



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201305332 A1

(43)公開日：中華民國 102 (2013) 年 02 月 01 日

(21)申請案號：100142830

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 22 日

(51)Int. Cl. : C12N1/21 (2006.01)

C12P7/56 (2006.01)

C12R1/07 (2006.01)

(30)優先權：2010/11/22 美國

61/416,002

(71)申請人：美國佛羅里達大學研究基金會公司 (美國) UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC. (US)

美國

(72)發明人：王青照 WANG, QINGZHAO (CN)；尚穆根 基爾納昇 T SHANMUGAM, KEELNATHAM T. (US)；英格拉姆 朗尼歐尼爾 INGRAM, LONNIE O'NEAL (US)

(74)代理人：李國光；張仲謙

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：7 共 85 頁

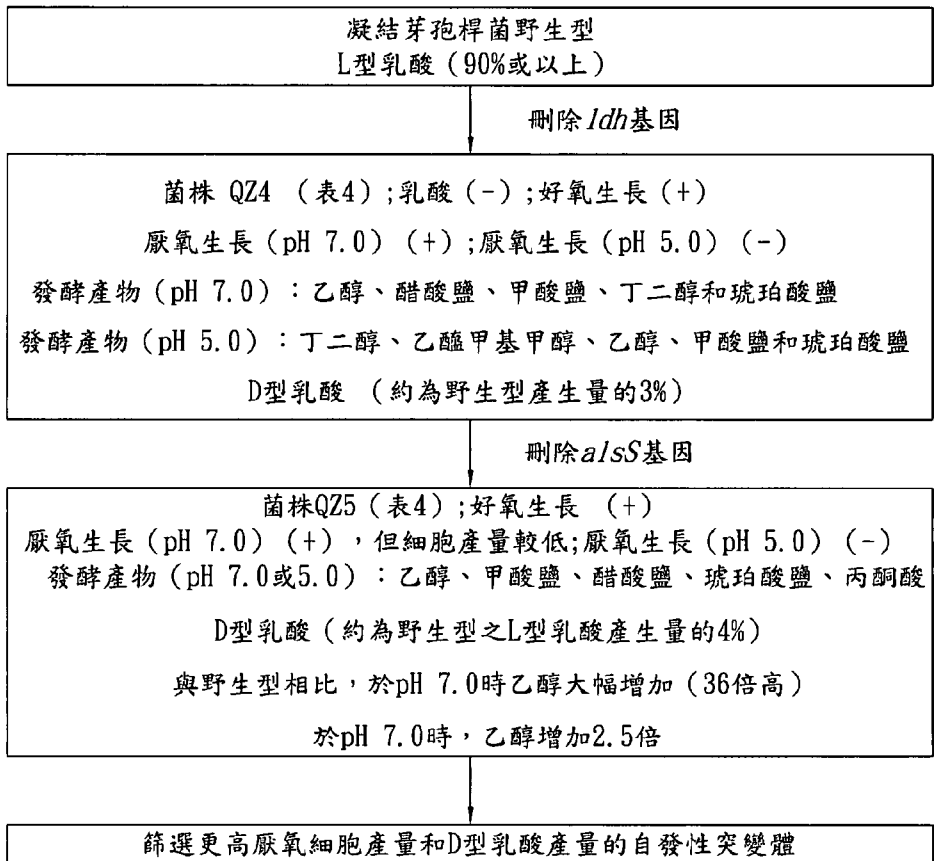
(54)名稱

製造D型〈左旋〉乳酸之耐熱凝結芽孢桿菌之遺傳工程

ENGINEERING OF THERMOTOLERANT BACILLUS COAGULANS FOR PRODUCTION OF D(-)-LACTIC ACID

(57)摘要

提供一種在溫度介於 30°C 至 55°C 之間的條件下、具有製造 D 型(左旋)乳酸之能力的基因改造微生物。在多種實施例中，微生物可能具有被失活的染色體乳酸脫氫酶(ldh)基因和/或染色體乙醯乳酸合成酶(alsS)基因。所揭露之方法中所用的範例微生物為芽孢桿菌，例如凝結芽孢桿菌。





(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 201305332 A1

(43) 公開日：中華民國 102 (2013) 年 02 月 01 日

(21) 申請案號：100142830

(22) 申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 22 日

(51) Int. Cl. :

*C12N1/21 (2006.01)*

*C12P7/56 (2006.01)*

*C12R1/07 (2006.01)*

(30) 優先權：2010/11/22 美國

61/416,002

(71) 申請人：美國佛羅里達大學研究基金會公司 (美國) UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC. (US)

美國

(72) 發明人：王青照 WANG, QINGZHAO (CN)；尚穆根 基爾納昇 T SHANMUGAM, KEELNATHAM T. (US)；英格拉姆 朗尼歐尼爾 INGRAM, LONNIE O'NEAL (US)

(74) 代理人：李國光；張仲謙

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：20 項 圖式數：7 共 85 頁

(54) 名稱

製造 D 型〈左旋〉乳酸之耐熱凝結芽孢桿菌之遺傳工程

ENGINEERING OF THERMOTOLERANT BACILLUS COAGULANS FOR PRODUCTION OF D(-)-LACTIC ACID

(57) 摘要

提供一種在溫度介於 30°C 至 55°C 之間的條件下、具有製造 D 型(左旋)乳酸之能力的基因改造微生物。在多種實施例中，微生物可能具有被失活的染色體乳酸脫氫酶(ldh)基因和/或染色體乙醯乳酸合成酶(alsS)基因。所揭露之方法中所用的範例微生物為芽孢桿菌，例如凝結芽孢桿菌。

# 發明專利說明書

(本申請書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號：100142830

※ 申請日：100 11 22

※IPC 分類：

C12N 1/21 (2006.01)

C12P 7/56 (2006.01)

C12R 1/67 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

製造 D 型 (左旋) 乳酸之耐熱凝結芽孢桿菌之遺傳  
工 程 / ENGINEERING OF THERMOTOLERANT  
*BACILLUS COAGULANS* FOR PRODUCTION OF  
D(-)-LACTIC ACID

二、中文發明摘要：

提供一種在溫度介於 30°C 至 55°C 之間的條件下、具有製造 D 型 (左旋) 乳酸之能力的基因改造微生物。在多種實施例中，微生物可能具有被失活的染色體乳酸脫氫酶 (*ldh*) 基因和/或染色體乙醃乳酸合成酶 (*alsS*) 基因。所揭露之方法中所用的範例微生物為芽孢桿菌，例如凝結芽孢桿菌。

三、英文發明摘要：

Genetically modified microorganisms having the ability to produce D(-)-lactic acid at temperatures between 30°C and 55°C are provided. In various embodiments, the microorganisms may have the chromosomal lactate dehydrogenase (*ldh*) gene and/or the chromosomal

acetolactate synthase (*alsS*) gene inactivated.  
Exemplary microorganisms for use in the disclosed  
methods are *Bacillus spp.*, such as *Bacillus coagulans*.

四、指定代表圖：

(一) 本案指定代表圖為：第(7)圖。

(二) 本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

#### 相關申請的前後參照

本申請要求於 2010 年 11 月 22 日提出之美國臨時專利申請案序號第 61/416002 號的權利，特此將該案的揭露內容，以資料參照的方式完整加入本案中，包括所有圖式、表格與核酸序列。

#### 政府支持

本發明受政府支持而成，能源部補助金編號第 DE-FG36-04GO14019 號。政府於本發明中擁有特定權利。

### 【先前技術】

石油不僅是主要的燃料來源，也是製造塑膠工業使用之多種聚合物的原料。由於石油的儲藏量是有限的，加上使用石油對環境所造成的負面衝擊，使人們將注意力逐漸轉向具替代性、可再生的燃料來源及化合物上，以期取代石油(23)。碳水化合物的發酵已被證明可製造出多種短鏈氫氧基酸，以及其他可被聚合並用以製造多種具有不同物理與化學特性之塑膠的其他化學物。在這些發酵產品中，乳酸以可做為製造可生物分解及可再生之塑膠的起始原料之主要化學物質，且因二氧化碳零排放而給環境帶來最小衝擊而受矚目。利用糖類發酵成乳酸可追溯至史前時代，而早在 1895 年(3)時，就已經

開始使用純細菌培養來生產商品化的乳酸。雖然乳酸主要用於食品和藥品產業，但若乳酸基聚合物的生產成本與石油衍生聚合物的生產成本相似，可預期乳酸衍生的生物聚合物之用途會超過上述的產業（8, 14, 18）。

乳酸被濃縮成減水乳酸，接著純化並聚合成聚乳酸（PLA），聚乳酸為一種熱塑性塑膠（18, 22）。藉由平均混合 D 型（左旋）和 L 型（右旋）乳酸，可以製造出具有多種不同物理及熱化學特性的聚合物。雖然乳酸可以用石油人造合成出來，但所生產出來的東西是兩種同質異構物的混合物，不適合用於 PLA 的製造。製造 PLA 所需的純 D 型（左旋）和純 L 型（右旋）乳酸僅能藉由微生物發酵而產生（14）。各種乳酸細菌，例如乳酸菌、乳酸球菌等等，會生產出大量的 L 型（右旋）乳酸，並從像是葡萄糖和蔗糖之類的可發酵糖類滴定出來（6, 14）。它們的營養需求很複雜，而它們的生長溫度範圍介於 30°C 到 35°C 之間。製造 D 型（左旋）乳酸做為主要發酵產物的微生物，已經被描述且目前業界正使用中（23, 34, 36）（12）。目前藉由這些微生物性生物催化劑進行乳酸發酵的溫度條件為 30°C 至 37°C 之間，預期把生長和發酵的溫度提高至 50°C 至 55°C，可將大量工業發酵所產生的污染減至最低（1）。為了降低乳酸的生產成本，也為了減少使用可食用碳水化合物做為乳酸生產的原料，替代性的可發酵糖源和微生物性生物催化劑目前正在開發中。木質纖維素生物量是一種具吸引力的糖類來源，例如葡萄糖或木糖等。然而，雖然曾數度試圖改進這些乳

酸細菌的木糖發酵特性，產業界所使用的乳酸細菌仍缺乏有效將五碳糖發酵成乳酸的能力（25, 31）。

凝結芽孢桿菌是一種產孢子乳酸細菌，生長在 50°C 到 55°C 且 pH 5.0 的環境中，且會發酵五碳糖和六碳糖（10, 27）。此細菌已被證明會在以葡萄糖和木糖進行饋料批式發酵條件下，產生濃度高達 180 克/升的 L 型（右旋）乳酸，此細菌同時也是一個讓纖維素同步醱化和發酵成純 D 型（左旋）和純 L 型（右旋）乳酸的絕佳選擇（26）。一般而言，凝結芽孢桿菌會抵抗基因工程，所以需要有製造純乳酸的方法，特別是使用經過基因工程但不含外源核酸序列的微生物。本發明一方面揭露了對此種頑抗基因工程之細菌進行基因工程的一種常規方法。使用揭露的辦法和以生長為基礎的篩選，凝結芽孢桿菌菌株 P4-102B 的發酵產物會從 L 型（右旋）乳酸變為 D 型（左旋）乳酸。工程化之生物催化劑在 48 小時以內，於 50°C 的溫度條件下，產生出濃度約達 90 克/升的 D 型（左旋）乳酸。

### 【發明內容】

提供一種具有基因改造微生物，其可在介於 30°C 至 55°C 之溫度條件下產生 D 型（右旋）乳酸。在各種實施例中，微生物可能具有失活的染色體乳酸脫氫酶（*ldh*）基因和/或失活染色體乙醯乳酸合成酶（*alsS*）基因。所揭露的方法中，利用芽孢桿菌屬做為示範微生物，例如凝結芽孢桿菌。如本揭露所產生的微生物，其可於培養

基中產生了濃度至少 60 克/升的 D 型（左旋）乳酸產物，即可至少為 70 克/升、80 克/升、90 克/升或 100 克/升。本發明亦提供一種製造和使用所揭露之基因改造微生物的方法。

### 【實施方式】

本申請案的其中一態樣係提出一種具有產生 D 型（左旋）乳酸之能力的基因改造微生物。在此態樣的各個發明實施例中，微生物可能具有染色體乳酸脫氫酶基因（*ldh*）、染色體丙酮酸甲酸裂解酶（*pflB*）基因、丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素（*pflA*）、 $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶（*alsD*）和/或染色體乙醯乳酸合成酶（*alsS*）基因的失活，而所述的微生物可為一種芽孢桿菌，例如凝結芽孢桿菌。如本揭露所述而製造出的微生物每公升培養基可生產至少有 60 克的 D 型（左旋）乳酸，即濃度至少為 70 克/升、80 克/升、90 克/升或 100 克/升。在本發明的特定態樣中，有染色體乳酸脫氫酶（*ldh*）基因、染色體丙酮酸甲酸裂解酶（*pflB*）基因和經失活的染色體乙醯乳酸合成酶（*alsS*）基因。本發明之另一態樣提出一種微生物，其具有染色體乳酸脫氫酶（*ldh*）基因和染色體乙醯乳酸合成酶（*alsS*）基因失活。根據本發明之其他態樣，提出一種微生物，其具有不同失活之酵素活性的多種組合（請見下列討論）。

「基因」一詞包括結構性基因和具有特定調控作用的區域，例如啟動子和操作子。「基因」一詞包括基因的

開放讀碼框還有上游與下游調控序列。上游調控區也被稱為是基因的啟動子區。下游調控區亦被稱為終止子序列區。可藉由符合下列狀況之染色體 DNA 中核苷酸序列的缺失，來造成 *ldh* 和 *alsS* 的失活：(1) 包含啟動子、操作子或 *ldh*、*pflA*、*pflB*、*alsD* 和/或 *alsS* 基因之同類物轉錄調控之染色體 DNA 中核苷酸序列；(2) 引入一框移 (frameshift)，使乳酸脫氫酶、丙酮酸甲酸裂解酶、丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素、 $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶和/或乙醯乳酸合成酶無法被表現成具活性之蛋白質；或(3) 編碼乳酸脫氫酶、丙酮酸甲酸裂解酶、丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素、 $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶和/或乙醯乳酸合成酶的整個結構基因或其部分已被刪除。在一較佳實施例中，提出一種微生物，其中整個編碼乳酸脫氫酶、丙酮酸甲酸裂解酶、丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素、 $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶和/或乙醯乳酸合成酶的基因已被刪除。乳酸脫氫酶基因及乙醯乳酸合成酶基因、 $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶的範例序列分別提供於序列識別號：1 及 2。丙酮酸甲酸裂解酶和丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素的編碼序列提供於序列識別號：3。

「部分結構基因」或「整個結構基因或其部分」等用語，可指結構基因部分中的單一核苷酸缺失。缺失較佳為結構基因中有 5 到 10 個核苷酸缺失，更佳為 10 到 50 個核苷酸，而最佳為 50 至 100 個核苷酸。在本發明的一態樣中，結構基因可能被整個刪除。在本發明的其他態樣中，提供了乳酸脫氫酶 (*ldh*)、丙酮酸甲酸裂解

酶 (*pflB*)、丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素 (*pflA*)、 $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶 (*alsD*) 和/或乙醯乳酸合成酶 (*alsS*) 的缺失。編碼上述酵素之基因的開放讀碼框記載於序列表上。如以下所述，*ldh* 以及 *pflA*、*pflB*、*alsS* 和 *alsD* 的任意組合可以被刪除。

在本發明的一態樣中，認為無需從外部來源引入基因或其部分，即可達成於微生物染色體中的基因突變。另一態樣則提出藉由引入一或多個點突變，或藉由將一或多個終止密碼子引入在正被改造的內源基因之開放讀碼框中，來造成內源基因的突變。在另一態樣中，則是可將內源基因的開放讀碼框從染色體 DNA 中刪除。

在某些態樣中，可引入一外源核苷酸序列以使一目標基因失活，以便選擇具有一目標表現型突變基因的細菌菌株。之後可無縫地將被引入微生物基因體的外源核苷酸序列移除，不會留下任何的外源核苷酸序列。

在一實施例中，依其產生高力價、高產量及高單位體積產率之 D 型 (左旋) 乳酸的能力，選出生物催化劑。一實施例中，提出一種生物催化劑，其每消耗一莫耳的碳源 (例如葡萄糖)，即能產生至少 0.5 莫耳的 D 型 (左旋) 乳酸。此類的生物催化劑可選擇性地利用以生長為基礎之篩選而選出。

「力價」一詞係指發酵肉湯中特定化合物的莫耳濃度。因此在製造 D 型 (左旋) 乳酸的發酵過程中，100 毫莫耳濃度的力價係指在測量時，每公升發酵肉湯中含

有 100 毫莫耳的乳酸。

「產量」一詞意指在發酵過程期間，消耗每莫耳原料所產生的特定化合物莫耳數。因此在使用葡萄糖做為原料，以製造 D 型（左旋）乳酸的發酵過程中，產量一詞代表消耗每莫耳葡萄糖所產生的 D 型（左旋）乳酸莫耳數。

「單位體積產率」一詞意指每單位時間每單位體積所產生的特定化合物之公克量。因此就 0.9 克/升·小時的 D 型（左旋）乳酸單位體積產率而言，係指在一小時的生長期間，一公升的發酵肉湯中累積了 0.9 公克的 D 型（左旋）乳酸。本文所揭露之基因改造微生物的單位體積產率範圍可高達 4 克/升·小時。舉例而言，QZ19 的單位體積產率可以達到超過 3 克/升·小時。

本揭露中使用的詞，如「力價」、「產量」和「單位體積產率」等，亦包含「常態化力價 (normalized titer)」、「常態化產量 (normalized titer)」和「常態化單位體積產率 (normalized volumetric productivity)」。在常態化力價、常態化產量和常態化單位體積產率的測定中，亦需考慮為了維持生長培養基酸鹼值而在發酵容器中加入的中和用試劑量。

「w/v」一詞意指每公升中含有的物質量（以公克為單位），單位為克/升。

本揭露中使用的「基因工程」或「基因改造」等詞，係指藉由操縱微生物的基因體去氧核糖核酸 (DNA)，以

改變微生物中一或多個酵素之表現的做法。在本揭露範圍中，可互換使用「基因改造微生物」、「基因改造菌株 (GMBS)」和「生物催化劑」三詞。在特定實施例中，多種芽孢桿菌皆屬可接受基因改造，例如凝結芽孢桿菌菌株、地衣芽孢桿菌菌株、枯草芽孢桿菌菌株、液化澱粉芽孢桿菌菌株、巨大芽孢桿菌菌株、浸麻類芽孢桿菌 (*Bacillus macerans*) 菌株、類芽孢屬菌株，或是像嗜熱桿菌芽孢 (*Geobacillus stearothermophilus*) 菌株這種嗜熱菌屬亦可接受基因改造。其它的芽孢桿菌菌株可藉由菌種中心取得，例如美國標準菌種中心 (American Type Culture Collection, ATCC)，且可依照本揭露中所述進行基因工程，使芽孢桿菌菌株可產生 D 型 (左旋) 乳酸。在本發明某些實施例中，凝結芽孢桿菌菌株 Suy27-13 和/或含有於 Suy27-13 中找到的點突變之凝結芽孢桿菌菌株，可以特別地排除在申請專利範圍的適用範圍以外。

因此，於本揭露的一態樣中，提出一種製程，藉由基因改造菌株從碳化合物中量產出大量乳酸。如本文所揭露，適合製造 D 型 (左旋) 乳酸的微生物，可用此處所揭露之一或兩步驟的製程培養。針對任何一項方法步驟，可將基因改造微生物維持在介於約 30°C 至 65°C 之間。多個不同之實施例皆試圖培養微生物在約 30°C、37°C 或 55°C 的溫度下。其他實施例則試圖在介於約 37°C 至約 65°C 之間、約 37°C 至約 55°C 之間、約 45°C 至約 60°C 之間或約 45°C 至 50°C 之間的溫度培養微生物。

「突變」或「失活」係指對基因進行基因改造，包

括開放讀碼框、上游調控區和下游調控區。基因突變會導致負調控或完全抑制基因開放讀碼框 (ORF) 的轉錄。基因突變可藉由下列方法而造成，藉由刪除全部的基因編碼區或編碼核苷酸序列的一部分、藉由在編碼區內引入一框移突變、藉由引入一錯義突變 (missense mutation)、插入破壞基因所編碼之蛋白質活性的序列以及藉由引入一終止密碼子或前述基因突變的任何組合。

本揭露中所用的「外源」一詞，係表示衍生自細胞外的一分子或一活動被引入宿主微生物內。例如將外源核酸分子引入微生物細胞中，被引入的核酸能以一獨立質體存在，或被合併入宿主染色體 DNA 裡。在某些實施例中，本文所揭露的生物催化劑中，並未找到編碼蛋白質的外源核苷酸。其他實施例則允許生物催化劑包含外源基因。外源基因 (核酸序列) 可以帶有本身之調節序列 (例如啟動子和終止子序列) 的可表現形式，而被引入微生物細胞中。另一種做法則是把外源核酸分子合併入宿主的染色體 DNA 中，並受宿主的調控序列所調控。

