



(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 201546275 A

(43)公開日：中華民國 104 (2015) 年 12 月 16 日

(21)申請案號：104105209

(22)申請日：中華民國 104 (2015) 年 02 月 16 日

(51)Int. Cl.：

C12N1/21 (2006.01)

C12N15/11 (2006.01)

C12P13/00 (2006.01)

(30)優先權：2014/02/20

歐洲專利局

14155936.9

2014/12/05

歐洲專利局

14196432.0

(71)申請人：拜耳材料科學股份有限公司 (德國) BAYER MATERIALSCIENCE AG (DE)
德國

(72)發明人：傑格 葛諾特 JAEGER, GERNOT (DE)；瑪格努斯 約根 MAGNUS, JORGEN (NO)；慕沙 阿姆蓋德 MOUSSA, AMGAD SALAH (EG)；歐夫 股乃特 OLF, GUENTER (DE)；羅自 股利歐 LOLLI, GIULIO (IT)；貝克 史維特 BEHNKEN, SWANTJE (DE)；尹正員 YOUN, JUNG-WON (KR)；雅方尼 莫哈姆德 YALFANI, MOHAMMAD (IR)；斯班格 喬治 SPRENGER, GEORG (DE)

(74)代理人：林秋琴；陳彥希

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：24 項 圖式數：39 共 182 頁

(54)名稱

生產鄰-胺基苯甲酸鹽之重組菌株及來自經由 2-胺基苯甲酸之再生資源發酵生產苯胺
RECOMBINANT STRAIN PRODUCING O-AMINOBENZOATE AND FERMENTATIVE
PRODUCTION OF ANILINE FROM RENEWABLE RESOURCES VIA 2-AMINOBENZOIC ACID

(57)摘要

本發明提供一種能夠以生物方式將包含可發酵碳物質的原料轉化成 o-胺基苯甲酸鹽的重組微生物宿主細胞。本發明進一步提供一種用以生產苯胺的方法，包含下列步驟：a)使用能夠以生物方式將包含至少一種可發酵碳物質的原料轉化成 o-胺基苯甲酸鹽的重組微生物宿主細胞，藉由發酵該含有至少一種可發酵碳物質的原料來生產 o-胺基苯甲酸鹽，其中該 o-胺基苯甲酸鹽包含鄰胺苯甲酸根陰離子；b)藉由酸質子化，將該 o-胺基苯甲酸鹽自該鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成鄰胺苯甲酸；c)藉由沉澱或藉由溶解於有機溶劑中回收該鄰胺苯甲酸，以及 d)藉由在有機溶劑中熱去羧化將該鄰胺苯甲酸轉化成苯胺。

The invention provides a recombinant microbial host cell capable of converting a raw material comprising a fermentable carbon substrate to o-aminobenzoate biologically. The invention further provides A method for producing aniline, comprising the steps of: a) producing o-aminobenzoate by fermentation of a raw material comprising at least one fermentable carbon substrate using the recombinant microbial host cell of the capable of converting said raw material comprising at least one fermentable carbon substrate to o-aminobenzoate biologically, wherein said o-aminobenzoate comprises anthranilate anion, b) converting said o-aminobenzoate from said anthranilate anion to anthranilic acid by acid protonation, c) recovering said anthranilic acid by precipitation or by dissolving in an organic solvent, and d) converting said anthranilic acid to aniline by thermal decarboxylation in an organic solvent.

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

生產鄰-胺基苯甲酸鹽之重組菌株及來自經由2-胺基苯甲酸之再生資源
發酵生產苯胺

RECOMBINANT STRAIN PRODUCING O-AMINOBENZOATE AND
FERMENTATIVE PRODUCTION OF ANILINE FROM RENEWABLE
RESOURCES VIA 2-AMINOBENZOIC ACID

【技術領域】

【0001】 本發明是有關於以適當微生物宿主將例如生質之再生資源原料，接著將中間產物化學轉化成苯胺而生產苯胺的領域。

【先前技術】

【0002】 目前，以每年數百萬噸自化石原料生產苯胺以生產聚胺基甲酸酯。以再生資源為基礎的苯胺源亦稱為「生物苯胺(bioaniline)」，對於化學產業來說有強烈需求用俾以擺脫化石資源。更重要的是，就化學製程而言，對降低二氧化碳(CO₂)排放並且增加使用原料中之再生資源有強烈需求。生物苯胺有高度省卻CO₂排放的潛力。

【0003】 本發明進一步是有關於微生物的設計並且自其生產芳香族化合物。具體而言，本發明是有關於自諸如例如生質的再生資源，在適當重組微生物宿主中生產o-胺基苯甲酸鹽(oAB)的領域。通常使用含有顯著比例之可發酵糖的來源。這些糖可包括聚醣(諸如雙糖，例如蔗糖，或三糖，例如蔗果三糖)，以及C-6單糖(諸如葡萄糖、果糖或甘露糖)與C-5單糖(諸如木糖和阿拉伯糖)。能夠將糖轉化成o-胺基苯甲酸鹽(2-胺基苯甲酸鹽、鄰-胺基苯甲酸鹽、o-胺基苯甲酸鹽、oAB)的重組微生物菌株將能夠自廣泛的再生資源(包括甜菜與甘蔗、含澱粉植物，諸如玉米、小麥與裸麥，以及木質纖維素，諸如來自禾稈、木或榨渣)生產o-胺基苯甲酸鹽。

【0004】 目前，沒有o-胺基苯甲酸鹽或相應酸的再生資源或生物衍生

資源可供使用，而且不曾描述過大規模生物生產 o -胺基苯甲酸鹽的已知實例。 o -胺基苯甲酸鹽是莽草酸途徑的天然中間物以及用以生物合成芳香族胺基酸L-色胺酸的前驅物。在原核生物與真核生物中，相對充分了解往 o -胺基苯甲酸鹽的生物合成途徑。可達到將 o -胺基苯甲酸鹽化學轉化成苯胺。現有的苯胺生產方法仰賴於從石油衍生原料的化學合成。此等石油衍生的原料相對於再生原料(諸如再生資源「生質」)來說並非可再生。涉及化學合成的數個化學步驟造成化學品的高額生產成本。苯胺的習用化學合成與對環境造成實質影響的有害中間物、溶劑及廢棄產物相關。在芳香環上的非特異性副反應導致產物產率降低。石油衍生的原料受到因為全球石油價格所致的成本波動影響。

【0005】 WO 2013/103894 A1揭示一種經由生物衍生之 p -胺基苯甲酸(4-胺基苯甲酸)生產芳香族胺的方法。但是，這份文件揭示在大腸桿菌中或在啤酒酵母菌中生產 p -胺基苯甲酸且沒有認定麩胺酸棒狀桿菌(*Corynebacterium glutamicum*)作為宿主的益處。此外，這份文件亦未揭示如何成功地將發酵程序與生物衍生之 p -胺基苯甲酸轉化成芳香族胺的下游化學程序組合。

【0006】 若基於生物合成途徑(包括酶反應、活體內、鄰胺苯甲酸鹽去羧化成為苯胺作為最後反應步驟)，作為一步驟轉化將糖直接發酵成苯胺被認為最省成本。因為胺基苯甲酸去羧酶在蛋白質工程化過程中無法成功地被鑑定出或被開發出，因此鄰胺苯甲酸鹽至苯胺的去羧化反應無法透過單純酶反應方式來進行。由於此一步驟製程在技術上不可行，便考慮實施胺基苯甲酸鹽去羧化成為苯胺的最終反應步驟最為最終反應步驟的替代製程，例如藉由相對於酶反應步驟的化學步驟。

【0007】 因此，本發明基於再生資源提供生產苯胺之方法，其優於現有發酵與化學方法，並且達到大幅降低二氧化碳排放、省卻化石資源，以及生產成本相比於已建立之以石油為主生產方法相近或更低。

【發明內容】

【0008】 藉由提供能夠以生物方式將包含可發酵碳物質的原料轉化成 o -胺基苯甲酸鹽的重組微生物宿主細胞，本發明已解決了該問題。

【0009】 本發明已進一步藉由提供用以生產苯胺的方法解決了該問題，該方法包含下列步驟：

- a) 藉由使用如本文所述以及如申請專利範圍中所主張之本發明重組微生物宿主細胞發酵含有至少一種可發酵碳物質的原料來生產 o -胺基苯甲酸鹽，該重組微生物宿主細胞能夠將該含有至少一種可發酵碳物質的原料以生物方式轉化成 o -胺基苯甲酸鹽，其中該 o -胺基苯甲酸鹽包含鄰胺苯甲酸根陰離子，
- b) 藉由酸質子化，將該 o -胺基苯甲酸鹽自該鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成鄰胺苯甲酸，
- c) 藉由沉澱或藉由溶解於有機溶劑中回收該鄰胺苯甲酸，以及
- d) 藉由在有機溶劑中熱去羧化將該鄰胺苯甲酸轉化成苯胺。

【0010】 基於再生資源(例如生質或可發酵碳源)對苯胺生產的改變，提供了明顯降低CO₂排放、容許屏除石油資源，並能夠降低生產成本的益處。本發明的另一個益處在於有害化學品及所生成廢棄物將會保持在最低程度。此外，可在對環境整體衝擊最小的情況下生產生物衍生的 o -胺基苯甲酸鹽並轉化成苯胺。

【0011】 具體而言，本發明提供一種能夠將包含可發酵碳物質的原料以生物方式轉化成 o -胺基苯甲酸鹽的重組微生物宿主細胞。依據本發明，這樣的一種重組微生物宿主可以是經遺傳改造的微生物，用以自再生資源(諸如例如生質)發酵生產 o -胺基苯甲酸鹽。舉例而言，本發明提供經遺傳改造的麩胺酸棒狀桿菌作為生物催化劑，其適於自可發酵碳源有效率地發酵生產 o -胺基苯甲酸鹽。

【0012】 麩胺酸棒狀桿菌是一種存在於土壤中的革蘭氏陽性菌。其屬於高GC含量的革蘭氏陽性放線菌。麩胺酸棒狀桿菌是生物技術中最為重要的細菌物種之一，其一年生產超過兩百萬噸的胺基酸，主要為L-麩胺酸以及L-離胺酸。因為這個極大的產業重要性，自從在1956年發現麩胺酸棒狀桿菌之後，麩胺酸棒狀桿菌立刻就受到廣泛研究。麩胺酸棒狀桿菌的基因體已定序並在2003年公開(Ikeda M, Nakagawa S, Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62:99. ; Kalinowski J, Bathe B, Bartels D, Bischoff N, Bott M, Burkovski A, Dusch N, Eggeling L, Eikmanns BJ, Gaigalat L, Goesmann A, Hartmann M,

et al., J Biotechnol, 2003, 104: 5)。作為生產胺基酸還有其他化學品的微生物工廠，麩胺酸棒狀桿菌展現出許多理想的內生性特性。棒狀桿菌生理學的深入基本知識以及建模程序或在組合方法中設計合成途徑的基因體後工具構成設計有效率並通用之棒狀桿菌生物精煉廠的基礎。產生oAB的麩胺酸棒狀桿菌生物合成途徑已被廣泛地研究並且可分成三個主要部分：中心代謝、通用芳香族途徑，以及L-色胺酸分支途徑。oAB是L-色胺酸生物合成的一個重要中間物(圖1)。但是，先前企圖針對胺基酸生產來進行的菌株改良主要是仰賴於傳統隨機突變與篩選程序，以刪除競爭途徑並在生物合成途徑中消除回饋調節為主要目標。因為難以達到完全解除調節步驟的管制以及提高適當生物合成酶活性，傳統方法在實用性上受到限制。此外，隨機突變通常會在基因體的一些位置處產生出乎意料的突變伴隨著合乎需要的突變。由於難以確認這些未經鑑別之突變的影響，更多菌株改良之處將會影響。這些問題廣泛存在於透過隨機突變而建構的產業菌株中。以主要在過去10年期間報導的文獻為基礎，使用透過傳統方法產生的菌株的現行生產產生相對於糖(wt%)大約為L-色胺酸20-23而L-苯丙胺酸約25。相對地，已報導許多其他胺基酸相對於糖有極高產率(wt%)，例如L-離胺酸40-50；L-麩胺酸45-55；L-精胺酸30-40；L-蘇胺酸40-50；L-纈胺酸30-40；以及L-丙胺酸45-55 (Leuchtenberger W, Huthmacher K, Drauz K, Appl Microbiol Biotechnol, 2005, 69:1；Ikeda M, Nakagawa S, Appl Microbiol Biotechnol, 2003, 62:99)。基於在分子生物學以及在從糖至L-色胺酸(以及oAB)之生物合成途徑功能性的理解中的現今進展，本發明提供一種能夠以生物方式將含有可發酵碳物質的原料轉化成o-胺基苯甲酸鹽的重組微生物宿主細胞，且更具體而言，是一種基於定位突變以及代謝工程化方法之麩胺酸棒狀桿菌 ATCC13032的oAB生產者。供代謝工程化以產生oAB生產者的某些基因標的位在產生oAB以及後續L-色胺酸的芳香族生物合成途徑中(圖1)。在麩胺酸棒狀桿菌中，L-色胺酸的生物合成於數個步驟處受到嚴格控制。因此，過量生產oAB需要在遺傳上移除存在於通用芳香族途徑以及在L-色胺酸分支中的代謝控制。另外，作為本發明的另一個具體例，擴增啟動芳香族途徑的DAHP合成酶是增加碳流下達通用途徑的一個重要策略。這些突變與生成芳香族胺基酸緩慢生長型菌株組合以規避對於芳香族胺基酸供給的持續

需求。前驅物的平衡供應是透過達到有效率地生產產物而獲得解決，考量到從葡萄糖生物合成1 mol的oAB需要1 mol的赤藻糖-4-磷酸(E4P)與2 mol磷酸烯醇丙酮酸(PEP)作為起始前驅物，並另外在其途徑上消耗1 mol的L-麩醯胺酸與釋出1 mol的丙酮酸。

【0013】 在下文中，發明人著重於麩胺酸棒狀桿菌作為重組微生物菌株用於以生物方式生產o-胺基苯甲酸鹽。因此，本發明提供一種能夠將包含可發酵碳物質的原料轉化成o-胺基苯甲酸鹽的重組微生物宿主細胞。該麩胺酸棒狀桿菌較佳為麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032，最佳為重組麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032。

【0014】 在本發明的又一個具體例中，麩胺酸棒狀桿菌菌株，較佳為麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032可包含編碼鄰胺苯甲酸磷酸核糖基轉移酶之*trpD*基因(Cgl3032，SEQ ID NO: 1)的一個遺傳修飾型，其中該遺傳修飾型較佳是選自由SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7，及SEQ ID NO: 8組成之群，其全都對*trpD*基因造成表現降低以產生色胺酸營養缺陷型菌株。前述遺傳修飾型的單獨一者已產生會生產o-胺基苯甲酸鹽(oAB)的重組麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032。

【0015】 在下文中，定義用於說明本發明的一些術語。

【0016】 術語「生物苯胺」依據本發明意指基於來自再生資源之原料的苯胺，再生資源為諸如甜菜；甘蔗；含澱粉植物，較佳為玉米、小麥與裸麥；以及木質纖維素，較佳為禾桿、木及榨渣；甘油與C1-化合物，較佳為CO；或諸如可發酵糖，較佳為C-5單糖、C-6單糖、雙糖及三糖，其中C-5單糖較佳為木糖及阿拉伯糖，而其中C-6單糖較佳為葡萄糖、果糖或甘露糖，且其中雙糖較佳為蔗糖，且其中三糖較佳為蔗果三糖。

【0017】 依據本發明「o-胺基苯甲酸鹽」意指鄰-胺基苯甲酸鹽(o-胺基苯甲酸鹽、「oAB」)。o-胺基苯甲酸鹽可以包含鄰胺苯甲酸根陰離子($C_6H_4COO^-$)與適當陽離子(諸如 NH_4^+ 或 Na^+)的鄰胺苯甲酸鹽，或鄰胺苯甲酸(其為兩性離子 $C_6H_4COO^- NH_3^+$ 與 $C_6H_4COO^- NH_2$)的形式存在。「o-胺基苯甲酸鹽」(「oAB」)不同於「4-胺基苯甲酸鹽」(「pAB」)之處在於pAB的胺基在C₄-位置(對位)附接至苯環，而o-胺基苯甲酸鹽(「oAB」)是在C₂-位置(鄰位)。

【0018】 術語「宿主」在本發明的含意中可包含能夠不論是以天然方式或者僅在轉形後成為「重組微生物宿主」，藉由發酵生產 α -胺基苯甲酸鹽，或除了天然存在 α -胺基苯甲酸鹽以外呈鄰胺苯甲酸根陰離子或鄰胺苯甲酸的任一者。「微生物宿主」依據本發明可選自由細菌、酵母菌及真菌組成之群。該宿主可選自由細菌、酵母菌及真菌組成之群，其中該細菌較佳為大腸桿菌菌株、棒狀桿菌菌株或假單孢菌菌株，其中該棒狀桿菌菌株較佳為麩胺酸棒狀桿菌，而其中該假單孢菌菌株較佳為臭味假單孢菌(*Pseudomonas putida*)。較佳地，該微生物宿主可為重組微生物宿主。此一重組微生物宿主可為如實例1中所示的*E. coli* W3110 *trpD9923*。此一重組宿主可為如實例4中所示的臭味假單孢菌KT2440。此一重組宿主可為如實例3中所示的麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032。

【0019】 術語「遺傳修飾型」在本發明含意中意指相較於野生型序列，微生物宿主的給定基因之核酸序列中的變化。此一遺傳修飾型可包含刪除以及插入一或多個去氧核糖核酸。此一遺傳修飾型可包含部分或完全刪除以及藉由轉形而被引入至微生物宿主基因體中的插入。這樣的一種遺傳修飾型可產生重組微生物宿主，其中相較於個別微生物宿主的野生型序列，該遺傳修飾型可包含至少一個、兩個、三個、四個或更多個單一核苷酸變化。舉例而言，一個遺傳修飾型可以是刪除或插入至少一個、兩個、三個、四個或更多個核苷酸或轉形至少一個、兩個、三個、四個或更多個單一核苷酸。遺傳修飾型依據本發明可具有例如個別基因表現降低或例如個別基因表現提高的效力。在這樣一個依據本發明的遺傳修飾型實例中，重組微生物宿主(例如麩胺酸棒狀桿菌)可包含編碼酶鄰胺苯甲酸磷酸核糖基轉移酶之*trpD*基因(Cgl3032, SEQ ID NO: 1)的一個遺傳修飾型，其中該遺傳修飾型可具有經修飾*trpD*基因表現降低的效力。此經修飾*trpD*基因可選自由SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7，及SEQ ID NO: 8組成之群。前述遺傳修飾型的單一者已產生麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032菌株，其顯示生產 α -胺基苯甲酸鹽(α AB)的經修飾*trpD*基因表現降低。在本發明的又一個具體例中，此遺傳修飾型亦可為*trpD*基因的刪除，如同在麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ 中般。

【0020】 術語「批次發酵」在本發明含意中意指具有有限定起始點以及

限定終點的單一發酵反應。若在連續發酵模式下微生物產率無法維持在高速率時，批次發酵可用於本發明方法的步驟a)中。

【0021】 術語「饋料批次發酵」在本發明含意中饋料批次發酵意指在生物技術製程中的一種操作技術，其中一或多種營養素(基質)在培養其中被饋送(提供)至生物反應器，且其中產物(等)維持在生物反應器中直到運行結束。若在連續發酵模式下微生物產率無法維持在高速率時，「饋料批次發酵」可用於本發明方法的步驟a)中。

【0022】 術語「連續發酵」在本發明含意中意指在本發明方法之步驟a)發酵期間，連續地添加基質並移除產物(意即*o*-胺基苯甲酸鹽，oAB)的發酵方法。

【0023】 在下文，詳細說明本發明。

【0024】 本發明提供一種能夠以生物方式將包含可發酵碳基質的原料轉化成*o*-胺基苯甲酸鹽(oAB)的重組微生物宿主細胞。

【0025】 該微生物宿主細胞可選自由細菌、酵母菌及真菌組成之群，其中該細胞較佳為大腸桿菌菌株、棒狀桿菌菌株或假單孢菌菌株，且其中該棒狀桿菌菌株較佳為麩胺酸棒狀桿菌，更佳為麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032，而其中該假單孢菌菌株較佳為臭味假單孢菌，更佳為臭味假單孢菌KT2440。

【0026】 在本發明重組微生物宿主細胞的又一個具體例中，重組微生物宿主細胞可為麩胺酸棒狀桿菌。在本發明的一個更明確具體例中，麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032為用以生產*o*-胺基苯甲酸鹽的較佳重組微生物宿主，因為發明人觀察到該生物體對*o*-胺基苯甲酸鹽具有高耐受性，而就其他微生物(例如大腸桿菌K12)而言，低濃度*o*-胺基苯甲酸鹽就有毒性。

【0027】 在本發明重組微生物宿主細胞的又一個具體例中，該麩胺酸棒狀桿菌，較佳為麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032，可包含編碼鄰胺苯甲酸磷酸核糖基轉移酶之*trpD*基因的一個遺傳修飾型(圖3)。

【0028】 該編碼鄰胺苯甲酸磷酸核糖基轉移酶之*trpD*基因(Cgl3032, SEQ ID NO: 1)的遺傳修飾型可選自由SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7，及SEQ ID NO: 8組成之群，且其中該遺傳修飾型具有*trpD*基因表現降低的效力。更具

體而言，前述序列中的突變可改變核糖體結合位點以及*trpD*基因的起始密碼子之間的間隔區。此外，改動*trpD*基因的天然起始密碼子可能會使得*trpD*的轉譯降低並因此產生L-色胺酸的緩慢生長型菌株，其在不補充L-色胺酸的情況下以數克規模生產o-胺基苯甲酸鹽。之後，尤其偏好此類型的菌株作為本發明的重組微生物宿主。

【0029】 在本發明重組微生物宿主細胞的更多具體例中，微生物宿主細胞可為麩胺酸棒狀桿菌，較佳為麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032，其中該麩胺酸棒狀桿菌或麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032可包含編碼分支酸變位酶之*csm*基因(Cgl0853，SEQ ID NO: 9)的遺傳修飾型(圖3)，其中該遺傳修飾型較佳是選自由SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15及SEQ ID NO:16組成之群，且其中該遺傳修飾型具有*csm*基因表現降低的效力。具體而言，*csm*基因可被操作以進一步藉由將L-苯丙胺酸與L-酪胺酸生產率降至最低來增進o-胺基苯甲酸鹽生產率。

【0030】 降低*csm*基因表現的效力在於L-酪胺酸與L-苯丙胺酸的緩慢生長型菌株結果，其在不補充L-酪胺酸及L-苯丙胺酸的情況下以數克規模生產o-胺基苯甲酸鹽。這規避了o-胺基苯甲酸鹽生產在芳香族酸途徑催化反應的酶因為L-酪胺酸及/或L-苯丙胺酸所致的回饋抑制的降低，在補充有L-酪胺酸及/或L-苯丙胺酸的L-酪胺酸與L-苯丙胺酸營養缺陷型菌株中亦可行。尤其偏好此類型的菌株作為本發明的重組微生物宿主。這個效力可導致更高的o-胺基苯甲酸鹽生產。

【0031】 在本發明重組微生物宿主細胞的更多具體例中，麩胺酸棒狀桿菌微生物宿主，較佳為麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032，可進一步包含一或多個選自下列組成之群的刪除：*hpr* (Cgl1937 – SEQ ID NO:17或SEQ ID NO: 18)、*ptsG* (Cgl1537 - SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20)、*pepco* (Cgl1523 – SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22)、*pyk* (Cgl2089 – SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 24)，以及*gpi* (Cgl0851 – SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 28)。

【0032】 基因*hpr* (Cgl1937 – SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18)與基因*ptsG* (SEQ ID NO:19或SEQ ID NO:20)：這些基因的每一者編碼一個單元的多酶複合體PEP-磷酸轉移酶系統(PTS)(圖1、2)。麩胺酸棒狀桿菌的PTS、

Hpr及PtsG單元經操作並且就生長、細胞存活率，還有oAB生產方面進行比較，如實例3中所見。

【0033】 基因*pepco* (Cgl1523 – SEQ ID NO:21或SEQ ID NO:22)編碼酶磷酸烯醇丙酮酸-羧化酶。酶磷酸烯醇丙酮酸-羧化酶藉由將PEP (磷酸烯醇丙酮酸)轉化成草醯乙酸來消耗PEP (圖1、2)。這個反應在氧氣消耗下是主要的回補反應，而在標準充足氧氣供應下丙酮酸激酶消耗大部分PEP以在獲得一個ATP的情況下生成丙酮酸。麩胺酸棒狀桿菌的基因*pepco*經操作並就生長、細胞存活率，還有oAB生產方面與其他麩胺酸棒狀桿菌菌株進行比較，如實例3中所見。

【0034】 基因*pyk* (Cgl2089 – SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 24)編碼酶丙酮酸激酶。丙酮酸激酶藉由生產丙酮酸與ATP來消耗PEP (磷酸烯醇丙酮酸)(圖1、2)。這個反應在麩胺酸棒狀桿菌中是糖解作用的一部分。標註在麩胺酸棒狀桿菌基因體中的Pyk編碼基因被刪除，如實例3中所述。

【0035】 基因*gpi* (Cgl0851 – SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 28)編碼酶葡萄糖-6-磷酸異構酶。該酶催化糖解作用將葡萄糖-6-磷酸轉化成果糖-6-磷酸的第一個步驟(圖1、2)。

【0036】 在本發明重組微生物宿主細胞的更特定具體例中，麩胺酸棒狀桿菌微生物宿主細胞，較佳為麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032，可進一步過度表現一或多個選自下列組成之群的基因：*galP* (SEQ ID NO: 30)、*iolT2* (SEQ ID NO: 31)、*ppgk* (SEQ ID NO: 32)、*pps* (SEQ ID NO: 33-35)、*ppk* (SEQ ID NO: 36)、*zwf1* (SEQ ID NO: 37)、*opcA* (SEQ ID NO: 38-39)、*tktCg* (SEQ ID NO: 40)、*tktEc* (SEQ ID NO: 41)、*talCg* (SEQ ID NO: 42)、*talEc* (SEQ ID NO: 43)、編碼TrpEGS38F (*trpEG*^{S38F}, SEQ ID NO: 50)的基因、編碼TrpEGS38R (*trpEG*^{S38R}, SEQ ID NO: 51)的基因、編碼TrpEGS40R (*trpEG*^{S40R}, SEQ ID NO: 52)的基因、編碼TrpEGS40F (*trpEG*^{S40F}, SEQ ID NO: 53)的基因、編碼AroGD146N (*aroG*^{D146N}, SEQ ID NO: 55)的基因、大腸桿菌LJ110的*aroL* (SEQ ID NO: 93)、*aroK* (SEQ ID NO: 94)、*glnA* (SEQ ID NO: 95)，及*qsuA* (SEQ ID NO: 96)。

【0037】 在麩胺酸棒狀桿菌微生物宿主(較佳為麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032)中，單獨或與本發明其他遺傳修飾型中任一者組合來表現具回

饋耐受性的 $trpEG$ 基因(鄰胺苯甲酸合成酶基因)、編碼TrpEGS38F ($trpEG^{S38F}$ – SEQ ID NO: 50)之基因、編碼TrpEGS38R ($trpEG^{S38R}$ – SEQ ID NO: 51)之基因、編碼TrpEGS40R ($trpEG^{S40R}$ – SEQ ID NO: 52)之基因、編碼TrpEGS40F ($trpEG^{S40F}$ – SEQ ID NO: 53)之基因為本發明較佳具體例。該等基因全共有其編碼鄰胺苯甲酸合成酶單元之突變形式的通用特徵，鄰胺苯甲酸合成酶在形成o-胺基苯甲酸鹽與L-麩胺酸的情況下釋出一個丙酮酸分子(圖3)。這些為TrpEG的具回饋耐受性形式，其是為何相應經突變基因被稱為 $trpEG^{br}$ 的原因。在麩胺酸棒狀桿菌微生物宿主(較佳為麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032)中，單獨或與本發明其他遺傳修飾型中任一者組合來表現具回饋耐受性的 $aroG$ 基因(3-去氧-D-阿糖基庚糖酮酸7-磷酸合成酶基因)，諸如編碼AroGD146N ($aroG^{D146N}$ – SEQ ID NO: 55)的基因為本發明另一較佳具體例。編碼AroGD146N的基因($aroG^{D146N}$ – SEQ ID NO: 55)編碼突變形式的AroG，其為在大腸桿菌中催化赤藻糖-4-磷酸(E4P)至3-去氧-D-阿糖基庚糖酮酸7-磷酸(DAHP)之反應的酶。

【0038】 編碼酶半乳糖通透酶的基因 $galP$ (Cgl2409 - SEQ ID NO: 30)。在PTS瓦解之後，葡萄糖攝取可以藉由表現半乳糖通透酶予以回復(圖1、2)。在麩胺酸棒狀桿菌中，鑑定出一個基因並註解為半乳糖通透酶，且因而就此一表現來說是一個不錯的候選者。在具有PTS瓦解的麩胺酸棒狀桿菌菌株中表現候選基因，如實例3中所示。

【0039】 基因 $iolT2$ (Cgl3058 – SEQ ID NO: 31)編碼肌醇通透酶T2單元。在PTS瓦解之後，葡萄糖攝取可以藉由表現肌醇通透酶T2單元予以回復(圖1、2)。於麩胺酸棒狀桿菌中作為在PTS瓦解之後過度表現半乳糖通透酶來修復葡萄糖攝取的替代性方法，進行肌醇通透酶之肌醇通透酶T2單元的過度表現。所得菌株特徵相比於菌株為過度表現半乳糖通透酶，如實例3中所示。

【0040】 基因 $ppgk$ (Cgl1910 – SEQ ID NO: 32)編碼酶聚磷酸葡萄糖激酶。半乳糖通透酶以及激醇通透酶T2單元僅能攝取葡萄糖，但它們無法將糖分子磷酸化(圖1、2)。但是，這個磷酸化作用對於葡萄糖分子的代謝是必須的。因此，將不同通透酶的表現與葡萄糖磷酸化酶的表現組合。這個Ppgk在本發明之表現不同通透酶的PTS缺乏型菌株中被共表現，如實例3中

所述。

【0041】 基因*pps* (Cgl0551與Cgl0552 – SEQ ID NO: 33-35)編碼酶PEP (磷酸烯醇丙酮酸)合成酶。除了瓦解會消耗PEP的反應以外，還增進生成PEP的生物合成步驟。PEP合成酶藉由丙酮酸再循環以及將ATP消耗成AMP來催化PEP形成，在麩胺酸棒狀桿菌中作為糖質新生的一部分(圖1、2)。過度表現*pps*基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中會造成oAB池增加，如實例3中所述。

【0042】 基因*ppk* (Cgl2862 – SEQ ID NO: 36)編碼酶PEP羧基激酶。作為乙醛酸途徑的一部分，草醯乙酸可以經由PEP羧化激酶被再循環成PEP(圖1、2)。過度表現該基因可以是可供用於oAB生物合成之更大PEP池的另一途徑，如實例3中所述。

【0043】 基因*zwf1* (Cgl1576 – SEQ ID NO: 37)與基因(*opcA* (Cgl1577 – SEQ ID NO: 38-39)編碼酶葡萄糖-6-磷酸去氫酶(圖1、2)。提高催化五碳糖磷酸途徑(PPP)的第一個反應(自葡萄糖-6-磷酸形成核酮糖-5-磷酸)(圖1、2)的酶產量可使得增加流入至PPP，造成E4P更大量的生產且經由果糖-6-磷酸(Frc-6-P)生產，並可進一步增加細胞PEP池，最後在麩胺酸棒狀桿菌菌株中造成oAB池增加。當這個操作被施加至麩胺酸棒狀桿菌菌株而且實施Zop酶的表現時，達到這個效力，如實例3中所述。

【0044】 基因*tktCG* (Cgl1574 – SEQ ID NO: 40)與基因*tktEC* (ECDH10B_3110 – SEQ ID NO: 41)編碼酶轉酮酶。觀察到流提高通過PPP並且增加E4P池，並甚至oAB以及芳香族胺基酸的生產因為在麩胺酸棒狀桿菌菌株中表現轉酮酶而增加(圖1、2)。大腸桿菌的轉酮酶基因以及在麩胺酸棒狀桿菌中編碼的轉酮酶被過度表現，如在實例3中所述。

【0045】 基因*talCG* (Cgl1575 – SEQ ID NO: 42)與基因*talEC* (ECDH10B_2629 – SEQ ID NO: 43)編碼酶轉醛醇酶。針對在大腸桿菌中過度表現轉醛醇酶，觀察到對E4P生產有著與如同轉酮酶過度表現相當的有利效力(圖1、2)。因為大腸桿菌及麩胺酸棒狀桿菌轉醛醇酶的序列明顯不同，發明人著手在本發明麩胺酸棒狀桿菌菌株中表現所述大腸桿菌基因以及天然麩胺酸棒狀桿菌基因，如實

例3中所述。轉醛醇酶以及轉酮酶編碼基因在一個載體上被組合並且於麩胺酸棒狀桿菌菌株中共同表現，以進一步提高oAB生產菌株特徵，如實例3中所述。

【0046】 基因 $qsuA$ (Cgr0492 – SEQ ID NO: 96)編碼藥物抗性轉運蛋白QsuA。在麩胺酸棒狀桿菌菌株中表現該基因會使得oAB轉運達到最佳，如實例3中所述。

【0047】 大腸桿菌LJ110的基因 $aroL$ (B0388 – SEQ ID NO: 93)編碼在大腸桿菌中催化從莽草酸(SHI)至莽草酸-3-磷酸(SHI3P)之反應的酶。在麩胺酸棒狀桿菌菌株中表現大腸桿菌的 $aroL$ 基因，如實例3中所述。

【0048】 基因 $aroK$ (Cgl1622 – SEQ ID NO: 94)編碼在麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032中催化從莽草酸(SHI)至莽草酸-3-磷酸(SHI3P)之反應的酶。在麩胺酸棒狀桿菌菌株中表現 $aroK$ 基因，如實例3中所述。

【0049】 基因 $glnA$ (Cgl2214 – SEQ ID NO: 95)編碼在麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032中的酶麩醯胺酸合成酶(圖3)。在麩胺酸棒狀桿菌菌株中表現 $glnA$ 基因，如實例3中所述。

【0050】 在本發明的尤佳具體例中，重組微生物宿主細胞可以是麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta pepco$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta gpi$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta pyk$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEx2-trpEG^{S40F}$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEx2-aroG^{D146N}$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEx2-aroG^{D146N}-trpEG^{S40F}$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEx2-aroL$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB072$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB073$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB074$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB075$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB076$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB077$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB078$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB085$ ，或麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB096$ ，如實例3中以及表4中進一步說明。

【0051】 在下文中說明本發明的更多重組微生物宿主。

【0052】 在本發明重組微生物宿主細胞的又另一個具體例中，微生物宿主細胞可以是臭味假單孢菌，較佳為臭味假單孢菌KT2440。

【0053】 在本發明重組微生物宿主細胞的又一個具體例中，該臭味假單孢菌(較佳為臭味假單孢菌KT2400)，可包含編碼鄰胺苯甲酸磷酸核糖基轉移酶與吡啶-3-甘油磷酸合成酶之*trpDC*基因(PP_0421與PP_0422 – SEQ ID NO: 63-64)的一個刪除，或編碼分支酸變位酶與預苯酸脫水酶之*pheA*基因(PP_1769 –SEQ ID NO: 65-66)的一個刪除，或兩者，如實例4中所述(圖4)。

【0054】 在本發明重組微生物宿主細胞的又一個具體例中，該臭味假單孢菌(較佳為臭味假單孢菌KT2440)，其中該臭味假單孢菌或臭味假單孢菌KT2440可表現一或多個選自下列組成之群的基因：編碼TrpEGS40F (*trpEG*^{S40F} – SEQ ID NO: 53)的基因及編碼AroGD146N (*aroG*^{D146N} – SEQ ID NO: 55)的基因(圖4)。在本發明重組微生物宿主細胞的某些具體例中，上述一或多個表現基因可藉由質體轉形或藉由染色體轉形併入該臭味假單孢菌微生物宿主細胞中，如實例4中所述。

【0055】 包含被重組微生物宿主細胞以生物方式轉化成*o*-胺基苯甲酸鹽(*o*AB)之可發酵碳物質的原料可選自由下列組成之群：甜菜、甘蔗、含澱粉植物(較佳為玉米、小麥與裸麥)，以及木質纖維素(較佳為禾桿、木與榨渣)、甘油及C1-化合物(較佳為CO)。

【0056】 在本發明的更多具體例中，原料中所含可發酵碳物質可選自由下列組成之群：C-5單糖、C-6單糖、雙糖及三糖，其中該C-5單糖較佳為木糖與阿拉伯糖，而其中該C-6單糖較佳為葡萄糖、果糖或甘露糖，且其中該雙糖較佳為蔗糖，且其中該三糖較佳為蔗果三糖。

【0057】 本發明已進一步藉由提供用以生產苯胺之方法解決以上問題，該方法包含下列步驟：

- a) 藉由使用如本文所述以及如申請專利範圍中所主張之重組微生物宿主細胞發酵含有至少一種可發酵碳物質的原料來生產*o*-胺基苯甲酸鹽，該重組微生物宿主細胞能夠將該含有至少一種可發酵碳物質的原料以生物方式轉化成*o*-胺基苯甲酸鹽，其中該*o*-胺基苯甲酸鹽包含鄰胺苯甲酸根陰離子，
- b) 藉由酸質子化，將該*o*-胺基苯甲酸鹽自該鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成鄰胺苯甲酸，
- c) 藉由沉澱或藉由溶解於有機溶劑中回收該鄰胺苯甲酸，以及

d) 藉由在有機溶劑中熱去羧化將該鄰胺苯甲酸轉化成苯胺。

【0058】 依據本發明之方法提供了生產苯胺的技術優勢，同時相較於以化石資源為主的方法達到大幅降低CO₂排放、不仰賴化石資源，且相較於已建立之以石油為主的苯胺生產方法達到類進或更低的生產成本。

【0059】 依據本發明之方法包含兩個主要部分，其中第一部分步驟a)是以發酵為基礎(生物技術)，且包含藉由適當重組微生物宿主透過發酵將含有至少一種可發酵碳物質轉化成*o*-胺基苯甲酸鹽，其中該*o*-胺基苯甲酸鹽包含鄰胺苯甲酸根陰離子(C₆H₄COO⁻ NH₂)。

【0060】 第二部分更具有化學性質並在步驟a)的下游，且包含下列步驟a)至d)，以及視情況選用的e)：

b) 藉由酸質子化，將該*o*-胺基苯甲酸鹽自該鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成鄰胺苯甲酸，

c) 藉由沉澱或藉由溶解於有機溶劑中回收該鄰胺苯甲酸，以及

d) 藉由在有機溶劑中熱去羧化將該鄰胺苯甲酸轉化成苯胺。

【0061】 總結，本發明因而提供一種用以生產苯胺的方法，其組合第一生物技術發酵步驟a)以及後續下游之包含至少步驟b)、c)與d)，與視情況選用之步驟e)的化學程序。

【0062】 在下文中，進一步詳盡說明本發明。本發明方法的整體概念列示於圖5中，且更為詳細的總覽呈現於圖6中。

【0063】 本發明進一步提供一種用以生產苯胺的方法，包含下列步驟：

a) 藉由使用如本文所述以及如申請專利範圍中所主張之重組微生物宿主細胞發酵含有至少一種可發酵碳物質的原料來生產*o*-胺基苯甲酸鹽，該重組微生物宿主細胞能夠將該含有至少一種可發酵碳物質的原料以生物方式轉化成*o*-胺基苯甲酸鹽，其中該*o*-胺基苯甲酸鹽包含鄰胺苯甲酸根陰離子，

b) 藉由酸質子化，將該*o*-胺基苯甲酸鹽自該鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成鄰胺苯甲酸，

c) 藉由沉澱或藉由溶解於有機溶劑中回收該鄰胺苯甲酸，以及

d) 藉由在有機溶劑中熱去羧化將該鄰胺苯甲酸轉化成苯胺。

【0064】 步驟a)的發酵可為批次發酵、饋料批次發酵或連續發酵。在步驟a)中為連續發酵的情況下，細胞留滯裝置可用來在發酵步驟a)中分離宿主與水相並且將宿主留滯於用來進行步驟a)的發酵槽內。細胞留滯裝置可併入此一發酵槽中，或作為一個較佳選項，其可位在發酵槽外側作為一個分離式裝置。此一分離可以藉由離心而達致，例如在盤式分離機或傾析離心機中，在沉降裝置中藉由重力，或藉由諸如交叉流過濾的過濾技術。分離可以被設計為留滯時間受限，以使得宿主(諸如細菌、酵母菌與真菌的細胞)花費在發酵槽外側的時間有限，而當其在分離裝置中時不會喪失其生長或生產鄰胺苯甲酸鹽的能力。具有細胞留滯的連續發酵容許發酵步驟a)在高細胞密度下運行並因而有高空間時間產率。更重要的是，步驟a)中的發酵可以在極低生長率下運行。這使得整體產物產率(每g原料的產物g)更高，因為更少量的糖被用於生產生質而更多的糖是用以生產oAB。

【0065】 連續發酵勝過批次發酵的又一個優點在於所謂發酵槽的「停工時間(down time)」可以降至最低。連續發酵的生產期比批次發酵來的更長，因此花在清潔、滅菌、填充以及收取的時間就比例上來說要短的多。對用以運行本發明方法的特定工廠產能來說，這方面被認為增加空間時間產率且因此降低投資成本。

【0066】 若方法的步驟a)是以批次或饋料批次發酵來運行，則總發酵產能可能由數個發酵槽來分配，則斷流槽可用於連續供應步驟a)的發酵材料至包含步驟b)至d)，或甚至e)的下游部分。在微生物的生產無法於連續發酵模式下維持在高生產率的情況下，批次或饋料批次發酵可以用於本發明方法的步驟a)中。

【0067】 本發明方法的步驟a)藉由使用宿主(較佳為能夠藉由發酵將糖轉化成o-胺基苯甲酸鹽之重組宿主)，發酵包含可發酵糖之原料提供包含鄰胺苯甲酸根陰離子的o-胺基苯甲酸鹽。較佳地，包含此一宿主的發酵反應槽在添加碳源(例如玉米糖漿、甘蔗汁、糖蜜與類似物)及氮源(例如氨氣、氫氧化銨溶液、硫酸銨、硝酸銨、玉米浸出液與類似物)，以及微生物生存所需個別微量營養素的情況下進行培育。在步驟a)的發酵中，pH可以在3至9的範圍中，較佳介於pH 4至8，更佳維持在介於6.5與7.5間之值。步驟a)中的pH可以藉由例如添加鹼(例如氨氣、氫氧化銨或氫氧化鈉)予以調整。

【0068】 在本發明方法的又一個具體例中，至少藉由發酵生產 o -胺基苯甲酸鹽的步驟a)，以及藉由酸質子化將該 o -胺基苯甲酸鹽自該鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成鄰胺苯甲酸的步驟b)可連續地運行。在此具體例中，連續地操作在步驟a)中實施的發酵槽，其中在步驟a)中所生產的發酵液可被連續地抽出並透過裝置(例如過濾器、離心機、膜等)進行處理，以分離包含生長至某個密度的宿主的生質。在洗淨一小部分包含重組微生物宿主的生質之後，此生質可被再循環至步驟a)發酵中所使用的發酵槽。來自生質的此洗淨流可用於避免生質累積。在發酵槽中增倍的一部分微生物宿主細胞以及死細胞因而可被移除，以便將發酵步驟a)的反應槽中的活宿主細胞濃度維持在預定限值內，最佳為恆定。這在饋料批次發酵的情況下可能有所不同，其中重組宿主細胞以及發酵產物(等)存留於生物反應器中直到運行結束，因此其並非連續發酵而是饋料批次發酵。充分的氧氣可呈純氧、呈空氣、或呈濃富空氣在步驟a)中被添加至所用反應槽中。發酵步驟a)的無細胞發酵液基本上可以是鄰胺苯甲酸鹽溶液，包含鄰胺苯甲酸根陰離子以及適當相對陽離子，諸如 NH_4^+ 或 Na^+ 。在發酵步驟a)中所生產的鄰胺苯甲酸鹽溶液可具有介於5 g/L與500 g/L鄰胺苯甲酸鹽之間的濃度，較佳介於20 g/L與200 g/L之間，最佳介於50 g/L與150 g/L之間。

【0069】 在本發明方法的又一個具體例中，步驟a)的發酵中所用重組微生物宿主在實施將該 o -胺基苯甲酸鹽自該鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成鄰胺苯甲酸的步驟b)之前被移除。較佳地，被移除的重組微生物宿主被再饋送至步驟a)的發酵中。這有容許連續發酵製程的技術優點，其可能尤其有效率並且節省成本。

【0070】 o -胺基苯甲酸鹽(oAB)是一種胺基酸；因此其離子化狀態，以及在水中的溶解度取決於pH；而兩性離子是最不溶解的形式。在可用於發酵步驟a)之發酵槽中普遍的pH 7下，oAB經陽離子(諸如 Na^+ 或 NH_4^+)緩衝以陰離子形式存在。添加酸(諸如HCl)直到pH降至等電點，因而導致oAB晶體沉澱。因此，本發明方法的方法步驟b)包含藉由酸質子化將鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成鄰胺苯甲酸，從而形成包含鄰胺苯甲酸晶體的沉澱物。為此，方法步驟b)也可稱為「結晶」。具體而言，步驟a)的鄰胺苯甲酸鹽溶液可與酸(較佳HCl)混合。因而，pH可能降低至介於2與4之間的值，較佳介於3.2

與3.6之間。這導致溶解度改變且使得鄰胺苯甲酸鹽晶體沉澱。在後續步驟c)(「回收」)中，鄰胺苯甲酸鹽晶體較佳可藉由過濾而被回收。在沉澱鄰胺苯甲酸鹽晶體(「濾餅」)中的殘餘水分以及無機鹽內含物取決於固體液體分離操作。

【0071】 當實施方法步驟b)時，於發酵步驟a)中所生產的無細胞水性發酵液內的鄰胺苯甲酸鹽首先藉由與強酸(較佳為HCl)反應被質子化成鄰胺苯甲酸，其中鄰胺苯甲酸沉澱且之後作為固體材料在方法步驟c)(「回收」)中被回收。接著，鄰胺苯甲酸在後續方法步驟d)中藉由熱去羧化被轉化成苯胺。

【0072】 在本發明方法的一個較佳具體例中，在方法步驟b)中，藉由酸質子化將 o -胺基苯甲酸鹽自鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成鄰胺苯甲酸可透過添加HCl至pH為2.5至4.5，更佳pH為3至4，最佳介於3.2與3.6之間來完成。

【0073】 在本發明方法的又一個具體例中，在方法步驟c)中藉由沉澱回收鄰胺苯甲酸包含過濾，從而生成包含該經回收鄰胺苯甲酸的漿液，其中包含該經回收鄰胺苯甲酸的該漿液較佳溶解於有機溶劑中。較佳地，在此階段中所使用的有機溶液為苯胺或1-十二醇或其混合物。

【0074】 在本發明方法的又一個具體例中，在方法步驟c)中藉由將該鄰胺苯甲酸溶解於有機溶劑中來回收鄰胺苯甲酸包含將該有機溶劑(較佳為苯胺或1-十二醇或其混合物)添加至該鄰胺苯甲酸，使得該鄰胺苯甲酸作為有機溶液中的溶質而被回收。

【0075】 較佳地，本發明方法的回收步驟c)之後可洗滌並且乾燥經回收鄰胺苯甲酸沉澱物，以進一步實施步驟d)的熱去羧化。

【0076】 在本發明方法的又一個具體例中，熱去羧化步驟d)可以在催化劑存在下實施。偏好此一催化劑為沸石催化劑，其中該沸石催化劑較佳為沸石H-Y (例如得自Zeolyst International，目錄編號CBV600)。酸催化劑沸石H-Y ($\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3$ 可為介於5與7，較佳其為5.5)具有特別高的酸性，且比例如ZSM5-27 (例如得自Clariant SuedChemie，目錄編號MFI-27， $\text{SiO}_2/\text{Al}_2\text{O}_3 = 27$)具有更寬的孔徑(0.7-0.8 nm)，ZSM5-27也具有強酸性但其具有較小的孔徑(0.5 nm)，使得AA分子無法有效穿透它們並因此無法輕易靠近酸性催化劑的活性位點，從而降低其有效性。

