

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00814743.4

[51] Int. Cl.

C12P 7/04 (2006.01)
G01N 33/554 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)
C08G 63/78 (2006.01)
C08G 63/82 (2006.01)
C08G 63/87 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 12 月 5 日

[11] 授权公告号 CN 100352932C

[22] 申请日 2000.9.22 [21] 申请号 00814743.4

[30] 优先权

[32] 1999. 9. 24 [33] US [31] 09/405,692

[86] 国际申请 PCT/US2000/026042 2000. 9. 22

[87] 国际公布 WO2001/021825 英 2001. 3. 29

[85] 进入国家阶段日期 2002. 4. 23

[73] 专利权人 金克克国际有限公司

地址 美国加利福尼亚

共同专利权人 佐治亚州大学研究基金会

[72] 发明人 M·瑟费尔德 J·维戈尔

G·怀特狄

[56] 参考文献

CN1189854A 1998. 8. 5

审查员 丁 海

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

代理人 樊卫民

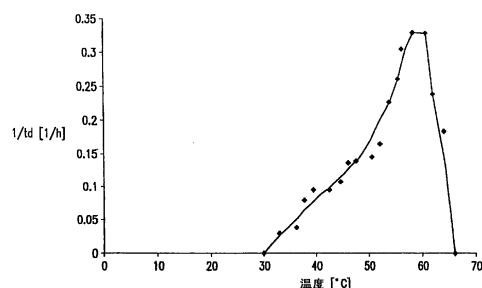
权利要求书 1 页 说明书 35 页 附图 5 页

[54] 发明名称

可使甘油脱水的新型酶

[57] 摘要

本发明涉及生产 1, 3 - 丙二醇的改进的方法和试剂。 更具体而言, 本发明提供能催化甘油发酵为 1, 3 - 丙二醇的新型嗜热生物和热稳定酶。 本发明也涉及分离这些嗜热生物的方法, 克隆编码这些酶的多核苷酸的方法, 编码这些酶的多核苷酸, 和利用这些酶和生物生产 1, 3 - 丙二醇的方法。



1. 一种分离的嗜热生物之培养物或细胞, 其中
 - a) 所述生物为保藏为 ATCC 号 PTA-584 的生物 *Caloramator viterbiensis* 或其子代。
2. 一种在嗜热生物中将甘油转化为 1,3-丙二醇的方法, 该方法包括:
提供一种可将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热生物, 其中嗜热生物是权利要求 1 的生物; 和
在如下条件下培养所述嗜热生物以产生 1, 3 - 丙二醇, 其中所述条件为 pH 在 5.0-7.6 之间, 温度在 33℃ - 64℃ 之间。
3. 权利要求 2 的方法, 其还包括收集由所述嗜热生物产生的 1,3-丙二醇的步骤。
4. 权利要求 3 的方法, 其还包括将 1,3-丙二醇聚合为聚合物的步骤。
5. 权利要求 4 的方法, 其中该聚合物是聚(对苯二甲酸 1,3-丙二醇酯)。
6. 权利要求 2 的方法, 其中的嗜热生物在厌氧条件下培养。

可使甘油脱水的新型酶

1 发明领域

本发明涉及生产 1,3-丙二醇的改进的方法和试剂。更具体而言, 本发明提供能催化甘油发酵为 1,3-丙二醇的新型嗜热生物和热稳定酶。本发明也涉及分离这些嗜热生物的方法, 克隆编码这些酶的多核苷酸的方法, 编码这些酶的多核苷酸, 和利用这些酶和生物生产 1,3-丙二醇的方法。

2 背景

1,3-丙二醇是一种在生产聚酯纤维和生产聚氨脂和环状化合物中使用的单体。

1,3-丙二醇的多种合成途径是周知的。例如, 1,3-丙二醇能如下合成: (1)在磷化氢、水、一氧化碳、氢和一种酸的存在下, 利用催化剂转化环氧乙烷; (2)丙烯醛的催化溶液相水合, 随后还原; (3)在一氧化碳和氢存在下, 利用具有元素周期表中 VIII 组原子的催化剂反应一种碳氢化合物(例如甘油)。然而, 传统化学合成法是昂贵的, 并且产生含有环境污染物的废液, 因而绝非理想的。发展便宜并且更加利于环境的生产 1,3-丙二醇的备选方法和试剂是所希望的。

一种备选方法在体内(即, 在微生物中)或在体外使用酶催化甘油发酵为 1,3-丙二醇。参见, 例如, WO 98/21339, WO 98/21341 和 US 专利号 5,821,092、5,254,467、5,633,362 和 5,686,276。能由甘油产生 1,3-丙二醇的菌株在例如柠檬酸杆菌属(*Citrobacter*)、梭菌属(*Clostridium*)、肠杆菌属(*Enterobacter*)、泥杆菌属(*Ilyobacter*)、克雷伯氏菌属(*Klebsiella*)、乳杆菌属(*Lactobacillus*)和暗杆菌属(*Pelobacter*)中发现。这些细菌通过两步酶催化反应将甘油转化为 1,3-丙二醇。第一步, 脱水酶催化甘油转化为 3-羟基-丙醛(3-HP)和水(方程式 1)。第二步, 3-HP 被 NAD^+ -连接的氧化还原酶还原为 1,3-丙二醇(方程式 2)。

甘油 + 3-HP + H₂O (方程式 1)

3-HP + NADH + H⁺ → 1,3-丙二醇 + NAD⁺ (方程式 2)

1,3-丙二醇不被进一步代谢, 因此能在基质中积累到高浓度。总反应导致还原的 b-烟碱腺嘌呤二核苷酸(NADH)氧化为烟碱腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)。

甘油向 1,3-丙二醇的生物转化通常在厌氧条件下进行, 用甘油作为唯一的碳源, 并且不存在其它的外源还原等价受体。在某些菌株中, 如在某些柠檬酸杆菌属、梭菌属和克雷伯氏菌属菌株中, 甘油代谢的一个平行途径在运转, 首先包括甘油被 NAD⁺-(或 NADP⁺)连接的甘油脱氢酶氧化为二羟丙酮(DHA)(方程式 3)。DHA 在被 DHA 激酶磷酸化为磷酸二羟丙酮(DHAP)后(方程式 4), 可用于生物合成和支持通过如糖酵解产生 ATP。

甘油 + NAD⁺ → DHA + NADH + H⁺ (方程式 3)

DHA + ATP → DHAP + ADP (方程式 4)

与 1,3-丙二醇途径不同, 该途径可为细胞提供碳和能量, 并且产生而不是消耗 NADH。

在肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)和弗氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter freundii*)中, 在 *dha* 调节子中发现编码甘油脱水酶(*dhaBCE*)、1,3-丙二醇氧化还原酶(*dhaT*)、甘油脱氢酶(*dhaD*)和二羟丙酮激酶(*dhaK*)的功能上相关连的活性的基因。来自柠檬酸杆菌属和克雷伯氏菌属的 *dha* 调节子已经在大肠杆菌中表达, 显示能将甘油转化为 1,3-丙二醇(Tong 等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 57:3541-46(1991); Seyfried 等人, *J. of Bact.* 178:5793-96(1996); Tobimatsu 等人, *J. Biol. Chem.* 271:22352-22357(1996))。

由于使用生物学方法和试剂生产 1,3-丙二醇所固有的潜在优点, 需要发展和确定能将甘油和其它碳底物转化为 1,3-丙二醇的具有优良特征的新型微生物和酶。本发明通过提供优良的微生物和酶以及鉴定其它优良微生物和酶的方法满足了这一需要。

3 发明概述

本发明涉及生产 1,3-丙二醇的改进的方法和试剂。更具体而言,本发明提供能催化甘油发酵为 1,3-丙二醇的新型嗜热生物和热稳定酶。本发明也涉及分离这些嗜热生物的方法,克隆编码这些酶的多核苷酸的方法,编码这些酶的多核苷酸,和利用这些酶和生物生产 1,3-丙二醇的方法。

一方面,本发明提供一种在嗜热生物中将甘油转化为 1,3-丙二醇的方法,该方法包括:提供一种可将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热生物;在可产生 1,3-丙二醇的条件下培养这种嗜热生物。在一个优选实施方案中,该方法还包括收集嗜热生物产生的 1,3-丙二醇的步骤。在另一个优选实施方案中,该嗜热生物是 *Caloramator viterbiensis*, 其中由保藏为 ATCC 号 PTA-584 的生物衍生的嗜热生物是特别优选的。

本发明还提供一种由甘油生产 1,3-丙二醇的方法,该方法包括:将甘油与热稳定的脱水酶一起温育,由此将甘油转化为 3-羟基丙醛;将 3-羟基丙醛还原为 1,3-丙二醇。在一个优选实施方案中,3-羟基丙醛向 1,3-丙二醇的还原由一种热稳定的 1,3-丙二醇氧化还原酶催化。在另一个优选实施方案中,该方法还包括收集 1,3-丙二醇的步骤。在另一个优选实施方案中,热稳定的脱水酶来自一种嗜热生物,如 *Caloramator viterbiensis*, 其中由保藏为 ATCC 号 PTA-584 的生物衍生的嗜热生物是特别优选的。

本发明另一方面提供一种来自 *C. viterbiensis* 的分离的热稳定甘油发酵酶,其中来自保藏为 ATCC 号 PTA-584 的生物学热稳定甘油发酵酶是特别优选的。在特别优选的实施方案中,热稳定甘油发酵酶是一种脱水酶,如甘油脱水酶,或 NAD^+ -连接的氧化还原酶,如 1,3-丙二醇氧化还原酶。本发明也提供一种分离的热稳定甘油发酵酶,它与来自 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶同源。

本发明也提供一种分离的 *C. viterbiensis* 培养物或细胞。在一个非限制性实施方案中,培养物或细胞的基因组与保藏为 ATCC 号 PTA-584 的生物学基因组至少 85%相同,优选地与保藏为 ATCC 号 PTA-584 的生物学基因组 90%相同,更优选地与保藏为 ATCC 号 PTA-584 的生物学基因组 95%相同,最优选地与保藏为 ATCC 号 PTA-584 的生物学基因

组至少 99%相同。在另一个非限制性实施方案中，培养物或细胞的 16S rDNA 序列与保藏为 ATCC 号 PTA-584 的生物的 16S rDNA 序列至少 95%相同，优选地与保藏为 ATCC 号 PTA-584 的生物的 16S rDNA 序列至少 98%相同。

另一方面，本发明提供一种克隆编码热稳定甘油发酵酶的多核苷酸序列的方法，该方法包括：使与已知甘油发酵酶基因的一部分同源的多核苷酸探针与怀疑含有嗜热生物的环境样品的多核苷酸分子杂交；分离与至少一种多核苷酸探针结合的多核苷酸序列。在一个非限制性实施方案中，该方法使用聚合酶链反应扩增与多核苷酸探针结合的多核苷酸序列。在一个优选实施方案中，热稳定甘油发酵酶来自确定其可将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热生物，其中 *C. viterbiensis* 是特别优选的。在另一个优选实施方案中，多核苷酸探针与已知 *dhaB* 基因的一部分同源，其中与来自克雷伯氏菌属的 *dhaB* 基因同源的探针是特别优选的。

本发明还提供一种克隆编码热稳定甘油发酵酶的多核苷酸序列的方法，该方法包括：用来自嗜热生物的 DNA 转化一种不能在甘油上厌氧生长的靶生物；通过在甘油上厌氧生长鉴定那些含有编码可将甘油发酵为 1,3-丙二醇的酶的多核苷酸序列的转化靶生物。在一个非限制性实施方案中，热稳定甘油发酵酶来自一种确定其可将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热生物，如 *C. viterbiensis*，其中由保藏为 ATCC 号 PTA-584 的生物衍生的嗜热生物是特别优选的。

本发明再另一方面提供一种分离可催化甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热生物的方法，该方法包括：在含有甘油作为主要碳源的培养基中温育含有嗜热生物样品；分离至少一种可将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热生物。在非限制性实施方案中，样品在约 40℃ 到约 100℃ 的温度和厌氧条件下温育。在另一个非限制性实施方案中，样品从温度约为环境温度到约 100℃、更优选地约 50℃ 到约 100℃ 的自然来源中获得。在一个优选实施方案中，该方法还包括检测嗜热生物产生 1,3-丙二醇和/或乙酸盐的步骤。

4 附图简述

图 1 显示温度对菌株 JW/MS-VS-5 的生长的影响, td=倍增时间。

图 2 显示 $\text{pH}^{25^\circ\text{C}}$ 对菌株 JW/MS-VS-5 在 60°C 的生长的影响, td=倍增时间。

图 3 显示基于 JW/MS-VS-5 和有关菌株的 16S rRNA 基因序列对比的无根系统发生树状图。邻接的树由距离矩阵重建。在分支点处显示 1000 个数据组的分析的引导(bootstrap)值(表示为百分数)。定标线条代替每 100 个核苷酸 5 个核苷酸置换。

