



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111194352 A

(43)申请公布日 2020.05.22

(21)申请号 201880065743.3

(22)申请日 2018.09.06

(30)优先权数据

62/555,431 2017.09.07 US

62/597,510 2017.12.12 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.04.09

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2018/051081 2018.09.06

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/046946 EN 2019.03.14

(71)申请人 多伦多大学管理委员会

地址 加拿大,安大略省

(72)发明人 A·V·潘伟迪 R·马哈德文

(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所

11313

代理人 郝名悦 刘文娜

(51)Int.Cl.

C12P 7/42(2006.01)

C12M 1/00(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 15/53(2006.01)

C12N 15/63(2006.01)

C12N 9/02(2006.01)

C12N 9/04(2006.01)

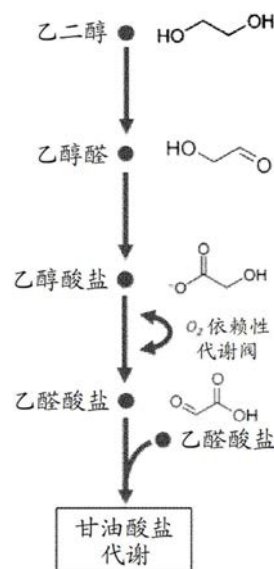
权利要求书8页 说明书28页 附图10页

(54)发明名称

从乙二醇生产乙醇酸盐以及相关微生物工程改造

(57)摘要

本文描述了用于从乙二醇生产乙醇酸盐的方法、系统和微生物。所述工艺总体上包括:将发酵肉汤供应到发酵容器中,其中所述发酵肉汤包含乙二醇和微生物,所述微生物具有用于利用乙二醇作为碳源的功能性代谢途径。在生长阶段,将含氧气气体注射到所述发酵肉汤中,以提供氧气生物利用度条件以促进所述微生物的细胞生长并且限制乙醇酸盐在所述发酵肉汤中的累积。在生产阶段,将含氧气气体注射到所述发酵肉汤中,以提供氧气生物利用度条件以促进所述微生物从乙二醇生产乙醇酸盐以及所述乙醇酸盐在所述发酵肉汤中的累积,从而产生富含乙醇酸盐的肉汤。



1. 一种用于从乙二醇生产乙醇酸盐的工艺,其包括:

将发酵肉汤供应到发酵容器中,其中所述发酵肉汤包含乙二醇和微生物,所述微生物经基因工程改造以与缺乏所述基因工程改造的相应微生物相比增加在氧气的存在下乙二醇向乙醇醛的转化,所述经基因工程改造的微生物响应于的降低而从促进乙醇酸盐向乙醛酸盐转化的细胞生长促进代谢途径过渡氧气生物利用度到抑制乙醇酸盐向乙醛酸盐转化的乙醇酸盐生产代谢途径;

在生长阶段,将含氧气气体注射到所述发酵肉汤中,并且提供初始氧气生物利用度条件以利用所述细胞生长促进代谢途径来促进所述微生物的细胞生长并且限制乙醇酸盐在所述发酵肉汤中的累积;并且

在生产阶段,将含氧气气体注射到所述发酵肉汤中,并且提供降低的氧气生物利用度条件以利用所述乙醇酸盐生产代谢途径来促进所述微生物从乙二醇生产乙醇酸盐以及所述乙醇酸盐在所述发酵肉汤中的累积,从而产生富含乙醇酸盐的肉汤;以及

从所述富含乙醇酸盐的肉汤中回收所述乙醇酸盐的至少一部分。

2. 一种用于生产乙醇酸盐的工艺,其包括:

将发酵肉汤供应到发酵容器中,其中所述发酵肉汤包含乙二醇和微生物,所述微生物具有用于利用乙二醇作为碳源的功能性代谢途径;

在生长阶段,将含氧气气体注射到所述发酵肉汤中,并且提供氧气生物利用度条件以促进所述微生物的细胞生长并且限制乙醇酸盐在所述发酵肉汤中的累积;并且

在生产阶段,将含氧气气体注射到所述发酵肉汤中,并且提供氧气生物利用度条件以促进所述微生物从乙二醇生产乙醇酸盐以及所述乙醇酸盐在所述发酵肉汤中的累积,从而产生富含乙醇酸盐的肉汤。

3. 如权利要求2所述的工艺,其中所述微生物具有用于将乙二醇转化为丙酮酸盐的功能性代谢途径。

4. 如权利要求2或3所述的工艺,其中所述功能性代谢途径包括多肽,所述多肽催化反应:

- (a) 乙二醇向乙醇醛;
- (b) 乙醇醛向乙醇酸盐;和
- (c) 乙醇酸盐向乙醛酸盐。

5. 如权利要求4所述的工艺,其中所述多肽中的一种或多种由相对于所述微生物外源和/或异源的一种或多种多核苷酸编码。

6. 如权利要求5所述的工艺,其中所述多核苷酸中的一种或多种的表达在一种或多种调控元件的控制下进行。

7. 如权利要求6所述的工艺,其中所述调控元件中的一种或多种能够响应于氧气水平、pH、营养物浓度、诱导物的存在或浓度、和/或在发酵期间可控制的另一种参数来控制所述多核苷酸中的一种或多种的表达。

8. 如权利要求6或7所述的工艺,其中所述调控元件中的一种或多种包含与所述一种或多种多核苷酸可操作地连接的一个或多个启动子和/或终止子。

9. 如权利要求6至8中任一项所述的工艺,其中所述调控元件中的一种或多种是相对于所述微生物外源和/或异源的。

10. 如权利要求5或6所述的工艺,其中所述多核苷酸中的一种或多种包含在质粒中。
11. 如权利要求5至7中任一项所述的工艺,其中所述多核苷酸中的一种或多种被整合到所述微生物的基因组中。
12. 如权利要求4至11中任一项所述的工艺,其中催化反应(a)的所述多肽包括E.C.1.1.1、E.C.1.1.3或E.C.1.1.5类的酶或其功能性变体或片段。
13. 如权利要求12所述的工艺,其中所述功能性变体是具有降低的氧敏感性的变体。
14. 如权利要求13所述的工艺,其中所述降低的氧敏感性包括降低的金属催化氧化敏感性。
15. 如权利要求5至14中任一项所述的工艺,其中催化反应(a)的所述多肽包括乳醛还原酶。
16. 如权利要求15所述的工艺,其中所述乳醛还原酶由基因fuc0编码。
17. 如权利要求15或16所述的工艺,其中基于由来自大肠杆菌(*E. coli*) MG1655的fuc0编码的天然乳醛还原酶的氨基酸编号,所述乳醛还原酶包含氨基酸取代I7L和/或L8V或L8M。
18. 如权利要求5至14中任一项所述的工艺,其中催化反应(a)的所述多肽包括使用非氧敏感性辅因子的酶。
19. 如权利要求18所述的工艺,其中所述酶使用除铁以外的辅因子。
20. 如权利要求18所述的工艺,其中所述酶使用锌作为辅因子,和/或所述酶是或包含锌依赖性醇脱氢酶或肉桂醇脱氢酶。
21. 如权利要求4至20中任一项所述的工艺,其中催化反应(b)的所述多肽包括E.C.1.2.1、E.C.1.2.3或E.C.1.2.5类的酶或其功能性变体或片段。
22. 如权利要求21所述的工艺,其中催化反应(b)的所述多肽包括乳醛脱氢酶。
23. 如权利要求22所述的工艺,其中所述乳醛脱氢酶由基因aldA编码。
24. 如权利要求4至23中任一项所述的工艺,其中催化反应(c)的所述多肽包括E.C.1.1.3.15类的酶或其功能性变体或片段。
25. 如权利要求24所述的工艺,其中催化反应(c)的所述多肽包括乙醇酸盐氧化酶。
26. 如权利要求4至25中任一项所述的工艺,其中所述微生物进一步包含编码催化反应(d)的多肽的多核苷酸,所述反应(d)将细胞内乙醇酸盐输出到细胞外环境。
27. 如权利要求26所述的工艺,其中催化反应(d)的所述多肽是相对于所述微生物外源和/或异源的。
28. 如权利要求4至27中任一项所述的工艺,其中所述微生物包含编码催化反应(a)和(b)两者的多肽的多核苷酸。
29. 如权利要求2至28中任一项所述的工艺,其中所述微生物进一步包含编码用于将乙醇酸盐转化为聚乙醇酸、乙醇胺或甘氨酸的一种或多种酶的一种或多核苷酸。
30. 如权利要求29所述的工艺,其中所述微生物进一步包含聚乙醇酸、乙醇胺或甘氨酸的输出蛋白,所述输出蛋白将细胞内聚乙醇酸、乙醇胺或甘氨酸输出到细胞外环境。
31. 如权利要求2至30中任一项所述的工艺,其中所述微生物是细菌。
32. 如权利要求31所述的工艺,其中所述细菌是大肠杆菌(*Escherichia coli*)。
33. 如权利要求31或32所述的工艺,其中所述细菌经基因修饰以与相应的野生型细菌

相比改进酸性pH耐受性。

34. 如权利要求2至30中任一项所述的工艺,其中所述微生物是酵母或真菌;或者经基因修饰以与相应的野生型酵母或真菌相比改进酸性pH耐受性的酵母或真菌。

35. 如权利要求34所述的工艺,其中所述酵母或真菌来自以下物种:博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)、蚀刻假丝酵母(*Candida etchellsii*)、*Candida geochares*、郎比可假丝酵母(*Candida lambica*)、山梨假丝酵母(*Candida sorbophila*)、*Candida sorbosivorans*、山梨木糖假丝酵母(*Candida sorboxylosa*)、*Candida vanderwaltii*、*Candida zemplinina*、汉氏德巴利氏酵母(*Debaryomyces castellii*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)、杰丁毕赤酵母(*Pichia jadinii*)、杰丁毕赤酵母、膜璞毕赤酵母(*Pichia membranifaciens*)、贝酵母(*Saccharomyces bayanus*)、博伊丁酵母(*Saccharomyces bulderi*)、*Saccharomycopsis crataegensis*、二孢接合酵母(*Zygosaccharomyces bisporus*)、*Zygosaccharomyces kombuchaensis*、或鲁氏接合酵母(*Zygosaccharomyces lentus*)。

36. 如权利要求2至30中任一项所述的工艺,其中所述微生物来自假单胞菌属物种(*Pseudomonas species*)、梭菌属物种(*Clostridium species*)、小球藻属物种(*Chlorella species*)或其他藻类、氧化葡萄糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*)、纳加毕赤酵母(*Pichia naganishii*)、棒状杆菌属物种(*Corynebacterium species*)或谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*);或者来自经基因修饰以与相应的野生型微生物相比改进酸性pH耐受性的其微生物。

37. 如权利要求2至30中任一项所述的工艺,其中所述微生物来自地中海富盐菌(*Haloferax mediterranei*)、*Halobacterium salinarum*、烟草(*Nicotiana tabacum*)或嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*);或者来自经基因修饰以与相应的野生型微生物相比改进酸性pH耐受性的其微生物。

38. 一种微生物,其是如权利要求2至37中任一项所定义的。

39. 如权利要求38所述的微生物,其用于发酵生产乙醇酸盐、聚乙醇酸、乙醇胺、和/或甘氨酸。

40. 如权利要求38所述的微生物用于发酵生产乙醇酸盐、聚乙醇酸、乙醇胺、和/或甘氨酸的用途。

41. 如权利要求2至37中任一项所述的工艺,其中用于所述微生物的主要碳源是所述乙二醇。

42. 如权利要求2至37中任一项所述的工艺,其中用于所述微生物的唯一碳源是所述乙二醇。

43. 如权利要求2所述的工艺,其中所述微生物经基因工程改造以与缺乏所述基因工程改造的相应微生物相比增加在氧气的存在下乙二醇向乙醇醛的转化,并且响应于氧气生物利用度的降低而从促进乙醇酸盐向乙醛酸盐转化的细胞生长促进代谢途径过渡到抑制乙醇酸盐向乙醛酸盐转化的乙醇酸盐生产代谢途径。

44. 如权利要求2至37中任一项所述的工艺,其进一步包括从所述富含乙醇酸盐的肉汤中回收所述乙醇酸盐的至少一部分。

45. 如权利要求44所述的工艺,其中所述回收包括从所述发酵容器中移出所述富含乙醇酸盐的肉汤,从所述富含乙醇酸盐的肉汤中分离出细胞以产生生物质耗尽的肉汤,以及从所述生物质耗尽的肉汤生产富含乙醇酸盐的流。

46. 如权利要求45所述的工艺,其进一步包括将从所述富含乙醇酸盐的肉汤中分离出的细胞的至少一部分再循环或再利用回到所述发酵容器中。

47. 如权利要求44所述的工艺,其进一步包括从所述发酵容器中释放出所述富含乙醇酸盐的肉汤的液体部分,并且从所述液体部分生产富含乙醇酸盐的流。

48. 如权利要求47所述的工艺,其进一步包括将细胞保留在所述发酵容器内,向所述发酵容器补充另外的肉汤和乙二醇,并且再利用所述保留的细胞以进行另外的乙醇酸盐生产。

49. 如权利要求2至37或41至48中任一项所述的工艺,其中所述乙醇酸盐生产以分批或补料分批过程的形式进行。

50. 如权利要求2至37或41至49中任一项所述的工艺,其中所述发酵罐容器具有腔室,所述发酵肉汤位于在所述腔室中,并且所述微生物细胞生长和乙醇酸盐生产两者均在所述腔室中发生。

51. 如权利要求2至37或41至50中任一项所述的工艺,其中在发酵后不存在用于进行生物转化的另外步骤。

52. 如权利要求2至37或41至51中任一项所述的工艺,其中所述含氧气气体包含或是空气。

53. 如权利要求2至37或41至52中任一项所述的工艺,其中在所述生长阶段期间以足够升高的浓度引入所述含氧气气体,以抑制乙醇酸盐在所述发酵肉汤中的细胞外累积。

54. 如权利要求2至37或41至53中任一项所述的工艺,其中在所述生产阶段期间以足够低的浓度引入所述含氧气气体,以抑制乙醇酸盐代谢转化为相应的代谢物。

55. 如权利要求2至37或41至54中任一项所述的工艺,其中在所述生长阶段期间以高于氧气生物利用度最小阈值来引入所述含氧气气体,并且在所述生产阶段期间以低于氧气生物利用度最大阈值来引入所述含氧气气体。

56. 如权利要求55所述的工艺,其中所述氧气生物利用度最小阈值和所述氧气生物利用度最大阈值是预定的。

57. 如权利要求55或56所述的工艺,其中所述氧气生物利用度最小阈值和所述氧气生物利用度最大阈值是相同的值。

58. 如权利要求55至57中任一项所述的工艺,其中所述氧气生物利用度最小阈值在4mmol/gDW/h与8mmol/gDW/h之间。

59. 如权利要求55至58中任一项所述的工艺,其中所述氧气生物利用度最大阈值在4mmol/gDW/h与8mmol/gDW/h之间并且低于所述氧气生物利用度最小阈值。

60. 如权利要求55至57中任一项所述的工艺,其中所述氧气生物利用度最大阈值大于约6mmol/gDW/h,并且所述氧气生物利用度最小阈值小于约6mmol/gDW/h;和/或其中所述氧气生物利用度最大阈值和最小阈值彼此相差至少0.5mmol/gDW/h、至少1mmol/gDW/h、至少2mmol/gDW/h、至少3mmol/gDW/h、至少4mmol/gDW/h、和/或至多4mmol/gDW/h。

61. 如权利要求2至37或41至60中任一项所述的工艺,其中操作并且控制所述生产阶段,使得在从所述发酵肉汤中移出所述乙醇酸盐之前在所述发酵肉汤中细胞外乙醇酸盐的

浓度大于约1g/L,任选地大于2g/L、5g/L、7g/L、10g/L或15g/L。

62.如权利要求2至37或41至61中任一项所述的工艺,其中所述生长阶段在约7的pH下、任选地在约6.5至约7.2的pH下、仍进一步任选地在小于7.2的pH下进行。

63.如权利要求2至37或41至62中任一项所述的工艺,其中所述生产阶段在小于7的pH下、任选地在小于6.5的pH下、并且仍进一步任选地在约6至约6.9的pH下进行。

64.如权利要求2至37或41至63中任一项所述的工艺,其中所述生长阶段在大于30℃、任选地在30℃与42℃之间、在33℃与40℃之间、在36℃与38℃之间、或在约37℃的温度下进行。

65.如权利要求2至37或41至64中任一项所述的工艺,其中所述生产阶段在大于30℃、任选地在30℃与42℃之间、在33℃与40℃之间、在36℃与38℃之间、或在约37℃的温度下;或者仍进一步任选地在总体上与所述生长阶段的温度相同的温度下进行。

66.如权利要求2至37或41至65中任一项所述的工艺,其中所述生长阶段以基于所述发酵容器的设计和所希望的氧气生物利用度最小阈值而确定的空气注射速率进行。

67.如权利要求2至37或41至66中任一项所述的工艺,其中所述生产阶段以基于所述发酵容器的设计和所希望的氧气生物利用度最大阈值而确定的空气注射速率进行。

68.如权利要求2至37或41至67中任一项所述的工艺,其中所述生长阶段在约7的pH和/或约37℃的温度下进行。

69.如权利要求2至37或41至68中任一项所述的工艺,其中所述生产阶段在约6.5的pH和/或比所述生长阶段的pH低约0.5的pH下,和/或在约37℃的温度和/或总体上与所述生长阶段的温度相同的温度下进行。

70.一种用于生产乙醇酸盐的工艺,其包括:

提供包含碳源和微生物的发酵肉汤,其中所述乙二醇是所述碳源的主要组分;以及

提供发酵条件以诱导所述微生物将所述乙二醇转化为乙醇酸盐并且在所述发酵肉汤中累积所述乙醇酸盐。

71.如权利要求70所述的工艺,其进一步包括如权利要求1至69中任一项所述的一个或多个特征。

72.一种用于通过以下方式生产乙醇酸盐的工艺:使用微生物将乙二醇微生物地转化为乙醇酸盐,所述微生物经基因工程改造以消耗乙二醇并且包含编码乳醛还原酶的多核苷酸和/或编码乳醛脱氢酶的多核苷酸。

73.一种用于通过以下方式生产乙醇酸盐的工艺:使用微生物将乙二醇微生物地转化为乙醇酸盐,所述微生物经基因工程改造以与缺乏所述基因工程改造的相应微生物相比增加在氧气的存在下乙二醇向第一相应代谢物的转化并且以氧依赖性地将乙醇酸盐转化为第二相应代谢物。

74.如权利要求72或73所述的工艺,其进一步包括如权利要求1至68中任一项所述的一个或多个特征。

75.一种用于通过培养微生物来在发酵肉汤中生产乙醇酸盐的方法,对于所述微生物,使用存在于所述发酵肉汤中的乙二醇作为碳源用于所述微生物生长和用于乙醇酸盐的生产。

76.如任一项前述权利要求所述的方法,其中所述微生物是经基因修饰的微生物。

77. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中所述乙醇酸盐生产以分批或补料分批过程或连续过程的形式进行。

78. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中微生物细胞生长和乙醇酸盐生产在相同发酵罐容器中进行。

79. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中所述发酵罐容器具有腔室, 所述发酵肉汤位于在所述腔室中, 并且所述微生物细胞生长和乙醇酸盐生产两者均在所述腔室中发生。

80. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中在发酵后不存在用于进行生物转化的另外步骤。

81. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中将空气引入所述发酵容器中。

82. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中引入所述空气, 使得摄氧速率大于约 6mmol/gDW/h 以在第一阶段中产生细胞生长, 并且其中所述摄氧速率降低至约低于 6mmol/gDW/h , 使得在第二阶段乙醇酸在所述发酵培养基中累积。

83. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中在从所述肉汤中分离出所述乙醇酸盐之前, 乙醇酸盐的浓度大于约 1g/L 、任选地大于 10g/L 。

84. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中所述培养基出现小于 7.2 、任选地小于约 6.5 的 pH 。

85. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中最终 pH 小于 7.2 。

86. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中所述经基因修饰的微生物是细菌。

87. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中所述微生物是大肠杆菌。

88. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中所述经基因修饰的微生物是酵母或真菌。

89. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中所述微生物包括用于将乙二醇转化为丙酮酸盐的功能性代谢途径。

90. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中所述代谢途径包括耐氧性醇脱氢酶, 所述耐氧性醇脱氢酶具有增强的将乙二醇转化为乙醇醛的活性。

91. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中所述代谢途径包括醛还原酶, 所述醛还原酶具有增强的将乙醇醛转化为乙醇酸的活性。

92. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中所述代谢途径包括活性和功能性内源性乙醇酸盐氧化酶, 所述乙醇酸盐氧化酶的活性可以通过使用影响所述基因启动子的机制、由蛋白质降解导致的基因失活和/或由变构控制导致的基因失活的组合来动态控制。

93. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中在所述发酵肉汤中所述微生物的浓度以干质量计为小于约 10g/L 。

94. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中在所述生产阶段期间获得的乙醇酸为按乙二醇的质量计大于 50% 产率、任选地大于 80% 。

95. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中将所述发酵分离为由以下主导的两个不同阶段: 其中存在很少乙醇酸产生的初级生长阶段, 和其中乙醇酸产生主导并且生物质产生很少的第二阶段。

96. 如任一项前述权利要求所述的方法, 其中所述微生物如权利要求中的一项或多项所定义。

97. 一种经基因工程改造以消耗乙二醇的微生物, 所述微生物经工程改造以包含编码

乳醛还原酶的多核苷酸和/或编码乳醛脱氢酶的多核苷酸。

98. 如任一项前述权利要求所述的微生物,所述微生物是细菌。

99. 如任一项前述权利要求所述的微生物,其中所述细菌是大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

100. 如任一项前述权利要求所述的微生物,其中所述细菌是大肠杆菌菌株MG1655。

101. 如任一项前述权利要求所述的微生物,所述微生物是酵母或真菌。

102. 如任一项前述权利要求所述的微生物,其中所述编码乳醛还原酶的多核苷酸是基因fuc0。

103. 如任一项前述权利要求所述的微生物,其中基于由来自大肠杆菌 (*E. coli*) MG1655的fuc0编码的天然乳醛还原酶的氨基酸编号,所述乳醛还原酶包含氨基酸取代I7L和/或L8V或L8M。

104. 如任一项前述权利要求所述的微生物,其中所述编码乳醛脱氢酶的多核苷酸是基因aldA。

105. 如任一项前述权利要求所述的微生物,其中所述多核苷酸与启动子和/或终止子可操作地连接。

106. 如任一项前述权利要求所述的微生物,其中所述启动子和/或终止子是相对于所述微生物异源的。

107. 如任一项前述权利要求所述的微生物,其中所述编码乳醛还原酶的多核苷酸和/或编码所述乳醛脱氢酶的多核苷酸是相对于所述微生物异源的。

108. 如任一项前述权利要求所述的微生物,其中所述乳醛还原酶和/或乳醛脱氢酶是在所述微生物中相对于所述相应的野生型微生物过表达的。

109. 如任一项前述权利要求所述的微生物,其中所述编码乳醛还原酶的多核苷酸和/或所述编码乳醛脱氢酶的多核苷酸包含在质粒中。

110. 如任一项前述权利要求所述的微生物,其中将所述编码乳醛还原酶的多核苷酸和/或所述编码乳醛脱氢酶的多核苷酸整合到所述微生物的基因组中。

111. 如任一项前述权利要求所述的微生物,所述微生物生产乙醇酸盐。

112. 如任一项前述权利要求所述的微生物,其用于发酵生产乙醇酸盐。

113. 如任一项前述权利要求所述的微生物用于发酵乙二醇以生产乙醇酸盐的用途。

114. 如前述权利要求所述的用途,其中乙二醇是所述用于细胞生长和乙醇酸盐生产的主要碳源。

115. 一种从乙二醇生产乙醇酸盐的工艺,其包括初级生长阶段,其中乙二醇的发酵主要导致微生物的细胞生长同时微量地产生乙醇酸,以及然后是生产阶段,所述生产阶段包括乙醇酸产生和微量生物物质产生。

116. 如前述权利要求所述的工艺,其中不进行从所述发酵肉汤中所述微生物的分离及其在另一种培养基中的重悬。

117. 如任一项前述权利要求所述的工艺,其中所述微生物不包括所述乙醇酸盐氧化酶 (gldE) 的失活。

118. 如任一项前述权利要求所述的工艺,其中所述发酵肉汤不耗尽或缺乏以下中的一种或多种:用于生长的碳源、用于生长的氮源、用于生长的磷酸盐源、用于生长的硫源、生长

所需的痕量金属或维生素。

119. 如任一项前述权利要求所述的工艺,其包括将所述细胞的摄氧速率控制在小于6mmol/gDW/h。

120. 如任一项前述权利要求所述的工艺,其中所述发酵培养基能够累积相对于所消耗的乙二醇按重量计至少80%的乙醇酸。

121. 如任一项前述权利要求所述的工艺,其包括如其他权利要求中任一项所述的一个或多个特征。

122. 一种系统,其包括用于接收发酵肉汤的发酵单元,所述发酵肉汤包含能够将乙二醇转化为乙醇酸盐的微生物。

123. 如前述权利要求所述的系统,其包括如权利要求1至121中任一项所述的一个或多个特征。

124. 如以上权利要求所述中任一项的方法、工艺、系统、用途或微生物,其进一步包括如本文描述或展示的一个或多个特征。

从乙二醇生产乙醇酸盐以及相关微生物工程改造

技术领域

[0001] 技术领域总体上涉及从乙二醇生产乙醇酸盐,特别地使用某些微生物以及培养条件和加工技术。

背景技术

[0002] 乙醇酸是用于制造诸如聚乙醇酸(PGA)、聚乳酸-乙醇酸(PLGA)和其他可降解聚合物的可生物降解聚合物的 α -羟基酸,并且用作在诸如溶剂、油漆和尤其化妆品的许多工业和家用产品中的成分。如今,乙醇酸的商业生产很大程度上是通过使用石油化工原料以及使用高毒性起始材料(诸如甲醛)来生产的。因此,希望从无毒的可再生源来生产这种重要的化学物。

[0003] 相比之下,可以通过电化学方式生产一些化学物。乙二醇是一种这样的化学物,其也是有前途的用于生物工艺的原料,因为它可以衍生自 CO_2 ,并且已开发出用于所述化学物的工艺(Tamura等人2015)。在这方面,其作为原料用于生物工艺的用途是重要的,因为它可以在现代生物工艺中用作葡萄糖(诸如从点源排放产生的那些)的替代物。

[0004] 还存在用于生产乙醇酸的一些其他生物工艺。相反,通过经基因修饰的微生物获得乙醇酸的这些常规方法已集中于使用糖作为用于生产的底物。已经公开了几项研究,所述研究检查了从葡萄糖和木糖进行的乙醇酸生产(Deng等人2015;Alkim等人2016;Koivistoinen等人2013;Zahoor等人2014;Cam等人2016)。这些报告中最高的实现了56.44g/L的滴度和0.52g/g的产率。然而,糖原料的使用存在局限性,诸如它不允许点源碳排放的捕获。

[0005] 因此,本文公开的实施方案的可能优点可以是提供一种用于生产乙醇酸盐的生物方法,所述方法使用可以可再生地衍生的碳原料并且不利用诸如甲醛的有毒化合物。其次,尽管文献中已描述了先前开发的用于生产乙醇酸盐的生物方法,但是使用这些方法进行的大规模乙醇酸盐生产具有某些缺陷。例如,通过生物方法从乙二醇进行的乙醇酸生产依赖于使用共底物以提供细胞生长或诱导乙二醇代谢酶的表达。与使用单一底物相比,共底物的使用可能给大规模乙醇酸盐生产带来某些挑战,诸如另外的成本。此外,已经在中性pH条件下进行了用于生产乙醇酸的其他生物方法。虽然乙醇酸的产生会降低发酵肉汤的pH,但优选的是具有小于pH 7.2的培养环境,使得可以降低乙醇酸生产的成本,因为培养基需要较少缓冲液来维持中性pH。

[0006] 例如,多位作者已经描述了乙醇酸的生物生产。然而,先前的方法具有许多缺陷。关于通过天然的或经基因修饰的微生物将乙二醇转化为乙醇酸的先前知识依赖于在磷酸盐缓冲的培养基中或在蒸馏水中乙二醇的氧化并且依赖于用于累积乙醇酸的静息细胞生物转化。这具有某些缺点,诸如需要从培养基中分离生物质,然后将所述生物质重悬于新鲜培养基中以在大得多的细胞密度下进行静息细胞转化。因此,此类工艺的缺点是需要另外的设备,如用于进行生物转化的次级容器或用于细胞分离和浓缩的另外离心机。

[0007] 此外,几个先前的方法依赖于除了用于生长的主要碳源(诸如葡萄糖、山梨糖醇或

甚至丙二醇)以外,还使用乙二醇作为次级碳源用于生物转化。对用于生长的次级碳源的依赖可能是所述工艺的另外成本。

[0008] 用于采用经基因修饰的微生物生产乙醇酸的其他先前方法的缺点是它们采用氧敏感性酶。乙醇酸的生产需要氧气作为底物。然而,在高氧气浓度或传质速率(诸如在工业生物反应器中可预期的速率)下,微生物必须通过具有功能性酶来保持活力。因此,使用氧敏感性酶生产乙醇酸可能对工艺的生产率和滴度具有不利影响。

[0009] 在几种已知的替代方法中,乙醇酸的生产在接近或高于7的pH下进行。当在发酵过程中产生有机酸时,结果是发酵肉汤的pH下降。因此,在较低pH下进行发酵操作在经济上是更可行的,因为它需要向发酵培养基中添加较少的碱或缓冲液。因此,几种替代方案的缺点是它们在接近或大于中性的pH下操作。

[0010] 因此,需要克服或缓和已知方法的至少一些缺点的技术。

发明内容

[0011] 本文描述了本发明的各个方面、实现方式、实施方案和特征。

[0012] 在一些实现方式中,本发明涉及微生物的开发以及用于使微生物靠乙二醇生长并且生产乙醇酸的培养条件。在一些实现方式中,本发明涉及使用微生物(所述微生物可能先前已被基因工程改造为具有某些特征)并且使用某些工艺操作条件从基本上包含乙二醇的底物生产乙醇酸的方法。

[0013] 本文描述了用于通过在乙二醇作为用于生长和乙醇酸盐生产的唯一碳源的情况下培养经基因修饰的微生物来生产乙醇酸的方法。在优选的实施方案中,将空气引入发酵容器中,使得摄氧速率(OUR)大于约6mmol/gDW/h以促进细胞呼吸,并且然后建立第二组培养条件,其中摄氧速率降低至低于约6mmol/gDW/h,使得乙醇酸以大于1g/L但在优选的实施方案中大于10g/L的浓度累积在发酵培养基中。

[0014] 在一些实施方案中,所述培养基出现小于7.2的pH,但在优选的实施方案中,pH小于约6.5(在生产阶段期间)。

[0015] 在一些实施方案中,经基因修饰的微生物包括用于将乙二醇转化为丙酮酸盐的功能性代谢途径,其中所述代谢途径包括具有增强的将乙二醇转化为乙醇醛的活性的耐氧性醇脱氢酶和具有增强的将乙醇醛转化为乙醇酸的活性的醛还原酶。

[0016] 在一些实施方案中,所述用于从乙二醇生产乙醇酸的方法包括活性和功能性内源性乙醇酸盐氧化酶,所述乙醇酸盐氧化酶的活性可以通过使用影响所述基因启动子的机制、由蛋白质降解导致的基因失活和/或由变构控制导致的基因失活的组合来动态控制。

[0017] 在所述用于生产乙醇酸的方法的一些方面,在发酵罐中经基因修饰的微生物的浓度以干质量计为小于约10g/L。

[0018] 在一些实施方案中,在所述生产阶段期间获得的乙醇酸为按乙二醇的质量计大于50%产率、但优选大于80%。

[0019] 在所述用于生产乙醇酸的方法的一些实施方案中,可以将所述发酵分离为由以下主导的两个不同阶段:其中存在很少乙醇酸产生的初级生长阶段,和其中乙醇酸产生主导并且存在很少生物质产生的第二阶段。

[0020] 在一些实现方式中,本发明允许在不使用诸如葡萄糖的次级碳源的情况下生产乙

醇酸,因为乙二醇既用作生长底物又作用于生产乙醇酸的前体。这具有显著的商业利益,因为它允许在单个容器中进行发酵,而无需将经基因修饰的微生物从其生长培养基中分离。这种简化允许乙醇酸的生产需要更少的发酵和生物转化容器,这将减少工艺的投资成本。

[0021] 在一些实现方式中,本发明利用耐氧形式的醇脱氢酶来催化用于将乙二醇转化为乙醇酸的代谢途径的第一步骤。

[0022] 在一些实现方式中,本发明采用两阶段发酵方法,其中在中性pH下培养经基因修饰的微生物,但是其中乙醇酸盐生产阶段在小于7、优选约6.5的pH下进行。

[0023] 在一些实现方式中,本发明包括一种用于通过在乙二醇的存在下培养经基因修饰的生物体(诸如大肠杆菌细胞)来生产乙醇酸的方法。

[0024] 在另一个实现方式中,提供了一种用于从乙二醇生产乙醇酸盐的工艺,其包括:将发酵肉汤供应到发酵容器中,其中所述发酵肉汤包含乙二醇和微生物,所述微生物经基因工程改造以与缺乏所述基因工程改造的相应微生物相比增加在氧气的存在下乙二醇向乙醇醛(并且最终是乙醇酸盐)的转化,所述经基因工程改造的微生物响应于氧气的降低而从促进乙醇酸盐向乙醛酸盐转化的细胞生长促进代谢途径过渡氧气生物利用度到抑制乙醇酸盐向乙醛酸盐转化的乙醇酸盐生产代谢途径;在生长阶段,将含氧气气体注射到所述发酵肉汤中,并且提供初始氧气生物利用度条件以利用所述细胞生长促进代谢途径来促进所述微生物的细胞生长并且限制乙醇酸盐在所述发酵肉汤中的累积;在生产阶段,将含氧气气体注射到所述发酵肉汤中,并且提供降低的氧气生物利用度条件以利用所述乙醇酸盐生产代谢途径来促进所述微生物从乙二醇生产乙醇酸盐以及所述乙醇酸盐在所述发酵肉汤中的累积,从而产生富含乙醇酸盐的肉汤;以及从所述富含乙醇酸盐的肉汤中回收所述乙醇酸盐的至少一部分。

[0025] 在一些实现方式中,提供了一种用于生产乙醇酸盐的工艺,其包括:将发酵肉汤供应到发酵容器中,其中所述发酵肉汤包含乙二醇和微生物,所述微生物具有用于利用乙二醇作为碳源的功能性代谢途径;在生长阶段,将含氧气气体注射到所述发酵肉汤中,并且提供氧气生物利用度条件以促进所述微生物的细胞生长并且限制乙醇酸盐在所述发酵肉汤中的累积;并且在生产阶段,将含氧气气体注射到所述发酵肉汤中,并且提供氧气生物利用度条件以促进所述微生物从乙二醇生产乙醇酸盐以及所述乙醇酸盐在所述发酵肉汤中的累积,从而产生富含乙醇酸盐的肉汤。

[0026] 在一些实现方式中,所述微生物具有用于将乙二醇转化为丙酮酸盐的功能性代谢途径。所述功能性代谢途径可以包括多肽,所述多肽催化反应:(a) 乙二醇向乙醇醛;(b) 乙醇醛向乙醇酸盐;(c) 乙醇酸盐向乙醛酸盐。所述多肽中的一种或多种可以由相对于所述微生物外源和/或异源的一种或多种多核苷酸编码。所述多核苷酸中的一种或多种的表达可以在一种或多种调控元件的控制下进行。所述调控元件中的一种或多种可以能够响应于氧气水平、pH、诸如磷酸盐或氮的营养物浓度、诱导物的存在或浓度、和/或在发酵期间可控制的另一种参数来控制所述多核苷酸中的一种或多种的表达。所述调控元件中的一种或多种可以包含与所述一种或多种多核苷酸可操作地连接的一个或多个启动子和/或终止子。所述调控元件中的一种或多种可以是相对于所述微生物外源和/或异源的。所述多核苷酸中的一种或多种可以包含在质粒中。所述多核苷酸中的一种或多种可以被整合到所述微生物

的基因组中。

[0027] 在一些实现方式中,催化反应(a)的多肽包括E.C.1.1.1、E.C.1.1.3或E.C.1.1.5类的酶或其功能性变体或片段,其将乙二醇转化为乙醇醛。所述功能性变体可以是具有降低的氧敏感性的变体。所述降低的氧敏感性可以包括降低的金属催化氧化敏感性。催化反应(a)的所述多肽可以包括乳醛还原酶。所述乳醛还原酶可以由基因fuc0编码。基于由来自大肠杆菌(*E. coli*) MG1655的fuc0编码的天然乳醛还原酶的氨基酸编号,所述乳醛还原酶可以包含氨基酸取代I7L和/或L8V或L8M。

[0028] 在一些实现方式中,催化反应(a)的所述多肽包括使用非氧敏感性辅因子的酶。所述酶可以使用除铁以外的辅因子,所述辅因子可以是锌(例如,锌依赖性醇脱氢酶或NAD依赖性醇脱氢酶)。

[0029] 在一些实现方式中,催化反应(b)的多肽包括E.C.1.2.1、E.C.1.2.3或E.C.1.2.5类的酶或其功能性变体或片段,其将乙醇醛转化为乙醇酸盐。催化反应(b)的多肽可以包括乳醛脱氢酶。所述乳醛脱氢酶可以由基因aldA编码。

[0030] 在一些实现方式中,催化反应(c)的多肽可以包括E.C.1.1.3.15类的酶或其功能性变体或片段,其将乙醇酸盐转化为乙醛酸盐。在一些实现方式中,催化反应(c)的所述多肽包括乙醇酸盐氧化酶。

[0031] 在一些实现方式中,所述微生物进一步包含编码催化反应(d)的多肽的多核苷酸,所述反应(d)将细胞内乙醇酸盐输出到细胞外环境。催化反应(d)的多肽可以是相对于所述微生物外源和/或异源的。

[0032] 在一些实现方式中,所述微生物包含编码催化反应(a)和(b)两者的多肽的多核苷酸。

[0033] 在一些实现方式中,所述微生物进一步包含编码用于将乙醇酸盐转化为聚乙醇酸、乙醇胺或甘氨酸的一种或多种酶的一种或多核苷酸。所述微生物进一步可以包含聚乙醇酸、乙醇胺或甘氨酸的输出蛋白,所述输出蛋白将细胞内聚乙醇酸、乙醇胺或甘氨酸输出到细胞外环境。

[0034] 在一些实现方式中,所述微生物是细菌(例如,大肠杆菌),所述细菌可以经基因修饰以与相应的野生型细菌相比改进酸性pH耐受性。

[0035] 在一些实现方式中,所述微生物是酵母或真菌;或者经基因修饰以与相应的野生型酵母或真菌相比改进酸性pH耐受性的酵母或真菌。所述酵母或真菌可以来自以下物种:博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)、蚀刻假丝酵母(*Candida etchellsii*)、*Candida geochares*、郎比可假丝酵母(*Candida lambica*)、山梨假丝酵母(*Candida sorbophila*)、*Candida sorbosivorans*、山梨木糖假丝酵母(*Candida sorboxylosa*)、*Candida vanderwaltii*、*Candida zemplinina*、汉氏德巴利氏酵母(*Debaryomyces castellii*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)、杰丁毕赤酵母(*Pichia jadinii*)、杰丁毕赤酵母、膜璞毕赤酵母(*Pichia membranifaciens*)、贝酵母(*Saccharomyces bayanus*)、博伊丁酵母(*Saccharomyces bulderi*)、*Saccharomycopsis crataegensis*、二孢接合酵母(*Zygosaccharomyces bisporus*)、*Zygosaccharomyces kombuchaensis*、或鲁氏接合酵母(*Zygosaccharomyces lentus*)。

