



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102498203 B

(45) 授权公告日 2015. 01. 07

(21) 申请号 201080039906. 4

(22) 申请日 2010. 09. 13

(30) 优先权数据

2009-214694 2009. 09. 16 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 03. 07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2010/065770 2010. 09. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/034031 JA 2011. 03. 24

(73) 专利权人 三井化学株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 森重敬 高桥均 竹林望

和田光史

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 杨宏军

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006. 01)

C12N 15/09 (2006. 01)

C12P 7/04 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2009008377 A1, 2009. 01. 15, 权利要求
1-15, 说明书第 21-22 段.

JP 2001346578 A, 2001. 12. 18, 权利要求
1-8, 实施例 1-8.

SHUKLA V. B. ET AL.. Production of
D(-)- lactate from sucrose and molasses.
《BIOTECHNOL. LETT. 》. 2004, 第 26 卷 (第 9
期), 689-693.

SAHIN-TOTH M. ET AL.. Cloning,
sequencing, and expression of cscA
invertase from Escherichia coli B-62.
《CAN. J. MICROBIOL. 》. 1999, 第 45 卷 (第 5
期), 418-422.

OLSON M. M. ET AL.. Production of
tyrosine from sucrose or glucose
achieved by rapid genetic changes to
phenylalanine-producing Escherichia
coli strains. 《APPL. MICROBIOL.
BIOTECHNOL. 》. 2007, 第 74 卷 1031-1040.

审查员 奚静

权利要求书1页 说明书17页
序列表5页 附图1页

(54) 发明名称

异丙醇生产细菌及异丙醇生产方法

(57) 摘要

本发明提供一种生产异丙醇的大肠杆菌, 该
大肠杆菌至少含有属于蔗糖非 PTS 基因组的蔗糖
水解酶基因, 同时被赋予或强化了异丙醇生产系
统。本发明还提供使用该大肠杆菌由来自含有蔗
糖的植物的原料生产异丙醇的异丙醇生产方法。

1. 一种生产异丙醇的大肠杆菌,至少含有属于蔗糖非 PTS 基因组的蔗糖水解酶基因,同时被赋予或强化了异丙醇生产系统,所述生产异丙醇的大肠杆菌是被赋予了乙酰乙酸脱羧酶活性、异丙醇脱氢酶活性、CoA 转移酶活性及硫解酶活性的大肠杆菌。

2. 如权利要求 1 所述的生产异丙醇的大肠杆菌,属于蔗糖非 PTS 基因组的基因中,仅含有所述蔗糖水解酶基因。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的生产异丙醇的大肠杆菌,其中,所述乙酰乙酸脱羧酶活性、异丙醇脱氢酶活性、CoA 转移酶活性及硫解酶活性,分别是通过导入编码来自下述细菌的各酶的基因而得到的,所述细菌为选自梭菌属细菌、芽孢杆菌属细菌及埃希氏菌属细菌中的至少 1 种。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的生产异丙醇的大肠杆菌,其中,所述乙酰乙酸脱羧酶活性及异丙醇脱氢酶活性是通过导入编码来自梭菌属细菌的各酶的基因而得到的,所述 CoA 转移酶活性及硫解酶活性是通过导入编码来自埃希氏菌属细菌的酶的基因而得到的。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的生产异丙醇的大肠杆菌,其中,所述乙酰乙酸脱羧酶活性是通过导入编码来自丙酮丁醇梭菌的酶的基因而得到的,所述异丙醇脱氢酶活性是通过导入编码来自拜氏梭菌的酶的基因而得到的,所述 CoA 转移酶活性及硫解酶活性是通过导入编码来自大肠杆菌的各酶的基因而得到的。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的生产异丙醇的大肠杆菌,其中,编码乙酰乙酸脱羧酶的基因、编码异丙醇脱氢酶的基因及编码蔗糖水解酶的基因通过质粒被导入,所述 CoA 转移酶活性及硫解酶活性是通过宿主大肠杆菌内的基因组基因得到的。

7. 如权利要求 6 所述的生产异丙醇的大肠杆菌,其中,用于表达编码 CoA 转移酶的基因及编码硫解酶的基因的启动子为甘油醛—3—磷酸脱氢酶启动子及丝氨酸羟甲基转移酶启动子中的至少一个。

8. 如权利要求 1 或 2 所述的生产异丙醇的大肠杆菌,其中,所述乙酰乙酸脱羧酶活性、异丙醇脱氢酶活性、所述 CoA 转移酶活性及硫解酶活性均是通过导入编码来自梭菌属细菌的各酶的基因而得到的。

9. 一种异丙醇生产方法,包括使用权利要求 1 ~ 8 中任一项所述的生产异丙醇的大肠杆菌由来自含有蔗糖的植物的原料生产异丙醇。

异丙醇生产细菌及异丙醇生产方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种异丙醇生产细菌及异丙醇生产方法。

背景技术

[0002] 丙烯是聚丙烯等合成树脂和石油化学制品的重要的基础原料,广泛用于汽车用减震器或食品容器、膜、医疗器械等。

[0003] 因为由来自植物的原料制备的异丙醇可以经过脱水步骤转化为丙烯,所以有希望作为碳中和的丙烯原料。目前,根据京都议定书,从 2008 年至 2012 年间所有发达国家有义务将二氧化碳排放量与 1990 年相比削减 5%,碳中和的丙烯由于其广泛适用性而对地球环境极其重要。

[0004] 已知将来自植物的原料同化生产异丙醇的细菌。例如国际公开 2009/008377 号中公开了为了以葡萄糖为原料高效地生产异丙醇而经修饰的细菌,记载了其作为异丙醇工业生产用生物催化剂优异。

[0005] 已知在大肠杆菌中不能同化蔗糖,如果能够利用在来自植物的材料中也为廉价的蔗糖,则在工业上有利。

[0006] 根据现有的发现,微生物同化蔗糖的机制大致分成蔗糖 PTS(磷酸烯醇丙酮酸:糖磷酸转移酶系统(Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System))和蔗糖非 PTS 两种(例如日本特开 2001-346578 号公报)。已知蔗糖非 PTS 由 *cscB*(进行蔗糖的获取)、*cscA*(在微生物内部进行蔗糖的分解)、*cscK*(进行果糖的磷酸化)及 *cscR*(控制 *cscB*、*A*、*K* 的表达)4 个因子构成。Biotechnolohy Letters, Vol. 27, pp. 1891-1896(2005)中记载了使用质粒将上述 4 个因子的基因导入 D-乳酸生产大肠杆菌,由蔗糖生产 D-乳酸。

[0007] 另外,已知蔗糖 PTS 由 *scrA*(进行蔗糖的获取)、*scrY*(进行蔗糖的磷酸化)、*scrB*(在微生物内部进行蔗糖的分解)、*scrR*(控制 *scrA*、*Y*、*B* 的表达)及 *scrK*(进行果糖的磷酸化)5 个因子构成。

[0008] 通常,将细菌所不具有的功能导入微生物时,研究表达上述功能的基因的导入。对于同化蔗糖能力来说,上述各因子的 DNA 的大小为 900 ~ 1500bp,且为了表达用于高效生产异丙醇所需的 4 种酶(硫解酶、CoA 转移酶、乙酰乙酸脱羧酶及异丙醇脱氢酶)的基因,所需的 DNA 大小约为 4800bp。即,要对大肠杆菌赋予同化蔗糖的能力和和生产 IPA 的能力两者时,需要导入约 9300bp 大小的 DNA。

[0009] 但是,由于所要导入的 DNA 的大小超过了基因导入中使用的质粒 DNA 大小的上限,所以将上述两种能力同时导入大肠杆菌非常困难。即使使用 2 种质粒载体,控制各个质粒 DNA 大小在 10000bp 以下,通常将 2 种质粒导入大肠杆菌时,重复增殖过程中某一方或两方的质粒也经常脱落。为了避免上述现象,需要使大肠杆菌经常暴露在与选择标记对应的昂贵的抗生素中,不适合工业化生产。

[0010] 因此,难以对大肠杆菌同时赋予同化蔗糖的能力和高效生产异丙醇的能力。

[0011] 另一方面,Can. J. Microbiol., Vol. 45, pp. 18-422(1999)公开了通过向大肠杆菌

中仅导入蔗糖水解酶(cscA),能够以蔗糖作为原料使大肠杆菌增殖。但是,该论文中同时也记载了通过基因重组技术使cscA基因大量表达时,cscA几乎全部存在于细胞内,cscA(转化酶)不在细胞外而在细胞内发挥作用,不能预测cscA在细胞外分解蔗糖。

[0012] 作为使用不能同化蔗糖的大肠杆菌由蔗糖生产物质的例子,可以举出以蔗糖作为原料的色氨酸的生产(例如日本特开2001-346578号公报)。但是,在该例子中表明,为了赋予大肠杆菌由蔗糖生产氨基酸的能力,需要至少导入cscA、cscB和cscK的基因组。

