



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106119113 A

(43)申请公布日 2016. 11. 16

(21)申请号 201610481598.X

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2010.04.30

C12N 1/00(2006.01)

C12P 7/18(2006.01)

(30)优先权数据

61/174,473 2009.04.30 US

(62)分案原申请数据

201080029715.X 2010.04.30

(71)申请人 基因组股份公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 A·P·博加德 M·J·伯克

罗宾·E·奥斯特豪特

普里蒂·法克雅

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 郑霞

权利要求书2页 说明书78页

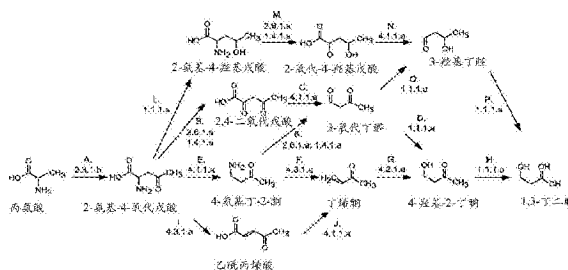
序列表1页 附图7页

(54)发明名称

用于生产 1,3-丁二醇的生物

(57)摘要

一种非天然存在的微生物,该微生物包括具有1,3-丁二醇(1,3-BDO)通路的微生物,该1,3-丁二醇(1,3-BDO)通路具有至少一种编码以足够的量表达的1,3-BDO通路酶的外源性核酸,以生产1,3-BDO。一种用于生产1,3-BDO的方法,该方法包括在多种条件下培养这类微生物达足够长的时间,以生产1,3-BDO。



1. 一种非天然存在的微生物,该微生物包括具有1,3-丁二醇(1,3-BDO)通路的微生物,该1,3-丁二醇(1,3-BDO)通路包含至少一种编码以足够的量表达的1,3-BDO通路酶的外源性核酸,以生产1,3-BDO,所述1,3-BDO通路包括选自如下的酶:2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶、AKP脱氢酶、2-氨基-4-羟基戊酸转氨酶、2-氨基-4-羟基戊酸氧化还原酶(脱氨基)、2-氧代-4-羟基戊酸脱羧酶、3-羟基丁醛还原酶、AKP转氨酶、AKP氧化还原酶(脱氨基)、2,4-二氧代戊酸脱羧酶、3-氧代丁醛还原酶(酮还原)、3-氧代丁醛还原酶(醛还原)、4-羟基-2-丁酮还原酶、AKP脱羧酶、4-氨基丁-2-酮转氨酶、4-氨基丁-2-酮氧化还原酶(脱氨基)、4-氨基丁-2-酮氨-裂解酶、丁烯酮水合酶、AKP氨-裂解酶、乙酰丙烯酸脱羧酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醛形成)、乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醇形成)、乙酰乙酰基-CoA还原酶(酮还原)、3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成)、3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)、4-羟基丁酰-CoA脱水酶和巴豆酸酶。

2. 根据权利要求1的非天然存在的微生物,其中所述微生物包含两种外源性核酸,各编码一种1,3-BDO通路酶。

3. 根据权利要求1的非天然存在的微生物,其中所述微生物包含三种外源性核酸,各编码一种1,3-BDO通路酶。

4. 根据权利要求1的非天然存在的微生物,其中所述微生物包含四种外源性核酸,各编码一种1,3-BDO通路酶。

5. 根据权利要求1的非天然存在的微生物,其中所述微生物包含五种外源性核酸,各编码一种1,3-BDO通路酶。

6. 根据权利要求1的非天然存在的微生物,其中所述至少一种外源性核酸是异源核酸。

7. 根据权利要求1的非天然存在的微生物,其中所述非天然存在的微生物在基本上厌氧的培养基中。

8. 根据权利要求1-5中任一项权利要求的非天然存在的微生物,其中所述1,3-BDO通路包含一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶选自如下:

(a)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP脱氢酶;(3)2-氨基-4-羟基戊酸转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(4)2-氧代-4-羟基戊酸脱羧酶;以及(5)3-羟基丁醛还原酶;

(b)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(3)2,4-二氧代戊酸脱羧酶;(4)3-氧代丁醛还原酶(酮还原);以及(5)3-羟基丁醛还原酶;

(c)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(3)2,4-二氧代戊酸脱羧酶;(4)3-氧代丁醛还原酶(醛还原);以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶;

(d)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP脱羧酶;(3)4-氨基丁-2-酮转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(4)3-氧代丁醛还原酶(酮还原);以及(5)3-羟基丁醛还原酶;

(e)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP脱羧酶;(3)4-氨基丁-2-酮转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(4)3-氧代丁醛还原酶(醛还原);以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶;

(f)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP脱羧酶;(3)4-氨基丁-2-酮氨-裂解酶;(4)丁烯酮水合酶;以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶;

(g)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP氨-裂解酶;(3)乙酰丙烯酸脱羧酶;(4)丁烯酮水合酶;以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶;

(h)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醛形成);(2)3-氧代丁醛还原酶(酮还

原);以及(3)3-羟基丁醛还原酶;

(i)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA依赖的、醇形成)和(2)4-羟基-2-丁酮还原酶;

(j)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醛形成);(2)3-氧代丁醛还原酶(醛还原);以及(3)4-羟基-2-丁酮还原酶;

(k)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(酮还原)和(2)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成);

(l)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(酮还原);(2)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成);以及(3)3-羟基丁醛还原酶;

(m)(1)4-羟基丁酰-CoA脱水酶;(2)巴豆酸酶;以及(3)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成);以及

(n)(1)4-羟基丁酰-CoA脱水酶;(2)巴豆酸酶;(3)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成);以及(4)3-羟基丁醛还原酶。

9. 根据权利要求8的非天然存在的微生物,其中所述一组1,3-BDO通路酶包含(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP脱氢酶;(3)2-氨基-4-羟基戊酸转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(4)2-氧代-4-羟基戊酸脱羧酶;以及(5)3-羟基丁醛还原酶。

10. 根据权利要求8的非天然存在的微生物,其中所述一组1,3-BDO通路酶包含(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(3)2,4-二氧代戊酸脱羧酶;(4)3-氧代丁醛还原酶(酮还原);以及(5)3-羟基丁醛还原酶。

用于生产 1,3-丁二醇的生物

[0001] 本申请是申请日为2010年04月30日、申请号为201080029715.X、名称为“用于生产1,3-丁二醇的生物”的发明申请的分案。

[0002] 相关申请说明

[0003] 本申请要求2009年4月30日提交的申请号为61/174,473的美国临时申请的优先权,所述美国临时申请的全部内容以引用方式并入本文。

[0004] 发明背景

[0005] 一般地,本发明涉及能够生产有机化合物的生物合成过程和生物。更具体地,本发明涉及可以生产化学商品1,3-丁二醇的非天然存在的生物。

[0006] 1,3-丁二醇(1,3-BDO)是通过乙炔的水合作用传统地产自乙炔的四碳二醇。所得的乙醛然后被转化成3-羟基丁醛,所述3-羟基丁醛随后被还原以形成1,3-BDO。在最近几年,乙炔已经被较便宜的乙烯取代来作为乙醛来源。1,3-BDO通常被用作食品调味剂的有机溶剂。它还被用作聚氨酯和聚酯树脂的共聚单体并被广泛用作降血糖药物。光学活性的1,3-BDO是对生物活性化合物和液晶体的合成有用的起始材料。1,3-丁二醇的基本商业用途是随后经脱水,以提供1,3-丁二烯(Ichikawa等人,J.of Molecular Catalysis A-Chemical,256:106-112(2006);Ichikawa等人,J.of Molecular Catalysis A-Chemical,231:181-189(2005)),1,3-丁二烯是一种用于制造合成橡胶(如轮胎)、乳胶和树脂的250亿lb/年的石化产品。对用于乙炔或乙烯的基于石油的原料的依赖使得有必要开发基于可再生原料生产1,3-丁二醇和丁二烯的路径。

[0007] 因此,需要开发微生物以及用其生产1,3-BDO的方法。本发明满足这种需要并且还提供相关的优势。

[0008] 发明概述

[0009] 在一些实施方式中,本发明针对一种非天然存在的微生物,该微生物包括具有1,3-丁二醇(1,3-BDO)通路的微生物,该1,3-丁二醇(1,3-BDO)通路具有至少一种编码以足够的量表达的1,3-BDO通路酶的外源性核酸,以生产1,3-BDO。该1,3-BDO通路包括选自如下的酶:2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶、AKP脱氢酶、2-氨基-4-羟基戊酸转氨酶、2-氨基-4-羟基戊酸氧化还原酶(脱氨基)、2-氧代-4-羟基戊酸脱羧酶、3-羟基丁醛还原酶、AKP转氨酶、AKP氧化还原酶(脱氨基)、2,4-二氧代戊酸脱羧酶、3-氧代丁醛还原酶(酮还原)、3-氧代丁醛还原酶(醛还原)、4-羟基-2-丁酮还原酶、AKP脱羧酶、4-氨基丁-2-酮转氨酶、4-氨基丁-2-酮氧化还原酶(脱氨基)、4-氨基丁-2-酮氨-裂解酶、丁烯酮水合酶、AKP氨-裂解酶、乙酰丙烯酸脱羧酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醛形成)、乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醇形成)、乙酰乙酰基-CoA还原酶(酮还原)、3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成)、3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)、4-羟基丁酰-CoA脱水酶和巴豆酸酶。

[0010] 在一些实施方式中,本发明针对一种用于生产1,3-BDO的方法,该方法包括在多种条件下培养这类非天然存在的微生物达足够长的时间,以生产1,3-BDO。

附图说明

[0011] 图1示出从丙氨酸到1,3-BDO的通路。酶为如下:A)AKP硫解酶、B)AKP转氨酶或AKP氧化还原酶(脱氨基)、C)2,4-二氧代戊酸脱羧酶、D)3-氧代丁醛还原酶(醛还原)、E)AKP脱羧酶、F)4-氨基丁-2-酮氨-裂解酶、G)丁烯酮水合酶、H)4-羟基,2-丁酮还原酶、I)AKP氨-裂解酶、J)乙酰丙烯酸脱羧酶、K)4-氨基丁-2-酮转氨酶或4-氨基丁-2-酮氧化还原酶(脱氨基)、L)AKP脱氢酶、M)2-氨基-4-羟基戊酸转氨酶或2-氨基-4-羟基戊酸氧化还原酶(脱氨基)、N)2-氧代-4-羟基戊酸脱羧酶、O)3-氧代丁醛还原酶(酮还原)以及P)3-羟基丁醛还原酶。

[0012] 图2示出从乙酰乙酰基-CoA到1,3-丁二醇的通路。酶为如下:A)乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醛形成)、B)3-氧代丁醛还原酶(酮还原)、C)3-羟基丁醛还原酶、D)乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醇形成)、E)3-氧代丁醛还原酶(醛还原)、F)4-羟基,2-丁酮还原酶、G)乙酰乙酰基-CoA还原酶(酮还原)、H)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成)以及I)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)。

[0013] 图3示出从4-羟基丁酰-CoA到1,3-丁二醇的通路。酶为如下:A)4-羟基丁酰-CoA脱水酶、B)巴豆酸酶、C)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成)、D)3-羟基丁醛还原酶以及E)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)。

[0014] 图4示出对3-羟基丁基-CoA显示明显活性的醛脱氢酶。

[0015] 图5示出透析前后来自糖乙酸多丁醇梭菌(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*)的bld对3-羟基丁酰-CoA的比活。

[0016] 图6示出当3-羟基丁醛作为底物加入以及在无底物的对照样品中1,3-BDO的浓度。显示了醇脱氢酶的GI号。

[0017] 图7示出当3-羟基丁酰-CoA作为底物加入以及在无底物的对照样品中1,3-BDO的浓度。显示了醇脱氢酶的GI号。同时受测的醛脱氢酶的GI号是163762382。

[0018] 发明详述

[0019] 本发明部分地针对非天然存在的微生物,该微生物表达编码催化1,3-丁二醇(1,3-BDO)生产的酶的基因。本文披露的用于1,3-丁二醇的生产的通路基于三个前体:(i)D-丙氨酸、(ii)乙酰乙酰基-CoA以及iii)4-羟基丁酰-CoA。成功地设计这些通路需要确定一组适当的具有足够的活性和特异性的酶、将其相应的基因克隆成生产宿主、优化发酵条件以及对发酵之后的产品形成进行测定。

[0020] 丙氨酸到1,3-BDO的转化可以通过多个通路以约五个酶催化步骤实现,如图1所示。在所有通路的第一步(步骤A),丙氨酸和乙酰-CoA通过2-氨基-4-酮戊酸硫解酶(一种高度选择性的酶)结合。该反应的产物2-氨基-4-氧代戊酸(AKP)然后可以被转氨基、还原、脱羧或脱氨,如图1所示。用于1,3-BDO的生产的进一步合成步骤在下文详细讨论。从这些通路的每个通路获得1,3-BDO的理论产率计算为约1.09摩尔/摩尔消耗的葡萄糖。

[0021] 图2概述了用于从乙酰乙酰基-CoA生产1,3-BDO的多个路径。从乙酰乙酰基-CoA到1,3-BDO的这些通路的每个通路利用三个还原当量并提供每摩尔消耗的葡萄糖1摩尔1,3-BDO的理论产率。其他碳源物(如合成气)也可以用于生产乙酰乙酰基-CoA。葡萄糖气化以形成合成气将导致最大的理论产率,即每摩尔消耗的葡萄糖1.09摩尔1,3-BDO(假设从葡萄糖获得6摩尔CO和6摩尔H₂):

[0022] $6\text{CO} + 6\text{H}_2 \rightarrow 1.091\text{C}_4\text{H}_{10}\text{O}_2 + 1.636\text{CO}_2 + 0.545\text{H}_2$

[0023] 4-羟基丁酰-CoA是一种重要的起始代谢产物,许多工业上有用的化合物,包括1,3-BDO可以由其制造,如图3所示。虽然4-羟基丁酰-CoA不是非常普遍的中心代谢产物,用于设计合成4-羟基丁酰-CoA的菌株的方法已被申请人于美国专利申请号2009/0075351中在先描述。假设葡萄糖作为碳水化合物原料,从4-羟基丁酰-CoA到1,3-丁二醇的通路具有1.09摩尔/摩尔产品产率的理论产率。

[0024] 本发明还部分地针对用于通过培养这些非天然存在的微生物生产1,3-BDO的方法。通过对本文所述的生物和方法生产的1,3-BDO的脱水提 供一种在小型终端使用设备中生产可再生丁二烯的机会,避免了运输这种易燃且反应的化学品的需要。

[0025] 如本文所用,术语“非天然存在的”当关于本发明的微生物使用时,意指该微生物具有至少一种通常不会在相关物种的天然存在的菌株(包括相关物种的野生型菌株)中发现的基因改变(genetic alteration)。基因改变包括,例如,引入编码代谢多肽的可表达的核酸的修饰(modification)、其他核酸新增、核酸缺失和/或微生物遗传物质的其他功能中断。这些修饰包括,例如,相关物种的异源多肽、同源多肽或异源和同源多肽的编码区和功能片段。其他修饰包括,例如,其中该修饰改变基因或操纵子的表达的非编码调控区域。示例性的代谢多肽包括在1,3-丁二醇的生物合成通路内的酶或蛋白质。

[0026] 代谢修饰是指从其天然存在的状态发生改变的生化反应。因此,非天然存在的微生物可以具有对编码代谢多肽的核酸或其功能片段的基因修饰。本文披露了示例性的代谢修饰。

[0027] 如本文所用,术语“分离”当关于微生物使用时,意指当相关微生物在自然界中被发现时,基本上不含至少一种组分的生物。该术语包括当在其自然环境中被发现时从部分或全部组分脱离的微生物。该术语还包括当其在非天然存在的环境中被发现时从部分或全部组分脱离的微生物。因此,当离体的微生物在自然界中被发现或者当其在非天然存在的环境中培育、储存或生存时,它部分或全部地从其他物质分离。分离的微生物的具体例子包括部分纯的微生物、基本上纯的微生物和在非天然存在的培养基中培养的微生物。

[0028] 如本文所用,术语“微生物”意在指任何作为包含在古菌域、细菌域或真核域的显微细胞(microscopic cell)存在的生物。因此,该术语意包括原核或真核细胞或具有显微尺寸的生物并包括所有种类的细菌、古菌和真细菌以及真核微生物(如酵母和真菌)。该术语还包括任何种类的可被培养用于生产生物化学品的细胞培养物。

[0029] 如本文所用,术语“CoA”或“辅酶A”意指有机辅因子或辅基(酶的非蛋白质部分),其存在是许多酶(脱辅基酶蛋白)的活性所需,以形成活性酶系统。辅酶A在某些缩合酶中起作用,在乙酰或其他酰基转移以及脂肪酸合成和氧化、丙酮酸氧化中以及在其他乙酰化作用中起作用。

[0030] 如本文所用,术语“基本上厌氧”当关于培养或培育条件使用时意指氧量少于液体培养基内溶解的氧的饱和量的约10%。该术语还意在包括在小于约1%的氧的气氛中保持的液体或固体培养基的密封室。

[0031] 如本文所用,“外源”意指有关分子或有关活性被引入宿主微生物。分子可以例如,通过将编码核酸引入宿主遗传物质,如通过整合入宿主染色体或作为非染色体遗传物质(如质粒)被引入。因此,当关于编码核酸的表达使用时,该术语指将编码核酸以可表达的形式引入微生物。当关于生物合成活性使用时,该术语指被引入宿主有关生物的活性。来源可

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

[0032] 本发明的该非天然存在的微生物可以包含稳定的基因改变,这指可以培养超过五代而无改变损失的微生物。一般地,稳定的基因改变包括持续超过10代的修饰,具体地,稳定的修饰将持续超过约25代,以及更具体地,稳定的基因修饰将超过50代,包括永久地。

[0033] 本领域的技术人员会理解所述基因改变(包括本文示例性的代谢修饰)是关于合适的宿主生物(如大肠杆菌)及其相应的代谢反应或所需的代谢通路的所需的遗传物质(如基因)的合适的来源生物描述的。然而,如果有各种各样的生物的完整的基因组测序和基因组学领域的高水平技能,本领域的技术人员将能够很容易地将本文提供的教诲和指导应用于基本上所有的其他生物。例如,本文示例性的大肠杆菌代谢改变可以通过纳入来自与有关物种不同的物种的相同或类似的编码核酸很容易地应用到其他物种。一般地,这类基因改变包括例如,物种同系物的基因改变,以及具体地,直系同源、旁系同源或非旁系同源基因置换。

[0034] 直系同源是通过垂直传递(vertical descent)相关且导致不同的生物内基本上相同或相似的功能的一种或多种基因。例如,小鼠环氧化物水解酶和人环氧化物水解酶因环氧化物水解的生物功能可以被认为是直系同源。例如,当基因共有足够量的序列相似性以表明它们是同源的或者通过进化自共同的祖先相关时,所述基因通过垂直传递相关。如果基因共有足够量的三维结构但不一定共有序列相似性以表明它们进化自共同的祖先达到基本序列相似性无法识别的程度,也认为它们是直系同源。直系同源的基因可以编码具有约25%到100%氨基酸序列一致性的序列相似性的蛋白质。如果编码共有的氨基酸相似性小于25%的蛋白质的基因其三维结构也显示出相似性,则所述基因也可以被认为通过垂直传递产生。酶类的丝氨酸蛋白酶家族的成员(包括组织型纤维蛋白溶酶原激活剂和弹性蛋白酶)被认为通过垂直传递产生自共同的祖先。

[0035] 直系同源包括通过例如,进化在结构或整体活性方面趋异的基因或其编码基因产物。例如,当一种物种编码显示两种功能的基因产物以及当这类功能在第二个物种内已经分为不同的基因时,这三个基因及其相应的产物被认为是直系同源。对于生化产品的生产,本领域的技术人员会理解含待引入或破坏的代谢活性的直系同源的基因将被选择用于所述非天然存在的微生物的构建。显示各自活性的直系同源的例子是当两个或两个以上物种之间或一个单一物种内部不同的活性已经分为不同的基因产物的情况。具体的例子是弹性蛋白酶蛋白质水解和纤维蛋白溶酶原蛋白质水解(两种类型的丝氨酸蛋白酶活性)分离为作为纤维蛋白溶酶原激活剂和弹性蛋白酶的不同分子。第二个例子是支原体5'-3'核酸外切酶和果蝇DNA聚合酶III活性的分离。来自第一物种的DNA聚合酶可以被认为是来自第二物种的核酸外切酶和聚合酶其一或两者的直系同源,反之亦然。

[0036] 相反,旁系同源是通过例如,复制然后进化趋异相关的同系物并具有相似或共同的,但不完全相同的功能。旁系同源可以源自例如,相同物种或源自不同的物种。例如,微粒体环氧化物水解酶(环氧化物水解酶I)和可溶性环氧化物水解酶(环氧化物水解酶II)可以

被认为是旁系同源,因为它们代表两种不同的酶类,协同进化自共同的祖先,催化不同的反应并在相同的物种内具有不同的功能。旁系同源是来自彼此具有显著的序列相似性的相同物种的蛋白质,这表明它们是同源的或通过协同进化自共同的祖先而相关。旁系同源蛋白质家族的群体包括HipA同系物、荧光素酶基因、肽酶以及其他。

[0037] 非直系同源基因置换是来自一个物种的非直系同源基因可以替代一种不同的物种内有关基因功能。替代包括例如,能够在起源物种内执行与所述不同的物种内所述有关功能相比基本上相同或相似的功能。虽然一般地,非直系同源基因置换可看作是与编码有关功能的已知基因结构相关,不过结构相关性差但功能相似的基因及其相应的基因产物仍然会如本文所用,落入所述术语的含义之内。功能相似性要求例如,与编码试图被替代的功能的基因相比,在非直系同源基因产物的活性位点或结合区域具有至少一些结构相似性。因此,直系同源基因包括例如,旁系同源或不相关的基因。

[0038] 因此,识别和构建本发明的具有1,3-BDO生物合成能力的非天然存在的微生物时,本领域的技术人员会将本文提供的教诲和指导应用于特定的物种并会理解代谢修饰的识别可以包括直系同源的识别和包含或灭活。如果编码催化相似或基本上相似的代谢反应的酶的旁系同源和/或非直系同源 基因置换存在于参照微生物内,本领域的技术人员还可以利用这些进化上相关的基因。

[0039] 直系同源、旁系同源和非直系同源基因置换可以通过本领域的技术人员熟知的方法确定。例如,对两种多肽的核酸或氨基酸序列的检验将揭示所比较的序列之间的序列一致性和相似性。基于这种相似性,本领域的技术人员可以确定相似性是否足够高以表明蛋白质是通过进化自共同的祖先而相关的。本领域的技术人员熟知的算法(如Align、BLAST、Clustal W以及其他)比较并确定原始序列相似性或一致性,以及还确定序列内空隙的存在或大小,其可以被赋予权数或得分。这类算法在本领域也已知并同样适用于确定核苷酸序列的相似性或一致性。足够的相似性以确定相关性的参数的计算基于熟知的用于计算统计相似性的方法或在随机多肽中发现相似匹配的几率以及确定的所述匹配的程度。如果需要,两个或两个以上序列的计算机对比还可以由本领域的技术人员进行可视优化。相关的基因产物或蛋白质应该具有高度的相似性,例如,25%到100%的序列一致性。不相关的蛋白质可以具有一致性,所述一致性基本上与预计将发生的几率相同,如果扫描一个具有相当规模的数据库(约5%)。5%到24%之间的序列可代表或不代表足以得出所比较的序列具有相关性的结论的同源性。在给定数据集的大小的情况下,可以进行额外的确定这种匹配的程度的统计分析,以确定这些序列的相关性。

[0040] 用于使用例如,所述BLAST算法确定两个或两个以上序列的相关性的示例性参数可以如下文描述。简言之,氨基酸序列比对可以使用BLASTP版本2.0.8(1999年1月5日)以及以下参数执行:矩阵:0BLOSUM 62;空位开放:11;空位延伸:1;x_dropoff:50;期望值:10.0;序列长度:3;过滤器:开。核酸序列比对可以使用BLASTN版本2.0.6(1998年9月16日)以及以下参数执行:匹配:1;错配:-2;空位开放:5;空位延伸:2;x_dropoff:50;期望值:10.0;序列长度:11;过滤器:关。本领域的技术人员会知道对以上参数作何修改会例如,增加或减少比较的严格性,以及确定两个或两个以上序列的相关性。

[0041] 在一些实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,该微生物包括具有1,3-丁二醇(1,3-BDO)通路的微生物,该1,3-丁二醇(1,3-BDO)通路具有至少一种编码以足够

的量表达的1,3-BDO通路酶的外源性核酸,以生产1,3-BDO。该1,3-BDO通路包括选自如下的酶:2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶、AKP脱氢酶、2-氨基-4-羟基戊酸转氨酶、2-氨基-4-羟基戊酸氧化还原酶(脱氨基)、2-氧代-4-羟基戊酸脱羧酶、3-羟基丁醛还原酶、AKP转氨酶、AKP氧化还原酶(脱氨基)、2,4-二氧代戊酸脱羧酶、3-氧代丁醛还原酶(酮还原)、3-氧代丁醛还原酶(醛还原)、4-羟基-2-丁酮还原酶、AKP脱羧酶、4-氨基丁-2-酮转氨酶、4-氨基丁-2-酮氧化还原酶(脱氨基)、4-氨基丁-2-酮氨-裂解酶、丁烯酮水合酶、AKP氨-裂解酶、乙酰丙烯酸脱羧酶、乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醛形成)、乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醇形成)、乙酰乙酰基-CoA还原酶(酮还原)、3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成)、3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)、4-羟基丁酰-CoA脱水酶和巴豆酸酶。

[0042] 上述酶的任意组合和任意数量的上述酶可以被引入宿主微生物,以完成1,3-BDO通路,如图1-3所示。例如,该非天然存在的微生物可以包括1,3-BDO通路中的核酸的一个、两个、三个、四个、五个至全部,每个核酸编码1,3-BDO通路酶。这类核酸可以包括异源核酸、现有基因的额外拷贝以及基因调节元件,如下文进一步解释。本发明的所述非天然存在的微生物的通路也被适当地设计,以在基本上厌氧的培养基中培养。

[0043] 在一些实施方式中,所述具有1,3-BDO通路的非天然存在的微生物包含一组1,3-BDO通路酶。一组1,3-BDO通路酶表示一群可以将丙氨酸、乙酰乙酰基-CoA或4-羟基丁酰-CoA转化为1,3-BDO(如图1-3所示)的酶。示例性的将丙氨酸转化为1,3-BDO(根据图1)的一组1,3-BDO通路酶包括(a)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP脱氢酶;(3)2-氨基-4-羟基戊酸转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(4)2-氧代-4-羟基戊酸脱羧酶;以及(5)3-羟基丁醛还原酶;(b)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(3)2,4-二氧代戊酸脱羧酶;(4)3-氧代丁醛还原酶(酮还原);以及(5)3-羟基丁醛还原酶;(c)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(3)2,4-二氧代戊酸脱羧酶;(4)3-氧代丁醛还原酶(醛还原);以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶;(d)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP脱羧酶;(3)4-氨基丁-2-酮转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(4)3-氧代丁醛还原酶(酮还原);以及(5)3-羟基丁醛还原酶;(e)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP脱羧酶;(3)4-氨基丁-2-酮转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(4)3-氧代丁醛还原酶(醛还原);以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶;(f)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP脱羧酶;(3)4-氨基丁-2-酮氨-裂解酶;(4)丁烯酮水合酶;以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶;以及(g)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP氨-裂解酶;(3)乙酰丙烯酸脱羧酶;(4)丁烯酮水合酶;以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶;

[0044] 示例性的将乙酰乙酰基-CoA转化为1,3-BDO(根据图2)的一组1,3-BDO通路酶包括(h)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醛形成);(2)3-氧代丁醛还原酶(酮还原);以及(3)3-羟基丁醛还原酶;(i)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA依赖的、醇形成)以及(2)4-羟基-2-丁酮还原酶;(j)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醛形成);(2)3-氧代丁醛还原酶(醛还原);以及(3)4-羟基-2-丁酮还原酶;(k)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(酮还原)以及(2)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成);以及(1)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(酮还原);(2)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成);以及(3)3-羟基丁醛还原酶;

[0045] 示例性的将4-羟基丁酰-CoA转化为1,3-BDO(根据图3)的一组1,3-BDO通路酶包括(m)(1)4-羟基丁酰-CoA脱水酶;(2)巴豆酸酶;以及(3)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成);以

及(n)(1)4-羟基丁酰-CoA脱水酶;(2)巴豆酸酶;(3)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成);以及(4)3-羟基丁醛还原酶。

[0046] 丙氨酸到1,3-BDO的转化可以通过多个通路以约五个酶催步骤实现,如图1所示。在所有通路的第一步骤(步骤A),丙氨酸和乙酰-CoA通过2-氨基-4-酮戊酸硫解酶(一种高度选择性的酶)结合。该反应的产物2-氨基-4-氧代戊酸(AKP)然后可以被转氨基、还原、脱羧或脱氨,如图1所示。

[0047] 在一个路径中,通过转氨酶或脱氨基氧化还原酶将AKP转化成2,4-二氧代戊酸,一种在结构上与 α -酮戊二酸相似的2-酮酸(步骤B)。然后通过2-酮酸脱羧酶将2,4-二氧代戊酸转化成3-氧代丁醛(步骤C)。将酮和乙醛基团还原成其相应的醇,获得1,3-丁二醇。可以任一顺序进行这些还原反应,以形成中间体3-羟基丁醛(步骤O和P)或4-羟基,2-丁酮(步骤D和H)。

[0048] 在另一个路径中,首先通过AKP脱氢酶将AKP的4-氧代基团还原为仲醇(步骤L)。然后将产物2-氨基-4-羟基戊酸转化为2-氧代-4-羟基戊酸(步骤M)。将所得的2-酮酸脱羧基化为3-羟基丁醛(步骤N)。在该路径的最后步骤中,通过3-羟基丁醛将3-羟基丁醛的醛还原成伯醇,形成1,3-丁二醇(步骤P)。

[0049] 仍然另一个路径涉及通过氨基酸脱羧酶对AKP进行脱羧基化(步骤E)。可以将脱羧基产物4-氨基丁-2-酮转氨基或氧化脱氨为3-氧代丁醛(步骤K)或脱氨为丁烯酮(步骤F)。当形成3-氧代丁醛,利用两个醇-形成还原步骤以形成1,3-丁二醇,如前文所述(步骤O和P或步骤D和H)。然后将脱氨产物丁烯酮水解为4-羟基,2-丁酮(步骤G),通过4-羟基-2-丁酮还原酶将4-羟基,2-丁酮还原为1,3-丁二醇(步骤H)。

[0050] 仍然另一个路径涉及将AKP脱氨为乙酰丙烯酸(步骤I)。将乙酰丙烯酸脱羧基化为丁烯酮(步骤J),其然后通过丁烯酮水合酶(步骤G)以及4-羟基,2-丁酮还原酶(步骤H)被转化为1,3-丁二醇。

[0051] 基于上文描述的用于从丙氨酸生产1,3-BDO的路径,在一些实施方式中,所述非天然存在的微生物具有一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶包括(1)2-氨基-4-酮戊酸酯(AKP)硫解酶;(2)AKP脱氢酶;(3)2-氨基-4-羟基戊酸转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(4)2-氧代-4-羟基戊酸脱羧酶;以及(5)3-羟基丁醛还原酶。任意数量的编码这些酶的核酸可以被引入宿主微生物,包括编码这些酶的核酸的一个、两个、三个、四个至全部五个。当一个、两个、三个或四个外源性核酸被引入时,这类核酸可以是这五个核酸的任意排列。

[0052] 在其他的实施方式中,非天然存在的微生物具有一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶包括(1)2-氨基-4-酮戊酸酯(AKP)硫解酶;(2)AKP转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(3)2,4-二氧代戊酸脱羧酶;(4)3-氧代丁醛还原酶(酮还原);以及(5)3-羟基丁醛还原酶。任意数量的编码这些酶的核酸可以被引入宿主微生物,包括编码这些酶的核酸的一个、两个、三个、四个至全部五个。当一个、两个、三个或四个外源性核酸被引入时,这类核酸可以是这五个核酸的任意排列。

[0053] 在仍然其他实施方式中,所述非天然存在的微生物具有一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶包括(1)2-氨基-4-酮戊酸酯(AKP)硫解酶;(2)KP转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(3)2,4-二氧代戊酸脱羧酶;(4)3-氧代丁醛还原酶(醛还原);以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶。任意数量的编码这些酶的核酸可以被引入宿主微生物,包括编码这些酶的核

酸的一个、两个、三个、四个至全部五个。当一个、两个、三个或四个外源性核酸被引入时,这类核酸可以是这五个核酸的任意排列。

[0054] 在仍然进一步的实施方式中,所述非天然存在的微生物具有一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶包括(1)2-氨基-4-酮戊酸酯(AKP)硫解酶;(2)AKP脱羧酶;(3)4-氨基丁-2-酮转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(4)3-氧代丁醛还原酶(酮还原);以及(5)3-羟基丁醛还原酶。任意数量的编码这些酶的核酸可以被引入宿主微生物,包括编码这些酶的核酸的一个、两个、三个、四个至全部五个。当一个、两个、三个或四个外源性核酸被引入时,这类核酸可以是这五个核酸的任意排列。

