



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103459602 B

(45) 授权公告日 2016. 08. 10

(21) 申请号 201280016837. 4

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2012. 02. 02

C12P 5/02(2006. 01)

(30) 优先权数据

61/438, 947 2011. 02. 02 US

(56) 对比文件

CN 103080324 A, 2013. 05. 01,

WO 2010006076 A2, 2010. 01. 14,

US 2010330635 A1, 2010. 12. 30,

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2013. 09. 30

审查员 冯晓亮

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/023632 2012. 02. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02012/106516 EN 2012. 08. 09

(73) 专利权人 基因组股份公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 M·J·伯克 A·P·博加德 孙军

罗宾·E·奥斯特豪特

普里蒂·法克雅

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 高瑜 杨淑媛

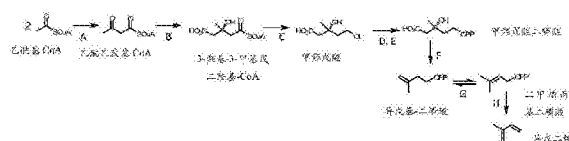
权利要求书2页 说明书73页 附图4页

(54) 发明名称

用于丁二烯生物合成的微生物和方法

(57) 摘要

本发明提供了具有丁二烯途径的非天然存在的微生物。本发明还提供使用这种生物来生产丁二烯的方法。在一些方面,本文中披露的实施方式涉及用于生产丁二烯的方法,包括(a)在足够量的营养物质和培养基中通过发酵培养产生巴豆醇的非天然存在的微生物;以及(b)将通过培养该非天然存在的微生物所产生的巴豆醇转化为丁二烯。



1. 一种用于生产丁二烯的方法：

(a) 在足够量的营养物质和培养基中通过发酵培养产生巴豆醇的非天然存在的微生物，从而生物合成地产生巴豆醇，其中，所述微生物包含巴豆醇途径，其中所述巴豆醇途径包括至少两种外源性核酸，其中所述至少两种外源性核酸编码巴豆醇途径酶，其中所述巴豆醇途径酶以足以产生巴豆醇的量表达，其中所述巴豆醇途径包括利用所述两种外源性核酸中的至少一种外源性核酸将巴豆酰基-CoA 转化为巴豆醇，其中所述巴豆醇途径酶选自自由以下的酶组成的组：

(i) 巴豆酰基-CoA 还原酶，醛形成；和巴豆醛还原酶，醇形成；

(ii) 巴豆酰基-CoA 还原酶，醇形成；和

(iii) 巴豆酰基-CoA 水解酶、合成酶或者转移酶；巴豆酸酯还原酶；和巴豆醛还原酶，醇形成；并且

其中所述巴豆醇途径进一步包括所述两种外源性核酸中的至少一种外源性核酸，其编码用于以下转化的巴豆醇途径酶：

(i) 利用乙酰基-CoA：乙酰基-CoA 酰基转移酶；乙酰乙酰基-CoA 还原酶和 3-羟基丁酰基-CoA 脱水酶将乙酰基-CoA 转化为巴豆酰基-CoA；

(ii) 利用戊烯二酰基-CoA 脱羧酶将戊烯二酰基-CoA 转化为巴豆酰基-CoA；

(iii) 利用戊二酰基-CoA 脱氢酶将戊二酰基-CoA 转化为巴豆酰基-CoA；

(iv) 利用 3-氨基丁酰基-CoA 脱氨酶将 3-氨基丁酰基-CoA 转化为巴豆酰基-CoA；或

(v) 利用 4-羟基丁酰基-CoA 脱水酶将 4-羟基丁酰基-CoA 转化为巴豆酰基-CoA；以及

(b) 将通过培养所述非天然存在的微生物所产生的巴豆醇化学脱水为丁二烯。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，步骤 (b) 在化学催化剂的存在下通过化学脱水执行。

3. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述微生物包含两种、三种、四种、五种或六种外源性核酸，每种均编码巴豆醇途径酶。

4. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述巴豆醇途径包括乙酰基-CoA：乙酰基-CoA 酰基转移酶；乙酰乙酰基-CoA 还原酶；3-羟基丁酰基-CoA 脱水酶；巴豆酰基-CoA 还原酶，醛形成；和巴豆醛还原酶，醇形成。

5. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述巴豆醇途径包括乙酰基-CoA：乙酰基-CoA 酰基转移酶；乙酰乙酰基-CoA 还原酶；3-羟基丁酰基-CoA 脱水酶；和巴豆酰基-CoA 还原酶，醇形成。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述巴豆醇途径包括乙酰基-CoA：乙酰基-CoA 酰基转移酶；乙酰乙酰基-CoA 还原酶；3-羟基丁酰基-CoA 脱水酶；巴豆醛还原酶，醇形成；巴豆酰基-CoA 水解酶、合成酶或者转移酶；以及巴豆酸酯还原酶。

7. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述巴豆醇途径包括戊烯二酰基-CoA 脱羧酶；巴豆酰基-CoA 还原酶，醛形成；和巴豆醛还原酶，醇形成。

8. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述巴豆醇途径包括戊烯二酰基-CoA 脱羧酶和巴豆酰基-CoA 还原酶，醇形成。

9. 根据权利要求 1 所述的方法，其中，所述巴豆醇途径包括戊烯二酰基-CoA 脱羧酶；巴豆醛还原酶，醇形成；巴豆酰基-CoA 水解酶、合成酶或者转移酶；以及巴豆酸酯还原酶。

10. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述巴豆醇途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶、巴豆酰基-CoA还原酶, 醛形成和巴豆醛还原酶, 醇形成。

11. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述巴豆醇途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶和巴豆酰基-CoA还原酶, 醇形成。

12. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述巴豆醇途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶; 巴豆醛还原酶, 醇形成; 巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶以及巴豆酸酯还原酶。

13. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述巴豆醇途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氢酶; 巴豆酰基-CoA还原酶, 醛形成; 和巴豆醛还原酶, 醇形成。

14. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述巴豆醇途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氢酶和巴豆酰基-CoA还原酶, 醇形成。

15. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述巴豆醇途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氢酶; 巴豆醛还原酶, 醇形成; 巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶以及巴豆酸酯还原酶。

16. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述巴豆醇途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶; 巴豆酰基-CoA还原酶, 醛形成; 和巴豆醛还原酶, 醇形成。

17. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述巴豆醇途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶和巴豆酰基-CoA还原酶, 醇形成。

18. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 所述巴豆醇途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶; 巴豆醛还原酶, 醇形成; 巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶以及巴豆酸酯还原酶。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的方法, 其中, 所述至少一种外源性核酸是异源性核酸。

20. 根据权利要求1-18中任一项所述的方法, 其中, 所述非天然存在的微生物在基本上厌氧的培养基中。

21. 根据权利要求2所述的方法, 其中, 所述化学催化剂为二氧化硅催化剂。

22. 根据权利要求2所述的方法, 其中, 所述化学催化剂为金属氧化物催化剂。

23. 根据权利要求2所述的方法, 其中, 所述化学催化剂选自由钼酸铋、磷酸盐-磷酸、二氧化铈、高岭土-氧化铁、高岭土-磷酸、二氧化硅-氧化铝以及氧化铝组成的组。

24. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(b)是在脱水剂的存在下通过化学脱水执行的。

25. 根据权利要求24所述的方法, 其中, 所述脱水剂活化巴豆醇的醇基以用于脱水。

26. 根据权利要求25所述的方法, 其中, 所述活化是以选自由磺酰基、磷酸盐、磷酸酯、磺酸盐和磺酸酯组成的组中的活化基团的方式进行的。

27. 根据权利要求26所述的方法, 其中, 所述磺酸酯选自由甲苯磺酸酯、甲磺酸酯、间硝基苯磺酸酯、对溴苯磺酸酯和三氟甲磺酸酯组成的组。

28. 根据权利要求25-27中任一项所述的方法, 其中, 所述活化包括使巴豆醇的醇基转化为卤素。

29. 根据权利要求28所述的方法, 其中, 所述卤素选自由碘、氯和溴组成的组。

30. 根据权利要求1所述的方法, 其中, 步骤(b)是通过热脱水执行的。

用于丁二烯生物合成的微生物和方法

[0001] 本申请要求2011年2月2日提交的序列号为61/438,947的美国临时申请的优先权权益,该美国临时申请的全部内容以引用方式并入本文。

[0002] 发明背景

[0003] 本发明一般地涉及生物合成过程,更具体地涉及具有丁二烯生物合成能力的生物。

[0004] 每年都有超过250亿磅的丁二烯(1,3-丁二烯,BD)生产出来并应用于聚合物(例如合成橡胶和ABS树脂)和化学品(例如己撑二胺和1,4-丁二醇)的制造中。丁二烯通常作为水蒸汽裂解过程的副产物而产生,所述水蒸汽裂解过程用于将石油原料(例如石脑油、液化的石油气体、乙烷或者天然气)转化为乙烯及其他烯烃类。在追求更加可持续的化学品生产工艺过程中,从替代和/或可再生原料制造丁二烯的能力将是一个重大的进步。

[0005] 可再生地生产丁二烯的一种可能方式涉及糖或其它原料的发酵,以产生二醇,如1,4-丁二醇或1,3-丁二醇,所述二醇在涉及基于金属的催化作用的第二步骤被分离、纯化,然后脱水形成丁二烯。从可再生原料直接发酵生产丁二烯便无须脱水步骤以及丁二烯气体(沸点-4.4℃)将连续地从发酵罐中射出并易于冷凝和收集。开发发酵生产工艺将消除对基于化石的丁二烯的需要,以及将允许大量节省成本和能源并减少有害废物和排放,与石化衍生的丁二烯形成对照。

[0006] 本文描述了用于有效地从衍生自生物质(包括农业和木材废料)的廉价的可再生原料(如糖蜜、甘蔗汁和糖)以及C1原料(如合成气和二氧化碳)生产丁二烯的微生物和方法,所述微生物和方法包括相关的优点。

[0007] 发明概述

[0008] 本发明提供包含丁二烯途径的非天然存在的微生物,其包括编码丁二烯途径酶的以足以生产丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸。此外,本发明提供通过在各种条件下以及在足以生产丁二烯这么长的时间内培养如本文所述的包含丁二烯途径的非天然存在的微生物,利用这类微生物生产丁二烯的方法。

[0009] 在一些方面,本文所披露的实施方式涉及一种用于生产丁二烯的方法,该方法包括(a)在足够量的营养物质和培养基中通过发酵培养产生巴豆醇的非天然存在的微生物;以及(b)将通过培养该非天然存在的微生物所产生的巴豆醇转化为丁二烯。

附图说明

[0010] 图1显示出通往异戊间二烯化合物和萜烯的天然途径。用于将确认的底物转化为产品的酶包括:A.乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、B.羟甲基戊二酰基-CoA合酶、C.3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA还原酶(醇形成)、D.甲羟戊酸激酶、E.磷酸甲羟戊酸激酶、F.二磷酸甲羟戊酸脱羧酶、G.异戊基-二磷酸异构酶、H.异戊二烯合酶。

[0011] 图2显示出经由巴豆醇从乙酰基-CoA、戊烯二酰基-CoA、戊二酰基-CoA、3-氨基丁酰基-CoA或者4-羟基丁酰基-CoA生产丁二烯的示例性途径。用于将确认的底物转化为产品的酶包括:A.乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶;B.乙酰乙酰基-CoA还原酶;C.3-羟基丁

酰基-CoA脱水酶;D.巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成);E.巴豆醛还原酶(醇形成);F.巴豆醇激酶;G.2-丁烯基-4-磷酸激酶;H.丁二烯合酶;I.巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶、转移酶;J.巴豆酸酯还原酶;K.巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成);L.戊烯二酰基-CoA脱羧酶;M.,戊二酰基-CoA脱氢酶;N.3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶;O.4-羟基丁酰基-CoA脱水酶;P.巴豆醇二磷酸激酶。通向丁二烯的化学途径利用脱水过程。

[0012] 图3显示出从赤藓糖-4-磷酸生产丁二烯的示例性途径。用于将确认的底物转化为产品的酶包括:A.赤藓糖-4-磷酸还原酶、B.赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶、C.4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶、D.赤藓醇2,4-环二磷酸合酶、E.1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶、F.1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶、G.丁烯基4-二磷酸异构酶、H.丁二烯合酶、I.赤藓糖-4-磷酸激酶、J.赤藓糖还原酶、K.赤藓醇激酶。

[0013] 图4显示出从丙二酰基-CoA和乙酰基-CoA生产丁二烯的示例性途径。用于将确认的底物转化为产品的酶包括:A.丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、B.3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(酮还原)、C.3-羟基戊二酰基-CoA还原酶(醛形成)、D.3-羟基-5-氧代戊酸还原酶、E.3,5-二羟基戊酸激酶、F.3H5PP激酶、G.3H5PDP脱羧酶、H.丁烯基4-二磷酸异构酶、I.丁二烯合酶、J.3-羟基戊二酰基-CoA还原酶(醇形成)、K.3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(醛形成)、L.3,5-二氧代戊酸还原酶(酮还原)、M.3,5-二氧代戊酸还原酶(醛还原)、N.5-羟基-3-氧代戊酸还原酶、O.3-氧代-戊二酰基-CoA还原酶(CoA还原和醇形成)。化合物缩写包括:3H5PP=3-羟基-5-磷酸氧基戊酸和3H5PDP=3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸。

[0014] 发明详述

[0015] 本发明旨在设计和生产具有丁二烯生物合成生产能力的细胞和生物。本发明具体地涉及通过引入一种或者多种的编码丁二烯途径酶的核酸设计能够生产丁二烯的微生物。

[0016] 在一个实施方式中,本发明利用大肠杆菌新陈代谢的硅内化学计量模型确认用于生物合成生产丁二烯的新陈代谢设计。本文所述的结果表明新陈代谢途径可以进行设计和重组工程以实现在大肠杆菌和其他细胞或者生物中丁二烯的生物合成。丁二烯的,例如针对硅内设计的,生物合成生产可以通过构建具有设计的新陈代谢基因型的菌株来证实。这些经过新陈代谢工程的细胞或者生物还可以经受适应性进化,以进一步增强丁二烯的生物合成,包括在接近理论最大增长量的条件下。

[0017] 在某些实施方式中,设计菌株的丁二烯生物合成特征使得他们具有基因稳定性以及在连续的生物工艺中极为有用。经确认,单独的菌株设计策略将不同的非原生或者异源性反应能力结合进入了大肠杆菌或者其他宿主生物,导致始自乙酰基-CoA、戊烯二酰基-CoA、戊二酰基-CoA、3-氨基丁酰基-CoA、4-羟基丁酰基-CoA、赤藓糖-4-磷酸;或者始自丙二酰基-CoA和乙酰基-CoA的丁二烯生产新陈代谢途径。经确认,硅内新陈代谢设计导致了微生物中从这些底物或者代谢中间体的每个到丁二烯的生物合成。

[0018] 经由平台的计算组件确认的菌株可以通过任何预测的新陈代谢改变的基因工程来投入实际生产,所述预测的新陈代谢改变导致丁二烯或者其他中间体和/或下游产品的生物合成生产。在仍然进一步的实施方式中,展示这些化合物的生物合成生产的菌株可以进一步经受适应性进化以进一步增强产品生物合成。适应性进化之后产品生物合成收率的水平也可以通过系统的计算组件来预测。

[0019] 从葡萄糖到丁二烯的最大理论收率是1.09mol/mol(0.33g/g)。

[0020] $11\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6=12\text{C}_4\text{H}_6+18\text{CO}_2+30\text{H}_2\text{O}$

[0021] 图2和图4所示的途径中,每摩尔所用的葡萄糖收获1.0摩尔的丁二烯。如果细胞能够通过途径(例如还原的(或者逆向的)TCA循环或者Wood-Ljungdahl途径)固定 CO_2 ,提高产品收率到理论最大值便是可能的。经过工程设计以具有图3中所述的途径的生物也能够达到丁二烯收率的理论最大值的近似值。

[0022] 如本文所用,术语“非天然存在的”当关于本发明的微生物使用时,意指该微生物具有至少一种通常不会在相关物种的天然存在的菌株(包括相关物种的野生型菌株)中发现的基因改变(genetic alteration)。基因改变包括,例如,引入编码代谢多肽的可表达的核酸的修饰(modification)、其他核酸新增、核酸缺失和/或微生物遗传物质的其他功能中断。这些修饰包括,例如,相关物种的异源多肽、同源多肽或异源和同源多肽的编码区和功能片段。其他修饰包括,例如,其中该修饰改变基因或操纵子的表达的非编码调控区域。示例性的代谢多肽包括在丁二烯生物合成途径内的酶或蛋白质。

[0023] 代谢修饰是指从其天然存在的状态发生改变的生化反应。因此,非天然存在的微生物可以具有对编码代谢多肽的核酸或其功能片段的基因修饰。本文披露了示例性的代谢修饰。

[0024] 如本文所用,术语“丁二烯”具有分子式 C_4H_6 和分子质量54.09g/mol(见图2-4)(IUPAC名称为丁-1,3-二烯),其在本文中与1,3-丁二烯、二乙烯、刺桐烯、联乙烯、丁二烯可互换使用。丁二烯是一种具有温和的芳香味或者类汽油味的无色、非腐蚀性的液化气。由于燃点低,丁二烯具有易爆性和易燃性。

[0025] 如本文所用,术语“分离”当关于微生物使用时,意指当相关微生物在自然界中被发现时,基本上不含至少一种组分的生物。该术语包括当在其自然环境中被发现时从部分或全部组分中脱离的微生物。该术语还包括当其在非天然存在的环境中被发现时从部分或全部组分中脱离的微生物。因此,当分离的微生物在自然界中被发现或者当其在非天然存在的环境中培育、储存或生存时,它部分或全部地从其他物质中分离。分离的微生物的具体例子包括部分纯的微生物、基本上纯的微生物和在非天然存在的培养基中培养的微生物。

[0026] 如本文所用,术语“微生物”意在指任何作为包含在古菌域、细菌域或真核域的显微细胞(microscopic cell)存在的生物。因此,该术语意包括原核或真核细胞或具有显微尺寸的生物并包括所有种类的细菌、古菌和真细菌以及真核微生物(如酵母和真菌)。该术语还包括任何种类的可被培养用于生产生物化学品的细胞培养物。

[0027] 如本文所用,术语“CoA”或者“辅酶A”意在指有机辅因子或者辅基(酶的非蛋白质部分),它的存在为许多酶(脱辅基酶蛋白)的活性所需以形成活性酶系统。辅酶A在某些缩合酶中起作用,在乙酰基或者其他酰基基团转移以及在脂肪酸合成和氧化、丙酮酸氧化以及在其他乙酰基化中起作用。

[0028] 如本文所用,术语“基本上厌氧”当关于培养或培育条件使用时意指氧量少于液体培养基内溶解的氧的饱和量的约10%。该术语还意在包括在小于约1%的氧的气氛中保持的液体或固体培养基的密封室。

[0029] 如本文所用,“外源”意指有关分子或有关活性被引入宿主微生物。分子可以例如,通过将编码核酸引入宿主遗传物质,如通过整合入宿主染色体或作为非染色体遗传物质(如质粒)被引入。因此,当关于编码核酸的表达使用时,该术语指将编码核酸以可表达的形

式引入微生物。当关于生物合成活性使用时,该术语指被引入宿主有关生物的活性。来源可以是例如,表达引入宿主微生物后有关活性的同源或异源编码核酸。因此,术语“内源”指在宿主内存在的有关分子或活性。同样,当关于编码核酸的表达使用时,该术语指包含在微生物体内编码核酸的表达。术语“异源”指来自与有关物种不同的来源的分子或活性而“同源”指来自宿主微生物的分子或活性。因此,本发明的编码核酸的外源性表达可以利用异源编码核酸和同源编码核酸的其一或两者。

[0030] 理解的是,当微生物内包含一种以上的外源性核酸时,所述一种以上的外源性核酸指相关的编码核酸或者生物合成活性,如上文所讨论。进一步理解的是,如本文所披露,这类一种以上的外源性核酸可以被引入在单独的核酸分子上、在多顺反子核酸分子上或者在其组合上的宿主微生物,并且仍然被看作是一种以上的外源性核酸。例如,如本文所披露,微生物可被设计以表达两种或者两种以上的编码所需的途径酶或者蛋白质的外源性核酸。在两种编码所需活性的外源性核酸被引入宿主微生物的情况下,理解的是,该两种外源性核酸可以作为单一核酸被引入例如,在单一质粒上、在单独的质粒上,可以被整合入位于单个位点或者多个位点的宿主染色体,以及仍然被看作是两种外源性核酸。同样,理解的是,两种以上的外源性核酸可以任何所需的组合形式被引入例如,在单一质粒上、在单独的质粒上的宿主生物,可以被整合入位于单一位点或者多个位点的宿主染色体,以及仍然被看作是两种或者两种以上的外源性核酸,例如三种外源性核酸。因此,相关的外源性核酸或者生物合成活性的数量指编码核酸的数量或者生物合成活性的数量,而非被引入宿主生物的单独的核酸的数量。

[0031] 本发明的该非天然存在的微生物可以包含稳定的基因改变,这指可以培养超过五代而无改变损失的微生物。一般地,稳定的基因改变包括持续超过10代的修饰,具体地,稳定的修饰将持续超过约25代,以及更具体地,稳定的基因修饰将超过50代,包括永久地。

[0032] 本领域的技术人员会理解所述基因改变(包括本文示例性的代谢修饰)是关于合适的宿主生物(如大肠杆菌)及其相应的代谢反应或所需的代谢途径的所需的遗传物质(如基因)的合适的来源生物描述的。然而,如果有各种各样的生物的完整的基因组测序和基因组学领域的高水平技能,本领域的技术人员将能够很容易地将本文提供的教诲和指导应用于基本上所有的其他生物。例如,本文示例性的大肠杆菌代谢改变可以通过纳入来自非相关物种的物种的相同或类似的编码核酸很容易地应用到其他物种。一般地,这类基因改变包括例如,物种同系物的基因改变,以及具体地,直系同源、旁系同源或非直系同源基因置换。

[0033] 直系同源是通过垂直传递(vertical descent)相关且导致不同的生物内基本上相同或相似的功能的一种或多种基因。例如,小鼠环氧化物水解酶和人环氧化物水解酶因环氧化物水解的生物功能可以被认为是直系同源。例如,当基因共有足够量的序列相似性以表明它们是同源的或者通过进化自共同的祖先相关时,所述基因通过垂直传递相关。如果基因共有足够量的三维结构但不一定共有序列相似性以表明它们进化自共同的祖先达到基本序列相似性无法识别的程度,也认为它们是直系同源。直系同源的基因可以编码具有约25%到100%氨基酸序列一致性的序列相似性的蛋白质。如果编码共有的氨基酸相似性小于25%的蛋白质的基因其三维结构也显示出相似性,则所述基因也可以被认为通过垂直传递产生。酶类的丝氨酸蛋白酶家族的成员(包括组织型纤维蛋白溶酶原激活剂和弹性蛋

白酶)被认为通过垂直传递产生自共同的祖先。

[0034] 直系同源包括通过例如,进化在结构或整体活性方面趋异的基因或其编码基因产物。例如,当一种物种编码显示两种功能的基因产物以及当这类功能在第二个物种内已经分为不同的基因时,这三个基因及其相应的产物被认为是直系同源。对于生化产品的生产,本领域的技术人员会理解含待引入或破坏的代谢活性的直系同源的基因将被选择用于所述非天然存在的微生物的构建。显示各自活性的直系同源的例子是当两个或两个以上物种之间或一个单一物种内部不同的活性已经分为不同的基因产物的情况。具体的例子是弹性蛋白酶蛋白质水解和纤维蛋白溶酶原蛋白质水解(两种类型的丝氨酸蛋白酶活性)分离为作为纤维蛋白溶酶原激活剂和弹性蛋白酶的不同分子。第二个例子是支原体5'-3'核酸外切酶和果蝇DNA聚合酶III活性的分离。来自第一物种的DNA聚合酶可以被认为是来自第二物种的核酸外切酶和聚合酶其一或两者的直系同源,反之亦然。

[0035] 相反,旁系同源是通过例如,复制然后进化趋异相关的同系物并具有相似或共同的,但不完全相同的功能。旁系同源可以源自例如,相同物种或源自不同的物种。例如,微粒体环氧化物水解酶(环氧化物水解酶I)和可溶性环氧化物水解酶(环氧化物水解酶II)可以被认为是旁系同源,因为它们代表两种不同的酶类,协同进化自共同的祖先,催化不同的反应并在相同的物种内具有不同的功能。旁系同源是来自彼此具有显著的序列相似性的相同物种的蛋白质,这表明它们是同源的或通过协同进化自共同的祖先而相关。旁系同源蛋白质家族的群体包括HipA同系物、荧光素酶基因、肽酶以及其他。

[0036] 非直系同源基因置换是来自一个物种的非直系同源基因,可以替代一种不同的物种内有关基因功能。替代包括例如,能够在起源物种内执行与所述不同的物种内所述有关功能相比基本上相同或相似的功能。虽然一般地,非直系同源基因置换可看作是与编码有关功能的已知基因结构相关,不过结构相关性差但功能相似的基因及其相应的基因产物仍然会如本文所用,落入所述术语的含义之内。功能相似性要求例如,与编码试图被替代的功能的基因相比,在非直系同源基因产物的活性位点或结合区域具有至少一些结构相似性。因此,直系同源基因包括例如,旁系同源或不相关的基因。

[0037] 因此,识别和构建本发明的具有丁二烯生物合成能力的非天然存在的微生物时,本领域的技术人员会将本文提供的教诲和指导应用于特定的物种并会理解代谢修饰的识别可以包括直系同源的识别和包含或灭活。如果编码催化相似或基本上相似的代谢反应的酶的旁系同源和/或非直系同源基因置换存在于参照微生物内,本领域的技术人员还可以利用这些进化上相关的基因。

[0038] 直系同源、旁系同源和非直系同源基因置换可以通过本领域的技术人员熟知的方法确定。例如,对两种多肽的核酸或氨基酸序列的检验将揭示所比较的序列之间的序列一致性和相似性。基于这种相似性,本领域的技术人员可以确定相似性是否足够高以表明蛋白质是通过进化自共同的祖先而相关的。本领域的技术人员熟知的算法(如Align、BLAST、Clustal W以及其他)比较并确定原始序列相似性或一致性,以及还确定序列内空隙的存在或大小,其可以被赋予权数或得分。这类算法在本领域也已知并同样适用于确定核苷酸序列的相似性或一致性。足够的相似性以确定相关性的参数的计算基于熟知的用于计算统计相似性的方法或在随机多肽中发现相似匹配的几率以及确定的所述匹配的程度。如果需要,两个或两个以上序列的计算机对比还可以由本领域的技术人员进行可视优化。相关的

基因产物或蛋白质应该具有高度的相似性,例如,25%到100%的序列一致性。不相关的蛋白质可以具有一致性,所述一致性基本上与预计将发生的几率相同,如果扫描一个具有相当规模的数据库(约5%)。5%到24%之间的序列可代表或不代表足以得出所比较的序列具有相关性的结论的同源性。在给定数据集的大小的情况下,可以进行额外的确定这种匹配的程度统计分析,以确定这些序列的相关性。

[0039] 用于使用例如,所述BLAST算法确定两个或两个以上序列的相关性的示例性参数可以如下文描述。简言之,氨基酸序列比对可以使用BLASTP版本2.0.8(1999年1月5日)以及以下参数执行:矩阵:0BLOSUM62;空位开放:11;空位延伸:1;x_dropoff:50;期望值:10.0;序列长度:3;过滤器:开。核酸序列比对可以使用BLASTN版本2.0.6(1998年9月16日)以及以下参数执行:匹配:1;错配:-2;空位开放:5;空位延伸:2;x_dropoff:50;期望值:10.0;序列长度:11;过滤器:关。本领域的技术人员会知道对以上参数作何修改会例如,增加或减少比较的严格性,以及确定两个或两个以上序列的相关性。

[0040] 在某些实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,该微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶;乙酰乙酰基-CoA还原酶;3-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成);巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆醇激酶;2-丁烯基-4-磷酸激酶;丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;巴豆酸酯还原酶;巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成);戊烯二酰基-CoA脱羧酶;戊二酰基-CoA脱氢酶;3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶;4-羟基丁酰基-CoA脱水酶或者巴豆醇二磷酸激酶(图2)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶、3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶和丁二烯合酶(图2,步骤A-H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶、3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶、丁二烯合酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)(图2,步骤A-C、K、F、G、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶、3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、丁二烯合酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤A-C、K、P、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶;乙酰乙酰基-CoA还原酶;3-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆醇激酶;2-丁烯基-4-磷酸激酶;丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶和巴豆酸酯还原酶(图2,步骤A-C、I、J、E、F、G、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶;乙酰乙酰基-CoA还原酶;3-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆醛还原酶(醇形

成);丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;巴豆酸酯还原酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤A-C、I、J、E、P、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶、3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、丁二烯合酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤A-E、P、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶和丁二烯合酶(图2,步骤L、D-H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶、丁二烯合酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)(图2,步骤L、K、F、G、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶、丁二烯合酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤L、K、P、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆醇激酶;2-丁烯基-4-磷酸激酶;丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶和巴豆酸酯还原酶(图2,步骤L、I、J、E、F、G、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶;巴豆醛还原酶(醇形成);丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;巴豆酸酯还原酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤L、I、J、E、P、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、丁二烯戊烯二酰基-CoA脱羧酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤L、C、D、E、P、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶和丁二烯合酶(图2,步骤M、D-H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶、丁二烯合酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)(图2,步骤M、K、F、G、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶、丁二烯合酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤M、K、P、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶;巴豆醛还原酶(醇形成);

巴豆醇激酶;2-丁烯基-4-磷酸激酶;丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶和巴豆酸酯还原酶(图2,步骤M、I、J、E、F、G、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶;巴豆醛还原酶(醇形成);丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;巴豆酸酯还原酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤M、I、J、E、P、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、丁二烯合酶、戊二酰基-CoA脱氢酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤M、C、D、E、P、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶和丁二烯合酶(图2,步骤N、D-H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶、丁二烯合酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)(图2,步骤N、K、F、G、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶、丁二烯合酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤N、K、P、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆醇激酶;2-丁烯基-4-磷酸激酶;丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶和巴豆酸酯还原酶(图2,步骤N、I、J、E、F、G、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶;巴豆醛还原酶(醇形成);丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;巴豆酸酯还原酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤N、I、J、E、P、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、丁二烯合酶、3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤N、C、D、E、P、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶和丁二烯合酶(图2,步骤O、D-H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶、丁二烯合酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)(图2,步骤O、K、F、G、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁

二烯途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶、丁二烯合酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤O、K、P、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆醇激酶;2-丁烯基-4-磷酸激酶;丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶和巴豆酸酯还原酶(图2,步骤O、I、J、E、F、G、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆醛还原酶(醇形成);丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;巴豆酸酯还原酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤O、I、J、E、P、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、丁二烯合酶、4-羟基丁酰基-CoA脱水酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤L、C、D、E、P、H)。

[0041] 在某些实施方式中,本发明提供了一种包括巴豆醇途径的非天然存在的微生物。该巴豆醇途径包括编码巴豆醇途径酶的以足以产生巴豆醇的量表达的至少一种外源性核酸。该巴豆醇途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶;乙酰乙酰基-CoA还原酶;3-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成);巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;巴豆酸酯还原酶;巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成);戊烯二酰基-CoA脱羧酶;戊二酰基-CoA脱氢酶;3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶;或者4-羟基丁酰基-CoA脱水酶。

[0042] 在某些实施方式中,该微生物包括两种外源性核酸,每种均编码巴豆醇途径酶;在其他实施方式中,该微生物包括三种外源性核酸,每种均编码巴豆醇途径酶;在仍然进一步的实施方式中,该微生物包括四种外源性核酸,每种均编码巴豆醇途径酶。

[0043] 在某些实施方式中,该巴豆醇途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶、3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)和巴豆醛还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,该巴豆醇途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶、3-羟基丁酰基-CoA脱水酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,该巴豆醇途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶;乙酰乙酰基-CoA还原酶;3-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;以及巴豆酸酯还原酶。在某些实施方式中,该巴豆醇途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)和巴豆醛还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,该巴豆醇途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,该巴豆醇途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;以及巴豆酸酯还原酶。在某些实施方式中,该巴豆醇途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)和巴豆醛还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,该巴豆醇途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,该巴豆醇途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;以及巴豆酸酯还原酶。在某些实施方式中,该巴豆醇途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)和巴豆醛还原酶(醇形成)。在某