发明内容

[0013] 如上所述,由于需要导入的DNA的大小过大,所以同时对不能同化蔗糖的大肠杆菌赋予同化蔗糖的能力和高效生产异丙醇的能力非常困难。

[0014] 本发明的目的在于提供对从廉价且工业上利用价值高的蔗糖有效地生产异丙醇有用的生产异丙醇的大肠杆菌及异丙醇生产方法。

[0015] 本发明提供以下生产异丙醇的大肠杆菌及异丙醇生产方法。

[0016] (1)一种生产异丙醇的大肠杆菌,至少含有属于蔗糖非PTS基因组的蔗糖水解酶基因,同时赋予或强化了异丙醇生产系统。

[0017] (2)如(1)所述的生产异丙醇的大肠杆菌,其中,属于蔗糖非PTS基因组的基因中,仅含有上述蔗糖水解酶基因。

[0018] (3)如(1)或(2)所述的生产异丙醇的大肠杆菌,其中,上述生产异丙醇的大肠杆菌是赋予了乙酰乙酸脱羧酶活性、异丙醇脱氢酶活性、CoA转移酶活性及硫解酶活性的大肠杆菌。

[0019] (4)如(3)所述的生产异丙醇的大肠杆菌,其中,上述乙酰乙酸脱羧酶活性、异丙醇脱氢酶活性、CoA转移酶活性及硫解酶活性分别是通过导入编码来自下述细菌的各酶的基因而得到的,所述细菌选自梭菌属细菌、芽孢杆菌属细菌及埃希氏菌属细菌中的至少1种。

[0020] (5)如(3)所述的生产异丙醇的大肠杆菌,其中,上述乙酰乙酸脱羧酶活性及异丙醇脱氢酶活性是通过导入编码来自梭菌属细菌的各酶的基因而得到的,上述CoA转移酶活性及硫解酶活性是通过导入编码来自埃希氏菌属细菌的酶的基因而得到的。

[0021] (6)如(3)所述的生产异丙醇的大肠杆菌,其中,上述乙酰乙酸脱羧酶活性是通过导入编码来自丙酮丁醇梭菌的酶的基因而得到的,上述异丙醇脱氢酶活性是通过导入编码来自拜氏梭菌的酶的基因而得到的,上述CoA转移酶活性及硫解酶活性是通过导入编码来自大肠杆菌的各酶的基因而得到的。

[0022] (7)如(3)所述的生产异丙醇的大肠杆菌,其中,上述编码乙酰乙酸脱羧酶的基因、编码异丙醇脱氢酶的基因及编码蔗糖水解酶的基因通过质粒被导入,上述CoA转移酶活性及硫解酶活性是通过宿主大肠杆菌内的基因组基因得到的。

[0023] (8)如(7)所述的生产异丙醇的大肠杆菌,其中,所述用于表达编码CoA转移酶的基因及编码硫解酶的基因的启动子为甘油醛-3-磷酸脱氢酶启动子及丝氨酸羟甲基转移酶启动子中的至少一个。

[0024] (9)如(3)所述的生产异丙醇的大肠杆菌,其中,上述乙酰乙酸脱羧酶活性、异丙醇脱氢酶活性、上述CoA转移酶活性及硫解酶活性均是通过导入编码来自梭菌属细菌的各酶的基因而得到的。

[0025] (10) 一种异丙醇生产方法,包括使用(1)~(9)中任一项所述的生产异丙醇的大肠杆菌由来自含有蔗糖的植物的原料生产异丙醇。

[0026] 附图说明

[0027] [图1] 为表示以葡萄糖及果糖作为糖源,培养大肠杆菌B株10小时时的培养上清液中的糖的减少量的图。

[0028] 具体实施方式

[0029] 本发明的生产异丙醇的大肠杆菌为至少含有属于蔗糖非PTS基因组的蔗糖水解酶基因、同时赋予或强化了异丙醇生产系统的生产异丙醇的大肠杆菌。

[0030] 本发明的异丙醇生产方法,包括使用上述生产异丙醇的大肠杆菌,由来自含有蔗糖的植物的原料生产异丙醇。

[0031] 本发明的生产异丙醇的大肠杆菌为了同化蔗糖,至少含有构成蔗糖非PTS基因组的蔗糖水解酶基因,同时具有异丙醇生产系统,因此,在不能同化蔗糖的大肠杆菌中,同时发挥同化蔗糖的能力和产生异丙醇的能力,能够由蔗糖有效地生产异丙醇。目前为止完全没有报道在不具有同化蔗糖能力的大肠杆菌中导入蔗糖非PTS基因组,以蔗糖作为碳源生产异丙醇的例子。

[0032] 本发明发现通过至少将属于构成非PTS基因组的基因组的蔗糖水解酶基因导入生产异丙醇的大肠杆菌中,即使高效生产异丙醇的大肠杆菌,也高效率地同化蔗糖。结果,能够显著减小为了赋予同化蔗糖的能力而导入的DNA大小,能够在1个质粒载体上同时连接赋予同化蔗糖能力的DNA和赋予异丙醇生产能力的DNA。由此,能够对不能同化蔗糖的大肠杆菌同时赋予同化蔗糖的能力和产生异丙醇的能力,能够来自甘蔗或甜菜的、廉价且能大量供给的蔗糖有效地得到异丙醇。

[0033] 特别是,本发明的生产异丙醇的大肠杆菌几乎同时同化蔗糖的分解产物即葡萄糖和果糖,能够生产异丙醇,因此更有效。

[0034] 一般认为在大肠杆菌中,通常葡萄糖的摄取优先于果糖,在葡萄糖存在下不能充分地代谢果糖。因此,令人惊奇的是本发明能够不受由葡萄糖引起的代谢抑制(分解代谢产物阻遏(catabolite repression))的影响,有效地进行异丙醇的生产。

[0035] 需要说明的是,在本发明中,所谓“宿主”,是指接收一个以上的基因从菌体外的导入,结果变为本发明的生产异丙醇的大肠杆菌的所述大肠杆菌。

[0036] 在本说明书中,术语“步骤”不仅是独立的步骤,即使在不能与其它步骤明确区别时,如果能实现本步骤所期望的作用,也包含在本术语中。

[0037] 另外,本说明书中,使用“~”表示的数值范围,表示以“~”前后记载的数值分别作为最小值及最大值所包含的范围。

[0038] 以下,说明本发明。

[0039] 所谓本发明的蔗糖非PTS基因组,是指微生物的同化蔗糖途径中与非PTS系相关的4个基因组。详细而言,为由阻抑蛋白(cscR)、蔗糖水解酶(cscA)、果糖激酶(cscK)、蔗糖透过酶(cscB)构成的基因组。本发明中,其中只要至少含有cscA的1种以上即可,例如可以举出只有cscA、cscA及cscK的组合、cscA及cscB的组合、cscA及cscR的组合、cscA、cscR及cscK的组合、cscA、cscR及cscB的组合等。其中,从更有效地生产异丙醇的观点考虑,优选只具有编码cscA的基因,不含有其它基因。

[0040] 本发明中的蔗糖水解酶（转化酶，CscA）是指基于国际生物化学联盟（I. U. B.）酶委员会报告被归属于酶编号 3. 2. 1. 26、催化由蔗糖生成 D- 葡萄糖和 D- 果糖的反应的酶的总称。

[0041] 上述酶为 K12 株及 B 株等大肠杆菌中本来不具有的酶，为包括质子共转运体、转化酶、果糖激酶及蔗糖特异性阻抑蛋白的非 PTS 代谢途径的酶的 1 种（参见 Canadian Journal of Microbiology, (1991) vol. 45, pp418-422）。本发明中，通过赋予上述 CscA，特别是通过仅赋予 cscA，菌体外的蔗糖可以在细胞膜上分解为葡萄糖及果糖并被释放到细胞外，通过葡萄糖 PTS 及果糖 PTS 被磷酸化并被引入细胞质内。结果，果糖被供给至细菌内的果糖代谢系统，并能够利用糖酵解系统被同化。

[0042] 作为本发明的被导入宿主细菌中的蔗糖水解酶（转化酶，CscA）的基因，可以利用由具有该酶的生物得到的具有编码蔗糖水解酶（转化酶，CscA）的基因的碱基序列的 DNA、或基于该基因的公知的碱基序列合成的合成 DNA 序列。作为优选的例子，可以举出来自欧文菌属菌（Erwinia）、变形杆菌属菌（Proteus）、弧菌属菌（Vibrio）、农杆菌属菌（Agrobacterium）、根瘤菌属菌（Rhizobium）、葡萄球菌属菌（Staphylococcus）、双歧杆菌属菌（Bifidobacterium）、埃希氏菌属菌（Escherichia）的基因，例如可以举出具有来自大肠杆菌 0157 株的基因的碱基序列的 DNA。特别优选具有来自大肠杆菌 0157 株的基因的碱基序列的 DNA。另外，优选在 cscA 中添加用于使 cscA 移到菌体的外周胞质的信号序列。

[0043] 作为本发明的被导入宿主细菌中的阻抑蛋白（CscR）的基因，可以利用由具有该酶的生物得到的具有编码阻抑蛋白（CscR）的基因的碱基序列的 DNA、或基于该基因的公知的碱基序列合成的合成 DNA 序列。作为优选例子，可以举出来自欧文菌属菌（Erwinia）、变形杆菌属菌（Proteus）、弧菌属菌（Vibrio）、农杆菌属菌（Agrobacterium）、根瘤菌属菌（Rhizobium）、葡萄球菌属菌（Staphylococcus）、双歧杆菌属菌（Bifidobacterium）、埃希氏菌属菌（Escherichia）的基因，例如可以举出具有来自大肠杆菌 0157 株的基因的碱基序列的 DNA。特别优选为具有来自大肠杆菌 0157 株的基因的碱基序列的 DNA。