[0036] 在一些实现方式中,所述微生物来自假单胞菌属物种(*Pseudomonas species*)、梭菌属物种(*Clostridium species*)、小球藻属物种(*Chlorella species*)或其他藻类、氧化葡萄糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*)、纳加毕赤酵母(*Pichia naganishii*)、棒状杆菌属物种(*Corynebacterium species*)或谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*);或者来自经基因修饰以与相应的野生型微生物相比改进酸性pH耐受性的其微生物。

[0037] 在一些实现方式中,所述微生物来自地中海富盐菌(*Haloferax mediterranei*)、*Halobactreium salinarum*、烟草(*Nicotiana tabacum*)或嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*);或者来自经基因修饰以与相应的野生型微生物相比改进酸性pH耐受性的其微生物。

[0038] 所述微生物可以用于发酵生产乙醇酸盐、聚乙醇酸、乙醇胺、和/或甘氨酸。在一些实现方式中,提供了如上或本文所定义的微生物用于发酵生产乙醇酸盐、聚乙醇酸、乙醇胺、和/或甘氨酸的用途。

[0039] 在本文描述的工艺的一些实现方式中,用于所述微生物的主要碳源是所述乙二醇。另外,用于所述微生物的唯一碳源可以是所述乙二醇。

[0040] 在本文描述的工艺的一些实现方式中,所述微生物经基因工程改造以与缺乏所述基因工程改造的相应微生物相比增加在氧气的存在下乙二醇向乙醇醛(并且最终为乙醇酸盐)的转化,并且响应于氧气生物利用度的降低而从促进乙醇酸盐向乙醛酸盐转化的细胞生长促进代谢途径过渡到抑制乙醇酸盐向乙醛酸盐转化的乙醇酸盐生产代谢途径。

[0041] 在一些实现方式中,所述工艺包括从所述富含乙醇酸盐的肉汤中回收所述乙醇酸盐的至少一部分。所述回收可以包括从所述发酵容器中移出所述富含乙醇酸盐的肉汤,从所述富含乙醇酸盐的肉汤中分离出细胞以产生生物质耗尽的肉汤,以及从所述生物质耗尽的肉汤生产富含乙醇酸盐的流。

[0042] 在一些实现方式中,所述工艺包括将从所述富含乙醇酸盐的肉汤中分离出的细胞的至少一部分再循环或再利用回到所述发酵容器中。在一些实现方式中,所述工艺包括从所述发酵容器中释放出所述富含乙醇酸盐的肉汤的液体部分,并且从所述液体部分生产富含乙醇酸盐的流。在一些实现方式中,所述工艺包括将细胞保留在所述发酵容器内,向所述发酵容器补充另外的肉汤和乙二醇,并且再利用所述保留的细胞以进行另外的乙醇酸盐生产。

[0043] 在一些实现方式中,所述乙醇酸盐生产以分批或补料分批过程的形式进行。

[0044] 在一些实现方式中,所述发酵罐容器具有腔室,所述发酵肉汤位于在所述腔室中,并且所述微生物细胞生长和乙醇酸盐生产两者均在所述腔室中发生。在一些实现方式中,在发酵后不存在用于进行生物转化的另外步骤。所述含氧气气体可以包含或是空气。在一些实现方式中,在所述生长阶段期间以足够升高的浓度引入所述含氧气气体,以抑制乙醇酸盐在所述发酵肉汤中的细胞外累积。可以在所述生产阶段期间以足够低的浓度引入所述含氧气气体,以抑制乙醇酸盐代谢转化为相应的代谢物。可以在所述生长阶段期间以高于氧气生物利用度最小阈值来引入所述含氧气气体,并且在所述生产阶段期间以低于氧气生物利用度最大阈值来引入所述含氧气气体。

[0045] 在一些实现方式中,所述氧气生物利用度最小阈值和所述氧气生物利用度最大阈值是预定的。所述氧气生物利用度最小阈值和所述氧气生物利用度最大阈值可以是相同的

值。所述氧气生物利用度最小阈值可以在4mmol/gDW/h与8mmol/gDW/h之间。所述氧气生物利用度最大阈值可以在4mmol/gDW/h与8mmol/gDW/h之间并且可以低于所述氧气生物利用度最小阈值。所述氧气生物利用度最大阈值可以大于约6mmol/gDW/h,并且所述氧气生物利用度最小阈值可以低于约6mmol/gDW/h;和/或所述氧气生物利用度最大阈值和最小阈值可以彼此相差至少0.5mmol/gDW/h、至少1mmol/gDW/h、至少2mmol/gDW/h、至少3mmol/gDW/h、至少4mmol/gDW/h、和/或至多4mmol/gDW/h。

[0046] 在一些实现方式中,操作并且控制所述生产阶段,使得在从所述发酵肉汤中移出所述乙醇酸盐之前在所述发酵肉汤中细胞外乙醇酸盐的浓度大于约1g/L,任选地大于2g/L、5g/L、7g/L、10g/L或15g/L。在一些实现方式中,所述生长阶段在约7的pH下、任选地在约6.5至约7.2的pH下、仍进一步任选地在小于7.2的pH下进行。

[0047] 在一些实现方式中,所述生产阶段在小于7的pH下、任选地在小于6.5的pH下、并且仍进一步任选地在约6至约6.9的pH下进行。在一些实现方式中,所述生长阶段在大于30℃、任选地在30℃与42℃之间、在33℃与40℃之间、在36℃与38℃之间、或在约37℃的温度下进行。

[0048] 在一些实现方式中,所述生产阶段在大于30℃、任选地在30℃与42℃之间、在33℃与40℃之间、在36℃与38℃之间、或在约37℃的温度下;或者仍进一步任选地在总体上与所述生长阶段的温度相同的温度下进行。在一些实现方式中,所述生长阶段以基于所述发酵容器的设计和所希望的氧气生物利用度最小阈值而确定的空气注射速率进行。

[0049] 在一些实现方式中,所述生产阶段以基于所述发酵容器的设计和所希望的氧气生物利用度最大阈值而确定的空气注射速率进行。

[0050] 在一些实现方式中,所述生长阶段在约7的pH和/或约37℃的温度下进行。所述生产阶段可以在约6.5的pH和/或比所述生长阶段的pH低约0.5的pH下,和/或在约37℃的温度和/或总体上与所述生长阶段的温度相同的温度下进行。

[0051] 在另一个实现方式中,提供了一种用于生产乙醇酸盐的工艺,其包括:提供包含碳源和微生物的发酵肉汤,其中所述乙二醇是所述碳源的主要组分;以及提供发酵条件以诱导所述微生物将所述乙二醇转化为乙醇酸盐并且在所述发酵肉汤中累积所述乙醇酸盐。在此类实现方式中,所述工艺可以包括来自本文描述的任何先前段落或项目的一个或多个特征。

[0052] 在另一个实现方式中,提供了一种用于通过以下方式生产乙醇酸盐的工艺:使用微生物将乙二醇微生物地转化为乙醇酸盐,所述微生物经基因工程改造以消耗乙二醇并且包含编码乳醛还原酶的多核苷酸和/或编码乳醛脱氢酶的多核苷酸。

[0053] 在另一个实现方式中,提供了一种用于通过以下方式生产乙醇酸盐的工艺:使用微生物将乙二醇微生物地转化为乙醇酸盐,所述微生物经基因工程改造以与缺乏所述基因工程改造的相应微生物相比增加在氧气的存在下乙二醇向第一相应代谢物的转化并且以氧依赖性地将乙醇酸盐转化为第二相应代谢物。

[0054] 在此类工艺实现方式中,所述工艺可以包括来自本文描述的任何先前段落或项目的一个或多个特征。

[0055] 下面描述关于与本发明有关的任选实施方案、方面、实验和实施例的进一步的背景和细节。

附图说明

[0056] 图1A、图1B和图1C是示出了乙二醇(图1A)、木糖(图1B)和葡萄糖(图1C)的代谢转化途径的图。

[0057] 图2是细胞生长和底物消耗随时间变化、特别是MEG浓度和OD₆₀₀与发酵时间的关系的曲线图。

[0058] 图3A和图3B是一对曲线图,其示出了通气对乙醇酸盐生产的影响,特别是代谢物和cDW浓度以及MEG与时间的关系。

[0059] 图4是曲线图,所述曲线图示出了乙醇酸盐生产的代谢建模,特别是乙醇酸盐产率(乙醇酸盐,固体)、呼吸商(RQ,点划线)和底物比生产率(SSP,虚线)与摄氧速率的关系,是使用通量平衡分析(FBA)建模的。

[0060] 图5A和图5B是一对曲线图,其涉及补料分批策略的发酵特征曲线,特别地示出了乙醇酸盐、生物质和乙二醇浓度与时间的关系。

[0061] 图6A和图6B是示出了在有氧(图6A)和限氧(图6B)条件下的途径中代谢和酶的通量分布的图。

[0062] 图7是从乙二醇生产乙醇酸盐的流程框图。

[0063] 图8是示意图,所述示意图包括流程框图、两阶段过程控制的说明性曲线图、和用于将乙二醇转化为乙醇酸盐的代谢途径的图解。

[0064] 图9是当在补充有20g/L乙二醇和0.1%酵母提取物的M9最小培养基中培养时细胞生长随时间变化的曲线图,将野生型大肠杆菌(*Escherichia coli*) MG1655菌株与表达使用锌而不是铁作为辅因子的乙二醇氧化Gox0313酶以及乙醇醛氧化酶(albA)的相应菌株进行对比。

具体实施方式

[0065] 乙二醇可以用作用于微生物转化为乙醇酸盐的底物,其中生产过程可以利用微生物的某些特征和工艺操作条件来增强性能。

[0066] 例如,可以控制所述过程,使得微生物的氧气利用度和摄取随时间变化,以促进两阶段过程,第一阶段是促进细胞生长并且限制乙醇酸盐累积的生长阶段,并且第二阶段是促进乙醇酸盐在发酵肉汤中累积的乙醇酸盐生产阶段。可以通过以下方式促进这种两阶段过程:控制在发酵肉汤中的摄氧条件,例如通过改变空气注射速率,使得生长阶段具有高的摄氧速率并且生产阶段具有较低的摄氧速率。

[0067] 另外,在所述过程中部署的微生物可以是经基因工程改造的微生物,其具有能够改进从乙二醇生产乙醇酸盐的性能的特征。例如,可以将微生物工程改造为包括用于将乙二醇转化为丙酮酸盐的功能性代谢途径,其中所述代谢途径包括将乙二醇转化为乙醇醛并且将乙醇醛转化为乙醇酸盐。可以根据本文描述的方法来工程改造各种微生物(诸如细菌或酵母)以提供用于生产乙醇酸盐的有利微生物。

[0068] 此外,所述过程可以包括乙二醇作为用于微生物生长和乙醇酸盐生产的基本上唯一碳底物。在此类情况下,可能存在痕量其他碳源,但乙二醇是不含显著量共底物(诸如葡萄糖和/或木糖)的主导碳源。例如,例如在生长阶段和生产阶段用于细胞生长和/或用于乙醇酸盐生产的碳源的至少80wt%、85wt%、90wt%、95wt%或99wt%或100wt%可以是乙二

醇。

[0069] 转到图7,示出了示例过程的总体图解。在发酵步骤中使用乙二醇和微生物,以及含氧气流体,诸如含氧气气体,如空气。发酵例如可以是分批过程。在可包括上述两阶段过程控制的发酵反应结束时,产生富含乙醇酸盐的溶液,并且可以使其经受分离以产生乙醇酸盐(例如,较高浓度或相对纯净的)以及废溶液。

[0070] 就从发酵肉汤中分离乙醇酸盐而言,可以使用各种方法。例如,可以使用基于反应性萃取、结晶、吸附-洗脱等的分离方法。在一些实现方式中,将包含生物质的发酵肉汤从发酵容器中移出,并且然后使其经受一系列分离步骤,例如,生物质去除,然后乙醇酸盐提取。可选地,可以将一部分发酵肉汤从发酵容器中移出,而将生物质保留在容器中,并且然后可以使生物质耗尽的发酵肉汤经受分离技术以除去乙醇酸盐。可以设计并且实现单元操作,取决于过程是分批、半分批或连续的。

[0071] 还应注意,所述细胞可以在连续过程或分批过程中再利用。可以将细胞例如通过离心或其他固液分离方法从富含乙醇酸盐的发酵肉汤中分离,并且然后在发酵容器中再利用。在此类情形下,可以适配使用经再循环的细胞的过程,使得可以不需要所述两阶段过程,因为所述细胞可准备再用于生产阶段。最终,可以将用过的细胞从所述过程中移出,例如在其生存期之后,之后可以在发酵容器中引入新的细胞培养物并且可以重复所述两阶段过程。因此,在一些实现方式中,可以通过多批次将细胞在生产阶段再利用,取决于生存力和稳定性因素。

[0072] 参见图8,乙醇酸盐生产系统10可以包括发酵罐12,所述发酵罐与进料线14偶联以进料乙二醇。还可以提供微生物入口16以将微生物供应至发酵罐12。所述发酵罐还具有有限定发酵腔室22的侧壁16、底部18和顶部20,在所述发酵腔室中发生发酵反应。进料材料在发酵腔室22内形成发酵肉汤。含氧气流体入口24也与发酵罐12偶联,用于将含氧气流体进料到发酵肉汤中。含氧气流体可以是例如空气或包含氧气的另一种气体。还可以提供用于各种进料材料的多个入口。含氧气流体入口24可以包括气体进料线26,所述气体进料线具有诸如阀的流量控制装置28,以使得能够控制或调节气体的流速。含氧气流体入口24还可以包括鼓泡单元,所述鼓泡单元具有分布在发酵腔室22的横截面上的多个出口孔,以将气泡注射到发酵肉汤中。

[0073] 图8还示出了系统10可以包括各种测量装置,所述测量装置与发酵罐12偶联以测量某些变量,诸如温度(T)、pH、浓度(C)等。系统10还可以包括控制器32,所述控制器可以与各种测量装置偶联以接收信息,并且还与发酵罐12的控制单元偶联以便改变一个或多个过程操作条件。例如,控制器32可以被配置用于接收关于在发酵肉汤中微生物的细胞生长进程的信息,并且一旦细胞生长进程充分,就通过关闭阀28来降低空气的注射速率,从而启动所述过程的第二阶段。控制器32还可以被配置用于通过改变提供给系统的热量来调控温度,通过添加pH调节剂来调控pH以将pH保持在希望的窗口内,和/或一旦产生所希望的乙醇酸盐浓度,就启动所述过程的不同阶段,包括生长阶段、生产阶段和回收阶段。

[0074] 可以使用各种方法和变量来监测细胞生长进程。例如,可以测量CO₂废气以确定生长进程。所述监测优选基于测量细胞数量,尽管可以测量其他变量。可以测量发酵肉汤的特征以推断细胞生长进程。另外,可以使用各种其他技术来确定细胞生长进程,或者可以基于先前的实验或操作来估计细胞生长进程,使得不进行主动确定,而是基于诸如发酵时间的

变量来估计。

[0075] 此外,就监测或确定氧气对系统的影响而言,可以使用方法来评估氧气的生物利用度,并且所述方法可以包括在发酵容器中的氧气的量以及氧气从气相到液相的传质。在一些实现方式中,可以测量另一种气体(例如,二氧化碳)作为氧气水平的代理。氧气的生物利用度可以通过以下方式来控制:调节进入容器的气体进料速率、在容器中混合的速率、在容器中的温度或影响溶解度和溶解氧的其他参数、和/或在进料到容器中的气体中的氧气含量(例如,通过将纯氧气和/或纯氮气经由相同的入口或单独的入口与空气共进料,以增加或降低在进料气体中的氧气含量)等。可以在每个过程阶段以及还有为了从一个阶段过渡到另一个阶段而估计和控制氧气生物利用度。

[0076] 在所述过程中还可以监测和操纵其他操作参数。例如,当从生长阶段过渡到生产阶段时,可以改变pH另外,在此过渡过程中,可以改变搅拌以及温度。可以改变此类参数,以便影响氧气的生物利用度和/或对感兴趣的过程阶段具有其他有益的影响。

[0077] 图8展示了发生的一些化学反应的特写视图,所述化学反应值得注意的是经由醇脱氢酶将乙二醇代谢转化为乙醇醛,然后经由醛还原酶将乙醇醛代谢转化为乙醇酸盐。下面进一步描述了更多关于可用于所述过程的微生物的某些方面和特征。

[0078] 仍参见图8,一旦发酵完成,就可以将富含乙醇酸盐的溶液经由出口线34从发酵罐12中排空并且供应至分离器36或其他下游加工单元以产生乙二醇流38和废溶液40。可以使用各种下游分离单元来分离乙醇酸盐,例如,过滤或离心以除去生物质/细胞,并且然后进行反应性萃取、结晶、色谱法等以除去乙醇酸盐。

[0079] 微生物

[0080] 通过使用具有某些特征的经基因工程改造的微生物,可以促进从乙二醇生产乙醇酸盐。例如,可以将微生物工程改造为包括用于将乙二醇转化为丙酮酸盐的功能性代谢途径,其中所述代谢途径包括多肽,所述多肽催化(a)将乙二醇转化为乙醇醛,(b)将乙醇醛转化为乙醇酸盐,和(c)将乙醇酸盐转化为乙醛酸盐。所述代谢途径可以进一步包括能够将乙醛酸盐转化为丙酮酸盐的天然酶和/或外源酶。

[0081] 在一些实现方式中,所述微生物具有利用乙二醇作为唯一或主导碳源的能力。主导碳源意指相对于诸如葡萄糖和/或木糖的其他碳源,微生物主要利用乙二醇来支持生长和/或化学生产(例如,乙醇酸盐或下游乙醇酸盐代谢产物)。如本文所用,表述“微生物具有利用乙二醇作为唯一碳源的能力”、“微生物可以利用乙二醇作为唯一碳源”和“微生物使用乙二醇作为唯一碳源”可互换使用,是指所述微生物本身的特性或特征,而不一定是指所述微生物所采用的发酵肉汤的内容物。

[0082] 在一些实现方式中,本文描述的微生物经基因工程改造以展现出在作为唯一或主要碳源的乙二醇上的持续生长。在一些实现方式中,经基因工程改造的微生物可以展现出相对于相应的野生型(或未经基因工程改造的)微生物至少2倍、3倍、4倍、5倍、6倍或更多的生长,例如,如在接种后24小时通过在600nm处的光密度(O.D.)测量的,和/或在本文描述的工艺的生长阶段中测量的。在一些实现方式中,当在本文描述的工艺的生长阶段培养时,当在作为唯一或主要碳源的乙二醇的存在下进行培养时,诸如在起始培养基/接种培养基中最初的非乙二醇碳源被耗尽之后,与相应的野生型(或未经基因工程改造的)微生物相比,经基因工程改造的微生物具有将其细胞密度(细胞数/单位体积)增加到2、3、4、5或6倍的能

力。

[0083] 在一些实现方式中,所述微生物可以是细菌(例如,大肠杆菌),所述细菌可以进一步经基因修饰以与相应的野生型细菌相比改进酸性pH耐受性。

[0084] 在一些实现方式中,所述微生物可以是酵母或真菌,诸如来自以下物种:博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)、蚀刻假丝酵母(*Candida etchellsii*)、*Candida geochares*、郎比可假丝酵母(*Candida lambica*)、山梨假丝酵母(*Candida sorbophila*)、*Candida sorbosivorans*、山梨木糖假丝酵母(*Candida sorboxylosa*)、*Candida vanderwaltii*、*Candida zemplinina*、汉氏德巴利氏酵母(*Debaryomyces castellii*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、异常毕赤酵母(*Pichia anomala*)、杰丁毕赤酵母(*Pichia jadinii*)、杰丁毕赤酵母、膜璞毕赤酵母(*Pichia membranifaciens*)、贝酵母(*Saccharomyces bayanus*)、博伊丁酵母(*Saccharomyces bulderi*)、*Saccharomycopsis crataegensis*、二孢接合酵母(*Zygosaccharomyces bisporus*)、*Zygosaccharomyces kombuchaensis*、或鲁氏接合酵母(*Zygosaccharomyces lentus*)。已经显示此类物种展现出改进的低pH环境耐受性。在一些实现方式中,与相应的野生型细菌相比,可以将所述酵母或真菌进一步经基因修饰以改进酸性pH耐受性。

