



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112442475 B

(45) 授权公告日 2021.04.30

(21) 申请号 202110133699.9

C12P 13/14 (2006.01)

(22) 申请日 2021.02.01

C12R 1/15 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 112442475 A

(56) 对比文件

CN 103088081 A, 2013.05.08

WO 2015052350 A3, 2015.07.16

(43) 申请公布日 2021.03.05

CN 108359630 A, 2018.08.03

(73) 专利权人 天津科技大学

CN 101065484 A, 2007.10.31

地址 300457 天津市滨海新区经济技术开发区第十三大街9号

户红通等. 超声辅助细胞转型的谷氨酸发酵工艺.《食品与发酵工业》.2019,

(72) 发明人 徐庆阳 刘景阳 李燕军 张成林

审查员 修旺珊

(74) 专利代理机构 天津市三利专利商标代理有限公司 12107

代理人 李蕊

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/77 (2006.01)

权利要求书2页 说明书5页
序列表5页

(54) 发明名称

一种L-谷氨酸生产菌株及其构建方法与应用

(57) 摘要

本发明提供了一种L-谷氨酸生产菌株及其构建方法与应用,所述L-谷氨酸生产菌株通过基因敲除实现细胞壁和细胞膜的双转型控制,获得具有缺陷的谷氨酸棒杆菌,进而解决生物素亚适量菌株在发酵后期出现的菌体活力下降等问题,采用“双开关”发酵生产L-谷氨酸,通过交替控制D-谷氨酸和生物素两个转型“开关”,达到菌体快速转型和提高菌体发酵后期菌体活力的效果。

1.L-谷氨酸生产菌株在发酵生产L-谷氨酸方面的应用,所述L-谷氨酸生产菌株是由下述方法得到的:敲除谷氨酸棒杆菌GDK-9基因组中的cg12509基因,获得基因敲除菌株谷氨酸棒杆菌GDK-9 Δ cg12509,其中所述基因cg12509序列为SEQ ID NO.1,具体发酵生产方法如下:

(1) 菌株活化:将谷氨酸棒杆菌GDK-9 Δ cg12509从-80℃冰箱中取出,接种于斜面培养基上,传代两次,得到活化菌株;所述斜面培养基为:蛋白胨5 g/L,牛肉膏10 g/L,酵母粉4 g/L,玉米浆干粉25 mL/L, KH_2PO_4 1 g/L, MgSO_4 0.2 g/L,NaCl 1 g/L,琼脂粉25 g/L,甲硫氨酸0.2 g/L,pH=6.8-7.0;

(2) 制备种子液:用无菌水将斜面上的菌株洗脱,全部接种到含有种子培养基的种子罐中,发酵控制条件:温度控制在34℃,溶氧控制在30-50%,pH通过氨水控制在6.8-7.2;所述种子培养基为:葡萄糖35 g/L,玉米浆干粉15 g/L,豆浓22 mL/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 3g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L,蛋氨酸0.5 g/L,苏氨酸 1 g/L,丁二酸1 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 5 mg/L, VB_1 0.5 mg/L, VB_3 0.5 mg/L, VB_5 0.5 mg/L, VB_{12} 0.5 mg/L,氯化胆碱0.1 g/L,甜菜碱0.1 g/L,D-谷氨酸 2g/L;

(3) 发酵:当种子液的 OD_{600} 达到20时,将种子液按20%的接种量接种到含有发酵培养基的发酵罐中,当发酵罐中的 OD_{600} 值达到20时开始流加玉米浆,流加玉米浆浓度为0.5-1.5 g/L;发酵控制条件:初始温度控制在34℃,每4 h升温0.5℃,升温至37℃停止;溶氧通过转速和通风控制在30-50%;pH通过流加氨水控制在6.8-7.2;所述发酵培养基: $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.8 g/L, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 mg/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 3.5 g/L,KCl 1.8 g/L, VB_1 0.5 mg/L, VB_3 0.5 mg/L, VB_5 0.5 mg/L, VB_{12} 0.5 mg/L,糖蜜1.2 g/L,玉米浆干粉2.5 g/L,豆粕水解液15 mL/L,氯化胆碱0.1 g/L,甜菜碱0.1 g/L,D-谷氨酸 2g/L。

2. 根据权利要求1所述的L-谷氨酸生产菌株在发酵生产L-谷氨酸方面的应用,其特征在于:所述L-谷氨酸生产菌株的构建方法的具体步骤如下:

(1) 同源性片段cg12509F和cg12509R的制备:以谷氨酸棒杆菌GDK-9菌体的DNA为模板,使用扩增引物cg12509F F1和cg12509F F2进行PCR扩增 cg12509F片段,使用扩增引物cg12509R R1和cg12509R R2进行PCR扩增 cg12509R片段,其中cg12509F F1和cg12509R R2的5'端分别加入限制性内切酶XbaI和HindIII的线性载体同源序列,其中,限制性内切酶XbaI线性载体同源序列为TCTAGA,限制性内切酶HindIII的线性载体同源序列为AAGCTT,同时对扩增后的cg12509F片段和cg12509R片段进行回收;所述引物cg12509F F1、cg12509F F2、cg12509R R1和cg12509R R2的序列依次为序列表SEQ ID NO.2-5所示序列;

