



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I542685 B

(45)公告日：中華民國 105 (2016) 年 07 月 21 日

(21)申請案號：100140808

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 11 月 09 日

(51)Int. Cl. : C12N1/20 (2006.01)

C12N15/01 (2006.01)

C12R1/145 (2006.01)

(30)優先權：2010/11/10 歐洲專利局 10306234.5

2010/11/10 美國 61/412,162

(71)申請人：代謝探索公司(法國) METABOLIC EXPLORER (FR)

法國

(72)發明人：裴基 瑞勒 FIGGE, RAINER (DE)

(74)代理人：黃慶源；陳彥希

(56)參考文獻：

TW 200904983A

G onzalez-Pajuelo M. et. al., Metabolic engineering of Clostridium acetobutylicum for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol, Metabolic engineering 7 (2005) 329-336.

審查人員：蔡付樺

申請專利範圍項數：8 項 圖式數：1 共 38 頁

(54)名稱

供使用高甘油濃度製備 1,3-丙二醇用之微生物

MICROORGANISMS FOR 1,3-PROPANEDIOL PRODUCTION USING HIGH GLYCERINE CONCENTRATION

(57)摘要

本發明是有關於一種用於製備 1,3-丙二醇(PDO)的丙酮丁醇梭菌族群，其中該族群含有至少一種丙酮丁醇梭菌種的菌株，該丙酮丁醇梭菌種的菌株具有選自表 1 中所鑑別之突變的突變，其中該等突變的相對百分比是選自於特定基因。

The present invention is related to a population of Clostridium acetobutylicum useful for the production of 1,3-propanediol (PDO), wherein said population comprises at least one strain of a Clostridium acetobutylicum sp. comprising mutations selected among the mutations identified in table 1, wherein relative percentages of said mutations are selected among specific genes.

## 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100140808

※申請日：100.11.9

※IPC 分類：

C12N 1/20

C12N 15/01

C12R 1/145

一、發明名稱：(中文/英文)

供使用高甘油濃度製備 1,3-丙二醇用之微生物  
MICROORGANISMS FOR 1,3-PROPANEDIOL  
PRODUCTION USING HIGH GLYCERINE  
CONCENTRATION

二、中文發明摘要：

本發明是有關於一種用於製備 1,3-丙二醇(PDO)的丙酮丁醇梭菌族群，其中該族群含有至少一種丙酮丁醇梭菌種的菌株，該丙酮丁醇梭菌種的菌株具有選自表 1 中所鑑別之突變的突變，其中該等突變的相對百分比是選自於特定基因。

三、英文發明摘要：

The present invention is related to a population of *Clostridium acetobutylicum* useful for the production of 1,3-propanediol (PDO), wherein said population comprises at least one strain of a *Clostridium acetobutylicum* sp. comprising mutations selected among the mutations identified in table 1, wherein relative percentages of said mutations are selected among specific genes.

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：無

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無

## 六、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明涉及一種供製備 1,3-丙二醇用之經修飾的新穎微生物。此微生物適於具有高甘油含量且特別是具有高濃度工業甘油的培養基中生長，並製備 1,3-丙二醇。本發明亦涉及該經改造微生物的培養條件以及製備 1,3-丙二醇之方法。最後，本發明涉及由該經修飾微生物製備的 1,3-丙二醇及其應用。

### 【先前技術】

1,3-丙二醇 (PDO)，亦被稱為三亞甲基二醇 (trimethylene glycol) 或丙二醇 (propylene glycol)，是最為熟知的發酵產物之一。1,3-丙二醇最早是在 1881 年由 August Freund 在含有巴氏梭菌 (*Clostridium pasteurianum*) 的甘油發酵培養物中被鑑定出來。PDO 是甘油發酵的一種典型產物，且已在其他有機物質的厭氧轉化中被發現到。僅有非常少數的生物(它們全為細菌)能夠形成 PDO。這些生物包括桿菌屬(肺炎桿菌；*K. pneumoniae*)、腸桿菌(聚集腸桿菌；*E. agglomerans*)與檸檬酸桿菌(佛氏檸檬酸桿菌；*C. freundii*)的腸內細菌 (enterobacteria)、乳酸桿菌(短毛乳酸桿菌(*L. brevis*)和布氏乳酸桿菌(*L. buchneri*))及梭菌的丁酸梭菌(*C. butyricum*)與巴氏梭菌(*C. pasteurianum*)群。

作為雙功能性有機化合物的 PDO 可用於許多合成

反應中，特別是作為用於聚縮合反應的單體以生產聚酯、聚醚、聚胺甲酸酯，以及特別是聚對苯二甲酸丙二酯(trimethylene terephthalate, PTT)。這些結構及反應性特點在化妝品、紡織品(衣服、纖維或地板材料)或塑膠(汽車工業及包裝或塗層)中有各不相同的應用。

PDO 可藉由不同的化學路徑製備，但是它們會產生含有極富污染性物質的廢物流，且製造成本甚高。因此，以化學的方式製備 PDO 可能無法與石化工業上使用的二醇(例如 1,2-乙二醇、1,2-丙二醇與 1,4-丁二醇)相競爭。為增加競爭力，杜邦(DuPont)在 1995 年針對葡萄糖生物轉化成 PDO 開始一項研究計畫。儘管此製程對環境是友善的，但它仍具有下列缺點：i)使用非常昂貴的輔因子，維生素 B12，以及 ii)因為製備菌株的不穩定性而成為一個不連續的製程。

基於生質柴油產業所產生的大量甘油具有可利用性，一種具有更高碳產率的連續、無維生素 B12 的製程正是有益的。

在本技藝中，已知可以自甘油製備 PDO，甘油是製備生質柴油的一種非所需副產物，其含有大約 80-85% 的甘油混合著鹽類和水。

丁酸梭菌在先前被描述為能夠在批式與兩階段連續發酵中生長並自工業甘油製備 PDO (Papanikolaou *et al.*, 2000)。但是，在最高甘油濃度下，在稀釋率  $0.02 \text{ h}^{-1}$  下所得到的最大 PDO 滴定量為  $48.1 \text{ g.L}^{-1}$ ，表示生產率

為  $0.9 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ 。在進料培養基中以最高甘油濃度  $90 \text{ g.L}^{-1}$  並在有酵母萃取物(一種含有機氮的昂貴化合物，習於該技藝者已知有助於增加細菌生質生產)存在下進行培養。

WO2006/128381 申請案揭示甘油供利用製備 PDO 的天然生物(諸如肺炎桿菌、丁酸梭菌與巴氏梭菌)進行批式及進料批式培養來製備 PDO 的用途。此外，WO2006/128381 中所使用的培養基亦含有酵母萃取物。如該專利申請案中所述，所達到的最高生產率是介於  $0.8$  至  $1.1 \text{ g.l}^{-1}.\text{h}^{-1}$ 。

在 Gonzalez-Pajuelo *et al.*, 2005 中已描述經修飾成含有來自丁酸梭菌(被稱為丙酮丁醇梭菌 (*C. acetobutylicum*)DG1 pSPD5)之維生素 B12 獨立型甘油脫水酶以及 PDO-去氫酶之丙酮丁醇梭菌的表現。此菌株起初在含有純甘油最高達  $120 \text{ g.l}^{-1}$  的進料培養基中生長並製備 PDO。另外，對於含有純或工業甘油最高達  $60 \text{ g.l}^{-1}$  的進料培養基的分析並未指出有任何差異。這些結果是在有酵母萃取物存在下所得。再者，未在工業甘油濃度高於  $60 \text{ g.l}^{-1}$  的情況下進行過測試。當野生型丁酸梭菌與經修飾的微生物「丙酮丁醇梭菌 DG1 pSPD5」相比較時，觀察到行為整體上是相似的。

在 PCT/EP2010/056078 專利申請案中，發明人已描述一種使丙酮丁醇梭菌 DG1 pSPD5 的菌株(諸如 Gonzalez-Pajuelo *et al.* (2005)中所述)適應於生長在具

有高濃度工業甘油且沒有酵母萃取物的培養基中的方法。所得到的菌株能夠在含有工業甘油高達  $120 \text{ g.l}^{-1}$  的培養基中以 PDO 至高為  $53.5 \text{ g.L}^{-1}$  的滴定量，至高為  $0.53 \text{ g.g}^{-1}$  的產量且至高為  $2.86 \text{ g.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$  的產率來製備 PDO。

在本專利申請案中，發明人強調經適應的微生物之遺傳修飾供製備 PDO 用，該微生物是諸如在有高濃度工業甘油存在下適應後所得。

### 【發明內容】

本發明涉及一種用於製備 1,3-丙二醇(PDO)的丙酮丁醇梭菌族群，其中該族群含有至少一種丙酮丁醇梭菌種的菌株，該丙酮丁醇梭菌種的菌株具有選自於表 1 中所鑑別之突變的突變，其中該等突變的相對百分比是選自於下列基因家族：