图 4 显示在 60°C 和厌氧条件下, 甲苯厌氧处理的 JW/MS-VS-5 细胞将甘油转化为 3-HPA 的时程测定。

图 5 显示在 60°C 和厌氧条件下, 甲苯厌氧处理的 JW/MS-VS-5 细胞将 1,2-丙二醇转化为丙醛的时程测定。

5 发明详述

嗜热生物是在大多数其它生物(例如中温生物)不能存活的升高温度下能够存活并生长的生物。这种对高温的异常的适应性部分地是由于这些生物利用热稳定酶催化生命中的生物学反应。热稳定酶使嗜热生物能在升高的温度下催化代谢反应。这些生物能从环境温度的环境中分离, 但更可能从高温环境中分离, 包括例如温泉、排热口和洗衣店排出液。嗜热细菌和酶的异常的热稳定性使得能在比使用中温生物和酶能达到的更高的温度下催化有经济价值的生物转化。在许多情况中, 在发酵过程中用嗜热细菌催化希望的体内反应。此外, 也能用热稳定酶在体外或“无细胞”生物转化中催化, 这一般利用固定的酶, 以便于控制反应和反应产物的回收。

在升高的温度下进行生物转化有许多优点。如同任何化学反应, 酶促催化反应的速率通常随反应温度的升高而显著提高。提高进行工业生物转化的速率可获得明显的效益。另外, 在大多数可能的污染生物不能存活的升高温度下进行反应, 能防止反应培养基的微生物污染。

使用嗜热生物在高温下催化生物转化的另一个优点在于, 有时高温

便于从反应培养基中分离希望的产物。例如，美国专利号 5,182,199 描述了使用热稳定酶和高温发酵促进从反应培养基中分离乙醇。

除了对高温稳定外，通常发现热稳定酶对一般可灭活酶的其它条件和物质也具有提高的稳定性。热稳定酶也倾向于比来自中温生物的酶有更长的贮存寿命。本发明提供酶催化生产 1,3-丙二醇的改进的方法和试剂。在某种程度上，本发明第一次提供了能催化甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热生物和热稳定酶。这些生物和酶的一个新的特征是它们在以前鉴定的 1,3-丙二醇产生生物和酶被快速灭活的升高温度下保持存活和催化活性的能力。本发明的方法和组合物能用来在升高的温度下将甘油生物转化为 1,3-丙二醇，由此比以前描述的方法(特别是在较低温度下进行的方法)有明显的优点。本发明还包括鉴定能由甘油产生 1,3-丙二醇的嗜热生物的方法，以及克隆编码催化该转化的热稳定酶的多核苷酸的方法。

5.1 在升高的温度下能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热生物，和分离这些生物的方法

在一个实施方案中，本发明提供一种在升高的温度下能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热生物。

在此使用时，术语“嗜热生物”是指在高温下、优选地在高于 50℃ 的温度下、更优选地在高于 60℃ 的温度下、再更优选地在高于 70℃ 的温度下、最优选地在高于 85℃ 的温度下能够生长的生物。在高于 85℃ 的温度下能够生长的生物被称作嗜高温生物。嗜热生物的例子能在如原核微生物真细菌和古细菌中发现。这些生物存在于热环境如温泉、火山区和海底火山口中，并能从中分离。另外，嗜热生物也能从环境温度来源中分离。

在本发明的一个优选实施方案中，在升高的温度下能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热生物是一种 *Caloramator viterbiensis* 菌株。*C. viterbiensis* 是能将甘油发酵为 1,3-丙二醇和乙酸盐的嗜热菌的一个种。*C. viterbiensis* 在此被定义为具有下列鉴定特征的菌种：该种是(1)嗜热的；(2)能将甘油发酵为 1,3-丙二醇；(3)与保藏为 ATCC 号 PTA-584 的模

式株 JW/MS-VS5^T 有“基本基因组序列同一性”。

在本发明的一个非限制性实施方案中，*C. viterbiensis* 种的一个成员也具有模式株 JW/MS-VS5^T 的下列鉴定特征。JW/MS-VS5^T 细胞是直的到略微弯曲的杆状，尺寸为 0.4~0.6 μ m。细胞单个存在，菌株为革兰氏阳性。在 pH6.0 时生长的温度范围为 33~64 $^{\circ}$ C，58 $^{\circ}$ C 时最佳。生长的 pH^{25 $^{\circ}$ C} 范围为 5.0~7.6，6.0~6.5 最佳。使用甘油、葡萄糖、果糖、甘露糖、半乳糖、蔗糖、纤维二糖、乳糖、淀粉和酵母提取物观察到生长。该菌株根本不能发酵木糖、阿拉伯糖、乙酸盐、乳酸盐、甲酸盐、甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、丙酸盐、丙酮、琥珀酸盐、乙二醇、1,2-丙二醇、苯酚和苯甲酸盐。在 H₂:CO₂ 存在时，在自养条件下不发生明显的生长。甘油的发酵产生乙酸盐和 1,3-丙二醇作为主要有机产物，在生长过程中产生明显量的 H₂。生长可被氨苄青霉素、氯霉素、红霉素、利福平和卡那霉素抑制(全都在 100 μ g/ml 时)。同样浓度的链霉素或四环素可延缓生长。经 HPLC 测定，该菌株 DNA 的 G+C 含量为 32mol%。

为了鉴定推断的 *C. viterbiensis* 种的成员，术语“基本基因组序列同一性”是指：生物基因组序列与模式株 JW/MS-VS5^T 的基因组序列至少 90% 的同一性，优选地至少 95% 的同一性，更优选地至少 99% 的同一性；或者，生物的 16S rDNA 序列与模式株 JW/MS-VS5^T 的 16S rDNA 序列至少 90% 的同一性，优选地至少 95% 的同一性，更优选地至少 99% 的同一性。

基本序列同一性可通过比较推断的 *C. viterbiensis* 与 JW/MS-VS5^T 的完整基因组序列来确定。此外，也能通过比较推断的 *C. viterbiensis* 与 JW/MS-VS5^T 的 16S rDNA 序列确定基本序列同一性。JW/MS-VS5^T 和推断的 *C. viterbiensis* 的全部或部分基因组序列，特别是生物的 16S rDNA 序列，能用本领域技术人员周知的常规核酸测序技术确定(参见，例如，Sambrook 等人，《分子克隆，实验室手册》(1989)和《现代分子生物学手册》(Ausubel 等人，编写，1989))。然后能用技术人员周知的序列对比方法比较这些序列。例如，能用 BLAST 计算机程序 2.0 版计算百分同一性，该程序可在互联网上获得 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。关于

BLAST 的描述, 参见, 例如, Altschul 等人, J. Mol. Biol. 215:403-10(1990) 和 Altschul 等人, Nucleic Acids Res. 25:3389-3402(1997)。

在一个具体实施方案中, 本发明提供一种能将甘油发酵为 1,3-丙二醇嗜热微生物, 其基因组在低严格条件下可与模式株 JW/MS-VS5^T 的基因组杂交。在一个备选的优选实施方案中, 本发明提供一种能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热微生物, 其 16S rDNA 序列在低严格条件下可与模式株 JW/MS-VS5^T 的 16S rDNA 序列杂交。使用低严格条件的方法可以如下进行(参见 Shilo 和 Weinberg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:6789-6792(1981)): 含 DNA 的滤纸在含有 35% 甲酰胺、5×SSC、50mM Tris-HCl(pH7.5)、5mM EDTA、0.1% PVP、0.1% Ficoll、1% BSA 和 500μg/ml 变性鲑精 DNA 的溶液在 40℃ 下预处理 6 小时。杂交在具有下列改变的相同溶液中进行: 使用 0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.2% BSA、100μg/ml 鲑精 DNA、10%(w/v) 硫酸葡聚糖和 5-20×10⁶ cpm ³²P 标记探针。滤纸在杂交混合液中 40℃ 温育 18-20 小时, 然后在含有 2×SSC、25mM Tris-HCl(pH7.4)、5mM EDTA 和 0.1% SDS 的溶液中 55℃ 洗涤 1.5 小时。将洗涤溶液替换为新鲜的溶液, 在 60℃ 下再温育 1.5 小时。滤纸干燥印迹, 暴露进行放射自显影。如必要, 滤纸在 65-68℃ 下第三次洗涤, 再次暴露于胶片。可以使用的其它低严格条件在本领域众所周知(如种间杂交使用的)。

在另一个具体实施方案中, 本发明提供一种能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热微生物, 其基因组在中度严格条件下可与模式株 JW/MS-VS5^T 的基因组杂交。在一个优选实施方案中, 本发明提供一种能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热微生物, 其 16S rDNA 序列在中度严格条件下可与模式株 JW/MS-VS5^T 的 16S rDNA 序列杂交。使用中度严格条件的方法能如下进行: 含 DNA 的滤纸在含有 6×SSC、5×Denhart's 溶液、0.5% SDS 和 100μg/ml 变性鲑精 DNA 的溶液在 55℃ 下预处理 6 小时。杂交在相同溶液中进行, 使用 5-20×10⁶ cpm ³²P 标记探针。滤纸在杂交混合液中 55℃ 温育 18-20 小时, 然后在含有 1×SSC 和 0.1% SDS 的溶液中 60℃ 洗涤 2 次 30 分钟。滤纸干燥印迹, 暴露进行放射自显影。可以使用的其它

中度严格条件在本领域众所周知。滤纸的洗涤在含有 2×SSC 和 0.1% SDS 的溶液中 37℃ 进行 1 小时。

在另一个具体实施方案中,本发明提供一种能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热微生物,其基因组在高度严格条件下可与模式株 JW/MS-VS5^T 的基因组杂交。在一个优选实施方案中,本发明提供一种能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热微生物,其 16S rDNA 序列在高度严格条件下可与模式株 JW/MS-VS5^T 的 16S rDNA 序列杂交。使用高度严格条件的方法能如下进行:含 DNA 的滤纸的预杂交在由 6×SSC、50mM Tris-HCl(pH7.5)、1mM EDTA、0.02% PVP、0.02% Ficoll、0.02% BSA 和 500μg/ml 变性鲑精 DNA 组成的缓冲液中进行 65℃ 下进行 8 小时至过夜。滤纸在含有 100μg/ml 变性鲑精 DNA 和 5-20×10⁶ cpm ³²P 标记探针的预杂交混合液中 65℃ 杂交 48 小时。滤纸的洗涤在含有 2×SSC、0.01% PVP、0.01% Ficoll 和 0.01% BSA 的溶液中 37℃ 进行 1 小时。随后在 0.1×SSC 中 50℃ 洗涤 45 分钟,之后进行放射自显影。可以使用的其它高度严格条件在本领域众所周知。

C. viterbiensis 种还包括模式株 JW/MS-VS5^T 的后代,包括相对于模式株 JW/MS-VS5^T 基因型和/或表型改变的后代。突变(包括定向或随机诱变引起的)能改变表型和/或基因型。本发明提供具有单个或多个突变的细胞,特别用来提高 1,3-丙二醇的产生。例如,耐受底物或产物抑制的能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的突变株预计在本发明中特别有用。

产生突变体的方法在本领域中常用且众所周知。例如,可将野生型细胞暴露于多种因素,如辐射或化学诱变剂,然后筛选希望的表型。当通过辐射产生突变时,可以使用紫外线(UV)或电离辐射。用辐射或化学剂产生突变体的具体方法在本领域中得到很好地证明。参见,例如, Brock, 《生物技术:工业微生物教材》第二版(1989), Sinauer Associates, Inc., Sunderland, Mass. 或 Deshpande, Appl. Biochem. Biotechnol. 36:227-34(1992), 在此引用作为参考。在诱变处理后,可以用多种方法筛选具有希望的表型的突变体。当对于希望的性质筛选诱变的细胞时,随机筛查是最常用的。突变体筛选方法在工业微生物领域高度发展并且众

所周知。参见，例如，Brock，同上文。

本发明还提供分离和培养保存能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热生物的方法。这些生物在实施本发明的实施方案中 useful，例如，能用它们在升高的温度下将甘油生物转化为 1,3-丙二醇，或者它们能用作发酵甘油的热稳定酶或编码它们的多核苷酸的来源。

适于细菌培养物保存和生长的材料与方法见，例如《普通细菌学方法手册》(Gerhardt 等人编写)，美国微生物学会，华盛顿，或 Brock，同上文。用于细菌细胞生长和保存的试剂和材料能从供应商处获得，例如 Aldrich Chemicals(Milwaukee, Wis.)、DIFCO Laboratories(Detroit, Mich.)、GIBCO/BRL(Gaithersburg, Md.) 或 Sigma Chemical Company(St. Louis, Mo.)。

