



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1882691 B

(45) 授权公告日 2014. 05. 28

(21) 申请号 200480023361. 2

C12N 9/02 (2006. 01)

(22) 申请日 2004. 08. 16

C12N 9/04 (2006. 01)

(30) 优先权数据

C12N 15/63 (2006. 01)

03017677. 0 2003. 08. 14 EP

C12N 1/21 (2006. 01)

C12P 17/04 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

C12P 7/60 (2006. 01)

2006. 02. 14

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/CH2004/000511 2004. 08. 16

SUGISAWA T ET AL. MICROBIAL PRODUCTION

(87) PCT国际申请的公布数据

OF 2-KETO-L-GULONIC ACID FROM

W02005/017159 EN 2005. 02. 24

L-SORBOSE AND D-SORBITOL BY GLUCONOBACTER

MELANOGENUS. AGRICULTURAL AND BIOLOGICAL

(73) 专利权人 帝斯曼知识产权资产管理有限公司
地址 荷兰海尔伦

CHEMISTRY 54 5. 1990, 54 (5), 1201-1209.

审查员 丁海

(72) 发明人 阿兰·贝利 康妮·李

安妮·弗朗索瓦·迈耶 新城雅子

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

代理人 肖善强

(51) Int. Cl.

C12N 15/53 (2006. 01)

C12N 15/11 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书29页

序列表21页

(54) 发明名称

对 L- 抗坏血酸进行微生物生产的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种经过分离的多核苷酸分子,其是从编码具有 L- 山梨糖酮脱氢酶活性的多肽的多核苷酸获得的,所述多核苷酸分子包含 SEQ ID NO :1 的至少 20 个连续核苷酸的部分核苷酸序列。本发明还涉及以高产量生产 L- 抗坏血酸的方法,特别是,使用能将给定碳源转化为维生素 C 的微生物的静止细胞的方法。可通过纯化和 / 或分离步骤对由此得到的维生素 C 进行进一步的加工。

1. 一种经过分离的多核苷酸分子或其互补链,所述多核苷酸分子编码具有 L- 山梨糖酮脱氢酶活性的多肽,所述多核苷酸分子选自:

- (a) 编码根据 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的多核苷酸;
- (b) 多核苷酸,其核苷酸序列如 SEQ NO:1 或 26 的核苷酸序列所示;以及
- (c) 多核苷酸,其互补链能在严谨条件下与(a)至(b)中任何一条所定义的多核苷酸杂交。

2. 一种多肽,所述多肽由权利要求 1 所述的多核苷酸编码,并且具有 L- 山梨糖酮脱氢酶活性。

3. 一种表达载体,其中包含如权利要求 1 所述的多核苷酸。

4. 一种重组微生物,其已被如权利要求 1 所述的多核苷酸和 / 或权利要求 3 的表达载体所转化,所述微生物选自真菌和细菌细胞所构成的组。

5. 如权利要求 4 所述的重组微生物,其中所述生物是选自葡萄糖杆菌(Gluconobacter)、醋酸杆菌(Acetobacter)、假单胞菌(Pseudomonas)和埃希氏菌(Escherichia)所构成的组的属的细菌。

6. 一种用于从选自 D- 山梨糖醇、L- 山梨糖和 L- 山梨糖酮的底物来生产 L- 抗坏血酸的方法,所述方法包括:

- (a) 在合适的培养基中繁殖如权利要求 4 或 5 所述的重组微生物,以及
- (b) 从所述培养基中回收和分离 L- 抗坏血酸。

7. 一种用于从选自 D- 山梨糖醇、L- 山梨糖和 L- 山梨糖酮的底物来生产 L- 抗坏血酸的方法,所述方法包括:

- (a) 在合适的培养基中繁殖如权利要求 4 或 5 所述的重组微生物,
- (b) 分离和纯化 L- 山梨糖酮脱氢酶,
- (c) 在存在(b)的 L- 山梨糖酮脱氢酶的情况下,对底物进行温育;以及
- (d) 从反应混合物中回收及分离 L- 抗坏血酸。

8. 一种用于生产 L- 山梨糖酮脱氢酶的方法,其中,在合适的培养基中繁殖包含如权利要求 1 所述的多核苷酸的重组微生物,对细胞进行破碎,以及对 L- 山梨糖酮脱氢酶进行分离。

9. 一种用于生产维生素 C 的方法,所述方法包括:在包含根据权利要求 4 或 5 的微生物的静止细胞的培养基中,将底物转化为维生素 C,其中,产生的维生素 C 的产量为至少 1.8g/l。

10. 如权利要求 9 所述的方法,包括如下步骤:

- (a) 在能进行生长的条件下培养所述微生物,
- (b) 改变所述条件,使得所述微生物的生长速率降低,导致静止细胞产生;以及
- (c) 用(b)的静止细胞从底物生产维生素 C 其中步骤(a)和(c)不被任何洗涤和 / 或分离步骤分开。

11. 如权利要求 9 所述的方法,其中,作为 600nm 处的 OD 来测量的培养基中静止细胞的密度为至少 10。

12. 如权利要求 9 所述的方法,其中,所述微生物选自酵母、藻类和细菌所构成的组。

13. 如权利要求 9 所述的方法,其中,所述微生物选自假丝酵母属(Candida)、酵母

属(*Saccharomyces*)、接合酵母属(*Zygosaccharomyces*)、*Scyzosaccharomyces*、克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、小球藻属(*Chlorella*)、葡萄糖杆菌属(*Gluconobacter*)、醋酸杆菌(*Acetobacter aceti*)、*Pantoea*、隐球菌属(*Cryptococcus*)、假单胞菌属(*Pseudomonas*)、和埃希氏菌属(*Escherichia*)所构成的组。

14. 如权利要求9所述的方法,其中,所述底物选自由D-葡萄糖、D-山梨糖醇、L-山梨糖、L-山梨糖酮、2-酮-L-古洛糖酸盐/酯、D-葡萄糖酸盐/酯、2-酮-D-葡萄糖酸盐/酯和2,5-二酮-葡萄糖酸盐/酯所构成的组。

15. 如权利要求9所述的方法,其中,使用能从底物生产维生素C和2-酮-L-古洛酸的微生物,并且其中,维生素C和2-KGA浓度之间的比例大于0.1。

16. 如权利要求9所述的方法,进一步包括:从所述培养基中分离出维生素C。

17. 如权利要求6所述的方法,进一步包括:利用电渗析从所述培养基组分中分离出维生素C。

18. 如权利要求7所述的方法,进一步包括:利用电渗析从所述培养基组分中分离出维生素C。

19. 如权利要求9所述的方法,进一步包括:利用电渗析从所述培养基组分中分离出维生素C。

20. 如权利要求10所述的方法,进一步包括:利用电渗析从所述培养基组分中分离出维生素C。

对 L- 抗坏血酸进行微生物生产的方法

[0001] 本发明涉及从编码能将 L- 山梨糖酮 (L-sorbose) 直接转化为 L- 抗坏血酸的酶的多核苷酸获得的 (derived) 多核苷酸。L- 山梨糖酮脱氢酶 (下文中 :SNDH) 能从 L- 山梨糖酮直接生产 L- 抗坏血酸 (维生素 C)。L- 山梨糖酮脱氢酶 (SNDH) 是从属于 *Gluconobacter* 属和 *Acetobacter* 属的细菌获得的。本发明还涉及以高产量生产 L- 抗坏血酸的方法。L- 抗坏血酸广泛用于制药、食品和化妆品工业。

[0002] 在过去的 70 年中,已通过公知的 Reichstein 方法从 D- 葡萄糖对 L 抗坏血酸 (维生素 C) 进行了工业生产。该方法中的所有步骤都是通过化学方式进行的,只除了其中一个 (从 D- 山梨糖醇到 L- 山梨糖的转化),其通过微生物转化来进行。自从对 L- 抗坏血酸的工业生产的最初开始,就已将多种化学方法和技术修饰用于提高 Reichstein 方法的效率。对维生素 C 生产的最新进展被概括于 Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 5th Edition, Vol. A27 (1996), pp. 547ff。近来,已在微生物或从中分离出的酶的协助下,来进行生产维生素 C 的不同步骤。

[0003] 目前用于生产 L- 抗坏血酸的方法具有一些人们不想要的特征,例如高能耗以及要使用大量的有机及无机溶剂。因此,在过去数十年中,人们已在研究用微生物转化来制造 L- 抗坏血酸的其它方法,所述方法将是更加经济以及环保的。已报道了在多种微生物中直接对 L- 抗坏血酸的生产。

[0004] 令人惊奇地,现在已发现,可用分离自 *G. oxydans* N44-1 的 L- 山梨糖酮脱氢酶 (下文中 :SNDH),或来自属于 *Gluconobacter* 属和 *Acetobacter* 属的乙酸细菌的其直系同源体 (ortholog),来进行 L- 山梨糖酮向 L- 抗坏血酸的直接转化。用于该反应的基因被分离出,对其进行测序。通过该基因编码的山梨糖酮脱氢酶能将 L- 山梨糖酮转化为 L- 抗坏血酸。该酶与已知的 SNDH 酶不同。

[0005] 术语“L- 抗坏血酸”和“维生素 C”在本文中可以互换使用,其可以是水溶液中发现的 L- 抗坏血酸的任何化学形式,例如未离解的、以其游离酸形式存在的或离解为阴离子的。L- 抗坏血酸的溶解的盐的形式为阴离子,同时存在通常发现于发酵上清液中的任何种类的阳离子,例如,钾、钠、铵或钙。还包括在内的可以有 L- 抗坏血酸的游离酸形式的经过分离的晶体。另一方面,用其相应的盐的名称来命名 L- 抗坏血酸的盐形式的经过分离的晶体,即抗坏血酸钠、抗坏血酸钾、抗坏血酸钙等。

[0006] L- 山梨糖酮向维生素 C 的转化表示 :导致维生素 C 产生的对底物的转化是通过 SNDH 来进行的,即,底物被直接转化为维生素 C。

[0007] 克隆载体可以例如是任何质粒或噬菌体 DNA 或能在宿主细胞中自主复制的其它 DNA 序列,所述序列有如下特征 :其具有一个或少量的限制性内切酶识别位点,可在这些位点以可确定的方式对此类 DNA 序列进行切割,而不会导致载体的基本生物学功能的损失,还可向这些位点接合进 DNA 片段,以使得复制发生。克隆载体还可含有,例如,适用于对经过克隆载体转化的细胞进行标识的标记。此类标记可以提供,例如,对抗生素的抗性,例如,对四环素或氨苄青霉素的抗性。

[0008] 表达载体可以是能增强被克隆进来的基因的表达的 any 载体,例如在转化进宿主

之后。被克隆的基因通常处于某些控制序列的控制之下（即，与其可操作地连接），例如启动子序列。启动子序列可以是组成型的或诱导型的。

[0009] 核酸分子可以包括 DNA 和 RNA。任何形式的，例如双链的、单链的核酸以及其核苷可被用作核酸分子。还包括在内的有杂交体，例如，DNA-RNA 杂交体、DNA-RNA-蛋白质杂交体、RNA-蛋白质杂交体和 DNA-蛋白质杂交体。多核苷酸可由若干碱基组成，通常至少 20 个核苷酸碱基。

[0010] 术语“同源性 (homology)”指两条多核苷酸序列间的相似性。为确定同源性，将多核苷酸序列以使相似的区域能被比较的方式排列起来。如果需要的话，某些位置上的核苷酸可被空位置代替，以提高相似性。同源性比较可以例如通过手工或通过使用商业可获得的计算机程序来进行。优选地，所述程序在标准条件下运行，以获得最大的同源性。两条核苷酸序列之间同源性或相似性的程度被表示为“%同源性”。

[0011] 突变可以例如是：目标核苷酸序列中单个碱基对的变化、插入或缺失，或者遗传事件，例如遗传元件（例如，转座子）的插入。

[0012] 将突变引入到 DNA 中，即，诱变可以以不同方式来进行，例如，随机地，即，随机诱变，其中，突变的精确位置不可预计，其可发生于微生物染色体上的任何地方，或发生于内源质粒上。突变还可作为例如放射、化学处理或遗传元件的插入等因素导致的物质损伤的结果被产生。

[0013] 作为启动子使用的可以是下述任何 DNA 序列，所述 DNA 序列定位于接近某基因的起始密码子的地方，能启动一种或多种相邻基因的转录。通常，启动子可以定位于某基因的 5' 区域。启动子可以是诱导型的或组成型的启动子。在诱导型启动子的情况下，转录速率会应答于诱导剂增加。在组成型启动子的情况下，转录速率不会被例如诱导剂所调节。

[0014] 术语“相同性”和“%相同性”指用序列分析程序（例如下文中示出的）对两条氨基酸序列进行的比较。“%相同”表示对象氨基酸序列与被比较的氨基酸序列的相同氨基酸匹配的氨基酸的百分比。如果被比较的两条氨基酸序列的任何氨基酸都没有区别，它们就是相同的或具有 100%相同性。

[0015] 在一种实施方式中，本发明涉及一种经过分离的多核苷酸分子，其可从编码具有 L-山梨糖酮脱氢酶活性的多肽的多核苷酸分子获得 (derivable)，并且包含 SEQ ID NO:1 的至少 20 个连续核苷酸的部分核苷酸序列。因此，本发明提供了一种经过分离的多核苷酸分子，其是从编码具有 L-山梨糖酮脱氢酶活性的多肽的多核苷酸获得的，并且包含 SEQ ID NO:1 的至少 20 个连续核苷酸的部分核苷酸序列。优选地，经过分离的多核苷酸包含 SEQ ID NO:1 的至少 50 个或更优选地，至少 100 个连续核苷酸的部分核苷酸序列。最优选的是包含 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列的经过分离的多核苷酸。进一步最优选的实施方式是包含选自 SEQ ID NOs:11、13、15、17、19、21 和 26 所构成的组的核苷酸序列的经过分离的多核苷酸。经过分离的多核苷酸可以从编码具有 L-山梨糖酮脱氢酶活性的多肽的多核苷酸获得。SEQ ID NO:1 代表了从微生物 *Gluconobacter oxydans* N44-1 中分离出的 SNDH_{ai} 的完整核苷酸序列。这样的序列各部分可被用于不同的目的。例如，短的多核苷酸可被用作引物，用于，例如对从其它生物中分离出的合适的多核苷酸进行扩增。短的多核苷酸可在大约 10 至大约 100 个碱基对 (bp) 的范围内，通常为大约 14 至大约 50，优选在大约 17 至 30bp。此类短的多核苷酸序列的例子可被 SEQ ID NOs:5、6、7、8、9、10、23 或 24 所表示。较长的多核

苷酸可编码具有酶活性的多肽。例如, SNDHai 具有跨膜结构域, 其可能不用于酶活性。如果编码蛋白质的酶活性区域的多核苷酸的部分在没有跨膜结构域的情况下表达, 此种多肽可能具有充分的酶活性。

[0016] 经过分离的多核苷酸分子通常从也编码具有 L- 山梨糖酮脱氢酶活性的多肽的较长的多核苷酸序列获得。此类多核苷酸可以例如分离自细菌。优选地, 它们是从属于 *Gluconobacter* 属和 *Acetobacter* 属的细菌中分离出来的, 所述细菌包括但不限于 *G. oxydans*、*G. frateurii*、*G. cerinus* 和 *A. aceti*。当此类多核苷酸从较长的多核苷酸序列获得时, 确定此类多核苷酸序列与 SEQ ID NO:1 之间的同源性是可能的。在此种情况下, 优选地, 选择具有至少 100 个连续核苷酸的区域, 将来自其它多核苷酸的相应的片断 (stretch) 与其进行比较。当多核苷酸序列与可从 SEQ ID NO:1 获得的相应片断具有例如 60 个相同的核苷酸时 (通过对 100 个连续的核苷酸进行比较), 那么同源性就是 60%。因此, 在一种实施方式中, 本发明涉及根据本发明的经过分离的多核苷酸, 其中, 所述部分核苷酸序列获得自: 对至少 100 个连续核苷酸进行比较时, 与 SEQ ID NO:1 具有至少 60% 同源性的多核苷酸序列。优选地, 本发明的部分多核苷酸序列与 SEQ ID NO:1 具有至少 80% 的同源性, 更优选地, 至少 90% 的同源性。为确定同源性, 使用例如至少 100 个连续核苷酸的片断, 优选地, 至少 300 个连续核苷酸的片断, 更优选地, 至少 500 个连续核苷酸的片断。

[0017] 本发明提供了新颖的多核苷酸序列, 所述序列编码属于乙酸细菌的微生物的 L- 山梨糖酮脱氢酶, 所述细菌包括 *Gluconobacter* 属和 *Acetobacter* 属, 所述的酶用于从 L- 山梨糖酮生产 L- 抗坏血酸。所述的多核苷酸优选编码具有 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的多肽, 或者, 从所述多肽获得的 (derived) 或可从所述多肽获得的 (derivable) 多肽, 例如, 通过在 SEQ ID NO:2 的序列中取代、缺失、插入或添加一个或多个氨基酸获得的, 所述多肽保留有从 L 山梨糖酮生产 L- 抗坏血酸的 L- 山梨糖酮脱氢酶活性。还包括在内的有: 编码保留有从 L 山梨糖酮生产 L- 抗坏血酸的 L- 山梨糖酮脱氢酶活性的多肽的部分多肽序列的多核苷酸序列, 例如, 由 SEQ ID NOs:12、14、16、18、20、22 或 27 所示。

[0018] 优选地, 本发明的多肽包含选自本申请公开的多肽的氨基酸序列的、具有至少 25 个连续氨基酸的部分氨基酸序列。本领域技术人员了解下述事实: 多肽中的某些片断是生物学功能所必需的。但是, 存在有其它区域, 其中氨基酸可被插入、缺失或被其它氨基酸取代, 优选是与被代替的氨基酸相似的那些氨基酸取代。

[0019] 本发明还涉及包含本发明多核苷酸的重组 DNA 分子和 / 或表达载体, 尤其是能在合适的宿主细胞中发挥功能的。

[0020] 任何可作为外源核苷酸分子受体的细胞都可被用作宿主细胞, 例如携带有可复制表达载体或克隆载体的细胞, 或通过公知技术对其进行过遗传改造从而在其染色体或基因组中含有想要的基因的细胞。宿主细胞可以是原核或真核来源的, 例如, 细菌细胞、动物细胞 (包括人的细胞)、真菌细胞 (包括酵母细胞) 和植物细胞。优选地, 宿主细胞属于能在体内将 L- 山梨糖酮脱氢酶作为活性形式表达的细菌, 更优选地, *Gluconobacter*、*Acetobacter*、*Pseudomonas* (例如 *P. putida*) 或 *Escherichia* 属 (例如 *E. coli*) 的细菌。

[0021] 因此, 本发明的一个方面是提供如上所述的宿主细胞, 其中包含具有整合到其染色体 DNA 上的多核苷酸的此类表达载体或此类核苷酸。此类宿主细胞然后被称为重组宿主细胞或重组生物。

[0022] 本发明还涉及制造由本发明的多核苷酸编码的重组 L- 山梨糖酮脱氢酶多肽的方法。此类方法包括：例如，对如上文特别描述的本发明的任何重组生物进行培养。因此，本发明的一部分是通过该方法制造的重组 L- 山梨糖酮脱氢酶多肽。此类重组 L- 山梨糖酮脱氢酶，例如，可作为可溶的酶，在技术人员已知的、用于酶反应的任何标准程序中使用，通过用膜模块或膜反应器等设备对其进行回收，或在用于固相酶反应的固体载体上对其进行固定。