[0055] 在仍然进一步的实施方式中,所述非天然存在的微生物具有一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶包括(1)2-氨基-4-酮戊酸酯(AKP)硫解酶;(2)AKP脱羧酶;(3)4-氨基丁-2-酮转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(4)3-氧代丁醛还原酶(醛还原);以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶。任意数量的编码这些酶的核酸可以被引入宿主微生物,包括编码这些酶的核酸的一个、两个、三个、四个至全部五个。当一个、两个、三个或四个外源性核酸被引入时,这类核酸可以是这五个核酸的任意排列。

[0056] 在仍然进一步的实施方式中,所述非天然存在的微生物具有一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶包括(1)2-氨基-4-酮戊酸酯(AKP)硫解酶;(2)AKP脱羧酶;(3)4-氨基丁-2-酮氨-裂解酶;(4)丁烯酮水合酶;以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶。任意数量的编码这些酶的核酸可以被引入宿主微生物,包括编码这些酶的核酸的一个、两个、三个、四个至全部五个。当一个、两个、三个或四个外源性核酸被引入时,这类核酸可以是这五个核酸的任意排列。

[0057] 在仍然进一步的实施方式中,所述非天然存在的微生物具有一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶包括(1)2-氨基-4-酮戊酸酯(AKP)硫解酶;(2)AKP氨-裂解酶;(3)乙酰丙烯酸脱羧酶;(4)丁烯酮水合酶;以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶。任意数量的编码这些酶的核酸可以被引入宿主微生物,包括编码这些酶的核酸的一个、两个、三个、四个至全部五个。当一个、两个、三个或四个外源性核酸被引入时,这类核酸可以是这五个核酸的任意排列。

[0058] 图2概述了用于从乙酰乙酰基-CoA生产1,3-丁二醇的多个路径。一个通过步骤A、B和C的路径利用(i)CoA-依赖的、醛形成的乙酰乙酰基-CoA还原酶,以将乙酰乙酰基-CoA转化为3-氧代丁醛(图2,步骤A),(ii)3-氧代丁醛还原酶,以将3-氧代丁醛还原为3-羟基丁醛(图2,步骤B)和(iii)最后,3-羟基丁醛还原酶,以形成1,3-丁二醇(图2,步骤C)。

[0059] 替代地,乙酰乙酰基-CoA可以通过所述醛形成的乙酰乙酰基-CoA还原酶被还原,以形成4-羟基,2-丁酮(图2,步骤D)。4-羟基,2-丁酮的形成还可以通过用所述醛还原的3-氧代丁醛还原酶来还原3-氧代丁醛(图2,步骤E)。最终,4-羟基,2-丁酮可以通过4-羟基-2-丁酮还原酶被还原,以形成1,3-BDO(图2,步骤F)。

[0060] 仍然另一套的1,3-BDO形成路径凭借通过所述酮还原的乙酰乙酰基-CoA还原酶将乙酰乙酰基-CoA还原为3-羟基丁酰-CoA(图2,步骤G)。该酶将乙酰乙酰基-CoA中的酮官能还原为羟基。3-羟基丁酰-CoA可以通过双官能的醇-形成3-羟基丁酰-CoA还原酶被还原,以形成1,3-丁二醇(图2,步骤I)。替代地,它可以首先通过所述醛形成的3-羟基丁酰-CoA还原酶被还原为3-羟基丁醛(步骤H)而3-羟基丁醛然后可以被还原,如步骤C所示。

[0061] 在一些实施方式中,基于上文所描述的用于从乙酰乙酰基-CoA生产1,3-BDO的路径,所述非天然存在的微生物具有一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶包括(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醛形成);(2)3-氧代丁醛还原酶(酮还原);以及(3)3-羟基丁醛还原酶。任意数量的编码这些酶的核酸可以被引入宿主微生物,包括编码这些酶的核酸的一个、两个至全部三个。当一个或两个外源性核酸被引入时,这类核酸可以是这三个核酸的任意排列。

[0062] 在其他实施方式中,所述非天然存在的微生物具有一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶包括(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA依赖的、醇形成)和(2)4-羟基-2-丁酮还原酶。任意数量的编码这些酶的核酸可以被引入宿主微生物,包括编码这些酶的核酸的一个或全部两个。当一个外源性核酸被引入时,这样一个核酸可以是这两个核酸中的任何一个。

[0063] 在进一步的实施方式中,所述非天然存在的微生物具有一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶包括(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醛形成);(2)3-氧代丁醛还原酶(醛还原);以及(3)4-羟基-2-丁酮还原酶。任意数量的编码这些酶的核酸可以被引入宿主微生物,包括编码这些酶的核酸的一个、两个至全部三个。当一个或两个外源性核酸被引入时,这类核酸可以是这三个核酸的任意排列。

[0064] 在仍然进一步的实施方式中,所述非天然存在的微生物具有一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶包括(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(酮还原)和(2)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)。任意数量的编码这些酶的核酸可以被引入宿主微生物,包括编码这些酶的核酸的一个或全部两个。当一个外源性核酸被引入时,这样一个核酸可以是这两个核酸中的任何一个。

[0065] 在仍然进一步的实施方式中,所述非天然存在的微生物具有一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶包括(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(酮还原);(2)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成);以及(3)3-羟基丁醛还原酶。任意数量的编码这些酶的核酸可以被引入宿主微生物,包括编码这些酶的核酸的一个、两个至全部三个。当一个或两个外源性核酸被引入时,这类核酸可以是这三个核酸的任意排列。

[0066] 4-羟基丁酰-CoA是一种重要的起始代谢产物,许多工业上有用的化合物可以由其制造。虽然4-羟基丁酰-CoA不是非常普遍的中心代谢产物,用于设计合成4-羟基丁酰-CoA的菌株的方法已被描述在Burk等人(US 20090075351)。示例性的方法涉及通过采用编码琥珀半醛脱氢酶(CoA-依赖)、4-羟丁酸脱氢酶、4-羟丁酸激酶和磷酸丁酰转移酶活性的基因从琥珀酰-CoA合成4-羟基丁酰-CoA。

[0067] 在所述通路中的第一步骤涉及4-羟基丁酰-CoA的脱水(图3步骤A),随后巴豆酰-CoA的水合,以形成3-羟基丁酰-CoA(步骤B)。3-羟基丁酰-CoA然后经过由两种酶中任意一个(步骤C和D)或单一的双官能酶(步骤E)执行的两个还原步骤,以形成1,3-丁二醇。

[0068] 因此,在一些实施方式中,所述非天然存在的微生物具有一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶包括(1)4-羟基丁酰-CoA脱水酶;(2)巴豆酸酶;以及(3)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)。任意数量的编码这些酶的核酸可以被引入宿主微生物,包括编码这些酶的核酸的一个、两个至全部三个。当一个或两个外源性核酸被引入时,这类核酸可以是这三个核酸的任意排列。

[0069] 在其他实施方式中,所述非天然存在的微生物具有一组1,3-BDO通路酶,所述一组1,3-BDO通路酶包括(1)4-羟基丁酰-CoA脱水酶;(2)巴豆酸酶;(3)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成);以及(4)3-羟基丁醛还原酶。任意数量的编码这些酶的核酸可以被引入宿主微生物,包括编码这些酶的核酸的一个、两个、三个至全部四个。当一个、两个或三个外源性核酸被引入时,这类核酸可以是这四个核酸的任意排列。

[0070] 在另外的实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物具有1,3-BDO通路,其中所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,所述酶或蛋白质将底物转化为选自如下的产物:丙氨酸到2-氨基-4-氧代戊酸、2-氨基-4-氧代戊酸到2-氨基-4-羟基戊酸、2-氨基-4-羟基戊酸到2-氧代-4-羟基戊酸、2-氧代-4-羟基戊酸到3-羟基丁醛以及3-羟基丁醛到1,3-BDO。

[0071] 在另外的实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物具有1,3-BDO通路,其中所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,所述酶或蛋白质将底物转化为选自如下的产物:丙氨酸到2-氨基-4-氧代戊酸、2-氨基-4-氧代戊酸到2,4-二氧代戊酸、2,4-二氧代戊酸到3-氧代丁醛、3-氧代丁醛到4-羟基-2-丁酮以及4-羟基-2-丁酮到1,3-BDO。

[0072] 在另外的实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物具有1,3-BDO通路,其中所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,所述酶或蛋白质将底物转化为选自如下的产物:丙氨酸到2-氨基-4-氧代戊酸、2-氨基-4-氧代戊酸到4-氨基丁-2-酮、4-氨基丁-2-酮到3-氧代丁醛、3-氧代丁醛到3-羟基丁醛以及3-羟基丁醛到1,3-BDO。

[0073] 在另外的实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物具有1,3-BDO通路,其中所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,所述酶或蛋白质将底物转化为选自如下的产物:丙氨酸到2-氨基-4-氧代戊酸、2-氨基-4-氧代戊酸到4-氨基丁-2-酮、4-氨基丁-2-酮到3-氧代丁醛、3-氧代丁醛到4-羟基-2-丁酮以及4-羟基-2-丁酮到1,3-BDO。

[0074] 在另外的实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物具有1,3-BDO通路,其中所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,所述酶或蛋白质将底物转化为选自如下的产物:丙氨酸到2-氨基-4-氧代戊酸、2-氨基-4-氧代戊酸到4-氨基丁-2-酮、4-氨基丁-2-酮到丁烯酮、丁烯酮到4-羟基-2-丁酮以及4-羟基-2-丁酮到1,3-BDO。

[0075] 在另外的实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物具有1,3-BDO通路,其中所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,所述酶或蛋白质将底物转化为选自如下的产物:丙氨酸到2-氨基-4-氧代戊酸、2-氨基-4-氧代戊酸到乙酰丙烯酸、乙酰丙烯酸到丁烯酮、丁烯酮到4-羟基-2-丁酮以及4-羟基-2-丁酮到1,3-BDO。

[0076] 因此,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,其中所述酶或蛋白质转化底物并将丙氨酸转化为1,3-BDO的1,3-BDO通路的产物,由如图1所示的通路示范。

[0077] 在另外的实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的

微生物具有1,3-BDO通路,其中所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,所述酶或蛋白质将底物转化为选自如下的产物:乙酰乙酰基-CoA到4-羟基-2-丁酮以及4-羟基-2-丁酮到1,3-BDO。

[0078] 在另外的实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物具有1,3-BDO通路,其中所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,所述酶或蛋白质将底物转化为选自如下的产物:乙酰乙酰基-CoA到3-氧代丁醛、3-氧代丁醛到4-羟基-2-丁酮以及4-羟基-2-丁酮到1,3-BDO。

[0079] 在另外的实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物具有1,3-BDO通路,其中所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,所述酶或蛋白质将底物转化为选自如下的产物:乙酰乙酰基-CoA到3-氧代丁醛、3-氧代丁醛到3-羟基丁醛以及3-羟基丁醛到1,3-BDO。

[0080] 在另外的实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物具有1,3-BDO通路,其中所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,所述酶或蛋白质将底物转化为选自如下的产物:乙酰乙酰基-CoA到3-羟基丁酰-CoA、3-羟基丁酰-CoA到3-羟基丁醛以及3-羟基丁醛到1,3-BDO。

[0081] 在另外的实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物具有1,3-BDO通路,其中所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,所述酶或蛋白质将底物转化为选自如下的产物:乙酰乙酰基-CoA到3-羟基丁酰-CoA以及3-羟基丁酰-CoA到1,3-BDO。

[0082] 因此,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,其中所述酶或蛋白质转化底物和将乙酰乙酰基-CoA转化为1,3-BDO的1,3-BDO通路的产物,由如图2所示的通路示范。

[0083] 在另外的实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物具有1,3-BDO通路,其中所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,所述酶或蛋白质将底物转化为选自如下的产物:4-羟基丁酰-CoA到巴豆酰-CoA、巴豆酰-CoA到3-羟基丁酰-CoA、3-羟基丁酰-CoA到3-羟基丁醛以及3-羟基丁醛到1,3-BDO。

[0084] 在另外的实施方式中,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物具有1,3-BDO通路,其中所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,所述酶或蛋白质将底物转化为选自如下的产物:4-羟基丁酰-CoA到巴豆酰-CoA、巴豆酰-CoA到3-羟基丁酰-CoA以及3-羟基丁酰-CoA到1,3-BDO。

[0085] 因此,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述非天然存在的微生物包含至少一种编码酶或蛋白质的外源性核酸,其中所述酶或蛋白质转化底物和将4-羟基丁酰-CoA转化为1,3-BDO的1,3-BDO通路的产物,由如图3所示的通路示范。

[0086] 成功地设计这些通路中的任何一条需要确定一组适当的具有足够的活性和特异性的酶、将其相应的基因克隆成生产宿主、优化发酵条件以及对发酵之后的产品形成进行测定。

[0087] 要设计用于生产任何前述产物的生产宿主,可以在微生物中表达一种或多种外源性DNA序列。此外,所述微生物可以使得内源性基因功能缺失。这些修饰将实现利用可再生

的原料生产1,3-BDO。

[0088] 下文,我们描述许多能够编码酶的生化特性的基因,所述酶对图1、2和3所示的步骤的每个进行催化。虽然我们描述这种用于大肠杆菌的方法,本领域的技术人员可以将这些教诲应用于基本上任何其他生物。具体而言,除了其他生物中的当被适当地克隆并表达时可以应用以催化适当转化的基因,对大肠杆菌来说是天然的基因也被列出。

[0089] 本文一般地参照代谢反应、反应物或其产物,或者具体地参照一种或多种编码酶(所述酶与所参照的代谢反应、反应物或产物有关或者催化所参照的代谢反应、反应物或产物)或者蛋白质(所述蛋白质与所参照的代谢反应、反应物或产物有关)的核酸或基因对本发明进行描述。除非本文另有明确规定,本领域的技术人员会理解对反应的参照也构成了对反应物以及所述反应的产物的参照。同样,除非本文另有明确规定,对反应物或产物的参照也是对反应的参照,以及对任何这些代谢组分的参照也是参照编码催化的酶或所参照的反应中涉及的蛋白质的基因。同样地,考虑到熟知的代谢生物化学、酶学和基因组学领域,本文对基因或编码核酸的参照也构成对相应的被编码的酶和其催化的反应或与反应有关的蛋白质以及反应物和反应的产物的参照。

[0090] 图1-3描绘的所有的转化分为表1所示的8个一般的转化类别。下文对每个类别中的多个生化特点的基因进行描述。具体而言,列出当被适当地克隆并表达时可以应用以催化图1-3中适当的转化的基因。下文进一步在表35-37中提供用于图1-3中步骤的每个的示例性基因。

[0091] 表1示出可用以将常见的普遍的中心代谢中间体转化为1,3-丁二醇的酶类型。每个标记的前三个数字对应于表示独立于底物特异性的一般转化类型的酶委员会编号的前三个数字。

[0092] 表1

[0093]

标记	功能
1.1.1.a	氧化还原酶(酮到羟基或醛到醇)
1.1.1.c	氧化还原酶(2步,酰基-CoA到醇)
1.2.1.b	氧化还原酶(酰基-CoA到醛)
1.4.1.a	氧化还原酶(脱氨基)
2.3.1.b	转酰酶
2.6.1.a	转氨酶
4.1.1.a	羧基裂解酶
4.2.1.a	水解酶
4.3.1.a	解氨酶

[0094] 图1、2和3中的众多转化属于氧化还原酶类,其将醛还原为醇。例如,图1中分别通过3-氧代丁醛还原酶(醛还原)和3-羟基丁醛还原酶催化的步骤D和P属于这一类。同样,图2中分别通过3-羟基丁醛还原酶和3-氧代丁醛还原酶(醛还原)催化的步骤C和E也是将醛官能转化为醇的氧化还原酶。

[0095] 图3中的通路涉及氧化还原酶,如步骤D中的3-羟基丁醛还原酶。

[0096] 示例性的编码催化醛到醇的转化的酶(即醇脱氢酶或当量醛还原酶)的基因包括

编码中链醇脱氢酶(C2-C14)的alrA(Tani等人,Appl.Environ.Microbiol.,66:5231-5235(2000))、来自酿酒酵母的ADH2(Atsumi等人,Nature,451:86-89(2008))、来自大肠杆菌的对长于C3的分子具有偏好的yqhD(Sulzenbacher等人,J.of Molecular Biology,342:489-502(2004))和来自丙酮丁醇梭菌的将丁醛转化为丁醇的bdh I和bdh II(Walter等人,J.of Bacteriology,174:7149-7158(1992))。yqhD基因产物利用NADPH作为辅因子催化乙醛、丙二醛、丙醛、丁醛以及丙烯醛的还原(Perez等人,J.Biol.Chem.,283:7346-7353(2008))。来自运动发酵单胞菌的adhA基因产物已被证实对许多醛具有活性,所述醛包括甲醛、乙醛、丙醛、丁醛以及丙烯醛(Kinoshita等人,Appl.Microbiol.Biotechnol,22:249-254(1985))。其他的候选醛还原酶由糖乙酸多丁醇梭菌(*C.saccharoperbutylacetonicum*)中的bdh和拜氏梭菌(*C.beijerinckii*)中的Cbei_1722、Cbei_2181和Cbei_2421编码。

[0097] 利用下文表2所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0098] 表2

[0099]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
alrA	BAB12273.1	9967138	不动杆菌菌株M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	酿酒酵母
yqhD	NP_41748401	16130909	大肠杆菌
bdh I	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌
bdh II	NP_349891.1	15896542	丙酮丁醇梭菌
adhA	YP_162971.1	56552132	运动发酵单胞菌
bdh	BAF45463.1	124221917	糖乙酸多丁醇梭菌
Cbei_1722	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

[0100] 显示3-羟基丁醛还原酶活性的酶(EC 1.1.1.61)也属于这一类别。这类酶已经表征于富养罗尔斯通氏菌(Bravo等人,J.Forensic Sci.,49:379-387(2004))、克鲁弗氏梭菌(Wolff等人,Protein Expr.Purif.,6:206-212(1995))和拟南芥(Breitkreuz等人,J.Biol.Chem.,278:41552-41556(2003))。仍然另一基因是来自热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌(Jeon等人,J.Biotechnol.,135:127-133(2008))的醇脱氢酶adhI。利用下文表3所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0101] 表3

[0102]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
4hbd	YP_726053.1	113867564	富养罗尔斯通氏菌H16
4hbd	L21902.1	146348486	克鲁弗氏梭菌DSM 555
4hbd	Q94B07	75249805	拟南芥
adhI	AAR91477.1	40795502	热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌M10EXG

[0103] 另一示例性的酶是对3-羟基异丁酸到甲基丙二酸半醛的可逆氧化进行催化的3-

羟基异丁酸脱氢酶。这种酶参与缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的降解并且已经发现于细菌、真核生物以及哺乳动物中。由来自嗜热栖热菌HB8的P84067编码的酶已经有结构表征(Lokanath等人, *J.Mol.Biol.*, 352:905-917(2005))。人3-羟基异丁酸脱氢酶的可逆性通过利用同位素标记的底物得到了证明(Manning等人, *Biochem J.*, 231:481-484(1985))。编码这种酶的其他基因包括智人(Hawes等人, *Methods Enzymol.*, 324:218-228(2000))和穴兔(Hawes等人, 同上; Chowdhury等人, *Biosci.Biotechnol Biochem.*, 60:2043-2047(1996))中的3hidh、绿脓假单胞菌和恶臭假单胞菌(Liao等人, 美国专利20050221466)中的mmsB以及恶臭假单胞菌(Aberhart等人, *J.Chem.Soc.*, 6:1404-1406(1979); Chowdhury等人, 同上; Chowdhury等人, *Biosci.Biotechnol Biochem.*, 67:438-441(2003))中的dhat。利用下文表4所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0104] 表4

[0105]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
P84067	P84067	75345323	嗜热栖热菌
3hidh	P31937.2	12643395	智人
3hidh	P32185.1	416872	穴兔
mmsB	P28811.1	127211	绿脓假单胞菌
mmsB	NP_746775.1	26991350	恶臭假单胞菌
dhat	Q59477.1	2842618	恶臭假单胞菌

[0106] 氧化还原酶将酮功能性转换为相应的羟基也是所披露的通路中的合成步骤。显而易见,图1中分别由AKP脱氢酶、3-氧代丁醛还原酶(酮还原)、4-羟基-2-丁酮还原酶催化的反应L、O和H是这一类别的转化。所述后两个转化在图2中还分别发生在步骤B和F。类似的路线上,在图2的步骤G中,乙酰乙酰基-CoA还原酶将乙酰乙酰基-CoA还原成3-羟基丁酰-CoA。

[0107] 通过脱氢酶还原2-氨基-4-氧代戊酸(AKP)的4-氧代基团获得2-氨基-4-羟基戊酸(图1,步骤L)。这个反应非常类似于由高丝氨酸脱氢酶(EC 1.1.13)催化的从天冬氨酸半醛到高丝氨酸的NAD(P)H-依赖的还原。在许多生物体(包括大肠杆菌)中,高丝氨酸脱氢酶是一种双官能酶,其还催化天冬氨酸到天冬氨酸基-4-磷酸的ATP-依赖的转化(Starnes等人, *Biochemistry*, 11:677-687(1973))。功能域是独立催化的并通过连接区域连接(Sibilli等人, *J.Biol.Chem.*, 256:10228-10230(1981))并且两个域都受到苏氨酸的变构抑制。由thrA编码的大肠杆菌酶的高丝氨酸脱氢酶域与天冬氨酸激酶域分离、表征并发现显示高催化活性和由苏氨酸导致的降低的抑制性(James等人, *Biochemistry*, 41:3720-3725(2002))。这可以应用到其他双官能的苏氨酸激酶,包括例如,植物乳杆菌(Cahyanto等人, *Microbiology*, 152:205-112(2006))和拟南芥的hom1。由酿酒酵母中的hom6(Jacques等人, *Biochem.Biophys.Acta*, 1544:28-41(2001))和植物乳杆菌的hom2(Cahyanto等人, 同上)编码的单官能高丝氨酸脱氢酶已经在大肠杆菌中有功能表达和表征。利用下文表5所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0108] 表5

[0109]

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

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

[0110] 对乙酰乙酰基-CoA到3-羟基丁酰-CoA还原进行催化的乙酰乙酰基-CoA还原酶(图2步骤G)参与多个种类的梭状芽孢杆菌中乙酰-CoA发酵到丁酸的通路并已被详细研究(Jones等人, *Microbiol. Rev.*, 50:484-524(1986))。由hbd编码的来自丙酮丁醇梭菌的酶已被克隆并在大肠杆菌中有功能表达(Youngleson等人, *J. Bacteriol.*, 171:6800-6807(1989))。此外,由fadB和fadJ编码的大肠杆菌中的两种脂肪酸氧化复合物的亚基作为3-羟基乙酰基-CoA脱氢酶起作用(Binstock等人, *Methods Enzymol*, 71C:403-411(1981))。仍然其他的被证明将乙酰乙酰基-CoA还原为3-羟基丁酰-CoA的基因是来自生枝动胶菌的phbB(Ploux等人, *Eur. J. Biochem.*, 174:177-182(1988))和来自类球红细菌的phaB(Alber等人, *Mol. Microbiol.*, 61:297-309(2006))。前一种基因是NADPH-依赖的,其核苷酸序列已被确定(Peoples等人, *Mol. Microbiol.* 3:349-357(1989))且该基因已在大肠杆菌中有表达。对该基因的底物特异性研究得出的结论为除了乙酰乙酰基-CoA,其可以接受3-氧代丙酰基-CoA作为底物(Ploux等人, 同上)。其他的基因包括克鲁弗氏梭菌中的Hbd1(C-端结构域)和Hbd2(N-端结构域)(Hillmer和Gottschalk, *Biochim. Biophys. Acta* 3334:12-23(1974))以及牛(*Bos taurus*)中的HSD17B10(Wakil等人, *J. Biol. Chem.*, 207:631-638(1954))。利用下文表6所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0111] 表6

[0112]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
fadB	P21177.2	119811	大肠杆菌
fadJ	P77399.1	3334437	大肠杆菌
Hbd2	EDK34807.1	146348271	克鲁弗氏梭菌
Hbd1	EDK32512.1	146345976	克鲁弗氏梭菌
hbd	P52041.2		丙酮丁醇梭菌
HSD17B10	002691.3	3183024	牛
phbB	P23238.1	130017	生枝动胶菌
phaB	YP_353825.1	77464321	类球红细菌

[0113] 许多相似的酶已经发现于其他种类的梭状芽孢杆菌以及勤奋生金球菌中(Berg等人, *Archaea. Science*, 318:1782-1786(2007)),如表7中所示。

[0114] 表7

[0115]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
Hbd	NP_349314.1	NP_349314.1	丙酮丁醇梭菌
Hbd	AAM14586.1	AAM14586.1	拜氏梭菌
Msed_1423	YP_001191505	YP_001191505	勤奋生金球菌

Msed_0399	YP_001190500	YP_001190500	勤奋生金球菌
Msed_0389	YP_001190490	YP_001190490	勤奋生金球菌
Msed_1993	YP_001192057	YP_001192057	勤奋生金球菌

[0116] 将酮转化为羟基的示例性的醇脱氢酶是显示在拜氏梭菌(Ismaiel等人, J.Bacteriol, 175:5097-5105(1993))和布氏热厌氧杆菌(Lamed等人, Biochem. J., 195:183-190(1981))中将丙酮转化为异丙醇的仲醇脱氢酶。来自激烈热球菌的对2-戊醇和丙酮醛显示最大活性的adhA基因产物显示有非常广泛的特异性,其包括异丙醇和丙酮(Van der等人, Eur. J. Biochem., 268:3062-3068(2001))。对异丙醇和丙酮具有活性的还有另一仲醇脱氢酶由来自赤红球菌的adh-A基因产物编码(Edegger等人, Chem. Commun. (Camb), 2402-2404(2006); Kosjek等人, Biotechnol. Bioeng., 86:55-62(2004))。这些基因连同其他基因被列入表8如下。

[0117] 表8

[0118]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
adh	AAA23199.2	60592974	拜氏梭菌NRRL B593
adh	P14941.1	113443	布氏热厌氧杆菌HTD4
adhA	AAC25556	3288810	激烈热球菌
adh-A	CAD36475	21615553	赤红球菌

[0119] 替代地,存在多种示例性的将酮转化为羟基官能团的醇脱氢酶。来自大肠杆菌的两种这类的酶由苹果酸脱氢酶(mdh)和乳酸脱氢酶(ldhA)编码。此外,已显示,来自富养罗尔斯通氏菌的乳酸脱氢酶对不同链长的底物(如乳酸、2-氧代丁酸、2-氧代戊酸和2-氧代戊二酸)显示高活性(Steinbuechel等人, Eur. J. Biochem., 130:329-334(1983))。氧代功能性到羟基的转换也可以由2-乙酮醇, 3-丁二醇还原酶催化,所述酶是一种据报道发现于大鼠和紫河车的酶(Suda等人, Arch. Biochem. Biophys., 176:610-620(1976); Suda等人, Biochem. Biophys. Res. Commun., 77:586-591(1977))。所有这些酶可以提供3-氧代丁醛还原酶以及4-羟基-2-丁酮还原酶。用于这些步骤的其他的酶是来自人心脏的已被克隆和表征的线粒体3-羟丁酸脱氢酶(bdh)(Marks等人, J. Biol. Chem. 267:15459-15463(1992))。这种酶是对3-羟基酸起作用的脱氢酶。利用下文表9所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0120] 表9

[0121]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
mdh	AAC76268.1	1789632	大肠杆菌
ldhA	NP_415898.1	16129341	大肠杆菌
ldh	YP_725182.1	113866693	富养罗尔斯通氏菌
bdh	AAA58352.1	177198	智人

[0122] 许多生物可以对4-羟基-2-丁酮到1,3-丁二醇的还原进行催化,其中包括那些属于芽孢杆菌属、短杆菌属、念珠菌属以及克雷伯氏菌属的生物,如Matsuyama等人所描述(1995)。

[0123] 图2和3中的若干转化依靠酰基-CoA到相应的醇的两步还原。例如,图2中的步骤D和I(涉及乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醇形成)和3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成))以及图3中的步骤E(涉及3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成))示出这类转化。

[0124] 示例性的将酰基-CoA转化为醇的两步氧化还原酶包括那些转化底物,如乙酰-CoA到乙醇的两步氧化还原酶(如来自大肠杆菌的adhE(Kessler等人, FEBS.Lett.,281:59-63(1991)) and 丁酰-CoA到丁醇的两步氧化还原酶(如来自丙酮丁醇梭菌的adhE2(Fontaine等人, J.Bacteriol.,184:821-830(2002))。除了将乙酰-CoA还原为乙醇,由肠膜明串珠菌内的adhE编码的酶已被显示将支链化合物异丁醛氧化为异丁酰-CoA(Kazahaya等人, J.Gen.Appl.Microbiol.,18:43-55(1972);Koo等人, Biotechnol.Lett.,27:505-510(2005))。利用下文表10所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0125] 表10

[0126]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
adhE	NP_415757.1	16129202	大肠杆菌
adhE2	AAK09379.1	12958626	丙酮丁醇梭菌
adhE	AAV66076.1	55818563	肠膜明串珠菌

[0127] 另一示例性的酶可以将丙二酰基-CoA转化为3-HP。一种具有这种活性的NADPH-依赖的酶表征在橙色绿屈挠菌中,其中其参与3-羟基丙酸循环(Hugler等人, J.Bacteriol.,184:2404-2410(2002);Strauss等人, Eur.J.Biochem.,215:633-643(1993))。这种酶(具有300kDa的量)具有高底物特异性并显示与其他已知的氧化还原酶几乎没有序列相似性(Hugler等人,同上)。在其他生物中没有显示为催化这一特异性反应的酶;然而存在其他生物可以具有相似通路的生物信息证据(Klatt等人, Environ.Microbiol.,9:2067-2078(2007))。可以通过序列相似性推断在其他生物(包括Roseiflexus castenholzii、赤细菌NAP1和海洋 γ -变形细菌HTCC2080)中的酶。

[0128] 表11

[0129]

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

[0130] 较长链的酰基-CoA分子可以通过酶被还原,如编码醇-形成脂肪酰基-CoA还原酶的荷荷巴(加州希蒙得木)FAR。其在大肠杆菌中的过表达导致FAR活性和脂肪醇的堆积(Metz等人, Plant Physiology,122:635-644(2000))(FAR, AAD38039.1,5020215,加州希蒙得木)。

[0131] 本文披露的所述通路涉及很多将酰基-CoA转化为醛的氧化还原酶型转化。具体而言,图2中由乙酰乙酰基-CoA还原酶(醛形成)和3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成)催化的步骤A和H以及来自图3的显示由3-羟基丁酰-CoA还原酶催化的转化的步骤C。

[0132] 若干酰基-CoA脱氢酶能够将酰基-CoA还原为其相应的醛。示例性的编码这类酶的基因包括编码脂肪酰基-CoA还原酶的乙酸钙不动杆菌*acr1*(Reiser等人, *J. of Bacteriology*, 179:2969-2975(1997))、编码脂肪酰基-CoA还原酶的嗜精不动杆菌M-1(Ishige等人, *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:1192-1195(2002))和克鲁弗氏梭菌中编码CoA-和NADP-依赖的琥珀酸半醛脱氢酶的*sucD*基因(Sohling等人, *J. Bacteriol.*, 178:871-880(1996))。牙龈卟啉单胞菌的*sucD*是另一种琥珀酸半醛脱氢酶(Takahashi等人, *J. Bacteriol.*, 182:4704-4710(2000))。多刺假单胞菌中由*bphG*编码的酶酰化型乙醛脱氢酶仍然是另一种被证明对乙醛、丙醛、丁醛、异丁醛和甲醛氧化和酰化的酶(Powlowski等人, *J. Bacteriol.*, 175:377-385(1993))。除了将乙酰-CoA还原为乙醇,由肠膜明串珠菌内的*adhE*编码的酶已被显示将支链化合物异丁醛氧化为异丁酰-CoA(Kazahaya等人, 同上; Koo等人, 同上)。丁醛脱氢酶催化生溶剂性生物(solventogenic organism)(如糖乙酸多丁醇梭菌)内的相似的反应,丁酰-CoA到丁醛的转化(Kosaka等人, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 71:58-61(2007))。其他的候选醛脱氢酶发现于食烯炔脱硫菌(*Desulfatibacillum alkenivorans*)、克氏柠檬酸杆菌、肠沙门氏菌、短乳杆菌和*Bacillus selenitireducens*。利用下文表12所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0133] 表12

[0134]

