨基葡萄糖产量提高的重组枯草芽孢杆菌,其特征在于,是以枯草芽孢杆菌BSGN6-P_{xy1A}-g1mS为出发菌株,敲除其 α -乙酰乳酸合成酶编码基因和 α -乙酰乳酸脱羧酶编码基因,并表达氨基葡萄糖乙酰化酶;所述出发菌株是以枯草芽孢杆菌168为基础,基因型作如下改造: Δ nagP Δ gamP Δ gamA Δ nagA Δ nagB Δ ldh Δ pta::lox72,并以木糖诱导启动子P_{xy1A}调控表达氨基葡萄糖合成酶基因g1mS;所述 α -乙酰乳酸合成酶编码基因如NCBI-Gene ID:936852所示, α -乙酰乳酸脱羧酶编码基因如NCBI-GeneID:936857所示。

2. 一种构建权利要求1所述重组枯草芽孢杆菌的方法,其特征在于,通过同源重组敲除敲除 α -乙酰乳酸合成酶编码基因和 α -乙酰乳酸脱羧酶编码基因,阻断宿主菌由丙酮酸生成乙偶姻和2,3-丁二醇的途径,在已敲除alsS和alsD的宿主菌内,运用表达载体pP43NMK过量表达酿酒酵母来源的氨基葡萄糖乙酰化酶编码基因。

3. 一种应用权利要求1所述重组枯草芽孢杆菌发酵生产氨基乙酰葡萄糖的方法,其特征在于,是将种子培养液转入发酵培养基,于30-37℃、200-220rpm条件下培养44-52h。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述发酵培养基按g/L计含有:玉米浆干粉20,酵母粉20,K₂HPO₄·3H₂O 12.5,KH₂PO₄2.5,CaCO₃5,微量元素15ml/L;微量元素溶液按g/L计含有:MnSO₄·5H₂O 1.0,Coc1₂·6H₂O 0.4,NaMoO₄·2H₂O 0.2,ZnSO₄·7H₂O 0.2,Alcl₃·6H₂O 0.1,Cuc1₂·H₂O 0.1,H₃BO₄0.05,含5M HCl。

5. 权利要求1所述重组枯草芽孢杆菌在氨基乙酰葡萄糖生产中的应用。

一种乙酰氨基葡萄糖产量提高的重组枯草芽孢杆菌

技术领域

[0001] 本发明涉及一种乙酰氨基葡萄糖产量提高的重组枯草芽孢杆菌,尤其是一种通过同源重组敲除alsS和alsD提高重组枯草芽孢杆菌乙酰氨基葡萄糖产量的方法,属于遗传工程领域。

背景技术

[0002] 乙酰氨基葡萄糖是生物体内的一种单糖,广泛存在于细菌、酵母、霉菌、植物以及动物体内。在人体中,乙酰氨基葡萄糖是糖胺聚糖二糖单元的合成前体,其对修复和维持软骨及关节组织功能具有重要作用。因此,乙酰氨基葡萄糖被广泛作为药物和营养膳食添加来治疗和修复关节损伤。此外,乙酰氨基葡萄糖在化妆品和制药领域也具有诸多应用。目前,乙酰氨基葡萄糖主要采用酸解虾壳或蟹壳中甲壳素生产,此方法产生的废液对环境污染较为严重,而且得到的产品易引起过敏反应,不适宜海鲜过敏的人群服用。

[0003] 枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)是一种被广泛用作食品酶制剂及重要营养化学品的生产宿主,其产品被FDA认证为“generally regarded as safe”(GRAS)安全级别。因此,运用代谢工程手段构建重组枯草芽孢杆菌是生产食品安全级乙酰氨基葡萄糖的有效途径。

[0004] 本发明通过阻断乙偶姻的合成以减弱糖酵解途径,避免了重组*B. subtilis*中心碳代谢溢流造成的乙偶姻、2,3-丁二醇等副产物大量积累,进而提高氨基糖合成代谢通量以进一步提高GlcNAc产量。

发明内容

[0005] 本发明要解决的第一个技术问题是提供一种乙酰氨基葡萄糖产量提高的重组枯草芽孢杆菌,是以枯草芽孢杆菌BSGN6-P_{xy1A}-g1mS为出发菌株,同时敲除 α -乙酰乳酸合成酶编码基因(alsS)和 α -乙酰乳酸脱羧酶编码基因(alsD),并表达了氨基葡萄糖乙酰化酶。

[0006] 所述枯草芽孢杆菌BSGN6-P_{xy1A}-g1mS是以枯草芽孢杆菌168为基础,基因型作如下改造: Δ nagP Δ gamP Δ gamA Δ nagA Δ nagB Δ ldh Δ pta::lox72,并以木糖诱导启动子P_{xy1A}调控表达g1mS基因。

[0007] 所述枯草芽孢杆菌BSGN6-P_{xy1A}-g1mS的构建方法参见:Modular pathway engineering of *Bacillus subtilis* for improved N-acetylglucosamine production. Yanfeng Liu, et al. *Metabolic Engineering*, 23 (2014) p42-52.