(2) 重叠PCR:用扩增出的上下游同源臂作为模板,以cg12509F F1和cg12509R R2作为引物,进行重叠PCR,获得cg12509中间缺失的重叠片段 Δ cg12509;

(3) 重组质粒的构建:对质粒p K18mobsac B用XbaI和HindIII进行双酶切线性化,所述质粒p K18mobsac B序列为序列表SEQ ID NO.6所示序列,然后将重叠片段 Δ cg12509与线性化后的pK18mobsacB进行连接,构成重组质粒pK18mobsac B Δ cg12509,然后将重组质粒转化至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,涂布于0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的卡那霉素抗性平板,进行验证,筛选出携带质粒的单菌落;摇管培养,并提取出重组质粒pK18mobsacB Δ cg12509;

(4) 将提出的重组质粒pK18mobsacB Δ cg12509电转到谷氨酸棒杆菌GDK-9的感受态菌株中并涂布于0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度的卡那霉素抗性平板,32℃培养24小时;挑选单菌落进行PCR,

琼脂糖凝胶电泳检验PCR片段长度是1700-1750为发生单交换的单菌落,同时将挑选出的菌株用体积分数为20%的甘油保藏;

(5) 将发生单交换的单菌落接入摇管,32℃培养,分别在2h、4h、6h接50μL培养液涂布于含有10%蔗糖的BHI平板;挑选单菌落进行pcr,并将单菌落对点于含有10%蔗糖的BHI平板和含0.01μg/mL浓度的卡那霉素抗性的BHI平板,挑选能在含有10%蔗糖的BHI平板上生长而不能在卡那霉素抗性的BHI平板上生长的单菌落,对其进行琼脂糖凝胶电泳检验,PCR片段长度是1300为发生双交换的单菌落,同时将挑选出的菌株用体积分数为20%的甘油保藏,此时获得的菌株即为谷氨酸棒杆菌GDK-9 Δ cg12509。

一种L-谷氨酸生产菌株及其构建方法与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程技术领域,尤其是一种L-谷氨酸生产菌株及其构建方法与应用。

背景技术

[0002] L-谷氨酸,又名 α -氨基戊二酸,是一种酸性氨基酸,是世界上最大的氨基酸产品,其既可以缓解肝毒,治疗肝昏迷症,又是制取味精、食品添加剂、化妆品等产品的前体物质,因此被广泛应用于食品、医药、化工和饲料行业,目前谷氨酸年产量近200多万吨,各种产品出口50多个国家,产值近200亿,市场潜力巨大,前景广阔。目前L-谷氨酸大规模工业化生产的方法是微生物发酵法,其中发酵最常利用的菌株为生物素亚适量型菌株,其具有产酸稳定、提取收率高、发酵周期短、不易染菌、放罐体积小和经济效益好等优点,但是随着近几年温度敏感型菌株的出现,生物素亚适量菌株在产酸量和糖酸转化率等方面劣势明显,因此,如何提高生物素亚适量型菌株的产酸量和糖酸转化率成了生物素亚适量型菌株发酵生产L-谷氨酸的研究重点。

[0003] 谷氨酸棒杆菌是一种革兰氏阳性菌,其细胞壁的主要组成成分为肽聚糖,它是由线性糖链经短肽交联形成的多聚体。糖链由N-乙酰葡萄糖胺和N-乙酰胞壁酸通过 β -1,4糖苷键交替连接而成,短肽通常由4-5个氨基酸组成,连接在N-乙酰胞壁酸上形成四肽尾,而D-谷氨酸是四肽尾的重要组成成分。

[0004] 目前生物素亚适量型菌株发酵采用的方法是在发酵液中限量添加生物素,使得菌体在翻倍的过程中,由于生物素亚适量无法形成完整的细胞膜从而加强L-谷氨酸的分泌。但是,另一方面由于生物素是三羧酸循环中关键酶的辅酶,生物素的限量使得菌体在发酵后期活力下降,进而产酸能力也出现下降。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题在于提供一种L-谷氨酸生产菌株。

[0006] 本发明所要解决的技术问题在于提供上述L-谷氨酸生产菌株的构建方法。

[0007] 本发明所要解决的技术问题在于提供上述L-谷氨酸生产菌株的应用。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明的技术方案是:

[0009] 一种L-谷氨酸生产菌株,是由下述方法得到的:敲除谷氨酸棒杆菌GDK-9(购自天津科技大学代谢工程研究室)基因组中的cg12509基因,获得基因敲除菌株谷氨酸棒杆菌GDK-9 Δ cg12509,其中所述基因cg12509序列为SEQ ID NO.1。

[0010] 上述L-谷氨酸生产菌株的构建方法,具体步骤如下:

[0011] (1) 同源性片段cg12509F和cg12509R的制备:以谷氨酸棒杆菌GDK-9菌体(购自天津科技大学)的DNA为模板,使用扩增引物cg12509F F1和cg12509F F2进行PCR扩增cg12509F片段,使用扩增引物cg12509R R1和cg12509R R2进行PCR扩增cg12509R片段(其中cg12509F F1和cg12509R R2的5'端分别加入限制性内切酶XbaI和HindIII的线性载体同