基因家族及功能	最低%
轉錄轉譯調控	12-15
轉運蛋白	10-12
假定蛋白	8-11
能量代謝	7-10
基因間	7-10
醣類代謝	5-7
膜蛋白	2-5
核酸代謝	2-5
胺基酸代謝	1-3
細胞分裂	1-3
孢子化	1-3
細胞附著	0-1
纖維素酶	0-1

甘油代謝	0-1
脂質代謝	0-1
蛋白酶/肽酶	0-1
細胞運動	0-1

特別地，本發明之族群包含至少一種選自於由下列所構成之群組中的丙酮丁醇梭菌菌株：

- 菌株 DG1 pSPD5 PD0001VE05c01，以登錄編號 I-4378 寄存於 CNCM；
- 菌株 DG1 pSPD5 PD0001VE05c05，以登錄編號 I-4379 寄存於 CNCM；
- 菌株 DG1 pSPD5 PD0001VE05c07，以登錄編號 I-4380 寄存於 CNCM。

CNCM 表示位於巴黎巴斯德研究所的「國家微生物菌種保存中心」。

在本發明的一個特定具體例中，該族群包含經進一步突變而具有下列點突變中之至少一者的上述菌株：

- 在丙酮丁醇梭菌基因體的位置 198989 之基因座 CA\_C0175 處以 T 取代 C，該基因座編碼一種被預測是糖磷酸異構酶，是一種真核生物葡萄糖激酶調節子(醣類代謝)的同源物
- 在丙酮丁醇梭菌基因體的位置 1444099 之基因座 CA\_C1300 處以 A 取代 G，該基因座編碼 RNA 聚合酶  $\sigma$  因子 RPOD (轉錄及轉譯調節)
- 在丙酮丁醇梭菌基因體的位置 2787387 之基因座 CA\_C2670 處以 T 取代 C，該基因座編碼 Glu-tRNAGln

醯胺轉移酶次單位 A (轉錄及轉譯調節)

- 在丙酮丁醇梭菌基因體的位置 3512658 之基因座 CA\_C3339 處以 T 取代 C，該基因座編碼 ABC 轉運蛋白的 ATP 酶組分(兩個 ATP 酶結構域)

- 在丙酮丁醇梭菌基因體的位置 1752341 之基因座 CA\_C1610 處以 T 取代 C，該基因座編碼支鏈胺基酸通透酶(轉運蛋白)。

本發明亦涉及一種製備 1,3-丙二醇的方法，其包含在含有甘油作為唯一碳源的培養基中培養本發明之用以製備 1,3-丙二醇(POD)的丙酮丁醇梭菌族群，並由該培養基回收所製備之 1,3-丙二醇。

#### 【實施方式】

*用以製備 1,3-丙二醇(POD)之丙酮丁醇梭菌族群*

用以製備 1,3-丙二醇(POD)的丙酮丁醇梭菌族群表示一或多個針對自作為唯一碳源之甘油製備 1,3-丙二醇的經遺傳修飾丙酮丁醇梭菌菌株。此等菌株在該技藝中為已知的，並且特別是揭示於 WO200104324 和 WO2008052595 申請案中。依據本發明之族群可以是數個菌株的組合(其中大多數包含如本發明之突變)以及一個單一菌株，且特別是分別以登錄編號 I-4378、I-4379、I-4380 寄存於 CNCM 的菌株 DG1 pSPD5 PD0001VE05c01、DG1 pSPD5 PD0001VE05c05 或 DG1 pSPD5 PD0001VE05c07，或是菌株 DG1 pSPD5

PD0001VE05c08。

突變是在菌株基因體中的核苷酸改變，更特別地是當與母代菌株 DG1 pSPD5 PD0001VT 相比較時所鑑定出的 SNP (「單一核苷酸多型性」)。該菌株揭示於 WO200104324 中並且是源自於菌株 ATCC824，菌株 ATCC824 的基因體序列已被公開(Nölling *et al.*, 2001)。

突變可能發生在編碼序列或非編碼序列中。這些突變可能是同義的(其中未修飾對應胺基酸)或非同義的(對應胺基酸被改變)。同義突變對於轉譯蛋白質的功能不具任何影響力，但若突變序列位在調節因子的結合位點時，可能對於對應基因或甚至其他基因的調節具影響力。非同義突變對於轉譯蛋白質的功能以及調節具有影響力，端視突變序列的特徵而定。

用以製備 1,3-丙二醇的丙酮丁醇梭菌族群較佳地包含彼等寄存菌株中的一者，該菌株含有額外修飾，下列修飾中的至少一者：

- 在丙酮丁醇梭菌基因體的位置 198989 之基因座 CA\_C0175 處以 T 取代 C，該基因座編碼一種被預測是糖磷酸異構酶，是一種真核生物葡萄糖激酶調節子(醣類代謝)的同源物

- 在丙酮丁醇梭菌基因體的位置 1444099 之基因座 CA\_C1300 處以 A 取代 G，該基因座編碼 RNA 聚合酶  $\sigma$  因子 RPOD (轉錄及轉譯調節)

- 在丙酮丁醇梭菌基因體的位置 2787387 之基因

座 CA\_C2670 處以 T 取代 C，該基因座編碼 Glu-tRNA<sup>Gln</sup> 醯胺轉移酶次單位 A (轉錄及轉譯調節)

- 在丙酮丁醇梭菌基因體的位置 3512658 之基因座 CA\_C3339 處以 T 取代 C，該基因座編碼 ABC 轉運蛋白的 ATP 酶組分(兩個 ATP 酶結構域)

- 在丙酮丁醇梭菌基因體的位置 1752341 之基因座 CA\_C1610 處以 T 取代 C，該基因座編碼支鏈胺基酸通透酶(轉運蛋白)。

其較佳地包含該等突變的任一組合，該組合含有此等突變之一、二、三、四或五者。

本發明之菌株族群能夠在含有甘油高達 120 g.L<sup>-1</sup> 且特別是工業甘油的培養基中生長。

本發明之菌株族群可在如 WO2008040387 申請案中所揭示的梭菌中使用突變誘發及/或基因置換的標準技術而獲得，該申請案的內容併入本文中做為參考資料。

習於本技藝者可由 WO200104324 和 WO2008052595 申請案中所揭示的菌株之一以及使用分別以登錄編號 I-4378、I-4379、I-4380 寄存於 CNCM 的 c01、c05 或 c07 開始並且引入額外的突變。

在一個較佳具體例中，本發明之族群包含菌株 DG1 pSPD5 PD0001VE05c08，其突變鑑別於表 1 中。習於該技藝者瞭解如何由分別以登錄編號 I-4378、I-4379、I-4380 寄存於 CNCM 的菌株 DG1 pSPD5

PD0001VE05c01、DG1 pSPD5 PD0001VE05c05 或 DG1 pSPD5 PD0001VE05c07 之一者開始，並使用標準基因置換與重組技術將突變引入梭菌菌株而產生類似於菌株 DG1 pSPD5 PD0001VE05c08 的菌株。

#### 含甘油的培養基

「適當的培養基」或「培養基」意指最適於梭菌菌株或族群生長或製備二醇的培養基。發酵製程通常是在具有適於梭菌種使用且含甘油之具有已知限定組成物的合成(特別是無機)培養基的反應器中進行。

術語「合成培養基」表示一種生物可生長於其上之含有化學限定組成物的培養基。在本發明的培養基中，甘油為有利的單一碳源。

術語「甘油(glycerine)」與「甘油(glycerol)」同義，且交替使用於本發明中供意指相同分子。

在一個特定的具體例中，甘油以含有至少 50%的甘油，較佳地至少 85%的甘油之甘油組合物形式被添加至培養基。

有利地，本發明培養基中所使用的甘油為工業甘油。「工業甘油」表示自工業製程所得而基本上未經純化的甘油產物。工業甘油也可以表示為「粗製甘油」。工業甘油含有超過 70%的甘油(較佳地超過 80%)、水以及諸如礦物鹽與脂肪酸的雜質。工業甘油中的最大甘油含量一般為 90%，更一般為約 85%。

工業甘油所獲自的工業製程本身是製造方法，其中

脂質與油(特別是植物來源的脂質與油)被加工成諸如清潔劑或潤滑劑的工業產物。在此等製造方法中，工業甘油被認為是副產物。

在一個特定具體例中，工業甘油是自製備生質柴油而來的副產物，且包含自製備生質柴油而來的已知甘油雜質，含有約 80 至 85% 甘油與鹽類、水和一些其他有機化合物，諸如脂肪酸。自生質柴油製備而來的工業甘油未進一步進行純化步驟。

