(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113528417 A
(43)申请公布日 2021.10.22

(21)申请号 202110879974.1

(22)申请日 2010.06.04

(30)优先权数据
61/184,311 2009.06.04 US

(62)分案原申请数据
201080034821.7 2010.06.04

(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 S·J·万殿 A·P·博加德
罗伯特·哈瑟尔贝克
凯瑟琳·J·普若尔-巴克斯利
牛巍 约翰·D·特拉威克
哈里·伊姆 M·J·伯克
罗宾·E·奥斯特豪特 孙军

(74)专利代理机构 北京世峰知识产权代理有限公司 11713
代理人 王思琪 王建秀

(51)Int.Cl.
C12N 1/21(2006.01)
C12P 7/18(2006.01)
C12R 1/19(2006.01)

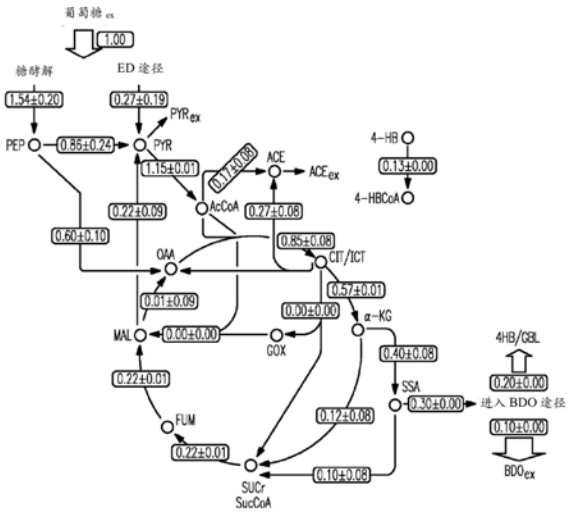
权利要求书9页 说明书138页
序列表64页 附图68页

(54)发明名称

生产1,4-丁二醇的微生物和相关方法

(57)摘要

本发明提供非天然存在的包含1,4-丁二醇(BDO)途径的微生物体,该途径包含编码BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述核酸以足以产生BDO的量表达,并且为BDO的表达被进一步优化。本发明另外提供利用所述微生物体生产BDO的方法。



CN 113528417 A

1.具有1,4-丁二醇(BDO)途径的非天然存在的微生物体,该途径包括编码以足够量表达而生产BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,其中所述微生物体经遗传修饰以表达外源的4-羟基丁酰-辅酶A还原酶;以表达外源的琥珀酰-辅酶A合成酶;以表达外源的α-酮戊二酸脱羧酶;以表达外源的琥珀酸半醛脱氢酶和4-羟基丁酸脱氢酶并且任选地表达4-羟基丁酰-辅酶A/乙酰-辅酶A移转酶;以表达外源的丁酸激酶和磷酸转丁酰酶;以表达外源的4-羟基丁醛还原酶;以表达外源的丙酮酸脱氢酶;以破坏编码需氧的呼吸控制调节系统的基因;以表达外源的NADH不敏感的柠檬酸合成酶;以表达外源的磷酸烯醇丙酮酸羧激酶。

2.非天然存在的微生物体,包括具有1,4-丁二醇(BDO)途径的微生物体,该途径包含编码以足够量表达以生产BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,其中所述微生物体如表28的菌株3-20中任一菌株经遗传修饰。

3.用于生产1,4-丁二醇(BDO)的方法,包括在一定条件下和以足够的时间培养权利要求12的非天然存在的微生物体以生产BDO。

4.具有1,4-丁二醇(BDO)途径的非天然存在的微生物体,其包括以足够量表达而生产BDO的BDO途径酶,其中所述微生物体经遗传修饰,且所述微生物体:

(A)包含选自如下的BDO途径:

(i)BDO途径,其包含:

(a)α-酮戊二酸脱羧酶;

α-酮戊二酸脱氢酶和辅酶A-依赖性的琥珀酸半醛脱氢酶;和/或

谷氨酸:琥珀酸半醛转氨酶和谷氨酸脱羧酶;

(b)4-羟基丁酸脱氢酶;

(c)4-羟基丁酰-辅酶A/乙酰-辅酶A移转酶;和/或

丁酸激酶和磷酸转丁酰酶;

(d)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和4-羟基丁醛还原酶;和/或

醛/醇脱氢酶;

(ii)BDO途径,其包含:

(a)α-酮戊二酸脱羧酶;和/或

琥珀酰-辅酶A合成酶和辅酶A-依赖性的琥珀酸半醛脱氢酶;

(b)4-羟基丁酸脱氢酶;

(c)4-羟基丁酰-辅酶A转移酶;和/或

4-羟基丁酸激酶和磷酸转-4-羟基丁酰酶;和

(d)醛脱氢酶和醇脱氢酶;和/或

醛/醇脱氢酶;

(iii)BDO途径,其包含:

(a)α-酮戊二酸脱羧酶;

谷氨酸脱氢酶;谷氨酸脱羧酶;和去氨基的4-氨基丁酸氧化还原酶或4-氨基丁酸氨基转移酶;和/或

α-酮戊二酸脱氢酶和辅酶A-依赖性的琥珀酸半醛脱氢酶;

(b)4-羟基丁酸脱氢酶;和

(c)4-羟基丁酸激酶;磷酸转-4-羟基丁酰酶;4-羟基丁酰-辅酶A还原酶;和4-羟基丁醛

还原酶；

4-羟基丁酸激酶；磷酸化的4-羟基丁醛脱氢酶；和4-羟基丁醛还原酶；

4-羟基丁酸激酶；磷酸转-4-羟基丁酰酶；和醇形成的4-羟基丁酰-辅酶A还原酶；

4-羟基丁酰-辅酶A转移酶或4-羟基丁酰-辅酶A水解酶或4-羟基丁酰-辅酶A连接酶；4-羟基丁酰-辅酶A还原酶；和4-羟基丁醛还原酶；和/或

4-羟基丁酰-辅酶A转移酶或4-羟基丁酰-辅酶A水解酶或4-羟基丁酰-辅酶A连接酶；和醇形成的4-羟基丁酰-辅酶A还原酶；

(iv)BDO途径，其包含：

(a)谷氨酸辅酶A转移酶或谷氨酰基-辅酶A水解酶或谷氨酰基-辅酶A连接酶；谷氨酰基-辅酶A还原酶；和谷氨酸-5-半醛还原酶；

谷氨酸辅酶A转移酶或谷氨酰基-辅酶A水解酶或谷氨酰基-辅酶A连接酶；和醇形成的谷氨酰基-辅酶A还原酶；和/或

谷氨酸5-激酶；磷酸化的谷氨酸-5-半醛脱氢酶；和谷氨酸-5-半醛还原酶；

(b)去氨基的2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶或2-氨基-5-羟基戊酸氨基转移酶；和

(c)5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶；和4-羟基丁醛还原酶；

脱羧的5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶；4-羟基丁酰-辅酶A还原酶；和4-羟基丁醛还原酶；和/或

脱羧的5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶和醇形成的4-羟基丁酰-辅酶A还原酶；

(v)BDO途径，其包含：4-羟基丁酸脱氢酶、琥珀酰-辅酶A合成酶、辅酶A-依赖性的琥珀酸半醛脱氢酶、4-羟基丁酰:辅酶A转移酶、4-丁酸激酶、磷酸转丁酰酶、α-酮戊二酸脱羧酶、醛脱氢酶、醇脱氢酶或醛/醇脱氢酶；

(vi)BDO途径，其包含：4-氨基丁酸辅酶A转移酶、4-氨基丁酰-辅酶A水解酶、4-氨基丁酸-辅酶A连接酶、4-氨基丁酰-辅酶A氧化还原酶(去氨基)、4-氨基丁酰-辅酶A氨基转移酶或4-羟基丁酰-辅酶A脱氢酶；

(vii)BDO途径，其包含：4-氨基丁酸辅酶A转移酶、4-氨基丁酰-辅酶A水解酶、4-氨基丁酸-辅酶A连接酶、4-氨基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成)、4-氨基丁酰-辅酶A还原酶、4-氨基丁-1-醇脱氢酶、4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)或4-氨基丁-1-醇氨基转移酶；

(viii)BDO途径，其包含：4-氨基丁酸激酶、4-氨基丁醛脱氢酶(磷酸化)、4-氨基丁-1-醇脱氢酶、4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)、4-氨基丁-1-醇氨基转移酶、[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸氧化还原酶(去氨基)、[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸氨基转移酶、4-羟基丁酰-磷酸脱氢酶或4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)；

(ix)BDO途径，其包含：α-酮戊二酸5-激酶、2,5-二氧代戊酸半醛脱氢酶(磷酸化)、2,5-二氧代戊酸还原酶、α-酮戊二酸辅酶A转移酶、α-酮戊二酸基-辅酶A水解酶、α-酮戊二酸基-辅酶A连接酶、α-酮戊二酸基-辅酶A还原酶、5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶、α-酮戊二酸基-辅酶A还原酶(醇形成)、5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶或5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)；

(x)BDO途径，其包含：谷氨酸辅酶A转移酶、谷氨酰基-辅酶A水解酶、谷氨酰基-辅酶A连接酶、谷氨酸5-激酶、谷氨酸-5-半醛脱氢酶(磷酸化)、谷氨酰基-辅酶A还原酶、谷氨酸-5-半醛还原酶、谷氨酰基-辅酶A还原酶(醇形成)、2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶(去氨基)、2-氨基-5-羟基戊酸氨基转移酶、5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶、5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶

(脱羧)；

(xi)BDO途径，其包含：3-羟基丁酰-辅酶A脱氢酶、3-羟基丁酰-辅酶A脱水酶、乙烯乙酰基-辅酶AΔ-异构酶或4-羟基丁酰-辅酶A脱水酶；

(xii)BDO途径，其包含：高丝氨酸脱氨酶、高丝氨酸辅酶A转移酶、高丝氨酸-辅酶A水解酶、高丝氨酸-辅酶A连接酶、高丝氨酸-辅酶A脱氨酶、4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A转移酶、4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A水解酶、4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A连接酶、4-羟基丁-2-烯酰酯还原酶、4-羟基丁酰-辅酶A转移酶、4-羟基丁酰-辅酶A水解酶、4-羟基丁酰-辅酶A连接酶或4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A还原酶；

(xiii)BDO途径，其包含：琥珀酰-辅酶A还原酶(醇形成)、4-羟基丁酰-辅酶A水解酶、4-羟基丁酰-辅酶A连接酶或4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)；和

(xiv)BDO途径，其包含：谷氨酸脱氢酶、4-氨基丁酸氧化还原酶(去氨基)、4-氨基丁酸氨基转移酶、谷氨酸脱羧酶、4-羟基丁酰-辅酶A水解酶、4-羟基丁酰-辅酶A连接酶或4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)；和

(B)包含编码需氧的呼吸控制调节系统的基因的破坏；或表达外源的NADH不敏感的柠檬酸合成酶。

5.用于生产1,4-丁二醇(BDO)的方法，包括在一定条件下和以足够的时间培养权利要求4的非天然存在的微生物体以生产BDO。

6.经遗传修饰的微生物体，其具有包含1,4-丁二醇(BDO)途径酶的BDO途径，其中所述微生物体：

(A)包含选自如下的BDO途径：

(i)BDO途径，其包含：

(a)α-酮戊二酸脱羧酶；或

α-酮戊二酸脱氢酶和辅酶A-依赖性的琥珀酸半醛脱氢酶；或

谷氨酸：琥珀酸半醛转氨酶和谷氨酸脱羧酶；

(b)4-羟基丁酸脱氢酶；

(c)4-羟基丁酰-辅酶A转移酶；或

4-羟基丁酸激酶和磷酸转-4-羟基丁酰酶；

(d)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和4-羟基丁醛还原酶；或

醛/醇脱氢酶，所述醛/醇脱氢酶将羟基丁酰-辅酶A转化为1,4-丁二醇；

(ii)BDO途径，其包含：

(a)α-酮戊二酸脱羧酶；或

琥珀酰-辅酶A合成酶和辅酶A-依赖性的琥珀酸半醛脱氢酶；

(b)4-羟基丁酸脱氢酶；

(c)4-羟基丁酰-辅酶A转移酶；或

4-羟基丁酸激酶和磷酸转-4-羟基丁酰酶；和

(d)醛脱氢酶，所述醛脱氢酶将羟基丁酰-辅酶A转化为4-羟基丁醛；和醇脱氢酶，所述醇脱氢酶将4-羟基丁醛转化为1,4-丁二醇；或

醛/醇脱氢酶，所述醛/醇脱氢酶将4-羟基丁酰-辅酶A转化为1,4-丁二醇；

(iii)BDO途径，其包含：

(a)α-酮戊二酸脱羧酶;或

谷氨酸脱氢酶;谷氨酸脱羧酶;和去氨基的4-氨基丁酸氧化还原酶或4-氨基丁酸转氨酶;或

α-酮戊二酸脱氢酶和辅酶A-依赖性的琥珀酸半醛脱氢酶;

(b)4-羟基丁酸脱氢酶;和

(c)4-羟基丁酸激酶;磷酸转-4-羟基丁酰酶;4-羟基丁酰-辅酶A还原酶;和4-羟基丁醛还原酶;或

4-羟基丁酸激酶;磷酸化的4-羟基丁醛脱氢酶;和4-羟基丁醛还原酶;或

4-羟基丁酸激酶;磷酸转-4-羟基丁酰酶;和醇形成的4-羟基丁酰-辅酶A还原酶;或

4-羟基丁酰-辅酶A转移酶或4-羟基丁酰-辅酶A水解酶或4-羟基丁酰-辅酶A连接酶;4-羟基丁酰-辅酶A还原酶;和4-羟基丁醛还原酶;或

4-羟基丁酰-辅酶A转移酶或4-羟基丁酰-辅酶A水解酶或4-羟基丁酰-辅酶A连接酶;和醇形成的4-羟基丁酰-辅酶A还原酶;和

(iv)BDO途径,其包含:

(a)谷氨酸辅酶A转移酶或谷氨酰基-辅酶A水解酶或谷氨酰基-辅酶A连接酶;谷氨酰基-辅酶A还原酶;和谷氨酸-5-半醛还原酶;或

谷氨酸辅酶A转移酶或谷氨酰基-辅酶A水解酶或谷氨酰基-辅酶A连接酶;和醇形成的谷氨酰基-辅酶A还原酶;或

谷氨酸5-激酶;磷酸化的谷氨酸-5-半醛脱氢酶;和谷氨酸-5-半醛还原酶;

(b)去氨基的2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶或2-氨基-5-羟基戊酸转氨酶;和

(c)5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶;和4-羟基丁醛还原酶;或

脱羧的5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶;4-羟基丁酰-辅酶A还原酶;和4-羟基丁醛还原酶;或

脱羧的5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶和醇形成的4-羟基丁酰-辅酶A还原酶;

(v)BDO途径,其包含:

(a)4-氨基丁酸辅酶A转移酶;

4-氨基丁酰-辅酶A水解酶;或

4-氨基丁酸-辅酶A连接酶;

(b)4-氨基丁酰-辅酶A氧化还原酶(去氨基);或

4-氨基丁酰-辅酶A转氨酶;

(c)4-羟基丁酰-辅酶A脱氢酶;和

(d)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成);或

4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和1,4-丁二醇脱氢酶;

(vi)BDO途径,其包含:

(a)4-氨基丁酸辅酶A转移酶;

4-氨基丁酰-辅酶A水解酶;或

4-氨基丁酸-辅酶A连接酶;

(b)4-氨基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成);或

4-氨基丁酰-辅酶A还原酶和4-氨基丁-1-醇脱氢酶;

(c)4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)或4-氨基丁-1-醇转氨酶;

和

(d)1,4-丁二醇脱氢酶;

(vii)BDO途径,其包含;

(a)4-氨基丁酸激酶;

(b)4-氨基丁醛脱氢酶(磷酸化);

(c)4-氨基丁-1-醇脱氢酶;

(d)4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基);或

4-氨基丁-1-醇转氨酶;和

(e)1,4-丁二醇脱氢酶;

(viii)BDO途径,其包含;

(a)4-氨基丁酸激酶;

(b)[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸氧化还原酶(去氨基);或[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸转氨酶;

(c)4-羟基丁酰-磷酸脱氢酶;

(d)4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化);和

(e)1,4-丁二醇脱氢酶;

(ix)BDO途径,其包含:

(a)α-酮戊二酸5-激酶;

(b)2,5-二氧代戊酸半醛脱氢酶(磷酸化);

(c)2,5-二氧代戊酸还原酶;

(d)5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶;和

(e)1,4-丁二醇脱氢酶;

(x)BDO途径,其包含:

(a)α-酮戊二酸辅酶A转移酶;

α-酮戊二酸基-辅酶A水解酶;或

α-酮戊二酸基-辅酶A连接酶;

(b)α-酮戊二酸基-辅酶A还原酶和5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶;或

α-酮戊二酸基-辅酶A还原酶(醇形成);

(c)5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶;和

(d)1,4-丁二醇脱氢酶;

(xi)BDO途径,其包含:

(a)α-酮戊二酸5-激酶;

(b)2,5-二氧代戊酸半醛脱氢酶(磷酸化);

(c)2,5-二氧代戊酸还原酶;

(d)5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧);和

(e)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成);或

4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和1,4-丁二醇脱氢酶;

(xii)BDO途径,其包含:

(a)α-酮戊二酸辅酶A转移酶;

α-酮戊二酸基-辅酶A水解酶;或

α-酮戊二酸基-辅酶A连接酶;

(b)α-酮戊二酸基-辅酶A还原酶和5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶;或

α-酮戊二酸基-辅酶A还原酶(醇形成);

(c)5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧);和

(d)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成);或

4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和1,4-丁二醇脱氢酶;

(xiii)BDO途径,其包含:

(a)谷氨酸辅酶A转移酶;

谷氨酰基-辅酶A水解酶;或

谷氨酰基-辅酶A连接酶;

(b)谷氨酰基-辅酶A还原酶和谷氨酸-5-半醛还原酶;或

谷氨酰基-辅酶A还原酶(醇形成);

(c)2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶(去氨基);或

2-氨基-5-羟基戊酸转氨酶;

(d)5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶;和

(e)1,4-丁二醇脱氢酶;

(xiv)BDO途径,其包含:

(a)谷氨酸5-激酶;

(b)谷氨酸-5-半醛脱氢酶(磷酸化);

(c)谷氨酸-5-半醛还原酶;

(d)2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶(去氨基);或

2-氨基-5-羟基戊酸转氨酶;

(e)5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶;和

(f)1,4-丁二醇脱氢酶;

(xv)BDO途径,其包含:

(a)谷氨酸辅酶A转移酶;

谷氨酰基-辅酶A水解酶;

谷氨酰基-辅酶A连接酶;

(b)谷氨酰基-辅酶A还原酶和谷氨酸-5-半醛还原酶;或

谷氨酰基-辅酶A还原酶(醇形成);

(c)2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶(去氨基);或

2-氨基-5-羟基戊酸转氨酶;

(d)5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧);和

(e)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成);或

4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和1,4-丁二醇脱氢酶;

(xvi)BDO途径,其包含:

(a)谷氨酸5-激酶;

(b)谷氨酸-5-半醛脱氢酶(磷酸化)；

(c)谷氨酸-5-半醛还原酶；

(d)2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶(去氨基)；或

2-氨基-5-羟基戊酸转氨酶；

(e)5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)；和

(f)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成)；或

4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和1,4-丁二醇脱氢酶；

(xvii)BDO途径，其包含：

(a)3-羟基丁酰-辅酶A脱氢酶；

(b)3-羟基丁酰-辅酶A脱水酶；

(c)乙烯乙酰基-辅酶AΔ-异构酶；

(d)4-羟基丁酰-辅酶A脱水酶；和

(e)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成)；或

4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和1,4-丁二醇脱氢酶；

(xviii)BDO途径，其包含：

(a)高丝氨酸脱氨酶；

(b)4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A转移酶；

4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A水解酶；或

4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A连接酶；

(c)4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A还原酶；和

(d)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成)；或

4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和1,4-丁二醇脱氢酶；

(xix)BDO途径，其包含：

(a)高丝氨酸脱氨酶；

(b)4-羟基丁-2-烯酰酯还原酶；

(c)4-羟基丁酰-辅酶A转移酶；

4-羟基丁酰-辅酶A水解酶；或

4-羟基丁酰-辅酶A连接酶；和

(d)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成)；或

4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和1,4-丁二醇脱氢酶；

(xx)BDO途径，其包含：

(a)高丝氨酸辅酶A转移酶；

高丝氨酸-辅酶A水解酶；或

高丝氨酸-辅酶A连接酶；

(b)高丝氨酸-辅酶A脱氨酶；

(c)4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A还原酶；和

(d)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成)；或

4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和1,4-丁二醇脱氢酶；

(xxi)BDO途径，其包含：

(a)琥珀酰-辅酶A还原酶和4-羟基丁酸脱氢酶;或
琥珀酰-辅酶A还原酶(醇形成);
(b)4-羟基丁酰-辅酶A转移酶;
4-羟基丁酰-辅酶A水解酶;或
4-羟基丁酰-辅酶A连接酶;和
(c)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成);或
4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和1,4-丁二醇脱氢酶;
(xxii)BDO途径,其包含:
(a)琥珀酰-辅酶A还原酶和4-羟基丁酸脱氢酶;或
琥珀酰-辅酶A还原酶(醇形成);
(b)4-羟基丁酸激酶;
(c)磷酸转-4-羟基丁酰酶;和
(d)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成);或
4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和1,4-丁二醇脱氢酶;
(xxiii)BDO途径,其包含:
(a)琥珀酰-辅酶A还原酶和4-羟基丁酸脱氢酶;或
琥珀酰-辅酶A还原酶(醇形成);
(b)4-羟基丁酸激酶;
(c)4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化);和
(d)1,4-丁二醇脱氢酶;
(xxiv)BDO途径,其包含:
(a)谷氨酸脱氢酶;
(b)谷氨酸脱羧酶;
(c)4-氨基丁酸氧化还原酶(去氨基);或
4-氨基丁酸转氨酶;
(d)4-羟基丁酸脱氢酶;
(e)4-羟基丁酰-辅酶A转移酶;
4-羟基丁酰-辅酶A水解酶;或
4-羟基丁酰-辅酶A连接酶;和
(f)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成);或
4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和1,4-丁二醇脱氢酶;
(xxv)BDO途径,其包含:
(a)α-酮戊二酸脱羧酶;
(b)4-羟基丁酸脱氢酶;
(c)4-羟基丁酰-辅酶A转移酶;
4-羟基丁酰-辅酶A水解酶;
4-羟基丁酰-辅酶A连接酶;和
(d)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成);或
4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和1,4-丁二醇脱氢酶;

(xxvi)BDO途径,其包含:

(a)谷氨酸脱氢酶;

(b)谷氨酸脱羧酶;

(c)4-氨基丁酸氧化还原酶(去氨基);或

4-氨基丁酸转氨酶;

(d)4-羟基丁酸脱氢酶;

(e)4-羟基丁酸激酶;

(f)磷酸转-4-羟基丁酰酶;和

(g)4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成);或

4-羟基丁酰-辅酶A还原酶和1,4-丁二醇脱氢酶;和

(xxvii)BDO途径,其包含:

(a)α-酮戊二酸脱羧酶;

(b)4-羟基丁酸脱氢酶;

(c)4-羟基丁酸激酶;

(d)4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化);和

(e)1,4-丁二醇脱氢酶;和

(B)包含编码需氧的呼吸控制调节系统的蛋白的基因的破坏;或表达外源的NADH不敏感柠檬酸合酶。

7.生产1,4-丁二醇(BDO)的方法,包括培养权利要求6的微生物体以生产BDO。

8.生产分离或纯化的1,4-丁二醇(BDO)的方法,包括培养权利要求6的微生物体以生产BDO,并分离或纯化BDO。

9.一种组合物,其包含生物合成的1,4-丁二醇和权利要求6的微生物体或其细胞溶解产物或培养上清液。

10.生产聚合物的方法,包括将权利要求6的微生物体生产的生物合成的1,4-丁二醇化学或酶催化转化为该聚合物。

生产1,4-丁二醇的微生物和相关方法

[0001] 本申请是申请日为2010年06月04日、申请号为201710711482.5、名称为“生产1,4-丁二醇的微生物和相关方法”的发明申请的分案。

[0002] 所述申请号为201710711482.5的发明申请是申请日为2010年06月04日、申请号为201080034821.7、名称为“生产1,4-丁二醇的微生物和相关方法”的发明申请的分案。

技术领域

[0003] 本申请要求2009年6月4日提交的美国临时申请No.61/184,311的优先权,所述全部内容在此通过引用引入。

[0004] 本发明总体上涉及生物体的计算机(in silico)设计和生物体的工程改造,更具体而言,涉及具有1,4-丁二醇生物合成能力的生物体。

背景技术

[0005] 化合物4-羟基丁酸(4-HB)是4-碳羧酸,其具有作为各种日用品和特种化学品的构造单元的工业潜力。具体而言,4-HB具有充当进入1,4-丁二醇家族化学品的新切入点的潜力,所述1,4-丁二醇家族化学品包括溶剂、树脂、聚合物前体和特种化学品。1,4-丁二醇(BDO)是聚合物中间体和工业溶剂,全球每年销售约30亿磅。BDO目前从石油化学前体、初级乙炔(primarily acetylene)、马来酸酐和环氧丙烷生产。

[0006] 例如,乙炔与2分子甲醛以Reppe合成反应进行反应(Kroschwitz和Grant,Encyclopedia of Chem.Tech.,John Wiley and Sons,Inc.,New York(1999)),然后通过催化氢化形成1,4-丁二醇。据估计美国生产的90%的乙炔被消耗用于丁二醇生产。可选地,其可以通过源自丁烷的马来酸酐的酯化和催化氢化形成。在下游,丁二醇可以通过例如氧化进一步被转化成γ-丁内酯--其可以进一步转化成吡咯烷酮和N-甲基-吡咯烷酮,或通过例如氢解进一步被转化成四氢呋喃。这些化合物作为聚合物中间体、溶剂和添加剂具有各种用途以及具有每年约20亿磅的组合销路。

[0007] 期望通过可选的手段开发生产这些化学品的方法,该手段不仅用可再生物代替石油基原料,而且使用较少的能源和资金集约型工艺。能源部已经提议1,4-二酸,以及特别是琥珀酸,作为关键的生物学生产的中间体,用于生产丁二醇家族产物(DOE Report,“Top Value-Added Chemicals from Biomass”,2004)。然而,琥珀酸的分离和纯化昂贵并且催化还原成丁二醇要求高温和高压。

[0008] 因此,对有效生产商业数量的1,4-丁二醇和其化学前体的可选方法存在需求。本发明满足了这种需求并且还提供相关的优势。

发明内容

[0009] 本发明提供包含1,4-丁二醇(BDO)途径的非天然存在的微生物体,该途径包含编码BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述核酸以足以产生BDO的量表达,并且为BDO的表达被进一步优化。本发明还提供利用所述微生物体生产BDO的方法。