本发明的嗜热生物，如 *C. viterbiensis*，能从有利于嗜热生物生长的任何环境中分离，例如，排热口、温泉或土壤或它们周围的水和沉积物，或洗衣店排出液。例如由沉积物、水或其混合物组成的样品从目的环境中收集。测量采样点的 pH 和温度作为从样品中分离的任一种生物的最适生长条件是希望的。然后用样品接种基础培养基，优选地甘油作为唯一或主要碳源的培养基。基础培养基一般用样品接种为终浓度约 10%(w/v)。培养基的 pH 优选地接近采样点。此外，能接种不同 pH 的多种基础培养基，以筛选具有不同 pH 生长依赖性的生物。然后在高温下温育富集培养物，优选地至少约 50℃，更优选地至少约 60℃，最优选地至少约 75℃，优选地在厌氧或微需氧环境中进行。培养嗜热生物的指导见，例如，Weigel, J., “嗜热生物的分离与研究方法”，《嗜热生物：普通、分子和应用微生物学》的第 4 章，T.D. Brock 编写(John Wiley & Sons, N.Y.)，第 17-37 页。

当富集培养物能利用甘油作为碳源时，均质培养物能如下分离：制备一系列稀释的培养物，使用软琼脂覆盖层(例如含有 0.8%琼脂的基础培养基)将这些系列涂布于固体基础培养基(例如 1.5%琼脂)上，挑取单菌落，在相同组成的液体培养基中传代培养，检查 1,3-丙二醇和/或乙酸盐的形成。对培养基进行高压液相层析(HPLC)分析能直接鉴定 1,3-丙二醇。

例如, 能用 0.01N 硫酸的流动相以等度方式在分析离子交换柱上分析发酵培养基。此外, 1,3-丙二醇也能用其它合适的分析技术鉴定, 包括但不限于气相色谱法(GC)和气相色谱-质谱法(GC-MS)。

能将甘油转化为 1,3-丙二醇的嗜热生物的一种菌株能用本领域周知的培养保存技术培养保存。这些方法包括冷藏(短贮存时间)、在液氮中冷冻(延长的贮存时间)和冻干(使细胞脱水)。保存方法的选择取决于培养物的性质和可以利用的设施。当使用冷冻时, 必须仔细控制冻融率, 以确保微生物存活, 因为冷冻过程中形成的冰晶能破坏膜。甘油通常用作“防冻”剂, 以防止冰晶引起的损害, 并确保当冷冻培养物融解时回收活微生物的能力。

5.2 在升高的温度下能产生 1,3-丙二醇的热稳定酶

在一个实施方案中, 本发明提供一种在升高的温度下催化甘油发酵为 1,3-丙二醇中的一个步骤的热稳定酶, 在此被称为“热稳定甘油发酵酶”。

在此使用时, 术语“热稳定甘油发酵酶”是指催化甘油发酵为 1,3-丙二醇中的至少一个反应步骤的一种酶, 它是“热稳定的”, 即, 在高温下(优选地在高于 50℃ 时, 更优选地在高于 60℃ 时, 再更优选地在高于 70℃ 时, 最优选地在高于 85℃ 时)稳定并具活性。如果一种酶在暴露于给定温度至少 5 分钟后, 优选地至少 30 分钟后, 更优选地至少 1 小时后, 再更优选地至少 8 小时后, 最优选地至少 24 小时或更长后, 能保留原始催化活性的至少 50%, 则该酶在该温度下“稳定”。在许多情况中, 热稳定酶也有延长的保存期, 并且对变性条件(如物理搅拌或接触有机溶剂)比具有类似功能特性的非热稳定酶更加稳定。

在一个优选实施方案中, 本发明提供一种来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶。在一个优选但非限制性的实施方案中, 本发明提供一种来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定的脱水酶。在另一个优选但非限制性的实施方案中, 本发明提供一种来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定的 1,3-丙二醇氧化还原酶。在本发明的一个特别优选的实施方案中, 热稳定甘油发

酵酶来源于 JW/MS-VS5^T 株。

在此使用时，术语“脱水酶”是指能催化甘油分子转化为产物 3-羟基丙醛的任一种酶。脱水酶的具体例子包括甘油脱水酶和二醇脱水酶，即优选底物分别为甘油和 1,2-丙二醇的脱水酶。

术语“1,3-丙二醇氧化还原酶”是指一种能催化 3-羟基丙醛转化为 1,3-丙二醇、并伴随有 NADH 氧化的酶。

催化甘油发酵为 1,3-丙二醇中的一个反应步骤的能力可通过测定酶活性确定。甘油发酵活性能用本领域技术人员周知的技术测定。例如，Poppe 等人, Eur. J. of Biochem 245:398-41(1997), Honda 等人, J. of Bact. 143:1458-65(1980), 和 Macis 等人, FEMS Microbiology Letters 164:21-28(1998)叙述了测定脱水酶活性的方法, 在此引用作为参考。例如, Johnson 等人, J. of Bact. 169:2050-54(1987)叙述了测定 1,3-丙二醇氧化还原酶活性的方法, 在此引用作为参考。酶活性能用甲苯处理的细胞原位测定, 如 Honda 等人所述。也能通过在一般不能发酵甘油的宿主细胞中表达酶, 并测定酶的表达是否可使细胞发酵甘油, 来确定该酶催化甘油发酵为 1,3-丙二醇中的一个反应步骤的能力。

对于本发明, 如果热稳定的 1,3-丙二醇产生酶: (a)由 *C. viterbiensis* 或 *C. viterbiensis* 的指定株内源表达, 或其氨基酸序列由 *C. viterbiensis* 或 *C. viterbiensis* 的指定株中存在的多核苷酸编码序列编码; (b)在实施本发明中有用, 则它“来源于”*C. viterbiensis* 或 *C. viterbiensis* 的指定株。在此使用时, 如果酶是一种热稳定甘油发酵酶, 即催化甘油发酵为 1,3-丙二醇中的至少一个反应步骤, 并在高温下(优选地在高于 50℃时, 更优选地在高于 60℃时, 再更优选地在高于 70℃时, 最优选地在高于 85℃时)稳定且具活性, 则该酶“在实施本发明中有用”。

本发明还提供一种与来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶同源的酶。对于本发明, 如果: (a)一种酶的氨基酸序列由一种多核苷酸编码序列编码, 该多核苷酸序列在中度严格条件下(即, 在 65℃时在 0.5M NaHPO₄、7%十二烷基硫酸钠(SDS)、1mM EDTA 中与滤纸结合的 DNA 杂交, 在 42℃时用 0.2×SSC/0.1% SDS 洗涤(Ausubel 等人, 1989, 《现

代分子生物学方法》第一卷, Green Publishing Associates, Inc., 和 John Wiley & Sons, Inc., 纽约, 第 2.10.3 页)) 可与编码来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶的多核苷酸序列的互补序列杂交; (b) 它在实施本发明中有用, 则该酶与来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶“同源”。在一个优选实施方案中, 该同源酶由一种多核苷酸编码序列编码, 该多核苷酸序列在高度严格条件下(即, 在 65℃ 时在 0.5M NaHPO₄、7% 十二烷基硫酸钠(SDS)、1mM EDTA 中与滤纸结合的 DNA 杂交, 在 68℃ 时用 0.1×SSC/0.1% SDS 洗涤(Ausubel 等人, 同上文)) 可与编码来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶的多核苷酸序列的互补序列杂交, 并且在实施本发明中有用。

与来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶同源的酶能采取多种形式。在本发明的某些实施方案中, 该同源酶是来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶的突变形式, 其中一个或多个氨基酸残基被置换为不同的氨基酸残基, 产生一种在实施本发明中有用的酶。突变可以是保守性的, 其中氨基酸残基被置换为具有类似功能和结构特征(如酸度、极性 or 侧链膨胀度)的另一种氨基酸残基。突变也可以是非保守性的, 其中置换的氨基酸残基的功能和/或结构特性不是保守的。有时, 来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶的突变形式具有相对于天然酶改变的功能特性, 如改变的催化能力、稳定性或最适 pH 或温度。这些突变体只要与来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶同源, 即属于本发明的范围。

酶的突变形式能用技术人员周知的多种技术产生。美国专利号 5,830,696 中综述了大量这些技术, 在此引用作为参考, 它描述了热稳定酶的定向进化。此外, 突变酶也能在生物中随机产生, 或自然存在。

而且, 与来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶同源的酶也可以是天然 *C. viterbiensis* 酶的缺失突变体或截短变体。这些酶形式的应用有时是希望的, 例如, 当缺失或截短导致相对于相应的天然酶稳定性提高或易于纯化时。

本发明还提供一种与来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶同源的酶, 它是来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶的一种嵌合形式,

即，一种融合蛋白。嵌合体能用于例如提高酶的稳定性或便于纯化，例如，通过内含能与离子交换、金属螯合、底物亲和或免疫亲和基质结合的部分。在一个优选实施方案中，本发明提供一种与固体载体(如纤维素)共价结合的同源酶。

此外，本发明也提供一种与来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶同源、而来源于不同微生物(优选嗜热微生物)的酶。这种酶的一个例子是热稳定甘油发酵酶“同系物”，它被定义为由不同种的基因编码的酶，其中本领域技术人员根据大于约 80% 的核苷酸序列同一性程度，认为该基因是 *C. viterbiensis* 甘油发酵基因的同系物。序列同一性能用如上文所述的 BLAST 程序确定。

在一个实施方案中，本发明提供一种分离的热稳定甘油发酵酶，术语“分离的”是指该酶至少是部分纯化的，即，相对于制品中的其它物质，制品中酶的重量百分比高于自然存在的。在一个优选实施方案中，本发明提供一种分离的热稳定甘油发酵酶，其纯度至少为污染的蛋白质重量的 90%，更优选地至少为蛋白质重量的 95%。

下文中描述了在制备和分离上述酶中可用的材料与方法。在一个实施方案中，本发明的酶能从内源表达该酶的嗜热生物(特别是 *C. viterbiensis* 菌株)中分离。此外，也能通过向合适的宿主细胞中引入编码该酶的多核苷酸序列并表达编码的基因产物，重组产生本发明的酶。本发明的酶也能利用体外翻译或化学合成技术产生。

5.3 克隆编码可将甘油转化为 1,3-丙二醇的热稳定酶的多核苷酸的方法

本发明提供一种编码热稳定甘油发酵酶的多核苷酸序列或其片段，和鉴定、分离和克隆这些多核苷酸的方法。这些方法包括获取含有来自嗜热生物的多核苷酸编码序列的样品，筛选编码热稳定甘油发酵酶的多核苷酸序列或其片段。样品可以采用多种形式之一，通过本领域技术人员周知的多种不同技术制备。类似地，可用多种合适的技术实现样品的筛选，下文中描述了这些技术的一些非限制性例子。

此处公开的多核苷酸分子和寡核苷酸分子的产生和操作在本领域范

国内，能按照以下所述的重组技术进行：Sambrook 等人，《分子克隆，实验室手册》(1989)；《现代分子生物学手册》(Ausubel 等人编写，1989)；《PCR 策略》(Innis 等人编写，1995)；和《PCR 技术》(Erlich 等人编写，1992)，全部在此引用作为参考。

在本发明的一些实施方案中，用具有被认为编码一种甘油发酵酶的核苷酸序列的探针，或代表其部分的探针筛查样品。探针序列可基于已知甘油发酵酶的氨基酸序列，或其片段，或编码这种酶的多核苷酸序列。例如，甘油发酵酶的一部分的氨基酸序列能用如 Creighton 《蛋白质结构与分子原则》(1983)所述的氨基酸测序技术测定，用这些信息产生一组简并探针。在本发明的一个优选实施方案中，用基于编码来自嗜热生物(如 *C. viterbiensis*)的脱水酶或氧化还原酶序列的探针筛查样品。此外，探针也可基于来自非嗜热生物(例如，*K. pasteurianum*、弗氏柠檬酸杆菌或巴氏梭菌(*C. pasteurianum*))的甘油发酵酶编码基因，如 *dhaBCE* 或 *dhaT* 基因，它们分别编码甘油脱水酶和氧化还原酶。文献中报道了 *dhaBCE* 基因的核苷酸序列(参见，例如，Macis 等人，FEMS Microbiology Letters 164:21-28(1998)(巴氏梭菌)；Seyfried 等人，J. of Bacteriology 178:5793-96(1996)(弗氏柠檬酸杆菌)；Tobimatsu 等人，J. Biol. Chem. 271:22352-57(1996)(*K. pasteurianum*))。也报道了 *dhaT* 基因的核苷酸序列(参见，例如，Luers 等人，FEMS Microbiol. Lett. 154:337-45(1997)(巴氏梭菌)；Daniel 等人，J. of Bacteriol. 177:2151-56(1995)(弗氏柠檬酸杆菌))。本发明提供的特异探针包括基于 *K. pasteurianum* 的 *dhaB* 基因的引物对(如以下通过说明性实施方案详述的，*dhaB15'*(SEQ ID NO:1)；*dhaB13'*(SEQ ID NO:2)；*dhaB25'*(SEQ ID NO:3)；*dhaB23'*(SEQ ID NO:4)；*dhaB35'*(SEQ ID NO:5)；*dhaB33'*(SEQ ID NO:6))，它们特别可用于通过聚合酶链反应(“PCR”)扩增甘油发酵酶编码多核苷酸或其片段。能用这种引物对从目的生物中扩增甘油发酵酶编码多核苷酸的片段，随后作为探针用于从相同或不同生物中鉴定并克隆全长编码序列。可标记探针，以在例如 cDNA 文库中鉴定同源序列。此外，也能用探针作为引物尤其通过 PCR 或 RT-PCR 扩增侧翼为可被该引物识别的序列的多核苷