蛋白质	Genbank ID 号	GI 号	生物
<i>acr1</i>	YP_047869.1	50086359	乙酸钙不动杆菌
<i>acr1</i>	AAC45217	1684886	贝氏不动杆菌
<i>acr1</i>	BAB85476.1	18857901	嗜精不动杆菌菌株 M-1
<i>sucD</i>	P38947.1	172046062	克鲁弗氏梭菌
<i>sucD</i>	NP_904963.1	34540484	牙龈卟啉单胞菌
<i>bphG</i>	BAA03892.1	425213	多刺假单胞菌
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	肠膜明串珠菌
<i>bld</i>	AAP42563.1	31075383	糖乙酸多丁醇梭菌
<i>ald</i>	ACL06658.1	218764192	食烯炔脱硫菌 AK-01
<i>ald</i>	YP_001452373	157145054	克氏柠檬酸杆菌 ATCC BAA-895
<i>pduP</i>	NP_460996.1	16765381	鼠伤寒肠沙门氏菌
<i>pduP</i>	ABJ64680.1	116099531	短乳杆菌 ATCC 367
BselDRAFT_1651	ZP_0169447	163762382	<i>Bacillus selenitireducens</i> MLS10

[0135] 其他的将酰基-CoA转化为其相应的醛的酶型是将丙二酰基-CoA转化为丙二酸半醛的丙二酰基-CoA还原酶。丙二酰基-CoA还原酶是在嗜热酸古生细菌中通过3-羟基丙酸循环的自养碳固定中的关键酶(Berg等人, 同上; Thauer, R. K., *Science*, 318:1732-1733(2007))。所述酶利用NADPH作为辅因子并已经表征在生金球菌和硫化叶菌菌种中(Alber等人, *J. Bacteriol.*, 188:8551-8559(2006); Hugler等人, 同上)。所述酶由勤奋生金球菌内的

Msed_0709编码(Alber等人,同上;Berg等人,同上)。来自硫化叶菌tokodaii的编码丙二酰基-CoA还原酶的基因被克隆并异源表达在大肠杆菌(Alber等人,同上)。已显示,这种酶也对甲基丙二酰基-CoA到其相应的醛的转化进行催化(2007)。虽然这些酶的醛脱氢酶功能性与来自橙色绿屈挠菌的双官能的脱氢酶相似,但是几乎没有序列相似性。两种丙二酰基-CoA还原酶具有相对于天冬氨酸半醛脱氢酶(一种催化天冬氨酸半醛-4-磷酸到天冬氨酸半醛的还原和同时发生的脱磷酸作用)的高度序列相似性。其他的基因可以通过蛋白质序列同源性发现于其他的生物,包括硫磺矿硫化叶菌和嗜酸热硫化叶菌并被列于下文。还有另一种针对CoA-酰化醛脱氢酶的酶是来自拜氏梭菌的ald基因(Toth等人,Appl.Environ.Microbiol.,65:4973-4980(1999))。已有报告称,这种酶将乙酰-CoA和丁酰-CoA还原为其相应的醛。这种基因与编码鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌的乙醛脱氢酶eutE非常相似(Toth等人,同上)。利用下文表13所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0136] 表13

[0137]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
MSED_0909	YP_001190808.1	146303492	勤奋生金球菌
mcr	NP_378167.1	15922498	硫化叶菌tokodaii
asd-2	NP_343563.1	15898958	硫磺矿硫化叶菌
Saci_2370	YP_256941.1	70608071	嗜酸热硫化叶菌
Ald	AAT66436	9473535	拜氏梭菌
eutE	AAA80209	687645	鼠伤寒沙门氏菌
eutE	P77445	2498347	大肠杆菌

[0138] 氨基到其相应的桥氧基的氧化脱氨作用通过EC等级1.4.1的脱氨氧化还原酶进行催化。这种酶利用NAD⁺、NADP⁺或FAD⁺作为接受体。这个等级的酶可进行一下转化:2-氨基-4-氧代戊酸到2,4-二氧代戊酸(图1,步骤B)、2-氨基-4-羟基戊酸到2-氧代-4-羟基戊酸(图1,步骤M)和4-氨基丁-2-酮到3-氧代丁醛(图1,步骤K)。示例性的对相似的底物起作用的氧化还原酶包括gdhA编码的谷氨酸脱氢酶(脱氨基)、ldh编码的亮氨酸脱氢酶(脱氨基)以及nadX编码的天冬氨酸脱氢酶(脱氨基)。来自大肠杆菌的gdhA基因产物(McPherson等人,Nucleic.Acids Res.11:5257-5266(1983);Korber等人,J.Mol.Biol.234:1270-1273(1993))、来自海栖热袍菌的gdh(Kort等人,Extremophiles 1:52-60(1997);Lebbink等人,J.Mol.Biol.280:287-296(1998);Lebbink等人,J.Mol.Biol.289:357-369(1999))和来自嗜盐杆菌的gdhA1(Ingoldsby等人,Gene.349:237-244(2005))催化谷氨酸到2-氧代戊二酸和氨的可逆的相互转化,而分别优选NADP(H)、NAD(H)或两者。其他候选的谷氨酸脱氢酶基因发现于枯草芽孢杆菌(Khan等人,Biosci.Biotechnol Biochem.69:1861-1870(2005))、烟草(Purnell等人,Planta 222:167-180(2005))、水稻(Abiko等人,Plant Cell Physiol 46:1724-1734(2005))、地中海富盐菌(Diaz等人,Extremophiles.10:105-115(2006))、嗜盐杆菌(Hayden等人,FEMS Microbiol Lett.211:37-41(2002))和酵母(Roca等人,Appl Environ.Microbiol 69:4732-4736(2003))。烟草酶由gdh1和gdh2编码的 α 和 β 亚基构成(Purnell等人,Planta 222:167-180(2005))。蜡样芽胞杆菌的ldh基因编码接受各式各样

的底物的LeuDH蛋白质,所述底物包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸以及2-氨基丁酸(Stoyan等人, *J. Biotechnol* 54:77-80(1997); Ansorge等人, *Biotechnol Bioeng.* 68:557-562(2000))。NAD的生物合成中涉及来自海栖热袍菌的针对天冬氨酸脱氢酶编码的nadX基因(Yang等人, *J. Biol. Chem.* 278:8804-8808(2003))。利用下文表14所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0139] 表14

[0140]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
gdhA	P00370	118547	大肠杆菌
gdh	P96110.4	6226595	海栖热袍菌
gdhA1	NP_279651.1	15789827	嗜盐杆菌
rocG	NP_391659.1	16080831	枯草芽孢杆菌
gdh1	AAR11534.1	38146335	烟草
gdh2	AAR11535.1	38146337	烟草
GDH	Q852M0	75243660	水稻
GDH	Q977U6	74499858	地中海富盐菌
GDH	P29051	118549	嗜盐杆菌
GDH2	NP_010066.1	6319986	酿酒酵母
ldh	P0A393	61222614	蜡样芽孢杆菌
nadX	NP_229443.1	15644391	海栖热袍菌

[0141] 需要具有4-氨基丁-2-酮氧化还原酶(脱氨基)活性的酶将4-氨基丁-2-酮转化为其相应的醛(图1,步骤K)。示例性的候选酶包括3,5-二氨基己酸脱氢酶(EC 1.4.1.11)和赖氨酸6-脱氢酶(EC 1.4.1.18)。3,5-二氨基己酸脱氢酶相互转化3-氨基酸和3-氧代酸并已被表征于发酵赖氨酸的生物内。最近,在具核梭杆菌中发现了编码3,5-二氨基己酸脱氢酶的基因kdd(Kreimeyer等人, *J Biol. Chem.* 282:7191-7197(2007))。所述酶已被纯化并表征在其他的生物内(Baker等人, *J Biol. Chem.* 247:7724-7734(1972); Baker等人, *Biochemistry* 13:292-299(1974)),但是与这些酶有关的基因未知。通过序列同源性可以推断其他序列生物内的候选酶。由lysDH基因编码的赖氨酸6-脱氢酶催化伯胺到其相应的醛的转化。这种酶自然地催化L-赖氨酸的6-氨基的可逆氧化脱氨作用,以形成2-氨基己二酸-6-半醛(Misono等人, *J Bacteriol.* 150:398-401(1982))。示例性的酶发现于嗜热脂肪土芽孢杆菌(Heydari等人, *Appl Environ. Microbiol* 70:937-942(2004))、根癌农杆菌(Hashimoto等人, *J Biochem.* 106:76-80(1989); Misono和Nagasaki, *J Bacteriol.* 150:398-401(1982))和反硝化无色杆菌(Ruldeekulthamrong等人, *BMB. Rep.* 41:790-795(2008))。利用下文表15所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0142] 表15

[0143]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
kdd	AAL93966.1	19713113	具核梭杆菌

lysDH	BAB39707	13429872	嗜热脂肪土芽孢杆菌
lysDH	NP_353966	15888285	根癌农杆菌
lysDH	AAZ94428	74026644	反硝化无色杆菌

[0144] 2-氨基-4-氧代戊酸(AKP)硫解酶或AKP硫解酶(AKPT)(图1步骤1)是一种参与斯氏梭菌中鸟氨酸降解的磷酸吡哆醛-依赖的酶(A. Biochemistry, 13:2898-2903(1974); Kenkies等人, Microbiology, 145:819-826(1999))。目前发现了编码AKPT的 α 和 β 亚基(or-2(ortA)和or-3(ortB))的基因簇并表征了所述酶的生化特性(Fonknechten等人, J. Bacteriol., In Press(2009))。所述酶能够在两个方向上起作用并与丙氨酸的D-异构体起反应。可以进行酶工程,以优化L-丙氨酸作为底物的功能。来自斯氏梭菌的AKPT已被表征,但是其蛋白质序列还未公布。具有高度序列同源性的酶发现于艰难梭菌、Alkaliphilus metalliredigenes QYF、嗜热厌氧杆菌属X514以及腾冲嗜热厌氧杆菌MB4(Fonknechten等人,同上)。利用下文表16所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0145] 表16

[0146]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
ortA(α)	YP_001086914.1	126698017	艰难梭菌630
ortB(β)	YP_001086915.1	126698018	艰难梭菌630
Amet_2368(α)	YP_001320181.1	150390132	Alkaliphilus metalliredigenes QYF
Amet_2369(β)	YP_001320182.1	150390133	Alkaliphilus metalliredigenes QYF
Teth514_1478(α)	YP_001663101.1	167040116	嗜热厌氧杆菌X514
Teth514_1479(β)	YP_001663102.1	167040117	嗜热厌氧杆菌X514
TTE1235(α)	NP_622858.1	20807687	腾冲嗜热厌氧杆菌MB4
thrC(β)	NP_622859.1	20807688	腾冲嗜热厌氧杆菌MB4

[0147] 2-氨基-4-氧代戊酸(AKP)到2,4-二氧代戊酸的转化(步骤B,图1)通过2-氨基-4-氧代戊酸转氨酶或氧化还原酶(脱氨基)完成。用于该转换的适当的酶的选择取决于底物的立体化学。例如,如果所述底物是D-构型,可以利用D-氨基酸转氨酶(EC 2.6.1.21),而L-立体异构体可以利用L-转氨酶,如天冬氨酸转氨酶(EC 2.6.1.1)。

[0148] 天冬氨酸转氨酶将氨基从天冬氨酸转移到 α -酮戊二酸,形成谷氨酸和草酰乙酸。天冬氨酸在结构上与2-氨基-4-氧代戊酸相似。该转化的催化通过,例如,来自大肠杆菌的aspC基因产物(Yagi等人,FEBS Lett., 100:81-84(1979); Yagi等人,Methods Enzymol., 133:83-89(1985))、来自酿酒酵母的AAT2(Yagi等人,J. Biochem., 92:35-43(1982))和来自拟南芥的ASP5(Kwok等人,J. Exp. Bot., 55:595-604(2004); De la等人,Plant J., 46:414-425(2006); Wilkie等人,Protein Expr. Purif., 12:381-389(1998))。已显示,来自褐鼠的酶诱导替代性底物(如2-氨基己二酸和2,4-二氨基丁酸)转氨(Recasens等人, Biochemistry, 19:4583-4589(1980))。对其他类氨基酸底物起作用的转氨酶还可以催化该转化。缬氨酸转氨酶催化缬氨酸和丙酮酸到2-酮异戊酸和丙氨酸的转化。大肠杆菌基因avtA编码一种这样的酶(Whalen等人,J. Bacteriol., 150:739-746(1982))。该基因产物还催化 α -酮丁酸的氨基化,以生成 α -氨基丁酸,虽然该反应中的胺供体还未确定(Whalen等

人, *J. Bacteriol.*, 158:571-574(1984))。另一候选酶是 α -氨基己二酸转氨酶(EC 2.6.1.39), 一种参与一些生物中赖氨酸生物合成和降解的酶。来自嗜热栖热菌的由lysN编码的酶由若干替代性底物(包括草酰乙酸、2-氧代异己酸、2-氧代异戊酸以及2-氧代-3-甲基戊酸)激活(Miyazaki等人, *Microbiol.* 150:2327-2334(2004))。来自智人的相似的酶已被表征(Okuno等人, *Enz. Prot.* 47:136-148(1993))。利用下文表17所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0149] 表17

[0150]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
aspC	NP_415448.1	16128895	大肠杆菌
AAT2	P23542.3	1703040	酿酒酵母
ASP5	P46248.2	20532373	拟南芥
got2	P00507	112987	褐鼠
avtA	YP_026231.1	49176374	大肠杆菌
lysN	BAC76939.1	31096548	嗜热栖热菌
AadAT-II	Q8N5Z0.2	46395904	智人

[0151] 当底物作为D-立体异构体存在时, 转氨基化可以通过D-转氨酶(EC2.6.1.21)(也就是通常所说的D-氨基酸转氨酶和D-丙氨酸转氨酶(DAAT))催化。这个类别的酶以其广泛的底物特异性(其是物种-特异性)著称。来自芽孢杆菌属YM-1的由dat编码的D-转氨酶已被克隆、测序(Tanizawa等人, *J. Biol. Chem.*, 264:2450-2454(1989))以及晶体结构已得到解析(Peisach等人, *Biochemistry*, 37:4958-4967(1998))。这种酶也已然是蛋白质工程研究的主题, 以改变底物特异性(Gutierrez等人, *Eur. J. Biochem*, 267:7218-7223(2000); Gutierrez等人, *Protein Eng.*, 11:53-58(1998))。其他的基因发现于地衣芽孢杆菌ATCC 10716(Taylor等人, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1350:38-40(1997))、溶血葡萄球菌(Pucci等人, *J. Bacteriol.*, 177:336-342 (1995))和枯草芽孢杆菌(Martinez-Carrion等人, *J. Biol. Chem.*, 240:3538-3546(1965))。利用下文表18所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0152] 表18

[0153]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
dat	P19938	118222	芽孢杆菌YM-1
dat	P54692	1706292	地衣芽孢杆菌ATCC 10716
dat	P54694	1706294	溶血葡萄球菌
dat	007597.1	3121979	枯草芽孢杆菌

[0154] 在图1的反应K中, 4-氨基丁-2-酮被转氨基化, 以形成3-氧代丁醛。这种转换可能会由将末端胺和醛相互转化的转氨酶催化。示例性的候选酶是 β -丙氨酸/ α -酮戊二酸转氨酶、GABA转氨酶、3-氨基-2-甲基丙酸转氨酶、赖氨酸-6-转氨酶、2,4-二氨基丁酸转氨酶、腐胺转氨酶和二胺转氨酶。

[0155] Cargill已经开发了一种用于通过丙二酰基-半醛从 β -丙氨酸生产3-HP的 β -丙氨

酸/ α -酮戊二酸转氨酶并取得了其专利权(Chandra等人, ARch. Microbiol., 176:443-451 (2001))。克鲁弗氏酵母中的SkPYD4基因产物也显示优选地利用 β -丙氨酸作为氨基供体(Aberhart等人, J. Chem. Soc. 6:1404-1406(1979))。SkUGA1编码酿酒酵母GABA转氨酶的同系物UGA1(Ichikawa等人, J. Mol. Catalysis A-Chem., 256:106-112(2006)), 而SkPYD4编码 β -丙氨酸和GABA转氨基化中涉及的酶(Aberthart等人, 同上)。3-氨基-2-甲基丙酸转氨酶催化从甲基丙二酸半醛到3-氨基-2-甲基丙酸的转换。该酶已表征于褐鼠和野猪中并由Abat编码(Chopra等人, Protein Expr. Purif., 25:533-540(2002), Kuznetsova等人, FEMS Microbiol. Rev., 29:263-279(2005))。在其他生物内的具有相对于3-氨基-2-甲基丙酸转氨酶的高度序列同源性的候选酶包括线虫中的Gta-1和枯草杆菌中的gabT。此外, 在大肠杆菌中由基因gabT编码的天然GABA转氨酶的一种已显示具有广泛的底物特异性(Fontaine等人, J. Bacteriol., 184:821-830(2002), Kanamasa等人, Appl. Microbiol Biotechnol., 80:223-229(2008))。基因puuE编码大肠杆菌中另一种4-氨基丁酸转氨酶(Drummond等人, J. Biol. Chem., 235:318-325(1960))。

[0156] 赖氨酸-6-转氨酶将赖氨酸转化为 α -氨基己二酸半醛。候选酶已表征于产朊假丝酵母中(Hammer等人, J Basic Microbiol 32:21-27(1992))、泥色黄杆菌(Fujii等人, J Biochem. 128:391-397(2000))和带小棒链霉菌(Romero等人, J Ind. Microbiol Biotechnol 18:241-246(1997))。来自带小棒链霉菌的重组赖氨酸-6-转氨酶在大肠杆菌有功能表达(Tobin等人, J Bacteriol. 173:6223-6229(1991))。泥色黄杆菌酶对作为氨基接受体的 α -酮戊二酸具有特异性(Soda等人, Biochemistry 7:4110-4119(1968))。具有二氨基丁酸转氨酶活性的酶由鲍氏不动杆菌中的dat基因产物编码(Ikai等人, J Bacteriol. 179:5118-5125(1997))。除了其自然底物2,4-二氨基丁酸, DAT将赖氨酸、4-氨基丁酸和鸟氨酸的末端胺转氨基化。候选的腐胺转氨酶由大肠杆菌中的ygiG和绿脓假单胞菌的spuC编码(Lu等人, J Bacteriol. 184:3765-3773(2002))。ygiG基因产物与替代性的底物尸胺、亚精胺和1,7-二氨基庚酸起反应(Samsonova等人, BMC. Microbiol 3:2(2003); Kim, J Biol. Chem. 239:783-786(1964))。

[0157] 利用下文表19所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0158] 表19

[0159]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
SkyPYD4	ABF58893.1	98626772	克鲁弗氏酵母
SkUGA1	ABF58894.1	98626792	克鲁弗氏酵母
UGA1	NP_011533.1	6321456	酿酒酵母
Abat	P50554.3	122065191	褐鼠
Abat	P80147.2	120968	野猪
Gta-1	Q21217.1	6016091	线虫
gabT	P94427.1	6016090	枯草杆菌
gabT	P22256.1	16130576	大肠杆菌K12
puuE	NP_415818.1	16129263	大肠杆菌K12

lat	BAB13756.1	10336502	泥色黄杆菌
lat	AAA26777.1	153343	带小棒链霉菌
dat	P56744.1	6685373	鲍氏不动杆菌
ygjG	NP_417544	145698310	大肠杆菌
spuC	AAG03688	9946143	绿脓假单胞菌

[0160] 图1步骤C中,2,4-二氧代戊酸通过2,4-二氧代戊酸脱羧酶脱羧基化,以形成3-氧代丁醛。2,4-二氧代戊酸与丙酮酸脱羧酶(EC 4.1.1.1)和苯甲酰甲酸脱羧酶(EC 4.1.1.7)的天然底物相似。丙酮酸脱羧酶(PDC)(又称为酮酸脱羧酶)是在生醇发酵中对丙酮酸到醛的脱羧基化进行催化的关键酶。来自酿酒酵母的酶具有针对脂肪族2-酮酸(包括2-酮丁酸、2-酮戊酸、3-羟基丙酮酸和2-苯基丙酮酸)的广泛的底物范围(Li等人,Biochemistry,38:10004-10012(1999))。已针对改变活性对这种酶进行了广泛的研究、设计并在大肠杆菌中进行功能表达(Killenberg-Jabs等人,Eur.J.Biochem.,268:1698-1704(2001);Li等人,同上;Schure等人,Appl.Environ.Microbiol.,64:1303-1307(1998))。来自运动发酵单胞菌的由pdc编码的PDC也具有广泛的底物范围且已然是定向工程研究的主题,以改变针对不同的底物的亲和性(Siegert等人.,ProteinEng.Des.Sel.,18:345-357(2005))。这种酶的晶体结构是可得的(Killenberg-Jabs,同上)。其他很好地表征的PDC酶包括来自巴斯德氏醋杆菌(Chandra等人,Arch.Microbiol.176:443-451(2001))和乳酸克鲁维酵母(Krieger等人,Eur.J.Biochem.,269:3256-3263(2002))的酶。利用下文表20所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0161] 表20

[0162]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
pdc	P06672.1	118391	运动发酵单胞菌
pdc1	P06169	30923172	酿酒酵母
pdc	Q8L388	20385191	巴斯德氏醋杆菌
pdc1	Q12629	52788279	乳酸克鲁维斯酵母

[0163] 与PDC类似,苯甲酰甲酸脱羧酶(EC 4.1.1.7)具有广泛的底物范围并已然是酶工程研究的目标。已经对来自恶臭假单胞菌的酶进行广泛研究并得到这种酶的晶体结构(Polovnikova等人,Biochemistry 42:1820-1830(2003);Hasson等人,Biochemistry,37:9918-9930(1998))。该恶臭假单胞菌酶的活性位点中两种残基的定点诱变改变了天然和非天然存在的底物的亲和性(Km)(Siegert等人,同上)。已经通过定向工程对这种酶的特性进行进一步修改(Lingen等人,Chembiochem,4:721-726(2003);Lingen等人.,Protein Eng.,15:585-593(2002))。也已经对来自绿脓假单胞菌由md1C编码的酶进行试验性的表征(Barrowman等人,FEMS Microbiology Letters,34:57-60(1986))。可以通过序列同源性推断或利用恶臭假单胞菌中培养的生长选择系统确定来自施氏假单胞菌、荧光假单胞菌和其他生物的其他基因(Henning等人,Appl.Environ.Microbiol.,72:7510-7517(2006))。利用下文表21所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0164] 表21

[0165]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
mdlC	P20906.2	3915757	恶臭假单胞菌
mdlC	Q9HUR2.1	81539678	绿脓假单胞菌
dpgB	ABN80423.1	126202187	施氏假单胞菌
ilvB-1	YP_260581.1	70730840	萤光假单胞菌

[0166] 能够对2-氧代酸脱羧基化的第三种酶是 α -酮戊二酸脱羧酶(KGD)。迄今还未对这种类别的酶的底物范围进行研究。Genomatica已经克隆来自结核分枝杆菌的KDC(Tian等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 102:10670-10675(2005))并已在大肠杆菌中对其进行功能表达。已经在若干种类的根瘤菌(包括大豆慢生根瘤菌和百脉根中慢生根瘤菌)中检测到KDC酶活性(Green等人, J. Bacteriol., 182:2838-2844(2000))。虽然这些生物中KDC编码基因还未分离, 基因组序列却是可得的以及每个基因组中若干基因被注释为假定KDC。也已经对来自纤细眼虫的KDC进行表征, 但是迄今还未确定与这种活性有关的基因(Shigeoka等人, Arch. Biochem. Biophys., 288:22-28(1991))。对自N末端开始的前二十个氨基酸测序为MTYKAPVKDVKFLLDKVFKV(Shigeoka等人, 同上)。可以通过对包含这种N末端序列的基因进行KDC活性测序确定所述基因。利用下文表22所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0167] 表22

[0168]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
kgd	050463.4	160395583	结核分枝杆菌
kgd	NP_767092.1	27375563	大豆慢生根瘤菌USDA110
kgd	NP_105204.1	13473636	百脉根中慢生根瘤菌

[0169] 用于催化这一步骤的第四种酶是支链 α -酮酸脱羧酶(BCKA)。这种类别的酶已显示对链长从3到6个碳不等的各种化合物起作用(Oku等人, J. Biol. Chem., 263:18386-18396(1988); Smit等人, Appl. Environ. Microbiol., 71:303-311(2005))。已经将乳酸乳球菌中的酶表征于各种支链和直链底物(包括2-氧代丁酸、2-氧代己酸、2-氧代戊酸、3-甲基-2-氧代丁酸、4-甲基-2-氧代丁酸和异己酸)(Smit等人, 同上)。已经对该酶进行结构表征(Berthold等人, D. Biol. Crystallogr., 63:1217-1224(2007))。乳酸乳球菌酶和运动发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶之间的序列比对表明催化残基和底物识别残基几乎是完全相同的(Siegert等人, 同上), 所以这种酶非常适合定向工程。通过相对于乳酸乳球菌蛋白质序列(kdcA, AAS49166.1, 44921617, 乳酸乳球菌)的同源性可以确定其他的BCKA基因。这种酶的许多高分BLASTp配对(BLASTp hits)被注释为吡嗪丙酮酸脱羧酶(EC 4.1.1.74)。吡嗪丙酮酸脱羧酶(IPDA)是一种催化植物和植物细菌内的吡嗪丙酮酸到吡嗪醛的脱羧基化的酶。

[0170] 在图1的步骤E中, 2-氨基-4-酮戊酸酯通过AKP脱羧酶脱羧基化, 以形成4-氨基丁-2-酮。这种转换可以通过氨基酸脱羧酶进行催化。适当的脱羧酶的选择取决于4-氨基-4-氧代戊酸的立体化学构型。当这种化合物是D-构型时, 可以利用D-氨基酸脱羧酶。一种这样的D-氨基酸脱羧酶是二氨基庚二酸脱羧酶(DDC, EC 4.1.1.20)。这种酶脱羧基化内消旋-二氨基庚二酸的D-立构中心, 催化赖氨酸生物合成的最后步骤。已经对许多生物(包括大肠杆菌

(Momany等人, *D. Biol. Crystallogr.*, 58:549-552(2002))、结核分枝杆菌(Kefala等人, *Acta. Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.*, 61:782-784(2005); Gokulan等人, *J. Biol. Chem.*, 278:18588-18596(2003); Andersen等人, *Gene*, 124:105-109(1993))、食甲基嗜甲基菌(Tsujimoto等人, *J. Biotechnol.*, 124:327-337(2006))和幽门螺杆菌(Hu等人, *J. Biol. Chem.*, 283:21284-21293(2008))中的DDC做过研究。替代地来自智人的鸟氨酸脱羧酶(EC 4.1.1.17)对D-异构体的鸟氨酸具有低活性(Qu等人, *Biochem. J.*, 375:465-470(2003); Fitzgerald等人, *DNA*, 8:623-634(1989))以及可以用于步骤E中的脱羧基化。利用下文表23所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0171] 表23

[0172]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
lysA	NP_417315.1	16130742	大肠杆菌
lysA	AAA25361.1	149964	结核分枝杆菌
lysA	BAC92756.1	37196770	食甲基嗜甲基菌
lysA	ABW70801.1	158523325	幽门螺杆菌
odc1	AA59969.1	386989	智人

[0173] 当2-氨基-4-酮戊酸显示L-立体化学时,可以利用氨基酸脱羧酶,如天冬氨酸脱羧酶(EC 4.1.1.11)、鸟氨酸脱羧酶(EC 4.1.1.17)或赖氨酸脱羧酶(EC4.1.1.18)。一种示例性的酶是天冬氨酸脱羧酶(EC 4.1.1.11)。2-氨基-4-酮戊酸与天冬氨酸(这种酶的天然底物)具有结构相似性。天冬氨酸脱羧酶参与泛酸生物合成并由大肠杆菌中的panD编码(Dusch等人, *Appl. Environ. Microbiol.*, 65:1530-1539(1999); Ramjee等人, *Biochem. J.*, 323:661-669(1997); Merkel等人, *FEMS Microbiol. Lett.*, 143:247-252(1996); Schmitzberger等人, *EMBO J.*, 22:6193-6204(2003))。来自结核分枝杆菌(Chopra等人, *Protein Expr. Purif.*, 25:533-540(2002))和谷氨酸棒杆菌(Dusch等人, 同上)的酶已被表达并表征于大肠杆菌。赖氨酸脱羧酶在大肠杆菌基因组中由基因cadA和ldcC编码。最近在副溶血性弧菌中发现了类似于CadA的赖氨酸脱羧酶(Tanaka等人, *J. Appl. Microbiol.* 104:1283-1293(2008))。来自反刍动物月形单胞菌由ldc编码的赖氨酸脱羧酶具有相对于真核生物的鸟氨酸脱羧酶的序列相似性并接受L-赖氨酸和L-鸟氨酸两者作为底物(Takatsuka等人, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 63:1843-1846(1999))。鸟氨酸脱羧酶候选酶发现于粘毛烟草(Lee等人, *Biochem. J.* 360:657-665(2001))、乳杆菌属30a(Guirard等人, *J Biol. Chem.* 255:5960-5964(1980))和创伤弧菌(Lee等人, *J Biol. Chem.* 282:27115-27125(2007))。已经对创伤弧菌底物特异性中涉及的残基进行阐明(Lee等人, 同上)。

[0174] 利用下文表24所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0175] 表24

[0176]

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

panD	P0A790	67470411	大肠杆菌
panD	Q9X4N0	18203593	谷氨酸棒杆菌
panD	P65660.1	54041701	结核分枝杆菌
cadA	AAA23536.	145458	大肠杆菌
ldcC	AAC73297.1	1786384	大肠杆菌
ldc	050657.1	13124043	反刍动物月形单胞菌
cadA	AB124819.1	44886078	副溶血性弧菌
AF323910.1:1..1299	AAG45222.1	12007488	粘毛烟草
odc1	P43099.2	1169251	乳杆菌属30a
VV2_1235	NP_763142.1	27367615	创伤弧菌

[0177] 在反应J(图1)中,乙酰丙烯酸通过乙酰丙烯酸脱羧酶被脱羧基化为2-氧代丁烯。催化这种转换的酶迄今还未确定,但是相似的反应通过酶乌头酸脱羧酶、4-草酰巴豆酸脱羧酶和肉桂酸脱羧酶被催化。

[0178] 乌头酸脱羧酶催化念珠菌属菌株以及丝状真菌土曲霉中衣康酸生物合成的最后步骤(Bonnarme等人,J.Bacteriol.,177:3573-3578(1995);Willke等人,Appl.Microbiol.Biotechnol.,56:289-295(2001))。已经在土曲霉和其他相关真菌中发现由ATEG_09971编码的顺式乌头酸脱羧酶(CAD)(EC 4.1.16)并对其进行了广泛研究。最近,已经对该基因进行克隆并进行了功能表征(Kanamasa等人,Appl.Microbiol.Biotechnol.,80:223-229(2008))和(WO/2009/014437)。

[0179] 已从很多生物中分离4-草酰巴豆酸脱羧酶并已对其进行表征。编码这种酶的基因包括多刺假单胞菌(菌株600)中的dmpH和dmpE(Shingler等人,J.Bacteriol.,174:711-724(1992))、来自恶臭假单胞菌的xylIII和xylIII(Kato等人,Arch.Microbiol.,168:457-463(1997);Stanley等人,Biochemistry,39:3514(2000);Lian等人,J.Am.Chem.Soc.,116:10403-10411(1994))和来自富养罗尔斯通氏菌JMP134的Reut_B5691和Reut_B5692(Hughes等人,J.Bacteriol.,158:79-83(1984))。来自多刺假单胞菌(菌株600)编码该酶的基因已被克隆并在大肠杆菌中表征(Shingler等人,同上)。利用下文表25所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0180] 表25

[0181]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
dmpH	CAA43228.1	45685	多刺假单胞菌CF600
dmpE	CAA43225.1	45682	多刺假单胞菌CF600
xylIII	YP_709328.1	111116444	恶臭假单胞菌
xvIIII	YP_709353.1	111116469	恶臭假单胞菌
Reut_B5691	YP_299880.1	73539513	富养罗尔斯通氏菌JMP134
Reut_B5692	YP_299881.1	73539514	富养罗尔斯通氏菌JMP134
ATEG_09971	EAU29420.1	114187720	土曲霉

[0182] 已表征其他等级的催化肉桂酸(苯基丙烯酸)和被取代的肉桂酸衍生物到相应的苯乙烯衍生物的转化的脱羧酶。这些酶在各种生物中是常见的以及编码这些酶的已被克隆

并表征于大肠杆菌中的特异性基因如下:来自酿酒酵母的pad 1(Clausen等人, Gene, 142: 107-112(1994))、来自植物乳杆菌的pdc(Barthelmebs等人, Appl. Environ. Microbiol., 67:1063-1069(2001); Rodriguez等人, J. Agric. Food Chem., 56:3068-3072(2008); Qi等人, Biochem. J., 375:465-470(2007))、来自产酸克雷伯氏菌(Uchiyama等人, Biosci. Biotechnol. Biochem., 72:116-123(2008); Hashidoko等人, Biosci. Biotech. Biochem., 58:217-218(1994))、戊糖片球菌(Barthelmebs等人, 同上)的pofK(pad)和来自枯草芽孢杆菌和短小芽胞杆菌的padC(Cavin等人, Appl. Environ. Microbiol., 64:1466-1471(1998))。来自萤光假单胞菌的阿魏酸脱羧酶也已被纯化并表征(Huang等人, J. Bacteriol., 176:5912-5918(1994))。重要的是, 这个等级的酶已显示具有稳定性以及不需要外源性或内结合的辅因子, 因此使得这些酶理想地合适生物转化(Sariaslani, F.S., Annu. Rev. Microbiol., 61:51-69(2007))。利用下文表26所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0183] 表26