源序列,其中,限制性内切酶XbaI线性载体同源序列为TCTAGA,限制性内切酶HindIII的线性载体同源序列为AAGCTT,cg12509F F2和cg12509R R1有22bp的重叠区域),同时对扩增后的cg12509F片段和cg12509R片段进行回收;所述引物cg12509F F1、cg12509F F2、cg12509R R1和cg12509R R2的序列依次为序列SEQ ID NO.2-5所示序列;

[0012] (2)重叠PCR:用扩增出的上下游同源臂作为模板,以cg12509F F1和cg12509R R2作为引物,进行重叠PCR,获得cg12509中间缺失的重叠片段 Δ cg12509;

[0013] (3)重组质粒的构建:对质粒p K18mobsac B(序列见序列SEQ ID NO.6所示序列)用XbaI和HindIII进行双酶切线性化,然后将重叠片段 Δ cg12509与线性化后的pK18mobsacB进行连接,构成重组质粒p K18mobsac B Δ cg12509,然后将重组质粒化转至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,涂布于0.05 μ g/mL(kan50)浓度的卡那霉素抗性平板,进行验证,筛选出携带质粒的单菌落;摇管培养,并提取出重组质粒pK18mobsacb Δ cg12509;

[0014] (4)将提出的重组质粒pK18mobsacb Δ cg12509电转到谷氨酸棒杆菌GDK-9的感受态菌株中并涂布于0.01 μ g/mL(kan10)浓度的卡那霉素抗性平板,32 $^{\circ}$ C培养24小时;挑选单菌落进行PCR,琼脂糖凝胶电泳检验PCR片段长度是1700-1750左右为发生单交换的单菌落,同时将挑选出的菌株用体积分数为20%的甘油保藏;

[0015] (5)将发生单交换的单菌落接入摇管,32 $^{\circ}$ C培养,分别在2h、4h、6h接50 μ L培养液涂布于含有10%蔗糖的BHI平板;挑选单菌落进行pcr,并将单菌落对点于含有10%蔗糖的BHI平板和含0.01 μ g/mL(kan10)浓度的卡那霉素抗性的BHI平板,挑选能在含有10%蔗糖的BHI平板上生长而不能在卡那霉素抗性的BHI平板上生长的单菌落,对其进行琼脂糖凝胶电泳检验,PCR片段长度是1300为发生双交换的单菌落,同时将挑选出的菌株用体积分数为20%的甘油保藏,此时获得的菌株即为谷氨酸棒杆菌GDK-9 Δ cg12509。

[0016] 上述L-谷氨酸生产菌株在发酵生产L-谷氨酸方面的应用。

[0017] 优选的,上述L-谷氨酸生产菌株的应用,具体发酵生产方法如下:

[0018] (1)菌株活化:将谷氨酸棒杆菌GDK-9 Δ cg12509从-80 $^{\circ}$ C冰箱中取出,接种于斜面培养基上,传代两次,得到活化菌株;所述斜面培养基为:蛋白胨5 g/L,牛肉膏10 g/L,酵母粉4 g/L,玉米浆干粉25 mL/L,KH₂PO₄1 g/L,MgSO₄0.2 g/L,NaCl1 g/L,琼脂粉25 g/L,甲硫氨酸0.2 g/L,pH=6.8-7.0;

[0019] (2)制备种子液:用无菌水将斜面上的菌株洗脱,全部接种到含有种子培养基的种子罐中,发酵控制条件:温度控制在34 $^{\circ}$ C,溶氧控制在30-50%,pH通过氨水控制在6.8-7.2;所述种子培养基为:葡萄糖35 g/L,玉米浆干粉15 g/L,豆浓22 mL/L,K₂HPO₄·3H₂O 3g/L,MgSO₄·7H₂O 1 g/L,蛋氨酸0.5 g/L,苏氨酸 1 g/L,丁二酸1 g/L,FeSO₄·7H₂O 5 mg/L,MnSO₄·H₂O 5 mg/L,VB₁ 0.5 mg/L,VB₃ 0.5 mg/L,VB₅ 0.5 mg/L,VB₁₂ 0.5 mg/L,氯化胆碱0.1 g/L,甜菜碱0.1 g/L,D-谷氨酸 2g/L;

[0020] (3)发酵:当种子液的OD₆₀₀达到20时,将种子液按20%的接种量接种到含有发酵培养基的发酵罐中,当发酵罐中的OD₆₀₀值达到20-40时开始流加玉米浆,流加玉米浆浓度为0.5-1.5 g/L;发酵控制条件:初始温度控制在34 $^{\circ}$ C,每4 h升温0.5 $^{\circ}$ C,升温至37 $^{\circ}$ C停止;溶氧通过转速和通风控制在30-50%;pH通过流加氨水控制在6.8-7.2;所述发酵培养基:MnSO₄·H₂O 10 mg/L,MgSO₄·7H₂O 1.8 g/L,FeSO₄·7H₂O 5 mg/L,Na₂HPO₄·12H₂O 3.5 g/L,KCl 1.8 g/L,VB₁ 0.5 mg/L,VB₃ 0.5 mg/L,VB₅ 0.5 mg/L,VB₁₂ 0.5 mg/L,糖蜜1.2 g/L,

玉米浆干粉2.5 g/L,豆粕水解液15 ml/L,氯化胆碱0.1 g/L,甜菜碱0.1 g/L,D-谷氨酸2g/L。

[0021] 有益效果:

[0022] 上述L-谷氨酸生产菌株通过基因敲除实现细胞壁和细胞膜的双转型控制,获得具有缺陷的谷氨酸棒杆菌,进而解决生物素亚适量菌株在发酵后期出现的菌体活力下降等问题,采用“双开关”发酵生产L-谷氨酸,通过交替控制D-谷氨酸和生物素两个转型“开关”,达到菌体快速转型和提高菌体发酵后期菌体活力的效果。具体体现在:

[0023] (1)D-谷氨酸是细胞壁肽聚糖四肽尾的重要组成成分,通过敲除cgl2509基因,使得菌体丧失合成D-谷氨酸的能力,进而使得菌体无法形成结构紧密的细胞壁,成为细胞壁缺陷细胞,从而加强细胞膜的通透性,为谷氨酸棒杆菌提供另一种转型方式。

[0024] (2)“双开关”发酵控制的实现途径,主要是在发酵开始时限量添加生物素,同时适量添加D-谷氨酸,当生物素耗尽时,菌体细胞膜缺陷开始第一次转型,菌体的剩余生长会继续利用D-谷氨酸,同时完成转型;当D-谷氨酸耗尽时,菌体继续进行剩余生长,这时由于细胞壁缺陷而引起的第二次转型就开始了,当菌体完成第二次转型时,向发酵液中添加一定量的玉米浆,由于玉米浆中含有生物素,因此菌体由于生物素亚适量添加而导致的缺陷细胞膜会逐渐修复,第一次转型丧失,但因为此时D-谷氨酸缺陷带来的第二次转型已经完成,因此菌体能继续分泌谷氨酸。同时,由于玉米浆的添加导致发酵液中生物素含量的上升,进而加强了菌体的三羧酸循环,提高了菌体活力,进一步加强了菌体的产酸能力,最终,实现了L-谷氨酸的高产。

具体实施方式

[0025] 下面结合具体实施例对本发明所述技术方案作进一步的说明。除非特别说明,本发明中所用的技术手段均为本领域技术人员所公知的方法。另外,实施方案应理解为说明性的,而非限制本发明的范围,本发明的实质和范围仅由权利要求书所限定。对于本领域技术人员而言,在不背离本发明实质和范围的前提下,对这些实施方案中的物料成分和用量进行的各种改变或改动也属于本发明的保护范围。

[0026] 实施例1

[0027] 敲除谷氨酸棒杆菌GDK-9(购自天津科技大学代谢工程研究室)基因组中的cgl2509基因,获得基因敲除菌株GDK-9 Δ cgl2509,所述基因cgl2509的序列为序列表SEQ ID NO.1所示序列:

[0028] (1)同源性片段cgl2509F和cgl2509R的制备:以谷氨酸棒杆菌GDK-9菌体的DNA为模板,使用扩增引物cgl2509F F1和cgl2509F F2进行PCR扩增 cgl2509F片段,使用扩增引物cgl2509R R1和cgl2509R R2进行PCR扩增 cgl2509R片段(其中cgl2509F F1和cgl2509R R2的5'端分别加入限制性内切酶XbaI和HindⅢ的线性载体同源序列,其中,限制性内切酶XbaI线性载体同源序列为TCTAGA,限制性内切酶HindⅢ的线性载体同源序列为AAGCTT,cgl2509F F2和cgl2509R R1有22bp的重叠区域),同时对扩增后的cgl2509F片段和cgl2509R片段进行回收;所述引物cgl2509F F1、cgl2509F F2、cgl2509R R1和cgl2509R R2的序列依次为序列表SEQ ID NO.2-5所示序列;

[0029] (2)重叠PCR:用扩增出的上下游同源臂作为模板,以cgl2509F F1和cgl2509R R2

作为引物,进行重叠PCR,获得cg12509中间缺失的重叠片段 Δ cg12509;

[0030] (3) 重组质粒的构建:对质粒pK18mobsacB(序列见序列表SEQ ID NO.6所示序列)用限制性内切酶XbaI和HindIII进行双酶切线性化,然后将重叠片段 Δ cg12509与线性化后的pK18mobsacB进行连接,构成重组质粒pK18mobsacB Δ cg12509;然后将重组质粒化转至大肠杆菌DH5 α 感受态细胞中,涂布于0.05 μ g/mL (kan50)浓度的卡那霉素抗性平板,进行验证,筛选出携带质粒的单菌落;摇管培养,并提取出重组质粒pK18mobsacB Δ cg12509;

[0031] (4) 将提出的重组质粒pK18mobsacB Δ cg12509电转到谷氨酸棒杆菌GDK-9的感受态菌株中并涂布于0.01 μ g/mL (kan10)浓度的卡那霉素抗性平板,32 $^{\circ}$ C培养24小时;挑选单菌落进行PCR,琼脂糖凝胶电泳检验PCR片段长度是1700-1750为发生单交换的单菌落,同时将挑选出的菌株用体积分数为20%的甘油保藏;

[0032] (5) 将发生单交换的单菌落接入摇管,32 $^{\circ}$ C培养,分别在2h,4h,6h接50 μ L培养液涂布于含有10%蔗糖的BHI平板。挑选单菌落进行pcr,并将单菌落对点于含有10%蔗糖的BHI平板和含0.01 μ g/mL (kan10)浓度的卡那霉素抗性的BHI平板,挑选能在含有10%蔗糖的BHI平板上生长而不能在卡那霉素抗性的BHI平板上生长的单菌落,对其进行琼脂糖凝胶电泳检验,PCR片段长度是1300为发生双交换的单菌落,同时将挑选出的菌株用体积分数为20%的甘油保藏,此时获得的菌株即为谷氨酸棒杆菌GDK-9 Δ cg12509。