較佳地，該培養基含有高濃度甘油。

術語「高甘油含量」或「高濃度甘油」表示培養基中的甘油超過  $90 \text{ g.L}^{-1}$ 。在較佳具體例中，濃度是介於  $90$  至  $200 \text{ g.L}^{-1}$  甘油，更特別是介於  $90$  至  $140 \text{ g/L}$  甘油，較佳約  $120 \text{ g.L}^{-1}$  甘油。

較佳地，培養基為不添加有機氮的合成培養基。

此等培養基揭示於本技藝中，特別是在 2010 年 5 月 5 日提申的 PCT/EP2010/056078 以及在 2010 年 10 月 5 日提申的 PCT/EP2010/064825，其內容併入本文中作為參考資料。

### 培養微生物

在本發明方法中，製備有利地是在批式、進料批式或連續製程中完成。以工業規模培養微生物來製備 1,3-丙二醇在該技藝中是已知的，特別是揭示於 2010 年 5 月 5 日提申的 PCT/EP2010/056078 以及在 2010 年 10 月 5 日提申的 PCT/EP2010/064825，其內容併入本文中作

為參考資料。

### 1,3-丙二醇回收

由發酵培養基中回收及最後純化 1,3-丙二醇的方法對於習於該技藝者來說是已知的。1,3-丙二醇可以藉由蒸餾分離。在大多數具體例中，1,3-丙二醇是由具有諸如乙酸之副產物的發酵培養基中蒸餾，且接而進一步藉由已知方法來純化。

一個特定的純化方法揭示於 WO2009/068110 以及 WO 2010/037843 中，其內容併入本文中作為參考資料。

## 實施例

### 實施例 1 自經演化的族群分離菌株

自族群菌株丙酮丁醇梭菌 DG1 pSPD5 PD0001VE05 之生長燒瓶培養物起在瓊脂平板上進行菌株分離。用於燒瓶培養的合成培養基每公升去離子水含有：甘油，30 g； $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，0.5 g； $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ，0.5g； $\text{MgSO}_4$ ， $7\text{H}_2\text{O}$ ，0.2 g； $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，0.01g；乙酸，99.8%，2.2 ml； $\text{NH}_4\text{Cl}$ ，1.65 g；MOPS，23.03 g；生物素，0.16 mg；*p*-胺基苯甲酸，32 mg； $\text{FeSO}_4$ ， $7\text{H}_2\text{O}$ ，0.028 g；刃天青，1 mg 以及半胱胺酸，0.5 g。以 6N 之  $\text{NH}_4\text{OH}$  將培養基的 pH 調整為 6.5。

針對在瓊脂平板上的分離使用不同培養基：合成瓊脂培養基(與上述相同)具有商業甘油或粗製甘油以及 CGM (梭菌生長培養基(Clostridial Growth Medium))瓊

脂培養基，其每公升去離子水含有：商業甘油或粗製甘油，30 g；酵母萃取物，5 g； $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，0.75； $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ，0.75 g； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，0.4 g；天冬醯胺酸，2 g； $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ，2 g；NaCl，1 g； $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ，10 mg； $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，10 mg；MOPS，23.03 g；刃天青，1 mg 以及半胱胺酸，15 g。以 3N 之  $\text{NH}_4\text{OH}$  將培養基的 pH 調整至 6.6。

以 4 種不同方式將細胞自燒瓶培養物(表 2)平板培養至下列平板上：

- 在具有商業甘油之合成培養基的瓊脂平板上；
- 在具有粗製甘油之合成培養基的瓊脂平板上；
- 在具有商業甘油之豐富培養基(rich medium)的瓊脂平板上；
- 在具有粗製甘油之豐富培養基的瓊脂平板上。

在瓊脂平板上接連進行 3 次繼代培養之後所分離出來的殖株被認為是純殖株。繼而將純殖株轉移至含有商業甘油或粗製甘油的液體豐富培養基中(表 2)。之後，以甘油 20% 將生長液體培養物保存於  $-80^\circ\text{C}$  下直到進一步的特徵鑑定。

接著，以下列方式對殖株進行特徵鑑定：

- 測量保存後的成活力：評估細胞在合成培養基上的生長率；
- 評估生長與代謝：在培養期間測量  $\text{OD}_{620\text{nm}}$  以及在合成培養基上的 PDO/甘油產率；

- 遺傳評估：PCR 分析以確認菌株的基因型；
- 連續培養以比對分離菌株與族群中的其他菌株的表現(實施例 2)；
- 萃取 gDNA 供進行菌株的序列分析用(實施例 3)。

表 2：用於自族群中分離 4 個菌株的合成瓊脂培養基以及液體培養基

菌株編號	用於分離的瓊脂培養基	在保存前用於菌株培養的液體培養基
c01	具有商業甘油的合成培養基	具有商業甘油的豐富培養基
c05	具有粗製甘油的豐富培養基	具有商業甘油的豐富培養基
c07	具有商業甘油的合成培養基	具有粗製甘油的豐富培養基
c08	具有商業甘油的豐富培養基	具有粗製甘油的豐富培養基

實施例 2 菌株 c08 在具有高濃度粗製甘油的連續培養中的表現

細菌菌株：

丙酮丁醇梭菌菌株 DG1 pSPD5 PD0001VE05 (菌株經 1/ pSOL1 處理，2/以具有 *dhaB1*、*dhaB2* 及 *dhaT* 基因(亦即 1,3-丙二醇操縱子)的質體 pSPD5 轉形，和 3/ 在高濃度粗製甘油中進行演化)的分離菌株。此分離步驟描述於實施例 1 中。

培養基：

用於梭菌批式培養的合成培養基每公升去離子水含有：甘油，30 g； $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，0.5 g； $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ，0.5 g； $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ，0.2 g； $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ，0.01 g； $\text{H}_2\text{SO}_4$ ，0.1 ml； $\text{NH}_4\text{Cl}$ ，1.5 g；生物素，0.16 mg；*p*-胺基苯甲酸，

32 mg 及  $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.028 g。以  $\text{NH}_4\text{OH}$  3N 將培養基的 pH 調整至 6.3。購自於 Sigma 的商業甘油(純度 99.5%)用於批式培養。用於連續培養的進料培養基每公升自來水含有：粗製甘油，105 g； $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ，0.5 g； $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ，0.5 g； $\text{MgSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ ，0.2 g； $\text{CoCl}_2, 6\text{H}_2\text{O}$ ，0.026 g； $\text{NH}_4\text{Cl}$ ，1.5 g；生物素，0.16 mg；*p*-胺基苯甲酸，32 mg； $\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ ，0.04 g；消泡劑，0.05 ml； $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ ，8 mg； $\text{CuCl}_2, 2\text{H}_2\text{O}$ ，4 mg； $\text{MnSO}_4, \text{H}_2\text{O}$ ，40 mg； $\text{H}_3\text{BO}_3$ ，2 mg； $\text{Na}_2\text{MoO}_4, 2\text{H}_2\text{O}$ ，0.8 mg。在本例中未調整培養基 pH。來自於生質柴油之轉酯反應的粗製甘油是由 Novance (Venette, France) 提供並具有以下純度：甘油 84.8% (w/w)。

#### 實驗架構：

在具有工作體積為 2000 ml 的 5l 生物反應器 Tryton (Pierre Guerin, France) 中進行連續培養。藉由自動調節培養物高度將培養物體積恆定維持於 2000 ml。以 200 RPM 攪拌培養物，溫度設定於 35°C 並藉由自動添加  $\text{NH}_4\text{OH}$  5.5N 而將 pH 恆定維持在 6.5。在整個培養期間控制 POR 多寡 (mV)。為創造出厭氧條件，在 60°C 下以無菌無  $\text{O}_2$  的氮氣沖洗容器中的無菌培養基 1 小時並再次沖洗直到達至 35°C (在 2 小時期間沖洗)。生物反應器氣體出口是受到五倍子酚的氧氣所保護 (Vasconcelos *et al.*, 1994)。在殺菌之後，亦以無菌無  $\text{O}_2$  的氮氣沖洗進料培養基直到達至室溫並維持在 200 mbar 的氮氣下以防

止 O<sub>2</sub> 進入。

批式及連續培養方法：

用於評估的方法已描述於 PCT/EP2010/056078 專利申請案(實施例 2)中。

指數生長期結束時於 100 ml 燒瓶的合成培養基(與上述批式培養物相同，但添加乙酸 2.2 g.L<sup>-1</sup> 及 MOPS 23.03 g.L<sup>-1</sup>)中生長的培養物用作為接種源(5% v/v)。