[0184]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
pad1	AAB64980.1	1165293	酿酒酵母
pdc	AAC45282.1	1762616	植物乳杆菌
pad	BAF65031.1	149941608	产酸克雷伯氏菌
padC	NP_391320.1	16080493	枯草芽孢杆菌
pad	YP_804027.1	116492292	戊糖片球菌
pad	CAC18719.1	11691810	短小芽胞杆菌

[0185] 其他的用于脱羧基化的酶是乙酰乙酸脱羧酶(EC 4.1.1.4), 一种将乙酰乙酸脱羧基化为丙酮的酶, 该酶并因此已受到针对其在细菌生溶剂性方面的作用的研究。示例性的细菌酶已经表征自丙酮丁醇梭菌(Benner等人, J. Am. Chem. So. 103:993-994(1981); Highbarger等人, Biochemistry 35:41-46(1996); Petersen等人, Appl. Environ. Microbiol. 56:3491-3498(1990); Rozzel等人, J. Am. Chem. Soc. 106:4937-4941(1984))、糖乙酸多丁醇梭菌(Kosaka, 等人, Biosci. Biotechnol Biochem. 71:58-68(2007))和拜氏梭菌(Ravagnani等人, Mol. Microbiol. 37:1172-1185(2000))。乙酰乙酸脱羧酶活性也已经显示于恶臭假单胞菌和多粘芽胞杆菌, 但迄今基因与这种活性无关(Matiasek等人, Curr. Microbiol. 42:276-281(2001))。在其他生物(如肉毒梭状芽孢杆菌和解淀粉芽胞杆菌)中的细菌基因可以通过序列同源性确定。在人和其他哺乳动物中, 乙酰乙酸脱羧酶催化酮-体通路的最后步骤(Kalapos, Biochim. Biophys. Acta 1621:122-139(2003)), 但是迄今还未确定与这种活性有关的基因。利用下文表27所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0186] 表27

[0187]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
adc	NP_149328.1	15004868	丙酮丁醇梭菌
adc	AAP42566.1	31075386	糖乙酸多丁醇梭菌

cbei_3835	YP_001310906.1	150018652	拜氏梭菌
CLL_A2135	YP_001886324.1	187933144	肉毒梭状芽孢杆菌
RBAM_030030	YP_001422565.1	154687404	解淀粉芽孢杆菌

[0188] 所有前述的候选基因也可用以催化图1的步骤N中2-氧代-4-羟基戊酸到3-羟基丁醛的脱羧基化。

[0189] 丁烯酮水合酶(图1步骤G)、4-羟基丁酰-CoA脱水酶(图3步骤A)和巴豆酸酶(图3步骤A)是水裂解酶型转化。具体而言,丁烯酮到4-羟基-2-丁酮的水合(图1步骤G)可以通过水合酶家族中的一种酶完成。可以执行这种转化的酶包括延胡索酸水合酶(EC 4.2.1.2)、2-(羟基甲基)戊二酸脱水酶(EC 4.2.1.-)、二甲基马来酸水合酶(EC 4.2.1.85)和柠檬酸水裂解酶(EC 4.2.1.34)。

[0190] 延胡索酸水合酶自然地催化延胡索酸到苹果酸的可逆水合作用。虽然文献中并未描述延胡索酸水合酶与作为底物的丁烯酮起反应的能力,关于这种酶的大量的结构信息却是可得的,以及其他研究人员已经成功地设计该酶,以改变活性、抑制和定位(Weaver, T., B. Biol. Crystallogr., 61:1395-1401(2005))。大肠杆菌具有三种延胡索酸酶:FumA、FumB和FumC,其通过多种培育条件调节。FumB具有氧敏感性且只有在厌氧条件下具有活性,FumA在微厌氧条件下具有活性,以及FumC是唯一在有氧培育下有活性的酶(Tseng等人, J. Bacteriol., 183:461-467(2001); Woods等人, Biochem. Biophys. Acta., 954:14-26(1988); Guest等人, J. Gen. Microbiol., 131:2971-2984(1985))。其他的酶发现于空肠弯曲杆菌(Smith等人, Int. J. Biochem. Cell Biol., 31:961-975(1999))、嗜热栖热菌(Mizobata等人, Arch. Biochem. Biophys., 355:49-55(1998))和褐鼠(Kobayashi等人, J. Biochem., 89:1923-1931(1981))。具有高序列同源性的相似的酶包括来自拟南芥的fum1和来自谷氨酸棒杆菌的fumC。来自Pelotomaculum thermopropionicum的MmcBC延胡索酸酶是另一等级的具有两种亚基的延胡索酸酶(Shimoyama等人, FEMS Microbiol. Lett., 270:207-213(2007))。利用下文表28所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0191] 表28

[0192]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
fumA	NP_416129.1	16129570	大肠杆菌
fumB	NP_418546.1	16131948	大肠杆菌
fumC	NP_416128.1	16129569	大肠杆菌
fumC	069294	9789756	空肠弯曲杆菌
fumC	P84127	75427690	嗜热栖热菌
fumH	P14408	120605	褐鼠
fum1	P93033	39931311	拟南芥
fumC	Q8NRN8	39931596	谷氨酸棒杆菌
MmcB	YP_001211906	147677691	Pelotomaculum thermopropionicum
MmcC	YP_001211907	147677692	Pelotomaculum thermopropionicum

[0193] 两种其他的水合酶是2-(羟基甲基)戊二酸脱水酶和二甲基马来酸水合酶,其在巴

克氏真杆菌(之前的巴克氏梭菌)中的烟酸分解代谢中的作用受到研究的酶(Alhapel等人, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:12341-12346(2006))。2-(羟基甲基)戊二酸脱水酶是一种将2-(羟基甲基)戊二酸脱水为2-亚甲基-戊二酸的含[4Fe-4S]的酶。这种酶由巴克氏真杆菌中的hmd编码(Alhapel等人,同上)。具有高序列同源性的相似的酶发现于多毛拟杆菌、*Anaerotruncus colihominis*以及厌氧性嗜盐嗜碱耐热菌(*Natranaerobius thermophilic*)。这些酶与含[4Fe-4S]的细菌丝氨酸脱水酶(如由tdcG、sdhB和sdaA编码的大肠杆菌酶)的 α 和 β 亚基同源。二甲基马来酸水合酶(EC 4.2.1.85)是顺乌头酸酶家族中一种使二甲基马来酸水合以形成(2R,3S)-2,3-二甲基苹果酸的可逆的Fe²⁺-依赖性和氧敏感性酶。这种酶由巴克氏真杆菌中的dmdAB编码(Alhapel,等人,同上;Kollmann-Koch等人, Physiol.Chem.,365:847-857(1984))。利用下文表29所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0194] 表29

[0195]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
<i>hmd</i>	ABC88407.1	86278275	巴克氏真杆菌
<i>BACCAP_02294</i>	ZP_02036683.1	154498305	多毛拟杆菌 ATCC 29799
<i>ANACOL_02527</i>	ZP_02443222.1	167771169	<i>Anaerotruncus colihominis</i> DSM 17241
<i>NtherDRAFT_2368</i>	ZP_02852366.1	169192667	厌氧性嗜盐嗜碱耐热菌 JW/NM-WN-LF
<i>dmdA</i>	ABC88408	86278276	巴克氏真杆菌
<i>dmdB</i>	ABC88409.1	86278277	巴克氏真杆菌

[0196] 其他的酶是2-甲基苹果酸脱水酶(也称柠檬酸水裂解酶),一种催化来自柠檬苹果酸的水的 α , β 消除反应以形成中康酸酯的可逆水裂解酶。这种酶已被纯化并表征于破伤风形梭菌(Wang等人, J.Biol.Chem.,244:2516-2526(1969))。这种酶的活性也已经在谷氨酸降解VI通路的情况下在柠檬酸杆菌属和摩根氏菌属的多种细菌中被检测到(Kato等人,同上)。迄今尚未在任何生物中发现编码这种酶的基因。

[0197] 巴豆酸酶(EC 4.2.1.55)催化巴豆酰基-CoA的水合以形成3-羟基丁酰-CoA(图3步骤B)。这些酶为正丁醇在一些生物(具体地,梭状芽孢杆菌属)中的形成所需,并包括一个在嗜热酸古生细菌硫化叶菌属、酸菌属和生金球菌属中的3-羟基丙酸/4-羟丁酸循环的步骤。编码巴豆酸酶的示例性基因可发现于丙酮丁醇梭菌(Boynton等人, J.Bacteriol.,178:3015-3024(1996))、克鲁弗氏梭菌(Hillmer等人, FEBS Lett.,21:351-354(1972))和勤奋生金球菌(Berg等人,同上)。烯酰基-CoA水合酶(其参与脂肪酸 β -氧化和/或各种氨基酸的代谢)还可以催化巴豆酰基-CoA的水合以形成3-羟基丁酰-CoA(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))。示例性的烯酰基-CoA水合酶是来自恶臭假单胞菌的ech基因产物(Roberts等人,同上)。恶臭假单胞菌的烯酰基-CoA水合酶phaA和phaB已被指出在苯基乙酸分解代谢期间执行双键的羟基化(Olivera等人, Proc.Natl.Acad.Sci USA,95:6419-6424(1998))。来自萤光假单胞菌的paaA和paaB催化类似的转化(Olivera等人,同上)。最后,据显示,许多大肠杆菌基因已展示烯酰基-CoA水合酶

功能性,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))和paaG(Ismail等人,同上;Park等人,同上;Park等人,同上)。利用下文表30所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0198] 表30

[0199]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
crt	NP_349318.1	15895969	丙酮丁醇梭菌
crt1	YP_001393856	153953091	克鲁弗氏梭菌DSM 555
ech	NP_745498.1	26990073	恶臭假单胞菌
phaA	ABF82233.1	26990002	恶臭假单胞菌
phaB	ABF82234.1	26990001	恶臭假单胞菌
paaA	NP_745427.1	106636093	萤光假单胞菌
paaB	NP_745426.1	106636094	萤光假单胞菌
maoC	NP_415905.1	16129348	大肠杆菌
paaF	NP_415911.1	16129354	大肠杆菌
paaG	NP_415912.1	16129355	大肠杆菌

[0200] 替代地,大肠杆菌基因产物fadA和fadB编码参与脂肪酸氧化、显示烯酰基-CoA水合酶活性的多酶复合物(Haller等人,Biochemistry 39:4622-4629(2000);Martinez-Carrion等人,J.Biol.Chem.240:3538-3546(1965);Matthies等人,Appl.Environ.Microbiol.58:1435-1439(1992))。可以利用对由fadR编码的负调节物的敲除(knock out)来激活fadB基因产物(Jeng等人,A.Biochemistry 13:2898-2903(1974))。fadI和fadJ基因编码相似的功能以及在厌氧条件下被自然表达(Atsumi等人,Nature451:86-89(2008))。利用下文表31所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0201] 表31

[0202]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
fadA	YP_026272.1	49176430	大肠杆菌
fadB	NP_418288.1	16131692	大肠杆菌
fadI	NP_416844.1	16130275	大肠杆菌
fadJ	NP_416843.1	16130274	大肠杆菌
fadR	NP_415705.1	16129150	大肠杆菌

[0203] 4-羟基丁酰-CoA到巴豆酰基-CoA的可逆缩合(图3步骤A)由双官能酶4-羟基丁酰-CoA脱水酶/乙烯乙酰-CoA Δ -异构酶催化。这种酶首先将4-羟基丁酰-CoA脱水为乙烯乙酰-CoA,该乙烯乙酰-CoA随后重排以形成巴豆酰-CoA。来自克鲁弗氏梭菌和氨基丁酸梭菌的酶已被纯化、表征并测序于N-端结构域(Scherf等人,Eur.J.Biochem.,215:421-429(1993);Scherf等人,Arch.Microbiol.,161:239-245(1994))。来自氨基丁酸梭菌和克鲁弗氏梭菌

的abfD基因与这些N-末端氨基酸序列完全匹配并已被指出编码4-羟基丁酰-CoA脱水酶/乙酰乙酰-CoA Δ -异构酶活性。相似的基因通过同源性从基因组工程确定,包括来自牙龈卟啉单胞菌的abfD和来自勤奋生金球菌的Msed_1220。利用下文表32所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0204] 表32

[0205]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
abfD	YP_001396399.1	153955634	克鲁佛氏梭菌
abfD	P55792	84028213	氨基丁酸梭菌
abfD	YP_001928843	188994591	牙龈卟啉单胞菌
Msed_1220	YP_001191305.1	146303989	勤奋生金球菌

[0206] 2-氨基-4-酮戊酸的脱氨反应(图1反应I)和4-氨基丁-2-酮的脱氨反应(图1步骤F)可以分别通过AKP氨-裂解酶和4-氨基丁-2-酮氨-裂解酶完成。这些脱氨反应非常类似于通过天冬氨酸酶进行的天冬氨酸到延胡索酸的脱氨反应。已对该酶进行广泛的研究,以及得到多种晶体结构。大肠杆菌酶已显示与替代性的底物(如天冬氨酸苯基甲基酯、天冬酰胺、苄基-天冬氨酸和苹果酸)起反应(Ma等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.,672:60-65(1992)。在一项独立研究中,已在这种酶上执行定向进化,以改变底物特异性(Asano等人,Biomol.Eng.,22:95-101(2005))。具有天冬氨酸酶功能性的酶也已被表征于流感嗜血杆菌(Sjostrom等人,Biochem.Biophys.Acta.,1324:182-190(1997))、萤光假单胞菌(Takagi等人,J.Biochem.,96:545-552(1984))、枯草杆菌(Sjostrom 等人,同上)和粘质沙雷氏菌(Takagi等人,J.Bacteriol.,161:1-6(1985))。利用下文表33所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0207] 表33

[0208]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
aspA	NP_418562	90111690	大肠杆菌
aspA	P44324.1	1168534	流感嗜血杆菌
aspA	P07346.1	114273	萤光假单胞菌
ansB	P26899.1	251757243	枯草杆菌
aspA	P33109.1	416661	粘质沙雷氏菌

[0209] 类似的氨裂解酶反应通过甲基天冬氨酸酶(EC 4.3.1.2)催化,所述甲基天冬氨酸酶是一种参与经由中康酸酯酯的谷氨酸发酵路径的酶(Kato等人,同上)。这种酶(又称为 β -甲基天冬氨酸酶和3-甲基天冬氨酸氨-裂解酶)自然催化苏-3-甲基天冬氨酸到中康酸酯的脱氨反应。来自破伤风形梭菌的3-甲基天冬氨酸酶已被克隆、在大肠杆菌进行功能表达以及结晶化(Asuncion等人,57:731-733(2001);Asuncion等人,JBiolChem.277:8306-8311(2002);Botting等人,27:2953-2955(1988);Goda等人,31:10747-10756(1992))。在无丙二酸柠檬酸杆菌中,这种酶由BAA28709编码(Kato等人,Arch.Microbiol168:457-463(1997))。3-甲基天冬氨酸酶也已由大肠杆菌YG1002结晶得到(Asano等人,FEMS Microbiol Lett.118:255-258(1994)),虽然该蛋白质序列并未列入公用数据库(如GenBank)。利用下

文表34所示的GenBank登记号可以找到与这些示例性的基因产物的每个的序列相关的数据。

[0210] 表34

[0211]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
mal	AAB24070.1	259429	破伤风形梭菌
BAA28709	BAA28709.1	3184397	无丙二酸柠檬酸杆菌

[0212] 在一些实施方式中,该2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶由一种或多种选自如下的基因编码:ortA(α)、ortB(β)、Amet_236B(α)、Amet_2369(β)、Teth514_1478(α)、Teth514_1479(β)、TTE1235(α)和thrC(β)。

[0213] 在一些实施方式中,该AKP脱氢酶由一种或多种选自如下的基因编码:thrA、akthr2、hom6、hom1、hom2、fadB、fadJ、Hbd2、Hbd1、hbd、HSD17B10、phbB、phaB、Msed_1423、Msed_0399、Msed_0389、Msed_1993、adh、adhA、adh-A、mdh、ldhA、ldh和bdh。

[0214] 在一些实施方式中,该2-氨基-4-羟基戊酸转氨酶由一种或多种选自如下的基因编码:aspC、AAT2、ASP5、got2、avtA、lysN、AadAT-II、dat、lat、yggJ、spuC、SkyPYD4、SkUGA1、UGA1、Abat、Abat、Gta-1、gabT和puuE。

[0215] 在一些实施方式中,该2-氨基-4-羟基戊酸氧化还原酶(脱氨基)由一种或多种选自如下的基因编码:gdhA、gdh、gdhA1、rocG、gdh1、gdh2、GDH、GDH2、ldh和nadX。

[0216] 在一些实施方式中,该2-氧代-4-羟基戊酸脱羧酶由一种或多种选自如下的基因编码:pdc、pdc1、mdlC、dpgB、ilvB-1、kgd、kdcA、lysA、panD、cadA、ldc、ldcC、AF323910.1:1...1299、odc1、VV2_1235、dmpH、dmpE、xylIII、xylIII、Reut_B5691、Reut_B5692、CAD、pad1、pofK(pad)、padC、pad、adc、cbei_3835、CLL_A2135、RBAM_030030。

[0217] 在一些实施方式中,该3-羟基丁醛还原酶由一种或多种选自如下的基因编码:alrA、ADH2、yqhD、bdh I、bdh II、adhA、4hbd、adhI、P84067、mmsb、dhat和3hidh。

[0218] 在一些实施方式中,该AKP转氨酶由一种或多种选自如下的基因编码:aspC、AAT2、ASP5、got2、avtA、lysN、AadAT-II、dat、lat、yggJ、spuC、SkyPYD4、SkUGA1、UGA1、Abat、Gta-1、gabT和puuE。

[0219] 在一些实施方式中,该AKP氧化还原酶(脱氨基)由一种或多种选自如下的基因编码:gdhA、gdh、gdhA1、rocG、gdh1、gdh2、GDH、GDH2、ldh和nadX。在一些实施方式中,该2,4-二氧代戊酸脱羧酶由一种或多种选自如下的基因编码:pdc、pdc1、mdlC、dpgB、ilvB-1、kgd、kdcA、lysA、panD、cadA、ldc、ldcC、AF323910.1:1...1299、odc1、VV2_1235、dmpH、dmpE、xylIII、xylIII、Reut_B5691、Reut_B5692、CAD、pad1、padC和pad、adc、cbei_3835、CLL_A2135、RBAM_030030。

[0220] 在一些实施方式中,该3-氧代丁醛还原酶(酮还原)由一种或多种选自如下的基因编码:thrA、akthr2、hom6、hom1、hom2、fadB、fadJ、Hbd2、Hbd1、hbd、HSD17B10、phbB、phaB、Msed_1423、Msed_0399、Msed_0389、Msed_1993、adh、adhA、adh-A、mdh、ldhA、ldh和bdh。

[0221] 在一些实施方式中,该3-氧代丁醛还原酶(醛还原)由一种或多种选自如下的基因编码:alrA、ADH2、yqhD、bdh I、bdh II、adhA、4hbd、adhI、P84067、mmsb、dhat和3hidh。

[0222] 在一些实施方式中,该4-羟基-2-丁酮还原酶由一种或多种选自如下的基因编码:

thrA、akthr2、hom6、hom1、hom2、fadB、fadJ、Hbd2、Hbd1、hbd、HSD17B10、phbB、phaB、Msed_1423、Msed_0399、Msed_0389、Msed_1993、adh、adhA、adh-A、mdh、ldhA、ldh和bdh。

[0223] 在一些实施方式中,该AKP脱羧酶由一种或多种选自如下的基因编码:pdc、pdc1、mdlC、dpgB、ilvB-1、kgd、kdcA、lysA、panD、cadA、ldc、ldcC、AF323910.1:1...1299、odc1、VV2_1235、dmpH、dmpE、xylIII、xylIII、Reut_B5691、Reut_B5692、CAD、pad1、pofK(pad)、padC、pad。

[0224] 在一些实施方式中,该4-氨基丁-2-酮转氨酶由一种或多种选自如下的基因编码:aspC、AAT2、ASP5、got2、avtA、lysN、AadAT-II、dat、lat、yggG、spuC、SkyPYD4、SkUGA1、UGA1、Abat、Gta-1、gabT和puuE。

[0225] 在一些实施方式中,该4-氨基丁-2-酮氧化还原酶(脱氨基)由一种或多种选自如下的基因编码:gdhA、gdh、gdhA1、rocG、gdh1、gdh2、GDH、GDH2、ldh、nadX、kdd和lysDH。

[0226] 在一些实施方式中,该4-氨基丁-2-酮氨-裂解酶由一种或多种选自如下的基因编码:aspA、ansB、mal和BAA28709。

[0227] 在一些实施方式中,该丁烯酮水合酶由一种或多种选自如下的基因编码:fumA、fumB、fumC、fumH、fum1、MmcB、MmcC、hmd、BACCAP_02294、ANACOL_02527、NtherDRAFT_2368、dmdA、dmdB、crt、crt1、echpaaA、paaB、phaA、phaB、maoC、paaF、paaG、abfD、Msed_1220、fadA、fadB、fadI、fadJ和fadR。

[0228] 在一些实施方式中,该AKP氨-裂解酶由一种或多种选自如下的基因编码:aspA、ansB、mal和BAA28709。

[0229] 在一些实施方式中,该乙酰丙烯酸脱羧酶由一种或多种选自如下的基因编码:pdc、pdc1、mdlC、dpgB、ilvB-1、kgd、kdcA、lysA、panD、cadA、ldc、ldcC、AF323910.1:1...1299、odc1、VV2_1235、dmpH、dmpE、xylIII、xylIII、Reut_B5691、Reut_B5692、CAD、pad1、pofK(pad)、padC、pad、adc、cbei_3835、CLL_A2135、RBAM_30030。

[0230] 在一些实施方式中,该乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醛形成)由一种或多种选自如下的基因编码:acr1、sucD、bphG、bld、adhE、Msed_0709、mcr、asd-2、Saci_2370、Ald和eutE。

[0231] 在一些实施方式中,该乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醇形成)由一种或多种选自如下的基因编码:adhE、adhE2、mcr、Rcas_2929、NAP1_02720、MGP2080_00535和FAR。

[0232] 在一些实施方式中,该乙酰乙酰基-CoA还原酶(酮还原)由一种或多种选自如下的基因编码:thrA、akthr2、hom6、hom1、hom2、fadB、fadJ、Hbd2、Hbd1、hbd、HSD17B10、phbB、phaB、Msed_1423、Msed_0399、Msed_0389、Msed_1993、adh、adhA、adh-A、mdh、ldhA、ldh和bdh。

[0233] 在一些实施方式中,该3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成)由一种或多种选自如下的基因编码:acr1、sucD、bphG、bld、adhE、Msed_0709、mcr、asd-2、Saci_2370、Ald和eutE。

[0234] 在一些实施方式中,该3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)由一种或多种选自如下的基因编码:adhE、adhE2、mcr、Rcas_2929、NAP1_02720、MGP2080_00535和FAR。

[0235] 在一些实施方式中,该4-羟基丁酰-CoA脱水酶由一种或多种选自如下的基因编码:fumA、fumB、fumC、fumH、fum1、MmcB、MmcC、hmd、BACCAP_02294、ANACOL_02527、NtherDRAFT_2368、dmdA、dmdB、crt、crt1、ech、paaA、paaB、phaA、phaB、maoC、paaF、paaG、

abfD、Msed_1220、fadA、fadB、fadI、fadJ和fadR。

[0236] 在一些实施方式中,该巴豆酸酶由一种或多种选自如下的基因编码:fumA、fumB、fumC、fumH、fumI、MmcB、MmcC、hmd、BACCAP_02294、ANACOL_02527、NtherDRAFT_2368、dmdA、dmdB、crt、crt1、ech paaA、paaB、phaA、phaB、maoC、paaF、paaG、abfD、Msed_1220、fadA、fadB、fadI、fadJ和fadR。

[0237] 本发明所述的非天然存在的微生物可以通过引入编码一种或多种参与一种或多种1,3-丁二醇生物合成通路的酶或蛋白质的可表达的核酸来生产。根据选择用于生物合成的宿主微生物,可以表达用于特定1,3-丁二醇生物合成通路的部分或全部的核酸。例如,如果选择的宿主存在用于所需的生物合成通路的一种或多种酶或蛋白质的缺陷,则可将用于缺陷酶或蛋白质的可表达的核酸引入该宿主,用于后续的外源性表达。替代性地,如果所选择的宿主显示了一些通路基因的内源性表达,但是在其他方面存在缺陷,则需要用于缺陷酶或蛋白质的编码核酸,以完成1,3-丁二醇的生物合成。因此,本发明的非天然存在的微生物可以通过引入外源性酶或蛋白质活性,以获得所需的生物合成通路来生产;或者可以通过引入一种或多种外源性酶或蛋白质活性获得所需的生物合成通路,所述通路连同一种或多种内源性酶或蛋白质生产所需的产品,如1,3-丁二醇。

[0238] 根据选择的宿主微生物的1,3-丁二醇生物合成通路组成,本发明的所述非天然存在的微生物包括至少一种外源性表达的1,3-丁二醇通路-编码核酸以及乃至所有的用于一种或多种1,3-丁二醇生物合成通路的编码核酸。例如,可以通过相应的编码核酸的外源性表达在有通路酶或蛋白质缺陷的宿主中建立1,3-丁二醇生物合成。在有1,3-丁二醇通路的所有酶或蛋白质缺陷的宿主中,可以包括在该通路中的所有酶或蛋白质的外源性表达,虽然理解,可以表达一种通路的所有酶或蛋白质,即使该宿主包含该通路酶或蛋白质的至少一种。例如,可以包括用于生产1,3-丁二醇的通路中的所有酶或蛋白质的外源性表达。

[0239] 考虑到本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员会理解以可表达的形成引入的编码核酸的数量将,至少,等于选择的宿主微生物的1,3-丁二醇通路缺陷量。因此,本发明的非天然存在的微生物可以具有一种、两种、三种、四种、五种乃至所有编码构成本文披露的1,3-丁二醇生物合成通路的酶或蛋白质的核酸。在一些实施方式中,所述非天然存在的微生物还可以包括其他便于或优化1,3-丁二醇生物合成或赋予宿主微生物其他有用的功能的基因修饰。一种所述其他的功能性可以包括,例如1,3-丁二醇通路前体(例如乙酰-CoA)的一种或多种的合成的增强。

[0240] 一般地,宿主微生物应该这样选择以使其生产1,3-丁二醇通路的前体,作为自然生产的分子或作为工程产物,其提供所需前体的从新生产或由宿主微生物自然生产的前体的增加生产。例如,乙酰-CoA自然产生于宿主生物,如大肠杆菌。宿主生物可以设计以增加前体的生产,正如本文所披露。此外,已被设计以生产所需前体的微生物可用作宿主生物并进一步被设计,以表达1,3-丁二醇通路的酶或蛋白质。

[0241] 在一些实施方式中,本发明的非天然存在的微生物产自包含合成1,3-丁二醇的酶催化能力的宿主。在该特定的实施方式中,其可用以增加1,3-丁二醇通路产物的合成或堆积,例如促使发生1,3-丁二醇通路反应,以便生产1,3-丁二醇。合成或堆积的增加可以通过,例如编码一种或多种上述的1,3-丁二醇通路酶或蛋白质的核酸的过表达来完成。该1,3-丁二醇通路的一种或多种酶和/或蛋白质过表达的发生可以,例如通过一种或多种内源

性基因的外源性表达或通过一种或多种异源性基因的外源性表达。因此,天然存在的生物可以很容易地生成为本发明的非天然存在的微生物,例如,通过编码1,3-丁二醇生物合成通路酶或蛋白质的核酸的一种、两种、三种、四种、五种,即全部的过表达来生产1,3-丁二醇。此外,非天然存在的生物可以通过造成1,3-丁二醇生物合成通路中酶活性的增加的内源性基因的诱变来生成。

[0242] 在特别有用的实施方式中,采用编码核酸的外源性表达。外源性表达赋予对宿主定制表达和/或调节元件的能力以及获得使用人控制的所需的表达水平的应用。然而,其他实施方式中还可以利用内源性表达,例如当连接至诱导型启动子或其他调节元件时,通过去除负调节效应子或基因启动子的诱导利用内源性表达。因此,具有天然存在的诱导型启动子的内源性基因可以通过提供适当的诱导剂上调;或者内源性基因的调节区域可设计以纳入诱导调节元件,从而允许在需要的时候调节内源性基因的上调表达。同样,可以包括诱导型启动子,作为针对引入非天然存在的微生物的外源性基因的调节元件。

[0243] 应理解的是,在本发明的方法中,可以将一种或多种外源性核酸的任意核酸引入微生物,以生产本发明的非天然存在的微生物。可以引入核酸,以便赋予该微生物,例如1,3-丁二醇生物合成通路。替代地,可以引入编码核酸,以生产具有生物合成能力的中间体微生物,以催化所需的反应的一些,从而赋予1,3-丁二醇生物合成能力。例如,具有1,3-丁二醇生物合成通路的非天然存在的微生物可以包括至少两种编码所需的酶或蛋白质的外源性核酸。因此,应理解的是,生物合成通路的两种或两种以上酶或蛋白质的任意组合可以包含在本发明的非天然存在的微生物中。同样,应理解的是,按照要求,生物合成通路的三种或三种以上酶或蛋白质的任意组合可以包含在本发明的非天然存在的微生物中等等,只要所需的生物合成通路的酶和/或蛋白质的组合导致相应的所需产品的产生。同样,按照要求,生物合成通路的四种或四种以上酶或蛋白质的任意组合可以包含在本发明的非天然存在的微生物中,只要所需的生物合成通路的酶和/或蛋白质的组合导致相应的所需产品的产生。

[0244] 除如本文描述的1,3-丁二醇的生物合成之外,本发明所述的非天然存在的微生物和方法也可以通过彼此间以及与本领域熟知的其他微生物和方法进行各种组合来应用,以通过其他路径获得产品生物合成。例如,除了使用1,3-丁二醇生产者,一种生产1,3-丁二醇的替代性方法是通过加入另一能够将1,3-丁二醇通路中间体转化为1,3-丁二醇的微生物。一种这样的步骤包括,例如生产1,3-丁二醇通路中间体的微生物的发酵。该1,3-丁二醇通路中间体然后可以被用作将1,3-丁二醇通路中间体转化为1,3-丁二醇的第二微生物的底物。该1,3-丁二醇通路中间体可以被直接加入该第二生物的另一培养物或该1,3-丁二醇通路中间体生产者的原始培养物可以通过,例如细胞分离耗尽这些微生物,然后可以利用将第二生物随后加入发酵液,以生产最终产品而无中间体纯化的步骤。

[0245] 在其他实施方式中,本发明的所述非天然存在的微生物和方法可以在各种各样的子通路中进行组合,以获得,例如1,3-丁二醇的生物合成。在这些实施方式中,可以将用于本发明的所需产品的生物合成通路分离到不同的微生物中,以及可以共同培养该不同的微生物,以生产最终产品。在这种生物合成方案中,一个微生物的产物是用于第二微生物的底物,直至合成最终产物。例如,可以通过构建包含用于将一个通路中间体转化为另一通路中间体或产物的生物合成通路的微生物完成1,3-丁二醇的生物合成。替代地,也可以通过利

用相同器皿内的两个生物的共同培养或共同发酵从微生物生物合成生产1,3-丁二醇,其中该第一微生物生产1,3-丁二醇中间体以及该第二微生物将该中间体转化为1,3-丁二醇。

[0246] 考虑到本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员会理解存在针对本发明的所述非天然存在的微生物和方法,连同其他微生物、具有子通路的其他非天然存在的微生物的共同培养物以及本领域熟知的生产1,3-丁二醇的其他化学和/或生化程序的组合的各种各样的组合和排列。

[0247] 用于1,3-丁二醇通路酶或蛋白质的编码核酸的源可以包括,例如其中被编码的基因产物能够催化参照反应的任何物种。这类物种既包括原核生物又包括真核生物,包括但不限于细菌(包括古生细菌和真细菌)以及真核生物(包括酵母)、植物、昆虫、动物以及哺乳动物(包括人)。针对这种源的示例性物种包括,例如大肠杆菌以及本文披露的或作为相应的基因的源生物可得的其他示例性的物种。然而,今天超过550个物种的完整的基因组序列是可得的(这些物种中超过一半的基因组序列在公用数据库,如NCBI中可以得到),包括395微生物基因组和各种酵母、真菌、植物以及哺乳动物基因组,在这种情况下,编码针对近缘或远缘物种中一种或多种基因的1,3-丁二醇生物合成活性的基因的识别(包括,例如已知基因的同系、直系同源、旁系同源和非直系同源基因置换)以及生物之间基因改变的互换在本领域是常规且熟知的。因此,实现本文所述的关于特定生物(如大肠杆菌)的1,3-丁二醇的生物合成的代谢改变可以以同样的方式很容易地应用到其他微生物,包括原核和真核生物。考虑到本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员会得知在一种生物中示范的代谢改变可以同样地应用于其他生物。

