

(21)申請案號：102137205

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 10 月 15 日

(51)Int. Cl. : C12N15/63 (2006.01)

C12P7/00 (2006.01)

(30)優先權：2012/10/15 美國

61/714,144

(71)申請人：奇諾麥提卡公司(美國) GENOMATICA, INC. (US)

美國

(72)發明人：歐斯特赫 羅賓 E OSTERHOUT, ROBIN E.(US)；柏賈德 安東尼 P BURGARD, ANTHONY P. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：41 項 圖式數：17 共 248 頁

(54)名稱

用於生產特定長度脂肪醇及相關化合物之微生物及方法

MICROORGANISMS AND METHODS FOR PRODUCTION OF SPECIFIC LENGTH FATTY ALCOHOLS AND RELATED COMPOUNDS

(57)摘要

本發明提供含有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體，其中該等微生物體選擇性生產特定長度之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。亦提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體，其中該等微生物體進一步包括乙醯 CoA 路徑。在一些態樣中，本發明之微生物體具有增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產的選擇基因破壞或酶衰減。本發明另外提供使用以上微生物體生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之方法。

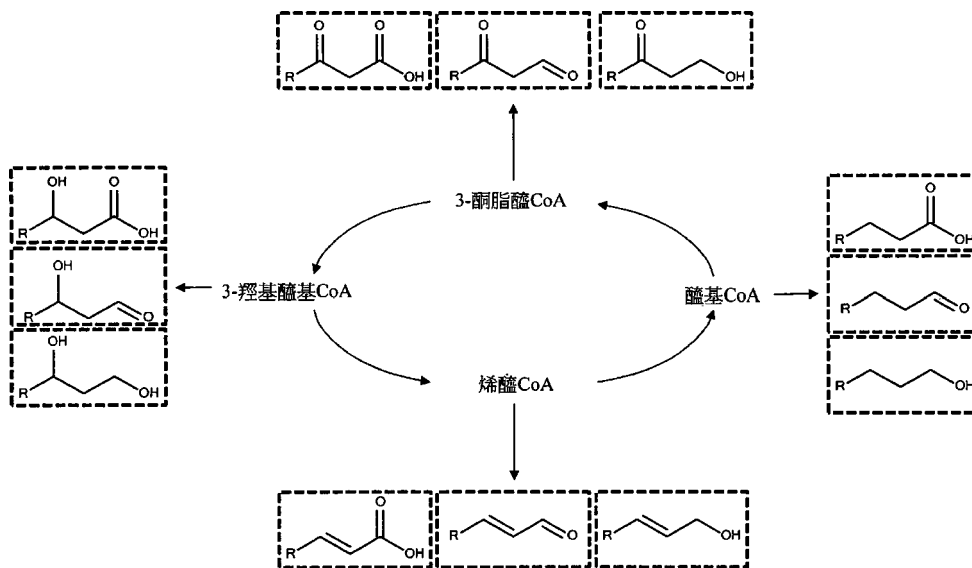


圖8

(21)申請案號：102137205

(22)申請日：中華民國 102 (2013) 年 10 月 15 日

(51)Int. Cl. : C12N15/63 (2006.01)

C12P7/00 (2006.01)

(30)優先權：2012/10/15 美國

61/714,144

(71)申請人：奇諾麥提卡公司 (美國) GENOMATICA, INC. (US)

美國

(72)發明人：歐斯特赫 羅賓 E OSTERHOUT, ROBIN E. (US)；柏賈德 安東尼 P BURGARD, ANTHONY P. (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：41 項 圖式數：17 共 248 頁

(54)名稱

用於生產特定長度脂肪醇及相關化合物之微生物及方法

MICROORGANISMS AND METHODS FOR PRODUCTION OF SPECIFIC LENGTH FATTY ALCOHOLS AND RELATED COMPOUNDS

(57)摘要

本發明提供含有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體，其中該等微生物體選擇性生產特定長度之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。亦提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體，其中該等微生物體進一步包括乙醯 CoA 路徑。在一些態樣中，本發明之微生物體具有增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產的選擇基因破壞或酶衰減。本發明另外提供使用以上微生物體生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之方法。

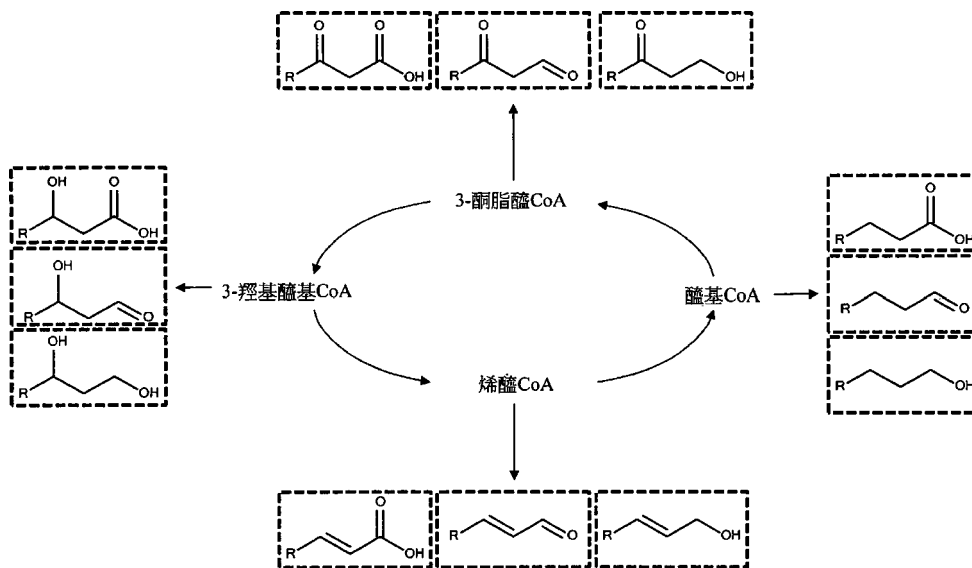


圖8

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】

用於生產特定長度脂肪醇及相關化合物之微生物及方法
MICROORGANISMS AND METHODS FOR PRODUCTION OF
SPECIFIC LENGTH FATTY ALCOHOLS AND RELATED
COMPOUNDS

本申請案主張 2012 年 10 月 15 日申請之美國臨時申請案第 61/714,144 號之優先權益，該案之全部內容以引用方式併入本文中。

【技術領域】

本發明大體上係關於生物合成過程，且更特定言之係關於具有特定長度脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成能力之生物體。

【先前技術】

一級醇為一種產品類別的具有多種工業應用之化合物，其包括多種生物燃料及特殊化學品。一級醇亦可用於製造許多其他工業產品，包括聚合物及界面活性劑。舉例而言，高碳一級醇(亦稱為脂肪醇(C₄-C₂₄))及其乙氧基化物在世界範圍內用作許多消費者洗滌劑、清潔產品及個人護理產品(諸如洗衣粉及洗衣液、洗碗液及硬面清潔劑)中之界面活性劑。其亦用於製造多種工業化學品及用於潤滑油添加劑。特定長度脂肪醇(諸如辛醇及己醇)具有適用感官性質且已長期用作芳香劑及調味物質。較小鏈長 C₄-C₈ 醇(例如丁醇)用作用於生產用於油漆、塗料及黏合劑應用中之衍生物(諸如丙烯酸酯)的化學中間物。

脂肪醇當前由例如脂肪酸氫化、末端烯烴氫甲醯化、正石蠟部分氧化及乙烯之 Al 催化聚合來生產。令人遺憾地，直接由基於石油之

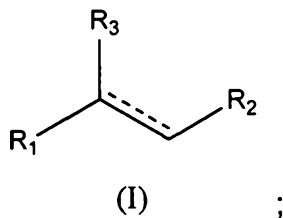
直鏈烴(正石蠟)氧化來生產脂肪醇商業上不可行。此不切實際係因為正石蠟氧化主要生產二級醇、三級醇或酮或此等化合物之混合物，但不生產高產量之脂肪醇。另外，當前已知的用於生產脂肪醇之方法受以下缺陷困擾：其限於相對昂貴之原料，尤其經由石油熱裂化來生產之乙烯。另外，當前方法需要若干步驟及若干催化劑類型。

藉由微生物之脂肪醇生產涉及脂肪酸合成，繼而醯基還原步驟。已研究見於大多數細胞中之通用脂肪酸生物合成路徑用於生產脂肪醇及其他脂肪酸衍生物。當前可達成大量改良以向脂肪醇生產提供更有效生物合成路徑，並使得理論產物及能量產率顯著更高。

因此，需要用於有效生產商業量之脂肪醇的替代方法。本發明滿足此需要且亦提供相關優勢。

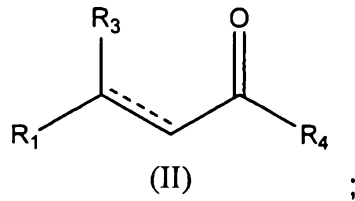
【發明內容】

本發明提供含有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體。在一些實施例中，本發明的非天然存在之微生物體具有如圖1、6及7中所描繪之丙二醯CoA非依賴性脂肪醯CoA延長(MI-FAE)循環及/或丙二醯CoA依賴性脂肪醯CoA延長(MD-FAE)循環以及終止路徑，其中MI-FAE循環、MD-FAE循環或終止路徑之酶由至少一種外源核酸編碼且以足以生產式(I)之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之量表現：



其中R₁為C₁₋₂₄直鏈烷基；R₂為CH₂OH、CHO或COOH；R₃為H、OH或側氧基(=O)；且 --- 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為R₃連接之碳原子的價數為四，其中該MI-FAE循環、該MD-FAE循環及該終止路徑之該等酶中之每一者之受質獨立地選自式(II)化合物、丙二醯

CoA、丙醯CoA或乙醯CoA：



其中 R_1 為 C_{1-24} 直鏈烷基； R_3 為H、OH或側氧基(=O)； R_4 為S-CoA、ACP、OH或H；且 ----- 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為 R_3 連接之碳原子的價數為四；其中該MI-FAE循環之該一或多種酶各自對 R_1 上之碳原子數目不大於該式(I)化合物之 R_1 上的碳原子數目之式(II)化合物具有選擇性，其中該MD-FAE循環之該一或多種酶各自對 R_1 上之碳原子數目不大於該式(I)化合物之 R_1 上的碳原子數目之式(II)化合物具有選擇性，且其中該終止路徑之該一或多種酶各自對 R_1 上之碳原子數目不小於該式(I)化合物之 R_1 上的碳原子數目之式(II)化合物具有選擇性。

在一些實施例中，本發明提供一種具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體，其中該微生物體進一步包括乙醯CoA路徑及至少一種編碼乙醯CoA路徑酶之外源核酸，該乙醯CoA路徑酶以足以生產乙醯CoA之量表現，其中該乙醯CoA路徑包括圖2、3、4或5中所示之路徑。

在一些實施例中，本發明提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體，其中該微生物體具有一或多個基因破壞，其中該一或多個基因破壞在編碼參與以下之蛋白質或酶的內源基因中出現：由該微生物體天然生產乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、 CO_2 、脂肪酸或丙二醯CoA；路徑中間物向除細胞溶質以外之細胞區室轉移；或由該微生物體天然降解MI-FAE循環中間物、MD-FAE循環中間物或終止路徑中間物，該一或多個基因破壞使得微生物體中之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產增加。

在一些實施例中，本發明提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體，其中該MI-FAE循環、MD-FAE循環或該終止路徑之一或多種酶優先與NADH輔因子反應或就與NAD(P)H輔因子反應而言具有減少之優先性。

在一些實施例中，本發明提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體，其中該微生物體在編碼蛋白質或酶之基因中具有一或多個基因破壞，該等蛋白質或酶導致存在於該微生物體之細胞溶質中之NAD(P)H與NAD(P)的比率在破壞之後增加。

在一些實施例中，本發明的非天然存在之微生物體為克拉布特里(Crabtree)陽性且在包括過量葡萄糖之培養基中。在該等條件下，如本文中所述，該微生物體可導致存在於該微生物體之細胞溶質中之NAD(P)H與NAD(P)的比率增加。

在一些實施例中，本發明提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體，其中該微生物體具有至少一種編碼本發明之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之細胞外轉運體或細胞外轉運系統的外源核酸。

在一些實施例中，本發明提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體，其中該微生物體具有一或多種參與以下之內源酶：由該微生物體天然生產乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、CO₂、脂肪酸或丙二醯CoA；路徑中間物向除細胞溶質以外之細胞區室轉移；或由該微生物體天然降解MI-FAE循環中間物、MD-FAE循環中間物或終止路徑中間物，該微生物體之酶活性或表現水準衰減。

在一些實施例中，本發明提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體，其中該微生物體就一或多種參與NAD(P)H或NADH氧化之內源酶而言之酶活性或表現水準衰減。

本發明另外提供使用以上微生物體生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪

酸之方法，其藉由在生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之條件下且持續充足時間段培養含有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體。

【圖式簡單說明】

圖1展示與終止路徑組合用於由MI-FAE循環或MD-FAE循環之醯基CoA中間物生產脂肪醇、醛或酸的例示性MI-FAE循環及/或MD-FAE循環。酶為：A. 硫解酶；B. 3-側氧基醯基CoA還原酶；C. 3-羥基醯基CoA脫水酶；D. 烯醯CoA還原酶；E. 醯基CoA還原酶(形成醛)；F. 醇脫氫酶；G. 醯基CoA還原酶(形成醇)；H. 醯基CoA水解酶、轉移酶或合成酶；J. 醯基ACP還原酶；K. 醯基CoA:ACP醯基轉移酶；L. 硫酯酶；N. 醛脫氫酶(形成酸)或羧酸還原酶；及O. 延長酶。

圖2展示用於由丙酮酸或蘇胺酸生產細胞溶質乙醯CoA之例示性路徑。酶為：A. 丙酮酸氧化酶(形成乙酸)；B. 乙醯CoA合成酶、連接酶或轉移酶；C. 乙酸激酶；D. 磷酸轉乙醯酶；E. 丙酮酸脫羧酶；F. 乙醛脫氫酶；G. 丙酮酸氧化酶(形成乙醯磷酸)；H. 丙酮酸脫氫酶、丙酮酸:鐵氧化還原蛋白氧化還原酶、丙酮酸:NAD(P)H氧化還原酶或丙酮酸甲酸裂解酶；I. 乙醛脫氫酶(醯化)；及J. 蘇胺酸醛縮酶。

圖3展示用於由磷酸烯醇丙酮酸(PEP)生產乙醯CoA之例示性路徑。酶為：A. PEP羧化酶或PEP羧激酶；B. 草醯乙酸脫羧酶；C. 丙二酸半醛脫氫酶(乙醯化)；D. 乙醯CoA羧化酶或丙二醯CoA脫羧酶；F. 草醯乙酸脫氫酶或草醯乙酸氧化還原酶；G. 丙二酸半醛脫氫酶(醯化)；H. 丙酮酸羧化酶；J. 丙二酸半醛脫氫酶；K. 丙二醯CoA合成酶或轉移酶；L. 蘋果酸酶；M. 蘋果酸脫氫酶或氧化還原酶；及N. 丙酮酸激酶或PEP磷酸酶。

圖4展示用於使用檸檬酸及蘋果酸轉運體由粒線體乙醯CoA生產細胞溶質乙醯CoA之例示性路徑。酶為：A. 檸檬酸合成酶；B. 檸檬酸轉運體；C. 檸檬酸/蘋果酸轉運體；D. ATP檸檬酸裂解酶；E. 檸檬酸裂解酶；F. 乙醯CoA合成酶或轉移酶；H. 細胞溶質蘋果酸脫氫酶；I. 蘋果酸轉運體；J. 粒線體蘋果酸脫氫酶；K. 乙酸激酶；及L. 磷酸轉乙醯酶。

圖5展示用於使用檸檬酸及草醯乙酸轉運體由粒線體乙醯CoA生產細胞溶質乙醯CoA之例示性路徑。酶為：A. 檸檬酸合成酶；B. 檸檬酸轉運體；C. 檸檬酸/草醯乙酸轉運體；D. ATP檸檬酸裂解酶；E. 檸檬酸裂解酶；F. 乙醯CoA合成酶或轉移酶；G) 草醯乙酸轉運體；K) 乙酸激酶；及L) 磷酸轉乙醯酶。

圖6展示用於延長 R_1 之直鏈烷基的例示性MI-FAE循環及/或MD-FAE循環。酶為：A. 硫解酶；B. 3-酮脂醯CoA還原酶；C. 3-羥基醯基CoA脫水酶；D. 烯醯CoA還原酶；及E. 延長酶。

圖7展示用於由圖6之MI-FAE循環中間物或MD-FAE循環中間物中任一者產生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的例示性終止循環。酶為：E. MI-FAE/MD-FAE中間物CoA還原酶(形成醛)；F. 醇脫氫酶；G. MI-FAE/MD-FAE中間物CoA還原酶(形成醇)；H. MI-FAE/MD-FAE中間物CoA水解酶、轉移酶或合成酶；J. MI-FAE/MD-FAE中間物ACP還原酶；K. MI-FAE/MD-FAE中間物CoA:ACP醯基轉移酶；L. 硫酯酶；及N. 醛脫氫酶(形成酸)或羧酸還原酶。 R_1 為 C_{1-24} 直鏈烷基； R_3 為H、OH或側氧基(=O)；且 --- 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為 R_3 連接之碳原子的價數為四。

圖8展示可使用圖6中描繪之循環及圖7中描繪之終止路徑由四種MI-FAE或MD-FAE循環中間物生產的例示性化合物。 R 為 C_{1-24} 直鏈烷基。

圖9描繪如實例X中所提供，在用包含編碼各種MI-FAE循環及終止路徑酶之基因之質體轉型的釀酒酵母(*S. cerevisiae*)中在存在或不存在pflAV或PDH旁路下1,3-丁二醇(圖9A)或乙醇(圖9B)之生產。

圖10描繪如實例X中所提供，在用包含編碼各種MI-FAE循環及終止路徑酶之基因之質體轉型的釀酒酵母中在存在或不存在pflAV或PDH旁路下丙酮酸(圖10A)、琥珀酸(圖10B)、乙酸(圖10C)或葡萄糖(圖10D)之生產。

圖11描繪如實例X中所提供，在用包含編碼各種MI-FAE循環及終止路徑酶之基因之質體轉型的釀酒酵母中在存在或不存在pflAV或PDH旁路下1,3-丁二醇之生產。

圖12描繪如實例XI中所提供，五種硫解酶對在大腸桿菌(*E. coli*)中之乙醯CoA縮合活性之估計比活性。

圖13A及13B描繪如實例XI中所提供，選殖於具有1495 (3-羥基丁醯CoA脫氫酶)之雙啓動子酵母載體中的兩種硫解酶(1491及560)對在大腸桿菌中之乙醯CoA縮合活性之估計比活性。

圖14描繪如實例XI中所提供，NADH之氧化之螢光偵測的時程，其用以量測乙醯乙醯CoA藉由3-羥基丁醯CoA脫氫酶向3-羥基丁醯CoA之代謝。藉由3-羥基丁醯CoA脫氫酶將乙醯乙醯CoA代謝為3-羥基丁醯CoA。該反應需要氧化NADH，該氧化可藉由340 nm激發波長及460 nm發射波長下之螢光監測。氧化形式NAD⁺不發螢光。在含有1491(載體id = pY3Hd17)或560(載體id = pY3Hd16)之雙啓動子酵母載體中分析來自拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)之Hbd 1495。

圖15描繪如實例XI中所提供，在1或5 μg/ml NADH或1或5 μg/ml NADPH存在下NAD(P)H氧化之水準，且顯示相對於NADPH，Hbd較偏好NADH。

圖16描繪如實例XI中所提供，將3-羥基丁醯CoA轉化為3-羥基丁

醛且需要NAD(P)H氧化之醛還原酶之粗溶解物的活性資料，該氧化可用以監測酶活性。將來自短乳桿菌(*Lactobacillus brevis*)之Ald(基因ID 707)選殖於含有來自糖乙酸多丁醇梭菌(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*)之醇脫氫酶(基因ID 28)的雙載體中。將此兩種酶選殖於含有Leu標記之另一雙啟動子酵母載體中。將來自大腸桿菌之707溶解物用作標準物。

圖17描繪ADH(基因28)於具有ALD(基因707)之雙啟動子載體中的評估，丁醛為3-羥基丁醛之替代受質。藉由醇脫氫酶(Adh)來形成1,3-BDO，該醇脫氫酶在NAD(P)H存在下還原3-羥基丁醛，且NAD(P)H之氧化用以監測反應。

【實施方式】

如本文中所示，術語「非天然存在」在關於本發明之微生物體或微生物使用時欲意謂微生物體具有至少一個在所參考物種之天然存在菌株(包括所參考物種之野生型菌株)中並不常見之基因改變。基因改變包括例如引入編碼代謝多肽之可表現核酸的修飾、其他核酸添加、核酸缺失及/或微生物體遺傳物質之其他功能性破壞。該等修飾包括例如所參考物種之異源、同源或異源與同源多肽之編碼區及其功能片段。其他修飾包括例如修飾改變了基因或操縱子之表現的非編碼調節區。例示性代謝多肽包括脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成路徑內之酶或蛋白質。

代謝修飾係指相較於其天然存在之狀態改變的生物化學反應。因此，非天然存在之微生物可具有針對編碼代謝多肽之核酸或其功能片段的基因修飾。本文中揭示例示性代謝修飾。

如本文中所示，術語「經分離」在關於微生物體使用時欲意謂生物體實質上不含所參考微生物體在自然界中所見之至少一種組分。該術語包括移除天然環境中所見之一些或所有組分的微生物體。該術

語亦包括移除微生物體在非天然存在之環境中所見之一些或所有組分的微生物體。因此，經分離之微生物體與其在自然界中所見或其在非天然存在之環境中生長、儲存或生存之其他物質部分或完全分離。經分離之微生物體的特定實例包括部分純微生物、實質上純微生物及於非天然存在之培養基中培養之微生物。

如本文中所用，術語「微生物的」、「微生物體」或「微生物」欲意謂包括於古菌、細菌或真核域內之以微觀細胞形式存在的任何生物體。因此，該術語欲涵蓋具有微觀尺寸之原核或真核細胞或生物體，且包括所有物種之細菌、古菌及真細菌以及真核微生物(諸如酵母及真菌)。該術語亦包括可經培養以便生產生物化學物質的任何物種之細胞培養物。

如本文中所用，術語「CoA」或「輔酶A」欲意謂有機輔因子或輔基(酶之非蛋白質部分)，其存在為許多酶(脫輔基酶)之活性所需以形成活性酶系統。某些縮合酶中之輔酶A功能在乙醯基或其他醯基轉移中及在脂肪酸合成及氧化、丙酮酸氧化中及在其他乙醯化中起作用。

如本文中所用，術語「ACP」或「醯基載體蛋白」係指與許多生物體(自細菌至植物)之脂肪酸合成酶系統相關之相對較小酸性蛋白中任一者。ACP可含有一個由磷酸酯鍵與絲胺酸殘基之羥基共價結合的4'-磷酸泛醯巯基乙胺輔基。4'-磷酸泛醯巯基乙胺部分之硫氫基在脂肪酸合成期間充當醯基中間物(硫)酯化之錨定物。ACP之一實例為大腸桿菌ACP，一種分離單一蛋白質，其含有77個胺基酸殘基(8.85 kDa)，其中磷酸泛醯巯基乙胺基與絲胺酸36鍵聯。

如本文中所用，術語「實質上缺氧」在關於培養或生長條件使用時欲意謂氧之量小於液體培養基中之溶解氧之飽和度的約10%。該術語亦欲包括維持具有小於約1%氧氣之氛圍的液體或固體培養基的

密封腔室。

「外源」在本文中使用时欲意謂所參考分子或所參考活性係引入宿主微生物體中。該分子可例如藉由將編碼核酸引入宿主遺傳物質中，諸如藉由整合於宿主染色體中或作為非染色體遺傳物質(諸如質體)引入。因此，該術語在其關於編碼核酸之表現使用時係指將編碼核酸以可表現形式引入微生物體中。當關於生物合成活性使用時，該術語係指引入宿主參考生物體中之活性。來源可為例如在引入宿主微生物體中之後表現所參考活性之同源或異源編碼核酸。因此，術語「內源」係指存在於宿主中之所參考分子或活性。類似地，該術語在關於編碼核酸之表現使用時係指微生物體內所含之編碼核酸的表現。術語「異源」係指源自不同於所參考物種之來源的分子或活性，而「同源」係指源自宿主微生物體之分子或活性。因此，本發明之編碼核酸之外源表現可利用異源或同源編碼核酸中之任一者或兩者。

應理解，當微生物體中包括一種以上外源核酸時，該一種以上外源核酸係指如上文所論述之所參考編碼核酸或生物合成活性。進一步應理解，如本文中所揭示，可將該一種以上外源核酸引入宿主微生物體中之各別核酸分子、多順反子核酸分子或其組合上，且仍視為一種以上外源核酸。舉例而言，如本文中所揭示，微生物體可經工程改造以表現編碼所要路徑酶或蛋白質之兩種或兩種以上外源核酸。在將編碼所要活性之兩種外源核酸引入宿主微生物體中之情況下，應理解該兩種外源核酸可以單一核酸形式引入例如於單一質體、各別質體上，可整合至宿主染色體中之單一位點或多個位點處，且仍視為兩種外源核酸。類似地，應理解可將兩種以上外源核酸以任何所要組合引入宿主生物體中，例如於單一質體上、於各別質體上，可整合至宿主染色體中之單一位點或多個位點處，且仍視為兩種或兩種以上外源核酸，例如三種外源核酸。因此，所參考外源核酸或生物合成活性之數

目係指編碼核酸數目或生物合成活性數目，而非引入宿主生物體中之各別核酸數目。

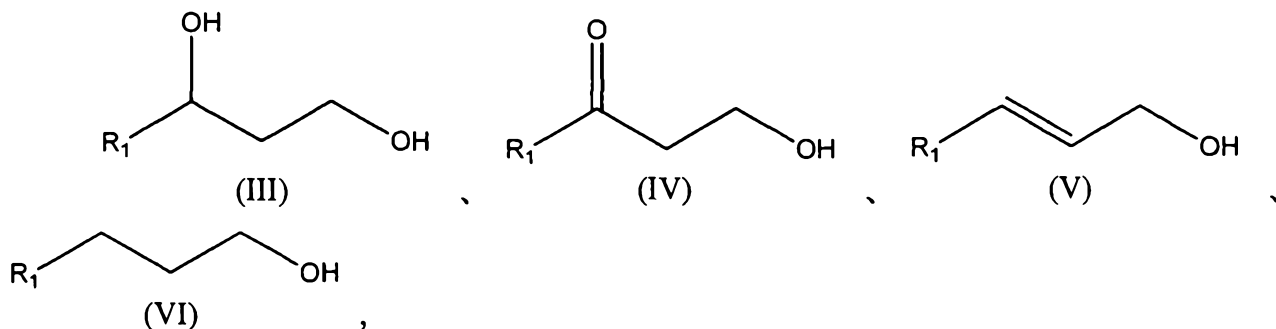
如本文中所用，術語「基因破壞」或其語法相等物欲意謂使得所編碼之基因產物無活性或衰減之基因改變。基因改變可為例如整個基因缺失、轉錄或轉譯所需之調節序列缺失、一部分基因缺失(產生截短基因產物)或使所編碼之基因產物不活化或衰減之各種突變策略中之任一者。一種尤其適用之基因破壞方法為完整基因缺失，此係因為其減少或消除了本發明的非天然存在之微生物中基因逆轉之發生。基因破壞亦包括剔除式突變，其係指基因或含有基因之區域內的突變，該突變導致基因不轉錄為RNA及/或轉譯為功能基因產物。該種剔除式突變可由許多類型之突變產生，該等突變包括例如不活化點突變、一部分基因缺失、整個基因缺失或染色體片段缺失。

如本文中所用，術語「生長耦合」在關於生產生物化學產物使用時欲意謂所參考生物化學產物之生物合成在微生物之生長期期間生產。在一特定實施例中，生長耦合生產可為專性的，意謂所參考生物化學物質之生物合成為微生物之生長期期間生產之專性產物。

如本文中所用，術語「衰減」或其語法相等物欲意謂減弱、降低或減小酶或蛋白質之活性或量。若酶或蛋白質之活性或量之衰減致使活性或量下降至既定路徑起作用所需之臨界水準以下，則該衰減可模擬完全破壞。然而，模擬一種路徑之完全破壞的酶或蛋白質之活性或量之衰減仍可足以使另一路徑繼續起作用。舉例而言，內源酶或蛋白質之衰減可足以模擬用於生產本發明之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸產物之相同酶或蛋白質的完全破壞，但酶或蛋白質之剩餘活性或量仍可足以維持其他路徑，諸如對宿主微生物體存活、繁殖或生長關鍵之路徑。酶或蛋白質之衰減亦可以足以增加本發明之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸產物產率但不必模擬酶或蛋白質之完全破壞的量減弱、降低或減

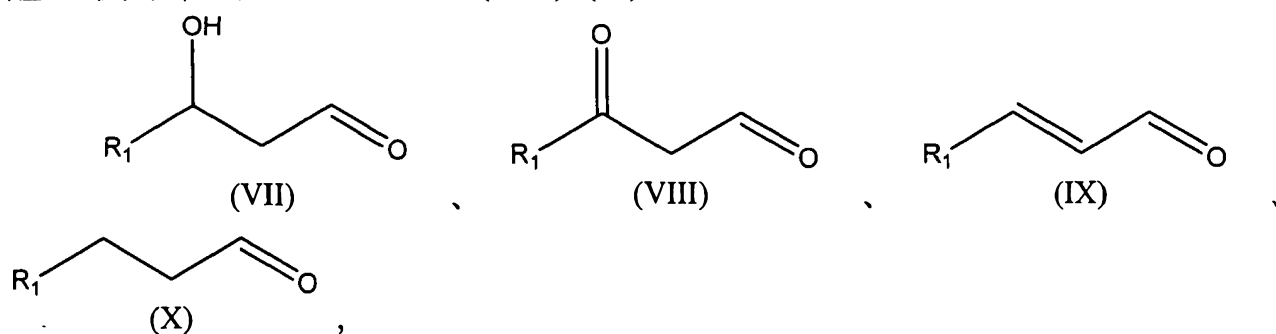
小酶或蛋白質之活性或量。

如本文中所用，術語「脂肪醇」欲意謂含有一或多個羥基且含有4個或4個以上碳原子之鏈的脂族化合物。脂肪醇具備基團-CH₂OH，其可經氧化以便形成具有相同碳原子數目之相應醛或酸。脂肪醇亦可為飽和脂肪醇、不飽和脂肪醇、1,3-二醇或3-側氧基-烷-1-醇。例示性脂肪醇包括式(III)-(VI)之化合物：



其中R₁為C₁₋₂₄直鏈烷基。

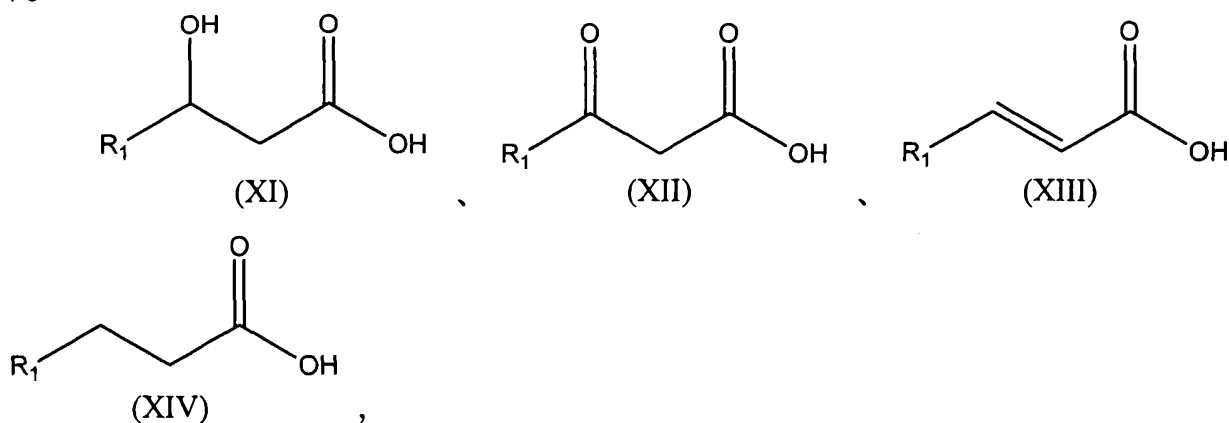
如本文中所用，術語「脂肪醛」欲意謂含有醛(CHO)基且含有4個或4個以上碳原子之鏈的脂族化合物。脂肪醛可經還原以形成具有相同碳原子數目之相應醇或經氧化以形成具有相同碳原子數目之羧酸。脂肪醛亦可為飽和脂肪醛、不飽和脂肪醛、3-羥基醛或3-側氧基醛。例示性脂肪醛包括式(VII)-(X)之化合物：



其中R₁為C₁₋₂₄直鏈烷基。

如本文中所用，術語「脂肪酸」欲意謂含有羧酸基且含有4個或4個以上碳原子之鏈的脂族化合物。脂肪酸可經還原以形成具有相同碳原子數目之相應醇或醛。脂肪酸亦可為飽和脂肪酸、不飽和脂肪

酸、3-羥基酸或3-側氧基酸。例示性脂肪酸包括式(XI)-(XIV)之化合物：



其中R₁為C₁₋₂₄直鏈烷基。

術語「烷基」係指直鏈飽和單價烴。烷基可為具有1至24 (C₁₋₂₄)、1至17 (C₁₋₁₇)或9至13 (C₉₋₁₃)個碳原子之直鏈飽和單價烴。烷基之實例包括(但不限於)甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基及十二烷基。舉例而言，C₉₋₁₃烷基係指具有9至13個碳原子之直鏈飽和單價烴。

本文中所揭示之本發明至少部分基於能夠使用丙二醯CoA非依賴性脂肪酸延長(MI-FAE)循環及/或丙二醯CoA依賴性脂肪酸延長(MD-FAE)循環以及終止路徑合成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之重組微生物。在一些實施例中，本發明之微生物可利用與醯基CoA終止路徑聯合之異源MI-FAE循環及/或MD-FAE循環以形成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。MI-FAE循環可包括硫解酶、3-側氧基醯基CoA還原酶、3-羥基醯基CoA脫水酶及烯醯CoA還原酶。MD-FAE循環可包括延長酶、3-側氧基醯基CoA還原酶、3-羥基醯基CoA脫水酶及烯醯CoA還原酶。通過MI-FAE循環及/或MD-FAE循環之各繼代導致與進入延長循環之醯基CoA受質相比延長單一兩個碳單位的醯基CoA形成。產物可為偶數或奇數鏈長，視進入醯基CoA延長路徑之初始受質(亦即兩個乙醯CoA受質、丙二醯CoA或與丙醯CoA受質組合之一個乙醯CoA受質)而

定。兩個乙醯CoA受質或丙二醯CoA之延長生產偶數鏈長產物，而在丙醯CoA受質情況下之延長生產奇數鏈長產物。終止路徑催化MI-FAE中間物及/或MD-FAE中間物(諸如醯基CoA)轉化爲其相應脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸產物。MI-FAE循環、MD-FAE循環及終止路徑酶可表現於微生物之一或多種區室中。舉例而言，在一個實施例中，所有MI-FAE循環及終止路徑酶均表現於細胞溶質中。在另一實施例中，所有MD-FAE循環及終止路徑酶均表現於細胞溶質中。另外，本發明之微生物可經工程改造以視情況將所要產物分泌至培養基或醱酵液(fermentation broth)中用於進一步操作或分離。

本發明之產物包括源自MI-FAE循環及/或MD-FAE循環之中間物的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。舉例而言，醇產物可包括飽和脂肪醇、不飽和脂肪醇、1,3-二醇及3-側氧基-烷-1-醇。醛產物可包括飽和脂肪醛、不飽和脂肪醛、3-羥基醛及3-側氧基醛。酸產物可包括飽和脂肪酸、不飽和脂肪酸、3-羥基酸及3-側氧基酸。此等產物可藉由化學或酶促方法進一步轉化爲諸如脂肪酯之衍生物。用於將脂肪醇轉化爲酯之方法爲此項技術中所熟知。

本發明亦涵蓋與宿主菌株工程改造策略結合的脂肪醇、脂肪醛及脂肪酸鏈長控制策略，以使得本發明的非天然存在之微生物有效定向碳及還原相等物朝向特定鏈長醱酵產物。

本發明之重組微生物可生產商業量之鏈長自四個碳原子(C₄)至二十四個碳原子(C₂₄)或二十四個以上碳原子變動的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。本發明之微生物可生產對於特定鏈長具有至少50%、60%、70%、75%、85%、90%、95%或95%以上選擇性之所要產物。藉由MI-FAE循環之一或多種酶(圖6之步驟A/B/C/D)及/或MD-FAE循環之一或多種酶(圖6之步驟E/B/C/D)以及一或多種終止路徑酶(圖7之步驟E-N)控制產物之碳鏈長。可在延長循環期間藉由一或多種對碳原子數目

不大於所要產物大小之MI-FAE循環受質展現選擇性的MI-FAE循環酶(硫解酶、3-側氧基醯基CoA還原酶、3-羥基醯基CoA脫水酶及/或烯醯CoA還原酶)將鏈長封端。或者或另外，可在延長循環期間藉由一或多種MD-FAE循環酶(延長酶、3-側氧基醯基CoA還原酶、3-羥基醯基CoA脫水酶及/或烯醯CoA還原酶)將鏈長封端。可藉由一或多種催化MI-FAE循環中間物向脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸產物轉化之酶進一步約束鏈長，以使得該一或多種終止酶僅與碳原子數目不少於所要脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸產物之受質反應。

催化MI-FAE-CoA中間物或MD-FAE-CoA中間物向脂肪醇轉化之終止路徑酶可包括脂肪醯基CoA還原酶(形成醇或醛)、脂肪醛還原酶、醯基ACP還原酶、醯基CoA:ACP醯基轉移酶、硫酯酶、醯基CoA水解酶及/或羧酸還原酶之組合(圖7之路徑G、E/F、K/J/F、H/N/F或K/L/N/F)。用於將MI-FAE-CoA中間物或MD-FAE-CoA中間物轉化為脂肪酸之終止路徑酶可包括硫酯酶、CoA水解酶、醯基CoA:ACP醯基轉移酶、醛脫氫酶及/或醯基ACP還原酶之組合(圖7之路徑H、K/L、E/N、K/J/N)。為了生產脂肪醛，終止路徑酶可包括脂肪醯基CoA還原酶(形成醛)、醯基ACP還原酶、醯基CoA:ACP醯基轉移酶、硫酯酶、醯基CoA水解酶及/或羧酸還原酶之組合(圖7之路徑E、K/J、H/N或K/L/N)。

本發明的非天然存在之微生物體亦可有效定向細胞資源(包括碳、能量及還原相等物)生產脂肪醇、脂肪醛及脂肪酸，從而產生相對於天然存在之生物體改良之產率、生產力及/或效價。在一個實施例中，微生物經修飾以增加細胞溶質乙醯CoA水準。在另一實施例中，微生物經修飾以有效定向細胞溶質醯基CoA成為脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸而非其他副產物或細胞過程。導致副產物形成之酶或路徑可衰減或經去除。例示性副產物包括(但不限於)乙醇、甘油、乳酸、乙

酸、酯及二氧化碳。其他副產物可包括脂肪醯基CoA衍生物，諸如醇、烯烴、烷烴、酯、酸及醛。因此，副產物可包括自所關注之產物轉移碳及/或還原相等物之任何醱酵產物。

在另一實施例中，還原相等物之可得性或氧化還原比率增加。在另一實施例中，使微生物之輔因子需求平衡，以使得在碳同化及主要代謝期間產生之相同還原輔因子由MI-FAE循環、MD-FAE循環及/或終止路徑酶利用。在另一實施例中，生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生物體表現自細胞導出脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之轉運體。

能夠生產脂肪醇之微生物體在本文中參考釀酒酵母遺傳背景例示。然而，在現在可得到數千種物種之完整基因組序列(其中超過一半可在諸如NCBI之公共資料庫得到)的情況下，一或多種基因之替代性物種同源物(包括例如直系同源物、旁系同源物及非直系同源基因置換)之鑑別；及真核生物體之間的基因改變互換為常規的且為此項技術中所熟知。因此，允許本文中參考特定生物體(諸如釀酒酵母)所述之脂肪醇生產的代謝改變可容易地應用於其他微生物。考慮到本文中所提供之教示及指導，熟習此項技術者理解，在一種生物體中例示之代謝改變可同等適用於其他生物體。

本發明之方法適用於各種原核及真核生物體，諸如細菌、酵母及真菌。舉例而言，酵母可包括釀酒酵母及鬚根黴菌(*Rhizopus arrhizus*)。例示性真核生物體亦可包括克拉布特里陽性及陰性酵母；及酵母屬(*Saccharomyces*)、克魯維酵母屬(*Kluyveromyces*)、假絲酵母屬(*Candida*)或畢赤酵母屬(*Pichia*)中之酵母。其他例示性真核物種包括選自以下各物之物種：粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、乳酸克魯維酵母(*Kluyveromyces lactis*)、馬克斯克魯維酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、土麴菌(*Aspergillus terreus*)、黑麴菌(*Aspergillus niger*)、鬚根黴菌、米根黴(*Rhizopus oryzae*)、白假絲酵

母(*Candida albicans*)、博伊丁假絲酵母(*Candida boidinii*)、薩納瑞西斯假絲酵母(*Candida sonorensis*)、熱帶假絲酵母(*Candida tropicalis*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)及巴斯德畢赤酵母(*Pichia pastoris*)。另外，自較大真核生物體選擇細胞亦適用於本發明之方法。例示性細菌包括選自以下各物之物種：大腸桿菌、產酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)、產琥珀酸厭氧螺菌(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)、產琥珀酸放線桿菌(*Actinobacillus succinogenes*)、產琥珀酸曼氏桿菌(*Mannheimia succiniciproducens*)、埃特里根瘤菌(*Rhizobium etli*)、枯草桿菌(*Bacillus subtilis*)、麩胺酸棒狀桿菌(*Corynebacterium glutamicum*)、氧化葡萄糖桿菌(*Gluconobacter oxydans*)、運動醱酵單胞菌(*Zymomonas mobilis*)、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)、植物乳桿菌(*Lactobacillus plantarum*)、天藍色鏈黴菌(*Streptomyces coelicolor*)、丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*)、螢光假單胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)及惡臭假單胞菌(*Pseudomonas putida*)。

在本發明之一些態樣中，通過本文中所揭示之MI-FAE循環及終止路徑生產脂肪醇、脂肪醛及脂肪酸尤其適用，此係因為該循環及該等路徑產生比通過天然存在之生物合成路徑(諸如熟知的丙二醯CoA依賴性脂肪酸合成路徑，或在一些態樣中，丙二醯ACP依賴性脂肪酸合成路徑)更高之產物及ATP產率。舉例而言，使用乙醯CoA作為C₂延伸單元(例如步驟A，圖1)而非丙二醯醯基載體蛋白(丙二醯ACP)使得每單位通量進入MI-FAE循環之乙醯CoA節約一個ATP分子。MI-FAE循環產生醯基CoA而非醯基ACP，且可在乙醯CoA用作延伸單元時排除需要ATP消耗性醯基CoA合成酶反應來生產辛醇及其他脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。本發明之生產脂肪醇、脂肪醛及脂肪酸之生物體可另外允許使用生物合成過程來轉化低成本可再生原料以便製造化學產

物。

本發明之真核生物體可經進一步工程改造以代謝及/或共同利用多種原料，包括葡萄糖、木糖、果糖、合成氣、甲醇及其類似物。

可使用高度活性酶與適用於所要脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生物合成的適合受質範圍之組合達成鏈長控制。可使用MI-FAE循環、MD-FAE循環或終止路徑之一或多種酶來控制產物之鏈長。如本文中所述，可在MI-FAE循環期間藉由一或多種MI-FAE循環酶(硫解酶、3-側氧基醯基CoA還原酶、3-羥基醯基CoA脫水酶及/或烯醯CoA還原酶)且在MD-FAE循環之情況下藉由一或多種MD-FAE循環酶(延長酶、3-側氧基醯基CoA還原酶、3-羥基醯基CoA脫水酶及/或烯醯CoA還原酶)將鏈長封端，該或該等酶對碳原子數目不大於所要產物大小之MI-FAE及/或MD-FAE循環受質展現選擇性。因為酶為可逆的，所以延長路徑酶中任一者可具有此能力。選擇具有廣泛受質範圍但規定鏈長邊界之酶使得能夠使用單一酶催化多個延長循環，同時賦予產物特異性。為了進一步增強特異性且防止較短副產物積聚，藉由產物形成性終止酶進一步約束選擇性，以使得一或多種酶對醯基CoA或碳原子數目不少於所要鏈長之其他終止路徑受質具有選擇性。生產不同鏈長產物之內源路徑酶之缺失或衰減可進一步增強產物特異性。

使用本文中概述之方法，熟習此項技術者可自文獻選擇具有表徵的受質範圍、選擇性生產特定鏈長之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸產物之酶。為了選擇性生產具有所要長度之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸，吾人可利用文獻中如上文所述的具有不同選擇性範圍之已知酶之組合。舉例而言，生產C₁₆脂肪醇的非天然存在之微生物體可表現僅接受達至長度C₁₆之受質的酶，諸如褐家鼠(*Rattus norvegicus*) *Acaala*硫解酶及恥垢分枝桿菌(*Mycobacterium smegmatis*)之烯醯CoA還原酶。將一種或兩種鏈延長酶與C₁₆-C₁₈脂肪醯基CoA還原酶(形成醇或醛)(諸如中

國希蒙得木(*Simmondsia chinensis*)之FAR)聯合藉由減少較短醇產物之合成而進一步增加產物特異性。作為另一實例，本發明的非天然存在之微生物體可藉由將擬南芥(*Arabidopsis thaliana*)之3-羥基醯基CoA脫水酶與不動桿菌屬(*Acinetobacter sp.*)菌株M-1之醯基CoA還原酶Acr1組合而選擇性生產長度C₁₄之醇。為了生產長度C₁₄之3-側氧基酸，吾人可例如將大鼠硫解酶與番茄(*Solanum lycopersicum*)之3-側氧基醯基CoA水解酶組合。作為另一實例，為了生產C₁₈脂肪酸，吾人可將腸道沙門氏菌(*Salmonella enterica*) *fadE*烯醯CoA還原酶與大腸桿菌之*tesB*硫酯酶組合。在另一實例中，選擇性生產C₆醇係藉由將來自富養羅爾斯通氏菌(*Ralstonia eutropha*)之*paaH1*硫解酶與賴氏菌屬(*Leifsonia sp.*) S749醇脫氫酶*lsadh*組合而形成。

例示性MI-FAE循環、MD-FAE循環及終止路徑酶詳細描述於實例I中。本文中所述之生物合成酶展現不同程度之受質特異性。在文獻中表徵之酶的例示性受質範圍展示於下表中且更詳細描述於實例I中。

路徑步驟	鏈長	基因	生物體
1A	C4	atoB	大腸桿菌
1A	C6	phaD	惡臭假單胞菌
1A	C6-C8	bktB	富養羅爾斯通氏菌
1A	C10-C16	Aca1a	褐家鼠
1B	C4	hbd	丙酮丁醇梭菌
1B	C4-C6	paaH1	富養羅爾斯通氏菌
1B	C4-C10	HADH	野豬(<i>Sus scrofa</i>)
1B	C4-C18	fadB	大腸桿菌
1C	C4-C6	crt	丙酮丁醇梭菌
1C	C4-C7	pimF	沼澤紅假單胞菌 (<i>Rhodopseudomonas palustris</i>)
1C	C4-C14	MFP2	擬南芥
1D	C4-C6	ECR1	纖細裸藻(<i>Euglena gracilis</i>)
1D	C6-C8	ECR3	纖細裸藻
1D	C8-10	ECR2	纖細裸藻
1D	C8-C16	ECR	褐家鼠
1D	C10-C16	ECR	恥垢分枝桿菌
1D	C2-C18	fadE	腸道沙門氏菌

1E	C2-C4	bphG	假單胞菌屬(<i>Pseudomonas sp.</i>)
1E	C4	Bld	糖乙酸多丁醇梭菌
1E	C12-C20	ACR	醋酸鈣不動桿菌(<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>)
1E	C14-C18	Acr1	不動桿菌屬菌株M-1
1E	C16-C18	Rv1543, Rv3391	結核分枝桿菌(<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
1F	C6-C7	lsadh	賴氏菌屬S749
1F	C2-C8	yqhD	大腸桿菌
1F	C3-C10	Adh	惡臭假單胞菌
1F	C2-C14	alrA	不動桿菌屬菌株M-1
1F	C2-C30	ADH1	嗜熱脫氮土芽孢桿菌(<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>)
1G	C2	adhE	大腸桿菌
1G	C2-C8	adhe2	丙酮丁醇梭菌
1G	C14-C16	At3g11980	擬南芥
1G	C16	At3g44560	擬南芥
1G	C16-C18	FAR	中國希蒙得木
1H	C4	Cat2	克氏梭菌(<i>Clostridium kluyveri</i>)
1H	C4-C6	Acot12	褐家鼠
1H	C14	MKS2	番茄
1L	C8-C10	fatB2	萼距花(<i>Cuphea hookeriana</i>)
1L	C12	fatB	加州月桂(<i>Umbellularia californica</i>)
1L	C14-C16	fatB3	萼距花
1L	C18	tesA	大腸桿菌
1N	C12-C18	Car	艾瓦諾卡菌(<i>Nocardia iowensis</i>)
1N	C12-C16	Car	分枝桿菌屬(<i>Mycobacterium sp.</i>)(菌株JLS)
1O	C4-C8	ELO1	布氏錐蟲(<i>Trypanosoma brucei</i>)
1O	C10-C12	ELO2	布氏錐蟲
1O	C14-C16	ELO3	布氏錐蟲
1O	C14-C16	ELO1	釀酒酵母
1O	C18-C20	ELO2	釀酒酵母
1O	C22-C24	ELO3	釀酒酵母

考慮到各酶在MI-FAE循環或MD-FAE循環中之鏈長特異性差異，熟習此項技術者可選擇一或多種酶用於催化各延長循環反應步驟(圖6之步驟A-D或步驟E/B/C/D)。舉例而言，就MI-FAE循環之硫解酶步驟而言，一些硫解酶(諸如富養羅爾斯通氏菌之*bktB*)催化短鏈及中鏈醯基 CoA 中間物(C₆-C₈)之延長，而其他硫解酶(諸如褐家鼠(*R. norvegicus*)之*Acaala*)對較長鏈受質(C₁₀-C₁₆)具有活性。因此，生產脂

肪醇、脂肪醛或脂肪酸之微生物體可包含硫解酶、延長酶、3-側氧基醯基CoA還原酶、3-羥基醯基CoA脫水酶及/或烯醯CoA還原酶之一種、兩種、三種、四種或四種以上變異體。

酶之鏈長特異性可藉由此項技術中熟知之方法來分析(例如 Wrensford等人, *Anal Biochem* 192:49-54 (1991))。生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之酶之受質範圍可藉由此項技術中熟知之方法進一步延伸或變窄。生物學存在之酶之變異體可例如藉由如本文中所述之合理及定向進化、突變誘發及酶改組來產生。作為一個實例，用於改變鏈長特異性之合理工程改造方法由 Denic 及 Weissman 進行 (Denic 及 Weissman, *Cell* 130:663-77 (2008))。Denic 及 Weissman 定位負責鏈長之酵母延長酶蛋白質之區域，且引入突變以改變脂肪酸產物之長度。在此情況下，疏水受質口袋之幾何形狀設定鏈長之上邊界。類似方法可適用於改變MI-FAE循環、MD-FAE循環及/或終止路徑之酶的鏈長特異性。

酶突變誘發、於宿主中表現及關於脂肪醇生產之篩選為用於產生具有關於所要應用之改良性質之酶變異體的另一適用方法。舉例而言，美國專利申請案 2012/0009640 列出棲藻海桿菌 (*Marinobacter algicola*) 及水油海桿菌 (*Marinobacter aquaeolei*) FAR 酶之具有優於野生型酶之改良活性且改變產物型態的數百種變異體。

與選擇平台結合之酶突變誘發(隨機或定向)為另一適用方法。舉例而言，Machado 及合作者開發一種旨在增加醯基CoA延長循環酶對較長鏈長受質之活性的選擇平台 (Machado 等人, *Met Eng* in press (2012))。Machado 等人鑑別其路徑之鏈長限制步驟(3-羥基醯基CoA脫氫酶)且使用缺氧生長拯救平台使其進化以獲得對C₆-C₈受質之改良活性。適用於生產脂肪醇之酶的其他變異體列於下表中：

酶	蛋白質/ GenBankID/ GI編號	生物體	變異體	參考文獻
3- 酮 脂 醯 CoA 硫 解 酶	Acaa2 NP_569117.1 GI:18426866	褐家鼠	H352A H352E H352K H352Y	Zeng等人, <i>Prot. Expr. Purif.</i> 35: 320-326 (2004)。
3- 羥 基 醯 基 CoA 脫 氫 酶	Hadh NP_476534.1 GI:17105336	褐家鼠	S137A S137C、S137T	Liu等人, <i>Prot. Expr. Purif.</i> 37:344-351 (2004)。
烯 醯 CoA 水 合 酶	Ech1 NP_072116.1 GI:12018256	褐家鼠	E144A E144A/Q162L E164A Q162A Q162L Q162M	Kiema 等 人 , <i>Biochem.</i> 38:2991-2999 (1999)。
烯 醯 CoA 還 原 酶	InhA AAAY54545.1 GI:66737267	結核分枝桿菌	K165A K165Q Y158F	Poletto, S.等人, <i>Prot. Expr. Purif.</i> 34: 118-125 (2004)。
醯 基 CoA 還 原 酶	LuxC AAT00788.1 GI:46561111	明亮發光桿菌 (<i>Photobacterium phosphoreum</i>)	C171S C279S、C286S	Lee, C. 等 人 , <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> 1338: 215-222 (1997)。
醇 脫 氫 酶	YADH-1 P00330.4 GI:1168350	釀酒酵母	D223G D49N E68Q G204A G224I H47R H51E、L203A	Leskovac 等 人 , <i>FEMS Yeast Res.</i> 2(4):481-94 (2002)。
形 成 脂 肪 醇 之 醯 基 CoA 還 原 酶(FAR)	AdhE NP_415757.1 GI:16129202	大腸桿菌	A267T/E568K、 A267T	Membrillo 等 人 , <i>J. Biol. Chem.</i> 275(43): 333869-75 (2000)。

熟習此項技術者將理解，包括本文中例示之代謝修飾的基因改變係參考適合宿主生物體(諸如大腸桿菌或釀酒酵母)及其相應代謝反應或關於所要遺傳物質(諸如關於所要代謝路徑之基因)之適合來源生物體來描述。然而，考慮到多種生物體之完整基因組定序及基因組學領域中之高技術水準，熟習此項技術者將能夠容易地將本文中所提供之教示及指導應用於基本上所有其他生物體。舉例而言，本文中例示之代謝改變可藉由併有來自不同於所參考物種之物種的相同或類似編碼核酸容易地應用於其他物種。該等基因改變大體上包括例如物種同

源物之基因改變，及尤其直系同源物、旁系同源物或非直系同源基因置換。

直系同源物為有垂直譜系傳遞(vertical descent)關係且在不同生物體中負責實質上相同或一致功能之基因。舉例而言，可將小鼠環氧化物水解酶與人類環氧化物水解酶視為環氧化物水解之生物功能的直系同源物。基因當例如其共有足量序列相似性以表明其為同源時有垂直譜系傳遞關係，或有自共同祖先進化相關關係。基因若共有三維結構但未必共有足量序列相似性以表明其由共同祖先進化至一級序列相似性不可鑑別之程度，則亦可視為直系同源物。直系同源基因可編碼具有約25%至100%胺基酸序列一致性之序列相似性的蛋白質。編碼共有小於25%之胺基酸相似性之蛋白質的基因若其三維結構亦顯示相似性，則亦可視為藉由垂直譜系傳遞產生。酶之絲胺酸蛋白酶家族之成員(包括組織纖維蛋白溶酶原活化因子及彈性蛋白酶)被視為藉由垂直譜系傳遞自共同祖先產生。

直系同源物包括基因或其經編碼基因產物，其經由例如進化在結構或總體活性方面趨異。舉例而言，當一種物種編碼展現兩種功能之基因產物時且當該等功能已在第二物種中分離至不同基因中時，將該三種基因及其相應產物視為直系同源物。為了產生生物化學產物，熟習此項技術者將理解，應選擇含有待引入或破壞之代謝活性之直系同源基因來構築非天然存在之微生物。展現可分離活性之直系同源物之實例為不同活性已在兩種或兩種以上物種之間或在單一物種內分離至不同基因產物中之情形。特定實例為將彈性蛋白酶蛋白分解與纖維蛋白溶酶原蛋白分解(即兩種類型之絲胺酸蛋白酶活性)分離至作為纖維蛋白溶酶原活化因子及彈性蛋白酶之不同分子中。第二實例為分離黴漿菌5'-3'核酸外切酶與果蠅(*Drosophila*) DNA聚合酶III活性。可將來自第一物種之DNA聚合酶視為來自第二物種之核酸外切酶或聚合酶

中之任一者或兩者的直系同源物，且反之亦然。

相比之下，旁系同源物為藉由例如複製、隨後進化趨異而相關之同源物且具有相似或共同而非一致之功能。旁系同源物可起源或源自例如相同物種或不同物種。舉例而言，微粒體環氧化物水解酶(環氧化物水解酶I)與可溶環氧化物水解酶(環氧化物水解酶II)因為其代表兩種不同酶、由共同祖先共進化而來、在相同物種中催化不同反應且具有不同功能，所以可視為旁系同源物。旁系同源物為來自相同物種之蛋白質，彼此具有顯著序列相似性從而表明其同源，或為經由自共同祖先共進化而相關的蛋白質。旁系同源蛋白質家族之群包括HipA同源物、螢光素酶基因、肽酶及其他蛋白質。

非直系同源基因置換為來自一種物種之非直系同源基因，其可取代不同物種中之所參考基因功能。取代包括例如能夠在起源物種中執行與不同物種中的所參考功能相比實質上相同或相似之功能。儘管一般而言，非直系同源基因置換將因與編碼所參考功能之已知基因在結構上相關而可鑑別，但結構相關性較小而功能相似之基因及其相應基因產物仍將屬於該術語在本文中使用的含義內。功能相似性需要例如與編碼尋求取代之功能的基因相比在非直系同源基因產物之活性位點或結合區中之至少一定程度之結構相似性。因此，非直系同源基因包括例如旁系同源物或無關基因。

因此，在鑑別及構築具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成能力的本發明之非天然存在之微生物體中，熟習此項技術者將理解，將本文中所提供之教示及指導應用於特定物種時，代謝修飾之鑑別可包括直系同源物之鑑別及納入或不活化。就所參考微生物中存在編碼催化相似或實質上相似代謝反應之酶的旁系同源物及/或非直系同源基因置換而言，熟習此項技術者亦可利用此等進化上相關基因。類似地就基因破壞而言，亦可在宿主微生物體中破壞或去除進化上相關基因

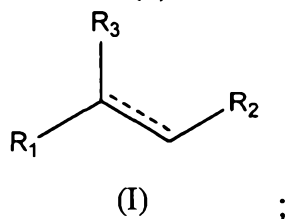
以減少或消除靶向破壞之酶促活性的功能冗餘。

可藉由熟習此項技術者所熟知的方法測定直系同源物、旁系同源物及非直系同源基因置換。舉例而言，檢查兩個多肽之核酸或胺基酸序列將揭示所比較序列之間的序列一致性及相似性。基於該等相似性，熟習此項技術者可確定相似性是否足夠高以表明蛋白質經由自共同祖先進化而相關。熟習此項技術者熟知之演算法(諸如Align、BLAST、Clustal W及其他演算法)比較並測定原始序列相似性或一致性，以及測定序列中可賦予權重或評分之空隙的存在或顯著性。該等演算法亦為此項技術中已知且同樣可適用於測定核苷酸序列相似性或一致性。基於計算統計學相似性，或在隨機多肽中發現相似匹配之機率，及所測定匹配之顯著性之熟知方法計算足以確定相關性之相似性之參數。必要時亦可由熟習此項技術者在視覺上最佳化兩個或兩個以上序列之電腦比較。相關基因產物或蛋白質可預期具有高相似性，例如，25%至100%序列一致性。若掃描足夠尺寸之資料庫(約5%)，則無關蛋白質可具有基本上與所預期偶然發生相同之一致性。5%與24%之間的序列可能代表或可能不代表足以推斷所比較序列相關之同源性。可進行其他統計分析以測定已知資料集尺寸時該等匹配之顯著性，從而測定此等序列之相關性。

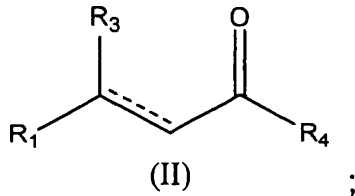
使用例如BLAST演算法測定兩個或兩個以上序列之相關性之例示性參數可闡述如下。簡言之，胺基酸序列比對可使用BLASTP 2.0.8版(1999年1月05日)及以下參數進行：矩陣：0 BLOSUM62；空隙開口：11；空隙延伸：1；x_dropoff：50；預期值：10.0；字長：3；過濾器：開。核酸序列比對可使用BLASTN 2.0.6版(1998年9月16日)及以下參數進行：匹配：1；錯配：-2；空隙開口：5；空隙延伸：2；x_dropoff：50；預期值：10.0；字長：11；過濾器：關。熟習此項技術者將知曉可對上述參數進行何種修改以例如提高或降低比較嚴格性

及測定兩個或兩個以上序列之相關性。

在一些實施例中，本發明提供一種具有MI-FAE循環或MD-FAE循環以及終止路徑的非天然存在之微生物體，其中該MI-FAE循環包括一或多種硫解酶、一或多種3-側氧基醯基CoA還原酶、一或多種3-羥基醯基CoA脫水酶及一或多種烯醯CoA還原酶，其中該MD-FAE循環包括一或多種延長酶、一或多種3-側氧基醯基CoA還原酶、一或多種3-羥基醯基CoA脫水酶及一或多種烯醯CoA還原酶，其中該終止路徑包括圖1、6或7中所示選自以下之路徑：(1) 1H；(2) 1K及1L；(3) 1E及1N；(4) 1K、1J及1N；(5) 1E；(6) 1K及1J；(7) 1H及1N；(8) 1K、1L及1N；(9) 1E及1F；(10) 1K、1J及1F；(11) 1H、1N及1F；(12) 1K、1L、1N及1F；及(13) 1G，其中1E為醯基CoA還原酶(形成醛)，其中1F為醇脫氫酶，其中1G為醯基CoA還原酶(形成醇)，其中1H為醯基CoA水解酶、醯基CoA轉移酶或醯基CoA合成酶，其中1J為醯基ACP還原酶，其中1K為醯基CoA:ACP醯基轉移酶，其中1L為硫酯酶，其中1N為醛脫氫酶(形成酸)或羧酸還原酶，其中該MI-FAE循環、MD-FAE循環或終止路徑之酶由至少一種外源核酸編碼且以足以生產以下式(I)化合物之量表現：



其中 R_1 為 C_{1-24} 直鏈烷基； R_2 為 CH_2OH 、 CHO 或 $COOH$ ； R_3 為 H 、 OH 或側氧基(=O)；且-----表示單鍵或雙鍵，其限制條件為 R_3 連接之碳原子的價數為四，其中該MI-FAE循環、MD-FAE循環及終止路徑之該等酶中之每一者的受質獨立地選自式(II)化合物、丙二醯CoA、丙醯CoA或乙醯CoA：



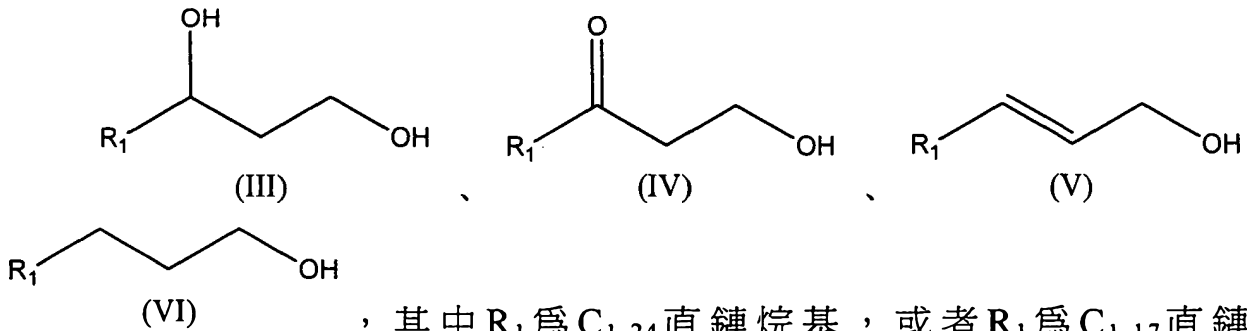
其中 R_1 為 C_{1-24} 直鏈烷基； R_3 為H、OH或側氧基(=O)； R_4 為S-CoA、ACP、OH或H；且 ----- 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為 R_3 連接之碳原子的價數為四；其中該MI-FAE循環之該一或多種酶各自對 R_1 上之碳原子數目不大于該式(I)化合物之 R_1 上的碳原子數目之式(II)化合物具有選擇性，其中該MD-FAE循環之該一或多種酶各自對 R_1 上之碳原子數目不大于該式(I)化合物之 R_1 上的碳原子數目之式(II)化合物具有選擇性，且其中該終止路徑之該一或多種酶各自對 R_1 上之碳原子數目不小于該式(I)化合物之 R_1 上的碳原子數目之式(II)化合物具有選擇性。

在本發明之一些態樣中，本發明的非天然存在之微生物體可生產式(I)化合物，其中 R_1 為 C_{1-17} 直鏈烷基。在本發明之另一態樣中，式(I)化合物之 R_1 為 C_1 直鏈烷基、 C_2 直鏈烷基、 C_3 直鏈烷基、 C_4 直鏈烷基、 C_5 直鏈烷基、 C_6 直鏈烷基、 C_7 直鏈烷基、 C_8 直鏈烷基、 C_9 直鏈烷基、 C_{10} 直鏈烷基、 C_{11} 直鏈烷基、 C_{12} 直鏈烷基或 C_{13} 直鏈烷基、 C_{14} 直鏈烷基、 C_{15} 直鏈烷基、 C_{16} 直鏈烷基、 C_{17} 直鏈烷基、 C_{18} 直鏈烷基、 C_{19} 直鏈烷基、 C_{20} 直鏈烷基、 C_{21} 直鏈烷基、 C_{22} 直鏈烷基、 C_{23} 直鏈烷基或 C_{24} 直鏈烷基。

在本發明之一些態樣中，微生物體包括兩種、三種或四種各自編碼MI-FAE循環或MD-FAE循環之酶的外源核酸。在本發明之一些態樣中，微生物體包括兩種、三種或四種各自編碼終止路徑之酶的外源核酸。在本發明之一些態樣中，微生物體包括編碼選自(1)-(13)之路徑中之至少一者的酶中之每一者之外源核酸。在一些態樣中，至少一種外源核酸為異源核酸。在一些態樣中，非天然存在之微生物體在實

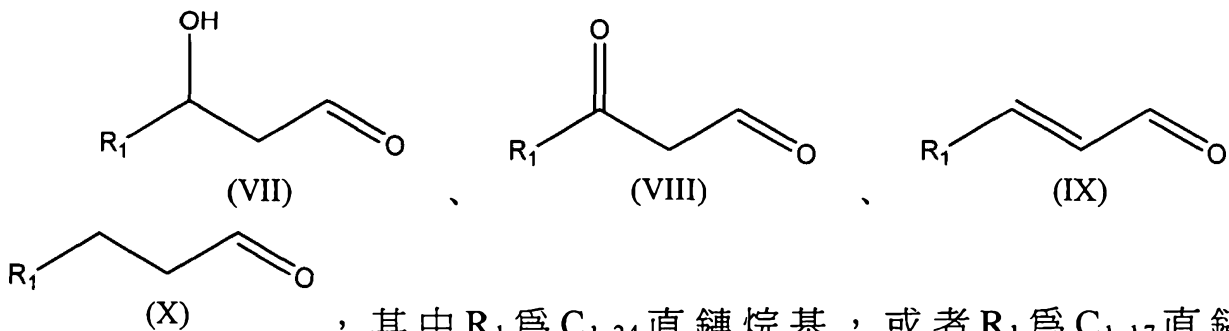
質上缺氧培養基中。

在一些實施例中，本發明提供一種非天然存在之微生物體，其中該MI-FAE循環、MD-FAE循環或終止路徑之一或多種酶以足以生產選自式(III)-(VI)之脂肪醇之量表現：



，其中R₁為C₁₋₂₄直鏈烷基，或者R₁為C₁₋₁₇直鏈烷基，或者R₁為C₉₋₁₃直鏈烷基。在本發明之一些態樣中，R₁為C₁直鏈烷基、C₂直鏈烷基、C₃直鏈烷基、C₄直鏈烷基、C₅直鏈烷基、C₆直鏈烷基、C₇直鏈烷基、C₈直鏈烷基、C₉直鏈烷基、C₁₀直鏈烷基、C₁₁直鏈烷基、C₁₂直鏈烷基或C₁₃直鏈烷基、C₁₄直鏈烷基、C₁₅直鏈烷基、C₁₆直鏈烷基、C₁₇直鏈烷基、C₁₈直鏈烷基、C₁₉直鏈烷基、C₂₀直鏈烷基、C₂₁直鏈烷基、C₂₂直鏈烷基、C₂₃直鏈烷基或C₂₄直鏈烷基。

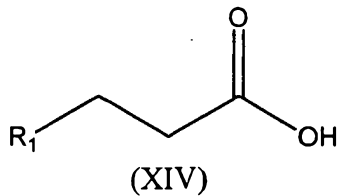
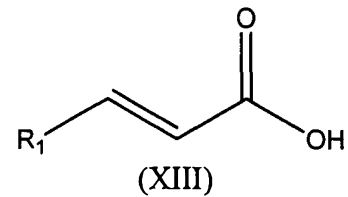
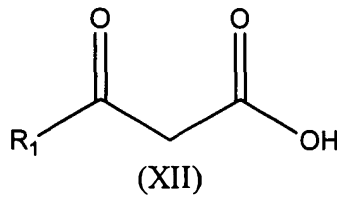
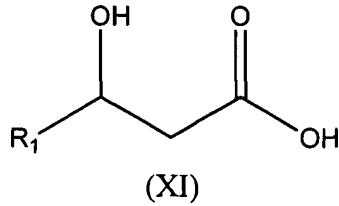
在一些實施例中，本發明提供一種非天然存在之微生物體，其中該MI-FAE循環、MD-FAE循環或終止路徑之一或多種酶以足以生產選自式(VII)-(X)之脂肪醛之量表現：



，其中R₁為C₁₋₂₄直鏈烷基，或者R₁為C₁₋₁₇直鏈烷基，或者R₁為C₉₋₁₃直鏈烷基。在本發明之一些態樣中，R₁為C₁直鏈烷基、C₂直鏈烷基、C₃直鏈烷基、C₄直鏈烷基、C₅直鏈烷基、C₆直鏈烷基、C₇直鏈烷基、C₈直鏈烷基、C₉直鏈烷基、C₁₀直鏈烷基、C₁₁直鏈

烷基、C₁₂直鏈烷基或C₁₃直鏈烷基、C₁₄直鏈烷基、C₁₅直鏈烷基、C₁₆直鏈烷基、C₁₇直鏈烷基、C₁₈直鏈烷基、C₁₉直鏈烷基、C₂₀直鏈烷基、C₂₁直鏈烷基、C₂₂直鏈烷基、C₂₃直鏈烷基或C₂₄直鏈烷基。