[0023] 本发明的另一方面是生产 L- 抗坏血酸的方法，所述方法包括：在本发明的多核苷酸编码的重组 L- 山梨糖酮脱氢酶多肽的协助下，将底物转化为 L- 抗坏血酸。从能天然（即，非重组地）生产此类酶的微生物中分离出来的 L- 山梨糖酮脱氢酶（SNDHai）的使用（其中，分离出的 SNDHai 是由本发明的多核苷酸编码的）也包括在本发明中。

[0024] 能通过本发明的多核苷酸编码的 SNDHai 转化为 L- 抗坏血酸的碳源可以作为底物使用。优选的底物选自 L- 山梨糖、D- 山梨糖醇和 L- 山梨糖酮。

[0025] 在本发明的一种实施方式中，用于生产 L- 抗坏血酸的方法包括将 L- 山梨糖或 D- 山梨糖醇转化为 L- 抗坏血酸，该过程在能将 L- 山梨糖转化为 L- 山梨糖酮或能将 D- 山梨糖醇转化为 L- 山梨糖酮的宿主细胞中进行。

[0026] 在另一种实施方式中，用于生产 L- 抗坏血酸的方法包括：在由本发明的多核苷酸编码的重组 SNDHai 的协助下，将 L- 山梨糖酮转化为 L- 抗坏血酸。从能天然（即，非重组地）生产此类酶的微生物中分离出来的 L- 山梨糖酮脱氢酶（SNDHai）的使用（其中，分离出的 SNDHai 是由本发明的多核苷酸编码的）也可用于此类方法。

[0027] 本发明提供了编码酶（L- 山梨糖酮脱氢酶 SNDHai 或其部分）的经过分离的核酸分子。对经过分离的核酸分子进行操作的方法和技术是本领域内公知的。用于分离、纯化和克隆核酸分子的方法，以及描述了对真核和原核宿主的使用及其中核酸和蛋白质表达的方法和技术是技术人员已知的。

[0028] 本发明的多肽的功能性衍生物也可以是本发明的一部分，对它的定义基于通过本发明的氨基酸序列的一个或多个氨基酸残基的添加、插入、缺失和 / 或取代产生的氨基酸序列，其中，用本领域已知的或本文中特别描述过的试验进行测量时，此类衍生物优选地仍具有 L- 山梨糖酮脱氢酶活性。

[0029] 此类功能性衍生物可以通过本领域已知的化学肽合成或基于如本文公开的 DNA 的重组技术、通过本领域范围内已知的方法来制造。通常不会改变此类分子活性的蛋白质和肽中的氨基酸取代是已知的。

[0030] 在本发明的特定的实施方式中，目标保守取代按照如下所述发生：作为示例性的取代，Ala 到 Val/Leu/Ile、Arg 到 Lys/Gln/Asn、Asn 到 Gln/His/Lys/Arg、Asp 到 Glu、Cys 到 Ser、Gln 到 Asn、Glu 到 Asp、Gly 到 Pro/Ala、His 到 Asn/Gln/Lys/Arg、Ile 到 Leu/Val/Met/Ala/Phe/norLeu、Lys 到 Arg/Gln/Asn、Met 到 Leu/Phe/Ile、Phe 到 Leu/Val/Ile/Ala/Tyr、Pro 到 Ala、Ser 到 Thr、Thr 到 Ser、Trp 到 Tyr/Phe、Tyr 到 Trp/Phe/Thr/Ser 和 Val 到 Ile/Leu/Met/Phe/Ala/norLeu 是合理的。作为优选的例子，Ala 到 Val、Arg 到 Lys、Asn 到 Gln、Asp 到 Glu、Cys 到 Ser、Gln 到 Asn、Glu 到 Asp、Gly 到 Ala、His 到 Arg、Ile 到 Leu、Leu 到 Ile、Lys 到 Arg、Met 到 Leu、Phe 到 Leu、Pro 到 Ala、Ser 到 Thr、Thr 到 Ser、Trp 到 Tyr、Tyr 到 Phe 和 Val 到 Leu 是合理的。如果此类取代导致生物活性的变化，那么，被上文

所述的示例性取代所命名的更多实质性的改变将被引入,产物将被筛选。

[0031] 除非特别指明,本文中通过对 DNA 分子进行测序来确定的所有核苷酸序列都是用自动 DNA 测序仪(例如 Applied Biosystems PRISM 310 genetic analyzer 的型号)测定的。因此,如本领域所已知的,对由该自动方法所测定的任何 DNA 序列而言,本文所测定的任何核苷酸序列都可能含有一些错误。典型地,通过自动方法测出的核苷酸序列与被测序的 DNA 分子的实际核苷酸序列至少大约 90% 同源,更典型地,至少大约 95% 至至少大约 99.9% 同源。通过其它方法,包括本领域内公知的人工 DNA 测序方法,可对实际序列进行更为精确的测定。也如本领域所已知的,较之实际序列,测得的核苷酸序列中的单个插入或缺失将会导致核苷酸序列翻译中的框移,使得:从此类插入或缺失的点开始,通过测得的核苷酸序列编码的预计氨基酸序列完全不同于被测序的 DNA 分子实际编码的氨基酸序列。

[0032] 在一种优选的实施方式中,本发明涉及编码具有 L- 山梨糖酮脱氢酶活性(如序列表所公开的,SEQ ID NO:2)的多肽的多核苷酸及其互补链,或包括这些序列、DNA 序列或其片段的那些,以及能在标准条件下与此类序列杂交的、但是编码具有完全相同的氨基酸序列的多肽的 DNA 序列。

[0033] 对多核苷酸序列的相似性进行描述的另一种模式是确定此类序列是否能杂交。这取决于为杂交选用的条件。

[0034] 用于杂交的标准条件在本文中指下述条件:其是本领域技术人员通常用于探测特异性杂交信号的条件,或者,优选地,本领域技术人员使用的所谓“严谨杂交条件”。因此,在本文中使用的术语“严谨杂交条件”指:如果序列之间存在大约 95% 以及优选地至少 97% 的同源性,杂交将会发生。严谨杂交条件是,例如,在有或没有 100 μ g/ml 的鲑鱼精 DNA 的 DigEasyHyb 溶液(Roche Diagnostics GmbH)中,或在包含 50% 甲酰胺、5xSSC(150mM NaCl、15mM 柠檬酸三钠)、0.02% 十二烷基磺酸钠、0.1% N- 月桂酰肌氨酸和 2% 封闭试剂(Roche Diagnostics GmbH)的溶液中,用地高辛(DIG)标记的 DNA 探针(通过用 DIG 标记系统(Roche Diagnostics GmbH, 68298 mannheim, Germany)来制备的)在 42°C 温育 2 小时至 4 天,接着在 2xSSC 和 0.1% SDS 中,于室温下,洗两次过滤器,每次 5 至 15 分钟,然后在 65-68°C,于 0.5xSSC 和 0.1% SDS 或 0.1xSSC 和 0.1% SDS 中洗两次,每次 15-30 分钟。

[0035] 在一个方面,可以通过下述步骤来获得用于本发明中的编码 L- 山梨糖酮脱氢酶的基因、含有所述基因的核酸分子、表达载体和重组生物。

[0036] (1) 如下文所述,对属于 *Gluconobacter* 属或 *Acetobacter* 属的、能从 L- 山梨糖酮生产 L- 抗坏血酸的菌株进行转座子诱变,以获得能表达由所用的转座子编码的抗生素抗性的菌落;

[0037] (2) 用 L- 山梨糖酮作为底物进行筛选,选出 L- 抗坏血酸非生产突变体;

[0038] (3) 从突变体中分离出染色体 DNA;

[0039] (4) 通过菌落、噬菌斑或 Southern 杂交、PCR(聚合酶链式反应)克隆等,克隆含有来自染色体的转座子的 DNA 片段;

[0040] (5) 测定含有转座子插入的 DNA 片段的核苷酸序列;

[0041] (6) 从能从 L- 山梨糖酮生产 L- 抗坏血酸的亲本菌株中克隆 DNA 片段;

[0042] (7) 构建表达载体,其中编码 L- 山梨糖酮脱氢酶的基因能有效表达;

[0043] (8) 通过适于将 DNA 引入到宿主细胞中的方法,例如,转化、转导、接合转移

(conjugal transfer) 和 / 或电穿孔, 构建重组微生物, 其带有编码 L- 山梨糖酮脱氢酶的基因, 所述宿主细胞由此变成了本发明的重组生物。

[0044] 转座子诱变作为遗传分析的有效工具是已知的 (P. Gerhardt et al., "Methods for General and Molecular Bacteriology" Chapter 17, Transposon Mutagenesis; American Society for Microbiology)。

[0045] 多种转座子都是本领域内已知的, 例如 Tn3、Tn5、Tn7、Tn9、Tn10、噬菌体 Mu 等。它们中间, Tn5 已知几乎不具有插入特异性, 其尺寸相对地小。对于在本发明的实施中用于随机诱变的目的而言, Tn5 是优选的。一系列的 Tn5 衍生物, 被命名为 Mini-Tn5s 的, 也是可用于本发明的, 其由 19bp 的 Tn5 反向重复构成, 这是与抗生素抗性或其它选择性标记基因结合的转座所需要的。除 Tn5 转座酶 (tnp) 之外, 此类 Mini-Tn5s 被插入到自杀性载体中, 以构建有效的自杀性 Tn5 诱变系统。

[0046] 用转座子进行的随机诱变包括: 通过, 例如, 转化、转导、接合交配或电穿孔, 用自杀性质粒或噬菌体载体, 将转座子引入到目标细菌细胞中。可在转座子携带的标记的帮助下, 对得到的突变体进行筛选。所用的载体通过离析丢失之后, 可探测到转座子向受体细菌基因组中的转座。

[0047] 为将转座子引入到 *Gluconobacter* 属或 *Acetobacter* 属的微生物中, 通常使用所谓的自杀性载体 (包括, 例如, 噬菌体 P1 的衍生物) 和窄宿主范围质粒 (例如带有 ColE1 复制起点的 pBR325 的衍生物)。可通过感染, 以及通过转化、接合交配 (conjugal mating) 或电穿孔, 分别将噬菌体 P1 载体和质粒载体转移到受体细胞中, 其中, 优选地, 这些载体缺少受体的合适起点。对将使用的自杀性载体和转座子的选择取决于如下标准, 包括, 例如, 噬菌体敏感性、受体细胞的内源抗生素抗性、基因转移系统 (包括转化、接合转移、电穿孔或感染, 以将带有转座子的载体引入 *E. coli*) 的可获得性。

[0048] 用于本发明的优选载体中的一种是, 例如, 噬菌体 P1 (ATCC25404), 其能将其 DNA 注入到属于 *Gluconobacter* 或 *Acetobacter* 属的微生物中, 但是该 DNA 不能复制, 通过离析将会丢失。此类携带有 Tn5 的 P1 噬菌体 (P1::Tn5) 可以以噬菌体分解物的形式 (其可根据已知方法, 对携带有 P1::Tn5 的 *E. coli* 进行裂解来制备) 使用 (见, 例如 "Methods for General and Molecular Bacteriology" Chapter 17, Transposon Mutagenesis; American Society for Microbiology 或美国专利 5082785, 1992)。

[0049] 为验证缺陷型菌株真的携带有转座子, 可通过标准方法来进行例如菌落杂交或 Southern 杂交等方法, 其中使用经过标记的含有转座子的 DNA 片段作为探针 (Molecular cloning, a laboratory manual second edition, Maniatis T., et al., 1989)。

[0050] 可根据本发明的实施例 5 所述来分离此类突变体。转座子突变体可被用于进一步鉴定编码 L- 山梨糖酮脱氢酶的目标基因, 以及测定紧随转座子的区域的核苷酸序列。

[0051] 通过筛选出既显示载体选择标记又显示转座子的转化子, 可将含有转座子插入的 DNA 片段克隆进任何 *E. coli* 克隆载体, 优选地, pUC18、pUC 19、pBluescript II KS+ (Stratagene Europe) 及其相关物。可通过本领域已知的测序方法来测定与转座子相邻的核苷酸序列。

[0052] 或者, 当从能从 L- 山梨糖酮生产 L- 抗坏血酸的菌株中纯化所述所述的 L- 山梨糖酮脱氢酶多肽时, 可通过如下示意性的方法, 将想要的基因从染色体全 DNA 克隆到质粒或

噬菌体载体中：

[0053] (i) 通过例如基质辅助激光解吸附 / 电离 (MALDI) 等方法, 从纯化的蛋白质或其肽片段来测定部分的氨基酸序列。在 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 之后, 可通过分离此类整个蛋白质或通过肽酶处理, 从凝胶中制备此类整个蛋白质或肽片段。由此获得的蛋白质或其片段还可用于蛋白质测序仪, 例如 Applied Biosystems 自动气相测序仪 470A。该氨基酸序列可被用于用 DNA 合成仪 (例如, Applied Biosystems 自动 DNA 测序仪 381A) 来设计和制备寡核苷酸探针和 / 或引物。该探针可被用于: 通过例如, Southern 杂交、菌落杂交或噬菌斑杂交, 从携带有目标基因的菌株的基因文库中分离出携带有目标基因的克隆。

[0054] (ii) 或者还可以, 为了从基因文库中筛选出表达目标蛋白质的克隆的目的, 使用免疫方法, 其中使用针对目标蛋白质制备出的抗体。

[0055] (iii) 可通过, 例如 PCR, 用一套引物 (即, 根据上文测定的氨基酸序列合成的两条寡核苷酸) 从染色体总 DNA 中扩增出目标基因的 DNA 片段。然后, 通过 Southern 杂交、菌落杂交或噬菌斑杂交, 用上面获得的 PCR 产物作为探针, 从例如在 *E. coli* 中构建的基因文库分离出携带有整个基因的克隆。

[0056] 通过本领域内已知的方法, 使用基于本文公开的 DNA 序列设计的引物, 可通过 PCR 获得的 DNA 序列也是本发明的目的。

[0057] 可以例如用, 经过纯化的 L- 山梨糖酮脱氢酶蛋白质、经过纯化的重组 L- 山梨糖酮脱氢酶蛋白质 (例如, *E. coli* 中表达的加上 His 标签的 L- 山梨糖酮脱氢酶) 或其肽片段作为抗原, 来制备上述抗体。从 L- 山梨糖酮脱氢酶的核苷酸序列推断出的多肽序列可用作抗原, 以制备抗体。

[0058] 一旦获得了携带有想要的基因的克隆, 就可以通过公知的方法来测定目标基因的核苷酸序列了。

[0059] 为有效表达想要的基因 / 核苷酸序列, 可以使用多种启动子; 例如, 基因的原始启动子, 抗生素抗性基因 (例如, Tn5 的卡纳霉素抗性基因、pBR322 的氨苄青霉素抗性基因) 的启动子, *E. coli* 的 beta 半乳糖苷酶 (*lac*)、*trp*、*tac*、*trc* 启动子, lambda 噬菌体启动子和可在宿主细胞中发挥功能的任何启动子。为此目的而言, 宿主细胞可以选自细菌细胞、动物细胞 (包括人类细胞)、真菌细胞 (包括酵母细胞) 和植物细胞所构成的组。优选地, 宿主细胞属于能在体内表达作为活性形式的 L- 山梨糖酮脱氢酶的细菌, 特别是 *Gluconobacter*、*Acetobacter*、*Pseudomonas* 和 *Escherichia* 属的细菌。

[0060] 为进行表达, 其它调控元件, 例如, 在宿主细胞中 (其中将引入编码序列, 以提供本发明的重组细胞) 可操作的 Shine-Dalgarno (SD) 序列 (例如, AGGAGG 等, 包括在宿主细胞中可操作的天然和合成的序列) 以及转录终止子 (反向重复结构, 包括任何天然的和合成的序列), 可以与上述启动子一起使用。

[0061] 在对双链 DNA 的克隆中, 可以使用一系列宿主 / 克隆载体的组合。用于在 *E. coli* 中表达本发明的基因 (即, *SNDH* 基因) 的优选载体可以选自任何通常用于 *E. coli* 中的载体, 例如能表达加上 His 标签的重组蛋白质的 pQE 载体 (QIAGEN AG Switzerland)、pBR322 或其衍生物 (包括, 例如 pUC18 和 pBluescript II (Stratagene Cloning Systems, Calif., USA))、pACYC177 和 pACYC184 及其衍生物和来自广宿主范围质粒的载体, 例如 RK2 和 RSF1010。用于在细菌 (包括 *Gluconobacter*、*Acetobacter* 和 *Pseudomonas*) 中表达本

发明的核苷酸序列的优选载体选自可在 *Gluconobacter*、*Acetobacter* 和 *Pseudomonas* 以及优选的克隆生物（例如 *E. coli*）中复制的任何载体。优选的载体是广宿主范围载体，例如，粘粒载体（例如 pVK100）及其衍生物和 RSF1010。为使克隆的基因稳定且有效地表达，还为了对携带有克隆基因的宿主细胞进行有效地培养，应对载体的拷贝数和稳定性进行仔细考虑。含有例如可转座元件（例如 Tn5）的核酸分子也可用作载体，以将想要的基因引入到优选宿主中，尤其是染色体上。含有从优选宿主中分离出的任何 DNA 和本发明的 SNDHai 基因的核酸分子还可用于将该基因引入优选的宿主细胞，尤其是染色体上。可通过使用本领域公知的任何传统方法，例如，转化、转导、接合交配或电穿孔，在考虑宿主细胞和核酸分子性质的情况下，将此类核酸分子转移至优选的宿主中。

[0062] 用本领域公知的方法，本发明提供的 L- 山梨糖酮脱氢酶基因 / 核苷酸序列可被连接到合适的载体上，所述载体含有在宿主细胞中可操作的调控序列，例如，启动子、核糖体结合位点和转录终止子，以产生表达载体。

[0063] 为构建携带有表达载体的重组微生物，多种基因转移方法，包括，转化、转导、接合交配或电穿孔都可以使用。用于构建重组细胞的方法可以选自分子生物学领域公知的方法。例如，传统的转化系统可用于 *Gluconobacter*、*Acetobacter*、*Pseudomonas* 或 *Escherichia*。转导系统也可用于 *E. coli*。接合交配系统可广泛用于革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌，包括，例如，*E. coli*、*P. putidita* 和 *Gluconobacter*。接合交配的一个例子公开于 WO 89/06,668 中。接合可发生于，例如，液体培养基中或固体表面上。用于 SNDHai 生产的受体的例子包括，例如，*Gluconobacter*、*Acetobacter*、*Pseudomonas* 或 *Escherichia* 的微生物。可向用于接合交配的受体中加入选择性标记；例如，通常选择对萘啶酸或利福平的抗性。天然的抗性也可使用，例如，可将多粘菌素 B 的抗性用于多种 *Gluconobacter*。

[0064] 本发明提供了重组的 L- 山梨糖酮脱氢酶 (SNDHai)。可以通过将本发明提供的 L- 山梨糖酮脱氢酶基因引入到上文所述的宿主细胞中，来增加 L- 山梨糖酮脱氢酶的产量。在一个方面，通过使用本发明的 L- 山梨糖酮脱氢酶基因，在选自由 *Gluconobacter*、*Acetobacter*、*Pseudomonas* 或 *Escherichia* 所构成的组的宿主细胞中，对 L- 山梨糖酮脱氢酶蛋白质进行生产。