首先以批式的方式使培養物生長。在指數生長前期時，吾人進行商業甘油的調節(pulse)：關於調節合成培養基(pulse synthetic medium)(與用於批式培養所述者相同)，在 3 小時期間以靜態流速添加 105 g.L<sup>-1</sup> 粗製甘油(亦即，添加 18 g.L<sup>-1</sup> 甘油)。接著，以批式的方式持續生長並且在指數生長期結束前以 0.025 h<sup>-1</sup> 的稀釋率開始連續進料。進料培養基含有 105 g.L<sup>-1</sup> 粗製甘油。在生物反應器接種 8-10 天後以及在 3 次滯留時間後，稀釋率按照不同階段由 0.025 h<sup>-1</sup> 增加至 0.060 h<sup>-1</sup>：在 48 小時內增加 0.01 h<sup>-1</sup> 單位-24 小時不改變-在 48 小時內增加 0.01 h<sup>-1</sup> 單位-24 小時不改變-在 48 小時內增加 0.015 h<sup>-1</sup> 單位。之後，待培養穩定後製備 1,3-丙二醇並且消耗甘油(第 1 圖)(使用下述的 HPLC 程序)。特別地，吾人等到殘餘甘油濃度儘可能為低之時。

c08 菌株的總體成果呈現於表 3 中，且與在相同條件下的族群成果以及諸如 Gonzalez-Pajuelo *et al.* (2005) 中所述的菌株丙酮丁醇梭菌 DG1 pSPD5 PD0001VT 的

成果相比較。

分析程序：

在 620 nm 下以濁度測量細胞濃度並且以直接測得的細胞乾重予以校正。甘油、1,3-丙二醇、乙醇、丁醇、乙酸與丁酸濃度是藉由 HPLC 分析來測定。在 Biorad Aminex HPX-87H 管柱上進行分離並且藉由折射率完成偵測。操作條件如下：移動相，硫酸 0.5 mM；流速，0.5 ml/min；溫度，25°C。

表 3：丙酮丁醇梭菌 DG1 pSPD5 族群 PD0001VE05 (4 個連續培養的平均數據)、菌株 c08 PD0001VE05c08 的成果。進料培養基含有 105 g.L<sup>-1</sup> 粗製甘油，稀釋率為 0.060 h<sup>-1</sup> 和 0.025 h<sup>-1</sup>。數值對應於在至少 3 次滯留時間後以 0.060 h<sup>-1</sup> 的稀釋率所分析的樣品平均值。

	菌株 c08 PD0001VE05c08 的平 均值及標準偏差	族群 PD0001VE05 的 平均值及標準偏差	菌株 PD0001VT (Gonzalez-Pajuelo et al. 2005)的平均值及標準 偏差
進料甘油(g.l <sup>-1</sup> )	105.49 +/- 1.07	104.21 +/- 1.36	58.54
1,3-丙二醇(g.l <sup>-1</sup> )	51.30 +/- 0.54	50.45 +/- 1.00	29.76
Y <sub>1,3-PDO</sub> (g.g <sup>-1</sup> )	0.50 +/- 0.01	0.53 +/- 0.01	0.50
Q <sub>1,3PDO</sub> (q.l <sup>-1</sup> .h <sup>-1</sup> )	3.05 +/- 0.03	3.18 +/- 0.21	1.49
稀釋率(h <sup>-1</sup> )	0.059 +/- 0.001	0.063 +/- 0.004	0.05
殘餘甘油(g.l <sup>-1</sup> )	3.72 +/- 1.62	4.82 +/- 1.82	0
生質(g.l <sup>-1</sup> )	1.52 +/- 0.55	2.09 +/- 0.15	1.64
乙酸(g.l <sup>-1</sup> )	2.67 +/- 0.26	2.09 +/- 0.27	NI
丁酸(g.l <sup>-1</sup> )	10.53 +/- 0.38	10.98 +/- 0.37	NI

Y<sub>1,3-PDO</sub> : PDO 產率 (g/g 消耗的甘油)

Q<sub>1,3PDO</sub> : PDO 體積生產率

NI: 無資料。PD0001VT 菌株無法在缺乏酵母萃取物的培養基中生長。

這些結果顯示，丙酮丁醇梭菌 DG1 pSPD5 的適應族群能夠生長在較高濃度的工業甘油中且因此使用工業甘油，比 Gonzalez-Pajuelo *et al.* (2005) 的未適應菌株丙酮丁醇梭菌 DG1 pSPD5 PD0001VT (其無法生長於缺乏酵母萃取物的培養基中) 表現出更好的滴定量與生產率。

### 實施例 3

#### 基因體 DNA 萃取

菌株 PD0001VT、PD0001VE05、PD0001VE05c01、PD0001VE05c05、PD0001VE05c07 以及 PD0001VE05c08 的基因體 DNA 是使用 Qiagen Genomic kit 500G (Qiagen, Inc., Valencia, CA) 進行萃取。簡言之，細胞分別在青黴素小瓶的豐富或合成甘油培養基 (如實施例 1 與 2 中所述) 中厭氧生長至指數晚期 ( $A_{620}$  1.5 至 2.0)。整個細胞溶解過程均維持嚴格的厭氧條件。收集細胞並以 SET 緩衝液 (25% 蔗糖、0.05 M Tris-HCl、0.05 M EDTA) 洗滌 2 次。將細胞丸懸浮於含 44  $\mu$ L RNA 酶、30 mg/mL 溶菌酶和 100  $\mu$ g/mL 蛋白酶 K 的 11 mL B1 kit 緩衝液中。在 37°C 下培育混合物 45 分鐘、離心而上清液依據 Qiagen DNA 純化套組操作指南用於 DNA 萃取。接而將 DNA 懸浮於 50  $\mu$ L 的 10 mM Tris-HCl (pH8.0) 中。

#### 定序分析

天然 DG1 pSPD5 PD0001VT 菌株以及演化族群 DG1 pSPD5 PD0001VE05 的基因體是使用 Roche GS FLX 技術進行定序。定序計畫是由 Eurofins Genomics MWG/ Operon (ZA de Courtabeuf-9 Avenue de la Laponie, 91978 Les Ulis Cedex) 執行，針對各菌株使用 1 個長標記雙末端圖書館(Long-Tag paired end libraries)(8 Kb)、以不完全的 GS FLX 鈦序列化學(GS FLX Titanium series chemistry)(最大 600 000 讀數，最大 180 000-300 000 真實雙末端讀數)產生序列並組織片段重疊群(contig)。

自演化族群而來的分離殖株是使用 NimbleGen (Roche NimbleGen Inc. 500 S. Rosa Rd. Madison WI 53719) 發展出的比較基因體定序(CGS)方法來定序。CGS 分析是以兩階段進行：在階段 1 中，基因體差異區是藉由比較雜交天然菌株與演化殖株的 DNA 而被鑑別。在階段 2 中，僅對經鑑別之基因體差異區進行定序而產生一組充分鑑別的單一核苷酸多型性(SNP)。

### SNP 分析

演化族群的生物資訊以及 SNP 分析是由 Eurofins Genomics MWG / Operon 執行。針對這個分析，將兩種菌株的讀值組分別使用軟體 gsMapper (Roche 454, V2.3) 與 Genbank 參考序列(*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AE001437>) 相比對。提供 3 個 SNP 檔案，它們比較 DG1 pSPD5

PD0001VT 與 ATCC824、DG1 pSPD5 PD0001VE05 與 ATCC824，以及 DG1 pSPD5 PD0001VT 與 DG1 pSPD5 PD0001VE05。天然與演化菌株間獨特的 SNP 表示如下。依據家族群演繹(family group annotations)所用的 KEGG 資料庫，剔除低涵蓋範圍(<25)以及低變異株頻率(<85%)而產生 160 個分布在 17 個家族中的特有 SNP。

分離植株的 SNP 分析是由 NimbleGen (Roche)執行。使用 Genbank 參考序列(*Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AE001437>) 提供 SNP 檔案，它們是比較天然 DG1 pSPD5 PD0001VT 與 DG1 pSPD5 PD0001VE05c01、DG1 pSPD5 PD0001VE05c05、DG1 pSPD5 PD0001VE05c07 或 DG1 pSPD5 PD0001VE05c08。

序列結果呈現於表 1 中，其含有下列資訊：

RefStart	出現差異之參考序列內的起始位置
RefNuc	差異位置處的參考核苷酸序列
VarNuc	差異位置處的不同核苷酸序列
VarFreq	不同讀值相對於完全橫跨差異位置之全部讀值的百分比
類型	不論在演繹基因內或演繹基因間是否有發現 SNP 的列表。基因內的 SNP 被標示為編碼。基因間的 SNP 被標示為基因間
AA 改變	依據是否會改變蛋白質的胺基酸序列而