在一些實施例中，本發明提供一種非天然存在之微生物體，其中該MI-FAE循環、MD-FAE循環或終止路徑之一或多種酶以足以生產選自式(XI)-(XIV)之脂肪酸之量表現：



，其中R₁為C₁₋₂₄直鏈烷基，或者R₁為C₁₋₁₇直鏈烷基，或者R₁為C₉₋₁₃直鏈烷基。在本發明之一些態樣中，R₁為C₁直鏈烷基、C₂直鏈烷基、C₃直鏈烷基、C₄直鏈烷基、C₅直鏈烷基、C₆直鏈烷基、C₇直鏈烷基、C₈直鏈烷基、C₉直鏈烷基、C₁₀直鏈烷基、C₁₁直鏈烷基、C₁₂直鏈烷基或C₁₃直鏈烷基、C₁₄直鏈烷基、C₁₅直鏈烷基、C₁₆直鏈烷基、C₁₇直鏈烷基、C₁₈直鏈烷基、C₁₉直鏈烷基、C₂₀直鏈烷基、C₂₁直鏈烷基、C₂₂直鏈烷基、C₂₃直鏈烷基或C₂₄直鏈烷基。

在一些實施例中，本發明提供如本文中所述的非天然存在之微生物體，其中該微生物體進一步包括乙醯CoA路徑及至少一種編碼乙醯CoA路徑酶之外源核酸，該乙醯CoA路徑酶以足以生產乙醯CoA之量表現，其中該乙醯CoA路徑包括圖2、3、4或5中所示選自以下之路徑：(1) 2A及2B；(2) 2A、2C及2D；(3) 2H；(4) 2G及2D；(5) 2E、2F及2B；(6) 2E及2I；(7) 2J、2F及2B；(8) 2J及2I；(9) 3A、3B及3C；(10) 3A、3B、3J、3K及3D；(11) 3A、3B、3G及3D；(12) 3A、3F及3D；(13) 3N、3H、3B及3C；(14) 3N、3H、3B、3J、3K及3D；(15)

3N、3H、3B、3G及3D；(16) 3N、3H、3F及3D；(17) 3L、3M、3B及3C；(18) 3L、3M、3B、3J、3K及3D；(19) 3L、3M、3B、3G及3D；(20) 3L、3M、3F及3D；(21) 4A、4B、4D、4H、4I及4J；(22) 4A、4B、4E、4F、4H、4I及4J；(23) 4A、4B、4E、4K、4L、4H、4I及4J；(24) 4A、4C、4D、4H及4J；(25) 4A、4C、4E、4F、4H及4J；(26) 4A、4C、4E、4K、4L、4H及4J；(27) 5A、5B、5D及5G；(28) 5A、5B、5E、5F及5G；(29) 5A、5B、5E、5K、5L及5G；(30) 5A、5C及5D；(31) 5A、5C、5E及5F；及(32) 5A、5C、5E、5K及5L，其中2A為丙酮酸氧化酶(形成乙酸)，其中2B為乙醯CoA合成酶、乙醯CoA連接酶或乙醯CoA轉移酶，其中2C為乙酸激酶，其中2D為磷酸轉乙醯酶，其中2E為丙酮酸脫羧酶，其中2F為乙醛脫氫酶，其中2G為丙酮酸氧化酶(形成乙醯磷酸)，其中2H為丙酮酸脫氫酶、丙酮酸:鐵氧化還原蛋白氧化還原酶、丙酮酸:NAD(P)H氧化還原酶或丙酮酸甲酸裂解酶，其中2I為乙醛脫氫酶(醯化)，其中2J為蘇胺酸醛縮酶，其中3A為磷酸烯醇丙酮酸(PEP)羧化酶或PEP羧激酶，其中3B為草醯乙酸脫羧酶，其中3C為丙二酸半醛脫氫酶(乙醯化)，其中3D為乙醯CoA羧化酶或丙二醯CoA脫羧酶，其中3F為草醯乙酸脫氫酶或草醯乙酸氧化還原酶，其中3G為丙二酸半醛脫氫酶(醯化)，其中3H為丙酮酸羧化酶，其中3J為丙二酸半醛脫氫酶，其中3K為丙二醯CoA合成酶或丙二醯CoA轉移酶，其中3L為蘋果酸酶，其中3M為蘋果酸脫氫酶或蘋果酸氧化還原酶，其中3N為丙酮酸激酶或PEP磷酸酶，其中4A為檸檬酸合成酶，其中4B為檸檬酸轉運體，其中4C為檸檬酸/蘋果酸轉運體，其中4D為ATP檸檬酸裂解酶，其中4E為檸檬酸裂解酶，其中4F為乙醯CoA合成酶或乙醯CoA轉移酶，其中4H為細胞溶質蘋果酸脫氫酶，其中4I為蘋果酸轉運體，其中4J為粒線體蘋果酸脫氫酶，其中4K為乙酸激酶，其中4L為磷酸轉乙醯酶，其中5A為檸檬酸合成酶，其中5B為

檸檬酸轉運體，其中5C為檸檬酸/草醯乙酸轉運體，其中5D為ATP檸檬酸裂解酶，其中5E為檸檬酸裂解酶，其中5F為乙醯CoA合成酶或乙醯CoA轉移酶，其中5G為草醯乙酸轉運體，其中5K為乙酸激酶，並且其中5L為磷酸轉乙醯酶。

在一些態樣中，本發明之微生物體可包括兩種、三種、四種、五種、六種、七種或八種各自編碼乙醯CoA路徑酶之外源核酸。在一些態樣中，微生物體包括編碼選自(1)-(32)之路徑中之至少一者的乙醯CoA路徑酶中之每一者之外源核酸。

在另一實施例中，本發明提供一種具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體，其中該非天然存在之微生物體包含至少一種編碼將受質轉化為產物之酶或蛋白質的外源核酸，該轉化選自由以下組成之群：兩個乙醯CoA分子至3-酮脂醯CoA、乙醯CoA加丙醯CoA至酮脂醯CoA、丙二醯CoA至3-酮脂醯CoA、3-酮脂醯CoA至3-羥基醯基CoA、3-羥基醯基CoA至烯醯CoA、烯醯CoA至醯基CoA、醯基CoA加乙醯CoA至3-酮脂醯CoA、醯基CoA加丙二醯CoA至3-酮脂醯CoA、醯基CoA至脂肪醛、脂肪醛至脂肪醇、醯基CoA至脂肪醇、醯基CoA至醯基ACP、醯基ACP至脂肪酸、醯基CoA至脂肪酸、醯基ACP至脂肪醛、脂肪酸至脂肪醛、脂肪醛至脂肪酸、丙酮酸至乙酸、乙酸至乙醯CoA、丙酮酸至乙醯CoA、丙酮酸至乙醛、蘇胺酸至乙醛、乙醛至乙酸、乙醛至乙醯CoA、丙酮酸至乙醯磷酸、乙酸至乙醯磷酸、乙醯磷酸至乙醯CoA、磷酸烯醇丙酮酸(PEP)至丙酮酸、丙酮酸至蘋果酸、蘋果酸至草醯乙酸、丙酮酸至草醯乙酸、PEP至草醯乙酸、草醯乙酸至丙二酸半醛、草醯乙酸至丙二醯CoA、丙二酸半醛至丙二酸、丙二酸至丙二醯CoA、丙二酸半醛至丙二醯CoA、丙二醯CoA至乙醯CoA、丙二酸半醛至乙醯CoA、草醯乙酸加乙醯CoA至檸檬酸、檸檬酸至草醯乙酸加乙醯CoA、檸檬酸至草醯乙酸加乙酸及草

醯乙酸至蘋果酸。熟習此項技術者將理解，其僅為例示性的，且適於生產所要產物且可獲得適當活性用於將受質轉化為產物的本文中所揭示之任何受質-產物對均可由熟習此項技術者基於本文中之教示容易地確定。因此，本文中提供含有至少一種編碼酶或蛋白質之外源核酸的非天然存在之微生物體，其中酶或蛋白質轉化脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑(諸如圖1-8中所示者)之受質及產物。

雖然本文中一般描述含有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑之微生物體，但應理解，本發明另外提供包含至少一種編碼脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑酶或蛋白質之外源核酸的非天然存在之微生物體，該脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑酶或蛋白質以足以生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑之中間物之量表現。舉例而言，如本文中所揭示，脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑例示於圖1-7中。因此，除了含有生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的微生物體之外，本發明另外提供包含至少一種編碼脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑酶之外源核酸的非天然存在之微生物體，其中該微生物體生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物，例如3-酮脂醯CoA、3-羥基醯基CoA、烯醯CoA、醯基CoA、醯基ACP、乙酸、乙醛、乙醯磷酸、草醯乙酸、蘋果酸、丙二酸半醛、丙二酸、丙二醯CoA、乙醯CoA或檸檬酸。

應理解，如實例中所述及圖中所例示，本文中所揭示之路徑中之任一者(包括圖1-7之路徑)均可用以產生視需要生產任何路徑中間物或產物的非天然存在之微生物體。如本文中所揭示，生產中間物之該種微生物體可與表現下游路徑酶之另一微生物體組合使用以生產所要產物。然而，應理解，生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物的非天然存在之生物體可用以生產中間物作為所要產物。

本文中一般參考代謝反應、其反應物或產物或特定參考一或多

種編碼以下之核酸或基因來描述本發明：與所參考代謝反應、反應物或產物相關或催化所參考代謝反應、反應物或產物之酶，或與所參考代謝反應、反應物或產物相關之蛋白質。除非本文中另外明確規定，否則熟習此項技術者將理解對反應之參考亦構成對反應之反應物及產物的參考。類似地，除非本文中另外明確規定，否則參考反應物或產物亦參考反應，且參考此等代謝成分中之任一者亦參考編碼以下之基因：催化所參考反應、反應物或產物之酶或參與所參考反應、反應物或產物之蛋白質。同樣，考慮到代謝生物化學、酶學及基因組學之熟知領域，本文中對基因或編碼核酸之參考亦構成對相應編碼酶及其所催化之反應或與反應以及反應之反應物及產物相關之蛋白質的參考。

本發明的非天然存在之微生物體可藉由引入編碼參與一或多種脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成路徑之一或多種酶或蛋白質之可表現核酸來生產。視選擇用於生物合成之宿主微生物體而定，可表現用於特定脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成路徑中一些或所有之核酸。舉例而言，若所選宿主中用於所要生物合成路徑之一或多種酶或蛋白質不足，則將不足酶或蛋白質之可表現核酸引入宿主中用於後續外源表現。或者，若所選宿主展現一些路徑基因之內源表現，但其他基因不足，則不足酶或蛋白質需要編碼核酸以達成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成。因此，本發明的非天然存在之微生物體可藉由引入外源酶或蛋白質活性以獲得所要生物合成路徑而生產；或所要生物合成路徑可藉由引入一或多種外源酶或蛋白質活性而獲得，該一或多種外源酶或蛋白質活性與一或多種內源酶或蛋白質一起生產所要產物，諸如脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。

宿主微生物體可選自以下及在以下中產生的非天然存在之微生物體：例如細菌、酵母、真菌，或可應用或適合於醱酵製程之多種其他微生物中之任一者。例示性細菌包括選自以下之任何物種：腸桿菌

目(*Enterobacteriales*)，腸桿菌科(*Enterobacteriaceae*)，包括埃希氏菌屬(*Escherichia*)及克雷伯氏菌屬(*Klebsiella*)；氣單胞菌目(*Aeromonadales*)，琥珀酸弧菌科(*Succinivibrionaceae*)，包括厭氧螺菌屬(*Anaerobiospirillum*)；巴斯德氏菌目(*Pasteurellales*)，巴斯德氏菌科(*Pasteurellaceae*)，包括放線桿菌屬(*Actinobacillus*)及曼氏桿菌屬(*Mannheimia*)；根瘤菌目(*Rhizobiales*)，慢生根瘤菌科(*Bradyrhizobiaceae*)，包括根瘤菌屬(*Rhizobium*)；芽孢桿菌目(*Bacillales*)，芽孢桿菌科(*Bacillaceae*)，包括芽孢桿菌屬(*Bacillus*)；放線菌目(*Actinomycetales*)，棒狀桿菌科(*Corynebacteriaceae*)及鏈黴菌科(*Streptomycetaceae*)，分別包括棒狀桿菌屬(*Corynebacterium*)及鏈黴菌屬(*Streptomyces*)；紅螺菌目(*Rhodospirillales*)，醋桿菌科(*Acetobacteraceae*)，包括葡糖桿菌屬(*Gluconobacter*)；鞘脂單胞菌目(*Sphingomonadales*)，鞘脂單胞菌科(*Sphingomonadaceae*)，包括醱酵單胞菌屬(*Zymomonas*)；乳桿菌目(*Lactobacillales*)，乳桿菌科(*Lactobacillaceae*)及鏈球菌科(*Streptococcaceae*)，分別包括乳桿菌屬(*Lactobacillus*)及乳球菌屬(*Lactococcus*)；梭菌目(*Clostridiales*)，梭菌科(*Clostridiaceae*)，梭菌屬(*Clostridium*)；及假單胞菌目(*Pseudomonadales*)，假單胞菌科(*Pseudomonadaceae*)，包括假單胞菌屬(*Pseudomonas*)。宿主細菌之非限制性物種包括大腸桿菌、產酸克雷伯氏菌、產琥珀酸厭氧螺菌、產琥珀酸放線桿菌、產琥珀酸曼氏桿菌、埃特里根瘤菌、枯草桿菌、麩胺酸棒狀桿菌、氧化葡糖桿菌、運動醱酵單胞菌、乳酸乳球菌、植物乳桿菌、天藍色鏈黴菌、丙酮丁醇梭菌、螢光假單胞菌及惡臭假單胞菌。

類似地，酵母或真菌物種之例示性物種包括選自以下之任何物種：酵母目(*Saccharomycetales*)，酵母科(*Saccaromycetaceae*)，包括酵母屬(*Saccharomyces*)、克魯維酵母屬(*Kluyveromyces*)及畢赤酵母屬

(*Pichia*)；酵母目，雙足囊菌科(*Dipodascaceae*)，包括耶氏酵母屬(*Yarrowia*)；裂殖酵母目(*Schizosaccharomycetales*)，裂殖酵母科(*Schizosaccaromycetaceae*)，包括裂殖酵母屬(*Schizosaccharomyces*)；散囊菌目(*Eurotiales*)，發菌科(*Trichocomaceae*)，包括麴菌屬(*Aspergillus*)；及毛黴目(*Mucorales*)，毛黴科(*Mucoraceae*)，包括根黴屬(*Rhizopus*)。宿主酵母或真菌之非限制性物種包括釀酒酵母、粟酒裂殖酵母、乳酸克魯維酵母、馬克斯克魯維酵母、土麴菌、黑麴菌、巴斯德畢赤酵母、鬚根黴菌、米根黴(*Rhizobus oryzae*)、解脂耶氏酵母及其類似物種。大腸桿菌為尤其適用之宿主生物體，此係因為其為適用於基因工程改造之經充分表徵之微生物體。其他尤其適用之宿主生物體包括酵母，諸如釀酒酵母。應理解，任何適合之微生物宿主生物體均可用以引入代謝及/或基因修飾以生產所要產物。

視所選宿主微生物體之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成路徑成分而定，本發明的非天然存在之微生物體將包括至少一種外源性表現之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑編碼核酸及多至用於一或多種脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成路徑之所有編碼核酸。舉例而言，脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成可在路徑酶或蛋白質不足之宿主中經由相應編碼核酸之外源表現而建立。在脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑之所有酶或蛋白質均不足之宿主中，可包括路徑中所有酶或蛋白質之外源表現，但應理解即使宿主含有至少一種路徑酶或蛋白質，亦可表現該路徑之所有酶或蛋白質。舉例而言，可包括用於脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產之路徑中之所有酶或蛋白質的外源表現，諸如用於脂肪醇生產之硫解酶、3-側氧基醯基CoA還原酶、3-羥基醯基CoA脫水酶、烯醯CoA還原酶、醯基CoA還原酶(形成醛)及醇脫氫酶。

考慮到本文中所提供之教示及指導，熟習此項技術者將理解，以可表現形式引入之編碼核酸之數目將至少與所選宿主微生物體之脂

肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑不足相當。因此，本發明的非天然存在之微生物體可具有編碼構成本文中所揭示之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成路徑之酶或蛋白質的一種、兩種、三種、四種、五種、六種、七種、八種或多至所有核酸。在一些實施例中，非天然存在之微生物體亦可包括促進或最佳化脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成或賦予宿主微生物體以其他適用功能之其他基因修飾。一種此類其他功能可包括例如加強一或多種脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑前驅體的合成，該一或多種脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑前驅體諸如乙醯CoA、丙二醯CoA或丙醯CoA。

一般而言，選擇宿主微生物體以使得其生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑之前驅體，呈天然生產之分子形式或呈經工程改造之產物形式，經工程改造之產物使得重新生產所要前驅體或由宿主微生物體天然生產之前驅體之生產增加。舉例而言，乙醯CoA於諸如大腸桿菌之宿主生物體中天然生產。如本文中所揭示，宿主生物體可經工程改造以增加前驅體生產。另外，已經工程改造以生產所要前驅體之微生物體可用作宿主生物體且經進一步工程改造以表現脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑之酶或蛋白質。

在一些實施例中，本發明的非天然存在之微生物體係由含有合成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之酶促能力的宿主產生。在此特定實施例中，可能適用的為，增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑產物之合成或積聚以例如驅動脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑反應向脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產進行。合成或積聚增加可藉由例如過度表現編碼一或多種上文所述之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑酶或蛋白質的核酸來實現。脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑之酶及/或蛋白質的過度表現可例如經由內源基因之外源表現或經由異源基因之外源表現來進行。因此，天然存在之生物體可容易產生為本發明的非天然存在之微生物

體，例如經由過度表現編碼脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成路徑酶或蛋白質之一種、兩種、三種、四種、五種、六種、七種、八種、多至所有核酸而生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。另外，非天然存在之生物體可藉由突變誘發引起脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成路徑中之酶之活性增加的內源基因而產生。

在尤其適用之實施例中，採用編碼核酸之外源表現。外源表現賦予宿主及應用以定製表現及/或調節元件之能力以達成由使用者控制之所要表現量。然而，內源表現亦可在其他實施例中諸如藉由移除負調節效應子或誘導基因之啓動子(當連接至誘導性啓動子或其他調節元件時)而加以利用。因此，具有天然存在之誘導性啓動子的內源基因可藉由提供適當誘導劑而上調，或內源基因之調節區可經工程改造以併有誘導性調節元件，藉此允許在需要時調節內源基因增加之表現。類似地，可包括誘導性啓動子作為引入非天然存在之微生物體之外源基因的調節元件。

應理解，在本發明之方法中，可將一或多種外源核酸中之任一者引入微生物體中以生產本發明的非天然存在之微生物體。可引入核酸以便賦予微生物體以例如脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成路徑。或者，可引入編碼核酸以生產具有生物合成能力之中間微生物體，以催化一些所需反應以賦予脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成能力。舉例而言，具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成路徑的非天然存在之微生物體可包含至少兩種編碼所要酶或蛋白質之外源核酸，諸如以下之組合：硫解酶及醯基CoA還原酶(形成醇)，或者2-側氧基醯基CoA還原酶及醯基CoA水解酶，或者烯醯CoA還原酶及醯基CoA還原酶(形成醛)，及其類似組合。因此，應理解，在本發明的非天然存在之微生物體中可包括生物合成路徑之兩種或兩種以上酶或蛋白質之任何組合。類似地，應理解，在本發明的非天然存在之微生物體中可視需要

包括生物合成路徑之三種或三種以上酶或蛋白質之任何組合(例如硫解酶、烯醯CoA還原酶及醛脫氫酶(形成酸)，或者3-羥基醯基CoA脫水酶、醯基CoA:ACP醯基轉移酶及硫酯酶，或者3-側氧基醯基CoA還原酶、醯基CoA水解酶及羧酸還原酶，等)，只要所要生物合成路徑之酶及/或蛋白質之組合引起相應所要產物生產即可。類似地，在本發明的非天然存在之微生物體中可視需要包括如本文中所揭示之生物合成路徑之四種、五種、六種、七種、八種或八種以上酶或蛋白質之任何組合，只要所要生物合成路徑之酶及/或蛋白質之組合引起相應所要產物生產即可。

除了如本文中所述之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生物合成之外，本發明的非天然存在之微生物體及方法亦可以與彼此及/或與此項技術中熟知藉由其他途徑達成產物生物合成之其他微生物體及方法的各種組合使用。舉例而言，除使用脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產者以外，一種生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之替代方案為經由添加另一種能夠將脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物轉化為脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之微生物體。一種此類程序包括例如使生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物之微生物體醱酵。脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物可隨後用作第二微生物體之受質，該第二微生物體將脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物轉化為脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。可直接添加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物至第二生物體之另一培養物中，或可藉由例如細胞分離來使脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物生產者之最初培養物耗乏此等微生物體，隨後可利用後續添加第二生物體至醱酵液中以生產最終產物而無中間物純化步驟。

在其他實施例中，本發明的非天然存在之微生物體及方法可於各種子路徑中組合以達成例如脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生物合成。在此等實施例中，可將本發明的所要產物之生物合成路徑分離至不同

微生物體中，且可共同培養不同微生物體以生產最終產物。在該種生物合成流程中，一種微生物體之產物為第二微生物體之受質直至合成最終產物為止。舉例而言，脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生物合成可藉由構築含有用於將一種路徑中間物轉化為另一路徑中間物或產物之生物合成路徑的微生物體而實現。或者，脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸亦可自微生物體經由在同一容器中使用兩種生物體共同培養或共同醱酵來以生物合成方式生產，其中第一微生物體生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸中間物且第二微生物體將中間物轉化為脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。

考慮到本文中所提供之教示及指導，熟習此項技術者將理解，存在本發明的非天然存在之微生物體及方法與其他微生物體；與具有子路徑之其他非天然存在之微生物體之共同培養物；及與此項技術中熟知生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之其他化學及/或生物化學程序之組合的各種組合及置換。

類似地，熟習此項技術者應理解，可基於引入一或多個基因破壞以增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產的所要特徵來選擇宿主生物體。因此，應理解，若欲將基因修飾引入宿主生物體中以破壞基因，則可類似地破壞催化相似但不相同代謝反應之任何同源物、直系同源物或旁系同源物以確保所要代謝反應受到充分破壞。因為不同生物體之間代謝網路存在某些差異，所以熟習此項技術者將理解在各生物體之間既定生物體中受到破壞之實際基因可能不同。然而，考慮到本文中所提供之教示及指導，熟習此項技術者亦將理解，本發明之方法可應用於任何適合宿主微生物以鑑別構築所關注物種中將增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成之生物體所需之同源代謝改變。在一特定實施例中，生產增加將脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成與生物體生長耦合，且必要時且如本文中所揭示，可必然將脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產與生物體生長耦合。

脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑酶或蛋白質之編碼核酸之來源可包括例如其中所編碼基因產物能夠催化所參考反應之任何物種。該等物種包括原核與真核生物體，包括(但不限於)細菌，包括古菌及真細菌；及真核生物，包括酵母、植物、昆蟲、動物及哺乳動物(包括人類)。該等來源之例示性物種包括例如大腸桿菌、255956237威斯康辛產黃青黴菌(*Penicillium chrysogenum Wisconsin*) 54-1255、巴斯德醋桿菌(*Acetobacter pasteurians*)、醱酵胺基酸球菌(*Acidaminococcus fermentans*)、貝氏不動桿菌(*Acinetobacter bayliyi*)、醋酸鈣不動桿菌、不動桿菌屬ADP1、不動桿菌屬菌株M-1、產琥珀酸放線桿菌、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、根癌農桿菌(*Agrobacterium tumefaciens*)、產金屬嗜鹼菌(*Alkaliphilus metalliredigens*) QYMF、奧倫蘭嗜鹼菌(*Alkaliphilus oremlandii*) OhILAs、多變魚腥藻(*Anabaena variabilis*) ATCC 29413、產琥珀酸厭氧螺菌、甘比亞瘧蚊(*Anopheles gambiae*)菌株PEST、意大利蜂(*Apis mellifera*)、風產液菌(*Aquifex aeolicus*)、擬南芥、閃爍古生球菌(*Archaeoglobus fulgidus*)、閃爍古生球菌DSM 4304、豬蛔蟲(*Ascaris suum*)、薰煙麴菌(*Aspergillus fumigatus*)、小巢狀麴菌(*Aspergillus nidulans*)、黑麴菌、黑麴菌CBS 513.88、土麴菌NIH2624、棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii*) DJ、蠟樣芽孢桿菌(*Bacillus cereus*)、巨桿菌(*Bacillus megaterium*)、甲醇芽孢桿菌(*Bacillus methanolicus*) MGA3、甲醇芽孢桿菌PB1、芽孢桿菌屬SG-1、枯草桿菌、韋氏芽孢桿菌(*Bacillus weihenstephanensis*) KBAB4、脆弱類桿菌(*Bacteroides fragilis*)、家蠶(*Bombyx mori*)、黃牛(*Bos taurus*)、慢生型大豆根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)、慢生型大豆根瘤菌USDA110、甘藍型油菜(*Brassica napsus*)、不明確伯克霍爾德菌(*Burkholderia ambifaria*) AMMD、多噬伯克霍爾德菌(*Burkholderia multivorans*) ATCC 17616、結瘤伯克霍爾德菌(*Burkholderia*

phymatum)、穩定伯克霍爾德菌(*Burkholderia stabilis*)、產丁酸細菌(*butyrate-producing bacterium*) L2-50、布里吉沙耶隱桿線蟲(*Caenorhabditis briggsae*) AF16、秀麗隱桿線蟲(*Caenorhabditis elegans*)、空腸彎曲桿菌(*Campylobacter jejuni*)、白假絲酵母、博伊丁假絲酵母、甲基假絲酵母(*Candida methylica*)、近平滑假絲酵母(*Candida parapsilosis*)、熱帶假絲酵母、熱帶假絲酵母MYA-3404、變形蟲原厚垣假絲酵母(*Candidatus Protochlamydia amoebophila*)、家犬(*Canis lupus familiaris*)(狗)、產氫羧基嗜熱菌(*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*)、紅花(*Carthamus tinctorius*)、萊茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)、泥生綠菌(*Chlorobium limicola*)、綠硫菌(*Chlorobium tepidum*)、橙色綠屈撓菌(*Chloroflexus aurantiacus*)、香橙(*Citrus junos*)、丙酮丁醇梭菌、胺基丁酸梭菌(*Clostridium aminobutyricum*)、拜氏梭菌、拜氏梭菌NCIMB 8052、食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*) P7、克氏梭菌、克氏梭菌DSM 555、巴斯德梭菌(*Clostridium pasteurianum*)、糖乙酸多丁醇梭菌、共生梭菌(*Clostridium symbiosum*)、破傷風梭菌(*Clostridium tetani*) E88、冷紅科爾韋爾氏菌(*Colwellia psychrerythraea*) 34H、麩胺酸棒狀桿菌、新型隱球菌變種(*Cryptococcus neoformans* var)、小隱孢子蟲(*Cryptosporidium parvum*) Iowa II、萼距花、沼澤萼距花(*Cuphea palustris*)、鉤蟲貪銅菌(*Cupriavidus necator*)、臺灣貪銅菌(*Cupriavidus taiwanensis*)、藍菌屬(*Cyanobium*) PCC7001、藍絲菌屬(*Cyanothece* sp.) PCC 7425、斑馬魚(*Danio rerio*)、食烯烴脫硫桿菌(*Desulfatibacillum alkenivorans*) AK-01、食油脫硫球菌(*Desulfococcus oleovorans*) Hxd3、非洲脫硫弧菌(*Desulfovibrio africanus*)、盤基網柄菌(*Dictyostelium discoideum*)、盤基網柄菌AX4、黑腹果蠅(*Drosophila melanogaster*)、赤桿菌屬(*Erythrobacter* sp.) NAP1、大腸桿菌K-12

MG1655、纖細裸藻、黃桿菌(*Flavobacteria bacterium*) *BAL38*、具核梭桿菌(*Fusobacterium nucleatum*)、嗜熱脫氮土芽孢桿菌、流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenza*)、死海鹽盒菌(*Haloarcula marismortui*)、死海鹽盒菌 *ATCC 43049*、鹽單胞菌屬(*Halomonas sp.*) *HTNK1*、向日葵(*Helianthus annuus*)、幽門螺旋桿菌(*Helicobacter pylori*)、幽門螺旋桿菌 *26695*、智人(*Homo sapiens*)、嗜熱產氫桿菌(*Hydrogenobacter thermophilus*)、肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)、乳酸克魯維酵母、乳酸克魯維酵母 *NRRL Y-1140*、凱氏乳桿菌(*Lactobacillus casei*)、植物乳桿菌、羅伊氏乳桿菌(*Lactobacillus reuteri*)、乳酸乳球菌、賴氏菌屬 *S749*、腸膜狀明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*)、鞘絲藻屬(*Lyngbya sp.*) *PCC 8106*、獼猴(*Macaca mulatta*)、趨磁螺菌(*Magnetospirillum magneticum*) *AMB-1*、產琥珀酸曼氏桿菌、海洋 γ 變形桿菌(*marine gamma proteobacterium*) *HTCC2080*、水油海桿菌、水油海桿菌 *VT8*、大黍(*Megathyrsus maximus*)、百脈根根瘤菌(*Mesorhizobium loti*)、勤奮金屬球菌(*Metallosphaera sedula*)、嗜熱甲烷八疊球菌(*Methanosarcina thermophila*)、熱自養甲烷熱桿菌(*Methanothermobacter thermautotrophicus*)、扭脫甲基桿菌(*Methylobacterium extorquens*)、領鞭毛蟲(*Monosiga brevicollis*) *MX1*、熱醋酸穆爾氏菌(*Moorella thermoacetica*)、熱醋酸穆爾氏菌 *ATCC 39073*、小家鼠(*Mus musculus*)、鳥副結核分枝桿菌(*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*) *K-10*、牛分枝桿菌(*Mycobacterium bovis*) *BCG*、海洋分枝桿菌(*Mycobacterium marinum*) *M*、恥垢分枝桿菌、恥垢分枝桿菌 *MC2 155*、分枝桿菌屬(菌株 *JLS*)、分枝桿菌屬 *MCS*、分枝桿菌屬菌株 *JLS*、結核分枝桿菌、黃色黏球菌(*Myxococcus xanthus*) *DK 1622*、星狀海葵(*Nematostella vectensis*)、粗糙脈孢菌(*Neurospora crassa*) *OR74A*、菸草(*Nicotiana tabacum*)、巴西

諾卡菌(*Nocardia brasiliensis*)、鼻疽諾卡菌(*Nocardia farcinica*) IFM 10152、艾瓦諾卡菌、泡沫節球藻(*Nodularia spumigena*) CCY9414、厚壁孢子念珠藻(*Nostoc azollae*)、念珠藻屬(*Nostoc sp.*) PCC 7120、豐佑細菌(*Opitutaceae bacterium*) TAV2、脫氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)、產黃青黴菌(*Penicillium chrysogenum*)、海洋帕金蟲(*Perkinsus marinus*) ATCC 50983、明亮發光桿菌、發光桿菌屬(*Photobacterium sp.*) SKA34、北美雲杉(*Picea sitchensis*)、巴斯德畢赤酵母、巴斯德畢赤酵母GS115、惡性瘧原蟲(*Plasmodium falciparum*)、牙齦卟啉單胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、牙齦卟啉單胞菌W83、海洋原綠球藻(*Prochlorococcus marinus*) MIT 9312、中度產丙酸菌(*Propionigenium modestum*)、綠膿假單胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、綠膿假單胞菌PAO1、螢光假單胞菌、螢光假單胞菌Pf0-1、克氏假單胞菌(*Pseudomonas knackmussii*)、克氏假單胞菌(B13)、惡臭假單胞菌，惡臭假單胞菌GB-1、假單胞菌屬、假單胞菌屬CF600、斯氏假單胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)、斯氏假單胞菌A1501、丁香假單胞菌(*Pseudomonas syringae*)、好氧火棒菌(*Pyrobaculum aerophilum*) 菌株IM2、富養羅爾斯通氏菌、耐金屬羅爾斯通氏菌(*Ralstonia metallidurans*)、褐家鼠、吉祥草屬(*Reinekea sp.*) MED297、埃特里根瘤菌CFN 42、豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)、類球紅細菌(*Rhodobacter sphaeroides*)、紅串紅球菌(*Rhodococcus erythropolis*)、紅球菌屬(*Rhodococcus sp.*)、沼澤紅假單胞菌、卡氏玫瑰彎菌(*Roseiflexus castenholzii*)、玫瑰變色菌屬(*Roseovarius sp.*) HTCC2601、釀酒酵母、釀酒酵母s288c、腸道沙門氏菌、腸道沙門氏菌鼠傷寒腸道血清型亞種(*Salmonella enterica subsp. enterica serovar Typhimurium*) 菌株LT2、鼠傷寒沙門氏菌(*Salmonella typhimurium*)、鼠傷寒沙門氏菌LT2、樹幹畢赤酵母

(*Scheffersomyces stipitis*)、粟酒裂殖酵母、痢疾志賀菌(*Shigella dysenteriae*)、宋內氏志賀氏菌(*Shigella sonnei*)、中國希蒙得木、番茄、大孢糞殼菌(*Sordaria macrospora*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、嗜麥芽窄食單胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、變異鏈球菌(*Streptococcus mutans*)、肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、血鏈球菌(*Streptococcus sanguinis*)、環圈鏈黴菌(*Streptomyces anulatus*)、阿維鏈黴菌(*Streptomyces avermitilis*)、肉桂地鏈黴菌(*Streptomyces cinnamonensis*)、天藍色鏈黴菌、灰色鏈黴菌灰色亞種NBRC 13350、蒼黃鏈黴菌(*Streptomyces luridus*)、鏈黴菌屬(*Streptomyces sp.*) CL190、鏈黴菌屬KO-3988、綠色產色鏈黴菌(*Streptomyces viridochromogenes*)、威德莫耳鏈黴菌(*Streptomyces wedmorensis*)、紫海膽(*Strongylocentrotus purpuratus*)、嗜酸熱硫化葉菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)、硫磺礦硫化葉菌(*Sulfolobus solfataricus*)、托科達硫化葉菌(*Sulfolobus tokodaii*)、地下硫氫菌(*Sulfurihydrogenibium subterraneum*)、脫氮硫單胞菌(*Sulfurimonas denitrificans*)、野豬、細長聚球藻(*Synechococcus elongatus*) PCC 6301、細長聚球藻 PCC 7942、聚球菌屬(*Synechococcus sp.*) PCC 7002、弗氏互營桿菌(*Syntrophobacter fumaroxidans*)、氫養互營菌(*Syntrophus aciditrophicus*)、黑青斑河豚(*Tetraodon nigroviridis*)、嗜熱厭氧乙醇桿菌(*Thermoanaerobacter ethanolicus*) JW 200、嗜熱厭氧假乙醇桿菌(*Thermoanaerobacter pseudethanolicus*) ATCC 33223、海濱熱球菌(*Thermococcus litoralis*)、嗜中性熱變形菌(*Thermoproteus neutrophilus*)、海棲熱孢菌(*Thermotoga maritime*)、齒垢密螺旋體(*Treponema denticola*)、赤擬穀盜(*Tribolium castaneum*)、陰道毛滴蟲(*Trichomonas vaginalis*) G3、小麥(*Triticum aestivum*)、布氏錐蟲、克氏錐蟲(*Trypanosoma cruzi*)菌株

CL Brener、微變塚村氏菌(*Tsukamurella paurometabola*) DSM 20162、加州月桂、小韋榮氏球菌(*Veillonella parvula*)、霍亂弧菌(*Vibrio cholerae*) V51、熱帶爪蟾(*Xenopus tropicalis*)、解脂耶氏酵母、玉蜀黍(*Zea mays*)、生枝動膠菌(*Zoogloea ramiger*)、運動醱酵單胞菌、運動醱酵單胞菌運動亞種(*Zymomonas mobilis subsp. mobilis*) ZM4以及本文中所揭示或可得到作為相應基因之來源生物體的其他例示性物種。然而，在現在可得到超過550種物種的完整基因組序列(其中超過一半可在諸如NCBI之公共資料庫得到)(包括395種微生物基因組及多種酵母、真菌、植物及哺乳動物基因組)之情況下，編碼相關或疏遠物種中之一或多種基因之必需脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成活性的基因(包括例如已知基因之同源物、直系同源物、旁系同源物及非直系同源基因置換)之鑑別；及生物體之間的基因改變互換為常規的且為此項技術中所熟知。因此，允許本文中參考特定生物體(諸如大腸桿菌)所述之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成的代謝改變可容易地應用於其他微生物，同樣包括原核及真核生物體。考慮到本文中所提供之教示及指導，熟習此項技術者將知曉在一種生物體中例示之代謝改變可同等適用於其他生物體。

在一些情況下，諸如當在無關物種中存在替代脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成路徑時，脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成可藉由例如來自無關物種的催化相似但不相同代謝反應以替代所參考反應之旁系同源物的外源表現而被賦予宿主物種。因為不同生物體之間代謝網路存在某些差異，所以熟習此項技術者將理解不同生物體之間的實際基因使用可能不同。然而，考慮到本文中所提供之教示及指導，熟習此項技術者亦將理解，本發明之教示及方法可使用對本文中例示者之同源代謝改變而應用於所有微生物體，以構築所關注物種中將合成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之微生物體。編碼本發明之脂肪醇、脂肪醛

或脂肪酸路徑酶或蛋白質的核酸分子亦可包括與本文中利用SEQ ID NO、GenBank及/或GI編號所揭示之核酸雜合的核酸分子；或與編碼本文中利用SEQ ID NO、GenBank及/或GI編號所揭示之胺基酸序列之核酸分子雜合的核酸分子。雜合條件可包括為熟習此項技術者所熟知之高度嚴格、中等嚴格或低嚴格雜交條件，諸如本文中所述之條件。類似地，可用於本發明之核酸分子可描述為與本文中利用SEQ ID NO、GenBank及/或GI編號所揭示之核酸，或與編碼本文中利用SEQ ID NO、GenBank及/或GI編號所揭示之胺基酸序列之核酸分子雜合的核酸分子具有一定序列一致性百分比。舉例而言，核酸分子可與本文中所述之核酸具有至少65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性。

嚴格雜合係指雜合聚核苷酸穩定時所處之條件。如熟習此項技術者所知，雜合聚核苷酸之穩定性以雜合物之熔融溫度(T_m)反映。一般而言，雜合聚核苷酸之穩定性隨鹽濃度(例如鈉離子濃度)及溫度而變化。雜合反應可在具有較低嚴格性之條件下進行，隨後進行具有不同但較高嚴格性之洗滌。提及雜合嚴格性涉及該等洗滌條件。高度嚴格雜合包括僅允許在65°C下在0.018 M NaCl中形成穩定雜合聚核苷酸之彼等核酸序列雜合之條件，例如，若雜合物在65°C下在0.018 M NaCl中不穩定，則其在如本文中涵蓋之高嚴格性條件下將不穩定。高嚴格性條件可例如藉由以下方式來提供：在42°C下在50%甲醯胺、5X 鄧哈特氏溶液(Denhart's solution)、5X SSPE、0.2% SDS中雜合；隨後在65°C下在0.1X SSPE及0.1% SDS中洗滌。亦可使用不同於高度嚴格雜合條件之雜合條件來描述本文中所述之核酸序列。舉例而言，片語中等嚴格雜合係指相當於以下之條件：在42°C下在50%甲醯胺、5X 鄧哈特氏溶液、5X SSPE、0.2% SDS中雜合，隨後在42°C下在0.2X SSPE、0.2% SDS中洗滌。片語低嚴格性雜合係指相當於以下之條

件：在22°C下在10%甲醯胺、5X鄧哈特氏溶液、6X SSPE、0.2% SDS中雜合，隨後在37°C下在1X SSPE、0.2% SDS中洗滌。鄧哈特氏溶液含有1% Ficoll、1%聚乙烯吡咯啉酮及1%牛血清白蛋白(BSA)。20X SSPE(氯化鈉、磷酸鈉、乙二胺四乙酸(EDTA))含有3 M氯化鈉、0.2 M磷酸鈉及0.025 M (EDTA)。其他適合之低、中等及高嚴格性雜合緩衝液及條件為熟習此項技術者熟知，且描述於例如以下文獻中：Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001)；及Ausubel等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)。

編碼本發明之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑酶或蛋白質的核酸分子可與本文中所揭示之核苷酸序列具有至少一定序列一致性。因此，在本發明之一些態樣中，編碼脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑酶或蛋白質之核酸分子具有與以下各物具有至少65%一致性、至少70%一致性、至少75%一致性、至少80%一致性、至少85%一致性、至少90%一致性、至少91%一致性、至少92%一致性、至少93%一致性、至少94%一致性、至少95%一致性、至少96%一致性、至少97%一致性、至少98%一致性或至少99%一致性之核苷酸序列：本文中利用SEQ ID NO、GenBank及/或GI編號所揭示之核酸；或與編碼本文中利用SEQ ID NO、GenBank及/或GI編號所揭示之胺基酸序列之核酸分子雜合的核酸分子。

序列一致性(亦稱為同源性或相似性)係指兩種核酸分子之間或兩種多肽之間的序列相似性。可藉由比較各序列中之位置測定一致性，該位置可出於比較之目的來比對。當比較序列中之位置由相同鹼基或胺基酸佔據時，則分子在該位置處一致。序列之間的一致性程度隨序列共用之匹配或同源位置的數目而變化。比對兩種序列以測定其序列

一致性百分比可使用此項技術中已知之軟體程式來進行，該等軟體程式諸如以下文獻中所述者：Ausubel等人，*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)。較佳地，使用預設參數來比對。可使用的此項技術中熟知之一種比對程式為BLAST，設定至預設參數。特定言之，程式為BLASTN及BLASTP，使用以下預設參數：遺傳密碼 = 標準；過濾器 = 無；股 = 兩者；截止值 = 60；預期值 = 10；矩陣 = BLOSUM62；描述 = 50個序列；排序方式 = 高計分；資料庫 = 非冗餘，GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS轉譯 + SwissProtein + SPupdate + PIR。此等程式之詳情可在國家生物技術資訊中心(the National Center for Biotechnology Information)得到。

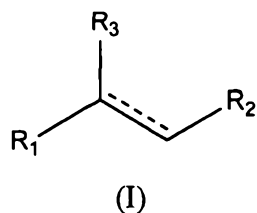
構築及測試生產非天然存在之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之宿主的表現水準之方法可例如藉由此項技術中熟知之重組及偵測方法來進行。該等方法可發現描述於例如以下文獻中：Sambrook等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001)；及Ausubel等人，*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)。

參與脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產之路徑的外源核酸序列可使用此項技術中熟知之技術穩定地或暫時地引入宿主細胞中，該等技術包括(但不限於)結合、電穿孔、化學轉化、轉導、轉染及超音波轉化。爲了在大腸桿菌或其他原核細胞中外源表現，真核核酸之基因或cDNA中之一些核酸序列可編碼靶向信號，諸如N端粒線體或其他靶向信號，必要時其可在轉型至原核宿主細胞中之前經移除。舉例而言，粒線體前導序列之移除使得大腸桿菌中之表現增加(Hoffmeister等人, *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338 (2005))。爲了在酵母或其他真核細胞中外源表現，基因可在不添加前導序列之情況下於細胞溶質中表

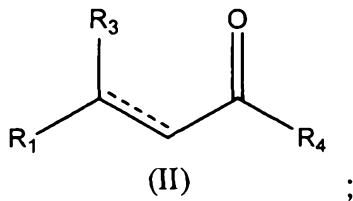
現，或可靶向粒線體或其他細胞器，或經靶向以便分泌，藉由添加適用於宿主細胞之適合靶向序列(諸如粒線體靶向或分泌信號)來達成。因此，應理解爲了移除或包括靶向序列而對核酸序列所作之適當修飾可併入外源核酸序列中以賦予所需性質。此外，可用此項技術中熟知之技術對基因進行密碼子最佳化以達成最佳化蛋白質表現。

可構築表現載體以包括一或多種如本文中例示的可操作地連接於在宿主生物體中起作用之表現控制序列的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成路徑編碼核酸。適用於本發明之微生物宿主生物體中之表現載體包括例如質體、噬菌體載體、病毒載體、游離基因體及人工染色體，包括可操作用於穩定整合至宿主染色體中之載體及選擇序列或標記。另外，表現載體可包括一或多種可選擇標記基因及適當表現控制序列。亦可包括如下可選擇標記基因，其例如提供對抗生素或毒素、補體營養缺陷型缺乏之抗性，或供應不在培養基中之關鍵營養素。表現控制序列可包括此項技術中熟知之構成性及誘導性啓動子、轉錄增強子、轉錄終止子及其類似物。當兩種或兩種以上外源編碼核酸欲共表現時，兩種核酸可插入例如單一表現載體或各別表現載體中。對於單一載體表現，編碼核酸可操作地連接於一個共同表現控制序列，或連接於不同表現控制序列，諸如一個誘導性啓動子及一個構成性啓動子。參與代謝或合成路徑之外源核酸序列的轉型可使用此項技術中熟知之方法來證實。該等方法包括例如核酸分析，諸如北方墨點法(Northern blots)或mRNA之聚合酶鏈反應(PCR)擴增；或關於基因產物表現之免疫墨點法，或測試所引入核酸序列或其相應基因產物之表現的其他適合分析方法。熟習此項技術者應理解，外源核酸以足以生產所要產物之量表現，且應進一步理解，可使用此項技術中熟知且如本文中所揭示之方法使表現水準最佳化以獲得充足表現。

在一些實施例中，本發明提供一種生產式(I)化合物之方法：



其中 R_1 為 C_{1-24} 直鏈烷基； R_2 為 CH_2OH 、 CHO 或 $COOH$ ； R_3 為 H 、 OH 或側氧基($=O$)；且 $-----$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為 R_3 連接之碳原子的價數為四，該方法包含在生產式(I)化合物之條件下且持續充足時間段培養非天然存在之微生物體，其中該非天然存在之微生物體具有MI-FAE循環及/或MD-FAE循環以及終止路徑，其中該MI-FAE循環包括一或多種硫解酶、一或多種3-側氧基醯基CoA還原酶、一或多種3-羥基醯基CoA脫水酶及一或多種烯醯CoA還原酶，其中該MD-FAE循環包括一或多種延長酶、一或多種3-側氧基醯基CoA還原酶、一或多種3-羥基醯基CoA脫水酶及一或多種烯醯CoA還原酶，其中該終止路徑包括圖1、6或7中所示選自以下之路徑：(1) 1H；(2) 1K及1L；(3) 1E及1N；(4) 1K、1J及1N；(5) 1E；(6) 1K及1J；(7) 1H及1N；(8) 1K、1L及1N；(9) 1E及1F；(10) 1K、1J及1F；(11) 1H、1N及1F；(12) 1K、1L、1N及1F；及(13) 1G，其中1E為醯基CoA還原酶(形成醛)，其中1F為醇脫氫酶，其中1G為醯基CoA還原酶(形成醇)，其中1H為醯基CoA水解酶、醯基CoA轉移酶或醯基CoA合成酶，其中1J為醯基ACP還原酶，其中1K為醯基CoA:ACP醯基轉移酶，其中1L為硫酯酶，其中1N為醛脫氫酶(形成酸)或羧酸還原酶，其中該MI-FAE循環、MD-FAE循環或終止路徑之酶由至少一種外源核酸編碼且以足以生產式(I)化合物之量表現，其中該MI-FAE循環、MD-FAE循環及終止路徑之該等酶中之每一者之受質獨立地選自式(II)化合物、丙二醯CoA、丙醯CoA或乙醯CoA：



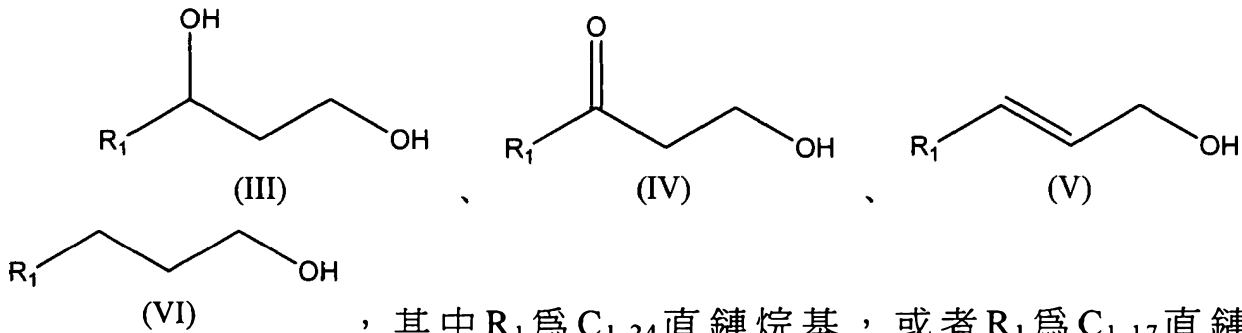
其中 R_1 為 C_{1-24} 直鏈烷基； R_3 為 H、OH 或側氧基 (=O)； R_4 為 S-CoA、ACP、OH 或 H；且 ----- 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為 R_3 連接之碳原子的價數為四；其中該 MI-FAE 循環之該一或多種酶各自對 R_1 上之碳原子數目不大於該式 (I) 化合物之 R_1 上的碳原子數目之式 (II) 化合物具有選擇性，其中該 MD-FAE 循環之該一或多種酶各自對 R_1 上之碳原子數目不大於該式 (I) 化合物之 R_1 上的碳原子數目之式 (II) 化合物具有選擇性，且其中該終止路徑之該一或多種酶各自對 R_1 上之碳原子數目不小於該式 (I) 化合物之 R_1 上的碳原子數目之式 (II) 化合物具有選擇性。

在一些實施例中，本發明提供一種生產式 (I) 化合物之方法，其中 R_1 為 C_{1-17} 直鏈烷基。在本發明之另一態樣中，式 (I) 化合物之 R_1 為 C_1 直鏈烷基、 C_2 直鏈烷基、 C_3 直鏈烷基、 C_4 直鏈烷基、 C_5 直鏈烷基、 C_6 直鏈烷基、 C_7 直鏈烷基、 C_8 直鏈烷基、 C_9 直鏈烷基、 C_{10} 直鏈烷基、 C_{11} 直鏈烷基、 C_{12} 直鏈烷基或 C_{13} 直鏈烷基、 C_{14} 直鏈烷基、 C_{15} 直鏈烷基、 C_{16} 直鏈烷基、 C_{17} 直鏈烷基、 C_{18} 直鏈烷基、 C_{19} 直鏈烷基、 C_{20} 直鏈烷基、 C_{21} 直鏈烷基、 C_{22} 直鏈烷基、 C_{23} 直鏈烷基或 C_{24} 直鏈烷基。

在本發明之一些態樣中，用於本發明之方法中的微生物體包括兩種、三種或四種各自編碼 MI-FAE 循環或 MD-FAE 循環之酶的外源核酸。在本發明之一些態樣中，用於本發明之方法中的微生物體包括兩種、三種或四種各自編碼終止路徑之酶的外源核酸。在本發明之一些態樣中，用於本發明之方法中的微生物體包括編碼選自 (1)-(13) 之路徑中之至少一者的酶中之每一者之外源核酸。在一些態樣中，至少一種外源核酸為異源核酸。在一些態樣中，用於本發明之方法中的非天

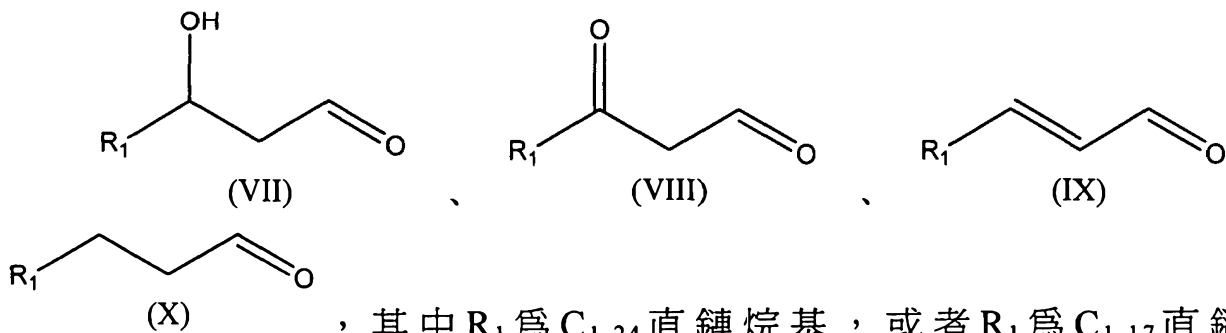
然存在之微生物體在實質上缺氧培養基中。

在一些實施例中，本發明提供一種生產選自式(III)-(VI)之脂肪醇的方法：



，其中 R_1 為 C_{1-24} 直鏈烷基，或者 R_1 為 C_{1-17} 直鏈烷基，或者 R_1 為 C_{9-13} 直鏈烷基。在本發明之一些態樣中， R_1 為 C_1 直鏈烷基、 C_2 直鏈烷基、 C_3 直鏈烷基、 C_4 直鏈烷基、 C_5 直鏈烷基、 C_6 直鏈烷基、 C_7 直鏈烷基、 C_8 直鏈烷基、 C_9 直鏈烷基、 C_{10} 直鏈烷基、 C_{11} 直鏈烷基、 C_{12} 直鏈烷基或 C_{13} 直鏈烷基、 C_{14} 直鏈烷基、 C_{15} 直鏈烷基、 C_{16} 直鏈烷基、 C_{17} 直鏈烷基、 C_{18} 直鏈烷基、 C_{19} 直鏈烷基、 C_{20} 直鏈烷基、 C_{21} 直鏈烷基、 C_{22} 直鏈烷基、 C_{23} 直鏈烷基或 C_{24} 直鏈烷基。

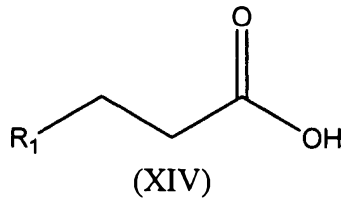
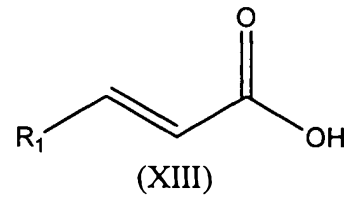
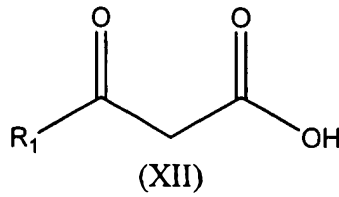
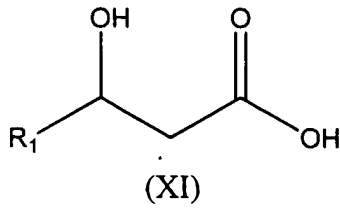
在一些實施例中，本發明提供一種生產選自式(VII)-(X)之脂肪醛的方法：



，其中 R_1 為 C_{1-24} 直鏈烷基，或者 R_1 為 C_{1-17} 直鏈烷基，或者 R_1 為 C_{9-13} 直鏈烷基。在本發明之一些態樣中， R_1 為 C_1 直鏈烷基、 C_2 直鏈烷基、 C_3 直鏈烷基、 C_4 直鏈烷基、 C_5 直鏈烷基、 C_6 直鏈烷基、 C_7 直鏈烷基、 C_8 直鏈烷基、 C_9 直鏈烷基、 C_{10} 直鏈烷基、 C_{11} 直鏈烷基、 C_{12} 直鏈烷基或 C_{13} 直鏈烷基、 C_{14} 直鏈烷基、 C_{15} 直鏈烷基、 C_{16} 直鏈烷基、 C_{17} 直鏈烷基、 C_{18} 直鏈烷基、 C_{19} 直鏈烷基、 C_{20} 直鏈烷

基、C₂₁直鏈烷基、C₂₂直鏈烷基、C₂₃直鏈烷基或C₂₄直鏈烷基。

在一些實施例中，本發明提供一種生產選自式(XI)-(XIV)之脂肪酸的方法：



，其中R₁為C₁₋₂₄直鏈烷基，或者R₁為C₁₋₁₇直鏈烷基，或者R₁為C₉₋₁₃直鏈烷基。在本發明之一些態樣中，R₁為C₁直鏈烷基、C₂直鏈烷基、C₃直鏈烷基、C₄直鏈烷基、C₅直鏈烷基、C₆直鏈烷基、C₇直鏈烷基、C₈直鏈烷基、C₉直鏈烷基、C₁₀直鏈烷基、C₁₁直鏈烷基、C₁₂直鏈烷基或C₁₃直鏈烷基、C₁₄直鏈烷基、C₁₅直鏈烷基、C₁₆直鏈烷基、C₁₇直鏈烷基、C₁₈直鏈烷基、C₁₉直鏈烷基、C₂₀直鏈烷基、C₂₁直鏈烷基、C₂₂直鏈烷基、C₂₃直鏈烷基或C₂₄直鏈烷基。

在一些實施例中，生產本文中所述之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的方法包括使用如下非天然存在之微生物體，其具有乙醯CoA路徑及至少一種編碼乙醯CoA路徑酶之外源核酸，該乙醯CoA路徑酶以足以生產乙醯CoA之量表現，其中該乙醯CoA路徑包括圖2、3、4或5中所示選自以下之路徑：(1) 2A及2B；(2) 2A、2C及2D；(3) 2H；(4) 2G及2D；(5) 2E、2F及2B；(6) 2E及2I；(7) 2J、2F及2B；(8) 2J及2I；(9) 3A、3B及3C；(10) 3A、3B、3J、3K及3D；(11) 3A、3B、3G及3D；(12) 3A、3F及3D；(13) 3N、3H、3B及3C；(14) 3N、3H、3B、3J、3K及3D；(15) 3N、3H、3B、3G及3D；(16) 3N、3H、3F及3D；(17) 3L、3M、3B及3C；(18) 3L、3M、3B、3J、3K及3D；(19) 3L、3M、3B、3G及3D；(20) 3L、3M、3F及3D；(21) 4A、4B、4D、

4H、4I及4J；(22) 4A、4B、4E、4F、4H、4I及4J；(23) 4A、4B、4E、4K、4L、4H、4I及4J；(24) 4A、4C、4D、4H及4J；(25) 4A、4C、4E、4F、4H及4J；(26) 4A、4C、4E、4K、4L、4H及4J；(27) 5A、5B、5D及5G；(28) 5A、5B、5E、5F及5G；(29) 5A、5B、5E、5K、5L及5G；(30) 5A、5C及5D；(31) 5A、5C、5E及5F；及(32) 5A、5C、5E、5K及5L，其中2A為丙酮酸氧化酶(形成乙酸)，其中2B為乙醯CoA合成酶、乙醯CoA連接酶或乙醯CoA轉移酶，其中2C為乙酸激酶，其中2D為磷酸轉乙醯酶，其中2E為丙酮酸脫羧酶，其中2F為乙醛脫氫酶，其中2G為丙酮酸氧化酶(形成乙醯磷酸)，其中2H為丙酮酸脫氫酶、丙酮酸:鐵氧化還原蛋白氧化還原酶、丙酮酸:NAD(P)H氧化還原酶或丙酮酸甲酸裂解酶，其中2I為乙醛脫氫酶(醯化)，其中2J為蘇胺酸醛縮酶，其中3A為磷酸烯醇丙酮酸(PEP)羧化酶或PEP羧激酶，其中3B為草醯乙酸脫羧酶，其中3C為丙二酸半醛脫氫酶(乙醯化)，其中3D為乙醯CoA羧化酶或丙二醯CoA脫羧酶，其中3F為草醯乙酸脫氫酶或草醯乙酸氧化還原酶，其中3G為丙二酸半醛脫氫酶(醯化)，其中3H為丙酮酸羧化酶，其中3J為丙二酸半醛脫氫酶，其中3K為丙二醯CoA合成酶或丙二醯CoA轉移酶，其中3L為蘋果酸酶，其中3M為蘋果酸脫氫酶或蘋果酸氧化還原酶，其中3N為丙酮酸激酶或PEP磷酸酶，其中4A為檸檬酸合成酶，其中4B為檸檬酸轉運體，其中4C為檸檬酸/蘋果酸轉運體，其中4D為ATP檸檬酸裂解酶，其中4E為檸檬酸裂解酶，其中4F為乙醯CoA合成酶或乙醯CoA轉移酶，其中4H為細胞溶質蘋果酸脫氫酶，其中4I為蘋果酸轉運體，其中4J為粒線體蘋果酸脫氫酶，其中4K為乙酸激酶，其中4L為磷酸轉乙醯酶，其中5A為檸檬酸合成酶，其中5B為檸檬酸轉運體，其中5C為檸檬酸/草醯乙酸轉運體，其中5D為ATP檸檬酸裂解酶，其中5E為檸檬酸裂解酶，其中5F為乙醯CoA合成酶或乙醯CoA轉移酶，其中5G為草醯乙酸轉運

體，其中5K為乙酸激酶，並且其中5L為磷酸轉乙酰酶。

在一些態樣中，用於本發明之方法中的微生物體包括兩種、三種、四種、五種、六種、七種或八種各自編碼乙酰CoA路徑酶之外源核酸。在一些態樣中，用於本發明之方法中的微生物體包括編碼選自(1)-(32)之路徑中之至少一者的乙酰CoA路徑酶中之每一者之外源核酸。

適合之純化及/或用以測試脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產之分析可使用熟知方法來進行。對於待測試之各工程改造菌株，可使諸如三個重複培養物之適合複製物生長。舉例而言，可監測經工程改造之生產宿主中的產物及副產物形成。最終產物及中間物，及其他有機化合物可藉由諸如HPLC(高效液相層析)、GC-MS(氣相層析-質譜分析)及LC-MS(液相層析-質譜分析)或其他適合分析方法之方法使用此項技術中熟知之常規程序來分析。醱酵液中產物之釋放亦可用培養物上清液測試。副產物及殘餘葡萄糖可藉由HPLC使用例如關於葡萄糖及醇之折射率偵測器及關於有機酸之UV偵測器(Lin等人, *Biotechnol. Bioeng.* 90:775-779 (2005))或此項技術中熟知的其他適合分析及偵測方法來定量。外源DNA序列之個別酶或蛋白質活性亦可使用此項技術中熟知之方法來分析。

脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸可使用此項技術中熟知之多種方法與培養物中之其他組分分離。該等分離方法包括例如萃取程序以及包括連續液-液萃取、滲透蒸發、膜過濾、膜分離、逆滲透、電滲析、蒸餾、結晶、離心、萃取過濾、離子交換層析、尺寸排阻層析、吸附層析及超濾之方法。所有上述方法均為此項技術中所熟知。

可培養本文中所述之非天然存在之微生物體中之任一者以生產及/或分泌本發明之生物合成產物。舉例而言，可培養脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產者以便生物合成生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。因

此，在一些實施例中，本發明提供一種培養基，其具有本文中所述之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物。在一些態樣中，培養基亦可與本發明的生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物之非天然存在之微生物體分離。自培養基分離微生物體之方法為此項技術中所熟知。例示性方法包括過濾、絮凝、沈澱、離心、沈降及其類似方法。

爲了生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸，重組菌株在具有碳源及其他必需營養素之培養基中培養。有時需要且可能極需要維持醱酵槽中之缺氧條件以降低總體製程之成本。該等條件可例如藉由首先以氮氣噴射培養基，隨後以隔膜及螺旋蓋密封燒瓶來獲得。對於在缺氧下未觀測到生長之菌株，可藉由將隔膜刺出小孔以達成有限充氣來施加微有氧或實質上缺氧條件。例示性缺氧條件先前已描述且爲此項技術中所熟知。例示性有氧及缺氧條件描述於例如2007年8月10日申請之美國公開案2009/0047719號中。如本文中所揭示，醱酵可以分批、分批饋入或連續方式進行。必要時，醱酵亦可分兩個階段進行。第一階段可爲有氧的以允許高生長且因此允許高生產力，隨後爲高脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸產率之缺氧階段。

必要時，培養基之pH值可藉由添加如將培養基維持在所需pH值下所需之鹼(諸如NaOH或其他鹼)或酸而維持在所需pH值，尤其中性pH值，諸如約7之pH值下。生長速率可藉由使用分光光度計(600 nm)量測光學密度來測定，且葡萄糖攝取速率藉由隨時間監測碳源消耗來測定。

生長培養基可包括例如可向非天然存在之微生物供應碳源之任何碳水化合物源。該等來源包括例如：糖，諸如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、果糖、蔗糖及澱粉；或甘油，且應理解，可使用單獨作爲唯一碳源或與本文中所述或此項技術中已知之其他碳源組合的碳源。碳水化合物之其他來源包括例如可再生原料及生物質。

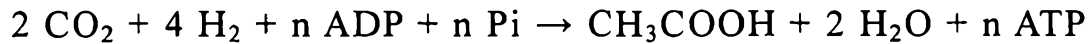
可用作本發明之方法中之原料的生物質之例示性類型包括纖維素生物質、半纖維素生物質及木質素原料或原料之部分。該等生物質原料含有例如適用作碳源之碳水化合物受質，諸如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、果糖及澱粉。考慮到本文中所提供之教示及指導，熟習此項技術者將理解，除上文例示者以外之可再生原料及生物質亦可用於培養本發明之微生物體以便生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。

除了諸如以上例示者之可再生原料之外，本發明之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸微生物體亦可經修飾以便在作為其碳源之合成氣上生長。在此特定實施例中，一或多種蛋白質或酶表現於生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生物體中以提供代謝路徑以便利用合成氣或其他氣體碳源。

合成氣體亦稱為合成氣或生產氣(producer gas)，為煤及含碳材料(諸如生物質材料，包括農作物及殘餘物)氣化之主要產物。合成氣為主要 H_2 與 CO 之混合物且可獲自任何有機原料之氣化，該有機原料包括(但不限於)煤、煤油、天然氣、生物質及有機廢物。一般在高燃料與氧氣比率下進行氣化。合成氣儘管主要包括 H_2 及 CO ，但亦可包括較少量 CO_2 及其他氣體。因此，合成氣體提供成本有效之氣體碳源，諸如 CO 及另外 CO_2 。

Wood-Ljungdahl路徑催化 CO 與 H_2 轉化為乙醯CoA及其他產物，諸如乙酸。能夠利用 CO 及合成氣之生物體一般亦具有經由Wood-Ljungdahl路徑所涵蓋之相同基本酶及轉型集合利用 CO_2 及 CO_2/H_2 混合物之能力。在揭示亦可由相同生物體使用 CO 且包括相同路徑之前，早已認識到藉由微生物使 CO_2 在 H_2 依賴性條件下轉化為乙酸。許多產乙酸菌(acetogen)已經展示在 CO_2 存在下生長且生產諸如乙酸之化合物，只要存在氫以供應必要還原相等物即可(參見例如 Drake,

Acetogenesis, 第3-60頁 Chapman and Hall, New York, (1994))。此可由以下方程式概括：



因此，具有 Wood-Ljungdahl 路徑之非天然存在之微生物亦可利用 CO_2 及 H_2 混合物以便生產乙醯CoA及其他所要產物。

Wood-Ljungdahl 路徑為此項技術中熟知且由可分離至兩個分支中之12個反應組成：(1) 甲基分支及(2) 羰基分支。甲基分支將合成氣轉化為甲基-四氫葉酸(甲基-THF)，而羰基分支將甲基-THF轉化為乙醯CoA。甲基分支中之反應依序由以下酶或蛋白質催化：鐵氧化還原蛋白氧化還原酶、甲酸脫氫酶、甲醯四氫葉酸合成酶、甲醯四氫葉酸環脫水酶、亞甲基四氫葉酸脫氫酶及亞甲基四氫葉酸還原酶。羰基分支中之反應依序由以下酶或蛋白質催化：甲基四氫葉酸：類咕啉蛋白甲基轉移酶(例如 AcsE)、類咕啉鐵硫蛋白、鎳蛋白裝配蛋白(例如 AcsF)、鐵氧化還原蛋白、乙醯CoA合成酶、一氧化碳脫氫酶及鎳蛋白裝配蛋白(例如CooC)。按照本文中所提供之教示及指導，為了引入足以產生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑之數目的編碼核酸，熟習此項技術者將理解，亦可相對於引入至少宿主生物體中不存在之編碼 Wood-Ljungdahl 酶或蛋白質之核酸來進行相同工程改造設計。因此，將一或多種編碼核酸引入本發明之微生物體中使得經修飾生物體含有完整 Wood-Ljungdahl 路徑，將賦予合成氣利用能力。

另外，還原性(逆向)三羧酸循環與一氧化碳脫氫酶及/或氫化酶活性耦合亦可用於將 CO 、 CO_2 及/或 H_2 轉化為乙醯CoA及其他產物，諸如乙酸。能夠經由還原性TCA路徑固定碳之生物體可利用一或多種以下酶：ATP檸檬酸裂解酶、檸檬酸裂解酶、烏頭酸酶、異檸檬酸脫氫酶、 α -酮戊二酸：鐵氧化還原蛋白氧化還原酶、琥珀醯CoA合成酶、琥珀醯CoA轉移酶、反丁烯二酸還原酶、反丁烯二酸酶(fumarase)、

蘋果酸脫氫酶、NAD(P)H:鐵氧化還原蛋白氧化還原酶、一氧化碳脫氫酶及氫化酶。特定言之，利用藉由一氧化碳脫氫酶及氫化酶自CO及/或H₂提取之還原相等物經由還原性TCA循環將CO₂固定為乙醯CoA或乙酸。乙酸可藉由諸如乙醯CoA轉移酶、乙酸激酶/磷酸轉乙醯酶及乙醯CoA合成酶之酶轉化為乙醯CoA。乙醯CoA可藉由丙酮酸:鐵氧化還原蛋白氧化還原酶及葡糖新生酶轉化為脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸前驅體、甘油醛-3-磷酸、磷酸烯醇丙酮酸及丙酮酸。按照本文中所提供之教示及指導，為了引入足以產生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑之數目的編碼核酸，熟習此項技術者將理解，亦可相對於引入至少宿主生物體中不存在之編碼還原性TCA路徑酶或蛋白質之核酸來進行相同工程改造設計。因此，將一或多種編碼核酸引入本發明之微生物體中使得經修飾生物體含有還原性TCA路徑，可賦予合成氣利用能力。

因此，考慮到本文中所提供之教示及指導，熟習此項技術者將理解，可生產當在諸如碳水化合物之碳源上生長時分泌本發明之生物合成化合物的非天然存在之微生物體。該等化合物包括例如脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸及脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中之中間代謝物中之任一者。唯一需要的為對一或多種所需酶或蛋白質活性進行工程改造以達成所要化合物或中間物(包括例如包括脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成路徑中之一些或所有者)之生物合成。因此，本發明提供一種非天然存在之微生物體，其當在碳水化合物或其他碳源上生長時生產及/或分泌脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸，且當在碳水化合物或其他碳源上生長時生產及/或分泌脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中所示之中間代謝物中之任一者。本發明的生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之微生物體可引發自中間物之合成，該中間物例如3-酮脂醯CoA、3-羥基醯基CoA、烯醯CoA、醯基CoA、醯基ACP、乙酸、乙醛、乙醯磷酸、草醯乙酸、蘋果酸、丙二酸半醛、丙二酸、丙二醯CoA、乙醯CoA或

檸檬酸。

如本文中所例示使用此項技術中熟知之方法構築本發明的非天然存在之微生物體，以外源性表現足以生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之量的至少一種編碼脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑酶或蛋白質之核酸。應理解，本發明之微生物體在足以生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之條件下培養。按照本文中所提供之教示及指導，本發明的非天然存在之微生物體可達成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生物合成，產生約0.1-200 mM之間或200 mM以上的細胞內濃度。一般而言，脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之細胞內濃度在約3-150 mM之間，尤其在約5-125 mM之間，且更尤其在約8-100 mM之間，包括約10 mM、20 mM、50 mM、80 mM或80 mM以上。在此等例示性範圍中之每一者之間及超出此等例示性範圍中之每一者的細胞內濃度亦可自本發明的非天然存在之微生物體達成。

