

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：94120467

※ 申請日期：94.6.20

※IPC 分類：A23C 9/12 (2006.01)

CIP 1/2 (2006.01)

一、發明名稱：(中文/英文)

以基因方法獲得之純化結冷膠(GELLAN GUM)

GENETICALLY PURIFIED GELLAN GUM

二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

美商CP凱爾可美國公司

CP KELCO U.S., INC.

代表人：(中文/英文)

卡洛絲 尼維

NIEVES, CARLOS

住居所或營業所地址：(中文/英文)

美國喬治亞州亞特蘭大市公園林圓環1000號

1000 PARKWOOD CIRCLE, SUITE 1000, ATLANTA, GA 30339, U.S.A.

國 籍：(中文/英文)

美國 U.S.A.

三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 約瑟夫 M 可雷利
CLEARY, JOSEPH M.
2. 盧瑟爾 J 寇雷曼
COLEMAN, RUSSELL J.
3. 南西 E 哈丁
HARDING, NANCY E.
4. 雅米尼 帕特爾
PATEL, YAMINI

國 籍：(中文/英文)

- 1.-4.均美國 U.S.A.

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：

1. 美國；2004年06月21日；60/580,730

2.

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

1.

2.

☐ 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】

本發明係關於食物添加物領域；明確言之，本發明係關於乳品食物添加物領域；更明確言之，本發明係關於無菌牛奶產品之添加物。

【先前技術】

結冷膠(gellan gum)係由依樂藻假單胞菌(*Sphingomonas elodea*)細菌中所產生的一種胞外多醣體。由細菌依樂藻假單胞菌所產生的結冷膠係為商業上可由位於加州聖地牙哥CP Kelco公司之Kelcogel LT100[®]所獲得。商業上，結冷膠係由有氧發酵所形成，發酵完成時，在回收發酵培養液中的結冷膠之前，將培養液進行巴斯得滅菌以殺死活細胞。

結冷膠係包含莫耳比例為2:1:1之葡萄糖、葡糖醛酸(glucuronic acid)及鼠李糖(rhamnose)，該等係經連接形成四醣重複單位。天然型結冷膠係於同一葡萄糖殘基上乙醯基化及甘油基化。平均每一個四醣重複單位有一個乙醯基團及半個甘油基團。

回收結冷膠的方法會影響膠的特性。直接回收會產生既軟且有彈性的膠。由於結冷膠質地及流變性質特性，其長期以來係用於經發酵、經調理及冷凍乳製品。然而，在此上架期穩定、以乳品為主要成分、含結冷膠產品之另一方面，產品會逐漸產生變質味道及異味，此味道及異味致使食物風味不佳。變質味道及異味已經認為與牛奶中基質所形成之對-甲酚有關係，例如，硫酸-對甲苯酯(para-cresyl

sulfate) 及葡糖醛酸-對甲苯酯(para-cresyl glucouronide)。在以乳品為主要成分、含結冷膠之產品中，經以極高溫度處理及貯存於室溫後，對-甲酚是可測得到的。

為了解決這問題，結冷膠經熱鹼處理以進行去醯基作用。雖然可有效的去除對-甲酚，但是去醯基作用處理使得結冷膠較易碎且較不利使用於某些食品應用上。解決此問題之另一個方法是以變性劑預先處理天然型結冷膠，例如，次氯酸鈉或氫氧化鉀。此方法會增加材料及處理成本。在此技術領域中，對於一個結冷膠產品其在延長儲存之無菌乳製產品及其不需額外處理步驟使膠產物不生產甲酚是有需要的。

【發明內容】

本發明第一個具體實施例係提供一個組合物，該組合物包含實質上不含芳香硫酸酯酶(arylsulfatase)蛋白質之結冷膠。

本發明第二個具體實施例係提供一個組合物，該組合物包含實質上不含 β -葡糖醛酸酶(β -glucuronidase)蛋白質之結冷膠。

本發明第三個具體實施例係提供一個組合物，該組合物包含實質上不含芳香硫酸酯酶及 β -葡糖醛酸酶蛋白質兩者之結冷膠。

本發明第四個具體實施例係提供一用以製備結冷膠組合物之方法。依樂藻假單胞菌培養於培養基中，該依樂藻假單胞菌產生不具催化活性之芳香硫酸酯酶，或不具催化活

性之 β -葡糖醛酸酶，或不具催化活性之芳香硫酸酯酶及 β -葡糖醛酸酶兩者。收集培養基，將結冷膠自該培養基沉澱出來。

本發明第五個具體實施例係提供微生物學上純化培養之依樂藻假單胞菌，該菌為芳香硫酸酯酶缺乏的。

本發明第六個具體實施例係提供微生物學上另一純化培養之依樂藻假單胞菌，該菌為 β -葡糖醛酸酶缺乏的。

本發明另一具體實施例係為微生物學上純化培養之依樂藻假單胞菌，該菌為芳香硫酸酯酶與 β -葡糖醛酸酶均缺乏的。

本發明第八個具體實施例係提供編碼依樂藻假單胞菌之芳香硫酸酯酶之經分離及經純化多核苷酸。該芳香硫酸酯酶具有一如SEQ ID NO: 2之胺基酸序列。

本發明第九個具體實施例係提供編碼依樂藻假單胞菌之 β -葡糖醛酸酶之經分離及經純化多核苷酸。該 β -葡糖醛酸酶具有一如SEQ ID NO: 5之胺基酸序列。

本發明第十個具體實施例係提供包括依樂藻假單胞菌基因組DNA之經分離及經純化多核苷酸。該基因組DNA包括一刪除全部或部分芳香硫酸酯酶編碼序列。

本發明第十一個具體實施例係提供包括依樂假單胞菌基因組DNA之經分離及經純化多核苷酸。該基因組DNA包括一刪除全部或部分 β -葡糖醛酸酶編碼序列。

以下更詳細敘明本發明該等及其他具體實施例係提供此技術領域符合成本效益之方法，以生產一更多消費者可接

受的、無菌的及含結冷膠之乳製品。

【實施方式】

本發明發明人咸已發現，如果依樂藻假單胞菌中編碼芳香硫酸酯酶及 β -葡糖醛酸酶中任一酵素之基因或偏碼兩者之基因經以突變作用失活，該細菌針對某些目的上會產生出具有較優特性之結冷膠。明確言之，經此突變作用所製備之結冷膠會賦予無菌乳製品一較長之上架期。

如果其一或兩者酵素未經失活作用，則它們會從發現於牛奶中之受質(硫酸-對甲苯酯及葡糖醛酸-對甲苯酯)產生出對-甲酚。對-甲酚會造成異道及通常令消費者不愉快的味道。去除這些酵素可減低上架期之無菌牛奶或乳製品中對-甲酚產生的速率。

其一或兩者酵素的突變作用可用以減低對-甲酚產生的速率。突變作用較佳類型係使蛋白質完全失活者，諸如，插入、無意義、移碼或刪除等突變作用。任何此技術領域中之已知技術皆可用來產生此等突變作用。申請人係利用一轉位子插入策略(transposon insertion strategy)，以識別編碼芳香硫酸酯酶及 β -葡糖醛酸酶之基因。之後，以同源基因重組方式利用側接於基因之5'及3' DNA片段相互連接，構建每一基因之刪除突變作用。儘管如此，其他策略亦可用來獲得於此等基因裡的突變作用。該等突變作用可於結冷膠「產生」菌株裡直接進行，或該等突變可由最初製造突變作用的一菌株轉移至此菌株。定點誘變技術係此技術領域中眾所周知的。請參考，例如 "In Vitro Mutagenesis

Protocols"，第二版，Braman, Jeff, ed., Humana 出版社，2002 年，以及商業上可獲得之 QuikChange™ 套組 (Stratagene公司)。如果提供依樂藻假單胞菌之芳香硫酸酯酶及 β -葡糖醛酸酶野生型序列，則熟識此技術領域之技藝人士可在此等基因輕易地製得所要之各種突變作用。

編碼芳香硫酸酯酶及 β -葡糖醛酸酶之野生型及突變基因序列業經確定，請看 SEQ ID NO:1(野生型芳香硫酸酯酶)，SEQ ID NO:3(刪除突變之芳香硫酸酯酶)，SEQ ID NO:4(野生型 β -葡糖醛酸酶)及 SEQ ID NO:6(刪除突變之 β -葡糖醛酸酶)。此等基因及其核苷酸序列之確定讓熟識此技術領域之技藝人士能輕易地製得其他具有針對該等酵素表現作用之所要無表現型之突變作用。諸如插入、刪除、無意義及移碼等突變作用最有可能導致該等酵素之無表現型。亦可造成誤義突變作用，且誤義突變作用慣常地係用以測試對酵素活性的影響。標準微生物遺傳技術可用以製造合適的突變。請看，例如 *Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering*, R. W. Old, S. B. Primrose, Blackwell 出版，1994 年。標準酵素分析可用以測試經突變酵素活性之喪失。請看，例如 Kim *et al.*, *Appl Microbiol Biotechnol.* 2004 年二月，63(5):553-9。

本發明組合物(實質上不含芳香硫酸酯酶或 β -葡糖醛酸酶)包括與野生型菌株比較少於 95%、96%、97%、98% 或 99% 總量之特定蛋白質。與含有來自野生型菌株結冷膠之組合物所產生之對-甲酚量比較，此酵素減少量應使無菌牛奶組

