



(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 I488970 B

(45)公告日：中華民國 104 (2015) 年 06 月 21 日

(21)申請案號：102106172

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 02 月 22 日

(51)Int. Cl. : C12P7/58 (2006.01)

C12R1/19 (2006.01)

(30)優先權：2012/02/24 日本

2012-039129

(71)申請人：旭化成化學股份有限公司 (日本) ASAHI KASEI CHEMICALS CORPORATION
(JP)

日本

(72)發明人：小西一誠 KONISHI, KAZUNOBU (JP)；今津晉一 IMAZU, SHINICHI (JP)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

(83)生物材料寄存：

食品工業發展研究所生物資源保存及研究中心 BCRC 910572 2013 年 01 月 30 日

(56)參考文獻：

Moon, T.S., et al., "Production of Glucaric Acid from a Synthetic Pathway in Recombinant Escherichia coli", Appl. Environ.

Microbiol., 2009, Vol.75, No.3, P.589-595.

Moon, T.S., et al., "Use of Modular, Synthetic Scaffolds for Improved Production of Glucaric Acid in Engineered E. coli", Metab.

Eng., 2010, Vol.12, Issue 3, P.298-305.

審查人員：林奕萍

申請專利範圍項數：14 項 圖式數：4 共 61 頁

(54)名稱

葡萄糖二酸的製造方法

METHOD OF PRODUCING GLUCARIC ACID

(57)摘要

本案係提供具有經有意義改善之葡萄糖二酸生產能之轉形體之製造方法，及利用該轉形體有效率地生產葡萄糖二酸之方法。

對保有肌醇-1-磷酸合成酶基因、肌醇單磷酸酯酶基因、肌肉肌醇加氧酶基因及糖醛酸脫氫酶基因之轉形體導入用以誘導功能性肌醇單磷酸酯酶之生產過剩或肌醇單磷酸酯酶之活化之基因重組或突變。

Provided is that a method of preparing a transformer having significantly improved glucaric acid production capacity, and a method of efficiently producing glucaric acid using the same. The method of preparing the transformer comprises introducing gene recombination or mutation which induces a functional overproduction or activation of inositol monophosphatase into the transformer having inositol-1-phosphate synthase gene, inositol monophosphatase gene, myoinositol oxygenase and uronic acid dehydrogenase.

發明摘要

公告本

※ 申請案號：102106172

※ 申請日：102. 2. 22

※ IPC 分類：C12P 7/58 (2006.01)
C12R 1/19 (2006.01)

【發明名稱】(中文/英文)

葡萄糖二酸的製造方法

METHOD OF PRODUCING GLUCARIC ACID

【中文】

本案係提供具有經有意義改善之葡萄糖二酸生產能之轉形體之製造方法，及利用該轉形體有效率地生產葡萄糖二酸之方法。

對保有肌醇-1-磷酸合成酶基因、肌醇單磷酸酯酶基因、肌肉肌醇加氧酶基因及糖醛酸脫氫酶基因之轉形體導入用以誘導功能性肌醇單磷酸酯酶之生產過剩或肌醇單磷酸酯酶之活化之基因重組或突變。

【英文】

Provided is that a method of preparing a transformer having significantly improved glucaric acid production capacity, and a method of efficiently producing glucaric acid using the same. The method of preparing the transformer comprises introducing gene recombination or mutation which induces a functional overproduction or activation of inositol monophosphatase into the transformer having inositol-1-phosphate synthase gene, inositol monophosphatase gene, myoinositol oxygenase and uronic acid dehydrogenase.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

本案圖式均為 DNA 及蛋白質序列，並非本案的代表圖。
故本案無指定代表圖。

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

本案無代表化學式

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

葡萄糖二酸的製造方法

METHOD OF PRODUCING GLUCARIC ACID

【技術領域】

【0001】本發明係有關在製造葡萄糖二酸中基因重組技術之應用。

【先前技術】

【0002】葡萄糖二酸(四羥基己二酸)為自古以來在植物或哺乳動物中發現之化合物。

【0003】近年來美國國立再生能研究所在對於從生物質(biomass)可製作高附加價值化學產品之報告(非專利文獻 1)中列舉將葡萄糖二酸作為前 12 名以內之化合物。另，該報告對於將葡萄糖二酸作為原料而可調製之葡萄糖二酸衍生物例示有葡萄糖- γ -內酯、葡萄糖- δ -內酯或葡萄糖二內酯等內酯類(可期待作為溶劑之用途)、多羥基聚醯胺類(可期待作為新穎尼龍之用途)等。又，於該報告，對於已知之葡萄糖二酸製造方法，可利用澱粉之硝酸氧化反應、在鹼性漂白劑存在下之觸媒氧化反應。

【0004】另，最近根據專利文獻 1，揭示可生合成葡萄糖二酸之轉形體。亦即，於該專利文獻中，將各別編碼肌肉肌醇-1-磷酸合成酶(Ino1)、肌肉肌醇加氧酶(MIOX)及糖醛酸脫氫酶(udh)之 3 個基因轉染(transfect)至大腸桿菌宿主。接著，經此獲得之轉形體在培養基內以 0.72 至 1.13g/L 之濃度生產葡萄糖二酸。惟，專利

文獻 1 之發明人等對該專利文獻之轉形體不需導入肌醇單磷酸酯酶(suhB)。

【0005】亦即，在將葡萄糖作為基質生成葡萄糖二酸之途徑，理論上下列 5 種活性是必要的：

【0006】活性 1：從適當之碳源生成葡萄糖- 6- 磷酸之活性；

【0007】活性 2：將葡萄糖-6-磷酸轉換為肌肉肌醇-1-磷酸之活性，亦即，肌醇-1-磷酸合成酶活性；

【0008】活性 3：將肌肉肌醇-1-磷酸轉換為肌肉肌醇之活性，亦即，將肌肉肌醇-1-磷酸作為基質之磷酸酯酶活性；

【0009】活性 4：將肌肉肌醇轉換為葡萄糖醛酸之活性，亦即，肌肉肌醇加氧酶活性；及

【0010】活性 5：將葡萄糖醛酸轉換為葡萄糖二酸之活性，亦即，糖醛酸脫氫酶活性。惟，實際上，由於活性 1 生成物之葡萄糖-6-磷酸為原核微生物普遍生成之代謝中間體，不需在原核微生物賦予該活性。

【0011】又，對於活性 3，已知不少微生物株表現內生性肌醇單磷酸酯酶，或具有可將肌肉肌醇-1-磷酸作為基質而廣泛使用之單磷酸酯酶活性。因此，亦同意專利文獻 1 之轉形體不需導入肌醇單磷酸酯酶基因。

【0012】惟，專利文獻 1 之結論為，在以所製造之轉形體之代謝分析為基礎，用於生成葡萄糖二酸之轉形體不需導入肌醇單磷酸酯酶基因。亦即，專利文獻 1 記載「亦應注意，我們不使 suhB 基因或相同之磷酸酯酶表現過度。惟，在培養產物中未偵測出肌肉肌醇-1-磷酸，另一方面，肌肉肌醇累積。因此，我們的結論是，

磷酸酯酶活性並未限制通過途徑之代謝流量(flux)。」(第 33 頁，第 2 行至第 5 行)。

【0013】因此，在用於生合成葡萄糖二酸之轉形體中導入肌醇單磷酸酯酶基因之明確動機不存在。

[先前技術文獻]

[專利文獻]

【0014】

[專利文獻 1] WO2009/145838 號說明書

[非專利文獻]

[非專利文獻 1] Top Value Added Chemicals from Biomass Volume I-Results of Screening for Potential Candidates from Sugars and Synthesis Gas” ”、[http：//www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf](http://www1.eere.energy.gov/biomass/pdfs/35523.pdf)、T. Werpy 及 G.Peterson 編，2004 年 8 月發行

【發明內容】

(發明解決課題)

【0015】本發明要解決的課題為製造具有經有意義改善之葡萄糖二酸生產能之轉形體及其利用。

(解決課題之方法)

【0016】如上所述，連在已揭示可生合成葡萄糖二酸之轉形體之專利文獻 1 中，都未在該轉形體中導入肌醇單磷酸酯酶基因，對於該活性亦未特別注意。

【0017】惟，與專利文獻 1 預想的相反，本發明人等發現在用於生合成葡萄糖二酸之轉形體，肌醇單磷酸酯酶活性占有重大的角色。尤其是經由強化肌醇單磷酸酯酶活性，該等轉形體之葡

葡萄糖二酸生產能提昇令人驚愕的數十至數百倍。

【0018】因此，本發明之第 1 方面為：

【0019】(1)一種葡萄糖二酸之製造方法，上述製造方法包含以下步驟：

1)準備帶有肌醇-1-磷酸合成酶基因、肌醇單磷酸酯酶基因、肌肉肌醇加氧酶基因及糖醛酸脫氫酶基因之轉形體的步驟，該轉形體具有用以誘導在該轉形體內之功能性肌醇單磷酸酯酶生產過剩或肌醇單磷酸酯酶活化之基因重組或突變；

2)在適合上述轉形體繁殖及/或維持之條件下，將該轉形體與可經由該轉形體轉換為葡萄糖二酸之碳源接觸之步驟；及

3)將葡萄糖二酸或葡萄糖二酸鹽從上述 2)獲得之培養物中分離之步驟。

【0020】更特定的為，在使用帶有肌醇-1-磷酸合成酶基因、肌醇單磷酸酯酶基因、肌肉肌醇加氧酶基因及糖醛酸脫氫酶基因之轉形體之葡萄糖二酸製造方法中，上述轉形體之特徵為具有誘導功能性肌醇單磷酸酯酶生產過剩或肌醇單磷酸酯酶活化之基因重組或突變之轉形體。

【0021】於本發明葡萄糖二酸之發酵生產中，較佳為使用包含適合生成肌醇-1-磷酸合成酶(上述之活性 2)基質之葡萄糖-6-磷酸之化合物之碳源作為培養基材。因此，本發明之較佳形式為：

【0022】(2)如上述(1)所述之製造方法，其中，上述碳源包含在上述轉形體內可轉換為葡萄糖-6-磷酸之化合物；及

【0023】(3)如上述(2)所述之製造方法，其中，上述碳源為 1 個以上選自由 D-葡萄糖、蔗糖、寡糖、多糖、澱粉、纖維素、米

糠、廢糖蜜(molasses)及含有 D-葡萄糖之生物質所成群組者。

【0024】以大腸桿菌為代表之原核微生物，因其迅速之繁殖能力、發酵管理之容易度，從工業性發酵生產之觀點而言，具有極大的魅力，同時，從基因重組技術適用之實績、經確立之安全性之觀點而言，亦具有優點。又，不具有從葡萄糖經過肌肉肌醇生合成葡萄糖二酸之途徑之多數原核微生物係使用與基因重組技術聯合之合成生物學方法，具有容易控制葡萄糖二酸生產性之優點。尤其是大腸桿菌等原核微生物宿主，由於不具有將作為葡萄糖二酸生合成途徑之中間體之肌肉肌醇合成代謝(anabolism)之能力(分解能)，合成生物學方法之適用更容易。因此，本發明之較佳形式為：

【0025】(4)如上述(1)至(3)中任何一項所述之製造方法，其中，上述轉形體之特徵為源自不具有肌肉肌醇合成代謝能之微生物；及

【0026】(5)如上述(1)至(4)中任何一項所述之製造方法，其中，上述轉形體為源自選自由大腸桿菌、桿菌屬細菌、棒狀桿菌屬細菌、發酵單胞菌屬細菌所成群組之細菌。