區別編碼 SNP。S 表示同義 SNP (無胺基酸改變)。N 表示非同義 SNP (胺基酸改變)。FC (骨架改變)表示蛋白質轉譯時因為插入或刪除核苷酸所致的修飾。

ORIG\_AA 就對應 SNP 位置與參考序列相關的胺基酸

SNP\_AA 就對應 SNP 位置與測試序列相關的胺基酸

基因座標記 Genbank 之對應基因的基因座標記

功能 Genbank 中所述的基因功能

家族 KEGG 之基因家族

表 1：天然菌株與演化菌株之間的突變。首先在經適應的族群中鑑定出突變並接著在分離殖株中核對各突變的存在(最後 4 欄：Y 為突變存在而 N 為突變不存在)

Ref Start	Ref Nuc	Var Nuc	Var Freq	類型	AA 改變	YRIG AA	SNP AA	基因座標記	功能	家族	c01	c05	c07	c08
15594	C	T	>99%	C	N	L	P	CA_C0009	未鑑定特徵的保守蛋白質，YRXA 枯草桿菌的直向同源物	假定蛋白	Y	Y	Y	Y
21339	G	A	>99%	I					I		Y	Y	Y	Y
25354	G	A	>99%	C	N	G	S	CA_C0017	絲胺醯基-tRNA 合成酶	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y
29516	G	A	>99%	C	N	G	D	CA_C0020	MDR-型通透酶	運輸蛋白	Y	Y	Y	Y
31667	C	T	>99%	C	N	A	V	CA_C0021	絲胺醯基-tRNA 合成酶(絲胺酸-tRNA 接合酶)	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y
35547	G	A	>99%	C	S	R	R	CA_C0024	膜蛋白，與放線桿菌蛋白質(1944168)相關	膜蛋白	Y	Y	Y	Y
43029	C	T	>99%	C	N	A	V	CA_C0032	轉錄調節子 TetR/AcrR 家族	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y
52503	A	G	>99%	C	S	A	A	CA_C0039	DNA 分離 ATP 酶 FtsK/SpoIIIE 家族蛋白質，含有 FHA 結構域	細胞分裂	Y	Y	Y	Y
76769	C	T	>99%	C	S	F	F	CA_C0066	ABC 轉運蛋白，ATP-結合蛋白	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y
143022	G	A	>99%	C	S	S	S	CA_C0135	假定蛋白，CF-23 家族	假定蛋白	Y	Y	Y	Y
198989	C	T	>99%	C	N	T	I	CA_C0175	預測為糖磷酸異構酶，真核生物葡萄糖激酶調節子的同源物	醣類代謝	Y	Y	Y	Y
219199	C	T	>99%	C	N	M	I	CA_C0193	未鑑定特徵的保守膜蛋白，影響 LPS 合成	膜蛋白	Y	Y	Y	Y
220222	T	C	>99%	C	N	N	S	CA_C0194	涉及細胞壁生成的糖基轉移酶	醣類代謝	Y	Y	Y	Y
265152	G	A	>99%	C	N	G	S	CA_C0234	PTS 系統，果糖-特異性 IIBC 組分	醣類代謝	Y	Y	Y	Y
286308	G	A	>99%	C	N	A	T	CA_C0256	固氮酶鐵-鐵蛋白， $\alpha$ 鏈(固氮酶組分 I)基因 nifD	能量代謝	Y	Y	Y	Y
347024	G	A	>99%	C	N	A	T	CA_C0291	融合物：甲硫胺酸合成酶 I (鈣胺基酸代謝)	醣類代謝	Y	Y	Y	Y



I223725	G	A	>99%	C	N	A	T	CA_C1072	Fe-S 氧化還原酶	能量代謝	Y	Y	Y	Y
I254865	T	A	>99%	C	N	Y	N	CA_C1086	NagC/XyIR 家族的轉錄調節子	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y
I299105	A	G	>99%	C	N	M	T	CA_C1133	與噬菌體相關的蛋白質, YonE 枯草桿菌同源物	假定蛋白	Y	Y	Y	Y
I309504	C	T	>99%	C	N	M	I	CA_C1143	外切去氧核糖核酸酶 V, $\alpha$ 次 單位, RecD	細胞分裂	Y	Y	Y	Y
I324897	A	G	>99%	C	S	P	P	CA_C1166	假定蛋白	假定蛋白	Y	Y	Y	Y
I366058	T	A	>99%	C	N	N	K	CA_C1223	DNA 聚合酶 III $\alpha$ 鏈(dnaE)	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y
I424502	A	G	>99%	C	N	Y	C	CA_C1280	熱休克基因的轉譯調節子, HrcA	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y
I444099	G	A	>99%	C	N	G	R	CA_C1300	RNA 聚合酶 $\sigma$ 因子 RPOD	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y
I540446	A	G	>99%	C	S	L	L	CA_C1396	磷酸核糖基胺-甘氨酸接合酶	核酸代謝	Y	Y	Y	Y
I554592	A	G	>99%	C	N	K	R	CA_C1408	磷酸- $\beta$ -葡萄糖苷酶	醣類代謝	Y	Y	Y	Y
I644651	A	-	>99%	I					I	I	Y	Y	Y	Y
I770126	A	G	>99%	C	N	I	V	CA_C1628	DNA 旋轉酶 A 次單位	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y
I778678	G	A	>99%	C	N	A	T	CA_C1636	未鑑定特徵的蛋白質, 堅強芽 孢桿菌(2654481)的同源物	假定蛋白	Y	Y	Y	Y
I805186	G	A	>99%	C	N	V	I	CA_C1661	預測為分泌的核糖結合蛋白	核酸代謝	Y	Y	Y	Y
I821699	G	A	>99%	C	N	A	T	CA_C1673	NADH-依賴型巯胺合成酶 的大次單位	能量代謝	Y	Y	Y	Y
I916660	A	G	>99%	C	N	N	S	CA_C1771	未鑑定特徵的蛋白質, ykl1 枯 草桿菌同源物	假定蛋白	Y	Y	Y	Y
I948050	C	T	>99%	I					I	I	Y	Y	Y	Y
2037205	G	A	>99%	C	S	C	C	CA_C1886	未鑑定特徵的噬菌體相關蛋白 質	假定蛋白	Y	Y	Y	Y
2114483	A	G	>99%	C	N	V	A	CA_C2003	預測為通透酶	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y
2123888	T	C	>99%	C	S	L	L	CA_C2010	預測為 Fe-S 氧化還原酶	能量代謝	Y	Y	Y	Y
2171503	C	T	>99%	C	N	D	N	CA_C2068	孢子化因子 spoIIM, 未鑑定特 徵的膜蛋白	孢子化	Y	Y	Y	Y
2231570	C	-	>99%	C	FC			CA_C2137	陽離子轉運 P-型 ATP 酶	轉運蛋白	N	N	N	Y

2294764	G	A	>99%	C	N	T	I	CA_C2201	假定蛋白	假定蛋白	假定蛋白	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
2299326	C	G	>99%	C	N	S	T	CA_C2205	鞭毛鉗-相關的蛋白質FlhD	細胞運動	細胞運動	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
2307214	C	T	>99%	C	N	G	R	CA_C2215	鞭毛切換蛋白FlhY, 含CheC樣結構域	細胞運動	細胞運動	Y	N	Y	Y	Y	Y	
2342826	G	C	>99%	C	N	P	A	CA_C2247	位置-特異性重組酶, DNA轉化酶Pin同源物	轉錄轉譯調節	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
2392178	C	T	>99%	C	N	V	.	CA_C2288	鹼基-蛋白合成酶, luxE	脂質代謝	脂質代謝	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
2450006	C	T	>99%	C	S	P	P	CA_C2340	DNA失配修復蛋白mutS, YSHD枯草桿菌直向同源物	轉錄轉譯調節	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
2477825	C	T	>99%	C	S	S	S	CA_C2367	未鑑定特徵的蛋白質, 含有預測細胞附著結構域及ChW-重複	細胞附著	細胞附著	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
2493211	T	C	>99%	C	S	H	H	CA_C2385	假定蛋白	假定蛋白	假定蛋白	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
2595349	G	A	>99%	C	N	A	V	CA_C2486	轉錄調節子, MarR/EmrR家族	轉錄轉譯調節	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
2693354	C	T	>99%	C	N	E	K	CA_C2588	糖基轉移酶	醣類代謝	醣類代謝	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
2787387	C	T	>99%	C	N	M	I	CA_C2670	Glu-tRNAGln 醣胺轉移酶次單位A	轉錄轉譯調節	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
2833384	T	C	>99%	C	N	I	V	CA_C2709	電子轉移黃素蛋白 $\alpha$ -次單位	能量代謝	能量代謝	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
2836979	G	A	>99%	C	N	A	V	CA_C2713	富含AT之DNA-結合蛋白	轉錄轉譯調節	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
2901642	C	T	>99%	C	N	V	.	CA_C2770	胺基酸轉運蛋白	轉運蛋白	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
2969858	G	A	>99%	C	N	M	I	CA_C2838	預測為核苷酸結合蛋白, YjeE家族	轉錄轉譯調節	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
3001642	G	A	>99%	C	S	L	L	CA_C2867	FoF1-型ATP合成酶 $\alpha$ 次單位	能量代謝	能量代謝	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
3032956	T	C	>99%	C	N	H	R	CA_C2898	第II期孢子化蛋白R	孢子化	孢子化	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
3140918	T	C	>99%	I						I	I	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
3174743	G	A	>99%	C	S	D	D	CA_C3032	半乳糖變旋酶相關的酵素	醣類代謝	醣類代謝	Y	N	Y	Y	Y	Y	
3251276	G	C	>99%	C	N	T	S	CA_C3099	假尿苷酸合成酶, TRUA	核酸代謝	核酸代謝	Y	Y	Y	Y	Y	Y	
3337937	G	-	>99%	I						I	I	N	N	N	N	N	N	
3392124	G	A	>99%	C	N	G	R	CA_C3242	未鑑定特徵的Fe-S蛋白質, PflX(丙酮酸甲酸離離酶活化	能量代謝	能量代謝	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