「內源」一詞係指自然 (天生) 出現在宿主細胞中的分子和活動。當用於指稱一生物合成活動時，「外源」一詞係指被引入宿主參照有機體 (host reference organism) 中的一活動。舉例而言，來源可以是一同源或異源編碼核酸，可表現出引入宿主細菌有機體後的參照活動 (referenced activity)。若編碼一蛋白質的核酸，從同屬的微生物有機體樣本取得，即稱為同源 DNA。若核酸乃衍生自不同屬的微生物樣本，則稱為異源 DNA。

不管 DNA 的性質為何，無論是同源或異源，在被引入宿主細胞時，DNA 和衍生自引入 DNA 的活動皆屬於外源。因此，編碼核酸的外源表現，可以利用同源或異源編碼的核酸其中之一或兩者皆用。

一態樣提出在 D 型（左旋）乳酸的生產上，表露出明顯力價、高產量和顯著單位體積產率的基因改造菌株。本發明所揭露的微生物可用於利用多種不同的糖類生產 D 型（左旋）乳酸的製造過程。在一實施例中，基因改造僅涉及操縱微生物原有基因組內的基因。在該實施例中，並無像帶有抗藥基因的質體或任何其它編碼特定酵素蛋白質之外源核苷酸序列的外源基因材料，出現在生產 D 型（左旋）乳酸之菌株中。

本發明結合特定基因之改造技術以及利用生長為基礎之篩選過程，來取得對 D 型（左旋）乳酸具有高產量、高力價和高單位體積產率的菌株。以本揭露方法製造出來的基因改造微生物菌株，接著可讓其在例如低酸鹼值等多種不同條件下生長數代，並選擇 D 型（左旋）乳酸生產力比原始親代菌株要高的菌株，和/或與親菌株相比具有較高細胞產量者。第 7 圖出示此態樣的範例圖解。這種以生長程度做為選擇具最佳表現型之菌株篩選標準的過程，被稱為生長為基礎之篩選。

在進行生長為基礎之篩選期間，反覆將基因改造菌株移至新鮮的培養基中一段時間，以顯現細菌生長快速/較多、迅速消耗不同碳源、具同時使用多種糖類的能力、

耐受碳源中有毒化學物的能力、以及對目標有機酸具有高產量與產率而對其他有機酸低產量的菌株。進行生長為基礎之篩選期間，需注意選擇具有上述之目標表現表現型的菌株。若篩選程序選出的菌株展現出非常良好的生長率，但在目標有機酸的產量上並無進步，則其並非我們所要的菌株。在揭露方法的實際作業中，選擇開始時是將改造菌株於有氧環境下進行培養、並按序將菌株於培養菌系統（例如發酵槽）中之限氧環境下進行繼代。選出能在限氧環境下生長的基因改造微生物，且繼續繼代，直到達成微嗜氧或厭氧條件為止。接著以厭氧方式，在增加酸鹼值的環境條件下培養微生物，並以微生物在培養環境下的 D 型（左旋）乳酸產量為基準來篩選微生物。針對任何一項方法步驟，可把基因改造微生物維持在介於約 30°C 和約 65°C 之間的溫度下。數個不同的實施例試圖在約 30°C、37°C 或 55°C 的溫度條件下培養微生物。其他實施例則試圖在介於約 37°C 和約 65°C 之間、介於約 37°C 和約 55°C 之間、介於約 45°C 和約 60°C 之間或介於約 45°C 和約 50°C 之間的溫度下培養微生物。

基因操作可伴隨著在基因操作階段之間的生長為基礎之篩選，而完成於數個不同的階段中。基因操作包含改變內源 DNA 序列及/或從基因體 DNA 中完全移除特定的 DNA 序列。基因操作亦可能包含在微生物的基因體 DNA 中插入一外來 DNA 序列。某些實施例中，係藉由將特定 DNA 序列從微生物基因體 DNA 中移除，且不引入任何外來 DNA，以達成基因操作的目的。某些使編碼

特定蛋白質的基因表現失活係必須的基因操作，需要將一外來 DNA 序列插入微生物的基因體中，以選出具有目標基因改造的菌株。舉例而言，外源抗生素標示基因可被用來插入並使內源基因失活，並選出具有目標基因型的菌株。在本發明的一實施例中，被引入的外源 DNA 序列最後被從微生物的基因體 DNA 中移除，以致基因工程程序結束時，有機體的結果基因體 DNA 中，只有少數或完全沒有外源 DNA，尤其是沒有外源 DNA 基因（或其部分）。技術領域中具有通常知識者已通曉達成本發明較佳實施例之目的所需的各式基因工程技術，包括在溫度升高情形下使用具不穩定性的質體（舉例而言，請見本發明範例中所討論的原料和方法）。本發明以參考資料的方式，完整併入任何引用的科學刊物和專利文件，以求提供對本發明而言屬有用的任何基因工程技術之必要資訊。

在本發明的一實施例中，可透過上述一或多種基因操作或基因工程技術，對已知可作用於發酵途徑中之一或多種編碼蛋白質的基因進行失活。可能被失活的基因和酵素包括：*ldh*，乳酸脫氫酶；以及 *alsS*，乙醃乳酸合成酶。

是故，提出下列的非有限實施例：

1. 一種細菌細胞，包括針對下列物質引起酵素活性失活的基因改造：

a) 乳酸脫氫酶以及非必要的乙醃乳酸合成酶和/

或丙酮酸甲酸裂解酶；

b) 乳酸脫氫酶和乙醯乳酸合成酶；

c) 乳酸脫氫酶、乙醯乳酸合成酶和丙酮酸甲酸裂解酶；或

d) 下列任何酵素活性之組合：乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素+丙酮酸甲酸裂解酶；乳酸脫氫酶+乙醯乳酸合成酶；乳酸脫氫酶+ $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶；乳酸脫氫酶+乙醯乳酸合成酶+ $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶+乙醯乳酸合成酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶+ $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素+乙醯乳酸合成酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素+ $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素+丙酮酸甲酸裂解酶+乙醯乳酸合成酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素+丙酮酸甲酸裂解酶+ $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素+ $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶+乙醯乳酸合成酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶+ $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶+乙醯乳酸合成酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素+丙酮酸甲酸裂解酶+ $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶+乙醯乳酸合成酶。

2. 如第 1 實施例的細菌細胞，進一步包括引起目標酵素活性失活的基因改造。

3. 如第 1 或第 2 實施例的細菌細胞，進一步包括將外源基因引入該細菌細胞中的基因改造。

4. 如第 1 或第 2 實施例的細菌細胞，其中該基因改造包括編碼乳酸脫氫酶 (*ldh*)、丙酮酸甲酸裂解酶 (*pflB*)、丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素 (*pflA*)、 $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶 (*alsD*) 和/或乙醯乳酸合成酶 (*alsS*) 之基因的突變，或編碼乳酸脫氫酶 (*ldh*)、丙酮酸甲酸裂解酶 (*pflB*)、丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素 (*pflA*)、 $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶 (*alsD*) 和/或乙醯乳酸合成酶 (*alsS*) 的基因之全部或部分缺失。

5. 如第 4 實施例的細菌細胞，該等基因的突變包括引入一或多個點突變，或是於基因開放讀碼框中引入一或多個終止密碼子。

6. 如第 1 至第 3 項實施例的細菌細胞，其中該基因改造包括乳酸脫氫酶 (*ldh*)、丙酮酸甲酸裂解酶 (*pflB*)、丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素 (*pflA*)、 $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶 (*alsD*) 和/或乙醯乳酸合成酶 (*alsS*) 之編碼序列/開放讀碼框中的一點突變或一缺失，或是於乳酸脫氫酶 (*ldh*)、丙酮酸甲酸裂解酶 (*pflB*)、丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素 (*pflA*)、 $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶 (*alsD*) 和/

或乙醯乳酸合成酶 (*alsS*) 的編碼區域/開放讀碼框中插入一外源序列。

7. 如第 1、第 2、第 4、第 5 或第 6 實施例中任一項的細菌細胞，其中該細菌細胞不含外源基因或其部分。

8. 如第 1、第 2、第 4、第 5 或第 6 實施例中任何一項所述的細菌細胞，其中可選擇使用對溫度敏感的質體，使 L 型乳酸脫氫酶、丙酮酸甲酸裂解酶和/或乙醯乳酸合成酶的酵素活性因同源重組而失活。

9. 如第 8 實施例的細菌細胞，其中該基因改造包括編碼乙醯乳酸合成酶、乳酸脫氫酶和/或丙酮酸甲酸裂解酶之核苷酸的完全或部分缺失。

10. 如第 1 至第 9 實施例中任一項的細菌細胞，其中：

a) 該細菌為一芽孢桿菌屬，例如凝結芽孢桿菌、地衣芽孢桿菌、枯草芽孢桿菌、液化澱粉芽孢桿菌、短小芽孢桿菌、環狀芽孢桿菌或解硫胺素芽孢桿菌；且

b) 其中，可將凝結芽孢桿菌 Suy27-13 選擇性地排除在申請專利範圍的適用範圍外。

11. 一種如第 1 至第 10 實施例中任一項的基因改造細菌細胞，其中該基因改造細菌細胞為 QZ15 或 QZ19。

12. 一種製造 D 型（左旋）乳酸的方法，包括在允許產生 D 型（左旋）乳酸之環境中，於含有碳源的培養基培養第 1 至第 11 實施例中任一項的基因改造細胞。

13. 如第 12 實施例的方法，進一步包括分離或純化 D 型（左旋）乳酸。

14. 如第 13 實施例的方法，其中在厭氧環境培養該菌株。

15. 如第 12 至第 14 實施例的方法，其中該培養基包括介於 2% 至 20%（w/v）之間的碳源。

16. 一種製造產生 D 型（左旋）乳酸之基因改造細菌細胞的方法，其包括：

a) 使該細菌細胞中之乳酸脫氫酶和乙醯乳酸合成酶活性的失活；

b) 在有氧和/或氧氣有限的環境下，於酸鹼值介於 3.0 至 6.0 且含有一碳源的培養基中培養該細菌細胞；

c) 選擇與親代菌株相比，展現出細胞產量增加且/或 D 型（左旋）乳酸產量增加的一細菌細胞；

d) 在厭氧環境下，於酸鹼值介於 6.5 至 8.0 且含有一碳源的培養基中培養所選的細菌細胞；且

e) 選擇與親代細菌細胞或步驟 d) 中所選的細菌細胞相比，展現出細胞量增加且/或 D 型（左旋）乳酸產量增加的一細菌細胞。

17. 如第 16 實施例所述的方法，其中執行步驟 b) 的酸鹼值條件：

a) 約為 4.5 或 5.5；或

b) 約為 5.0。

18. 如第 16 實施例所述的方法，其中執行步驟 d) 的酸鹼值條件：

a) 約為 6.5 至約為 7.5；或

b) 約為 7.0。

19. 如第 16 至第 18 實施例的方法，其中在含有持續增加之碳源的培養基中重複執行步驟 d) 和步驟 e)。

20. 如第 16 至第 18 實施例的方法，其中在含有持

續增加之碳源的培養基中重複執行步驟 b) 和步驟 c)。

21. 如第 16 至第 18 實施例的方法，其中在含有持續增加之碳源的培養基中重複執行步驟 b) 至步驟 e)。

22. 如第 12 至第 21 實施例的方法，其中碳源為葡萄糖、果糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、鼠李糖、蔗糖、纖維雙糖、半纖維素、纖維素、甘油或相關組合。

23. 如第 12 至第 15 實施例的方法，其中該發酵是在酸鹼值為下列數值之厭氧環境中所進行的：

a) 約為 6.5 至約為 7.5；或

b) 約為 7.0。

24. 如第 12 至第 22 實施例的方法，其中該基因改造細菌細胞在發酵開始後的 48 小時內，每公升發酵培養基至少產生 60 克的乳酸、每公升發酵培養基至少產生 80 克的乳酸或每公升發酵培養基至少產生 90 克的乳酸。

25. 如第 12 至第 24 實施例的方法，其中用來培養該基因改造細菌細胞的培養基之酸鹼值，係以自動加酸或加鹼來維持。

26. 如第 16 至第 23 實施例的方法，其中該基因改造細菌細胞剛開始時培養於有氧環境下，且於氧氣量逐漸減少的环境條件下，持續繼代於培養系統中，直到達成微嗜氧或厭氧條件為止。

27. 如第 16 至第 23 實施例或第 26 實施例的方法，其中細菌細胞為一芽孢桿菌屬，例如凝結芽孢桿菌、地衣芽孢桿菌、枯草芽孢桿菌、液化澱粉芽孢桿菌、短小芽孢桿菌、環狀芽孢桿菌或解硫胺素芽孢桿菌；其中可選擇性排除凝結芽孢桿菌 Suy27-13。

28. 如第 1 至第 10 實施例和第 12 至第 27 實施例中任一項的細菌細胞或方法，其中細菌細胞具有下列其中一種基因失活之組合：*ldh+pflB*；*ldh+pflA*；*ldh+pflA+pflB*；*ldh+alsS*；*ldh+alsD*；*ldh+alsS+alsD*；*ldh+pflB+alsS*；*ldh+pflB+alsD*；*ldh+pflA+alsS*；*ldh+pflA+alsD*；*ldh+pflA+pflB+alsS*；*ldh+pflA+pflB+alsD*；*ldh+pflA+alsD+alsS*；*ldh+pflB+alsD+alsS*；*ldh+pflA+pflB+alsD+alsS*；或具有下列其中一種酵素活性失活之組合：乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素+丙酮酸甲酸裂解酶；乳酸脫氫酶+乙醯乳酸合成酶；乳酸脫氫酶+ $\alpha$ -乙

醃乳酸脫羧酶；乳酸脫氫酶+乙醃乳酸合成酶+ $\alpha$ -乙醃乳酸脫羧酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶+乙醃乳酸合成酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶+ $\alpha$ -乙醃乳酸脫羧酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素+乙醃乳酸合成酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素+ $\alpha$ -乙醃乳酸脫羧酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素+丙酮酸甲酸裂解酶+乙醃乳酸合成酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素+丙酮酸甲酸裂解酶+ $\alpha$ -乙醃乳酸脫羧酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素+ $\alpha$ -乙醃乳酸脫羧酶+乙醃乳酸合成酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶+ $\alpha$ -乙醃乳酸脫羧酶+乙醃乳酸合成酶；乳酸脫氫酶+丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素+丙酮酸甲酸裂解酶+ $\alpha$ -乙醃乳酸脫羧酶+乙醃乳酸合成酶。

29. 如第 1 至第 11 實施例或第 28 實施例中任一項的細菌細胞，其中細菌細胞產生 D 型（左旋）乳酸的溫度條件介於約 30°C 和 65°C 之間；介於約 37°C 和約 65°C 之間；介於約 37°C 和約 55°C 之間；介於約 45°C 和約 60°C 之間；介於約 45°C 和約 50°C 之間；或是溫度條件為約 30°C；約 37°C；或約 55°C。

30. 如第 12 至第 28 實施例中任何一項的方法，其中方法包括培養細菌細胞的溫度條件介於約 30°C 和 65°C 之間；介於約 37°C 和約 65°C 之間；介於約 37°C 和約

55°C 之間；介於約 45°C 和約 60°C 之間；介於約 45°C 和約 50°C 之間；或是溫度條件為約 30°C；約 37°C；或約 55°C。

微生物寄存於美國農業研究培養中心，地址為美國 61604 伊利諾州沛歐瑞亞市北大學街 1815 號（表 5）。這些培養菌寄存在確保本專利申請案未決期間能取得及使用培養菌的環境條件下，一直到經 37 CFR 1.14 和 35 USC 122 相關法規授權的專利商標委員會裁定出申請結果為止。若本申請案副本或其子案提出專利申請的海外國家之專利法有所要求時，所寄存的培養菌係可取得。然而，應明白存放培養菌的可取得性，並非准許毀損政府法令授予之專利權而實行本發明。

此外，主要培養菌之寄存將根據布達佩斯條約關於微生物寄存之條款規定，進行貯存並可為公眾所取得。即，其將偕所有必要之謹慎，在完成最近一次提供寄存物樣本的要求後，使寄存物存活且不受污染達至少五年的時間；無論如何，要求自存放當日起後至少 30（三十）年，或於任何可能揭露此寄存物之專利的可實施有效期內，使寄存物存活且不受污染。若保管者在接獲要求提供寄存物，但因寄存物之狀況而無法提供樣品時，寄存者了解其有更換寄存物的責任。所有針對主要培養菌寄存物的公眾可得性限制，將在揭露這些寄存物的專利核准後，不可撤銷地移除。

為說明本發明故提出下列實施例。這些發明非以任何方式侷限本發明的適用範圍。熟習微生物領域產業技術者，即能在不違反本發明精神的情況下，以數種不同實施例實現本發明。

本發明提及或引用的所有專利、專利申請案、臨時專利申請案和刊物，係參考其整體資料而合併於本文件中，包括所有圖形和圖表，其揭露範圍與本說明書的詳盡教示無不同。

以下為說明發明實行程序的範例。不應將這些範例解讀為限制。所有百分比皆以重量為計，除非另行註解，否則所有溶液混合物比例皆以體積為計。

**第 1 例 - 建構產生 D 型（左旋）乳酸且耐熱的凝結芽孢桿菌**

### **原料與方法**

#### **菌株與質體**

先前已針對凝結芽孢桿菌野生型菌株 P4-102B 進行過說明（27）。在建構本研究所使用的各種質體期間，使用大腸桿菌菌株 Top10（Invitrogen 公司）和枯草桿菌菌株 HB1000（11）做為宿主。質體 pGK12 帶有氯黴素和紅黴素耐抗基因，並於數種革蘭式陽性細菌和大腸桿菌（17，21）中進行複製。雖然本質體具有廣泛的宿主範圍，但其複製則天生受限於 $\leq 42^{\circ}\text{C}$ 的溫度條件。由於質體 pGK12 複製體在  $50^{\circ}\text{C}$  複製之對溫度敏感的天性，因此，

提供一個機會去篩選可在 50°C 至 55°C 溫度範圍生長之具有染色體 DNA 嵌入的凝結芽孢桿菌。質體 pGK12 和其衍生物在 37°C 被保存於枯草芽孢桿菌菌株 HB1000 中，溫度條件為。當轉形進凝結芽孢桿菌時，選出轉形株並保存於 37°C 的溫度條件下。表 1 列出建構突變株所使用的質體和凝結芽孢桿菌突變菌株。

### 培養基和生長條件

依需要使用 L-broth (簡稱 LB) 培養基做為在 H 5.0 或 7.0 條件下進行細菌培養的富培養基。分開消毒葡萄糖，並在接種前按指定濃度加入培養基中。在需要時，把氯黴素、紅黴素和青黴素分別按 7.5 毫克/升、5 毫克/升和 100 毫克/升的濃度比例加入 LB 培養基中。如先前所述 (30)，用 2.5 毫升的碳酸鈣瓊脂 (懸浮於水中的固態碳酸鈣 (1% w/v) 偕 1.5% 的瓊脂) 覆蓋以葡萄糖做為營養補充 (2% w/v) 的 LB-瓊脂培養基，以製作碳酸鈣培養基。

在 200 rpm 的振盪器中培養好氧菌生長。用小型訂製發酵槽 (2) 或 2.5 公升發酵槽 (New Brunswick 牌 Scientific Bioflo 110) 進行發酵。利用自動添加 2N 或 6N 氫氧化鉀 (KOH) 將培養菌的酸鹼值維持於設定值。除非另行指定，否則在發酵開始時，按需要加入固態碳酸鈣 (Fisher Scientific 公司，賓州匹茲堡) 至濃度為 2.0% (w/v)。在相同培養基中以有氧條件培養這些培養菌的

接種 (inoculum) 過夜，溫度條件為 50°C，並用 1% (v/v) 的接種開始進行發酵。定時取出樣本，以定量發酵產物和殘留糖之濃度。

### 建構凝結芽孢桿菌的缺失突變體

依前述方法分離凝結芽孢桿菌的缺失突變體，方法中利用單一重組事件，於合適之 DNA 序列同源目標處，將含有目標基因兩端的質體 DNA 嵌入染色體。這種具有合適之抗生素抗性之重組菌株，可以利用條件複製 (replication-conditional) 質體，在限制溫度下，將完整質體從細胞質中排除，而輕易被辨識出來 (13)。接著，藉由被引入的質體 DNA 和合適染色體 DNA 進行單一同源重組，將質體 DNA 和相關的抗生素抗性基因從染色體中移除，而留下缺失之目標基因。在建構凝結芽孢桿菌的 *ldh* 基因缺失過程中，一開始使用的是無法在凝結芽孢桿菌中進行複製的質體載體。然而，使用此質體無法偵測到被引入之質體 DNA 的染色體嵌入。這可能是因為凝結芽孢桿菌菌株 P4-102B 的質體轉形效率，低於即將嵌入染色體之質體的可能重組頻率 (29)。為了克服這些低頻率狀況，質體 pGK12 被用以作為將 DNA 移轉至供缺失建構用之凝結芽孢桿菌的主要載體。質體 pGK12 於 37°C 時，在凝結芽孢桿菌中呈穩定狀態，而非 50°C。當溫度為 37°C 時，群體 ( $10^9$  CFU/毫升) 中的每個細胞中的皆有質體出現，有助於克服質體 DNA 進入該細菌的低