在一些實施例中，培養條件包括缺氧或實質上缺氧生長或維持條件。例示性缺氧條件先前已描述且為此項技術中所熟知。用於醱酵製程中之例示性缺氧條件描述於本文中，且描述於例如2007年8月10日申請之美國公開案2009/0047719中。在非天然存在之微生物體之情況下可採用此等條件中之任一者以及此項技術中熟知之其他缺氧條件。在該等缺氧或實質上缺氧條件下，脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產者可以5-10 mM或10 mM以上之細胞內濃度以及本文中例示之所有其他濃度合成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。應理解，即使以上描述係指細胞內濃度，生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之微生物體亦可在細胞內生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸及/或將產物分泌至培養基中。

例示性醱酵製程包括(但不限於)分批饋入醱酵及分批分離；分批饋入醱酵及連續分離；及連續醱酵及連續分離。在例示性分批醱酵方案中，生產生物體在以適當氣體噴射的具有適合尺寸之生物反應器中

生長。在缺氧條件下，培養物以惰性氣體或氣體之組合(例如氮氣、 N_2/CO_2 混合物、氫氣、氦氣及其類似氣體)噴射。隨著細胞生長及利用碳源，額外的碳源及/或其他營養素以大致平衡碳源及/或營養素之消耗的速率饋入生物反應器中。生物反應器之溫度維持於所要溫度下，一般在22-37°C範圍內，但溫度可視生產生物體之生長特徵及/或醱酵製程之所要條件而維持於更高或更低溫度下。生長持續所要時間段以在醱酵槽中達成培養物之所要特徵，例如細胞密度、產物濃度及其類似特徵。在分批醱酵製程中，醱酵之時間段視所要培養條件而一般在數小時至數天範圍內，例如8至24小時，或1、2、3、4或5天或長達一週。可視需要控制或不控制pH值，在該情況下，其中不控制pH值之培養物在操作結束時典型地將降低至pH 3-6。在培養期完成時，可使醱酵槽內容物通過細胞分離單元(例如離心機、過濾單元及其類似單元)以移除細胞及細胞碎片。在所要產物在細胞內表現之情況下，可視需要在自醱酵液分離細胞之前或之後以酶促方式或以化學方式溶解或破壞細胞，以便釋放額外的產物。可將醱酵液轉移至產物分離單元。產物之分離藉由此項技術中所用之標準分離程序進行以自稀水溶液分離所要產物。該等方法視醱酵製程之產物的化學特徵而包括(但不限於)適當時使用水不可混溶有機溶劑(例如甲苯或其他適合溶劑，包括(但不限於)乙醚、乙酸乙酯、四氫呋喃(THF)、二氯甲烷、氯仿、苯、戊烷、己烷、庚烷、石油醚、甲基第三丁基醚(MTBE)、二噁烷、二甲基甲醯胺(DMF)、二甲亞砜(DMSO)及其類似溶劑)進行液-液萃取以提供產物之有機溶液；標準蒸餾方法；及其類似方法。

在例示性完全連續醱酵方案中，生產生物體一般首先以分批模式生長以便達成所要細胞密度。當碳源及/或其他營養素耗盡時，以所要速率連續地供應具有相同組成之饋入培養基，且以相同速率抽出醱酵液體。在該等條件下，生物反應器中之產物濃度以及細胞密度一

般保持恆定。如上文所論述，醱酵槽之溫度維持於所要溫度下。在連續醱酵階段期間，一般需要維持適合pH值範圍以達成最佳化生產。pH值可使用常規方法監測並維持，該等方法包括添加適合酸或鹼以維持所要pH值範圍。生物反應器適當且必要時連續地操作延長之時間段，一般至少一週至數週且長達一個月或一個月以上。醱酵液體及/或培養物視需要定期進行監測，包括多至每天取樣，以確保產物濃度及/或細胞密度之一致性。在連續模式中，隨著新的饋入培養基的供應，連續移除醱酵槽內容物。一般對含有細胞、培養基及產物之排出流進行連續產物分離程序，視需要移除或不移除細胞及細胞碎片。此項技術中所用之連續分離方法可用以自稀水溶液分離產物，包括(但不限於)使用水不可混溶有機溶劑(例如甲苯或其他適合溶劑，包括(但不限於)乙醚、乙酸乙酯、四氫呋喃(THF)、二氯甲烷、氯仿、苯、戊烷、己烷、庚烷、石油醚、甲基第三丁基醚(MTBE)、二噁烷、二甲基甲醯胺(DMF)、二甲亞砜(DMSO)及其類似溶劑)進行之連續液-液萃取；標準連續蒸餾方法；及其類似方法；或此項技術中熟知之其他方法。

除了本文中所揭示之培養及醱酵條件之外，達成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成之生長條件可包括添加滲透保護劑至培養條件。在某些實施例中，本發明的非天然存在之微生物體可如本文中所述在滲透保護劑存在下維持、培養或醱酵。簡言之，滲透保護劑係指充當滲透劑(osmolyte)且有助於如本文中所述之微生物體經受住滲透應力之化合物。滲透保護劑包括(但不限於)甜菜鹼、胺基酸及糖海藻糖。該等滲透保護劑之非限制性實例為甘胺酸甜菜鹼、堅果糖甜菜鹼、二甲基噻亭(dimethylthetin)、二甲基二氫硫基丙酸酯、3-二甲基二氫硫基-2-甲基丙酸酯、哌啶甲酸(pipecolic acid)、二甲基二氫硫基乙酸酯、膽鹼、L-肉鹼及艾克托因(ectoine)。在一個態樣中，滲透保護劑

為甘胺酸甜菜鹼。一般技術者應理解，適用於保護本文中所述之微生物體不受滲透應力影響之滲透保護劑的量及類型將視所用微生物體而定。培養條件中滲透保護劑之量可為例如不超過約0.1 mM、不超過約0.5 mM、不超過約1.0 mM、不超過約1.5 mM、不超過約2.0 mM、不超過約2.5 mM、不超過約3.0 mM、不超過約5.0 mM、不超過約7.0 mM、不超過約10 mM、不超過約50 mM、不超過約100 mM或不超過約500 mM。

在一些實施例中，可選擇碳原料及其他細胞攝取源(諸如磷酸、氫、硫酸、氯及其他鹵素)以改變脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或任何脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物中所存在之原子的同位素分佈。上文列舉之各種碳原料及其他攝取源在本文中將統稱為「攝取源」。攝取源可向產物脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物中所存在之任何原子或偏離脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑之反應中產生之副產物提供同位素增濃。同位素增濃可對任何目標原子達成，包括例如碳、氫、氧、氮、硫、磷、氯或其他鹵素。

在一些實施例中，可選擇攝取源以改變碳-12、碳-13及碳-14比率。在一些實施例中，可選擇攝取源以改變氧-16、氧-17及氧-18比率。在一些實施例中，可選擇攝取源以改變氫、氘及氚比率。在一些實施例中，可選擇攝取源以改變氮-14及氮-15比率。在一些實施例中，可選擇攝取源以改變硫-32、硫-33、硫-34及硫-35比率。在一些實施例中，可選擇攝取源以改變磷-31、磷-32及磷-33比率。在一些實施例中，可選擇攝取源以改變氯-35、氯-36及氯-37比率。

在一些實施例中，目標原子之同位素比率可藉由選擇一或多種攝取源改變為所要比率。攝取源可源自天然源(如自然界中所見)或人造源，且熟習此項技術者可選擇天然源、人造源或其組合以達成目標原子之所要同位素比率。人造攝取源之實例包括例如至少部分源自化

學合成反應之攝取源。該等同位素增濃攝取源可在商業上購買或在實驗室中製備及/或視情況與攝取源之天然源混合以達成所要同位素比率。在一些實施例中，攝取源之目標原子同位素比率可藉由選擇如自然界中所見之攝取源的所要起源而獲得。舉例而言，如本文中所論述，天然源可為生物性的，源自生物體或諸如石油基產物或大氣之來源或由生物體或諸如石油基產物或大氣之來源合成。在一些此類實施例中，碳源例如可選自化石燃料衍生之碳源，其可相對耗乏碳-14；或環境或大氣碳源，諸如CO₂，其碳-14含量可大於其石油衍生之對應物。

在地球大氣中，10¹²個碳原子中約有1個碳原子由不穩定碳同位素碳-14或放射性碳構成，且該不穩定碳同位素碳-14或放射性碳之半衰期為約5700年。碳儲備在上層大氣中由涉及宇宙射線及普通氮(¹⁴N)之核反應補充。化石燃料不含有碳-14，因為碳-14早已衰變。化石燃料燃燒降低大氣碳-14分率，即所謂「休斯效應(Suess effect)」。

測定化合物中原子之同位素比率的方法為熟習此項技術者所熟知。同位素增濃容易藉由質譜分析使用此項技術中已知之技術評估，該等技術諸如加速質譜分析(AMS)、穩定同位素比率質譜分析(SIRMS)及位點特異性天然同位素分餾核磁共振(SNIF-NMR)。該等質譜技術可與分離技術整合，該等分離技術諸如液相層析(LC)、高效液相層析(HPLC)及/或氣相層析及其類似技術。

在碳之情況下，在美國已由國際性美國測試與材料協會(ASTM)開發出ASTM D6866作為使用放射性碳定年法來測定固體、液體及氣體樣品之生物性含量的標準化分析方法。該標準係基於使用放射性碳定年法來測定產物的生物性含量。ASTM D6866最先在2004年公開，且該標準之現行版本為ASTM D6866-11 (2011年4月1日施行)。放射性碳定年技術為熟習此項技術者所熟知，包括本文中所述之技術。

化合物之生物性含量由碳-14 (^{14}C)與碳-12 (^{12}C)之比率估算。特定言之，由以下表達式計算現代分率(Fm)： $Fm = (S-B)/(M-B)$ ，其中B、S及M分別代表空白、樣品及現代參考物之 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比率。現代分率為樣品之 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比率與「現代值」之偏差的量度。現代值係定義為國家標準局(NBS)草酸I(亦即標準參考物質(SRM) 4990b)之針對 $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}=-19$ /密耳正規化之放射性碳濃度(AD 1950)的95% (Olsson, *The use of Oxalic acid as a Standard. Radiocarbon Variations and Absolute Chronology*, 諾貝爾研討會(Nobel Symposium), 第12屆會刊, John Wiley & Sons, New York (1970))。使用國際上認可之定義： $0.95 \times \text{NBS草酸I (SRM 4990b)}$ 的比活性(針對 $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}}=-19$ /密耳正規化)計算例如由ASM量測之質譜分析結果。此等於 $1.176 \pm 0.010 \times 10^{-12}$ 之絕對(AD 1950) $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比率(Karlen等人, *Arkiv Geofysik*, 4:465-471 (1968))。標準計算考慮了一種同位素相對於另一同位素之差異攝取，例如生物系統中之吸收優先級為 C^{12} 優於 C^{13} 優於 C^{14} ，且此等校正反映為針對 δ^{13} 校正之Fm。

草酸標準物(SRM 4990b或HOx 1)由1955甜菜作物製成。儘管製造了1000磅，但此草酸標準物不再可在市面上購得。草酸II標準物(HOx 2；N.I.S.T名稱SRM 4990 C)由1977法國甜菜糖蜜作物製成。在1980年代早期，由12個實驗室組成之團體量測了兩種標準物之比率。草酸II與草酸I之活性比為 1.2933 ± 0.001 (加權平均值)。HOx II之同位素比率為 -17.8 /密耳。ASTM D6866-11提出將可獲得之草酸II標準物SRM 4990 C (Hox2)用於現代標準(參見Mann, *Radiocarbon*, 25(2):519-527 (1983)中原有草酸標準物對比當前可得草酸標準物之論述)。Fm = 0%表示在材料中完全不含碳-14原子，因此表明為化石(例如石油基)碳源。Fm = 100%(在針對1950年由核彈試驗向大氣中注入碳-14後進行校正之後)指示完全為現代碳源。如本文中所述，該種「現代」源

包括生物性源。

如ASTM D6866中所述，由於1950年代核試驗項目持續但逐漸減少之影響(其引起大氣中碳-14顯著增濃，如ASTM D6866-11中所述)，現代碳百分比(pMC)可大於100%。因為所有樣品碳-14活性均參考「爆炸前(pre-bomb)」標準，且因為幾乎所有新的生物性產物均係在爆炸後環境中產生，因此所有pMC值(在針對同位素分率校正之後)均必須乘以0.95(自2010年起)以更好地反映樣品之真實生物性含量。生物性含量大於103%表明存在分析誤差，抑或生物性碳源超過若干年。

ASTM D6866相對於物質之總有機物含量對生物性含量進行定量，且不考慮存在之無機碳及其他不含碳物質。舉例而言，基於ASTM D6866，含有50%澱粉基物質及50%水的產物將被視為具有=100%的生物性含量(50%有機物含量，其為100%生物性的)。在另一實例中，含有50%澱粉基物質、25%石油基及25%水的產物將具有=66.7%的生物性含量(75%有機物含量，但僅50%產物為生物性的)。在另一實例中，含有50%有機碳且為石油基產物的產物將被視為具有=0%的生物性含量(50%有機碳但來自化石源)。因此，基於測定化合物或物質的生物性含量之熟知方法及已知標準，熟習此項技術者可容易地測定生物性含量及/或製備具有所要生物性含量的本發明利用之下游產物。

此項技術中已知應用碳-14定年技術來定量物質的生物性含量(Currie等人, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B*, 172:281-287 (2000))。舉例而言，已使用碳-14定年法來定量含對苯二甲酸之物質的生物性含量(Colonna等人, *Green Chemistry*, 13:2543-2548 (2011))。值得注意地，源自可再生1,3-丙二醇及石油衍生之對苯二甲酸的聚對苯二甲酸伸丙酯(PPT)聚合物產生接近30%之Fm值(亦即

因爲3/11聚合碳源自可再生1,3-丙二醇且8/11聚合碳源自化石末端成員對苯二甲酸)(Currie等人, 前述, 2000)。相比之下, 源自可再生1,4-丁二醇及可再生對苯二甲酸之聚對苯二甲酸伸丁酯聚合物產生超過90%的生物性含量(Colonna等人, 前述, 2011)。

因此, 在一些實施例中, 本發明提供脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物, 其具有反映大氣碳(亦稱爲環境碳)攝取源之碳-12、碳-13及碳-14比率。舉例而言, 在一些態樣中, 脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物可具有至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、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%或多至100%之Fm值。在一些此類實施例中, 攝取源爲CO₂。在一些實施例中, 本發明提供脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物, 其具有反映石油基碳攝取源的碳-12、碳-13及碳-14比率。在此態樣中, 脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物可具有小於95%、小於90%、小於85%、小於80%、小於75%、小於70%、小於65%、小於60%、小於55%、小於50%、小於45%、小於40%、小於35%、小於30%、小於25%、小於20%、小於15%、小於10%、小於5%、小於2%或小於1%之Fm值。在一些實施例中, 本發明提供脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物, 其具有由大氣碳攝取源與石油基攝取源的組合獲得之碳-12、碳-13及碳-14比率。使用該種攝取源組合爲可用以改變碳-12、碳-13及碳-14比率之一種方法, 且各別比率將反映攝取源之比例。

此外, 本發明係關於如本文中所揭示的以生物方式生產之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物, 且關於

由其衍生之產物，其中脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物具有與環境中存在之CO₂大致相同之值的碳-12、碳-13及碳-14同位素比率。舉例而言，在一些態樣中，本發明提供生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸中間物，其具有與環境中存在之CO₂大致相同之值或本文中所揭示之任何其他比率的碳-12與碳-13與碳-14同位素比率。應理解，如本文中所揭示，產物可具有與環境中存在之CO₂大致相同之值或本文中所揭示之任何比率的碳-12與碳-13與碳-14同位素比率，其中產物由如本文中所揭示的生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物產生，其中生物衍生之產物經化學修飾以產生最終產物。如本文所述，化學修飾脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生物衍生之產物或其中間物以產生所要產物之方法為熟習此項技術者所熟知。本發明進一步提供生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑油添加劑、芳香劑、調味物質或丙烯酸酯，其具有與環境中存在之CO₂大致相同之值的碳-12與碳-13與碳-14同位素比率，其中生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑油添加劑、芳香劑、調味物質或丙烯酸酯直接由如本文中所揭示的生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物產生或與其組合。

脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸為用於商業及工業應用中之化學品。該等應用之非限制性實例包括生產生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑油添加劑、芳香劑、調味物質及丙烯酸酯。因此，在一些實施例中，本發明提供生物性生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑油添加劑、芳香劑、調味物質及丙烯酸酯，其包含由本發明的非天然存在之微生物生產或使用本文中所揭示之方法生產的一或多種生物衍生之脂肪

醇、脂肪醛或脂肪酸或生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物。

如本文中所示，術語「生物衍生」意謂源自生物體或由生物體合成，且因為其可由生物體產生而可被視為可再生資源。該種生物體，尤其本文中所揭示的本發明之微生物體可利用由農業、植物、細菌或動物來源獲得之原料或生物質，諸如糖或碳水化合物。或者，生物體可利用大氣碳。如本文中所示，術語「生物性」意謂完全或部分地由本發明之生物衍生之化合物構成的如上文所述之產物。生物性或生物衍生之產物與石油衍生之產物形成對比，在石油衍生之產物中該種產物源自石油或石油化學原料或由其合成。

在一些實施例中，本發明提供一種生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑油添加劑、芳香劑、調味物質或丙烯酸酯，其包含生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物，其中生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物包括用於生產以下的所有或部分脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物：生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑油添加劑、芳香劑、調味物質或丙烯酸酯。舉例而言，最終生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑油添加劑、芳香劑、調味物質或丙烯酸酯可含有製造生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑油添加劑、芳香劑、調味物質或丙烯酸酯時所得到的生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸、脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物或其部分。該製造可包括使生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物在生產最終生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑

油添加劑、芳香劑、調味物質或丙烯酸酯的反應中與自身或另一化合物發生化學反應(例如化學轉化、化學官能化、化學偶合、氧化、還原、聚合、共聚合及其類似反應)。因此，在一些態樣中，本發明提供一種生物性生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑油添加劑、芳香劑、調味物質或丙烯酸酯，其包含至少2%、至少3%、至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或100%如本文中所示的生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物。在一些態樣中，當產物為包括本文中所述的生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物或由其獲得之生物性聚合物時，生物性聚合物可使用此項技術中熟知之方法來模製。因此，在一些實施例中，本文中提供一種包含本文中所述之生物性聚合物的模製產物。

另外，在一些實施例中，本發明提供一種組合物，其具有本文中所示的生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物；及除生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物以外的化合物。舉例而言，在一些態樣中，本發明提供一種生物性生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑油添加劑、芳香劑、調味物質或丙烯酸酯，其中用於其生產之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物為生物衍生與石油衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物的組合。舉例而言，生物性生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑油添加劑、芳香劑、調味物質或丙烯酸酯可使用50%生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸及50%石油衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或

諸如 60%/40%、70%/30%、80%/20%、90%/10%、95%/5%、100%/0%、40%/60%、30%/70%、20%/80%、10%/90%之生物衍生/石油衍生之前驅體的其他所要比率生產，只要至少一部分產物包含由本文中所揭示之微生物體生產的生物衍生之產物即可。應理解，使用本發明的生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑中間物生產生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑油添加劑、芳香劑、調味物質或丙烯酸酯的方法為此項技術中所熟知。

本發明進一步提供一種組合物，其包含生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸；及除生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸以外的化合物。除生物衍生之產物以外的化合物可為本發明之具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體之細胞部分(例如痕量細胞部分)；或可為在本發明之具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體存在下生產的醱酵液或培養基或其純化或部分純化部分。當由如本文中所揭示的具有減少之副產物形成之生物體生產時，組合物可包含例如降低水準之副產物。組合物可包含例如本發明之微生物體的生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸，或細胞溶解物或培養物上清液。

在某些實施例中，本文中提供一種組合物，其包含本文中所提供的生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸；例如，藉由培養如本文中所提供之具有MI-FAE循環及/或MD-FAE循環以及終止路徑的非天然存在之微生物體生產的生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在一些實施例中，組合物進一步包含除該生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸以外的化合物。在某些實施例中，除該生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸以外的化合物為具有MI-FAE循環及/或MD-FAE循環以及終止路徑的非天然存在之微生物體之痕量細胞部分。

在一些實施例中，本文中提供一種生物性產物，其包含本文中所提供的生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在某些實施例中，生物性產物為生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑油添加劑、芳香劑、調味物質或丙烯酸酯。在某些實施例中，生物性產物包含至少5%生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在某些實施例中，生物性產物包含至少10%生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在一些實施例中，生物性產物包含至少20%生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在其他實施例中，生物性產物包含至少30%生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在一些實施例中，生物性產物包含至少40%生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在其他實施例中，生物性產物包含至少50%生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在一個實施例中，生物性產物包含該生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的一部分作為重複單元。在另一實施例中，本文中提供一種模製產物，其藉由模製本文中提供之生物性產物而獲得。在其他實施例中，本文中提供一種生產本文中所提供的生物性產物之方法，其包含使該生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸在生產該生物性產物之反應中與自身或另一化合物發生化學反應。在某些實施例中，本文中提供一種聚合物，其包含生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或藉由轉化生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸而獲得。在其他實施例中，本文中提供一種生產聚合物之方法，其包含將生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸化學酶促轉化為聚合物。在其他實施例中，本文中提供一種組合物，其包含生物衍生之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或其細胞溶解物或培養物上清液。

培養條件可包括例如液體培養程序以及醱酵及其他大規模培養程序。如本文中所述，本發明之生物合成產物的尤其適用產率可在缺氧或實質上缺氧培養條件下獲得。

如本文中所述，達成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生物合成的一種例示性生長條件包括缺氧培養或醱酵條件。在某些實施例中，本發明的非天然存在之微生物體可在缺氧或實質上缺氧條件下維持、培養或醱酵。簡言之，缺氧條件係指缺乏氧氣之環境。實質上缺氧條件包括例如培養、分批醱酵或連續醱酵，使得培養基中之溶解氧濃度保持在0與10%飽和度之間。實質上缺氧條件亦包括使細胞在液體培養基中或在固體瓊脂上在維持具有小於1%氧氣之氛圍的密封腔室內生長或靜止。氧氣百分比可藉由例如以 N_2/CO_2 混合物或其他適合非氧氣體噴射培養物來維持。

本文中所述之培養條件可連續按比例擴大及生長以便製造脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。例示性生長程序包括例如分批饋入醱酵及分批分離；分批饋入醱酵及連續分離，或連續醱酵及連續分離。所有此等製程均為此項技術中所熟知。醱酵程序尤其適用於生物合成生產商業量之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。一般而言且如同非連續培養程序一般，脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之連續及/或接近連續生產將包括在充足營養素及培養基中培養本發明的非天然存在之生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生物體以維持及/或接近維持處於指數期之生長。在該等條件下之連續培養可包括例如生長或培養1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或7天以上。另外，連續培養可包括1週、2週、3週、4週或5週或5週以上及長達數月之較長時間段。或者，本發明之生物體在適用於特定應用時可培養數小時。應理解，連續及/或接近連續培養條件亦可包括此等例示性時段之間的所有時間間隔。進一步應理解，培養本發明之微生物體的時間為持續足以生產充足量之產物達成所要目的的時間段。

醱酵程序為此項技術中所熟知。簡言之，用於生物合成生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之醱酵可以例如分批饋入醱酵及分批分離；分

批饋入醱酵及連續分離；或連續醱酵及連續分離形式利用。分批及連續醱酵程序之實例爲此項技術中所熟知。

除了使用本發明之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產者來連續生產大量脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的以上醱酵程序之外，必要時，脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產者亦可例如同時進行化學合成及/或酶促程序以將產物轉化爲其他化合物，或可將產物與醱酵培養物分離且隨後進行化學及/或酶促轉化以將產物轉化爲其他化合物。

爲產生更佳生產者，可利用代謝模型化以使生長條件最佳化。模型化亦可用以設計另外使路徑利用最佳化之基因剔除(參見例如美國專利公開案 US 2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US 2003/0059792、US 2002/0168654及US 2004/0009466，及美國專利第7,127,379號)。模型化分析允許可靠預測使代謝向脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之更有效生產偏移對細胞生長之影響。

除了以高產率、效價及生產力生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之活性及選擇性酶之外，可有效將碳及還原相等物定向至脂肪醇、脂肪醛及脂肪酸生物合成之穩固宿主生物體亦可爲有益的。本文中所述之宿主修飾尤其適用於與本文中所述之促成所要脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸產物形成之選擇性酶組合。本文中所述之若干宿主修飾需要將異源酶活性引入宿主生物體中。其他修飾涉及相對於野生型水準過度表現或提昇酶活性。其他修飾包括破壞內源基因或使內源酶活性衰減。

在本發明之一實施例中，微生物體有效將碳及能量源定向至生產乙醯CoA，該乙醯CoA用作MI-FAE循環中之引子及延伸單元。在本發明之一實施例中，微生物體有效將碳及能量源定向至生產丙二醯CoA，該丙二醯CoA用作MD-FAE循環中之引子及延伸單元。在未經修飾之微生物體中，細胞溶質中之脂肪醇、脂肪醛及脂肪酸生產依靠

天然細胞機構以提供必要前驅體。因此，需要高濃度之細胞溶質乙醯CoA及/或丙二醯CoA以便促進採用來源於乙醯CoA或丙二醯CoA之細胞溶質脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產路徑。本文中揭示用於增加細胞溶質乙醯CoA及丙二醯CoA之代謝工程改造策略。

因爲許多真核生物體在依賴葡萄糖生長期間在粒線體中合成其大部分乙醯CoA，所以增加細胞溶質中乙醯CoA之可得性可藉由引入細胞溶質乙醯CoA生物合成路徑而獲得。因此，本文中描述乙醯CoA生物合成路徑。在一個實施例中，利用圖2中所示之路徑，乙醯CoA可在細胞溶質中自丙酮酸或蘇胺酸前驅體合成。在其他實施例中，乙醯CoA可在細胞溶質中自磷酸烯醇丙酮酸(PEP)或丙酮酸(圖3)合成。在另一實施例中，乙醯CoA可在細胞區室中合成且轉運至細胞溶質。舉例而言，一種機制涉及將粒線體乙醯CoA轉化爲代謝中間物(諸如檸檬酸或檸檬酸(citramalate))，將該等中間物轉運至細胞溶質，及隨後使乙醯CoA再生(參見圖4及5)。例示性乙醯CoA路徑及相應酶進一步描述於實例II-IV中。

在另一實施例中，增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成之細胞溶質乙醯CoA可得性在於破壞利用乙醯CoA或其前驅體之競爭酶及路徑或使其衰減。例示性競爭酶活性包括(但不限於)丙酮酸脫羧酶、乳酸脫氫酶、短鏈醛及醇脫氫酶、乙酸激酶、磷酸轉乙醯酶、甘油醛-3-磷酸脫氫酶、丙酮酸氧化酶及乙醯CoA羧化酶。破壞或衰減可改良脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產之例示性乙醯CoA消耗路徑包括粒線體TCA循環、脂肪酸生物合成、乙醇生產及胺基酸生物合成。本文中進一步描述此等酶及路徑。

用於增加細胞溶質乙醯CoA生產之另一策略爲增加細胞質中可得到之CoA池。此可藉由在細胞溶質中過度表現CoA生物合成酶來實現。特定言之，可使用泛酸激酶(EC 2.7.1.33)之表現。此酶催化第一

步驟及輔酶A生物合成之限速酶。對CoA之反饋抑制具有抵抗性之例示性泛酸激酶變異體爲此項技術中所熟知(Rock等人, *J Bacteriol* 185: 3410-5 (2003))，且描述於下表中。

蛋白質	寄存編號	GI編號	生物體
coaA	AAC76952	1790409	大腸桿菌
CAB1	NP_010820.3	398366683	釀酒酵母
KLLA0C00869g	XP_452233.1	50304555	乳酸克魯維酵母
YALI0D25476g	XP_503275.1	50551601	解脂耶氏酵母
ANI_1_3272024	XP_001400486.2	317028058	黑麴菌

亦可使自本發明之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產轉移醯基CoA受質的競爭酶及路徑衰減或受到破壞。用於衰減之例示性酶包括MI-FAE循環、MD-FAE循環或終止路徑酶之醯基轉移酶、肉鹼穿梭酶及負調節因子。

將醯基部分自CoA轉移至其他受體(諸如ACP、甘油、乙醇及其他受體)之醯基轉移酶的破壞或衰減可增加用於脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產之醯基CoA的可得性。舉例而言，醯基CoA:ACP轉醯酶(EC 2.3.1.38；2.3.1.39)酶(諸如大腸桿菌之*fabH* (KASIII))將醯基部分自CoA轉移至ACP。FabH對乙醯CoA及丁醯CoA具有活性(Prescott等人, *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol*, 36:269-311 (1972))。惡性瘧原蟲及阿維鏈黴菌之乙醯CoA:ACP轉醯酶已經異源表現於大腸桿菌中(Lobo等人, *Biochem* 40:11955-64 (2001))。表現於*fabH*缺乏乳酸乳球菌宿主中的惡性瘧原蟲之合成KASIII (FabH)能夠補充天然*fabH*活性(Du等人, *AEM* 76:3959-66 (2010))。菠菜(*Spinacia oleracea*)之乙醯CoA:ACP轉醯酶接受其他醯基ACP分子作爲受質，包括丁醯ACP (Shimakata等人, *Methods Enzym* 122:53-9 (1986))。丙二醯CoA:ACP轉醯酶包括大腸桿菌及甘藍型油菜之FabD (Verwoert等人, *J Bacteriol*, 174:2851-7 (1992)；Simon等人, *FEBS Lett* 435:204-6 (1998))。甘藍型油菜之FabD能夠補充*fabD*缺乏大腸桿菌。多功能真核脂肪酸合成酶複合物

(本文中所述)亦催化此活性。其他例示性醯基轉移酶包括二醯甘油醯基轉移酶，諸如釀酒酵母之LRO1及DGA1及解脂耶氏酵母之DGA1及DGA2；甘油脂質醯基轉移酶，諸如大腸桿菌之*plsB* (GenBank: AAC77011.2, GI:87082362; Heath及Rock, *J Bacteriol* 180:1425-30 (1998)); 固醇醯基轉移酶，諸如釀酒酵母之ARE1及ARE2；乙醇醯基轉移酶(EEB1、EHT1)；推定醯基轉移酶(YMR210W)；及其他醯基轉移酶。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
fabH	AAC74175.1	1787333	大腸桿菌
fadA	NP_824032.1	29829398	阿維鏈黴菌
fabH	AAC63960.1	3746429	惡性瘧原蟲
合成構築體	ACX34097.1	260178848	惡性瘧原蟲
fabH	CAL98359.1	124493385	乳酸乳球菌
fabD	AAC74176.1	1787334	大腸桿菌
fabD	CAB45522.1	5139348	甘藍型油菜
LRO1	NP_014405.1	6324335	釀酒酵母
DGA1	NP_014888.1	6324819	釀酒酵母
DGA1	CAG79269.1	49649549	解脂耶氏酵母
DGA2	XP_504700.1	50554583	解脂耶氏酵母
ARE1	NP_009978.1	6319896	釀酒酵母
ARE2	NP_014416.1	6324346	釀酒酵母
EEB1	NP_015230.1	6325162	釀酒酵母
EHT1	NP_009736.3	398365307	釀酒酵母
YMR210W	NP_013937.1	6323866	釀酒酵母
ALE1	NP_014818.1	6324749	釀酒酵母

脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產增加可使參與將乙醯CoA及醯基CoA分子自生物體之細胞溶質運送至其他區室(諸如粒線體、內質網、蛋白磷脂體及過氧化體)之酶的破壞或衰減成爲必要。在此等區室中，醯基CoA中間物可降解或用作構築嵌段以合成脂肪酸、輔因子及其他副產物。

定位於細胞溶質中之乙醯CoA及醯基CoA分子可藉助於載體分子肉鹼經由肉鹼穿梭而轉運至其他細胞區室中(van Roermund等人, *EMBO J* 14:3480-86 (1995))。細胞區室之間的醯肉鹼穿梭已於酵母(諸

如白假絲酵母)中表徵 (Strijbis 等人, *J Biol Chem* 285:24335-46 (2010))。在此等穿梭中, 醯基CoA之醯基部分藉由醯肉鹼轉移酶可逆地轉移至肉鹼。乙醯肉鹼可隨後藉由細胞器特異性醯肉鹼/肉鹼移位酶而轉運穿過膜。在移位之後, 醯基CoA藉由乙醯肉鹼轉移酶再生。適用於破壞或衰減之酶包括肉鹼醯基轉移酶、醯肉鹼移位酶、醯肉鹼載體蛋白及參與肉鹼生物合成之酶。

肉鹼轉乙醯酶(CAT, EC 2.3.1.7)將乙醯單元自乙醯CoA可逆地連接於載體分子肉鹼。白假絲酵母編碼三種CAT同功酶: *Cat2*、*Yat1*及 *Yat2* (Strijbis 等人, *J Biol Chem* 285:24335-46 (2010))。Cat2表現於粒線體及過氧化體中, 而Yat1及Yat2表現於細胞溶質中。Cat2轉錄物含有兩種在不同碳源條件下調節之起始密碼子。較長轉錄物含有粒線體靶向序列, 而較短轉錄物靶向過氧化體。釀酒酵母之Cat2及小巢狀麴菌之AcuJ採用相似雙定位機制 (Elgersma 等人, *EMBO J* 14:3472-9 (1995); Hynes 等人, *Euk Cell* 10:547-55 (2011))。小巢狀麴菌之細胞溶質CAT由*facC*編碼。其他例示性CAT酶見於褐家鼠及智人中 (Cordente 等人, *Biochem* 45:6133-41 (2006))。例示性肉鹼醯基轉移酶 (EC 2.3.1.21)為褐家鼠之Cpt1及Cpt2基因產物 (de Vries 等人, *Biochem* 36:5285-92 (1997))。

蛋白質	寄存編號	GI編號	生物體
Cat2	AAN31660.1	23394954	白假絲酵母
Yat1	AAN31659.1	23394952	白假絲酵母
Yat2	XP_711005.1	68490355	白假絲酵母
Cat2	CAA88327.1	683665	釀酒酵母
Yat1	AAC09495.1	456138	釀酒酵母
Yat2	NP_010941.1	6320862	釀酒酵母
AcuJ	CBF69795.1	259479509	小巢狀麴菌
FacC	AAC82487.1	2511761	小巢狀麴菌
Crat	AAH83616.1	53733439	褐家鼠
Crat	P43155.5	215274265	智人
Cpt1	AAB48046.1	1850590	褐家鼠
Cpt2	AAB02339.1	1374784	褐家鼠

肉鹼-醯肉鹼移位酶可催化肉鹼及肉鹼-脂肪酸複合物之雙向轉運。Cact基因產物提供一種用於轉運醯基肉鹼受質穿過粒線體膜之機制(Ramsay等人 *Biochim Biophys Acta* 1546:21-42 (2001))。已在人類中研究相似蛋白質(Sekoguchi等人, *J Biol Chem* 278:38796-38802 (2003))。釀酒酵母粒線體肉鹼載體為Crc1 (van Roermund等人, 前述; Palmieri等人, *Biochimica et Biophys Acta* 1757:1249-62 (2006))。人類肉鹼移位酶能夠補充釀酒酵母之Crc1缺乏菌株(van Roermund等人, 前述)。兩種見於黑腹果蠅及秀麗隱桿線蟲中之其他肉鹼移位酶亦能夠補充Crc1缺乏酵母(Oey等人, *Mol Genet Metab* 85:121-24 (2005))。四種粒線體肉鹼/乙醯肉鹼載體於布氏錐蟲中基於與酵母及人類轉運體之序列同源性鑑別(Colasante等人, *Mol Biochem Parasit* 167:104-117 (2009))。白假絲酵母之肉鹼轉運體亦藉由序列同源性鑑別。另一粒線體肉鹼轉運體為小巢狀麴菌之acuH基因產物, 其專有地定位至粒線體膜(Lucas等人, *FEMS Microbiol Lett* 201:193-8 (2006))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
Cact	P97521.1	2497984	褐家鼠
Cacl	NP_001034444.1	86198310	智人
CaO19.2851	XP_715782.1	68480576	白假絲酵母
Crc1	NP_014743.1	6324674	釀酒酵母
Dif-1	CAA88283.1	829102	秀麗隱桿線蟲
colt	CAA73099.1	1944534	黑腹果蠅
Tb11.02.2960	EAN79492.1	70833990	布氏錐蟲
Tb11.03.0870	EAN79007.1	70833505	布氏錐蟲
Tb11.01.5040	EAN80288.1	70834786	布氏錐蟲
Tb927.8.5810	AAX69329.1	62175181	布氏錐蟲
acuH	CAB44434.1	5019305	小巢狀麴菌

肉鹼及醯肉鹼穿過過氧化體膜之轉運尚未充分表徵。酵母中之特異性過氧化體醯肉鹼載體蛋白迄今尚未鑑別。然而, 粒線體肉鹼移位酶亦可在肉鹼及乙醯肉鹼之過氧化體轉運中起作用。實驗證據表明, 小家鼠之OCTN3蛋白為過氧化體肉鹼/醯肉鹼移位酶。

另一可能為醯基CoA或醯基肉鹼藉由醯基CoA轉運體(諸如釀酒酵母之Pxa1及Pxa2 ABC轉運體或智人之ALDP ABC轉運體)轉運穿過過氧化體或粒線體膜(van Roermund等人, *FASEB J* 22:4201-8 (2008))。Pxa1及Pxa2 (Pat1及Pat2)在過氧化體膜中形成雜二聚複合物, 且催化脂肪醯基CoA酯ATP依賴性轉運至過氧化體(Verleur等人, *Eur J Biochem* 249: 657-61 (1997))。pxa1/pxa2缺乏酵母之突變表型可由ALDP之異源表現拯救, 該ALDP展示轉運一系列醯基CoA受質(van Roermund等人, *FASEB J* 22:4201-8 (2008))。Pxa12轉運系統之缺失與過氧化體脂肪醯輔酶A合成酶(Faa2)之缺失聯合消除釀酒酵母中之過氧化體 β -氧化。減少路徑中間物或產物向過氧化體轉運之另一策略為藉由干擾參與過氧化體生物發生之系統使過氧化體功能衰減或消除。例示性目標為解脂耶氏酵母及同源物之Pex10。

蛋白質	寄存編號	GI編號	生物體
OCTN3	BAA78343.1	4996131	小家鼠
Pxa1	AAC49009.1	619668	釀酒酵母
Pxa2	AAB51597.1	1931633	釀酒酵母
Faa2	NP_010931.3	398364331	釀酒酵母
ALDP	NP_000024.2	7262393	智人
Pex10	BAA99413.1	9049374	解脂耶氏酵母

肉鹼生物合成路徑酶亦為用於破壞或衰減之適合候選者。在白假絲酵母中, 例如, 肉鹼在四個酶促步驟中自三甲基-L-離胺酸合成(Strijbis等人, *FASEB J* 23:2349-59 (2009))。肉鹼路徑前驅體三甲基離胺酸(TML)在蛋白質降解期間生產。TML雙加氧酶(CaO13.4316)使TML羥基化以形成3-羥基-6-N-三甲基離胺酸。5'-磷酸吡哆醛依賴性醛縮酶(CaO19.6305)隨後使HTML分裂為4-三甲胺基丁醛。4-三甲胺基丁醛隨後由脫氫酶(CaO19.6306)氧化為4-三甲胺基丁酸酯。在最終步驟中, 4-三甲胺基丁酸酯藉由CaO19.7131之基因產物經羥基化以形成肉鹼。藉由路徑受質之可得性限制通過肉鹼生物合成路徑之通量,

且極低水準之肉鹼似乎足以滿足正常肉鹼穿梭活性 (Strejbis 等人, *IUBMB Life* 62:357-62 (2010))。

蛋白質	寄存編號	GI編號	生物體
CaO19.4316	XP_720623.1	68470755	白假絲酵母
CaO19.6305	XP_711090.1	68490151	白假絲酵母
CaO19.6306	XP_711091.1	68490153	白假絲酵母
CaO19.7131	XP_715182.1	68481628	白假絲酵母

可藉由去除競爭路徑或使其衰減來改良朝向脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產之碳通量。酵母之典型醱酵產物包括乙醇、甘油及CO₂。可藉由本文中所述之方法來實現此等副產物之消除或減少。舉例而言，可減少因呼吸所致之碳損失。其他潛在副產物包括乳酸、乙酸、甲酸、脂肪酸及胺基酸。

乙醯CoA向乙醇之轉化可能不利於脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產，此係因為轉化過程會使碳及還原相等物自MI-FAE循環、MD-FAE循環及終止路徑離開。乙醇可在兩個由丙酮酸脫羧酶及乙醇脫氫酶催化之酶促步驟中由丙酮酸形成。釀酒酵母具有三種丙酮酸脫羧酶 (PDC1、PDC5及PDC6)。PDC1為主要同功酶，且強烈表現於活性醱酵細胞中。PDC5亦在糖分解醱酵期間起作用，但僅在不存在PDC1之情況下或在硫胺素限制條件下表現。PDC6在於不可醱酵碳源上生長期間起作用。去除PDC1及PDC5可顯著減少乙醇生產；然而此等缺失可能會產生具有增加之PDC6表現的突變體。所有三者之缺失完全消除乙醇形成，但亦可能會由於細胞不能形成充足乙醯CoA用於生物質形成而導致生長缺陷。然而，此可能藉由使細胞在減少量之C2碳源 (乙醇或乙酸)存在下進化而克服 (van Maris 等人, *AEM* 69:2094-9 (2003))。亦已報導，丙酮酸脫羧酶PDC1及PDC5之正調節因子PDC2的缺失將乙醇形成減少至由野生型製造之乙醇的約10% (Hohmann 等人, *Mol Gen Genet* 241:657-66 (1993))。PDC酶之蛋白質序列及鑑別器列於實例II中。

或者，可破壞將乙醛轉化為乙醇之醇脫氫酶及/或其他短鏈醇脫氫酶或使其衰減以提供碳及還原相等物用於MI-FAE循環、MD-FAE或終止路徑。迄今，已報導釀酒酵母中之七種醇脫氫酶，即ADHI-ADHVII (de Smidt等人, *FEMS Yeast Res* 8:967-78 (2008))。ADHI (GI:1419926)為負責使乙醛在細胞溶質中在缺氧條件下還原為乙醇之關鍵酶。已報導，缺乏ADH1之酵母菌株不能缺氧地生長，此係因為活性呼吸鏈為用以使NADH再生且引起ATP淨增益之唯一替代性路徑 (Drewke等人, *J Bacteriol* 172:3909-17 (1990))。此酶為用於下調以限制乙醇生產之理想候選物。ADH2在葡萄糖存在下受嚴重抑制。在乳酸克魯維酵母中，已鑑別且表徵兩種NAD依賴性細胞溶質醇脫氫酶。此等基因亦對其他脂族醇展示活性。基因ADH1 (GI:113358)及ADHII (GI:51704293)優先表現於葡萄糖生長細胞中 (Bozzi等人, *Biochim Biophys Acta* 1339:133-142 (1997))。細胞溶質醇脫氫酶在白假絲酵母中由ADH1 (GI:608690)編碼，在粟酒裂殖酵母中由ADH1 (GI:3810864)編碼，在解脂耶氏酵母中由ADH1 (GI:5802617)編碼，且在樹幹畢赤酵母 (*Pichia stipitis* 或 *Scheffersomyces stipitis*) 中由ADH1 (GI:2114038)及ADHII (GI:2143328)編碼 (Passoth等人, *Yeast* 14:1311-23 (1998))。候選醇脫氫酶展示於下表中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
SADH	BAA24528.1	2815409	近平滑假絲酵母
ADH1	NP_014555.1	6324486	釀酒酵母s288c
ADH2	NP_014032.1	6323961	釀酒酵母s288c
ADH3	NP_013800.1	6323729	釀酒酵母s288c
ADH4	NP_011258.2	269970305	釀酒酵母s288c
ADH5 (SFA1)	NP_010113.1	6320033	釀酒酵母s288c
ADH6	NP_014051.1	6323980	釀酒酵母s288c
ADH7	NP_010030.1	6319949	釀酒酵母s288c
adhP	CAA44614.1	2810	乳酸克魯維酵母
ADH1	P20369.1	113358	乳酸克魯維酵母
ADH2	CAA45739.1	2833	乳酸克魯維酵母
ADH3	P49384.2	51704294	乳酸克魯維酵母

ADH1	CAA57342.1	608690	白假絲酵母
ADH2	CAA21988.1	3859714	白假絲酵母
SAD	XP_712899.1	68486457	白假絲酵母
ADH1	CAA21782.1	3810864	粟酒裂殖酵母
ADH1	AAD51737.1	5802617	解脂耶氏酵母
ADH2	AAD51738.1	5802619	解脂耶氏酵母
ADH3	AAD51739.1	5802621	解脂耶氏酵母
AlcB	AAX53105.1	61696864	黑麴菌
ANI_1_282024	XP_001399347.1	145231748	黑麴菌
ANI_1_126164	XP_001398574.2	317037131	黑麴菌
ANI_1_1756104	XP_001395505.2	317033815	黑麴菌
ADH2	CAA73827.1	2143328	樹幹畢赤酵母

一或多種甘油-3-磷酸酶或甘油-3-磷酸(G3P)脫氫酶之衰減或破壞可消除或減少甘油形成，且從而保留碳及還原相等物用於脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產。

G3P磷酸酶催化G3P水解為甘油。具有此活性之酶包括釀酒酵母(*GPP1*及*GPP2*)、白假絲酵母及巴夫杜氏藻(*Dunaleilla parva*)之甘油-1-磷酸酶(EC 3.1.3.21) (Popp等人, *Biotechnol Bioeng* 100:497-505 (2008); Fan等人, *FEMS Microbiol Lett* 245:107-16 (2005))。迄今尚未鑑別巴夫杜氏藻基因。此等及其他G3P磷酸酶展示於下表中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
GPP1	DAA08494.1	285812595	釀酒酵母
GPP2	NP_010984.1	6320905	釀酒酵母
GPP1	XP_717809.1	68476319	白假絲酵母
KLLA0C08217g	XP_452565.1	50305213	乳酸克魯維酵母
KLLA0C11143g	XP_452697.1	50305475	乳酸克魯維酵母
ANI_1_380074	XP_001392369.1	145239445	黑麴菌
ANI_1_444054	XP_001390913.2	317029125	黑麴菌

釀酒酵母具有三種G3P脫氫酶，在細胞溶質中由GPD1及GDP2編碼且在粒線體中由GUT2編碼。GPD2已知編碼負責大多數甘油形成之酶且導致在缺氧條件下維持氧化還原平衡。GPD1主要負責釀酒酵母對於滲透應力之適應(Bakker等人, *FEMS Microbiol Rev* 24:15-37 (2001))。GPD1、GPD2及/或GUT2之衰減將減少甘油形成。GPD1及GUT2編碼解脂耶氏酵母中之G3P脫氫酶(Beopoulos等人, *AEM*

74:7779-89 (2008))。GPD1及GPD2編碼粟酒裂殖酵母中之G3P脫氫酶。類似地，G3P脫氫酶在熱帶假絲酵母中由CTRG_02011編碼，且在白假絲酵母中由表示為GI:20522022之基因編碼。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
GPD1	CAA98582.1	1430995	釀酒酵母
GPD2	NP_014582.1	6324513	釀酒酵母
GUT2	NP_012111.1	6322036	釀酒酵母
GPD1	CAA22119.1	6066826	解脂耶氏酵母
GUT2	CAG83113.1	49646728	解脂耶氏酵母
GPD1	CAA22119.1	3873542	粟酒裂殖酵母
GPD2	CAA91239.1	1039342	粟酒裂殖酵母
ANI_1_786014	XP_001389035.2	317025419	黑麴菌
ANI_1_1768134	XP_001397265.1	145251503	黑麴菌
KLLA0C04004g	XP_452375.1	50304839	乳酸克魯維酵母
CTRG_02011	XP_002547704.1	255725550	熱帶假絲酵母
GPD1	XP_714362.1	68483412	白假絲酵母
GPD2	XP_713824.1	68484586	白假絲酵母

亦可使形成酸副產物(諸如乙酸、甲酸及乳酸)之酶衰減或受到破壞。該等酶包括乙酸激酶、磷酸轉乙醯酶及丙酮酸氧化酶。丙酮酸甲酸裂解酶及甲酸脫氫酶之破壞或衰減可限制甲酸及二氧化碳形成。此等酶更詳細描述於實例II中。

將丙酮酸轉化為乳酸之醇脫氫酶亦為破壞或衰減之候選物。乳酸脫氫酶包括大腸桿菌之*ldhA*及富養羅爾斯通氏菌之*ldh* (Steinbuechel及Schlegel, *Eur. J. Biochem.* 130:329-334 (1983))。以上列出之其他醇脫氫酶亦可展現LDH活性。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	16129341	大腸桿菌
<i>Ldh</i>	YP_725182.1	113866693	富養羅爾斯通氏菌

下調粒線體丙酮酸脫氫酶複合物之活性將限制通向粒線體TCA循環之通量。在缺氧條件下且在培養基中之葡萄糖濃度較高之條件下，此粒線體酶之能力極有限且不存在通過其之顯著通量。然而，在一些實施例中，可破壞此酶或使其衰減以增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產。例示性丙酮酸脫氫酶基因包括PDB1、PDA1、LAT1及LPD1。寄

存編號及同源物列於實例II中。

減少通向TCA循環之通量的另一策略為藉由下調或去除粒線體丙酮酸載體來限制丙酮酸向粒線體轉運。釀酒酵母中丙酮酸向粒線體之轉運由藉由MPC1及MPC2編碼之雜合物催化(Herzig等人, *Science* 337:93-6 (2012); Bricker等人, *Science* 337:96-100 (2012))。釀酒酵母編碼五種其他推定單羧酸轉運體(MCH1-5)，其中數者可定位至粒線體膜(Makuc等人, *Yeast* 18:1131-43 (2001))。NDT1為另一推定丙酮酸轉運體，但此蛋白質之作用在文獻中有爭議(Todisco等人, *J Biol Chem* 20:1524-31 (2006))。例示性丙酮酸及單羧酸轉運體展示於下表中：

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
MPC1	NP_011435.1	6321358	釀酒酵母
MPC2	NP_012032.1	6321956	釀酒酵母
MPC1	XP_504811.1	50554805	解脂耶氏酵母
MPC2	XP_501390.1	50547841	解脂耶氏酵母
MPC1	XP_719951.1	68471816	白假絲酵母
MPC2	XP_716190.1	68479656	白假絲酵母
MCH1	NP_010229.1	6320149	釀酒酵母
MCH2	NP_012701.2	330443640	釀酒酵母
MCH3	NP_014274.1	6324204	釀酒酵母
MCH5	NP_014951.2	330443742	釀酒酵母
NDT1	NP_012260.1	6322185	釀酒酵母
ANI_1_1592184	XP_001401484.2	317038471	黑麴菌
CaJ7_0216	XP_888808.1	77022728	白假絲酵母
YAL10E16478g	XP_504023.1	50553226	解脂耶氏酵母
KLLA0D14036g	XP_453688.1	50307419	乳酸克魯維酵母

合成丙二醯CoA及脂肪酸之酶的破壞或衰減可增加可用於自乙醯CoA生物合成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之碳的供應。用於破壞或衰減之例示性酶包括脂肪酸合成酶、乙醯CoA羧化酶、生物素:脫輔基酶連接酶、醯基載體蛋白、硫酯酶、醯基轉移酶、ACP丙二醯轉移酶、脂肪酸延長酶、醯基CoA合成酶、醯基CoA轉移酶及醯基CoA水解酶。

減少脂肪酸生物合成之另一策略為表現或過度表現抑制脂肪酸形成基因之調節蛋白質。乙醯CoA羧化酶(EC 6.4.1.2)在許多生物體中催化脂肪酸生物合成之第一步驟：乙醯CoA至丙二醯CoA之ATP依賴性羧化。此酶利用生物素作為輔因子。例示性ACC酶由大腸桿菌之 *accABCD* (Davis等人, *J Biol Chem* 275:28593-8 (2000))、釀酒酵母及同源物之ACC1 (Sumper等人, *Methods Enzym* 71:34-7 (1981))編碼。釀酒酵母之粒線體乙醯CoA羧化酶由HFA1編碼。乙醯CoA羧化酶全酶形成需要生物素由生物素:脫輔基蛋白連接酶(諸如釀酒酵母之BPL1)連接。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
ACC1	CAA96294.1	1302498	釀酒酵母
KLLA0F06072g	XP_455355.1	50310667	乳酸克魯維酵母
ACC1	XP_718624.1	68474502	白假絲酵母
YALI0C11407p	XP_501721.1	50548503	解脂耶氏酵母
ANI_1_1724104	XP_001395476.1	145246454	黑麴菌
accA	AAC73296.1	1786382	大腸桿菌
accB	AAC76287.1	1789653	大腸桿菌
accC	AAC76288.1	1789654	大腸桿菌
accD	AAC75376.1	1788655	大腸桿菌
HFA1	NP_013934.1	6323863	釀酒酵母
BPL1	NP_010140.1	6320060	釀酒酵母

參與脂肪酸合成之蛋白質展示如下。酵母之脂肪酸合成酶複合物由兩種多功能次單元FAS1及FAS2構成，該等次單元一起催化乙醯CoA及丙二醯CoA向脂肪酸之淨轉化(Lomakin等人, *Cell* 129: 319-32 (2007))。與粒線體脂肪酸合成相關之其他蛋白質包括OAR1、Mct1、ETR1、ACP1及PPT2。ACP1為粒線體醯基載體蛋白，且PPT2編碼磷酸泛醯巯基乙胺轉移酶，其使粒線體ACP泛醯巯基乙胺化且為粒線體中脂肪酸生物合成所需(Stuible等人, *J Biol Chem*: 273: 22334-9 (1998))。用於降低脂肪酸合成酶活性之非基因策略為添加諸如淺藍菌素(cerulenin)之抑制劑。亦可改變脂肪生物合成之整體調節因子以在長鏈醇或有關產物生產期間下調內源脂肪酸生物合成路徑。例示性整

體調節因子為解脂耶氏酵母及釀酒酵母之SNF1。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
FAS1	NP_012739.1	6322666	釀酒酵母
FAS2	NP_015093.1	6325025	釀酒酵母
FAS1	XP_451653.1	50303423	乳酸克魯維酵母
FAS2	XP_452914.1	50305907	乳酸克魯維酵母
FAS1	XP_716817.1	68478392	白假絲酵母
FAS2	XP_723014.1	68465892	白假絲酵母
FAS1	XP_500912.1	50546885	解脂耶氏酵母
FAS2	XP_501096.1	50547253	解脂耶氏酵母
FAS1	XP_001393490.2	317031809	黑麴菌
FAS2	XP_001388458.1	145228299	黑麴菌
OAR1	NP_012868.1	6322795	釀酒酵母
MCT1	NP_014864.4	398365823	釀酒酵母
ETR1	NP_009582.1	6319500	釀酒酵母
ACP1	NP_012729.1	6322656	釀酒酵母
PPT2	NP_015177.2	37362701	釀酒酵母
SNF1	CAG80498.1	49648180	解脂耶氏酵母
SNF1	P06782.1	134588	釀酒酵母

亦可使用將醯基CoA受質轉化為較長鏈長脂肪酸之延長酶的破壞或衰減來增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產。延長酶見於諸如粒線體、內質網、蛋白磷脂體及過氧化體之區室中。舉例而言，一些酵母(諸如釀酒酵母)能夠經由接受外源或內源醯基CoA受質之粒線體延長酶合成鏈長C16及C16以上之長鏈脂肪酸(Bessoule等人, *FEBS Lett* 214: 158-162 (1987))。此系統需要ATP以達成活性。內質網亦具有用於自不同長度之醯基CoA受質合成極長鏈脂肪酸(C18+)的延長酶系統(Kohlwein等人, *Mol Cell Biol* 21:109-25 (2001))。參與此系統之基因包括TSC13、ELO2及ELO3。ELO1催化C12醯基CoA延長為C16-C18脂肪酸。

蛋白質	寄存編號	GI編號	生物體
ELO2	NP_009963.1	6319882	釀酒酵母
ELO3	NP_013476.3	398366027	釀酒酵母
TSC13	NP_010269.1	6320189	釀酒酵母
ELO1	NP_012339.1	6322265	釀酒酵母

將醯基CoA路徑中間物轉化為酸副產物之天然酶亦可降低脂肪

醇、脂肪醛或脂肪酸產率。舉例而言，CoA水解酶、轉移酶及合成酶可作用於醯基CoA中間物以形成短鏈、中鏈或長鏈酸。內源CoA水解酶、CoA轉移酶及/或可逆CoA合成酶之破壞或衰減可用於增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸產率。例示性酶展示於下表中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
Tes1	NP_012553.1	6322480	釀酒酵母 <i>s288c</i>
ACH1	NP_009538.1	6319456	釀酒酵母 <i>s288c</i>
EHD3	NP_010321.1	6320241	釀酒酵母 <i>s288c</i>
YAL10F14729p	XP_505426.1	50556036	解脂耶氏酵母
YAL10E30965p	XP_504613.1	50554409	解脂耶氏酵母
KLLA0E16523g	XP_454694.1	50309373	乳酸克魯維酵母
KLLA0E10561g	XP_454427.1	50308845	乳酸克魯維酵母
ACH1	P83773.2	229462795	白假絲酵母
CaO19.10681	XP_714720.1	68482646	白假絲酵母
ANI_1_318184	XP_001401512.1	145256774	黑麴菌
ANI_1_1594124	XP_001401252.2	317035188	黑麴菌
tesB	NP_414986.1	16128437	大腸桿菌
tesB	NP_355686.2	159185364	根癌農桿菌
atoA	2492994	P76459.1	大腸桿菌
atoD	2492990	P76458.1	大腸桿菌

亦可破壞促成產物、MI-FAE循環中間物、MD-FAE循環中間物或終止路徑中間物降解之酶或使其衰減。實例包括醛脫氫酶，醛脫羰基酶、氧化醇脫氫酶及不可逆脂肪醯基CoA降解酶。

爲了生產本發明之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸，非特異性醛脫氫酶之缺失或衰減可改良產率。爲了生產脂肪酸，該種酶之表現可改良產物形成。該等酶可例如將乙醯CoA轉化爲乙醛，將脂肪醛轉化爲脂肪酸，或將脂肪醇轉化爲脂肪酸。醯化醛脫氫酶描述於實例I中。形成酸之醛脫氫酶描述於實例III及IX中。

若促成逆方向之路徑酶不利於脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產，則亦可破壞其或使其衰減。一實例爲促成氧化方向之長鏈醇脫氫酶(EC 1.1.1.192)。例示性長鏈醇脫氫酶爲嗜熱脫氮土芽孢桿菌之ADH1及ADH2，其氧化鏈長長達C30之醇(Liu等人, *Physiol Biochem*

155:2078-85 (2009))。此等及其他例示性脂肪醇脫氫酶列於實例I及II中。若形成醇之醯基CoA還原酶用於脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成，則內源脂肪醇脫氫酶之缺失將實質上減少回通量。

β -氧化酶可在醯基CoA合成方向上為可逆的及操作。然而，若其在降解方向上為不可逆的或經強烈促成，則其為用於破壞或衰減之候選物。屬於此類別之酶包括釀酒酵母之FOX2，一種具有3-羥基醯基CoA脫氫酶及烯醯CoA水合酶活性之多功能酶(Hiltunen等人, *J Biol Chem* 267: 6646-6653 (1992))。其他基因包括利用除NAD(P)H (例如EC 1.3.8.-)以外之輔因子(諸如大腸桿菌之*fadE*)的降解硫解酶(諸如POT1及醯基CoA脫氫酶)。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
POT1	NP_012106.1	6322031	釀酒酵母
FOX2	NP_012934.1	6322861	釀酒酵母
<i>fadE</i>	AAC73325.2	87081702	大腸桿菌

脂肪醯基CoA氧化酶(諸如釀酒酵母之POX1)催化脂肪醯基CoA受質之氧依賴性氧化。若具有此活性之酶在脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產條件下表現，則可破壞其或使其衰減。POX1 (EC 1.3.3.6)基因及同源物展示於下表中。POX1經受OAF1之調節，OAF1亦使參與過氧化體 β -氧化、組織及生物發生之基因活化(Luo等人, *J Biol Chem* 271:12068-75 (1996))。具有與OAF1相似之功能的調節因子及過氧化體脂肪酸轉運體PXA1及PXA2亦為用於缺失之候選物。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
POX1	NP_011310.1	6321233	釀酒酵母
OAF1	NP_009349.3	330443370	釀酒酵母
PXA1	NP_015178.1	6325110	釀酒酵母
PXA2	NP_012733.1	6322660	釀酒酵母
YALI0F10857g	XP_505264.1	50555712	解脂耶氏酵母
YALI0D24750p	XP_503244.1	50551539	解脂耶氏酵母
YALI0E32835p	XP_504703.1	50554589	解脂耶氏酵母
YALI0E06567p	XP_503632.1	50552444	解脂耶氏酵母
YALI0E27654p	XP_504475.1	50554133	解脂耶氏酵母
YALI0C23859p	XP_502199.1	50549457	解脂耶氏酵母

POX	XP_455532.1	50311017	乳酸克魯維酵母
POX104	XP_721610.1	68468582	白假絲酵母
POX105	XP_717995.1	68475844	白假絲酵母
POX102	XP_721613.1	68468588	白假絲酵母

用於破壞或衰減之另一候選物為醯基CoA結合蛋白。釀酒酵母之醯基結合蛋白ACB1例如結合醯基CoA酯且將其穿梭移動至醯基CoA利用過程(Schjerling等人, J Biol Chem 271: 22514-21 (1996))。此蛋白質之缺失不影響生長速率且導致較長鏈醯基CoA分子之積聚增加。醯基CoA酯參與各種細胞過程，包括脂質生物合成及內穩態、信號轉導、生長調節及細胞分化(Rose等人, PNAS USA 89: 11287-11291 (1992))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
ACB1	P31787.3	398991	釀酒酵母
KLLA0B05643g	XP_451787.2	302309983	乳酸克魯維酵母
YALI0E23185g	XP_002143080.1	210076210	解脂耶氏酵母
ANI_1_1084034	XP_001390082.1	145234867	黑麴菌

爲了達成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之高產率，需要宿主生物體可以充足量供應MI-FAE循環、MD-FAE及/或終止路徑所需要之輔因子。在若干生物體、尤其真核生物體(諸如若干酵母屬、克魯維酵母屬、假絲酵母屬、麴菌屬及耶氏酵母屬)中，NADH在細胞溶質中由於其由糖酵解大量生產而比NADPH更充足。可藉由藉助於細胞溶質中之異源或天然NAD依賴性酶(諸如NAD依賴性丙酮酸脫氫酶、NAD依賴性甲酸脫氫酶、NADH:鐵氧化還原蛋白氧化還原酶或NAD依賴性醯化乙醛脫氫酶)將丙酮酸轉化爲乙醯CoA來使NADH更充足。考慮到大多數生物體之細胞溶質中NADH之豐度，可爲有益的爲，MI-FAE循環、MD-FAE循環及/或末端路徑之所有還原步驟均優先接受NADH作爲優於其他還原劑(諸如NADPH)之還原劑。脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之高產率因此可藉由例如以下方式來實現：1) 鑑別及執行對NADH比對其他還原相等物(諸如NADPH)優先性更強之內源或外源

MI-FAE循環、MD-FAE循環及/或終止路徑酶；2) 使一或多種有助於NADPH依賴性還原活性之內源MI-FAE循環、MD-FAE循環或終止路徑酶衰減；3) 改變內源或外源MI-FAE循環、MD-FAE循環或終止路徑酶之輔因子特異性，以便其對NADH具有比對其天然型式更強之優先性；或4) 改變內源或外源MI-FAE循環、MD-FAE循環或終止路徑酶之輔因子特異性，以便其對NADPH具有比對其天然型式更弱之優先性。

用於工程改造NADH促成之MI-FAE循環、MD-FAE循環及/或終止路徑的策略更詳細描述於實例V中。用於改變酶之輔因子特異性的方法為此項技術中所熟知，且一實例描述於實例VI中。

若一或多種MI-FAE循環、MD-FAE循環及/或終止路徑酶利用NADPH作為輔因子，則可有益於增加宿主生物體中NADPH之生產。特定言之，若MI-FAE循環、MD-FAE循環及/或終止路徑存在於宿主生物體之細胞溶質中，則增加細胞溶質中之NADPH生產的方法可為有益的。可實施若干用於增加NADPH之細胞溶質生產的方法，包括引導相對於野生型增加量之通量通過戊糖磷酸路徑之氧化分支；引導相對於野生型增加量之通量通過恩特納-杜德洛夫路徑(Entner Doudoroff pathway)；引入可溶或膜結合轉氫酶以將NADH轉化為NADPH；或採用以下酶之NADP依賴性型式：磷酸化或非磷酸化甘油醛-3-磷酸脫氫酶、丙酮酸脫氫酶、甲酸脫氫酶或醯化乙醛脫氫酶。此等活性可藉由破壞天然NAD依賴性酶(包括甘油醛-3-磷酸脫氫酶、丙酮酸脫氫酶、甲酸脫氫酶或醯化乙醛脫氫酶)或使其衰減而加強。用於工程改造增加之NADPH可得性的策略描述於實例VII中。

細胞溶質中脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之合成可視充足碳及還原相等物之可得性而定。因此，不受任何特定操作理論限制，增加NAD(P)H與NAD(P)之氧化還原比率可有助於前向地驅動MI-FAE循

環、MD-FAE循環及/或終止路徑。用於增加NAD(P)H與NAD(P)之氧化還原比率的方法包括限制呼吸；使生產還原之副產物(諸如乙醇及甘油)的競爭路徑衰減或破壞其；藉由NADH脫氫酶減弱或消除NADH之使用；及減弱或消除區室之間的氧化還原穿梭。

一種提供增加數目之還原相等物(諸如NAD(P)H)以使得能夠形成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的例示性方法為約束在呼吸期間該等還原相等物之使用。呼吸可藉由以下方式來限制：減少氧之可得性；使NADH脫氫酶及/或細胞色素氧化酶活性衰減；使G3P脫氫酶衰減；及/或向克拉布特里陽性生物體提供過量葡萄糖。

藉由在醱酵槽中培養非天然存在之真核生物體而限制氧可得性為限制呼吸且從而增加NAD(P)H與NAD(P)之比率的一個實例。NAD(P)H/NAD(P)之比率隨著培養條件變得更缺氧而增加，完全缺氧條件提供最高的還原輔因子與氧化輔因子比率。舉例而言，已報導，在大腸桿菌中NADH/NAD之比率在有氧條件下= 0.02且在缺氧條件下= 0.75 (de Graes等人, *J Bacteriol* 181:2351-57 (1999))。

呼吸亦可藉由在有氧條件下在細胞中減少NADH脫氫酶及/或細胞色素氧化酶之表現或活性來限制。在此情況下，呼吸可藉由電子傳遞鏈之能力來限制。該種方法已用以使得大腸桿菌能夠在完全有氧條件下缺氧代謝(Portnoy等人, *AEM* 74:7561-9 (2008))。釀酒酵母可使用由NDE1及NDE2編碼之外部NADH脫氫酶直接使細胞溶質NADH氧化。解脂耶氏酵母中之一種此類NADH脫氫酶由NDH2編碼(Kerscher等人, *J Cell Sci* 112:2347-54 (1999))。此等及其他NADH脫氫酶列於下表中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
NDE1	NP_013865.1	6323794	釀酒酵母 <i>s288c</i>
NDE2	NP_010198.1	6320118	釀酒酵母 <i>s288c</i>
NDH2	AJ006852.1	3718004	解脂耶氏酵母
ANI_1_610074	XP_001392541.2	317030427	黑麴菌

ANI_1_2462094	XP_001394893.2	317033119	黑麴菌
KLLA0E21891g	XP_454942.1	50309857	乳酸克魯維酵母
KLLA0C06336g	XP_452480.1	50305045	乳酸克魯維酵母
NDE1	XP_720034.1	68471982	白假絲酵母
NDE2	XP_717986.1	68475826	白假絲酵母

釀酒酵母之細胞色素氧化酶包括COX基因產物。COX1-3為三種由粒線體基因組編碼之核心次單元，而COX4-13由核基因編碼。細胞色素基因中任一者之衰減或破壞導致減少或阻止呼吸生長(Hermann及Funes, Gene 354:43-52 (2005))。其他生物體中之細胞色素氧化酶基因可藉由序列同源性推斷。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
COX1	CAA09824.1	4160366	釀酒酵母 <i>s288c</i>
COX2	CAA09845.1	4160387	釀酒酵母 <i>s288c</i>
COX3	CAA09846.1	4160389	釀酒酵母 <i>s288c</i>
COX4	NP_011328.1	6321251	釀酒酵母 <i>s288c</i>
COX5A	NP_014346.1	6324276	釀酒酵母 <i>s288c</i>
COX5B	NP_012155.1	6322080	釀酒酵母 <i>s288c</i>
COX6	NP_011918.1	6321842	釀酒酵母 <i>s288c</i>
COX7	NP_013983.1	6323912	釀酒酵母 <i>s288c</i>
COX8	NP_013499.1	6323427	釀酒酵母 <i>s288c</i>
COX9	NP_010216.1	6320136	釀酒酵母 <i>s288c</i>
COX12	NP_013139.1	6323067	釀酒酵母 <i>s288c</i>
COX13	NP_011324.1	6321247	釀酒酵母 <i>s288c</i>

細胞溶質NADH亦可藉由呼吸鏈經由G3P脫氫酶穿梭來氧化，該G3P脫氫酶穿梭由細胞溶質NADH連接之G3P脫氫酶及膜結合之G3P:泛醌氧化還原酶組成。G3P脫氫酶之缺失或衰減亦將防止NADH氧化用於呼吸。本文中描述編碼此等酶之酶候選物。

另外，在克拉布特里陽性生物體中，醱酵代謝可在過量葡萄糖存在下達成。舉例而言，釀酒酵母在有氧條件下甚至製造乙醇。可藉由饋入過量葡萄糖至克拉布特里陽性生物體中而將克拉布特里陽性生物體中乙醇及甘油之形成減少/消除且替換為脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產。在另一態樣中，本文中提供一種生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之方法，其包含在生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之條件下且持續充

足時間段培養非天然存在之真核生物體，其中該真核生物體為包含至少一種編碼MI-FAE循環、MD-FAE循環及/或終止路徑酶之外源核酸的克拉布特里陽性生物體，且其中真核生物體在包含過量葡萄糖之培養基中。

防止還原之醱酵副產物形成將增加用於脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產的碳及還原相等物兩者之可得性。在缺氧及微有氧條件下兩種關鍵還原副產物為乙醇及甘油。乙醇典型地在兩個由丙酮酸脫羧酶及乙醇脫氫酶催化之酶促步驟中由丙酮酸形成。甘油藉由酶甘油-3-磷酸脫氫酶及甘油-3-磷酸磷酸酶由糖分解中間物二羥基丙酮磷酸形成。一或多種此等酶活性之衰減將增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之產率。本文中描述用於減少或消除乙醇及甘油形成之菌株工程改造策略。

酵母(諸如釀酒酵母)可生產甘油以允許NAD(P)在缺氧條件下再生。減少或消除甘油生產之另一方法為藉由限氧培育(Bakker等人, 前述)。甘油形成僅在細胞之氧攝取比速率降低至低於再氧化生物合成中形成之NADH所需的速率時開始。