[0008] 所述 α -乙酰乳酸合成酶编码基因如NCBI-Gene ID:936852所示, α -乙酰乳酸脱羧酶编码基因如NCBI-Gene ID:936857所示。

[0009] 所述氨基葡萄糖乙酰化酶编码基因(GNA1)来源于酿酒酵母。

[0010] 本发明要解决的另一个技术问题是提供一种构建上述重组枯草芽孢杆菌的方法,通过同源重组敲除敲除 α -乙酰乳酸合成酶编码基因(alsS)和 α -乙酰乳酸脱羧酶编码基因(alsD),阻断宿主菌由丙酮酸生成乙偶姻和2,3-丁二醇的途径,在已敲除alsS和alsD的宿

主菌内,运用表达载体pP43NMK过量表达酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* S288C)中氨基葡萄糖乙酰化酶编码基因(GNA1),通过改造代谢途径,实现乙酰氨基葡萄糖产量的提高。

[0011] 本发明还提供了一种应用所述重组枯草芽孢杆菌发酵生产氨基乙酰葡萄糖的方法,是将种子培养液转入发酵培养基,于30-37℃、200-220rpm条件下培养44-52h。

[0012] 所述发酵培养基按g/L计含有:玉米浆干粉20,酵母粉20,K₂HPO₄·3H₂O 12.5, KH₂PO₄2.5, CaCO₃5,微量元素15ml/L;微量元素溶液(g/L):MnSO₄·5H₂O 1.0,CoCl₂·6H₂O 0.4,NaMoO₄·2H₂O 0.2,ZnSO₄·7H₂O 0.2,AlCl₃·6H₂O 0.1,CuCl₂·H₂O 0.1,H₃BO₄0.05,含5M HCl。

[0013] 本发明提供的重组枯草芽孢杆菌可提高乙酰氨基葡萄糖在胞外积累,其浓度可达到38.46g/L,为进一步代谢工程改造枯草芽孢杆菌生产氨基葡萄糖奠定了基础。本发明提供的重组枯草芽孢杆菌构建方法简单,便于使用,具有很好地应用前景。

具体实施方式

[0014] 种子培养基(g/L):胰蛋白胨10,酵母粉5,NaCl 10。

[0015] 发酵培养基(g/L):玉米浆干粉20,酵母粉20,K₂HPO₄·3H₂O 12.5, KH₂PO₄2.5, CaCO₃5,微量元素15ml/L;微量元素溶液(g/L):MnSO₄·5H₂O 1.0,CoCl₂·6H₂O 0.4, NaMoO₄·2H₂O0.2,ZnSO₄·7H₂O 0.2,AlCl₃·6H₂O 0.1,CuCl₂·H₂O 0.1,H₃BO₄0.05,含5M HCl。

[0016] 培养条件:将37℃、200rpm下培养12h的种子以5%的接种量转入发酵培养基,于37℃、200rpm条件下培养48h。

[0017] 乙酰氨基葡萄糖的测定方法:高效液相色谱(HPLC)检测法:Agilent 1200,RID检测器,NH₂柱(250×4.6mm,5μm),流动相:70%乙腈,流速0.75mL/min,柱温30℃,进样体积为10μL。

[0018] 实施例1敲除α-乙酰乳酸合成酶编码基因(alsS)和α-乙酰乳酸脱羧酶编码基因(alsD)

[0019] 根据NCBI上公布的枯草芽孢杆菌168(ATCC No.27370)的α-乙酰乳酸合成酶编码基因(alsS)和α-乙酰乳酸脱羧酶编码基因(alsD)上下游序列,设计敲除框同源臂扩增引物,左臂上下游引物分别为:alsSD-L-F:5'-CCATGTATAGAGTAGGCCATGCTTCTTTAGC-3'和

[0020] alsSD-L-R:

[0021] 5'-AGGATCCCCGGGTACCGAGCTCCACCCTCACTCCTTATTATGCATTTTAAACGTAAAA-3';右臂上下游引物分别为:alsSD-R-F:

[0022] 5'-GTCGACCTGCAGGCATGCAAGCAAGAAAAAAGAAAGCCCCTTTTAGCAGGG-3'和alsSD-R-R:5'-CTACTGCGCTGTGAGAAGCAAAATCAG-3'。运用上述引物从枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis* 168)基因组中扩增敲除框中包含的左臂和右臂。根据NCBI上公布的p7Z6质粒序列(南京农业大学,闫新博士惠赠,NCBI accession no.EU541492),设计引物,扩增博来霉素抗性基因(zeo),上下游引物分别为:alsSD-Z-F:

[0023] 5'-TTTTACGTTTAAAATGCATAATAAGGAGTGAGGGTGGAGCTCGGTACCCGGGGATCCT-3'和alsSD-Z-R:5'-

[0024] CCCTGCTAAAAGGGGCTTTCTTTTTTTCTTGCTTGCATGCCTGCAGGTCGAC-3'。通过融合PCR方法,将敲除框左、右臂及抗性基因融合为敲除框。通过测序确认alsSD敲除框构建成功,序列如SEQ ID NO.9所示。

[0025] 实施例2重组枯草芽孢杆菌的构建

[0026] 将构建好的敲除框转化枯草芽孢杆菌BSGN6-P_{xy1A}-g1mS,通过博来霉素抗性平板筛选、菌落PCR验证,确认 α -乙酰乳酸合成酶编码基因(alsS)和 α -乙酰乳酸脱羧酶编码基因敲除成功,得到重组枯草芽孢杆菌BSGN10。

[0027] 根据NCBI上公布的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) S288C(ATCC 204508)中氨基葡萄糖乙酰化酶编码基因(GNA1),设计引物GNA1-F:

[0028] 5'-GGGGTACCATTATAGGTAAGAGAGGAATGTACACATGAGCTTACCCGATGGATTTTATA-3', GNA1-R:5'-CCCAAGCTTCTATTTTCTAATTTGCATTTCCACG-3'。使用上述引物从酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae* S288C)基因组中扩增氨基葡萄糖乙酰化酶编码基因(GNA1)。扩增片段经KpnI和HindIII双酶切后连接至pP43NMK表达载体。酶切验证并测序,确认重组质粒pP43-GNA1构建成功。

[0029] 将构建好的表达载体pP43-GNA1转化枯草芽孢杆菌BSGN10。采用GNA1-F及GNA1-R引物挑选转化子进行菌落PCR,出现480bp条带,验证重组枯草芽孢杆菌构建成功。

[0030] 实施例3发酵生产乙酰氨基葡萄糖

[0031] 将37℃、200rpm下培养12h的种子以5%的接种量转入发酵培养基,于37℃、200rpm条件下培养48h。发酵48h,发酵上清液中乙酰氨基葡萄糖含量达到38.46g/L,比未敲除alsS、alsD的对照菌30.25g/L提高了27.1%。通过敲除 α -乙酰乳酸合成酶编码基因(alsS)和 α -乙酰乳酸脱羧酶编码基因(alsD),并且在已敲除nagP宿主中过量表达氨基葡萄糖乙酰化酶编码基因(GNA1),实现了乙酰氨基葡萄糖在重组枯草芽孢杆菌胞外产量的提高。

[0032] 虽然本发明已以较佳实施例公开如上,但其并非用以限定本发明,任何熟悉此技术的人,在不脱离本发明的精神和范围内,都可做各种的改动与修饰,因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

[0001]

核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

序列表

<110> 江南大学

<120> 一种乙酰氨基葡萄糖产量提高的重组枯草芽孢杆菌

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 31

<212> DNA

<213> alsSD-L-F

<400> 1

ccatgtatag agtaggccaat gcttcittag c

31

<210> 2

<211> 58

<212> DNA

<213> alsSD-L-R

<400> 2

aggatccccg ggtaccgagc tcaccctca ctccttatta tgcattttaa acgtaaaa

58

<210> 3

<211> 52

<212> DNA

- <213> alsSD-R-F
- <400> 3
gtcgacctgc aggcattgcaa gcaagaaaaa aagaaagccc ctlttagcag gg 52
- <210> 4
<211> 27
<212> DNA
<213> alsSD-R-R
- <400> 4
ctactgcgct gtcagaagca aaatcag 27
- [0002] <210> 5
<211> 58
<212> DNA
<213> alsSD-Z-F
- <400> 5
ttttacgttt aaaatgcata ataaggagtg aggggtggagc toggtagccg gggatcct 58
- <210> 6
<211> 52
<212> DNA
<213> alsSD-Z-R
- <400> 6
ccctgctaaa aggggctttc ttttttctt gcttgcattg ctgcaggctg ac 52