【0077】 方法步驟d)包含藉由在有機溶劑中熱去羧化將步驟c)的鄰胺苯甲酸轉化成苯胺。鄰胺苯甲酸，例如呈鄰胺苯甲酸鹽晶體形式，在有或沒有殘餘水分存在下，經熱去羧化，較佳是藉由將鄰胺苯甲酸饋送至可實施步驟d)的去羧化反應器中。步驟d)的熱去羧化可以在介於150°C與250°C的溫度下操作，較佳介於160°C與220°C，更佳介於180°C與200°C。步驟d)的熱去羧化可以運行足夠使鄰胺苯甲酸成為苯胺的時間。較佳地，步驟d)可運行0.5小時至3小時。

【0078】 步驟d)的熱去羧化可在酸催化劑存在下進行，以便加速熱去羧化。

【0079】 熱去羧化步驟d)可在溶劑(諸如水、苯胺，或在1-十二醇)中運行，較佳在1-十二醇，或在1-十二醇與苯胺的混合物中。

【0080】 再者，熱去羧化步驟d)可在反應器中實施，其中反應器中的壓力可按照在反應期間容許多少蒸發以及隨著去羧化產物二氧化碳(CO₂)離開反應器的液相予以選定。

【0081】 再者，熱去羧化步驟d)可生產苯胺有機溶劑混合物，其接而隨著苯胺以及存留或溶解其中的水蒸餾。回收步驟c)中所使用的任何有機溶劑可以回收作為「頂部產物」。接著冷卻溶劑並再循環供蒸餾用。含有苯胺的頂部流可被饋送至蒸餾步驟，例如非均相共沸蒸餾。

【0082】 在本發明方法的又一個具體例中，熱去羧化步驟d)之後是純化苯胺的又一步驟e)，較佳是藉由蒸餾。

【0083】 在本發明方法的一個具體例中，於回收步驟c)之後，溶液(「母液」)仍可具有高至3-10 g/l鄰胺苯甲酸鹽。因此，在本發明方法的又一個具體例中，於回收步驟c)之後，殘餘鄰胺苯甲酸根陰離子可以藉由吸附至離子交換樹脂或活性碳材料或沸石，然後藉由去吸附經回收鄰胺苯甲酸根陰離子，並將該鄰胺苯甲酸陰離子再饋送至轉化步驟b)供酸質子化用而被回收，沸石較佳為經Fe³⁺或Ca²⁺改質的沸石，較佳為可藉商用沸石H-Y的離子交換生產的Fe-Y沸石(例如得自Zeolyst International – CBV600)，例如實例6中所述，諸如Fe-Y。經回收鄰胺苯甲酸根陰離子的去吸附較佳在pH 5至10下進行。例如，去吸附可以在具有pH 5至10的水中實施，例如可使用具有中性或鹼性pH的水。溶液在去吸附之後可被再循環至轉化步驟b)中酸添加

的上游以及發酵步驟a)之後生質移除的下游。

【0084】 在回收步驟c)之後，殘餘鄰胺苯甲酸根陰離子可以藉由吸附至離子交換樹脂或活性碳材料或沸石而被回收，較佳的沸石經 Fe^{3+} 或 Ca^{2+} 改質，較佳為Fe-Y沸石。此一Fe-Y可以如實例6中所述製備。在殘餘鄰胺苯甲酸根陰離子吸附之後，接著是經回收鄰胺苯甲酸根陰離子去吸附至液相中。此經回收鄰胺苯甲酸根陰離子的去吸附可以至有機溶劑相中或至水相中。圖7顯示吸附在沸石Fe-Y上之AA分解的質量概況。圖8顯示AA自沸石Fe-Y去吸附至有機溶劑1-十二醇中，1-十二醇因為AA在其中的溶解度高以及其在水中的互溶性低(0.004 g/L)而為較佳有機溶劑。圖9顯示鄰胺苯甲酸(AA)自吸附劑去解離至液相中。

【0085】 經回收並經去吸附的殘餘鄰胺苯甲酸根陰離子偏好至少部分被再饋送至轉化步驟b)，供藉由酸質子化將該鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成鄰胺苯甲酸。這具有增進方法效能，甚至進一步有相關經濟效益的技術優勢。

【0086】 在本發明方法的一個尤佳具體例中，在回收步驟c)後藉由吸附回收殘餘鄰胺苯甲酸根陰離子之後，無吸附鄰胺苯甲酸根陰離子的水流至少部分地再饋送至步驟a)的發酵中。這個又更加進一步增進方法效能的技術優勢。

【0087】 在本發明的一個較佳具體例中，步驟a)至d)可連續地以一個整合製程來運行。在本發明的另一個較佳具體例中，步驟a)至e)可連續地以一個整合製程來運行。在此一整合與連續製程中，步驟a)的發酵可在細胞留滯的情況下連續地運行，以及於步驟a)之發酵內將鄰胺苯甲酸鹽連續自發酵液移除，之後在步驟b)至d)中藉由熱去羧化連續地處理苯胺。因此，依據本發明之方法可以是一個整合且連續的製程，其針對生產成本來進行最佳化。因而，相較於以非連續方式運行之本技藝方法更習用狀態，本發明之方法提供苯胺產率更高以及對應經濟效益的顯著技術益處。

【0088】 在本發明方法的另一個具體例中，發酵步驟a)的原料可選自由下列組成之群：甜菜、甘蔗、含蔗糖植物(較佳為玉米、小麥與裸麥)，以及木質纖維素(較佳為禾桿、木與榨渣)、甘油及C1-化合物(較佳為CO)。

【0089】 在本發明方法的再一具體例中，發酵步驟a)的該可發酵碳物

質可選自由下列組成之群：C-5單糖、C-6單糖、雙糖及三糖，其中該C-5單糖較佳為木糖與阿拉伯糖，而其中該C-6單糖較佳為葡萄糖、果糖或甘露糖，且其中該雙糖較佳為蔗糖，且其中該三糖較佳為蔗果三糖。

【0090】 在本發明方法的又一個具體例中，發酵步驟a)的該重組微生物宿主可選自由細菌、酵母菌及真菌組成之群，其中該細菌較佳為大腸桿菌菌株、棒狀桿菌菌株或假單孢菌菌株，且其中該棒狀桿菌菌株較佳為麩胺酸棒狀桿菌，更佳為麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032，且其中該假單孢菌菌株較佳為臭味假單孢菌，更佳為臭味假單孢菌KT2440。本質上，上述本發明的重組微生物宿主細胞任一者可用於本發明方法的發酵步驟a)中。

【0091】 在本發明的一個不同具體例中，提供又一個用以生產苯胺的方法，包含下列步驟：

- a) 提供*o*-胺基苯甲酸鹽，其中該*o*-胺基苯甲酸鹽包含鄰胺苯甲酸根陰離子與適當陽離子，
- b) 在催化劑存在或不存在下，藉由熱去羧化將該鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成苯胺，
- c) 在有機溶劑中萃取步驟b)中生產之苯胺至少一次，以及
- d) 藉由蒸餾純化步驟b)與步驟c)中生產的苯胺，其中該蒸餾生產苯胺及水相。

【0092】 在此具體例中，步驟a)中的該*o*-胺基苯甲酸鹽可以化學方式提供或以生物方式生產，較佳地其使用能夠將包含可發酵碳基質的原料藉由發酵轉化成*o*-胺基苯甲酸鹽的重組微生物宿主細胞，透過發酵該含有至少一種可發酵碳基質的原料而以生物方式被生產，其中該*o*-胺基苯甲酸鹽包含鄰胺苯甲酸根陰離子及適當陽離子。

【0093】 該步驟a)的發酵可為批次發酵、饋料批次發酵或連續發酵。在一個較佳具體例中，步驟a)至步驟d)可連續地運行。步驟a)的適當陽離子可為NH₄⁺或Na⁺。步驟a)的重組微生物宿主可在之後在步驟b)中藉由熱去羧化將該鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成苯胺之前被移除，其中該經移除重組微生物宿主較佳可被再饋送至步驟a)的發酵中。在本發明此具體例中所使用的催化劑可為不均相酸催化劑，較佳為沸石，最佳為沸石H-Y。但是，該催化劑亦可為不均相鹼催化劑，較佳為水滑石，最佳為Mg-Al水滑石。

【0094】 在本發明又一個方法的一個較佳具體例中，於步驟c)中在有機溶劑中萃取苯胺可實施超過一次，用以在蒸餾之前進一步預濃縮苯胺。

【0095】 在本發明又一個方法的一個較佳具體例中，該方法可包含回收在步驟c)萃取中使用的有機溶液，其中該回收較佳可藉由蒸餾完成，其中該回收的有機溶劑較佳地可被再饋送至步驟c)以再次使用來萃取步驟b)中所生產之苯胺。該有機溶劑可選自由醇、酚、醯胺、醚及芳香族烴組成之群，其中該醇較佳為1-十二醇。在另一個具體例中，本發明的此又一個方法可包含又一個將步驟c)中實施萃取的水相再饋送及/或步驟d)中實施蒸餾之水相再饋送至步驟a)發酵的步驟e)。在步驟d)蒸餾之後， NH_4^+ 陽離子可回收為 NH_3 並再饋送至步驟a)發酵。

【0096】 最後，本發明亦提供依據本發明方法生產之苯胺的用途，其中在步驟d)及/或e)中生產的苯胺於水及催化劑存在下被進一步轉化成亞甲二苯胺(MDA)與甲醛。以此方式生產的MDA可進一步轉化成亞甲二異氰酸酯(MDI)與光氣。

【0097】 對於習於技藝者來說，對本發明方法及重組宿主菌株做出的各種修飾將會清楚的。因此，本發明意欲含括此等修飾及變化，前提為它們落在隨附申請專利範圍的範疇與其等效範疇內。

【0098】 表格的目錄

表1顯示此研究中使用及/或產生的載體與質體。

表2顯示此研究中使用及/或產生的細菌菌株。

表3顯示此研究中使用的引子。

表4顯示此研究中使用及/或產生之細菌菌株的oAB生產特徵(CDW：細胞乾重；Y：產率； $\mu_{\max}$ ：最大生長率；STY：空間時間產率)。

表5顯示生產關於TrpEG活性之不同TrpEG變異體的麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ 粗萃取物的生化特徵。

表6顯示如實例6中所述，AA 0.5%在水中藉由HAP、沸石Y(GO257與GO55)以及ZSM5(ZSM5-27與ZSM5-55)的吸附。

表7顯示如實例6中所述，經金屬交換之沸石GO257以g AA/kg吸

附劑計，在蒸餾水與緩衝水溶液中在10及60分鐘後的AA吸附力。

【圖式簡單說明】

【0099】 圖1顯示總覽概圖，展示在麩胺酸棒狀桿菌中從葡萄糖至oAB（鄰胺苯甲酸鹽）的生物合成途徑，表現增加來自中央代謝的前驅物供給的策略(PTS：磷酸轉移酶系統；PEP：磷酸烯醇丙酮酸；TCA：三羧酸；IolT2：肌醇通透酶單元T2；PorA/H：具有PorA與PorH的孔蛋白(porine)複合體；MFS：主要易化系統) 粗箭頭展示被增強的生物合成步驟而又字展示被中斷的生物合成步驟。

【0100】 圖2為在麩胺酸棒狀桿菌中的中央碳代謝的總覽概圖。顯示用於葡萄糖攝取的磷酸轉移酶系統(PTS)、糖解、五碳糖磷酸途徑及相關的回補反應。指出TCA(三羧酸)-循環及莽草酸途徑以說明進入這些途徑的位置及轉移(GAPDH = 甘油醛3-磷酸去氫酶；G6PDH = 葡萄糖-6-磷酸去氫酶；6PGD = 葡萄糖酸去氫酶；PEP = 磷酸烯醇丙酮酸)。

【0101】 圖3為在麩胺酸棒狀桿菌中從前驅物分子至芳香族胺基酸的莽草酸途徑總覽概圖。提供中央中間物的結構式。

【0102】 圖4顯示在臭味假單孢菌KT2440中芳香族生物合成的遺傳背景。所實施的遺傳操作以灰色強調。

【0103】 圖5顯示本發明方法的整體概念，包含在發酵步驟中將原料轉化成鄰胺苯甲酸鹽，之後在下游處理中化學轉化及純化成苯胺。

【0104】 圖6更詳細顯示本發明方法的整體概念。NaOH及NH₃可用作為發酵槽中的緩衝劑。

【0105】 圖7顯示在100-550℃的溫度範圍內，吸附在Fe-Y上的鄰胺苯甲酸解離的質量曲線。

【0106】 圖8顯示鄰胺苯甲酸自Fe-Y去吸附至1-十二醇中。實驗是藉由將含有10.8 mg鄰胺苯甲酸的0.2 g Fe-Y懸浮於2 mL 1-十二醇中來實施。在25-120℃的溫度範圍內攪拌漿液歷時0.5 h。去吸附結

果顯示於圖2中，其中最高27.8%鄰胺苯甲酸在120℃下可去吸附至1-十二醇中。

【0107】 圖9顯示鄰胺苯甲酸自吸附劑去吸附至液相中。鄰胺苯甲酸自Fe-Y去吸附至水中顯示，鄰胺苯甲酸於水溶液中藉由經金屬交換的沸石的去吸附是可逆的。測試鄰胺苯甲酸至有機溶劑中的去吸附。選定1-十二醇作為有機溶劑，因為磷酸苯甲酸在其中的溶解度高以及其在水中的互溶性相當低(0.004 g/L)。

【0108】 圖10顯示在有催化劑的情況下，鄰胺苯甲酸於有機介質中的解離。顯示在160℃及180℃、沸石Y存在下，3 wt%溶解於1-十二醇中的鄰胺苯甲酸的去羧化動力學。鄰胺苯甲酸(3 wt%)溶解於1-十二醇中。酸在這個濃度下完全可溶於有機溶劑中，即便是在室溫下。80 mL的以上溶液接著被轉移到160 mL高壓釜，添加1.5 g沸石催化劑並加熱至160℃或180℃。為供比對，也測試無催化劑(空白)及鹼性水滑石(HTC)、H-ZSM5、參雜鈉的沸石(NaY)、沸石Y銨形式(NH₄-Y)的空白測試。以不同時間間隔取得樣品並藉由HPLC法分析以測定苯胺形成速率。

【0109】 圖11顯示菌株大腸桿菌、枯草桿菌、麩胺酸棒狀桿菌、臭味假單孢菌及啤酒酵母在pH 5下的100-mL搖瓶培養物(具有MES緩衝劑)於33 h內追蹤在600 nm下的光學密度(OD₆₀₀)(三重測定)。麩胺酸棒狀桿菌另外培育在pH 7下(補充MOPS緩衝劑)。

【0110】 圖12顯示菌株大腸桿菌、枯草桿菌、麩胺酸棒狀桿菌、臭味假單孢菌及啤酒酵母在pH 7下的100-mL搖瓶培養物(具有MOPS緩衝劑)於25 h內追蹤在600 nm下的光學密度(OD₆₀₀)(雙重測定)。

【0111】 圖13顯示菌株大腸桿菌、枯草桿菌、麩胺酸棒狀桿菌、臭味假單孢菌及啤酒酵母在pH 7下之補充有3 g/L oAB的100-mL搖瓶培養物(具有MOPS緩衝劑)於25 h內追蹤在600 nm下的光學密度(OD₆₀₀)(雙重測定)。

【0112】 圖14顯示菌株麩胺酸棒狀桿菌在pH 7下之未補充(黑色)或補充(灰色)3 g/L oAB的100-mL搖瓶培養物(具有MOPS緩衝劑)於25 h內追蹤

在600 nm下的光學密度(OD_{600})(雙重測定)。

【0113】 圖15顯示菌株臭味假單孢菌在pH 7下之未補充(黑色)或補充(灰色)3 g/L oAB的100-mL搖瓶培養物(具有MOPS緩衝劑)於25 h內追蹤在600 nm下的光學密度(OD_{600})(雙重測定)。

【0114】 圖16顯示菌株大腸桿菌、枯草桿菌、麩胺酸棒狀桿菌、臭味假單孢菌及啤酒酵母在pH 7下之補充3 g/L pAB的100-mL搖瓶培養物(具有MOPS緩衝劑)於27 h內追蹤在600 nm下的光學密度(OD_{600})(雙重測定)。

【0115】 圖17顯示菌株麩胺酸棒狀桿菌在pH 7下之補充有0.1 g/L辛醇的100-mL搖瓶培養物(具有MOPS緩衝劑)於25 h內追蹤在600 nm下的光學密度(OD_{600})(雙重測定)(二重複呈黑色與灰色)。

【0116】 圖18顯示菌株臭味假單孢菌在pH 7下之補充有0.1 g/L辛醇的100-mL搖瓶培養物(具有MOPS緩衝劑)於25 h內追蹤在600 nm下的光學密度(OD_{600})(雙重測定)(二重複呈黑色與灰色)。

【0117】 圖19顯示菌株麩胺酸棒狀桿菌在pH 7下的100-mL搖瓶培養物於25 h內追蹤在600 nm下的光學密度(OD_{600})(補充如圖中所表示；二重複)。

【0118】 圖20顯示菌株麩胺酸棒狀桿菌在pH 5下的100-mL搖瓶培養物於25 h內追蹤在600 nm下的光學密度(OD_{600})(補充如圖中所表示；二重複)。

【0119】 圖21顯示菌株麩胺酸棒狀桿菌在pH 7 (MOPS)與pH 5 (MES)下的100-mL搖瓶培養物於28 h內追蹤在600 nm下的光學密度(OD_{600})(補充如圖中所表示；二重複)。

【0120】 圖22顯示麩胺酸棒狀桿菌在3、4、及5 h之後補充至最終濃度0 g/L補充(矩形)、7 g/L oAB (圓形)、7 g/L pAB (叉字)、40 mg/L十二醇(三角形)於pH 7下之發酵培養物追蹤50 h在600 nm下的光學密度(OD_{600})

【0121】 圖23顯示麩胺酸棒狀桿菌在2 h (補充oAB之前)、5 h (補充7 g/L oAB之後)、25 h，及49.5 h後與7 g/L oAB之發酵培養物上清液在254 nm下的HPLC-層析。加上oAB標準品。

【0122】 圖24顯示麩胺酸棒狀桿菌發酵培養物在pH 7下於3、4、5、6及7 h後補充至最終濃度0 g/L補充(矩形)、15 g/L oAB (三角形)、35 g/L oAB

(叉字)，及80 g/L oAB (圓形)，追蹤58 h內在600 nm下的光學密度(OD₆₀₀)。

【0123】 圖25顯示麩胺酸棒狀桿菌發酵培養物在pH 7下於3、4、5、6及7 h後補充至最終濃度35 g/L oAB，追蹤58 h內在600 nm下的光學密度(OD₆₀₀)。

【0124】 圖26顯示麩胺酸棒狀桿菌發酵培養物在pH 7下於3、4、5、6及7 h後補充至最終濃度80 g/L oAB，追蹤58 h內在600 nm下的光學密度(OD₆₀₀)。

【0125】 圖27顯示基於載體系統pEMG之剔除程序的方案。

【0126】 圖28顯示臭味假單孢菌KT2440 *trpEGDC*簇的遺傳圖譜(上)以及臭味假單孢菌KT2440 *trpDC*刪除(下)的遺傳圖譜(*gph*：磷酸乙醇酸磷酸酶(局部)；*trpE*：鄰胺苯甲酸合成酶組分I；GDSL：GDSL家族脂酶(與L-色胺酸生物合成不相干)；*hyp*：假定蛋白質；*trpG*：鄰胺苯甲酸合成酶組分II；*crg*：cAMP-調節蛋白(局部)；TS1：刪除側1；TS2：刪除側2)。

【0127】 圖29顯示臭味假單孢菌KT2440 *serCpheA*簇的遺傳圖譜(上)以及鋸齒型臭味假單孢菌KT2440 *pheA*刪除的遺傳圖譜(下) (*gyrA*：DNA旋轉酶次單位A (局部)；*serC*：磷酸絲胺酸胺基轉移酶；*pheA*：分支酸變位酶 / 預苯酸脫水酶；*tyrA*：預苯酸去氫酶 / 3-磷酸莽草酸1-羧基乙基轉移酶；*cmk*：胞苷酸酯激酶；TS1：刪除側1；TS2：刪除側2)。

【0128】 圖30顯示併入交叉流超過濾模組(截量值為750 kDa)用以在細胞留滯的情況下於1 L實驗室規模生物反應器中進行連續發酵。

【0129】 圖31顯示併入離心機(Centrifuge Lab III)用以在細胞留滯的情況下於1 L實驗室規模生物反應器中進行連續發酵。

【0130】 圖32顯示針對使用1 L培養體積、0.05 L/h稀釋率、30°C培育溫度、以1 M NH₄OH控制在pH 7、空氣流速0.2 L/min用於通氣、藉由調整攪拌速度介於200與1200 rpm將pO₂控制在30%空氣飽和，在批次與連續模式期間用以生產oAB的麩胺酸棒狀桿菌Δ*trpD*發酵。藉由交叉流超過濾達到細胞留滯。

【0131】 圖33顯示針對使用1 L培養體積、0.01 L/h稀釋率、30°C培育溫度、以1 M NH₄OH及1 M HCl控制在pH 7、空氣流速0.2 L/min用於通氣、藉由調整攪拌速度介於200與1400 rpm將pO₂控制在30%空氣飽和，在批次與

連續模式期間用以生產oAB的麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta gpi$ 發酵。藉由離心達到細胞留滯。

【0132】 圖34顯示針對使用1 L培養體積、如圖中所示0.025 L/h或0.05 L/h稀釋率、30°C培育溫度、以1 M NH_4OH 控制在pH 7、空氣流速0.2 L/min用於通氣、藉由調整攪拌速度介於200與1200 rpm將 pO_2 控制在30%空氣飽和，用以連續生產oAB的麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ 發酵。藉由交叉流超過濾達到細胞留滯。

【0133】 圖35顯示於催化劑存在下，2-胺基苯甲酸(鄰胺苯甲酸，AA)在苯胺中的解離。於沸石Y存在下，顯示於160°C、180°C及200°C下在苯胺中溶解40 wt%的鄰胺苯甲酸(AA)的去羧化動力學。

【0134】 圖36顯示在催化劑存在下，2-胺基苯甲酸(鄰胺苯甲酸，AA)於苯胺中的解離。於沸石Y存在下，顯示在200°C下40 wt%溶解於苯胺中以及10%水-90%苯胺中的鄰胺苯甲酸(AA)的去羧化動力學。

【0135】 圖37顯示於催化劑存在下，2-胺基苯甲酸(鄰胺苯甲酸，AA)在苯胺中的解離。於沸石Y存在下，顯示於180°C下在苯胺中溶解40 wt%的鄰胺苯甲酸(AA)的去羧化動力學。

【0136】 圖38顯示於催化劑存在下，2-胺基苯甲酸(鄰胺苯甲酸，AA)在苯胺中的解離。於沸石Y存在下，顯示於180°C下在苯胺中溶解40 wt%的鄰胺苯甲酸(AA)的去羧化動力學。

【0137】 圖39顯示新鮮製備的H-Y催化劑及在如上述使用分離自水解玉米澱粉之AA的反應之後的H-Y催化劑的IR光譜。標記苯胺的典型帶。這個高度鹼性物質確實發生吸收。也強調出OH區。OH訊號降低與一些可能與存在微量元素時發生的部分離子交換相當，然而OH基團在催化中似乎不是活化的，原因可能是Al-O-Si橋。

【實施方式】

實例

實例1-使用大腸桿菌生產o-胺基苯甲酸鹽

【0138】 自耶魯大學大腸桿菌遺傳資源中心購得菌株大腸桿菌W3110 $trpD9923$ (大腸桿菌:: $trpD9923$ ；表2)。該菌株已藉由隨機突變被創

造並含有被稱為*trpD9923*的經突變*trpD*基因。藉由在相關基因中的隨機點突變(G→T)使酶不活化，在轉移酶活性編碼區中造成無義突變。因此，原轉移酶結構域僅七個胺基酸被轉譯(Ikeda M, Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69:615)。 *trpD*基因的相關截斷酶喪失其催化鄰胺苯甲酸磷酸核糖基轉移酶反應的能力，但保留其鄰胺苯甲酸合成酶活性。因此，該菌株可合成鄰胺苯甲酸鹽，但無法將其代謝為L-色胺酸並因此為L-色胺酸營養缺陷型。這會導致鄰胺苯甲酸鹽累積。

【0139】 在28℃下，菌株以140 rpm生長在具有10 mL培養物體積的50 mL搖瓶中。使用的培養基為具有20 mg/L L-色胺酸的礦物質培養基M9 (1 g/L (NH₄)₂Cl、0.5 g/L NaCl、0.05 g/L 噻胺、1 g/L KH₂PO₄、1 g/L K₂HPO₄、0.247 g/L MgSO₄·7H₂O (Merck, Darmstadt)、0.015 g/L CaCl₂，與10 g/L葡萄糖。以5 mol/L氫氧化鈉溶液將pH調整至7)。如藉由HPLC-DAD (254 nm)測量，該菌株在25.5 h後生產60 mg/L鄰胺苯甲酸鹽(表4及實例3)。該菌株藉由使用剔除刪除不活化磷酸轉移酶系統(PTS)來進一步最佳化。因此，產生所得PTS缺陷型菌株大腸桿菌::*trpD9923Δhpr* (表2)，並經改造成仰賴葡萄糖生長且使用具有10 mL培養物體積的25 mL搖瓶發酵在37℃下以150 rpm測試鄰胺苯甲酸鹽生產。至於*pts*陽性菌株也使用相同培養基。如藉由HPLC-DAD (254 nm)測量，其在25小時後生產69 mg/L鄰胺苯甲酸鹽(表4及實例3)。

實例2-用以開發生產*o*-胺基苯甲酸鹽之微生物菌株的菌株篩選

【0140】 針對工業生物技術常用的數個菌株，探討其對*o*AB以及對用於稍晚產物萃取之考慮中有機溶劑(例如1-十二醇或辛醇)的天然耐受性。另外，探討所用pH值的影響。自先前實驗已知，至少對大腸桿菌來說，芳香族化合物的毒性強烈取決於pH值，可能是因為質子化酸可以更有效地穿透細胞膜而其毒性因而嚴重地升高。假定萃取有機相中的*o*AB在低pH值下進行為最佳，該低pH值接近於*o*AB的等電點。被認為最為恰當的宿主菌株為：大腸桿菌K12、麩胺酸棒狀桿菌DSM 20300 (= ATCC 13032)、臭味假單孢菌KT2440、枯草桿菌亞種168、啤酒酵母DSM 70449，以及畢赤酵母X33 (DSM 70382)。

【0141】 針對選定特徵來研究選定菌株，實施搖瓶以及小規模發酵實

驗且生物體在不同pH值下補充不同濃度的毒性物質(胺基苯甲酸鹽、溶劑)，並研究菌株的行為。

【0142】 生物體(商業上得自於訂購自DSMZ，德國微生物及細胞培養物保存中心，Braunschweig)首先在搖瓶中以及其各自適當的已公開標準最低培養液中培育以描繪其在標準培育條件下的生長(麩胺酸棒狀桿菌：預培養：BHI培養基(37 g/L；心腦浸出液；Becton Dickenson and Company, Heidelberg)；主要培養pH 7：CGXII-MOPS培養基(42 g/L MOPS緩衝劑、20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、5 g/L 脲(Fisher Scientific, Schwerte)、1 g/L KH_2PO_4 、1 g/L K_2HPO_4 、0.25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)、0.01 g/L CaCl_2 及10 g/L 葡萄糖(分別經高壓殺菌)。以5 mol/L氫氧化鈉溶液將pH調整至7。在無菌過濾之後添加下列組分：2 mg/L生物素、0.01 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)、0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)、1 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)、0.02 mg/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)，及0.03 g/L 3,4-二羥基苯甲酸(Acros Organics, Nidderau)；主要培養pH 5：CGXII-MES培養基(39 g/L MES緩衝劑、20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、5 g/L 脲(Fisher Scientific, Schwerte)、1 g/L KH_2PO_4 、1 g/L K_2HPO_4 、0.25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)、0.01 g/L CaCl_2 ，及10 g/L葡萄糖(分別經高壓殺菌)。以5 mol/L氫氧化鈉溶液將pH調整至5。在無菌過濾之後添加下列組分：2 mg/L生物素、0.01 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)、0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)、1 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)、0.02 mg/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)，及0.03 g/L 3,4-二羥基苯甲酸(Acros Organics, Nidderau)；大腸桿菌：預培養：LB培養基(Luria-Bertani; Roth, Karlsruhe)；主要培養pH 7：M9培養基(1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{Cl}$ 、0.5 g/L NaCl、0.05 g/L 氯化噻胺、1 g/L KH_2PO_4 、1 g/L K_2HPO_4 、0.247 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)、0.015 g/L CaCl_2 ，及10 g/L葡萄糖。以5 mol/L氫氧化鈉溶液將pH調整至7)；主要培養pH 5：M9-MES培養基(19.5 g/L MES緩衝劑、1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{Cl}$ 、0.5 g/L NaCl、0.05 g/L 氯化噻胺、1 g/L KH_2PO_4 、1 g/L K_2HPO_4 、0.247 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)、0.015 g/L CaCl_2 ，及10 g/L葡萄糖。以5 mol/L氫氧化鈉溶液將pH調整至7)；枯草桿菌：預培養：LB培養基；主要培養pH 7：M9-SL培養基(1 g/L

$(\text{NH}_4)_2\text{Cl}$ 、0.5 g/L NaCl、0.05 g/L 噻胺、1 g/L KH_2PO_4 、1 g/L K_2HPO_4 、0.247 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.015 g/L CaCl_2 、1.0 mg/L $\text{MnCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、1.35 mg/L $\text{FeCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1.7 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.04 mg/L $\text{CuCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.06 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.06 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，及10 g/L葡萄糖。以5 mol/L氫氧化鈉溶液將pH調整至7)；主要培養pH 5：M9-SL-MES培養基(19.5 g/L MES緩衝劑、1 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{Cl}$ 、0.5 g/L NaCl、0.05 g/L 噻胺、1 g/L KH_2PO_4 、1 g/L K_2HPO_4 、0.247 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.015 g/L CaCl_2 、1.0 mg/L $\text{MnCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、1.35 mg/L $\text{FeCl} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1.7 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.04 mg/L $\text{CuCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.06 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.06 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，及10 g/L葡萄糖。以5 mol/L氫氧化鈉溶液將pH調整至5)；臭味假單孢菌：預培養：LB培養基；主要培養pH 7：布魯納培養基(Brunner medium) (0.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 g/L KH_2PO_4 、1 g/L K_2HPO_4 、0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 g/L CaCl_2 、5.0 mg/L EDTA、2.0 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.03 mg/L $\text{MnCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.1 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 mg/L $\text{CuCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.03 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.3 mg/L H_3BO_3 、0.02 mg/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，及10 g/L葡萄糖。以5 mol/L氫氧化鈉溶液將pH調整至7)；主要培養pH 5：布魯納-MES培養基(19.5 g/L MES緩衝劑、0.5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、1 g/L KH_2PO_4 、1 g/L K_2HPO_4 、0.2 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.05 g/L CaCl_2 、5.0 mg/L EDTA、2.0 mg/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.03 mg/L $\text{MnCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.1 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 mg/L $\text{CuCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.03 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、0.3 mg/L H_3BO_3 、0.02 mg/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，及10 g/L葡萄糖。以5 mol/L氫氧化鈉溶液將pH調整至5)；啤酒酵母：預培養：YPD培養基(10 g/L酵母萃取物、20 g/L胰、20 g/L葡萄糖)；主要培養pH 5：SCM培養基(5 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、3 g/L KH_2PO_4 、2.5 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.5 g/L NaCl、20 mg/L肌醇、5 mg/L 噻胺、1.32 mg/L核黃素、17.8 mg/L泛酸鈣、18.4 mg/L菸鹼酸、5.16 mg/L吡哆醇-HCl、0.18 mg/L生物素、0.12 mg/L葉酸、40.6 mg/L $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、6.0 mg/L $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、3.0 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、5.76 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、6.0 mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、6.0 mg/L $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、1.56 mg/L H_3BO_3 ，及5 g/L葡萄糖。以5 mol/L氫氧化鈉溶液將pH調整至5)。(Sambrock J; Fritsch, EF, and Maniatis, T: Molecular Cloning - a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989; New York ; Harwood CR, Cutting SM:

Molecular biological methods for *Bacillus*. Chichester, England: John Wiley & Sons Ltd; 1990; Keilhauer, C, Eggeling, L, Sahm, H: J Bacteriol, 1993, 175(17): 5595)。使用pH為7及pH為5的培養基來實施這些實驗，以便評估胺基苯甲酸鹽在低pH值下的毒性差異。酵母菌菌株僅在低於7的pH值下(5.5與3.5)進行研究。藉由添加不同的緩衝系統(MOPS、MES)來穩定不同的pH值。

【0143】 培育菌株的100-mL搖瓶培養物(pH 5 (具有MES緩衝劑))歷時33 h且隨著時間藉由測量在600 nm下的光學密度(OD_{600})(三重測定)追蹤生長。麩胺酸棒狀桿菌另外培育在pH 7下(具有MOPS緩衝劑)。圖11顯示結果。

【0144】 收集的數據顯示，於所有研究生物體中，麩胺酸棒狀桿菌在pH 5下展示最佳生長。大腸桿菌、臭味假單孢菌以及啤酒酵母在pH 5下生長得相當差。但是，在一些培養物中，因為代謝活性，pH也掉至4以下。為排除因為代謝活性所致的生長影響，在自動pH調控的發酵槽中進行實驗。一如預期已看到，在低pH下培育會降低所有測試生物體的生長率。然而，為比對所有考量生物體在標準培育條件下於pH 7下的生長，使用所有補充有MOPS緩衝劑的最低培養基重複實驗。此外，培養物類似地補充有oAB (最終濃度為3 g/L，在指數生長期開始時分三個部分添加(在2、3、4 h培育時間後))。在有或沒有補充3 g/L oAB的情況下，在pH 7下培育菌株的100-mL搖瓶培養物歷時25 h，且隨著時間藉由測量在600 nm下的光學密度(OD_{600})(雙重測定)追蹤生長(圖12及圖13)。麩胺酸棒狀桿菌在選定培育條件下達到最高 OD_{600} 值，且另外其生長未受到添加3 g/L oAB所抑制，而其他生物體(像是例如枯草桿菌)的生長在3 g/L oAB下已強烈地減少。由這些結果，麩胺酸棒狀桿菌被鑑定為在pH 7下用於oAB生產的較佳候選者(圖14及圖15)。

【0145】 為探討所考慮菌株對對-胺基苯甲酸鹽(pAB)及溶劑(辛醇與1-十二醇)的耐受性，如前所述在pH 7下培育菌株(啤酒酵母在pH 5.5下)並補充3 g/L pAB (圖16)。麩胺酸棒狀桿菌、大腸桿菌、臭味假單孢菌及畢赤酵母的生長在此等條件下未受到pAB抑制，而啤酒酵母與枯草桿菌的生長嚴重地減少。探討萃取溶劑辛醇的毒性。辛醇在水中的溶解度為約0.1 g/L，因此培養物補充這樣的一個辛醇數量以及額外3 g/L。已顯示在0.1 g/L下所有生物體無法生長，但在3 g/L下更清楚。僅有臭味假單孢菌在辛醇添加之後顯

示微量生長活性(圖17及圖18)。

【0146】 如在所有實施的實驗中，麩胺酸棒狀桿菌顯示最高細胞密度以及最佳耐受力，這個菌株分別類似地與5 g/L oAB及5 g/L pAB在pH 5與pH 7下培育。在這些條件下偵測到無生長抑制(圖19及圖20)。在pH 5下，細胞密度減半，得到的發酵更佳應在pH 7下實施的結論。

【0147】 研究做為替代性萃取溶劑的十二醇。十二醇在水中展現約40 mg/L的溶解度。如上述在pH 5與7於補充40 mg/L 1-十二醇的情況下培育麩胺酸棒狀桿菌。十二醇在此等條件下並未影響菌株的生長(參見圖19及圖20)。

【0148】 於小規模發酵槽中重現在使用麩胺酸棒狀桿菌的搖瓶實驗中得到的結果(圖21)。為進一步對麩胺酸棒狀桿菌在pH 7下對胺基苯甲酸鹽與1-十二醇壓力的耐受性進行特徵描繪，使用pH、攪動、供氧、溫度與葡萄糖饋料受調控的1L-4倍發酵裝置(HiTecZang)來實施生物體的小規模發酵。葡萄糖饋料容許菌株生長至較高細胞密度。

【0149】 使用麩胺酸棒狀桿菌在最低培養基pH 7中實施發酵實驗(如上所述，但未添加MOPS、生物素、原兒茶酸及脲)，且一個發酵槽甚麼也不補充(陽性對照)、一個發酵槽補充7 g/L oAB、一個發酵槽補充7 g/L pAB而一個發酵槽補充40 mg/L 1-十二醇。所得生長曲線顯示，麩胺酸棒狀桿菌的生長並未受到添加1-十二醇影響。這確認搖瓶所得結果(參見圖22)。分別補充oAB以及pAB使得遲滯期延長，但最後達到相同的細胞密度(參見圖22)。推斷1-十二醇是適合的oAB萃取溶劑。

【0150】 進一步提高胺基苯甲酸鹽濃度以便找出明顯抑制麩胺酸棒狀桿菌生長的邊界。必須排除生物體分解胺基苯甲酸鹽且因此在遲滯期延長之後恢復生長。為探究發酵槽中的胺基苯甲酸鹽穩定性，在發酵期間收集培養物上清液樣品並藉由HPLC-DAD (254 nm)分析(參見圖23及實例3)。在培育期間，胺基苯甲酸鹽並未明顯被分解。

【0151】 在又一個實驗中，增加oAB濃度以便探究對麩胺酸棒狀桿菌菌株的影響。對四個發酵槽補充0 g/L、15 g/L、35 g/L及80 g/L的oAB。為了在pH 7下於這樣高的濃度中達到酸穩定性，使用氫氧化銨滴定該酸，以便形成oAB的相應銨鹽，之後以原液在5 h內以五個部分(在培育3、4、5、6

及7 h之後)添加至發酵槽中。如上述維持其餘培育條件。添加80 g/L oAB在54小時內會造成細胞死亡(溶解)，而35 g/L oAB造成生長抑制(參見圖24、圖25及圖26)。補充15 g/L oAB的培養物在34-48 h內於生長恢復還有細胞進入指數期之前已顯示大範圍遲滯期。藉由HPLC測量培養物上清液，在發酵期間的oAB分解再次被排除(數據未顯示)。

【0152】 總之，推斷oAB的生產最佳應使用麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032菌株來完成。此外推斷製程發酵較佳應在pH 5-7下實施，且更佳在pH 7下而萃取(若需要的話)較佳應使用1-十二醇作為萃取溶劑來進行。辛醇不是一個適當的萃取溶劑。

實例3-使用麩胺酸棒狀桿菌生產o-胺基苯甲酸鹽

【0153】 開發出一株以g/L規模計生產鄰胺苯甲酸鹽的細菌菌株。這個作業是基於遺傳操作色胺酸生產者(例如在大腸桿菌及麩胺酸棒狀桿菌中)並包括開發與實行一個策略以在遺傳上操作中心代謝、通用芳香族生物合成與L-色胺酸分支途徑，以便獲得一個鄰胺苯甲酸鹽(oAB)生產者。基於上述結果，代謝工程較佳基於麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032。

以大腸桿菌DH5α為主之菌株的一般性培育

【0154】 如果沒有表示不同，則所有化學品是獲自Sigma-Aldrich (Sternheim)而所有施加的酶是來自New England Biolabs (Schwalbach)。在無菌條件、37°C下，於LB培養基(Luria-Bertani; Roth, Karlsruhe)中或LB-瓊脂(Abcr GmbH & Co. Kg, Karlsruhe)盤上培育大腸桿菌菌株。透過添加抗生素(100 mg/L安比西林鈉鹽；50/25 mg/L硫酸康那黴素；100 mg/L硫酸奇黴素)達到篩選性培育。關於質體製備，在200 rpm恆定震盪下，菌株於37°C下在15 mL-管的3 mL LB培養基與篩選抗生素中培育歷時14 h-16 h (Kuhner Shaker ISF-4-W；Adolf Kühner AG, Basel (Switzerland))。

一般性分子生物學方法

【0155】 大體上使用Platinum[®] Taq DNA Polymerase (5 U/μL；Life technologies, Darmstadt)來實施PCR反應，其具有約50 ng PCR模板與10 pmol

對應引子對(參見表3)。PCR條件：98°C 5 min，98°C 30 sec，56°C 30 sec，72°C 1 min/kb，30x，16°C維持(Mastercycler® nexus – Cycler; Eppendorf, Hamburg)。質體DNA純化是使用NucleoSpin® Plasmid Pure套組(Macherey & Nagel, Düren)遵循製造商的使用說明來完成。質體DNA消化是在20 µL規模的5 U相關限制酶與在緩衝液中約1 µg質體DNA來完成(按照酶供應商的建議)，並在37°C下培育歷時約2 h且之後藉由瓊脂糖凝膠電泳予以分析。瓊脂糖凝膠是由1 %瓊脂糖(Abcr GmbH & Co. Kg, Karlsruhe)溶解於1xTAE電泳緩衝液(Promega, Fitchburg USA)中所製成。所施加的電場為90 V-120 V (EPS300；Pharmacia Biotech；VWR International GmbH, Darmstadt)而DNA是經由溴化乙菲錠(0.3-0.5 mg/L)或Midori Green (Midori Green Advance DNA Stain；NIPPON Genetics EUROPE GmbH, Düren)偵測。凝膠紀錄：Gene Genius®；VWR；Darmstadt。關於瓊脂糖凝膠DNA萃取，如製造商所指明使用NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey & Nagel, Düren)套組。關於DNA接合，使用由製造商供應之緩衝液中的T4-DNA接合酶(20 U)。所使用的插入物對質體質量比為4：1。在16°C下培育混合物歷時約15 h且之後在65°C下培育歷時10 min。質體及接合反應物被引入電勝任(electro-competent)大腸桿菌DH5α細胞(ElectroMAX™ DH5α-ETM Competent Cells；Life Technologies, Darmstadt)。在於0.2 cm空隙電穿孔比色杯(BioRad, Hercules, CA)中使用Gene Pulser Xcell System (BioRad, Hercules, CA)電轉形(條件：~20 ms指數衰變脈衝，2.5 kV/cm，25 F, 200 Ω)後，立刻添加800 µL LB回收培養基並將懸浮液轉移至1.5 mL微量離心管中。在37°C下1 h後，將細胞懸浮液散布在補充有適當抗生素的LB瓊脂盤上，並在37°C下培育過夜。收集菌落以及經由限制分析、菌落PCR及/或定序來確認正確轉形。關於菌落的菌落PCR分析，以無菌牙籤挑出菌落、轉移至個別盤(主盤)、溶解於1 µL DMSO中，且在加入標準PCR混合物之前於98°C下煮沸歷時10 min。所有質體的正确選殖以及相關突變體的生成是透過PCR及/或DNA定序獲得檢驗。

以麩胺酸棒狀桿菌ATCC13032為基礎之菌株的一般性培育

【0156】 在30°C下，在BHI培養基(37 g/L；腦心浸出液；Becton

Dickenson and Company, Heidelberg)管、搖瓶中或瓊脂盤上於無菌條件下培育麩胺酸棒狀桿菌菌株。藉由添加抗生素(15 mg/L 硫酸康那黴素；100 mg/L 硫酸奇黴素)達到篩選性培育。

【0157】 關於菌株特徵鑑定，第一預培養物是始於分離的菌落並在4 mL BHI培養基中以400 rpm恆定震盪培育歷時10 h，且取決於菌株來補充適當抗生素或芳香族胺基酸。第二預培養物生長於50 mL CGXII-MOPS培養基(42 g/L MOPS 緩衝劑、20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、5 g/L 脲(Fisher Scientific, Schwerte)、3.7 g/L 腦心浸出液、1 g/L KH_2PO_4 、1 g/L K_2HPO_4 、0.25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)、0.01 g/L CaCl_2 ，及10 g/L 葡萄糖(分別經高壓殺菌)。以5 mol/L 氫氧化鈉溶液將pH調整至7。接種1 mL 第一預培養物並在400 rpm下恆定震盪培育16 h-18 h之後，於250 mL 搖瓶中在無菌過濾之後添加下列組分：2 mg/L 生物素、0.01 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)、0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)、1 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)、0.02 mg/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt)，及0.03 g/L 3,4-二羥基苯甲酸(Acros Organics, Nidderau)。發酵培養物生長在100 mL CGXII培養基(20 g/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、5 g/L 脲、1 g/L KH_2PO_4 、1 g/L K_2HPO_4 、0.25 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g/L CaCl_2 、100 $\mu\text{L/L}$ 聚丙二醇(分別經高壓殺菌)，及18 g/L 葡萄糖(分別經高壓殺菌)中。以5 mol/L 氫氧化鈉溶液將pH調整至7。在無菌過濾之後添加下列組分：2 mg/L 生物素、0.01 g/L $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 、0.01 g/L $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 mg/L $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.2 mg/L $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、0.02 mg/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，及0.03 g/L 3,4-二羥基苯甲酸)。各個生物反應器(DasBox, Eppendorf, Hamburg)接種第二預培養物達最終 OD_{600} 為0.5。起始攪拌速度設定為100 rpm並以2.2 L/h (0.37 V/(V*min))供氣。持續監控溶氧(OxyFermFDA 120; Hamilton, Bonaduz (Switzerland))並透過自動調整攪拌速度而維持在30%飽和空氣。測量pH (EasyFermPlus K8 120; Hamilton, Bonaduz (Switzerland))並透過自動添加1 M NaOH而維持在7，且溫度維持在30°C。為防止泡沫形成，藉由導電率感測器在發酵液上測量導電率而自動地添加10%聚丙二醇溶液。如重複批次程序實施發酵。施行一個額外的18 g/L 葡萄糖饋料(分別經高壓殺菌)三次。在發酵期間，由1.5 mL 發酵槽樣品離線測量細胞乾重(BDW)、葡萄糖濃度，及鄰胺苯甲酸鹽濃度。

各個樣品於經秤重反應管中的1 mL等份式樣在16000 x g (5415R; Eppendorf, Hamburg)下離心5分鐘。為測定細胞乾重，在60°C下乾燥丸粒歷時至少72 h (Hybridisation oven; Appligene Oncor Lifescreen, Watford (UK))。之後，使用分析型天平(La 230 S; Satorius AG, Göttingen)來測定確切丸粒重量。經由HPLC-DAD (1100; Agilent Technologies, Santa Clara (USA))與YSI (YSI-Select 2700; Kreienbaum Neoscience GmbH, Langenfeld)分析上清液。收集的數據顯示於表4中。

麩胺酸棒狀桿菌ATCC13032的一般性操作

【0158】 質體DNA藉由電穿孔被轉移至麩胺酸棒狀桿菌ATCC13032中。關於轉形，藉由離心(4000 g, 10 min, 4°C (5810R; Eppendorf, Hamburg))自生長在BHI培養基中並處於指數生長期($OD_{600} = 1.75-2.0$)的200 mL培養物收取細胞並以20 mL冰冷TG緩衝液(1 mM Tris-HCl, 10%甘油, pH 7.0)洗滌三次。將丸粒再懸浮於2 mL 10%甘油溶液中並直接用於轉形或儲存在-80°C下直到使用。關於轉形，首先質體DNA (約1 μ g)，接著是150 μ L細胞懸浮液被抽吸至冰冷0.2 cm空隙電穿孔比色杯中。在冰上培育歷時5 min後，實施電穿孔(條件：~20 ms指數衰變脈衝，2.5 kV/cm, 25 F, 200 Ω)。將懸浮液轉移至具有500 μ L經預熱(46°C)BHI培養基的反應管中並在30°C下以400 rpm恆定震盪培育歷時1 h。將細胞散布於含有相應抗生素的BHI培養基瓊脂盤上。