[0065] 能表达由本发明的多核苷酸序列编码的 SNDHai 的微生物可在有氧条件下被培养于补充有合适营养物的水性培养基中。培养可以以分批、补料分批、半连续或连续模式进行。培养期可根据，例如，用于表达目标多肽的宿主、pH、温度和使用的营养培养基而变动，其优选为：以分批或补料分批模式进行大约 1 至大约 10 天。培养可在，例如，大约 4.0 至大约 9.0 的 pH 下进行，优选地，大约 5.0 至大约 8.0。用于进行培养的优选的温度范围为大约 13°C 至大约 36°C，优选地，从大约 18°C 至大约 33°C。通常，培养既可以含有下述营养物质，例如，可吸收碳源（例如，甘油、D- 甘露醇、D- 山梨糖醇、L- 山梨糖、赤藻糖醇、核糖醇、木糖醇、阿糖醇、肌糖、半乳糖醇、D- 核糖、D- 果糖、D- 葡萄糖和蔗糖，优选地，D- 山梨糖醇、D- 甘露醇和甘油）；以及可消化的氮源，例如，有机物质，例如，蛋白胨、酵母提取物、烘焙酵母、尿素、氨基酸和玉米浸出液。多种无机物质也可被用作氮源，例如，硝酸盐和铵盐。此外，培养基通常含有无机盐，例如，硫酸镁、硫酸锰、磷酸钾和碳酸钙。

[0066] 应当理解，用包含由本发明的多核苷酸编码的 SNDHai 的宿主，从底物来生产维生素 C 的方法是用生长中的细胞来进行的，即，细胞的比生长速率例如为至少 0.02h^{-1} 。

[0067] 本发明的一种实施方式是经过分离的本文公开的核苷酸序列编码的 SNDHai 用于生产维生素 C 的用途。为在培养之后从微生物中分离和纯化出 SNDHai, 可从液体培养基中收获微生物细胞, 例如, 通过离心或过滤。可对收获的细胞进行洗涤, 例如, 用水、生理盐水或具有适当 pH 的缓冲溶液。可将洗过的细胞悬浮于合适的缓冲溶液中, 并使其裂解, 这通过, 例如均质机、超声波仪、French 压力仪来进行, 或者通过用溶菌酶等去处理, 以获得破碎的细胞的溶液。可从不含细胞的提取液或破碎的细胞中对 L- 山梨糖酮脱氢酶进行分离和纯化, 优选地, 通过标准方法从膜的部分获得, 所述方法例如: 超离心、用合适的去垢剂进行差异溶解 (differential solubilization)、通过盐或其它合适的试剂进行沉淀、透析、离子交换色谱、羟基磷灰石色谱、疏水色谱、尺寸排除色谱、亲和色谱或结晶。当重组的 L- 山梨糖酮脱氢酶作为加上标签 (例如, His 标签) 的多肽被生产时, 可用亲和树脂, 例如 Nickel 亲和树脂对其进行纯化。可通过光度测量来监测 L- 山梨糖酮的纯化, 通过使用, 例如人工电子受体, 例如, 氯化硝基四氮唑蓝 (NBT) 和吩嗪硫酸甲酯、2,6- 二氯靛酚 (DCIP)、铁氰化物或细胞色素 c 来进行。

[0068] 本发明提供了在本文所述的 SNDHai 的帮助下对 L- 抗坏血酸的生产。SNDHai 的来源并不重要。该方法可利用, 例如, 天然就能表达活性 SNDHai 酶的微生物、从所述微生物中分离出来的本发明的核苷酸序列编码的 SNDHai、上文所述的带有本发明的 SNDHai 基因的重组生物, 或者通过使用以膜部分形式存在的天然的和 / 或重组的 SNDHai、下文所述的作为生物催化剂以将 L- 山梨糖酮转化为 L- 抗坏血酸的可溶的酶或被固定的酶来进行。上述用于分离和纯化 SNDHai 的方法可用于天然的以及重组的 SNDHai。

[0069] 可按照上文所述对用于从 L- 山梨糖酮产生 L- 抗坏血酸的重组生物进行培养。优选地, 所述重组生物选自由携带有本发明的 L- 山梨糖酮脱氢酶基因的 *Gluconobacter*、*Acetobacter*、*Pseudomonas* 和 *Escherichia* 所构成的组。可在与上文所述相同的条件下对重组微生物进行培养。如果被用于生产 L- 抗坏血酸的重组生物不能将任何上述碳源转化为 L- 山梨糖酮, 那么必须向培养基中添加 L- 山梨糖酮, 使其被用作为生产 L- 抗坏血酸的前体。反应时间可随 pH、温度和将使用的反应混合物而变动, 其优选为大约 1 至大约 10 天, 以分批或补料分批方式进行。

[0070] 在一种实施方式中, 重组或天然的 (即, 经过分离的非重组的酶) 本发明的 SNDHai, 可纯化自上述培养基中, 并可以以可溶的或被固定的酶的形式作为生物催化剂用于将 L- 山梨糖酮转化为 L- 抗坏血酸, 这可以以技术人员已知的任何工艺模式来进行, 例如分批、补料分批、办连续或连续模式。经过纯化的 L- 山梨糖酮脱氢酶可被, 例如, 以可溶形式, 通过膜设备保留于反应容器中, 或被固定于任何固体界面 (例如, 多孔的或聚合的基质) 上的酶来使用。例如, 该酶可与具有一个或多个功能基团的树脂的膜、颗粒等直接结合, 或者其可通过具有一个或多个功能基团的桥联分子 (例如, 戊二醛) 结合到树脂上。使用可溶的、保留的或固定形式的经过纯化的酶的反应可以在需氧条件下发生于, 例如, 含有 L- 山梨糖酮和其它合适营养物的水性培养基中。反应培养基可以含有, 例如, 无机盐, 例如, 硫酸镁、磷酸钾和碳酸钙。反应可在大约 4.0 至 9.0 的 pH 下进行, 优选在大约 5.0 至大约 8.0 的 pH 下。用于进行反应的优选的温度范围为从大约 13°C 至大约 36°C, 优选地, 从大约 18°C 至大约 33°C。

[0071] 可被用于本发明的微生物可被公众从不同来源获得, 例如, Deutsche Sammlund

von Mikroorganismen und Zellkulturen(DSMZ), Mascheroder Weg1B, D-38124 Braunschweig, Germany; American Type Culture Collection(ATCC), P. O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA, 于 2003 年 5 月 12 日; 或, Culture Collection Division, NITE Biological Resource Center, 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, 292-0818, Japan(以前: Institute for Fermentation, Osaka(IFO), 17-85, Juso-honmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japan)。保存到 IFO 的优选的细菌的例子例如是 *Gluconobacter oxydans*(以前被称为 *G. melanogenus*) IFO3293、*Gluconobacter oxydans*(以前被称为 *G. melanogenus*) IFO3292、*Gluconobacter oxydans*(以前被称为 *G. rubiginosus*) IFO3244、*Gluconobacter frateurii*(以前被称为 *G. industrius*) IFO3260、*Gluconobacter cerinus* IFO3266、*Gluconobacter oxydans* IFO 3287 和 *Acetobacter aceti* subsp. *orleanus* IFO 3259, 上述这些都于 1954 年 4 月 5 日被保藏; 1975 年 10 月 22 日保藏的 *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IFO13693 和 1977 年 12 月 8 日保藏的 *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IFO13773。菌株 *Acetobacter* sp. ATCC 15164 也是优选细菌的例子, 其被保藏于 ATCC。菌株 *Gluconobacter oxydans*(以前被称为 *G. melanogenus*) N44-1 是优选细菌的另一个例子, 其是菌株 IFO 3293 的衍生物, 在 Sugisawa et al., Agric. Biol. Chem. 54:1201-1209, 1990 中有所描述。

[0072] 应当理解, 上述微生物还包括此类菌株的具有同样生理属性的异名(synonym)或基原异名(basonym), 其如 International Code of Nomenclature of Prokaryotes 所定义。

[0073] 在另一个方面, 本发明涉及以高产量生产 L-抗坏血酸(维生素 C)的新颖的方法, 所述方法通过使用能将给定的碳源转化为维生素 C 的微生物的静止细胞来实现。

[0074] 使用不同的培养方法, 直接对 L-抗坏血酸进行的生产已被报道于多种微生物中。但是, 此类方法的缺点是维生素 C 的低产量, 因为产物具有不稳定性。例如, 使用已知能生产 2-酮-L-古洛酸(gulonic acid)(2-KGA)和维生素 C 的微生物, 通过微生物对维生素 C 进行的生产的产量会进一步受到相对高的对 2-KGA 的生产的限制, 2-KGA 更容易被所述微生物所合成, 这会导致, 例如, 维生素 C 和 2-KGA 的浓度比小于 0.1。因此, 本发明的目的是改进对维生素 C 的微生物生产, 以获得较之现有技术中所述的方法更高的产量。

[0075] 令人惊奇地, 已经发现, 用能进行从底物到维生素 C 的直接转化的微生物的静止细胞来开展的方法, 能获得更高产量的维生素 C。

[0076] 具体而言, 本发明提供了一种生产维生素 C 的方法, 所述方法包括: 在包含微生物的静止细胞的培养基中, 将底物转化为维生素 C。

[0077] 用于上述使用微生物静止细胞的方法的底物可以是能被转化为 L-抗坏血酸的碳源, 其可以容易地从 D-葡萄糖或 D-山梨糖醇代谢途径获得, 例如, D-葡萄糖、D-山梨糖醇、L-山梨糖、L-山梨糖酮、2-酮-L-古洛糖酸盐/酯、D-葡萄糖酸盐/酯、2-酮-D-葡萄糖酸盐/酯, 或 2,5-二酮-葡萄糖酸盐/酯。其它可能的底物可以是半乳糖。优选地, 底物选自, 例如, D-葡萄糖、D-山梨糖醇、L-山梨糖或 L-山梨糖酮, 更优选地, 选自 D-葡萄糖、D-山梨糖醇或 L-山梨糖, 以及最优选地, 选自 D-山梨糖醇或 L-山梨糖。在使用微生物静止细胞进行的上述方法的方面, 术语“底物”和“生产底物”在本文中可互换使用。

[0078] 在使用微生物静止细胞进行的上述方法的方面, 从底物向维生素 C 的转化指: 通过微生物来进行从底物产生维生素 C 的转化, 即, 底物可被直接转化为维生素 C。在允许上

文定义的从底物进行的此类转化的条件下,对所述微生物进行培养。

[0079] 针对使用微生物静止细胞进行的上述方法,本文中使用的培养基可以是任何合适的用于生产维生素 C 的培养基。典型地,该培养基是包含:例如,盐、底物和某个 pH 的水性培养基。其中底物被转化为维生素 C 的培养基还被称为生产培养基。

[0080] 在使用微生物静止细胞进行的上述方法的方面,任何能进行从底物向维生素 C 的转化的微生物都可使用,例如,酵母、藻类或细菌,它们可以作为野生型菌株、通过经典诱变和选择方法获得的突变体菌株或者作为重组菌株存在。此类酵母的例子可以是,例如, *Candida*、*Saccharomyces*、*Zygosaccharomyces*、*Scyzosaccharomyces* 或 *Kluyveromyces*。此类藻类的例子可以是,例如, *Chlorella*。此类细菌的例子可以是,例如, *Gluconobacter*、*Acetobacter*、*Ketogulonicigenium*、*Pantoea*、*Cryptococcus*、*Pseudomonas* (例如, *Pseudomonas putida*) 和 *Escherichia*, 例如 *Escherichia coli*。优选的是 *Gluconobacter* 或 *Acetobacter acetii*, 例如, *G. oxydans*、*G. cerinus*、*G. frateurii*、*A. acetii* subsp. *xylinum* 或 *A. acetii* subsp. *orleanus*。

[0081] 在使用微生物静止细胞进行的上述方法的方面,可被用于本发明的微生物可被公众从不同来源获得,例如, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Mascheroder Weg 1B, D-38124 Braunschweig, Germany; American Type Culture Collection (ATCC), P.O. Box 1549, Manassas, VA 20108 USA, 于 2003 年 5 月 12 日; 或, Culture Collection Division, NITE Biological Resource Center, 2-5-8, Kazusakamatari, Kisarazu-shi, Chiba, 292-0818, Japan (以前: Institute for Fermentation, Osaka (IFO), 17-85, Jusohonmachi 2-chome, Yodogawa-ku, Osaka 532-8686, Japan)。保存到 IFO 的优选的细菌的例子例如是 *Gluconobacter oxydans* (以前被称为 *G. melanogenus*) IFO 3293、*Gluconobacter oxydans* (以前被称为 *G. melanogenus*) IFO 3292、*Gluconobacter oxydans* (以前被称为 *G. rubiginosus*) IFO 3244、*Gluconobacter frateurii* (以前被称为 *G. industrius*) IFO 3260、*Gluconobacter cerinus* IFO 3266、*Gluconobacter oxydans* IFO 3287 和 *Acetobacter acetii* subsp. *orleanus* IFO 3259, 上述这些都于 1954 年 4 月 5 日被保藏; 1975 年 10 月 22 日保藏的 *Acetobacter acetii* subsp. *xylinum* IFO 13693 和 1977 年 12 月 8 日保藏的 *Acetobacter acetii* subsp. *xylinum* IFO 13773。菌株 *Acetobacter* sp. ATCC 15164 也是优选细菌的例子, 其被保藏于 ATCC。菌株 *Gluconobacter oxydans* (以前被称为 *G. melanogenus*) N44-1 是优选细菌的另一个例子, 其是菌株 IFO 3293 的衍生物, 在 Sugisawa et al., Agric. Biol. Chem. 54:1201-1209, 1990 中有所描述。

[0082] 在使用微生物静止细胞进行的上述方法的方面, 应当理解, 上述微生物还包括此类菌株的具有同样生理属性的异名 (synonym) 或基原异名 (basonym), 其如 International Code of Nomenclature of Prokaryotes 所定义。本文中使用的对微生物的命名是 International Committee on systematics of Prokaryotes and the Bacteriology and Applied Microbiology Division of the International Union of Microbiological Societies 官方接受的 (在优先权申请的提交日期时), 并被其官方出版物 International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM) 所公开。具体的参考文献是 Urbance et al., IJSEM (2001) vol 51:1059-1070, 以及 IJSEM (2001) vol 51:1231-1233

上的修订通知,其中描述了对作为 *Ketogulonicigenium vulgare* 的 *G. oxydans* DSM 4025 的分类学上的重新归类。

[0083] 本文中使用的静止细胞指下述微生物的细胞,所述微生物例如是存活但不能活跃生长的,或者以低的比生长速率 [μ] 生长的,例如,低于 0.02h^{-1} 的生长速率,优选地,低于 0.01h^{-1} 。显示出上述生长速率的细胞被称为“静止细胞模式”。

[0084] 如上所述使用微生物静止细胞来进行的本发明的方法可以以不同的步骤或阶段来进行:优选地,在第一个步骤(也被称为步骤(a)或生长阶段)中,于能够生长的条件下对微生物进行培养。该阶段由条件的改变终止,其中,所述条件改变使得微生物的生长速率降低至静止细胞产生,这也被称为步骤(b),接着是用(b)的静止细胞从底物来生产维生素C,这也被称为生产阶段。

[0085] 使用微生物静止细胞的上述方法中进行的生长和生产阶段可在同样的容器中进行,即,仅有一个容器,或在两个或更多的不同容器中进行,在两个阶段之间具有可选的分离步骤。可通过任何合适的手段从细胞中回收得到产生的维生素C。回收意味着,例如,产生的维生素C可从生产培养基中分离出来。可选地,由此产生的维生素C可被进一步加工。

[0086] 就使用微生物静止细胞进行上述方法的本发明的目的而言,术语“生长阶段”、“生长(growing)步骤”、“生长(growth)步骤”和“生长时期”在本文中可互换使用。这同样适用于“生产阶段”、“生产步骤”、“生产时期”。

[0087] 进行本发明的使用微生物静止细胞的上述方法的一种途径可以是下述方法,其中:微生物生长于第一种容器(所谓的生长容器)中,它们作为静止细胞的来源,细胞中的至少一部分被转移到第二种容器(所谓的生产容器)中。生产容器中的条件可以是:使得从生长容器中转移出的细胞变为上文定义的静止细胞的条件。维生素C在第二种容器中产生,并从其中被回收。

[0088] 在使用微生物静止细胞进行的上述方法的方面,在一个方面,生长步骤可在水性培养基中进行,即,补充有助于在需氧条件下生长的合适营养物的生长培养基。培养可以以,例如,分批、补料分批、半连续或连续模式来进行。培养时间可以随所用的细胞种类、pH、温度、营养培养基而变化,其可以为例如:以分批或补料分批模式进行时,10小时至大约10天之间,优选为大约1天至大约10天之间,更优选地,大约1至大约5天,取决于所述微生物。如果细胞以连续模式被培养,驻留时间可以例如为大约2至大约100小时,优选地,大约2至大约50小时,取决于所述微生物。如果微生物选自细菌,培养可进行于大约3.0至大约9.0的pH下,优选为大约4.0至大约9.0,更优选地,大约4.0至大约8.0,进一步更优选地,大约5.0至大约8.0。如果使用了藻类或酵母,培养可进行于低于大约7.0的pH下,优选低于大约6.0,更优选低于大约5.5,最优选地,低于大约5.0。使用细菌进行培养的合适的温度范围为,例如,从大约 13°C 至大约 40°C ,优选地,从大约 18°C 至大约 37°C ,更优选地,从大约 13°C 至大约 36°C ,最优选地,从大约 18°C 至大约 33°C 。如果使用藻类或酵母,用于进行培养的合适的温度范围可以例如,大约 15°C 至大约 40°C ,优选地,大约 20°C 至大约 45°C ,更优选地,大约 25°C 至大约 40°C ,进一步更优选地,大约 25°C 至大约 38°C ,最优选地,大约 30°C 至大约 38°C 。用于进行培养的培养基通常可以含有下述营养物,例如,可被吸收的碳源,例如,甘油、D-甘露醇、D-山梨糖醇、L-山梨糖、赤藻糖醇、核糖醇、木糖醇、阿糖醇、肌糖、半乳糖醇、D-核糖、D-果糖、D-葡萄糖和蔗糖,优选地,L-山梨糖、D-葡萄糖、D-山梨

糖醇、D-甘露醇和甘油；以及可消化的氮源，例如，有机物质，例如，蛋白胨、酵母提取物和氨基酸。所述培养基可以具有或不具有尿素和 / 或玉米浸出液和 / 或烘焙酵母。多种无机物质也可被用作氮源，例如，硝酸盐和铵盐。此外，培养基通常含有无机盐，例如，硫酸镁、硫酸锰、磷酸钾和碳酸钙。

[0089] 在使用微生物静止细胞进行的上述方法的方面，在生长阶段中，比生长速率例如为至少 0.02h^{-1} 。对于以分批、补料分批或半连续模式生长的细胞而言，生长速率取决于，例如，生长培养基的组成、pH、温度等。通常，生长速率可以例如在大约 0.05 至大约 0.2h^{-1} 的范围内，优选地，在大约 0.06 至大约 0.15h^{-1} 的范围内，最优选地，在大约 0.07 至大约 0.13h^{-1} 的范围内。

[0090] 在使用微生物静止细胞进行的上述方法的另一个方面，静止细胞可通过对个别微生物在作为生长容器的琼脂平板上进行培养来提供，其中使用了基本上相同的条件，例如，如上所述的培养时间、pH、温度、营养培养基，并添加有琼脂。

[0091] 在使用微生物静止细胞进行的上述方法的方面，如果生长和生产阶段进行于两种分离的容器中，那么来自生长阶段的细胞可被收获或浓缩，并转移至第二种容器（所谓的生产容器）中。该容器可以含有补充有任何适用的生产底物（可通过细胞被转化为 L-抗坏血酸）的水性培养基。来自生长容器的细胞可通过任何合适的操作被收获或浓缩，例如，离心、膜横流（membrane crossflow）超滤或微滤、过滤、倾析、絮凝。由此获得的细胞还可以以原始培养液的形式从生长容器转移至生产容器中，而不用被收获、浓缩或洗涤，即，以细胞悬浮液的形式被转移。在一种优选的实施方式中，细胞以细胞悬浮液的形式从生长容器被转移至生产容器，在它们之间没有任何洗涤或分离步骤。