[0044] 作为本发明的被导入宿主细菌中的果糖激酶（CscK）的基因，可以利用由具有该酶的生物得到的具有编码果糖激酶（CscK）的基因的碱基序列的 DNA、或基于该基因的公知的碱基序列合成的合成 DNA 序列。作为优选例子，可以举出来自欧文菌属菌（Erwinia）、变形杆菌属菌（Proteus）、弧菌属菌（Vibrio）、农杆菌属菌（Agrobacterium）、根瘤菌属菌（Rhizobium）、葡萄球菌属菌（Staphylococcus）、双歧杆菌属菌（Bifidobacterium）、埃希氏菌属菌（Escherichia）的基因，例如可以举出具有来自大肠杆菌 0157 株的基因的碱基序列的 DNA。特别优选为具有来自大肠杆菌 0157 株的基因的碱基序列的 DNA。

[0045] 作为本发明的被导入宿主细菌中的蔗糖透过酶（CscB）的基因，可以利用由具有该酶的生物得到的具有编码蔗糖透过酶（CscB）的基因的碱基序列的 DNA、或基于该基因的公知的碱基序列合成的合成 DNA 序列。作为优选的例子，例如可以举出来自欧文菌属菌（Erwinia）、变形杆菌属菌（Proteus）、弧菌属菌（Vibrio）、农杆菌属菌（Agrobacterium）、根瘤菌属菌（Rhizobium）、葡萄球菌属菌（Staphylococcus）、双歧杆菌属菌（Bifidobacterium）、埃希氏菌属菌（Escherichia）的基因，例如可以举出具有来自大肠杆菌 0157 株的基因的碱基序列的 DNA。特别优选为具有来自大肠杆菌 0157 株的基因的碱基序列的 DNA。

[0046] 本发明中所说的生产异丙醇的大肠杆菌,是指通过基因重组导入或修饰后的具有异丙醇生产能力的大肠杆菌。利用该大肠杆菌,使其与上述 CscA 活性组合,即使本来不具有同化蔗糖能力的大肠杆菌,也可以有效地由蔗糖生产异丙醇。

[0047] 需要说明的是,本发明的“通过基因重组”的语句,包括全部通过在原有基因的碱基序列中插入其它 DNA、或基因的某部分的置换、缺失或它们的组合而发生的碱基序列上的改变,例如该基因重组可以是突变产生的。

[0048] 本发明中,所谓同化蔗糖,是指将蔗糖直接低分子化或高分子化,优选低分子化摄入机体内的能力,或代谢转换成其它物质的能力。另外,本发明中,所谓同化包括将蔗糖进一步低分子化的分解。详细而言,包括将蔗糖分解为 D-葡萄糖和 D-果糖。

[0049] 本发明中的异丙醇生产系统,只要为在作为对象的大肠杆菌中生产异丙醇的系统即可,可以为任意的系统。

[0050] 本发明中赋予或强化的异丙醇生产系统,是指通过基因重组导入或修饰后的、用于发挥异丙醇生产能力的构造。所述异丙醇生产系统只要是使作为对象的大肠杆菌中的本来的异丙醇生产量增加的系统即可,可以为任意的系统。优选可以举出与异丙醇生产活性相关的酶活性的灭活、减少或增强或它们的组合。由此,与上述 CscA 活性组合,即使为本来不具有同化蔗糖能力的大肠杆菌,也能够有效地由蔗糖生产异丙醇。

[0051] 优选可以举出赋予与异丙醇的生产相关的被增强了的酶活性。更优选可以举出硫解酶、CoA 转移酶、乙酰乙酸脱羧酶、异丙醇脱氢酶的酶活性的增强。即,本发明的生产异丙醇的大肠杆菌优选被赋予乙酰乙酸脱羧酶活性、异丙醇脱氢酶活性、CoA 转移酶活性及硫解酶活性 4 种酶活性。

[0052] 本发明中的活性的“赋予”除了包括将编码酶的基因从宿主细菌的菌体外导入菌体内之外,还包括通过强化宿主细菌在基因组上具有的酶基因的启动子活性或与其它启动子置换使酶基因强表达。

[0053] 本发明中的乙酰乙酸脱羧酶是指基于国际生物化学联盟(I. U. B.)酶委员会报告被归属于酶编号 4. 1. 1. 4、催化由乙酰乙酸生成丙酮的的反应的酶的总称。

[0054] 作为所述乙酰乙酸脱羧酶,例如可以举出来自丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)等梭菌属细菌、多粘芽孢杆菌(*Bacillus polymyxa*)等芽孢杆菌属细菌的乙酰乙酸脱羧酶。

[0055] 作为本发明的被导入宿主细菌中的乙酰乙酸脱羧酶的基因,可以利用从上述各来源生物得到的具有编码乙酰乙酸脱羧酶的基因的碱基序列的 DNA 或基于该基因的公知的碱基序列合成的合成 DNA 序列。作为优选基因,可以举出来自梭菌属细菌或芽孢杆菌属细菌的 DNA,例如可以举出具有来自丙酮丁醇梭菌、多粘芽孢杆菌的基因的碱基序列的 DNA。特别优选具有来自丙酮丁醇梭菌的基因的碱基序列的 DNA。

[0056] 本发明中的异丙醇脱氢酶是指基于国际生物化学联盟(I. U. B.)酶委员会报告被归属于酶编号 1. 1. 1. 80、催化由丙酮生成异丙醇的的反应的酶的总称。

[0057] 作为异丙醇脱氢酶,可以举出来自拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)等梭菌属细菌的异丙醇脱氢酶。

[0058] 作为被导入本发明的宿主细菌中的异丙醇脱氢酶的基因,可以利用从上述各来源生物得到的具有编码异丙醇脱氢酶的基因的碱基序列的 DNA 或基于该基因的公知的碱基

序列合成的合成 DNA 序列。作为优选基因,可以举出来自梭菌属细菌的 DNA,例如具有来自拜氏梭菌的基因的碱基序列的 DNA。

[0059] 本发明中的 CoA 转移酶是指基于国际生物化学联盟 (I. U. B.) 酶委员会报告被归属于酶编号 2. 8. 3. 8、催化由乙酰乙酰基 CoA 生成乙酰乙酸的反应的酶的总称。

[0060] 作为所述 CoA 转移酶,例如可以举出来自下述细菌的 CoA 转移酶,所述细菌为丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*)、拜氏梭菌 (*Clostridium beijerinckii*) 等梭菌属细菌、*Roseburia intestinalis* 等罗斯氏菌属细菌、普拉梭菌 (*Faecalibacterium prausnitzii*) 等 *Faecalibacterium* 属细菌、粪球菌 (*Coprococcus*) 属细菌、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*) 等锥虫、大肠杆菌 (*Escherichia coli* :大肠杆菌) 等埃希氏菌属细菌。

[0061] 作为本发明的被导入宿主细菌中的 CoA 转移酶的基因,可以利用从上述各来源生物得到的具有编码 CoA 转移酶的基因的碱基序列的 DNA 或基于该基因的公知的碱基序列合成的合成 DNA 序列。作为优选的基因,可以为具有来自下述细菌的基因的碱基序列的 DNA,所述细菌为丙酮丁醇梭菌等梭菌属细菌、*Roseburia intestinalis* 等罗斯氏菌属细菌、普拉梭菌等 *Faecalibacterium* 属细菌、粪球菌属细菌、布氏锥虫等锥虫、大肠杆菌等埃希氏菌属细菌。作为较优选基因,可以举出来自梭菌属细菌或埃希氏菌属细菌的基因,特别优选为具有来自丙酮丁醇梭菌或大肠杆菌的基因的碱基序列的 DNA。

[0062] 本发明中所说的硫解酶是指基于国际生物化学联盟 (I. U. B.) 酶委员会报告被归属于酶编号 2. 3. 1. 9、催化由乙酰基 CoA 生成乙酰乙酰基 CoA 的反应的酶的总称。

[0063] 作为所述硫解酶,例如可以举出来自下述细菌的硫解酶,所述细菌为丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*)、拜氏梭菌 (*Clostridium beijerinckii*) 等梭菌属细菌、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 等埃希氏菌属细菌、盐杆菌种 (*Halobacterium* sp.) 细菌、生枝动胶菌 (*Zoogloea ramigera*) 等动胶菌属细菌、、根瘤菌属 (*Rhizobium* sp.) 细菌、大豆慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 等慢生根瘤菌属细菌、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 等假丝酵母菌属细菌、新月柄杆菌 (*Caulobacter crescentus*) 等柄杆菌属细菌、山丘链霉菌 (*Streptomyces collinus*) 等链霉菌属细菌、粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 等肠球菌属细菌。

[0064] 作为本发明的被导入宿主细菌中的硫解酶的基因,可以利用由上述各来源生物得到的具有编码硫解酶的基因的碱基序列的 DNA 或基于该基因的公知的碱基序列合成的合成 DNA 序列。作为优选基因,可以举出具有来自下述细菌的基因的碱基序列的 DNA,所述细菌为丙酮丁醇梭菌、拜氏梭菌等梭菌属细菌、大肠杆菌等埃希氏菌属细菌、盐杆菌种的细菌、生枝动胶菌等动胶菌属细菌、根瘤菌种的细菌、大豆慢生根瘤菌等慢生根瘤菌属细菌、热带假丝酵母等假丝酵母菌属细菌、新月柄杆菌等柄杆菌属细菌、山丘链霉菌等链霉菌属细菌、粪肠球菌等肠球菌属细菌。作为较优选基因,可以举出来自梭菌属细菌或埃希氏菌属细菌的基因,特别优选为具有来自丙酮丁醇梭菌或大肠杆菌的基因的碱基序列的 DNA。

