[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl[7]
C12P 13/20

[12]发明专利说明书

[21] ZL 专利号 99100744.1

[45]授权公告日 2002 年 5 月 8 日

[11]授权公告号 CN 1084389C

[22]申请日 1999.2.12 [24]颁证日 2002.5.8
[21]申请号 99100744.1
[30]优先权
[32]1998.2.13 [33]JP [31]031809/1998
[73]专利权人 株式会社日本触媒
地址 日本大阪
[72]发明人 向山正治 小松崎聪美
[56]参考文献

CN1124769A	1996. 7. 3	C12P13/20
CN1165860A	1997.11.26	C12N9/82
EP0110422A2	1984. 6.13	C12P13/20
JP3048795	1991. 7.25	G12C1/02
JP55035110	1980. 9.11	F01L1/00

审查员 谢 妍

[74]专利代理机构 中原信达知识产权代理有限责任公司
代理人 丁业平 王达佐

权利要求书 2 页 说明书 35 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 生产 L－天冬氨酸的方法

[57]摘要

本发明涉及用于生产 L－天冬氨酸的方法，该方法包括：固定含天 冬氨酸酶的微生物细胞以产生固定化天冬氨酸酶；将富马酸铵溶液加至 装有固定化天冬氨酸酶的反应器中；从反应混合物中回收生产的 L－天冬 氨酸，其中固定化天冬氨酸酶的活力为 250U 或更高，其中以 LHSV 为 2－35 的进料速率将富马酸铵溶液加至反应器中。

ISSN1008-4274

权 利 要 求 书

1. 用于生产 L-天冬氨酸的方法，该方法包括：

固定含天冬氨酸酶的微生物细胞以产生固定化天冬氨酸酶；

将富马酸铵溶液加至装有固定化天冬氨酸酶的反应器中；和

从反应混合物中回收生产的 L-天冬氨酸，

其中固定化天冬氨酸酶的活力为 250U 或更高，其中以 LHSV 为 2-35 的进料速率将富马酸铵溶液加至反应器中。

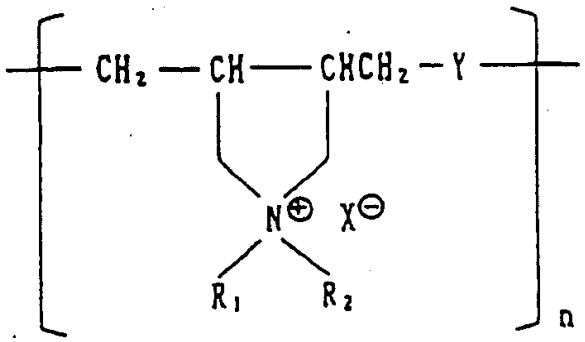
2. 根据权利要求 1 的方法，其中将要被加入反应器的富马酸铵溶液的温度加以控制，以便天冬氨酸酶的稳定性至少不受天氨酸酶与富马酸铵反应所产生的热而引起的富马酸铵溶液温度升高的损害。

3. 根据权利要求 1 的方法，其中要被加入反应器的富马酸铵溶液的温度为 10-33℃。

4. 根据权利要求 1 的方法，其中含天冬氨酸酶的微生物是含有通过重组 DNA 技术导入的天冬氨酸酶基因的重组微生物细胞。

5. 根据权利要求 1-4 任意一项的方法，其中通过用含天冬氨酸酶的微生物细胞和聚合物的混合物包被球形载体而得到固定化天冬氨酸酶。

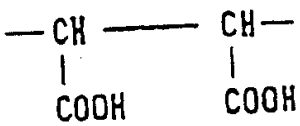
6. 根据权利要求 1-5 任意一项的方法，其中所述固定化天冬氨酸酶是通过与下列通式代表的聚合物混合的含天冬氨酸酶的微生物细胞包被球形苯乙烯二乙烯基苯共聚物型离子交换树脂载体而制得的：



其中 Y 是直接键或由下列分子式代表的双功能基团：



或



R_1 和 R_2 各自独立地是氢原子或有机残基，$X^{\ominus}$ 是阴离子，n 是 100-5000 的整数。

7. 根据权利要求 1-6 任意一项的方法，其中当 LHSV 为 20 时，所述固定化天冬氨酸酶的压力损失为在水中于 20℃下每米固定化天冬氨酸酶层 2.0kg/cm^2 或更低。

说　明　书

生产 L-天冬氨酸的方法

本发明涉及用具有高天冬氨酸酶活性的微生物生产 L-天冬氨酸的方法。

用具有天冬氨酸酶活性的微生物大肠杆菌从富马酸铵经酶促生产 L-天冬氨酸的方法是已知的。日本专利公开 55-35110(即 JP-B-55-35110)描述了其中将大肠杆菌天冬氨酸酶固定于离子交换树脂 Duolite A-7 的方法。应用生物化学和生物技术(Applied Biochemistry and Biotechnology)第 13 卷 231-240 页(1986)描述了连续生产 L-天冬氨酸的方法，其中反应器中装有大肠杆菌，所述大肠杆菌通过凝胶包埋而被固定于κ 角叉菜胶中。但是，从工业化生产的角度来看，这些方法是不令人满意的，因为被固定化的天冬氨酸酶活性低，或者因为凝胶包埋固定会引起扩散障碍或使扩散速率受到限制。

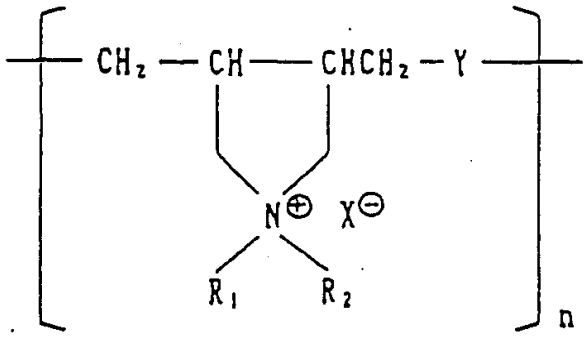
由于传统的固定化天冬氨酸酶没有足够高的活性，因此，需在 30℃或更高的温度完成反应，在反应中需要冷却，因为天冬氨酸酶会因反应热而损失了其活性。具体地说，在超过 40℃时，活性显著降低(Applied Microbiology vol.27, No.5,878-885 页(1974); Applied Microbioloyg vol.27, No.5, 886-889 页(1974))。为了防止因反应热而引起反应器中温度的升高，需要给反应器安装内部冷却管或冷却装置例如夹套，这样使反应器结构复杂。此外，由于现有技术中固定化天冬氨酸酶的活力低，因此，不能用所述天冬氨酸酶以高 LHSV 完成酶促反应。在使用通过凝胶包埋固定化的天冬氨酸酶的方法中，由于扩散障碍更大，也不可能以高 LHSV(液体时空速)完成酶促反应。

需要以高 LHSV 完成反应以便提高利用固定化天冬氨酸酶的酶促反应生产 L-天冬氨酸的生产率。利用在低温具有足够高的反应活性并且

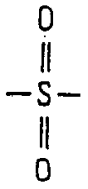
扩散障碍低和压力损失小的固定化天冬氨酸酶可完成所述反应。令人遗憾的是，本领域尚未制备出所述固定化天冬氨酸酶。在这种情况下，本发明人现已制备出具有上述优良特性的固定化天冬氨酸酶，并已发现通过将底物溶液导入反应器中，同时将底物溶液的温度控制在低于至少因反应热引起的温度升高而损害天冬氨酸酶稳定性的温度，确保固定化天冬氨酸酶的稳定活性，则无需除去热即可基本上以高 LHSV 完成反应。