[0092] 因此，本适用微生物静止细胞进行的上述方法的一种优选的实施方式中，上文所述的本发明方法的步骤 (a) 和 (c) 不被任何洗涤和 / 或分离步骤分开。

[0093] 在使用微生物静止细胞进行的上述方法的方面，如果生长和生产阶段进行于同样的容器中，细胞可以生长于适当的条件下，达到理想的细胞密度，接着用含有生产底物的生产培养基来替换生长培养基。此类替换可以例如是，在从容器中收回或收获上清液的同时，以与之相同的速度，将生产培养基补入到容器中。为将静止细胞保留于容器中，可以使用用于细胞回收或驻留的操作，例如，细胞回收步骤。此类回收步骤，例如包括但不限于使用如下的方法：离心机、过滤器、超滤步骤的膜横流微滤、膜反应器、絮凝或在合适的多孔、非多孔或聚合基质上的细胞固定。在转移阶段之后，容器被用于下述加工条件，在此条件下，细胞以如上定义的静止细胞模式存在，生产底物能有效地转化为维生素 C。

[0094] 在使用微生物的静止细胞的上述方法的方面，用于生产步骤中的生产容器中水性培养基在下文中被称为生产培养基，其可以仅含有将被转化为 L-抗坏血酸的生产底物，或可以含有，例如，额外的无机盐，例如，氯化钠、氯化钙、硫酸镁、硫酸锰、磷酸钾、磷酸钙和碳酸钙。生产培养基还可以含有可消化的氮源，例如有机物质，例如，蛋白胨、酵母提取物、尿素、氨基酸和玉米浸出液；以及无机物质，例如，氨、硫酸铵和硝酸钠，其浓度为使得细胞被保持为上文定义的静止细胞模式的浓度。培养基可以含有或不含有尿素和 / 或玉米浸出液和 / 或烘焙酵母。生产步骤可以，例如以批次、补料分批、半连续或连续模式进行。在补料分批、半连续或连续模式下，来自生长容器和生产培养基的两种细胞都可以以合适的补料速率被连续或间歇地补入到生产容器中。或者，仅有生产培养基可被连续或间歇补入到生产

容器中,而来自生长容器的细胞可被立刻转移至生产容器。来自生长容器的细胞可被用作生产容器中的细胞悬浮液,或者可被用作:例如,在任何固相(例如,多孔或聚合基质)上絮凝或固定的物质。生长时期(被定义为从底物进入到生产容器中开始,到收获含有维生素C的上清液,所谓的收获流(harvest stream)之间的时期),可根据,例如,使用的细胞的浓度和种类、pH、温度和营养培养基而变动,其优选在大约2至大约100小时之间。pH和温度可与生长步骤中的pH和温度不同,但应与生长步骤中的基本上相同。

[0095] 在使用微生物的静止细胞的上述方法的一种优选的实施方式中,生产步骤可以以连续模式进行,这意味着,含有来自生长容器的细胞的第一种补料流和含有底物的第二种补料流被连续或间歇补入到生产容器中。第一种流可以仅含有从生长培养基中分离/分开的细胞,或直接来自生长步骤的细胞悬浮液,即,悬浮于生长培养基中的细胞,而没有任何中间的细胞分离、洗涤和/或分离步骤。在本文中定义的第二种补料流可以包括生产步骤的操作所需要的所有其它补料流,例如,以一种或多种不同的流的形式存在的包含底物的生产培养基、用于稀释的水以及用于控制pH的碱。

[0096] 在使用微生物的静止细胞的上述方法的方面,当两种流都连续补料时,第一种流的补料速率与第二种流的补料速率之比可在大约0.01至大约10之间变动,优选地,在大约0.01至大约5之间变动,优选地,在大约0.02至大约2之间变动。该比例取决于第一种和第二种流中各自的细胞和底物地浓度。

[0097] 进行本发明的使用微生物静止细胞的上述方法的另一种方式可以是:在生长容器中使用一定细胞密度的静止细胞的方法。通过技术人员已知的方法,于600nm处,细胞密度可作为吸收单位(光学密度)被测得。在一种优选的实施方式中,生产步骤中的细胞密度为至少大约10,更优选地,大约10至大约200之间,进一步更优选地,大约15至大约200之间,进一步更优选地,大约15至大约120之间,最优选地,大约20至大约120之间。

[0098] 在使用微生物的静止细胞的上述方法的方面,为在生产阶段期间(例如,以连续或半连续模式进行的),以想要的细胞密度将细胞保持于生产容器中,本领域内已知的任何手段都可以使用,例如,通过离心、过滤、微滤的膜横流超滤、倾析、絮凝进行的细胞再循环,通过膜设备进行的细胞驻留或细胞固定。此外,在生产步骤以连续或半连续模式进行的情况下,从生长容器中连续或间歇补入细胞,生产容器中的细胞密度可被保持于恒定的水平,例如,通过从生产容器中收获一定量的细胞来进行,所述的量相应于从生长容器中补入的细胞的量。

[0099] 在使用微生物静止细胞的上述方法的方面,从生产容器中回收/收获在所谓的收获流中含有的产生出的维生素C。收获流可以包括,例如,来自生产容器的不含细胞的或含有细胞的水溶液,其中含有通过生产容器中的静止细胞从生产底物转化得到的维生素C。可通过本领域内已知的任何操作,将仍处于收获流中的细胞与维生素C分开,例如,过滤、离心、倾析、膜横流超滤或微滤、切线流超滤或微滤或端点(dead end)过滤。在该细胞分离操作之后,收获流中基本不含细胞。

[0100] 在使用微生物静止细胞的上述方法的方面,在一个方面,本发明的方法使得维生素C的产量为至少大约1.8g/l,优选为至少大约2.5g/l,更优选为至少大约4.0g/l,最优选为至少大约5.7g/l。在一种实施方式中,由本发明的方法产生的维生素C的产量在大约1.8至大约600g/l的范围内。维生素C的产量指直接从生产容器中获得的收获流中(即包

含维生素 C 的不含细胞的上清液中) 的维生素 C 浓度。

[0101] 在使用微生物静止细胞的上述方法的方面, 在本发明的一种实施方式中, 使用重组微生物的静止细胞, 例如重组细菌, 通过上述方法来生产维生素 C。优选地, 重组细菌选自能在体内表达作为活性形式的 L- 山梨糖酮脱氢酶的细菌, 特别是 *Gluconobacter*、*Acetobacter*、*Pseudomonas* 和 *Escherichia* 属的细菌, 最优选地, 来自 *Gluconobacter*、*Acetobacter* 或 *E. coli* 的细菌。进一步更优选地是, 例如, *G. oxydans* 和 *E. coli*, 最优选地, 选自由 *G. oxydans* N44-1、*G. oxydans* IF0 3293 和 *G. oxydans* IF0 3244 所构成的组。重组微生物可以是下述任何微生物: 已用公知技术对其进行了遗传改造, 以在其染色体上或在质粒上含有一种或多种想要的引入到所述微生物中的基因, 使得(例如) 所述基因过量表达。引入到所述微生物中的想要的基因可以编码, 例如, 从底物到维生素 C 的转化中涉及到的酶。在一种优选的实施方式中, 想要的基因编码 L- 山梨糖酮脱氢酶, 其催化 L- 山梨糖酮向维生素 C 的转化。一种用于本发明的优选的 L- 山梨糖酮脱氢酶是, 例如, SEQ ID NO:2 所示的 *G. oxydans* N44-1 的 L- 山梨糖酮脱氢酶 (SNDHai) (Sugisawa et al., *Agric. Biol. Chem.* 54:1201-1209, 1990), 编码所述 SNDHai 的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。所述 SNDHai 的功能性衍生物可被用于本发明的目的。应当理解, 较之 SEQ ID NO:1, 具有至少 80%, 优选至少 90% 同源性, 并编码能催化 L- 山梨糖酮向维生素 C 的转化的酶的核苷酸序列也是本发明的一部分。

[0102] 重组微生物, 例如 *G. oxydans* N44-1, 可以包含克隆于合适的质粒上或整合进其染色体的 SNDHai 的若干拷贝。适合用于本发明的质粒拷贝例如在每个被转化的微生物中大约 2 个至大约 15 个的范围内, 优选在大约 5 个至大约 10 个的范围内。可通过, 例如, 将 SDS-PAGE 上可见的各条条带的亮度相比较来确定质粒拷贝数。

[0103] 在使用微生物静止细胞的上述方法的方面, 当使用用于本发明方法的重组微生物时, 生长和生产步骤可与上文所述基本相同。如果使用了包含 SNDHai 的重组微生物, 例如, 具有增加的 SNDHai 剂量的重组 *G. oxydans* N44-1, 生长培养基可以含有, 例如, 单独的 D- 山梨糖醇、L- 山梨糖、甘油或 D- 葡萄糖或它们的混合物, 一种或多种合适的氮源和盐。生长培养基可以含有, 例如, D- 山梨糖醇和 / 或 L- 山梨糖和盐。可基本按照本文所述来进行维生素 C 的收获。

[0104] 在另一个方面, 本发明的方法可与下述其它步骤组合, 所述步骤用于将维生素 C 与收获流中含有的其它组分进行进一步分离和 / 或纯化, 即, 所谓的下游加工步骤。这些步骤可以包括技术人员已知的任何手段, 例如, 浓缩、结晶、沉淀、吸附、离子交换、电渗析、两极膜电渗析和 / 或反渗透。维生素 C 可作为游离酸形式或其已知的任何盐的形式被进一步纯化, 这是通过下述操作手段来进行的, 例如, 用活性炭进行处理、离子交换、吸附和洗脱、浓缩、结晶、过滤和干燥。特别地, 将维生素 C 与收获流中其它组分的第一次分离可通过下述方法地任何合适的组合或重复来进行, 所述方法为: 两区室或三区室电渗析 (two-or three-compartment electrodialysis), 两极膜电渗析, 反渗透或吸附, 其进行于, 例如, 离子交换树脂或非离子树脂上。如果获得的维生素 C 的形式为 L- 抗坏血酸的盐, 将该盐形式转化为游离酸形式可通过, 例如, 两极膜电渗析、离子交换、模拟移动床色谱技术等来进行。上述步骤的组合, 例如, 将电渗析和两极膜电渗析组合为一个步骤也可使用, 上述步骤, 例如, 多个使用模拟移动床色谱方法的离子交换步骤的组合也可以使用。上述流程中的任何一种单

独或互相的组合就构成了用于分离和纯化产物,即维生素 C 的方便的手段。由此获得的产物还可被进一步分离(通过下述方法,例如,通过浓缩、结晶、沉淀、对晶体的洗涤和干燥来进行)和/或进一步纯化(用活性炭处理,离子交换和/或重结晶)。

[0105] 在一种优选的实施方式中,通过上述一系列下游加工步骤来从收获流中纯化维生素 C,而不必要在该过程中的任何时刻将其转移到非水性溶液中,即,所有步骤都在水性环境中进行。此类优选的下游加工流程可以包括,例如,通过两区室或三区室电渗析对来自生产容器的收获流进行浓缩,通过两极膜电渗析和/或离子交换将浓缩溶液中以其盐的形式存在的维生素 C 转化为其酸的形式,通过用活性炭进行处理、离子交换或非离子树脂来进行纯化,接着进行进一步的浓缩步骤和结晶。这些晶体可被分离、洗涤和干燥。如果必要的话,晶体还可被重新溶解于水中,用活性炭和/或离子交换树脂对其进行处理,并对其进行重结晶。然后可对上述晶体进行分离、洗涤和干燥。

[0106] 下述实施例进一步地阐述了本发明,但其并不欲以任何方式对本发明加以限制。

[0107] 实施例 1 用纯化的 SNDHai 来生产 L-抗坏血酸

[0108] 1. 纯化 SNDHai

[0109] 将通过补料分批培养(关于培养,见实施例 3)的能生产 SNDHai 的微生物细胞悬浮于 25ml 磷酸缓冲液(20mM, pH7.0)中,所述缓冲液中含有 2mM 的 $MgCl_2$ 、1mM 二硫苏糖醇(DTT)和 2-3 片不含 EDTA 的蛋白酶抑制剂药片(Roche Diagnostics GmbH)。用 French Pressure cell 对细胞悬浮液进行三次处理。随后,加入 25ml 磷酸缓冲液(20mM, pH 7.0,其中含有 2mM 的 $MgCl_2$ 、1M NaCl),对悬浮液进行超离心(30,000rpm,60 分钟,4℃)。用磷酸缓冲液(20mM, pH 7.0,其中含有 2mM 的 $MgCl_2$ 、500mM NaCl)对含有膜部分的沉淀进行洗涤,然后将其悬浮于适当量的磷酸缓冲液(20mM, pH 7.0,其中含有 2mM 的 $MgCl_2$)中。然后加入 N-辛基葡萄糖苷(Fluka),至终浓度为 2% (w/v),在冰上轻微搅拌下将悬浮液培养 90 分钟。离心(20,000rpm,60 分钟,4℃)后,收集澄清的、略带红色的上清液,加入终浓度为 15% (w/v) 的聚乙二醇 6000(Fluka)。在 4℃ 轻微振荡下培养 60 分钟后,接着进行离心(10,000rpm,30 分钟,4℃),将沉淀溶解于 Tris-HCl 缓冲液(20mM, pH 7.6,含有 2mM 的 $MgCl_2$ 和 0.5% (w/v) 月桂基磺基甜菜碱)中。在 4℃ 轻微振荡下过夜后,对溶液进行离心(20,000rpm,30 分钟,4℃)。收集上清液,按照下述方法对其进行进一步纯化。

[0110] 下述纯化步骤进行于 4℃,其在 Ä KTA Explorer 10 S-系统(AmershamBiosciences)上进行,其中使用软件 UNICORN 3.1。用于离子交换色谱的典型流速在 1-2ml/分钟的范围。在 280nm 处对蛋白质洗脱进行监测,用标准的光度检测,在纯化的所有阶段(见下文)对 SNDHai 活性部分进行测定,或对纯化部分进行产物检测。

[0111] 用 20mM Tris-HCl 缓冲液(pH 7.6,含有 2mM 的 $MgCl_2$ 和 0.5% (w/v) 月桂基磺基甜菜碱),在 Sephadex G 25-凝胶过滤柱(空体积:2.5ml)上,对澄清的上清液 IV 进行脱盐,所述上清液以 2.5ml 为一份。

[0112] 收集 SNDHai 阳性部分,将其中一份(大约 10ml)置于强阴离子交换柱(例如, Mono-Q HR, Amersham Biosciences,柱体积:8ml)上,所述柱在使用之前已用缓冲液 A1(10mM Tris、10mM BisTris、10mM MES、2mM $MgCl_2$ 、0.5% 月桂基磺基甜菜碱, pH7.6)平衡过。用 100% 的缓冲液 A1 来洗脱未结合的蛋白质,四份柱体积之后,应用在 6 份柱体积内变化到 100% 缓冲液 B1(Tris, 10mM ;BisTris, 10mM ;MES, 10mM ; $MgCl_2$, 2mM 和月桂基磺基

甜菜碱, 0.5%, pH4.7) 的线性 pH 梯度, 接着是 8 份柱体积的 100% 缓冲液 B1。在大约 6.5 的 pH 值 (其非常接近于从氨基酸序列计算出的 6.52 的 pI 值) 洗脱出了 SNDHai。收集活性部分, 用等量的 HEPES- 缓冲液 (50mM, pH8.0, 其中含有 2mM $MgCl_2$ 和 0.5% 月桂基磺基甜菜碱, 终体积为 15-20ml) 进行稀释, 将其用于另一强阴离子交换柱 (例如, Mono-Q HR, Amersham Biosciences, 柱体积: 1ml), 其已经过了缓冲液 A2 (15mM HEPES, 2mM $MgCl_2$, 0.5% 月桂基磺基甜菜碱, pH 7.6) 的平衡。用 100% 的缓冲液 A2 来洗脱未结合的蛋白质, 四份柱体积之后, 应用在 20 份柱体积内变化到 40% 缓冲液 B2 (HEPES, 15mM; $MgCl_2$, 2mM; LiCl, 1M 和月桂基磺基甜菜碱, 0.5%, pH7.6) 的线性盐梯度, 接着是至 100% 缓冲液 B2 的阶梯度 (stepgradient)。SNDHai 在大约 150mM LiCl 处洗脱出。活性部分在 SDS 凝胶电泳上显示为大约 85kDa 的单条带。

[0113] 2. 用于 SNDHai 的光度检测

[0114] 用于对 SNDHai 活性进行光度测量的反应混合物由 0.196mM 氯化硝基四氮唑蓝 (NBT)、0.137mM 吩嗪硫酸甲酯 (PMS)、20.4mM L- 山梨糖酮和处于终体积为 1.0ml 的 0.1M 的磷酸钠缓冲液 (pH7.5) 中的酶溶液构成。所述反应从加入酶开始, 在具有 1-cm 光路的比色皿中, 于 570nm 处, 对作为 NBT 还原速率的酶活性进行测量 ($T = 25^{\circ}C$)。酶活性的一个单位被定义为: 每分钟催化 1 μM NBT 还原的酶的量。pH 7.5 处 NBT 的消光系数被取为 $100mM^{-1}cm^{-1}$ 。两种参照比色皿被用于活性测定: 其中一种含有除了 L- 山梨糖酮之外的上述成分, 另一种含有除了酶溶液之外的所有成分。

[0115] 3. 用于 SNDHai 的产物检测

[0116] 用下述组合物 (0.5ml 的总体积) 的检测, 针对从 L- 山梨糖酮对 L- 抗坏血酸的生产, 直接对含有纯的 SNDHai 的部分 (见上) 进行分析, 所述组合物包括: 0.14mg/ml 的纯化并脱盐的 SNDHai、50mM 磷酸缓冲液 (pH6.5)、8mg/ml 牛血清清蛋白 (BSA)、100mM L- 山梨糖酮、1mM PMS、5mM $CaCl_2$ 、50 μM PQQ- K_2 。检测于 $25^{\circ}C$, 充分振荡下 (台上振荡器上, 900rpm), 没有光的情况下, 在合适的反应试管中进行。

[0117] 用具有与 Aminex-HPX-78H (300x7.8mm) 柱 (Biorad, Reinach, Switzerland) 相连的 LiChrospher-100-RP18 (125x4.6mm) 柱 (Merck, Darmstadt, Germany) 的 Agilent 1100 HPLC 系统 (Agilent Technologies, Wilmington, USA), 通过高效液相色谱 (HPLC) 对样品进行分析。流动相为 0.004M 硫酸, 流速为 0.6ml/分钟。用 UV 探测器 (波长 254nm) 结合折射率探测器来记录两种信号。此外, 用氨基柱 (YMC-Pack Polyamine-II, YMC, Inc., Kyoto, Japan) 和 254nm 处的 UV 探测来进行对 L- 抗坏血酸的鉴定。流动相为 50mM $NH_4H_2PO_4$ 和乙腈 (40:60)。在这些条件下, 典型的初始定体积 L- 抗坏血酸产率为 0.5-1.0g/l/h。因此, 1 小时的反应时间之后, 上清液中 L- 抗坏血酸的浓度为 300 至 930mg/l。

[0118] 实施例 2 在试管和瓶中发酵从 L- 山梨糖和 D- 山梨糖醇来生产 L- 抗坏血酸

[0119] 将 G. oxydans N44-1 的细胞用于接种 4ml No. 3BD 液体培养基, 并在 220rpm 振荡下, 于 $30^{\circ}C$ 在试管 (18mm 直径) 中对其进行培养 3 天。在培养时期的末尾, 收集到 20mg/l 的 L- 抗坏血酸。

[0120] 在 200rpm 振荡下, $30^{\circ}C$ 时, 在 500ml 带挡板摇瓶中的 50ml No. 5 培养基中, 对菌株 N44-1 的细胞 (重复三份) 进行培养, 所述培养基含有 100g/l D- 山梨糖醇、0.5g/l 甘油、15g/l 酵母提取物 (Difco)、2.5g/l $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 和 15g/L 的 $CaCO_3$ 。72 小时的培养后, 在三