[0065] 其中,从酶活性的观点考虑,优选上述 4 种酶分别为来自下述细菌的酶,所述细菌为选自梭菌属细菌、芽孢杆菌属细菌及埃希氏菌属细菌中的至少一种,其中,更优选乙酰乙酸脱羧酶及异丙醇脱氢酶来自梭菌属细菌的情况,CoA 转移酶活性及硫解酶活性来自埃希氏菌属细菌,和所述 4 种酶均来自梭菌属细菌。

[0066] 其中,从酶活性的观点考虑,优选本发明中的 4 种酶分别来自丙酮丁醇梭菌、拜氏梭菌或大肠杆菌中的任一种;较优选乙酰乙酸脱羧酶为来自丙酮丁醇梭菌的酶,CoA 转移酶及硫解酶分别为来自丙酮丁醇梭菌或大肠杆菌的酶,异丙醇脱氢酶为来自拜氏梭菌的酶;上述 4 种酶从酶活性的观点考虑,特别优选乙酰乙酸脱羧酶活性来自丙酮丁醇梭菌,上述异丙醇脱氢酶活性来自拜氏梭菌,CoA 转移酶活性及硫解酶活性来自大肠杆菌。

[0067] 另外,CoA 转移酶活性及硫解酶活性来自大肠杆菌时,从异丙醇生产能力的观点考虑优选上述编码乙酰乙酸脱羧酶的基因、编码异丙醇脱氢酶的基因及编码蔗糖水解酶的基因通过质粒被导入,上述 CoA 转移酶活性及硫解酶活性通过宿主大肠杆菌内的基因组基因获得。

[0068] 作为本发明中与异丙醇的生产相关的酶活性被增强、生产异丙醇的大肠杆菌的例子,可以举出 W02009/008377 号中记载的 pIPA/B 株或 pIaaa/B 株。

[0069] 本发明中的基因的启动子,只要为能够控制上述任一种基因的表达的启动子即可,为平常在微生物内发挥作用的强有力的启动子,并且为即使在葡萄糖存在下也不易受到表达抑制的影响的启动子,具体可以举出甘油醛-3-磷酸脱氢酶(以下有时称作 GAPDH)的启动子和丝氨酸羟甲基转移酶的启动子。

[0070] 本发明中的启动子是指与具有 Sigma 因子的 RNA 聚合酶连接的、开始转录的部位。例如来自大肠杆菌的 GAPDH 启动子在 GenBank accession number X02662 的碱基序列信息中,被记载于碱基编号 397-440 中。

[0071] 来自大肠杆菌的 CoA 转移酶基因(atoD 及 atoA)和硫解酶基因(atoB)以 atoD、atoA、atoB 的顺序在大肠杆菌基因组上形成操纵子(Journal of Bacteriology Vol. 169pp 42-52 Lauren Sallus Jenkins 等),因此,通过改变 atoD 的启动子,能够同时控制 CoA 转移酶基因和硫解酶基因的表达。

[0072] 由此,CoA 转移酶活性及硫解酶活性通过宿主大肠杆菌的基因组基因得到时,从获得充分的异丙醇生产能力的观点考虑,优选通过将担负两种酶基因的表达的启动子与其它启动子置换等,强化两种酶基因的表达。作为用于强化 CoA 转移酶活性及硫解酶活性的启动子,可以举出上述来自大肠杆菌的 GAPDH 启动子等。

[0073] 本发明中的所述酶的活性可以从菌体外向菌体内导入,或者通过强化宿主细菌在基因组上具有的酶基因的启动子活性或与其他启动子置换使酶基因强表达。

[0074] 酶活性的导入可以通过例如使用基因重组技术将编码所述 4 种酶的基因从宿主细菌的菌体外导入菌体内而进行。此时,被导入的酶基因与宿主细胞同种或不同种均可。从菌体外向菌体内导入基因时需要的基因组 DNA 的制备、DNA 的切断及连接、转化、PCR(Polymerase Chain Reaction)、用作引物的寡核苷酸的设计、合成等的方法,可以按照本领域技术人员公知的通常的方法来进行。所述方法记载于 Sambrook, J., et. al., "Molecular Cloning A Laboratory Manual, Second Edition", Cold Spring Harbor Laboratory Press, (1989) 等中。

[0075] 本发明中的能力的“赋予”或“强化”除了包括将编码酶的基因从宿主细菌的菌体外导入菌体内之外,还包括通过强化宿主细菌在基因组上具有的酶基因的启动子活性或与其他启动子置换使酶基因强表达。

[0076] 本发明中赋予了酶的活性的大肠杆菌是指从菌体外向菌体内通过任何方法能够

赋予该酶活性的大肠杆菌。所述大肠杆菌例如可以使用下述方法制备,即,使用与上述同样的基因重组技术,将编码该酶及蛋白质的基因从菌体外导入菌体内等方法。

[0077] 本发明中强化了酶的活性的大肠杆菌是指使用任何方法强化了该酶活性的大肠杆菌。所述大肠杆菌例如可以使用下述方法制备,即,使用与上述同样的基因重组技术,使用质粒将编码该酶及蛋白质的基因从菌体外导入菌体内,或通过强化宿主大肠杆菌在基因组上具有的酶基因的启动子活性或与其他启动子置换使酶基因强表达等方法。

[0078] 在本发明中,大肠杆菌是指不论本来是否具有从来自植物的原料生产异丙醇的能力,能够通过使用任何方法具有从来自植物的原料生产异丙醇的能力的大肠杆菌。

[0079] 此处,作为用作上述各基因的导入对象的大肠杆菌,可以为不具有异丙醇生产能力的大肠杆菌,只要能够导入及改变上述各基因,则可以为任意大肠杆菌。

[0080] 较优选为预先赋予了异丙醇生产能力的大肠杆菌,由此,能够更有效地生产异丙醇。特别是,根据本发明,能够对本来不具有同化蔗糖能力的大肠杆菌赋予同化蔗糖能力,有效地从蔗糖生产异丙醇。作为上述本来不具有同化蔗糖能力的大肠杆菌,可以举出 K12 株、B 株、C 株及来自它们的株等。

[0081] 作为上述生产异丙醇的大肠杆菌,例如可以举出国际公开 2009/008377 号说明书中记载的赋予乙酰乙酸脱羧酶活性、异丙醇脱氢酶活性、CoA 转移酶活性、及硫解酶活性、且能够来自植物的原料生成异丙醇的异丙醇生成细菌等。

[0082] 本发明的异丙醇生产方法包括使用上述生产异丙醇的大肠杆菌来自含有蔗糖的植物的原料生产异丙醇,即,包括使上述生产异丙醇的大肠杆菌和来自含有蔗糖的植物的原料接触进行培养的步骤、和回收通过接触得到的异丙醇的回收步骤。

[0083] 上述异丙醇生产方法中使用的来自植物的原料只要为从植物得到的碳源、且为来自含有蔗糖的植物的原料即可,没有特别的限制。在本发明中指根、茎、秆、枝、叶、花、种子等器官、含有它们的植物体、所述植物器官的分解产物,进而在由植物体、植物器官或它们的分解产物得到的碳源中,能在微生物培养中用作碳源的物质也包含在来自植物的原料中。

[0084] 在包含于所述来自植物的原料中的碳源中,除蔗糖之外,作为通常物质可以举出淀粉、葡萄糖、果糖、木糖、阿拉伯糖等糖类、或者大量含有所述成分的草木质分解产物、纤维素水解物等或它们的组合,进而来自植物油的甘油或脂肪酸也可以包含在本发明的碳源中。

[0085] 作为本发明中的来自植物的原料的例子,可以优选举出谷物等农作物、玉米、米、小麦、大豆、甘蔗、甜菜、棉花等或它们的组合,作为这些原料的使用形态为未加工品、榨汁、粉碎物等,没有特别限定。另外,可以为仅是上述碳源的形态。

[0086] 培养步骤中的生产异丙醇的大肠杆菌与来自植物的原料的接触一般通过在含有来自植物的原料的培养基中培养生产异丙醇的大肠杆菌而进行。

[0087] 来自植物的原料与生产异丙醇的大肠杆菌的接触密度根据生产异丙醇的大肠杆菌的活性而不同,但通常作为培养基中来自植物的原料的浓度,以换算为葡萄糖计,可以使最初的糖浓度相对于混合物的总质量为 20 质量%以下,从大肠杆菌的耐糖性的观点考虑,优选可以使最初的糖浓度为 15 质量%以下。其他各成分只要以在微生物的培养基中通常添加的量进行添加即可,没有特别限定。

[0088] 另外,作为培养基中的生产异丙醇的大肠杆菌的含量,根据大肠杆菌的种类及活性而不同,通常可以使培养开始时投入的预培养的菌液的量相对于培养液为 0.1 质量%~30 质量%,从控制培养条件的观点考虑,优选可以为 1 质量%~10 质量%。

[0089] 作为生产异丙醇的大肠杆菌的培养中使用的培养基,只要为含有了碳源、氮源、无机离子及微生物用于生产异丙醇所需的有机微量元素、核酸、维生素类等的培养基即可,没有特别限制。

[0090] 作为碳源,除蔗糖之外,可以适当使用葡萄糖、果糖、糖蜜等糖类;富马酸、柠檬酸、琥珀酸等有机酸;甲醇、乙醇、丙三醇等醇类及其他。作为氮源,可以适当使用有机铵盐、无机铵盐、氨气、氨水等无机体氮源;及蛋白质水解物等有机体氮源及其他。作为无机离子,可以根据需要适当使用镁离子、磷酸离子、钾离子、铁离子、锰离子及其他。