[0033] 实施例2

[0034] 利用构建的菌株GDK-9 Δ cg12509采用“双开关”发酵技术进行L-谷氨酸发酵。

[0035] (1) 菌株活化:将谷氨酸棒杆菌GDK-9 Δ cg12509从-80 $^{\circ}$ C冰箱中取出,接种于斜面培养基上,传代两次,得到活化菌株;所述斜面培养基为蛋白胨5 g/L,牛肉膏10 g/L,酵母粉4 g/L,玉米浆干粉25 mL/L,KH₂PO₄ 1 g/L,MgSO₄ 0.2 g/L,NaCl 1 g/L,琼脂粉25 g/L,甲硫氨酸0.2 g/L,pH=6.8-7.0;

[0036] (2) 制备种子液:用无菌水将斜面上的菌株洗脱,全部接种到含有种子培养基的种子罐中;发酵控制条件:温度控制在34 $^{\circ}$ C,溶氧控制在30-50%,pH通过氨水控制在6.8-7.2;所述种子培养基为:葡萄糖35 g/L,玉米浆干粉15 g/L,豆浓22 mL/L,K₂HPO₄ \cdot 3H₂O 3g/L,MgSO₄ \cdot 7H₂O 1 g/L,蛋氨酸0.5 g/L,苏氨酸 1 g/L,丁二酸1 g/L,FeSO₄ \cdot 7H₂O 5 mg/L,MnSO₄ \cdot H₂O 5 mg/L,VB₁ 0.5 mg/L,VB₃ 0.5 mg/L,VB₅ 0.5 mg/L,VB₁₂ 0.5 mg/L,氯化胆碱0.1 g/L,甜菜碱0.1 g/L,D-谷氨酸 2g/L;

[0037] (3) 发酵:当种子液的OD₆₀₀达到20时,将种子液按20%的接种量接种到含有发酵培养基的发酵罐中,当发酵罐中的OD₆₀₀达到30时开始以0.1 r/min的速率流加1g/L的玉米浆;发酵控制条件:初始温度控制在34 $^{\circ}$ C,每4 h升温0.5 $^{\circ}$ C,升温至37 $^{\circ}$ C停止;溶氧通过转速和通风控制在30-50%;pH通过流加氨水控制在6.8-7.2;所述发酵培养基:MnSO₄ \cdot H₂O 10 mg/L,MgSO₄ \cdot 7H₂O 1.8 g/L,FeSO₄ \cdot 7H₂O 5 mg/L,Na₂HPO₄ \cdot 12H₂O 3.5 g/L,KCl 1.8 g/L,VB₁ 0.5 mg/L,VB₃ 0.5 mg/L,VB₅ 0.5 mg/L,VB₁₂ 0.5 mg/L,糖蜜1.2 g/L,玉米浆干粉2.5 g/L,豆粕水解液15 mL/L,氯化胆碱0.1 g/L,甜菜碱0.1 g/L,D-谷氨酸 2g/L。

[0038] 实施例3

[0039] 参照实施例2,不同之处在于当发酵罐中的OD₆₀₀达到20时开始流加玉米浆。

[0040] 实施例4

[0041] 参照实施例2,不同之处在于当发酵罐中的OD₆₀₀达到40时开始流加玉米浆。

[0042] 实施例5

[0043] 参照实施例2,不同之处在于流加的玉米浆浓度为0.5 g/L。

[0044] 实施例6

[0045] 参照实施例2,不同之处在于流加的玉米浆浓度为1.5 g/L

[0046] 实施例7

[0047] 参照实施例2,不同之处在于所使用的菌株为出发菌株GDK-9,采用常规生物素亚适量发酵工艺,即发酵过程中不流加玉米浆,仅通过生物素亚适量来控制菌株转型。

[0048] 上述实施例2-7中生物量、L-谷氨酸产量和转型时间见表1。

[0049] 表1实施例生物量、L-谷氨酸产量和转型时间对比指标

[0050]

	生物量 (OD ₆₀₀)	L-谷氨酸产量 (g/L)	转型时间 (h)
实施例2	48	168	3
实施例3	43	153	5
实施例4	47	162	4
实施例5	40	163	3
实施例6	46	165	3
实施例7	39	159	4

[0051] 由表1可知,通过对实施例2、实施例3和实施例4的对比分析发现,当OD₆₀₀在30左右开始流加玉米浆时,效果最好。玉米浆流加开始时间太早,第一次转型还没有完成,此时流加的玉米浆带来的生物素会使菌体细胞膜完善,进而使得第一次转型失败,大大延后了菌体的转型;玉米浆流加时间太晚,后续弥补的生物素对于菌体活力的提升不明显。从实施例2、实施例5和实施例6的数据可以看出,随着玉米浆浓度的提高,菌体的OD₆₀₀和产酸量先升高后降低,出现这种现象是因为如果玉米浆浓度太低,则不足以提高菌体活力;反之玉米浆浓度太高,过高的营养物质和渗透压反而会降低菌体活力,从而影响菌体生长和产酸。实施例2与实施例7,即本发明所用菌株和发酵方法与传统发酵方法,这两种方法的数据对比分析可以得出本发明在生物量OD₆₀₀和L-谷氨酸产量方面分别达到了48和168 g/L,提高了23%和5.6%,转型时间提前了1个小时。