些实施方式中,该巴豆醇途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氢酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,该巴豆醇途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氢酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;以及巴豆酸酯还原酶。在某些实施方式中,该巴豆醇途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)和巴豆醛还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,该巴豆醇途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,该巴豆醇途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;以及巴豆酸酯还原酶。在某些实施方式中,具有巴豆醇途径的非天然存在的微生物具有至少一种外源性核酸,该外源性核酸是异源性核酸。在某些实施方式中,该具有巴豆醇途径的非天然存在的微生物在基本上厌氧的培养基中。

[0044] 在某些实施方式中,本发明提供了一种非天然存在的微生物,该微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括赤藓糖-4-磷酸还原酶、赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶、4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶、赤藓醇2,4-环二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶、丁烯基4-二磷酸异构酶、丁二烯合酶、赤藓糖-4-磷酸激酶、赤藓糖还原酶或者赤藓醇激酶(图3)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括赤藓糖-4-磷酸还原酶、赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶、4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶、赤藓醇2,4-环二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶和丁二烯合酶(图3,步骤A-F和H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括赤藓糖-4-磷酸还原酶、赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶、4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶、赤藓醇2,4-环二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶、丁烯基4-二磷酸异构酶和丁二烯合酶(图3,步骤A-H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶、4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶、赤藓醇2,4-环二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶、丁二烯合酶、赤藓糖-4-磷酸激酶、赤藓糖还原酶和赤藓醇激酶(图3,步骤I、J、K、B-F、H)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶、4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶、赤藓醇2,4-环二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶、丁烯基4-二磷酸异构酶、丁二烯合酶、赤藓糖-4-磷酸激酶、赤藓糖还原酶和赤藓醇激酶(图3,步骤I、J、K、B-H)。

[0045] 在某些实施方式中,本发明提供了一种非天然存在的微生物,该微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(酮还原)、3-羟基戊二酰基-CoA还原酶(醛形成)、3-羟基-5-氧代戊酸还原酶、3,5-二羟基戊酸激酶、3-羟基-5-磷酸酰氧基戊酸激酶、3-羟基-5-[羟基(磷酸酰氧基)磷酸基]氧

基戊酸脱羧酶、丁烯基4-二磷酸异构酶、丁二烯合酶、3-羟基戊二酰基-CoA还原酶(醇形成)、3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(醛形成)、3,5-二氧代戊酸还原酶(酮还原)、3,5-二氧代戊酸还原酶(醛还原)、5-羟基-3-氧代戊酸还原酶或者3-氧代-戊二酰基-CoA还原酶(CoA还原和醇形成)(图4)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(酮还原)、3-羟基戊二酰基-CoA还原酶(醛形成)、3-羟基-5-氧代戊酸还原酶、3,5-二羟基戊酸激酶、3-羟基-5-磷酸氧基戊酸激酶、3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸脱羧酶、丁烯基4-二磷酸异构酶和丁二烯合酶(图4,步骤A-I)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、3,5-二羟基戊酸激酶、3-羟基-5-磷酸氧基戊酸激酶、3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸脱羧酶、丁烯基4-二磷酸异构酶、丁二烯合酶、3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(醛形成)、3,5-二氧代戊酸还原酶(醛还原)和5-羟基-3-氧代戊酸还原酶。(图4,步骤A、K、M、N、E、F、G、H、I)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、3-羟基-5-氧代戊酸还原酶、3,5-二羟基戊酸激酶、3-羟基-5-磷酸氧基戊酸激酶、3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸脱羧酶、丁烯基4-二磷酸异构酶、丁二烯合酶、3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(醛形成)和3,5-二氧代戊酸还原酶(酮还原)。(图4,步骤A、K、L、D、E、F、G、H、I)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、3,5-二羟基戊酸激酶、3-羟基-5-磷酸氧基戊酸激酶、3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸脱羧酶、丁烯基4-二磷酸异构酶、丁二烯合酶、5-羟基-3-氧代戊酸还原酶和3-氧代-戊二酰基-CoA还原酶(CoA还原和醇形成)。(图4,步骤A、O、N、E、F、G、H、I)。在一个方面,该非天然存在的微生物包括具有丁二烯途径的微生物,其具有编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(酮还原)、3,5-二羟基戊酸激酶、3-羟基-5-磷酸氧基戊酸激酶、3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸脱羧酶、丁烯基4-二磷酸异构酶、丁二烯合酶和3-羟基戊二酰基-CoA还原酶(醇形成)。(图4,步骤A、B、J、E、F、G、H、I)。

[0046] 在另外的实施方式中,本发明提供了一种具有丁二烯途径的非天然存在的微生物,其中该非天然存在的微生物包括编码酶或者蛋白质的至少一种外源性核酸,所述酶或者蛋白质进行选自如下的从底物到产品的转化:乙酰基-CoA到乙酰乙酰基-CoA、乙酰乙酰基-CoA到3-羟基丁酰基-CoA、3-羟基丁酰基-CoA到巴豆酰基-CoA、巴豆酰基-CoA到巴豆醛、巴豆醛到巴豆醇、巴豆醇到2-丁烯基-磷酸、2-丁烯基-磷酸到2-丁烯基-4-二磷酸、2-丁烯基-4-二磷酸到丁二烯、赤藓糖-4-磷酸到赤藓醇-4-磷酸、赤藓醇-4-磷酸到4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇、4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇到2-磷酸-4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇、2-磷酸-4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇到赤藓醇-2,4-环二磷酸、赤藓醇-2,4-环二磷酸到1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸到丁烯基4-二磷酸、丁烯基4-二磷酸到2-丁

烯基4-二磷酸、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸到2-丁烯基4-二磷酸、2-丁烯基4-二磷酸到丁二烯、丙二酰基-CoA和乙酰基-CoA到3-氧代戊二酰基-CoA、3-氧代戊二酰基-CoA到3-羟基戊二酰基-CoA到3-羟基-5-氧代戊酸、3-羟基-5-氧代戊酸到3,5-二羟基戊酸、3,5-二羟基戊酸到3-羟基-5-磷酸氧基戊酸、3-羟基-5-磷酸氧基戊酸到3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸、3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸到丁烯基4-二磷酸、戊烯二酰基-CoA到巴豆酰基-CoA、戊二酰基-CoA到巴豆酰基-CoA、3-氨基丁酰基-CoA到巴豆酰基-CoA、4-羟基丁酰基-CoA到巴豆酰基-CoA、巴豆酰基-CoA到巴豆酸、巴豆酸到巴豆醛、巴豆酰基-CoA到巴豆醇、巴豆醇到2-丁烯基-4-二磷酸、赤藓糖-4-磷酸到赤藓糖、赤藓糖到赤藓醇、赤藓醇到赤藓醇-4-磷酸、3-氧代戊二酰基-CoA到3,5-二氧代戊酸、3,5-二氧代戊酸到5-羟基-3-氧代戊酸、5-羟基-3-氧代戊酸到3,5-二羟基戊酸、3-氧代戊二酰基-CoA到5-羟基-3-氧代戊酸、3,5-二氧代戊酸到3-羟基-5-氧代戊酸以及3-羟基戊二酰基-CoA到3,5-二羟基戊酸。本领域的技术人员会理解这些仅仅是示例性以及基于本文的教导,本领域的技术人员可以容易地确定本文披露的任何适于生产所需产品以及具有从底物到产品的转化所需的适当活性的底物-产品对。因此,本发明提供了一种包含编码酶或者蛋白质的至少一种外源性核酸的非天然存在的微生物,其中该酶或者蛋白质转化丁二烯途径的底物以及产品,如图2-图4中所示。

[0047] 虽然本文中一般地描述了一种包含丁二烯途径的微生物,但是可以理解的是,本发明另外提供了一种非天然存在的微生物,该微生物包括编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯途径的中间体的量表达的至少一种外源性核酸。例如,如本文所披露,丁二烯途径的示例见图2-图4。因此,除了包含生产丁二烯的丁二烯途径的微生物,本发明还提供一种包括编码丁二烯途径酶的至少一种外源性核酸的非天然存在的微生物,其中该微生物生产丁二烯途径中间体,例如,乙酰乙酰基-CoA、3-羟基丁酰基-CoA、巴豆酰基-CoA、巴豆醛、巴豆醇、2-丁烯基-磷酸、2-丁烯基-4-二磷酸、赤藓醇-4-磷酸、4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇、2-磷酸-4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇、赤藓醇-2,4-环二磷酸、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸、丁烯基4-二磷酸、2-丁烯基4-二磷酸、3-氧代戊二酰基-CoA、3-羟基戊二酰基-CoA、3-羟基-5-氧代戊酸、3,5-二羟基戊酸、3-羟基-5-磷酸氧基戊酸、3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸、巴豆酸、赤藓糖、赤藓醇、3,5-二氧代戊酸或者5-羟基-3-氧代戊酸。

[0048] 理解的是,本文披露的任何途径,如实施例中所述的以及附图中示范的途径(包括图2-图4的途径),可用以生成一种根据需要生产任何途径中间体或者产品的非天然存在的微生物。如本文所披露,这类生产中间体的微生物可以与另一种表达下游途径酶的微生物组合使用,以生产所需的产品。然而,理解的是,生产丁二烯途径中间体的非天然存在的微生物可用以将该中间体作为所需的产品来生产。

[0049] 在某些实施方式中,能够通过生物合成生产巴豆醇以及随后经化学脱水为丁二烯来获得丁二烯。在某些实施方式中,本发明提供了一种用于生产丁二烯的方法,该方法包括(a)在足够量的营养物质和培养基中通过发酵培养产生巴豆醇的非天然存在的微生物;以及(b)将通过培养该非天然存在的微生物所产生的巴豆醇转化为丁二烯。

[0050] 醇的脱水已为本领域所知并且可以包括各种催化的和非催化的热过程。在某些实施方式中,催化的热脱水采用金属氧化物催化剂或二氧化硅。在某些实施方式中,该方法的步骤(b)在催化剂的存在下通过化学脱水执行。例如,已经指出,巴豆醇可以经钼酸铋脱水

(Adams, C.R.J. Catal. 10:355-361, 1968), 以提供1,3-丁二烯。

[0051] 脱水可以通过活化醇基以及后续通过标准消除机制(如E1或E2消除)消除而实现。活化可以通过将醇基转换为卤素(如碘、氯或溴)的方式实现。活化也可以通过磺酰基、磷酸盐或将醇转化为良好的离去基团的其他活化功能来实现。在某些实施方式中,活化基团是选自甲苯磺酸盐、甲磺酸盐、间硝基苯磺酸酯、对溴苯磺酸酯和三氟甲磺酸酯的硫酸盐或硫酸酯。在某些实施方式中,该离去基团是磷酸盐或磷酸酯。在某些这类实施方式中,脱水剂是五氧化二磷。

[0052] 在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用包括巴豆醇途径的非天然存在的微生物,该巴豆醇途径具有编码巴豆醇途径酶的以足以产生巴豆醇的量表达的至少一种外源性核酸。该巴豆醇途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶;乙酰乙酰基-CoA还原酶;3-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成);巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;巴豆酸酯还原酶;巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成);戊烯二酰基-CoA脱羧酶;戊二酰基-CoA脱氢酶;3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶;或者4-羟基丁酰基-CoA脱水酶。

[0053] 在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用微生物,该微生物包括两种外源核酸,每种均编码巴豆醇途径酶。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用微生物,该微生物包括三种外源核酸,每种均编码巴豆醇途径酶。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用微生物,该微生物包括四种外源核酸,每种均编码巴豆醇途径酶。

[0054] 在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶、3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)和巴豆醛还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶、3-羟基丁酰基-CoA脱水酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶;乙酰乙酰基-CoA还原酶;3-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;以及巴豆酸酯还原酶。

[0055] 在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)和巴豆醛还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;以及巴豆酸酯还原酶。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)和戊烯二酰基-CoA脱羧酶。

[0056] 在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径

的微生物,该巴豆醇途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)和巴豆醛还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;以及巴豆酸酯还原酶。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)和戊二酰基-CoA脱氢酶。

[0057] 在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氢酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)和巴豆醛还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氢酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氢酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;以及巴豆酸酯还原酶。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)和3-氨基丁酰基-CoA脱氢酶。

[0058] 在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)和巴豆醛还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;以及巴豆酸酯还原酶。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有巴豆醇途径的微生物,该巴豆醇途径包括3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)和4-羟基丁酰基-CoA脱水酶。

[0059] 在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用具有至少一种外源性核酸的微生物,该外源性核酸是异源性核酸。在某些实施方式中,本发明依赖于巴豆醇的生物生产的方法利用非天然存在的微生物,该非天然存在的微生物在基本上厌氧的培养基中。

[0060] 根据本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员会理解,在通向1,3-丁二烯的进一步的化学酶催化路径中可以靶向丁二烯途径中的其他生物合成中间体。例如,已经指出,巴豆醛可以在乙醇的存在下,在二氧化硅催化剂之上被转化为1,3-丁二烯(Toussaint等人, Ind. Eng. Chem., 39(2):120-125, (1947))。在某些实施方式中,用于生产1,3-丁二烯的方法包括:a)在足够量的营养物质和培养基中通过发酵培养产生巴豆醛的非天然存在的微生物;以及(b)将通过培养该非天然存在的微生物所产生的巴豆醛转化为丁二烯。在本发明的某些这类化学酶催化过程中,巴豆醛和乙醇均可以作为来自单一的非天然存在的生物体

或来自两种独立的生物体的发酵产物被提供。如上所述,可以用二氧化硅催化剂将这两种发酵产物转化为1,3-丁二烯。

[0061] 本文一般地参照代谢反应、反应物或其产物,或者具体地参照一种或多种编码酶(所述酶与所参照的代谢反应、反应物或产物有关或者催化所参照的代谢反应、反应物或产物)的核酸或基因对本发明进行描述。除非本文另有明确规定,本领域的技术人员会理解对反应的参照也构成了对所述反应的反应物以及产物的参照。同样,除非本文另有明确规定,对反应物或产物的参照也是对反应的参照,以及对任何这些代谢组分的参照也是参照一种或者多种的编码酶或蛋白质的基因,所述酶催化所参照的反应、反应物或产物以及所述蛋白质包含在所参照的反应、反应物或产物中。同样地,考虑到熟知的代谢生物化学、酶学和基因组学领域,本文对基因或编码核酸的参照也构成对相应的被编码的酶和其催化的反应;或者与所述反应以及所述反应的反应物和产物相关的蛋白质的参照。

[0062] 如本文所披露,中间体巴豆酸酯;3,5-二氧代戊酸、5-羟基-3-氧代戊酸、3-羟基-5-氧代戊酸、3-氧代戊二酰基-CoA和3-羟基戊二酰基-CoA,以及其他中间体是可以以不同的离子化形式(包括完全质子化的、部分质子化的和完全去质子化的形式)发生的羧酸。因此,后缀“酯”或酸形式可以互换使用,以描述游离酸形式以及任何去质子化的形式,特别是因为,已知离子化形式依赖于化合物被发现时的pH。理解的是,羧化物产品或者中间体包括羧化物产品或者途径中间体的酯形式,例如O-羧酸酯和S-羧酸酯。O-羧化物和S-羧化物可以包括较低级的烷基,即C1到C6的支链或者直链羧化物。一些这类O-羧化物或S-羧化物包括但不限于甲基、乙基、正丙基、正丁基、i-丙基、仲丁基和叔丁基、戊基、己基O-羧化物或S-羧化物,其中任何一种可以进一步具有不饱和,提供例如丙烯基、丁烯基、戊基和己烯基O-羧化物或S-羧化物。O-羧化物可以是生物合成途径的产物。经由生物合成途径获得的示例性的O-羧化物可以包括但不限于巴豆酸甲酯;甲基-3,5-二氧代戊酸;甲基-5-羟基-3-氧代戊酸;甲基-3-羟基-5-氧代戊酸;3-氧代戊二酰基-CoA,甲酯;3-羟基戊二酰基-CoA,甲酯;巴豆酸乙酯;乙基-3,5-二氧代戊酸;乙基-5-羟基-3-氧代戊酸;乙基-3-羟基-5-氧代戊酸;3-氧代戊二酰基-CoA,乙酯;3-羟基戊二酰基-CoA,乙酯;巴豆酸正丙酯;n-丙基-3,5-二氧代戊酸;n-丙基-5-羟基-3-氧代戊酸;n-丙基-3-羟基-5-氧代戊酸;3-氧代戊二酰基-CoA,正丙酯;以及3-羟基戊二酰基-CoA,正丙酯。其他可通过生物合成获得的O-羧化物可以包括中链到长链基团,即衍生自脂肪族醇(例如庚醇、辛醇、壬醇、癸醇、十一醇、月桂醇、十三醇、十四醇、十五醇、十六醇、棕榈醇、十七醇、十八醇、十九醇、花生醇、二十一醇和二十二醇)的C7-C220-羧酸酯,其中任何一种可以可选地是支链的和/或包含不饱和。O-羧酸酯还可以经由生化或者化学过程(例如游离羧酸产品的酯化作用或者O-羧化物或S-羧化物的转酯作用)获得。S-羧化物的例子是CoA S-酯类、半胱氨酰S-酯类、烷基硫酯类以及各种芳基和杂芳基硫酯类。

[0063] 本发明所述的非天然存在的微生物可以通过引入可表达的核酸来生产,该核酸编码一种或者多种的参与一种或者多种的丁二烯生物合成途径的酶。根据选定用于生物合成的宿主微生物,可以表达用于部分或者全部的具体丁二烯生物合成途径的核酸。例如,如果在所需的生物合成途径中,选定的宿主存在一种或者多种的酶的缺陷,则将用于缺陷的一种或者多种的酶或蛋白质的可表达的核酸引入该宿主用于后续的外源性表达。替代性地,如果该选定的宿主显示出一些途径酶的内源性表达,但是在其他方面存在缺陷,则需要用

于缺陷的一种或者多种的酶或蛋白质的编码核酸,以实现丁二烯的生物合成。因此,可以通过引入外源酶或者蛋白质活性以获得所需的生物合成途径来生产本发明的非天然存在的微生物或者可以通过引入与一种或者多种内源性的酶或者蛋白质一起生产所需的产品(如丁二烯)的一种或者多种外源酶或者蛋白质活性以获得所需的生物合成途径。

[0064] 宿主微生物可以选自以及所述非天然存在的微生物可以生成于,例如细菌、酵母、真菌或各种其他适用于发酵过程的微生物的任意一种。示例性的细菌包括选自如下的物种:大肠杆菌、产酸克雷伯氏菌、产琥珀酸厌氧螺菌、琥珀酸放线杆菌、产琥珀酸曼氏杆菌、菜豆根瘤菌、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌、氧化葡萄糖杆菌、运动发酵单胞菌、乳酸乳球菌、植物乳杆菌、天蓝色链霉菌、丙酮丁醇梭菌、萤光假单胞菌以及恶臭假单胞菌。示例性的酵母或真菌包括选自如下的物种:酿酒酵母、人体酵母菌探针、乳酸克鲁维酵母、马克斯克鲁维酵母、土曲霉、黑曲霉、毕赤酵母、无根根霉菌、稻根霉菌(*Rhizobus oryzae*)、解脂耶氏酵母等等。大肠杆菌是一种特别有用的宿主生物,因为其是一种适于基因工程的具有良好表征的微生物。其他特别有用的宿主生物包括酵母,如酿酒酵母。理解的是,任何适合的宿主微生物可用以引入代谢和/或基因修饰,以生产所需的产品。

[0065] 依据选定的宿主微生物的丁二烯的生物合成途径构成,本发明所述的非天然存在的微生物将包括至少一种外源性表达的丁二烯途径的编码核酸乃至用于一种或者多种丁二烯生物合成途径的所有的编码核酸。例如,通过外源性表达相应的编码核酸在存在途径酶或者蛋白质缺陷的宿主内建立丁二烯生物合成。在存在丁二烯途径的所有的酶或者蛋白质缺陷的宿主内,可以包含该途径中所有的酶或者蛋白质的外源性表达,虽然理解的是,即使该宿主包含至少一种途径酶或者蛋白质,也可以表达该途径的所有的酶或者蛋白质。例如,可以包含用于生产丁二烯的途径中所有的酶或者蛋白质的外源性表达,例如乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶、3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶和丁二烯合酶(图2,步骤A-H)。

[0066] 考虑到本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员会理解以可表达的形式引入的编码核酸的数量将,至少,等于所选定的宿主微生物的丁二烯途径缺陷量。因此,本发明的非天然存在的微生物可以具有一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种或十种,乃至所有的编码本文披露的构成丁二烯生物合成途径的酶的核酸。在一些实施方式中,该非天然存在的微生物还可以包括其他促进或者优化丁二烯的生物合成或者赋予该宿主微生物其他有用的功能的基因修饰。一种这类的其他功能性可以包括例如,对一种或者多种丁二烯途径前体(如乙酰基-CoA、戊烯二酰基-CoA、戊二酰基-CoA、3-氨基丁酰基-CoA、4-羟基丁酰基-CoA、赤藓糖-4-磷酸或丙二酰基-CoA)的合成的增强。

[0067] 一般地,宿主微生物应该这样选择以便其生产丁二烯途径的前体,作为自然生产的分子或作为工程产物,其提供所需前体的从新生产或由该宿主微生物自然生产的前体的增加生产。例如,乙酰基-CoA、戊烯二酰基-CoA、戊二酰基-CoA、3-氨基丁酰基-CoA、4-羟基丁酰基-CoA、赤藓糖-4-磷酸或丙二酰基-CoA自然产生于宿主生物,如大肠杆菌。宿主生物可以设计以增加前体的生产,正如本文所披露。此外,已被设计以生产所需前体的微生物可用作宿主生物并进一步被设计,以表达丁二烯途径的酶或蛋白质。

[0068] 在一些实施方式中,本发明的非天然存在的微生物生成自包含合成丁二烯的酶催

能力的宿主。在该特定的实施方式中,其可用以增加丁二烯途径产物的合成或堆积以,例如促使发生丁二烯途径反应,以便生产丁二烯。合成或堆积的增加可以通过,例如编码上述的一种或多种丁二烯途径酶或蛋白质的核酸的过表达来完成。该一种或多种丁二烯途径酶和/或蛋白质的过表达的发生可以,例如通过一种或多种内源性基因的外源性表达或通过一种或多种异源性基因的外源性表达。因此,通过一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种或十种,即乃至所有的编码丁二烯生物合成途径酶或蛋白质的核酸的过表达,天然存在的生物可以很容易地生成为本发明的非天然存在的微生物。此外,非天然存在的生物可以通过造成丁二烯生物合成途径中酶活性的增加的内源性基因的诱变来生成。

[0069] 在特别有用的实施方式中,采用编码核酸的外源性表达。外源性表达赋予对宿主定制表达和/或调节元件的能力以及获得使用人控制的所需的表达水平的应用。然而,其他实施方式中还可以利用内源性表达,例如当连接至诱导型启动子或其他调节元件时,通过去除负调节效应子或基因启动子的诱导利用内源性表达。因此,具有天然存在的诱导型启动子的内源性基因可以通过提供适当的诱导剂上调;或者内源性基因的调节区域可设计以纳入诱导调节元件,从而允许在需要的时候调节内源性基因的上调表达。同样,可以包括诱导型启动子,作为针对引入非天然存在的微生物的外源性基因的调节元件。

[0070] 理解的是,在本发明的方法中,任何所述一种或者多种外源性核酸可被引入微生物以生产本发明的一种非天然存在的微生物。该核酸可被引入以便赋予该微生物,例如丁二烯生物合成途径。替代性地,可以引入编码核酸,以生产具有生物合成能力的中间体微生物,以催化所需的反应的一些,从而赋予丁二烯生物合成能力。例如,具有丁二烯生物合成途径的非天然存在的微生物可以包括至少两种编码所需的酶或者蛋白质的外源性核酸,所述酶的例子有如下组合:巴豆醇激酶和丁二烯合酶;或者替代性地,4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶和丁二烯合酶;或者替代性地,1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶和丁二烯合酶;或者替代性地,3-羟基-5-磷酸氧基戊酸激酶和丁二烯合酶;或者替代性地,巴豆酰基-CoA水解酶和巴豆醇二磷酸激酶;或者替代性地,赤藓糖还原酶和丁二烯合酶;或者替代性地,3-氧代-戊二酰基-CoA还原酶(CoA还原和醇形成)和3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸脱羧酶等等。因此,应理解的是,生物合成途径的两种或两种以上酶的任意组合可以包含在本发明的非天然存在的微生物中。同样,应理解的是,按照要求,生物合成途径的三种(例如,巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶和丁二烯合酶;或者替代性地,1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶和丁二烯合酶;或者替代性地,3-氧代戊二酰基-CoA还原酶、3-羟基-5-氧代戊酸还原酶和丁二烯合酶;或者替代性地,乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、巴豆醇激酶和丁二烯合酶;或者替代性地,戊烯二酰基-CoA脱羧酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)和巴豆醇二磷酸激酶;或者替代性地,赤藓糖-4-磷酸激酶、4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶和1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶;或者替代性地,3,5-二氧代戊酸还原酶(醛还原)、丁烯基4-二磷酸异构酶和丁二烯合酶等等)或三种以上酶或蛋白质的任意组合可以包含在本发明的非天然存在的微生物中,只要所需的生物合成途径的酶或蛋白质的组合导致相应的所需产品的产生。同样,按照要求,本文披露的生物合成途径的四种(例如巴豆醇还原酶(醇形成)、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶和丁二烯合酶;或者替代性地,1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶、丁烯基4-二磷酸异构酶和丁二烯合酶;或者替代性地,3-羟基-5-磷酸氧基戊酸激酶、3-羟基-

5-[羟基(磷酰氧基)磷酰基]氧基戊酸激酶、丁烯基4-二磷酸异构酶和丁二烯合酶;或者替代性地,赤藓糖-4-磷酸还原酶、赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶、4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶和丁二烯合酶;或者替代性地,3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)、巴豆醇二磷酸激酶和丁二烯合酶;或者替代性地,赤藓糖还原酶、4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶、赤藓醇2,4-环二磷酸合酶和1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶;或者替代性地,丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、3-羟基戊二酰基-CoA还原酶(醇形成)、丁烯基4-二磷酸异构酶和丁二烯合酶)或四种以上酶或蛋白质的任意组合可以包含在本发明的非天然存在的微生物中,只要所需的生物合成途径的酶或蛋白质的组合导致相应的所需产品的产生。

[0071] 除本文所述的丁二烯的生物合成之外,本发明所述的非天然存在的微生物和方法也可以通过彼此间以及与本领域熟知的其他微生物和方法进行各种组合来应用,以通过其他路径实现产品生物合成。例如,除了使用丁二烯生产者之外,一种生产丁二烯的替代性方法是通过加入另一种能够将丁二烯途径中间体转化为丁二烯的微生物。

[0072] 一种这样的程序包括例如,生产丁二烯途径中间体的微生物的发酵。该丁二烯途径中间体然后可以用作将丁二烯途径中间体转化为丁二烯的第二微生物的底物。该丁二烯途径中间体可以被直接加入该第二生物的另一培养物或该丁二烯途径中间体生产者的原始培养物可以通过,例如细胞分离耗尽这些微生物,然后可以利用将第二生物随后加入发酵肉汤,以生产最终产品而无中间体纯化的步骤。

[0073] 在其他实施方式中,本发明的所述非天然存在的微生物和方法可以在各种各样的子途径中进行组合,以实现,例如丁二烯的生物合成。在这些实施方式中,可以将用于本发明的所需产品的生物合成途径分离到不同的微生物中,以及可以共同培养该不同的微生物,以生产最终产品。在这种生物合成方案中,一种微生物的产物是用于第二微生物的底物,直至合成最终产品。例如,可以通过构建如下微生物完成丁二烯的生物合成:该微生物包含用于将一个途径中间体转化为另一途径中间体或产物的生物合成途径。替代性地,也可以通过利用相同器皿内的两种生物的共同培养或共同发酵从微生物生物合成生产丁二烯,其中第一种微生物生产丁二烯中间体以及第二种微生物将该中间体转化为丁二烯。

[0074] 考虑到本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员会理解存在针对本发明的所述非天然存在的微生物和方法,连同其他微生物、具有子途径的其他非天然存在的微生物的共同培养物以及本领域熟知的生产丁二烯的其他化学和/或生化程序的组合的各种各样的组合和排列。

[0075] 用于丁二烯途径酶或蛋白质的编码核酸的源可以包括,例如其中被编码的基因产物能够催化参照反应的任何物种。这类物种既包括原核生物又包括真核生物,包括但不限于细菌(包括古生细菌和真细菌)以及真核生物(包括酵母)、植物、昆虫、动物以及哺乳动物(包括人)。针对这种源的示例性物种包括,例如大肠杆菌、发酵氨基酸球菌、贝氏不动杆菌、乙酸钙不动杆菌、不动杆菌属种ADP1、不动杆菌属种菌株M-1、嗜嗜热菌、拟南芥、Co1生态型拟南芥、Co1生态型拟南芥、闪烁古生球菌DSM4304、固氮弧菌属种CIB、蜡样芽胞杆菌、枯草芽胞杆菌、牛、马尔他布鲁氏菌、伯克霍尔德氏菌ambifaria AMMD、瘤状伯克霍尔德氏菌、空肠弯曲杆菌、白色念珠菌、木兰假丝酵母、橙色绿屈挠菌、杨氏柠檬酸杆菌ATCC29220、丙酮丁醇梭菌、氨基丁酸梭菌、拜氏梭菌、拜氏梭菌NCIMB8052、拜氏梭菌NRRL B593、肉毒杆

菌C菌株Eklund、克鲁佛氏梭菌、克鲁佛氏梭菌DSM555、诺氏梭菌NT、丙酸梭菌、糖乙酸多丁醇梭菌、谷氨酸棒杆菌ATCC13032、台湾贪铜菌、蓝菌属PCC7001、盘基网柄菌AX4、粪肠球菌、赤细菌属种NAP1、大肠杆菌K12、大肠杆菌菌株K-12次代菌株MG1655、直肠真杆菌ATCC33656、具核梭杆菌、具核梭杆菌亚种具核ATCC25586、热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌、雨生红球藻、流感嗜血杆菌、死海盐盒菌ATCC43049、幽门螺旋杆菌、智人、肺炎克雷伯氏菌、植物乳杆菌、肠膜明串珠菌、海洋 γ -蛋白质菌HTCC2080、勤奋生金球菌、詹氏甲烷球菌、小家鼠、鸟型分枝杆菌亚种类结核K-10、牛结核分支杆菌BCG、海分枝杆菌M、包皮垢分支杆菌MC2155、结核分枝杆菌、肺炎支原体M129、皮疽诺卡氏菌IFM10152、艾瓦诺卡氏菌(sp.NRRL5646)、穴兔、脱氮副球菌、产黄青霉、银白杨、欧洲山杨x银白杨、牙龈红棕色单胞菌、牙龈红棕色单胞菌W83、绿脓假单胞菌、绿脓假单胞菌PA01、荧光假单胞菌、荧光假单胞菌Pf-5、帚形假单胞菌(B13)、恶臭假单胞菌、恶臭假单胞菌E23、恶臭假单胞菌KT2440、假单胞菌属种、山葛、耐超高温热棒菌菌株IM2、激烈热球菌、富养罗尔斯通氏菌、富养罗尔斯通氏菌H16、富养罗尔斯通氏菌H16、罗尔斯通氏贪铜菌、褐鼠、类球红细菌、赤红球菌、沼泽红假单胞菌、肠罗斯氏菌(*Roseburia intestinalis*)L1-82、罗斯氏菌*inulinivorans* DSM16841、罗斯氏菌属种A2-183、*Roseiflexus castenholzii*、酿酒酵母、红色糖多孢菌NRRL2338、肠沙门氏菌亚种arizonae serovar、鼠伤寒沙门氏菌、人体酵母菌探针、加州希蒙得木、苜蓿中华根瘤菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、天蓝色链霉菌、灰色链霉菌亚种灰色NBRC13350、链霉菌属种ACT-1、嗜酸热硫化叶菌、希氏硫化叶菌、硫磺矿硫化叶菌、硫化叶菌tokodaii、集胞蓝细菌属种菌株PCC6803、*Syntrophus aciditrophicus*、布氏热厌氧杆菌HTD4、腾冲热厌氧杆菌MB4、细长嗜热聚球藻、海栖热袍菌MSB8、嗜热栖热菌、嗜热栖热菌HB8、阴道滴虫G3、类丝孢酵母(*Trichosporonoides megachiliensis*)、布氏锥虫、微代谢豕村氏菌DSM20162、中间耶尔森氏菌ATCC29909、生枝动胶菌、鲁氏接合酵母、运动发酵单胞菌以及本文披露的其他示例性物种可作为相应基因的源生物(原文语法错误)。然而,今天超过550个物种的完整的基因组序列是可得的(这些物种中超过一半的基因组序列在公用数据库,如NCBI中可以得到),包括395种微生物基因组和各种酵母、真菌、植物以及哺乳动物基因组,在这种情况下,编码针对近缘或远缘物种中一种或多种基因的必要的丁二烯生物合成活性的基因的识别(包括,例如已知基因的同系、直系同源、旁系同源和非直系同源基因置换)以及生物之间基因改变的互换在本领域是常规且熟知的。因此,实现本文所述的关于特定生物(如大肠杆菌)的丁二烯的生物合成的代谢改变可以以同样的方式很容易地应用到其他微生物,包括原核和真核生物。考虑到本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员会得知在一种生物中示范的代谢改变可以同样地应用于其他生物。