[0085] 在一些实现方式中,所述微生物可以来自天然消耗乙二醇的物种。此类物种包括例如假单胞菌属物种(*Pseudomonas species*) (例如,恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*); Muckchel等人,2012)、梭菌属物种(*Clostridium species*) (Gaston和Stadtman, 1963)、小球藻属物种(*Chlorella species*)或其他藻类(Kishi等人,2015)、氧化葡萄糖杆菌(*Gluconobacter oxydans*, Zhang等人,2016)、或纳加毕赤酵母(*Pichia naganishii*, Kataoka等人,2001)。在一些实现方式中,来自此类物种的微生物可以进一步经基因修饰以与相应的野生型细菌相比改进酸性pH耐受性。

[0086] 在一些实现方式中,例如其中微生物来自天然消耗乙二醇的物种,所述微生物可以经基因修饰以破坏用于摄取和/或利用乙二醇的内源性代谢途径。可选地,可以将所述微生物的用于摄取和/或利用乙二醇的天然代谢途径转向生产乙醇酸盐。天然消耗乙二醇的微生物可以利用两种类型的代谢途径中的一种。

[0087] 摄取/降解乙二醇的第一途径利用二醇脱水酶,导致乙二醇脱水成乙醛。然后通过乙醛脱氢酶将乙醛活化为乙酰辅酶A,这为细胞提供了关键的前体代谢物以经由TCA循环和糖异生途径支持生长。从一摩尔乙二醇生产一摩尔乙酰辅酶A会伴随地产生一个NADH。由于二醇脱水酶^{25,27}的氧敏感性,这种途径最常见于某些梭菌属物种和几种其他厌氧生物体中。因此,在一些实现方式中,所述微生物可以包含一种或多种(外源)多核苷酸,其编码将乙二醇转化为乙醛的酶(例如,二醇脱水酶)。所述微生物可以包含一种或多种(外源)多核苷酸,其编码将乙醛转化为乙酰辅酶A的酶(例如,乙醛脱氢酶)。

[0088] 摄取/降解乙二醇的第二途径利用这样的途径,其中使用烟酰胺辅因子和氧气将乙二醇连续氧化以产生乙醛酸盐。然后,可以将作为糖异生碳底物的乙醛酸盐用作生长代谢物,因为它在2-磷酸甘油酸盐节点处进入低级糖酵解(lower glycolysis)以及经由乙醛酸盐分路进入TCA循环。因此,在一些实现方式中,可以将所述微生物进行基因修饰以表达此第二途径的一种或多种(外源)酶。在一些实现方式中,所述微生物可以经基因修饰以表

达编码一种或多种将乙醛酸盐转化成乙醇酸盐的酶(例如,乙醛酸还原酶;EC 1.1.1.26)的一种或多种(外源)多核苷酸;和/或将所述微生物基因改造以破坏或缺失天然乙醇酸盐氧化酶。

[0089] 在一些实现方式中,所述微生物可以来自棒状杆菌属物种(例如,谷氨酸棒状杆菌)。

[0090] 在一些实现方式中,所述微生物可以来自地中海富盐菌、*Halobacterium salinarum*、烟草、或嗜热栖热菌。此类生物体具有在极端条件下生长的能力,这在某些实现方式下可能是有利的。

[0091] 基因修饰

[0092] 在一些实现方式中,催化反应(a)、(b)或(c)的一种或多种多肽可以由一种或多种多核苷酸编码,所述一种或多种多核苷酸是相对于所述微生物外源和/或异源的。

[0093] 如本文所用,关于微生物的基因组分,“内源”意指所述基因组分(多核苷酸、调控元件、启动子、或终止子)存在于特定生物体的天然形式的基因组中的特定位置处。相比之下,关于基因组分,如本文所用的“外源”意指所述基因组分不存在于特定生物体的天然(即,野生型或天然存在的)形式的基因组中的特定位置处。例如,外源基因组分可以具有天然或非天然的多核苷酸序列。如果具有天然多核苷酸序列(即,在相应的野生型生物体的基因组中存在的序列)的基因组分存在于在经基因工程改造的微生物中与在野生型微生物的基因组内的相同基因组分的位置不同的位置处,可仍将其视为外源基因组分。为了进一步清楚起见,如果将第一微生物物种的天然多核苷酸序列引入第二微生物物种的基因组中,则将其视为外源序列,并且反之亦然。

[0094] 如本文所用,关于多核苷酸和多肽的术语“异源”意指所述多核苷酸和多肽的序列通常在经基因修饰的相应天然或野生型微生物中未被找到。

[0095] 在一些实现方式中,本文描述的一种或多种多核苷酸的表达可以置于一种或多种调控元件(例如,启动子、终止子、转录增强子、激活子、或阻遏子、基因开关)的控制之下。在一些实现方式中,此类调控元件(可以是相对于所述微生物外源和/或异源的)可操作地连接至本文描述的多核苷酸,以使得能够响应于氧气水平(例如,氧敏感性启动子)、细胞内或细胞外pH(例如,pH敏感性启动子)、营养物浓度(例如,磷酸盐或氮)、诱导物(例如,诱导型启动子)的存在或浓度、和/或在发酵过程中可控制的参数(例如,温度、发酵肉汤的组成)的变化而控制其表达。在一些实现方式中,可以使用不同调控元件的组合来实现本文描述的一种或多种多核苷酸的差异表达,例如取决于本文描述的工艺的阶段(例如,生长阶段与生产阶段)。例如,催化将乙醇酸盐转化为乙醛酸盐的多肽的表达可以在生长阶段期间增加并且随后在生产阶段期间降低,而编码乙醇酸盐输出蛋白的多肽的表达可以在生长阶段期间降低并且随后在生产阶段期间增加。

[0096] 在一些实现方式中,本文描述的一种或多种多核苷酸可以包含在质粒中,和/或整合到微生物的基因组中。在所述多核苷酸被包含在质粒中的情况下,所述质粒可以进一步包含能够选择和/或鉴定阳性转化体的一种或多种选择标记基因(例如,抗生素抗性基因)。

[0097] (a) 乙二醇转化为乙醇醛

[0098] 在一些实现方式中,所述微生物可以经基因工程改造(或基因修饰)以与缺乏所述基因工程改造(或基因修饰)的相应微生物相比增加在氧气的存在下(例如,改进的耐氧性)

乙二醇向乙醇醛的转化。例如,所述微生物可以经基因工程改造(或基因修饰)以与缺乏所述基因工程改造(或基因修饰)的相应微生物相比改进乙二醇向乙醇醛的耐氧性转化。如本文所用,表述“改进的耐氧性转化”或“改进的耐氧性”涉及这样的基因修饰,所述基因修饰减轻了已增加的/不断增加的氧气水平对例如依赖于易被金属催化氧化降解的酶的微生物摄取和/或消耗乙二醇的负面作用。

[0099] 在一些实现方式中,本文描述的微生物可以包含编码催化反应(a)(即,乙二醇转化为乙醇醛)的多肽的多核苷酸,其中所述多肽包括E.C.1.1.1、E.C.1.1.3或E.C.1.1.5类的酶或其功能性变体或片段。

[0100] 属于E.C.1.1.1的酶包括氧化还原酶,所述氧化还原酶作用于供体的CH-OH基团,其中NAD(+)或NADP(+)作为受体(Levin等人,2004)。属于E.C.1.1.3的酶包括氧化还原酶,所述氧化还原酶作用于供体的CH-OH基团,其中氧作为受体(例如,氧化酶,诸如醇氧化酶或甘油氧化酶;Isobe,1995;Isobe和Nishiseb,1995)。属于E.C.1.1.5的酶包括氧化还原酶,所述氧化还原酶作用于供体的CH-OH基团,其中醌或类似化合物作为受体(例如,吡咯并喹啉醌(PQQ)依赖性酶,诸如来自恶臭假单胞菌;Muckschel等人,2012)。

[0101] 如本文所用,表述“功能性变体”和“其功能性片段”是指本文描述的多肽的变体,其与参考多肽的不同之处在于不消除所述多肽的希望酶促活性的一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入。例如,在一些实现方式中,功能性变体可以包含参考多肽的一个或多个保守氨基酸取代,或者功能性片段可以包括在参考多肽的N末端和/或C末端的截短而不影响例如参考多肽的催化结构域。

[0102] 在一些实现方式中,出于本文描述的工艺的目的(例如,用于增强的乙醇酸盐生产),本文描述的多肽的功能性变体可以具有相对于参考多肽改进的特性(例如,改进的酶促活性、稳定性和/或亚细胞定位)。例如,功能性变体(例如,催化反应(a)和/或(b)的多肽的功能性变体)可以具有降低的氧(例如,金属催化氧化)敏感性(改进的耐受性)。

[0103] 在一些实现方式中,例如与相应的野生型酶相比,将乙二醇转化为乙醇醛的酶的表达和/或活性是非氧依赖性的或者具有降低的氧敏感性(改进的耐氧性)。

[0104] 在一些实现方式中,催化反应(a)的多肽可以包括乳醛还原酶(也称为丙二醇氧化还原酶E.C.1.1.177)或其功能性变体或者由其组成。在一些实现方式中,所述乳醛还原酶可以由基因fuc0编码。在一些实现方式中,基于由来自大肠杆菌(E.coli) MG1655的fuc0编码的天然乳醛还原酶的氨基酸编号,所述乳醛还原酶可以包含氨基酸取代I7L和/或L8V或L8M。此类氨基酸取代可以改进酶对由金属催化氧化导致的降解的抗性,从而降低其氧敏感性。

[0105] 在一些实现方式中,催化反应(a)的多肽可以包括使用非氧敏感性辅因子或较低氧敏感性辅因子(诸如除铁以外的其他辅因子)的酶或由其组成。在一些实现方式中,催化反应(a)的多肽可以包括使用锌作为辅因子的酶或由其组成和/或所述酶是或包含以下作为锌依赖性醇脱氢酶(例如,肉桂醇脱氢酶):诸如来自在Genbank登录号:AAW60096中阐述的氧化葡萄糖杆菌621H的NAD依赖性醇脱氢酶,如图9所示。

[0106] 在一些实现方式中,可以将编码催化反应(a)的多肽的多核苷酸的表达置于组成型活性启动子的控制下。

[0107] 在一些实现方式中,可以有意地控制或减弱催化反应(b)的多肽的表达以将细胞

内乙醇醛水平维持在亚毒性水平(例如,通过使用弱启动子、诱导型启动子、和/或低拷贝数质粒)。

[0108] (b) 乙醇醛转化为乙醇酸盐

[0109] 在一些实现方式中,本文描述的微生物可以包含编码催化反应(b)(即,乙醇醛转化为乙醇酸盐)的多肽的多核苷酸,其中所述多肽包括E.C.1.2.1、E.C.1.2.3或E.C.1.2.5类的酶或其功能性变体或片段。

[0110] 属于E.C.1.2.1的酶包括氧化还原酶,所述氧化还原酶作用于供体的醛或氧代基团,其中NAD(+)或NADP(+)作为受体(例如,醛脱氢酶;Brouns等人,2006)。属于E.C.1.2.3的酶包括氧化还原酶,所述氧化还原酶作用于供体的醛或氧代基团,其中氧作为受体(例如,醛氧化酶;Yamada等人,2015)。属于E.C.1.2.5的酶包括氧化还原酶,所述氧化还原酶作用于供体的醛或氧代基团,其中醌或类似化合物作为受体(例如,脱氢酶;Klein等人,1994;Zhang等人,2003)。

[0111] 在一些实现方式中,催化反应(b)的多肽可以包括乳醛脱氢酶(E.C.1.2.1.22)或由其组成。在一些实现方式中,所述乳醛脱氢酶可以由基因aldA编码。

[0112] 在一些实现方式中,可以将编码催化反应(b)的多肽的多核苷酸的表达置于组成型活性启动子的控制下。

[0113] 在一些实现方式中,可以有意地控制或减弱催化反应(c)的多肽的表达以将细胞内乙醇醛水平维持在亚毒性水平(例如,经由使用弱启动子、诱导型启动子、和/或低拷贝数质粒)。

[0114] (c) 乙醇酸盐转化为乙醛酸盐

[0115] 在一些实现方式中,本文描述的微生物可以包含编码催化反应(c)(即,乙醇酸盐转化为乙醛酸盐)的多肽的多核苷酸,其中所述多肽包括E.C.1.1.3.15类的酶或其功能性变体或片段。

[0116] E.C.1.1.3.15类的酶包括氧化还原酶,所述氧化还原酶作用于供体的CH-OH基团,其中氧作为受体。在一些实现方式中,催化反应(c)的多肽可以包括乙醇酸盐氧化酶或由其组成。

[0117] 如图1所指示,在一些实现方式中,乙醇酸盐向乙醛酸盐的氧依赖性酶促转化充当氧依赖性代谢阀,所述氧依赖性代谢阀使所述微生物能够(1)在生长阶段在较高的氧气浓度下利用乙醛酸盐进行细胞生长(生物质累积)并且(2)在生产阶段在较低的氧气浓度下累积乙醛酸盐。

[0118] 在一些实现方式中,可以将编码催化反应(c)的多肽的多核苷酸的表达置于组成型活性启动子、氧敏感性启动子、pH敏感性启动子、或诱导型启动子的控制下。在一些实现方式中,可能是有利的是采用强和/或组成型活性启动子以便将细胞内乙醇醛水平维持在亚毒性水平。

[0119] (d) 细胞外输出乙醇酸盐

[0120] 在一些实现方式中,本文描述的微生物可以包含编码催化或促进反应(d)的多肽的多核苷酸,所述反应(d)将细胞内乙醇酸盐输出到细胞外环境(例如,进入发酵肉汤中)。例如,一些微生物可以包含天然乙醇酸盐输出蛋白,并且一些微生物可以经基因修饰以表达外源和/或异源的乙醇酸盐输出蛋白。

[0121] 在一些实现方式中,可以将催化或促进反应(d)的多肽标注为乙醇酸盐通透酶,诸如来自大肠杆菌的glcA;甲酸盐通透酶,诸如来自大肠杆菌的focA;乳酸盐/乙醇酸盐同向转运蛋白,诸如来自大肠杆菌的lltP;或乙醇酸盐/甘油酸盐转运蛋白,诸如来自拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的PLGG1;或其功能性片段或变体。

[0122] 在一些实现方式中,可能有利的是表达编码融合蛋白的多核苷酸,所述融合蛋白包含催化本文描述的两个或更多个反应(例如,反应(a)和(b),或(b)和(c))的酶。此类融合蛋白在本说明书的范围内。

[0123] 在一些实现方式中,例如在乙醇酸盐不是最终产物的情况下,可能有利的是所述微生物将乙醇酸盐转化为感兴趣的下游产物,诸如聚乙醇酸、乙醇胺或甘氨酸。在此类实现方式中,所述微生物进一步经基因工程改造以包含编码用于将乙醇酸盐转化为聚乙醇酸、乙醇胺和/或甘氨酸的一种或多种酶的一种或多核苷酸。然后,所述微生物可以进一步经基因工程改造以表达聚乙醇酸、乙醇胺或甘氨酸的输出蛋白,所述输出蛋白将细胞内聚乙醇酸、乙醇胺或甘氨酸输出到细胞外环境。

[0124] 下面将进一步详细描述关于本技术的各个方面、实现方式、实施方案、特征、实施例和实验。

[0125] 工作、发现结果和实验

[0126] 下面提供了对在本技术和创新的背景下已经完成的工作、发现结果和实验的详细描述。

[0127] 工作和发现结果的简要概述

[0128] 在用于生产化学物和燃料的生物工艺的开发中,相当大的挑战是相对于油价而言高昂的原料成本,这使得这些工艺与传统石油化工对应物相比没有竞争力。因此,在可预见的未来没有高油价的情况下(这是白色生物技术的主要推动力),行业已经转变为取而代之地生产较高价值的化合物,诸如化妆品用香料。然而,仍然需要解决气候变化,并且开发用于生产市场大、价值较低的化学物和燃料的生物工艺技术方法。在这项工作中,对作为已显示出有望解决这一挑战的新型原料的乙二醇进行研究。将大肠杆菌工程改造为消耗乙二醇,并且作为案例研究,对于化学生产,检查乙醇酸盐的生产。在测试条件下,一个积极的示例发酵性能导致在112小时的生产时间后产生10.4g/L的乙醇酸盐。结果清楚地表明,氧气浓度是在作为底物的MEG的同化中的重要因素。还发现乙二醇的摄取速率足以满足生产率和产率的商业基准。最后,代谢建模的使用揭示了通过牵涉到2-磷酸甘油酸盐的通量的中央代谢的细胞内分布,所述中央代谢作为MEG同化的主要途径。总体而言,本文描述的工作表明,乙二醇是用于商业合成燃料和化学物的有用平台,所述平台可以在整合二氧化碳的同时实现与石油化工原料的经济均等。

[0129] 对工作的介绍和评论

[0130] 解决气候变化的生物工艺技术方法和整合二氧化碳的需求已聚焦于微生物菌株的开发上,所述微生物菌株经工程改造为生产衍生自可再生糖源的化学物和燃料。尽管在工程改造这些菌株上取得了相当大的成功,但是缺乏在商业规模上许多成功掩盖了在面对低油价和昂贵的原料成本时这些技术在财务可行性方面的巨大挑战。作为回应,已提出将非糖原料作为替代物以与基于葡萄糖的生物工艺有效竞争。例如,甲烷和合成气发酵目前正在深入研究中并且也是商业开发的重点¹⁻³。甲酸盐是已表明作为葡萄糖的替代物的另一种化

学物,因为它可以从二氧化碳来产生并且由于与生物工艺的固有相容性^{4,5}。然而,其作为生物工艺的原料的用途遭受许多缺陷。最明显的缺陷是在诸如酵母或大肠杆菌的传统劳作(workhorse)生物体的代谢中缺少其同化途径。底物的氧化性质也会导致碳损失,从而无法合成支持产物和ATP形成的NAD(P)H辅因子,并且无法满足进入细胞中的高输送速率以实现与葡萄糖或木糖发酵类似的生产率的要求。因此,尽管具有吸引力,但技术挑战众多。

[0131] 但是,这种吸引力来自于可从CO₂通过电化学方式生成甲酸的事实。一摩尔CO₂的一个电子对还原产生一摩尔甲酸。然而,通过调整催化剂和还原电位,可以实现多电子还原,并且可以生产多种不同的还原碳物种⁶。已使用生物工艺来生产典型地通过石油化学工业生产的这些相同化学物中的许多,包括1-丙醇、乙酸盐、乙烯等⁷⁻⁹。在此,所述工作使用的观察结果是,与甲酸盐一样,这些其他化学物(也可以通过电化学还原CO₂衍生)是用于生物工艺的可行生长底物,并且这应考虑将其用作生物工艺的替代原料。

[0132] 在评估作为葡萄糖的潜在替代物的这些底物时,重要的是要认识到许多不能被传统工业劳作体(workhorses)天然分解代谢。因此,与甲酸盐类似,对于希望的生产性能,对底物利用途径的代谢工程改造是优选的。另外,许多潜在的替代物是有毒的,并且与生物工艺不相容。虽然作为生物工艺的输入在技术上是可行的,但是其他替代物在电化学反应器中遭受差的法拉第效率或差的选择性¹⁰⁻¹³。因此,在从可通过电化学方式生成的产物的清单中进行筛选后,变得明显的是,仅有几种可以实现作为葡萄糖⁶的实践替换物。最后,除了可以以相对直接的方式评估的毒性和效率外,还可能由于其利用与高度互连的代谢网络是如何联系的而使评估新底物用于生物基化学生产的可行性变得模糊。实际上,在过去,已证明将大型代谢途径重构到异源宿主中是有挑战性的¹⁴。可能有助于解释为什么新底物表现不佳的一种方法是检查代谢途径,所述代谢途径支持底物用于与细胞的整个代谢有关的化学生产。

