

公告本 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 97 110002

C12P 7/04 (2006.01,

※ 申請日期： 97. 3. 21

※IPC 分類： C12P 7/26 (2006.01,

一、發明名稱：(中文/英文)

C12N 15/53 (2006.01,

製造 1,2-丙二醇及丙酮醇之微生物及方法

MICROORGANISMS AND METHODS FOR PRODUCTION OF

1,2-PROPANEDIOL AND ACETOL

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

代謝探索公司

METABOLIC EXPLORER

代表人：(中文/英文)(簽章)

高哲利斯/GONZALEZ, BENJAMIN

住居所或營業所地址：(中文/英文)

法國聖布利爾市克萊蒙利馬生技園區

Biopole Clermont-Limagne, 63360 Saint-Beauzire, France

國 籍：(中文/英文)

法國/France

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 蘇凱利/SOUCAILLE, PHILIPPE

2. 梅妮爾/MEYNIAL-SALLES, ISABELLE

3. 佛爾克/VOELKER, FRANCOIS

4. 菲萊納/FIGGE, RAINER

國 籍：(中文/英文)

1.-3.均為法國/France

4.為德國/Germany

四、聲明事項：

☐ 主張專利法第二十二條第二項 ☐ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為： 年 月 日。

☒ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☒ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

專利合作條約；西元 2007 年 3 月 23 日；PCT/IB2007/001677

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

九、發明說明：

【發明所屬之技術領域】

本發明係有關一種經改造之微生物，及其於製備 1,2-丙二醇與/或丙酮醇上之用途。

【先前技術】

1,2-丙二醇或丙二醇(即 C3 二元醇)為一種常用之化學物質。其係不飽和聚酯樹脂、液態清潔劑、著色劑、防凍劑與飛機之防結冰劑液體之成份。自從 1993-1994，丙二醇即用於替代被認為毒性高於丙烯衍生物之乙烯衍生物。

1,2-丙二醇之目前製法係採用化學方法，使用消耗大量水之氧化丙烯水合法進行。氧化丙烯有兩種製法，其中一種使用表氯醇，另一種使用過氧化氫。這兩種途徑均使用高毒性物質。此外，過氧化氫途徑會產生如：第三丁醇與 1-苯基乙醇之副產物。若想在丙烯之生產上獲利，必需想辦法利用此等副產物。該化學途徑通常產生消旋性 1,2-丙二醇，而這兩種立體異構物(*R*)1,2-丙二醇與(*S*)1,2-丙二醇均可用於某些用途(例如：作為特殊化學物質與醫藥產品之對掌性起始物)。

丙酮醇或羥基丙酮(1-羥基-2-丙酮)為一種 C3 酮基醇。此產物在紡織工業之大染缸之染織過程中作為還原劑使用。傳統之含硫還原劑宜撤換，以減少廢水中有害環境之硫含量。丙酮醇亦為化學工業之起始物，其可用於例如：製造多元醇或雜環分子。其亦具有有利之螯合與溶劑性質。

丙酮醇目前主要利用 1,2-丙二醇之催化性氧化或脫水反應製備。現已提出一種由可再生之原料(如：甘油)為起始物之製法(參見 DE4128692 與 WO 2005/095536)。目前化學製法中丙酮醇之生產成本降低了其工業用途與市場。

製造 1,2-丙二醇與/或丙酮醇之化學製法之缺點促使生物合成法成為吸引人之替代方案。已知有兩種利用微生物，由糖類自然生產此等產物之途徑。

第一種途徑為裂解 6-去氧糖類(例如：L-鼠李糖或 L-岩藻糖)形成二羥基丙酮磷酸鹽與(S)-乳醛，其再還原成(S)-1,2-丙二醇(Badia 等人之 1985)。此途徑在大腸桿菌(*E. coli*)中進行，但由於去氧六碳糖之成本提高，因此無法在經濟上有效生產。

第二種途徑為由一般糖類(例如：葡萄糖或木糖)經由糖原酵解法後，進行甲基乙二醛途徑之新陳代謝法。轉化二羥基丙酮磷酸鹽所形成之甲基乙二醛可還原成乳醛或丙酮醇。這兩種化合物可再進行第二種還原反應，產生 1,2-丙二醇。(R)-1,2-丙二醇之天然生產者，如：楔形梭菌(*Clostridium sphenoides*)與熱糖解高溫厭氧菌(*Thermoanaerobacter thermosaccharolyticum*)即採用此途徑。已利用楔形梭菌在限制磷酸鹽條件下製造 1,2-丙二醇，其效價為 1.58 克/升(Tran Din 與 Gottschalk, 1985)。已有研究利用熱糖解高溫厭氧菌來製造 1,2-丙二醇(Cameron 與 Cooney, 1986; Sanchez-Rivera 等人, 1987)。所得之最佳效價為 9 克/升，且由葡萄糖得到之產量為 0.2

克/克。然而，使用此等微生物所改善之效能同樣受到遺傳工具短缺之限制。

大腸桿菌具有天然製造 1,2-丙二醇與丙酮醇之遺傳能力。形成 1,2-丙二醇之生物合成途徑始自糖原酵解中間物二羥基丙酮磷酸鹽。此代謝中間物可利用 *mgsA* 基因所編碼之甲基乙二醛合成酶轉化成甲基乙二醛 (Cooper, 1984、Töttemeyer 等人, 1998)。甲基乙二醛為一種可與巨型分子(如：DNA、RNA 與蛋白質)之親核性中心反應之極毒性親電子物。其可抑制細菌生長，在極低濃度(0.3 至 0.7 mM)下即可導致細胞死亡。因此，目前已有人探討排除甲基乙二醛毒性之途徑 (Ferguson 等人之 1998)。已於細菌中鑑別出二種途徑，尤指大腸桿菌：

- 第一種途徑為依賴穀胱甘肽之乙二醛酶 I-II 系統(由 *gloA* 與 *gloB* 基因編碼)，其分兩步驟轉化甲基乙二醛形成 D-乳酸鹽。
- 第二種途徑為不依賴穀胱甘肽之乙二醛酶 III 酵素，其催化甲基乙二醛轉化成 D-乳酸鹽。
- 第三種系統包括由甲基乙二醛還原酶降解甲基乙二醛。該最後一個系統與 1,2-丙二醇之製造有關。甲基乙二醛為一種 C3 酮基醛，在 C1 帶有醛基且在 C2 帶有酮基。這兩個位置均可還原成醇，分別產生丙酮醇(或羥基丙酮)、非對掌性分子與乳醛，係可呈 L-或 D-型之對掌性分子(參見圖 1)。這 3 個分子：丙酮醇、L-乳醛與 D-乳醛隨後可在其他位置還原，產生對掌性 1,2-丙二醇。

此時，大腸桿菌優先使用之途徑尚未清楚建立。優先使用 NADPH 作為輔因子之甲基乙二醛還原酶已經純化，且在大腸桿菌中部份鑑別出(Saikusa 等人之 1987)。已知此反應之產物為乳醛。Misra 等人(1996)說明兩種甲基乙二醛還原酶活性之純化結果產生相同產物丙酮醇。其中一種依賴 NADH 之活性可為醇脫氫酶活性，而依賴 NADPH 之活性則為非專一性醛還原酶。Altaras 與 Cameron(1999)證實大腸桿菌之 *gldA* 基因所編碼之甘油脫氫酶(GldA)有活性還原甲基乙二醛形成(R)-乳醛，且亦可轉化丙酮醇形成 1,2-丙二醇。

基因 *yghZ* 係自大腸桿菌中選殖出，且已鑑別其表現與蛋白質(Grant, 2003)。其以 NADPH 為輔因子時，對形成甲基乙二醛具有高度比活性，但反應產物則尚未鑑別出。當此基因過度表現時，則會對甲基乙二醛毒性產生抗性。

Ko 等人(2005)全面探討大腸桿菌之 9 種醛-酮還原酶作為轉化甲基乙二醛形成丙酮醇之候選物。其顯示，有 4 種純化酵素：YafB、YqhE、YeaE 與 YghZ 可在 NADPH 之存在下轉化甲基乙二醛形成丙酮醇。依據其研究，甲基乙二醛還原酶：YafB、YeaE 與 YghZ 在活體內之去毒性方面，與甲基乙二醛之代謝作用相關性最高。Di Luccio 等人(2006)顯示大腸桿菌之基因 *ydjG* 之產物在使用 NADH 下，對甲基乙二醛具有活性，但尚未鑑別出其反應產物。

Cameron 之研究團隊(Cameron 等人 1998、Altaras 與

Cameron, 1999、Altaras 與 Cameron, 2000)與 Bennett 之研究團隊(Huang 等人, 1999、Berrios-Rivera 等人, 2003)已使用單純碳源進行大腸桿菌之遺傳改造法之許多研究, 以得到 1,2-丙二醇製造者。此等研究依賴二羥基丙酮磷酸鹽形成 1,2-丙二醇之途徑中酵素活性之一種或多種編碼基因之表現。Cameron 等人(1998)顯示, 編碼大鼠水晶體醛糖還原酶基因或 *gldA* 基因之過度表現會使得 1,2-丙二醇之產量低於 0.2 克/升。藉由兩種大腸桿菌基因: *mgsA* 與 *gldA* 之共同表現, 即可改善此效價。採用此組合可得到 0.7 克/升之 1,2-丙二醇效價(Altaras 與 Cameron, 1999)。當大腸桿菌中表現完整之 1,2-丙二醇途徑時, 可進一步改善效價與產量(Altaras 與 Cameron, 2000)。有三種基因: *mgsA*、*gldA* 與 *fucO* 在缺失編碼乳酸鹽脫氫酶基因(*ldhA*)之菌株中過度表現。Cameron 研究團隊採用此組合在厭氧性燒瓶培養物中, 在每消耗 1 克葡萄糖產生 0.2 克之產量下所得最佳 1,2-丙二醇製造量為 1.4 克/升。當外推至厭氧性分批進料之發酵槽中時, 在每消耗 1 克葡萄糖產生 0.19 克之產量下之 1,2-丙二醇製造量為 4.5 克/升。在專利案 US 6,087,140、US 6,303,352 與 WO 98/37204 中亦說明採用相同方法得到之結果, 但其效價與產量均較低。Bennett 團隊亦使用缺失 *ldhA* 之大腸桿菌宿主菌株, 使來自丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)之 *mgs* 基因與來自大腸桿菌之 *gldA* 基因過度表現。在厭氧條件之燒瓶培養物得到效價 1.3 克/升與產量 0.12 克/克, 而微好氧培養物

則得到效價 1.4 克/升，產量 0.13 克/克。

在此階段之所有此等結果均未優於彼等由熱糖解高溫厭氧菌 (*T. thermosaccharolyticum*) 菌株得到之結果。

迄今尚無人說明以來自微生物，特定言之大腸桿菌之內因性活性來轉化甲基乙二醛形成丙酮醇之用法。

【發明內容】

本發明係有關具有提高之甲基乙二醛還原酶活性之經改造之微生物，及其於製備 1,2-丙二醇與/或丙酮醇上之用途。甲基乙二醛還原酶酵素為微生物基因之產物。當涉及甲基乙二醛轉化成丙酮醇之一種或多種基因(較佳係選自：*yqhD*、*yafB*、*ycdW*、*yqhE*、*yeaE*、*yghZ*、*yajO*、*tas*、*ydjG* 與 *ydbC*)過度表現時，即提高甲基乙二醛還原酶活性。