酸序列。特别是，能从 cDNA 或基因组文库，从分离的生物，或从环境样品中扩增目的序列，如下详述。

在本发明的一个实施方案中，将要筛选的样品是一种怀疑携带嗜热生物的环境样品，如从利于嗜热生活的环境中收集的水、土壤或泥样品。一般而言，以一种方式制备环境样品，使样品中存在的核酸可与互补探针如 PCR 引物相互作用。能根据与上述探针杂交的能力识别编码甘油发酵酶的多核苷酸或其片段。

从环境样品中分离和克隆本发明的多核苷酸的一种优选方法是利用 PCR。该技术利用编码同源酶或具有类似活性的酶的多核苷酸之间的序列同源性。该方法使用基于已知甘油发酵酶编码多核苷酸序列或其部分的一组引物，从环境样品中扩增同源多核苷酸序列或其片段。能用本领域周知的常规 PCR 方法从样品中的 DNA 中，特别是从样品中微生物的基因组 DNA 中扩增同源多核苷酸。此外，也能通过合成 RNA 的第一链 cDNA 拷贝，并经 PCR(如 RT-PCR)扩增 cDNA，从样品中的 RNA 中，特别是 mRNA 或总 RNA 中扩增同源多核苷酸。利用本领域技术人员周知的技术，能调节反应的退火条件，使引物以希望的同源性水平杂交，由此可扩增与引物所基于的序列有较多或较少同源性的序列。该方法允许分离完整的甘油发酵酶编码开放阅读框(“ORF”)或其片段。甘油发酵酶编码 ORF 的一个或多个片段能一起克隆和剪接，以产生完整的 ORF。然后能在实施本发明的不同方面中用扩增的甘油发酵酶编码 ORF 表达编码的甘油发酵酶。例如，能将序列导入宿主细胞中，从而使宿主细胞能发酵甘油。此外，为了如无细胞发酵的用途也能纯化表达的酶。此外，为了进一步检测和分离新型热稳定甘油发酵酶编码序列，能用 ORF 序列本身设计新型引物和探针。

在本发明的另一个实施方案中，样品是由嗜热生物(特别是已知能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的生物)制备的一种多核苷酸文库，优选地是一种基因组或 cDNA 文库。关于分子生物学技术的一般背景及如何制备 cDNA 文库和基因组文库，参见，例如，Ausubel 等人，同上文；Sambrook 等人，同上文；美国专利号 5,650,148。如上所述，能用核酸杂交筛选技术

结合适当标记的探针筛查该文库。Benton 和 Davis, Science 196:180(1977)(噬菌体文库)和 Grunstein 和 Hogness, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72:3961-65(1975)(质粒文库)描述了合适的筛选技术, 在此引用作为参考。

在本发明的另一个实施方案中, 样品含有一种分离的生物, 或由分离的生物产生的多核苷酸文库, 能用 PCR 或 RT-PCR 从中扩增本发明的多核苷酸。优选地, 使用的分离的生物是嗜热生物, 并能发酵甘油。

在本发明的一个实施方案中, 构建一种表达文库, 它能指导该文库的多核苷酸组分编码的基因产物的表达。

在本发明的一个特别优选的实施方案中, 通过检测其组分编码可催化甘油发酵中一个步骤的基因产物的能力, 功能筛查表达文库。在一个优选实施方案中, 通常不能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的生物用如上所述的 DNA 文库(优选地由已知能发酵甘油的嗜热生物制备的文库)的组分转化。然后通过甘油上厌氧生长, 根据将甘油发酵为 1,3-丙二醇的能力, 筛选转化的生物。能根据 1,3-丙二醇或乙酸盐的产生筛选转化的微生物。在甘油上厌氧生长或产生 1,3-丙二醇和/或乙酸盐的能力表明, 用来转化生物的文库组分编码一种具有甘油发酵所需酶活性的酶。然后能用标准技术克隆和表征该文库组分, 并在实施本发明的各方面中使用。

用上述功能克隆策略转化的微生物可以是先天缺乏发酵甘油的能力的微生物, 或由于突变(例如甘油发酵所需的一种基因的无效突变)丧失发酵甘油的能力的微生物。可以用本领域周知的技术将这种突变构建到生物中。微生物可以是, 但并非必须是嗜热生物。优选地, 测试的微生物没有甘油发酵所需的一种酶活性, 使得导入一种酶活性能恢复发酵甘油的能力。

此外, 能用标准技术结合抗甘油发酵酶的抗体免疫筛选表达的基因产物。关于这种筛选技术, 参见, 例如, 《抗体: 实验室手册》(Harlow 和 Lane 编写, 1988)。

5.4 能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的重组生物

本发明也提供一种遗传改造后表达一种或多种外源(即异源)热稳定甘油发酵酶的重组生物。在本说明书中使用时,术语“外源”是指该酶由一种异源多核苷酸编码序列(即对于宿主生物不是天然的或内源的多核苷酸序列)编码。在一个优选实施方案中,构建重组生物使之表达一种来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶,或与这种酶同源的酶。在一个特别优选的实施方案中,构建重组生物使之表达一种来源于 *C. viterbiensis* 株如 JW/MS-VS5^T 的脱水酶或 1,3-丙二醇氧化还原酶。

本发明的一种重组生物能用于实施本发明的多个方面。例如,能用该重组生物作为甘油生物转化为 1,3-丙二醇过程中的催化剂。在另一个非限制性实施方案中,能用该重组生物作为热稳定甘油发酵酶的来源,它能用技术人员熟悉的蛋白质纯化技术分离。

本发明提供适于克隆、转化和表达编码热稳定甘油发酵酶的多核苷酸序列或其片段的多种载体和转化和表达盒。合适的载体是那些适应于宿主微生物和产生的重组微生物的用途的载体。例如,合适的载体可来源于质粒、病毒(如噬菌体 T7 或 M13 衍生的噬菌体)或粘粒。获得和使用这些载体的方法为本领域技术人员所周知。参见,例如, Sambrook 等人,同上文。

载体或盒一般含有指导相关基因转录和翻译的序列、选择性标记和允许自主复制或染色体整合的序列。合适的载体包含携带转录起始控制的编码序列 5' 的区域和控制转录终止的编码序列 3' 的区域。在一个优选实施方案中,控制区来源于与转化的宿主细胞同源的基因。

优选地构建本发明的重组载体,特别是表达载体,使编码序列与编码序列转录和翻译所必需的一个或多个调节元件有效结合。在此使用时,术语“调节元件”包括但不限于编码诱导型和非诱导型启动子、增强子、操纵子的核苷酸序列和本领域中周知可引导和/或调节多核苷酸编码序列表达的其它元件。在此使用时,当调节元件有效调节或允许编码序列的转录或其 mRNA 的翻译或此两者时,称编码序列与一个或多个调节元件“有效结合”。

这些载体的调节元件在强度和特异性上可能不同。根据使用的宿主/

载体系统，能使用多种合适的转录和翻译元件中的任一种。细菌的转录调节区或启动子的非限制性例子包括 β -gal 启动子、T7 启动子、TAC 启动子、 λ 左及右启动子、trp 和 lac 启动子和 trp-lac 融合启动子。

表达重组蛋白的一般方法在本领域中众所周知，如 R. Kaufman, *Methods in Enzymology* 185:537-566(1990)。任选地，异源序列能编码包含 N 端鉴定肽的融合蛋白，该肽提供希望的特性，例如表达的重组产物的稳定性或简化的纯化。

为了引导甘油发酵酶进入宿主细胞的分泌途径，可在表达载体中含有分泌信号序列。分泌信号序列与编码甘油发酵酶的多核苷酸序列在正确的阅读框中连接。分泌信号序列通常位于编码序列的 5'。分泌信号序列可以与宿主生物分泌的蛋白质正常结合。

一旦构建合适的转化或表达载体，即可利用已知的方法用它转化合适的宿主细胞，如钙通透的细胞、电穿孔、原生质体转化或用重组噬菌体病毒转染。合适的表达宿主包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、链霉菌属(*Streptomyces*)和葡萄球菌属(*Staphylococcus*)的不同种，尽管也可使用其它的作为选择。

在一个优选实施方案中，本发明提供一种经遗传构建表达一种或多种外源热稳定甘油发酵酶的嗜热重组微生物。这些微生物特别可用于如上所述的甘油向 1,3-丙二醇的生物转化。嗜热微生物的例子包括芽孢杆菌属、栖热菌属(*Thermus*)、硫化叶菌属(*Sulfolobus*)、热厌氧杆菌属(*Thermoanaerobacter*)、热分枝菌属(*Thermobrachium*)和喜热菌属(*Caloramator*)的成员。

选择的宿主微生物优选地能产生辅因子腺苷-钴胺素(辅酶 B₁₂)。必要时，能引入 B₁₂ 合成基因，微生物和/或培养基能补充维生素 B₁₂。

5.5 分离热稳定甘油发酵酶的方法

本发明提供一种制备和分离热稳定甘油发酵酶的方法。在一个优选实施方案中，该酶为基本上纯化的形式。在一个非限制性实施方案中，

从表达天然热稳定甘油发酵酶的嗜热微生物中分离该酶。在另一个非限制性实施方案中，从经构造表达编码热稳定甘油发酵酶的外源多核苷酸序列的重组生物中分离该酶。此外，也能用常规溶液或固相肽合成法制备本发明的热稳定酶，如 Creighton，同上文所述。

表达目的热稳定甘油发酵酶的宿主细胞一般用本领域周知的方法在适于生产该酶的营养培养基中培养。例如，可通过摇瓶培养、在实验室或工业发酵罐中小规模或大规模发酵(包括连续、分批、补料分批或固态发酵)培养细胞，这在合适的培养基中和可表达和/或分离该酶的条件下进行。合适的营养培养基一般包含碳源和氮源和无机盐，使用本领域周知的方法。合适的培养基可从供应商处获得，或者可以按照公开的组成制备(例如，美国典型培养物保藏中心目录)。

根据使用的宿主细胞和表达载体的性质，酶可以保留在细胞质中，通常是不溶性颗粒(称为包涵体)，或者可以由细菌分泌序列导向周质间隙。对于前者，裂解细胞，回收并变性颗粒，之后通过稀释变性剂使该酶重折叠。对于后者，可以通过破坏细胞，例如超声处理或渗透压休克，释放周质间隙的内容物并回收该酶，从周质间隙中回收该酶。如果酶分泌到营养培养基中，可直接从培养基中回收。

然后可利用本领域周知的常规技术回收细胞产生的酶，包括但不限于：离心、过滤、抽提、喷雾干燥、蒸发、差异溶解度(例如硫酸铵沉淀)、层析(例如离子交换、亲和、疏水、层析聚焦和大小排阻)或电泳法(例如制备、等电聚焦(IEF))(参见，例如《蛋白质纯化》(Janson 和 Ryden 编写，1989)；Scopes，《蛋白质纯化：原理与实践》(1994)；Sambrook 等人，同上文；Ausubel 等人，同上文)。

在一个优选实施方案中，将酶纯化为包含便于快速亲和纯化的融合元件的融合蛋白。有用的纯化融合元件包括组氨酸和谷胱甘肽 S-转移酶(GST)标签。可包含一个蛋白酶识别位点，如凝血酶或因子 Xa 识别位点，使得能从融合元件上切下希望的蛋白质产物。可用于构建基因融合表达系统的载体能商品获得，如从 Amersham Pharmacia Biotech, Inc.(Piscataway, NJ)购得。

