



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105073997 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 18

(21) 申请号 201380072620. X

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 12. 13

C12P 7/42(2006. 01)

(30) 优先权数据

C12P 7/44(2006. 01)

13/715, 981 2012. 12. 14 US

C12P 13/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 08. 10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/075087 2013. 12. 13

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/093865 EN 2014. 06. 19

(71) 申请人 英威达技术有限责任公司

地址 瑞士圣加伦

(72) 发明人 A. L. 博特斯 A. V. E. 康拉迪

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

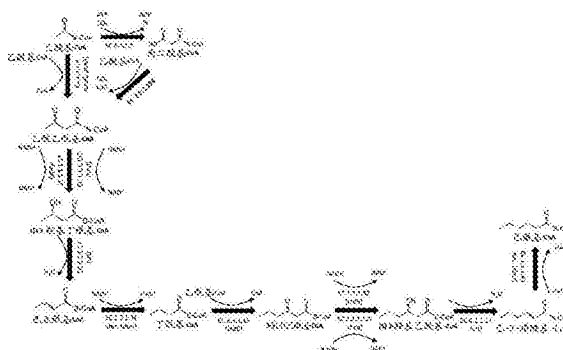
权利要求书3页 说明书31页 附图28页

(54) 发明名称

经由与碳储存有关的 CoA 依赖性碳链延长生成 6 碳化学品的的方法

(57) 摘要

本文件描述了通过在 C6 脂肪族主链底物中形成两个末端官能团(包括羧基、胺或羟基基团)生成己二酸、己内酰胺、6-氨基己酸、6-羟基己酸、己亚甲基二胺或 1, 6-己二醇的生物化学途径。本文中描述的这些途径、代谢工程和培养策略取决于与聚羟基烷酸酯积累细菌的碳储存途径相关的 CoA 依赖性延长酶或者类似的酶。



1. 一种用于生物合成一种或多种选自己二酸、6-氨基己酸、6-羟基己酸、己亚甲基二胺、己内酰胺、和 1,6-己二醇的产物的方法,所述方法包括经由两个循环的 CoA 依赖性碳链延长从乙酰基 -CoA 酶促合成 6 碳链脂肪族主链,并且在一个或多个步骤中在所述主链中酶促形成两个选自羧基、胺、和羟基基团的末端官能团以直接生成所述产物或在随后的步骤中生成所述产物。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述 6 碳链脂肪族主链是己酰基 -CoA。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中所述两个循环的 CoA 依赖性碳链延长包括使用 β -酮硫解酶或乙酰基 -CoA 羧化酶和乙酰乙酰基 -CoA 合酶、3-羟酰基 -CoA 脱氢酶或 3-氧化酰基 -CoA 还原酶、烯酰基 -CoA 水合酶、和反式 -2-烯酰基 -CoA 还原酶以从乙酰基 -CoA 形成己酰基 -CoA。

4. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述两个末端官能团是相同的。

5. 权利要求 1-3 中任一项的方法,其中所述两个末端官能团是不同的。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述产物包含末端胺和末端羧基基团。

7. 权利要求 5 的方法,其中所述产物包含末端羟基基团和末端羧基基团。

8. 权利要求 1-4 中任一项的方法,其中所述两个末端官能团是胺。

9. 权利要求 8 的方法,其中 ω -转氨酶或脱乙酰酶酶促形成所述两个胺基团。

10. 权利要求 1-7 中任一项的方法,其中所述两个末端官能团是羟基基团。

11. 权利要求 7 或权利要求 10 的方法,其中单加氧酶、氧化还原酶和铁氧还蛋白或 (ii) 醇脱氢酶酶促形成所述两个羟基基团。

12. 权利要求 11 的方法,其中所述单加氧酶与 SEQ ID NO:13-15 中所列的任一种氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性。

13. 权利要求 1-7 中任一项的方法,其中硫酯酶、醛脱氢酶、7-氧代庚酸脱氢酶、或 6-氧代己酸脱氢酶酶促形成末端羧基基团。

14. 权利要求 13 的方法,其中所述硫酯酶与 SEQ ID NO:1 中所列的氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性。

15. 权利要求 6、8、或 9 的方法,其中 ω -转氨酶酶促形成所述胺基团。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述 ω -转氨酶与 SEQ ID NO. 7-12 中所列的任一种氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性。

17. 权利要求 1-7 中任一项的方法,其中羧酸还原酶和磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶在形成所述产物中形成末端醛基团作为中间体。

18. 权利要求 17 的方法,其中所述羧酸还原酶与 SEQ ID NO. 2-6 中所列的任一种氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性。

19. 前述权利要求中任一项的方法,其中在重组宿主中实施所述方法。

20. 权利要求 19 的方法,其中对所述宿主进行需氧、厌氧或微需氧培养条件下的培养策略。

21. 权利要求 19 或权利要求 20 的方法,其中在营养物限制的条件下培养所述宿主。

22. 根据权利要求 19-21 中任一项的方法,其中使用陶瓷中空纤维膜保留所述宿主以维持发酵期间的高细胞密度。

23. 根据权利要求 19-22 中任一项的方法,其中对所述发酵补料的主要碳源源自生物

或非生物给料。

24. 权利要求 23 的方法, 其中所述生物给料是或者源自单糖、二糖、木质纤维素、半纤维素、纤维素、木质素、乙酰丙酸、甲酸、甘油三酯、甘油、脂肪酸、农业废物、浓缩酒糟或城市废物。

25. 权利要求 23 的方法, 其中所述非生物给料是或者源自天然气、合成气、CO₂/H₂、甲醇、乙醇、来自环己烷氧化过程的非挥发性残留物 (NVR) 或碱洗废物流、或对苯二甲酸 / 异酞酸混合物废物流。

26. 权利要求 19-25 中任一项的方法, 其中所述宿主是原核生物。

27. 权利要求 26 的方法, 其中所述原核生物来自埃希氏菌属 (*Escherichia*) 如大肠杆菌 (*Escherichia coli*); 来自梭菌属 (*Clostridia*) 如杨氏梭菌 (*Clostridium ljungdahlii*)、自产乙醇梭菌 (*Clostridium autoethanogenum*) 或者克鲁佛梭菌 (*Clostridium kluyveri*); 来自棒状杆菌属 (*Corynebacteria*) 如谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*); 来自贪铜菌属 (*Cupriavidus*) 如钩虫贪铜菌 (*Cupriavidus necator*) 或者耐金属贪铜菌 (*Cupriavidus metallidurans*); 来自假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 如荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 或者食油假单胞菌 (*Pseudomonas oleovorans*); 来自代尔夫特菌属 (*Delftia*) 如食酸代尔夫特菌 (*Delftia acidovorans*); 来自芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 如枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*); 来自乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 如德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*); 或者来自乳球菌属 (*Lactococcus*) 如乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) 或来自红球菌属 (*Rhodococcus*) 如马红球菌 (*Rhodococcus equi*)。

28. 权利要求 19-25 中任一项的方法, 其中所述宿主是真核生物。

29. 权利要求 28 的方法, 其中所述真核生物来自曲霉属 (*Aspergillus*) 如黑曲霉 (*Aspergillus niger*); 来自酵母属 (*Saccharomyces*) 如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*); 来自毕赤氏酵母属 (*Pichia*) 如巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*); 来自耶罗维亚酵母属 (*Yarrowia*) 如解脂耶罗维亚酵母 (*Yarrowia lipolytica*); 来自伊萨酵母属 (*Issatchenkia*) 如东方伊萨酵母 (*Issatchenkia orientalis*); 来自德巴利酵母属 (*Debaryomyces*) 如汉逊德巴利酵母 (*Debaryomyces hansenii*); 来自 *Arxula* 属如 *Arxula adenoinivorans*; 或者来自克鲁维酵母菌属 (*Kluyveromyces*) 如乳酸克鲁维酵母菌 (*Kluyveromyces lactis*)。

30. 权利要求 19 的方法, 其中所述宿主对高浓度的 C6 结构单元的耐受性通过在选择性环境中的连续培养而得到改善。

31. 权利要求 19-30 中任一项的方法, 其中所述宿主包含下列一种或多种弱化的酶: 聚羟基烷酸酯合酶、乙酰基 -CoA 硫酯酶、形成乙酸的磷酸转乙酰酶、乙酸激酶、乳酸脱氢酶、menaquinol- 延胡索酸氧化还原酶、生成异丁醇的 2- 酮酸脱羧酶、形成乙醇的醇脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、丙酮酸脱羧酶、葡萄糖 -6- 磷酸异构酶、NADH 消耗性转氢酶、NADH 特异性谷氨酸脱氢酶、NADH/NADPH 利用性谷氨酸脱氢酶、庚二酰基 -CoA 脱氢酶; 接受 C6 结构单元和中心前体作为底物的酰基 -CoA 脱氢酶; 丁酰 CoA 脱氢酶; 或己二酰基 -CoA 合成酶。

32. 权利要求 19-31 中任一项的方法, 其中所述宿主过表达一种或多种编码以下的基因: 乙酰基 -CoA 合成酶、6- 磷酸葡糖酸脱氢酶; 转酮醇酶; 吡啶核苷酸转氢酶 (puridine

nucleotide transhydrogenase);甘油醛-3P-脱氢酶;苹果酸酶;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;葡萄糖脱氢酶;果糖1,6二磷酸酶;L-丙氨酸脱氢酶;L-谷氨酸脱氢酶;甲酸脱氢酶;L-谷氨酰胺合成酶;二胺转运蛋白;二羧酸转运蛋白;和/或多药物转运蛋白。

33. 一种重组宿主,其包含至少一种编码以下的外源核酸:(i) β -酮硫解酶或乙酰基-CoA 羧化酶和乙酰乙酰基合酶, (ii) 3-羟酰基-CoA 脱氢酶或 3-氧化酰基-CoA 还原酶, (iii) 烯酰基-CoA 水合酶,和 (iv) 反式-2-烯酰基-CoA 还原酶,所述宿主生成己酰基-CoA。

34. 权利要求 33 的重组宿主,所述宿主进一步包含硫酯酶、醛脱氢酶、或正丁醛脱氢酶中的一种或多种,所述宿主生成己醛或己酸。

35. 权利要求 34 的重组宿主,所述宿主进一步包含单加氧酶、醇脱氢酶、醛脱氢酶、6-羟基己酸脱氢酶、5-羟基戊酸脱氢酶、4-羟基丁酸脱氢酶、6-氧代己酸脱氢酶、或 7-氧代庚酸脱氢酶中的一种或多种,所述宿主生成己二酸或己二酸半醛。

36. 权利要求 34 的重组宿主,所述宿主进一步包含单加氧酶、转氨酶、6-羟基己酸脱氢酶、5-羟基戊酸脱氢酶、4-羟基丁酸脱氢酶、和醇脱氢酶中的一种或多种,所述宿主生成 6-氨基己酸。

37. 权利要求 36 的重组宿主,所述宿主基因进一步包含内酰胺酶,所述宿主生成己内酰胺。

38. 权利要求 34 的重组宿主,所述宿主进一步包含单加氧酶,所述宿主生成 6-羟基己酸。

39. 权利要求 34 的重组宿主,所述宿主进一步包含羧酸还原酶、 ω -转氨酶、脱乙酰酶、N-乙酰基转移酶、或醇脱氢酶中的一种或多种,所述宿主生成己亚甲基二胺。

40. 权利要求 39 的重组宿主,所述宿主进一步包含羧酸还原酶或醇脱氢酶,所述宿主生成 1,6-己二醇。

经由与碳储存有关的 CoA 依赖性碳链延长生成 6 碳化学品的 的方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是 2011 年 12 月 14 日提交的美国申请流水号 13/715,981 的部分连续案,其要求 2011 年 12 月 16 日提交的美国申请流水号 61/576,401 的优先权。通过提及完整并入申请的公开内容。

发明领域

[0003] 本发明涉及使用一种或多种分离的酶(诸如 β -酮硫解酶、脱氢酶、还原酶、硫酯酶、水合酶、单加氧酶、和转氨酶)或使用表达一种或多种此类酶的重组宿主细胞生物合成己二酸(adipic acid)、6-氨基己酸、6-羟基己酸、己亚甲基二胺、己内酰胺、和 1,6-己二醇中一种或多种的方法。

[0004] 发明背景

[0005] 尼龙是聚酰胺,其通常通过二胺与二羧酸的缩聚合成。类似地,尼龙可通过内酰胺的缩聚生成。一种无处不在的尼龙是尼龙 6,6,其通过六亚甲基二胺(HMD)和己二酸的反应生成。尼龙 6 可以通过己内酰胺的开环聚合生成。因此,己二酸、己亚甲基二胺和己内酰胺是尼龙生产中的重要中间体(Anton&Baird, Polyamides Fibers, Encyclopedia of Polymer Science and Technology, 2001)。

[0006] 在产业上,经由环己胺的空气氧化生产己二酸和己内酰胺。环己胺的空气氧化在一系列的步骤中生成环己酮(K)和环己醇(A)的混合物,称为 KA 油。KA 油的硝酸氧化生成己二酸(Musser, Adipic acid, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000)。己内酰胺从环己酮经由其肟和随后的酸重排生成(Fuchs, Kieczka and Moran, Caprolactam, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2000)。

[0007] 在产业上,通过将 C6 结构单元氢氰化成己二腈,接着氢化成 HMD(Herzog and Smiley, Hexamethylenediamine, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, 2012)生产己亚甲基二胺(HMD)。

[0008] 鉴于对石油化学给料的依赖性;生物技术提供了一种经由生物催化的备选方法。生物催化是使用生物催化剂(诸如酶)来实施有机化合物的生物化学转化。

[0009] 生物衍生给料和石油化学给料两者是用于生物催化过程的可行起始材料。

[0010] 因而,针对此背景,清楚的是需要用于生成己二酸、己内酰胺、6-氨基己酸、6-羟基己酸、己亚甲基二胺、和 1,6-己二醇(下文为“C6 结构单元”)中一种或多种的可持续方法,其中所述方法是基于生物催化剂的(Jang 等, Biotechnology&Bioengineering, 2012, 109(10), 2437 - 2459)。

[0011] 然而,无野生型原核生物或真核生物天然过度生成 C6 结构单元或将其排出至胞外环境。不过,已经报告了己二酸和己内酰胺的代谢(Ramsay 等, Appl. Environ. Microbiol., 1986, 52(1), 152 - 156; 及 Kulkarni and Kanekar, Current Microbiology, 1998, 37, 191 - 194)。

[0012] 二羧酸己二酸作为碳源经由 β -氧化被众多细菌和真菌有效转化成中心代谢物。辅酶 A (CoA) 活化的己二酸到 CoA 活化的 3-氧代己二酸的 β -氧化经由例如与芳香族底物降解有关的途径促进进一步代谢。已经广泛表征了 3-氧代己二酰基-CoA 被几种细菌和真菌分解代谢成乙酰基-CoA 和琥珀酰基-CoA (Harwood and Parales, Annual Review of Microbiology, 1996, 50:553 - 590)。己二酸和 6-氨基己酸两者都是己内酰胺的分解代谢中的中间体,其最终经由 3-氧代己二酰基被降解成中心代谢物。

[0013] 已经提示了用于从生物量-糖生成己二酸的潜在代谢途径:(1) 经由邻位切割芳香族降解途径从葡萄糖以生物化学方式得到顺,顺-粘康酸 (cis,cis-muconic acid),接着化学催化成己二酸;(2) 经由琥珀酰基-CoA 和乙酰基-CoA 的缩合的可逆己二酸降解途径和 (3) 组合 β -氧化、脂肪酸合酶和 ω -氧化。然而,尚未报告使用这些策略的信息 (Jang 等, Biotechnology & Bioengineering, 2012, 109 (10), 2437 - 2459)。

[0014] 最优性原理陈述微生物调节其生物化学网络以支持最大生物量生长。超出宿主生物体中表达异源路径的需要,将碳流量引向充当碳源而非充当生物量生长成分的 C6 结构单元与最优性原理矛盾。例如,与天然生产者的产量性能相比,将 1-丁醇途径从梭菌 (Clostridium) 物种转移入其它生产菌株中经常下降一个数量级 (Shen 等, Appl. Environ. Microbiol., 2011, 77 (9), 2905 - 2915)。

[0015] 在 C6 脂肪族主链上形成末端官能团 (诸如羧基、胺或羟基基团) 前,6 碳脂肪族主链前体的有效合成是合成 C6 结构单元中的重要考虑因素。

[0016] 发明概述

[0017] 本文件至少部分基于如下的发现:有可能构建生成 6 碳链脂肪族主链前体的生物化学路径,其中可以形成两个官能团 (例如羧基、胺或羟基),从而导致己二酸、6-氨基己酸、6-羟基己酸、己亚甲基二胺、己内酰胺、和 1,6-己二醇 (下文为“C6 结构单元”) 中一种或多种的合成。己二酸和己二酸盐、6-羟基己酸和 6-羟基己酸盐及 6-氨基己酸和 6-氨基己酸盐在本文中可互换使用,指其任何中性或离子化形式的化合物,包括其任何盐形式。本领域技术人员应当理解,具体的形式会取决于 pH。本文中描述的这些途径、代谢工程和培养策略取决于与聚羟基烷酸酯积累细菌的碳储存途径相关的其 CoA 依赖性延长酶或者同源物。

[0018] 面对最优性原理,令人惊讶地发现了可以组合合适的非天然途径、给料、宿主微生物、对宿主生物化学网络的弱化策略和培养策略来有效生成 C6 结构单元。

[0019] 在一些实施方案中,可以使用 NADH 或 NADPH 依赖性酶经由两个循环的 CoA 依赖性碳链延长从乙酰基-CoA 形成用于转化成 C6 结构单元的 C6 脂肪族主链。参见图 1 和图 2。

[0020] 在一些实施方案中,生成 C6 脂肪族主链的 CoA 依赖性碳链延长途径中的酶催化不可逆酶促步骤。

[0021] 在一些实施方案中,可以使用硫酯酶、醛脱氢酶、6-氧代己酸脱氢酶、7-氧代庚酸脱氢酶、或单加氧酶 (例如与氧化还原酶和铁氧还蛋白组合) 酶促形成末端羧基基团。参见图 3 和图 4。硫酯酶可以与 SEQ ID NO:1 中所列的氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性。

[0022] 在一些实施方案中,可以使用 ω -转氨酶或脱乙酰酶酶促形成末端胺基基团。参见图 5 和图 6。 ω -转氨酶可以与 SEQ ID NO:7 - 12 中所列的任一种氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性。

[0023] 在一些实施方案中,可以使用单加氧酶(例如与氧化还原酶和铁氧还蛋白组合)或醇脱氢酶酶促形成末端羟基基团。参见图7和图8。单加氧酶可以与SEQ ID NO:13-15中所列的任一种氨基酸序列具有至少70%序列同一性。

[0024] 在一个方面,本文件特征在于一种用于生物合成一种或多种选自己二酸、6-氨基己酸、6-羟基己酸、己亚甲基二胺、己内酰胺、和1,6-己二醇的产物的方法。所述方法包括酶促合成6碳链脂肪族主链(例如己酰基-CoA),并且在一个或多个步骤中在所述主链中酶促形成两个选自羧基、胺、和羟基基团的末端官能团以直接生成所述产物或在随后的步骤中生成所述产物。两个末端功能团可以是相同的(例如羟基或胺)或者可以是不同的(例如末端羟基基团和末端羧基基团;或末端胺和末端羧基基团)。

[0025] 己酰基-CoA可以使用NADH或NADPH依赖性酶经由两个循环的CoA依赖性碳链延长从乙酰基-CoA酶促合成。可以通过在EC 1.3.1.44、EC 1.3.1.38、或EC 1.3.1.8下分类的烯酰基-CoA还原酶,诸如ter或tdter的基因产物转化己-2-烯酰基-CoA形成己酰基-CoA。可以通过EC 4.2.1.17下分类的反式-2-烯酰基-CoA水合酶转化(S)3-羟基己酰基-CoA或者通过EC 4.2.1.119下分类的反式-2-烯酰基-CoA水合酶转化(R)3-羟基己酰基-CoA形成己-2-烯酰基-CoA。反式-2-烯酰基-CoA水合酶可以是crt的基因产物。可以通过EC 1.1.1.35下分类的3-羟基酰基-CoA脱氢酶,诸如由fadB编码的3-羟基酰基-CoA脱氢酶转化3-氧代己酰基-CoA形成(S)3-羟基己酰基-CoA。可以通过EC 2.3.1.16下分类的 β -酮硫解酶(诸如由bktB编码的)转化丁酰基-CoA形成3-氧代己酰基-CoA。可以通过EC 1.3.1.44、EC 1.3.1.38、或EC 1.3.1.8下分类的烯酰基-CoA还原酶转化巴豆酰基-CoA形成丁酰基-CoA。可以通过EC 4.2.1.17下分类的反式-2-烯酰基-CoA水合酶转化(S)3-羟基丁酰基-CoA形成巴豆酰基-CoA。可以通过EC 1.1.1.157下分类的3-羟基丁酰基-CoA脱氢酶,诸如由hbd编码的3-羟基丁酰基-CoA脱氢酶转化乙酰乙酰基-CoA形成(S)3-羟基丁酰基-CoA。可以通过EC 2.3.1.9下分类的 β -酮硫解酶(诸如由atoB或phaA编码的)转化乙酰基-CoA形成乙酰乙酰基-CoA。可以通过EC 2.3.1.194下分类的乙酰乙酰基-CoA合酶转化丙二酰基-CoA形成乙酰乙酰基-CoA。可以通过EC 6.4.1.2下分类的乙酰基-CoA羧化酶转化乙酰基-CoA形成丙二酰基-CoA。

[0026] 可以通过EC 1.1.1.100下分类的3-氧代酰基-CoA还原酶(诸如由fabG编码的)转化3-氧代己酰基-CoA形成(R)3-羟基己酰基-CoA。可以通过EC 4.2.1.119下分类的反式-2-烯酰基-CoA水合酶转化(R)3-羟基丁酰基-CoA形成巴豆酰基-CoA。反式-2-烯酰基-CoA水合酶可以是phaJ的基因产物。可以通过EC 1.1.1.36下分类的乙酰酰基-CoA还原酶(诸如由phaB编码的)转化乙酰乙酰基-CoA形成(R)3-羟基丁酰基-CoA。

[0027] 在本文中描述的任何方法中,方法可以包括通过使用硫酯酶和醛脱氢酶,或硫酯酶在己酰基CoA中形成第一个末端羧基基团生成己酸。硫酯酶可以由YciA、tesB或Acot13编码。硫酯酶可以与SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列具有至少70%序列同一性。

[0028] 可以通过EC 1.2.1.4下分类的醛脱氢酶在己醛中形成第一个末端羧基基团生成己酸。可以通过EC 1.2.1.57下分类的正丁醛脱氢酶转化己酰基-CoA形成己醛。

[0029] 羧酸还原酶(例如与磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶组合)可以在形成所述产物中形成末端醛基团作为中间体。羧酸还原酶可以与SEQ ID NO.2-6中所列的任一种氨基酸序列具有至少70%序列同一性。

[0030] 在本文中描述的任何方法中,方法可以包括用一种或多种酶促转化将己酸转化己二酸、6-氨基己酸、己亚甲基二胺、6-羟基己酸、 ϵ -己内酰胺或1,6-己二醇,其中酶促转化之一引入第二个末端官能团。方法可以包括使用诸如来自家族 CYP153 的单加氧酶(诸如 CYP153A)将己酸转化成6-羟基己酸。可以使用(i)醇脱氢酶(诸如由 YMR318C 编码)、5-羟基戊酸脱氢酶(诸如由 cpnD 编码)或4-羟基丁酸脱氢酶(诸如由 gabD 编码)(ii)6-羟基己酸脱氢酶(诸如由 ChnD 编码),或(iii)细胞色素 P450 家族中的单加氧酶将6-羟基己酸转化成己二酸半醛。

[0031] 在本文中描述的任何方法中,可以通过使用(i)EC 1.2.1.3 下分类的醛脱氢酶,(ii)EC 1.2.1.63 下分类的6-氧代己酸脱氢酶(诸如由 ChnE 编码)或 EC1.2.1.- 下分类的7-氧代庚酸脱氢酶(例如 ThnG 的基因产物)或(iii)细胞色素 P450 家族中的单加氧酶在己二酸半醛中形成第二个末端官能团生成己二酸。

[0032] 在本文中描述的任何方法中,可以通过使用 EC 2.61.18、EC 2.6.1.19、EC 2.6.1.29、EC 2.6.1.48、或 EC 2.6.1.82 下分类的 ω -转氨酶在己二酸半醛中形成第二个末端官能团生成6-氨基己酸。

[0033] 在本文中描述的任何方法中,可以通过使用 EC 3.5.2.- 下分类的内酰胺酶自6-氨基己酸生成己内酰胺。自6-氨基己酸的末端羧基基团和末端胺基团生成与己内酰胺有关的酰胺键。

[0034] 在本文中描述的任何方法中,可以通过使用 EC 2.61.18、EC 2.6.1.19、EC 2.6.1.29、EC 2.6.1.48 或 EC 2.6.1.82 下分类的转氨酶在(i)6-氨基己醛中或者使用例如在 EC 3.5.1.17 下分类的脱乙酰酶在(ii)N6-乙酰基-1,6-二氨基己烷中形成第二个末端官能团生成己亚甲基二胺。

[0035] 在本文中描述的任何方法中,可以通过使用 EC 1.1.1.- (例如 1、2、21、或 184) 下分类的醇脱氢酶(诸如由 YMR318C、YqhD 或 CAA81612.1 编码)在6-羟基己醛中形成第二个末端官能团生成1,6-己二醇。

[0036] 在一些实施方案中,对发酵补料的主要碳源可以是或者可以源自生物或非生物给料。在一些实施方案中,所述生物给料是,包括或者源自单糖、二糖、木质纤维素、半纤维素、纤维素、木质素、乙酰丙酸(levulinic acid)、甲酸、甘油三酯、甘油、脂肪酸、农业废物、浓缩酒糟(condensed distillers' solubles)或城市废物。

[0037] 在一些实施方案中,非生物给料可以是或者可以源自天然气、合成气、CO₂/H₂、甲醇、乙醇、来自环己烷氧化过程的非挥发性残留物(NVR)或碱洗废物流、或对苯二甲酸/异酞酸混合物废物流。

[0038] 在一些实施方案中,宿主微生物是原核生物。例如,原核生物可以来自细菌埃希氏菌属如大肠杆菌;细菌梭菌属如杨氏梭菌、自产乙醇梭菌或者克鲁佛梭菌;细菌棒状杆菌属如谷氨酸棒状杆菌;细菌贪铜菌属如钩虫贪铜菌或者耐金属贪铜菌;细菌假单胞菌属如荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌或者食油假单胞菌;细菌代尔夫特菌属如食酸代尔夫特菌;细菌芽孢杆菌属如枯草芽孢杆菌;细菌乳杆菌属如德氏乳杆菌;或者细菌乳球菌属如乳酸乳球菌。此类原核生物也可以是构建能够生成 C6 结构单元的本文中描述的重组宿主细胞的基因来源。

[0039] 在一些实施方案中,宿主微生物是真核生物(例如真菌,诸如酵母)。例如,真核

生物可以来自真菌曲霉属如黑曲霉；来自酵母酵母属如酿酒酵母；来自酵母毕赤氏酵母属如巴斯德毕赤酵母；来自酵母耶罗维亚酵母属如解脂耶罗维亚酵母；来自酵母伊萨酵母属如东方伊萨酵母；来自酵母德巴利酵母属如汉逊德巴利酵母；来自酵母 *Arxula* 属如 *Arxula adenoinivorans*；或者来自酵母克鲁维酵母菌属如乳酸克鲁维酵母菌的。此类真核生物也可以是构建能够生成 C6 结构单元的本文中描述的重组宿主细胞的基因来源。

[0040] 在一些实施方案中，宿主微生物的对高浓度的一种或多种 C6 结构单元的耐受性可以通过在选择性环境中的连续培养来改善。

[0041] 在一些实施方案中，弱化或增强宿主微生物的生物化学网络以 (1) 确保乙酰基 -CoA 的胞内利用度，(2) 产生 NADH 或 NADPH 不平衡，其仅可以经由一种或多种 C6 结构单元的形成来平衡，(3) 阻止降解导致并包含 C7 结构单元的中心代谢物，中心前体，并且 (4) 确保从细胞的有效流出。