合物含有少於90%、93%、95%、97%或99%之對-甲酚總量。利用立即可測試受質(諸如，來自Sigma公司之5-溴-4-氯-3-吡啶基硫酸鹽(X-SO₄)；CAS No. 6578-07-0或來自Sigma公司或RPI股份(有限)公司之5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-葡糖醛酸(X-GlcA)；CAS No. 114162-64-0，或對-硝基兒茶酚)藉由酵素分析法可測定所產生的芳香硫酸酯酶或β-葡糖醛酸酶蛋白質的含量。另一種方式是利用免疫學技術(諸如西方墨點法)測定該蛋白質。

● 結冷膠典型地係用在無菌或經超高溫(ultra high temperature；UHT)處理之乳製品或冷凍乳製品。此類產品包括但不受限於：冰淇淋、冷凍酸乳酪、布丁、發泡乳製品、咖啡奶油、法式焦糖焗蛋及乳製飲料。本發明結冷膠亦如典型來自野生型菌株之結冷膠，可用於此類或任何其他食物。典型上結冷膠係用以懸浮精細顆粒，但是其亦可用以賦予討人喜愛之口感。

● 根據任何此技術領域中針對野生型菌株之已知方法，利用本發明突變菌株可製備結冷膠。係菌典型地係生長於液態培養基中，此培養基典型地包括碳源、磷酸鹽、有機及無機氮源及適當之微量元素。發酵作用典型地係在無菌條件下進行，並通氣及震盪。發酵期間終了，收集培養基，典型地係不移除細胞。在回收結冷膠之前，將發酵培養基進行巴斯得殺菌，以殺死活細胞。結冷膠可以本技術領域中已知的方法進行沈澱。典型地可用酒精進行沈澱，例如異丙醇。經沈澱之結冷膠可於復水作用之前乾燥。

可利用本技術領域中任何已知方式測量對-甲酚。其中一種方法是利用二氯甲烷萃取、濃縮及氣相層析質譜儀。

雖然本發明業已描述關於特定實施例(包括目前較佳實施本發明方式)，但熟識本技術領域之技藝人士會瞭解仍有許多變化及上述系統之超突變及技術係屬列於附加之請求項中所示之本發明的精神及範圍內。

實例

實例 1

以下試劑係用以篩選及特性分析突變菌株：

5-溴-4-氯-3-吡啶基硫酸鹽(X-SO₄)，CAS號碼 6578-07-0

來源：Sigma公司

5-溴-4-氯-3-吡啶基-β-D-葡糖醛酸(X-GlcA)，CAS號碼 114162-64-0，

來源：Sigma公司或RPI股份(有限)公司

實例 2

確認編碼芳香硫酸酯酶或β-葡糖醛酸酶，其係利用商業上購自 Epicentre公司(麥迪森，美國威斯康辛州)之 EZ::TN™<R6Kgamma-ori/KAN-2> 插入套組，藉由在依樂藻假單胞菌中製備隨機轉位子突變基因庫之非類黏蛋白菌株，Gps2。篩選康黴素抗性突變菌株，該等菌株在含有特定發色受質之選擇性培養基上缺少(或顯著減少)藍顏色。請看實例 1，利用色原 5-溴-4-氯-3-吡啶基硫酸鹽(X-SO₄)，在含有氯鹽之界定培養基的瓊脂上鑑別出具有阻斷芳香硫酸酯酶產生或活性之突變株。在含有色原 5-溴-4-氯-3-吡啶基

- β -D-葡糖醛酸(X-GlcA)之界定培養基上篩選出 β -葡糖醛酸酶突變株。

隨後，利用限制酵素將轉位子及相鄰基因組DNA從染色體切下來，該等限制酵素片段用連接酶接合成環狀，並轉型至大腸桿菌，由於轉位子上存有複製子，因此大腸桿菌中含有轉位子之DNA可以被複製。純化並定序質體DNA。帶有芳香硫酸酯酶基因之質體被定名為R6K-AS#14E，此質體某部分已被定序(SEQ ID NO:1)。帶有 β -葡糖醛酸酶基因之質體被定名為R6K-BG#6S，此質體某部分已被定序(SEQ ID NO:4)。此些於大腸桿菌菌株EC100D pir+裡的質體業已於2004年6月21號寄存在美國維吉尼亞州馬納薩斯市之美國菌種收集單位(American Type Culture Collection)。

在具有失活芳香硫酸酯酶之細菌中，該轉位子實際上已插入在一鄰近芳香硫酸酯酶基因之理論性蛋白基因位置處。在具有失活 β -葡糖醛酸酶之細菌中，該轉位子之插入位置係位在 β -葡糖醛酸酶之胺基部分基因處。在國家生物科技資料中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)資料庫裡，DNA基因定序顯示它們與已知其他物種之基因為同源。

芳香硫酸酯酶基因及 β -葡糖醛酸酶基因及相鄰基因組DNA已被定序。基因之刪除突變已建構於質體上，之後並將其轉型至S-60wtc及PDG-1之依樂藻假單胞菌菌株中。請看WO 01/64897。刪除突變係以同源重組方式插入於基因組中。藉由聚合酶鏈反應(PCR)增幅位於目標基因側邊之DNA

序列並選殖至質體 pLO2 中(先前文獻 "The *Alcaligenes eutrophus* H16 *hoxX* gene participates in hydrogenase regulation," J. Bacteriol. 176:4385-4393, Lenz, O., E. Schwartz, J. Dornedde, M. Eitinger 及 B. Friedrich. 1994 年)。藉由接合作用將此構築體移轉至依樂藻假單胞菌菌株中, 所得之康黴素抗性菌株之後在無抗生素條件下生長 30 至 40 代。藉由篩選對蔗糖耐性偵測出丟失此質體之分離菌株, 原因係在於質體 pLO2 上 *sacB* 基因的喪失, 並以康黴素敏感度確認之。經過在非選擇性培養基中生長後丟失質體之分離菌株包括兩種類型: 基因刪除突變型或野生型。所要的基因刪除突變之菌株係在適當指示瓊脂上缺少藍色(請看實例 1)並藉由 PCR 測試後加以確認。以下, 構築流程如下列圖 1 所示。

為了構築芳香硫酸酯酶基因 (*atsA*) 的準確刪除突變作用, 需要確認最有可能之 *atsA* 基因起始密碼子及相鄰基因之起始及終止密碼子。利用 Ishikawa 及 Hotta 設計之 FramePlot-3 程式, 根據與基因庫 (GenBank) 裡其他基因及第三鹼 GC 較佳同源比對之 DNA 序列定出基因的終端位置。"FramePlot: a new implementation of the Frame analysis for predicting protein-coding regions in bacterial DNA with a high G+C content." *FEMS Microbiology Letters* 174:251-253(1999 年)。此分析顯示芳香硫酸酯酶基因係以轉譯方式偶合至保守理論性之蛋白質基因, 例如, 芳香硫酸酯酶基因之終止密碼子與保守理論性蛋白質基因之起始

密碼子重疊。芳香硫酸酯酶之刪除突變已構築留下烷硫酸酯酶基因及未知蛋白質基因完整無缺，因無法知曉是否理想細胞生長及結冷膠生產需要這些蛋白質。

PCR引子AS5(CCGAGCTCAACGCCTTCGACTATGTCCA; SEQ ID NO:11)及AS6(CCTCTAGACTGGGGATTGTCCGGAA AAG; SEQ ID NO: 12)係用以增幅一512鹼基對片段，其位於*atsA*起始密碼子上游(係為一*SacI*-*XbaI*片段，總共528鹼基對)。引子AS3(CGTCTAGATCCACCCCGGCGACCTTCCC; SEQ ID NO: 13) 及AS4(TATAGCATGCGGCGACCACGGGCTCCTCCTCA; SEQ ID NO: 14) 係用以增幅一479鹼基對片段，其包括*atsA*基因末端及保守理論性蛋白質始端(係為一*XbaI*-*SphI*片段，總共497鹼基對)。因此，*atsA*終止密碼子被保留但起始密碼子被刪除。因此，應無芳香硫酸酯酶蛋白質部分被合成。將選殖所需之限制位置加進至引子末端，其後PCR片段相繼地連接於質體載體pLO2之多酶切點接頭，以形成*atsA*基因之刪除突變。上游*SacI*-*XbaI*片段選殖至pLO2之*SacI*-*XbaI*切點。接著，選殖下游*XbaI*-*SphI*片段(圖2)。此帶有*atsA*基因刪除突變之質體其後藉由接合作用轉移至依樂藻假單胞菌株S-60wtc及PDG-1中，讓質體重組進入染色體。純化康黴素抗性菌株，然後使之生長於缺少抗生素環境中，其後塗抹於含有蔗糖及X-SO₄之培養基上，以此挑選出因丟失編碼*sacB*基因之質體而帶有蔗糖耐性之菌株。挑選出蔗糖抗性、康黴素敏感之黃色菌落。S-60wtc及PDG-1菌株之*atsA*衍生菌株分別命名為GAS-1及PAS-1。