本发明提供用于生产 L-天冬氨酸的方法，该方法包括：固定含天冬氨酸酶的微生物细胞以产生固定化天冬氨酸酶；将富马酸铵溶液加入装有固定化天冬氨酸酶的反应器中；从反应混合物中回收产生的 L-天冬氨酸，其中固定化天冬氨酸酶的活力为 250U 或更高，其中以 2-35 LHSV 的进料速率将富马酸铵溶液加至反应器中。本文所用“ 1U ”指每分钟每毫升固定化酶产生 1μmol L-天冬氨酸，“ LHSV ”表示“液体时空速”并表示每体积催化剂(以毫升计)每小时的进料底物体积(以毫升计)。

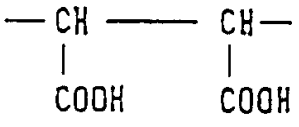
本发明所用的固定化天冬氨酸酶例如是固定化的重组微生物细胞，所述微生物细胞含有利用重组 DNA 技术导入的天冬氨酸酶基因。用含天冬氨酸酶的上述微生物细胞和聚合物包被球形载体即可得到固定化天冬氨酸酶。具体地讲，用与下列通式代表的聚合物混合的含天冬氨酸酶的上述微生物细胞包被球形苯乙烯二乙烯基苯共聚物型离子交换树脂载体可得到固定化天冬氨酸酶：



其中 Y 是直接键或由下列分子式代表的双功能基团：



或



R_1 和 R_2 各自独立地是氢原子或有机残基， $X^{\ominus}$ 是阴离子， n 是 100-5000 的整数。

举证性的有机残基包括含有 10 个碳原子以下的烷基，如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基和叔丁基，优选甲基。有机残基可包括至少一个作为取代基的卤素或羟基，例如 4-氯-2-二甲基戊基， 3-乙基-2,5-二氯庚基和 2-羟基-3,5-二甲基壬基，优选 3-氯-2-羟基丙基。

$X^{\ominus}$ 的实例包括卤素离子如 F^-、 Cl^-、 Br^-和 I^-，优选 Cl^-。也可用其他单价离子如 NO_3^-作为 $X^{\ominus}$。

通过上述固定方法固定上述含天冬氨酸酶基因的重组微生物细胞而得到的本发明固定化天冬氨酸酶有极高的活性并且压力损失少以及扩散障碍小。结果，与传统固定化天冬氨酸酶不同，利用本发明的固定化天冬氨酸酶可以以高 LHSV 完成酶促反应。

由于可将低温富马酸铵溶液加至反应中，所以天冬氨酸酶的寿命得到延长。

在阅读和理解了下列详细描述后，本发明的这些和其他优点对于本领域技术人员来说将是显而易见的。

本发明说明书包括在日本专利申请 10-31809 说明书中所公开的所有内容，该申请是本申请的优先权文件。

发明详述

本发明可使用的含天冬氨酸酶微生物优选是大肠杆菌、荧光假单胞菌、短杆菌属等，已知所述微生物具有高天冬氨酸酶活性。特别优选含有用重组 DNA 技术导入的天冬氨酸酶基因的重组细胞。

本发明所用的天冬氨酸酶基因优选得自大肠杆菌和含有天冬氨酸酶活性并且已知其基因与大肠杆菌基因天然杂交的微生物，例如荧光假单胞菌、肠杆菌属或柠檬酸杆菌属。但是，可以使用来自任何具有天冬氨酸酶活性之微生物的天冬氨酸酶基因。

例如，利用大肠杆菌 K-12(IFO3301)或荧光假单胞菌(IFO3081) 的染色体 DNA 为模板，利用以已知天冬氨酸酶基因序列为基础制备的引物，通过 PCR 扩增天冬氨酸酶基因。或者，通过其他常规方法，例如将得自染色体 DNA 的限制片段进行电泳以回收含天冬氨酸酶基因的片段，也可得到天冬氨酸酶基因。

用于掺入由此所得的天冬氨酸酶基因的质粒可以是任何能够在大肠杆菌细胞中复制的质粒。所述质粒的实例包括，但不限于 pUC18(Nippon Gene Co., Ltd.)和 pKK223-3(Pharmacia)。

作为用于导入已掺入天冬氨酸酶基因之质粒的宿主微生物，可以使用大肠杆菌菌株 K-12(Stratagene)等。

优选以具有下列特性的方法固定含天冬氨酸酶的微生物细胞，所述方法应使固定化产物有足够的强度，而且在加入底物溶液后不太可能引起压力损失或扩散障碍。

优选通过用细胞和聚合物包被球形载体表面来固定微生物细胞。更优选的是用细胞和聚丙烯基胺聚合物的混合物包被苯乙烯二乙烯苯共聚物型离子交换树脂的表面。作为苯乙烯二乙烯苯共聚物型离子交换树

脂和聚丙烯基胺聚合物，分别优选 Amberlite IRA96SB(Organo)和 PAS-880(Nitto Boseki Co., Ltd)。

根据上述方法，由于含天冬氨酸酶的微生物细胞本身即可被固定在载体上，因此，所述细胞中所含的天冬氨酸酶几乎全部被固定，由此得到具有很高活性的固定化天冬氨酸酶。

通过将与 PAS-880(pH7.0)混合的细胞加至含 Teflon 球和 Amberlite IRA-96SB 的茄形烧瓶中，用旋转蒸发器减压旋转干燥混合物，由此用细胞和 PAS-880 包被 Amberlite IRA-96SB 的表面，从而固定微生物细胞。

根据上述方法，可得到球形固定化产物，当 LHSV 为 20 时，每米固定化天冬氨酸酶层的压力损失为 2.0kg/cm^2 或更低(水中， 20 ℃)。这样以高 LHSV 反应就成为可能。该方法的其他优点是扩散层足够薄，因此可表现出足够的酶活性。当 LHSV 为 20 时，每米固定化天冬氨酸酶层固定化酶的压力损失优选为 2kg/cm^2 或更低，更优选 1 kg/cm^2 或更低。用于本发明的反应器形状通常，但不限于圆柱形反应器。反应器长度优选为 10 米或低于 10 米，因为反应器过长会引起压力损失。不需给反应器安装冷却装置。更优选，反应器是绝缘的。

需要在反应器前安装一温度可控储槽或热交换器以便使加至反应器中的富马酸铵溶液保持恒温。

通常，超过 40 ℃时，嗜温菌酶是不稳定的，而且由于热其失活也会加速。在超过 40 ℃时，大肠杆菌天冬氨酸酶极为不稳定，而且因热会使其活性受到损失(Applied Microbiology vol.27, No.5,878-885 页(1974); Applied Microbiology vol.27, No.5, 886-889 页(1974))。这种因热而引起的失活会导致固定化酶的寿命缩短。

为了防止因热引起的天冬氨酸酶失活，就需要控制加至反应器中的富马酸铵的温度，以便反应器出口处反应混合物的温度不超过 40 ℃。

在所述温度范围内，可得到具有良好稳定性的天冬氨酸酶。在大肠杆菌的情况下，温度范围是 40 ℃或低于 40 ℃，在较低的温度，稳定性较高。为了用在 40 ℃或高于 40 ℃的最佳温度仍稳定的天冬氨酸酶得到相似的效果，将进料底物溶液的温度控制在低于损伤天冬氨酸酶稳定性的温度，所述对天冬氨酸酶稳定性的损伤至少是由于反应热引起的温度升高而导致的。用传统固定化酶在上述范围内不能完成反应，因为传统固定化酶的活力不够。“损伤天冬氨酸酶稳定性的温度”，在大肠杆菌天冬氨酸酶的情况下是 40 ℃左右，在黄色短杆菌天冬氨酸酶的情况下是 48 ℃左右(Journal of Japan Society for Bioscience ,Biotechnology, and Agrochemistry, vol.59,No.1, 31-37 页,1985)，在产氨基酸芽孢杆菌天冬氨酸酶的情况下是 50 ℃左右(日本专利申请 3-48795)。

此外，当将富马酸铵溶液加至反应器并在平衡状态转变成 L-天冬氨酸时，富马酸铵溶液的温度将升高。在这种情况下，通过将富马酸铵溶液温度控制在低于 40 ℃，就可将反应混合物的温度保持在 40 ℃或 40 ℃以下。在上述范围内，温度应尽可能低以便提高稳定性。但是温度过低可能会引起晶体富马酸铵沉淀，因此在反应器入口的富马酸铵溶液温度优选最低为 10 ℃至 33 ℃，更优选 15 ℃至 28 ℃。