个瓶中通过 HPLC 检测到的 L- 抗坏血酸的量为 400、500 和 680mg/l。

[0121] 实施例 3 在补料分批发酵中从 D- 山梨糖醇来生产 L- 抗坏血酸

[0122] 在 180rpm 振荡下, 30℃ 时, 在 2-1 带挡板摇瓶中的 200ml No. 5 培养基中, 对 *G. oxydans* N44-1 的细胞进行培养, 所述培养基含有 100g/l D- 山梨糖醇、0.5g/l 甘油、15g/l 酵母提取物 (Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland)、2.5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 15g/L 的 CaCO_3 。48 小时后, 用 150ml 该培养物去接种 10l 的生物反应器 (B. Braun ED10, Melsungen, Germany), 所述反应器中已装有 5.3l 的培养基 (含有 20g/l D- 山梨糖醇、0.5g/l 甘油、15g/l 酵母提取物 (Fluka Biochemika, Buchs, Switzerland) 和 2.5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), 并装备有温度、pH 和溶解氧传感器和控制线圈。温度被控制为 30℃, 通过加入 28% 氨溶液将 pH 控制为 6.0, 气流为 4.5l/分钟, 通过搅拌速度 (最小 300rpm) 级联将溶解氧控制为 30%。6 小时的反应时间后, 以 25g/h 的速率, 在 44 小时的时段内, 补加入 500g/l 的山梨糖醇溶液。96 小时的反应时间后, 上清液中留有 1% 的底物, 并已产生了 950mg/l 的 L- 抗坏血酸。

[0123] 实施例 4 在细胞膜部分中从 L- 山梨糖酮或 L- 山梨糖来生产 L- 抗坏血酸

[0124] 在 500ml 带挡板瓶中 100ml No. 3BD 液体培养基中, 220rpm 的振荡下, 于 30℃ 对 *G. oxydans* N44-1 的细胞进行 3 天的培养。在 500rpm 对得到的培养物进行离心, 以去除 CaCO_3 。然后在 5,000rpm 对来自该步骤的上清液进行离心, 以使细胞沉淀。将收集的细胞悬浮于 3ml 的 50mM 磷酸钾缓冲液 (pH7.0) 中, 通过在 900psi. 两次经过 French Pressure cell (SIM-AMINCO Spetronic Instruments, USA) 来使细胞破碎。先在 5,000 rpm 下对得到的均匀混合物进行离心, 以去除细胞残骸。然后, 将上清液稀释为最终的蛋白质浓度为 3mg 蛋白质/ml。将该经过稀释的样品称为不含细胞的提取物 (CFE)。在 100,000xg 对 CFE 进行 60 分钟的离心。弃去上清液, 收集沉淀, 作为膜部分。

[0125] 在 220rpm 振荡下, 于 30℃, 在 50mM 磷酸钾缓冲液 (pH7.0) 中, 用膜部分 (100 μ l) 来进行 15 小时的反应 (200 μ l)。待测底物为 L- 山梨糖酮 (1% 终浓度) 和 L- 山梨糖 (2% 终浓度)。用于反应的最终蛋白质浓度为 1.5mg/ml。在培养时期的末尾, 从 1% L- 山梨糖酮和 2% L- 山梨糖分别产生了 680mg/l 和 10mg/l 的 L- 抗坏血酸。

[0126] 实施例 5 从 *Gluconobacter oxydans* N44-1 中分离 SNDHai 基因

[0127] 1. Tn5 诱变

[0128] 通过下述接合交配方法, 将质粒 pSUP2021 (含有 Tn5 的“自杀性”载体 (Simon R. et al. 1983. BIO/TECHNOLOGY 1:784-791)) 从 *E. coli* HB101 中转移至 *G. oxydans* N44-1 中。于 30℃ 在含有 5ml MB 液体培养基的试管中对 *G. oxydans* N44-1 进行过夜的培养。于 37℃, 在含有 5ml LB 培养基 (具有 50 μ g/ml 卡纳霉素) 的试管中, 对携带有助手质粒 (helper plasmid) pRK2013 (D. H. Figurski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76, 1648-1652, 1979) 的 *E. coli* HB101 和携带有质粒 pSUP2021 的 *E. coli* HB101 进行过夜培养。通过离心, 从过夜培养物中分别收集 *G. oxydans* N44-1、*E. coli* HB101 (pRK2013) 和 *E. coli* HB101 (pSUP2021) 的细胞, 并将它们悬浮于原始体积的 MB 培养基中。然后将这些细胞悬浮液等体积混合, 将混合物涂布到置于 MB 琼脂平板顶端的 0.45 μ m 硝酸纤维素膜上。在 27℃ 培养一天之后, 从膜上刮下细胞, 在 MB 培养基中制备稀释液。然后将经过稀释的细胞涂布于含有 10 μ g/ml 多粘菌素 B 和 50 μ g/ml 卡纳霉素的 MB 琼脂培养基 (MPK 培养基) 上。多粘菌素 B 针对

E. coli 供体和助手菌株进行选择,而卡纳霉素则选出已经经过质粒 pSUP2021 转化的那些 *G. oxydans* 细胞(即,转化接合子)。获得了大约 30,000 个转化接合子。

[0129] 2. 筛选 L- 抗坏血酸非生产者

[0130] 用灭菌牙签将总共 3,760 个转化接合子转移到 MPK 格网平板(gridplate)上,并在 27℃ 培养 3 天。为对从 L- 山梨糖酮到 L- 抗坏血酸的生产进行检测,用灭菌牙签从格网平板上挑出每个转化接合子的细胞,将其悬浮于 96 孔微滴定板中的 50 μ l 静止细胞反应混合物(含有 0.5% L- 山梨糖酮、0.3% NaCl 和 1% CaCO₃)中。在 30℃,没有振荡的情况下,对微滴定板进行一天的培养。得到的反应混合物中每种取 1 微升,用抗坏血酸试验条带(test strip)和 RQFlex2 仪器(Merck KGaA,64271 Darmstadt, Germany)针对 L- 抗坏血酸的形成对其进行分析。阳性对照菌株是在相同条件下生长的 *G. oxydans* N44-1。通过该方法,鉴定出了 L- 抗坏血酸非生产突变体 N44-1-6A9。然后进行 Southern 印记杂交分析,以验证突变体 N44-1-6A9 的染色体 DNA 中 Tn5 的存在。用 ApaI、ClaI、EcoRI、EcoRV、KpnI、StuI、BamHI、SalI 或 HindIII 对 2 μ g 从突变体中分离出的染色体 DNA 进行消化,并对其进行琼脂糖凝胶电泳(0.8% 琼脂糖)。然后用 0.25N HCl 对凝胶进行 15 分钟的处理,接着用 0.5N NaOH 处理 30 分钟。用快速向下转移系统 TurboBlotter(Schleicher&Schuell GmbH, Germany)将 DNA 转移至尼龙膜上。用质粒 pSUP2021 作为模板,使用引物 Tn2419(SEQ ID NO:3)和 Tn3125R(SEQ ID NO:4),用 PCR-DIG 标记试剂盒(Roche Diagnostics GmbH,68298 Mannheim, Germany)来制备探针。获得了 707bp 的 PCR 产物。

[0131] 所用的杂交条件如下所示:杂交在严谨杂交条件下进行,例如,在具有 100 μ g/ml 鲑鱼精 DNA 的 DigEasyHyb 溶液(Roche Diagnostics)中,用地高辛(DIG)标记过的 DNA 探针(使用 DIG 标记系统制备的;Roche Diagnostics GmbH,68298 Mannheim, Germany)于 42℃ 进行 2 小时至 4 天的培养,接着在室温下 2xSSC 和 0.1% SDS 中对过滤器进行 15 分钟的洗涤(进行两次),然后在 65℃,于 0.5xSSC 和 0.1% SDS 或 0.1xSSC 和 0.1% SDS 中再洗 15 分钟(进行两次)。

[0132] 杂交步骤之后,用 STORM 仪器(Amersham Biosciences),用抗 DIG-AP 接合物(conjugate)(Roche Diagnostics GmbH,68298 Mannheim, Germany)和 ECF 底物(Amersham Biosciences Uppsala, Sweden)来进行对杂交的探测。所有操作都按照厂商说明书来进行。

[0133] 用上述方法,验证了突变体 N44-1-6A9 染色体中 Tn5 的存在。

[0134] 3. 克隆被 Tn5 打断的 DNA 片段,并对邻近区域进行测序

[0135] 基于上节 2 中所述的限制性酶消化的结果,选用 ApaI、ClaI、EcoRI 和 EcoRV 作为能产生下述 DNA 片段的酶,所述 DNA 片段具有超过 1kb 的、在 Tn5 插入两端的侧翼染色体 DNA。用 SalI(其在 Tn5 的大约中间处进行切割)和 ApaI 对突变体 N44-1-6A9 的 DNA 进行双消化,给出了两条能与上述 707bp 的探针进行杂交的片段(6.2 和 3.8kb)。

[0136] 制备 Tn5 突变体 *G. oxydans* N44-1-6A9 的染色体 DNA,用 ApaI 进行消化。从琼脂糖凝胶中分离出大小为 9 至 12kb 的 DNA 片段,将其与预先用 ApaI 消化过的克隆载体 pBluescript II KS+(Stratagene, Switzerland)连接。然后将连接混合物用于转化感受态 *E. coli* 细胞,在含有 50 μ g/ml 卡纳霉素和 100 μ g/ml 氨苄青霉素的 L- 琼脂平板上进行选择。从一个转化子中提取出质粒,对侧翼于 Tn5 插入的克隆区域进行测序。移去 9bp 的重复(已知在 Tn5 转座事件期间发生)后,组合出了单个开放读码框(被 Tn5 插入打断)

的核苷酸序列。完整开放读码框的核苷酸序列,在下文中被称为 *Gluconobacter oxydans* N44-1 的 SNDHai 基因,其由 2367bp 构成,被示为 SEQ ID NO:1。从 SEQ ID NO:1 的核苷酸序列推断出的相应的氨基酸序列在本文中所示为 SEQ ID NO:2。

[0137] 在数据库 PRO SW-SwissProt(完整释放版本,加上了增加的更新)上,对 SNDHai 基因的核苷酸序列(SEQ ID NO:1)进行 Blast 2 搜索(来自 National Center for Biotechnology Information[NCBI]的 BLAST 的版本 2,在 Altschul et al. (Nucleic Acids Res. 25:3389-3402, 1997) 中有所描述)。所使用的条件为:带缺口比对,以及对于低复杂度区域过滤掉查询序列。

[0138] 用程序 MOTIFS,很容易鉴定出细菌的醌蛋白脱氢酶特征序列,这表明, SNDHai 具有 PQQ 依赖型酶的特征。

[0139] 实施例 6 对能从 L-山梨糖酮生产 L-抗坏血酸的细菌进行 Southern 印记分析

[0140] 从 *Gluconobacter oxydans* IF0 3293、IF0 3292、IF0 3244、IF03287, *Gluconobacter frateurii* IF0 3260 和 IF0 3265, *Gluconobacter cerinus* IF03266 和 IF0 3269, *Acetobacter aceti* subsp. *orleanus* IF0 3259, *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* IF0 13693 和 IF013773, *Acetobacter* sp. ATCC 15164 和 *Escherichia coli* K-12 的细胞来制备染色体 DNA。在含有 5g/l 细菌蛋白胨 (Difco)、5g/l 酵母提取物 (Difco)、5g/L 葡萄糖、5g/L 甘露醇、1g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、5ml/L 乙醇和 15g/L 琼脂的 No. 350 培养基上,于 27°C 对菌株 IF0 13693 和 IF0 13773 进行 3 天的培养。在含有 25g/l 甘露醇、5g/l 酵母提取物 (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA)、3g/l 细菌蛋白胨 (Difco) 和 18g/l 琼脂 (Difco) 的甘露醇培养基 (MB) 琼脂培养基上,于 27°C 对所有其它的 *Acetobacter* 菌株和所有 *Gluconobacter* 菌株进行 3 天的培养。*E. coli* K-12 被培养于 Luria Broth 琼脂培养基上。染色体 DNA 制备物被用于在实施例 5 所述的严谨条件下进行 Southern 印记杂交。用 ClaI (当分析 N-结构域区域时) 或 EcoRI (当分析 C-结构域区域时) 对染色体 DNA 制备物进行消化,通过琼脂糖凝胶电泳 (1% 琼脂糖) 分离出 1 μ g 的 DNA 片段。用 0.25N 的 HCl 对凝胶进行 15 分钟的处理,然后用 0.5N NaOH 进行 30 分钟的处理,然后将其按照厂商说明书用 Vacuum Blotter Model 785 (BIO-RAD Laboratories AG, Switzerland) 印到尼龙膜上。使用表 2 中所述的引物组,用 PCR-DIG 标记试剂盒 (Roche Diagnostics) 来制备探针。PCR 产物 P1 对应于 SNDHai 的被称为 N-结构域的区域 (可能的跨膜区域),而 PCR 产物 P2 则对应于 SNDHai 的被称为 C-结构域的区域 (可能的主要脱氢酶区域)。

[0141] 表 2. 用于 PCR 以产生用于 Southern 杂交的经过标记的探针的引物

[0142]

引物组	引物的 SEQ ID NOs.	PCR 产物	PCR 产物的预计大小 (bp)
SNDH1F 和 SNDH420R	5 和 6	P1	420
SNDH501F 和 SNDH2364R	7 和 8	P2	1864
SNDH501F 和 SNDH1530R	7 和 9	P3	1030
SNDH1391F 和 SNDH2364R	10 和 8	P4	974

[0143] 表 2 显示了 Southern 印记杂交实验的结果。在用 P1 (N- 结构域) 探针进行的杂交中,观察到了关于 *G. oxydans* IF0 3293、IF0 3293、IF03244、IF0 3287 和 *A. sp.* ATCC 15164 的清楚的阳性条带。在用 P2 (C- 结构域) 探针进行的杂交中,观察到了关于菌株 IF0 3293、IF0 3292、IF03244、IF0 3287 和 *A. sp.* ATCC 15164 的清楚的阳性条带,而对菌株 IF03260、IF0 3265、IF0 3266、IF0 3269 和 IF0 13773 只观察到了模糊的条带。对照菌株 *E. coli* K-12 对于这两种结构域都没有显示出可被探测到的信号。

[0144] 表 3. 对用于 SNDHai 的 N- 和 C- 结构域的探针 (探针 P1 和 P2) 进行 Southern 印记杂交在不同菌株中获得的杂交信号的探测

[0145]

菌株	P1	P2
<i>G. oxydans</i> IF0 3293	+	+
<i>G. oxydans</i> IF0 3292	+	+
<i>G. oxydans</i> IF0 3244	+	+
<i>G. frateurii</i> IF0 3260	nd	tr
<i>G. frateurii</i> IF0 3265	nd	tr
<i>G. cerinus</i> IF0 3266	nd	tr
<i>G. oxydans</i> IF0 3269	nd	tr
<i>G. oxydans</i> IF0 3287	+	+
<i>A. aceti</i> subsp. <i>orleanus</i> IF0 3259	nd	nd
<i>A. aceti</i> subsp. <i>orleanus</i> IF0 13693	nd	nd
<i>A. aceti</i> subsp. <i>orleanus</i> IF0 13773	nd	tr
<i>Acetobacter</i> sp. ATCC 15164	+	+
<i>E. coli</i> K-12	nd	nd

[0146] tr,痕量 ;nd,未探测到。探针 P1 和 P2 是用表 2 中列出的引物组来合成的 (作为 DIG 标记的 PCR 产物)。

[0147] 实施例 7 对 *Gluconobacter oxydans* N44-1 SNDHai 基因的直向同源体的 PCR 扩增和测序

[0148] 染色体 DNA 制备物 (按照实施例 6 中所示来制备) 被用作为 PCR 的模板,其中使用表 2 中所示的四对引物组。每份反应 (总体积, 50 μ l) 中使用 5 至 100ng 的染色体 DNA。除非另有指明,使用 Expand HighFidelity PCR 系统 (Roche Diagnostics)。PCR 条件如下

所示：

[0149] 在 94℃温育 2 分钟；30 个如下循环：(i)94℃变性步骤，15 秒，(ii)60℃退火步骤，30 秒，(iii)72℃合成步骤，45 至 120 秒（对引物组 P1、P2、P3 和 P4 而言，用于合成步骤的时间分别为 45 秒、120 秒、90 秒和 90 秒）；在 72℃延伸 7 分钟。

[0150] 通过琼脂糖凝胶电泳分离出 PCR 反应的样品，用溴化乙啶染色后，用透照器(transilluminator)来观察条带。PCR 反应的结果被概括于表 4 中。

[0151] 表 4. 对用表 2 的引物组在不同菌株中获得的 PCR 产物 P1、P2、P3 和 P4 的探测（通过琼脂糖凝胶电泳来观察产物）

[0152]

菌株	P1	P2	P3	P4
G. oxydans IF0 3293	+	+	nt	+
G. oxydans IF0 3292	+	nd	nd	+
G. oxydans IF0 3244	+	+	+	+
G. frateurii IF0 3260	nd	nd	nd	nd
G. cerinus IF0 3266	nd	nd	nd	nd
G. oxydans IF0 3287	+	+	nd	+
A. aceti subsp. orleanus IF0 3259	nd	nd	nd	nd
A. aceti subsp. orleanus IF0 13693	nd	nd	nd	nd
A. aceti subsp. orleanus IF0 13773	nd	nd	nd	nd
Acetobacter sp. ATCC 15164	+	+	nd	nd
E. coli K-12	nd	nd	nt	nd

[0153] +, 探测到；nd, 未探测到；nt, 未检测。* 用跟 Expand High Fidelity PCR 系统相同的反应循环，用 GC-rich PCR 系统 (Roche Diagnostics) 来进行该 PCR。

[0154] 当在琼脂糖凝胶上观察到清楚的 PCR 条带时（表 4），PCR 产物被直接用于使用标准方法的核苷酸测序。将针对不同 PCR 产物获得的核苷酸序列及其所编码的肽的相应的氨基酸序列，与来自 G. oxydans N44-1 的 SNDHai 基因和蛋白质的全长序列进行比较。

[0155] Gluconobacter oxydans IF0 3292 SNDHai 直向同源体

[0156] 用来自 G. oxydans IF0 3292 的染色体 DNA 作为模板，用引物 SNDH1391F (SEQ ID NO:10) 和 SNDH2364R (SEQ ID NO:8) 进行扩增，获得了 PCR 产物（大约 1kb），将其用于用 SNDH1391F (SEQ ID NO:10) 进行的测序。测得的 771bp 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:11) 显

示出了与来自 *G. oxydans* N44-1 的 SNDHai 的序列 (SEQ ID NO:1) 的 1431-2201 位核苷酸的 98.7% (761/771) 的同源性。推断出的 256 个氨基酸的氨基酸序列 (SEQ ID NO:12) 显示出:与来自 *G. oxydans* N44-1 的 SNDH 的氨基酸序列 (SEQ ID NO:2) 的 478-733 位具有 100% 的相同性。

[0157] *Gluconobacter oxydans* IF0 3287 SNDHai 直向同源体

[0158] 用来自 *G. oxydans* IF0 3287 的染色体 DNA 作为模板,用引物 SNDH1F (SEQ ID NO:5) 和 SNDH420R (SEQ ID NO:6) 进行扩增,获得了 PCR 产物 (大约 0.4kb),将其用于用 SNDH420R (SEQ ID NO:6) 进行的测序。测得的 350bp 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:13) 显示出了与 SEQ ID NO:1 的 31-380 位核苷酸的 97.4% (341/350) 的同源性。推断出的 116 个残基的氨基酸序列 (SEQ ID NO:14) 显示出了与 SEQ ID NO:2 的 11-126 位氨基酸的 100% 的相同性。