本發明另一態樣中，甲基乙二醛合成酶活性亦因 *mgsA* 基因之過度表現而提高。

本發明另一態樣中，因刪除 *edd* 或 *eda* 基因或二者而消失了恩特-朵夫途徑。此外，藉由減弱涉及由甲基乙二醛合成乳酸鹽之酵素之編碼基因(如：*gloA*、*aldA*、*aldB*)、由丙酮酸鹽(*ldhA*)、甲酸鹽(*pflA*、*pflB*)、乙醇(*adhE*)與乙酸鹽(*ackA*、*pta*、*poxB*)合成乳酸鹽之酵素之編碼基因之表現而減少合成不要之副產物。

較佳者，藉由刪除 *tpiA* 基因將使得一半葡萄糖代謝成二羥基丙酮磷酸鹽，最終形成 1,2-丙二醇與/或丙酮醇。可視需要藉由活性 *tpiA* 基因降低甘油醛 3 磷酸鹽活性，以

使一部份可利用之甘油醛 3 磷酸鹽重新導向合成 1,2-丙二醇與/或丙酮醇。本發明一態樣中，藉由使用不依賴磷酸烯醇丙酮酸鹽(PEP)之糖輸入系統(如：由 *galP* 編碼者)或藉由提供更多 PEP 給糖-磷酸轉化酶系統，來提高糖輸入之效率。此點可藉由消除消耗 PEP 之途徑(如：丙酮酸鹽激酶(由 *pykA* 與 *pykF* 基因編碼者))與/或促進合成 PEP(例如：由編碼 PEP 合成酶之 *ppsA* 基因過度表現)來達成。

針對 1,2-丙二醇之製造，可視需要改造微生物，以增加其他轉化二羥基丙酮磷酸鹽形成 1,2-丙二醇之酵素，如：甘油脫氫酶(由 *gldA* 編碼)與 1,2-丙二醇氧化還原酶(由 *fucO* 編碼)。此外，轉化丙酮酸鹽形成乙醯基-coA 之酵素應需抵抗出現在厭氧條件下之高濃度 NADH。此點可由 *lpd* 基因之特異性突變達成。最後，為了減少用於還原丙酮醇形成 1,2-丙二醇之 NADH，可刪除 *arcA* 與 *ndh* 基因。用於製備 1,2-丙二醇之微生物係選自細菌、酵母與真菌，但以大腸桿菌(*Escherichia coli*)或丙酮丁醇梭菌較佳。本發明提供一種製造 1,2-丙二醇之方法，其係由經改造微生物於含單純或複合碳源之適當生長培養基中培養，回收及純化所產生之 1,2-丙二醇。

針對丙酮醇之製造，需減弱或刪除編碼甘油脫氫酶之基因，防止形成 1,2-丙二醇。用於製備丙酮醇之微生物係選自：細菌、酵母與真菌，但以大腸桿菌或肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)較佳。本發明另一項目的在於製造丙酮醇之方法，其係由該經改造微生物於含單純碳源之

適當生長培養基中培養，回收與純化所製造之丙酮醇。

【實施方式】

本發明係有關一種適用於由碳源製造 1,2-丙二醇與/或丙酮醇之經改造之微生物，其中該微生物之特徵在於提高由來自微生物之一種或多種基因編碼之甲基乙二醛還原酶活性。

本文所採用之下列名詞可用於說明申請專利範圍與說明書。

依據本發明，‘培養’、‘生長’與‘發酵’等名詞可交換用於代表細菌於含單純碳源之適當生長培養基中之生長。

“經改造之微生物”一詞代表已經改造可提高甲基乙二醛還原酶活性之微生物，如：細菌、酵母或真菌。此等改造作用包括常用於利用遺傳元素轉形微生物之方法，包括基因置換法或導入用於涉及甲基乙二醛還原作用之基因表現之載體。其亦包括微生物在常用於誘發此等誘變之條件下進行之隨機或定向誘變法。其亦包括微生物之演化方法，如：WO 2004/076659 所揭示之演化法。

“適用於製造”一詞代表該微生物利用發酵法產生所需產物。發酵法為可於好氧、微好氧或厭氧條件下進行之傳統製法。

根據本發明之“碳源”一詞代表任何可由習此相關技藝之人士用於維持微生物正常生長之碳源，其可為六碳糖、五碳糖、單醣、雙醣、寡醣、澱粉或其衍生物、半木

纖維素、甘油與其組合。

“提高之酵素活性”意指該活性高於相同微生物在改造前所測定野生型酵素之活性。相應之未改造微生物為與經改造微生物具有相同特性，但已改造其甲基乙二醛還原酶活性之微生物。該甲基乙二醛還原酶活性可利用一般方式測定，如：由 Misra 等人(Molecular and Cellular Biochemistry 156: 117-124(1996))或 Ko 等人(J. Bacteriol. 187: 5782-5789(2005))揭示之方法。

相較於相應之未改造微生物之甲基乙二醛還原酶活性，該甲基乙二醛還原酶活性宜提高至少 50%，較佳為至少 100%。

較佳者，所提高之甲基乙二醛還原酶活性係藉由涉及甲基乙二醛還原作用之至少一種基因之過度表現達成。

“表現”一詞係指由可產生相應蛋白質(基因產物)之基因序列進行之轉錄與轉譯。為了得到所需基因之過度表現，習此相關技藝之人士習知各種不同方法，例如：

1- 以可誘發該所需基因更高度表現之啟動子置換該基因之天然啟動子。

以已知可在特定微生物中誘發高度基因表現之啟動子置換該基因之天然啟動子，可得到更高度表現。用於大腸桿菌之此等啟動子為例如：啟動子 Ptrc、Ptac、Plac、 λ -啟動子 cI 或習此相關技藝之人士已知之其他啟動子。習此相關技藝之人士可針對其他微生物菌種決定可使用之啟動子。

2- 藉由下列方法在微生物中導入涉及甲基乙二醛還原作
用所需基因之多套複本：

- 導入帶有且表現該所需基因之表現載體。
- 導入基因之另一套複本至微生物染色體中。

5 本發明之明確具體實施例中，過度表現至少一種下列
基因：*yqhD*、*yafB*、*ydhF*、*ycdW*、*yqhE*、*yeaE*、*yghZ*、
yajO、*tas*、*ydjG* 與 *ydbC*。該基因編碼可以轉化甲基乙二
醛形成丙酮醇之酵素。較佳者，*yqhD* 基因係單獨過度表
現或組合其他基因過度表現。

10 本發明另一項具體實施例中，進一步改造已具有提高
之甲基乙二醛活性之微生物。

較佳者，依據本發明微生物展現提高之甲基乙二醛合
成酶活性。此點宜藉由提高涉及轉化 DHAP 形成甲基乙二
醛之甲基乙二醛合成酶之 *mgsA* 編碼基因之表現達成。

15 另一種達到此提高之酵素活性之方法為在 *mgsA* 基因
中導入專一性突變，使得基因產物之轉譯作用得以展現高
於天然蛋白質之活性。

較佳者，在根據本發明之微生物中，減弱至少一種涉
及恩特-朵夫(Entner-Doudoroff)途徑之基因。除了糖原酵
20 解法外，該恩特-朵夫途徑提供另一種降解葡萄糖形成甘
油醛-3-磷酸鹽與丙酮酸鹽之方式。減弱該恩特-朵夫途徑
可確保大多數或最好所有葡萄糖均經由糖原酵解法降
解，並用於製造 1,2-丙二醇。

最好減弱下列至少一種基因之表現：*edd*、*eda*。

“減弱酵素活性”一詞意指相較於相同微生物在進行任何改造之前所觀察到之活性，降低所需酵素活性。習此相關技藝之人士已知多種可得到此結果之方式，例如：

- 在基因中導入突變，降低此基因之表現程度或所編碼蛋白質之活性程度。
- 以低強度之啟動子置換天然啟動子，以得到較低表現。
- 使用破壞相應信使 RNA 或蛋白質穩定度之元素。
- 刪除完全不需要其表現之基因。

依據本發明“減弱基因表現”一詞係指部份或完全壓抑基因之表現，然後則可稱為“減弱”。此壓抑表現法可為抑制基因表現、刪除基因表現所必需之所有或部份啟動子區，或刪除基因之編碼區。較佳者，減弱基因基本上為完全刪除該基因，該基因可被有助於鑑別、單離及純化根據本發明菌株之選拔標記物基因置換。最好利用同系物重組技術去除基因活性(Datsenko, K.A. & Wanner, B.L.(2000) “於大腸桿菌 K-12 中使用 PCR 產物去除染色體基因活性之單步驟法(One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products)”，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97：6640-6645)。

本發明另一項具體實施例中，減弱至少一種涉及轉化甲基乙二醛形成乳酸鹽之酵素活性。此減弱目的為促使1,2-丙二醇合成法所必需之細胞結構使用可利用之甲基乙二醛(參見圖 1)。

涉及轉化甲基乙二醛形成乳酸鹽之基因特定言之為：

- 編碼乙二醛酶 I 之 *gloA* 基因，其催化由甲基乙二醛合成乳醯基胺穀胱甘肽。
- 編碼乳醯脫氫酶之 *aldA* 與 *aldB* 基因(其催化由(S)乳醯合成(S)乳酸鹽)。

宜減弱微生物中一種或多種此等基因。較佳者，宜減弱或完全刪除基因 *gloA*。

本發明微生物中，最好減弱至少一種涉及副產物合成(如：乳酸鹽、乙醇與甲酸鹽)之酵素。

特定言之，宜減弱催化丙酮酸鹽合成乳酸鹽之乳醯脫氫酶之編碼基因 *ldhA*，與催化乙醯基-CoA 合成乙醇之醇-醯脫氫酶之編碼基因 *adhE*。

同樣地，可迫使微生物利用丙酮酸鹽脫氫酶複合物，改由丙酮酸鹽製造乙醯基-CoA CO_2 與 NADH，而非乙醯基-CoA 與甲酸鹽。此點可藉由減弱編碼丙酮酸鹽甲酸鹽裂解酶之基因 *pflA* 與 *pflB* 達成。

本發明另一項明確具體實施例中，藉由減弱至少一種涉及乙酸鹽副產物合成之酵素來防止該副產物之合成。最好避免合成此等乙酸鹽，以達到最佳之 1,2-丙二醇生產。

為了防止產生乙酸鹽，宜減弱至少一種選自：*ackA*、*pta* 與 *poxB* 之基因。此等基因均編碼涉及不同乙酸鹽生合成途徑之酵素(參見圖 1)。

本發明一項明確具體實施例中，減弱三碳糖磷酸鹽異構酶活性。較佳者，其係藉由減弱 *tpiA* 基因之表現而達成

galP 與 *glk* 之至少一種基因之表現。由於可省卻 PTS，因此可藉由減弱至少一種選自 *ptsH*、*ptsI* 或 *crr* 之基因而消除。

本發明另一項明確具體實施例中，藉由提高代謝物磷酸烯醇丙酮酸鹽之可利用度來提高糖-磷酸轉化酶系統 (PTS) 之效率。由於減弱 *gapA* 活性及降低流向丙酮酸鹽之碳流入量，因此限制了本發明之經改造菌株中 PEP 含量，因而降低運送至細胞中之葡萄糖量。