轉形效率。具有質體 DNA 的大量細胞群體，讓我們得以在質體 DNA 和染色體的同源區之間選出罕見的重組結果。在具有被嵌入染色體裡之質體 DNA (包含抗生素抗性基因) 的細胞群體中，質體 DNA 於細胞培養於溫度 50°C 至 55°C 後而被排除時，這些稀有的重組體可以立即被辨識出來。

### $\Delta$ ldh 突變菌株的分離

為建構 *ldh* 缺失衍生物，使用兩組引子 [引子 9 (BsaAI)、10 (EcoRI) 和 11 (EcoRI)、12 (StuI)] (請見表 2)，利用凝結芽孢細胞菌株 P4-102B 基因體 DNA 作為模板、分別放大 *ldh* 基因的 5'端和 3'端。這些引子在 5'端處具有特殊核酸內切酶辨識序列。利用 EcoRI 來水解兩個被放大的片段並接合在一起。使用接合產物做為模板 (引子 9 和 12)，以產生一無啟動子之 *ldh* 基因片段，從來自 *ldh* 基因之「ATG」中的「A」開始算 431 bp 處，於 *ldh* 基因中間缺少 100 bp 之區域。利用 BsaAI 和 StuI 水解此片段，接著和相似之經水解的質體 pGK12 (質體 pQZ44) 接合。藉由定序確認該質體中的嵌入物。質體 pQZ44 被轉形進入菌株 P4-102B，並在溫度 37°C 下選出具紅黴素抗性的菌株。以 50°C 的溫度培養其中一株轉形株 (transformant)，並選出也是 L-LDH-負型 (約 1%) 的抗紅黴素衍生物 (菌株 QZ3)。藉由合適引子進行聚合酶連鎖反應 (PCR) 以放大基因組 DNA 並將放大產物

進行定序，確定質體 DNA 存在於菌株 QZ3 染色體中的 *ldh* 基因中。在無紅黴素的培養基中進行繼代培養（sub-cultures）期間，發現菌株 QZ3 的 *ldh*-負型特性不穩定，並容易分離出 *ldh*<sup>+</sup>反突變體（revertant）。因此，將菌株 QZ3 每天連續移入 55°C 且無紅黴素的新鮮培養基（1% v/v 接種體）中，連續培養 10 天。最後的培養菌株被稀釋並平鋪在 LB 瓊脂培養基上。以 50°C 的溫度下培養過夜後，以印影平面培養法（replica plating）將菌落移往 LB 瓊脂、LB 瓊脂+紅黴素和碳酸鈣培養基（用葡萄糖和 CaCO<sub>3</sub>（30）補充養分之 LB 瓊脂）。在 LB 瓊脂上生長、而不在 LB 瓊脂+紅黴素上生長、且基於碳酸鈣培養基透明的程度而被判斷未產乳酸之菌落，被挑選後於液態培養中進行進一步乳酸生產的測試。預期第二次重組會產生對紅黴素敏感但缺乏 L-LDH 活性的衍生物，因為其 *ldh* 基因中有 100 bp 的缺失。在這些實驗中， $\Delta ldh$  的頻率為每 5000 個紅黴素敏感菌落出現 1 個。在這些  $\Delta ldh$  突變體中，選出一株菌株 QZ4 以供進一步研究之用。

運用類似方法，無法利用氯黴素抗性（chloramphenicol resistance）做為遴選標記（selective marker）來分離出  $\Delta ldh$  突變體。不論質體骨架為何，當抗氯黴素基因出現時，質體 DNA 會對準並插入染色體中的獨特位置，而此染色體中的獨特位置與質體中的凝結芽孢桿菌染色體 DNA 無關（Su 和 Rhee，未公開資料）。這些結果顯示，抗氯黴素基因不適合用於凝結芽孢桿菌

菌株中進行突變株之建構。

### $\Delta als$ 突變體的建構

缺乏乙醯乳酸合成酶活性的菌株 QZ4 突變株衍生物，並不預期會產生凝結芽孢桿菌之 *ldh* 突變株所產生的發酵產物 (30)，如乙醯甲基甲醇 (acetoin) 和丁二醇 (butanediol)。建構此雙重突變 ( $\Delta ldh \Delta als$ ) 的第一步驟，是利用引子 17 與 21，並藉由聚合酵素連鎖反應 (PCR) 及菌株 P4-102B 基因之基因體 DNA 將 *alsD* ( $\alpha$ -乙醯乳酸脫羧酶) 和 *alsS* (乙醯乳酸合成酶) 序列進行放大。將該 PCR 片段利用 T4 聚核苷酸磷酸酶處理後，與 HincII 水解後之質體載體 pUC19 接合，以形成質體 pQZ45。藉由合適引子進行定序，來驗證插入於質體 pQZ45 中的 *alsSD* DNA。藉由聚合酵素連鎖反應並使用引子 18 和 22，自僅含 *alsSD* 編碼區 (無啟動子) 之質體 pQZ45，放大含 2,380 bp 之 DNA。把放大的 DNA 選殖入質體 pUC19 的 HincII 區位內，產生質體 pQZ45-1。在 AfeI 和 HincII 進行水解後，*alsS* 中 596 bp 長之區域自質體 pQZ45-1 中被移除，並在該位置處插入紅黴素抗性基因片段。這個新質體 pQZ54 作為模板 (引子 18 和 22)，用以放大帶有在 *alsS* 中具有一 596 bp 缺失之 *alsSD* 基因和編碼紅黴素抗性之基因的具有 *alsSD* 基因的一片段。將聚合酵素連鎖反應產物藉由聚核苷酸磷酸酶磷酸化，並與利用 BsaAI 和 AfeI 水解後的質體

pGK12 接合。接著藉由電穿孔法將所產生的質體 pQZ64 轉形進入凝結芽孢桿菌菌株 QZ4，並在 37°C 的溫度條件下篩選出抗紅黴素之菌落。使用上述建構  $\Delta ldh$  的步驟，將  $\Delta alsS$  突變引入菌株 QZ4。藉此方法產生數種在好氧和厭氧環境下具有不同生長率的 *alsS* 突變體。選擇其中具有最高生長率的一突變體（菌株 QZ5）供進一步研究之用。

### 大腸桿菌、枯草芽孢桿菌和凝結芽孢桿菌的轉形 (transformation)

依據先前說明的標準技術進行大腸桿菌的轉形。依據 Boylan 和其他人 (4) 所說明的步驟加上些許變化，進行枯草桿菌菌株 HB1000 的轉形。將於 LB 培養基中處穩定生長階段中之隔夜培養菌的細菌細胞，接種 (10% v/v) 入 10 毫升新鮮配製的改造勝任培養基 (29)，其置於 125 毫升的錐形燒瓶中，其中含有 100 mM 的磷酸緩衝液 (pH 7.0)、3 mM 的三檸檬酸鈉、3mM 的硫酸鎂、2% 的葡萄糖、22 微克/毫升的檸檬酸鐵胺、0.1% 的酪蛋白水解產物和 0.2% 的穀胺酸鉀，並在 37°C 的溫度條件下加上搖動進行培養三小時。當 OD600 nm 達到約 0.6 時，將 0.6 毫升的培養菌移到一只 13 x 100 mm 的試管中，並把 DNA 加入細菌細胞。這個帶有 DNA 的細菌細胞被放置在一個旋轉裝置中，在 37°C 之溫度條件進行培養 2.5 小時。以離心法在室溫下收集細胞，再讓細胞懸浮於 0.1

毫升的 LB 培養基中，並平鋪在具有合適抗生素的 LB 瓊脂培養基上。並將瓊脂培養基培養在 37°C 的溫度下，並於隔天選出轉形株。

為了野生型凝結芽孢桿菌 P4-102B 的轉形，將在 50°C (OD<sub>420 nm</sub> 0.3) 溫度條件下，生長於 125 毫升的燒瓶之 10 毫升的 LB 培養基中的細菌細胞，接種 (10% v/v) 入 1 公升燒瓶中之 100 毫升的 LB 培養基中。將細菌細胞以震盪 (200RPM) 培養在 50°C 下約 3 至 4 小時，直到 420 nm 的吸光值達到約 0.3 至 0.5 為止。將細菌細胞以離心法 (溫度 4°C ; 4300 x g ; 10 分鐘) 收集，並用 30、25 和 15 毫升的冰冷 SG 培養基 (0.5 M 蔗糖，10% 甘油) 清洗三次。立即使用這些電勝任細胞。將 75 µl 的細胞懸浮物混合 0.1µg 的質體 DNA，把混合物移到冷凍的細胞電穿孔專用管中 (間隙 1 mm)。將電穿孔條件 (Bio-Rad 電穿孔機) 設為 1.75 KV 的方波電擊 5 ms。完成電穿孔後，把細菌細胞移到 2 毫升之預先溫熱過 (37°C 或 50°C) 的 RG 培養基 (LB 培養基加 0.5 M 的蔗糖、55.6 mM 的葡萄糖和 20 mM 的氯化鎂) 中。在平板接種入選擇性抗生素培養基之前，將這些細菌細胞移到 13 x 100 mm 大的螺蓋試管裡，再放入試管旋轉器中於溫度 50°C 下培養 3 小時。針對轉形溫度敏感型質體，再生溫度為 37°C，並將培養菌培養隔夜。針對轉形突變體 QZ4，將 DNA 的濃度增加成 1 µg 之質體 DNA，並將電穿孔條件改成 1.5 KV、25 µF 和 600 ohms，且時間常數為 10 ms。

## 針對具目標表現型之自發性突變體的生長為基礎之篩選

由於每種微生物培養菌都會有特定數量的自發性隨機突變，可以藉由提供優先支援特定突變體生長的生長條件，對具有目標表現型的突變體進行分離。由於 $\Delta ldh$   $\Delta alsS$  突變體菌株 QZ5 在 pH 5.0 的細菌培養中表現出厭氧生長缺陷，期望藉由開始新的發酵路徑（舉例而言，生產 D 型乳酸）而增加厭氧生長的突變，能具有凌駕於其他親代全體的生長優勢。欲達到更高的厭氧生長率，可能需要一個以上的突變（以開始發酵路徑或可藉由增加酵素濃度以提高該路徑的新陳代謝流量等）。可以藉由進行一連串的培养菌移轉，直到單一細胞裡的期望突變量累積足夠並顯現出可辨認的表現型時，即達成對生長率和/或產物的生產上具有增值增長效益的各種有益突變之累積。由於菌株 QZ5 屬厭氧生長缺陷，因此培養開始時是在小型的酸鹼值控制發酵槽（發酵物 250 毫升於 500 毫升容器中）中以空氣作為氣相進行菌的培养。隨著培养菌開始生長，嚴苛的氧氣限制會侷限住生長與細菌細胞的產量。欲進一步增加細胞密度，需仰賴細胞發酵出現在培养基中之糖類的能力。欲分離可厭氧生長的 QZ5 菌株之突變體衍生物，需在使用小型酸鹼值控制發酵槽的指定條件下，對發酵槽培养菌進行繼代培养（subculture）。將轉移的條件調整為不同時間與接種份量。平均而言，在培养菌適應增量糖濃度期間，在以 2% 的接種並生長經過兩或三天後進行轉移。

### 訊息核糖核酸 (mRNA) 的定量

為定量凝結芽孢桿菌中的訊息核糖核酸 (mRNA)，以離心法 (16000 x g; 30 秒, 室溫) 收集在不同條件下生長的細菌細胞。按先前所說明的酸酚萃取法來分離核糖核酸 (30)。以 260 nm 時的吸光值來定量核糖核酸濃度 (NanoVue, GE)。以針對所選基因之特定引子, 利用 Superscript III 反轉錄酶 (Invitrogen) 來製備互補去氧核糖核酸 (cDNA) 複本。藉由使用基因特定引子和含有聚合酵素連鎖反應混合物 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California) 之 SYBR-green 來定量 cDNA (mRNA) 濃度。定量含有不同濃度 cDNA 的每一聚合酵素連鎖反應之閾值循環數, 並與同時反應的標準 DNA 模板 (template) 相比較 (16)。從這些結果中計算出檢體中出現的特定基因之 (gene-specific) mRNA 濃度比例。報告之結果為至少三次實驗的平均值。RT-PCR 所使用的引子列於表 2 中; *ldh* 引子-引子 23 和引子 24, *pfl* 引子-引子 25 和引子 26, *pdhA* (*E1 $\alpha$* ) 引子-引子 27 和引子 28, *d-ldh* 引子-引子 29 和引子 30, *als* 引子-引子 31 和引子 32, 用來做為內部對照組的 *polA* 質體-引子 33 和引子 34。

### 酵素分析

為判定 PDH 和 LDH 的活性, 在 LB 培養基中培養

細菌細胞，直到培養菌達到生長之對數期至後對數期。以離心法（ $10000 \times g$ ，10 分鐘；室溫）收集細胞，用 10 毫升的磷酸鹽緩衝液（50 mM，pH 7.0）清洗一次，並懸浮於 5.0 毫升的相同磷酸鹽緩衝液中。將細菌細胞通過高壓細胞均質機（French pressure cell）（20000 PSI）以破碎細胞。此步驟之後的所有操作皆在  $4^{\circ}\text{C}$  下進行。將細胞萃取物以  $12000 \times g$  離心 30 分鐘，以移除細胞碎片，並將上清液再次以  $100000 \times g$ （Beckman）離心一小時，以移除大型微粒和膜泡。使用上清液進行酵素分析。如先前說明（33），於波長 340 nm（ $\epsilon = 6220 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ），以丙酮酸依賴（pyruvate-dependent）之菸鹼醯胺腺二核苷酸氧化態（ $\text{NAD}^+$ ）的減少，作為 PDH 活性分析）的依據。每 1 毫升反應混合物含磷酸鉀緩衝液（50 mM；pH 7.5）、焦磷酸硫酸素（0.4 mM）、輔酶 A（0.13 mM）、六水合氯化鎂（2 mM）、二硫蘇糖醇（2.6 mM）、 $\text{NAD}^+$ （0.75 mM）和未經加工的萃取物。因加入丙酮酸（5 mM）而啟動反應。按先前說明（35），在丙酮酸存在下菸鹼醯胺腺二核苷酸還原態（NADH）的氧化現象，對 LDH 活性進行分析。每 1 毫升的反應混合物含磷酸鉀緩衝液（50 mM；pH 7.5）、菸鹼醯胺腺二核苷酸還原態（NADH，0.1 mM）和未經加工的萃取物。因加入丙酮酸（25 mM）而啟動反應。藉由 Bradford 法，並以牛血清白蛋白（BSA）為標準品（5）來定量蛋白質濃度。

## 分析法

如先前所說明，藉由高效能液相層析法 (HPLC) 以 Aminex HPX 87H 離子排除層析管柱來進行葡萄糖和發酵物的測定 (32)。藉由高效能液相層析法並以光學異構物管柱 Chirex 312 (D) - 青黴胺管柱 (penicillamine column) (150 × 4.6 mm, 5 微米) (Phenomenex), 偕 2 mM 的硫酸銅 (CuSO<sub>4</sub>) 作為沖出液，以定量 D 型 (左旋) 和 L 型 (右旋) 乳酸的光學同質異構物。亦用 D 型-乳酸脫氫酶之酵素法來分析 D 型 (左旋) 乳酸 (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)。

## 材料

生物化學物質來自 Sigma 化學公司 (St. Louis, MO)，有機與無機化學物質來自 Fisher 科技公司 (Pittsburgh, PA)。分子生物試劑和耗材來自新英格蘭生物實驗室 (Ipswich, MA)、Invitrogen 或 Bio-Rad 實驗室。

## 結果與討論

例如凝結芽孢桿菌之產孢子的乳酸菌，不管其碳源 (葡萄糖、木糖、纖維雙糖等) 為何，可產生 L 型 (右旋) 乳酸作為其主要發酵物 (10, 27, 28)。此點的佐證有：不管生長酸鹼值或生長階段為何，在丙酮酸節點處編碼蛋白質的基因之間，編碼 *ldh* 基因的 mRNA 呈現最

高表現量 (表 3) (30)。自凝結芽孢桿菌中找出編碼 D 型 (左旋) 乳酸脫氫酶 (*ldhA*) 的基因，以活性態轉殖並表現在大腸桿菌中。然而，凝結芽孢桿菌發酵肉湯中的 D 型 (左旋) 乳酸量從未超過所產乳酸總量的 5%，而且大部分的發酵肉湯確實缺乏可偵測的 D 型 (左旋) 乳酸 (27)。細菌細胞裡 *ldhA* mRNA 的量低於 *ldh* mRNA 量的 5% (表 3)。

糖發酵期間，凝結芽孢桿菌亦產生了少量的醋酸鹽、乙醇和甲酸鹽，尤其是五碳糖發酵期間，例如木糖，表示存在有具活性的丙酮酸甲酸裂解酶 (27)。雖然編碼丁二醇路徑中之酵素的基因出現在凝結芽孢桿菌的經定序之基因組裡，但不管生長酸鹼值為何，野生型凝結芽孢桿菌的發酵肉湯中並未偵測到丁二醇。很明顯這是 *alsD* 操縱子在野生型中表現不良的結果 (表 3)，或是對乳酸的通量高到足以消耗完丙酮酸。為了建構能產生 D 型 (左旋) 乳酸做為主要發酵物的凝結芽孢桿菌衍生物，由 L-LDH (*ldh*) 進行催化的 L 型 (右旋) 乳酸主要發酵途徑需要被刪除，而編碼 D-LDH 的 *ldhA* 表現量則需要被提升。

### 建構一 $\Delta ldh$ 突變體

如前所述 (30)，缺乏 L-LDH 活性的凝結芽孢桿菌突變體，產生醋酸鹽、乙醇、甲酸鹽和丁二醇做為發酵產物，但無 D 型 (左旋) 乳酸。此 *ldh* 突變體 Suy27-13

在 *ldh* 基因中帶有單一鹼基變化 (single base change)，並在厭氧生長期間發生回復突變 (reversion)，尤其是在 pH 5.0 環境下生長的期間。為了克服菌株 Suy27-13 中 *ldh* 突變的高回復突變率，故將 *ldh* 基因刪除。

現有數種可在細菌內建構基因刪除的方法，其中多數皆利用帶有正向篩選基因的合適線型 DNA，正向篩選基因例如被對應目標基因 (7、20、24) 之短 DNA 序列包夾的抗生素抗性基因。然而，試圖利用線型 DNA 在凝結芽孢桿菌建構  $\Delta ldh$  突變體並未成功。可能是因為凝結芽孢桿菌的低轉形效率，加上需要由進入的 DNA 去重組產生可選擇的轉形體之故。為了克服這項限制，使用已經被證明在刪除基因上屬有用的替代方法 (13)。建構具有合適目標 *ldh* 基因序列和紅黴素抗性基因的溫度敏感質體 (質體 pQZ44)。在利用電穿孔法讓凝結芽孢桿菌菌株 P4-102B 轉形後，在有助於質體的穩定維持之 37°C 條件下，選出含質體 pQZ44 的轉型體。持續培養此含質體之衍生物，預期可藉由在 *ldh* 基因處的單一重組，將質體移動到部分群體的染色體上。在溫度 50°C 條件下生長的期間，因為質體無法在此溫度點進行複製之故，質體會被從細胞中剔除，而在 50°C 時出現的抗紅黴素菌落，被預期會在染色體 *ldh* 基因處具有質體 DNA。將這些衍生物進一步培養，將會導致誘使目標基因 *ldh* 刪除的 DNA 重新排列。此類 *ldh* 突變體其中之一菌株 QZ4，因喪失對紅黴素的抗性且缺乏作為發酵產物之乳酸而被辨識出來 (表 3 及 4)。其符合先前對 *ldh* 突變體 (30) 的

報導，甚至是在 pH 5.0 且使用葡萄糖的富培養基中，菌株 QZ4 的厭氧生長都非常微小。

### $\Delta ldh$ 菌株 QZ4 的特性

在 pH 7.0 環境下進行培養時，*ldh* 突變體菌株 QZ4 會產生乙醇作為主要發酵產物，而在 pH 5.0 環境下生長及發酵時，會產生丁二醇（表 4；第 1 圖）作為主要產物。PFL 和 PDH 兩者皆在 pH 7.0 時提供乙醯輔酶 A 以利於乙醇的製造，而根據發酵肉湯中的甲酸鹽量，計算由 PDH 所產生之乙醇約為 80%。在支持 PDH 為主（PDH-based）的乙醇製造中，於生長對數期間在 pH 7.0 發酵環境中生長的突變體，其 PDH 活性約高出兩倍（表 2）。然而，隨著培養菌進入靜止期，PDH 活性產生減退跡象，相反地，親代菌株在相同生長階段時的活性是增長的。在 5.0 環境下，無法偵測到突變體的厭氧生長，隨著氣相中之空氣而開始（限氧環境）的酸鹼值控制發酵確實能讓突變體生長。然而，隨著細胞密度的增加、氧氣變得非常有限，生長因而停止，且 pH 5.0 發酵培養菌的最後細胞產量只有親代菌株培養菌的約 1/2 而已。與 pH 7.0 的發酵相比，在這類限氧發酵中 *ldh* 突變體製造出之乙醇的量非常少。於 pH 5.0 培養菌的大部分產物為丁二醇（表 4；第 1 圖）。