[0159] 用引物 SNDH501F (SEQ ID NO:7) 和 SNDH2364R (SEQ ID NO:8) 扩增获得的 PCR 产物 (大约 1.9kb) 被用于用 SNDH501F (SEQ ID NO:7) 进行的测序。测得的 808bp 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:15) 显示出了与 SEQ ID NO:1 的 578-1385 位核苷酸的 98.0% (745/808) 的同源性。推断出的 268 个残基的氨基酸序列 (SEQ ID NO:16) 显示出了与 SEQ ID NO:2 的 194-461 位氨基酸的 100% 的相同性。

[0160] 用引物 SNDH1391F (SEQ ID NO:10) 和 SNDH2364R (SEQ ID NO:8) 扩增获得的 PCR 产物 (大约 1kb) 被用于用 SNDH1391F (SEQ ID NO:10) 进行的测序。测得的 800bp 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:17) 显示出了与 SEQ ID NO:1 的 1469-2268 位核苷酸的 98.8% (790/800) 的同源性。推断出的 266 个残基的氨基酸序列 (SEQ ID NO:18) 显示出了与 SEQ ID NO:2 的 491-756 位氨基酸的 100% 的相同性。

[0161] *Acetobacter* sp. ATCC 15164 SNDHai 直向同源体

[0162] 用来自 *A. sp.* ATCC 15164 的染色体 DNA 作为模板,用引物 SNDH1F (SEQ ID NO:5) 和 SNDH420R (SEQ ID NO:6) 进行扩增,获得了 PCR 产物 (大约 0.4kb),将其用于用 SNDH420R (SEQ ID NO:6) 进行的测序。测得的 360bp 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:19) 显示出了与 SEQ ID NO:1 的 31-390 位核苷酸的 97.8% (352/360) 的同源性。推断出的 120 个残基的氨基酸序列 (SEQ ID NO:20) 显示出了与 SEQ ID NO:2 的 11-130 位氨基酸的 100% 的相同性。

[0163] 用引物 SNDH501F (SEQ ID NO:7) 和 SNDH2364R (SEQ ID NO:8) 扩增获得的 PCR 产物 (大约 1.9kb) 被用于用 SNDH501F (SEQ ID NO:7) 进行的测序。测得的 760bp 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:21) 显示出了与 SEQ ID NO:1 的 563-1322 位核苷酸的 98.0% (745/760) 的同源性。推断出的 252 个残基的氨基酸序列 (SEQ ID NO:22) 显示出了与 SEQ ID NO:2 的 189-440 位氨基酸的 100% 的相同性。

[0164] *Gluconobacter oxydans* IF0 3244 SNDHai 直向同源体

[0165] 通过使用用 *G. oxydans* IF0 3244 的染色体作为模板和下述引物组获得的 PCR 产物,来测定 *G. oxydans* IF0 3244 的 SNDHai 直向同源体基因的完全核苷酸序列,所述引物组为: SNDH1 F (SEQ ID NO:5) 和 SNDH420R (SEQ ID NO:6); SNDH501F (SEQ ID NO:7) 和 SNDH1530R (SEQ ID NO:9); SNDH1391F (SEQ ID NO:10) 和 SNDH2364R (SEQ ID NO:8); SNDH382 (SEQ ID NO:23) 和 SNDH1530R (SEQ ID NO:9); SNDH1F (SEQ ID NO:5) 和

SNDH689R(SEQ ID NO:24)。用 BglIII 和 BamHI 消化过并被连接的染色体 DNA 被用于使用下述引物组的另外两种 PCR:SNDH420R(SEQ ID NO:6) 和 SNDH501F(SEQ ID NO:7) 和 SNDH1530R(SEQ ID NO:9) 和 IS-50.3(SEQ ID NO:25)。完整的核苷酸序列(SEQ ID NO:26) 显示出:与来自 *G. oxydans* N44-1 的 SNDHai 的核苷酸序列(SEQ ID NO:1) 具有 98.4% 的同源性。推断出的氨基酸序列(SEQ ID NO:27) 显示出了与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列的 100% 的相同性。

[0166] 实施例 8 通过增加 SNDHai 基因剂量增加从 L- 山梨糖酮到 L- 抗坏血酸的生产

[0167] 用菌株 N44-1 的染色体 DNA 作为模版,用引物组 N1(SEQ ID NO:28) 和 N2(SEQ ID NO:29) 来进行 PCR,扩增出了具有上游和下游侧翼序列的 SNDHai 基因。

[0168] 按照厂商说明书,用 GC-rich 的 PCR 系统 (Roche Diagnostics) 来进行 PCR。将扩增得到的 DNA 片段插入到载体 pCR2.1-TOPO(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中。然后用 HindIII 和 XhoI 去消化得到的质粒。将包括有 SNDHai 基因的 HindIII-XhoI 片段连接到预先用 HindIII 和 XhoI 处理过的载体 pVK100(可从 American Type Culture Collection 获得,目录号 ATCC 37156) 上。连接混合物被用于转化 *E. coli* TG1。想要的质粒被命名为 pVK-P-SNDHai-T,将其从 *E. coli* 中分离出来,并使用标准方法进行电穿孔 (Electrocell manipulator ECM600, BTX Inc., San Diego, CA, USA) 将其引入到 *G. oxydans* 菌株 N44-1 中。

[0169] 在 200rpm 的振荡下,于 30℃,在 500ml 带挡板摇瓶中的 50ml No. 5 培养基中,对 *G. oxydans* 菌株 N44-1 和携带有质粒 pVK-P-SNDHai-T 的 N44-1 的细胞进行培养,所述培养基含有 100g/l 山梨糖醇、0.5g/l 甘油、15g/l 酵母提取物 (Difco)、2.5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 15g/L CaCO_3 。48 小时的培养之后,通过 HPLC 对两只瓶中的上清液进行测量,其中 L- 抗坏血酸的含量分别为 110mg/l 和 200mg/l。

[0170] 实施例 9 用在甘露糖醇培养基琼脂培养基上培养的静止细胞从 L- 山梨糖酮来生产 L- 抗坏血酸

[0171] IF0 菌株 3293、3292、3244、3260、3266、3287、3259、13693 和 13773 以及 *Acetobacter* sp. ATCC 15164 和 *Gluconobacter oxydans* N44-1,菌株 IF0 3293 的衍生物,被用于从 L- 山梨糖酮生产 L- 抗坏血酸。

[0172] 在含有 5g/l 细菌蛋白胨 (Difco)、5g/l 酵母提取物 (Difco)、5g/l 葡萄糖、5g/l 甘露糖醇、1g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、5ml/l 乙醇和 15g/l 琼脂的 No. 350 培养基上,于 27℃,对菌株 IF0 13693 和 IF0 13773 进行 3 天的培养。在含有 25g/l 甘露糖醇、5g/l 酵母提取物 (Difco Laboratories, Detroit, Mich., USA)、3g/l 细菌蛋白胨 (Difco) 和 18g/l 琼脂 (Difco) 的甘露糖醇培养基 (MB) 琼脂培养基上,于 27℃,对所有其它 *Acetobacter* 菌株和所有 *Gluconobacter* 菌株进行 3 天的培养。

[0173] 从琼脂平板上刮下细胞,将其悬浮于蒸馏水中,用于静止细胞反应,所述反应进行于 30℃,230rpm 振荡下,5ml 试管中,进行 20 小时。反应混合物 (0.5ml) 含有 1% 的 L- 山梨糖酮、0.3% NaCl、1% CaCO_3 和终浓度为 600 纳米下 (OD600) 10 个吸光率单位的细胞。在培养阶段的最后,用具有与 Aminex-HPX-78H(300x7.8mm) 柱 (Biorad, Reinach, Switzerland) 相连的 Lichrospher-100-RP18(125x4.6mm) 柱 (Merck, Darmstadt, Germany) 的 Agilent 1100 HPLC 系统 (Agilent Technologies, Wilmington, USA),通过高效液相色谱 (HPLC) 来

对反应混合物进行分析。流动相为 0.004M 硫酸,流速为 0.6ml/ 分钟。用 UV 探测器(波长 254nm) 结合折射系数探测器,记录下两个信号。此外,用具有 UV 探测的氨基柱(YMC-Pack Polyamine-II,YMC, Inc., Kyoto, Japan) 在 254nm 处来进行对 L- 抗坏血酸的鉴定。流动相为 50mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 和乙腈(40 : 60)。

[0174] Agilent Series 1100 HPLC- 质谱(MS) 系统被用于鉴定 L- 抗坏血酸。用电喷雾界面在阳离子模式下来操作 MS。用 LUNA0C8(2) 柱(100x4.6mm) (Phenomenex, Torrance, USA) 来进行分离。流动相为 0.1% 蚁酸和甲醇(96 : 4) 的混合物。L- 抗坏血酸在驻留时间为 3.1 分钟时被洗脱出来。通过驻留时间和该化合物的分子量来确认 L- 抗坏血酸的身份。

[0175] 为排除 D- 异抗坏血酸的存在,用具有 UV 探测的氨基柱(YMC-Pack Polyamine-II, YMC, Inc., Kyoto, Japan) 在 254nm 处通过驻留时间对 L- 抗坏血酸进行额外的鉴定。流动相为 50mM $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 和乙腈(40 : 60)。

[0176] 如表 5 所示, *Gluconobacter* 和 *Acetobacter* 菌株能从 L- 山梨糖酮产生 L- 抗坏血酸。

[0177] 表 5. 从 L- 山梨糖酮生产 L- 抗坏血酸

[0178]

菌株	L- 抗坏血酸 (mg/L)
<i>G. oxydans</i> IFO 3293	1740
<i>G. oxydans</i> N44-1	570
<i>G. oxydans</i> IFO 3292	410
<i>G. oxydans</i> IFO 3244	1280
<i>G. frateurii</i> IFO 3260	50
<i>G. cerinus</i> IFO 3266	140
<i>G. oxydans</i> IFO 3287	60
<i>A. aceti</i> subsp. <i>Orleanus</i> IFO 3259	30
<i>A. aceti</i> subsp. <i>Xylinum</i> IFO 13693	40
<i>A. aceti</i> subsp. <i>Xylinum</i> IFO 13693	120
<i>Acetobacter</i> sp. ATCC 15164	310
空白对照	未检测到

[0179] 空白对照 : 反应在没有细胞的反应混合物中进行。

[0180] 实施例 10 用生长于 3BD 琼脂培养基上的静止细胞, 从 D- 山梨糖醇、L- 山梨糖或

L- 山梨糖酮来生产 L- 抗坏血酸

[0181] 在含有 70g/l L- 山梨糖、0.5g/l 甘油、7.5g/l 酵母提取物 (Difco)、2.5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、10g/l CaCO_3 和 18g/l 琼脂 (Difco) 的 No.3 BD 琼脂培养基上,于 27℃ 对 *G. oxydans* N44-1 的细胞进行 3 天的培养。如实施例 9 所述,用 2% D- 山梨糖醇、2% L- 山梨糖或 1% L- 山梨糖酮于 30℃ 来进行 24 小时静止细胞反应 (10ml 试管中,1ml 反应混合物)。菌株 N44-1 分别从 D- 山梨糖醇、L- 山梨糖和 L- 山梨糖酮生产出了 280、400 和 1780mg/l 的 L- 抗坏血酸。

[0182] 如实施例 9 所述,在含有 2% D- 山梨糖醇、2% L- 山梨糖或 2% L- 山梨糖酮的反应混合物中,用 No.3BD 琼脂培养基上生长的 N44-1 细胞来进行其它反应 (10ml 试管中,0.5ml 反应混合物),进行 2 天。菌株 N44-1 分别从 D- 山梨糖醇、L- 山梨糖和 L- 山梨糖酮生产出了 1.8、2.0 和 5.1g/l 的 L- 抗坏血酸。

[0183] 按照上文所述,用 2% L- 山梨糖酮,用 *G. oxydans* IF0 3293 的细胞来进行反应。菌株 IF0 3293 在 2 天内生产出了 5.7g/l 的 L- 抗坏血酸。

[0184] 实施例 11 用生长于液体培养基中的静止细胞来从 D- 山梨糖醇生产 L- 抗坏血酸

[0185] *G. oxydans* N44-1 的细胞被培养于 200ml No.5 培养基上,所述培养基含有 100g/l D- 山梨糖醇、0.5g/l 甘油、15g/l 酵母提取物 (FlukaBiochemika, Buchs, Switzerland)、2.5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 15g/l CaCO_3 ,培养在 2-1 带挡板摇瓶中,于 30℃ 下在 180rpm 的振荡下进行。24 小时后,在 3220g 下对培养物进行离心 (Eppendorf 5810R, Hamburg, Germany),并将细胞重新悬浮于 0.9% NaCl 溶液中,再在 3220g 下离心,细胞沉淀被用于接种一只含有 50ml 完全生长培养基 (100g/l D- 山梨糖醇、0.5g/l 甘油、15g/l 酵母提取物、2.5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、15g/l CaCO_3) 的带挡板 500ml 摇瓶以及另一只含有 50ml 生产培养基 (100g/l D- 山梨糖醇、3g/l NaCl、10g/l CaCO_3) 的带挡板 500ml 摇瓶。作为 600nm 处测量的光密度 (OD_{600}) 的初始细胞密度在两只瓶中均为 10。在 180rpm 振荡下,于 30℃ 对两只瓶进行培养。48 小时后,生长培养基和生产培养基中的细胞悬浮液分别已经积累了 1.06 和 1.18g/l 的 L- 抗坏血酸。培养期间在完全培养基中没有观察到额外的生长。

[0186] 实施例 12 具有增加的 SNDHai 基因剂量的重细微生物静止细胞,从 L- 山梨糖酮或 D- 山梨糖醇来生产 L- 抗坏血酸

[0187] 通过用菌株 N44-1 的染色体 DNA 作为模板,用引物组 N1 (SEQ ID NO :28) 和 N2 (SEQ ID NO :29) 进行 PCR,来扩增具有上游和下游侧翼序列的 *G. oxydans* N44-1 (SEQ ID NO :1) 的 SNDHai 基因。

[0188] 按照厂商说明书,用 GC-rich 的 PCR 系统 (Roche Diagnostics GmbH) 来进行 PCR。扩增出的片段被插入到载体 pCR2.1-TOP0 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 中。然后用 HindIII 和 XhoI 来消化得到的质粒。包括有 SNDHai 基因的 HindIII-XhoI 片段被连接到之前用 HindIII 和 XhoI 处理过的载体 pVK100 (可从 American Type Culture Collection 获得,目录号为 ATCC 37156) 上。连接混合物被用于转化 *E. coli* TG1。想要的质粒被命名为 pVK-P-SNDHai-T,将其从 *E. coli* 中分离出来,并使用标准方法进行电穿孔 (Electrocell manipulator ECM600, BTX Inc., San Diego, CA, USA) 将其引入到 *G. oxydans* 菌株 N44-1 中。

[0189] 三种独立的转化子,被命名为 N44-1 (pVK-P-SNDHai-T) 克隆 1 号、2 号和 3 号,它们

与亲本菌株 *G. oxydans* N44-1 一起,每种都被培养于 No. 3BD 琼脂和 MB 琼脂培养基上。从平板上刮下细胞,将其用于静止细胞反应(1% L- 山梨糖酮作为底物),如实施例 9 所述。在 No. 3BD 琼脂上培养之后,在静止细胞测试中,菌株 N44-1 产生出了 2.5g/l 的 L- 抗坏血酸,而菌株 N44-1 (pVK-P-SNDHai-T) 克隆 1、2 和 3 则分别产生出了 4.2、4.1 和 4.2g/l 的 L- 抗坏血酸。在 MB 琼脂上培养之后,在静止细胞测试中,菌株 N44-1 产生出了 0.12g/l 的 L- 抗坏血酸,而菌株 N44-1 (pVK-P-SNDHai-T) 克隆 1、2 和 3 则分别产生出了 1.8、2.5 和 0.94g/l 的 L- 抗坏血酸。

[0190] 用 *G. oxydans* N44-1 和克隆 2(见上)的细胞来进行另一项反应,所述细胞在 220rpm 振荡下于 30℃,在双份 500ml 带挡板摇瓶中的 50ml No. 5 培养基(100g/l D- 山梨糖醇、0.5g/l 甘油、15g/l 酵母提取物、2.5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、15g/l CaCO_3)中培养了 3 天。对每种菌株而言,在 500rpm 对一瓶中得到的培养物进行离心,以去除 CaCO_3 。然后再在 5,000rpm 下对来自该步的上清液进行离心,以沉淀细胞。将收集到的细胞重新悬浮于 10ml 0.9% 的 NaCl 溶液中,再在 5,000rpm 下进行离心以沉淀细胞。再将收集到的细胞重新悬浮于水中,并用于接种 1ml 生产培养基(20g/l D- 山梨糖醇、3g/l NaCl、10g/l CaCO_3),所述培养基处于 10ml 反应试管中,最终的静止细胞密度相当于 600nm 处的 50D 单位。在 30℃ 和 220rpm 下,20 小时反应时间后,对菌株 N44-1 和过量表达 SNDHai 的 N44-1 而言,从生产瓶中收获的上清液中分别含有 360 和 760mg/l 的 L- 抗坏血酸。相反,72 小时后,从剩下的生长培养基中收获的上清液分别含有 0 和 440mg/l 的 L- 抗坏血酸。

[0191] 实施例 13 在 *E. coli* 的静止细胞中从 L- 山梨糖酮来生产 L- 抗坏血酸

[0192] 没有终止密码子的 SNDHai 基因被命名为 SNDHai-1,其对应于 SEQ ID NO:1 的 1-2364 位核苷酸,用引物组 SNDHai-Nde(SEQ ID NO:30)和 SNDHaiHis-X(SEQ ID NO:31),通过 PCR(Roche High Fidelity 试剂盒)从菌株 N44-1 的染色体 DNA 对其进行了扩增。

[0193] 扩增出的 DNA 被克隆进 pCR2.1-TOPO(Invitrogen, Carlsbad, CA, USA),以获得 pCR2.1-TOPO-SNDHai-1,其 SNDHai 序列通过核苷酸测序被验证为是正确的。然后用 NdeI 和 XhoI 切出来 SNDHai-1 基因,将其连接到 pET-21b(+) (Novagen, Madison, WI, USA) 的 NdeI 和 XhoI 位点之间,以产生出 pET21b-SNDHaiHis;6xHis 被加到 SNDHai 的 C- 末端。pET21b-SNDHaiHis 被引入到 *E. coli* BL21(DE3) 中。

[0194] 从在添加有 50 $\mu\text{g/ml}$ 羧苄青霉素的 LB 中培养的 *E. coli* BL21(DE3)/pET21b-SNDHaiHis 的过夜培养物中取 5ml,接种到 200ml 同样的培养基中。在 230rpm 下于 37℃ 对细胞进行 2 小时的培养,然后用 1mM IPTG 诱导,继续在 230rpm 下于 25℃ 培养 3 小时。对得到的培养物进行离心,然后用盐水洗两次,将细胞沉淀悬浮于 2ml 水中。细胞被用于静止细胞反应,其中使用的反应混合物(5ml 试管中,500 μl) 含有 $\text{OD}_{600} = 10$ 的细胞,1% 的单水合山梨糖酮、5 μM PQQ、5mM MgCl_2 、0.3% NaCl 和 1% CaCO_3 ,反应在 30℃ 下进行 15 小时。在温育 15 小时后,生产出了 0.14g/L 的 L- 抗坏血酸。当用 1 μM PQQ 来进行静止细胞反应时(其它条件都与上文所述相同),在温育 3 小时后生产出了 0.05g/L 的 L- 抗坏血酸。