除了以上列出之氧化還原吸收之外，蘋果酸脫氫酶在其在還原方向上起作用時亦可能引開還原相等物。威信在釀酒酵母中起作用之若干氧化還原穿梭利用此酶在細胞溶質與粒線體之間轉移還原相等物。此氧化還原轉移可藉由使蘋果酸脫氫酶及/或蘋果酸酶活性衰減而預防。可藉由mdh之衰減阻止的氧化還原穿梭包括(i) 蘋果酸-天冬醯胺穿梭；(ii) 蘋果酸-草醯乙酸穿梭；及(iii) 蘋果酸-丙酮酸穿梭。編碼蘋果酸脫氫酶及蘋果酸酶之基因列於下表中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
MDH1	NP_012838.1	6322765	釀酒酵母
MDH2	NP_014515.2	116006499	釀酒酵母
MDH3	NP_010205.1	6320125	釀酒酵母
MAE1	NP_012896.1	6322823	釀酒酵母

MDH1	XP_722674.1	68466384	白假絲酵母
MDH2	XP_718638.1	68474530	白假絲酵母
MAE1	XP_716669.1	68478574	白假絲酵母
KLLA0F25960g	XP_456236.1	50312405	乳酸克魯維酵母
KLLA0E18635g	XP_454793.1	50309563	乳酸克魯維酵母
KLLA0E07525g	XP_454288.1	50308571	乳酸克魯維酵母
YALI0D16753p	XP_502909.1	50550873	解脂耶氏酵母
YALI0E18634p	XP_504112.1	50553402	解脂耶氏酵母
ANI_1_268064	XP_001391302.1	145237310	黑麴菌
ANI_1_12134	XP_001396546.1	145250065	黑麴菌
ANI_1_22104	XP_001395105.2	317033225	黑麴菌

總體而言，以上提及之氧化還原吸收單獨或與其他氧化還原吸收組合的破壞或衰減可消除或減少用於呼吸或副產物形成之還原能力使用。已報導，外部NADH脫氫酶(NDE1及NDE2)及粒線體G3P脫氫酶(GUT2)之缺失幾乎完全消除釀酒酵母中之細胞溶質NAD⁺再生(Overkamp等人, *J Bacteriol* 182:2823-30 (2000))。

本發明之微生物生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸且視情況分泌脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸至培養基中。具有異源脂肪醇形成活性之釀酒酵母、解脂耶氏酵母及大腸桿菌在細胞內積聚脂肪醇；然而在培養基中偵測不到脂肪醇(Behrouzian等人, 美國專利申請案20100298612)。具有改良活性之脂肪醯基CoA還原酶的引入導致較高水準之脂肪醇分泌至培養基中。或者，脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸轉運體或轉運系統之引入可改良脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之細胞外積聚。例示性轉運體列於下表中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
Fatp	NP_524723.2	24583463	黑腹果蠅
AY161280.1:45..1757	AAN73268.1	34776949	紅串紅球菌
acrA	CAF23274.1	46399825	變形蟲原厚垣假絲酵母
acrB	CAF23275.1	46399826	變形蟲原厚垣假絲酵母
CER5	AY734542.1	52354013	擬南芥
AmiS2	JC5491	7449112	紅球菌屬
ANI_1_1160064	XP_001391993.1	145238692	黑麴菌
YALI0E16016g	XP_504004.1	50553188	解脂耶氏酵母

因此，在一些實施例中，本發明提供一種如本文中所揭示的具

有一或多個基因破壞之非天然存在之微生物體，其中該一或多個基因破壞在編碼參與以下之蛋白質或酶的內源基因中出現：由該微生物體天然生產乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、CO₂、脂肪酸或丙二醯CoA；路徑中間物向除細胞溶質以外之細胞區室轉移；或由該微生物體天然降解MI-FAE循環中間物、MD-FAE循環中間物或終止路徑中間物，該一或多個基因破壞使得微生物體中之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產增加。因此，蛋白質或酶可為脂肪酸合成酶、乙醯CoA羧化酶、生物素：脫輔基酶連接酶、醯基載體蛋白、硫酯酶、醯基轉移酶、ACP丙二醯轉移酶、脂肪酸延長酶、醯基CoA合成酶、醯基CoA轉移酶、醯基CoA水解酶、丙酮酸脫羧酶、乳酸脫氫酶、醇脫氫酶、形成酸之醛脫氫酶、乙酸激酶、磷酸轉乙醯酶、丙酮酸氧化酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、粒線體丙酮酸載體、過氧化體脂肪酸轉運體、過氧化體醯基CoA轉運體、過氧化體肉鹼/醯肉鹼轉移酶、醯基CoA氧化酶或醯基CoA結合蛋白。在一些態樣中，該一或多個基因破壞包括一或多種基因之缺失。

在一些實施例中，本發明提供一種如本文中所述的非天然存在之微生物體，其中該MI-FAE循環、該MD-FAE循環或該終止路徑之一或多種酶優先與NADH輔因子反應或就與NAD(P)H輔因子反應而言具有減少之優先性。舉例而言，該MI-FAE循環之一或多種酶可為3-酮脂醯CoA還原酶或烯醯CoA還原酶。就終止路徑而言，一或多種酶可為醯基CoA還原酶(形成醛)、醇脫氫酶、醯基CoA還原酶(形成醇)、醛脫羧基酶、醯基ACP還原酶、醛脫氫酶(形成酸)或羧酸還原酶。

在一些實施例中，本發明提供一種如本文中所述的在編碼蛋白質或酶之基因中具有一或多個基因破壞的非天然存在之微生物體，該等蛋白質或酶導致存在於該微生物體之細胞溶質中之NAD(P)H與NAD(P)比率在破壞之後增加。因此，編碼導致存在於微生物體之細

胞溶質中之NAD(P)H與NAD(P)比率在破壞之後增加的蛋白質或酶之基因可為NADH脫氫酶、細胞色素氧化酶、G3P脫氫酶、G3P磷酸酶、醇脫氫酶、丙酮酸脫羧酶、醛脫氫酶(形成酸)、乳酸脫氫酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸:醯氧化還原酶、蘋果酸酶及蘋果酸脫氫酶。在一些態樣中，該一或多個基因破壞包括一或多種基因之缺失。

在一些實施例中，本發明的非天然存在之微生物體為克拉布特里陽性且在包括過量葡萄糖之培養基中。在該等條件下，如本文所述，該微生物體可導致存在於該微生物體之細胞溶質中之NAD(P)H與NAD(P)比率增加。

在一些實施例中，本發明提供一種如本文所述的非天然存在之微生物體，其具有至少一種編碼用於本發明之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的細胞外轉運體或細胞外轉運系統之外源核酸。

在一些實施例中，本發明提供一種如本文所述的非天然存在之微生物體，其中一或多種參與以下之內源酶具有衰減之酶活性或表現水準：由該微生物體天然生產乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、CO₂、脂肪酸或丙二醯CoA；路徑中間物向除細胞溶質以外之細胞區室轉移；或由該微生物體天然降解MI-FAE循環中間物、MD-FAE循環中間物或終止路徑中間物。因此，內源酶可為脂肪酸合成酶、乙醯CoA羧化酶、生物素:脫輔基酶連接酶、醯基載體蛋白、硫酯酶、醯基轉移酶、ACP丙二醯轉移酶、脂肪酸延長酶、醯基CoA合成酶、醯基CoA轉移酶、醯基CoA水解酶、丙酮酸脫羧酶、乳酸脫氫酶、醇脫氫酶、形成酸之醛脫氫酶、乙酸激酶、磷酸轉乙醯酶、丙酮酸氧化酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、粒線體丙酮酸載體、過氧化體脂肪酸轉運體、過氧化體醯基CoA轉運體、過氧化體肉鹼/醯肉鹼轉移酶、醯基CoA氧化酶或醯基CoA結合蛋白。

在一些實施例中，本發明提供一種如本文中所述的非天然存在之微生物體，其中一或多種參與NAD(P)H或NADH氧化之內源酶具有衰減之酶活性或表現水準。因此，一或多種內源酶可為NADH脫氫酶、細胞色素氧化酶、G3P脫氫酶、G3P磷酸酶、醇脫氫酶、丙酮酸脫羧酶、醛脫氫酶(形成酸)、乳酸脫氫酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸：醌氧化還原酶、蘋果酸酶及蘋果酸脫氫酶。

本發明的非天然存在之微生物體可含有穩定基因改變，其係指可經培養超過五代而無改變損失之微生物。一般而言，穩定基因改變包括持續超過10代之修飾，特定言之穩定修飾將持續超過約25代，且更特定言之穩定基因修飾將持續超過50代，包括無限期。

在基因破壞之情況下，尤其適用之穩定基因改變為基因缺失。使用基因缺失以引入穩定基因改變尤其適用於在基因改變之前降低逆轉為表型之可能性。舉例而言，生物化學物質之穩定生長耦合生產可例如藉由缺失編碼催化一組代謝修飾內之一或多個反應之酶的基因來達成。生物化學物質之生長耦合生產的穩定性可經由多個缺失來進一步增強，從而顯著降低就各經破壞活性而言發生多個代償逆轉之可能性。

亦提供一種生產非天然存在之微生物體的方法，該非天然存在之微生物體具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之穩定生長耦合生產。該方法可包括電腦模擬鑑別一組增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產、例如在指數生長期間增加生產之代謝修飾；基因修飾生物體以含有該組增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產之代謝修飾，及培養該基因修飾生物體。必要時，培養可包括使基因修飾生物體在需要脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產之條件下適應性進化。本發明之方法適用於如本文中所揭示之細菌、酵母及真菌以及多種其他細胞及微生物。

因此，本發明提供一種非天然存在之微生物體，其包含一或多



個基因破壞，該一或多個基因破壞使得脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產增加。在一個實施例中，該一或多個基因破壞使得脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產生長耦合，且可例如使得脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產穩定生長耦合。在另一實施例中，該一或多個基因破壞可使得脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產與微生物體之生長專性耦合。該一或多個基因破壞降低對應的一或多種編碼酶之活性。

非天然存在之微生物體可具有一或多個基因破壞包括於編碼本文中所示之酶或蛋白質的基因中。如本文中所示，該一或多個基因破壞可為缺失。本發明的該等非天然存在之微生物體包括如本文中所示之細菌、酵母、真菌，或適用於醱酵製程之多種其他微生物中任一者。

因此，本發明提供一種非天然存在之微生物體，其包含一或多個基因破壞，其中該一或多個基因破壞在編碼蛋白質或酶之基因中出現，其中該一或多個基因破壞使得該生物體中脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產增加。脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產可為生長耦合的或非生長耦合的。在一特定實施例中，脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產可與如本文中所示的生物體之生長專性耦合。

本發明提供非天然存在之微生物體，其具有增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產、例如脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生長耦合生產的基因改變(諸如基因破壞)。產物生產可例如藉由基因改變如本文中所示的細胞之代謝路徑而強制性地與微生物之指數生長期相關聯。基因改變可增加所要產物之生產，或甚至使得所要產物成為在生長期期間之專性產物。本文中例示導致脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成之生產增加及水準提昇的代謝改變或轉化。各改變對應於應功能上受到破壞之必要代謝反應。一或多種路徑內之所有反應的功能破壞可藉由在生長期期間工程改造菌株而導致脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產增

加。

此等非天然存在之改變中的每一者均使得與不含有該等代謝改變之菌株相比，在適當培養條件下，例如在微生物體之指數生長期期間脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產之生產增加及水準增進。適當條件包括例如本文中所示之條件，包括諸如特定碳源或反應劑可得性及/或適應性進化之條件。

考慮到本文中所提供之教示及指導，熟習此項技術者將理解，為了引入酶之代謝改變(諸如衰減)，可能需要破壞參與反應之一或多種酶的催化活性。或者，代謝改變可包括破壞酶活性或最大活性所需之調節蛋白質或輔因子的表現。此外，酶促反應所需之輔因子之基因損失亦可具有與破壞編碼酶之基因相同的作用。破壞可藉由多種方法進行，包括例如編碼基因之缺失或在一或多個編碼基因序列中併入基因改變。靶向破壞之編碼基因可為編碼參與催化活性之酶的一種、一些或所有基因。舉例而言，在單一酶參與目標催化活性時，破壞可藉由減小或消除所編碼基因產物之催化活性的基因改變進行。類似地，在單一酶為多聚體(包括雜聚體)時，破壞可藉由減少或破壞所編碼基因產物之一種或所有次單元之功能的基因改變進行。活性破壞可藉由形成活性複合物所需之一或多種次單元之結合活性的損失、藉由破壞多聚複合物之催化次單元或藉由兩種方式來實現。亦可靶向多聚蛋白質締合及活性之其他功能以便破壞本發明之代謝反應。該等其他功能為熟習此項技術者所熟知。類似地，目標酶活性可藉由破壞修飾及/或活化目標酶的蛋白質或酶(例如將脫輔基酶轉化為全酶所需之分子)之表現而減小或消除。此外，可根據本發明破壞單一多肽或多聚複合物之一些或所有功能以便減小或消除參與本發明之反應或代謝修飾之一或多種酶之催化活性。類似地，可破壞參與本發明之反應或代謝修飾之一些或所有酶，只要目標反應得以減少或消除即可。

考慮到本文中所提供之教示及指導，熟習此項技術者亦將理解，酶促反應可藉由減少或消除由常見基因及/或由該基因之展現相似或實質上相同活性之一或多種直系同源物編碼之反應而受到破壞。常見基因及所有直系同源物之減少可引起目標反應之任何催化活性的完全消除。然而，破壞常見基因或一或多種直系同源物可引起目標反應之催化活性減小，足以促進生長與產物生物合成之耦合。本文中例示編碼用於多種代謝修飾之催化活性的常見基因以及其直系同源物。熟習此項技術者將理解，編碼目標代謝反應之酶之一些或所有基因的破壞可在本發明之方法中實踐且併入本發明的非天然存在之微生物體以便實現脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產增加或生長耦合之產物生產。

考慮到本文中所提供之教示及指導，熟習此項技術者亦將理解，酶活性或表現可使用熟知方法衰減。若酶之活性或量之減小致使酶之活性下降至路徑起作用通常所需之臨界水準以下，則該減小可模擬基因之完全破壞。藉由各種技術而非使用基因破壞達成之酶活性減小對於生物體之生存力可為重要的。引起與基因破壞相似或一致之作用的減小酶活性之方法包括(但不限於)：減少基因轉錄或轉譯；使mRNA、蛋白質或催化RNA去穩定化；及使影響酶活性或動力學之基因突變(參見Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001)；及Ausubel等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)。天然或施加之調節控制亦可實現酶衰減，包括：啟動子替代(參見Wang等人, *Mol. Biotechnol.* 52(2):300-308 (2012))；轉錄因子損失或改變(Dietrick等人, *Annu. Rev. Biochem.* 79:563-590 (2010)；及Simicevic等人, *Mol. Biosyst.* 6(3):462-468 (2010))；抑制性RNA或肽(諸如siRNA、反義RNA)、RNA或肽/小分子

結合適體、核糖核酸酶、適體酶及核糖開關之引入(Wieland等人, *Methods* 56(3):351-357 (2012) ; O'Sullivan, *Anal. Bioanal. Chem.* 372(1):44-48 (2002) ; 及Lee等人, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14(5):505-511 (2003)) ; 及減小或破壞酶活性的藥物或其他化學品(諸如酶抑制劑、抗生素或目標特異性藥物)之添加。

熟習此項技術者亦將理解且認識到，酶之衰減可在各種層面進行。舉例而言，在基因層面，引起部分或完全剔除式表型之突變(諸如基因破壞)或引起遮蔽基因產物活性之上位基因作用之突變(Miko, *Nature Education* 1(1) (2008))可用以使酶衰減。在基因表現層面，用於衰減之方法包括：使轉錄與內源或外源誘導物(諸如異丙硫基- β -半乳糖苷(IPTG))偶聯，隨後在生產階段期間添加少量誘導物或不添加誘導物(Donovan等人, *J. Ind. Microbiol.* 16(3):145-154 (1996) ; 及Hansen等人, *Curr. Microbiol.* 36(6):341-347 (1998)) ; 引入或修飾基因之正或負調節因子；修飾在基因經整合之真核染色體區域中之組蛋白乙醯化/脫乙醯化(Yang等人, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13(2):143-153 (2003) 及Kurdistani等人, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4(4):276-284 (2003)) ; 引入轉位以破壞啓動子或調節基因(Bleykasten-Broschans等人, *C. R. Biol.* 33(8-9):679-686 (2011) ; 及McCue等人, *PLoS Genet.* 8(2):e1002474 (2012)) ; 翻轉轉位元件或啓動子區域之定向以便調節相鄰基因之基因表現(Wang等人, *Genetics* 120(4):875-885 (1988) ; Hayes, *Annu. Rev. Genet.* 37:3-29 (2003) ; 在二倍體生物體中，缺失一個導致異型接合性損失之對偶基因(Daigaku等人, *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 600(1-2):177-183 (2006)) ; 引入增加RNA降解之核酸(Houseley等人, *Cell*, 136(4):763-776 (2009) ; 或在細菌中，例如引入轉運信使RNA(tmRNA)標籤，其可引起RNA降解及核糖體失速(Sunohara等人, *RNA*

10(3):378-386 (2004)；及Sunohara等人, *J. Biol. Chem.* 279:15368-15375 (2004)。在轉譯層面，衰減可包括：引入罕見密碼子以限制轉譯(Angov, *Biotechnol. J.* 6(6):650-659 (2011))；引入阻止轉譯之RNA干擾分子(Castel等人, *Nat. Rev. Genet.* 14(2):100-112 (2013))；及Kawasaki等人, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 7(2):125-131 (2005)；修飾編碼序列外之區域，例如將二級結構引入至未轉譯區域(UTR)中以阻止轉譯或降低轉譯效率(Ringnér等人, *PLoS Comput. Biol.* 1(7):e72 (2005))；添加達成快速轉錄物降解之RNA酶位點(Pasquinelli, *Nat. Rev. Genet.* 13(4):271-282 (2012))；及Arraiano等人, *FEMS Microbiol. Rev.* 34(5):883-932 (2010)；引入反義RNA寡聚物或反義轉錄物(Nashizawa等人, *Front. Biosci.* 17:938-958 (2012))；引入RNA或肽適體、核糖核酸酶、適體酶、核糖開關(Wieland等人, *Methods* 56(3):351-357 (2012))；O'Sullivan, *Anal. Bioanal. Chem.* 372(1):44-48 (2002)；及Lee等人, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14(5):505-511 (2003))；或引入涉及RNA結構之轉譯調節元件，其可防止或減少可受小分子存在或不存在控制之轉譯(Araujo等人, *Comparative and Functional Genomics*, 文章編號475731, 8頁 (2012))。在酶定位及/或壽命之層面，酶衰減可包括：添加達成更快速蛋白質周轉之降解標籤(Hochstrasser, *Annual Rev. Genet.* 30:405-439 (1996))；及Yuan等人, *PLoS One* 8(4):e62529 (2013))；或添加定位標籤，其使得酶在真核細胞中分泌或定位於亞細胞區室，在該亞細胞區室中酶將不能與其正常受質反應(Nakai等人 *Genomics* 14(4):897-911 (1992))；及Russell等人, *J. Bact.* 189(21):7581-7585 (2007))。在轉譯後調節層面，酶衰減可包括：增加已知抑制劑之胞內濃度；或修飾轉譯後修飾位點(Mann等人, *Nature Biotech.* 21:255-261 (2003))。在酶活性層面，酶衰減可包括：添加內源或外源抑制劑(諸如酶抑制劑、抗生素或目標特異性藥物)以

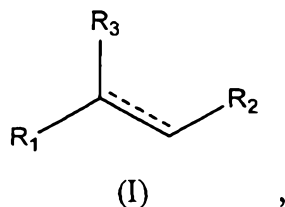
減小酶活性；限制必需輔因子(諸如維生素B12)對需要該輔因子之酶之可得性；使酶活性所需之金屬離子螯合；或引入顯性負突變。上文所述之衰減技術之適用性可視既定宿主微生物體為原核抑或真核而定，且應理解，對於既定宿主何種技術為適當技術的確定可容易由熟習此項技術者作出。

在一些實施例中，可基於所要產物之生長耦合形成而使用微有氧設計。為檢驗此，可藉由在網路中可行之不同生物質形成速率下首先將產物產率最大化隨後最小化來針對各策略構築生產錐體。若突變網路之所有可能表型之最右邊界為單一點，則意味著在網路中可能之最大生物質形成速率下存在唯一最佳產物產率。在其他情況下，可行表型之最右邊界為垂直線，表明在最大生物質點處，網路可產生在計算範圍內之任何量的產物，包括垂直線之最底點處之最少量。給予該等設計低優先性。

可破壞本文中所揭示之各個表中鑑別之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產策略以增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產。因此，本發明亦提供一種非天然存在之微生物體，其具有將脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產與生物體之生長耦合的代謝修飾，其中代謝修飾包括破壞選自編碼本文中所揭示之各個表中所示之蛋白質及/或酶的基因之一或多種基因。

若確定菌株設計並不充分增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產及/或將產物形成與生物質形成耦合，則菌株中之每一者均可補充有其他缺失。或者，已知在生長條件下不具有顯著活性之一些其他酶可因適應性進化或隨機突變誘發而變得有活性。亦可阻斷該等活性。然而，本文中所揭示之基因缺失清單允許構築展現高產率脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產(包括生長耦合之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產)之菌株。

在一些實施例中，本發明提供一種生產式(I)化合物之方法：



其中 R_1 為 C_{1-24} 直鏈烷基； R_2 為 CH_2OH 、 CHO 或 $COOH$ ； R_3 為 H 、 OH 或側氧基(=O)；且 $====$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為 R_3 連接之碳原子的價數為四，其包含在生產式(I)化合物之條件下且持續充足時間段培養本文中所述的非天然存在之微生物體，其中該非天然存在之微生物體具有一或多個基因破壞，其中該一或多個基因破壞在編碼參與以下之蛋白質或酶的內源基因中出現：由該微生物體天然生產乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、 CO_2 、脂肪酸或丙二醯CoA；路徑中間物向除細胞溶質以外之細胞區室轉移；或由該微生物體天然降解MI-FAE循環中間物、MD-FAE循環中間物或終止路徑中間物，該一或多個基因破壞使得微生物體中之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產增加。因此，蛋白質或酶可為脂肪酸合成酶、乙醯CoA羧化酶、生物素：脫輔基酶連接酶、醯基載體蛋白、硫酯酶、醯基轉移酶、ACP丙二醯轉移酶、脂肪酸延長酶、醯基CoA合成酶、醯基CoA轉移酶、醯基CoA水解酶、丙酮酸脫羧酶、乳酸脫氫酶、醇脫氫酶、形成酸之醛脫氫酶、乙酸激酶、磷酸轉乙醯酶、丙酮酸氧化酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、粒線體丙酮酸載體、過氧化體脂肪酸轉運體、過氧化體醯基CoA轉運體、過氧化體肉鹼/醯肉鹼轉移酶、醯基CoA氧化酶或醯基CoA結合蛋白。在一些態樣中，該一或多個基因破壞包括一或多種基因之缺失。

在一些實施例中，本發明提供一種使用如本文中所述的非天然存在之微生物體生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之方法，其中該MI-FAE循環、該MD-FAE循環或該終止路徑之一或多種酶優先與NADH

輔因子反應或就與NAD(P)H輔因子反應而言具有減少之優先性。舉例而言，該MI-FAE循環或MD-FAE循環之一或多種酶可為3-酮脂醯CoA還原酶或烯醯CoA還原酶。就終止路徑而言，一或多種酶可為醯基CoA還原酶(形成醛)、醇脫氫酶、醯基CoA還原酶(形成醇)、醛脫羰基酶、醯基ACP還原酶、醛脫氫酶(形成酸)或羧酸還原酶。

在一些實施例中，本發明提供一種使用如本文中所述的在編碼蛋白質或酶之基因中具有一或多個基因破壞的非天然存在之微生物體生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之方法，該等蛋白質或酶導致存在於該微生物體之細胞溶質中之NAD(P)H與NAD(P)比率在破壞之後增加。因此，編碼導致存在於微生物體之細胞溶質中之NAD(P)H與NAD(P)比率在破壞之後增加的蛋白質或酶之基因可為NADH脫氫酶、細胞色素氧化酶、甘油-3-磷酸(G3P)脫氫酶、甘油-3-磷酸(G3P)磷酸酶、醇脫氫酶、丙酮酸脫羧酶、醛脫氫酶(形成酸)、乳酸脫氫酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸:醌氧化還原酶、蘋果酸酶及蘋果酸脫氫酶。在一些態樣中，該一或多個基因破壞包括一或多種基因之缺失。

在一些實施例中，本發明提供一種使用本發明的非天然存在之微生物體生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之方法，該非天然存在之微生物體為克拉布特里陽性且在包括過量葡萄糖之培養基中。在該等條件下，如本文中所述，該微生物體可導致存在於該微生物體之細胞溶質中之NAD(P)H與NAD(P)比率增加。

在一些實施例中，本發明提供一種使用如本文中所述的非天然存在之微生物體生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之方法，該非天然存在之微生物體具有至少一種編碼用於本發明之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的細胞外轉運體或細胞外轉運系統之外源核酸。

在一些實施例中，本發明提供一種使用如本文中所述的非天然存在之微生物體生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之方法，其中一或多種

參與以下之內源酶具有衰減之酶活性或表現水準：由該微生物體天然生產乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、CO₂、脂肪酸或丙二醯CoA；路徑中間物向除細胞溶質以外之細胞區室轉移；或由該微生物體天然降解MI-FAE循環中間物、MD-FAE循環中間物或終止路徑中間物。因此，內源酶可為脂肪酸合成酶、乙醯CoA羧化酶、生物素:脫輔基酶連接酶、醯基載體蛋白、硫酯酶、醯基轉移酶、ACP丙二醯轉移酶、脂肪酸延長酶、醯基CoA合成酶、醯基CoA轉移酶、醯基CoA水解酶、丙酮酸脫羧酶、乳酸脫氫酶、醇脫氫酶、形成酸之醛脫氫酶、乙酸激酶、磷酸轉乙醯酶、丙酮酸氧化酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、粒線體丙酮酸載體、過氧化體脂肪酸轉運體、過氧化體醯基CoA轉運體、過氧化體肉鹼/醯肉鹼轉移酶、醯基CoA氧化酶及醯基CoA結合蛋白。

在一些實施例中，本發明提供一種使用如本文中所述的非天然存在之微生物體生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之方法，其中一或多種參與NAD(P)H或NADH氧化之內源酶具有衰減之酶活性或表現水準。因此，一或多種內源酶可為NADH脫氫酶、細胞色素氧化酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、醇脫氫酶、丙酮酸脫羧酶、醛脫氫酶(形成酸)、乳酸脫氫酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸:醯氧化還原酶、蘋果酸酶及蘋果酸脫氫酶。

如本文中所揭示，脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸可在微生物體培養期間、例如在連續及/或接近連續培養期中之任何時間點收集或分離。一般而言，微生物於連續及/或接近連續生長期維持得愈久，可生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之量按比例愈大。

因此，本發明另外提供一種生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之方法，其包括培養如本文中所揭示的具有一或多個基因破壞之非天然存在之微生物體。破壞可在一或多種編碼增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸

生產之酶的基因中進行，包括當基因破壞減小或消除酶活性時視情況將脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產與微生物生長耦合。舉例而言，破壞可賦予非天然微生物體以脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之穩定生長耦合生產。

在一些實施例中，基因破壞可包括完整基因缺失。在一些實施例中，破壞基因之其他方法包括例如藉由省略或添加寡核苷酸或藉由致使基因不可操作之突變進行框移。熟習此項技術者將認識到基因缺失之優點，然而，由於穩定性，其使得非天然存在之生物體不會恢復為未發生基因破壞之親本表型。特定言之，基因破壞係選自如本文中所揭示之基因組。

一旦對可供破壞以增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產之基因組作出計算預測，即可構築、進化並測試菌株。包括基因缺失之基因破壞藉由此項技術中熟知之方法引入宿主生物體中。如本文中所揭示，尤其適用於基因破壞之方法為藉由同源重組。

經工程改造菌株可藉由量測生長速率、受質攝取速率及/或產物/副產物分泌速率來表徵。培養物可生長且用作新鮮分批培養物之接種原，在指數生長期間對其進行量測。生長速率可藉由使用分光光度計(A600)量測光學密度來測定。培養物上清液中葡萄糖及其他有機酸副產物之濃度可藉由如本文中所揭示的適用於所要產物分析之熟知方法(諸如HPLC、GC-MS或其他熟知分析方法)來測定，且用以計算攝取及分泌速率。

含有基因破壞之菌株可展現次最佳生長速率直至其代謝網路已根據其缺失功能進行調節。為了幫助此調節，可使菌株進行適應性進化。藉由使菌株進行適應性進化，細胞生長速率變為主要選擇壓力，且迫使突變細胞重新配置其代謝通量以便增進其生長速率。近來已展示數種大腸桿菌突變體的此代謝重程式化，該等大腸桿菌突變體已在

各種受質上適應性進化以達到由電腦模擬模型先驗性預測之生長速率 (Fong及Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004))。由適應性進化引起之生長改良可伴隨有增進之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產速率。菌株一般重複地進行適應性進化，平行操作，以解決可由宿主生物體展現之進化模式差異 (Fong及Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004)；Fong等人, *J. Bacteriol.* 185:6400-6408 (2003)；Ibarra等人, *Nature* 420:186-189 (2002))，其可能產生具有優於其他菌株的優越生產品質的一種菌株。進化可操作一段時間，典型地2-6週，視所獲得之生長改良率而定。一般而言，一旦獲得穩定表型，即停止進化。

在適應性進化過程之後，再次藉由量測生長速率、受質攝取速率及產物/副產物分泌速率來表徵新菌株。藉由將實際生長及生產產率與來自代謝模型化之生產包絡線一起繪製曲線來將此等結果與理論預測值相比較。選擇最成功設計/進化組合以進一步繼續，且在實驗室規模之分批及連續醱酵中進行表徵。本文中所揭示之方法(諸如OptKnock方法)背後的生長耦合生物化學生產概念亦應引起遺傳穩定過度生產者之產生。因此，以連續模式維持培養物一段延長之時間(例如一個月或一個月以上)以評估長期穩定性。可獲取週期性樣品以確保維持產率及生產力。

適應性進化為可用以增加突變體或經工程改造微生物菌株或在非天然環境條件下生長之野生型菌株之生長速率的強大技術。其尤其適用於經由諸如OptKnock(其引起生長耦合產物形成)之方法設計的菌株。因此，朝著最佳生長菌株之進化亦將間接地使生產最佳化。經由基因剔除及適應性進化產生大腸桿菌K-12 MG1655之獨特菌株。(Fong及Palsson, *Nat. Genet.* 36:1056-1058 (2004))。在此工作中，所有適應性進化培養物均藉由在達到生長停滯期之前將分批培養物連續繼代至新鮮培養基中而維持於延長之指數生長，因此使得生長速率成爲

主要選擇壓力。構築基因剔除菌株且使其在補充有不同碳受質(每個基因剔除菌株四種)之基本培養基上進化。一式兩份或一式三份地進行進化培養，得到總共50個進化基因剔除菌株。進化培養物維持於指數生長直至達到穩定生長速率。在所檢測的50例中之38例中，計算預測值在預測基因剔除菌株之進化後生長速率方面為精確的(在10%內)。此外，OptKnock設計與適應性進化之組合已產生改良之乳酸生產菌株。(Fong等人, *Biotechnol. Bioeng.* 91:643-648 (2005))。相似方法可應用於本文中所揭示之菌株且應用於各種宿主菌株。

存在多種已開發技術用於進行適應性進化。例示性方法揭示於本文中。在一些實施例中，本發明的非天然存在之生物體之最佳化包括利用適應性進化技術增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產及/或生產菌株之穩定性。

連續培養涉及將小體積之生長培養物反覆轉移至大得多的含有新鮮生長培養基之容器中。當在新容器中培養之生物體已生長至飽和時，重複該過程。此方法已在文獻(Lenski及Travisano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:6808-6814 (1994))中在實驗中用以達成維持培養物之最長久展示，其清楚地展示在一年內生殖速率之一致改良。典型地，培養物之轉移通常在指數期期間進行，因此每天精確計算轉移體積以維持貫穿下一個24小時時段的指數生長。手動連續稀釋成本低且易於平行化。

在連續培養物中，恆化器中之細胞生長代表保留極高分率細胞群體之極端稀釋情況。隨著培養物生長且變得飽和，以新鮮培養基替換小比例之生長培養物，從而允許培養物連續生長接近於其最大群體尺寸。恆化器已用以展現生殖速率的短期快速改良(Dykhuisen, *Methods Enzymol.* 613-631 (1993))。此等裝置之潛在適用性被認識到，但傳統恆化器因稀釋抗性(靜態)變異體之非期望選擇而不能維持

長時期之選擇來達成增加之生殖速率。此等變異體能夠藉由黏附於恆化器之表面而抵抗稀釋，且藉此勝過黏著性較小之個體，包括具有較高生殖速率者，因此妨礙該裝置之預期目的(Chao及Ramsdell, *J. Gen. Microbiol* 20:132-138 (1985))。一種克服此缺點之可行方法為建構具有兩個生長腔室之裝置，其如先前所述定期地經歷短暫滅菌階段(Marliere及Mutzel, 美國專利第6,686,194號)。

Evolugator™為由Evolugate, LLC (Gainesville, FL)開發之連續培養裝置，且相較於傳統進化技術明顯省時省力(de Crecy等人, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77:489-496 (2007))。細胞在達到生長停滯期之前藉由將分批培養物連續繼代至新鮮培養基中而維持於延長之指數生長。藉由自動化光學密度量測及液體處理，Evolugator™可使用較大培養物體積在高速率下進行連續轉移，因此接近恆化器在細胞擬合進化中之效率。舉例而言，轉譯設備之組件不足且具有嚴重受妨礙生長的不動桿菌屬ADP1之突變體在200代中進化至野生型生長速率之80%。然而，與將細胞維持於單一容器中之恆化器對比，該機器藉由在管線軸之再分區域中自一個「反應器」移動至下一個中來操作，因此消除關於壁生長之任何選擇。轉移體積為可調節的，且通常設定為約50%。此裝置之一個缺點為，其較大且成本高，因此平行操作較大數目之進化不可行。此外，在當前裝置配置下，氣體添加未得到良好調節，且嚴格缺氧條件未得以維持。然而，此為使生產菌株適應性進化之替代方法。

如本文中所揭示，可將編碼脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑之所要活性的核酸引入宿主生物體中。在一些情況下，可能需要修飾脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑酶或蛋白質之活性以增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產。舉例而言，可將增加蛋白質或酶活性之已知突變引入編碼核酸分子中。另外，可應用最佳化方法以增加酶或蛋白質活性及

/或降低抑制活性，例如降低負調節因子之活性。

一種此類最佳化方法為定向進化(directed evolution)。定向進化為一種涉及引入靶向特定基因之突變以改良及/或改變酶性質之強大方法。經改良及/或改變之酶可經由開發及實施允許自動篩選多種酶變異體(例如 $> 10^4$ 種)之敏感性高產量篩選分析來鑑別。典型地進行數輪反覆之突變誘發及篩選以得到具有最佳化性質之酶。可有助於鑑別供突變誘發之基因區域之計算演算法亦已經開發且可顯著減少需要產生及篩選之酶變異體的數目。已開發出眾多定向進化技術(關於評述，參見Hibbert等人，*Biomol. Eng* 22:11-19 (2005)；Huisman及Lalonde, *Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries* pgs. 717-742 (2007), Patel (編), CRC Press；Otten及Quax. *Biomol. Eng* 22:1-9 (2005)；及Sen等人，*Appl Biochem. Biotechnol* 143:212-223 (2007))以有效建立多樣性變異體文庫，且此等方法已成功地應用於改良涉及許多酶類別的多種性質。已藉由定向進化技術改良及/或改變之酶特徵包括例如：選擇性/特異性，用於轉化非天然受質；溫度穩定性，用於穩固高溫加工；pH值穩定性，用於在較低或較高pH值條件下生物加工；受質或產物容限，使得可達成高產物效價；結合(K_m)，包括加寬受質結合以包括非天然受質；抑制(K_i)，以移除產物、受質或關鍵中間物之抑制；活性(k_{cat})，以提高酶促反應速率以達成所要通量；表現水準，以增加蛋白質產率及總路徑通量；氧氣穩定性，針對在有氧條件下操作空氣敏感性酶；及缺氧活性，針對在無氧氣存在下操作好氧酶。

下文更詳細地描述已開發用於基因突變誘發及多樣化以靶向特異性酶之所要特性的例示性方法。該等方法為熟習此項技術者所熟知。此等方法中任一者可用於對脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑酶或蛋白質之活性進行改變及/或最佳化。

EpPCR (Pritchard等人, *J Theor. Biol.* 234:497-509 (2005))藉由以下方式來引入隨機點突變：藉由添加 Mn^{2+} 離子降低PCR反應中DNA聚合酶的保真度；偏重dNTP濃度；或其他條件變化。將突變誘發限於相關目標基因之五步選殖法包括：1) 易錯PCR擴增相關基因；2) 限制酶消化；3) 凝膠純化所要DNA片段；4) 接合至載體中；5) 將基因變異體轉型至適合宿主中且針對改良效能篩選文庫。此方法可在單一基因中同時產生多個突變，其可適用於篩選較大數目之具有所要活性之可能變異體。可藉由EpPCR產生高數目之突變體，因此例如使用機器人之高產量篩選分析或選擇方法適用於鑑別具有所需特徵者。

易錯滾環擴增(Error-prone Rolling Circle Amplification, epRCA) (Fujii等人, *Nucleic Acids Res.* 32:e145 (2004)；及Fujii等人, *Nat. Protoc.* 1:2493-2497 (2006))具有許多與epPCR相同之元件，除了使用完整環形質體作為模板，且使用在最後2個核苷酸上具有核酸外切酶抗性硫代磷酸酯鍵之隨機6-聚體來擴增質體，隨後轉型至其中質體已在連續重複序列處重新環化之細胞中。調節 Mn^{2+} 濃度可稍微改變突變速率。此技術使用一種簡單易錯單步法以產生具有3-4個突變/kbp之質體的完整複本。不需要限制酶消化或特異性引子。另外，此方法典型地以市售套組形式可得。

DNA或家族改組(Stemmer, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10747-10751 (1994)；及Stemmer, *Nature* 370:389-391 (1994))典型地涉及用核酸酶(諸如Dnase I或EndoV)消化兩種或兩種以上變異基因以產生隨機片段池，該隨機片段池藉由在DNA聚合酶存在下黏接及延伸之循環而重組，產生嵌合基因文庫。片段彼此引發(prime)且當一個複本引發另一複本(模板切換)時發生重組。此方法可用於>1 kbp DNA序列。除藉由片段重組裝產生之突變重組體外，此方法亦在延伸步驟中以類似於易錯PCR之速率引入點突變。該方法可用以移除有害、隨機及中性

突變。

交錯延伸(StEP) (Zhao等人, *Nat. Biotechnol.* 16:258-261 (1998))需要模板引發，隨後為具有變性與極短持續時間的黏接/延伸(短至5秒)之2步PCR的重複循環。生長片段黏接於不同模板且進一步延伸，其經重複直至產生全長序列為止。模板切換意謂大多數所得片段具有多個親本。低保真度聚合酶(Taq與Mutazyme)之組合因相反突變譜而減小易錯偏倚。

在隨機引發重組(Random Priming Recombination, RPR)中，使用隨機序列引子產生許多與模板之不同區段互補之短DNA片段(Shao等人, *Nucleic Acids Res* 26:681-683 (1998))。鹼基錯誤併入及經由epPCR錯誤引發得到點突變。短DNA片段基於同源性彼此引發且藉由重複熱循環重組並重組裝成全長。在此步驟之前移除模板可確保低親本重組體。此方法如大多數其他方法可歷經多個反覆來進行以進化獨特性質。此技術避免序列偏倚，與基因長度無關且需要極少親本DNA供應用。

在異雙螺旋重組中，使用線性化質體DNA形成藉由錯配修復法來修復之異雙螺旋(Volkov等人, *Nucleic Acids Res.* 27:e18 (1999)；及Volkov等人, *Methods Enzymol.* 328:456-463 (2000))。錯配修復步驟至少稍微誘發突變。異雙螺旋比線性同雙螺旋(homoduplex)轉型更有效。此方法適用於大基因及全部操縱子。

暫時性模板之隨機嵌合發生(RACHITT) (Coco等人, *Nat. Biotechnol.* 19:354-359 (2001))採用單股DNA (ssDNA)之Dnase I切斷及篩分。同源片段在無聚合酶存在下與互補ssDNA骨架雜交。任何重疊之未雜交片段末端均藉由核酸外切酶修剪。填充片段之間間隙，且隨後接合得到與骨架雜交之全長不同股之池，其含有U以排除擴增。隨後破壞骨架且藉由PCR擴增以與不同股互補之新股替代。該方法涉

及僅來自一個母體之一個股(骨架)，而引發片段源自其他基因，且針對母體骨架進行選擇。因此，不發生親本片段再黏接。以核酸外切酶修剪重疊片段。另外，此在概念上類似於DNA改組及StEP。因此，應不存在同輩份物(sibling)、存在極少非活性物且不存在未改組親本。此技術之優勢在於產生極少或不產生親本基因且相對於標準DNA改組可得到多得多之交越(crossover)。

截短模板之重組延伸(RETT)需要在用作模板池之單向ssDNA片段存在下，使模板自引子轉換成單向生長股(Lee等人, *J. Molec. Catalysis* 26:119-129 (2003))。不使用DNA核酸內切酶。單向ssDNA係藉由DNA聚合酶使用隨機引子產生，或藉由連續缺失使用核酸外切酶產生。單向ssDNA僅為模板且不為引子。隨機引發及核酸外切酶並未引入序列偏好作為DNA改組/RACHITT之酶促裂解的真相。RETT因為使用正常PCR條件而非極短延伸，所以可比StEP更輕易最佳化。重組係作為PCR步驟之分項出現，亦即無直接改組。此方法亦可因不存在暫停而比StEP更隨機。

在簡併寡核苷酸基因改組(DOGS)中，使用簡併引子控制分子之間的重組；(Bergquist及Gibbs, *Methods Mol. Biol* 352:191-204 (2007)；Bergquist等人, *Biomol. Eng* 22:63-72 (2005)；Gibbs等人, *Gene* 271:13-20 (2001))此可用於控制諸如DNA改組之其他方法使親本基因再生的趨勢。此方法可與所選基因區段之隨機突變誘發(epPCR)組合。此可為阻斷親本序列重組之良好方法。不需要核酸內切酶。藉由調節所產生區段之輸入濃度，可向所要骨架偏倚。此方法允許在無限制酶消化物之情況下自無關母體進行DNA改組且允許選擇隨機突變誘發方法。

用於產生雜合酶之增量截短(ITCHY)產生具有所關注之基因或基因片段之1個鹼基對缺失的組合文庫(Ostermeier等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:3562-3567 (1999)；及Ostermeier等人, *Nat. Biotechnol.*

17:1205-1209 (1999))。在2種不同基因之片上在相反方向上引入截短。將其接合在一起且選殖該等融合物。此技術不需要2種親本基因之間的同源性。當ITCHY與DNA改組組合時，將系統稱作SCRATCHY(參見下文)。兩者之主要優勢在於無需親本基因之間的同源性；例如經由ITCHY產生大腸桿菌與人類基因之間的功能融合物。當產生ITCHY文庫時，捕捉所有可能之交越。

用於產生雜合酶之硫增量截短(THIO-ITCHY)類似於ITCHY法，除了使用硫代磷酸酯dNTP產生截短物(Lutz等人, *Nucleic Acids Res* 29:E16 (2001))。相對於ITCHY，THIO-ITCHY可更輕易地最佳化，提供更多再現性及可調性。

SCRATCHY將組合兩種重組基因之方法(ITCHY與DNA改組)(Lutz等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98:11248-11253 (2001))。SCRATCHY組合ITCHY與DNA改組之最佳特徵。第一，使用ITCHY在基因片段之間以DNA同源性無關方式產生廣泛融合物組。隨後使此人造家族經受DNA改組步驟以增大交越數目。可將計算預測值用於最佳化中。當序列一致性在80%以下時，SCRATCHY比DNA改組更有效。

在隨機漂移突變誘發(Random Drift Mutagenesis, RNDM)中，在經由epPCR進行突變後篩選/選擇彼等保留適用活性之突變(Bergquist等人, *Biomol. Eng.* 22:63-72 (2005))。隨後，將該等突變用於DOGS以在多種活性突變體之間或在活性突變體與一些其他所需母體之間產生融合物重組體。經設計以促進中性突變分離；其目的在於針對保留之催化活性進行篩選而無論此活性高於或低於原始基因中之活性。當篩選能夠偵測到在背景以上之活性時，RNDM可用於高產量分析中。RNDM已在產生多樣性中用作DOGS前端。該技術強加在改組或其他後續步驟之前之活性要求；表明中性漂移文庫自較小文庫產生活性之

較高/較快改良。儘管公開使用epPCR，但此技術亦可應用於其他大規模突變誘發方法。

序列飽和突變誘發(SeSaM)為一種隨機突變誘發方法，其：1) 使用隨機併入硫代磷酸核苷酸及裂解產生隨機長度片段之池；此池用作模板以2) 在「通用」鹼基(諸如肌核苷)存在下延伸；3) 含肌核苷之補體複製引起隨機鹼基併入且因此發生突變誘發(Wong等人, *Biotechnol. J.* 3:74-82 (2008)；Wong等人, *Nucleic Acids Res.* 32:e26 (2004)；及Wong等人, *Anal. Biochem.* 341:187-189 (2005))。使用此技術，可能在2至3日內使用簡單方法產生大的突變體文庫。此技術與DNA聚合酶之突變偏倚相比為非定向的。此方法之差異使得此技術與epPCR互補(或為其替代方法)。

在合成改組中，重疊寡核苷酸經設計以編碼「目標中之所有基因多樣性」且實現經改組子代之極高多樣性(Ness等人, *Nat. Biotechnol.* 20:1251-1255 (2002))。在此技術中，可設計待改組片段。此有助於提高子代之所得多樣性。可設計序列/密碼子偏倚以使得較遠相關之序列以接近對於較緊密相關序列所觀測到之速率的速率重組。另外，該技術不需要實體上具有模板基因。

核苷酸交換及切除技術NexT利用dUTP併入隨後相繼用尿嘧啶DNA糖基化酶及嘧啶處理之組合以進行終點DNA切斷(Muller等人, *Nucleic Acids Res.* 33:e117 (2005))。基因係使用內部PCR引子延伸與校對聚合酶(proofreading polymerase)進行重組裝。改組尺寸可使用不同dUPT:dTTP比率直接控制。此為使用尿嘧啶併入及裂解之簡單方法的終點反應。諸如8-側氧基-鳥嘌呤之其他核苷酸類似物可用於此方法。另外，該技術係以極短片段(86 bp)良好工作且具有低錯誤率。用於此技術之DNA的化學裂解產生極少未改組純系。

在不依賴序列同源性之蛋白質重組(SHIPREC)中，使用連接子促

進兩種相關性較弱或無關基因之間的融合。使用核酸酶處理在兩種基因之間產生一系列嵌合體。此等融合物產生單交越雜合物之文庫 (Sieber等人, *Nat. Biotechnol.* 19:456-460 (2001))。此產生有限類型之改組且需要一種突變誘發之各別方法。另外，因為無需同源性，所以此技術可產生具有不同分數之兩種無關親本基因中每一者的嵌合體之文庫。以細菌CP450之血色素結合域融合至哺乳動物CP450之N端區，藉此測試SHIPREC；此在溶解性較高之酶中產生哺乳動物活性。

在基因位點飽和突變誘發™(Gene Site Saturation Mutagenesis™, GSSM™)中，起始物質為含有插入物及兩個引子之超螺旋 dsDNA 質體，其在所要突變位點處簡併 (Kretz 等人, *Methods Enzymol.* 388:3-11 (2004))。攜帶相關突變之引子黏接至 DNA 之相反股上之相同序列。該突變典型地在引子中間且每一側側接正確序列之約 20 個核苷酸。引子中之序列為 NNN 或 NNK (編碼) 及 MNN (非編碼) (N = 均為 4, K = G、T, M = A、C)。延伸後，使用 DpnI 來消化 dam 甲基化 DNA 以消除野生型模板。此技術探索在既定基因座 (亦即一個密碼子) 處之所有可能之胺基酸取代。該技術有助於在沒有無義密碼子之單一位點處產生所有可能之置換且以相等至接近相等之程度呈現最有可能之對偶基因。此技術不需要目標酶之結構、機制或域的先前知識。若隨後進行改組或基因重組裝，則此技術產生含有單一位點向上突變 (single-site up-mutation) 之所有可能組合之重組體的不同文庫。已顯示此技術組合適用於 50 種以上不同酶之成功進化，以及既定酶中之一種以上性質。

組合型卡匣突變誘發 (CCM) 涉及使用短寡核苷酸卡匣置換具有大量可能胺基酸序列改變之限制區域 (Reidhaar-Olson 等人 *Methods Enzymol.* 208:564-586 (1991)；及 Reidhaar-Olson 等人 *Science* 241:53-57 (1988))。使用此技術可能在二或三個位點處同時取代。另外，該

方法測試在有限範圍之位點處可能序列變化的較大多重性。此技術已用以探索 λ 抑制因子DNA結合域之資訊含量。

組合型多卡匣突變誘發(CMCM)基本上類似於CCM，但其用作較大程式之一部分：1) 在高突變速率下使用epPCR以2) 鑑別熱點及熱區域，且隨後3) 藉由CMCM延伸以覆蓋蛋白質序列空間之界定區域(Reetz等人, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 40:3589-3591 (2001))。如用CCM，此方法可測試目標區域上事實上所有可能之改變。若連同產生隨機突變及改組基因之方法一起使用，則其提供產生不同改組蛋白質之優良方法。此方法將酶之對映選擇性(enantioselectivity)成功提高51倍。

在致突變菌株技術(Mutator Strains technique)中，條件性 ts 致突變質體使選擇期間的隨機及自然突變頻率增加20至4000倍且在無需進行選擇時阻止有害突變之積聚(Selifonova等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3645-3649 (2001))。此技術係基於質體來源 $mutD5$ 基因，其編碼DNA聚合酶III之突變型次單元。此次單元結合於內源DNA聚合酶III且損害具有質體之任何菌株中聚合酶III之校對能力。發生各種鹼基取代及框移突變。為了有效使用，致突變質體應在達成所要表型後立即移除；此係經由溫度敏感性(ts)複製起點實現，其使得質體在41°C下固化。應注意，已探索致突變菌株很長時間(參見Low等人, *J. Mol. Biol.* 260:359-3680 (1996))。在此技術中，觀測到極高自發突變速率。條件性性質將非所要背景突變減至最少。此技術可與適應性進化組合以提高突變誘發速率且較快速達成所要表型。

精確突變誘發(Look-Through Mutagenesis, LTM)為評估及最佳化所選胺基酸之組合突變的多維突變誘發方法(Rajpal等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102:8466-8471 (2005))。不以所有可能之胺基酸變化使各位點飽和，選擇一組九個變化以涵蓋胺基酸R基團化學之範圍。

每個位點較少變化允許多個位點經受此類型突變誘發。經由此方法已使對低奈莫耳濃度至皮莫耳濃度抗體之結合親和力提高800倍以上。此為最小化隨機組合數目之合理方法且可藉由極大減少待篩選純系之數目提高發現改良特性之能力。此已應用於抗體工程改造，特定言之應用於提高結合親和力及/或降低解離。該技術可與篩選或選擇組合。

基因重組裝為DNA改組方法，其可同時應用於多個基因或建立單一基因之大型嵌合體文庫(多個突變)(由Verenium公司供應之可調基因重組裝(Tunable GeneReassembly)TM (TGRTM)技術)。典型地此技術係與超高產量篩選組合用以查詢所要改良之所呈現序列空間。此技術允許與同源性無關之多基因重組。交越事件之精確數目及位置可使用經由生物資訊分析設計之片段來預測定。此技術產生極高水準之多樣性與事實上無親本基因重組及低水準非活性基因。與GSSMTM組合，可測試較大突變範圍之改良活性。該方法允許DNA改組之「摻合」及「精細調節」，例如，密碼子使用可經最佳化。

電腦模擬蛋白質設計自動化(PDA)為最佳化演算法，其錨定具備特定摺疊之結構上界定之蛋白質骨架且搜尋序列空間以進行胺基酸取代，由此可使摺疊及總體蛋白質能量學穩定(Hayes等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99:15926-15931 (2002))。此技術使用基於電腦模擬結構之熵預測以朝著蛋白質胺基酸變化方面搜尋結構容限。應用統計力學以計算在各位置處之偶合相互作用。朝著胺基酸取代方面之結構容限為偶合之量度。最終，將此技術設計為產生蛋白質性質之所要修改，同時維持結構特徵完整性。該方法利用計算方法評估且允許過濾極大數目之可能的序列變異體(10^{50})。選擇待測試序列變異體係關於基於最有利熱力學之預測。表面上僅穩定性或與穩定性有關之性質可用此技術有效解決。該方法已成功用於一些治療蛋白質中，尤其用於

工程改造免疫球蛋白。電腦模擬預測可避免測試相當多可能之變異體。基於現存三維結構之預測比基於假想結構之預測更可能成功。此技術可輕易預測及允許多種同時突變之靶向篩選，此篩選因數目指數增大而不可能用純粹實驗技術實現。

反覆飽和突變誘發(ISM)涉及：1) 使用結構/功能知識來選擇酶改良之可能位點；2) 使用諸如Stratagene QuikChange (Stratagene；San Diego CA)之突變誘發方法在所選位點處進行飽和突變誘發；3) 篩選/選擇所要性質；及4) 使用經改良之純系，在另一位點處重新開始，且繼續重複直至獲得所要活性為止(Reetz等人, *Nat. Protoc.* 2:891-903 (2007)；及Reetz等人, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 45:7745-7751 (2006))。此為經證明之方法，其確保產生在既定位置處之所有可能置換以便篩選/選擇。

任何以上提及之突變誘發方法均可單獨使用或以任何組合使用。另外，定向進化方法中任一者或其組合可與如本文中所述之適應性進化技術聯合使用。

應理解，亦在本文中所提供的本發明之定義內提供不會實質上影響本發明之各種實施例之活性的修改。因此，以下實例意欲說明而非限制本發明。

實例I

藉由MI-FAE循環、MD-FAE循環及醯基CoA終止路徑生產脂肪醇及脂肪醛

可用作賦予宿主微生物體以脂肪醇及脂肪醛生產能力之來源的編碼核酸及物種進一步例示如下。

多酶複合物

在一個例示性實施例中，基因*fadA*及*fadB*編碼多酶複合物，該多酶複合物展現丙二醯CoA非依賴性FAS路徑之三種成分活性，亦即酮

脂醯 CoA 硫解酶、3-羥基醯基 CoA 脫氫酶及烯醯 CoA 水合酶活性 (Nakahigashi, K. 及 H. Inokuchi, *Nucleic Acids Research* 18:4937 (1990); Yang 等人, *Journal of Bacteriology* 173:7405-7406 (1991); Yang 等人, *Journal of Biological Chemistry* 265:10424-10429 (1990); Yang 等人, *Biochemistry* 30:6788-6795 (1990))。 *fadI* 及 *fadJ* 基因編碼相似活性，其可取代以上丙二醯 CoA 非依賴性 FAS 賦予之基因 *fadA* 及 *fadB*。大腸桿菌之醯基 CoA 脫氫酶由 *fadE* 編碼 (Campbell 等人, *J Bacteriol* 184: 3759-64)。此酶催化 β -氧化之限速步驟 (O'Brien 等人, *J Bacteriol* 132:532-40 (1977))。以上 *fad* 基因中之每一者的核酸序列為此項技術中所熟知，且可使用以下寄存編號在諸如 Genbank 之公共資料庫得到。

蛋白質	GenBank ID	GI 編號	生物體
<i>fadA</i>	YP_026272.1	49176430	大腸桿菌
<i>fadB</i>	NP_418288.1	16131692	大腸桿菌
<i>fadI</i>	NP_416844.1	16130275	大腸桿菌
<i>fadJ</i>	NP_416843.1	16130274	大腸桿菌
<i>fadR</i>	NP_415705.1	16129150	大腸桿菌
<i>fadE</i>	AAC73325.2	87081702	大腸桿菌

步驟 A. 硫解酶

本文中(圖 1A 及 6A)描述適用於脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產之硫解酶，亦稱為 β -酮硫解酶、醯基 CoA C-轉乙醯酶、醯基 CoA:醯基 CoA C-醯基轉移酶、3-側氧基醯基 CoA 硫解酶、3-酮脂醯 CoA 硫解酶、 β -酮脂醯 CoA 硫解酶及醯基 CoA 硫解酶。例示性乙醯乙醯 CoA 硫解酶包括以下之基因產物：來自大腸桿菌之 *atoB* 及同源物 *yqeF* (Martin 等人, *Nat. Biotechnol* 21:796-802 (2003))；來自丙酮丁醇梭菌之 *thlA* 及 *thlB* (Hanai 等人, *Appl Environ Microbiol* 73:7814-7818 (2007)；Winzer 等人, *J. Mol. Microbiol Biotechnol* 2:531-541 (2000))；及來自釀酒酵母之 *ERG10* (Hiser 等人, *J. Biol. Chem.* 269:31383-31389 (1994))。

釀酒酵母之降解硫解酶由POT1編碼。另一候選硫解酶為富養羅爾斯通氏菌之*phaA*基因產物(Jenkins等人, *Journal of Bacteriology* 169:42-52 (1987))。來自生枝動膠菌之乙醯乙醯CoA硫解酶在生物合成方向上不可逆且可得到晶體結構(Merilainen等人, *Biochem* 48: 11011-25 (2009))。此等硫解酶及同源物之寄存編號包括於下表中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
atoB	NP_416728	16130161	大腸桿菌
yqeF	NP_417321.2	90111494	大腸桿菌
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	釀酒酵母
POT1	NP_012106.1	6322031	釀酒酵母
phaA	YP_725941	113867452	富養羅爾斯通氏菌
phbA	P07097.4	135759	生枝動膠菌
h16_A1713	YP_726205.1	113867716	富養羅爾斯通氏菌
pcaF	YP_728366.1	116694155	富養羅爾斯通氏菌
h16_B1369	YP_840888.1	116695312	富養羅爾斯通氏菌
h16_A0170	YP_724690.1	113866201	富養羅爾斯通氏菌
h16_A0462	YP_724980.1	113866491	富養羅爾斯通氏菌
h16_A1528	YP_726028.1	113867539	富養羅爾斯通氏菌
h16_B0381	YP_728545.1	116694334	富養羅爾斯通氏菌
h16_B0662	YP_728824.1	116694613	富養羅爾斯通氏菌
h16_B0759	YP_728921.1	116694710	富養羅爾斯通氏菌
h16_B0668	YP_728830.1	116694619	富養羅爾斯通氏菌
h16_A1720	YP_726212.1	113867723	富養羅爾斯通氏菌
h16_A1887	YP_726356.1	113867867	富養羅爾斯通氏菌
bktB	YP_002005382.1	194289475	臺灣貪銅菌
Rmet_1362	YP_583514.1	94310304	耐金屬羅爾斯通氏菌
Bphy_0975	YP_001857210.1	186475740	結瘤伯克霍爾德菌

許多硫解酶催化較長鏈醯基CoA產物之形成。例示性硫解酶包括例如3-側氧基己二醯CoA硫解酶(EC 2.3.1.174)及醯基CoA硫解酶(EC 2.3.1.16)。3-側氧基己二醯CoA硫解酶將琥珀醯CoA及乙醯CoA轉化為3-側氧基己二醯CoA，且為用於芳族化合物降解之 β -酮己二酸路徑的關鍵酶。該酶廣布於土壤細菌及真菌中，包括惡臭假單胞菌(Harwood等人, *J Bacteriol.* 176:6479-6488 (1994))及醋酸鈣不動桿菌(Doten等人, *J Bacteriol.* 169:3168-3174 (1987))。由以下編碼之基因產物亦催

化此轉化：假單胞菌屬菌株 B13 中之 *pcaF* (Kaschabek 等人, *J. Bacteriol.* 184:207-215 (2002))、惡臭假單胞菌 *U* 中之 *phaD* (Olivera 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* 95:6419-6424 (1998))、螢光假單胞菌 *ST* 中之 *paaE* (Di 等人, *Arch. Microbiol* 188:117-125 (2007)) 及來自大腸桿菌之 *paaJ* (Nogales 等人, *Microbiology* 153:357-365 (2007))。若干 β -酮硫解酶在側氧基己二醯 CoA 形成方向上展現顯著及選擇性活性，包括來自惡臭假單胞菌之 *bkt*、來自綠膿假單胞菌 *PAO1* 之 *pcaF* 及 *bkt*、來自不明確伯克霍爾德菌 *AMMD* 之 *bkt*、來自大腸桿菌之 *paaJ* 及來自惡臭假單胞菌之 *phaD*。富養羅爾斯通氏菌 (以前稱為富養產鹼菌 (*Alcaligenes eutrophus*)) 之由基因 *bktB* 及 *bktC* 編碼的兩種基因產物催化 3-側氧基庚二醯 CoA 之形成 (Slater 等人, *J. Bacteriol.* 180:1979-1987 (1998); Haywood 等人, *FEMS Microbiology Letters* 52:91-96 (1988))。已知 *BktB* 蛋白質之序列；然而，尚未報導 *BktC* 蛋白質之序列。*BktB* 在長度 C6 及 C8 之受質上亦有活性 (Machado 等人, *Met Eng* in press (2012))。沼澤紅假單胞菌之 *pim* 操縱子亦編碼 β -酮硫解酶，其由 *pimB* 編碼，經預測在苯甲醯 CoA 降解期間在降解方向上催化此轉化 (Harrison 等人, *Microbiology* 151:727-736 (2005))。氫養互營菌中之 β -酮硫解酶候選物藉由與 *bktB* 之序列同源性鑑別 (43% 一致性，評估 = $1e-93$)。

基因名稱	GI 編號	GenBank 寄存編號	生物體
<i>paaJ</i>	16129358	NP_415915.1	大腸桿菌
<i>pcaF</i>	17736947	AAI02407	克氏假單胞菌 (<i>B13</i>)
<i>phaD</i>	3253200	AAC24332.1	惡臭假單胞菌
<i>pcaF</i>	506695	AAA85138.1	惡臭假單胞菌
<i>pcaF</i>	141777	AAC37148.1	醋酸鈣不動桿菌
<i>paaE</i>	106636097	ABF82237.1	螢光假單胞菌
<i>bkt</i>	115360515	YP_777652.1	不明確伯克霍爾德菌 <i>AMMD</i>
<i>bkt</i>	9949744	AAG06977.1	綠膿假單胞菌 <i>PAO1</i>
<i>pcaF</i>	9946065	AAG03617.1	綠膿假單胞菌 <i>PAO1</i>
<i>bktB</i>	YP_725948	11386745	富養羅爾斯通氏菌
<i>pimB</i>	CAE29156	39650633	沼澤紅假單胞菌

參與脂肪酸降解之 β -氧化循環的醯基CoA硫解酶(EC 2.3.1.16)在具有不同鏈長之大量醯基CoA受質上展現活性。例示性醯基CoA硫解酶見於擬南芥(Cruz等人, *Plant Physiol* 135:85-94 (2004))、智人(Mannaerts等人, *Cell Biochem Biophys* 32:73-87 (2000))、向日葵(Schiedel等人, *Prot Expr Purif* 33:25-33 (2004))中。硫解酶之鏈長特異性可藉由此項技術中熟知之方法來分析(Wrensford等人, *Anal Biochem* 192:49-54 (1991))。見於大鼠肝中之過氧化體硫解酶催化較長鏈醯基CoA產物自辛醯CoA之乙醯CoA依賴性形成(Horie等人, *Arch Biochem Biophys* 274: 64-73 (1989); Hijikata等人, *J Biol Chem* 265, 4600-4606 (1990))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
AY308827.1:1..1350	AAQ77242.1	34597334	向日葵
KAT2	Q56WD9.2	73919871	擬南芥
KAT1	Q8LF48.2	73919870	擬南芥
KAT5	Q570C8.2	73919872	擬南芥
ACAA1	P09110.2	135751	智人
LCTHIO	AAF04612.1	6165556	野豬
Acaal a	NP_036621.1	6978429	褐家鼠
Acaal b	NP_001035108.1	90968642	褐家鼠
Acaa2	NP_569117.1	18426866	褐家鼠

乙醯乙醯CoA亦可藉由乙醯乙醯CoA合成酶(EC 2.3.1.194)自乙醯CoA及丙二醯CoA合成。此酶(*FhsA*)已於土壤細菌鏈黴菌屬CL190中表徵，其中其參與甲羥戊酸生物合成(Okamura等人, *PNAS USA* 107:11265-70 (2010))。由於此酶催化基本上不可逆反應，因此其尤其適用於用於過度生產源自乙醯乙醯CoA之代謝物、燃料或化學品(諸如長鏈醇)之代謝工程改造應用。其他乙醯乙醯CoA合成酶基因可藉由與*fhsA*之序列同源性鑑別。醯基CoA合成酶(諸如*fhsA*)及同源物可藉由此項技術中已知之方法經工程改造或進化以接受較長醯基CoA受質。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
fhsA	BAJ83474.1	325302227	鏈黴菌屬 <i>CL190</i>
AB183750.1:11991..12971	BAD86806.1	57753876	鏈黴菌屬 <i>KO-3988</i>
epzT	ADQ43379.1	312190954	肉桂地鏈黴菌
ppzT	CAX48662.1	238623523	環圈鏈黴菌
O3I_22085	ZP_09840373.1	378817444	巴西諾卡菌

上文所述之所選硫解酶之鏈長選擇性概述於下表中。

鏈長	基因	生物體
C4	atoB	大腸桿菌
C6	phaD	惡臭假單胞菌
C6-C8	bktB	富養羅爾斯通氏菌
C10-C16	Acaala	褐家鼠

步驟B. 3-側氧基醯基CoA還原酶

3-側氧基醯基CoA還原酶(亦稱為3-羥基醯基CoA脫氫酶、3-酮脂醯CoA還原酶、 β -酮脂醯CoA還原酶、 β -羥基醯基CoA脫氫酶、羥基醯基CoA脫氫酶及酮脂醯CoA還原酶)催化3-側氧基醯基CoA受質還原為3-羥基醯基CoA產物(圖1B及圖6B)。此等酶經常參與脂肪酸 β -氧化及芳族降解路徑。舉例而言，大腸桿菌中之由*fadB*及*fadJ*編碼的兩種脂肪酸氧化複合物之次單元充當3-羥基醯基CoA脫氫酶(Binstock等人, *Methods Enzymol.* 71 Pt C:403-411 (1981))。基因剔除由*fadR*編碼之負調節因子可用以活化*fadB*基因產物(Sato等人, *J Biosci. Bioeng* 103:38-44 (2007))。來自大腸桿菌之另一3-羥基醯基CoA脫氫酶為*paaH*(Ismail等人, *European Journal of Biochemistry* 270:3047-3054 (2003))。其他3-側氧基醯基CoA酶包括以下之基因產物：惡臭假單胞菌中之*phaC*(Olivera等人, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* 95:6419-6424 (1998))及螢光假單胞菌中之*paaC*(Di等人, 188:117-125 (2007))。此等酶在苯乙酸或苯乙烯之分解代謝期間催化3-羥基己二醯CoA可逆氧化為3-側氧基己二醯CoA。其他適合酶候選物包括來自纖細裸藻之AAO72312.1(Winkler等人, *Plant Physiology* 131:753-762 (2003))及來自惡臭假單胞菌之*paaC*(Olivera等人, *PNAS USA* 95:6419-6424 (1998))。催化乙醯乙醯CoA還原為3-羥基丁醯CoA之酶包括丙酮丁醇

梭菌之 *hbd* (Youngleson 等人, *J Bacteriol.* 171:6800-6807 (1989))、來自生枝動膠菌之 *phbB* (Ploux 等人, *Eur. J Biochem.* 174:177-182 (1988))、來自類球紅細菌之 *phaB* (Alber 等人, *Mol. Microbiol* 61:297-309 (2006)) 及富養羅爾斯通氏菌之 *paaH1* (Machado 等人, *Met Eng*, In Press (2012))。生枝動膠菌酶為 NADPH 依賴性且亦接受 3-側氧基丙醯 CoA 作為受質 (Ploux 等人, *Eur. J Biochem.* 174:177-182 (1988))。其他基因包括脫氮副球菌中之 *phaB*、克氏梭菌中之 *Hbd1* (C 端域) 及 *Hbd2* (N 端域) (Hillmer 及 Gottschalk, *Biochim. Biophys. Acta* 3334:12-23 (1974)) 及黃牛中之 *HSD17B10* (Wakil 等人, *J Biol. Chem.* 207:631-638 (1954))。來自脫氮副球菌之酶已於大腸桿菌中功能性表現及表徵 (Yabutani 等人, *FEMS Microbiol Lett.* 133:85-90 (1995))。許多相似酶已見於梭菌屬之其他物種及勤奮金屬球菌中 (Berg 等人, *Science.* 318:1782-1786 (2007))。來自熱帶假絲酵母之酶為 2 型過氧化體脂肪酸 β -氧化多功能酶 (MFE-2) 之組分。此蛋白質之脫氫酶 B 域在乙醯乙醯 CoA 上具有催化活性。該域已於大腸桿菌中功能性表現，可得到晶體結構，且催化機理得到充分理解 (Ylianttila 等人, *Biochem Biophys Res Commun* 324:25-30 (2004)；Ylianttila 等人, *J Mol Biol* 358:1286-1295 (2006))。接受較長醯基 CoA 受質之 3-羥基醯基 CoA 脫氫酶 (例如 EC 1.1.1.35) 典型地參與 β -氧化。一實例為黃牛中之 *HSD17B10* (Wakil 等人, *J Biol. Chem.* 207:631-638 (1954))。豬肝酶優先在短及中鏈醯基 CoA 受質上具有活性，而心臟酶選擇性不大 (He 等人, *Biochim Biophys Acta* 1392:119-26 (1998))。釀酒酵母酶 FOX2 在 β -降解路徑中具有活性且亦具有烯醯 CoA 水合酶活性 (Hiltunen 等人, *J Biol Chem* 267: 6646-6653 (1992))。

蛋白質	Genbank ID	GI 編號	生物體
fadB	P21177.2	119811	大腸桿菌
fadJ	P77399.1	3334437	大腸桿菌
paaH	NP_415913.1	16129356	大腸桿菌
Hbd2	EDK34807.1	146348271	克氏梭菌
Hbd1	EDK32512.1	146345976	克氏梭菌

phaC	NP_745425.1	26990000	惡臭假單胞菌
paaC	ABF82235.1	106636095	螢光假單胞菌
HSD17B10	O02691.3	3183024	黃牛
phbB	P23238.1	130017	生枝動膠菌
phaB	YP_353825.1	77464321	類球紅細菌
paaH1	CAJ91433.1	113525088	富養羅爾斯通氏菌
phaB	BAA08358	675524	脫氮副球菌
Hbd	NP_349314.1	15895965	丙酮丁醇梭菌
Hbd	AAM14586.1	20162442	拜氏梭菌
Msed_1423	YP_001191505	146304189	勤奮金屬球菌
Msed_0399	YP_001190500	146303184	勤奮金屬球菌
Msed_0389	YP_001190490	146303174	勤奮金屬球菌
Msed_1993	YP_001192057	146304741	勤奮金屬球菌
Fox2	Q02207	399508	熱帶假絲酵母
HSD17B10	O02691.3	3183024	黃牛
HADH	NP_999496.1	47523722	黃牛
3HCDH	AAO72312.1	29293591	纖細裸藻
FOX2	NP_012934.1	6322861	釀酒酵母

所選羧基醯基CoA脫氫酶之鏈長特異性展示如下。定向進化可增進用於較長鏈受質之酶的選擇性。舉例而言，Machado及合作者開發一種選擇平台用於定向進化有利於較長醯基CoA受質之鏈延長酶。此群組使富養羅爾斯通氏菌之*paaH1*進化以達成於3-側氧基-己醯CoA上之改良活性(Machado等人, *Met Eng*, In Press (2012))。