[0133] 在较早期的研究²²中,这种关系的特征在于计算细胞系统的两个竞争目标:生长和化学生产之间的相互作用。理论提出了潜在的网络结构如何让位于非生长依赖性化学生产。通过使用基本通量模式以测量细胞系统与所希望的目标的互连性的数学框架来捕获这种关系。因此,定义了一种指标来测量化学生产途径相对于生物质生产的正交性。

[0134] 发现被设计为使细胞范围相互作用最小化的理想代谢结构的组织具有特征性分支拓扑。可以将这种类型的正交结构发掘用于两阶段发酵。此外,这种研究的重要发现结果是葡萄糖,虽然是用于工业发酵的常见底物,但是由于在生物质合成途径与化学生产途径之间存在显著重叠,因此不是理想适合于化学生产目标的。取而代之的是,底物选择应基于以生产为目标的化学物。在各种底物和产物中,已鉴定的是,乙二醇是用于正交生产多种化学物的极有前途的底物,因为它使生物质途径与化学物生产途径之间的相互作用最小化。

[0135] 因此,在可通过电化学方式生产的多种不同化学物中,乙二醇是有前途的非常规原料。现今,它主要是由石化行业从乙烯生产的。然而,用于从CO₂制造乙二醇的工艺已显示出提早的前途,并且目前是工业规模化的重点。在这方面,其作为原料用于生物工艺的用途是重要的,因为它可以用作现代生物工艺中的葡萄糖的替代物。

[0136] 在本工作中,大肠杆菌经工程改造并且被表征为能够消耗作为碳源的乙二醇的生物催化剂,并且探索了其作为新型底物用于工业生物工艺的应用。然后将这种用于生长和化学生产的平台应用于乙醇酸生产的案例研究。此案例研究试图验证用于化学生产的正交

方法,将网络拓扑和两阶段发酵相联系。用于在大肠杆菌中获得乙醇酸的常规方法相反地聚焦于使用葡萄糖作为底物,并且实现了将生产与生长偶联的基因策略。已经发表了几项研究,所述研究检查了从葡萄糖^{15,16}和木糖¹⁷⁻¹⁹进行的乙醇酸生产。这些报告中最高实现了56.44g/L的滴度和0.52g/g的产率²⁰。据我们所知,只有三项研究检查了以生物转化的形式进行的乙二醇向乙醇酸的转化²¹⁻²³。然而,在这项工作中,充分表征了靠乙二醇生长的大肠杆菌的代谢和生长生理学。发现尽管相对于靠葡萄糖的生长而言生长速率明显缓慢,其中靠乙二醇的倍增时间为3.85小时,但是底物摄取速率足够高,最高达5mmol/gDW-h,而与工业生产相关。需要微有氧条件的乙醇酸盐达到10.4g/L的滴度,66%的最大理论产率。总体而言,发现了解细胞的生长特征和乙醇酸盐生产的模型显示,在其中CO₂流和可再生电力可用的应用中,乙二醇的使用具有替代葡萄糖用于工业生物方法的潜力。

[0137] 材料和方法

[0138] 培养基和培养条件

[0139] 按照制造商的说明(Bioshop,安大略省伯灵顿),使用溶原性肉汤(LB)进行细胞生长,以进行所有菌株构建和发酵预培养。当表征菌株时,使细胞在具有以下组成的M9最小培养基下生长:1.0g/L NH₄Cl、3.0g/L KH₂PO₄、6.8g/L Na₂HPO₄、0.50g/L NaCl。将2g/L酵母提取物的补充物添加到最小培养基中。使用乙二醇作为碳源,如本文中描述的浓度。必要时,以1mM的浓度使用IPTG。根据以0.1M HCl/升制备并且以1/1000的浓度添加的以下组成制备痕量金属溶液:1.6g FeCl₃、0.2g CoCl₂·6H₂O、0.1g CuCl₂、0.2g ZnCl₂·4H₂O、0.2g NaMoO₄、0.05g H₃BO₃。还分别以1/500和1/10,000的浓度向培养基中添加1M MgSO₄和1M CaCl₂。对于所有培养物,视情况以100μg/mL添加羧苄青霉素。使细胞在250mL摇瓶中生长以用于所有表征实验,并且在生物反应器中生长,如所描述。

[0140] 在反应器中的培养技术

[0141] 使预培养物在10mL试管中的富含LB的培养基中生长,培养过夜,并且然后转移到含LB、1mM IPTG和10g/L乙二醇的新鲜摇瓶中。24小时后,通过离心收集这些细胞,将其重悬于2mL残留上清液中,并且用作用于在37℃下表征的生物反应器或最小培养基摇瓶的接种物。

[0142] 使用Applikon MiniBio500发酵容器以在生物反应器中培养菌株。根据制造商的操作指南使用溶解氧和pH探针。使用M9最小培养基以在生物反应器中培养。通过添加3N KOH将pH维持在7。将生长条件维持在37℃。如文中所描述维持溶解氧。使用Books Instruments 质量流量控制器(GF系列)如所描述控制流速,并且使用Thermo Scientific™ Sentinel dB质谱仪分析气体以进行在线气体测量。

[0143] 分析方法

[0144] 发酵生产的分析经由高效液相色谱法(HPLC)来测量。使用Bio-rad HPX-87H有机酸柱,其中5mM H₂SO₄用作洗脱液,并且在50℃下的流速为0.4mL/min。在210nm处检测有机酸。通过测量在600nm处的光密度(GENESYS 20可见分光光度计)来确定培养物的细胞密度。根据需要将细胞密度样品稀释,以落入线性范围内。使用差分析光率检测器(安捷伦公司(Agilent),加利福尼亚州圣克拉拉)进行分析物的检测和定量。在两个时间点之间计算产率,而在初始测量与最终测量之间计算累积产率。

[0145] 质粒和菌株

[0146] 从大肠杆菌MG1655基因组DNA克隆fucO和aldA,并且使用Gibson Assembly²⁴将其组装成pTrc99a载体。将核糖体结合位点(RBS)序列置于正向引物的突出上。AACAAATGAGGAGGTACTGAG (SEQ ID NO:1)是在aldA前面使用的RBS序列。AAGTTAAGAGGCAAGA (SEQ ID NO:2)是在fucO前面使用的RBS序列。使用Trc启动子以驱动表达。从Coli Genetic Stock Centre (大肠杆菌遗传储备中心,耶鲁)获得大肠杆菌MG1655的野生型菌株。

[0147] 通量平衡分析

[0148] 使用安装有COBRA 2.0工具箱的MATLAB R2015a并且使用GLPK线性解算器(GNU工程)进行通量平衡分析(FBA)。使用基因组规模模型iAF1260来进行所有建模。ATP维持反应在8.9mmol/gDW-h下维持不变。通过添加用于使用NAD辅因子将乙二醇转化为乙醇醛的反应来修改模型。将乙二醇的输送建模为自由扩散,并且不包括质子易位作为其交换反应的一部分。用于建模呼吸商的细胞初始表征仅受在5mmol/gDW-h下测量的其底物摄取速率的约束。通过以下方式推测出更详细的细胞内通量数据:约束底物摄取速率以及乙醇酸盐生产速率和摄氧速率,如通过在生物反应器培养过程中对来自过程质谱的废气进行分析来确定。

[0149] 结果

[0150] 乙二醇是优于甲酸盐的优选底物

[0151] 在较早期的研究中,正交性被鉴定为评估和设计用于生产化学物的有效代谢网络的指标。所述研究将正交性定义为在生产目标化学物的途径与生产生物物质的途径之间的互连性的定量量度。这项工作的主要重点是检查代谢途径组织如何影响化学生产。在此第一部分中,应用方法以比较甲酸盐和乙二醇的利用,两者均可以通过电化学方式合成。还评估了底物选择对在表1中找到的五种工业重要的化学物所具有的特定作用。这种分析允许我们隐含地解释代谢约束条件,诸如氧化还原和ATP。在所有底物产物对之间乙醇酸显示出最高的正交性得分,并且因此将其选择作为用于从乙二醇进行的生产的示范产物。

[0152] 表1

	琥珀酸盐		乙醇		乙醇酸盐		2,3-丁烷二醇	
	得分	产率	得分	产率	得分	产率	得分	产率
[0153] 甲酸盐	0.47	0.29	0.50	0.14	0.48	0.33	0.49	0.18
乙二醇	0.54	0.95	0.61	0.62	0.67	1.22	0.66	0.66
葡萄糖	0.41	1.12	0.44	0.51	0.41	0.85	0.47	0.50
木糖	0.36	1.11	0.36	0.65	0.34	0.65	0.40	0.64

[0154] 表1示出了使用乙二醇和甲酸盐作为碳源的这些化学物的正交性得分。在计算中还包括葡萄糖和木糖,因为它们为常规生物工艺提供了参考。对于所有化学物,乙二醇的正交性得分大于甲酸盐的正交性得分,并且生产相同数量的产物所需的底物也更少。因此,表1涉及从不同底物进行的化学生产的产率和正交性指标。示出了各种产物的正交性得分,将可通过电化学方式生成的两种底物与通过其天然途径获得的常规使用的底物进行比较。甲酸盐具有与许多糖消耗途径类似的正交性得分,指示其利用的相对复杂和互连性。对于乙二醇的那些的得分最高,其产率优于糖葡萄糖和木糖。产率以g产物/g底物给出。

[0155] 正交性指标是每种底物同化途径所具有的与其途径外的细胞组分的相互作用的集合的数学量度。因此,它隐含地测量人们可能期望确保所述途径的生物分子机械

(biomolecular machinery)可以在细胞的天然代谢中同时起作用以支持生物和化学生产目标的生物复杂性。对甲酸盐代谢的分析显示,其低得分是由于其低还原度导致的,还原度需要通过用于生成生长和能量所需的还原当量的TCA循环的通量,而与产生何种化学物无关。还原度低也是产物产率低的原因。因此,这条网络分析线表明,乙二醇是在大肠杆菌中比甲酸盐优异的底物。鉴于乙二醇利用的得分较高,解决了乙二醇利用是有前途的,并且将这些结果与在大肠杆菌中用于乙醇酸生产的糖代谢进行比较。

[0156] 乙醇酸盐是用于合成多种不同塑料和聚合物、化妆品和工业洗涤剂的 α -羟基酸。当前,代谢工程改造已经建立了从葡萄糖和木糖到乙醇酸的途径。理论产率既取决于所选择的底物以及用于生产的生物合成途径两者。在文献中从葡萄糖生产乙醇酸盐的例子主要通过乙醛酸盐分路的激活来证明。

[0157] 关于图1,应注意的是,乙醇酸盐可以通过多种不同的底物产生。(A)中示出了乙二醇向乙醇酸盐的转化。两种最常研究的用于生产的底物是木糖(B)和葡萄糖(C)。为了从葡萄糖或木糖有效地生产乙醇酸盐,需要对中央代谢进行基因干预以将生长和乙醇酸盐合成偶联。此研究的重点是检查乙二醇的消耗。限制氧气提供了允许乙醇酸盐累积的机制。在完全有氧条件下,乙醇酸盐被转化为乙醛酸盐,并且经由甘油酸盐代谢被引导至中央代谢以进行生长。在限氧条件下,乙醇酸盐累积。

[0158] 图1示出了从三种不同的途径生产乙醇酸盐。从葡萄糖进行的生产与生物质合成高度偶联,并且展现出最低的正交性得分0.41。通过使用在大肠杆菌中的木糖同化的合成途径也证明了从木糖生产乙醇酸盐。虽然此途径部分地符合针对乙醇酸生产的正交标准,但是对于每摩尔乙醇酸盐的伴随的丙酮酸盐生产需要使用高度互连的乙醛酸盐循环的细胞以达到理论产率。因此,正交性得分相对较小。对于其中乙二醇用作底物的情况,发现最大正交性得分为0.67。乙二醇向乙醇酸盐的生物转化符合遵循分支途径的理想网络架构。在限氧条件下,可以限制由乙醇酸盐氧化酶催化的消耗乙醇酸盐的反应,并且细胞可以累积乙醇酸盐。这些结果显示,乙二醇作为底物比传统底物有更大正交性,并且因此适合作为概念验证基于正交途径的设计。

[0159] 大肠杆菌对乙二醇的利用

[0160] 自然界中存在允许微生物消耗作为碳源的乙二醇的途径²⁵⁻²⁸。尽管在代谢工程改造应用中不常被报道,但这些生物体使用两种类型的代谢途径之一。第一途径利用二醇脱水酶,导致乙二醇脱水成乙醛。然后通过乙醛脱氢酶将乙醛活化为乙酰辅酶a,这为细胞提供了关键的前体代谢物以经由TCA循环和糖异生途径支持生长。从一摩尔乙二醇生产一摩尔乙酰辅酶a会伴随地产生一个NADH。由于二醇脱水酶^{25,27}的氧敏感性,这种途径最常见于某些梭菌属物种和几种其他厌氧生物体中。降解乙二醇的第二模式利用这样的途径,其中使用烟酰胺辅因子和氧气将乙二醇连续氧化以产生乙醛酸盐。然后,可以将作为糖异生碳底物的乙醛酸盐用作生长代谢物,因为它在2-磷酸甘油酸盐节点处进入低级糖酵解(lower glycolysis)以及经由乙醛酸盐分路进入TCA循环。

[0161] 野生型大肠杆菌MG1655无法天然地靠乙二醇生长或降解乙二醇。然而,可以选择此菌株,并且据我们所知,仅有一项研究报道过大肠杆菌利用乙二醇。²⁹所述菌株选自利用丙二醇的突变体的衍生物。研究人员鉴定出乙醇酸盐氧化酶、乙醇醛脱氢酶和丙二醇氧化还原酶的活性增加是其同化所必需的组分。更通常地,对文献的调查显示,酶混杂是醇利用

的相关要素^{22,23}。在这种特定情况下,被认为对在许多生物体中丙二醇或甚至甘油的利用很重要的酶已显示出对乙二醇的活性,并且被认为是关键的降解方法,而与经由乙醛酸盐²⁶⁻²⁸的脱水酶途径或的氧化途径无关。因此,在此研究中,为了工程改造大肠杆菌,使已作为在大肠杆菌中支持丙二醇利用的关键酶而建立天然基因fucO和aldA过表达。由于先前已显示FucO是氧敏感性的(经由金属催化氧化),这导致Fe²⁺依赖性丙二醇氧化还原酶失活,因此设计了消耗乙二醇的途径的两种变体。在变体1(菌株LMSE11)中,使用突变形式的fucO,其中I7L和L8V基于较早期的诱变研究³⁰。在第二变体(菌株LMSE12)中,使用L8M,因为还表明它在大肠杆菌对丙二醇同化中在减轻金属催化氧化(MCO)毒性方面发挥作用。两种变体在起始密码子的上游具有相同的核糖体结合位点和trc启动子。

[0162] 使细胞在250mL摇瓶中的补充有0.2%酵母提取物的含约10g/L乙二醇的M9最小培养基中有氧生长。所构建的两种菌株之间的发酵特征曲线显著不同。LMSE11在47小时内完全消耗了乙二醇,而LMSE12在相同的时间段期间仅消耗了初始底物的约10%,其中10g/L为残留MEG。这些结果在图2中示出。

[0163] 图2展示了在此研究中构建的菌株的细胞生长曲线以及其底物消耗特征曲线。在摇瓶实验中,fucO的氧变体显示出生长速率和底物利用的显著差异。虚线示出了乙二醇消耗,并且实线描绘了OD₆₀₀。黄色(浅)示出了菌株LMSE11,而绿色示出了LMSE12。误差条指示一式三份的实验的标准偏差。

[0164] LMSE11的生长产率计算为0.28gDW/g MEG。经由对大肠杆菌核心模型的计算机模拟进行的通量平衡分析揭示了理论产率为0.35gDW/g MEG。这些结果似乎与生物质合成的理论产率合理地吻合,表明两个基因足以有效地使用大肠杆菌的天然生物合成途径将乙二醇转化为生物质。在摇瓶中的底物摄取速率被确定为5mmol/gDW-h。实验生长速率计算为0.18h⁻¹,对应于3.85小时的倍增时间。图2示出了两种变体的生长曲线和底物利用。在相同的时间段内,LMSE12消耗了显著更少的乙二醇,并且具有略低于10g/L的残留乙二醇浓度。

[0165] 通过HPLC对发酵培养基的分析显示不存在发酵产物(如乙酸盐或乳酸盐)以及中间代谢物乙醇醛和乙醇酸盐。然而,由于LMSE11显示出更高的利用率,因此决定进一步采用所述变体。

[0166] 通过大肠杆菌正交生产乙醇酸盐

[0167] 已通过工程改造的大肠杆菌菌株建立了乙二醇消耗,探索了将乙二醇用作生产乙醇酸的正交底物。使大肠杆菌菌株LMSE11在具有最小培养基的生物反应器中生长,所述最小培养基补充有2g/L酵母提取物并且用空气鼓泡以将空气维持在1v/vm(300mL/min)。这些条件确保氧气饱和度高于50%。首先使细胞生长过夜,持续18小时,以在补充有乙二醇并且用IPTG诱导的富含LB的培养基中生长。过夜生长后,将它们离心,洗涤并且悬浮在最小培养基中,并且以约0.4的OD(大约0.23gDW/L)接种到生物反应器中。所述生物反应器含有1mM IPTG,以维持MEG利用基因的诱导表达以支持生物质。

[0168] 在20小时时,将通气量降低至150mL/min(0.5v/vm)和50mL/min(0.16v/vm),以模拟高通气速率和低通气速率,并且将叶轮搅拌下降至500rpm。观察到细胞持续生长直到大约40小时,达到大约5gDW/L,此时两个反应器中的细胞似乎都达到了静止阶段。然而,在静止阶段开始后,乙醇酸盐的生产继续进行另外30小时,此时发酵停止。到批次结束时,在较高通气速率下生长的细胞累积了更多乙醇酸盐。两种处理的最终乙醇酸盐滴度为2.5g/L和

4.1g/L。使用通量平衡分析以粗略估计由呼吸造成的碳损失并且解释细胞生长和其他产物,可以将碳平衡分别接近83%和88%。在生产阶段期间测量的相对于MEG的乙醇酸盐的平均质量产率为0.18g/g和0.32g/g。图3展示了这些实验的结果。

[0169] 参见图3,展示了通气对乙醇酸盐生产的影响。为了评估在生物反应器中氧传递的影响,在发酵的微有氧阶段期间使细胞在两种通气速率下生长。(上图)高通气具有150mL/min的流速。(下图)低通气的特征在于50mL/min的流量。一式两份地进行实验。误差条指示测量值的范围。

[0170] 与直觉相反,较低的通气导致较低的乙醇酸盐滴度,即使预期在MEG利用途径中FucO对较高的氧气水平敏感。然而,此结果可以通过以下事实来解释:NAD的再生需要氧气,NAD是MEG利用途径的底物。因此,较低的氧气浓度可能导致通过此途径的通量降低,从而导致较低的滴度。这些结果表明,在一方面氧敏感性与在途径中氧气作为底物的要求之间的权衡。接下来,希望进一步使用代谢建模来分析氧气的作用并且通过增加通气速率来甚至进一步查看是否可以增强乙醇酸盐的生产。

[0171] 溶解氧和对代谢的控制

[0172] 为了进一步深入了解使用氧气对细胞代谢的控制并且完善我们的乙醇酸盐生产方法,使用通量平衡分析(FBA)来模拟在通过用摇瓶实验确定的5mmol/gDW-h下通过中央代谢的细胞内通量。使用底物摄取速率来约束模拟,以接近于在摇瓶中测量的早期指数生长阶段期间的大肠杆菌生长。ATP维持通量是粗略估计为8.9mmol/gDW-h,这是在实验上用于葡萄糖代谢的值。模拟通量分布揭示了使用糖异生途径的高度重组的大肠杆菌中央代谢。