[0195] 实施例 14 通过具有增加的 SNDHai 基因剂量的重组微生物的静止细胞从 D- 山梨糖醇来生产 L- 抗坏血酸

[0196] 在 180rpm 的振荡下,于 30℃,在 500ml 带挡板摇瓶中的 50ml No. 5 培养基中,

对过量表达 SNDH_{ai} 的 *G. oxydans* N44-1 细胞进行培养,所述培养基含有 100g/l D- 山梨糖醇、0.5g/l 甘油、15g/l 酵母提取物 (FlukaBioChemika, Buchs, Switzerland)、2.5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 15g/l CaCO_3 , 培养 48 小时。得到的细胞悬浮液被用于接种 2L 的生物反应器,所述反应器被称为生长容器 (Biostat-MD, B. Braun Melsungen, Melsungen, Germany), 其中含有 1.25 l 的培养基,所述培养基由 100g/l D- 山梨糖醇、15g/l 酵母提取物 (Fluka BioChemika, Buchs, Switzerland)、2.5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.3g/l KH_2PO_4 和 0.12g/l CaSO_4 组成。细胞被培养于 30℃, 1 l/ 分钟通气速率下,用 25% 的 Na_2CO_3 溶液将 pH 控制为 5.7, 通过改变搅拌速率将溶解氧控制为 10% 的饱和度。24 小时后,作为 600nm 处吸光率单位测得的细胞密度为 20。在该时间点,将含有 100g/l D- 山梨糖醇、15g/l 酵母提取物 (Fluka BioChemika, Buchs, Switzerland)、2.5g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、0.3g/l KH_2PO_4 和 0.12g/l CaSO_4 的补料溶液以 125ml/ 小时的补料速率补入到生长容器中,以 125ml/ 小时的收获速率连续收获培养物。通过该方法,生长容器中的体积被保持恒定为 1.25 l。按照上文所述对其它工艺参数进行连续控制。

[0197] 该培养物以 125ml/ 小时的速率被连续补入到第二反应器中,该反应器被称为生产容器,其中装有 5l 生产培养基,其中含有 100g/l D- 山梨糖醇、0.3g/l NaCl 和 0.12g/l CaSO_4 , 温度被保持为 30℃, 通过 20% 的 NaOH 溶液将 pH 控制为 7.0。通气速率被保持恒定为 10 l/ 分钟,通过变化搅拌器速率将溶解氧控制为 20%。具有相同组成的生产培养基还被连续补入到生产容器中,补料速率为 375ml/ 小时。通过以 500ml/ 小时的速率持续收获上清液,使容器体积保持 5l 恒定,得到来自具有 500kDa 孔径的横流超滤模块 (UFP-500-E-9A, Amersham Biosciences) 的过滤流,用 Masterflex 泵,以 50 l/ 小时,通过其从生产容器中收获细胞悬浮液。渗余物被泵回到容器中。一旦生产容器中的细胞密度达到 600nm 下的吸光率为 100, 就开始以 25ml/ 小时的速率从流回到生产容器中的经过浓缩的细胞流中收获细胞,以保持生产容器中的细胞密度恒定。

[0198] 不含细胞的上清液的收获流含有 4g/l 的 L- 抗坏血酸,其被以 500ml/ 小时的速率持续补入到具有双夹套 (double jacket) 的收集容器中,这在 30℃ 下进行 (Ecoline Rel12, Lauda, Lauda-Koenigshofen, Germany)。该容器持续将上清液以 180 l/ 小时的速率补入到两区室电渗析单元 (含有具有阳离子交换膜 CMX-S 和阴离子交换膜 ASM 的 10 个单元对的堆叠 (stack), 膜的总面积为 0.2m², 来自 Eurodia Industries, Wissous, France) 的稀释区室中,持续的流被泵出容器以保持其体积恒定为 2l。另一具有双夹套 (含有最初去离子水, 30℃) 容器被持续补入新鲜的去离子水,速率为 62.5ml/ 小时,其以 200 l/ 小时地速率向电渗析单元的浓缩区室中持续泵入水性溶液,持续的收获流被从容器中泵出。用蠕动泵 (7518-00, Masterflex, USA) 将补料溶液泵到电渗析堆叠中,在旋转式泵 (MD-20, IWAK, Tokyo, Japan) 的协助下,使通过每个电渗析区室的溶液流通。在整个过程中,对电渗析堆叠应用 14V 电压 (电源 FuMATech TS001/5, St. Ingbert, Germany)。收获流中 L- 抗坏血酸的浓度为 16g/L。

[0199] 实施例 15 通过下游加工步骤对用静止细胞反应生产的 L- 抗坏血酸进行纯化

[0200] 将实施例 14 中含有 16g/l L- 抗坏血酸的收获流补入到螯合树脂 (Amberlite IRC 748, Rohm and Haas, Philadelphia, PA, USA) 中,以从流中除去二价阳离子。然后在经过冷却的容器 (补料容器) 中对其进行收集,当收集到 10 升时,通过两极膜电渗析单元 (含有

7 Neosepta BP1/CMB膜的堆叠,膜的总面积为 0.14m^2 ,来自Eurodia Industries,Wissous, France)以分批模式对它们进行加工处理。以 200 l/小时 将该溶液泵过电渗析单元的补料区室,并回收到补料容器中。含有最初为 5 l 的 2 g/l NaOH 溶液的另一经过冷却的容器(浓缩容器)被以 100 l/小时 泵过两极膜电渗析单元的浓缩区室。通过应用 25 V 的最大电压,以及 20 A 的最大电流,将来自补料区室的钠离子转移到浓缩区室中,因此在补料流中存在的L-抗坏血酸的钠盐形式被转化为相应的游离酸形式。达到 90% 的转化产率后,该过程被终止。在浓缩容器中, 6 l 含 7.5 g/l NaOH 的溶液被收集于稀释容器中, 9 l 含有大约 16 g/l 游离酸形式L-抗坏血酸和 1.6 g/l 钠盐形式的L-抗坏血酸的溶液被通过阳离子交换树脂(Amberlite FPC 21 H,Rohm andHass,Philadelphia,PA,USA)进行进一步的加工处理,以将从钠盐到游离酸形式的转化产率提高到大约 99% 。或者,通过阳离子交换树脂,对来自电渗析步骤的 10 l 含有 16 g/l 钠盐形式的L-抗坏血酸的溶液进行直接地处理,将其以 99% 的产率转化为游离酸形式。然后通过下述一系列步骤,对通过上述任何方法获得的、以游离酸形式存在的L-抗坏血酸的流进行加工处理,所述步骤为:阴离子交换、活性炭处理、浓缩、结晶、晶体过滤和干燥。获得的晶体的终纯度为 98% ,用组合下游加工步骤获得的产率为 80% 。

序列表

<110> 帝斯曼知识产权资产管理有限公司

<120> 对 L- 抗坏血酸进行微生物生产的方法

<130>21864 WO

<150>EP 03017677.0

<151>2003-08-14

<160>31

<170>PatentIn version 3.2

<210>1

<211>2367

<212>DNA

<213>Gluconobacter oxydans N44-1

<400>1

atgaacacgcg	gccccgcac	gctctccatg	atcatcgggga	ttctgggcgc	cctcatggcc	60
gccttctctga	tcategaagg	cctccacctc	atcatcctcg	gcggctcgtg	gttctacacc	120
ctcgccggca	tcgcgtggc	ggccagcagc	gtctacatga	tccgtcgcaa	catcctctcg	180
acatggatcg	ccctgggcct	gcttgtggca	acagccctgt	ggtcgctcgc	cgaagtcggc	240
accagcttct	ggcccagctt	ctcccgcctg	atcgtgttcc	tgtgcgtcgc	cctgatcgcg	300
actctcatgg	cgccttggt	cagcgcccc	ggccggcgct	acttcacccg	ccccgtcaca	360
ggcgccacat	ccggcgccct	cgcgcgatc	atcgtggctt	tcctcgccgg	catgttccgg	420
gtccaccgga	ccatgcccc	gcaggacacc	acccacccgc	aggaaaccgc	gtccaccgcc	480
gactccgacc	agccaggcca	tgactggccc	gcctatggcc	gcacggcttc	cggcacgcgc	540
tacgccagct	tcacgcagat	caaccgcgac	aatgtcagca	agctccgcgt	cgcctggacc	600
taccgcaccg	gcgacatggc	gttgaacggc	gccgagttcc	agggcacccc	catcaagatc	660
ggcgacacgg	tctatatctg	ctcaccgcac	aacatcgtct	cggcccttga	cccggacacc	720
ggcacggaaa	agtgggaagt	cgacccccac	gccagacga	aagtctggca	gcgtgcccgc	780
ggcgctcggt	actggcatga	cagcacggcc	acggacgcca	acgcgccctg	cgcctcgcgc	840
atcgctctca	ccacgatcga	cgcgcgcctc	atcaccatcg	acgcccgtac	cggccaggcc	900
tgcacggatt	tcggaacgaa	cggcaacgtc	aatctcctga	ccggcctcgg	cccgcacagct	960
cccggtctgt	actaccgcac	cgcgcgcctc	ctcgtggcgg	gtgacatcgt	ggtcgtcggc	1020
ggcgcatcgc	ccgataacga	gcgcaccggc	gagccctccg	gcgtcgtccg	cggctatgat	1080
gtccgcaccg	gcgcacaggt	ctgggcctgg	gacgccacca	acccgcacgc	cggcaccaca	1140

34

	85	90	95
Ala Leu Ile	Ala Thr Leu Met	Ala Pro Trp Leu Ser	Gly Pro Gly Arg
100	105	110	
Arg Tyr Phe	Thr Arg Pro Val	Thr Gly Ala Thr Ser	Gly Ala Leu Gly
115	120	125	
Ala Ile Ile	Val Ala Phe Leu	Ala Gly Met Phe Arg	Val His Pro Thr
130	135	140	
Ile Ala Pro	Gln Asp Thr Thr	His Pro Gln Glu Thr	Ala Ser Thr Ala
145	150	155	160
Asp Ser Asp	Gln Pro Gly His	Asp Trp Pro Ala Tyr	Gly Arg Thr Ala
165	170	175	
Ser Gly Thr	Arg Tyr Ala Ser	Phe Thr Gln Ile Asn	Arg Asp Asn Val
180	185	190	
Ser Lys Leu	Arg Val Ala Trp	Thr Tyr Arg Thr Gly	Asp Met Ala Leu
195	200	205	
Asn Gly Ala	Glu Phe Gln Gly	Thr Pro Ile Lys Ile	Gly Asp Thr Val
210	215	220	
Tyr Ile Cys	Ser Pro His Asn	Ile Val Ser Ala Leu	Asp Pro Asp Thr
225	230	235	240
Gly Thr Glu	Lys Trp Lys Phe	Asp Pro His Ala Gln	Thr Lys Val Trp
245	250	255	
Gln Arg Cys	Arg Gly Val Gly	Tyr Trp His Asp Ser	Thr Ala Thr Asp
260	265	270	
Ala Asn Ala	Pro Cys Ala Ser	Arg Ile Val Leu Thr	Thr Ile Asp Ala
275	280	285	
Arg Leu Ile	Thr Ile Asp Ala	Arg Thr Gly Gln Ala	Cys Thr Asp Phe
290	295	300	
Gly Thr Asn	Gly Asn Val Asn	Leu Leu Thr Gly Leu	Gly Pro Thr Ala
305	310	315	320
Pro Gly Ser	Tyr Tyr Pro Thr	Ala Ala Pro Leu Val	Ala Gly Asp Ile
325	330	335	
Val Val Val	Gly Gly Arg Ile	Ala Asp Asn Glu Arg	Thr Gly Glu Pro
340	345	350	
Ser Gly Val	Val Arg Gly Tyr	Asp Val Arg Thr Gly	Ala Gln Val Trp
355	360	365	
Ala Trp Asp	Ala Thr Asn Pro	His Arg Gly Thr Thr	Pro Leu Ala Glu
370	375	380	
Gly Glu Ile	Tyr Pro Ala Glu	Thr Pro Asn Met Trp	Gly Thr Ala Ser
385	390	395	400

Tyr Asp Pro Lys Leu Asn Leu Val Phe Phe Pro Leu Gly Asn Gln Thr			
405	410	415	
Pro Asp Phe Trp Gly Gly Asp Arg Ser Lys Ala Ser Asp Glu Tyr Asn			
420	425	430	
Asp Ala Phe Val Ala Val Asp Ala Lys Thr Gly Asp Glu Arg Trp His			
435	440	445	
Phe Arg Thr Ala Asn His Asp Leu Val Asp Tyr Asp Ala Thr Ala Gln			
450	455	460	
Pro Ile Leu Tyr Asp Ile Pro Asp Gly His Gly Gly Thr Arg Pro Ala			
465	470	475	480
Ile Ile Ala Met Thr Lys Arg Gly Gln Ile Phe Val Leu Asp Arg Arg			
485	490	495	
Asp Gly Thr Pro Ile Val Pro Val Glu Met Arg Lys Val Pro Gln Asp			
500	505	510	
Gly Ala Pro Glu His Gln Tyr Leu Ala Pro Glu Gln Pro Tyr Ser Ala			
515	520	525	
Leu Ser Ile Gly Thr Glu Arg Leu Lys Pro Ser Asp Met Trp Gly Gly			
530	535	540	
Thr Ile Phe Asp Gln Leu Leu Cys Arg Ile Gln Phe Ala Ser Tyr Arg			
545	550	555	560
Tyr Glu Gly Glu Phe Thr Pro Val Asn Glu Lys Gln Ala Thr Ile Ile			
565	570	575	
Tyr Pro Gly Tyr Tyr Gly Gly Ile Asn Trp Gly Gly Gly Ala Val Asp			
580	585	590	
Glu Ser Thr Gly Thr Leu Leu Val Asn Asp Ile Arg Met Ala Gln Trp			
595	600	605	
Gly Lys Phe Met Lys Gln Glu Glu Ala Arg Arg Ser Gly Phe Lys Pro			
610	615	620	
Ser Ser Glu Gly Glu Tyr Ser Glu Gln Lys Gly Thr Pro Trp Gly Val			
625	630	635	640
Val Arg Ser Met Phe Phe Ser Pro Ala Gly Leu Pro Cys Val Lys Pro			
645	650	655	
Pro Tyr Gly Thr Met Asn Ala Ile Asp Leu Arg Ser Gly Lys Val Lys			
660	665	670	
Trp Ser Met Pro Leu Gly Thr Ile Gln Asp Met Pro Val His Gly Met			
675	680	685	
Val Pro Gly Leu Ala Ile Pro Leu Gly Met Pro Thr Met Ser Gly Pro			
690	695	700	
Leu Ala Thr His Thr Gly Leu Val Phe Phe Ser Gly Thr Leu Asp Asn			

705	710	715	720
Tyr Val Arg Ala Leu Asn Thr Asp Thr Gly Glu Val Val Trp Lys Ala			
	725	730	735
Arg Leu Pro Val Ala Ser Gln Ala Ala Pro Met Ser Tyr Met Ser Asp			
	740	745	750
Lys Thr Gly Lys Gln Tyr Ile Val Val Thr Ala Gly Gly Leu Thr Arg			
	755	760	765
Ser Gly Val Asp Lys Asn Arg Gly Asp Tyr Val Ile Ala Tyr Ala Leu			
	770	775	780
Pro Ser Glu Glu			
785			

<210>3

<211>20

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>3

cgccttctat gaaaggttgg

20

<210>4

<211>20

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>4

agcggatgga gatcgggcgg

20

<210>5

<211>30

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>5

atgaacagcg gcccccgac gctctccatg 30

<210>6

<211>30

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>6

ccggaacatg ccggcgagga aagccacgat 30

<210>7

<211>30

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>7

tgactggccc gcctatggcc gcacggcttc 30

<210>8

<211>30

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>8

ttcttcggag ggcagggcgt aggcgatgac 30

<210>9

<211>30

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>9

cgggactttg cgcatttcca cagggacgat

30

<210>10

<211>30

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>10

agcccatcct ctatgacatt ccggacggcc

30

<210>11

<211>771

<212>DNA

<213>Gluconobacter oxydans IF0 3292

<400>11

ccgcccggcg atcatcgcca tgaccaagcg cggccagatc ttcgtgctcg accgcccgcga	60
cggcacccccg atcgtccccg tggaaatgcg caaagtcccc caggacggcg caccggaaca	120
ccagtacctc gccccgaac agccctattc cgccctctcc atcggaacag agcgccctgaa	180
acccagegat atgtggggcg gcacgatctt cgaccagctc ctgtgccgca tccagttcgc	240
ctcctaccgc tatgaaggcg agttcacccc cgtcaacgag aagcaggcca ccatcatcta	300
tccgggctat tacggcggca tcaactgggg cggcggcgcc gtggatgaaa gcaccggaac	360
gctgctggtc aacgacatcc gcatggccca gtggggcaag ttcatgaagc aagaagaagc	420
ccgcccgcage ggcttcaaac ccagctcgga aggccaatat tccgaacaga aaggcacccc	480
ctggggcgte gtccgctega tgtttctctc ccccgcgggt ctcccctgcg tgaaaccgcc	540
ctatggcacg atgaacgcca tcgacctgcg cagcggcaag gtcaaatgga gcatgccgct	600
tggcacgate caggacatgc cggtcacgg catgggtcccc ggcctcgcca tcccgtcgcg	660

aatgccgacc atgagcggcc cgctggccac ccataccggc ctggtcttct tctccggcac 720
gctcgacaac tatgtccgcg cgctcaacac cgacaccggc gaagtcgtct g 771

<210>12

<211>256

<212>PRT

<213>Gluconobacter oxydans IF0 3292

<400>12

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

Leu Asp Asn Tyr Val Arg Ala Leu Asn Thr Asp Thr Gly Glu Val Val
 245 250 255

<210>13

<211>350

<212>DNA

<213>Gluconobacter oxydans IF0 3287

<220>

<221>misc_feature

<222>(123)..(123)

<223>n 是 a 或 c 或 g 或 t

<400>13

```

atcatcgga ttctgggcgc cctcatggcc gccttcctga tcatcgaagg cctccacctc      60
atcatcctcg gcggctcatg gttttacacc ctgcgcggca tcgcgctggc agccagcagc      120
gtntacatga tccgtcgcaa catcctctcg acatggatcg ccctcggcct gcttgtggca      180
acagccctgt ggtegcctgc cgaagtcggc accagcttct ggcccagctt ctcccgctg      240
atcgtatttc tgtgcgtcgc cctgategcg accctcatgg cgccctggct cagcggcccc      300
ggccggcgct acttaccgcg ccccgtcaca ggcgccacct ccggcgccct      350

```

<210>14

<211>116

<212>PRT

<213>Gluconobacter oxydans IF0 3287

<400>14

```

Ile Ile Gly Ile Leu Gly Ala Leu Met Ala Ala Phe Leu Ile Ile Glu
1           5           10          15
Gly Leu His Leu Ile Ile Leu Gly Gly Ser Trp phe Tyr Thr Leu Ala
20          25          30
Gly Ile Ala Leu Ala Ala Ser Ser Val Tyr Met Ile Arg Arg Asn Ile
35          40          45
Leu Ser Thr Trp Ile Ala Leu Gly Leu Leu Val Ala Thr Ala Leu Trp
50          55          60
Ser Leu Ala Glu Val Gly Thr Ser Phe Trp Pro Ser Phe Ser Arg Leu
65          70          75          80
Ile Val Phe Leu Cys Val Ala Leu Ile Ala Thr Leu Met Ala Pro Trp