鏈長	基因	生物體
C4	hbd	丙酮丁醇梭菌
C5	phbB	生枝動膠菌
C4-C6	paaH1	富養羅爾斯通氏菌
C4-C10	HADH	野豬
C4-C18	fadB	大腸桿菌

步驟C. 3-羧基醯基CoA脫水酶

3-羧基醯基CoA脫水酶(例如EC 4.2.1.17, 亦稱為烯醯CoA水合酶)催化一系列3-羧基醯基CoA受質之脫水(Roberts等人, *Arch. Microbiol* 117:99-108 (1978); Agnihotri等人, *Bioorg. Med. Chem.* 11:9-20 (2003); Conrad等人, *J Bacteriol.* 118:103-111 (1974)), 且可用於將3-羧基醯基CoA轉化為烯醯CoA(圖1C及6C)。惡臭假單胞菌之*ech*基因產物催化3-羧基丁醯CoA轉化為巴豆醯CoA (Roberts等人, *Arch.*

Microbiol 117:99-108 (1978))。此轉化亦由丙酮丁醇梭菌之 *crt* 基因產物、克氏梭菌及其他梭菌目生物體之 *crt1* 基因產物催化 (Atsumi 等人, *Metab Eng* 10:305-311 (2008); Boynton 等人, *J Bacteriol.* 178:3015-3024 (1996); Hillmer 等人, *FEBS Lett.* 21:351-354 (1972))。其他烯醯 CoA 水合酶候選物為惡臭假單胞菌之 *phaA* 及 *phaB* 及來自螢光假單胞菌之 *paaA* 及 *paaB* (Olivera 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* 95:6419-6424 (1998))。沼澤紅假單胞菌中之 *pimF* 之基因產物據預測編碼參與庚二醯 CoA 降解之烯醯 CoA 水合酶 (Harrison 等人, *Microbiology* 151:727-736 (2005))。最後，許多大腸桿菌基因已顯示展現烯醯 CoA 水合酶功能，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. Biotechnol* 113-116:335-346 (2004); Park 等人, *Biotechnol Bioeng* 86:681-686 (2004)) 及 *paaG* (Ismail 等人, *Eur. J Biochem.* 270:3047-3054 (2003); Park 及 Lee, *Appl. Biochem. Biotechnol* 113-116:335-346 (2004); Park 及 Yup, *Biotechnol Bioeng* 86:681-686 (2004))。釀酒酵母中之具有 3-羥基醯基 CoA 脫水酶活性之酶包括 PHS1 及 FOX2。

基因	GenBank 寄存編號	GI 編號	生物體
ech	NP_745498.1	26990073	惡臭假單胞菌
crt	NP_349318.1	15895969	丙酮丁醇梭菌
crt1	YP_001393856	153953091	克氏梭菌
phaA	ABF82233.1	26990002	惡臭假單胞菌
phaB	ABF82234.1	26990001	惡臭假單胞菌
paaA	NP_745427.1	106636093	螢光假單胞菌
paaB	NP_745426.1	106636094	螢光假單胞菌
pimF	CAE29158.1	39650635	沼澤紅假單胞菌
maoC	NP_415905.1	16129348	大腸桿菌
paaF	NP_415911.1	16129354	大腸桿菌
paaG	NP_415912.1	16129355	大腸桿菌
FOX2	NP_012934.1	6322861	釀酒酵母
PHS1	NP_012438.1	6322364	釀酒酵母

參與 β -氧化之烯醯CoA水合酶亦可用於脂肪醇、脂肪醛及脂肪酸生物合成路徑。舉例而言，擬南芥之多功能MFP2基因產物展現對小於或等於C14之鏈長具有選擇性的烯醯CoA還原酶活性(Arent等人, *J Biol Chem* 285:24066-77 (2010))。或者，fadA及fadB之大腸桿菌基因產物編碼參與脂肪酸氧化、展現烯醯CoA水合酶活性之多酶複合物(Yang等人, *Biochemistry* 30:6788-6795 (1991); Yang, *J Bacteriol.* 173:7405-7406 (1991); Nakahigashi等人, *Nucleic Acids Res.* 18:4937 (1990))。fadI及fadJ基因編碼相似功能且在缺氧條件下天然地表現(Campbell等人, *Mol. Microbiol* 47:793-805 (2003))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
MFP2	AAD18042.1	4337027	擬南芥
fadA	YP_026272.1	49176430	大腸桿菌
fadB	NP_418288.1	16131692	大腸桿菌
fadI	NP_416844.1	16130275	大腸桿菌
fadJ	NP_416843.1	16130274	大腸桿菌
fadR	NP_415705.1	16129150	大腸桿菌

所選3-羥基醯基CoA脫水酶之鏈長特異性展示如下。

鏈長	基因	生物體
C4-C6	crt	丙酮丁醇梭菌
C4-C7	pimF	沼澤紅假單胞菌
C4-C14	MFP2	擬南芥

步驟D. 烯醯CoA還原酶

烯醯CoA還原酶(亦稱為醯基CoA脫氫酶、反-2-烯醯CoA還原酶或醯基CoA氧化還原酶)催化烯醯CoA轉化為醯基CoA(圖1及6之步驟D)。例示性醯基CoA脫氫酶或烯醯CoA還原酶(ECR)為大腸桿菌及腸道沙門氏菌之fadE的基因產物(Iram等人, *J Bacteriol* 188:599-608 (2006))。來自丙酮丁醇梭菌之bcd基因產物(Atsumi等人, 10:305-311 (2008); Boynton等人, *J Bacteriol.* 178:3015-3024 (1996))催化巴豆醯CoA還原為丁醯CoA(EC 1.3.99.2)。此酶參與梭菌目物種中朝向丁酸之乙醯CoA醱酵路徑(Jones等人, *Microbiol Rev.* 50:484-524 (1986))。

丁醯CoA還原酶之活性可藉由與表現丙酮丁醇梭菌*etfAB*基因結合表現*bcd*而增進，該等丙酮丁醇梭菌*etfAB*基因編碼電子傳遞黃素蛋白。用於烯醯CoA還原酶步驟之其他候選物為來自纖細裸藻之烯醯CoA還原酶(EC 1.3.1.44)TER (Hoffmeister等人, *J Biol. Chem* 280:4329-4338 (2005))。在移除其粒線體靶向前導序列之後將源自此序列之構築體選殖於大腸桿菌中，產生活性酶。來自原核生物齒垢密螺旋體之由TDE0597編碼的ECR蛋白質的近似同源物亦已選殖並表現於大腸桿菌中(Tucci等人, *FEBS Lett*, 581:1561-1566 (2007))。氫養互營菌中之六種基因藉由與丙酮丁醇梭菌*bcd*基因產物之序列同源性鑑別。氫養互營菌基因*syn_02637*及*syn_02636*與丙酮丁醇梭菌之*etfAB*基因具有較高序列同源性，且經預測編碼電子傳遞黃素蛋白之 α 及 β 次單元。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
fadE	AAC73325.2	87081702	大腸桿菌
fadE	YP_005241256.1	379699528	腸道沙門氏菌
bcd	NP_349317.1	15895968	丙酮丁醇梭菌
etfA	NP_349315.1	15895966	丙酮丁醇梭菌
etfB	NP_349316.1	15895967	丙酮丁醇梭菌
TER	Q5EU90.1	62287512	纖細裸藻
TER	NP_612558.1	19924091	褐家鼠
TDE0597	NP_971211.1	42526113	齒垢密螺旋體
<i>syn_02587</i>	ABC76101	85721158	氫養互營菌
<i>syn_02586</i>	ABC76100	85721157	氫養互營菌
<i>syn_01146</i>	ABC76260	85721317	氫養互營菌
<i>syn_00480</i>	ABC77899	85722956	氫養互營菌
<i>syn_02128</i>	ABC76949	85722006	氫養互營菌
<i>syn_01699</i>	ABC78863	85723920	氫養互營菌
<i>syn_02637</i>	ABC78522.1	85723579	氫養互營菌
<i>syn_02636</i>	ABC78523.1	85723580	氫養互營菌

其他烯醯CoA還原酶候選物見於降解芳族化合物之生物體中。沼澤紅假單胞菌，一種用於苯甲酸降解之模型生物體，具有經由庚二醯CoA之 β -氧化降解庚二酸之酶促能力。*pim*操縱子中之相鄰基因*pimC*及*pimD*與丙酮丁醇梭菌*bcd*具有序列同源性，且經預測編碼含黃素之庚二醯CoA脫氫酶(Harrison等人, 151:727-736 (2005))。固氮大豆共生

物慢生型大豆根瘤菌之基因組亦含有 *pim* 操縱子，其由與沼澤紅假單胞菌之 *pimC* 及 *pimD* 具有較高序列相似性的基因構成 (Harrison 及 Harwood, *Microbiology* 151:727-736 (2005))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
<i>pimC</i>	CAE29155	39650632	沼澤紅假單胞菌
<i>pimD</i>	CAE29154	39650631	沼澤紅假單胞菌
<i>pimC</i>	BAC53083	27356102	慢生型大豆根瘤菌
<i>pimD</i>	BAC53082	27356101	慢生型大豆根瘤菌

另一候選物為 2-甲基-分支鏈烯醯 CoA 還原酶 (EC 1.3.1.52 及 EC 1.3.99.12)，一種催化位阻反-烯醯 CoA 受質還原之酶。此酶參與線蟲豬蛔蟲中之分支鏈脂肪酸合成，且能夠還原多種直鏈及分支鏈受質，包括 2-甲基戊醯 CoA、2-甲基丁醯 CoA、2-甲基戊醯 CoA、辛醯 CoA 及戊醯 CoA (Duran 等人, 268:22391-22396 (1993))。酶之由基因 *acad1* 及 *acad* 編碼的兩種同功異型物已經表徵。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
<i>acad1</i>	AAC48316.1	2407655	豬蛔蟲
<i>acad</i>	AAA16096.1	347404	豬蛔蟲

至少三種粒線體烯醯 CoA 還原酶存在於纖細裸藻中且適用於本發明中。纖細裸藻之三種粒線體烯醯 CoA 還原酶 (ECR1-3) 展現不同鏈長優先性 (Inui 等人, *European Journal of Biochemistry* 142:121-126 (1984))，此尤其適用於指示所要脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸產物之鏈長。EST 之 ELL00002199、ELL00002335 及 ELL00002648，均註解為粒線體反-2-烯醯 CoA 還原酶，可用於藉由此項技術中已知之方法分離此等其他烯醯 CoA 還原酶基因。來自大鼠肝微粒體之兩種 ECR 酶亦展現不同受質特異性 (Nagi 等人, *Arch Biochem Biophys* 226:50-64 (1983))。迄今尚未鑑別此等酶之序列。恥垢分枝桿菌烯醯 CoA 還原酶接受鏈長在 C10-C16 之間的醯基 CoA 受質 (Shimakata 等人, *J Biochem* 89:1075-80 (1981))。

烯醯 CoA 還原酶及其鏈長特異性展示於下表中。

鏈長	基因	生物體
C4-C6	ECR1	纖細裸藻
C6-C8	ECR3	纖細裸藻
C8-10	ECR2	纖細裸藻
C8-C16	長鏈ECR	褐家鼠
C10-C16	ECR	恥垢分枝桿菌
C2-C18	fadE	腸道沙門氏菌

步驟E. 醯基CoA還原酶(形成醛)

醯基CoA還原為脂肪醇係由單一酶或一對展現醯基CoA還原酶及醇脫氫酶活性之酶催化。將醯基CoA還原為其相應醛之醯基CoA脫氫酶包括脂肪醯基CoA還原酶(EC 1.2.1.42、1.2.1.50)、琥珀醯基CoA還原酶(EC 1.2.1.76)、乙醯CoA還原酶、丁醯CoA還原酶及丙醯CoA還原酶(EC 1.2.1.3)。對醯基CoA、3-羥基醯基CoA及3-側氧基醯基CoA受質具有顯示活性的形成醛之醯基CoA還原酶在文獻中已知。若干醯基CoA還原酶對3-羥基醯基CoA受質具有活性。舉例而言，來自梭菌目生物體之一些丁醯CoA還原酶對3-羥基丁醯CoA具有活性，且羅伊氏乳桿菌之丙醯CoA還原酶對3-羥基丙醯CoA具有活性。用於將3-側氧基醯基CoA受質轉化為其相應醛之酶為丙二醯CoA還原酶。迄今尚未鑑別對烯醯CoA受質顯示活性之此種酶。可使用此項技術中已知之進化或酶工程改造方法來改善對於特定受質之特異性。

例示性脂肪醯基CoA還原酶由醋酸鈣不動桿菌(Reiser, *Journal of Bacteriology* 179:2969-2975 (1997))及不動桿菌屬 *M-1* (Ishige等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1192-1195 (2002))之 *acr1* 編碼。來自結核分枝桿菌之兩種基因產物接受長度C16-C18之較長鏈脂肪醯基CoA受質(Harinder Singh, U. Central Florida (2007))。另一脂肪醯基CoA還原酶為明亮發光桿菌之LuxC (Lee等人, *Biochim Biohys Acta* 1388:215-22 (1997))。具有琥珀醯CoA還原酶活性之酶由克氏梭菌之 *sucD* (Sohling, *J. Bacteriol.* 178:871-880 (1996))及牙齦卟啉單胞菌之 *sucD*

(Takahashi, *J. Bacteriol* 182:4704-4710 (2000))編碼。其他琥珀醯CoA還原酶參與包括以下之嗜熱古菌的3-羥基丙酸/4-羥基丁酸循環：勤奮金屬球菌(Berg等人, *Science* 318:1782-1786 (2007))及嗜中性熱變形菌(Ramos-Vera等人, *J Bacteriol*, 191:4286-4297 (2009))。由*Msed_0709*編碼之勤奮金屬球菌酶為嚴格NADPH依賴性的且亦具有丙二醯CoA還原酶活性。嗜中性熱變形菌酶對NADPH及NADH均具有活性。假單胞菌屬中之由*bphG*編碼的酶醯化乙醛脫氫酶為另一者，此由於其已顯示可氧化及醯化乙醛、丙醛、丁醛、異丁醛及甲醛(Powlowski, *J. Bacteriol.* 175:377-385 (1993))。除了將乙醯CoA還原為乙醇之外，腸膜狀明串珠菌中之由*adhE*編碼的酶亦已顯示可將分支鏈化合物異丁醛氧化為異丁醯CoA (Kazahaya, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18:43-55 (1972)；及Koo等人, *Biotechnol Lett.* 27:505-510 (2005))。丁醛脫氫酶在產溶劑性生物體(諸如糖乙酸多丁醇梭菌)中催化相似反應，即丁醯CoA轉化為丁醛(Kosaka等人, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71:58-68 (2007))。例示性丙醯CoA還原酶包括鼠傷寒沙門氏菌*LT2*之*pduP* (Leal, *Arch. Microbiol.* 180:353-361 (2003))及來自大腸桿菌之*eutE* (Skraly, WO專利第2004/024876號)。鼠傷寒沙門氏菌*LT2*之丙醯CoA還原酶，天然地將丙醯CoA轉化為丙醛，亦催化5-羥基戊醯CoA還原為5-羥基戊醛(WO 2010/068953A2)。羅伊氏乳桿菌之丙醛脫氫酶*PduP*具有廣泛受質範圍，其包括丁醛、戊醛及3-羥基丙醛(Luo等人, *Appl Microbiol Biotech*, 89: 697-703 (2011))。另外，一些醯基ACP還原酶(諸如細長聚球藻*PCC7942*之*orf1594*基因產物)亦展現形成醛之醯基CoA還原酶活性(Schirmer等人, *Science*, 329: 559-62 (2010))。醯基ACP還原酶及同源物更詳細描述於實例IX中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
acr1	YP_047869.1	50086359	醋酸鈣不動桿菌
acr1	AAC45217	1684886	貝氏不動桿菌

acrI	BAB85476.1	18857901	不動桿菌屬菌株M-1
Rv1543	NP_216059.1	15608681	結核分枝桿菌
Rv3391	NP_217908.1	15610527	結核分枝桿菌
LuxC	AAT00788.1	46561111	明亮發光桿菌
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	勤奮金屬球菌
Tneu_0421	ACB39369.1	170934108	嗜中性熱變形菌
sucD	P38947.1	172046062	克氏梭菌
sucD	NP_904963.1	34540484	牙齦卟啉單胞菌
bphG	BAA03892.1	425213	假單胞菌屬
adhE	AAV66076.1	55818563	腸膜狀明串珠菌
bld	AAP42563.1	31075383	糖乙酸多丁醇梭菌
pduP	NP_460996	16765381	鼠傷寒沙門氏菌LT2
eutE	NP_416950	16130380	大腸桿菌
pduP	CCC03595.1	337728491	羅伊氏乳桿菌

將醯基CoA轉化為其相應醛之另一酶類型為將丙二醯CoA轉化為丙二酸半醛之丙二醯CoA還原酶。丙二醯CoA還原酶為在嗜熱嗜酸古菌細菌(thermoacidophilic archaeal bacteria)中經由3-羥基丙酸循環自養固碳中之關鍵酶(Berg, *Science* 318:1782-1786 (2007))；及Thauer, *Science* 318:1732-1733 (2007))。該酶利用NADPH作為輔因子，且已於金屬球菌屬及硫化葉菌屬中表徵(Alber等人, *J. Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006))；及Hugler, *J. Bacteriol.* 184:2404-2410 (2002))。該酶由勤奮金屬球菌中之Msed_0709編碼(Alber等人, *J. Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006))；及Berg, *Science* 318:1782-1786 (2007))。將編碼來自托科達硫化葉菌之丙二醯CoA還原酶的基因選殖且異源表現於大腸桿菌中(Alber等人, *J. Bacteriol.* 188:8551-8559 (2006))。此酶亦已顯示催化甲基丙二醯CoA轉化為其相應醛(WO2007141208 (2007))。儘管此等酶之醛脫氫酶功能類似於來自橙色綠屈撓菌之二功能脫氫酶，但序列相似性極小。兩種丙二醯CoA還原酶候選物均與天冬胺酸-半醛脫氫酶具有較高序列相似性，該天冬胺酸-半醛脫氫酶為催化天冬胺醯-4-磷酸還原及同時脫磷酸為天冬胺酸半醛之酶。其他基因候選物可藉由與其他生物體(包括硫磺礦硫化葉菌及嗜酸熱硫化葉菌)中之蛋白質的

序列同源性而發現且已列於以下。CoA醯化醛脫氫酶之另一候選物為來自拜氏梭菌之*ald*基因(Toth, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999))。此酶已經報導可將乙醯CoA及丁醯CoA還原為其相應醛。此基因極類似於編碼鼠傷寒沙門氏菌及大腸桿菌之乙醛脫氫酶的*eutE*(Toth, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999))。

基因	GenBank ID	GI編號	生物體
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	勤奮金屬球菌
mcr	NP_378167.1	15922498	托科達硫化葉菌
asd-2	NP_343563.1	15898958	硫磺礦硫化葉菌
Saci_2370	YP_256941.1	70608071	嗜酸熱硫化葉菌
Ald	AAT66436	49473535	拜氏梭菌
eutE	AAA80209	687645	鼠傷寒沙門氏菌
eutE	NP_416950	16130380	大腸桿菌

所選形成醛之醯基CoA還原酶的鏈長特異性範圍展示於下表中。

鏈長	基因	生物體
C2-C4	bphG	假單胞菌屬
C4	Bld	糖乙酸多丁醇梭菌
C12-C20	ACR	醋酸鈣不動桿菌
C14-C18	Acrl	不動桿菌屬菌株 <i>M-1</i>
C16-C18	Rv1543, Rv3391	結核分枝桿菌

步驟G. 醯基CoA還原酶(形成醇)

二功能形成醇之醯基CoA還原酶催化圖1及6之步驟G(亦即步驟E及F)。具有此活性之酶包括大腸桿菌之*adhE* (Kessler等人, *FEBS. Lett.* 281:59-63 (1991))及丙酮丁醇梭菌之*adhE2* (Fontaine等人, *J. Bacteriol.* 184:821-830 (2002))。大腸桿菌酶對C2受質具有活性，而丙酮丁醇梭菌酶具有跨越C2-C8之廣泛受質範圍(Dekishima等人, *J Am Chem Soc* 133:11399-11401 (2011))。由*bdh I*及*bdh II*編碼之丙酮丁醇梭菌酶(Walter等人, *J. Bacteriol.* 174:7149-7158 (1992))分別將乙醯CoA及丁醯CoA還原為乙醇及丁醇。來自腸膜狀明串珠菌之*adhE*基因產物對乙醯CoA及異丁醯CoA具有活性(Kazahaya等人, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18:43-55 (1972); Koo等人, *Biotechnol Lett*, 27:505-510 (2005))。其他

生物體中之酶候選物(包括卡氏玫瑰彎菌、赤桿菌屬*NAP1*及海洋 γ 變形桿菌HTCC2080)可藉由序列相似性推斷。較長鏈醯基CoA分子可藉由諸如編碼形成醇之脂肪醯基CoA還原酶的希蒙德木(中國希蒙得木)*FAR*之酶還原為其相應醇。其於大腸桿菌中之過度表現產生FAR活性及C16-C18脂肪醇積聚(Metz等人, *Plant Physiol*, 122:635-644 (2000))。擬南芥中之FAR酶包括*At3g11980*及*At3g44560*之基因產物(Doan等人, *J Plant Physiol* 166 (2006))。二功能原核FAR酶見於水油海桿菌VT8 (Hofvander等人, *FEBS Lett* 3538-43 (2011))、棲藻海桿菌及海洋桿菌屬(*Oceanobacter*)菌株*RED65*(美國專利申請案20110000125)中。其他適合酶包括來自家蠶之*bfar*、來自小家鼠之*mfar1*及*mfar2*、來自小家鼠之*mfar2*、來自不動桿菌屬M1之*acrM1*及來自智人之*hfar*。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
adhE	NP_415757.1	16129202	大腸桿菌
adhE2	AAK09379.1	12958626	丙酮丁醇梭菌
bdh I	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌
bdh II	NP_349891.1	15896542	丙酮丁醇梭菌
adhE	AAV66076.1	55818563	腸膜狀明串珠菌
mcr	AAS20429.1	42561982	橙色綠屈撓菌
Rcas_2929	YP_001433009.1	156742880	卡氏玫瑰彎菌
NAP1_02720	ZP_01039179.1	85708113	赤桿菌屬 <i>NAP1</i>
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	119504313	海洋 γ 變形桿菌HTCC2080
FAR	AAD38039.1	5020215	中國希蒙得木
At3g11980	NP_191229.1	15228993	擬南芥
At3g44560	NP_190042.2	145339120	擬南芥
FAR	YP_959486.1	120555135	水油海桿菌
bfar	Q8R079	81901336	家蠶

所選形成醇之醯基CoA還原酶的鏈長特異性範圍展示於下表中。

鏈長	基因	生物體
C2	adhE	大腸桿菌
C2-C8	adhe2	丙酮丁醇梭菌
C14-C16	At3g11980	擬南芥
C16	At3g44560	擬南芥
C16-C18	FAR	中國希蒙得木
C14-C18	FAR	水油海桿菌

步驟F. 脂肪醛還原酶

編碼催化醛轉化為醇之酶(亦即醇脫氫酶或等效醛還原酶)的例示性基因包括編碼C2-C14之中鏈醇脫氫酶的 *alrA* (Tani等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 66:5231-5235 (2000))；來自大腸桿菌之 *yqhD* 及 *fucO* (Sulzenbacher等人, 342:489-502 (2004))；及來自丙酮丁醇梭菌之 *bdh I* 及 *bdh II*，其將丁醛轉化為丁醇 (Walter等人, *J Bacteriol* 174:7149-7158 (1992))。 *alrA* 基因產物對長於C14之醛不顯示活性，且有利於還原方向(Tani等人, 前述)。 *YqhD* 使用NADPH作為輔因子催化各種醛之還原，對於長於C(3)之鏈長具有優先性(Sulzenbacher等人, *J Mol Biol* 342:489-502 (2004)；Perez等人, *J Biol. Chem.* 283:7346-7353 (2008))。來自運動醱酵單胞菌之 *adhA* 基因產物已顯示對許多醛(包括甲醛、乙醛、丙醛、丁醛及丙烯醛)具有活性(Kinoshita等人, *Appl Microbiol Biotechnol* 22:249-254 (1985))。其他醛還原酶候選物由以下編碼：糖乙酸多丁醇梭菌(*C. saccharoperbutylacetonicum*)中之 *bdh*；及拜氏梭菌(*C. beijerinckii*)中之 *Cbei_1722*、*Cbei_2181* 及 *Cbei_2421*。來自賴氏菌屬 *S749* 之醇脫氫酶對長度C6-C7之中鏈長度受質顯示最大活性(Inoue等人, *AEM* 71: 3633-3641 (2005))。惡臭假單胞菌之 *adh* 基因產物對長度C3-C10之受質具有活性(Nagashima等人, *J Ferment Bioeng* 82:328-33(1996))。嗜熱脫氮土芽孢桿菌之醇脫氫酶 *ADH1* 及 *ADH2* 氧化長達C30鏈長之醇(Liu等人, *Physiol Biochem* 155:2078-85 (2009))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
<i>alrA</i>	BAB12273.1	9967138	不動桿菌屬菌株 <i>M-1</i>
<i>ADH2</i>	NP_014032.1	6323961	釀酒酵母
<i>yqhD</i>	NP_417484.1	16130909	大腸桿菌
<i>fucO</i>	NP_417279.1	16130706	大腸桿菌
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	15896542	丙酮丁醇梭菌
<i>adhA</i>	YP_162971.1	56552132	運動醱酵單胞菌
<i>bdh</i>	BAF45463.1	124221917	糖乙酸多丁醇梭菌
<i>Cbei_1722</i>	YP_001308850	150016596	拜氏梭菌

Cbei_2181	YP_001309304	150017050	拜氏梭菌
Cbei_2421	YP_001309535	150017281	拜氏梭菌
lsadh	BAD99642.1	67625613	賴氏菌屬S749
adh			惡臭假單胞菌

天然醇脫氫酶亦將醛受質轉化為醇產物。迄今，已報導釀酒酵母中之七種醇脫氫酶，即ADHI-ADHVII (de Smidt等人, FEMS Yeast Res 8:967-78 (2008))。ADH1 (GI:1419926)為造成乙醛在細胞溶質中在缺氧條件下還原為乙醇之關鍵酶。在乳酸克魯維酵母中，已鑑別且表徵兩種NAD依賴性細胞溶質醇脫氫酶。此等基因亦對其他脂族醇顯示活性。基因ADH1 (GI:113358)及ADHII (GI:51704293)優先表現於葡萄糖生長細胞中 (Bozzi 等人, *Biochim Biophys Acta* 1339:133-142 (1997))。細胞溶質醇脫氫酶在白假絲酵母中由ADH1 (GI:608690)編碼，在粟酒裂殖酵母中由ADH1 (GI:3810864)編碼，在解脂耶氏酵母中由ADH1 (GI:5802617)編碼，在樹幹畢赤酵母中由ADH1 (GI:2114038)及ADHII (GI:2143328)編碼 (Passoth等人, *Yeast* 14:1311-23 (1998))。候選醇脫氫酶展示於下表中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
SADH	BAA24528.1	2815409	近平滑假絲酵母
ADH1	NP_014555.1	6324486	釀酒酵母s288c
ADH2	NP_014032.1	6323961	釀酒酵母s288c
ADH3	NP_013800.1	6323729	釀酒酵母s288c
ADH4	NP_011258.2	269970305	釀酒酵母s288c
ADH5 (SFA1)	NP_010113.1	6320033	釀酒酵母s288c
ADH6	NP_014051.1	6323980	釀酒酵母s288c
ADH7	NP_010030.1	6319949	釀酒酵母s288c
adhP	CAA44614.1	2810	乳酸克魯維酵母
ADH1	P20369.1	113358	乳酸克魯維酵母
ADH2	CAA45739.1	2833	乳酸克魯維酵母
ADH3	P49384.2	51704294	乳酸克魯維酵母
ADH1	YP_001126968.1	138896515	嗜熱脫氮土芽孢桿菌
ADH2	YP_001125863.1	138895410	嗜熱脫氮土芽孢桿菌

所選醇脫氫酶之受質特異性範圍展示於下表中。

鏈長	基因	生物體
C6-C7	lsadh	賴氏菌屬S749
C2-C8	yqhD	大腸桿菌

鏈長	基因	生物體
C3-C10	Adh	惡臭假單胞菌
C2-C14	alrA	不動桿菌屬菌株 <i>M-1</i>
C2-C30	ADH1	嗜熱脫氮土芽孢桿菌

步驟O. 延長酶

延長酶(ELO)利用丙二醯CoA以將C2單元添加至生長之醯基CoA鏈上。此過程亦涉及脫羧且因此基本上不可逆。已知布氏錐蟲(一種真核人類寄生蟲)使用延長酶系統生產長鏈脂肪酸。該過程由丁醯CoA引發。特定言之，ELO系統使生長之脂肪酸鏈酯化為CoA中間物而非ACP中間物，如細菌及其他微生物對應物(Lee等人, *Cell* 126, 691-699, 2006; Cronan, *Cell*, 126, 2006)。此與典型細菌脂肪酸延長形成對比，典型細菌脂肪酸延長在自丙二醯ACP形成乙醯乙醯基醯基ACP之後引發。迄今為止，與其動物對應物同源之四種ELO(由ELO1-4編碼)已見於布氏錐蟲中(Lee等人, *Nature Reviews Microbiology*, 第5卷, 287-297, 2007)。ELO1-3一起造成長達C18鏈長之飽和脂肪酸的合成。ELO1將C4轉化為C10，ELO2將鏈長自C10延長為肉豆蔻酸(C14)，且ELO3將肉豆蔻酸延長為C18。ELO特異性方面存在一定重疊；例如，ELO1可將C10引子延長為C12，即使活性較低。ELO4為對多不飽和脂肪酸(PUFA)具有特異性之ELO的一實例。其延長花生四烯酸(C20:4)兩個碳原子。可藉由序列同源性發現若干其他ELO酶(參見Lee等人, *Nature Reviews Microbiology*, 第5卷, 287-297, 2007)。

延長酶見於包括粒線體、內質網、蛋白磷脂體及過氧化體之若干區室中。舉例而言，一些酵母(諸如釀酒酵母)能夠經由接受外源或內源醯基CoA受質之粒線體延長酶合成鏈長C16及C16以上之長鏈脂肪酸(Bessoule等人, *FEBS Lett* 214: 158-162 (1987))。此系統需要ATP以達成活性。內質網亦具有用於自不同長度之醯基CoA受質合成極長鏈脂肪酸(C18+)的延長酶系統(Kohlwein等人, *Mol Cell Biol* 21:109-25

(2001))。參與此系統之基因包括TSC13、ELO2及ELO3。ELO1催化C12醯基CoA延長為C16-C18脂肪酸。

蛋白質	寄存編號	GI編號	生物體
ELO2	NP_009963.1	6319882	釀酒酵母
ELO3	NP_013476.3	398366027	釀酒酵母
TSC13	NP_010269.1	6320189	釀酒酵母
ELO1	NP_012339.1	6322265	釀酒酵母
ELO1	AAX70671.1	62176566	布氏錐蟲
ELO2	AAX70672.1	62176567	布氏錐蟲
ELO3	AAX70673.1	62176568	布氏錐蟲
ELO4	AAX70768.1	62176665	布氏錐蟲
ELO4	AAX69821.1	62175690	布氏錐蟲

熟習此項技術者亦可藉由使用來自可得來源之已知序列選殖來獲得編碼任何或所有丙二醯CoA非依賴性FAS路徑或醯基還原路徑酶之核酸。舉例而言，丙二醯CoA非依賴性FAS路徑之任何或所有編碼核酸可容易地使用此項技術中熟知之方法自纖細裸藻獲得，因為此路徑已於此生物體中充分表徵。纖細裸藻編碼核酸可使用已知序列之探針自例如纖細裸藻cDNA文庫分離。探針可設計有來自公開可得序列資料庫TBestDB (<http://tbestdb.bcm.umontreal.ca>)之以下EST序列的整個或部分DNA序列。由此過程產生之核酸可插入適當表現載體中且轉型至大腸桿菌或其他微生物中以產生本發明之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產生物體。

硫解酶(圖1A)：ELL00002550、ELL00002493、ELL00000789

3-羥基醯基CoA脫氫酶(圖1B)：ELL00000206、ELL00002419、ELL00006286、ELL00006656

烯醯CoA水合酶(圖1C)：ELL00005926、ELL00001952、ELL00002235、ELL00006206

烯醯CoA還原酶(圖1D)：ELL00002199、ELL00002335、ELL00002648

醯基CoA還原酶(圖1E；1E/F)：ELL00002572、ELL00002581、

ELL00000108

或者，以上EST序列可用於經由BLAST搜尋鑑別GenBank中之同源多肽。所得同源多肽及其相應基因序列提供其他編碼核酸用於轉型至大腸桿菌或其他微生物中以產生本發明之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產生物體。如下所列為適用於本發明的非天然存在之生物體之例示性同源多肽及其於GenBank中之基因寄存編號。

酮脂醯CoA醯基轉移酶(或酮脂醯CoA硫解酶)

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
Dole_2160	YP_001530041	158522171	食油脫硫球菌Hxd3
DalkDRAFT_1939	ZP_02133627	163726110	食烯烴脫硫桿菌AK-01
BSG1_09488	ZP_01860900	149182424	芽孢桿菌屬SG-1

3-羥基醯基CoA脫氫酶

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
AaeL_AAEL002841	XP_001655993	157132312	埃及伊蚊
hadh	NP_001011073	58331907	熱帶爪蟾
hadh	NP_001003515	51011113	斑馬魚

烯醯CoA水合酶

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
Tb927.3.4850	XP_844077	72387305	布氏錐蟲
Tc00.1047053509701.10	XP_802711	71399112	克氏錐蟲菌株CL Brener
PputGB1_3629	YP_001669856	167034625	惡臭假單胞菌GB-1

烯醯CoA還原酶

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
<i>mecr</i>	XP_642118	66816217	盤基網柄菌AX4
NEMVEDRAFT_v1g228294	XP_001639469	156402181	星狀海葵
AaeL_AAEL003995	XP_001648220	157104018	埃及伊蚊

除了以上例示性編碼核酸之外，亦可將除本發明之MI-FAE循環、MD-FAE及/或終止路徑內之核酸以外的核酸引入宿主生物體中用於進一步生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。舉例而言，富養羅爾斯通氏菌*BktB*及*PhbB*基因催化丁醯CoA及乙醯CoA縮合形成 β -酮己醯CoA及 β -酮己醯CoA還原為3-羥基-己醯CoA (Fukui等人, *Biomacromolecules* 3:618-624 (2002))。為了改良脂肪醇生產，編碼此等特異性酶之外源

DNA序列可表現於所關注之生產宿主中。此外，以上所述之酶可經受定向進化以產生此等酶之具有高活性及高受質特異性的改良型式。類似方法亦可用於本發明之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產路徑中的任何或所有其他酶促步驟，以例如改良酶活性及/或特異性及/或產生預定鏈長之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。

實例II

用於自細胞溶質丙酮酸生產細胞溶質乙醯CoA之路徑

以下實例描述如圖2中所示用於將細胞溶質丙酮酸及蘇胺酸轉化為細胞溶質乙醯CoA之例示性路徑。

用於將細胞溶質丙酮酸及蘇胺酸轉化為細胞溶質乙醯CoA之路徑可使得能夠採用來源於乙醯CoA之細胞溶質脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產路徑。若干用於將細胞溶質丙酮酸轉化為細胞溶質乙醯CoA之路徑展示於圖2中。丙酮酸向乙醯CoA之直接轉化可藉由丙酮酸脫氫酶、丙酮酸甲酸裂解酶、丙酮酸:NAD(P)氧化還原酶或丙酮酸:鐵氧化還原蛋白氧化還原酶催化。若利用丙酮酸甲酸裂解酶，則甲酸副產物可藉由甲酸脫氫酶或甲酸氫裂解酶進一步轉化為CO₂。

丙酮酸向乙醯CoA之間接轉化可經由若干替代途徑進行。丙酮酸可藉由丙酮酸脫羧酶轉化為乙醛。乙醛可隨後藉由醯化(CoA依賴性)乙醛脫氫酶轉化為乙醯CoA。或者，藉由丙酮酸脫羧酶產生之乙醛可藉由「PDH旁路」路徑轉化為乙醯CoA。在此路徑中，乙醛藉由乙醛脫氫酶氧化為乙酸，其隨後藉由CoA連接酶、合成酶或轉移酶轉化為乙醯CoA。在另一實施例中，乙酸中間物藉由乙酸激酶轉化為乙醯磷酸，其隨後藉由磷酸轉乙醯酶轉化為乙醯CoA。在另一實施例中，丙酮酸藉由丙酮酸氧化酶(形成乙醯磷酸)直接轉化為乙醯磷酸。丙酮酸向乙酸之轉化亦藉由形成乙酸之丙酮酸氧化酶催化。

細胞溶質乙醯CoA亦可藉由表現天然或異源蘇胺酸醛縮酶自蘇胺

酸合成(圖5J) (van Maris等人, *AEM* 69:2094-9 (2003))。蘇胺酸醛縮酶將蘇胺酸轉化爲乙醛及甘胺酸。乙醛產物隨後藉由上文所述之各種路徑轉化爲乙醯CoA。

用於圖2中所示之乙醯CoA形成酶的基因候選物描述如下。

丙酮酸氧化酶(形成乙酸)(圖2A)或丙酮酸:醌氧化還原酶(PQO)可使用泛醌(EC 1.2.5.1)或醌(EC 1.2.2.1)作爲電子受體催化丙酮酸氧化脫羧爲乙酸。大腸桿菌酶PoxB定位於內膜上(Abdel-Hamid等人, *Microbiol* 147:1483-98 (2001))。該酶具有硫胺素焦磷酸及黃素腺嘌呤二核苷酸(FAD)輔因子(Koland及Gennis, *Biochemistry* 21:4438-4442 (1982); O'Brien等人, *Biochemistry* 16:3105-3109 (1977); O'Brien及Gennis, *J. Biol. Chem.* 255:3302-3307 (1980))。PoxB與釀酒酵母及運動醱酵單胞菌之丙酮酸脫羧酶具有相似性。麩胺酸棒狀桿菌之轉錄物編碼醌依賴性且形成乙酸之丙酮酸氧化還原酶(Schreiner等人, *J. Bacteriol* 188:1341-50 (2006))。相似酶可藉由序列同源性推斷。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
poxB	NP_415392.1	16128839	大腸桿菌
pqo	YP_226851.1	62391449	麩胺酸棒狀桿菌
poxB	YP_309835.1	74311416	宋內氏志賀氏菌
poxB	ZP_03065403.1	194433121	痢疾志賀菌

乙酸醯化爲乙醯CoA(圖2B)可藉由具有乙醯CoA合成酶、連接酶或轉移酶活性之酶催化。可催化此反應之兩種酶爲形成AMP之乙醯CoA合成酶或連接酶(EC 6.2.1.1)及形成ADP之乙醯CoA合成酶(EC 6.2.1.13)。形成AMP之乙醯CoA合成酶(ACS)爲用於將乙酸活化爲乙醯CoA之主要酶。例示性ACS酶見於以下中：大腸桿菌(Brown等人, *J. Gen. Microbiol.* 102:327-336 (1977))、富養羅爾斯通氏菌(Priefert及Steinbuchel, *J. Bacteriol.* 174:6590-6599 (1992))、熱自養甲烷熱桿菌(Ingram-Smith及Smith, *Archaea* 2:95-107 (2007))、腸道沙門氏菌(Gulick等人, *Biochemistry* 42:2866-2873 (2003))及釀酒酵母(Jogl及

Tong, *Biochemistry* 43:1425-1431 (2004))。形成ADP之乙醯CoA合成酶為具有一般廣泛受質範圍之可逆酶(Musfeldt及Schonheit, *J. Bacteriol.* 184:636-644 (2002))。形成ADP之乙醯CoA合成酶之兩種同功酶於閃爍古生球菌基因組中由AF1211及AF1983編碼(Musfeldt及Schonheit, 前述(2002))。來自死海鹽盒菌之酶(註解為琥珀醯CoA合成酶)亦接受乙酸作為受質且顯示酶之可逆性(Brasen及Schonheit, *Arch. Microbiol.* 182:277-287 (2004))。來自極端嗜熱泉古菌(hyperthermophilic crenarchaeon)好氧火棒菌之由PAE3250編碼的ACD顯示所有表徵ACD之最廣泛受質範圍，與乙酸、異丁醯CoA(較佳受質)及苯乙醯CoA反應(Brasen及Schonheit, 前述(2004))。定向進化或工程改造可用於修飾此酶以在宿主生物體之生理溫度下操作。來自閃爍古生球菌、死海鹽盒菌及好氧火棒菌之酶已於大腸桿菌中選殖、功能性表現及表徵(Brasen及Schonheit, 前述(2004)；Musfeldt及Schonheit, 前述(2002))。其他候選物包括大腸桿菌中之由*sucCD*編碼的琥珀醯CoA合成酶(Buck等人, *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985))及來自惡臭假單胞菌之醯基CoA連接酶(Fernandez-Valverde等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1149-1154 (1993))。以上提及之蛋白質展示如下。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
acs	AAC77039.1	1790505	大腸桿菌
acoE	AAA21945.1	141890	富養羅爾斯通氏菌
acsI	ABC87079.1	86169671	熱自養甲烷熱桿菌
acsI	AAL23099.1	16422835	腸道沙門氏菌
ACS1	Q01574.2	257050994	釀酒酵母
AF1211	NP_070039.1	11498810	閃爍古生球菌
AF1983	NP_070807.1	11499565	閃爍古生球菌
scs	YP_135572.1	55377722	死海鹽盒菌
PAE3250	NP_560604.1	18313937	好氧火棒菌菌株IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	大腸桿菌
sucD	AAC73823.1	1786949	大腸桿菌
paaF	AAC24333.2	22711873	惡臭假單胞菌

乙酸醯化為乙醯CoA亦可藉由CoA轉移酶催化(圖2B)。眾多酶採

用乙酸作為CoA受體，導致形成乙醯CoA。例示性CoA轉移酶為由大腸桿菌*atoA* (α 次單元)及*atoD* (β 次單元)基因編碼之乙醯乙醯CoA轉移酶(Korolev等人, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel等人, 33:902-908 (1968))。此酶具有廣泛受質範圍(Sramek等人, *Arch Biochem Biophys* 171:14-26 (1975))，且已顯示將CoA部分自多種分支鏈及直鏈醯基CoA受質轉移至乙酸，該等受質包括異丁酸(Matthies等人, *Appl Environ. Microbiol* 58:1435-1439 (1992))、戊酸(Vanderwinkel等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33:902-908 (1968))及丁酸(Vanderwinkel等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33:902-908 (1968))。相似酶存在於以下中：麩胺酸棒狀桿菌ATCC 13032 (Duncan等人, 68:5186-5190 (2002))、丙酮丁醇梭菌(Cary等人, *Appl Environ Microbiol* 56:1576-1583 (1990))；Wiesenborn等人, *Appl Environ Microbiol* 55:323-329 (1989))及糖乙酸多丁醇梭菌(Kosaka等人, *Biosci. Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007))。

基因	GI編號	寄存編號	生物體
<i>atoA</i>	2492994	P76459.1	大腸桿菌
<i>atoD</i>	2492990	P76458.1	大腸桿菌
<i>actA</i>	62391407	YP_226809.1	麩胺酸棒狀桿菌
<i>cg0592</i>	62389399	YP_224801.1	麩胺酸棒狀桿菌
<i>ctfA</i>	15004866	NP_149326.1	丙酮丁醇梭菌
<i>ctfB</i>	15004867	NP_149327.1	丙酮丁醇梭菌
<i>ctfA</i>	31075384	AAP42564.1	糖乙酸多丁醇梭菌
<i>ctfB</i>	31075385	AAP42565.1	糖乙酸多丁醇梭菌

乙酸激酶(EC 2.7.2.1)可催化乙酸可逆ATP依賴性磷酸化為乙醯磷酸(圖2C)。例示性乙酸激酶已於包括以下之許多生物體中經表徵：大腸桿菌、丙酮丁醇梭菌及嗜熱甲烷八疊球菌(Ingram-Smith等人, *J. Bacteriol.* 187:2386-2394 (2005))；Fox及Roseman, *J. Biol. Chem.* 261:13487-13497 (1986)；Winzer等人, *Microbiology* 143 (Pt 10):3279-

3286 (1997))。乙酸激酶活性亦已顯示於大腸桿菌*purT*之基因產物中 (Marolewski等人, *Biochemistry* 33:2531-2537 (1994))。一些丁酸激酶 (EC 2.7.2.7)(例如來自丙酮丁醇梭菌之*buk1*及*buk2*)亦接受乙酸作為受質(Hartmanis, M.G., *J. Biol. Chem.* 262:617-621 (1987))。同源物存在於包括腸道沙門氏菌及萊茵衣藻之若干其他生物體中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
ackA	NP_416799.1	16130231	大腸桿菌
Ack	AAB18301.1	1491790	丙酮丁醇梭菌
Ack	AAA72042.1	349834	嗜熱甲烷八疊球菌
purT	AAC74919.1	1788155	大腸桿菌
buk1	NP_349675	15896326	丙酮丁醇梭菌
buk2	Q97III	20137415	丙酮丁醇梭菌
ackA	NP_461279.1	16765664	鼠傷寒沙門氏菌
ACK1	XP_001694505.1	159472745	萊茵衣藻
ACK2	XP_001691682.1	159466992	萊茵衣藻

自乙醯磷酸形成乙醯CoA可藉由磷酸轉乙醯酶(EC 2.3.1.8)催化(圖2D)。來自大腸桿菌之*pta*基因編碼將乙醯CoA可逆轉化為乙醯磷酸之酶(Suzuki, T., *Biochim. Biophys. Acta* 191:559-569 (1969))。其他轉乙醯酶已於以下中經表徵：枯草桿菌(Rado及Hoch, *Biochim. Biophys. Acta* 321:114-125 (1973))、克氏梭菌(Stadtman, E., *Methods Enzymol.* 1:5896-599 (1955))及海棲熱孢菌(Bock等人, *J. Bacteriol.* 181:1861-1867 (1999))。此反應亦可藉由一些磷酸轉丁醯酶(EC 2.3.1.19)催化，包括來自丙酮丁醇梭菌之*ptb*基因產物(Wiesenborn等人, *App. Environ. Microbiol.* 55:317-322 (1989)；Walter等人, *Gene* 134:107-111 (1993))。其他*ptb*基因見於產丁酸細菌L2-50 (Louis等人, *J. Bacteriol.* 186:2099-2106 (2004))及巨桿菌(Vazquez等人, *Curr. Microbiol.* 42:345-349 (2001))中。大腸桿菌*pta*基因之同源物存在於包括腸道沙門氏菌及萊茵衣藻之若干其他生物體中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
Pta	NP_416800.1	71152910	大腸桿菌
Pta	P39646	730415	枯草桿菌

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
Pta	A5N801	146346896	克氏梭菌
Pta	Q9X0L4	6685776	海棲熱孢菌
Ptb	NP_349676	34540484	丙酮丁醇梭菌
Ptb	AAR19757.1	38425288	產丁酸細菌L2-50
Ptb	CAC07932.1	10046659	巨桿菌
Pta	NP_461280.1	16765665	腸道沙門氏菌鼠傷寒腸道血清型亞種菌株LT2
PAT2	XP_001694504.1	159472743	萊茵衣藻
PAT1	XP_001691787.1	159467202	萊茵衣藻

丙酮酸脫羧酶(PDC)為醇醱酵中之一種關鍵酶，催化丙酮酸脫羧為乙醛(圖2E)。已廣泛研究來自釀酒酵母之PDC1酶(Killenbergs-Jabs等人, *Eur. J. Biochem.* 268:1698-1704 (2001); Li等人, *Biochemistry.* 38:10004-10012 (1999); ter Schure等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1303-1307 (1998))。其他充分表徵之PDC酶見於以下中：運動醱酵單胞菌(Siegert等人, *Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005))、巴斯德醋桿菌(Chandra等人, 176:443-451 (2001))及乳酸克魯維酵母(Krieger等人, 269:3256-3263 (2002))。釀酒酵母之PDC1及PDC5酶藉由PDC2經受正向轉錄調節(Hohmann等人, *Mol Gen Genet* 241:657-66 (1993))。丙酮酸脫羧酶活性亦為如下蛋白質所具有：在熱帶假絲酵母中由CTRG_03826 (GI:255729208)編碼，在乳酸克魯維酵母中由PDC1 (GI編號：1226007)編碼，在解脂耶氏酵母中由YALI0D10131g (GI:50550349)編碼，在巴斯德畢赤酵母中由PAS_chr3_0188 (GI:254570575)編碼，在粟酒裂殖酵母中由丙酮酸脫羧酶 (GI:GI:159883897)編碼，在黑麴菌中由ANI_1_1024084 (GI:145241548)、ANI_1_796114 (GI:317034487)、ANI_1_936024 (GI:317026934)及ANI_1_2276014 (GI:317025935)編碼。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
pdc	P06672.1	118391	運動醱酵單胞菌
pdc1	P06169	30923172	釀酒酵母
Pdc2	NP_010366.1	6320286	釀酒酵母
Pdc5	NP_013235.1	6323163	釀酒酵母

CTRG_03826	XP_002549529	255729208	熱帶假絲酵母
CU329670.1:585597.587312	CAA90807	159883897	粟酒裂殖酵母
YALI0D10131g	XP_502647	50550349	解脂耶氏酵母
PAS_chr3_0188	XP_002492397	254570575	巴斯德畢赤酵母
pdc	Q8L388	20385191	巴斯德醋桿菌
pdc1	Q12629	52788279	乳酸克魯維酵母
ANI_1_1024084	XP_001393420	145241548	黑麴菌
ANI_1_796114	XP_001399817	317026934	黑麴菌
ANI_1_936024	XP_001396467	317034487	黑麴菌
ANI_1_2276014	XP_001388598	317025935	黑麴菌

EC種類 1.2.1 中之醛脫氫酶催化乙醛氧化為乙酸(圖 2F)。編碼此活性之例示性基因如上所述。乙醛氧化為乙酸亦可藉由具有乙醛氧化酶活性之醛氧化酶催化。該等酶可將乙醛、水及 O₂ 轉化為乙酸及過氧化氫。已顯示催化此轉化之例示性醛氧化酶可見於黃牛及小家鼠中 (Garattini 等人, *Cell Mol Life Sci* 65:1019-48 (2008); Cabre 等人, *Biochem Soc Trans* 15:882-3 (1987))。其他醛氧化酶基因候選物包括玉蜀黍之由 *zmAO-1* 及 *zmAO-2* 編碼的兩種含黃素及鋁之醛氧化酶 (Sekimoto 等人, *J Biol Chem* 272:15280-85 (1997))。

基因	GenBank 寄存編號	GI 編號	生物體
zmAO-1	NP_001105308.1	162458742	玉蜀黍
zmAO-2	BAA23227.1	2589164	玉蜀黍
Aox1	O54754.2	20978408	小家鼠
XDH	DAA24801.1	296482686	黃牛

丙酮酸氧化酶(形成乙醯磷酸)可催化丙酮酸、氧氣及磷酸轉化為乙醯磷酸及過氧化氫(圖 2G)。此類型之丙酮酸氧化酶為可溶的，且需要輔因子硫胺素二磷酸及黃素腺嘌呤二核苷酸(FAD)。形成乙醯磷酸之丙酮酸氧化酶可見於乳酸細菌德氏乳桿菌 (*Lactobacillus delbrueckii*) 及植物乳桿菌中 (Lorquet 等人, *J Bacteriol* 186:3749-3759 (2004); Hager 等人, *Fed Proc* 13:734-38 (1954))。已解析植物乳桿菌酶之晶體結構 (Muller 等人, (1994))。在血鏈球菌及肺炎鏈球菌中，形成乙醯磷酸之丙酮酸氧化酶由 *spxB* 基因編碼 (Spellerberg 等人, *Mol Micro* 19:803-13 (1996); Ramos-Montanez 等人, *Mol Micro* 67:729-46

(2008))。SpxR顯示可正調節肺炎鏈球菌中之spxB的轉錄(Ramos-Montanez等人, 前述)。血鏈球菌中之相似調節因子藉由序列同源性鑑別。引入或修飾過氧化氫酶活性可減少過氧化氫產物積聚。

基因	GenBank寄存編號	GI編號	生物體
poxB	NP_786788.1	28379896	植物乳桿菌
spxB	L39074.1	1161269	肺炎鏈球菌
Spd_0969 (spxR)	YP_816445.1	116517139	肺炎鏈球菌
spxB	ZP_07887723.1	315612812	血鏈球菌
spxR	ZP_07887944.1 GI:	315613033	血鏈球菌

丙酮酸脫氫酶(PDH)複合物催化丙酮酸轉化為乙醯CoA(圖2H)。大腸桿菌PDH複合物由基因*aceEF*及*lpdA*編碼。酶工程改造工作已改良在缺氧條件下之大腸桿菌PDH酶活性(Kim等人, *J. Bacteriol.* 190:3851-3858 (2008); Kim等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 73:1766-1771 (2007); Zhou等人, *Biotechnol. Lett.* 30:335-342 (2008))。與大腸桿菌PDH形成對比, 枯草桿菌複合物為活性且為在缺氧條件下生長所需(Nakano等人, 179:6749-6755 (1997))。在於甘油上生長期間表徵之肺炎克雷伯氏菌PDH在缺氧條件下亦具有活性(Menzel等人, 56:135-142 (1997))。可得來自牛腎之酶複合物(Zhou等人, 98:14802-14807 (2001))及來自棕色固氮菌之E2催化域的晶體結構(Mattevi等人, *Science.* 255:1544-1550 (1992))。一些哺乳動物PDH酶複合物可對替代性受質(諸如2-側氧基丁酸)起反應。褐家鼠PDH及BCKAD之比較動力學指示, BCKAD對作為受質之2-側氧基丁酸具有更高活性(Paxton等人, *Biochem. J.* 234:295-303 (1986))。釀酒酵母PDH複合物可由以下組成: E2 (*LAT1*)核心, 其結合E1 (*PDA1*, *PDB1*)、E3 (*LPD1*)及蛋白質X (*PDX1*)組分(Pronk等人, *Yeast* 12:1607-1633 (1996))。釀酒酵母之PDH複合物由包括PKP1 (PDH激酶I)、PTC5 (PDH磷酸酶I)、PKP2及PTC6之E1磷酸化調節。修飾此等調節因子亦可增進PDH活性。硫辛醯基連接酶(大腸桿菌之*LplA*及釀酒酵母中之AIM22)與PDH於細胞溶質中之

共表現可為活化PDH酶複合物所需。藉由修飾代謝路徑或用硫辛酸進行培養基補充增加細胞溶質硫辛酸之供應亦可改良PDH活性。

基因	寄存編號	GI編號	生物體
aceE	NP_414656.1	16128107	大腸桿菌
aceF	NP_414657.1	16128108	大腸桿菌
lpd	NP_414658.1	16128109	大腸桿菌
lplA	NP_418803.1	16132203	大腸桿菌
pdhA	P21881.1	3123238	枯草桿菌
pdhB	P21882.1	129068	枯草桿菌
pdhC	P21883.2	129054	枯草桿菌
pdhD	P21880.1	118672	枯草桿菌
aceE	YP_001333808.1	152968699	肺炎克雷伯氏菌
aceF	YP_001333809.1	152968700	肺炎克雷伯氏菌
lpdA	YP_001333810.1	152968701	肺炎克雷伯氏菌
Pdha1	NP_001004072.2	124430510	褐家鼠
Pdha2	NP_446446.1	16758900	褐家鼠
Dlat	NP_112287.1	78365255	褐家鼠
Dld	NP_955417.1	40786469	褐家鼠
LAT1	NP_014328	6324258	釀酒酵母
PDA1	NP_011105	37362644	釀酒酵母
PDB1	NP_009780	6319698	釀酒酵母
LPD1	NP_116635	14318501	釀酒酵母
PDX1	NP_011709	6321632	釀酒酵母
AIM22	NP_012489.2	83578101	釀酒酵母

作為如上所述之大的多酶PDH複合物之替代物，一些生物體利用2-酮酸氧化還原酶家族(OFOR)中之酶以催化2-酮酸之醯化氧化脫羧。不同於PDH複合物，PFOR酶含有鐵-硫簇，利用不同輔因子，且使用鐵氧還蛋白或黃素氧化還原蛋白作為電子受體替代NAD(P)H。丙酮酸鐵氧還蛋白氧化還原酶(PFOR)可催化丙酮酸氧化以形成乙醯CoA(圖2H)。來自非洲脫硫弧菌之PFOR已於大腸桿菌中經選殖並表現，產生在氧氣存在下穩定數天之活性重組酶(Pieulle等人, *J Bacteriol.* 179:5684-5692 (1997))。氧氣穩定性在PFOR中相對罕見，且咸信由非洲脫硫弧菌酶之多肽鏈中之60個殘基延伸賦予。熱醋酸穆爾氏菌PFOR亦經充分表徵(Menon等人, *Biochemistry* 36:8484-8494 (1997))，且在自養生長期間甚至顯示在丙酮酸合成方向上具有高活性(Furdui等

人, *J Biol Chem.* 275:28494-28499 (2000))。此外，大腸桿菌具有未經表徵之開放閱讀框架 $ydbK$ ，其編碼與熱醋酸穆爾氏菌PFOR 51%一致之蛋白質。已描述大腸桿菌中之丙酮酸氧化還原酶活性的證據(Blaschkowski等人, *Eur. J Biochem.* 123:563-569 (1982))。若干其他PFOR酶描述於Ragsdale, *Chem. Rev.* 103:2333-2346 (2003)中。最後，黃素氧化還原蛋白還原酶(例如來自幽門螺旋桿菌或空腸彎曲桿菌之 $fqrB$ (St Maurice等人, *J. Bacteriol.* 189:4764-4773 (2007)))或Rnf型蛋白質(Seedorf等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S.A.* 105:2128-2133 (2008)；Herrmann等人, *J. Bacteriol.* 190:784-791 (2008))提供自由PFOR產生之還原鐵氧化還原蛋白產生NADH或NADPH之方法。此等蛋白質鑑別如下。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
Por	CAA70873.1	1770208	非洲脫硫弧菌
Por	YP_428946.1	83588937	熱醋酸穆爾氏菌
$ydbK$	NP_415896.1	16129339	大腸桿菌
$fqrB$	NP_207955.1	15645778	幽門螺旋桿菌
$fqrB$	YP_001482096.1	157414840	空腸彎曲桿菌
RnfC	EDK33306.1	146346770	克氏梭菌
RnfD	EDK33307.1	146346771	克氏梭菌
RnfG	EDK33308.1	146346772	克氏梭菌
RnfE	EDK33309.1	146346773	克氏梭菌
RnfA	EDK33310.1	146346774	克氏梭菌
RnfB	EDK33311.1	146346775	克氏梭菌

大腸桿菌中之由 $pflB$ 編碼的丙酮酸甲酸裂解酶(PFL, EC 2.3.1.54)(圖2H)可將丙酮酸轉化為乙醯CoA及甲酸。PFL之活性可藉由由 $pflA$ 編碼之活化酶增進(Knappe等人, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.* 81:1332-1335 (1984)；Wong等人, *Biochemistry* 32:14102-14110 (1993))。酮酸甲酸裂解酶(EC2.3.1.-)，亦稱為2-酮丁酸甲酸裂解酶(KFL)及丙酮酸甲酸裂解酶4，為大腸桿菌中之 $tdcE$ 之基因產物。此酶在缺氧蘇胺酸降解期間催化2-酮丁酸轉化為丙醯CoA及甲酸，且亦可在缺氧分解代謝中取代丙酮酸甲酸裂解酶(Simanshu等人, *J Biosci.*

32:1195-1206 (2007))。該酶對氧敏感，且如PflB，可能需要藉由PFL-AE進行轉譯後修飾以活化活性位點處之甘胺醯基(Hesslinger等人, *Mol. Microbiol* 27:477-492 (1998))。來自閃爍古生球菌之由pflD編碼的丙酮酸甲酸裂解酶已於大腸桿菌中經選殖、表現及表徵(Lehtio等人, *Protein Eng Des Sel* 17:545-552 (2004))。已解析閃爍古生球菌及大腸桿菌酶之晶體結構(Lehtio等人, *J Mol. Biol.* 357:221-235 (2006)；Leppanen等人, *Structure.* 7:733-744 (1999))。其他PFL及PFL-AE候選物見於以下中：乳酸乳球菌(Melchiorson等人, *Appl Microbiol Biotechnol* 58:338-344 (2002))及變異鏈球菌(Takahashi-Abbe等人, *Oral. Microbiol Immunol.* 18:293-297 (2003))、萊茵衣藻(Hemschemeier等人, *Eukaryot. Cell* 7:518-526 (2008b)；Atteia等人, *J. Biol. Chem.* 281:9909-9918 (2006))及巴斯德梭菌(Weidner等人, *J Bacteriol.* 178:2440-2444 (1996))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
pflB	NP_415423	16128870	大腸桿菌
pflA	NP_415422.1	16128869	大腸桿菌
tdcE	AAT48170.1	48994926	大腸桿菌
pflD	NP_070278.1	11499044	閃爍古生球菌
pfl	CAA03993	2407931	乳酸乳球菌
pfl	BAA09085	1129082	變異鏈球菌
PFL1	XP_001689719.1	159462978	萊茵衣藻
pflA1	XP_001700657.1	159485246	萊茵衣藻
pfl	Q46266.1	2500058	巴斯德梭菌
act	CAA63749.1	1072362	巴斯德梭菌

若利用丙酮酸甲酸裂解酶將丙酮酸轉化為乙醯CoA，則甲酸脫氫酶或甲酸氫裂解酶之共表現將甲酸轉化為二氧化碳。甲酸脫氫酶(FDH)催化電子自甲酸可逆傳遞至受體。具有FDH活性之酶利用各種電子載體，諸如NADH (EC 1.2.1.2)、NADPH (EC 1.2.1.43)、醌醇(EC 1.1.5.6)、細胞色素(EC 1.2.2.3)及氫化酶(EC 1.1.99.33)。FDH酶已自熱醋酸穆爾氏菌表徵(Andreesen及Ljungdahl, *J Bacteriol* 116:867-873

(1973)；Li等人, *J Bacteriol* 92:405-412 (1966)；Yamamoto等人, *J Biol Chem.* 258:1826-1832 (1983)。基因座Moth_2312負責編碼甲酸脫氫酶之 α 次單元，而 β 次單元由Moth_2314編碼(Pierce等人, *Environ Microbiol* (2008))。另一組編碼甲酸脫氫酶活性(具有CO₂還原傾向)之基因由弗氏互營桿菌中之Sfum_2703至Sfum_2706編碼(de Bok等人, *Eur J Biochem.* 270:2476-2485 (2003))；Reda等人, *PNAS* 105:10654-10658 (2008)。據推測實現相同功能之一組類似基因由產氫羧基嗜熱菌中之CHY_0731、CHY_0732及CHY_0733編碼(Wu等人, *PLoS Genet* 1:e65 (2005))。甲酸脫氫酶亦見於包括以下之多種其他生物體中：食一氧化碳梭菌P7、甲醇芽孢桿菌、穩定伯克霍爾德菌、熱醋酸穆爾氏菌ATCC 39073、博伊丁假絲酵母、甲基假絲酵母及釀酒酵母S288c。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
Moth_2312	YP_431142	148283121	熱醋酸穆爾氏菌
Moth_2314	YP_431144	83591135	熱醋酸穆爾氏菌
Sfum_2703	YP_846816.1	116750129	弗氏互營桿菌
Sfum_2704	YP_846817.1	116750130	弗氏互營桿菌
Sfum_2705	YP_846818.1	116750131	弗氏互營桿菌
Sfum_2706	YP_846819.1	116750132	弗氏互營桿菌
CHY_0731	YP_359585.1	78044572	產氫羧基嗜熱菌
CHY_0732	YP_359586.1	78044500	產氫羧基嗜熱菌
CHY_0733	YP_359587.1	78044647	產氫羧基嗜熱菌
CcarbDRAFT_0901	ZP_05390901.1	255523938	食一氧化碳梭菌P7
CcarbDRAFT_4380	ZP_05394380.1	255527512	食一氧化碳梭菌P7
fdhA, MGA3_06625	EIJ82879.1	387590560	甲醇芽孢桿菌MGA3
fdhA, PB1_11719	ZP_10131761.1	387929084	甲醇芽孢桿菌PB1
fdhD, MGA3_06630	EIJ82880.1	387590561	甲醇芽孢桿菌MGA3
fdhD, PB1_11724	ZP_10131762.1	387929085	甲醇芽孢桿菌PB1
fdh	ACF35003.	194220249	穩定伯克霍爾德菌
FDH1	AAC49766.1	2276465	博伊丁假絲酵母
fdh	CAA57036.1	1181204	甲基假絲酵母
FDH2	P0CF35.1	294956522	釀酒酵母s288c
FDH1	NP_015033.1	6324964	釀酒酵母s288c

或者，甲酸氫裂解酶可用以將甲酸轉化為二氧化碳及氫氣。例示性甲酸氫裂解酶可見於大腸桿菌中。大腸桿菌甲酸氫裂解酶由氫化

酶 3 及甲酸脫氫酶 -H 組成 (Maeda 等人, *Appl Microbiol Biotechnol* 77:879-890 (2007))。其藉由 *fhIA* 之基因產物活化。(Maeda 等人, *Appl Microbiol Biotechnol* 77:879-890 (2007))。已顯示向醱酵液中添加痕量元素硒、鎳及鉬可增進甲酸氫裂解酶活性 (Soini 等人, *Microb. Cell Fact.* 7:26 (2008))。各種氫化酶 3、甲酸脫氫酶及轉錄活化基因展示如下。甲酸氫裂解酶亦存在於極端嗜熱古菌海濱熱球菌中 (Takacs 等人, *BMC. Microbiol* 8:88 (2008))。其他甲酸氫裂解酶系統已見於鼠傷寒沙門氏菌、肺炎克雷伯氏菌、深紅紅螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*)、甲酸甲烷桿菌 (*Methanobacterium formicicum*) 中 (Vardar-Schara 等人, *Microbial Biotechnology* 1:107-125 (2008))。

蛋白質	GenBank ID	GI 編號	生物體
hycA	NP_417205	16130632	大腸桿菌 K-12 MG1655
hycB	NP_417204	16130631	大腸桿菌 K-12 MG1655
hycC	NP_417203	16130630	大腸桿菌 K-12 MG1655
hycD	NP_417202	16130629	大腸桿菌 K-12 MG1655
hycE	NP_417201	16130628	大腸桿菌 K-12 MG1655
hycF	NP_417200	16130627	大腸桿菌 K-12 MG1655
hycG	NP_417199	16130626	大腸桿菌 K-12 MG1655
hycH	NP_417198	16130625	大腸桿菌 K-12 MG1655
hycI	NP_417197	16130624	大腸桿菌 K-12 MG1655
fdhF	NP_418503	16131905	大腸桿菌 K-12 MG1655
fhIA	NP_417211	16130638	大腸桿菌 K-12 MG1655
mhyC	ABW05543	157954626	海濱熱球菌
mhyD	ABW05544	157954627	海濱熱球菌
mhyE	ABW05545	157954628	海濱熱球菌
myhF	ABW05546	157954629	海濱熱球菌
myhG	ABW05547	157954630	海濱熱球菌
myhH	ABW05548	157954631	海濱熱球菌
fdhA	AAB94932	2746736	海濱熱球菌
fdhB	AAB94931	157954625	海濱熱球菌

丙酮酸:NADP 氧化還原酶 (PNO) 催化丙酮酸轉化為乙醯 CoA。此酶由單一基因編碼，且與如上所述之多次單元 PDH 酶複合物對比，此活性酶為均二聚體。來自纖細裸藻之酶藉由其輔因子硫胺素焦磷酸穩定化 (Nakazawa 等人, *Arch Biochem Biophys* 411:183-8 (2003))。應移除

此酶之粒線體靶向序列以表現於細胞溶質中。纖細裸藻蛋白質之PNO蛋白質及其他NADP依賴性丙酮酸:NADP+氧化還原酶列於下表中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
PNO	Q94IN5.1	33112418	纖細裸藻
cgd4_690	XP_625673.1	66356990	小隱孢子蟲 <i>Iowa II</i>
TPP_PFOR_PNO	XP_002765111.11	294867463	海洋帕金蟲 <i>ATCC 50983</i>

乙醛向乙醯CoA之NAD(P)⁺依賴性氧化(圖2I)可由醯化乙醛脫氫酶(EC 1.2.1.10)催化。大腸桿菌之醯化乙醛脫氫酶由*adhE*、*eutE*及*mhpF*編碼(Ferrandez等人, *J Bacteriol* 179:2573-81 (1997))。由*dmpF*編碼之假單胞菌屬CF600酶參與間位裂解路徑且與4-羥基-2-側氧基戊酸醛縮酶形成複合物(Shingler等人, *J Bacteriol* 174:711-24 (1992))。產溶劑性生物體(諸如丙酮丁醇梭菌)編碼具有醇脫氫酶及乙醛脫氫酶活性之二功能酶。二功能丙酮丁醇梭菌酶由*bdh I*及*adhE2*編碼(Walter, 等人, *J. Bacteriol.* 174:7149-7158 (1992); Fontaine等人, *J. Bacteriol.* 184:821-830 (2002))。醯化乙醛脫氫酶之另一候選物為來自拜氏梭菌之*ald*基因(Toth, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999))。此基因極類似於鼠傷寒沙門氏菌及大腸桿菌之*eutE*乙醛脫氫酶基因(Toth, *Appl. Environ. Microbiol.* 65:4973-4980 (1999))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
<i>adhE</i>	NP_415757.1	16129202	大腸桿菌
<i>mhpF</i>	NP_414885.1	16128336	大腸桿菌
<i>dmpF</i>	CAA43226.1	45683	假單胞菌屬CF600
<i>adhE2</i>	AAK09379.1	12958626	丙酮丁醇梭菌
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌
<i>Ald</i>	AAT66436	49473535	拜氏梭菌
<i>eutE</i>	NP_416950	16130380	大腸桿菌
<i>eutE</i>	AAA80209	687645	鼠傷寒沙門氏菌

蘇胺酸醛縮酶(EC 4.1.2.5)催化蘇胺酸裂解為甘胺酸及乙醛(圖2J)。釀酒酵母及白假絲酵母酶由GLY1編碼(Liu等人, *Eur J Biochem* 245:289-93 (1997); McNeil等人, *Yeast* 16:167-75 (2000))。大腸桿菌之*ltaE*及*glyA*基因產物亦編碼具有此活性之酶(Liu等人, *Eur J Biochem*

255:220-6 (1998))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
GLY1	NP_010868.1	6320789	釀酒酵母
GLY1	AAB64198.1	2282060	白假絲酵母
ltaE	AAC73957.1	1787095	大腸桿菌
glyA	AAC75604.1	1788902	大腸桿菌

實例 III

用於自 PEP 及 丙酮酸 生產 乙醯 CoA 之路徑

用於將細胞溶質磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 及 丙酮酸 轉化為細胞溶質乙醯 CoA 之路徑亦可使得能夠採用來自乙醯 CoA 之細胞溶質脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產路徑。圖 3 展示眾多用於將 PEP 及 丙酮酸 轉化為乙醯 CoA 之路徑。