[0091] 作为有机微量成分,可以适当使用维生素、氨基酸等及含有它们的酵母提取物、蛋白胨、玉米浆(Corn Steep Liquor)、酪蛋白分解产物及其他。

[0092] 另外,可以以通常使用的量含有通常被添加到微生物的培养基中的其他添加成分,例如抗生素等。需要说明的是,为了抑制反应时的发泡,优选适当添加消泡剂。上述成分在培养基中的含量通常只要为大肠杆菌的培养所适用的范围即可,没有特别限制。

[0093] 需要说明的是,作为本发明中使用的培养基,若从用于工业生产方面考虑,优选液体培养基。

[0094] 本方法中,从分离·回收率的观点考虑,优选异丙醇以溶解在培养基和来自植物的原料的混合液中的形态、或溶解在捕集液中的形态进行回收。作为捕集液,可以举出甲苯或二甲基甲酰胺等有机溶剂或水等。作为捕集液,其中,优选易于分离异丙醇生产时副产的挥发性杂质和异丙醇的水。作为上述回收方法,例如可以举出国际公开 2009/008377 号说明书中记载的方法等。

[0095] 作为在能以溶解在捕集液或混合物中的形态回收的异丙醇的生产方法中能够使用的装置,例如可以举出国际公开 2009/008377 号说明书的图 1 所示的生产装置。

[0096] 在上述生产装置中,在容纳有含有异丙醇生产细菌和来自植物的原料的培养基的培养槽上,连接有用于从装置外部注入气体的注入管,能够对培养基通气。

[0097] 另外,在培养槽上通过连接管连接有捕集槽,所述捕集槽容纳有作为捕捉液的捕集液(trap solution)。此时,向捕集槽移动的气体或液体与捕集液接触发生起泡。

[0098] 由此,在培养槽中通过通气培养生成的异丙醇由于通气而蒸发,易于从培养基中分离,同时在捕集槽中被捕集液捕集。结果,能够以进一步精制的形态连续且简便地生产异丙醇。

[0099] 实施例

[0100] 以下记载本发明的实施例,但本发明并不限于此。需要说明的是,记载中的“%”若没有特别说明则为质量基准。

[0101] [实施例 1]

[0102] <来自大肠杆菌的硫解酶基因、来自大肠杆菌的 CoA 转移酶基因、来自梭菌属细菌的乙酰乙酸脱羧酶基因、来自梭菌属细菌的异丙醇脱氢酶基因、来自大肠杆菌 0157 的转化酶基因表达载体及该表达载体转化体的构筑>

[0103] 已经报道了大肠杆菌的硫解酶及大肠杆菌的 CoA 转移酶的氨基酸序列和基因的

碱基序列。即,编码硫解酶的基因被记载于在 GenBank accession number U00096 中记载的大肠杆菌 MG1655 株基因组序列的 2324131 ~ 2325315 中。另外,编码 CoA 转移酶的基因被记载于上述大肠杆菌 MG1655 株基因组序列的 2321469 ~ 2322781 中。

[0104] 作为用于使上述基因表达所需的启动子的碱基序列,可以使用在 GenBank accession number X02662 的碱基序列信息中,记载于 397-440 中的来自大肠杆菌的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(以下有时称作 GAPDH)的启动子序列。

[0105] 为了取得 GAPDH 启动子,使用大肠杆菌 MG1655 株的基因组 DNA 作为模板,通过 c gagctacatatgcaatgattgacacgattccg(序列号 1) 及 cgcgcgcatgctatttgttagtgaataaaagg(序列号 2) 按照 PCR 法进行扩增,将得到的 DNA 片段用限制酶 NdeI、SphI 进行消化,由此得到约 100bp 的对应于 GAPDH 启动子的 DNA 片段。将得到的 DNA 片段、和用限制酶 NdeI 及 SphI 消化质粒 pBR322(GenBank accession number J01749) 而得到的片段混合,使用连接酶连接后,转化到大肠杆菌 DH5 α 株感受态细胞(东洋纺织株式会社 DNA-903)中,得到在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上繁殖的转化体。将得到的菌落在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37℃ 下培养一夜,从得到的菌体中回收质粒,确认 GAPDH 启动子被正确插入,将该质粒命名为 pBRgapP。

[0106] 为了取得异丙醇脱氢酶基因,使用 *Clostridium beijerinckii* NRR L B-593 的基因组 DNA 作为模板,通过 aatatgcatgctggtggaacatatgaaaggttttgcaatgctagg(序列号 3) 及 gcggatccggtaccttataataactactgctttaattaagtc(序列号 4) 按照 PCR 法进行扩增,将得到的 DNA 片段用限制酶 SphI、BamHI 进行消化,由此得到约 1.1kbp 的异丙醇脱氢酶片段。将得到的 DNA 片段、与用限制酶 SphI 及 BamHI 消化之前构筑的 pBRgapP 而得到的片段混合,使用连接酶连接后,转化到大肠杆菌 DH5 α 株感受态细胞(东洋纺织株式会社 DNA-903)中,得到在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上繁殖的转化体。将得到的菌落在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中于 37℃ 下培养一夜,从得到的菌体中回收质粒,确认异丙醇脱氢酶被正确插入,将该质粒命名为 pGAP-IPAdh。

[0107] 为了取得来自大肠杆菌的硫解酶基因,使用大肠杆菌 MG 1655 株的基因组 DNA 作为模板,通过 atggatccgctggtggaacatatgaaaaattgtgtcatcgctcag(序列号 5) 及 gcagaagcttgtctagattaattcaaccgttcaatcaccatc(序列号 6) 按照 PCR 法进行扩增,将得到的 DNA 片段用限制酶 BamHI、HindIII 进行消化,由此得到约 1.2kbp 的硫解酶片段。将得到的 DNA 片段、与用限制酶 BamHI 及 HindIII 消化之前制成的质粒 pGAP-IPAdh 而得到的片段混合,使用连接酶连接后,转化到大肠杆菌 DH5 α 株感受态细胞(东洋纺织株式会社 DNA-903)中,得到在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上繁殖的转化体。将得到的菌落在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,于 37℃ 下培养一夜,从得到的菌体中回收质粒,确认硫解酶基因被正确插入,将该质粒命名为 pGAP-IPAdh-atoB。

[0108] 为了取得来自大肠杆菌的 CoA 转移酶 α 亚基基因,使用大肠杆菌 MG1655 株的基因组 DNA 作为模板,通过 gctctagagctggtggaacatatgaaacaaaattgatgacattacaagac(序列号 7) 及 tagcaagcttctactcgagttatttgcctcctgtgaaacg(序列号 8) 按照 PCR 法进行扩增,将得到的 DNA 片段用限制酶 XbaI、HindIII 进行消化,由此得到约 600bp 的 CoA 转移酶 α 亚基片段。将得到的 DNA 片段、和用限制酶 XbaI 及 HindIII 消化之前制成的质粒 pGAP-IPAdh-atoB 而得到的片段混合,使用连接酶连接后,转化到大肠杆菌 DH5 α 株感受态

细胞（东洋纺织株式会社 DNA-903）中，得到在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上繁殖的转化体。将得到的菌落在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中，于 37℃ 下培养一夜，从得到的菌体中回收质粒，确认 CoA 转移酶 α 亚基基因被正确插入，将该质粒命名为 pGAP-IPAdh-atoB-atoD。

[0109] 进而，为了得到来自大肠杆菌的 CoA 转移酶 β 亚基基因，使用大肠杆菌 MG1655 株的基因组 DNA 作为模板，通过 aagtctcgagctggtggaacatatggatgcgaaacaacgtattg（序列号 9）及 ggccaagcttcataaatcaccccggttgc（序列号 10）按照 PCR 法进行扩增，将得到的 DNA 片段用限制酶 XhoI、HindIII 进行消化，由此得到约 600bp 的 CoA 转移酶 β 亚基片段。将得到的 DNA 片段、和用限制酶 XhoI 及 HindIII 消化之前制成的质粒 pGAP-IPAdh-atoB-atoD 而得到的片段混合，使用连接酶连接后，转化到大肠杆菌 DH5 α 株感受态细胞（东洋纺织株式会社 DNA-903）中，得到在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上繁殖的转化体。将得到的菌落在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基上，于 37℃ 下培养一夜，从得到的菌体中回收质粒，确认 CoA 转移酶 β 亚基基因被正确插入，将该质粒命名为 pGAP-IPAdh-atoB-atoD-atoA。

[0110] 进而，为了取得来自大肠杆菌 O 157 株的 cscA，使用大肠杆菌 O157 株的基因组 DNA 作为模板，通过 gctggtggaacatatgacgcaatctcgattgcatg（序列号 11）及 ttaaccagttgccagagtgc（序列号 12）按照 PCR 法进行扩增，将得到的 DNA 片段用 T4 多核苷酸激酶进行末端磷酸化，由此得到约 1470bp 的 cscA 片段。将该 DNA 片段、和将之前制成的 pGAP-IPAdh-atoB-atoD-atoA 用限制酶 HindIII 消化后用 T4DNA 聚合酶进行平端化进而用碱性磷酸酶将末端脱磷酸化得到的片段进行混合，使用连接酶连接后，转化到大肠杆菌 DH5 α 株感受态细胞（东洋纺织株式会社 DNA-903）中，得到在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上繁殖的转化体。从得到的菌体中回收质粒，连接 CoA 转移酶 β 亚基基因的 3' 末端侧和 cscA 的 5' 末端侧，将确认了 cscA 被正确插入的质粒命名为 pGAP-IPAdh-atoB-atoD-atoA-cscA。