```


35	40	45
Thr Glu Lys Trp Lys Phe Asp Pro His Ala Gln Thr Lys Val Trp Gln		
50	55	60
Arg Cys Arg Gly Val Gly Tyr Trp His Asp Ser Thr Ala Thr Asp Ala		
65	70	75
Asn Ala Pro Cys Ala Ser Arg Ile Val Leu Thr Thr Ile Asp Ala Arg		
85	90	95
Leu Ile Thr Ile Asp Ala Arg Thr Gly Gln Ala Cys Thr Asp Phe Gly		
100	105	110
Thr Asn Gly Asn Val Asn Leu Leu Thr Gly Leu Gly Pro Thr Ala Pro		
115	120	125
Gly Ser Tyr Tyr Pro Thr Ala Ala Pro Leu Val Ala Gly Asp Ile Val		
130	135	140
Val Val Gly Gly Arg Ile Ala Asp Asn Glu Arg Thr Gly Glu Pro Ser		
145	150	155
Gly Val Val Arg Gly Tyr Asp Val Arg Thr Gly Ala Gln Val Trp Ala		
165	170	175
Trp Asp Ala Thr Asn Pro His Arg Gly Thr Thr Pro Leu Ala Glu Gly		
180	185	190
Glu Ile Tyr Pro Ala Glu Thr Pro Asn Met Trp Gly Thr Ala Ser Tyr		
195	200	205
Asp Pro Lys Leu Asn Leu Val Phe Phe Pro Leu Gly Asn Gln Thr Pro		
210	215	220
Asp Phe Trp Gly Gly Asp Arg Ser Lys Ala Ser Asp Glu Tyr Asn Asp		
225	230	235
Ala Phe Val Ala Val Asp Ala Lys Thr Gly Asp Glu Arg Trp His Phe		
245	250	255
Arg Thr Ala Asn His Asp Leu Val Asp Tyr Asp Ala		
260	265	

<210>17

<211>800

<212>DNA

<213>Gluconobacter oxydans IF0 3287

<400>17

tcttcgtgct cgaccgccgc gacggcaccc cgatcgcccc cgtggaaatg cgcaaagtcc	60
cgcaggacgg cgcaccggaa caccagtacc tcgcccccca acagccctat tccgccctct	120
ccatcggaac agagcgccgtg aaaccacagc atatgtgggg tggtagcatt ttcgaccage	180

```

tcctgtgccg catccagttc gcctcctacc gctatgaagg cgagttcacc cccgtcaacg 240
agaaacaggc caccatcate tatecgggct attacggcgg catcaactgg ggcgggcgcg 300
ccgtggatga aagcaccgga acgtctgtgg tcaacgacat ccgcatggcc cagtggggca 360
agttcatgaa gcaggaagaa gcccgtcgca gcggcttcaa acccagctcg gaaggcgaat 420
attccgaaca gaaaggcacc ccctggggcg tegtccgctc gatgtttctt tccccgccg 480
gtctccccctg cgtaaaaccg ccctatggca cgatgaacgc catcgacctg cgcagcggca 540
aggtgaaatg gagcatgccg cttggcacga tccaggacat gccgggtccac ggcatggtcc 600
caggcctcgc cateccgctc ggaatgcaa ccatgagcgg cccgctggcc acccataccg 660
gcttgggtctt cttctccggc acgtctgaca actacgtccg cgcgctcaac accgacaccg 720
gcgaggtcgt ctggaaagcc cgtctccccg tcgcctcaca ggccgctccg atgagctaca 780
tgtccgacaa gaccggcaaa 800

```

<210>18

<211>266

<212>PRT

<213>Gluconobacter oxydans IF0 3287

<400>18

```

Phe Val Leu Asp Arg Arg Asp Gly Thr Pro Ile Val Pro Val Glu Met
1           5           10           15
Arg Lys Val Pro Gln Asp Gly Ala Pro Glu His Gln Tyr Leu Ala Pro
20           25           30
Glu Gln Pro Tyr Ser Ala Leu Ser Ile Gly Thr Glu Arg Leu Lys Pro
35           40           45
Ser Asp Met Trp Gly Gly Thr Ile Phe Asp Gln Leu Leu Cys Arg Ile
50           55           60
Gln Phe Ala Ser Tyr Arg Tyr Glu Gly Glu Phe Thr Pro Val Asn Glu
65           70           75           80
Lys Gln Ala Thr Ile Ile Tyr Pro Gly Tyr Tyr Gly Gly Ile Asn Trp
85           90           95
Gly Gly Gly Ala Val Asp Glu Ser Thr Gly Thr Leu Leu Val Asn Asp
100          105          110
Ile Arg Met Ala Gln Trp Gly Lys Phe Met Lys Gln Glu Glu Ala Arg
115          120          125
Arg Ser Gly Phe Lys Pro Ser Ser Glu Gly Glu Tyr Ser Glu Gln Lys
130          135          140
Gly Thr Pro Trp Gly Val Val Arg Ser Met Phe Phe Ser Pro Ala Gly
145          150          155          160
Leu Pro Cys Val Lys Pro Pro Tyr Gly Thr Met Asn Ala Ile Asp Leu

```

	165		170		175
Arg Ser Gly Lys Val Lys Trp Ser Met Pro Leu Gly Thr Ile Gln Asp					
	180		185		190
Met Pro Val His Gly Met Val Pro Gly Leu Ala Ile Pro Leu Gly Met					
	195		200		205
Pro Thr Met Ser Gly Pro Leu Ala Thr His Thr Gly Leu Val Phe Phe					
	210		215		220
Ser Gly Thr Leu Asp Asn Tyr Val Arg Ala Leu Asn Thr Asp Thr Gly					
225		230		235	240
Glu Val Val Trp Lys Ala Arg Leu Pro Val Ala Ser Gln Ala Ala Pro					
	245		250		255
Met Ser Tyr Met Ser Asp Lys Thr Gly Lys					
	260		265		

<210>19

<211>360

<212>DNA

<213>Acetobacter sp. ATCC 15164

<220>

<221>misc_feature

<222>(123).. (123)

<223>n 是 a 或 c 或 g 或 t

<400>19

atcatcgga ttctgggcgc cctcatggcc gccttcctga tcatcgaagg cctccacctc	60
atcatcctcg gcggtcgtg gttttacacc ctgcgcggca tcgcgctggc ggccagcagc	120
gtntacatga tccgtcgcaa catectctcg acatggatcg ccctcggcct gcttgtagca	180
acagccctgt ggtcgctcgc cgaagtcggc accagcttct ggcccagctt ctcccgcctg	240
atcgtgttcc tgtgcgtcgc cctgatecgc actctcatgg cgccctggct cagcggcccc	300
ggccggcgct acttcacccg ccccgtcaca ggggccacct ccggcgccact cggcgccatc	360

<210>20

<211>120

<212>PRT

<213>Acetobacter sp. ATCC 15164

<400>20

Ile	Ile	Gly	Ile	Leu	Gly	Ala	Leu	Met	Ala	Ala	Phe	Leu	Ile	Ile	Glu
1				5					10					15	
Gly	Leu	His	Leu	Ile	Ile	Leu	Gly	Gly	Ser	Trp	Phe	Tyr	Thr	Leu	Ala
			20					25						30	
Gly	Ile	Ala	Leu	Ala	Ala	Ser	Ser	Val	Tyr	Met	Ile	Arg	Arg	Asn	Ile
		35						40						45	
Leu	Ser	Thr	Trp	Ile	Ala	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Ala	Thr	Ala	Leu	Trp
		50						55						60	
Ser	Leu	Ala	Glu	Val	Gly	Thr	Ser	Phe	Trp	Pro	Ser	Phe	Ser	Arg	Leu
65					70					75					80
Ile	Val	Phe	Leu	Cys	Val	Ala	Leu	Ile	Ala	Thr	Leu	Met	Ala	Pro	Trp
				85						90					95
Leu	Ser	Gly	Pro	Gly	Arg	Arg	Tyr	Phe	Thr	Arg	Pro	Val	Thr	Gly	Ala
			100							105					110
Thr	Ser	Gly	Ala	Leu	Gly	Ala	Ile								
			115												120

<210>21

<211>760

<212>DNA

<213>Acetobacter sp. ATCC 15164

<400>21

accgcgacaa tgtcagcaag ctccgcgtcg cctggaccta ccgcaccggc gacatggcgc	60
tgaacggcgc cgaattccag ggcaccccc tcaagatcgg cgatacggtc tatactctgt	120
caccccacaa catcgtctcg gccctcgacc ccgacaccgg cacggaaaag tggaagtctg	180
acccccacgc ccagacgaaa gtctggcagc gctgccgcgg cgtcggctac tggcatgaca	240
gcacagccac ggacgccaac gcgccctgcg cctcgcgcat cgtcctcacc acgatcgacg	300
cccgccctcat caccatcgac gcccgaccg gccaggcctg cacggatttc ggaacgaacg	360
gcaacgtcaa tctcctgacc ggcctcggcc cgacagcccc cggctcctac taccgaccg	420
ccgccccct cgtggcgggt gacatcgtgg tcgtcggcgg ccgcatcgcc gataacgagc	480
gcacaggcga gccttcgggc gtcgtccgcg gctacgacgt ccgcaccggc gcacaggtct	540
gggcctggga cgccaccaac ccgcatcgcg gcaccacacc actggccgaa ggcgagatct	600
accccgccga aacccccaac atgtggggca ccgccagcta cgaccgaaa ctcaacctcg	660
tcttttccc gctcggcaac cagaccccc atttctgggg cggcgaccgc agcaaggcct	720
cggatgaata caacgacgcc ttcgtcgccg tggacgcaa	760

<210>22

<211>252

<212>PRT

<213>Acetobacter sp. ATCC 15164

<400>22

```

Arg Asp Asn Val Ser Lys Leu Arg Val Ala Trp Thr Tyr Arg Thr Gly
1           5           10           15
Asp Met Ala Leu Asn Gly Ala Glu Phe Gln Gly Thr Pro Ile Lys Ile
          20           25           30
Gly Asp Thr Val Tyr Ile Cys Ser Pro His Asn Ile Val Ser Ala Leu
          35           40           45
Asp Pro Asp Thr Gly Thr Glu Lys Trp Lys Phe Asp Pro His Ala Gln
          50           55           60
Thr Lys Val Trp Gln Arg Cys Arg Gly Val Gly Tyr Trp His Asp Ser
65           70           75           80
Thr Ala Thr Asp Ala Asn Ala Pro Cys Ala Ser Arg Ile Val Leu Thr
          85           90           95
Thr Ile Asp Ala Arg Leu Ile Thr Ile Asp Ala Arg Thr Gly Gln Ala
          100          105          110
Cys Thr Asp Phe Gly Thr Asn Gly Asn Val Asn Leu Leu Thr Gly Leu
          115          120          125
Gly Pro Thr Ala Pro Gly Ser Tyr Tyr Pro Thr Ala Ala Pro Leu Val
          130          135          140
Ala Gly Asp Ile Val Val Val Gly Gly Arg Ile Ala Asp Asn Glu Arg
145          150          155          160
Thr Gly Glu Pro Ser Gly Val Val Arg Gly Tyr Asp Val Arg Thr Gly
          165          170          175
Ala Gln Val Trp Ala Trp Asp Ala Thr Asn Pro His Arg Gly Thr Thr
          180          185          190
Pro Leu Ala Glu Gly Glu Ile Tyr Pro Ala Glu Thr Pro Asn Met Trp
          195          200          205
Gly Thr Ala Ser Tyr Asp Pro Lys Leu Asn Leu Val Phe Phe Pro Leu
          210          215          220
Gly Asn Gln Thr Pro Asp Phe Trp Gly Gly Asp Arg Ser Lys Ala Ser
225          230          235          240
Asp Glu Tyr Asn Asp Ala Phe Val Ala Val Asp Ala
          245          250

```

<210>23

<211>20

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>23

ggcgcgatca tcgtggcttt 20

<210>24

<211>23

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>24

gggtcaaggg ccgagacgat gtt 23

<210>25

<211>20

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>25

gcacgctcga caactatgtc 20

<210>26

<211>2367

<212>DNA

<213>Gluconobacter oxydans IF0 3244

<400>26

atgaacagcg gccccgcac gctctccatg atcatcgga ttctgggcgc cctcatggcc 60

gccttctga	tcategaagg	cctccacctc	atcatcctcg	gcggctcgtg	gttctacacc	120
ctcgccggca	tcgcgtggc	ggccagcagc	gtctacatga	tccgtcgcaa	catcctctcg	180
acatggatcg	ccctcggcct	gcttgtagca	acagccctgt	ggtcgctcgc	cgaagtcggc	240
accagcttct	ggcccagctt	ctcccgcctg	atcgtgttcc	tgtgcgtcgc	cctgatcgcg	300
actctcatgg	cgccctggct	cagcggcccc	ggccggcgct	acttcacccg	ccccgtcaca	360
ggggccacct	ceggcgcaact	cggcgccatc	atcgtggctt	tcctcgccgg	catgttccgg	420
gtccaccgga	ccatcgcccc	gcaggacacc	acccacccgc	aggaaaccgc	gtccaccgcc	480
gactccgacc	agcccggcca	tgactggccc	gcctatggcc	gcacagcttc	cggcacgcgc	540
tacgccagct	tcacacagat	caaccgcgac	aatgtcagca	agctccgcgt	cgcctggacc	600
taccgcaccg	gcgacatggc	gctgaacggc	gccgaattcc	agggcacccc	catcaagatc	660
ggcgatacgg	tctatatctg	ctcacccccac	aacatcgtct	cggccctcga	ccccgacacc	720
ggcacggaaa	agtgggaagt	cgacccccac	gcccagacga	aagtctggca	gcgtcgccgc	780
ggcgtcggct	actggcatga	cagcacagcc	acggacgcca	acgcgccctg	cgcctcgcgc	840
atcgtcctca	ccacgatega	cgcccgcctc	atcaccatcg	acgcccgcac	cggccaggcc	900
tgcacggatt	tcggaacgaa	cggcaacgtc	aatctcctga	ccggcctcgg	cccgacagcc	960
cccggctcct	actacceggac	cgccgcccc	ctcgtggcgg	gtgacatcgt	ggtcgtcggc	1020
ggccgcatcg	ccgataacga	gcgcacaggc	gagccttcgg	gcgtcgtccg	cggctacgac	1080
gtccgcaccg	gcgcacaggt	ctgggccttg	gacgccacca	acccgcatcg	cggcaccaca	1140
ccactggccg	aaggcgagat	ctaccccgc	gaaaccccc	acatgtgggg	caccgccagc	1200
tacgaccgga	aactcaacct	cgtcttcttc	ccgctcggca	accagacccc	cgatttctgg	1260
ggcggcgacc	gcagcaaggc	ctcggatgaa	tacaacgacg	ccttcgtcgc	cgtggacgcc	1320
aaaaccggcg	acgaacgctg	gcacttcgc	accgccaaac	acgatctcgt	ggactacgat	1380
gccacggccc	agcccatcct	ctacgacatt	ccggacggcc	atggcggcac	ccgcccggcg	1440
atcatcgcca	tgaccaagcg	cggccagatc	ttcgtgctcg	accgccgcga	cggcaccccc	1500
atcgtccccg	tggaaatgcg	caaagtcccc	caggacggcg	caccggaaca	ccagtacctc	1560
gccccgaac	agccctattc	cgccctctcc	atcggaacag	agcgccctgaa	acccagcgat	1620
atgtggggcg	gcacgatctt	cgaccagctc	ctgtgccgca	tccagtctgc	ctcctaccgc	1680
tatgaaggcg	agttcacccc	cgtcaacgag	aagcaggcca	ccatcatcta	tccgggctat	1740
tacggcggca	tcaactgggg	cggcggcgcc	gtggatgaaa	gcaccggaac	gctgctggtc	1800
aacgacatcc	gcatggccca	gtggggcaag	tcatgaagc	aagaagaagc	ccgccgcagc	1860
ggcttcaaac	ccagctcgga	aggcgaatat	tccgaacaga	aaggcacccc	ctggggcgctc	1920
gtccgctega	tgttcttctc	ccccgcgggt	ctcccctgcg	tgaaacccgc	ctatggcacg	1980
atgaacgcca	tcgacctgcg	cagcggcaag	gtcaaatgga	gcatgccgct	tggcacgac	2040
caggacatgc	cggctccacgg	catggtcccc	ggcctcgcca	tcccgtcggg	aatgccgacc	2100
atgagcggcc	cgctggccac	ccataccggc	ctggtcttct	tctccggcac	gctcgacaac	2160
tatgtcccg	cgctcaaac	cgacaccggc	gaagtcgtct	ggaaagcccc	tctccccgtc	2220
gcctcacagg	ccgctccgat	gagctacatg	tccgacaaga	ccggcaaaca	gtacatcgctc	2280
gtcaccgcag	gcggcctgac	ccgctccggc	gtcgacaaaa	accgcggcga	ctacgtcatc	2340
gcctacgccc	tgccctccga	agaataa				2367

<210>27

<211>788

<212>PRT

<213>Gluconobacter oxydans IF0 3244

<400>27

```

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

```

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

Tyr	Glu	Gly	Glu	Phe	Thr	Pro	Val	Asn	Glu	Lys	Gln	Ala	Thr	Ile	Ile		
565								570				575					
Tyr	Pro	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Gly	Ile	Asn	Trp	Gly	Gly	Gly	Ala	Val	Asp		
580								585				590					
Glu	Ser	Thr	Gly	Thr	Leu	Leu	Val	Asn	Asp	Ile	Arg	Met	Ala	Gln	Trp		
595								600				605					
Gly	Lys	Phe	Met	Lys	Gln	Glu	Glu	Ala	Arg	Arg	Ser	Gly	Phe	Lys	Pro		
610								615				620					
Ser	Ser	Glu	Gly	Glu	Tyr	Ser	Glu	Gln	Lys	Gly	Thr	Pro	Trp	Gly	Val		
625								630				635				640	
Val	Arg	Ser	Met	Phe	Phe	Ser	Pro	Ala	Gly	Leu	Pro	Cys	Val	Lys	Pro		
645								650				655					
Pro	Tyr	Gly	Thr	Met	Asn	Ala	Ile	Asp	Leu	Arg	Ser	Gly	Lys	Val	Lys		
660								665				670					
Trp	Ser	Met	Pro	Leu	Gly	Thr	Ile	Gln	Asp	Met	Pro	Val	His	Gly	Met		
675								680				685					
Val	Pro	Gly	Leu	Ala	Ile	Pro	Leu	Gly	Met	Pro	Thr	Met	Ser	Gly	Pro		
690								695				700					
Leu	Ala	Thr	His	Thr	Gly	Leu	Val	Phe	Phe	Ser	Gly	Thr	Leu	Asp	Asn		
705								710				715				720	
Tyr	Val	Arg	Ala	Leu	Asn	Thr	Asp	Thr	Gly	Glu	Val	Val	Trp	Lys	Ala		
725								730				735					
Arg	Leu	Pro	Val	Ala	Ser	Gln	Ala	Ala	Pro	Met	Ser	Tyr	Met	Ser	Asp		
740								745				750					
Lys	Thr	Gly	Lys	Gln	Tyr	Ile	Val	Val	Thr	Ala	Gly	Gly	Leu	Thr	Arg		
755								760				765					
Ser	Gly	Val	Asp	Lys	Asn	Arg	Gly	Asp	Tyr	Val	Ile	Ala	Tyr	Ala	Leu		
770								775				780					
Pro	Ser	Glu	Glu														
785																	

<210>28

<211>30

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>28

ccgaattcag gccgaacagc agcaggtcac 30

<210>29

<211>30

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>29

gtgcctgggt acctcggtgg aggtcatgaa 30

<210>30

<211>30

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>30

aagtcatatg aacagcggcc cccgcacgct 30

<210>31

<211>30

<212>DNA

<213> 人工

<220>

<223> 引物

<400>31

atctcgagtt cttcggaggg cagggcgtag 30