PEP 轉化為草醯乙酸係在一個、兩個或三個酶促步驟中經催化。草醯乙酸經由丙二酸半醛或丙二醯 CoA 中間物進一步轉化為乙醯 CoA。在一個路徑中，PEP 羧化酶或 PEP 羧激酶將 PEP 轉化為草醯乙酸 (步驟 A)；草醯乙酸脫羧酶將草醯乙酸轉化為丙二酸 (步驟 B)；且丙二酸半醛脫氫酶 (乙醯化) 將丙二酸半醛轉化為乙醯 CoA (步驟 C)。在另一路徑中，丙酮酸激酶或 PEP 磷酸酶將 PEP 轉化為丙酮酸 (步驟 N)；丙酮酸羧化酶將丙酮酸轉化為 (步驟 H)；草醯乙酸脫羧酶將草醯乙酸轉化為丙二酸 (步驟 B)；且丙二酸半醛脫氫酶 (乙醯化) 將丙二酸半醛轉化為乙醯 CoA (步驟 C)。在另一路徑中，丙酮酸激酶或 PEP 磷酸酶將 PEP 轉化為丙酮酸 (步驟 N)；蘋果酸酶將丙酮酸轉化為蘋果酸 (步驟 L)；蘋果酸脫氫酶或氧化還原酶將蘋果酸轉化為草醯乙酸 (步驟 M)；草醯乙酸脫羧酶將草醯乙酸轉化為丙二酸 (步驟 B)；且丙二酸半醛脫氫酶 (乙醯化) 將丙二酸半醛轉化為乙醯 CoA (步驟 C)。在另一路徑中，PEP 羧化酶或 PEP 羧激酶將 PEP 轉化為草醯乙酸 (步驟 A)；草醯乙酸脫羧酶將草醯乙酸轉化為丙二酸半醛 (步驟 B)；丙二醯 CoA 還原酶將丙二酸半醛轉化為丙二醯 CoA (步驟 G)；且丙二醯 CoA 脫羧酶將丙二醯 CoA 轉化為

乙醯CoA(步驟D)。在另一路徑中，丙酮酸激酶或PEP磷酸酶將PEP轉化為丙酮酸(步驟N)；丙酮酸羧化酶將丙酮酸轉化為草醯乙酸(步驟H)；草醯乙酸脫羧酶將草醯乙酸轉化為丙二酸半醛(步驟B)；丙二醯CoA還原酶將丙二酸半醛轉化為丙二醯CoA(步驟G)；且丙二醯CoA脫羧酶將丙二醯CoA轉化為乙醯CoA(步驟D)。在另一路徑中，丙酮酸激酶或PEP磷酸酶將PEP轉化為丙酮酸(步驟N)；蘋果酸酶將丙酮酸轉化為蘋果酸(步驟L)；蘋果酸脫氫酶或氧化還原酶將蘋果酸轉化為草醯乙酸(步驟M)；草醯乙酸脫羧酶將草醯乙酸轉化為丙二酸半醛(步驟B)；丙二醯CoA還原酶將丙二酸半醛轉化為丙二醯CoA(步驟G)；且丙二醯CoA脫羧酶將丙二醯CoA轉化為乙醯CoA(步驟D)。在另一路徑中，PEP羧化酶或PEP羧激酶將PEP轉化為草醯乙酸(步驟A)；草醯乙酸脫羧酶將草醯乙酸轉化為丙二酸半醛(步驟B)；丙二酸半醛脫氫酶將丙二酸半醛轉化為丙二酸(步驟J)；丙二醯CoA合成酶或轉移酶將丙二酸轉化為丙二醯CoA(步驟K)；且丙二醯CoA脫羧酶將丙二醯CoA轉化為乙醯CoA(步驟D)。在另一路徑中，丙酮酸激酶或PEP磷酸酶將PEP轉化為丙酮酸(步驟N)；丙酮酸羧化酶將丙酮酸轉化為草醯乙酸(步驟H)；草醯乙酸脫羧酶將草醯乙酸轉化為丙二酸半醛(步驟B)；丙二酸半醛脫氫酶將丙二酸半醛轉化為丙二酸(步驟J)；丙二醯CoA合成酶或轉移酶將丙二酸轉化為丙二醯CoA(步驟K)；且丙二醯CoA脫羧酶將丙二醯CoA轉化為乙醯CoA(步驟D)。在另一路徑中，丙酮酸激酶或PEP磷酸酶將PEP轉化為丙酮酸(步驟N)；蘋果酸酶將丙酮酸轉化為蘋果酸(步驟L)；蘋果酸脫氫酶或氧化還原酶將蘋果酸轉化為草醯乙酸(步驟M)；草醯乙酸脫羧酶將草醯乙酸轉化為丙二酸半醛(步驟B)；丙二酸半醛脫氫酶將丙二酸半醛轉化為丙二酸(步驟J)；丙二醯CoA合成酶或轉移酶將丙二酸轉化為丙二醯CoA(步驟K)；且丙二醯CoA脫羧酶將丙二醯CoA轉化為乙醯CoA(步驟D)。在另一路徑中，PEP羧化酶或

PEP羧激酶將PEP轉化爲草醯乙酸(步驟A)；草醯乙酸脫氫酶或草醯乙酸氧化還原酶將草醯乙酸轉化爲丙二醯CoA(步驟F)；且丙二醯CoA脫羧酶將丙二醯CoA轉化爲乙醯CoA(步驟D)。在另一路徑中，丙酮酸激酶或PEP磷酸酶將PEP轉化爲丙酮酸(步驟N)；丙酮酸羧化酶將丙酮酸轉化爲草醯乙酸(步驟H)；草醯乙酸脫氫酶或草醯乙酸氧化還原酶將草醯乙酸轉化爲丙二醯CoA(步驟F)；且丙二醯CoA脫羧酶將丙二醯CoA轉化爲乙醯CoA(步驟D)。在另一路徑中，丙酮酸激酶或PEP磷酸酶將PEP轉化爲丙酮酸(步驟N)；蘋果酸酶將丙酮酸轉化爲蘋果酸(步驟L)；蘋果酸脫氫酶或氧化還原酶將蘋果酸轉化爲草醯乙酸(步驟M)；草醯乙酸脫氫酶或草醯乙酸氧化還原酶將草醯乙酸轉化爲丙二醯CoA(步驟F)；且丙二醯CoA脫羧酶將丙二醯CoA轉化爲乙醯CoA(步驟D)。

用於圖3中所示之反應的酶候選物描述如下。

1.1.n.a	氧化還原酶(醇至側氧基)	M
1.1.1.d	蘋果酸酶	L
1.2.1.a	氧化還原酶(醛至酸)	J
1.2.1.b	氧化還原酶(醯基CoA至醛)	G
1.2.1.f	氧化還原酶(將醯基CoA脫羧爲醛)	C
2.7.2.a	激酶	N
2.8.3.a	CoA轉移酶	K
3.1.3.a	磷酸酶	N
4.1.1.a	脫羧酶	A、B、D
6.2.1.a	CoA合成酶	K
6.4.1.a	羧化酶	D、H

用於圖3中之若干酶的酶候選物已描述於本文中別處。其包括乙醯CoA羧化酶、乙醯乙醯CoA合成酶、乙醯乙醯COA硫解酶、丙二醯CoA還原酶(亦稱爲丙二酸半醛脫氫酶(醯化))、蘋果酸脫氫酶。

1.1.n.a 氧化還原酶(醇至側氧基)

蘋果酸脫氫酶或氧化還原酶催化蘋果酸氧化爲草醯乙酸。不同載體可充當此種類酶之電子受體。蘋果酸脫氫酶利用NADP或NAD作

為電子受體。蘋果酸脫氫酶(步驟M)候選物如上描述於實例1(表7、23)中。蘋果酸：醌氧化還原酶(EC 1.1.5.4)為膜相關的，且利用醌、黃素蛋白或維生素K作為電子受體。大腸桿菌、幽門螺旋桿菌及丁香假單胞菌之蘋果酸：醌氧化還原酶由*mgo*編碼(Kather等人, *J Bacteriol* 182:3204-9 (2000); Mellgren等人, *J Bacteriol* 191:3132-42 (2009))。麩胺酸棒狀桿菌之Cgl2001基因亦編碼MQO酶(Mitsuhashi等人, *Biosci Biotechnol Biochem* 70:2803-6 (2006))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
mgo	NP_416714.1	16130147	大腸桿菌
mgo	NP_206886.1	15644716	幽門螺旋桿菌
mgo	NP_790970.1	28868351	丁香假單胞菌
Cgl2001	NP_601207.1	19553205	麩胺酸棒狀桿菌

1.1.1.d 蘋果酸酶

蘋果酸酶(蘋果酸脫氫酶)催化丙酮酸可逆氧化羧化為蘋果酸。大腸桿菌編碼兩種蘋果酸酶MaeA及MaeB (Takeo, *J. Biochem.* 66:379-387 (1969))。儘管典型地設想蘋果酸酶在自蘋果酸形成丙酮酸方向上起作用，但由*maeA*編碼之NAD依賴性酶已顯示在固碳方向上起作用(Stols及Donnelly, *Appl. Environ. Microbiol.* 63(7) 2695-2701 (1997))。在於大腸桿菌中過度表現來自豬蛔蟲之蘋果酸酶時，得到相似觀測結果(Stols等人, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 63-65(1), 153-158 (1997))。由*maeB*編碼之第二大腸桿菌蘋果酸酶為NADP依賴性的，且亦使草醯乙酸及其他 α -酮酸脫羧(Iwakura等人, *J. Biochem.* 85(5):1355-65 (1979))。另一適合酶候選物為來自玉蜀黍之*mel* (Furumoto等人, *Plant Cell Physiol* 41:1200-1209 (2000))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
maeA	NP_415996	90111281	大腸桿菌
maeB	NP_416958	16130388	大腸桿菌
NAD-ME	P27443	126732	豬蛔蟲
Mel	P16243.1	126737	玉蜀黍

1.2.1.a 氧化還原酶(醛至酸)

丙二酸半醛氧化為丙二酸係由丙二酸半醛脫氫酶(EC 1.2.1.15)催化。此酶於綠膿假單胞菌中表徵(Nakamura等人, *Biochim Biophys Acta* 50:147-52 (1961))。纖細裸藻之NADP及NAD依賴性琥珀酸半醛脫氫酶接受丙二酸半醛作為受質(Tokunaga等人, *Biochem Biophys Acta* 429:55-62 (1976))。迄今尚未鑑別編碼此等酶之基因。來自真核生物體(諸如釀酒酵母、白假絲酵母、解脂耶氏酵母及黑麴菌)之醛脫氫酶典型地具有廣泛受質特異性且為適合候選物。此等酶及其他形成酸之醛脫氫酶及醛氧化酶先前經描述且列於表9及30中。其他MSA脫氫酶候選物包括NAD(P)+依賴性醛脫氫酶(EC 1.2.1.3)。見於人類肝中之兩種醛脫氫酶ALDH-1及ALDH-2具有用於多種脂族、芳族及多環醛之廣泛受質範圍(Klyosov, *Biochemistry* 35:4457-4467 (1996a))。活性ALDH-2已使用GroEL蛋白質作為伴侶素於大腸桿菌中有效表現(Lee等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298:216-224 (2002))。大鼠粒線體醛脫氫酶亦具有廣泛受質範圍(Siew等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 176:638-649 (1976))。大腸桿菌基因*astD*及*aldH*編碼NAD+依賴性醛脫氫酶。AstD對琥珀酸半醛具有活性(Kuznetsova等人, *FEMS Microbiol Rev* 29:263-279 (2005))，且*aldH*對大量芳族及脂族受質具有活性(Jo等人, *Appl Microbiol Biotechnol* 81:51-60 (2008))。

基因	GenBank寄存編號	GI編號	生物體
<i>astD</i>	P76217.1	3913108	大腸桿菌
<i>aldH</i>	AAC74382.1	1787558	大腸桿菌
ALDH-2	P05091.2	118504	智人
ALDH-2	NP_115792.1	14192933	褐家鼠

1.2.1.f 氧化還原酶(將醯基CoA脫羧為醛)

丙二酸半醛脫氫酶(乙醯化)(EC 1.2.1.18)催化丙二酸半醛氧化脫羧為乙醯CoA。例示性酶由以下編碼：鹽單胞菌屬*HTNK1*之*ddcC*(Todd等人, *Environ Microbiol* 12:237-43 (2010))及凱氏乳桿菌之*IolA*(Yebra等人, *AEM* 73:3850-8 (2007))。DdcC酶具有黑麴菌及白假絲酵

母中之展示於下表中的同源物。褐家鼠中之丙二酸半醛脫氫酶Mmsdh亦將丙二酸半醛轉化為乙醯CoA (US 8048624)。丙二酸半醛脫氫酶(乙醯化)亦已於螢光假單胞菌中表徵，但迄今尚未鑑別基因(Hayaishi等人, *J Biol Chem* 236:781-90 (1961))。甲基丙二酸半醛脫氫酶(乙醯化)(EC 1.2.1.27)亦為適合候選物，因為此種類中之若干酶接受丙二酸半醛作為受質，該等酶包括枯草桿菌之Msdh (Stines-Chaumeil等人, *Biochem J* 395:107-15 (2006))及褐家鼠之甲基丙二酸半醛脫氫酶(Kedishvii等人, *Methods Enzymol* 324:207-18 (2000))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
ddcC	ACV84070.1	258618587	鹽單胞菌屬HTNK1
ANI_1_1120014	XP_001389265.1	145229913	黑麴菌
ALD6	XP_710976.1	68490403	白假絲酵母
YALI0C01859g	XP_501343.1	50547747	解脂耶氏酵母
mmsA_1	YP_257876.1	70734236	螢光假單胞菌
mmsA_2	YP_257884.1	70734244	螢光假單胞菌
PA0130	NP_248820.1	15595328	綠膿假單胞菌
Mmsdh	Q02253.1	400269	褐家鼠
msdh	NP_391855.1	16081027	枯草桿菌
IolA	ABP57762.1	145309085	凱氏乳桿菌

2.7.2.a 激酶

丙酮酸激酶(步驟10N)，亦稱為磷酸烯醇丙酮酸合成酶(EC 2.7.9.2)，將丙酮酸及ATP轉化為PEP及AMP。此酶由釀酒酵母中之PYK1 (Burke等人, *J. Biol. Chem.* 258:2193-2201 (1983))及PYK2 (Boles等人, *J. Bacteriol.* 179:2987-2993 (1997))基因編碼。在大腸桿菌中，此活性由pykF及pykA之基因產物催化。釀酒酵母酶之所選同源物亦展示於下表中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
PYK1	NP_009362	6319279	釀酒酵母
PYK2	NP_014992	6324923	釀酒酵母
pykF	NP_416191.1	16129632	大腸桿菌
pykA	NP_416368.1	16129807	大腸桿菌
KLLA0F23397g	XP_456122.1	50312181	乳酸克魯維酵母
CaO19.3575	XP_714934.1	68482353	白假絲酵母
CaO19.11059	XP_714997.1	68482226	白假絲酵母

YALIOF09185p	XP_505195	210075987	解脂耶氏酵母
ANI_1_1126064	XP_001391973	145238652	黑麴菌

2.8.3.a CoA轉移酶

丙二酸活化為丙二醯CoA係由EC種類2.8.3.a中之Co轉移酶催化。丙二醯CoA:乙酸CoA轉移酶(EC 2.8.3.3)已於包括以下之假單胞菌屬中表徵：螢光假單胞菌及惡臭假單胞菌(Takamura等人, *Biochem Int* 3:483-91 (1981)；Hayaishi等人, *J Biol Chem* 215:125-36 (1955))。迄今尚未鑑別與此等酶相關之基因。見於褐家鼠肝中之粒線體CoA轉移酶亦催化此反應，且能夠利用一系列CoA供體及受體(Deana等人, *Biochem Int* 26:767-73 (1992))。如上所述之若干CoA轉移酶亦可應用於催化圖10之步驟K。此等酶包括乙醯CoA轉移酶(表26)、3-HB CoA轉移酶(表8)、乙醯乙醯CoA轉移酶(表55)、SCOT(表56)及其他CoA轉移酶(表57)。

3.1.3.a 磷酸酶

磷酸烯醇丙酮酸磷酸酶(EC 3.1.3.60，步驟10N)催化PEP水解為丙酮酸及磷酸。眾多磷酸酶催化此活性，包括鹼性磷酸酶(EC 3.1.3.1)、酸性磷酸酶(EC 3.1.3.2)、磷酸甘油酸磷酸酶(EC 3.1.3.20)及PEP磷酸酶(EC 3.1.3.60)。PEP磷酸酶已於諸如綠豆(*Vigna radiate*)、海蓮(*Bruguiera sexangula*)及黑芥菜(*Brassica nigra*)之植物中表徵。來自薰煙麴菌之植酸酶、來自智人之酸性磷酸酶及大腸桿菌之鹼性磷酸酶亦催化PEP水解為丙酮酸(Brugger等人, *Appl Microbiol Biotech* 63:383-9 (2004)；Hayman等人, *Biochem J* 261:601-9 (1989)；等人, *The Enzymes* 第3版 4:373-415 (1971))。相似酶已於以下中表徵：空腸彎曲桿菌(van Mourik等人, *Microbiol.* 154:584-92 (2008))、釀酒酵母(Oshima等人, *Gene* 179:171-7 (1996))及金黃色葡萄球菌(Shah及Blobel, *J. Bacteriol.* 94:780-1 (1967))。目標序列之酶工程改造及/或移

除可為鹼性磷酸酶於細胞質中起作用所需。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
phyA	O00092.1	41017447	薰煙麴菌
Acp5	P13686.3	56757583	智人
phoA	NP_414917.2	49176017	大腸桿菌
phoX	ZP_01072054.1	86153851	空腸彎曲桿菌
PHO8	AAA34871.1	172164	釀酒酵母
SaurJH1_2706	YP_001317815.1	150395140	金黃色葡萄球菌

4.1.1.a 脫羧酶

圖10中之若干反應由EC種類4.1.1中之脫羧酶催化，包括草醯乙酸脫羧酶(步驟B)、丙二醯CoA脫羧酶(步驟D)及丙酮酸羧化酶或羧激酶(步驟A)。

磷酸烯醇丙酮酸羧化為草醯乙酸係由磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(EC 4.1.1.31)催化。例示性PEP羧化酶由以下編碼：大腸桿菌中之*ppc* (Kai等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 414:170-179 (2003)、扭脫甲基桿菌*AM1*中之*ppcA* (Arps等人, *J. Bacteriol.* 175:3776-3783 (1993)及麩胺酸棒狀桿菌中之*ppc* (Eikmanns等人, *Mol. Gen. Genet.* 218:330-339 (1989))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
Ppc	NP_418391	16131794	大腸桿菌
ppcA	AAB58883	28572162	扭脫甲基桿菌
Ppc	ABB53270	80973080	麩胺酸棒狀桿菌

用於將磷酸烯醇丙酮酸羧化為草醯乙酸之替代性酶為PEP羧激酶(EC 4.1.1.32、4.1.1.49)，其同時形成ATP或GTP。在大多數生物體中，PEP羧激酶提供葡糖新生功能且耗費一個ATP將草醯乙酸轉化為PEP。釀酒酵母為天然PEP羧激酶*PCK1*提供葡糖新生作用之一種此類生物體(Valdes-Hevia等人, *FEBS Lett.* 258:313-316 (1989))。大腸桿菌為另一此類生物體，因為咸信PEP羧激酶在生產草醯乙酸中之作用在與PEP羧化酶相比時較微小(Kim等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1238-1241 (2004))。儘管如此，近來已在大腸桿菌K-12之*ppc*突變體中顯示天然大腸桿菌PEP羧激酶之自PEP朝向草醯乙酸的活性

(Kwon等人, *J. Microbiol. Biotechnol.* 16:1448-1452 (2006))。此等菌株不展現生長缺陷，且在高NaHCO₃濃度下具有增加之琥珀酸生產。大腸桿菌之突變菌株可在適應性進化之後採取*Pck*作為主要CO₂固定酶(Zhang等人 2009)。在一些生物體、尤其瘤胃細菌中，PEP羧激酶在自PEP生產草醯乙酸並產生ATP方面相當有效。已選殖至大腸桿菌中之PEP羧激酶基因的實例包括來自以下者：產琥珀酸曼氏桿菌(Lee等人, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 7:95-99 (2002))、產琥珀酸厭氧螺菌(Laivenieks等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 63:2273-2280 (1997))及產琥珀酸放線桿菌(Kim等人 前述)。由流感嗜血桿菌編碼之PEP羧激酶對自PEP形成草醯乙酸有效。另一適合候選物為來自大黍之PEPCK酶，其對CO₂(咸信在大腸桿菌酶中限速之受質)具有低Km (Chen等人, *Plant Physiol* 128:160-164 (2002)；Cotelesage等人, *Int. J Biochem. Cell Biol.* 39:1204-1210 (2007))。來自鉤蟲貪銅菌之GTP依賴性*pepck*基因產物的動力學有利於草醯乙酸形成(US8048624及Lea等人, *Amino Acids* 20:225-41 (2001))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
PCK1	NP_013023	6322950	釀酒酵母
pck	NP_417862.1	16131280	大腸桿菌
pckA	YP_089485.1	52426348	產琥珀酸曼氏桿菌
pckA	O09460.1	3122621	產琥珀酸厭氧螺菌
pckA	Q6W6X5	75440571	產琥珀酸放線桿菌
pckA	P43923.1	1172573	流感嗜血桿菌
AF532733.1:1..1929	AAQ10076.1	33329363	大黍
pepck	YP_728135.1	113869646	鉤蟲貪銅菌

草醯乙酸脫羧酶催化草醯乙酸脫羧為丙二酸半醛。催化此反應之酶包括結核分枝桿菌之*kgd* (GenBank ID: O50463.4，GI: 160395583)。自*kgd*進化之對草醯乙酸具有改良活性及/或受質特異性的酶亦有描述(美國專利8048624)。適用於催化此反應之其他酶包括展示於下表中之酮酸脫羧酶。

EC編號	名稱
4.1.1.1	丙酮酸脫羧酶
4.1.1.7	苯甲醯甲酸脫羧酶
4.1.1.40	羥基丙酮酸脫羧酶
4.1.1.43	酮苯基丙酮酸脫羧酶
4.1.1.71	α -酮戊二酸脫羧酶
4.1.1.72	分支鏈酮酸脫羧酶
4.1.1.74	吡啶丙酮酸脫羧酶
4.1.1.75	2-酮精胺酸脫羧酶
4.1.1.79	硫化丙酮酸脫羧酶
4.1.1.80	羥苯基丙酮酸脫羧酶
4.1.1.82	磷醯丙酮酸脫羧酶

酮酸之脫羧由具有變化之受質特異性之多種酶催化，包括丙酮酸脫羧酶(EC 4.1.1.1)、苯甲醯甲酸脫羧酶(EC 4.1.1.7)、 α -酮戊二酸脫羧酶及分支鏈 α -酮酸脫羧酶。丙酮酸脫羧酶(PDC)，亦稱為酮酸脫羧酶，為醇醱酵中之一種關鍵酶，催化丙酮酸脫羧為乙醛。來自釀酒酵母之PDC1酶具有關於脂族2-酮酸之廣泛受質範圍，該等脂族2-酮酸包括2-酮丁酸、2-酮戊酸、3-羥基丙酮酸及2-苯基丙酮酸(22)。此酶已於大腸桿菌中得到廣泛研究，經工程改造以達成改變活性且功能性表現(Killenberg-Jabs等人, *Eur. J. Biochem.* 268:1698-1704 (2001)；Li等人, *Biochemistry.* 38:10004-10012 (1999)；ter Schure等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 64:1303-1307 (1998))。來自運動醱酵單胞菌之由Protein Eng Des Sel 18:345-357 (2005))。可得到此酶之晶體結構(Killenberg-Jabs等人, *Eur. J. Biochem.* 268:1698-1704 (2001))。其他經充分表徵之PDC候選物包括來自巴斯德醋桿菌(Chandra等人, 176:443-451 (2001))及乳酸克魯維酵母(Krieger等人, 269:3256-3263 (2002))之酶。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
pdc	P06672.1	118391	運動醱酵單胞菌
pdc1	P06169	30923172	釀酒酵母
pdc	Q8L388	20385191	巴斯德醋桿菌
pdc1	Q12629	52788279	乳酸克魯維酵母

如PDC，苯甲醯甲酸脫羧酶(EC 4.1.1.7)具有廣泛受質範圍，且已成為酶工程改造研究之目標。來自惡臭假單胞菌之酶已得到廣泛研究，且可得到此酶之晶體結構(Polovnikova等人，42:1820-1830 (2003)；Hasson等人，37:9918-9930 (1998))。惡臭假單胞菌酶之活性位點處之兩個殘基的定點突變誘發改變天然及非天然存在之受質的親和力(K_m) (Siegert等人，*Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005))。此酶之性質已藉由定向工程改造進一步修飾(Lingen等人，*Chembiochem* 4:721-726 (2003)；Lingen等人，*Protein Eng* 15:585-593 (2002))。來自綠膿假單胞菌之由*mdlC*編碼的酶亦已經實驗表徵(Barrowman等人，34:57-60 (1986))。來自斯氏假單胞菌、螢光假單胞菌及其他生物體之其他基因候選物可藉由序列同源性推斷或使用惡臭假單胞菌中顯現之生長選擇系統鑑別(Henning等人，*Appl. Environ. Microbiol.* 72:7510-7517 (2006))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
mdlC	P20906.2	3915757	惡臭假單胞菌
mdlC	Q9HUR2.1	81539678	綠膿假單胞菌
dpgB	ABN80423.1	126202187	斯氏假單胞菌
ilvB-1	YP_260581.1	70730840	螢光假單胞菌

能夠將2-側氧基酸脫羧之第三酶為 α -酮戊二酸脫羧酶(KGD，EC 4.1.1.71)。迄今尚未研究此種類酶之受質範圍。例示性KDC由結核分枝桿菌中之*kad*編碼(Tian等人，*PNAS* 102:10670-10675 (2005))。KDC酶活性亦已於若干根瘤菌物種中偵測到，包括慢生型大豆根瘤菌及百脈根根瘤菌(Green等人，*J Bacteriol* 182:2838-2844 (2000))。儘管KDC編碼基因尚未於此等生物體中分離，但可得到基因組序列，且各基因組中之若干基因註解為推定KDC。來自纖細裸藻之KDC亦已經表徵，但迄今尚未鑑別與此活性相關之基因(Shigeoka等人，*Arch. Biochem. Biophys.* 288:22-28 (1991))。自N端開始前二十個胺基酸定序為MTYKAPVKDVKFLLDKVFKV (Shigeoka及 Nakano,

Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28 (1991))。基因可藉由測試含有此N端序列之候選基因的KDC活性而鑑別。近來已於藍細菌(諸如聚球菌屬*PCC 7002*)及同源物中鑑別AKG脫羧酶之新穎種類(Zhang及Bryant, *Science* 334:1551-3 (2011))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
kgd	O50463.4	160395583	結核分枝桿菌
kgd	NP_767092.1	27375563	慢生型大豆根瘤菌 <i>USDA110</i>
kgd	NP_105204.1	13473636	百脈根根瘤菌
ilvB	ACB00744.1	169887030	聚球菌屬 <i>PCC 7002</i>

用於催化此反應之第四候選酶為分支鏈 α -酮酸脫羧酶(BCKA)。此種類之酶已顯示作用於鏈長自3至6個碳變動之多種化合物(Oku等人, *J Biol Chem.* 263:18386-18396 (1988); Smit等人, *Appl Environ Microbiol* 71:303-311 (2005))。乳酸乳球菌中之酶已對多種分支鏈及直鏈受質進行表徵, 該等受質包括2-側氧基丁酸、2-側氧基己酸、2-側氧基戊酸、3-甲基-2-側氧基丁酸、4-甲基-2-側氧基丁酸及異己酸(Smit等人, *Appl Environ Microbiol* 71:303-311 (2005))。該酶已在結構上經表徵(Berg等人, *Science.* 318:1782-1786 (2007))。乳酸乳球菌酶與運動醱酵單胞菌之丙酮酸脫羧酶之間的序列比對指示催化及受質識別殘基接近一致(Siegert等人, *Protein Eng Des Sel* 18:345-357 (2005)), 因此此酶應為有希望之定向工程改造候選物。釀酒酵母之若干酮酸脫羧酶催化分支鏈受質之脫羧, 包括ARO10、PDC6、PDC5、PDC1及THI3 (Dickenson等人, *J Biol Chem* 275:10937-42 (2000))。另一BCKAD酶由結核分枝桿菌之rv0853c編碼(Werther等人, *J Biol Chem* 283:5344-54 (2008))。此酶藉由 α -酮酸受質經受別構活化。 α -酮戊二酸藉由BCKA脫羧於枯草桿菌中偵測到; 然而, 此活性相對於對其他分支鏈受質之活性較低(5%) (Oku及Kaneda, *J Biol Chem.* 263:18386-18396 (1988)), 且迄今尚未鑑別編碼此酶之基因。其他BCKA基因候選物可藉由與乳酸乳球菌蛋白質序列之同源性鑑別。此酶之高計分

BLASTp命中中有許多註解為吡哌丙酮酸脫羧酶(EC 4.1.1.74)。吡哌丙酮酸脫羧酶(IPDA)為催化植物及植物細菌中吡哌丙酮酸脫羧為吡哌乙醛之酶。源自來自智人及黃牛之粒線體分支鏈酮酸脫氫酶複合物之E1次單元的重組分支鏈 α -酮酸脫羧酶已選殖及功能性表現於大腸桿菌中(Davie等人, *J. Biol. Chem.* 267:16601-16606 (1992); Wynn等人, *J. Biol. Chem.* 267:12400-12403 (1992); Wynn等人, *J. Biol. Chem.* 267:1881-1887 (1992))。在此等研究中, 作者發現, 伴侶素GroEL及GroES之共表現使脫羧酶之比活性增進500倍(Wynn等人, *J. Biol. Chem.* 267:12400-12403 (1992))。此等酶由兩個 α 及兩個 β 次單元構成。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
kdcA	AAS49166.1	44921617	乳酸乳球菌
PDC6	NP_010366.1	6320286	釀酒酵母
PDC5	NP_013235.1	6323163	釀酒酵母
PDC1	P06169	30923172	釀酒酵母
ARO10	NP_010668.1	6320588	釀酒酵母
THI3	NP_010203.1	6320123	釀酒酵母
rv0853c	O53865.1	81343167	結核分枝桿菌
BCKDHB	NP_898871.1	34101272	智人
BCKDHA	NP_000700.1	11386135	智人
BCKDHB	P21839	115502434	黃牛
BCKDHA	P11178	129030	黃牛

3-磷醯丙酮酸脫羧酶(EC 4.1.1.82)催化3-磷醯丙酮酸脫羧為2-磷醯乙醛。例示性磷醯丙酮酸脫羧酶由以下編碼：蒼黃鏈黴菌之*dhpF*、綠色產色鏈黴菌之*ppd*、威德莫耳鏈黴菌之*fom2*及吸水鏈黴菌(*Streptomyces hygroscopicus*)之*bcpC* (Circello等人, *Chem Biol* 17:402-11 (2010); Blodgett等人, *FEMS Microbiol Lett* 163:149-57 (2005); Hidaka等人, *Mol Gen Genet* 249:274-80 (1995); Nakashita等人, *Biochim Biophys Acta* 1490:159-62 (2000))。由*aepY*編碼之脆弱類桿菌酶亦使丙酮酸及硫化丙酮酸脫羧(Zhang等人, *J Biol Chem* 278:41302-8 (2003))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
dhpF	ACZ13457.1	268628095	蒼黃鏈黴菌
Ppd	CAJ14045.1	68697716	綠色產色鏈黴菌
Fom2	BAA32496.1	1061008	威德莫耳鏈黴菌
aepY	AAG26466.1	11023509	脆弱類桿菌

許多草醯乙酸脫羧酶(諸如大腸桿菌中之 *eda* 基因產物 (EC 4.1.1.3))作用於草醯乙酸之末端酸以形成丙酮酸。因為3-酮酸位置處之脫羧與2-酮酸位置處之形成丙二酸半醛之脫羧競爭，所以在具有經由丙二酸半醛中間物進行之路徑的宿主菌株中可破壞此酶活性。

丙二醯CoA脫羧酶(EC 4.1.1.9)催化丙二醯CoA脫羧為乙醯CoA。酶已於豌豆根瘤菌及醋酸鈣不動桿菌中表徵(An等人, *Eur J Biochem* 257: 395-402 (1998); Koo等人, *Eur J Biochem* 266:683-90 (1999))。相似酶已於紅黴素鏈黴菌(*Streptomyces erythreus*)中表徵(Hunaiti等人, *Arch Biochem Biophys* 229:426-39 (1984))。重組人類丙二醯CoA脫羧酶於大腸桿菌中過度表現(Zhou等人, *Prot Expr Pur* 34:261-9 (2004))。使丙二醯CoA脫羧之甲基丙二醯CoA脫羧酶亦為適合候選物。舉例而言，小韋榮氏球菌酶接受丙二醯CoA作為受質(Hilpert等人, *Nature* 296:584-5 (1982))。大腸桿菌酶由 *ygfG* 編碼(Benning等人, *Biochemistry*. 39:4630-4639 (2000); Haller等人, *Biochemistry*. 39:4622-4629 (2000))。並未報導大腸桿菌酶之立體特異性，但中度產丙酸菌(Bott等人, *Eur. J. Biochem.* 250:590-599 (1997))及小韋榮氏球菌(Huder等人, *J. Biol. Chem.* 268:24564-24571 (1993))中之酶催化甲基丙二醯CoA之(S)-立體異構體的脫羧(Hoffmann等人, *FEBS. Lett.* 220:121-125 (1987))。來自中度產丙酸菌及小韋榮氏球菌之酶包含多個次單元，其不僅使(S)-甲基丙二醯CoA脫羧，而且產生轉運鈉離子穿過細胞膜作為產生能量之手段的泵。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
YgfG	NP_417394	90111512	大腸桿菌
matA	Q9ZIP6	75424899	豌豆根瘤菌
mdcD	AAB97628.1	2804622	醋酸鈣不動桿菌

mdcE	AAF20287.1	6642782	醋酸鈣不動桿菌
mdcA	AAB97627.1	2804621	醋酸鈣不動桿菌
mdcC	AAB97630.1	2804624	醋酸鈣不動桿菌
mcd	NP_036345.2	110349750	智人
mmdA	CAA05137	2706398	中度產丙酸菌
mmdD	CAA05138	2706399	中度產丙酸菌
mmdC	CAA05139	2706400	中度產丙酸菌
mmdB	CAA05140	2706401	中度產丙酸菌
mmdA	CAA80872	415915	小韋榮氏球菌
mmdC	CAA80873	415916	小韋榮氏球菌
mmdE	CAA80874	415917	小韋榮氏球菌
mmdD	CAA80875	415918	小韋榮氏球菌
mmdB	CAA80876	415919	小韋榮氏球菌

6.2.1.a CoA合成酶

丙二酸活化為丙二醯CoA係由EC種類6.2.1.a中之CoA合成酶催化。催化此反應之CoA合成酶迄今尚未描述於文獻中。如上所述之若干CoA合成酶亦可應用於催化圖10之步驟K。此等酶包括乙醯CoA合成酶(表16、25)及形成ADP之CoA合成酶(表17)。

6.4.1.a 羧化酶

丙酮酸羧化酶(EC 6.4.1.1)耗費一個ATP將丙酮酸轉化為草醯乙酸(步驟H)。例示性丙酮酸羧化酶由釀酒酵母中之PYC1 (Walker等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 176:1210-1217 (1991)及PYC2 (Walker等人, 前述); 及恥垢分枝桿菌中之pyc (Mukhopadhyay and Purwantini, *Biochim. Biophys. Acta* 1475:191-206 (2000))編碼。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
PYC1	NP_011453	6321376	釀酒酵母
PYC2	NP_009777	6319695	釀酒酵母
Pyc	YP_890857.1	118470447	恥垢分枝桿菌

實例IV

用於自粒線體乙醯CoA生產細胞溶質乙醯CoA之路徑

用於將乙醯CoA自粒線體轉運至細胞溶質之機制可促進採用來源於乙醯CoA之細胞溶質脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生產路徑。用於輸出

乙醯CoA之例示性機制包括圖4及5中描繪之機制，其可包括於粒線體中自乙醯CoA及草醯乙酸形成檸檬酸，將檸檬酸自粒線體輸出至細胞溶質，及將檸檬酸轉化為草醯乙酸及乙酸或乙醯CoA。在某些實施例中，本文中提供用於工程改造真核生物體以增加其細胞溶質乙醯CoA之可得性的方法，該等方法係藉由引入能夠實現圖4及5中任一者中描繪之轉化的酶。本文中亦揭示能夠實現所需轉化之例示性酶。

自粒線體乙醯CoA生產細胞溶質乙醯CoA可藉由許多路徑、例如在三至五個酶促步驟中實現。在一個例示性路徑中，粒線體乙醯CoA及草醯乙酸藉由檸檬酸合成酶組合成檸檬酸，且檸檬酸藉由檸檬酸或檸檬酸/草醯乙酸轉運體輸出粒線體外。細胞溶質中檸檬酸之酶促轉化產生細胞溶質乙醯CoA及草醯乙酸。細胞溶質草醯乙酸可隨後視情況藉由草醯乙酸轉運體及/或檸檬酸/草醯乙酸轉運體轉運回至粒線體中。在另一例示性路徑中，細胞溶質草醯乙酸首先於細胞溶質中酶促轉化為蘋果酸，且隨後視情況藉由蘋果酸轉運體及/或蘋果酸/檸檬酸轉運體轉移至粒線體中。粒線體蘋果酸可隨後使用粒線體蘋果酸脫氫酶轉化為草醯乙酸。

在另一例示性路徑中，粒線體乙醯CoA可經由檸檬酸中間物轉化為細胞溶質乙醯CoA。舉例而言，粒線體乙醯CoA及丙酮酸藉由檸檬酸合成酶轉化為檸檬酸。檸檬酸可隨後藉由檸檬酸或二羧酸轉運體轉運至細胞溶質中。細胞溶質乙醯CoA及丙酮酸隨後直接或間接自檸檬酸再生，且丙酮酸可再進入粒線體。

按照此等路線，用於自粒線體乙醯CoA生產細胞溶質乙醯CoA之若干例示性乙醯CoA路徑展示於圖4及5中。在一個實施例中，粒線體草醯乙酸與粒線體乙醯CoA藉由檸檬酸合成酶組合以形成檸檬酸。檸檬酸藉由檸檬酸轉運體、檸檬酸/草醯乙酸轉運體或檸檬酸/蘋果酸轉運體轉運出粒線體外。細胞溶質檸檬酸藉由ATP檸檬酸裂解酶轉化為

細胞溶質乙醯CoA及草醯乙酸。在另一路徑中，細胞溶質檸檬酸藉由檸檬酸裂解酶轉化為乙酸及草醯乙酸。乙酸可隨後藉由乙醯CoA合成酶或轉移酶轉化為細胞溶質乙醯CoA。或者，乙酸可藉由乙酸激酶轉化為乙醯磷酸，且乙醯磷酸可藉由磷酸轉乙醯酶轉化為細胞溶質乙醯CoA。用於乙醯CoA路徑酶之例示性酶候選物描述如下。

草醯乙酸及粒線體乙醯CoA之轉化由檸檬酸合成酶催化(圖4及5，步驟A)。在某些實施例中，檸檬酸合成酶表現於本文中所提供的非天然存在之真核生物體之粒線體中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
CIT1	NP_014398.1	6324328	釀酒酵母S288c
CIT2	NP_009931.1	6319850	釀酒酵母S288c
CIT3	NP_015325.1	6325257	釀酒酵母S288c
YALI0E02684p	XP_503469.1	50551989	解脂耶氏酵母
YALI0E00638p	XP_503380.1	50551811	解脂耶氏酵母
ANI_1_876084	XP_001393983.1	145242820	黑麴菌CBS 513.88
ANI_1_1474074	XP_001393195.2	317030721	黑麴菌CBS 513.88
ANI_1_2950014	XP_001389414.2	317026339	黑麴菌CBS 513.88
ANI_1_1226134	XP_001396731.1	145250435	黑麴菌CBS 513.88
gltA	NP_415248.1	16128695	大腸桿菌K-12 MG1655

檸檬酸自粒線體轉運至細胞溶質可藉由若干轉運蛋白進行。如圖4及5中所示，該等蛋白質將檸檬酸直接輸出(亦即檸檬酸轉運體，圖4及5，步驟B)至細胞溶質；或將檸檬酸輸出至細胞溶質，同時自細胞溶質轉運諸如蘋果酸(亦即檸檬酸/蘋果酸轉運體，圖4，步驟C)或草醯乙酸(亦即檸檬酸/草醯乙酸轉運體，圖5，步驟C)之分子至粒線體中。實現此等轉化之例示性轉運酶提供於下表中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
CTP1	NP_009850.1	6319768	釀酒酵母S288c
YALI0F26323p	XP_505902.1	50556988	解脂耶氏酵母
ATEG_09970	EAU29419.1	114187719	土麴菌NIH2624
KLLA0E18723g	XP_454797.1	50309571	乳酸克魯維酵母NRRL Y-1140
CTRG_02320	XP_002548023.1	255726194	熱帶假絲酵母MYA-3404
ANI_1_1474094	XP_001395080.1	145245625	黑麴菌CBS 513.88
YHM2	NP_013968.1	6323897	釀酒酵母S288c
DTC	CAC84549.1	19913113	擬南芥

DTC1	CAC84545.1	19913105	菸草
DTC2	CAC84546.1	19913107	菸草
DTC3	CAC84547.1	19913109	菸草
DTC4	CAC84548.1	19913111	菸草
DTC	AAR06239.1	37964368	香橙

ATP檸檬酸裂解酶(ACL, EC 2.3.3.8, 圖4及5, 步驟D), 亦稱為ATP檸檬酸合成酶, 催化檸檬酸ATP依賴性裂解為草醯乙酸及乙醯CoA。在某些實施例中, ATP檸檬酸裂解酶表現於真核生物體之細胞溶質中。ACL為已於綠色硫細菌泥生綠菌及綠硫菌中研究的RTCA循環之酶。來自泥生綠菌之 $\alpha(4)\beta(4)$ 雜聚酶於大腸桿菌中選殖及表徵(Kanao等人, *Eur. J. Biochem.* 269:3409-3416 (2002))。由aclAB編碼之泥生綠菌酶不可逆, 且該酶之活性藉由ADP/ATP比率調節。在闡明 α 及 β 次單元於催化機制中之作用的研究中, 來自綠硫菌之重組ACL亦表現於大腸桿菌中, 且全酶活體外復原(Kim及Tabita, *J. Bacteriol.* 188:6544-6552 (2006))。ACL酶亦已於無機營養產水菌(*Balnearium lithotrophicum*)、地下硫氫菌、及細菌門產水菌門(*Aquificae*)之其他成員中鑑別(Hugler等人, *Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007))。此活性亦已於一些真菌中有所報導。例示性生物體包括大孢糞殼菌(Nowrousian等人, *Curr. Genet.* 37:189-93 (2000))、小巢狀麴菌及解脂耶氏酵母(Hynes及Murray, *Eukaryotic Cell*, July: 1039-1048, (2010))及黑麴菌(Meijer等人 *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 36:1275-1280 (2009))。其他候選物可基於序列同源性發現。與此等酶相關之資訊列表如下。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
aclA	BAB21376.1	12407237	泥生綠菌
aclB	BAB21375.1	12407235	泥生綠菌
aclA	AAM72321.1	21647054	綠硫菌
aclB	AAM72322.1	21647055	綠硫菌
aclB	ABI50084.1	114055039	地下硫氫菌
aclA	AAX76834.1	62199504	脫氮硫單胞菌
aclB	AAX76835.1	62199506	脫氮硫單胞菌

acl1	XP_504787.1	50554757	解脂耶氏酵母
acl2	XP_503231.1	50551515	解脂耶氏酵母
SPBC1703.07	NP_596202.1	19112994	粟酒裂殖酵母
SPAC22A12.16	NP_593246.1	19114158	粟酒裂殖酵母
acl1	CAB76165.1	7160185	大孢糞殼菌
acl2	CAB76164.1	7160184	大孢糞殼菌
aclA	CBF86850.1	259487849	小巢狀麴菌
aclB	CBF86848	259487848	小巢狀麴菌

在一些生物體中，檸檬酸轉化為草醃乙酸及乙醃CoA係經由檸檬醃CoA中間物進行，藉由兩種各別酶檸檬醃CoA合成酶(EC 6.2.1.18)及檸檬醃CoA裂解酶(EC 4.1.3.34)催化(Aoshima, M., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75:249-255 (2007))。檸檬醃CoA合成酶催化檸檬酸活化為檸檬醃CoA。嗜熱產氫桿菌酶由分別由*ccsA*及*ccsB*編碼之大及小次單元構成(Aoshima等人, *Mol. Microbiol.* 52:751-761 (2004))。風產液菌之檸檬醃CoA合成酶由以*sucC1*及*sucD1*編碼之 α 及 β 次單元構成(Hugler等人, *Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007))。檸檬醃CoA裂解酶將檸檬醃CoA分裂為草醃乙酸及乙醃CoA。此酶為由嗜熱產氫桿菌中之*ccl* (Aoshima等人, *Mol. Microbiol.* 52:763-770 (2004))及風產液菌中之*aq_150* (Hugler等人, 前述(2007))編碼的均三聚物。用於將檸檬酸轉化為草醃乙酸及檸檬醃CoA之此機制的基因近來亦於綠硫菌中報導(Eisen等人, *PNAS* 99(14): 9509-14 (2002))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
<i>ccsA</i>	BAD17844.1	46849514	嗜熱產氫桿菌
<i>ccsB</i>	BAD17846.1	46849517	嗜熱產氫桿菌
<i>sucC1</i>	AAC07285	2983723	風產液菌
<i>sucD1</i>	AAC07686	2984152	風產液菌
<i>ccl</i>	BAD17841.1	46849510	嗜熱產氫桿菌
<i>aq_150</i>	AAC06486	2982866	風產液菌
CT0380	NP_661284	21673219	綠硫菌
CT0269	NP_661173.1	21673108	綠硫菌
CT1834	AAM73055.1	21647851	綠硫菌

檸檬酸裂解酶(EC 4.1.3.6, 圖4及5, 步驟E)催化一系列反應, 導致檸檬酸裂解為乙酸及草醃乙酸。在某些實施例中, 檸檬酸裂解酶表

現於真核生物體之細胞溶質中。該酶在缺氧條件下具有活性，且由三種次單元構成：醯基載體蛋白(ACP, γ)、ACP轉移酶(α)及醯基裂解酶(β)。酶活化使用以下不尋常輔基之共價結合及乙醯化：2'-(5"-磷酸核糖基)-3'-脫磷酸CoA，其與乙醯CoA結構相似。醯化由CitC(一種檸檬酸裂解酶合成酶)催化。兩種其他蛋白質CitG及CitX用以將脫輔基酶轉化為活性全酶(Schneider等人, *Biochemistry* 39:9438-9450 (2000))。野生型大腸桿菌不具有檸檬酸裂解酶活性；然而，缺乏鉬輔因子合成之突變體具有活性檸檬酸裂解酶(Clark, *FEMS Microbiol. Lett.* 55:245-249 (1990))。大腸桿菌酶由*citEFD*編碼，且檸檬酸裂解酶合成酶由*citC*編碼(Nilekani及SivaRaman, *Biochemistry* 22:4657-4663 (1983))。腸膜狀明串珠菌檸檬酸裂解酶已於大腸桿菌中選殖、表徵及表現(Bekal等人, *J. Bacteriol.* 180:647-654 (1998))。檸檬酸裂解酶亦已於利用檸檬酸作為碳及能量來源之腸細菌中鑑別，該等腸細菌包括鼠傷寒沙門氏菌及肺炎克雷伯氏菌(Bott, *Arch. Microbiol.* 167: 78-88 (1997)；Bott及Dimroth, *Mol. Microbiol.* 14:347-356 (1994))。以上提及之蛋白質列表如下。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
citF	AAC73716.1	1786832	大腸桿菌
cite	AAC73717.2	87081764	大腸桿菌
citD	AAC73718.1	1786834	大腸桿菌
citC	AAC73719.2	87081765	大腸桿菌
citG	AAC73714.1	1786830	大腸桿菌
citX	AAC73715.1	1786831	大腸桿菌
citF	CAA71633.1	2842397	腸膜狀明串珠菌
citE	CAA71632.1	2842396	腸膜狀明串珠菌
citD	CAA71635.1	2842395	腸膜狀明串珠菌
citC	CAA71636.1	3413797	腸膜狀明串珠菌
citG	CAA71634.1	2842398	腸膜狀明串珠菌
citX	CAA71634.1	2842398	腸膜狀明串珠菌
citF	NP_459613.1	16763998	鼠傷寒沙門氏菌
citE	AAL19573.1	16419133	鼠傷寒沙門氏菌
citD	NP_459064.1	16763449	鼠傷寒沙門氏菌
citC	NP_459616.1	16764001	鼠傷寒沙門氏菌

citG	NP_459611.1	16763996	鼠傷寒沙門氏菌
citX	NP_459612.1	16763997	鼠傷寒沙門氏菌
citF	CAA56217.1	565619	肺炎克雷伯氏菌
citE	CAA56216.1	565618	肺炎克雷伯氏菌
citD	CAA56215.1	565617	肺炎克雷伯氏菌
citC	BAH66541.1	238774045	肺炎克雷伯氏菌
citG	CAA56218.1	565620	肺炎克雷伯氏菌
citX	AAL60463.1	18140907	肺炎克雷伯氏菌

乙酸醯化爲乙醯CoA係由具有乙醯CoA合成酶活性之酶催化(圖4及5, 步驟F)。在某些實施例中, 乙醯CoA合成酶表現於真核生物體之細胞溶質中。催化此反應之兩種酶爲形成AMP之乙醯CoA合成酶(EC 6.2.1.1)及形成ADP之乙醯CoA合成酶(EC 6.2.1.13)。形成AMP之乙醯CoA合成酶(ACS)爲用於將乙酸活化爲乙醯CoA之主要酶。例示性ACS酶見於以下中: 大腸桿菌(Brown等人, *J. Gen. Microbiol.* 102:327-336 (1977))、富養羅爾斯通氏菌(Priefert及Steinbuchel, *J. Bacteriol.* 174:6590-6599 (1992))、熱自養甲烷熱桿菌(Ingram-Smith及Smith, *Archaea* 2:95-107 (2007))、腸道沙門氏菌(Gulick等人, *Biochemistry* 42:2866-2873 (2003))及釀酒酵母(Jogl及Tong, *Biochemistry* 43:1425-1431 (2004))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
acs	AAC77039.1	1790505	大腸桿菌
acoE	AAA21945.1	141890	富養羅爾斯通氏菌
acsI	ABC87079.1	86169671	熱自養甲烷熱桿菌
acsI	AAL23099.1	16422835	腸道沙門氏菌
ACS1	Q01574.2	257050994	釀酒酵母

形成ADP之乙醯CoA合成酶(ACD, EC 6.2.1.13)爲將醯基CoA酯轉化爲其相應酸與ATP之同時合成耦合的另一候選酶。若干具有廣泛受質特異性之酶已描述於文獻中。來自閃爍古生球菌之由AF1211編碼的ACD I顯示對多種直鏈及分支鏈受質起作用, 該等受質包括乙醯CoA、丙醯CoA、丁醯CoA、乙酸、丙酸、丁酸、異丁酸、異戊酸、琥珀酸、反丁烯二酸、苯乙酸、吲哚乙酸(Musfeldt等人, *J. Bacteriol.*

184:636-644 (2002))。來自死海鹽盒菌之酶(註解為琥珀醯CoA合成酶)接受丙酸、丁酸及分支鏈酸(異戊酸及異丁酸)作為受質，且顯示在正及反方向上起作用(Brasen等人, *Arch. Microbiol.* 182:277-287 (2004))。來自極端嗜熱泉古菌好氧火棒菌之由PAE3250編碼的ACD顯示所有表徵之ACD之最廣泛受質範圍，與乙醯CoA、異丁醯CoA(較佳受質)及苯乙醯CoA反應(Brasen等人, 前述(2004))。來自閃爍古生球菌、死海鹽盒菌及好氧火棒菌之酶均已於大腸桿菌中選殖、功能性表現及表徵(Musfeldt等人, 前述; Brasen等人, 前述(2004))。其他候選物包括由以下編碼之琥珀醯CoA合成酶：大腸桿菌中之*sucCD* (Buck等人, *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985))及來自惡臭假單胞菌之醯基CoA連接酶(Fernandez-Valverde等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1149-1154 (1993))。與此等蛋白質及基因相關之資訊展示如下。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
AF1211	NP_070039.1	11498810	閃爍古生球菌DSM 4304
AF1983	NP_070807.1	11499565	閃爍古生球菌DSM 4304
scs	YP_135572.1	55377722	死海鹽盒菌ATCC 43049
PAE3250	NP_560604.1	18313937	好氧火棒菌菌株JM2
sucC	NP_415256.1	16128703	大腸桿菌
sucD	AAC73823.1	1786949	大腸桿菌
paaF	AAC24333.2	22711873	惡臭假單胞菌

用於將CoA部分添加至乙酸中之替代性方法為應用一對酶，諸如轉移磷酸之醯基轉移酶及乙酸激酶(圖4及5，步驟F)。此活性使得乙醯CoA能夠淨形成，同時消耗ATP。在某些實施例中，磷酸轉乙醯酶表現於真核生物體之細胞溶質中。例示性轉移磷酸之醯基轉移酶為由*pta*編碼之磷酸轉乙醯酶。來自大腸桿菌之*pta*基因編碼可將乙醯CoA轉化為乙醯磷酸且反之亦然之酶(Suzuki, T. *Biochim. Biophys. Acta* 191:559-569 (1969))。此酶在該過程中亦可利用形成丙醯CoA而非乙醯CoA之丙酸(Hesslinger等人, *Mol. Microbiol* 27:477-492 (1998))。同源物存在於若干其他生物體中，包括腸道沙門氏菌及萊茵衣藻。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
Pta	NP_416800.1	16130232	大腸桿菌
Pta	NP_461280.1	16765665	腸道沙門氏菌鼠傷寒腸道血清型亞種菌株LT2
PAT2	XP_001694504.1	159472743	萊茵衣藻
PAT1	XP_001691787.1	159467202	萊茵衣藻

例示性乙酸激酶為由 *ackA* 編碼之大腸桿菌乙酸激酶 (Skarstedt 及 Silverstein *J. Biol. Chem.* 251:6775-6783 (1976))。同源物存在於若干其他生物體中，包括腸道沙門氏菌及萊茵衣藻。與此等蛋白質及基因相關之資訊展示如下：

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
AckA	NP_416799.1	16130231	大腸桿菌
AckA	NP_461279.1	16765664	腸道沙門氏菌鼠傷寒腸道血清型亞種菌株LT2
ACK1	XP_001694505.1	159472745	萊茵衣藻
ACK2	XP_001691682.1	159466992	萊茵衣藻

在一些實施例中，細胞溶質草醯乙酸藉由草醯乙酸轉運體轉運回至粒線體中。轉運回至粒線體中之草醯乙酸可隨後用於本文所述之乙醯CoA路徑。草醯乙酸自細胞溶質轉運至粒線體可藉由若干轉運蛋白進行。該等蛋白質將草醯乙酸直接輸入(亦即草醯乙酸轉運體)至粒線體中；或將草醯乙酸輸入至細胞溶質中，同時將諸如檸檬酸(亦即檸檬酸/草醯乙酸轉運體)之分子自粒線體轉運至如圖5中所示之細胞溶質中。實現此等轉化之例示性轉運酶提供於下表中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
OAC1	NP_012802.1	6322729	釀酒酵母S288c
KLLA0B12826g	XP_452102.1	50304305	乳酸克魯維酵母NRRL Y-1140
YALI0E04048g	XP_503525.1	50552101	解脂耶氏酵母
CTRG_02239	XP_002547942.1	255726032	熱帶假絲酵母MYA-3404
DIC1	NP_013452.1	6323381	釀酒酵母S288c
YALI0B03344g	XP_500457.1	50545838	解脂耶氏酵母
CTRG_02122	XP_002547815.1	255725772	熱帶假絲酵母MYA-3404
PAS_chr4_0877	XP_002494326.1	254574434	巴斯德畢赤酵母GS115
DTC	CAC84549.1	19913113	擬南芥
DTC1	CAC84545.1	19913105	菸草
DTC2	CAC84546.1	19913107	菸草
DTC3	CAC84547.1	19913109	菸草
DTC4	CAC84548.1	19913111	菸草

DTC	AAR06239.1	37964368	香橙
-----	------------	----------	----

在一些實施例中，細胞溶質草醃乙酸首先藉由細胞溶質蘋果酸脫氫酶轉化為蘋果酸(圖4，步驟H)。細胞溶質蘋果酸藉由蘋果酸轉運體或檸檬酸/蘋果酸轉運體轉運至粒線體中(圖4，步驟I)。粒線體蘋果酸隨後藉由粒線體蘋果酸脫氫酶轉化為草醃乙酸(圖4，步驟J)。粒線體草醃乙酸可隨後用於本文中所述之乙醃CoA路徑。此等酶中之每一者的例示性實例提供如下。

草醃乙酸藉由蘋果酸脫氫酶轉化為蘋果酸(EC 1.1.1.37，圖4，步驟H)。當蘋果酸為自細胞溶質轉運至粒線體之二羧酸時，例如如圖3中所示，可使用蘋果酸脫氫酶之細胞溶質及粒線體型式兩者的表現。釀酒酵母具有蘋果酸脫氫酶之三種複本：*MDH1* (McAlister-Henn及Thompson, *J. Bacteriol.* 169:5157-5166 (1987))、*MDH2* (Minard及McAlister-Henn, *Mol. Cell. Biol.* 11:370-380 (1991)；Gibson及McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 278:25628-25636 (2003))及*MDH3* (Steffan及McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 267:24708-24715 (1992))，其分別定位至粒線體、細胞溶質及過氧化體。來自釀酒酵母之與細胞溶質蘋果酸脫氫酶*MDH2*近似的同源物見於若干生物體中，包括乳酸克魯維酵母及熱帶假絲酵母。亦已知大腸桿菌具有由*mdh*編碼之活性蘋果酸脫氫酶。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
MDH1	NP_012838	6322765	釀酒酵母
MDH2	NP_014515	116006499	釀酒酵母
MDH3	NP_010205	6320125	釀酒酵母
Mdh	NP_417703.1	16131126	大腸桿菌
KLLA0E07525p	XP_454288.1	50308571	乳酸克魯維酵母NRRL Y-1140
YALI0D16753g	XP_502909.1	50550873	解脂耶氏酵母
CTRG_01021	XP_002546239.1	255722609	熱帶假絲酵母MYA-3404

蘋果酸自細胞溶質轉運至粒線體可藉由若干轉運蛋白進行。該等蛋白質將蘋果酸直接輸入(亦即蘋果酸轉運體)至粒線體中；或將蘋

果酸輸入至細胞溶質中，同時將諸如檸檬酸(亦即檸檬酸/蘋果酸轉運體)之分子自粒線體轉運至如圖4中所示之細胞溶質中。實現此等轉化之例示性轉運酶提供於下表中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
OAC1	NP_012802.1	6322729	釀酒酵母S288c
KLLA0B12826g	XP_452102.1	50304305	乳酸克魯維酵母NRRL Y-1140
YALI0E04048g	XP_503525.1	50552101	解脂耶氏酵母
CTRG_02239	XP_002547942.1	255726032	熱帶假絲酵母MYA-3404
DIC1	NP_013452.1	6323381	釀酒酵母S288c
YALI0B03344g	XP_500457.1	50545838	解脂耶氏酵母
CTRG_02122	XP_002547815.1	255725772	熱帶假絲酵母MYA-3404
PAS_chr4_0877	XP_002494326.1	254574434	巴斯德畢赤酵母GS115
DTC	CAC84549.1	19913113	擬南芥
DTC1	CAC84545.1	19913105	菸草
DTC2	CAC84546.1	19913107	菸草
DTC3	CAC84547.1	19913109	菸草
DTC4	CAC84548.1	19913111	菸草
DTC	AAR06239.1	37964368	香橙

蘋果酸可藉由蘋果酸脫氫酶轉化為草醯乙酸(EC 1.1.1.37, 圖4, 步驟J)。當蘋果酸為自細胞溶質轉運至粒線體之二羧酸時，在某些實施例中，如圖3及4中所示，表現蘋果酸脫氫酶之細胞溶質及粒線體型式兩者。釀酒酵母具有蘋果酸脫氫酶之三種複本：*MDH1* (McAlister-Henn及Thompson, *J. Bacteriol.* 169:5157-5166 (1987))、*MDH2* (Minard及McAlister-Henn, *Mol. Cell. Biol.* 11:370-380 (1991))；Gibson及McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 278:25628-25636 (2003))及*MDH3* (Steffan及McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 267:24708-24715 (1992))，其分別定位至粒線體、細胞溶質及過氧化體。來自釀酒酵母之與粒線體蘋果酸脫氫酶MDH1近似的同源物見於若干生物體中，包括乳酸克魯維酵母、解脂耶氏酵母、熱帶假絲酵母。亦已知大腸桿菌具有由*mdh*編碼之活性蘋果酸脫氫酶。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
MDH1	NP_012838	6322765	釀酒酵母
MDH2	NP_014515	116006499	釀酒酵母
MDH3	NP_010205	6320125	釀酒酵母

Mdh	NP_417703.1	16131126	大腸桿菌
KLLA0F25960g	XP_456236.1	50312405	乳酸克魯維酵母NRRL Y-1140
YALI0D16753g	XP_502909.1	50550873	解脂耶氏酵母
CTRG_00226	XP_002545445.1	255721021	熱帶假絲酵母MYA-3404

實例V

利用對NADH具有優先性之路徑酶

自葡萄糖生產乙醯CoA可產生至多四種呈NADH形式之還原相等物。使還原相等物之產率最大化之直接及能量有效方式為採用埃姆登-邁耶霍夫-帕那斯糖酵解路徑(Embden-Meyerhof-Parnas glycolysis pathway, EMP路徑)。在多種利用碳水化合物之生物體中，各甘油醛-3-磷酸分子藉助於甘油醛-3-磷酸脫氫酶之每一氧化產生一個NADH分子。假定經由EMP路徑代謝之每個葡萄糖分子產生兩個甘油醛-3-磷酸分子，可由葡萄糖轉化為丙酮酸獲得兩個NADH分子。

假定經由EMP路徑代謝之每個葡萄糖分子產生兩個丙酮酸分子，可由丙酮酸轉化為乙醯CoA獲得兩個額外NADH分子。此可藉由採用將丙酮酸轉化為乙醯CoA之以下酶或酶集合中之任一者來進行：

- I. NAD依賴性丙酮酸脫氫酶；
- II. 丙酮酸甲酸裂解酶及NAD依賴性甲酸脫氫酶；
- III. 丙酮酸:鐵氧化還原蛋白氧化還原酶及NADH:鐵氧化還原蛋白氧化還原酶；
- IV. 丙酮酸脫羧酶及NAD依賴性醯化乙醛脫氫酶；
- V. 丙酮酸脫羧酶、NAD依賴性醯化乙醛脫氫酶、乙酸激酶及磷酸轉乙醯酶；及
- VI. 丙酮酸脫羧酶、NAD依賴性醯化乙醛脫氫酶及乙醯CoA合成酶。

總體而言，每個代謝之葡萄糖分子可獲得四個NADH分子。在一個態樣中，脂肪醇路徑需要來自乙醯CoA之三個還原步驟。因此，可

能的為，此三個還原步驟中之每一者將利用NADPH或NADH作為還原劑，之後分別將此等分子轉化為NADP或NAD。因此，在一些態樣中，可能需要所有還原步驟均為NADH依賴性的，以使脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之產率最大化。脂肪醇、脂肪醛及脂肪酸之高產率因此可藉由以下方式來實現：

鑑別及執行對NADH比對其他還原相等物(諸如NADPH)優先性更強之內源或外源脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑酶，

- I. 使一或多種有助於NADPH依賴性還原活性之內源脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑酶衰減，
- II. 改變內源或外源脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑酶之輔因子特異性，以便其對NADH具有比對其天然型式更強之優先性，或
- III. 改變內源或外源脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑酶之輔因子特異性，以便其對NADPH具有比對其天然型式更弱之優先性。

內源或外源DNA序列之個別酶或蛋白質活性可使用此項技術中熟知之方法來分析。舉例而言，基因可表現於大腸桿菌中，且其編碼蛋白質之活性可使用細胞提取物量測。或者，酶可使用此項技術中熟知之標準程序純化，且分析活性。基於分光光度之分析尤其有效。

改變酶之輔因子特異性的若干實例及方法為此項技術中已知。舉例而言，Khoury等人(*Protein Sci.* 2009年10月; 18(10): 2125-2138)製造對NADH具有增加之親和力且對NADPH具有降低之親和力的若干木糖還原酶。Ehsani等人(*Biotechnology and Bioengineering*, 第104卷, 第2期, 第381-389頁, 2009年10月1日)急劇降低2,3-丁二醇脫氫酶對NADH之活性同時增加對NADPH之活性。Machielsen等人(*Engineering in Life Sciences*, 第9卷, 第1期, 第38-44頁, 2009年2月)顯著地增加醇脫氫酶對NADH之活性。Khoury等人(*Protein Sci.* 2009年10月; 18(10): 2125-2138)在表I中列出成功改變超過25種其他酶之輔因子優先性的若

干先前實例。其他描述可見於以下中：Lutz等人，Protein Engineering Handbook, 第1卷及第2卷，2009, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA，尤其第31章：Altering Enzyme Substrate and Cofactor Specificity via Protein Engineering。

實例VI

測定路徑酶之輔因子優先性

此實例描述用於測定酶之輔因子優先性的實驗方法。

用於每一路徑步驟之酶之輔因子優先性可藉由以下方式來測定：將個別基因選殖於組成性或誘導性啓動子後之質體上，及轉化至宿主生物體(諸如大腸桿菌)中。舉例而言，編碼催化以下路徑步驟之酶的基因可組裝於如下文所述的基於pZ之表現載體上：1) 乙醯乙醯CoA至3-羥基丁醯CoA，2) 3-羥基丁醯CoA至3-羥基丁醛，3) 3-羥基丁醛至1,3-丁二醇(其中R₁為C1；R₃為OH)。

置換基於pZ之表現載體中的填塞片段。載體骨架由Expressys之Dr. Rolf Lutz獲得(<http://www.expressys.de/>)。載體及菌株基於由Lutz及Bujard開發之pZ表現系統(*Nucleic Acids Res* 25, 1203-1210 (1997))。pZE13luc、pZA33luc、pZS*13luc及pZE22luc含有螢光素酶基因作為填塞片段。為了用側接適當限制酶位點之lacZ- α 片段置換螢光素酶填塞片段，藉由用EcoRI及XbaI消化將螢光素酶填塞片段自各載體中移出。lacZ- α 片段為用以下引子自pUC19擴增之PCR：

lacZ α -RI

5'GACGAATTCGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGTCCAATTCAGTGGCC
GTCGTTTAC3' (SEQ ID NO:)

lacZ α 3'BB

5'-GACCCTAGGAAGCTTTCTAGAGTCGACCTATGCGGCATCAGAGCAGA-3'
(SEQ ID NO:)

此產生具有EcoRI位點、NheI位點、核糖體結合位點、Sall位點

及起始密碼子之5'末端的片段。在片段之3'末端上為終止密碼子、XbaI、HindIII及AvrII位點。PCR產物用EcoRI及AvrII消化，且接合至用EcoRI及XbaI消化之鹼基載體中(XbaI及AvrII具有相容末端且產生非位點)。因為NheI及XbaI限制酶位點產生可接合在一起之相容末端(但在接合之後產生不由任一酶消化之位點)，所以選殖至載體中之基因可「生物磚化」在一起(http://openwetware.org/wiki/Synthetic_Biology:BioBricks)。簡言之，此方法使得無限數目之基因能夠使用相同2個限制位點接合至載體中(只要位點不出現於基因內)，此係因為基因之間的位點在各添加之後受到破壞。此等載體可隨後使用Phusion®定點突變誘發套組(NEB, Ipswich, MA, USA)修飾以在EcoRI與NheI位點之間插入間隔序列AATTAA。此消除RNA中限制RBS及起始密碼子之推定莖環結構。

所有載體均具有pZ名稱，後面為字母及編號，指示複製起點、抗生素抗性標記及啓動子/調節單位。複製起點為第二字母，且對ColE1由E表示、對p15A由A表示，且對基於pSC101之來源由S表示(以及pSC101之較低複本數型式表示為S*)。第一編號表示抗生素抗性標記(對安比西林(Ampicillin)為1，對卡那黴素(Kanamycin)為2，對氯黴素(Chloramphenicol)為3)。最終編號定義調節所關注基因之啓動子(對PLtetO-1為1，對PLlacO-1為2，且對PA1lacO-1為3)。就本文中論述之研究而言，吾人採用三種鹼基載體，pZS*13S、pZA33S及pZE13S，經修飾用於如上文所論述之生物磚插入。

含有編碼路徑酶之基因的質體可隨後轉移至含有lacIQ之宿主菌株中，其允許藉由添加異丙基 β -D-1-硫代哌喃半乳糖苷(IPTG)誘導性表現。在活體外分析中，使用菌株大腸桿菌MG1655 lacIQ作為含有路徑基因之質體構築體的宿主，測試異源酶之活性。細胞可在含有各構築體之適當抗生素的LB培養基(Difco)中有氧生長，且在光學密度

(OD600)達至大約0.5時，藉由添加1 mM之IPTG誘導。可在6小時之後收集細胞，且如下文所論述進行酶分析。

活體外酶分析。爲了獲得粗提取物用於活性分析，可藉由在4,500 rpm下離心(Beckman-Coulter, Allegera X-15R) 10分鐘來收集細胞。將集結粒再懸浮於具有核酸酶(benzonase)及溶菌酶之0.3 mL BugBuster (Novagen)試劑中，且在室溫下在輕緩震盪下進行溶解持續約15分鐘。藉由在4°C下在14,000 rpm (Eppendorf離心機5402)下離心30分鐘獲得無細胞溶解物。使用Bradford等人, Anal. Biochem. 72:248-254 (1976)之方法測定樣品中之細胞蛋白質，且如下文所述進行特異性酶分析。以單位/mg蛋白質報導活性，其中活性單位定義爲在室溫下在1分鐘中轉化1微莫耳受質所需酶之量。

可使用由若干文獻來源改編之程序在還原方向上分析路徑步驟(Durre等人, FEMS Microbiol. Rev. 17:251-262 (1995); Palosaari及Rogers, Bacteriol. 170:2971-2976 (1988); 及 Welch 等人, Arch. Biochem. Biophys. 273:309-318 (1989))。NADH或NADPH之氧化後可爲：在室溫下持續總共240秒每隔四秒讀取340 nM下之吸光度。可在100 mM MOPS(用KOH調節至pH 7.5)、0.4 mM NADH或0.4 mM NADPH中及自1至50 μ mol細胞提取物進行還原分析。就類似於羧酸還原酶之酶而言，亦可在飽和濃度下添加ATP。可藉由添加以下試劑開始反應：100 μ mol 100 mM乙醯乙醯CoA、3-羥基丁醯CoA、3-羥基丁酸或3-羥基丁醛。快速使分光光度計空白，且隨後開始動力學讀數。可使用340 nM下之吸光度每分鐘降低之所得斜率以及NAD(P)H在340 nM下之莫耳消光係數(6000)及提取物之蛋白質濃度以測定比活性。

實例VII

用於增加NADPH可得性之方法

在本發明之一些態樣中，可能有利的爲採用使用NADPH作爲還

原劑具有活性之路徑酶。舉例而言，NADPH依賴性路徑酶可對MI-FAE循環、MD-FAE循環及/或終止路徑中間物具有高度特異性，或可對使用NADPH作為受質具有有利動力學性質。若一或多個路徑步驟為NADPH依賴性的，則可採用增加NADPH可得性之若干替代性方法。其包括：