將 β -葡糖醛酸酶基因(*gusA*)之刪除突變構築於質體pLO2上，並轉移至S60wtc，GAS-1。利用與其他蛋白質之同源性及核糖體結合位點的存在，確認最有可能之*gusA*基因起始密碼子。二級結構區位在起始密碼子上游。*gusA*基因刪除突變已構築以維持上游之二級結構及下游之*gusA*。引子Bgluc3(AACTGCAGACACGTGGCTTGTGCCGAAC; SEQ ID NO:7)及Bgluc4(GGCTCTAGACTTCTCCCTGTTCTCCGGGAAA; SEQ ID NO: 8)係用以增幅一560鹼基對片段，在*gusA*基因上游，係為一 *PstI*-*XbaI* 片段 (總共 577 鹼基對)。引子Bgluc1(TTTCTAGATGACTGTCCAGGCCCTCTC; SEQ ID NO: 9) 及Bgluc2(TCGAGCTCCAATGTCCTCGTAGCTGTTC; SEQ ID NO: 10)係用以增幅一489鹼基對片段，在*gusA*基因下游，係為一 *XbaI*-*SacI* 片段(總共505鹼基對)。將 *PstI*-*XbaI* 片段選殖至pLO2之 *PstI*-*XbaI* 切點。接著，選殖下游 *XbaI*-*SacI* 片段。此帶有*gusA*基因刪除突變之質體藉由接合作用轉移至S-60wtc、GAS-1及PAS-1菌株中，使之進行重組作用。純化康黴素抗性菌株，使之生長於缺少抗生素環境中，其後塗抹於含有蔗糖及X-GlcA之培養基上，以此挑選因丟失編碼*sacB*基因之質體而帶有蔗糖耐性之菌株。獲得藍-綠(野生型)及淡綠(突變株)菌落之混合物。藉由康黴素敏感性確認丟失質體之蔗糖抗性、淡綠菌株。S-60wtc、GAS-1及PAS-1菌株之*gusA*刪除突變衍生菌株分別命名為GBG、GBAD及PBAD。

業經完成S-60wtc及PDG-1菌株中芳香硫酸酯酶基因

(*atsA*)之刪除突變作用。 β -葡糖醛酸酶基因業已確認及定序，其相鄰DNA已定序。業已構築完成各個S-60、PDG-1及GAS-1菌株中 β -葡糖醛酸酶基因之刪除突變作用。

於超高溫乳品應用試驗中，以每月間隔評估GAS-1菌株(帶有芳香硫酸酯酶基因之刪除突變)及GBAD-1菌株(帶有芳香硫酸酯酶基因及 β -葡糖醛酸酶基因兩基因之刪除突變)所製得之結冷膠樣本中對-甲酚的產生。一個月後，野生型菌株之結冷膠樣本會產生3至152(平均65)ppb之對-甲酚，而兩個月後會產生4至212(平均96)ppb之對-甲酚。一到五個月後，GAS-1菌株之結冷膠樣本產生大約1至3ppb之對-甲酚。至多3個月檢測時，GBAD-1菌株之結冷膠樣本產生少於1ppb(檢測極限)之對-甲酚。

【圖式簡單說明】

圖1所示為芳香硫酸酯酶基因(*atsA*)附近之基因組區及藉由PCR增幅之區域位置及選殖至質體pLO2之基因圖。帶有經選殖PCR片段之pLO2質體之後係用來以同源基因重組方式取代此含有刪除突變之區域。

圖2所示為依樂藻假單胞菌(*Sphingomonas elodea*)之 β -葡糖醛酸酶基因(*gusA*)附近之基因組區之限制酶圖。選殖體BG-6及BG-7中轉位子插入位置標示於下方。

序列表

<110> 美商CP凱爾可美國公司
<120> 以基因方法獲得之純化結冷膠
<130> 012047.00029
<140> 094120467
<141> 2005-06-20
<150> 60/580,730
<151> 2004-06-21

<160> 14

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 3250
<212> DNA
<213> 依樂藻假單胞菌(Sphingomonas elodea)

<220>
<221> CDS
<222> (521)...(2176)

<400> 1
tccacaccaa cgccttcgac tatgtccagc aacgccccga ggcgaccagc gagcagggtcc 60
gccgtcaccg cgaagtgttc gcctccacgg cgtacgagac cgagcatccg gtggtgcgcg 120
tccatccggt gaccggcgag aagctgctgc tgctcggcag cttcgtgaag agcttcgtcg 180
ggttcagccg cgaggatttc tcccggctgt tcggcatcct gcaggatcat gcgaccaagc 240
ccgagaacac ggtgcgctgg cgctggagcc cgggcgatgt ggcgatctgg gacaaccgcg 300
ccacccagca ccgcgccatc gcggacttcg gcaagcacgc ccgccatctg cgccggggcga 360
cgatcgccgg cgacgtgccg cgcggcgtcg acggcaagcc cagccgggtg ctcaagcccc 420
agccggtcgc cgcagtcgaa gccgccgccg cctgaacttc ccgtgcctgg gccgcgctcc 480
cctcggggaa gcgcggctct cttttccgga caatccccag atg cgc ctt cgc ctc 535
Met Arg Leu Arg Leu
1 5

acc gcc ctg cta ctg ctg ctg ctc ccc tcg ccg gcc gtg gtc gca cag 583
Thr Ala Leu Leu Leu Leu Leu Pro Ser Pro Ala Val Val Ala Gln
10 15 20

gac aag ccc cac ccg gcc ccg ccc ccc aag cgc ccc aac atc ctg atc 631
Asp Lys Pro His Pro Ala Pro Pro Pro Lys Arg Pro Asn Ile Leu Ile
25 30 35



atc gtc gcc gac gat ctc ggc tat tcg gac ctc ggc gcg ttc ggc ggc Ile Val Ala Asp Asp Leu Gly Tyr Ser Asp Leu Gly Ala Phe Gly Gly 40 45 50	679
gag atc cac acg ccc aat ctc gac gcg ctc gcc gag cac ggc ctg cgc Glu Ile His Thr Pro Asn Leu Asp Ala Leu Ala Glu His Gly Leu Arg 55 60 65	727
ctc acc ggc ttc cac gcc gcg ccg acc tgc tcg ccg acg cgc tcg atg Leu Thr Gly Phe His Ala Ala Pro Thr Cys Ser Pro Thr Arg Ser Met 70 75 80 85	775
ctg ctg tcg ggc acc gac aac cac ctc gcg ggg ctc ggc aac atg gcc Leu Leu Ser Gly Thr Asp Asn His Leu Ala Gly Leu Gly Asn Met Ala 90 95 100	823
gaa ctg gtc gcg ccc aac cag atc ggc aag ccc ggc tat cag ggc tat Glu Leu Val Ala Pro Asn Gln Ile Gly Lys Pro Gly Tyr Gln Gly Tyr 105 110 115	871
ctg ccc gac gac gtg gtg acg ctc gcc gag cgg ctg cgc gat ctc ggc Leu Pro Asp Asp Val Val Thr Leu Ala Glu Arg Leu Arg Asp Leu Gly 120 125 130	919
tat gca acc gcg atg tcg ggc aag tgg cat ctc ggc acg cgg ccg cag Tyr Ala Thr Ala Met Ser Gly Lys Trp His Leu Gly Thr Arg Pro Gln 135 140 145	967
gac gat ccc acc cgc cac ggc ttc gac cag gcc ttc acc ctg ctc cag Asp Asp Pro Thr Arg His Gly Phe Asp Gln Ala Phe Thr Leu Leu Gln 150 155 160 165	1015
ggc ggc gcc aac cat ttc ggc atc gat gcc acg gcg acc ccg ctg ccc Gly Gly Ala Asn His Phe Gly Ile Asp Ala Thr Ala Thr Pro Leu Pro 170 175 180	1063
ggc cag gcg acc tat cgc gag aac ggc gtc acc ctg ccc aac ctg ccc Gly Gln Ala Thr Tyr Arg Glu Asn Gly Val Thr Leu Pro Asn Leu Pro 185 190 195	1111
aag gac ttc tat tcc tcc gac gcc tat gcc gcg aag ctg atc ggg ttc Lys Asp Phe Tyr Ser Ser Asp Ala Tyr Ala Ala Lys Leu Ile Gly Phe 200 205 210	1159
ctc ggc aag acg gac ccg gcc aag ccc ttc ttc gcc tat ctc acc ttc Leu Gly Lys Thr Asp Pro Ala Lys Pro Phe Phe Ala Tyr Leu Thr Phe 215 220 225	1207

acc gcg ccg cac tgg ccg ctt cag gca ctg ccc gag gat atc gcc aaa	1255
Thr Ala Pro His Trp Pro Leu Gln Ala Leu Pro Glu Asp Ile Ala Lys	
230 235 240 245	
tat cgc ggc cgc tac gat gcc ggg ttc gag gtg ctc cag gcc gag cgg	1303
Tyr Arg Gly Arg Tyr Asp Ala Gly Phe Glu Val Leu Gln Ala Glu Arg	
250 255 260	
ctg aag cgc cag cag gcg ctg ggg ctg gtg ccc gcg ggc gtg aag ccg	1351
Leu Lys Arg Gln Gln Ala Leu Gly Leu Val Pro Ala Gly Val Lys Pro	
265 270 275	
cat ccc ttc gtg ctc ccc gac ggg cgc gac tgg gcg cat ctc tcg ccc	1399
His Pro Phe Val Leu Pro Asp Gly Arg Asp Trp Ala His Leu Ser Pro	
280 285 290	
acc gag aag cgc gaa cag gcg cgg ctg atg gaa gtc tat gcc gcg atg	1447
Thr Glu Lys Arg Glu Gln Ala Arg Leu Met Glu Val Tyr Ala Ala Met	
295 300 305	
gtc gac cgg ctt gac cag aat gtc ggc aag gtg atc gcg cac ctc aag	1495
Val Asp Arg Leu Asp Gln Asn Val Gly Lys Val Ile Ala His Leu Lys	
310 315 320 325	
gcg acc ggc cag tat gac aac acc atc atc ctg ttc ctc gcc gac aat	1543
Ala Thr Gly Gln Tyr Asp Asn Thr Ile Ile Leu Phe Leu Ala Asp Asn	
330 335 340	
ggc gcc gaa ggg atc gac ctc gcc acc acc agg ctg ccc acc atg gcg	1591
Gly Ala Glu Gly Ile Asp Leu Ala Thr Thr Arg Leu Pro Thr Met Ala	
345 350 355	
gca cgg ctg aag gcg gcg gac aat cgg ctc gac aat ctc ggc gcg gca	1639
Ala Arg Leu Lys Ala Ala Asp Asn Arg Leu Asp Asn Leu Gly Ala Ala	
360 365 370	
agc tcc tac acc gcc tat ggt ccc ggc tgg gcg cag gcg gcg acc acg	1687
Ser Ser Tyr Thr Ala Tyr Gly Pro Gly Trp Ala Gln Ala Ala Thr Thr	
375 380 385	
ccc tcc ttc ctc tac aag ggc ttc acc agc gag ggc ggc acc cgc gtc	1735
Pro Ser Phe Leu Tyr Lys Gly Phe Thr Ser Glu Gly Gly Thr Arg Val	
390 395 400 405	
gcg gcg ttc ctc tcc tat ccc ggc tgg aag cgg cag ggc ggg atc agc	1783
Ala Ala Phe Leu Ser Tyr Pro Gly Trp Lys Arg Gln Gly Gly Ile Ser	