[0042] 在一些实施方案中，使用非循环培养策略来实现厌氧、需氧或微需氧培养条件。

[0043] 在一些实施方案中，使用循环培养策略来在厌氧和需氧培养条件之间交替。

[0044] 在一些实施方案中，培养策略包括限制营养物，诸如限制氮、磷酸盐或氧。

[0045] 在一些实施方案中，使用非循环或循环发酵策略通过单一类型的微生物（例如含有一种或多种外源核酸的重组宿主）生成一种或多种 C6 结构单元。

[0046] 在一些实施方案中，通过共培养超过一种类型的微生物（例如两种或更多种不同重组宿主）生成一种或多种 C6 结构单元，其中每种宿主含有特定组的外源核酸。

[0047] 在一些实施方案中，可以通过连续发酵生成一种或多种 C6 结构单元，其中可以将来自前面发酵的培养液或浓缩物 (centrate) 补料给一连串发酵，作为给料、中心代谢物或中心前体的来源；最终生成 C6 结构单元。

[0048] 本文件特征还在于包含至少一种编码例如下列一种或多种的外源核酸的重组宿主：甲酸脱氢酶、烯酰基 -CoA 还原酶、反式 -2- 烯酰基 -CoA 水合酶、3- 羟基丁酰基 -CoA 脱氢酶、 β - 酮硫解酶、乙酰酰基 -CoA 还原酶、乙酰基 -CoA 合成酶、乙酰基 -CoA 羧化酶、苹果酸酶、吡啶核苷酸转氢酶、甘油醛 -3P- 脱氢酶、硫酯酶、醛脱氢酶、单加氧酶、醇脱氢酶、6- 羟基己酸脱氢酶、5- 羟基戊酸脱氢酶、4- 羟基丁酸脱氢酶、6- 氧代己酸脱氢酶、7- 氧代庚酸脱氢酶、 ω - 转氨酶、丙酰基 -CoA 合成酶、和羧酸还原酶，其中所述宿主包含一种或多种例如在葡萄糖 -6- 磷酸异构酶、乙酸激酶、将丙酮酸降解成乳酸的酶（诸如乳酸脱氢酶）、介导磷酸烯醇丙酮酸降解成琥珀酸的酶（诸如 menaquinol- 延胡索酸氧化还原酶、醇脱氢酶、丙酮酸脱羧酶、2- 酮酸脱羧酶、丙糖磷酸异构酶、或 NADH 特异性谷氨酸脱氢酶中的缺陷。

[0049] 在一个方面，本文件特征在于重组宿主，其包含至少一种编码以下的外源核酸：(i) β - 酮硫解酶或乙酰基 -CoA 羧化酶和乙酰乙酰基 -CoA 合酶，(ii) 3- 羟基酰基 -CoA 脱氢酶或 3- 氧化酰基 -CoA 还原酶，(iii) 烯酰基 -CoA 水合酶，和 (iv) 反式 -2- 烯酰基 -CoA 还原酶，其中所述宿主生成己酰基 -CoA。宿主进一步可以包含硫酯酶、醛脱氢酶、或正丁醛脱氢酶中的一种或多种，其中宿主生成己醛或己酸。

[0050] 生成己醛或己酸的重组体可以进一步包含单加氧酶、醇脱氢酶、醛脱氢酶、6- 羟基己酸脱氢酶、5- 羟基戊酸脱氢酶、4- 羟基丁酸脱氢酶、6- 氧代己酸脱氢酶、或 7- 氧代庚酸脱氢酶中的一种或多种，其中宿主生成己二酸或己二酸半醛。

[0051] 生成己醛或己酸的重组体可以进一步包含单加氧酶、转氨酶、6- 羟基己酸脱氢酶、

5-羟基戊酸脱氢酶、4-羟基丁酸脱氢酶、和醇脱氢酶中的一种或多种,其中宿主生成7-氨基己酸。宿主可以进一步包含内酰胺酶并且生成己内酰胺。

[0052] 生成己醛或己酸的重组体可以进一步包含单加氧酶,所示宿主生成6-羟基己酸。

[0053] 生成己醛、己酸、6-羟基己酸、或6-氨基己酸的重组宿主可以进一步包含羧酸还原酶、 ω -转氨酶、脱乙酰酶、N-乙酰基转移酶、或醇脱氢酶中的一种或多种,并且生成己亚甲基二胺。

[0054] 生成6-羟基己酸的重组宿主可以进一步包含羧酸还原酶或醇脱氢酶,所示宿主生成1,6-己二醇。

[0055] 本文中描述的任何重组宿主可以进一步包含下列一种或多种弱化的酶:聚羟基烷酸酯合酶、乙酰基-CoA 硫酯酶、形成乙酸的磷酸转乙酰酶、乙酸激酶、乳酸脱氢酶、menaquinol-延胡索酸氧化还原酶、形成异丁醇的2-酮酸脱羧酶、形成乙醇的醇脱氢酶、磷酸丙糖异构酶、丙酮酸脱羧酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、NADH-消耗性转氢酶、NADH-特异性谷氨酸脱氢酶、NADH/NADPH 利用性谷氨酸脱氢酶、庚二酰基-CoA 脱氢酶;接受C6结构单元和中心前体作为底物的酰基-CoA 脱氢酶;丁二酰基-CoA 脱氢酶;或己二酰基-CoA 合成酶。

[0056] 本文中描述的任何重组宿主可以进一步过表达一种或多种编码以下的基因:乙酰基-CoA 合成酶;6-磷酸葡糖酸脱氢酶;转酮醇酶;吡啶核苷酸转氢酶;甘油醛-3P-脱氢酶;苹果酸酶;葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;葡萄糖脱氢酶;果糖1,6二磷酸酶;L-丙氨酸脱氢酶;L-谷氨酸脱氢酶;L-谷氨酰胺合成酶;甲酸脱氢酶;二胺转运蛋白;二羧酸转运蛋白;和/或多药物转运蛋白。

[0057] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解具有相同的意义。虽然可以使用与本文中描述的方法和材料相似或等同的方法和材料来实施本发明,但是下文描述了合适的方法和材料。通过提及完整并入本文中提及的所有出版物、专利申请、专利、和其它出版物。在冲突的情况中,应以本说明书(包括定义)为准。另外,材料、方法和例子仅是例示性的,而不意图为限制性的。

[0058] 本发明的一个或者多个实施方案的细节在附图和下面的描述中阐明。根据说明书和附图,并根据权利要求书,本发明的其它特征、目的和优点将显而易见。根据专利法的标准实践,词语“包含”在权利要求书中可被“基本上由...组成”或者“由...组成”替代。

[0059] 附图简述

[0060] 图1是产生己酰基-CoA的例示性生物化学途径的示意图,其使用NADH依赖性酶并用乙酰基-CoA作为中心代谢物。

[0061] 图2是产生己酰基-CoA的例示性生物化学途径的示意图,其使用NADPH依赖性酶并用乙酰基-CoA作为中心代谢物。

[0062] 图3是使用己酰基-CoA作为中心前体产生己酸的例示性生物化学途径的示意图。

[0063] 图4是使用己酸作为中心前体产生己二酸的例示性生物化学途径的示意图。

[0064] 图5是使用己酸作为中心前体产生6-氨基己酸的例示性生物化学途径的示意图和从6-氨基己酸产生己内酰胺的例示性生物化学途径的示意图。

[0065] 图6是使用6-氨基己酸、6-羟基己酸、或己二酸半醛作为中心前体产生己亚甲基二胺的例示性生物化学途径的示意图。

[0066] 图7是使用己酸作为中心前体产生6-羟基己酸的例示性生物化学途径的示意图。

[0067] 图 8 是使用 6- 羟基己酸作为中心前体产生 1,6 己二醇的例示性生物化学途径的示意图。

[0068] 图 9 含有由 tesB 编码的大肠杆菌硫酯酶 (参见 GenBank 登录号 AAA24665.1, SEQ ID NO:1)、海分枝杆菌 (*Mycobacterium marinum*) 羧酸还原酶 (参见 GenBank 登录号 ACC40567.1, SEQ ID NO:2)、耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 羧酸还原酶 (参见 GenBank 登录号 ABK71854.1, SEQ ID NO:3)、Segniliparus rugosus 羧酸还原酶 (参见 GenBank 登录号 EFV11917.1, SEQ ID NO:4)、马赛分枝杆菌 (*Mycobacterium massiliense*) 羧酸还原酶 (参见 GenBank 登录号 EIV11143.1, SEQ ID NO:5)、Segniliparus rotundus 羧酸还原酶 (参见 GenBank 登录号 ADG98140.1, SEQ ID NO:6)、紫色色杆菌 (*Chromobacterium violaceum*) ω -转氨酶 (参见 GenBank 登录号 AAQ59697.1, SEQ ID NO:7)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) ω -转氨酶 (参见 GenBank 登录号 AAG08191.1, SEQ ID NO:8)、丁香假单胞菌 (*Pseudomonas syringae*) ω -转氨酶 (参见 GenBank 登录号 AAY39893.1, SEQ ID NO:9)、球形红杆菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) ω -转氨酶 (参见 GenBank 登录号 ABA81135.1, SEQ ID NO:10)、大肠杆菌 ω -转氨酶 (参见 GenBank 登录号 AAA57874.1, SEQ ID NO:11)、河流弧菌 (*Vibrio Fluvialis*) ω -转氨酶 (参见 GenBank 登录号 AEA39183.1, SEQ ID NO:12);极单胞菌物种 (*Polaromonas sp.*) JS666 单加氧酶 (参见 GenBank 登录号 ABE47160.1, SEQ ID NO:13)、分枝杆菌物种 (*Mycobacterium sp.*) HXN-1500 单加氧酶 (参见 GenBank 登录号 CAH04396.1, SEQ ID NO:14)、南非分枝杆菌 (*Mycobacterium austroafricanum*) 单加氧酶 (参见 GenBank 登录号 ACJ06772.1, SEQ ID NO:15)、极单胞菌物种 JS666 氧化还原酶 (参见 GenBank 登录号 ABE47159.1, SEQ ID NO:16)、分枝杆菌物种 HXN-1500 氧化还原酶 (参见 GenBank 登录号 CAH04397.1, SEQ ID NO:17)、极单胞菌物种 JS666 铁氧还蛋白 (参见 GenBank 登录号 ABE47158.1, SEQ ID NO:18)、分枝杆菌物种 HXN-1500 铁氧还蛋白 (参见 GenBank 登录号 CAH04398.1, SEQ ID NO:19)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 (参见 GenBank 登录号 CAA44858.1, SEQ ID NO:20)、和诺卡菌物种 (*Nocardia sp.*) NRRL 5646 磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶 (参见 GenBank 登录号 ABI83656.1, SEQ ID NO:21) 的氨基酸序列。

[0069] 图 10 是作为相对于空载体对照的用于将己酰基-CoA 转化成己酸的硫酯酶活性的测量的释放 CoA 的 412nm 相对吸光度的棒图。

[0070] 图 11 是汇总 20 分钟后于 340nm 的吸光度的变化 (其是仅酶对照 (无底物) 的 NADPH 消耗和羧酸还原酶活性的测量) 的棒图。

[0071] 图 12 是 20 分钟后 340nm 吸光度的变化 (其是相对于空载体对照的 NADPH 消耗和用于将己二酸转化成己二酸半醛的羧酸还原酶活性的测量) 的棒图。

[0072] 图 13 是汇总 20 分钟后于 340nm 的吸光度的变化 (其是相对于空载体对照的 NADPH 消耗和用于将羟基己酸转化成 6- 羟基己醛的羧酸还原酶活性的测量) 的棒图。

[0073] 图 14 是汇总 20 分钟后于 340nm 的吸光度的变化 (其是相对于空载体对照的 NADPH 消耗和用于将 N6- 乙酰基-6- 氨基己酸转化成 N6- 乙酰基-6- 氨基己醛的羧酸还原酶活性的测量) 的棒图。

[0074] 图 15 是汇总 20 分钟后于 340nm 的吸光度的变化 (其是相对于空载体对照的 NADPH 消耗和用于将己二酸半醛转化成己二醛 (heptanedial) 的羧酸还原酶活性的测量) 的棒

图。

[0075] 图 16 是汇总在 4 小时后丙酮酸至 L-丙氨酸的百分比转化 (mol/mol) 作为仅酶对照 (无底物) 的 ω -转氨酶活性测量的棒图。

[0076] 图 17 是 24 小时后丙酮酸至 L-丙氨酸的百分比转化 (mol/mol) 作为相对于空载体对照用于将 6-氨基己酸转化成己二酸半醛的 ω -转氨酶活性的测量的棒图。

[0077] 图 18 是 4 小时后 L-丙氨酸至丙酮酸的百分比转化 (mol/mol) 作为相对于空载体对照用于将己二酸半醛转化成 6-氨基己酸的 ω -转氨酶活性的测量的棒图。

[0078] 图 19 是 4 小时后丙酮酸至 L-丙氨酸的百分比转化 (mol/mol) 作为相对于空载体对照用于将己亚甲基二胺转化成 6-氨基己醛的 ω -转氨酶活性的测量的棒图。

[0079] 图 20 是 4 小时后丙酮酸至 L-丙氨酸的百分比转化 (mol/mol) 作为相对于空载体对照用于将 N6-乙酰基-1,6-二氨基己烷转化成 N6-乙酰基-6-氨基己醛的 ω -转氨酶活性的测量的棒图。

[0080] 图 21 是 4 小时后丙酮酸至 L-丙氨酸的百分比转化 (mol/mol) 作为相对于空载体对照用于将 6-氨基己醇转化成 5-氧代己醇的 ω -转氨酶活性的测量的棒图。

[0081] 图 22 是如经由 LC-MS 测定的 6-羟基己酸的峰面积变化 (作为相对于空载体对照, 用于将己酸转化成 6-羟基己酸的单加氧酶活性的测量) 的棒图。

[0082] 发明详述

[0083] 一般而言,本文件提供酶、非天然途径、培养策略、给料、宿主微生物和对宿主的生物化学网络的弱化,其从中心代谢物产生 6 碳链脂肪族主链,在所述中心代谢物中可形成两个末端官能团,从而导致己二酸、己内酰胺、6-氨基己酸、6-羟基己酸、己亚甲基二胺、或 1,6-己二醇 (本文中称为“C6 结构单元”) 中一种或多种的合成。如本文中使用的,术语“中心前体”用于表示导致 C6 结构单元合成的本文中显示的任何代谢途径中的任何代谢物。术语“中心代谢物”在本文中用于表示在所有微生物中产生以支持生长的代谢物。

[0084] 本文中描述的宿主微生物可以包含可以操作为使得可生成一种或多种 C6 结构单元的内源途径。在一种内源途径中,宿主微生物天然表达催化途径内的反应的所有酶。含有工程化途径的宿主微生物不天然表达催化途径内的反应的所有酶,但是已经工程化改造为使得在宿主中表达途径内的所有酶。

[0085] 如本文中提及核酸 (或蛋白质) 和宿主使用的,术语“外源”指不像其在自然界中被发现一样存在于特定类型细胞中 (并且不能从特定类型细胞获得) 的核酸或由所述核酸编码的蛋白质。如此,非天然存在的核酸一旦在宿主中即视为对于宿主而言外源的。重要的是注意非天然存在的核酸可含有在自然界中发现的核酸序列的核酸亚序列或片段,只要该核酸作为整体不存在于自然界中。例如,表达载体内含有基因组 DNA 序列的核酸分子是非天然存在的核酸,如此一旦导入宿主中对于宿主细胞而言是外源的,因为该核酸分子作为整体 (基因组 DNA 加载体 DNA) 不存在于自然界中。如此,作为整体不存在于自然界中的任何载体、自主复制的质粒或病毒 (例如逆转录病毒、腺病毒、或疱疹病毒) 视为非天然存在的核酸。由此得出结论通过 PCR 或限制内切性核酸酶处理产生的基因组 DNA 片段以及 cDNA 也视为非天然存在的核酸,因为它们作为未见于自然界的分开的分子存在。由此还得出结论任何以未见于自然界中的排布含有启动子序列和多肽编码序列 (例如 cDNA 或基因组 DNA) 的任何核酸也是非天然存在的核酸。天然存在的核酸可以是对于特定宿主微生物

而言外源的。例如,从酵母 x 的细胞分离的完整染色体一旦将该染色体导入酵母 y 的细胞中就酵母 y 细胞而言是外源核酸。

[0086] 比较而言,如本文中提及核酸(例如基因)(或蛋白质)和宿主使用的,术语“内源的”指就像其在自然界中被发现一样的确存在于特定宿主中(并且可以从特定宿主获得)的核酸(或蛋白质)。此外,“内源表达”核酸(或蛋白质)的细胞就像其在自然界中被发现时相同特定类型的宿主那样表达所述核酸(或蛋白质)。此外,“内源生成”核酸、蛋白质、或其它化合物的宿主就像其在自然界中被发现时相同特定类型的宿主那样生成所述核酸、蛋白质、或化合物。

[0087] 例如,根据宿主和由宿主生成的化合物,在(i) β -酮硫解酶或乙酰基-CoA 羧化酶和乙酰乙酰基-CoA 合酶,(ii) 3-羟酰基-CoA 脱氢酶或 3-氧化酰基-CoA 还原酶,(iii) 烯酰基-CoA 水合酶,和(iv) 反式-2-烯酰基-CoA 还原酶外,可以在宿主中表达下列一种或多种酶:硫酯酶、醛脱氢酶、正丁醛脱氢酶、单加氧酶、醇脱氢酶、6-氧己酸脱氢酶、7-氧庚酸脱氢酶、 ω 转氨酶、6-羟基己酸脱氢酶、5-羟基戊酸脱氢酶、4-羟基丁酸脱氢酶、羧酸还原酶、脱乙酰酶、或 N-乙酰基转移酶。在表达羧酸还原酶的重组宿主中,也可以表达磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,因为它增强羧酸还原酶的活性。在表达单加氧酶的重组宿主中,也可以表达电子转移链蛋白诸如氧化还原酶或铁氧还蛋白多肽。

[0088] 在一些实施方案中,重组宿主可以包含至少一种编码 β -酮硫解酶或乙酰基-CoA 羧化酶和乙酰乙酰基-CoA 合酶、3-羟酰基-CoA 脱氢酶或 3-氧化酰基-CoA 还原酶、烯酰基-CoA 水合酶、和反式-2-烯酰基-CoA 还原酶的外源核酸,并且生成己酰基-CoA。此类宿主可以进一步包含硫酯酶、醛脱氢酶、或正丁醛脱氢酶中一种或多种(例如两种或三种),并且生成己醛或己酸。

[0089] 生成己醛或己酸的重组宿主可以进一步包含单加氧酶、醇脱氢酶、醛脱氢酶、6-羟基己酸脱氢酶、5-羟基戊酸脱氢酶、4-羟基丁酸脱氢酶、6-氧己酸脱氢酶、或 7-氧庚酸脱氢酶中一种或多种,并且生成己二酸或己二酸半醛。例如,重组宿主可以进一步包含单加氧酶并且生成己二酸或己二酸半醛。作为另一个例子,重组宿主可以进一步包含(i) 单加氧酶,(ii) 醇脱氢酶,6-羟基己酸脱氢酶,5-羟基戊酸脱氢酶,或 4-羟基丁酸脱氢酶和(iii) 醛脱氢酶,6-氧己酸脱氢酶,或 7-氧庚酸脱氢酶,并且生成己二酸。

[0090] 生成己醛或己酸的重组宿主可以进一步包含单加氧酶、转氨酶、6-羟基己酸脱氢酶、5-羟基戊酸脱氢酶、4-羟基丁酸脱氢酶和醇脱氢酶中一种或多种,并且生成 6-氨基己酸。例如,重组宿主可以进一步包含单加氧酶、转氨酶、和 6-羟基己酸脱氢酶中每种。

[0091] 生成己醛或己酸的重组宿主可以进一步包含单加氧酶,并且生成 6-羟基己酸。

[0092] 生成 6-氨基己酸、6-羟基己酸、或己二酸半醛的重组宿主可以进一步包含羧酸还原酶、 ω -转氨酶、脱乙酰酶、N-乙酰基转移酶、或醇脱氢酶中一种或多种,并且生成己亚甲基二胺。在一些实施方案中,重组宿主可以进一步包含羧酸还原酶、 ω -转氨酶、脱乙酰酶、和 N-乙酰基转移酶中每种。在一些实施方案中,重组宿主可以进一步包含羧酸还原酶和 ω -转氨酶。在一些实施方案中,重组宿主可以进一步包含羧酸还原酶、 ω -转氨酶、和醇脱氢酶。

[0093] 生成 6-羟基己酸的重组宿主可以进一步包含羧酸还原酶和醇脱氢酶中一种或多种,并且生成 1,6-己二醇。

[0094] 在工程化途径内,酶可以来自单一来源,即来自一种物种或属,或者可以来自多种来源,即不同物种或属。编码本文中描述的酶的核酸已经自各种生物体鉴定,并且在公众可用的数据库(诸如 GenBank 或 EMBL)中容易地可得到。

[0095] 可以用于生成一种或多种 C6 结构单元的本文中描述的任何酶可以与相应野生型酶的氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性(同源性)(例如至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、或 100%)。例如,本文中描述的硫酯酶可以与由 tesB 编码的大肠杆菌硫酯酶的氨基酸序列(参见 GenBank 登录号 AAA24665.1, SEQ ID NO:1)具有至少 70% 序列同一性(同源性)(例如至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、或 100%)。参见图 9。

[0096] 例如,本文中描述的羧酸还原酶可以与以下的氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性(同源性)(例如至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、或 100%):海分枝杆菌(参见 GenBank 登录号 ACC40567.1, SEQ ID NO:2),耻垢分枝杆菌(参见 GenBank 登录号 ABK71854.1, SEQ ID NO:3),Segniliparus rugosus(参见 GenBank 登录号 EFV11917.1, SEQ ID NO:4),马赛分枝杆菌(参见 GenBank 登录号 EIV11143.1, SEQ ID NO:5),或 Segniliparus rotundus(参见 GenBank 登录号 ADG98140.1, SEQ ID NO:6)羧酸还原酶的氨基酸序列。参见图 9。

[0097] 例如,本文中描述的 ω -转氨酶可以与以下的氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性(同源性)(例如至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、或 100%):紫色色杆菌(参见 GenBank 登录号 AAQ59697.1, SEQ ID NO:7),铜绿假单胞菌(参见 GenBank 登录号 AAG08191.1, SEQ ID NO:8),丁香假单胞菌(参见 GenBank 登录号 AAY39893.1, SEQ ID NO:9),球形红杆菌(参见 GenBank 登录号 ABA81135.1, SEQ ID NO:10),大肠杆菌(参见 GenBank 登录号 AAA57874.1, SEQ ID NO:11),或河流弧菌(参见 GenBank 登录号 AEA39183.1, SEQ ID NO:12) ω -转氨酶的氨基酸序列。这些中的一些 ω -转氨酶是二胺 ω -转氨酶。参见图 9。

[0098] 例如,本文中描述的单加氧酶可以与以下的氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性(同源性)(例如至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、或 100%):极单胞菌物种 JS666 单加氧酶(参见 GenBank 登录号 ABE47160.1, SEQ ID NO:13),分枝杆菌物种 HXN-1500 单加氧酶(参见 GenBank 登录号 CAH04396.1, SEQ ID NO:14),或南非分枝杆菌单加氧酶(参见 GenBank 登录号 ACJ06772.1, SEQ ID NO:15)的氨基酸序列。参见图 9。

[0099] 例如,本文中描述的氧化还原酶可以与以下氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性(同源性)(例如至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、或 100%):极单胞菌物种 JS666 氧化还原酶(参见 GenBank 登录号 ABE47159.1, SEQ ID NO:16)或分枝杆菌物种 HXN-1500 氧化还原酶(参见 GenBank 登录号 CAH04397.1, SEQ ID NO:17)的氨基酸序列。参见图 9。

[0100] 例如,本文中描述的铁氧还蛋白多肽可以与以下氨基酸序列具有至少 70% 序列同一性(同源性)(例如至少 75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、或 100%):极单胞菌物种 JS666 铁氧还蛋白(参见 GenBank 登录号 ABE47158.1, SEQ ID NO:18)或分枝杆菌物种 HXN-1500 铁氧还蛋白(参见 GenBank 登录号 CAH04398.1, SEQ ID NO:19)的氨基酸序列。参见图 9。

[0101] 例如,本文中描述的磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶可以与以下氨基酸序列具有至少70%序列同一性(同源性)(例如至少75%、80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、或100%):枯草芽孢杆菌磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(参见GenBank登录号CAA44858.1,SEQ ID NO:20)或诺卡尔菌物种NRRL 5646磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶(参见GenBank登录号ABI83656.1,SEQ ID NO:21)的氨基酸序列。参见图9。

[0102] 可以如下测定两种氨基酸序列间的百分比同一性(同源性)。首先,使用来自含有BLASTP第2.0.14版的单机版BLASTZ的BLAST 2Sequences(B12seq)程序比对氨基酸序列。此单机版BLASTZ可以获自Fish&Richardson的网站(例如www.fr.com/blast/)或美国政府国立生物技术信息中心网站(www.ncbi.nlm.nih.gov)。解释如何使用B12seq程序的用法说明可以参见伴随BLASTZ的自述文件。B12seq使用BLASTP算法实施两种氨基酸序列之间的比较。为了比较两种氨基酸序列,如下设置B12seq的选项:-i设置为含有要比较的第一氨基酸序列的文件(例如C:\seq1.txt);-j设置为含有要比较的第二氨基酸序列的文件(例如C:\seq2.txt);-p设置为blastp;-o设置为任何期望的文件名称(例如C:\output.txt);并且所有其它选项保持为其缺省设置。例如,可以使用以下命令来产生含有两种氨基酸序列间的比较的输出文件:C:\B12seq-ic:\seq1.txt-jc:\seq2.txt-pblastp-o c:\output.txt。如果两种比较序列共享同源性(同一性),那么指定的输出文件会呈现那些同源性区作为比对序列。如果两种比较序列不共享同源性(同一性),那么指定的输出文件不会呈现比对序列。可以对核酸序列遵循相似的规程,只是使用blastn。

[0103] 一旦比对,通过计算相同氨基酸残基在这两种序列中呈现的位置的数目确定匹配数目。通过用匹配数目除以全长多肽氨基酸序列的长度,接着将所得的数值乘以100来确定百分比同一性(同源性)。注意到百分比同一性(同源性)值被四舍五入到最近的十分位。例如,78.11、78.12、78.13、和78.14被向下四舍五入到78.1,而78.15、78.16、78.17、78.18、和78.19被向上四舍五入到78.2。还注意到长度值会总是整数。

[0104] 应当领会,许多核酸可以编码具有特定氨基酸序列的多肽。遗传密码的简并性是本领域中公知的;即对于许多氨基酸,存在有超过一种充当氨基酸密码子的核苷酸三联体。例如,可以修饰给定酶的编码序列中的密码子,从而获得特定物种(例如细菌或真菌)中的最佳表达,这使用适合于所述物种的密码子偏爱表进行。

[0105] 也可以在本文件的方法中使用本文中描述的任何酶的功能性片段。如本文中使用的,术语“功能性片段”指与相应的成熟、全长、野生型蛋白质的活性具有至少25%(例如至少30%;40%;50%;60%;70%;75%;80%;85%;90%;95%;98%;99%;100%;或甚至大于100%)的蛋白质的肽片段。功能性片段一般但不总是可以由蛋白质的连续区构成,其中该区具有功能性活性。

[0106] 此文件还提供了(i)本文件的方法中使用的酶的功能性变体和(ii)上文描述的功能性片段的功能性变体。相对于相应的野生型序列,酶和功能性片段的功能性变体可以含有添加、缺失、或取代。具有取代的酶一般会具有不超过50(例如不超过1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、35、40、或50)处氨基酸取代(例如保守取代)。这适用于本文中描述的任何酶和功能性片段。保守取代是用一种氨基酸取代具有相似特征的另一氨基酸。保守取代包括下列组内的取代:缬氨酸、丙氨酸和甘氨酸;亮氨酸、缬氨酸、和异亮氨酸;天冬氨酸和谷氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;丝氨酸、半胱氨酸、和苏氨酸;赖氨酸和精氨酸;和苯丙

氨酸和酪氨酸。非极性疏水性氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电荷的（碱性）氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电荷的（酸性）氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。用上文提及的极性、碱性或酸性组的一种成员被相同组的另一种成员的任何取代可以视为保守取代。比较而言，非保守取代是用一种氨基酸取代具有不同特征的另一一种。