[0076] 在某些情况下,例如当替代性的丁二烯生物合成途径存在于不相关的物种中时,可以通过,例如来自催化相似的、但非完全相同的代谢反应以取代参照反应的不相关物种的一种旁系同源物或多种旁系同源物的外源性表达,赋予该宿主物种丁二烯的生物合成。由于不同的生物之间存在代谢网络间的某些差异,本领域的技术人员会理解不同生物之间的实际的基因用法可以存在差异。然而,考虑到本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员还会理解,本发明的教诲和方法可以通过利用对本文那些示例性的微生物所作的同源代谢改变应用于所有的微生物,以在有关的物种中构建会合成丁二烯的微生物。

[0077] 可以例如,通过本领域熟知的重组和检测方法操作用于构建和测试生产非天然存

在的丁二烯的宿主的表达水平的方法。这类方法的描述可以见于,例如Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001); Ausubel等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)

[0078] 可以利用本领域熟知的技术(包括但不限于接合、电穿孔术、化学转化法、转导、转染和超声转化)将用于生产丁二烯的途径中涉及的外源性核酸序列稳定或瞬时地引入宿主细胞。对于大肠杆菌或其他原核细胞中的外源性表达,真核细胞核酸的基因或cDNA中的一些核酸序列可以编码导向信号(targeting signal),如N-末端线粒体导向信号或其他导向信号,如果需要,其可以在转换进入原核宿主细胞之前被去除。例如,线粒体前导序列的去除导致了大肠杆菌中表达的上调(Hoffmeister等人, *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338 (2005))。对于酵母或其他真核细胞中的外源性表达,可以在胞质溶胶中表达基因,而不添加前导序列;或者可以通过添加适于宿主细胞的合适的导向序列(如线粒体导向或分泌信号)将基因导向线粒体或其他细胞器或者导向分泌。因此,理解的是,对核酸序列的适当的以去除或包含导向序列的修改可被纳入外源性核酸序列中,以提供所需的特性。此外,以本领域熟知的技术可以使基因经受密码子优化,以实现蛋白质的优化表达。

[0079] 表达载体可以被构建以包括如本文所示范的可操作地连接于宿主生物中功能性的表达调控序列的一种或多种丁二烯生物合成途径编码核酸。适用于本发明的宿主微生物的表达载体包括,例如质粒、噬菌体载体、病毒载体、附加体和人工染色体(包括可操作地用以稳定地整合到宿主染色体的载体和选择序列或标记)。此外,该表达载体可以包括一种或多种选择标记基因和适当的表达调控序列。还可以包括,例如提供抗生素或毒素抗性、补充营养缺陷或者提供培养基中没有的关键营养物的选择标记基因。表达调控序列可以包括组成型和诱导型启动子、转录增强子、转录终止子以及本领域熟知的诸如此类的表达调控序列。当两个或两个以上外源性编码核酸被共同表达时,两个核酸都可以被插入,例如单一表达载体或独立表达载体。对于单一载体表达,编码核酸可被可操作地连接到一个共同的表达调控序列或连接到不同的表达调控序列,如一个诱导型启动子和一个组成型启动子。可以利用本领域熟知的方法确定代谢或合成途径中涉及的外源性核酸序列的转化。这类方法包括,例如核酸分析法,如Northern印迹法或mRNA聚合酶链反应(PCR)扩增;或基因产物表达免疫印迹法;或其他合适的测试被引入的核酸序列或其相应的基因产物的表达的分析方法。本领域的技术人员理解的是,以足以生产所需产品的量来表达外源性核酸以及进一步理解的是,可以利用本领域熟知的和本文披露的方法优化表达水平以获得足够的表达。

[0080] 在某些实施方式中,本发明提供一种用于生产丁二烯的方法,该方法包括培养非天然存在的微生物,该微生物包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶;乙酰乙酰基-CoA还原酶;3-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成);巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆醇激酶;2-丁烯基-4-磷酸激酶;丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;巴豆酸酯还原酶;巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成);戊烯二酰基-CoA脱羧酶;戊二酰基-CoA脱氢酶;3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶;4-羟基丁酰基-CoA脱水酶或者巴豆醇二磷酸激酶(图2)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、乙酰乙酰基-CoA还

原酶、3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶和丁二烯合酶(图2,步骤A-H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶、3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶、丁二烯合酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)(图2,步骤A-C、K、F、G、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶、3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、丁二烯合酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤A-C、K、P、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶、3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆醛还原酶(醇形成)、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶、丁二烯合酶、巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶和巴豆酸酯还原酶(图2,步骤A-C、I、J、E、F、G、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶;乙酰乙酰基-CoA还原酶;3-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆醛还原酶(醇形成);丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;巴豆酸酯还原酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤A-C、I、J、E、P、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶、3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、丁二烯合酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤A-E、P、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶和丁二烯合酶(图2,步骤L、D-H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶、丁二烯合酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)(图2,步骤L、K、F、G、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶、丁二烯合酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤L、K、P、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆醇激酶;2-丁烯基-4-磷酸激酶;丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶和巴豆酸酯还原酶(图2,步骤L、I、J、E、F、G、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括戊烯二酰基-CoA脱羧酶;巴豆醛还原酶(醇形成);丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;巴豆酸酯还原酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤L、I、J、E、P、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、丁二烯戊烯二酰基-CoA脱羧酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤L、C、D、E、P、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶和丁二烯合酶(图2,步骤M、D-H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶、丁二烯合酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)(图2,步骤M、K、F、G、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶、丁二烯合酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤M、K、P、H)。在一个方面,该方

法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆醇激酶;2-丁烯基-4-磷酸激酶;丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶和巴豆酸酯还原酶(图2,步骤M、I、J、E、F、G、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括戊二酰基-CoA脱氢酶;巴豆醛还原酶(醇形成);丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;巴豆酸酯还原酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤M、I、J、E、P、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、丁二烯合酶、戊二酰基-CoA脱氢酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤M、C、D、E、P、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶和丁二烯合酶(图2,步骤N、D-H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶、丁二烯合酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)(图2,步骤N、K、F、G、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶、丁二烯合酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤N、K、P、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆醇激酶;2-丁烯基-4-磷酸激酶;丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶和巴豆酸酯还原酶(图2,步骤N、I、J、E、F、G、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶;巴豆醛还原酶(醇形成);丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;巴豆酸酯还原酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤N、I、J、E、P、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、丁二烯合酶、3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤N、C、D、E、P、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶和丁二烯合酶(图2,步骤O、D-H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆醇激酶、2-丁烯基-4-磷酸激酶、丁二烯合酶和巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)(图2,步骤O、K、F、G、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶、丁二烯合酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤O、K、P、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆醛还原酶(醇形成);巴豆醇激酶;2-丁烯基-4-磷酸激酶;丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶和巴豆酸酯还原酶(图2,步骤O、I、J、E、F、G、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括4-羟基丁酰基-CoA脱水酶;巴豆醛还原酶(醇形成);丁二烯合酶;巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶或者转移酶;巴豆酸酯还原酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤O、I、J、E、P、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括3-羟基丁酰基-CoA脱水酶、巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)、巴豆醛还原酶(醇形成)、丁二烯合酶、4-羟基丁酰基-CoA脱水酶和巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤O、C、D、E、P、H)。

[0081] 在某些实施方式中,本发明提供一种用于生产丁二烯的方法,该方法包括培养一

种非天然存在的微生物,该微生物包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括赤藓糖-4-磷酸还原酶、赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶、4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶、赤藓醇2,4-环二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶、丁烯基4-二磷酸异构酶、丁二烯合酶、赤藓糖-4-磷酸激酶、赤藓糖还原酶或者赤藓醇激酶(图3)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括赤藓糖-4-磷酸还原酶、赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶、4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶、赤藓醇2,4-环二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶和丁二烯合酶(图3,步骤A-F和H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括赤藓糖-4-磷酸还原酶、赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶、4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶、赤藓醇2,4-环二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶、丁烯基4-二磷酸异构酶和丁二烯合酶(图3,步骤A-H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶、4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶、赤藓醇2,4-环二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶、丁二烯合酶、赤藓糖-4-磷酸激酶、赤藓糖还原酶和赤藓醇激酶(图3,步骤I、J、K、B-F、H)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶、4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶、赤藓醇2,4-环二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶、丁烯基4-二磷酸异构酶、丁二烯合酶、赤藓糖-4-磷酸激酶、赤藓糖还原酶和赤藓醇激酶(图3,步骤I、J、K、B-H)。

[0082] 在某些实施方式中,本发明提供一种用于生产丁二烯的方法,该方法包括培养一种非天然存在的微生物,该微生物包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括编码丁二烯途径酶的以足以产生丁二烯的量表达的至少一种外源性核酸,该丁二烯途径包括丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(酮还原)、3-羟基戊二酰基-CoA还原酶(醛形成)、3-羟基-5-氧代戊酸还原酶、3,5-二羟基戊酸激酶、3-羟基-5-磷酸酰氧基戊酸激酶、3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸脱羧酶、丁烯基4-二磷酸异构酶、丁二烯合酶、3-羟基戊二酰基-CoA还原酶(醇形成)、3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(醛形成)、3,5-二氧代戊酸还原酶(酮还原)、3,5-二氧代戊酸还原酶(醛还原)、5-羟基-3-氧代戊酸还原酶或者3-氧代-戊二酰基-CoA还原酶(CoA还原和醇形成)(图4)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(酮还原)、3-羟基戊二酰基-CoA还原酶(醛形成)、3-羟基-5-氧代戊酸还原酶、3,5-二羟基戊酸激酶、3-羟基-5-磷酸酰氧基戊酸激酶、3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸脱羧酶、丁烯基4-二磷酸异构酶和丁二烯合酶(图4,步骤A-I)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、3,5-二羟基戊酸激酶、3-羟基-5-磷酸酰氧基戊酸激酶、3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸脱羧酶、丁烯基4-二磷酸异构酶、丁二烯合酶、3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(醛形成)、3,5-二氧代戊酸还原酶(醛还原)和5-羟基-3-氧代戊酸还原酶。(图4,步骤A、K、M、N、E、F、G、H、I)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、3-羟基-5-氧代戊酸还原酶、3,5-二羟基戊

酸激酶、3-羟基-5-磷酸氧基戊酸激酶、3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸脱羧酶、丁烯基4-二磷酸异构酶、丁二烯合酶、3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(醛形成)和3,5-二氧代戊酸还原酶(酮还原)。(图4,步骤A、K、L、D、E、F、G、H、I)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、3,5-二羟基戊酸激酶、3-羟基-5-磷酸氧基戊酸激酶、3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸脱羧酶、丁烯基4-二磷酸异构酶、丁二烯合酶、5-羟基-3-氧代戊酸还原酶和3-氧代-戊二酰基-CoA还原酶(CoA还原和醇形成)。(图4,步骤A、O、N、E、F、G、H、I)。在一个方面,该方法包括具有丁二烯途径的微生物,该丁二烯途径包括丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶、3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(酮还原)、3,5-二羟基戊酸激酶、3-羟基-5-磷酸氧基戊酸激酶、3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸脱羧酶、丁烯基4-二磷酸异构酶、丁二烯合酶和3-羟基戊二酰基-CoA还原酶(醇形成)。(图4,步骤A、B、J、E、F、G、H、I)。

[0083] 可以利用熟知的方法进行适用于丁二烯生产测试的纯化和/或测定。可以为每个设计的待测菌株培育合适的复制品,如一式三份的培养物。例如,可以监测所设计的生产宿主中产物和副产物的形成。可以通过各种方法,例如HPLC(高效液相色谱)、GC-MS(气相色谱-质谱法)和LC-MS(液相色谱-质谱法)或者其他利用本领域熟知的例行程序的合适的分析方法来分析最终产品和中间体以及其他有机化合物。也可以利用培养上清液对产物在发酵肉汤中的释放进行测试。可以利用,例如针对葡萄糖和醇的折光率检测器以及针对有机酸的紫外检测器(Lin等人,Biotechnol.Bioeng.90:775-779(2005))通过HPLC或本领域熟知的其他合适的测定和检测方法对副产物和残余葡萄糖进行定量。也可以利用本领域熟知的方法对来自外源性DNA序列的个别酶或蛋白质活性进行测定。典型的测定方法见于Manual on Hydrocarbon Analysis(ASTM Manula Series,A.W.Drews,ed.,第6版,1998,American Society for Testing and Materials,Baltimore,Maryland)。

[0084] 可以利用本领域熟知的各种方法从培养物中的其他组分中分离丁二烯。这类分离方法包括,例如萃取程序以及包括如下的方法:连续液液萃取法、全蒸发法、膜滤法、膜分离法、反渗透法、电渗析法、蒸馏法、结晶法、离心法、萃取过滤法、离子交换色谱法、体积排阻色谱法、吸附色谱法以及超滤法。所有上述方法为本领域所熟知。

[0085] 本文所述的任何所述非天然存在的微生物可以培养以生产和/或分泌本发明的生物合成产物。例如,丁二烯生产者可以培养用于丁二烯的生物合成生产。

[0086] 为了生产丁二烯,在具有碳源和其他必需营养物的培养基中培养重组菌株。在发酵罐中保持厌氧条件以降低整个过程的消耗,这在有时候是需要的并且肯定是非常可取的。这种条件的获取可以通过,例如首先用氮喷射该培养基,然后用垫片和钳口盖密封烧瓶。对于培育不遵循厌氧的菌株,可以通过在该垫片上打一小孔进行有限通气来采用微氧或者基本上厌氧的条件。示例性的厌氧条件已有先前描述并为本领域所熟知。示例性的有氧和厌氧条件的描述见于,例如2007年8月10日提交的美国公布号2009/0047719。如本文所披露,可以以分批、补料分批或连续的方式进行发酵。

[0087] 如果需要,可以将培养基的pH值保持为所需的pH值,特别是按需要通过添加碱(如NaOH或其他碱)或酸保持为中性pH值(如约7的pH值),以将培养基保持在所需的pH值。可以通过利用分光光度计(600nm)测量光密度确定生长速率,以及可以通过监测随着时间的推移碳源的消耗确定葡萄糖摄取速率。

[0088] 生长培养基可以包括,例如任何可以向该非天然存在的微生物提供碳源的碳水化合物源。这类源包括,例如糖类(如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、果糖、蔗糖和淀粉)。其他碳水化合物源包括,例如可再生的原料和生物质。可在本发明所述的方法中用作原料的示例性类型的生物质包括纤维素生物质、半纤维素生物质和木素原料或原料的木素部分。这类生物质原料包含,例如用作碳源的碳水化合物底物(如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、果糖和淀粉)。考虑到本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员会理解除上文那些示例性的原料和生物质,可再生的原料和生物质也可用以培养用于生产丁二烯的本发明的所述微生物。

[0089] 除了如上文的那些示例性的可再生的原料,本发明所述的丁二烯微生物也可以修改为将合成气作为其碳源进行培育。在这个特定的实施方式中,在生产丁二烯的生物中表达一种或多种蛋白质或酶,以提供用于利用合成气或其他气态碳源的代谢途径。

[0090] 合成气体(也称为合成气或者发生炉煤气)是煤炭和碳质材料(如包括农作物和农业剩余物的生物质材料)气化的主要产物。合成气是一种主要含 H_2 和CO的混合物以及可以通过气化任何有机原料(包括但不限于煤炭、煤油、天然气、生物质以及有机废物)获得。一般地,在高燃料/氧气比的条件下进行气化。虽然大部分含 H_2 和CO,合成气还可以包括少量的 CO_2 和其他气体。因此,合成气体提供了有成本效益的气体碳源,如CO以及另外地, CO_2 。

[0091] Wood-Ljungdahl途径催化从CO和 H_2 到乙酰基-CoA和其他产物(如乙酸)的转化。能够利用CO和合成气的生物一般地也具有通过该Wood-Ljungdahl途径包含的相同的基本酶和转化组利用 CO_2 和 CO_2/H_2 混合物的能力。通过微生物依赖 H_2 的从 CO_2 到乙酸的转化得到公认很长时间之后,显示,CO也可以被相同的生物采用以及涉及的途径也相同。已有显示,许多产乙酸菌在 CO_2 的存在下生长,以及只要存在氢以提供必需的还原当量,便生产化合物,如乙酸(见例如,Drake, Acetogenesis, pp. 3-60 Chapman and Hall, New York, (1994))。这可以概括为如下的反应式:

[0092] $2CO_2 + 4H_2 + n \text{ ADP} + n \text{ Pi} \rightarrow CH_3COOH + 2H_2O + n \text{ ATP}$ 。

[0093] 因此,具有该Wood-Ljungdahl途径的非天然存在的微生物也可以利用 CO_2 和 H_2 混合物来生产乙酰基-CoA和其他所需的产品。

[0094] 该Wood-Ljungdahl途径为本领域熟知以及由12个反应组成,所述反应可以分为两个支路:(1)甲基支路和(2)羰基支路。该甲基支路将合成气转化为甲基-四氢叶酸(甲基-THF)而该羰基支路将甲基-THF转化为乙酰基-CoA。依次通过如下酶或者蛋白质催化该甲基支路中的反应:铁氧还蛋白氧化还原酶、甲酸脱氢酶、乙酰基四氢叶酸合成酶、次甲基四氢叶酸环化脱水酶、亚甲基四氢叶酸脱氢酶和亚甲基四氢叶酸还原酶。依次通过如下酶或者蛋白质催化在该羰基支路中的反应:甲基四氢叶酸:类咕啉蛋白质甲基转移酶(例如AcsE)、钴铁硫蛋白质、镍-蛋白质装配蛋白质(例如AcsF)、铁氧还蛋白、乙酰基-CoA合酶、一氧化碳脱氢酶和镍-蛋白质装配蛋白质(例如CooC)。遵循本文提供的关于引入足够数量的编码核酸以生成丁二烯途径的教诲和指导,本领域的技术人员会理解,关于至少引入编码宿主生物中缺少的Wood-Ljungdahl酶或者蛋白质的核酸,也可以进行相同的工程设计。因此,将一种或者多种编码核酸引入本发明的微生物使得修饰的生物包含完整的Wood-Ljungdahl途径,这将获得合成气利用能力。

[0095] 另外,与一氧化碳脱氢酶和/或氢化酶活性偶合的还原(逆)三羧酸循环用于也可

以用于CO、CO₂和/或H₂到乙酰基-CoA和其他产物(如乙酸)的转化。能够经由还原TCA途径来固定碳的生物可以利用一种或者多种如下酶:ATP柠檬酸-裂解酶、柠檬酸裂解酶、乌头酸酶、异柠檬酸脱氢酶、 α -酮戊二酸:铁氧还蛋白氧化还原酶、琥珀酰-CoA合成酶、琥珀酰-CoA转移酶、延胡索酸还原酶、延胡索酸酶、苹果酸脱氢酶、NAD(P)H:铁氧还蛋白氧化还原酶、一氧化碳脱氢酶,以及氢化酶。具体地,将通过一氧化碳脱氢酶和氢化酶从CO和/或H₂萃取得到的还原当量用于经由还原TCA循环将CO₂固定入乙酰基-CoA或者乙酸。乙酸可以通过酶(如乙酰基-CoA转移酶、乙酸激酶/磷酸转乙酰酶以及乙酰基-CoA合成酶)转化为乙酰基-CoA。乙酰基-CoA可以通过丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶和糖异生酶转化为丁二烯、甘油醛-3-磷酸、磷酸烯醇丙酮酸以及丙酮酸。遵循本文提供的关于引入足够数量的编码核酸以生成丁二烯途径的教诲和指导,本领域的技术人员会理解,关于至少引入编码宿主生物中缺少的还原TCA途径酶或者蛋白质的核酸,也可以进行相同的工程设计。因此,将一种或者多种编码核酸引入本发明的微生物使得修饰的生物包含完整的还原TCA途径,这将获得合成气利用能力。

[0096] 因此,考虑到本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员会理解,可以生产一种非天然存在的微生物,该微生物当在碳源(如碳水化合物)上培养时分泌本发明的生物合成的化合物。这类化合物包括,例如,丁二烯以及在丁二烯途径中的任何中间体代谢产物。所有需要的是在一种或多种所需的酶或蛋白质活性中进行设计,以实现所需化合物或中间体(包括,例如部分或全部所述丁二烯生物合成途径的包涵物)的生物合成。因此,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述微生物当培育在碳水化合物或其他碳源上时生产和/或分泌丁二烯以及当培育在碳水化合物或其他碳源上时分泌丁二烯途径中所示的任何中间体代谢产物。本发明的所述生产丁二烯的微生物可以启动始自中间体(例如,乙酰乙酰基-CoA、3-羟基丁酰基-CoA、巴豆酰基-CoA、巴豆醛、巴豆醇、2-丁烯基-磷酸、2-丁烯基-4-二磷酸、赤藓醇-4-磷酸、4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇、2-磷酸-4-(胞啶5'-二磷酸)-赤藓醇、赤藓醇-2,4-环二磷酸、1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸、丁烯基4-二磷酸、2-丁烯基4-二磷酸、3-氧代戊二酰基-CoA、3-羟基戊二酰基-CoA、3-羟基-5-氧代戊酸、3,5-二羟基戊酸、3-羟基-5-磷酸氧基戊酸、3-羟基-5-[羟基(磷酸氧基)磷酸基]氧基戊酸、巴豆酸、赤藓糖、赤藓醇、3,5-二氧代戊酸或者5-羟基-3-氧代戊酸)的合成。

[0097] 利用本领域熟知的方法如本文所示范构建本发明所述的非天然存在的微生物,以以足够的量外源性表达编码丁二烯途径酶的至少一种核酸,以生产丁二烯。理解的是,在足以生产丁二烯的条件下培养本发明的所述微生物。遵循本文提供的教诲和指导,本发明所述的非天然存在的微生物可以实现丁二烯的生物合成,产生在约0.001-2000mM或更多之间的细胞内浓度。一般地,丁二烯的细胞内浓度在约3-1500mM或更多之间,特别地在约5-1250mM或更多之间以及更特别地在约8-1000mM之间,包括约10mM、100mM、200mM、500mM、800mM或更多。也可以从本发明的所述非天然存在的微生物获得这些示例性范围的每个之间和以上的细胞内浓度。

[0098] 在一些实施方式中,培养条件包括厌氧或基本上厌氧培育或维持条件。示例性的厌氧条件已有先前描述并为本领域所熟知。用于发酵过程的示例性的厌氧条件的描述见于本文以及,例如2007年8月10日提交的美国专利申请号US2009/0047719。任何这些条件可以与所述非天然存在的微生物以及本领域熟知的其他厌氧条件一起使用。在这种厌氧或基本

上厌氧的条件下,丁二烯生产者可以合成细胞内浓度为5-10mM或更多以及本文示例性的所有其他浓度的丁二烯。理解的是,虽然上文的描述指细胞内浓度,生产丁二烯的微生物可以在细胞内生产丁二烯和/或分泌产物到培养基内。

[0099] 在一些实施方式中,可以选择碳原料和其他细胞摄取源,例如磷酸盐、氨、硫酸盐、氯化物和其他卤素来改变丁二烯或任何丁二烯途径中间体中存在的原子的同位素分布。上面列举的各种碳原料和其他摄取源在本文中将被统称为“摄取源”。摄取源可以为产品丁二烯或丁二烯途径中间体(包括在任何点从该途径岔开时生成的任何丁二烯杂质)中存在的任何原子提供同位素富集。可以针对任何靶原子(包括,例如碳、氢、氧、氮、硫、磷、氯化物或其他卤素)实现同位素富集。

[0100] 在一些实施方式中,可以选择摄取源以改变碳-12、碳-13和碳-14的比率。在一些实施方式中,可以选择摄取源以改变氧-16、氧-17和氧-18的比率。在一些实施方式中,可以选择摄取源以改变氢、氘和氚的比率。在一些实施方式中,可以选择摄取源以改变氮-14和氮-15的比率。在一些实施方式中,可以选择摄取源以改变硫-32、硫-33、硫-34和硫-35的比率。在一些实施方式中,可以选择摄取源以改变磷-31、磷-32和磷-33的比率。在一些实施方式中,可以选择摄取源以改变氯-35、氯-36和氯-37的比率。

[0101] 在一些实施方式中,可以通过摄取源的合成化学富集获得该摄取源的靶同位素比率。这种同位素富集的摄取源可以从市场上购得或在实验室内制备得到。在一些实施方式中,通过选择摄取源在自然界中的来源可以获得该摄取源的靶同位素比率。在一些这样的实施方式中,例如,碳源可以选自衍生自化石燃料的碳源(其碳-14可能相对贫化);或环境碳源,如CO₂(其与其衍生自石油的对应物相比,可能具有更大量的碳-14)。

[0102] 不稳定的碳同位素碳-14或放射性碳组成地球大气层中碳原子的大约1/10¹²。碳-14的半衰期约为5700年。储备在上层大气中通过涉及宇宙射线和普通氮(¹⁴N)的核反应得以补充。化石燃料中不含碳-14,因为其腐烂发生在很久以前。燃烧化石燃料可降低大气中的碳-14组分(“休斯效应”)。事实上,自核弹试验开始向大气中注入碳-14起,在树木年轮上测得,大气中的碳-14从约1850年到1954年下降了2%至2.5%。

[0103] 美国开发了ASTM D6866作为用于使用放射性碳测年法测定固体、液体和气体样品的生物基含量的标准化分析方法。具体来说,ASTM D6866是应美国农业部的要求开发的,以满足要求立法的联邦机构,根据制造商产品中的最大生物量对制造商优先采购(根据2002年的Farm Security and Rural Investment Act)。很快便证实,放射性碳测年法是用于产品生物基含量测定的唯一可行且准确的技术。工业用的放射性碳测年法的现行标准完成于2004年,且目前被美国联邦法律(7CFR2902)引用。ASTM D6866首次公开于2004年。从那时起,已经发布有好几个版本。该标准的当前有效版本是2011年4月1日起生效的ASTM D6866-11。

[0104] 利用本领域已知的技术,如稳定同位素比质谱(SIRMS)和点特异性天然同位素分馏核磁共振(SNIF-NMR),通过质谱法很容易对同位素富集进行评估。这种质谱技术可以结合分离技术,如液相色谱(LC)和/或高效液相色谱法(HPLC)。

[0105] 通过加速器质谱(AMS)测得的碳-14(¹⁴C)与碳-12(¹²C)的比率估算单体的生物基含量(即,Fm或现代组分(modern fraction))。具体而言,该现代组分(Fm)根据如下表达式计算:Fm=(S-B)/(M-B),其中B、S和M分别代表空白对照、样品和现代参考物的¹⁴C/¹²C比率。

现代组分是样品相对于“现代”的 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比率偏差的量度。现代被定义为被归一化为 $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -19\text{‰}$ 的, NBS草酸I(即SRM4990b)的放射性碳浓度(公元1950年)的95%。Olsson, The use of Oxalic acid as a Standard. 见Radiocarbon Variations and Absolute Chronology, Nobel Symposium, 12th Proc., John Wiley & Sons, New York (1970)。使用国际上通用的关于被归一化为 $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -19\text{‰}$ 的NBS草酸I(SRM4990b)的比活度的0.95倍的定义算得AMS结果。这相当于 $1.176 \pm 0.010 \times 10^{-12}$ 的绝对(公元1950年) $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比率。Karlen等人, Arkiv Geofysik, 4:465-471(1968)。

[0106] 草酸标准物(SRM4990b或者H0x1)从1955年的甜菜作物中制得。虽然当时制有1000磅,但是这种草酸标准物已经不能从市场上购得了。当SRM4990b的存量开始减少时,制备了另一种标准物草酸II。草酸II标准物(H0x2; N. I. S. T名称为SRM4990C)从1977年法国的甜菜糖蜜作物中制得。在20世纪80年代初,一组12个实验室测量了这两个标准的比率。草酸II与I的活性比率为 1.293 ± 0.001 (加权平均)。Mann, Radiocarbon, 25(2):519-527(1983)。H0x II的同位素比率是 -17.8‰ 。ASTM D6866-11建议将SRM4990C用作现代标准物。Fm=0%表示材料中完全没有碳-14原子,从而表明是化石(例如石油基)碳源。Fm=100%(针对1950年后炸弹向大气中注入碳-14的现象校正之后)同样表明是完全现代的碳源。

[0107] 如ASTM D6866中所述,现代碳百分数(pMC)可能大于100%,这是由于20世纪50年代核试验方案的持续但递减的效果,这导致如ASTM D6866-11中所述的,大气中有相当大量的碳-14富集。因为所有样品碳-14活性参考“炸弹前”(pre-bomb)标准,而因为几乎所有新的生物基产品在后炸弹环境(post-bomb environment)中生产,所以所有的pMC值(同位素组分校正后)必须乘以0.95(自2010年起),以更好地反映样品真实的生物基含量。大于103%的生物基含量表明,要么发生了分析错误,要么生物基碳的来源有些年头。

[0108] ASTM D6866相对材料的总有机物含量对生物基含量进行量化,并不考虑存在的无机碳及其他非含碳物质。下面通过一些示例性的配方及其相应的ASTM D6866结果进行说明:

[0109] 产品1-具有50%淀粉基材料和50%水的液体。生物基含量=100%(产品1具有50%有机物含量以及该组分的100%是生物基的);

[0110] 产品2-具有50%淀粉基材料、25%石油基材料、25%水的液体。生物基含量=66.7%(产品2具有75%有机物含量,但该组分中只有50%是生物基的);

[0111] 产品3-50%是玻璃以及50%是来自石油的聚乙烯的固体。生物基含量=0%(产品3具有50%但来自化石源的有机碳;玻璃是不含碳的);

[0112] 产品4-50%是玻璃以及50%是来自生物质的聚乙烯的固体。生物基含量=100%(产品4具有50%有机碳以及其100%是可再生的);以及

[0113] 产品5-具有50%大豆基材料、30%石油基材料、10%水和10%无机物质的液体。生物基含量=62.5%(产品5具有80%有机碳,但其中只有50%是可再生的)。

[0114] 碳-14测年技术在量化可再生材料生物基含量方面的应用为本领域已知。Currie等人, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 172:281-287(2000)。例如,碳-14测年法已被用来量化含对苯二甲酸盐的材料生物基含量。Colonna等人, Green Chemistry, 13:2543-2548(2011)。值得注意的是,衍生自可再生的1,3-丙二醇的聚对苯二甲酸丙二醇酯(PPT)聚合物和衍生自石油的对苯二甲酸产生了接近30%的Fm值(即,

由于3/11的聚合物碳衍生自可再生的1,3-丙二醇以及8/11衍生自化石端元(end member)对苯二甲酸)。Currie等人,同上文。与此相反,衍生自可再生的1,4-丁二醇和可再生的对苯二甲酸的聚对苯二甲酸丁二醇酯聚合物产生了超过90%的生物基含量。Colonna等人,同上文。

[0115] 因此,在一些实施方式中,本发明提供了具有反映大气中碳摄取源的碳-12、碳-13和碳-14的比率的丁二烯或丁二烯中间体。例如,在一些方面,丁二烯或丁二烯中间体可以具有至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或高达100%的Fm值。在一些这类实施方式中,该摄取源是CO₂。在一些实施方式中,本发明提供了具有反映石油基碳摄取源的碳-12、碳-13和碳-14的比率的丁二烯或丁二烯中间体。在这方面,丁二烯或丁二烯中间体可以具有小于10%、小于5%、小于2%或小于1%的Fm值。在一些实施方式中,本发明提供了具有碳-12、碳-13和碳-14的比率的丁二烯或丁二烯中间体,所述比率通过将大气中的碳摄取源与石油基摄取源相结合而获得。摄取源的这种组合是碳-12、碳-13和碳-14的比率可以变化的一种手段。