在 pH 5.0 的培養菌中，*pflB* 基因的表現量相對較低，且在限氧發酵中甲酸鹽量低（表 3 及 4；第 1 圖），

這也就暗示，在酸鹼值 pH 5.0 時，*ldh* 突變體為表現型為 LDH 和 PFL 陰性。先前已報導過大腸桿菌的 *ldh*、*pfl* 雙重突變體為厭氧陰性 (15)，而相同特性同樣被帶到凝結芽孢桿菌上。雖然 *ldh* 突變體在 pH 5.0 的條件下產生丁二醇做為主要發酵產物，但其無法利用這種發酵途徑在厭氧環境下生長。顯然是因為由於引入少量氧氣至 pH 5.0 發酵反應中，確實支持更高量的丁二醇產生及相關之生長，而導致氧化還原反應不平衡之故。既然甚至在 pH 7.0 環境下生長的期間，丁二醇也是 *ldh* 突變體的重要發酵產物，故建構出缺乏 L-LDH 和 ALS 的雙重突變體菌株 QZ5。

### 凝結芽孢桿菌 $\Delta ldh \Delta als$ 雙重突變體

菌株 QZ5 為  $\Delta ldh \Delta alsS$  雙重突變體，在 pH 5.0 與 7.0 環境條件下好氧生長。只有在 pH 7.0 時，方偵測得到雙重突變體在以有氧方式開始之酸鹼控制發酵環境中厭氧生長，此為雙重突變體和親代菌株 QZ4 共有的一特性(第 2 圖)。於 pH 7.0 發酵的主要產物為乙醇、甲酸鹽、丙酮酸和醋酸鹽。雙重突變體的 pH 7.0 培養菌發酵肉湯中有大量的丙酮酸，表示結合 PDH 和 PFL 仍無法符合藉由糖解反應把葡萄糖轉換成丙酮酸的速率。不管是單一或雙重突變物，都無法產生具可偵測量的 L 型(右旋)乳酸。

由於雙重突變體產生大量的甲酸鹽和其他 PFL 活性的產物，故建構出缺乏 PFL 活性的三重突變體。然而，

這個缺乏 L-LDH、ALS 和 PFL 的三重突變體無法在所有測試條件下厭氧生長，而不再拿來做進一步的使用。

### 用以製造 D 型（左旋）乳酸的生長為基礎之篩選

雙重突變體所產生的少量乳酸為 D 型（左旋）乳酸（表 4）。可預期增加 D 型（左旋）乳酸的產量可支持雙重突變體的厭氧生長，就如同野生型菌株可以厭氧生長並以 L 型（右旋）乳酸為主要發酵產物。無論培養菌的酸鹼值如何，和野生型相比，*ldh* 突變體菌株確實製造出較高量的 *ldhA* mRNA（表 3）。突變體在 pH 5.0 環境下生長的期間，其表現非常低量的 PFL 活性（基於甲酸鹽產量）（表 4）和 *pflB* 的低表現量（表 3），這也就表示培養菌酸鹼值在 PFL 控制中扮演角色。因為 *ldhA* 的表現量增加和/或 D-LDH 的活性超過於 PFL 的活性，為了增加 pH 5.0 發酵環境中的厭氧生長率和細菌細胞產量，所以執行以生長為基礎之篩選。相對地，在具有較高 PFL 活性之 pH 7.0 環境進行類似之 *ldh*、*alsS* 雙重突變體的生長為基礎之篩選，其可誘生出具有提高活性之 PFL 而非 D-LDH 的衍生物。

以厭氧生長依賴篩選選出的菌株 QZ5 於 pH 5.0 的條件下，在使用葡萄糖發酵的 LB 培養基中經過約 120 天後產出一衍生物（第 3 圖）。QZ13 這個菌株在 pH 5.0 發酵中的細胞產量，比起始菌株 QZ5 要來得高。雖然菌株 QZ13 與其起始親代菌株 QZ5 的細胞產量和葡萄糖消耗

量，在 pH 7.0 的發酵中大略相同，但菌株 QZ13 在 pH 7.0 發酵中的 D 型乳酸產量，比 QZ5 菌株在相同酸鹼值發酵中的乳酸產量要高出約 10 倍（表 4）。由 PDH/PFL 產生之發酵產物，也從菌株 QZ5 所消耗葡萄糖的 0.85 到降低至大約 0.4。

由於菌株 QZ13 於 pH 7.0 發酵中增加 D 型乳酸的產量並伴隨減少 PFL/PDH 的衍生產物，因此於 pH 7.0 環境下，在使用葡萄糖發酵之 LB 培養基中進行進一步篩選，以求能有更好之生長和更高之細菌產量。菌株 QZ14 是在 pH 7.0 環境下連續篩選並添加養分約 40 天後衍生出來的（第 4 圖）。菌株 QZ14 的乳酸產量約為被發酵葡萄糖的 0.8，而 PFL/PDH 貢獻量也減少至約 7% 的葡萄糖衍生產物（表 4）。菌株 QZ14 的發酵肉湯依然含有可測得量的丙酮酸，暗示細胞中的 D-LDH 活性並不符合通過糖解作用的葡萄糖通量。下一組篩選著重於增加乳酸力價，以分離出能將 LDH 活性有效耦合（couple）至葡萄糖之糖解化通量的突變衍生物。在藉由增加葡萄糖濃度進行額外 60 天的序列轉移和篩選後，分離出菌株 QZ15（第 5 圖）。菌株 QZ15 在 pH 7.0 之葡萄糖發酵中的 D 型（左旋）乳酸力價超過 80 克/升。菌株 QZ15 不斷的進化，引發葡萄糖對乳酸的通量進一步增加，在 pH 7.0 環境發酵 48 小時以內可達到約 90 克/升（菌株 QZ19；表 4；第 6 圖）。這些具高乳酸力價的衍生物中，並未測到甲酸鹽的存在。這些培養菌所產生的少量乙醇和醋酸鹽，可能是衍生自 PDH 產生的乙醯輔酶 A（PDH-produced

acetyl-CoA) (15)。

結果顯示，藉由刪除 *ldh* 和 *alsS* 基因並結合根據於丙酮酸節點對此物種之生理的理解，以進行篩選合適的突變之厭氧生長為基礎之篩選，能夠使凝結芽孢桿菌主要發酵產物由 L 型（右旋）乳酸改變為 D 型（左旋）乳酸。雖然 *pflAB* 基因在最後的衍生物中依然完好如初，但藉透過 D-LDH 增加了對 D 型乳酸的新陳代謝通量，實質上是透過 PFL 中和了至乙醯輔酶 A 的任何丙酮酸通量。為了找出致使菌株 QZ19 中 D-LDH 活性提高的突變，已進行進一步的研究（研究結果已公開於名為「來自甘油脫氫酶之 D 型乳酸脫氫酶活性的進化，及其以纖維素產生 D 型乳酸的利用性」的論文中，王與其他人，*Proc. Natl. Acad. Sci*，美國，2011，線上發表 2011 年 11 月 7 日；doi 10.1073/pnas.1111085108，特此以參考資料方式將其完整併入）。

## 結論

使用本案開發的方法來刪除難以接受基因改造之凝結芽孢桿菌中的特定基因，編碼 L-LDH 的 *ldh* 基因被刪除掉。儘管 pH 7.0 對其生長無重大影響，但  $\Delta ldh$  突變體無法在 pH 5.0 的環境下厭氧生長。PFL、PDH 和丁二醇途徑支持 pH 7.0 環境中的發酵生長。雖然編碼 D-LDH (*ldhA*) 的基因出現在染色體中，但刪除 *ldh*、*alsS* 和 *pflB* 之舉剔除了突變體的厭氧生長。基於對凝結芽孢細

胞在各種酸鹼值生長環境下之生理機能特性以及此細菌厭氧生長過程期間丙酮酸節點處之碳流的了解，以 *ldh*、*alsS* 雙重突變體開始進行的生長為基礎之篩選，產出了一突變體，其具有提高 D 型乳酸產量至與野生型產生的 L 型乳酸產量與力價相同的能力。可預期當進一步增加乳酸生產率，可以消除發酵肉湯中出現的少量副產物，如乙醇和醋酸。此為嗜熱乳酸菌 (thermophilic lactic acid bacterium) 的第一份報告，當中僅利用細菌的原生基因 (無外來基因)，把主要發酵產物從 L 型 (右旋) 乳酸更改為 D 型 (左旋) 乳酸。此乃根據選擇性突變以及根據細菌的生理機能作用而成之適當的額外策略。50-55°C 時可產生光學純度之 D 型 (左旋) 或 L 型 (右旋) 乳酸之耐熱凝結芽孢桿菌菌株的可取得性，預期可藉由減少會降低乳酸光學純度的潛在污染物，而有助於降低乳酸做為製造具不同熱化學特性之生物基聚乳酸塑膠原料的成本。

表 1

本研究所使用的細菌菌株、質體和引子		
菌株	相關基因型	來源或參考文獻
P4-102B	野生型	(26)
大腸桿菌 Top10		Invitrogen
枯草芽孢桿菌 HB1000		(11)
QZ3	P4-102B <i>ldh</i> ::pQZ44, Em <sup>R</sup>	本發明
QZ4	QZ3 $\Delta$ <i>ldh</i>	本發明
QZ5	QZ4 $\Delta$ <i>alsS</i>	本發明
QZ13	由 QZ5 在 pH 5.0 環境下進化而成，以求更高細胞產量	本發明
QZ14	由 QZ13 在 pH 7.0 環境下進化而成，以求更高乳酸力價	本發明
QZ15	由 QZ14 進化而成，以求更高糖使用量	本發明
QZ16	從 QZ15 篩選出來，以求於碳酸鈣培養基中具更高葡萄糖使用率，並產出更多乳酸	本發明
QZ19	由 QZ16 進一步演化而成，以求更高乳酸鹽產率	本發明
質體		
pGK12	廣泛宿主範圍, Cm <sup>R</sup> , Em <sup>R</sup>	(16)
pUC19	質體載體 Ap <sup>R</sup>	實驗室庫存
pQZ44	具有 100bp 刪除之無啟動子 <i>ldh</i> (P4-102B) 的 pGK12	本發明
pQZ45	具有 P4-102B 之 <i>alsSD</i> 的 pUC19	本發明
pQZ45-1	具有 2,380 bp 無啟動子之 P4-102B 之 <i>alsSD</i> 的 pUC19	本發明
pQZ54	具有帶 Em <sup>R</sup> 基因插入之 596 bp <i>alsS</i> 刪除的 pQZ45-1	本發明
pQZ64	具有帶 Em <sup>R</sup> 基因插入之 506 bp <i>alsS</i> 刪除的 pGK12	本發明

表 2

所用的引子	
引子名稱	序列 (5'-3')
引子 9	ccctacgtaTTGGAACGGGTGCAGTTGGT (SEQ ID NO: 4)
引子 10	cccgaattcCCGGGTTGCTGGCAACAAGA (SEQ ID NO: 5)
引子 11	cccgaattcTTTGAGCGCCAATTTGGAA (SEQ ID NO: 6)
引子 12	cccaggcctCCGGAACGCCAACGTACACA (SEQ ID NO: 7)
引子 17	ACGAGCCGCTGACACTGGAT (SEQ ID NO: 8)
引子 18	GCCGTCTTCGCCTTCGTTCA (SEQ ID NO: 9)
引子 19	TGAACCGAACCGCCTGCTGT (SEQ ID NO: 10)
引子 20	TCGCGCCAGACGATATGCAC (SEQ ID NO: 11)
引子 21	TGTCATAAGTCGCCGAACCG (SEQ ID NO: 12)
引子 22	TGATTGTATGCCGCCACGAA (SEQ ID NO: 13)
引子 23	GGTGTTGCAGAAGAGCTTGT (SEQ ID NO: 14)
引子 24	GTGCCGCAATCGGAATAATC (SEQ ID NO: 15)
引子 25	CATCAACGCCGCCGTTAATC (SEQ ID NO: 16)
引子 26	TCGTTCCGCTTCTGAACAC (SEQ ID NO: 17)
引子 27	CCCGCCGCAAATCATTATCG (SEQ ID NO: 18)
引子 28	TAAAAGCACCCGCAAAGTT (SEQ ID NO: 19)
引子 29	AGATCTTAAGCCGTGTGGAG (SEQ ID NO: 20)
引子 30	CGCAACAATACTGCCGATTC (SEQ ID NO: 21)
引子 31	TCGCTTCCGCTCGTCGTCTT (SEQ ID NO: 22)
引子 32	TCCCGCAAATCCCTTACCTG (SEQ ID NO: 23)
引子 33	TTGGAGGCGAACAAGAACA (SEQ ID NO: 24)
引子 34	CGGCAATGGAAAAAGAAATG (SEQ ID NO: 25)
大寫字母代表凝結芽孢桿菌序列。小寫字代表限制酶辨識序列以及 5'延伸，以分別藉由各限制酶來達成放大產物的最佳水解。	

表 3

野生型凝結芽孢桿菌和 $\Delta ldh$  突變體菌株 QZ4 中丙酮酸結點處之酵素編碼基因的 mRNA 表現量

菌株	培養 菌 酸鹼 值	OD 420 nm*	mRNA 表現量 (ng/mL) **					酵素活性†	
			<i>pdhA</i>	<i>ldh</i> ‡	<i>pflB</i>	<i>alsS</i>	<i>ldhA</i> ‡	PDH	LDH
P4-102B (野生 型)	5.0	1.0	2.73	61.92	0.02	0.08	0.12	0.4	14.0
	5.0	3.4	25.59	61.55	0.87	0.27	0.19	8.0	23.5
	7.0	1.0	2.59	55.11	0.09	0.14	0.22	3.8	29.9
	7.0	4.3	11.53	12.75	3.20	0.11	0.15	20.6	28.1
突變體 QZ4 ( $\Delta ldh$ )	5.0	1.0	3.39	0.02	0.37	5.30	1.08	1.9	1.6
	5.0	2.0	2.76	0.001	0.57	1.32	1.95	6.3	2.2
	7.0	1.0	2.51	0.004	1.22	3.07	1.65	6.6	1.6
	7.0	7.0	33.41	0.21	2.67	5.62	0.88	3.1	2.5

\*代表收集時的 OD420 nm。在生長對數期前期至中期期間 (OD 值 1.0)，及生長對數期後期 (第二組 OD 值) 自酸鹼控制之發酵環境 (使用葡萄糖的 LB 培養基) 中收集細胞。

\*\*分離之總核糖核酸 (total isolated RNA) 中的特定 mRNA 濃度。

†定量未經加工萃取物中的酵素活性，並以  $\text{nmoles min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$  為表示單位。

‡*ldh* 和 *ldhA* 分別代表編碼 L 型 (右旋) 和 D 型 (左旋) 乳酸脫氫酶的基因。

表 4

凝結芽孢桿菌衍生物在溫度 50°C 環境條件下產生 D 型 (左旋) 乳酸的發酵數據圖

菌株	基因型	培養菌 酸鹼值	生長 (OD <sub>420</sub> nm)	消耗的 葡萄糖 (mM)	產物 (mM)										產量							
					L 型 (+)					D 型 (-)					乳酸鹽	乙醇	甲酸鹽	琥珀酸鹽	丙酮酸	醋酸鹽	乳酸鹽	總量
					葡萄糖	丙酮酸	醋酸鹽	琥珀酸鹽	甲酸鹽	乙醇	乳酸鹽	丙酮酸	醋酸鹽	琥珀酸鹽								
P4-102B	野生型	5.0	3.0	144.3	255.6	UD	UD	0.6	5.7	0.6	UD	10.5	0.90	1.00								
		7.0	7.1	188.6	336.4	UD	UD	0.4	15.9	0.4	UD	4.6	0.89	0.96								
QZ4**	$\Delta dh$	5.0	1.8	53.8	UD	1.0	UD	1.0	UD	6.5	20.3	0.01	0.21									
		7.0	8.1	226.0	UD	9.7	UD	6.7	42.3	90.6	224.5	0.02	0.63									
QZ5	$\Delta dh \Delta alsD$	5.0	2.5	32.8	UD	9.8	4.5	0.1	4.6	25.3	25.6	0.15	0.72									
		7.0	5.8	152.5	UD	12.8	10.1	2.1	95.4	154.6	164.5	0.04	0.94									
QZ13	連續篩選	5.0	3.7	34.5	UD	20.9	20.9	0.4	2.5	15.9	18.8	0.30	0.92									
		7.0	5.1	148.7	UD	139.9	15.8	3.2	45.2	90.0	80.7	0.50	1.00									
QZ14	連續篩選	5.0																				
		7.0	5.8	199.0	UD	335.3	11.4	0.5	5.7	44.0	39.0	0.80	0.99									
		7.0†		265.7	UD	468.4	1.6	1.3	UD	21.5	28.4	0.88	0.93									
QZ15	連續篩選	7.0† (68h)		562.6	UD	928.2	UD	8.1	22.6	UD	97.5	0.83	0.94									
QZ19		7.0† (48h)		590.0	UD	993.0	UD	5.7	45.3	UD	84.2	0.84	0.96									

所有發酵皆於含葡萄糖之 LB 培養基中進行，除非另行載明，否則所報導之數值皆為發酵經過 72 小時後的數值。

\*括號內的數值代表兩種同質異構物皆出現。

\*\*菌株 QZ4 亦產生乙醇和丁二醇；pH 5.0 培養菌，44.5 mM 丁二醇；pH 7.0 培養菌，31.6 mM 乙醯甲基甲醇和 93.1 mM 丁二醇。並未在從其他培養菌取得的發酵肉湯中偵測到這兩種產物。

†因培養基中出現碳酸鈣的關係，並無定量這些培養菌的細菌細胞密度。

UD - 無法測得

表 5

培養菌	菌株代號	寄存日期
QZ4	NRRL B-50438	2010 年 11 月 4 日
QZ5	NRRL B-50439	2010 年 11 月 4 日
QZ13	NRRL B-50440	2010 年 11 月 4 日
QZ14	NRRL B-50441	2010 年 11 月 4 日
QZ15	NRRL B-50442	2010 年 11 月 4 日
QZ19	NRRL B-50443	2010 年 11 月 4 日

## 参考文献

1. Abdel-Banat BMA, Hoshida H, Ano A, Nonklang S, Akada R (2010) High-temperature fermentation: how can processes for ethanol production at high temperatures become superior to the traditional process using mesophilic yeast? *Appl Microbiol Biotechnol* 85:861-867.
2. Beall DS, Ohta K, Ingram LO (1991) Parametric studies of ethanol production from xylose and other sugars by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng* 38:296-303.
3. Benninga H 1990. A history of lactic acid making. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
4. Boylan RJ, Mendelson NH, Brooks D, Young FE (1972) Regulation of the bacterial cell wall: analysis of a mutant of *Bacillus subtilis* defective in biosynthesis of teichoic acid. *J Bacteriol* 110:281-290.
5. Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
6. Carr FJ, Chill D, Maida N (2002) The lactic acid bacteria: A literature survey. *Crit Rev Microbiol* 28:281-370.
7. Datsenko KA, Wanner BL (2000) One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:6640-6645.
8. Datta R, Henry M (2006) Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies - a review. *J Chem Technol Biotechnol* 81:1119-1129.
9. Davis RW, Botstein D, Roth JR 1980. *Advanced Bacterial Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
10. De Clerck E, Rodriguez-Diaz M, Forsyth G, Lebbe L, Logan NA, DeVos P (2004) Polyphasic characterization of *Bacillus coagulans* strains, illustrating heterogeneity within this species, and emended description of the species. *System Appl Microbiol* 27:50-60.
11. Fredrick K, Helmann JD (1996) FlgM is a primary regulator of sigmaD activity, and its absence restores motility to a *sinR* mutant. *J Bacteriol* 178:7010-7013.
12. Grabar TB, Zhou S, Shanmugam KT, Yomano LP, Ingram LO (2006) Methylglyoxal bypass identified as source of chiral contamination in L(+) and D(-)-lactate fermentations by recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol Lett* 28:1527-1535.
13. Hamilton CM, Aldea M, Washburn BK, Babitzke P, Kushner SR (1989) New method for generating deletions and gene replacements in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 171:4617-4622.
14. Hofvendahl K, Hans-Hagerdal B (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enz Microb Technol* 26:87-107.