附图说明

[0010] 图1是显示4-羟基丁酸(4-HB)和1,4-丁二醇生产的生物化学途径的示意图。前5个步骤对于大肠杆菌是内源性的,而其余步骤可以异源表达。催化生物合成反应的酶是:(1)琥珀酰-CoA合成酶;(2)CoA-非依赖性琥珀酸半醛脱氢酶;(3)α-酮戊二酸脱氢酶;(4)谷氨酸:琥珀酸半醛转氨酶;(5)谷氨酸脱羧酶;(6)CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶;(7)4-羟基丁酸脱氢酶;(8)α-酮戊二酸脱羧酶;(9)4-羟基丁酰CoA:乙酰-CoA转移酶;(10)丁酸激酶;(11)磷酸转丁酰酶;(12)醛脱氢酶;(13)醇脱氢酶。

[0011] 图2是显示在大肠杆菌(E.coli)中高丝氨酸生物合成的示意图。

[0012] 图3显示使用含有表达各种组合的4-HB途径基因质粒的大肠杆菌菌株在葡萄糖基本培养基中生产4-HB。(a)在培养液中的4-HB浓度;(b)在培养液中的琥珀酸浓度;(c)在600nm处测量的培养物OD。条形图组表示24小时、48小时和72小时(如果测量)时间点。沿X轴的编码表示使用的菌株/质粒组合。第一个标记指宿主菌株:1,MG1655lacIQ;2,MG1655ΔgabD lacIQ;3,MG1655ΔgabDΔaldA lacIQ。第二个标记指使用的质粒组合:1,pZE13-0004-0035和pZA33-0036;2,pZE13-0004-0035和pZA33-0010n;3,pZE13-0004-0008和pZA33-0036;4,pZE13-0004-0008和pZA33-0010n;5,对照载体pZE13和pZA33。

[0013] 图4显示在表达来自结核分支杆菌(Mycobacterium tuberculosis)的α-酮戊二酸脱羧酶的大肠杆菌菌株中从葡萄糖生产4-HB。菌株1-3包含pZE13-0032和pZA33-0036。菌株4仅表达空载体pZE13和pZA33。宿主菌株如下:1和4,MG1655lacIQ;2,MG1655ΔgabD lacIQ;3,MG1655ΔgabDΔaldA lacIQ。条形图指在24和48小时时的浓度。

[0014] 图5显示在重组大肠杆菌菌株中从10mM4-HB生产BDO。编号的位置与实验对应,其中MG1655lacIQ包含pZA33-0024,表达来自牙龈卟啉单胞菌(P.gingivalis)的cat2,以及下列基因在pZE13上表达:1,没有(对照);2,0002;3,0003;4,0003n;5,0011;6,0013;7,0023;8,0025;9,0008n;10,0035。基因编号在表6中定义。对于每个位置,条形图分别指需氧条件、微需氧条件和厌氧条件。微需氧条件通过密封培养管但不排空它们来建立。

[0015] 图6显示由MG1655 lacIQ pZE13-0004-0035-0002pZA33-0034-0036产生的4-HB和BDO的质谱,MG1655lacIQ pZE13-0004-0035-0002pZA33-0034-0036生长在补充有4g/L未标记的葡萄糖(a、c、e和g)、均匀标记的13C-葡萄糖(b、d、f和h)的M9基本培养基中。(a)和(b),衍生BDO的质量116特征碎片,包含2个碳原子;(c)和(d),衍生BDO的质量177特征碎片,包含1个碳原子;(e)和(f),衍生4-HB的质量117特征碎片,包含2个碳原子;(g)和(h),衍生4-HB的质量233特征碎片,包含4个碳原子。

[0016] 图7是生产γ-丁内酯的生物过程的示意性工艺流程图。图(a)图解了伴随分批分离的补料分批发酵,图(b)图解了伴随连续分离的补料分批发酵。

[0017] 图8A和8B显示示例性的1,4-丁二醇(BDO)途径。图8A显示来自琥珀酰-CoA的BDO途径。图8B显示来自α-酮戊二酸的BDO途径。

[0018] 图9A-9C显示示例性的BDO途径。图9A和9B显示来自4-氨基丁酸的途径。图9C显示来自乙酰-CoA至4-氨基丁酸的途径。

[0019] 图10显示示例性的来自α-酮戊二酸的BDO途径。

[0020] 图11显示示例性的来自谷氨酸的BDO途径。

[0021] 图12显示示例性的来自乙酰-CoA的BDO途径。

[0022] 图13显示示例性的来自高丝氨酸的BDO途径。

[0023] 图14显示大肠杆菌琥珀酰-CoA合成酶的核苷酸和氨基酸序列。图14A显示大肠杆菌sucCD操纵子的核苷酸序列(SEQ ID NO:)。图14B(SEQ ID NO:)和14C(SEQ ID NO:)显示由sucCD操纵子编码的珀酰-CoA合成酶亚单位的氨基酸序列。

[0024] 图15显示牛分枝杆菌α-酮戊二酸脱羧酶的核苷酸和氨基酸序列。图15A显示牛分枝杆菌sucA基因的核苷酸序列(SEQ ID NO:)。图15B显示牛分支杆菌α-酮戊二酸脱羧酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:)。

[0025] 图16显示大肠杆菌中厌氧(微需氧)条件下4-羟基丁酸从基本培养基中的葡萄糖经过α-酮戊二酸的生物合成。所述宿主菌株是ECKh-401。所述实验以质粒pZA33上存在的如下上游途径基因为基础进行标记:1)4hbd-sucA;2)sucCD-sucD-4hbd;3)sucCD-sucD-4hbd-sucA。

[0026] 图17显示大肠杆菌中4-羟基丁酸从基本培养基中的葡萄糖经过琥珀酸和α-酮戊二酸的生物合成。所述宿主菌株是野生型MG1655。所述实验以质粒pZE13和pZA33上存在的如下基因为基础进行标记:1)空对照质粒;2)空pZE13、pZA33-4hbd;3)pZE13-sucA、pZA33-4hbd。

[0027] 图18A显示来自牙龈卟啉单胞菌的oA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶(sucD)的核苷酸序列(SEQ ID NO:),图18B显示编码的氨基酸序列(SEQ ID NO:)。

[0028] 图19A显示来自牙龈卟啉单胞菌的4-羟基丁酸脱氢酶(4hbd)的核苷酸序列(SEQ ID NO:),图19B显示编码的氨基酸序列(SEQ ID NO:)。

[0029] 图20A显示来自牙龈卟啉单胞菌的4-羟基丁酸CoA移转酶(cat2)的核苷酸序列(SEQ ID NO:),图20B显示编码的氨基酸序列(SEQ ID NO:)。

[0030] 图21A显示来自丙酮丁醇梭菌的磷酸转丁酰酶(iptb)的核苷酸序列(SEQ ID NO:),图21B显示编码的氨基酸序列(SEQ ID NO:)。

[0031] 图22A显示来自丙酮丁醇梭菌的丁酸激酶(bukl)的核苷酸序列(SEQ ID NO:),图22B显示编码的氨基酸序列(SEQ ID NO:)。

[0032] 图23显示为了相对于丙酮丁醇梭菌的天然序列具有更多优势大肠杆菌密码子而具有改变的密码子的丙酮丁醇梭菌020(磷酸转丁酰酶)替代核苷酸序列。图23A-23D(分别为020A-020D,SEQ ID NOS:)包含具有大量稀有大肠杆菌密码子由更多优势密码子(A<B<C<D)替代的序列。

[0033] 图24显示为了相对于丙酮丁醇梭菌的天然序列具有更多优势大肠杆菌密码子而具有改变的密码子的丙酮丁醇梭菌021(丁酸激酶)替代核苷酸序列。图24A-24D(分别为021A-021B,SEQ ID NOS:)包含具有大量稀有大肠杆菌密码子由更多优势密码子(A<B<C<D)替代的序列。

[0034] 图25显示具有用于大肠杆菌中表达的优化密码子的丁酸激酶(BK)和磷酸转丁酰酶(PTB)的提高表达。图25A显示蛋白质用考马斯蓝染色的十二烷基磺酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE);泳道1,无插入物的对照质粒;泳道2,大肠杆菌中丙酮丁醇梭菌天然序列的表达;泳道3,020B-021B密码子优化的PTB-BK的表达;泳道4,020C-021C密码子优化的PTB-BK的表达。显示BK和PTB的位置。图25B显示相比于密码子优化的020B-021B(2021B)和020C-021C(2021C),天然丙酮丁醇梭菌序列(2021n)的BK和PTB活性。

[0035] 图26显示表达BDO产生酶:Cat2(034);2021n;2021B;2021C的不同菌株中BDO和γ-丁内酯(GBL)和生产。

[0036] 图27A显示天然拜氏梭菌Ald基因(025n)的核苷酸序列(SEQ ID NO:),图27B显示编码的氨基酸序列(SEQ ID NO:)。

[0037] 图28A-28D显示拜氏梭菌Ald基因(分别为025A-025D,SEQ ID NOS:)的替代基因序列,其中增加的稀有密码子量由更多的优势密码子替代(A<B<C<D)。

[0038] 图29显示天然的拜氏梭菌Ald基因和密码子优化的变体的表达;无插入物(对照无插入物)、025n、025A、025B、025C、025D。

[0039] 图30显示不同的菌株中BDO或BDO和乙醇的产生。图30显示包含天然拜氏梭菌Ald基因(025n)或具有用于大肠杆菌中表达的优化密码子的变体(025A-025D)的菌株中BDO的产生。图30B显示相比密码子优化的变体025B,表达丙酮丁醇梭菌AdhE2酶(002C)的菌株中乙醇和BDO的产生。第三组显示牙龈卟啉单胞菌sucD(035)的表达。所有情况下均表达牙龈卟啉单胞菌Cat2(034)。

[0040] 图31A显示来自热葡糖苷酶地芽孢杆菌(Geobacillus thermoglucosidasius)的adh1基因核苷酸序列SEQ ID NO:),图31B显示编码的氨基酸序列(SEQ ID NO:)。

[0041] 图32A显示大肠杆菌中热葡糖苷酶地芽孢杆菌adh1基因的表达。通过SDS-PAGE且考马斯蓝染色分析无插入物的质粒、具有083插入物(头状地霉N-苄基-3-吡咯烷醇脱氢酶)的质粒和具有084插入物(热葡糖苷酶地芽孢杆菌adh1)的质粒的全部细胞溶解产物或上清液。图32B显示丁醛(菱形)或4-羟基丁醛(正方形)作为底物的084的活性。

[0042] 图33显示各种菌株中BDO的生产:无插入物的质粒;025B,025B-026n;025B-026A;025B-026B;025B-026C;025B-050;025B-052;025B-053;025B-055;025B-057;025B-058;025B-071;025B-083;025B-084;PTSlacO-025B;PTSlacO-025B-026n。

[0043] 图34显示载体pRE1 19-V2的质粒图。

[0044] 图35显示包含aceF和lpdA基因的ECKh-138区域的序列。肺炎克雷伯菌lpdA基因为下划线的,Glu354Lys突变体中改变的密码子为阴影的。

[0045] 图36显示天然大肠杆菌lpdA和突变体肺炎克雷伯菌lpdA的蛋白质序列对比。

[0046] 图37显示菌株AB3,MG1655 AldhA和ECKh-138中4-羟基丁酸(左条形图)和BDO(右条形图)的产生。所有菌株表达中拷贝质粒pZA33上的大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd,以及高拷贝质粒pZE13上的牙龈卟啉单胞菌Cat2,丙酮丁醇梭菌AdhE2。

[0047] 图38显示融合至pflB-p6启动子和核糖体结合位点(RBS)的aceE基因5'末端的核苷酸序列。5'斜体序列显示aroP基因的起始点,其与pdh操纵子相反的方向转录。3'斜体序列显示aceE基因的起始点。大写体:pflB RBS。下划线:FNR结合位点。粗体:pflB-p6启动子序列。

[0048] 图39显示菌株ECKh-456中aceF-lpdA区域的核苷酸序列(SEQ ID NO:)。

[0049] 图40显示各个菌株ECKh-439,ECKh-455和ECKh-456 4-羟基丁酸,BDO和内酮酸盐的产生(分别为从左至右的条形图)。

[0050] 图41A显示用于缺失mdh基因的重组位点的图解。图41B显示来自质粒pKD3的FRT位点和mdh基因同源区侧翼的抗氯霉素基因(CAT)PCR扩增产物的序列。

[0051] 图42显示菌株ECKh-401中arc A缺失区域的序列。

[0052] 图43显示包含菌株ECKh-422突变gltA基因的区域的序列。

[0053] 图44显示野生型gltA基因产物和R163L突变体的柠檬酸合成酶活性。在无(菱形)或存在0.4mMNADH(正方形)时进行测定。

[0054] 图45显示菌株ECKh-401和ECKh-422中4-羟基丁酸(左条形图)和BDO(右条形图)的产生,两者均表达质粒上用于完成BDO途径的基因。

[0055] 图46显示来自代谢标记实验的中心代谢量和相关的95％置信区间。数值为标准化至1mMol/h葡萄糖摄入率的摩尔量。结果表明碳量通过柠檬酸合成酶进入氧化方向并且大部分碳进入BDO途径而不是完成三羧酸循环。

[0056] 图47显示菌株ECKh-138和ECKh-422的胞外产物形成,两者均表达质粒上的完整BDO途径。所测定的产物为乙酸盐(Ace),内酮酸盐(Pyr),4-羟基丁酸(4HB),1,4-丁二醇(BDO),乙醇(EtOH)和其他产物,其包括γ-丁内酯(GBL),琥珀酸和乳酸盐。