[0248] 在某些情况下,例如当替代性的1,3-丁二醇生物合成通路存在于不相关的物种中时,可以通过,例如来自催化相似的、但非完全相同的代谢反应以取代参照反应的不相关物种的一种旁系同源物或多种旁系同源物的外源性表达,赋予宿主物种1,3-丁二醇生物合成。由于不同的生物之间存在代谢网络间的某些差异,本领域的技术人员会理解不同生物之间的实际的基因用法可以存在差异。然而,考虑到本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员还会理解本发明的教诲和方法可以通过利用对那些本文示例性的微生物所作的同源代谢改变应用于所有的微生物,以在有关的物种中构建会合成1,3-丁二醇的微生物。

[0249] 宿主微生物可以选自以及所述非天然存在的微生物可以生成于,例如细菌、酵母、真菌或各种其他适用于发酵过程的微生物的任意一种。示例性的细菌包括选自如下的物种:大肠杆菌、产酸克雷伯氏菌、产琥珀酸厌氧螺菌、琥珀酸放线杆菌、产琥珀酸曼氏杆菌、菜豆根瘤菌、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒杆菌、氧化葡糖杆菌、运动发酵单胞菌、乳酸乳球菌、植物乳杆菌、天蓝色链霉菌、丙酮丁醇梭菌、萤光假单胞菌以及恶臭假单胞菌。示例性酵母或真菌包括选自如下的物种:酿酒酵母、人体酵母菌探针、乳酸克鲁维酵母、马克斯克鲁维酵母、土曲霉、黑曲霉和毕赤酵母。大肠杆菌是一种特别有用的宿主生物,因为其是一种适于基因工程的具有良好表征的微生物。其他特别有用的宿主生物包括酵母,如酿酒酵母。

[0250] 可以例如,通过本领域熟知的重组和检测方法操作用于构建和测试生产非天然存在的1,3-丁二醇的宿主的表达水平的方法。这类方法的描述可以见于,例如Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001) 和 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)。

[0251] 可以利用本领域熟知的技术(包括但不限于接合、电穿孔术、化学转化法、转导、转染和超声转化)将用于生产1,3-丁二醇的通路中涉及的外源性核酸序列稳定或瞬时地引入宿主细胞。对于大肠杆菌或其他原核细胞中的外源性表达,真核细胞核酸的基因或cDNA中的一些核酸序列可以编码导向信号(targeting signal),如N-末端线粒体导向信号或其他导向信号,如果需要,其可以在转换进入原核宿主细胞之前被去除。例如,线粒体前导序列的去除导致了大肠杆菌中表达的上调(Hoffmeister等人,J.Biol.Chem.280:4329-4338(2005))。对于酵母或其他真核细胞中的外源性表达,可以在胞质溶胶中表达基因,而不添加前导序列;或者可以通过添加适于宿主细胞的合适的导向序列(如线粒体导向或分泌信号)将基因导向线粒体或其他细胞器。因此,理解的是,对核酸序列的适当的以去除或包含导向序列的修改可被纳入外源性核酸序列中,以提供所需的特性。此外,以本领域熟知的技术可以使基因经受密码子优化,以实现蛋白质的优化表达。

[0252] 表达载体可以被构建以包括如本文所示范的可操作地连接于宿主生物中功能性的表达调控序列的一种或多种1,3-丁二醇生物合成通路编码核酸。适用于本发明的宿主微生物的表达载体包括,例如质粒、噬菌体载体、病毒载体、附加体和人工染色体(包括可操作地用以稳定地整合到宿主染色体的载体和选择序列或标记)。此外,该表达载体可以包括一种或多种选择标记基因和适当的表达调控序列。还可以包括,例如提供抗生素或毒素抗性、补充营养缺陷或者提供培养基中没有的关键营养物的选择标记基因。表达调控序列可以包括组成型和诱导型启动子、转录增强子、转录终止子以及本领域熟知的诸如此类的表达调控序列。当两个或两个以上外源性编码核酸被共同表达时,两个核酸都可以被插入,例如单一表达载体或独立表达载体。对于单一载体表达,编码核酸可被可操作地连接到一个共同的表达调控序列或连接到不同的表达调控序列,如一个诱导型启动子和一个组成型启动子。可以利用本领域熟知的方法确定代谢或合成通路中涉及的外源性核酸序列的转化。这类方法包括,例如核酸分析(如北方吸印技术或mRNA聚合酶链反应(PCR)扩增或基因产物表达免疫印迹法或其他合适的测试引入核酸序列或其相应的基因产物的表达的分析方法。本领域的技术人员理解的是,以足够量表达外源性核酸以生产所需的产品以及进一步理解的是,可以利用本领域熟知的和本文披露的方法优化表达水平以获得足够的表达。

[0253] 本发明提供一种用于生产1,3-BDO的方法,该方法包括在多种条件下培养本文披露的所述非天然存在的微生物达足够长的时间,以生产1,3-BDO,所述非天然存在的微生物包括纳入编码完成1,3-BDO通路的酶的一个、两个、三个、四个、五个至全部外源性核酸的微生物。该1,3-BDO通路包含一组1,3-BDO通路酶,其中该一组1,3-BDO通路酶的确认为上文,即:(a)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP脱氢酶;(3)2-氨基-4-羟基戊酸转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(4)2-氧代-4-羟基戊酸脱羧酶;以及(5)3-羟基丁醛还原酶;(b)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(3)2,4-二氧代戊酸脱羧酶;(4)3-氧代丁醛还原酶(酮还原);以及(5)3-羟基丁醛还原酶;(c)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(3)2,4-二氧代戊酸脱羧酶;(4)3-氧代丁醛还原酶(醛还原);以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶;(d)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP脱羧酶;(3)4-氨基丁-2-酮转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(4)3-氧代丁醛还原酶(酮还原);以及(5)3-羟基丁醛还原酶;(e)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP脱羧酶;(3)4-氨基丁-2-酮转氨酶或氧化还原酶(脱氨基);(4)3-氧代丁醛还原酶

(醛还原);以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶;(f)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP脱羧酶;(3)4-氨基丁-2-酮氨-裂解酶;(4)丁酮水合酶;以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶;(g)(1)2-氨基-4-酮戊酸(AKP)硫解酶;(2)AKP氨-裂解酶;(3)乙酰丙烯酸脱羧酶;(4)丁酮水合酶;以及(5)4-羟基-2-丁酮还原酶;(h)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醛形成);(2)3-氧代丁醛还原酶(酮还原);以及(3)3-羟基丁醛还原酶;(i)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA依赖的、醇形成)和(2)4-羟基-2-丁酮还原酶;(j)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(CoA-依赖的、醛形成);(2)3-氧代丁醛还原酶(醛还原);以及(3)4-羟基-2-丁酮还原酶;(k)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(酮还原)和(2)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成);(1)(1)乙酰乙酰基-CoA还原酶(酮还原);(2)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成);以及(3)3-羟基丁醛还原酶;(m)(1)4-羟基丁酰-CoA脱水酶;(2)巴豆酸酶;以及(3)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成);以及(n)(1)4-羟基丁酰-CoA脱水酶;(2)巴豆酸酶;(3)3-羟基丁酰-CoA还原酶(醛形成);以及(4)3-羟基丁醛还原酶。

[0254] 可以利用熟知的方法进行适用于1,3-丁二醇生产测试的纯化和/或测定。可以为每个设计的待测菌株培育合适的复制品,如一式三份的培养物。例如,可以监测所设计的生产宿主中产物和副产物的形成。可以通过各种方法,例如HPLC(高效液相色谱)、GC-MS(气相色谱-质谱法)和LC-MS(液相色谱-质谱法)或者其他利用本领域熟知的例行程序的合适的分析方法分析最终产品和中间体以及其他有机化合物。也可以利用培养上清液对产物在发酵液中的释放进行测试。可以利用,例如针对葡萄糖和醇的折光率检测器以及针对有机酸的紫外检测器(Lin等人,Biotechnol.Bioeng.90:775-779(2005))通过HPLC或本领域熟知的其他合适的测定和检测方法对副产物和残余葡萄糖进行定量。也可以利用本领域熟知的方法对来自外源性DNA序列的个别酶或蛋白质活性进行测定(参见,例如WO/2008/115840和Hanai等人,Appl Environ.Microbiol.73:7814-7818(2007))。

[0255] 可以利用本领域熟知的各种方法从培养物中的其他组分分离1,3-丁二醇。这类分离方法包括,例如萃取程序以及包括如下的方法:连续液液萃取法、全蒸发法、膜滤法、膜分离法、反渗透法、电渗析法、蒸馏法、结晶法、离心法、萃取过滤法、离子交换色谱法、体积排阻色谱法、吸附色谱法以及超滤法。所有上述方法为本领域所熟知。

[0256] 本文描述的任意非天然存在的微生物可以培养以生产和/或分泌本发明的生物合成产物。例如,1,3-丁二醇生产者可以培养以用于1,3-丁二醇的生物合成生产。

[0257] 为了生产1,3-丁二醇,在具有碳源和其他必需营养物的培养基中培养重组菌株。在发酵罐中保持厌氧条件以降低整个过程的消耗是非常可取的。这种条件的获取可以通过,例如首先用氮喷射该培养基,然后用垫片和钳口盖密封烧瓶。对于培育不遵循厌氧的菌株,可以通过在该垫片上打一小孔进行有限通气来采用微氧条件。示例性的厌氧条件已有先前描述并为本领域所熟知。示例性的有氧和厌氧条件的描述见于,例如2007年8月10日提交的美国公布号US-2009-0047719。如本文所披露,可以分批、补料分批或连续的方式进行发酵。

[0258] 如果需要,可以将培养基的pH值保持为所需的pH值,特别是按需要通过添加碱(如NaOH或其他碱)或酸保持为中性pH值(如约7的pH值),以将培养基保持在所需的pH值。可以通过利用分光光度计(600nm)测量光密度确定生长速率,以及可以通过监测随着时间的推移碳源的消耗确定葡萄糖摄取速率。

[0259] 除了如上文的那些示例性的可再生的原料,本发明所述的1,3-丁二醇微生物也可以修改为将合成气作为其碳源进行培育。在这个特定的实施方式中,一种或多种蛋白质或酶表达于生产1,3-丁二醇的生物中,以提供用于利用合成气或其他气态碳源的代谢通路。

[0260] 本发明的生物可以利用,例如任何可以向非天然存在的微生物提供碳源的碳水化合物源。这类源包括,例如糖类(如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、果糖和淀粉)。其他碳水化合物源包括,例如可再生的原料和生物质。可在本发明所述的方法中用作原料的示例性类型的生物质包括纤维素生物质、半纤维素生物质和木素原料或原料的木素部分。这类生物质原料包含,例如用作碳源的碳水化合物底物(如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、果糖和淀粉)。考虑到本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员会理解除上文那些示例性的原料和生物质,可再生的原料和生物质也可用以培养用于生产1,3-丁二醇的本发明的所述微生物。

[0261] 因此,考虑到本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员会理解可以生产非天然存在的微生物,所述微生物当培育在碳源(如合成气、CO和/或CO₂)上时分泌本发明的生物合成的化合物。这类化合物包括,例如1,3-丁二醇和1,3-丁二醇通路中任何中间体代谢产物。所有需要的是在一种或多种所需酶或蛋白质活性中进行设计,以实现所需化合物或中间体(包括,例如1,3-丁二醇生物合成通路的部分或所有的包涵物)的生物合成。因此,本发明提供一种非天然存在的微生物,所述微生物当培育在碳水化合物或其他碳源上时生产和/或分泌1,3-丁二醇以及当培育在碳水化合物或其他碳源上时生产和/或分泌该1,3-丁二醇通路中所示的任何中间体代谢产物。本发明的所述生产1,3-丁二醇的微生物可以促使来自中间体(例如乙酰-CoA)的合成。

[0262] 利用本领域熟知的方法如本文所示范构建本发明的所述非天然存在的微生物,以以足够的量外源性表达至少一种编码1,3-丁二醇通路酶或蛋白质的核酸,以生产1,3-丁二醇。理解的是,在足以生产1,3-丁二醇的条件下培养本发明的所述微生物。遵循本文提供的教诲和指导,本发明的所述非天然存在的微生物可以实现1,3-丁二醇的生物合成,产生约0.1-2000mM或以上的细胞内浓度。一般地,1,3-丁二醇的细胞内浓度在约3-1800mM之间,特别地在约5-1700mM之间以及更特别地在约8-1600mM之间,包括约100mM、200mM、500mM、800mM或以上。也可以从本发明的所述非天然存在的微生物获得这些示例性范围的每个之间和以上的细胞内浓度。

[0263] 在一些实施方式中,培养条件包括厌氧或基本上厌氧培育或维持条件。示例性的厌氧条件已有先前描述并为本领域所熟知。用于发酵过程的示例性的厌氧条件的描述见于本文以及,例如2007年8月10日提交的美国专利申请号US 2009/0047719。任何这些条件可以与所述非天然存在的微生物以及本领域熟知的其他厌氧条件一起使用。在这种厌氧条件下,该1,3-丁二醇生产者可以合成细胞内浓度为5-10mM或以上以及本文示例性的所有其他浓度的1,3-丁二醇。理解的是,虽然上文的描述指细胞内浓度,生产1,3-丁二醇的微生物可以在细胞内生产1,3-丁二醇和/或分泌产物到培养基内。

[0264] 培养条件可以包括,例如液体培养程序以及发酵和其他大规模培养程序。如本文所描述,在厌氧或基本上厌氧的培养条件下可以获得本发明生物合成产物的特别有用的收率。

[0265] 如本文所描述,一种用于实现1,3-丁二醇生物合成的示例性培育条件包括厌氧培

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

[0266] 本文所述的培养条件可以按比例扩大并连续增长,用于制造1,3-丁二醇。示例性的培育程序包括,例如补料分批发酵和分批分离;补料分批发酵和连续分离或连续发酵和连续分离。所有这些过程都为本领域所熟知。发酵程序对于工业规模的1,3-丁二醇的生物合成生产特别有用的。一般地以及与非连续培养程序一样,1,3-丁二醇的连续和/或接近连续的生产将包括在足够的营养物和培养基中培养本发明的生产非天然存在的1,3-丁二醇的生物,以维持和/或接近维持指数期的生长。这种条件下的连续培养可以包括,例如1天、2、3、4、5、6或7天或更多。此外,连续培养可以包括1周、2、3、4或5或更多周乃至数月。替代地,如果适于具体的应用,本发明的生物可以培养数小时。理解的是,连续和/或接近连续培养的条件还可以包括这些示例性周期之间的所有的时间间隔。进一步理解的是,本发明的所述微生物的培养时间是足以生产足够量的用于所需目的的时间段。

[0267] 发酵程序为本领域所熟知。简言之,可以,例如补料分批发酵和分批分离;补料分批发酵和连续分离或连续发酵和连续分离的方式利用用于1,3-丁二醇的生物合成生产的发酵。分批和连续发酵程序的例子为本领域所熟知。

[0268] 除了上文将本发明的所述1,3-丁二醇生产者用于1,3-丁二醇的大量连续的生产的发酵程序,所述1,3-丁二醇生产者还可以,例如同时经受化学合成程序,以将产物转化为其他化合物或产物可以从发酵培养物中分离以及后续经受化学转化,以将产物转化为其他化合物(如有需要)。

[0269] 在一些实施方式中,合成气可以用作碳原料。针对合成气发酵的重要过程考虑是高生物物质浓度和良好的气液传质(Bredwell等人,Biotechnol Prog.,15:834-844(1999))。CO在水中的溶解度略小于氧的溶解度。可以在受控的发酵罐中进行连续气体喷射发酵并通过质谱法进行恒定的烟气分析以及通过GC和HPLC进行周期性液体取样和分析。液相可以分批模式起作用。例如利用Aminex®系列的HPLC柱(例如HPX-87系列)(BioRad,Hercules CA)、利用针对葡萄糖和醇的折光率检测器以及针对有机酸的紫外检测器通过HPLC(Shimadzu,Columbia MD)对发酵产物(如醇、有机酸以及残余葡萄糖连同残余乙醇)进行定量。可以通过利用分光光度计(600nm)测量光密度确定生长速率。这些系统中所有的管道都是玻璃或金属的,以保持厌氧条件。用玻璃粉进行气体喷射,以减小气泡尺寸并改善传质。测试各种喷射速率,范围从约0.1到1vvm(每分钟的蒸汽体积)。为获得准确的气体摄取速率的测量值,执行周期性质询,其中暂时性止住气流,以及监测气相组分,并将其作为时间函数。

[0270] 为了获得整个目标产率,采用细胞滞留或再循环方法。一种增加微生物浓度的方法是经由相对于侧流的切向流动膜进行细胞再循环。也可以利用重复的分批培养,如先前所描述的通过穆尔氏菌属的乙酸生产(Sakai等人,J Biosci.Bioeng,99:252-258(2005))。还可以使用各种其他方法(Bredwell等人,Biotechnol Prog.,15:834-844(1999));Datar等

人, *Biotechnol Bioeng*, 86:587-594(2004))。其他的优化测试可以,例如在1.5atm的高压下进行,以改善传质(Najafpour等人, *Enzyme and Microbial Technology*, 38[1-2], 223-228(2006))。

[0271] 一旦利用纯H₂/CO作为料实现令人满意的效能,生成的合成气体混合物包含可能存在于商业合成气中的抑制剂。例如,典型的杂质分布图是4.5%CH₄、0.1%C₂H₂、0.35%C₂H₆、1.4%C₂H₄和150ppm的一氧化氮(Datar等人, *Biotechnol Bioeng*, 86:587-594(2004))。以ppm的水平加入焦油(其代表化合物如苯、甲苯、乙苯、对二甲苯、邻二甲苯和萘),以测试对生产的任何影响。例如,已显示40pp的NO对*C. carboxidivorans*具有抑制性(Ahmed等人, *Biotechnol Bioeng*, 97:1080-1086(2007))。培养物在移至发酵罐前在摇瓶培养中进行测试。另外,测试不同的水平的这些潜在的抑制性化合物,以对它们对细胞生长的影响进行定量。利用这点知识形成合成气纯度的规范,并将其用于大规模的研究和生产。如果发现任何具体的组分难以减少或从合成气去除,则利用适应性的进化过程以使细胞逐渐容忍一种或多种杂质。

[0272] 蛋白质工程领域的进步使得改变本文披露的任意酶以有效地作用于对所述酶来说尚未知是自然的底物是切实可行的。来自相关不同等级的广泛特异性的酶和已用于这类酶的进化以作用于非自然底物的方法的例子见下文。

[0273] 本文披露的通路中一个等级的酶是进行酮或醛与醇的相互转化的氧化还原酶(1.1.1)。这个等级的酶可以对各式各样的底物起作用。显示,由土壤细菌短杆菌KU 1309纯化得到的醇脱氢酶(1.1.1.1)(Hirano等人, *J. Biosci. Bioeng.* 100:318-322(2005))对过量脂肪以及高活性芳族醇起作用。表33示出该酶的活性及其对不同的醇的K_m。该酶是可逆的并对多种醛具有非常高的活性,又如表34所示。

[0274] 表33

[0275]

底物	相对活性(%)	K _M (MM)
2-苯乙醇	100	0.025
(S)-2-苯丙醇	156	0.157
(R)-2-苯丙醇	63	0.020
苯醇	199	0.012
3-苯丙醇	135	0.033
乙醇	76	
1-丁醇	111	
1-辛醇	101	
1-十二烷醇	68	
1-苯乙醇	46	
2-丙醇	54	

[0276] 在该表中,2-苯基乙醇的活性(对应19.2U/mg)被视作100%。

[0277] 表34

底物	相对活性(%)	K_M (MM)
苯乙醛	100	0.261
2-苯丙醛	188	0.864
1-辛醛	87	
苯乙酮	0	

[0279] 来自富养罗尔斯通氏菌的乳酸脱氢酶(1.1.1.27)是另一已被证明对多种2-氧代酸,如2-氧代丁酸、2-氧代戊酸和2-氧代戊二酸(与2-氧代己二酸类似的C5化合物)具有高活性的酶(Steinbuechel等人,同上)。表35中第2列示出来自富养罗尔斯通氏菌(之前的真养产碱杆菌)的ldhA对不同底物的活性(Steinbuechel等人,同上)。

[0280] 表35

[0281]

底物	活性		
	L(+)-	L(+)-	D(-)-
	来自真养产碱杆菌的乳酸脱氢酶	来自兔肌肉的乳酸脱氢酶	来自莱希曼氏乳酸菌的乳酸脱氢酶
	%		
乙醛酸	8.7	23.9	5.0
丙酮酸	100.0	100.0	100.0
2-氧代丁酸	107.0	18.6	1.1
2-氧代戊酸	125.0	0.7	0.0
3-甲基-2-氧代丁酸	28.5	0.0	0.0
3-甲基-2-氧代戊酸	5.3	0.0	0.0
4-甲基-2-氧代戊酸	39.0	1.4	1.1
草酰乙酸	0.0	33.1	23.1
2-氧代戊二酸	79.6	0.0	0.0
3-氟代丙酮酸	33.6	74.3	40.0

[0282] 已显示,可以将2-氧代酸转化为其酰基-CoA配对物(1.2.1)的氧化还原酶也接受多个底物。例如,支链2-酮-酸脱氢酶复合物(BCKAD)(也称为2-氧代异戊酸脱氢酶(1.2.1.25))参与支链氨基酸降解通路,将缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的2-酮酸衍生物转化为其酰基-CoA衍生物和CO₂。在一些生物(包括褐鼠(Paxton等人,Biochem.J.234:295-303(1986)) and 酿酒酵母(Sinclair等人,Biochem.Mol.Biol.Int.31:911-922(1993))中,该复合物已被显示具有广泛的底物范围,除支链氨基酸前体之外还包括直链氧代酸,如2-氧代丁酸和 α -酮戊二酸。

[0283] 已有报告称,又有另一等级的酶成员即转氨酶(2.6.1)对多个底物起作用。来自激烈热球菌的天冬氨酸转氨酶(aspAT)已被发现、表征于大肠杆菌并有重组蛋白质表征,以证明该酶对天冬氨酸和 α -酮戊二酸具有最高活性,但是对丙氨酸、谷氨酸和芳族氨基酸具有较低但显著的活性(Ward等人,Archaea.1:133-141(2002))。在另一情况下,有报告称一种从墨西哥利什曼原虫中发现的并表征于大肠杆菌中的转氨酶(Vernal等人,FEMS Microbiol.Lett.229:217-222(2003))具有广泛的底物特异性,分别为对酪氨酸(认为对酪

氨酸的活性100%)、对苯基丙氨酸(90%)、对色氨酸(85%)、对天冬氨酸(30%)、对亮氨酸(25%)以及对蛋氨酸(25%)(Vernal等人, *Mol. Biochem. Parasitol.* 96:83-92(1998))。已有报告称,虽然这两种酶的序列同源性仅为6%,来自克氏锥虫的酪氨酸转氨酶具有相似的广泛特异性。注意,后一种酶可以接受亮氨酸、蛋氨酸以及酪氨酸、苯基丙氨酸、色氨酸和丙氨酸作为高效氨基供体(Nowicki等人, *Biochim. Biophys. Acta* 1546:268-281(2001))。

[0284] 在这些例子中所述酶自然地具有广泛的底物特异性,与此形成对照的是,很多酶已通过利用定向进化进行修饰,以扩大其对于其非自然底物的特异性。替代地,酶的底物优选性也已通过利用定向进化进行改变。例如,已有报告称,来自绿脓假单胞菌的脂肪酶的对映选择性得到了显著的改善。这种酶以对(S)-酸有利的仅2%的对映体过量(ee)水解了对-硝基苯基2-甲基癸酸。然而,连续四轮易错诱变和筛选后,产生了以81% ee催化必不可少的反应的变体(Reetz等人, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 36:2830-2832(1997))。

[0285] 定向进化方法已经使得对酶进行修饰以对大量的非自然底物起作用成为可能。绿脓假单胞菌中的脂肪酶的底物特异性通过对活性位点附近的氨基酸残基随机化得到了扩大。这允许该酶接受 α -取代的羧基酯(Reetz等人, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 44:4192-4196(2005))。在另一成功的尝试中,采用了DNA改组,以产生大肠杆菌转氨酶,所述酶接受了对于野生型酶来说接受性很差的 β -支链底物(Yano等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95:5511-5515(1998))。具体而言,四轮改组结束时,天冬氨酸转氨酶对于缬氨酸和2-氧代缬氨酸的活性增加了五个数量级之多,而对于自然底物天冬氨酸的活性降低了30倍之多。最近,一种算法被用以设计逆醛醇酶(retro-aldolase),所述酶可用于催化非自然和非生物底物4-羟基-4-(6-甲氧基-2-萘基)-2-丁酮中的碳-碳键断裂。这些算法利用四个不同的催化motif的不同组合来设计新型酶以及用于实验表征的20个选定设计相比未催化的反应具有四倍的改善率(Jiang等人, *Science* 319:1387-1391(2008))。因此,这些工程方法不仅能够扩展酶可以起作用的底物阵列,而且能够允许设计和构建非常高效的酶。例如,有报告称,一种DNA改组方法(临时模板随机嵌合生长或RACHITT)产生一种设计的单加氧酶,所述酶具有改善的复合物底物脱硫率以及改善20倍的非自然底物转化速率(Coco等人, *Nat. Biotechnol.* 19:354-359(2001))。同样,迟缓突变磷酸丙糖异构酶的比活改善了1.3倍乃至19倍(Hermes等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 87:696-700(1990))。通过利用在蛋白质的整体长度之上的随机诱变完成了比活的增加以及该改善可以追溯至六个氨基酸残基中的突变。

[0286] 蛋白质工程方法在针对所需底物改变酶的底物特异性方面的有效性也已经得以证实。来自嗜热栖热菌的异丙基苹果酸脱氢酶通过改变靠近活性位点的残基得以修饰,以便其现在可以对作为底物的苹果酸和D-乳酸起作用(Fujita等人, *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 65:2695-2700(2001))。该研究以及其他研究中指出可以修饰一个或几个残基,以改变底物特异性。一个相关的实例是二氢黄酮醇4-还原酶,其单氨基酸在假定的底物-结合区域被改变以及其可以优先地还原二氢山奈酚(Johnson等人, *Plant J.* 25:325-333(2001))。来自大肠杆菌的非常特异性的异柠檬酸脱氢酶的底物特异性通过改变活性位点的一个残基从异柠檬酸改变为异丙基苹果酸(Doyle等人, *Biochemistry* 40:4234-4241(2001))。同样地, NAD^+ -依赖的1,5-羟基前列腺素脱氢酶的辅因子特异性通过改变N-末端附近的几个残基得以改变为 NADP^+ (Cho等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 419:139-146

(2003))。序列分析和分子建模分析被用以识别用于修饰的关键残基,其进一步通过定点诱变得到研究。

[0287] 通过DNA改组和筛选从大肠杆菌中的半乳糖苷酶进化得到岩藻糖苷酶(Zhang等人,Proc Natl Acad Sci US.A 94:4504-4509(1997))。同样,利用同源建模和定点诱变将来自大肠杆菌的天冬氨酸转氨酶转化为酪氨酸转氨酶(Onuffer等人.,Protein Sci.4:1750-1757(1995))。有报告称,来自恶臭假单胞菌的苯甲酰甲酸脱羧酶的活性位点中两个残基的定点诱变改变了对于自然和非自然底物的亲和性(K_m)(Siegert等人,Protein Eng Des Sel 18:345-357(2005))。来自酿酒酵母的细胞色素C过氧化物酶(CCP)经受定向分子进化,以生成针对传统的过氧化物酶底物愈创木酚具有增加的活性的突变体,从而将CCP的底物特异性从蛋白质细胞色素c改变为小的有机分子。三轮DNA改组和筛选后,分离相比针对自然底物,具有针对愈创木酚增加300倍活性以及对于这种底物增加达1000倍特异性的突变体(Iffland等人,Biochemistry 39:10790-10798(2000))。

[0288] 在某些情况下,已经获得具有不同于两亲本酶的底物优选性的酶。例如,通过改组来自两种细菌类产碱假单胞菌和洋葱伯克霍尔德菌的基因改善联苯-加双氧酶-介导的多氯联苯的降解(Kumamaru等人,Nat.Biotechnol 16,663-666(1998))。所得的嵌合联苯加氧酶显示了不同于两亲本酶的底物优选性以及提高了对于相关联苯化合物和单环芳烃(如甲苯和苯)的降解活性,所述联苯化合物和单环芳烃对酶来说最初是不良的底物。

[0289] 这不仅可能改变酶特异性,而且可能提高对于自然状态的酶对其具有低活性的那些底物的活性。一项研究证明,通过随机诱变可以显著地改善来自恶臭假单胞菌的(尤其对赖氨酸、精氨酸、丙氨酸、丝氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸、亮氨酸和组氨酸)具有广泛的底物特异性但是对色氨酸具有低活性的氨基酸消旋酶(Kino等人,Appl.Microbiol.Biotechnol.73:1299-1305(2007))。同样,牛BCKAD的活性位点被设计以支持替代性的底物乙酰基-CoA(Meng等人,Biochemistry 33:12879-12885(1994))。这些方法的一个有趣的方面是即使当已经用随机方法生成这些具有有效活性的突变酶时,可以确定赋予活性改善的确切的突变或结构改变。例如,在前述的研究中,促进改善对于色氨酸的活性的突变可以追溯到两个不同的位置。

[0290] 定向进化也已被用以表达难以表达的蛋白质。例如,通过使辣根过氧化物酶经受随机诱变和基因重组,可以提取活性是野生型14倍以上的突变体(Lin等人,Biotechnol.Prog.15:467-471(1999))。

[0291] 定向进化的最后一个例子以获得一系列的所需功能的广泛的修饰。使酶,即来自嗜热脂肪芽胞杆菌的乳酸脱氢酶经受了定点诱变,以及在被指出以确定对于不同的羟基酸的特异性的位点进行了三个氨基酸置换(Clarke等人,Biochem.Biophys.Res.Commun.148:15-23(1987))。这些突变之后,对草酰乙酸比对丙酮酸的特异性增加到500,与野生型酶对丙酮酸比对草酰乙酸的催化特异性1000形成对照。利用定点诱变进一步将该酶设计为具有针对支链取代的丙酮酸的活性(Wilks等人,Biochemistry 29:8587-8591(1990))。具体而言,该酶对于 α -酮异己酸的 K_{cat} 改善了55倍。在同一酶中进行三个结构修饰,以将其底物特异性从乳酸改至苹果酸。该酶对于苹果酸具有高活性和特异性(Wilks等人,Science 242:1541-1544(1988))。随后对来自嗜热脂肪芽胞杆菌的同一种酶进行设计,使其对带正电荷侧链的 α -酮酸(如包含铵基的那些)具有高催化活性(Hogan等人,Biochemistry 34:4225-

4230(1995))。在酶的102位置引入酸性氨基酸的突变体支持这种侧链铵基的结合。所得的结果证明该突变体显示了对于 ω -氨基- α -酮酸底物的 k_{cat}/K_m 值的高达25倍改善。这种酶还进行了结构修饰,以作为苯基乳酸脱氢酶而非作为乳酸脱氢酶起作用(Wilks等人, *Biochemistry* 31:7802-7806(1992))。将限制位点引入针对该酶的基因,这允许基因区域的切除。该区域编码多肽的移动表面环(残基98-110),其通常密封来自大量溶剂的活性位点液泡,而且是底物特异性的主要决定簇。可变的长度和序列环被插入切割基因并用以合成具有改变的底物特异性的羧基脱氢酶。在构建一个更长的环的情况下,对丙酮酸的活性被降低了一百万倍,但是对苯基丙酮酸的活性在很大程度上并未改变。获得了390,000倍的特异性(K_{cat}/K_m)转变。这种酶对于苯基丙酮酸与对于丙酮酸的1700:1选择性正是苯基乳酸脱氢酶所需要的。

[0292] 如上文所指出,定向进化是一种涉及引入靶向特异性基因的突变以改善和/或改变酶的特性的强有力的方法。可以通过开发和实施允许许多酶变体(如 $>10^4$)的自动筛选的敏感性高通量筛选测定确定改善和/或改变的酶。通常进行迭代轮的诱变和筛选,以使酶具有优化的特性。可有助于识别进行诱变的基因区域的计算算法也已经被开发并可以显著地减少需要生成和筛选的酶变体的数目。

[0293] 已经开发了大量的定向进化技术(参阅Hibbert,E.G.,F.Baganz,H.C.Hailes,J.M.Ward,G.J.Lye,J.M.Woodley,and P.A.Dalby,2005,Directed evolution of biocatalytic processes.*Biomol.Eng* 22:11-19;Huisman,G.W.和J.J.Lalonde,2007,Enzyme evolution for chemical process applications,p.717-742.In R.N.Patel (ed.),*Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries*.CRC Press;Otten,L.G.and W.J.Quax.2005.Directed evolution:selecting today's biocatalysts.*Biomol.Eng* 22:1-9;以及Sen,S.,D.Venkata,V,and B.Mandal,2007,Developments in directed evolution for improving enzyme functions.*Appl Biochem.Biotechnol* 143:212-223)以有效地创建多样化变体库并且这些方法已被成功地应用于许多酶等级范围内各种特性的改善。