已有多種不同方式可用於提高微生物菌株中 PEP 之可利用度。特定言之，有一種方式為減弱 PEP → 丙酮酸鹽之反應。較佳者，減弱該菌株中編碼丙酮酸鹽激酶酵素之至少一種選自 *pykA* 與 *pykF* 之基因，以達成此結果。另一種方式為提高 PEP 之可利用度，以利於丙酮酸鹽 → PEP 之反應，其係藉由提高磷酸烯醇丙酮酸鹽合成酶酵素活性而催化。此酵素係由 *ppsA* 基因編碼。因此，最好在微生物中優先提高 *ppsA* 基因表現。兩種改造法均可同時於微生物中進行。

本發明一項明確具體實施例中，經改造微生物之設計係用於主要生產 1,2-丙二醇。可藉由傾向轉化丙酮醇與其他前體(例如：乳醛)形成 1,2-丙二醇來達成此結果。其包括：

- 提高甘油脫氫酶活性。最好提高 *gldA* 基因表現。
- 提高 1,2-丙二醇氧化還原酶活性，最好提高 *fucO* 基因表現。

尤其在厭氧性或微好氧條件下，其優點在於該酵素有利於代謝丙酮酸鹽形成乙醯基 coA(特定言之，丙酮酸鹽脫氫酶複合物)，其對 NADH 之抑制作用敏感度低。較低敏感度係參考野生型酵素之敏感度加以定義。此等特性係藉由 *lpd* 基因(編碼 PDC 之亞單位脂醯胺脫氫酶)之專一性突變導致酵素之蛋白質序列中丙胺酸 55 被纈胺酸殘基置換而得。

在厭氧性或微好氧條件下，有利於提高 NADH 之利用度，用於還原前體形成 1,2-丙二醇。此點係藉由減緩回復總調節物 ArcA(由 *arcA* 基因編碼)所媒介三羧酸循環而得。細胞中 NADH 濃度亦可藉由去除基因 *ndh* 所編碼 NADH 脫氫酶 II 之活性而得。因此，最好減弱至少一種選自 *arcA* 與 *ndh* 之基因表現。

設計用於主要產生 1,2-丙二醇之微生物最好選自細菌、酵母或真菌。更佳者，該微生物係選自腸桿菌科(Enterobacteriaceae)、芽孢桿菌科(Bacillaceae)、梭菌科(Clostridiaceae)、鏈黴菌科(Streptomycetaceae)與棒桿菌科(Corynebacteriaceae)。甚至更佳者，該微生物係來自大腸桿菌或丙酮丁醇梭菌。

本發明另一項明確具體實施例中，經改造微生物之設計係用於主要產生丙酮醇。較佳者，此結果係藉由減弱涉及轉化丙酮醇形成 1,2-丙二醇之至少一種酵素活性來達成。較佳者，減弱 *gldA* 基因表現。

設計用於主要產生丙酮醇之微生物宜為細菌、酵母或

真菌。更佳者，該微生物係選自下列菌種：腸桿菌科、芽孢桿菌科、鏈黴菌科與棒桿菌科。甚至更佳者，該微生物係選自大腸桿菌或肺炎克雷伯氏菌。

本發明亦有關一種製備 1,2-丙二醇之方法，其中根據本發明微生物係於含碳源之適當生長培養基中生長，並回收所製造之 1,2-丙二醇。1,2-丙二醇之製造係在好氧、微好氧或厭氧條件下進行。

一項具體實施例中，由大腸桿菌微生物於含單純碳源之適當生長培養基中生長。

另一項具體實施例中，由丙酮丁醇梭菌微生物於含單純或複合碳源之適當生長培養基中生長。

宜進一步純化所回收之 1,2-丙二醇。

本發明亦有關一種製備丙酮醇之方法，其中由根據本發明微生物於含單純碳源之適當生長培養基中生長，並回收所產生之丙酮醇。丙酮醇之製造係在好氧或微好氧條件下進行，以好氧條件下較佳。

宜進一步純化所回收之丙酮醇。

該發酵法之培養條件很容易由習此相關技藝之人士界定。特定言之，由細菌在 20°C 至 55°C 之溫度間發酵，較佳為 25°C 至 40°C 之間，且丙酮丁醇梭菌 (*C. acetobutylicum*) 以約 35°C 較佳，大腸桿菌與肺炎克雷伯氏菌則以約 37°C 較佳。

此製法係依分批法、分批進料法或連續法進行。

‘在好氧條件下’意指供給培養物之氧氣係由氣體溶於

液相中之方式提供。此作法為(1)將含氧氣體(例如：空氣)通入液相中或(2)使含培養基之容器振盪，以使上方空間所含氧氣得以進入液相中。改用好氧條件替代厭氧條件下之發酵法之優點在於所含之氧可作為電子受體，以改善菌株以 ATP 型式製造更多能量供給細胞處理之能力。因此，可改善菌株之一般代謝作用。

微好氧條件所定義之培養條件為使低百分比之氧氣(例如：使用含 0.1 至 10% 氧氣，其餘以氮氣補充至 100% 所得之氣體混合物)溶於液相中。

厭氧條件所定義之培養條件為其中不提供氧氣給培養基。嚴格之厭氧條件為在培養基中通入惰性氣體(如：氮氣)，以排除微量之其他氣體。可使用硝酸鹽作為電子受體，以改善菌株之 ATP 產量，並改善其代謝作用。

根據本發明‘適當生長培養基’一詞意指配合微生物生長之已知分子組成之培養基。例如：可配合所使用之細菌使用含有至少一種碳源之已知分子組成之礦物培養基。特定言之，用於大腸桿菌或肺炎克雷伯氏菌之礦物生長培養基之組成可與 M9 培養基(Anderson, 1946, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 32: 120-128)、M63 培養基(Miller, 1992; 細菌遺傳學速成：大腸桿菌與相關細菌之實驗指南與手冊(A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)或如：Schaefer 等人所定義之培養基(1999, *Anal.*

參考文獻，依據內文之摘錄順序排列

1. Badia J, Ros J, Aguilar J (1985), *J. Bacteriol.* **161**: 435-437.
2. Tran Din K and Gottschalk G (1985), *Arch. Microbiol.* **142**: 87-92
3. Cameron DC and Cooney CL (1986), *Bio/Technology*, **4**: 651-654
4. Sanchez-Rivera F, Cameron DC, Cooney CL (1987), *Biotechnol. Lett.* **9**: 449-454
5. Cooper RA (1984), *Annu. Rev. Microbiol.* **38**: 49-68
6. Töttemeyer S, Booth NA, Nichols WW, Dunbar B, Booth IR (1998), *Mol. Microbiol.* **27**: 553-562
7. Ferguson GP, Töttemeyer S, MacLean MJ, Booth IR (1998), *Arch. Microbiol.* **170**: 209-218
8. Saikusa T, Rhee HI, Watanabe K, Murata K, Kimura A (1987), *Agric. Biol. Chem.* **51**: 1893-1899
9. Misra K, Banerjee AB, Ray S, Ray M (1996), *Mol. Cell. Biochem.* **156**: 117-124
10. Altaras NE and Cameron DC (1999), *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1180-1185
11. Grant AW, Steel G, Waugh H, Ellis EM (2003), *FEMS Microbiol. Lett.* **218**: 93-99
12. Di Luccio E, Elling RA, Wilson DK (2006), *Biochem. J.* **400**: 105-114

13. Ko J, Kim I, Yoo S, Min B, Kim K, Park C (2005), *J. Bacteriol.* **187**: 5782-5789
14. Cameron DC, Altaras NE, Hoffman ML, Shaw AJ (1998), *Biotechnol. Prog.* **14**: 116-125
- 5 15. Altaras NE and Cameron DC (2000), *Biotechnol. Prog.* **16**: 940-946
16. Huang K, Rudolph FB, Bennett GN (1999), *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3244-3247
17. Berrios-Rivera SJ, San KY, Bennett GN (2003), *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 34-40
- 10 18. Datsenko KA and Wanner BL (2000), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 6640-6645
19. Anderson EH (1946), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **32**:120-128
- 15 20. Miller (1992), A Short Course in Bacterial Genetics: A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York
21. Schaefer U, Boos W, Takors R, Weuster-Botz D (1999), *Anal. Biochem.* **270**: 88-96
- 20 22. Wiesenborn DP, Rudolph RB, Papoutsakis ET (1987), *Appl. Environ. Microbiol.*, **54** : 2717-2722
23. Monot F, Martin JR, Petitdemange H, Gay R (1982), *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 1318-1324

24. Vasconcelos I, Girbal L, Soucaille P (1994), *J. Bacteriol.* 176: 1443-1450

實例

實例 1：在恆化器中培養之大腸桿菌菌株 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、*ldhA::km*、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 中涉及甲基乙二醛還原作用之酵素之萃取法、純化法與鑑別法

a) 涉及還原甲基乙二醛之 NADH-或 NADPH-依賴性酵素之純化法：

設計用於純化涉及甲基之還原作用之 NADH-或 NADPH-依賴性酵素之整體純化法包括 5 個步驟。每一步驟均以酵素活性分析法檢測目標酵素。測定兩種酵素活性：1)NADPH-依賴性甲基乙二醛還原作用，2)NADH-依賴性甲基乙二醛還原作用。

1) 自於嚴格厭氧或微好氧條件之恆化器進行之大腸桿菌 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、*ldhA::km*、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd (用於構築菌株，參見 WO 2005/073364)培養物中收集微生物生質。

2) 離心收集細胞，以 50 mM HEPES 緩衝液 pH 7.5(含 5 mM DTT)洗滌，再懸浮於相同緩衝液中後，才儲存於-20°C 下。

3) 細胞於音波處理下瓦解(0°C，厭氧條件下，每次 30 秒，每次循環之間間隔 2 分鐘，共循環 4 次，在蛋白

酶抑制劑之存在下進行)。離心排除細胞碎片，細胞均質液中之核酸則利用鏈黴素硫酸鹽處理而沉澱，或使用酵素處理法(benzonase；核酸酶)水解)(表 I)。

表 1:細胞均質液經過核酸酶或鏈黴素硫酸鹽(粗字體)處理後對涉及甲基乙二醛還原作用之酵素活性之影響：

分析之活性	比活性 單位/毫克		總酵素活性 單位	
NADPH 依賴性甲基乙二醛 還原作用	0.13	0.043	0.095	0.120
NADPH 依賴性甲基乙二醛 還原作用	0.285	0.149	0.209	0.408