【0159】 關於指定目標基因的表現，採用大腸桿菌-麩胺酸棒狀桿菌穿梭載體pEKEx2 (Eikmanns BJ, Kleinertz E, Liebl W, Sahm H, Gene, 1991, 102:93)。8.16 kb載體是衍生自載體pU18且編碼康那黴素抗性匣、在麩胺酸棒狀桿菌中增殖用的pBL1源點V (oriV)、在大腸桿菌中增殖用的pU18 oriV、強*tac*-啟動子(異丙基 β -D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)-誘導性)，及*lacIQ*基因。或者，採用大腸桿菌-麩胺酸棒狀桿菌穿梭載體pCRB210 (Yukawa H, Inui M, US20130302860(A1), 2013)，其與pEKEx2共轉形時可相容。4.96 kb載體編碼奇黴素抗性匣、在麩胺酸棒狀桿菌中增殖用的pCASE1源點V (oriV)、在大腸桿菌中增殖用的oriV，以及*gapA*-啟動子用於組成性基因表現。透過藉由單一核苷酸交換(沉默突變)移除所有天然的*SbfI*、*BamHI*、*BglIII*、*NcoI*，

及*NdeI*限制位點並且在對應ORF (*aroG*、*aroK*、*glnA*，及*aroL*的基因序列以外，其藉由PCR從其天然基因座被擴增，參見引子(表3))上游處插入核糖體結合位點，由MWG Operon GmbH合成在麩胺酸棒狀桿菌或其突變體中過度表現的選定基因片段。在*trpEG*與*aroG*基因中，單一核苷酸交換被納入基因以評估相關酶的回饋耐受性形式。所得序列經由*SbfI*與*BamHI*限制以及再接合被選殖至pEKEx2載體的多重選殖位點中。除了*glnA*基因序列，這經由*NcoI*限制以及再接合被選殖至pCRB210載體中，產生pCRB-*glnA* (表1)。所合成的基因片段基本上具有下列結構：「*SbfI*-*BglII*-RBS-基因-*BamHI*」。這容許目標基因經由單個*BamHI*限制位點反覆接合(作為*BglII*-*BamHI*-片段)至載體中。將質體定序以確認正確選殖及序列。依據抗生素耐受性篩選麩胺酸棒狀桿菌(及其變異體)轉形體並藉由PCR證實正確生成相關突變體。

【0160】 關於刪除目標基因，以及關於基因或其他序列片段插入麩胺酸棒狀桿菌基因體，採用大腸桿菌-麩胺酸棒狀桿菌穿梭載體pK19*mobsacB* (Schäfer A, Tauch A, Jäger W, Kalinowski J, Thierbach G, Pühler A, Gene, 1994, 145:69)。5.72 kb載體是衍生自載體pU18且編碼康那黴素抗性匣、無在麩胺酸棒狀桿菌中增殖用的源點、在大腸桿菌中增殖用的pU18 oriV、*lacZα*基因，及*sacB*基因。透過藉由單一核苷酸交換(沉默突變)移除所有天然*HindIII*與*EcoRI*限制位點並經由*HindIII*與*EcoRI*限制與再接合選殖至載體的多重選殖位點，由MWG Operon GmbH合成目標序列(除了*trpD*與*csm*，其由麩胺酸棒狀桿菌ATCC13032基因體使用特定引子(表3) PCR擴增)。關於基因刪除(或嵌入)，經選殖DNA序列由目標基因的300-500 bp的5'-端區(包括基因的頭六個密碼子)、21 bp的外來誤義序列(或要被合併至基因體中的序列)，以及目標基因的300-500 bp的3'-端區(包括感興趣基因的最末6個密碼子)組成。根據康那黴素篩選，針對單一交換事件將質體併入基因體中來篩選麩胺酸棒狀桿菌轉形體，因為所得質體本身無法在麩胺酸棒狀桿菌中增殖。在30°C下培育含有轉形體的BHI培養基瓊脂盤(含有15 mg/L康那黴素)歷時1-7天。之後，藉由篩選來源(菌落培育在5 mL BHI培養基中歷時4 h- 6 h且接著以兩種不同稀釋度(1:100與1:10000)鋪在含有10% (w/v)蔗糖之BHI培養基瓊脂盤上)，針對雙重交叉事件篩選經分離的選殖株，造成目標基因的框內刪除，僅留下21 bp的外來誤義序列(或是要被併入基因體的序列)。

載體上的*sacB*基因編碼左聚糖蔗糖酶，其將蔗糖轉成致命性產物，且因此防止所有仍在其基因體中帶有質體的選植株生長。藉由共轉移至BHI培養基瓊脂盤補充有15 mg/L康那黴素以及BHI培養基瓊脂盤上並在30°C下培育歷時1-7天，分析生長在含蔗糖之盤上的所有菌落。藉由菌落PCR來分析僅生長在無康那黴素補充之盤上的菌落，以便確認正確重組。所有質體的正确選殖及相關突變體的生成是藉由PCR及/或DNA定序來確認。

高效液相層析

【0161】 使用Agilent 1100系列HPLC-DAD系統(具有二極體陣列偵測器；Agilent Technologies, Santa Clara (USA))來定量培養物上清液中的oAB濃度。作為固定相，在20°C下使用C18管柱Luna® HPLC-管柱(4.6 × 250 mm; 3 μm; Phenomenex)，其使用甲醇(溶劑B)及含有0.1%甲酸的水(溶劑A)組成的二元溶劑系統。注射10 μL的經稀釋培養物上清液。以0.5 mL/min的流速施加下列梯度：0-1 min，2 % B；1-2 min，2-10 % B；2-12 min，10-70 % B；12-23 min，70-90 % B；23-25 min，90 -98 % B，25-27 min，98 % B；27-27.5 min，98 %-2 % B；27.5-30 min，2 % B。使用一個外部校正曲線，在254 nm下自訊號積分測定oAB濃度(留滯時間：18.9 min)。

trpD基因在麩胺酸棒狀桿菌中的設計

【0162】 使用大腸桿菌-麩胺酸棒狀桿菌穿梭載體pK19*mobsacB*，藉由*trpD*基因(編碼鄰胺苯甲酸磷酸核糖基轉移酶；Cgl3032；SEQ ID NO: 1)的框內刪除做出菌株麩胺酸棒狀桿菌Δ*trpD* (參見表2)。藉由使用引子對Del-*trpD*-1與Del-*trpD*-2，及Del-*trpD*-3與Del-*trpD*-4 (表3，SEQ ID NO: 66-69)的PCR，分別由分離自麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032的基因體DNA擴增*trpD*開放讀框的5'-端區(包括基因的頭7個密碼子)以及目標基因的3'-端區(包括*trpD*開放讀框的末8個密碼子)。藉由交叉PCR使用引子對Del-*trpD*-1與Del-*trpD*-4來組合所得兩個片段。經由*Sma*I限制及再接合，所得片段被選殖至pK19*mobsacB*載體的多重選殖位點中。所得載體被運用於從麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032基因體框內刪除*trpD*基因，並且將24 bp的外來誤義序列框內引入至用以交叉PCR的基因體(在基因座中所得序列：SEQ ID No.2)中。如

上述分離正確的突變體並且藉由PCR證實正確的基因刪除。這產生帶有oAB累積的L-色胺酸營養缺陷型菌株。在添加0.1 mM L-色胺酸或0.1 mM吲哚的情況下，該菌株經特徵鑑定其特性為如上述的oAB生產者(參見表4)。

【0163】 如上所述，六種形式的*trpD*基因經由*SbfI*與*BamHI*限制及再接合被選殖至載體pEKEEx2中。藉由PCR使用麩胺酸棒狀桿菌基因體DNA作為模板，*trpD*基因的六種不同形式(SEQ ID No. 3-8)是在起始密碼子，以及核糖體結合位點與*trpD*起始密碼子之間之間隔子長度不同的情況下生成。六個片段生成所運用的引子為順向引子(Ex-*trpD*-1至-6，表2，SEQ ID No. 70-75)，其包括已有所改變之起始密碼子以及核糖體結合位點與起始密碼子之間之間隔子；以及各個形式未經改變的反向引子(Ex-*trpD*-rev，表2，SEQ ID No. 76)。選擇這個方法以便在所生產的菌株中達到TrpD蛋白轉譯減少。菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ (表2)經所得質體(表1)轉形且所得菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD/pEKEEx2-trpD1-6$ (表2)在沒有添加L-色胺酸的情況下生長，並因而經特徵鑑定其特性，在對培養基補充25 mg/L康那黴素與1 μ M IPTG (異丙基 β -D-1-硫代半乳糖苷)的情況下為如上述的oAB生產者(表4)。菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD/pEKEEx2-trpD5-6$ 也生產足夠的L-色胺酸而有生質形成；它們累積顯著數量的oAB (表4)。*trpD*基因的形式*trpD1-3*、*trpD5*，及*trpD6*進一步使用pK19*mobsacB*載體如上所述藉由同源性重組各自併入菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ 的基因體中(表2)。藉由使用引子對Del-*trpD*-1與Ko-*trpD*-1，以及Del-*trpD*-3與Del-*trpD*-4 (表3，SEQ ID No. 66、77，68及69)的PCR，分別由分離自麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032的基因體DNA擴增*trpD*基因形式的5'-端區以及目標基因的3'-區。藉由使用引子對Ex-*trpD*-1-3、-5或-6及Ko-*trpD*-2 (表3，SEQ ID No. 70-72、74、75，及78)的交叉PCR，所得兩個片段與不同*trpD*變異體合併。所得五個片段經由*SmaI*限制與再接合被選殖至pK19*mobsacB*的多重選殖位點中。所得質體(表1)運用於將六個*trpD*形式引入菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ 的基因體中。另外，10個外來核苷酸(GCCCTGCAGG，SEQ ID NO: 92)由於選殖程序而被併入基因體中，在*trpD*基因的核糖體結合位點上游，其等用於交叉PCR。如上述分離正確的突變體並藉由*trpD*區的定序來確認嵌入。所得菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD1-3$ 、*trpD5*，或*trpD6* (表2)在沒有添加L-色胺酸或康那黴素的情

況下生長並因此經特徵鑑定其特性為如上述不需要進一步培養基添加的oAB生產者(參見表4)。

【0164】 所述用於基因表現降低的方法可應用於其他基因以取代實施基因刪除。

csm基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0165】 使用大腸桿菌-麩胺酸棒狀桿菌穿梭載體pK19*mobsacB*，藉由*csm*基因(編碼分支酸變位酶；Cgl0853)的框內刪除做出菌株麩胺酸棒狀桿菌 Δcsm 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD\Delta csm$ ，及麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta csm$ (表2)。藉由使用引子對Del-csm-1與Del-csm-2，及Del-csm-3與Del-csm-4(表3，SEQ ID NO: 79-82)的PCR，分別由分離自麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032的基因體DNA擴增*csm*開放讀框的5'-端區(包括基因的頭6個密碼子)及目標基因的3'-端區(包括*csm*開放讀框的末6個密碼子)。所得兩個片段藉由使用引子對Del-csm-1與Del-csm-4的交叉PCR被組合。經由*Sma*I限制與再接合，所得片段如上述被選殖至pK19*mobsacB*載體的多重選殖位點中。所得載體被運用於分別從麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ ，及從菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ 基因體框內刪除*csm*，並且將24 bp外來誤義序列框內引入至用以交叉PCR的基因體(在*csm*基因座中所得序列：SEQ ID No.10)中。如上述分離正確的突變體並且藉由PCR證實正確的基因刪除。這產生L-酪胺酸與L-苯丙胺酸營養缺陷型菌株麩胺酸棒狀桿菌 Δcsm 與麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta csm$ ，還有L-酪胺酸、L-苯丙胺酸與L-色胺酸營養缺陷型菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD\Delta csm$ 。菌株經特徵鑑定其特性為如上述在對培養基補充0.1 mM L-酪胺酸及0.1 mM L-苯丙胺酸下的oAB生產者菌株(麩胺酸棒狀桿菌菌株 Δcsm 菌株)以及在對培養基補充0.1 mM L-酪胺酸、0.1 mM L-苯丙胺酸，及0.1 mM L-色胺酸的oAB生產者菌株(麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD\Delta csm$ 菌株)(表2)。相較於野生型菌株以及麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ ，所生成菌株的生長率減弱，且它們在標準培育條件下不累積顯著數量的oAB(表4)。

【0166】 如上所述，*csm*基因的六種形式如上述經由*Sbf*I與*Bam*HI限制及再接合被選殖至載體pEKEx2中。藉由PCR使用麩胺酸棒狀桿菌基因體

DNA作為模板，*csm*基因的六種不同形式是在起始密碼子，以及核糖體結合位點與*csm*起始密碼子之間之間隔子(SEQ ID No. 11-16)長度不同的情況下生成。六個片段生成所運用的引子為順向引子(Ex-*csm*-1至-6)，其包括已有所改變之起始密碼子以及核糖體結合位點與起始密碼子之間之間隔子；以及各個形式未經改變的反向引子(Ex-*csm*-rev，表3，SEQ ID No. 89)。選擇這個方法以便在所生產的菌株中達到Csm蛋白轉譯減少。菌株麩胺酸棒狀桿菌 Δcsm (表2)經所得質體(表1)轉形且所得菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta csm/pEKEEx2-csm1-6$ (表2)在沒有添加L-酪胺酸、L-苯丙胺酸與L-色胺酸的情況下生長，並因而經特徵鑑定其特性，在對培養基補充25 mg/L康那黴素與1 μ M IPTG的情況下為如上述的oAB生產者(參見表4)。菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta csm$ (表2)經空載體對照pEKEEx2 (表1)轉形，而所得菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta csm/pEKEEx2$ (表2)在沒有添加L-色胺酸的情況下生長，並因而經特徵鑑定其特性，在對培養基補充25 mg/L康那黴素與1 μ M IPTG的情況下為如上述的oAB生產者(表4)。所生成的菌株產生足夠的芳香族胺基酸而有生質形成，但在標準培育條件下它們未累積顯著數量的oAB (表4)。

麩胺酸棒狀桿菌菌株的通用芳香族途徑與L-色胺酸分支的設計

*trpEG*基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0167】 已闡述麩胺酸棒狀桿菌的芳香族生物合成途徑且與編碼用於oAB生物合成之酶相關的基因為已知的(Ikeda M, Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69:615)。oAB是L-色胺酸生物合成途徑的中間物並且是透過鄰胺苯甲酸合成酶自分支酸(CHO)衍生而來，鄰胺苯甲酸合成酶是由醯胺轉移酶(TrpE；供體：L-麩醯胺酸)與鄰胺苯甲酸合成酶單元(TrpEG)組成，其在形成oAB與L-麩胺酸時釋出一個丙酮酸分子。TrpEG編碼基因的表現增加已顯示造成L-色胺酸在大腸桿菌菌株中累積(Ikeda M, Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69:615)。但是，該酶已被報導受到L-色胺酸強烈地回饋抑制(Ikeda M, Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69:615)，導致施用TrpEG蛋白的回饋耐受性形式。TrpEG蛋白的回饋耐受性形式已被報導是基於乳酸發酵短桿菌(*Brevibacterium lactofermentum*)(麩胺酸棒狀桿菌)、大腸桿菌及沙門

氏鼠傷寒桿菌的*trpEG*序列(Calguri *et al.*, J Bio Chem, 1991, 8328-8335 ; Kwak *et al.*, J Biochem Mol Bio, 1999, 20-24, Ikeda M, Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69:615及Matsui *et al.*, J Bac, 1987, 5330-5332)。基於大腸桿菌基因，最偏好*trpEG*形式在麩胺酸棒狀桿菌菌株中被表現，而在麩胺酸棒狀桿菌ATCC13032之天然TrpEG蛋白的*trpEG*序列上實施選定胺基酸交換並在麩胺酸棒狀桿菌菌株中表現。相比於麩胺酸棒狀桿菌的天然TrpEG蛋白，四個回饋耐受性TrpEG蛋白(基於大腸桿菌TrpEG：TrpEGS40R與TrpEGS40F (SEQ ID No. 50-51)；以及基於麩胺酸棒狀桿菌TrpEG: TrpEGS38R與TrpEGS38F) (SEQ ID No. 52-53))一起進行特徵鑑定。由Eurofins MWG Operon GmbH合成*trpEG*基因的五個形式，並如上述經由*SbfI*與*BamHI*限制及再接合選殖至載體pEKEx2中，且透過定序確認正確的選殖。菌株麩胺酸棒狀桿菌ATCC13032以及麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ (表2)經所得質體(表3)轉形(麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ 僅以質體pEKEx2-*trpEG*^{S40F}轉形)，且所得菌株麩胺酸棒狀桿菌/pEKEx2-*trpEG*、麩胺酸棒狀桿菌/pEKEx-*trpEG*^{S38F}、麩胺酸棒狀桿菌/pEKEx2-*trpEG*^{S38R}、麩胺酸棒狀桿菌/pEKEx2-*trpEG*^{S40F}、麩胺酸棒狀桿菌/pEKEx2-*trpEG*^{S40R}、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ /pEKEx2-*trpEG*^{S40F} (表2)如上述經特徵鑑定其特性，在對培養基補充25 mg/L康那黴素及0.1 mM IPTG的情況下為oAB生產者(參見表4)。此外，依據Caliguri and Bauerle (1991)，針對鄰胺苯甲酸合成酶活性來分析五個帶有pEKEx2-*trpEG*變異體之麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ 基菌株的細胞溶解產物。細胞溶解產物是自帶有pEKEx2-*trpEG*變異體之麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ 基菌株於300 mL搖瓶中且在30℃下以150 rpm震盪生長的30 mL培養物(最終OD₆₀₀ 4)生成的細胞丸粒，該搖瓶具有補充有25 mg/L康那黴素與1 mM IPTG的30 mL BHI培養基。依據Caliguri and Bauerle (1991)，在25℃下使用0.1 mm氧化鋯珠粒(Zymo Research Cooperation, Irvine, CA)溶解細胞丸粒並再懸浮於分析緩衝液(50 mM KH₂PO₄/K₂HPO₄、20 mM L-麩醯胺酸、10 mM MgCl₂，及25 μ M分支酸)中。在390 nm使用分光螢光計測量發射(激發：390 nm)。相較於具有天然麩胺酸棒狀桿菌TrpEG蛋白的細胞溶解產物，所有的測試變異體對鄰胺苯甲酸合成酶活性顯示有更高的比活性。三個生物重複品被用於測量。相較於麩胺酸棒狀桿菌TrpEG蛋白變異體，大腸桿菌TrpEG

蛋白變異體兼具更高活性以及更低 K_M (使用*Graphpad Prism* (La Jolla, CA)實施測定 K_M 與 v_{max} 值)。菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD/pEKEEx2-trpEG^{S40F}$ 的細胞溶解產物具有最佳效能(參見表5)。

表5 生產不同TrpEG變異體之麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ 粗萃取物對TrpEG活性的生化特性

菌株	K_M (μ mol)	V_{max} (mU/mg)
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD/pEKEEx2-trpEG$	11.4	12.7
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD/pEKEEx2-trpEG^{S38F}$	16.2	68.8
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD/pEKEEx2-trpEG^{S38R}$	21.6	231.2
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD/pEKEEx2-trpEG^{S40F}$	1.9	427.5
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD/pEKEEx2-trpEG^{S40R}$	1.9	317.9

aroG基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0168】 在麩胺酸棒狀桿菌以及大腸桿菌中已報導過，通過通用芳香族途徑上至分支酸的碳流主要在3-去氧-D-阿糖基-庚糖酮酸7-磷酸合成酶的第一個反應處受到控制(Ikeda M, Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69:615)。在麩胺酸棒狀桿菌中，存在有兩種具有不同次單元規模的DS類型。一者為L-酪胺酸敏感型DS，具有預測分子質量為39 kDa (第I型-DS；*aro*產物；Cgl0950)；而一者為L-苯丙胺酸與L-酪胺酸敏感型DS，具有預測分子質量為51 kDa (第II型-DS；*aroII*產物；Cgl2098)。第II型-DS與分支酸變位酶形成多肽複合體，其將分支酸轉化成預苯酸。第II型-DS自身展現其活性，而CM活性需要有第II型-DS蛋白的存在(Ikeda M, Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69:615)。已描述過回饋耐受性AroI DS (AroIS187C) (Ikeda M, Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69:615)。來自大腸桿菌之AroII的回饋耐受性等效DS，AroG^{fbr} (AroGD146N；SEQ ID No. 55)，其未受到芳香族胺基酸所抑制，被



表現於麩胺酸棒狀桿菌菌株中以提高碳流經過通用芳香族途徑往CHO以及oAB。使用引子Ex-aroG-1與Ex-aroG-2 (表3, SEQ ID No. 109-110), 藉由PCR擴增 $aroG^{D146N}$ 基因, 如上述其納入限制位點以及核糖體結合位點。經由*SbfI*與*BamHI*限制以及再接合, 如上述所得DNA片段被選殖至載體pEKEEx2, 並透過定序確認正確選殖。菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ (表2)經所得質體(表1)轉形, 且所得菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEEx2-aroG^{D146N}$ (表2)如上述經特徵鑑定其特性為在對培養基補充25 mg/L康那黴素與0.1 mM IPTG下的oAB生產者(參見表4)。

trpEG與aroG基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0169】 為容許探究AroGD146N以及TrpEGS40F的組合表現在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的影響, 編碼此等蛋白質的DNA序列被融合至pEKEEx2載體。如上述均經由*BglII*與*BamHI*限制與再接合, $aroG^{D146N}$ 序列被融合至pEKEEx2- $trpEG^{S40F}$ 以獲得pEKEEx2- $trpEG^{S40F}-aroG^{D146N}$ (表1), 而基因 $trpEG^{S40F}$ 被融合至質體pEKEEx2- $aroG^{D146N}$ 以獲得pEKEEx2- $aroG^{D146N}-trpEG^{S40F}$ (表1), 並透過定序確認正確選殖。菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ (表2)經各個所得質體轉形而所得菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEEx2-aroG^{D146N}-trpEG^{S40F}$ 以及麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEEx2-trpEG^{S40F}-aroG^{D146N}$ (表2)如上述經特徵鑑定其特性在對培養基補充25 mg/L康那黴素與0.1 mM IPTG下為oAB生產者(參見表4)。另外, 菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta csm$ (表2)經質體pEKEEx2- $aroG^{D146N}-trpEG^{S40F}$ 轉形, 而所得菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta csm /pEKEEx2-aroG^{D146N}-trpEG^{S40F}$ (表2)如上述經特徵鑑定其特性在對培養基補充25 mg/L康那黴素、0.1 mM L-酪胺酸、0.1 mM L-苯丙胺酸與0.1 mM IPTG下為oAB生產者(參見表4)。

aroK及aroL基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0170】 為防止中間物在麩胺酸棒狀桿菌菌株的通用芳香族胺基酸生物合成途徑中累積, 研究麩胺酸棒狀桿菌的基因 $aroK$ (編碼莽草酸激酶; Cgl1622; SEQ ID No. 94)以及大腸桿菌的基因 $aroL$ (編碼莽草酸激酶;

CP000948 ; SEQ ID No. 93) 。藉由PCR分別使用引子Ex-aroK-1與Ex-aroK-2 (表3 , SEQ ID No. 101-102)以及Ex-aroL-1與Ex-aroL-2 (表3 , SEQ ID No. 99-100)各別擴增*aroK*與*aroL*基因。如上述，引子包括限制位點以及核糖體結合位點。如所述所得DNA片段經由*SbfI*與*BamHI*限制以及再接合分別被併入載體pEKEx2，以產生質體pEKEx2-*aroK*與pEKEx2-*aroL*，且藉由定序確認正確選殖。菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ (表2)經所得質體(表3)轉形且所得菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEx2-aroL$ 以及麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEx2-aroK$ (表2)如上述經特徵鑑定其特性在對培養基補充25 mg/L康那黴素與0.1 mM IPTG下為oAB生產者(參見表4)。在菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEx2-aroL$ 中，依據培養物上清液的HPLC-DAD分析，偵測到莽草酸與3-去氫莽草酸無顯著累積。

*glnA*基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0171】 為分析L-麩醯胺酸合成酶(*GlnA* ; Cgl2214 , SEQ ID No. 95)活性對於麩胺酸棒狀桿菌菌株生產oAB的影響，在菌株麩胺酸棒狀桿菌中表現L-麩醯胺酸合成酶基因*glnA*。如上述藉由PCR使用引子Ex-*glnA*-1與Ex-*glnA*-2 (表3 , SEQ ID No. 97-98)擴增*glnA*基因，其包括限制位點以及核糖體結合為點。如上述所得DNA經由*NcoI*限制以及再接合被選殖至載體pCRB210中，並透過定序確認正確選殖。菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ 經所得質體(表3)轉形，且所得菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pCRB-glnA$ (表2)如上述經特徵鑑定其特性在對培養基補充25 mg/L康那黴素與0.1 mM IPTG下為oAB生產者(參見表4)。作為對照，菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ 經空載體對照pCRB210 (表1)轉形且所得菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pCRB210$ (表2)如上述經特徵鑑定其特性在對培養基補充25 mg/L康那黴素與0.1 mM IPTG下為oAB生產者(參見表4)。儘管菌株的生長減低，但並沒有觀察到對麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ 的鄰胺苯甲酸鹽累積有益的效用。無法排除*GlnA*活性增加會提高鄰胺苯甲酸鹽在更後階段oAB生產者菌株中如同在大腸桿菌中觀察到的累積(Sun *et al.*, Appl Environ Microbiol, 2013, 4024-4030)。

麩胺酸棒狀桿菌菌株的中心代謝的設計

Pyk基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0172】 丙酮酸激酶(Pyk)在生產丙酮酸與ATP時消耗磷酸烯醇丙酮酸。要探討在麩胺酸棒狀桿菌菌株中框內刪除*pyk*基因(SEQ ID NO: 23)的影響。如上述使用大腸桿菌-麩胺酸棒狀桿菌穿梭載體pK19*mobsacB*，藉由框內刪除*pyk*基因(編碼丙酮酸激酶；Cgl2089)造出菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta pyk$ (表2)。所得質體pSB082(表1)被運用於從麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ 基因體框內刪除*pyk*基因，並且將24 bp外來誤義序列框內引入基因體(在*pyk*基因座中所得序列：SEQ ID No. 24)。如上述分離正確的突變體並且藉由PCR證實正確的基因刪除。這產生如上述經特徵鑑定其特性為oAB生產者菌株的菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta pyk$ (表4)。

*gpi*基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0173】 為將碳流導向五碳糖磷酸途徑，在麩胺酸棒狀桿菌菌株中探討框內刪除葡萄糖-6-磷酸異構酶(*Gpi*)編碼基因(SEQ ID NO: 27)的影響。如上述使用大腸桿菌-麩胺酸棒狀桿菌穿梭載體pK19*mobsacB*，藉由框架內刪除*gpi*基因(編碼葡萄糖-6-磷酸異構酶；Cgl0851)造出菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta gpi$ (表2)。所得質體pSB064(表1)被運用於從麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ 基因體框內刪除*gpi*基因，並將24 bp外來誤義序列框內引入至基因體(在*gpi*基因座中所得序列：SEQ ID No.28)中。如上述分離正確的突變體並且藉由PCR證實正確的基因刪除。這產生如上述經特徵鑑定其特性為oAB生產者菌株的菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta gpi$ (表4)。

*pepco*基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0174】 磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(*Pepco*)在將PEP轉化成草醯乙酸時消耗PEP。為估算增加的PEP池，探討在麩胺酸棒狀桿菌菌株中框內刪除磷酸烯醇丙酮酸羧化酶編碼基因(SEQ ID NO: 21)。如上述使用大腸桿菌-麩胺酸棒狀桿菌穿梭載體pK19*mobsacB*，藉由框內刪除*pepco*基因(編碼磷酸烯醇丙酮酸羧化酶；Cgl1585)造出菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta pepco$ (表2)。所得質體pSB061(表1)被運用於從麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ 基因體

框內刪除*pepco*基因，並且將24 bp外來誤義序列框內引入基因體(在*pepco*基因座中所得序列：SEQ ID No.22)。如上述分離正確的突變體(對BHI培養基瓊脂盤額外補充1%乙酸)並且藉由PCR證實正確的基因刪除。這產生如上述經特徵鑑定其特性為oAB生產者菌株的菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta pepco$ (表4)。

ptsG與hpr基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0175】 麩胺酸棒狀桿菌的葡萄糖及果糖攝取主要是由磷酸轉移酶系統(PTS)所利用。這個多酶複合體經由磷酸烯醇丙酮酸媒介之磷酸化級聯執行葡萄糖的轉位，伴隨著葡萄糖磷酸化成葡萄糖-6-磷酸穿過細胞膜(Siebold *et al.* 2001)。這個系統有兩個可溶性組分酶I以及富含組胺酸蛋白(Hpr)以及一個膜結合/締合酶複合體(Tanaka *et al.* 2008)。如上述使用大腸桿菌-麩胺酸棒狀桿菌穿梭載體pK19*mobsacB*，藉由框內刪除*hpr*基因(編碼富含組胺酸蛋白；Cgl1937，SEQ ID NO: 17)及*ptsG*基因(編碼磷酸轉移酶系統單元G；Cgl1360，SEQ ID NO: 19)分別造出菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta hpr$ 以及麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta ptsG$ (表2)。所得質體pSB060與pSB079 (表1)被運用於分別從麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ 基因體框內刪除*hpr*基因與*ptsG*基因，並且將24 bp外來誤義序列框內引入基因體(在*hpr/ptsG*基因座中所得序列：SEQ ID No.18；*ptsG*基因座：20)中。如上述分離正確的突變體(對BHI培養基瓊脂盤額外補充5 g/L核糖)並且藉由PCR證實正確的基因刪除。這產生如上述經特徵鑑定其特性為oAB生產者菌株的菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta hpr$ 及麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta ptsG$ (表4)。兩個菌株如上所述在標準發酵條件下均未顯示顯著生長，且因此並未累積oAB。

ppk基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0176】 磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶(Ppk)可做為乙醛酸途徑的一部份，將草醯乙酸再循環至PEP中。為估算增加的PEP池，在麩胺酸棒狀桿菌菌株中探討磷酸烯醇丙酮酸羧化激酶編碼基因(Cgl2862；SEQ ID NO: 36)以質體為主的表現。由Eurofins MWG Operon GmbH合成*ppk*基因，並且如上

述經由*SbfI*與*BamHI*限制及再接合選殖至載體pEKEEx2中，產生質體pSB072 (表1)，且透過定序證實正確的選殖。如上述藉由以質體pSB072轉形菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ 造出菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB072$ (表2)。如上述分離正確的突變體並且透過菌落PCR證實帶有目標基因的成功轉形。這產生菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB072$ ，如上述經特徵鑑定其特性為oAB生產者菌株(表4)。

pps基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0177】 磷酸烯醇丙酮酸合成酶(Pps)催化作為，作為糖質新生的一部分，在丙酮酸再循環時PEP形成並ATP消耗成AMP。為估算增加的PEP池，在麩胺酸棒狀桿菌菌株中探討磷酸烯醇丙酮酸合成酶編碼基因和PEP合成酶結合域編碼基因(Cgl0551與Cgl0552；SEQ ID NO: 33-35)以質體為主的表現。由Eurofins MWG Operon GmbH一起合成pps基因，並且如上述經由*SbfI*與*BamHI*限制及再接合選殖至載體pEKEEx2中，產生質體pSB073，且透過定序證實正確的選殖。如上述以質體pSB073轉形菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ 造出菌株麩胺酸棒狀桿菌 $trpD::trpD5/pSB073$ (表2)。如上述分離正確的突變體並透過菌落PCR證實帶有目標基因的成功轉形。這產生菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB073$ ，如上述經特徵鑑定其特性為oAB生產者菌株(表4)。

zwf1與opcA基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0178】 在運動發酵單孢菌(*Zymomonas mobilis*)以及大腸桿菌中，報導過催化五碳糖磷酸途徑(PPP)第一個反應(透過葡萄糖-6-磷酸去氫酶(Zwf1與OpcA)自葡萄糖-6-磷酸形成核酮糖-5-磷酸)的酶生產增加，會致使赤藻糖-4-磷酸(E4P)池增加。為估算增加的E4P池，在麩胺酸棒狀桿菌菌株中探討葡萄糖-6-磷酸去氫酶編碼基因(*zwf1* (Cgl1576)以及*opcA* (Cgl1577; SEQ ID NO: 37-39))以質體為主的表現。由Eurofins MWG Operon GmbH一起合成基因，並且如上述經由*SbfI*與*BamHI*限制及再接合選殖至載體pEKEEx2中，產生質體pSB078 (表1)，且透過定序證實正確的選殖。如上述藉由以質體pSB078轉形菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ 造出菌株麩胺酸棒狀桿菌

$\Delta trpD::trpD5/pSB078$ (表2)。如上述分離正確的突變體並且透過菌落PCR證實帶有目標基因的成功轉形。這產生菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB078$ ，如上述經特徵鑑定其特性為oAB生產者菌株(表4)。

tal與tkt基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0179】 已報導因為轉酮酶與轉醛醇酶在大腸桿菌中的表現提高，碳流增加通過PPP且EP4池增加。以質體為基礎在麩胺酸棒狀桿菌菌株中表現大腸桿菌的轉酮酶(Tkt)及轉醛醇酶(Tal)編碼基因(*tktEC* (ECDH10B_3110)及*talEC* (ECDH10B_2629)；SEQ ID NO: 41與43)，還有麩胺酸棒狀桿菌的相同基因(*tktCG* (Cgl1574)及*talCG* (Cgl1575)；SEQ ID NO: 40及42)。由MWG Operon GmbH合成四個序列，並且如上述經由*SbfI*與*BamHI*限制及再接合個別併入載體pEKEx2中，產生質體pSB074-pSB077 (表1)，且透過定序證實正確的選殖。如上述藉由以各個質體轉形麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ ，造出菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB074 - pSB077$ (表2)。如上述分離正確的突變體並且透過菌落PCR證實帶有目標基因的成功轉形。這產生菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB074 - pSB077$ ，如上述經特徵鑑定其特性為oAB生產者菌株(表4)。

【0180】 為容許評估轉酮酶及轉醛醇酶的組合表現在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的影響，編碼此等蛋白質的DNA序列被融合至載體pEKEx2。如上述兩者均經由*BglII*與*BamHI*限制及再接合，*talCG*序列被融合至pSB075以獲得pSB085 (表1)，而基因*talEC*被融合至質體pSB077以獲得pSB086 (表1)，且透過定序證實正確的選殖。以各個所得質體轉形菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ ，而所得菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB085$ 與麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB086$ (表2)如上述經特徵鑑定其特性在對培養基補充25 mg/L康那黴素及0.1 mM IPTG下為oAB生產者(表4)。

galP、iolT2與ppgk基因在麩胺酸棒狀桿菌菌株中的設計

【0181】 為在Pts-缺陷型麩胺酸棒狀桿菌菌株中回復有效的葡萄糖攝取，探討半乳糖通透酶編碼基因(*galP*，Cgl2409；SEQ ID NO: 30)及聚磷酸葡萄糖激酶(葡萄糖磷酸化酶)編碼基因(*ppgk* (Cg1910；SEQ ID NO: 32)在

麩胺酸棒狀桿菌菌株中以質體為基礎的表現。另外，在麩胺酸棒狀桿菌菌株中探討(肌醇通透酶的)肌醇通透酶T2單元編碼基因(*iolT2*, Cg13058; SEQ ID NO: 31)與聚磷酸葡萄糖激酶編碼基因(*ppgk* (Cg1910; SEQ ID NO: 32)的組合。由Eurofins MWG Operon GmbH合成四個基因，並且如上述經由*SbfI*與*BamHI*限制及再接合各自併入至載體pEKEEx2中，產生質體pSB068、pSB070，及pSB071 (表1)，且透過定序證實正確的選殖。如上述均經由*BglII*與*BamHI*限制及再接合，*ppgk*序列在pEKEEx2載體上分別被融合至*galP*序列及*iolT2*。*galP*序列被融合至pSB071以獲得pSB083 (表1)，而基因*iolT2*被融合至質體pSB071以獲得pSB084 (表1)，且透過定序證實正確的選殖。各自以質體pSB083與pSB084轉形菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta ptsG$ 以及麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta hpr$ (表2)，而所得菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta ptsG/pSB083$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta ptsG/pSB084$ 、麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta hpr/pSB083$ ，以及麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta hpr/pSB084$ (表2)如上述經特徵鑑定其特性在對培養基補充25 mg/L 康那黴素及 0.1 mM IPTG 下為 oAB 生產者 (表4)。菌株 $\Delta trpD::trpD5\Delta hpr/pSB083$ 如上述在標準發酵條件下未顯示明顯生長，且因此不累積oAB。

自麩胺酸棒狀桿菌菌株輸出oAB的設計

【0182】 隨者oAB生產率增加，自生產細胞輸出產品很可能變成一個生產限制步驟。此外，oAB的細胞內累積對細胞非常可能具有明顯毒性。目前未曾描述過oAB輸出者。近來，Kubota等人已描述莽草酸通透酶(QsuA)(屬於主要易化蛋白系統家族)，其在麩胺酸棒狀桿菌中促使莽草酸及奎尼酸(quininate)輸入(Kubota *et al.*, Molecular Microbiol, 2014, 92(2), 356)。為測試莽草酸通透酶在麩胺酸棒狀桿菌菌株中對於oAB細胞內濃度與細胞外濃度的影響，由Eurofins MWG Operon GmbH合成相關基因(*qsuA*, Cg10492; SEQ ID NO: 96)，且如上述經由*SbfI*與*BamHI*限制及再接合併入載體pEKEEx2中，產生質體pSB096 (表1)，且透過定序證實正確的選殖。如上述藉由以質體pSB096轉形菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5$ 造出菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB096$ (表2)。如上述分離正確的突變體並且透過菌落PCR證

實帶有目標基因的成功轉形。這產生菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB096$ ，如上述經特徵鑑定其特性為oAB生產者菌株(表4)。

實例4-使用臭味假單胞菌生產o-胺基苯甲酸鹽

【0183】 開發出衍生自臭味假單胞菌KT2440之生產oAB的菌株。為藉由臭味單胞菌菌株達到oAB累積，在臭味假單胞菌KT2440中中斷選定編碼鄰胺苯甲酸磷酸核糖基轉移酶與吡啶-3-甘油磷酸合成酶的 $trpDC$ 基因(PP_0421 與 PP_0422 ; SEQ ID NO: 63)。依據 Martinez-Garcia 等人 (Martinez-Garcia *et al*, Environ Microbiol, 2011, 13(10), 2702)中所述使用載體pEMG的方法，基於剔除質體pEMG-Del- $trpDC$ (表1)著手處理刪除突變體臭味假單胞菌 $\Delta trpDC$ 的建構。這個方法導致移除基因序列(感興趣基因，GOI)而沒有殘餘選殖損傷或標記。該方法的概念顯示於圖27中。在步驟A-B中，設計的剔除載體pEMG帶有中斷側TS1與TS2、康那黴素標記與I-SceI位點，其被併入臭味假單胞菌的基因體中。在步驟C中，透過第二個質體(pSW-2)的轉形引起雙股斷裂，該質體帶有大範圍核酸酶(meganuclease) I-SceI基因。在活體內透過TS1或TS2區的同源性重組修復斷裂，產生臭味假單胞菌野生型或臭味假單胞菌 $\Delta trpDC$ (步驟D)。步驟E顯示PCR篩選，需要PCR篩選來區別並分離不同的菌株。選出刪除側以使得基因的開放讀框被移除，同時保持鄰近基因完整(圖28)。這個策略可在長期連續培育時產生更高的菌株穩定性。使用Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase (New England Biolabs)擴增800 bp斷裂側TS1及TS2。依據製造商的操作手冊實施Phusion PCR (25個循環，61,8°C (TS1)，70,2°C (TS2) 1:30分)。以BamHI與XhoI消化PCR片段TS1，並以XhoI與SbfI消化PCR片段TS2。以BamHI與SbfI消化質體pEMG以及經融合TS1-TS2 PCR產物。所有限制混合物是使用High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)予以純化。使用單獨側TS1及TS2，利用T4 DNA 接合酶(Thermo Fisher Scientific)依據製造商的使用說明實施pEMG-Del- $trpDC$ 的接合。接合混合物轉形成化學勝任大腸桿菌DH5 α λ pir菌株。藉由限制分析並透過定序確認由兩個單獨側及經消化載體pEMG組成之三點接合混合物的陽性質體，其確認成功建構了pEMG-Del- $trpDC$ (表1)。使用受體菌株臭味假單胞菌、供體菌株大腸桿菌 DH5 α

λ pir/pEMG-Del-*trpDC*以及輔助菌株大腸桿菌HB101 pRK2013，剔除載體pEMG-Del-*trpDC*藉由三親交配(tri-parental mating)被併入臭味假單孢菌的基因體中(圖27，步驟A-B) (Martinez-Garcia *et al*, Environ Microbiol, 2011, 13(10), 2702)。臭味假單孢菌/pEMG-Del-*trpDC*是由細胞混合物藉由使用具有50 mg/L康那黴素的溴化十六基三甲銨瓊脂盤分離，且單一菌落被劃紋於LB-康那黴素盤上。在單一菌落中藉由菌落PCR確認剔除載體的基因體嵌入。為了在基因體中引入雙股斷裂(圖27，步驟C)，帶有I-SceI大範圍核酸酶基因的第二个質體(pSW-2)被轉形至新建構的菌株中。因此，依據Choi等人(Choi *et al*, J Microbiol Methods, 2005, 64(3), 391)獲得電勝任臭味假單孢菌/pEMG-Del-*trpDC*細胞。使用Biorad Gene Pulser Xcell Electroporator (2.5 kV, 200 ohm, 25 μ F)來實施電穿孔，且細胞懸浮液被完全鋪置於LB-健他黴素與(30 mg/L)及LB-康那黴素-健他黴素盤(分別為30 mg/L與50 mg/L)上。在Martinez-Garcia等人中所述的剔除步驟程序之後，需要誘發I-SceI大範圍核酸酶。但是，因為實務經驗暗指I-SceI大範圍核酸酶有洩漏表現而省略這個步驟。為區別合宜臭味假單孢菌 Δ *trpDC*剔除菌株與臭味假單孢菌及臭味假單孢菌/pEMG-Del-*trpDC*菌株，將單一菌落完全鋪置於LB及LB-康那黴素盤上。如上述經由菌落PCR檢驗康那黴素敏感型菌落。此外，在具有20 mM葡萄糖以及在有或沒有0.1 mM L-色胺酸存在下的最低培養基上，針對L-苯丙胺酸營養缺陷型來檢驗康那黴素敏感型菌落。透過PCR分析及定序驗證基因刪除。所得菌株臭味假單孢菌 Δ *trpDC* (表2)無法在沒有L-色胺酸補充的最低培養基上生長。

【0184】 在臭味假單孢菌 Δ *trpDC*菌株中使編碼分支酸變位酶的*pheA*基因(PP_1769, SEQ ID NO: 64)斷裂。*pheA*基因編碼L-苯丙胺酸及L-酪胺酸生物合成的第一個步驟，其可能與鄰胺苯甲酸鹽生產相競爭。如上述依據Martinez-Garcia等人(Martinez-Garcia *et al*, Environ Microbiol, 2011, 13(10), 2702)中所述的方法使用載體pEMG，基於剔除質體pEMG-Del-*pheA*著手處理刪除突變體臭味假單孢菌 Δ *trpDC* Δ *pheA*的建構。選出刪除側以使得基因的開放讀框被移除，同時保持鄰近基因完整(圖29)。這個策略可在長期連續培育時產生更高的菌株穩定性。在*pheA*的情況下，這意味著基因因為與*serC*基因重疊而保留八個5'核苷酸。為建構800 bp斷裂側TS1及TS2，使用下列

引子：JK038f、JK039r、JK040f，及JK041r (表3，SEQ ID NO: 103-106)。

以*Bam*HI與*Xho*I消化PCR片段TS1，並以*Xho*I與*Sbf*I消化PCR片段TS2。以*Bam*HI與*Sbf*I消化質體pEMG及經融合TS1-TS2 PCR產物。所有限制混合物是使用High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)予以純化。使用單獨側TS1及TS2，利用T4 DNA接合酶(Thermo Fisher Scientific)依據製造商的使用說明實施pEMG-Del-*pheA*的接合。接合混合物轉形成化學勝任大腸桿菌DH5α λ pir菌株。藉由限制分析並透過定序確認由兩個單獨側及經消化載體pEMG組成之三點接合混合物的陽性質體，其確認成功建構了pEMG-Del-*pheA* (表1)。

使用受體菌株臭味假單孢菌 Δ *trpDC*、供體菌株大腸桿菌DH5α λ pir/pEMG-Del-*pheA*以及輔助菌株大腸桿菌HB101 pRK2013，剔除載體pEMG-Del-*pheA*藉由三親交配被併入臭味假單孢菌 Δ *trpDC*的基因體中(圖27，步驟A-B) (Martinez-Garcia *et al*, Environ Microbiol, 2011, 13(10), 2702)。

臭味假單孢菌 Δ *trpDC*/pEMG-Del-*pheA*是由細胞混合物藉由使用具有50 mg/L康那黴素的溴化十六基三甲銨瓊脂盤分離，且單一菌落被劃紋於LB-康那黴素盤上。在單一菌落中藉由菌落PCR確認剔除載體的基因體嵌入。為了在基因體中引入雙股斷裂(圖27，步驟C)，帶有I-*Sce*I大範圍核酸酶基因的第二个質體(pSW-2)被轉形至新建構的菌株中。因此，依據Choi等人(Choi *et al*, J Microbiol Methods, 2005, 64(3), 391)獲得電勝任臭味假單孢菌 Δ *trpDC* /pEMG-Del-*pheA*細胞。使用Biorad Gene Pulser Xcell Electroporator (2.5 kV, 200 ohm, 25 μ F)來實施電穿孔，且細胞懸浮液被完全鋪置於LB-健他黴素(30 mg/L)及LB-康那黴素-健他黴素盤(分別為30 mg/L與50 mg/L)上。在Martinez-Garcia等人中所述的剔除步驟程序之後，需要誘發I-*Sce*I大範圍核酸酶。但是，因為實務經驗暗指I-*Sce*I大範圍核酸酶有洩漏表現而省略這個步驟。為區別合宜臭味假單孢菌 Δ *trpDC* Δ *pheA* (表2)剔除菌株與臭味假單孢菌 Δ *trpDC*及臭味假單孢菌菌株 Δ *trpDC*/pEMG-Del-*pheA*，將單一菌落完全鋪置於LB及LB-康那黴素盤上。如上述經由菌落PCR檢驗康那黴素敏感型菌落。此外，在具有20 mM葡萄糖、0.1 mM L-色胺酸以及有或沒有0.1 mM L-苯丙胺酸存在下的最低培養基上，針對L-苯丙胺酸營養缺陷型來檢驗康那黴素敏感型菌落。透過PCR分析及定序驗證基因刪除。因為臭味假單孢菌KT2440具有將L-苯丙胺酸轉化成L-酪胺酸的L-苯丙胺酸-4-羥化酶(PheA)，

L-酪胺酸營養缺陷型透過添加L-苯丙胺酸而獲得援救。由於L-色胺酸以及L-苯丙胺酸營養缺陷型是透過單一基因破壞而獲得，假定沒有編碼替代性酶的多餘基因存在於臭味假單孢菌KT2440中。