[0111] 需要说明的是，大肠杆菌 O157 的基因组可以从标准物质及计量技术研究所获得。

[0112] 为了取得乙酰乙酸脱羧酶基因，使用 *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 的基因组 DNA 作为模板，通过 caggtaccgctggtggaacatatgttaaaggatgaagtaattaaacaattagc（序列号 13）、及 gcggatccttacttaagataatcatatataacttcage（序列号 14）按照 PCR 法进行扩增，将得到的 DNA 片段用限制酶 KpnI、BamHI 进行消化，由此得到约 700bp 的乙酰乙酸脱羧酶片段。将得到的 DNA 片段、和用限制酶 KpnI 及 BamHI 消化之前制成的质粒 pGAP-IPAdh-atoB-atoD-atoA-cscA 而得到的片段混合，使用连接酶连接后，转化到大肠杆菌 DH5 α 株感受态细胞（东洋纺织株式会社 DNA-903）中，得到在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上繁殖的转化体。将得到的菌落在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中于 37℃ 下培养一夜，从得到的菌体中回收质粒，确认乙酰乙酸脱羧酶基因被正确插入，将该质粒命名为 pGAP-Iaaa-cscA。将该质粒转化到大肠杆菌 B 株（ATCC11303）中，在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上于 37℃ 下培养一夜，将得到的转化体作为 pGAP-Iaaa-cscA/B 株。

[0113] [实施例 2]

[0114] < 使用 3L 培养槽、利用大肠杆菌 pGAP-Iaaa-cscA/B 株由蔗糖生产异丙醇 >

[0115] 本实施例中,使用 W02009/008377 号说明书图 1 所示的生产装置进行异丙醇的生产。培养槽使用 3 升容积的槽,捕集槽使用 10L 容积的槽。培养槽、捕集槽、注入管、连接管、排出管均为玻璃制。在捕集槽中,以 6L 的量注入作为捕集液的水(捕集水)。需要说明的是,在培养槽中设置废液管,将由糖和中和剂的流入而增加的培养液适当排出至培养槽外。

[0116] 作为预培养,在加入了 25mL 含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LBBroth,Miller 培养液(Difco244620)的 100mL 容量的锥形瓶中接种实施例 1 中得到的 pGAP-Iaaa-cscA/B 株,在培养温度 35℃、120rpm 的条件下搅拌培养一夜。将全部量的预培养液移至装入了 1475g 以下所示组成的培养基的 3L 容积的培养槽(ABLE 公司制培养装置 BMJ-01)中,进行培养。

[0117] 培养在大气压下、在通气量 1.5L/min、搅拌速度 550rpm、培养温度 35℃、pH7.0(用 NH_3 水溶液调节)下进行。从培养开始至 8 小时后的期间,以 5g/L/小时的流速添加 40wt/wt% 的蔗糖水溶液。之后,以 15g/L/小时的流速添加 40wt/wt% 的蔗糖水溶液。从培养开始至 48 小时后,对菌体培养液取样,通过离心操作除去菌体后,通过 HPLC 按照常用方法测定所得的培养上清液中的异丙醇的蓄积量。

[0118] <培养基组成>

[0119] 玉米浆(日本食品化工制):20g/L

[0120] $\text{Fe}_2\text{SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:0.09g/L

[0121] K_2HPO_4 :2g/L

[0122] KH_2PO_4 :2g/L

[0123] $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$:2g/L

[0124] $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$:2g/L

[0125] Adecano1 LG126(旭电化工业)0.6g/L

[0126] (剩余部分:水)

[0127] 结果,培养开始 48 小时后确认到蓄积有 5.9g/L 的异丙醇。需要说明的是,测定值为培养后的培养液和捕集水(6L)中的合计值。

[0128] 由上述结果可知,通过在蔗糖非 PTS 基因组中导入 cscA 分解蔗糖,作为分解产物的葡萄糖和果糖被迅速摄入细胞内,转化为异丙醇。

[0129] [实施例 3]

[0130] 强化宿主大肠杆菌的基因组上的 CoA 转移酶基因(atoD 及 atoA)和硫解酶基因(atoB)的表达,在导入的质粒载体上仅连接乙酰乙酸脱羧酶基因、异丙醇脱氢酶基因及 cscA,使质粒全长的 DNA 大小变小,尝试由蔗糖生产异丙醇。

[0131] <大肠杆菌 B 株基因组上 atoD 启动子置换为 GAPDH 启动子>

[0132] 大肠杆菌 MG1655 株的基因组 DNA 的全部碱基序列是公知的(GenBank accession number U00096),还报道了编码大肠杆菌 MG1655 株的 CoA 转移酶 α 亚基的基因(以下有时简写为 atoD)的碱基序列。即,atoD 记载于在 GenBank accession number U00096 中记载的大肠杆菌 MG1655 株基因组序列的 2321469 ~ 2322131 中。

[0133] 作为用于表达上述基因所需的启动子的碱基序列,可以使用在 GenBank accession number X02662 的碱基序列信息中,记载于 397-440 的来自大肠杆菌的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(以下有时称作 GAPDH)的启动子序列。为了取得 GAPDH 启动子,使用大肠杆菌 MG1655 株的基因组 DNA 作为模板,通过 cgctcaattgcaatgattgacacgattccg(序

列号 15) 及 acagaattcgctatttggtagtgaataaaagg(序列号 16) 按照 PCR 法进行扩增,将得到的 DNA 片段用限制酶 MfeI 及 EcoRI 消化,由此得到约 100bp 的编码 GAPDH 启动子的 DNA 片段。将得到的 DNA 片段和用限制酶 EcoRI 消化质粒 pUC19 (GenBank accession number X02514)、进而进行碱性磷酸酶处理而得到的片段混合,使用连接酶连接后,转化到大肠杆菌 DH5 α 株感受态细胞(东洋纺织株式会社 DNA-903)中,得到在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上繁殖的转化体。将得到的 10 个菌落分别在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中于 37 $^{\circ}$ C 下培养一夜,回收质粒,选择用限制酶 EcoRI 及 KpnI 进行消化时 GAPDH 启动子未被切除的质粒,进而确认 DNA 序列,将 GAPDH 启动子被正确插入的质粒作为 pUCgapP。将得到的 pUCgapP 用限制酶 EcoRI 及 KpnI 消化。

[0134] 进而,为了取得 atoD,使用大肠杆菌 MG1655 株的基因组 DNA 作为模板,通过 cgaattcgctgggtggaacatatgaaaacaaaattgatgacattacaagac(序列号 17) 及 gcggtaccttatttggctctcctgtgaaacg(序列号 18) 按照 PCR 法进行扩增,将得到的 DNA 片段用限制酶 EcoRI 及 KpnI 消化,由此得到约 690bp 的 atoD 片段。将该 DNA 片段与之前用限制酶 EcoRI 及 KpnI 消化后的 pUCgapP 混合,使用连接酶连接后,转化到大肠杆菌 DH5 α 株感受态细胞(东洋纺织株式会社 DNA-903)中,得到在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上繁殖的转化体。从得到的菌体中回收质粒,确认 atoD 被正确插入,将该质粒命名为 pGAPatoD。

[0135] 需要说明的是,大肠杆菌 MG1655 株可以由美国标准生物品收藏中心 (American Type Culture Collection) 获得。

[0136] 如上所述,还报道了大肠杆菌 MG1655 株的基因组 DNA 中的 atoD 的碱基序列。使用基于大肠杆菌 MG1655 株的 atoD 的 5' 附近区域的基因信息制成的 gctctagatgctgaaatccactagtcttgtc(序列号 19) 和 tactgcagcgttccagcaccttatcaacc(序列号 20),以大肠杆菌 MG1655 株的基因组 DNA 作为模板进行 PCR,由此扩增了约 1.1kbp 的 DNA 片段。

[0137] 另外,使用基于大肠杆菌 MG1655 株的 GAPDH 启动子的序列信息制作的 ggtctagagcaatgattgacacgattccg(序列号 21) 和基于大肠杆菌 MG1655 株的 atoD 的序列信息制作的序列号 18 的引物,以上述制作的表达载体 pGAPatoD 作为模板进行 PCR,得到具有 GAPDH 启动子和 atoD 的约 790bp 的 DNA 片段。

[0138] 将如上得到的片段分别用限制酶 PstI 和 XbaI、XbaI 和 KpnI 消化,将该片段和将温度感受性质粒 pTH18cs1 (GenBank accession number AB019610) (Hashimoto-Gotoh, T., Gene, 241, 185-191 (2000)) 用 PstI 和 KpnI 消化得到的片段混合,使用连接酶连接后,转化到 DH5 α 株中,得到在含有 10 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂板上于 30 $^{\circ}$ C 繁殖的转化体。将得到的菌落在含有 10 μ g/ml 氯霉素的 LB 液体培养基中于 30 $^{\circ}$ C 下培养一夜,从得到的菌体中回收质粒。将该质粒转化到大肠杆菌 B 株 (ATCC11303) 中,在含有 10 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂板上于 30 $^{\circ}$ C 下培养一夜,得到转化体。将得到的转化体接种在含有 10 μ g/ml 氯霉素的 LB 液体培养基上,在 30 $^{\circ}$ C 下培养一夜。将得到的培养菌体涂布在含有 10 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂板上,在 42 $^{\circ}$ C 下培养,得到菌落。将得到的菌落在不含抗生素的 LB 液体培养基中于 30 $^{\circ}$ C 下培养 2 小时,涂布在不含抗生素的 LB 琼脂板上,得到在 42 $^{\circ}$ C 下繁殖的菌落。