依據表 1，鏈黴素硫酸鹽處理法可較有效率地達到較高比活性。可以排除雜質(核酸與不要之蛋白質)，同時保留所需酵素之生物活性。

- 4) 取經過鏈黴素硫酸鹽處理之細胞均質物離心，加至已連接 AKTA 純化系統且經 50 mM HEPES 緩衝液(含 5 mM DTT)平衡之陰離子交換層析管柱(Ressource Q, Amersham Bioscience)上。於 pH 7 或 7.5 或 8 分離蛋白質。以連續 KCl 梯度(2%)溶離蛋白質，並分段收集溶離份。
- 5) 集合含酵素活性溶離份，並加至已經過 50 mM HEPES 緩衝液(含 5 mM DTT)平衡之疏水性交互作用層析管柱 (Hitrap 苯基賽弗羅斯(sepharose), Amersham

Biosciences)上。

若需要時，可增加最後一個凝膠滲析層析步驟。在每一步驟之後測定產量及純化因數。最後一個純化步驟後，留在活性溶離份中之蛋白質再於 SDS-聚丙烯醯胺凝膠上分離。由溶離份之活性與溶離點大小之相關性鑑別所需蛋白質。切下蛋白質溶離點，經洗滌，以專一性蛋白酶(胰蛋白酶分解法)分解，以質譜儀(LC-MS/MS 與 MALDI)鑑別。

b) 於厭氧條件下生長之大腸桿菌 *MG1655 lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $ldhA::km$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 中涉及甲基乙二醛還原作用之酵素之鑑別法：

該純化法採用陰離子交換層析法，於 pH 7 下進行後，經疏水性交互作用層析法純化，鑑別出兩種會還原甲基乙二醛之 NADPH 依賴性酵素：由 *yqhD* 基因編碼之 YQHD(42KDa)與由 *ydhF* 基因編碼之 YDHF(33KDa)(圖 2)。已發現第三種酵素(由 *gldA* 基因編碼之甘油脫氫酶)在 NADH 與 NADPH 依賴性甲基乙二醛還原作用中具有活性。

當於 pH 8 下進行陰離子交換層析法後，接著進行疏水性交互作用層析法及最後一個凝膠滲析層析法時，鑑別出另一種可還原甲基乙二醛之 NADPH 依賴性酵素：由 *dkgB(yafB)* 基因編碼之 2,5-二酮基-D-葡糖酸鹽還原酶 B(29KDa)。

c) 於微好氧條件下生長之大腸桿菌 *MG1655 lpd**、

2. ppsAR，由 43 個鹼基(SEQ ID NO 71)組成

aatcgcaagcttGAATCCGGTTATTTCTTCAGTTCAGCCAG
GC

其中含：

- 與基因 *ppsA* 區域(1785136 至 1782758)之序列
(1782758-1782780)具有同質性之區域，
- 限制酶切割位置 *HindIII*(以下加線字母表示)

同時採用下列寡核苷酸擴增大腸桿菌基因 *gapA* 之
gapA 啟動子區域：

1. *gapA*-ppsAR，由 65 個鹼基(SEQ ID NO 72)組成

GCACCAGCGGTGACGAGCCATTGTTGGACATatattcca
ccagctatttgtagtgaataaaagg

其中含：

- 與基因 *ppsA*(1785136 至 1782758)之序列(1785106
-1785136)具有同質性之區域(以大字母表示)，及
- 與 *gapA* 啟動子(1860794 - 1860761)具有同質性之區
域(以小字母表示)。

2. *gapAF*，由 33 個鹼基(SEQ ID NO 73)組成

ACGTCCCGGGcaagcccaaaggaagagtgaggc

其中含：

- 與 *gapA* 啟動子(1860639 - 1860661)具有同質性之區
域(以小字母表示)。
- 限制酶切割位置 *SmaI*(以下加線字母表示)。

隨後使用寡核苷酸 ppsAR 與 *gapAF*(Horton et al. 1989

Gene 77 : 61-68) 稠合這兩個片段。使用限制酶切割酵素 *Hind*III 與 *Sma*I 切下 PCR 擴增之片段並選殖至載體 *pJB137*(EMBL 登錄編號 : U75326)之 *Hind*III/*Sma*I 位置，產生載體 *pJB137-PgapA-ppsA*。

取不同 *pME101VB01* 質體與 *pJB137-PgapA-ppsA* 導入大腸桿菌菌株 *MG1655 Ptrc16-gapA*、 $\Delta edd-eda$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta pykA$ 、 $\Delta pykF$ 中。所得菌株分別稱為大腸桿菌 *MG1655 Ptrc16-gapA*、 $\Delta edd-eda$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta pykA$ 、 $\Delta pykF$ 、*pME101VB01-yqhD-mgsA-gldA*、*pJB137-PgapA-ppsA*(菌株 1)、大腸桿菌 *MG1655 Ptrc16-gapA*、 $\Delta edd-eda$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta pykA$ 、 $\Delta pykF$ 、*pME101VB01-yafB-mgsA-gldA*、*pJB137-PgapA-ppsA*(菌株 2) 與大腸桿菌 *MG1655 Ptrc16-gapA*、 $\Delta edd-eda$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta pykA$ 、 $\Delta pykF$ 、*pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA*、*pJB137-PgapA-ppsA*(菌株 3)。

實例 5：不同菌株於好氧條件下之 1,2-丙二醇產量之比較

取依實例 4 之說明製得之菌株(菌株 1、2 與 3)與對照組菌株 (對照組 1 : *MG1655 pME101VB01-yqhD-mgsA-gldA*，對照組 2 : *MG1655 pME101VB01-yafB-mgsA-gldA*，對照組 3 : *MG1655 pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA* 與對照組 4 : *MG1655 Ptrc16-gapA*、 $\Delta edd-eda$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta pykA$ 、 $\Delta pykF$)於錐形瓶中，在好氧條件下，於最基本培養基中，使用葡萄糖作為

碳源進行分析。於 34°C 或 37°C 下培養，並使用 MOPS 來緩衝培養基，維持 pH。培養結束時，以 HPLC 分析發酵槽中 1,2-丙二醇、丙酮醇與殘留葡萄糖含量，並計算相對於葡萄糖之 1,2-丙二醇產量及相對於葡萄糖之 1,2-丙二醇 + 丙酮醇產量。

菌株	1,2-丙二醇效價 (克/升)	丙酮醇 效價 (克/升)	1,2-丙二醇產量 (克/克葡萄糖)	1,2-丙二醇+丙 酮醇產量(克/ 克葡萄糖)
對照組 1	0.02	0	0.004	0.004
對照組 2	0	0	0	0
對照組 3	0.01	0	0.002	0.002
對照組 4	0.05	0.34	0	0.04
菌株 1	2.25	1.40	0.14	0.23
菌株 2	1.64	1.31	0.10	0.18
菌株 3	0.77	0.47	0.06	0.10

【圖式簡要說明】

納入本文中且構成本說明書一部份之附圖係舉例說明本發明，且連同其說明共同解釋本發明之原理。

圖 1 出示用於發展由碳水化合物製造 1,2-丙二醇之系統之中心代謝作用之遺傳工程法。

圖 2 出示三種蛋白質 YQHD、YDHF 與 GLDA 於陰離子交換層析管柱中，在 pH 7 下之溶離圖形。

五、中文發明摘要：

本發明係有關一種具有提高之甲基乙二醛還原酶活性之經改造之微生物，及其於製備 1,2-丙二醇與/或丙酮醇上之用途。特定言之，此提高之甲基乙二醛還原酶活性係經由提高微生物之特定基因表現而得。

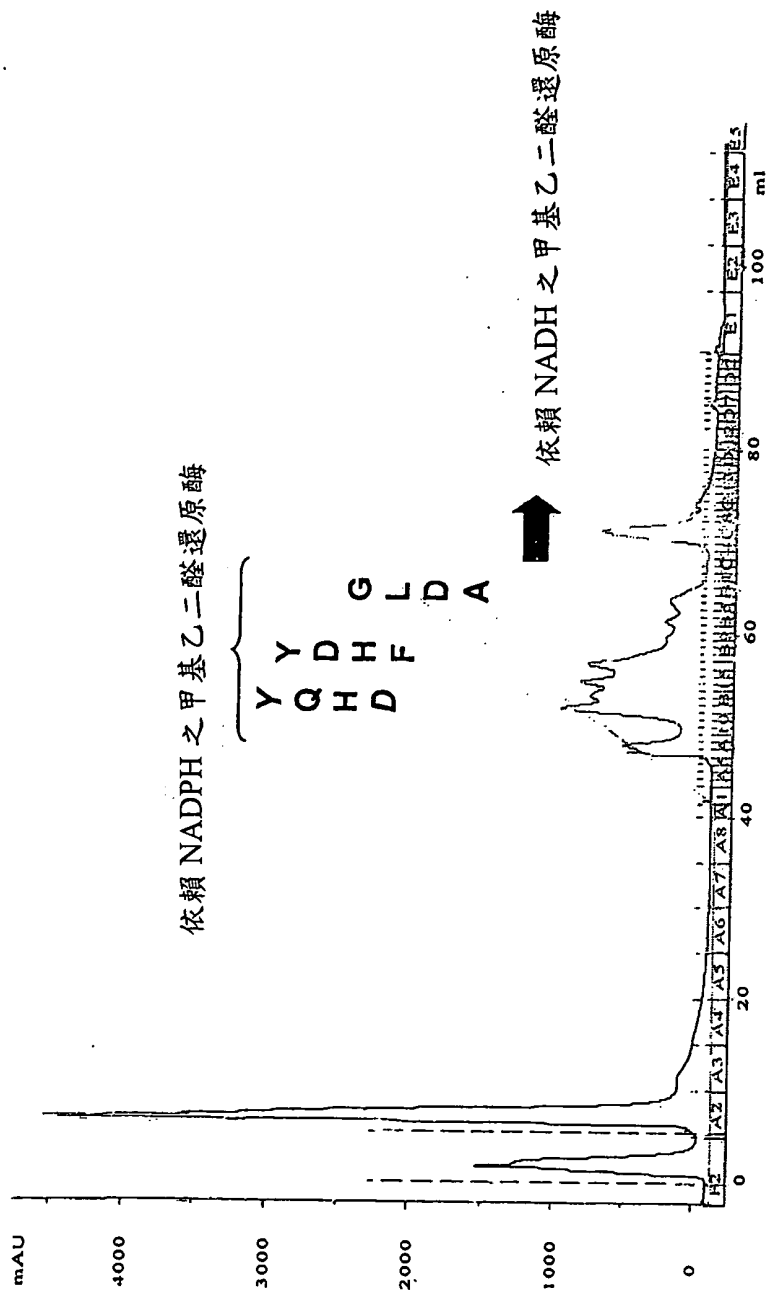
本發明亦有關一種由具有提高之甲基乙二醛還原酶活性之微生物發酵製造 1,2-丙二醇與/或丙酮醇之方法。

六、英文發明摘要：

The present invention concerns a modified microorganism with an increased methylglyoxal reductase activity, and its use for the preparation of 1,2-propanediol and/or acetol. In particular this increased methylglyoxal reductase activity is obtained by increasing the expression of specific genes from microorganisms.

This invention is also related to a method for producing 1,2-propanediol and/or acetol by fermentation of a microorganism having an increased methylglyoxal reductase activity.