【0027】不論宿主微生物是否具有內生性肌醇單磷酸酯酶活性，藉由於該細胞內生產過剩肌醇單磷酸酯酶，可強化該細胞之肌醇單磷酸酯酶活性。適用各種公知之技術，可在細胞中生產過剩肌醇單磷酸酯酶。因此，本發明為以下之形式：

【0028】(6)如上述(1)至(5)中任何一項所述之製造方法，其中，上述肌醇單磷酸酯酶之生產過剩為對上述轉形體經由下列方式誘導者：

- a) 導入外來肌醇單磷酸酯酶基因、
- b) 增加內生性肌醇單磷酸酯酶基因之複製數、
- c) 在內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區導入突變、
- d) 將內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區以高表現誘導性外來調控區置換、或
- e) 使內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區缺失；及

【0029】(7)如上述(6)所述之製造方法，其中，上述肌醇單磷酸酯酶之生產過剩經由對上述轉形體導入外來肌醇單磷酸酯酶基因而誘導者。

【0030】又，宿主細胞具有內生性肌醇單磷酸酯酶基因時，根據以下之形式，亦可強化該細胞之肌醇單磷酸酯酶活性。

【0031】(8)如上述(1)至(5)中任何一項所述之製造方法，其中，上述肌醇單磷酸酯酶之活化為對上述轉形體經由下列方式誘導者：

- f) 在內生性肌醇單磷酸酯酶基因中導入突變、
- g) 將內生性肌醇單磷酸酯酶基因之一部分或全部予以置換、
- h) 使內生性肌醇單磷酸酯酶基因之一部分缺失、
- i) 減少使肌醇單磷酸酯酶降低活性之其他蛋白質；
- j) 減少使肌醇單磷酸酯酶活性降低之化合物之生成。

【0032】又，本發明亦意圖用於上述葡萄糖二酸之製造方法之轉形體。因此，本發明之第 2 方面為：

【0033】(9)一種帶有肌醇-1-磷酸合成酶基因、肌醇單磷酸酯酶基因、肌肉肌醇加氧酶基因及糖醛酸脫氫酶基因之轉形體，該轉形體具有用以誘導在該轉形體內功能性肌醇單磷酸酯酶生產過

剩或肌醇單磷酸酯酶活化之基因重組或突變。

【0034】更特定的為，在帶有肌醇-1-磷酸合成酶基因、肌醇單磷酸酯酶基因、肌肉肌醇加氧酶基因及糖醛酸脫氫酶基因之轉形體中，其特徵為具有誘導功能性肌醇單磷酸酯酶生產過剩或肌醇單磷酸酯酶活化之基因重組或突變。

【0035】又，對於本發明第 1 方面記載之形式亦適用於本發明之第 2 方面。該等形式為：

【0036】(10)如上述(9)所述之轉形體，其中，上述轉形體之特徵為源自不具有肌肉肌醇合成代謝能之微生物；

【0037】(11)如上述(9)或(10)所述之轉形體，其中，上述轉形體為源自選自由大腸桿菌、桿菌屬細菌、棒狀桿菌屬細菌、發酵單胞菌屬細菌所成群組之細菌；

【0038】(12)如上述(9)至(11)中任何一項所述之轉形體，其中，上述肌醇單磷酸酯酶之生產過剩為對上述轉形體經由下列方式誘導者：

- a) 導入外來肌醇單磷酸酯酶基因、
- b) 增加內生性肌醇單磷酸酯酶基因之複製數、
- c) 在內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區導入突變、
- d) 將內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區以高表現誘導性外來調控區置換、或
- e) 使內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區缺失；

【0039】(13)如上述(12)所述之轉形體，其中，上述肌醇單磷酸酯酶之生產過剩為經由對上述轉形體導入外來肌醇單磷酸酯酶基因而誘導者；及

【0040】(14)如上述(9)至(11)中任何一項所述之轉形體，其中，上述肌醇單磷酸酯酶之活化為對上述轉形體經由下列方式誘導者：

- f) 在內生性肌醇單磷酸酯酶基因中導入突變、
- g) 將內生性肌醇單磷酸酯酶基因之一部分或全部予以置換、
- h) 使內生性肌醇單磷酸酯酶基因之一部分缺失、
- i) 減少使肌醇單磷酸酯酶活性降低之其他蛋白質、
- j) 減少使肌醇單磷酸酯酶活性降低之化合物之生成。

(發明之效果)

【0041】根據本發明，可達成經由微生物培養技術，效率化的工業性生產葡萄糖二酸。

【圖式簡單說明】

【0042】

第 1 圖係表示 INO1 基因之編碼區(序列編號 1)。

第 2 圖係表示 suhB 基因之編碼區(序列編號 3)。

第 3 圖係表示 miox 基因之編碼區(序列編號 5)。

第 4 圖係表示 udh 基因之編碼區(序列編號 7)。

【實施方式】

【0043】本發明之課題經由在帶有肌醇-1-磷酸合成酶基因、肌醇單磷酸酯酶基因、肌肉肌醇加氧酶基因及糖醛酸脫氫酶基因之轉形體中，強化肌醇單磷酸酯酶活性而解決。

【0044】本發明之轉形體可使用各種宿主微生物細胞製造。尤其是將原核微生物作為宿主，由於在該宿主細胞內可建構新的葡萄糖二酸生合成途徑(亦即，不影響既存之內生性途徑)，在合

成生物學方法之適用上有極大的魅力。例示之原核微生物爲：埃希氏菌(*Escherichia*)、綠膿桿菌(*Pseudomonas*)、桿菌(*Bacillus*)、芽孢桿菌(*Geobacillus*)、甲烷單胞菌(*Methanomonas*)、甲基菌(*Methylobacillus*)、嗜甲基菌(*Methylophilus*)、精蛋白桿菌(*Protaminobacter*)、嗜甲烷菌(*Methylococcus*)、棒狀桿菌(*Corynebacterium*)、短桿菌(*Brevibacterium*)、發酵單胞菌(*Zymomonas*)及李斯特菌(*Listeria*)屬之細菌。於工業性發酵生產中較佳之原核微生物之非限定例示包含大腸桿菌、桿菌屬細菌、棒狀桿菌屬細菌、發酵單胞菌屬細菌。大腸桿菌由於其迅速之繁殖能力或發酵管理容易，爲本發明宿主微生物之特佳例。

【0045】又，作爲本發明宿主細胞而可利用之細胞株，可爲通常意思之野生型，或者亦可爲營養需求性突變株、抗生素抗性突變株。另，作爲本發明宿主細胞而可利用之細胞株，亦可爲具有關於如上述之突變之各種標識基因的經轉形者。該等突變或基因在本發明轉形體之製造、維持、管理中可提供有益之性質。較好爲經由使用對氯黴素(chloramphenicol)、安比西林(ampicillin)、卡那黴素(kanamycin)、四環素(tetracycline)等抗生素顯示耐性之細胞株，可使本發明之葡萄糖二酸之生產簡便地進行。

【0046】於指向合成生物學之本發明中，爲了在宿主細胞中建構新的葡萄糖二酸生合成途徑，在宿主細胞未表現內生性肌醇-1-磷酸合成酶之情況中，導入外來肌醇-1-磷酸合成酶基因。又，於本明細書中，所謂的「外來」或「外來性」之用語係用於，在轉形前之宿主微生物不具有經由本發明應導入之基因的情形經由該基因編碼之酶實質上未表現的情形、及根據不同基因將該酶之

胺基酸序列編碼，惟，轉形後未表現比得上內生性酶活性之情形，將以本發明為基礎之基因或核酸序列導入宿主之意思。

【0047】肌醇-1-磷酸合成酶基因為公知(例如，GenBank Accession Nos.AB032073、AF056325、AF071103、AF078915、AF120146、AF207640、AF284065、BC111160、L23520、U32511)，該任何一種基因均可在本發明之目的使用。尤其是具有序列編號 1 表示之編碼化區核苷酸序列之肌醇-1-磷酸合成酶基因可適用於本發明。惟，本發明中可利用之肌醇-1-磷酸合成酶基因不只限於上述者，亦可為源自其他生物者或可為人工合成者，只要是在上述宿主微生物細胞內可表現實質之肌醇-1-磷酸合成酶活性者即可。

【0048】因此，可利用於本發明之目的之肌醇-1-磷酸合成酶基因只要是在上述宿主微生物細胞內可表現實質之肌醇-1-磷酸合成酶活性者即可，亦可具有在自然界會發生之所有突變或經人工導入之突變及修飾。例如，編碼特定之胺基酸之各種密碼子(coden)已知有多餘之密碼子(冗餘碼，redundancy)存在。因此，於本發明中，可利用最終轉譯成為同一胺基酸之代替密碼子。亦即，由於基因編碼簡化，為了要將某一特定胺基酸編碼而可使用複數之密碼子，因此，胺基酸序列可以任意 1 組合之類似 DNA 寡核苷酸編碼。雖然只有該組合之唯一成員與天然型酶之基因序列相同，但即使是不匹配(mismatch)之 DNA 寡核苷酸，在適當之緊縮條件下(例如，3xSSC、於 68°C 雜交、2xSSC、以 0.1%SDS 及於 68°C 洗淨)，可在天然型序列中雜交，可將天然型序列編碼之 DNA 鑑定、分離，另，該等基因亦可利用於本發明。尤其是，已知大部

分之生物優先使用特定密碼子(最適合之密碼子)之子集(subset)(Gene、Vol.105、第 61-72 頁、1991 等)、依據宿主微生物所進行之「編碼最適化」於本發明亦有用。

【0049】惟，業者應了解於本發明中，經由將肌醇-1-磷酸合成酶基因作為「表現匣」(expression cassette)而導入宿主微生物細胞內，可獲得更安定、高水平之肌醇-1-磷酸合成酶活性。於本說明書中，「表現匣」意指包含將表現對象之核酸或在表現對象之基因中功能性結合之轉錄及翻譯而調控之核酸序列之核苷酸。典型上，本發明之表現匣包含從編碼序列於 5' 上流為啟動子序列、於 3' 下流為終止序列，且根據情況復將通常之調控元件(element)功能性結合之狀態，於該等情況，表現對象之核酸或表現對象之基因在宿主微生物中「可表現導入」。

【0050】啟動子(promoter)之定義為不論是構造性啟動子或是調控性啟動子，將 RNA 聚合酶結合於 DNA 而開始 RNA 合成之 DNA 序列。強啟動子為使 mRNA 合成以高頻率開始之啟動子，亦適用於本發明中。對於 lac 系、trp 系、TAC 或 TRC 系、 λ 噬菌體之主要操作子(operator)及啟動子區、fd 編碼蛋白質之調控區、糖解系酶(例如，3-磷酸甘油激酶、甘油醛-3-磷酸脫氫酶)、麩胺酸脫羧酶 A、絲胺酸羧甲基轉移酶之啟動子等，可依據其宿主細胞之性質等利用。除了啟動子及終結子(terminator)序列之外，可作為其他調控元件之例列舉有選擇標識、增幅信號、複製起點等。較佳之調控序列記載於例如“Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185”、Academic Press(1990)。