1) 經由包含葡萄糖-6-磷酸脫氫酶、6-磷酸葡萄糖酸內酯酶及6-磷酸葡萄糖酸脫氫酶(脫羧)之磷酸戊糖路徑的氧化分支，相對於野生型增加通量。此將每個葡萄糖-6-磷酸代謝產生2個NADPH分子。然而，脫羧步驟將降低1,3-丁二醇之最大理論產率。

2) 經由包含葡萄糖-6-磷酸脫氫酶、6-磷酸葡萄糖酸內酯酶、磷酸葡萄糖酸脫水酶及2-酮-3-脫氧葡萄糖酸6-磷酸醛縮酶之恩特納-杜德洛夫路徑，相對於野生型增加通量。

3) 引入可溶轉氫酶以將NADH轉化為NADPH。

4) 引入膜結合轉氫酶以將NADH轉化為NADPH。

5) 採用NADP依賴性甘油醛-3-磷酸脫氫酶。

6) 採用將丙酮酸轉化為乙醯CoA之以下酶或酶集合中之任一者：

a) NADP依賴性丙酮酸脫氫酶；

b) 丙酮酸甲酸裂解酶及NADP依賴性甲酸脫氫酶；

c) 丙酮酸:鐵氧化還原蛋白氧化還原酶及NADPH:鐵氧化還原蛋白氧化還原酶；

d) 丙酮酸脫羧酶及NADP依賴性醯化乙醛脫氫酶；

e) 丙酮酸脫羧酶、NADP依賴性乙醛脫氫酶、乙酸激酶及磷酸轉乙醯酶；及

f) 丙酮酸脫羧酶、NADP依賴性乙醛脫氫酶及乙醯CoA合成酶；及視情況使此等酶之NAD依賴性型式衰減。

7) 改變天然甘油醛-3-磷酸脫氫酶、丙酮酸脫氫酶、甲酸脫氫酶或醯化乙醛脫氫酶之輔因子特異性以使對NADPH比對其天然型式優先性更強。

8) 改變天然甘油醛-3-磷酸脫氫酶、丙酮酸脫氫酶、甲酸脫氫酶或醯化乙醛脫氫酶之輔因子特異性以使對NADH比對其天然型式優先性更弱。

內源或外源DNA序列之個別酶或蛋白質活性可使用此項技術中熟知之方法來分析。舉例而言，基因可表現於大腸桿菌中，且其編碼蛋白質之活性可如先前實例中所述使用細胞提取物量測。或者，酶可使用此項技術中熟知之標準程序純化，且分析活性。基於分光光度之分析尤其有效。

改變酶之輔因子特異性的若干實例及方法為此項技術中已知。舉例而言，Khoury等人(*Protein Sci.* 2009年10月; 18(10): 2125-2138)製造對NADH具有增加之親和力且對NADPH具有降低之親和力的若干木糖還原酶。Ehsani等人(*Biotechnology and Bioengineering*, 第104卷, 第2期, 第381-389頁, 2009年10月1日)急劇降低2,3-丁二醇脫氫酶對NADH之活性同時增加對NADPH之活性。Machielsen等人(*Engineering in Life Sciences*, 第9卷, 第1期, 第38-44頁, 2009年2月)顯著地增加醇脫氫酶對NADH之活性。Khoury等人(*Protein Sci.* 2009年10月; 18(10): 2125-2138)在表I中列出成功改變超過25種其他酶之輔因子優先性的若干先前實例。其他描述可見於以下中：Lutz等人, *Protein Engineering Handbook*, 第1卷及第2卷, 2009, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 尤其第31章：Altering Enzyme Substrate and Cofactor Specificity via Protein Engineering。

用於此等步驟之酶候選物提供如下。

葡萄糖-6-磷酸脫氫酶

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
ZWF1	NP_014158.1	6324088	釀酒酵母S288c
ZWF1	XP_504275.1	50553728	解脂耶氏酵母
Zwf	XP_002548953.1	255728055	熱帶假絲酵母MYA-3404
Zwf	XP_001400342.1	145233939	黑麴菌CBS 513.88
KLLA0D19855g	XP_453944.1	50307901	乳酸克魯維酵母NRRL Y-1140

6-磷酸葡萄糖酸內酯酶

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
SOL3	NP_012033.2	82795254	釀酒酵母S288c
SOL4	NP_011764.1	6321687	釀酒酵母S288c
YALI0E11671g	XP_503830.1	50552840	解脂耶氏酵母
YALI0C19085g	XP_501998.1	50549055	解脂耶氏酵母
ANI_1_656014	XP_001388941.1	145229265	黑麴菌CBS 513.88
CTRG_00665	XP_002545884.1	255721899	熱帶假絲酵母MYA-3404
CTRG_02095	XP_002547788.1	255725718	熱帶假絲酵母MYA-3404
KLLA0A05390g	XP_451238.1	50302605	乳酸克魯維酵母NRRL Y-1140
KLLA0C08415g	XP_452574.1	50305231	乳酸克魯維酵母NRRL Y-1140

6-磷酸葡萄糖酸脫氫酶(脫羧)

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
GND1	NP_012053.1	6321977	釀酒酵母S288c
GND2	NP_011772.1	6321695	釀酒酵母S288c
ANI_1_282094	XP_001394208.2	317032184	黑麴菌CBS 513.88
ANI_1_2126094	XP_001394596.2	317032939	黑麴菌CBS 513.88
YALI0B15598g	XP_500938.1	50546937	解脂耶氏酵母
CTRG_03660	XP_002549363.1	255728875	熱帶假絲酵母MYA-3404
KLLA0A09339g	XP_451408.1	50302941	乳酸克魯維酵母NRRL Y-1140

磷酸葡萄糖酸脫水酶

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
Edd	AAC74921.1	1788157	大腸桿菌K-12 MG1655
Edd	AAG29866.1	11095426	運動醱酵單胞菌運動亞種ZM4
Edd	YP_350103.1	77460596	螢光假單胞菌Pfl-1
ANI_1_2126094	XP_001394596.2	317032939	黑麴菌CBS 513.88
YALI0B15598g	XP_500938.1	50546937	解脂耶氏酵母
CTRG_03660	XP_002549363.1	255728875	熱帶假絲酵母MYA-3404
KLLA0A09339g	XP_451408.1	50302941	乳酸克魯維酵母NRRL Y-1140

2-酮-3-脫氧葡萄糖酸6-磷酸醛縮酶

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
Eda	NP_416364.1	16129803	大腸桿菌K-12 MG1655
Eda	Q00384.2	59802878	運動醱酵單胞菌運動亞種ZM4
Eda	ABA76098.1	77384585	螢光假單胞菌Pfl-1

可溶轉氫酶

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
SthA	NP_418397.2	90111670	大腸桿菌K-12 MG1655
SthA	YP_002798658.1	226943585	棕色固氮菌DJ
SthA	O05139.3	11135075	螢光假單胞菌

膜結合轉氫酶

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
ANI_1_29100	XP_001400109.2	317027842	黑麴菌CBS 513.88
Pc21g18800	XP_002568871.1	226943585	255956237威斯康辛產黃青黴菌54-1255
SthA	O05139.3	11135075	螢光假單胞菌
NCU01140	XP_961047.2	164426165	粗糙脈孢菌OR74A

NADP依賴性甘油醛-3-磷酸脫氫酶

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
gapN	AAA91091.1	642667	變異鏈球菌
NP-GAPDH	AEC07555.1	330252461	擬南芥
GAPN	AAM77679.2	82469904	小麥
gapN	CAI56300.1	87298962	丙酮丁醇梭菌
NADP-GAPDH	2D2I_A	112490271	細長聚球藻PCC 7942
NADP-GAPDH	CAA62619.1	4741714	細長聚球藻PCC 7942
GDP1	XP_455496.1	50310947	乳酸克魯維酵母NRRL Y-1140
HP1346	NP_208138.1	15645959	幽門螺旋桿菌26695

NAD依賴性甘油醛-3-磷酸脫氫酶

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
TDH1	NP_012483.1	6322409	釀酒酵母s288c
TDH2	NP_012542.1	6322468	釀酒酵母s288c
TDH3	NP_011708.1	632163	釀酒酵母s288c
KLLA0A11858g	XP_451516.1	50303157	乳酸克魯維酵母NRRL Y-1140
KLLA0F20988g	XP_456022.1	50311981	乳酸克魯維酵母NRRL Y-1140
ANI_1_256144	XP_001397496.1	145251966	黑麴菌CBS 513.88
YALI0C06369g	XP_501515.1	50548091	解脂耶氏酵母
CTRG_05666	XP_002551368.1	255732890	熱帶假絲酵母MYA-3404

描述於Biochemistry, 1993, 32 (11), 第2737-2740頁中的來自大腸桿菌K-12 MG1655之突變LpdA :

MSTEIKTQVVVLGAGPAGYSAAFRCADLGLETVIVERYNTLGGVCLNVGCIP
 SKALLHVAKVIEEAKALAEHGIVFGPKTDIDKIRTWKEKVINQLTGGLAGMAKGRK
 VKVVNGLGKFTGANTLEVEGENGKTVINFDNAIIAAGSRPIQLPFIPHEDPRIWDSTD
 ALELKEVPERLLVMGGGIIGLEMGTVYHALGSQIDVVVRKHQVIRAADKDIVKVFTK
 RISKKFNLMLETKVTAVEAKEDGIYVTMEGKKAPAEPQRYDAVLVAIGRVPNGKNL
 DAGKAGVEVDDRGFIRVDKQLRTNVPHIFAIGDIVGQPMLAHKGVHEGHVAAEVIA
 GKKHYFDPKVIPSIAYTEPEVAWVGLTEKEAKEKGISYETATFPWAASGRAIASDCA
 DGMTKLIFDKESHVRVIGGAIVGTNGGELLGEIGLAIEMGCDAEDIALTIHAHPTLHES
 VGLAAEVFECSITDLPNPKAKKK (SEQ ID NO:)

描述於Biochemistry, 1993, 32 (11), 第2737-2740頁中的來自大腸桿菌K-12 MG1655之突變LpdA :

MSTEIKTQVVVLGAGPAGYSAAFRCADLGLETVIVERYNTLGGVCLNVGCIP
 SKALLHVAKVIEEAKALAEHGIVFGPKTDIDKIRTWKEKVINQLTGGLAGMAKGRK
 VKVVNGLGKFTGANTLEVEGENGKTVINFDNAIIAAGSRPIQLPFIPHEDPRIWDSTD
 ALELKEVPERLLVMGGGIIALEMATVYHALGSQIDVVVRKHQVIRAADKDIVKVFTK
 RISKKFNLMLETKVTAVEAKEDGIYVTMEGKKAPAEPQRYDAVLVAIGRVPNGKNL
 DAGKAGVEVDDRGFIRVDKQLRTNVPHIFAIGDIVGQPMLAHKGVHEGHVAAEVIA
 GKKHYFDPKVIPSIAYTEPEVAWVGLTEKEAKEKGISYETATFPWAASGRAIASDCA
 DGMTKLIFDKESHVRVIGGAIVGTNGGELLGEIGLAIEMGCDAEDIALTIHAHPTLHES
 VGLAAEVFECSITDLPNPKAKKK (SEQ ID NO:)

NADP依賴性甲酸脫氫酶

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
fdh	ACF35003.	194220249	穩定伯克霍爾德菌
fdh	ABC20599.2	146386149	熱醋酸穆爾氏菌ATCC 39073

描述於Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 第61卷, 第3-4期, 2009年12月, 第157-161頁中之突變博伊丁假絲酵母酶 :

MKIVLVLYDAGKHAADDEKLYGCTENKLGIANWLKDQGHELITSDKEGETS
 ELDKHIPDADIIITPFHPAYITKERLDKAKNLKLVVAVGVSDHIDLIDYINQTKKKIS
 VLEVTGSNVVSVAEHVMTMLVLRNFVPAHEQIINHDEVAIAKDAYDIEGKTI
 ATIGAGRIGYRVLERLLPFNPKELLYYQRQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQADIV
 TVNAPLHAGTKGLINKELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGG
 DVWFPQPAPKDHPWRDMRNKYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFT
 GKFDYRPQDIILLNGEYVTKAYGKHDKK (SEQ ID NO:)

描述於Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 第61卷, 第3-4期, 2009年12月, 第157-161頁中之突變博伊丁假絲酵母酶 :

MKIVLVLYDAGKHAADDEEKLYGCTENKLGIANWLKDGHELIITSDKEGETS
 ELDKHIPDADIIITPPFHPAYTTKERLDKAKNLKLVVAVGVGSDHIDLDTYNQTGKKIS
 VLEVTGSNVVSVAEHVVMTMLVLRNFVPAHEQIINHDEVAIAIAKDAYDIEGKTI
 ATIGAGRIGYRVLERLLPFNPKELLYYSPQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQADIV
 TVNAPLHAGTKGLINKELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESGQLRGYGG
 DVWFPQPAPKDHDPWRDMRNKYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFT
 GKFDYRPQDIILLNGEYVTKAYGKHDKK (SEQ ID NO:)

描述於 Biochem J. 2002年11月 1:367(第3部分):841-847中之突變
 釀酒酵母酶：

MSKGVLLVLYEGGKHAEEQEKLLGCIENELGIRNFIEEQGYELVTTIDKDPE
 PTSTVDRELKDAEIVITPPFFPAYISRNRIAEAPNLKLCVTAGVGSVDHVDLEAANERKI
 TVTEVTGSNVVSVAEHVMTILVLIRNYNGGHQQAINGEWDIAGVAKNEYDLEDKII
 STVGAGRIGYRVLERLVAFNPKLLYYARQELPAEAINRLNEASKLFNNGRDIVQRV
 EKLEDMVAQSDVVTINCLHKDSRGLFNKLLISHMKDGAYLVNTARGAICVAEDVA
 EAVKSGKLAGYGGDVWDKQPAPKDHDPWRMDNKDHVGNAMTVHISGTSLDAQKR
 YAQGVKNILNSYFSKFDYRPQDIIVQNGSYATRAYGQKK (SEQ ID NO:)

NADPH:鐵氧化還原蛋白氧化還原酶

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
petH	YP_171276.1	56750575	細長聚球藻 <i>PCC 6301</i>
fpr	NP_457968.1	16762351	腸道沙門氏菌
fnr1	XP_001697352.1	159478523	萊茵衣藻
rfnr1	NP_567293.1	18412939	擬南芥
aceF	NP_414657.1	6128108	大腸桿菌 <i>K-12 MG1655</i>

NADP依賴性醃化乙醛脫氫酶

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
adhB	AAB06720.1	1513071	嗜熱厭氧假乙醇桿菌 <i>ATCC 33223</i>
TheetDRAFT_0840	ZP_08211603.	326390041	嗜熱厭氧乙醇桿菌 <i>JW 200</i>
Cbei_3832	YP_001310903.1	150018649	拜氏梭菌 <i>NCIMB 8052</i>
Cbei_4054	YP_001311120.1	150018866	拜氏梭菌 <i>NCIMB 8052</i>
Cbei_4045	YP_001311111.1	150018857	拜氏梭菌 <i>NCIMB 8052</i>

編碼丙酮酸脫氫酶、丙酮酸:鐵氧化還原蛋白氧化還原酶、丙酮酸
 甲酸裂解酶、丙酮酸脫羧酶、乙酸激酶、磷酸轉乙醃酶及乙醃CoA
 合成酶之例示性基因如上描述於實例II中。

實例VIII

工程改造釀酒酵母用於化學生產

真核宿主具有若干優於原核系統之優勢。其能夠支持轉譯後修飾及宿主膜錨定及細胞器特異性酶。真核生物中之基因典型地具有內含子，其可影響基因表現之定時及蛋白質結構。

極適用於工業化學生產之例示性真核生物體為釀酒酵母。此生物體經充分表徵、易基因控制且工業上穩固。基因可容易使用此項技術中已知之方法進行插入、缺失、置換、過度表現或低表現。一些方法為基於質體的，而其他方法修飾染色體(Guthrie及Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology*, 第B部分, 第350卷, Academic Press (2002); Guthrie及Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology*, 第C部分, 第351卷, Academic Press (2002))。

酵母游離型質體(YEp)使質體介導之基因表現實現。YEp允許高水準之表現；然而其並非極穩定且其需要在選擇性培養基中培育。其亦使宿主代謝具有高維護成本。可使用使用營養缺陷型(例如URA3、TRP1、HIS3、LEU2)或抗生素可選擇標記(例如Zeo^R或Kan^R)之高複本數質體，其通常具有強組成性啓動子(諸如PGK1或ACT1)及轉錄終止子聚腺苷酸化區(諸如來自CYC1或AOX者)。精通此項技術者可得到多種實例。其包括pVV214(具有URA3可選擇標記之2微米質體)及pVV200(具有TRP1可選擇標記之2微米質體)(Van等人, *Yeast* 20:739-746 (2003))。或者，可使用低複本質體，諸如有中節的或CEN質體。同樣，精通此項技術者可得到多種實例。其包括pRS313及pRS315(Sikorski及Hieter, *Genetics* 122:19-27 (1989))，其中兩者均需要添加啓動子(例如PGK1或ACT1)及終止子(例如CYC1、AOX)。

在工業應用中，基因之染色體過度表現較佳為質體介導之過度表現。Mikkelsen及合作者已在釀酒酵母基因組之高度表現區域上在染色體X、XI及XII上鑑別11個整合位點(Mikkelsen等人, *Met Eng*

14:104-11 (2012))。藉由必需基因分隔位點，使位點之間的重組可能性最小化。

用於將基因插入至真核生物體(諸如釀酒酵母)中之工具為此項技術中已知。尤其適用之工具包括酵母整合質體(YIp)、酵母人工染色體(YACS)及基因靶向/同源重組。注意，此等工具亦可用以插入、缺失、置換、低表現或以其他方式改變宿主之基因組。

酵母整合質體(YIp)利用天然酵母同源重組系統以有效將DNA整合至染色體中。此等質體不含有複製起點且因此可僅在染色體整合之後維持。例示性構築體包括啓動子、所關注基因、終止子及具有啓動子、側接FRT位點、loxP位點之可選擇標記，或使得抗性標記能夠移除及再循環之定向重複序列。該方法需要合成及用適合引子擴增所關注基因，隨後消化獨特限制位點處之基因，諸如藉由*EcoRI*及*XhoI*酶產生者(Vellanki等人, *Biotechnol Lett.* 29:313-318 (2007))。將所關注基因在*EcoRI*及*XhoI*位點處插入至啓動子下游之適合表現載體中。藉由PCR及DNA序列分析檢驗基因插入。隨後在所位點處使用適當轉化方法將重組質體線性化及整合至釀酒酵母之染色體DNA中。將細胞塗於具有適當選擇標記之YPD培養基上，且培育2-3天。藉由群落PCR分析轉型體之必要基因插入物。爲了自側接loxP位點之構築體移除抗生素標記，引入含有Cre重組酶之質體。Cre重組酶促進與側接loxP位點之序列的切除。(Gueldener等人, *Nucleic Acids Res.* 30:e23 (2002))。藉由在不存在任何抗生素下在培養基上連續培養使所得菌株不含Cre質體。或者，Cre重組酶質體具有URA選擇標記，且藉由使細胞在充當URA之反選擇的5-FOA上生長有效移除質體。此方法亦可用於無疤整合而非使用loxP。熟習此項技術者可使用URA作爲標記整合，藉由在無URA板上生長而選擇用於整合，及隨後藉由在5-FOA板上生長而選擇用於URA突變體。5-FOA藉由URA基因產物轉化爲有毒

5-氟尿嘧啶。或者，FLP-*FRT*系統可用於將基因整合至染色體中。此系統包括藉由源自酵母釀酒酵母之2 μ 質體的Flipase重組酶(FLP)重組短Flipase識別目標(*FRT*)位點之間的序列(Sadowski, P. D., *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* 51:53-91 (1995); Zhu及Sadowski *J. Biol. Chem.* 270:23044-23054 (1995))。類似地，基因缺失方法將如文獻中所述進行。Baudin等人 *Nucleic. Acids Res.* 21:3329-3330 (1993); Brachmann等人, *Yeast* 14:115-132 (1998); Giaever等人, *Nature* 418:387-391 (2002); Longtine等人, *Yeast* 14:953-961 (1998); Winzeler等人, *Science* 285:901-906 (1999)。

用於操縱酵母染色體之另一方法為基因靶向。此方法利用酵母中之雙股DNA破碎藉由同源重組修復的事實。側接靶向序列之線性DNA片段因此可使用天然同源重組機構有效整合至酵母基因組中。除了應用插入基因之外，基因靶向方法亦適用於基因組DNA操作，諸如缺失基因；在基因、其啓動子或其他調節元件中引入突變，或添加標籤至基因中。

酵母人工染色體(YAC)為適用於路徑構築及組裝之人工染色體。YAC使得含有多個基因之大DNA序列(100-3000 kB)能夠表現。近來使用YAC應用於工程改造酵母中之類黃酮生物合成(Naesby等人, *Microb Cell Fact* 8:49-56 (2009))。在此方法中，YAC用以快速測試隨機組裝之路徑基因以得到最佳組合。

可藉由改變基因及/或其調節區之序列來調節基因之表現水準。該等基因調節區包括例如啓動子、增強子、內含子及終止子。負調節元件(諸如阻遏子及/或靜止子)之功能破壞亦可用以增進基因表現。基於RNA之工具亦可用以調節基因表現。該等工具包括RNA適體、核糖開關、反義RNA、核糖核酸酶及核糖開關。

爲了藉由基因之啓動子改變基因之表現，可得到不同強度之組

成性及誘導性啓動子之文庫。強組成性啓動子包括pTEF1、pADH1及源自糖酵解路徑基因之啓動子。pGAL啓動子爲由半乳糖活化且由葡萄糖抑制的經充分研究之誘導性啓動子。另一常用誘導性啓動子爲銅誘導性啓動子pCUP1 (Farhi等人, *Met Eng* 13:474-81 (2011))。啓動子強度之其他變化可藉由突變誘發或改組方法引入。舉例而言，易錯PCR可應用於產生如Alper及同事所示之合成啓動子文庫(Alper等人, *PNAS* 102:12678-83 (2005))。啓動子強度可以報導蛋白質(諸如 β -半乳糖苷酶、螢光蛋白質及螢光素酶)表徵。

插入之基因於基因組中的置放可改變其表現水準。舉例而言，整合基因之過度表現可藉由將基因整合至重複DNA元件(諸如核糖體DNA)或長末端重複序列中達成。

爲了在酵母或其他真核細胞中外源表現，基因可在不添加前導序列之情況下於細胞溶質中表現，或可靶向粒線體或其他細胞器，或經靶向以便分泌，藉由添加諸如適用於宿主細胞之粒線體靶向或分泌信號之適合靶向序列來達成。因此，應理解爲了移除或包括靶向序列而對核酸序列所作之適當修飾可併入外源核酸序列中以賦予所需性質。亦可進行基因修飾以增進多肽合成。舉例而言，藉由用最佳或共同序列取代核糖體結合位點及/或改變基因之序列以添加或移除二級結構來增進轉譯效率。亦可藉由用另一編碼序列取代一個編碼序列以更佳匹配宿主之密碼子優先性來增加轉譯速率。

實例IX

用於製造脂肪醇、醛及酸之終止路徑

此實例描述用於將MI-FAE循環或MD-FAE循環之中間物轉化爲所關注產物(諸如脂肪醇、脂肪醛及脂肪酸)的酶。路徑展示於圖1及7中。用於催化步驟A-G之酶揭示於實例I中。此實例描述適用於催化步驟H-N之酶。

酶包括：A. 硫解酶，B. 3-酮脂醯CoA還原酶，C. β -羥基ACP脫水酶，D. 烯醯CoA還原酶，E. 醯基CoA還原酶(形成醛)，F. 醇脫氫酶，G. 醯基CoA還原酶(形成醇)，H. 醯基CoA水解酶、轉移酶或合成酶，J. 醯基ACP還原酶，K. 醯基CoA:ACP醯基轉移酶，L. 硫酯酶，N. 醛脫氫酶(形成酸)或羧酸還原酶。

用於將MI-FAE循環中間物轉化為脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸產物之路徑展示於下表中。此等路徑在本文中亦稱為「終止路徑」。

產物	來自圖1之終止路徑酶
酸	H
	K/L
	E/N
	K/J/N
醛	E
	K/J
	H/N
	K/L/N
醇	E/F
	K/J/F
	H/N/F
	K/L/N/F
	G

可使用圖1及6中所示之一或多種酶微調產物特異性。藉由延長路徑之一或多種酶連同如上文所述之終止路徑之一或多種酶控制鏈長。藉由終止路徑之一或多種酶控制產物結構。與各種路徑中間物反應的所選終止路徑酶之實例展示於下表中。其他實例描述於本文中。

酶	受質	實例
醯基CoA還原酶	醯基CoA	貝氏不動桿菌之 <i>Acr1</i> (GenBank AAC45217)
	3-羥基醯基CoA	羅伊氏乳桿菌之 <i>PduP</i> (GenBank CCC03595.1)
	3-側氧基醯基CoA	托科達硫化葉菌之 <i>Mcr</i> (GenBank NP_378167)
醯基CoA水解酶、轉移酶或合成酶	醯基CoA	大腸桿菌之 <i>tesB</i> (GenBank NP_414986)
	3-羥基醯基CoA	褐家鼠之 <i>hibch</i> (GenBank Q5XIE6.2)
	3-側氧基醯基CoA	番茄之 <i>MKS2</i> (GenBank ACG69783)
	烯醯CoA	醃酵胺基酸球菌之 <i>gctAB</i> (GenBank CAA57199、CAA57200)

步驟H. 醯基CoA水解酶、轉移酶或合成酶

醯基CoA水解酶、轉移酶及合成酶將醯基CoA部分轉化為其相應酸。該種酶可用以例如將脂肪醯基CoA轉化為脂肪酸，將3-羥基醯基CoA轉化為3-羥基酸，將3-側氧基醯基CoA轉化為3-側氧基酸，或將烯醯CoA轉化為烯酸。

3.1.2家族中之CoA水解酶或硫酯酶將醯基CoA分子水解為其相應酸。具有不同受質範圍之若干CoA水解酶適用於將醯基CoA、3-羥基醯基CoA、3-側氧基醯基CoA及烯醯CoA受質水解為其相應酸。舉例而言，來自褐家鼠腦之由*acot12*編碼的酶(Robinson等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:959-965 (1976))可與丁醯CoA、己醯CoA及丙二醯CoA反應。由*acot8*編碼之人類二羧酸硫酯酶對戊二醯CoA、己二醯CoA、環庚基CoA、癸二醯CoA及十二烷二醯CoA展現活性(Westin等人, *J. Biol. Chem.* 280:38125-38132 (2005))。此酶之最接近大腸桿菌同源物*tesB*亦可使一系列CoA硫酯水解(Naggert等人, *J Biol Chem* 266:11044-11050 (1991))。相似酶亦已於大鼠肝中表徵(Deana R., *Biochem Int* 26:767-773 (1992))。大腸桿菌中之具有水解酶活性的其他酶包括*ybgC*、*paal*及*ybdB* (Kuznetsova等人, *FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29(2):263-279；Song等人, *J Biol Chem*, 2006, 281(16):11028-38))。儘管尚未報導其序列，但來自豌豆葉之粒線體的酶具有廣泛受質特異性，對乙醯CoA、丙醯CoA、丁醯CoA、棕櫚醯CoA、油醯CoA、琥珀醯CoA及巴豆醯CoA展現活性(Zeiher等人, *Plant. Physiol.* 94:20-27 (1990))。來自釀酒酵母之乙醯CoA水解酶*ACH1*表示另一候選水解酶(Buu等人, *J. Biol. Chem.* 278:17203-17209 (2003))。具有芳基CoA水解酶活性之其他酶包括結核分枝桿菌之棕櫚醯CoA水解酶(Wang等人, *Chem. Biol.* 14:543-551 (2007))及大腸桿菌之

由 *entH* 編碼的醯基 CoA 水解酶 (Guo 等人, *Biochemistry* 48:1712-1722 (2009))。其他 CoA 水解酶如上所述。

基因名稱	GenBank 寄存編號	GI 編號	生物體
acot12	NP_570103.1	18543355	褐家鼠
tesB	NP_414986	16128437	大腸桿菌
acot8	CAA15502	3191970	智人
acot8	NP_570112	51036669	褐家鼠
tesA	NP_415027	16128478	大腸桿菌
ybgC	NP_415264	16128711	大腸桿菌
paal	NP_415914	16129357	大腸桿菌
ybdB	NP_415129	16128580	大腸桿菌
ACH1	NP_009538	6319456	釀酒酵母
Rv0098	NP_214612.1	15607240	結核分枝桿菌
entH	AAC73698.1	1786813	大腸桿菌

CoA 水解酶對 3-羥基醯基 CoA、3-側氧基醯基 CoA 及烯醯 CoA 中間物之活性亦在此項技術中熟知。舉例而言，用於將烯醯 CoA 受質轉化為其相應酸之酶為來自醱酵胺基酸球菌之戊烯二酸 CoA-轉移酶。此酶藉由定點突變誘發轉化為對戊二醯 CoA、乙醯 CoA 及 3-丁烯醯 CoA 具有活性之醯基 CoA 水解酶 (Mack 等人, *FEBS Lett.* 405:209-212 (1997))。另一適合酶為大腸桿菌之 *fadM* 硫酯酶 III。此酶參與油酸 β -氧化，且較佳受質為 3,5-十四基二烯醯 CoA (Nie 等人, *Biochem* 47:7744-51 (2008))。

蛋白質	GenBank ID	GI 編號	生物體
gctA	CAA57199.1	559392	醱酵胺基酸球菌
gctB	CAA57200.1	559393	醱酵胺基酸球菌
gctA	ACJ24333.1	212292816	共生梭菌
gctB	ACJ24326.1	212292808	共生梭菌
gctA	NP_603109.1	19703547	具核梭桿菌
gctB	NP_603110.1	19703548	具核梭桿菌
fadM	NP_414977.1	16128428	大腸桿菌

3-羥異丁醯 CoA 水解酶對 3-羥基醯基 CoA 受質具有活性 (Shimomura 等人, *J Biol Chem.* 269:14248-14253 (1994))。編碼此酶之基因包括褐家鼠 (Shimomura 等人, *Methods Enzymol.* 324:229-240 (2000)) 及智人 (Shimomura 等人, 前述) 之 *hibch*。相似基因候選物亦可

藉由序列同源性鑑別，包括釀酒酵母之 *hibch* 及蠟樣芽孢桿菌之 *BC_2292*。例示性3-側氧基醯基CoA水解酶為番茄之MKS2 (Yu等人, *Plant Physiol* 154:67-77 (2010))。此酶之天然受質為3-側氧基-肉豆蔻醯CoA，其生產C14鏈長產物。

基因名稱	GenBank寄存編號	GI編號	生物體
fadM	NP_414977.1	16128428	大腸桿菌
hibch	Q5XIE6.2	146324906	褐家鼠
hibch	Q6NVY1.2	146324905	智人
hibch	P28817.2	2506374	釀酒酵母
BC_2292	AP09256	29895975	蠟樣芽孢桿菌
MKS2	ACG69783.1	196122243	番茄

CoA轉移酶催化CoA部分自一個分子可逆轉移至另一分子。若干轉化需要CoA轉移酶以將羧酸活化為其相應醯基CoA衍生物。CoA轉移酶已描述於公開文獻中，且表示用於此等步驟之適合候選物。其描述如下。

克氏梭菌之 *cat1*、*cat2* 及 *cat3* 的基因產物已顯示分別展現琥珀醯CoA、4-羥基丁醯CoA及丁醯CoA轉移酶活性(Seedorf等人, *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A* 105:2128-2133 (2008)；Sohling等人, *J. Bacteriol.* 178:871-880 (1996))。相似CoA轉移酶活性亦存在於陰道毛滴蟲、布氏錐蟲、胺基丁酸梭菌及牙齦卟啉單胞菌中(Riviere等人, *J. Biol. Chem.* 279:45337-45346 (2004)；van Grinsven等人, *J. Biol. Chem.* 283:1411-1418 (2008))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
cat1	P38946.1	729048	克氏梭菌
cat2	P38942.2	172046066	克氏梭菌
cat3	EDK35586.1	146349050	克氏梭菌
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	陰道毛滴蟲G3
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	布氏錐蟲
cat2	CAB60036.1	6249316	胺基丁酸梭菌
cat2	NP_906037.1	34541558	牙齦卟啉單胞菌W83

利用乙醯CoA作為CoA供體之脂肪醯基CoA轉移酶為由大腸桿菌 *atoA* (α 次單元)及 *atoD* (β 次單元)基因編碼之乙醯乙醯CoA轉移酶

(Korolev 等人, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel 等人, 33:902-908 (1968))。此酶對鏈長 C3-C6 之受質具有廣泛受質範圍(Sramek 等人, *Arch Biochem Biophys* 171:14-26 (1975))，且已顯示將 CoA 部分自多種分支鏈及直鏈 3-側氧基及醯基 CoA 受質轉移至乙酸，該等受質包括異丁酸(Matthies 等人, *Appl Environ. Microbiol* 58:1435-1439 (1992))、戊酸(Vanderwinkel 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33:902-908 (1968)) 及丁酸(Vanderwinkel 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33:902-908 (1968))。此酶由乙醯乙酸以轉錄水準誘導，因此調節控制之修飾可為將此酶工程改造至路徑中所需(Pauli 等人, *Eur. J Biochem.* 29:553-562 (1972))。相似酶存在於以下中：麩胺酸棒狀桿菌 ATCC 13032 (Duncan 等人, 68:5186-5190 (2002))、丙酮丁醇梭菌(Cary 等人, *Appl Environ Microbiol* 56:1576-1583 (1990))；Wiesenborn 等人, *Appl Environ Microbiol* 55:323-329 (1989))及糖乙酸多丁醇梭菌(Kosaka 等人, *Biosci. Biotechnol Biochem.* 71:58-68 (2007))。

基因	GI 編號	寄存編號	生物體
atoA	2492994	P76459.1	大腸桿菌
atoD	2492990	P76458.1	大腸桿菌
actA	62391407	YP_226809.1	麩胺酸棒狀桿菌
cg0592	62389399	YP_224801.1	麩胺酸棒狀桿菌
ctfA	15004866	NP_149326.1	丙酮丁醇梭菌
ctfB	15004867	NP_149327.1	丙酮丁醇梭菌
ctfA	31075384	AAP42564.1	糖乙酸多丁醇梭菌
ctfB	31075385	AAP42565.1	糖乙酸多丁醇梭菌

β -酮己二醯 CoA 轉移酶，亦稱為琥珀醯 CoA:3-側氧基酸 CoA 轉移酶，對於 3-側氧基醯基 CoA 受質具有活性。此酶由惡臭假單胞菌中之 *pcaI* 及 *pcaJ* 編碼(Kaschabek 等人, *J Bacteriol.* 184:207-215 (2002))。相似酶見於以下中：不動桿菌屬 ADP1 (Kowalchuk 等人, *Gene* 146:23-30 (1994))、天藍色鏈黴菌及克氏假單胞菌(以前為物種 *B13*) (Gobel 等人,

J Bacteriol. 184:216-223 (2002) ; Kaschabek等人, *J Bacteriol.* 184:207-215 (2002))。其他例示性琥珀醯CoA:3-側氧基酸CoA轉移酶已於以下中表徵：幽門螺旋桿菌 (Corthesy-Theulaz 等人, *J Biol. Chem.* 272:25659-25667 (1997))、枯草桿菌 (Stols等人, *Protein Expr. Purif.* 53:396-403 (2007))及智人 (Fukao, T. 等人, *Genomics* 68:144-151 (2000) ; Tanaka, H.等人, *Mol Hum Reprod* 8:16-23 (2002))。下文概括與此等基因相關之Genbank資訊。

基因	GI編號	寄存編號	生物體
pcaI	24985644	AAN69545.1	惡臭假單胞菌
pcaJ	26990657	NP_746082.1	惡臭假單胞菌
pcaI	50084858	YP_046368.1	不動桿菌屬ADPI
pcaJ	141776	AAC37147.1	不動桿菌屬ADPI
pcaI	21224997	NP_630776.1	天藍色鏈黴菌
pcaJ	21224996	NP_630775.1	天藍色鏈黴菌
catI	75404583	Q8VPF3	克氏假單胞菌
catJ	75404582	Q8VPF2	克氏假單胞菌
HPAG1_0676	108563101	YP_627417	幽門螺旋桿菌
HPAG1_0677	108563102	YP_627418	幽門螺旋桿菌
ScoA	16080950	NP_391778	枯草桿菌
ScoB	16080949	NP_391777	枯草桿菌
OXCT1	NP_000427	4557817	智人
OXCT2	NP_071403	11545841	智人

醯基CoA受質轉化為其酸產物可由6.2.1家族酶中之CoA酸硫醇連接酶或CoA合成酶催化。將ATP轉化為ADP(形成ADP)之CoA合成酶為可逆的，且在形成酸之方向上反應，而形成AMP之酶僅催化酸活化為醯基CoA。就脂肪酸形成而言，形成AMP之酶的缺失或衰減將降低回通量。形成ADP之乙醯CoA合成酶(ACD, EC 6.2.1.13)為將醯基CoA酯轉化為其相應酸與ATP之伴隨合成耦合的酶。來自閃爍古生球菌之由AF1211編碼的ACD I顯示對多種直鏈及分支鏈受質(包括異丁酸、異戊酸及反丁烯二酸)起作用(Musfeldt等人, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002))。閃爍古生球菌中之由AF1983編碼的第二可逆ACD亦顯示具有廣泛受質範圍(Musfeldt及Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644

(2002))。來自死海鹽盒菌之酶(註解為琥珀醯CoA合成酶)接受丙酸、丁酸及分支鏈酸(異戊酸及異丁酸)作為受質，且顯示在正及反方向上起作用(Brasen等人, *Arch Microbiol* 182:277-287 (2004))。來自極端嗜熱泉古菌好氧火棒菌之由PAE3250編碼的ACD顯示所有表徵之ACD之最廣泛受質範圍，與乙醯CoA、異丁醯CoA(較佳受質)及苯乙醯CoA反應(Brasen等人, 前述)。定向進化或工程改造可用於修飾此酶以在宿主生物體之生理溫度下操作。來自閃爍古生球菌、死海鹽盒菌及好氧火棒菌之酶均已於大腸桿菌中選殖、功能性表現及表徵(Brasen及Schonheit, 前述; Musfeldt及Schonheit, *J Bacteriol.* 184:636-644 (2002))。其他候選物為由大腸桿菌之*sucCD*及釀酒酵母之*LSC1*及*LSC2*基因編碼的琥珀醯CoA合成酶。此等酶催化在活體內可逆的反應中自琥珀酸形成琥珀醯CoA，伴隨消耗一個ATP (Buck等人, *Biochemistry* 24:6245-6252 (1985))。來自惡臭假單胞菌之醯基CoA連接酶已顯示對若干脂族受質(包括乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸及辛酸)及芳族化合物(諸如苯基乙酸及苯氧基乙酸)起作用(Fernandez-Valverde等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1149-1154 (1993))。來自豌豆根瘤菌之相關酶丙二醯CoA合成酶(6.3.4.9)可將若干二酸(亦即乙基-、丙基-、烯丙基-、異丙基-、二甲基-、環丙基-、環丙基亞甲基-、環丁基-及苯甲基-丙二酸)轉化為其相應單硫酯(Pohl等人, *J. Am. Chem. Soc.* 123:5822-5823 (2001))。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
AF1211	NP_070039.1	11498810	閃爍古生球菌
AF1983	NP_070807.1	11499565	閃爍古生球菌
scs	YP_135572.1	55377722	死海鹽盒菌
PAE3250	NP_560604.1	18313937	好氧火棒菌菌株JM2
sucC	NP_415256.1	16128703	大腸桿菌
sucD	AAC73823.1	1786949	大腸桿菌
LSC1	NP_014785	6324716	釀酒酵母
LSC2	NP_011760	6321683	釀酒酵母
paaF	AAC24333.2	22711873	惡臭假單胞菌

matB	AAC83455.1	3982573	豌豆根瘤菌
------	------------	---------	-------

步驟J. 醯基ACP還原酶

醯基ACP還原為其相應醛係由醯基ACP還原酶(AAR)催化。該種轉化描繪於圖1及7之步驟J中。適合酶候選物包括細長聚球藻 *PCC7942* 及其同源物之 orf1594 基因產物 (Schirmer 等人, *Science*, 329: 559-62 (2010))。細長聚球藻 *PCC7942* 醯基ACP還原酶與操縱子中之醛脫羧基酶共表現，該醛脫羧基酶似乎保留於大多數藍藻生物體中。與醛脫羧基酶一起表現於大腸桿菌中之此酶賦予生產烷烴之能力。海洋原綠球藻 AAR 亦選殖至大腸桿菌中，且與脫羧基酶一起顯示可生產烷烴 (美國申請案 2011/0207203)。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
orf1594	YP_400611.1	81300403	細長聚球藻 <i>PCC7942</i>
PMT9312_0533	YP_397030.1	78778918	海洋原綠球藻 <i>MIT 9312</i>
syc0051_d	YP_170761.1	56750060	細長聚球藻 <i>PCC 6301</i>
Ava_2534	YP_323044.1	75908748	多變魚腥藻 <i>ATCC 29413</i>
alr5284	NP_489324.1	17232776	念珠藻屬 <i>PCC 7120</i>
Aazo_3370	YP_003722151.1	298491974	厚壁孢子念珠藻
Cyan7425_0399	YP_002481152.1	220905841	藍絲菌屬 <i>PCC 7425</i>
N9414_21225	ZP_01628095.1	119508943	泡沫節球藻 <i>CCY9414</i>
L8106_07064	ZP_01619574.1	119485189	鞘絲藻屬 <i>PCC 8106</i>

步驟K. 醯基CoA:ACP醯基轉移酶

醯基CoA轉移至醯基ACP係由EC種類2.3.1中之醯基轉移酶催化。具有此活性之酶如上所述。

步驟L. 硫酯酶

醯基ACP硫酯酶將醯基ACP轉化為其相應酸。在圖1之步驟L中需要該種轉化。例示性酶包括擬南芥之FatA及FatB同功異型物 (Salas 等人, *Arch Biochem Biophys* 403:25-34 (2002))。此兩種蛋白質之活性隨碳鏈長度而變化，FatA偏好油基ACP且FatB偏好棕櫚醯ACP。具有不同鏈長特異性之許多硫酯酶列於WO 2008/113041中，且包括於下表中。舉例而言，先前已顯示，中鏈植物硫酯酶(如來自加州月桂之

FatB)於大腸桿菌中之表現導致高水準之中鏈脂肪酸、主要月桂酸(C12:0)積聚。類似地，沼澤萼距花FatB1硫酯酶於大腸桿菌中之表現導致C8-10:0產物積聚(Dehesh等人, *Plant Physiol* 110:203-10 (1996))。類似地，表現於大腸桿菌中之紅花硫酯酶在C 18:1鏈終止及釋放為游離脂肪酸方面導致>50倍提昇(Knutzon等人, *Plant Physiol* 100:1751-58 (1992))。用於改變硫酯酶之受質特異性的方法亦在此項技術中已知(例如EP1605048)。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
fatA	AEE76980.1	332643459	擬南芥
fatB	AEE28300.1	332190179	擬南芥
fatB2	AAC49269.1	1292906	萼距花
fatB3	AAC72881.1	3859828	萼距花
fatB1	AAC49179.1	1215718	沼澤萼距花
M96568.1:94..1251	AAA33019.1	404026	紅花
fatB1	Q41635.1	8469218	加州月桂
tesA	AAC73596.1	1786702	大腸桿菌

步驟N. 醛脫氫酶(形成酸)或羧酸還原酶

醛轉化為酸係由形成酸之醛脫氫酶催化。若干釀酒酵母酶催化醛氧化為酸，包括ALD1 (ALD6)、ALD2及ALD3 (Navarro-Avino等人, *Yeast* 15:829-42 (1999); Quash等人, *Biochem Pharmacol* 64:1279-92 (2002))。粒線體蛋白質ALD4及ALD5催化相似轉化(Wang等人, *J Bacteriol* 180:822-30 (1998); Boubekour等人, *Eur J Biochem* 268:5057-65 (2001))。HFD1編碼十六醛脫氫酶。例示性形成酸之醛脫氫酶列於下表中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
ALD2	NP_013893.1	6323822	釀酒酵母s288c
ALD3	NP_013892.1	6323821	釀酒酵母s288c
ALD4	NP_015019.1	6324950	釀酒酵母s288c
ALD5	NP_010996.2	330443526	釀酒酵母s288c
ALD6	NP_015264.1	6325196	釀酒酵母s288c
HFD1	NP_013828.1	6323757	釀酒酵母s288c
CaO19.8361	XP_710976.1	68490403	白假絲酵母
CaO19.742	XP_710989.1	68490378	白假絲酵母
YALI0C03025	CAG81682.1	49647250	解脂耶氏酵母

ANI_1_1334164	XP_001398871.1	145255133	黑麴菌
ANI_1_2234074	XP_001392964.2	317031176	黑麴菌
ANI_1_226174	XP_001402476.1	145256256	黑麴菌
ALDH	P41751.1	1169291	黑麴菌
KLLA0D09999	CAH00602.1	49642640	乳酸克魯維酵母

酸轉化為醛為熱力學上不利的，且典型地需要富能量輔因子及多個酶促步驟。舉例而言，在丁醇生物合成中，丁酸轉化為丁醛係藉由以CoA轉移酶或連接酶將丁酸活化為其相應醯基CoA、隨後由CoA依賴性醛脫氫酶還原為丁醛來催化。或者，酸可活化為醯基磷酸，且隨後藉由磷酸還原酶還原。酸藉由單一酶直接轉化為醛係由1.2.1家族中之二功能羧酸還原酶催化。催化此等轉化之例示性酶包括羧酸還原酶， α -胺基己二酸還原酶及視黃酸還原酶。

見於艾瓦諾卡菌中之羧酸還原酶(CAR)催化羧酸向其相應醛之鎂、ATP及NADPH依賴性還原(Venkitasubramanian等人, *J Biol. Chem.* 282:478-485 (2007))。此酶之天然受質為苯甲酸，且該酶展現對芳族及脂族受質(包括長度C12-C18之脂肪酸)之廣泛接受度(Venkitasubramanian等人, *Biocatalysis in Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. CRC press (2006); WO 2010/135624)。CAR需要藉由磷酸泛醯巯基乙胺轉移酶(PPTase)轉譯後活化，該酶將非活性脫輔基酶轉化為活性全酶(Hansen等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 75:2765-2774 (2009))。將諾卡菌屬(*Nocardia*) CAR酶選殖且功能性表現於大腸桿菌中(Venkitasubramanian等人, *J Biol. Chem.* 282:478-485 (2007))。編碼特定PPTase之*npt*基因的共表現改良酶之活性。來自分枝桿菌屬菌株JLS之相關酶催化長度C12-C16之脂肪酸的還原。此酶之對脂肪酸具有增進活性的變異體描述於WO 2010/135624中。 α -胺基己二酸還原酶(AAR, EC 1.2.1.31)參與一些真菌物種中之離胺酸生物合成路徑。此酶天然地還原 α -胺基己二酸為 α -胺基己二酸半醛。羧基首先經由腺苷酸之ATP依賴性形成活化，腺苷酸隨後由NAD(P)H還



原，產生醛及AMP。如CAR，此酶利用鎂且需要由PPTase活化。AAR及其相應PPTase之酶候選物見於釀酒酵母(Morris等人, *Gene* 98:141-145 (1991))、白假絲酵母(Guo等人, *Mol. Genet. Genomics* 269:271-279 (2003))及粟酒裂殖酵母(Ford等人, *Curr. Genet.* 28:131-137 (1995))中。來自粟酒裂殖酵母之AAR當於大腸桿菌中表現時展現顯著活性(Guo等人, *Yeast* 21:1279-1288 (2004))。來自產黃青黴菌之AAR接受S-羧甲基-L-半胱胺酸作為替代受質，但不與己二酸、L-麩胺酸或二胺基庚二酸反應(Hijarrubia等人, *J Biol. Chem.* 278:8250-8256 (2003))。編碼產黃青黴菌PPTase之基因迄今為止尚未鑑別，且藉由序列比較同源性搜尋未鑑別高置信度命中。

蛋白質	GenBank ID	GI編號	生物體
car	AAR91681.1	40796035	艾瓦諾卡菌
npt	ABI83656.1	114848891	艾瓦諾卡菌
car	YP_001070587.1	126434896	分枝桿菌屬菌株JLS
npt	YP_001070355.1	126434664	分枝桿菌屬菌株JLS
LYS2	AAA34747.1	171867	釀酒酵母
LYS5	P50113.1	1708896	釀酒酵母
LYS2	AAC02241.1	2853226	白假絲酵母
LYS5	AAO26020.1	28136195	白假絲酵母
Lys1p	P40976.3	13124791	粟酒裂殖酵母
Lys7p	Q10474.1	1723561	粟酒裂殖酵母
Lys2	CAA74300.1	3282044	產黃青黴菌

其他car及npt基因可基於序列同源性鑑別。

基因名稱	GI編號	GenBank 寄存編號	生物體
fadD9	121638475	YP_978699.1	牛分枝桿菌BCG
BCG_2812c	121638674	YP_978898.1	牛分枝桿菌BCG
nfa20150	54023983	YP_118225.1	鼻疽諾卡菌IFM 10152
nfa40540	54026024	YP_120266.1	鼻疽諾卡菌IFM 10152
SGR_6790	YP_001828302.1	182440583	灰色鏈黴菌灰色亞種(<i>Streptomyces griseus</i> subsp. <i>griseus</i>) NBRC 13350
SGR_665	YP_001822177.1	182434458	灰色鏈黴菌灰色亞種NBRC 13350
MSMEG_2956	YP_887275.1	118473501	恥垢分枝桿菌 MC2 155
MSMEG_5739	YP_889972.1	118469671	恥垢分枝桿菌 MC2 155
MSMEG_2648	YP_886985.1	118471293	恥垢分枝桿菌 MC2 155

MAP1040c	NP_959974.1	41407138	鳥副結核分枝桿菌 <i>K-10</i>
MAP2899c	NP_961833.1	41408997	鳥副結核分枝桿菌 <i>K-10</i>
MMAR_2117	YP_001850422.1	183982131	海洋分枝桿菌 <i>M</i>
MMAR_2936	YP_001851230.1	183982939	海洋分枝桿菌 <i>M</i>
MMAR_1916	YP_001850220.1	183981929	海洋分枝桿菌 <i>M</i>
Tpau_1373	YP_003646340.1	296139097	微變塚村氏菌 <i>DSM 20162</i>
Tpau_1726	YP_003646683.1	296139440	微變塚村氏菌 <i>DSM 20162</i>
CPC7001_1320	ZP_05045132.1	254431429	藍菌屬 <i>PCC7001</i>
DDBDRAFT_0187729	XP_636931.1	66806417	盤基網柄菌 <i>AX4</i>

發現於灰色鏈黴菌中之另一CAR酶由*griC*及*griD*基因編碼。咸信此酶將3-胺基-4-羥基苯甲酸轉化為3-胺基-4-羥基苯甲醛，因為缺失*griC*或*griD*導致3-胺基-4-羥基苯甲酸代謝之分路產物3-乙醯胺基-4-羥基苯甲酸細胞外積聚(Suzuki等人, *J. Antibiot.* 60(6):380-387 (2007))。 *griC*及*griD*經SGR_665(序列與艾瓦諾卡氏菌*npt*類似之酶)共表現可為有利的。

基因名稱	GI編號	GenBank寄存編號	生物體
<i>griC</i>	YP_001825755.1	182438036	灰色鏈黴菌灰色亞種 <i>NBRC 13350</i>
<i>griD</i>	YP_001825756.1	182438037	灰色鏈黴菌灰色亞種 <i>NBRC 13350</i>

實例X

在釀酒酵母中自葡萄糖生產1,3-丁二醇

此實例說明在釀酒酵母中自葡萄糖構築及生物合成生產1,3-BDO。

用於1,3-BDO生產之路徑包含兩種MI-FAE循環酶(硫解酶及3-側氧基醯基CoA還原酶)，以及終止路徑酶(醯基CoA還原酶(形成醛)及醇脫氫酶)。經工程改造至釀酒酵母中之1,3-BDO路徑由將乙醯CoA轉化為1,3-BDO之四個酶促步驟構成。第一步驟需要藉由乙醯乙醯CoA硫解酶(THL)將兩個乙醯CoA分子縮合為乙醯乙醯CoA。在第二步驟中，乙醯乙醯CoA藉由乙醯乙醯CoA還原酶(亦稱為3-β-羥基丁醯CoA脫氫酶(HBD))還原為3-羥基丁醯CoA。3-羥基丁醯CoA還原酶(ALD)催化自醯基CoA形成醛。3-羥基丁醛進一步還原為1,3-BDO係由1,3-

BDO脫氫酶(ADH)催化。

為了使得能夠在細胞溶質中進行1,3-BDO生產，兩種乙醯CoA形成路徑經工程改造至釀酒酵母中。第一路徑需要藉由丙酮酸脫羧酶(圖2E)、乙醛脫氫酶(圖2F)及乙醯CoA合成酶(圖2B)將丙酮酸轉化為乙醯CoA。第二路徑為丙酮酸甲酸裂解酶(圖2H)。

在1,3-BDO路徑之各酶促步驟中，組裝適用基因之清單以供確證。在此研究中選殖及評估之基因以及適當參考文獻及關於多肽序列之URL引用如下呈現於表1中。

表1

乙醯乙醯CoA硫解酶(THL)					
例示性 步驟	ID	基因	NCBI寄存編 號	GI	來源生物體
圖1A	1502	<i>thiI</i>	P45359.1	1174677	丙酮丁醇梭菌 ATCC 824
圖1A	1491	<i>atoB</i>	NP_416728	16130161	大腸桿菌菌株K-12亞菌株 MG1655
圖1A	560	<i>thiA</i>	NP_349476.1	15896127	丙酮丁醇梭菌 ATCC 824
圖1A	1512	<i>phbA</i>	P07097.4	135759	生枝動膠菌
圖1A	1501	<i>phbA</i>	P14611.1	135754	富養羅爾斯通氏菌H16
3-羥基丁醯CoA脫氫酶(HBD)					
圖1B	1495	<i>hbd</i>	AAM14586.1	20162442	拜氏梭菌NCIMB 8052
3-羥基丁醯CoA還原酶(ALD)					
圖1E	707	<i>Lvis 1603</i>	YP_795711.1	116334184	短乳桿菌ATCC 367
3-羥基丁醛還原酶(ADH)					
圖1F	28	<i>bdh</i>	BAF45463.1	124221917	糖乙酸多丁醇梭菌
丙酮酸甲酸裂解酶(PflAB)					
圖2H	1799	<i>pflA</i>	NP_415422.1	16128869	大腸桿菌MG1655
圖2H	500	<i>pflB</i>	NP_415423	16128870	大腸桿菌MG1655
PDH旁路(醛脫氫酶、乙醯CoA合成酶)					
圖2F	1849	<i>ALD6</i>	NP_015264.1	6325196	釀酒酵母S288c
圖2B	1845	<i>Acs</i>	AAL23099.1	16422835	腸道沙門氏菌 LT2
圖2B	1845A	<i>Acsm</i>	AAL23099.1	16422835	腸道沙門氏菌 LT2

經由PCR自天然或野生型生物體之基因組DNA選殖基因。用以擴增路徑基因之引子為(自5'至3'；加下劃線之序列具有基因特異性)：

ThI 1502:

201420761

FP:TCTAATCTAAGTTTTCTAGAACTAGTAAAGATGAGAGATGTAGTAATA
GTAAGTGCTGTA (SEQ ID NO:)

RP:GATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCTTAGTCTCTTTCAACTACG
AGAGCTGTT (SEQ ID NO:)

Thl 1491:

FP:TCTAATCTAAGTTTTCTAGAACTAGTAAAGATGAAAAATTGTGTCATCG
TCAGTG (SEQ ID NO:11)

RP:GATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCTTAATTCAACCGTTCAAT
CACCATCGCAAT (SEQ ID NO:)

Thl 560:

FP:AATCTAAGTTTTCTAGAACTAGTAAAGATGAAAGAAGTTGTAATAGCT
AGTGCAAGTAA (SEQ ID NO:)

RP:TATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCTTAATGGTGATGGTGATGAT
GGCACTTTTCTA (SEQ ID NO:)

Thl 1512:

FP:TCTAATCTAAGTTTTCTAGAACTAGTAAAGATGAGCACCCCGTCCATCG
TCA (SEQ ID NO:)

RP:GATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCCTAAAGGCTCTCGATGCA
CATCGCC (SEQ ID NO:)

Thl 1501:

FP:TAAGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGACTGACGTTGTCATCGTATC
CGC (SEQ ID NO:)

RP: GCCTTAGGAAGCTTTCTAGATTATTATTTGCGCTCGACTGCCAGC
(SEQ ID NO:)

Hbd 1495:

FP:AAGCATACAATCAACTATCTCATATACAATGAAAAAGATTTTTGTACTT
GGAGCA (SEQ ID NO:)

RP:AAAAATCATAAATCATAAGAAATTCGCTTATTTAGAGTAATCATAGAA
TCCTTTTCTGA (SEQ ID NO:)

Ald 707:

FP:AATCTAAGTTTTCTAGAACTAGTAAAGATGAACACAGAAAACATTGAA
CAAGCCAT (SEQ ID NO:)

RP:TATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGGATCCCTAAGCCTCCCAAGTCCGTA
ATGAGAACCCTT (SEQ ID NO:)

Adh 28:

FP:CCAAGCATACAATCAACTATCTCATATACAATGGAGAATTTTAGATTAA
ATGCATATACA (SEQ ID NO:)

RP:AATAAAAATCATAAATCATAAGAAATTCGCTTAAAGGGACATTTCTAA
AATTTTATATAC (SEQ ID NO:)

1845A為野生型(1845)酶之序列變異體。該變異為殘基Leu-641 (L641P)中之點突變，描述於Starai及合作者(Starai等人, *J Biol Chem* 280: 26200-5 (2005))中。突變之功能為例如藉由乙醯化防止轉譯後調節，且維持Acs酶處於其活化狀態。

構築表2中所示之穿梭質體以便於釀酒酵母中表現異源基因。質體d9、d10及d11為分別具有Ura、His及Leu選擇標記的空質體對照物。質體d12或d13含有具有URA3選擇標記之單一ALD或ADH基因。質體d14、d16及d17含有具有HIS3選擇標記之*hbd*及*thl*基因。

表2

質體	選擇標記	基因
pESC-L	URA3	NA
pESC-H	HIS3	NA
pESC-U	LEU2	NA
pY3Hd1	URA3	1799(pflA)-500(pflB)
pY3Hd2	HIS3	1799(pflA)-500(pflB)
pY3Hd3	LEU2	1799(pflA)-500(pflB)
pY3Hd4	URA3	1849(ALD6)-1845(Acs)
pY3Hd5	URA3	1849(ALD6)-1845A(Acsm)
pY3Hd6	URA3	1495(Hbd) - 1491(Thl)
pY3Hd7	URA3	1495(Hbd) - 560(Thl)
pY3Hd8	LEU2	28(ADH)-707(ALD)
pY3Hd9	URA3	NA
pY3Hd10	HIS3	NA
pY3Hd11	LEU2	NA
pY3Hd12	URA3	707(ALD)
pY3Hd13	URA3	28(ADH)
pY3Hd14	HIS3	1495(Hbd) - 1502(Thl)
pY3Hd15	HIS3	1495(Hbd) - 1512(Thl)
pY3Hd16	HIS3	1495(Hbd) - 1491(Thl)
pY3Hd17	HIS3	1495(Hbd) - 560(Thl)

選擇酵母宿主BY4741 [MATa his3 Δ 0 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0]作為宿主菌株用於此研究，作為具有適當營養缺陷型標記之野生型實驗

室菌株以寄主路徑質體。用含有1,3-BDO路徑基因之質體單獨地或與含有PDH旁路基因或pflAB基因之質體一起轉化BY4741。用於此實例中之載體主要成分包括p427TEF酵母表現載體、pY3H橋連載體(Sunrise Science)及pESC酵母抗原決定基標籤載體(Agilent Technologies)。使用來自釀酒酵母之含有TEF1啟動子、CYC終止子及URA3選擇標記的pY3H載體以構築具有不同選擇標記之雙啟動子質體。將釀酒酵母之ADH1啟動子及終止子序列插入TEF1啟動子上游，因此兩個轉錄單位處於背對背定向。在選殖過程期間移除SV40核定位信號序列。將所得質體命名為pY3Hd9。為了構築具有不同選擇標記之質體，用來自釀酒酵母之HIS3或LEU2基因置換pY3Hd9中之URA3基因，以分別製造pY3Hd10及pY3Hd11。將四種1,3-BDO路徑基因中之兩者Hbd及Thl(關於基因編號，參見表103)選殖至具有HIS3標記之雙啟動子質體中，以便藉由ADH1啟動子控制Hbd基因之表現，同時藉由TEF1啟動子控制Thl基因之表現(pY3Hd14至17)。將Ald及Adh基因選殖至具有LEU2選擇標記之雙啟動子質體中，以便ADH1啟動子驅動adh基因，且TEF1啟動子驅動ald基因(pY3Hd8)。將PflAB基因或PDH旁路基因(ALD6及acs)選殖至具有URA3標記之雙啟動子質體中，其中藉由ADH1啟動子控制pflA或ALD6，且藉由TEF1啟動子控制pflB或acs。使用冷凍-EZ酵母轉化(Frozen-EZ Yeast Transformation)(Zymo Research)進行酵母轉化。

表3及4展示所測試之質體及實驗條件的組合。

表3

樣品	質體1	質體2	質體3	基因1	基因2	基因3	基因4	基因5	基因6	曝氣	註釋
1	pESC-L	pESC-H								缺氧	EV2
2	pESC-L	pESC-H								23G	EV2
3	d8	d16		1495	1491	28	707			缺氧	BDO
4	d8	d16		1495	1491	28	707			缺氧	BDO
5	d8	d16		1495	1491	28	707			23G	BDO
6	d8	d16		1495	1491	28	707			23G	BDO

7	d8	d17		1495	560	28	707			缺氧	BDO
8	d8	d17		1495	560	28	707			缺氧	BDO
9	d8	d17		1495	560	28	707			23G	BDO
10	d8	d17		1495	560	28	707			23G	BDO
11	pESC-H	pESC-L	pESC-U							缺氧	EV3
12	pESC-H	pESC-L	pESC-U							23G	EV3
13	d8	d16	d1	1495	1491	28	707	pflA	pflB	缺氧	BDO+ pflAB
14	d8	d16	d1	1495	1491	28	707	pflA	pflB	缺氧	BDO + pflAB
15	d8	d16	d1	1495	1491	28	707	pflA	pflB	23G	BDO + pflAB
16	d8	d16	d1	1495	1491	28	707	pflA	pflB	23G	BDO + pflAB
17	d8	d17	d1	1495	560	28	707	pflA	pflB	缺氧	BDO + pflAB
18	d8	d17	d1	1495	560	28	707	pflA	pflB	缺氧	BDO + pflB
19	d8	d17	d1	1495	560	28	707	pflA	pflB	23G	BDO + pflB
20	d8	d17	d1	1495	560	28	707	pflA	pflB	23G	BDO + pflAB
21	d8	d16	d5	1495	1491	28	707	ALD6	acsm	缺氧	BDO + PDH
22	d8	d16	d5	1495	1491	28	707	ALD6	acsm	缺氧	BDO + PDH
23	d8	d16	d5	1495	1491	28	707	ALD6	acsm	23G	BDO + PDH
24	d8	d16	d5	1495	1491	28	707	ALD6	acsm	23G	BDO + PDH
25	d8	d17	d5	1495	560	28	707	ALD6	acsm	缺氧	BDO + PDH
26	d8	d17	d5	1495	560	28	707	ALD6	acsm	缺氧	BDO + PDH
27	d8	d17	d5	1495	560	28	707	ALD6	acsm	23G	BDO + PDH
28	d8	d17	d5	1495	560	28	707	ALD6	acsm	23G	BDO + PDH

表 4

質體1	質體2	質體3	基因1	基因2	基因3	基因4	基因5	基因6	曝氣	註釋
d9	d11								有氧	EVC
d8	d17		1495	560	28	707			有氧	BDO
d8	d17	d5	1495	560	28	707	1849	1845A	有氧	BDO + PDH
d8	d14		1495	1502	28	707			有氧	BDO
d8	d14	d5	1495	1502	28	707	1849	1845A	有氧	BDO + PDH

在表3中，將群落接種於5 ml具有相應胺基酸漏失(dropout)之2%

葡萄糖培養基中，且在30度下培養約48小時。將細胞短暫離心，且再懸浮於2 ml添加有吐溫-80及麥角固醇之新鮮2%葡萄糖培養基中。將再懸浮培養物添加至20 ml瓶中之10 ml新鮮葡萄糖培養基中，獲得0.2之起始OD。就缺氧培養物而言，將含有培養基之瓶抽真空且以氮氣填充。為達成微有氧生長，插入23G針。在30度下在震盪下培育所有培養物24小時。在表4中，在96孔板中進行實驗，且使細胞在1.2 ml具有不同葡萄糖及乙酸濃度(5%葡萄糖，10%葡萄糖，5%葡萄糖+50 mM乙酸，及10%葡萄糖+50 mM乙酸)之培養基中需氧生長。

藉由使用HPX-87H管柱(BioRad)進行HPLC來測定培養物上清液中葡萄糖、1,3-BDO、醇及其他有機酸副產物之濃度。

在存在或不存在pflAB或PDH旁路下測試MI-FAE循環及終止路徑基因。如圖9-11中所示，此等構築體在酵母釀酒酵母BY4741中生產0.3-3.35 mM 1,3-BDO，且在所測試之測試樣品中生產乙醇。PDH旁路(此處，*ALD6*及*acs*或*acsm*基因之過度表現)改良1,3-BDO之生產。

實例XI

1,3-丁二醇路徑酶之酶活性

此實例描述使用活體外分析偵測1,3-BDO路徑酶活性。

在活體外分析中，使用內部酵母菌株作為含有路徑基因之質體構築體的宿主，測試異源酶之活性。使細胞於含有各構築體之適當氨基酸的酵母培養基中需氧生長。為了獲得粗提取物用於活性分析，藉由離心收集細胞。將集結粒再懸浮於0.1 mL含有蛋白酶抑制劑混合物之100 mM Tris pH 7.0緩衝液中。使用珠磨(bead beating) 3分鐘之方法製備溶解物。在珠磨之後，使溶液在4°C下在14,000 rpm下離心(Eppendorf離心機5402) 15分鐘。使用Bradford等人, *Anal. Biochem.* 72:248-254 (1976)之方法測定樣品中之細胞蛋白質，且如下文所述進行特異性酶分析。

硫解酶

硫解酶催化兩個乙醯CoA縮合形成乙醯乙醯CoA。在反應中，釋放輔酶A (CoA)，且游離CoA可使用5,5'-二硫雙-2-硝基苯甲酸(DTNB)偵測到，該酸在與CoA反應時在410 nm下吸光。測試五種硫解酶(參見實例X，表1)。大腸桿菌粗溶解物中之估計比活性展示於圖12中。

在顯示所表現蛋白質之Th1之中，1512及1502對在大腸桿菌粗溶解物中之乙醯CoA縮合活性展現最高比活性。

將1491及560選殖於具有1495之雙啓動子酵母載體中，該1495為3-羥基丁醯CoA脫氫酶(參見圖13)。評估此等硫解酶之乙醯CoA縮合活性，且資料展示於圖13中。結果表明，560及1491均展現初始活性爆發，該爆發太快速以致無法量測。然而，在初始酶速率之後，560之縮合速率大於1491。因此，如粗溶解物中觀測之活性硫解酶活性所指示，在酵母雙啓動子載體的情況下存在蛋白質表現及活性酶。

3-羥基丁醯CoA脫氫酶(Hbd)

藉由3-羥基丁醯CoA脫氫酶將乙醯乙醯CoA代謝為3-羥基丁醯CoA。該反應需要氧化NADH，該氧化可藉由340 nm激發波長及460 nm發射波長下之螢光監測。氧化形式NAD⁺不發螢光。將此偵測策略用於所有脫氫酶步驟。在含有1491(載體id = pY3Hd17)或560(載體id = pY3Hd16)之雙啓動子酵母載體中分析來自拜氏梭菌之Hbd 1495。關於各酶之GenBank鑑別號，參見表1。時程資料展示於圖14中。

含有560之1495的Hbd速率比1491快得多。圖15中提供之結果顯示，Hbd對NADH比對NADPH更偏好。在四種路徑酶之中，Hbd酶似乎在粗溶解物中顯示最快催化活性。Hbd酶(亦即3-酮脂醯CoA還原酶)為優先與NADH輔因子反應之MI-FAE循環或MD-FAE循環酶的實例。

醛脫氫酶(Ald)

醛還原酶將3-羥基丁醯CoA轉化為3-羥基丁醛。此反應需要

NAD(P)H氧化，該氧化可用於監測酶活性。將來自短乳桿菌之Ald(基因ID 707)選殖於含有來自糖乙酸多丁醇梭菌之醇脫氫酶(基因ID 28)的雙載體中。將此兩種酶選殖於含有Leu標記之另一雙啓動子酵母載體中。

粗溶解物之Ald活性資料展示於圖16中，來自大腸桿菌之707溶解物用作標準物。結果表明，707在與來自細菌之溶解物相當的酵母溶解物中顯示酶活性。另外，相對於NADPH，707基因產物較偏好NADH作為輔因子。707基因產物(亦即醯基CoA還原酶(形成醛))為優先與NADH輔因子反應之終止路徑酶的實例。

醇脫氫酶(Adh)

藉由醇脫氫酶(Adh)來形成1,3-BDO，該醇脫氫酶在NAD(P)H存在下還原3-羥基丁醛。可使用NAD(P)H之氧化來監測如上文所述之反應。

ADH(基因28)於具有ALD(基因707)之雙啓動子載體中的評估展示於圖17中，丁醛為3-羥基丁醛之替代受質。資料表明，基因28具有與具有丁醛及NADPH之無插入物對照(EV)相似的Adh活性。此可能由存在於酵母中、可以與28相同之能力起作用的內源ADH酶造成。

總而言之，Thl、Hbd、Ald及Adh之用以生產1,3-BDO的候選物於酵母粗溶解物中對於所構築之雙啓動子載體顯示酶活性。

在整篇本申請案中，已參考各種公開案。此等公開案之揭示內容全文(包括GenBank及GI編號公開案)據此以引用的方式併入本申請案中以更充分描述本發明所屬之技術現狀。雖然已參考上文所提供之實例描述本發明，但應理解在不背離本發明之精神下可進行多種修改。

【符號說明】

無

發明摘要

※ 申請案號：102137265

※ 申請日：102 10 15

※IPC 分類：C12N 15/63 (2006.01)

C12P 7/00 (2006.01)

【發明名稱】

用於生產特定長度脂肪醇及相關化合物之微生物及方法
MICROORGANISMS AND METHODS FOR PRODUCTION OF
SPECIFIC LENGTH FATTY ALCOHOLS AND RELATED
COMPOUNDS

【中文】

本發明提供含有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體，其中該等微生物體選擇性生產特定長度之脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。亦提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸路徑的非天然存在之微生物體，其中該等微生物體進一步包括乙醯CoA路徑。在一些態樣中，本發明之微生物體具有增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之生產的選擇基因破壞或酶衰減。本發明另外提供使用以上微生物體生產脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸之方法。

【英文】

The invention provides non-naturally occurring microbial organisms containing a fatty alcohol, fatty aldehyde or fatty acid pathway, wherein the microbial organisms selectively produce a fatty alcohol, fatty aldehyde or fatty acid of a specified length. Also provided are non-naturally occurring microbial organisms having a fatty alcohol, fatty aldehyde or fatty acid pathway, wherein the microbial organisms further include an acetyl-CoA pathway. In some aspects, the microbial organisms of the invention have select gene disruptions or enzyme attenuations that increase production of fatty alcohols, fatty aldehydes or fatty acids. The invention additionally provides methods of using the above microbial organisms to produce a fatty alcohol, a fatty aldehyde or a fatty acid.