	<210> 7	
	<211> 59	
	<212> DNA	
	<213> GNA1-F	
	<400> 7	
	ggggtaccat tataggaag agaggaatgt acacatgagc ttaccgatg gattttata	59
	<210> 8	
	<211> 34	
	<212> DNA	
	<213> GNA1-R	
	<400> 8	
[0003]	cccaagcttc tattttctaa ttgcatttc cacg	34
	<210> 9	
	<211> 2126	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<400> 9	
	ccatgtatag agtaggccaat gcttctttag caacagtaat aattgggtca tctcttaaat	60
	ccctcaatcgt aattgalccc ttagaagtca atgggtgttg cttaggcaaa gctaaaacac	120
	aagggctgct ttgggcggtt tcgatafgta aagctgtatg ctgtaaggga ggatgaagta	180
	taccaatafc aatgttgecc tttagtagct cctcctgctg cctagacgag gatatttcac	240
	gcagttctat ttccacagat gggaattttt tacgataltc cggacaate ggcggcagaa	300
	attcatatgt agctgatccg acaaaaccga ttacgagaag gccttgctcg ccgcgggccg	360

	iccgtgtgc cagtcaatt cctgtccga ttgcatcaa tgccatgagg caatgattta	420
	aaaagatttc tcelgtgcg glaagctega caaatcgllt lgtcctlltc agaagcgtaa	480
	ctccgacttc tctccage tgtttgatet gctggctgag aggaggctgc gtcattgtca	540
	gccgccgggc agcctttccg aatgaagct cctcggctac tgcgataaag tattgaagat	600
	ggcgaagctc catcaatat gcattccttt ccalaggfta ataattcgtt ttacatatta	660
	atcataaggc gaatcgatat tggaggctcaa ttccaaaga gtgtatagtg aaacttatca	720
	caagatattt aaaattttac gtttaaaatg cataataagg agtgagggtg gagctcggta	780
	cccggggatc ctctagagat tctaccgttc gtatagcata cattatacga agttatcttg	840
	atatggcttt ttatattgtt tactctacat acagaaagga ggaactaaat atggccaagt	900
	tgaccagtgc cgttccgggtg ctcaaccgcgc gcgacgtcgc cggagcggtc gatttctgga	960
	ccgaccggct cgggttctcc cgggacttcg tggaggacga cttcggccgt gtggtccggg	1020
	acgacgtgac cctgttcatc agcgcggctc aggaccaggf ggtgccggac aacaccctgg	1080
	cctgggtgtg ggtgcgcggc ctggacgagc tctacgccga gggtcggag gtcgttcca	1140
	cgaacttccg ggacgectcc gggccggcca tgaccgagat cggcgagcag ccgtgggggc	1200
	gggagttcgc cctgcgcgac ccggccggca actgcgtgca cttcgtggcc gaggagcagg	1260
[0004]	actgaataac tctglatagc atacattata cgaacggtag aatcgtcgc ctgcaggcat	1320
	gcaagcaaga aaaaaagaaa gccccttta gcagggttt cttttattt ggctcttttc	1380
	ctgattttag ataaaaaac atcaaacag taaagggtg gtctgatgaa aatattggtt	1440
	ttggcagtgc alccatata ggagacctca gttglaata aggcgtgggc tgaggaattg	1500
	agtaaacaatg acaatatac agtacgggat ctttataagg aatacccgga tgaagcgata	1560
	gatgttgcga aggaacagca gctgtgcgag gaatacgate ggattgtctt tcaattccg	1620
	ctatattggt acagctctcc gccgctcttg aaaaaatggc aggatcttgt gctgacttat	1680
	ggctgggctt ttggttcaga aggaaatgcc ttgcatggca aggagctgat gctggctgta	1740
	tcaacaggga gcgaagcggg aaaatatcaa gcggggggag caaatcatta ctgatcagt	1800
	gagctattga aaccatttca ggccacgagt aatctgatcg gcatgaagta tctcctcca	1860
	tatgtttct atggcgtgaa ttatgcagct gcagaggata ttctcacag tgcaaacgg	1920
	ttagccgaat acatccagca gccctttgtt taaaatacag ccctgtccaa catacggcag	1980
	ggctgtattt gtttaaaat ccggcagctc agacaggfta tttccttga tgcctccgg	2040
	ttcaactcgc aaaatgtcac gcccgtattt atggaagaca tcaacatgag cgagtttcc	2100
	tgattttgct tctgacagcg cagtag	2126