[0173] 在限氧条件下,FBA可以预测观察到的发酵细胞行为和乙醇酸盐累积。然后,通过对细胞的乙醇酸盐生产(以产率计)以及其呼吸商随摄氧速率的变化进行建模来进一步探索此观察结果。此分析允许我们将进入反应器的空气的流速与代谢物的生产产率隐式关联,因为比摄氧量是空气吸收量的函数。图4显示,随着摄氧速率的降低,乙醇酸盐产率增加并且发酵开始。这些产率与呼吸商(RQ)相关,呼吸商在较低的氧气通量下也降低并且随着氧气通量的增加而增加,然后在饱和条件下趋于平稳。这些结果表明,RQ是重要的变量,可以监测和控制所述变量以实时优化乙醇酸盐生产。因此,使用这种方法来通过确保有充足的通气以控制在后续运行中乙醇酸盐的生产。

[0174] 关于图4,示出了与乙醇酸盐生产的代谢建模有关的曲线图,其中使用FBA对乙醇酸盐产率(乙醇酸盐,蓝色)、呼吸商(RQ,绿色)和底物比生产率(SSP,红色)进行建模。乙醇酸盐的生产开始于限氧的开始,限氧的开始在大约8mmol/gDW-h的氧气下进行。在较大值下,RQ在像可用于完全呼吸的那样充足的氧气下稳定,并且FBA预测没有乙醇酸盐累积。灰色条指示在后来批次中在生产阶段期间通过实验方式控制的RQ值。

[0175] 乙醇酸盐生产和补料分批策略

[0176] 最后,鉴于可以产生乙醇酸盐,因此进行进一步实验,以试图改进乙醇酸盐的生产产率并且增加滴度。基于从初始发酵中学到的知识,寻求增长乙醇酸盐生产阶段并且减少生物质生产阶段。这通过以下方式实现:在批次的生长阶段将通气速率增加到2v/vm(600mL/min),以防止乙醇酸盐的累积并且尽可能多地使通量转向生物质。在第二阶段,通气速率下降至100mL/min。此策略的结果在图5A中示出。在初始生产阶段生物质浓度为大约4gDW/L的情况下,在大约70小时的生产时间后,最终的乙醇酸盐滴度达到6.8g/L,对应于平

均生产率0.1g/L-h或大约0.32mmol/gDW-h。在采集第一个样品后,乙醇酸盐的初始产率为0.92g/g,然而,在批次的生产过程中累积产率降低,其中最终总生产产率为0.75g/g或理论值的61%。

[0177] 从这些条件观察到,尽管以较高的产率生产了显著较多的产物,但是细胞花费了长得多的时间才达到适合于生产阶段的浓度。而当在较早批次中的通气速率为1v/vm时,细胞在30小时内达到4gDW/L的浓度。然而,在2v/vm下,其花费了几乎70小时才达到相同的浓度。据推测,由于在早期的指数阶段期间增加的溶解氧水平和较快的到细胞中的氧传质速率,达到较高OD的时间很可能更长。鉴于FucO的氧敏感性,即使在突变体变体中,这两个因素也很可能使细胞产生氧中毒,这是由于这些蛋白质通过金属催化氧化而失活并且在高蛋白质需求而没有足够的手段来利用作为碳源的乙二醇的情况下对细胞造成高代谢负担。

[0178] 氧气要求也是影响生物化学物工业生产的因素之一,因为它是操作成本的关键组分,操作成本由能量输入来确定。用于工艺的显著能量输入之一是向生物反应器中通气所需的能量。在较早期的实验中,发现与直觉相反,较高的通气导致较高的乙醇酸盐滴度,产率较高,但所述较高的通气也阻碍细胞生长。从工艺角度来看,希望以较低的流速来操作反应器。建立在所有这些早期研究和各种竞争目标上,试图以高的滴度但较低的通气速率来生产乙醇酸盐。因此,使细胞在恒定通气0.16v/vm (50mL/min) 下生长,但是在生产阶段期间,在反应器中的叶轮速度下降直到如通过在线质谱仪测量的RQ读数为约0.4。基于FBA模拟的可行假设是,这将达到大于0.4mol/mol的产率,并且使生产阶段接近其最大底物比生产率。图4中的阴影区域示出了在生产阶段的过程中测量的RQ的范围,如通过与平均值的三个标准偏差来确定。平均RQ测量为0.37。此实验的结果在图5B中示出。可以将生物质生产阶段减少至26小时,并且在112小时生产阶段中生产10.4g/L乙醇酸盐。从乙二醇确定总产率为0.8g/g,对应于0.66mol/mol的摩尔产率。生产率是与早期实验可比较的,为0.1g/L-h。这些实验结果与使用RQ作为控制变量的FBA预测相符并且很好地相关。当批料进入乙醇酸盐生产阶段时,观察到RQ下降。然而,测量的RQ值0.37对应于0.66mol/mol的生产产率-高于0.40mol/mol的预期产率。结果意味着,尽管实验数据与FBA模拟之间的总体相符可用于建立靠乙二醇发酵的控制机制,但是需要进一步优化模型参数以准确预测对环境条件的生理反应。特别地,然而发现体内底物摄取速率显著降低(大约0.7mmol/gDW-h),这未被FBA模型(3.5mmol/gDW-h)准确捕获。

[0179] 关于图5A和图5B,其涉及补料分批策略的发酵特征曲线,进行补料分批研究以评估生产阶段的长期稳定性。通过灰色阴影将生产阶段与生长阶段分开。(A) 示出了在对应于4gDW/L的细胞密度下在生长阶段期间2v/vm的生物反应器条件以及在生产阶段期间0.33v/vm的生物反应器条件。(B) 使细胞在0.167v/vm的进入生物反应器中的空气的流速下生长,其中平均静止阶段细胞密度为2.5gDW/L。细胞能够在生产阶段在超过100小时内很好地进行稳健的乙醇酸盐生产。

[0180] 使用大肠杆菌模型进行代谢通量分析

[0181] 为了深入了解细胞的细胞内通量,使用质谱仪和HPLC数据来约束大肠杆菌的基因组规模模型并且执行通量平衡分析。然后使用所述模型来估计在乙二醇生长条件下的细胞内通量,从而深入了解细胞代谢。确定的是,乙二醇在乙醛酸盐节点处进入代谢(图6A)。在有氧条件下,70%的乙醛酸盐生产通量被引导至2-磷酸甘油酸盐(2PG),其进入低级糖醇

解。剩余的乙醛酸盐用于经由苹果酸盐合酶来生成苹果酸盐。从模拟似乎看出,由这些途径产生的苹果酸盐和2PG的大部分都终止于TCA循环。以百分比计,作为乙二醇进入细胞中的总碳的65%被引导至乙酰辅酶a。相反,总碳的约五分之一通过被糖异生途径引导至上级糖酵解(upper glycolysis)和戊糖磷酸盐途径。

[0182] 在生长阶段期间,还观察到少量乙醇酸盐。乙醇酸盐的累积表明氧气不足,并且因此表明可诱导细胞中的厌氧途径的可能性。确实,检测到在HPLC色谱图中作为峰的痕量甲酸盐。

[0183] 鉴于同化乙二醇的2PG途径经由丙醇二酸盐半醛聚醛酶步骤导致碳损失,进行模拟以通过从模型中除去反应glyck2(甘油酸盐激酶)来确定乙醛酸盐循环是否足以支持细胞生长。从基因组规模模型中除去乙醛酸盐聚醛酶显示,在计算机中进行的生长速率降低了50%。相比之下,对在相同途径中基因缺失的实验工作显示,它消除了靠乙醇酸盐的生长。为了调和这些差异,分析基因组规模模型以确定支持细胞生长的特定反应。发现在没有乙醛酸盐聚醛酶的情况下,理论上可以由苏氨酸途径支持细胞生长,在苏氨酸途径中草酰乙酸盐被转化为丝氨酸、高丝氨酸和苏氨酸。苏氨酸醛缩酶能够将所述氨基酸切割成用于生长的甘氨酸和用于提供乙醛,所述乙醛补充被苹果酸盐合酶所消耗的乙酰辅酶a所需的乙酰辅酶a。因此,正是从草酰乙酸盐产生的苏氨酸代谢提供了途径来支持在计算机中进行的生物物质。此途径将乙酰辅酶a转化为甘氨酸。然而,不太可能的是,这些酶以足够的数量被表达以携带足够的通量来支持生长。因此,在乙醛酸盐代谢中在glyck2反应与mals(苹果酸盐合酶)反应之间的次级苹果酸盐合酶途径和通量分支的主要作用似乎是在补充TCA循环中间体,而不是同化乙二醇。

[0184] 应用相似的方法来确定在微有氧条件下的细胞内通量分布。在乙醇酸盐生产阶段(图4-图5B),限制进入生物反应器中的氧气的流速以创造微有氧环境。所得的氧气浓度下降影响代谢通量分布。最值得注意的变化是乙二醇的底物摄取速率降低至约0.7mmol/gDW-h,是在有氧生长期间所观察到的四分之一。其次,在计算机中的模拟预测出减少的通过苹果酸盐合酶的乙醛酸盐利用,并且相反,大部分通量通过2PG转向TCA循环。尽管在好氧条件下通过低级糖酵解的通量与通过苹果酸盐合酶的通量的摩尔比率几乎是1:1,但是在微有氧条件下其估计为30:1。可以推测,底物摄取量的降低很可能是由于氧气对NADH的氧化速率较低导致的,导致NAD辅因子累积减少并且使可用于乙二醇分解代谢的氧化分子更少。在代谢中乙酸盐的产生是与发酵代谢相关的溢流代谢的特征。由受氧气转录地控制的丙酮酸盐甲酸盐裂解酶产生的痕量甲酸盐与其他研究一致,所述其他研究显示出在向发酵代谢过渡中厌氧途径的激活。

[0185] 关于图6,它示出了在途径中代谢的通量分布和关键酶。(A)部分示出了估计的在有氧条件下的细胞内通量分布。(B)部分示出了在限氧条件下,代谢模型估计了乙二醇通量,乙二醇主要转化为乙醇酸盐。括号中的值表示从通量变异性分析获得的上限值和下限值。通量范围提供了基于对以上模拟施加的约束条件的反应通量的误差估计值。在这种情况下,对于估计相对窄的范围可用于对数据作出生理上有意义的解释。

[0186] 使用可选乙二醇氧化酶能够消耗乙二醇

[0187] 虽然本文显示fuc0和aldA可以为大肠杆菌赋予同化作为碳源的乙二醇的能力,但是在一些情况下希望的是当细胞在高通气条件下生长时使用fuc0的替代物。这是因为Fuc0

酶(以及许多使用铁作为辅因子的其他酶)含有铁-硫簇,所述簇容易在氧气的存在下失活。因此,测试了几种使用锌作为辅因子的候选酶,并且在体外验证了它们将乙二醇转化为乙醇醛的能力。在大肠杆菌MG1655中表达一种经体外验证的酶(来自氧化葡萄糖杆菌的Gox0313基因)以及在低拷贝质粒上的aldA(p15A复制起点)。使细胞在250mL摇瓶中的补充有20g/L乙二醇和0.1%酵母提取物的M9最小培养基中生长。菌株的发酵特征曲线证实了使用Gox0313同化乙二醇的能力。相比之下,野生型菌株由于生长培养基中存在的酵母提取物而很少生长(参见图9)。在分析此实验的结果时,我们观察到细胞的OD600从约0.4到约9.9花费了41小时。通过比较,在其中使用氧敏感性降低的fuc0变体的较早期的实验中,我们观察到OD600从约0.4到约6.2花费了大约45小时。因此,相对于fuc0变体,含有Gox0313的变体在更短的时间段内达到了更高的总生物质浓度。因此,这些结果表明,这种含锌酶在其支持生长和乙二醇利用的能力上优于含Fe辅因子的fuc0变体。

[0188] 讨论

[0189] 化学物的生物基生产的常规方法依赖于使用葡萄糖,并且最近使用木糖作为原料。然而,微生物在代谢不同碳源的能力上倾向于非常多样化。在这项工作中,提出并且检查了使用乙二醇作为底物替代葡萄糖在生物工艺中用于生长和化学生产。与许多涉及从葡萄糖合成乙二醇的其他研究相反,我们研究乙二醇作为底物的动机源于它也可以衍生自CO₂^{6,31}。因此,将其作为可潜在地螯合碳并且降低温室气体排放的原料的考虑类似于检查利用甲酸盐的合成气发酵的研究。

[0190] 为了评估在生物化学生产中乙二醇的利用,检查乙醇酸的生产。乙醇酸是用于化妆品和聚合物应用的 α 羟基酸。我们的研究结果允许我们得出这样的结论:乙二醇是用于生长的合适平台,并且对于生产乙醇酸是高效的。更通常地,发现在进一步的代谢工程改造的情况下,乙二醇可用于生产典型地在发酵代谢期间产生的醇和其他有机酸。据信,这种能力可能对工业生物技术具有影响。通过检查三个特定领域来提供对这些发现结果的详细阐述。

[0191] 与在大肠杆菌中利用非天然底物有关的挑战可能促使考虑将乙二醇作为底物。这些相互作用(在较早期被描述为正交性)有助于鉴定具有高和低相互作用程度的途径。通过计算方式,发现乙二醇展现出与许多天然和某些合成途径相比更低的相互作用水平,这使其可以比诸如甲酸盐或甲醇的底物更稳健。因此,这些相互作用为选择新型底物利用途径并且将其工程改造到大肠杆菌中提供了合理的基础。这项工作证明了基于正交性指标的用于代谢工程改造的正交途径的第一从头设计。

[0192] 结果证明,大肠杆菌适用于使用从未被视为潜在原料的新且新型的底物。对细胞生长的初始表征确定了底物摄取速率是大约5mmol/gDW-h。在用于工业过程的典型细胞密度(10-100g/L)²⁴下,这对应于3-30g/L-h的净通量,远高于典型需要的非生长依赖性生产²⁵所需的3-4g/L-h的生产率。对这些菌株的进一步表征让我们确定存在一些氧敏感性,尤其是在早期的指数阶段。据信,这些很可能是由于在存在过量通气的情况下Fuc0的金属催化氧化引起的,并且可以通过使用O₂耐受性Zn²⁺依赖性变体来解决。

[0193] 在这些实验的过程中所作的重要观察结果是在限氧条件期间底物摄取速率降低。据信,限氧导致NADH库增加,导致由fuc0和aldA催化的反应的速率降低。这种速率变化具有降低乙二醇进入细胞的通量的净作用。此发现结果需要进一步研究在乙二醇利用下的细胞

生理学,以便了解随进料到生物反应器中的溶解氧变化的产率和生产率的权衡。例如,虽然进一步发现相对于50mL/min,在150mL/min下总乙醇酸盐滴度增加,但是经由维持目标呼吸商而进行的在线监测补料分批研究有助于相对于在150mL/min下的较早期实验条件,在50mL/min下增加产物产率和滴度。因此,既在产物形成方面还在通气的绝对成本方面,对在生物反应器中的通气的优化将显著改进经济性能。例如,在此生物反应器中的实验的操作条件对应于 120h^{-1} 的 k_{La} 。典型的射流环式生物反应器²⁶能够以 $3\text{kW}/\text{m}^3$ 的传质功率提供这种设计约束条件。因此,在典型的发酵过程中,350m³的典型反应器将消耗1000kW的功率或160,000kWh。这种要求相当于超过\$15,000的能源成本(\$0.10/kWh),其占在典型的350,000L发酵罐中100g/L、\$2/kg的最终产物成本的20%(显著大的一部分)。因此,通过基因工程改造来优化工艺条件的重要性对其财务可行性是重要的。需要对氧传递和乙醇酸盐滴度进行更详细研究的进一步工作预期更准确地确定最佳条件。

[0194] 进一步的计算建模允许我们推断出代谢中关键分支点的比率,并且鉴定乙醛酸盐聚醛酶为同化乙二醇的中央途径,其中苹果酸盐合酶在其同化中的作用相对小。此模型的结果还显示,细胞生长的NADPH氧化还原要求中的许多出人意料地通过戊糖磷酸盐途径获得并且相对很少从补缺NADP依赖性苹果酸酶中获得,如最初可预期的。还观察到在微好氧乙醇酸盐生产阶段期间的发酵培养基中有少量乙酸盐和痕量乙醇。FBA建模结果预测了在微有氧条件下的乙醇生产,但在没有足够约束条件的情况下无法预测乙酸盐的生产。对在发酵培养基中乙酸盐和乙醇(厌氧生长的典型产物)的观察表明,微有氧条件可以允许乙二醇作为用于生产其他厌氧产物的合适原料,尽管它需要氧气。最后,通过扩展来自通量平衡分析的观察结果,可以使用过程质谱以实时测量呼吸商并且通过使用简单的模型,并且显示其作为在发酵的过程中控制乙醇酸生产的参数的适用性。在可以有效控制氧传质速率的前提下,这可能为使用乙二醇作为原料生产各种产物开启新的机会。

[0195] 本文描述的结果为未来使用乙二醇作为底物在大肠杆菌中生产化学物建立了框架。本文首次描述了从乙二醇成功生产乙醇酸,其中使用所述底物作为生长和生产的原料。例如,对于将生物精炼整合到其中可从点源中捕获二氧化碳的工业中,基于乙二醇作为原料的生物工艺在未来可能具有重要的启示和应用。

[0196] 迄今为止开发的用于将乙二醇转化为乙醇酸的先前方法的中心缺陷是生产方法依赖于生物转化,所述生物转化需要将经基因修饰的微生物分离并且重悬于磷酸盐缓冲的培养基或蒸馏水中。这给商业应用带来了问题,因为分离生物质并且将其悬浮于新鲜培养基中是昂贵的。因此,希望开发一种用于在单个发酵容器中生产乙醇酸的方法。

[0197] 尽管通过迄今为止开发的先前方法进行的乙醇酸生产依赖于在不允许细胞生长的营养物质或基因的情况下转化乙二醇,但是在本文中针对生产乙醇酸而公开的新知识是:不必通过乙醇酸盐氧化酶(glcDEF)的失活或通过缺乏以下中的一种或多种的培养基的使用来限制细胞生长:用于生长的碳源、用于生长的氮源、用于生长的磷酸盐源、用于生长的硫源、生长所需的痕量金属或维生素。此外,考虑到氧气对于生长和乙醇酸盐生产都是必需的,过去还没有显示甚至小数量的氧气的存在是否会允许乙醇酸的生产,因为碳可能转向生物质。出于这个原因,文献没有指示可以在微有氧环境下并且在使用起作用的乙醇酸盐氧化酶的情况下以按重量计大于80%的产率生产乙醇酸。更进一步地,公开了当细胞的摄氧速率小于 $6\text{mmol}/\text{gDW}/\text{h}$ 时,相对于所消耗的乙二醇,发酵培养基能够累积按重量计至

少80%的乙醇酸。此外,先前公开的使用大肠杆菌菌株生产乙醇酸的方法使用了野生型乳酸还原酶,而我们使用耐氧性酶,显示出其活性在氧气的存在下的抑制性,并且耐氧性醇还原酶的使用是乙醇酸生产微生物的新颖实施方案。

[0198] 还应注意,可以从本文描述的信息适配地使用各种替代方法。例如,在一些情况下可以使用除乙二醇以外的其他底物作为碳源,特别是与乙二醇相似的那些,诸如其中利用相应代谢途径的其他二醇或多元醇;可以使用除大肠杆菌以外的其他微生物,并且可以与本文描述类似的方式对其进行基因工程改造,并且可以在优化操作条件(诸如pH、温度等)方面适配使用此类微生物的工艺;除本文描述的基因修饰之外,还可以进行其他基因修饰;并且可以使用其他工艺操作条件,取决于各种因素(例如,可以使用除6mmol/gDW/h以外的其他摄氧速率阈值来定义生长和生产的两个过程阶段;和/或在这两个阶段中在细胞生长与乙醇酸盐生产方面底物(例如,乙二醇)的消耗比率;和/或与这两个阶段有关的其他特性,以及在生长和生产的两个阶段之前或之后另外阶段的可能性)。另外,可以使用本文描述的方法的一些方面来生产其他产物,诸如类似于乙醇酸盐的那些,或可包含乙醇酸盐的产物的混合物,取决于各种因素。

[0199] 参考文献

[0200] 1.Erickson,B.,Nelson&Winters,P.Perspective on opportunities in industrial biotechnology in renewable chemicals.Biotechnol.J.7,176-185(2012) .