申請專利範圍

1. 一種非天然存在之微生物體，其具有丙二醯CoA非依賴性脂肪醯CoA延長(MI-FAE)循環及/或丙二醯CoA依賴性脂肪醯CoA延長(MD-FAE)循環以及終止路徑，

其中該MI-FAE循環包含一或多種硫解酶、一或多種3-側氧基醯基CoA還原酶、一或多種3-羥基醯基CoA脫水酶及一或多種烯醯CoA還原酶，

其中該MD-FAE循環包含一或多種延長酶、一或多種3-側氧基醯基CoA還原酶、一或多種3-羥基醯基CoA脫水酶及一或多種烯醯CoA還原酶，

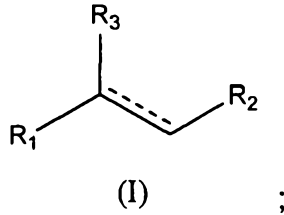
其中該終止路徑包含選自以下之路徑：

- (1) 1H；
- (2) 1K及1L；
- (3) 1E及1N；
- (4) 1K、1J及1N；
- (5) 1E；
- (6) 1K及1J；
- (7) 1H及1N；
- (8) 1K、1L及1N；
- (9) 1E及1F；
- (10) 1K、1J及1F；
- (11) 1H、1N及1F；
- (12) 1K、1L、1N及1F；及
- (13) 1G，

其中1E為醯基CoA還原酶(形成醛)，其中1F為醇脫氫酶，其中

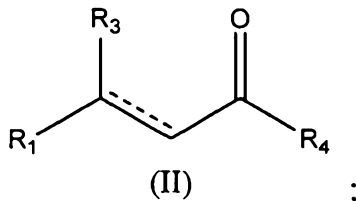
1G為醯基CoA還原酶(形成醇)，其中1H為醯基CoA水解酶、醯基CoA轉移酶或醯基CoA合成酶，其中1J為醯基ACP還原酶，其中1K為醯基CoA:ACP醯基轉移酶，其中1L為硫酯酶，其中1N為醛脫氫酶(形成酸)或羧酸還原酶，

其中該MI-FAE循環、MD-FAE循環或終止路徑之酶由至少一種外源核酸編碼且以足以生產式(I)化合物之量表現：



其中R₁為C₁₋₂₄直鏈烷基；R₂為CH₂OH、CHO或COOH；R₃為H、OH或側氧基(=O)；且-----表示單鍵或雙鍵，其限制條件為R₃連接之碳原子的價數為四，

其中該MI-FAE循環、MD-FAE循環及該終止路徑之該等酶中之每一者的受質獨立地選自式(II)化合物、丙二醯CoA、丙醯CoA或乙醯CoA：



其中R₁為C₁₋₂₄直鏈烷基；R₃為H、OH或側氧基(=O)；R₄為S-CoA、ACP、OH或H；且-----表示單鍵或雙鍵，其限制條件為R₃連接之碳原子的價數為四；

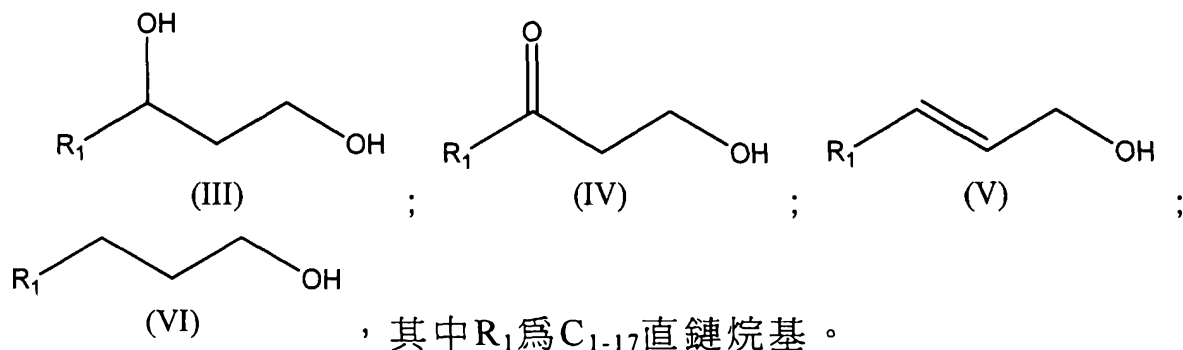
其中該MI-FAE循環之該一或多種酶各自對R₁上之碳原子數目不大於該式(I)化合物之R₁上的碳原子數目之式(II)化合物具有選擇性，

其中該MD-FAE循環之該一或多種酶各自對R₁上之碳原子數目不大於該式(I)化合物之R₁上的碳原子數目之式(II)化合物具有選

擇性，且

其中該終止路徑之該一或多種酶各自對 R_1 上之碳原子數目不小於該式(I)化合物之 R_1 上的碳原子數目之式(II)化合物具有選擇性。

2. 如請求項1之非天然存在之微生物體，其中 R_1 為 C_{1-17} 直鏈烷基。
3. 如請求項2之非天然存在之微生物體，其中 R_1 為 C_9 直鏈烷基、 C_{10} 直鏈烷基、 C_{11} 直鏈烷基、 C_{12} 直鏈烷基或 C_{13} 直鏈烷基。
4. 如請求項1之非天然存在之微生物體，其中該微生物體包含兩種、三種或四種各自編碼該MI-FAE循環或該MD-FAE循環之酶的外源核酸。
5. 如請求項1之非天然存在之微生物體，其中該微生物體包含兩種、三種或四種各自編碼該終止路徑之酶的外源核酸。
6. 如請求項3之非天然存在之微生物體，其中該微生物體包含編碼選自(1)-(13)之路徑中之至少一者的酶中之每一者之外源核酸。
7. 如請求項1之非天然存在之微生物體，其中該至少一種外源核酸為異源核酸。
8. 如請求項1之非天然存在之微生物體，其中該非天然存在之微生物體在實質上缺氧培養基中。
9. 如請求項1之非天然存在之微生物體，其中該MI-FAE循環、MD-FAE循環或終止路徑之該酶以足以生產選自式(III)-(VI)之化合物的量表現：



10. 如請求項9之非天然存在之微生物體，其中R₁為C₉直鏈烷基、C₁₀直鏈烷基、C₁₁直鏈烷基、C₁₂直鏈烷基或C₁₃直鏈烷基。
11. 如請求項1之非天然存在之微生物體，其中該微生物體進一步包含乙醯CoA路徑及至少一種編碼乙醯CoA路徑酶之外源核酸，該乙醯CoA路徑酶以足以生產乙醯CoA之量表現，其中該乙醯CoA路徑包含選自以下之路徑：
 - (1) 2A及2B；
 - (2) 2A、2C及2D；
 - (3) 2H；
 - (4) 2G及2D；
 - (5) 2E、2F及2B；
 - (6) 2E及2I；
 - (7) 2J、2F及2B；
 - (8) 2J及2I；
 - (9) 3A、3B及3C；
 - (10) 3A、3B、3J、3K及3D；
 - (11) 3A、3B、3G及3D；
 - (12) 3A、3F及3D；
 - (13) 3N、3H、3B及3C；
 - (14) 3N、3H、3B、3J、3K及3D；
 - (15) 3N、3H、3B、3G及3D；
 - (16) 3N、3H、3F及3D；
 - (17) 3L、3M、3B及3C；
 - (18) 3L、3M、3B、3J、3K及3D；
 - (19) 3L、3M、3B、3G及3D；
 - (20) 3L、3M、3F及3D；

- (21) 4A、4B、4D、4H、4I及4J；
- (22) 4A、4B、4E、4F、4H、4I及4J；
- (23) 4A、4B、4E、4K、4L、4H、4I及4J；
- (24) 4A、4C、4D、4H及4J；
- (25) 4A、4C、4E、4F、4H及4J；
- (26) 4A、4C、4E、4K、4L、4H及4J；
- (27) 5A、5B、5D及5G；
- (28) 5A、5B、5E、5F及5G；
- (29) 5A、5B、5E、5K、5L及5G；
- (30) 5A、5C及5D；
- (31) 5A、5C、5E及5F；及
- (32) 5A、5C、5E、5K及5L，

其中2A為丙酮酸氧化酶(形成乙酸)，其中2B為乙醯CoA合成酶、乙醯CoA連接酶或乙醯CoA轉移酶，其中2C為乙酸激酶，其中2D為磷酸轉乙醯酶，其中2E為丙酮酸脫羧酶，其中2F為乙醛脫氫酶，其中2G為丙酮酸氧化酶(形成乙醯磷酸)，其中2H為丙酮酸脫氫酶、丙酮酸:鐵氧化還原蛋白氧化還原酶、丙酮酸:NAD(P)H氧化還原酶或丙酮酸甲酸裂解酶，其中2I為乙醛脫氫酶(醯化)，其中2J為蘇胺酸醛縮酶，其中3A為磷酸烯醇丙酮酸(PEP)羧化酶或PEP羧激酶，其中3B為草醯乙酸脫羧酶，其中3C為丙二酸半醛脫氫酶(乙醯化)，其中3D為乙醯CoA羧化酶或丙二醯CoA脫羧酶，其中3E為草醯乙酸脫羧酶，其中3F為草醯乙酸脫氫酶或草醯乙酸氧化還原酶，其中3G為丙二酸半醛脫氫酶(醯化)，其中3H為丙酮酸羧化酶，其中3I為丙酮酸羧化酶，其中3J為丙二酸半醛脫氫酶，其中3K為丙二醯CoA合成酶或丙二醯CoA轉移酶，其中3L為蘋果酸酶，其中3M為蘋果酸脫氫酶或蘋果酸氧化還原酶，其中3N為丙酮酸激酶或PEP磷酸酶，其

中4A為檸檬酸合成酶，其中4B為檸檬酸轉運體，其中4C為檸檬酸/蘋果酸轉運體，其中4D為ATP檸檬酸裂解酶，其中4E為檸檬酸裂解酶，其中4F為乙醯CoA合成酶或乙醯CoA轉移酶，其中4H為細胞溶質蘋果酸脫氫酶，其中4I為蘋果酸轉運體，其中4J為粒線體蘋果酸脫氫酶，其中4K為乙酸激酶，其中4L為磷酸轉乙醯酶，其中5A為檸檬酸合成酶，其中5B為檸檬酸轉運體，其中5C為檸檬酸/草醯乙酸轉運體，其中5D為ATP檸檬酸裂解酶，其中5E為檸檬酸裂解酶，其中5F為乙醯CoA合成酶或乙醯CoA轉移酶，其中5G為草醯乙酸轉運體，其中5K為乙酸激酶，並且其中5L為磷酸轉乙醯酶。

12. 如請求項11之非天然存在之微生物體，其中該微生物體包含兩種、三種、四種、五種、六種、七種或八種各自編碼乙醯CoA路徑酶之外源核酸。
13. 如請求項12之非天然存在之微生物體，其中該微生物體包含編碼選自(1)-(32)之路徑中之至少一者的乙醯CoA路徑酶中之每一者之外源核酸。
14. 如請求項1之非天然存在之微生物體，其進一步包含一或多個基因破壞，該一或多個基因破壞在編碼參與以下之蛋白質或酶的內源基因中出現：由該微生物體天然生產乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、CO₂、脂肪酸或丙二醯CoA；路徑中間物向除細胞溶質以外之細胞區室轉移；或由該微生物體天然降解MI-FAE循環中間物、MD-FAE循環中間物或終止路徑中間物，其中該一或多個基因破壞使得該微生物體中該式(I)化合物之生產增加。
15. 如請求項14之非天然存在之微生物體，其中該蛋白質或酶係選自由以下組成之群：脂肪酸合成酶、乙醯CoA羧化酶、生物素：脫輔基酶連接酶、醯基載體蛋白、硫酯酶、醯基轉移酶、ACP丙

二醯轉移酶、脂肪酸延長酶、醯基CoA合成酶、醯基CoA轉移酶、醯基CoA水解酶、丙酮酸脫羧酶、乳酸脫氫酶、醇脫氫酶、形成酸之醛脫氫酶、乙酸激酶、磷酸轉乙醯酶、丙酮酸氧化酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、粒線體丙酮酸載體、過氧化體脂肪酸轉運體、過氧化體醯基CoA轉運體、過氧化體肉鹼/醯肉鹼轉移酶、醯基CoA氧化酶及醯基CoA結合蛋白。

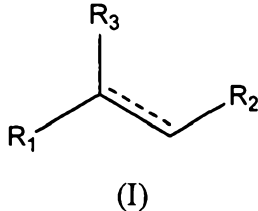
16. 如請求項1之非天然存在之微生物體，其中該MI-FAE循環、MD-FAE循環或該終止路徑之一或多種酶優先與NADH輔因子反應或就與NAD(P)H輔因子反應而言具有減少之優先性，其中該MI-FAE循環或MD-FAE循環之該一或多種酶為3-酮脂醯CoA還原酶或烯醯CoA還原酶，且其中該終止路徑之該一或多種酶係選自醯基CoA還原酶(形成醛)、醇脫氫酶、醯基CoA還原酶(形成醇)、醛脫羧基酶、醯基ACP還原酶、醛脫氫酶(形成酸)及羧酸還原酶。
17. 如請求項1之非天然存在之微生物體，其進一步包含一或多個基因破壞，該一或多個基因破壞在編碼蛋白質或酶之基因中出現，該等蛋白質或酶導致存在於該微生物體之細胞溶質中之NAD(P)H與NAD(P)比率在該等破壞之後增加。
18. 如請求項17之非天然存在之微生物體，其中該編碼導致存在於該微生物體之細胞溶質中之NAD(P)H與NAD(P)比率在該等破壞之後增加的蛋白質或酶之基因係選自由以下組成之群：NADH脫氫酶、細胞色素氧化酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、醇脫氫酶、丙酮酸脫羧酶、醛脫氫酶(形成酸)、乳酸脫氫酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸:醌氧化還原酶、蘋果酸酶及蘋果酸脫氫酶。
19. 如請求項14或17之非天然存在之生物體，其中該一或多個基因

破壞包含該一或多種基因之缺失。

20. 如請求項1之非天然存在之微生物體，其中該微生物體為克拉布特里(Crabtree)陽性且在包含過量葡萄糖之培養基中，從而增加存在於該微生物體之細胞溶質中之NAD(P)H與NAD(P)比率。
21. 如請求項1之非天然存在之微生物體，其進一步包含至少一種編碼該式(I)化合物之細胞外轉運體或細胞外轉運系統的外源核酸。
22. 如請求項1之非天然存在之微生物體，其中一或多種參與以下之內源酶具有衰減之酶活性或表現水準：由該微生物體天然生產乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、CO₂、脂肪酸或丙二醯CoA；路徑中間物向除細胞溶質以外之細胞區室轉移；或由該微生物體天然降解MI-FAE循環中間物、MD-FAE循環中間物或終止路徑中間物。
23. 如請求項22之非天然存在之微生物體，其中該酶係選自由以下組成之群：脂肪酸合成酶、乙醯CoA羧化酶、生物素:脫輔基酶連接酶、硫酸酯酶、醯基載體蛋白、硫酸酯酶、醯基轉移酶、ACP丙二醯轉移酶、脂肪酸延長酶、醯基CoA合成酶、醯基CoA轉移酶、醯基CoA水解酶、丙酮酸脫羧酶、乳酸脫氫酶、短鏈醇脫氫酶、形成酸之醛脫氫酶、乙酸激酶、磷酸轉乙醯酶、丙酮酸氧化酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、粒線體丙酮酸載體、過氧化體脂肪酸轉運體、過氧化體醯基CoA轉運體、過氧化體肉鹼/醯肉鹼轉移酶、醯基CoA氧化酶及醯基CoA結合蛋白。
24. 如請求項1之非天然存在之微生物體，其中一或多種參與NAD(P)H或NADH之氧化的內源酶具有衰減之酶活性或表現水準。
25. 如請求項24之非天然存在之微生物體，其中該一或多種內源酶

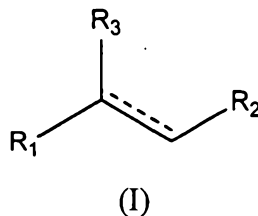
係選自由以下組成之群：NADH脫氫酶、細胞色素氧化酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、醇脫氫酶、丙酮酸脫羧酶、醛脫氫酶(形成酸)、乳酸脫氫酶、甘油-3-磷酸脫氫酶、甘油-3-磷酸:醌氧化還原酶、蘋果酸酶及蘋果酸脫氫酶。

26. 一種生產式(I)化合物之方法，



其中 R_1 為 C_{1-24} 直鏈烷基； R_2 為 CH_2OH 、 CHO 或 $COOH$ ； R_3 為 H 、 OH 或側氧基(=O)；且 $-----$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為 R_3 連接之碳原子的價數為四，其包含在生產該式(I)化合物之條件下且持續充足時間段培養如請求項1至25中任一項之非天然存在之微生物體。

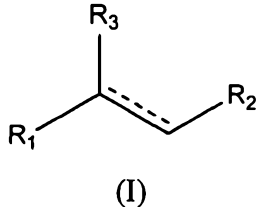
27. 如請求項26之方法，其中該方法進一步包含在培養物中將該式(I)化合物與其他組分分離。
28. 如請求項27之方法，其中該分離包含萃取、連續液-液萃取、滲透蒸發、膜過濾、膜分離、逆滲透、電滲析、蒸餾、結晶、離心、萃取過濾、離子交換層析、吸附層析或超濾。
29. 一種培養基，其包含生物衍生之式(I)化合物：



其中 R_1 為 C_{1-24} 直鏈烷基； R_2 為 CH_2OH 、 CHO 或 $COOH$ ； R_3 為 H 、 OH 或側氧基(=O)；且 $-----$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為 R_3 連接之碳原子的價數為四，其中該生物衍生之化合物具有反映大氣二氧化碳攝取源之碳-12、碳-13及碳-14同位素比率。

30. 如請求項29之培養基，其中該培養基與具有丙二醯CoA非依賴性脂肪醯CoA延長(MI-FAE)循環及/或丙二醯CoA依賴性脂肪醯CoA延長(MD-FAE)循環以及終止路徑的非天然存在之微生物體分離。

31. 一種生物衍生之式(I)化合物，



其中 R_1 為 C_{1-24} 直鏈烷基； R_2 為 CH_2OH 、 CHO 或 $COOH$ ； R_3 為 H 、 OH 或側氧基($=O$)；且 $-----$ 表示單鍵或雙鍵，其限制條件為 R_3 連接之碳原子的價數為四，其具有反映大氣二氧化碳攝取源之碳-12、碳-13及碳-14同位素比率。

32. 如請求項31之生物衍生之化合物，其中該生物衍生之化合物具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%之Fm值。

33. 一種生物衍生之化合物，其根據如請求項26至28中任一項之方法生產。

34. 一種組合物，其包含如請求項31至33中任一項之該生物衍生之化合物；及除該生物衍生之化合物以外之化合物。

35. 如請求項34之組合物，其中除該生物衍生之化合物以外之該化合物為具有丙二醯CoA非依賴性脂肪醯CoA延長(MI-FAE)循環及/或丙二醯CoA依賴性脂肪醯CoA延長(MD-FAE)循環以及終止路徑的非天然存在之微生物體之痕量細胞部分。

36. 一種組合物，其包含如請求項31至33中任一項之生物衍生之化合物或其細胞溶解物或培養物上清液。

37. 一種生物性產物，其包含如請求項31至33中任一項之該生物衍

生之化合物，其中該生物性產物為生物燃料、化學品、聚合物、界面活性劑、皂、清潔劑、洗髮精、潤滑油添加劑、芳香劑、調味物質或丙烯酸酯。

38. 如請求項37之生物性產物，其包含至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%或至少50%該生物衍生之化合物。
39. 如請求項37或38之生物性產物，其中該生物性產物包含該生物衍生之化合物之一部分作為重複單元。
40. 一種模製產物，其藉由模製如請求項37至39中任一項之生物性產物而獲得，生物性產物為聚合物。
41. 一種生產如請求項37至39中任一項之生物性產物之方法，其包含使該生物衍生之化合物在生產該生物性產物之反應中與自身或另一化合物發生化學反應。

圖式

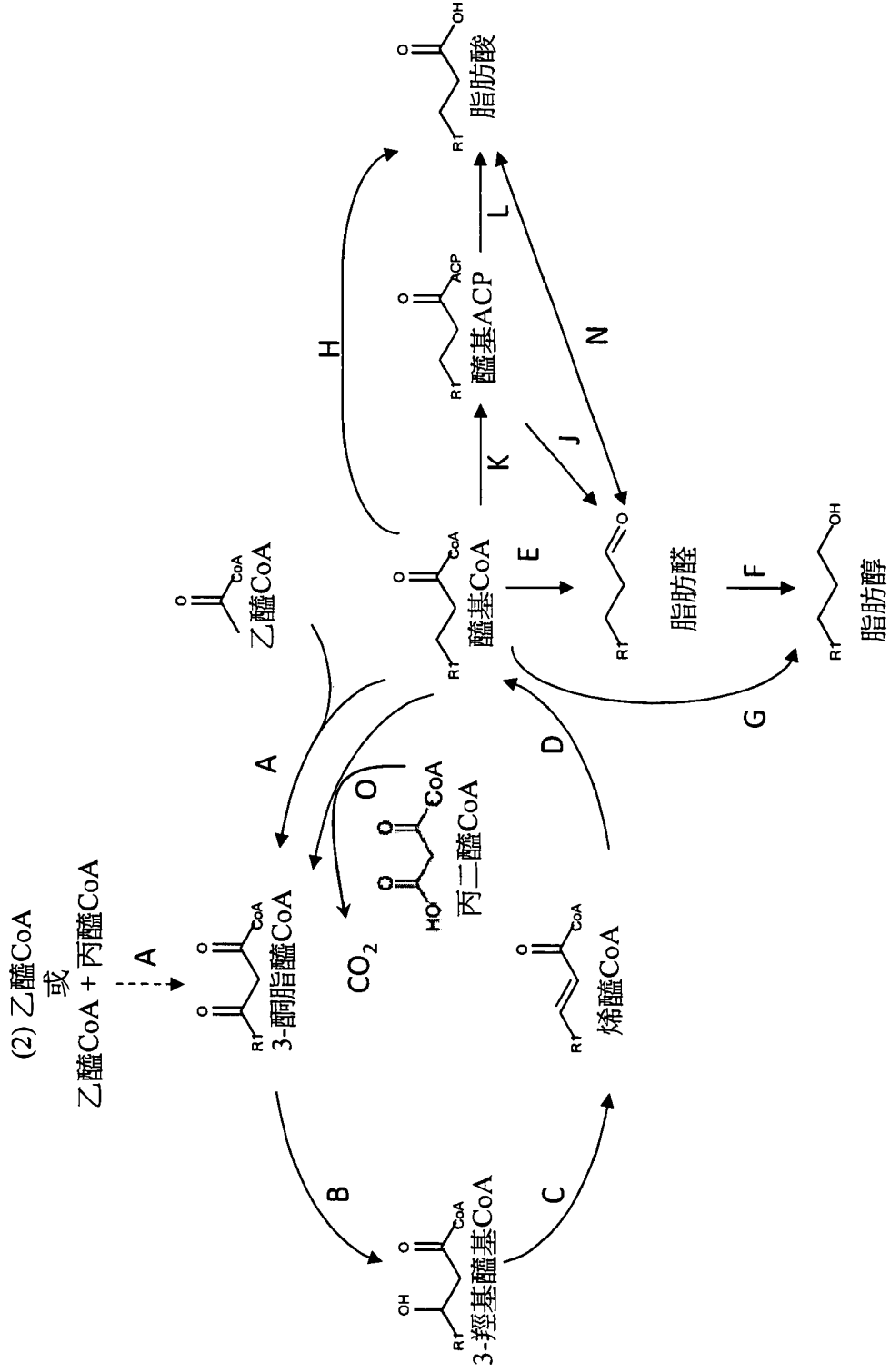


圖1

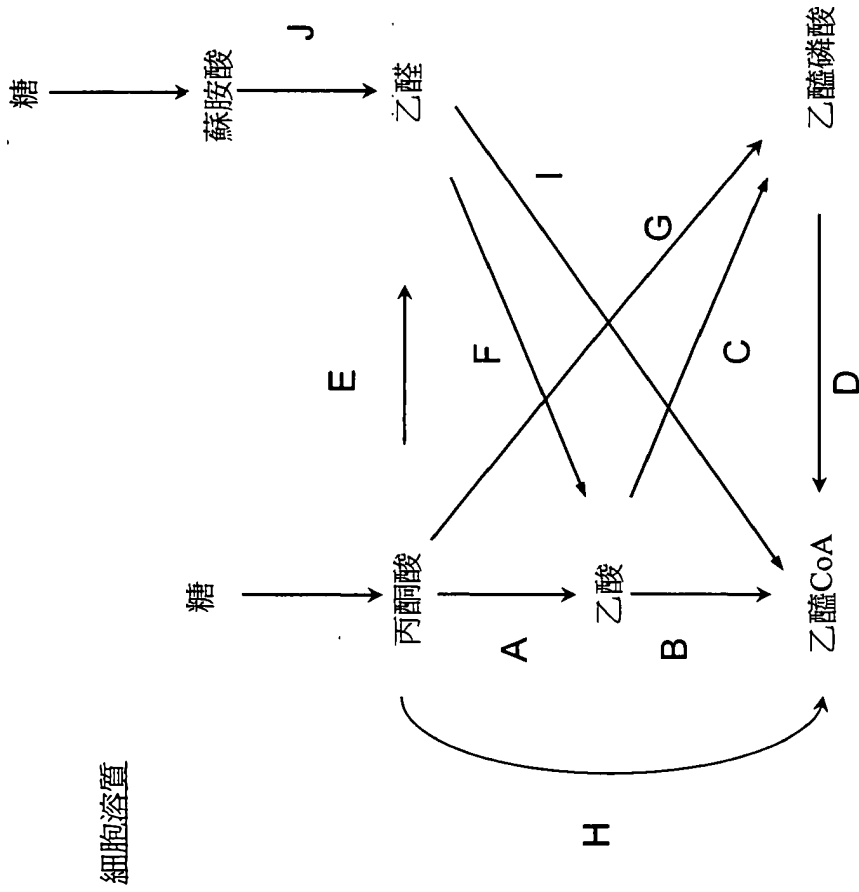


圖2

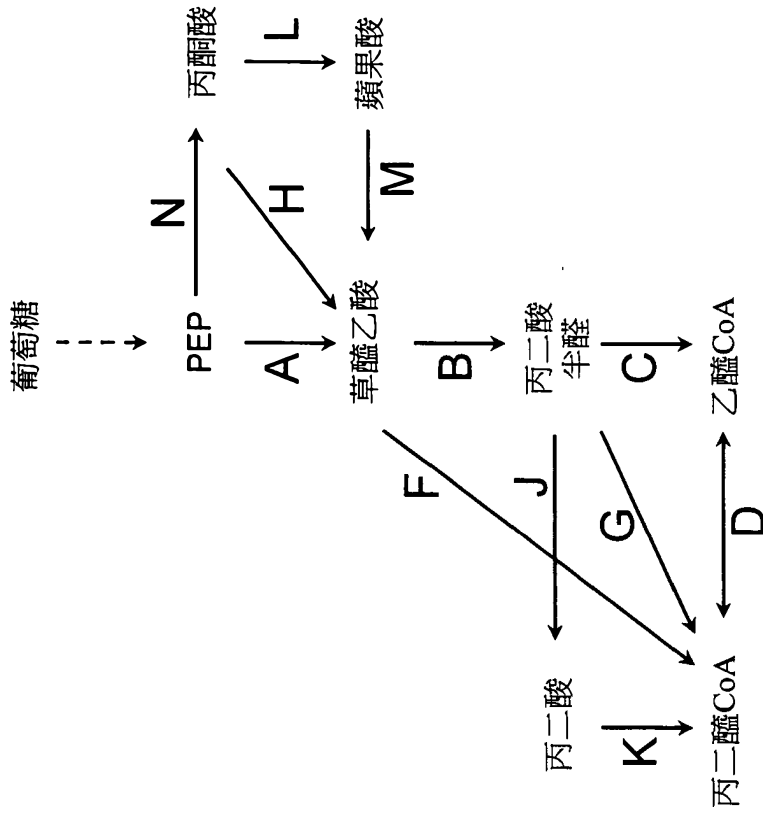


圖3

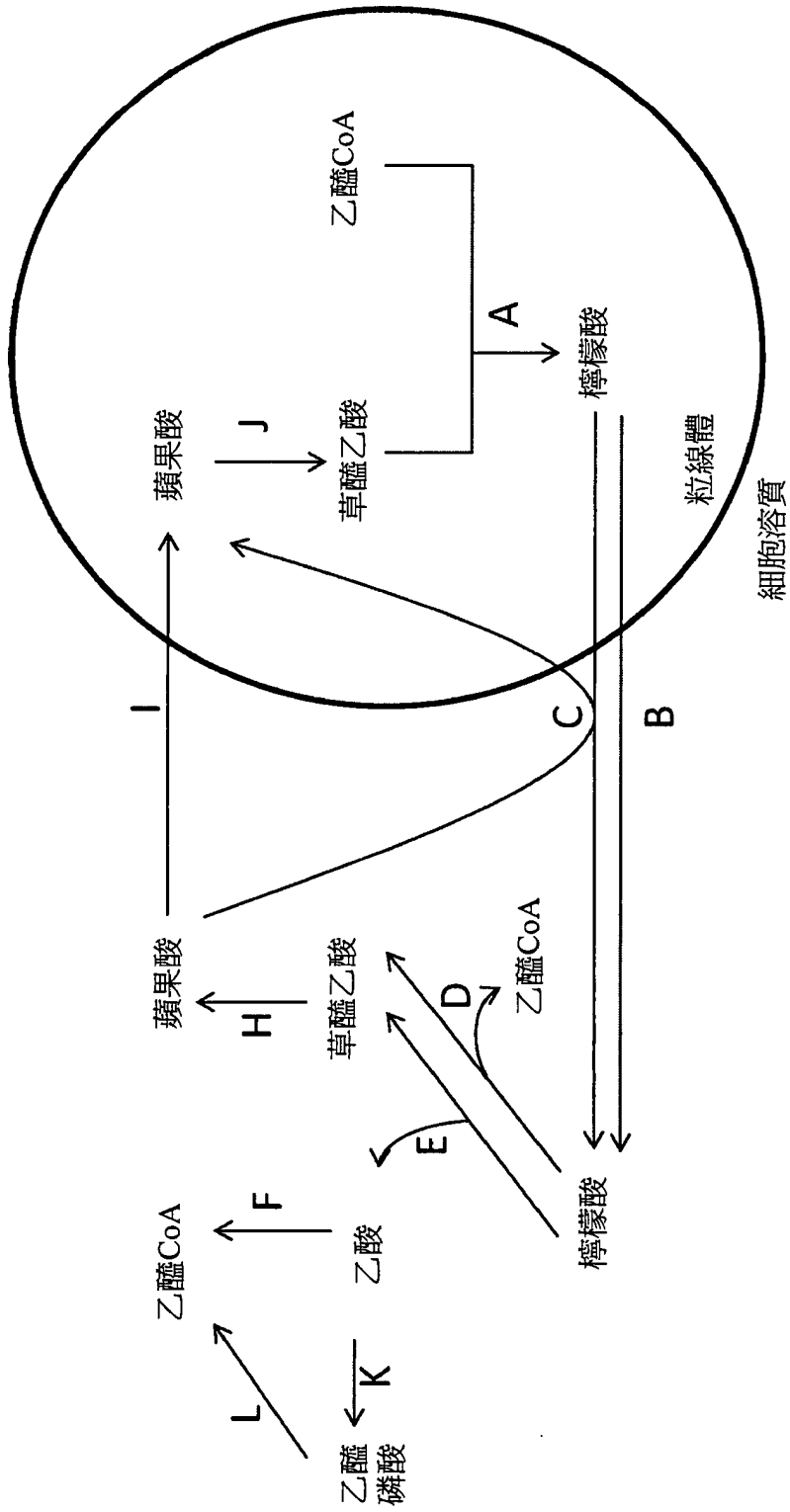


圖4

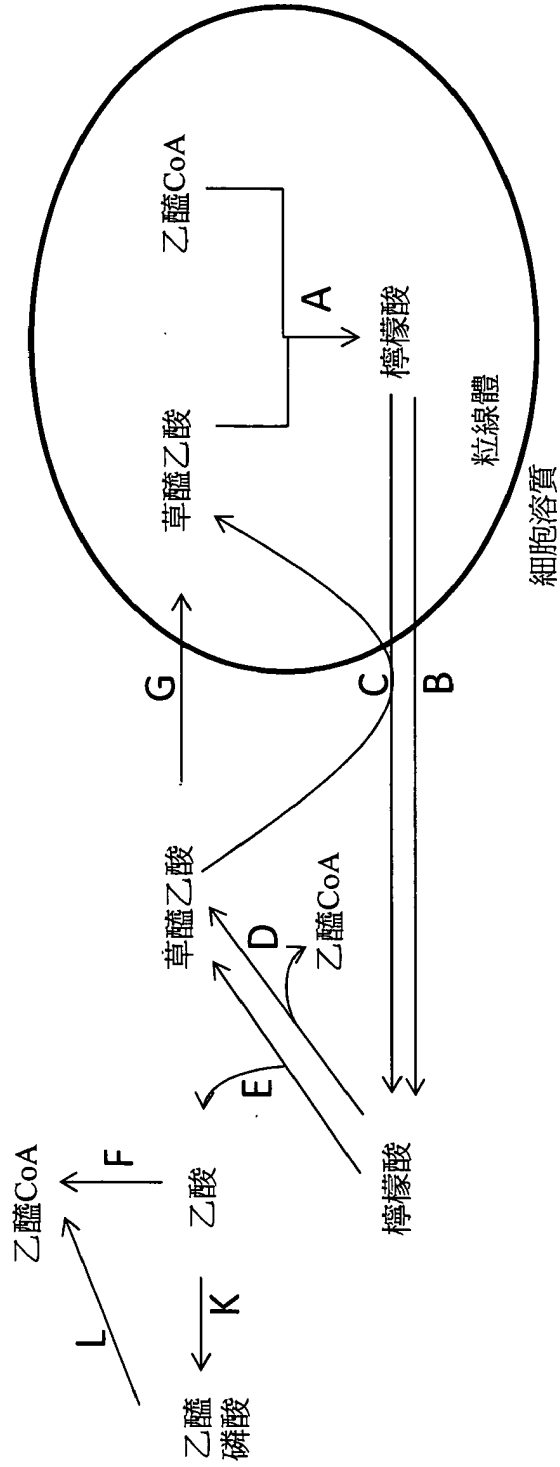


圖5

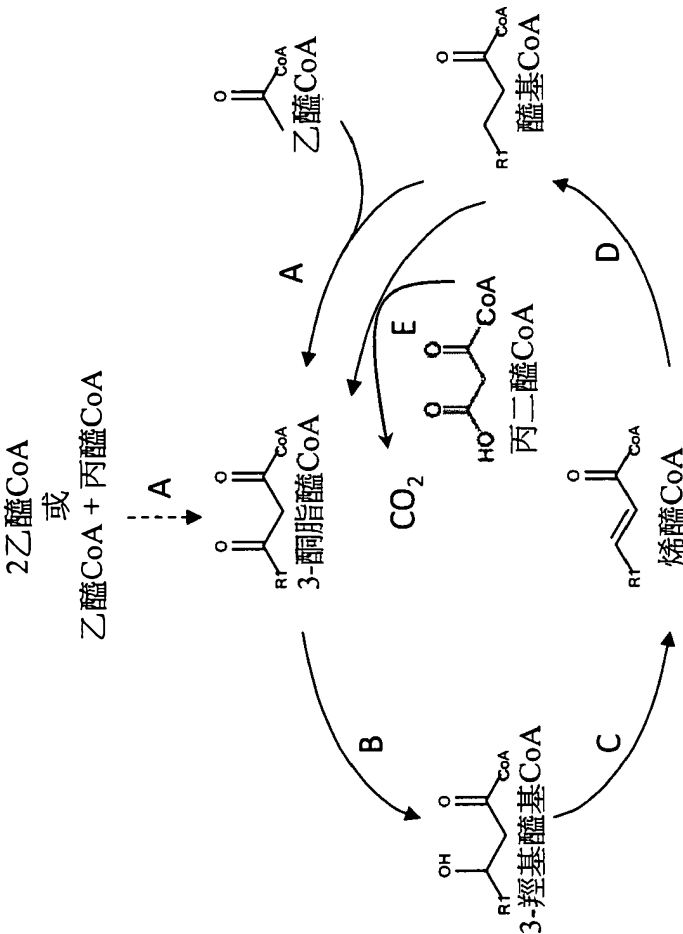


圖6



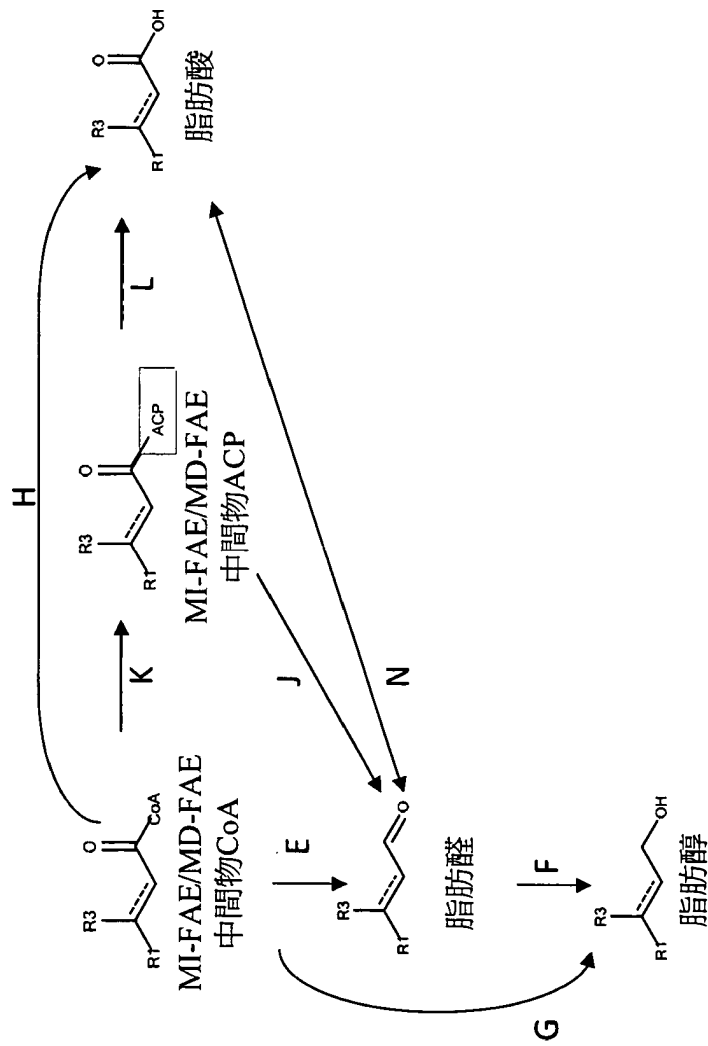


圖7

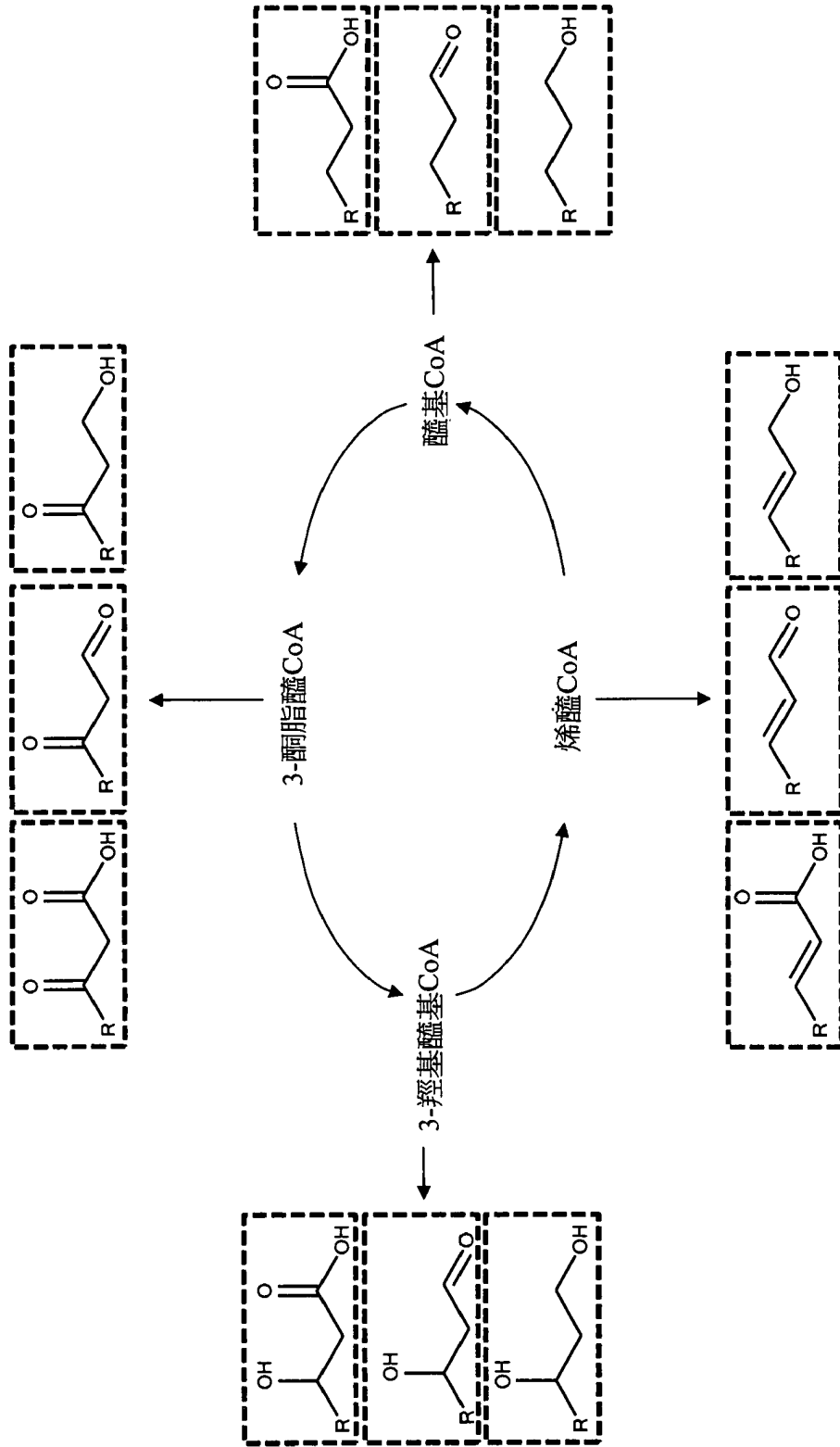


圖8

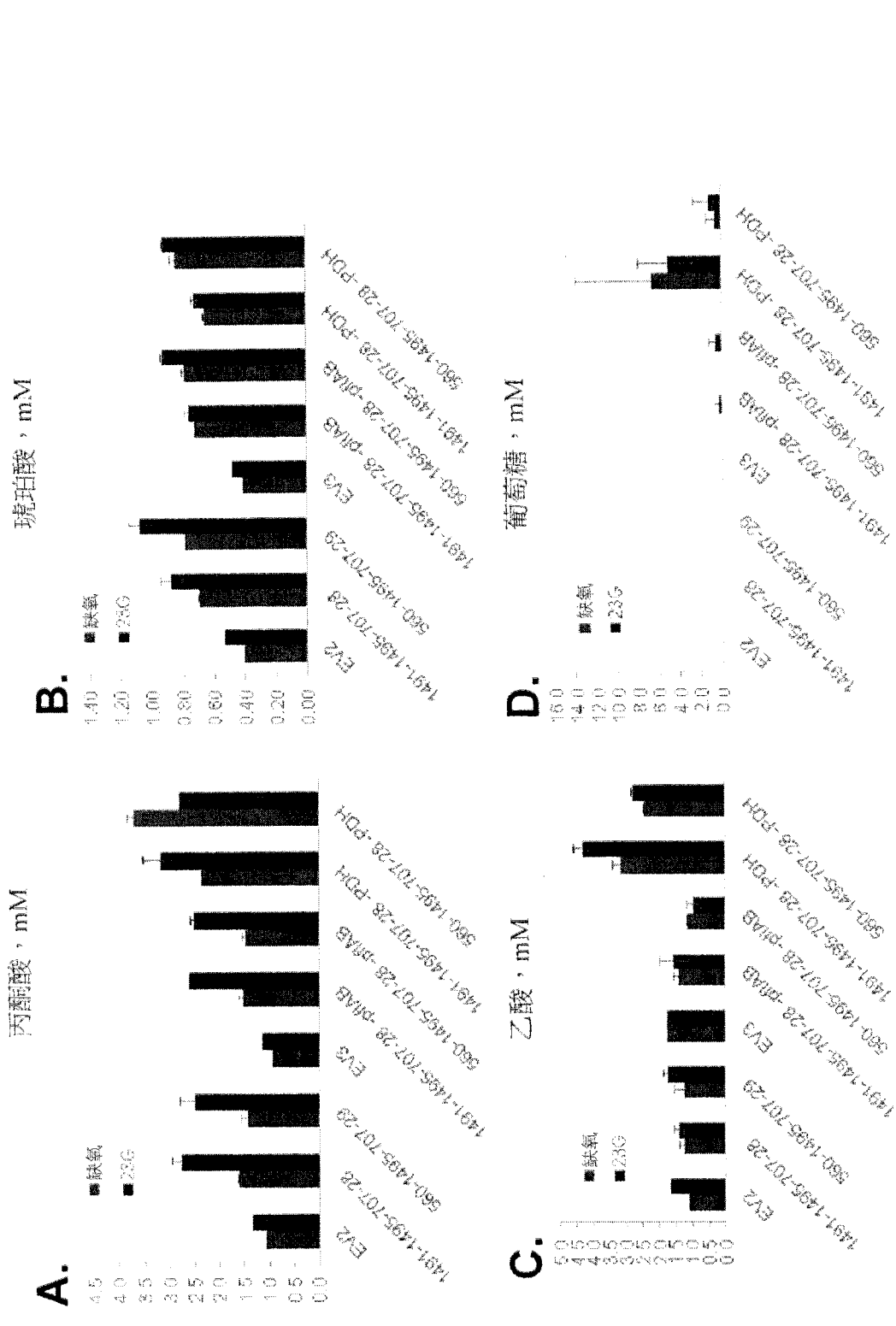


圖10

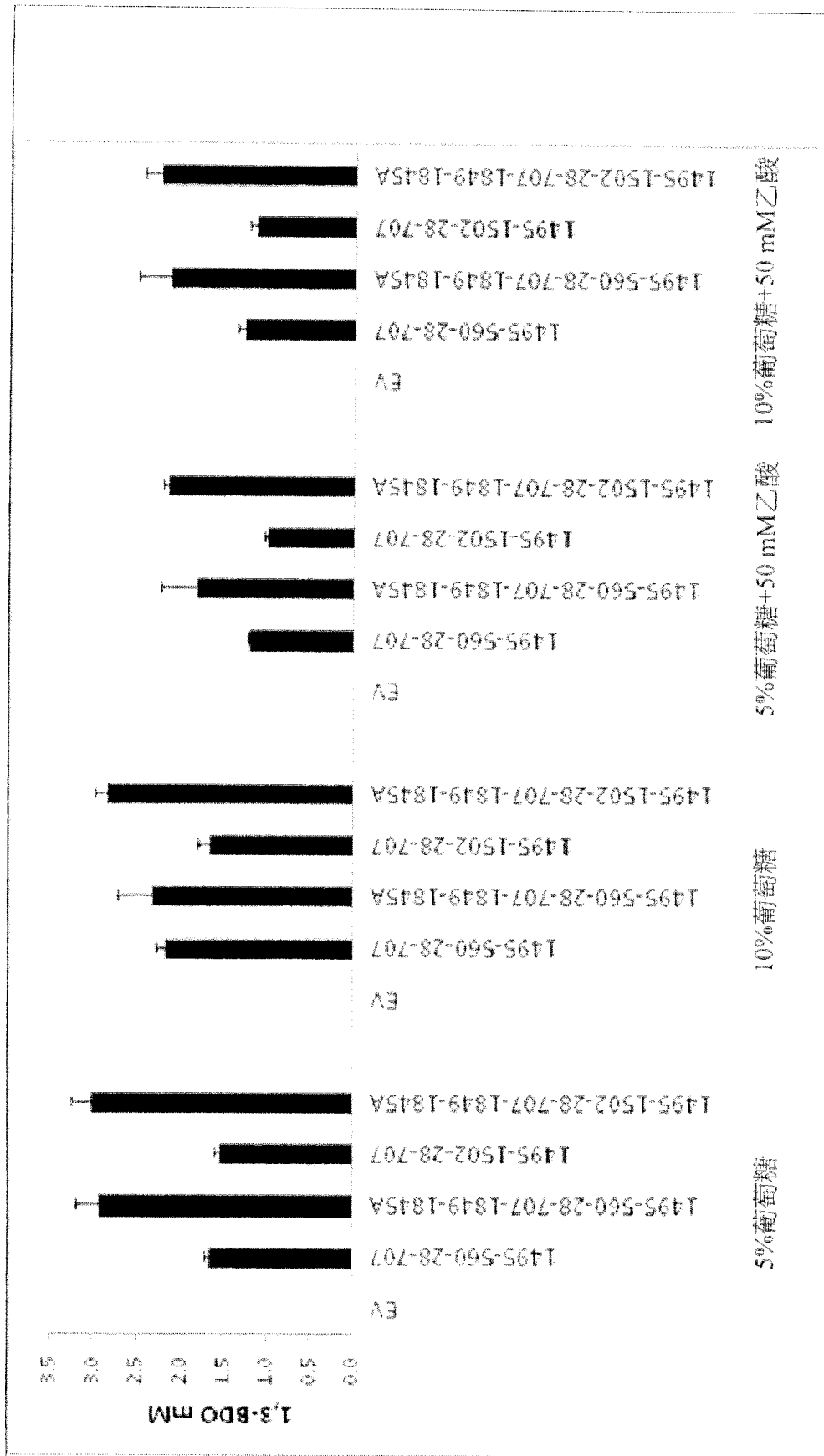


圖 11

估計比活性

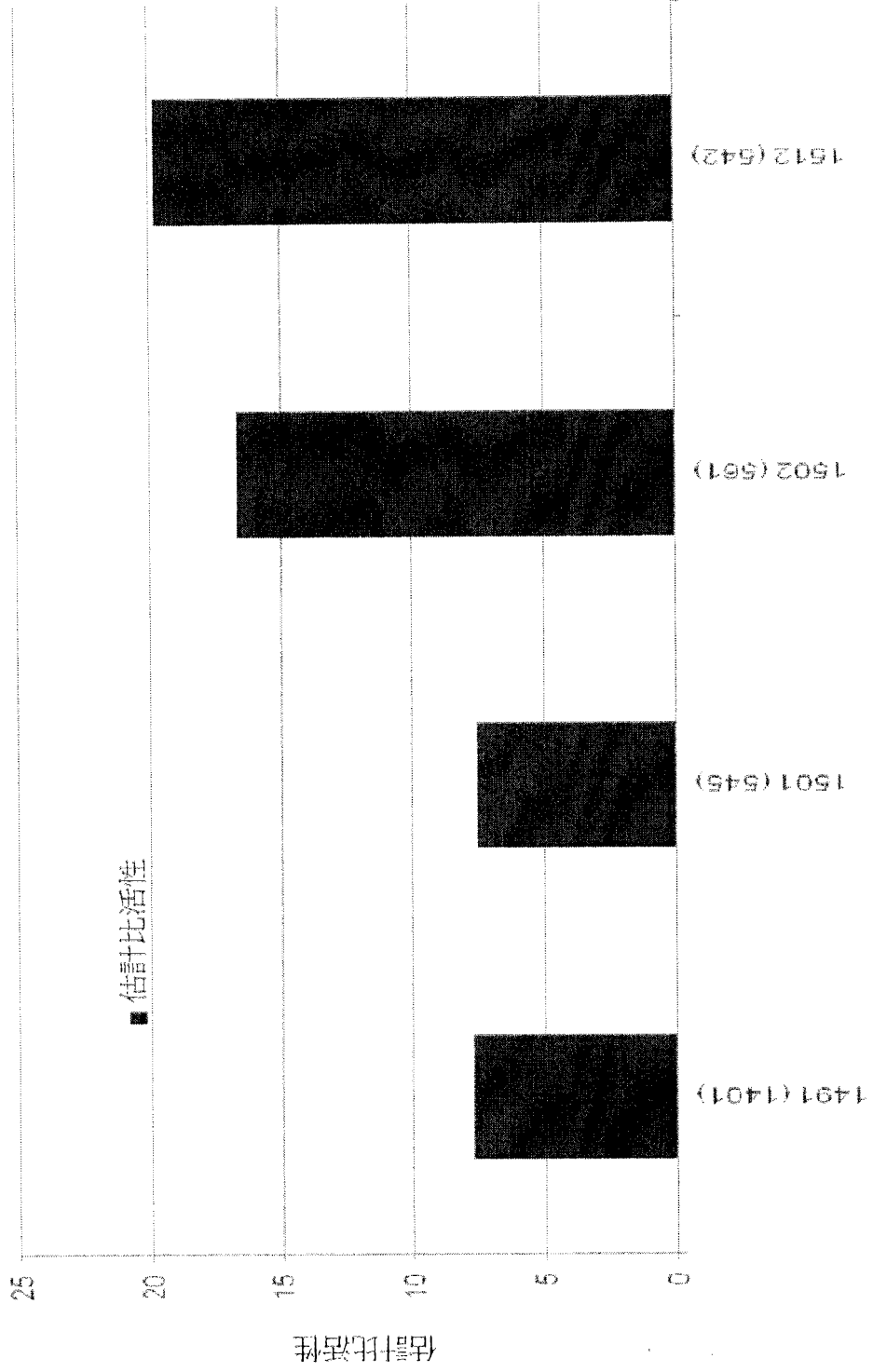
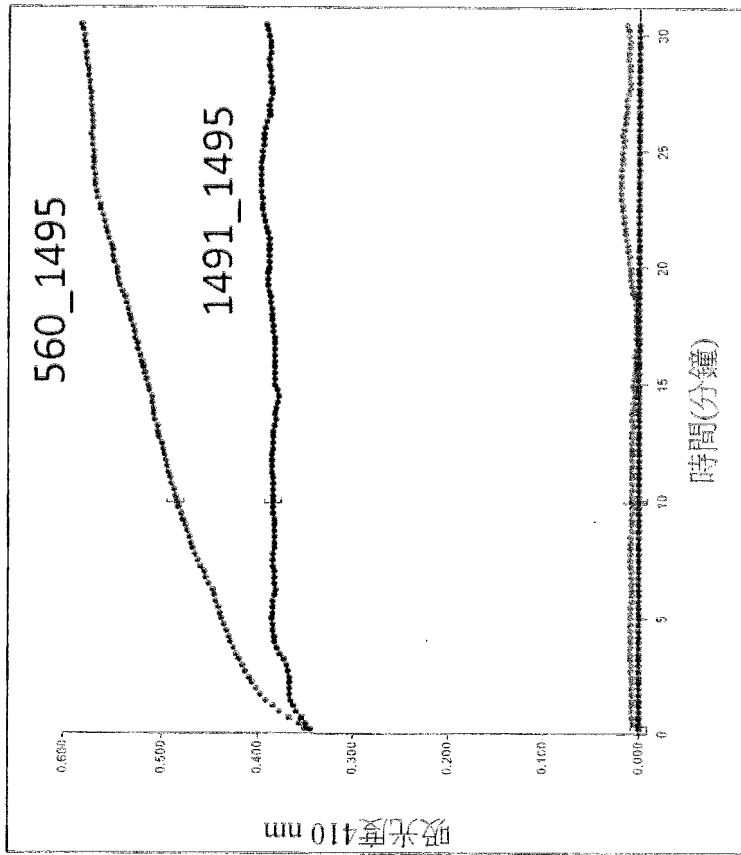


圖12

A.



B.

560 = 丙酮丁醇梭菌Thi
 1491 = 大腸桿菌AtoB
 1495 = 拜氏梭菌Hbd

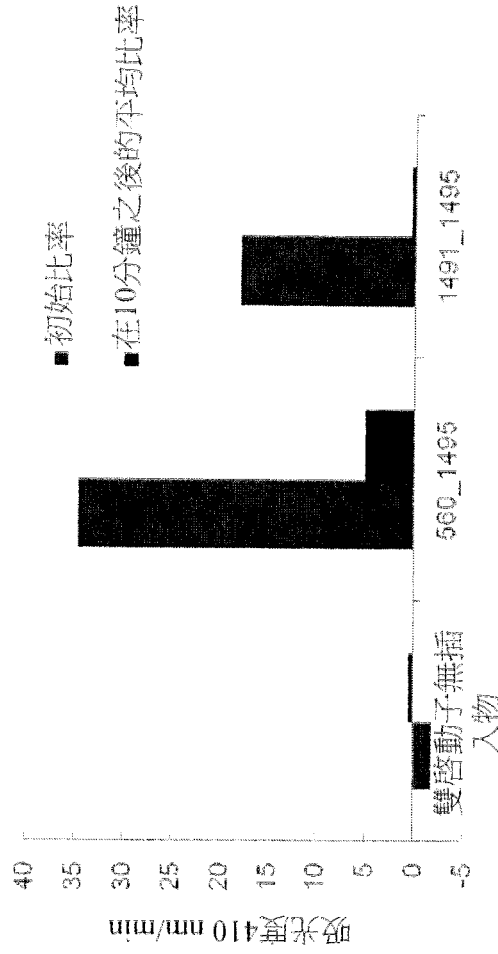


圖13

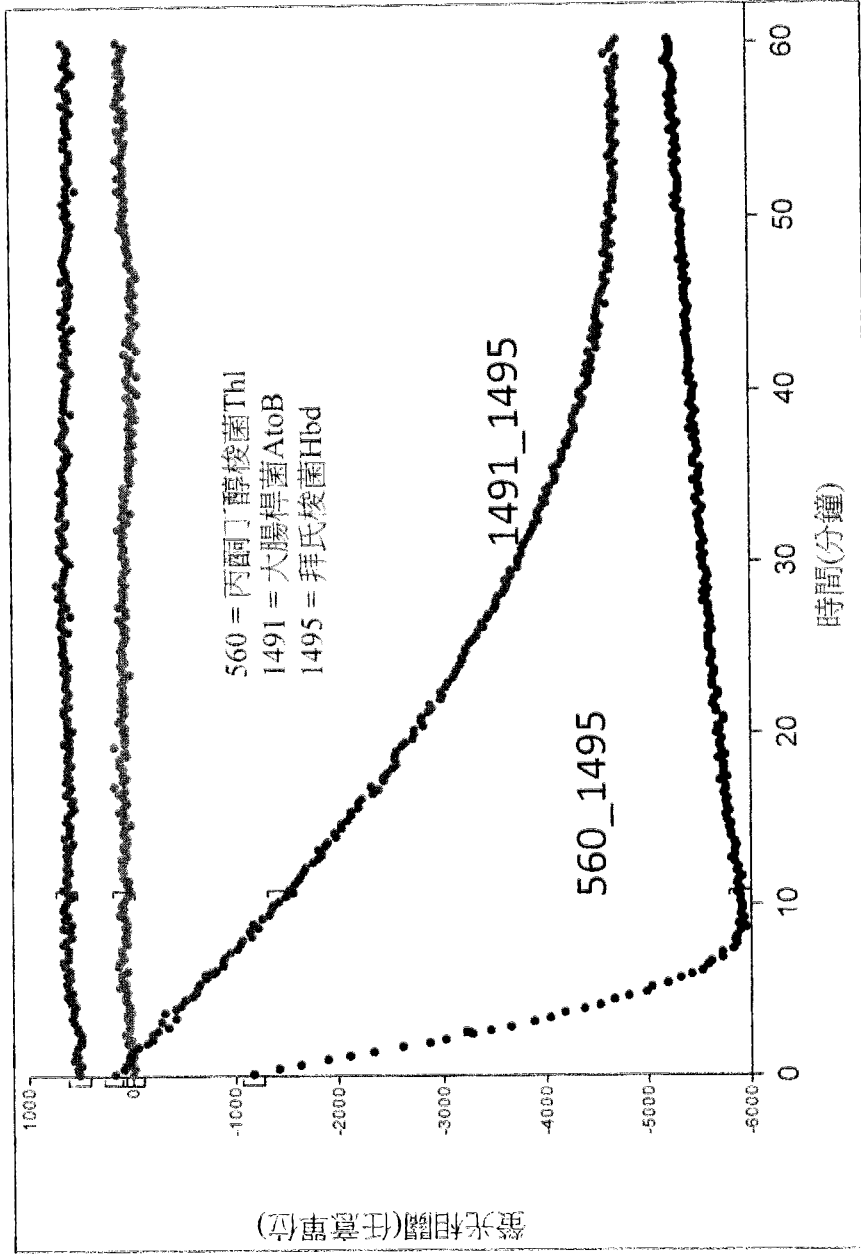


圖14

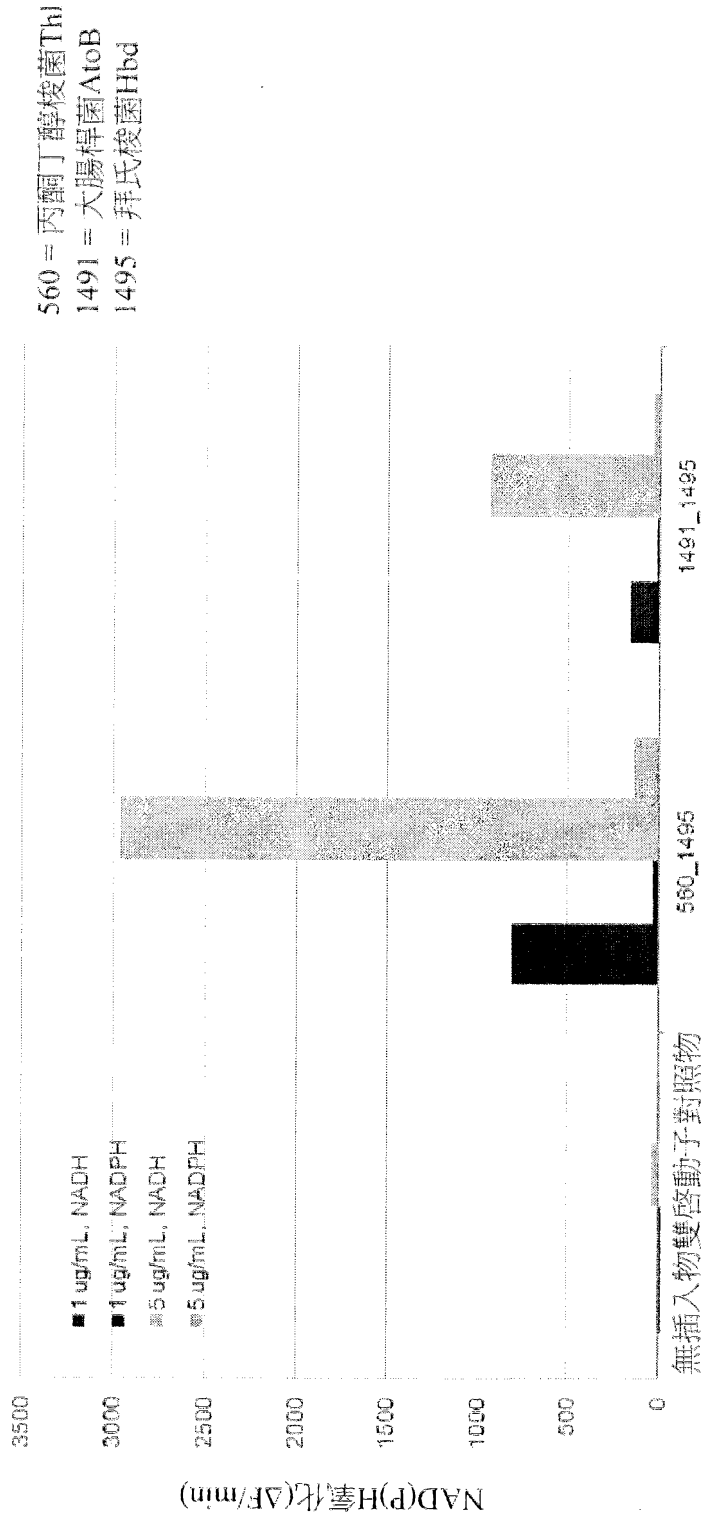


圖15

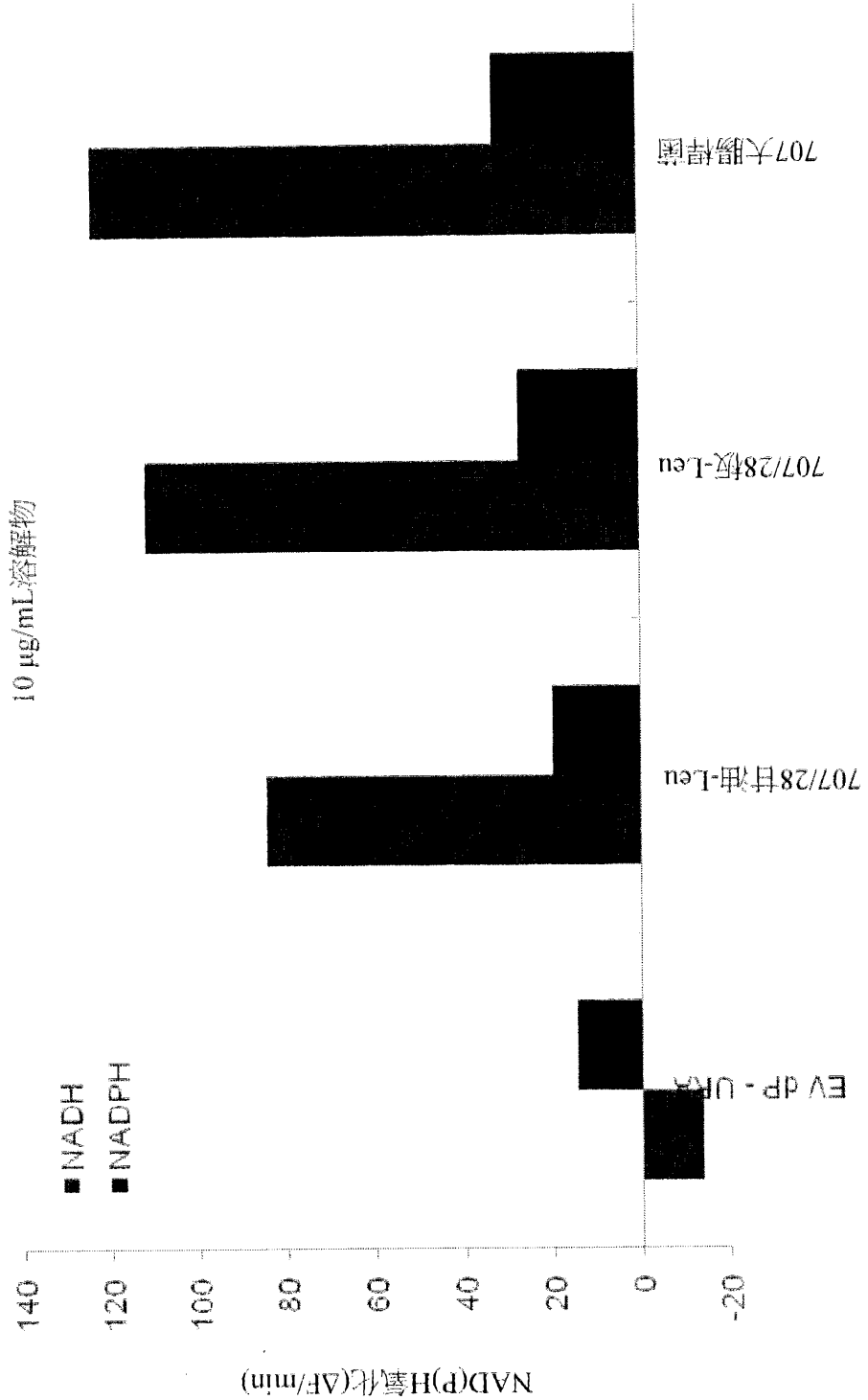


圖16



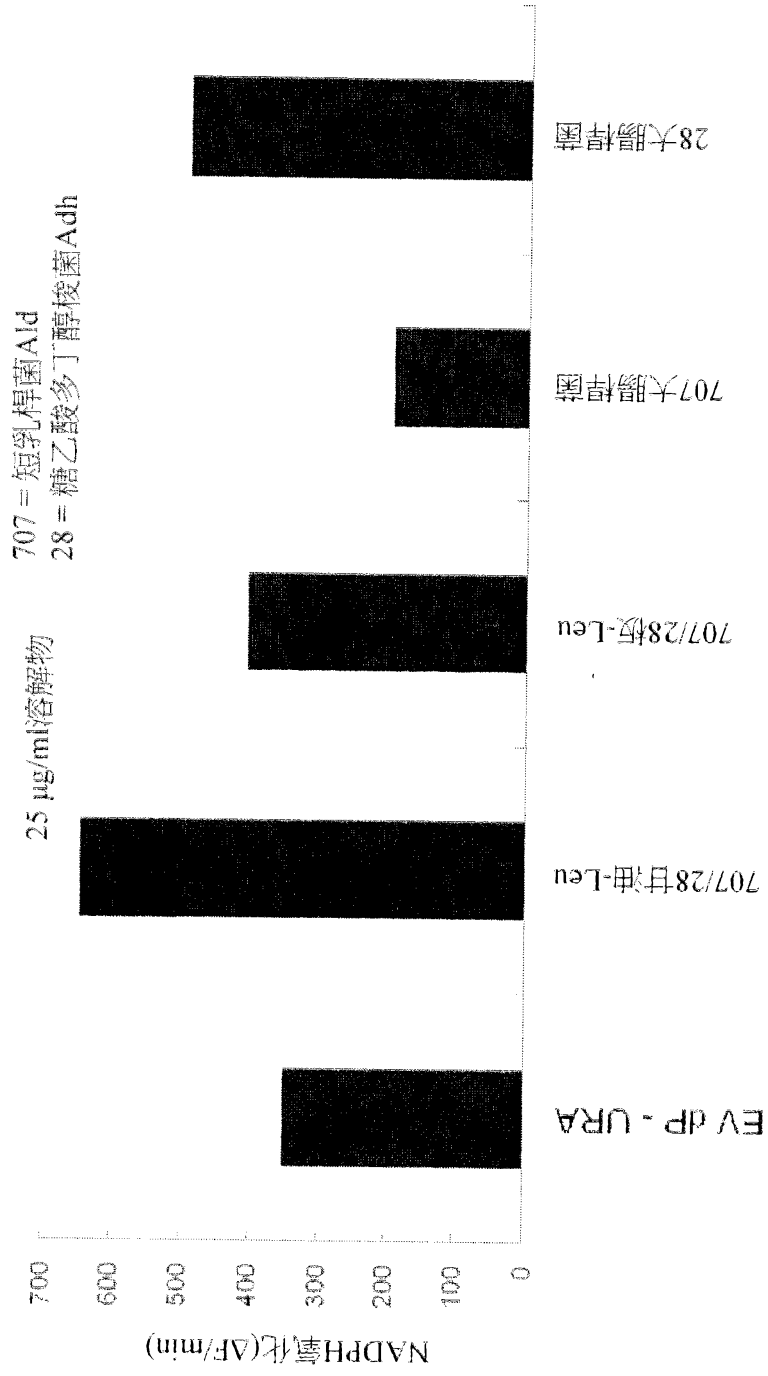


圖 17

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（8）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

無

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

（無）