【0185】 芳香族胺基酸生物合成途徑的第一個專用反應是由DAHP合成酶同功酶所催化。在數種生物體中已顯示，過度表現這個酶的回饋不敏感型突變體增加通過芳香族生物合成途徑的流(Ikeda M, Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69:615)。因此，為增加鄰胺苯甲酸鹽生產，在菌株臭味假單孢菌KT2440、臭味假單孢菌 $\Delta trpDC$ 及臭味假單孢菌 $\Delta trpDC\Delta pheA$ 中，經由載體pSEVA234 (受 $lacI^P$ - P_{trc} 系統控制；編碼康那黴素抗性以及pBBR1複製源)表現由 $aroG^{D146N}$ 基因(SEQ ID NO: 55)所編碼的回饋不敏感型3-去氧-D-阿糖基庚糖酮酸7-磷酸(DAHP)合成酶(Silva-Rocha *et al*, Nucleic Acids Research, 2013, D666-75)。如上述(實例3)， $aroG^{D146N}$ 基因是使用 $EcoRI$ 與 $BamHI$ 限制酶以及標準條件由供體質體(pCAS-2JF- $aroG^{D146N}$)進行限制處理而來，產生1117 bp片段。使用相同酶來對載體pSEVA234進行限制處理。該等片段是使用High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)予以純化。利用T4 DNA接合酶(Thermo Fisher Scientific)依據製造商的使用說明實施片段的接合以取得pSEVA234- $aroG^{D146N}$ (表1)。接合混合物被引入電勝任大腸桿菌DH5 α 細胞(ElectroMAX™ DH5 α -E™ Competent Cells; Life Technologies, Darmstadt)中。在於0.2 cm空隙電穿孔比色杯(BioRad, Hercules, CA)中使用Gene Pulser Xcell System (BioRad, Hercules, CA)電轉形(條件：~20 ms指數衰退脈衝，2.5 kV/cm，25 F，200 Ω)之後，立刻添加800 μ L LB回收培養基(Luria-Bertani；Roth, Karlsruhe)並將懸浮液轉移至1.5 mL微量離心管中。在37°C下1 h後，將細胞懸浮液散布在補充有50 mg/L康那黴素的LB瓊脂盤(Abcr GmbH & Co. Kg, Karlsruhe)上，並在37°C下培育過夜。經由限制分析及定序，收集選殖株並確認正確轉形。關於質體製備，在200 rpm恆定震盪下，菌株於37°C下在15 mL-管的3 mL LB培養基與50 mg/L康那黴素中培育歷時14 h-16 h (Kuhner Shaker ISF-4-W；Adolf Kühner AG, Basel (Switzerland))。質體DNA純化是使用NucleoSpin® Plasmid Pure套組(Macherey & Nagel, Düren)遵照製造商的使用說明來完成。依據Choi等人(Choi *et al*, J Microbiol Methods, 2005, 64(3):391)獲得電勝任臭味假單孢菌

KT2440、臭味假單孢菌 $\Delta trpDC$ 及臭味假單孢菌 $\Delta trpDC\Delta pheA$ 細胞。使用Biorad Gene Pulser Xcell Electroporator (2.5 kV, 200 ohm, 25 μ F)來實施電穿孔，且細胞懸浮液被完全鋪置於補充有50 m/L康那黴素的LB-瓊脂盤上。這產生了菌株臭味假單孢菌KT2440/ $pSEVA234-aroG^{D46N}$ 、臭味假單孢菌 $\Delta trpDC/pSEVA234-aroG^{D46N}$ ，及臭味假單孢菌 $\Delta trpDC\Delta pheA/pSEVA234-aroG^{D46N}$ (表2)。此外，空載體pSEVA234被轉形至菌株臭味假單孢菌 $\Delta trpDC$ 及臭味假單孢菌 $\Delta trpDC\Delta pheA$ 中，以獲得菌株臭味假單孢菌 $\Delta trpDC/pSEVA234$ 及臭味假單孢菌 $\Delta trpDC\Delta pheA/pSEVA234$ (表2)。

【0186】 oAB是L-色胺酸生物合成途徑的中間物並且是透過鄰胺苯甲酸合成酶自分支酸衍生而來，鄰胺苯甲酸合成酶是由醯胺轉移酶(TrpE；供體：L-麩醯胺酸)與鄰胺苯甲酸合成酶單元(TrpEG)組成，其在形成oAB與L-麩胺酸時釋出一個丙酮酸分子。TrpEG編碼基因的表現增加已顯示造成L-色胺酸在大腸桿菌菌株中累積(Ikeda M, Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69:615)。但是，該酶已被報導受到L-色胺酸強烈地回饋抑制，導致施用TrpEG蛋白的回饋耐受性形式。TrpEG蛋白的回饋耐受性形式已被報導是基於沙門氏鼠傷寒桿菌的 $trpEG$ 序列(Ikeda M, Appl Microbiol Biotechnol, 2006, 69:615)。基於沙門氏鼠傷寒桿菌基因之最偏好 $trpEG$ 形式 $trpEG^{S40F}$ (SEQ ID No. 53)在臭味假單孢菌菌株中被表現。 $trpEG$ 基因的回饋抑制耐受性形式被選殖至臭味假單孢菌載體pSEVA234中，而能夠在菌株臭味假單孢菌KT2440、臭味假單孢菌 $\Delta trpDC$ 及臭味假單孢菌 $\Delta trpDC\Delta pheA$ 中以質體為主地表現(受 $lacI^P$ -Ptrc系統控制；編碼康那黴素抗性及pBBR1複製源)(Silva-Rocha *et al*, Nucleic Acids Research, 2013, D666-75)。如上述(實例3)， $trpEG^{S40F}$ 基因是使用BglII與BamHI限制酶及標準條件由供體質體進行限制處理而來，產生2200 bp片段。使用BamHI來對載體pSEVA234進行限制處理，生成4550 bp片段。片段使用High Pure PCR Product Purification Kit (Roche)予以純化。利用T4 DNA接合酶(Thermo Fisher Scientific)依據製造商的使用說明實施片段的接合以取得pSEVA234- $trpEG^{S40F}$ (表1)。接合混合物被引入電勝任大腸桿菌DH5 α 細胞(ElectroMAX™ DH5 α -E™ Competent Cells; Life Technologies, Darmstadt)中。於0.2 cm空隙電穿孔比色杯(BioRad,

Hercules, CA)中使用Gene Pulser Xcell System (BioRad, Hercules, CA)電轉形(條件：~20 ms指數衰退脈衝，2.5 kV/cm，25 F，200 Ω)之後，立刻添加800 μ L LB回收培養基(Luria-Bertani; Roth, Karlsruhe)並將懸浮液轉移至1.5 mL微量離心管中。在37°C下1 h後，將細胞懸浮液散布在補充有50 mg/L康那黴素的LB瓊脂盤(Abcr GmbH & Co. Kg, Karlsruhe)上，並在37°C下培育過夜。經由限制分析及定序，收集選殖株以及確認正確轉形。關於質體製備，在200 rpm恆定震盪下，菌株於37°C下在15 mL-管的3 mL LB培養基與50 mg/L康那黴素中培育歷時14 h-16 h (Kuhner Shaker ISF-4-W; Adolf Kühner AG, Basel (Switzerland))。質體DNA純化是使用NucleoSpin® Plasmid Pure套組(Macherey & Nagel, Düren)遵照製造商的使用說明來完成。依據Choi等人(Choi *et al*, J Microbiol Methods, 2005, 64(3), 391)獲得電勝任臭味假單孢菌KT2440、臭味假單孢菌 $\Delta trpDC$ ，及臭味假單孢菌 $\Delta trpDC\Delta pheA$ 細胞。使用Biorad Gene Pulser Xcell Electroporator (2.5 kV, 200 ohm, 25 μ F)來實施電穿孔，且細胞懸浮液被完全鋪置於補充有50 m/L康那黴素的LB-瓊脂盤上。這產生了菌株臭味假單孢菌KT2440/ $pSEVA234-trpEG^{S40F}$ 、臭味假單孢菌 $\Delta trpDC/pSEVA234-trpEG^{S40F}$ ，及臭味假單孢菌 $\Delta trpDC\Delta pheA/pSEVA234-trpEG^{S40F}$ (表2)。

【0187】 全部所得臭味假單孢菌菌株(臭味假單孢菌KT2440、臭味假單孢菌 $\Delta trpDC/pSEVA234$ 、臭味假單孢菌 $\Delta trpDC\Delta pheA/pSEVA234$ 、臭味假單孢菌/ $pSEVA234-aroG^{D146N}$ 、臭味假單孢菌/ $pSEVA234-trpEG^{S40F}$ 、臭味假單孢菌 $\Delta trpDC/pSEVA234-aroG^{D146N}$ 、臭味假單孢菌 $\Delta trpDC/pSEVA234-trpEG^{S40F}$ 、臭味假單孢菌 $\Delta trpDC\Delta pheA/pSEVA234-aroG^{D146N}$ ，及臭味假單孢菌 $\Delta trpDC\Delta pheA/pSEVA234-trpEG^{S40F}$)(表2)經特徵鑑定其特性在搖瓶培養中為oAB生產者。依據Wierckx等人(Wierckx *et al.*, AEM, 2005, 71:8221)，在30 °C以及在250 rpm震盪下使菌株生長於最低培養基中。最低培養基的組成為：2 g/L (NH₄)₂SO₄、1.63 g/L NaH₂PO₄、3.88 g/L K₂HPO₄、0.1 g/L MgSO₄·7H₂O、1.0 mg/L CaCl₂、10 mg/L EDTA、5.0 mg/L FeSO₄·7H₂O、1.0 mg/L MnCl·H₂O、2.0 mg/L ZnSO₄·7H₂O、0.2 mg/L CuSO₄·5H₂O、0.4 mg/L CoCl₂·6H₂O、0.2 mg/L Na₂MoO₄·2H₂O，及5 g/L葡萄糖。利用5 mol/L氫氧化

鈉溶液將pH調整至7。在最低培養基中預培養菌株並且接種至500 mL搖瓶之OD₆₀₀為約0.1的50 mL主要培養物。帶有質體之菌株的培養物補充有50 mg/L康那黴素。具有*trpDC*基因斷裂的菌株培養物額外補充0.1 mM L-色胺酸，而具有*pheA*基因斷裂的菌株培養物額外補充1 mM L-苯丙胺酸。在中指數期開始時，藉由添加1 mM IPTG誘發*lacI^f*系統而使得oAB生產。如實例3所述測量作為oAB生產者的菌株的特徵。在培育期間，自1.5 mL培養物樣品離線測量OD₆₀₀、葡萄糖濃度及鄰胺苯甲酸鹽濃度。在使用光度計測量OD₆₀₀之後，每個樣品的1 mL等分試樣在16000 x g (5415R; Eppendorf, Hamburg)下於反應管中離心歷時5 min。經由HPLC-DAD (1100; Agilent Technologies, Santa Clara (USA)) 及 YSI (YSI-Select 2700; Kreienbaum Neoscience GmbH, Langenfeld)分析上清液。實例3與實例4的收集數據顯示於表4中。

表1 本發明中所用及/或生成的載體與質體

命名	說明及適合基因型	來源/參考文獻
pEKEx2	用於經調節基因表現的穿梭載體麩胺酸棒狀桿菌及大腸桿菌； <i>P_{tac} lacI^f</i> pBL1ori <i>V_{Cg}</i> pUC18ori <i>V_{Ec}</i> ；Kan ^R	Eikmanns <i>et al.</i> , 1991
pK19 <i>mobsacB</i>	在麩胺酸棒狀桿菌中用於建構插入及刪除突變體的大腸桿菌/麩胺酸棒狀桿菌穿梭載體(pK18ori <i>V_{Ec}</i> <i>sacB lacZα</i>) Kan ^r	Schäfer <i>et al.</i> , 1994
pCRB210	用於基因過度表現的穿梭載體胺酸棒狀桿菌及大腸桿菌； <i>P_{gapA}</i> pCASE1ori <i>V_{Cg}</i> ori <i>V_{Ec}</i> ；Spec ^r	Yukawa <i>et al.</i> , 2013
pEMG	在臭味假單孢菌中用於建構插入及刪除突變體的大腸桿菌/臭味假單孢菌穿梭載體(有兩個側邊 <i>I-SceI</i> 位點，R6Kori <i>V_{lacZα}</i>) Kan ^r	Martínez-García <i>et al.</i> , 2011
pSEVA234	用於經調節基因表現的穿梭載體臭味假單孢菌及大腸桿菌； <i>P_{trc} lacI^f</i> pBBR1ori <i>V</i> ；Kan ^R	Silva-Rocha <i>et al.</i> , 2013
pEKEx2- <i>trpD1</i>	用於 <i>trpD1</i> 之 IPTG-誘發性表現的 Kan ^R ， pEKEx2 衍生物	本研究
pEKEx2- <i>trpD2</i>	用於 <i>trpD2</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R ， pEKEx2 衍生物	本研究
pEKEx2- <i>trpD3</i>	用於 <i>trpD3</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R ， pEKEx2 衍生物	本研究
pEKEx2- <i>trpD4</i>	用於 <i>trpD4</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R ， pEKEx2 衍生物	本研究
pEKEx2- <i>trpD5</i>	用於 <i>trpD5</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R ，	本研究



	pEKEEx2 衍生物	
pEKEEx2- <i>trpD6</i>	用於 <i>trpD6</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>trpEG</i>	用於 <i>trpEG</i> ^{CsWT} 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>trpEG</i> ^{S38F}	用於 <i>trpEG</i> ^{S38F} 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>trpEG</i> ^{S38R}	用於 <i>trpEG</i> ^{S38R} 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>trpEG</i> ^{S40F}	用於 <i>trpEG</i> ^{S40F} 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>trpEG</i> ^{S40R}	用於 <i>trpEG</i> ^{S40R} 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>aroG</i> ^{D146N}	用於 <i>aroG</i> ^{D146N} 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>aroG</i> ^{D146N} - <i>trpEG</i> ^{S40F}	用於 <i>aroG</i> ^{D146N} - <i>trpEG</i> ^{S40F} 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>trpEG</i> ^{S40F} - <i>aroG</i> ^{D146N}	用於 <i>trpEG</i> ^{S40F} - <i>aroG</i> ^{D146N} 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>csm1</i>	用於 <i>csm1</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>csm2</i>	用於 <i>csm2</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>csm3</i>	用於 <i>csm3</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>csm4</i>	用於 <i>csm4</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>csm5</i>	用於 <i>csm5</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>csm6</i>	用於 <i>csm6</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>aroK</i>	用於 <i>aroK</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pEKEEx2- <i>aroL</i>	用於 <i>aroL</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pSB068	用於 <i>galP</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pSB070	用於 <i>iolT2</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pSB071	用於 <i>ppgk</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pSB072	用於 <i>ppk</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究

pSB073	用於 <i>pps</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pSB074	用於 <i>talCG</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pSB075	用於 <i>tkiCG</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pSB076	用於 <i>talEC</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pSB077	用於 <i>tkiEC</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pSB078	用於 <i>zwf1</i> 與 <i>opcA</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pSB083	用於 <i>ppgk</i> 與 <i>galP</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pSB084	用於 <i>ppgk</i> 與 <i>iolT2</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pSB085	用於 <i>tkiCG</i> 與 <i>talCG</i> 之 IPTG 誘發性表現 的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pSB086	用於 <i>tkiEC</i> 與 <i>talEC</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pSB096	用於 <i>qsuA</i> 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pEKEEx2 衍生物	本研究
pCRB- <i>glnA</i>	用於 <i>glnA</i> 之組成性表現的 pCRB210 衍 生物	本研究
pK19 <i>mobsacB</i> -Del- <i>trpD</i>	具有 <i>trpD</i> 刪除建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pK19 <i>mobsacB</i> -inte- <i>trpD1</i>	具有 <i>trpD1</i> 嵌入建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pK19 <i>mobsacB</i> -inte- <i>trpD2</i>	具有 <i>trpD2</i> 嵌入建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pK19 <i>mobsacB</i> -inte- <i>trpD3</i>	具有 <i>trpD3</i> 嵌入建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pK19 <i>mobsacB</i> -inte- <i>trpD4</i>	具有 <i>trpD4</i> 嵌入建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pK19 <i>mobsacB</i> -inte- <i>trpD5</i>	具有 <i>trpD5</i> 嵌入建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pK19 <i>mobsacB</i> -inte- <i>trpD6</i>	具有 <i>trpD6</i> 嵌入建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pK19 <i>mobsacB</i> -Del- <i>csm</i>	具有 <i>csm</i> 刪除建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pK19 <i>mobsacB</i> -inte- <i>csm1</i>	具有 <i>csm1</i> 嵌入建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pK19 <i>mobsacB</i> -inte- <i>csm2</i>	具有 <i>csm2</i> 嵌入建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pK19 <i>mobsacB</i> -inte- <i>csm3</i>	具有 <i>csm3</i> 嵌入建構的 Kan ^R ,	本研究

	pK19 <i>mobsacB</i>	
pK19 <i>mobsacB</i> -inte- <i>csm4</i>	具有 <i>csm4</i> 嵌入建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pK19 <i>mobsacB</i> -inte- <i>csm5</i>	具有 <i>csm5</i> 嵌入建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pK19 <i>mobsacB</i> -inte- <i>csm6</i>	具有 <i>csm6</i> 嵌入建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pSB060	具有 <i>hpr</i> 刪除建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pSB061	具有 <i>pepco</i> 刪除建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pSB082	具有 <i>pyk</i> 刪除建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pSB064	具有 <i>gpi</i> 刪除建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pSB079	具有 <i>ptsG</i> 刪除建構的 Kan ^R , pK19 <i>mobsacB</i>	本研究
pEMG-Del- <i>trpDC</i>	具有 <i>trpDC</i> 刪除建構的 Kan ^R , pEMG	本研究
pEMG-Del- <i>pheA</i>	具有 <i>pheA</i> 刪除建構的 Kan ^R , pEMG	本研究
pSEVA234- <i>aroG</i> ^{D146N}	用於 <i>aroG</i> ^{D146N} 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pSEVA234 衍生物	本研究
pSEVA234- <i>trpEG</i> ^{S40F}	用於 <i>trpEG</i> ^{S40F} 之 IPTG 誘發性表現的 Kan ^R , pSEVA234 衍生物	本研究

表2 本發明中所用及/或生成的細菌菌株

命名	說明及適合基因型	來源/參考文獻
大腸桿菌	菌株 DH5α ; <i>supE44</i> 、 <i>DlacU169</i> (<i>f80 lacZDM15</i>) 、 <i>hsdR17</i> (<i>rk-mk+</i>) 、 <i>recA1</i> 、 <i>endA1</i> 、 <i>thi1</i> 、 <i>gyrA</i> 、 <i>relA</i>	Hanahan and Meselson, 1983
大腸桿菌:: <i>trpD9923</i>	具有 <i>trpD9923</i> 突變的菌株 W3110	<i>E. coli</i> Genetic Resource Center (Yale University)
大腸桿菌:: <i>trpD9923Δhpr</i>	<i>trpD9923</i> 菌株中 <i>hpr</i> 的框內 刪除	Balderas-Hernandez <i>et al.</i> , 2009
麩胺酸棒狀桿菌	菌株 ATCC 13032	DSMZ
麩胺酸棒狀桿菌/pEKEx2	具有空表現載體 pEKEx2 的 菌株 ATCC 13032	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$	<i>trpD</i> (Cgl3032)的框內刪除	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 Δcsm	<i>csm</i> (Cgl0853)的框內刪除	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD\Delta csm$	<i>trpD</i> 與 <i>csm</i> 的框內刪除	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD1$	<i>trpD1</i> 嵌入麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD2$	<i>trpD2</i> 嵌入麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD3$	<i>trpD3</i> 嵌入麩胺酸棒狀桿菌	本研究

	<i>ΔtrpD</i>	
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5</i>	<i>trpD5</i> 嵌入麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD</i>	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD6</i>	<i>trpD6</i> 嵌入麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD</i>	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pEKEx2</i>	具有空表現載體 pEKEx2 的 <i>ΔtrpD::trpD5</i> 菌株	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5Δcsm</i>	具有空表現載體 pEKEx2 的 <i>ΔtrpD::trpD5Δcsm</i> 菌株	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5ΔptsG</i>	在 <i>ΔtrpD::trpD5</i> 菌株中 <i>ptsG</i> 的框內刪除(Cgl1360)	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5Δhpr</i>	在 <i>ΔtrpD::trpD5</i> 菌株中 <i>hpr</i> (Cgl1937)的框內刪除	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5Δpepco</i>	在 <i>ΔtrpD::trpD5</i> 菌株中 <i>pepco</i> (Cgl1585)的框內刪除	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5Δgpi</i>	在 <i>ΔtrpD::trpD5</i> 菌株中 <i>gpi</i> (Cgl0851)的框內刪除	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5Δpyk</i>	在 <i>ΔtrpD::trpD5</i> 菌株中 <i>pyk</i> (Cgl2089)的框內刪除	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD/pEKEx2-trpD1</i>	在 <i>ΔtrpD</i> 菌株中 <i>trpD1</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD/pEKEx2-trpD2</i>	在 <i>ΔtrpD</i> 菌株中 <i>trpD2</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD/pEKEx2-trpD3</i>	在 <i>ΔtrpD</i> 菌株中 <i>trpD3</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD/pEKEx2-trpD4</i>	在 <i>ΔtrpD</i> 菌株中 <i>trpD4</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD/pEKEx2-trpD5</i>	在 <i>ΔtrpD</i> 菌株中 <i>trpD5</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD/pEKEx2-trpD6</i>	在 <i>ΔtrpD</i> 菌株中 <i>trpD6</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>Δcsm/pEKEx2-csm1</i>	在 <i>Δcsm</i> 菌株中 <i>csm1</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>Δcsm/pEKEx2-csm2</i>	在 <i>Δcsm</i> 菌株中 <i>csm2</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>Δcsm/pEKEx2-csm3</i>	在 <i>Δcsm</i> 菌株中 <i>csm3</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>Δcsm/pEKEx2-csm4</i>	在 <i>Δcsm</i> 菌株中 <i>csm4</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>Δcsm/pEKEx2-csm5</i>	在 <i>Δcsm</i> 菌株中 <i>csm5</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>Δcsm/pEKEx2-csm6</i>	在 <i>Δcsm</i> 菌株中 <i>csm6</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>/pEKEx2-trpEG</i>	在 ATCC 13032 菌株中 <i>trpEG</i> (Cgl3029/31)的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>/pEKEx2-trpEG^{S38F}</i>	在 ATCC 13032 菌株中 <i>trpEG^{S38F}</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>/pEKEx2-trpEG^{S38R}</i>	在 ATCC 13032 菌株中 <i>trpEG^{S38R}</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>/pEKEx2-trpEG^{S40F}</i>	在 ATCC 13032 菌株中 <i>trpEG^{S40F}</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>/pEKEx2-trpEG^{S40R}</i>	在 ATCC 13032 菌株中 <i>trpEG^{S40R}</i> 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pEKEx2-trpEG^{S40F}</i>	在 <i>ΔtrpD::trpD5</i> 菌株中 <i>trpEG^{S40F}</i> 的表現	本研究



麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEEx2-aroG^{D146N}$	在 $\Delta trpD::trpD5$ 菌株中 $aroG^{D146N}$ (CP000948)的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEEx2-aroG^{D146N}-trpEG^{S40F}$	在 $\Delta trpD::trpD5$ 菌株中 $aroG^{D146N}$ 與 $trpEG^{S40F}$ 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEEx2-trpEG^{S40F}-aroG^{D146N}$	在 $\Delta trpD::trpD5$ 菌株中 $trpEG^{S40F}$ 與 $aroG^{D146N}$ 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta csm$ $pEKEEx2-aroG^{D146N}-trpEG^{S40F}$	在 $\Delta trpD::trpD5\Delta csm$ 菌株中 $aroG^{D146N}$ 與 $trpEG^{S40F}$ 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEEx2-aroK$	在 $\Delta trpD::trpD5$ 菌株中 $aroK$ (Cgl1622)的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pEKEEx2-aroL$	在 $\Delta trpD::trpD5$ 菌株中 $aroL$ (CP000948)的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pCRB210$	具有空白表現載體 pCRB210 的菌株 $\Delta trpD::trpD5$	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pCRB-glnA$	在 $\Delta trpD::trpD5$ 菌株中 $glnA$ (Cgl2214)的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta ptsG/pSB084$	在 $\Delta trpD::trpD5\Delta ptsG$ 菌株中 $ppgk$ (Cgl1910)與 $iolT2$ 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta ptsG/pSB083$	在 $\Delta trpD::trpD5\Delta ptsG$ 菌株中 $ppgk$ 與 $galP$ (Cgl2409)的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta hpr/pSB084$	在 $\Delta trpD::trpD5\Delta hpr$ 菌株中 $ppgk$ 與 $iolT2$ (Cgl3058)的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta hpr/pSB083$	在 $\Delta trpD::trpD5\Delta hpr$ 菌株中 $ppgk$ 與 $galP$ 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB072$	Expression of ppk (Cgl2862) in $\Delta trpD::trpD5$ 菌株	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB073$	在 $\Delta trpD::trpD5$ 菌株中 pps (Cgl0552/1)的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB074$	在 $\Delta trpD::trpD5$ 菌株中 $talCG$ (Cgl1575)的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB075$	在 $\Delta trpD::trpD5$ 菌株中 $tkiCG$ (Cgl1574)的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB076$	在 $\Delta trpD::trpD5$ 菌株中 $talEC$ (ECDH10B_2629)的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB077$	在 $\Delta trpD::trpD5$ 菌株中 $tkiEC$ (ECDH10B_3110)的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB078$	在 $\Delta trpD::trpD5$ 菌株中 $zwf1$ (Cgl1576)與 $opcA$ (Cgl1577) 的表現	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB085$	Expression of $tkiCG$ and	本研究

	<i>talCG</i> in $\Delta trpD::trpD5$ 菌株	
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/ pSB086$	Expression of <i>tktEC</i> and <i>talEC</i> in $\Delta trpD::trpD5$ 菌株	本研究
麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5/pSB096$	Expression of <i>qsuA</i> (CgR0492) in $\Delta trpD::trpD5$ 菌株	本研究
臭味假單胞菌	消除 TOL 質體 pWW0 的菌株 KT2440 <i>mt-2</i> 衍生物	Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981
臭味假單胞菌 $\Delta trpDC/pSEVA234$	具有空表現載體 pSEVA23 的 <i>trpDC</i> (PP_0422) 框內刪除	本研究
臭味假單胞菌 $\Delta trpDC\Delta pheA/pSEVA234$	具有空表現載體 pSEVA234 的 <i>pheA</i> (PP_1769) 框內刪除	本研究
臭味假單胞菌/ $pSEVA234\text{-}aroG^{D46N}$	在 KT2440 菌株中 <i>aroG</i> ^{D46N} 的表現	本研究
臭味假單胞菌/ $pSEVA234\text{-}trpEG^{S40F}$	在 KT2440 菌株中 <i>trpEG</i> ^{S40F} 的表現	本研究
臭味假單胞菌 $\Delta trpDC/ pSEVA234\text{-}aroG^{D46N}$	在 $\Delta trpDC$ 菌株中 <i>aroG</i> ^{D46N} 的表現	本研究
臭味假單胞菌 $\Delta trpDC/ pSEVA234\text{-}trpEG^{S40F}$	在 $\Delta trpDC$ 菌株中 <i>trpEG</i> ^{S40F} 的表現	本研究
臭味假單胞菌 $\Delta trpDC\Delta pheA/ pSEVA234\text{-}aroG^{D46N}$	在 $\Delta trpDC\Delta pheA$ 菌株中 <i>aroG</i> ^{D146N} 的表現	本研究
臭味假單胞菌 $\Delta trpDC\Delta pheA/ pSEVA234\text{-}trpEG^{S40F}$	在 $\Delta trpDC\Delta pheA$ 菌株中 <i>trpEG</i> ^{S40F} 的表現	本研究

表3 本發明中所用的引子

命名	序列(5'->3')	SEQ ID NO.
Del-trpD-1	TAT GCC GTG TTG AAT GCC ATT	66
Del- trpD -2	CCC GGG ATC CAC TAA ACT TAA CAC AGT GTT GCT GGA GAA GTC AT	67
Del- trpD -3	TGT TTA AGT TTA GTG GAT CCC GGG GAA AAG GAG TCT TCC AAT GAC TAG	68
Del- trpD -4	CCA GAT CGACGT TTT CCT GGC	69
Ko-trpD -1	AAT CCT TTT TTT ACC TGC AGG GCT TAG TTC GCG AGA AGC TGT TCG	77
Ko-trpD -2	AAG GAG TCT TCC AAT GAC TAG	78
Del-csm-1	GTC TCC CCA ATC AAA TCA TCA	79
Del-csm-2	CCC GGG ATC CAC TAA ACT TAA ACA GTC ACC TGC ATT AGT CAT	80
Del-csm-3	TGT TTA AGT TTA GTG GAT CCC GGG CGC GGA AAA CTC	81



	GGA TAA	
Del-csm-4	TGA TGA TGT GCC CGT CCA CAG	82
Ko-csm-1	CTT GCC GAC GAG CGT AGA AAT	107
Ko-csm-2	GTT GAG GAC TAC CTT GAC TTG	108
Ex-csm1	GCC CTG CAG GAC GTG GCA GAA TAG TGT GCA TGA CTA ATG CAG GTG AC	83
Ex-csm2	GCC CTG CAG GAC GTG GCA GAA TAG TGT GCG TGA CTA ATG CAG GTG AC	84
Ex-csm3	GCC CTG CAG GAC GTG GCA GAA TAG TGT GCT TGA CTA ATG CAG GTG AC	85
Ex-csm4	GCC CTG CAG GAC GTG GCA GAA TAG ATG ACT AAT GCA GGT GAC	86
Ex-csm5	GCC CTG CAG GAC GTG GCA GAA TAG GTG ACT AAT GCA GGT GAC	87
Ex-csm6	GCC CTG CAG GAC GTG GCA GAA TAG TTG ACT AAT GCA GGT GAC	88
Ex-csm-rev	CCC GGG ATC CTT ATC CGA GTT TTC CGC GTC C	89
Ex-trpD1	GCC CTG CAG GTA AAA AAA GGA TTT GAT TCA TGA CTT CTC CAG CAA CAC TG	70
Ex- trpD2	GCC CTG CAG GTA AAA AAA GGA TTT GAT TCG TGA CTT CTC CAG CAA CAC TG	71
Ex- trpD3	GCC CTG CAG GTA AAA AAA GGA TTT GAT TCT TGA CTT CTC CAG CAA CAC TG	72
Ex- trpD4	GCC CTG CAG GTA AAA AAA GGA TTA TGA CTT CTC CAG CAA CAC TG	73
Ex- trpD5	GCC CTG CAG GTA AAA AAA GGA TTG TGA CTT CTC CAG CAA CAC TG	74
Ex- trpD6	GCC CTG CAG GTA AAA AAA GGA TTT TGA CTT CTC CAG CAA CAC TG	75
Ex-trpD-rev	CCC GGG ATC CCT AGT CAT TGG AAG ACT CCT T	76
Ex-aroG-1	GC CCT GCA GGA GAT CTG AAA GGA GGC CCT TCA GAT GAA TTA TCA GAA CGA CGA T	109
Ex-aroG-2	CCC GGG ATC CTT ACC CGC GAC GCG CTT TTA C	110
Ex-glnA -1	TTA GAG GAG ACA CCA TAT GGC GTT TGA AAC CCC GGA AGA	97
Ex-glnA -2	GAA CCA TGG GCT AGC CTC GAG TTA GCA GTC GAA GTA CAA TTC	98
Ex-aroL -1	GGC CCT GCA GGG AAA GGA GGC CCT TCA GAT GAC ACA ACC TCT TTT TCT GA	99
Ex-aroL -2	CCC GGG ATC CTC AAC AAT TGA TCG TCT GTG C	100
Ex-aroK -1	GGC CCT GCA GGG AAA GGA GGC CCT TCA GAT GAA TGA TCA AAT TCA CTT AG	101
Ex-aroK -2	CCC GGG ATC CTT AAT CGA TTT CTA GAT GAT GC	102

JK038f	ATT CGA GCT CGG TAC CCG GGG ATC CAC TAC ATC GAA ACC GGC ATC	103
JK039r	CTG AAC TCG AGT CAG CCA TGC TCC TTC TC	104
JK040f	GCA TGG CTG ACT CGA GTT CAG GGG CCT TGG GGC T	105
JK041r	TAG AAG CTT GCA TGC CTG CAG GCA GTG AGT CGA CCA GGC CAA AG	106

表4 本發明中所用及/或生成細菌菌株的oAB生產特徵(CDW：細胞乾重；
Y：產率； $\mu_{\max}$ ：最大生長率；STY：空間時間產率)

菌株	oAB 滴定 濃度 _{最終} (g/L)	CDW _{最終} (g/L)	$Y_{\text{oAB/Glc}}$ (g/g)	$Y_{\text{oAB/CDW}}$ (g/g)	$\mu_{\max}$ (h ⁻¹)	oAB STY (g/(L*h))	處理 時間 (h)
大腸桿菌::trpD9923	0.06	n.a.	0.01	n.a.	n.a.	0.002	26
大腸桿 菌::trpD9923 Δ hpr	0.07	n.a.	0.01	n.a.	n.a.	0.003	25
麴胺酸棒狀桿菌	0.00	14.5	0.00	0.00	0.16	0.00	26
麴胺酸棒狀桿菌 Δ trpD	1.07	8.78	0.02	0.12	0.19	0.02	47
麴胺酸棒狀桿菌 Δ csm	0.00	2.26	0.00	0.00	0.02	0.00	72
麴胺酸棒狀桿菌 Δ trpD Δ csm	0.00	2.41	0.00	0.00	0.03	0.00	72
麴胺酸棒狀桿菌 Δ trpD::trpD1	0.00	7.3	0.00	0.00	0.27	0.00	24
麴胺酸棒狀桿菌 Δ trpD::trpD2	0.00	7.0	0.00	0.00	0.28	0.00	24
麴胺酸棒狀桿菌 Δ trpD::trpD3	0.00	7.4	0.00	0.00	0.25	0.00	24
麴胺酸棒狀桿菌 Δ trpD::trpD5	4.50	18.9	0.08	0.24	0.12	0.10	45
麴胺酸棒狀桿菌 Δ trpD::trpD6	0.36	7.20	0.01	0.05	0.09	0.005	76
麴胺酸棒狀桿菌 Δ trpD::trpD5/pEKEx2	3.51	15.1	0.06	0.23	0.12	0.05	68
麴胺酸棒狀桿菌 Δ trpD::trpD5 Δ csm	0.26	7.3	0.01	0.04	0.21	0.04	44
麴胺酸棒狀桿菌 Δ trpD::trpD5 Δ ptsG	在標準發酵條件下無生長						
麴胺酸棒狀桿菌 Δ trpD::trpD5 Δ hpr	在標準發酵條件下無生長						
麴胺酸棒狀桿菌 Δ trpD::trpD5 Δ pepco	8.6	14.2	0.11	0.61	0.06	0.18	48



麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5Δgpi</i>	4.42	14.3	0.06	0.31	0.02	0.04	125
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5Δpyk</i>	5.34	19.4	0.07	0.30	0.05	0.10	55
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD/pEKEEx2-trpD1</i>	0.00	8.3	0.00	0.00	0.19	0.00	51
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD/pEKEEx2-trpD2</i>	0.00	7.9	0.00	0.00	0.21	0.00	51
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD/pEKEEx2-trpD3</i>	0.00	8.4	0.00	0.00	0.15	0.00	51
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD/pEKEEx2-trpD4</i>	0.00	8.5	0.00	0.00	0.13	0.00	51
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD/pEKEEx2-trpD5</i>	1.04	8.35	0.01	0.12	0.18	0.01	76
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD/pEKEEx2-trpD6</i>	1.02	8.90	0.02	0.11	0.15	0.02	54
麩胺酸棒狀桿菌 <i>Δcsm/pEKEEx2-csm1</i>	0.00	5.9	0.00	0.00	0.21	0.00	48
麩胺酸棒狀桿菌 <i>Δcsm/pEKEEx2-csm2</i>	0.00	6.5	0.00	0.00	0.22	0.00	48
麩胺酸棒狀桿菌 <i>Δcsm/pEKEEx2-csm3</i>	0.00	6.3	0.00	0.00	0.16	0.00	48
麩胺酸棒狀桿菌 <i>Δcsm/pEKEEx2-csm4</i>	0.00	7.1	0.00	0.00	0.20	0.00	48
麩胺酸棒狀桿菌 <i>Δcsm/pEKEEx2-csm5</i>	0.00	6.6	0.00	0.00	0.15	0.00	48
麩胺酸棒狀桿菌 <i>Δcsm/pEKEEx2-csm6</i>	0.00	6.5	0.00	0.00	0.12	0.00	48
麩胺酸棒狀桿菌 <i>/pEKEEx2-trpEG</i>	0.00	7.7	0.00	0.00	0.25	0.00	26
麩胺酸棒狀桿菌 <i>/pEKEEx2-trpEG^{S38F}</i>	0.03	8.1	0.002	0.003	0.26	0.008	26
麩胺酸棒狀桿菌 <i>/pEKEEx2-trpEG^{S38R}</i>	0.01	8.5	0.001	0.002	0.26	0.004	26
麩胺酸棒狀桿菌 <i>/pEKEEx2-trpEG^{S40F}</i>	0.01	7.9	0.0001	0.002	0.24	0.004	26
麩胺酸棒狀桿菌 <i>/pEKEEx2-trpEG^{S40R}</i>	0.01	8.2	0.001	0.002	0.25	0.004	26
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pEKEEx2-trpEG^{S40F}</i>	1.44	6.7	0.08	0.22	0.09	0.21	50
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pEKEEx2</i>	1.36	7.1	0.08	0.19	0.09	0.19	50

- <i>aroG</i> ^{D146N}							
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pEKEEx2</i> - <i>aroG</i> ^{D146N} - <i>trpEG</i> ^{S40F}	1.71	6.3	0.10	0.27	0.08	0.25	50
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5Δcsm</i> <i>pEKEEx2-aroG</i> ^{D146N} - <i>trpEG</i> ^{S40F}	1.56	6.8	0.09	0.23	0.15	0.26	44
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pEKEEx2</i> - <i>trpEG</i> ^{S40F} - <i>aroG</i> ^{D146N}	1.58	6.7	0.09	0.24	0.08	0.23	50
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pEKEEx2</i> - <i>aroK</i>	1.03	7.5	0.06	0.18	0.08	0.19	52
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pEKEEx2</i> - <i>aroL</i>	1.36	6.7	0.07	0.15	0.18	0.14	52
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pCRB21</i> 0	0.80	6.7	0.04	0.12	0.12	0.07	78
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pCRB-gl</i> <i>nA</i>	0.82	6.2	0.05	0.13	0.06	0.08	78
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5ΔptsG/p</i> <i>SB084</i>	0.10	10.2	0.03	0.01	0.01	0.0004	240
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5ΔptsG/p</i> <i>SB083</i>	1.10	8.20	0.06	0.13	0.01	0.006	192
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5Δhpr/pS</i> <i>B084</i>	0.12	9.60	0.06	0.01	0.01	0.001	71
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5Δhpr/pS</i> <i>B083</i>	在標準培育條件下無生長						
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pSB072</i>	3.48	15.8	0.05	0.22	0.04	0.05	75
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pSB073</i>	4.13	16.4	0.06	0.25	0.02	0.05	77
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pSB074</i>	4.99	16.2	0.07	0.31	0.07	0.10	50
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pSB075</i>	4.77	14.6	0.08	0.33	0.04	0.07	47

麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pSB076</i>	5.56	14.2	0.09	0.39	0.03	0.11	50
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pSB077</i>	4.85	16.8	0.07	0.29	0.04	0.09	53
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pSB078</i>	3.21	5.50	0.06	0.58	0.07	0.05	66
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pSB085</i>	4.18	15.2	0.06	0.30	0.03	0.05	72
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pSB086</i>	0.97	12.2	0.06	0.40	0.05	0.01	68
麩胺酸棒狀桿菌 <i>ΔtrpD::trpD5/pSB096</i>	3.23	7.20	0.05	0.45	0.03	0.05	66
臭味假單孢菌	0.00	n.a.	0.00	n.a.	0.50	0.00	24
臭味假單孢菌 <i>ΔtrpDC/pSEVA234</i>	0.14	n.a.	0.01	0.11	n.a.	n.a.	32
臭味假單孢菌 <i>ΔtrpDCΔpheA/pSEVA234</i>	0.04	n.a.	0.005	0.09	0.19	0.006	49
臭味假單孢菌/ <i>pSEVA234-aroG^{fbr}</i>	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
臭味假單孢菌/ <i>pSEVA234-trpEG^{S40F}</i>	0.00	n.a.	0.00	n.a.	0.44	0.00	32
臭味假單孢菌 <i>ΔtrpDC/ pSEVA234-aroG^{fbr}</i>	0.12	n.a.	0.01	0.09	n.a.	0.004	32
臭味假單孢菌 <i>ΔtrpDC/ pSEVA234-trpEG^{S40F}</i>	0.25	n.a.	0.02	0.11	0.40	0.005	47
臭味假單孢菌 <i>ΔtrpDCΔpheA/ pSEVA234-aroG^{fbr}</i>	0.09	n.a.	0.01	0.05	n.a.	0.002	38
臭味假單孢菌 <i>ΔtrpDCΔpheA/ pSEVA234-trpEG^{S40F}</i>	0.12	n.a.	0.01	0.22	0.28	0.002	47

實例5-在細胞留滯的情況下於連續發酵槽中培育麩胺酸棒狀桿菌菌株

【0188】 連續發酵用於生產鄰胺苯甲酸鹽以達到最佳化空間時間產率。在連續發酵期間運用細胞留滯系統，以便在不增加饋料溶液之葡萄糖濃度的情況下增加生質濃度。兩種不同系統以實驗室規模被使用於細胞留滯實驗中：截量值為750 kDa之JM Water Separations (WaterSep Technology

Corporation, Marlborough, MA, USA)的中空纖維過濾模組，以及Pneumatic Scale Angelus (Allen Road, Stow, OH, USA)的可拋棄式離心機(Centrifuge Lab III)。兩種系統連結至1 L實驗室規模生物反應器(OmniFerm, HiTec Zang, Herzogenrath, Germany)。過濾模組的合併顯示於圖30中，而離心機的合併顯示於圖31中。

菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ 的連續發酵

【0189】 在填充50 mL無菌BHIS培養基(含有37 g/L腦心浸出液(BHI)與91 g/L山梨糖醇)的無菌250 mL錐形瓶中，製備麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ (參見表2)的預培養物。在28°C下以140 rpm震盪頻率培育產生OD₆₀₀為6.0。將體積9 mL的培養物轉移至91 mL新鮮CGXII-MOPS衍生之培養基，該培養基含有42 g/L MOPS緩衝劑、20 g/L (NH₄)₂SO₄、5 g/L脲、3.7 g/L腦心浸出液、9.1 g/L山梨糖醇、1 g/L KH₂PO₄、1 g/L K₂HPO₄、0.25 g/L MgSO₄·7H₂O、0.01 g/L CaCl₂及10 g/L葡萄糖(分別經高壓殺菌)。在無菌過濾後添加下列組分：2 mg/L 生物素、0.1 mM L-色胺酸、0.01 g/L MnSO₄·H₂O、0.01 g/L FeSO₄·7H₂O、1 mg/L ZnSO₄·7H₂O、0.2 mg/L CuSO₄·5H₂O、0.02 mg/L NiCl₂·6H₂O及0.03 g/L 3,4-二羥基苯甲酸。於28°C、140 rpm的震盪頻率下，在500 mL錐形瓶中培育100 mL培養物體積歷時24h產生18.7的OD₆₀₀。離心27 mL的培養物體積，丟棄上清液並將丸粒再懸浮於25 mL無菌等張PBS緩衝液中。將懸浮液注射至具有1 L無菌CGXII衍生之培養基的發酵槽中，該培養基含有20 g/L (NH₄)₂SO₄、1 g/L KH₂PO₄、1 g/L K₂HPO₄、0.25 g/L MgSO₄·7H₂O、0.01 g/L CaCl₂、100 μ L/L聚丙二醇及10 g/L葡萄糖(分別經高壓殺菌)。在無菌過濾後添加下列組分：2 mg/L生物素、0.1 mM L-色胺酸、0.01 g/L MnSO₄·H₂O、0.01 g/L FeSO₄·7H₂O、1 mg/L ZnSO₄·7H₂O、0.2 mg/L CuSO₄·5H₂O、0.02 mg/L NiCl₂·6H₂O及0.03 g/L 3,4-二羥基苯甲酸。相同培養基在連續操作期間用於饋料。藉由調整攪拌速率介於200與1200 rpm將溶氧濃度控制在30%。調整恆定氣體流速為0.2 l/h空氣用於通氣，而以1 M NH₄OH將pH控制在pH 7。發酵結果顯示於圖32中。在前24 h的批次期期間，葡萄糖被消耗且生質與oAB被生產。在24 h的培育時間之後，藉由饋送50 mL/h無菌培養基並且清洗包括生質與oAB的50 mL/h發酵液將發酵槽切換

成連續操作。在連續培育期間達到oAB的恆定生產。在100 h的培育時間後，如圖30中所指定使用交叉流超過濾啟動細胞留滯。如圖32中所示，透過細胞留滯達到細胞乾重增加。

菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta gpi$ 的連續發酵

【0190】 在填充50 mL無菌BHIS培養基(含有37 g/L腦心浸出液(BHI)與91 g/L山梨糖醇)的無菌250 mL錐形瓶中，製備麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD::trpD5\Delta gpi$ (參見表2)的預培養物。在28°C下以140 rpm震盪頻率的培育歷時24 h產生OD₆₀₀為8.2。將10 mL的培養物體積轉移至90 mL CGXII-MOPS衍生之培養基，該培養基含有42 g/L MOPS緩衝劑、20 g/L (NH₄)₂SO₄、5 g/L脲、3.7 g/L腦心浸出液、9.1 g/L山梨糖醇、1 g/L KH₂PO₄、1 g/L K₂HPO₄、0.25 g/L MgSO₄·7H₂O、0.01 g/L CaCl₂及10 g/L葡萄糖(分別經高壓殺菌)。在無菌過濾後添加下列組分：2 mg/L生物素、0.01 g/L MnSO₄·H₂O、0.01 g/L FeSO₄·7H₂O、1 mg/L ZnSO₄·7H₂O、0.2 mg/L CuSO₄·5H₂O、0.02 mg/L NiCl₂·6H₂O及0.03 g/L 3,4-二羥基苯甲酸。於30°C、300 rpm的震盪頻率下，在兩個250 mL錐形瓶中培育100 mL培養物體積歷時24h產生20.5的OD₆₀₀。將55 mL培養液體積注射至具有1 L CGXII衍生之培養基的發酵槽中，該培養基含有20 g/L (NH₄)₂SO₄、1 g/L KH₂PO₄、1 g/L K₂HPO₄、0.25 g/L MgSO₄·7H₂O、0.01 g/L CaCl₂、100 μL/L聚丙二醇2000及10 g/L葡萄糖(分別經高壓殺菌)。在無菌過濾後添加下列組分：2 mg/L生物素、0.01 g/L MnSO₄·H₂O、0.01 g/L FeSO₄·7H₂O、1 mg/L ZnSO₄·7H₂O、0.2 mg/L CuSO₄·5H₂O、0.02 mg/L NiCl₂·6H₂O及0.03 g/L 3,4-二羥基苯甲酸。一個更濃的培養基用於饋料，其包含20 g/L (NH₄)₂SO₄、10 g/L KH₂PO₄、10 g/L K₂HPO₄、2.5 g/L MgSO₄·7H₂O、0.1 g/L CaCl₂、2 mL/L聚丙二醇2000及100 g/L葡萄糖(分別經高壓殺菌)。在無菌過濾後添加下列組分：20 mg/L生物素、0.1 g/L MnSO₄·H₂O、0.1 g/L FeSO₄·7H₂O、10 mg/L ZnSO₄·7H₂O、2 mg/L CuSO₄·5H₂O、0.2 mg/L NiCl₂·6H₂O及0.3 g/L 3,4-二羥基苯甲酸。藉由調整攪拌速率介於200與1400 rpm將溶氧濃度控制在30%。調整恆定氣體流速為0.2 l/h空氣用於通氣，而以1 M NH₄OH將pH控制在pH 7。發酵結果顯示於圖33中。在前40 h內的批次期期間，葡萄糖被消耗且生質與oAB被生產。在40 h

的培育時間之後，藉由饋送10 mL/h培養基並且清洗包括生質與oAB的10 mL/h發酵液將發酵槽切換成連續操作。在連續操作開始時，生質濃度並未高到足以完全消耗饋料溶液中所添加的葡萄糖，造成葡萄糖在反應器中累積，如圖33中所示。在136 h後，細胞濃度高到足以完全消耗所添加的葡萄糖。如圖31中所示使用離心機在184 h後啟動細胞留滯。如圖33中所示，透過細胞再循環達到細胞乾重增加。在400 h連續發酵期間，達到oAB的連續生產。