15. Kim Y, Ingram LO, Shanmugam KT (2007) Construction of an *Escherichia coli* K-12 mutant for homoethanologenic fermentation of glucose or xylose without foreign genes. *Appl Environ Microbiol* 73:1766-1771.
16. Kim Y, Ingram LO, Shanmugam KT (2008) Dihydrolipoamide dehydrogenase mutation alters the NADH sensitivity of pyruvate dehydrogenase complex of *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 190:3851-3858.
17. Kok J, van der Vossen JM, Venema G (1984) Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 48:726-731.
18. Kulkarni RK, Moore EG, Hegyeli AF, Leonard F (1971) Biodegradable poly(lactic acid) polymers. *J Biomed Mater Res* 5:169-181.
19. Lee JH, Patel P, Sankar P, Shanmugam KT (1985) Isolation and characterization of mutant strains of *Escherichia coli* altered in H<sub>2</sub> metabolism. *J Bacteriol* 162:344-352.
20. Lin Y, Hansen JN (1995) Characterization of a chimeric proU operon in a subtilin-producing mutant of *Bacillus subtilis* 168. *J Bacteriol* 177:6874-6880.
21. Luchansky JB, Muriana PM, Klaenhammer TR (1988) Application of electroporation for transfer of plasmid DNA to *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Listeria*, *Pediococcus*, *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Enterococcus* and *Propionibacterium*. *Mol Microbiol* 2:637-646.
22. Matsumoto K, Taguchi S Enzymatic and whole-cell synthesis of lactate-containing polyesters: toward the complete biological production of polylactate. *Appl Microbiol Biotechnol* 85:921-932.
23. Mecking S (2004) Nature or petrochemistry?-biologically degradable materials. *Angew Chem Int Ed* 43:1078-1085.
24. Morimoto T, Kadoya R, Endo K, Tohata M, Sawada K, Liu S, Ozawa T, Kodama T, Kakeshita H, Kageyama Y, Manabe K, Kanaya S, Ara K, Ozaki K, Ogasawara N (2008) Enhanced recombinant protein productivity by genome reduction in *Bacillus subtilis*. *DNA Research* 15:73-81.
25. Okano K, Yoshida S, Yamada R, Tanaka T, Ogino C, Fukuda H, Kondo A (2009) Improved production of homo-D-lactic acid via xylose fermentation by introduction of xylose assimilation genes and redirection of the phosphoketolase pathway to the pentose phosphate pathway in L-Lactate dehydrogenase gene-deficient *Lactobacillus plantarum*. *Appl Environ Microbiol* 75:7858-7861.
26. Ou MS, Ingram LO, Shanmugam KT (2011) L: (+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 38: 599-605..
27. Patel MA, Ou MS, Harbrucker R, Aldrich HC, Buszko ML, Ingram LO, Shanmugam KT (2006) Isolation and characterization of

acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. *Appl Environ Microbiol* 72:3228-3235.

28. Payot T, Chemaly Z, Fick M (1999) Lactic acid production by *Bacillus coagulans* - Kinetic studies and optimization of culture medium for batch and continuous fermentations. *Enz Microb Technol* 24:191-199.

29. Rhee MS, Kim JW, Qian Y, Ingram LO, Shanmugam KT (2007) Development of plasmid vector and electroporation condition for gene transfer in sporogenic lactic acid bacterium, *Bacillus coagulans*. *Plasmid* 58:13-22.

30. Su Y, Rhee MS, Ingram LO, Shanmugam KT (2011) Physiological and fermentation properties of *Bacillus coagulans* and a mutant lacking fermentative lactate dehydrogenase activity. *J Ind Microbiol Biotechnol*.38:441-450..

31. Tanaka K, Komiyama A, Sonomoto K, Ishizaki A, Hall SJ, Stanbury PE (2002) Two different pathways for D-xylose metabolism and the effect of xylose concentration on the yield coefficient of L-lactate in mixed-acid fermentation by the lactic acid bacterium *Lactococcus lactis* IO-1. *Appl Microbiol Biotechnol* 60:160-167.

32. Underwood SA, Zhou S, Causey TB, Yomano LP, Shanmugam KT, Ingram LO (2002) Genetic changes to optimize carbon partitioning between ethanol and biosynthesis in ethanologenic *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol* 68:6263-6272.

33. Visser J, Kester H, Jeyaseelan K, Topp R (1982) Pyruvate dehydrogenase complex from *Bacillus*. *Methods Enzymol* 89 Pt D:399-407.

34. Yanez R, Moldes AB, Alonso JL, Parajo JC (2003) Production of D(-)-lactic acid from cellulose by simultaneous saccharification and fermentation using *Lactobacillus coryniformis* subsp. *torquens*. *Biotechnol Lett* 25:1161-1164.

35. Yoshida A, Freese E (1975) Lactate dehydrogenase from *Bacillus subtilis*. *Meth Enzymol* 41:304-309.

36. Zhou S, Shanmugam KT, Ingram LO (2003) Functional replacement of the *Escherichia coli* D(-)-lactate dehydrogenase gene (*ldhA*) with the L-(+)-lactate dehydrogenase gene (*ldhL*) from *Pediococcus acidilactici*. *Appl Environ Microbiol* 69:2237-2244.

### 【圖式簡單說明】

第 1 圖 係為凝結芽孢桿菌菌株 QZ4( $\Delta ldh$ )在 pH 5.0 (第(A)圖)和 pH 7.0 (第(B)圖)環境下的發酵圖。在小型發酵槽中，以葡萄糖在具有

酸鹼值控制的 LB 培養基中進行發酵。pH 5.0 那組之初始葡萄糖濃度為 30 克/升；pH 7.0 那組之初始葡萄糖濃度為 50 克/升。

第 2 圖 係為凝結芽孢桿菌菌株 QZ5 ( $\Delta ldh$ ,  $\Delta alsS$ ) 在 pH 5.0 (第(A)圖) 和 pH 7.0 (第(B)圖) 環境下的發酵圖。在小型發酵槽中，以濃度 30 克/升的葡萄糖在 LB 培養基中進行發酵，以自動添加 KOH 的方式來控制酸鹼值。

第 3 圖 係於小型發酵槽內，以濃度 30 克/升的葡萄糖於 LB 培養基在 pH 5.0 之環境條件下，利用凝結芽孢桿菌菌株 QZ5 進行以生長為基礎之篩選，以得到菌株 QZ13。

第 4 圖 係於小型發酵槽內，以濃度 50 克/升的葡萄糖於 LB 培養基在 pH 7.0 之環境條件下，利用凝結芽孢桿菌菌株 QZ13 進行以生長為基礎之篩選，以得到菌株 QZ14。

第 5 圖 係於小型發酵槽內，以持續增加濃度的葡萄糖於 LB 培養基在 pH 7.0 之環境條件下，利用凝結芽孢桿菌菌株 QZ14 進行以生長為基礎之篩選，以得到菌株 QZ15。培養基亦含 20 克/升的碳酸鈣。初始葡萄糖濃度為 50 克/升。在第三次移轉後，葡萄糖濃度增加為 60 克/升。在第五次移轉後，葡萄糖濃度增加為 100 克/升。

第 6 圖 係為凝結芽孢桿菌菌株 QZ19 在 pH 7.0 環境下，於含有葡萄糖及 20 克/升碳酸鈣之 LB 培養基中的發酵圖。發酵肉湯中偵測不到 L 型（右旋）乳酸或甲酸鹽。

第 7 圖 生產可製造 D 型（左旋）乳酸之細菌菌株之範例示意圖。通常，目標菌株/細胞經基因改造，以使右旋-乳酸脫氫酶和乙醯乳酸合成酶活性失活，以在丙酮酸節點處競爭反應。接著將細胞培養於 pH 值介於 4.5 至 5.5 之間的限氧環境下。選擇和親代菌株相比，具有較高之細胞產量且/或乳酸產量的細胞以進行進一步培育。接著培養所選細胞在 pH 值介於 6.5 至 7.5 之間的限氧/厭氧環境下。選擇和原選菌株相比，具有較高細胞產量且/或乳酸產量的細胞以進行進一步培育或用於製造 D 型（左旋）乳酸。在本發明的特定較佳態樣中，用以製造 D 型（左旋）乳酸的細胞，每公升培養基至少生產 60 克的乳酸（最佳在約 48 小時之內）。

#### 【主要元件符號說明】

無

## 序列表

<110> Wang, Qingzhao  
Shanmugam, Keelnatham T.  
Ingram, Lonnie O'Neal

<120> 製造 D 型 (左旋) 乳酸之耐熱凝結芽孢桿菌之遺傳工程

<130> UF.958P

<160> 25

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 2300

<212> DNA

<213> Bacillus coagulans

<220>

<221> exon

<222> (851)..(1789)

<223> 開放讀碼框 (ORF) *ldh* (L-乳酸脫氫酶)

<400> 1

```
ttaaggataa aatgcgaacg attgaaagtc aatgatgaat atcattcgtg tttttaatgt      60
ggcaagtacc ggaaatggaa agaaaagaat tggcagtcaa accgttctct tcttctttga      120
taataaatga aagcagccgg tatggaaaga aaaaatttac ttatataaaa ttgattttat      180
ggccggcttt attatgcccg tcgtactggc tgtccgcacg gtgtccattt atgatgcaga      240
catgaatggc tgggcagttg cgtttttgtc gatgcctggc gtgcacgcct ccatgcatgt      300
gaagcggggt tttttaagcg ggcagcaccg gcttttttgg agggcaggca ttcaggagca      360
aaaatggcag agatcatttg ggcgggatca gccatttatt cctccatccg gggcactttg      420
tgaaaatcag cacaagaatg aataacgctt acatatctgg ctctttcaaa taaagccatt      480
tgtgaaaaat gtaaacggat aattttgaaa aaccgtcatt ttcctttaa accgggcatt      540
tgggcagata aattttcaaa ttttcgcat aaaatatgtg aatctgatca caaaaatagt      600
ggtatactta cccatgtgga atgaaggaaa atgaacggaa cagtcaattt cagccataaa      660
gggcatgccg tccatctatt tcacaaaccg cacggcagca ttgctgcaaa gtttaattgt      720
cctgctttaa aggaaagcag tatggatcca ttaggagttg cacatatcca tagactggat      780
agggccccgc atgccgggct gcaaactgct ttcatacagt gatatatttt tacttgatgg      840
agagatatac atg aaa aag gtc aat cgt att gca gtg gtt gga acg ggt      889
          Met Lys Lys Val Asn Arg Ile Ala Val Val Gly Thr Gly
          1           5           10

gca gtt ggt aca agt tac tgc tac gcc atg att aat cag ggt gtt gca      937
Ala Val Gly Thr Ser Tyr Cys Tyr Ala Met Ile Asn Gln Gly Val Ala
```

15	20	25	
gaa gag ctt gtt tta atc gat att aac gaa gca aaa gca gaa ggg gaa			985
Glu Glu Leu Val Leu Ile Asp Ile Asn Glu Ala Lys Ala Glu Gly Glu			
30	35	40	45
gcc atg gac ctg aac cac ggc ctg cca ttt gcg cct acg ccg acc cgc			1033
Ala Met Asp Leu Asn His Gly Leu Pro Phe Ala Pro Thr Pro Thr Arg			
	50	55	60
gtt tgg aaa ggc gat tat tcc gat tgc ggc act gcc gat ctt gtt gtc			1081
Val Trp Lys Gly Asp Tyr Ser Asp Cys Gly Thr Ala Asp Leu Val Val			
	65	70	75
att acg gca ggt tcc ccg caa aaa ccg ggc gaa aca agg ctt gat ctt			1129
Ile Thr Ala Gly Ser Pro Gln Lys Pro Gly Glu Thr Arg Leu Asp Leu			
	80	85	90
gtt gcc aaa aac gca aaa att ttt aaa ggc atg att aag agc atc atg			1177
Val Ala Lys Asn Ala Lys Ile Phe Lys Gly Met Ile Lys Ser Ile Met			
	95	100	105
gac agc ggc ttt aac ggg att ttt ctt gtt gcc agc aac ccg gtt gac			1225
Asp Ser Gly Phe Asn Gly Ile Phe Leu Val Ala Ser Asn Pro Val Asp			
110	115	120	125
att ttg aca tat gta act tgg aaa gag tcc ggc ctg ccg aaa gaa cat			1273
Ile Leu Thr Tyr Val Thr Trp Lys Glu Ser Gly Leu Pro Lys Glu His			
	130	135	140
gtt atc ggt tgc ggc aca gtg ctt gac tcc gcg cgt ctc cgc aac tct			1321
Val Ile Gly Ser Gly Thr Val Leu Asp Ser Ala Arg Leu Arg Asn Ser			
	145	150	155
ttg agc gcc caa ttt gga att gac ccg cgc aat gtg cat gct gcg att			1369
Leu Ser Ala Gln Phe Gly Ile Asp Pro Arg Asn Val His Ala Ala Ile			
	160	165	170
atc ggc gaa cac ggc gat acg gaa ctt ccg gta tgg agc cat aca aat			1417
Ile Gly Glu His Gly Asp Thr Glu Leu Pro Val Trp Ser His Thr Asn			
	175	180	185
atc ggt tac gat acg att gaa agc tat cta caa aaa gga att att gac			1465
Ile Gly Tyr Asp Thr Ile Glu Ser Tyr Leu Gln Lys Gly Ile Ile Asp			
190	195	200	205
gaa aag acg tta gat gac att ttt gtc aat acg aga gat gcg gct tat			1513
Glu Lys Thr Leu Asp Asp Ile Phe Val Asn Thr Arg Asp Ala Ala Tyr			
	210	215	220
cat att att gaa cga aaa ggg gcc aca ttt tac ggc atc ggg atg tcc			1561
His Ile Ile Glu Arg Lys Gly Ala Thr Phe Tyr Gly Ile Gly Met Ser			
	225	230	235
ctg acc cgg att aca agg gca atc ctg aac aat gaa aac agc gta ttg			1609
Leu Thr Arg Ile Thr Arg Ala Ile Leu Asn Asn Glu Asn Ser Val Leu			
	240	245	250
acg gtc tct gca ttt ctt gaa ggc caa tac gga aac agc gat gtg tac			1657
Thr Val Ser Ala Phe Leu Glu Gly Gln Tyr Gly Asn Ser Asp Val Tyr			
	255	260	265
gtt ggc gtt ccg gcc atc atc aat cgc cag ggc atc cgt gaa gtg gtt			1705

```

Val Gly Val Pro Ala Ile Ile Asn Arg Gln Gly Ile Arg Glu Val Val
270                               275                               280                               285

gaa atc aaa ctg aac gaa aaa gaa cag gaa cag ttc aat cat tct gta      1753
Glu Ile Lys Leu Asn Glu Lys Glu Gln Glu Gln Phe Asn His Ser Val
                290                               295                               300

aaa gtg cta aaa gaa aca atg gca ccg gta ttg taa gcatttgtgc      1799
Lys Val Leu Lys Glu Thr Met Ala Pro Val Leu
                305                               310

cggccgggct tcatgggagg cccggctttt tctttgaaaa aaatcccggc gcctgcttaa  1859

ggcggactgc cgaaaaaagt gcccatgctt gccccgcttt ccgggaaaag catgggcctg  1919

ttttttgccg gggttaggag ggggcctgcc ataggcggat ataaaaaagc agccttgaat  1979

cgattcaagg ctgctttttc ttaattcaat atgatcaact tgaccgtacg gcgcccccat  2039

gcgatggaag cttttttggt cggcatcagg acatcgatga tatggccctt aatggcaccg  2099

ccggtatcgg ctgcatggc aaccccgat ccttcaaccc agactttgct gccgagcgga  2159

atgaccgatg gatcgacagc gatcaatttc atgttcgggt ttttcttaat gttatatccc  2219

aaagcggtaa tatccagctt cgtatcttca tggttataag atgtcgccgt cacataaaag  2279

gatttgcctt gtggcgtgct g                                     2300

```

```

<210> 2
<211> 3298
<212> DNA
<213> Bacillus coagulans

```

```

<220>
<221> exon
<222> (519)..(2207)
<223> 開放讀碼框 (ORF) alsS (乙醯乳酸合成酶 (代謝))

```

```

<220>
<221> exon
<222> (2292)..(3041)
<223> 開放讀碼框 (ORF) alsD (alpha-乙醯乳酸脫羧酶)

```

```

<400> 2
atagccggca aaatgtcata agtcgccgaa ccgacaaagc cgactaccac attccogaat      60

tcccccgct cagcccgctg tgcattttcc ctgccctgtc cagctgctca aggacctgct      120

tggcctcttt taaaaaaact tttcccggga tcgtcagttc aacatgacgt ttattgcgga      180

taaaaaggtc caccccgatt tcttcttcca gctgccggat ttgctgggaa agcgggtggct      240

gggtcatttg cagccgctct gctgcttttc cgaaatgtag ttcttccgcg accgttaaaa      300

aataatgaag atggcgcagt tccatctgta tttcctcctc cctcattggg attaataatt      360

attatatatt atttatagca caataatata ttttaaacat ttcctcgtgt ggtgtaaagt      420

atagatagaa acaagttcgc tcagcctata gatgaacggt tccccctgta ataaacgggg      480

```

gaaagttcaa aatagggctg tccttgggag tgggaact gtg gaa aaa aag aat tca 536  
Val Glu Lys Lys Asn Ser  
1 5

aat cca acc aat acg acg aaa aaa aca gct gca gac ctg gtt gtc gat 584  
Asn Pro Thr Asn Thr Thr Lys Lys Thr Ala Ala Asp Leu Val Val Asp  
10 15 20

tgc ctt gaa aaa cag gaa gtt ccg tac gtt ttc ggc att ccg ggc gca 632  
Cys Leu Glu Lys Gln Glu Val Pro Tyr Val Phe Gly Ile Pro Gly Ala  
25 30 35

aaa atc gat gcc gta ttt gat gtc cta aaa gaa cgc ggc ccg gaa ttg 680  
Lys Ile Asp Ala Val Phe Asp Val Leu Lys Glu Arg Gly Pro Glu Leu  
40 45 50

att gta tgc cgc cac gaa caa aat gcc gct ttt atg gcc gct gct atc 728  
Ile Val Cys Arg His Glu Gln Asn Ala Ala Phe Met Ala Ala Ala Ile  
55 60 65 70

ggg cgt tta aca gga aaa ccg ggt gtc tgc ctg gta acg agc ggg ccg 776  
Gly Arg Leu Thr Gly Lys Pro Gly Val Cys Leu Val Thr Ser Gly Pro  
75 80 85

ggg gct tcc aac ctt gcc acc ggg ctt gcc act gcg aat acg gag tgc 824  
Gly Ala Ser Asn Leu Ala Thr Gly Leu Ala Thr Ala Asn Thr Glu Cys  
90 95 100

gat cct gtc gtt gca atc gca gga aac gtg ccg cgc gca gac aga ctg 872  
Asp Pro Val Val Ala Ile Ala Gly Asn Val Pro Arg Ala Asp Arg Leu  
105 110 115

aaa aaa acg cac cag tcg atg gac aat gta tcc ctg ttt cag ccg att 920  
Lys Lys Thr His Gln Ser Met Asp Asn Val Ser Leu Phe Gln Pro Ile  
120 125 130

aca aaa tac gca gcg gaa gtg gtt cat ccg gat aca gtg ccg gaa gtg 968  
Thr Lys Tyr Ala Ala Glu Val Val His Pro Asp Thr Val Pro Glu Val  
135 140 145 150

atg aca aat gca ttt cgt tct gcc gct tca gca cag gca ggg gca gct 1016  
Met Thr Asn Ala Phe Arg Ser Ala Ala Ser Ala Gln Ala Gly Ala Ala  
155 160 165

ttt atc agc ttc ccg cag gat gtg ctg atg gag ccg gcg tct gtc aaa 1064  
Phe Ile Ser Phe Pro Gln Asp Val Leu Met Glu Pro Ala Ser Val Lys  
170 175 180

gct ttg ggt ccg ctt gaa agc ccg gaa ctc ggg aaa gca aat gaa gaa 1112  
Ala Leu Gly Pro Leu Glu Ser Pro Glu Leu Gly Lys Ala Asn Glu Glu  
185 190 195

gcg att aaa gaa gct gta aaa gcg atc cag cat gcc aaa ttg ccg gtc 1160  
Ala Ile Lys Glu Ala Val Lys Ala Ile Gln His Ala Lys Leu Pro Val  
200 205 210

att ctg gtc ggg atg cgt gcg agc cgc ccg aaa gtc gtg aaa gcg gtc 1208  
Ile Leu Val Gly Met Arg Ala Ser Arg Pro Lys Val Val Lys Ala Val  
215 220 225 230

cgg tcc ctc ctg aaa aaa atc gca ttg ccg gtt gtt gaa aca ttc cag 1256  
Arg Ser Leu Leu Lys Lys Ile Ala Leu Pro Val Val Glu Thr Phe Gln