[0057] 图48显示通过流感嗜血杆菌磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(pepck)替换PEP羧化酶(ppc)后区域的序列。pepck编码区为下划线的。

[0058] 图49显示在含有50mMNaHCO3的基本培养基中培养的发展pepCK菌株的生长。

[0059] 图50显示表达质粒pZS*13上的牙龈卟啉单胞菌Cat2和拜氏梭菌Ald的菌株ECKh-453中产物的形成。所测定的产物为1,4-丁二醇(BDO),内酮酸盐,4-羟基丁酸(4HB),乙酸盐,γ-丁内酯(GBL)和乙醇。

[0060] 图51显示两种菌株ECKh-453和ECKh-432的BDO生产。两者均包含表达牙龈卟啉单胞菌Cat2和拜氏梭菌Ald的质粒pZS*13。如所显示的,培养物在用27或18号规格的针穿孔的容器中微需氧条件下培养。

[0061] 图52显示在包含启动子,sucCD基因,sucD基因,4hbd基因和终止子序列的多顺反子DNA片断插入区域的菌株ECKh-426基因组DNA的核苷酸序列。

[0062] 图53显示在包含启动子,sucA基因,克氏梭菌4hbd基因和终止子序列的多顺反子序列插入区域的菌株ECKh-432染色体区域的核苷酸序列。

[0063] 图54显示具有整合入染色体的上游BDO途径编码基因并且包含含有下游BDO途径基因的ECKh-432菌株在基本培养基中从葡萄糖合成BDO。

[0064] 图55显示包含与rrnC区域同源的区域侧翼的非-磷酸转移酶(非-PTS)蔗糖利用基因的PCR产物。

[0065] 图56显示rrnC操纵子中整合位点的示意图。

[0066] 图57显示菌株ECKh-432在葡萄糖上培养以及菌株ECKh-463在蔗糖上培养生长48小时后,标准化至培养物OD600的平均产物浓缩。两者均含有表达牙龈卟啉单胞菌Cat2和拜氏梭菌Ald的质粒pZS*13。所述数据为每种菌株的6次重复培养物。所测定的产物为1,4-丁二醇(BDO),4-羟基丁酸(4HB),γ-丁内酯(GBL),内酮酸盐(PYR)和乙酸盐(ACE)(分别为从左至右的条形图)。

具体实施方式

[0067] 本发明涉及设计和生产具有4-羟基丁酸(4-HB)、γ-丁内酯和1,4-丁二醇生物合成生产能力的细胞和生物体。本发明尤其涉及通过导入编码BDO途径酶的一种或多种核酸

能够生产BDO的微生物体的设计。

[0068] 在一个实施方式中，本发明利用大肠杆菌新陈代谢的计算机化学计算模型，该模型鉴定生物合成生产4-羟基丁酸(4-HB)和1,4-丁二醇(BDO)的代谢设计。本文所述的结果表明，在大肠杆菌和其它细胞或生物体中可以设计和重组改造代谢途径，以实现4-HB和下游产物诸如1,4-丁二醇的生物合成。4-HB的生物合成生产，例如，对于计算机设计，可以通过构建具有已设计的代谢基因型的菌株确认。这些代谢改造的细胞或生物体也可以经历适应进化以进一步增加4-HB生物合成，包括在一些条件下接近理论最大生长。

[0069] 在某些实施方式中，设计菌株的4-HB生物合成特征使得它们是遗传稳定的并且在连续的生物过程中特别有用。单独菌株设计策略通过如下鉴定：将不同的非自然的或异源的反应能力掺入大肠杆菌中，以导致从CoA-非依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、琥珀酰-CoA合成酶和CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶或谷氨酸：琥珀酸半醛转氨酶产生4-HB和1,4-丁二醇的代谢途径。鉴定计算机代谢设计，其在大肠杆菌和酵母种中从这些代谢途径的每一种导致4-HB的生物合成。1,4-丁二醇中间体γ-丁内酯可在pH＜7.5的条件下通过自发环化在培养物中产生，特别是在酸性条件下，诸如pH 5.5以下，例如，pH＜7、pH＜6.5、pH＜6以及特别是pH＜5.5或更低。

[0070] 经由平台的计算组分鉴定的菌株可通过基因改造任意预测的代谢变化而被投入实际生产中，该代谢变化导致4-HB、1,4-丁二醇或其它中间体和/或下游产物的生物合成生产。在另一进一步的实施方式中，显示出这些化合物的生物合成生产的菌株可进一步经受适应进化，以进一步增加产物的生物合成。适应进化后产物生物合成产率的水平也可以通过系统的计算组分预测。

[0071] 在其它具体实施方式中，微生物体被构建以表达4-HB生物合成途径，该途径编码从琥珀酸至4-HB以及至4-HB-CoA的酶促步骤。琥珀酸辅酶A转移酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、NAD-依赖性4-羟基丁酸脱氢酶和4-羟基丁酸辅酶A转移酶在宿主微生物体中的共表达，与缺乏4-HB生物合成途径的宿主微生物体相比，导致显著的4-HB产生。在进一步的具体实施方式中，产生4-HB的微生物体被生产，通过引入编码α-酮戊二酸脱羧酶和NAD-依赖性4-羟基丁酸脱氢酶的核酸，该微生物体利用α-酮戊二酸作为底物。

[0072] 在另一具体实施方式中，包含1,4-丁二醇(BDO)生物合成途径的微生物体被构建，当该微生物体在4-HB存在的情况下培养时其生物合成BDO。BDO生物合成途径由编码多功能醛/醇脱氢酶的核酸或编码醛脱氢酶(dehydrogenawse)和醇脱氢酶的核酸组成。为了维持在4-HB底物上生长，这些产生BDO的微生物体也表达4-羟基丁酸CoA转移酶或4-丁酸激酶以及磷酸转羟基丁酰酶。在另一进一步的具体实施方式中，微生物体被生产，其通过编码功能性4-HB生物合成途径和功能性BDO生物合成途径的核酸的外源表达来合成BDO。4-HB生物合成途径由琥珀酸辅酶A转移酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、NAD-依赖性4-羟基丁酸脱氢酶和4-羟基丁酸辅酶A转移酶组成。BDO途径由多功能的醛/醇脱氢酶组成。此处进一步的描述为生产BDO的另外的途径(参见图8-13)。

[0073] 如本文所用，术语“非自然存在的”，当用于指本发明的微生物体或微生物时，意欲指该微生物体具有至少一个在所述物种的自然存在的菌株中通常未发现的遗传变化，包括所述物种的野生型菌株。遗传变化包括，例如，引入编码代谢多肽的可表达核酸的修饰、其它核酸加成、核酸缺失和/或微生物遗传物质的其它功能破坏。这些修饰包括，例如，所述物

种的异源多肽、同源多肽或异源和同源多肽的编码区和其功能片段。另外的修饰包括，例如，非编码调控区，其中修饰改变基因或操纵子的表达。

[0074] 示例性的代谢多肽包括在4-HB生物合成途径中的酶和在BDO化合物家族的生物合成途径中的酶。

[0075] 代谢修饰是指从其自然存在的状态被改变的生物化学反应。因此，非自然存在的微生物具有对编码代谢多肽或其功能片段的核酸的遗传修饰。针对大肠杆菌和酵母菌微生物体，示例性的代谢修饰将在下面进一步描述。

[0076] 如本文所用，术语“分离的”，当用于指微生物体时，意欲指基本上不含至少一种当所述微生物体在自然界中发现时的组分的生物体。该术语包括从在其自然环境中被发现时的一些或全部组分中移出的微生物体。该术语还包括从微生物体在其非自然存在环境中被发现时的一些或全部组分中移出的微生物体。因此，分离的微生物体部分或完全与其在自然界中发现时或其在非自然存在的环境中生长、保藏、生存时的其它物质分离。分离的微生物体的具体实例包括部分纯的微生物、基本上纯的微生物和在非自然存在的培养基中培养的微生物。

[0077] 如本文所用，术语“微生物的(microbial)”、“微生物体(microbial organism)”或“微生物(microorganism)”意欲指是作为微观细胞存在的任意生物，其包括在古细菌、细菌或真核生物的范围内。因此，该术语意欲包括原核或真核细胞或具有微观大小的生物以及包括所有物种的细菌、古细菌和真细菌以及真核微生物诸如酵母和真菌。该术语还包括任意物种的细胞培养物，所述物种可培养用于生产生物化学物质。

[0078] 如本文所用，术语“4-羟基丁酸”意欲指是丁酸的4-羟基衍生物，其具有化学式$C_4H_8O_3$和104.11g/mol(其钠盐为126.09g/mol)的分子量。化合物4-羟基丁酸(4-hydroxybutanoic acid)在本领域中也被称为4-HB、4-羟基丁酸(4-hydroxybutyrate)、γ-羟基丁酸或GHB。本文使用的术语拟包括该化合物的各种盐形式的任一个并且包括，例如，4-羟基丁酸盐(4-hydroxybutanoate)和4-羟基丁酸酯(4-hydroxybutyrate)。4-HB盐形式的具体实例包括4-HB钠和4-HB钾。因此，术语4-羟基丁酸、4-HB、4-羟基丁酸盐、4-羟基丁酸酯、γ-羟基丁酸和GHB以及其它的本领域公认的名称在本文中同义使用。

[0079] 如本文所用，术语“单体的”，当用于指4-HB时，意欲指是非聚合或非衍生形式的4-HB。聚合4-HB的具体实例包括聚-4-羟基丁酸和例如4-HB和3-HB的共聚物。4-HB的衍生形式的具体实例是4-HB-CoA。其它聚合4-HB形式和其它4-HB衍生形式在本领域也是已知的。

[0080] 如本文所用，术语“γ-丁内酯”意欲指是具有化学式C4H6O2和分子量为86.089g/mol的内酯。化合物γ-丁内酯在本领域也被称为GBL、丁内酯、1,4-内酯、4-丁内酯、4-羟基丁酸内酯和γ-羟基丁酸内酯。本文使用的术语拟包括该化合物的各种盐形式的任一种。

[0081] 如本文所用，术语“1,4-丁二醇”意欲指是链烷丁烷的醇衍生物，其带有两个羟基，具有化学式C4H10O2和90.12g/mol的分子量。化合物1,4-丁二醇在本领域也称为BDO并且是本文中被称为BDO化合物家族的化合物家族的化学中间体或前体。

[0082] 如本文所用，术语“四氢呋喃”意欲指与芳香化合物呋喃的完全氢化类似物对应的杂环有机化合物，其具有化学式C4H8O和72.11g/mol的分子量。化合物四氢呋喃在本领域也被称为THF、四氢呋喃、1,4-环氧丁烷、环氧丁烷、环四氢呋喃(cyclotetramethylene oxide)、噁环戊烷、二亚乙基氧、四氢呋喃(oxolane)、呋喃烷、氢化呋喃、四亚甲基氧

(tetramethylene oxide)。本文使用的术语拟包括该化合物的各种盐形式的任一种。

[0083] 如本文所用,术语“CoA”或“辅酶A”意欲指有机辅助因子或辅基(酶的非蛋白质部分),其存在是许多酶(脱辅基酶蛋白)的活性所必需的,以形成活性酶系统。辅酶A在某些缩合酶中起作用,在乙酰基或其它酰基转移以及在脂肪酸合成和氧化、丙酮酸氧化以及在其它乙酰化中产生影响。

[0084] 如本文所用,术语“基本上厌氧的”,当用于指培养物或生长条件时,意欲指对于在液体培养基中的溶解氧而言氧的量小于饱和状态的约10%。该术语还拟包括液体或固体培养基的密封室被保持在小于约1%氧的空气下。

[0085] 本发明的非自然存在的微生物可包含稳定的遗传变化,其指可被培养成五代以上而不失去所述变化的微生物。一般而言,稳定的遗传变化包括持续10代以上的修饰,特别稳定的修饰将持续约25代以上,以及更特别稳定的遗传修饰将是50代以上,包括无限地。

[0086] 本领域的技术人员应当理解,包括本文示例的代谢修饰在内的遗传变化是参考大肠杆菌和酵母基因以及它们相应的代谢反应进行描述的。然而,假定许多生物的基因组测序完整以及基因组学领域的技能水平高,本领域的技术人员可容易地将本文提供的教导和指导应用于基本上所有的其它生物。例如,本文示例的大肠杆菌代谢变化可通过掺入来自除所述物种之外的物种的相同或相似的编码核酸而容易地应用于其它物种。这些遗传变化一般而言包括例如物种同源物的遗传变化,以及具体而言,直向同源物、种内同源物或非直向同源基因置换。

[0087] 直向同源物通过垂直传递(vertical descent)相关并且在不同生物中负责基本上相同或同一功能的一个基因或多个基因。例如,小鼠环氧化物水解酶和人环氧化物水解酶对于环氧化物的水解生物学功能而言可被认为是直向同源物。例如,当基因共享数量足以表明它们是同源的序列相似性时,所述基因通过垂直传递相关,或基因通过从共同的祖先进化而相关。如果基因共享三维结构,但不一定共享足以表明它们从共同的祖先进化而来的量--其程度为一级序列相似性不可鉴定--的序列相似性,则所述基因也可以被认为直向同源物。为直向同源的基因可以编码具有约25%序列相似性至100%氨基酸序列同源性的蛋白质。编码共享小于25%的氨基酸相似性的蛋白质的基因,如果它们的三维结构也显示相似性,也可以被认为通过垂直传递产生。酶的丝氨酸蛋白酶家族成员--包括组织纤溶酶原激活物和弹性蛋白酶,被认为从共同的祖先通过垂直传递产生。