可将除大肠杆菌外的微生物天冬氨酸酶置于与上述条件相似的条件下。

具体地讲，当富马酸铵溶液的浓度为 10%(按富马酸计算)时，由于反应热，温度升高约 7 ℃。考虑固定化天冬氨酸酶的反应性，优选在 10 ℃至 33 ℃，更优选 15 ℃至 28 ℃，将富马酸铵溶液加至反应器中。

当富马酸铵溶液的浓度为 20%(按富马酸计算)时，由于反应热，温

度升高约 14 ℃，因此，优选在 10 ℃至 26 ℃，更优选 15 ℃至 24 ℃，将富马酸铵溶液加至反应器中。用这种方法，反应器出口的反应混合物的温度将不超过 40 ℃，天冬氨酸酶保持稳定。此外，在反应器内不需进行冷却，反应器本身的结构更加简单。

就生产率而言，优选加至反应器中的富马酸铵溶液的速度尽可能高，但所述速度可随富马酸铵溶液的浓度、固定化天冬氨酸酶的活力和固定化天冬氨酸酶层的长度而变化。 LHSV 范围优选为 2-35 ，特别为 6-30 ，最佳为 7-25 。

LHSV 超出上述范围是不利的，因为富马酸铵溶液转变成 L-天冬氨酸的转化率将降低。另一方面， LHSV 低于上述范围也是不利的，因为会使生产率降低。

在反应器出口，富马酸铵溶液转变成 L-天冬氨酸的转化率优选为 90%或更高，最佳为 95%或更高。异常低的转化率是不利的，因为这样会增加未反应富马酸的量并引起成本增加。

优选固定化天冬氨酸酶的活力为 250U ，最佳为 500U 。

当固定化天冬氨酸酶的活力为 250U 时，在以 LHSV 为 2 ，将 20%富马酸铵溶液加至反应器中并且其入口处温度为 20 ℃的条件下，转化率为 99%或更高。但是，当固定化天冬氨酸酶的活力为 100U ，其他条件与上述相同时，转化率降至 80%。当固定化天冬氨酸酶的活力为 1000U ，在以 LHSV 为 10 ，将 20%富马酸铵溶液加至反应器中并且其入口处温度为 23 ℃的条件下，转化率为 99%或更高。

如上所述，具有较高活性的固定化天冬氨酸酶能够使反应以较高 LHSV 进行。

以下将描述用遗传工程技术制备大肠杆菌或荧光假单胞菌天冬氨酸酶的方法。

(1)制备重组大肠杆菌天冬氨酸酶

将从发酵研究所(Institute for Fermentaton, Osaka, Japan (IFO))购买的大肠杆菌菌株 IFO3301 接种至表 1 所示的 LB 培养基中，在 37 ℃培养 8 小时。从 1 毫升培养物中，收集大肠杆菌细胞并悬浮在 1 毫升蒸馏水中。用 1 微升细胞悬浮液作为模板 DNA 用于扩增天冬氨酸酶基因。

表 1

LB 培养基的组成	
聚胨	10g
酵母提取物	5g
NaCl	10g
蒸馏水	1 升(用高压消毒锅在 121 ℃灭菌 15 分钟)

(2)用 PCR 扩增天冬氨酸酶基因并制备插入片段

为了扩增大肠杆菌的天冬氨酸酶基因，以已知大肠杆菌菌株 K-12 的天冬氨酸酶基因(其核苷酸序列由 SEQ ID NO： 1 表示，由其编码的氨基酸序列由 SEQ ID NO： 2 表示)(Biochem. J. 237(2),547-557)为基础，制备下列两个引物：

引物 F1：GGATAATCGTCGGTCGAAAA (SEQ ID NO:3)

引物 R1：CGTCATCTGACGTGCCTTT (SEQ ID NO:4)

用 KOD DNA 聚合酶(Toyobo Co., Ltd.)制备含有下列组成的反应溶液以便在下列条件下通过 PCR 扩增天冬氨酸酶基因：

组成：

10x 缓冲液	5μl
dNTPs 混合物	5μl
$MgCl_2$	2μl
模板 DNA	1μl
KOD DNA 聚合酶	1μl
引物 F1(25 pmol)	1μl
引物 R1(25 pmol)	1μl
蒸馏水	34μl
总量	50μl

PCR 条件(其中将 ii 至 iv 重复 30 个循环)：

i.	98 ℃， 5 分钟
ii.	98 ℃， 30 秒
iii.	53 ℃， 30 秒
iv.	68 ℃， 1 分钟

在 PCR 反应结束时，在 1%琼脂糖凝胶上电泳扩增的 DNA 片段并用溴化乙锭染色。预期的约 1600bp 片段被扩增。

从凝胶上切下片段以用 Prep-A-Gene®(Bio-Rad Laboratories, Inc.)回收 DNA 。

(3)将插入片段与载体连接

存在限制酶 Srf 和 DNA 连接酶的条件下，将回收的 DNA 片段连接至 pCR-Script Amp SK(+)克隆载体中。

将含插入片段的转化体命名为 PUaspE1 菌株。将菌株 PUaspE1 接种至 3 毫升含 100ppm 氨苄青霉素的 LB 培养基中并在 37 ℃振荡培养过

夜。从 1.5 ml 培养物收集细胞，再用碱 SDS 方法从细胞中回收质粒。将质粒命名为 pUaspE1 。

质粒中插入片段的定序表明以与载体启动子相反的方向插入了天冬氨酸酶基因。

为了相对于启动子以向前的方向正确地连接天冬氨酸酶基因，用限制酶 SacI 和 BamHI 从质粒 pUaspE1 中裂解出插入片段以导入 pUC19(Nippon Gene Co., Ltd.)。具体地讲，首先用 BamHI 裂解质粒 pUaspE1，然后在用 SacI 裂解前，通过乙醇沉淀收集 DNA 。在 1%琼脂糖凝胶上电泳分离裂解的 DNA 片段，然后从凝胶上切下以便用 Prep-A-Gene®(Bio-Rad Laboratories, Inc.)回收 DNA 插入片段。

(4)制备载体

将 1μg 质粒 pUC19(Nippon Gene Co., Ltd.)用限制酶 BamHI 裂解，然后通过乙醇沉淀回收所得的 DNA 片段，再用 SacI 裂解。在 1%琼脂糖凝胶上电泳分离裂解的 DNA 片段，然后从凝胶上切下以便用 Prep-A-Gene®(Bio-Rad Laboratories, Inc.)回收靶 DNA 作为载体。

(5)将插入片段与载体相连

在 16 ℃，经 30 分钟，用 Ligation high®(Toyobo Co., Ltd.)将均已用相同限制酶裂解过的插入片段和载体相连。

(6)转化大肠杆菌

为了转化大肠杆菌，将 2μl 反应混合物加至 200μl 感受态大肠杆菌细胞(由 Stratagene 生产的 XL2-Blue MRF'超感受态细胞)中，所述反应混合物含有带连接的插入片段的载体。将大肠杆菌转化体铺在含 100ppm 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基上并在 37 ℃培养过夜。

作为对照，将用不含插入片段的质粒 pUC18 转化的大肠杆菌铺在

含 100ppm 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基上并在 37 ℃培养过夜。

捡出出现的 20 个菌落，接种至含 100ppm 氨苄青霉素的 LB 培养基中，在 37 ℃振荡培养。 8 小时后，将 IPTG(异丙基-1-硫代-β-D-半乳糖苷)加至培养基中达到 1mM 的浓度，然后在 30 ℃振荡培养过夜。从 1 毫升培养物中回收细胞。