[0139] 从出现的菌落中随机地取出 100 个菌落,分别使它们在不含抗生素的 LB 琼脂板和含有 10 μ g/ml 氯霉素的 LB 琼脂板上繁殖,选择氯霉素感受性的克隆。进而,通过 PCR 从上述克隆的染色体 DNA 中使含有 GAPDH 启动子和 atoD 的约 790bp 片段扩增,选择 atoD 启动

子区域被 GAPDH 启动子置换的株,将满足以上条件的克隆命名为大肠杆菌 B 株 *atoD* 缺失 GAP*patoD* 基因组插入株。

[0140] 需要说明的是,大肠杆菌 B 株 (ATCC11303) 可以从作为细胞·微生物·基因文库的美国标准生物品收藏中心获得。

[0141] [实施例 4]

[0142] < 来自梭菌属细菌的乙酰乙酸脱羧酶基因、来自梭菌属细菌的异丙醇脱氢酶基因表达载体及该表达载体转化体的构筑 >

[0143] 梭菌属细菌的乙酰乙酸脱羧酶记载于 GenBank accession number M55392 中,异丙醇脱氢酶记载于 GenBank accession number AF157307 中。

[0144] 为了取得异丙醇脱氢酶基因,使用 *Clostridium beijerinckii* NRR L B-593 的基因组 DNA 作为模板,通过 AATATGCATGCTGGTGAACATATGAAAGGTTTGTCAATGCTAGG (序列号 3) 及 gcggatccttataataactactgctttaattaagtc (序列号 22) 按照 PCR 法进行扩增,将得到的 DNA 片段用限制酶 *Sph*I、*Bam*HI 消化,由此得到约 1.1kbp 的异丙醇脱氢酶片段。将得到的 DNA 片段、与用限制酶 *Sph*I 及 *Bam*HI 消化之前制成的质粒 pBRgapP 而得到的片段混合,使用连接酶连接后,转化到大肠杆菌 DH5 α 株感受态细胞 (东洋纺织株式会社 DNA-903) 中,得到在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上繁殖的转化体。将得到的菌落在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中于 37℃ 下培养一夜,从得到的菌体回收质粒,确认 IPAdh 被正确插入,将该质粒命名为 pGAP-IPAdh。

[0145] 为了取得乙酰乙酸脱羧酶基因,使用 *Clostridium acetobutylicum* ATCC824 的基因组 DNA 作为模板,通过 caggatccgctggtggaacatatgttaaaggatgaagtaattaacaaattagc (序列号 23) 及 ggaattcgggtaccttacttaagataatcatatataacttcagc (序列号 24) 按照 PCR 法进行扩增,将得到的 DNA 片段用限制酶 *Bam*HI、*Eco*RI 消化,由此得到约 700bp 的乙酰乙酸脱羧酶片段。将得到的 DNA 片段、与用限制酶 *Bam*HI 及 *Eco*RI 消化之前制成的质粒 pGAP-IPAdh 而得到的片段混合,使用连接酶连接后,转化到大肠杆菌 DH5 α 株感受态细胞 (东洋纺织株式会社 DNA-903) 中,得到在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上繁殖的转化体。将得到的菌落在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中于 37℃ 下培养一夜,从得到的菌体中回收质粒,确认 *adc* 被正确插入,将该质粒命名为 pGAP-Ia。

[0146] 将上述质粒 pGAP-Ia 转化到实施例 3 中制成的大肠杆菌 B 株 *atoD* 缺失 GAP*patoD* 基因组插入株的感受态细胞中,在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上于 37℃ 下培养一夜,由此得到大肠杆菌 pGAP-Ia/GAP*patoD* 基因组插入株。

[0147] 需要说明的是, *Clostridium acetobutylicum* ATCC824、大肠杆菌 B 株可以从作为细胞·微生物·基因文库的美国标准生物品收藏中心获得。另外, *Clostridium beijerinckii* NRRL B-593 可以从作为细胞·微生物文库的 VTT 生物品收藏中心获得。

[0148] [实施例 5]

[0149] < 来自梭菌属细菌的乙酰乙酸脱羧酶基因、来自梭菌属细菌的异丙醇脱氢酶基因、来自大肠杆菌 0157 的转化酶基因表达载体及该表达载体转化体的构筑 >

[0150] 大肠杆菌 0157 株的基因组 DNA 的全部碱基序列是公知的 (GenBank accession number AE005174),还报道了编码大肠杆菌 0157 株的转化酶的基因 (以下有时简称为 *cscA*) 的碱基序列。即, *cscA* 记载于在 GenBank accession number AE005174 中记载的大

肠杆菌 0157 株基因组序列的 3274383 ~ 3275816 中。

[0151] 为了取得 *cscA*, 使用大肠杆菌 0157 株的基因组 DNA 作为模板, 通过 ATGGTACCGCTG GTGGAACATATGACGCAATCTCGATTGCATG (序列号 25) 及 CGAATTCTTAACCCAGTTGCCAGAGTGC (序列号 26) 按照 PCR 法进行扩增, 将得到的 DNA 片段用限制酶 KpnI 及 EcoRI 消化, 由此得到约 1470bp 的 *cscA* 片段。将上述 DNA 片段、和用限制酶 KpnI 及 EcoRI 消化之前实施例 4 中制成的 pGAP-Ia (来自梭菌属细菌的乙酰乙酸脱羧酶基因、来自梭菌属细菌的异丙醇脱氢酶基因表达载体) 而得到的片段混合, 使用连接酶连接后, 转化到大肠杆菌 DH5 α 株感受态细胞 (东洋纺织株式会社 DNA-903) 中, 得到在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上繁殖的转化体。从得到的菌体中回收质粒, 确认 *cscA* 被正确插入, 将该质粒命名为 pGAP-Ia-*cscA*。

[0152] 将上述质粒 pGAP-Ia-*cscA* 转化到实施例 3 中制成的大肠杆菌 B 株 *atoD* 缺失 GAP*patoD* 基因组插入株的感受态细胞中, 在含有 50 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上, 于 37°C 下培养一夜, 由此得到大肠杆菌 pGAP-Ia-*cscA*/GAP*patoD* 基因组插入株。

[0153] 需要说明的是, 大肠杆菌 0157 的基因组可以从标准物质及计量技术研究所获得。

[0154] [实施例 6]

[0155] < 使用 3L 培养槽、利用大肠杆菌 pGAP-Ia-*cscA*/GAP*patoD* 基因组插入株由蔗糖生产异丙醇 >

[0156] 使用实施例 5 中得到的大肠杆菌 pGAP-Ia-*cscA*/GAP*patoD* 基因组插入株, 与实施例 2 同样地进行异丙醇生产研究。

[0157] 另外, 测定培养槽中的蔗糖、葡萄糖、果糖的蓄积量, 结果示于表 1。

[0158] 结果, 在培养开始 48 小时后确认到蓄积了 31.4g/L 的异丙醇。需要说明的是, 测定值为培养后的培养液和捕集水中的合计值。

[0159] [表 1]

[0160]

时间 hr	40%蔗糖添加量 g	残留糖			异丙醇蓄积量 g/L
		蔗糖 g/L	葡萄糖 g/L	果糖 g/L	
0	0.0	0.00	0.00	0.00	0.00
3	23.6	22.07	0.00	0.00	0.00
6	67.2	46.05	0.02	0.03	0.43
10	152.1	78.28	0.76	0.00	6.43
24	384.6	0.00	0.00	0.00	11.87
30	536.0	0.00	0.00	0.00	18.28
48	1011.9	0.00	0.00	0.00	31.38

[0161] 由上述结果可知, 选择来自梭菌属细菌的基因用于乙酰乙酸脱羧酶活性及异丙醇脱氢酶活性, 将它们仅与蔗糖非 PTS 基因组中的 *cscA* 导入, 由此分解蔗糖, 作为分解产物的葡萄糖和果糖被迅速摄入细胞内, 转化为异丙醇。另外, 本结果中, 虽然通过蔗糖的分解应等摩尔生成葡萄糖和果糖, 但果糖在培养基中不蓄积, 能确认到有效地进行异丙醇的生产而不受由葡萄糖产生的代谢抑制 (分解代谢产物阻遏) 的影响。

[0162] [实施例 7]

[0163] < 使用 1L 培养槽、利用大肠杆菌 pGAP-Ia-*cscA*/GAP*patoD* 基因组插入株由糖蜜生产异丙醇 >

[0164] 与实施例 6 同样地进行异丙醇生产研究。其中,使用 80wt/wt% 的糖蜜(大日本明治精糖制)代替 40wt/wt% 的蔗糖水溶液进行。培养开始 48 小时后确认到蓄积了 29.4g/L 的异丙醇。需要说明的是,测定值为培养后的培养液和捕集水中的合计值。

[0165] [比较例 1]