3462380	C	T	>99%	C	S	N	N	CA_C3297	蛋白)同源物 D-丙酮酸-D-丙酮酸羧化酶 家族水解酶, YODJ 枯草桿菌 直向同源物	假蛋白	Y	Y	Y	Y
3509372	C	T	>99%	C	S	E	E	CA_C3335	短鏈酒精去氫酶家族酵素	能量代謝	Y	Y	Y	Y
3512658	C	T	>99%	C	S	Y	Y	CA_C3339	ABC 轉運蛋白的 ATP 酶組分(2 個 ATP 酶結構域)	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y
3518240	T	C	>99%	C	S	Y	Y	CA_C3345	轉錄調節子, AcrR 家族	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y
3541557	T	C	>99%	C	N	I	V	CA_C3363	假蛋白	假蛋白	Y	Y	Y	Y
3565291	C	T	>99%	C	N	T	I	CA_C3387	果膠酸解離酶	纖維素酶	Y	Y	Y	Y
3576865	T	C	>99%	C	N	H	R	CA_C3392	NADH-依賴型丁醇去氫酶	能量代謝	Y	Y	Y	Y
3583724	C	T	>99%	I	I				I	I	Y	Y	Y	Y
3608511	C	T	>99%	C	S	S	S	CA_C3422	糖:質子同向轉運蛋白(可能是 木酮糖)	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y
3614985	C	T	>99%	C	S	K	K	CA_C3428	含 6Fe-6S 三硫烷簇的蛋白質	能量代謝	Y	Y	Y	Y
3674358	T	C	>99%	I	I				I	I	Y	Y	Y	Y
3707038	T	C	>99%	C	S	L	L	CA_C3510	膜相關之甲基接受超化性蛋白 (具有 HAMP 結構域)	膜蛋白	Y	Y	Y	Y
3747653	G	A	>99%	C	N	A	V	CA_C3551	Na+ABC 轉運蛋白(ATP-結合 蛋白), NATA	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y
3821135	C	T	>99%	C	S	N	N	CA_C3617	未鑑定特徵的膜蛋白, YHAG 枯草桿菌同源物	假蛋白	Y	Y	Y	Y
3850220	A	G	>99%	C	N	I	T	CA_C3650	含 HD-GYP 結構域的蛋白質	蛋白酶/肽酶	Y	Y	Y	Y
3921509	C	T	>99%	C	N	V	I	CA_C3716	Lon 樣 ATP-依賴型蛋白酶	蛋白酶/肽酶	Y	Y	Y	Y
239312	G	A	98%	C	N	E	K	CA_C0214	內葡聚糖酶, 胺基肽酶 M42 家 族	纖維素酶	Y	Y	Y	Y
244251	C	T	98%	I	I				I	I	Y	Y	Y	Y
2410308	G	A	98%	C	S	L	L	CA_C2306	孢子化-特異性 $\sigma$ 因子 F	孢子化	Y	Y	Y	Y
3656844	G	A	98%	C	N	A	T	CA_C3459	細胞分裂 GTP 酶 FtsZ 的同源 物, 趨異	細胞分裂	Y	Y	Y	Y

3823060	A	G	98%	C	N	V	A	CA_C3620	胺基酸(可能為麩胺酸)ABC轉運蛋白, 周質結合蛋白組分	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y
3838496	C	T	98%	C	N	G	R	CA_C3637	寡肽 ABC 轉運蛋白, 通透酶組分	轉運蛋白	N	N	N	N
914	G	A	97%	C	N	G	R	CA_C0001	DNA 複製起始蛋白, ATP 酶	細胞分裂	Y	Y	Y	Y
27240	C	T	97%	C	N	R	Q	CA_C0019	轉錄調節子, AcrR 家族	轉錄轉譯調節	N	Y	N	Y
36341	G	A	97%	C	N	D	N	CA_C0025	三磷酸去氧胞苷去胺酶	核酸代謝	N	Y	N	N
299266	G	A	97%	C	N	D	N	CA_C0267	L-乳糖去氫酶	能量代謝	Y	N	Y	Y
376886	G	A	97%	C	S	K	K	CA_C0322	感覺蛋白, 含 EAL 結構域	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y
474915	G	A	97%	C	N	G	D	CA_C0408	DNA 分離 ATP 酶 FtsK/SpoIIIE (3 個 ATP 酶), 含 FHA 結構域	細胞分裂	Y	Y	Y	Y
599925	G	A	97%	C	N	R	K	CA_C0519	二乳清酸酶	核酸代謝	Y	Y	Y	Y
723433	G	A	97%	I						I	N	N	N	N
723434	GT	-	97%	I						I	N	N	N	N
723871	A	G	97%	C	N	I	M	CA_C0622	聚磷酸激酶	能量代謝	Y	Y	Y	Y
809008	C	T	97%	C	S	L	L	CA_C0699	孢子光化產物解離酶, spIB	孢子化	Y	Y	Y	Y
846466	G	T	97%	C	N	A	S	CA_C0731	融合物: 核甘-二磷酸-糖表異構酶與 GAF 結構域	核酸代謝	Y	Y	Y	Y
1717948	G	A	97%	C	N	V	I	CA_C1572	果糖-1,6-二磷酸酶(YUDE 枯草桿菌直向同源物)	醣類代謝	Y	Y	Y	Y
2004797	C	T	97%	C	N	S	N	CA_C1852	鎂及鈷轉運蛋白	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y
2134058	G	A	97%	C	S	A	A	CA_C2020	鈿喋呤生合成酵素, MocA, 融合至鈿喋呤-結合結構域	能量代謝	Y	Y	Y	Y
2331746	G	A	97%	C	N	G	R	CA_C2237	ADP-葡萄糖焦磷酸酶	脂質代謝	Y	Y	Y	Y
2391588	G	A	97%	C	N	P	L	CA_C2288	鹽基-蛋白合成酶, luxE	脂質代謝	Y	Y	Y	Y
2452705	C	T	97%	C	N	C	Y	CA_C2341	膠原蛋白酶家族蛋白酶	蛋白酶/肽酶	Y	Y	Y	Y
2739459	T	C	97%	C	N	I	V	CA_C2630	未鑑定特徵的保守蛋白質, YOME 枯草桿菌直向同源物	假定蛋白	Y	Y	Y	Y
2775979	C	T	97%	C	N	A	T	CA_C2660	丙酮酸羧酶, PYKA	醣類代謝	Y	Y	Y	Y
2813985	G	-	97%	I						I	N	N	N	N