[0088] 直向同源物包括基因或它们编码的基因产物,其通过例如进化在结构或总体活性方面已经偏离。例如,在一种物种编码显示两种功能的基因产物并且这些功能在第二种物种中已经被分成不同的基因的情况下,三个基因和它们的相应的产物被认为是直向同源物。对于生物化学产物的生长相关的生产(growth-coupled production),本领域的技术人员应当理解,包埋待被破坏的代谢活性的直向同源基因要进行选择用以构建非自然存在的微生物。显示可分离活性的直向同源物的实例是其中不同的活性已经在两种或更多种物种之间或在单一物种内被分成不同的基因产物的情况。具体实例是将弹性蛋白酶蛋白酶解和纤维蛋白溶酶原蛋白酶解--两种类型的丝氨酸蛋白酶活性--作为纤溶酶原激活物和弹性蛋白酶分成不同的分子。第二个实例是支原体5’-3’外切核酸酶和果蝇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外切核酸酶或聚合酶中任一种或两者的直向同源物,反之亦然。

[0089] 相反，种内同源基因是通过例如进化趋异所伴随的复制相关的同源物，并且其具有类似或共同的但不是同样的功能。种内同源基因可以起源或源自例如相同的物种或不同的物种。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)可以被认为是种内同源基因，这是因为它们代表两种不同的酶--其从共同的祖先共同进化而来，所述酶催化不同的反应并且在相同的物种中具有不同的功能。种内同源基因是来自相同物种的、彼此具有明显的序列相似性的蛋白质，这表明它们是同源的或通过从共同的祖先共同进化而相关。种内同源蛋白质家族群包括Hip A同源物、荧光素酶基因、肽酶以及其它。非直向同源基因置换是来自一种物种的非直向同源基因，其可以取代不同物种中的相关基因功能。取代包括，例如，与不同物种的相关功能相比，能够在起源的物种中完成基本上相同或类似的功能。尽管一般而言，非直向同源基因置换可以鉴定为结构上与编码相关功能的已知基因有关，但是结构上较不相关但功能上类似的基因和它们相应的基因产物，仍将落入本文所使用的术语的含义中。功能相似性要求，例如，与编码要求取代的功能的基因相比，在非直向同源基因的活性部位或结合区域上至少有一些结构相似性。因此，非直向同源基因包括例如种内同源基因(paralog)或不相关的基因。

[0090] 因此，在鉴定和构建具有4-HB、GBL和/或BDO生物合成能力的本发明的非自然存在的微生物体中，本领域技术人员应当理解，通过将本文提供的教导和指导应用到具体的物种，代谢修饰的鉴定可以包括直向同源物的鉴定以及引入或失活。就种内同源基因和/或非直向同源基因置换存在于编码催化相似或基本上相似的代谢反应的酶的相关微生物中的程度，本领域的技术人员还可以利用这些进化相关的基因。

[0091] 直向同源物、种内同源基因和非直向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，检查两种多肽的核酸或氨基酸序列将揭示在所比较的序列之间的序列同源性和相似性。基于这些相似性，本领域技术人员可以确定相似性是否足够高，以表明蛋白质通过从共同的祖先进化而相关。本领域的技术人员熟知的算法，诸如Align、BLAST、Clustal W以及其它算法，比较和测定未处理的序列相似性或同源性，并且还测定序列中空位(gap)的存在和显著性，所述空位可以被标记重量或分数。这些算法在本领域也是已知的并且可类似地应用于确定核苷酸序列相似性或同源性。确定相关性的足够相似性的参数基于熟知的方法计算，所述方法用于计算统计学的相似性或在随机多肽中发现相似匹配的机会和所确定的匹配的显著性。如果期望，两个或更多个序列的计算机比较也可以由本领域技术人员进行视觉优化。相关的基因产物或蛋白质可以期望具有高度相似性，例如，25％至100％序列同源性。如果细察足够大小的数据库(约5％)，不相关的蛋自质可以具有一定同源性，所述同源性与期望偶然出现的基本相同。在5％和24％之间的序列可以或不可以代表足够的同源性，以推断所比较的序列是相关的。根据数据集的大小，可以实施确定这些匹配的显著性的另外的统计学分析，以确定这些序列的相关性。

[0092] 使用BLAST算法确定两个或更多个序列的相关性的示例性参数例如可以是如下所示。简言之，氨基酸序列比对可以使用BLASTP2.0.8版(1999年1月5日)和如下参数完成：Matrix:0BLOSUM62;gap open:11;gap extension:1;x_dropoff:50;expect:10.0;wordsize:3;filter:on。核酸序列比对可以使用BLASTN 2.0.6版(1998年9月16日)和如下参数完成:Match:1;mismatch:-2;gap open:5;gap extension:2;x_dropoff:50;expect:10.0;wordsize:11;filter:off。本领域的技术人员了解对上述参数可以进行何种修改以

增加或减少例如比较的严格性和测定两个或更多个序列的相关性。

[0093] 本发明提供非自然存在的微生物生物催化剂,其包括具有4-羟基丁酸(4-HB)生物合成途径的微生物体,所述生物合成途径包含至少一种外源核酸,该外源核酸编码4-羟基丁酸脱氢酶、CoA-非依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、琥珀酰-CoA合成酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、谷氨酸:琥珀酸半醛转氨酶、α-酮戊二酸脱羧酶或谷氨酸脱羧酶,其中外源核酸以足够产生单体4-羟基丁酸(4-HB)的量表达。4-羟基丁酸脱氢酶也称为4-羟基丁酸脱氢酶或4-HB脱氢酶。琥珀酰-CoA合成酶也称为琥珀酰-CoA合成酶或琥珀酰-CoA连接酶。

[0094] 也提供非自然存在的微生物生物催化剂,其包括具有4-羟基丁酸(4-HB)生物合成途径的微生物体,所述途径具有至少一种外源核酸,该外源核酸编码4-羟基丁酸脱氢酶、琥珀酰-CoA合成酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶或α-酮戊二酸脱羧酶,其中外源核酸以足够产生单体4-羟基丁酸(4-HB)的量表达。

[0095] 本发明的非自然存在的微生物生物催化剂包括微生物体,其采用代谢反应的组合以生物合成生产本发明化合物。生物合成的化合物可以胞内产生和/或分泌到培养基中。由非自然存在的微生物产生的示例性化合物包括,例如,4-羟基丁酸、1,4-丁二醇和γ-丁内酯。

[0096] 在一个实施方式中,非自然存在的微生物体被基因工程改造以产生4-HB。该化合物是一个进入1,4-丁二醇化合物家族的有用切入点。从琥珀酸、通过琥珀酰-CoA从琥珀酸或从α-酮戊二酸形成4-HB的生物化学反应在图1的步骤1-8中示出。

[0097] 当然只要能实现起始成分转变为BDO产物,可以利用BDO途径酶的任何合适的组合。因此,可以理解的是可以利用本文公开的任何代谢途径,且本领域技术人员很清楚为了实现本文公开的所需途径如何选择合适的酶。

[0098] 在另一实施方案中,本文公开了非天然存在的微生物体,包括具有1,4-丁二醇(BDO)途径的微生物体,该途径包括编码以足够量表达而生产BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括4-氨基丁酸CoA移转酶,4-氨基丁酰-CoA水解酶,4-氨基丁酸-CoA连接酶,4-氨基丁酰-CoA氧化还原酶(去氨基),4氨基丁酰-CoA氨基转移酶或4-β-羟丁酰CoA消旋酶(参见实施例VII表17)。所述BDO途径可进一步包括4-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成),4-羟基丁酰-CoA还原酶或1,4-丁二醇脱氢酶。

[0099] 本领域技术人员知晓可利用本文公开的各种途径的组合。例如,在非天然发生的微生物体中,核酸可编码4-氨基丁酸CoA移转酶,4-氨基丁酰-CoA水解酶或4-氨基丁酸-CoA连接酶;4-氨基丁酰-CoA氧化还原酶(去氨基)或4-氨基丁酰-CoA氨基转移酶;以及4-β-羟丁酰CoA消旋酶。其他示例性的组合如下具体描述并且可在图8-13中找到。例如,BDO途径可进一步包括4-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成),4-羟基丁酰-CoA还原酶或1,4-丁二醇脱氢酶。

[0100] 本文另外公开的是非天然存在的微生物体,包括具有BDO途径的微生物体,该途径包括编码以足够量表达而生产BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括4-氨基丁酸CoA移转酶,4-氨基丁酰-CoA水解酶,4-氨基丁酸-CoA连接酶,4-氨基丁酰-CoA还原酶(醇形成),4-氨基丁酰-CoA还原酶,4-氨基丁-1-醇脱氢酶,4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)或4-氨基丁-1-醇氨基转移酶(参见实施例VII和表18),并且可进一步包括1,4-丁二醇脱氢酶。例如,外源核酸可编码4-氨基丁酸CoA移转酶,4-氨基丁酰-CoA水解酶或4-氨

基丁酸-CoA连接酶;4-氨基丁酰-CoA还原酶(醇形成);以及4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)或4-氨基丁-1-醇氨基转移酶。另外,外源核酸可编码4-氨基丁酸CoA移转酶,4-氨基丁酰-CoA水解酶或4-氨基丁酸-CoA连接酶;4-氨基丁酰-CoA还原酶;4-氨基丁-1-醇脱氢酶;以及4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)或4-氨基丁-1-醇氨基转移酶。

[0101] 本文还公开非天然存在的微生物体,包括具有BDO途径的微生物体,该途径包括编码以足够量表达而生产BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括4-氨基丁酸激酶,4-氨基丁醛脱氢酶(磷酸化),4-氨基丁-1-醇脱氢酶,4氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基),4-氨基丁-1-醇氨基转移酶,[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸氧化还原酶(去氨基),[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸氨基转移酶,4-羟基丁酰-磷酸脱氢酶,或4-脱氢酶(磷酸化)(参见实施例VII和表19)。例如,外源核酸可编码4-氨基丁酸激酶;4-氨基丁酰-脱氢酶(磷酸化);4-氨基丁-1-醇脱氢酶;以及4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)或4-氨基丁-1-醇氨基转移酶。或者,外源核酸可编码4-氨基丁酸激酶;[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸氧化还原酶(去氨基)或[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸氨基转移酶;4-羟基丁酰-磷酸脱氢酶;以及4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)。

[0102] 本文另外公开的是非天然存在的微生物体,包括具有BDO途径的微生物体,该途径包括编码以足够量表达而生产BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括α-酮戊二酸-激酶,2,5-二氧代戊酸半醛脱氢酶(磷酸化),2,5-二氧代戊酸脱氢酶,α-酮戊二酸基-CoA还原酶(醇形成),5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶或5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)(参见实施例VIII和表20)。所述BDO途径可进一步包括4-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成),4-羟基丁酰-CoA还原酶或1,4-丁二醇脱氢酶。例如:,所述外源的核酸可编码α-酮戊二酸-激酶;2,5-二氧代戊酸半醛脱氢酶(磷酸化);2,5-二氧代戊酸还原酶;以及5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶。或者,外源核酸可编码α-酮戊二酸-激酶;2,5-二氧代戊酸半醛脱氢酶(磷酸化);2,5-二氧代戊酸还原酶;以及5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)。或者,所述外源核酸可编码α-酮戊二酸CoA移转酶,α-酮戊二酸基-CoA水解酶,或α-酮戊二酸基-CoA连接酶;α-酮戊二酸基-CoA还原酶,5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶;以及5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶。在另一实施方案中,所述外源核酸可编码α-酮戊二酸CoA移转酶,α-酮戊二酸基-CoA水解酶或α-酮戊二酸基-CoA连接酶;α-酮戊二酸基-CoA还原酶,5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶,以及5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)。或者,所述外源核酸可编码α-酮戊二酸CoA移转酶,α-酮戊二酸基-CoA水解酶或α-酮戊二酸基-CoA连接酶;α-酮戊二酸基-CoA还原酶(醇形成);以及5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶。又一个实施方案中,所述外源核酸可编码α-酮戊二酸CoA移转酶,α-酮戊二酸基-CoA水解酶或α-酮戊二酸基-CoA连接酶;α-酮戊二酸基-CoA还原酶(醇形成);以及5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)。

[0103] 本文另外公开的是非天然存在的微生物体,包括具有BDO途径的微生物体,该途径包括编码以足够量表达而生产BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括谷氨酸CoA移转酶,谷氨酰基-CoA水解酶,谷氨酰基-CoA连接酶,谷氨酸5-激酶,谷氨酸-5-半醛脱氢酶(磷酸化),谷氨酰基-CoA还原酶,谷氨酸-5-半醛还原酶,谷氨酰基-CoA还原酶(醇形成),2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶(去氨基),2-氨基-5-羟基戊酸氨基转移酶,5-羟基-2氧代戊酸脱羧酶,5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)(参见实施例IX和表21)。例如,所述外源核酸可编码谷氨酸CoA移转酶,谷氨酰基-CoA水解酶或谷氨酰基-CoA连接酶;谷氨酰基-

CoA还原酶;谷氨酸-5-半醛还原酶;2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶(去氨基)或2-氨基-5-羟基戊酸氨基转移酶;和5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶或5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)。或者,所述外源核酸可编码谷氨酸5-激酶;谷氨酸-5-半醛脱氢酶(磷酸化);谷氨酸-5-半醛还原酶;2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶(去氨基)或2-氨基-5-羟基戊酸氨基转移酶;和5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶或5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)。另外的实施方案中,所述外源核酸可编码谷氨酸CoA移转酶,谷氨酰基-CoA水解酶或谷氨酰基-CoA连接酶;谷氨酰基-CoA还原酶(醇形成);2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶(去氨基)或2-氨基-5-羟基戊酸氨基转移酶;和5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶或5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)。另一实施方案中,所述外源核酸可编码谷氨酸5-激酶;谷氨酸-5-半醛脱氢酶(磷酸化);2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶(去氨基)或2-氨基-5-羟基戊酸氨基转移酶;和5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶或5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)。