【0051】將上述說明之表現匣組合至由例如質體、噬菌體、

轉位子(transposon)、IS 元件(insertion sequence element)、尾感器(phasmid)、黏質體(cosmid)或由線狀或環狀 DNA 等形成之載體，並插入宿主微生物中。較佳為質體及噬菌體。該等載體可為在宿主微生物中自行複製者，亦可經由染色體複製。較佳之質體為例如大腸桿菌之 pLG338、pACYC184、pBR322、pUC18、pUC19、pKC30、pRep4、pHS1、pKK223-3、pDHE19.2、pHS2、pPLc236、pMBL24、pLG200、pUR290、pIN-III113-B1、 λ g t11 或 pBdCI；桿菌之 pUB110、pC194 或 pBD214；棒狀桿菌屬之 pSA77 或 pAJ667 等。其他亦可使用之質體等記載於“Cloning Vectors”、Elsevier、1985。載體中導入表現匣可經由包含經適當之限制酶切出、選殖及黏合(ligation)之慣用方法。

【0052】經由上述操作建構具有本發明表現匣之載體後，將該載體導入宿主微生物中時適用之方法係使用，例如共沈澱、原生質體融合、電穿孔法、反轉錄病毒轉染等慣用之選殖法及轉染法。該等例記載於「分子生物學之最新實驗步驟(Current Protocols in Molecular Biology)」、F. Ausubel 人等、Publ.Wiley Interscience、New York、1997 或 Sambrook 人等「分子選殖：實驗室手冊」、第 2 版、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor、NY、1989。

【0053】令人驚訝的是本發明人等發現，在不具有內生性葡萄糖二酸生合成途徑之宿主微生物內導入葡萄糖二酸生合成途徑獲得之轉形體中，肌醇單磷酸酯酶活性扮演重大的角色。如上所述，至今之任何研究對於肌醇單磷酸酯酶活性沒有特別的注意。惟，未預期的，經由強化肌醇單磷酸酯酶活性，大幅度提昇該等

轉形體之葡萄糖二酸生產能。

【0054】因此，本發明之一形式包含在帶有肌醇-1-磷酸合成酶基因、肌醇單磷酸酯酶基因、肌肉肌醇加氧酶基因及糖醛酸脫氫酶基因之轉形體中生產過剩肌醇單磷酸酯酶。

【0055】本發明意圖之肌醇單磷酸酯酶，除了對於肌醇-1-磷酸顯示高基質專一性之外，亦包含經由顯示對於廣泛之基質可作用之磷酸單酯水解酶活性，可將肌醇-1-磷酸實質水解化之蛋白質。典型之肌醇單磷酸酯酶已知例如肌醇-1-單磷酸酯酶，多數源自生物之該基因(suhB 基因)發表於 GenBank Accession Nos.ZP_04619988、YP_001451848 等。尤其是使用源自大腸桿菌之 suhB 基因(序列編號 3：AAC75586(MG1655))在將大腸桿菌作為宿主細胞時為便利。

【0056】本發明之轉形微生物應具有之下一個活性為肌肉肌醇加氧酶活性。該酶典型的經由以下之反應，將肌肉肌醇轉換為葡萄糖二酸。

[化學式 1]



【0057】已知各種肌肉肌醇加氧酶基因且可利用。例如，於 WO2002/074926 號說明書揭示源自隱球菌(*Cryptococcus*)及人類之肌肉肌醇加氧酶基因及其異種之表現。其他亦有於專利文獻 1 揭示之肌肉肌醇加氧酶基因可使用於本發明。另，已知例如以下之賦予 GenBank Accession 編號之源自多數生物之肌肉肌醇加氧酶基因可用於本發明。

Accession No.AY738258(人類肌肉肌醇加氧酶(MIOX))

Accession No.NM101319(阿拉伯芥(*Arabidopsis thaliana*)肌醇加氧酶 1(MIOX1))

Accession No.NM001101065(歐洲牛(*Bos taurus*)肌肉肌醇加氧酶(MIOX))

Accession No.NM001030266(斑馬魚(*Danio rerio*)肌肉肌醇加氧酶(miox))

Accession No.NM214102(山豬(*Sus scrofa*)肌肉肌醇加氧酶(MIOX))

Accession No.AY064416(人類肌肉肌醇加氧酶(MIOX))

Accession No.NM001247664(蕃茄(*Solanum lycopersicum*)肌肉肌醇加氧酶(MIOX))

Accession No.XM630762(黏菌(*Dictyostelium discoideum*)AX4肌醇加氧酶(miox))

Accession No.NM145771(褐鼠(*Rattus norvegicus*)肌肉肌醇加氧酶(Miox))

Accession No.NM017584(人類肌肉肌醇加氧酶(MIOX))

Accession No.NM001131282(蘇門答臘猩猩(*Pongo abelii*) 肌肉肌醇加氧酶(MIOX))

【0058】尤其是序列編號 5 表示之具有編碼化區核苷酸序列之 miox 基因之使用為便利。

【0059】本發明之轉形微生物應具有之最後之生物活性為糖醛酸脫氫酶活性。該酶典型的經由以下之反應，在 NAD⁺存在下將葡萄糖醛酸轉換為葡萄糖二酸。

[化學式 2]



【0060】已知各種糖醛酸脫氫酶基因且可利用。例如於專利文獻 1 記載之綠膿桿菌或農桿菌(*Agrobacterium*)屬細菌之糖醛酸脫氫酶亦可使用於本發明。另，已知例如以下之賦予 GenBank Accession 編號之 *udh* 基因可用於本發明。

Accession No.BK006462(根瘤土壤桿菌種(*Agrobacterium tumefaciens* str. C58)糖醛酸脫氫酶(*udh*)基因)

Accession No.EU377538(假單孢菌蕃茄葉致病種(*Pseudomonas syringae* pv. *tomato* str. DC3000)糖醛酸脫氫酶(*udh*)基因)

【0061】尤其是序列編號 7 表示之具有編碼化區核苷酸序列之 *udh* 基因之使用為便利。

【0062】於肌醇-1-磷酸合成酶基因記載之突變或修飾及密碼子最適化及表現匣、啟動子等之調控序列及質體等與經由此轉形之說明，係適用於所有本發明之肌醇單磷酸酯酶基因、肌肉肌醇加氧酶基因及糖醛酸脫氫酶基因，該業者應該可容易理解。因此，本發明之轉形體可帶有 4 個表現匣：包含將肌醇-1-磷酸合成酶編碼之核酸之表現匣、包含將肌醇單磷酸酯酶編碼之核酸之表現匣、包含將肌肉肌醇加氧酶編碼之核酸之表現匣及包含將糖醛酸脫氫酶編碼之核酸之表現匣。較佳之本發明之轉形體帶有包含具有序列編號 1 表示之核苷酸序列之核酸之表現匣、包含具有序列編號 3 表示之核苷酸序列之核酸之表現匣、包含具有序列編號 5 表示之核苷酸序列之核酸之表現匣及包含具有序列編號 7 表示之核苷酸序列之核酸之表現匣。

【0063】上述 4 個表現匣可配置於 1 個載體上而轉染至宿主微生物。或是將配置其中之任意 2 個以上之表現匣之載體與配置剩餘表現匣之載體共同轉染至宿主微生物中，亦可將配置各個表現匣之 4 個載體共同轉染至宿主微生物中。另，亦可將上述 4 個表現匣中之任意 1 個以上組合至宿主微生物之基因組中，且剩餘之表現匣作為質體存在於該轉形體內。例如，對大腸桿菌 AKC-018 株(作為 FERM P-22181，於 2011 年 10 月 25 日寄託於獨立行政法人產業技術綜合研究所特許生物寄託中心。)，其染色體上具有包含肌醇-1-磷酸合成酶編碼化核酸(INO1)之表現匣及包含將肌醇單磷酸酯酶編碼之核酸(suhB)之表現匣兩者，亦可轉染配置包含將肌肉肌醇加氧酶編碼之核酸之表現匣及包含將葡萄糖二酸脫氫酶編碼之核酸之表現匣之質體。

【0064】另，多數微生物細胞被認為表現著本發明意圖之肌醇單磷酸酯酶活性(亦即，具有將肌醇單磷酸酯酶編碼之內生性基因)。因此，本發明中肌醇單磷酸酯酶之生產過剩亦可經由誘導增加內生性肌醇單磷酸酯酶基因之複製數；在內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區導入突變；將內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區以高表現誘導性外來調控區置換；及使內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區缺失。具體而言，為了達成肌醇單磷酸酯酶之過剩表現，可以下列方式達成：經由包含內生性肌醇單磷酸酯酶基因、或經由包含在該內生性基因編碼化區中附加適當調控區之表現匣之建構物，將上述宿主微生物轉形，使在該轉形體內之該肌醇單磷酸酯酶基因複製數與原本之宿主細胞相比實質性增加、或關於具有內生性肌醇單磷酸酯酶基因之原本宿主細胞，將染色體之突

變、附加及缺失經由公知之基因重組技術實施、或使用突變劑等在染色體任意地進行突變導入。肌醇單磷酸酯酶生產過剩之確認可使用公知之 SDS-PAGE 分析法等。

【0065】另，爲了將肌醇單磷酸酯酶活性強化之本發明之另一形式包含在宿主微生物細胞中誘導肌醇單磷酸酯酶活化。爲了其目的，可例示 1)在內生性肌醇單磷酸酯酶基因導入突變、2)將內生性肌醇單磷酸酯酶基因之一部分或全部置換、3)使內生性肌醇單磷酸酯酶基因之一部分缺失、4)減少使肌醇單磷酸酯酶活性降低之其他蛋白質及/或 5)減少使肌醇單磷酸酯酶活性降低之化合物生成之方法。

【0066】關於上述爲了將肌醇單磷酸酯酶活性強化之 1)至 5)之方法，具體而言，在肌醇單磷酸酯酶之基因實施突變、附加或缺失後評估將該基因編碼之肌醇單磷酸酯酶之活性，可獲得肌醇單磷酸酯酶活性經強化之肌醇單磷酸酯酶。

【0067】如上操作獲得之轉形體爲了生產本發明之葡萄糖二酸，在適合繁殖及/或維持上述轉形體之條件下培養及維持。用於源自各種宿主微生物細胞之轉形體之適當培養基組成、培養條件、培養時間於業者爲公知。

【0068】培養基可爲 1 個以上之碳源、氮源、無機鹽、維生素及根據情況含有微量元素或維生素等微量成分之天然、半合成、合成培養基。惟，使用之培養基並非一定要適當滿足培養轉形體之營養需求。另，爲了將上述轉形體與經由該轉形體可變換爲葡萄糖二酸之碳源接觸，本發明之培養基應含有最終可作爲葡萄糖二酸生產之基質利用之碳源，亦即轉形體內可轉換爲葡萄糖

-6-磷酸之化合物。碳源可為 D-葡萄糖、蔗糖、寡糖、多糖、澱粉、纖維素、米糠、廢糖蜜，另，可為含有 D-葡萄糖之生物質。較佳之生物質可例示玉蜀黍分解液或纖維素分解液。又，培養基在轉形體表現有用之附加性質時，例如具有對於抗生素耐性之標識時，可包含對應之抗生素。經由此可降低因發酵中之雜菌污染之風險。

【0069】上述宿主微生物不能將纖維素或多糖類等碳源合成代謝時，藉由在該宿主微生物實施導入外來基因等公知之基因工程方法，可適用於使用該等碳源之葡萄糖二酸生產。外來基因可列舉例如纖維素酶基因或澱粉酶基因等。