同样，培养不含插入片段的对照转化体以回收细胞。通过加入 1 毫升表 2 所示的富马酸铵底物溶液悬浮回收的细胞，然后使其在 30 ℃反应 1 小时。

表 2

20%富马酸铵底物溶液的组成

富马酸	200g
25%氨水	200g
硫酸镁	2.5g
离子交换水	500g

在用 25%氨水将反应混合物的 pH 调整至 8.3 后，加入离子交换水达到 1 升的总体积。在分析反应混合物时，在含插入片段的大肠杆菌转化体中，转变成 L-天冬氨酸的转变百分比为 99.5%，而不含插入片段的对照转化体的转变百分比为 5%。

将含插入片段的一个转化体命名为 PUaspE2 。将 PUaspE2 菌株接种至 3 毫升含 100ppm 氨苄青霉素的 LB 培养基中，然后在 37 ℃培养 8 小时。从 1.5ml 培养物中，用碱 SDS 方法回收质粒，将其命名为 pUaspE2 。用限制酶 SmaI 裂解质粒 pUaspE2，然后用限制酶 HindIII 裂解，接着用 1%琼脂糖凝胶电泳以确定 DNA 片段的大小。出现了大小分别为约 2960bp 和约 1600bp 的两个片段。

用 PUaspE2 菌株接种 3 毫升含 100ppm 氨苄青霉素的 LB 培养基，然后在 37 ℃振荡培养。 8 小时后，将 IPTG 加至培养基中达到 1mM 的浓度，然后在 30 ℃继续振荡培养。从 1 毫升培养物中回收细胞，其在 OD 660nm 的密度为 8.0 。将细胞悬浮在 10 毫升 20%富马酸铵底物溶液中，然后在 30 ℃反应 1 小时。用 HPLC 分析反应混合物。以 L-天冬氨酸产率和细胞密度为基础计算天冬氨酸酶活性，其活性为 2,000,000μM L-天冬氨酸/小时/OD 660nm 细胞密度。

同样，培养并回收不含插入片段的一个对照转化体。其在 OD 660nm 的密度为 8.5 。将细胞悬浮在 10 毫升 20%富马酸铵底物溶液中，然后在 30 ℃反应 1 小时。用 HPLC 分析反应混合物。以 L-天冬氨酸产率和细胞密度为基础计算天冬氨酸酶活性，其活性为 10,000μM L-天冬氨酸/小时/OD 660nm 细胞密度。

PUaspE2 菌株的天冬氨酸酶活性是不含天冬氨酸酶基因插入片段之菌株的 200 倍。

(7)培养重组大肠杆菌

用能够表达大肠杆菌天冬氨酸酶的重组体大肠杆菌菌株 PUaspE2 接种 10 个试验试管，每个试管含有 3 毫升通过将 100ppm 氨苄青霉素加至表 1 所示培养基而制备的培养基，然后在 37 ℃培养。 8 小时后，用试验试管中的培养物分别接种 10 个 Sakaguchi 烧瓶，每个烧瓶含 100 毫升与上述用 1mM IPTG 补充的培养基具有相同组成的培养基，然后在 30 ℃振荡培养过夜。

从这些培养物中，离心收集细胞。测量的细胞的天冬氨酸酶活性为 1.05mol L-天冬氨酸/小时/g 细胞。

(8)制备重组荧光假单胞菌天冬氨酸酶

用从发酵研究所, Osaka(IFO)购买的荧光假单胞菌菌株 IFO3081 接

种表 1 所示的 LB 培养基，然后在 30 ℃培养 8 小时。从 1 毫升培养物收集细胞，然后悬浮在 1 毫升蒸馏水中。用 1μl 细胞悬浮液作为模板 DNA 用于扩增天冬氨酸酶基因。

(9)用 PCR 扩增天冬氨酸酶基因并制备插入片段

为了扩增荧光假单胞菌的天冬氨酸酶基因，以已知荧光假单胞菌菌株 IFO3081 的天冬氨酸酶基因的核苷酸序列(J.Biochem. 100, 697-705(1986))为基础，制备下列两个引物：

引物 F2：

GGGCATATGATCTCCGTCATGTCCTCTGCTGCATCTTTCCG (SEQ ID NO:5)

引物 R2：

CCCGGATCCTTAGGCCTTCAGCGGACCAAGCGTGGGG (SEQ ID NO:6)

用 KOD DNA 聚合酶(Toyobo Co., Ltd.)制备含有下列组成的反应溶液以便在下列条件下通过 PCR 扩增天冬氨酸酶基因：

组成：

10x 缓冲液	5μl
dNTPs 混合物	5μl
$MgCl_2$	2μl
模板 DNA	1μl
KOD DNA 聚合酶	1μl
引物 F2(25 pmol)	1μl
引物 R2(25 pmol)	1μl
无菌水	34μl
总量	50μl

PCR 条件(其中将 ii 至 iv 重复 30 个循环)：

i.	98 ℃， 5 分钟
ii.	98 ℃， 30 秒
iii.	55 ℃， 30 秒
iv.	68 ℃， 1 分钟

在 PCR 反应结束时，在 1%琼脂糖凝胶上电泳扩增的 DNA 片段并用溴化乙锭染色。预期的约 1500bp 片段被扩增。

从凝胶上切下片段以用 Prep-A-Gene®(Bio-Rad Laboratories, Inc.)回收 DNA。用限制酶 NdeI 和 BamHI 同时裂解回收的 DNA，通过在 1%琼脂糖凝胶上电泳分离所得的 NdeI-BamHI 片段，然后从凝胶上切下以按上述用 Prep-A-Gene®(Bio-Rad Laboratories, Inc.)回收 DNA。

(10)制备载体

为了通过 PCR 制备在质粒 pUC18 的β-半乳糖苷酶结构基因的起始和终止密码子位置分别含有 NdeI 和 BamHI 限制酶位点的载体 DNA 片段，制备下列两个引物：

引物 F3：CCCCATATGTGTTTCCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACA ATTCCACACAATATACGAGCC (SEQ ID NO:7)

引物 R3 CCCGGATCCTTAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACC (SEQ ID NO:8)

用 KOD DNA 聚合酶(Toyobo Co., Ltd.)制备含有下列组成的反应溶液以便在下列条件下通过 PCR 扩增天冬氨酸酶基因：

组成：

10x 缓冲液	5μl
dNTPs 混合物	5μl
$MgCl_2$	2μl
模板 DNA	1μl
KOD DNA 聚合酶	1μl
引物 F3(25 pmol)	1μl
引物 R3(25 pmol)	1μl
无菌水	34μl
总量	50μl

PCR 条件(其中将 ii 至 iv 重复 30 个循环)：

i. 98 ℃， 5 分钟

ii. 98 ℃， 30 秒

iii. 55 ℃， 30 秒

iv. 68 ℃， 1 分钟

在 PCR 反应结束时，在 1%琼脂糖凝胶上电泳扩增的 DNA 片段并用溴化乙锭染色。预期的约 2400bp 片段被扩增。

从凝胶上切下片段以用 Prep-A-Gene®(Bio-Rad Laboratories, Inc.)回收 DNA 。用限制酶 NdeI 和 BamHI 同时裂解回收的 DNA，通过在 1%琼脂糖凝胶上电泳分离所得的 NdeI-BamHI 片段，然后从凝胶上切下以按上述用 Prep-A-Gene®(Bio-Rad Laboratories, Inc.)回收 DNA 。

(11)将插入片段与载体相连

在 16 ℃，经 30 分钟，用 Ligation high®(Toyobo Co., Ltd.)将均已用相同限制酶裂解过的插入片段和载体相连。

(12)转化大肠杆菌

为了转化大肠杆菌，将 2μl 反应混合物加至 200μl 感受态大肠杆菌细胞(由 Stratagene 生产的 XL2-Blue MRF'超感受态细胞)中，所述反应混合物含有带连接的插入片段的载体。将大肠杆菌转化体铺在含 100ppm 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基上并在 37 ℃培养过夜。