235	240	245	
gcg gca ggc ttg att tca aga gat ttg gaa gac cgt ttc ttc ggc cgc			1304
Ala Ala Gly Leu Ile Ser Arg Asp Leu Glu Asp Arg Phe Phe Gly Arg			
250	255	260	
atc ggc ttg ttc cgc aac cag ccg ggc gat att ttg ctt gag cat gcg			1352
Ile Gly Leu Phe Arg Asn Gln Pro Gly Asp Ile Leu Leu Glu His Ala			
265	270	275	
gat gtg gtg ctt gcg atc ggt tac gat tct gtt gag tac gat ccg aag			1400
Asp Val Val Leu Ala Ile Gly Tyr Asp Ser Val Glu Tyr Asp Pro Lys			
280	285	290	
ttt tgg aac agc gaa ggg gaa aga aaa atc atc cat ctc gat gaa atc			1448
Phe Trp Asn Ser Glu Gly Glu Arg Lys Ile Ile His Leu Asp Glu Ile			
295	300	305	310
cgc gcc gat atc gat cat gat tac cag ccg gaa atc gaa ctt gtc ggt			1496
Arg Ala Asp Ile Asp His Asp Tyr Gln Pro Glu Ile Glu Leu Val Gly			
315	320	325	
gac att tca gcg agc gtt gac agc atc aaa gaa cag ctg gcc cgt tta			1544
Asp Ile Ser Ala Ser Val Asp Ser Ile Lys Glu Gln Leu Ala Arg Leu			
330	335	340	
aat atg agc agt aag tcc atg gaa ctt ttg gaa cat ctc cgc aac cag			1592
Asn Met Ser Ser Lys Ser Met Glu Leu Leu Glu His Leu Arg Asn Gln			
345	350	355	
ctg aat ttg cgc gac gaa cca tcg gaa aag gcg gat aaa aat ctt gtg			1640
Leu Asn Leu Arg Asp Glu Pro Ser Glu Lys Ala Asp Lys Asn Leu Val			
360	365	370	
cat ccg ctc cag ttc att cat gat ttg cgt tcg ttg att gat gac cat			1688
His Pro Leu Gln Phe Ile His Asp Leu Arg Ser Leu Ile Asp Asp His			
375	380	385	390
gtg acc gtg aca tgc gat gtc ggt tcc cat tat att tgg atg gcg cgc			1736
Val Thr Val Thr Cys Asp Val Gly Ser His Tyr Ile Trp Met Ala Arg			
395	400	405	
cat ttc agg gta tat gaa ccg aac cgc ctg ctg ttt tca aat ggc atg			1784
His Phe Arg Val Tyr Glu Pro Asn Arg Leu Leu Phe Ser Asn Gly Met			
410	415	420	
cag acg ctc ggg gtt gcg ctt ccg tgg gcg att gcc gca acg ctt gtc			1832
Gln Thr Leu Gly Val Ala Leu Pro Trp Ala Ile Ala Ala Thr Leu Val			
425	430	435	
aat ccg gat gaa aaa gta ata tcg atc tcc gga gac ggc ggc ttc ctg			1880
Asn Pro Asp Glu Lys Val Ile Ser Ile Ser Gly Asp Gly Gly Phe Leu			
440	445	450	
ttc tcc gcc atg gaa ctt gaa acg gcc gtc cgt tta aaa tca ccg ctt			1928
Phe Ser Ala Met Glu Leu Glu Thr Ala Val Arg Leu Lys Ser Pro Leu			
455	460	465	470
gtg cat atc gtc tgg cgc gac ggc acg tat gac atg gtg gcg ttc cag			1976
Val His Ile Val Trp Arg Asp Gly Thr Tyr Asp Met Val Ala Phe Gln			
475	480	485	
cag caa atg aaa tac ggg cgc aca tcg gga gca gac ttc ggc ccc gtt			2024

Gln Gln Met Lys Tyr Gly Arg Thr Ser Gly Ala Asp Phe Gly Pro Val	
490	495 500
gat att gta aaa cac gcg gaa agt tac ggc gca aaa ggc ttg cgg gtg	2072
Asp Ile Val Lys His Ala Glu Ser Tyr Gly Ala Lys Gly Leu Arg Val	
505	510 515
aat gca cct gat gag ctg gtt tct gta ctg aag gaa gcg ctg gac tca	2120
Asn Ala Pro Asp Glu Leu Val Ser Val Leu Lys Glu Ala Leu Asp Ser	
520	525 530
gaa ggc ccg gtc gtg gtc gat gtc ccg gtt gat tat agc gac aac ctg	2168
Glu Gly Pro Val Val Val Asp Val Pro Val Asp Tyr Ser Asp Asn Leu	
535	540 545 550
gaa ctg gcg aaa aaa ctg ctg cct aac caa ttg gta taa tcacttactg	2217
Glu Leu Ala Lys Lys Leu Leu Pro Asn Gln Leu Val	
555	560
cgggcgggcag ctgctataac ttggactcag ccggcacaaa tttttcagga tacgatagaa	2277
agaagggggtt tacc atg cgt act gct gca gaa aat caa aat aca gag caa	2327
Met Arg Thr Ala Ala Glu Asn Gln Asn Thr Glu Gln	
565	570
att tta aca agc cgg acc gat gaa gta tac caa ttg tcc acg atg aca	2375
Ile Leu Thr Ser Arg Thr Asp Glu Val Tyr Gln Leu Ser Thr Met Thr	
575	580 585 590
tcg ctt ctt gac ggc gta tac gaa agc gac aag acg ttt gct gaa tta	2423
Ser Leu Leu Asp Gly Val Tyr Glu Ser Asp Lys Thr Phe Ala Glu Leu	
595	600 605
aaa aag ttc ggc gat ttc ggc atc ggc act ttc aac cat ttg gac ggg	2471
Lys Lys Phe Gly Asp Phe Gly Ile Gly Thr Phe Asn His Leu Asp Gly	
610	615 620
gaa ttg att gcc ttt gac aat gcg ttc tat cag ctg aag gac ggg acg	2519
Glu Leu Ile Ala Phe Asp Asn Ala Phe Tyr Gln Leu Lys Asp Gly Thr	
625	630 635
gca aaa cgt gta cag cct gaa gac aag tca ccg ttt tgc tcg ctt gca	2567
Ala Lys Arg Val Gln Pro Glu Asp Lys Ser Pro Phe Cys Ser Leu Ala	
640	645 650
cat ttt tcg gag gat atc acc tat aca gct gaa ggt cct cta gca aaa	2615
His Phe Ser Glu Asp Ile Thr Tyr Thr Ala Glu Gly Pro Leu Ala Lys	
655	660 665 670
ccc gaa ctg gaa gac ttg atc aaa gat ctc gtc cgc agc gaa aat tta	2663
Pro Glu Leu Glu Asp Leu Ile Lys Asp Leu Val Arg Ser Glu Asn Leu	
675	680 685
ttt tat gcc att cgt gtg gac ggt gtt ttt aaa aaa atg aac aca aga	2711
Phe Tyr Ala Ile Arg Val Asp Gly Val Phe Lys Lys Met Asn Thr Arg	
690	695 700
acc gtc tcc tac cag gaa aaa ccg gtt ccc atg acg gaa gcg gtg aaa	2759
Thr Val Ser Tyr Gln Glu Lys Pro Val Pro Met Thr Glu Ala Val Lys	
705	710 715
tcc cag ccg gtt tac tcg ttt gaa aat aca aaa gga acg ctt gct ggt	2807
Ser Gln Pro Val Tyr Ser Phe Glu Asn Thr Lys Gly Thr Leu Ala Gly	

720	725	730	
ttt tgg acg ccg atg ttt gca caa gga atc gcg gtc gcc ggc ttc cac			2855
Phe Trp Thr Pro Met Phe Ala Gln Gly Ile Ala Val Ala Gly Phe His			
735	740	745	750
ctc cat ttt att gac gac aaa cgc acc ggc ggc ggc cat gtc ttt gac			2903
Leu His Phe Ile Asp Asp Lys Arg Thr Gly Gly Gly His Val Phe Asp			
	755	760	765
tat gtg ctt gac tac ggg acg atc cgg atc agc aaa aaa acg cat atg			2951
Tyr Val Leu Asp Tyr Gly Thr Ile Arg Ile Ser Lys Lys Thr His Met			
	770	775	780
cat ctg gaa ctt ccg gaa aca gac gct ttt tta aat gcg aac ctt tcc			2999
His Leu Glu Leu Pro Glu Thr Asp Ala Phe Leu Asn Ala Asn Leu Ser			
	785	790	795
cgc gcc aat ttg gca gag gaa ctg gaa aag aca gaa ggc tga			3041
Arg Ala Asn Leu Ala Glu Glu Leu Glu Lys Thr Glu Gly			
	800	805	810
acgaaggcga agacggccc catccggcga aaaccggatg cgggtttctt caaattgggc			3101
ggggcttgcc tgactccggc aacctaggct ttttcatctc caccocgcct gtcacttctg			3161
caatcgctta cgattatatg attcgtcaaa cgcttttccc tcaagctcag gatccagtgt			3221
cagcggctcg ttgcaatgca tgcaaatatc taccocggccc agcatttttg tccgcttgcc			3281
gcagcccggg catacaa			3298

<210> 3  
 <211> 3638  
 <212> DNA  
 <213> Bacillus coagulans

<220>  
 <221> exon  
 <222> (375)..(2639)  
 <223> 開放讀碼框 (ORF) *PflB* (丙酮酸甲酸裂解酶)

<220>  
 <221> exon  
 <222> (2729)..(3466)  
 <223> 開放讀碼框 (ORF) *PflA* (丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素)

<400> 3			
ccccactcct tttatgtaac tgcttacatg aaaaatataa cgcaaacgct ttcactctggc			60
tgtgcccaatt ttgtgaaata ttgagcatgt taccaaatca caaactctcc ccaagaaaaa			120
taatcatgtg aaaaactgat caatttgtgt tataaacacgc tttcatcgca tttttctatt			180
atatacttac ggccaaatgt tttgaacatt ctttgacaac tgcttttttt ggccccaaaa			240
tgtgaacgct atcactatct ttttaaaatc gaccatgcta aatgaaagc gtaataagaa			300
atggtcacta ttaacaaac aaacatccaa ttctgaaggc agctcattaa taggcttaaa			360

ggaggccatt taaa atg act gaa caa tta ctg aca aaa gca acg ctc tcc 410  
 Met Thr Glu Gln Leu Leu Thr Lys Ala Thr Leu Ser  
 1 5 10

aaa aaa caa tgg gaa ggc ttc aaa gga gga aac tgg caa aaa gaa atc 458  
 Lys Lys Gln Trp Glu Gly Phe Lys Gly Gly Asn Trp Gln Lys Glu Ile  
 15 20 25

gat gta agg gac ttt att ctg aaa aat gta acc cct tac gaa ggc gat 506  
 Asp Val Arg Asp Phe Ile Leu Lys Asn Val Thr Pro Tyr Glu Gly Asp  
 30 35 40

gaa agc ttt ctt gcc ggc ccg act gaa gcc act tta aaa tta tgg gat 554  
 Glu Ser Phe Leu Ala Gly Pro Thr Glu Ala Thr Leu Lys Leu Trp Asp  
 45 50 55 60

cag gtc atg gaa ctg tcg aaa cag gaa cgc gaa aaa ggc ggc gtc ctg 602  
 Gln Val Met Glu Leu Ser Lys Gln Glu Arg Glu Lys Gly Gly Val Leu  
 65 70 75

gat atg gat acg aaa att gta tct acc att aca tcg cat ggc ccg ggc 650  
 Asp Met Asp Thr Lys Ile Val Ser Thr Ile Thr Ser His Gly Pro Gly  
 80 85 90

tat tta aac aaa gaa ctt gaa aaa att gtc ggt ttc caa acc gat aaa 698  
 Tyr Leu Asn Lys Glu Leu Glu Lys Ile Val Gly Phe Gln Thr Asp Lys  
 95 100 105

ccg ttc aaa cgt tcg atg atg ccg ttt ggc gga atc cgg atg gca gaa 746  
 Pro Phe Lys Arg Ser Met Met Pro Phe Gly Gly Ile Arg Met Ala Glu  
 110 115 120

agt gcc tta aaa tct tac ggc tat gaa att gat ccg gaa atc aaa cat 794  
 Ser Ala Leu Lys Ser Tyr Gly Tyr Glu Ile Asp Pro Glu Ile Lys His  
 125 130 135 140

att ttt aca gaa tgg cgg aaa acc cat aac caa ggt gta ttc gat gcc 842  
 Ile Phe Thr Glu Trp Arg Lys Thr His Asn Gln Gly Val Phe Asp Ala  
 145 150 155

tac aca ccg gaa atc aaa gct gca cgg cat gcc ggc att gta aca ggc 890  
 Tyr Thr Pro Glu Ile Lys Ala Ala Arg His Ala Gly Ile Val Thr Gly  
 160 165 170

ctt ccg gat gct tac ggc cgc ggc cgc att atc ggc gac tac cgg cgc 938  
 Leu Pro Asp Ala Tyr Gly Arg Gly Arg Ile Ile Gly Asp Tyr Arg Arg  
 175 180 185

gtt gcc ctt tac ggt gta gat tat tta att gag caa aag aaa aaa gat 986  
 Val Ala Leu Tyr Gly Val Asp Tyr Leu Ile Glu Gln Lys Lys Lys Asp  
 190 195 200

ctc gat tta atc ggc tgc ggc ttg atg aca gaa gaa gtc atc cgt gaa 1034  
 Leu Asp Leu Ile Gly Cys Gly Leu Met Thr Glu Glu Val Ile Arg Glu  
 205 210 215 220

cgt gaa gaa cat tcg gaa caa att cgt gca ttg caa gaa ttg aaa caa 1082  
 Arg Glu Glu His Ser Glu Gln Ile Arg Ala Leu Gln Glu Leu Lys Gln  
 225 230 235

atg gca caa agc tac gga ttc gat att tcc gaa ccg gct tca aac gca 1130  
 Met Ala Gln Ser Tyr Gly Phe Asp Ile Ser Glu Pro Ala Ser Asn Ala  
 240 245 250

cac gaa gct ttc caa tgg ctg tat ttc gcg tat ctg gct gcc att aaa 1178  
His Glu Ala Phe Gln Trp Leu Tyr Phe Ala Tyr Leu Ala Ala Ile Lys  
255 260 265

gaa caa aat ggc gcg gcc atg agt ctt ggg cgc aca tcc act ttc ctt 1226  
Glu Gln Asn Gly Ala Ala Met Ser Leu Gly Arg Thr Ser Thr Phe Leu  
270 275 280

gac att tat att gaa aga gat ttg aaa aac ggc gtc ctg act gaa cg 1274  
Asp Ile Tyr Ile Glu Arg Asp Leu Lys Asn Gly Val Leu Thr Glu Arg  
285 290 295 300

gaa gca caa gaa ctc gtc gac cac ttt gtc atg aaa ctc cgc ctc gtc 1322  
Glu Ala Gln Glu Leu Val Asp His Phe Val Met Lys Leu Arg Leu Val  
305 310 315

aaa ttt gca cgg acg gaa gac tat aat gaa ctg ttc agc ggc gac ccg 1370  
Lys Phe Ala Arg Thr Glu Asp Tyr Asn Glu Leu Phe Ser Gly Asp Pro  
320 325 330

aca tgg gta aca gaa tcg atc ggc ggc atg gct ttg gac ggc cgt aca 1418  
Thr Trp Val Thr Glu Ser Ile Gly Gly Met Ala Leu Asp Gly Arg Thr  
335 340 345

ctc gtt acg aaa aac tcg ttc cgc ttc ctg aac acg ctt gat aat ctc 1466  
Leu Val Thr Lys Asn Ser Phe Arg Phe Leu Asn Thr Leu Asp Asn Leu  
350 355 360

ggc cct gcg ccg gaa ccg aac ctg acc gtg ctc tgg tcg acg aaa ctg 1514  
Gly Pro Ala Pro Glu Pro Asn Leu Thr Val Leu Trp Ser Thr Lys Leu  
365 370 375 380

ccg gat aaa tgg aaa caa tat tgc gcg aaa atg tcg atc aag aca agc 1562  
Pro Asp Lys Trp Lys Gln Tyr Cys Ala Lys Met Ser Ile Lys Thr Ser  
385 390 395

gcc atc caa tat gaa aac gat gac tta atg cgt gaa gaa tac ggc gat 1610  
Ala Ile Gln Tyr Glu Asn Asp Asp Leu Met Arg Glu Glu Tyr Gly Asp  
400 405 410

gat tat ggc att gcc tgc tgt gta tcg gcg atg cgg atc ggc aaa caa 1658  
Asp Tyr Gly Ile Ala Cys Cys Val Ser Ala Met Arg Ile Gly Lys Gln  
415 420 425

atg caa ttc ttc ggc gcc cgc gcc aac ctg gca aaa gct ttg ctg tat 1706  
Met Gln Phe Phe Gly Ala Arg Ala Asn Leu Ala Lys Ala Leu Leu Tyr  
430 435 440

gcg att aac ggc ggc gtt gat gaa cgg tat aaa atg caa gtc gca cct 1754  
Ala Ile Asn Gly Gly Val Asp Glu Arg Tyr Lys Met Gln Val Ala Pro  
445 450 455 460

ccg ttc cag ccg atc aca tcg gaa tat ctc gat tac gat gaa gtc atg 1802  
Pro Phe Gln Pro Ile Thr Ser Glu Tyr Leu Asp Tyr Asp Glu Val Met  
465 470 475

gaa aaa tac gat cgg atg cta gac tgg ctt gca ggc gtt tat atc aat 1850  
Glu Lys Tyr Asp Arg Met Leu Asp Trp Leu Ala Gly Val Tyr Ile Asn  
480 485 490

gct ttg aac atc att cat tat atg cat gac aaa tac agc tac gaa cg 1898  
Ala Leu Asn Ile Ile His Tyr Met His Asp Lys Tyr Ser Tyr Glu Arg

495	500	505	
ctt gaa atg gca ttg cat gac cgc aat gta ctg cgc acg atg gct tgc Leu Glu Met Ala Leu His Asp Arg Asn Val Leu Arg Thr Met Ala Cys 510 515 520			1946
ggc gtt gcc ggc ttg tct gtt gcg gcc gac tct cta agc gcc atc aaa Gly Val Ala Gly Leu Ser Val Ala Ala Asp Ser Leu Ser Ala Ile Lys 525 530 535 540			1994
tat gcg aaa gta aaa gtc atc cgt gac gaa gac ggc ctt gct gtt gac Tyr Ala Lys Val Lys Val Ile Arg Asp Glu Asp Gly Leu Ala Val Asp 545 550 555			2042
tat gaa gtc gaa ggc gat tac ccg aaa tac ggc aac aac gat gac cgc Tyr Glu Val Glu Gly Asp Tyr Pro Lys Tyr Gly Asn Asn Asp Asp Arg 560 565 570			2090
gtc gac caa att gcc gtc aat ctc gtc aag tcg ttt atg caa aaa ctg Val Asp Gln Ile Ala Val Asn Leu Val Lys Ser Phe Met Gln Lys Leu 575 580 585			2138
caa aaa tat ccg act tac ccg aac gct gtc cat act tct tcg atc ctg Gln Lys Tyr Pro Thr Tyr Arg Asn Ala Val His Thr Ser Ser Ile Leu 590 595 600			2186
aca att aca tcg aac gtt gta tac ggc aag aaa aca gga agc aca ccg Thr Ile Thr Ser Asn Val Val Tyr Gly Lys Lys Thr Gly Ser Thr Pro 605 610 615 620			2234
gac ggc cgg aaa gca ggc gaa ccg ttc gcc cct ggc gca aac ccg atg Asp Gly Arg Lys Ala Gly Glu Pro Phe Ala Pro Gly Ala Asn Pro Met 625 630 635			2282
cac ggc cgc gat tcg cac ggc gca gtc gca tcg ttg aca tct gtt gcg His Gly Arg Asp Ser His Gly Ala Val Ala Ser Leu Thr Ser Val Ala 640 645 650			2330
aaa ctg cct tat aaa tat tcg ctt gac ggc att tcc aac act ttc tcg Lys Leu Pro Tyr Lys Tyr Ser Leu Asp Gly Ile Ser Asn Thr Phe Ser 655 660 665			2378
att gtc ccg gaa gcg ctc gga cac gaa gaa gaa aca cag gtc tcc aac Ile Val Pro Glu Ala Leu Gly His Glu Glu Glu Thr Gln Val Ser Asn 670 675 680			2426
ctg gac ggc atg ctg gac ggc tat atg gcg aaa aaa gcg cac cac tta Leu Asp Gly Met Leu Asp Gly Tyr Met Ala Lys Lys Ala His His Leu 685 690 695 700			2474
aac gtc aac gtc ctg cat cgc gaa aca ttg ctg gat gcg atg gat cat Asn Val Asn Val Leu His Arg Glu Thr Leu Leu Asp Ala Met Asp His 705 710 715			2522
ccg gaa aaa tat ccg caa ttg acg atc cgt gta tcg gga tat gcg gta Pro Glu Lys Tyr Pro Gln Leu Thr Ile Arg Val Ser Gly Tyr Ala Val 720 725 730			2570
aac ttc att aaa ttg aca agg gaa caa caa ctt gaa gtc att aac cgc Asn Phe Ile Lys Leu Thr Arg Glu Gln Gln Leu Glu Val Ile Asn Arg 735 740 745			2618
acg ttc cat gaa atg atg taa actgattcgg gcggcatgca cctgcgtgcc			2669