[0116] 除本文披露的培养和发酵条件之外,用于实现丁二烯的生物合成的培育条件可以包括将渗透保护剂添加到培养条件中。在某些实施方式中,可以在渗透保护剂的存在下如本文所述维持、培养或者发酵本发明所述的非天然存在的微生物。简言之,渗透保护剂指作为渗透物起作用以及帮助如本文所述的微生物经受得住渗透应力的化合物。渗透保护剂包括但不限于甜菜碱、氨基酸以及海藻糖。这类渗透保护剂的非限制性的实施例是甘油酸甜菜碱、果仁糖甜菜碱、二甲基噻亭、二甲基巯基丙酸(dimethylsulfoniopropionate)、3-二甲基巯基-2-甲基丙酸、哌可酸、二甲基巯基乙酸、胆碱、L-肉毒碱和四氢嘧啶。在一个方面,该渗透保护剂是甘油酸甜菜碱。本领域的任一普通技术人员理解的是,适于保护本文所述的微生物不受渗透应力影响的渗透保护剂的量和类型将取决于所用的微生物。在培养条件下的渗透保护剂的量可以是例如,不多于约0.1mM、不多于约0.5mM、不多于约1.0mM、不多于约1.5mM、不多于约2.0mM、不多于约2.5mM、不多于约3.0mM、不多于约5.0mM、不多于约7.0mM、不多于约10mM、不多于约50mM、不多于约100mM或者不多于约500mM。

[0117] 培养条件可以包括,例如液体培养程序以及发酵和其他大规模培养程序。如本文所描述,在厌氧或基本上厌氧的培养条件下可以获得本发明生物合成产物的特别有用的收率。

[0118] 如本文所描述,一种用于实现丁二烯生物合成的示例性培育条件包括厌氧培养或发酵条件。在某些实施方式中,本发明的所述非天然存在的微生物可以在厌氧或基本上厌氧的条件下维持、培养或发酵。简言之,厌氧条件指缺乏氧的环境。基本上厌氧的条件包括,例如培养菌分批发酵或连续发酵以便培养基中溶解的氧浓度保持在0和10%的饱和度之间。基本上厌氧的条件还包括在保持在小于1%的氧气氛中的密封室内部的液体培养基中或固体琼脂上培育或静置细胞。可以通过,例如用N₂/CO₂混合物或一种或多种其他合适的非氧气体喷射培养菌来保持氧的百分比。

[0119] 本文所述的培养条件可以按比例扩大并连续增长,以用于生产丁二烯。示例性的培养程序包括,例如补料分批发酵和分批分离;补料分批发酵和连续分离;或者连续发酵和连续分离。所有这些过程都为本领域所熟知。发酵程序对于工业规模的丁二烯的生物合成生产是特别有用的。一般地以及与非连续培养程序一样,丁二烯的连续和/或接近连续的生

产将包括在足够的营养物和培养基中培养本发明的生产丁二烯的非天然存在的生物,以维持和/或接近维持指数期的生长。这种条件下的连续培养可以包括,例如1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多。此外,连续培养可以包括1周、2周、3周、4周或5周或更多周乃至数月。替代性地,如果适于具体的应用,本发明的生物可以培养数小时。理解的是,连续和/或接近连续培养的条件还可以包括这些示例性周期之间的所有的时间间隔。进一步理解的是,本发明的所述微生物的培养时间是足以生产足够量的用于所需目的的产品的时间段。

[0120] 发酵程序为本领域所熟知。简言之,可以以,例如补料分批发酵和分批分离;补料分批发酵和连续分离;或连续发酵和连续分离的方式利用用于丁二烯的生物合成生产的发酵。分批和连续发酵程序的例子为本领域所熟知。

[0121] 除了上文将本发明的所述丁二烯生产者分别用于丁二烯的连续的生产的发酵程序,所述丁二烯生产者还可以,例如同时经受化学合成程序,以将产物转化为其他化合物,以及产物可以从发酵培养物中分离以及后续经受化学或酶催转化,以将产物转化为其他化合物(如有需要)。

[0122] 为生成更好的生产者,可以利用代谢建模优化培育条件。建模还可被用以设计另外优化途径应用的基因敲除(参见,例如美国专利公布US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、US2004/0072723、US2003/0059792、US2002/0168654和US2004/0009466;以及美国专利号7,127,379)。建模分析允许对偏移代谢对细胞生长的影响进行可靠的预测,以便更高效地生产丁二烯。

[0123] 一种用于识别和设计支持所需产品的生物合成的代谢改变的计算方法是OptKnock计算框架(Burgard等人,Biotechnol.Bioeng.84:647-657(2003))。OptKnock是一种代谢建模和模拟程序,该程序提出基因删除或者中断策略,其产生从基因方面来说稳定的微生物,该微生物超过定额地生产靶产品。具体而言,该框架检查微生物的完整的代谢和/或生化网络,以便提出迫使所需的生化品变为细胞生长的专性副产品的基因操作。通过战略性放置的基因缺失或其他功能基因中断把生化生产与细胞生长耦合起来,在生物反应器中长时间之后,施加至设计菌株的生长选择压力由于结合强制性生长的生化生产引起效能改善。最后,当基因缺失被构建时,由于OptKnock选择的基因将从基因组完全去除,设计菌株回复到其野生型状态的可能性可以忽略不计。因此,该计算方法可用以识别导致所需产品生物合成的替代性途径或与所述非天然存在的微生物结合用于所需产品生物合成的进一步优化。

[0124] 简言之,术语OptKnock在本文用以指用于建模细胞代谢的计算方法和系统。OptKnock方案涉及将具体的约束因素引入通量平衡分析(FBA)模型的模型和方法的框架。这些约束因素包括,例如定性动力信息、定性调节信息和/或DNA微阵列实验数据。OptKnock还通过,例如收紧通过通量平衡模型导出的通量边界以及随后在基因添加或删除的存在下探测代谢网络的效能极限来计算各种代谢问题的解。OptKnock计算框架允许使代谢网络的效能极限的有效质询可行的模型表述的构建以及提供用于解决引起的混合整数线性规划问题的方法。本文称为OptKnock的代谢建模和模拟方法的描述见于,例如2002年1月10日提交的美国公布2002/0168654、2002年1月10日提交的国际专利号PCT/US02/00660以及2007年8月10日提交的美国公布2009/0047719。

[0125] 另一种用于识别和设计支持产品的生物合成生产的代谢改变的计算方法是一种

代谢建模和模拟系统,称为**SimPheny**[®]。该计算方法和系统的描述见于,例如2002年6月14日提交的美国公布2003/0233218以及见于2003年6月13日提交的PCT/US03/18838。

SimPheny[®]是一种计算系统,该系统可用以产生硅内网络模型并用以通过生物系统的化学反应模拟质量、能量或电荷的通量,以限定包含该系统中化学反应的任何以及所有可能的函数的解空间,从而确定该生物系统一系列的允许活性。这种方法称为基于约束因素的建模,因为该解空间由约束因素限定,如所包含的反应的已知的化学计量以及通过反应与最大通量关联的反应热动力和能力约束因素。可以询问这些约束因素限定的空间,以确定该生物系统或其生化部件的显型能力和行为。

[0126] 这些计算方法与生物现实一致,因为生物系统具有灵活性并可以许多不同的方式达到相同的结果。生物系统已经通过由所有生物系统必须面对的基本的约束因素限制的进化机制加以设计。因此,基于约束因素的建模策略包括这些一般现实。进一步地,通过约束因素收紧向网络模型连续施加进一步的限制的能力导致解空间的尺寸变小,从而提升生理效能或显型可预测的精确性。

[0127] 考虑到本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员将能够应用各种用于代谢模型和模拟的计算框架,以在宿主微生物中设计和实施所需化合物的生物合成。这种代谢建模和模拟方法包括,例如上文示范为**SimPheny**[®]和OptKnock的计算系统。为了说明本发明,本文描述一些关于用于建模和模拟的OptKnock计算框架的方法。本领域的技术人员会了解如何利用OptKnock将代谢改变的识别、设计和实施应用于为本领域所熟知的任何这类其他代谢模型和模拟计算框架和方法。

[0128] 上文描述的方法将提供待中断的一组代谢反应。该组或代谢修饰内每个反应的消除可以在生物的培育期期间产生作为专性产品的所需产品。由于反应已知,双层OptKnock问题的解也将提供编码一种或多种催化该组反应内每个反应的酶的有关基因。一组反应及其相应的编码参与每个反应的酶的基因的识别通常是自动化过程,通过将反应与具有酶和编码基因之间的关系的反应数据库相关联得以完成。

[0129] 一旦确定,通过至少一个编码该组反应内每个代谢反应的基因的功能中断在靶细胞或生物内实施该组反应,该组反应待中断以便实现所需产品的生产。一种实现该反应组的功能中断的特别有用的手段是通过删除每个编码基因。然而,在某些情况下,通过其他的遗传畸变(包括,例如调节区域如启动子或针对调节因子的顺式结合位点的突变、删除或者通过大量位置的任意处编码序列的截断)中断该反应可能是有利的。这些导致基因组不完全删除的后者畸变可能是有用的,例如,当需要产物耦合的快速评估或当不太可能发生遗传回复变异时。

[0130] 为识别上文描述的导致进一步的中断反应组或可以导致生物合成(包括所需产品的生长耦合的生物合成)的代谢修饰的双层OptKnock问题的其他的富有成效的解,可以实施一种优化方法,称为整数切割。该方法通过在每次迭代时纳入被称为整数切割的另一约束因素迭代地解决上文示例性的OptKnock问题而进行下去。整数切割约束因素有效地阻止解程序选择在任何先前的强制耦合产品生物合成至生长的迭代中确定的恰好相同的反应组。例如,如果先前确定的耦合生长的代谢修饰指定反应1、2和3进行中断,则接下来的约束因素阻止相同的反应被同时考虑在后续解中。该整数切割方法为本领域所熟知以及可以发

现其被描述于,例如Burgard等人,Biotechnol.Prog.17:791-797(2001)。与本文关于其结合用于代谢模型和模拟的OptKnock计算框架的用途所述的所有方法一样,减少迭代计算分析中的冗余的整数切割方法还可以与本领域所熟知的其他计算框架(包括,例如SimPheny®)一起应用。

[0131] 本文示例性的方法允许生物合成地生产所需产品的细胞和生物的构建,包括靶生化产品的生产与被设计包括所识别的基因改变的细胞或生物生长的强制耦合。因此,本文所述的计算方法允许通过选自OptKnock或SimPheny®的硅内方法识别的代谢修饰的识别和实施。代谢修饰组可包括,例如一种或多种生物合成途径酶的添加和/或一种或多种代谢反应的功能中断(包括,例如通过基因删除中断)。

[0132] 如上文所讨论,该OptKnock方法的开发前提是当遭受长期的生长选择时突变微生物网络可以朝向其计算地预测最大生长显型进化。换言之,该方法利用生物在选择压力下的自优化能力。该OptKnock框架允许有基于网络化学计量强迫形成生化生产和细胞生长之间的耦合的基因删除组合的穷尽枚举(exhaustive enumeration)。最佳基因/反应敲除的确认需要双层优化问题的解,所述解选择活性反应组以便所得网络的最佳生长解超过定额地生产相关生化品(Burgard等人,Biotechnol.Bioeng.84:647-657(2003))。

[0133] 大肠杆菌代谢的硅内化学计量模型可用以识别代谢途径必需的基因,如先前示范以及描述,见于,例如美国专利公布US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、US2004/0072723、US2003/0059792、US2002/0168654和US2004/0009466以及见于美国专利号7,127,379。如本文所披露,OptKnock数学框架可用以精确地定位基因删除,导致所需产品的耦合生长的生产。进一步地,双层OptKnock问题的解仅提供一组删除。要枚举所有有意义的解,即导致耦合生长的生产的形成的所有敲除组,可以实施优化技术,称为整数切割。这必伴有通过在每次迭代时纳入被称为整数切割的另一约束因素迭代地解决该OptKnock问题,如上文所讨论。

[0134] 如本文所披露,可将编码丁二烯途径的所需活性的核酸引入宿主生物。在某些情况下,修饰丁二烯途径酶或者蛋白质的活性以提高丁二烯的生产,这会是可取的。例如,可将增加蛋白质或者酶的活性的已知突变引入编码核酸分子。另外,可以采用优化方法来提高酶或者蛋白质的活性和/或降低抑制活性,例如,降低负调节因子的活性。

[0135] 一种这类的优化方法是定向进化。定向进化是一种涉及引入靶向特异性基因的突变以改善和/或改变酶的特性的强有力的方法。可以通过开发和实施允许许多酶变体(如 $>10^4$)的自动筛选的敏感性高通量筛选测定确定改善和/或改变的酶。通常进行迭代轮的诱变和筛选,以使酶具有优化的特性。可有助于识别进行诱变的基因区域的计算算法也已经被开发并可以显著地减少需要生成和筛选的酶变体的数目。已经开发了大量的定向进化技术(参阅Hibbert等人,Biomol.Eng22:11-19(2005);Huisman和Lalonde,In Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries pgs.717-742(2007),Patel(ed.),CRC Press;Otten和Quax.Biomol.Eng22:1-9(2005).;以及Sen等人,Appl Biochem.Biotechnol143:212-223(2007))以有效地创建多样化变体库并且这些方法已被成功地应用于许多酶等级范围内各种特性的改善。通过定向进化技术改善和/或改变的酶特性包括,例如选择性/特异性-针对非自然底物的转化;温度稳定性-针对鲁棒高温处理;

pH值稳定性-针对较低或较高pH值条件下的生物工艺;底物或产物容忍性(tolerance)-以便可以实现高产物滴度;结合性(K_m)-扩大底物结合以包括非自然底物;抑制性(K_i)-以通过产物、底物或关键的中间体去除抑制;活性(k_{cat})-提高酶催反应速率,以获得所需通量;表达水平-增加蛋白质收率和整个途径通量;氧稳定性-针对在有氧条件下空气敏感性酶的操作;以及厌氧活性-针对缺氧条件下需氧酶的操作。

[0136] 下文对示例性的方法进行更详细的描述,所述示例性的方法已经被开发用于基因的诱变和多样化以靶向特异性酶的所需特性。这类方法为本领域的技术人员所熟知。任何这些方法可用以改变和/或优化丁二烯途径酶或者蛋白质的活性。

[0137] EpPCR(Pritchard等人,J Theor.Biol.234:497-509(2005))通过添加 Mn^{2+} 离子降低PCR反应中DNA聚合酶的保真度、通过加偏压于dNTP浓度或通过其他条件性的改变引入随机点突变。将诱变局限于相关靶基因的五步骤克隆过程涉及:1)相关基因的易错PCR扩增;2)限制酶切;3)所需DNA片段的凝胶纯化;4)连接入载体;5)基因变体至合适的宿主的转化以及为改善效能进行的库筛选。该方法可以同时单个基因中产生多个突变,所述突变可用于筛选更大量的具有所需活性的潜在变体。通过EpPCR可以生成大量的突变体,因此高通量筛选测定或选择方法(例如,利用机器人)对于识别那些具有所需特性的突变体是有用的。

[0138] 易错滚环扩增(epRCA)(Fujii等人,Nucleic Acids Res.32:e145(2004);以及Fujii等人,Nat.Protoc.1:2493-2497(2006))具有许多与epPCR相同的要素,除了整个环状质粒被用作模板以及在最后2个核苷酸上具有核酸外切酶抗性硫代磷酸酯键的随机6-引物被用以扩增该质粒,接着转化至细胞,在那里该质粒以串联反复被再环化。调整 Mn^{2+} 浓度可以稍微改变突变率。该技术利用一种简易的易错、单步骤方法以3-4突变/kbp创建质粒的完整副本。无需限制酶消化或特异性引物。此外,该方法通常以可购得的试剂盒的形式被利用。

[0139] DNA或家族改组(Stemmer,Proc Natl Acad Sci USA91:10747-10751(1994));以及Stemmer,Nature370:389-391(1994))通常涉及以核酸酶(如脱氧核糖核酸酶I或核酸内切酶V)消化两种或两种以上的变体基因,以生成随机片段池,所述随机片段在DNA聚合酶的存在下通过退火和扩展循环进行重装,以创建嵌合基因库。片段相互作为引物以及当一个副本作为另一副本的引物(模板切换)时发生重组。该方法可以与>1kbp的DNA序列一起使用。除了片段重装(fragment reassembly)创建的突变重组,该方法以与易错PCR类似的速率在扩展步骤引入点突变。该方法可用以去除有害的、随机的以及中性的突变。

[0140] 交错延伸(StEP)(Zhao等人,Nat.Biotechnol.16:258-261(1998))必伴有模板引物,接着是以变性和持续非常短(短似5秒)的退火/延伸进行的2步PCR的重复循环。成长的片段退火至不同的模板并进一步延伸,这被重复直至形成完整长度的序列。模板切换意味着多数所得的片段具有多个亲本。低保真度聚合酶(Taq和Mutazyme)的组合由于相反的突变谱减少易错偏差。

[0141] 在随机引物重组(RPR)中,随机序列引物被用以生成许多与不同的模板段互补的短DNA片段(Shao等人,Nucleic Acids Res26:681-683(1998))。通过epPCR的碱的错误掺入和错引物(mispriming)带来点突变。基于同源性,短的DNA片段相互作为引物以及通过重复热循环被重组并重装成完整长度。该步骤之前的模板去除保证了低亲本重组。与多数其他

方法类似,该方法进行多重迭代,以逐步得到不同的特性。该技术避免了序列偏差,不依赖于基因长度并且施用需要亲本DNA少之又少。

[0142] 在异源双链重组中,线性质粒DNA被用以形成通过错配修复得以修复的异源双链(Volkov等人,Nucleic Acids Res.27:e18(1999);以及Volkov等人,Methods Enzymol.328:456-463(2000))。错配修复步骤至少是有点诱变的。异源双链的转化比线性同源双链较为高效。这种方法适于大基因和整体操纵子。

[0143] 临时模板随机嵌合生长(RACHITT)(Coco等人,Nat.Biotechnol.19:354-359(2001))采用单链DNA的脱氧核糖核酸酶I断裂和大小分级。在缺少聚合酶的条件下将同源片段杂交至互补单链DNA支架。通过外核酸酶修整任何重叠的未杂交片段端。填充片段之间的空隙,然后连接以提供完整长度的多样化链池,所述链杂交至包含U以阻止扩增的支架。然后破坏所述支架并通过PCR扩增取代以与所述多样化链互补的新链。该方法涉及仅来自一个亲本的一个链(支架)而引物片段则来自其他基因,以及相对选择亲本支架。因此,不会有亲本片段的重退火发生。用核酸外切酶修整重叠的片段。在其他方面,这类似于DNA改组和StEP。因此,应该没有亲子(sibling)、几乎没有灭活物以及没有未改组的亲本。这项技术的优势在于几乎没有或没有亲本基因产生以及相对于标准的DNA改组可以产生许多更多的交叉(crossover)。

[0144] 截短状模板重组延伸(RETT)必伴有在单向单链DNA片段作为模板池的存在下自引物单向生长的链的模板切换(Lee等人,J.Molec.Catalysis26:119-129(2003))。不使用DNA核酸内切酶。通过带有随机引物的DNA聚合酶或利用核酸外切酶的连续删除(serial deletion)生成单向单链DNA。单向单链DNA仅仅是模板而非引物。随机引物和核酸外切酶不引入如同DNA改组/RACHITT的酶催断裂的序列偏差。RETT的优化可以比StEP更容易,因为其利用正常的PCR条件而非非常短的扩展。重组作为PCR步骤的部分发生,即无直接改组。这种方法由于无停顿也可以比StEP更随机。

[0145] 在简并寡核苷酸基因改组(DOGS)中,简并引物被用以控制分子之间的重组;(Bergquist和Gibbs,Methods Mol.Biol352:191-204(2007);Bergquist等人,Biomol.Eng22:63-72(2005);Gibbs等人,Gene271:13-20(2001))这可用以控制其他方法(如DNA改组)再简并亲本基因的趋势。这种方法可以结合选择基因区段的随机诱变(epPCR)。这会是一个良好的阻碍亲本序列再形成的方法。不需要核酸内切酶。通过调整所得区段的输入浓度,可以偏向所需的骨架。这种方法允许自不相关亲本的DNA改组,而无限制酶消化并允许选择随机诱变方法。

[0146] 渐进式切割产生杂合酶(ITCHY)创建带有相关基因或基因片段的1碱基对删除的组合库(Ostermeier等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA96:3562-3567(1999);以及Ostermeier等人,Nat.Biotechnol.17:1205-1209(1999))。以相反的方向将切割物引入至2个不同的基因片上。将这些连接在一起并克隆融合。该技术不需要2个亲本基因之间的同源性。当ITCHY结合DNA改组时,该系统被称为SCRATCHY(见下文)。两者主要的优势是无需亲本基因之间的同源性;例如,通过ITCHY创建大肠杆菌和人基因之间的功能融合。当ITCHY文库形成,捕捉所有可能的交换。

[0147] 除了硫代磷酸dNTP被用以产生切割物,硫代渐进式切割产生杂合酶(THIO-ITCHY)与ITCHY相似(Lutz等人,Nucleic Acids Res29:E16(2001))。相比于ITCHY,THIO-ITCHY可

以更易优化、提供更多的再现性和可调性。

[0148] SCRATCHY结合两种用于重组基因的方法ITCHY和DNA改组(Lutz等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA98:11248-11253(2001))。SCRATCHY兼具ITCHY和DNA改组的最好特性。首先,ITCHY被用来以不依赖DNA同源性的方式创建一套全面的基因片段之间的融合。然后,对该人造的家族执行DNA改组步骤,以增加交叉的数量。计算预测法可以在优化中使用。当序列一致性低于80%时,SCRATCHY比DNA改组更有效。

[0149] 在随机漂变诱变(RNDM)中,通过epPCR进行突变,接着对保留有用活性的那些进行筛选/选择(Bergquist等人,Biomol.Eng.22:63-72(2005))。然后,这些被用于DOGS,以产生具有多个活性突变体之间或活性突变体和其他一些所需的亲本之间的融合的重组体。设计以促进中性突变的隔离;其目的是对保留的催化活性进行这种活性是高于还是低于原始基因中的活性的筛选。当筛选能够检测背景(background)上的活性时,RNDM在高通量测定中是有用的。在产生多样性方面,RNDM已被用作DOGS的前端。该技术提出改组或其他后续步骤之前的活性要求;中性漂变文库被指出相比更小的文库产生更高/更快的活性改善。虽然公布利用epPCR,这可应用于其他大规模诱变方法。

[0150] 序列饱和诱变(SeSaM)是一种随机诱变方法,该方法:1)利用硫代磷酸核苷酸的随机掺入和断裂生成随机长度片段池;该池被用作模板,以2)在“通用”碱(如肌苷)的存在下延伸;3)包含肌苷的补体的复制提供随机碱掺入以及因此提供诱变(Wong等人,Biotechnol.J.3:74-82(2008);Wong等人,Nucleic Acids Res.32:e26(2004);以及Wong等人,Anal.Biochem.341:187-189(2005))。利用这种技术,采用简易的方法在2天到3天内产生突变体的大型文库是可能的。较之于DNA聚合酶的突变偏向,这是不定向的。这种方法的差异使得该技术是epPCR的补充(或者替代性选择)。

[0151] 在合成改组中,重叠的寡核苷酸被设计以编码“靶中所有的遗传多样性”并允许改组的后代有非常高的多样性(Ness,等人,Nat.Biotechnol.20:1251-1255(2002))。在这种技术中,可以将片段设计为被改组。这有助于提高后代所得的多样性。可以设计序列/密码子偏差,以使得更远缘的相关序列以与更密切相关的序列所遵循的速率接近的速率重组。另外,该技术不需要物质上占有模板基因。

[0152] 核苷酸交换和切除技术(NexT)利用dUTP掺入组合,继之以用尿嘧啶DNA糖基化酶然后哌啶进行处理,以执行端点DNA断裂(Muller等人,Nucleic Acids Res.33:e117(2005))。利用内部PCR引物扩展以校正聚合酶重装基因。利用变化的dUPT::dTTP比率,改组的大小是直接可控的。这种是一种利用尿嘧啶掺入和断裂的简易方法的端点反应。对于这种方法,可以使用其他的核苷酸类似物,如8-氧代-鸟嘌呤。此外,该技术对于非常短的片段(86bp)效果良好并具有低的出错率。该项技术中所用的DNA的化学断裂导致几乎没有未改组的克隆。

[0153] 在不依赖序列同源性的蛋白质重组(SHIPREC)中,接头被用以促进两个远缘/不相关的基因之间的融合。核酸酶处理被用以在这两个基因之间产生一系列嵌合体。这些融合产生单交叉文库(Sieber等人,Nat.Biotechnol.19:456-460(2001))。这产生有限类型的改组以及诱变需要一个单独的过程。此外,因为不需要同源性,这项技术可以用两个不相关的亲本基因的每个的变化分数创建嵌合体文库。通过细菌CP450的血红素结合区域融合至哺乳动物CP450的N末端区域对SHIPREC进行了测试;这在更具可溶性的酶中产生了哺乳动物

活性。

[0154] 在基因位点饱和诱变TM(GSSMTM)中,起始材料是在所需的突变位点包含插入和两个引物简并的超螺旋双链DNA质粒(Kretz等人,Methods Enzymol.388:3-11(2004))。带有相关突变的引物为DNA相对链上的相同序列退火。突变通常在引物的中间以及位于每边上正确序列的大约20个核苷酸的侧面。引物中的序列是NNN或NNK(编码)和MNN(未编码)(N=全部4、K=G,T,M=A,C)。延伸后,DpnI被用以消化dam-甲基化DNA,以消除野生型模板。这项技术探索了给定位点(即一个密码子)的所有可能的氨基酸替代。该技术便于产生没有无意义密码子的单个位点上所有可能的取代以及导致最可能的等位基因的相等或近乎相等的表现。该项技术不需要靶酶的结构、作用机理或区域的现有知识。如果随后是改组或基因重装,这项技术创建包含所有可能的组合的单位点向上突变的重组体的多样化文库。这项技术组合的实用性已被证明用于超过50个不同的酶的成功进化以及用于给定酶中一个以上的特性。

[0155] 组合式盒式诱变(CCM)涉及短寡核苷酸盒以大量可能的氨基酸序列改变取代有限区域的用途(Reidhaar-Olson等人,Methods Enzymol.208:564-586(1991);以及Reidhaar-Olson等人,Science241:53-57(1988))。利用这项技术在两个或三个位点进行同时替代是可能的。此外,该方法测试有限范围的位点上大量可能的序列改变。这项技术已被用于探索 λ 抑制子DNA结合区域的信息内容。

[0156] 组合式多重盒式诱变(CMCM)在本质上与CCM相似,除了其被作为更大方案的部分所采用:1)以高突变速率使用epPCR,以2)确认热点和热区域,然后3)通过CMCM延伸,以覆盖蛋白质序列空间的限定区域(Reetz等人,Angew.Chem.Int.Ed Engl.40:3589-3591(2001))。与CCM一样,这种技术实际上可以测试靶区域上所有可能的改变。如果与产生随机突变和改组基因的方法一起使用,其提供一种极好的生成多样的、改组的蛋白质的手段。这种方法成功地将酶的对映选择性提高了51倍。

[0157] 在致突变菌株技术中,附条件的ts致突变质粒允许选择期间随机和自然突变频率增加20到4000倍以及当无需选择时,允许阻碍有害突变的堆积(Selifonova等人,Appl.Environ.Microbiol.67:3645-3649(2001))。这项技术基于质粒衍生mutD5基因,其编码DNA聚合酶III的突变亚基。该亚基结合至内源性DNA聚合酶III并危害任何包含该质粒的菌株中聚合酶III的校正能力。范围广泛的碱替代和移码突变发生。为了有效地使用,一旦实现所需的显型,该致突变质粒应被去除;其通过复制的温度敏感性(ts)起点完成,这允许在41℃下消除质粒。应注意的是,致突变菌株已得到长时间的探究(参见Low等人,J.Mol Biol.260:359-3680(1996))。在这项技术中,观察到非常高的自发突变速率。附条件的特性使非所需的本底突变最小化。这项技术可以结合适应性进化,以提高诱变速率并更迅速地获得所需的显型。

[0158] 精确诱变(LTM)是一种评估和优化选择氨基酸的组合突变的多维诱变方法(Rajpal等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA102:8466-8471(2005))。不是用所有可能的氨基酸改变使每个位点饱和,而是选择一组九个以覆盖氨基酸R基化学品的范围。每个位点的较少改变允许多个位点遭受这种类型的诱变。已通过这种方法实现针对抗体的从低纳摩尔到皮可摩尔的结合亲和性的>800倍增加。这是一种合理的最小化随机组合数目的方法以及这能够通过极大地减少待筛选克隆的数目提高发现改善的性状的能力。这已被用于抗体工程,尤其是提高结合亲和性和/或减少解离。该技术可以结合筛选或选择。

[0159] 基因重装是一种DNA改组方法,该方法可以一次应用于多个基因或应用于创建单基因的大型嵌合体(多重突变)文库(由Verenium Corporation提供的可调基因重装™(TGR™))。通常这项技术与超高通量的筛选结合使用,以质询用于所需改善的所表示的序列空间。这项技术允许不依赖于同源性的多个基因重组。可以利用通过生物信息学分析设计的片段预先确定交叉事件的确切数目和位置。这项技术导致非常高水平的多样性而实际上无亲本基因再形成以及低水平的灭活基因。与GSSM™结合,可以对大范围的突变进行改善活性测试。该方法允许DNA改组的“混合”和“微调”,例如可以优化密码子用法。

[0160] 计算机模拟的蛋白质设计自动化(PDA)是一种优化算法,所述算法固定具有特定折叠子的结构上限定的蛋白质骨架,以及为可以稳固该折叠子和整个蛋白质能量的氨基酸替代寻找序列空间(Hayes等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA99:15926-15931(2002))。这项技术利用计算机模拟的基于结构的熵预测,以便寻求对于蛋白质氨基酸变化的结构容忍性。统计力学被用以计算每个位置上的耦合相互作用。对于氨基酸替代的结构容忍性是耦合的量度。最后,这项技术被设计以取得蛋白质特性的所需修饰同时保持结构特性的完整性。该方法计算地评估并允许非常大量的可能的序列变体(1050)的过滤。待测序列变体的选择与基于最适合的热力学预测相关。明显地,只有稳定性或与稳定性相联系的特性可以用这项技术有效地解决。该方法已被成功地用于一些医用蛋白质,特别用于工程免疫球蛋白。计算机模拟的预测避免测试异常大量的潜在变体。基于现有三维结构的预测比基于假拟结构的预测更有可能成功。这项技术可以很容易地预测和允许许多重同时突变的靶向筛选,由于数目的指数增加这在简单的实验技术是不可能的事情。

[0161] 迭代饱和诱变(ISM)涉及:1)利用结构/功能的知识选择用于酶改善的适当的位点;2)利用诱变方法,如Stratagene QuikChange(Stratagene;San Diego CA)在选定的位点进行饱和诱变;3)筛选/选择所需的特性;以及4)利用改善的克隆,在另一位点重新开始并持续重复,直至实现所需的活性(Reetz等人,Nat.Protoc.2:891-903(2007));以及Reetz等人,Angew.Chem.Int.Ed Engl.45:7745-7751(2006))。这是一种被证明的操作法,其确保在给定位置所有可能的取代有助于筛选/选择。

[0162] 前述的用于诱变的任何方法可以单独或以任何组合使用。此外,所述定向进化方法的任何一个或组合可以结合适应性进化技术使用,如本文所述。

[0163] 应理解的是,本质上不影响本发明各种实施方式的效能的修改也包含在本文提供的本发明的定义中。因此,下文的实施例旨在说明而非限制本发明。

[0164] 实施例I

[0165] 用于生产丁二烯或巴豆醇的途径

[0166] 本文披露了利用经设计的非天然的微生物直接生产丁二烯或巴豆醇的新方法,所述微生物具有普通代谢物转化为四碳二烯,即1,3-丁二烯或巴豆醇所需的酶。通向直接生产丁二烯的一个新路径需要:经由利用醛和醇脱氢酶的还原,从已知的丁醇途径代谢物巴豆酰基-CoA还原为巴豆醇;接着是利用激酶的磷酸化作用,以提供巴豆基焦磷酸以及随后利用异戊二烯合酶或者其变体转化为丁二烯(见图2)。另一路径(图3)是用于异戊间二烯化合物的生物合成、具有良好表征的DXP途径的变体。在这个路径中,底物缺乏2-甲基基团并通过丁二烯合酶提供丁二烯而非异戊二烯。可以利用本文所述的多种方法,例如定向进化从异戊二烯合酶衍生得到这类丁二烯合酶。最后,图4显示出通向丁二烯的途径,该途径涉