文献中描述了可用于分离甘油发酵酶的特异蛋白质纯化方法(参见, 例如, Seyfried 等人, J. of Bact. 178:5793-96(1996)(甘油脱水酶); Tobimatsu 等人, J. of Bact. 181:4110-13(1996)(甘油脱水酶); Johnson 等人, J. of Bact. 169:2050-54(1987)(1,3-丙二醇氧化还原酶)). 例如, Seyfried 等人描述了用维生素 B₁₂-琼脂糖树脂作为亲和基质纯化甘油脱水酶。

5.6 将甘油生物转化为 1,3-丙二醇的方法

本发明提供将甘油转化为 1,3-丙二醇的生物方法。在此使用时, 将甘油转化为 1,3-丙二醇的“生物”方法是使用生物催化剂(如甘油发酵酶)作为微生物的组分或在无细胞酶催化反应系统中使用它的方法。特别是, 本发明提供能在高温下进行, 由嗜热生物和/或热稳定酶催化的生物转化方法。在一个优选实施方案中, 该方法在高于 50℃ 时、更优选地在高于 60℃ 时进行, 使用能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的嗜热微生物。

在一个非限制性实施方案中, 该方法使用一种自然表达热稳定甘油发酵酶全互补序列的嗜热微生物, 表达的酶足以催化甘油发酵为 1,3-丙二醇中的所有反应步骤, 例如 1,3-丙二醇氧化还原酶、甘油脱水酶和/或二醇脱水酶。在一个特别优选的实施方案中, 用一种 *C. viterbiensis* 菌株, 例如 JW/MS-VS5^T 株, 作为生物催化剂。

在一个备选实施方案中, 该方法使用一种重组微生物, 优选地一种嗜热重组微生物, 它经过遗传构造可表达一种或多种外源热稳定甘油发酵酶。嗜热微生物的例子包括芽孢杆菌属、栖热菌属、硫化叶菌属、热厌氧杆菌属、热分枝菌属和喜热菌属的成员。在本说明书中使用时, 术语“外源”是指该酶由一种异源多核苷酸编码序列(即对于嗜热宿主生物不是天然的或内源的多核苷酸序列)编码。在一个优选实施方案中, 异源多核苷酸序列编码一种来源于 *C. viterbiensis* 的热稳定甘油发酵酶, 或与这种酶同源的酶。在一个特别优选的实施方案中, 异源多核苷酸序列来源于一种 *C. viterbiensis* 菌株。

任选地, 在本发明的方法中使用的嗜热微生物能产生辅因子腺苷-钴胺素(辅酶 B₁₂)。必要时, 能引入 B₁₂ 合成基因, 微生物和/或培养基中能

补充维生素 B₁₂。

本发明提供一种用本发明的嗜热生物将甘油生物转化为 1,3-丙二醇的发酵方法。应当优化发酵条件，平衡成本收益与产量和效率。商业发酵方法的发展一般逐步进行，开始时用小瓶，然后用小发酵罐(10 加仑以下)、中度大小的发酵罐(可达几百加仑)，最后用大规模发酵罐(数千加仑)。在每一生产阶段，调节发展条件以最小成本产生最大产量。培养基的有机和无机组成，以及 pH、温度和氧浓度，是使生产效率达到最大的主要变化因素。甚至在分批培养过程中，为了达到最大产量，发酵过程中条件常常变化，并且在发酵过程中监测条件，以确保重要参数保持在允许的限制内。在加入生产过程中使用的微生物菌株之前，反应室和底物溶液应当灭菌。当在较低温度下发酵时，反应物感染微生物污染物容易导致用于生产物的菌株的竞争性置换，具有明显的不利结果。本发明的一个重要优点是，利用嗜热生物和/或热稳定酶，能在大多数可能的污染物不能存活的高温下进行反应。

发酵培养基的组成必须包括支持微生物生长和希望的产物形成所必需的养分。必需的养分包括碳源、氮源和磷。根据经济及生物基础选择特定营养来源。根据发酵方法的性质，可在发酵开始时加入所有原材料，或者可以在过程中向微生物中逐渐补加养分。

反应物的 pH 可大大影响发酵。参与形成希望的产物的酶全都具有最大活性的最适 pH 范围和保持活性的有限 pH 范围。发酵罐中生物的快速生长能快速改变培养基的 pH。例如，酸(如乙酸)的积累能使未缓冲的培养基的 pH 急剧降低，抑制或终止希望的发酵产物的产生。为了防止这些改变，应当缓冲发酵培养基以防止 pH 改变。另外，一般连续监测反应溶液的 pH，需要时加入酸或碱，以保持在可接受的允许限度内。在使用 JW/MS-VS5^T 株的发酵过程中，培养基的 pH 应当保持在约 5.0-7.8，优选地约 pH 6.0-6.5。

也应当仔细调节反应温度，以达到最佳产量。能用加热盘管保持升高的温度，以达到最佳的产物形成率，并抑制微生物污染物的感染。加热盘管也能用于对发酵容器的定期灭菌。能在符合微生物活性和生存力

的任何温度下进行发酵。在一个优选实施方案中，在至少 40℃、优选地至少 50℃、最优选地至少 60℃或更高的温度下进行本发明。在使用 JW/MS-VS5^T 株的发酵过程中，温度应当保持在 33-64℃，优选地 50-64℃，最优选地 57-64℃。

除了营养和环境参数外，发酵过程可以设计为分批过程，类似于用微生物培养物接种含有培养液的摇瓶，或是连续流动过程，类似于恒化器。方法设计的选择取决于希望的产物生产和回收的经济情况。与分批过程相比，流通发酵罐更易于被不希望的生物污染，这使得质量控制难以保持，特别是在适中温度下进行发酵时。然而，流通设计具有可生产能以恒定速度回收的连续产物的优点。由于它们是自然的，分批方法需要一定的启动时间来起始发酵过程，需要一定的温育时间使发酵产物积累，需要一定的回收时间使产物与培养基和微生物细胞分离。

在本发明的另一个实施方案中，能用该方法将可发酵碳底物而不是甘油转化为 1,3-丙二醇。在一个非限制性实施方案中，可以通过向微生物中重组导入甘油转化为 1,3-丙二醇所必需的热稳定 1,3-丙二醇产生酶的互补物，构建能将可发酵碳底物(如单糖，如葡萄糖，或多糖)转化为甘油的嗜热微生物，使之产生 1,3-丙二醇。这些酶可来源于能将甘油转化为 1,3-丙二醇的嗜热生物，例如 *C. viterbiensis*。美国专利号 5,686,276 叙述了向非嗜热生物中重组构建甘油发酵为 1,3-丙二醇所需酶活性的技术，在此引用作为参考。

此外，能构建本发明的一种重组微生物，使之将不是甘油的碳源发酵为 1,3-丙二醇。这些生物的使用是有利的，特别是对于由便宜的碳源(如葡萄糖或可发酵多糖)生产 1,3-丙二醇。例如，可以构建能将甘油发酵为 1,3-丙二醇的微生物，使之能将糖酵解中间产物(如二羟丙酮磷酸盐)转化为甘油，从而允许将来自非甘油来源的碳引入发酵途径中。WO 98/21340(在此引用作为参考)叙述了通过用含有编码甘油-3-磷酸脱氢酶的基因和编码甘油-3-磷酸激酶的基因之一或两者的表达盒转化合适的宿主细胞，由重组生物产生甘油的方法。这些生物能将单糖(如葡萄糖)发酵为甘油。这些生物，或者实际上是可产生这些酶或备选甘油合成途

径酶的任何遗传工程生物，能作为宿主细胞用于利用本发明的组合物和方法将甘油进一步发酵为 1,3-丙二醇。此外，WO 98/21339(在此引用作为参考)叙述了可表达编码甘油-3-磷酸脱氢酶、甘油-3-磷酸酶、甘油脱水酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶的基因，从而能将葡萄糖和其它糖转化为 1,3-丙二醇的工程重组微生物。因此，本领域技术人员能利用这一策略由任何碳底物生产 1,3-丙二醇，它能被转化为甘油、二羟丙酮、甘油氧化状态的 C_3 化合物(例如甘油-3-磷酸)或二羟丙酮氧化状态的 C_3 化合物(例如二羟丙酮磷酸或甘油醛 3-磷酸)(参见，例如，WO 98/21339)。

在本发明的另一个实施方案中，可以构建使用的重组嗜热生物，使之表达或以提高的水平表达一种能抑制甘油发酵酶失活的蛋白质。例如，能用 WO 98/21341(在此引用作为参考)所述的技术引入能逆转甘油脱水酶的底物介导失活的酶的表达。

在含有将被转化为 1,3-丙二醇的碳底物(优选地作为唯一的或主要的碳源)的培养基中实施本发明的方法。在一个优选实施方案中，使用一种基础培养基，其中甘油作为唯一或主要的碳源。除了合适的碳源外，发酵培养基必须含有合适的矿物质、盐、辅因子、缓冲液和本领域技术人员公知适于培养物生长和提高产生 1,3-丙二醇所需的酶活性的其它成分。应当特别注意 $Co(II)$ 盐和/或维生素 B_{12} 或其前体。以下实施例中列出了在 *C. viterbiensis* 将甘油转化为 1,3-丙二醇中使用的合适培养基的具体非限制性实例。

本发明的方法能在需氧或厌氧条件下进行，厌氧或微需氧条件是优选的。在一个特别优选的实施方案中，该方法在氮或氩空气下进行，例如在比例为 80:20 的 N_2/CO_2 空气下进行。也可加入能与培养基中的分子氧反应并除去它们的化学药品。例如，巯基醋酸钠能与游离氧反应，并从溶液中除去它。类似地，氨基酸半胱氨酸和含有巯基的其它化合物也能用来从培养基中清除分子氧。对于液体培养物，可以用氮使培养基起泡，以除去空气和痕量的氧，之后密封培养容器，以防止氧气再次进入。

另外，也可以用厌氧培养室排除空气中的氧。厌氧室的常见形式(如 Gas Pak 系统)可产生氢，它在厌氧室内作为催化剂与氧反应，产生水。

该系统中也产生二氧化碳，以占据氧气转化为水所消耗的气体体积。

可以通过对培养基进行高压液相层析(HPLC)分析直接鉴定 1,3-丙二醇。例如，能用 0.01N 硫酸的流动相以等度方式在分析离子交换柱上分析发酵培养基。此外，1,3-丙二醇也能用其它合适的分析技术鉴定，包括但不限于气相色谱法(GC)和气相色谱-质谱法(GC-MS)。

1,3-丙二醇能用本领域技术人员公知的技术从发酵培养基中纯化，包括蒸馏、离心、过滤和层析分离。例如，通过对反应混合物进行有机溶剂抽提、蒸馏和柱层析，能从细胞培养基中获得丙二醇，如美国专利号 5,356,812 所述，在此引用作为参考。对于这种方法，一种特别优秀的有机溶剂是环己烷，如美国专利号 5,008,473 所述。

此外，也能在使用吸附到或结合于载体(如纤维素)的酶和/或微生物细胞的发酵系统中产生 1,3-丙二醇。结合的及这样固定的酶作为固体表面催化剂。然后使一种含有反应底物(如甘油)的溶液通过固体表面。温度、pH 和氧浓度设置为最佳水平，以达到最大转化率。当希望的转化包括一个代谢步骤，例如甘油转化为 1,3-丙二醇形成过程中的一种中间物，或这种中间物转化为 1,3-丙二醇，这一类型的方法是特别合适的。当需要多种酶活性将初始底物转化为希望的产物时，这种方法更加复杂。该培养基一般必须包含催化所需的任何辅助因子，如酶辅因子(例如维生素 B₁₂)和还原相当物。能用上文所述的技术从发酵培养基中纯化希望的产物。当使用这些固定系统时，提供保持酶活性和使酶失活或损失减到最小的条件是重要的。当在这类固定系统中使用全细胞而不是无细胞酶时，在过程中保持微生物的生存力是重要的。使用固定细胞的该方法一般包括加入必要的生长底物。

根据本发明的方法使得甘油能被基本上化学计量地转化为 1,3-丙二醇。1,3-丙二醇的产量通常为由 3 摩尔甘油产生 2 摩尔 1,3-丙二醇的数量级。在本说明书中，基本上被理解为至少 80%、优选地至少 95%的甘油消耗。

本发明的方法和组合物产生的 1,3-丙二醇在生产聚酯和薄膜中 useful。例如，Whinfield 和 Dickson 用 1,3-丙二醇作为原材料合成了聚(对苯二甲

酸 1,3-丙二酯)(PPT)。PPT 的物理性质优于一般可购得的聚酯聚(对苯二甲酸乙二酯)(PET)。例如, 美国专利号 5,340,909 和 5,872,204 叙述了合成 PPT 的其它方法, 在此引用作为参考。也能合成其它聚合物。