[0201] 2.Jiang,Z.,Xiao,T.,Kuznetsov,V.L.&Edwards,P.P.Turning carbon dioxide into fuel.Philos.Trans.A.Math.Phys.Eng.Sci.368,3343-3364(2010) .

[0202] 3.Liao,J.C.,Mi,L.,Pontrelli,S.&Luo,S.Fuelling the future:microbial engineering for the production of sustainable biofuels.Nat.Rev.Microbiol.14, 288-304(2016) .

[0203] 4.Siegel,J.B.et al.Computational protein design enables a novel one-carbon assimilation pathway.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.112,3704-9(2015) .

[0204] 5.Bar-Even,A.,Noor,E.,Flamholz,A.&Milo,R.Design and analysis of metabolic pathways supporting formatotrophic growth for electricity-dependent cultivation of microbes.Biochim.Biophys.Acta-Bioenerg.1827,1039-1047(2013) .

[0205] 6.Kuhl,K.P.,Cave,E.R.,Abram,D.N.&Jaramillo,T.F.New insights into the electrochemical reduction of carbon dioxide on metallic copper surfaces.Energy Environ.Sci.5,7050-7059(2012) .

[0206] 7.Straub,M.,Demler,M.,Weuster-Botz,D.&Dürre,P.Selective enhancement of autotrophic acetate production with genetically modified *Acetobacterium woodii*,J.Biotechnol.178,67-72(2014) .

[0207] 8.Shen,C.R.&Liao,J.C.Synergy as design principle for metabolic engineering of l-propanol production in *Escherichia coli*.Metab.Eng.17,12-22(2013) .

[0208] 9.Pirkov,I.,Albers,E.,Norbeck,J.&Larsson,C.Ethylene production by metabolic engineering of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.Metab.Eng.10,276-280(2008) .

- [0209] 10.Kortlever,R.,Shen,J.,Schouten,K.J.P.,Calle-Vallejo,F.&Koper,M.T.M.Catalysts and Reaction Pathways for the Electrochemical Reduction of Carbon Dioxide.J.Phys.Chem.Lett.6,4073-4082 (2015) .
- [0210] 11.Yang,N.,Waldvogel,S.R.&Jiang,X.Electrochemistry of Carbon Dioxide on Carbon Electrodes.ACS Appl.Mater.Interfaces 8,28357-28371 (2016) .
- [0211] 12.Peterson,A.A.,Abild-Pedersen,F.,Studt,F.,Rossmeisl,J.&Norskov,J.K.How copper catalyzes the electroreduction of carbon dioxide into hydrocarbon fuels.Energy Environ Sci.3,1311 (2010) .
- [0212] 13.Malik,K.,Singh,S.,Basu,S.&Verma,A.Electrochemical reduction of CO₂ for synthesis of green fuel.Wiley Interdiscip.Rev.Energy Environ.e244 (2017) .doi:10.1002/wene.244
- [0213] 14.Smanski,M.J.et al.Functional optimization of gene clusters by combinatorial design and assembly.Nat.Biotechnol.32,1241-1249 (2014) .
- [0214] 15.Koivistoinen,O.M.et al.Glycolic acid production in the engineered yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces lactis*.Microb.Cell Fact.12, 82 (2013) .
- [0215] 16.Zahoor,A.,Otten,A.&Wendisch,V.F.Metabolic engineering of *Corynebacterium glutamicum* for glycolate production.J.Biotechnol.192,366-375 (2014) .
- [0216] 17.Adh,N.et al.Efficient utilization of pentoses for bioproduction of the renewable two-carbon compounds ethylene glycol and glycolate.Nucleic Acids Res.7,80-87 (2013) .
- [0217] 18.Cain,Y.et al.Engineehng of a Synthetic Metabolic Pathway for the Assimilation of (d)-Xylose into Value-Added Chemicals.ACS Synth.Biol.5,607-618 (2016) .
- [0218] 19.Alkim,C.et al.The synthetic xylulose-1 phosphate pathway increases production of glycolic acid from xylose-rich sugar mixtures.Biotechnol.Biofuels9,201 (2016) .
- [0219] 20.Deng,Y.,Mao,Y.&Zhang,X.Metabolic engineering of *E coli* for efficient production of glycolic acid from glucose.Biochem.Eng.J.103,256-262 (2015) .
- [0220] 21.Kataoka,M.,Sasaki,M.,Hidalgo,A.G.D.&Nakano,M.Glycolic Acid Production Using Ethylene Glycol-Oxidizing Microorganisms.8451,37-41 (2014) .
- [0221] 22.Gao,X.,Ma,Z.,Yang,L.&Ma,J.Enhanced Bioconversion of Ethylene Glycol to Glycolic Acid by a Newly Isolated *Burkholderia* sp.EG13.Appl.Biochem.Biotechnol.174,1572-1580 (2014) .
- [0222] 23.Wei,G.et al.High cell density fermentation of *Gluconobacter oxydans* DSM 2003 for glycolic acid production.J.Ind.Microbiol.Biotechnol.36, 1029-1034 (2009) .

- [0223] 24.Gibson,D.G.et al.Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases.Nat.Methods 6,343-345(2009) .
- [0224] 25.Toraya,T.,Honda,S.&Fukui,S.Fermentation of 1,2-propanediol with 1, 2-ethanediol by some genera of Enterobacteriaceae,involving coenzyme B12-dependent diol dehydrtase.J.Bacteriol.139,39-47(1979) .
- [0225] 26.Child,J.&Willetts,A.Microbial metabolism of aliphatic glycols bacterial metabolism of ethylene glycol.BBA-Gen.Subj.538,316-327(1978) .
- [0226] 27.Hartmanis,M.G.&Stadtman,T.C.Diols metabolism and diol dehydratase in Clostridium glycolicum.Arch.Biochem.Biophys.245,144-152(1986) .
- [0227] 28.Mückschel,B.et al.Ethylene glycol metabolism by Pseudomonas putida.Appl.Environ.Microbiol.78,8531-8539(2012) .
- [0228] 29.Boronat,A.,Caballero,E.&Aguilar,J.Experimental evolution of a metabolic pathway for ethylene glycol utilization by Escherichia coli.J.Bacteriol.153,134-139(1983) .
- [0229] 30.Lu,Z.et al.Evolution of an Escherichia coli Protein with Increased Resistance to Oxidative Stress *.273,8308-8316(1998) .
- [0230] 31.Tamura,J.et al.Electrochemical reduction of CO₂ to ethylene glycol on imidazolium ion-terminated self-assembly monolayer-modified Au electrodes in an aqueous solution.Phys.Chem.Chem.Phys.17,26072-26078(2015) .
- [0231] 32.Method for producing high amount of glycolic acid by fermentation.US 20120315682 A1
- [0232] 33.Eukaryotic cell and method for producing glycolic acid.US 20140295510 A1
- [0233] 34.Process for producing hydroxycarboxylic acid.US 8728780 B2
- [0234] 35.Glycolic Acid Production By Fermentation From Renewable Resources.WO 2007/141316 A2
- [0235] 36.Direct conversion of sugars to glycolic acid.WO 2016193540 A1
- [0236] 37.Microbial Preparation Of Glycolic Acid.JPS54119089 (A)
- [0237] 38.Production Of Glycolic Acid By Microorganism.JPH10174594 (A)
- [0238] 39.Production Of Glycolic Acid By Yeast.JPH10174593 (A)
- [0239] 40.Production of polyhydroxyalkanoates from polyols.US 20020164729 A1.
- [0240] 41.Fermentation process for producing glycolic acid.US 20120178136 A1
- [0241] 42.Levin et al.,“The ternary complex of Pseudomonas aeruginosa alcohol dehydrogenase with NADH and ethylene glycol”.Protein Science(2004),13 (6):1547-1556.
- [0242] 43.Isobe,“Oxidation of Ethylene Glycol and Glycolic Acid by Glycerol Oxidase”.Bioscience,Biotechnology.and Biochemistry(1995),59(4):576-81.
- [0243] 44.Isobe and Nishiseb,“A new enzymatic method for glycolaldehyde

production from ethylene glycol”.Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic. (1995),1(1):37-43.

[0244] 44.Muckschel et al.,“Ethylene Glycol Metabolism by *Pseudomonas putida*”Appl.Environ.Microbiol.(2012),78(24):8531-8539.

[0245] 45.Brouns et al.,“Identification of the Missing Links in Prokaryotic Pentose Oxidation Pathways”.The Journal of Biological Chemistry(2006),281(37):27378-27388.

[0246] 46.Klein et al.,“A novel dye-linked formaldehyde dehydrogenase with some properties indicating the presence of a protein-bound redox-active quinone cofactor”.Biochem.J.(1994)301,289-295.

[0247] 47.Zhang et al.,“Enhancement of cell growth and glycolic acid production by overexpression of membrane-bound alcohol dehydrogenase in *Gluconobacter oxydans* DSM 2003”.Journal of Biotechnology.(2016),237(10):18-24.

[0248] 48.Gaston and Stadtman,“Fermentation of ethylene glycol by *Clostridium glycolicum*,sp.N”.J Bacteriol.(1963),85:356-62.

[0249] 49.Kishi et al.,“Heterotrophic utilization of ethylene glycol and propylene glycol by *Chlorella protothecoides*”.Algal Research(2015),11:428-434.

[0250] 50.Kataoka et al.,“Glycolic acid production using ethylene glycol-oxidizing microorganisms”.Biosci.Biotechnol.Biochem.(2001),65:2265-2270.