[0052] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 天津科技大学
- [0003] <120> 一种L-谷氨酸生产菌株及其构建方法与应用
- [0004] <160> 6
- [0005] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0006] <210> 1
- [0007] <211> 857
- [0008] <212> DNA
- [0009] <213> gene
- [0010] <220>
- [0011] <221> gene
- [0012] <222> (1) .. (857)
- [0013] <400> 1
- [0014] atgatggcaa ccgtgactga tttcagtgga tctatgattg aacgccccgt gccaggtgct 60
- [0015] gatgcgccga ttggaatddd tgattctgga gttggcggat taaccgtagc tgcacaatc 120
- [0016] atcgatcaat tgccacatga atcagttatt tatatcggtg tgatactgcc aatggccctt 180
- [0017] atggtccggt gcctatcgtc aaggtccgtg agcacgccat ccgcatgtcc gatgagttgg 240
- [0018] tggaacgcgg atgcaagatg attgtcattg cctgcaacac tgcgtccgct gcgtttctcc 300
- [0019] gagatgcccc tgaacgatac agtgtgccag tcgtggaagt tattcttccc gcagtaaggc 360
- [0020] gtgcggtggc atccaccgcg aatggcaaag tgggcgtgat cggcacagtg ggaaccatta 420
- [0021] actccggtgc gtaccaggat cttttctctg caagcccctc cattgtggtc aacgcagtgg 480
- [0022] catgcccacg gtttgtggat ttcgtggaac gcggaattac cagcggcagg cagatcctca 540
- [0023] acattgcgca ggattattta gagcctttgc aagcagaagg ggtggacacc ctcgtgcttg 600
- [0024] gatgcacca ctatccactg ctttccggtg tcattcagtt ggcaatgggg gaccacgtaa 660
- [0025] gtttggcttc tagcgcggaa gaaactgcga aagacgtgct gagaatddd agccagcaag 720
- [0026] atcttttagc cgatccggac atgcatctg agccaagtta tagctttgaa tcaacaggcg 780
- [0027] atccgaaat ctttgcgcaa ttaagccgcc gattccttgg accaattggt tcccaagtga 840
- [0028] gacaaaacga gggataa 857
- [0029] <210> 2
- [0030] <211> 43
- [0031] <212> DNA
- [0032] <213> primer
- [0033] <220>
- [0034] <221> primer_bind
- [0035] <222> (1) .. (43)
- [0036] <400> 2
- [0037] ggtaccgggg gatcctctag aatcaacca atgagactgc ctt 43
- [0038] <210> 3
- [0039] <211> 39
- [0040] <212> DNA
- [0041] <213> primer

[0042] <220>
 [0043] <221> primer_bind
 [0044] <222> (1)..(39)
 [0045] <400> 3
 [0046] cccccattgc caactgaatg cgataggcaa cggaccata 39
 [0047] <210> 4
 [0048] <211> 19
 [0049] <212> DNA
 [0050] <213> primer
 [0051] <220>
 [0052] <221> primer_bind
 [0053] <222> (1)..(19)
 [0054] <400> 4
 [0055] attcagttgg caatggggg 19
 [0056] <210> 5
 [0057] <211> 43
 [0058] <212> DNA
 [0059] <213> primer
 [0060] <220>
 [0061] <221> primer_bind
 [0062] <222> (1)..(43)
 [0063] <400> 5
 [0064] acgacggcca gtgccaagct tctaccctt cccttcaga ggt 43
 [0065] <210> 6
 [0066] <211> 5719
 [0067] <212> DNA
 [0068] <213> plasmid
 [0069] <220>
 [0070] <221> old_sequence
 [0071] <222> (1)..(5719)
 [0072] <400> 6
 [0073] tgccgcaagc actcagggcg caagggctgc taaaggaagc ggaacacgta gaaagccagt 60
 [0074] ccgcagaaac ggtgctgacc ccggatgaat gtcagctact gggctatctg gacaagggaa 120
 [0075] aacgcaagcg caaagagaaa gcaggtagct tgcagtgggc ttacatggcg atagctagac 180
 [0076] tggcggttt tatggacagc aagcgaaccg gaattgccag ctggggcgcc ctctgtaag 240
 [0077] gttgggaagc cctgcaaagt aaactggatg gctttcttgc cgccaaggat ctgatggcgc 300
 [0078] aggggatcaa gatctgatca agagacagga tgaggatcgt ttcgatgat tgaacaagat 360
 [0079] ggattgcacg caggttctcc ggccgcttgg gtggagagc tatteggcta tgactgggca 420
 [0080] caacagaaa tcggctgctc tgatgccgcc gtgttccggc tgtcagcgea ggggcgccc 480
 [0081] gttctttttg tcaagaccga cctgtccggt gccctgaatg aactccaaga cgaggcagcg 540
 [0082] cggctatcgt ggctggccac gacggcgctt ccttgccgag ctgtgctcga cgttgctact 600
 [0083] gaagcgggaa gggactggct gctattgggc gaagtgccgg ggcaggatct cctgtcatct 660