[0294] 通过定向进化技术改善和/或改变的酶特性包括,例如选择性/特异性-针对非自然底物的转化;温度稳定性-针对鲁棒高温处理;pH值稳定性-针对较低或较高pH值条件下的生物工艺;底物或产物容忍性(tolerance)-以便可以实现高产物滴度;结合性(K_m)-扩大底物结合以包括非自然底物;抑制性(K_i)-以通过产物、底物或关键的中间体去除抑制;活性(k_{cat})-提高酶催反应速率,以获得所需通量;表达水平-增加蛋白质收率和整个通路通量;氧稳定性-针对在有氧条件下空气敏感性酶的操作;以及厌氧活性-针对缺氧条件下需氧酶的操作。

[0295] 下文示例性的方法已经开发用于基因的诱变和多样化以靶向特异性酶的所需特性。这些方法的任何一种都可用以改变/优化脱羧酶的活性。

[0296] EpPCR(Pritchard,L.,D.Corne,D.Keil,J.Rowland以及M.Winson,2005,A general model of error-prone PCR.*J Theor.Biol* 234:497-509.)通过添加 Mn^{2+} 离子降低PCR反应中DNA聚合酶的保真度、通过加偏压于dNTP浓度或通过其他条件性的改变引入随机点突变。将诱变局限于相关靶基因的五步骤克隆过程涉及:1)相关基因的易错PCR扩增;2)限制酶切;3)所需DNA片段的凝胶纯化;4)连接入载体;5)基因变体至合适的宿主的转化

以及为改善效能进行的库筛选。该方法可以同时单个基因中产生多个必定有用的突变。通过epPCR可以生成大量的突变体,因此高通量筛选测定或选择方法(特别是利用机器人)对于识别那些具有所需特性的突变体是有用的。

[0297] 易错滚环扩增(epRCA)(Fujii,R.,M.kitaoka和K.Hayashi,2004,One-step random mutagenesis by error-prone rolling circle amplification.Nucleic Acids Res 32:e145;以及Fujii,R.,M.kitaoka和K.Hayashi,2006,Error-prone rolling circle amplification:the simplest random mutagenesis protocol.Nat.Protoc.1:2493-2497)具有许多与epPCR相同的要素,除了整个环状质粒被用作模板以及在最后2个核苷酸上具有核酸外切酶抗性硫代磷酸酯键的随机6-引物被用以扩增该质粒,接着转化至细胞,在那里该质粒以串联反复被再环化。调整Mn²⁺浓度可以稍微改变突变率。该技术利用一种简易的易错、单步骤方法以3-4突变/kbp创建质粒的完整副本。无需限制酶消化或特异性引物。此外,该方法通常以试剂盒的形式被利用。

[0298] DNA或家族改组(Stemmer,W.P.1994,DNA shuffling by random fragmentation and reassembly:in vitro recombination for molecular evolution.Proc Natl Acad Sci U S.A 91:10747-10751;以及Stemmer,W.P.1994.Rapid evolution of a protein in vitro by DNA shuffling.Nature 370:389-391)通常涉及以核酸酶(如脱氧核糖核酸酶I或核酸内切酶V)消化2种或2种以上的变体基因,以生成随机片段池,所述随机片段在DNA聚合酶的存在下通过退火和扩展循环进行重装,以创建嵌合基因库。片段相互作为引物以及当一个副本作为另一副本的引物(模板切换)时发生重组。该方法可以与>1kbp的DNA序列一起使用。除了片段重装(fragment reassembly)创建的突变重组,该方法以与易错PCR类似的速率在扩展步骤引入点突变。该方法可用以去除可能带来抗原性的有害的随机中性突变。

[0299] 交错延伸(StEP)(Zhao,H.,L.Giver,Z.Shao,J.A.Affholter和F.H.Arnold,1998,Molecular evolution by staggered extension process(StEP)in vitro recombination.Nat.Biotechnol 16:258-261.)必伴有模板引物,接着是以变性和持续非常短(短似5秒)的退火/延伸进行的2步PCR的重复循环。成长的片段退火至不同的模板并进一步延伸,这被重复直至形成完整长度的序列。模板切换意味着多数所得的片段具有多个亲本。低保真度聚合酶(Taq和Mutazyme)的组合由于相反的突变谱减少易错偏差。

[0300] 在随机引物重组(RPR)中,随机序列引物被用以生成许多与不同的模板段互补的短DNA片段(Shao,Z.,H.Zhao,L.Giver和F.H.Arnold,1998,Random-priming in vitro recombination:an effective tool for directed evolution.Nucleic Acids Res 26:681-683.)通过epPCR的碱的错误掺入和错引物(mispriming)带来点突变。基于同源性,短的DNA片段相互作为引物以及通过重复热循环被重组并重装成完整长度。该步骤之前的模板去除保证了低亲本重组。与多数其他方法类似,该方法进行多重迭代,以逐步得到不同的特性。该技术避免了序列偏差,不依赖于基因长度并且施用需要亲本DNA少之又少。

[0301] 在异源双链重组中,线性质粒DNA被用以形成通过错配修复得以修复的异源双链(Volkov,A.A.,Z.Shao和F.H.Arnold.1999.Recombination and chimeragenesis by in vitro heteroduplex formation and in vivo repair.Nucleic Acids Res 27:e18;以及Volkov,A.A.,Z.Shao和F.H.Arnold.2000.Random chimeragenesis by heteroduplex

recombination. *Methods Enzymol.* 328:456-463) 错配修复步骤至少是有点诱变的。异源双链的转化比线性同源双链较为高效。这种方法适于大基因和整体操纵子。

[0302] 临时模板随机嵌合生长(RACHITT)(Coco, W.M., W.E. Levinson, M.J. Crist, H.J. Hektor, A. Darzins, P.T. Pienkos, C.H. Squires 和 D.J. Monticello, 2001, DNA shuffling method for generating highly recombined genes and evolved enzymes. *Nat. Biotechnol.* 19:354-359) 采用单链DNA的脱氧核糖核酸酶I断裂和大小分级。在缺少聚合酶的条件下将同源片段杂交至互补单链DNA支架。通过外核酸酶修整任何重叠的未杂交片段端。填充片段之间的空隙, 然后连接以提供完整长度的多样化链池, 所述链杂交至所述支架(其包含U以阻止扩增)。然后破坏所述支架并通过PCR扩增取代以与所述多样化链互补的新链。该方法涉及仅来自一个亲本的一个链(支架)而引物片段则来自其他基因; 相对选择亲本支架。因此, 不会有亲本片段的重退火发生。用核酸外切酶修整重叠的片段。在其他方面, 这类似于DNA改组和StEP。因此, 应该没有亲子(sibling)、几乎没有灭活物以及没有未改组的亲本。这项技术的优势在于几乎没有或没有亲本基因产生以及相对于标准的DNA改组可以产生许多更多的交叉(crossover)。

[0303] 截短状模板重组延伸(RETT)必伴有在单向单链DNA片段作为模板池的存在下自引物单向生长的链的模板切换(Lee, S.H., E.J. Ryu, M.J. Kang, E.-S. Wang, Z.C.Y. Piao, K.J.J. Jung 和 Y. Shin, 2003, A new approach to directed gene evolution by recombined extension on truncated templates(RETT). *J. Molecular Catalysis* 26:119-129.) 不使用DNA核酸内切酶。通过带有随机引物的DNA聚合酶或利用核酸外切酶的连续删除(serial deletion)生成单向单链DNA。单向单链DNA仅仅是模板而非引物。随机引物和核酸外切酶不引入如同DNA改组/RACHITT的酶催断裂的序列偏差。RETT的优化可以比StEP更容易, 因为其利用正常的PCR条件而非非常短的扩展。重组作为PCR步骤的部分发生一无直接改组。这种方法由于无停顿也可以比StEP更随机。

[0304] 在简并寡核苷酸基因改组(DOGS)中, 简并引物被用以控制分子之间的重组(Bergquist, P.L. 和 M.D. Gibbs, 2007, Degenerate oligonucleotide gene shuffling. *Methods Mol. Biol.* 352:191-204; Bergquist, P.L., R.A. Reeves 和 M.D. Gibbs, 2005, Degenerate oligonucleotide gene shuffling(DOGS) and random drift mutagenesis(RNDM): two complementary techniques for enzyme evolution. *Biomol. Eng.* 22:63-72; Gibbs, M.D., K.M. Nevalainen 和 P.L. Bergquist, 2001, Degenerate oligonucleotide gene shuffling(DOGS): a method for enhancing the frequency of recombination with family shuffling. *Gene* 271:13-20), 这可用以控制其他方法(如DNA改组)再简并亲本基因的趋势。这种方法可以结合选择基因区段的随机诱变(epPCR)。这会是一个良好的阻碍亲本序列再形成的方法。不需要核酸内切酶。通过调整所得区段的输入浓度, 可以偏向所需的骨架。这种方法允许自不相关亲本的DNA改组, 而无限制酶消化并允许选择随机诱变方法。

[0305] 渐进式切割产生杂合酶(ITCHY)创建带有相关基因或基因片段的1碱基对删除的组合库。(Ostermeier等人, *Proc Natl Acad Sci US.A.* 96:3562-3567(1999); Ostermeier等人, 1999 *Nat. Biotechnol.* 17:1205-1209(1999)以相反的方向将切割物引入至2个不同的基因片上。将这些连接在一起并克隆融合。该技术不需要2个亲本基因之间的同源性。当

ITCHY结合DNA改组时,该系统被称为SCRATCHY(见下文)。两者主要的优势是无需亲本基因之间的同源性;例如,通过ITCHY创建大肠杆菌和人基因之间的功能融合。当ITCHY文库形成,捕捉所有可能的交换。

[0306] 除了硫代磷酸dNTP被用以产生切割物,硫代渐进式切割产生杂合酶(THIO-ITCHY)几乎与ITCHY相同。(Lutz,S.,M.Ostermeier和S.J.Benkovic,2001,Rapid generation of incremental truncation libraries for protein engineering using alpha-phosphothioate nucleotides.Nucleic Acids Res 29:E16.)相比于ITCHY,THIO-ITCHY可以更易优化、提供更多的再现性和可调性。

[0307] 结合DNA改组的SCRATCHY-ITCHY是DNA改组和ITCHY的组合;因此,允许多个交叉(Lutz等人,Proc Natl Acad Sci U S.A.98:11248-11253(2001))。SCRATCHY兼具ITCHY和DNA改组的最好特性。计算预测法可以在优化中使用。当序列一致性低于80%时,SCRATCHY比DNA改组更有效。

[0308] 在随机漂变诱变(RNDM)中,通过epPCR进行突变,接着对保留有用活性的那些进行筛选/选择(Bergquist等人,Biomol.Eng.22:63-72(2005))。然后,这些被用于DOGS,以产生具有多个活性突变体之间或活性突变体和其他一些所需的亲本之间的融合的重组体。设计以促进中性突变的隔离;其目的是对保留的催化活性进行这种活性是高于还是低于原始基因中的活性的筛选。当筛选能够检测背景(background)上的活性时,RNDM在高通量测定中是有用的。在产生多样性方面,RNDM已被用作DOGS的前端。该技术提出改组或其他后续步骤之前的活性要求;中性漂变文库被指出相比更小的文库产生更高/更快的活性改善。虽然公布利用epPCR,这可应用于其他大规模诱变方法。

[0309] 序列饱和诱变(SeSaM)是一种随机诱变方法,该方法:1)利用硫代磷酸核苷酸的随机掺入和断裂生成随机长度片段池;该池被用作模板,以2)在“通用”碱(如肌苷)的存在下延伸;3)包含肌苷的补体的复制提供随机碱掺入以及因此提供诱变(Wong等人,Biotechnol J.3:74-82(2008);Wong Nucleic Acids Res 32:e26;Wong等人,Anal.Biochem.341:187-189(2005))。利用这种技术,采用简易的方法在2-3天内产生突变体大型文库是可能的。较之于DNA聚合酶的突变偏向,这是非常不定向的。这种方法的差异使得该技术是epPCR的补充(或者替代性选择)。

[0310] 在合成改组中,重叠的寡核苷酸被设计以编码“靶中所有的遗传多样性”并允许改组的后代有非常高的多样性(Ness,等人,Nat.Biotechnol 20:1251-1255(2002))。在这种技术中,可以将片段设计为被改组。这有助于提高后代所得的多样性。可以设计序列/密码子偏差,以使得更远缘的相关序列以接近更密切相关的序列的速率重组以及不需要物质上占有模板基因。

[0311] 核苷酸交换和切除技术(NexT)利用dUTP掺入组合,继之以用尿嘧啶DNA糖基化酶然后哌啶进行处理,以执行端点DNA断裂(Muller等人,Nucleic Acids Res 33:e117(2005))。利用内部PCR引物扩展以校正聚合酶重装基因。利用变化的dUPT::dTTP比率,改组的大小是直接可控的。这种是一种利用尿嘧啶掺入和断裂的简易方法的端点反应。对于这种方法,可以使用其他的核苷酸类似物,如8-氧代-鸟嘌呤。此外,该技术对于非常短的片段(86bp)效果良好并具有低的出错率。DNA的化学断裂意味着几乎没有未改组的克隆。

[0312] 在不依赖序列同源性的蛋白质重组(SHIPREC)中,接头被用以促进2个远缘/不相

关的基因之间的融合;核酸酶处理被用以在这两个之间产生一系列嵌合体。结果是这些融合的单交叉文库(Sieber, V., C.A. Martinez和F.H. Arnold, 2001, Libraries of hybrid proteins from distantly related sequences. *Nat. Biotechnol* 19:456-460)。这产生有限类型的改组;诱变是一个单独的过程。这项技术可以用2个不相关的亲本基因的每个的变化分数创建嵌合体文库。不需要同源性。通过细菌CP450的血红素结合区域融合至哺乳动物CP450的N末端区域对SHIPREC进行了测试;这在更具可溶性的酶中产生了哺乳动物活性。

[0313] 在基因位点饱和诱变(GSSM)中,起始材料是在所需的突变位点具有插入和2个引物简并的超螺旋双链DNA质粒(Kretz, K.A., T.H. Richardson, K.A. Gray, D.E. Robertson, X. Tan和J.M. Short, 2004, Gene site saturation mutagenesis: a comprehensive mutagenesis approach. *Methods Enzymol.* 388:3-11)。引物为DNA相对链上的相同序列带来相关突变和退火;引物中间的突变以及每边上正确序列侧翼的~20核苷酸。引物中的序列是NNN或NNK(编码)和MNN(未编码)(N=全部4, K=G, T, M=A, C)。延伸后, DpnI被用以消化dam-甲基化DNA, 以消除野生型模板。这项技术探索了给定位点(即一个密码子)的所有可能的氨基酸替代。该技术便于产生一个没有无意义密码子的位点上所有可能的取代以及最可能的等位基因的相等或近乎相等的表现。不需要靶酶的结构、作用机理或区域的现有知识。如果随后是改组或基因重装, 这项技术创建包含所有可能的组合的单位点向上突变的重组体的多样化文库。这项技术组合的实用性已被证明用于超过50个不同的酶的成功进化以及用于给定酶中一个以上的特性。

[0314] 组合式盒式诱变(CCM)涉及短寡核苷酸盒以大量可能的氨基酸序列改变取代有限区域的用途(Reidhaar-Olson, J.F., J.U. Bowie, R.M. Breyer, J.C. Hu, K.L. Knight, W.A. Lim, M.C. Mossing, D.A. Parsell, K.R. Shoemaker和R.T. Sauer, 1991, Random mutagenesis of protein sequences using oligonucleotide cassettes. *Methods Enzymol.* 208:564-586; and Reidhaar-Olson, J.F. and R.T. Sauer, 1988, Combinatorial cassette mutagenesis as a probe of the informational content of protein sequences. *Science* 241:53-57)。利用这项技术在2或3个位点进行同时替代是可能的。此外, 该方法测试有限范围的位点上大量可能的序列改变。其已被用于探索 λ 抑制子DNA结合区域的信息内容。

[0315] 组合式多重盒式诱变(CMCM)在本质上与CCM相似, 除了其被作为更大方案的部分所采用: 1)以高突变速率使用epPCR, 以2)确认热点和热区域, 然后3)通过CMCM延伸, 以覆盖蛋白质序列空间的限定区域(Reetz, M.T., S. Wilensek, D. Zha和K.E. Jaeger, 2001, Directed Evolution of an 对映selective Enzyme through Combinatorial Multiple-Cassette Mutagenesis. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 40:3589-3591)。与CCM一样, 这种技术实际上可以测试靶区域上所有可能的改变。如果与产生随机突变和改组基因的方法一起使用, 其提供一种极好的生成多样的、改组的蛋白质的手段。这种方法成功地将酶的对映选择性提高了51倍。

[0316] 在致突变菌株技术中, 附条件的ts致突变质粒允许选择期间随机和自然突变频率增加20-到4000-X以及当无需选择时, 允许阻碍有害突变的堆积(Selifonova, O., F. Valle和V. Schellenberger, 2001, Rapid evolution of novel traits in microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 67:3645-3649)。这项技术基于质粒衍生mutD5

基因,其编码DNA聚合酶III的突变亚基。该亚基结合至内源性DNA聚合酶III并危害任何包含该质粒的菌株中聚合酶III的校正能力。范围广泛的碱替代和移码突变发生。为了有效地使用,一旦实现所需的显型,该致突变质粒应被去除;其通过复制的温度敏感性起点完成,这允许在41℃下消除质粒。应注意的是,致突变菌株已得到长时间的探究(如,参见Winter及同事,1996,J.Mol Biol.260,359-3680.)在这项技术中,观察到非常高的自发突变速率。附条件的特性使非所需的本底突变最小化。这项技术可以结合适应性进化,以提高诱变速率并更迅速地获得所需的显型。

[0317] “精确诱变(LTM)是一种评估和优化选择氨基酸的组合突变的多维诱变方法”(Rajpal,A.,N.Beyaz,L.Haber,G.Cappuccilli,H.Yee,R.R.Bhatt,T.Takeuchi,R.A.Lerner和R.Crea,2005,A general method for greatly improving the affinity of antibodies by using combinatorial libraries.Proc Natl Acad Sci U S.A 102:8466-8471)不是用所有可能的氨基酸改变使每个位点饱和,而是选择一组9个以覆盖氨基酸R基化学品的范围。每个位点的较少改变允许多个位点遭受这种类型的诱变。已通过这种方法实现针对抗体的从低纳摩尔到皮可摩尔的结合亲和性的>800倍增加。这是一种合理的最小化随机组合数目的方法以及这会通过极大地减少待筛选克隆的数目提高发现改善的性状的能力。这已被用于抗体工程,尤其是提高结合亲和性和/或减少解离。该技术可以结合筛选或选择。

[0318] 基因重装是一种DNA改组方法,该方法可以一次应用于多个基因或应用于创建单基因的大型嵌合体(多重突变)文库(见网址 www.verenium.com/Pages/Technology/EnzymeTech/TechEnzyTGR.html)。通常这项技术与超高通量的筛选结合使用,以质询用于所需改善的所表示的序列空间。这项技术允许不依赖于同源性的多个基因重组。可以利用通过生物信息学分析设计的片段预先确定交叉事件的确切数目和位置。这项技术导致非常高水平的多样性而实际上无亲本基因再形成以及低水平的灭活基因。与GSSM结合,可以对大范围的突变进行改善活性测试。该方法允许DNA改组的“混合”和“微调”,例如可以优化密码子用法。

[0319] 计算机模拟的蛋白质设计自动化PDA是一种优化算法,所述算法固定具有特定折叠子的结构上限定的蛋白质骨架,以及为可以稳固该折叠子和整个蛋白质能量的氨基酸替代寻找序列空间(Hayes,R.J.,J.Bentzien,M.L.Ary,M.Y.Hwang,J.M.Jacinto,J.Vielmetter,A.Kundu和B.I.Dahiyat,2002,Combining computational and experimental screening for rapid optimization of protein properties.Proc Natl Acad Sci U S.A 99:15926-15931)。这项技术允许计算机模拟的基于结构的熵预测,以便寻求对于蛋白质氨基酸变化的结构容忍性。统计力学被用以计算每个位置上的耦合相互作用-对于氨基酸替代的结构容忍性是耦合的量度。最后,这项技术被设计以取得蛋白质特性的所需修饰同时保持结构特性的完整性。该方法计算地评估并允许非常大量的可能的序列变体(10^{50})的过滤。待测序列变体的选择与基于最适合的热力学预测相关以及明显地,只有稳定性或与稳定性相联系的特性可以用这项技术有效地解决。该方法已被成功地用于一些医用蛋白质,特别用于工程免疫球蛋白。计算机模拟的预测避免测试异常大量的潜在变体。基于现有三维结构的预测比基于假拟结构的预测更有可能成功。这项技术可以很容易地预测和允许多重同时突变的靶向筛选,由于数目的指数增加这在简单的实验技术是不可

能的事情。

[0320] 迭代饱和和诱变(ISM)涉及1)利用结构/功能的知识选择用于酶改善的适当的位点。2)利用Stratagene QuikChange(或其他合适的手段)在选定的位点进行饱和和诱变。3)筛选/选择所需的特性。4)在改善克隆条件下,在另一位点重新开始并持续重复(Reetz, M.T.和J.D.Carballeira, 2007, Iterative saturation mutagenesis (ISM) for rapid directed evolution of functional enzymes. Nat. Protoc. 2: 891-903; 以及Reetz, M.T., J.D.Carballeira和A.Vogel, 2006, Iterative saturation mutagenesis on the basis of B factors as a strategy for increasing protein thermostability. Angew. Chem. Int. Ed Engl. 45: 7745-7751)。这是一种被证明的操作法,确保在给定位置所有可能的取代有助于筛选/选择。

[0321] 前述的用于诱变的任何方法可以单独或以任何组合使用。此外,所述定向进化方法的任何一个或组合可以结合适应性进化技术使用。

[0322] 为生成更好的生产者,可以利用代谢建模优化培育条件。建模还可被用以设计另外优化通路应用的基因敲除(参见,例如美国专利公布US 2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US 2003/0059792、US 2002/0168654和US 2004/0009466以及美国专利号7,127,379)。建模分析允许对偏移代谢对细胞生长的影响进行可靠的预测,以便更高效地生产1,3-丁二醇。

[0323] 一种用于识别和设计支持所需产品的生物合成的代谢改变的计算方法OptKnock计算框架(Burgard等人, Biotechnol. Bioeng. 84: 647-657 (2003))。OptKnock是一种代谢建模和模拟程序,该程序提出基因删除策略,其产生从基因方面来说稳定的微生物,该微生物超过定额地生产靶产品。具体而言,该框架检查微生物的完整的代谢和/或生化网络,以便提出迫使所需的生化品变为细胞生长的专性副产品的基因操作。通过战略性放置的基因缺失或其他功能基因中断把生化生产与细胞生长耦合起来,在生物反应器中长时间之后,施加至设计菌株的生长选择压力由于结合强制性生长的生化生产引起效能改善。最后,当基因缺失被构建时,由于OptKnock选择的基因将从基因组完全去除,设计菌株回复到其野生型状态的可能性可以忽略不计。因此,该计算方法可用以识别导致所需产品生物合成的替代性通路或与所述非天然存在的微生物结合用于所需产品生物合成的进一步优化。

[0324] 简言之,术语OptKnock在本文用以指用于建模细胞代谢的计算方法和系统。OptKnock方案涉及将具体的约束因素引入通量平衡分析(FBA)模型的模型和方法的框架。这些约束因素包括,例如定性动力信息、定性调节信息和/或DNA微阵列实验数据。OptKnock还通过,例如收紧通过通量平衡模型导出的通量边界以及随后在基因添加或删除的存在下探测代谢网络的效能极限来计算各种代谢问题的解。OptKnock计算框架允许使代谢网络的效能极限的有效质询可行的模型表述的构建以及提供用于解决引起的混合整数线性规划问题的方法。本文称为OptKnock的代谢建模和模拟方法的描述见于,例如U.S. 2002/0168654、WO 2002/055995和U.S. 2009/0047719。

[0325] 另一种用于识别和设计支持产品的生物合成生产的代谢改变的计算方法是一种代谢建模和模拟系统,称为SimPheny[®]。该计算方法和系统的描述见于,例如2002年6月14日提交的U.S. 2003/0233218以及见于WO/2003/106998。SimPheny[®]是一种计算系统,该系

统可用以产生计算机模拟的网络模型并用以通过生物系统的化学反应模拟质量、能量或电荷的通量,以限定包含该系统中化学反应的任何以及所有可能的函数的解空间,从而确定一系列该生物系统的允许的活性。这种方法称为基于约束因素的建模,因为该解空间由约束因素限定,如所包含的反应的已知的化学计量以及通过反应与最大通量关联的反应热动力和能力约束因素。可以询问这些约束因素限定的空间,以确定该生物系统或其生化部件的显型能力和行为。

[0326] 这些计算方法与生物现实一致,因为生物系统具有灵活性并可以许多不同的方式达到相同的结果。生物系统已经通过由所有生物系统必须面对的基本的约束因素限制的进化机制加以设计。因此,基于约束因素的建模策略包括这些一般现实。进一步,通过约束因素收紧向网络模型连续施加进一步的限制的能力导致解空间的尺寸变小,从而提升生理效能或显型可预测的精确性。

[0327] 考虑到本文提供的教诲和指导,本领域的技术人员将能够应用于代谢模型和模拟的各种计算框架以在宿主微生物中设计和实施所需化合物的生物合成。这种代谢建模和模拟方法包括,例如上文示范为SimPheny[®]和OptKnock的计算系统。为了说明本发明,本文描述一些关于用于建模和模拟的OptKnock计算框架的方法。本领域的技术人员会了解如何利用OptKnock 将代谢改变的识别、设计和实施应用于为本领域所熟知的任何这类其他代谢模型和模拟计算框架和方法。

[0328] 上文描述的方法将提供待中断的一组代谢反应。该组或代谢修饰内每个反应的消除可以在生物的培育期期间产生作为专性产品的所需产品。由于反应已知,双层OptKnock问题的解也将提供编码一种或多种催化该组反应内每个反应的酶的有关基因。一组反应及其相应的编码参与每个反应的酶的基因的认识通常是自动化过程,通过将反应与具有酶和编码基因之间的关系的关系的反应数据库相关联得以完成。

[0329] 一旦确定,通过至少一个编码该组反应内每个代谢反应的基因的功能中断在靶细胞或生物内实施该组反应,该组反应待中断以便实现所需产品的生产。一种实现该反应组的功能中断的特别有用的手段是通过删除每个编码基因。然而,在某些情况下,通过其他的遗传畸变(包括,例如调节区域如启动子或针对调节因子的顺式结合位点的突变、删除或者通过大量位置的任意处编码序列的截断)中断该反应可能是有利的。这些导致基因组不完全删除的后者畸变可能是有用的,例如,当需要产物耦合的快速评估或当不太可能发生遗传回复变异时。

[0330] 为识别上文描述的导致进一步的中断反应组或可以导致生物合成(包括所需产品的生长耦合的生物合成)的代谢修饰的双层OptKnock问题的其他的富有成效的解,可以实施一种优化方法,称为整数切割。该方法通过在每次迭代时纳入被称为整数切割的另一约束因素迭代地解决上文示例性的OptKnock问题而进行下去。整数切割约束因素有效地阻止解程序选择在任何先前的强制耦合产品生物合成至生长的迭代中确定的恰好相同的反应组。例如,如果先前确定的耦合生长的代谢修饰指定反应1、2和3进行中断,则接下来的约束因素阻止相同的反应被同时考虑在后续解中。该整数切割方法为本领域所熟知以及可以发现其被描述于,例如Burgard等人,Biotechnol.Prog.17:791-797(2001)。与本文关于其结合用于代谢模型和模拟的OptKnock计算框架的用途所述的所有方法一样,减少迭代计算分析中的冗余的整数切割方法还可以与本领域所熟知的其他计算框架(包括,例如

SimPheny®)一起应用。

[0331] 本文示例性的方法允许生物合成地生产所需产品的细胞和生物的构建,包括靶生化产品的生产与被设计包括所识别的基因改变的细胞或生物生长的强制耦合。因此,本文所述的计算方法允许通过选自OptKnock或 SimPheny®的计算机模拟方法识别的代谢修饰的识别和实施。代谢修饰组可包括,例如一种或多种生物合成通路酶的添加和/或一种或多种代谢反应的功能中断(包括,例如通过基因删除中断)。

[0332] 如上文所讨论,该OptKnock方法的开发前提是当遭受长期的生长选择时突变微生物网络可以朝向其计算地预测最大生长显型进化。换言之,该方法利用生物在选择性压力下的自优化能力。该OptKnock框架允许有基于网络化学计量强迫形成生化生产和细胞生长之间的耦合的基因删除组合的穷尽枚举(exhaustive enumeration)。最佳基因/反应敲除的确认需要双层优化问题的解,所述解选择活性反应组以便所得网络的最佳生长解超过定额地生产相关生化品(Burgard等人,Biotechnol.Bioeng.84:647-657(2003))。

[0333] 大肠杆菌代谢的计算机模拟化学计量模型可用以识别代谢通路必需的基因,如先前示范和描述,见于,例如美国专利公布US 2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US 2003/0059792、US 2002/0168654和US 2004/0009466以及见于美国专利号7,127,379。如本文所披露,OptKnock数学框架可用以精确地定位基因删除,导致所需产品的耦合生长的生产。进一步地,双层OptKnock问题的解仅提供一组删除。要枚举所有有意义的解,即导致耦合生长的生产的形成的所有敲除组,可以实施优化技术,称为整数切割。这必伴有通过在每次迭代时纳入被称为整数切割的另一约束因素迭代地解决该OptKnock问题。

[0334] 应理解的是,本质上不影响本发明各种实施方式的效能的修改也包含在本文提供的本发明的定义中。因此,下文的实施例旨在说明而非限制本发明。

[0335] 实施例I

[0336] 通过丙氨酸的1,3-丁二醇合成

[0337] 本实施例描述了能够利用图1的丙氨酸通路经由步骤A、B、C、D和H生产1,3-丁二醇的微生物的生成。

[0338] 大肠杆菌被用作靶生物以设计1,3-丁二醇-生产通路,如图1所示。大肠杆菌提供用于生成能够生产1,3-丁二醇的非天然存在的微生物的良好的宿主。大肠杆菌适宜于遗传操纵以及已知能够在厌氧或微氧条件下有效地生产各种产品,像乙醇、乙酸、甲酸、乳酸和琥珀酸。

[0339] 为生成设计以生产1,3-丁二醇的大肠杆菌,利用熟知的分子生物技术在大肠杆菌中表达编码如先前所描述在丙氨酸通路中所用的酶的核酸(参见,例如Sambrook,同上,2001;Ausubel同上,1999;Roberts等人,同上,1989)。

[0340] 具体地,分别编码AKP硫解酶、AKP转氨酶和2,4-二氧代戊酸脱羧酶活性的ortA(YP_001086914.1)、ortB(YP_001086915.1)、dat(P19938)和pdc(P06672)基因被克隆进入PA1/lacO启动子下的pZE13载体(德国Ruelzheim的Expressys)。此外,分别编码3-氧代丁醛还原酶(醛还原)和A-羟基,2-丁酮还原酶的yqhD(NP_417484.1)和adh(AAA23199.2)基因被克隆进入PA1/lacO启动子下的pZA33载体(德国Ruelzheim的Expressys)。这两组质粒被转化进入大肠杆菌菌株MG1655,以表达经由丙氨酸通路的1,3-丁二醇合成所需的蛋白质和

酶。注意,大肠杆菌具有形成D-丙氨酸的能力。

[0341] 遵循本领域所熟知的程序在包含葡萄糖的培养基中培养所得的遗传工程生物(参见,例如Sambrook等人,同上,2001)。利用本领域所熟知的用于确定多肽表达或酶催活性的方法(包括,例如北方吸印技术、mRNA的PCR扩增、免疫印迹法)巩固丙氨酸通路基因的表达。利用对个体活性具有特异性的测定法确定被表达酶的酶催活性。利用HPLC、气相色谱-质谱法(GCMS)或液相色谱-质谱法(LCMS)确定被设计的大肠杆菌菌株生产1,3-丁二醇的能力。

[0342] 通过优化功能性的1,3-丁二醇合成通路的高效利用进一步增强被设计以具有该通路的微生物菌株。简言之,对该被设计的菌株进行评定以确定任何外源性基因是否以速率受限水平进行表达。针对以低水平表达的可以通过,例如引入额外的基因副本数目限制通过该通路的通量的任意酶进行表达增加。