[0104] 本文还非天然存在的微生物体,包括具有BDO途径的微生物体,该途径包括编码以足够量表达而生产BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括3-羟丁酰CoA消旋酶,3-羟基丁酰-CoA脱水酶,乙烯基乙酰基-CoA A-异构酶或4-羟基丁酰-CoA脱水酶(参见实施例X和表22)。例如,外源核酸可编码3-羟丁酰-CoA消旋酶;3-羟基丁酰-CoA脱水酶;乙烯基乙酰基-CoA A-异构酶;以及4-羟基丁酰-CoA脱水酶。

[0105] 本文另外公开的是非天然存在的微生物体,包括具有BDO途径的微生物体,该途径包括编码以足够量表达而生产BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括高丝氨酸脱氨酶,高丝氨酸CoA移转酶,高丝氨酸-CoA水解酶,高丝氨酸-CoA连接酶,高丝氨酸-CoA脱氨酶,4-羟基丁-2-烯酰基-CoA移转酶,4-羟基丁-2-烯酰基-CoA水解酶,4-羟基丁-2-烯酰基-CoA连接酶,4-羟基丁-2-烯酸酯还原酶,4-羟基丁酰-CoA移转酶,4-羟基丁酰-CoA水解酶,4-羟基丁酰-CoA连接酶或4-羟基丁-2-烯酰基-CoA还原酶(参见实施例XI和表23)。例如,所述外源核酸可编码高丝氨酸脱氨酶;4-羟基丁-2-烯酰基-CoA移转酶,4-羟基丁-2-烯酰基-CoA水解酶,4-羟基丁-2-烯酰基-CoA连接酶;4-羟基丁-2-烯酰基-CoA还原酶。或者,所述外源核酸可编码高丝氨酸CoA移转酶,高丝氨酸-CoA水解酶,或高丝氨酸-CoA连接酶;高丝氨酸-CoA脱氨酶;以及4-羟基丁-2-烯酰基-CoA还原酶。另外的实施方案中,所述外源核酸可编码高丝氨酸脱氨酶;4-羟基丁-2-烯酸酯还原酶;以及4-羟基丁酰-CoA移转酶,4-羟基丁酰-CoA水解酶或4-羟基丁酰-CoA连接酶。或者,所述外源核酸可编码高丝氨酸CoA移转酶,高丝氨酸-CoA水解酶,或高丝氨酸-CoA连接酶;高丝氨酸-CoA脱氨酶;以及4-羟基丁-2-烯酰基-CoA还原酶。

[0106] 本文另外公开非天然存在的微生物体,包括具有BDO途径的微生物体,该途径包括编码以足够量表达而生产BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括琥珀酰-CoA还原酶(醇形成),4-羟基丁酰-CoA水解酶,4-羟基丁酰-CoA连接酶,4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)(参见表15)。所述BDO途径可另外包括琥珀酰-CoA还原酶,4-羟基丁酸脱氢酶,4-羟基丁酰-CoA移转酶,4-羟基丁酸激酶,磷酸转-4-羟基丁酰酶,4-羟基丁酰-CoA还原酶,4-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)或1,4-丁二醇脱氢酶。

[0107] 本文另外公开了非天然存在的微生物体,包括具有BDO途径的微生物体,该途径包括编码以足够量表达而生产BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括谷氨酸脱氢酶,4-氨基丁酸氧化还原酶(去氨基),4-氨基丁酸氨基转移酶,谷氨酸脱羧酶,4-羟

基丁酰-CoA水解酶,4-羟基丁酰-CoA连接酶,4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)(参见表16)。所述BDO途径可另外包括α-酮戊二酸脱羧酶,4-羟基丁酸脱氢酶,4-羟基丁酰-CoA移转酶,4-羟基丁酸激酶,磷酸转-4-羟基丁酰酶,4-羟基丁酰-CoA还原酶,4-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)或1,4-丁二醇脱氢酶。

[0108] 如上所述途径仅为示例性的。本领域技术人员可根据需要,很容易从本文公开的那些选择合适的途径以获得合适的BDO途径或其他代谢途径。

[0109] 本发明提供遗传修饰的生物体,其允许通过增加产物或减少不需要的副产品而提高所需产物例如BDO的生产。如本文公开的,本发明提供非天然存在微生物体,包括具有1,4-丁二醇(BDO)途径的微生物体,该途径包含编码以足够量表达以生产BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸。在一实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源琥珀酰-CoA合成酶(参见实施例XII)。例如,所述琥珀酰-CoA合成酶可通过大肠杆菌sucCD基因编码。

[0110] 在另一实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源α-酮戊二酸脱羧酶(参见实施例XIII)。例如,α-酮戊二酸脱羧酶可通过牛分枝杆菌sucA基因编码。还另外的实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源琥珀酸半醛脱氢酶和4-羟基丁酸脱氢酶并且任选地表达4-羟基丁酰-CoA/乙酰-CoA移转酶(参见实施例XIII)。例如,所述琥珀酸半醛脱氢酶(CoA-依赖的),4-羟基丁酸脱氢酶和4-羟基丁酰-CoA/乙酰-CoA移转酶可通过牙龈卟啉单胞菌W83基因编码。另外的实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源丁酸激酶和磷酸转丁酰酶(参见实施例XIII)。例如,所述丁酸激酶和磷酸转丁酰酶可通过丙酮丁醇梭菌bukl和ptb基因编码。

[0111] 另一实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源4-羟基丁酰-CoA还原酶(参见实施例XIII)。例如,所述4-羟基丁酰-CoA还原酶可通过拜氏梭菌Ald基因编码。另外,本发明的实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源4-羟基丁醛还原酶(参见实施例XIII)。例如,所述4-羟基丁醛还原酶可通过热葡糖苷酶地芽孢杆菌adhl基因编码。在另一实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源丙酮酸脱氢酶亚基(参见实施例XIV)。例如,所述外源丙酮酸脱氢酶可以是NADH不敏感的。所述丙酮酸脱氢酶亚单位可以通过克雷伯氏肺炎杆菌IpdA基因编码。具体的实施方案中,所述微生物体的丙酮酸脱氢酶亚单位基因可受丙酮酸甲酸盐裂解酶启动子调控。

[0112] 另外的实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以破坏编码需氧呼吸控制调节系统的基因(参见实施例XV)。例如,可以破坏arcA基因。所述生物体可进一步包含编码苹果酸脱氢酶的基因的破坏。另外的实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源NADH不敏感的柠檬酸合成酶(参见实施例XV)。例如,所述NADH不敏感的柠檬酸合成酶可通过gltA,例如gltA的R163L突变体编码。在另一实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(参见实施例XVI)。例如,所述磷酸烯醇丙酮酸羧激酶可通过流感嗜血杆菌磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因编码。

[0113] 可以理解的是如本文公开的任何数目的遗传修饰可单独使用或以一种或多种本文公开的所述遗传修饰的不同组合使用以提高产BDO的微生物体中BDO的生产。具体的实施方案中,所述微生物体可经遗传修饰以引入任何且至所有遗传修饰以提高BDO的生产。具体的实施方案中,包含BDO途径的微生物体可经遗传修饰以表达外源琥珀酰-CoA合成酶;表达外源α-酮戊二酸脱羧酶;表达外源琥珀酸半醛脱氢酶和4-羟基丁酸脱氢酶以及选择性地4-

羟基丁酰-CoA/乙酰-CoA移转酶;表达外源丁酸激酶和磷酸转丁酰酶;表达外源4-羟基丁酰-CoA还原酶;并且表达外源4-羟基丁醛还原酶;表达外源丙酮酸脱氢酶;破坏编码需氧呼吸控制调节系统的基因;表达外源NADH不敏感的柠檬酸合成酶;以及表达外源磷酸烯醇丙酮酸羧激酶。用于提高生产的所述菌株在实施例XII-XIX中描述。因此可理解的是除了如上所述的修饰,所述菌株可另外包括本文公开的其他修饰。所述修饰包括,但不限于内源乳酸脱氢酶(IdhA),醇脱氢酶(adhE)和/或丙酮酸甲酸盐裂解酶(pflB)的缺失(参见实施例XII-XIX和表28)。

[0114] 另外提供一种微生物体,其中编码外源表达酶的一种或多种基因整合入宿主生物体的fimD基因座(参见实施例XVII)。例如,编码BDO途径酶的一种或多种基因可整合入用于提高BDO生产的fimD基因座。另外提供表达提高BDO生产的非-磷酸转移酶蔗糖摄取系统的微生物体。

[0115] 虽然本文公开的遗传修饰的微生物体以含有特定BDO途径酶的微生物体举例说明,可以理解的是所述修饰可以整合入具有在所述遗传修饰存在时提高生产的BDO途径的任何微生物体。本发明的微生物体可因此具有本文公开的任何BDO途径。例如,所述BDO途径可包含4-羟基丁酸脱氢酶,琥珀酰-CoA合成酶,CoA-依赖的琥珀酸半醛脱氢酶,4-羟基丁酸:CoA移转酶,4-丁酸激酶,磷酸转丁酰酶,α-酮戊二酸脱羧酶,醛脱氢酶,醇脱氢酶或醛/醇脱氢酶(参见图1)。或者,所述BDO途径可包含4-氨基丁酸CoA移转酶,4-氨基丁酰-CoA水解酶,4-氨基丁酸-CoA连接酶,4-氨基丁酰-CoA氧化还原酶(去氨基),4-氨基丁酰-CoA氨基转移酶或4-羟基丁酰-CoA脱氢酶(参见表17)。所述BDO途径可进一步包括4-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成),4-羟基丁酰-CoA还原酶或1,4-丁二醇脱氢酶。

[0116] 另外,所述BDO途径可包含4-氨基丁酸CoA移转酶,4-氨基丁酰-CoA水解酶,4-氨基丁酸-CoA连接酶;4-氨基丁酰-CoA还原酶(醇形成),4-氨基丁酰-CoA还原酶,4-氨基丁-1-醇脱氢酶,4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)或4-氨基丁-1-醇氨基转移酶(参见表18)。此外,所述BDO途径可包含4-氨基丁酸激酶,4-氨基丁醛脱氢酶(磷酸化),4-氨基丁-1-醇脱氢酶,4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基),4-氨基丁-1-醇氨基转移酶,[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸氧化还原酶(去氨基),[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸氨基转移酶,4-羟基丁酰-磷酸脱氢酶或4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)(参见表19)。所述途径可进一步包含1,4-丁二醇脱氢酶。

[0117] 所述BDO途径还可以包含α-酮戊二酸5-激酶,2,5-二氧代戊酸半醛脱氢酶(磷酸化),2,5-二氧代戊酸还原酶,α-酮戊二酸CoA移转酶,α-酮戊二酸基-CoA水解酶,α-酮戊二酸基-CoA连接酶,α-酮戊二酸基-CoA还原酶,5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶,α-酮戊二酸基-CoA还原酶(醇形成),5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶,或5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)(参见表20)。所述BDO途径可进一步包括4-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成),4-羟基丁酰-CoA还原酶或1,4-丁二醇脱氢酶。另外,所述BDO途径可包含谷氨酸CoA移转酶,谷氨酰基-CoA水解酶,谷氨酰基-CoA连接酶,谷氨酸5-激酶,谷氨酸-5-半醛脱氢酶(磷酸化),谷氨酰基-CoA还原酶,谷氨酸-5-半醛还原酶,谷氨酰基-CoA还原酶(醇形成),2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶(去氨基),2-氨基-5-羟基戊酸氨基转移酶,5-羟基-2氧代戊酸脱羧酶,5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)(参见表21)。所述BDO途径可进一步包括4-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成),4-羟基丁酰-CoA还原酶或1,4-丁二醇脱氢酶。

[0118] 另外，所述BDO途径可包含3-羟基丁酰-CoA脱氢酶，3羟基丁酰-CoA脱水酶，乙烯基乙酰基-CoA A-异构酶或4羟基丁酰-CoA脱水酶(参见表22)。此外，所述BDO途径可包括高丝氨酸脱氨酶，高丝氨酸CoA移转酶，高丝氨酸-CoA水解酶，高丝氨酸-CoA连接酶，高丝氨酸-CoA脱氨酶，4-羟基丁-2-烯酰基-CoA移转酶，4-羟基丁-2-烯酰基-CoA水解酶，4-羟基丁-2-烯酰基-CoA连接酶，4-羟基丁-2-烯酸酯还原酶，4-羟基丁酰-CoA移转酶，4-羟基丁酰-CoA水解酶，4-羟基丁酰-CoA连接酶或4-羟基丁-2-烯酰基-CoA还原酶(参见表23)。所述BDO途径可进一步包括4-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)，4-羟基丁酰-CoA还原酶或1,4-丁二醇脱氢酶。