410	415	420	
cat gcc tat ggc acg gtg atg gac gtg gtg ccg acg ctg gtc gag gcg			1831
His Ala Tyr Gly Thr Val Met Asp Val Val Pro Thr Leu Val Glu Ala			
425	430	435	
gcc ggc ggc cac tgg cgg ggc agc agc tat ggc ggc cgt acg gtg cag			1879
Ala Gly Gly His Trp Arg Gly Ser Ser Tyr Gly Gly Arg Thr Val Gln			
440	445	450	
ccg gtg cgc ggg agc agc tgg ctt ccc tat ctg cgt ggg cag tcc aag			1927
Pro Val Arg Gly Ser Ser Trp Leu Pro Tyr Leu Arg Gly Gln Ser Lys			
455	460	465	
gcg gtg cat ggg ccg aaa gag atc gtc ggc acc gag ttg ttc ggc cgc			1975
Ala Val His Gly Pro Lys Glu Ile Val Gly Thr Glu Leu Phe Gly Arg			
470	475	480	485
cgc gcg atc cgg cag ggc gat tgg aag atc atc gat ctc ggc gac ggc			2023
Arg Ala Ile Arg Gln Gly Asp Trp Lys Ile Ile Asp Leu Gly Asp Gly			
490	495	500	
tgg aag ctc tac aat ctg gcc gag gat ccc ggc gag acc cgc gac cgc			2071
Trp Lys Leu Tyr Asn Leu Ala Glu Asp Pro Gly Glu Thr Arg Asp Arg			
505	510	515	
gcc gcc gac cag ccc gcc cgg ttg aag acg ctg gtc gcg gcc tgg gat			2119
Ala Ala Asp Gln Pro Ala Arg Leu Lys Thr Leu Val Ala Ala Trp Asp			
520	525	530	
gcc tat gcc aag ggc gcg ggc gtg gtg atg cag tcc acc ccg gcg acc			2167
Ala Tyr Ala Lys Gly Ala Gly Val Val Met Gln Ser Thr Pro Ala Thr			
535	540	545	
ttc ccg tga agccgatcgc gtcctcgcg ctgcgcgcgc tggccgggct			2216
Phe Pro *			
550			
gccgctgctc tgggcgacgc gcccggcagc ggcacctacc cccgccggcc cgccacgggt			2276
gtgcgcgggc agccatctcg accggccggt gcgcattccc gccagccgct tcgtgatggg			2336
cagcagccgc tattatcccg aggaaggccc gccaccgaa accgaggtgc cggcgttcga			2396
catcgacgca cagaggtca ccaaccgcca gttcgcgacc ttcgtggctg caaccggcta			2456
tcgcaccgaa gcggagaagc ccggcggcgg tgccttcgtg ttcgtaccgc ccaagaccgc			2516
gatcgacgaa cccgatccac gccgctggtg gcgtttcgtg cccggcgcaa actggcggca			2576
tcccagagggg ccgggcagca gcatcgccgg gcatgaggag gagcccgttg tcgccgtcac			2636
cttcgtcgat gcccaggcct atgcccgctg ggccgggtcgt gcaactgccga gcgaggagca			2696
gttcgaggcg gccgcgcgtg ttggcctcac cgatccggac gcggagccca accccgacca			2756

ggcgaacacc	tggcagggca	gcttcccca	catgaacgcc	aagcgcgacg	gctatacggg	2816
tcgtgcgcct	gccggctgct	tcaagccgaa	cggggctggt	gcctatgacc	tgatcggcaa	2876
tgtctgggaa	tggaccgaga	gcttggtatct	gcccggccac	gcgccgttcg	cggtcggcga	2936
cggatcgccc	ggcaaccga	gcttcgatcc	gcgccagccc	gaggcgaagg	cgcgctgat	2996
caaggcggc	tcctatctct	gcgcgaacaa	ctattgcgcc	cgctaccgcc	ctgccgccg	3056
ccacgcacaa	gaggagacgc	tcgccgcctc	gcattctggga	tttcggacgg	tgagccggtc	3116
cgcgttcgat	ctcgcgaccg	acgcgagcgg	gcacgcccgc	cccgcccggt	cgccgtcctc	3176
gagggcgcaa	ggccctgccc	tctaatacgaa	tcgctgatgg	cgggcccgtc	cgagacccc	3236
catgatggtc	gcgc					3250

<210> 2

<211> 551

<212> PRT

<213> Sphingomonas elodea

<400> 2

Met	Arg	Leu	Arg	Leu	Thr	Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Ser	Pro
1			5				10					15		
Ala	Val	Val	Ala	Gln	Asp	Lys	Pro	His	Pro	Ala	Pro	Pro	Pro	Lys
			20				25					30		Arg
Pro	Asn	Ile	Leu	Ile	Ile	Val	Ala	Asp	Asp	Leu	Gly	Tyr	Ser	Asp
		35				40					45			Leu
Gly	Ala	Phe	Gly	Gly	Glu	Ile	His	Thr	Pro	Asn	Leu	Asp	Ala	Leu
	50				55						60			Ala
Glu	His	Gly	Leu	Arg	Leu	Thr	Gly	Phe	His	Ala	Ala	Pro	Thr	Cys
65				70				75						80
Pro	Thr	Arg	Ser	Met	Leu	Leu	Ser	Gly	Thr	Asp	Asn	His	Leu	Ala
			85					90					95	Gly
Leu	Gly	Asn	Met	Ala	Glu	Leu	Val	Ala	Pro	Asn	Gln	Ile	Gly	Lys
		100						105					110	Pro
Gly	Tyr	Gln	Gly	Tyr	Leu	Pro	Asp	Asp	Val	Val	Thr	Leu	Ala	Glu
	115					120						125		Arg
Leu	Arg	Asp	Leu	Gly	Tyr	Ala	Thr	Ala	Met	Ser	Gly	Lys	Trp	His
	130					135					140			Leu
Gly	Thr	Arg	Pro	Gln	Asp	Asp	Pro	Thr	Arg	His	Gly	Phe	Asp	Gln
145				150						155				160
Phe	Thr	Leu	Leu	Gln	Gly	Gly	Ala	Asn	His	Phe	Gly	Ile	Asp	Ala
			165					170					175	Thr
Ala	Thr	Pro	Leu	Pro	Gly	Gln	Ala	Thr	Tyr	Arg	Glu	Asn	Gly	Val
		180						185				190		Thr
Leu	Pro	Asn	Leu	Pro	Lys	Asp	Phe	Tyr	Ser	Ser	Asp	Ala	Tyr	Ala
	195					200					205			Ala
Lys	Leu	Ile	Gly	Phe	Leu	Gly	Lys	Thr	Asp	Pro	Ala	Lys	Pro	Phe
	210					215				220				Phe
Ala	Tyr	Leu	Thr	Phe	Thr	Ala	Pro	His	Trp	Pro	Leu	Gln	Ala	Leu
225					230					235				240
Glu	Asp	Ile	Ala	Lys	Tyr	Arg	Gly	Arg	Tyr	Asp	Ala	Gly	Phe	Glu
														Val