3082247	C	T	97%	C	N	L	F	CA_C2948	ABC 轉運蛋白的 ATP 酶組分, 具有重複的 ATP 酶結構域 (第 2 個結構域不活化)	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y
3242900	G	C	97%	C	N	V	L	CA_C3088	NtrC 家族轉錄調節子, ATP 酶結構域融合至 2 個 PAS 結構域	轉錄轉譯調節	Y	N	N	Y
3442855	T	C	97%	C	N	M	V	CA_C3282	ABC-型多重藥物/蛋白質/脂質轉運系統, ATP 酶組分	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y
3498584	C	T	97%	C	N	L	F	CA_C3327	胺基酸 ABC-型轉運蛋白, ATP 酶組分	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y
3643224	G	A	97%	C	S	L	L	CA_C3447	蛋白質-雙硫異構酶	孢子化	Y	Y	Y	Y
3663477	-	T	97%	C	FC			CA_C3464	DsbC/DsbG	假定蛋白	N	N	N	N
204202	G	A	96%	C	N	G	E	CA_C0180	未鑑定特徵的保守蛋白質(片段)	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y
803682	C	T	96%	C	N	T	I	CA_C0695	寡肽 ABC 轉運蛋白, ATP-結合蛋白	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y
892875	G	A	96%	C	N	M	I	CA_C0770	阿卓糖酸氧化還原酶	醣類代謝	Y	Y	Y	Y
1009389	C	T	96%	C	N	P	S	CA_C0879	甘油攝取促進蛋白, 通透酶	甘油代謝	Y	Y	Y	Y
1690355	C	T	96%	C	S	G	G	CA_C1546	ABC-型極性胺基酸轉運系統, ATP 酶組分	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y
1752341	C	T	96%	C	N	G	R	CA_C1610	嘧啶-核苷磷酸酶	核酸代謝	Y	Y	Y	Y
3217481	A	C	96%	C	S	L	L	CA_C3067	支鏈胺基酸通透酶	轉運蛋白	Y	Y	Y	Y
3238489	T	C	96%	C	S	S	S	CA_C3086	預測為膜蛋白	膜蛋白	Y	Y	Y	Y
447460	A	-	95%	I					含細胞附着結構域的蛋白質 I	細胞附着	Y	Y	Y	Y
670931	G	A	95%	C	S	N	N	CA_C0578	鈷素-依賴型甲硫胺酸合成酶 I (甲基轉移酶及鈷胺素結合結構域)	胺基酸代謝	N	Y	Y	Y
994575	G	A	95%	C	N	A	I	CA_C0864	細胞分裂 GTP 酶 FtsZ 的同源物, 趨異	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y
3657101	A	-	95%	C	FC			CA_C3459	細胞分裂 GTP 酶 FtsZ 的同源物, 趨異	細胞分裂	N	N	N	N

1142263	T	-	-	94%	C	FC				CA_C0995	預測為腺蛋白	腺蛋白	N	N	N	N
1823156	G	A	E	94%	C	S	E	E		CA_C1674	NADPH-依賴型麩胺酸合成酶的小次單位	胺基酸代謝	Y	Y	Y	Y
1989117	C	T	R	94%	C	N		K		CA_C1837	失配修復蛋白 MutS, ATP 酶	轉錄轉譯調節	Y	Y	Y	Y
3481651	G	A	S	94%	C	S	S	S		CA_C3311	融合至糖基轉移酶的 TPR-重複結構域	醣類代謝	Y	Y	Y	Y
126942	G	A	E	93%	C	N	E	K		CA_C0116	一氧化碳去氫酶, $\beta$ 鏈	能量代謝	Y	Y	Y	Y
302716	-	T		93%	C	FC				CA_C0270	假定蛋白	假定蛋白	N	N	N	N
2551103	G	A	S	93%	C	S	S	S		CA_C2434	與膜相關的組胺酸激酶, 具有 HAMP 結構域	轉錄轉譯調節	Y	N	Y	Y
1834077	C	T	S	92%	C	N	S	L		CA_C1684	TYPA/BIPA 型 GTP 酶	能量代謝	Y	Y	Y	Y
3927304	G	A		92%	I						I		Y	N	Y	N
786649	-	T		91%	C	FC				CA_C0680	預測為腺蛋白	腺蛋白	N	N	N	N
2640439	C	T	E	91%	C	N	E	K		CA_C2532	含 ChW-重複的蛋白	細胞附著	Y	Y	Y	Y
3601904	A	-		91%	C	FC				CA_C3415	ABC-型多重藥物/蛋白質/脂質轉運系統, ATP 酶組分	轉運蛋白	N	N	N	N
838350	A	-		89%	C	FC				CA_C0723	轉錄調節子, AcrR 家族	轉錄轉譯調節	N	N	N	N
3721023	G	A	S	89%	C	S	S	S		CA_C3523	假定蛋白, CF-7 家族	假定蛋白	Y	Y	Y	Y
803924	G	A	A	88%	C	N	A	T		CA_C0695	阿卓糖鐵氧化還原酶	醣類代謝	Y	Y	Y	Y
3478420	C	T	G	87%	C	N	G	E		CA_C3309	預測為腺蛋白	腺蛋白	N	Y	N	Y
3853836	T	C	N	87%	C	N	N	D		CA_C3652	乙醯乳酸合成酶	胺基酸代謝	Y	Y	Y	Y
244464	C	T	S	86%	C	N	S	L		CA_C0220	假定蛋白	假定蛋白	Y	Y	Y	Y
899104	G	A	M	86%	C	N	M	I		CA_C0776	與 NCAIR 變位酶(PurE)-相關的蛋白質	核酸代謝	Y	N	Y	N
658665	T	-		85%	C	FC				CA_C0569	SACPA 操縱子抗終止因子 (sacI)	轉錄轉譯調節	N	N	N	N

## 參考文獻

1. González-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, Andrade JC, Vasconcelos I, and Soucaille P. 2005. Metabolic engineering of *Clostridium acetobutylicum* for the industrial production of 1,3-propanediol from glycerol. *Metabolic Engineering* 7: 329–336.
2. González-Pajuelo M, Meynial-Salles I, Mendes F, Soucaille P, and Vasconcelos I. 2006. Microbial conversion of a natural producer, *Clostridium butyricum* VPI 3266, and an engineered strain, *Clostridium acetobutylicum* DG (pSPD5). *Applied and Environmental Microbiology*, 72: 96-101.
3. Nölling J, Breton G, Omelchenko MV, Makarova KS, Zeng Q, Gibson R, Lee HM, Dubois J, Qiu D, Hitti J, Wolf YI, Tatusov RL, Sabathe F, Doucette-Stamm L, Soucaille P, Daly MJ, Bennett GN, Koonin EV, Smith DR. 2001. Genome sequence and comparative analysis of the solvent-producing bacterium *Clostridium acetobutylicum*. *Journal of bacteriology* 183(16):4823 – 4838
4. Papanikolaou S, Ruiz-Sanchez P, Pariset B,

- Blanchard F and Fick M. 2000. High production of 1,3-propanediol from industrial glycerol by a newly isolated *Clostridium butyricum* strain. *Journal of Biotechnology*. 77: 191-208.
5. Vasconcelos I, Girbal L, Soucaille P. 1994. Regulation of carbon and electron flow in *Clostridium acetobutylicum* grown in chemostat culture at neutral pH on mixtures of glucose and glycerol. *Journal of bacteriology*. 176(5): 1443-1450.

#### 【圖式簡單說明】

第 1 圖說明在自接種至高  $D = 0.06 \text{ h}^{-1}$  起的連續培養期間，族群以及菌株 c08 的 1,3-丙二醇製備及甘油消耗的演化。

#### 【主要元件符號說明】

無

105年3月18日修正替換頁  
第 33-37頁

專利申請案第 100140808 號  
ROC Patent Appln No. 100140808  
修正後無劃線之申請專利範圍中文本 - 附件(二)  
Amended Claims in Chinese - Encl.(II)  
(民國 105 年 3 月 18 日送呈)  
(Submitted on March 18, 2016)

## 七、申請專利範圍：

1. 一種用於製備 1,3-丙二醇(PDO)的丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)菌株，其選自於由下列所構成之群組：

a) 菌株 DG1 pSPD5 PD0001VE05c01，以登錄編號 I-4378 寄存於 CNCM，其中該等菌株進一步包含下列核苷酸突變：

- 在丙酮丁醇梭菌基因體(ATCC824, Genbank: AE001437)的核苷酸位置 2231570 之基因座 CA\_C2137 處，刪除 C，該基因座編碼陽離子轉運 P-型 ATP 酶(轉運蛋白)，

- 在丙酮丁醇梭菌基因體(ATCC824, Genbank: AE001437)的核苷酸位置 27240 之基因座 CA\_C0019 處，以 T 取代 C，該基因座編碼轉錄調節子(轉錄轉譯調節)，

- 在丙酮丁醇梭菌基因體(ATCC824, Genbank: AE001437)的核苷酸位置 670931 之基因座 CA\_C0578 處，以 A 取代 G，該基因座編碼鈷胺素-依賴型甲硫胺酸合成酶 I(胺基酸代謝)，

- 在丙酮丁醇梭菌基因體(ATCC824, Genbank: AE001437)的核苷酸位置 3478420 之基因座 CA\_C3309 處，以 T 取代 C，該基因座編碼一預測膜蛋白(膜蛋白)，

- 在丙酮丁醇梭菌基因體(ATCC824, Genbank:

AE001437)的核苷酸位置 3927304 處，以 G 取代 A，及

- 在丙酮丁醇梭菌基因體 (ATCC824, Genbank: AE001437) 的核苷酸位置 899104 之基因座 CA\_C0776 處，以 G 取代 A，該基因座編碼 NCAIR 變位酶(核酸代謝)；或

b) 菌株 DG1 pSPD5 PD0001VE05c05，以登錄編號 I-4379 寄存於 CNCM，其中該等菌株進一步包含下列核苷酸突變：

- 在丙酮丁醇梭菌基因體 (ATCC824, Genbank: AE001437) 的核苷酸位置 2231570 之基因座 CA\_C2137 處，刪除 C，該基因座編碼陽離子轉運 P-型 ATP 酶(轉運蛋白)，

- 在丙酮丁醇梭菌基因體 (ATCC824, Genbank: AE001437) 的核苷酸位置 2307214 之基因座 CA\_C2215 處，以 T 取代 C，該基因座編碼鞭毛切換蛋白 FliY (細胞運動)，

- 在丙酮丁醇梭菌基因體 (ATCC824, Genbank: AE001437) 的核苷酸位置 3174743 之基因座 CA\_C3032 處，以 A 取代 G，該基因座編碼半乳糖變旋酶相關蛋白(醣類代謝)，

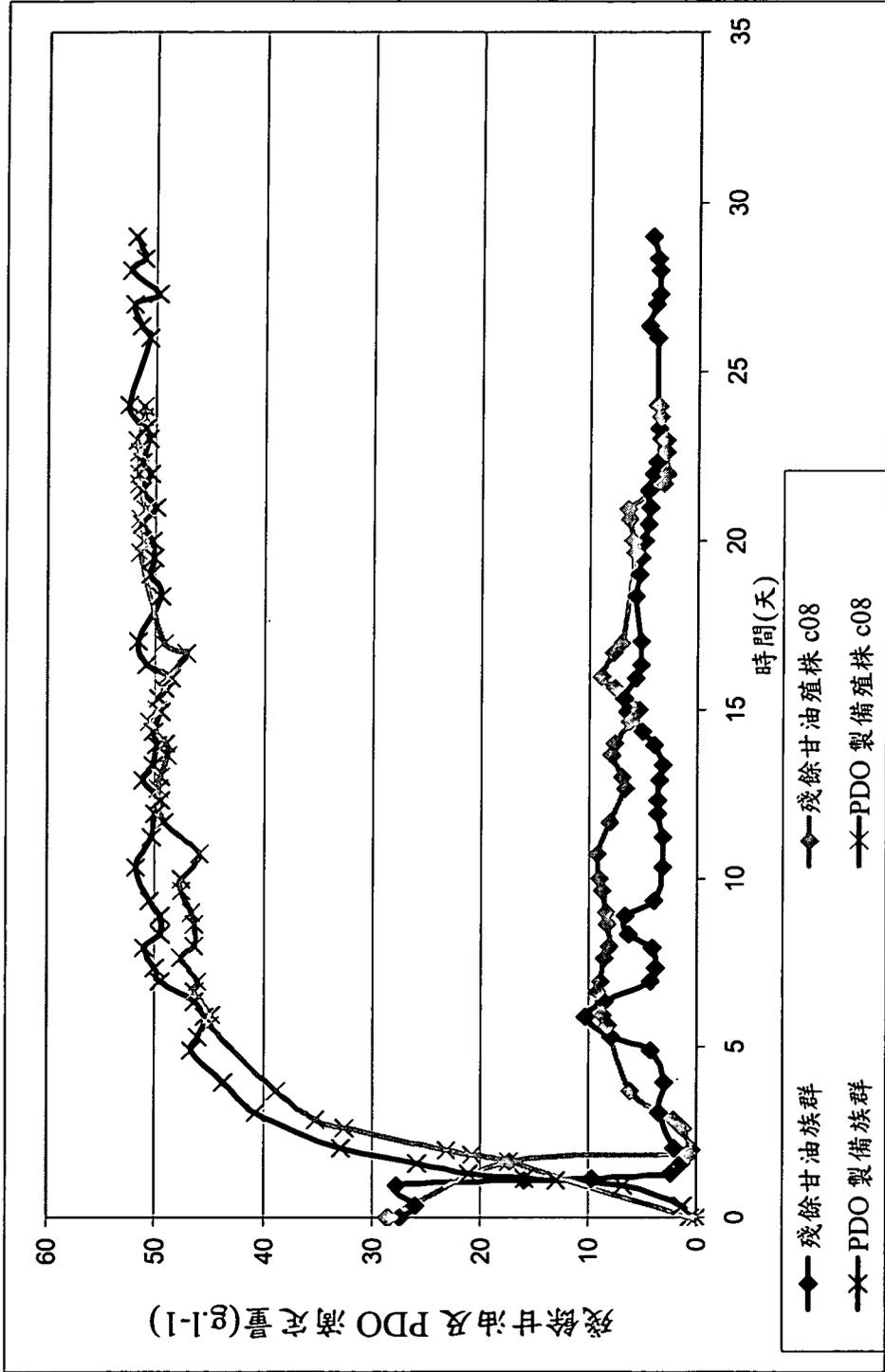
- 在丙酮丁醇梭菌基因體 (ATCC824, Genbank: AE001437) 的核苷酸位置 299266 之基因座 CA\_C0267 處，以 A 取代 G，該基因座編碼 L-乳

- 糖去氫酶(能量代謝)，
- 在丙酮丁醇梭菌基因體(ATCC824, Genbank: AE001437)的核苷酸位置 3242900 之基因座 CA\_C3088 處，以 C 取代 G，該基因座編碼 NtrC 家族轉錄調節子(轉錄轉譯調節)，
  - 在丙酮丁醇梭菌基因體(ATCC824, Genbank: AE001437)的核苷酸位置 2551103 之基因座 CA\_C2434 處，以 A 取代 G，該基因座編碼具有 HAMP 結構域之膜相關組胺酸激酶(轉錄轉譯調節)，及
  - 在丙酮丁醇梭菌基因體(ATCC824, Genbank: AE001437)的核苷酸位置 36341 之基因座 CA\_C0025 處，以 G 取代 A，該基因座編碼三磷酸去氧胞苷去胺酶(核酸代謝)；或
- c) 菌株 DG1 pSPD5 PD0001VE05c07，以登錄編號 I-4380 寄存於 CNCM，其中該等菌株進一步包含下列核苷酸突變：
- 在丙酮丁醇梭菌基因體(ATCC824, Genbank: AE001437)的核苷酸位置 2231570 之基因座 CA\_C2137 處，刪除 C，該基因座編碼陽離子轉運 P-型 ATP 酶(轉運蛋白)，
  - 在丙酮丁醇梭菌基因體(ATCC824, Genbank: AE001437)的核苷酸位置 27240 之基因座 CA\_C0019 處，以 T 取代 C，該基因座編碼轉錄

- 調節子(轉錄轉譯調節)，
- 在丙酮丁醇梭菌基因體(ATCC824, Genbank: AE001437)的核苷酸位置 3242900 之基因座 CA\_C3088 處，以 C 取代 G，該基因座編碼 NtrC 家族轉錄調節子(轉錄轉譯調節)，
  - 在丙酮丁醇梭菌基因體(ATCC824, Genbank: AE001437)的核苷酸位置 3478420 之基因座 CA\_C3309 處，以 T 取代 C，該基因座編碼一預測膜蛋白(膜蛋白)，
  - 在丙酮丁醇梭菌基因體(ATCC824, Genbank: AE001437)的核苷酸位置 3927304 處，以 G 取代 A，及
  - 在丙酮丁醇梭菌基因體的核苷酸位置 899104 之基因座 CA\_C0776 處，以 G 取代 A，該基因座編碼 NCAIR 變位酶(核酸代謝)。
2. 一種用於製備 1,3-丙二醇(PDO)的丙酮丁醇梭菌族群，其中該族群至少包含申請專利範圍第 1 項所定義之菌株。
3. 一種製備 1,3-丙二醇的方法，其包含在含有甘油作為唯一碳源而無添加有機氮的合成培養基中培養如申請專利範圍第 1 項所定義的菌株或申請專利範圍第 2 項所定義的族群，並且由該培養基回收所

製備之 1,3-丙二醇。

4. 如申請專利範圍第 3 項之方法，其中 1,3-丙二醇經進一步純化。
5. 如申請專利範圍第 3 或 4 項之方法，其中該培養基中的甘油濃度介於 90 至 120 g/L 甘油。
6. 如申請專利範圍第 5 項之方法，其中該培養基中的甘油濃度約 105 g/L。
7. 如申請專利範圍第 3 項之方法，其中甘油是以工業甘油提供。
8. 如申請專利範圍第 7 項之方法，其中工業甘油是製備生質柴油的副產物。



第 1 圖