[0119] 所述BDO途径可另外包括琥珀酰-CoA还原酶(醇形成)，4-羟基丁酰-CoA水解酶，4-羟基丁酰-CoA连接酶或4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)(参见表15)。所述BDO途径可进一步包括琥珀酰-CoA还原酶，4-羟基丁酸脱氢酶，4-羟基丁酰-CoA移转酶，4-羟基丁酸激酶，磷酸转-4-羟基丁酰酶，4-羟基丁酰-CoA还原酶，4-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)或1,4-丁二醇脱氢酶。此外，所述BDO途径可包括谷氨酸脱氢酶，4-氨基丁酸氧化还原酶(去氨基)，4-氨基丁酸氨基转移酶，谷氨酸脱羧酶，4-羟基丁酰-CoA水解酶，4-羟基丁酰-CoA连接酶或4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)(参见表16)。所述BDO途径可进一步包括α-酮戊二酸脱羧酶，4-羟基丁酸脱氢酶，4-羟基丁酰-CoA移转酶，4-羟基丁酸激酶，磷酸转-4-羟基丁酰酶，4-羟基丁酰-CoA还原酶，4-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)或1,4-丁二醇脱氢酶。

[0120] 本文一般参考代谢反应、反应物或其产物，或具体参考一个或更多个核酸或基因对本发明进行描述，所述核酸或基因编码与所述代谢反应、反应物或产物相关或催化所述代谢反应、反应物或产物的酶。除非本文另外明确说明，本领域的技术人员应当理解，描述反应也等同于描述反应物和反应产物。类似地，除非本文另外明确说明，描述反应物或产物也涉及反应，以及描述任意的这些代谢成分也涉及编码催化所指代的反应、反应物或产物的酶的一个基因或多个基因。同样地，假定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讨论也等同于对对应的编码酶和其催化的反应以及该反应的反应物和产物的讨论。

[0121] 使用本发明的微生物体通过生物合成方式生产4-HB是特别有用的，这是因为它能生产单体4-HB。本发明的非天然存在的微生物体和它们的4-HB和BDO家族化合物的生物合成也是特别有用的，这是因为4-HB产物：(1)被分泌；(2)可以没有任何衍生化诸如辅酶A；(3)避免生物合成期间的热力学改变；(4)允许直接生物合成BDO，以及(5)在酸性pH培养基中允许自发地将4-HB化学转化为γ-丁内酯(GBL)。后面的特性例如对于有效地化学合成或生物合成BDO家族化合物诸如1,4-丁二醇和/或四氢呋喃(THF)也是特别有用的。

[0122] 微生物体一般缺乏合成4-HB的能力，因此，本文公开的任意化合物已知在1,4-丁二醇家族化合物内，或本领域技术人员已知是在1,4-丁二醇家族化合物内此外，已知具有所有必要的代谢酶能力的生物不从所述的酶和本文所示例的生物化学途径产生4-HB。更确切地，可能不包括下面进一步描述的少数厌氧微生物，具有酶能力的微生物使用4-HB作为底物以生产例如琥珀酸。相反，本发明的非自然存在的微生物体产生4-HB或BDO作为产物。如上所述，以其单体形式生物合成4-HB不仅在化学合成BDO家族化合物中特别有用，而且它还允许进一步生物合成BDO家族化合物并且完全避免化学合成步骤。

[0123] 本发明的可以生产4-HB的非天然存在的微生物体通过确保宿主微生物体包括完

全地生物化学合成至少一种本发明的4-HB生物合成途径的功能能力而产生。确保至少一种必要的4-HB或BDO生物合成途径将4-HB生物合成能力赋予宿主微生物体。

[0124] 为了图1的说明，五种必要的4-HB生物合成途径在本文中被示例和显示。另外的4-HB和BDO途径在图8-13中描述。一种4-HB生物合成途径包括从琥珀酸生物合成4-HB(琥珀酸途径)。参与该4-HB途径的酶包括CoA-非依赖性琥珀酸半醛脱氢酶和4-羟基丁酸脱氢酶。在该途径中，CoA-非依赖性琥珀酸半醛脱氢酶催化与图1显示的箭头相反的反应。另一4-HB生物合成途径包括通过琥珀酰-CoA从琥珀酸进行生物合成(琥珀酰-CoA途径)。参与该4-HB途径的酶包括琥珀酰-CoA合成酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶和4-羟基丁酸脱氢酶。三种其它4-HB生物合成途径包括从α-酮戊二酸生物合成4-HB(α-酮戊二酸途径)。因此，第三种4-HB生物合成途径是通过谷氨酸：琥珀酸半醛转氨酶、谷氨酸脱羧酶和4-羟基丁酸脱氢酶生物合成琥珀酸半醛。第四种4-HB生物合成途径还包括从α-酮戊二酸生物合成4-HB，但利用α-酮戊二酸脱羧酶催化琥珀酸半醛合成。4-羟基丁酸脱氢酶催化琥珀酸半醛向4-HB的转化。第五种4-HB生物合成途径包括通过琥珀酰-CoA从α-酮戊二酸进行的生物合成并且利用α-酮戊二酸脱氢酶产生琥珀酰-CoA，其进入上述的琥珀酰-CoA途径。这些4-HB生物合成途径的每一种、它们的底物、反应物和产物在下面的实施例中进一步描述。如本文所述，4-HB可进一步通过包含适于生产BDO的酶而生物合成转变成BDO(参见实施例)。因此，可以理解的是4-HB途径可与用于将4-HB转变为BDO以生成BDO途径的酶一起使用。

[0125] 本发明的非自然存在的微生物体可以通过引入可表达的核酸产生，该核酸编码一种或更多种参与一种或多种4-HB或BDO生物合成途径的酶。根据选择用于生物合成的宿主微生物体，可以表达用于一些或所有特定的4-HB或BDO生物合成途径的核酸。例如，如果选择的宿主缺乏琥珀酸至4-HB途径中的一种或多种酶并且该途径被选择用于4-HB生物合成，则例如在该实施例中将CoA-非依赖性琥珀酸半醛脱氢酶和4-羟基丁酸脱氢酶的可表达核酸引入宿主中，用于随后的外源性表达。可选地，如果选择的宿主表现出一些途径酶的内源表达，但是缺乏其它的途径酶，则需要所述有缺陷的酶的编码核酸以实现4-HB或BDO生物合成。例如，如果所选的宿主表现出内源CoA-非依赖性琥珀酸半醛脱氢酶，但是缺乏4-羟基丁酸脱氢酶，则需要该酶的编码核酸以实现4-HB生物合成。因此，本发明非天然存在的微生物体可通过引入外源酶或蛋白质活性以获得所需的生物合成途径而产生或可通过将一种或多种外源酶或蛋白质活性与一种或多种内源酶或蛋白质一起引入获得所需的生物合成途径，生产所需的产物例如4-HB或BDO。

[0126] 以同样的方式，在4-HB生物合成被选择通过琥珀酸至琥珀酰-CoA途径(琥珀酰-CoA途径)发生的情况中，对于缺乏下述酶的宿主：琥珀酰-CoA合成酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶和/或4-羟基丁酸脱氢酶，编码核酸将在受体宿主中外源表达。

[0127] 选择通过α-酮戊二酸至琥珀酸半醛途径(α-酮戊二酸途径)的4-HB生物合成，对于缺乏一种或更多种下述酶的宿主而言可以利用外源表达：谷氨酸：琥珀酸半醛转氨酶、谷氨酸脱羧酶和/或4-羟基丁酸脱氢酶或α-酮戊二酸脱羧酶和4-羟基丁酸脱氢酶。本领域技术人员可很容易确定用于生产4-HB或BDO的，如本文公开的途径酶。

[0128] 根据已选择的宿主微生物体的4-HB或BDO生物合成途径的组成，本发明的非自然存在的微生物体包括至少一种外源表达的4-HB或BDO途径的编码核酸和针对一个或更多个4-HB或BDO生物合成途径的多达所有的编码核酸。例如，通过相应编码核酸的外源表达，在

缺乏途径酶或蛋白质的宿主中，可以建立4-HB或BDO生物合成。在缺乏4-HB或BDO途径所有酶或蛋白质的宿主中，可包括所述途径中所有酶或蛋白质的外源表达，虽然可以理解即使所述宿主包含至少一种途径酶或蛋白质，也可以表达该途径的所有酶或蛋白质。例如，通过4-羟基丁酸脱氢酶编码核酸的外源表达，在缺乏4-羟基丁酸脱氢酶的宿主中，可以从所有五个途径建立4-HB生物合成。相反，通过所有八种下述酶的外源表达，在缺乏所有八种酶的宿主中，可以从所有五个途径建立4-HB生物合成：CoA-非依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、琥珀酰-CoA合成酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、谷氨酸：琥珀酸半醛转氨酶、谷氨酸脱羧酶、α-酮戊二酸脱羧酶、α-酮戊二酸脱氢酶和4-羟基丁酸脱氢酶。

[0129] 在本文提供的教导和指导下，本领域的技术人员将理解，以可表达方式引入的编码核酸的数量至少与已选择的宿主微生物体的4-HB或BDO途径缺乏相对应。因此，本发明的非天然存在的微生物体可以具有一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个或八个核酸，其编码组成一个或多个4-HB或BDO生物合成途径的上述酶。在一些实施方式中，非天然存在的微生物体还可以包括其它遗传修饰，其促进或优化4-HB或BDO生物合成或对宿主微生物体赋予其它有用的功能。一种这样的其它功能可以包括，例如，增加一个或多个4-HB途径前体的合成，诸如琥珀酸、琥珀酰-CoA，α-酮戊二酸，4-氨基丁酸，谷氨酸，乙酰-CoA和/或高丝氨酸。

[0130] 一般，选择宿主微生物体使得其生产4-HB或BDO途径的前体，或者作为提供所需前体从头产生或提高通过宿主微生物体自然产生的前体产量的自然产生分子或基因工程改造产物。例如宿主生物体例如大肠杆菌中自然产生琥珀酰-CoA，α-酮戊二酸，4-氨基丁酸，谷氨酸，乙酰-CoA和高丝氨酸。如本文公开的宿主生物体可经改造以提高前体产量。另外，已经改造生产所需前体的微生物体可用作宿主生物体并且进一步改造以表达4-HB或BDO途径的酶或蛋白质。

[0131] 在某些实施方式中，本发明的非天然存在的微生物体从包含合成4-HB或BDO的酶能力的宿主产生。在该具体的实施方式中，增加4-HB或BDO途径产物的合成或累积可以是有用的，以便例如向着4-HB或BDO生产方向推动4-HB或BDO途径反应。增加的合成或累积可通过例如编码一种或更多种上述4-HB或BDO途径酶的核酸的过量表达完成。4-HB或BDO途径一种酶或多种酶的过量表达可以通过例如一个或多个内源基因的外源表达发生，或通过一个或多个异源基因的外源表达发生。因此，自然存在的生物通过一种，两种，三种，四种，五种，六种等直至所有编码4-HB或BDO生物合成途径酶的核酸的过量表达可以容易地产生而成为本发明的非自然的产生4-HB或BDO的微生物体。另外，非自然存在的生物可以通过内源基因的突变产生，所述突变引起4-HB或BDO生物合成途径中的酶活性增加。

[0132] 在特别有用的实施方式中，采用编码核酸的外源表达。外源表达赋予宿主定制表达和/或调控元件的能力和实现由使用者控制的期望的表达水平的应用。然而，在其它实施方式中，也可以利用内源表达，诸如当连接到诱导型启动子或其它调控元件时，通过除去负调控效应物或诱导基因的启动子。因此，具有自然存在的诱导型启动子的内源基因通过提供适当的诱导剂可以增量调节，或内源基因的调控区可以进行基因工程以掺入诱导型调控元件，从而允许在期望的时间调控内源基因的增加的表达。类似地，对于引入非自然存在的微生物体中的外源基因，诱导型启动子可以作为调控元件被包括(参见实施例)。

[0133] 本文所使用的“外源的”意欲指是相关分子或相关活性被引入宿主微生物体中。所

述分子可例如通过诸如整合进入宿主染色体中或作为非染色体遗传物质诸如质粒而将编码核酸引入宿主遗传物质中。因此，当用于指编码核酸的表达时，该术语指将编码核酸以可表达的形式引入微生物体中。当用于指生物合成活性时，该术语指被引入至宿主相关生物中的活性。来源可以是例如同源的或异源的编码核酸，其引入至宿主微生物体后表达相关的活性。因此，术语“内源的”指在宿主中存在的相关分子或活性。类似地，当用于指编码核酸的表达时，该术语指在微生物体中含有的编码核酸的表达。术语“异源的”指源自相关物种之外的来源的分子或活性，而“同源的”指源自宿主微生物体的分子或活性。因此，本发明编码核酸的外源表达可以利用异源的或同源的编码核酸中的任一种或两者。