245 250 255
 Leu Gln Ala Glu Arg Leu Lys Arg Gln Gln Ala Leu Gly Leu Val Pro
 260 265 270
 Ala Gly Val Lys Pro His Pro Phe Val Leu Pro Asp Gly Arg Asp Trp
 275 280 285
 Ala His Leu Ser Pro Thr Glu Lys Arg Glu Gln Ala Arg Leu Met Glu
 290 295 300
 Val Tyr Ala Ala Met Val Asp Arg Leu Asp Gln Asn Val Gly Lys Val
 305 310 315 320
 Ile Ala His Leu Lys Ala Thr Gly Gln Tyr Asp Asn Thr Ile Ile Leu
 325 330 335
 Phe Leu Ala Asp Asn Gly Ala Glu Gly Ile Asp Leu Ala Thr Thr Arg
 340 345 350
 Leu Pro Thr Met Ala Ala Arg Leu Lys Ala Ala Asp Asn Arg Leu Asp
 355 360 365
 Asn Leu Gly Ala Ala Ser Ser Tyr Thr Ala Tyr Gly Pro Gly Trp Ala
 370 375 380
 Gln Ala Ala Thr Thr Pro Ser Phe Leu Tyr Lys Gly Phe Thr Ser Glu
 385 390 395 400
 Gly Gly Thr Arg Val Ala Ala Phe Leu Ser Tyr Pro Gly Trp Lys Arg
 405 410 415
 Gln Gly Gly Ile Ser His Ala Tyr Gly Thr Val Met Asp Val Val Pro
 420 425 430
 Thr Leu Val Glu Ala Ala Gly Gly His Trp Arg Gly Ser Ser Tyr Gly
 435 440 445
 Gly Arg Thr Val Gln Pro Val Arg Gly Ser Ser Trp Leu Pro Tyr Leu
 450 455 460
 Arg Gly Gln Ser Lys Ala Val His Gly Pro Lys Glu Ile Val Gly Thr
 465 470 475 480
 Glu Leu Phe Gly Arg Arg Ala Ile Arg Gln Gly Asp Trp Lys Ile Ile
 485 490 495
 Asp Leu Gly Asp Gly Trp Lys Leu Tyr Asn Leu Ala Glu Asp Pro Gly
 500 505 510
 Glu Thr Arg Asp Arg Ala Ala Asp Gln Pro Ala Arg Leu Lys Thr Leu
 515 520 525
 Val Ala Ala Trp Asp Ala Tyr Ala Lys Gly Ala Gly Val Val Met Gln
 530 535 540
 Ser Thr Pro Ala Thr Phe Pro
 545 550

<210> 3

<211> 1624

<212> DNA

<213> 依樂藻假單胞菌(Sphingomonas elodea)

<400> 3

tccacaccaa cgccttcgac tatgtccagc aacgccccga ggcgaccagc gagcaggtcc

60

```

gccgtcaccg cgaagtgttc gcctccacgg cgtacgagac cgagcatccg gtggtgcgcg 120
tccatccggt gaccggcgag aagctgctgc tgctcggcag cttcgtgaag agcttcgtcg 180
ggttcagccg cgaggatttc tcccggctgt tcggcatcct gcaggatcat gcgaccaagc 240
ccgagaacac ggtgcgctgg cgctggagcc cgggcgatgt ggcgatctgg gacaaccgcg 300
ccaccagca ccgcgccatc gcggacttcg gcaagcacgc ccgccatctg cgcggggcga 360
cgatcgccgg cgacgtgccg cgcggcgctg acggcaagcc cagccgggtg ctcaagcccg 420
agccggtcgc cgcagtcgaa gccgcgcgcg cctgaacttc ccgtgcctgg gccgcgctcc 480
cctcggggaa gcgcggctct cttttccgga caatccccag tctagatcca ccccggcgac 540
cttcccgtga agccgatcgc gtccttcgcg ctgcgcgcgc tggccgggct gccgtgctc 600
tgggcgacgc gccgggcagc ggcacctacc cccgcgggcc cgccacgggt gtgcgcgggc 660
agccatctcg accggccggt gcgcatctcc gccagccgct tcgtgatggg cagcagccgc 720
tattatcccg aggaaggccc gccaccgaa accgaggtgc cggcgttcga catcgacga 780
cacgaggtca ccaaccgcca gtgcgcgacc ttcgtggctg caaccggcta tcgaccgaa 840
gcggagaagc ccggcgggcg tgccctcgtg ttcgtaccgc ccaagaccgc gatcgacgaa 900
cccgatccac gccgctgggt gcgtttcgtg cccggcgcaa actggcggca tcccaggggg 960
ccgggcagca gcatcgccgg gcatgaggag gagcccgtgg tcgccgtcac cttcgtcgat 1020
gcccaggcct atgcccgctg ggccgggtcgt gcactgccga gcgaggagca gttcgaggcg 1080
gccgcgcgtg tiggcctcac cgatccggac gcggagccca accccgacca ggcgaacacc 1140
tgccagggca gcttcccaa catgaacgcc aagcgcgacg gctatacggg tcgtgcgcct 1200
gccggtgct tcaagccgaa cggggctggt gcctatgacc tgatcggcaa tgtctgggaa 1260
tggaaccgaga gctggtatct gcccgccac gcgccgttcg cggtcggcga cggatcgccc 1320
ggcaaccgga gcttcgatcc gcgccagccc gaggcgaagg cgcgctgat caaggcgggc 1380
tcctatctct gcgcaacaa ctattgcgc ccgtaccgcc ctgccgcccg ccacgcacaa 1440
gaggagacgc tcgccgctc gcatctggga tttcgacgg tgagccggtc cgcgttcgat 1500
ctcgcgaccg acgcgagcgg gcacgccgc cccgcccgtt cgccgtcctc gagggcgcaa 1560
ggccctgccc tctaategaa tcgctgatgg cgggcccgtc cgagaccccg catgatggtc 1620
gcgc

```

<210> 4

<211> 4716

<212> DNA

<213> 依樂藻假單胞菌(*Sphingomonas elodea*)

<220>

<221> CDS

<222> (1591)...(3450)

<400> 4

```

ctgcgtgatc ggcccggtca cccgtgccgc gacgtcgacc ggctcgcgcg cctcgacgaa 60
gccggtggca tagacgacat cggcggccgg gccgatccgg acgggcgtgc cgaccaccgc 120
gagcggctgg cggagccaga acaggccgcc ggcccccgcg cccgcgatcg ccaccggaac 180
cagccaatag atgcgccgca accgcatgtc cgtctccagc ctctgacctg tgctaccagc 240
agcggccggg ggtggtaact agggaggett ccgcagcttc cctaactgga acgtggccgc 300
tatgcgaac gttcgcccgg gcggtcgcca gcgacagccc ggccgcccga tcccggccgg 360
cgcgctgccg gcgcagtatg gaaaccaccg cccggcatga ctgcgctcct cgatcgttac 420
cgcgccctcg tctccgccgg cgagcttcgc cccgatctgt agcaggaagc cgccgccgcc 480
cgtctcgacg ccttgccgcg ggaactgcag gccgcccgcg gcaagggcag cgtgttgttg 540

```

aagcttaccg gccgcaagcc ggcggtgccg cgcgggctgt atctgtgggg cgatgtcggc	600
cgcggaagtc cgatgctgat ggacctgttc tacgacagcc tcgacatccg ccggaagcgc	660
cgcggtccatt ttcacgaatt catgctcgag gtgcatgagc ggctgaacgt cgagcggcag	720
aaggataccg ccgatccggt ggtcgccgtc gccgatgcgc tcgccagcga cacgcgcctg	780
ctcgcccttg acgaactggt ggtgaacaat ccgcccagcg cgatgatcct ctcgaggttg	840
ttcaccgcga tgatggcaca cgggctcacg gtggctcgcca cctccaatcg cccgcccag	900
gatctctaca aggacgggct caaccgccag ctgttcctgc ccttcacga cctgatcggc	960
gagaagatgg acgtgctcgc gctcaacggc ccggtcgact atcgccgcga ccggtgggc	1020
agcgtaacaca cgtggcttgt gccgaacggg cccgaagcca ccgccaccct ctccgcggcc	1080
ttttccgcc tcaccgacta tccggtcgag gaccgcgccc gcgtgccgtc ctgccaggtg	1140
ccgatccccg gcggccgcga gatcctggtg ccgaaatgcg tgaagggcgt cgccgtcttc	1200
tcgttcaagc ggctgtgcgc cgaagcgcgg ggtgcgccgg actatctcgc catcgacgg	1260
cgcttccata ccgtgatcct ggtcggcac ccaaagctgg gaccggaaaa tcggaacgag	1320
gccgcccgct tcgtcacgct ggtcgacgcg ctctacgagc acaaggtgaa gctgctcgcc	1380
gccgccaatg ccgaaccgga acatctctac gagagtggcg acgggcgggt cgagttcgag	1440
cgcaccgtgt cgcgcctgct cgagatgcag tccgacgact atctggccaa aggccatgga	1500
caggattgat cagaccacgt tgtaagtcca ttctccggt ctacaatgac atcgggctcc	1560
gggttttccc ggaggaacag ggagaagatg atg cgg cga ttg cgc ctt ctc gca	1614
Met Arg Arg Leu Arg Leu Leu Ala	
1 5	
gcc atg ggg ttt gcg tgg ctc gga ata tcc tcg gcc tgg gcg cag ccc	1662
Ala Met Gly Phe Ala Trp Leu Gly Ile Ser Ser Ala Trp Ala Gln Pro	
10 15 20	
gtg ctc gtc gcg gcg gac ctc cgc cag cag cag agc ctc gac ggg ccg	1710
Val Leu Val Ala Ala Asp Leu Arg Gln Gln Gln Ser Leu Asp Gly Pro	
25 30 35 40	
tgg cac tgg tcg atc gat cca tac cgc gat ggt ctg gcc ggt ttc cat	1758
Trp His Trp Ser Ile Asp Pro Tyr Arg Asp Gly Leu Ala Gly Phe His	
45 50 55	
ggc gaa ccg ccc aac cag cgc acc aac cgc gcc gcc gac gtg atc ccc	1806
Gly Glu Pro Pro Asn Gln Arg Thr Asn Arg Ala Ala Asp Val Ile Pro	
60 65 70	
gcc gag gtg atg cag gcc aag ccg cgc acc ttc ttc gaa tat gac atg	1854
Ala Glu Val Met Gln Ala Lys Pro Arg Thr Phe Phe Glu Tyr Asp Met	
75 80 85	
cag cag tcg ccg gta gcc agc ctg ccg gga tcg tgg atc ggc cat tcg	1902
Gln Gln Ser Pro Val Ala Ser Leu Pro Gly Ser Trp Ile Gly His Ser	
90 95 100	
ccc gag atg cgg ctg tac cag ggg ctg gtc tgg tac cag cgc gac ttc	1950
Pro Glu Met Arg Leu Tyr Gln Gly Leu Val Trp Tyr Gln Arg Asp Phe	