菌株麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ 使用複合碳源的連續發酵

【0191】 在填充50 mL無菌BHIS培養基(含有37 g/L腦心浸出液(BHI)與91 g/L山梨糖醇)的無菌250 mL錐形瓶中，製備麩胺酸棒狀桿菌 $\Delta trpD$ (參見表2)的預培養物。在28°C下以140 rpm震盪頻率的培育歷時24 h產生OD₆₀₀為7.53。將7 mL的培養物體積轉移至93 mL新鮮CGXII-MOPS衍生之培養基，該培養基含有42 g/L MOPS緩衝劑、20 g/L (NH₄)₂SO₄、5 g/L 脲、3.7 g/L 腦心浸出液、9.1 g/L山梨糖醇、1 g/L KH₂PO₄、1 g/L K₂HPO₄、0.25 g/L MgSO₄·7H₂O、0.01 g/L CaCl₂及10 g/L葡萄糖(分別經高壓殺菌)。在無菌過濾後添加下列組分：2 mg/L生物素、0.1 mM L-色胺酸、0.01 g/L MnSO₄·H₂O、0.01 g/L FeSO₄·7H₂O、1 mg/L ZnSO₄·7H₂O、0.2 mg/L CuSO₄·5H₂O、0.02 mg/L NiCl₂·6H₂O及0.03 g/L 3,4-二羥基苯甲酸。於28°C、140 rpm的震盪頻率下，在500 mL錐形瓶中培育100 mL培養物體積歷時24h產生21.3的OD₆₀₀。離心25 mL的培養物體積，丟棄上清液並將丸粒再懸浮於25 mL無菌等張PBS緩衝液中。將懸浮液注射至具有1 L無菌CGXII衍生之培養基的發酵槽中，該培養基含有20 g/L (NH₄)₂SO₄、1 g/L KH₂PO₄、1 g/L K₂HPO₄、0.25 g/L MgSO₄·7H₂O、0.01 g/L CaCl₂、100 μ L/L聚丙二醇2000及10 g/L葡萄糖(分別經高壓殺菌)。在無菌過濾後添加下列組分：2 mg/L生物素、0.1 mM L-色胺酸、0.01 g/L MnSO₄·H₂O、0.01 g/L FeSO₄·7H₂O、1 mg/L ZnSO₄·7H₂O、0.2 mg/L CuSO₄·5H₂O、0.02 mg/L NiCl₂·6H₂O及0.03 g/L 3,4-二羥基苯甲酸。相同培養基在連續操作頭772小時期間用於饋料(饋料培養基1)。772小時之後，饋料組成物變成饋料培養基2，饋料培養基2含有40 g/L (NH₄)₂SO₄、0.5 g/L KH₂PO₄、5 mL/L 玉米浸出液(Sigma Aldrich, C4648，批號：

MKBP5720V)、1 mL/L 聚丙二醇、267 g/L 葡萄糖漿(Cargill C*Sweet D02767, 批號: 03285882), 分別經高壓殺菌, 以在饋料溶液中達到200 g/L 的最終葡萄糖濃度與0.1 mM L-色胺酸(經無菌過濾且在高壓殺菌後被添加)。藉由調整攪拌速率介於200與1200 rpm將溶氧濃度控制在30%。調整恆定氣體流速為0.2 l/h空氣用於通氣, 而以1 M NH_4OH 將pH控制在pH 7。使用饋料培養基2的連續發酵結果顯示於圖34中。未顯示使用饋料培養基1的連續發現前772 h。如圖30中所指定使用交叉流超過濾達到連續細胞留滯, 且如圖34中所示在培育期間達到鄰胺苯甲酸鹽的連續生產。因為葡萄糖累積, 如在圖34中所指透過停止期暫時中斷連續操作。饋料及收取在葡萄糖位準降低之後重新啟動。

實例6-鄰胺苯甲酸(AA)的吸附/去吸附

【0192】 為取得溶液濃度更高的鄰胺苯甲酸(AA)溶液, 藉由實施吸附-去吸附操作將AA由水溶液轉移至有機溶劑中。為了這樣做, 測試AA在不同類型吸附劑上的吸附力。

【0193】 選擇沸石Y (Zeolyst International, 目錄號CBV600)及ZSM5 (Süd-Chemie/Clariant, 目錄號H-MFI-27)作為沸石, 其作為用於不同分子的分子篩。因為羥基磷灰石($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) (Sigma-Aldrich catalog no. 289396)於不同溶劑中吸附AA以及其他類似化合物的能力, 測試羥基磷灰石。

【0194】 吸附測試: 已在300°C下煅燒吸附劑歷時3小時, 以便釋放出任何殘餘的水分。製備AA在水中的溶液(0.5 wt%)。20 mL的此溶液被轉移至含有0.2 g吸附劑的50 mL燒瓶。在攪拌某段時間後, 藉由HPLC分析AA在水中的濃度。在水中AA濃度降低被認為是吸附AA。

【0195】 合成經金屬交換的沸石: 考慮到併入Ca之沸石的吸附力增進(採用W. H. Goodman, US 4910336, 1990), 藉由離子交換製備要在AA吸附中測試之經Ca交換的沸石(S. M. Seo, S. Y. Coi, J. M. Suh, K. J. Jung, N. H. Heo and W. T. Lim, Bull. Korean Chem. Soc. 2009, 30:1703)。將如粉末的3 g沸石添加至 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 的溶液(0.5 M)中。攪拌漿液4小時並接著以新鮮溶液置換溶液, 且重複這個程序又兩次。最後, 藉由離心分離固體並在80

℃下乾燥，且在300℃下煅燒歷時3 h。以如上解釋的相同方法製備使用K、Na、Mg與Fe的四種其他經金屬交換之沸石Y樣品。然後將樣品標記K-Y、Na-Y、Ca-Y、Mg-Y及Fe-Y。沸石H-ZSM5的孔徑可在0.4-0.6 nm範圍內，較佳為0.5 nm。沸石H-Y的孔徑可在0.6 nm -0.9 nm範圍內，較佳為0.7-0.9 nm (例如，如得自Zeolyst International，目錄號CBV600者)。

【0196】 使用上文提及的吸附劑實施AA的吸附測試。這些測試的結果顯示於表6中。

表6：AA 0.5%的吸附

吸附劑	HAP	H-ZSM5	H-Y	Na-Y	K-Y	Mg-Y	Ca-Y	Fe-Y
吸 附 力 (gAA / kg 吸附劑)	10.8 g/kg	11.6 g/kg	24.8 g/kg	25.0 g/kg	27.4 g/kg	27.6 g/kg	36.8 g/kg	51.2 g/kg

【0197】 沸石Y顯示從水溶液吸附AA的能力最高。經Ca交換之沸石Y可以增進AA吸附達近50%。經Fe交換的沸石Y可增進AA吸附近倍增。使用AA溶液在蒸餾水中還有在含有(NH₄)₂SO₄ (20 g/L)、Na₂HPO₄ (1 g/L)、KH₂PO₄ (1 g/L)與MgSO₄ (0.25 g/L)的緩衝液中實施測試。之後，MgSO₄自緩衝液消除，因為其形成不可溶鄰胺苯甲酸鎂鹽。在以上經金屬交換的沸石中，Fe-Y顯示最高的AA吸附力(高於50 g AA/ kg Fe-Y)。幸運的是，緩衝液內容物不影響AA吸附且吸附力與在蒸餾水中相似。在吸附測試之後，Fe-Y樣品的IR光譜顯示AA的一些特徵峰，其可能是AA存在於Fe-Y表面上的證據，最有可能是與Fe螯合。

表7：在接觸10分鐘及60分鐘之後，經金屬交換之沸石Y在蒸餾水與緩衝水溶液中的AA吸附力^a

吸附劑	Na-Y	K-Y	Mg-Y	Ca-Y	Fe-Y
蒸餾水(10 分鐘)	24.2	29.6	29.2	36.2	50.6
蒸餾水(60 分鐘)	22.6	31.6	34	42.2	54.2
緩衝溶液(10 分鐘)	25	27.4	27.6	36.8	51.2



緩衝溶液(60 分鐘)	25.9	22.3	22.8	25.6	45.3
-------------	------	------	------	------	------

^a g AA/kg吸附劑

【0198】 藉由ICP-MS分析吸附測試之後的Fe-Y與新鮮Fe-Y樣品。這個分析顯示，Fe/Al比在兩種樣品中分別為1.25與1.3，彼此非常接近。因此，Fe過濾量可以忽略。在Ca-Y的情況中，於吸附測試之後偵測到64% Ca過濾。

【0199】 於至高550°C的溫度下，使用配備有質量分析儀的熱重量分析儀(TGA-MS)研究在Fe-Y上去吸附的AA的解離。如可在圖7中所見，在低於400°C的溫度下無ANL形成。在高於400°C下，AA直接解離成聚苯胺，其在樣品夾上觀察到為暗色物質。在高於400°C偵測到少量ANL。因此，吸附在吸附劑上的AA直接熱轉化成ANL並不成功。

AA自吸附劑去吸附至液相中

【0200】 AA自Fe-Y至水中的去吸附測試顯示，在水溶液中AA因為經金屬交換的沸石而去吸附是可逆的。之後，測試AA至有機溶劑中的去吸附。1-十二醇被選作為有機溶劑，因為AA在其中有高溶解度且其在水中互溶性極低(0.004 g/L)。此外，其沸點(259°C)比苯胺(183°C)與水高的多，以使得其自最終混合物的分離更為方便。AA自Fe-Y至1-十二醇中的去解離是藉由將含有10.8 mg AA的0.2 g Fe-Y懸浮於2 mL 1-十二醇中來實施。在25-120°C的溫度範圍下攪拌漿液歷時0.5 h。去吸附結果顯示於圖8中，其中最高27.8% AA在120°C下可去吸附至1-十二醇中。

實例7-鄰胺苯甲酸在有機溶劑中藉由熱去羧化之去羧化的反應動力學

AA溶解於1-十二醇中的去羧化

【0201】 在160°C下測試溶解於1-十二醇中的AA 3 wt%的去羧化。篩選具有不同特徵的催化劑。可在圖9中看到結果。沒有任何催化劑的空白測試僅顯示1.4%轉化，而在沸石Y (CBV600, 「GO257」)存在下於1h內產生超過70%轉化成ANL。

【0202】 在沸石Y (CBV600, 「GO257」)上的高AA轉化可能是因為其高度酸性特徵還有孔徑(0.7-0.8 nm)。ZSM5 (MFI-27)儘管具有酸性特徵，但具有孔徑更小(0.5 nm)，使得AA分子無法穿透它們並無法靠近活性位點。羥基磷灰石(HTC, Mg₆Al₂(CO₃)(OH)₁₆·4H₂O)具有鹼性特徵與低AA轉化

率，指明鹼性位點在AA去羧化時不像酸性位點具有活性。向沸石H-Y (「GO257」)添加Na會降低其酸性並因此達到低AA轉化率。氨形式(CBV500, 「GO55」)也具有比H-Y (CBV600, 「GO257」)更低數目的酸性部位。

【0203】 如可在圖10中所見，於160°C及180°C下，在1-十二醇中的AA去羧化曲線顯示，AA轉化及ANL形成遵循零級動力學。在160°C及180°C下反應的模擬模型可計算出速率常數(k)分別為0.235 mol L⁻¹.h⁻¹及0.522 mol.L⁻¹.h⁻¹。這些反應對ANL的選擇性為100%且觀察到質量平衡為95-110% (平均為100.4%)。

AA溶解於苯胺中的去羧化

【0204】 對於AA來說，苯胺是一個比十二醇好得多的溶劑，也是去羧化產物，其用途相較於1-十二醇呈現出更多益處。吾人發現，在室溫(20°C)下至多30% AA可溶解於苯胺中，在室溫(50°C)下至多40% AA可溶解於苯胺中而在90°C下至多50%可溶解。

【0205】 在160°C、180°C及200°C下測試AA 40 wt%溶解於苯胺中的去羧化。無任何催化劑的空白測試顯示如前可忽略的轉化，同時在沸石Y (CBV600, 「GO257」)存在下於2h內產生超過99%轉化成ANL。結果顯示於圖35中。吾人亦能依據簡單動力學模型來擬合數據：

$$r \left(\frac{g_{ANL}}{g_{CAT} h} \right) = k^0 \exp \left(-\frac{E_a}{RT} \right) AA^n$$

其中「 r 」為以g苯胺/g催化劑/小時計的反應速率，「 k^0 」為同樣以g苯胺/g催化劑/小時計的動力學常數，「 E_a 」為以kJ/mol計的反應活化能，「 R 」為理想氣體常數8.31 J / K mol，「 T 」為以K計的溫度，「AA」為AA濃度而「 n 」為反應級數。圖35亦顯示在不同溫度下此反應模型的擬合。擬合結果概括如下：

$$k^0 = 55492 \text{ g AN / g CAT h}$$

$$E_a = 37.4 \text{ kJ/mol}$$

$$n = 0.16$$

【0206】 圖35顯示於催化劑存在下，2-胺基苯甲酸(鄰胺苯甲酸，AA)

在苯胺中的解離。於沸石Y存在下，顯示於160°C、180°C及200°C下在苯胺中溶解40 wt%的鄰胺苯甲酸(AA)的去羧化動力學。

【0207】 鄰胺苯甲酸(40 wt%)溶解於苯胺中。在這個濃度下，該酸較佳在加熱至約50°C時溶解於有機溶劑中。80 mL的上述溶液接著被轉移至160 mL高壓釜中，添加1.5 g沸石催化劑並加熱至160°C、180°C或200°C。以不同時間間隔取得樣品並藉由HPLC法分析以測定苯胺形成速率。

溶解於苯胺中的AA於水存在下的去羧化

【0208】 因為從結晶製程分離的鄰胺苯甲酸可能存在一些殘餘水分(約10%)，吾人決定在水存在下檢驗反應動力學。執行類似於先前實驗的實驗，除了特意添加10 wt%水至反應混合物中。吾人發現到，整體動力學及反應型態維持不辨。反應溫度200°C的結果呈現於圖36中。

【0209】 圖36顯示在催化劑存在下2-胺基苯甲酸(鄰胺苯甲酸，AA)於苯胺中的解離。顯示在200°C下於沸石Y存在下，40 wt%溶解於苯胺中以及10%水-90%苯胺中的鄰胺苯甲酸(AA)的去羧化動力學。

【0210】 鄰胺苯甲酸(40 wt%)溶解於苯胺中。在加熱至約50°C後，酸在這個濃度下完全可溶於有機溶劑中。80 mL的上述溶液之後被轉移至160 mL高壓釜中，然後添加10% (8 g)水，添加1.5 g沸石催化劑並加熱至160°C、180°C或200°C。以不同時間間隔取得樣品並藉由HPLC法分析以測定苯胺形成速率。

溶解於來自不同有機來源之苯胺中的AA去羧化

【0211】 依據本發明，鄰胺苯甲酸可藉由發酵不同糖介質而以生物方式被生產。預期存在於不同介質(亦即水解玉米澱粉、甘蔗汁或葡萄糖)中的微量元素差異可能影響鄰胺苯甲酸進一步去羧化成苯胺。為驗證這些差異是否會干擾催化劑以及去羧化反應，測試透過結晶作用測試自不同生長介質所分離的不同鄰胺苯甲酸。總是相對於購自實驗室供應商Sigma Aldrich的化學純鄰胺苯甲酸來進行比較。

【0212】 在與先前測試相同的條件下從180°C下測試在苯胺中之40% AA溶液開始，測試不同AA。結果歸納於圖36中。所有AA來源在少於90分鐘內完全被轉化成苯胺。最快的轉化是由純化學原料(Aldrich)所顯示。這與

透過發酵化學純葡萄糖(VN35)所生產的材料相當。略低者為分離自水解玉米澱粉(VN32及33)的原料，之後為分離自甘蔗汁(VN34)的材料。這個順序遵循所用培養基的精製程度。最純的糖源，自其分離而來的AA產生最快的解離。這可以由存在微量元素來解釋，微量元素為例如離子或礦物質，其可能干擾沸石催化劑。但是，效用有限以致於不會干擾相當快速進展至完成的去羧化反應，與AA來源無關。

【0213】 圖37顯示於催化劑存在下，2-胺基苯甲酸(鄰胺苯甲酸，AA)在苯胺中的解離。於沸石Y存在下，顯示於180°C下在苯胺中溶解40 wt%的鄰胺苯甲酸(AA)的去羧化動力學。

【0214】 鄰胺苯甲酸是由不同糖介質(像是化學純葡萄糖、水解玉米澱粉及甘蔗汁)的結晶作用所獲得。所得經分離鄰胺苯甲酸(40 wt%)溶解於苯胺中。在這個濃度下，酸於加熱至50°C後完全可溶於有機溶劑中。80 mL的上述溶液被轉移至160 mL高壓釜中，添加1.5 g沸石催化劑並加熱至180°C。以不同時間間隔取得樣品並藉由HPLC法分析以測定苯胺形成速率。用以溶解於苯胺中之來自水解玉米澱粉的AA的去羧化的催化劑穩定性

【0215】 考慮到前面觀察到微量元素的影響，吾人在數個運行中測試催化劑穩定性。遵照前述反應程序，吾人藉由再循環催化劑並藉由將其使用於下列反應而不經任何洗滌步驟來實施。結果呈現於圖38中。新鮮製備之催化劑與再利用催化劑之間的活性差異極微。再利用催化劑似乎比新鮮系統更快或更好。這顯示微量元素對於催化劑沒有毒化或抑制效用，其在去羧化反應中仍保留活性。為進一步驗證，吾人事後(post mortem)分析催化劑並且將其與新鮮製備的催化劑相比較。2種催化劑的IR光譜顯示於圖39中。除了一些吸收的苯胺物質以外，OH訊號僅呈現有少量減少。這個OH可再與其他離子(微量元素)交換之後被抑制，但是它們可能不是用於催化的活性位點，因為沸石的強烈酸性是來自於Al-O-Si橋。

【0216】 圖38顯示於催化劑存在下，2-胺基苯甲酸(鄰胺苯甲酸，AA)在苯胺中的解離。於沸石Y存在下，顯示於180°C下在苯胺中溶解40 wt%的鄰胺苯甲酸(AA)的去羧化動力學。

【0217】 鄰胺苯甲酸是由水解玉米澱粉的結晶作用所獲得。所得經分離鄰胺苯甲酸(40 wt%)溶解於苯胺中。在這個濃度下，酸加熱至約50°C後完

全可溶於有機溶劑中。80 mL的上述溶液然後被轉移至160 mL高壓釜中，添加1.5 g沸石催化劑並加熱至180°C。分離並回收催化劑並再循環用於後續反應而沒有進一步處理或洗滌。以不同時間間隔取得樣品並藉由HPLC法分析以測定苯胺形成速率。

【0218】 圖39顯示新鮮製備的H-Y催化劑及在如上述使用分離自水解玉米澱粉之AA的反應之後的H-Y催化劑的IR光譜。標記苯胺的典型帶。這個高度鹼性物質確實發生吸收。也強調出OH區。OH訊號降低與一些可能與存在微量元素時部分離子交換的發生相當，然而OH基團在催化中似乎不是活化的，原因可能是Al-O-Si橋。

實例8 來自發酵液之oAB的溶解與結晶

【0219】 產業糖源用於麩胺酸棒狀桿菌的發酵。100 ml培養液具有內含物21,5 g/L葡萄糖，3,7 g/L乳糖與10g鄰胺苯甲酸於250 ml實驗室反應器中混合。漿液具有4.7的pH值。在室溫、pH 4.5下，oAB的溶解度為約4.5 g/L。之後，以4等分添加9.12 g NaOH (32%)直到出現溶液。溶液具有8.3的pH值。在1小時內添加7, g HCl (37%)。藉由給予HCl，自5.8的pH值出現第一個成核作用。在給予期間晶體數目增加。在給予結束時，懸浮液具有3.6的pH值。之後，攪拌漿液歷時1小時。最後，過濾漿液。

過濾

【0220】 依據VDI指引「VDI 2762」，在0.2巴及12.6 cm²的過濾器面積下實施過濾。過濾125 g懸浮液並以25 g水洗滌。測量91 g母液及23.1 g濕固體。依據「VDI 2762」測定的濾餅抗性為約5 x 10¹⁰ l/m²。在乾燥爐中乾燥濾餅。在乾燥之後，測量9.1 g的乾燥固體，對應於91%產率。

【0221】 母液中的鄰胺苯甲酸部分為0.72%。測量固體的灰分作為鄰胺苯甲酸之鹽含量的指標。灰分測量為0.55%。

實例9- oAB在1-十二醇中的溶解度

【0222】 在溫度增加的情況下測試oAB在十二醇中的溶解度。

SLE=固體液體平衡

SLE oAB / 1-十二醇							

投入 1-十二醇							
完全=	270,74	g					
空=	170,67	g					
澄清=	100,07	g					
投入 oAB:							
編號	目標	完全	空	澄清	總和	濃度	溫度
	g	g	g	g	g	wt %	°C
1	5	25,49	20,36	5,13	5,13	4,88	40
2	10	30,36	20,41	9,95	15,08	13,10	68
3	15	35,22	20,32	14,90	29,98	23,05	93
4	25	53,81	29,10	24,71	54,69	35,34	111
5	25	53,51	28,87	24,64	79,33	44,22	119
6	25	53,72	29,19	24,53	103,86	50,93	123

【0223】 oAB在1-十二醇中的溶解度隨著溫度升高而增加。

【符號說明】

無

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

無

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

無

【序列表】(請換頁單獨記載)

序列表

- <110> 拜耳材料科學股份有限公司
Bayer MaterialScience AG
- <120> 生產鄰-胺基苯甲酸鹽之重組菌株及來自經由2-胺基苯甲酸之再生資源發酵生產苯胺
- <130> BMS131142 WO
- <150> EP14155936.9
- <151> 2014-02-20
- <160> 110
- <170> PatentIn第3.5版
- <210> 1
- <211> 1047
- <212> DNA
- <213> 麩胺酸棒狀桿菌

<400> 1	
atgacttctc cagcaacact gaaagtcttc aacgcctact tggataaccc cactccaacc	60
ctggaggagg caattgaggt gtacaccccg ctgaccgtgg gtgaatacga tgacgtgcac	120
atcgcagcgc tgcttgccac catccgtact cgcggtgagc agttcgctga tattgccggc	180
gctgccaagg cgttcctcgc ggcggctcgt ccgttcccga ttactggcgc aggtttgcta	240
gattccgctg gtactgggtgg cgacgggtgcc aacaccatca acatcaccac cggcgcatcc	300
ctgatcgag catccgggtgg agtgaagctg gttgaagcag gcaaccgttc ggtgagctcc	360
aagtccggct ccgccgatgt gctggaagcg ctgaatattc ctttgggcct tgatgtggat	420
cgtgctgtga agtggttcga agcgtccaac ttacaccttc tgttcgcacc tgcgtacaac	480
cctgcgattg cgcattgtga gccggttcgc caggcgctga aattccccac catcttcaac	540
acgcttggac cattgctgtc cccggcgcg cccgagcgctc agatcatggg cgtggccaat	600
gccaatcatg gacagctcat cgccgaggtc ttccgcgagt tgggccgtac acgcgcgctt	660
gttgtgcatg ggcagggcac cgatgagatc gcagttccacg gcaccacctt ggtgtgggag	720
cttaaagaag acggcaccat cgagcattac accatcgagc ctgaggacct tggccttggc	780
cgctacaccc ttgaggatct cgtagggtggc ctccggcactg agaacgccga agctatgcgc	840
gtacttttcg cgggcaccgg ccctgatgca caccgtgatg cgttggctgc gtccgcaggt	900
gcgatgttct acctcaacgg cgatgtcgac tccttgaaag atggtgcaca aaaggcgctt	960
tccttgcttg ccgacggcac caccaggca tggttggcca agcacgaaga gatcgattac	1020

tcagaaaagg agtcttccaa tgactag 1047

<210> 2
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工建構物

<400> 2
atgacttctc cagcaacact gtgtttaagt ttagtggatc ccggggaaaa ggagtcttcc 60
aatgactag 69

<210> 3
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工建構物

<400> 3
gccctgcagg taaaaaaagg atttgattca tg 32

<210> 4
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工建構物

<400> 4
gccctgcagg taaaaaaagg atttgattcg tg 32

<210> 5
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工建構物

<400> 5
gccctgcagg taaaaaaagg atttgattct tg 32

<210> 6



<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工建構物	
<400>	6	
gccctgcagg	taaaaaaagg attatg	26
<210>	7	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工建構物	
<400>	7	
gccctgcagg	taaaaaaagg attgtg	26
<210>	8	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工建構物	
<400>	8	
gccctgcagg	taaaaaaagg attttg	26
<210>	9	
<211>	312	
<212>	DNA	
<213>	麴胺酸棒狀桿菌	
<400>	9	
gtgtgcatga	ctaattgcagg tgacaacttc gagatcagga tgccttctgg cacggatgac	60
ccattgtccg	atgcggagat ccaaaagtat cgcgaggaga tcaaccgctt ggaccgcgaa	120
atcctcgatg	cgggtgaaacg ccgcacgaag atttcccaaa ccatcggaaa aacacgcatg	180
agctcgggcg	gaacacgtct cgtgcacacc cgagaagtag caatcatcaa ccaattccgt	240
gaagagatcg	gcgaggaagg ccctgccctc gctggaattt tgctgcgcat gggacgcgga	300
aaactcggat	aa	312
<210>	10	

<211>	60	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工建構物	
<400>	10	
	atgactaatg caggtgactg tttaagttta gtggatcccg ggcgcggaaa actcggataa	60
<210>	11	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	11	
	gccctgcagg acgtggcaga atagtgtgca tg	32
<210>	12	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	12	
	gccctgcagg acgtggcaga atagtgtgcg tg	32
<210>	13	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	13	
	gccctgcagg acgtggcaga atagtgtgct tg	32
<210>	14	
<211>	27	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	



<400> 14
gccctgcagg acgtggcaga atagatg 27

<210> 15
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 15
gccctgcagg acgtggcaga ataggtg 27

<210> 16
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 16
gccctgcagg acgtggcaga atagttg 27

<210> 17
<211> 270
<212> DNA
<213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 17
atggcttcca agactgtaac cgtcggttcc tccgttggcc tgcacgcacg tccagcatcc 60
atcatcgctg aagcggctgc tgagtacgac gacgaaatct tgctgaccct ggttggctcc 120
gatgatgacg aagagaccga cgcgtcctct tccctcatga tcatggcgct gggcgcagag 180
cacggcaacg aagttaccgt cacctccgac aacgctgaag ctgttgagaa gatcgtgcg 240
cttatcgcac aggaccttga cgctgagtaa 270

<210> 18
<211> 63
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 18
atggcttcca agactgtaac ctgtttaagt ttagtggatg ggcaggacct tgacgctgag 60

taa 63

<210> 19
<211> 2052
<212> DNA
<213> 麩胺酸棒狀桿菌

<400> 19
atggcgtcca aactgacgac gacatcgcaa catattctgg aaaaccttgg tggaccagac 60
aatattactt cgatgactca ctgtgcgact cgccttcgct tccaagtga ggatcaatcc 120
attgttgatc aacaagaaat tgactccgac ccatcagttc ttggcgtagt accccaagga 180
tccaccggta tgcaggtagt gatgggtgga tctgttgcaa actattacca agaaatcctc 240
aaacttgatg gaatgaagca cttcgccgac ggtgaagcta cagagagttc atccaagaag 300
gaatacggcg gagtccgtgg caagtactcg tggattgact acgccttcga gttcttgtct 360
gatactttcc gaccaatcct gtgggccctg ctgtgtgcct cactgattat taccttgttg 420
gttcttgcgg atactttcgg ttgtcaagac ttccgcgctc caatggatga gcagcctgat 480
acttatgtat tcctgcacac catgtggcgc tcggtcttct acttcctgcc aattatggtt 540
ggtgccaccg cagctcgaaa gctcggcgca aacgagtgga ttggtgcagc tattccagcc 600
gcacttctta ctccagaatt ctgtggcactg ggttctgccg gcgataccgt cacagtcttt 660
ggcctgccaa tggttctgaa tgactactcc ggacaggtat tcccaccgct gattgcagca 720
attggtctgt actgggtgga aaagggactg aagaagatca tccctgaagc agtccaaatg 780
gtgttcgtcc cattcttctc cctgctgatt atgatcccag cgaccgcatt cctgcttgga 840
cctttcggca tcggtgttgg taacggaatt tccaacctgc ttgaagcga taacaacttc 900
agcccattta ttctttccat cgttatccca ttgctctacc cattcttggg tccacttgga 960
ttgcactggc cactaaacgc catcatgac cagaacatca acacctggg ttacgacttc 1020
attcagggac caatgggtgc ctggaacttc gcctgcttcg gcctggtcac cggcgtgttc 1080
ttgctctcca ttaaggaacg aaacaaggcc atgcgtcagg tttccctggg tggcatgttg 1140
gctggtttgc tcggcggcat ttccgagcct tccctctacg gtgttctgct ccgattcaag 1200
aagacctact tccgcctcct gccgggttgt ttggcaggcg gtatcgtgat gggcatcttc 1260
gacatcaagg cgtacgcttt cgtgttcacc tccttgctta ccatcccagc aatggaccca 1320
tggttgggct acaccattgg tatcgagtt gcattcttcg ttccatgtt ccttgttctc 1380

gcactggact accgttccaa cgaagagcgc gatgaggcac gtgcaaaggt tgctgctgac 1440
aagcaggcag aagaagatct gaaggcagaa gctaatgcaa ctctgcagc tccagtagct 1500
gctgcagggtg cgggagccgg tgcagggtgca ggagccgctg ctggcgctgc aaccgccgtg 1560
gcagctaagc cgaagctggc cgctggggaa gtagtggaca ttgtttcccc actcgaaggc 1620
aaggcaattc cactttctga agtacctgac ccaatctttg cagcaggcaa gcttggacca 1680
ggcattgcaa tccaaccaac tggaaacacc gttgttgctc cagcagacgc tactgtcatc 1740
cttgtccaga aatctggaca cgcagtgga ttagcgcttag atagcggagt tgaaatcctt 1800
gtccacgttg gattggacac cgtgcaattg ggcggcgaag gcttcaccgt tcacgttgag 1860
cgcaggcagc aagtcaaggc gggggatcca ctgatcacit ttgacgctga cttcattcga 1920
tccaaggatc tacctttgat caccctcagtt gtgggtgcta acgccgcgaa attcggtgaa 1980
attgaaggta ttcctgcaga tcaggcaaat tcttccacga ctgtgatcaa ggtcaacggc 2040
aagaacgagt aa 2052

<210> 20
<211> 63
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 20
atggcgtcca aactgacgac gtgtttaagt ttagtggatg gggtaacgg caagaacgag 60
taa 63

<210> 21
<211> 2760
<212> DNA
<213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 21
atgactgatt ttttacgca tgacatcagg ttcctcggtc aaatcctcgg tgaggtaatt 60
gcggaacaag aaggccagga ggtttatgaa ctggtcgaac aagcgcgcct gacttctttt 120
gatatcgcca agggcaacgc cgaaatggat agcctggttc aggttttcga cggcattact 180
ccagccaagg caacaccgat tgctcgcgca ttttccact tcgctctgct ggctaacctg 240
gcggaagacc tctacgatga agagcttcgt gaacaggctc tcgatgcagg cgacaccctt 300

ccggacagca ctcttgatgc cacctggctg aaactcaatg agggcaatgt tggcgcagaa	360
gctgtggccg atgtgctgcg caatgctgag gtggcgccgg ttctgactgc gcaccaact	420
gagactcgcc gccgcactgt ttttgatgcg caaaagtgga tcaccacca catgcgtgaa	480
cgccacgctt tgcagtcigc ggagcctacc gtcgtacgc aaagcaagt ggatgagatc	540
gagaagaaca tccgccgtcg catcaccatt ttgtggcaga ccgcgttgat tcgtgtggcc	600
cgcccacgta tcgaggacga gatcgaagta gggctgcgct actacaagct gagccttttg	660
gaagagattc cacgtatcaa ccgtgatgtg gctgttgagc ttctgtgagc ttccggcgag	720
ggtgttcctt tgaagcccgt ggtcaagcca ggttcctgga ttggtggaga ccacgacgtt	780
aacccttatg tcaccgcgga aacagttgag tattccactc accgcgctgc ggaaaccgtg	840
ctcaagtact atgcacgcca gctgcattcc ctcgagcatg agctcagcct gtcggaccgc	900
atgaataagg tcaccccgca gctgcttgcg ctggcagatg cagggcacia cgacgtgcca	960
agccgcgtgg atgagcctta tcgacgcgcc gtccatggcg ttccgaggac tatcctcgcg	1020
acgacggccg agctgatcgg cgaggacgcc gttgagggcg tgtggttcaa ggtctttact	1080
ccatacgcat ctccggaaga attcttaaac gatgcgttga ccattgatca ttctctcgct	1140
gaatccaagg acgtttctcat tgccgatgat cgtttgtctg tgctgatttc tgccatcgag	1200
agctttggat tcaaccttta cgcactggat ctgcgcaaaa actccgaaag ctacgaggac	1260
gtcctcaccg agctttttcga acgcgccccaa gtcaccgcaa actaccgga gctgtctgaa	1320
gcagagaagc ttgagggtgct gctgaaggaa ctgcgcagcc ctcgctccgt gatcccgac	1380
ggttcagatg aatacagcga ggtcaccgac cgcgagctcg gcatcttccg caccgcgtcg	1440
gaggctgtta agaaattcgg gccacggatg gtgcctcact gcatcatctc catggcatca	1500
tcggtcaccg atgtgctcga gccgatggtg ttgctcaagg aattcggact catcgagcc	1560
aacggcgaca acccacgcgg caccgtcgat gtcatccac tgttcgaaac catcgaagat	1620
ctccaggccg gcgccggaat cctcgacgaa ctgtggaaaa ttgatctcta ccgcaactac	1680
ctcctgcagc gcgacaacgt ccaggaagtc atgctcggtt actccgattc caacaaggat	1740
ggcggatatt tctccgcaaa ctgggcgctt tacgacgcgg aactgcagct cgtcgaacta	1800
tgccgatcag ccgggggtcaa gcttcgcctg ttccacggcc gtggtggcac cgtcggccgc	1860
ggtggcggac cttcctacga cgcgattctt gccagccca ggggggctgt ccaaggttcc	1920

gtgcgcatca ccgagcaggg cgagatcatc tccgctaagt acggcaaccc cgaaaccgcg 1980
cgccgaaacc tcgaagccct ggctctcagcc acgcttgagg catcgcttct cgacgtctcc 2040
gaactcaccg atcaccaacg cgcgtacgac atcatgagt agatctctga gctcagcttg 2100
aagaagtacg cctccttggg gcacgaggat caaggcttca tcgattactt caccaggtcc 2160
acgccgctgc aggagattgg atccctcaac atcggatcca ggccttcctc acgcaagcag 2220
acctcctcgg tggaagattt gcgagccatc ccatgggtgc tcagctgggc acagtctcgt 2280
gtcatgctgc caggctgggt tgggtgctgga accgcattag agcagtggat tggcgaaggg 2340
gagcaggcca cccaacgcat tgccgagctg caaacactca atgagtcctg gccatttttc 2400
acctcagtgt tggataacat ggctcagggt atgtccaagg cagagctgcg ttgggcaaag 2460
ctctacgcag acctgatccc agatacggaa gtagccgagc gagtctattc cgtcatccgc 2520
gaggagtact tctgaccaa gaagatgttc tgcgtaatca ccggctctga tgatctgctt 2580
gatgacaacc cacttctcgc acgctctgtc cagcgccgat acccctacct gcttccactc 2640
aacgtgatcc aggtagagat gatgcgacgc taccgaaaag gcgaccaaag cgagcaagtg 2700
tcccgcaaca ttcagctgac catgaacggg ctttccactg cgctgcgcaa ctccggctag 2760

<210> 22
<211> 63
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 22
atgactgatt ttttacgcga ttgtttaagt ttagtggatg gggcgctgcg caactccggc 60
tag 63

<210> 23
<211> 1414
<212> DNA
<213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 23
atgggcgtgg atagacgaac taagattgta tgtaccctag gccagcggg ggctagtgca 60
gatggaattc tgcgtttggg agaagacggc atggatgttg ctgcctcaa cttctcccat 120
ggtgaccacc cagatcatga gcaaaactac aagtgggtcc gcgaggcggc ggagaagact 180

ggccgtgcag tccgtattct cgcagacctc caaggaccga agatccgtct tggccgtttc 240
actgacggcg caaccgtgtg ggaaaacggc gagaccattc ggatcaccgt tgacgatgta 300
gagggaacgc acgatcgtgt gtccaccacc tacaagaatc tggcaaaaga cgcgaagcca 360
ggcgaccgcc tgctcgttga tgacggcaag gttggcctcg tctgcgtttc cgtcgaaggt 420
aacgacgtca tctgtgaggt tgttgagggc ggaccagtct ccaacaacaa ggggtgtttcc 480
ctgccaggta tggatatitc cgtacctgca ctgtccgaaa aggatatccg tgacctgcgc 540
ttcgccctga agctcggcgt ggactttatt gcactgtcct tcgtacgttc cccagcagat 600
gctgaactcg ttcacaagat catggacgaa gaaggtcgtc gtgttcctgt gatcgccaag 660
ctggaaaagc cagaggctgt cacctccctc gagccaatcg tgttggcatt cgacgccgtc 720
atggttgctc gtggtgacct cggcgttgag gticcctctgg aggaggttcc actggttcag 780
aagcgcgcaa tccagattgc ccgtgagaac gcaaagccag ttatcgtggc aaccagatg 840
ctggattcca tgattgagaa ctcccgccca acccgtgcgg aagcttctga cgtggcaaac 900
gctgtgctcg atggcgcaga tgctgtcatg ctttcttggtg aaacttcagt gggcaaagat 960
ccgcacaacg ttgtgcgcac catgtctcgc attgttcgct tcgctgaaac cgacggtcgc 1020
gtcccagacc tgaccacat ccctcgcact aagcgtggcg ttatttccta ctctgcacgt 1080
gatatcgccg agcgcctcaa cgctcgtgca ttggttgcgt tcaccacctc tggtgatacc 1140
gcaaagcgtg tggctcgtct gcacagccac ctgccactgc tcgtgttcac tccaaatgag 1200
gcagttcgct ctgagctggc gctgacctgg ggtgcaacca ccttcctgtg tccacctgtc 1260
agcgataccg atgacatgat gcgcgaagtc gaccgtgctc ttttagcaat gcctgagtac 1320
aacaagggtg acatgatggt tgttgttgca ggttcccctc ctggtgttac cggtaacacc 1380
aacatgattc acgtccacct tcttgggtgat ctaa 1414

<210> 24
<211> 63
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 24
atgggcgtgg atagacgaac ttgtttaagt ttagtggatg ggacaaggat tgcaaagctc 60
taa 63



<210> 25
 <211> 1860
 <212> DNA
 <213> 麩胺酸棒狀桿菌

<400> 25
 atgaatgagt ttgaccagga cattctccag gagatcaaga ctgaactcga cgagttaatt 60
 ctagaacttg atgaggtgac acaaactcac agcgaggcca tcgggcaggt ctccccaacc 120
 cattacgttg gtgcccgcaa cctcatgcat tacgcgcata ttcgcaccaa agacctccgt 180
 ggcttgcagc aacgcctctc ctctgtggga gctacccgct tgactaccac cgaaccagca 240
 gtgcaggccc gcctcaaggc cgcccgaat gttatcggag ctttcgcagg tgaaggccca 300
 ctttatccac cctcagatgt cgtcgatgcc ttcgaagatg ccgatgagat tctcgacgag 360
 cacgccgaaa ttctccttgg cgaaccctta ccggatactc catcctgcat catggtcacc 420
 ctgcccaccg aagccgccac cgacattgaa cttgtccgtg gcttcgcca aagcggcatg 480
 aatctagctc gcatcaactg tgcacacgac gatgaaaccg tctggaagca gatgatcgac 540
 aacgtccaca ccgttgcaga agaagtggc cgggaaatcc gcgtcagcat ggacctcgcc 600
 ggacaaaaag tacgcaccgg cgaaatcgcc ccaggcgcag aagtaggtcg cgcacgagta 660
 acccgcgacg aaaccggaaa agtactgacg cccgcaaaac tgtggatcac cgccacggc 720
 tccgaaccag tcccagcccc cgaaagcctg cccggtcgcc ccgctctgcc gattgaagtc 780
 accccagaat ggttcgacaa actagaaatc ggcagcgtca tcaacgtccc agacaccgc 840
 ggatcccgcc gagcattcac cgtgaccagg gtttttcatg gcgcggctct cgccgaaggc 900
 ccacaaaaag cctacatctc caacggcacc ctcttggaac acaactacga ccgctcccgg 960
 gtctacggca tccccgccgt agttcagcgc atcaacctca aagtcggcga ccgcctcatc 1020
 cttaccgacg aagaactcac ctacgatcca tccctcggat ccggccgcac accacgcatc 1080
 agctgcaccc ticcacaagc agtcgatgca attaaagtcg ggcaccgctg gcttttcgac 1140
 gacggagcca tcgccgcagt ctgcatcgac aagacctcca ctgccgacgg ccacaacgac 1200
 gtagaattgg aagtcaccca cgcccgcga caaggcgtaa acctggccgc atacaaggga 1260
 atcaacctcc cagactccga acttccactc ccaagcctca ctgaagaaga cctccaacac 1320
 ctgcgctttg tcgtcaaata cgccgacatc gcagccatct ccttcatccg aaacgtcgcc 1380
 gacgtggaat acctcctcca agcactcgcc gacatcggag atccagtagc cgtcgaacgc 1440

cttggcctcg tccttaaaat cgagaccatc ccaggctacg aaggcctcgc ccaaatcctc 1500
ctgaccggca tgcgccacga aaacttcggc atcatgatcg cccgcggaga cctcgccgtc 1560
gaactcggct tcgaccgcat ggcagaagtc cccaactga tcatggccct tgccgaagcc 1620
gcccacgtcc caaccatctt ggccacccaa gtcctggaaa acatggccaa aaacggactc 1680
ccatctcgcg cagaaatcac cgacgcagca atggcacttc gcgctgaatg cgtcatgctg 1740
aacaagggac cacacatcaa cgacgccatc aaggctctca ccgaaatgag ccgcaaactt 1800
ggtgcatccc aacgaaagag taggctgctg ctgcgcaagg tgaagagctg ggaagagtaa 1860

<210> 26
<211> 63
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 26
atgaatgagt ttgaccagga ctgtttaagt ttagtggatg gggatgaagag ctgggaagag 60
taa , 63

<210> 27
<211> 1603
<212> DNA
<213> 麩胺酸棒狀桿菌

<400> 27
atggcggaca ttctgaccac ccaggtttgg caagacctga ccgatcatta ctcaaacttc 60
caggcaacca ctctgcgtga acttttcaag gaagaaaacc gcgccgagaa gtacaccttc 120
tccgcggctg gcctccacgt cgacctgtcg aagaatctgc ttgacgacgc caccctcacc 180
aagctccttg cactgaccga agaacttggc cttcgcgaac gcattgacgc gatgtttgcc 240
ggtgaacacc tcaacaacac cgaagaccgc gctgtcctcc acaccgcgct gcgccttcct 300
gccgaagctg atctgtcagt agatggccaa gatgttgctg ctgatgtcca cgaagttttg 360
ggacgcatgc gtgacttcgc tactgcgctg cgctcaggca actggttggg acacaccggc 420
cacacgatca agaagatcgt caacattggt atcggttggct ctgacctcgg accagccatg 480
gctacgaagg ctctgcgtgc atacgcgacc gctggtatct cagcagaatt cgtctccaac 540
gtcgacccag cagacctcgt ttctgtgttg gaagacctcg atgcagaatc cacattgttc 600



gtgatcgctt cgaaaacttt caccacccag gagacgctgt ccaacgctcg tgcagctcgt 660
gcttggctgg tagagaagct cggatgaagag gctgtcgca agcacttcgt cgcagtgtcc 720
accaatgctg aaaaggctcg agagttcgg atcgacacgg acaacatgtt cggcttctgg 780
gactgggtcg gaggtcgta ctccgtggac tccgcagttg gtctttccct catggcagtg 840
atcggccctc gcgacttcat gcgtttcctc ggtggattcc acgcgatgga tgaacacttc 900
cgcaccacca agttcgaaga gaacgttcca atcttgatgg ctctgctcgg tgtctggtac 960
tccgatttct atggtgcaga aaccacgct gtcctacctt attccgagga tctcagccgt 1020
tttgcctgtt acctccagca gctgaccatg gaatcaaatg gcaagtcagt ccaccgcgac 1080
ggctcccctg tttccactgg cactggcgaa atttactggg gtgagcctgg cacaaatggc 1140
cagcacgctt tcttccagct gatccaccag ggcactcgcc ttgttccagc tgatttcatt 1200
ggtttcgctc gtccaaagca ggatcttcct gccggtgagc gcaccatgca tgaccttttg 1260
atgagcaact tcttcgcaca gaccaagggt ttggctttcg gtaagaacgc tgaagagatc 1320
gctgcggaag gtgtcgacc tgagctggc aaccacaagg tcatgccagg taatcgccca 1380
accaccacca ttttggcgga ggaacttacc ctttctattc tcggtgcgtt gatcgctttg 1440
tacgaacaca tcgtgatggt tcagggcgtg atttgggaca tcaactcctt cgaccaatgg 1500
ggtgttgaac tgggcaaaca gcaggcaa at gacctcgctc cggctgtctc tggatgaagag 1560
gatgttgact cgggagattc ttccactgat tcaaaatagg tag 1603

<210> 28
<211> 63
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 28
atggcggaca ttctgaccac ctgtttaagt ttagtggatg ggtgggtaccg cgcaa atagg 60
tag 63

<210> 29
<211> 975
<212> DNA
<213> 麩胺酸棒狀桿菌

<400> 29
atgagcaccg ccgtagtttc acagaagaag tccacaacgg catccaaaat tggacattgg 60
atgctcaata acggtgcgtt ggtggggctg attgcactgt gtgttggact ttttattgca 120
acaccccact ttctcaccat tcctaacctg atcaacatcg gtatccaatc ggcgacgggtg 180
gcgatccttg cgttcggcat gaccttcgtc atcgttaccg caggcattga tttgtctgtg 240
ggatcagtgg ctgcgttggg tgcgatgacc tcggcgtatt tcttcgcgga agttggtttg 300
ccgggctgga tcacgctgct gattggcctg ttcatcggat tgttggcggg tgcgatctct 360
ggcattttcta ttgcttatgg caagtgcct gcgtttattg ccaccttggc catgatgtcg 420
atcgccaggg gaatcacctt ggtcatttcc caaggctcac caattcccag tgcaccagct 480
gtgaacgctt tggggcgcac ctactttggc atcccgatgc cgattctgat gatggcactg 540
gctggcattg tgtgttgggt tattttgagc cgcaccgtgc tgggacggtc catgtacgcc 600
attggcggaa acatggaagc agcccgacta tctggctcgc cagtgaagaa aatcctggtc 660
atggtctatg cactggctgg tgtgtatgca gcacttgcgg gtctgggtcat gacgggacgc 720
ttgtcgtccg cgcagccgca ggcaggcgtg ggatacgaac tcgatgcgat tgccgccgtg 780
gtcattgggtg gtgcgtcact tgctggcggg accggaaaag caacgggcac tttgattggt 840
gccatcttgt tggccgtgat ccgcaatggc ttgaacattt tgaacgtgtc ctcgttctgg 900
cagcagattg tcatcggttg tgtcatcgcg ctctcggttg gcttcgatgt catccgaaac 960
aaaacctcta agtaa 975