圖 2



七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 (1) 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無。

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無。

此結果。*tpiA* 基因編碼酵素‘三碳糖磷酸鹽異構酶’，其催化 DHAP 轉化成甘油醛 3-磷酸鹽(參見圖 1)。減弱此基因表現可確保所代謝之半數葡萄糖轉化成 1,2-丙二醇與/或丙酮醇。

5 本發明一項明確具體實施例中，減弱甘油醛 3 磷酸鹽脫氫酶活性。甘油醛 3-磷酸鹽脫氫酶亦稱為 GAPDH，為一種涉及糖原酵解葡萄糖轉化成丙酮酸之關鍵酵素。減弱
● 酵素之結果使得一部份 GA3P 重新導向合成 1,2-丙二醇與
/或丙酮醇。1,2-丙二醇與葡萄糖之產量比將可超過 1 莫耳
10 /莫耳。甘油醛 3-磷酸鹽脫氫酶之活性宜為野生型 GAPDH 之一般活性之約 30%以下，較佳為 10%以下。

較佳者，減弱編碼 GAPDH 之 *gapA* 基因表現。

較佳者，在根據本發明微生物中，提高糖輸入之效率。大幅減弱 *gapA* 基因表現之結果造成 GAPDH 反應中
15 之碳流入量下降超過 50%，其結果導致每輸入一莫耳葡萄糖，所合成之 PEP 即少於 1 莫耳。糖-磷酸轉化酶系統(PTS)
● 所需之 PEP 通常用於輸入單純糖類至細胞中，因為該輸入過程亦偶聯 PEP 之磷酸轉移至葡萄糖之作用，產生葡萄糖-6-磷酸鹽。因此減少 PEP 用量將對糖輸入產生負面影響。

20 本發明一項明確具體實施例中，糖可藉由不依賴磷酸烯醇丙酮酸鹽之糖輸入系統輸入微生物中。可利用未涉及磷酸化反應之由基因 *galP* 編碼之半乳糖酶-質子同向共同運輸子。此時，輸入之葡萄糖必需經 *glk* 基因所編碼之葡萄糖激酶活性進行磷酸化。為了促進此途徑，提高選自

Biochem. 270: 88-96)相同或相似，特定言之，該最基本培養基稱為 MPG，說明如下：

K_2HPO_4	1.4 克/升
氮川三乙酸	0.2 克/升
微量元素溶液*	10 毫升/升
$(NH_4)_2SO_4$	1 克/升
NaCl	0.2 克/升
NaHCO ₃	0.2 克/升
MgSO ₄	0.2 克/升
葡萄糖	20 至 100 克/升
NaNO ₃	0.424 克/升
硫胺素	10 毫克/升
FeSO ₄ , 7H ₂ O	50 毫克/升
酵母抽出物	4 克/升

5 使用氫氧化鈉調整培養基之 pH 至 7.4。

*微量元素溶液：檸檬酸 4.37 克/升、MnSO₄ 3 克/升、CaCl₂ 1 克/升、CoCl₂, 2H₂O 0.1 克/升、ZnSO₄, 7H₂O 0.10 克/升、CuSO₄, 5H₂O 10 毫克/升、H₃BO₃ 10 毫克/升、Na₂MoO₄ 8.31 毫克/升。

10 大腸桿菌或肺炎克雷伯氏菌之培養基所使用之碳源以單純碳源較佳，且可為阿拉伯糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、乳糖、麥芽糖、蔗糖或木糖。特別佳之單純碳源為葡

萄糖。

丙酮丁醇梭菌之生長培養基之組成可與梭菌生長培養基(CGM, Wiesenborn 等人, Appl. Environm. Microbiol., 54: 2717-2722)或由 Monot 等人提供之礦物生長培養基 (Appl. Environm. Microbiol., 44: 1318-1324)或 Vasconcelos et al.(J. Bacteriol., 176: 1443-1450)相同或相似。

丙酮丁醇梭菌之培養基所使用之碳源可為單純或複合碳源。單純碳源可為阿拉伯糖、果糖、半乳糖、葡萄糖、乳糖、麥芽糖、蔗糖或木糖。特別佳之單純碳源為葡萄糖。複合碳源可為澱粉或半木纖維素。特別佳之複合碳源可為澱粉。

上文、下文及實例中以大腸桿菌為例說明本發明。因此，可供根據本發明初始及衍化之菌株減弱、刪除或過度表現之基因主要採用來自大腸桿菌之基因名稱來界定。然而，根據本發明之此命名法具有更一般之定義，且涵蓋其他微生物中之相應基因。習此相關技藝之人士可採用來自大腸桿菌基因之基因銀行(GenBank)參考物來決定大腸桿菌以外之其他微生物中之等效基因。

鑑別同質性序列與其同質性百分比之方式係習此相關技藝之人士習知者，特定言之包括可於網頁 [http: //www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)上應用之 BLAST 程式，預設參數已出示在該網頁上。可採用例如：CLUSTALW 程式([http: //www.ebi.ac.uk/clustalw/](http://www.ebi.ac.uk/clustalw/))探討(定位)所得序列，預設參數已出示在該網頁上。

PFAM 資料庫(排列與隱馬爾可夫模式(hidden Markov model) 之 蛋 白 質 家 族 資 料 庫 [http :
//www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/](http://www.sanger.ac.uk/Software/Pfam/))收集大量蛋白質序列之排列。各 PFAM 可以看到多重排列，檢視蛋白質功能部位、評估其在生物體中之分佈、與其他資料庫交流及檢視已知蛋白質結構。

COGs(異 種 蛋 白 質 群 集 [http :
//www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/))係由衍生自代表 44 種主要分類細胞系之 66 種完全定序之單細胞基因組之蛋白質序列進行比對而得。各 COG 由至少三種細胞系界定，因此可鑑別古老之保留功能部位。

ΔtpiA、*ΔpflAB*、*ΔadhE*、*ldhA::km*、*ΔgloA*、*ΔaldA*、*ΔaldB*、*Δedd* 中涉及 甲基乙二醛還原作用之酵素之鑑別法：

所設計之純化法係採用陰離子性交換層析法，於 pH 7.5 下進行，鑑別出一種稱為 YCDW 之 36 KDa 蛋白質，其係由 *ycdW* 基因編碼，其催化 NADPH 依賴性還原甲基乙二醛。

當於 pH 7.5 下進行陰離子交換層析法後，接著進行疏水性交互作用層析法時，鑑別出其他兩種催化 NADPH 依賴性還原甲基乙二醛之酵素：由 *yqhD* 基因編碼之 YQHD(42KDa)(已自厭氧條件下生長之細胞中純化)與由 *dkgA(yqhE)* 基因編碼之 2.5 -二酮基-D-葡糖酸鹽還原酶 A(31 KDa)。

實例 2：在大腸桿菌菌株 *MG1655 lpd**、*ΔtpiA*、*ΔpflAB*、*ΔadhE*、*ΔldhA::cm*、*ΔgloA*、*ΔaldA*、*ΔaldB*、*Δedd* 中刪除 *ΔyqhD*、*ΔyafB*、*ΔydhF* 與 *ΔycdW*，評估該等基因於甲基乙二醛還原作用中之涉及程度

a)經改造之大腸桿菌菌株 *MG1655 lpd**、*ΔtpiA*、*ΔpflAB*、*ΔadhE*、*ldhA::Km*、*ΔgloA*、*ΔaldA*、*ΔaldB*、*Δedd* 之構築法

依據製程 1 消去大腸桿菌菌株 *MG1655 lpd**、*ΔtpiA*、*ΔpflAB*、*ΔadhE*、*ldhA::km*、*ΔgloA*、*ΔaldA*、*ΔaldB*、*Δedd::cm* 之氯黴素抗性區段。

製程 1：抗性區段之消去法

依據下列技術消去氯黴素(chloramphenicol)與/或康黴素(kanamycin)抗性區段。利用電穿孔法，將帶有作用在氯黴素與/或康黴素抗性區段中 FRT 位置之 FLP 重組酶之質體 pCP20 導入菌株。於 42°C 下進行一系列培養後，採用表 2 所示之寡核苷酸進行 PCR 分析法，檢測抗生素抗性區段。

採用表 2 所示之寡核苷酸檢測先前已於菌株中建構之改造。

所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、*ldhA::km*、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 。

表 2：用於檢測嵌入抗性區段或流失抗性區段之寡核苷酸

區域名稱	寡核苷酸名稱	SEQ ID	同質染色體區域
<i>tpiA</i> 基因 (刪除)	cdh	N°1	參見 WO2005073364
	YIIQ	N°2	
<i>pflAB</i> 基因	pflABF	N°3	參見 WO2005073364
	pflABR	N°4	
<i>adhE</i> 基因	ychGf	N°5	參見 WO2005073364
	adhECr	N°6	
<i>ldhA</i> 基因 (嵌入區段)	hsIJC	N°7	參見 WO2005073364
	ldhAC2	N°8	
<i>gloA</i> 基因	NemACd	N°9	參見 WO2005073364
	Rnt Cr	N°10	
<i>aldA</i> 基因	Ydc F C f	N°11	參見 WO2005073364

區域名稱	寡核苷酸名稱	SEQ ID	同質染色體區域
	gapCCr	N°12	
<i>aldB</i> 基因	aldB C f YiaYCr	N°13 N°14	參見 WO2005073364
<i>edd</i> 基因	Eda d Zwf r	N°15 N°16	參見 WO2005073364
<i>ldhA</i> 基因 (刪除)	ldhAF ldhAR	N°17 N°18	1439724 至 1439743 1441029 至 1441007
<i>yqhD</i> 基因	yqhDF yqhDR	N°19 N°20	3153060 至 3153092 3154817 至 3154789
<i>yafB</i> 基因	yafBF yafBR	N°21 N°22	228785 至 228804 230296 至 230276
<i>ydhF</i> 基因	ydhFF ydhFR	N°23 N°24	1722394 至 1722423 1723920 至 1723890
<i>ycdW</i> 基因	ycdWF ycdWR	N°25 N°26	1096789 至 1096809 1098297 至 1098277
<i>gapA</i> 啟動子 (Ptrcl6-gapA)	yeaAF gapAR	N°27 N°28	1860259-1860287 1861068-1861040
<i>edd</i> 與 <i>eda</i> 基因	eddF edaR	N°29 N°30	1932996-1932968 1929754-1929777
<i>pykA</i> 基因	pykAF pykAR	N°31 N°32	1935338 至 1935360 1937425 至 1937401
<i>pykF</i> 基因	pykFF pykFR	N°33 N°34	1753371 至 1753392 1755518 至 1755495

b)經改造之大腸桿菌菌株 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA::cm$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 之構築法

為了消去康黴素抗性區段及去除 *ldhA* 基因之活性，
依據製程 2，將氯黴素抗性區段嵌入已刪除大多數相關基因之 *ldhA* 基因中。

製程 2：供重組及選拔重組體之 PCR 產物之導入法

採用選自表 3 所示供置換基因或基因間區域之寡核苷酸來擴增來自質體 pKD3 之氯黴素抗性區段或來自質體 pKD4 之康黴素抗性區段 (Datsenko, K.A. & Wanner, B.L.(2000))。所得 PCR 產物再利用電穿孔法導入帶有質體 pKD46 之受體菌株中，其中系統 λ Red($\gamma\beta$, *exo*)之表現極有利於同質性重組作用。然後選拔抗生素抗性轉化體，並採用表 2 所示之適當寡核苷酸進行 PCR 分析法，檢測所嵌入之抗性區段。