105	110	115	120	
acc gcg gcg gca ccc aag ccc ggt aac cgc gtg ttc ctg cgc atc ggc				1998
Thr Ala Ala Ala Pro Lys Pro Gly Asn Arg Val Phe Leu Arg Ile Gly				
125		130	135	
gcg gcc gaa tat cgc tcc tat gtg tat ctc aac ggc aag ccg ctg ggc				2046
Ala Ala Glu Tyr Arg Ser Tyr Val Tyr Leu Asn Gly Lys Pro Leu Gly				
140		145	150	
gag cat cgc ggc ggc tac acg ccg ttc gcc ttc gag gtc acc aag ctg				2094
Glu His Arg Gly Gly Tyr Thr Pro Phe Ala Phe Glu Val Thr Lys Leu				
155		160	165	
ctg cgc ccg ggt cgc aac cag gtg acg atc ggc gtc gat tcg gtg cgc				2142
Leu Arg Pro Gly Arg Asn Gln Val Thr Ile Gly Val Asp Ser Val Arg				
170		175	180	
acc gcc aac gac gtg ccg cca ccg gtg acc gat tgg gag acc tat ggc				2190
Thr Ala Asn Asp Val Pro Pro Pro Val Thr Asp Trp Glu Thr Tyr Gly				
185		190	195	200
ggc atc acc cgc agc gtc acg ctt gtc acc gtg ccc gat acc tat gtc				2238
Gly Ile Thr Arg Ser Val Thr Leu Val Thr Val Pro Asp Thr Tyr Val				
205		210	215	
gac gac gcc ttc gtc cgc ctg acg ccg gac ggc acc cgc atc gcg gta				2286
Asp Asp Ala Phe Val Arg Leu Thr Pro Asp Gly Thr Arg Ile Ala Val				
220		225	230	
tcg gtg aag ctc gaa ggg ccg gcg gcc gcg gga acg gcg gtc agg ttc				2334
Ser Val Lys Leu Glu Gly Pro Ala Ala Ala Gly Thr Ala Val Arg Phe				
235		240	245	
cgc att ccg ggc ctc ggc gcc gtg ctc gac ggc aag acc gat ggc gag				2382
Arg Ile Pro Gly Leu Gly Ala Val Leu Asp Gly Lys Thr Asp Gly Glu				
250		255	260	
ggc aaa tgg gac gcg acg ctg ccg gtg ccg cgt gcg ctg gtc cgc tgg				2430
Gly Lys Trp Asp Ala Thr Leu Pro Val Pro Arg Ala Leu Val Arg Trp				
265		270	275	280
tcg ccg gag aac ccg aag ctc tac gac atc gcc atc gac gcc ggc gcc				2478
Ser Pro Glu Asn Pro Lys Leu Tyr Asp Ile Ala Ile Asp Ala Gly Ala				
285		290	295	
gat cat ttc gcc gat cgc atg ggc ttc cgc acc atc gcg gtg aag ggc				2526

Asp His Phe Ala Asp Arg Met Gly Phe Arg Thr Ile Ala Val Lys Gly	
300 305 310	
gcc gac atc ctg ctc aac ggc aag ccg atc ttc ctg cgc ggc atc tcg	2574
Ala Asp Ile Leu Leu Asn Gly Lys Pro Ile Phe Leu Arg Gly Ile Ser	
315 320 325	
atg cac gag gaa gaa ctg ggc gcc gat ccg gtt cgc gcg atg acg ccg	2622
Met His Glu Glu Glu Leu Gly Ala Asp Pro Val Arg Ala Met Thr Pro	
330 335 340	
gca gcc gcc cgc gcc ctg ctg ggc gag atc aaa tat ggc ctg cac ggc	2670
Ala Ala Ala Arg Ala Leu Leu Gly Glu Ile Lys Tyr Gly Leu His Gly	
345 350 355 360	
aat ttc gtg cgg ctg gcg cac tat ccg cac agc gag tcg acc acc cgc	2718
Asn Phe Val Arg Leu Ala His Tyr Pro His Ser Glu Ser Thr Thr Arg	
365 370 375	
atg gcg gac gag atg ggc ctg ctg gtg tgg agc gag gtg ccc ctc tac	2766
Met Ala Asp Glu Met Gly Leu Leu Val Trp Ser Glu Val Pro Leu Tyr	
380 385 390	
tgg ctg gtc aac tgg aac aac ccg gac acg ctg gcc gac gcc cgt cgc	2814
Trp Leu Val Asn Trp Asn Asn Pro Asp Thr Leu Ala Asp Ala Arg Arg	
395 400 405	
atc cag gcc gag aac atc cgc cgc gac cgc aac cgt gcc tcg gtc gtg	2862
Ile Gln Ala Glu Asn Ile Arg Arg Asp Arg Asn Arg Ala Ser Val Val	
410 415 420	
ctg tgg agc gtc gcc aac gag acg ccg acc aac gat gcg cgc aac gcc	2910
Leu Trp Ser Val Ala Asn Glu Thr Pro Thr Asn Asp Ala Arg Asn Ala	
425 430 435 440	
ttc ctg cgc acg atg atc gcc gat gtc cgc gcg ctc gac tcc agc cgt	2958
Phe Leu Arg Thr Met Ile Ala Asp Val Arg Ala Leu Asp Ser Ser Arg	
445 450 455	
ctc gtc acc gcc gcg ctg ctc agc ggt cgc gag ggc aag agc atc atg	3006
Leu Val Thr Ala Ala Leu Leu Ser Gly Arg Glu Gly Lys Ser Ile Met	
460 465 470	
aag atc gac gat ccg ctg gcc aac gac ctc gat gtc atg gcg atc aac	3054
Lys Ile Asp Asp Pro Leu Ala Asn Asp Leu Asp Val Met Ala Ile Asn	
475 480 485	

acc tat aat ggt tgg tac tcc gac gac gcg ctg gag gat ctg gcc agc Thr Tyr Asn Gly Trp Tyr Ser Asp Asp Ala Leu Glu Asp Leu Ala Ser 490 495 500	3102
cag gaa tgg cgc gga ccg gcg aac aag ccg ctg atc ttc tcc gaa ttc Gln Glu Trp Arg Gly Pro Ala Asn Lys Pro Leu Ile Phe Ser Glu Phe 505 510 515 520	3150
ggc gcc gac gcc cgc gcc ggc tat cac gac ccg gtg gcg agc ccg cac Gly Ala Asp Ala Arg Ala Gly Tyr His Asp Pro Val Ala Ser Pro His 525 530 535	3198
aag ttc agc gag gag tat cag gcc gac tat tac cgc gcg aca ctg gcg Lys Phe Ser Glu Glu Tyr Gln Ala Asp Tyr Tyr Arg Ala Thr Leu Ala 540 545 550	3246
atg gcc gcc aag gtg ccg ttc ctg cgc ggc atg agc ccc tgg atc ctc Met Ala Ala Lys Val Pro Phe Leu Arg Gly Met Ser Pro Trp Ile Leu 555 560 565	3294
aag gac ttc cgc tcg ccg cgg cgc cag cac ccg atc tat cag cag ggc Lys Asp Phe Arg Ser Pro Arg Arg Gln His Pro Ile Tyr Gln Gln Gly 570 575 580	3342
tgg aac cgc aag ggc ctg atc tcc gag aca ggc cag cac aag ctg gcg Trp Asn Arg Lys Gly Leu Ile Ser Glu Thr Gly Gln His Lys Leu Ala 585 590 595 600	3390
ttc gat gtg ctc gca ggc gat tat gcc aag cgc gag gct gcg gac gcg Phe Asp Val Leu Ala Gly Asp Tyr Ala Lys Arg Glu Ala Ala Asp Ala 605 610 615	3438
gcg aag aag tga ctgtccaggc ccctctcgca tgcgggaggg gcctagggtg Ala Lys Lys *	3490
cggaggccgg tgtcctctgc acggttggcg ggaagccgca gggaagtcgc cagaatcccg cagcggcgcg aaaccgagca aaatactctc tattgtcttt gcgaatgaat tgcaaagata atcctgcacc tatccccaa cacgggttgc agcgtcgcta ttataggcct atcccgcccc cgcttttcgcg gcgcatcgtg atgcggccgc tttgcttggga tccaaccaag gagattccat ggctcgcaag aagatcgcg tgatcggctc cgcatgac ggtaggaccc tcgcgaccc cgctgcaatc aaggaactgg gcgatatcgt cctgttcgac attgccgagg gcacgccgca gggcaaggcg ctgcacatcg cacagtccgg accggtcgaa ggcttcgatg ccaacctcaa ggcgcgcaac agctacgagg acattgcggg cgccgacgtc tgcatcgta ccgccggtat cccgcgcaag ccgggcatga gccgcgacga tcttctcaag accaacctgg gcgtgatgaa ggccgtgggc gagggcatcg ccgcgcacgc gcccgcgagc ttcgtgatct gcatcacaa cccgctcgac gcgatggtgt gggcgctgcg cgagttctcg ggctgcccgc accagaaggt	3550 3610 3670 3730 3790 3850 3910 3970 4030 4090 4150

```

cgtcggcatg gccggcgtgc tcgactcggc gcgcttccgc cacttcctcg ccgaggaatt 4210
caacgtctcg gtcgaggacg tcaccgcctt cgtgctgggc ggacacggcg acaccatggt 4270
cccgtgatc gagtattcga ccgtcgccgg catcccgggtg cccgacctga tcaagatggg 4330
ctgggtccacc caggagcgca tcgacgcat cgtcgcgcgc acccgctcgg gcggcggcga 4390
gatcgtcgcg ctgtcaaga ccggctcggc ctattatgcg ccggccacca gcgcgatcgc 4450
gatggccgag agctatctga aggacaagaa gcgcctgctt ccctgtgccg cgcacctcac 4510
cggccagtac ggcgctcgacg atctgtacgt cggcgtgccg atcgtcatcg gcaaggacgg 4570
cgtcgagcgc atcgtcgaga tcgagctgaa cgccacggcg aagcagaatt tcgacgtctc 4630
ggtcgatgcg gtcaaggaac tggtcgcagc atgcaagtcg atcgacgcct cgctcgcctg 4690
atcctacccg cgctcgtggc ggtgcc 4716