[0084]	caccttgctc	ctgccgagaa	agtatccatc	atggctgatg	caatgcggcg	gctgcatacg	720
[0085]	cttgatccgg	ctacctgccc	attcgaccac	caagcgaaac	atcgcacgca	gcgagcacgt	780
[0086]	actcggatgg	aagccggctc	tgctgatcag	gatgatctgg	acgaagagca	tcaggggctc	840
[0087]	gcgccagccg	aactgttcgc	caggctcaag	gcgcggatgc	ccgacggcga	ggatctcgtc	900
[0088]	gtgacccatg	gcatgacctg	cttgccgaat	atcatggtgg	aaaatggccg	cttttctgga	960
[0089]	ttcatcgact	gtggccggct	gggtgtggcg	gaccgctatc	aggacatagc	gttggtacc	1020
[0090]	cgtgatattg	ctgaagagct	tggcggcgaa	tgggctgacc	gcttctcgt	gctttacgg	1080
[0091]	atcgccgctc	ccgattcga	gcgcatcgcc	ttctatcgcc	ttcttgacga	gttcttctga	1140
[0092]	gcgggactct	gggttcgct	agaggatcga	tcctttttaa	cccatcacat	atacctgccg	1200
[0093]	ttcactatta	tttagtga	tgagatatta	tgatattttc	tgaattgtga	ttaaaaaggc	1260
[0094]	aactttatgc	ccatgcaaca	gaaactataa	aaaatacaga	gaatgaaaag	aaacagatag	1320
[0095]	atTTTTtagt	tcttttagcc	cgtagtctgc	aaatcctttt	atgattttct	atcaaacaaa	1380
[0096]	agaggaaaat	agaccagttg	caatccaaac	gagagtctaa	tagaatgagg	tcgaaaagta	1440
[0097]	aatcgcgcgg	gtttgttact	gataaagcag	gcaagaccta	aaatgtgtaa	agggcaaagt	1500
[0098]	gtatactttg	gcgtcacccc	ttacatattt	taggtctttt	tttattgtgc	gtaactaact	1560
[0099]	tgccatcttc	aaacaggagg	gctggaagaa	gcagaccgct	aacacagtac	ataaaaaagg	1620
[0100]	agacatgaac	gatgaacatc	aaaaagttg	caaaacaagc	aacagtatta	acctttacta	1680
[0101]	ccgactgct	ggcaggaggc	gcaactcaag	cgtttgcgaa	agaaacgaac	caaaagccat	1740
[0102]	ataaggaaac	atacggcatt	tcccatatta	cagccatga	tatgctgcaa	atccctgaac	1800
[0103]	agcaaaaaaa	tgaaaaatat	caagtttctg	aatttgattc	gtccacaatt	aaaaatatct	1860
[0104]	cttctgcaaa	aggcctggac	gtttgggaca	gctggccatt	acaaaacgct	gacggcactg	1920
[0105]	tcgcaaaacta	tcacggctac	cacatcgtct	ttgcattagc	cggagatcct	aaaaatgcgg	1980
[0106]	atgacacatc	gatttcatag	ttctatcaaa	aagtcggcga	aacttctatt	gacagctgga	2040
[0107]	aaaacgctgg	ccgcgtcttt	aaagacagcg	acaattcga	tgcaaatgat	tctatcctaa	2100
[0108]	aagaccaaac	acaagaatgg	tcaggttcag	ccacatttac	atctgacgga	aaaatccgtt	2160
[0109]	tattctacac	tgatttctcc	ggtaaacatt	acggcaaaca	aacactgaca	actgcacaag	2220
[0110]	ttaacgtatc	agcatcagac	agctctttga	acatcaacgg	tgtagaggat	tataaatcaa	2280
[0111]	tctttgacgg	tgacggaaaa	acgtatcaaa	atgtacagca	gttcatcgat	gaaggcaact	2340
[0112]	acagctcagg	cgacaacccat	acgctgagag	atcctcacta	cgtagaagat	aaaggccaca	2400
[0113]	aatacttagt	atTTgaagca	aacactggaa	ctgaagatgg	ctaccaagc	gaagaatctt	2460
[0114]	tatttaacaa	agcatactat	ggcaaaagca	catcattctt	ccgtcaagaa	agtcaaaaac	2520
[0115]	ttctgaaaag	cgataaaaaa	cgcacggctg	agttagcaaa	cggcgcctct	ggtatgattg	2580
[0116]	agctaaacga	tgattacaca	ctgaaaaaag	tgatgaaacc	gctgattgca	tctaacacag	2640
[0117]	taacagatga	aattgaacgc	gcgaacgtct	ttaaaatgaa	cggcaaatgg	tacctgttca	2700
[0118]	ctgactcccg	cggatcaaaa	atgacgattg	acggcattac	gtctaacgat	atttcatgc	2760
[0119]	ttggttatgt	ttctaattct	ttaactggcc	catacaagcc	gctgaacaaa	actggccttg	2820
[0120]	tgTTaaaaat	ggatcttgat	cctaacgatg	taacctttac	ttactcacac	ttcgtgtac	2880
[0121]	ctcaagcgaa	aggaaacaat	gtcgtgatta	caagctatat	gacaaacaga	ggattctacg	2940
[0122]	cagacaacaa	atcaacgttt	gcgccgagct	tctgtctgaa	catcaaagc	aagaaaacat	3000
[0123]	ctgttgtaa	agacagcatc	cttgaacaag	gacaattaac	agttaacaaa	taaaaacgca	3060
[0124]	aaagaaaatg	ccgatgggta	ccgagcga	tgaccgacca	agcgacgcc	aacctgcat	3120
[0125]	cacgagattt	cgattccacc	gccgccttct	atgaaaggtt	gggcttcgga	atcgTTTTtc	3180