採用表 2 所示之寡核苷酸檢測菌株之其他改造。

所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 *lpd**、 $\Delta ldhA::cm\Delta.tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 。

表 3：於大腸桿菌菌株 MG1655 中使用 PCR 產物進行重組以置換染色體區域時所使用之寡核苷酸

區域名稱	寡核苷酸名稱	SEQ ID	同質染色體區域
<i>ldhA</i> 基因	DldhAF	N°35	1440865- 1440786
	DldhAR	N°36	1439878- 1439958
<i>yqhD</i> 基因	DyqhDF	N°37	3153369-3153448
	DyqhDR	N°38	3154532- 3154452
<i>yafB</i> 基因	DyafBF	N°39	229167-229245
	DyafBR	N°40	229966-229887
<i>ydhF</i> 基因	DydhFF	N°41	1722760-1722840
	DydhFR	N°42	1723656- 1723576
<i>ycdW</i> 基因	DycdWF	N°43	1097074-1097150
	DycdWR	N°44	1098047-1097969
<i>gapA</i> 啟動子 (Ptrc16- <i>gapA</i>)	Ptrc- <i>gapA</i> F	N°45	1860478- 1860536
	Ptrc- <i>gapA</i> R	N°46	1860762-1860800
<i>edd</i> 與 <i>eda</i> 基因	DeddF	N°47	1932582-1932501
	DedaR	N°48	1930144-1930223
<i>gloA</i> 基因	GLOAD f	N°49	1725861- 1725940
	<i>gloA</i> D r	N°50	1726268-1726189
<i>pykA</i> 基因	DpykAF	N°51	1935756-1935836
	DpykAR	N°52	1937055-1937135
<i>pykF</i> 基因	DpykFF	N°53	1753689-1753766
	DpykFR	N°54	1755129-1755051

c) 經改造之大腸桿菌菌株 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 、 $\Delta yqhD$ 之構築法

採用製程 2 說明之技術，採用表 3 所示之寡核苷酸，
5 於大腸桿菌菌株 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA::cm$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 中，藉由嵌入康黴素抗生素抗性區段，並刪除大部份相關基因，以去除基因 *yqhD* 之活性。

所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、
10 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA::cm$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 、 $\Delta yqhD::km$ 。

採用表 2 所示寡核苷酸檢測菌株之其他改造。

然後依據製程 1 消去氯黴素與康黴素抗性區段。

所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、
15 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 、 $\Delta yqhD$ 。

d) 經改造之大腸桿菌菌株 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 、 $\Delta yafB$ 之構築法

採用製程 2 說明之技術，使用表 3 所示寡核苷酸，於
20 大腸桿菌菌株 MG1655 中，藉由嵌入康黴素抗生素抗性區段，並刪除大部份相關基因，以去除基因 *yafB* 之活性。所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 $\Delta yafB::km$ 。

採用噬菌體 P1 進行轉導技術，於大腸桿菌菌株

MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA::cm$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 中，以康黴素抗性區段置換基因法，來刪除基因 *yafB*。

5 製程 3：使用噬菌體 P1 進行轉導作用來刪除基因

採用噬菌體 P1 進行轉導技術，於受體大腸桿菌菌株中，以抗性區段(康黴素或氯黴素)置換基因法，來刪除所選用之基因。該製程分兩步驟(i)於刪除單一基因之菌株 MG1655 上製備噬菌體溶胞物，與(ii)以此噬菌體溶胞物轉導受體菌株。

噬菌體溶胞物製法

- 接種 100 微升含已刪除單一基因之菌株 MG1655 之隔夜培養物之 10 毫升 LB + Cm 30 微克/毫升 + 葡萄糖 0.2% + CaCl₂ 5 mM。
- 於 37°C 下振盪培養 30 分鐘。
- 添加 100 微升於野生型菌株 MG1655 上製備之噬菌體溶胞物 P1(約 1×10^9 個噬菌體/毫升)。
- 於 37°C 下振盪 3 小時，直到所有細胞均溶解為止。
- 添加 200 微升氯仿並渦轉混合。
- 於 4500g 下離心 10 分鐘，以排除細胞碎片。
- 取上清液移至無菌管中，添加 200 微升氯仿。
- 溶胞物保存在 4°C 下。

轉導法

- 取 5 毫升含於 LB 培養基之大腸桿菌受體菌株之隔夜培養物於 1500g 下離心 10 分鐘。
- 取細胞集結塊懸浮於 2.5 毫升 MgSO_4 10 mM、 CaCl_2 5 mM 中。
- 對照組試管：100 微升細胞
- 100 微升已刪除單一基因之菌株 MG1655 之噬菌體 P1。
- 試驗組試管：100 微升細胞+100 微升已刪除單一基因之菌株 MG1655 之噬菌體 P1。
- 於 30°C 且不振盪下培養 30 分鐘。
- 在各試管中添加 100 微升 1 M 檸檬酸鈉，並渦轉混合。
- 添加 1 毫升 LB。
- 於 37°C 與振盪下培養 1 小時。
- 試管於 7000rpm 下離心 3 分鐘後，塗覆在培養皿 LB + Cm 30 微克/毫升上。

然後選拔抗生素抗性轉化體，並採用表 1 所示之適當寡核苷酸進行 PCR 分析法，檢測嵌入之刪除基因。

採用表 2 所示寡核苷酸檢測菌株之其他改造。

所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA::cm$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 、 $\Delta yafB::km$ 。

依據製程 1 消去氯黴素與康黴素抗性區段。

所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 、 $\Delta yafB$ 。

e) 經改造之大腸桿菌菌株 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 、 $\Delta ydhF$ 之構築法

採用製程 2 說明之技術及表 3 所示之寡核苷酸，於大腸桿菌菌株 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA::cm$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 中嵌入康黴素抗生素抗性區段並刪除相關基因，以去除基因 *ydhF* 之活性。所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA::cm$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 、 $\Delta ydhF::km$ 。

採用表 2 所示之寡核苷酸檢測菌株之其他改造。

然後依據製程 1 消去氯黴素與康黴素抗性區段。

所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 、 $\Delta ydhF$ 。

f) 經改造之大腸桿菌菌株 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 、 $\Delta ycdW$ 之構築法

採用製程 2 說明之技術及表 3 所示之寡核苷酸，於大腸桿菌菌株 MG1655 中嵌入康黴素抗生素抗性區段，並刪除相關基因，以去除基因 *ycdW* 之活性。所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 $\Delta ycdW::km$ 。

採用製程 3 所述之噬菌體 P1 進行轉導技術，以大腸桿菌菌株 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA::cm$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 之康黴素抗性區

段置換基因法來刪除基因 *ycdW*。

於菌株 MG1655 $\Delta ycdW::km$ 上取得噬菌體 P1 溶胞物，並採用此噬菌體溶胞物轉導大腸桿菌菌株 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA::cm$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 。

所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA::cm$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 、 $\Delta ycdW::km$ 。

採用表 2 所示之寡核苷酸檢測菌株之其他改造。

然後依據製程 1 消去氯黴素與康黴素抗性區段。

所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 *lpd**、 $\Delta tpiA$ 、 $\Delta pflAB$ 、 $\Delta adhE$ 、 $\Delta ldhA$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta aldA$ 、 $\Delta aldB$ 、 Δedd 、 $\Delta ycdW$ 。

f) 已刪除編碼已鑑別出之甲基乙二醛還原酶之基因之菌株培養法

於錐形瓶中，在微好氧條件下，使用 MPG 培養基，pH 6.7 與 37°C 下培養已刪除 $\Delta yqhD$ 、 $\Delta yafB$ 、 $\Delta dhfF$ 與 $\Delta ycdW$ 之四種菌株。

培養 72 小時後，由 HPLC 測定培養物上清液中之丙酮醇與 1,2-丙二醇產量。其結果示於表 4。

表 4：在已刪除編碼甲基乙二醛還原酶之基因之菌株中之 1,2-丙二醇與丙酮醇產量(各數值分別為兩次不同培養物所得兩個數值之平均值)

產物 (mM)	$\Delta ydhF$ 菌株	$\Delta ycdW$ 菌株	$\Delta yafB$ 菌株	$\Delta yqhD$ 菌株	對照 菌株
1,2-丙二醇	10.7	16.3	8.1	0	16.7
丙酮醇	9.3	11.1	7.2	0	11.3
總和	20.0	27.4	15.3	0	28.0

5

其結果顯示，所有已鑑別出之甲基乙二醛還原酶均涉及轉化甲基乙二醛形成丙酮醇，且進一步形成 1,2-丙二醇。刪除 *yqhD* 之結果會強力抑制生長，可能因甲基乙二醛累積所致。刪除 *yafB* 與 *ydhF* 亦對丙酮醇與 1,2-丙二醇之生產有重大影響。

10

實例 3：經改造之大腸桿菌菌株

MG1655(pME101VB01-*yqhD*-*mgsA*-*gldA*)、大腸桿菌
MG1655(pME101VB01-*yafB*-*mgsA*-*gldA*)與大腸桿菌
MG1655(pME101VB01-*yqhE*-*mgsA*-*gldA*)之構築法

15

為了提高 1,2-丙二醇產量，由質體 pME101VB01 使用 *trc* 啟動子表現不同基因組合。

a) 質體 pME101VB01 之構築法

質體 pME101VB01 係衍生自質體 pME101 且具有多重選殖位置，其中包含針對稀有之限制內切核酸酶 *NheI*、*SnaBI*、*PacI*、*BglII*、*AvrII*、*SacII* 與 *AgeI* 之辨認位置序列，接續為丙酮丁醇梭菌 ATCC824 之 *adc* 轉錄終結子。

5 由低套數複本載體進行表現時，依下列方法構築質體 pME101。由質體 *pCL1920* (Lerner & Inouye, 1990, NAR 18, 15 p 4631 - GenBank AX085428) 使用寡核苷酸 PME101F 與 PME101R 進行 PCR 擴增法，且在擴增之載體中嵌入來自載體 *pTrc99A* (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, N.J.) 且內含 *lacI* 基因與 *trc* 啟動子之 *BstZ17I-XmnI* 片段。

PME101F (SEQ ID NO 55) :

ccgacagtaagacgggtaagcctg

PME101R (SEQ ID NO 56) :

agcttagtaaagccctcgctag

15 採用包含多重選殖位置與 *adc* 轉錄終結子之合成性雙股核酸連接物形成 pME101VB01。黏合兩個補體側接 *NcoI* 或 *HindIII* 分解之限制酶切割位置之 100 個鹼基寡核苷酸。次選殖該 100 個鹼基對產物至 *NcoI* / *HindIII* 分解質體 pME101 中，形成 pME101VB01。