```

<210> 5

<211> 619

<212> PRT

<213> 依樂藻假單胞菌(*Sphingomonas elodea*)

<400> 5

```

Met Arg Arg Leu Arg Leu Leu Ala Ala Met Gly Phe Ala Trp Leu Gly
1          5          10          15
Ile Ser Ser Ala Trp Ala Gln Pro Val Leu Val Ala Ala Asp Leu Arg
20        25        30
Gln Gln Gln Ser Leu Asp Gly Pro Trp His Trp Ser Ile Asp Pro Tyr
35        40        45
Arg Asp Gly Leu Ala Gly Phe His Gly Glu Pro Pro Asn Gln Arg Thr
50        55        60
Asn Arg Ala Ala Asp Val Ile Pro Ala Glu Val Met Gln Ala Lys Pro
65        70        75        80
Arg Thr Phe Phe Glu Tyr Asp Met Gln Gln Ser Pro Val Ala Ser Leu
85        90        95
Pro Gly Ser Trp Ile Gly His Ser Pro Glu Met Arg Leu Tyr Gln Gly
100       105       110
Leu Val Trp Tyr Gln Arg Asp Phe Thr Ala Ala Ala Pro Lys Pro Gly
115       120       125
Asn Arg Val Phe Leu Arg Ile Gly Ala Ala Glu Tyr Arg Ser Tyr Val
130       135       140
Tyr Leu Asn Gly Lys Pro Leu Gly Glu His Arg Gly Gly Tyr Thr Pro
145       150       155       160
Phe Ala Phe Glu Val Thr Lys Leu Leu Arg Pro Gly Arg Asn Gln Val
165       170       175
Thr Ile Gly Val Asp Ser Val Arg Thr Ala Asn Asp Val Pro Pro Pro
180       185       190
Val Thr Asp Trp Glu Thr Tyr Gly Gly Ile Thr Arg Ser Val Thr Leu
195       200       205
Val Thr Val Pro Asp Thr Tyr Val Asp Asp Ala Phe Val Arg Leu Thr
210       215       220
Pro Asp Gly Thr Arg Ile Ala Val Ser Val Lys Leu Glu Gly Pro Ala
225       230       235       240

```

Ala Ala Gly Thr Ala Val Arg Phe Arg Ile Pro Gly Leu Gly Ala Val
245 250 255
Leu Asp Gly Lys Thr Asp Gly Glu Gly Lys Trp Asp Ala Thr Leu Pro
260 265 270
Val Pro Arg Ala Leu Val Arg Trp Ser Pro Glu Asn Pro Lys Leu Tyr
275 280 285
Asp Ile Ala Ile Asp Ala Gly Ala Asp His Phe Ala Asp Arg Met Gly
290 295 300
Phe Arg Thr Ile Ala Val Lys Gly Ala Asp Ile Leu Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Pro Ile Phe Leu Arg Gly Ile Ser Met His Glu Glu Glu Leu Gly Ala
325 330 335
Asp Pro Val Arg Ala Met Thr Pro Ala Ala Ala Arg Ala Leu Leu Gly
340 345 350
Glu Ile Lys Tyr Gly Leu His Gly Asn Phe Val Arg Leu Ala His Tyr
355 360 365
Pro His Ser Glu Ser Thr Thr Arg Met Ala Asp Glu Met Gly Leu Leu
370 375 380
Val Trp Ser Glu Val Pro Leu Tyr Trp Leu Val Asn Trp Asn Asn Pro
385 390 395 400
Asp Thr Leu Ala Asp Ala Arg Arg Ile Gln Ala Glu Asn Ile Arg Arg
405 410 415
Asp Arg Asn Arg Ala Ser Val Val Leu Trp Ser Val Ala Asn Glu Thr
420 425 430
Pro Thr Asn Asp Ala Arg Asn Ala Phe Leu Arg Thr Met Ile Ala Asp
435 440 445
Val Arg Ala Leu Asp Ser Ser Arg Leu Val Thr Ala Ala Leu Leu Ser
450 455 460
Gly Arg Glu Gly Lys Ser Ile Met Lys Ile Asp Asp Pro Leu Ala Asn
465 470 475 480
Asp Leu Asp Val Met Ala Ile Asn Thr Tyr Asn Gly Trp Tyr Ser Asp
485 490 495
Asp Ala Leu Glu Asp Leu Ala Ser Gln Glu Trp Arg Gly Pro Ala Asn
500 505 510
Lys Pro Leu Ile Phe Ser Glu Phe Gly Ala Asp Ala Arg Ala Gly Tyr
515 520 525
His Asp Pro Val Ala Ser Pro His Lys Phe Ser Glu Glu Tyr Gln Ala
530 535 540
Asp Tyr Tyr Arg Ala Thr Leu Ala Met Ala Ala Lys Val Pro Phe Leu
545 550 555 560
Arg Gly Met Ser Pro Trp Ile Leu Lys Asp Phe Arg Ser Pro Arg Arg
565 570 575
Gln His Pro Ile Tyr Gln Gln Gly Trp Asn Arg Lys Gly Leu Ile Ser
580 585 590
Glu Thr Gly Gln His Lys Leu Ala Phe Asp Val Leu Ala Gly Asp Tyr
595 600 605
Ala Lys Arg Glu Ala Ala Asp Ala Ala Lys Lys

610

615

<210> 6

<211> 2862

<212> DNA

<213> 依樂藻假單胞菌(*Sphingomonas elodea*)

<400> 6

ctgctgatc	ggcgccgtca	cccgtgccgc	gacgtcgacc	ggctcgcgcg	cctcgacgaa	60
gccggtggca	tagacgacat	cggcgccggg	gccgatccgg	acgggctgtc	cgaccaccgc	120
gagcggctgg	cggagccaga	acaggccgcc	ggcgcccgcc	cccgcgatcg	ccaccggaac	180
cagccaatag	atgcgccgca	accgcatgtc	ctctccagc	ctcgtgcctg	tgctaccagc	240
agcggccggg	ggtggttaact	agggaggctt	ccgcagcttc	cctaactgga	acgtggccgc	300
tatgcgcaac	gttcgcccgg	gcggtcgcca	gcgacagccc	ggccgcccga	tcccgccggg	360
cgcgctgccg	gcgcagtatg	gaaaccaccg	cccggcatga	ctcgcgtcct	cgatcgttac	420
cgcgccctcg	tctccgccgg	cgagcttcgc	cccgatcgtg	agcaggaagc	cgccgccgcc	480
cgtctcgacg	ccctggccgc	ggaactgcag	gccgcccgcg	gcaagggcag	cgtgttgttg	540
aagcttaccg	gccgcaagcc	ggcggtgccg	cgcgggctgt	atctgtgggg	cgatgtcggc	600
cgcggaagt	cgatgctgat	ggacctgttc	tacgacagcc	tcgacatccg	ccggaagcgc	660
cgctccatt	ttcacgaatt	catgctcgag	gtgcatgagc	ggctgaacgt	cgagcggcag	720
aaggataccg	ccgatccggg	ggtcgccgtc	gccgatgcgc	tcgccagcga	cacgcgcctg	780
ctcgcccttg	acgaactggg	ggtgaacaat	ccgcccagcg	cgatgatcct	ctcgaggttg	840
ttcaccgcga	tgatggcaca	cgggctcacg	gtggctcgcca	cctccaatcg	cccgcccaag	900
gatctctaca	aggacgggct	caaccgccag	ctgttcctgc	ccttcacgca	cctgatcggc	960
gagaagatgg	acgtgctcgc	gctcaacggc	ccggctcgact	atcgccgcga	ccggctgggc	1020
agcgtacaca	cgtggcttgt	gccgaacggg	cccgaagcca	ccgccaccct	ctccgcggcc	1080
tttttccgcc	tcaccgacta	tccggtcgag	gaccgcgccc	gcgtgccgtc	ctgccagggtg	1140
ccgatccccg	gcggccgcga	gatacctggtg	ccgaaatgcg	tgaaggcggt	cgccgtcttc	1200
tcgttcaagc	ggctgtgcgg	cgaagcgcg	ggtgcgcggg	actatctcgc	catcgacagg	1260
cgcttccata	ccgtgatcct	ggtcggcata	ccaaagctgg	gaccggaaaa	tcggaacgag	1320
gccgcccgt	tcgtcacgct	ggtcgacgcg	ctctacgagc	acaagggtga	gctgctcgcc	1380
gccgccaatg	ccgaacccga	acatctctac	gagagtggcg	acgggcggtt	cgagttcgag	1440
cgcaccgtgt	cgccctgtgt	cgagatgcag	tccgacgact	atctggccaa	aggccatgga	1500
caggattgat	cagaccacgt	tgtaagtcca	ttctcccgtt	ctacaatgac	atcgggctcc	1560
gggttttccc	ggaggaacag	ggagaagtct	agatgactgt	ccaggcccct	ctcgcatgcg	1620
ggaggggcct	aggggtcgga	ggccgggtgtc	ctctgcacgg	ttggcgggaa	gccgcaggga	1680
agtcgccaga	atcccgcagc	ggcgcgaaac	cgagcaaaat	actctctatt	gctcttgcga	1740
atgaattgca	aagataatcc	tgcacctatc	ccccaacacg	ggttgcagcg	tcgctattat	1800
aggcctatcc	cgccccgct	ttcgcgcg	atcgtgatgc	ggccgctttg	cttggatcca	1860
accaaggaga	ttccatggct	cgcaagaaga	tcgcgtgat	cggctccggc	atgatcggtg	1920
gcaccctcgc	gcacctcgt	gcaatcaagg	aactgggcga	tatcgtcctg	ttcgacattg	1980
ccgagggcac	gccgcagggc	aaggcgctcg	acatcgacac	gtccggaccg	gtcgaaggct	2040
tcgatgccaa	cctcaagggc	gcgaacagct	acgaggacat	tgccggcgcc	gacgtctgca	2100
tcgtcaccgc	cggtatcccg	cgcaagccgg	gcatgagccg	cgacgatctt	ctcaagacca	2160
acctgggcgt	gatgaaggcc	gtgggcgagg	gcatcgccgc	gcacgcgccc	gacgcgttcg	2220
tgatctgcat	caccaaccgg	ctcgacgcga	tgggtgtggc	gctgcgcgag	ttctcggggc	2280
tgccgcacca	gaaggctcgt	ggcatggccg	gcgtgctcga	ctcggcgcgc	ttccgccact	2340