[0107] 缺失变体可以缺乏 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、或 20 个氨基酸的区段（具有两种或更多种氨基酸）或非连续的单一氨基酸。添加（添加变体）包括融合蛋白，其含有：(a) 本文中描述的任何酶或其片段；和 (b) 内部或末端（C 或 N）无关或异源氨基酸序列。在此类融合蛋白的背景中，术语“异源氨基酸序列”指与 (a) 不同的氨基酸序列。异源序列可以是例如用于纯化重组蛋白的序列（例如 FLAG、多组氨酸（例如六组氨酸）、凝集素（HA）、谷胱甘肽-S-转移酶（GST）、或麦芽糖结合蛋白（MBP））。异源序列也可以是可用作可检测标志物的蛋白质，例如萤光素酶、绿色荧光蛋白（GFP）、或氯霉素乙酰基转移酶（CAT）。在一些实施方案中，融合蛋白含有来自另一种蛋白质的信号序列。在某些宿主细胞（例如酵母宿主细胞）中，可以经由使用异源信号序列提高靶蛋白的表达和/或分泌。在一些实施方案中，融合蛋白可以含有可用于例如引发免疫应答以生成抗体的载体（例如 K_{LH}）或 ER 或高尔基体保留信号。异源序列可以是不同长度的，并且在一些情况中可以是比与异源序列衔接的全长靶蛋白质更长的序列。

[0108] 工程化宿主可以天然表达本文中描述的途径的酶中的无一或一些（例如一种或多种、两种或更多种、三种或更多种、四种或更多种、五种或更多种、或六种或更多种）。如此，工程化宿主内的途径可以包含所有外源酶，或者可以包含内源和外源酶两者。也可以破坏工程化宿主的内源基因以阻止不想要的代谢物的形成或阻止经由对中间体起作用的其它酶引起的途径中此类中间体的损失。工程化宿主可以称为重组宿主或重组宿主细胞。如本文中描述的，重组宿主可以包含编码如本文中描述的脱氢酶、 β -酮硫解酶、乙酰乙酰基-CoA 合酶、羧化酶、还原酶、水合酶、硫酯酶、单加氧酶、硫酯酶或转氨酶中的一种或多种的核酸。

[0109] 另外，可以使用本文中描述的分离的酶，使用来自宿主微生物的裂解物（例如细胞裂解物）作为酶来源，或者使用来自不同宿主微生物的多种裂解物作为酶来源在体外实施 C6 结构单元的生成。

[0110] 可以在一种或多种宿主株中实施本文中描述的途径的反应，所述宿主株 (a) 天然表达一种或多种相关酶，(b) 经过遗传工程化改造以表达一种或多种相关酶，或 (c) 天然表达一种或多种相关酶，并且经过遗传工程化改造以表达一种或多种相关酶。或者，相关酶可以自上述类型的宿主细胞提取，并且可以以纯化或半纯化形式使用。此外，此类提取物包括可以作为相关酶来源使用的裂解物（例如细胞裂解物）。在由本文件提供的方法中，可以在宿主细胞中实施所有步骤，可以使用提取的酶实施所有步骤，或者可以在细胞中实施一些步骤，并且可以使用提取的酶实施其它步骤。

[0111] 生成用于转化成 C6 结构单元的 C6 脂肪族主链的酶

[0112] 如图 1 和图 2 中描绘的，可以使用 NADH 或 NADPH 依赖性酶经由两个循环的 CoA 依赖性碳链延长从乙酰基-CoA 形成用于转化成 C6 结构单元的 C6 脂肪族主链。

[0113] 在一些实施方案中, CoA 依赖性碳链延长循环包括 β -酮硫解酶或乙酰基-CoA 羧化酶和乙酰乙酰基-CoA 合酶、3-羟酰基-CoA 脱氢酶或 3-氧化酰基-CoA 还原酶、烯酰基-CoA 水合酶和反式-2-烯酰基-CoA 还原酶。 β -酮硫解酶可以将乙酰基-CoA 转化成乙酰乙酰基-CoA, 并且可以将丁酰基-CoA 转化成 3-氧己酰基-CoA。乙酰基-CoA 羧化酶可以将乙酰基-CoA 转化成丙二酰-CoA。乙酰乙酰基-CoA 合酶可以将丙二酰-CoA 转化成乙酰乙酰基-CoA。3-羟基丁酰基-CoA 脱氢酶可以将乙酰乙酰基-CoA 转化成 3-羟基丁酰基 CoA。3-氧化酰基-CoA 还原酶/3-羟酰基-CoA 脱氢酶可以将 3-氧己酰基-CoA 转化成 3-羟基己酰基-CoA。烯酰基-CoA 水合酶可以将 3-羟基丁酰基-CoA 转化成巴豆酰基-CoA, 并且可以将 3-羟基己酰基-CoA 转化成己-2-烯酰基-CoA。反式-2-烯酰基-CoA 还原酶可以将戊-2-烯酰基-CoA 转化成丁酰基-CoA, 并且可以将己-2-烯酰基-CoA 转化成己酰基-CoA。

[0114] 在一些实施方案中, β -酮硫解酶可以在 EC 2.3.1.9 下分类(诸如 atoB 或 phaA 的基因产物), 或 EC 2.3.1.16 下分类, 诸如 bktB 的基因产物。由来自钩虫贪铜菌的 bktB 编码的 β -酮硫解酶接受乙酰基-CoA 和丁酰基-CoA 作为底物, 形成 CoA 活化的 C6 脂肪族主链(参见例如 Haywood 等, FEMS Microbiology Letters, 1988, 52:91-96; Slater 等, J. Bacteriol., 1998, 180(8):1979-1987)。由 atoB 或 phaA 编码的 β -酮硫解酶接受乙酰基-CoA 作为底物, 形成丁酰基-CoA(参见 Haywood 等, 1988, 见上文; Slater 等, 1998, 见上文)。

[0115] 在一些实施方案中, 乙酰基-CoA 羧化酶可以例如在 EC 6.4.1.2 下分类。已经显示了通过乙酰基-CoA 羧化酶将乙酰基-CoA 转化成丙二酰基-CoA 提高脂肪酸合成的速率(Davis 等, J. Biol. Chem., 2000, 275(37), 28593-28598)。

[0116] 在一些实施方案中, 乙酰乙酰基-CoA 合酶可以在 EC 2.3.1.194 下分类。已经证明了可以在与多羟基丁酸合成有关的碳链延长中使用乙酰乙酰基-CoA 合酶作为 phaA 基因产物的不可逆替代(Matsumoto 等, Biosci. Biotechnol. Biochem., 2011, 75(2), 364-366)。

[0117] 在一些实施方案中, 3-羟酰基-CoA 脱氢酶或 3-氧化酰基-CoA 脱氢酶可以在 EC 1.1.1.- 下分类。例如, 3-羟酰基-CoA 脱氢酶可以在 EC 1.1.1.35 下分类, 诸如 fadB 的基因产物; 在 EC 1.1.1.157 下分类, 诸如 hbd 的基因产物(又可以称为 3-羟基丁酰基-CoA 脱氢酶); 或在 EC 1.1.1.36 下分类, 诸如 phaB 的乙酰乙酰基-CoA 还原酶基因产物(Liu&Chen, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2007, 76(5):1153-1159; Shen 等, Appl. Environ. Microbiol., 2011, 77(9):2905-2915; Budde 等, J. Bacteriol., 2010, 192(20):5319-5328)。

[0118] 在一些实施方案中, 3-氧化酰基-CoA 还原酶可以在 EC 1.1.1.100 下分类, 诸如 fabG 的基因产物(Budde 等, J. Bacteriol., 2010, 192(20):5319-5328; Nomura 等, Appl. Environ. Microbiol., 2005, 71(8):4297-4306)。

[0119] 在一些实施方案中, 烯酰基-CoA 水合酶可以在 EC 4.2.1.17 下分类, 诸如 crt 的基因产物, 或者在 EC 4.2.1.119 下分类, 诸如 phaJ 的基因产物(Shen 等, 2011, 见上文; Fukui 等, J. Bacteriol., 1998, 180(3):667-673)。

[0120] 在一些实施方案中, 反式-2-烯酰基-CoA 还原酶可以在 EC 1.3.1.38, EC 1.3.1.8, 或 EC 1.3.1.44 下分类, 诸如 ter(Nishimaki 等, J. Biochem., 1984, 95:1315-1321; Shen 等, 2011, 见上文) 或 tdter(Bond-Watts 等, Biochemistry, 2012, 51:6827-6837) 的基因

产物。

[0121] 在 C6 结构单元的生物合成中生成末端羧基基团的酶

[0122] 如图 3 和图 4 中描绘的,可以使用硫酯酶、醛脱氢酶、6-氧己酸脱氢酶、7-氧庚酸脱氢酶、或单加氧酶酶促形成末端羧基基团。

[0123] 在一些实施方案中,通过 EC 3.1.2. - 下分类的硫酯酶在己酰基 -CoA 中酶促形成导致 C6 结构单元合成的第一末端羧基基团,导致己酸的生成 (Cantu 等, *Protein Science*, 2010, 19, 1281 - 1295 ;Zhuang 等, *Biochemistry*, 2008, 47(9):2789 - 2796 ; Naggert 等, *J. Biol. Chem.*, 1991, 266(17):11044 - 11050)。硫酯酶可以是 YciA、tesB 或 Acot13 的基因产物。

[0124] 在一些实施方案中,可以通过在 EC 1.2.1.4 下分类的醛脱氢酶在己醛中酶促形成导致 C6 结构单元合成的第一末端羧基基团 (参见 Ho&Weiner, *J. Bacteriol.*, 2005, 187(3):1067 - 1073),导致己酸的生成。

[0125] 在一些实施方案中,通过在 EC 1.2.1.3 下分类的醛脱氢酶在己二酸半醛中酶促形成导致己二酸合成的第二末端羧基基团 (Guerrillot&Vandecasteele, *Eur. J. Biochem.*, 1977, 81, 185 - 192)。

[0126] 在一些实施方案中,通过 6-氧己酸脱氢酶诸如来自不动杆菌物种 (*Acinetobacter* sp.) 的 ChnE 的基因产物或 7-氧庚酸脱氢酶诸如来自 *Sphingomonas macrogolita* 的 ThnG 的基因产物在己二酸半醛中酶促形成导致己二酸合成的第二末端羧基基团 (Iwaki 等, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, 65(11), 5158 - 5162 ; López-Sánchez 等, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2010, 76(1), 110-118)。例如,6-氧己酸脱氢酶可以在 EC 1.2.1.63 下分类。例如,7-氧庚酸脱氢酶可以在 EC 1.2.1. - 下分类。

[0127] 在一些实施方案中,通过细胞色素 P450 家族中的单加氧酶诸如 CYP4F3B 在己二酸半醛中酶促形成导致己二酸合成的第二末端羧基基团 (参见例如 Sanders 等, *J. Lipid Research*, 2005, 46(5):1001-1008 ;Sanders 等, *The FASEB Journal*, 2008, 22(6):2064 - 2071)。

[0128] 已经在导致己二酸合成的酵母热带念珠菌 (*Candida tropicalis*) 中证明了 ω -氧化在将羧基基团引入链烷中的效用 (Okuhara 等, *Agr. Biol. Chem.*, 1971, 35(9), 1376 - 1380)。

[0129] 在 C6 结构单元的生物合成中生成末端胺基基团的酶

[0130] 如图 5 和图 6 中描绘的,可以使用 ω -转氨酶或脱乙酰酶酶促形成末端胺基基团。

[0131] 在一些实施方案中,通过例如在 EC 2.6.1.18、EC 2.6.1.19、EC 2.6.1.29、EC 2.6.1.48、或 EC 2.6.1.82 下分类的 ω -转氨酶 (诸如获自紫色色杆菌 (Genbank 登录号 AAQ59697.1, SEQ ID NO:7),铜绿假单胞菌 (Genbank 登录号 AAG08191.1, SEQ ID NO:8),丁香假单胞菌 (Genbank 登录号 AAY39893.1, SEQ ID NO:9),球形红杆菌 (Genbank 登录号 ABA81135.1, SEQ ID NO:10),河流弧菌 (Genbank 登录号 AAA57874.1, SEQ ID NO:11),灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*),或绿色梭菌 (*Clostridium viride*) 的) 在己二酸半醛中酶促形成导致 6-氨基己酸合成的第一末端胺基基团。可以在本文中描述的方法和宿主中使用的别的 ω -转氨酶来自大肠杆菌 (Genbank 登录号 AAA57874.1, SEQ ID NO:11)。一些例如在 EC 2.6.1.29 或 EC 2.6.1.82 下分类的 ω -转氨酶是二胺 ω -转氨酶 (例如 SEQ ID

NO:11)。

[0132] 来自紫色色杆菌的可逆 ω -转氨酶 (Genbank 登录号 AAQ59697.1, SEQ ID NO:7) 已经表明类似的活性,其接受 6-氨基己酸作为氨基供体,如此在己二酸半醛中形成第一末端胺基团 (Kaulmann 等, *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 41, 628 - 637)。

[0133] 来自灰色链霉菌的可逆 4-氨基丁酸:2-氧戊二酸转氨酶已经表明用于将 6-氨基己酸转化成己二酸半醛的活性 (Yonaha 等, *Eur. J. Biochem.*, 1985, 146, 101-106)。

[0134] 来自绿色梭菌的可逆 5-氨基戊酸转氨酶已经表明用于将 6-氨基己酸转化成己二酸半醛的活性 (Barker 等, *J. Biol. Chem.*, 1987, 262(19), 8994 - 9003)。

[0135] 在一些实施方案中,通过例如在 EC 2.6.1.29 下分类或例如在 EC 2.6.1.82 下分类的二胺转氨酶,诸如来自大肠杆菌的 YgjG 的基因产物 (Genbank 登录号 AAA57874.1, SEQ ID NO:12) 在 6-氨基己醛中酶促形成导致己亚甲基二胺合成的第二个末端胺基团。

[0136] ygjG 的基因产物接受一大批二胺碳链长度底物,诸如腐胺、尸胺和亚精胺 (Samsonova 等, *BMC Microbiology*, 2003, 3:2)。

[0137] 来自大肠杆菌菌株 B 的二胺转氨酶已经表明针对 1,7 二氨基庚烷的活性 (Kim, *The Journal of Chemistry*, 1964, 239(3), 783 - 786)。

[0138] 在一些实施方案中,通过例如在 EC 3.5.1.62 下分类的脱乙酰酶诸如乙酰基腐胺脱乙酰酶酶促形成导致庚亚甲基二胺合成的第二末端胺基团。来自藤黄微球菌 (*Micrococcus luteus*) K-11 的乙酰基腐胺脱乙酰酶接受一大批碳链长度底物,诸如乙酰基腐胺、乙酰基尸胺和 N8-乙酰基亚精胺 (参见例如 Suzuki 等, 1986, *BBA - General Subjects*, 882(1):140 - 142)。

[0139] 在 C6 结构单位的生物合成中生成末端羟基基团的酶

[0140] 如图 7 和图 8 中描绘的,可以使用单加氧酶或醇脱氢酶酶促形成末端羟基基团。

[0141] 在一些实施方案中,通过单加氧酶在己酸中酶促形成导致 C6 结构单元合成的第一末端羟基基团。例如,在例如 EC 1.14.15.1 下分类的单加氧酶 CYP153A 家族是可溶的,并且对末端羟基化具有区域特异性 (regio-specificity),其接受中等链长度底物 (参见例如 Koch 等, 2009, *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(2), 337-344; Funhoff 等, 2006, *J. Bacteriol.*, 188(44):5220 - 5227; Van Beilen & Funhoff, *Current Opinion in Biotechnology*, 2005, 16, 308 - 314; Nieder and Shapiro, *J. Bacteriol.*, 1975, 122(1), 93-98)。虽然在体外对 CYP153A 观察到非末端羟基化,但是在体内仅发生 1-羟基化 (Funhoff et al., *J. Bacteriol.*, 2006, 188(14), 5220 - 5227)。

[0142] 已经经由成功将 CYP153A6 的链长度特异性降低至低于 C8 加宽末端单加氧酶的底物特异性和活性 (Koch 等, 2009, 见上文)。

[0143] 在一些实施方案中,通过在 EC 1.1.1.- (例如 EC 1.1.1.1, 1.1.1.2, 1.1.1.21, 或 1.1.1.184) 下分类的醇脱氢酶在 6-羟基己醛中酶促形成导致 1,6 己二醇合成的第二末端羟基基团。

[0144] 生物化学途径

[0145] 到己酰基 -CoA 的途径,所述己酰基 -CoA 作为导致 C6 结构单元的中心前体的前体

[0146] 在一些实施方案中,如下自中心代谢物乙酰基 -CoA 合成己酰基 -CoA,即通过例如 EC 2.3.1.9 下分类的乙酰乙酰基 -CoA 硫解酶,诸如 atoB 或 phaA 的基因产物,或者通过例

如在 EC 6.4.1.2 下分类的乙酰基 -CoA 羧化酶和例如在 EC 2.3.1.194 下分类的乙酰乙酰基 -CoA 合酶经由丙二酰基 -CoA 将乙酰基 -CoA 转化成乙酰乙酰基 -CoA ;接着通过例如在 EC 1.1.1.35 (诸如 *fadB* 的基因产物) 下分类的或例如在 EC 1.1.1.157 (诸如 *hbd* 的基因产物) 下分类的 3- 羟基丁酰基 -CoA 脱氢酶将乙酰乙酰基 -CoA 转化成 (S)3- 羟基丁酰基 -CoA ;接着通过例如在 EC 4.2.1.17 下分类的烯酰基 -CoA 水合酶, 诸如 *crt* 的基因产物将 (S)3- 羟基丁酰基 -CoA 转化成巴豆酰基 -CoA ;接着通过例如在 EC 1.3.1.44 下分类的反式 -2- 烯酰基 -CoA 还原酶诸如 *ter* 或 *tdter* 的基因产物将巴豆酰基 -CoA 转化成丁酰基 -CoA ;接着通过例如在 EC 2.3.1.16 下分类的 β - 酮硫解酶诸如 *bktB* 的基因产物将丁酰基 -CoA 转化成 3- 氧代 - 己酰基 -CoA ;接着通过例如在 EC 1.1.1.35 下分类的 3- 羟酰基 -CoA 脱氢酶诸如 *fadB* 的基因产物或者通过例如在 EC 1.1.1.157 下分类的 3- 羟酰基 -CoA 脱氢酶诸如 *hbd* 的基因产物将 3- 氧代 - 己酰基 -CoA 转化成 (S)3- 羟基己酰基 -CoA ;接着通过例如在 EC 4.2.1.17 下分类的烯酰基 -CoA 水合酶诸如 *crt* 的基因产物将 (S)3- 羟基己酰基 -CoA 转化成己 -2- 烯酰基 -CoA ;接着通过例如在 EC 1.3.1.44 下分类的反式 -2- 烯酰基 -CoA 还原酶诸如 *ter* 或 *tdter* 的基因产物将己 -2- 烯酰基 -CoA 转化成己酰基 -CoA。参见图 1。

[0147] 在一些实施方案中, 从中心代谢物乙酰基 -CoA 合成己酰基 -CoA, 即通过例如在 EC 2.3.1.9 下分类的乙酰乙酰基 -CoA 硫解酶 (诸如 *atoB* 或 *phaA* 的基因产物) 或者通过例如 EC 6.4.1.2 下分类的乙酰基 -CoA 羧化酶和例如 EC 2.3.1.194 下分类的乙酰乙酰基 -CoA 合酶经由丙二酰基 -CoA 将乙酰基 -CoA 转化成乙酰乙酰基 -CoA ;接着通过例如在 EC 1.1.1.36 下分类的 3- 乙酰乙酰基 -CoA 还原酶, 诸如 *phaB* 的基因产物或者例如在 EC 1.1.1.100 下分类的 3- 乙酰乙酰基 -CoA 还原酶, 诸如 *fabG* 的基因产物将乙酰乙酰基 -CoA 转化成 (R)3- 羟基丁酰基 -CoA ;接着通过例如在 EC 4.2.1.119 下分类的烯酰基 -CoA 水合酶诸如 *phaJ* 的基因产物将 (R)3- 羟基丁酰基 -CoA 转化成巴豆酰基 -CoA ;接着通过例如在 EC 1.3.1.38 下分类的反式 -2- 烯酰基 -CoA 还原酶或者例如在 EC 1.3.1.8 下分类的酰基 - 脱氢酶将巴豆酰基 -CoA 转化成丁酰基 -CoA ;接着通过例如在 EC 2.3.1.16 下分类的 β - 酮硫解酶诸如 *bktB* 的基因产物将丁酰基 -CoA 转化成 3- 氧代 - 己酰基 -CoA ;接着通过例如 EC 1.1.1.36 下分类得到 3- 氧代酰基 -CoA 还原酶诸如 *phaB* 的基因产物或者例如在 EC 1.1.1.100 下分类的 3- 氧代酰基 -CoA 还原酶诸如 *fabG* 的基因产物将 3- 氧代 - 己酰基 -CoA 转化成 (R)3- 羟基己酰基 -CoA ;接着通过例如在 EC 4.2.1.119 下分类的烯酰基 -CoA 水合酶诸如 *phaJ* 的基因产物将 (R)3- 羟基己酰基 -CoA 转化成己 -2- 烯酰基 -CoA ;接着通过例如在 EC 1.3.1.38 下分类的反式 -2- 烯酰基 -CoA 还原酶或例如在 EC 1.3.1.8 下分类的酰基 -CoA 脱氢酶将己 -2- 烯酰基 -CoA 转化成己酰基 -CoA。参见图 2。

[0148] 使用己酰基 -CoA 作为产生中心前体己酸的前体的途径

[0149] 在一些实施方案中, 通过例如在 EC 3.1.2.- 下分类的硫酯酶诸如 *YciA*、*tesB* 或 *Acot13* 的基因产物将己酰基 -CoA 转化成己酸从中心代谢物己酰基 -CoA 合成己酸。

[0150] 在一些实施方案中, 如下从中心代谢物己酰基 -CoA 合成己酸, 即通过例如在 EC 1.2.1.57 下分类的丁醛脱氢酶将己酰基 -CoA 转化成己醛 ;接着通过例如在 EC 1.2.1.4 下分类的醛脱氢酶将己醛转化己酸。参见图 3。

[0151] 对作为辅因子的 NADH 和 NADPH 两者已经证明了己酰基 -CoA 到己醛的转化

(Palosaari and Rogers, J. Bacteriol., 1988, 170 (7), 2971 - 2976)。

[0152] 使用己酸作为己二酸的中心前体的途径

[0153] 在一些实施方案中,从中心前体己酸合成己二酸,即通过单加氧酶(例如细胞色素 P450)(诸如来自 CYP153 家族(例如 CYP153A6))将己酸转化成 6-羟基己酸;接着通过例如在 EC 1.1.1.- 下分类的醇脱氢酶诸如 YMR318C(例如在 EC 1.1.1.2 下分类,参见 GenBank 登录号 CAA90836.1)(Larroy 等, 2002, Biochem J., 361(Pt 1), 163 - 172), cpnD(Iwaki 等, 2002, Appl. Environ. Microbiol., 68(11):5671 - 5684) 或 gabD(Lütke-Eversloh&Steinbüchel, 1999, FEMS Microbiology Letters, 181(1):63 - 71) 的基因产物或例如在 EC 1.1.1.258 下分类的 6-羟基己酸脱氢酶诸如 ChnD 的基因产物(Iwaki 等, Appl. Environ. Microbiol., 1999, 65(11):5158-5162) 将 6-羟基己酸转化成己二酸半醛;接着通过例如在 EC 1.2.1.- 下分类的脱氢酶诸如 7-氧代庚酸脱氢酶(例如 ThnG 的基因产物), 6-氧己酸脱氢酶(例如 ChnE 的基因产物),或在 EC 1.2.1.3 下分类的醛脱氢酶将己二酸半醛转化成己二酸。参见图 4。由 YMR318C 编码的醇脱氢酶具有宽的底物特异性,包括 C6 醇的氧化。

[0154] 在一些实施方案中,如下从中心前体己酸合成己二酸,即通过单加氧酶(例如细胞色素 P450)(诸如来自 CYP153(例如 CYP153A) 将己酸转化成 6-羟基己酸;接着通过细胞色素 P450 将 6-羟基己酸转化成己二酸半醛(Sanders 等, J. Lipid Research, 2005, 46(5), 1001-1008; Sanders 等, The FASEB Journal, 2008, 22(6), 2064 - 2071);接着通过细胞色素 P450 家族中的单加氧酶诸如 CYP4F3B 将己二酸半醛转化成己二酸。参见图 4。

[0155] 使用己酸作为 6-氨基己酸和 ϵ -己内酰胺的中心前体的途径

[0156] 在一些实施方案中,如下从中心前体己酸合成 6-氨基己酸,即通过单加氧酶(例如细胞色素 P450)(诸如来自 CYP153 家族(例如 CYP153A6))将己酸转化成 6-羟基己酸;接着通过例如在 EC 1.1.1.2 下分类的醇脱氢酶诸如 YMR318C 的基因产物,例如在 EC 1.1.1.258 下分类的 6-羟基己酸脱氢酶,例如在 EC 1.1.1.- 下分类的 5-羟基戊酸脱氢酶诸如 cpnD 的基因产物,或例如在 EC 1.1.1.- 下分类的 4-羟基丁酸脱氢酶诸如 gabD 的基因产物将 6-羟基己酸转化成己二酸半醛;接着通过 ω -转氨酶(EC 2.6.1.18、EC 2.6.1.19、EC 2.6.1.29、EC 2.6.1.48、或 EC 2.6.1.82, 诸如 SEQ ID NO:7-12, 参见上文)将己二酸半醛转化成 6-氨基己酸。参见图 5。

[0157] 在一些实施方案中,如下从中心前体己酸合成 ϵ -己内酰胺,即通过单加氧酶(诸如来自 CYP153 家族(例如 CYP153A))将己酸转化成 6-羟基己酸;接着通过例如在 EC 1.1.1.2 下分类的醇脱氢酶诸如 YMR318C 的基因产物、例如在 EC 1.1.1.258 下分类的 6-羟基己酸脱氢酶、例如在 EC 1.1.1.- 下分类的 5-羟基戊酸脱氢酶诸如 cpnD 的基因产物、或例如在 EC 1.1.1.- 下分类的 4-羟基丁酸脱氢酶诸如 gabD 的基因产物将 6-羟基己酸转化成己二酸半醛;接着通过 ω -转氨酶(EC 2.6.1.18、EC 2.6.1.19、EC 2.6.1.29、EC 2.6.1.48、或 EC 2.6.1.82)将己二酸半醛转化成 6-氨基己酸;接着通过水解酶(EC 3.5.2.-)将 6-氨基己酸转化成 ϵ -己内酰胺。参见图 5。

[0158] 使用 6-氨基己酸、6-羟基己酸、或己二酸半醛作为己亚甲基二胺的中心前体的途径

[0159] 在一些实施方案中,如下从中心前体 6-氨基己酸合成己亚甲基二胺,即通过例如在 EC 1.2.99.6 下分类的羧酸还原酶诸如 car 的基因产物组合磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶增强剂(例如由来自枯草芽孢杆菌的 sfp 基因或来自诺卡氏菌属(*Nocardia*)的 npt 基因编码)或来自灰色链霉菌的 GriC 和 GriD 的基因产物将 6-氨基己酸转化成 6-氨基己醛(Suzuki et al., *J. Antibiot.*, 2007, 60(6), 380 - 387);接着通过 ω -转氨酶(例如 EC 2.6.1.18, EC 2.6.1.19, EC 2.6.1.48, EC 2.6.1.82, 诸如 SEQ ID NO:7-12)将 6-氨基己醛转化成己亚甲基二胺。羧酸还原酶可以获自例如海分枝杆菌(Genbank 登录号 ACC40567.1, SEQ ID NO:2),耻垢分枝杆菌(Genbank 登录号 ABK71854.1, SEQ ID NO:3), *Segniliparus rugosus*(Genbank 登录号 EFV11917.1, SEQ ID NO:4),马赛分枝杆菌(Genbank 登录号 EIV11143.1, SEQ ID NO:5),或 *Segniliparus rotundus*(Genbank 登录号 ADG98140.1, SEQ ID NO:6)。参见图 6。

[0160] 由 car 和增强剂 npt 或 sfp 的基因产物编码的羧酸还原酶具有较宽的底物特异性,包括末端双官能性 C4 和 C5 羧酸(Venkitasubramanian 等, *Enzyme and Microbial Technology*, 2008, 42, 130 - 137)。