及底物3-羟基戊二酰基-CoA,该底物作为天然甲羟戊酸途径底物3-羟基-3-甲基-戊二酰基-CoA的替代性底物(如图1所示)。下文提供用于图2的步骤A-P、图3的步骤A-K和图4的步骤A-O的候选酶。

[0167] 乙酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶(图2,步骤A)

[0168] 乙酰乙酰基-CoA硫解酶将乙酰基-CoA的两个分子转化为乙酰乙酰基-CoA和CoA的每个的一个分子。示例性的乙酰乙酰基-CoA硫解酶包括来自大肠杆菌的atoB(Martin等人, Nat.Biotechnol21:796-802(2003))、来自丙酮丁醇梭菌的thlA和thlB(Hanai等人, Appl Environ Microbiol73:7814-7818(2007);Winzer等人, J.Mol.Microbiol Biotechnol2: 531-541(2000))和来自酿酒酵母的ERG10(Hiser等人, J.Biol.Chem.269:31383-31389 (1994))的基因产物。

[0169]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
AtoB	NP_416728	16130161	大肠杆菌
ThlA	NP_349476.1	15896127	丙酮丁醇梭菌
ThlB	NP_149242.1	15004782	丙酮丁醇梭菌
ERG10	NP_015297	6325229	酿酒酵母

[0170] 乙酰乙酰基-CoA还原酶(图2,步骤B)

[0171] 催化乙酰乙酰基-CoA还原为3-羟基丁酰基-CoA的乙酰乙酰基-CoA还原酶参与梭菌属的多个物种中通向丁酸的乙酰基-CoA发酵途径并已经得到了详细的研究(Jones等人, Microbiol Rev.50:484-524(1986))。来自丙酮丁醇梭菌的由hbd编码的所述酶已经被克隆并功能表达于大肠杆菌中(Youngleson等人, J Bacteriol.171:6800-6807(1989))。此外, 由fadB和fadJ编码的、大肠杆菌中的两种脂肪酸氧化复合物的亚基起3-羟基酰基-CoA脱氢酶的作用(Binstock等人, Methods Enzymol.71Pt C:403-411(1981))。经证实的将乙酰乙酰基-CoA还原为3-羟基丁酰基-CoA的仍然其他的候选基因是来自生枝动胶菌的phbB(Ploux等人, Eur.J Biochem.174:177-182(1988))和来自类球红细菌的phaB(Alber等人, Mol.Microbiol61:297-309(2006))。前面的候选基因是依赖NADPH的,其核苷酸序列已被测定(Peoples等人, Mol.Microbiol3:349-357(1989))以及该基因已表达于大肠杆菌中。对该基因的底物特异性研究得出的结论是,除了乙酰乙酰基-CoA之外,该基因还可接受3-氧代丙酰基-CoA作为底物(Ploux等人,同上,(1988))。另外的候选基因包括克鲁佛氏梭菌中的Hbd1(C-末端域)和Hbd2(N-末端域)(Hillmer和Gottschalk, Biochim.Biophys.Acta3334: 12-23(1974))和牛中的HSD17B10(WAKIL等人, J Biol.Chem.207:631-638(1954))。

[0172]

蛋白质	Genbank ID	GI号	生物
fadB	P21177.2	119811	大肠杆菌
fadJ	P77399.1	3334437	大肠杆菌
Hbd2	EDK34807.1	146348271	克鲁佛氏梭菌
Hbd1	EDK32512.1	146345976	克鲁佛氏梭菌
hbd	P52041.2	18266893	丙酮丁醇梭菌
HSD17B10	002691.3	3183024	牛

phbB	P23238.1	130017	生枝动胶菌
phaB	YP_353825.1	77464321	类球红细菌

[0173] 许多类似的酶已发现于梭菌属的其他物种以及勤奋生金球菌中(Berg等人, Science.318:1782-1786(2007))。

[0174]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
hbd	NP_349314.1	NP_349314.1	丙酮丁醇梭菌
hbd	AAM14586.1	AAM14586.1	拜氏梭菌
Msed_1423	YP_001191505	YP_001191505	勤奋生金球菌
Msed_0399	YP_001190500	YP_001190500	勤奋生金球菌
Msed_0389	YP_001190490	YP_001190490	勤奋生金球菌
Msed_1993	YP_001192057	YP_001192057	勤奋生金球菌

[0175] 3-羟基丁酰基-CoA脱水酶(图2,步骤C)

[0176] 3-羟基丁酰基-CoA脱水酶(EC4.2.1.55)(也称为巴豆酸酶)是一种可逆地使3-羟基丁酰基-CoA脱水以形成巴豆酰基-CoA的烯酰基-CoA水合酶。巴豆酸酶为一些生物,特别是梭菌属物种中正丁醇的形成所需,以及还包括硫化叶菌属、酸菌属和生金球菌属的嗜热酸古生细菌中的一个3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环步骤。编码巴豆酸酶的示例性基因可以发现于丙酮丁醇梭菌(Atsumi等人, Metab Eng.10:305-311(2008); Boynton等人, J Bacteriol.178:3015-3024(1996))、克鲁弗氏梭菌(Hillmer等人, FEBS Lett.21:351-354(1972))和勤奋生金球菌(Berg等人, Science318:1782-1786(2007a))中,虽然后者基因的序列是未知的。由ech编码的恶臭假单胞菌的烯酰基-CoA水合酶催化巴豆酰基-CoA到3-羟基丁酰基-CoA的转化(Roberts等人, Arch Microbiol.117:99-108(1978))。另外的候选烯酰基-CoA水合酶是恶臭假单胞菌的phaA和phaB,以及来自荧光假单胞菌的paaA和paaB(Olivera等人, Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A95:6419-6424(1998))。最后,许多大肠杆菌基因已表明显示出烯酰基-CoA水合酶功能性,这些基因包括maoC(Park等人, J Bacteriol.185:5391-5397(2003))、paaF(Ismail等人, Eur.J Biochem.270:3047-3054(2003); Park等人, Appl.Biochem.Biotechnol113-116:335-346(2004); Park等人, Biotechnol Bioeng86:681-686(2004))和paaG(Ismail等人, 同上,(2003); Park和Lee, 同上,(2004); Park和Yup, 同上,(2004))。这些蛋白质确认如下。

[0177]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
crt	NP_349318.1	15895969	丙酮丁醇梭菌
crt1	YP_001393856.1	153953091	克鲁弗氏梭菌
ech	NP_745498.1	26990073	恶臭假单胞菌
paaA	NP_745427.1	26990002	恶臭假单胞菌
paaB	NP_745426.1	26990001	恶臭假单胞菌
phaA	ABF82233.1	106636093	荧光假单胞菌

[0178]

phaB	ABF82234.1	106636094	荧光假单胞菌
------	------------	-----------	--------

maoC	NP_415905.1	16129348	大肠杆菌
paaF	NP_415911.1	16129354	大肠杆菌
paaG	NP_415912.1	16129355	大肠杆菌

[0179] 巴豆酰基-CoA还原酶(醛形成)(图2,步骤D)

[0180] 若干酰基-CoA脱氢酶能够将酰基-CoA还原为其相应的醛。因此,它们能够自然地将巴豆酰基-CoA还原为巴豆醛或者可以经设计达到此目的。编码这类酶的示例性基因包括编码脂肪酰基-CoA还原酶的乙酸钙不动杆菌acr1(Reiser等人,J.Bacteriol.179:2969-2975(1997))、编码脂肪酰基-CoA还原酶的嗜精不动杆菌属种M-1(Ishige等人,Appl.Environ.Microbiol.68:1192-1195(2002))和克鲁弗氏梭菌中编码依赖CoA和依赖NADP的琥珀酸半醛脱氢酶的sucD基因(Sohling等人,J.Bacteriol.178:871-880(1996);Sohling等人,J.Bacteriol.178:871-80(1996)))。牙龈卟啉单胞菌的sucD是另一种琥珀酸半醛脱氢酶(Takahashi等人J.Bacteriol.182:4704-4710(2000))。这些琥珀酸半醛脱氢酶详细地示于参考资料(Burk等人,W0/2008/115840:(2008))中,其将4-羟基丁酰基-CoA转化为4-羟基丁醛,作为生产1,4-丁二醇的途径的一部分。假单胞菌属种中由bphG编码的酶酰化型乙醛脱氢酶仍然是另一种有能力的酶,因为其已被证明对乙醛、丙醛、丁醛、异丁醛和甲醛有氧化和酰化作用(Powlowski等人,J.Bacteriol.175:377-385(1993))。

[0181]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
acr1	YP_047869.1	50086359	乙酸钙不动杆菌
acr1	AAC45217	1684886	贝氏不动杆菌
acr1	BAB85476.1	18857901	不动杆菌属种菌株M-1
sucD	P38947.1	172046062	克鲁弗氏梭菌
sucD	NP_904963.1	34540484	牙龈红棕色单胞菌
bphG	BAA03892.1	425213	假单胞菌

[0182] 其他的将酰基-CoA转化为其相应的醛的酶型是将丙二酰基-CoA转化为丙二酸半醛的丙二酰基-CoA还原酶。丙二酰基-CoA还原酶是在嗜热酸古生细菌中通过3-羟基丙酸循环的自养碳固定中的关键酶(Berg等人,Science318:1782-1786(2007b);Thauer,318:1732-1733(2007))。所述酶利用NADPH作为辅因子并已经表征在生金球菌和硫化叶菌菌种中(Alber等人,J.Bacteriol.188:8551-8559(2006);Hugler等人,J.Bacteriol.184:2404-2410(2002))。来自硫化叶菌tokodaii的编码丙二酰基-CoA还原酶的基因被克隆并异源表达在大肠杆菌中(Alber等人,同上(2006))。虽然这些酶的醛脱氢酶功能性与来自橙色绿屈挠菌的双功能脱氢酶相似,但是几乎没有序列相似性。两种候选的丙二酰基-CoA还原酶具有相对于天冬氨酸半醛脱氢酶(一种催化天冬氨酰基-4-磷酸到天冬氨酸半醛的还原和同时发生的脱磷酸作用的酶)的高度序列相似性。其他的候选基因可以通过蛋白质序列同源性发现于其他的生物,包括硫磺矿硫化叶菌和嗜酸热硫化叶菌。用于CoA-酰基化醛脱氢酶的仍然另一候选是来自拜氏梭菌的ald基因(Toth等人,Appl.Environ.Microbiol.65:4973-4980(1999))。已有报告称,这种酶将乙酰基-CoA和丁酰基-CoA还原为它们相应的醛。这种基因非常类似于编码鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌的乙醛脱氢酶的eutE(Toth等人,Appl.Environ.Microbiol.65:4973-4980(1999))。这些蛋白质确认如下。

[0183]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	勤奋生金球菌
Mcr	NP_378167.1	15922498	硫化叶菌tokodaii
asd-2	NP_343563.1	15898958	硫磺矿硫化叶菌
Saci_2370	YP_256941.1	70608071	嗜酸热硫化叶菌
Ald	AAT66436	49473535	拜氏梭菌
eutE	AAA80209	687645	鼠伤寒沙门氏菌
eutE	P77445	2498347	大肠杆菌

[0184] 巴豆醛还原酶(醇形成)(图2,步骤E)

[0185] 显示巴豆醛还原酶(醇形成)活性的酶能够从巴豆醛形成巴豆醇。下文的酶可以自然地具有这种活性或者可以经设计显示这种活性。编码催化醛到醇转化的酶(即醇脱氢酶或者对等地,醛还原酶)的示例性基因包括编码C2-C14的中链醇脱氢酶的alrA(Tani等人, Appl. Environ. Microbiol. 66:5231-5235(2000))、来自酿酒酵母的ADH2(Atsumi等人, Nature 451:86-89(2008))、来自大肠杆菌偏向长于C(3)的分子的yqhD(Sulzenbacher等人, J. Mol. Biol. 342:489-502(2004))以及来自丙酮丁醇梭菌将丁醛转化为丁醇的bdh I和bdh II(Walter等人, J. Bacteriol. 174:7149-7158(1992))。来自运动发酵单胞菌的ADH1已经被证实对许多醛具有活性,所述醛包括甲醛、乙醛、丙醛、丁醛和丙烯醛(Kinoshita, Appl. Microbiol. Biotechnol. 22:249-254(1985))。来自拜氏梭菌NCIMB8052的Cbei_2181编码仍然另一种有用的醇脱氢酶,该醇脱氢酶能够将巴豆醛转化为巴豆醇。

[0186]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
alrA	BAB12273.1	9967138	不动杆菌属种菌株M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	酿酒酵母
yqhD	NP_417484.1	16130909	大肠杆菌
bdh I	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌

[0187]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
bdh II	NP_349891.1	15896542	丙酮丁醇梭菌
adhA	YP_162971.1	56552132	运动发酵单胞菌
Cbei_2181	YP_001309304.1	150017050	拜氏梭菌NCIMB8052

[0188] 显示4-羟基丁酸脱氢酶活性的酶(EC1.1.1.61)也属于这一类别。这类酶已经表征于富养罗尔斯通氏菌(Bravo等人, J. Forensic Sci., 49:379-387(2004))、克鲁弗氏梭菌(Wolff等人, Protein Expr. Purif., 6:206-212(1995))和拟南芥(Breitkreuz等人, J. Biol. Chem., 278:41552-41556(2003))。

[0189]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
4hbd	YP_726053.1	113867564	富养罗尔斯通氏菌H16
4hbd	L21902.1	146348486	克鲁弗氏梭菌DSM555

4hbd	Q94B07	75249805	拟南芥
------	--------	----------	-----

[0190] 巴豆醇激酶(图2,步骤F)

[0191] 巴豆醇激酶催化巴豆醇的磷酸基团转移至羟基基团。下文所述的酶自然地具有这种活性或者可以经设计显示这种活性。催化磷酸基团转移到醇基团的激酶是EC2.7.1酶等级的成员。下表中列出EC2.7.1酶等级中若干有用的激酶。

[0192]

EC 号	酶名称	EC 号	酶名称	EC 号	酶名称
2.7.1.1	己糖激酶	2.7.1.48	尿苷激酶	2.7.1.94	酰基甘油激酶
2.7.1.2	葡萄糖激酶	2.7.1.49	羟甲基嘧啶激酶	2.7.1.95	卡那霉素激酶
2.7.1.3	己酮糖激酶	2.7.1.50	羧基乙基蛋氨酸激酶	2.7.1.100	S-甲基-5-硫代核糖激酶
2.7.1.4	果糖激酶	2.7.1.51	L-墨角藻糖激酶	2.7.1.101	塔格糖激酶
2.7.1.5	鼠李树胶糖激酶	2.7.1.52	墨角藻糖激酶	2.7.1.102	金缕梅糖激酶
2.7.1.6	半乳糖激酶	2.7.1.53	L-木酮糖激酶	2.7.1.103	紫霉素激酶
2.7.1.7	甘露糖激酶	2.7.1.54	D-阿拉伯糖激酶	2.7.1.105	6-磷酸果糖-2-激酶
2.7.1.8	葡萄糖胺激酶	2.7.1.55	阿洛糖激酶	2.7.1.106	葡萄糖-1,6-二磷酸合酶
2.7.1.10	磷酸葡萄糖激酶	2.7.1.56	1-磷酸果糖激酶	2.7.1.107	甘油二酯激酶
2.7.1.11	6-磷酸果糖激酶	2.7.1.58	2-脱氢-3-脱氧半乳糖酸激酶	2.7.1.108	长醇激酶
2.7.1.12	葡萄糖酸激酶	2.7.1.59	N-乙酰基葡萄糖胺激酶	2.7.1.113	脱氧鸟苷激酶
2.7.1.13	脱氢葡萄糖酸激酶	2.7.1.60	N-酰基甘露糖胺激酶	2.7.1.114	AMP—胸苷激酶
2.7.1.14	景天庚酮糖激酶	2.7.1.61	酰基-磷酸—己糖磷酸转移酶	2.7.1.118	ADP—胸苷激酶
2.7.1.15	核糖激酶	2.7.1.62	氨基磷酸酯—己糖磷酸转移酶	2.7.1.119	潮霉素-B 7"-O-激酶
2.7.1.16	核酮糖激酶	2.7.1.63	多磷酸—葡萄糖磷酸转移酶	2.7.1.121	磷酸烯醇丙酮酸—甘油酮磷酸转移酶
2.7.1.17	木酮糖激酶	2.7.1.64	肌醇 3-激酶	2.7.1.122	木糖醇激酶
2.7.1.18	磷酸核糖激酶	2.7.1.65	黄-肌醇胺 4-激酶	2.7.1.127	肌醇-三磷酸 3-激酶
2.7.1.19	磷酸核酮糖激酶	2.7.1.66	十一烯醇激酶	2.7.1.130	四酰基二糖 4'-激酶
2.7.1.20	腺苷激酶	2.7.1.67	1-磷脂酰肌醇 4-激酶	2.7.1.134	肌醇-四磷酸 1-激酶
2.7.1.21	胸苷激酶	2.7.1.68	1-磷脂酰肌醇-4-磷酸 5-激酶	2.7.1.136	大环内酯 2'-激酶
2.7.1.22	核糖基烟酰胺激酶	2.7.1.69	蛋白质-Np-磷酸组氨酸—糖磷酸转移酶	2.7.1.137	磷脂酰肌醇 3-激酶
2.7.1.23	NAD ⁺ 激酶	2.7.1.70	与 EC 2.7.1.37 相同	2.7.1.138	神经酰胺激酶
2.7.1.24	脱磷酸-CoA 激酶	2.7.1.71	莽草酸激酶	2.7.1.140	肌醇-四磷酸 5-激酶

[0193]

EC 号	酶名称	EC 号	酶名称	EC 号	酶名称
2.7.1.25	腺苷酰-硫酸激酶	2.7.1.72	链霉素 6-激酶	2.7.1.142	甘油-3-磷酸-葡萄糖磷酸转移酶
2.7.1.26	核黄素激酶	2.7.1.73	肌核苷激酶	2.7.1.143	二磷酸-嘌呤核苷激酶
2.7.1.27	赤藓醇激酶	2.7.1.74	脱氧胞啶激酶	2.7.1.144	塔格糖-6-磷酸激酶
2.7.1.28	丙糖激酶	2.7.1.76	脱氧腺苷激酶	2.7.1.145	脱氧核苷激酶
2.7.1.29	甘油酮激酶	2.7.1.77	核苷磷酸转移酶	2.7.1.146	依赖 ADP 的磷酸果糖激酶
2.7.1.30	甘油激酶	2.7.1.78	多聚核苷酸 5'-羟基 1-激酶	2.7.1.147	依赖 ADP 的葡萄糖激酶
2.7.1.31	甘油酸激酶	2.7.1.79	二磷酸-甘油磷酸转移酶	2.7.1.148	4-(胞嘧啶 5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶
2.7.1.32	胆碱激酶	2.7.1.80	二磷酸-丝氨酸磷酸转移酶	2.7.1.149	1-磷脂酰肌醇-5-磷酸 4-激酶
2.7.1.33	泛酰激酶	2.7.1.81	羧基赖氨酸激酶	2.7.1.150	1-磷脂酰肌醇-3-磷酸 5-激酶
2.7.1.34	泛酰巯基乙胺激酶	2.7.1.82	乙醇胺激酶	2.7.1.151	肌醇-多磷酸多激酶
2.7.1.35	吡哆醛激酶	2.7.1.83	假尿苷激酶	2.7.1.153	磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶
2.7.1.36	甲羟戊酸激酶	2.7.1.84	烷基甘油酮激酶	2.7.1.154	磷脂酰肌醇-4-磷酸 3-激酶
2.7.1.39	高丝氨酸激酶	2.7.1.85	β -葡萄糖苷激酶	2.7.1.156	腺苷钴胺醇转胺激酶
2.7.1.40	丙酮酸激酶	2.7.1.86	NADH 激酶	2.7.1.157	N-乙酰基半乳糖胺激酶
2.7.1.41	葡萄糖-1-磷酸磷酸歧化酶	2.7.1.87	链霉素 3"-激酶	2.7.1.158	肌醇-五磷酸 2-激酶
2.7.1.42	核黄素磷酸转移酶	2.7.1.88	二氢链霉素-6-磷酸 3'a-激酶	2.7.1.159	肌醇-1,3,4-三磷酸 5/6-激酶
2.7.1.43	葡萄糖酸激酶	2.7.1.89	硫酸激酶	2.7.1.160	2'-磷酸转移酶
2.7.1.44	半乳糖醛酸激酶	2.7.1.90	二磷酸-果糖-6-磷酸 1-磷酸转移酶	2.7.1.161	依赖 CTP 的核黄素激酶
2.7.1.45	2-脱氢-3-脱氧葡萄糖酸激酶	2.7.1.91	二羟神经鞘氨醇激酶	2.7.1.162	N-乙酰己糖胺 1-激酶
2.7.1.46	L-阿拉伯糖激酶	2.7.1.92	5-脱氢-2-脱氧葡萄糖酸激酶	2.7.1.163	潮霉素 B 4-O-激酶
2.7.1.47	D-核酮糖激酶	2.7.1.93	烷基甘油激酶	2.7.1.164	O-磷酸丝氨酰-tRNA ^{Sec} 激酶

[0194] 用于该步骤的良好候选酶是甲羟戊酸激酶(EC2.7.1.36), 其将3,5-二羟基戊酸的甲基类似物-甲羟戊酸的末端羟基基团磷酸化。用于该步骤的一些候选基因是来自酿酒酵母的erg12、来自詹氏甲烷球菌的mvk、来自智人的MVK和来自Co1生态型拟南芥的mvk。

[0195]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
erg12	CAA39359.1	3684	酿酒酵母
mvk	Q58487.1	2497517	詹氏甲烷球菌
mvk	AAH16140.1	16359371	智人
M\mvk	NP_851084.1	30690651	拟南芥

[0196] 甘油激酶也使甘油中的末端羟基基团磷酸化以形成甘油-3-磷酸。该反应发生在若干物种中, 包括大肠杆菌、酿酒酵母和海栖热袍菌。大肠杆菌甘油激酶已显示接受替代性底物, 例如二羟丙酮和甘油醛(Hayashi等人, J Biol. Chem. 242:1030-1035(1967))。海栖热袍菌有两种甘油激酶(Nelson等人, Nature 399:323-329(1999))。甘油激酶已显示具有范围广泛的底物特异性。Crans和Whiteside研究了来自四种不同生物(大肠杆菌、酿酒酵母、嗜热脂肪芽孢杆菌和假丝酵母)的甘油激酶(Crans等人, J. Am. Chem. Soc. 107:7008-7018(2010); Nelson等人, 同上, (1999))。他们研究了甘油的66种不同的类似物, 以及得出的结论是, 该酶能接受一系列的取代基来取代一个末端羟基基团以及C2上的氢原子能被甲基基团取代。有趣的是, 来自所述所有四种生物的酶其动力学常数是高度相似的。候选基因如

下:

[0197]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
glpK	AP_003883.1	89110103	大肠杆菌K12
glpK1	NP_228760.1	15642775	海栖热袍菌MSB8
glpK2	NP_229230.1	15642775	海栖热袍菌MSB8
Gut1	NP_011831.1	82795252	酿酒酵母

[0198] 高丝氨酸激酶是另一种可能的候选酶,其可以导致3,5-二羟基戊酸的磷酸化。该酶也存在于许多生物中,包括大肠杆菌、链霉菌属种和酿酒酵母。来自大肠杆菌的高丝氨酸激酶已显示对众多的底物有活性,所述底物包括L-2-氨基-1,4-丁二醇、天冬氨酸半醛和2-氨基-5-羟基戊酸(Huo等人, *Biochemistry* 35:16180-16185(1996);Huo等人, *Arch.Biochem.Biophys.* 330:373-379(1996))。这种酶可以作用于底物,其中 α 位置的羧基基团已被酯或者羟甲基基团取代。候选基因如下:

[0199]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
thrB	BAB96580.2	85674277	大肠杆菌K12
SACT1DRAFT_4809	ZP_06280784.1	282871792	链霉菌属种ACT-1
Thr1	AAA35154.1	172978	酿酒酵母

[0200] 2-丁烯基-4-磷酸激酶(图2,步骤G)

[0201] 2-丁烯基-4-磷酸激酶酶催化2-丁烯基-4-磷酸的磷酸基团到磷酸基团的转移。下文所述的酶自然地具有这种活性或者可以经设计显示这种活性。催化磷酸基团转移到另一磷酸基团的激酶是EC2.7.4酶等级的成员。下表中列出EC2.7.4酶等级中的若干有用的激酶。

[0202]

EC号	酶名称
2.7.4.1	多磷酸激酶
2.7.4.2	磷酸甲羟戊酸激酶
2.7.4.3	腺苷酸激酶
2.7.4.4	核苷-磷酸激酶
2.7.4.6	核苷-二磷酸激酶
2.7.4.7	磷酸甲基嘧啶激酶
2.7.4.8	鸟苷酸激酶

[0203]

EC号	酶名称
2.7.4.9	dTMP激酶
2.7.4.10	核苷-三磷酸—腺苷酸激酶
2.7.4.11	(脱氧)腺苷酸激酶
2.7.4.12	T2-诱导的脱氧核苷酸激酶
2.7.4.13	(脱氧)核苷-磷酸激酶

2.7.4.14	胞嘧啶核苷酸激酶
2.7.4.15	硫胺-二磷酸激酶
2.7.4.16	硫胺-磷酸激酶
2.7.4.17	3-磷酸甘油酰-磷酸—多磷酸磷酸转移酶
2.7.4.18	法呢基-二磷酸激酶
2.7.4.19	5-甲基脱氧胞啶-5'-磷酸激酶
2.7.4.20	长醇-二磷酸—多磷酸磷酸转移酶
2.7.4.21	肌醇-六磷酸激酶
2.7.4.22	UMP激酶
2.7.4.23	核酸糖1,5-二磷酸磷酸激酶
2.7.4.24	二磷酸肌醇-五磷酸激酶

[0204] 磷酸甲羟戊酸激酶是特别令人感兴趣的。磷酸甲羟戊酸激酶(EC2.7.4.2)催化与2-丁烯基-4-磷酸激酶类似的转化。这种酶由酿酒酵母中的erg8(Tsay等人,Mol. Cell Biol.11:620-631(1991))和肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌中的mvaK2(Doun等人,Protein Sci.14:1134-1139(2005);Wilding等人,J Bacteriol.182:4319-4327(2000))编码。肺炎链球菌和粪肠球菌酶被克隆并表征于大肠杆菌中(Pilloff等人,J Biol.Chem.278:4510-4515(2003);Doun等人,Protein Sci.14:1134-1139(2005))。

[0205]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
Erg8	AAA34596.1	171479	酿酒酵母
mvaK2	AAG02426.1	9937366	金黄色葡萄球菌
mvaK2	AAG02457.1	9937409	肺炎链球菌
mvaK2	AAG02442.1	9937388	粪肠球菌

[0206] 丁二烯合酶(图2,步骤H)

[0207] 丁二烯合酶催化2-丁烯基-4-二磷酸到1,3-丁二烯的转化。下文所述的酶自然地具有这种活性或者可以经设计显示这种活性。异戊二烯合酶自然地催化二甲烯丙基二磷酸到异戊二烯的转化,但也可以催化2-丁烯基-4-二磷酸到1,3-丁二烯的合成。异戊二烯合酶可以发现于若干生物中,所述生物包括银白杨(Sasaki等人,FEBS Letters,2005,579(11),2514-2518)、山葛(Lindberg等人,Metabolic Eng,2010,12(1),70-79;Sharkey等人,Plant Physiol.,2005,137(2),700-712)以及欧洲山杨x银白杨(Miller等人,Planta,2001,213(3),483-487)。另外的异戊二烯合酶的描述见(Chotani等人,WO/2010/031079,Systems Using Cell Culture for Production of Isoprene;Cervin等人,美国专利申请20100003716,Isoprene Synthase Variants for Improved Microbial Production of Isoprene)。

[0208]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
ispS	BAD98243.1	63108310	银白杨
ispS	AAQ84170.1	35187004	山葛
ispS	CAC35696.1	13539551	欧洲山杨x银白杨

[0209] 巴豆酰基-CoA水解酶、合成酶、转移酶(图2,步骤I)

[0210] 巴豆酰基-CoA水解酶催化巴豆酰基-CoA到巴豆酸的转化。下文所述的酶自然地具有这种活性或者可以经设计显示这种活性。在缬氨酸降解期间,3-羟基异丁酰基-CoA水解酶有效地催化3-羟基异丁酰基-CoA到3-羟基异丁酸的转化(Shimomura等人,J Biol Chem.269:14248-14253(1994))。编码这种酶的基因包括褐鼠(Shimomura等人,同上; Shimomura等人,Method Enzymol.324:229-240(2000))和智人(Shimomura等人,同上)的hibch。智人酶也接受3-羟基丁酰基-CoA和3-羟基丙酰基-CoA作为底物(Shimomura等人,同上)。通过序列同源性的候选基因包括酿酒酵母的hibch和蜡样芽胞杆菌的BC_2292。这些蛋白质确认如下。

[0211]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
hibch	Q5XIE6.2	146324906	褐鼠
hibch	Q6NVY1.2	146324905	智人
hibch	P28817.2	2506374	酿酒酵母
BC_2292	AP09256	29895975	蜡样芽胞杆菌

[0212] 若干真核生物的乙酰基-CoA水解酶(EC3.1.2.1)具有广泛的底物特异性,因此代表合适的候选酶。例如,来自褐鼠脑的所述酶(Robinson等人,Res.Comm.71:959-965(1976))可以与丁酰基-CoA、己酰基-CoA和丙二酰基-CoA反应。虽然尚未有关于其序列的报告,来自豌豆叶子的线粒体的所述酶也具有广泛的底物特异性,其对乙酰基-CoA、丙酰基-CoA、丁酰基-CoA、棕榈酰基-CoA、油酰基-CoA、琥珀酰-CoA以及巴豆酰基-CoA的活性已得到证实(Zeiher等人,Plant.Physiol.94:20-27(1990))。来自酿酒酵母的乙酰基-CoA水解酶ACH1代表另一候选水解酶(Buu等人,J.Biol.Chem.278:17203-17209(2003))。这些蛋白质确认如下。

[0213]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
acot12	NP_570103.1	18543355	褐鼠
ACH1	NP_009538	6319456	酿酒酵母

[0214] 另一候选水解酶是人二羧酸硫酯酶acot8,其显示出对戊二酰基-CoA、己二酰-CoA、环庚基-CoA、癸二酰基-CoA以及十二烷基二酰基-CoA的活性(Westin等人,J Biol.Chem.280:38125-38132(2005));以及最接近的大肠杆菌同系物tesB,其也可以水解一大批CoA硫酯(Naggert等人,J Biol.Chem.266:11044-11050(1991))。类似的酶也已经被表征于大鼠肝脏中(Deana,Biochem.Int.26:767-773(1992))。其他潜在的大肠杆菌硫酯水解酶包括tesA(Bonner等人,Chem.247:3123-3133(1972))、ybgC(Kuznetsova等人,FEMS Microbiol Rev29:263-279(2005));以及Zhuang等人,FEBS Lett.516:161-163(2002))、paaI(Song等人,J Biol.Chem.281:11028-11038(2006))以及ybdB(Leduc等人,J Bacteriol.189:7112-7126(2007))的基因产物。这些蛋白质确认如下。

[0215]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
tesB	NP_414986	16128437	大肠杆菌

acot8	CAA15502	3191970	智人
acot8	NP_570112	51036669	褐鼠
tesA	NP_415027	16128478	大肠杆菌
ybgC	NP_415264	16128711	大肠杆菌
paaI	NP_415914	16129357	大肠杆菌
ybdB	NP_415129	16128580	大肠杆菌

[0216] 仍然另一候选水解酶是来自发酵氨基酸球菌的戊烯二酸CoA-转移酶。这种酶通过定点诱变被转化成对戊二酰基-CoA、乙酰基-CoA和3-丁烯酰基-CoA具有活性的酰基-CoA水解酶(Mack等人, FEBS. Lett. 405:209-212(1997))。这表明, 编码琥珀酰-CoA:3-酮酸-CoA转移酶和乙酰乙酰基-CoA:乙酰基-CoA转移酶的酶也可以用作用于这种反应步骤的候选酶, 但是很可能需要某些突变以改变它们的功能。这些蛋白质确认如下。

[0217]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
gctA	CAA57199	559392	发酵氨基酸球菌
gctB	CAA57200	559393	发酵氨基酸球菌