【0070】培養可為分批式，亦可為連續式。又，於任何一種情況，亦可為在培養之適當時間點補給追加之上述碳源等之形式。另，培養應邊維持適合之溫度、氧濃度、pH 等邊繼續培養。源自通常之微生物宿主細胞之轉形體之適當培養溫度通常在 15°C 至 45°C、較好 25°C 至 37°C 之範圍。宿主微生物為好氧性時，為了確保發酵中適當之氧濃度，必須進行振盪(燒瓶培養等)、攪拌/通氣(小型發酵罐(jar fermentor)培養等)。該等培養條件係業者可容易地設定。

【0071】經由將業者公知之方法組合，可將葡萄糖二酸從上述之培養物中精製。例如，為了該目的，有用之葡萄糖二酸之偵測或定量方法具體記載於專利文獻 1。

【0072】將以上之說明提供給業者，可充分實施本發明。以下，以進一步說明為目的提供實施例，因此，本發明並非受限於該等實施例。又，於本說明書若無特別說明，核苷酸序列係從

5' 向 3' 之方向記載。

[實施例]

實施例 1：質體之建構

1-a)肌醇單磷酸酯酶表現匣

【0073】於 37℃，將大腸桿菌株 W3110(NBRC 12713)在 LB 培養基中(2ml)振盪培養。培養完成後，將菌體從培養液回收，使用 Nucleo Spin Tissue(商品名，MACHEREY-NAGEL 公司製造)將基因組(genome)DNA 萃取。萃取之基因組 DNA 用為模板，經由以下之引子進行聚合酶鏈鎖反應(PCR)放大(PrimeSTAR Max DNA Polymerase(商品名，Takara Bio 公司製造)，反應條件：98℃ 歷時 10 秒，55℃ 歷時 5 秒，72℃ 歷時 20 秒，28 個循環)而將 *suhB* 基因之編碼區(序列編號 3)選殖。

[化學式 3]

正向：atgcatccgatgctgaac (序列編號 9)

反向：ttaacgcttcagagcgctcg (序列編號 10)

【0074】所獲得之 *suhB* 編碼區可轉錄插入下述序列之啟動子下游。

[化學式 4]

啟動子 : g t c g t t t t t c t g c t t a g g a t t t t g t t a
t t t a a a t t a a g c c t g t a a t g c c t t g c t t c c a t t g c
g g a t a a a t c c t a c t t t t t a t t g c c t t c a a a t a a a
t t t a a g g a g t t c (序列編號11)

【0075】亦即，在質體 pNFP-A51(作為 FERM AP-22182 於 2011 年 10 月 25 日寄託於獨立行政法人產業技術綜合研究所特許生物寄託中心)之多重選殖位中插入終結子序列及上述啟動子序列。在

導入之啓動子序列之下游黏合以上述方式選殖之 *suH*B 編碼區，建構 pNFP-A54。將建構之 pNFP-A54 經由氯化鈣法(參照羊土社 基因工學實驗摘記 上 田村隆明著)轉染至大腸桿菌 AKC-016 株(作為 FERM P-22104，於 2011 年 4 月 20 日寄託於獨立行政法人產業技術總合研究所專利生物寄託中心。)。經由 SDS-PAGE 確認在該大腸桿菌可溶性區分中之肌醇單磷酸酯酶高表現。

1-b)肌醇-1-磷酸合成酶表現匣

【0076】將菌體從酒精酵母之培養液中回收，使用 Nucleo Spin Tissue(商品名，MACHEREY-NAGEL 公司製造)將基因組 DNA 萃取。萃取之基因組 DNA 用於模板，經由以下之引子進行聚合酶鏈鎖反應(PCR)放大(PrimeSTAR Max DNA Polymerase(商品名，Takara Bio 公司製造)，反應條件：98℃ 歷時 10 秒，55℃ 歷時 5 秒，72℃ 歷時 20 秒，28 個循環)，而將 *INO1* 基因之編碼區(序列編號 1)選殖。

[化學式 5]

正向：atgacagaagataatattgctc (序列編號 12)

反向：ttacaacaatctctcttcg (序列編號 13)

【0077】所獲得之 *INO1* 編碼領域可轉錄插入下述序列之啓動子之下游。

[化學式 6]

啓動子 : c t c a a g c c c a a a g g a a g a g t g a g g c g a
g t c a g t c g c g t a a t g c t t a g g c a c a g g a t t g a t t t
g t c g c a a t g a t t g a c a c g a t t c c g c t t g a c g c t g c
g t a a g g t t t t t g t a a t t t t a c a g g c a a c c t t t t a t
t c a c t a a c a a a t a g c t g g t g g a a (序列編號14)

【0078】亦即，在質體 pNFP-A51 之多重選殖位中插入終結子

序列及上述啟動子序列。在導入之啟動子序列之下游黏合以上述方式選殖之 INO1 編碼區，建構 pNFP-D78。將建構之 pNFP-D78 經由氯化鈣法(參照羊土社 基因工學實驗摘記 上 田村隆明著)轉染至大腸桿菌 AKC-016 株(作為 FERM P-22104，於 2011 年 4 月 20 日寄託於獨立行政法人產業技術綜合研究所專利生物寄託中心。)。經由 SDS-PAGE 確認在該大腸桿菌可溶性區分中之肌醇-1 磷酸合成酶之高表現。

1-c)肌肉肌醇加氧酶表現匣

【0079】肌肉肌醇加氧酶(miox)基因可由將具有序列編號 5 之核苷酸序列之 DNA 經由人工合成製造，將該 DNA 用作模板，經由以下之引子進行聚合酶鏈鎖反應(PCR)(PrimeSTAR Max DNA Polymerase(商品名，Takara Bio 公司製造)，反應條件：98℃ 歷時 10 秒，55℃ 歷時 5 秒，72℃ 歷時 20 秒，28 個循環)而獲得。

[化學式 7]

正向：atgaaagttgatgttggtcctg (序列編號 15)

反向：ttaccaggacagggtgcc (序列編號 16)

【0080】所獲得之 miox 編碼區可轉錄插入序列編號 11 之啟動子之下游。亦即，在上述 pNFP-A51 之多重選殖位中插入終結子序列及上述啟動子序列。在導入之啟動子序列之下游黏合以上述方式選殖之 miox 編碼區，建構 pNFP-H26。將建構之 pNFP-H26 經由氯化鈣法(參照羊土社 基因工學實驗摘記 上 田村隆明著)轉染至大腸桿菌株 FERM P-22104。經由 SDS-PAGE 確認在該大腸桿菌可溶性區分中之肌肉肌醇加氧酶之高表現。

1-d)糖醛酸脫氫酶表現匣

【0081】糖醛酸脫氫酶(udh)基因可由將具有序列編號 7 之核苷酸序列之 DNA 經由人工合成製造，將該 DNA 用作模板，經由以下之引子進行聚合酶鏈鎖反應(PCR)(PrimeSTAR Max DNA Polymerase(商品名，Takara Bio 公司製造)，反應條件：98℃ 歷時 10 秒，55℃ 歷時 5 秒，72℃ 歷時 20 秒，28 個循環)而獲得。

[化學式 8]

正向：atgaccactaccccccttcaat (序列編號 17)

反向：tcagttgaacgggccgg (序列編號 18)

【0082】所獲得之 udh 編碼區可轉錄插入序列編號 11 之啟動子之下游。亦即，在上述 pNFP-A51 之多重選殖位中插入終結子序列及上述啟動子序列。在導入之啟動子序列之下游黏合以上述方式選殖之 udh 編碼區，建構 pNFP-H45。將建構之 pNFP-H45 經由氯化鈣法(參照羊土社 基因工學實驗摘記 上 田村隆明著)轉染至大腸桿菌株 FERM P-22104。經由 SDS-PAGE 確認在該大腸桿菌可溶性區分中之糖醛酸脫氫酶之高表現。

1-e)用於轉形之質體之建構

【0083】將以上述方式製造之 pNFP-D78 以 Sal I 切割(digest)，使其成為平滑末端(blunt end)及將 5' 末端去磷酸化。將 pNFP-A54 中之 suhB 表現匣選殖，黏合於 pNFP-D78。獲得與 pNFP-D78 中之 INO1 表現匣同方向之黏合 suhB 表現匣之 pNFP-G22。接著，將 pNFP-G22 以 Sal I 切割，使其成為平滑末端及將 5' 末端去磷酸化。將實施例 1 中製造之 pNFP-H26 中之 miox 表現匣及 pNFP-H45 中之 udh 表現匣選殖，將兩個表現匣黏合於 pNFP-G22。獲得與 pNFP-G22 中之 INO1 表現匣及 suhB 表現匣同方向之黏合 miox 表

現匣及 udh 表現匣之本發明之質體。

實施例 2：

2-a)經由含有表現匣之質體轉染之轉形體，使用 Jar 培養槽生產葡萄糖二酸

【0084】將根據上述之步驟建構之本發明之質體在大腸桿菌 AKC-016 株(作為 FERM P-22104，於 2011 年 4 月 20 日寄託於獨立行政法人產業技術總合研究所專利生物寄託中心。)使用氯化鈣法(參照羊土社 基因工學實驗摘記 上 田村隆明著)進行轉染。

【0085】將獲得之轉形體在含有安比西林(100mg/L)之 LB 盤上，於 37℃ 培養 1 日，使其形成群體(colony)。將含有安比西林(100mg/L)之 LB 培養基 30mL 放入 150mL 容量之燒瓶中，從上述盤將群體用接種環(inculating loop)植菌，以 180rpm 於 37℃，3 至 5 小時進行培養至 OD(600nm)成為約 0.5 左右，將此作為用於本培養之前培養液。

【0086】在 1000mL 容量之 Jar 培養裝置(丸菱生物工程(Bioengineering)公司製造)中放入包含 10g/L 之葡萄糖及 100mg/L 之安比西林之合成培養基(表 1)300mL，添加 6mL 之前培養液，進行本培養(使用 Jar 裝置之葡萄糖二酸生產試驗)。培養條件如下所述；培養溫度 32℃；培養 pH 6.0[下限]；鹼添加為 28%(重量/容量)氨水；攪拌 850rpm；通氣 1vvm。適當添加成為原料之葡萄糖給料溶液(表 2)，使培養液中之葡萄糖濃度成為 0 至 5g/L。

【0087】 (表 1)

合成培養基組成

KH_2PO_4	13.3	g
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	4	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.2	g
$\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$	8.4	mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	2.5	mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	15	mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.5	mg
H_3BO_3	3	mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.5	mg
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	13	mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	100	mg

總量 1 L

使用8N KOH將pH調整至6.3

【0088】 (表 2)

葡萄糖給料溶液

Glucose	700	g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20	g
$\text{EDTA} \cdot 2\text{Na}$	13	mg
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	5	mg
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	29	mg
$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4	mg
H_3BO_3	5	mg
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4	mg
$\text{Zn}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	21	mg
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	41	mg
總量	1	L

【0089】將上述之培養液於 4℃ 以 10,000g×10 分鐘離心分離，將上清液回收，測定培養上清液之葡萄糖二酸濃度。具體而言，將 Shim-Pak SCR-H(保護管柱)及 Shim-Pak SCR-101H(均為商品名，島津 GLC 公司製造)連結，進行 HPLC 分析(偵測器：RI，管柱溫度：40℃，流速：1mL/分鐘，移動相：0.1%甲酸)，定量培養上清液中葡萄糖二酸之濃度。