下列实施例是为了说明, 而不是限制本发明。

6 实施例: *C. viterbiensis* 模式株 JW/MS-VS5^T 的分离

6.1 材料与方法

6.1.1 生物来源

该菌株从 1997 年 6 月从靠近意大利 Viterbo 的 Bagnaccio 泉区淡水温泉中收集的混合沉淀/水样品中分离。采样点的温度为 63℃, pH 为 6.6-6.7。Canganella 等人, J. Basic Microbiol. 35:9-19(1995)更全面地描述了这些条件, 在此引用作为参考。

6.1.2 培养基与培养

用于富集、分离和培养的基础培养基按照改进 Hungate 技术在 N₂/CO₂(80:20)气相下制备, 如 Ljungdahl 等人《工业微生物与生物技术手册》(Demain 和 Solomon 编写, 1896)所述。基础培养基含有(每升去离子水): 0.5g (NH₄)₂SO₄、0.5g NH₄Cl、2.0g KH₂PO₄、0.04g MgCl₂ · 6H₂O、0.04g CaCl₂ · 2H₂O、4.2g NaHCO₃、0.13g Na₂S · 9H₂O、0.13g 半胱氨酸-HCl、0.3g 酵母提取物、0.001g 刃天青、3.0g 甘油、2ml 维生素溶液(如 Wolin 等人, J. Biol. Chem. 238:2882-86(1963)所述)和 1ml 痕量元素溶液。痕量元素含有(mmol/l): 2.0 (NH₄)₂FeSO₄ · 6H₂O、1.0 CoCl₂ · 6H₂O、1.0 (NH₄)₂Ni(SO₄)₂ · 6H₂O、0.1 Na₂MoO₄ · 2H₂O、0.1 Na₂WO₄ · 2H₂O、0.5 ZnSO₄ · 7H₂O、0.01 CuCl₂ · 2H₂O、0.5 Na₂SeO₃、0.1 H₃BO₃、0.5 MnCl₂ · 4H₂O 和 0.01 AlK(SO₄)₂ · 12H₂O。调节 pH 为 6.0(25℃时)。富集物和纯培养物通常在 Hungate 管中的 10ml 培养基中在 N₂/CO₂(80:20)空气下生长。除非另外指出, 所有温育均在 60℃下进行。

6.1.3 生长的测定

通过在 600nm 波长下测量光密度的增加测定细菌的生长(spectronic 21, Bausch & Lomb, Rochester, NY)。

6.1.4 pH 和温度范围

为了确定生长的 pH 范围, 用 815 MP 型 pH 计(Fisher Scientific, Pittsburg, PA)在 25℃ 时测量 pH。在 pH^{25℃} 6.0 的基础培养基中, 用温度梯度培养箱(Scientific Industries, Inc., Bohemia, N.Y.)在振摇(15 spm)下测量生长的温度范围。

6.1.5 底物利用

用补充了高压灭菌或过滤除菌的底物代替甘油的基础培养基测试生物利用不同底物的能力。培养物温育两周, 通过测量光密度监测其生长。

6.1.6 电子受体

在含有甘油(3g/l)作为底物的基础培养基中研究不同电子受体的可能的用途。由高压灭菌的贮存液中加入不同电子受体。基础培养基中生长的培养物用作接种物(10% v/v)。通过测定亚硝酸盐产生(对于硝酸盐)、硫化物产生(对于硫酸盐和元素硫)或颜色改变(AQDS)监测电子受体(10mM)的利用。

6.1.7 抗生素敏感性

通过向含有 100g/ml 过滤除菌的抗生素的新鲜基础培养基中转移指数生长的培养物测定对抗生素的敏感性。培养物温育两周。

6.1.8 显微镜检查

常规检查用光学显微镜进行(PM 10AD 型, Olympus Optical Co., Ltd, 东京, 日本, 配有相差光学装置)。透射电镜检查用 100CX 型电子显微镜进行(JEOL, 东京, 日本)。进行超薄切片的样品用乙酸双氧铀和柠檬酸铅制备, 用于后染色, 如 Spurr, J. Ultrastruc. Res. 26:31-43(1969)所述。革兰氏染色用 Hucker 的方法进行(Doetsch, 《普通微生物学方法手册》(Gerhardt 等人编写, 1981))。

6.1.9 分析技术

甘油、葡萄糖、短链有机酸和乙醇的测定如以前 Svetlitshnyi 等人, Int. J. Syst. Microbiol. 46:1131-37(1996)所述经高压液相层析(HPLC)进行。分子氢用气相色谱分析(Svetlitshnyi 等人)。亚硝酸盐的产生用 Boehringer Mannheim 的酶分析试剂盒(目录号 905608)测定。硫化物用

Cord-Ruwisch, J. Microbiol. Methods 4:33-36(1985)的方法测定。

6.1.10 DNA 的 G+C 含量

按照使用说明书用 QIAGEN 基因组 DNA 纯化方法分离纯化 DNA。酶促消化 DNA, 如 Whitman 等人, Syst. Appl. Microbiol. 7:235-240(1986) 和 Mesbah 等人, Int. J. Syst. Bacteriol. 39:159-167(1989)所述通过 HPLC 分离核苷测定鸟嘌呤+胞嘧啶(G+C)含量。

6.1.11 16S rRNA 基因序列测定和系统发生分析

基因组 DNA 的提取、16S rRNA 基因的 PCR 扩增和纯化 PCR 产物的测序如 Rainey 等人, Int. J. Syst. Bacteriol. 46:28-96(1996)所述进行。序列反应产物经乙醇沉淀纯化, 并用 310 型遗传学分析仪 (Applied Biosystems, Foster City, Calif.)电泳。利用 ae2 编辑程序(Maidak 等人, Nucleic acids Res 27:171-173(1999)), 将该研究中获得的 16S rRNA 基因序列与以前测定的可从公开数据库中获得的低 G+C 革兰氏阳性序列对比。PHYLIP 软件包的程序包括 DNADIST 和 NEIGHBOR, 用于系统发生分析(Felsenstein(1993), 系统发生推理软件包, 3.5.1 版, 华盛顿大学遗传学系, 西雅图)。用 Jukes 等人在《哺乳动物蛋白质代谢》(Munro 编写, 1969)中的方法计算进化距离。用 1000 上引导数据组和 PHYLIP 软件包(Felsenstein, 同上文)的 SEQBOOT、DNADIST 和 CONSENSE 程序再次分析树状结构。

6.1.12 核苷酸序列保藏号

本研究中测定的 16S rRNA 基因序列由 GenBank 保藏为保藏号 AF181848。系统发生分析中使用的参照 16S rRNA 基因序列的保藏号和菌株名称如下: 掘越氏厌氧分枝菌(*Anaerobranca horikoshii*) DSM 9786^T(U21809)、解糖热解纤维素菌(*Caldicellulosiruptor saccharolyticus*)ATCC 43494^T(L09178)、*Caloramator coolhaasii* DSM 12679 AF104215、发光喜热菌(*Caloramator fervidus*)ATCC 432045^T(L09187)、印度喜热菌(*Caloramator indicus*) ACM 3982^T(X75788)、解蛋白喜热菌(*Caloramator proteoclasticus*) DSM 10124^T(X90488)、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)ATCC

19398^T(M59085)、产气荚膜梭菌 (*Clostridium perfringens*) ATCC 13124^T(M59103)、甘油穆尔氏菌 (*Moorella glycerini*) DSM 11254^T(U82327)、热醋穆尔氏菌 (*Moorella thermoacetica*) LJD^T(M59121)、热自养穆尔氏菌 (*Moorella thermoautotrophica* DSM 1974^T(L09168)、普氏产醋杆菌 (*Oxobacter pfennigii*) DSM 3222^T(X77838)、产乙醇热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter ethanolicus*) ATCC 31550^T(L09162)、热产硫磺热厌氧杆菌 (*Thermoanaerobacter thermosulfurigenes*) ATCC 3374^T(L09171)、速生热分枝菌 (*Thermobrachium celere*) DSM 8682 X99238、解脂热分枝菌 (*Thermosyntropho lipolytica*) DSM 11003^T(X99980)。

6.2 结果

6.2.1 富集和分离

含甘油的基础培养基用大约 10%(w/v)的样品接种,并在 60℃下温育。另外, pH 7.5 和 pH 9.0 的相同组成的培养基用样品接种(每个 10%(w/v))。只有在 pH 6.0 时才获得利用甘油的富集培养物。在之后的转移后(10% v/v),制备该富集培养物的稀释系列,并用软琼脂覆盖层(由含 0.8%琼脂的基础培养基组成)平板接种于固体基础培养基(1.5%琼脂)上。挑取单克隆,在相同组成的液体培养基中传代培养,通过 HPLC 测定 1,3-丙二醇的形成。为了随后的平板接种,用基础培养基及 Kell 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 99:81-88(1981)所述的已知成分复杂培养基重复该方法几次。当培养物在振摇下温育时,在液体培养基中的生长大大增强。在将菌落转移到振摇下的 60℃液体基础培养基中后,获得甘油发酵培养物,它被认为是纯的,被命名为 JW/MS-VS5^T株。

6.2.2 菌落和细胞形态学

在含基础培养基的平板上,在 7-10 天后出现菌落。一旦适应在平板上生长,随后在新鲜平板上划线在 2-3 天后产生菌落。菌落是均一的圆形、白色的,直径 1.0-1.5mm。JW/MS-VS5^T株的细胞是直的到略微弯曲的杆状,直径 0.4-0.6mm,长度 2.0-3.0mm。细胞主要单个存在。利用光学显微镜没有观察到运动性的迹象。利用不同生长阶段的细胞,负染后进行

的电镜分析未能显示鞭毛的存在。在任何生长阶段都没有观察到孢子的出现。

6.2.3 革兰氏染色反应和革兰氏类型

细胞只在指数生长早期革兰氏染色阳性。JW/MS-VS5^T 株的超薄切片显示厚的肽聚糖，因而认为生物是革兰氏阳性的，Wiegel, Int. J. Syst. Bacteriol. 47:651-56(1997)。这种定位与 16S rRNA 测序数据一致，后者将该生物归于梭菌属-芽孢杆菌属分支。除了肽聚糖外，还发现了另一个外层，它可能代表 S 层，但是 EM 显微照片不能显示任何几何排列。

6.2.4 温度与 pH 范围

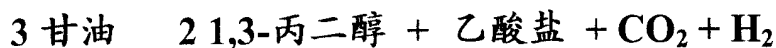
pH^{25℃} 6.0 时 JW/MS-VS5^T 株生长的温度范围为 33-64℃，最适温度为 58℃(图 1)。在 67℃ 或低于 33℃ 时不能检测到生长。该菌株在 pH^{25℃} 为 5.0-7.8 时生长，最适为 pH^{25℃} 6.0-6.5(图 2)。在 pH^{25℃} 4.7 和 pH^{25℃} 8.0 时未检测到生长。在最适条件下的最短倍增时间为 2.8 小时。

6.2.5 底物利用与发酵产物

利用的底物包括甘油、葡萄糖、果糖、蔗糖、纤维二糖、乳糖、半乳糖、甘露糖(20mM)、淀粉和酵母提取物(5g/l)。JW/MS-VS5^T 株不能利用木糖、阿拉伯糖、乙酸盐、乳酸盐、甲酸盐、甲醇、乙醇、正丙醇、异丙醇、正丁醇、丙酸盐、丙酮、琥珀酸盐、乙二醇、1,2-丙二醇、苯酚、苯甲酸盐和 H₂/CO₂。

如表 1 所示，甘油发酵产生乙酸盐和 1,3-丙二醇作为唯一的有机代谢产物。没有检测到可测量的 C₁-C₃ 醇、1,3-丙二醇之外的二醇或乙酸之外的有机酸。在这些培养物中产生显著含量的 H₂。

获得的发酵模式提示根据下列方程式的一种甘油转化：



6.2.6 电子受体

在甘油作为底物存在下，JW/MS-VS5^T 株不能还原硝酸盐(10mM)、无定形氧化 Fe(III)(90mM)、9,10-蒽醌-2,6-二磺酸(AQDS)、硫酸盐(10mM)或沉淀的或升华的 So(30mM)。在任何这类电子受体的存在下不能实现 1,3-丙二醇的产生。在气相中使用 O₂(20% v/v)，JW/MS-VS5^T 株不能生