[0161] 在一些实施方案中,如下从中心前体 6-羟基己酸(其可以如图 7 中描述的那样生成)合成己亚甲基二胺,即通过例如在 EC 1.2.99.6 下分类的羧酸还原酶诸如 car 的基因产物(参见上文)组合磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶增强剂(例如由来自枯草芽孢杆菌的 sfp 基因或来自诺卡氏菌属的 npt 基因编码)或 GriC 和 GriD 的基因产物(Suzuki 等, 2007, 见上文)将 6-羟基己酸转化成 6-羟基己醛;接着通过例如在 EC 2.6.1.18, EC 2.6.1.19, EC 2.6.1.29, EC 2.6.1.48, 或 EC 2.6.1.82 下分类的 ω -转氨酶(诸如 SEQ ID NO:7-12, 参见上文)将 6-羟基己醛转化成 6-氨基己醇;接着通过例如在 EC 1.1.1.-(例如 EC 1.1.1.1, EC 1.1.1.2, EC 1.1.1.21, 或 EC 1.1.1.184)下分类的醇脱氢酶诸如 YMR318C 或 YqhD 的基因产物(Liu 等, *Microbiology*, 2009, 155, 2078 - 2085; Larroy 等, 2002, *Biochem J.*, 361(Pt 1), 163 - 172; Jarboe, 2011, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89(2), 249-257)或具有 Genbank 登录号 CAA81612.1 的蛋白质转化成 7-氨基庚醛;接着通过例如在 EC 2.6.1.18, EC 2.6.1.19, EC 2.6.1.29, EC 2.6.1.48, 或 EC 2.6.1.82 下分类的 ω -转氨酶(诸如 SEQ ID NO:7-12, 参见上文)转化成庚亚甲基二胺。参见图 6。

[0162] 在一些实施方案中,如下从中心前体 6-氨基己酸合成己亚甲基二胺,即通过 N-乙酰基转移酶诸如例如在 EC 2.3.1.32 下分类的赖氨酸 N-乙酰基转移酶将 6-氨基己酸转化成 N6-乙酰基-6-氨基己酸;接着通过例如在 EC 1.2.99.6 下分类的羧酸还原酶(诸如 car 的基因产物(参见上文))组合磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶增强剂(例如由来自枯草芽孢杆菌的 sfp 基因或诺卡氏菌属的 npt 基因编码)或 GriC 和 GriD 的基因产物转化成 N6-乙酰基-6-氨基己醛;接着通过例如在 EC 2.6.1.18, EC 2.6.1.19, EC 2.6.1.29, EC 2.6.1.48, 或 EC 2.6.1.82 下分类的 ω -转氨酶(诸如 SEQ ID NO:7-12, 参见上文)转化成 N6-乙酰基-1,6-二氨基己烷;接着通过例如在 EC 3.5.1.62 下分类的乙酰基腐胺脱乙酰酶转化成庚亚甲基二胺。参见图 6。

[0163] 在一些实施方案中,如下从中心前体己二酸半醛合成己亚甲基二胺,即通过例如在 EC 1.2.99.6 下分类的羧酸还原酶诸如 car 的基因产物(参见上文)组合磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶增强剂(例如,由来自枯草芽孢杆菌的 sfp 基因或诺卡氏菌属的 npt 基

因编码)或 GriC 和 GriD 的基因产物将己二酸半醛转化成己二醛;接着通过例如在 EC 2.6.1.18, EC 2.6.1.19, 或 EC 2.6.1.48 下分类的 ω -转氨酶转化成 6-氨基己醛;接着通过例如在 EC 2.6.1.18, EC 2.6.1.19, EC 2.6.1.29, EC 2.6.1.48, 或 EC 2.6.1.82 下分类的 ω -转氨酶(诸如 SEQ ID NO:7-12)转化成己亚甲基二胺。参见图 6。

[0164] 使用己酸作为 6-羟基己酸或 1,6-己二醇的中心前体的途径

[0165] 在一些实施方案中,如下从中心前体己酸合成 6-羟基己酸,即通过单加氧酶(诸如来自 CYP153 家族(例如 CYP153A))将己酸转化成 6-羟基己酸。参见图 7。

[0166] 在一些实施方案中,如下从中心前体 6-羟基己酸合成 1,6-己二醇,即通过例如在 EC 1.2.99.6 下分类的羧酸还原酶诸如 car 的基因产物(参见上文)组合磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶增强剂(例如由来自枯草芽孢杆菌的 sfp 基因或诺卡氏菌属的 npt 基因编码)或来自灰色链霉菌的 GriC 和 GriD 的基因产物将 6-羟基己酸转化成 6-羟基己醛(Suzuki 等, *J. Antibiot.*, 2007, 60(6), 380-387);接着通过例如在 EC 1.1.1.-诸如 EC 1.1.1.1, EC 1.1.1.2, EC 1.1.1.21, 或 EC 1.1.1.184)下分类的醇脱氢酶诸如 YMR318C 或 YqhD 的基因产物(来自大肠杆菌, Genbank 登录号 AAA69178.1)(参见例如 Liu 等, *Microbiology*, 2009, 155, 2078-2085; Larroy 等, 2002, *Biochem J.*, 361(Pt 1), 163-172; 或 Jarboe, 2011, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 89(2), 249-257)或具有 Genbank 登录号 CAA81612.1 的蛋白质(来自嗜热脂肪土芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*))将 6-羟基己醛转化成 1,6-己二醇。参见图 8。

[0167] 培养策略

[0168] 在一些实施方案中,使用厌氧、需氧或微需氧培养条件在重组宿主中生物合成一种或多种 C6 结构单元。可以使用非循环或循环培养策略来实现期望的培养条件。例如,可以使用非循环策略来实现厌氧、需氧或微需氧培养条件。

[0169] 在一些实施方案中,可以使用循环培养策略来在厌氧培养条件和需氧培养条件之间交替。

[0170] 在一些实施方案中,培养策略需要营养物限制诸如氮、磷酸盐或氧限制。

[0171] 在一些实施方案中,可以采用使用例如陶瓷中空纤维膜的细胞保留策略来实现并维持补料分批或连续发酵期间的高细胞密度。

[0172] 在一些实施方案中,在一种或多种 C6 结构单元合成中对发酵补料的主要碳源可以源自生物或非生物给料。

[0173] 在一些实施方案中,生物给料可以是或者可以源自单糖、二糖、木质纤维素、半纤维素、纤维素、木质素、乙酰丙酸和甲酸、甘油三酯、甘油、脂肪酸、农业废物、浓缩酒糟或城市废物。

[0174] 已经在几种微生物(诸如大肠杆菌、钩虫贪铜菌、食油假单胞菌、恶臭假单胞菌和解脂耶罗维亚酵母)中证明了源自生物柴油生产的粗制甘油的有效分解代谢(Lee 等, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 2012, 166:1801-1813; Yang 等, *Biotechnology for Biofuels*, 2012, 5:13; Meijnen 等, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2011, 90:885-893)。

[0175] 已经在几种生物体(诸如钩虫贪铜菌和恶臭假单胞菌)中在经由前体丙酰基-CoA 合成 3-羟基戊酸中证明了木质纤维素衍生的乙酰丙酸的有效分解代谢(Jaremko and Yu, 2011, 见上文; Martin and Prather, *J. Biotechnol.*, 2009, 139:61-67)。

[0176] 已经在几种微生物（诸如恶臭假单胞菌、钩虫贪铜菌）中证明了木质素衍生的芳香族化合物诸如苯甲酸类似物的有效分解代谢 (Bugg 等, *Current Opinion in Biotechnology*, 2011, 22, 394 - 400 ;Pérez-Pantoja 等, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2008, 32, 736 - 794)。

[0177] 已经在几种微生物（包括解脂耶罗维亚酵母）中证明了农业废物（诸如橄榄磨坊废水）的有效利用 (Papanikolaou 等, *Bioresour. Technol.*, 2008, 99(7):2419-2428)。

[0178] 已经对几种微生物（诸如大肠杆菌、谷氨酸棒状杆菌和德氏乳杆菌和乳酸乳球菌）证明了可发酵糖类（诸如源自纤维素、半纤维素、甘蔗和甜菜糖蜜、木薯、玉米和其它农业来源的单糖和二糖）的有效利用（参见例如 Hermann 等, *J. Biotechnol.*, 2003, 104:155 - 172 ;Wee 等, *Food Technol. Biotechnol.*, 2006, 44(2):163 - 172 ;Ohashi 等, *J. Bioscience and Bioengineering*, 1999, 87(5):647-654)。

[0179] 已经对钩虫贪铜菌证明了源自多种农业木质纤维素来源的糠醛的有效利用 (Li 等, *Biodegradation*, 2011, 22:1215 - 1225)。

[0180] 在一些实施方案中,非生物给料可以是或者可以源自天然气、合成气、CO₂/H₂、甲醇、乙醇、苯甲酸、来自环己烷氧化过程的非挥发性残留物 (NVR) 或碱洗废物流、或对苯二甲酸 / 异酞酸混合物废物流。

[0181] 已经对甲基营养型酵母巴斯德毕赤酵母证明了甲醇的有效分解代谢。

[0182] 已经对克鲁佛梭菌证明了乙醇的有效分解代谢 (Seedorf 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2008, 105(6)2128-2133)。

[0183] 已经对钩虫贪铜菌证明了 CO₂和 H₂(其可以源自天然气和其它化学和石油化学来源)的有效分解代谢 (Prybylski 等, *Energy, Sustainability and Society*, 2012, 2:11)。

[0184] 已经对多种微生物（诸如杨氏梭菌和自产乙醇梭菌）证明了合成气的有效分解代谢 (Köpke 等, *Applied and Environmental Microbiology*, 2011, 77(15):5467 - 5475)。

[0185] 已经对多种微生物（诸如食酸代尔夫特菌和钩虫贪铜菌证明了来自环己烷过程的非挥发性残留物废物流的有效分解代谢 (Ramsay 等, *Applied and Environmental Microbiology*, 1986, 52(1):152 - 156)。

[0186] 在一些实施方案中,宿主微生物是原核生物。例如,原核生物可以是来自以下的细菌:埃希氏菌属如大肠杆菌;梭菌属如杨氏梭菌、自产乙醇梭菌或者克鲁佛梭菌;棒状杆菌属如谷氨酸棒状杆菌;贪铜菌属如钩虫贪铜菌或者耐金属贪铜菌;假单胞菌属如荧光假单胞菌、恶臭假单胞菌或者食油假单胞菌;代尔夫特菌属如食酸代尔夫特菌;芽孢杆菌属如枯草芽孢杆菌;乳杆菌属如德氏乳杆菌;或者乳球菌属如乳酸乳球菌。此类原核生物也可以是构建能够生成一种或多种 C7 结构单元的本文中描述的重组宿主细胞的基因来源。

[0187] 在一些实施方案中,宿主微生物是真核生物。例如,真核生物可以是丝状真菌,例如来自曲霉属如黑曲霉的。或者,真核生物可以是酵母,例如来自酵母属如酿酒酵母;来自毕赤氏酵母属如巴斯德毕赤酵母;来自耶罗维亚酵母属如解脂耶罗维亚酵母;来自伊萨酵母属如东方伊萨酵母;来自德巴利酵母属如汉逊德巴利酵母;来自 *Arxula* 属如 *Arxula adenoinivorans*;或者来自克鲁维酵母菌属如乳酸克鲁维酵母菌的。此类真核生物也可以是构建能够生成一种或多种 C6 结构单元的本文中描述的重组宿主细胞的基因来源。

[0188] 代谢工程

[0189] 本文件提供方法,所述方法牵涉少于对所有上述途径描述的所有的步骤。这种方法可牵涉例如此类步骤中的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或者更多个。在这种方法包含少于所有步骤的情况下,第一个且在一些实施方案中唯一的步骤可为所列步骤中的任何步骤。

[0190] 此外,本文中描述的重组宿主可以包括上述酶中的任何组合,使得所述步骤中的一个或者多个,例如此类步骤中的 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 或者更多个可以在重组宿主内实施。本文件提供所列出的和基因工程化以表达本文件中列举的任何酶的一种或者多中(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12 或者更多种)重组形式的任何属和种的宿主细胞。如此,例如,宿主细胞可含有外源核酸,其编码催化本文中描述的任何途径的一个或者多个步骤的酶。

[0191] 另外,本文件认识到,在酶已经被描述为接受 CoA 活化的底物的情况下,存在与 [acp] 结合底物相关的相似的酶活性,其不一定为相同的酶种类。

[0192] 此外,本文件认识到,在酶已经被描述为接受底物的 (R)-对映异构体的情况下,存在与底物的 (S)-对映异构体相关的相似的酶活性,其不一定为相同的酶种类。

[0193] 本文件还认识到,在已经显示酶接受特定辅因子如 NADPH 或者共底物如乙酰基-CoA 的情况下,许多酶在催化特定酶活性中在接受大量不同辅因子或者共底物方面是泛宿主性的 (promiscuous)。此外,本文件认识到,在酶对例如特定辅助因子如 NADH 具有高特异性的情况下,对辅助因子 NADPH 具有高特异性的具有相似或者相同活性的酶可为不同的酶种类。

[0194] 在一些实施方案中,本文中概述的途径中的酶是经由非直接或者合理酶设计方法的酶工程的结果,目的在于改善活性、改善特异性、降低反馈抑制、降低阻抑、改善酶溶解度、改变立体特异性,或者改变辅助因子特异性。

[0195] 在一些实施方案中,可以将本文概述的途径中的酶经由附加型或者染色体整合方法基因给予(即,过表达)至所得的遗传修饰的生物体中。

[0196] 在一些实施方案中,可以利用基因组级别 (genome-scale) 系统生物学技术如通量平衡分析来设计用于将碳流量引导至 C6 结构单元的基因组级别的弱化或者敲除策略。

[0197] 弱化策略包括但不限于使用转座子、同源重组(双交叉方法)、诱变、酶抑制剂和 RNAi 干扰。

[0198] 在一些实施方案中,可以利用通量组 (fluxomic)、代谢物组 (metabolomic) 和转录物组 (transcriptomal) 数据来告知或者支持基因组级别的系统生物学技术,由此在将碳流量导向 C6 结构单元中设计基因组级别的弱化或者敲除策略。

[0199] 在一些实施方案中,宿主微生物的对高浓度的 C6 结构单元的耐受性可以通过在选择性环境中的连续培养来改善。

[0200] 在一些实施方案中,可以弱化或增强宿主微生物的内源生物化学网络以 (1) 确保乙酰基-CoA 的胞内利用度, (2) 产生 NADH 或 NADPH 不平衡,其仅可以经由一种或多种 C6 结构单元的形成来平衡, (3) 阻止降解导致并包含 C6 结构单元的中心代谢物,中心前体,并且 (4) 确保从细胞的有效流出。

[0201] 在需要乙酰基-CoA 的胞内利用度以合成 C6 结构单元的一些实施方案中,可以在

宿主生物体中弱化催化乙酰基 -CoA 水解的内源酶, 诸如短链长度硫酯酶。

[0202] 在需要乙酰基 -CoA 的胞内利用度以合成 C6 结构单元的一些实施方案中, 可以弱化生成乙酸的内源磷酸转乙酰酶诸如 *pta* (Shen 等, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77(9):2905 - 2915)。

[0203] 在需要乙酰基 -CoA 的胞内利用度以合成 C6 结构单元的一些实施方案中, 可以弱化乙酸合成途径中编码乙酸激酶的内源基因 (诸如 *ack*)。

[0204] 在需要乙酰基 -CoA 和 NADH 的胞内利用度以合成 C6 结构单元的一些实施方案中, 可以弱化编码催化将丙酮酸降解成乳酸的酶 (诸如由 *ldhA* 编码的乳酸脱氢酶) 的内源基因 (Shen 等, 2011, 见上文)。

[0205] 在需要乙酰基 -CoA 和 NADH 的胞内利用度以合成 C6 结构单元的一些实施方案中, 可以弱化编码催化将磷酸烯醇丙酮酸 (phosphoenolpyruvate) 降解成琥珀酸的酶 (诸如 *menaquinol*-延胡索酸氧化还原酶) 的内源基因, 诸如 *frdBC* (参见例如 Shen 等, 2011, 见上文)。

[0206] 在需要乙酰基 -CoA 和 NADH 的胞内利用度以合成 C6 结构单元的一些实施方案中, 可以弱化编码催化将乙酰基 -CoA 降解成乙醇的酶 (诸如由 *adhE* 编码的醇脱氢酶) 的内源基因 (Shen 等, 2011, 见上文)。

[0207] 在一些实施方案中, 在途径需要过量的 NADH 辅因子以合成 C6 结构单元的情况下, 可以在宿主生物体中过表达重组甲酸脱氢酶基因 (Shen 等, 2011, 见上文)。

[0208] 在一些实施方案中, 在途径需要过量的 NADH 辅因子以合成 C7 结构单元的情况下, 可以弱化重组 NADH-消耗性转氢酶。

[0209] 在一些实施方案中, 可以弱化编码催化将丙酮酸降解成乙醇的酶 (诸如丙酮酸脱羧酶) 的内源基因。

[0210] 在一些实施方案中, 可以弱化编码催化生成异丁醇的酶 (诸如 2-酮酸脱羧酶) 的内源基因。

[0211] 在需要乙酰基 -CoA 的胞内利用度以合成 C6 结构单元的一些实施方案中, 可以在微生物中过表达重组乙酰基 -CoA 合成酶诸如 *acs* 的基因产物 (Sato 等, *J. Bioscience and Bioengineering*, 2003, 95(4):335 - 341)。

[0212] 在一些实施方案中, 可以通过弱化内源葡萄糖 -6-磷酸异构酶 (EC 5.3.1.9) 将碳流量引导入戊糖磷酸循环中以提高 NADPH 的供应。

[0213] 在一些实施方案中, 可以通过过表达 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶和 / 或转酮醇酶将碳流量改变方向到戊糖磷酸循环中以提高 NADPH 供应 (Lee 等, 2003, *Biotechnology Progress*, 19(5), 1444 - 1449)。

[0214] 在一些实施方案中, 在途径在合成 C6 结构单元中需要过量 NADPH 辅因子的情况下, 可以在宿主生物体中过表达编码吡啶核苷酸转氢酶的基因诸如 *UdhA* (Brigham 等, *Advanced Biofuels and Bioproducts*, 2012, Chapter 39, 1065-1090)。

[0215] 在一些实施方案中, 在途径在合成 C6 结构单元中需要过量的 NADPH 辅因子的情况下, 可以在宿主生物体中过表达重组甘油醛 -3-磷酸 -脱氢酶基因诸如 *GapN* (Brigham 等, 2012, 见上文)。

[0216] 在一些实施方案中, 在途径在合成 C6 结构单元中需要过量的 NADPH 辅因子的情况

中,可以在宿主生物体中过表达重组苹果酸酶基因诸如 maeA 或 maeB(Brigham 等,2012,见上文)。

[0217] 在一些实施方案中,在途径在合成 C6 结构单元中需要过量的 NADPH 辅因子的情况中,可以在宿主生物体中过表达重组葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因诸如 zwf(Lim 等, J. Bioscience and Bioengineering, 2002, 93(6), 543-549)。

[0218] 在一些实施方案中,在途径在合成 C6 结构单元中需要过量的 NADPH 辅因子的情况中,可以在宿主生物体中过表达重组果糖 1,6 二磷酸酶基因诸如 fbp(Becker 等, J. Biotechnol., 2007, 132:99-109)。

[0219] 在一些实施方案中,在途径在合成 C6 结构单元中需要过量的 NADPH 辅因子的情况中,可以弱化内源磷酸丙糖异构酶 (EC 5.3.1.1)。

[0220] 在一些实施方案中,在途径在合成 C6 结构单元中需要过量的 NADPH 辅因子的情况中,可以在宿主生物体中过表达重组葡萄糖脱氢酶诸如 gdh 的基因产物 (Sato 等, J. Bioscience and Bioengineering, 2003, 95(4):335-341)。

[0221] 在一些实施方案中,可以弱化促进将 NADPH 转化成 NADH 的内源酶,诸如 NADH 生成循环,其可以经由 EC 1.4.1.2(NADH 特异性)和 EC 1.4.1.4(NADPH 特异性)下分类的谷氨酸脱氢酶的互变产生。

[0222] 在一些实施方案中,可以弱化利用 NADH 和 NADPH 两者作为辅因子的内源谷氨酸脱氢酶 (EC 1.4.1.3)。

[0223] 在一些实施方案中,可以通过仅表达胞质域而非将 P450 锚定至内质网的 N 端区增溶膜结合细胞色素 P450 诸如 CYP4F3B(Scheller 等, J. Biol. Chem., 1994, 269(17):12779-12783)。

[0224] 在一些实施方案中,可以经由以与小的可溶蛋白(例如麦芽糖结合蛋白)的融合蛋白表达增溶烯酰基-CoA 还原酶 (Gloerich 等, FEBS Letters, 2006, 580, 2092-2096)。

[0225] 在使用天然积累多羟基链烷酸酯的宿主的一些实施方案中,可以在宿主株中弱化内源酶聚合物合酶。

[0226] 在一些实施方案中,可以在宿主中过表达 L-丙氨酸脱氢酶以从丙酮酸再生 L-丙氨酸作为 ω -转氨酶反应的氨基供体。

[0227] 在一些实施方案中,可以在宿主中过表达 L-谷氨酸脱氢酶、L-谷氨酰胺合成酶、或谷氨酰胺合酶以从 2-氧代戊二酸再生 L-谷氨酸作为 ω -转氨酶反应的氨基供体。

[0228] 在一些实施方案中,可以弱化降解中心代谢物和中心前体,导致并包含 C6 结构单元的酶,诸如 EC 1.3.1.62 下分类的庚二酰基-CoA 脱氢酶;例如在 EC1.3.8.7、EC 1.3.8.1 或 EC 1.3.99.- 下分类的酰基-CoA 脱氢酶;和/或例如在 EC1.3.8.6 下分类的丁酰基-CoA 脱氢酶。

[0229] 在一些实施方案中,可以弱化经由辅酶 A 酯化活化 C6 结构单元的内源酶诸如例如 EC 6.2.1.- 下分类的 CoA 连接酶(例如己二酰基-CoA 合成酶)。

[0230] 在一些实施方案中,可以通过对细胞膜的遗传工程化结构修饰或提高 C6 结构单元的任何相关转运蛋白活性增强或放大 C6 结构单元跨越细胞膜到胞外介质的流出。

[0231] 可以通过过表达宽底物范围多药物转运蛋白,诸如来自枯草芽孢杆菌的 Blt(Woolridge 等, 1997, J. Biol. Chem., 272(14):8864-8866);来自大肠杆菌的 AcrB 和

AcrD(Elkins&Nikaido, 2002, J. Bacteriol., 184(23), 6490 - 6499), 来自金黄色葡萄球菌的 NorA(Ng 等, 1994, Antimicrob Agents Chemother, 38(6), 1345 - 1355), 或来自枯草芽孢杆菌的 Bmr(Neyfakh, 1992, Antimicrob Agents Chemother, 36(2), 484 - 485) 增强或放大己亚甲基二胺的流出。

[0232] 可以通过过表达溶质转运蛋白诸如来自谷氨酸棒状杆菌的 lysE 转运蛋白增强或放大 6-氨基己酸和庚亚甲基二胺的流出 (Bellmann 等, 2001, Microbiology, 147, 1765 - 1774)。

[0233] 可以通过过表达二羧酸转运蛋白诸如来自谷氨酸棒状杆菌的 SucE 转运蛋白增强或扩增己二酸的流出 (Huhn 等, Appl. Microbiol. & Biotech., 89(2), 327 - 335)。

[0234] 使用重组宿主生成 C6 结构单元

[0235] 通常, 可以通过提供宿主微生物并且用含有如上文描述的合适碳源的培养基培养提供的微生物生成一种或多种 C6 结构单元。一般地, 培养基和 / 或培养条件可以使得微生物生长至足够的密度, 并且有效生成 C6 结构单元。对于大规模生产工艺, 可以使用任何方法, 诸如那些在别处描述的 (Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2nd Edition, Editors: A. L. Demain and J. E. Davies, ASM Press; and Principles of Fermentation Technology, P. F. Stanbury and A. Whitaker, Pergamon)。简言之, 用特定的微生物接种含有合适培养基的大罐 (例如, 100 加仑, 200 加仑, 500 加仑, 或更大的罐)。在接种后, 温育微生物以容许生成生物量。一旦达到期望的生物量, 可以将含有微生物的培养液转移到第二个罐。此第二个罐可以是任何大小。例如, 第二个罐可以比 / 与第一个罐大、小或相同大小。通常, 第二个罐大于第一个, 从而可以对来自第一个罐的培养液添加额外的培养基。另外, 此第二个罐内的培养基可以与第一个罐中使用的培养基相同或不同。

[0236] 一旦转移, 可以温育微生物以容许生成 C6 结构单元。一旦生成, 可以使用任何方法来分离 C6 结构单元。例如, 可以经由吸附方法从发酵液选择性回收 C6 结构单元。在己二酸和 6-氨基己酸的情况中, 所得的洗脱液可以经由蒸发进一步浓缩, 经由蒸发和 / 或冷却结晶来结晶, 并且经由离心回收晶体。在己亚甲基二胺和 1,6-庚二醇的情况中, 可以采用蒸馏来实现期望的产物纯度。

[0237] 本发明会在以下实施例中进一步描述, 所述实施例不限制权利要求书中描述的本发明范围。

实施例

[0238] 实施例 1

[0239] 用于在酿酒酵母中自葡萄糖循环合成己二酸的基因组级别弱化策略

[0240] 使用称作 iMM904 的基因组级别酿酒酵母模型进行基因组级别流量平衡分析 (Genome-scale Flux Balance Analysis) (Mo 等, BMC Systems Biology, 2009, 3(37), 1-17)。

[0241] 通过包括如发表工作中对真核生物体概述的 ω -氧化途径 (Sanders 等, Journal of Lipid Research, 2005, 46(5), 1001 - 1008) 扩充 IMM904 模型。此外, 扩充 iMM904 模型的过氧化物酶体中的 β -氧化反应, 并且包括相关膜转运反应。在验证扩充模型期间要求

延胡索酸还原酶的失活以比对模型流量与实验流量数据。

[0242] 将图 1 中概述的 NADH 特异性酶促反应掺入该模型中。

[0243] 容许己酸和己二酸至胞外介质的膜转运和从胞外介质中膜转运己酸和己二酸。

[0244] 在大肠杆菌中生成 1-丁醇中 NADH 的化学计量平衡在过表达甲酸脱氢酶时有效得多 (Shen 等, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2011, 77 (9), 2905 - 2915)。iMM904 模型包括甲酸脱氢酶,但是缺乏丙酮酸甲酸裂合酶活性,其被纳入酿酒酵母模型中。

[0245] 评估 NAD(H) 或 NADP(H) 依赖性酶的辅因子特异性,并且在出版文献就特异性而言不明确的情况下,假设混杂的酶。

[0246] 使用代谢工程工作台 Optflux 来搜索与弱化策略的生物化学网络有关的解空间 (solution space),搜索弱化策略 (1) 自葡萄糖在厌氧条件下生成己酸,接着 (2) 自胞外己酸在需氧条件下生成己二酸,期间共补料葡萄糖作为碳源和能源。

[0247] 优化试验发现了 4 种有益的弱化;即 (1) 弱化葡萄糖-6-磷酸异构酶,从而将流量引导入戊糖磷酸循环中;(2) 弱化丙酮酸脱羧酶或醇脱氢酶,从而阻止乙醇生成;(3) 弱化 2-酮酸脱羧酶,从而阻止异丁醇生成,并且 (4) 使 β -氧化失活,从而阻止中心前体、中心代谢物和己二酸降解。

[0248] 使用葡萄糖作为碳源和能源的此酿酒酵母突变体中的弱化经由生成己酸以使生物量生长最大化为手段有利于平衡 NADH。

[0249] 酿酒酵母突变体中的甲酸脱氢酶的过表达消除甲酸和丙酮酸的副产物形成,以摩尔产率 0.62 [(mol 己酸)/(mol 葡萄糖)] 生成己酸。

[0250] 在维持葡萄糖补料速率以匹配厌氧条件下的生长速率的情况中从厌氧至需氧培养的循环导致 0.38 [(mol 己二酸)/(mol 总葡萄糖)] 的总体摩尔产率。

[0251] 使用确认模型的生物化学网络的计算机模拟 (In-silico) 弱化确定培养策略 (厌氧和需氧条件之间的循环) 从补料葡萄糖主要生成己二酸。

[0252] 实施例 2

[0253] 在酿酒酵母中使用 NADH 不平衡将碳流量引导至己二酸自葡萄糖的微需氧合成的基因组级别弱化策略

[0254] 利用实施例 1 中概述的 iMM904 模型来评估在微需氧、底物氧化和生长限制培养条件下使用葡萄糖作为碳源和能源的非循环己二酸生成。

[0255] 使用扩充的 iMM904 模型和代谢工程工作台 Optflux;优化试验发现了最佳的弱化策略,包括:(1) 弱化己酸转运至胞外介质;(2) 弱化乙醇排出至胞外介质;(3) 弱化 2-羟基丁酸氧化还原酶,从而阻止 2-羟基丁酸生成;(4) 弱化 DL 甘油-3-磷酸酶,从而阻止甘油生成,并且 (5) 弱化苹果酸脱氢酶,从而阻止 NADH 至 NADPH 的互变。