[0218] 巴豆酰基-CoA合成酶催化巴豆酰基-CoA到巴豆酸的转化。下文所述的酶自然地具有这种活性或者可以经设计显示这种活性。ADP形成乙酰基-CoA合成酶(ACD, EC6.2.1.13)是另一候选酶, 其将酰基-CoA酯到其相应酸的转化与同时发生的ATP合成耦合起来。具有广泛底物特异性的多种酶已经在文献中有描述。来自闪烁古生球菌由AF1211编码的ACD I显示对各种直链和支链底物(包括乙酰基-CoA、丙酰基-CoA、丁酰基-CoA、乙酸、丙酸、丁酸盐、异丁酸盐、异戊酸、琥珀酸、延胡索酸、苯基乙酸、吡啶乙酸)起作用(Musfeldt等人, J Bacteriol 184:636-644(2002))。来自死海盐盒菌的酶(注释为琥珀酰-CoA合成酶)接受丙酸、丁酸盐以及支链酸(异戊酸和异丁酸盐)作为底物, 以及显示按正向和逆向方向起作用(Brasen等人, Arch Microbiol 182:277-287(2004))。由来自超嗜热泉古菌耐超高温热棒菌的PAE3250编码的ACD显示具有所有的表征的ACD的最广泛的底物范围, 与乙酰基-CoA、异丁酰基-CoA(优选的底物)和苯基乙酰基-CoA反应(Brasen等人, 同上)。来自闪烁古生球菌、死海盐盒菌和耐超高温热棒菌的酶已经被克隆、功能表达以及表征于大肠杆菌中(Musfeldt等人, 同上; Brasen等人, 同上)。这些蛋白质确认如下。

[0219]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
AF1211	NP_070039.1	11498810	闪烁古生球菌DSM4304
scs	YP_135572.1	55377722	死海盐盒菌ATCC43049
PAE3250	NP_560604.1	18313937	耐超高温热棒菌菌株IM2

[0220] 另一候选CoA合成酶是琥珀酰-CoA合成酶。大肠杆菌的sucCD基因形成琥珀酰-CoA合成酶复合物, 这种复合物自然地催化从琥珀酸到琥珀酰-CoA的形成以及污染性消耗一种ATP(一种在体内可逆的反应)(Buck等人, Biochem. 24:6245-6252(1985))。这些蛋白质确认如下。

[0221]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
-----	------------	-----	----

sucC	NP_415256.1	16128703	大肠杆菌
sucD	AAC73823.1	1786949	大肠杆菌

[0222] 其他示例性的CoA-连接酶包括序列尚未表征的大鼠二羧酸-CoA连接酶(Vamecq等人, *Biochemical Journal* 230:683-693(1985))、来自产黄青霉的两种表征的苯基乙酸-CoA连接酶的任一种(Lamas-Maceiras等人, *Biochem. J.* 395:147-155(2005); Wang等人, *Biochem Biophys Res Commun* 360(2):453-458(2007))、来自恶臭假单胞菌的苯基乙酸-CoA连接酶(Martinez-Blanco等人, *J. Biol. Chem.* 265:7084-7090(1990))以及来自枯草芽孢杆菌的6-羧基己酸-CoA连接酶(Bower等人, *J. Bacteriol.* 178(14):4122-4130(1996))。其他候选酶是来自小家鼠(Hasegawa等人, *Biochim Biophys Acta* 1779:414-419(2008))和智人(Ohgami等人, *Biochem Pharmacol* 65:989-994(2003))的乙酰乙酰基-CoA合成酶,其自然地催化乙酰乙酸到乙酰乙酰基-CoA的依赖ATP的转化。这些蛋白质确认如下。

[0223]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
phl	CAJ15517.1	77019264	产黄青霉
phlB	ABS19624.1	152002983	产黄青霉
paaF	AAC24333.2	22711873	恶臭假单胞菌
bioW	NP_390902.2	50812281	枯草芽孢杆菌
AACS	NP_084486.1	21313520	小家鼠
AACS	NP_076417.2	31982927	智人

[0224] 巴豆酰基-CoA转移酶催化巴豆酰基-CoA到巴豆酸的转化。下文所述的酶自然地具有这种活性或者可以经设计显示这种活性。许多转移酶具有广泛的特异性,因此可以利用各种各样的CoA受体,如乙酸、琥珀酸、丙酸、丁酸、2-甲基乙酰乙酸、3-酮己酸、3-酮戊酸、戊酸、巴豆酸、3-巯基丙酸、丙酸、乙烯基乙酸、丁酸等等。例如,来自罗斯氏菌属种A2-183的酶显示具有丁酰基-CoA:乙酸:CoA转移酶和丙酰基-CoA:乙酸:CoA转移酶活性(Charrier等人, *Microbiology* 152, 179-185(2006))。相近的同系物可以发现于,例如肠罗斯氏菌L1-82、罗斯氏菌 *inulinivorans* DSM16841、直肠真杆菌ATCC33656中。另一具有丙酰基-CoA转移酶活性的酶可以发现于丙酸梭菌(Selmer等人, *Eur J Biochem* 269, 372-380(2002))中。这种酶可以将乙酸、(R)-乳酸、(S)-乳酸、丙烯酸和丁酸作为CoA受体(Selmer等人, *Eur J Biochem* 269, 372-380(2002); Schweiger和Buckel, *FEBS Letters*, 171(1)79-84(1984))。相近的同系物可以发现于,例如诺氏梭菌NT、拜氏梭菌NCIMB8052和肉毒杆菌C菌株Eklund中。YgfH编码大肠杆菌中的丙酰基CoA:琥珀酸CoA转移酶(Haller等人, *Biochemistry*, 39(16) 4622-4629)。相近的同系物可以发现于,例如杨氏柠檬酸杆菌ATCC29220、肠沙门氏菌亚种 *arizonae* serovar和中间耶尔森氏菌ATCC29909中。这些蛋白质确认如下。

[0225]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物
<i>Ach1</i>	AAX19660.1	60396828	罗斯氏菌属种 A2-183
<i>ROSINTL182_07121</i>	ZP_04743841.2	257413684	肠罗斯氏菌 L1-82
<i>ROSEINA2194_03642</i>	ZP_03755203.1	225377982	罗斯氏菌 <i>inulinivorans</i> DSM 16841
<i>EUBREC_3075</i>	YP_002938937.1	238925420	直肠真杆菌 ATCC 33656
<i>pct</i>	CAB77207.1	7242549	丙酸梭菌
<i>NT01CX_2372</i>	YP_878445.1	118444712	诺氏梭菌 NT
<i>Cbei_4543</i>	YP_001311608.1	150019354	拜氏梭菌 NCIMB 8052
<i>CBC_A0889</i>	ZP_02621218.1	168186583	肉毒杆菌 C 菌株 <i>Eklund</i>
<i>ygfII</i>	NP_417395.1	16130821	大肠杆菌菌株 K-12 次代菌株

[0226]

			<i>MG1655</i>
<i>CIT292_04485</i>	ZP_03838384.1	227334728	杨氏柠檬酸杆菌 ATCC 29220
<i>SARI_04582</i>	YP_001573497.1	161506385	肠沙门氏菌亚种 <i>arizonae</i> serovar
<i>yinte0001_14430</i>	ZP_04635364.1	238791727	中间耶尔森氏菌 ATCC 29909

[0227] 另外的候选酶是由假单胞菌中的和编码的双位点酶,该酶已显示具有3-氧代己二酰-CoA/琥珀酸转移酶活性(Kaschabek等人,同上)。基于同源性的类似酶存在于不动杆菌属种ADP1(Kowalchuk等人,Gene146:23-30(1994))和天蓝色链霉菌中。另外的示例性琥珀酰-CoA:3:含氧酸-CoA转移酶存在于幽门螺旋杆菌(Corthesy-Theulaz等人,J.Biol.Chem.272:25659-25667(1997))和枯草芽孢杆菌(Stols等人,Protein.Expr.Purif.53:396-403(2007))中。这些蛋白质确认如下。

[0228]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物
pcaI	AAN69545.1	24985644	恶臭假单胞菌
pcaJ	NP_746082.1	26990657	恶臭假单胞菌
pcaI	YP_046368.1	50084858	不动杆菌属种ADP1
pcaJ	AAC37147.1	141776	不动杆菌属种ADP1
pcaI	NP_630776.1	21224997	天蓝色链霉菌
pcaJ	NP_630775.1	21224996	天蓝色链霉菌
HPAG1_0676	YP_627417	108563101	幽门螺旋杆菌
HPAG1_0677	YP_627418	108563102	幽门螺旋杆菌
ScoA	NP_391778	16080950	枯草芽孢杆菌
ScoB	NP_391777	16080949	枯草芽孢杆菌

[0229] 可以将乙酸用作CoA受体的CoA转移酶是由大肠杆菌atoA(α 亚基)和atoD(β 亚基)基因编码的乙酰乙酰基-CoA转移酶(Vanderwinkel等人,Biochem.Biophys.Res Commun.33:902-908(1968);Korolev等人,Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr.58:2116-2121(2002))。这种酶已经显示将CoA部分从各种支链和直链酰基-CoA底物转移至乙

酸,包括异丁酸(Matthies等人,Appl Environ Microbiol58:1435-1439(1992))、戊酸(Vanderwinkel等人,同上)和丁酸酯(Vanderwinkel等人,同上)。类似的酶存在于谷氨酸棒杆菌ATCC13032(Duncan等人,Appl Environ Microbiol68:5186-5190(2002))、丙酮丁醇梭菌(Cary等人,Appl Environ Microbiol56:1576-1583(1990))以及糖乙酸多丁醇梭菌(Kosaka等人,Biosci.Biotechnol Biochem.71:58-68(2007))中。这些蛋白质确认如下。

[0230]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
atoA	P76459.1	2492994	大肠杆菌K12
atoD	P76458.1	2492990	大肠杆菌K12

[0231]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
actA	YP_226809.1	62391407	谷氨酸棒杆菌ATCC13032
cg0592	YP_224801.1	62389399	谷氨酸棒杆菌ATCC13032
ctfA	NP_149326.1	15004866	丙酮丁醇梭菌
ctfB	NP_149327.1	15004867	丙酮丁醇梭菌
ctfA	AAP42564.1	31075384	糖乙酸多丁醇梭菌
ctfB	AAP42565.1	31075385	糖乙酸多丁醇梭菌

[0232] 上述酶也可以对巴豆酰基-CoA显示所需活性。另外的示例性候选转移酶由克鲁佛氏梭菌的cat1、cat2和cat3的基因产物催化。所述克鲁佛氏梭菌的cat1、cat2和cat3的基因产物已经显示分别具有琥珀酰-CoA、4-羟基丁酰基-CoA以及丁酰基-CoA转移酶活性(Seedorf等人,同上;Sohling等人,Eur.J Biochem.212:121-127(1993);Sohling等人,J Bacteriol.178:871-880(1996))。类似CoA转移酶活性还存在于阴道滴虫(van Grinsven等人,J.Biol.Chem.283:1411-1418(2008))和布氏锥虫(Riviere等人,J.Biol.Chem.279:45337-45346(2004))中。这些蛋白质确认如下。

[0233]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
cat1	P38946.1	729048	克鲁佛氏梭菌
cat2	P38942.2	172046066	克鲁佛氏梭菌
cat3	EDK35586.1	146349050	克鲁佛氏梭菌
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	阴道滴虫G3
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	布氏锥虫

[0234] 来自厌氧细菌发酵氨基酸球菌的戊烯二酸-CoA-转移酶(EC2.8.3.12)与二酸戊烯二酰基-CoA和3-丁烯酰基-CoA反应(Mack等人,FEBS Lett.405:209-212(1997))。编码这种酶的基因是gctA和gctB。这种酶对其他CoA衍生物(包括戊二酰基-CoA、2-羟基戊二酰基-CoA、己二酰-CoA和烯丙酰-CoA)具有降低的但是可检测出的活性(Buckel等人,Eur.J.Biochem.118:315-321(1981))。该酶已被克隆和表达在大肠杆菌中(Mac等人,Eur.J.Biochem.226:41-51(1994))。这些蛋白质确认如下。

[0235]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
-----	------------	-----	----

gctA	CAA57199.1	559392	发酵氨基酸球菌
gctB	CAA57200.1	559393	发酵氨基酸球菌

[0236] 巴豆酸酯还原酶(图2,步骤J)

[0237] 巴豆酸酯还原酶能够催化巴豆酸到巴豆醛的转化。下文所述的酶自然地具有这种活性或者可以经设计显示这种活性。羧酸还原酶催化从羧酸到其相应的醛的依赖镁、ATP和NADPH的还原反应(Venkitasubramanian等人,J.Biol.Chem.282:478-485(2007))。这种由car编码的酶被克隆以及功能表达于大肠杆菌中(Venkitasubramanian等人,J.Biol.Chem.282:478-485(2007))。npt基因产物的表达经由转录后修饰改善了该酶的活性。npt基因编码将钝化脱辅基酶转化为活性全酶的特异性磷酸泛酰巯基乙胺转移酶(PPTase)。这种酶的天然底物是香草酸,以及该酶显示对芳香族和脂肪族底物的广泛接受性(Venkitasubramanian等人,in Biocatalysis in the Pharmaceutical and Biotechnology Industries,ed.R.N.Patel,Chapter15,pp.425-440,CRC Press LLC,Boca Raton,FL.(2006))。

[0238]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
Car	AAR91681.1	40796035	艾瓦诺卡氏菌(sp.NRRL5646)
Npt	ABI83656.1	114848891	艾瓦诺卡氏菌(sp.NRRL5646)

[0239] 其他的car和npt基因可以基于序列同源性得到确认。

[0240]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
fadD9	YP_978699.1	121638475	牛结核分支杆菌BCG
BCG_2812c	YP_978898.1	121638674	牛结核分支杆菌BCG
nfa20150	YP_118225.1	54023983	皮疽诺卡氏菌IFM10152
nfa40540	YP_120266.1	54026024	皮疽诺卡氏菌IFM10152
SGR_6790	YP_001828302.1	182440583	灰色链霉菌亚种灰色NBRC13350
SGR_665	YP_001822177.1	182434458	灰色链霉菌亚种灰色NBRC13350
MSMEG_2956	YP_887275.1	118473501	包皮垢分支杆菌MC2 155
MSMEG_5739	YP_889972.1	118469671	包皮垢分支杆菌MC2 155
MSMEG_2648	YP_886985.1	118471293	包皮垢分支杆菌MC2 155
MAP1040c	NP_959974.1	41407138	鸟型分枝杆菌亚种类结核K-10
MAP2899c	NP_961833.1	41408997	鸟型分枝杆菌亚种类结核K-10
MMAR_2117	YP_001850422.1	183982131	海分枝杆菌M
MMAR_2936	YP_001851230.1	183982939	海分枝杆菌M
MMAR_1916	YP_001850220.1	183981929	海分枝杆菌M
TpauDRAFT_33060	ZP_04027864.1	227980601	微代谢豕村氏菌DSM20162
TpauDRAFT_20920	ZP_04026660.1	227979396	微代谢豕村氏菌DSM20162
CPCC7001_1320	ZP_05045132.1	254431429	蓝菌属PCC7001
DDBDRAFT_0187729	XP_636931.1	66806417	盘基网柄菌AX4

[0241] 发现于灰色链霉菌的另一种候选酶由griC和griD基因编码。认为,这种酶将3-氨

基-4-羟基苯甲酸转化为3-氨基-4-羟基苯甲醛,因为griC或者griD的删除导致细胞外3-乙酰氨基-4-羟基苯甲酸(3-氨基-4-羟基苯甲酸代谢的一种分路产物)的堆积(Suzuki,等人,J.Antibiot.60(6):380-387(2007))。griC和griD与SGR_665(一种在序列上类似于艾瓦诺卡氏菌npt的酶)的共表达会是有益处的。

[0242]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
griC	YP_001825755.1	182438036	灰色链霉菌亚种灰色NBRC13350
Grid	YP_001825756.1	182438037	灰色链霉菌亚种灰色NBRC13350

[0243] 一种具有类似特性的酶 α -氨基己二酸还原酶(AAR,EC1.2.1.31)参与一些真菌物种中的赖氨酸生物合成途径。这种酶自然地将 α -氨基己二酸还原为 α -氨基己二酸半醛。首先通过依赖ATP的腺苷酸形成激活羧基基团,然后通过NAD(P)H还原所述腺苷酸以收获醛和AMP。如同CAR,这种酶利用镁并需要通过PPTase进行激活。用于AAR及其相应的PPTase的候选酶发现于酿酒酵母(Morris等人,Gene98:141-145(1991))、白色念珠菌(Guo等人,Mol.Genet.Genomics269:271-279(2003))以及人体酵母菌探针(Ford等人,Curr.Genet.28:131-137(1995))中。来自人体酵母菌探针的AAR当表达于大肠杆菌中时显示出显著的活性(Guo等人,Yeast21:1279-1288(2004))。来自产黄青霉的AAR接受S-羧基甲基-L-半胱氨酸作为替代性底物,但是不与己二酸、L-谷氨酸或者二氨基庚二酸反应(Hijarrubia等人,J.Biol.Chem.278:8250-8256(2003))。迄今为止还未确认编码产黄青霉PPTase的基因。

[0244]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
LYS2	AAA34747.1	171867	酿酒酵母
LYS5	P50113.1	1708896	酿酒酵母
LYS2	AAC02241.1	2853226	白色念珠菌
LYS5	AA026020.1	28136195	白色念珠菌
Lys1p	P40976.3	13124791	人体酵母菌探针
Lys7p	Q10474.1	1723561	人体酵母菌探针
Lys2	CAA74300.1	3282044	产黄青霉

[0245] 巴豆酰基-CoA还原酶(醇形成)(图2,步骤K)

[0246] 巴豆醛还原酶(醇形成)催化从巴豆酰基-CoA形成巴豆醇所需的2个还原步骤。转化酰基-CoA到醇的示例性2步氧化还原酶提供如下。此类酶可以自然地转化巴豆酰基-CoA到巴豆醇或者可以经设计达到此目的。这些酶包括那些转换底物的酶,如转化乙酰基-CoA到乙醇(例如,来自大肠杆菌的adhE(Kessler等人,FEBS.Lett.281:59-63(1991))以及转化丁酰基-CoA到丁醇(例如,来自丙酮丁醇梭菌的adhE2(Fontaine等人,J.Bacteriol.184:821-830(2002))。来自丙酮丁醇梭菌的adhE2酶具体显示于参考文件(Burk等人,同上,(2008))中,从4-羟基丁酰基-CoA生产BD0。除了还原乙酰基-CoA到乙醇之外,由肠膜明串珠菌中的adhE编码的酶也已显示将支链化合物异丁醛氧化为异丁酰基-CoA(Kazahaya等人,J.Gen.Appl.Microbiol.18:43-55(1972);Koo等人,Biotechnol.Lett.27:505-510(2005))。

[0247]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
adhE	NP_415757.1	16129202	大肠杆菌

[0248]

adhE2	AAK09379.1	12958626	丙酮丁醇梭菌
adhE	AAV66076.1	55818563	肠膜明串珠菌

[0249] 另一示例性的酶可以将丙二酰基-CoA转化为3-HP。具有这种活性的依赖NADPH的酶已经表征在橙色绿屈挠菌中,其中它参与3-羟基丙酸循环(Hugler等人,同上,(2002); Strauss等人,215:633-643(1993))。这种酶(具有300kDa的量)具有高底物特异性并显示与其他已知的氧化还原酶几乎没有序列相似性(Hugler等人,同上,(2002))。在其他生物中没有显示为催化这一特异性反应的酶;然而存在其他生物可以具有相似途径的生物信息证据(Klatt等人,Environ Microbiol.9:2067-2078(2007))。可以通过序列相似性推断在其他生物(包括Roseiflexus castenholzii、赤细菌属种NAP1和海洋 γ -蛋白质菌HTCC2080)中的候选酶。

[0250]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
mcr	AAS20429.1	42561982	橙色绿屈挠菌
Rcas_2929	YP_001433009.1	156742880	Roseiflexus castenholzii
NAP1_02720	ZP_01039179.1	85708113	赤细菌属种NAP1
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	119504313	海洋 γ -蛋白质菌HTCC2080

[0251] 戊烯二酰基-CoA脱羧酶(图2,步骤L)

[0252] 表征于谷氨酸-发酵厌氧菌中的戊烯二酰基-CoA脱羧酶是钠离子移位脱羧酶,该酶利用生物素作为辅因子并由四种(α 、 β 、 γ 和 δ)亚基组成(Boiangiu等人,J Mol.Microbiol Biotechnol10:105-119(2005);Buckel,Biochim Biophys Acta.1505:15-27(2001))。此类酶已经被表征于具核梭杆菌(Beatrix等人,Arch Microbiol.154:362-369(1990))和发酵氨基酸球菌(Braune等人,Mol.Microbiol31:473-487(1999))中。具核梭杆菌戊烯二酰基-CoA脱羧酶 α 、 β 和 δ 亚基的类似物发现于Syntrophus aciditrophicus中。注释为烯酰基-CoA脱氢酶的基因syn_00480(另一种GCD)位于生物素-羧基载体(syn_00479)和戊烯二酰基-CoA脱羧酶 α 亚基(syn_00481)之间的预测操纵子中。利用如下所示的GenBank登记号可以找到示例性的基因产物的蛋白质序列。

[0253]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
gcdA	CAA49210	49182	发酵氨基酸球菌
gcdC	AAC69172	3777506	发酵氨基酸球菌
gcdD	AAC69171	3777505	发酵氨基酸球菌
gcdB	AAC69173	3777507	发酵氨基酸球菌
FN0200	AAL94406	19713641	具核梭杆菌
FN0201	AAL94407	19713642	具核梭杆菌
FN0204	AAL94410	19713645	具核梭杆菌

[0254]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
syn_00479	YP_462066	85859864	Syntrophus aciditrophicus
syn_00481	YP_462068	85859866	Syntrophus aciditrophicus
syn_01431	YP_460282	85858080	Syntrophus aciditrophicus
syn_00480	ABC77899	85722956	Syntrophus aciditrophicus

[0255] 戊二酰基-CoA脱氢酶(图2步骤M)

[0256] 戊二酰基-CoA脱氢酶(GCD, EC1.3.99.7和EC4.1.1.70)是催化戊二酰基-CoA到巴豆酰基-CoA的氧化脱羧作用(图3, 步骤3)的双功能酶。双功能GCD酶是将电子转移黄素蛋白作为电子受体的同源四聚体(Hartel等人, Arch Microbiol. 159:174-181(1993))。此类酶首先在于芳香族化合物上培育期间被表征于假单胞菌菌株KB740和K172的细胞抽提物中(Hartel等人, 同上, (1993)), 但这些生物中的相关基因是未知的。编码戊二酰基-CoA脱氢酶(gcdH)及其同源转录调节因子(gcdR)的基因在固氮弧菌属种CIB中得以确认(Blazquez等人, Environ Microbiol. 10:474-482(2008))。gcdH活性不足的固氮弧菌属菌株被用来从恶臭假单胞菌中确认异源基因gcdH(Blazquez等人, 同上, (2008))。恶臭假单胞菌中的同源转录调节因子尚未得到确认, 但位点PP_0157具有针对固氮弧菌属酶的高序列同源性(>69%的一致性)。另外的GCD酶发现于荧光假单胞菌和脱氮副球菌中(Husain等人, J Bacteriol. 163:709-715(1985))。已经对人GCD进行了广泛研究, 将其过表达于大肠杆菌中(Dwyer等人, Biochemistry 39:11488-11499(2000)), 晶体化以及已经对涉及活性位点中保留的谷氨酸残基的催化机制进行了描述(Fu等人, Biochemistry 43:9674-9684(2004))。Syntrophus aciditrophicus中的GCD在于巴豆酸上培育期间按CO₂同化方向起作用(Mouttaki等人, Appl Environ Microbiol. 73:930-938(2007))。通过与固氮弧菌属GcdH的蛋白质序列同源性确认了Syntrophus aciditrophicus中的两种GCD基因:syn_00480(31%)和syn_01146(31%)。没有发现与固氮弧菌属GcdR调节蛋白质的显著的同源性。利用如下所示的GenBank登记号可以找到示例性的基因产物的蛋白质序列。

[0257]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
gcdH	ABM69268.1	123187384	固氮弧菌属种CIB
gcdR	ABM69269.1	123187385	固氮弧菌属种CIB
gcdH	AAN65791.1	24981507	恶臭假单胞菌KT2440
PP_0157(gcdR)	AAN65790.1	24981506	恶臭假单胞菌KT2440
gcdH	YP_257269.1	70733629	荧光假单胞菌Pf-5
gcvA(gcdR)	YP_257268.1	70733628	荧光假单胞菌Pf-5
gcd	YP_918172.1	119387117	脱氮副球菌

[0258]

gcdR	YP_918173.1	119387118	脱氮副球菌
gcd	AAH02579.1	12803505	智人
syn_00480	ABC77899	85722956	Syntrophus aciditrophicus
syn_01146	ABC76260	85721317	Syntrophus aciditrophicus

[0259] 3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶(图2,步骤N)

[0260] 3-氨基丁酰基-CoA是赖氨酸发酵中的中间体。它也可以通过转氨酶或者氨化脱氢酶从乙酰乙酰基-CoA形成。3-氨基丁酰基-CoA脱氨酶(或者3-氨基丁酰基-CoA氨裂解酶)催化3-氨基丁酰基-CoA的脱氨基作用,以形成巴豆酰基-CoA。该可逆性的酶存在于具核梭杆菌、牙龈红棕色单胞菌、腾冲热厌氧杆菌和若干其他生物中以及与赖氨酸发酵中涉及的若干基因共定位(Kreimeyer等人,J Biol Chem,2007,282(10)7191-7197)。

[0261]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
kal	NP_602669.1	19705174	具核梭杆菌亚种具核ATCC25586
kal	NP_905282.1	34540803	牙龈红棕色单胞菌W83
kal	NP_622376.1	20807205	腾冲热厌氧杆菌MB4

[0262] 4-羟基丁酰基-CoA脱水酶(图2,步骤O)

[0263] 若干酶自然地催化4-羟基丁酰基-CoA到丁烯酰基-CoA的脱水作用。这种转化是氨基丁酸梭菌的4-氨基丁酸发酵(Scherf等人,Eur.J Biochem.215:421-429(1993))和克鲁佛氏梭菌的琥珀酸-乙醇发酵(Scherf等人,Arch.Microbiol1161:239-245(1994))所需的。这种转化在古生细菌(例如勤奋生金球菌)中也作为3-羟基丙酸/4-羟基丁酸自养二氧化碳同化途径的一部分,是关键步骤(Berg等人,同上,(2007))。4-羟基丁酰基-CoA脱水酶的可逆性存档完好(Muh等人,Biochemistry.35:11710-11718(1996);Friedrich等人,Angew.Chem.Int.Ed.Engl.47:3254-3257(2008);Muh等人,Eur.J.Biochem.248:380-384(1997))以及据报道,在丁烯酰基-CoA方面,平衡常数约为4(Scherf和Buckel,同上,(1993))。

[0264]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
AbfD	CAB60035	70910046	氨基丁酸梭菌
AbfD	YP_001396399	153955634	克鲁佛氏梭菌
Msed_1321	YP_001191403	146304087	勤奋生金球菌
Msed_1220	YP_001191305	146303989	勤奋生金球菌

[0265] 巴豆醇二磷酸激酶(图2,步骤P)

[0266] 巴豆醇二磷酸激酶催化巴豆醇的二磷酸基团转移到羟基基团。下文所述的酶自然地具有这种活性或者可以经设计显示这种活性。催化二磷酸基团转移的激酶是EC2.7.6酶等级的成员。下表中列出EC2.7.6酶等级中若干有用的激酶。

[0267]

EC号	酶名称
2.7.6.1	核糖-磷酸二磷酸激酶
2.7.6.2	硫胺二磷酸激酶
2.7.6.3	2-氨基-4-羟基-6-羟甲基二氢蝶啶二磷酸激酶
2.7.6.4	核苷酸二磷酸激酶
2.7.6.5	GTP二磷酸激酶

[0268] 特别令人感兴趣的是核糖-磷酸二磷酸激酶,其已经于大肠杆菌(Hove-Jenson等

人, J Biol Chem, 1986, 261(15):6765-71)和肺炎支原体M129(McElwain等人, International Journal of Systematic Bacteriology, 1988, 38:417-423)中得到确认; 以及硫胺二磷酸激酶。示例性的硫胺二磷酸激酶发现于拟南芥中(Ajjawi, Plant Mol Biol, 2007, 65(1-2):151-62)。

[0269]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
prs	NP_415725.1	16129170	大肠杆菌
prsA	NP_109761.1	13507812	肺炎支原体M129
TPK1	BAH19964.1	222424006	Col生态型拟南芥
TPK2	BAH57065.1	227204427	Col生态型拟南芥

[0270] 赤藓糖-4-磷酸还原酶(图3, 步骤A)

[0271] 在途径的步骤A中, 赤藓糖-4-磷酸通过赤藓糖-4-磷酸还原酶或者赤藓醇-4-磷酸脱氢酶转化为赤藓醇-4-磷酸。在生产赤藓醇期间, 在酒明串珠菌中观察赤藓糖-4-磷酸的还原(Veiga-da-Cunha等人, J Bacteriol. 175:3941-3948(1993))。将NADPH确认为辅因子(Veiga-da-Cunha等人, 同上, (1993))。然而, 用于赤藓糖-4-磷酸的基因并未确认。因此, 从酒明串珠菌中确认赤藓糖-4-磷酸还原酶基因并应用于该步骤中是可能的。此外, 催化类似反应的酶可以用于该步骤。这些酶的例子是催化1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸到2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸的转化的1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶(EC1.1.1.267), 其与步骤A相比, 具有另外一个甲基基团。已经对编码1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸还原异构酶的dxr或者ispC基因做了充分地研究: 纯化了来自大肠杆菌和结核分枝杆菌的Dxr蛋白质并测定了他们的晶体结构(Yajima等人, Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun. 63: 466-470(2007); Mac等人, J Mol. Biol. 345:115-127(2005); Henriksson等人, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 62:807-813(2006); Henriksson等人, J Biol. Chem. 282:19905-19916(2007)); 通过定点诱变进行的研究表明, 来自集胞蓝细菌的Dxr蛋白质具有改性的活性和改变的动力学(Fernandes等人, Biochim. Biophys. Acta 1764: 223-229(2006); Fernandes等人, Arch. Biochem. Biophys. 444:159-164(2005))。此外, 来自大肠杆菌的催化甘油醛3-磷酸以及甘油-3-磷酸之间的转化的甘油醛3-磷酸还原酶YghZ(Desai等人, Biochemistry 47:7983-7985(2008))也可以应用于该步骤。如下基因可以用于步骤A转化:

[0272]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
dxr	P45568.2	2506592	大肠杆菌菌株K12
dxr	A5U6M4.1	166218269	结核分枝杆菌
dxr	Q55663.1	2496789	集胞蓝细菌属种菌株PCC6803
yghZ	NP_417474.1	16130899	大肠杆菌菌株K12

[0273] 赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶(图3, 步骤B)

[0274] 在途径的步骤B中, 赤藓醇-4-磷酸通过赤藓醇-4-磷酸胞苷酰转移酶或者4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇合酶转化为4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇。用于该步骤的确切酶尚未确认。然而, 催化类似反应的酶可以应用于该步骤。例子是2-C-甲基-D-赤藓醇-4-磷酸胞苷酰

转移酶或者4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇合酶(EC2.7.7.60)。2-C-甲基-D-赤藓醇4-磷酸胞苷酰转移酶在用于异戊间二烯化合物生物合成的甲基赤藓醇磷酸途径中以及催化2-C-甲基-D-赤藓醇4-磷酸和4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇之间的转化,与步骤B转化相比,其具有额外的甲基基团。2-C-甲基-D-赤藓醇4-磷酸胞苷酰转移酶由ispD基因编码以及大肠杆菌IspD的晶体结构被测定(Kemp等人,Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.57:1189-1191(2001);Kemp等人,Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.59:607-610(2003);Richard等人,Nat.Struct.Biol.8:641-648(2001))。来自结核分枝杆菌H37Rv的ispD基因被克隆和表达于大肠杆菌中,以及重组蛋白质利用N-末端组氨酸标签得以纯化(Shi等人,J Biochem.Mol.Biol.40:911-920(2007))。此外,将天蓝色链霉菌ispD基因克隆并表达于大肠杆菌中,以及对重组蛋白质进行物理学和动力学表征(Cane等人,Bioorg.Med.Chem.9:1467-1477(2001))。如下基因可以用于步骤B转化:

[0275]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
ispD	Q46893.3	2833415	大肠杆菌菌株K12
ispD	A5U8Q7.1	166215456	结核分枝杆菌
ispD	Q9L0Q8.1	12230289	天蓝色链霉菌

[0276] 4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶(图3,步骤C)

[0277] 在途径的步骤C中,4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇通过4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇激酶转化为2-磷酸-4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇。用于该步骤的确切酶尚未确认。然而,催化类似反应的酶可以应用于该步骤。例子是4-二磷酸胞苷基-2-C-甲基赤藓醇激酶(EC2.7.1.148)。4-二磷酸胞苷基-2-C-甲基赤藓醇激酶也在用于异戊间二烯化合物生物合成的甲基赤藓醇磷酸途径中以及催化4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇和2-磷酸-4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇之间的转化,与步骤C转化相比,其具有额外的甲基基团。4-二磷酸胞苷基-2-C-甲基赤藓醇激酶由ispE基因编码以及大肠杆菌、嗜热栖热菌HB8和风产液菌IspE的晶体结构被(Sgraja等人,FEBS J275:2779-2794(2008);Miallau等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A100:9173-9178(2003);Wada等人,J Biol.Chem.278:30022-30027(2003))。将来自上述生物的ispE基因克隆并表达,以及将重组蛋白质纯化,进行结晶。如下基因可以用于步骤C转化:

[0278]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
ispE	P62615.1	50402174	大肠杆菌菌株K12
ispE	P83700.1	51316201	嗜热栖热菌HB8
ispE	O67060.1	6919911	风产液菌

[0279] 赤藓醇2,4-环二磷酸合酶(图3,步骤D)

[0280] 在途径的步骤D中,2-磷酸-4-(胞嘧啶5'-二磷酸)-赤藓醇通过赤藓醇2,4-环二磷酸合酶转化为赤藓醇-2,4-环二磷酸。用于该步骤的确切酶尚未确认。然而,催化类似反应的酶可以应用于该步骤。例子是2-C-甲基-D-赤藓醇2,4-环二磷酸合酶(EC4.6.1.12)。2-C-甲基-D-赤藓醇2,4-环二磷酸合酶也在用于异戊间二烯化合物生物合成的甲基赤藓醇磷酸途

径中以及催化2-磷酸-4-(胞嘧啶5'二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇和2-C-甲基-D-赤藓醇-2,4-环二磷酸之间的转化,与步骤D转化相比,其具有额外的甲基基团。2-C-甲基-D-赤藓醇-2,4-环二磷酸合酶由ispF基因编码以及大肠杆菌、嗜热栖热菌、流感嗜血杆菌和空肠弯曲杆菌IspF的晶体结构被测定(Richard等人,J Biol.Chem.277:8667-8672(2002);Steinbacher等人,J Mol.Biol.316:79-88(2002);Lehmann等人,Proteins49:135-138(2002);Kishida等人,Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.59:23-31(2003);Gabrielsen等人,J Biol.Chem.279:52753-52761(2004))。将来自上述生物的ispF基因克隆并表达,以及将重组蛋白质纯化,进行结晶。如下基因可以用于步骤D转化:

[0281]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
ispF	P62617.1	51317402	大肠杆菌菌株K12
ispF	Q8RQP5.1	51701599	嗜热栖热菌HB8
ispF	P44815.1	1176081	流感嗜血杆菌
ispF	Q9PM68.1	12230305	空肠弯曲杆菌

[0282] 1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶(图3,步骤E)

[0283] 图3的步骤E需要通过1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸合酶将赤藓醇-2,4-环二磷酸转化为1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸。具有这种活性的酶至今未得到表征。这个转化类似于通过(E)-4-羟基-3-甲基丁-2-烯基-二磷酸合酶(EC1.17.7.1)从2-C-甲基-D-赤藓醇-2,4-环二磷酸还原为1-羟基-2-甲基-2-(E)-丁烯基4-二磷酸。这种酶是一种铁硫蛋白,其参与发现于细菌和植物中的用于异戊间二烯化合物生物合成的非甲羟戊酸途径。大多数由ispG编码的细菌酶(包括大肠杆菌酶)将还原的铁氧还蛋白或者黄素氧还蛋白作为电子供体(Zepeck等人,J Org.Chem.70:9168-9174(2005))。来自嗜热蓝细菌属细长嗜热聚球藻BP-1的、由gcpE编码的类似酶被异源表达并表征于大肠杆菌中(Okada等人,J Biol.Chem.280:20672-20679(2005))。已经将来自嗜热栖热菌和拟南芥的其他候选酶表征并表达于大肠杆菌中(Seemann等人,J Biol.Inorg.Chem.10:131-137(2005);Kollas等人,FEBS Lett.532:432-436(2002))。

[0284]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
ispG	NP_417010.1	16130440	大肠杆菌
gcpE	NP_681786.1	22298539	细长嗜热聚球藻
gcpE	AA021364.1	27802077	嗜热栖热菌
gcpE	AA015446.1	27462472	拟南芥

[0285] 1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶(图3,步骤F)

[0286] 同时发生的1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸的脱水和还原作用由具有1-羟基-2-丁烯基4-二磷酸还原酶活性的酶催化(图3,步骤F)。这类酶将形成产物丁烯基4-二磷酸或者2-丁烯基4-二磷酸的混合物。在用于异戊间二烯化合物生物合成的非甲羟戊酸途径中,通过4-羟基-3-甲基丁-2-烯基二磷酸还原酶(EC1.17.1.2)催化类似的反应。这种酶是一种铁硫蛋白,其将还原的铁氧还蛋白或者黄素氧还蛋白作为电子供体。由ispH编码的4-羟基-3-甲基丁-2-烯基二磷酸还原酶大肠杆菌的最大活性既需要黄素氧还蛋白,又需要黄素氧还蛋

白还原酶(Wolff等人,FEBS Lett.541:115-120(2003);Grawert等人,J Am.Chem.Soc.126:12847-12855(2004))。在表征的催化体系中,通过依赖NAD(P)+的黄素氧还蛋白还原酶再生成还原的黄素氧还蛋白。将来自风产液菌的、由lytB编码的酶作为加上组氨酸标签的酶表达于大肠杆菌并表征(Altincicek等人,FEBS Lett.532:437-440(2002))。植物中类似的酶由拟南芥的hdr编码(Botella-Pavia等人,Plant J40:188-199(2004))。

[0287]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
ispH	AAL38655.1	18652795	大肠杆菌
lytB	O67625.1	8928180	风产液菌
hdr	NP_567965.1	18418433	拟南芥

[0288] 改变铁硫簇构造中涉及基因的表达水平可以对拟议途径中的铁硫蛋白(例如,图3的步骤E和步骤F所需的酶)的活性产生有利的影响。在大肠杆菌中,已证实的是,包含铁硫的蛋白质IspH的过表达(类似于图3的步骤F)通过共同表达来自铁硫簇的组装所涉及的isc区域的基因得以提高(Grawert等人,J Am.Chem.Soc.126:12847-12855(2004))。基因簇由基因icsS、icsU、icsA、hscB、hscA和fdx组成。据显示,这些基因的过表达改善了铁硫组装管线的合成能力,这是铁硫蛋白质的功能表达所需要的。在本申请中,类似的方法可以适用。

[0289]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
iscS	AAT48142.1	48994898	大肠杆菌
iscU	AAC75582.1	1788878	大肠杆菌
iscA	AAC75581.1	1788877	大肠杆菌
hscB	AAC75580.1	1788876	大肠杆菌
hscA	AAC75579.1	1788875	大肠杆菌
fdx	AAC75578.1	1788874	大肠杆菌

[0290] 丁烯基4-二磷酸异构酶(图3,步骤G)

[0291] 丁烯基4-二磷酸异构酶催化2-丁烯基-4-二磷酸和丁烯基-4-二磷酸的可逆相互转化。如下的酶可以自然地具有这种活性或者可以经设计显示这种活性。有用的基因包括那些编码催化异戊基二磷酸和二甲烯丙基二磷酸相互转化的酶。这些酶包括来自大肠杆菌(Rodríguez-Concepción等人,FEBS Lett,473(3):328-332)、酿酒酵母(Anderson等人,J Biol Chem,1989,264(32):19169-75)以及希氏硫化叶菌(Yamashita等人,Eur J Biochem,2004,271(6):1087-93)的异戊基二磷酸异构酶。由大肠杆菌的Idi蛋白质催化的异构化其反应机制的特点已经从机械学角度进行了详细论述(de Ruyck等人,J Biol.Chem.281:17864-17869(2006))。来自酿酒酵母、枯草芽孢杆菌和雨生红球藻的异戊基二磷酸异构酶已经被异源性表达在大肠杆菌中(Laupitz等人,Eur.J Biochem.271:2658-2669(2004);Kajiwar等人,Biochem.J324(Pt2):421-426(1997))。

[0292]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
Idi	NP_417365.1	16130791	大肠杆菌
IDI1	NP_015208.1	6325140	酿酒酵母

Idi	BAC82424.1	34327946	希氏硫化叶菌
Idi	AAC32209.1	3421423	雨生红球藻
Idi	BAB32625.1	12862826	枯草芽孢杆菌

[0293] 丁二烯合酶(图3,步骤H)

[0294] 丁二烯合酶催化2-丁烯基-4-二磷酸到1,3-丁二烯的转化。下文所述的酶自然地具有这种活性或者可以经设计显示这种活性。异戊二烯合酶自然地催化二甲烯丙基二磷酸到异戊二烯的转化,但也可以催化从2-丁烯基-4-二磷酸到1,3-丁二烯的合成。异戊二烯合酶可以发现于若干生物中,所述生物包括银白杨(Sasaki等人,FEBS Letters,579(11),2514-2518(2005))、山葛(Lindberg等人,Metabolic Eng.,12(1):70-79(2010);Sharkey等人,Plant Physiol.,137(2):700-712(2005))以及欧洲山杨x银白杨(Miller等人,Planta,213(3):483-487(2001))。另外的异戊二烯合酶的描述见(Chotani等人,WO/2010/031079, Systems Using Cell Culture for Production of Isoprene;Cervin等人,美国专利申请20100003716, Isoprene Synthase Variants for Improved Microbial Production of Isoprene)。

[0295]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
ispS	BAD98243.1	63108310	银白杨
ispS	AAQ84170.1	35187004	山葛
ispS	CAC35696.1	13539551	欧洲山杨x银白杨

[0296] 赤藓糖-4-磷酸激酶(图3,步骤I)

[0297] 在途径的步骤I中,赤藓糖-4-磷酸通过赤藓糖-4-磷酸激酶转化为赤藓糖。在通过酵母的赤藓醇工业发酵生产中,通过戊糖磷酸途径将葡萄糖转化为赤藓糖-4-磷酸并将赤藓糖-4-磷酸脱磷酸化并还原,以生产赤藓醇(Moon等人,Appl.Microbiol Biotechnol.86:1017-1025(2010))。因此,赤藓糖-4-磷酸激酶存在于许多这类产赤藓醇的酵母中,包括类丝孢酵母SN-G42(Sawada等人,J Biosci.Bioeng.108:385-390(2009))、木兰假丝酵母(Kohl等人,Biotechnol.Lett.25:2103-2105(2003))和酿酒母(HAJNY等人,Appl.Microbiol12:240-246(1964);Oh等人,J Ind.Microbiol Biotechnol.26:248-252(2001))。然而,赤藓糖-4-磷酸激酶基因尚未确认。有许多具有广泛底物范围的多元醇磷酸转移酶可以应用于该步骤。例子是催化甘油醛和甘油醛-3-磷酸之间的可逆转化的丙糖激酶(EC2.7.1.28),与步骤I相比,其具有一个较短的碳。其他例子包括催化5C多元醇醛的磷酸化作用的木酮糖激酶(EC2.7.1.17)或者阿拉伯糖激酶(EC2.7.1.54)。如下基因可以用于步骤I转化:

[0298]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
xy1B	P09099.1	139849	大肠杆菌菌株K12
xks1	P42826.2	1723736	酿酒酵母
xy1B	P29444.1	267426	肺炎克雷伯氏菌
dak1	Q9HFC5	74624685	鲁氏接合酵母

[0299] 赤藓糖还原酶(图3,步骤J)

[0300] 在途径的步骤J中,赤藓糖通过赤藓糖还原酶转化为赤藓醇。在通过酵母的赤藓醇工业发酵生产中,通过戊糖磷酸途径将葡萄糖转化为赤藓糖-4-磷酸并将赤藓糖-4-磷酸脱磷酸化并还原,以生产赤藓醇(Moon等人,同上,(2010))。因此,赤藓糖还原酶存在于许多这类产赤藓醇的酵母中,包括类丝孢酵母SN-G42(Sawada等人,同上,(2009))、木兰假丝酵母(Kohl等人,同上,(2003))和酿酒(HAJNY等人,同上,(1964);Oh等人,同上,(2001))。表征并从*Torula corallina*(Lee等人,Biotechnol.Prog.19:495-500(2003);Lee等人,Appl.Environ.Microbiol.68:4534-4538(2002))、木兰假丝酵母(Lee等人,Appl.Environ.Microbiol.69:3710-3718(2003))和类丝孢酵母SN-G42(Sawada等人,同上,(2009))中纯化得到赤藓糖还原酶。几种赤藓糖还原酶基因被克隆并可以应用于步骤J。如下基因可以用于步骤J转化:

[0301]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
alr	ACT78580.1	254679867	木兰假丝酵母
er1	BAD90687.1	60458781	类丝孢酵母
er2	BAD90688.1	60458783	类丝孢酵母
er3	BAD90689.1	60458785	类丝孢酵母

[0302] 赤藓醇激酶(图3,步骤K)

[0303] 在途径的步骤K中,赤藓醇通过赤藓醇激酶转化为赤藓醇-4-磷酸。赤藓醇激酶(EC2.7.1.27)催化赤藓醇的磷酸化作用。赤藓醇激酶被表征于利用赤藓醇的细菌,例如流产布鲁氏菌(Sperry等人,J Bacteriol.121:619-630(1975))中。流产布鲁氏菌的eryA基因已经被功能表达于大肠杆菌中,以及据显示,所得的EryA催化赤藓醇到赤藓醇-4-磷酸的依赖ATP的转化(Lillo等人,Bioorg.Med.Chem.Lett.13:737-739(2003))。如下基因可以用于步骤K转化:

[0304]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
eryA	Q8YCU8	81850596	马尔他布鲁氏菌
eriA	Q92NH0	81774560	苜蓿中华根瘤菌
eryA	YP_001108625.1	134102964	红色糖多孢菌NRRL2338

[0305] 丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶(图4,步骤A)

[0306] 在图4所述的途径的步骤A中,通过丙二酰基-CoA:乙酰基-CoA酰基转移酶,即β-酮硫解酶将丙二酰基-CoA和乙酰基-CoA冷凝,以形成3-氧代戊二酰基-CoA。虽然至今没有关于对丙二酰基-CoA具有活性的酶的报道,但是对于这种转化,有一种好的候选酶,即β-酮己二酰-CoA硫解酶(EC2.3.1.174),也被称为3-氧代己二酰-CoA硫解酶,该酶将β-酮己二酰-CoA转化为琥珀酰-CoA和乙酰基-CoA,是用于芳香族化合物降解的β-酮己二酸途径的关键酶。该酶广泛存在于土壤细菌和真菌(包括恶臭假单胞菌(Harwood等人,J Bacteriol.176:6479-6488(1994)) and 乙酸钙不动杆菌(Doten等人,J Bacteriol.169:3168-3174(1987)))中。由假单胞菌菌株B13中的pcaF(Kaschabek等人,J Bacteriol.184:207-215(2002))、恶臭假单胞菌U中的phaD(Olivera等人,同上,(1998))、荧光假单胞菌ST中的paaE(Di Gennaro等人,Arch Microbiol.88:117-125(2007))和来自大肠杆菌的paaJ(Nogales等人,

Microbiology, 153:357-365(2007))编码的基因产物也催化这种转化。若干 β -酮硫解酶显示了氧代己二酰-CoA形成方向上显著的和选择性的活性,包括来自恶臭假单胞菌的bkt、来自绿脓假单胞菌PA01的pcaF和bkt、来自伯克霍尔德氏菌ambifaria AMMD的bkt、来自大肠杆菌的paaJ和来自恶臭假单胞菌的phaD。这些酶也可以用于合成3-氧代戊二酰基-CoA,一种结构上与3-氧代己二酰-CoA类似的化合物。

[0307]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
paaJ	NP_415915.1	16129358	大肠杆菌
pcaF	AAL02407	17736947	帚形假单胞菌(B13)
phaD	AAC24332.1	3253200	恶臭假单胞菌
pcaF	AAA85138.1	506695	恶臭假单胞菌
pcaF	AAC37148.1	141777	乙酸钙不动杆菌
paaE	ABF82237.1	106636097	荧光假单胞菌
bkt	YP_777652.1	115360515	伯克霍尔德氏菌ambifaria AMMD
bkt	AAG06977.1	9949744	绿脓假单胞菌PA01
pcaF	AAG03617.1	9946065	绿脓假单胞菌PA01

[0308] 另一相关的 β -酮硫解酶是氧代庚二酰基-CoA:戊二酰基-CoA酰基转移酶(EC2.3.1.16),其将戊二酰基-CoA和乙酰基-CoA结合以形成3-氧代庚二酰基-CoA。催化这种转化的酶发现于富养罗尔斯通氏菌(之前称为真养产碱杆菌)中,由基因bktB和bktC编码(Slater等人,J.Bacteriol.180:1979-1987(1998);Haywood等人,FEMS Microbiology Letters52:91-96(1988))。BktB蛋白质的序列是已知的;然而,还未有关于BktC蛋白质的序列的报道。沼泽红假单胞菌的pim操纵子也编码 β -酮硫解酶, β -酮硫解酶由pimB编码,预计在苯甲酰基-CoA降解期间按降解方向催化这种转化(Harrison等人,Microbiology151:727-736(2005))。Syntrophus aciditrophicus中的候选 β -酮硫解酶通过与bktB的序列同源性得到了确认(43%的一致性,E值=1e-93)。

[0309]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
bktB	YP_725948	bktB	富养罗尔斯通氏菌
pimB	CAE29156	pimB	沼泽红假单胞菌
syn_02642	YP_462685.1	syn_02642	Syntrophus aciditrophicus

[0310] 催化乙酰基-CoA和丙酰基-CoA形成 β -酮戊酰基-CoA的 β -酮硫解酶也能够催化形成3-氧代戊二酰基-CoA。生枝动胶菌具有两种可以从丙酰基-CoA和乙酰基-CoA形成 β -酮戊酰基-CoA的酮硫解酶以及富养罗尔斯通氏菌具有一种也能够催化这种转化的 β -氧化酮硫解酶(Slater等人,J.Bacteriol.180:1979-1987(1998))。这些基因或者其经翻译的蛋白质其序列还未有报道,但富养罗尔斯通氏菌、生枝动胶菌或其他生物中几种候选可以基于与来自富养罗尔斯通氏菌的bktB的序列同源性得到确认。这些包括:

[0311]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
phaA	YP_725941.1	113867452	富养罗尔斯通氏菌

h16_A1713	YP_726205.1	113867716	富养罗尔斯通氏菌
pcaF	YP_728366.1	116694155	富养罗尔斯通氏菌
h16_B1369	YP_840888.1	116695312	富养罗尔斯通氏菌
h16_A0170	YP_724690.1	113866201	富养罗尔斯通氏菌
h16_A0462	YP_724980.1	113866491	富养罗尔斯通氏菌
h16_A1528	YP_726028.1	113867539	富养罗尔斯通氏菌
h16_B0381	YP_728545.1	116694334	富养罗尔斯通氏菌
h16_B0662	YP_728824.1	116694613	富养罗尔斯通氏菌
h16_B0759	YP_728921.1	116694710	富养罗尔斯通氏菌
h16_B0668	YP_728830.1	116694619	富养罗尔斯通氏菌
h16_A1720	YP_726212.1	113867723	富养罗尔斯通氏菌
h16_A1887	YP_726356.1	113867867	富养罗尔斯通氏菌
phbA	P07097.4	135759	生枝动胶菌
bktB	YP_002005382.1	194289475	台湾贪铜菌
Rmet_1362	YP_583514.1	94310304	罗尔斯通氏贪铜菌
Bphy_0975	YP_001857210.1	186475740	瘤状伯克霍尔德氏菌

[0312] 另外的候选包括已知将乙酰基-CoA的两个分子转化为乙酰乙酰基-CoA的 β -酮硫解酶(EC2.1.3.9)。示例性的乙酰乙酰基-CoA硫解酶包括来自大肠杆菌的atoB(Martin等人,同上,(2003))、来自丙酮丁醇梭菌的thlA和thlB(Hanai等人,同上,(2007);Winzer等人,同上,(2000))和来自酿酒酵母的ERG10(Hiser等人,同上,(1994))的基因产物。

[0313]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
toB	NP_416728	16130161	大肠杆菌
thlA	NP_349476.1	15896127	丙酮丁醇梭菌
thlB	NP_149242.1	15004782	丙酮丁醇梭菌
ERG10	NP_015297	6325229	酿酒酵母

[0314] 3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(酮还原)(图4,步骤B)

[0315] 在图4所示途径的步骤B中,这种酶催化3-氧代戊二酰基-CoA中的3-氧代基团还原为3-羟基基团。

[0316] 3-氧代酰基-CoA脱氢酶将3-氧代酰基-CoA分子转化成3-羟基酰基-CoA分子并经常参与脂肪酸 β -氧化或者苯基乙酸分解代谢。例如,大肠杆菌中两种脂肪酸氧化复合物的由fadB和fadJ编码的亚基作为3-羟基酰基-CoA脱氢酶起作用(Binstock等人,Methods Enzymol. 71Pt C:403-411(1981))。此外,由恶臭假单胞菌U中的phaC(Olivera等人,同上,(1998))和荧光假单胞菌ST中的paaC(Di等人,同上,(2007))编码的基因产物在苯基乙酸或者苯乙烯的分解代谢期间,催化3-羟基己二酰-CoA的可逆氧化,以形成3-氧代己二酰-CoA。另外,鉴于大肠杆菌中的paaH接近苯基乙酸降解操纵子中的其他基因(Nogales等人,同上,(2007)),以及鉴于paaH突变体不能在苯基乙酸上生长的事实(Ismail等人,同上,(2003)),预期大肠杆菌paaH基因编码-羟基酰基-CoA脱氢酶。

[0317]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
fadB	P21177.2	119811	大肠杆菌
fadJ	P77399.1	3334437	大肠杆菌
paaH	NP_415913.1	16129356	大肠杆菌
phaC	NP_745425.1	26990000	恶臭假单胞菌
paaC	ABF82235.1	106636095	荧光假单胞菌

[0318] 3-羟基丁酰基-CoA脱氢酶(也称为乙酰乙酰基-CoA还原酶)催化乙酰乙酰基-CoA到3-羟基丁酰基-CoA的可逆的依赖NAD(P)H的转化。这种酶参与梭菌属的若干物种中通向丁酸的乙酰基-CoA发酵途径并已经得到详细的研究(Jone和Woods,同上,(1986))。候选酶包括来自丙酮丁醇梭菌的hbd(Boynton等人,J.Bacteriol.178:3015-3024(1996))、来自拜氏梭菌的hbd(Colby等人,Appl Environ.Microbiol58:3297-3302(1992))和许多来自勤奋生金球菌的类似酶(Berg等人,同上,(2007))。来自丙酮丁醇梭菌的、由hbd编码的酶已经被克隆并功能表达于大肠杆菌(Youngleson等人,同上,(1989))中。还有被证实将乙酰乙酰基-CoA还原为3-羟基丁酰基-CoA的其他基因,他们是来自生枝动胶菌的phbB(Ploux等人,同上,(1988))和来自类球红细菌的phaB(Alber等人,同上,(2006))。前者基因是依赖NADPH的,其核苷酸序列已经得到测定(People和Sinskey,同上,(1989))以及该基因已被表达于大肠杆菌中。另外的基因包括克鲁佛氏梭菌中的hbd1(C-末端域)和hbd2(N-末端域)(Hillmer和Gottschalk,Biochim.Biophys.Acta3334:12-23(1974))和牛中的HSD17B10(WAKIL等人,同上,(1954))。

[0319]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
hbd	NP_349314.1	15895965	丙酮丁醇梭菌
hbd	AAM14586.1	20162442	拜氏梭菌
Msed_1423	YP_001191505	146304189	勤奋生金球菌
Msed_0399	YP_001190500	146303184	勤奋生金球菌
Msed_0389	YP_001190490	146303174	勤奋生金球菌

[0320]

Msed_1993	YP_001192057	146304741	勤奋生金球菌
hbd2	EDK34807.1	146348271	克鲁佛氏梭菌
hbd1	EDK32512.1	146345976	克鲁佛氏梭菌
HSD17B10	002691.3	3183024	牛
phaB	YP_353825.1	77464321	类球红细菌
phbB	P23238.1	130017	生枝动胶菌

[0321] 3-羟基戊二酰基-CoA还原酶(醛形成)(图4,步骤C)

[0322] 3-羟基戊二酰基-CoA还原酶将3-羟基戊二酰基-CoA还原为3-羟基-5-氧代戊酸。几种酰基-CoA脱氢酶将酰基-CoA还原为其相应的醛(EC1.2.1)。编码此类酶的示例性基因包括编码脂肪酰基-CoA还原酶的乙酸钙不动杆菌acr1(Reiser和Somerville,同上,(1997))、编码脂肪酰基-CoA还原酶的不动杆菌属种M-1(Ishige等人,同上,(2002)),以及

克鲁佛氏梭菌中编码依赖CoA和NADP的琥珀酸半醛脱氢酶的sucD基因(Sohling和Gottschalk,同上,(1996);Sohling和Gottschalk,同上,(1996))。牙龈红棕色单胞菌的sucD是另一种琥珀酸半醛脱氢酶(Takahashi等人,同上,(2000))。假单胞菌中由bphG编码的酶酰化型乙醛脱氢酶仍然是另一种被证明对乙醛、丙醛、丁醛、异丁醛和甲醛氧化和酰化的酶(Powlowski等人,同上,(1993))。除了将乙酰基-CoA还原为乙醇,肠膜明串珠菌中由adhE编码的该酶还显示将支链化合物异丁醛氧化为异丁酰基-CoA(Koo等人,Biotechnol Lett.27:505-510(2005))。丁醛脱氢酶催化生溶剂性生物(solventogenic organism),如糖乙酸多丁醇梭菌(Kosaka等人,Biosci.Biotechnol Biochem.71:58-68(2007))中的类似反应,丁酰基-CoA到丁醛的转化。

[0323]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
acr1	YP_047869.1	50086359	乙酸钙不动杆菌
acr1	AAC45217	1684886	贝氏不动杆菌
acr1	BAB85476.1	18857901	不动杆菌属种菌株M-1
sucD	P38947.1	172046062	克鲁佛氏梭菌
sucD	NP_904963.1	34540484	牙龈红棕色单胞菌
bphG	BAA03892.1	425213	假单胞菌
adhE	AAV66076.1	55818563	肠膜明串珠菌
bld	AAP42563.1	31075383	糖乙酸多丁醇梭菌

[0324] 其他的将酰基-CoA转化为其相应的醛的酶型是将丙二酰基-CoA转化为丙二酸半醛的丙二酰基-CoA还原酶。丙二酰基-CoA还原酶是在嗜热酸古生细菌中通过3-羟基丙酸循环的自养碳固定中的关键酶(Berg等人,同上,(2007b);Thauer,同上,(2007))。该酶利用NADPH作为辅因子并已经表征在生金球菌属和硫化叶菌菌种中(Alber等人,同上,(2006);Hugler等人,同上,(2002))。该酶由勤奋生金球菌中的Msed_0709编码(Alber等人,同上,(2006);Berg等人,同上,(2007b))。来自硫化叶菌tokodaii的编码丙二酰基-CoA还原酶的基因被克隆并异源表达在大肠杆菌中(Alber等人,同上,(2006))。该酶也已显示催化甲基丙二酰基-CoA到其相应的醛的转化(WO/2007/141208)。虽然这些酶的醛脱氢酶功能性与来自橙色绿屈挠菌的双功能脱氢酶相似,但是几乎没有序列相似性。两种丙二酰基-CoA还原酶具有相对于天冬氨酸半醛脱氢酶(一种催化天冬氨酰基-4-磷酸到天冬氨酸半醛的还原和同时发生的脱磷酸作用)的高度序列相似性。其他的候选基因可以通过蛋白质序列同源性发现于其他的生物中,包括硫磺矿硫化叶菌和嗜酸热硫化叶菌。仍然另一候选酶酰基-CoA还原酶(醛形成)是来自拜氏梭菌的ald基因(Toth等人,Appl Environ.Microbiol.65:4973-4980(1999))。已有报告称,这种酶将乙酰基-CoA和丁酰-CoA还原为它们相应的醛。这种基因非常类似于编码鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌的乙醛脱氢酶的eutE(Toth等人,同上,(1999))。

[0325]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	勤奋生金球菌
mcr	NP_378167.1	15922498	硫化叶菌tokodaii

asd-2	NP_343563.1	15898958	硫磺矿硫化叶菌
Saci_2370	YP_256941.1	70608071	嗜酸热硫化叶菌
Ald	AAT66436	9473535	拜氏梭菌
eutE	AAA80209	687645	鼠伤寒沙门氏菌
eutE	P77445	2498347	大肠杆菌

[0326] 3-羟基-5-氧代戊酸还原酶(图4,步骤D)

[0327] 这种酶将3-羟基-5-氧代戊酸中的末端醛基团还原为醇基团。编码催化醛到醇转化的酶(即醇脱氢酶或者对等地,醛还原酶,1.1.1.a)的示例性基因包括编码C2-C14的中链醇脱氢酶的alrA(Tani等人,同上,(2000))、来自酿酒酵母的ADH2(Atsumi等人,同上,(2008))、来自大肠杆菌偏向长于C(3)的分子的yqhD(Sulzenbacher等人,同上,(2004))以及来自丙酮丁醇梭菌将丁醛转化为丁醇的bdh I和bdh II(Walter等人,同上,(1992))。yqhD的基因产物利用NADPH作为辅因子催化乙醛、丙二醛、丙醛、丁醛和丙烯醛的还原(Perez等人,283:7346-7353(2008);Perez等人,J Biol.Chem.283:7346-7353(2008))。来自运动发酵单胞菌的adhA基因产物已被证实,对许多醛(包括甲醛、乙醛、丙醛、丁醛和丙烯醛)具有活性(Kinoshita等人,Appl Microbiol Biotechnol22:249-254(1985))。

[0328]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
alrA	BAB12273.1	9967138	不动杆菌属种菌株M-1

[0329]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
ADH2	NP_014032.1	6323961	酿酒酵母
yqhD	NP_417484.1	16130909	大肠杆菌
bdh I	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌
bdh II	NP_349891.1	15896542	丙酮丁醇梭菌
adhA	YP_162971.1	56552132	运动发酵单胞菌

[0330] 显示4-羟基丁酸脱氢酶活性的酶(EC1.1.1.61)也属于这一类别。这类酶已经表征于富养罗尔斯通氏菌(Bravo等人,同上,(2004))、克鲁弗氏梭菌(Wolff和Kenealy,同上,(1995))和拟南芥(Breitkreuz等人,同上,(2003))中。拟南芥酶被克隆并表征于酵母[12882961]中。仍然另一种基因是来自热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌的醇脱氢酶adhI(Jeon等人,J Biotechnol135:127-133(2008))。

[0331]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
4hbd	YP_726053.1	113867564	富养罗尔斯通氏菌H16
4hbd	EDK35022.1	146348486	克鲁弗氏梭菌
4hbd	Q94B07	75249805	拟南芥
adhI	AAR91477.1	40795502	热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌

[0332] 另一示例性的酶是对3-羟基异丁酸到甲基丙二酸半醛的可逆氧化进行催化的3-羟基异丁酸脱氢酶。这种酶参与缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解并且已经发现于细菌、真核生物以及哺乳动物中。由来自嗜热栖热菌HB8的P84067编码的酶已经有结构表征

(Lokanath等人, J Mol Biol 352:905-17(2005))。人3-羟基异丁酸脱氢酶的可逆性通过利用同位素标记的底物得到了证明(Manning等人, Biochem J 231:481-4(1985))。编码这种酶的其他基因包括智人(Hawes等人, Methods Enzymol 324:218-228(2000))和穴兔(Hawes等人, 同上, (2000); Chowdhury等人, Biosci. Biotechnol Biochem. 60:2043-2047(1996))中的3hidh、绿脓假单胞菌中的mmsb以及恶臭假单胞菌中的dhat(Aberhart等人, J Chem. Soc. [Perkin 1] 6:1404-1406(1979); Chowdhury等人, 同上, (1996); Chowdhury等人, Biosci. Biotechnol Biochem. 67:438-441(2003))。