作为对照，将用不含插入片段的质粒 pUC18 转化的大肠杆菌铺在含 100ppm 氨苄青霉素的 LB 琼脂培养基上并在 37 ℃培养过夜。

捡出出现的 20 个菌落，接种至含 100ppm 氨苄青霉素的 LB 培养基中，在 37 ℃振荡培养。8 小时后，将 IPTG 加至培养基中达到 1mM 的浓度，然后在 30 ℃振荡培养过夜。从 1 毫升培养物中回收细胞。

同样，培养不含插入片段的一个对照转化体以回收细胞。

将回收的细胞悬浮在 1 毫升表 2 所示的富马酸铵底物溶液中并在 30 ℃反应 1 小时。

分析反应混合物。结果在含插入片段的大肠杆菌转化体中，转变成 L-天冬氨酸的转化%为 99.5%，而不含插入片段的对照转化体的转化%为 5%。

将含插入片段的转化体命名为 PUaspP1 。用菌株 PUaspP1 接种 3 毫升含 100ppm 氨苄青霉素的 LB 培养基，然后在 37 ℃培养 8 小时。从 1.5 毫升培养物中用碱 SDS 法回收质粒，将该质粒命名为 pUaspP1 。用限制酶 NdeI 和 BamHI 裂解该质粒，然后用 1%琼脂糖凝胶电泳以确定 DNA 片段的大小。出现了大小为约 2400bp 和约 1500bp 的两个片段。

用 PUaspP1 菌株接种 3 毫升含 100ppm 氨苄青霉素的 LB 培养基，然后在 37 ℃振荡培养。8 小时后，将 IPTG 加至培养基中达到 1mM 的浓度，然后在 30 ℃继续振荡培养。从 1 毫升培养物中回收细胞，其在

OD 660nm 的密度为 8.0 。将细胞悬浮在 10 毫升 20%富马酸铵底物溶液中，然后在 30 ℃反应 1 小时。通过 HPLC 分析反应混合物。以 L-天冬氨酸产率和细胞密度为基础计算天冬氨酸酶活性，其活性为 2,500,000μM L-天冬氨酸/小时/OD 660nm 细胞密度。

同样，培养并回收不含插入片段的一个对照转化体。其在 OD 660nm 的密度为 7.0 。将细胞悬浮在 10 毫升 20%富马酸铵底物溶液中，然后在 30 ℃反应 1 小时。通过 HPLC 分析反应混合物。以 L-天冬氨酸产率和细胞密度为基础计算天冬氨酸酶活性，其活性为 10,000μM L-天冬氨酸/小时/OD 660nm 细胞密度。

PUaspP1 菌株的天冬氨酸酶活性是不含天冬氨酸酶基因插入片段之菌株的 250 倍。

(13)培养重组大肠杆菌

用能够表达荧光假单胞天冬氨酸酶的重组大肠杆菌菌株 PUaspP1 接种 10 个试验试管，每个试管含有 3 毫升通过将 100ppm 氨苄青霉素加至表 1 所示培养基而制备的培养基，然后在 37 ℃培养。 8 小时后，用试验试管中的培养物分别接种 10 个 Sakaguchi 烧瓶，每个烧瓶含 100 毫升与上述用 1mM IPTG 补充的培养基具有相同组成的培养基，然后在 30 ℃振荡培养过夜。

从这些培养物中，离心收集细胞。测量的细胞的天冬氨酸酶活性为 0.85mol L-天冬氨酸/小时/g 细胞。

下文将通过下列实施例更详细地描述本发明。但是本发明的技术范围不限于所述实施例。

实施例 1

用能够表达荧光假单胞菌天冬氨酸酶的重组大肠杆菌菌株

PUaspP1 接种 10 个试验试管，每个试管含有 3 毫升通过将 100ppm 氨苄青霉素加至表 1 所示培养基而制备的培养基，然后在 37 ℃培养。 8 小时后，用试验试管中的培养物分别接种 10 个 Sakaguchi 烧瓶，每个烧瓶含 100 毫升通过将 1mM IPTG 和 100ppm 氨苄青霉素加入到表 3 所示的培养基中制得的培养基，然后在 30 ℃振荡培养过夜。从这些培养物中，离心收集细胞。天冬氨酸酶的活力为 0.19 mol L-天冬氨酸/小时/g 细胞。

表 3

培养基组成

富马酸	10g
硫酸铵	5g
KH_2PO_4	1g
K_2HPO_4	3g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5g
NaOH	6.5g, pH6.3
酵母提取物	20g

(用高压消毒锅在 121 ℃灭菌 15 分钟)

将 70g PAS-880(Nitto Boseki Co., Ltd.)(用碱将 pH 调至 7.0 左右)和 230g 去离子水彻底混合，在其中将收集的细胞分散均匀。将 300 毫升离子交换树脂(由 Organo, Japan 生产的 Amberlite IRA-96SB 型 C1，平均颗粒大小为 0.5mm)和 200 个 Teflon 球(每个 0.5 英寸)放在 6L 茄形烧瓶中，向其中加入 1/6 上述细胞分散液。在 30 ℃用蒸发器将混合物旋转干燥 1 小时以便用细胞包被离子交换树脂。该步骤重复 6 次后，除去 Teflon 球得到珠样的固定化天冬氨酸酶。所述固定化天冬氨酸酶的活力为 354U 。

4 ℃，将上述制备的固定化天冬氨酸酶浸在 20%富马酸铵溶液(pH8.3)中过夜，用其中的 50 毫升填充柱形反应器(1cm 直径)。负载的固定化天冬氨酸酶层的长度为约 64 厘米。为了使反应器绝热，用热绝缘材料即聚苯乙烯泡沫包覆该柱。经用热绝缘材料包覆的 Teflon 管，以

100 毫升/小时(LHSV ＝ 2.0)的流速将底物溶液(每升含 200g 富马酸，200g 25%氨水， 0.25g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$；用氨水将 pH 调至 8.3)加至柱中以完成连续反应。

反应开始后 3 小时，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 99.77%。流出物的温度为 33 ℃。反应开始后 7 天，甚至 1 个月，转化率仍达到 99.7%。

为了测量固定化天冬氨酸酶的压力损失，使水(20 ℃)流过该柱。结果，当 LHSV 为 20(1L/小时)时，每米固定化天冬氨酸酶层的压力损失为 0.8 kg/cm^2。

实施例 2

用能够表达荧光假单胞菌天冬氨酸酶的重组大肠杆菌菌株 PUaspP1 接种 10 个试验试管，每个试管含有 3 毫升通过将 100ppm 氨苄青霉素加至表 1 所示培养基而制备的培养基，然后在 37 ℃培养。 8 小时后，用试验试管中的培养物分别接种 10 个 Sakaguchi 烧瓶，每个烧瓶含 100 毫升通过将 1mM IPTG 和 100ppm 氨苄青霉素加入到表 3 所示的培养基中制得的培养基，然后在 30 ℃振荡培养过夜。从这些培养物中，离心收集细胞。天冬氨酸酶的活力为 0.85mol L-天冬氨酸/小时/g 细胞。

按照与实施例 1 相同的方法固定细胞以得到固定化天冬氨酸酶。固定化天冬氨酸酶的活力为 2800U 。

4 ℃，将上述制备的固定化天冬氨酸酶浸在 20%富马酸铵溶液(pH8.3)中过夜，用其中的 10 毫升填充柱形反应器(1cm 直径)以便按照实施例 1 的描述进行连续反应。负载的固定化天冬氨酸酶层的长度为约 13 厘米。以 100 毫升/小时(LHSV ＝ 10.0)的流速将底物溶液(20 ℃)加至柱中以完成连续反应。

反应开始后 3 小时，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 99.6%。流出物的温度为 33 ℃。反应开始后 7 天，甚至 1 个月，转化率仍达到 99.5%。