【0090】其結果，根據本發明之帶有肌醇-1-磷酸合成酶基因、肌醇單磷酸酯酶基因、肌肉肌醇加氧酶基因及糖醛酸脫氫酶基因之轉形體中，經由強化肌醇單磷酸酯酶活性，在該轉形體之培養上清中生產約 73g/L(培養時間 68 小時)之葡萄糖二酸。

參考例：

【0091】製造肌醇單磷酸酯酶未生產過剩之轉形體，除了使用該肌醇單磷酸酯酶非強化株之外，根據上述實施例進行葡萄糖二酸生產試驗時，在培養時間 68 小時中，只生產 0.26g/L 之葡萄糖二酸。

(產業上之利用可能性)

【0092】本發明可利用於葡萄糖二酸之工業發酵生產。

【符號說明】

無。

【生物材料寄存】

國內寄存資訊【請依寄存機構、日期、號碼順序註記】

<u>寄存國家</u>	<u>機構</u>	<u>日期</u>	<u>號碼</u>
1.中華民國	食品工業發展研究所	2013 年 1 月 30 日	BCRC 910572
2.中華民國	食品工業發展研究所	2013 年 1 月 30 日	BCRC 910574

3.中華民國

食品工業發展研究所

2013 年 1 月 30 日

BCRC 940653

國外寄存資訊【請依寄存國家、機構、日期、號碼順序註記】

日本國、獨立行政法人製品評價技術基盤機構特許生物寄託中心

1. 2011 年 4 月 20 日、FERM ABP-11512

2. 2011 年 10 月 25 日、FERM ABP-11514

3. 2011 年 10 月 25 日、FERM ABP-11515

序列表

<110> 旭化成化學股份有限公司(ASAHI KASEI CHEMICALS)

<120> 葡萄糖二酸的製造方法(METHOD OF PRODUCTION OF GLUCARIC ACID)

<130> F112222-WO

<150> 日本專利申請案第 2012-39129 號

<151> 2012-02-24

<160> 18

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 1602

<212> DNA

<213> 啤酒酵母菌(Saccharomyces cerevisiae)

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1602)

<400> 1

atg aca gaa gat aat att gct cca atc acc tcc gtt aaa gta gtt acc	48
Met Thr Glu Asp Asn Ile Ala Pro Ile Thr Ser Val Lys Val Val Thr	
1 5 10 15	
gac aag tgc acg tac aag gac aac gag ctg ctc acc aag tac agc tac	96
Asp Lys Cys Thr Tyr Lys Asp Asn Glu Leu Leu Thr Lys Tyr Ser Tyr	

	20	25	30	
gaa aat gct gta gtt acg aag aca gct agt ggc cgc ttc gat gtc acg				144
Glu Asn Ala Val Val Thr Lys Thr Ala Ser Gly Arg Phe Asp Val Thr				
	35	40	45	
ccc act gtt caa gac tac gtg ttc aaa ctt gac tta aaa aag ccg gaa				192
Pro Thr Val Gln Asp Tyr Val Phe Lys Leu Asp Leu Lys Lys Pro Glu				
	50	55	60	
aaa cta gga att atg ctc att ggg tta ggt ggc aac aat ggc tcc acc				240
Lys Leu Gly Ile Met Leu Ile Gly Leu Gly Gly Asn Asn Gly Ser Thr				
	65	70	75	80
tta gtg gcc tcg gta ttg gcg aat aag cac aat gtg gag ttt caa act				288
Leu Val Ala Ser Val Leu Ala Asn Lys His Asn Val Glu Phe Gln Thr				
	85	90	95	
aag gaa ggc gtt aag caa cca aac tac ttc ggc tcc atg act caa tgt				336
Lys Glu Gly Val Lys Gln Pro Asn Tyr Phe Gly Ser Met Thr Gln Cys				
	100	105	110	
tct acc ttg aaa ctg ggt gtc gat gcg gag ggg aat gac gtt tat gct				384
Ser Thr Leu Lys Leu Gly Val Asp Ala Glu Gly Asn Asp Val Tyr Ala				
	115	120	125	
cct ttt aac tct ctg ttg ccc atg gtt agc cca aac gac ttt gtc gtc				432
Pro Phe Asn Ser Leu Leu Pro Met Val Ser Pro Asn Asp Phe Val Val				
	130	135	140	
tct ggt tgg gac atc aat aac gca gat cta tac gaa gct atg cag aga				480
Ser Gly Trp Asp Ile Asn Asn Ala Asp Leu Tyr Glu Ala Met Gln Arg				
	145	150	155	160
agt cag gtt ctc gaa tat gat ctg caa caa cgc ttg aag gcg aag atg				528
Ser Gln Val Leu Glu Tyr Asp Leu Gln Gln Arg Leu Lys Ala Lys Met				
	165	170	175	

tcc ttg gtg aag cct ctt cct tcc att tac tac cct gat ttc att gca	576
Ser Leu Val Lys Pro Leu Pro Ser Ile Tyr Tyr Pro Asp Phe Ile Ala	
180 185 190	
gct aat caa gat gag aga gcc aat aac tgc atc aat ttg gat gaa aaa	624
Ala Asn Gln Asp Glu Arg Ala Asn Asn Cys Ile Asn Leu Asp Glu Lys	
195 200 205	
ggc aac gta acc acg agg ggt aag tgg gcc cat ctg caa cgc atc aga	672
Gly Asn Val Thr Thr Arg Gly Lys Trp Ala His Leu Gln Arg Ile Arg	
210 215 220	
cgc gat att cag aat ttc aaa gaa gaa aac gcc ctt gat aaa gta atc	720
Arg Asp Ile Gln Asn Phe Lys Glu Glu Asn Ala Leu Asp Lys Val Ile	
225 230 235 240	
gtt ctt tgg act gca aat act gag agg tca gta gaa gta tct cct ggt	768
Val Leu Trp Thr Ala Asn Thr Glu Arg Ser Val Glu Val Ser Pro Gly	
245 250 255	
gtt aat gac acc atg gaa aac ctc ttg cag tct att aag aat gac cat	816
Val Asn Asp Thr Met Glu Asn Leu Leu Gln Ser Ile Lys Asn Asp His	
260 265 270	
gaa gag att gct cct tcc acg atc ttt gca gca gca tct atc ttg gaa	864
Glu Glu Ile Ala Pro Ser Thr Ile Phe Ala Ala Ala Ser Ile Leu Glu	
275 280 285	
ggg gtc ccc tat att aat ggt tca ccg cag aat act ttt gtt ccc ggc	912
Gly Val Pro Tyr Ile Asn Gly Ser Pro Gln Asn Thr Phe Val Pro Gly	
290 295 300	
ttg gtt cag ctg gct gag cat gag ggt aca ttc att gcg gga gac gat	960
Leu Val Gln Leu Ala Glu His Glu Gly Thr Phe Ile Ala Gly Asp Asp	
305 310 315 320	

ctc aag tcg gga caa acc aag ttg aag tct gtt ctg gcc cag ttc tta	1008
Leu Lys Ser Gly Gln Thr Lys Leu Lys Ser Val Leu Ala Gln Phe Leu	
325 330 335	
gtg gat gca ggt att aaa ccg gtc tcc att gca tcc tat aac cat tta	1056
Val Asp Ala Gly Ile Lys Pro Val Ser Ile Ala Ser Tyr Asn His Leu	
340 345 350	
ggc aat aat gac ggt tat aac tta tct gct cca aaa caa ttt agg tct	1104
Gly Asn Asn Asp Gly Tyr Asn Leu Ser Ala Pro Lys Gln Phe Arg Ser	
355 360 365	
aag gag att tcc aaa agt tct gtc ata gat gac atc atc gcg tct aat	1152
Lys Glu Ile Ser Lys Ser Ser Val Ile Asp Asp Ile Ile Ala Ser Asn	
370 375 380	
gat atc ttg tac aat gat aaa ctg ggt aaa aaa gtt gac cac tgc att	1200
Asp Ile Leu Tyr Asn Asp Lys Leu Gly Lys Lys Val Asp His Cys Ile	
385 390 395 400	
gtc att aaa tat atg aag ccc gtc ggg gac tca aaa gtg gca atg gac	1248
Val Ile Lys Tyr Met Lys Pro Val Gly Asp Ser Lys Val Ala Met Asp	
405 410 415	
gag tat tac agt gag ttg atg tta ggt ggc cat aac cgg att tcc att	1296
Glu Tyr Tyr Ser Glu Leu Met Leu Gly Gly His Asn Arg Ile Ser Ile	
420 425 430	
cac aat gtt tgc gaa gat tct tta ctg gct acg ccc ttg atc atc gat	1344
His Asn Val Cys Glu Asp Ser Leu Leu Ala Thr Pro Leu Ile Ile Asp	
435 440 445	
ctt tta gtc atg act gag ttt tgt aca aga gtg tcc tat aag aag gtg	1392
Leu Leu Val Met Thr Glu Phe Cys Thr Arg Val Ser Tyr Lys Lys Val	
450 455 460	
gac cca gtt aaa gaa gat gct ggc aaa ttt gag aac ttt tat cca gtt	1440

Asp Pro Val Lys Glu Asp Ala Gly Lys Phe Glu Asn Phe Tyr Pro Val	
465 470 475 480	
tta acc ttc ttg agt tac tgg tta aaa gct cca tta aca aga cca gga	1488
Leu Thr Phe Leu Ser Tyr Trp Leu Lys Ala Pro Leu Thr Arg Pro Gly	
485 490 495	
ttt cac ccg gtg aat ggc tta aac aag caa aga acc gcc tta gaa aat	1536
Phe His Pro Val Asn Gly Leu Asn Lys Gln Arg Thr Ala Leu Glu Asn	
500 505 510	
ttt tta aga ttg ttg att gga ttg cct tct caa aac gaa cta aga ttc	1584
Phe Leu Arg Leu Leu Ile Gly Leu Pro Ser Gln Asn Glu Leu Arg Phe	
515 520 525	
gaa gag aga ttg ttg taa	1602
Glu Glu Arg Leu Leu	
530	
<210> 2	
<211> 533	
<212> PRT	
<213> 啤酒酵母菌	
<400> 2	
Met Thr Glu Asp Asn Ile Ala Pro Ile Thr Ser Val Lys Val Val Thr	
1 5 10 15	
Asp Lys Cys Thr Tyr Lys Asp Asn Glu Leu Leu Thr Lys Tyr Ser Tyr	
20 25 30	
Glu Asn Ala Val Val Thr Lys Thr Ala Ser Gly Arg Phe Asp Val Thr	
35 40 45	

Pro Thr Val Gln Asp Tyr Val Phe Lys Leu Asp Leu Lys Lys Pro Glu
50 55 60

Lys Leu Gly Ile Met Leu Ile Gly Leu Gly Gly Asn Asn Gly Ser Thr
65 70 75 80

Leu Val Ala Ser Val Leu Ala Asn Lys His Asn Val Glu Phe Gln Thr
85 90 95

Lys Glu Gly Val Lys Gln Pro Asn Tyr Phe Gly Ser Met Thr Gln Cys
100 105 110

Ser Thr Leu Lys Leu Gly Val Asp Ala Glu Gly Asn Asp Val Tyr Ala
115 120 125

Pro Phe Asn Ser Leu Leu Pro Met Val Ser Pro Asn Asp Phe Val Val
130 135 140

Ser Gly Trp Asp Ile Asn Asn Ala Asp Leu Tyr Glu Ala Met Gln Arg
145 150 155 160

Ser Gln Val Leu Glu Tyr Asp Leu Gln Gln Arg Leu Lys Ala Lys Met
165 170 175

Ser Leu Val Lys Pro Leu Pro Ser Ile Tyr Tyr Pro Asp Phe Ile Ala
180 185 190

Ala Asn Gln Asp Glu Arg Ala Asn Asn Cys Ile Asn Leu Asp Glu Lys
195 200 205

Gly Asn Val Thr Thr Arg Gly Lys Trp Ala His Leu Gln Arg Ile Arg . . .
210 215 220