tcctcgccga ggaattcaac gtctcggtcg aggacgtcac cgccttcgtg ctgggcggac	2400
acggcgacac catggtcccg gtgatcgagt attcgaccgt cgccggcatc ccggtgcccg	2460
acctgatcaa gatgggctgg tccaccagg agcgcatcga cgccatcgtc gcgcgcaccc	2520
gctcgggcgg cggcgagatc gtgcgcgtgc tcaagaccgg ctcggcctat tatgcgccgg	2580
ccaccagcgc gatcgcgatg gccgagagct atctgaagga caagaagcgc ctgcttcctt	2640
gtgccgcgca cctcaccggc cagtacggcg tcgacgatct gtacgtcggc gtgccgatcg	2700
tcatcgcaaa ggacggcgtc gagcgcatcg tcgagatcga gctgaacgcc acggcgaagc	2760
agaatttcga cgtctcggtc gatgcggtca aggaactggt cgacgatgc aagtcgatcg	2820
acgcctcgct cgctgatcc taccgcgct cgtggcggtg cc	2862

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> 依樂藻假單胞菌(*Sphingomonas elodea*)

<400> 7

aactgcagac acgtggcttg tgccgaac

28

<210> 8

<211> 32

<212> DNA

<213> 依樂藻假單胞菌(*Sphingomonas elodea*)

<400> 8

ggctctagac ttctccctgt tcctccggga aa

32

<210> 9

<211> 28

<212> DNA

<213> 依樂藻假單胞菌(*Sphingomonas elodea*)

<400> 9

tttctagatg actgtccagg cccctctc

28

<210> 10

<211> 28

<212> DNA

<213> 依樂藻假單胞菌(*Sphingomonas elodea*)

<400> 10

tcgagctcca atgtcctcgt agctgttc

28

<210> 11

<211> 28

<212> DNA

<213> 依樂藻假單胞菌(*Sphingomonas elodea*)

<400> 11
ccgagctcaa cgccttcgac tatgtcca 28

<210> 12
<211> 28
<212> DNA
<213> 依樂藻假單胞菌(*Sphingomonas elodea*)

<400> 12
cctctagact ggggattgtc cggaaaag 28

<210> 13
<211> 28
<212> DNA
<213> 依樂藻假單胞菌(*Sphingomonas elodea*)

<400> 13
cgtctagatc caccccggcg accttccc 28

<210> 14
<211> 32
<212> DNA
<213> 依樂藻假單胞菌(*Sphingomonas elodea*)

<400> 14
tatagcatgc ggcgaccacg ggctcctcct ca 32

五、中文發明摘要：

本發明係關於在某些牛奶產品中與對-甲酚(para-cresol)生產有關之蛋白質之突變性失活作用，進而導致味道與氣味的改良。生產結冷膠(gellan gum)之細菌所產生酵素經一段時間後會導致不受歡迎的對-甲酚形成。由於結冷膠典型地係以一種相當未純化型態使用，因此酵素係與結冷膠一起加入至牛奶。酵素的失活作用係一種不需要任何額外純化或加工過程而用以去除酵素之基因方法。

六、英文發明摘要：

十一、圖式：

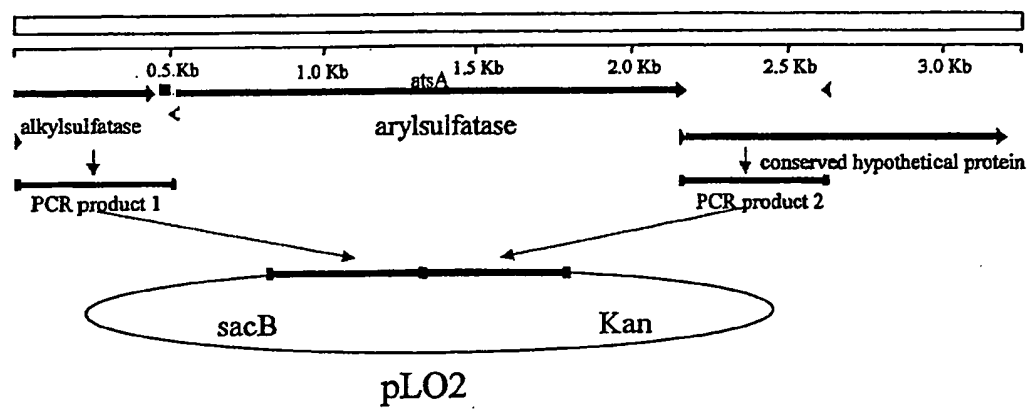


圖 1

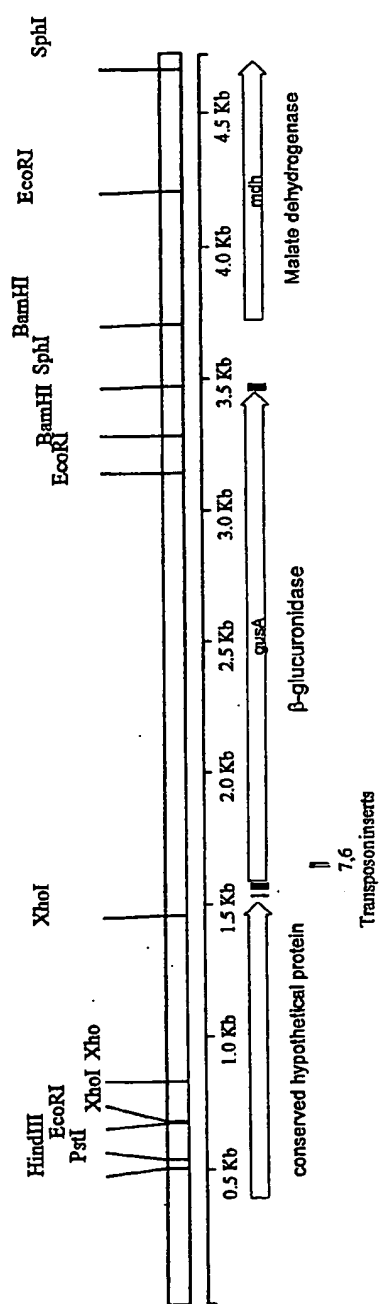


圖 2

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：

(無元件符號說明)

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)

十、申請專利範圍：

1. 一種組合物，其包括實質上不含具催化活性之芳香硫酸酯酶及實質上不含變性劑及實質上不含芳香硫酸酯酶蛋白質之結冷膠(gellan gum)。
2. 根據請求項1之組合物，其亦實質上不含具催化活性之 β -葡糖醛酸酶蛋白質及實質上不含 β -葡糖醛酸酶蛋白質。
3. 根據請求項1或2之組合物，其係為一依樂藻假單胞菌(*Sphingomonas elodea*)之培養液。
4. 根據請求項1或2之組合物，其係為一依樂藻假單胞菌之經沉澱培養液。
5. 根據請求項1或2之組合物，其係為一無菌牛奶產品。
6. 根據請求項5之組合物，其係為冰淇淋。
7. 根據請求項5之組合物，其係為冷凍酸乳酪。
8. 根據請求項5之組合物，其係為布丁。
9. 根據請求項5之組合物，其係為發泡乳製產品。
10. 根據請求項5之組合物，其係為咖啡奶油。
11. 根據請求項5之組合物，其係為法式焦糖焗蛋。
12. 根據請求項5之組合物，其係為乳製飲料。