20 pME101VB01 1，由 100 個鹼基 (SEQ ID NO 57) 組成：
catgggctagctacgtattaattaagatctcctagggagctcaccggtTAAAAA
TAAGAGTTACCTTAAATGGTAACTCTTATTTTTTTTAggcg
cgcca

pME101VB01 2，由 100 個鹼基 (SEQ ID NO 58) 組成：

agcttggcgcgccTAAAAAATAAGAGTTACCATTTAAGGTA
 ACTCTTATTTTAAaccggtgagctccctaggagatctttaattaacgtagc
tagcc

其具有：

- 相當於多重選殖位置之區域(以下加線之小字母表示)。
- 相當於丙酮丁醇梭菌 ATCC 824 *pSOL1*(NC_001988)之 *adc* 轉錄終結子(序列 179847 至 179814)之區域(以大字母表示)。

b)用於表現 1,2- 丙二醇之生合成途徑之不同基因組合之質體 (*pME101VB01-yqhD-mgsA-gldA*、*pME101VB01-yafB-mgsA-gldA* 與 *pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA*)之構築法

採用表 1 所示寡核苷酸，由大腸桿菌 MG1655 之基因組 DNA 為不同基因進行 PCR 擴增法。

表 5：用於擴增 1,2-丙二醇途徑之基因之寡核苷酸

基因名稱	寡核苷酸名稱	序列編號 (SEQ ID)	同質性基因	限制酶切割位置
<i>yqhD</i>	<i>yqhDR2</i> <i>yqhDF2</i>	N°59 N°60	3153369-3153400 3154544- 3154475	<i>BspHI</i> added <i>BspHI</i> removed <i>NheI</i> added
<i>mgsA</i>	<i>mgsAF</i> <i>mgsAR</i>	N°61 N°62	1026268-1026248 1025780-1025800	<i>SnaBI</i> added <i>BglII</i> added
<i>gldA</i>	<i>gldAF</i>	N°63	4136631-4136612	<i>AvrII</i> added

基因名稱	寡核苷酸 名稱	序列編號 (SEQ ID)	同質性基因	限制酶切割位 置
	gldAR	N°64	4135512-4135530	<i>SacI</i> added
<i>yafB</i>	<i>yafB</i> F2	N°65	229167-229190	<i>NcoI</i> added
	<i>yafB</i> R	N°66	229970-229950	<i>NheI</i> added
<i>yqhE</i>	<i>yqhE</i> F	N°67	3154641-3154661	<i>NcoI</i> added
	<i>yqhE</i> R	N°68	3155464-3155444	<i>NheI</i> added

採用表 5 所述之限制酶酵素切割 PCR 擴增之片段，
並選殖至質體 *pME101VB01* 之限制酶切割位置中。建構下
列質體：*pME101VB01-yqhD-mgsA-gldA*、
5 *pME101VB01-yafB-mgsA-gldA* 與
pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA。

然後將質體導入大腸桿菌菌株 MG1655。

實例 4：可以產生高產量 1,2-丙二醇之經改造之大腸桿菌
菌株 MG1655 *P_{trc16}-gapA*、 $\Delta edd-eda$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta pykA$ 、
10 $\Delta pykF$ (*pME101VB01-yqhD-mgsA-gldA*)、
(*pJB137-P_{gapA}-ppsA*)、大腸桿菌 MG1655 *P_{trc16}-gapA*、
 $\Delta edd-eda$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta pykA$ 、
 $\Delta pykF$ (*pME101VB01-yafB-mgsA-gldA*)、
15 (*pJB137-P_{gapA}-ppsA*)與大腸桿菌 MG1655
P_{trc16}-gapA、 $\Delta edd-eda$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta pykA$ 、
 $\Delta pykF$ (*pME101VB01-yqhE-mgsA-gldA*)、
(*pJB137-P_{gapA}-ppsA*)之構築法

在大腸桿菌菌株 MG1655 中，使用合成之短型 Ptrc16 啟動子(SEQ ID NO 69：

gagctgttgacgattaatcatccggctcgaataatgtgtgg)置換天然 *gapA* 啟動子之作法為採用製程 2 說明之技術及表 3 所示之寡核苷酸，以 FRT-CmR-FRT 與經工程處理之啟動子置換上游 *gapA* 序列之 225 pb。

採用表 2 所示之寡核苷酸進行 PCR 分析法，檢測嵌入之抗性區段。所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 Ptrc16-*gapA*::cm。

採用製程 2 說明之技術及表 3 所示之寡核苷酸，在大腸桿菌菌株 MG1655 中嵌入康黴素抗生素抗性區段，並刪除大部份相關基因，以去除基因 *edd-eda* 之活性。所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 Δ *edd-eda*::km。

依據製程 3 將此刪除轉移至大腸桿菌菌株 MG1655 Ptrc16-*gapA*::cm 中。

所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 Ptrc16-*gapA*::cm, Δ *edd-eda*::km。

然後依據製程 1 消去抗生素抗性區段。

依據製程 2，使用表 3 所示寡核苷酸，建構菌株 MG1655 Δ *gloA*::cm，依據製程 3 將此刪除轉移至先前已建構之菌株中。所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 Ptrc16-*gapA*、 Δ *edd-eda*、 Δ *gloA*::cm。

依據製程 2，使用表 3 所示寡核苷酸，在先前之菌株中嵌入康黴素抗生素抗性區段，以去除基因 *pykA* 之活性。

所得菌株稱為大腸桿菌 MG1655 *Ptrc16-gapA*、 $\Delta edd-eda$ 、 $\Delta gloA::cm$ 、 $\Delta pykA::km$ 。

然後依據製程 1 消去抗生素抗性區段。

依據製程 2，使用表 3 所示寡核苷酸，嵌入氯黴素抗
生素抗性區段，以去除基因 *pykF* 之活性。所得菌株稱為
大腸桿菌 MG1655 *Ptrc16-gapA*、 $\Delta edd-eda$ 、 $\Delta gloA$ 、 $\Delta pykA$ 、 $\Delta pykF::cm$ 。

然後依據製程 1 消去抗生素抗性區段。

每一個步驟均採用表 3 所示之寡核苷酸檢測先前建構
之所有刪除結果。

為了提高磷酸烯醇丙酮酸鹽之產量，由質體 pJB137
使用 *gapA* 啟動子表現 *ppsA* 基因。構築質體
pJB137-*PgapA-ppsA* 時，採用下列寡核苷酸，由大腸桿菌
MG1655 之基因組 DNA 進行 PCR，擴增基因 *ppsA*：

1. *gapA-ppsAF*，由 65 個鹼基(SEQ ID NO 70)組成

ccttttattcactaacaataagctggtggaatatATGTCCAACAATGGC
TCGTCACCGCTGGTGC

其中含：

- 與基因 *ppsA*(1785136 至 1782758)之序列

(1785106-1785136)具有同質性之區域(以大字母表
示)，其參考序列示於網頁 <http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>，及

<http://genolist.pasteur.fr/Colibri/>，及

- 與 *gapA* 啟動子(1860794- 1860761)具有同質性之區域
(以小字母表示)。

102年11月29日修(更)正本

序列表

附件
(三)

<110> 代謝探索公司

<120> 製造1,2-丙二醇及丙酮醇之微生物及方法

<130> D25262

<140> 097110002

<141> 2008-03-21

<150> PCT/IB2007/001677

<151> 2007-03-23

<160> 73

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR 引子

<400> 1

ggtgatgata gttatcgccg

20

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR 引子

<400> 2

cgtgccatcg acagcagtc

20

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR 引子

<400> 3

agacattaaa aatatacgtg cagctacccg

30

<210> 4

<211> 30
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 4
gtgaaagctg acaacccttt tgatctttta 30

<210> 5
<211> 22
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 5
ggctcatgtgc accaccatcc ag 22

<210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 6
gaaaagacgc gctgacaata cgcc 24

<210> 7
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 7
gccatcagca ggcttagccg 20

<210> 8
<211> 23
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 8
gggtattgtg gcatgtttaa ccg 23

<210> 9
<211> 31
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 9
gaagtggatcg atgccgggat tgaagaatgg g 31

<210> 10
<211> 31
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 10
gggttacgtt tcagtgaggc gcgttctgcg g 31

<210> 11
<211> 31
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 11
tgcagcggcg cacgatggcg acgttccgcc g 31

<210> 12
<211> 31
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 12
cacgatgacg accattcatg cctatactgg c 31

<210> 13
<211> 40
<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR 引子

<400> 13

catatttccc tcaaagaata taaaaaagaa caattaacgc

40

<210> 14

<211> 31

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR 引子

<400> 14

tatgttcacg cgatggcgca ccagctgggc g

31

<210> 15

<211> 24

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR 引子

<400> 15

ccccggaatc agaggaatag tccc

24

<210> 16

<211> 29

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR 引子

<400> 16

gggtagactc cattactgag gcgtgggcg

29

<210> 17

<211> 20

<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> 專一性引子

<400> 17

gccatcagca ggcttagcgc

20

<210> 18
<211> 23
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 18
gggtattgtg gcatgtttaa ccg

23

<210> 19
<211> 33
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 19
ggcgtctcgc catacaacaa acgcacatcg ggc

33

<210> 20
<211> 29
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 20
gggctttgcc gacaccttct tcgttcttg

29

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 21
cctgacccca tgccgaactc

20

<210> 22
<211> 21
<212> DNA
<213> 人造

<220>		
<223>	專一性引子	
<400>	22	
cccgcctcccc tcaataacctg g		21
<210>	23	
<211>	30	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	專一性引子	
<400>	23	
gtggatcaag atgcccgcct gcggattccg		30
<210>	24	
<211>	31	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	專一性引子	
<400>	24	
cccgtccaga gcccgtgccg gggaatttgc c		31
<210>	25	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	專一性引子	
<400>	25	
ggcggtgagg gggggattcg		20
<210>	26	
<211>	21	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	專一性引子	
<400>	26	
ccccatcaac cactcgcggc c		21

<210>	27	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	專一性引子	
<400>	27	
	gccacagccg gaatcatact tggtttggg	29
<210>	28	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	專一性引子	
<400>	28	
	cgtcaacacc aacttcgtcc catttcagg	29
<210>	29	
<211>	29	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	PCR 引子	
<400>	29	
	gggtagactc cattactgag gcgtgggcg	29
<210>	30	
<211>	24	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	PCR 引子	
<400>	30	
	ccacatgata ccgggatggt gacg	24
<210>	31	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	人造	
<220>		
<223>	PCR 引子	

<400> 31
ggcaattacc ctcgacgtac cgg 23

<210> 32
<211> 25
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 32
ccgatggatg atctgttaga ggcgg 25

<210> 33
<211> 23
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 33
ggcaattacc ctcgacgtac cgg 23

<210> 34
<211> 25
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 34
ccgcctctaa cagatcatcc atcgg 25

<210> 35
<211> 100
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 35
gaaactcgcc gtttatagca caaaacagta cgacaagaag tacctgcaac aggtgaacga 60

gtccctttggc tttagagctgg tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 36
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 專一性引子