Arg Asp Ile Gln Asn Phe Lys Glu Glu Asn Ala Leu Asp Lys Val Ile
225 230 235 240

Val Leu Trp Thr Ala Asn Thr Glu Arg Ser Val Glu Val Ser Pro Gly
245 250 255

Val Asn Asp Thr Met Glu Asn Leu Leu Gln Ser Ile Lys Asn Asp His
260 265 270

Glu Glu Ile Ala Pro Ser Thr Ile Phe Ala Ala Ala Ser Ile Leu Glu
275 280 285

Gly Val Pro Tyr Ile Asn Gly Ser Pro Gln Asn Thr Phe Val Pro Gly
290 295 300

Leu Val Gln Leu Ala Glu His Glu Gly Thr Phe Ile Ala Gly Asp Asp
305 310 315 320

Leu Lys Ser Gly Gln Thr Lys Leu Lys Ser Val Leu Ala Gln Phe Leu
325 330 335

Val Asp Ala Gly Ile Lys Pro Val Ser Ile Ala Ser Tyr Asn His Leu
340 345 350

Gly Asn Asn Asp Gly Tyr Asn Leu Ser Ala Pro Lys Gln Phe Arg Ser . . .
355 360 365

Lys Glu Ile Ser Lys Ser Ser Val Ile Asp Asp Ile Ile Ala Ser Asn
370 375 380

Asp Ile Leu Tyr Asn Asp Lys Leu Gly Lys Lys Val Asp His Cys Ile
385 390 395 400

Val Ile Lys Tyr Met Lys Pro Val Gly Asp Ser Lys Val Ala Met Asp
405 410 415

Glu Tyr Tyr Ser Glu Leu Met Leu Gly Gly His Asn Arg Ile Ser Ile
420 425 430

His Asn Val Cys Glu Asp Ser Leu Leu Ala Thr Pro Leu Ile Ile Asp
435 440 445

Leu Leu Val Met Thr Glu Phe Cys Thr Arg Val Ser Tyr Lys Lys Val
450 455 460

Asp Pro Val Lys Glu Asp Ala Gly Lys Phe Glu Asn Phe Tyr Pro Val
465 470 475 480

Leu Thr Phe Leu Ser Tyr Trp Leu Lys Ala Pro Leu Thr Arg Pro Gly

485 490 495

Phe His Pro Val Asn Gly Leu Asn Lys Gln Arg Thr Ala Leu Glu Asn
500 505 510

Phe Leu Arg Leu Leu Ile Gly Leu Pro Ser Gln Asn Glu Leu Arg Phe
515 520 525

Glu Glu Arg Leu Leu
530

<210> 3
<211> 804
<212> DNA
<213> 大腸桿菌

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(804)

<400> 3
atg cat ccg atg ctg aac atc gcc gtg cgc gca gcg cgc aag gcg ggt 48
Met His Pro Met Leu Asn Ile Ala Val Arg Ala Ala Arg Lys Ala Gly
1 5 10 15

aat tta att gcc aaa aac tat gaa acc ccg gac gct gta gaa gcg agc 96
Asn Leu Ile Ala Lys Asn Tyr Glu Thr Pro Asp Ala Val Glu Ala Ser
20 25 30

cag aaa ggc agt aac gat ttc gtg acc aac gta gat aaa gct gcc gaa 144
Gln Lys Gly Ser Asn Asp Phe Val Thr Asn Val Asp Lys Ala Ala Glu
35 40 45

gcg gtg att atc gac acg att cgt aaa tct tac cca cag cac acc atc	192
Ala Val Ile Ile Asp Thr Ile Arg Lys Ser Tyr Pro Gln His Thr Ile	
50 55 60	
atc acc gaa gaa agc ggt gaa ctt gaa ggt act gat cag gat gtt caa	240
Ile Thr Glu Glu Ser Gly Glu Leu Glu Gly Thr Asp Gln Asp Val Gln	
65 70 75 80	
tgg gtt atc gat cca ctg gat ggc act acc aac ttt atc aaa cgt ctg	288
Trp Val Ile Asp Pro Leu Asp Gly Thr Thr Asn Phe Ile Lys Arg Leu	
85 90 95	
ccg cac ttc gcg gta tct atc gct gtt cgt atc aaa ggc cgc acc gaa	336
Pro His Phe Ala Val Ser Ile Ala Val Arg Ile Lys Gly Arg Thr Glu	
100 105 110	
gtt gct gtg gta tac gat cct atg cgt aac gaa ctg ttc acc gcc act	384
Val Ala Val Val Tyr Asp Pro Met Arg Asn Glu Leu Phe Thr Ala Thr	
115 120 125	
cgc ggt cag ggc gca cag ctg aac ggc tac cga ctg cgc ggc agc acc	432
Arg Gly Gln Gly Ala Gln Leu Asn Gly Tyr Arg Leu Arg Gly Ser Thr	
130 135 140	
gct cgc gat ctc gac ggt act att ctg gcg acc ggc ttc ccg ttc aaa	480
Ala Arg Asp Leu Asp Gly Thr Ile Leu Ala Thr Gly Phe Pro Phe Lys	
145 150 155 160	
gca aaa cag tac gcc act acc tac atc aac atc gtc ggc aaa ctg ttc	528
Ala Lys Gln Tyr Ala Thr Thr Tyr Ile Asn Ile Val Gly Lys Leu Phe	
165 170 175	
aac gaa tgt gca gac ttc cgt cgt acc ggt tct gcg gcg ctg gat ctg	576
Asn Glu Cys Ala Asp Phe Arg Arg Thr Gly Ser Ala Ala Leu Asp Leu	
180 185 190	

gct tac gtc gct gcg ggt cgt gtt gac ggt ttc ttt gaa atc ggt ctg 624
Ala Tyr Val Ala Ala Gly Arg Val Asp Gly Phe Phe Glu Ile Gly Leu
195 200 205

cgc ccg tgg gac ttc gcc gca ggc gag ctg ctg.gtt cgt gaa gcg ggc 672
Arg Pro Trp Asp Phe Ala Ala Gly Glu Leu Leu Val Arg Glu Ala Gly
210 215 220

ggc atc gtc agc gac ttc acc ggt ggt cat aac tac atg ctg acc ggt 720
Gly Ile Val Ser Asp Phe Thr Gly Gly His Asn Tyr Met Leu Thr Gly
225 230 235 240

aac atc gtt gct ggt aac ccg cgc gtt gtt aaa gcc atg ctg gcg aac 768
Asn Ile Val Ala Gly Asn Pro Arg Val Val Lys Ala Met Leu Ala Asn
245 250 255

atg cgt gac gag tta agc gac gct ctg aag cgt taa 804
Met Arg Asp Glu Leu Ser Asp Ala Leu Lys Arg
260 265

<210> 4
<211> 267
<212> PRT
<213> 大腸桿菌

<400> 4

Met His Pro Met Leu Asn Ile Ala Val Arg Ala Ala Arg Lys Ala Gly
1 5 10 15

Asn Leu Ile Ala Lys Asn Tyr Glu Thr Pro Asp Ala Val Glu Ala Ser
20 25 30

Gln Lys Gly Ser Asn Asp Phe Val Thr Asn Val Asp Lys Ala Ala Glu

35 40 45

Ala Val Ile Ile Asp Thr Ile Arg Lys Ser Tyr Pro Gln His Thr Ile
50 55 60

Ile Thr Glu Glu Ser Gly Glu Leu Glu Gly Thr Asp Gln Asp Val Gln
65 70 75 80

Trp Val Ile Asp Pro Leu Asp Gly Thr Thr Asn Phe Ile Lys Arg Leu
85 90 95

Pro His Phe Ala Val Ser Ile Ala Val Arg Ile Lys Gly Arg Thr Glu
100 105 110

Val Ala Val Val Tyr Asp Pro Met Arg Asn Glu Leu Phe Thr Ala Thr
115 120 125

Arg Gly Gln Gly Ala Gln Leu Asn Gly Tyr Arg Leu Arg Gly Ser Thr
130 135 140

Ala Arg Asp Leu Asp Gly Thr Ile Leu Ala Thr Gly Phe Pro Phe Lys
145 150 155 160

Ala Lys Gln Tyr Ala Thr Thr Tyr Ile Asn Ile Val Gly Lys Leu Phe
165 170 175

Asn Glu Cys Ala Asp Phe Arg Arg Thr Gly Ser Ala Ala Leu Asp Leu
180 185 190

Ala Tyr Val Ala Ala Gly Arg Val Asp Gly Phe Phe Glu Ile Gly Leu
195 200 205

Arg Pro Trp Asp Phe Ala Ala Gly Glu Leu Leu Val Arg Glu Ala Gly
210 215 220

Gly Ile Val Ser Asp Phe Thr Gly Gly His Asn Tyr Met Leu Thr Gly
225 230 235 240

Asn Ile Val Ala Gly Asn Pro Arg Val Val Lys Ala Met Leu Ala Asn
245 250 255

Met Arg Asp Glu Leu Ser Asp Ala Leu Lys Arg
260 265

<210> 5
<211> 858
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 肌肉肌醇加氧酶基因編碼區

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(858)

<400> 5
atg aaa gtt gat gtt ggt cct gat ccg tct ctg gtt tat cgt cca gac 48

•



•

.	145	150	155	160	
.	ttc cag gat aac ccg gat ctg cag gat ccg cgc tat tcc acc gaa ctg				528
	Phe Gln Asp Asn Pro Asp Leu Gln Asp Pro Arg Tyr Ser Thr Glu Leu				
	165 170 175				
	ggc atg tac cag ccg cat tgc ggc ctg gag aac gtt ctg atg tct tgg				576
	Gly Met Tyr Gln Pro His Cys Gly Leu Glu Asn Val Leu Met Ser Trp				
	180 185 190				
.	ggt cac gac gag tac ctg tat cag atg atg aaa ttc aac aaa ttc tcc				624
	Gly His Asp Glu Tyr Leu Tyr Gln Met Met Lys Phe Asn Lys Phe Ser				
.	195 200 205				
	ctg ccg tcc gag gca ttt tac atg atc cgt ttt cac tcc ttc tac ccg				672
	Leu Pro Ser Glu Ala Phe Tyr Met Ile Arg Phe His Ser Phe Tyr Pro				
	210 215 220				
	tgg cat acc ggt ggc gat tat cgt cag ctg tgc tct cag cag gat ctg				720
	Trp His Thr Gly Gly Asp Tyr Arg Gln Leu Cys Ser Gln Gln Asp Leu				
	225 230 235 240				
	gat atg ctg ccg tgg gtt cag gag ttc aat aaa ttc gac ctg tat acc				768
	Asp Met Leu Pro Trp Val Gln Glu Phe Asn Lys Phe Asp Leu Tyr Thr				
	245 250 255				
	aaa tgc cct gac ctg cca gat gtt gaa tcc ctg cgc cca tac tac caa				816
	Lys Cys Pro Asp Leu Pro Asp Val Glu Ser Leu Arg Pro Tyr Tyr Gln				
	260 265 270				
	ggc ctg att gac aaa tac tgc ccg ggc acc ctg tcc tgg taa				858
	Gly Leu Ile Asp Lys Tyr Cys Pro Gly Thr Leu Ser Trp				
	275 280 285				
.	<210> 6				
.	<211> 285				

.