实施例 3

用能够表达荧光假单胞菌天冬氨酸酶的重组大肠杆菌菌株 PUaspP1 接种 10 个试验试管，每个试管含有 3 毫升通过将 100ppm 氨苄青霉素加至表 1 所示培养基而制备的培养基，然后在 37 ℃培养。8 小时后，用试验试管中的培养物分别接种 10 个 Sakaguchi 烧瓶，每个烧瓶含 100 毫升通过将 1mM IPTG 和 100ppm 氨苄青霉素加入到表 3 所示的培养基中制得的培养基，然后在 30 ℃振荡培养过夜。从这些培养物中，离心收集细胞。天冬氨酸酶的活力为 0.85mol L-天冬氨酸/小时/g 细胞。

按照实施例 1 所述的方法固定细胞以得到固定化天冬氨酸酶，不同之处是仅将一半的细胞用于固定。固定化天冬氨酸酶的活力为 560U 。

4 ℃，将上述制备的固定化天冬氨酸酶浸在 20%富马酸铵溶液(pH8.3)中过夜，用其中的 10 毫升填充柱形反应器(1cm 直径)以便按实施例 2 所述完成连续反应，但用恒温器将底物溶液保持在 23 ℃。以 100 毫升/小时(LHSV ＝ 10.0)的流速将底物溶液加至柱中以完成连续反应。

反应开始后 3 小时，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 99.6%。流出物的温度为 36 ℃。反应开始后 7 天，甚至 1 个月，转化率仍达到 99.5%。

实施例 4

用能够表达大肠杆菌天冬氨酸酶的重组大肠杆菌菌株 PUaspE2 接

种 10 个试验试管，每个试管含有 3 毫升通过将 100ppm 氨苄青霉素加至表 1 所示培养基而制备的培养基，然后在 37 ℃培养。 8 小时后，用试验试管中的培养物分别接种 10 个 Sakaguchi 烧瓶，每个烧瓶含 100 毫升通过将 1mM IPTG 和 100ppm 氨苄青霉素加入到表 3 所示的培养基中制得的培养基，然后在 30 ℃振荡培养过夜。从这些培养物中，离心收集细胞。天冬氨酸酶的活力为 1.27mol L-天冬氨酸/小时/g 细胞。

按照与实施例 1 所述相同的方法固定细胞以得到固定化天冬氨酸酶。固定化天冬氨酸酶的活力为 3200U 。

4 ℃，将上述制备的固定化天冬氨酸酶浸在 20%富马酸铵溶液(pH8.3)中过夜，用其中的 10 毫升填充柱形反应器(1cm 直径)以便按实施例 1 所述完成连续反应。以 100 毫升/小时(LHSV ＝ 10.0)的流速将底物溶液(20 ℃)加至柱中以完成连续反应。

反应开始后 3 小时，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 99.6%。流出物的温度为 33 ℃。反应开始后 7 天，甚至 1 个月，转化率仍达到 99.6%。

为了测量固定化天冬氨酸酶的压力损失，使水(20 ℃)流过该柱。结果，当 LHSV 为 20(1L/小时)时，每米固定化天冬氨酸酶层的压力损失为 0.7kg/cm^2 。

实施例 5

按实施例 4 所述培养能够表达大肠杆菌天冬氨酸酶的重组大肠杆菌菌株 PUaspE2 以收集细胞。天冬氨酸酶活性为 1.00mol L-天冬氨酸/小时/g 细胞。除仅用 1/10 所得细胞外，按实施例 1 所述得到固定化天冬氨酸酶。固定化天冬氨酸酶的活力为 265U 。

4 ℃，将上述制备的固定化天冬氨酸酶浸在 20%富马酸铵溶液(pH8.3)中过夜，用其中的 10 毫升填充柱形反应器(1cm 直径)以便按实施例 1 所述完成连续反应。以 20 毫升/小时(LHSV = 2.0)的流速将底物溶液(20 ℃)加至柱中。反应开始后 3 小时，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 99.2%。流出物的温度为 31 ℃。反应开始后 7 天，甚至 1 个月，转化率仍达到 99.2%。

实施例 6

按实施例 4 所述培养能够表达大肠杆菌天冬氨酸酶的重组大肠杆菌菌株 PUaspE2 以收集细胞。天冬氨酸酶活性为 1.20mol L-天冬氨酸/小时/g 细胞。按实施例 1 所述从细胞制备固定化天冬氨酸酶。固定化天冬氨酸酶的活力为 3600U 。

4 ℃，将上述制备的固定化天冬氨酸酶浸在 20%富马酸铵溶液(pH8.3)中过夜，用其中的 10 毫升填充柱形反应器(1cm 直径)以便按实施例 1 所述完成连续反应。以 200 毫升/小时(LHSV = 20.0)的流速将底物溶液(20 ℃)加至柱中以完成连续反应。

反应开始后 3 小时，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 97.0%。流出物的温度为 33 ℃。反应开始后 7 天，甚至 1 个月，转化率仍达到 97.0%。

实施例 7

按实施例 4 所述培养能够表达大肠杆菌天冬氨酸酶的重组大肠杆菌菌株 PUaspE2 以收集细胞。天冬氨酸酶活性为 1.20mol L-天冬氨酸/小时/g 细胞。按实施例 1 所述从细胞制备固定化天冬氨酸酶。固定化天冬氨酸酶的活力为 3600U 。

4 ℃，将上述制备的固定化天冬氨酸酶浸在 20%富马酸铵溶液(pH8.3)中过夜，用其中的 10 毫升填充柱形反应器(1cm 直径)以便按实施例 1 所述完成连续反应。以 250 毫升/小时(LHSV ＝ 25.0)的流速将底物溶液(20 ℃)加至柱中。

反应开始后 3 小时，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 90.0%。流出物的温度为 31 ℃。反应开始后 7 天，甚至 1 个月，转化率仍达到 90.0%。

实施例 8

按实施例 4 所述培养能够表达大肠杆菌天冬氨酸酶的重组大肠杆菌菌株 PUaspE2 并经两次固定过程以制备约 600 毫升固定化天冬氨酸酶。固定化天冬氨酸酶的活力为 3000U 。将上述制备的固定化天冬氨酸酶浸在 20%富马酸铵溶液(pH8.3)中一星期，用其中的 500 毫升填充柱形反应器(1 英寸直径)以便按实施例 1 所述完成连续反应。固定化天冬氨酸酶层的长度为 80 厘米。

在底物溶液温度为 24 ℃进料速率为 5 升/小时(LHSV ＝ 10)的条件下完成反应。反应开始后 2 小时，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 99.4%。

反应开始后 3 小时，将进料速率改为 10L/小时(LHSV ＝ 20)。 1 小时后，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸的摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 98.2%。

反应开始后 4 小时，将进料速率改为 12.5L/小时(LHSV ＝ 25)。 1 小时后，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸的摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 96.3%。

反应开始后 7 小时，将进料速率改为 15L/小时(LHSV = 30)。 1 小时后，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸的摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 93.8%。

反应开始后 9 小时，将进料速率改为 17.5L/小时(LHSV = 35)。 1 小时后，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 90.3%。

反应开始后 11 小时，将进料速率改为 20L/小时(LHSV = 40)。 1 小时后，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸的摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 85.8%。

比较实施例 1

用大肠杆菌菌株 K-12(IFO3301)接种 10 个试验试管，每个试管含 3 毫升表 3 所示培养基，然后在 37 ℃培养。 8 小时后，分别用试验试管中的培养物接种 10 个 Sakaguchi 烧瓶，每个烧瓶含 100 毫升表 3 所示培养基，然后在 30 ℃振荡培养过夜。从这些培养物中离心收集细胞。天冬氨酸酶活性为 0.063mol L-天冬氨酸/小时/g 细胞。从所得细胞按实施例 1 所述制备固定化天冬氨酸酶。固定化天冬氨酸酶的活力为 126U 。

4 ℃，将上述制备的固定化天冬氨酸酶浸在 20%富马酸铵溶液(pH8.3)中过夜，用其中的 10 毫升填充柱形反应器(1cm 直径)以便按实施例 1 所述完成连续反应。以 20 毫升/小时(LHSV = 2.0)的流速将底物溶液(20 ℃)加至柱中。