[0126]	gggacgccct cgcgacgtg ctcatagtcc acgacgcccg tgattttgta gccctggccg	3240
[0127]	acggccagca ggtaggccga caggctcatg ccggccgccc ccgccttttc ctcaatcgct	3300
[0128]	cttcgttcgt ctggaaggca gtacaccttg atagggtggc tgcccttccct ggttggttg	3360
[0129]	gtttcatcag ccatccgctt gccctcatct gttacgccgg cggtagccgg ccagcctcgc	3420
[0130]	agagcaggat tcccgttgag caccgccagg tgcgaataag ggacagtga gaaggaacac	3480
[0131]	ccgctcgcgg gtgggcctac ttcacctatc ctgcccggct gacgccgttg gatacaccia	3540
[0132]	ggaaagtcta cacgaaccct ttggcaaat cctgtatatac gtgcgaaaaa ggatggatat	3600
[0133]	accgaaaaaa tcgtataat gaccccgaag cagggttatg cagcggaaaa gcgctgcttc	3660
[0134]	cctgctgttt tgtggaatat ctaccgactg gaaacaggca aatgcaggaa attactgaac	3720
[0135]	tgaggggaca ggcgagagac gatgccaaag agctcctgaa aatctcgata actcaaaaa	3780
[0136]	tacgccgggt agtgatctta tttcattatg gtgaaagttg gaacctctta cgtgccgatc	3840
[0137]	aacgtctcat tttcgccaaa agttggccca gggcttcccg gtatcaacag ggacaccagg	3900
[0138]	atattttat tctgcgaagt gatcttccgt cacaggtatt tattcggcgc aaagtgcgc	3960
[0139]	gggtgatgct gccaaactac tgatttagtg tatgatggtg tttttgaggt gctccagtgg	4020
[0140]	cttctgtttc tatcagctcc tgaaaatctc gataactcaa aaaatacgcc cggtagtgat	4080
[0141]	cttatttcat tatggtgaaa gttggaacct cttacgtgcc gatcaacgtc tcattttcgc	4140
[0142]	caaaagtgg cccagggtt cccggtatca acaggacac caggatttat ttattctgcg	4200
[0143]	aagtgatctt ccgtcacagg tatttatctg gcgcaaagt cgtcgggtga tgctgccaac	4260
[0144]	ttactgattt agtgatgat ggtgtttttg aggtgctcca gtggcttctg tttctatcag	4320
[0145]	ggctggatga tcctccagcg cggggtctc atgctggagt tcttcgcca cccaaaagg	4380
[0146]	atctaggatga agatcctttt tgataatctc atgacaaaaa tcccttaac tgagttttcg	4440
[0147]	ttcactgag cgtcagacc cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt	4500
[0148]	ctgcgcgtaa tctgctgctt gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgttg	4560
[0149]	ccggatcaag agctaccaac tcttttccg aaggttaactg gcttcagcag agcgcagata	4620
[0150]	ccaaatactg ttcttctagt gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca	4680
[0151]	ccgcctacat acctcgtct gctaactctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag	4740
[0152]	tcgtgtctta ccgggttga ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc	4800
[0153]	tgaacggggg gttcgtgcac acagcccagc ttggagcga cgacctacac cgaactgaga	4860
[0154]	tacctacagc gtgagctatg agaaagcgc acgcttccc aaggagaaaa ggccgacagg	4920
[0155]	tatccggtaa gcggcagggt cggaacagga gagcgcacga gggagcttc agggggaaac	4980
[0156]	gcctgtatc tttatagtcc tgtcgggtt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg	5040
[0157]	tgatgctcgt cagggggcg gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg	5100
[0158]	ttctggcct tttgctggcc ttttgtcac atgttcttc ctgcgttatc ccctgattct	5160
[0159]	gtggataacc gtattaccgc ctttgagtga gctgataccg ctcgccgag ccgaacgacc	5220
[0160]	gagcgcagcg agtcagtgag cgaggaagcg gaagagcgc caatacgcaa accgcctctc	5280
[0161]	cccgcgcgtt ggccgattca ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccga ctggaaagcg	5340
[0162]	ggcagtgagc gcaacgcaat taatgtgagt tagctcactc attaggcacc ccaggcttta	5400
[0163]	cactttatgc ttccggtcgt tatgtttgtt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca	5460
[0164]	ggaaacagct atgacatgat tacgaattcg agctcggtag ccggggatcc tctagagtcg	5520
[0165]	acctgcaggc atgcaagctt ggcaactggc gtcgttttac aacgtcgtga ctgggaaac	5580
[0166]	cctggcgtaa cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc ctttcgccag ctggcgtaat	5640
[0167]	agcgaagagg cccgcaccga tcgcccttc caacagttgc gcagcctgaa tggcgaatgg	5700

[0168] cgataagcta gcttcacgc 5719