<400> 36
 ttaaaccagt tcgttcgggc aggtttcgcc tttttccaga ttgcttaagt ttgcagcgt 60
 agtctgagaa atactgggtca gcatatgaat atcctcctta g 101

<210> 37
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 專一性引子

<400> 37
 atgaacaact ttaatctgca caccccaacc cgcattctgt ttggtaaagg cgcaatcgct 60
 ggttttacgcg aacaaattcc tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 38
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 專一性引子

<400> 38
 ttagcgggcg gcttcgtata tacggcggct gacatccaac gtaatgtcat gattttcgcc 60
 cagttgggtc atgccgtgct ccatatgaat atcctcctta g 101

<210> 39
 <211> 99
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 專一性引子

<400> 39
 atggctatcc ctgcatttgg tttaggctact ttccgtctga aagacgacgt tgttatttca 60
 tctgtgataa cggcgcttgt gtaggctgga gctgcttcg 99

<210> 40
<211> 100
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 40
tcccatcag gagccagacc ttccgggcta accaggcggc cgttgcaatc cagtgcggcg 60
atcgcttttt tatcttcggc cataatgaata tcctccttag 100

<210> 41
<211> 101
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 41
ttacgggtacg tcgtacccca gtgccgcttt acggatacga aaccattgtt gacgggtcat 60
tttcagtgtt tctgcttcga ctgtaggctg gagctgcttc g 101

<210> 42
<211> 101
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 42
atggttcagc gtattactat tgcgccgcaa ggccccggagt tttcccgttt tgtgatgggc 60
tactggcgat tgatggactg gcatatgaat atcctcctta g 101

<210> 43
<211> 101
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 43
atgagaataa atttcgcaca acgcttttcg ggagtcagta tggatatcat cttttatcac 60
ccaacgttcg atacccaatg gtgtaggctg gagctgcttc g 101

<210> 44
<211> 99
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 44
ttagtagccg cgtgcgcggt cgacttgccc gcagaccctc tccccttttt cgagctgggc 60
aatggtgcga gaaatgtacc atatgaatat cctccttag 99

<210> 45
<211> 100
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 45
agtcataatat tccaccagct atttgtagt gaataaaagc cacacattat tcgagccgga 60
tgattaatag tcaacagctc tgtaggctgg agctgcttcg 100

<210> 46
<211> 79
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 46
gctcacatta cgtgactgat tctaacaaaa cattaacacc aactggcaaa attttgtccc 60
atatgaatat cctccttag 79

<210> 47
<211> 102
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 47
cgcgcgagac tcgctctgct tatctcgccc gtagagaaca agcgaaaact tcgaccgttc 60

atcgttcgca gttggcatgc ggtgtaggct ggagctgctt cg 102

<210> 48
<211> 100
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 48
gcttagcgcc ttctacagct tcacgcgcca gcttagtaat gcggtcgtaa tcgcccgtt 60
ccagcgcattc tgccggaacc catatgaata tcctccttag 100

<210> 49
<211> 101
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 49
atgcgtcttc ttcataccat gctgcgcgtt ggcgatttgc aacgctccat cgatttttat 60
accaaagtgc tgggcatgaa gtgtaggctg gagctgcttc g 101

<210> 50
<211> 100
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 50
ttagttgccc agaccgcgac cggcgtcttt ctcttcgatt aactcaattt tgtaaccgtc 60
cggatcttcc acaaacgcga catatgaata tcctccttag 100

<210> 51
<211> 101
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 51
cgcggcgggt gccaacgttg tacgtatgaa cttttctcac ggctcgctg aagatcacao 60

aatgcgcgcg gataaagttc gtgtaggctg gagctgcttc g 101

<210> 52
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> PCR 引子

<400> 52
 cgccgcatcc ggcaacgtac ttactctacc gttaaaatac gcgtggtatt agtagaaccc 60

acggtactca tcacgtcgcc ccatatgaat atcctcctta g 101

<210> 53
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> PCR 引子

<400> 53
 cgcggcgggt gccaacgttg tacgtatgaa cttttctcac ggctcgccctg aagatcacia 60

aatgcgcgcg gataaagttc gtgtaggctg gagctgcttc g 101

<210> 54
 <211> 101
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> PCR 引子

<400> 54
 cgccgcatcc ggcaacgtac ttactctacc gttaaaatac gcgtggtatt agtagaaccc 60

acggtactca tcacgtcgcc ccatatgaat atcctcctta g 101

<210> 55
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 專一性引子

<400> 55

ccgacagtaa gacgggtaag cctg 24

<210> 56
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 專一性引子

<400> 56
 agcttagtaa agccctcgct ag 22

<210> 57
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 專一性引子

<400> 57
 catgggctag ctacgtatta attaaagatc tcctagggag ctcaccggtt aaaaataaga 60

gttaccttaa atggtaactc ttattttttt aggcgcgcca 100

<210> 58
 <211> 100
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 專一性引子

<400> 58
 agcttggcgc gcctaaaaaa ataagagtta ccatttaagg taactcttat tttaaccgg 60

tgagctccct aggagatcct taattaatac gtagctagcc 100

<210> 59
 <211> 79
 <212> DNA
 <213> 人造

<220>
 <223> 專一性引子

<400> 59
 ctagctagcg gcgtaaaaag cttagcgggc ggcttcgtat atacggcggc tgacatccaa 60

cgtaatgtcg tgattttcg 79

<210> 60
<211> 43
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 60
cgatgcacgt catgaacaac tttaatctgc acaccccaac ccg

43

<210> 61
<211> 29
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 61
cgtacgtact gtaggaaagt taactacgg

29

<210> 62
<211> 29
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 62
gaagatcttt acttcagacg gtccgcgag

29

<210> 63
<211> 28
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 63
gacctaggct ctaaaggagc aattatgg

28

<210> 64
<211> 26
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 專一性引子

<400> 64
cgagctcttta ttccactct tgcagg 26

<210> 65
<211> 30
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 65
catgcatgg ctatccctgc atttggttta 30

<210> 66
<211> 30
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 66
ctagctagct taatccatt caggagccag 30

<210> 67
<211> 31
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 67
catgcatgg ctaatccaac cgttattaag c 31

<210> 68
<211> 30
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 68
ctagctagct tagccgccga actggtcagg 30

<210> 69
<211> 41
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> 合成性啟動子

<400> 69
gagctgttga cgattaatca tccggctcga ataatgtgtg g 41

<210> 70
<211> 65
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 70
ccittttattc actaacaaat agcttggtgga atatatgtcc aacaatggct cgtcacccgct 60
ggtgc 65

<210> 71
<211> 43
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 71
aatcgcaagc ttgaatccgg ttattttcttc agttcagcca ggc 43

<210> 72
<211> 65
<212> DNA
<213> 人造

<220>
<223> PCR 引子

<400> 72
gcaccagcgg tgacgagcca ttgttggaca tataatccac cagctatttg ttagtgaata 60
aaagg 65

<210> 73
<211> 33
<212> DNA

<213> 人造

<220>

<223> PCR 引子

<400> 73

acgtcccggg caagcccaaa ggaagagtga ggc

33

公告本

十、申請專利範圍：

1. 一種製造 1,2-丙二醇的方法，其中用於生產 1,2-丙二醇之經改造的大腸桿菌(*Escherichia coli*)的特徵在於：

- 藉由從大腸桿菌過度表現基因 *yqhD* 而得到提高的甲基乙二醛還原酶活性，
- 刪除至少一種涉及恩特-朵夫(Entner-Doudoroff)途徑的基因 *edd*、*eda*，

於含有碳源的適當生長培養基中生長，並回收所製造的 1,2-丙二醇，

其中於經改造的大腸桿菌中，該過度表現係藉由置換涉及甲基乙二醛還原作用之基因 *yqhD* 的天然啟動子成可誘發至少一種該基因更高度表現的啟動子，或藉由導入涉及甲基乙二醛還原作用之基因 *yqhD* 之多套複本至該微生物而達成。

2. 根據申請專利範圍第 1 項之方法，其中於經改造的大腸桿菌中，甲基乙二醛合成酶活性藉由過度表現 *mgsA* 基因而被提高。

3. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中於經改造的大腸桿菌中，至少一種涉及轉化甲基乙二醛形成乳酸鹽的下列基因表現被減弱：*gloA*、*aldA*、*aldB*。

4. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中於經改造的大腸桿菌中，至少一種涉及合成乳酸鹽、甲酸鹽或乙醇的下列基因表現被減弱：*ldhA*、*pflA*、*pflB*、*adhE*。

5. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中於經改造的

大腸桿菌中，至少一種涉及合成乙酸鹽的下列基因表現被減弱：*ackA*、*pta*、*poxB*。

6. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中於經改造的大腸桿菌中，甘油醛 3 磷酸鹽脫氫酶活性藉由減弱 *gapA* 基因的表現而被減弱。

7. 根據申請專利範圍第 6 項之方法，其中於經改造的大腸桿菌中，糖之輸入效率藉由提高至少一種涉及不依賴磷酸烯醇丙酮酸鹽之糖輸入系統並選自 *galP* 與 *glk* 的基因表現而被提高。

8. 根據申請專利範圍第 7 項之方法，其中於經改造的大腸桿菌中，糖-磷酸轉移酶系統效率藉由提高代謝物磷酸烯醇丙酮酸鹽之可利用度而被改善，其中：

- 至少一種編碼丙酮酸鹽激酶並選自 *pykA* 與 *pykF* 的基因表現被減弱，

- 編碼磷酸烯醇丙酮酸鹽合成酶的 *ppsA* 基因表現被提高。

9. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中於經改造的大腸桿菌中：

- 甘油脫氫酶活性藉由提高 *gldA* 基因的表現而被提高及/或，

- 1,2-丙二醇氧化還原酶活性藉由提高 *fucO* 基因的表現而被提高。

10. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中於經改造的

大腸桿菌中，基因 *lpd* 具有定點突變，造成丙胺酸 55 被纈胺酸置換。

11. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中於經改造的大腸桿菌中：

- 三碳糖磷酸鹽異構酶活性藉由減弱 *tpiA* 的基因表現而被提高及/或，
- 至少一種選自 *arcA* 與 *ndh* 的基因表現被減弱。

12. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中所回收的 1,2-丙二醇進一步被純化。

13. 根據申請專利範圍第 1 或 2 項之方法，其中丙酮醇進一步被回收及純化。

14. 一種用於由碳源製造 1,2-丙二醇與/或丙酮醇之經改造的大腸桿菌，其中該株之特徵在於：

- 藉由從大腸桿菌過度表現基因 *yqhD* 而得到提高的甲基乙二醛還原酶活性，
- 藉由過度表現 *mgsA* 基因而得到提高的甲基乙二醛合成酶活性，及
- 刪除至少一種涉及恩特-朵夫(Entner-Doudoroff)途徑的基因 *edd*、*eda*，

其中於經改造的大腸桿菌中，該過度表現係藉由置換涉及甲基乙二醛還原作用之基因 *yqhD* 或 *mgsA* 基因的天然啟動子成可誘發至少一種該基因更高度表現的啟動子，或藉由導入涉及甲基乙二醛還原作用之基因 *yqhD* 或 *mgsA* 之多套複本至該微生物而達成。