反应开始后 3 小时，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 86.4%。流出物的温度为 31 ℃。反应开始后 7 天和 1 个月，转化率分别为 86.8%和 86.2%。

比较实施例 2

按实施例 5 所述培养能够表达大肠杆菌天冬氨酸酶的重组大肠杆菌菌株 PUaspE1 以制备固定化天冬氨酸酶。固定化天冬氨酸酶的活力为 263U 。

按实施例 1 所述，经用绝热材料包覆的 Teflon 管，以 20 毫升/小时(LHSV ＝ 2.0)的流速将底物溶液(每升含 200g 富马酸， 200g 25%氨水，0.25g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ；用氨水将 pH 调至 8.3)加至柱中以完成连续反应。

反应开始后 3 小时，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸的摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 99.7%。流出物的温度为 43 ℃。反应开始后 7 天和 1 个月，转化率分别为 94.5%和 77.6%。

比较实施例 3

按实施例 4 所述培养能够表达大肠杆菌天冬氨酸酶的重组大肠杆菌菌株 PUaspE2 以收集细胞。天冬氨酸酶活性为 1.20mol L-天冬氨酸/小时/g 细胞。从这些细胞按实施例 1 所述制备固定化天冬氨酸酶。固定化天冬氨酸酶的活力为 3500U 。

4 ℃，将上述制备的固定化天冬氨酸酶浸在 20%富马酸铵溶液(pH8.3)中过夜，用其中的 10 毫升填充柱形反应器(1cm 直径)以便按实施例 1 所述完成连续反应。以 300 毫升/小时(LHSV ＝ 30.0)的流速将底物溶液(20 ℃)加至柱中。

反应开始后 3 小时，分析反应混合物。所得的反应产物即 L-天冬氨酸的摩尔数基本上等于消耗的富马酸的摩尔数。反应转化率为 75.0%。流出物的温度为 31 ℃。反应开始后 7 天，甚至 1 个月，转化率仍达到 75.0%。

根据本发明的方法，利用具有高天冬氨酸酶活性的微生物可以以高产率得到L-天冬氨酸。

不偏离本发明范围和精神的各种其他修饰对于本领域技术人员是显而易见并很容易完成的。因此，不能认为本文权利要求的反应仅限于本文所描述的范围，而应给权利要求以更宽的解释。

本文引用的所有文献包括专利和专利申请均全文引入本文作为参考。

下列是本文描述的序列资料：

序列表

SEQ ID NO： 1：

序列长度： 1573

序列类型：核酸

链型：双链

拓扑结构：线性

分子类型： cDNA 到 mRNA

来源：大肠杆菌

序列描述： SEQ ID NO： 1

```
ggggataatc gtcggtcgaa aaacattcga aaccacatat attctgtgtg tttaaagcaa 60
atcattggca gcttgaaaaa gaaggttcac atg tca aac aac att cgt atc gaa 114
                                Met Ser Asn Asn Ile Arg Ile Glu
                                 1               5
gaa gat ctg ttg ggt acc agg gaa gtt cca gct gat gcc tac tat ggt 162
Glu Asp Leu Leu Gly Thr Arg Glu Val Pro Ala Asp Ala Tyr Tyr Gly
    10                  15                  20
gtt cac act ctg aga gcg att gta aac ttc tat atc agc aac aac aaa 210
Val His Thr Leu Arg Ala Ile Val Asn Phe Tyr Ile Ser Asn Asn Lys
25                  30                  35                  40
atc agt gat att cct gaa ttt gtt cgc ggt atg gta atg gtt aaa aaa 258
Ile Ser Asp Ile Pro Glu Phe Val Arg Gly Met Val Met Val Lys Lys
                45                  50                  55
```

gcc gca gct atg gca aac aaa gag ctg caa acc att cct aaa agt gta 306
Ala Ala Ala Met Ala Asn Lys Glu Leu Gln Thr Ile Pro Lys Ser Val
60 65 70

gcg aat gcc atc att gcc gca tgt gat gaa gtc ctg aac aac gga aaa 354
Ala Asn Ala Ile Ile Ala Ala Cys Asp Glu Val Leu Asn Asn Gly Lys
75 80 85

tgc atg gat cag ttc ccg gta gac gtc tac cag ggc ggc gca ggt act 402
Cys Met Asp Gln Phe Pro Val Asp Val Tyr Gln Gly Gly Ala Gly Thr
90 95 100

tcc gta aac atg aac acc aac gaa gtg ctg gcc aat atc ggt ctg gaa 450
Ser Val Asn Met Asn Thr Asn Glu Val Leu Ala Asn Ile Gly Leu Glu
105 110 115 120

ctg atg ggt cac caa aaa ggt gaa tat cag tac ctg aac ccg aac gac 498
Leu Met Gly His Gln Lys Gly Glu Tyr Gln Tyr Leu Asn Pro Asn Asp
125 130 135

cat gtt aac aaa tgt cag tcc act aac gac gcc tac ccg acc ggt ttc 546
His Val Asn Lys Cys Gln Ser Thr Asn Asp Ala Tyr Pro Thr Gly Phe
140 145 150

cgt atc gca gtt tac tct tcc ctg att aag ctg gta gat gcg att aac 594
Arg Ile Ala Val Tyr Ser Ser Leu Ile Lys Leu Val Asp Ala Ile Asn
155 160 165

caa ctg cgt gaa ggc ttt gaa cgt aaa gct gtc gaa ttc cag gac atc 642
Gln Leu Arg Glu Gly Phe Glu Arg Lys Ala Val Glu Phe Gln Asp Ile
170 175 180

ctg aaa atg ggt cgt acc cag ctg cag gac gca gta ccg atg acc ctc 690
Leu Lys Met Gly Arg Thr Gln Leu Gln Asp Ala Val Pro Met Thr Leu

185 190 195 200

ggt cag gaa ttc cgc gct ttc agc atc ctg ctg aaa gaa gaa gtg aaa 738
Gly Gln Glu Phe Arg Ala Phe Ser Ile Leu Leu Lys Glu Glu Val Lys
205 210 215

aac atc caa cgt acc gct gaa ctg ctg ctg gaa gtt aac ctt ggt gca 786
Asn Ile Gln Arg Thr Ala Glu Leu Leu Leu Glu Val Asn Leu Gly Ala
220 225 230

aca gca atc ggt act ggt ctg aac acg ccg aaa gag tac tct ccg ctg 834
Thr Ala Ile Gly Thr Gly Leu Asn Thr Pro Lys Glu Tyr Ser Pro Leu
235 240 245

gca gtg aaa aaa ctg gct gaa gtt act ggc ttc cca tgc gta ccg gct 882
Ala Val Lys Lys Leu Ala Glu Val Thr Gly Phe Pro Cys Val Pro Ala
250 255 260

gaa gac ctg atc gaa gcg acc tct gac tgc ggc gct tat gtt atg gtt 930
Glu Asp Leu Ile Glu Ala Thr Ser Asp Cys Gly Ala Tyr Val Met Val
265 270 275 280

cac ggc gcg ctg aaa cgc ctg gct gtg aag atg tcc aaa atc tgt aac 978
His Gly Ala Leu Lys Arg Leu Ala Val Lys Met Ser Lys Ile Cys Asn
285 290 295

gac ctg cgc ttg ctc tct tca ggc cca cgt gcc ggc ctg aac gag atc 1026
Asp Leu Arg Leu Leu Ser Ser Gly Pro Arg Ala Gly Leu Asn Glu Ile
300 305 310

aac ctg ccg gaa ctg cag gcg ggc tct tcc atc atg cca gct aaa gta 1074
Asn Leu Pro Glu Leu Gln Ala Gly Ser Ser Ile Met Pro Ala Lys Val
315 320 325