[0333]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
P84067	P84067	75345323	嗜热栖热菌
mmsb	P28811.1	127211	绿脓假单胞菌
dhat	Q59477.1	2842618	恶臭假单胞菌
3hidh	P31937.2	12643395	智人
3hidh	P32185.1	416872	穴兔

[0334] 丙二酸半醛到3-HP的转化还可以通过两种其他的酶完成: 依赖NADH的3-羟基丙酸脱氢酶和依赖NADPH的丙二酸半醛还原酶。认为, 依赖NADH的3-羟基丙酸脱氢酶参与细菌和植物中从丙酸到β-丙氨酸的生物合成途径(Rathinasabapathi B., Journal of Plant Pathology 159:671-674(2002); Stadtman, J. Am. Chem. Soc. 77:5765-5766(1955))。迄今为止, 这种酶仍未与任何生物中的基因有所关联。依赖NADPH的丙二酸半醛还原酶催化固定CO₂的自养细菌中的逆反应。虽然已在勤奋生金球菌中检测到该酶的活性, 但是基因的身份尚未可知(Alber等人, 同上, (2006))。

[0335] 3,5-二羟基戊酸激酶(图4, 步骤E)

[0336] 这种酶使图4(步骤E)中的3,5-二羟基戊酸磷酸化以形成3-羟基-5-磷酸氧基戊酸(3H5PP)。这种转化可以通过EC等级2.7.1中能实现磷酸基团到醇的依赖ATP的转移的酶来催化。

[0337] 用于该步骤的好的候选酶是甲羟戊酸激酶(EC2.7.1.36), 该酶使3,5-二羟基戊酸的甲基类似物-甲羟戊酸的末端羟基基团磷酸化。用于该步骤的一些候选基因是来自酿酒酵母的erg12、来自詹氏甲烷球菌的mvk、来自智人的MVK和来自Co1生态型拟南芥的mvk。

[0338]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
erg12	CAA39359.1	3684	酿酒酵母
mvk	Q58487.1	2497517	詹氏甲烷球菌
mvk	AAH16140.1	16359371	智人
M\mvk	NP_851084.1	30690651	拟南芥

[0339] 甘油激酶也使甘油中的末端羟基基团磷酸化以形成甘油-3-磷酸。该反应发生在若干物种中, 包括大肠杆菌、酿酒酵母和海栖热袍菌。大肠杆菌甘油激酶已显示接受替代性底物, 例如二羟丙酮和甘油醛(Hayashi和Lin, 同上, (1967))。海栖热袍菌有两种甘油激酶(Nelson等人, 同上, (1999))。甘油激酶已显示具有范围广泛的底物特异性。Crans和Whiteside研究了来自四种不同生物(大肠杆菌、酿酒酵母、嗜热脂肪芽孢杆菌和假丝酵母)

的甘油激酶(Crans和Whitesides,同上,(2010);Nelson等人,同上,(1999))。他们研究了甘油的66种不同的类似物,以及得出的结论是,该酶能接受一系列的取代基来取代一个末端羟基基团以及C2上的氢原子能被甲基基团取代。有趣的是,来自所述所有四种生物的酶其动力学常数是高度相似的。候选基因如下:

[0340]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
glpK	AP_003883.1	89110103	大肠杆菌K12
glpK1	NP_228760.1	15642775	海栖热袍菌MSB8
glpK2	NP_229230.1	15642775	海栖热袍菌MSB8

[0341]

Gut1	NP_011831.1	82795252	酿酒酵母
------	-------------	----------	------

[0342] 高丝氨酸激酶是另一种可能的候选酶,其可以导致3,5-二羟基戊酸的磷酸化。该酶也存在于许多生物中,包括大肠杆菌、链霉菌属种和酿酒酵母。来自大肠杆菌的高丝氨酸激酶已显示对众多的底物有活性,所述底物包括L-2-氨基-1,4-丁二醇、天冬氨酸半醛和2-氨基-5-羟基戊酸(Huo和Viola,同上,(1996);Huo和Viola,同上,(1996))。这种酶可以作用于底物,其中 α 位置的羧基基团已被酯或者羟甲基基团取代。候选基因如下:

[0343]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
thrB	BAB96580.2	85674277	大肠杆菌K12
SACT1DRAFT_4809	ZP_06280784.1	282871792	链霉菌属种ACT-1
Thr1	AAA35154.1	172978	酿酒酵母

[0344] 3H5PP激酶(图4,步骤F)

[0345] 3H5PP到3H5PDP的磷酸化作用是由3H5PP激酶催化的(图4,步骤F)。磷酸甲羟戊酸激酶(EC2.7.4.2)催化与甲羟戊酸途径中的转化类似的转化。这种酶由酿酒酵母中的erg8(Tsay等人,Mol.Cell Biol.11:620-631(1991))和肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌和粪肠球菌中的mvaK2(Doun等人,Protein Sci.14:1134-1139(2005);Wilding等人,J Bacteriol.182:4319-4327(2000))编码。肺炎链球菌和粪肠球菌酶被克隆并表征于大肠杆菌中(Pilloff等人,J Biol.Chem.278:4510-4515(2003);Doun等人,Protein Sci.14:1134-1139(2005))。

[0346]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
Erg8	AAA34596.1	171479	酿酒酵母
mvaK2	AAG02426.1	9937366	金黄色葡萄球菌
mvaK2	AAG02457.1	9937409	肺炎链球菌
mvaK2	AAG02442.1	9937388	粪肠球菌

[0347] 3H5PDP脱羧酶(图4,步骤G)

[0348] 通过3H5PDP脱羧酶从3H5PDP的依赖ATP的脱羧作用形成丁烯基4-二磷酸(图4,步骤G)。虽然具有这种活性的酶至今未得到表征,但是类似的反应通过甲羟戊酸二磷酸脱羧酶(EC4.1.1.33)(一种参与用于异戊间二烯化合物生物合成的甲羟戊酸途径的酶)得以催

化。这种反应由酿酒酵母中的MVD1、智人中的MVD以及金黄色葡萄球菌和布氏锥虫中的MDD催化(Toth等人,J Biol.Chem.271:7895-7898(1996);Byres等人,J Mol.Biol.371:540-553(2007))。

[0349]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
MVD1	P32377.2	1706682	酿酒酵母

[0350]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
MVD	NP_002452.1	4505289	智人
MDD	ABQ48418.1	147740120	金黄色葡萄球菌
MDD	EAN78728.1	70833224	布氏锥虫

[0351] 丁烯基4-二磷酸异构酶(图4,步骤H)

[0352] 丁烯基4-二磷酸异构酶催化2-丁烯基-4-二磷酸和丁烯基-4-二磷酸的可逆相互转化。如下的酶可以自然地具有这种活性或者可以经设计显示这种活性。有用的基因包括那些编码催化异戊基二磷酸和二甲烯丙基二磷酸相互转化的酶。这些酶包括来自大肠杆菌(Rodríguez-Concepción等人,FEBS Lett,473(3):328-332)、酿酒酵母(Anderson等人,J Biol Chem,1989,264(32):19169-75)以及希氏硫化叶菌(Yamashita等人,Eur J Biochem,2004,271(6):1087-93)的异戊基二磷酸异构酶。由大肠杆菌的Idi蛋白质催化的异构化其反应机制的特点已经从机械学角度进行了详细论述(de Ruyck等人,J Biol.Chem.281:17864-17869(2006))。来自酿酒酵母、枯草芽孢杆菌和雨生红球藻的异戊基二磷酸异构酶已经被异源性表达在大肠杆菌中(Laupitz等人,Eur.J Biochem.271:2658-2669(2004);Kajiwar等人,Biochem.J324(Pt2):421-426(1997))。

[0353]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
Idi	NP_417365.1	16130791	大肠杆菌
IDI1	NP_015208.1	6325140	酿酒酵母
Idi	BAC82424.1	34327946	希氏硫化叶菌
Idi	AAC32209.1	3421423	雨生红球藻
Idi	BAB32625.1	12862826	枯草芽孢杆菌

[0354] 丁二烯合酶(图4,步骤I)

[0355] 丁二烯合酶催化2-丁烯基-4-二磷酸到1,3-丁二烯的转化。下文所述的酶自然地具有这种活性或者可以经设计显示这种活性。异戊二烯合酶自然地催化二甲烯丙基二磷酸到异戊二烯的转化,但也可以催化2-丁烯基-4-二磷酸到1,3-丁二烯的合成。异戊二烯合酶可以发现于若干生物中,所述生物包括银白杨(Sasaki等人,FEBS Letters,2005,579(11),2514-2518)、山葛(Lindberg等人,Metabolic Eng,12(1):70-79(2010);Sharkey等人,Plant Physiol.,137(2):700-712(2005))以及欧洲山杨x银白杨(Miller等人,Planta,213(3):483-487(2001))。另外的异戊二烯合酶的描述见(Chotani等人,W0/2010/031079, Systems Using Cell Culture for Production of Isoprene;Cervin等人,美国专利申请20100003716,Isoprene Synthase Variants for Improved Microbial Production of Isoprene)。

[0356]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
ispS	BAD98243.1	63108310	银白杨
ispS	AAQ84170.1	35187004	山葛
ispS	CAC35696.1	13539551	欧洲山杨x银白杨

[0357] 3-羟基戊二酰基-CoA还原酶(醇形成)(图4,步骤J)

[0358] 该步骤催化3-羟基戊二酰基-CoA中的酰基-CoA基团还原为醇基团。将酰基-CoA转化为醇的示例性双功能氧化还原酶包括那些转换底物的酶,如转化乙酰基-CoA到乙醇(例如,来自大肠杆菌的adhE(Kessler等人,同上,(1991)))以及转化丁酰基-CoA到丁醇(例如,来自丙酮丁醇梭菌的adhE2(Fontaine等人,同上,(2002)))。除了还原乙酰基-CoA到乙醇之外,由肠膜明串珠菌中的adhE编码的酶也已显示将支链化合物异丁醛氧化为异丁酰基-CoA(Kazahaya等人,同上,(1972);Koo等人,同上,(2005))。

[0359] 另一示例性的酶可以将丙二酰基-CoA转化为3-HP。具有这种活性的依赖NADPH的酶已经表征在橙色绿屈挠菌中,其中它参与3-羟基丙酸循环(Hugler等人,同上,(2002);Straus和Fuchs,同上,(1993))。这种酶(具有300kDa的量)具有高底物特异性并显示与其他已知的氧化还原酶几乎没有序列相似性(Hugler等人,同上,(2002))。在其他生物中没有显示为催化这一特异性反应的酶;然而存在其他生物可以具有相似途径的生物信息证据(Klatt等人,同上,(2007))。可以通过序列相似性推断在其他生物(包括Roseiflexus castenholzii、赤细菌属种NAP1和海洋 γ -蛋白质菌HTCC2080)中的候选酶。

[0360]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
adhE	NP_415757.1	16129202	大肠杆菌
adhE2	AAK09379.1	12958626	丙酮丁醇梭菌
adhE	AAV66076.1	55818563	肠膜明串珠菌
mcr	AAS20429.1	42561982	橙色绿屈挠菌
Rcas_2929	YP_001433009.1	156742880	Roseiflexus castenholzii
NAP1_02720	ZP_01039179.1	85708113	赤细菌属种NAP1
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	119504313	海洋 γ -蛋白质菌HTCC2080

[0361] 较长链的酰基-CoA分子可以通过酶被还原,如编码醇-形成脂肪酰基-CoA还原酶的荷荷巴(加州希蒙得木)FAR。其在大肠杆菌中的过表达导致FAR活性和脂肪醇的堆积(Metz等人,Plant Physiology122:635-644(2000))。

[0362]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
FAR	AAD38039.1	5020215	加州希蒙得木

[0363] 用于催化该步骤的另一候选酶是3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA还原酶(或者HMG-CoA还原酶)。这种酶还原将3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA中的CoA基团还原为形成醇的甲羟戊酸。用于该步骤的候选基因包括:

[0364]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
-----	------------	-----	----

HMG1	CAA86503.1	587536	酿酒酵母
HMG2	NP_013555	6323483	酿酒酵母
HMG1	CAA70691.1	1694976	拟南芥
hmgA	AAC45370.1	2130564	硫磺矿硫化叶菌

[0365] 已经将硫磺矿硫化叶菌的编码3-羟基-3-甲基戊二酰基-CoA还原酶的hmgA基因克隆、测序并表达于大肠杆菌中(Bochar等人,J Bacteriol.179:3632-3638(1997))。酿酒酵母体内也有两种HMG-CoA还原酶(Basson等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A83:5563-5567(1986))。该基因也已经从拟南芥中分离得到以及已显示补充了酿酒酵母中HMG-CoA还原酶活性(Learned等人,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A86:2779-2783(1989))。

[0366] 3-氧代戊二酰基-CoA还原酶(醛形成)(图4,步骤K)

[0367] 若干酰基-CoA脱氢酶能够将酰基-CoA还原为其相应的醛。因此,他们可以自然地将3-氧代戊二酰基-CoA还原为3,5-二氧代戊酸或者可以经设计达到此目的。编码此类酶的示例性基因在“图4,步骤C”中讨论。

[0368] 3,5-二氧代戊酸还原酶(酮还原)(图4,步骤L)

[0369] 存在转化酮到羟基官能团的多种示例性醇脱氢酶。来自大肠杆菌的两种这类酶由苹果酸脱氢酶(mdh)和乳酸脱氢酶(ldhA)编码。此外,已显示,来自富养罗尔斯通氏菌的乳酸脱氢酶被证实对链长不等的2-酮酸(包括乳酸、2-氧代丁酸、2-氧代戊酸和2-氧代戊二酸)具有高活性(Steinbuchel等人,Eur.J.Biochem.130:329-334(1983))。 α -酮己二酸到 α -羟基己二酸的转化可以通过2-酮己二酸还原酶催化,该酶据报告发现于大鼠和紫河车中(Suda等人,Arch.Biochem.Biophys.176:610-620(1976);Suda等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.77:586-591(1977))。用于该步骤的其他候选酶是来自人类心脏的线粒体3-羟基丁酸脱氢酶(bdh),该酶已被克隆并表征(Marks等人,J.Biol.Chem.267:15459-15463(1992))。这种酶是一种作用于3-羟基酸的脱氢酶。另一示例性醇脱氢酶将丙酮转化为异丙醇,如拜氏梭菌(Ismail等人,J.Bacteriol.175:5097-5105(1993))和布氏热厌氧杆菌(Lamed等人,Biochem.J.195:183-190(1981);Peretz等人,Biochemistry.28:6549-6555(1989))中所示。丁酮还原酶或者替代性地,2-丁醇脱氢酶催化MEK的还原作用,以形成2-丁醇。示例性的酶可以发现于赤红球菌(Kosjek等人,Biotechnol Bioeng.86:55-62(2004))和激烈热球菌(van der等人,Eur.J.Biochem.268:3062-3068(2001))中。

[0370]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
mdh	AAC76268.1	1789632	大肠杆菌
ldhA	NP_415898.1	16129341	大肠杆菌
ldh	YP_725182.1	113866693	富养罗尔斯通氏菌
bdh	AAA58352.1	177198	智人
adh	AAA23199.2	60592974	拜氏梭菌NRRL B593
adh	P14941.1	113443	布氏热厌氧杆菌HTD4
adhA	AAC25556	3288810	激烈热球菌
adh-A	CAD36475	21615553	赤红球菌

[0371] 许多生物可以催化4-羟基-2-丁酮到1,3-丁二醇的还原作用,包括那些属于芽孢杆菌属、短杆菌属、念珠菌属和克雷伯氏菌属等等的生物,如Matsuyama等人的美国专利5,413,922中所述。突变的红球菌苯乙醛还原酶(Sar268)和Leifsonia(原文少了s)醇脱氢酶也已显示催化这种转化且收率高(Itoh等人,Appl.Microbiol.Biotechnol.75(6):1249-1256)。

[0372] 高丝氨酸脱氢酶(EC1.1.1.13)催化天冬氨酸半醛到高丝氨酸的依赖NAD(P)H的还原作用。在许多生物(包括大肠杆菌)中,高丝氨酸脱氢酶是一种双功能的酶,其也催化天冬氨酸到天冬氨酰基-4-磷酸的依赖ATP的转化(Starnes等人,Biochemistry11:677-687(1972))。功能域其催化是相互独立的并通过连接区连接(Sibilli等人,J Biol Chem256:10228-10230(1981))以及两个区域均受苏氨酸的变构抑制。将由thrA编码的大肠杆菌酶的高丝氨酸脱氢酶区域与天冬氨酸激酶区域分离、表征并发现其显示高催化活性以及降低的苏氨酸抑制性(James等人,Biochemistry41:3720-3725(2002))。这可以应用于其他双功能苏氨酸激酶,包括,例如,植物乳杆菌(Cahyanto等人,Microbiology152:105-112(2006))和拟南芥的hom1。由酿酒酵母中的hom6(Jacques等人,Biochim Biophys Acta1544:28-41(2001))和植物乳杆菌中的hom2(Cahyanto等人,同上,(2006))编码的单功能高丝氨酸脱氢酶已被功能表达并表征于大肠杆菌中。

[0373]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
thrA	AAC73113.1	1786183	大肠杆菌K12
akthr2	081852	75100442	拟南芥
hom6	CAA89671	1015880	酿酒酵母
hom1	CAD64819	28271914	植物乳杆菌
hom2	CAD63186	28270285	植物乳杆菌

[0374] 3,5-二氧代戊酸还原酶(醛还原)(图4,步骤M)

[0375] 若干还原醛的还原酶能够将一种醛还原为其相应的醇。因此,他们可以自然地将3,5-二氧代戊酸还原为5-羟基-3-氧代戊酸或者可以经设计达到此目的。编码此类酶的示例性基因在“图4,步骤D”中讨论。

[0376] 5-羟基-3-氧代戊酸还原酶(图4,步骤N)

[0377] 若干还原酮的还原酶能够将一种酮还原为其相应的羟基基团。因此,他们可以自然地将5-羟基-3-氧代戊酸还原为3,5-二羟基戊酸或者可以经设计达到此目的。编码此类酶的示例性基因在“图4,步骤L”中讨论。

[0378] 3-氧代-戊二酰基-CoA还原酶(CoA还原和醇形成)(图4,步骤O)

[0379] 3-氧代-戊二酰基-CoA还原酶(CoA还原和醇形成)催化从3-氧代-戊二酰基-CoA形成5-羟基-3-氧代戊酸所需的2个还原步骤。将酰基-CoA转化为醇的示例性的2步氧化还原酶提供在图4的步骤J中。此类酶可以自然地将3-氧代-戊二酰基-CoA转化为5-羟基-3-氧代戊酸或者可以经设计达到此目的。

[0380] 实施例II

[0381] 从巴豆醇到丁二烯的化工生产

[0382] 在用于将巴豆醇转化为丁二烯的典型工艺中,在反应容器或反应管内部,在存在

或不存在蒸汽时,使纯的或含于溶剂中的巴豆醇通过被加热至40-400℃范围内的温度的固体无机、有机或含金属的脱水催化剂之上,从而除去水并将丁二烯作为气体释放,将该丁二烯冷凝(丁二烯沸点=-4.4℃)并收集在贮器中,用于进一步的处理、存储或者使用。常用的催化剂可以包括钼酸铋、磷酸盐-磷酸、二氧化铈、高岭土-氧化铁、高岭土-磷酸、二氧化硅-氧化铝以及氧化铝。典型的工艺吞吐量范围为0.1-20,000kg/h。常用的溶剂为甲苯、庚烷、辛烷、乙苯和二甲苯。

[0383] 本申请通篇中已经引用了各种出版物。本申请中特此以引用方式并入这些出版物披露的全文(包括GenBank和GI号码公布),以便更充分地描述本发明所属的现有技术水平。虽然已经就上文提供的实施例对本发明进行了描述,但是应该理解的是,在不脱离本发明精神的情况下,可以作出各种修改。

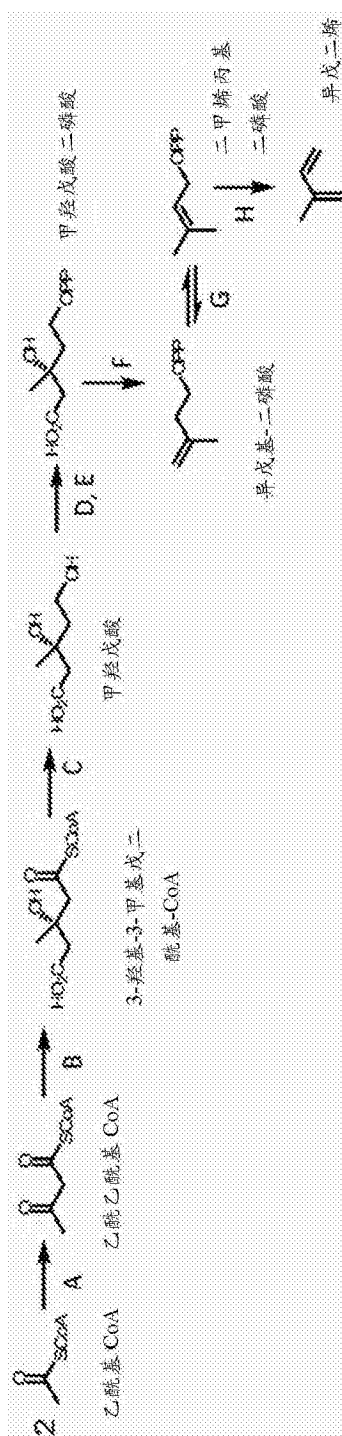


图1

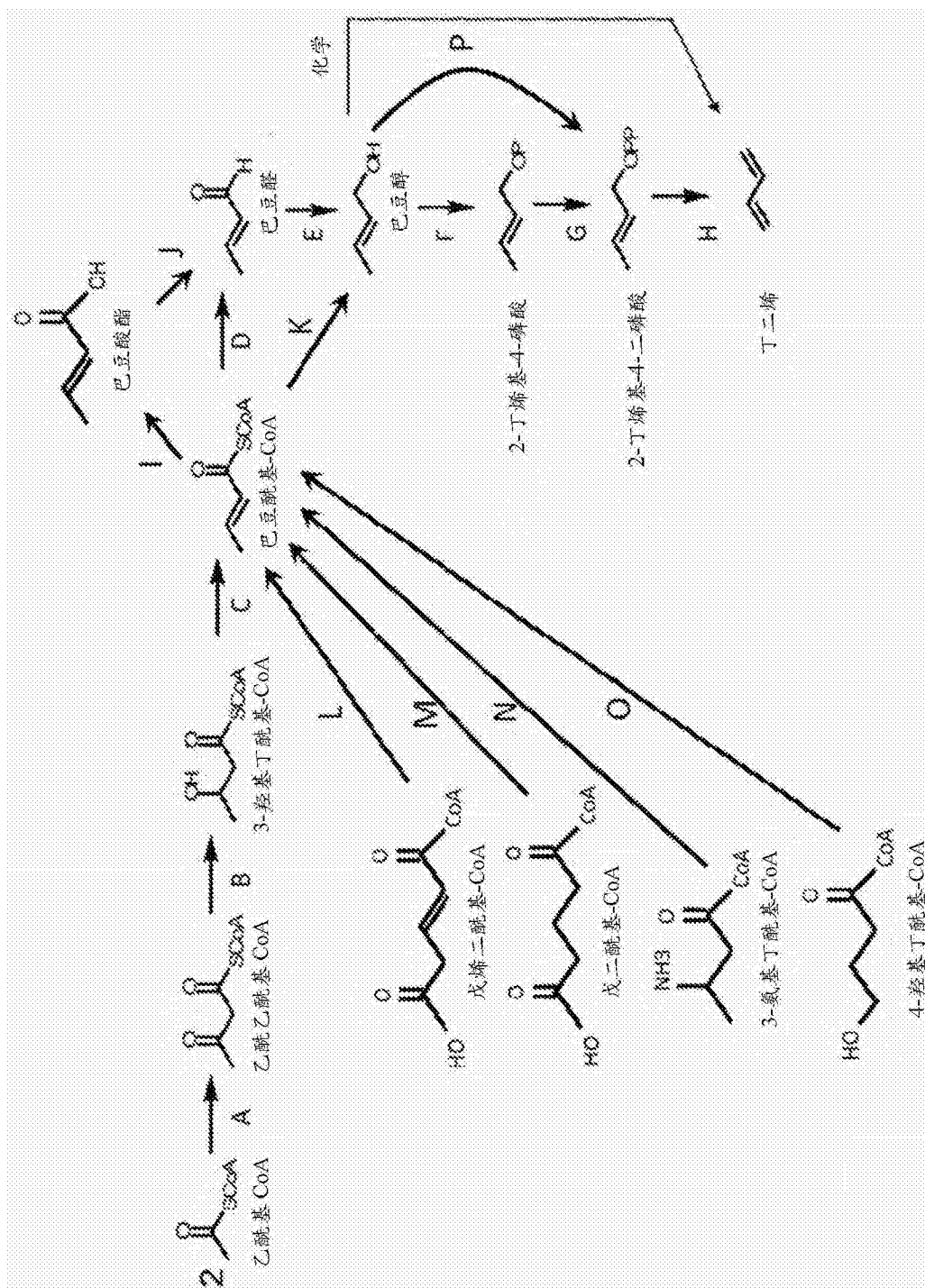


图2

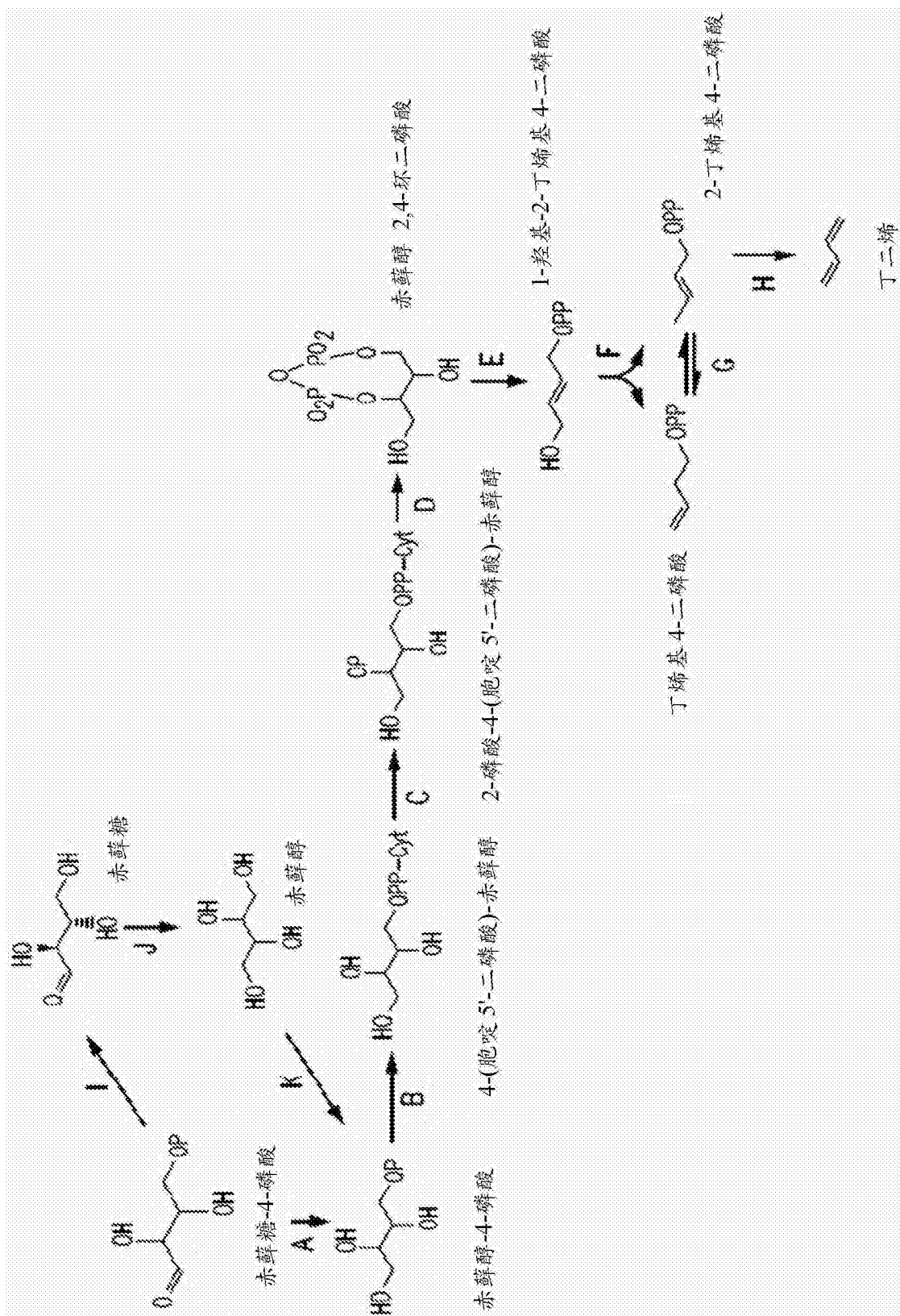


图3

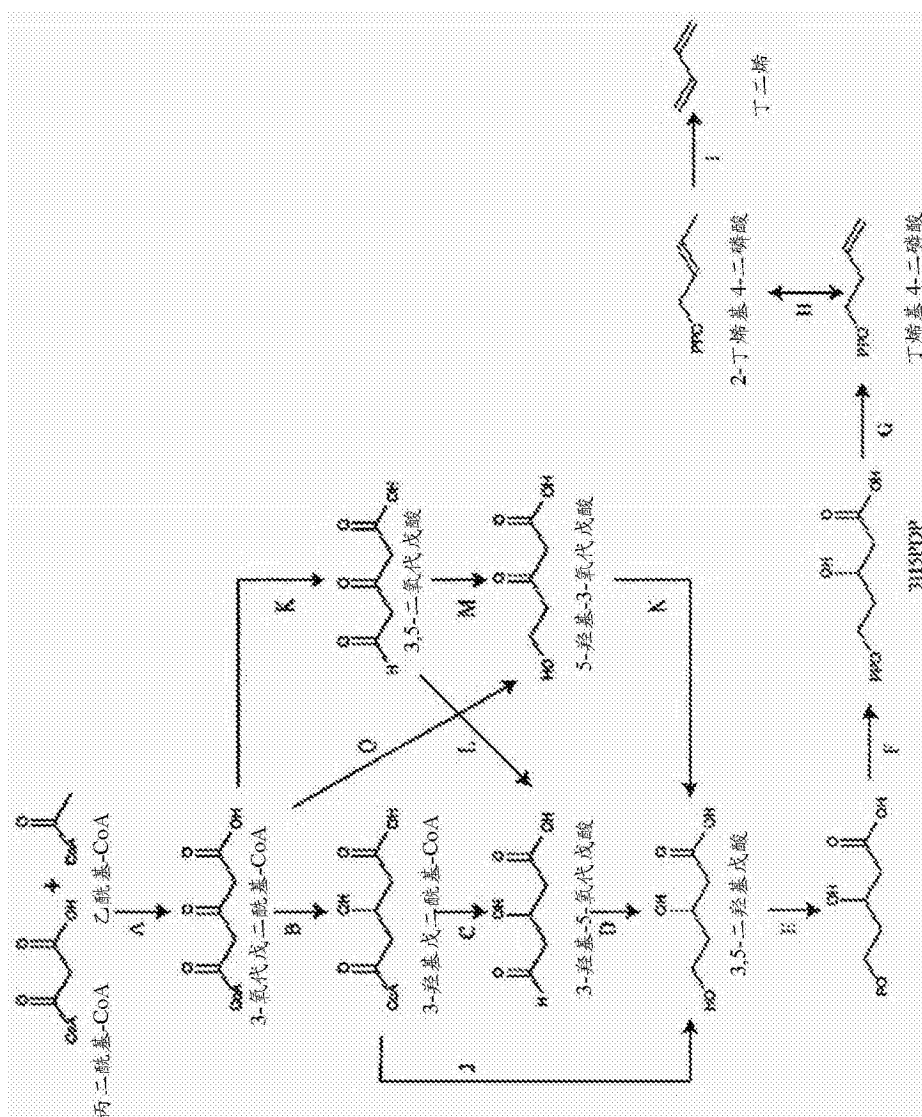


图 4