长。

6.2.7 抗生素敏感性

氯苄青霉素、氯霉素、红霉素、利福平和卡那霉素在 100mg/ml 培养基的浓度时完全抑制生长。加入相同浓度的链霉素和四环素导致生长延迟。

6.2.8 DNA 碱基组成

基因组 DNA 的 G+C 含量为 32 mol%(HPLC)。

6.2.9 16S rRNA 基因序列对比

测定了含长度为 1480 个核苷酸的 JW/MS-VS5^T 株的几乎全部 16S rRNA 基因序列。两个数据组用于系统发生分析。数据组 1 含有在该研究中测定的序列和从低 G+C 革兰氏阳性菌中选择的参照序列，而数据组 2 含有新的序列和可从数据库中获得的喜热菌属和热分枝菌属的 5 个种的序列。基于数据组 1 的系统发生分析(含有位点 98 与位点 1469(大肠杆菌位点, Brosius 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75:4801-4805(1978))之间的 1206 个确定的核苷酸)显示新的分离株聚簇为以前所述的喜热菌属和热分枝菌属辐射内的不同谱系(图 3)。JW/MS-VS5^T 株与以前所述的喜热菌属和热分枝菌属的种有 91.7%-94.1%的 16S rRNA 基因序列相似性，与数据组 1 所含且图 3 所示的其它分类群的序列有 83.4%-87.1%的相似性。第二个数据组含有新分离株的序列和喜热菌属和热分枝菌属的其它 5 个种的序列，并含有位点 38 与位点 1469(大肠杆菌位点, Brosius 等人, 同上文)之间的 1393 个确定的核苷酸，用它来计算该簇的分类组之间的成对相似性值。JW/MS-VS5 株与以前所述分类组之间的 16S rRNA 基因序列相似性为 91.3-93.7%。在喜热菌属/热分枝菌属簇内，在 JW/MS-VS5 株与速生热分枝菌之间发现最高的序列相似性值(93.7%)。图 5 所示的对这些分支的引导分析明显地支持喜热菌属/热分枝菌属簇，以及该组与 Collins 等人, Int. J. Swiss P. Bacteriol. 44:812-826(1994)所述梭菌属簇 I 的关系。

根据系统发生分析(图 3)显然，该菌株与速生热分枝菌和 3 个喜热菌属的种最相关，它们构成了系统发生树的革兰氏阳性芽孢杆菌-梭菌分支

内的不同簇。这4个种是显示低G+C含量的嗜热、化能有机营养厌氧菌，这也适用于JW/MS-VS5^T株。表2显示了该簇中所见5个种的形态学和生理性质的对比。

表 1. JW/MS-VS5^T 株的甘油发酵

底物	形成的产物[mM]			碳回收率[%]
消耗的甘油[mM]	1,3-丙二醇	乙酸盐	H ₂	
16.2	11.2	4.8	6.5	99

用于在基础培养基中培养 JW/MS-VS5^T 株的甘油的初始浓度为33mM。

表 2. 本研究中使用的菌株的选择特性：JW/MS-VS5^T，速生热分枝菌，和喜热菌属的种发光喜热菌、印度喜热菌和解蛋白喜热菌。

特性							
菌株	孢子形成	温度范围	最适温度	最适pH	甘油利用	最短倍增时间(h)	G+C 含量 [mol%]
JW/MS-VS5 ^T	-	≥33-≤64	58	6.0-6.5	+	2.80	32
速生热分枝菌*	-	>(37-45)-<(70-80)	62-67	8.0-8.5	-	0.17	30-31
印度喜热菌	-	>37-<80	60-65	8.1	NR	0.33	25
发光喜热菌	+	>37-<80	68	7.0-7.5	NR	0.75	39
解蛋白喜热菌	+	≤30-<68	55	7.0-7.5	NR	0.50	31

NR: 未报道

*: 不同菌株

7 实施例：JW/MS-VS5^T 中 dhaB 样基因的检测

7.1 材料与amp;方法

用肺炎克雷伯氏菌 dhaB 基因作为阳性对照通过 PCR 方法表征 JW/MS-VS5^T。使用 4 组引物：(a)dhaB1，包括 dhaB15' GGA ATT CAG ATC TCA GCA ATG AAA AGA TCA AAA CG(SEQ ID NO:1)和

dhaB13' GCT CTA GAT TAT TCA ATG GTG TCG GG(SEQ ID NO:2); (b)**dhaB2**, 包括 **dhaB25'** GGA ATA CAG ATC TCA GCA ATG CAA CAG ACA ACC C (SEQ ID NO:3)和 **dhaB23'** GCT CTA GAT CAC TCC CTT ACT AAG TCG (SEQ ID NO:4); (c)**dhaB3**, 包括 **dhaB35'** GGA ATT CAG ATC TCA GCA ATG AGC GAG AAA ACC ATG C (SEQ ID NO:5)和 **dhaB33'** GCT CTA GAT TAG CTT CCT TTA CGC AGC (SEQ ID NO:6); 和(d)**dhaX**, 包括 **dhaX5'** AGG TGG TGC GGA TCC TGT CGA ATC CCT A (SEQ ID NO:7)和 **dhaX3'** GAT ACG AGA TCT TTA ATT CGC CTG ACC GGC CAG TAG CAG (SEQ ID NO:8)。所有引物均购自 GIBCO BRL。PCR 反应在 Hot Start PCR 管 (Molecular Bio-Products, Inc.)中进行, 使用 100 μ l PCR 反应试剂。每 100 μ l PCR 反应液含有: 2 μ l 细菌培养物, 20 μ l 1mM dNTPs, 10 μ l 10 $\times$ PCR 缓冲液 (100mM KCl, 100mM (NH₄)₂SO₄, 200mM Tris-Cl(pH8.75), 20mM MgSO₄, 1% Triton, 1mg/ml BSA)-[Stratagene, La Jolla, CA], 3 μ l 每 2 条相对引物组(10 OD/ μ l), 和 1 μ l Pfu DNA 聚合酶(2.5U/ μ l)-[Stratagene, La Jolla, CA]。在自动热微循环仪(MJ Research)中在 3 种不同退火温度下进行 PCR 扩增以检测最佳条件。最终条件如下: 最初 5 个循环的变性(94 $^{\circ}$ C, 1.5mm.)、低严格性退火(37 $^{\circ}$ C, 1.5mm.)和延伸(72 $^{\circ}$ C, 2.5mm.)。在最初的循环后, 在较高退火严格性下进行另 25 个循环: 变性(94 $^{\circ}$ C, 1.5mm.)、退火(55 $^{\circ}$ C, 1.5mm.)和延伸(72 $^{\circ}$ C, 2.5mm.)。向每个样品中加入 10 μ l 10 $\times$ DNA 加样染料, 在琼脂糖凝胶上电泳 15 μ l 每种 PCR 产物。

7.2 结果

阳性对照如所料的产生合适的带。未知微生物显示与 **dhaB1** 和 **dhaB3** 相同大小但与 **dhaB2** 和 **dhaX** 大小不同的模糊的 DNA 带。模糊的带可能是由于 PCR 引物与靶基因的低同源性。这些结果表明, JW/MS-VS5^T可能携带一种 **dhaB** 样基因, 它与肺炎克雷伯氏菌中的 **dhaB** 具有相同或相似的功能。

8 实施例: JW/MS-VS5^T 甘油脱水酶活性的体外测定

检测甲苯处理的 JW/MS-VS5^T 株细胞将甘油转化为 3-羟基丙醛 (3-HPA) 和将 1,2-丙二醇转化为丙醛的能力。

8.1 材料与方法

细胞在补充有 0.5g/l 酵母提取物和 3g/l 甘油的矿物盐培养基 pH6.8 中 60℃ 厌氧生长。厌氧收获细胞, 在液氮中 -70℃ 贮存。

融解冷冻的细胞, 在手套箱中在厌氧条件下用甲苯处理。甲苯处理包括下列步骤: (a) 用 1ml 50mM KPO₄ pH8.0 洗涤细胞; (b) 在 Eppendorf 5415C 离心机中以 14000 转/分离心细胞 6 分钟; (c) 用 1.5ml 50mM KPO₄ pH8.0 洗涤细胞; (d) 再次在 Eppendorf 5415C 离心机中以 14000 转/分离心细胞 6 分钟; (e) 用 2ml 50mM KPO₄ pH8.0 再溶解细胞; (f) 加入 20μl 甲苯; (g) 剧烈振荡 15 分钟; (h) 在 Eppendorf 5415C 离心机中以 14000 转/分离心细胞 10 分钟; (i) 用 2ml 50mM KPO₄ pH8.0 洗涤细胞; (j) 在 Eppendorf 5415C 离心机中以 14000 转/分离心细胞 6 分钟; (k) 重复步骤 (i) 和 (j); (l) 用 50mM KPO₄ pH8.0 再溶解甲苯处理的细胞; (m) 在 600nm 下测量溶解的细胞的吸光度; (n) 细胞贮存在 -70℃ 下。

反应混合物含有(1.0ml): 15mM KPO₄, pH8.0; 0.25M KCl; 200mM 甘油或 1,2-丙二醇; 甲苯处理的细胞, 0.38 OD₆₀₀; 和 12μM 辅酶 B₁₂。反应物在 60℃ 下厌氧温育, 在图 4 所示的时间取样。向 50 μl 甲苯基噻唑啉酮脘(MBTH)溶液(6mg/ml 于 375mM 甘氨酸-HCl pH2.7 中)中加入 100 μl 样品, 100℃ 加热 3 分钟, 在冰上冷却 30 秒, 通过以 14000 转/分离心 5 分钟澄清。

然后通过用如下 C₈-反相 HPLC 系统检测产物分析澄清的上清液: (a) 柱子是 15×4.6 cm Supelco, Supelcosil LC-8-DB, 3 μM 颗粒大小; (b) 溶剂 A 是 0.1% TFA; (c) 溶剂 B 是 90% 乙腈, 0.08% TFA; (d) 梯度是(时间[分钟]/%B): 0/0, 7/45, 17/65, 22/100, 24/100, 25/0, 30/0; (e) 排出体积是 20 μl; (f) 注射器牵拉速度是 833.3 μl/分钟; (g) 在 305nm 下检测, 以 500nm 为参照; (h) 样品波长的带宽是 4, 参照波长的带宽是 80。利用该系统, 3-HPA 的滞留时间是 8.7 分钟, 丙醛为 10.7 分钟。

8.2 结果

图4显示了60℃时甘油转化为3-HPA和1,2-丙二醇转化为丙醛的时程。结果表明,甘油脱水酶在60℃(生物的生长温度)时有活性。该酶被甘油但不被1,2-丙二醇灭活。文献中报道了其它甘油脱水酶的类似的灭活。然而,来自克雷伯氏菌属的甘油脱水酶在60℃时无活性。实际上,未报道甘油脱水酶在60℃时有活性。

9 生物保藏物和序列表简述

C. viterbiensis 模式株 JW/MS-VS5^T 在1999年8月27日按照国际专利程序微生物保藏物识别的布达佩斯条约的条款由ATCC保藏,命名为ATCC PTA-584。“ATCC”是指位于12301 Parklawn Drive, Rockville, MD 20852 U.S.A 的美国典型培养物保藏中心国际保藏所。命名是指保藏物的保藏号。

JW/MS-VS5^T 株的16S rDNA序列在Genbank数据库中保藏为保藏号 AF181848。

等同

前面所述说明书足以使本领域技术人员实施本发明。实际上,对于分子生物学、生物技术或相关领域技术人员明显的实施本发明的上述方法的许多修改也在下列权利要求书的范围之内。