<212> PRT
<213> 人造序列

.

<220>
<223> 合成的建構體

<400> 6

Met Lys Val Asp Val Gly Pro Asp Pro Ser Leu Val Tyr Arg Pro Asp
1 5 10 15

.

Val Asp Pro Glu Met Ala Lys Ser Lys Asp Ser Phe Arg Asn Tyr Thr
 20 25 30

.

Ser Gly Pro Leu Leu Asp Arg Val Phe Thr Thr Tyr Lys Leu Met His
 35 40 45

Thr His Gln Thr Val Asp Phe Val Ser Arg Lys Arg Ile Gln Tyr Gly
 50 55 60

Ser Phe Ser Tyr Lys Lys Met Thr Ile Met Glu Ala Val Gly Met Leu
65 70 75 80

Asp Asp Leu Val Asp Glu Ser Asp Pro Asp Val Asp Phe Pro Asn Ser
 85 90 95

Phe His Ala Phe Gln Thr Ala Glu Gly Ile Arg Lys Ala His Pro Asp
 100 105 110

.

Lys Asp Trp Phe His Leu Val Gly Leu Leu His Asp Leu Gly Lys Ile

.

125

.

•



Lys Cys Pro Asp Leu Pro Asp Val Glu Ser Leu Arg Pro Tyr Tyr Gln
260 265 270

Gly Leu Ile Asp Lys Tyr Cys Pro Gly Thr Leu Ser Trp
275 280 285

<210> 7
<211> 807
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 糖醛酸脫氫酶基因編碼區

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(807)

<400> 7
atg acc act acc ccc ttc aat cgc ctg ctg ctc acc gga gcc gca ggc 48
Met Thr Thr Thr Pro Phe Asn Arg Leu Leu Leu Thr Gly Ala Ala Gly
1 5 10 15

ggc ctg ggc aag gtc ctt cgc gaa cgc ctg aaa ggc tac gcc gag gtc 96
Gly Leu Gly Lys Val Leu Arg Glu Arg Leu Lys Gly Tyr Ala Glu Val
20 25 30

ctg cgc ctg tct gac atc agc ccc atg gcc ccg gcc gcg ggc ccg cat 144
Leu Arg Leu Ser Asp Ile Ser Pro Met Ala Pro Ala Ala Gly Pro His
35 40 45

gaa gaa gtc att acc tgt gac ctg gcc gac aag gct gcg gtg cat acc 192
Glu Glu Val Ile Thr Cys Asp Leu Ala Asp Lys Ala Ala Val His Thr
50 55 60

ctg gtc gag ggc gta gac gcc atc atc cac ttt ggc ggg gtt tct acc 240

288

336

384

432

480

528

576

624

672

210 215 220
cac ctg ggc tat gta ccc aag gac agc tcc gaa acc ttc cgc gca gcc 720
His Leu Gly Tyr Val Pro Lys Asp Ser Ser Glu Thr Phe Arg Ala Ala
225 230 235 240
gtg gag gcc caa ccg gca ccc gcc gcc gat gac ccg agc atg gtc tac 768
Val Glu Ala Gln Pro Ala Pro Ala Ala Asp Asp Pro Ser Met Val Tyr
245 250 255
cag ggc ggc gct ttc gcc gtg gcc ggc ccg ttc aac tga 807
Gln Gly Gly Ala Phe Ala Val Ala Gly Pro Phe Asn
260 265

<210> 8
<211> 268
<212> PRT
<213> 人造序列

<220>
<223> 合成的建構體

<400> 8

Met Thr Thr Thr Pro Phe Asn Arg Leu Leu Leu Thr Gly Ala Ala Gly
1 5 10 15

Gly Leu Gly Lys Val Leu Arg Glu Arg Leu Lys Gly Tyr Ala Glu Val
20 25 30

Leu Arg Leu Ser Asp Ile Ser Pro Met Ala Pro Ala Ala Gly Pro His
35 40 45

Glu Glu Val Ile Thr Cys Asp Leu Ala Asp Lys Ala Ala Val His Thr
50 55 60

Leu Val Glu Gly Val Asp Ala Ile Ile His Phe Gly Gly Val Ser Thr
65 70 75 80

Glu His Ala Phe Glu Glu Ile Leu Gly Pro Asn Ile Cys Gly Val Phe
85 90 95

His Val Tyr Glu Ala Ala Arg Lys His Gly Val Lys Arg Ile Ile Phe
100 105 110

Ala Ser Ser Asn His Thr Ile Gly Phe Tyr Arg Gln Asp Glu Arg Ile
115 120 125

Asp Ala His Ala Pro Arg Arg Pro Asp Ser Tyr Tyr Gly Leu Ser Lys
130 135 140

Cys Tyr Gly Glu Asp Val Ala Ser Phe Tyr Phe Asp Arg Tyr Gly Ile
145 150 155 160

Glu Thr Val Ser Ile Arg Ile Gly Ser Ser Phe Pro Gln Pro Gln Asn
165 170 175

Leu Arg Met Leu Cys Thr Trp Leu Ser Tyr Asp Asp Leu Val Gln Leu
180 185 190

Ile Glu Arg Gly Leu Phe Thr Pro Gly Val Gly His Thr Ile Val Tyr

195 200 205

Gly Ala Ser Asp Asn Arg Thr Val Trp Trp Asp Asn Arg His Ala Ala
210 215 220

His Leu Gly Tyr Val Pro Lys Asp Ser Ser Glu Thr Phe Arg Ala Ala
225 230 235 240

Val Glu Ala Gln Pro Ala Pro Ala Ala Asp Asp Pro Ser Met Val Tyr
245 250 255

Gln Gly Gly Ala Phe Ala Val Ala Gly Pro Phe Asn
260 265

<210> 9
<211> 18
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 肌醇單磷酸酯酶編碼區之正向 PCR 引子

<400> 9
atgcatccga tgctgaac 18

<210> 10
<211> 19
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>

<223> 肌醇單磷酸酯酶編碼區之反向 PCR 引子

<400> 10
ttaacgcttc agagcgtcg 19

<210> 11
<211> 109
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 肌醇單磷酸酯酶編碼區之促進子

<400> 11
gtcgtttttc tgcttaggat ttgttattt aaattaagcc tgtaatgcct tgcttcatt 60

gcggataaat cctacttttt tattgccttc aaataaattt aaggagttc 109

<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>
<223> 肌肉肌醇-1-磷酸合成酶編碼區之正向 PCR 引子

<400> 12
atgacagaag ataatttgc tc 22

<210> 13
<211> 19
<212> DNA
<213> 人造序列

<220>		
<223>	肌肉肌醇-1-磷酸合成酶編碼區之反向 PCR 引子	
<400>	13	
ttacaacaat ctctcttcg		19
<210>	14	
<211>	155	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	肌肉肌醇-1-磷酸合成酶編碼區之促進子	
<400>	14	
ctcaagccca aaggaagagt gaggcgagtc agtcgcgtaa tgcttaggca caggattgat		60
ttgtcgcaat gattgacacg attccgcttg acgctgcgta aggtttttgt aattttacag		120
gcaacctttt attcactaac aaatagctgg tggaa		155
<210>	15	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	人造序列	
<220>		
<223>	肌肉肌醇加氧酶編碼區之正向 PCR 引子	
<400>	15	
atgaaagttg atgttggtcc tg		22
<210>	16	
<211>	18	

.	<212> DNA	
	<213> 人造區域	
.	<220>	
	<223> 肌肉肌醇加氧酶編碼區之反向 PCR 引子	
.	<400> 16	
	ttaccaggac agggtgcc	18
.	<210> 17	
	<211> 21	
.	<212> DNA	
	<213> 人造序列	
●	<220>	
	<223> 糖醛酸脫氫酶編碼區之正向 PCR 引子	
●	<400> 17	
	atgaccacta ccccttcaa t	21
.	<210> 18	
	<211> 17	
.	<212> DNA	
	<213> 人造序列	
.	<220>	
	<223> 糖醛酸脫氫酶編碼區之反向 PCR 引子	
●	<400> 18	
	tcagttgaac gggccgg	17

申請專利範圍

1. 一種葡萄糖二酸之製造方法，其中，上述製造方法包含下列步驟：
 - 1)準備帶有肌醇-1-磷酸合成酶表現匣、肌醇單磷酸酯酶表現匣、肌肉肌醇加氧酶表現匣及糖醛酸脫氫酶表現匣之轉形體之步驟，該轉形體具有用以誘導在該轉形體內之功能性肌醇單磷酸酯酶生產過剩或肌醇單磷酸酯酶活化之基因重組或突變；
 - 2)在適合繁殖及/或維持上述轉形體之條件下，將該轉形體與可經由該轉形體轉換為葡萄糖二酸之碳源接觸之步驟；及
 - 3)將葡萄糖二酸或葡萄糖二酸鹽從上述 2)獲得之培養物中分離之步驟。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之製造方法，其中，上述碳源包含在上述轉形體內可轉換為葡萄糖-6-磷酸之化合物。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之製造方法，其中，上述碳源為 1 個以上選自由 D-葡萄糖、蔗糖、寡糖、多糖、澱粉、纖維素、米糠、廢糖蜜及含有 D-葡萄糖之生物質所成群組。
4. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項所述之製造方法，其中，上述轉形體之特徵為源自不具有肌肉肌醇合成代謝能之微生物。
5. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項所述之製造方法，其中，上述轉形體為源自選自由大腸桿菌、桿菌屬細菌、棒狀桿菌屬細菌、發酵單胞菌屬細菌所成群組之細菌。

6. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項所述之製造方法，其中，上述肌醇單磷酸酯酶之生產過剩為對上述轉形體經由下列方式誘導者：
- a)導入外來肌醇單磷酸酯酶基因、
 - b)增加內生性肌醇單磷酸酯酶基因之複製數、
 - c)在內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區導入突變、
 - d)將內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區以高表現誘導性外來調控區置換、或
 - e)使內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區缺失。
7. 如申請專利範圍第 6 項所述之製造方法，其中，上述肌醇單磷酸酯酶之生產過剩為經由對上述轉形體導入外來肌醇單磷酸酯酶基因而誘導。
8. 如申請專利範圍第 1 項至第 3 項中任一項所述之製造方法，其中，上述肌醇單磷酸酯酶之活化為對上述轉形體經由下列方式誘導者：
- f)在內生性肌醇單磷酸酯酶基因中導入突變、
 - g)將內生性肌醇單磷酸酯酶基因之一部分或全部予以置換、
 - h)使內生性肌醇單磷酸酯酶基因之一部分缺失、
 - i)減少使肌醇單磷酸酯酶活性降低之其他蛋白質、
 - j)減少使肌醇單磷酸酯酶活性降低之化合物之生成。
9. 一種轉形體，為帶有肌醇-1-磷酸合成酶表現匣、肌醇單磷酸酯酶表現匣、肌肉肌醇加氧酶表現匣及糖醛酸脫氫酶表現匣之轉形體，該轉形體具有用以誘導該轉形體內之功能性肌醇