[0166] <使用 3L 培养槽、利用大肠杆菌 pGAP-Ia/GAPpatoD 基因组插入株生产异丙醇>

[0167] 在与实施例 2 同样的条件下,针对实施例 4 中制成的 pGAP-Ia/GAPpatoD 基因组插入株进行异丙醇培养研究。结果,即使在 48 小时后也未确认到异丙醇的生产,添加的蔗糖几乎以相同量残留在培养上清液中。

[0168] 上述结果表明即使赋予异丙醇生产能力,如果不导入 CscA,则不能生产异丙醇。

[0169] [比较例 2]

[0170] <使用 3L 培养槽、利用大肠杆菌 pGAP-Ia-cscA/B 株生产异丙醇>

[0171] 将实施例 5 中制成的质粒 pGAP-Ia-cscA 转化到大肠杆菌 B 株(ATCC 11303)中,在含有 50 μ g/ml 氨苄青霉素的 LB 琼脂板上,于 37℃ 下培养一夜,以得到的转化体作为 pGAP-Ia-cscA/B 株。对于制成的 pGAP-Ia-cscA/B 株,在与实施例 2 相同的条件下,进行异丙醇培养研究。在 48 小时未确认到异丙醇的生产。

[0172] 上述结果表明如果不赋予异丙醇生产能力,即使仅将 CscA 导入大肠杆菌 B 株,也不能生产异丙醇。

[0173] [比较例 3]

[0174] <大肠杆菌 B 株中的由葡萄糖产生的代谢抑制(分解代谢产物阻遏)的确认>

[0175] 确认到作为本发明的生产异丙醇的大肠杆菌的宿主的 B 株为本来受由葡萄糖引起的代谢抑制(分解代谢产物阻遏)的影响的大肠杆菌。

[0176] 作为预培养,在加入了 5mL LB Broth,Miller 培养液(Difco244620)的 14mL 容量的塑料管(FALCON 社制 2057)中接种大肠杆菌 B 株(ATCC11303),在培养温度 37℃、120rpm 的条件下搅拌培养一夜。将 0.3mL 预培养液移至装入了 30mL 表 2 所述的 1~4 组成的培养基的 100mL 容量的三角瓶(Baffled Flasks)中,进行培养。培养在搅拌速度 120rpm、培养温度 37℃ 下进行。

[0177] 从培养开始 0、2、4、6、8、10 小时后对菌体培养液取样,通过离心操作除去菌体后,用 F- 试剂盒葡萄糖/果糖(J. K. 国际产品编号 139106)测定得到的培养上清液中的葡萄糖和果糖的含量。结果示于图 1。图 1 中黑圆点表示葡萄糖的减少量,白圆点表示果糖的减少量。进而,算出从培养第 0 小时开始的各培养时间下葡萄糖或果糖的减少程度。各培养基中的 10 小时后的葡萄糖减少量示于表 2。

[0178] [表 2]

[0179]

	No.	1	2	3	4
M9 培养基	NH_2Cl_4 (g/L)	10	10	10	10
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 12\text{H}_2\text{O}$ (g/L)	17.1	17.1	17.1	17.1
	KH_2PO_4 (g/L)	3	3	3	3
	NaCl (g/L)	0.5	0.5	0.5	0.5
	$\text{MgSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$ (mg/L)	490	490	490	490
	$\text{CaCl}_2 - 2\text{H}_2\text{O}$ (mg/L)	14.7	14.7	14.7	14.7
	$\text{FeSO}_4 - 7\text{H}_2\text{O}$ (mg/L)	2.8	2.8	2.8	2.8
	维生素 $\text{B}_1 - \text{HCl}$ (mg/L)	10	10	10	10
糖	葡萄糖 (g/L)	0	9	18	0
	果糖 (g/L)	0	9	0	18
(剩余部分: 水)					
葡萄糖减少量 (g/L)		-	4.4	5.1	-
果糖减少量 (g/L)		-	1.0	-	3.4

[0180] 如表 2 所示,比较 10 小时后的果糖葡萄糖减少量,结果表明仅含有果糖作为糖源的培养基 No. 4 变为 3.4g/L,相对于此,在含有糖源为葡萄糖和果糖两者的培养基 No. 2 中,果糖的摄入被抑制。由此确认到在 B 株中糖源单独为果糖时,与葡萄糖同样地摄入果糖,但葡萄糖和果糖共存时,果糖的摄入被抑制。

[0181] 综上所述,根据本发明,能够提供用于从廉价且工业上利用价值高的蔗糖有效地生产异丙醇的有用的生产异丙醇的大肠杆菌及异丙醇生产方法。

[0182] 2009 年 9 月 16 日申请的日本国专利申请第 2009-214694 号公开的全部内容通过参照被引入本说明书中。

[0183] 本说明书中记载的全部文献、专利申请及技术规格,与各文献、专利申请及技术标准通过参照被具体且单独记载的情况相同程度地被引入本说明书中。

[0001]

序列表

<110> 三井化学株式会社
<120> 异丙醇生产细菌及异丙醇生产方法
<130> MT-F03083-00
<150> JP2009-214694
<151> 2009-09-16
<160> 26
<170> PatentIn version 3.1
<210> 1
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 引物
<400> 1
cgagctacat atgcaatgat tgacacgatt ccg 33
<210> 2
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 引物
<400> 2
cgcgcgcatg ctatttgta gigaataaaa gg 32
<210> 3
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 引物
<400> 3
aatatgcatg ctggtggaac atatgaaagg ttttgcaalg clagg 45
<210> 4
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 引物
<400> 4
gcggatccgg taccttataa tataactact gctttaatta agtc 44
<210> 5
<211> 44
<212> DNA
<213> 人工
<220>
<223> 引物
<400> 5
atggatccgc tgggtggaaca tatgaaaaat tgtgtcatcg tcag 44
<210> 6

[0002]

<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 6	
gcagaagctt gtctagatta attcaaccgt tcaatcacca tc	42
<210> 7	
<211> 51	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 7	
gctctagagc tgggtggaaca tatgaaaaca aaattgatga cattacaaga c	51
<210> 8	
<211> 41	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 8	
tagcaagctt ctactcgagt tatttgcctt cctgtgaaac g	41
<210> 9	
<211> 44	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 9	
aagtctcgag ctggtggaac atatggatgc gaaacaacgt attg	44
<210> 10	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 10	
ggccaagctt cataaatcac cccgttgc	28
<210> 11	
<211> 35	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 11	
gctggtggaa catatgacgc aatctcgatt gcatg	35
<210> 12	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工	

[0003]

<220>		
<223>	引物	
<400>	12	
	ttaacccagt tgccagagtg c	21
<210>	13	
<211>	54	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	13	
	caggtaccgc tgggtgaaca tatgttaaag gatgaagtaa ttaaacaat tagc	54
<210>	14	
<211>	38	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	14	
	gcggtaccctt acttaagata atcatatata acttcagc	38
<210>	15	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	15	
	cgtcaattg caatgattga cacgattccg	30
<210>	16	
<211>	32	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	16	
	acagaattcg ctatttgta gtgaataaaa gg	32
<210>	17	
<211>	50	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	17	
	cgaattcgt ggtggaacat atgaaaacaa aattgatgac attacaagac	50
<210>	18	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人工	
<220>		
<223>	引物	
<400>	18	

[0004]

gcggtacctt atttgctctc ctgtgaaacg	30
<210> 19 <211> 31 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 引物	
<400> 19 gctctagatg ctgaaatcca ctagtcttgt c	31
<210> 20 <211> 29 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 引物	
<400> 20 tactgcagcg ttccagcacc ttatcaacc	29
<210> 21 <211> 29 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 引物	
<400> 21 ggtctagagc aatgattgac acgattccg	29
<210> 22 <211> 38 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 引物	
<400> 22 gcggatcctt ataataaac tactgcttta attaagtc	38
<210> 23 <211> 54 <212> DNA <213> 人工	
<220> <223> 引物	
<400> 23 caggatccgc tgggtgaaca tatgttaaag gatgaagtaa ttaaacaat tagc	54
<210> 24 <211> 43 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> 引物	
<220> <221> 引物 <222> (1)..(24) <223>	

[0005]

<400> 24	
ggaattcggg accctactta agataatcat atataacttc agc	43
<210> 25	
<211> 43	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 25	
atgggtaccgc tgggtggaaca tatgacgcaa tctcgattgc atg	43
<210> 26	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> 引物	
<400> 26	
cgaattccta acccagttgc cagagtgc	28

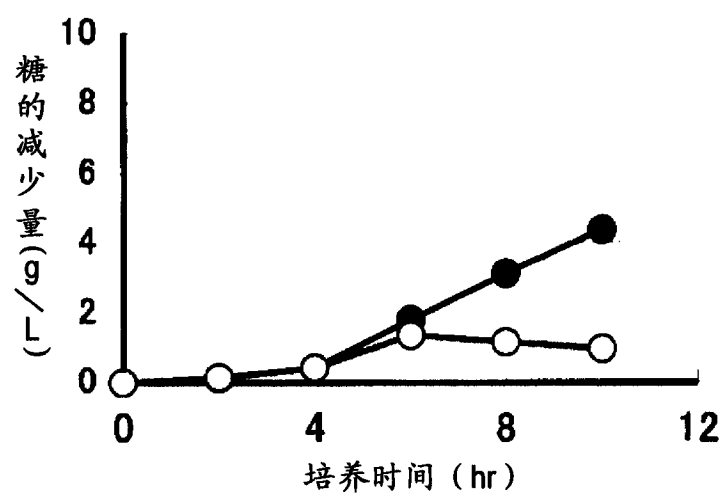


图 1