[0343] 为生成更好的生产者,可以利用代谢建模优化培育条件。建模还被用以设计另外优化通路应用的基因敲除(参见,例如美国专利公布US 2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US 2003/0059792、US 2002/0168654和US 2004/0009466以及参见美国专利号7,127,379)。建模分析允许对偏移代谢对细胞生长的影响进行可靠的预测,以便更高效地生产1,3-丁二醇。一个建模方法是双层优化方法OptKnock(Burgard等人,Biotechnol.Bioengineer.84:647-657(2003)),其被用以选择共同地导致1,3-丁二醇的更好生产的基因敲除。适应性进化还可用以生成,例如丙氨酸或2-氨基-4-氧代戊酸中间体或1,3-丁二醇产品的更好的生产者。执行适应性进化,以改善生长和生产特性(Fong和Palsson,Nat.Genet.36:1056-1058(2004);Alper等人,Science 314:1565-1568(2006))。基于结果,后续几轮的建模、基因工程和适应性进化可应用于1,3-丁二醇生产者,以进一步增加生产。

[0344] 为了大规模生产1,3-丁二醇,利用本领域已知的培养基在发酵罐中培养上文的包含丙氨酸通路的生物以支持厌氧条件下生物的生长。以分批、补料分批或连续的方式进行发酵。通过首先用氮喷射该培养基,然后密封培养器皿(如可以用垫片和钳口盖密封烧瓶)保持厌氧条件。也可以通过提供小孔进行有限通气来采用微氧条件。通过添加酸(如H₂SO₄)保持该培养基的pH值为pH值7。通过利用分光光度计(600nm)测量光密度确定生长速率,以及通过监测随着时间的推移碳源的消耗确定葡萄糖摄取速率。可以利用针对葡萄糖和醇的折光率检测器以及针对有机酸的紫外检测器通过带有HPX-087柱(BioRad)的HPLC(Shimadzu)对副产物(如不想要的醇、有机酸以及残余葡萄糖)进行定量,Lin等人,Biotechnol.Bioeng.,775-779(2005)。

[0345] 实施例II

[0346] 利用乙酰乙酰基-CoA作为中间体的1,3-BDO合成

[0347] 本实施例描述了能够利用乙酰乙酰基-CoA作为前体生产1,3-丁二醇(图2步骤G、H和I)的微生物的生成。

[0348] 大肠杆菌被用作靶生物以设计图2中通过步骤G(乙酰乙酰基-CoA至3-羟基丁酰-CoA的转化)、H(3-羟基丁酰-CoA至3-羟基丁醛的转化)和I(3-羟基丁醛至1,3-丁二醇的转化)的通路。大肠杆菌提供用于生成能够生产1,3-丁二醇的非天然存在的微生物的良好的宿主。大肠杆菌适宜于遗传操纵以及已知能够在厌氧或微氧条件下有效地生产各种产品,像乙醇、乙酸、甲酸、乳酸和琥珀酸。

[0349] 为生成设计以生产1,3-丁二醇的大肠杆菌,利用熟知的分子生物技术在大肠杆菌中表达编码如先前所描述在披露的通路(步骤G、H和I)中所用的酶的核酸(参见,例如 Sambrook,同上,2001;Ausubel同上,1999;Roberts等人,同上,1989)。注意,大肠杆菌具有由atoB(登记号:NP_416728.1)编码的缩合乙酰-CoA的两个分子以形成乙酰乙酰基-CoA的天然硫解酶。

[0350] 进一步地,编码乙酰乙酰基-CoA还原酶(酮还原)的hbd(NP_349314.1)被克隆进入PA1/lacO启动子下的pZE13载体(德国Ruelzheim的Expressys)。该质粒被转化进入大肠杆菌菌株MG1655,以表达经由乙酰乙酰基-CoA的3-羟基丁酰-CoA形成所需的酶。将3-羟基丁酰-CoA转化为3-羟基丁醛的醛脱氢酶(选自下文表A)以及进一步将3-羟基丁醛还原为1,3-BDO的醇脱氢酶(选自下文表B)也被克隆进入PA1/lacO启动子下的pZE13载体。

[0351] 遵循本领域所熟知的程序在包含葡萄糖的培养基中培养所得的遗传工程生物(参见,例如Sambrook等人,同上,2001)。利用本领域所熟知的用于确定多肽表达或酶催活性的方法(包括,例如北方吸印技术、mRNA的PCR扩增、免疫印迹法)巩固该通路基因的表达。利用对个体活性具有特异性的测定法确定被表达酶的酶催活性。利用HPLC、气相色谱-质谱法(GCMS)或液相色谱-质谱法(LCMS)确定被设计的大肠杆菌菌株生产1,3-丁二醇的能力。

[0352] 通过优化功能性的1,3-丁二醇合成通路的高效利用进一步增强被设计以具有该通路的微生物菌株。简言之,对该被设计的菌株进行评定以确定任何外源性基因是否以速率受限水平进行表达。针对以低水平表达的可以通过,例如引入额外的基因副本数目限制通过该通路的通量的任意酶进行表达增加。

[0353] 为生成更好的生产者,可以利用代谢建模优化培育条件。建模还被用以设计另外优化通路应用的基因敲除(参见,例如美国专利公布US 2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US 2003/0059792、US 2002/0168654和US 2004/0009466以及参见美国专利号7,127,379)。建模分析允许对偏移代谢对细胞生长的影响进行可靠的预测,以便更高效地生产1,3-丁二醇。一个建模方法是双层优化方法OptKnock(Burgard等人,Biotechnol.Bioengineer.84:647-657(2003)),其被用以选择共同地导致1,3-丁二醇的更好生产的基因敲除。适应性进化还可用以生成,例如乙酰-CoA中间体或1,3-丁二醇产品的更好的生产者。执行适应性进化,以改善生长和生产特性(Fong和Palsson,Nat.Genet.36:1056-1058(2004);Alper等人,Science 314:1565-1568(2006))。基于结果,后续几轮的建模、基因工程和适应性进化可应用于1,3-丁二醇生产者,以进一步增加生产。

[0354] 为了大规模生产1,3-丁二醇,利用本领域已知的培养基在发酵罐中培养重组生物以支持厌氧条件下生物的生长。以分批、补料分批或连续的方式进行发酵。通过首先用氮喷射该培养基,然后密封培养器皿(如可以用垫片和钳口盖密封烧瓶)保持厌氧条件。也可以通过提供小孔进行有限通气来采用微氧条件。通过添加酸(如H₂SO₄)保持该培养基的pH值为pH值7。通过利用分光光度计(600nm)测量光密度确定生长速率,以及通过监测随着时间的推移碳源的消耗确定葡萄糖摄取速率。可以利用针对葡萄糖和醇的折光率检测器以及针对有机酸的紫外检测器通过带有HPX-087柱(BioRad)的HPLC(Shimadzu)对副产物(如不想要的醇、有机酸以及残余葡萄糖)进行定量(Lin等人,Biotechnol.Bioeng.,90:775-779(2005))。

[0355] 对若干醛脱氢酶进行对于3-羟基丁酰-CoA的活性的测试。细菌的粗制裂解液

(crude lysate)中,通过测量CoA部分的释放对每个携带下文表A中所列的用于编码醛脱氢酶的六个基因的一个的菌株进行对于3-羟基丁酰-CoA的活性的测试。受测的以及据发现对3-HBCoA具有显著活性的基因编码具有如下登记和GI号的蛋白质:

[0356] 表A

[0357]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
<i>bld</i>	AAP42563.1	31075383	糖乙酸多丁醇梭菌
<i>ald</i>	ACL06658.1	218764192	食烯烴脱硫菌 <i>AK-01</i>
<i>ald</i>	YP_001452373	157145054	克氏柠檬酸杆菌 <i>ATCC BAA-895</i>
<i>pduP</i>	NP_460996.1	16765381	鼠伤寒肠沙门氏菌
<i>pduP</i>	ABJ64680.1	116099531	短乳杆菌 <i>ATCC 367</i>
BselDRAFT_1651	ZP_02189447	163762382	<i>Bacillus selenitireducens</i> <i>MLS10</i>

[0358] 为校正该裂解液中的本底活性,将测得的活性与无ALD基因(只有载体,“Vo”)的阴性对照进行了比较。图4示出所测基因的每个对3-羟基丁酰-CoA的比活。在x轴示出基因ids。

[0359] 进一步地,还测试了*bld*(GenBank ID:AAP42563.1,GI号:31075383)对3-HBCoA的活性。接下来的图5示出透析前后该基因对3-羟基丁酰-CoA的活性。

[0360] 下文列出接受了对3-羟基丁醛的活性的测试并证明具有显著活性的醇脱氢酶。

[0361] 表B

[0362]

蛋白质	GenBank ID号	GI号	生物
Bdh(Cbei_2181)	YP_001309304	150017050	拜氏梭菌
Bdh(Cbei_1722)	YP_001309535.1	150016596	拜氏梭菌
Bdh(Cbei_2421)	YP_001309535.1	150017281	拜氏梭菌

[0363] 下文的方案被用以证明醇脱氢酶活性(即将3-羟基丁醛转化为,3-BDO)和组合醛和醇脱氢酶活性(即将3-羟基丁酰-CoA转化为1,3-BDO)。

[0364] 用包含醛脱氢酶或醇脱氢酶(上文表A和B所列)的质粒转化化学感受态细胞。挑选来自板的菌落并于LB加100ug/ml羧苄青霉素中培育过夜,然后使用0.6mL接种每个醇脱氢酶的0mL培养物,或使用1.5mL接种每个醛脱氢酶的500mL培养物。在37°C下培育细胞至~0.7的O.D.并用IPTG诱导。在4小时的蛋白质表达期间,于30°C下孵育培养物。将细胞培养物分为30ml等分、离心并于-80°C下存储细胞团。用细胞培养物的样品估算最终细胞密度。

[0365] 在96孔板格式中以3-羟基丁酰-CoA作为底物加对照(无底物)对醇脱氢酶和醛脱

氢酶的组合进行筛选。替代地,为测试醇脱氢酶活性,在有和无底物3-羟基丁醛的情况下仅仅加入醇脱氢酶。在冷冻间(4℃)于冰上进行细胞裂解液的制备。使用最终细胞密度计算每个细胞团的Bug Buster细胞裂解试剂的量。将溶菌酶(10μL)和benzonase(10μL)加入到35ml的bugbuster中并轻轻地倒置以混合。首先,将50μm的二硫苏糖醇(100mM原料)加入到该团,然后将每0.05ml的1.0(600nm)of Bug Buster加酶混合物加入到该细胞团并轻轻地混合以再悬浮。

[0366] 向每个孔中加入1M MOPS(pH值=7.5)的50μl和25μl的辅因子混合物(4mM NADH和4mM NADPH)、100μL的醛脱氢酶细胞裂解液和150μL的醇脱氢酶细胞裂解液两者或仅仅150μL的醇脱氢酶细胞裂解液并轻轻地混合。然后,将有关底物加入到孔中。在250μL的水中再悬浮25mg的3-羟基丁酰CoA以及向每个测试醇和醛脱氢酶活性的孔加入5μL,得到最终浓度1.8mM。为仅仅测试醇脱氢酶活性,向每个孔加入50μL的3-羟基丁醛(通过在5ml水加催化碱(一个NaOH丸)中混入0.6ml的醛制备得到Guthrie,J.P.(附有参考文件)。每个孔中3-羟基丁醛的最终浓度约为50mM。用塑料PCR密封件密封该96深孔板并于30℃下摇晃孵育过夜(总共18小时)。因为孵育期间蛋白质和细胞碎片形成沉淀,以4500x g离心该板10分钟以及通过Whatman 96孔过滤板(0.45μm)过滤上清液,然后进行LC-MS分析。分析样品用于1,3-丁二醇形成。

[0367] 图6示出当3-羟基丁醛作为底物加入以及在无底物的对照样品中1,3-BDO的浓度。显示了醇脱氢酶的GI号。

[0368] 图7示出当3-羟基丁酰-CoA作为底物加入以及在无底物的对照样品中1,3-BDO的浓度。显示了醇脱氢酶的GI号。同时受测的乙醛脱氢酶的GI号是163762382。

[0369] 实施例III

[0370] 利用4-羟基丁酰-CoA作为中间体的1,3-BDO合成

[0371] 本实施例描述了能够利用4-羟基丁酰-CoA作为前体生产1,3-丁二醇(图3步骤A、B和E)的微生物的生成。

[0372] 大肠杆菌被用作靶生物以设计图3中通过步骤A、B和E的通路。大肠杆菌提供用于生成能够生产1,3-丁二醇的非天然存在的微生物的良好的宿主。大肠杆菌适宜于遗传操纵以及已知能够在厌氧或微氧条件下有效地生产各种产品,例如乙醇、乙酸、甲酸、乳酸和琥珀酸。

[0373] 为生成设计以生产1,3-丁二醇的大肠杆菌,利用熟知的分子生物技术在大肠杆菌中表达编码如先前所描述在披露的通路(步骤A、B和E)中所用的酶的核酸(参见,例如 Sambrook,同上,2001;Ausubel同上,1999;Roberts等人,同上,1989)。已设计以生产大量4-羟基丁酰-CoA的重组菌株已被申请人先前描述(Burk等人,(US 20090075351)以及将用于将所提议的通路插入1,3-丁二醇。

[0374] 进一步地,分别编码4-羟基丁酰-CoA脱水酶、巴豆酸酶和3-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)活性的abfD(YP_3001396399.1)、crt(NP_349318.1)和adhE2(AAK09379.1)基因被克隆进入PA1/lacO启动子下的pZE13载体(德国Ruelzheim的Expressys)。该质粒被转化进入生产4-羟基丁酰-CoA的重组大肠杆菌菌株,以表达始自该代谢产物的1,3-丁二醇合成所需的蛋白质和酶。

[0375] 遵循本领域所熟知的程序在包含葡萄糖的培养基中培养所得的遗传工程生物(参

见,例如Sambrook等人,同上,2001)。利用本领域所熟知的用于确定多肽表达或酶催活性的方法(包括,例如北方吸印技术、mRNA的PCR扩增、免疫印迹法)巩固该通路基因的表达。利用对个体活性具有特异性的测定法确定被表达酶的酶催活性。利用HPLC、气相色谱-质谱法(GCMS)或液相色谱-质谱法(LCMS)确定被设计的大肠杆菌菌株生产1,3-丁二醇的能力。

[0376] 通过优化功能性的1,3-丁二醇合成通路的高效利用进一步增强被设计以具有该通路的微生物菌株。简言之,对该被设计的菌株进行评定以确定任何外源性基因是否以速率受限水平进行表达。针对以低水平表达的可以通过,例如引入额外的基因副本数目限制通过该通路的通量的任意酶进行表达增加。

[0377] 为生成更好的生产者,可以利用代谢建模优化培育条件。建模还被用以设计另外优化通路应用的基因敲除(参见,例如美国专利公布US 2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US 2003/0059792、US 2002/0168654和US 2004/0009466以及参见美国专利号7,127,379)。建模分析允许对偏移代谢对细胞生长的影响进行可靠的预测,以便更高效地生产1,3-丁二醇。一个建模方法是双层优化方法OptKnock(Burgard等人,Biotechnol.Bioengineer.84:647-657(2003)),其被用以选择共同地导致1,3-丁二醇的更好生产的基因敲除。适应性进化还可用以生成,例如乙酰-CoA中间体或1,3-丁二醇产品的更好的生产者。执行适应性进化,以改善生长和生产特性(Fong和Palsson,Nat.Genet.36:1056-1058(2004);Alper等人,Science 314:1565-1568(2006))。基于结果,后续几轮的建模、基因工程和适应性进化可应用于1,3-丁二醇生产者,以进一步增加生产。

[0378] 为了大规模生产1,3-丁二醇,利用本领域已知的培养基在发酵罐中培养重组生物以支持厌氧条件下生物的生长。以分批、补料分批或连续的方式进行发酵。通过首先用氮喷射该培养基,然后密封培养器皿(如可以用垫片和钳口盖密封烧瓶)保持厌氧条件。也可以通过提供小孔进行有限通气来采用微氧条件。通过添加酸(如H₂SO₄)保持该培养基的pH值为pH值7。通过利用分光光度计(600nm)测量光密度确定生长速率,以及通过监测随着时间的推移碳源的消耗确定葡萄糖摄取速率。可以利用针对葡萄糖和醇的折光率检测器以及针对有机酸的紫外检测器通过带有HPX-087柱(BioRad)的HPLC(Shimadzu)对副产物(如不想要的醇、有机酸以及残余葡萄糖)进行定量(Lin等人,Biotechnol.Bioeng.,90:775-779(2005))。

[0379]

表 36(参考: 图 1)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物					
A	2.3.1.b	D-丙氨酸	2-氨基-4-氧代戊酸	AKP 硫解酶	<i>orfA</i>	YP_001086914.1	艰难梭菌 630	D-丙氨酸					
						YP_001086915.1	艰难梭菌 630	D-丙氨酸					
						YP_001320181.1	<i>Alcaliphilus metalliredigenes</i> QYF	D-丙氨酸					
						YP_001320182.1	<i>Alcaliphilus metalliredigenes</i> QYF	D-丙氨酸					
						YP_001663101.1	嗜热厌氧杆菌 X514	D-丙氨酸					
						YP_001663102.1	嗜热厌氧杆菌 X514	D-丙氨酸					
B	2.6.1.a	2-氨基-4-氧代戊酸	2,4-氧代戊酸	2-氨基-4-氧代戊酸转氨酶或氧化还原酶(脱氨基)	<i>aspC</i>	NP_415448.1	大肠杆菌	L-天冬氨酸					
						YP_026231.1	大肠杆菌	L-丙氨酸、L-缬氨酸					
						P23542.3	酿酒酵母	L-天冬氨酸					
						P19938	芽孢杆菌 YM-1	D-丙氨酸、D-2-氨基丁酸、D-天冬氨酸					
						(007597)	枯草芽孢杆菌	D-丙氨酸、D-2-氨基丁酸、D-天冬氨酸					
						P0A393	嗜热芽孢杆菌	L-亮氨酸、L-缬氨酸、2-氨基丁酸、L-异亮氨酸					
						NP_229443.1	海栖热袍菌	L-天冬氨酸					

[0380]

表 36(参考: 图 1)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物
C	4.1.1.a	2,4-二氧代戊酸	3-氧代丁醛	2,4-二氧代戊酸 脱羧酶	<i>pic</i>	P06672.1	运动发酵单胞菌	2-酮丁酸
					<i>pic1</i>	P06169	酿酒酵母	2-酮丁酸、3-羧基丙酮酸
					<i>mdc</i>	P20906.2	恶臭假单胞菌	2-酮丁酸
					<i>kgd</i>	O50463.4	结核分枝杆菌	α -酮戊二酸
D	1.1.1.a	3-氧代丁醛	4-羧基-2-丁酮	3-氧代丁醛还原酶(醛还原)	<i>abr4</i>	BAB12273.1	嗜精不动杆菌 M-1	C2-C14 醛
					<i>ADHE</i>	NP_014032.1	酿酒酵母	丙醛、异丁醛、丁醛、2-甲基丁醛、3-甲基丁醛、2-苯基乙醛
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	乙醛、丙二醛、丙醛、丁醛以及丙烯醛
					<i>bah1</i>	NP_349892.1	丙酮丁醇梭菌	丁醛
					<i>bah2</i>	NP_349891.1	丙酮丁醇梭菌	丁醛
					<i>4abd</i>	YP_726053.1	高养罗尔斯通氏菌 H16	琥珀酸半醛
					<i>ADH1</i>	AAR91477.1	热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌 M10EXG	乙醇、1-丁醇、1-戊醇、1-庚醇、1-己醇、1-辛醇、2-丙醇

[0381]

表 36(参考: 图 1)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物
					<i>mmsb</i>	P28811.1	绿脓假单胞菌	3-羧基丁醛、丙二酸半醛、甲基丙二酸半醛
					<i>P84067</i>	P84067	嗜热栖热菌	甲基丙二酸半醛

表 36(参考: 图 1)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物
E	4.1.1.a	2-氨基-4-氧代戊酸	4-氨基丁-2-酮	2-氨基-4-氧代戊酸脱羧酶	<i>lysA</i>	NP_417315.1	大肠杆菌	内消旋-二氨基庚二酸
					<i>lysA</i>	AA25361.1	枯核分枝杆菌	内消旋-二氨基庚二酸
					<i>lysA</i>	BAC92756.1	食甲基嗜嗜甲基菌	内消旋-二氨基庚二酸
					<i>cadC</i>	AA59967.1	智人	D-鸟氨酸
					<i>panD</i>	PUA790	大肠杆菌	L-天冬氨酸
					<i>panD</i>	Q9X4N0	谷氨酸棒杆菌	L-天冬氨酸
					<i>panD</i>	P65660	枯核分枝杆菌	L-天冬氨酸
F	4.3.1.a	4-氨基丁-2-酮	丁烯酮	4-氨基丁-2-酮氨-裂解酶	<i>aspA</i>	NP_418562	大肠杆菌 K12 亚种	L-天冬氨酸
					<i>aspA</i>	P44324.1	MG1655 流感嗜血杆菌	L-天冬氨酸

[0382]

表 36(参考: 图 1)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物
					<i>aspA</i>	P07346.1	萤光假单胞菌	L-天冬氨酸
					<i>ansB</i>	P26899.1	粘草杆菌	L-天冬氨酸
					<i>aspA</i>	P33109.1	粘质沙雷氏菌	L-天冬氨酸
G	4.2.1.a	丁烯酮	4-羟基,2-丁酮	丁烯酮水合酶	<i>fumA</i>	P0AC33	大肠杆菌 K12	延胡索酸
					<i>fumC</i>	P05042	大肠杆菌 K12	延胡索酸
					<i>fumC</i>	O69294	空肠弯曲杆菌	延胡索酸
					<i>fumC</i>	P84127	嗜热栖热菌	延胡索酸
					<i>fumH</i>	P14408	褐鼠	延胡索酸
					<i>hmd</i>	ABC88407.1	巴克氏真杆菌	2-亚甲基-戊二酸
					<i>hmdA</i>	ABC88408	巴克氏真杆菌	二甲基马来酸
					<i>hmdB</i>	ABC88409.1	巴克氏真杆菌	二甲基马来酸
H	1.1.1.a	4-羟基,2-丁酮	1,3-丁二醇	4-羟基,2-丁酮还原酶	<i>bdtH</i>	AAA58352.1	曾人	3-氧代丁酸
					<i>adh</i>	AAA23199.2	拜氏梭菌 NRRL B593	丙酮
					<i>adhA</i>	AAC25556	激烈热球菌	2-戊醇,丙酮醛
					<i>ldh</i>	YP_725182.1	雷养罗尔斯通氏菌	乳酸、2-氧代丁酸、 2-氧代戊酸和 2-氧 代戊二酸
					<i>adh</i>	F14941.1	布氏热厌氧杆菌 HTD4	丙酮

[0383]

表 36(参考: 图 1)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物
I	4.3.1.a	2-氨基-4-氧代戊酸	乙酰丙烯酸	2-氨基-4-氧代戊酸裂解酶	<i>aspA</i>	NP_418562	大肠杆菌 K12 亚种 MG1655	L-天冬氨酸
					<i>aspA</i>	P44324.1	流感嗜血杆菌	L-天冬氨酸
					<i>aspA</i>	P07346.1	萤光假单胞菌	L-天冬氨酸
					<i>ansB</i>	P26899.1	枯草杆菌	L-天冬氨酸
					<i>aspA</i>	P33109.1	粘质沙雷氏菌	L-天冬氨酸
J	4.1.1.a	乙酰丙烯酸	丁烯酮	乙酰丙烯酸脱羧酶	<i>xydH</i>	YP_709328.1	恶臭假单胞菌	4-草酰巴豆酸
					<i>xydH</i>	YP_709353.1	恶臭假单胞菌	4-草酰巴豆酸
					<i>dmpH</i>	CAA43228.1	多刺假单胞菌 CF600	4-草酰巴豆酸
					<i>ibmpE</i>	CAA43225.1	多刺假单胞菌 CF600	4-草酰巴豆酸
					<i>pac</i>	U63827	植物乳杆菌	肉桂酸及衍生物
					<i>pac</i>	AB330293	产酸克雷伯氏菌	肉桂酸及衍生物
K	2.6.1.a	4-氨基丁-2-酮	3-氧代丁醛	4-氨基丁-2-酮转氨酶或氧化还原酶(脱氨基)	<i>SkyPYD4</i>	ABF58893	克鲁弗氏梭菌	β-丙氨酸
					<i>gabT</i>	P22256	大肠杆菌	4-氨基丁酸
					<i>Abat</i>	P50554	褐鼠	3-氨基-2-甲基丙酸
					<i>UGAI</i>	NP_011533	酿酒酵母	4-氨基丁酸
					<i>kdd</i>	AAL93966.1	具核梭杆菌	3,5-二氨基己酸

[0384]

表 36(参考: 图 1)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物
					<i>lysDH</i>	BAB39707	嗜热脂肪土芽孢杆菌	L-赖氨酸
L	1.1.1.3	2-氨基-4-氧代戊酸	2-氨基-4-羟基戊酸	2-氨基-4-氧代戊酸 脱氢酶	<i>tim4</i>	AAC73113	大肠杆菌	L-赖氨酸 天冬氨酸半醛
					<i>ham6</i>	CA89671	酿酒酵母	天冬氨酸半醛
					<i>hom2</i>	CA163186	植物乳杆菌	天冬氨酸半醛
					<i>akktv2</i>	081852	拟南芥	天冬氨酸半醛
					<i>hom1</i>	CA164819	植物乳杆菌	天冬氨酸半醛
M	2.6.1.a	2-氨基-4-羟基戊酸	2-氧代-4-羟基戊酸	2-氨基-4-羟基戊 酸转氨酶或氧化 还原酶(脱氨基)	<i>aspC</i>	NP_415448.1	大肠杆菌	L-天冬氨酸
					<i>avt4</i>	YP_026231.1	大肠杆菌	L-丙氨酸、L-缬氨酸
					<i>AAT2</i>	P23542.3	酿酒酵母	L-天冬氨酸
					<i>dat</i>	P19938	芽孢杆菌 YM-1	D-丙氨酸、D-2-氨基 丁酸、D-天冬氨酸
					<i>dat</i>	007597	粘草芽孢杆菌	D-丙氨酸、D-2-氨基 丁酸、D-天冬氨酸
					<i>tdh</i>	POA393	嗜热芽孢杆菌	L-亮氨酸、L-缬氨酸、 2-氨基丁酸、L-异亮 氨酸
					<i>nadX</i>	NP_229443.1	海栖热袍菌	L-天冬氨酸

[0385]

表 36(参考: 图 1)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物
4	4.1.1.6	2-氧代-4-羟基戊酸	3-羟基丁醛	2-氧代-4-羟基戊酸	<i>fad</i>	F146672.1	运动发酵单胞菌	2-酮丁酸
					<i>fad1</i>	F146673	酿酒酵母	2-酮丁酸、3-羟基丙酮酸
					<i>fad2</i>	F146676.2	恶臭假单胞菌	2-酮丁酸
					<i>fad3</i>	U30463.4	结核分枝杆菌	α-酮戊二酸
0	1.1.1.6	3-氧代-丁醛	3-羟基丁醛	3-氧代丁醛还原酶 (酮还原)	<i>fadB</i>	AAA98332.1	智人	3-氧代丁酸
					<i>adk</i>	AAA23199.2	拜氏梭菌 NRRL B593	丙酮
					<i>adk1</i>	AAU25356	激烈热球菌	2-戊醇, 丙酮醛
					<i>ldh</i>	YP_225182.1	雷养罗斯通氏菌	乳酸、2-氧代丁酸、2-氧代戊酸和 2-氧代戊二酸
					<i>adh</i>	F14941.1	布氏热厌氧杆菌 HTD4	丙酮
8	1.1.1.6	3-羟基丁醛	1,3-丁二醇	3-羟基丁醛还原酶	<i>adh</i>	BA812273.1	嗜精不动杆菌 M-1	C2-C14 醛
					<i>ADH2</i>	XP_014832.1	酿酒酵母	丙醛、异丁醛、丁醛、2-甲基丁醛、3-甲基丁醛、2-苯基乙醛

[0386]

表 36(参考: 图 1)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物
					<i>vghD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	乙醛、丙二醛、丙醛、丁醛以及丙酮醛
					<i>bdh I</i>	NP_349892.1	丙酮丁醇梭菌	丁醛
					<i>bdh II</i>	NP_349891.1	丙酮丁醇梭菌	丁醛
					<i>4thbd</i>	YP_726053.1	富养罗斯通氏菌 HI6	琥珀酸半醛
					<i>ADHI</i>	AAR91477.1	热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌 M10EXG	乙醇、1-丁醇、1-戊醇、1-庚醇、1-己醇、1-辛醇、2-丙醇
					<i>romsb</i>	P28811.1	绿脓假单胞菌	3-羧基丁醛、丙二醛、甲基丙二醛半醛
					<i>P84067</i>	P84067	嗜热栖热菌	知基丙二醛半醛

[0387]

表 37(参考: 图 2)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物
A	1.2.1.b	乙酰乙酰-CoA	3-氧代丁醛	乙酰乙酰基-CoA 还原酶 (醛形成)	<i>ald</i>	AA166436	拜氏梭菌	丁酰-CoA
					<i>sacD</i>	NP_904963.1	牙龈卟啉单胞菌	琥珀酰-CoA
					<i>bpxG</i>	BAA03892.1	多刺假单胞菌	乙醛、丙醛、丁醛、 异丁醛和甲醛
					<i>Mkac_0709</i>	YP_001190808.1	勤春生全球菌	丙二酰基-CoA
					<i>mcx</i>	NP_378167	硫化叶菌 tokodaii	丙二酰基-CoA、甲 基丙二酰基-CoA
B	1.1.1.4	3-氧代丁醛	3-羟基丁醛	3-氧代丁醛 还原酶(酮 还原)	<i>adh</i>	AAA5852.1	智人	3-氧代丁酸
					<i>adh</i>	AAA23199.2	拜氏梭菌 NRRL B593	丙酮
					<i>adhA</i>	AAC25556	激烈热球菌	2-戊醇、丙酮醛
					<i>adh</i>	YP_725182.1	雷养罗尔斯通氏 菌	乳酸、2-氧代丁酸、 2-氧代戊酸和2-氧 代戊二酸
					<i>adh</i>	P1494.1	布氏热灰氧杆菌 HTD4	丙酮

[0388]

表 37(参考: 图 2)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物
C	1.1.1.3	3-羟基丁醛	1,3-丁二醇	3-羟基丁醛还原酶	<i>aldA</i>	BAB12273.1	嗜精不动杆菌 M-1	C2-C14 醛
					<i>ADH2</i>	NP_014032.1	酿酒酵母	丙醛、异丁醛、丁醛、2-甲基丁醛、3-甲基丁醛、2-苯基乙醛
					<i>yghD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	乙醛、丙二醛、丙醛、丁醛以及丙烯醛
					<i>bdh I</i>	NP_349892.1	丙酮丁醇梭菌	丁醛
					<i>bdh II</i>	NP_349891.1	丙酮丁醇梭菌	丁醛
					<i>4hbd</i>	YP_726053.1	雷奈罗尔斯道氏菌 HI6	琥珀酸半醛
					<i>ADH</i>	AAR91477.1	热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌 M10EXG	乙醇、1-丁醇、1-戊醇、1-庚醇、1-己醇、1-辛醇、2-丙醇
					<i>mnsb</i>	P28811.1	绿脓假单胞菌	3-羟基丁醛、丙二酸半醛、甲基丙二酸半醛

[0389]

表 37(参考: 图 2)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物		
D	1.1.1.c	乙酰乙酰胺-CoA	4-羟基-2-丁酮	乙酰乙酰胺-CoA 还原酶 (醇形成)	<i>PR4067</i>	<i>PR4067</i>	嗜热栖热菌	甲基丙二酸半醛		
					<i>adhE2</i>	<i>AAK99379.1</i>	丙酮丁醇梭菌	丁酰胺-CoA		
					<i>mcr</i>	<i>AAS20429.1</i>	橙色绿屈挠菌	丙二酰基-CoA		
E	1.1.1.a	3-氧代丁醛	4-羟基-2-丁酮	3-氧代丁醛还原酶(醛还原)	<i>F4R</i>	<i>AAD38039.1</i>	加州希蒙得木	长链酰基-CoA		
					<i>aldA</i>	<i>BAB12273.1</i>	嗜精不动杆菌 <i>M-1</i>	C2-C14 醛		
					<i>ADH2</i>	<i>NP_014032.1</i>	酿酒酵母	丙醛、异丁醛、丁醛、2-甲基丁醛、3-甲基丁醛、2-苯基乙醛		
				<i>ypbD</i>	<i>NP_417464.1</i>	<i>NP_417464.1</i>	大肠杆菌	乙醛、丙二醛、丙醛、丁醛以及丙烯醛		
							<i>bdb I</i>	<i>NP_349892.1</i>	丙酮丁醇梭菌	丁醛
							<i>bdb II</i>	<i>NP_349891.1</i>	丙酮丁醇梭菌	丁醛

[0390]