[0256] 所得的酿酒酵母突变体生成己二酸作为平衡 NADH 以使生物量生长最大化的最有利手段,从而以摩尔产率 0.71 [(mol 己二酸)/(mol 葡萄糖)] 生成己二酸。

[0257] 使用确认模型的生物化学网络的计算机模拟弱化确定微需氧条件下的非循环培养策略从补料葡萄糖主要生成己二酸。

[0258] 实施例 3

[0259] 在酿酒酵母中使用 NADPH 不平衡将碳流量引导至己二酸自葡萄糖的需氧合成的基因组级别弱化策略

[0260] 利用实施例 1 中概述的 iMM904 模型来评估在需氧培养和生长限制条件下使用葡萄糖作为碳源和能源的非循环己二酸生成。

[0261] 通过图 2 中概述的等同 NADPH 特异性酶促反应替换图 1 中概述的 NADH 特异性酶促反应。

[0262] 使用扩充的 iMM904 模型和代谢工程工作台 Optflux ;优化试验发现了最佳的弱化策略,包括:(1) 弱化丙糖磷酸异构酶 / 磷酸葡萄糖异构酶,使流量重定向入戊糖磷酸循环;(2) 通过弱化 NADH 依赖性谷氨酸脱氢酶和脯氨酸氧化酶来阻止 NADPH 至 NADH 的互变。

[0263] 所得的酿酒酵母突变体生成己二酸作为平衡 NADPH 以使生物量生长最大化的最有利手段,从而以摩尔产率 0.4 [(mol 己二酸)/(mol 葡萄糖)] 生成己二酸。

[0264] 使用确认模型的生物化学网络的计算机模拟弱化确定需氧条件下的非循环培养策略从补料葡萄糖主要生成己二酸。

[0265] 实施例 4

[0266] 使用己酰基 -CoA 作为底物并且形成己酸的硫酯酶的酶活性

[0267] 将编码 His 标签的核苷酸序列添加至编码硫酯酶的来自大肠杆菌的 tesB 基因 (SEQ ID NO 1, 参见图 9), 使得可以产生 N- 末端有 HIS 标签的硫酯酶。将经修饰的 tesB 基因在 T7 启动子的控制下克隆入 pET15b 表达载体中。将表达载体转化入 BL21 [DE3] 大肠杆菌宿主中。于 37°C 在含有 50mL Luria Broth (LB) 培养基和抗生素选择压力的 250mL 摇瓶培养物中在以 230rpm 摇动的情况中培养所得的重组大肠杆菌菌株。使用 0.5mM IPTG 于 17°C 诱导培养物过夜。

[0268] 经由离心收获来自诱导的摇瓶培养物的团粒。重悬每个团粒,并且在 Y-per™ 溶液 (ThermoScientific, Rockford, IL) 中裂解。经由离心从上清液分离细胞碎片。使用 Ni- 亲和层析从上清液纯化硫酯酶,并且将洗脱液进行缓冲液更换,并且经由超滤浓缩。

[0269] 在缓冲液中一式三份实施酶活性测定法,所述缓冲液由 50mM 磷酸盐缓冲液 (pH = 7.4)、0.1mM Ellman 试剂、和 133 μM 己酰基 -CoA (作为底物) 组成。通过添加 0.8 μM tesB 基因产物至含有己酰基 -CoA 的测定缓冲液,并于 37°C 温育 20 分钟启动酶活性测定反应。通过于 412nm 的吸光度监测辅酶 A 的释放。将与仅底物对照 (其含有煮沸的酶) 有关的吸光度从活性酶测定法吸光度扣除,并与空载体对照比较。tesB 的基因产物接受己酰基 -CoA 作为底物,如经由相对分光光度术确定的 (参见图 10), 并且合成己酸作为反应产物。

[0270] 实施例 5

[0271] 使用己二酸半醛作为底物并且形成 6- 氨基己酸的 ω- 转氨酶的酶活性

[0272] 将编码 His 标签的核苷酸序列添加至分别编码 SEQ ID NO: 7、8、9、10、12 的 ω- 转氨酶的来自紫色色杆菌、铜绿假单胞菌、丁香假单胞菌、球形红杆菌、和河流弧菌的基因 (参见图 9), 使得可以产生 N- 末端有 HIS 标签的 ω- 转氨酶。将每种所得的经修饰基因在 T7 启动子的控制下克隆入 pET21a 表达载体中,并且将每种表达载体转化入 BL21 [DE3] 大肠杆菌宿主中。于 37°C 在含有 50mL LB 培养基和抗生素选择压力的 250mL 摇瓶培养物中在以 230rpm 摇动的情况中培养所得的重组大肠杆菌菌株。使用 1mM IPTG 于 16°C 诱导每种培养物过夜。

[0273] 经由离心收获来自每种经诱导的摇瓶培养物的团粒。重悬每个团粒,并经由超声处理裂解。经由离心分开细胞碎片与上清液,并且立即在酶活性测定法中使用无细胞提取

物。

[0274] 在缓冲液中实施逆向（即 6-氨基己酸至己二酸半醛）的酶活性测定法，所述缓冲液由终浓度 50mM HEPES 缓冲液（pH = 7.5）、10mM 6-氨基己酸、10mM 丙酮酸和 100 μ M 吡哆（pyridoxyl）5' 磷酸盐组成。通过添加 ω -转氨酶基因产物或空载体对照的无细胞提取物到含有 6-氨基己酸的测定缓冲液启动每个酶活性测定反应，并在以 250rpm 摇动的情况下于 25°C 温育 24 小时。经由 RP-HPLC 量化从丙酮酸形成 L-丙氨酸。

[0275] 每种没有 6-氨基己酸的仅酶对照表明丙酮酸至 L-丙氨酸的低基线转化。参见图 16。SEQ ID NO 7、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 10 和 SEQ ID NO 12 的基因产物接受 6-氨基己酸作为底物，如相对于空载体对照确认的。参见图 17。

[0276] 对 SEQ ID NO 7、SEQ ID NO 8、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 10 和 SEQ ID NO 12 的转氨酶确认正向（即己二酸半醛至 6-氨基己酸）的酶反应。在缓冲液中实施酶活性测定法，所述缓冲液由终浓度 50mM HEPES 缓冲液（pH = 7.5）、10mM 己二酸半醛、10mM L-丙氨酸和 100 μ M 吡哆 5' 磷酸盐组成。通过添加 ω -转氨酶基因产物或空载体对照的无细胞提取物到含有己二酸半醛的测定缓冲液启动每个酶活性测定反应，并在以 250rpm 摇动的情况下于 25°C 温育 4 小时。经由 RP-HPLC 量化丙酮酸的形成。

[0277] SEQ ID NO 7、SEQ ID NO 8、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 10 和 SEQ ID NO 12 的基因产物接受己二酸半醛作为底物，如相对于空载体对照确认的。参见图 18。确认 ω -转氨酶活性的可逆性，证明了 SEQ ID NO 7、SEQ ID NO 8、SEQ ID NO 9、SEQ ID NO 10 和 SEQ ID NO 12 的 ω -转氨酶接受己二酸半醛作为底物，并且合成 6-氨基己酸作为反应产物。

[0278] 实施例 6

[0279] 使用己二酸作为底物并且形成己二酸半醛的羧酸还原酶的酶活性

[0280] 将编码 HIS 标签的核苷酸序列添加至分别编码 SEQ ID NO:4 和 6 的羧酸还原酶的来自 *Segniliparus rugosus* 和 *Segniliparus rotundus* 的基因（参见图 9），使得可以生成 N-末端有 HIS 标签的羧酸还原酶。将每种经修饰的基因与编码有 HIS 标签的来自枯草芽孢杆菌的磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶一起（两者都在 T7 启动子下）克隆入 pET Duet 表达载体中。将每种表达载体转化入 BL21 [DE3] 大肠杆菌宿主，并且于 37°C 在含有 50mL LB 培养基和抗生素选择压力的 250mL 摇瓶培养物中在以 230rpm 摇动的情况中培养所得的重组大肠杆菌菌株。使用自身诱导培养基于 37°C 诱导每种培养物过夜。

[0281] 经由离心收获来自每种经诱导的摇瓶培养物的团粒。重悬每个团粒，并经由超声处理裂解，并经由离心分开细胞碎片与上清液。使用 Ni-亲和层析从上清液中纯化羧酸还原酶和磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶，以 10 倍稀释入 50mM HEPES 缓冲液（pH = 7.5）中，并经由超滤浓缩。

[0282] 在缓冲液中一式三份实施酶活性测定法（即从己二酸盐至己二酸半醛），所述缓冲液由终浓度 50mM HEPES 缓冲液（pH = 7.5）、2mM 己二酸、10mM $MgCl_2$ 、1mM ATP 和 1mM NADPH 组成。通过添加纯化的羧酸还原酶和磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶基因产物或空载体对照至含有己二酸的测定缓冲液启动每个酶活性测定反应，然后于室温温育 20 分钟。通过于 340nm 的吸光度监测 NADPH 的消耗。每种没有己二酸的仅酶对照表明 NADPH 的低基线消耗。参见图 11。

[0283] SEQ ID NO 4 和 SEQ ID NO 6 的基因产物（得到 sfp 的基因产物增强）接受己二

酸作为底物,如相对于空载体对照确认的(参见图 12),并且合成己二酸半醛。

[0284] 实施例 7

[0285] 使用 6-羟基己酸作为底物并且形成 6-羟基己醛的羧酸还原酶的酶活性

[0286] 将编码 His 标签的核苷酸序列添加至分别编码 SEQ ID NO:2-6 的羧酸还原酶的来自海分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、Segniliparus rugosus、马赛分枝杆菌、和 Segniliparus rotundus 的基因(参见图 9),使得可以生成 N-末端有 HIS 标签的羧酸还原酶。将每种经修饰的基因与编码有 His 标签的来自枯草芽孢杆菌的磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶一起(两者都在 T7 启动子下)克隆入 pET Duet 表达载体中。将每种表达载体与来自实施例 3 的表达载体一起转化入 BL21 [DE3] 大肠杆菌宿主。于 37°C 在含有 50mL LB 培养基和抗生素选择压力的 250mL 摇瓶培养物中在以 230rpm 摇动的情况中培养所得的重组大肠杆菌菌株。使用自身诱导培养基于 37°C 诱导每种培养物过夜。

[0287] 经由离心收获来自每种经诱导的摇瓶培养物的团粒。重悬每个团粒,并经由超声处理裂解。经由离心分开细胞碎片与上清液。使用 Ni-亲和和层析从上清液中纯化羧酸还原酶和磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶,以 10 倍稀释入 50mM HEPES 缓冲液 (pH = 7.5) 中,并经由超滤浓缩。

[0288] 在缓冲液中一式三份实施酶活性测定法(即从 6-羟基己酸至 6-羟基己醛),所述缓冲液由终浓度 50mM HEPES 缓冲液 (pH = 7.5)、2mM 6-羟基己醛、10mM MgCl₂、1mM ATP 和 1mM NADPH 组成。通过添加纯化的羧酸还原酶和磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶或空载体对照至含有 6-羟基己酸的测定缓冲液启动每个酶活性测定反应,然后于室温温育 20 分钟。通过于 340nm 的吸光度监测 NADPH 的消耗。每种没有 6-羟基己酸的仅酶对照表明 NADPH 的低基线消耗。参见图 11。

[0289] SEQ ID NO 2-6 的基因产物(得到 sfp 的基因产物增强)接受 6-羟基己酸作为底物,如相对于空载体对照确认的(参见图 13),并且合成 6-羟基己醛。

[0290] 实施例 8

[0291] 针对 6-氨基己醇形成 6-氧代己醇的 ω -转氨酶的酶活性

[0292] 将编码 N-末端 His 标签的核苷酸序列添加至分别编码 SEQ ID NO:7-12 的 ω -转氨酶的来自紫色色杆菌、铜绿假单胞菌、丁香假单胞菌、球形红杆菌、大肠杆菌、和河流弧菌基因(参见图 9),使得可以产生 N-末端有 HIS 标签的 ω -转氨酶。将经修饰基因在 T7 启动子的控制下克隆入 pET21a 表达载体中。将每种表达载体转化入 BL21 [DE3] 大肠杆菌宿主中。于 37°C 在含有 50mL LB 培养基和抗生素选择压力的 250mL 摇瓶培养物中在以 230rpm 摇动的情况中培养每种所得的重组大肠杆菌菌株。使用 1mM IPTG 于 16°C 诱导每种培养物过夜。

[0293] 经由离心收获来自每种经诱导的摇瓶培养物的团粒。重悬每个团粒,并经由超声处理裂解。经由离心分开细胞碎片与上清液,并且立即在酶活性测定法中使用无细胞提取物。

[0294] 在缓冲液中实施逆向(即 6-氨基己醇至 6-氧代己醇)的酶活性测定法,所述缓冲液由终浓度 50mM HEPES 缓冲液 (pH = 7.5)、10mM 6-氨基己醇、10mM 丙酮酸和 100 μ M 吡哆 5' 磷酸盐组成。通过添加 ω -转氨酶基因产物或空载体对照的无细胞提取物到含有 6-氨基己醇的测定缓冲液启动每个酶活性测定反应,并在以 250rpm 摇动的情况下于 25°C 温育 4

小时。经由 RP-HPLC 量化 L- 丙氨酸形成。

[0295] 每种没有 6- 氨基己醇的仅酶对照具有丙酮酸至 L- 丙氨酸的低基线转化。参见图 16。

[0296] SEQ ID NO 7-12 的基因产物接受 6- 氨基己醇作为底物, 如相对于空载体对照确认的 (参见图 21), 并且合成 6- 氧代己醇作为反应产物。鉴于 ω - 转氨酶活性的可逆性 (参见实施例 5), 可以推断 SEQ ID NO 7-12 的基因产物接受 6- 氨基己醇作为底物, 并且形成 6- 氧代己醇。

[0297] 实施例 9

[0298] 使用己亚甲基二胺作为底物并且形成 6- 氨基己醛的 ω - 转氨酶的酶活性

[0299] 将编码 N- 末端 His 标签的核苷酸序列添加至分别编码 SEQ ID NO:7-12 的 ω - 转氨酶的紫色色杆菌、铜绿假单胞菌、丁香假单胞菌、球形红杆菌、大肠杆菌、和河流弧菌基因 (参见图 9), 使得可以产生 N- 末端有 HIS 标签的 ω - 转氨酶。将经修饰基因在 T7 启动子的控制下克隆入 pET21a 表达载体中。将每种表达载体转化入 BL21 [DE3] 大肠杆菌宿主中。于 37°C 在含有 50mL LB 培养基和抗生素选择压力的 250mL 摇瓶培养物中在以 230rpm 摇动的情况中培养每种所得的重组大肠杆菌菌株。使用 1mM IPTG 于 16°C 诱导每种培养物过夜。

[0300] 经由离心收获来自每种经诱导的摇瓶培养物的团粒。重悬每个团粒, 并经由超声处理裂解。经由离心分开细胞碎片与上清液, 并且立即在酶活性测定法中使用无细胞提取物。

[0301] 在缓冲液中实施逆向 (即己亚甲基二胺至 6- 氨基己醛) 的酶活性测定法, 所述缓冲液由终浓度 50mM HEPES 缓冲液 (pH = 7.5)、10mM 己亚甲基二胺、10mM 丙酮酸和 100 μ M 吡哆 5' 磷酸盐组成。通过添加 ω - 转氨酶基因产物或空载体对照的无细胞提取物到含有己亚甲基二胺的测定缓冲液启动每个酶活性测定反应, 并在以 250rpm 摇动的情况下于 25°C 温育 4 小时。经由 RP-HPLC 量化 L- 丙氨酸形成。

[0302] 每种没有己亚甲基二胺的仅酶对照具有丙酮酸至 L- 丙氨酸的低基线转化。参见图 16。

[0303] SEQ ID NO 7-12 的基因产物接受己亚甲基二胺作为底物, 如相对于空载体对照确认的 (参见图 19), 并且合成 6- 氨基己醛作为反应产物。鉴于 ω - 转氨酶活性的可逆性 (参见实施例 5), 可以推断 SEQ ID 7-12 的基因产物接受 6- 氨基己醛作为底物, 并且形成己亚甲基二胺。

[0304] 实施例 10

[0305] 针对 N6- 乙酰基 -6- 氨基己酸形成 N6- 乙酰基 -6- 氨基己醛的羧酸还原酶的酶活性

[0306] 一式三份在缓冲液中测定用于将 N6- 乙酰基 -6- 氨基己酸转化成 N6- 乙酰基 -6- 氨基己醛的 N 末端有 His 标签的 SEQ ID NO:4-6 的羧酸还原酶的活性 (参见实施例 7, 及图 9), 所述缓冲液由终浓度 50mM HEPES 缓冲液 (pH = 7.5)、2mM N6- 乙酰基 -6- 氨基己酸、10mM MgCl₂、1mM ATP、和 1mM NADPH 组成。通过添加纯化的羧酸还原酶和磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶或空载体对照至含有 N6- 乙酰基 -6- 氨基己酸的测定缓冲液启动测定法, 然后于室温温育 20 分钟。通过于 340nm 的吸光度监测 NADPH 的消耗。每种没有 N6- 乙酰基 -6- 氨基己酸的仅酶对照表明 NADPH 的低基线消耗。参见图 11。

[0307] SEQ ID NO 4-6 的基因产物 (其得到 *sfp* 的基因产物增强) 接受 N6-乙酰基-6-氨基己酸作为底物, 如相对于空载体对照确认的 (参见图 14), 并且合成 N6-乙酰基-6-氨基己醛。

[0308] 实施例 11

[0309] 使用 N6-乙酰基-1,6-二氨基己烷并且形成 N6-乙酰基-6-氨基己醛的 ω -转氨酶的酶活性

[0310] 在缓冲液中测定用于将 N6-乙酰基-1,6-二氨基己烷转化成 N6-乙酰基-6-氨基己醛的 N 末端有 His 标签的 SEQ ID NO:7-12 的 ω -转氨酶的活性 (参见实施例 9, 及图 9), 所述缓冲液由终浓度 50mM HEPES 缓冲液 (pH = 7.5)、10mM N6-乙酰基-1,6-二氨基己烷、10mM 丙酮酸和 100 μ M 吡哆 5' 磷酸盐组成。通过添加 ω -转氨酶或空载体对照的无细胞提取物至含有 N6-乙酰基-1,6-二氨基己烷的测定缓冲液启动每种酶活性测定反应, 然后在以 250rpm 摇动的情况中于 25°C 温育 4 分钟。经由 RP-HPLC 量化 L-丙氨酸的形成。

[0311] 每种没有 N6-乙酰基-1,6-二氨基己烷的仅酶对照表明丙酮酸至 L-丙氨酸的低基线转化。参见图 16。

[0312] SEQ ID NO:7-12 的基因产物接受 N6-乙酰基-1,6-二氨基己烷作为底物, 如相对于空载体对照确认的 (参见图 20), 并且合成 N6-乙酰基-6-氨基己醛作为反应产物。

[0313] 鉴于 ω -转氨酶活性的可逆性 (参见实施例 5), SEQ ID NO:7-12 的基因产物接受 N6-乙酰基-6-氨基己醛作为底物, 形成 N6-乙酰基-1,6-二氨基己烷。

[0314] 实施例 12

[0315] 使用己二酸半醛作为底物并且形成己二醛的羧酸还原酶的酶活性

[0316] 使用己二酸半醛作为底物测定 N-末端有 His 标签的 SEQ ID NO 6 的羧酸还原酶 (参见实施例 7 和图 9)。一式三份在缓冲液中实施酶活性测定法, 所述缓冲液由终浓度 50mM HEPES 缓冲液 (pH = 7.5)、2mM 己二酸半醛、10mM $MgCl_2$ 、1mM ATP、和 1mM NADPH 组成。通过添加纯化的羧酸还原酶和磷酸泛酰巯基乙胺基转移酶或空载体对照至含有己二酸半醛的测定缓冲液启动测定法, 然后于室温温育 20 分钟。通过于 340nm 的吸光度监测 NADPH 的消耗。每种没有己二酸半醛的仅酶对照表明 NADPH 的低基线消耗。参见图 11。

[0317] SEQ ID NO 6 的基因产物 (其得到 *sfp* 的基因产物增强) 接受己二酸半醛作为底物, 如相对于空载体对照确认的 (参见图 15), 并且合成己二醛。

[0318] 实施例 13

[0319] 在形成 6-羟基己酸中使用己酸作为底物的 CYP153 单加氧酶的酶活性

[0320] 将编码 HIS 标签的序列分别添加至极单胞菌物种 JS666、分枝杆菌物种 HXN-1500 和南非分枝杆菌基因, 其编码 (1) 单加氧酶 (SEQ ID NO:13-15), (2) 关联的铁氧还蛋白还原酶配偶体 (SEQ ID NO:16-17) 和物种的铁氧还蛋白 (SEQ ID NO:18-19)。对于南非分枝杆菌单加氧酶, 使用分枝杆菌物种 HXN-1500 氧化还原酶和铁氧还蛋白配偶体。将 3 种经修饰的蛋白质配偶体在杂合 pTac 启动子下克隆入 pgBlue 表达载体中。将每种表达载体转化入 BL21 [DE3] 大肠杆菌宿主中。于 37°C 在含有 50mL LB 培养基和抗生素选择压力的 500mL 摇瓶培养物培养每种所得的重组大肠杆菌菌株。于 28°C 使用 1mM IPTG 诱导每种培养物 24 小时。

[0321] 经由离心收获来自每种诱导的摇瓶培养物的团粒。重悬每个团粒, 并且于室温使

用 Y-per™ 溶液 (ThermoScientific, Rockford, IL) 20 分钟使细胞变得可通透。于 0℃ 在 Y-per™ 溶液保持透化细胞。

[0322] 在缓冲液中实施酶活性测定法,所述缓冲液由终浓度 25mM 磷酸钾缓冲液 (pH = 7.8)、1.7mM MgSO₄、2.5mM NADPH 和 30mM 己酸盐组成。通过添加在 Y-per™ 溶液中悬浮的固定质量的透化细胞的湿细胞重量至含有庚酸的测定缓冲液启动每个酶活性测定反应,然后于 28℃ 在加热块摇动器中以 1400rpm 摇动的情况中温育 24 小时。经由 LC-MS 量化 7-羟基庚酸的形成。

[0323] 与还原酶和铁氧还蛋白配偶体一起的 SEQ ID NO 13-15 的单加氧酶基因产物接受己酸作为底物,如相对于空载体对照确认的 (参见图 22), 并且合成 6-羟基己酸作为反应产物。

[0324] 其它实施方案

[0325] 应理解的是,尽管本发明结合其详细描述进行了描述,但是前面的描述意图为例示的并且不限制发明的范围,本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其它方面、优点和修饰也在权利要求书的范围内。