Thr Phe His Glu Met Met  
750

ccctcccccc tattaaacac ttaacttatg gggaatctat atagaaggat ttgattgag 2728

atg aac atg aca acg cgc att cat tcc act gaa tcg ttt ggc aca gtc 2776  
Met Asn Met Thr Thr Arg Ile His Ser Thr Glu Ser Phe Gly Thr Val  
755 760 765 770

gac ggg ccc ggc atc cgc tat gtc gta ttt acg caa ggc tgc ccg ctg 2824  
Asp Gly Pro Gly Ile Arg Tyr Val Val Phe Thr Gln Gly Cys Pro Leu  
775 780 785

cgc tgc aaa ttc tgc cac aac cca gat aca tgg aaa atc aat gaa ggc 2872  
Arg Cys Lys Phe Cys His Asn Pro Asp Thr Trp Lys Ile Asn Glu Gly  
790 795 800

aat gaa atg agc gtc gaa gag att atg agc gat gtg cgc gat tac ctg 2920  
Asn Glu Met Ser Val Glu Glu Ile Met Ser Asp Val Arg Asp Tyr Leu  
805 810 815

cct ttt att gaa gct tcc ggc ggt ggc att aca gtg agc ggc ggt gaa 2968  
Pro Phe Ile Glu Ala Ser Gly Gly Gly Ile Thr Val Ser Gly Gly Glu  
820 825 830

ccg ctt ttg cac ctc gat ttt ctg atc gaa ttg ttt aaa gcg tgc aaa 3016  
Pro Leu Leu His Leu Asp Phe Leu Ile Glu Leu Phe Lys Ala Cys Lys  
835 840 845 850

gaa att ggc gtc cat act gcc att gac aca gcg ggc gga tgt ttc tcg 3064  
Glu Ile Gly Val His Thr Ala Ile Asp Thr Ala Gly Gly Cys Phe Ser  
855 860 865

cgc agt tcc cgg ttt atg gaa aaa ctg gat gaa ttg atg aaa tat aca 3112  
Arg Ser Ser Arg Phe Met Glu Lys Leu Asp Glu Leu Met Lys Tyr Thr  
870 875 880

aat ctt gta tta ttg gac atc aag cat att gac ccg gaa aag cat aaa 3160  
Asn Leu Val Leu Leu Asp Ile Lys His Ile Asp Pro Glu Lys His Lys  
885 890 895

tgg ctg acc ggc atg tca aat gag cat att ctc gat ttc gcc cgg tat 3208  
Trp Leu Thr Gly Met Ser Asn Glu His Ile Leu Asp Phe Ala Arg Tyr  
900 905 910

ctc gct gac aag cat att ccg gtc tgg atc cgc cat gtg ctc gtt ccc 3256  
Leu Ala Asp Lys His Ile Pro Val Trp Ile Arg His Val Leu Val Pro  
915 920 925 930

ggc gtc gat tca gaa gaa gat ttg caa aaa aca tct gat ttt atc cat 3304  
Gly Val Asp Ser Glu Glu Asp Leu Gln Lys Thr Ser Asp Phe Ile His  
935 940 945

tcg ctg cca aac gtc gaa aaa atc gaa atc ctt ccg tac cat aag tta 3352  
Ser Leu Pro Asn Val Glu Lys Ile Glu Ile Leu Pro Tyr His Lys Leu  
950 955 960

ggc gtc tac aaa tac gag gcg ctc ggc atc gac tat ccc ctc aaa ggt 3400  
Gly Val Tyr Lys Tyr Glu Ala Leu Gly Ile Asp Tyr Pro Leu Lys Gly  
965 970 975

gtc gaa ccg ccg aca aaa gaa caa gtt gca cat gcg gaa cag att tta 3448  
Val Glu Pro Pro Thr Lys Glu Gln Val Ala His Ala Glu Gln Ile Leu

# 201305332

980 985 990

aaa agg gaa ttg cag taa agaaaaagcg ccggctgtcc gccggcactt 3496  
Lys Arg Glu Leu Gln  
995

ttttattccg cctaaaagaa cgatacaatg ttaagaaagc ggaaaaactt agagctcctc 3556

tcccctgaaa aattgccccg gggtttttta tccttttgct ggtaacgcgt catacggcaa 3616

gataaacggc aaaatggtcg cc 3638

<210> 4  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子 9

<400> 4  
ccctacgtat tggaacgggt gcagttggt 29

<210> 5  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子 10

<400> 5  
cccgaattcc cgggttgctg gcaacaaga 29

<210> 6  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子 11

<400> 6  
cccgaattct ttgagcgccc aatttgaa 29

<210> 7  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子 12

<400> 7  
cccaggcctc cggaacgcca acgtacaca 29

<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子 17

<400> 8  
acgagccgct gacactggat 20

<210> 9  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子 18

<400> 9  
gccgtcttcg ccttcgttca 20

<210> 10  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子 19

<400> 10  
tgaaccgaac cgcctgctgt 20

<210> 11  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子 20

<400> 11  
tcgcgccaga cgatatgcac 20

<210> 12  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子 21

<400> 12  
tgtcataagt cgccgaaccg 20

<210> 13

# 201305332

<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子 22

<400> 13  
tgattgtatg ccgccacgaa 20

<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子 23

<400> 14  
ggtgttgcag aagagcttgt 20

<210> 15  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子 24

<400> 15  
gtgccgcaat cgaataatc 20

<210> 16  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子 25

<400> 16  
catcaacgcc gccgttaatc 20

<210> 17  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 引子 26

<400> 17  
tcgttccgct tcctgaacac 20

<210> 18  
<211> 20

<212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引子 27  
  
 <400> 18  
 cccgccgcaa atcattatcg 20  
  
  
 <210> 19  
 <211> 19  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引子 28  
  
 <400> 19  
 taaaagcacc cgcaaagt 19  
  
  
 <210> 20  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引子 29  
  
 <400> 20  
 agatcttaag ccgtgtggag 20  
  
  
 <210> 21  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引子 30  
  
 <400> 21  
 cgcaacaata ctgccgattc 20  
  
  
 <210> 22  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
  
 <220>  
 <223> 引子 31  
  
 <400> 22  
 tcgcttccgc tcgtcgtt 20  
  
  
 <210> 23  
 <211> 20  
 <212> DNA

# 201305332

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子 32

<400> 23

tcccgcaaat cccttacctg

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子 33

<400> 24

ttggaggcga acaaagaaca

20

<210> 25

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子 34

<400> 25

cggcaatgga aaaagaaatg

20

七、申請專利範圍：

1. 一種分離之基因改造細菌細胞，包括：

(i) L 型（右旋）乳酸脫氫酶基因之失活或缺失；  
及

(ii) 乙醃乳酸合成酶基因之失活或缺失。

2. 如申請專利範圍第 1 項之細菌細胞，進一步包括選自於由丙酮酸甲酸裂解酶基因、編碼丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素之基因、 $\alpha$ -乙醃乳酸脫羧酶基因、丙酮酸脫氫酶基因及乙醇脫氫酶基因所組成之群組中之一或多個基因之失活（inactivation）或缺失（deletion）。

3. 如申請專利範圍第 1 項之細菌細胞，進一步包括將複數個外源基因引入該細菌細胞之一基因改造。

4. 如申請專利範圍第 1 項之細菌細胞，其中該基因改造包括編碼乳酸脫氫酶（*ldh*）、丙酮酸甲酸裂解酶（*pflB*）、丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素（*pflA*）、 $\alpha$ -乙醃乳酸脫羧酶（*alsD*）和/或乙醃乳酸合成酶（*alsS*）之一基因之突變，或是編碼乳酸脫氫酶（*ldh*）、丙酮酸甲酸裂解酶（*pflB*）、丙酮酸甲酸裂解酶活化酵素（*pflA*）、 $\alpha$ -乙醃乳酸脫羧酶（*alsD*）和/或乙醃乳

酸合成酶 (*alsS*) 之一基因全部或部分缺失。

5. 如申請專利範圍第 4 項之細菌細胞，該等基因之突變包括引入一或多個點突變，或是在基因之開放讀碼框中引入一或多個終止密碼子。
6. 如申請專利範圍第 3 項之細菌細胞，其中該基因改造包括乳酸脫氫酶、丙酮酸甲酸裂解酶和/或乙醯乳酸合成酶編碼序列中之一點突變或一缺失，和/或是將一外源序列插入乳酸脫氫酶、丙酮酸甲酸裂解酶和/或乙醯乳酸合成酶編碼區域。
7. 如申請專利範圍第 1 項之細菌細胞，其中該細菌細胞不含外源基因或其部分。
8. 如申請專利範圍第 1 項之細菌細胞，其中藉由選擇性使用對溫度敏感之一質體進行同源重組，使該細菌細胞之乳酸脫氫酶、丙酮酸甲酸裂解酶和/或乙醯乳酸合成酶之酵素活性失活。
9. 如申請專利範圍第 8 項之細菌細胞，其中該基因改造包括編碼乙醯乳酸合成酶之基因之完整或部分缺失。

10. 如申請專利範圍第 1 項之細菌細胞，其中該細菌為芽孢桿菌，或是選自於由凝結芽孢桿菌、地衣芽孢桿菌、枯草芽孢桿菌、液化澱粉芽孢桿菌、短小芽孢桿菌、環狀芽孢桿菌及解硫胺素芽孢桿菌所組成之群組中之一細菌。
  
11. 一種如申請專利範圍第 1 項所述之基因改造細菌細胞，其中該基因改造細菌細胞為 QZ4、QZ5、QZ13、QZ14、QZ15 或 QZ19。
  
12. 一種製造 D 型（左旋）乳酸之方法，該方法包括在含有一碳源之培養基中，於允許 D 型（左旋）乳酸產生之環境條件下，培養一基因改造細菌細胞，其中該基因改造細菌細胞係選自：
  - a) 一基因改造細菌細胞，其包括 (i) L 型（右旋）乳酸脫氫酶基因之失活或缺失；和 (ii) 乙醯乳酸合成酶基因之失活或缺失；或
  - b) QZ4、QZ5、QZ13、QZ14、QZ15 或 QZ19。
  
13. 如申請專利範圍第 12 項之方法，進一步包括分離或純化 D 型（左旋）-乳酸。

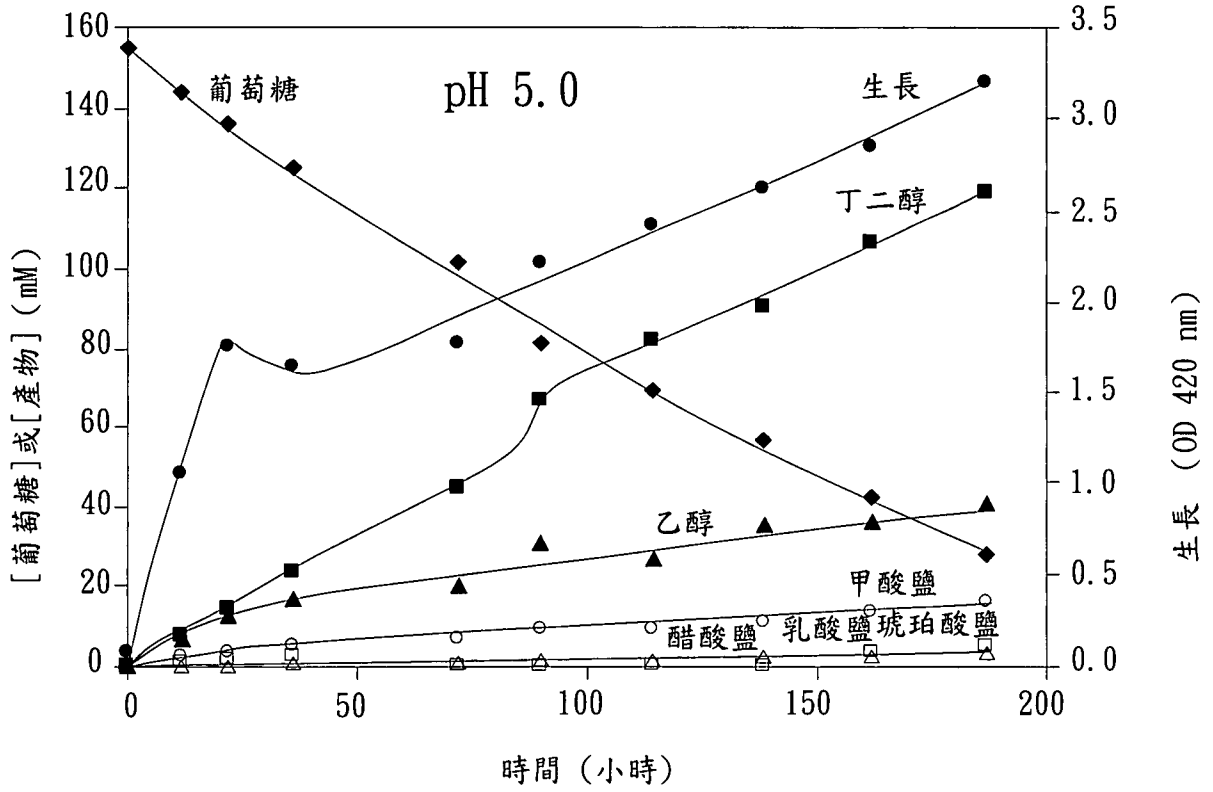
14. 如申請專利範圍第 13 項之方法，其中該菌株培養於一厭氧環境中。
15. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該培養基包括重量百分比介於 2%至 20%(w/v)之間之該碳源。
16. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該碳源係為葡萄糖、果糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、鼠李糖、蔗糖、纖維雙糖、半纖維素、纖維素、甘油或其組合。
17. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該發酵於厭氧環境下進行，酸鹼值為：
  - a) 約 5.0 至約 7.5；或
  - b) 約 7.0；或
  - c) 約 5.0。
18. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該基因改造細菌細胞在開始發酵後之 48 小時內，每公升發酵培養基產出至少 60 克之乳酸。
19. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中用以培養該

基因改造細菌細胞之該培養基之酸鹼值係利用自動加酸或鹼維持。

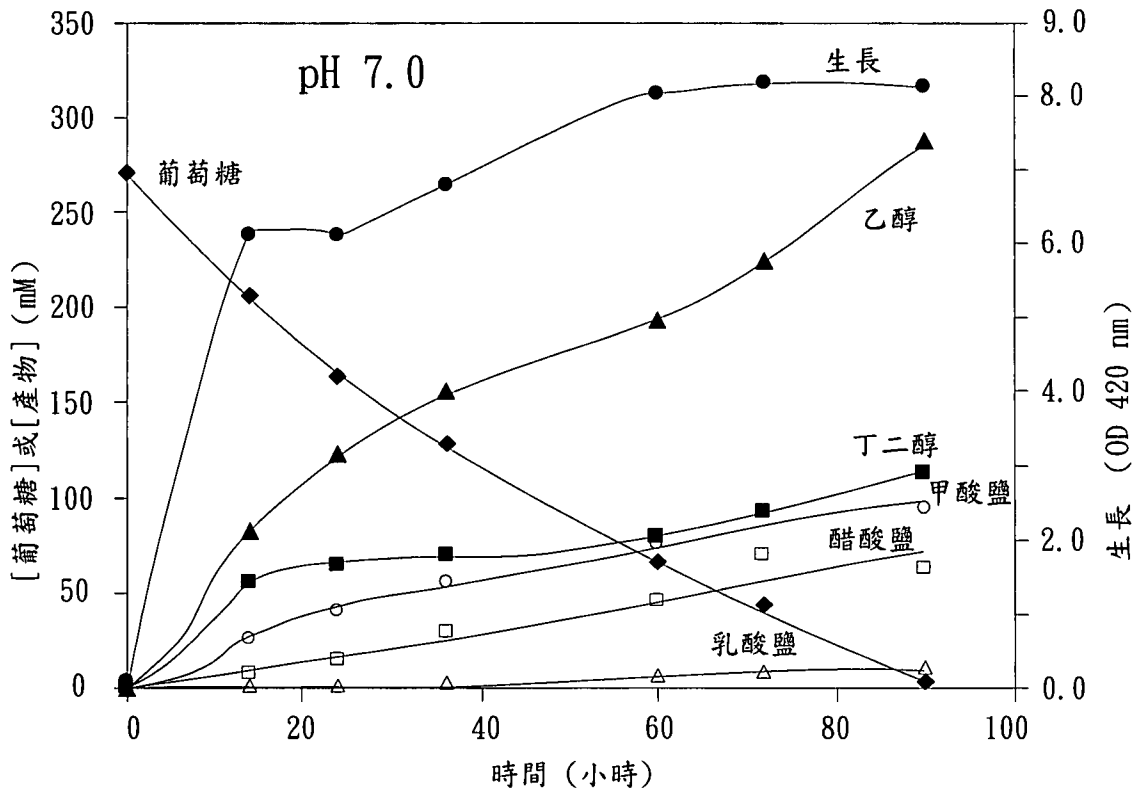
20. 如申請專利範圍第 12 項之方法，其中該方法包括在一溫度條件下培養該細菌細胞，該溫度條件係介於約 30°C 到約 65°C 之間；介於約 37°C 到約 65°C 之間；介於 37°C 到約 55°C 之間；介於約 45°C 到約 60°C 之間；介於約 45°C 到約 50°C 之間；或一溫度，該溫度係為約 30°C；約 37°C；或約 55°C。

八、圖式：

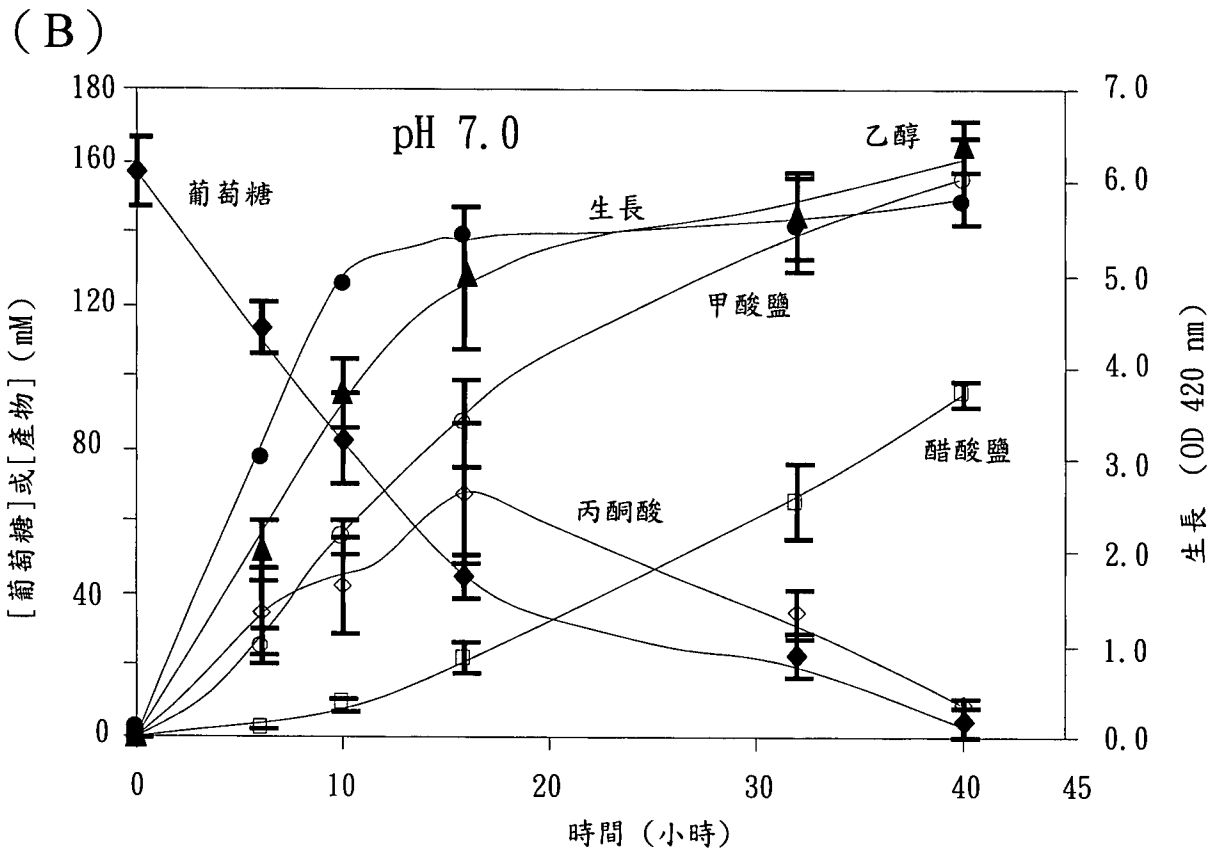
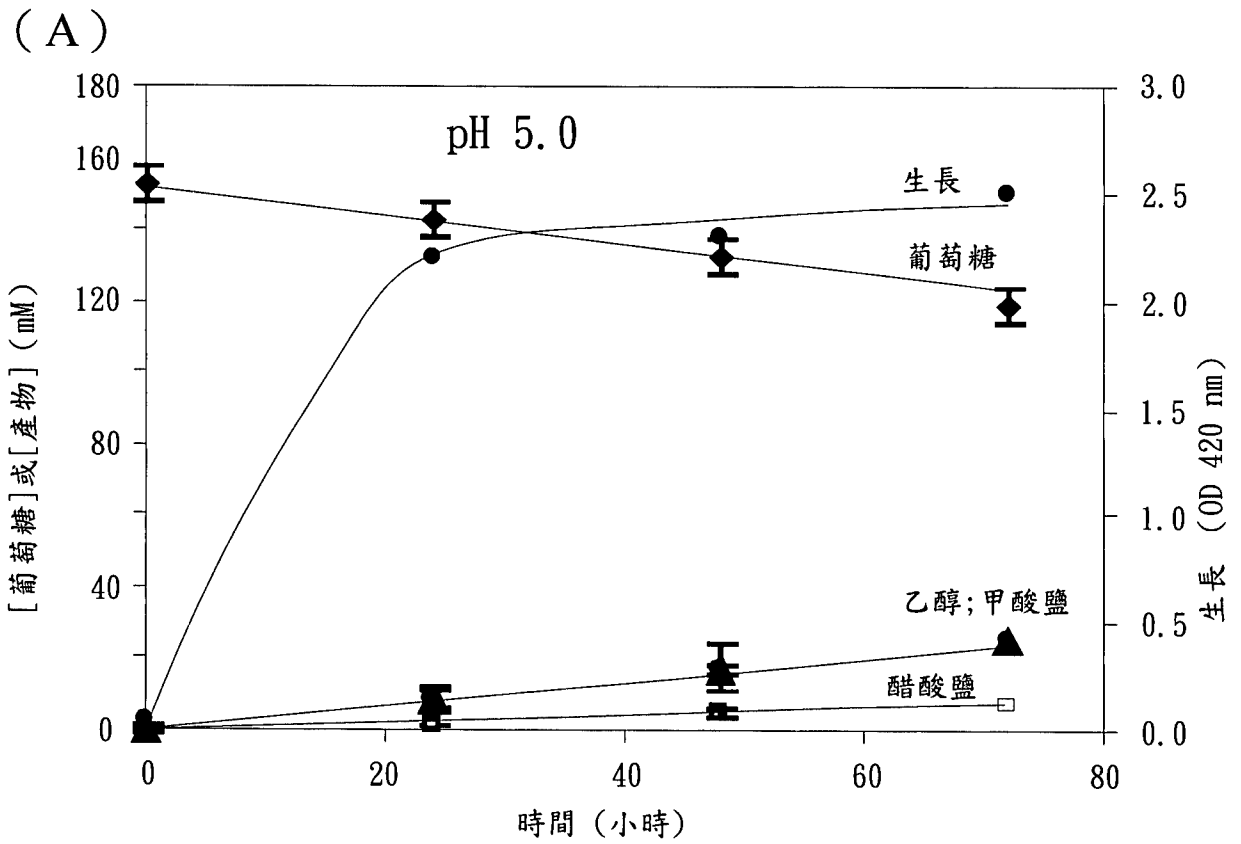
(A)