表 37(参考: 图 2)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物
					<i>hhd</i>	YP_726053.1	富养罗斯通氏菌 <i>H16</i>	琥珀酸半醛
					<i>ADH1</i>	AAR91477.1	热葡萄糖酶地芽孢杆菌 <i>M10EXG</i>	乙醇、1-丁醇、1-戊醇、1-庚醇、1-己醇、1-辛醇、2-丙醇
					<i>masb</i>	P28811.1	绿脓假单胞菌	3-羧基丁醛、丙二酸半醛、甲基丙二酸半醛
					<i>P84067</i>	F84067	嗜热栖热菌	甲基丙二酸半醛
F	1.1.1.a	4-羧基,2-丁酮	1,3-丁二醇	4-羧基,2-丁酮还原酶	<i>bdh</i>	AAAS8352.1	智人	3-氧代丁酸
					<i>adh</i>	AAA23199.2	拜氏梭菌 NRRL B593	丙酮
					<i>adh4</i>	AAC25556	激烈热球菌	2-戊醇,丙酮醛
					<i>ldh</i>	YP_725182.1	富养罗斯通氏菌	乳酸、2-氧代丁酸、2-氧代戊酸和2-氧代戊二酸
					<i>adh</i>	P14941.1	布氏热厌氧杆菌 HTD4	丙酮
G	1.1.1.a	乙酰乙酰基-CoA	3-羧基丁酰-CoA	乙酰乙酰基-CoA 还原酶 (酮还原)	<i>hhd</i>	NP_349314.1	丙酮丁醇梭菌	乙酰乙酰基-CoA

[0391]

表 37(参考: 图 2)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可查)	生物	已知底物
					<i>hbd1</i>	AA314586.1	拜氏梭菌	乙酰乙酰基-CoA
					<i>Hbd2</i>	EDK34807.1	克鲁弗氏梭菌	乙酰乙酰基-CoA
					<i>Hbd1</i>	EDK32512.1	克鲁弗氏梭菌	乙酰乙酰基-CoA
					<i>Msed_1123</i>	YP_001191505	勤奋生金球菌	3-羟基丁酰-CoA(疑)
					<i>Msed_0399</i>	YP_001190500	勤奋生金球菌	3-羟基丁酰-CoA(疑)
					<i>Msed_0389</i>	YP_001190490	勤奋生金球菌	3-羟基丁酰-CoA(疑)
					<i>Msed_1993</i>	YP_001192057	勤奋生金球菌	3-羟基丁酰-CoA(疑)
					<i>fadB</i>	P21177.2	大肠杆菌	3-氧代酰基-CoA
					<i>fadJ</i>	P77399.1	大肠杆菌	3-氧代酰基-CoA
II	1.2.1.b	3-羟基丁酰-CoA	3-羟基丁醛	3-羟基丁酰-CoA 还原酶 (醛形成)	<i>Ald</i>	AA166436	拜氏梭菌	丁酰-CoA
					<i>uccD</i>	NP_904963.1	牙龈叶啉单胞菌	琥珀酰-CoA
					<i>bphG</i>	BAA03892.1	多刺假单胞菌	乙醛、丙醛、丁醛、 异丁醛和甲醛
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	勤奋生金球菌	丙二酰基-CoA
					<i>mlt</i>	NP_378167	硫化叶菌 Tokodani	丙二酰基-CoA、甲基 丙二酰基-CoA

[0392]

表 37(参考: 图 2)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物
I	1.1.1.10	3-羟基丁酰-CoA	1,3-丁二醇	3-羟基丁酰-CoA 还原酶 (醇形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	丙酮丁醇梭菌	丁酰-CoA
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	橙色绿屈挠菌	丙二酰基-CoA
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	加州希蒙得木	长链酰基-CoA

[0393]

表 38(参考: 图 3)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 [若可获]	生物	已知底物
A	4.2.1.8	4-羟基丁酰-CoA	巴豆酰-CoA	4-羟基丁酰-CoA 脱水酶	<i>abfB</i>	YP_001336399.1	克鲁弗氏梭菌 DSM 555	4-羟基丁酰-CoA
								4-羟基丁酰-CoA
B	4.2.1.8	巴豆酰-CoA	3-羟基丁酰-CoA	巴豆酸酶	<i>cro</i>	YP_001928843	产靛叶啉单胞菌 ATCC 33277	4-羟基丁酰-CoA
					<i>cro</i>	NP_349318.1	丙酮丁醇梭菌	3-羟基丁酰-CoA
					<i>cro</i>	YP_001336856	克鲁弗氏梭菌 DSM 555	3-羟基丁酰-CoA
					<i>cro</i>	YP_001929291.1	产靛叶啉单胞菌 ATCC 33277	基于序列相似性的 例子
					<i>psaA</i>	NP_745427.1	恶臭假单胞菌	烯酰基-CoA, 苯乙 酰基-CoA 的顺式- 二氢二醇衍生物
					<i>psaB</i>	NP_745426.1		烯酰基-CoA, 苯乙 酰基-CoA 的顺式- 二氢二醇衍生物
				<i>phad</i>	ABF82233.1	黄光假单胞菌	烯酰基-CoA, 苯乙 酰基-CoA 的顺式- 二氢二醇衍生物	
				<i>phab</i>	ABF82234.1	黄光假单胞菌	烯酰基-CoA, 苯乙 酰基-CoA 的顺式- 二氢二醇衍生物	
				<i>macC</i>	NP_415905.1	大肠杆菌	烯酰基-CoA, 苯乙 酰基-CoA 的顺式- 二氢二醇衍生物	

[0394]

表 38(参考: 图 3)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可得)	生物	已知底物
					<i>praf</i>	NP_415911.1	大肠杆菌	烯酰基-CoA, 苯乙 酰基-CoA 的顺式- 二氢二醇衍生物
					<i>pracG</i>	NP_415912.1	大肠杆菌	烯酰基-CoA, 苯乙 酰基-CoA 的顺式- 二氢二醇衍生物
C	1.2.1.b	3-羟基丁酰-CoA	3-羟基丁醛	3-羟基丁酰 -CoA 还原酶(醛 形成)	<i>Ald</i>	AA166436	拜氏梭菌	丁酰-CoA
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	牙螺叶啉单胞菌	琥珀酰-CoA
					<i>bphG</i>	BAA03892.1	多刺假单胞菌	乙醛、丙醛、丁醛、 异丁醛和甲醛
					<i>Mxscd_0709</i>	YP_001190808.1	勤奋生金球菌	丙二酰基-CoA
					<i>mcr</i>	NP_378167	硫化叶菌 tokodaiti	丙二酰基-CoA, 甲 基丙二酰基-CoA

[0395]

D	1.1.1.a	3-羟基丁醛	1,3-丁二醇	3-羟基丁醛还 原酶	<i>ald</i>	BABI2273.1 NF_014032.1	嗜精不动杆菌 <i>M-1</i> 酿酒酵母	C2-C14 醛 丙醛、异丁醛、丁醛、 2-甲基丁醛、3-甲基 丁醛、2-苯基乙醛
---	---------	--------	---------	---------------	------------	---------------------------	------------------------------	----------------------------------------------------

表 38(参考: 图 3)

步骤	EC 等级	所需底物	所需产品	酶名称	基因名称	Genbank ID 号 (若可保)	生物	已知底物
					<i>pyhd</i>	NP_417484.1	大肠埃希氏杆菌	乙醛、丙二醛、丙醛、 丁醛以及丙醛
					<i>bah 1</i>	NP_349892.1	丙酮丁醇梭菌	丁醛
					<i>bah II</i>	NP_349891.1	丙酮丁醇梭菌	丁醛
					<i>4hd</i>	YP_728453.1	富养罗尔斯通氏菌 <i>III6</i>	琥珀酸半醛
					<i>ADH</i>	AAR91477.1	热葡萄糖苷酶地芽孢 杆菌 <i>M10EXG</i>	乙醇、1-丁醇、1-戊 醇、1-庚醇、1-己醇、 1-辛醇、2-丙醇
					<i>mmsb</i>	P28811.1	绿脓假单胞菌	3-羟基丁醛、丙二酸 半醛、甲基丙二酸半 醛

[0396]

E	11.1.c	3-羟基丁酰-CoA	1,3-丁二醇	3-羟基丁酰-CoA 还原酶 (醇形成)	<i>adhE2</i>	FS4067 AAK09379.1	嗜热栖热菌 丙酮丁梭菌	甲基丙二酸半醛 丁酰-CoA
					<i>mcF</i>	AAQ20429.1	橙色绿屈挠菌	丙二酰基-CoA
					<i>FAR</i>	AAQ38039.1	加州希蒙得木	长链酰基-CoA

[0397] 虽然已根据披露的实施方式对本发明进行描述,本领域的技术人员将很容易地理解上文详述的特定的例子和研究只是对本发明的说明。应当理解的是,可以进行各种修改

而不背离本发明的精神。因此,本发明只受如下的权利要求的限制。

序列表

[0001]

<110> A.P.博加德
M.J.伯克
罗宾.E.奥斯特豪特
普里蒂.法克雅

<120> 用于生产1,3-丁二醇的生物

<130> 066662-0297

<140> 12/772,114
<141> 2010-04-30

<150> 61/174,473
<151> 2009-04-30

<160> 1

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1
<211> 20
<212> PRT
<213> 纤细眼虫

<400> 1
Met Thr Tyr Lys Ala Pro Val Lys Asp Val Lys Phe Leu Leu Asp Lys
1 5 10 15

Val Phe Lys Val
20

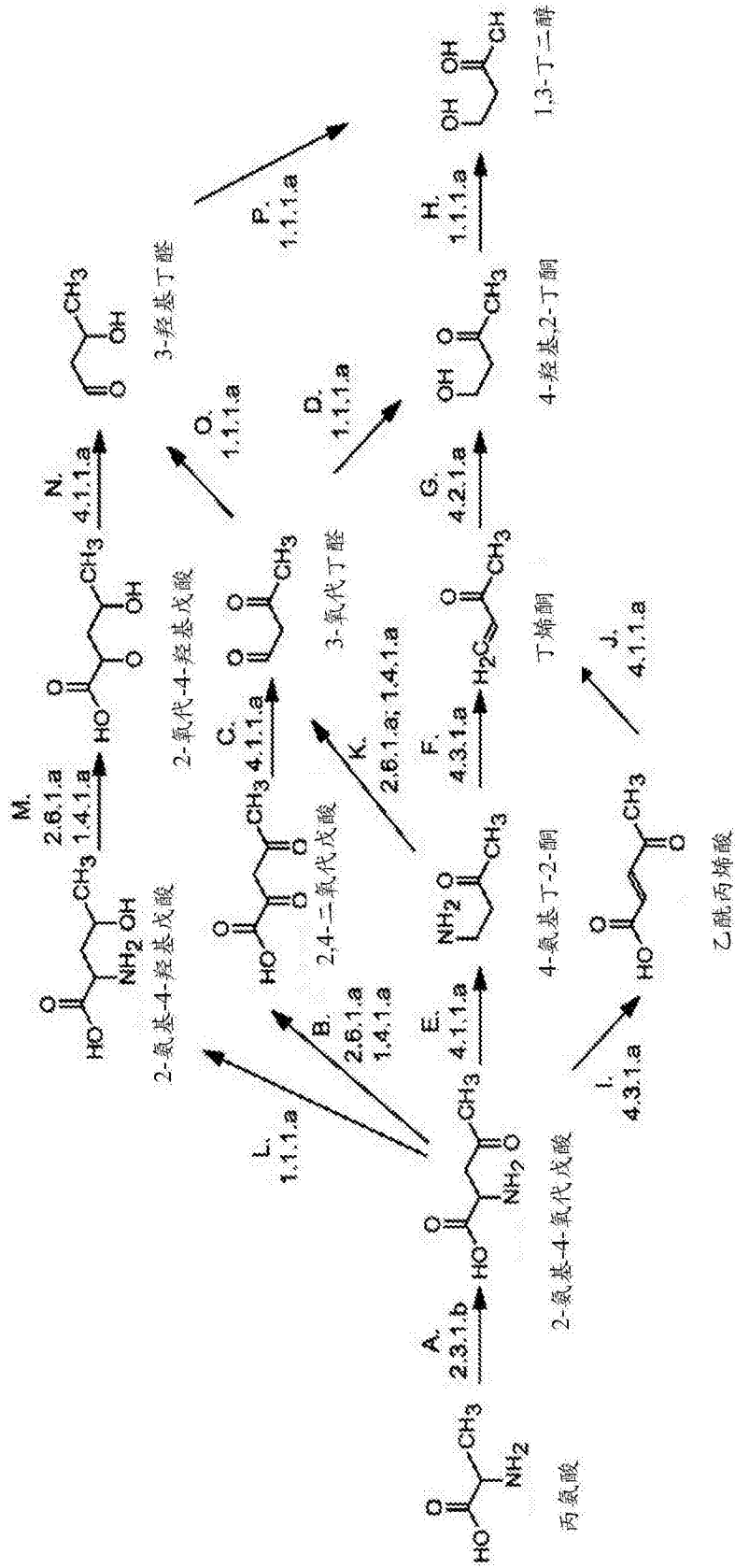


图1

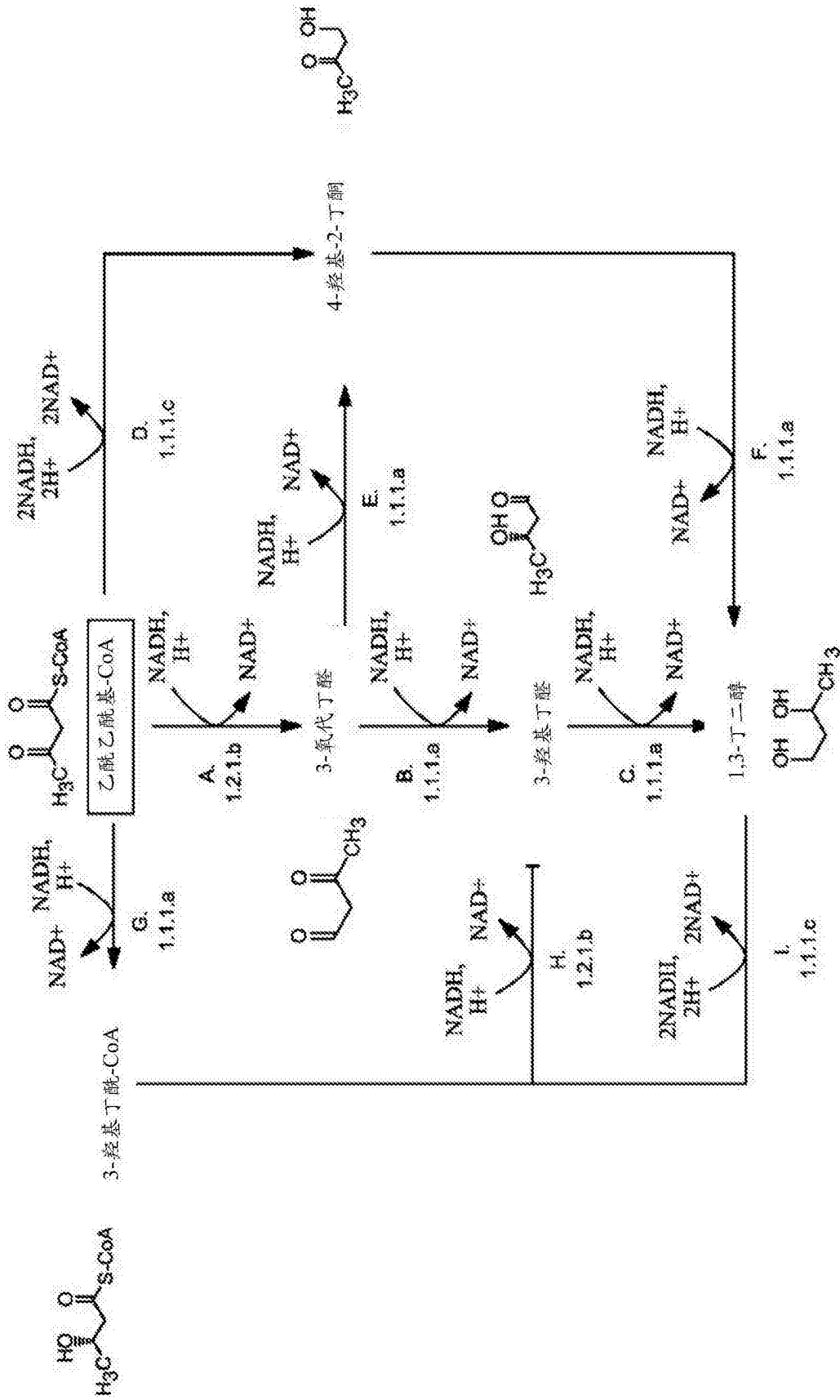


图2

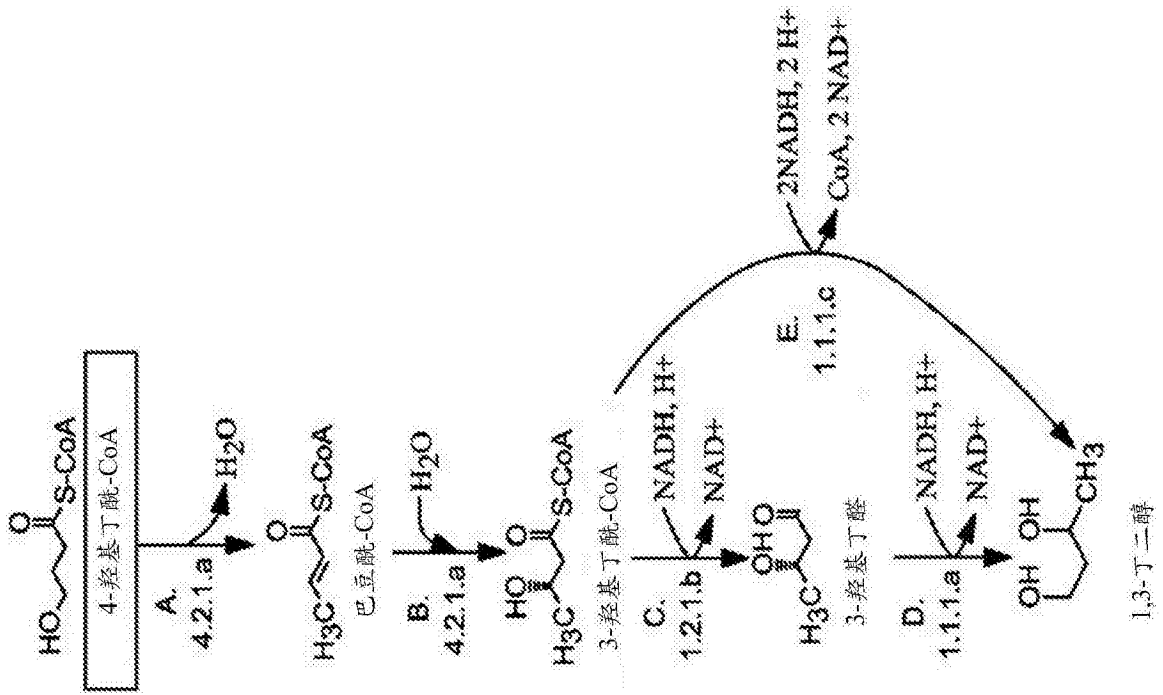


图3

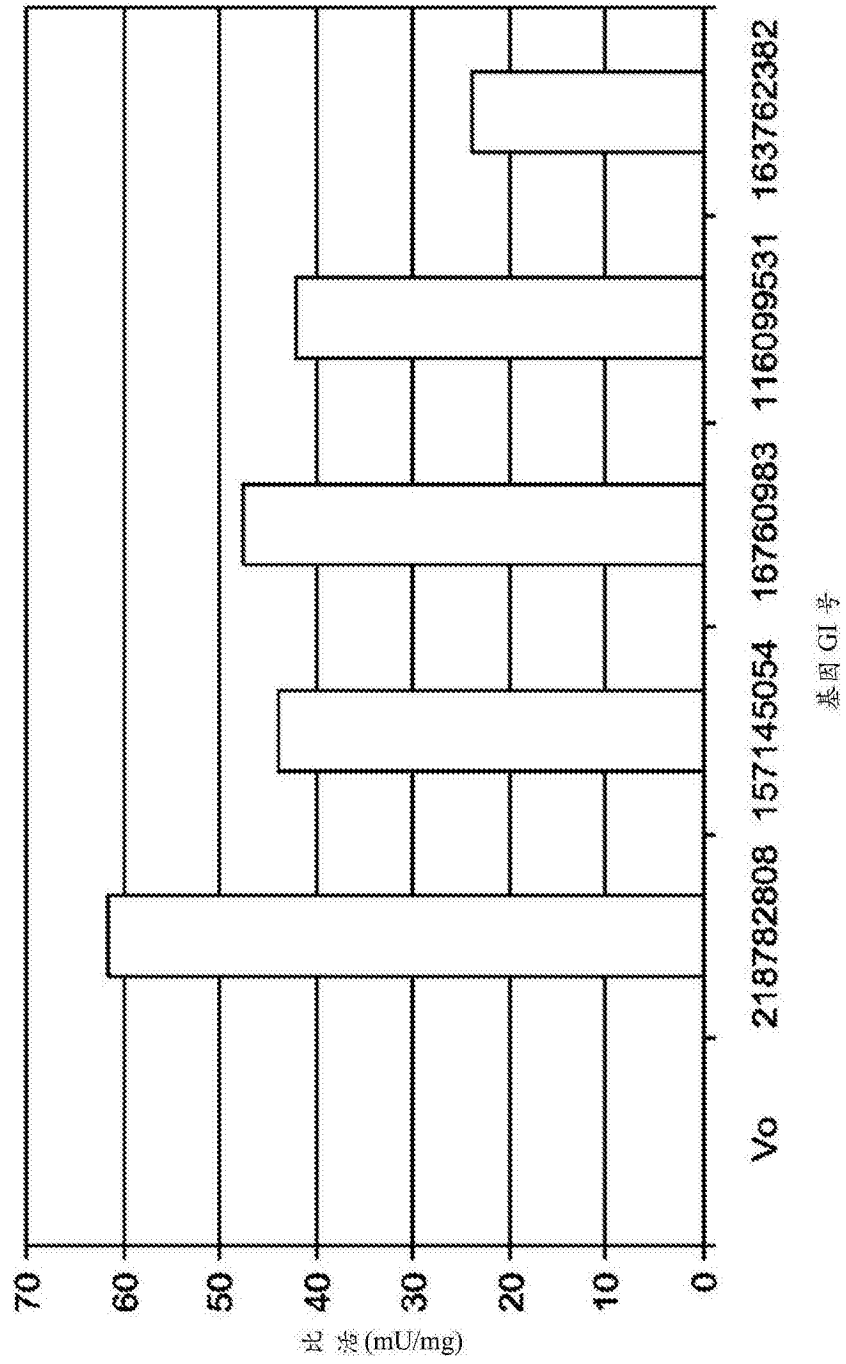


图4

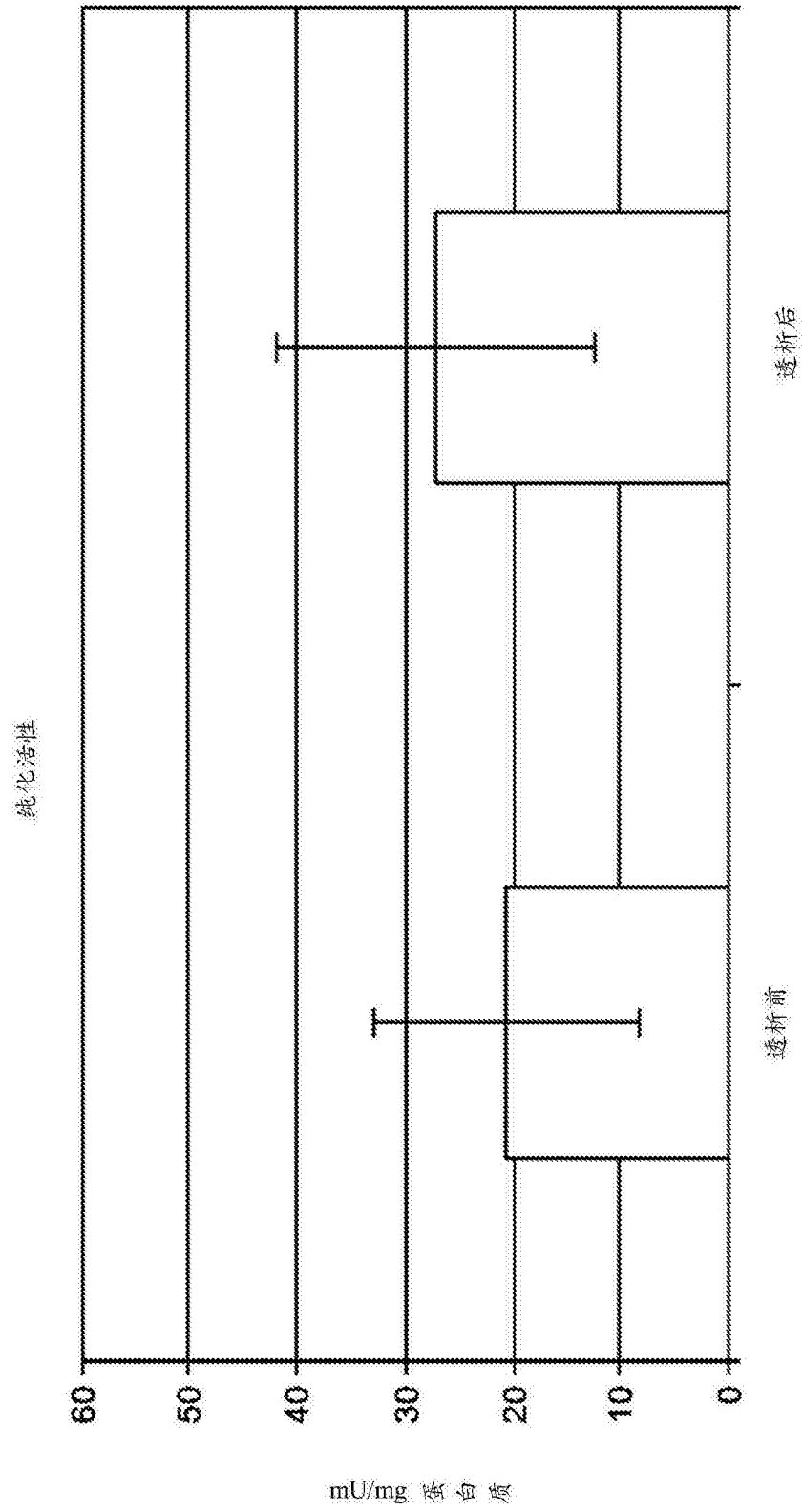


图5

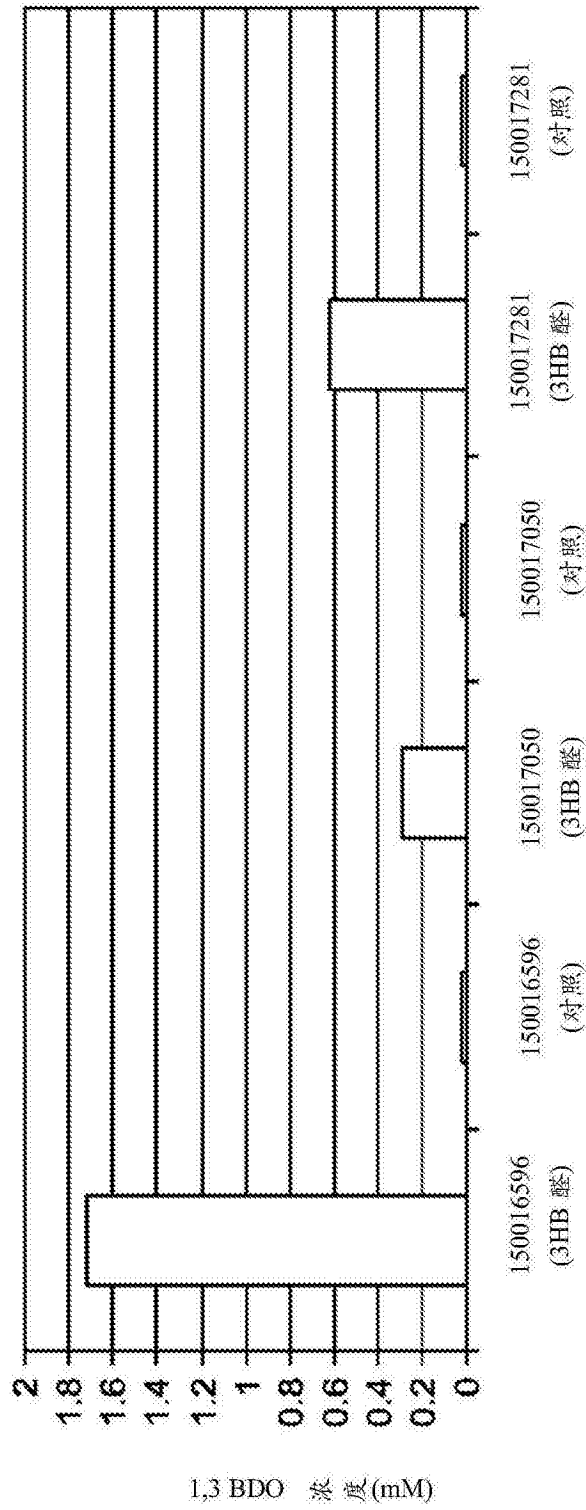


图6

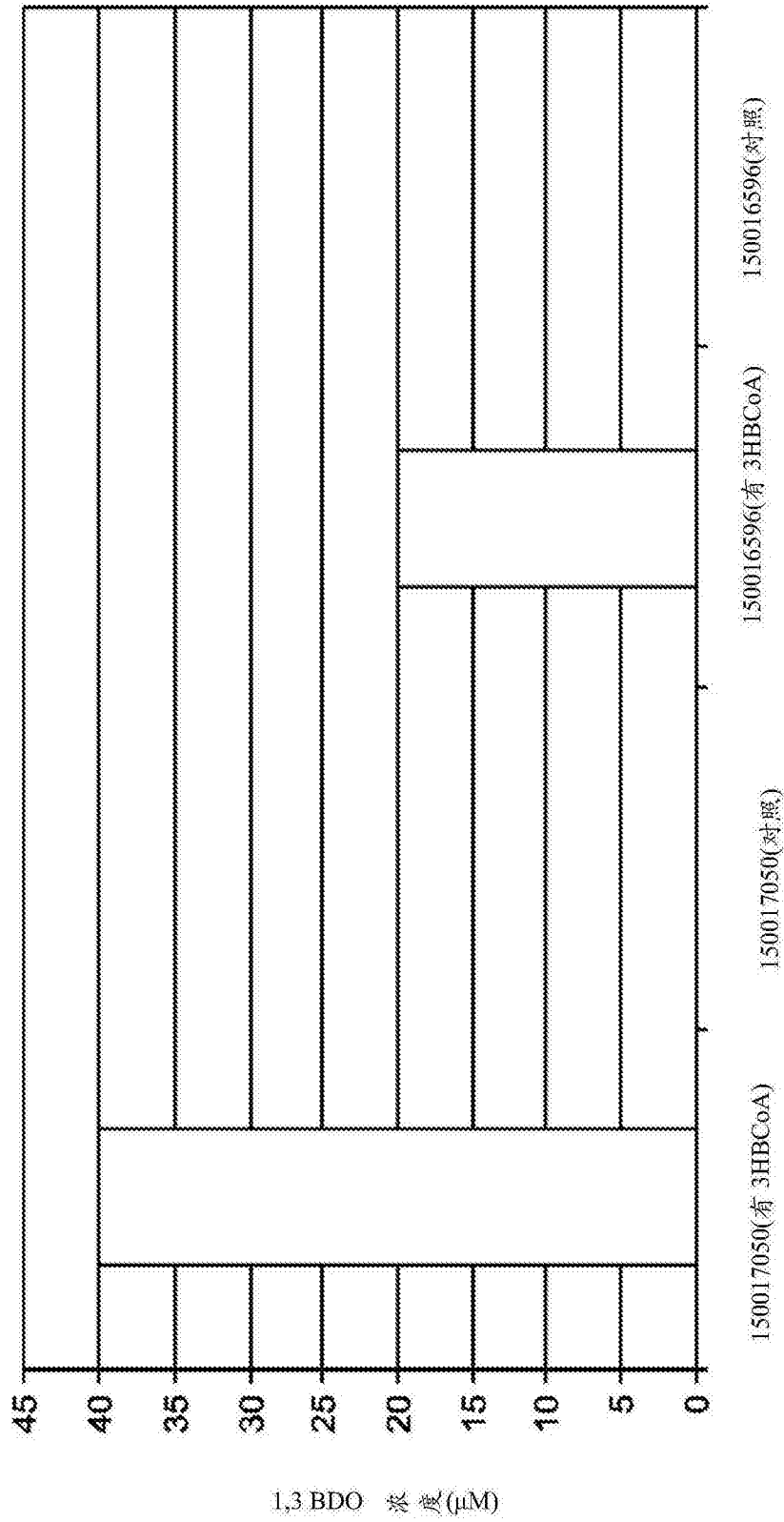


图7