aac ccg gtt gtt ccg gaa gtg gtt aac cag gta tgc ttc aaa gtc atc 1122

Asn Pro Val Val Pro Glu Val Val Asn Gln Val Cys Phe Lys Val Ile
330 335 340

ggt aac gac acc act gtt acc atg gca gca gaa gca ggt cag ctg cag 1170
Gly Asn Asp Thr Thr Val Thr Met Ala Ala Glu Ala Gly Gln Leu Gln
345 350 355 360

ttg aac gtt atg gag ccg gtc att ggc cag gcc atg ttc gaa tcc gtt 1218
Leu Asn Val Met Glu Pro Val Ile Gly Gln Ala Met Phe Glu Ser Val
365 370 375

cac att ctg acc aac gct tgc tac aac ctg ctg gaa aaa tgc att aac 1266
His Ile Leu Thr Asn Ala Cys Tyr Asn Leu Leu Glu Lys Cys Ile Asn
380 385 390

ggc atc act gct aac aaa gaa gtg tgc gaa ggt tac gtt tac aac tct 1314
Gly Ile Thr Ala Asn Lys Glu Val Cys Glu Gly Tyr Val Tyr Asn Ser
395 400 405

atc ggt atc gtt act tac ctg aac ccg ttc atc ggt cac cac aac ggt 1362
Ile Gly Ile Val Thr Tyr Leu Asn Pro Phe Ile Gly His His Asn Gly
410 415 420

gac atc gtg ggt aaa atc tgt gcc gaa acc ggt aag agt gta cgt gaa 1410
Asp Ile Val Gly Lys Ile Cys Ala Glu Thr Gly Lys Ser Val Arg Glu
425 430 435 440

gtc gtt ctg gaa cgc ggt ctg ttg act gaa gcg gaa ctt gac gat att 1458
Val Val Leu Glu Arg Gly Leu Leu Thr Glu Ala Glu Leu Asp Asp Ile
445 450 455

ttc tcc gta cag aat ctg atg cac ccg gct tac aaa gca aaa cgc tat 1506
Phe Ser Val Gln Asn Leu Met His Pro Ala Tyr Lys Ala Lys Arg Tyr
460 465 470

act gat gaa agc gaa cag taatcgtaca gggtagtaca aataaaaaag 1554

Thr Asp Glu Ser Glu Gln

475

gcacgtcaga tgacgtgcc 1573

SEQ ID NO： 2：

序列长度： 478

序列类型：氨基酸

分子类型：蛋白质

来源：大肠杆菌

序列描述： SEQ ID NO： 2

Met Ser Asn Asn Ile Arg Ile Glu Glu Asp Leu Leu Gly Thr Arg Glu

1 5 10 15

Val Pro Ala Asp Ala Tyr Tyr Gly Val His Thr Leu Arg Ala Ile Val

20 25 30

Asn Phe Tyr Ile Ser Asn Asn Lys Ile Ser Asp Ile Pro Glu Phe Val

35 40 45

Arg Gly Met Val Met Val Lys Lys Ala Ala Ala Met Ala Asn Lys Glu

50 55 60

Leu Gln Thr Ile Pro Lys Ser Val Ala Asn Ala Ile Ile Ala Ala Cys

65 70 75 80

Asp Glu Val Leu Asn Asn Gly Lys Cys Met Asp Gln Phe Pro Val Asp

85 90 95

Val Tyr Gln Gly Gly Ala Gly Thr Ser Val Asn Met Asn Thr Asn Glu

100 105 110

Val Leu Ala Asn Ile Gly Leu Glu Leu Met Gly His Gln Lys Gly Glu

115 120 125

Tyr Gln Tyr Leu Asn Pro Asn Asp His Val Asn Lys Cys Gln Ser Thr

130 135 140

Asn Asp Ala Tyr Pro Thr Gly Phe Arg Ile Ala Val Tyr Ser Ser Leu

145 150 155 160

Ile Lys Leu Val Asp Ala Ile Asn Gln Leu Arg Glu Gly Phe Glu Arg

165 170 175

Lys Ala Val Glu Phe Gln Asp Ile Leu Lys Met Gly Arg Thr Gln Leu

180 185 190

Gln Asp Ala Val Pro Met Thr Leu Gly Gln Glu Phe Arg Ala Phe Ser

195 200 205

Ile Leu Leu Lys Glu Glu Val Lys Asn Ile Gln Arg Thr Ala Glu Leu

210 215 220

Leu Leu Glu Val Asn Leu Gly Ala Thr Ala Ile Gly Thr Gly Leu Asn

225 230 235 240

Thr Pro Lys Glu Tyr Ser Pro Leu Ala Val Lys Lys Leu Ala Glu Val

245 250 255

Thr Gly Phe Pro Cys Val Pro Ala Glu Asp Leu Ile Glu Ala Thr Ser

260 265 270

Asp Cys Gly Ala Tyr Val Met Val His Gly Ala Leu Lys Arg Leu Ala

275 280 285

Val Lys Met Ser Lys Ile Cys Asn Asp Leu Arg Leu Leu Ser Ser Gly

290 295 300

Pro Arg Ala Gly Leu Asn Glu Ile Asn Leu Pro Glu Leu Gln Ala Gly

305 310 315 320

Ser Ser Ile Met Pro Ala Lys Val Asn Pro Val Val Pro Glu Val Val

325 330 335

Asn Gln Val Cys Phe Lys Val Ile Gly Asn Asp Thr Thr Val Thr Met

340 345 350

Ala Ala Glu Ala Gly Gln Leu Gln Leu Asn Val Met Glu Pro Val Ile

355 360 365

Gly Gln Ala Met Phe Glu Ser Val His Ile Leu Thr Asn Ala Cys Tyr

370 375 380

Asn Leu Leu Glu Lys Cys Ile Asn Gly Ile Thr Ala Asn Lys Glu Val

385 390 395 400

Cys Glu Gly Tyr Val Tyr Asn Ser Ile Gly Ile Val Thr Tyr Leu Asn

405 410 415

Pro Phe Ile Gly His His Asn Gly Asp Ile Val Gly Lys Ile Cys Ala

420 425 430

Glu Thr Gly Lys Ser Val Arg Glu Val Val Leu Glu Arg Gly Leu Leu

435 440 445

Thr Glu Ala Glu Leu Asp Asp Ile Phe Ser Val Gln Asn Leu Met His

450 455 460

Pro Ala Tyr Lys Ala Lys Arg Tyr Thr Asp Glu Ser Glu Gln

465 470 475

SEQ ID NO： 3：

序列长度： 20

序列类型：核酸

链型：单链

拓扑结构：线性

分子类型：其他核酸，人工序列

序列描述： SEQ ID NO： 3

ggataatcgt cggtcgaaaa 20

SEQ ID NO： 4：

序列长度： 19

序列类型：核酸

链型：单链

拓扑结构：线性

分子类型：其他核酸，人工序列

序列描述： SEQ ID NO： 4

cgtcatctga cgtgccttt 19

SEQ ID NO： 5：

序列长度： 41

序列类型：核酸

链型：单链

拓扑结构：线性

分子类型：其他核酸，人工序列

序列描述： SEQ ID NO： 5

gggcatatga tctccgtcat gtcctctgct gcatctttcc g 41

SEQ ID NO： 6：

序列长度： 37

序列类型：核酸

链型：单链

拓扑结构：线性

分子类型：其他核酸，人工序列

序列描述： SEQ ID NO： 6

cccggatcct taggccttca gcggaccaag cgtgggg 37

SEQ ID NO： 7：

序列长度： 62

序列类型：核酸

链型：单链

拓扑结构：线性

分子类型：其他核酸，人工序列

序列描述： SEQ ID NO： 7

ccccatatgt gtttcctgtg tgaaattgtt atccgctcac aattccacac aatatacgac 60

cc 62

SEQ ID NO： 8：

序列长度： 42

序列类型：核酸

链型：单链

拓扑结构：线性

分子类型：其他核酸，人工序列

序列描述： SEQ ID NO： 8

cccggatcct tagttaagcc agccccgaca cccgccaaca cc 42