<210> 30
<211> 1383
<212> DNA
<213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 30
atgacaatgt gcgattactt cacaagctca aggagaattt ctgtggcttc ccaaatttct 60
ggcggctggc aaagtgccaa acaccgcacc actgtttaca tggctcctcgt agttgtgggc 120
atttctattc tttttgacgg ctacgatcta gtgatctac gcgccgtgct gtcaacacta 180
cttgaagatc caaccagat cgggtgcgctc agcccagcag tcgccggcac ctttggttcc 240
tacgcatga tcggcgtgat gatcgggtgct ctatctgcag gtgccgttgg tgaccgcctt 300
ggtcgtcgca aagttaatgct caccgcaatc gtctggttct ctgtgggcat ggcgctgacc 360
gcgttcgcgt cctcgattgc gctgttcggt ttcttgcgtt tcctcaccgg acttggcgtg 420

ggcatgatcg ttgcaaccgg cggcgcaatc atcgcgaggt tcgctccagc gaataggcgc	480
aacttggttca acgcaatcgt gtactccggt gtcccagccg gtggcgtgct ggcttctatc	540
cttgcaactgc tctttgaaga tgtcatcggc tggcgcgagc tcttctcat cggtaggttcc	600
ccactactgt tcttccctgcc acttgcatatc tcttccctcc cagagtcctc gcgctggctc	660
acctcccgcg gccgtgctgc ggacgcaaaa gccctctgcg cacgctatgg gctgccgacg	720
gaggaatttg tcgtcgaaaa gcagcaggaa acaaagggca ccggattcgc tgggaatttc	780
tcttccaagt acctcatggg caccattctc atcggcgcaa tgagcttcat cgggctgctt	840
tcgacctacg gctgaacac ctggttgcca aagatcatgg aatccaacgg cgcaacctca	900
catgattccc tgtactccct gctgttctc aacggcggcg cagtgttcgg tggcctcatc	960
gcattcctggg tcgtgaccg catcggcgcg aagaccgtga tcacctccac cttcgctctc	1020
gccgcgatct gcctcggagt cctgccaaac atctctctct ggccaatgat gtacaccgca	1080
atcgattcgc caggcgtcgg cgtcctgggc acccaggttc tcacctacgg cctgacctcg	1140
aacttcttcg gaaccgaatg ccgcgcagcg ggagttgcat ggtgtgcagg attcggccga	1200
ctcggcgga tgcgtggacc agcaatcggg ggccgatca tcggcgagc attcggacca	1260
agctccgcat tcttcatctt cgcagcagct gccgcaatcg gcgcggtctg caccttgctg	1320
atcccgcgct cccagcaga agtagaggtc aaggctcgcg aggaaccact tgcacgtgtc	1380
taa	1383

<210> 31
 <211> 1527
 <212> DNA
 <213> 麴酸棒狀桿菌

<400> 31	
atgacggaca tcaaggccac atcaagtaca tcggccacta cagcaccac agcaggccga	60
ccagcgcgtc gacttggaca aatttccctc gtcgcctgtc tcggcggact tctcttcggc	120
tatgacaccg gtgtcgccaa cggcgccgaa ggccacatgg cacaagaact cggactcaac	180
gtgctgcagc tcggcgttgt catcagttca ctggttttcg ctgcagcctt tggcgcgctg	240
ttcgctgggc gtatctcgga cgaaatcggg cgtcgaaaag caattatcac ttgtccgtg	300
ctgttcttcc tcggatcaat cctcgtcgtc ttctcccccg ccggtgagct ggggcagttc	360
tacggaccag gatttgccac ctggttcacc gggcgcatca tgttgggtct cgcggttggc	420

ggcgccctcca cagtagttcc ggtgtacctc gctgaactcg caccactaga aatccgcggc 480
 tccctgaccg gccgaaacga gcttgctatc gtcaccggcc agctgcttgc ctctgtgac 540
 aacgcgccta tcgccgtcac cctacacgga gttattgatg gaatctggcg catcatgttc 600
 gccgtctgtg cccctccctgc cgtcgccctc ttctctcgca tgcctgcgat gccggaatca 660
 ccacgctggc tgggtcaacca ggggcgttac gacgacgccc gccgcgtcat ggagaccgtc 720
 cgtacccttg agcgtgcgaa agccgaaatg gatgaaatca tcgcggtgca ctctgaaaac 780
 aatgcggcac ttcttggtgt taagcagtct tcggggcagg cttcaggcca ggtttctagc 840
 aagcacaccc acatgtccat cggcgaagtc ctacgcaaca aatggctggt tcgtctgctc 900
 atcgccggca tcggtgttgc agttgccag cagctcaccg gcatcaacgc catcatgtac 960
 tacggaaccc gcgtcctcga ggaatccggc atgagcgag aaatggctgt ggttgccaac 1020
 attgctttcg gtgccgttgc cgtcatcggg ggactgatcg cactgcgcaa catggaccgc 1080
 ctggatcgcc gcaccacctt catcatcggc ctgtcactga ccaccacctt ccaccttttg 1140
 atcgagctg ccggcactct ccttccagaa ggtaactcca ttcgaccatt cgccatcatg 1200
 atccttggtg ttgggttcgt gctctccatg cagactttcc tcaacgttgc agtgtgggtg 1260
 tggctggcgg aaatcttccc agtccgaatg aagggtatcg gcaccggtat ttcggtattc 1320
 tgcggttggg gcatcaatgg cgtcctagcg ttgttcttcc cagcactggt ctccggcgtg 1380
 ggtatcacct tctccttcc tctcttcgca gtcgtcggag tcattgccct ggcgttcgtc 1440
 accaagtttg ttctgaaac ccgtggccgc tcacttgaag aactcgatca cgcagcattc 1500
 accggccaga ttttcaagaa ggcttaa 1527

<210> 32
 <211> 753
 <212> DNA
 <213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 32
 atgactgaga ctggatttgg aattgatatt ggtggctccg gcatcaaagg cgcccgcgtt 60
 aaccttaaga ccggtgagtt tattgatgaa cgcataaaaa tcgccacccc taagccagca 120
 accccagagg ctgtcgccga agtagtcgca gagattatct ctcaagccga atgggagggt 180
 ccggtcggaa ttaccttgcc gtcggtcgtt cgcgggcaga tcgcgctatc cgcagccaac 240
 attgacaagt cctggatcgg caccgatgtg cacgaacttt ttgaccgcca cctaaatggc 300

cgagagatca ccgtttctcaa tgacgcagac gccgccggca tcgccgaagc aacctttggc	360
aaccttgccg cacgcgaagg cgcagtcac ctcgtgacct ttggtacagg tatttggttcc	420
gcattcccttg tggatggcca actgttcccc aacacagaac tcggtcacat gatcgttgac	480
ggcgaggaag cagaacacct tgcagcagca tccgtcaaag aaaacgagga tctgtcatgg	540
aagaaatggg cgaagcacct gaacaagggt ctgagcgaat acgagaaact tttctcccca	600
tccgtcttca tcatcgggtgg cggaatttcc agaaagcacg aaaagtggct tccattgatg	660
gagctagaca ctgacattgt cccagctgag ctgcgcaatc gagccggaat cgtaggagct	720
gctatggcag taaaccaaca cctcacccca taa	753

<210> 33
 <211> 1083
 <212> DNA
 <213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 33	
atgaacatcc cgtttgtcca gcgcttcgat gaaggcctgg accctgttct agaagtactc	60
ggtggcaagg gcgcttcact agtcaccatg acagatgctg gaatgcccgt tccacctgga	120
tttgtgggtca ctactgccag ctttgatgag ttcatccgtg aagcaggggt tgctgaacac	180
atcgataaat tcctaaacga tctcgatgca gaagatgtta aggaagtgga tcgagtttct	240
gcgatcatcc gcgatgagct gtgcagtcct gacgttccag agaatgctcg tttcgcagtg	300
caccaggcct atcgcgatct catggaacga tgcgggtggcg acgtcccgtg tgctgtccgg	360
tcatcggcca ctgccgaaga cctgcccgat gcttccctcg cagggaaca ggacacctat	420
ctgtggcaag tcggtttgag cgctgtcact gaacacatcc gtaaagtctg ggcttcgctg	480
ttcacttccc gtgccattat ctaccgtctg aaaaacaaca tcccgaatga gggcctctcg	540
atggcggtag ttgttcaaaa aatgggtcaac tctcgtgtcg caggcgtggc aatcactatg	600
aatccttcca acggcgaccg ctccaagatc accatcgatt cctcatgggg tgttggtgaa	660
atgggtgtct cagggtgaagt gacaccagac aatatcttgc tggacaagat cacgctgcag	720
gttgtctccg aacacattgg aagcaaacac gctgaactca tccccgatgc caccagtgga	780
agcctcgtgg aaaagcccgt tgatgaagaa cgcgcaaacc gccgcagtct gactgatgag	840
gaaatgctcg ctgtggcaca aatggctaag cgtgcagaaa aacactacaa gtgcccacaa	900
gatatcgaat gggcgctgga cgctgatctg ccagatggag aaaaccttct gttattgcaa	960

tcccgcccg aaactatcca ctccaacggt gtgaagaagg aaacccaac tccgcaggct	1020
gccaaaacca taggcaccit cgatttcagc tcaatcacgg tgcgaatgac cggcacgaag	1080
taa	1083

<210> 34
 <211> 1743
 <212> DNA
 <213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 34	
atgttcaagc cttttgaaac tatcggtggt gagttcgctg taaagtgcct cggccaatac	60
aacgctcggc atttgatgat ccgaatgcc aatggcatcg agttccgctg gcatctggga	120
tacctctata tgtcccctat tccagtgcct gaagatcaga ttgcggaacg cgtcccatg	180
ttccaggaaac gcatcacgca ctacttccaa aactgggagc caatgctggc aaattggaag	240
gagcgagtat taggaacccat caatgagctg gaatctctag agttcaagcc actgcctgac	300
tacgtgccta tcgatgatat tgtctccgga aaagccaaag acggcaccga agtactcatg	360
gaaaacttcg atcggtctat tcagctcgcc taccaaaact ggcaatacca ctttgagttc	420
ctcaacttgg gttacatcgc ttacctagat ttcttcaatt tctgcaagga agtcttccca	480
gatatccctg atcaatcaat ttgatgatg gttcagggcg tggatatgga gctgttccgc	540
cccgatgatg aactaaagat tctggcacag ctagcggctg accttggcct gcaaactcac	600
tttgccaacc cggatgatcc gcaagctacc ttggctgcta tcgcaaaggc agaaggcggc	660
gcgacatgga tagcgcgctg ggaagaagca caagatccgt ggttcaactt caccgtcggc	720
aatggcttct acggtcacga taaatactgg atcgagcacc tggaaacttc actggggtag	780
atcgcggatt acatccgccg cctagatgaa ggccaaacca tctccgccc gaaagatgaa	840
ctcatcgag aaaaggaacg cgtggtggaa gaataccgcg accttttggg tggagaacaa	900
ctcgcgagcgt ttgatgctaa atgcggcctc gctgctactg cataccccta tgtggaaaac	960
cataacttct acatcgagca ctggaccatg tcagtatttt ggcgcaaagt acgcgaactt	1020
tccgcacttc tccagggtta cggtttctgg gagaacgagg atgacatgtt gtacctcaac	1080
cgcactgaag tccgcgatgt cctcttcgac ctggctactg cgtgggggtgt cggcgacccc	1140
ggtgggtccaa ttggcacgat catttggccg gaagaaattg agcgaagaaa agcaattgtc	1200
accgctttga aaactgcccc accagcgcca gctcttaaca ctccctccaga gtccatcacc	1260

gaacctttca cccgcatgct ctggggaatc accaccgaac aggtgcaatc atggttgggc	1320
aatgacgagg atgccgaaga aggaaccctt aaaggcatgg ctgcatcccc tgggtgtggtg	1380
gaaggctacg ctcgagtaat tctcagcgca gatgaccttt cagaaatcca gcaggatgaa	1440
atcctcgttg cccctgtaac agcaccttct tggggcccaa tctttggcaa aatcaaggca	1500
acagtcactg atattgggtg catgatgagc catgctgcga tcgtgtgccg cgaatacggc	1560
ttgccggctg ttacttggaac tggcgctgca tccaccacca tcaaaaccgg cgattacctc	1620
aaggctgatg gaaccaaggg caaggttgtc attgttgatc cagatgcgcc acgcatcgaa	1680
ggacccggcg cgcacagcca tgcgcactca gtagcagcac atggggtgga tacacatgcc	1740
tag	1743

<210> 35
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 35	
aaccaccgaa aggaggccct tcag	24

<210> 36
 <211> 1833
 <212> DNA
 <213> 麩胺酸棒狀桿菌

<400> 36	
atgactactg ctgcaatcag gggccttcag ggcgaggcgc cgaccaagaa taaggaaactg	60
ctgaactgga tcgcagacgc cgtcgagctc ttccagcctg aggctgttgt gttcgttgat	120
ggttcccagg ctgagtggga tcgcatggcg gaggatcttg ttgaagccgg taccctcatc	180
aagctcaacg aggaaaagcg tccgaacagc tacctagctc gttccaaccc atctgacgtt	240
gcgcgcgttg agtcccgcac cttcattctgc tccgagaagg aagaagatgc tggcccaacc	300
aacaactggg ctccaccaca ggcaatgaag gacgaaatgt ccaagcattt cgctggttcc	360
atgaaggggc gcaccatgta cgtcgtgcct ttctgcatgg gtccaatcag cgatccggac	420
cctaagctcg gtgtgcagct cactgactcc gagtacgttg tcatgtccat gcgcatcatg	480
acccgcatgg gtattgaagc gctggacaag atcggcgcga acggcagctt cgtcaggtgc	540

ctccactccg ttggtgctcc ttggagcca ggccaggaag acgttgcatg gccttgcaac	600
gacaccaagt acatcaccca gtcccagag accaaggaaa ttggtccta cggttccggc	660
tacggcggaa acgcaatcct ggcaaagaag tgctacgcac tgcgtatcgc atctgtcatg	720
gctcgcgaag aaggatggat ggctgagcac atgctcatcc tgaagctgat caaccagag	780
ggcaaggcgt accacatcgc agcagcattc ccatctgctt gtggcaagac caacctcgcc	840
atgatcactc caaccatccc aggctggacc gctcaggttg ttggcgacga catcgcttgg	900
ctgaagctgc gcgaggacgg cctctacgca gttaaccag aaaatggttt cttcggtgtt	960
gctccaggca ccaactacgc atccaacca atcgcgatga agactatgga accaggcaac	1020
acctgtttca ccaacgtggc atcacccgac gacggcgaca tctggtggga aggcatggac	1080
ggcgacgccc cagctcacct cattgactgg atgggcaacg actggacccc agagtccgac	1140
gaaaacgctg ctacccctaa ctcccgttac tgcgtagcaa tcgaccagtc cccagcagca	1200
gcacctgagt tcaacgactg ggaaggcgtc aagatcgacg caatcctctt cggtggacgt	1260
cgcgacagaca ccgtccact gggtaccag acctacgact gggagcacgg cactatgggt	1320
gggtgcactgc tcgcatccgg tcagaccgca gcttccgcag aagcaaaggc cggcacactc	1380
cgccacgacc caatggcaat gctcccatc attggctaca acgctggatga atacctgcag	1440
aactggattg acatgggtaa caagggtggc gacaagatgc catccatctt cctggtcaac	1500
tggttccgcc gtggcgaaga tggacgcttc ctgtggcctg gcttcggcga caactctcgc	1560
gttctgaagt gggatcatga ccgcatcgaa ggccacgttg gcgcagacga gaccgttggt	1620
ggacacaccg ctaaggccga agacctcgac ctgcacggcc tcgacacccc aattgaggat	1680
gtcaaggaag cactgaccgc tcctgcagag cagtgggcaa acgacgttga agacaacgcc	1740
gagtacctca ctttcctcgg accacgtgtt cctgcagagg ttcacagcca gttcgatgct	1800
ctgaaggccc gcatttcagc agctcacgct taa	1833

<210> 37
 <211> 1455
 <212> DNA
 <213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 37	
atggtgatct tcggtgtcac tggcgacttg gctcgaaaga agctgctccc cgccatttat	60
gatctagcaa accgcggatt gctgccccca ggattctcgt tggtaggtta cggccgccgc	120

gaatggtcca aagaagactt tgaaaaatac gtacgcgatg ccgcaagtgc tgggtgctcgt	180
acggagttcc gtgaaaatgt ttgggagcgc ctgccgagg gtatggaatt tgttcgcggc	240
aactttgatg atgatgcagc ttctgacaac ctgcgtgcaa cactcaagcg catcgacaaa	300
acccgcggca ccgccggcaa ctgggccttac tacctgtcca ttccaccaga ttccttcaca	360
gcggtctgcc accagctgga gcgttccggc atggctgaat ccaccgaaga agcatggcgc	420
cgcgatgaca tcgagaagcc ttctggccac aacctcgaat ccgcacacga gctcaaccag	480
ctgggtcaacg cagtcttccc agaattctct gtgttccgca tcgaccacta ttitgggcaag	540
gaaacagttc aaaacatcct ggctctgcgt ttgtctaacc agctgtttga gccactgtgg	600
aactccaact acgttgacca cgtccagatc acaatggctg aagatattgg ctitgggtgga	660
cgtgctgggt actacgacgg catcggcgca gcccgcgacg tcatccagaa ccacctgatc	720
cagctcttgg ctctggttgc tatggaagaa ccaatttctt tcgtgccagc gcagctgcag	780
gcagaaaaga tcaaggtgct ctctgcgaca aagccgtgct acccattgga taaaacctcc	840
gctcgtggtc agtacgctgc cggttggcag ggctctgagt tagtcaaggg acttcgcgaa	900
gaagatggct tcaaccctga gtccaccact gagacttttg cggcttgtac cttagagatc	960
acgtctcgtc gctgggctgg tgtgccgttc tacctgcgca ccggtaagcg tcttggtcgc	1020
cgtgttactg agattgccgt ggtgttttaa gacgcaccac accagccttt cgacggcgac	1080
atgactgtat cccttggcca aaacgccatc gtgattcgcg tgcagcctga tgaaggtgtg	1140
ctcatccgtt tcggttccaa ggttccaggt tctgctatgg aagtccgtga cgtcaacatg	1200
gacttctcct actcagaatc ctctactgaa gaatcacctg aagcatacga gcgcctcatt	1260
ttggatgcgc tgttagatga atccagcctc ttccctacca acgaggaagt ggaactgagc	1320
tggaagattc tggaccaat tcttgaagca tgggatgccg atggagaacc agaggattac	1380
ccagcgggta cgtgggggtc aaagagcgt gatgaaatgc ttccccgcaa cggtcacacc	1440
tggcgcaggc cataa	1455

<210> 38

<211> 960

<212> DNA

<213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 38

atgatctttg aacttccgga taccaccacc cagcaaattt ccaagaccct aactcgactg	60
---	----

cgtgaatcgg gcacccaggt caccaccggc cgagtgtca ccctcatcgt ggtcactgac 120
tccgaaagcg atgtcgctgc agttaccgag tccaccaatg aagcctcgcg cgagcaccca 180
tctcgctga tcattttggt ggttggcgat aaaactgcag aaaacaaagt tgacgcagaa 240
gtccgtatcg gtggcgacgc tggtgcttcc gagatgatca tcatgcatct caacggacct 300
gtcgctgaca agctccagta tgtcgtcaca ccactgttgc ttccctgacac ccccatcggt 360
gcttgggtggc caggtgaatc accaaagaat ccttcccagg acccaattgg acgcatcgca 420
caacgacgca tcaactgatgc tttgtacgac cgtgatgacg cactagaaga tcgtgttgag 480
aactatcacc caggtgatac cgacatgacg tgggcgcgcc ttaccagtg gcggggactt 540
gttgcctcct cattggatca cccaccacac agcgaaatca cttccgtgag gctgaccggt 600
gcaagcggca gtacctcggt ggatttggct gcaggctggt tggcgcggag gctgaaagtg 660
cctgtgatcc gcgaggtgac agatgctccc accgtgccaa ccgatgagtt tggctactcca 720
ctgctggcta tccagcgctt ggagatcggt cgcaccaccg gctcgatcat catcaccatc 780
tatgacgctc atacccctca ggtagagatg ccggaatccg gcaatgcccc atcgctgggtg 840
gctattggtc gtcgaagtga gtccgactgc ttgtctgagg agcttcgcca catggaccca 900
gatttgggct accagcacgc actatccggc ttgtccagcg tcaagctgga aaccgtctaa 960

<210> 39
<211> 14
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 39
tttaggggca aaaa 14

<210> 40
<211> 2031
<212> DNA
<213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 40
atggacacca aggctgtaga cactgttcgt gtcctcgctg cagacgctgt agaaaactgt 60
ggctccggcc acccaggcac cgcaatgagc ctggctcccc ttgcatacac cttgtaccag 120
cgggttatga acgtagatcc acaggacacc aactgggcag gccgtgaccg cttcgttctt 180



tcttgtggcc actcctcttt gaccagtac atccagcttt acttgggtgg attcggcctt	240
gagatggatg acctgaaggc tctgcgcacc tgggattcct tgaccccagg acaccctgag	300
taccgccaca ccaagggcgt tgagatcacc actggccctc ttggccaggg tcttgcattc	360
gcagttggta tggctatggc tgctcgtcgt gagcgtggcc tattcgacct aaccgctgct	420
gagggcgaat ccccatcga ccaccacatc tacgtcattg cttctgatgg tgaccttcag	480
gaaggtgtca cctctgaggc atccctccatc gctggcaccc agcagctggg caacctcatc	540
gtgttctggg atgacaaccg catctccatc gaagacaaca ctgagatcgc tttcaacgag	600
gacgttgttg ctctgttaca ggcttacggc tggcagacca ttgaggttga ggctggcgag	660
gacgttgcag caatcgaagc tgcagtggct gaggctaaga aggacaccaa gcgacctacc	720
ttcatccgcg ttgcaccat catcggttc ccagctccaa ctatgatgaa caccggtgct	780
gtgcacgggtg ctgctcttgg cgcagctgag gttgcagcaa ccaagactga gcttggattc	840
gatcctgagg ctcaattcgc gatcgacgat gaggttatcg ctcacacccg ctccctcgca	900
gagcgcgctg cacagaagaa ggctgcatgg caggtcaagt tcgatgagtg ggcagctgcc	960
aaccctgaga acaaggctct gttcgatcgc ctgaactccc gtgagcttcc agcgggctac	1020
gctgacgagc tcccaacatg ggatgcagat gagaagggcg tcgcaactcg taaggcttcc	1080
gaggctgcac ttcaggcact gggcaagacc cttcctgagc tgtggggcgg ttccgctgac	1140
ctcgcaggtt ccaacaacac cgtgatcaag ggctccccct ccttcggccc tgagtcctc	1200
tccaccgaga cctggctctgc tgagccttac ggccgtaacc tgcacttcgg tatccgtgag	1260
cacgctatgg gctccatcct caacggcatt tccctccacg gtggcacccg ccctacggc	1320
ggaaccttcc tcattctctc cgactacatg cgtcctgcag ttctgtcttc agctctcatg	1380
gagaccgacg ctactacgt ctggaccac gactccatcg gtctgggcga agatggccca	1440
accaccagc ctgttgaaac ctgggtgca ctgcgcgcca tcccaggtct gtccgtcctg	1500
cgtcctgcag atgcgaacga gaccgccag gcttgggctg cagcacttga gtacaaggaa	1560
ggccctaagg gtcttgact gaccgccag aacgttcttg ttctggaagg caccaaggag	1620
aaggctgctg aaggcgttcg ccgcggtggc tacgtcctgg ttgagggttc caaggaaacc	1680
ccagatgtga tcctcatggg ctccggctcc gaggttcagc ttgcagttaa cgctgcgaag	1740
gctctggaag ctgagggcgt tgcagctcgc gttgtttccg ttcccttgcatt ggattggttc	1800

caggagcagg acgcagagta catcgagtcg gttctgcctg cagctgtgac cgctcgtgtg	1860
tctgttgaag ctggcatcgc aatgccttgg taccgcttct tgggcaccca gggccgtgct	1920
gtctcccttg agcacttcgg tgcttctgcg gattaccaga ccctgtttga gaagttcggc	1980
atcaccaccg atgcagtcgt ggccagcggcc aaggactcca ttaacggtta a	2031

<210> 41
 <211> 1992
 <212> DNA
 <213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 41	
atgtcctcac gtaaagagct tgccaatgct attcgtgcgc tgagcatgga cgcagtacag	60
aaagccaaat ccggtcaccc gggtgcccct atgggtatgg ctgacattgc cgaagtcctg	120
tggcgtgatt tcttgaaaca caaccgcag aatccgtcct gggctgaccg tgaccgcttc	180
gtgctgtcca acggccacgg ctccatgctg atctacagcc tgctgcacct caccggttac	240
gatctgccga tggaagaact gaaaaacttc cgtcagctgc actctaaaac tccgggtcac	300
ccggaagtgg gttacaccgc tgggtgtgaa accaccaccg gtccgctggg tcagggtatt	360
gccaacgcag tcggtatggc gattgcagaa aaaacgctgg cggcgcagtt taaccgtccg	420
ggccacgaca ttgtcgacca ctacacctac gccttcattg gcgacggctg catgatggaa	480
ggcatctccc acgaagtittg ctctctggcg ggtacgctga agctgggtaa actgattgca	540
ttctacgatg acaacggtat ttctatcgat ggtcacgttg aaggctgggt caccgacgac	600
accgcaatgc gtttcgaagc atacggctgg cacgttattc gcgacatcga cggtcatgac	660
gcggcatcta tcaaacgcgc agtagaagaa gcgcgcgcag tgactgacaa accttccttg	720
ctgatgtgca aaaccatcat cggtttcggt tccccgaaca aagccggtac ccacgactcc	780
cacggtgcgc cgctgggcga cgctgaaatt gccctgacct gcgaacaact gggctggaaa	840
tatgcgccgt tcgaaatccc gtctgaaatc tatgctcagt gggatgcgaa agaagcaggc	900
caggcgaaag aatccgcatg gaacgagaaa ttcgctgctt acgcgaaagc atatccgcag	960
gaagccgctg aatttaccgc ccgtatgaaa ggcgaaatgc cgtctgactt cgacgctaaa	1020
gcgaaagagt tcatcgctaa actgcaggct aatccggcga aaatcgccag ccgtaaagcg	1080
tctcagaatg ctatcgaagc gttcggttcc ctgttgccgg agttcctcgg cggttctgct	1140
gacctggcgc cgtctaacct gaccctgtgg tctggttcta aagcaatcaa cgaagatgct	1200

gcgggtaact acatccacta cgggtgttcgc gagttcggta tgaccgcgat tgctaaccgt	1260
atctccctgc acgggtggctt cctgccgtac acctccacct tcctgatgtt cgtggaatac	1320
gcacgtaacg ccgtacgtat ggctgcgctg atgaaacagc gtcaggtgat ggtttacacc	1380
cacgactcca tcggctctggg cgaagacggc ccgactcacc agccgggtga gcaggtcgct	1440
tctctgcgcg taaccccgaa catgtctaca tggcgtccgt gtgaccaggt tgaatccgcg	1500
gtcgcgtgga aatacgggtg tgagcgtcag gacggcccg cgcactgat cctctcccgt	1560
cagaacctgg cgcagcagga acgaactgaa gagcaactgg caaacatcgc gcgcggtggt	1620
tatgtgctga aagactgcgc cggtcagccg gaactgattt tcatcgctac cggttcagaa	1680
gttgaactgg ctgttgctgc ctacgaaaaa ctgactgccg aaggcgtgaa agcgcgcgtg	1740
gtgtccatgc cgtctaccga cgcatttgac aagcaggatg ctgcttaccg tgaatccgta	1800
ctgccgaaag cggttactgc acgcgttgct gtagaagcgg gtattgctga ctactggtac	1860
aagtatgttg gcctgaacgg tgctatcgtc ggtatgacca ccttcggtga atctgctccg	1920
gcagagctgc tgtttgaaga gttcggcttc actgttgata acgttggtgc gaaagcaaaa	1980
gaactgctgt aa	1992

<210> 42
 <211> 1083
 <212> DNA
 <213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 42	
atgtctcaca ttgatgatct tgcacagctc ggcacttcca ctgggtcga cgacctctcc	60
cgcgagcgca ttacttccgg caatctcagc caggttattg aggaaaagtc tgtagtcggt	120
gtcaccacca acccagctat tttcgcagca gcaatgtcca agggcgattc ctacgacgt	180
cagatcgcag agctcaaggc cgctggcgca tctgttgacc aggctgttta cgccatgagc	240
atcgacgacg ttcgcaatgc ttgtgatctg ttcaccggca tcttcgagtc ctccaacggc	300
tacgacggcc gcgtgtccat cgaggttgac ccacgtatct ctgctgaccg cgacgcaacc	360
ctgggtcagg ccaaggagct gtgggcaaag gttgatcgtc caaacgtcat gatcaagatc	420
cctgcaaccc caggttcttt gccagcaatc accgacgctt tggctgaggg catcagcgtt	480
aacgtcacct tgatcttctc cgttgctcgc taccgcgagg tcatcgctgc gticacgag	540
ggcatcaagc aggctgctgc aaacggccac gacgtctcca agatccactc tgtggcttcc	600

ttcttcgtct cccgcgtcga cgttgagatc gacaagcgcc tcgaggcaat cggctccgat	660
gaggcttttg ctcctgcgcgg caaggcaggc gttgccaacg ctcagcgcgc ttacgctgtg	720
tacaaggagc ttttcgacgc cgccgagctg cctgaagggtg ccaacactca gcgcccactg	780
tgggcatcca ccggcgtgaa gaaccctgcg tacgctgcaa ctctttacgt ttccgagctg	840
gctgggtccaa acaccgtcaa caccatgccca gaaggcacca tcgacgcggt tctggagcag	900
ggcaacctgc acggtgacac cctgtccaac tccgcggcag aagctgacgc tgtgtttctcc	960
cagcttgagg ctctgggcgt tgacttggca gatgtcttcc aggtcctgga gaccgagggt	1020
gtggacaagt tcgttgcttc ttggagcgaa ctgcttgagt ctatggaagc tcgcctgaag	1080
tag	1083

<210> 43
 <211> 951
 <212> DNA
 <213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 43	
atgaacgagt tagacggcat caaacagttc accactgtcg tggcagacag cggcgatatt	60
gagtcatttc gccattatca tccccaggat gccaccacca atccttcgct gttactcaaa	120
gctgccggat tatcacaata tgagcattta atagacgatg ctatcgcttg gggtaaaaaa	180
aatggcaaga cccaggaaca acagggtggc gcagcgtgtg acaaactggc ggtcaatttc	240
gggtgtgaaa tccitcaaaat cgtacccggt cgcggtgtcaa cagaagtga tgcacgcctc	300
tccttttgata aagaaaagag tattgagaag gcgcgccatc tgggtggactt gtatcagcaa	360
caaggcggtg agaaatcacg cattctgac aagctggctt cgacctggga aggtattcgc	420
gcggcagaag agctggaaaa agaaggtatt aactgcaacc tgacgctgct gttttctttt	480
gcacaggcac gggcctgtgc ggaagcaggc gtttttctga tttcgccgtt tgtcgggcgt	540
atttatgact ggtatcaggc acgcaagccg atggaccgt atgtggtgga agaagatccg	600
ggcgttaaat cgggtgcgcaa tatctacgac tactataagc aacaccacta tgaaaccatt	660
gtgatgggcg cgagcttccg tcgcaccgaa caaatcctcg ccttaaccgg ctgcgatcga	720
ctgactatcg caccgaattt actgaaggag ctgcaggaaa aagtttcgcc agtggtacgt	780
aaattaatcc caccttctca gacgttccca cgcccagctc ccatgagcga agcggagttc	840
cgttgggagc acaatcagga tgcgatggcg gtagaaaaac tgtctgaagg cattcgtctg	900

ttcgccgttg atcaacgcaa actggaagac cttcttgccg ccaaactata a 951

<210> 44
<211> 1452
<212> DNA
<213> 麩胺酸棒狀桿菌

<400> 44
atgtcttaca catcttttaa aggcgatgat aaagccctca tcggcatagt tttatcagtt 60
ctcacatttt ggctttttgc tcagtcaacc ctaaatatcg gccagatat ggcaactgat 120
ttagggatga gcgatggcac catgaacata gctgtcgtgg ccgccgcgtt attctgtgga 180
acattttatcg tcgcagccgg cggcatcgca gatgtctttg gccgagtacg aatcatgatg 240
attggcaaca tccttaacat cctgggatct ctctcatcg ccacggcaac gacttcttta 300
gccacccaaa tggatgacac cggccgagtt ctccaaggac tggcagcagc ggccatcatg 360
tctgcatccc tagcattagt taagacatat tggttaggta ctgaccgcca acgagcagtc 420
tccatttggg ccattgggtc atgggggtggc accggattct gcgcgctttt cgcgggtctt 480
gttgtagcaa gcccctttgg ttggagagga atcttcgccc tctgcgcgat cgtctccatc 540
gttgctattg cccttaccg ccacatcccg gaatcccgtc cggctcaatc cattggcatg 600
catttggatt ggagtggcat catcgttctt gccctcagtg ttctatctct tgaattgttt 660
attaccaag gtgaatcact tggctggacg cactggatga cctggactct ccttgccgtt 720
tctttgacat ttcttgagtg ttctgtcttc attgaacgca tcgccagctg gccagttctc 780
gacttcaacc ttttcaaaga ccacgccttc agcgggtgcga ccatcaccaa cttcattatg 840
agcgctactg gcggagtagt tgccgttgtc atgtgggttc agcaaattggg atgggggtgc 900
tccccaacaa tctcgggact caccagcatc ggcttcgcag cctttgtcat ccttttcatt 960
cgagttggag aaaaggccat gcagaaagtt ggcgcccag cagtgatcat caccgctggc 1020
atcttggtag cgaccgcgac cgccctccta atgataccg cggtcagcga gtcaacgtac 1080
atcgtcatct ccctcgccgg ctctctccctt tatggccttg gcctcggact cttcgccacc 1140
ccagtcaccg atactgcgct tggaacactt cccaaagacc gtaccggcgc tggatgcaggt 1200
gtattcaaga tgtctcttcc cctcggcgca gcactcggca tcgcaatctc cacttcagtg 1260
ttcctcgcac ttcgcgacgg caccctccatc aactccgacg tcgcactcgc cggaacagtt 1320
tcacttggca tcaacgttgt attcgcagca acagccacca tcaccgcagc agtccttatt 1380

ccaaaagccg ctggcaaagt ctcacaaacc agcatcacc ttcttgagcc agctatcgct 1440
gtaaaaatct aa 1452

<210> 45
<211> 174
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 45
atggatcttt cccttctcaa ggaaaccctc ggcaactacg agaccttcgg tggcaacatc 60
ggtaccgctc ttcagagcat cccaaccctg ctcgattcca tccttaactt cttcgacaac 120
ttcggagacc tcgctgacac caccggcgag aatctggata acttctcttc ctaa 174

<210> 46
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 46
gagaaatcct gaaaggaggc ccttcag 27

<210> 47
<211> 138
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列

<400> 47
atggaaaacg tttaacagatt ccttggaaac ctgatgtcc ttccggctc cggcctcatc 60
ggctacgtct tcgacttcct cggcgcttcc agcaagtggg ctggcgcagt tgctgacctc 120
atcggctctgc ttggctaa 138

<210> 48
<211> 1209
<212> DNA
<213> 枯草桿菌

<400> 48



atgaaaaata ttattgcatt gtcttctgtc ccgcttgtga tgacactcgg gaactccatg	60
ctgattccctg ttcttccgat gatggagaaa aagctgtctg tgacttcatt tcaagtatct	120
ttaatcatta ctgtatattc agtagtagca attatttgca ttccgattgc cggatatttg	180
tcggatcggt tcgggagaaa aaaaatattg cttccatgcc tcctcattgc aggattgggg	240
ggagccgtag ctgcitttgc ctgcacctat atgaaaaatc cttatgctat gatcttggcg	300
gggcggttc ttcaaggcat tggttctgca ggtgccgctc cgattgtcat gccgtttatc	360
ggcgacctgt ttaaaggaga cgatgaaaag gtcagcgcg gtccttggcga tattgaaacc	420
gccaacacgt cagggaaggt actgagtcctc atacttggag ccttactggc ttcttgggtat	480
tggtttgtac cgttttgggt tatttccgttt ttctgtttga tcagcttttt gctcgtattg	540
tttttgggtgg ccaagcctga agaagatgaa gatgcgcctg ctgtttctga gtttattaag	600
agtgtgaaga aaatttttaa acaggatggt cgctggcttt atacggctctt cattatcggg	660
tgtgtcatta tgtttttggt atttggcgta ttattttatt tatcagatac gctggagaac	720
aagtatgcta ttgacggagt agctaaaggc ggattactgg caatcccact ttgtttttg	780
tcaaccagtt cttttatagc tggcaaaaag atcggtaaag ataaaggccg aatgaaattt	840
tgcgttggtta caggaatgat tctgttaacc ctttcgttta ttgccttgtg gtggaaccac	900
agtttttatt ttttatttgt ctttttaagc tttagcgagg ttgggattgg aatggctctt	960
cctgcttttag atgcattgat aaccgaaggg attgaaagtg aacaatgcgg aaccatttcc	1020
tccttttaca atagcatgcg ctttatagga gtagctctcg gtccacctgt ttttctgca	1080
ttaatgtcta atgcaaactg gattattttc atactctcgg cgttttgcag catcgtttct	1140
ttatttttag tgctctttac tgtagatgct aaaaaaagtg aagaagaaaa aaacttaggg	1200
acggtctag	1209

<210> 49
 <211> 1209
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 針對麩胺酸棒狀桿菌最佳化的ymfD BSU16825密碼子

<400> 49	
atgaagaaca tcattgcgct gtctctgtg ccactcgtta tgacccttgg caactctatg	60
ctgatccccg ttctcccat gatggagaag aaactctcag tcacttcgtt tcaggtgtcc	120

ctcatcatca ccgtgtattc tgtcgttgcc atcatctgca ttcccatcgc tggctacctt	180
tcagatcgct tcggtcgcaa gaagattctg ctcccttgct tgctgatcgc tggccttggc	240
ggagctgtcg cagcattcgc atctacgtac atgaagaacc cgtatgctat gatccttgcg	300
ggtcgtgtcc ttcaaggcat cggctctgct ggtgctgccc cgattgtaat gccgttcatt	360
ggtgacctct ttaagggcga tgatgagaaa gtatcagctg gcctgggaga tattgaaacc	420
gccaatcgt ccgggaaagt gcttagccca attctcggag cccttttggc tagctggtat	480
tggtttgctc cgttttgggt catccctttc ttctgcctta tttccttcct tctggtgctc	540
tttctgggtg ccaaacctga agaggacgaa gatgccccag cagttagcga gttcatcaaa	600
tcgggtcaaga aaatcttcaa gcaggatggc cgatggctgt acaccgtgtt catcatcggg	660
tgtgtcatta tgttccttct cttcggggta ctgttttacc tgagcgacac cctggaaaac	720
aagtacgcaa tcgacgggtg tgcgaagggt ggtttgctgg caattccact gctcttcctg	780
tccacatcct cctttatcgc tggtaagaaa atcggtaaag acaagggccg catgaagttt	840
tgcgttgtga ccggaatgat cctgctcaca ttgtccttca tcgcactgtg gtggaatcac	900
agcttctact tcttgttcgt gttcctgtct tttggcggaa tcggcattgg catggcgttg	960
cctgcgttgg atgccctcat taccgaaggg atcgaatcgg agcagtgtgg aaccatttcc	1020
tccttctaca actcaatgcg gttcatcgga gtcgctctgg gtccaccagt ctttcagcc	1080
ctgatgtcca atgcgaactg gatcatcttt atcctgtcgg cattctgctc cattgtttcc	1140
ctgttcttgg tgcgtttcac tgttgacgca aagaagtccg aagaggagaa gaacttgggc	1200
actgtttaa	1209

<210> 50
 <211> 2180
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 50	
atgagcacga atcccatgt tttctcccta gatgtccgt atcacgagga tgcttctgca	60
ttgtttgccc acttgggtgg cacaaccgca gatgatgcag ccctgttggga attcgctgat	120
atcaccacca agaatgggat ttcttccctc gcggtgttga agagtccgt gcgcattacg	180

tgcacgggca acacggtggt aacgcagccg ctgacggact cgggtagggc agtggttgcg	240
cgcctaacgc agcagcttgg ccagtacaac accgcagaga acacctttag cttccccgcc	300
tcagatgcgg ttgatgagcg cgagcgcctc accgcaccaa gcaccatcga agtgctgcgc	360
aagttagcagt tcgagtcagg ctacagcgac gcgtccctgc cactgctcat gggcgggttc	420
gcgtttgatt tcttagaaac ctttgaaacg ctccccgctg tcgaggagag cgtcaacact	480
taccccgatt accagttcgt cctcgcggaa atcgtcctgg acatcaatca ccaggaccag	540
accgccaaac tcgccggcgt ctccaacgcc ccaggcgagc tcgaggccga gctcaacaag	600
ctttcattgc ttatcgacgc cgccctcccc gcaaccgaac acgcctacca aaccaccct	660
cacgacggcg acactcttcg cgttgtggct gatattcccg atgctcagtt ccgcaccag	720
atcaatgagc tgaagaaaa catttacaac ggtgacatct accaagttgt cccggcgcgc	780
actttcaccg caccatgtcc tgatgcattc gctgcttatt tgcagctgcg tgccaccaac	840
ccgtcgccgt acatgttcta tatccgtggc ctcaacgaag gccgctccta tgaacttttt	900
ggcgcatccc ctgagtccaa cctcaagttc accgctgcta accgtgagct gcagctgtac	960
ccaatcgag gtacccgccc ccgtggactc aaccagatg gctccatcaa cgatgagcta	1020
gatatccgca atgagttgga tatgcgcact gatgccaaag agatcgcgga gcacaccatg	1080
cttgctgata tcgcccgcaa cgacctggcc cgcgtctcgg tcccagcgtc gcgccgggtt	1140
gcggatcttt tgcaggtgga tcgctattcc cgcgtgatgc acttggtgtc ccgtgtgacg	1200
gcgacgttgg acccagagct tgatgctttg gacgcctatc gggcgtgcat gaatatgggc	1260
acgttgaccg gcgctccgaa gttgcgcgt atggagctgt tgcgcggcgt cgaaaagcgc	1320
aggcgtgggt cttatggtgg ggcagtgggg tacctgcgcg gcaatggcga tatggataat	1380
tgcattgtta ttcgttcggc gtttgtccag gatggtgtgg ctgctgtgca ggctgggtgt	1440
ggtgtggtcc gcgattctaa tcctcaatct gaagccgatg agacgttgca caaggcgtat	1500
gccgtgttga atgccattgc gcttgctgct ggttccactt tggaggatcat ccgatgacac	1560
acgttgttct cattgataat cacgattctt ttgtctacaa cctgggtggat gcgttcgccg	1620
tggccggtta taagtgcacg gtgttccgca atacggtgcc agtggaaacc attttggcag	1680
ccaaccggga cctgatctgc cttcacctg gacctggtta ccctgccgat gcgggcaaca	1740
tgatggcgct gatcgagcgc acactcgcc agattccttt actgggtatt tgcctcggct	1800
accaggcact catcgaatac cacggcggca aggttagacc ttgtggccct gtgcacggca	1860

ccaccgacaa catgatccctt actgatgcag gtgtgcagag ccctgttttt gcaggtcttg	1920
ccactgatgt tgagccctgat catccagaaa tcccaggccg caaggttcca attggccgtt	1980
atcactcact gggctgcgtg gtgccccag acggtattga atcactaggt acctgttcct	2040
cggagattgg tgatgtcatc atggcggcac gcaccaccga tggaaaggcc attggccctgc	2100
agtttcaccc tgagtcagtg ctaagcccaa cgggtcctgt cattttgtcc cgctgtgtcg	2160
aacagcttct cggaactaa	2180

<210> 51
 <211> 2180
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 51	
atgagcacga atcccatgt ttctcccta gatgtccgt atcacagga tgcttctgca	60
ttgtttgccc acttgggtgg cacaaccgca gatgatgcag ccctgttga acgcgctgat	120
atcaccacca agaatggat ttcttccctc gcggtgttga agagtccgt gcgcattacg	180
tgcacgggca acacgggtgt aacgcagccg ctgacggact cgggtagggc agtggttgcg	240
cgcctaacgc agcagcttgg ccagtacaac accgcagaga acaccttag cttccccgcc	300
tcagatgcgg ttgatgagcg cgagcgctc accgcaccaa gcaccatcga agtgctgcgc	360
aagtgtcagt tcgagtccgg ctacagcgac gcgtccctgc cactgctcat gggcggtttc	420
gcgtttgatt tcttagaaac ctttgaaacg ctccccgtg tcgaggagag cgtcaacact	480
taccccgatt accagttcgt cctcgcgga atcgtcctgg acatcaatca ccaggaccag	540
accgcaaacc tcgccggcgt ctccaacgcc ccaggcgagc tcgaggccga gctcaacaag	600
ctttcattgc ttatcgacgc cgccctcccc gcaaccgaac acgcctacca aaccaccct	660
cacgacggcg acactcttcg cgttgtggct gatattcccg atgctcagtt ccgcaccag	720
atcaatgagc tgaaagaaaa catttacaac ggtgacatct accaagttgt cccggcgcgc	780
actttaccg caccatgtcc tgatgattc gctgcttacc tgcagctgcg tgccaccaac	840
ccgtcgccgt acatgttcta tatccgtggc ctcaacgaag gccgctccta tgaacttttt	900
ggcgcatccc ctgagtccaa cctcaagttc accgctgcta accgtgagct gcagctgtac	960

ccaatcgag gtacccgccc ccgtggactc aaccagatg gctccatcaa cgatgagcta	1020
gatatccgca atgagttgga tatgcgcact gatgccaaag agatcgcgga gcacaccatg	1080
cttgtcgatc tcgcccgcaa cgacctggcc cgcgtctcgg tcccagcgtc gcgccgggtt	1140
gcggatcttt tgcaggtgga tcgctattcc cgcgtgatgc acttgggtgc ccgtgtgacg	1200
gcgacgttgg acccagagct tgatgctttg gacgcctatc gggcgtgcat gaatatgggc	1260
acgttgaccg gcgctccgaa gttgcgcgct atggagctgt tgcgcggcgt cgaaaagcgc	1320
aggcgtgggtt cttatgggtg ggcagtgagg tacctgcgcg gcaatggcga tatggataat	1380
tgcattgtta ttcgttcggc gtttgtccag gatgggtgtg ctgctgtgca ggctgggtgt	1440
ggtgtggtcc gcgattctaa tccicaatct gaagccgatg agacgttgca caaggcgtat	1500
gccgtgttga atgccattgc gcttgcgtgt ggttccactt tggaggatcat ccgatgacac	1560
acgttgttct cattgataat cacgattctt ttgtctacaa cctgggtggat gcgttcgccg	1620
tggccgggtta taagtgcacg gtgttccgca atacggtgcc agtggaaacc attttggcag	1680
ccaaccgga cctgatctgc ctttcacctg gacctgggtta ccttgccgat gcgggcaaca	1740
tgatggcgct gatcgagcgc aactcggcc agattccttt actgggtatt tgccctcggct	1800
accaggcact catcgaatac cacggcggca aggttgagcc ttgtggccct gtgcacggca	1860
ccaccgaaa catgatcctt actgatgcag gtgtgcagag cctgttttt gcaggctctg	1920
ccactgatgt tgagcctgat catccagaaa tcccaggccg caagggtcca attggccgtt	1980
atcactcact gggctgcgtg gttgccccag acggtattga atcactaggt acctgttcct	2040
cggagattgg tgatgtcatc atggcggcac gcaccaccga tggaaaggcc attggcctgc	2100
agtttcaccc tgagtcagt ctaagcccaa cgggtcctgt cattttgtcc cgctgtgtcg	2160
aacagcttct cgcaactaa	2180