[0251] 将本文件中提及的参考文献特此通过引用并入本文。

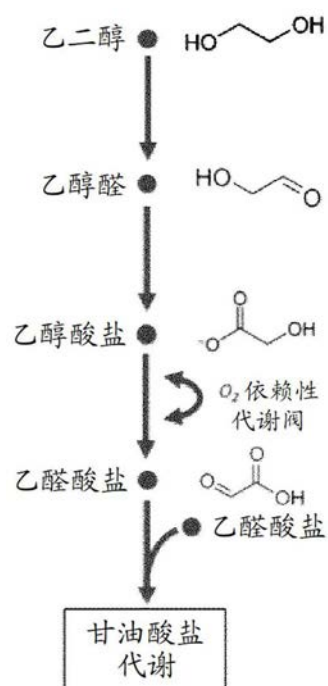


图1A

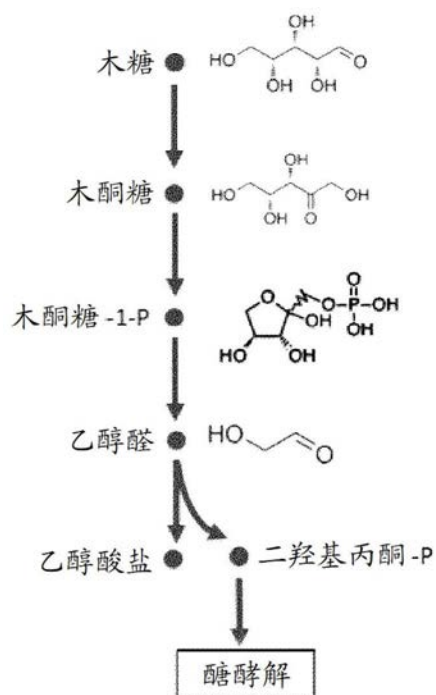


图1B

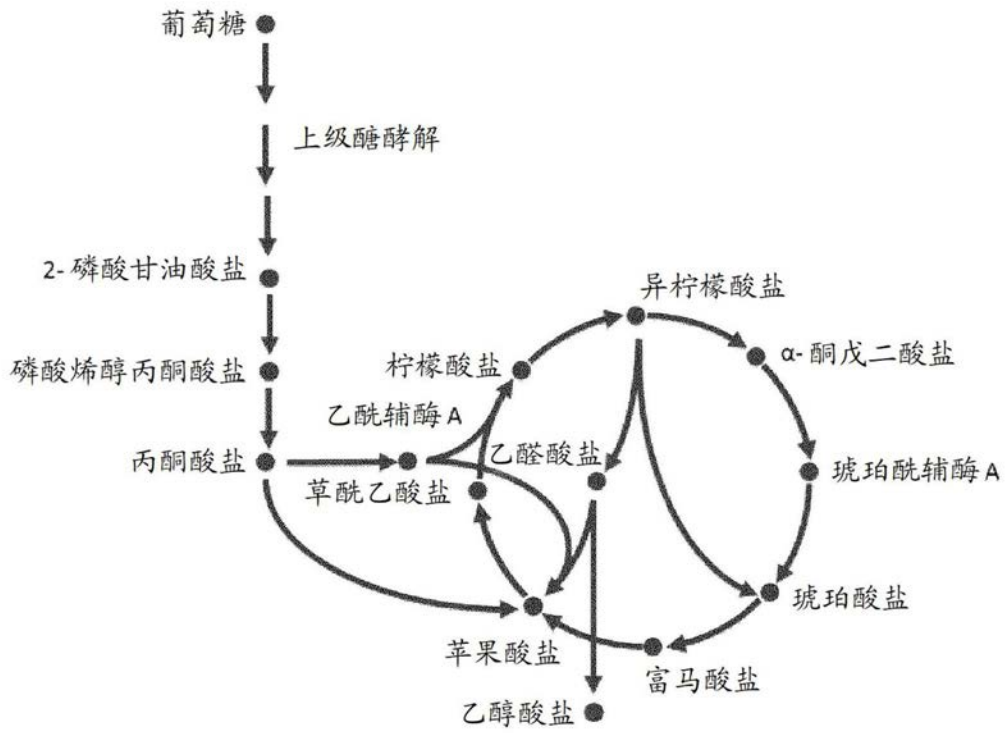


图1C

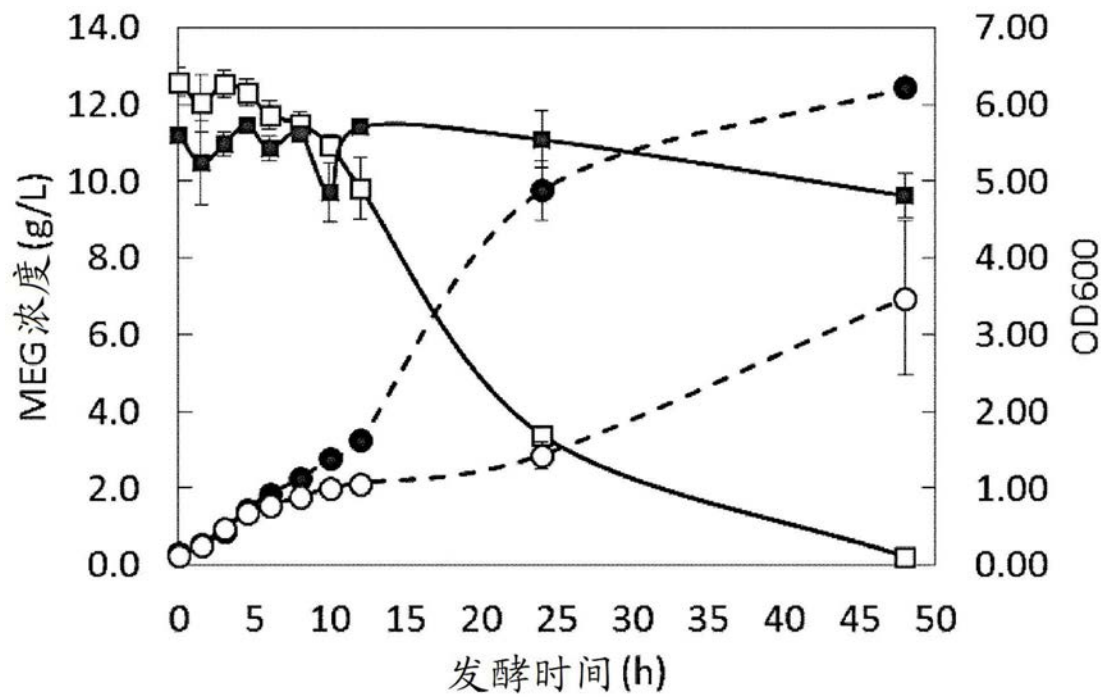


图2

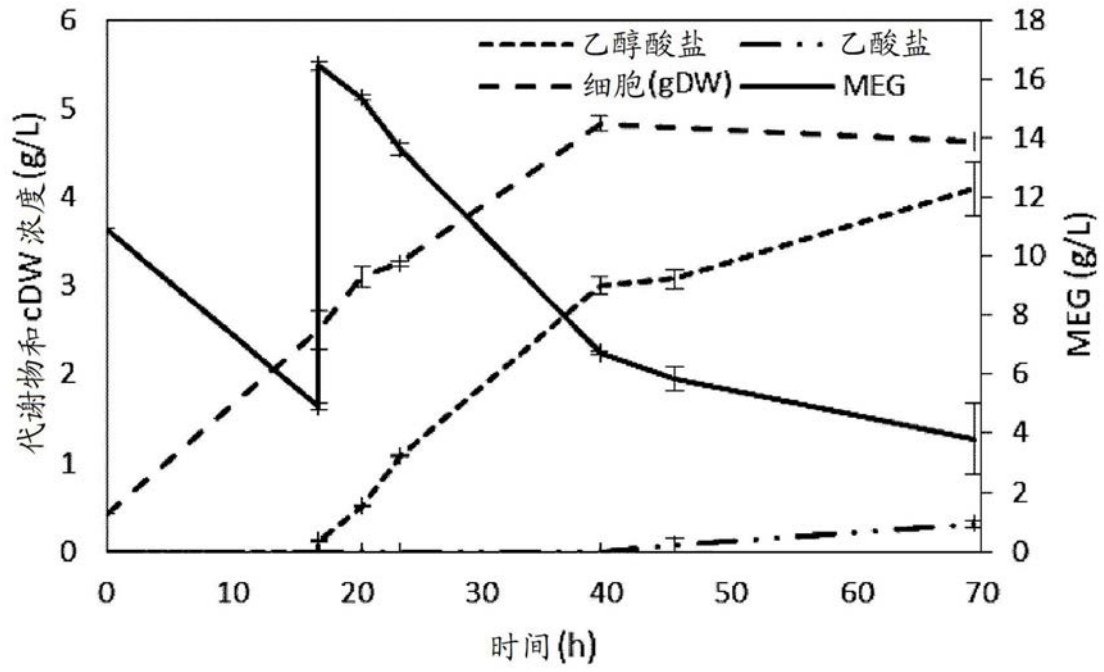


图3A

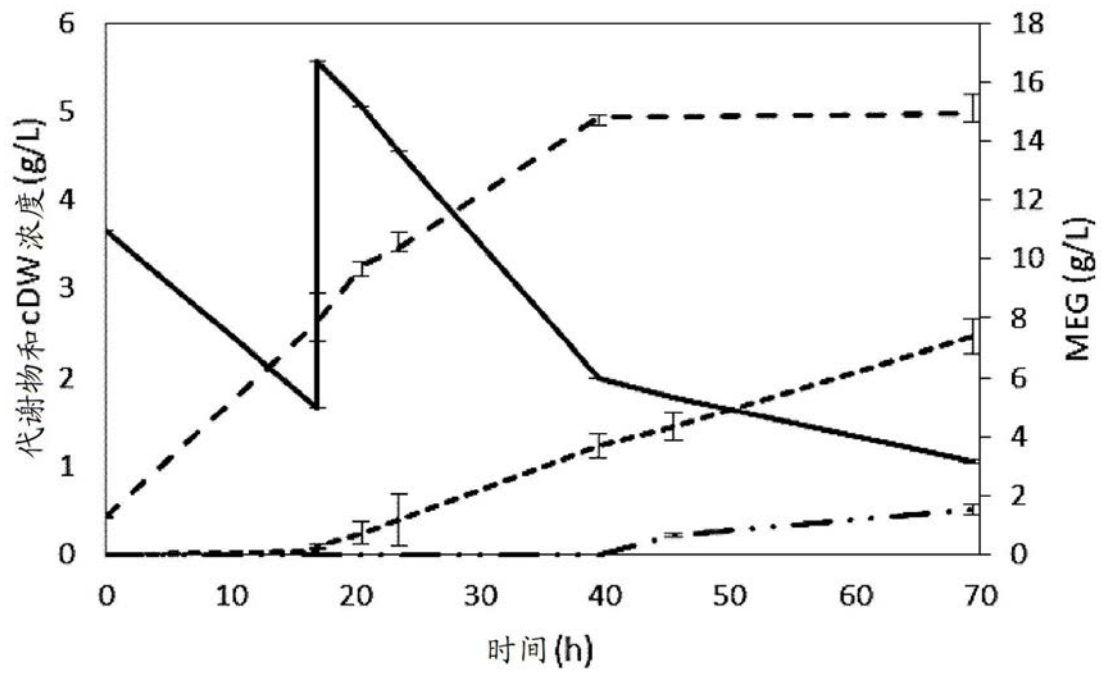


图3B

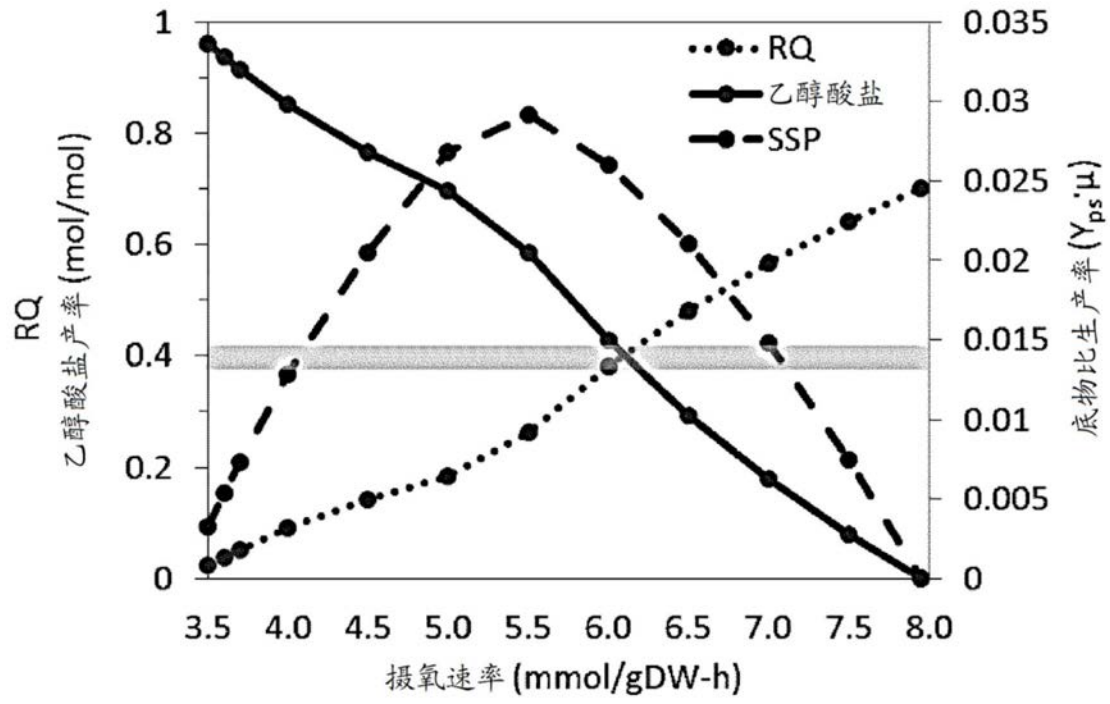


图4

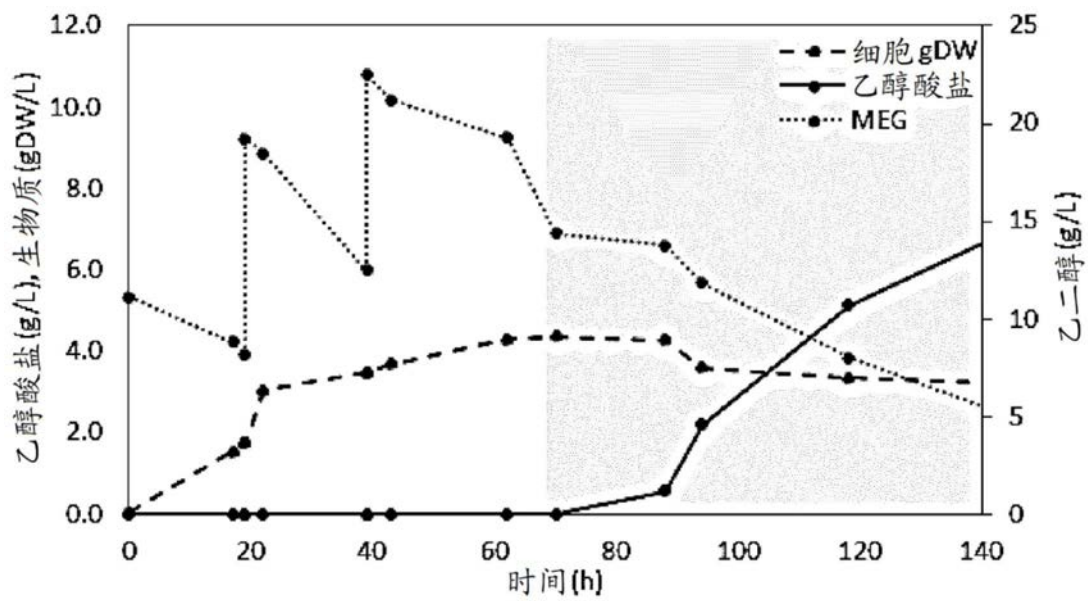


图5A

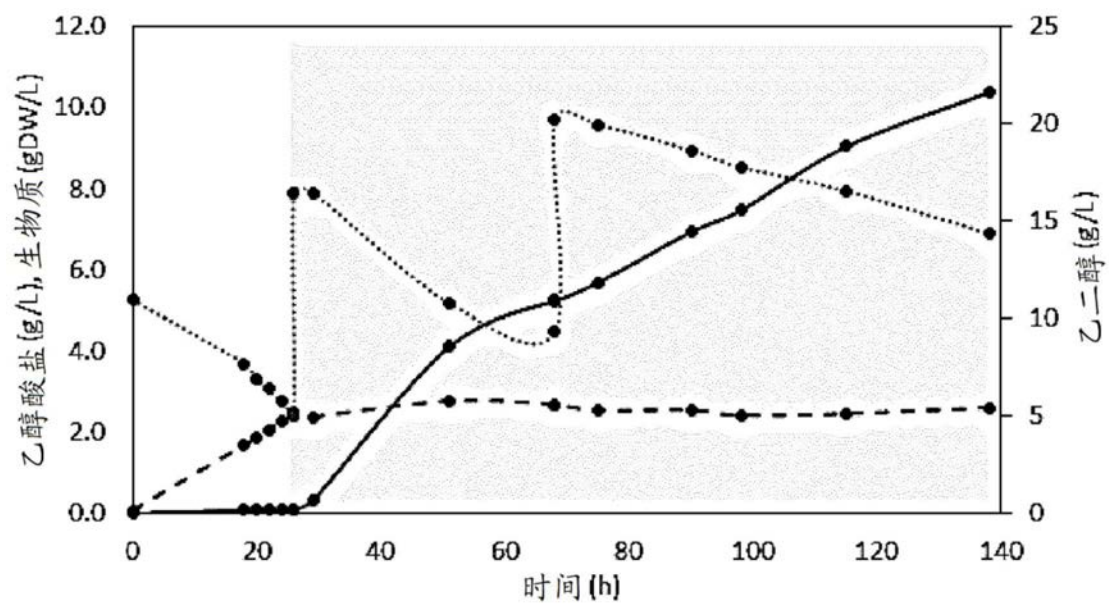


图5B

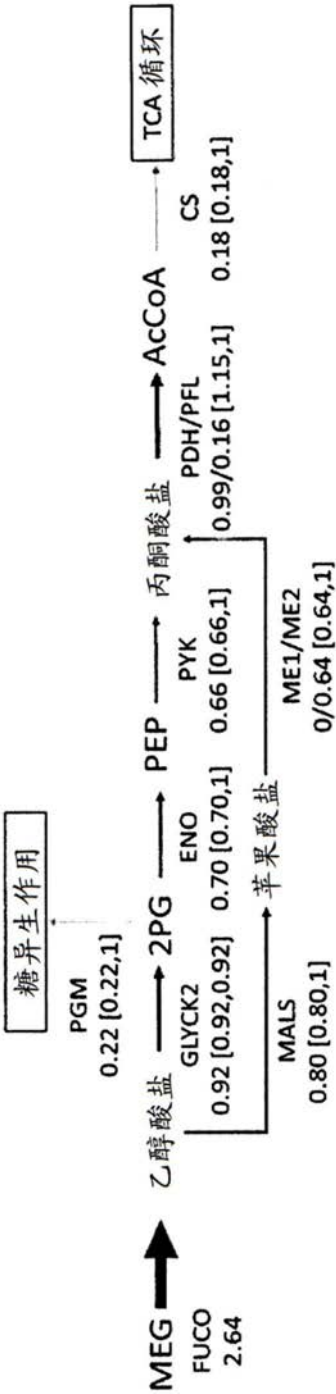


图6A

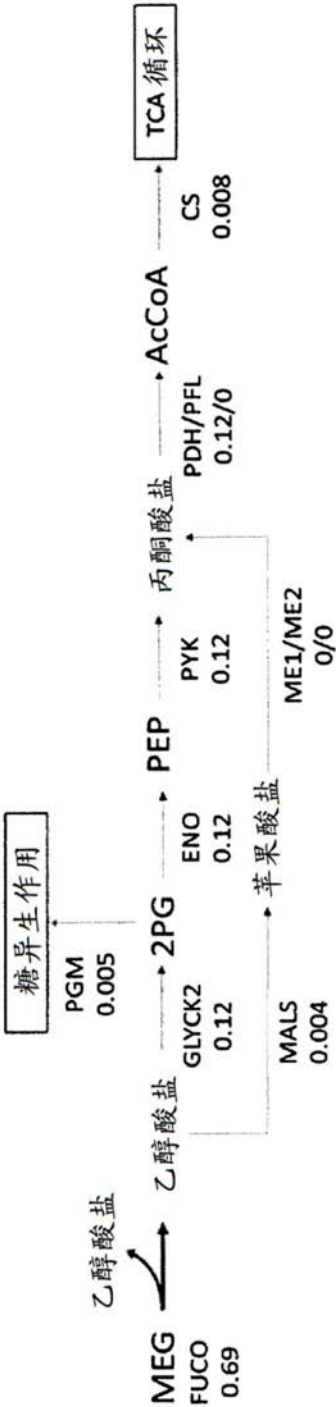


图6B

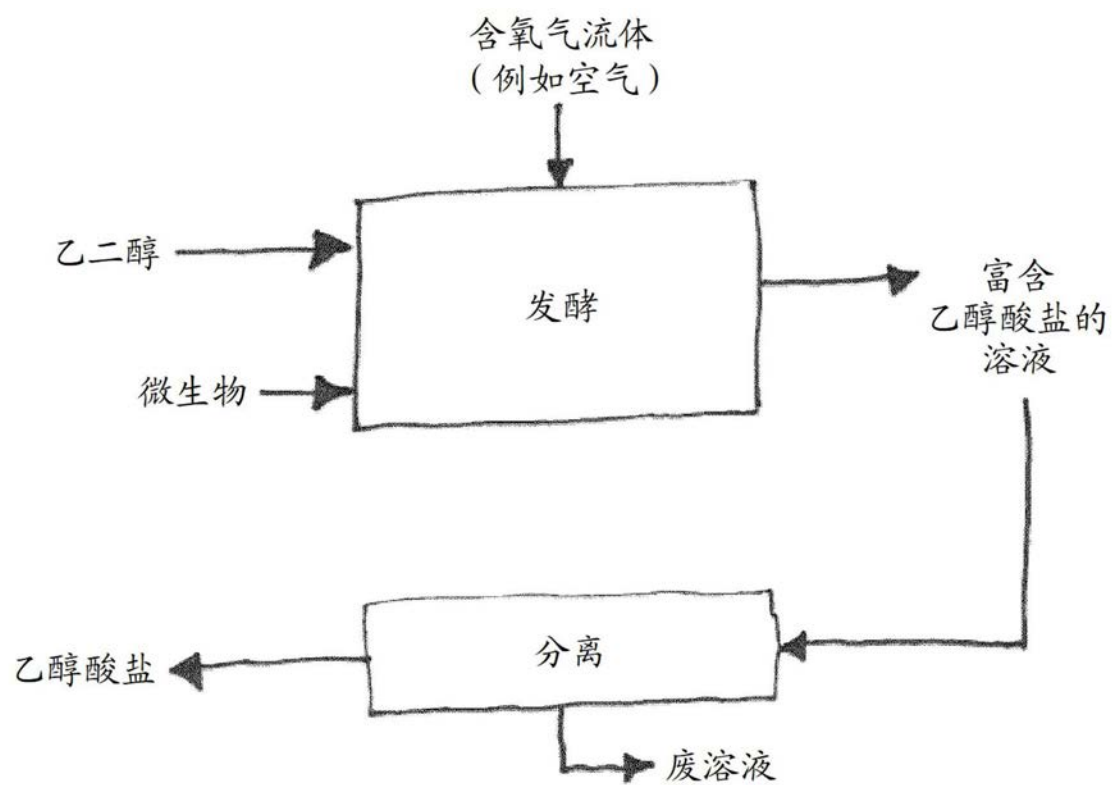


图7

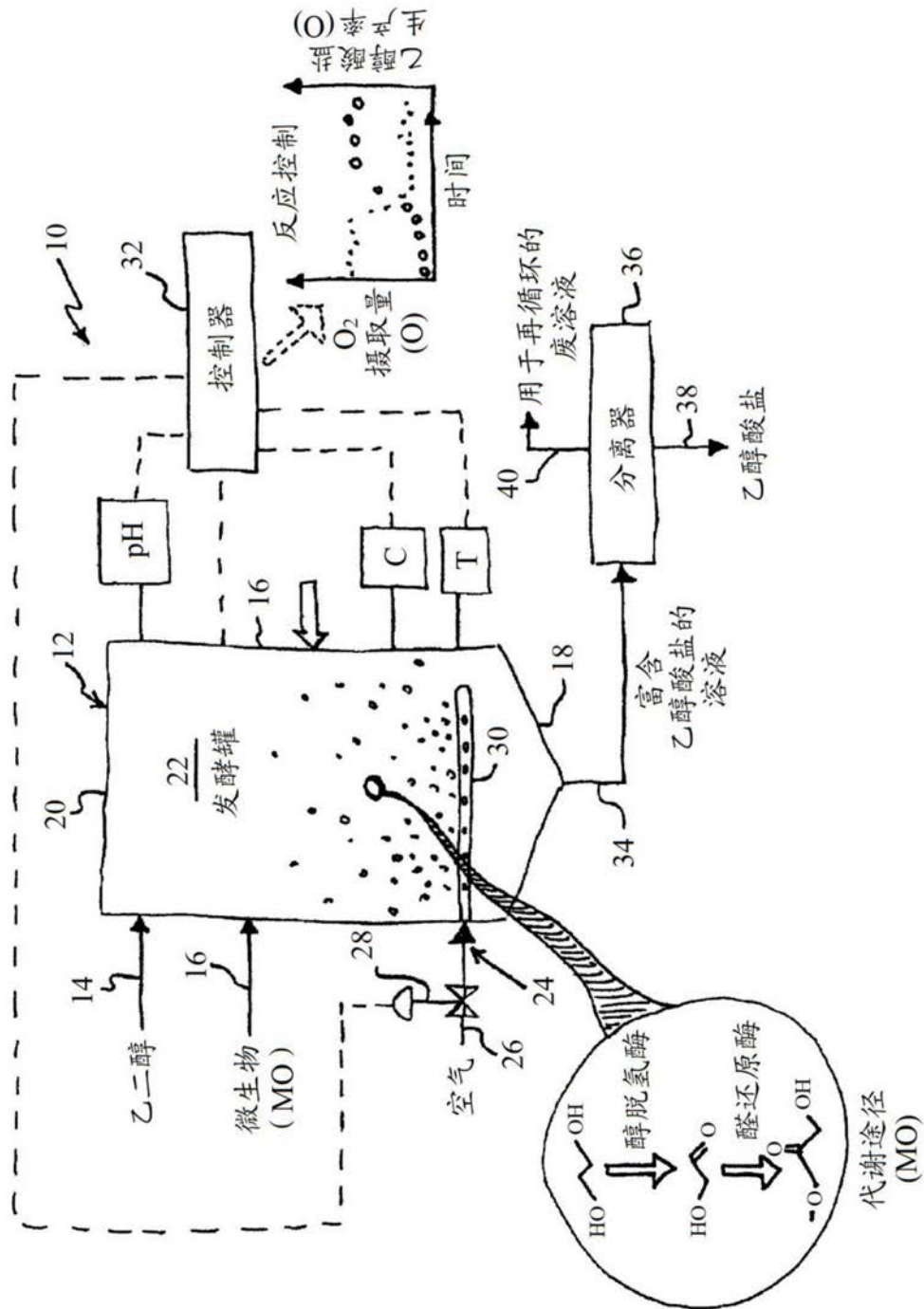


图8

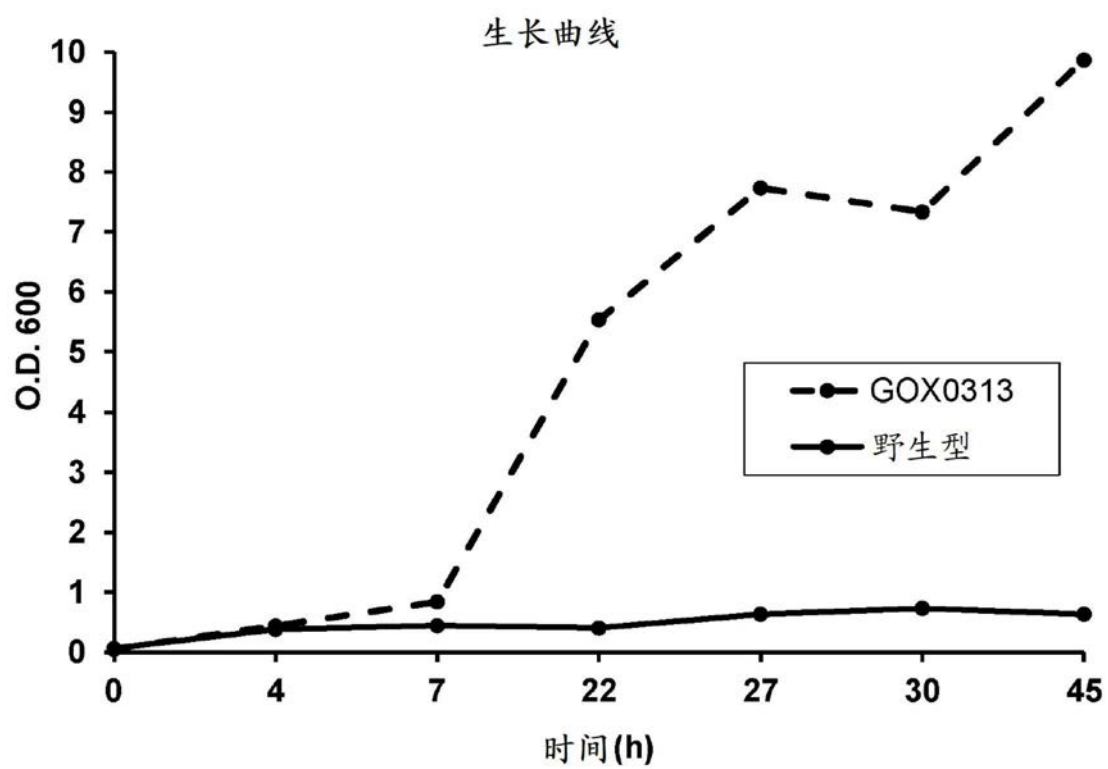


图9