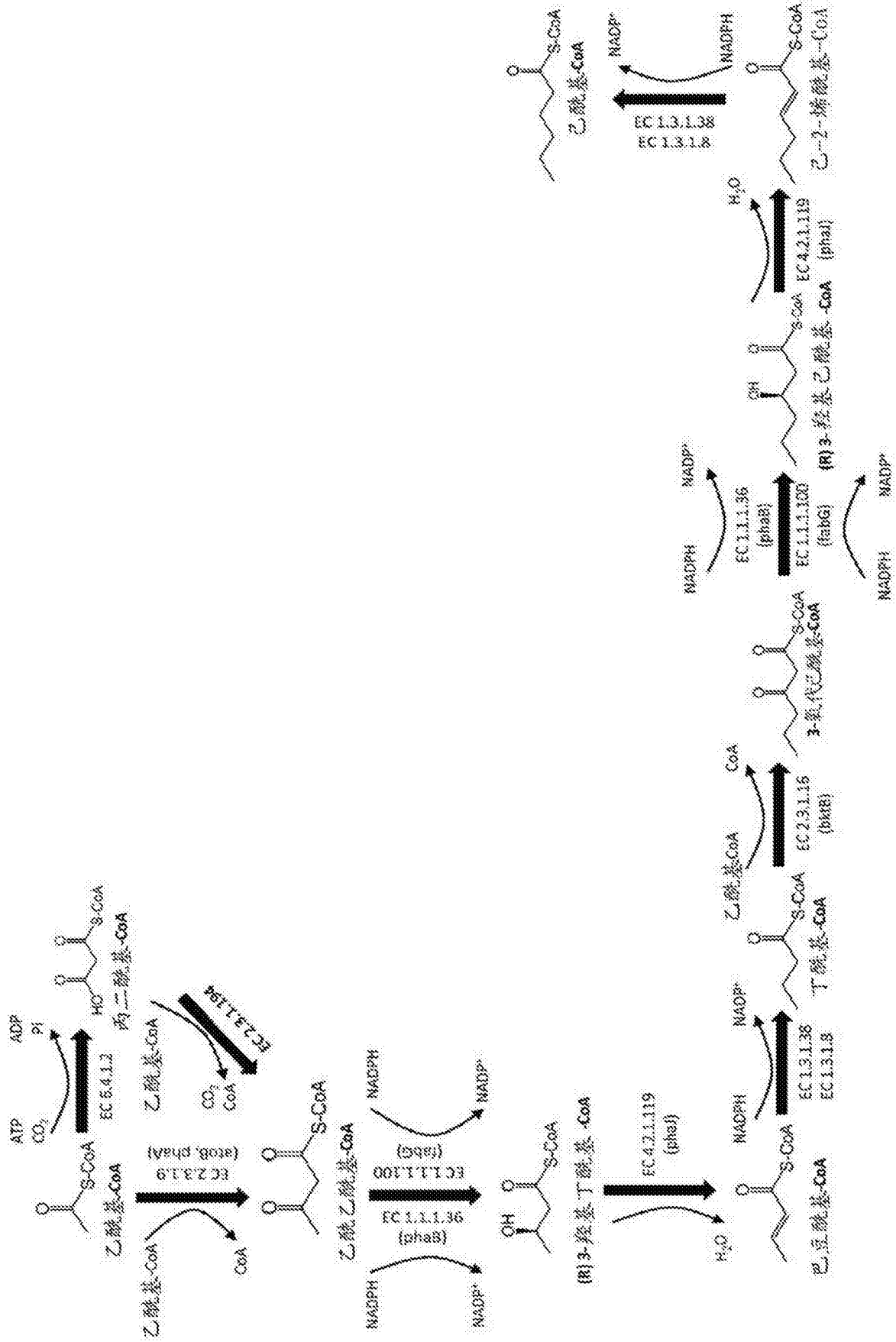


图 2

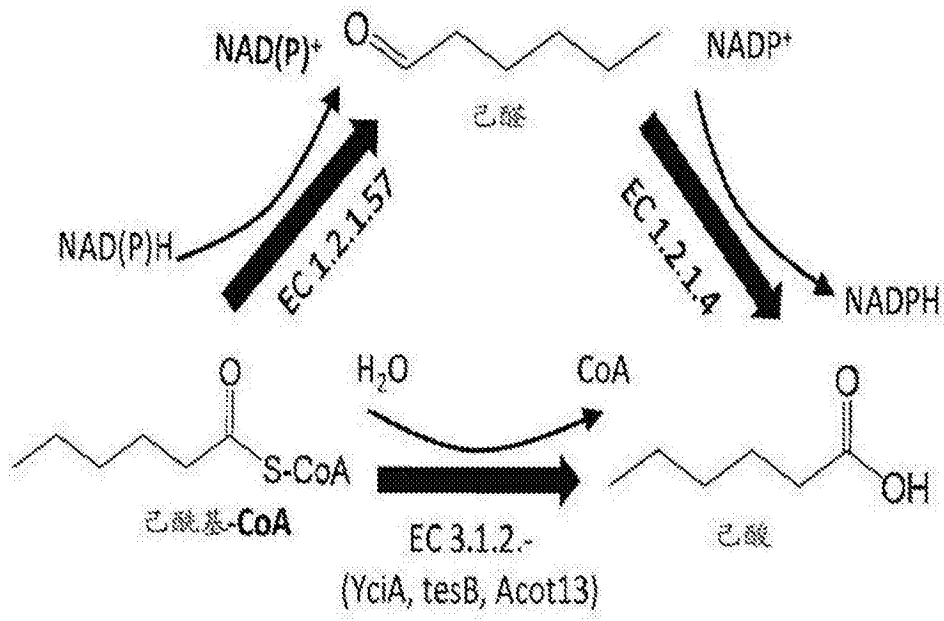


图 3

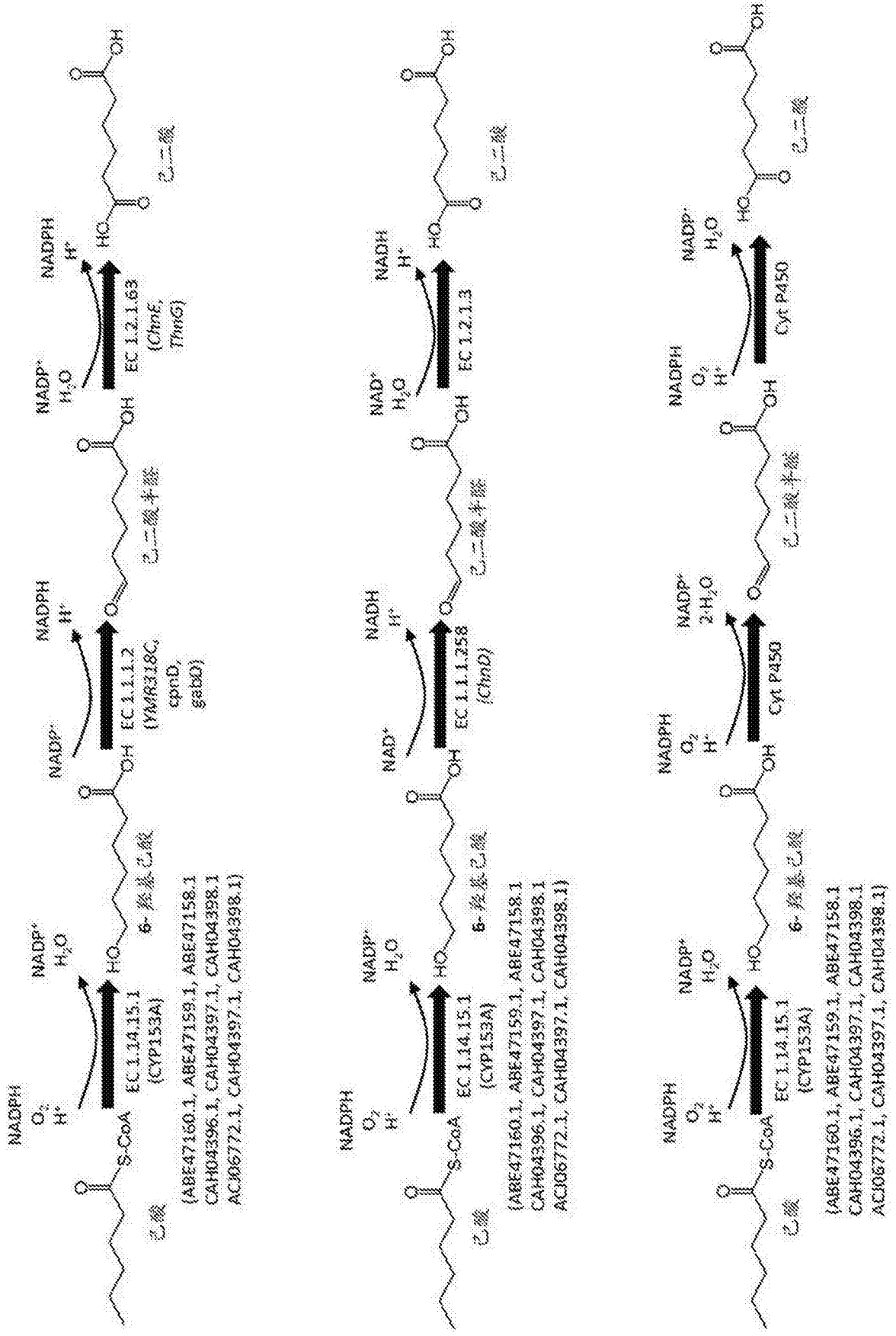


图 4

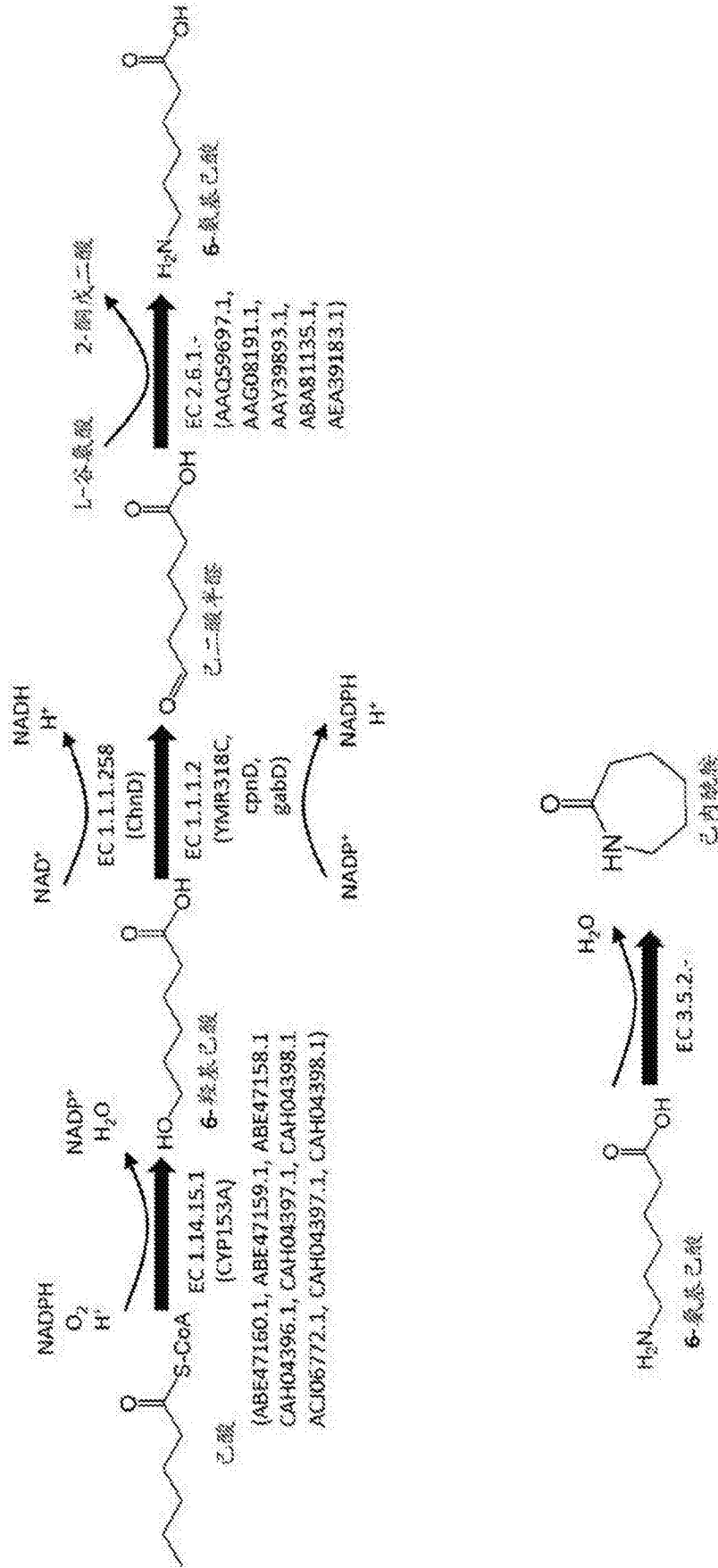


图 5

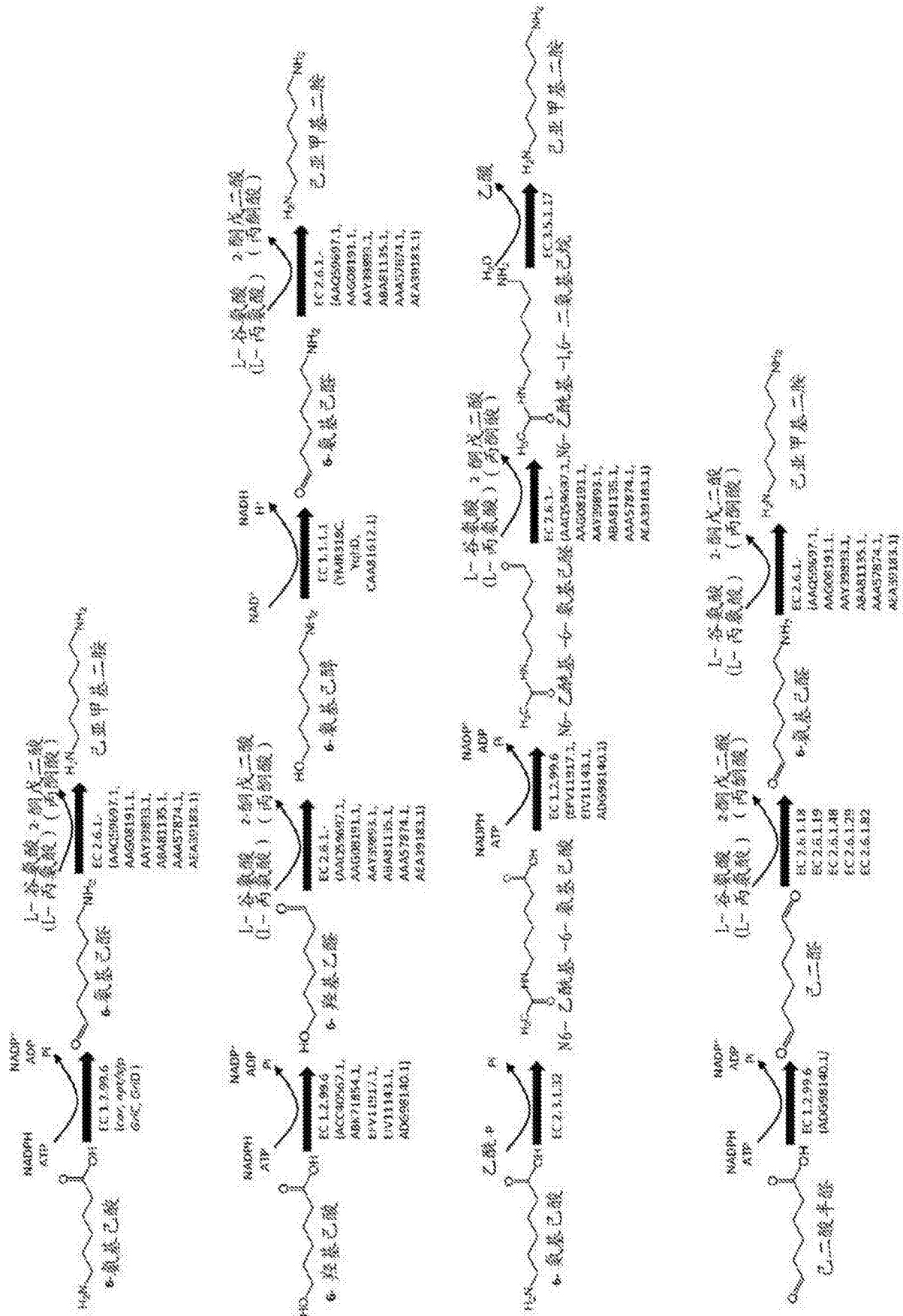


图 6

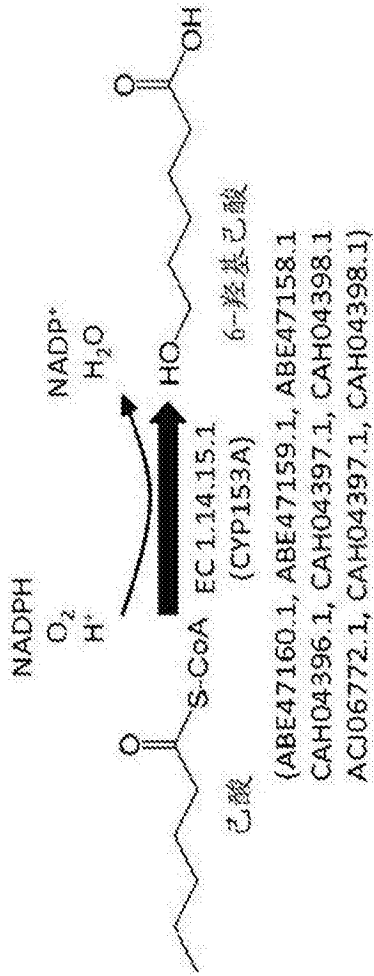


图 7

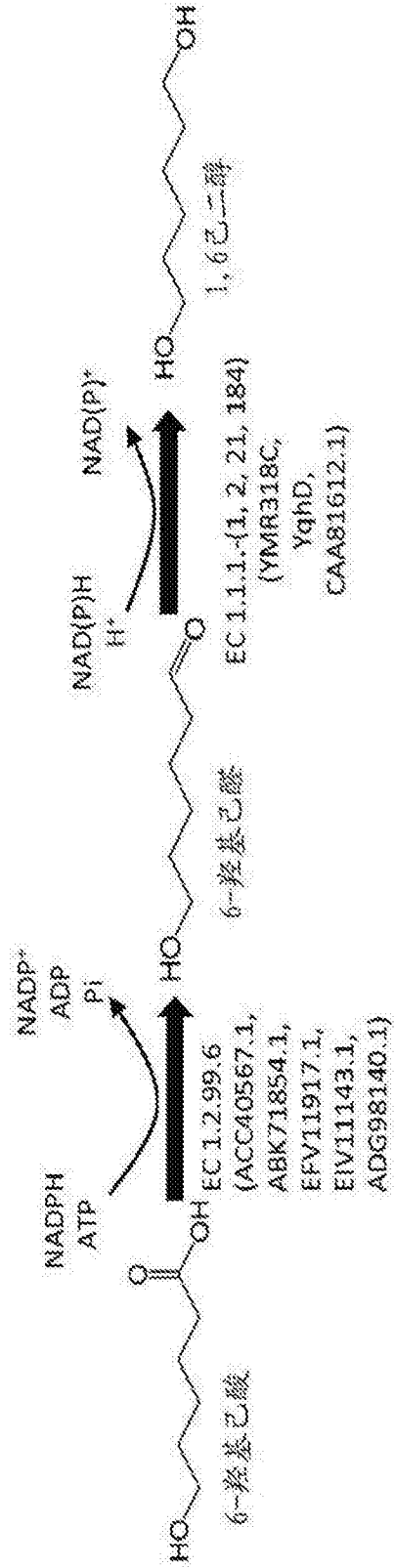


图 8

SEQ ID NO	生物体	GENBANK 参照	氨基酸序列
1	大肠杆菌	AA24665.1	<p>MSQAKNLLTLNLEKIEGLFRGQSEDLGLRQVFGGQVVQALYAAKETVPEERLVHSF HSYLRFPGDSKKPIYDVETLRDGNFSARRVAIQNGKPIFYMTASFOAPEAGFEHQKT MPSAPDPGLPSETQIAQSLAHLPPVLKDKFCIDRPLEVRPVEFHINPLKGHVAEPHRQV WIRANGSVDDLRVHQYLLGYASDLNPLVALQPHGIGFLEPGIQIATIDHSMWFFRPFN LNEWLLYSVESTSASSARGFVRGEFYTQDGVLVASTVQEGVMRNHN</p>
2	海分歧杆菌	ACC40567.1	<p>MSPITREERLERIQDLYANDPQFAAKPATATAAIERPGLPQIETVMTGYADRP LAQRSVEFVTDAGTGHITLRLPHFETISYELWDRISALADVLSTEQTYKPGDRVCLLG FNSVDYATIDMTLARLGAVAVPLQTSAAITLQPIVAETQPTMIAASVDALADATELALS GQTATRVLVFDHHRQVDAHRAAVESARERLAGSVAVETLAEAIARGDVPARGASAGSAPGT DVSDSLALIYTSGSTGAPKAMYPARNVATFWRKRTWFEGGYEPSITLNFMPMSHYMG RQILYGLCNGGTAFFVAKSDLSLTFEDLALVRPTLTFVPRVWDMVDFEQSEVDRRLV DGADRVALEAQVKAEIRNDVILGGRYTSALTGSAPISEMKAWVEELDMHLEVEGYS TEA GMILIDGAIARRPAVLDYKLVDPDLGYFLTDRIHPHPRGELLVKTDSLFFPGYYQRAEVTADV FDADGFYRTGDMMAEVGPEQFVYLDRIIRNVKLSQGEFVTSKLEAVFGDSPLVRFQYIY GNSARAYLLAVVPTQEALDAVPVEELKARLGDLSQEVAKAAGLQSYEIPRDFIETTPW TLENGLLTGIRKLARPQKKHYGELLEQIYTLAHGQADELRSRQSGADAPVLYTVCR AAALLGGSASDVQPDHFTDLGGDSLSALSFTNLLHEIFDIEVPVGVVYSPANDLQALAD YVEAARKPGSSRPTFASVHGASNGQVTEVHAGDLSLDKFDIDAAFLAEAPRLPAANTQV VLLTGATGFLGRYLALEWLERMDLVGKLCILVRAKSDTEARALDKTFDSGDPELLAHY RALAGDHLEVLGDKGEADLGLDRQVWQRLADTVLDLVDPAALVNHVLPYSQLFGPNALG TALLRLAITSKIKPYSYTSITIGVADQIPPSAFTEADIRVISA TRAVDSDSYANGYSNSK WAGEVLLREAHDLGCLPVAVFRCDMILADTTWAGQLNVPDMFTRMILSLAATGIAPGSFY ELAADGARQRARAHYDGLPVEFIAEAI STLGAOSQDGFHTYHMNMPYDDGIGLDFVDWLN E SGCPQRIADYGDWLRFFETALRALPDRQRHSSLLPLLNHRQPERPVRGSIAPTRFRFA AVQEAKIGPKDIPHYGAPIVKVYVSDRLLLGLL</p>

图 9

SEQ ID NO	生物体	GENBANK 参照	氨基酸序列
3	耻垢分枝杆菌	ABK71854.1	MFSVDHDAIDGVTETALDDEQSTRRIAEIYATDPEFAAAAPLPAVWDAHKPGLRLAEIL QTLFTGYGDRPALGYRARELATDEGGRTVTRLLPRFDLTYAQVWSRVQAVAAALRHMF QPIYPGDAVATIGFASPOYLTLDVCAVLGLVSVPLQHNAPVSRAPILAEVEPRILTVS AEYLDLAVESYRDVNSVSQLVFDHHPVEDDHRDALARAREQLAGKGIAVTLLDAIAD AGLPAEPIYTAHDQRRLAMILYTSGSTGAPKGMYTEAMVARLWMTMSFITGDP FMPLNHLGGRIPISTAVQNGGTSYFPESDMSTLFEDLALVRTELGLVPRVADMLYQHH LATVDRLVTOGADeltaEQAGAEELREQVLGGRVITGFVSTAPLAEMRAFLLDITLGAHI VDGYGLTETGAVTRDGVIVRPPVIDYKLIIDVPELGYFSTDKPYPRGELLVRSQTLTPGY KRPEVTASVFRDGGYHTGDVMAETAPDHLVYVDRRNNVLAQGEFVAVANLEAVFSGA ALVROIFVYGNSESRFLAVVPTPEALEQYDPAALKAALADSLQRTARDAEQLQSYEYPA DFIVETEPFSAANGLLSGVGKLLRPNLKORYGQRLEOMYADIAAATQANQLRELRAAATQ PVIDTLTQAAAATILGTGSEVASDAHFTDLGGDSLSALTSNLLSDFGFEVPGVTVNPA TNLAQLAQHIEAQRRTAGDRRPSFTTVHGADATEIRASELTLDRFIDAEILRAAPGLPKVT TEPRTVLLSGANGWLGRLTLOWLERLAPVGGTLITVIRGRDDAAARLTOAYDTP SRRFAELADRLRIVVAGDIGDPNGLTPEIWHRLAAEVDLWHPAALVNHVLPYRQLFGP NVVGTAEVVKLALTERIKPVTYLSTVSVAMGIPDEEDGDIRTVSPVRPLDGGYANGYGN SKWAGEVLLREAHDLGLPVATFRSDMILAHPRYRQVWVPMFTRLLSLLITGVAPRS FYIGDGERPRAHYPLTVDVFAEAVTLLGAQQREGYVSDVMNPHDDGISLDFVFDWLIR AGHPIDRVDDYDDWVRRFETALTALPEKRRACQTVLPLLHAFRAQOAPLRGAPETEVFHA AVRTAKYGFQDIPHLDEALIDKYIRDIREFGLI

图9(续)

SEQ ID NO	生物体	GENBANK 参照	氨基酸序列
4	<i>Segniliparus rugosus</i>	EFV11917.1	<p>MGDGEERAKRFQRIGELSATDPOFAAAAPDPAPVAVSDFSLSTFRYDLTLMRGYAERP ALAHRVAGAGYETISYGELWARVGAIAAAWQADGLAPGDFVATVGTSPDYVAVDIAAARS GLVSVPIQAGASLAQILVGILETEPKVLAASASSLEGAVACALAAPSVQRLVYFDLRGPD ASESAADERRGALADAEELARAGRAVWETLADLAARGEALPEAPLFEPAEGEDPLALL IYTSSTGAPKGMYSQRLVSQLWGTTPVVPMPNLSLHYMPLSHSYGRAVLGALSAGG TAHFTANSDLSTLFEDIALARPTFLALVPRVCEMLFQESQRGQDVLAELRERVILGGRLIVA VCGSAPLSPEMRAFMEEVIGFPLDGYGSTEALGVMRNGHQRPVVDYKLVDPPELGYR TTDKPYPRGELCIRSTSLUSGYKRPETAIEVFDAGQGYKTDGMMAELAPDHLVYVDRSK NVILKSQGEFVAVAKLEAAAGTSPYKQIFVYGNERSFLLAVVFPNAEVLGARDQEEAK PLJAASLQIAKEAGLSYEVPRDFLIETETPTTQNGLLSEVGNLIRPKLKARYGEALEA RYDEIAHGQADELBAIRDGAGQRPVETVRAAAVIGSGEAEVGPANFADLGGDSLSA LSLANLLHDVFEVEVPVRIIGPTASLAGIAKHEAERAGASAPTAASVHGAGATRIRAS ELTIKFLPEDILAAAKGLPAADQVRTVLLTGANGWLGFRFLAEQLERLARSQDGGKLI CLVRGKDAARRIEETLGTDPALAAARFAELAEGRLEVPDGVGEPKFGLLDDAAWDRLA EEVDVIVHPAALVNHVLPYHQLFGPNVVGTAIEIRLAIATAKRPVYTLSTVAVAAGVEPS SFEEGDIRAVVPERPLGDGYANGYNSKWAGEVLIIEAHLELVGLPVAVFRSDMILAHTR YTGQUNVPDQFTRLVLSLLATGIAPKSFYQQGAAGERQRAHYDGPVDFTEAITTLGAE PSWFDGGAGFRSDFVFNPHHDGVGLDFVDWIEAGHPISRIDDDHKEWFARFETAVRGLP EAQRQHSLLPLLRAYSFPHPVYDGSVYPTGKFGQAVKAAQVGSDDHVPHLGKALIVKYAD DLKALGILL</p>

图9(续)

SEQ ID NO	生物体	GENBANK 参照	氨基酸序列
5	马寨分枝杆菌	EIV1143.1	MTNETPQEQLSRIRESDPQFRAAQPDPVAEQVIRPGLHLSAIAALMTGYAER PALGERARELVIDQDGRITLRLPRFDTTYGELWSRTTSVAAAWHHDAHPVKAGDLVA TLGFTSIDYTVLDAIMILGGVAVPLQTSAPASQWTTILAEAPNTLAVSIELIGAAMES VRATPSIKQVWFVDFYTPVEDDQREAFEAASTQLAGTGIALETLDAYIARGAALPAAPLYA PSAGDDPLALLIYTSGSTGAPKGAIMHSENIWRWIREDV MAGTENLPMIGLNFMPMSHI MGRGTLTSTLSTIGGIGYFAASSDMSTLFEDMELIRPTALALVPRVCDMVFQRFQTEVDRR LASGDTASAEAAVAEYKADIRDNLFGRYSAVMVGSAPLSEELGEFESCFELNLTGYYG STEAGMVFRRDGNVQPPVIDYKLVDPPELGYFSTDKPFRGELLKTDGMFLGWYKRPEV TASVFDADGFYMTGDVIAELAHNDNIEIHRNRNIVKLSQGEFVAVATLEAEYANSPVVHQ IYVYSSERSYLLAWVFTPEAVAAAKGDAALKTTIADSLQDIAKEIKLQSYEVRDFI IEPOFTQGNGLTGIAKLARPNUKAHYGRLEQMYAEIAEQQAMELRALHGVDPDKPAL ETVLKAQALLGYSSAELAADAHFTDLGGDSLALSFDLLRDFAVEYVPGVIVSAAND LGGVAKFVDEQRHSGGTRPTAETVHGAGHTERAADLTLDKFIIDEATLHAAPSLPKAAGI PHTVLLTGSNGYLGHYLALEWLERLDKTDGKLVIVRGKNAEAYGRLEEAFTDGTTELL AHFRSLADKHLEVLAGDIGDPNLGLDADTWQRLADTVDVIVHPAALVNHVLPYNQLFGPN VVGTAIEIKLAITTKIKPVYILSTVAVAAVDPPTTFDEESDIRLSAVRPIDDGYANGYG NAKWAGEVLLREAHDLGCLPVAVFRSDMILAHSTRYTGQLNVDPDQFTRILSLIATGIAPG SPYQAQTTGERPLAHYDGLPGDFTAEAITTLGTQVPEGSEGFVYDCVNPHADGISLDNF VDWLIEAGYPIARIDNYTEWFTREDTAIRGLSEKQKQHSLLPLLHAFEQPSAENHGVPV AKRFOHAVQAAGIGPVGODGTTDIPHLRRLINVKYAKDLEQLGLL

图9(续)

SEQ ID NO	生物体	GENBANK 参照	氨基酸序列
6	<i>Segniliparus rotundus</i>	ADG98140.1	<p>MTQSHIQGPQASAAHSRLARRAAELLATDPQAAATLPDPEVVRQATRPGELRAERVDAIL SGYADRPALGQRSFQTVKDPITGRSSVELLPTDITTYRELRRERATAIASDLAHHPQAPA KPGDFLASIGFISVDVAIDYAGVFAGLTAVPLQJTGATLATLTAITAEPTLFAASIEH LPTAVDAVLA TFSVRRLLVFDYRAGSDEDEAREAVEAARKRIADAGSSVLDVLDVDEVIARNGK SAPKAPLPATDAGDDSLIHTYSGSTGTPKSGAMYPERNVAHFVGGVWAAAFDEDAAPP VPAINITFLPSHVASRLSIMPTRLRGGIMHFVAKSDLSLTFEDLKLARPTNIFLVRVY EMLYQHYGSELDRRGVQDGTREAEAVKODLRTGLLGGRIITAGFGSAPLSAELAGFIESL LQHLVDGYGSTEAGVWRDGYLVKPVTDYKLDIVPELGYFSTDSPPHPRGELAIKTQTI LPGYKRPETTAEYFDEDDGYLTGDVVAQIQPEQFAYVDRRNKLVKLSQGEFVTLAKLEA AYSSPLVRLQFVYSSERSYLLAVVPTDALKKFGVGEAAKAAALGESLQKJARDEGLQ SYEVPRDFHETDPTVENGLLSDARKSLRPKLKEHYGERLEAMYKELADGOANELRDIR RGVQQRPTLETVRRAAAAMILGASAAEKPDAAHFTDIGGDSLSALTF2NFIHDI FEVDVPV GVIVSAANTLGSVAEHIDAQLAGGRARPTFATVHGKGSTTIKASDILTIDKPFIDEQTEAA KHLKPADPPRTVLLTGANGWLGRFLALEWLERLAPAGGKLTIVRGKDAQAQAKARLDA YESGDKLAGHYQDLAATLEVLADGSEPRGLGDEATWNRLEADYDFISHPGALVNHVL PYNQLFGPNVAGVAEIKLAIITRIKPYTYLSTVAYAAGVEPSALDEDDGDIRTVSAERSV DEGYANGYGMKSWGGEVLLREAHDRITGLPVRFRSDMILAHQKVTGQVWATDQFTRLVQS LLATGLAPKSFYELDAQNRQRAHYDGPVDFTAESITTLGGDGLGEGYRSYNVFNPHRDG VGLDEFVDWLEAGHPITRIDDYDQWLSRFETSIRGLPELSEKROASVLPILHAFARPPAV DGSFRNTYFRIDVQKAKIGAEHDIPHLGKALYLVYADDIKQLGILL MQKQRTTSQWRELDAAHHLHPFTDASLNQAGARVMTRGEVYVLDSEGNKIDGSMAGLW CVNVGYSRKRDFEAARROMEEELFFYNTEFKTTHPAVVELLSLAEVTPAGFDRYVFTNSG SESVDTMIRMVRRYWDVYQGKPEKKTUGRWNGYHGSSTGGASLGGMKYMHEQSDLPFGM AHIEQPWWYKHGKDMTPDEFVVAARWLEEKILEIGADKVAAFVGEPIQAGSGVIVPPAT YWPEIERICRKYDVLVVADEVICGFGRTGEWFQHQFGFQPDIFTAAKGLSSGYLPIGAV FVSKRVAEGLJAGDFNHGFTYSGHPVCAAVAHANVAALRDEGIVORVKDDIGPYMOKRW RETFSREHVDVVRGVSMVQAFTLVKNKAKRELFPOFGEIGTLCRDIFFRNMLMRACGD HIVSAPPLVMTRAEVDEMLVAERCLFEELTKARGLA MNARLHATSPGLGADLVRADQAHYMHGTHYFDDHVRVNGSLNIAAGDGYVDTAGNRRLD AVGGMWCTNIGLREEMARTVAEQTRLLAYSNPFCDMANPRAIELCRKLAELAPGDLDHV FLTISGTAVDTAIRLMHYHQNCRGKRAKKHYITRINAYHGSTFLGMSLGGK5ADRPAEF DFLDERIHHLACPPYYRRAPELGEAEFLDGLVDEFEKRIELGADRVGAFISEPVFGSGG VIVPPAGYHRRMMWELCQRYDVLISDEVVTSFRLGHFFA5QAVFVQVDPDILTAKGLTS GYQPLGACIFSRRIWEVIAEPDKGRCFSHGFTYSGHPVACAAALKNIEIEREGLLAHAD EVGRYFEERLQSLRDLPIVGDVGRMRFMACVEFVADKASKALFPESLNGEWWVHLRAQKR GLLVRRIVHLNVMSPPILITREQVDTVVRVLESIEETVEDLVRAIGHR</p>
7	紫色杆菌	AAQ59597.1	
8	铜绿假单胞菌	AAG08191.1	