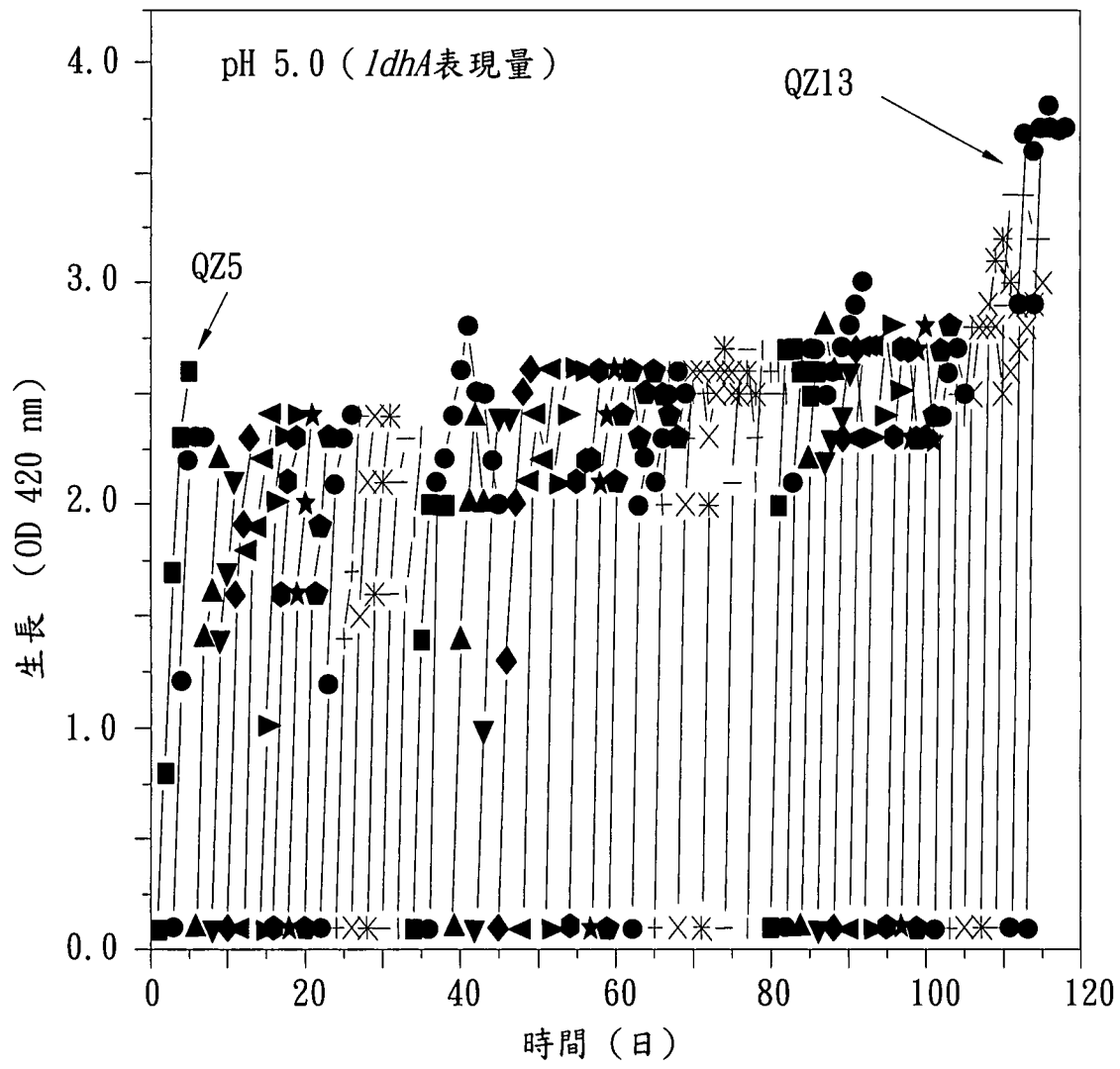
(B)

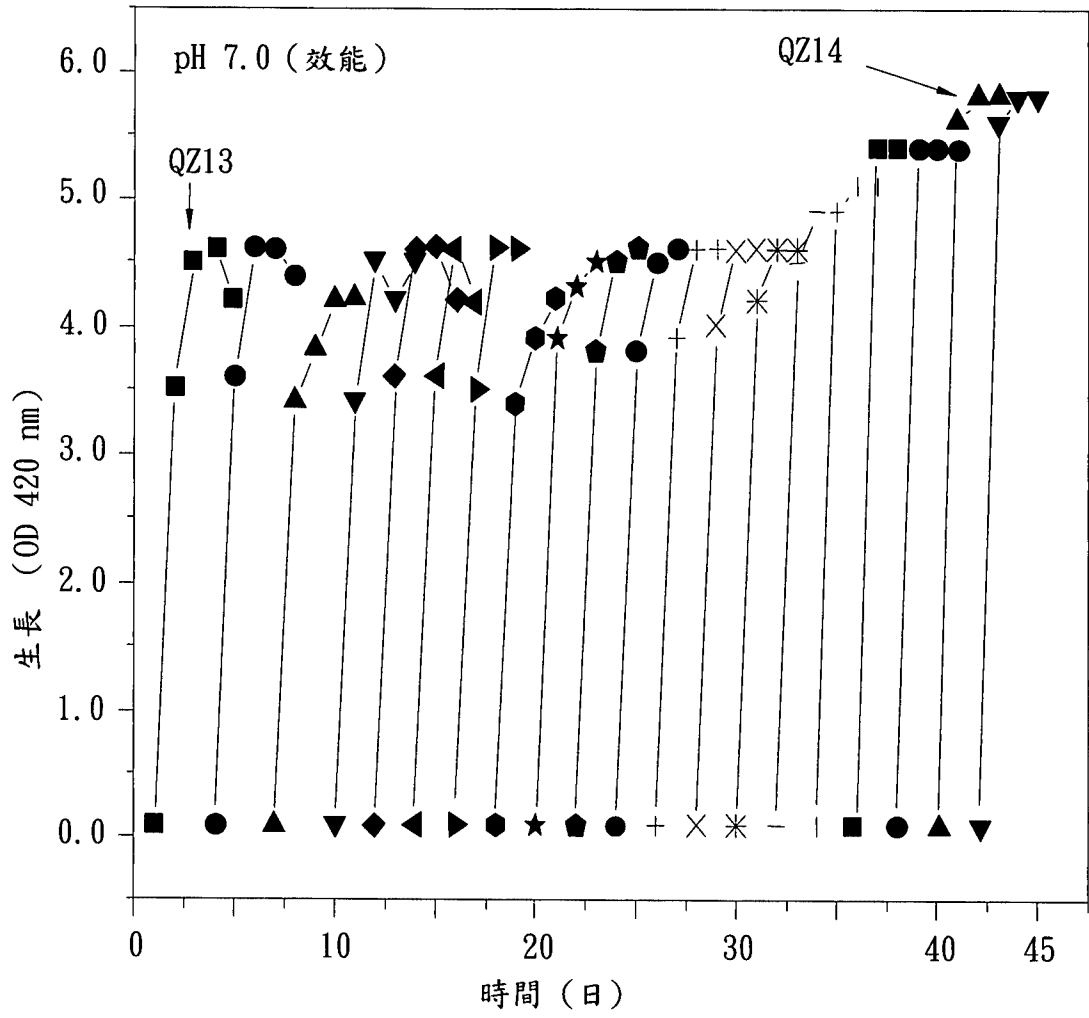


第 1 圖

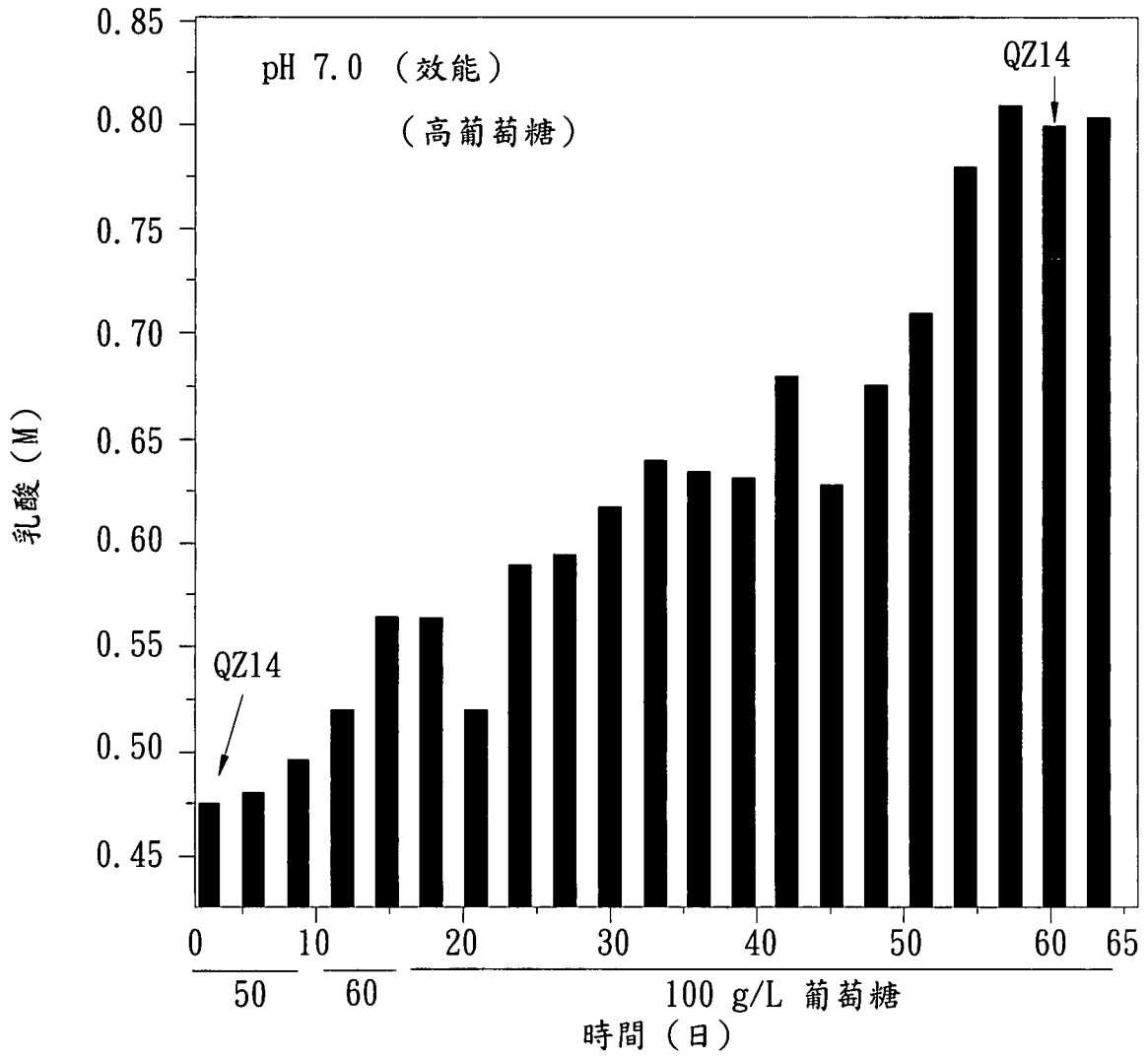


第 2 圖

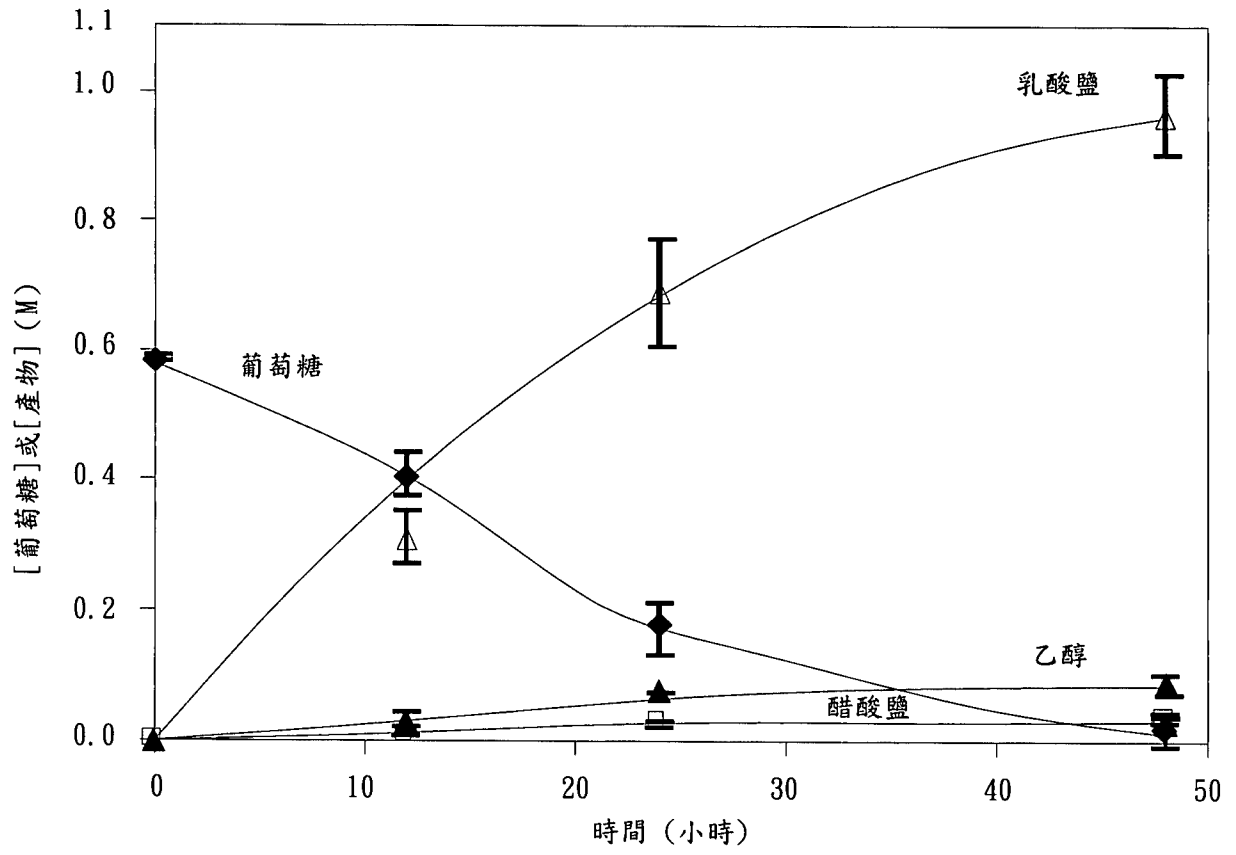




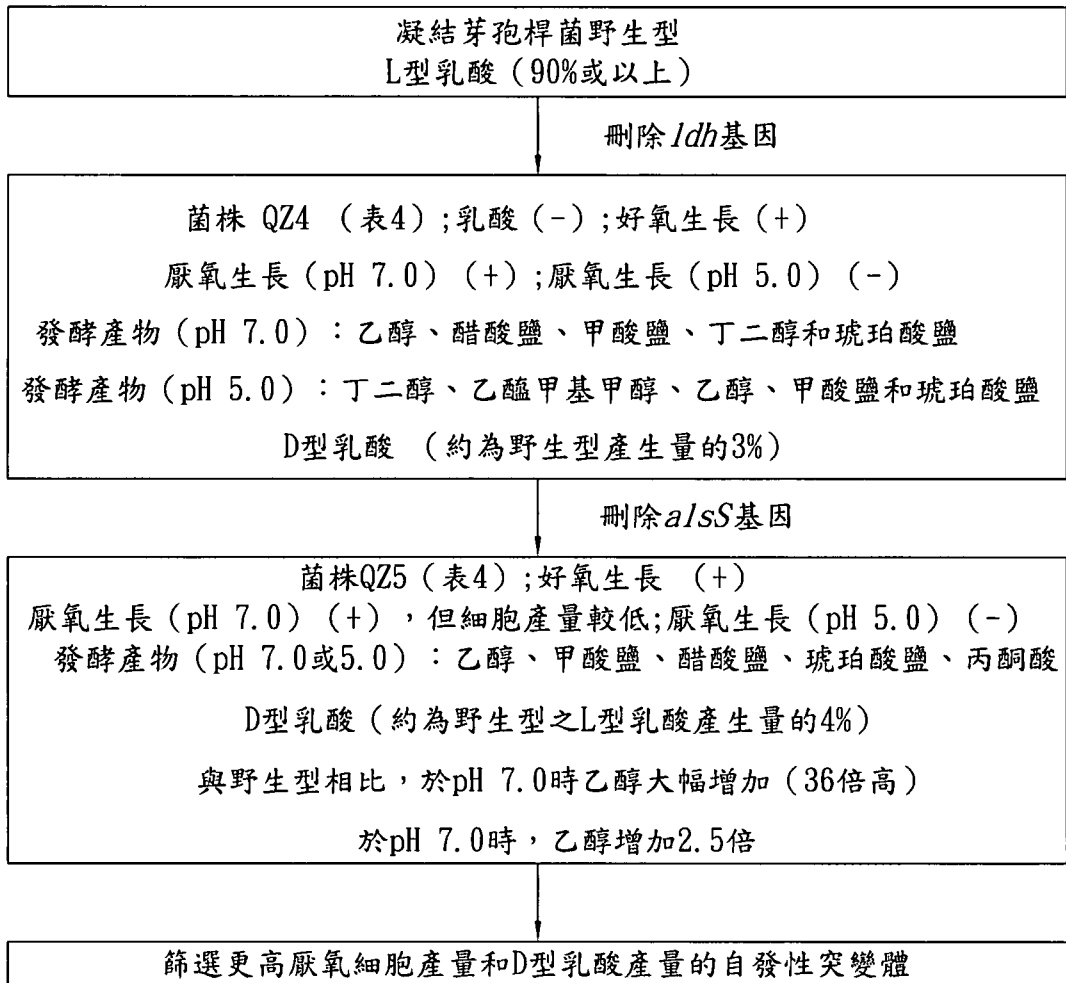
第 4 圖



第 5 圖



第 6 圖



第 7 圖