<210> 52
 <211> 2177
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 52	
atgcaaacac aaaaaccgac tctcgaactg ctaacctgcg aaggcgctta tcgcgacaat	60
cccaccgcgc tttttcacca gttgtgtggg gatcgtccgg caacgctgct gctggaattc	120

gcagatatcg acagcaaaga tgatttaaaa agcctgctgc tggtagacag tgcgctgcgc	180
attacagctt taggtgacac tgtcacaatc caggcacttt ccggcaacgg cgaagccctc	240
ctggcactac tggataacgc cctgccctgcg ggtgtggaaa gtgaacaatc accaaactgc	300
cgtgtgctgc gcttcccccc tgtcagtcca ctgctggatg aagacgcccg cttatgctcc	360
ctttcggttt ttgacgcttt ccgtttattg cagaatctgt tgaatgtacc gaaggaagaa	420
cgagaagcca tgttcttcgg cggcctgttc tcttatgacc ttgtggcggg atttgaagat	480
ttaccgcaac tgtcagcggg aaataactgc cctgatttct gtttttatct cgctgaaacg	540
ctgatggatga ttgaccatca gaaaaaagc acccgatttc aggccagcct gtttgctccg	600
aatgaagaag aaaaacaacg tctcactgct cgcctgaacg aactacgtca gcaactgacc	660
gaagccgcgc cggcgtgcc agtgggttcc gtgccgcaca tgcgttgtga atgtaatcag	720
agcgatgaag agttcggtgg cgtagtgcgt ttgttgcaaa aagcgattcg cgctggagaa	780
attttccagg tgggtccatc tcgccgttcc tctctgccct gcccgtcacc gctggcggcc	840
tattacgtgc tgaaaaagag taatcccagc ccgtacatgt tttttatgca ggataatgat	900
ttcacccctat ttggcgcgtc gccggaaagc tcgctcaagt atgatgccac cagccgccag	960
attgaaatct acccgattgc cggaacacgc ccacgcggtc gtcgcgccga tggttcactg	1020
gacagggatc tcgacagccg tattgaaactg gaaatgcgta ccgatcataa agagctgtct	1080
gaacatctga tgctgggtga tctcgcccggt aatgatctgg cacgcatttg ccccccggc	1140
agccgctacg tcgccgatct caccaaagtt gaccgttatt cctatgtgat gcacctcgtc	1200
tctcgcgtag tcggcgaact gcgtcacgat ctgacgccc tgcacgtta tcgcgctgt	1260
atgaatatgg ggacgttaag cgggtgcgccg aaagtacgcg ctatgcagtt aattgccgag	1320
gcggaaggctc gtcgccgcgg cagctacggc ggcgcggtag gttatttcac cgcgcatggc	1380
gatctcgaca cctgcattgt gatccgctcg gcgctggtgg aaaacggtat cgccaccgtg	1440
caagcgggtg ctggtgtagt ccttgattct gtccgcagt cggaagccga cgaaaccgt	1500
aacaaagccc gcgctgtact gcgcgctatt gccaccgcgc atcatgcaca ggagactttc	1560
tgatggctga cattctgctg ctcgataata tcgactcttt tacgtacaac ctggcagatc	1620
agttgcgcag caatgggcat aacgtggtga ttaccgcaa ccatattccg gcgcaaacct	1680
taattgaacg cctggcgacc atgagcaatc cgggtgctgat gctttctcct ggccccggtg	1740

tgccgagcga agccgggtgt atgccggaac tcctcaccgc ctgctgtggc aagctgcccc	1800
ttattggcat ttgcctcggg catcaggcga ttgtcgaagc ttacgggggc tatgtcggtc	1860
aggcggggcga aattctccac ggtaaagcct ccagcattga acatgacggg caggcgatgt	1920
ttgccggatt aacaaacccg ctgccgggtg cgcgttatca ctgctgggtt ggcagtaaca	1980
ttccggccgg tttaaccatc aacgcccatt ttaatggcat ggtgatggca gtacgtcacg	2040
atgcggatcg cgtttgtgga ttccagttcc atccggaatc cattctcacc acccagggcg	2100
ctgcctgct ggaacaaacg ctggcctggg cgcagcagaa actagagcca gccaacacgc	2160
tgcaaccgat tctgtaa	2177

<210> 53
 <211> 2177
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 53	
atgcaaacac aaaaaccgac tctcgaactg ctaacctgcg aaggcgctta tcgcgacaat	60
cccaccgcgc tttttcacca gttgtgtggg gatcgtccgg caacgctgct gctggaattc	120
gcagatatcg acagcaaaga tgatttaaaa agcctgctgc tggtagacag tgcgctgcgc	180
attacagctt taggtgacac tgtcacaatc caggcacttt ccggcaacgg cgaagccctc	240
ctggcactac tggataacgc cctgcctgcg ggtgtggaaa gtgaacaatc accaaactgc	300
cgtgtgctgc gcttcccccc tgtcagtcca ctgctggatg aagacgcccg cttatgctcc	360
ctttcggttt ttgacgcttt ccgtttattg cagaatctgt tgaatgtacc gaaggaagaa	420
cgagaagcca tgttcttcgg cggcctgttc tcttatgacc ttgtggcggg atttgaagat	480
ttaccgcaac tgtcagcggg aaataactgc cctgatttct gtttttatct cgctgaaacg	540
ctgatggtga ttgaccatca gaaaaaagc acccgtattc aggccagcct gtttgctccg	600
aatgaagaag aaaaacaacg tctcactgct cgcctgaacg aactacgtca gcaactgacc	660
gaagccgcgc cgccgctgcc agtgggtttc gtgccgcaca tgcgttgtga atgtaatcag	720
agcgatgaag agttcgggtg cgtagtgcgt ttgttgcaaa aagcgattcg cgctggagaa	780
attttccagg tgggtgccatc tcgccgtttc tctctgccct gcccgtcacc gctggcggcc	840
tattacgtgc tgaaaaagag taatcccagc ccgtacatgt tttttatgca ggataatgat	900

ttcacccctat ttggcgcgtc gccggaaagc tcgctcaagt atgatgccac cagccgccag	960
attgaaatct acccgattgc cggaacacgc ccacgcggtc gtcgcgccga tggttcactg	1020
gacagggatc tcgacagccg tattgaactg gaaatgcgta ccgatacataa agagctgtct	1080
gaacatctga tgctggttga tctcgcccgt aatgatctgg cacgcatttg ccccccggc	1140
agccgctacg tcgccgatct caccaaagtt gaccgttatt cctatgtgat gcacctcgtc	1200
tctcgcgtag tcggcgaact gcgtcacgat cttagcggc tgcacgctta tcgcgcctgt	1260
atgaatatgg ggacgttaag cggtagcgccg aaagtacgcg ctatgcagtt aattgccgag	1320
gcggaagggtc gtcgccgcgg cagctacggc ggcgcggtag gttatttcac cgcgcatggc	1380
gatctcgaca cctgcattgt gatccgctcg gcgctggtgg aaaacggtat cgccaccgtg	1440
caagcgggtg ctggtgtagt ccttgattct gtccgcagtt cggaagccga cgaaaccgt	1500
aacaaagccc gcgctgtact gcgcgctatt gccaccgcgc atcatgcaca ggagactttc	1560
tgatggctga cattctgctg ctcgataata tcgactcttt tacgtacaac ctggcagatc	1620
agttgcgcag caatgggcat aacgtgggtga ttaccgcaa ccatattccg gcgcaaacct	1680
taattgaacg cctggcgacc atgagcaatc cggtagctgat gctttctcct ggccccggtg	1740
tgccgagcga agccggttgt atgccggaac tcctcaccgc cttgcgtggc aagctgcccc	1800
ttattggcat ttgcctcgga catcaggcga ttgtcgaagc ttacgggggc tatgtcggtc	1860
aggcgggcga aattctccac ggtaaagcct ccagcattga acatgacggt caggcgatgt	1920
ttgccggatt aacaaaccgc ctgccggtgg cgcgttatca ctcgctggtt ggcagtaaca	1980
ttccggccgg tttaaccatc aacgcccatt ttaatggcat ggtgatggca gtacgtcacg	2040
atgcggatcg cgtttgtgga ttccagttcc atccggaatc cattctcacc acccagggcg	2100
ctcgccctgct ggaacaaacg ctggcctggg cgcagcagaa actagagcca gccaacacgc	2160
tgcaaccgat tctgtaa	2177

<210> 54
 <211> 2177
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 54

atgcaaacac aaaaaccgac tctcgaactg ctaacctgcg aaggcgctta tcgcgacaat	60
cccaccgcgc tttttcacca gttgtgtggg gatcgtccgg caacgctgct gctggaatcc	120
gcagatatcg acagcaaaga tgatttaaaa agcctgctgc tggtagacag tgcgctgcgc	180
attacagcitt taggtgacac tgtcacaatc caggcacttt ccggcaacgg cgaagccctc	240
ctggcactac tggataacgc cctgcctgcg ggtgtggaaa gtgaacaatc accaaactgc	300
cgtgtgctgc gcttcccccc tgtcagtcca ctgctggatg aagacgcccg cttatgctcc	360
ctttcggttt ttgacgcttt ccgtttattg cagaatctgt tgaatgtacc gaaggaagaa	420
cgagaagcca tgttcttcgg cggcctgttc tcttatgacc ttgtggcggg atttgaagat	480
ttaccgcaac tgtcagcgga aaataactgc cctgatttct gtttttatct cgctgaaacg	540
ctgatggatga ttgacatca gaaaaaagc acccgtattc aggccagcct gtttgctccg	600
aatgaagaag aaaaacaacg tctcactgct cgccctgaacg aactacgtca gcaactgacc	660
gaagccgcgc cgccgctgcc agtgggtttcc gtgccgcaca tgcgttgtga atgtaatcag	720
agcgatgaag agttcggttg cgtagtgcgt ttgttgcaaa aagcgattcg cgctggagaa	780
attttccagg tggatccatc tcgccgtttc tctctgccct gcccgtcacc gctggcggcc	840
tattacgtgc tgaaaaagag taatcccagc ccgtacatgt tttttacgca ggataatgat	900
ttcaccttat ttggcgcgtc gccggaaagc tcgctcaagt atgatgccac cagccgccag	960
attgaaatct acccgattgc cggaacacgc ccacgcggtc gtcgcgccga tggttcactg	1020
gacagggatc tcgacagccg tattgaaactg gaaatgcgta ccgatacataa agagctgtct	1080
gaacatctga tgctggttga tctcgcccgt aatgatctgg cagcatttg cccccggc	1140
agccgctacg tcgccgatct caccaaagtt gaccgttatt cctatgtgat gcacctcgtc	1200
tctcgcgtag tcggcgaact gcgtcacgat cttgacgccc tgcacgctta tcgcgcctgt	1260
atgaatatgg ggacgttaag cggcgcgccg aaagtacgcg ctatgcagtt aattgccgag	1320
gcggaaggtc gtcgccgcgg cagctacggc ggcgcggtag gttatttcac cgcgcatggc	1380
gatctcgaca cctgcattgt gatccgctcg gcgctgggtg aaaacggtat cgccaccgtg	1440
caagcgggtg ctggtgtagt ccttgattct gtccgcagc cggaagccga cgaaaccgt	1500
aacaaagccc gcgctgtact gcgcgctatt gccaccgcgc atcatgcaca ggagactttc	1560
tgatggctga cattctgctg ctcgataata tcgactcttt tacgtacaac ctggcagatc	1620
agttgcgcag caatgggcat aacgtggtga ttaccgcaa ccatattccg gcgcaaacct	1680

taattgaacg cctggcgacc atgagcaatc cggtgctgat gctttctcct ggccccggtg	1740
tgccgagcga agccggttgt atgccggaac tcctcaccgc cttgcgtggc aagctgcccc	1800
ttattggcat ttgcctcgga catcaggcga ttgtcgaagc ttacgggggc tatgtcggtc	1860
aggcgggcga aattctccac ggtaaagcct ccagcattga acatgacggt caggcgatgt	1920
ttgccggatt aacaaacccg ctgccgggtg gcggttatca ctcgctggtt ggcagtaaca	1980
ttccggccgg tttaaccatc aacgcccatt ttaatggcat ggtgatggca gtacgtcacg	2040
atgcggatcg cgtttgtgga ttccagttcc atccggaatc cattctcacc acccagggcg	2100
ctcgcttgcg ggaacaaacg ctggcctggg cgcagcagaa actagagcca gccaacacgc	2160
tgcaaccgat tctgtaa	2177

<210> 55
 <211> 1053
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 55	
atgaattatc agaacgacga ttacgcac aaagaaatca aagagttact tcctcctgtc	60
gcattgctgg aaaaattccc cgctactgaa aatgccgcga atacggttgc ccatgcccga	120
aaagcgatcc ataagatcct gaaaggtaat gatgatcgcc tgttggttgt gattggcccc	180
tgtcgaattc atgatcctgt cgcggcaaaa gagtatgcc ctcgcttgct ggcgctgcgt	240
gaagagctga aagatgagct ggaaatcgta atgcgcgtct attttgaaaa gccgcgtacc	300
acggtgggct ggaaagggt gattaacgat ccgcacatgg ataatagctt ccagatcaac	360
gacggtctgc gtatagcccg taaattgctg cttgatatta acgacagcgg tctgccagcg	420
gcaggtgagt ttctcaatat gatcacccca caatatctcg ctgacctgat gagctggggc	480
gcaattggcg cacgtaccac cgaatcgag gtgcaccgcg aactggcatc agggctttct	540
tgtccggtcg gcttcaaaaa tggcaccgac ggtacgatta aagtggctat cgatgccatt	600
aatgccgccg gtgcgccgca ctgcttcctg tccgtaacga aatgggggca ttcggcgatt	660
gtgaatacca gcggtaacgg cgattgccat atcattctgc gcggcggtaa agagcctaac	720
tacagcgcgga agcacgttgc tgaagtgaag gaagggtga acaaagcagg cctgccagca	780

caggatgatga tcgatttcag ccattgctaac tcgtccaaac aattcaaaaa gcagatggat	840
gtttgtgctg acgtttgccg gcagattgcc ggtggcgaaa aggccattat tggcgtgatg	900
gtggaaagcc atctggtgga aggcaatcag agcctcgaga gcggggagcc gctggcctac	960
ggtaagagca tcaccgatgc ctgcatcggc tgggaagata ccgatgctct gttacgtcaa	1020
ctggcgaatg cagtaaaagc gcgtcgcggg taa	1053

<210> 56
 <211> 1101
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 56	
atgagttctc cagtctcact cgaaaacgcg gcgtcaacca gcaacaagcg cgtcgtggct	60
ttccacgagc tgcctagccc tacagacctc atcgccgcaa acccactgac accaaagcag	120
gcttccaagg tggagcagga tcgccaggac atcgctgata tcttcgctgg cgacgatgac	180
cgccctcgttg tcgttgtggg accttgc tca gttcacgata ctgaagcagc catcgattac	240
gcaaaccgcc tggctccgct ggcaaagcgc cttgatcagg acctcaagat tgtcatgcgc	300
gtgtacttcg agaagcctcg caccatcgtc ggatggaagg gattgatcaa tgatcctcac	360
ctcaacgaaa cctacgacat ccagaggggc ttgcgcattg cgcgcaaagt gcttatcgac	420
gttgtgaacc ttgatctccc agtcggctgc gaattcctcg aaccaaacag ccctcagtac	480
tacgccgaca ctgtcgcatg gggagcaatc ggcgctcgta ccaccgaatc tcagggtgcac	540
cgccagctgg cttctgggat gtgtatgcca atttggtttca agaacggaac tgacggaaac	600
atccaggttg cagtcgacgc ggtacaggct gccagaacc cacacttctt cttcggaacc	660
tccgacgacg gcgcgtgag cgtcgtggag accgcaggca acagcaactc ccacatcatt	720
ttgcgcggcg gtacctccgg ccggaatcat gatgcagctt cggtaggaggc cgtcgtcgag	780
aagcttggtg aaaacgctcg tctcatgata gatgcttccc atgctaactc cggcaaggat	840
catatccgac aggttgaggt tgttcgtgaa atcgagagc agatttctgg cggttctgaa	900
gctgtggctg gaatcatgat tgagtccttc ctcgttgggt gcgcacagaa ccttgatcct	960
gcgaaattgc gcatcaatgg cggtagaggc ctggtgtacg gacagtctgt gaccgataag	1020
tgcatcgata ttgacaccac catcgatttg ctcgctgagc tggccgcagc agtaaggga	1080

cgccgagcag cagccaagta a

1101

<210> 57

<211> 1089

<212> DNA

<213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 57

atggagagga ttgtcgttac tctcggggaa cgtagttacc caattacat cgcatctggt	60
ttgtttaatg aaccagcttc attcttaccg ctgaaatcgg gcgagcaggt catgttggtc	120
accaacgaaa ccttggctcc tctgtatctc gataaggctc gggcggtact tgaacaggcg	180
ggtgttaacg tcgatagcgt tctcctccct gacggcgagc agtataaaaag cctggctgta	240
ctcgataccg tccttacggc gttgtttaca aaaccgcatg gtcgcgatac tacgctggtg	300
gcgcttggcg gggcgtagt gggcgatctg accggcttcg cggcggcgag ttatcagcgc	360
ggtgtccgtt tcattcaagt cccgacgacg ttactgtcgc aggtcgattc ctccgttggc	420
ggcaaaactg cgggtcaacca tcccctcggg aaaaacatga ttggcgcggt ctaccaacct	480
gcttcagttg tgggtgatct cgactgtctg aaaacgcttc ccccgctga gttagcgtcg	540
gggctggcag aagtcacaa atacggcatt attcttgacg gtgcgttttt taactggctg	600
gaagagaatc tggatgcgtt gttgcgtctg gacgggtccg caatggcgta ctgtattcgc	660
cgttgttgtg aactgaaggc agaagttgtc gccgccgacg agcgcgaaac cgggttacgt	720
gctttactga atctgggaca cacctttggt catgccattg aagctgaaat ggggtatggc	780
aatttggttac atggtgaagc ggtcgctgcg ggtatggtga tggcggcgcg gacgtcggaa	840
cgctcggggc agtttagttc tgccgaaacg cagcgtatta taaccctgct caagcgggct	900
gggttaccgg tcaatgggcc gcgcgaaatg tccgcgcagg cgtatttacc gcacatgctg	960
cgtgacaaga aagtccttgc gggagagatg cgcttaattc ttccgttggc aattggtgag	1020
agtgaagtgc gcagcggcgt ttcgcacgag cttgttctta acgccattgc cgattgtcaa	1080
tcagcgtaa	1089

<210> 58

<211> 1098

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列

<400> 58

atgagcgcag tgcagatitt caacaccgtc cacgtcaatg gatcttcccc ctatgatgtc	60
cacattgggt cggccctcaa cgagctcatt gttcagcgcg cagcgggaatc aggcgcgag	120
caggtagcga ttttgcacca gcccagcatg gatgacattg catccgagtt ggatgcagca	180
ctagtcgctg ctggtttgaa ggtcctgcac cttaatgttc ccgatgcgga aaacggcaag	240
tccttggaa tagcggggca gtgctgggat gaattgggtg gcgcagcatt cggccgccgc	300
gatatcgtca tcggacttgg tggcgggtgct gccacagacc tcgcgggatt cgtcgctgct	360
gcatggatgc gtggcgtgcg cgtcattcag gtccaacca ccttgttggc tatggtggac	420
gctgcggtgg gcggcaagac tggcatcaat accgccgcag gcaagaacct tgtgggcgcg	480
ttccacgagc ctgacgcagt attcattgac accgatcgcc tagccaccct gcctgacgcg	540
gaaatcatcg cgggttccgc cgaaatcatc aaaactgggt tcatcgccga cccagaaatc	600
ctgcgccttt acgaaactga tcccgcagcc tgcctgaaga aagaagtcga aggctccac	660
ctacctgaac tgatttggcg ctccgtcacc gtcaagggct ccgtggtcgg ccaagacctc	720
aaagaatcta gcctgcgca aatcctcaac tacggacaca cctttgcca cgccgtcgaa	780
ctccgcgaaa acttccgctg gcgccacggc aatgccgttg cagtgggcat gatgttcac	840
gccaacctct cccacaagct cgggcttacc gacgcgcccc tcctcgagcg ccaccgctca	900
atcctggcgg ccatcggctt gccacttcc tacgaaggcg gagccttcga cgagctttac	960
gacggtatga cccgcgacaa gaaaaaccgc gacggcaaca tccgcttcgt cgcactgacc	1020
gccgtgggcg aggttacccg cattgagggg ccctcaaaac aagatttaca gagtgcctat	1080
gaggcaatca gccactaa	1098

<210> 59

<211> 525

<212> DNA

<213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 59

atgacacaac ctctttttct gatcgggcct cggggctgtg gtaaaacaac ggtcggaatg	60
gcccttgccg attcgcttaa ccgtcggttt gtcgataccg atcagtgggt gcaatcacag	120
ctcaatatga cggtcgcgga gatcgtcgaa agggaagagt gggcgggatt tcgcgccaga	180
gaaacggcgg cgctggaagc ggtaactgcg ccatccaccg ttatcgctac aggcggcggc	240

attattctga cggaatttaa tcgtcacttc atgcaaaaata acgggatcgt ggtttatttg	300
tgtgcccag tatcagtcct ggttaaccga ctgcaagctg caccggaaga agatttacgg	360
ccaaccttaa cgggaaaacc gctgagcgaa gaagttcagg aagtgctgga agaacgcgat	420
gcgctatata gcgaagttgc gcatattatc atcgacgcaa caaacgaacc cagccaggtg	480
atttctgaaa ttgcgcgcgc cctggcacag acgatcaatt gttga	525

<210> 60
 <211> 573
 <212> DNA
 <213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 60	
atggagcgta atgaagtga tgatcaaatt cacttagatc atcaatcaga tgacacctct	60
gaatgctcct gcccgatcgt ggttcttgtg ggtttgccag gagctggaaa atccaccatt	120
ggacgtcgat tagcgcgcg cttaaacact gaactcgtcg actccgacga actgattgag	180
cgcgccaccg gaaaagcctg tggcgccgtg ttcagcgagc tcggcgagcc agccttccgc	240
gagctcgagg ccatccacgt ggccgaagca ctgaaatcct ccggagtggg gagcttggga	300
ggcggatctg tgcctgacaga atccacccgt gaactgctca aaggccagga cgtggtctgg	360
atcgacgtgc cagtagaaga aggcatcagg cgcaccgcaa acgagcggtc ccgccccgtg	420
ctgcaagccg ccgaccccg cagacactac cgcaacctgg tgaaagtgcg cacccttg	480
tacgaagagg tggcaacctt ccgacttcgc accaacaacc gcagccccca gcaagtgggtg	540
gcagcagtgt tgcatcatct agaaatcgat taa	573

<210> 61
 <211> 1434
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 61	
gtggcggttg aaaccccgga agaaattgtc aagttcatca aggatgaaaa cgtcgagtgc	60
gttgacgttc gattcaccga ccttcccggc accgagcagc acttcagcat ccagctgcc	120
agcttcgatg cagatacaat cgaagaaggt ctcgattcg acggctcctc gatccgtggc	180
ttcaccacga tcgacgaatc tgacatgaat ctctgccag acctcggaac ggccaccctt	240

gatccattcc gcaaggcaaa gaccctgaac gttaagtctc tcgttcacga tcctttcacc	300
cgcgaggcat tctcccgcga cccacgcaac gtggcacgca aggcagagca gtacctggca	360
tccaccggca ttgcagacac ctgcaacttc ggcgccgagg ctgagttcta cctcttcgac	420
tccgttcgct actccaccga gatgaactcc ggcttctacg aagtagatac cgaagaaggc	480
tggtggaacc gtggcaagga aaccaacctc gacggcaccc caaacctggg cgcaaagaac	540
cgcgtcaagg gtggctactt cccagtagca ccatacgacc aaaccgttga cgtgcgcgat	600
gacatggttc gcaacctcgc agcttccggc ttcgctcttg agcgtttcca ccacgaagtc	660
ggtggcggac agcaggaaat caactaccgc ttcaacacca tgctccacgc ggcagatgat	720
atccagacct tcaagtacat catcaagaac accgctcgcc tccacggcaa ggctgcaacc	780
ttcatgccta agccactggc tggcgacaac ggttccggca tgcacgctca ccagtccttc	840
tggaaggacg gcaagccact ctccacgat gagtccggct acgcaggcct gtccgacatc	900
gcccgtact acatcggcgg catcctgcac cacgcaggcg ctgttctggc gttaccaac	960
gcaacctga actcctacca ccgtctgggt ccaggcttcg aggctccaat caacctgggtg	1020
tactcacagc gcaaccgttc cgctgctgtc cgtatcccaa tcaccggatc aaaccggaag	1080
gcaaagcgca tcgaattccg cgctccagac ccatcaggca acccatacct gggctttgca	1140
gcgatgatga tggccggcct cgacggcatc aagaaccgca tcgagccaca cgctccagtg	1200
gacaaggacc tctacgaact accaccagag gaagctgcat ccattccaca ggcaccaacc	1260
tccctggaag catccctgaa ggcactgcag gaagacaccg acttcctcac cgagtctgac	1320
gtcttcaccg aggatctcat cgaggcgtac atccagtaca agtacgacaa cgaaatctcc	1380
ccagttcgcc tgcgccaac cccgcaggaa ttcgaaattgt acttcgactg ctaa	1434

<210> 62
 <211> 1341
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列

<400> 62	
atgaacagcg aacaggaatt tgtactcagc gccattgaag aacgcgacat taagtttgtg	60
cgtctatggc tcaactgacat tcttggccac ttgaagtcag tggttgtggc tcctgcagaa	120

ctagagtctg cgttggaaga aggcacgga ttcgatggct cagccattga gggctacgcg	180
cgtatctcgg aagcggacac cattgcccgc ccagatccat cgacattcca ggtcctccca	240
ctagaagcgg gcatctcaaa actgcaggca gcacgcctgt tttgcgatgt cacgatgcca	300
gacggacagc catctttttc tgacccgcgc caagtgtgc gcaggcaggt ccaactagct	360
gcagatgaag gcttgacctg catgatctca ccagagattg agttctatit ggtgcaaagc	420
cttcgcacca acggactgcc acctgtgccc actgacaacg gcggatatit cgaccaagcc	480
acattcaatg aggcgccgaa tttccgtcga aacgcgatgg tagcgctgga ggaactcggc	540
atccctgtcg agttctccca ccatgaaact gcacctggcc agcaagaaat cgattttacgc	600
catgcggatg cgctcactat ggccgacaac atcatgacct tccgctacat catgaaacag	660
gtggcaaggg accaaggcgt cggggcatca tttatgcccc agccattcca agaacatgca	720
ggctccgcca tgcacacgca catgtcctta tttgaggcg ataccaacgc gttccacgat	780
ccagacgatt cttacatgct gtccaaaacc gcaaaacagt tcatcgctgg aatcttgcat	840
cacgctccag aattcacgc tgtgaccaac cagtgggtca attcctacaa acgcatcgtg	900
tacggaaacg aagctccaac tgcggcaacc tggggtgtat ctaatcgttc tgcgctggtt	960
cgtgttccta cctaccgtit gaataaggag gagtgcgcc gggaggaggt gcgtcttctt	1020
gataccgctt gtaaccata tttggcggtt tcagtgatgc tcggcgctgg tttgaaaggc	1080
attaaagaag gttatgagct cgacgagcca gctgaggacg atatctccaa cttgagcttc	1140
cgggaacgtc gcgctatggg ctacaacgat ctgccaagca gccttgatca ggcactgcgc	1200
caaattgaaa agtcagagct tgttgctgac atcctcgggt agcacgtttt tgagtttttc	1260
ttgcgcaata agtggcgtga atggcgtgac taccaagagc agatcactcc gtgggagctc	1320
cgaaacaatc ttgattacta g	1341

<210> 63
 <211> 1880
 <212> DNA
 <213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 63	
atggatatca agagtgcgtt gagccgtatc gtcgggcagt tggacctgac taccgaagaa	60
atgcgcgagg tcatgcgcca gatcatgacc ggtcagtga gcgaggcgca gataggcgct	120
ttcctgatgg gcatgcgcat gaaaagcgaa agcatcgacg aaatcgtcgg tgcggtgtcg	180

gtgatgcgtg agctggccga aaaggtcgag ctgcaaagcc tcgatggtgt cgtcgatatt	240
gtcgggaccg gtggtgatgg cgccaacatc ttcaacgtgt ccaccgcttc gtccttcgtc	300
ctggcggcgg cgggttgccc ggtggccaag catggtaacc gcgcagtctc gggcaagagc	360
ggcagtgccg acctgctgga agctgccggc atctacctga acctgacgcc aactcaagtg	420
gcacgctgca tcgacagcct gggcatcggc ttcatgttcg cgcaaagtca ccactcggcc	480
atgaaacatg ccgctggccc acgtcgagaa ctggggttgc gcaccctgtt caatatgctc	540
ggcccgcctta cgaatccggc cggagtgaag caccaggtgg tcggtgtgtt cgcgcaaacc	600
ctttgccgcc cgctggctga ggtgctgcag cgcctgggga gcaagcatgt gctggtcgtg	660
cactcgaagg atggtctgga cgagttcagc ctggctgcac ccaccttcgt cgccgaactg	720
aaaaatgacg aaatcactga atattgggtc gagccggaag acctcggcat gaagagtcag	780
agccttcattg gcctggctgt cgagagcccc caggcttcgc tggagttgat ccgcgatgcg	840
ctgggcccggc gcaagaccga gaacggtcag aaggccgccg agatgatcgt gcttaatgct	900
ggcgcggcac tgtatgcagc cgaccatgcc atgagcctga aagccggtgt agaactggcc	960
catgatgtac tgcacaccgg cctggcctgg gaaaagctgc aggaattggg tgcctttact	1020
gcagtattca aggtggagaa cgaagcatga gtgtgccgac ggtgctggaa aggatcattg	1080
cccgaagtt tcaggaagtg gccgagcgca gtgcgcacgt cagcctcgcc gaactggagg	1140
gcctggccaa ggccgctgac gccccgcgag gcttcgccaa cgcgctgac gagcaggcca	1200
agcgcaagca gcccgcggtg attgccgaaa tcaagaaagc ttcgccaagc aagggcgtga	1260
tccgcgagca cttcgtgcc a gcgaaaatcg cggtcagcta cgagaagggc ggggccacct	1320
gcctgtcggg gttgaccgat gtcgattatt tccaggggtgc cgatgagtac ttgcagcagg	1380
cccgcgcggc ggtttcgtg ccggtgatcc gcaaggactt catggtcgac ccttaccaga	1440
tcgtcgaagc ccgggccctg ggggcagatt gcgtactgct gatcgtgtcg gcgctggatg	1500
acgtgaagat ggctgaactg gccgccactg ccaaggacgt cggcctcgac gtgctggtgg	1560
aagtgcacga tggcgaigaa ctggagcgcg cgctgaaaac cctggatacg ccgctggtgg	1620
gggtgaacaa ccgcaacctg cacaccttcg aggtcagcct ggaaaccacc ctigacctgc	1680
tgccgcgcat tccgcgtgac cgtctggcga ttaccgaaag cggatattctc aaccgggccg	1740
atgtggagct gatggcaatc aacgaggttt actcgttcct ggtgggtgag gcgttcatgc	1800
gcgccgagca gcctggcctg gaattacagc ggctgttctt ccccgagcag gtgaagaaga	1860

ctgttcagca actggactga 1880

<210> 64
<211> 1104
<212> DNA
<213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 64
atggctgaca tgtccgaaca ggagctcaag gcgctgcgcg tacgcatcga cagcctcgac 60
gagaaaattc tcgagctgat cagcgaccgc gcccgctgcg ccgaagaagt ggcccgggtc 120
aagactgcct cgctgaaaga aggcgagaag cgggtgttct accgtcccga gcgtgaagct 180
gcgggtgctca agcgcgtgat ggaacgcaac aaggggcccgc tgggcaacga agagatggcg 240
cggctgttcc gcgaaatcat gtctgtctgc ctggccctgg aagagccgct gaaaatcgcc 300
tacctcggcc ctgaagggtac ctacaccag gcggcggcca tgaagcactt cggccacgcg 360
gtgatcagtc ggccgatggc ggccatcgac gaagtgttcc gtgaagtggc ggccggtgcc 420
gtcaacttcg gtgtgggtgcc ggtggaaaac tccactgaag gtgcggtcag ccacaccctg 480
gacagcttcc tcgagcatga catggtgatt tgcggtgagg tcgagctgcg tatccaccac 540
cacctgctgg tgggcgagaa caccaagacc gacagcatca cccgcatcta ctcccacgcc 600
cagtcgctgg ccagtgccg aaagtggctg gacgctcact acccgaacgt ggagcgcgtg 660
gccgtttcga gcaatgccga agcggccaag cgggtcaagg gtgagtggaa ctccggcggcg 720
atcgccggcg atatggcggc caacctgtac ggctgaccc gtctggccga gaagatcgaa 780
gaccgcccgg acaactccac gcgcttcctg atgatcggtg accaggaagt accgccgacc 840
ggcgacgaca agacctgat catcgtttcg atgagcaaca agccaggtgc gttgcatgag 900
ttgctgggtgc cgttctatca gaacggcatc gacctgaccc gcatcgagac ccgcccgtcg 960
cgcagcggca agtggacctg cgtgttcttc atcgacttcg tcggccacca ccgcgacccg 1020
ctgatcaagg cgggtgctcg gcagatcagc caggaggctg tggcgctgaa ggtgctgggc 1080
tcttatccga aggcggtgct ttga 1104

<210> 65
<211> 8
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223>	人工序列	
<400>	65	
	atggctga	8
<210>	66	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	66	
	tatgccgtgt tgaatgccat t	21
<210>	67	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	67	
	cccgggatcc actaaactta aacacagtgt tgctggagaa gtcat	45
<210>	68	
<211>	48	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	68	
	tgtttaagtt tagtggatcc cggggaaaag gagtcctcca atgactag	48
<210>	69	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	69	
	ccagatcgac gttttcctgg c	21
<210>	70	

<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	70	
gccctgcagg	taaaaaaagg atttgattca tgacttctcc agcaacactg	50
<210>	71	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	71	
gccctgcagg	taaaaaaagg atttgattcg tgacttctcc agcaacactg	50
<210>	72	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	72	
gccctgcagg	taaaaaaagg atttgattct tgacttctcc agcaacactg	50
<210>	73	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	
<400>	73	
gccctgcagg	taaaaaaagg attatgactt ctccagcaac actg	44
<210>	74	
<211>	44	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列	



<400> 74
gccctgcagg taaaaaaagg attatgactt ctccagcaac actg 44

<210> 75
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成

<400> 75
gccctgcagg taaaaaaagg attttgactt ctccagcaac actg 44

<210> 76
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成

<400> 76
cccgggatcc ctagtcattg gaagactcct t 31

<210> 77
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成

<400> 77
aatccttttt ttacctgcag ggcttagttc gcgagaagct gttcg 45

<210> 78
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列合成

<400> 78
aaggagtctt ccaatgacta g 21

<210> 79
<211> 21
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列合成

<400> 79
gtctccccaa tcaaatcatc a 21

<210> 80
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列合成

<400> 80
cccgggatcc actaaacitc aacagtcacc tgcattagtc at 42

<210> 81
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列合成

<400> 81
tgtttaagtt tagtggatcc cgggcgcgga aaactcggat aa 42

<210> 82
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列合成

<400> 82
tgatgatgtg cccgtccaca g 21

<210> 83
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列合成

<400> 83
gccctgcagg acgtggcaga atagtgtgca tgactaatgc aggtgac 47

<210> 84
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列合成

<400> 84
 gccctgcagg acgtggcaga atagtgtgcg tgactaatgc aggtgac 47

<210> 85
 <211> 47
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列合成

<400> 85
 gccctgcagg acgtggcaga atagtgtgct tgactaatgc aggtgac 47

<210> 86
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列合成

<400> 86
 gccctgcagg acgtggcaga atagatgact aatgcaggtg ac 42

<210> 87
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 人工序列合成

<400> 87
 gccctgcagg acgtggcaga ataggtgact aatgcaggtg ac 42

<210> 88
 <211> 42
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>		
<223>	人工序列合成	
<400>	88	
	gccctgcagg acgtggcaga atagttgact aatgcaggtg ac	42
<210>	89	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列合成	
<400>	89	
	cccgggatcc ttatccgagt tttccgcgtc c	31
<210>	90	
<211>	45	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列合成	
<400>	90	
	aatccttttt ttacctgcag ggcttagttc gcgagaagct gttcg	45
<210>	91	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列合成	
<400>	91	
	aaggagtcctt ccaatgacta g	21
<210>	92	
<211>	11	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	人工序列合成	
<400>	92	
	agccctgcag g	11

<210> 93
<211> 525
<212> DNA
<213> 大腸桿菌

<400> 93
atgacacaac ctctttttct gatcgggcct cggggctgtg gtaaaacaac ggtcggaatg 60
gcccttgccg attcgcttaa ccgtcggttt gtcgataccg atcagtggtt gcaatcacag 120
ctcaatatga cggtcgcgga gatcgtcgaa agggaaagagt gggcgggatt tcgcgccaga 180
gaaacggcgg cgctggaagc ggtaactgcg ccatccaccg ttatcgctac aggcggcggc 240
attattctga cggaatttaa tcgtcacitc atgcaaaaata acgggatcgt ggttttattg 300
tgtgcgccag tatcagtcct ggtaaaccga ctgcaagctg caccggaaga agatttacgg 360
ccaaccttaa cgggaaaacc gctgagcgaa gaagttcagg aagtgcctgga agaacgcgat 420
gcgctatatc gcgaagttag gcatattatc atcgacgcaa caaacgaacc cagccaggtg 480
atttctgaaa ttgcgcagcgc cctggcacag acgatcaatt gttga 525

<210> 94
<211> 573
<212> DNA
<213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 94
atggagcgtg atgaagtga tgatcaaatt cacttagatc atcaatcaga tgacacctct 60
gaatgctcct gcccgatcgt ggttctttgtg ggtttggcag gagctggaaa atccaccatt 120
ggacgtcgat tagcgcgcgc cttaaact gaactcgtcg actccgacga actgattgag 180
cgcgccaccg gaaaagcctg tggcgccgtg ttcagcgagc tcggcgagcc agccttccgc 240
gagctcgagg ccatccacgt ggccgaagca ctgaaatcct ccggagtggg gagcttggga 300
ggcggatctg tgctgacaga atccaccgt gaactgctca aaggccagga cgtggtctgg 360
atcgacgtgc cagtagaaga aggcatcagg cgcaccgcaa acgagcgttc ccgccccgtg 420
ctgcaagccg ccgacccgcg cgagcactac cgcaacctgg tgaaagtgcg caccctgtg 480
tacgaagagg tggcaacctt ccgacttcgc accaacaacc gcagccccca gcaagtgggtg 540
gcagcagtggt tgcattcatct agaaatcgat taa 573

<210> 95
<211> 1434
<212> DNA

<213> 麩胺酸棒狀桿菌

<400> 95

gtggcggttg aaaccccgga agaaattgtc aagttcatca aggatgaaaa cgtcgagttc	60
gttgacgttc gattcaccga ccttcccggc accgagcagc acttcagcat cccagctgcc	120
agcttcgatg cagatacaat cgaagaaggf ctgcattcg acggatcctc gatccgtggc	180
ttcaccacga tcgacgaatc tgacatgaat ctccctgccag acctcggaac ggccaccctt	240
gatccattcc gcaaggcaaa gaccctgaac gttaagtict tcgttcacga tcctttcacc	300
cgcgaggcat tctcccgcga cccacgcaac gtggcacgca aggcagagca gtacctggca	360
tccaccggca ttgcagacac ctgcaacttc ggcgccgagg ctgagttcta cctcttcgac	420
tccgttcgct actccaccga gatgaactcc ggcttctacg aagtagatac cgaagaaggc	480
tggtggaacc gtggcaagga aaccaacctc gacggcacc caaacctggg cgcaaagaac	540
cgcgtaagg gtggctactt cccagtagca ccatcgacc aaaccgttga cgtgcgcgat	600
gacatggttc gcaacctcgc agcttccggc ttcgctcttg agcgtttcca ccacgaagtc	660
ggtggcggac agcaggaaat caactaccgc ticaacacca tgctccacgc ggcagatgat	720
atccagacct tcaagtacat catcaagaac accgctcgcc tccacggcaa ggctgcaacc	780
ttcatgccta agccactggc tggcgacaac ggttccggca tgcacgtca ccagtccttc	840
tggaaggacg gcaagccact ctccacgat gagtccggct acgcaggcct gtccgacatc	900
gcccgtact acatcggcgg catcctgcac cacgcaggcg ctgttctggc gttcaccaac	960
gcaacctga actcctacca ccgtctggtt ccaggcttcg aggtccaat caacctggtg	1020
tactcacagc gcaaccgttc cgctgctgtc cgtatcccaa tcaccggatc caaccgaag	1080
gcaaagcgca tcgaattccg cgctccagac ccatcaggca accatacct gggctttgca	1140
gcgatgatga tggccggcct cgacggcatc aagaaccgca tcgagccaca cgctccagtg	1200
gacaaggacc tctacgaact accaccagag gaagctgcat ccattccaca ggcaccaacc	1260
tccttgaag catccctgaa ggcactgcag gaagacaccg acttcctcac cgagtctgac	1320
gtcttcaccg aggatctcat cgaggcgtag atccagtaca agtacgacaa cgagatctcc	1380
ccagttcgcc tgcgccaac cccgcaggaa ttcgaattgt acttcgactg ctaa	1434

<210> 96

<211> 1857

<212> DNA

<213> 麴胺酸棒狀桿菌

<400> 96

atgcgtacat ccattgccac tgtttgtttg tccggaactc ttgctgaaaa gctgcgcgca	60
gctgcagatg ctggatttga tgggtgtggaa atcttcgagc aggacttggg ggtttccccg	120
cattcggcag agcagattcg tcagcgggct caggatttgg gattaaccct ggatctgttc	180
cagccgtttc gagatttcga aggtgtggaa gaagagcagt ttctgaagaa tctgcaccgc	240
ttggaagaga agttcaagct gatgaacagg ctgggcattg agatgatctt gttgtgttcc	300
aatgtgggca ccgcgaccat caatgatgat gaccttttcg tggagcagtt gcatcgtgca	360
gcagatttgg ctgagaagta caacgtcaag attgcttatg aagcgttggc gtggggcaag	420
tttgtcaatg attttgagca tgcgcatgca cttgtggaga aggtgaatca caaggcgtg	480
ggaacctgct tggatacgtt ccatattctt tcccgtgggt gggaaaccga cgaggtggaa	540
aacatcccgg cggagaagat tttctttgtt cagttggcgg atgcaccgaa gctgagcatg	600
gacattttgt cctggtcgcg tcaccaccgt gttttccctg gtgaaggcga tttcgatctg	660
gtgaaattca tggttcatct ggccaagacg ggttatgatg gcccgatttc tttggaaatc	720
ttcaacgatt ccttccgcaa ggccgagggt ggtcgcaccg cgattgatgg gttgcgttct	780
ttgcgttggg ttggaagatca gacctggcat gcgctaaatg ctgaggatcg tccaagcgca	840
ctagagctgc gtgcacttcc tgaggtcgcg gaacctgaag gcgttgattt cattgagatc	900
gccactggac gtttgggtga gaccattcgg gttcttcac aattgggttt ccgcttgggt	960
ggtcactact gcagtaagca ggattaccag gtatggaccc agggcgatgt gcgcattgtg	1020
gtgtgtgatc gtggggccac cggggctcca accacgatct ctgcgatggg ctttgacacc	1080
cctgatccag aagccgcgca tgcctgtcgc gaattgctgc gggctcagac aattgatcgt	1140
ccccacatcg aggggtgaagt tgaccttaaa ggtgtgtacg cgccggatgg ggtggagctg	1200
tttttcgcgg ggccgagccc cgatggaatg cccgagtggc tgccggagt t cggcgtcgaa	1260
aagcaagaag ctggtctcat tgaagccatc gaccacgtca atttcgcca gccgtggcaa	1320
cattttgatg aggcagtgtt gttttacacc gcgctgatgg cgttagagac tgtcgtgag	1380
gatgagttcc cgagcccaat tggtttgggt cgcaatcagg tgatgcgttc gccgaatgat	1440
gcggtgcggt tgctgctcag cgtggcgccg gaggacggtg agcagggaga tttcctcaac	1500
gcggcctacc cggagcacat tgcgttggcc acggcggaca tcgtggcggt ggctgaacgt	1560

gcgcgcaaac gaggcctgga tttcttgccc gtcccagaga attactacga cgatgtgcag 1620
gcgcgttttg atttgccgca ggagtctctg gacacactca aggaaaacca cctgctttac 1680
gactgcgacg agaacggcga gttcctccac ttttacaccc gcacgttggg cacgctgttc 1740
ttcgaagtgg tggaacgccg cggcggtttt gcaggttggg gcgaaacaaa cgctccggtg 1800
cggtttagcgg cgcagtatcg tgaggtgcgg gacctcgagc ggggaatccc caactag 1857

<210> 97
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> Primer

<400> 97
ttagaggaga caccatatgg cgittgaaac cccggaaga 39

<210> 98
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子Ex-glnA-2

<400> 98
gaaccatggg ctagcctcga gttagcagtc gaagtacaat tc 42

<210> 99
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子Ex-aroL-1

<400> 99
ggccctgcag ggaaaggagg cccttcagat gacacaacct ctttttctga 50

<210> 100
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子Ex-aroL-2

<400> 100
cccgggatcc tcaacaattg atcgtctgtg c 31

<210> 101
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子Ex-aroK-1

<400> 101
ggccctgcag ggaaaggagg cccctcagat gaatgatcaa attcacttag 50

<210> 102
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子Ex-aroK-2

<400> 102
cccgggatcc ttaatcgatt tctagatgat gc 32

<210> 103
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子JK038f

<400> 103
attcgagctc ggtacccggg gatccactac atcgaaaccg gcatc 45

<210> 104
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子JK039r

<400> 104
ctgaactcga gtcagccatg ctccttctc 29

<210> 105
<211> 34
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引子JK040f

<400> 105
gcatggctga ctcgagttca ggggccttgg ggct 34

<210> 106
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 引子JK041r

<400> 106
tagaagcttg catgcctgca ggcagtgagt cgaccaggcc aaag 44

<210> 107
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 引子Ko-csm-1

<400> 107
cttgccgacg agcgtagaaa t 21

<210> 108
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 引子Ko-csm-2

<400> 108
gttgaggact accttgactt g 21

<210> 109
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 引子Ex-aroG-1

<400> 109
gccctgcagg agatctgaaa ggaggccctt cagatgaatt atcagaacga cgat 54

.