图9(续)

SEQ ID NO	生物体	GENBANK 参照	氨基酸序列
9	丁香假单胞菌	AA539893.1	MSANNPQLEWQALSSSEHILAPFSDYKQKKEKRIIHTRAEGVYLVWSEGKILDMGMSGL WCVAIGYGREELADAAASKQMRLEPYNLFQTAHPVYLAELAKAISDIAPEGMNHVFFTTGS GSEGNCTMLRMYRWYALKGQPNKTHSRVNGYHGSTVAGASLGGMTYMHHEQGDLPFG VVHIPQYWFEGEGDMPDFEGWAAEQLEKKEKILEGVENYGFIAEPIQAGGIVVPPD SYWPKIKELSRDYILFAADEVICGFGRTSEWFGSDYGLRPMVMTHAKGLTGYVPMGG LIVRDEIVAVLNEGDPNHFYSGHPVAAAVALENRILREKIKYERVKSETAPYLQKR LRELSDPVLVGEVRGVLGAIELVQDKTTRERTYDKGAGMICRTFCFNDNGLMRAVGD MHAAPLVISFAQIDELVEKARTCLDLTAVLQG
10	球形红杆菌	ABA81135.1	MTRNDATNAAGAVGAAMRDHILLPAQEMAKLGSQOPVLTHAEGYVHTEDGRRIDGPA GMWCAQVGYGRREIVDAMAHQAMVLPYASPYWYMATSPAARLAEKIATLTPGDLNRIFFT GGSTAVDSALRFSEFYNNVLGRPQKRIIVRYDGYHGSTALTAACRTGRGNWPNFDIAQD RISFLSPNRRHAGNRSQEAFLDDLVDQEFDRIESLGPDTIAFLAERPLASGGVIRPPA GYHARFKAICEKHDILYSDEVVTGFGRCGEWFASEKVFQVVPDIITFAKGGTSGYVPLG GLAISEAVLARISGENAKGSWFTNGYTSNQPVACAAALANIELMERE GIVDQAREMADY FAAALASLRDLPGVAETRSVGLVGCVOCLDPTRADGTAEDKAFILKIDERCFFELGLVR PLGDLCVISPLISRAQIDEMVAHMQAITEVSAAHGLTAKEPAAY
11	大肠杆菌	AAA57874.1	MNRLPSSASALACSAHALNLEKRLDHEEMKALNREVIEWEKEHVNPFGLEYRNSVYTAG GDYGAWEWQAGSLNLTLDVDTGGDFDCLGFGGIFNVGHRNPVVAVSQNCLAKQPLHSQE LDPRLAMLAKTLAALTPGKLYSFFCSNGTSEVAELKAKAYQSPRGKFTFIATSGAF HGKSLGALSATAKSTFRKPFMPLPGFRHYPFGNIEAMRALTNECKTKDDVAAVILEPI QGGEGVILPPPGYLTAVRKLCDEFGALMILDEVQTMRTGKMFACENHVQPDILCLAK ALGGGVMPGATATEEVSVLFDNPFLLHTTFFGGNPLACAAALAHNVLLEQNLPAQAE QKGDMLLDGFRQLAREYPDLVQEQARGKGMILMAIEFVDNEIGVYNFASEMFRQRYLVAGTLN NAKTRIEPPLTLTIEQCELVIKARKALAAAMRVSVEEA
12	河流弧菌	AEA39183.1	MNKPQSWEARAETSYLGFDTMPSLHQRGTVVVTHTGEGPYIVDVNGRRYLDANSGLWNMY AGFDHKGLIDAAKAOYERFPGYHAFFGRMSDQVMLSEKLEVSFPDSDGRVFTNSGSEA NDTAMVKMLWFLHAAEGKPKRRIKILTRWNAIYHGVTAVSASMTGKPYNSVFGIPIPGFVHLT CPHYWRYGEEGETEEQVBARLARELEETIQREGADTIAGFAEPVMSAGGVIPPAKGYFQ AILPILRYDIPYISDEVICGFGRTGNTWGCVTYDFTPDAISSKNLTAGFFPMGAVILG PELSKRLETAIEAIEEFPHGFTASGHPVGCALAKAIDVYMNREGLAENVRRLAPRFEERL KHIAERPNIGYRGIGFMWALEAVKDKASKTDFDGNLSYSERIANCTDGLGCRPLGQS VYLCPPFLTEADMDENFDKLEKALDKYFAEVA
13	板单胞菌物种 JS666	ABE47160.1	MSEAVYNNQNDQSRAYAIPLIEDIDVSNPELFRDNTMWYGERLRRDPVWYCKDSLSP YWSVTKFKDQIMQVETHPEFSEGNITMESNAAVTLPMTIAMDPFKHCVQRMVSPVA PENLAKLEGLRERTGRALDGLPINETFDWWVKLVNLTQMLATLDFPFWEDRAKILTRW SDVATALVGTSHDSEEQRMEEKGCVQYMTRIWNERVNPVPPGNDLUSMMAHTESMRNMT PEEFLGNILLVGGNDITRNSMTGGVIALNENPDEYRKLCAHPALIASMVPYERWQITP LHMRRALTQDTEIGGKSRKSGKVMVYVYSGMRDPEAIENPOAFIDRAKPRHHSFGF GHRCSVGNRLAELQLRIYWEELKRWPNFGQIEVVGAPERVLSPEVKGYESLQVRINA

图9(续)

SEQ ID NO	生物体	GENBANK 参照	氨基酸序列
21	诺卡菌物种NRRL 5646	AB183656.1	MIETILPAGVESAELEYPEDLKAHPAEEHLLIAKSVERRRDFIGARHCARLALAEELGEP PVAIGKGERGAPIWPRGVVGSLLTHCDGYRAAAVAHKMFRFSIGDAEPHATLPEGVLDV SLPPERWLTIDSALHLDRIILFCAKEATYKAWWPLTARWILGFEEAHITFEIEDGSADSG NGTFHSELLVFGQTNDGGTPLLSTFDGRWLDADGGFILTALAYA

图9(续)