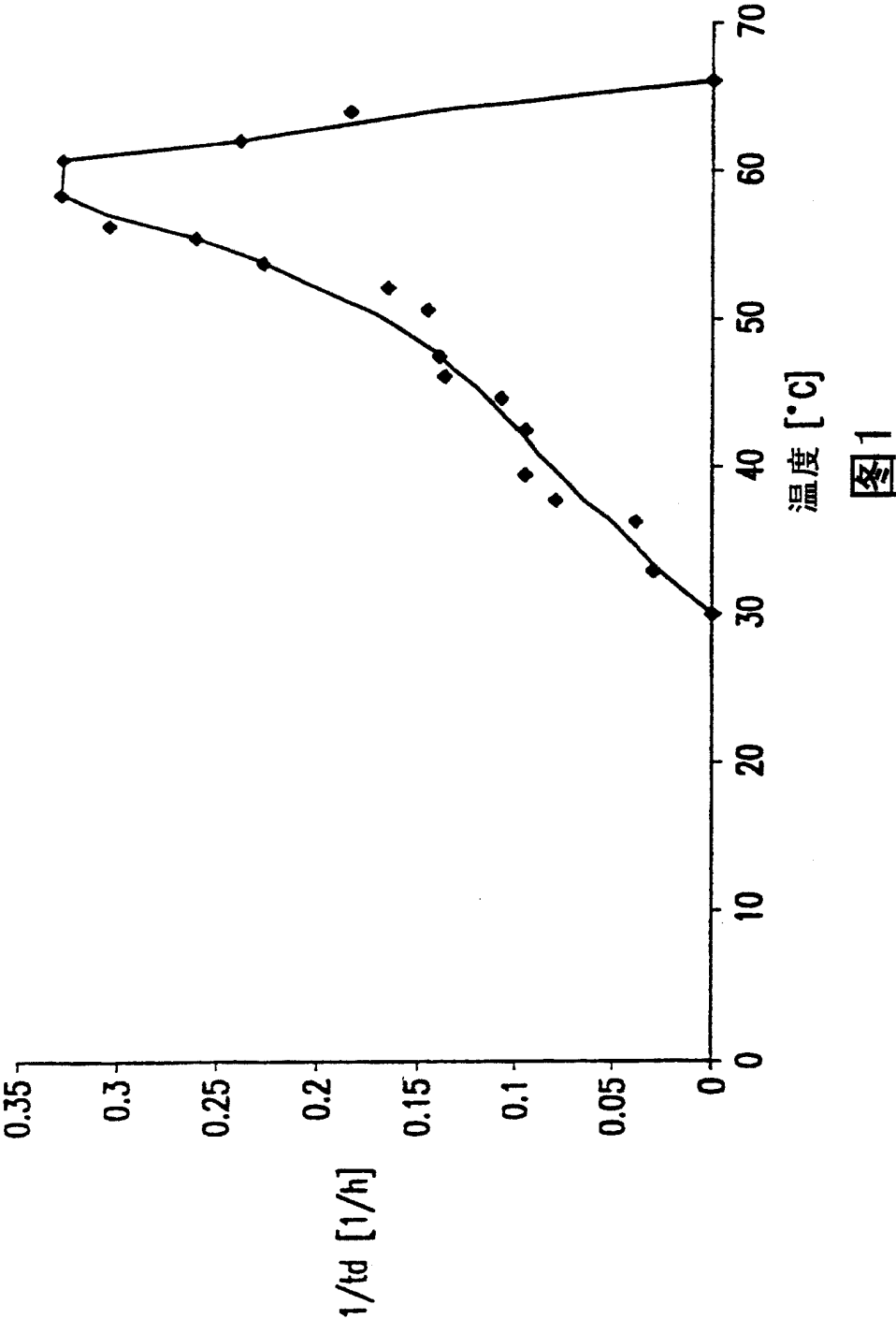


图1

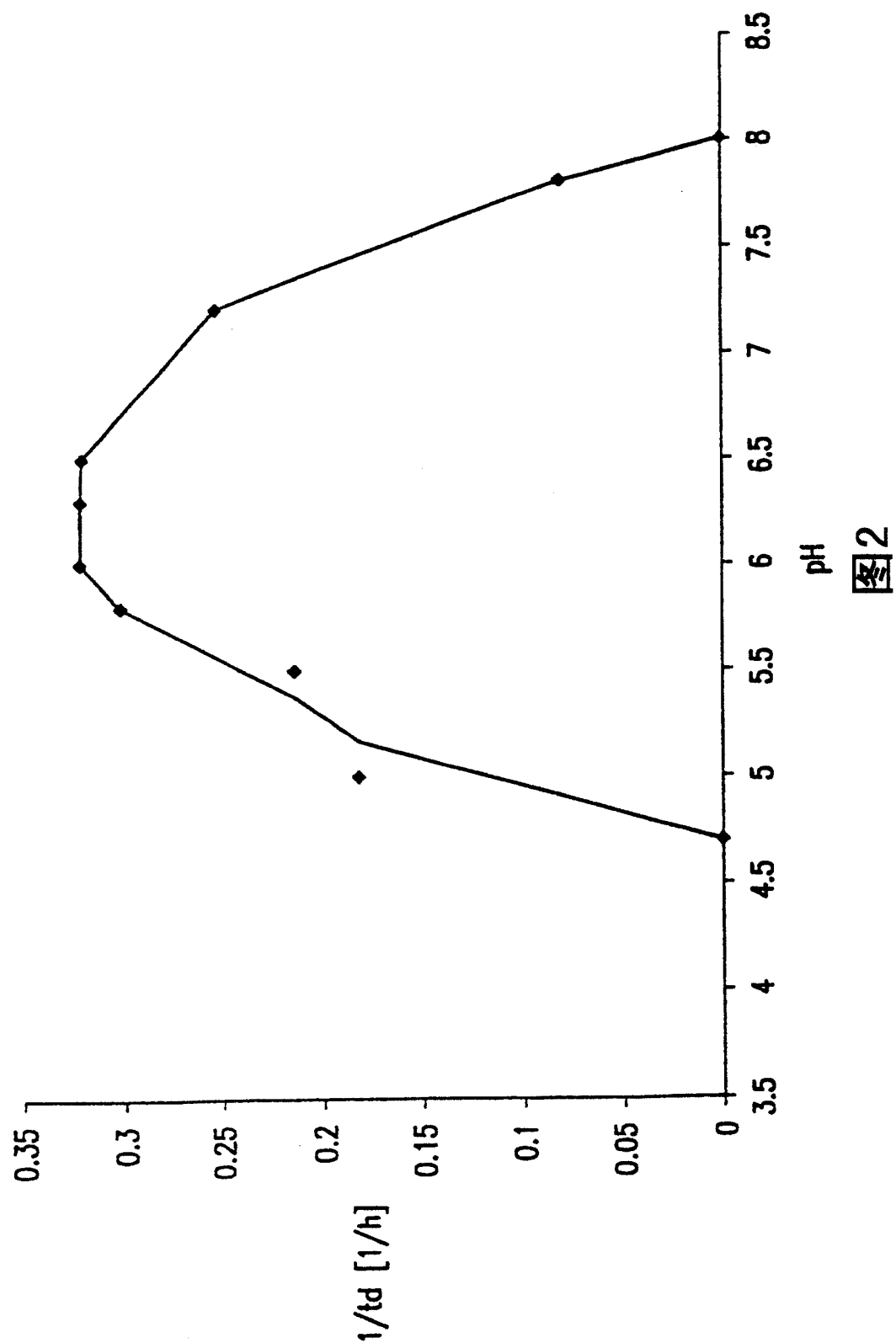


图2

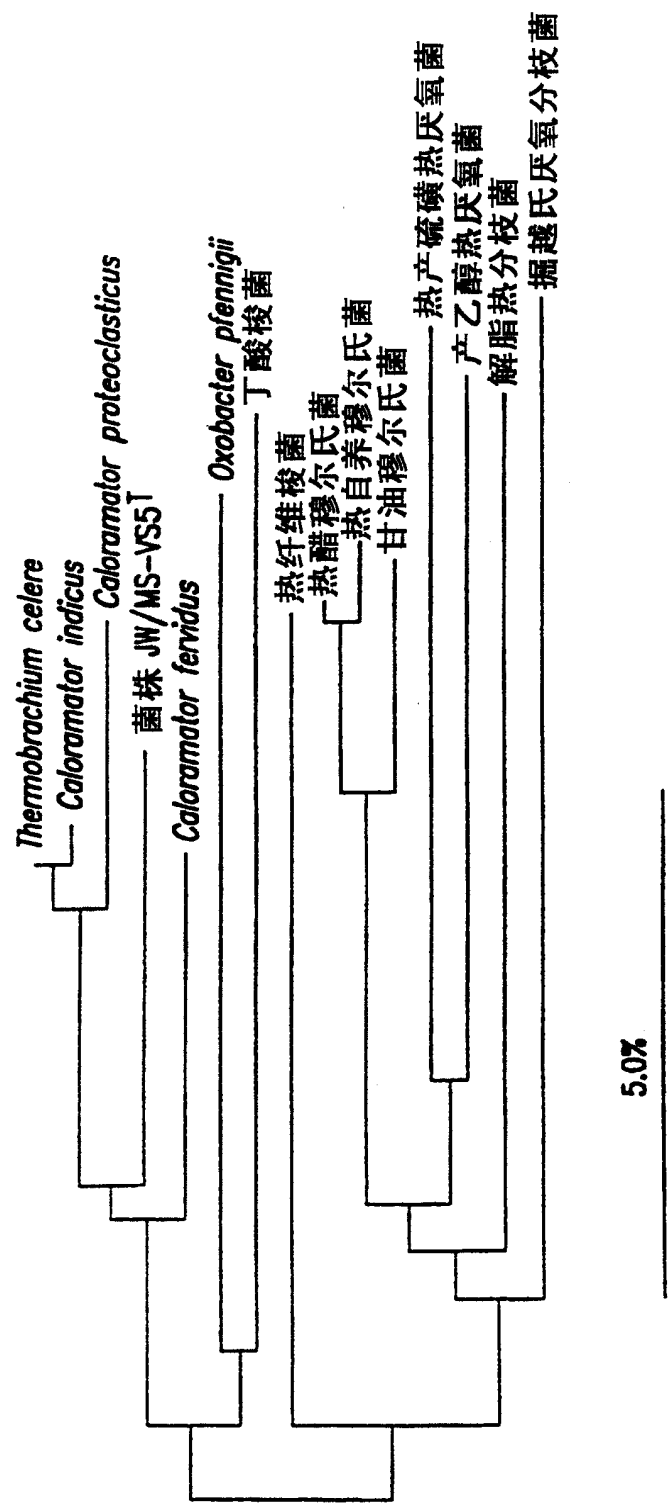


图3

在60℃和厌氧条件下甲苯化厌氧的JW/MS-VS-5
细胞将甘油转化为3-HPA的时程

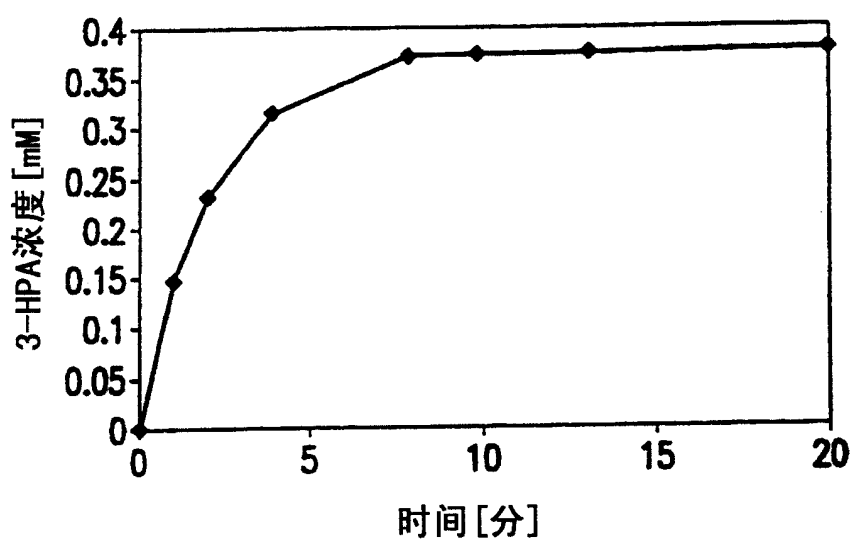


图4

在60℃和厌氧条件下厌氧地甲苯化JW/MS-VS-5细胞
将1, 2-丙二醇转化为丙醛的时程测定

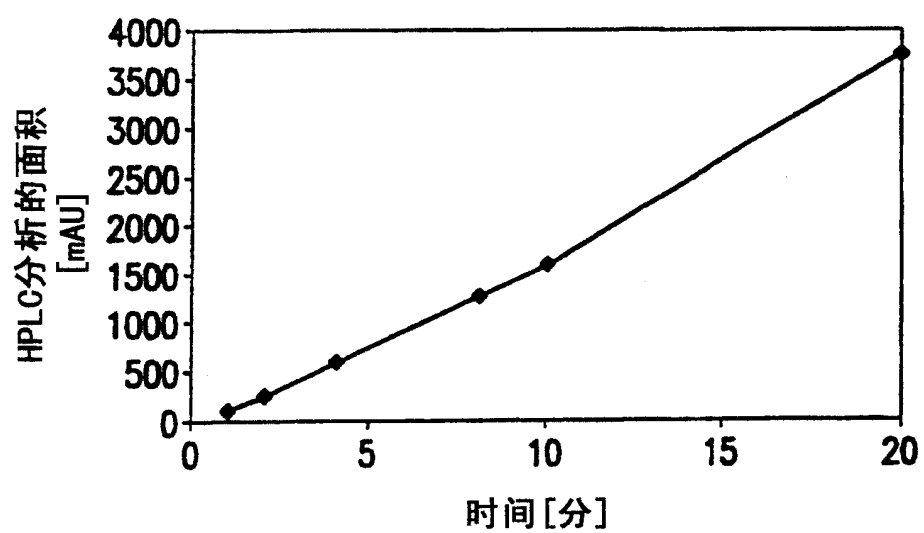


图5