<210> 110
<211> 31
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 引子Ex-aroG-2

<400> 110
cccgggatcc ttacccgcga cgcgctttta c

31

發明摘要

※ 申請案號：104105209

※ 申請日：104.2.16

※ I P C 分類：

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/11 (2006.01)

C12P 13/00 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

生產鄰-胺基苯甲酸鹽之重組菌株及來自經由2-胺基苯甲酸之再生資源發酵生產苯胺

RECOMBINANT STRAIN PRODUCING O-AMINOBENZOATE AND
FERMENTATIVE PRODUCTION OF ANILINE FROM RENEWABLE
RESOURCES VIA 2-AMINOBENZOIC ACID

【中文】

本發明提供一種能夠以生物方式將包含可發酵碳物質的原料轉化成o-胺基苯甲酸鹽的重組微生物宿主細胞。本發明進一步提供一種用以生產苯胺的方法，包含下列步驟：a)使用能夠以生物方式將包含至少一種可發酵碳物質的原料轉化成o-胺基苯甲酸鹽的重組微生物宿主細胞，藉由發酵該含有至少一種可發酵碳物質的原料來生產o-胺基苯甲酸鹽，其中該o-胺基苯甲酸鹽包含鄰胺苯甲酸根陰離子；b)藉由酸質子化，將該o-胺基苯甲酸鹽自該鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成鄰胺苯甲酸；c)藉由沉澱或藉由溶解於有機溶劑中回收該鄰胺苯甲酸，以及d)藉由在有機溶劑中熱去羧化將該鄰胺苯甲酸轉化成苯胺。

【英文】

The invention provides a recombinant microbial host cell capable of converting a raw material comprising a fermentable carbon substrate to o-aminobenzoate biologically. The invention further provides A method for producing aniline, comprising the steps of: a) producing o-aminobenzoate by fermentation of a raw material comprising at least one fermentable carbon substrate using the recombinant microbial host cell of the capable of converting said raw material comprising at least one fermentable carbon substrate to o-aminobenzoate biologically, wherein said

o-aminobenzoate comprises anthranilate anion, b) converting said o-aminobenzoate from said anthranilate anion to anthranilic acid by acid protonation, c) recovering said anthranilic acid by precipitation or by dissolving in an organic solvent, and d) converting said anthranilic acid to aniline by thermal decarboxylation in an organic solvent.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：無

【本代表圖之符號簡單說明】：無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：無

申請專利範圍

1. 一種重組微生物宿主細胞，其能夠以生物方式將包含可發酵碳物質的原料轉化成 o -胺基苯甲酸鹽。
2. 如請求項1之重組微生物宿主細胞，其中該微生物宿主細胞是選自由細菌、酵母菌及真菌組成之群，其中該細菌較佳為大腸桿菌菌株、棒狀桿菌菌株或假單孢菌菌株，其中該棒狀桿菌菌株較佳為麩胺酸棒狀桿菌，更佳為麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032，而其中該假單孢菌菌株較佳為臭味假單孢菌(*Pseudomonas putida*)，更佳為臭味假單孢菌KT2440。
3. 如請求項1或2之重組微生物宿主細胞，其中該微生物宿主細胞為麩胺酸棒狀桿菌，較佳為麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032，其中該麩胺酸棒狀桿菌包含編碼鄰胺苯甲酸磷酸核糖基轉移酶之 $trpD$ 基因(SEQ ID NO: 1)的一個遺傳修飾型，其中該遺傳修飾型較佳是選自由SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 4、SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7，及SEQ ID NO: 8組成之群，且其中該遺傳修飾型具有 $trpD$ 基因表現降低的效力。
4. 如請求項1至3中任一項之重組微生物宿主細胞，其中該微生物宿主細胞為麩胺酸棒狀桿菌，較佳為麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032，其中該麩胺酸棒狀桿菌包含編碼分支酸變位酶之 csm 基因(SEQ ID NO: 9)的一個遺傳修飾型，其中該遺傳修飾型是選自由SEQ ID NO: 10、SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12、SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 15及SEQ ID NO: 16組成之群，且其中該遺傳修飾型具有 csm 基因表現降低的效力。
5. 如請求項2至4中任一項之重組微生物宿主細胞，其中該麩胺酸棒狀桿菌微生物宿主細胞進一步包含一或多個選自下列組成之群的刪除： hpr (SEQ ID NO: 17或SEQ ID NO: 18)、 $ptsG$ (SEQ ID NO: 19或SEQ ID NO: 20)、 $pepco$ (SEQ ID NO: 21或SEQ ID NO: 22)、 pyk (SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 24)，以及 gpi (SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 28)。
6. 如請求項2至5中任一項之重組微生物宿主細胞，其中該麩胺酸棒狀桿菌微生物宿主細胞進一步過度表現一或多個選自下列組成之群的基因： $galP$ (SEQ ID NO: 30)、 $iolT2$ (SEQ ID NO: 31)、 $ppgk$ (SEQ ID NO: 32)、

pps (SEQ ID NO: 33-35)、*ppk* (SEQ ID NO: 36)、*zwf1* (SEQ ID NO: 37)、*opcA* (SEQ ID NO: 38-39)、*tktCg* (SEQ ID NO: 40)、*tktEc* (SEQ ID NO: 41)、*talCg* (SEQ ID NO: 42)、*talEc* (SEQ ID NO: 43)、*qsuA* (SEQ ID NO: 96)、*trpEG^{S38F}* (SEQ ID NO: 50)、*trpEG^{S38R}* (SEQ ID NO: 51)、*trpEG^{S40R}* (SEQ ID NO: 52)、*trpEG^{S40F}* (SEQ ID NO: 53)、*aroG^{D146N}* (SEQ ID NO: 55)、*aroL* (SEQ ID NO: 93)、*aroK* (SEQ ID NO: 94)，及*glnA* (SEQ ID NO: 95)。

7. 如請求項1或2中任一項之重組微生物宿主細胞，其中該微生物宿主細胞為臭味假單孢菌，較佳為臭味假單孢菌KT2440，其中該臭味假單孢菌包含編碼鄰胺苯甲酸磷酸核糖基轉移酶之*trpDC*基因(SEQ ID NO: 63與SEQ ID NO: 65)的一個刪除，或編碼分支酸變位酶之*pheA*基因(SEQ ID NO: 64與SEQ ID NO: 65)的一個刪除，或兩者。
8. 如請求項1至2及7中任一項之重組微生物宿主細胞，其中該微生物宿主細胞為臭味假單孢菌，較佳為臭味假單孢菌KT2440，其中該臭味假單孢菌過度表現一或多個選自下列組成之群的基因：*trpEG^{S40F}* (SEQ ID NO: 53)及*aroG^{D146N}* (SEQ ID NO: 55)。
9. 如請求項6或8之重組微生物宿主細胞，其中該一或多個過度表現的基因藉由質體轉形或藉由染色體轉形被併入該麩胺酸棒狀桿菌微生物宿主細胞中或臭味假單孢菌微生物宿主細胞中。
10. 如請求項1至9中任一項之重組微生物宿主細胞，其中該原料是選自由甜菜、甘蔗、含澱粉植物(較佳為玉米、小麥與裸麥)，以及木質纖維素(較佳為禾桿、木與榨渣)、甘油及C1-化合物(較佳為CO)組成之群。
11. 如請求項1至10中任一項之重組微生物宿主細胞，其中該可發酵碳物質是選自由下列組成之群：C-5單糖、C-6單糖、雙糖及三糖，其中C-5單糖較佳為木糖與阿拉伯糖，而其中C-6單糖較佳為葡萄糖、果糖或甘露糖，且其中雙糖較佳為蔗糖，且其中三糖較佳為蔗果三糖。
12. 一種用以生產苯胺的方法，其包含下列步驟：
 - a) 藉由使用如請求項1至10中任一項之重組微生物宿主細胞發酵含有至少一種可發酵碳物質的原料來生產*o*-胺基苯甲酸鹽，該重組微生物宿主細胞能夠將該含有至少一種可發酵碳物質的原料以生物方

- 式轉化成*o*-胺基苯甲酸鹽，其中該*o*-胺基苯甲酸鹽包含鄰胺苯甲酸根陰離子，
- b) 藉由酸質子化，將該*o*-胺基苯甲酸鹽自該鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成鄰胺苯甲酸，
 - c) 藉由沉澱或藉由溶解於有機溶劑中回收該鄰胺苯甲酸，以及
 - d) 藉由在有機溶劑中熱去羧化將該鄰胺苯甲酸轉化成苯胺。
13. 如請求項12之方法，其中該步驟a)的發酵為批次發酵、饋料批次發酵或連續發酵。
 14. 如請求項12或13之方法，其中至少步驟a)及步驟b)連續地運行。
 15. 如請求項12至14中任一項之方法，其中該重組微生物宿主在實施將該*o*-胺基苯甲酸鹽自該鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成鄰胺苯甲酸的步驟b)之前被移除，其中被移除的重組微生物宿主較佳被再饋送至步驟a)的發酵中。
 16. 如請求項12至15中任一項之方法，其中該步驟b)的酸質子化是藉由添加HCl，較佳達到pH為2,5至4,5，更佳pH為3至4來完成。
 17. 如請求項12至16中任一項之方法，其中在步驟c)中藉由沉澱回收鄰胺苯甲酸包含過濾，從而生成包含該經回收鄰胺苯甲酸的漿液，其中包含該經回收鄰胺苯甲酸的該漿液較佳溶解於有機溶劑中，其中該有機溶劑較佳為苯胺或1-十二醇或其混合物。
 18. 如請求項12至17中任一項之方法，其中在步驟c)中藉由將該鄰胺苯甲酸溶解於有機溶劑中來回收包含將該有機溶劑(較佳為苯胺或1-十二醇或其混合物)添加至該鄰胺苯甲酸，使得該鄰胺苯甲酸作為有機溶液中的溶質而被回收。
 19. 如請求項12至18中任一項之方法，其中步驟c)之後洗滌並且乾燥經回收鄰胺苯甲酸沉澱物，以進一步實施步驟d)的熱去羧化。
 20. 如請求項12至19中任一項之方法，其中步驟d)在催化劑存在下實施，其中該催化劑較佳為沸石催化劑，其中該沸石催化劑較佳為沸石H-Y，且其中熱去羧化步驟d)之後較佳為純化苯胺的又一步驟e)，較佳是藉由蒸餾。
 21. 如請求項12至20中任一項之方法，其中在步驟c)之後，殘餘鄰胺苯甲酸根陰離子是藉由吸附至離子交換樹脂或活性碳材料或沸石而被回收，較

佳的沸石經 Fe^{3+} 或 Ca^{2+} 改質，較佳為Fe-Y沸石，接著是經回收鄰胺苯甲酸根陰離子去吸附，且較佳之後將該鄰胺苯甲酸根陰離子至少部分再饋送至步驟b)以供藉由酸質子化將該鄰胺苯甲酸根陰離子轉化成鄰胺苯甲酸。

22. 如請求項21之方法，其中在步驟c)後藉由吸附回收殘餘鄰胺苯甲酸根陰離子之後，無吸附鄰胺苯甲酸根陰離子的水流至少部分地再饋送至步驟a)的發酵中。
23. 一種如請求項12至22中任一項所生產之苯胺用於生產亞甲二苯胺(MDA)的用途，其中在步驟d)及/或e)中生產的苯胺於水及催化劑存在下進一步轉化成亞甲二苯胺(MDA)與甲醛。
24. 如請求項23之用途，其中所生產之MDA進一步轉化成亞甲二異氰酸酯(MDI)與光氣。

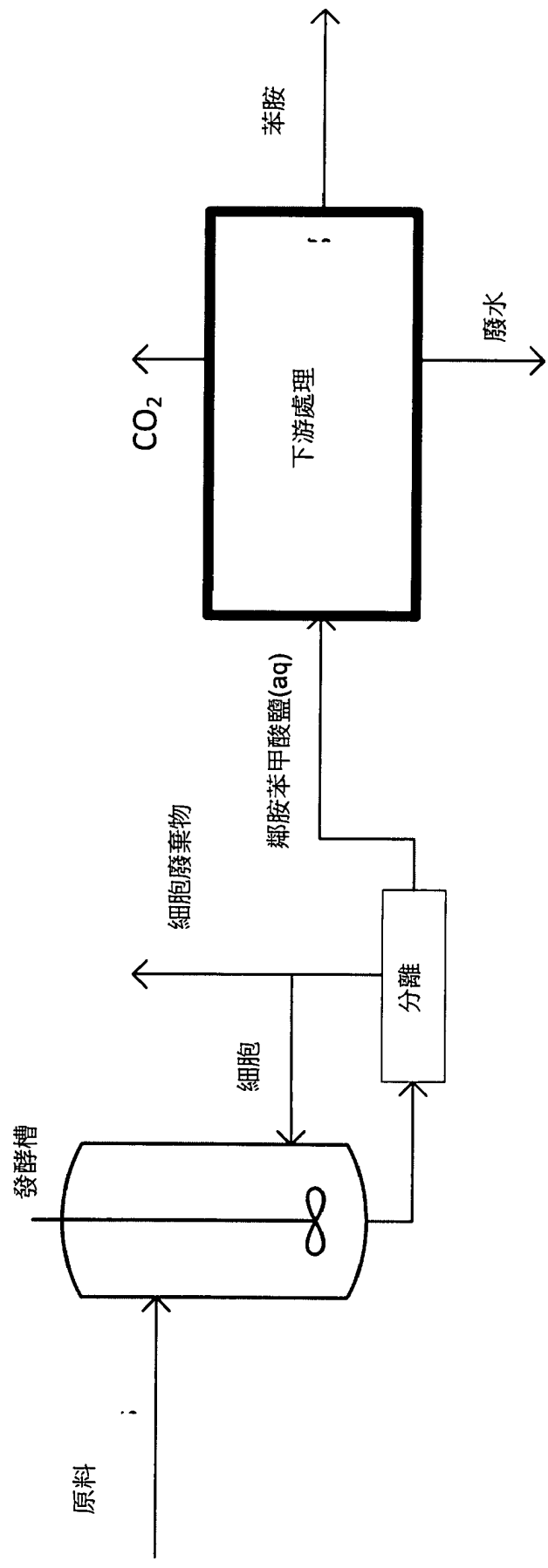


圖 5

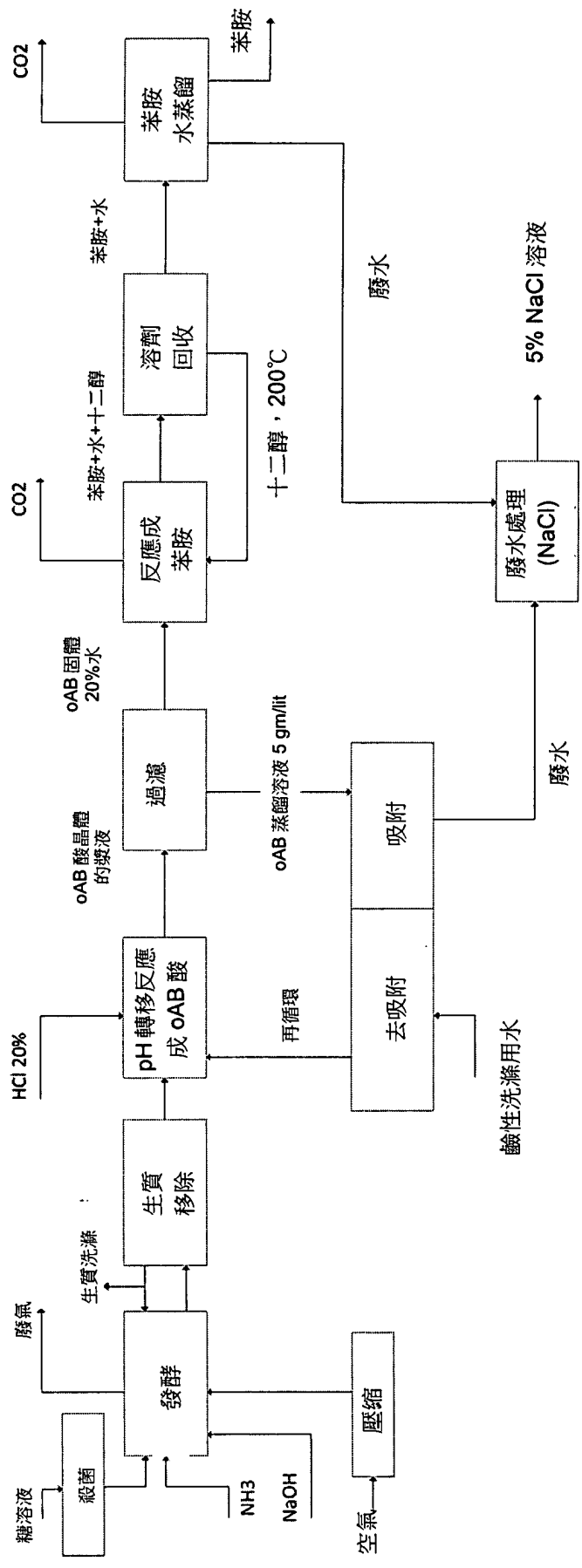


圖 6

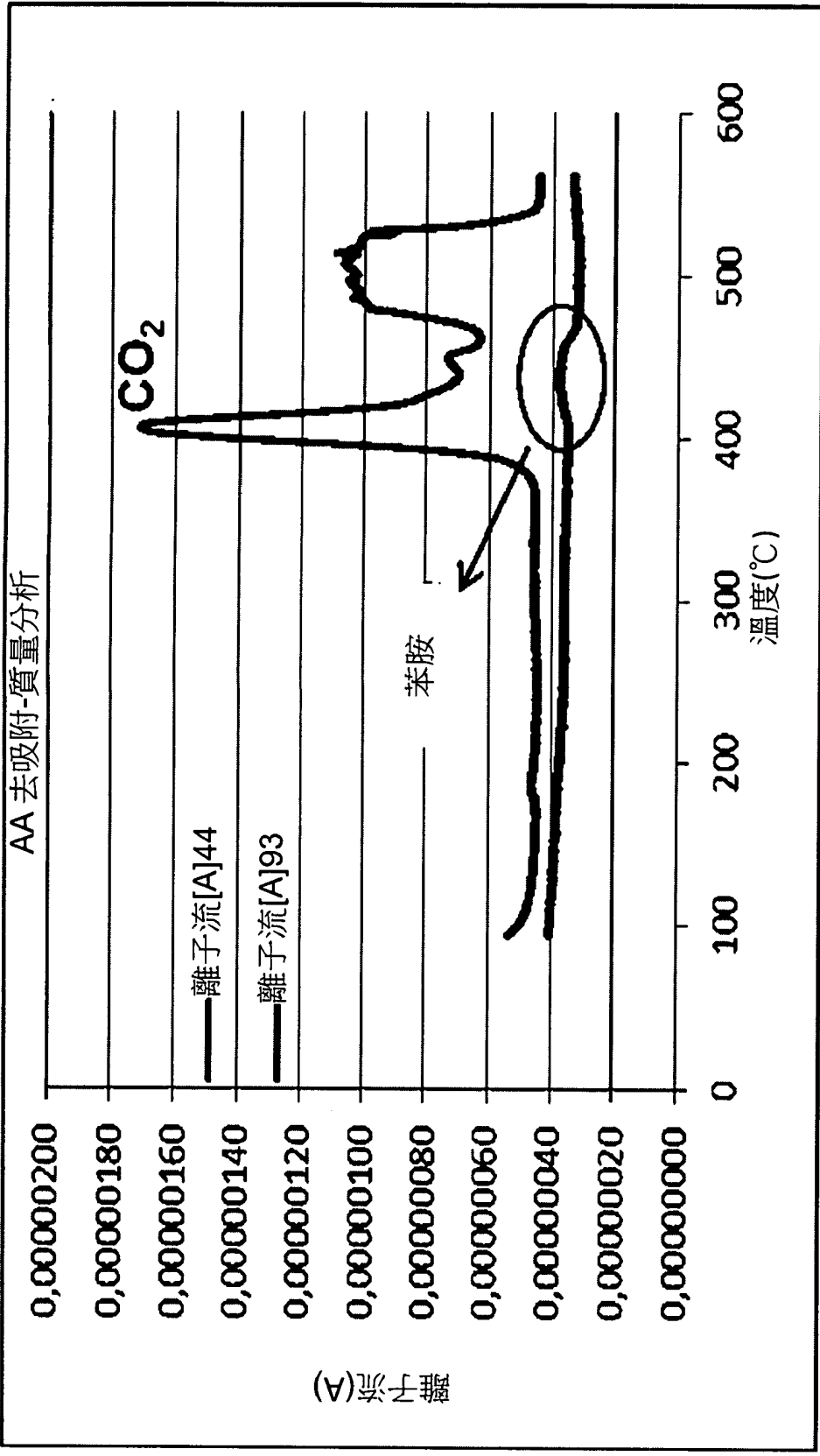


圖 7

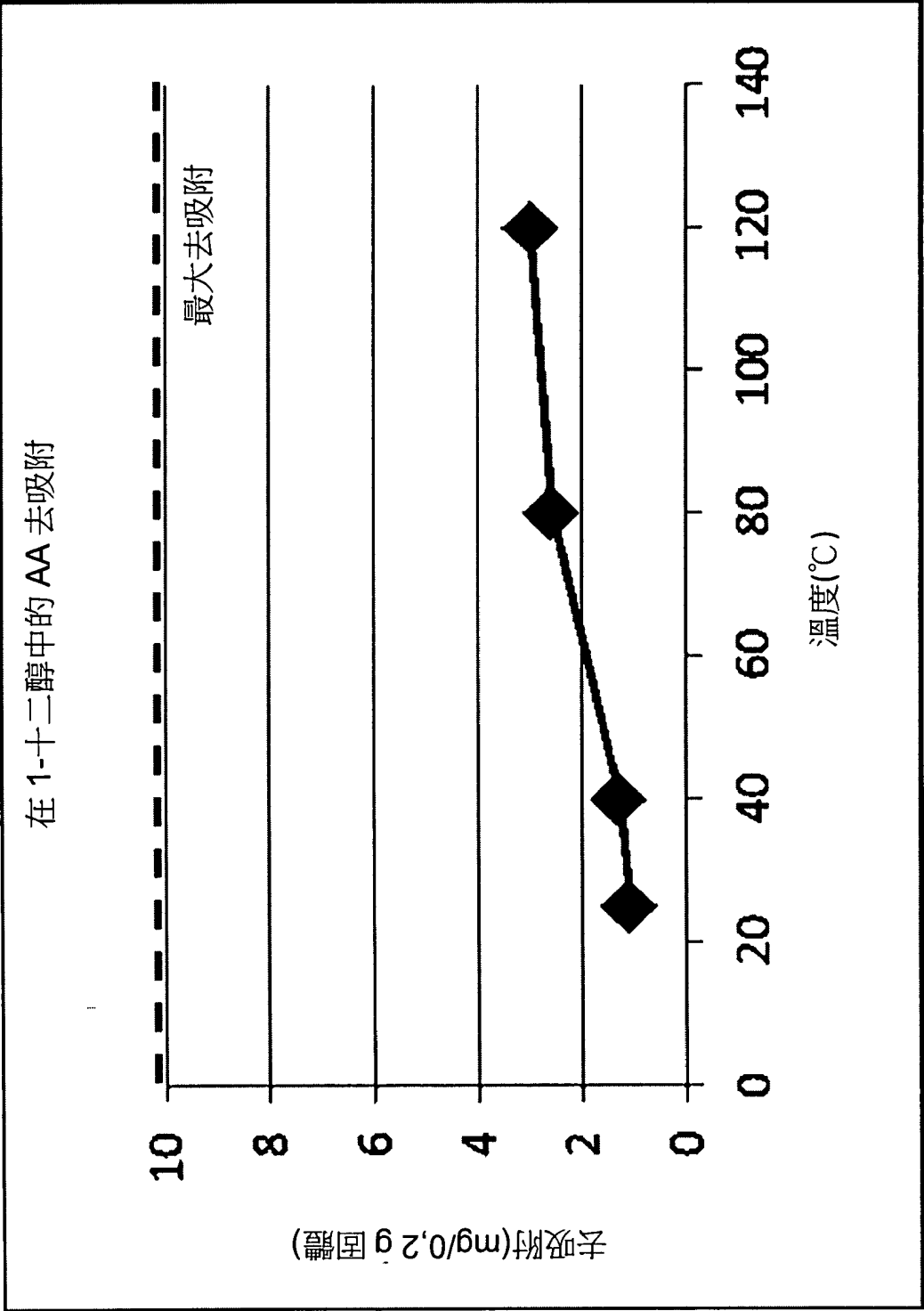


圖 8

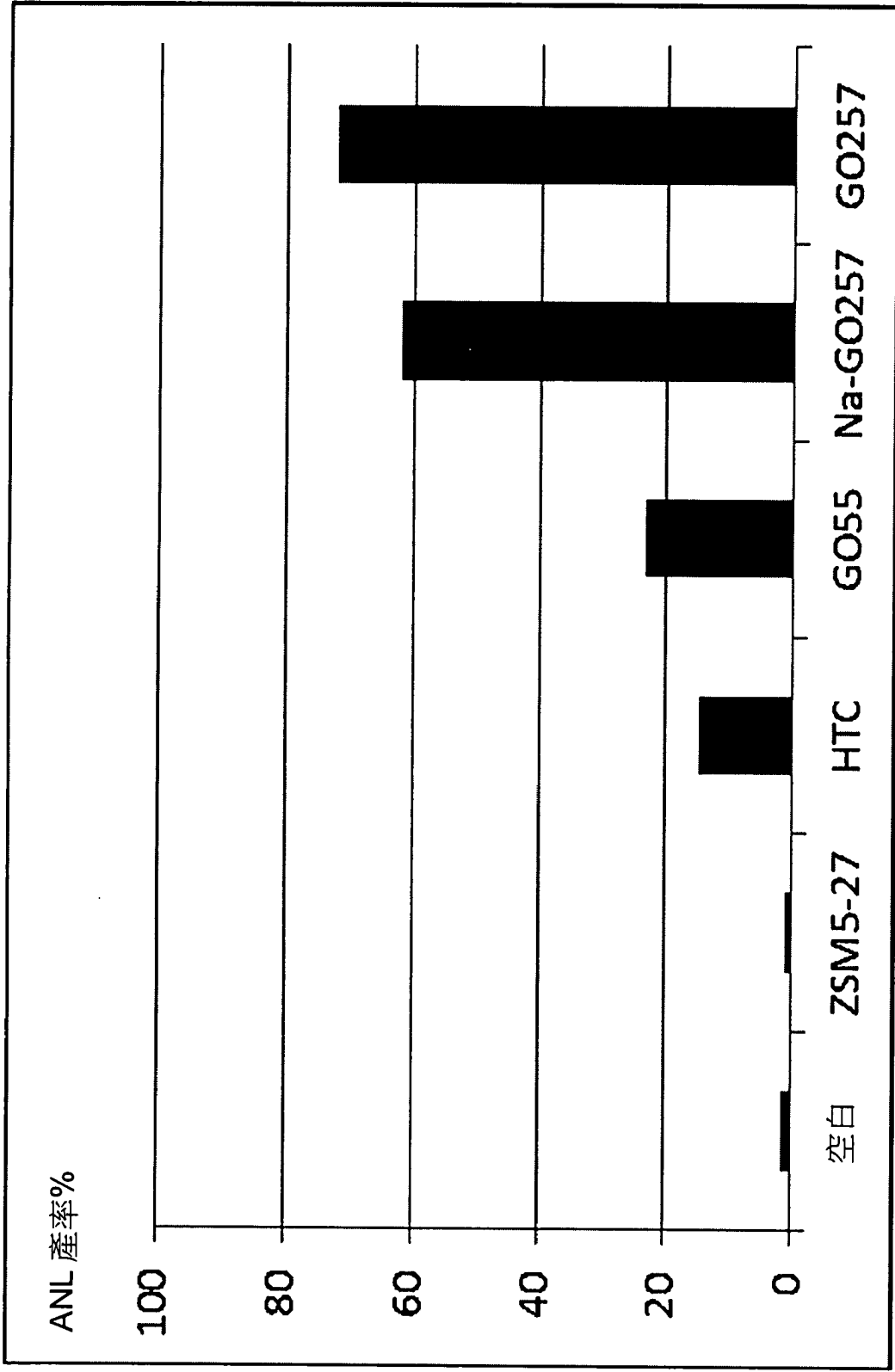


圖 9

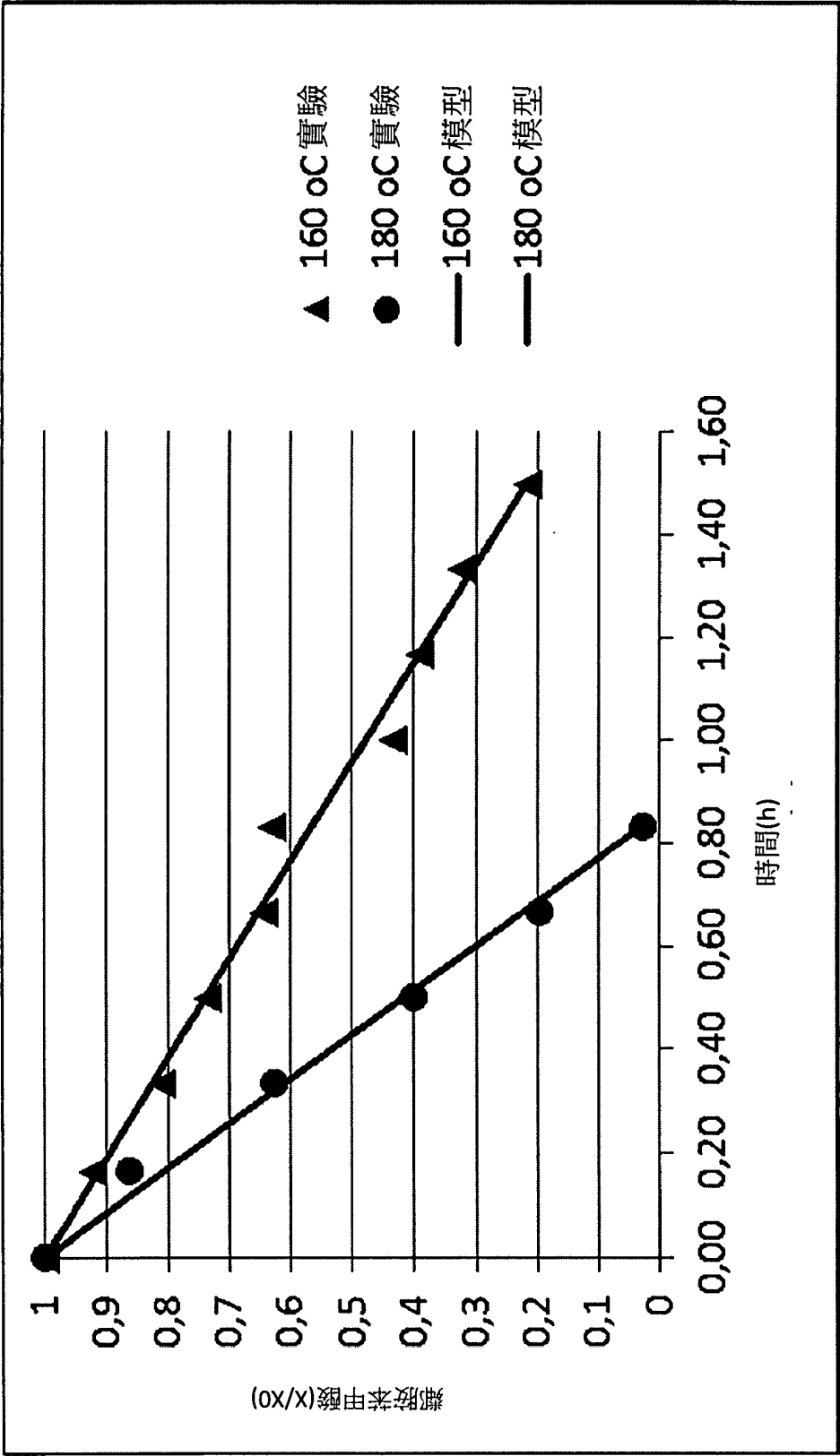


圖 10

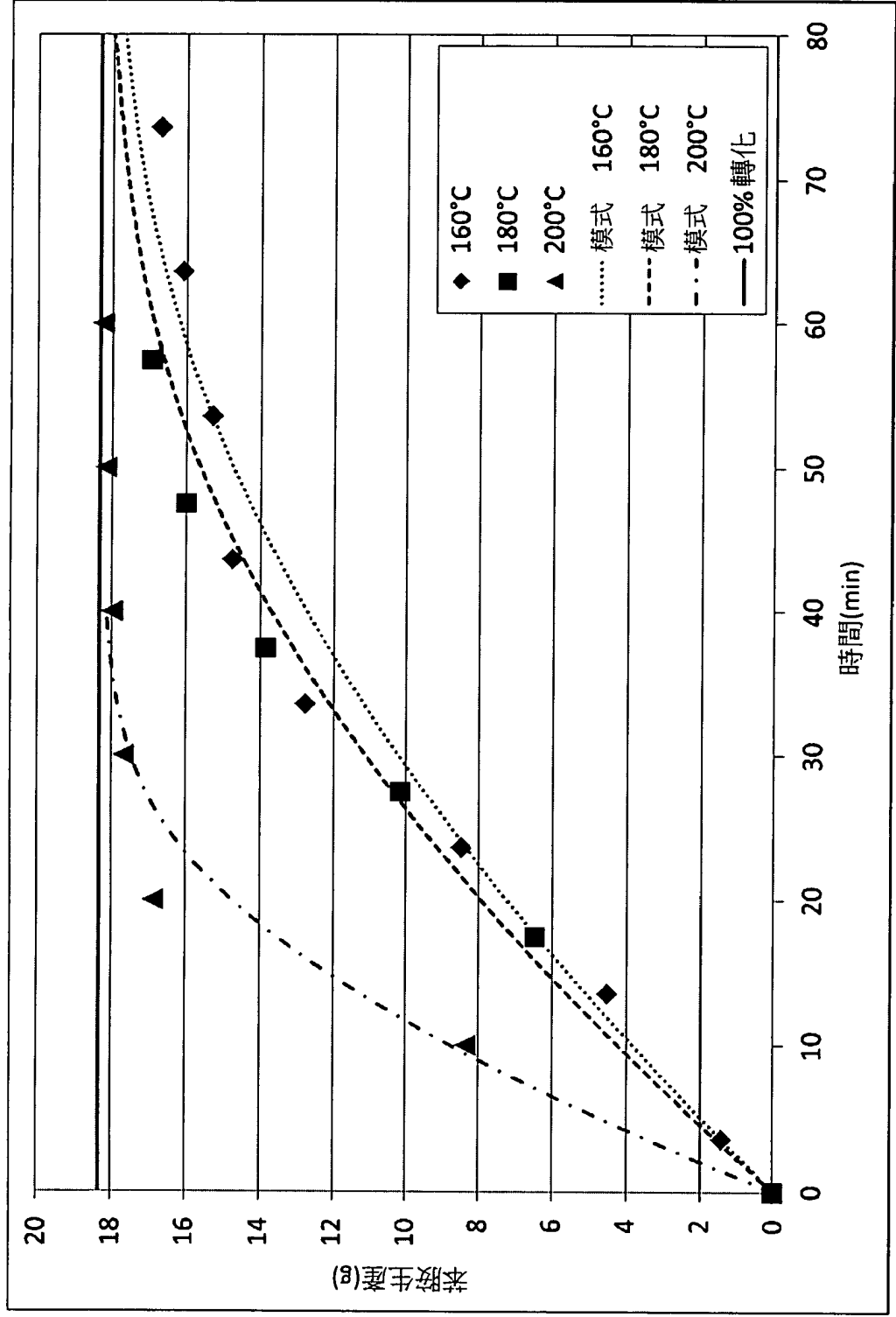


圖 35

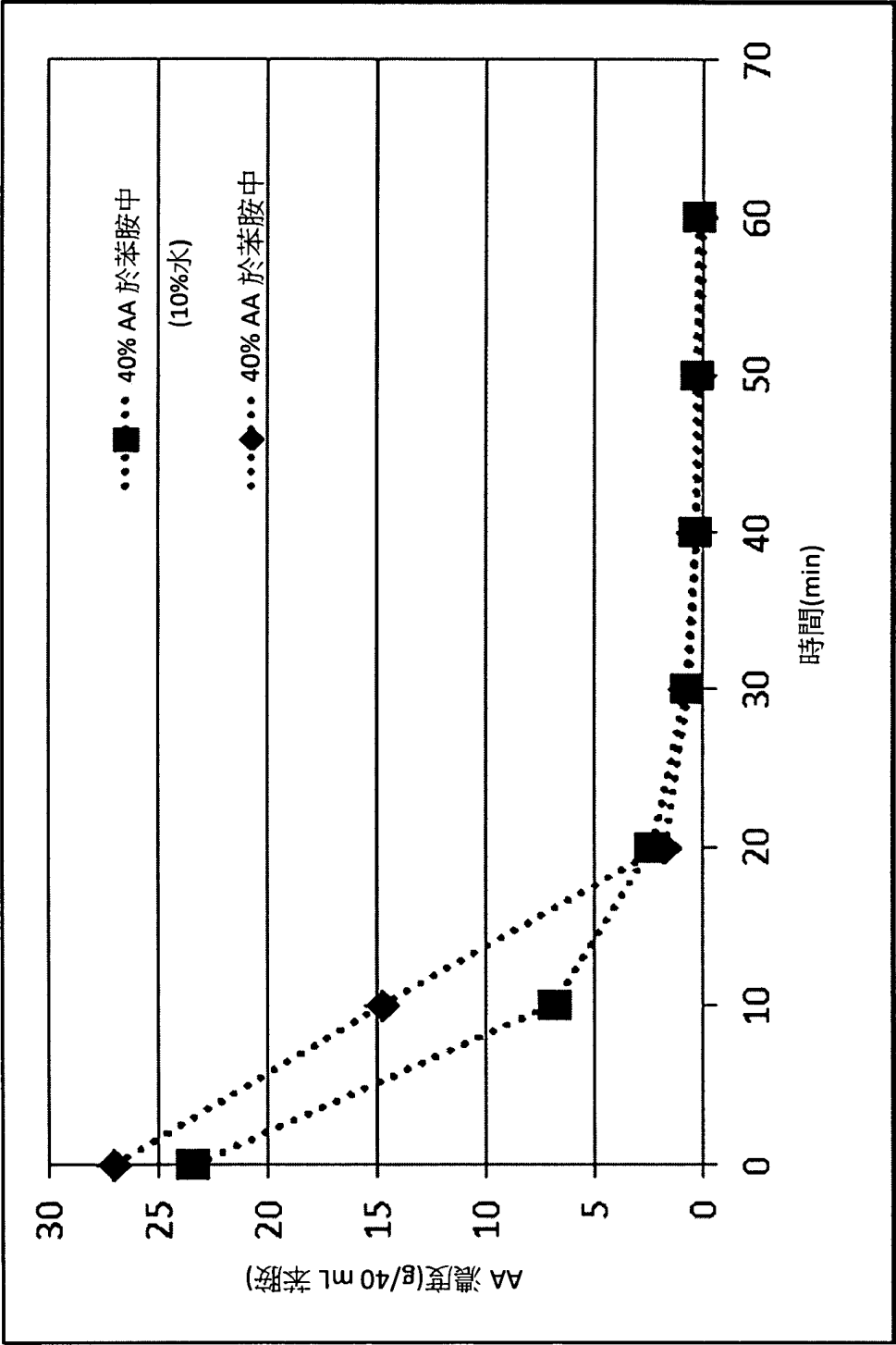


圖 36

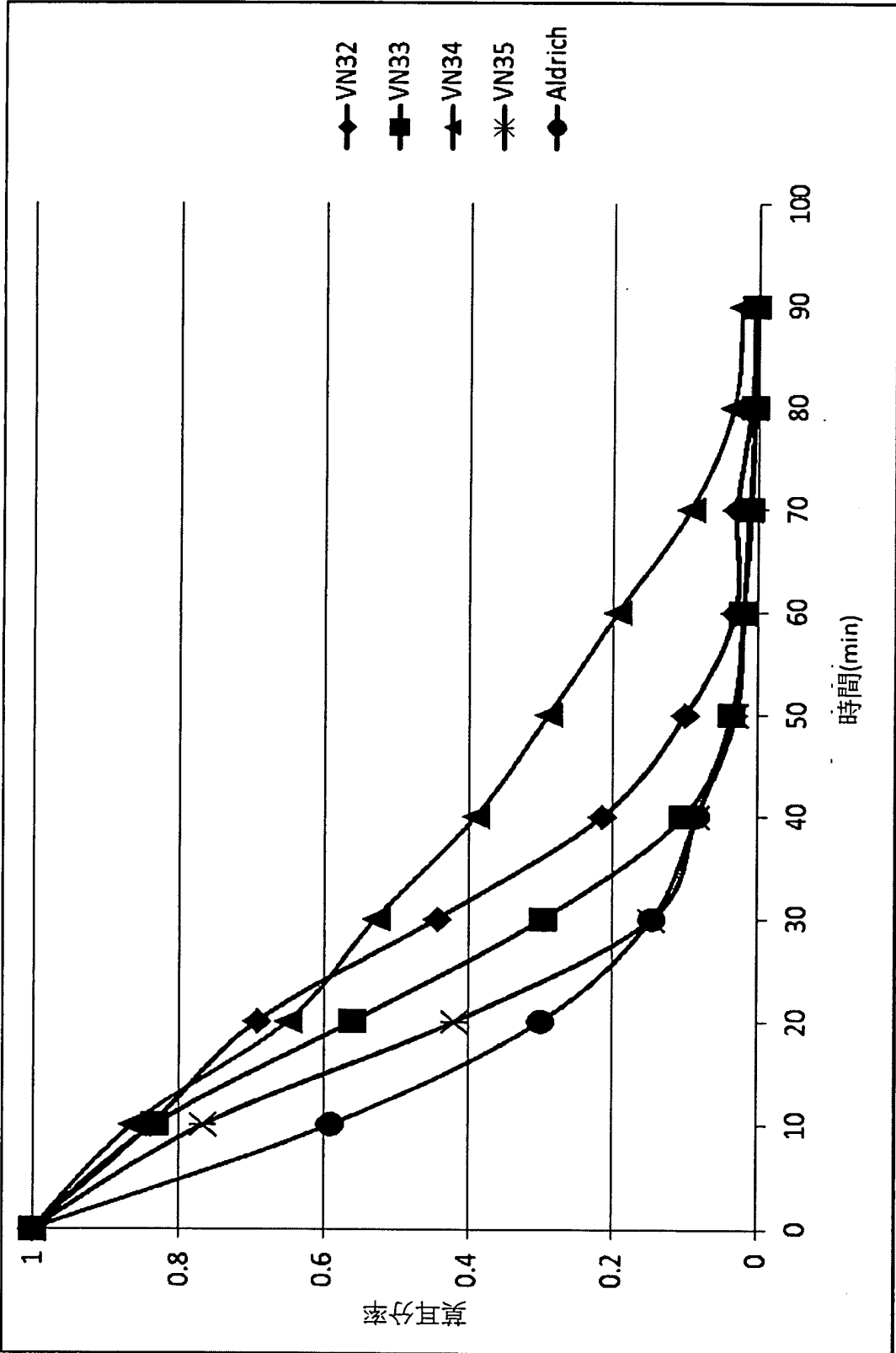


圖 37

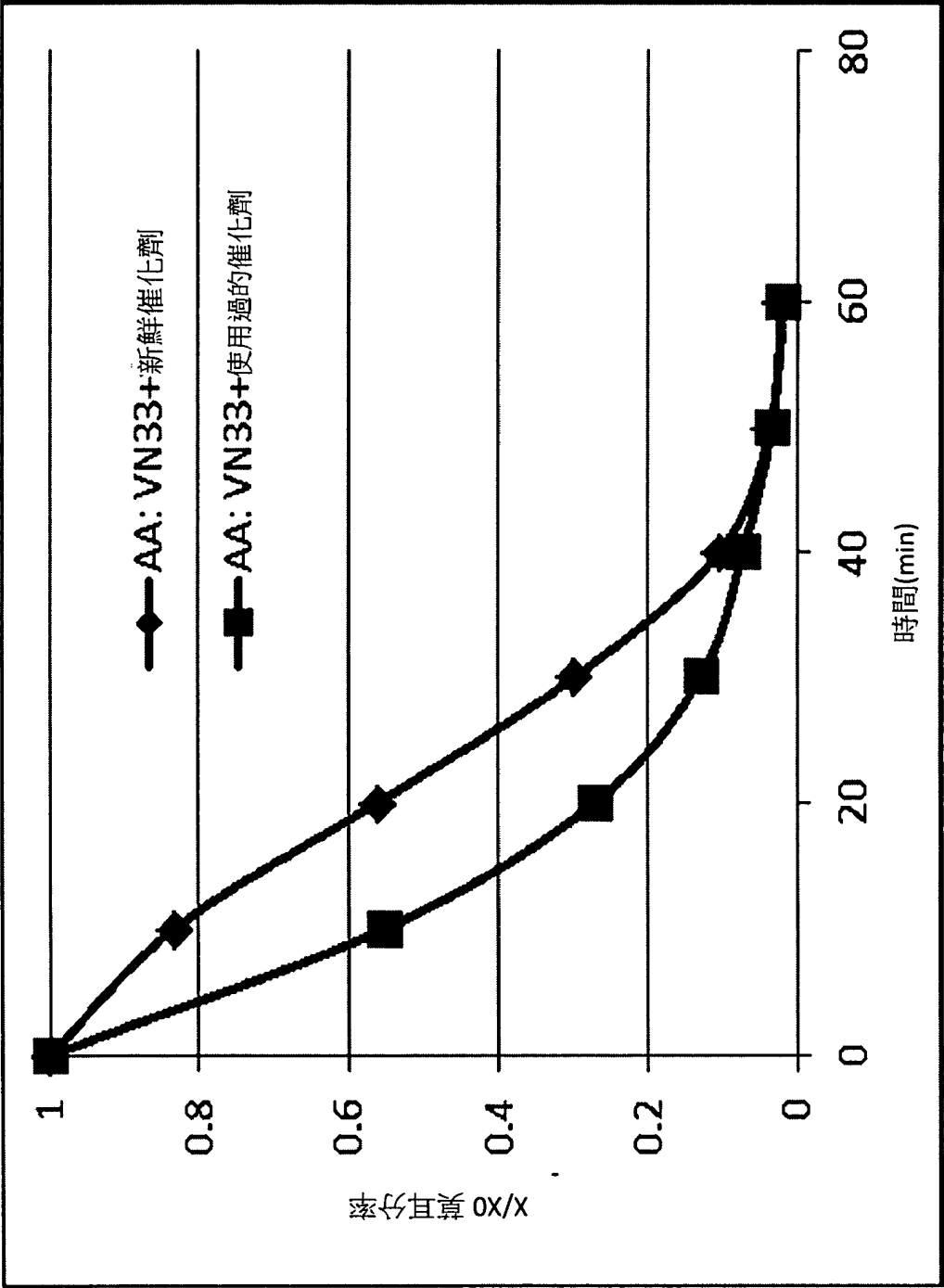


圖 38



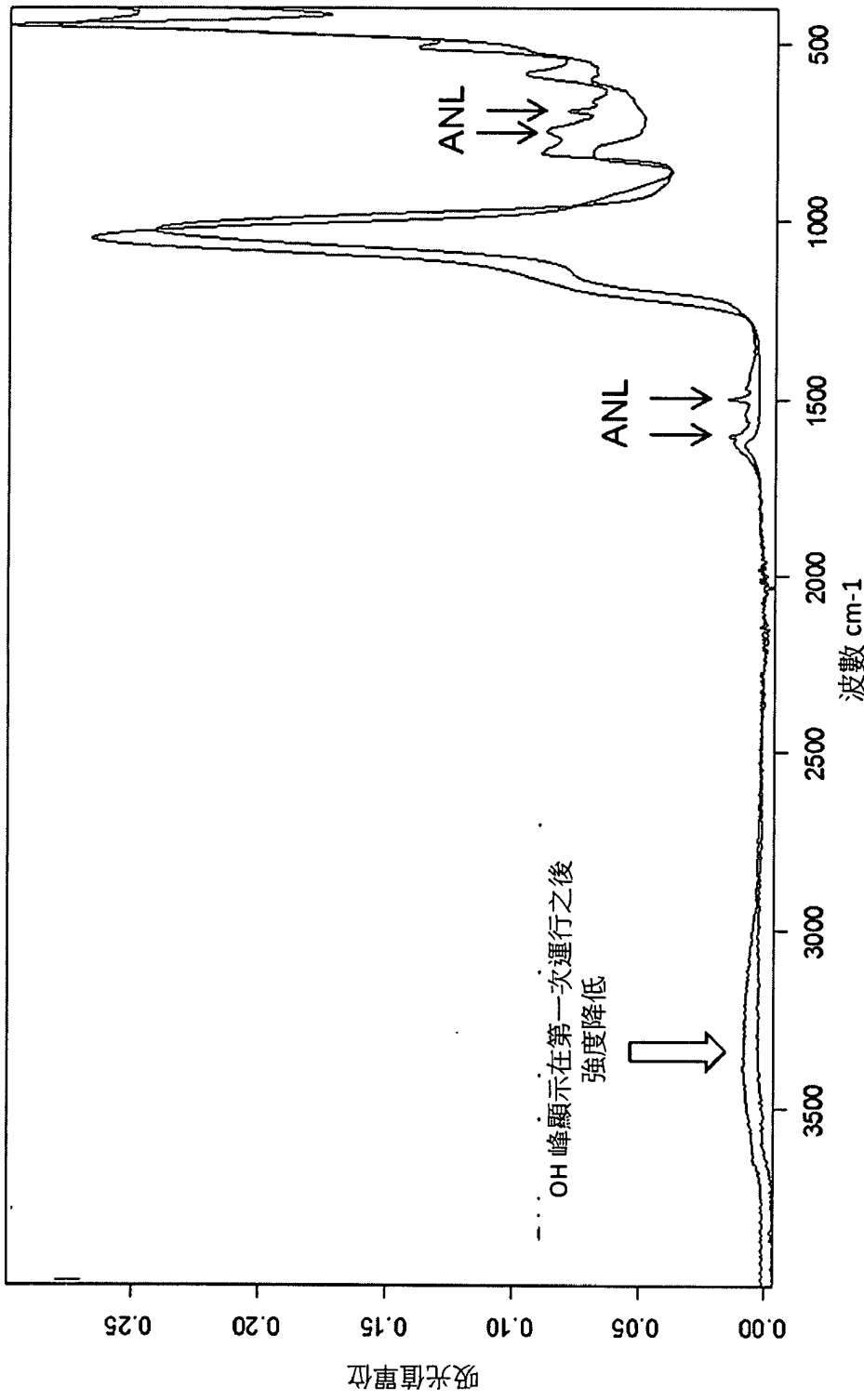


圖 39