單磷酸酯酶生產過剩或肌醇單磷酸酯酶活化之基因重組或突變。

10. 如申請專利範圍第 9 項所述之轉形體，其中，上述轉形體為源自不具有肌肉肌醇合成代謝能之微生物。

11. 如申請專利範圍第 9 項或第 10 項所述之轉形體，其中，上述轉形體為源自選自由大腸桿菌、桿菌屬細菌、棒狀桿菌屬細菌、發酵單胞菌屬細菌所成群組之細菌。

12. 如申請專利範圍第 9 項或第 10 項所述之轉形體，其中，上述肌醇單磷酸酯酶之生產過剩為對上述轉形體經由下列方式誘導者：

a) 導入外來肌醇單磷酸酯酶基因、

b) 增加內生性肌醇單磷酸酯酶基因之複製數、

c) 在內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區導入突變、

d) 將內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區以高表現誘導性外來調控區置換、或

e) 使內生性肌醇單磷酸酯酶基因之調控區缺失。

13. 如申請專利範圍第 12 項所述之轉形體，其中，上述肌醇單磷酸酯酶之生產過剩為經由對上述轉形體導入外來肌醇單磷酸酯酶基因而誘導者。

14. 如申請專利範圍第 9 項或第 10 項所述之轉形體，其中，上述肌醇單磷酸酯酶之活化為對上述轉形體經由下列方式誘導者：

f) 在內生性肌醇單磷酸酯酶基因中導入突變、

g) 將內生性肌醇單磷酸酯酶基因之一部分或全部予以置

換、

- h)使內生性肌醇單磷酸酯酶基因之一部分缺失、
- i)減少使肌醇單磷酸酯酶活性降低之其他蛋白質、
- j)減少使肌醇單磷酸酯酶活性降低之化合物之生成。

圖式

ATGACAGAAG ATAATATTGC TCCAATCACC TCCGTTAAAG TAGTTACCGA CAAGTGCACG
TACAAGGACA ACGAGCTGCT CACCAAGTAC AGCTACGAAA ATGCTGTAGT TACGAAGACA
GCTAGTGGCC GCTTCGATGT CACGCCCACT GTTCAAGACT ACGTGTTCAA ACTTGACTTA
AAAAAGCCGG AAAAAGTAGG AATTATGCTC ATTGGGTTAG GTGGCAACAA TGGCTCCACC
TTAGTGGCCT CGGTATTGGC GAATAAGCAC AATGTGGAGT TTCAAACATA GGAAGGCGTT
AAGCAACCAA ACTACTTCGG CTCCATGACT CAATGTTCTA CCTTGAAACT GGGTGTTCAT
GCGGAGGGGA ATGACGTTTA TGCTCCTTTT AACTCTCTGT TGCCCATGGT TAGCCCAAAC
GACTTTGTCT TCTCTGGTTG GGACATCAAT AACGCAGATC TATACGAAGC TATGCAGAGA
AGTCAGGTTT TCGAATATGA TCTGCAACAA CGCTTGAAGG CGAAGATGTC CTTGGTGAAG
CCTCTTCCTT CCATTTACTA CCCTGATTTT ATTGCAGCTA ATCAAGATGA GAGAGCCAAT
AACTGCATCA ATTTGGATGA AAAAGGCAAC GTAACCACGA GGGGTAAGTG GGCCCATCTG
CAACGCATCA GACGCGATAT TCAGAATTTT AAAGAAGAAA ACGCCCTTGA TAAAGTAATC
GTTCTTTGGA CTGCAATAC TGAGAGGTCA GTAGAAGTAT CTCCTGGTGT TAATGACACC
ATGGAAGAAC TCTTGAGTC TATTAAGAAT GACCATGAAG AGATTGCTCC TTCCACGATC
TTTGACGAG CATCTATCTT GGAAGGTGTC CCCTATATTA ATGGTTCACC GCAGAATACT
TTTGTTCCCG GCTTGGTTCA GCTGGCTGAG CATGAGGGTA CATTATTGC GGGAGACGAT
CTCAAGTCGG GACAAACCAA GTTGAAGTCT GTTCTGGCCC AGTTCCTAGT GGATGCAGGT
ATTAAACCGG TCTCCATTGC ATCCTATAAC CATTTAGGCA ATAATGACGG TTATAACTTA
TCTGCTCCAA AACAATTTAG GTCTAAGGAG ATTTCCAAAA GTTCTGTCTAT AGATGACATC
ATCGCGTCTA ATGATATCTT GTACAATGAT AACTGGGTA AAAAGTTGA CCACTGCATT
GTCATTAAAT ATATGAAGCC CGTCGGGGAC TCAAAAGTGG CAATGGACGA GTATTACAGT
GAGTTGATGT TAGGTGGCCA TAACCGGATT TCCATTACA ATGTTTGCGA AGATTCTTTA
CTGGCTACGC CCTTGATCAT CGATCTTTTA GTCATGACTG AGTTTTGTAC AAGAGTGTCC
TATAAGAAGG TGGACCCAGT TAAAGAAGAT GCTGGCAAAT TTGAGAACTT TTATCCAGTT
TTAACCTTCT TGAGTTACTG GTTAAAAGCT CCATTAACAA GACCAGGATT TCACCCGGTG
AATGGCTTAA ACAAGCAAAG AACCGCCTTA GAAAATTTTT TAAGATTGTT GATTGGATTG
CCTTCTCAAA ACGAACTAAG ATTCGAAGAG AGATTGTTGT AA (SEQ ID NO 1)

第1圖

atgcatccgatgctgaacatcgccgtgcgcgcagcgcgcaaggcgggtaatttaattgcc
aaaaactatgaaaccccgacgctgtagaagcgagccagaaaggcagtaacgatttcgtg
accaacgtagataaagctgccgaagcgggtgattatcgacacgattcgtaaattcttaccca
cagcacaccatcatcaccgaagaaagcgggtgaacttgaagggtactgatcaggatgttcaa
tgggttatcgatccactggatggcactaccaactttatcaaactctgcgcacttcgcg
gtatctatcgctgttcgtatcaaaggccgcaccgaagtgtgtgtgtatatacgatcctatg
cgtaacgaactgttcaccgccactcgcggtcagggcgcacagctgaacggctaccgactg
cgcggcagcaccgctcgcgatctcgacgggtactattctggcgaccgggttcccggtcaaa
gcaaaacagtacgccactacctacatcaacatcgctcggcaaactgttcaacgaatgtgca
gacttccgtcgtaccggttctgcggcgctggatctggcttacgtcgctgcgggtcgtgtt
gacgggtttctttgaaatcgggtctgcgcccgtgggaacttcgcgcgaggcgagctgctggt
cgtgaagcgggcggcatcgtcagcgacttcaccgggtggtcataactacatgctgaccggt
aacatcgttgctggtaaccgcgcggttggttaaagccatgctggcgaacatgcgtgacgag
ttaagcgacgctctgaagcggttaa (SEQ ID NO 3)

第2圖

10	20	30	40	50	60
ATGAAAGTTG	ATGTTGGTCC	TGATCCGTCT	CTGGTTTATC	GTCCAGACGT	GGATCCGGAG
70	80	90	100	110	120
ATGGCAAAGA	GCAAAGACTC	TTTCCGTAAC	TACACTTCTG	GTCCGCTGCT	GGATCGCGTT
130	140	150	160	170	180
TTCACGACCT	ACAACTGAT	GCACACCCAT	CAGACCGTTG	ATTTCGTGAG	CCGCAAGCGC
190	200	210	220	230	240
ATCCAGTATG	GTTCTTTCTC	TTACAAAAG	ATGACCATTA	TGGAGGCTGT	TGGTATGCTG
250	260	270	280	290	300
GATGACCTGG	TTGACGAAAG	CGACCCTGAC	GTTGACTTCC	CTAACTCTTT	CCATGCATTT
310	320	330	340	350	360
CAGACCGCCG	AAGGTATTCTG	TAAAGCTCAT	CCTGATAAAG	ATTGGTTCCA	CCTGGTCGGT
370	380	390	400	410	420
CTGCTGCACG	ACCTGGGTAA	GATCATGGCG	CTGTGGGGCG	AACCACAATG	GGCGGTAGTG
430	440	450	460	470	480
GGCGATACTT	TCCCGGTGGG	CTGCCGCCCA	CAGGCATCCG	TGGTCTTCTG	CGACTCTACC
490	500	510	520	530	540
TTCCAGGATA	ACCCGATCT	GCAGGATCCG	CGCTATTCCA	CCGAACTGGG	CATGTACCAG
550	560	570	580	590	600
CCGCATTGCG	GCCTGGAGAA	CGTTCTGATG	TCTTGGGGTC	ACGACGAGTA	CCTGTATCAG
610	620	630	640	650	660
ATGATGAAAT	TCAACAAATT	CTCCCTGCCG	TCCGAGGCAT	TTACATGAT	CCGTTTTCAC
670	680	690	700	710	720
TCCTTCTACC	CGTGGCATAC	CGGTGGCGAT	TATCGTCAGC	TGTGCTCTCA	GCAGGATCTG
730	740	750	760	770	780
GATATGCTGC	CGTGGGTCA	GGAGTTCAAT	AAATTCGACC	TGTATACCAA	ATGCCCTGAC
790	800	810	820	830	840
CTGCCAGATG	TTGAATCCCT	GCCCCATAC	TACCAAGGCC	TGATTGACAA	ATACTGCCCG
850	860				
GGCACCCCTGT	CCTGGTAA	(SEQ ID NO 5)			

第3圖

10	20	30	40	50	60
atgaccacta ccccttcaa tcgctgctg ctcaccggag ccgcaggcgg cctgggcaag					
70	80	90	100	110	120
gtccttcgcg aacgcctgaa aggctacgcc gaggtcctgc gcctgtctga catcagcccc					
130	140	150	160	170	180
atggccccgg ccgcggggccc gcatgaagaa gtcattacct gtgacctggc cgacaaggct					
190	200	210	220	230	240
gcggtgcata ccttggtcga gggcgtagac gccatcatcc actttggcgg ggtttctacc					
250	260	270	280	290	300
gaacacgcct tcgaagagat tctcgccccc aatatctgcg gcgtgttcca cgtgtacgag					
310	320	330	340	350	360
gcggcgcgca agcacgggggt caagcgcatc atcttcgcca gctccaacca caccatcggt					
370	380	390	400	410	420
ttctatcgcc aggatgagcg catcgacgct caccgcccgc gccggcccca cagctattac					
430	440	450	460	470	480
gggctgtcca agtgctacgg cgaagatgtg gccagcttct actttgaccg ctacggcatc					
490	500	510	520	530	540
gagaccgtca gcattcgcat cggtcgtcg ttcccgcagc cacagaacct gcgcatgctc					
550	560	570	580	590	600
tgcacctggc tcagttacga cgacctggtg cagttgatcg aacgcgggct gttcaccccc					
610	620	630	640	650	660
ggggttggcc acaccatcgt ctacggcgcc tccgacaatc gcaccgtgtg gtgggacaac					
670	680	690	700	710	720
cgccatgccg cgcacctggg ctatgtaccc aaggacagct ccgaaacctt ccgcgcagcc					
730	740	750	760	770	780
gtggaggccc aaccggcacc cgccgccgat gaccgagca tggtctacca gggcggcgct					
790	800	810			
ttcgccgtgg ccggcccgtt caactga			(SEQ ID NO 7)		

第4圖