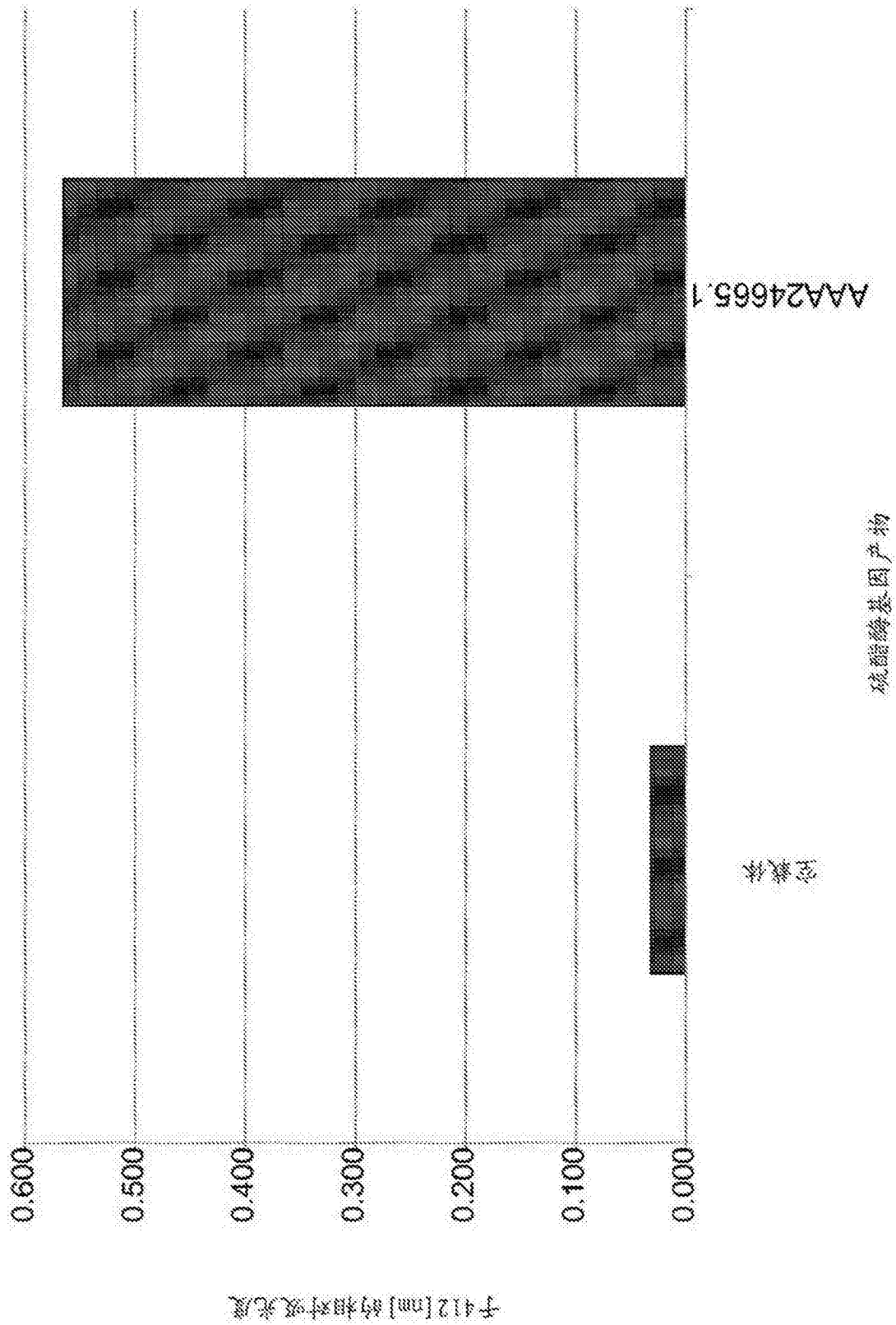


图 10

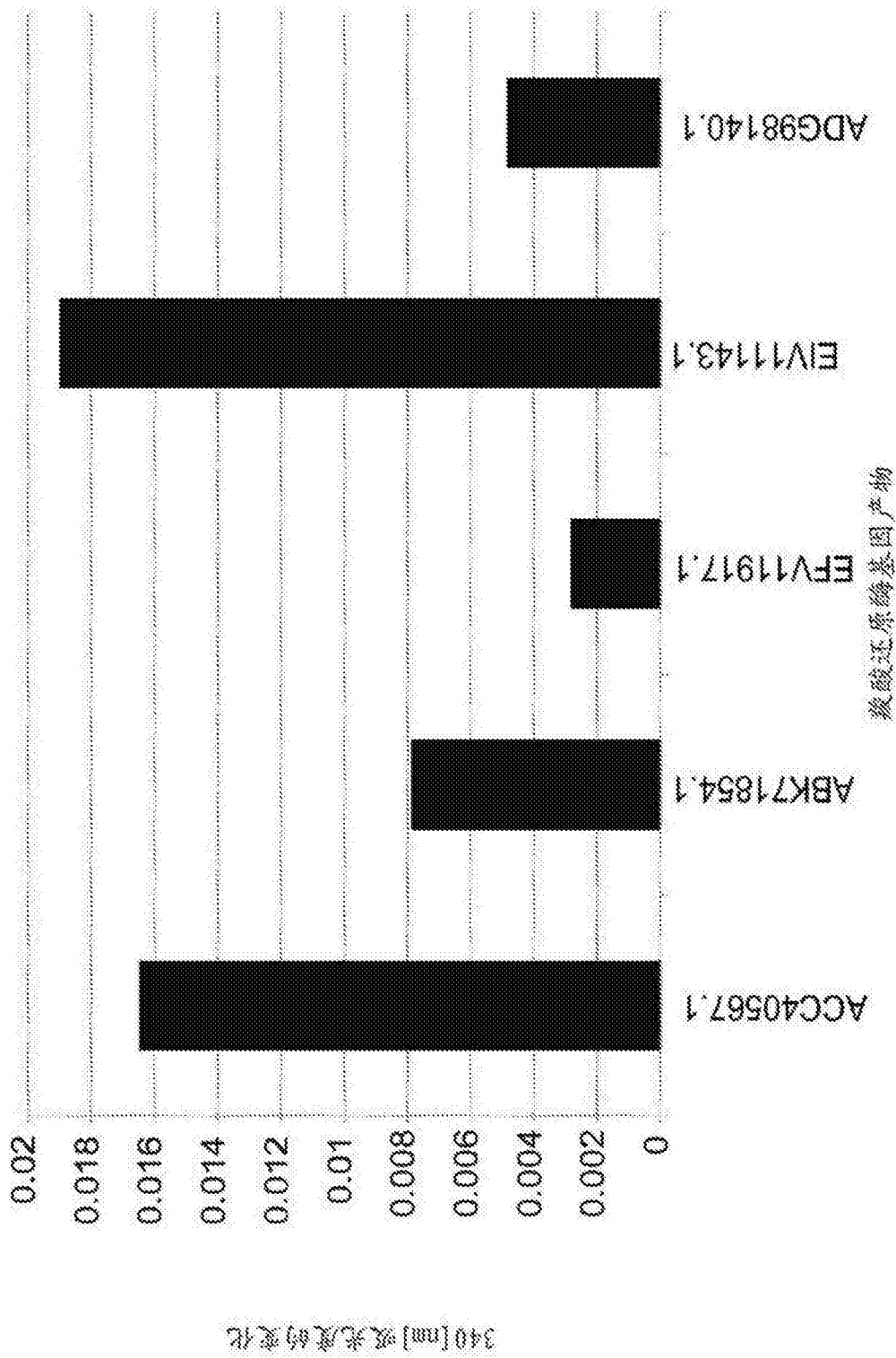


图 11

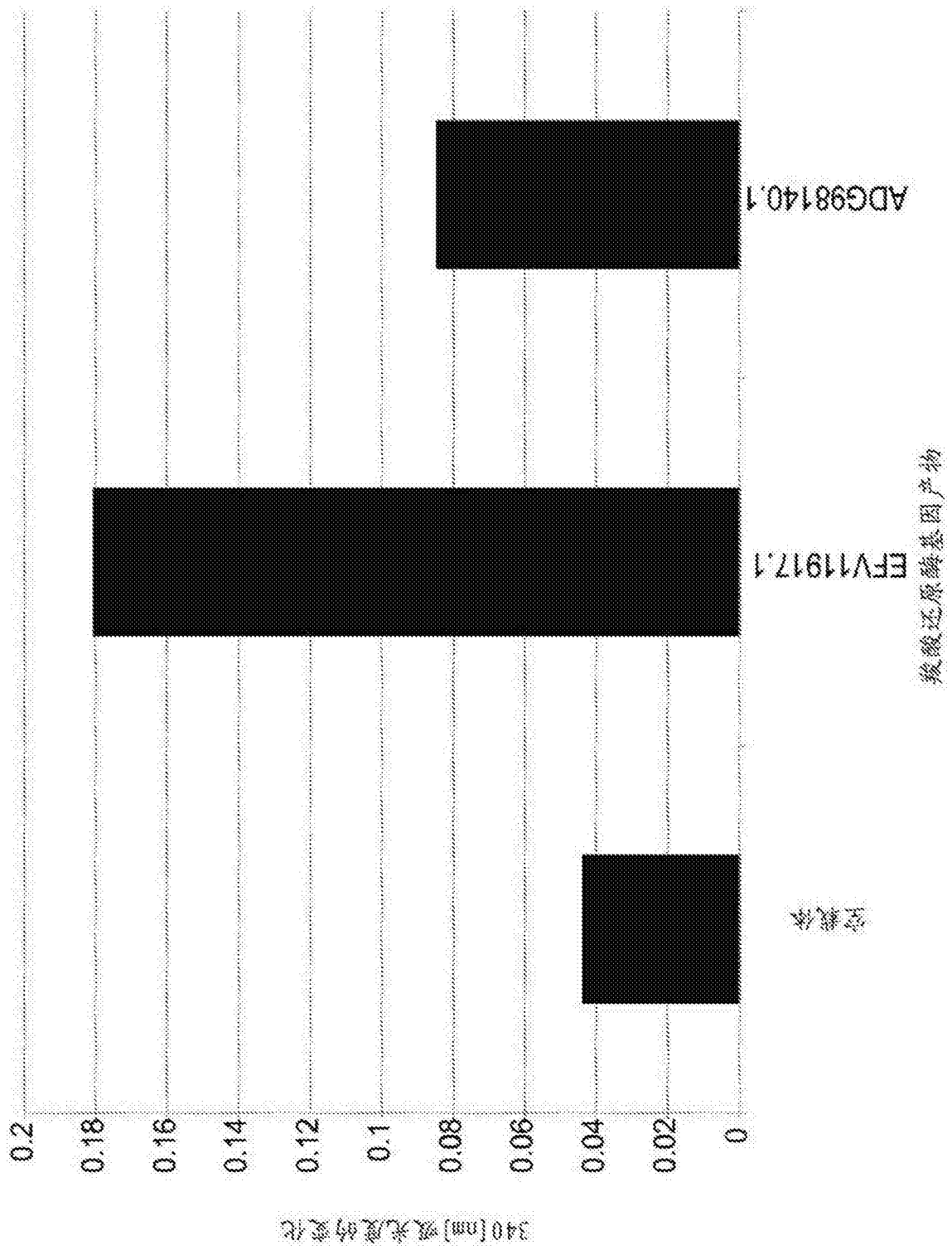


图 12

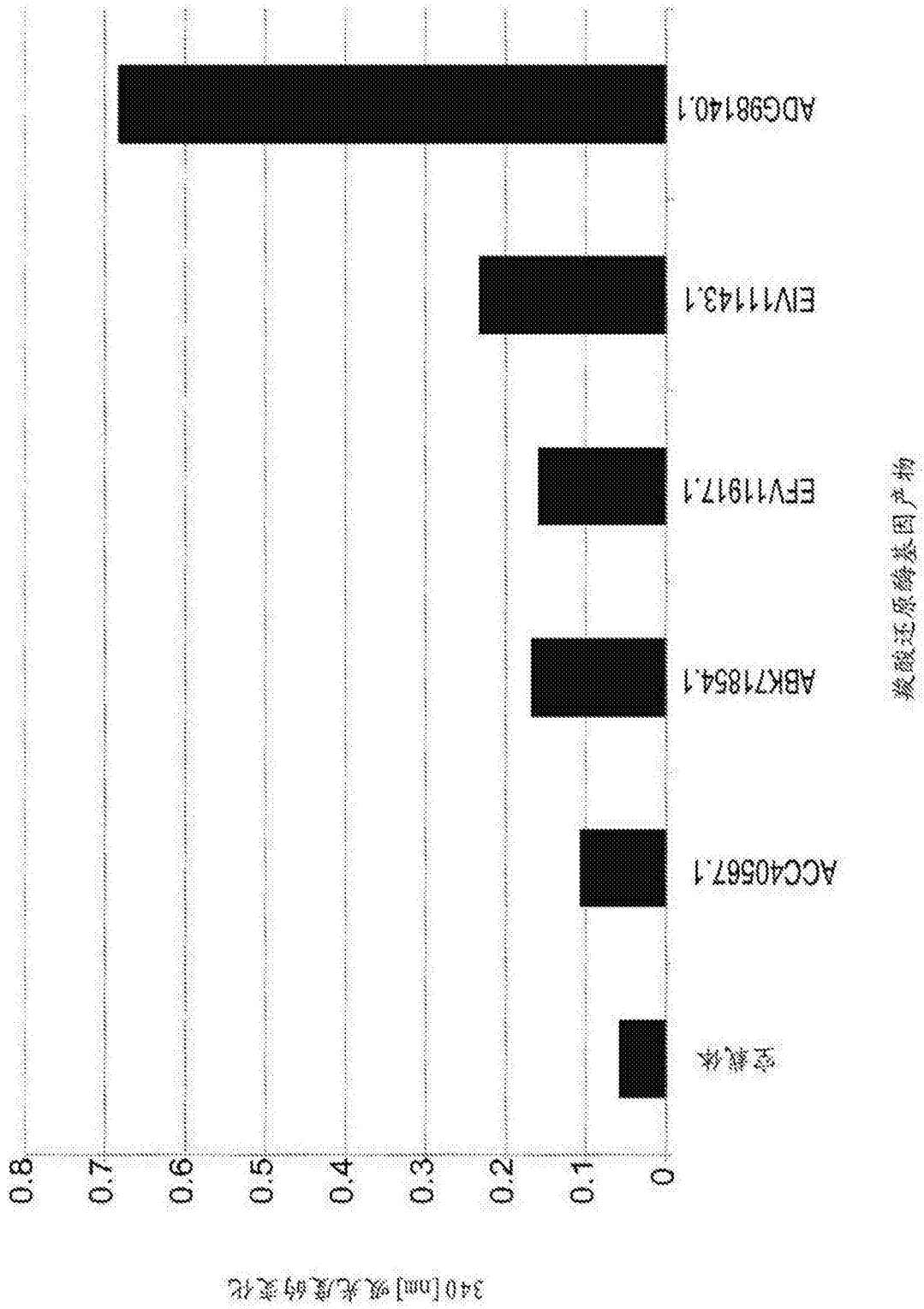


图 13

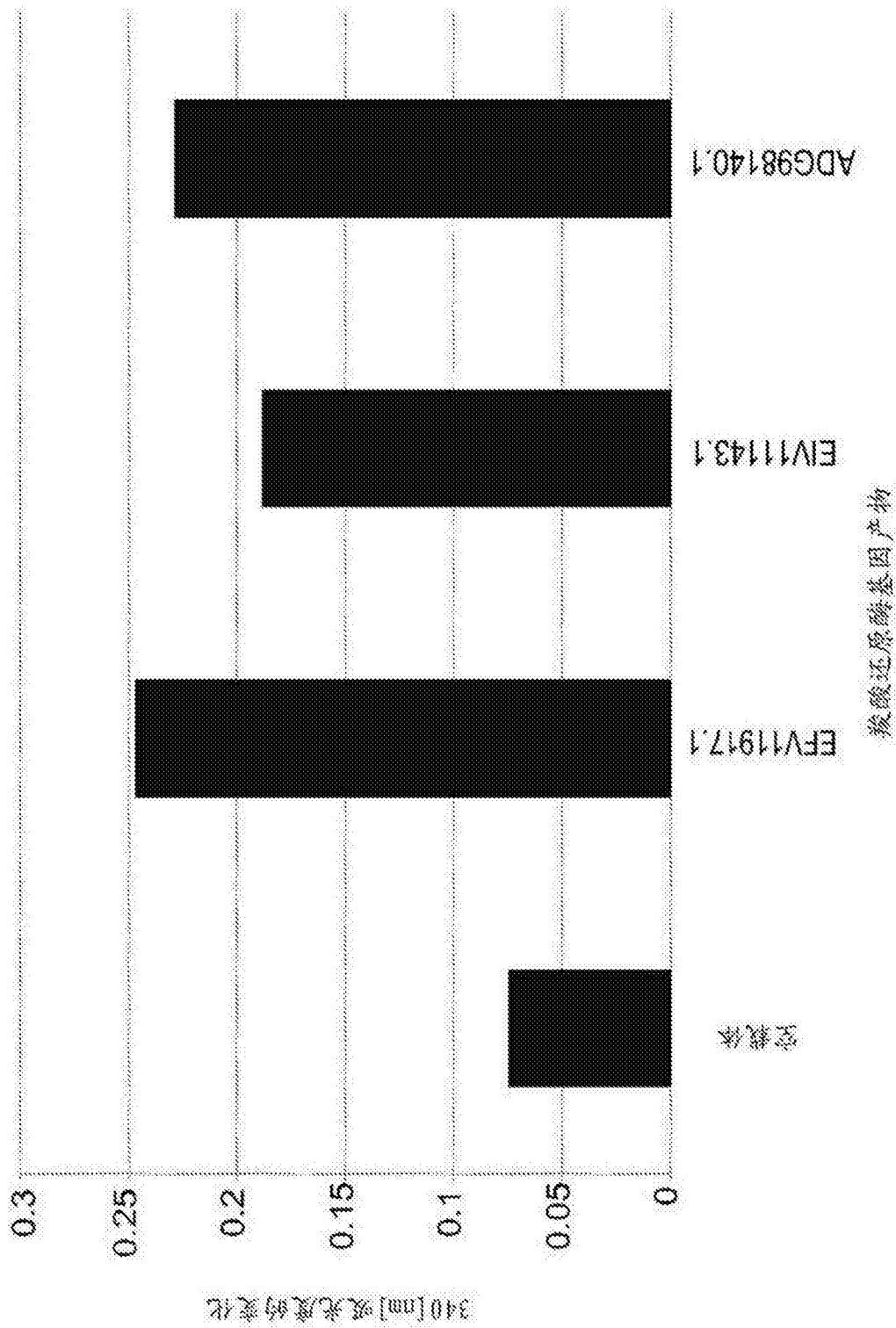


图 14

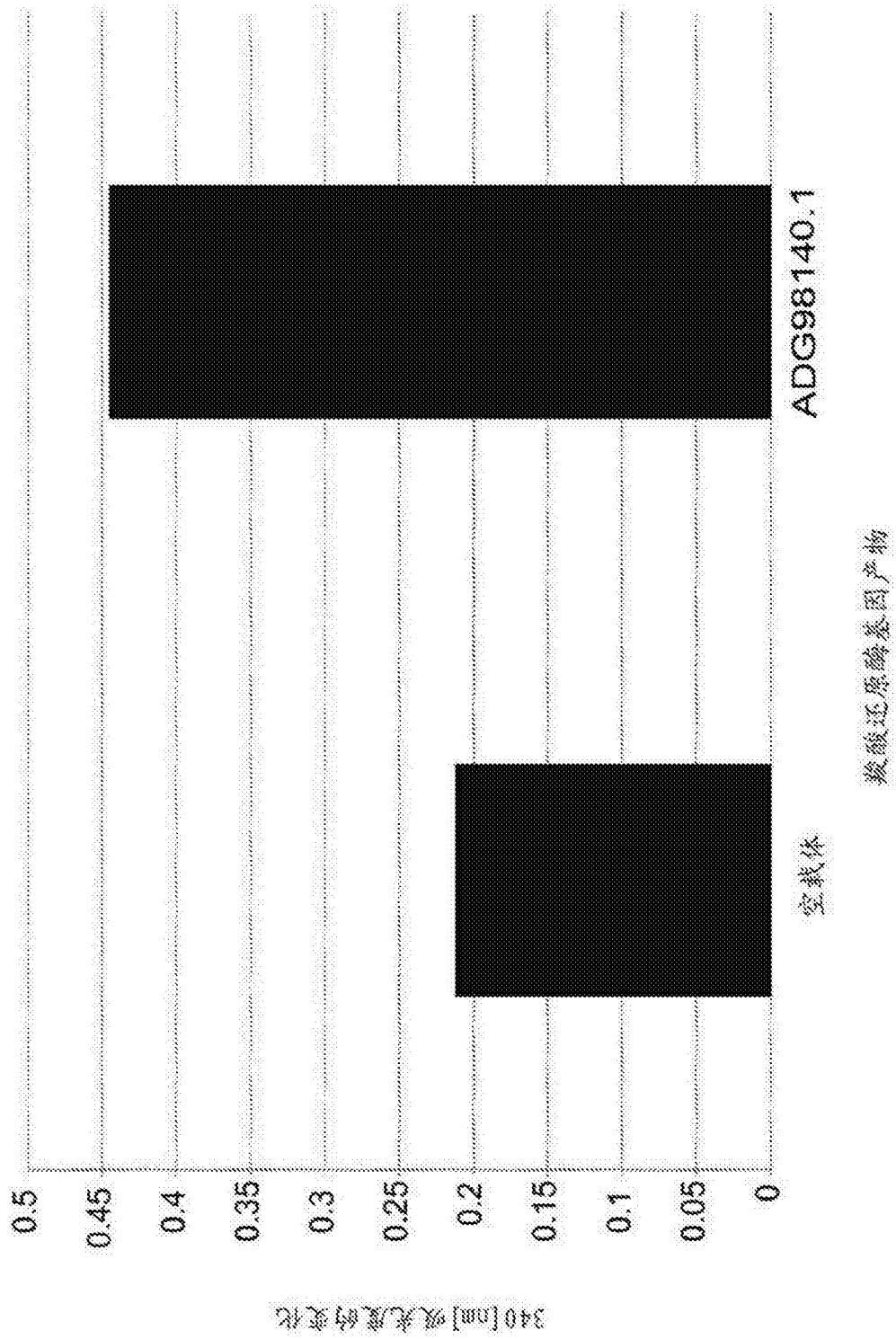


图 15

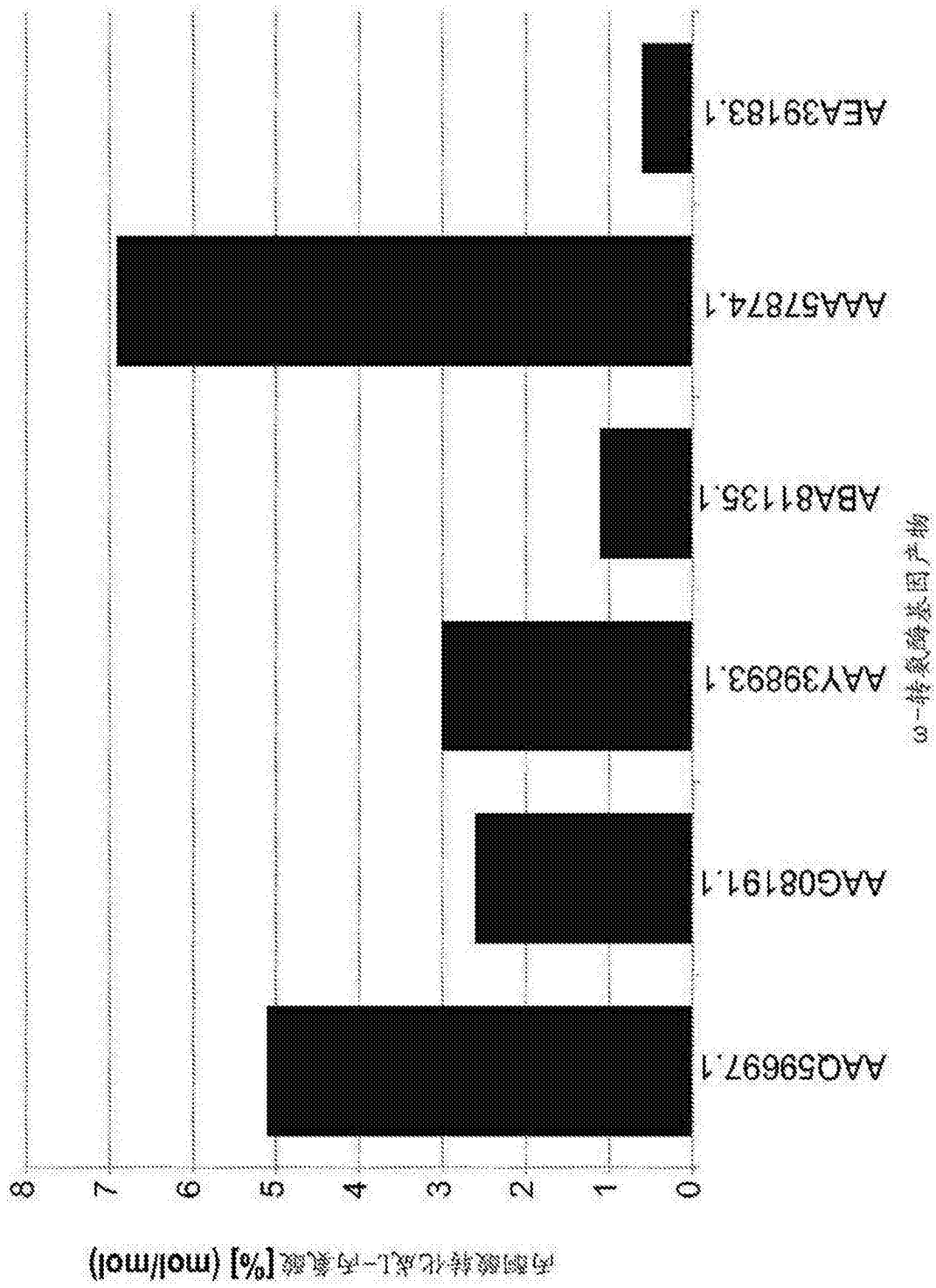


图 16

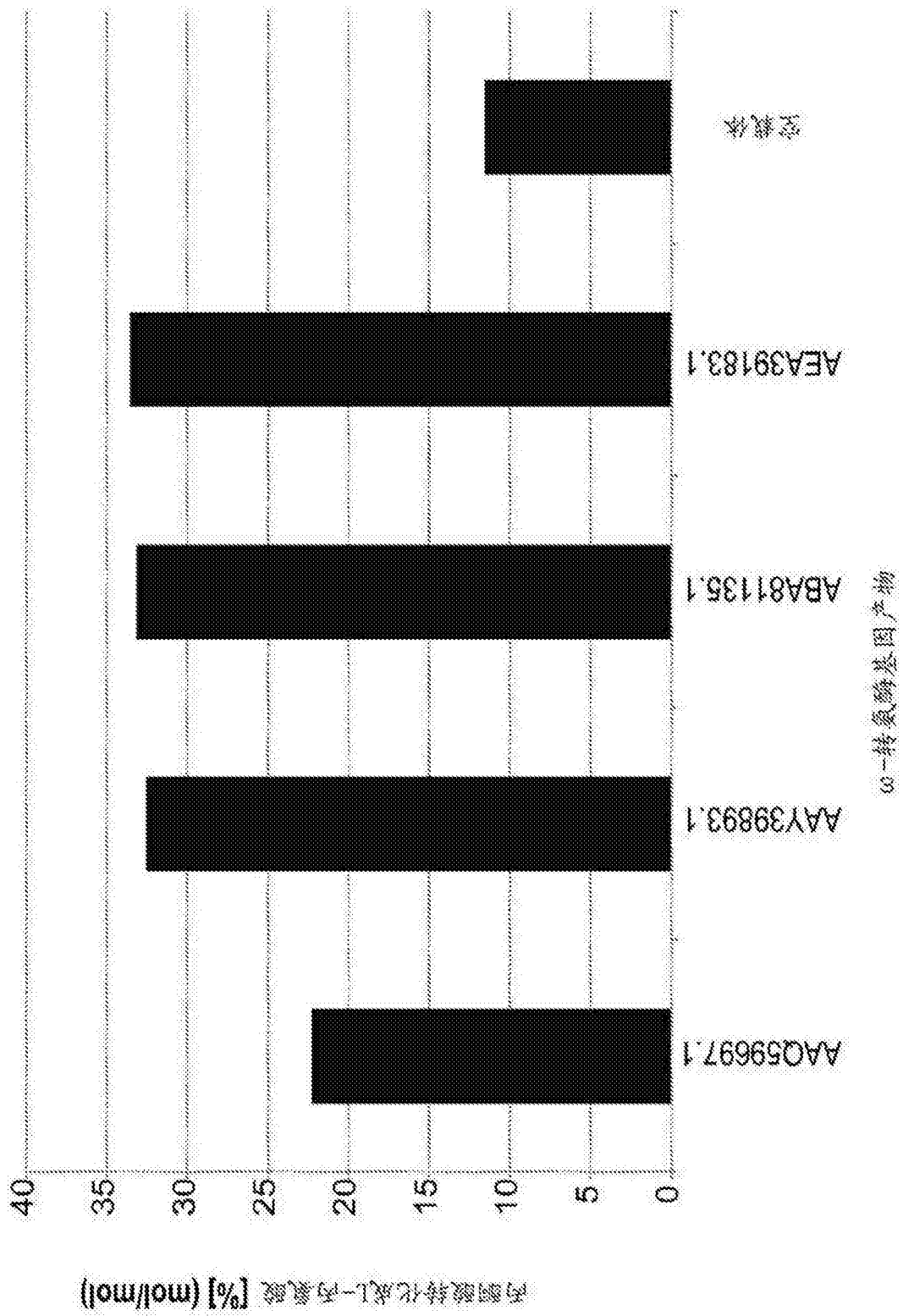


图 17

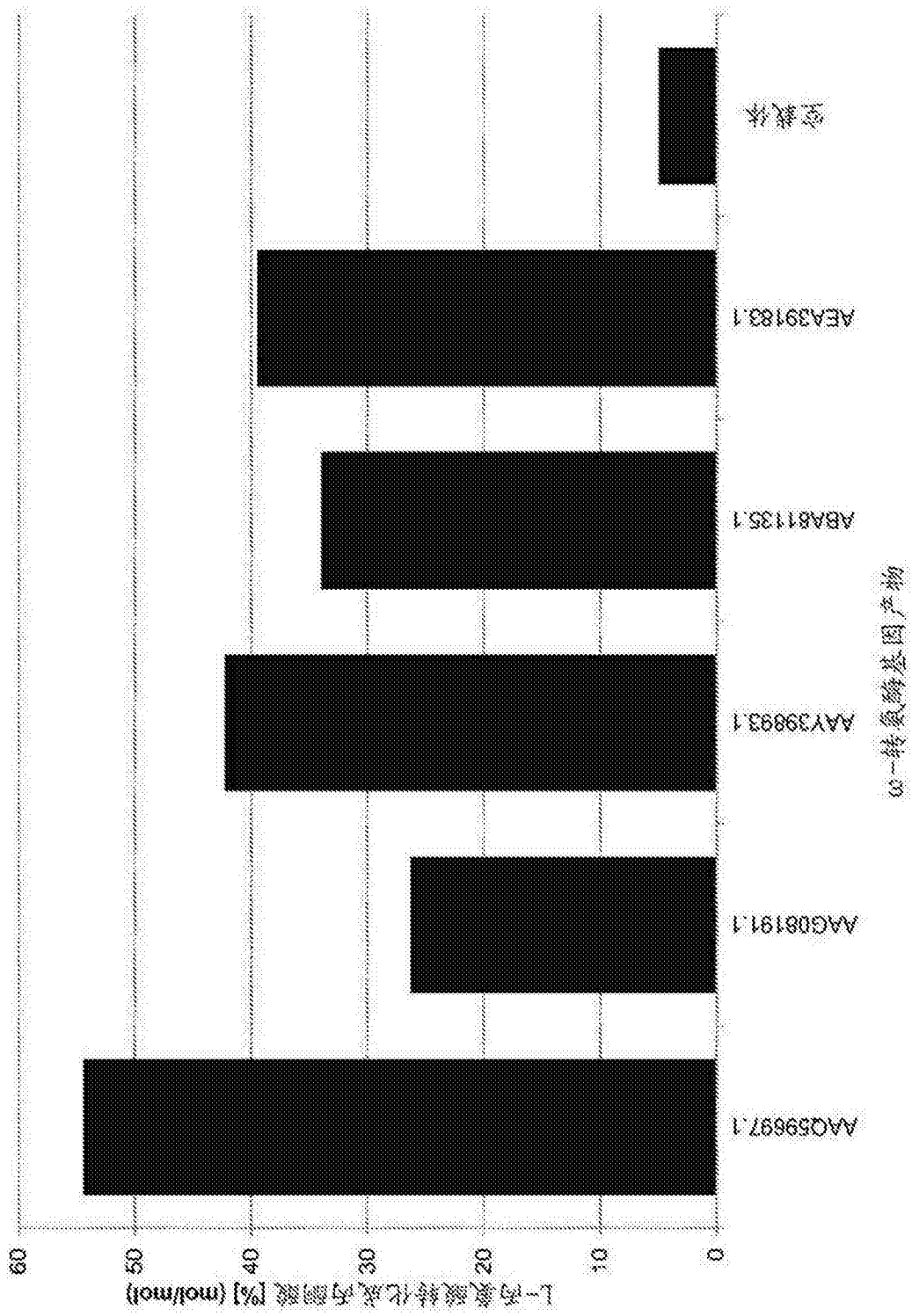


图 18

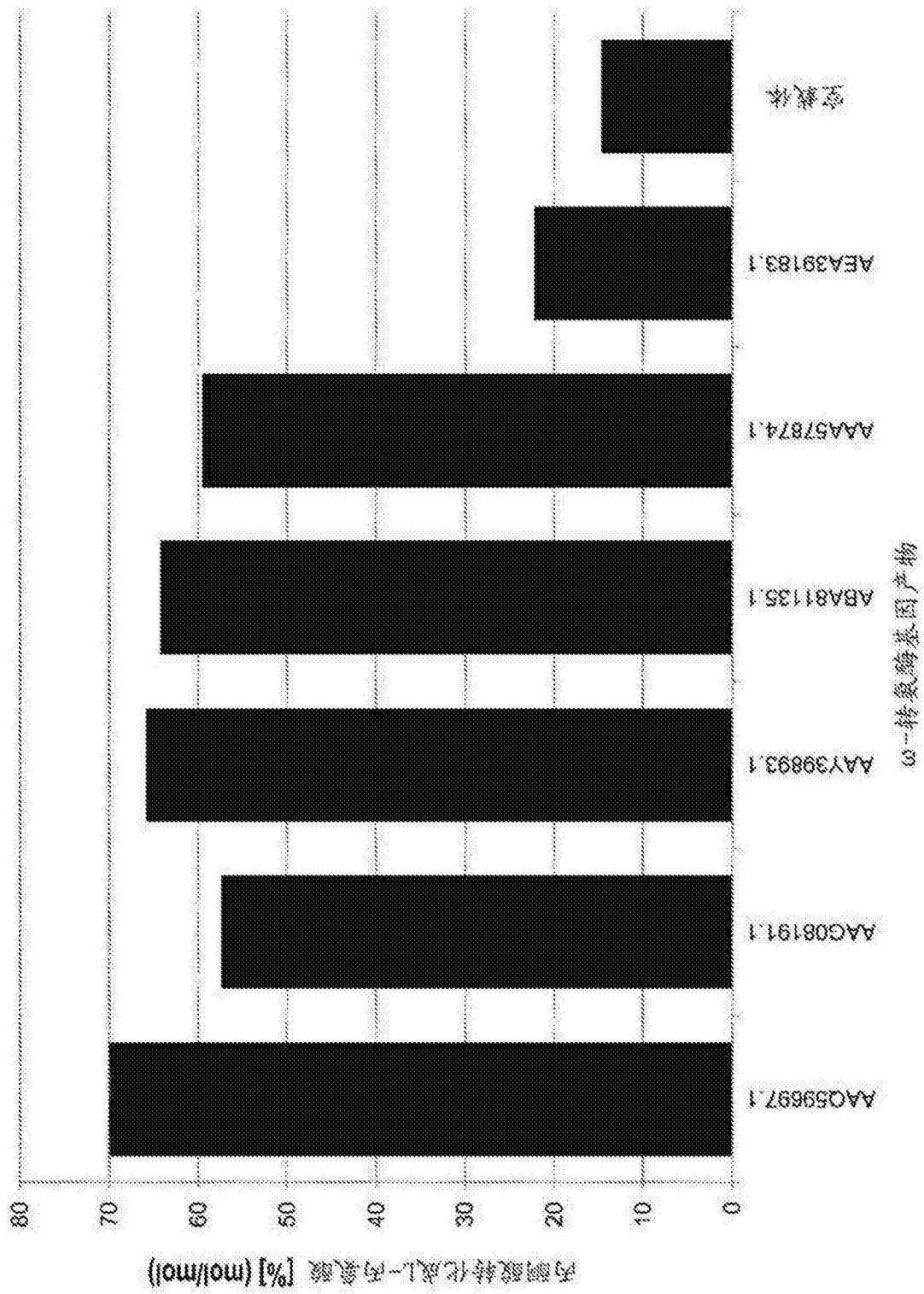


图 19

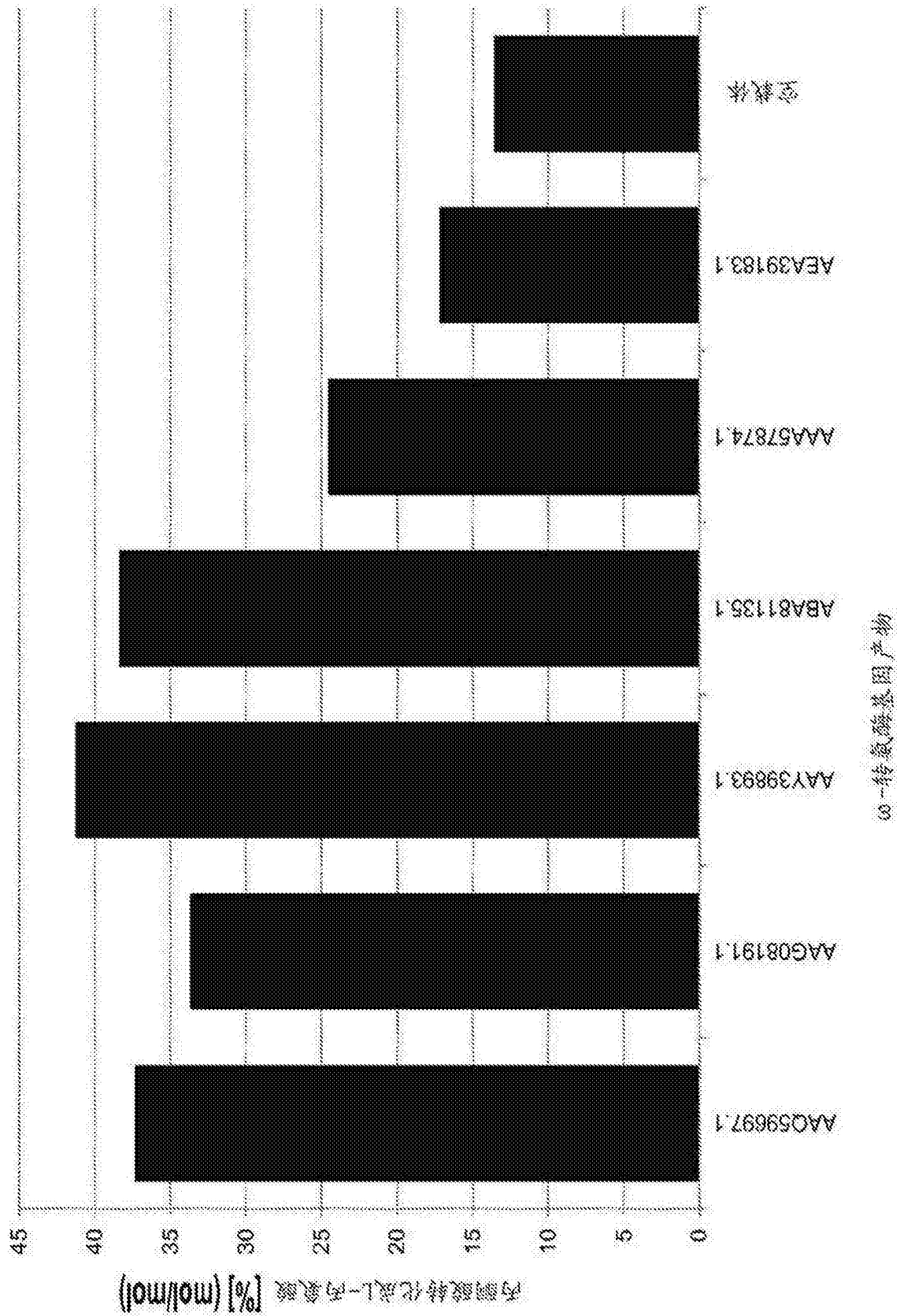


图 20

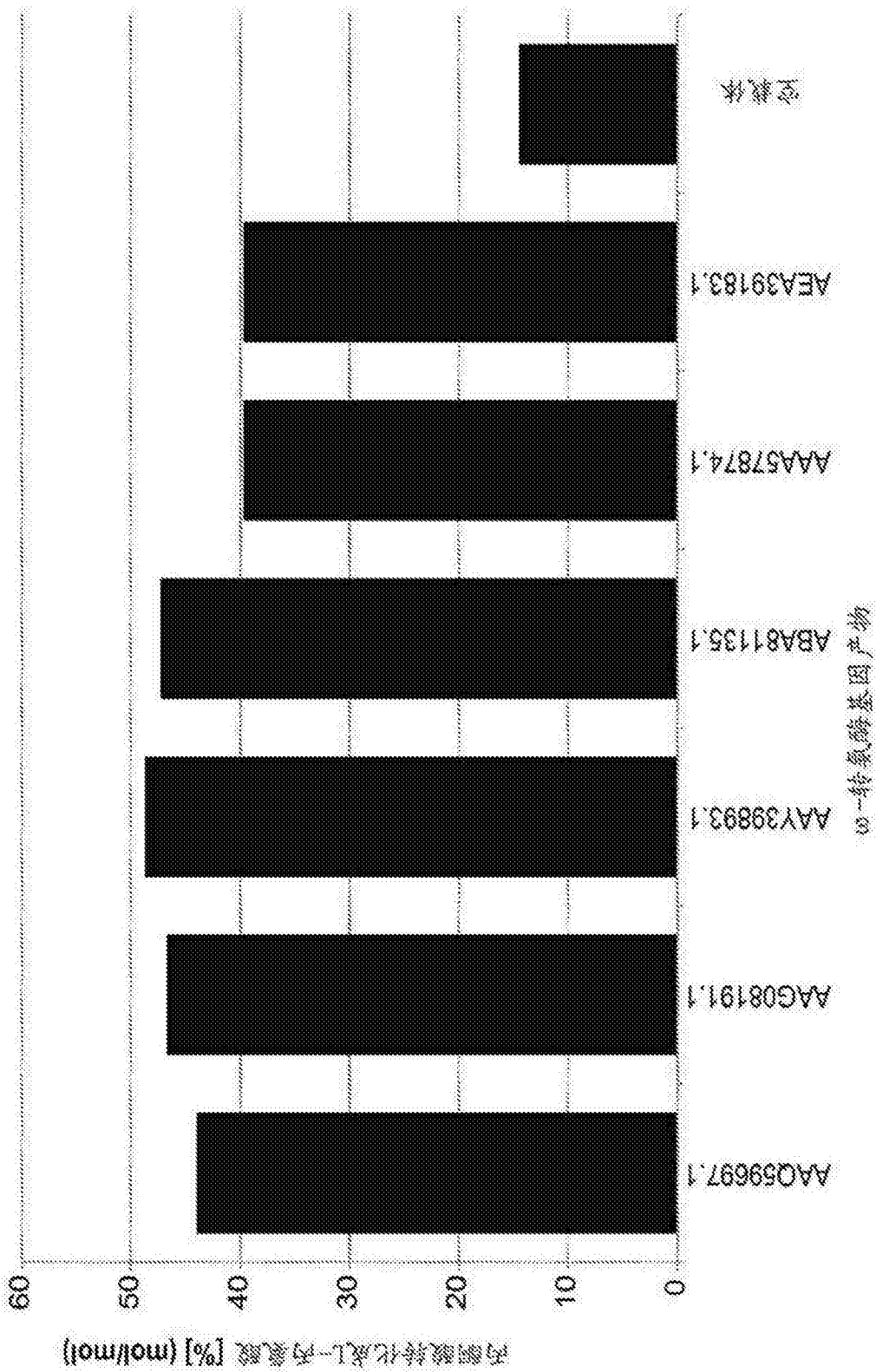


图 21

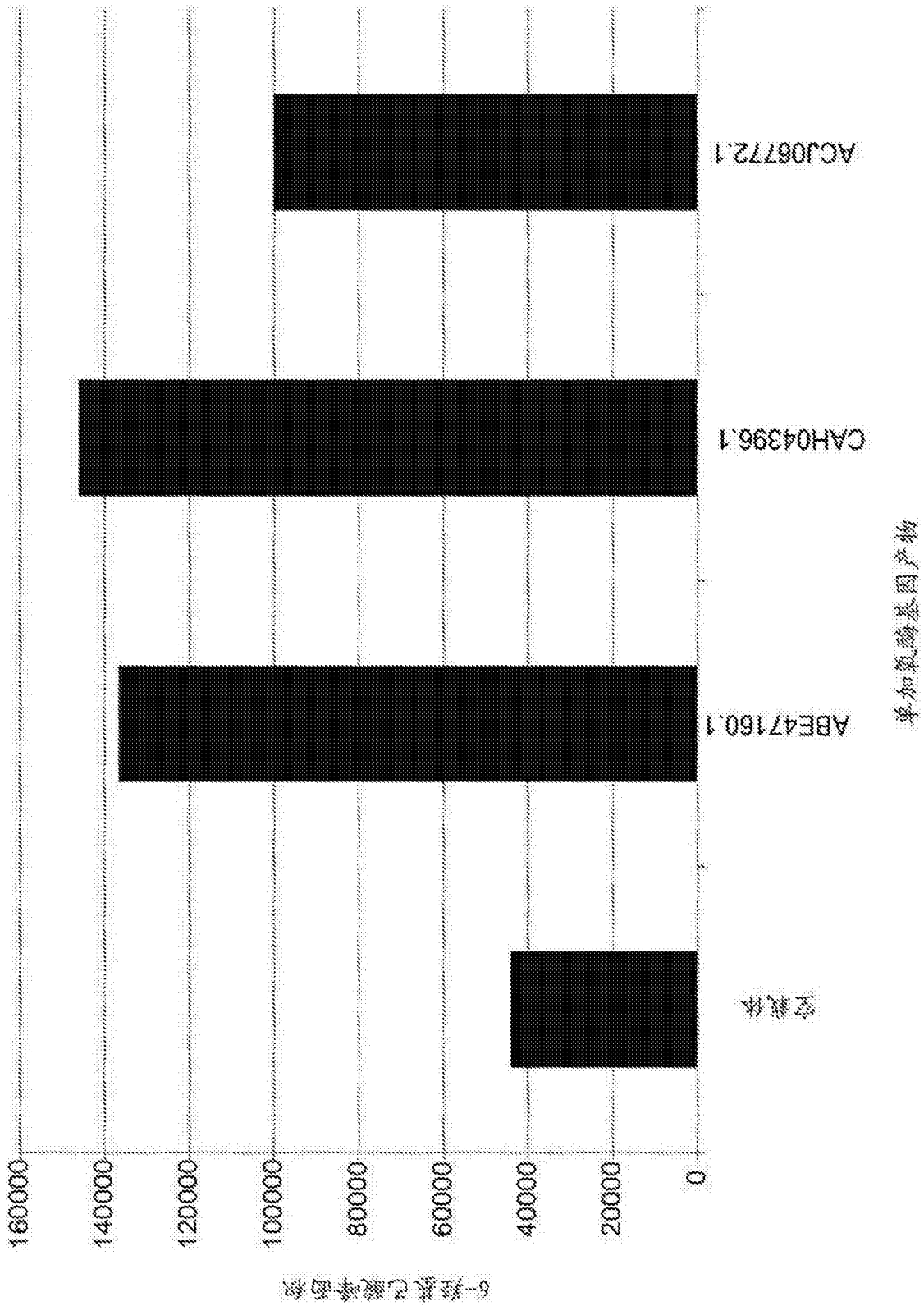


图 22