[0134] 4-HB或BDO途径酶的编码核酸的来源可以包括，例如，其中编码的基因产物能够催化相关反应的任意物种。这些物种包括原核和真核生物，包括但不限于，细菌--包括古细菌和真细菌，以及真核细胞--包括酵母、植物、昆虫、动物和包括人在内的哺乳动物。这些来源的示例性物种包括，例如，大肠杆菌、酿酒酵母菌、克氏酵母、克氏梭状芽胞杆菌、丙酮丁醇梭菌、拜氏梭菌、糖多丁醇乙酸梭菌、产气荚膜梭菌、艰难梭菌、肉毒梭菌、酪丁酸梭菌、破伤风形梭状芽胞杆菌、破伤风杆菌、丙酸梭菌、氨基丁酸梭菌、近端梭菌、斯氏梭菌、真氧产碱杆菌、牛分枝杆菌、结核分枝杆菌、牙龈卟啉单胞菌、拟南芥、嗜热栖热菌、假单胞菌属，包括绿脓杆菌、恶臭假单胞菌、施氏假单胞菌、荧光假单胞菌，人类、兔、球形红细菌、布氏热厌氧杆菌、勤奋金属球菌、明串珠菌、橙色绿屈挠菌、卡氏玫瑰弯菌、赤细菌属、加州希蒙得木、不动杆菌属，包括醋酸钙不动杆菌和鲍氏不动杆菌、牙龈卟啉单胞菌、超嗜热古菌硫化叶菌、硫磺矿硫化叶菌、嗜酸热硫化叶菌、枯草杆菌、蜡样芽胞杆菌、巨大杆状菌、短芽孢杆菌、短小芽胞杆菌、褐鼠、肺炎克雷伯氏菌、产酸克雷伯氏菌、纤细裸藻、齿垢密螺旋体、热醋穆尔氏菌、海栖热袍菌、盐沼盐杆菌、嗜热脂肪芽孢杆菌、敏捷气热菌、野猪、秀丽隐杆线虫、谷氨酸棒杆菌、发酵氨基酸球菌、乳酸乳球菌、植物乳杆菌、嗜热链球菌、产气肠杆菌、假丝酵母、土曲霉、戊糖片球菌、运动发酵单胞菌、巴氏醋杆菌、乳酸克卢费氏酵母、巴氏真细菌、多毛拟杆菌、Anaerotruncus colihominis、Natranaerobius thermophilusm、空肠弯曲杆菌、流感嗜血杆菌、灵杆菌、无丙二酸柠檬酸杆菌、黄色粘球菌、具核梭杆菌、产黄青霉、海洋γ蛋白菌、产丁酸细菌，及其他本文公开的(参见实施例)。例如，具有4-HB或BDO生物合成产生的微生物体在本文参考大肠杆菌和酵母宿主进行示例。然而，由于目前可获得550个物种以上的全基因组序列(这些中一半以上可在公共数据库上获得，诸如NCBI)，包括395种微生物基因组以及多种酵母、真菌、植物和哺乳动物基因组，对于在相关或远缘物种中一个或更多个基因，包括例如已知基因的同源染色体、直向同源物、种内同源基因和非直向同源基因置换，以及生物间遗传变化的互换，对编码必要的4-HB或BDO生物合成活性的基因的鉴定，在本领域中是常规的和熟知的。因此，本文参考具体生物诸如大肠杆菌或酵母描述的能够生物合成本发明的4-HB或BDO和其它化合物的代谢变化可以容易地应用于其它微生物，包括原核和真核生物等。在本文提供的教导和指导下，本领域技术人员知道在一种生物中示例的代谢变化可以同样应用于其它生物。

[0135] 在某些情况中，诸如当可选的4-HB或BDO生物合成途径存在于不相关的物种中时，4-HB或BDO生物合成可以通过例如外源表达来自不相关物种的一个或多个种内同源基因而被赋予给宿主物种，所述外源表达催化类似的但不相同的代谢反应，以替换相关的反应。因为不同的生物间存在某些代谢网络之间的差异，所以本领域技术人员应当理解，在不同的

生物之间实际的基因应用可以不同。然而，在本文提供的教导和指导下，本领域的技术人员也应当理解，本发明的教导和方法可以使用与本文示例的那些的关联代谢变化而被应用于所有微生物体，以在感兴趣物种中构建合成4-HB诸如单体4-HB或BDO的微生物体。

[0136] 宿主微生物体可以选自例如细菌、酵母、真菌或可用于发酵过程的多种其它微生物的任一种，并且非自然存在的微生物体在它们中产生。示例性细菌包括选自以下的物种：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、Mannheimia succiniciproducens、豆根瘤菌、枯草杆菌、谷氨酸棒杆菌、结核分支杆菌、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、荧光假单胞菌和恶臭假单胞菌。示例性酵母或真菌包括选自以下的物种：酿酒酵母、粟酒裂殖酵母、乳酸克鲁维斯酵母、马克斯克鲁维酵母、土曲霉、黑曲霉和毕赤酵母。由于其为适于遗传工程的很好表征的微生物体，大肠杆菌为特别有用的宿主生物体。其他特别有用的宿主生物体包括酵母诸如酿酒酵母。

[0137] 构建和检测非自然存在的产生4-HB或BDO的宿主的表达水平的方法可以通过例如本领域中熟知的重组和检测方法完成。可以发现这些方法描述在例如Sambrook等，Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Third Ed.,Cold Spring Harbor Laboratory,New York(2001);Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons,Baltimore,MD(1999)中。4-HB和GBL可以通过例如使用Spherisorb 5ODS1柱以及70％10mM磷酸盐缓冲液(pH＝7)和30％甲醇的流动相的HPLC分离，并使用UV检测器在215nm处检测(Hennessy等2004,J.Forensic Sci.46(6):1-9)。通过气相色谱或通过HPLC和折光率检测器检测BDO，其使用Aminex HPX-87H柱和0.5mM硫酸的流动相(Gonzalez-Pajuelo等,Met.Eng.7:329-336(2005))。

[0138] 参与产生4-HB或BDO的途径的外源核酸序列可利用本领域熟知的技术稳定或瞬时导入宿主细胞中，所述技术包括但不限于，接合，电穿孔，化学转变，转导，转染和超声转变。对于大肠杆菌或其他原核细胞中的外源表达，如果需要，一些基因中的核酸序列或真核核酸的cDNA可编码靶信号诸如N-末端线粒体或其他的靶信号，其可在转入原核宿主细胞之前除去。例如，线粒体前导序列的除去导致大肠杆菌中表达提高(Hoffmeister等，J.Biol.Chem.280:4329-4338(2005))。对于酵母或其他真核细胞中的外源表达，基因可在不添加前导序列时在胞液中表达，或可通过添加合适的靶序列诸如适于宿主细胞的线粒体靶向或分泌信号而靶向至线粒体或其他的细胞器官，或靶向分泌。因此，可以理解的是对核酸序列的合适的修饰以除去或包含靶序列可引入外源核酸序列中以赋予其合乎需要的特性。此外，基因可用本领域熟知的技术进行密码子优化以实现蛋白质的优化表达。

[0139] 可以构建一个或多个表达载体，以含有本文所示例的一种或多种4-HB生物合成途径和/或一种或多种BDO生物合成编码核酸，其被有效连接到在宿主生物中起作用的表达调控序列。适用于本发明的宿主微生物体的表达载体包括例如质粒、噬菌体载体、病毒载体、附加体和人造染色体，包括可操作稳定整合进入宿主染色体中的载体和选择序列或标记。另外，所述表达载体可包含一种或多种筛选标记基因和合适的表达调控序列。可选择的标记基因也可以被包括，其例如提供抗生素或毒素抗性，补充营养缺陷型缺乏，或供给培养基中没有的关键营养物。表达调控序列可以包括本领域熟知的组成型和诱导型启动子、转录增强子、转录终止子等。当两种或更多种外源编码核酸共同表达时，可以将两种核酸插入到

例如单一表达载体中或分离的表达载体中。对于单一载体表达，编码核酸可以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，诸如一个诱导型启动子和一个组成型启动子。参与代谢或合成途径的外源核酸序列的转化可以使用本领域中熟知的方法证实。所述方法包括例如，核酸分析诸如Northern印迹或mRNA的聚合酶链反应(PCR)扩增，或用于基因产物表达的免疫印迹，或检测导入的核酸序列表达或其相应基因产物的其他合适的分析方法。本领域技术人员可知外源核酸以产生所需产物的足够量表达，且进一步可知可利用本领域熟知的和本文公开的方法优化表达水平以获得充分的表达。

[0140] 使用上述示例的本领域中熟知的方法构建本发明的非自然存在的微生物体，以足以产生4-HB诸如单体4-HB，或BDO的量外源表达至少一种编码4-HB或BDO途径酶的核酸。当然本发明的微生物体在足以产生4-HB或BDO的条件下培养。每个途径中4-HB酶的示例性表达水平在下面的实施例中将进一步描述。按照本文提供的教导和指导，本发明的非自然存在的微生物体可以实现4-HB诸如单体4-HB，或BDO的生物合成，其产生的胞内浓度在大约0.1至200mM之间或以上，例如0.1至25mM之间或以上。一般而言，4-HB诸如单体4-HB，或BDO的胞内浓度是在大约3至150mM之间或以上，特别在大约5至125mM之间或以上，以及更特别在大约8至100mM之间，例如，大约3-20mM，尤其在大约5至15mM之间且更特别在大约8至12mM之间，包括大约10mM、20mM、50mM、80mM或更高。在这些示例性范围的每一个之间和之上的胞内浓度也可由从本发明的非自然存在的微生物体实现。具体的实施方案中，本发明的微生物体尤其是诸如此处公开的菌株(参见实施例XII-XIX和表28)，可通过增加BDO的产生和/或降低不合需要的副产品而提供所需产物诸如BDO的生产。所述产量水平包括但不限于，此处公开的那些并且包括从大约每升1克至大约25克，例如大约每升2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24克或甚至更高量的产物。

[0141] 一些实施方案中，培养条件包括厌氧或基本上厌氧的生长或保持条件。示例性的厌氧条件之前已经描述过并且为本领域所熟知。用于发酵过程的示例性的厌氧条件在本文描述并且例如在2007年8月10日提交的美国专利申请系列No.11/891,602中描述。与本领域熟知的其他厌氧条件一样，任何这些条件可用于非天然发生的微生物体。在所述厌氧条件下，4-HB或BDO生产者可以与本文示例的所有其他浓度一样，以5-10mM或更高的胞内浓度合成4-HB或BDO。当然，即使上述描述指胞内浓度，4-HB或BDO产生微生物体可在胞内和/或将产物分泌入培养基而生产4-HB或BDO。

[0142] 与发酵和其他大规模培养过程一样，所述培养条件可包括例如液体培养过程。如本文所述，在厌氧或基本上厌氧的培养条件下可获得特别有用的本发明生物合成产物的产出。

[0143] 如本文所述，用于实现4-HB或BDO生物合成的一种示例性的培养条件包括厌氧培养或发酵条件。在某些实施方式中，本发明的非自然存在的微生物体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，厌氧条件指没有氧的环境。基本上厌氧的条件包括例如培养、分批发酵或连续发酵，以便培养基中的溶解氧浓度保持在饱和状态的0和10％之间。基本上厌氧的条件还包括在液体培养基中或在固体琼脂上培养或静止细胞，所述液体培养基或固体琼脂处于维持在小于1％氧的气氛下的密封室中。氧的百分比可以通过例如用N_2/CO_2混合物或其它适合的一种或多种非氧气体喷射培养物来维持。

[0144] 本发明还提供非自然存在的微生物生物催化剂，其包括具有4-羟基丁酸(4-HB)和

1,4-丁二醇(BDO)生物合成途径的微生物体,所述途径包括至少一种外源核酸,该核酸编码4-羟基丁酸脱氢酶、CoA-非依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、琥珀酰-CoA合成酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、4-羟基丁酸:CoA转移酶、谷氨酸:琥珀酸半醛转氨酶、谷氨酸脱羧酶、CoA-非依赖性醛脱氢酶、CoA-依赖性醛脱氢酶或醇脱氢酶,其中外源核酸以足以产生1,4-丁二醇(BDO)的量表达。4-羟基丁酸:CoA转移酶也被称为4-羟基丁酰CoA:乙酰-CoA转移酶。本文还公开了另外的4-HB或BDO途径酶(参见实施例和图8-13)。

[0145] 本发明进一步提供非自然存在的微生物生物催化剂,其包括具有4-羟基丁酸(4-HB)和1,4-丁二醇(BDO)生物合成途径的微生物体,所述途径包括至少一种外源核酸,所述核酸编码4-羟基丁酸脱氢酶、琥珀酰-CoA合成酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、4-羟基丁酸:CoA转移酶、4-丁酸激酶、磷酸转丁酰酶、α-酮戊二酸脱羧酶、醛脱氢酶、醇脱氢酶或醛/醇脱氢酶,其中外源核酸以足以产生1,4-丁二醇(BDO)的量表达。

[0146] 也可以产生生物合成BDO的非自然存在的微生物体。如同本发明的产生4-HB的微生物体,产生BDO的微生物体也可在胞内产生BDO或分泌BDO到培养基中。按照先前提供的用于构建合成4-HB的微生物体的教导和指导,可以将另外的BDO途径掺入产生4-HB的微生物体中,以产生也合成BDO和其它BDO家族化合物的生物。BDO的化学合成和其下游产品是已知的。能够进行BDO生物合成的本发明的非自然存在的微生物体避免了使用4-HB作为切入点的这些化学合成,如图1中所示。如下面进一步所描述,4-HB生产者例如也可以被用于将4-HB化学转化为GBL以及然后转化为BDO或THF。可选地,4-HB生产者可以被进一步修饰,以包含将4-HB和/或GBL转化为BDO的生物合成能力。

[0147] 另外的引入4-HB生产者中的BDO途径包括,例如,在宿主缺乏的背景下外源表达或过量表达一种或更多种在图1中步骤9-13示例的酶。一种这种途径包括,例如,实施如图1中步骤9、12和13显示的反应所必需的酶活性,其中醛和醇脱氢酶可以是具有醛和醇脱氢酶活性的分离酶或多功能酶。另一个这样的途径包括,例如,实施如图1中步骤10、11、12和13中显示的反应所必需的酶活性,同样,其中醛和醇脱氢酶可以是具有醛和醇脱氢酶活性的分离酶或多功能酶。因此,引入至4-HB生产者的另外的BDO途径包括,例如,在宿主缺乏的背景下外源表达或过量表达4-羟基丁酸:CoA转移酶、丁酸激酶、磷酸转丁酰酶、CoA-非依赖性醛脱氢酶、CoA-依赖性醛脱氢酶或醇脱氢酶中的一种或更多种。在不存在能够修饰4-HB的内源酰基-CoA合成酶的情况下,非自然存在的产生BDO的微生物体可进一步包括选择用于4-HB的外源酰基-CoA合成酶,或多种酶的组合,所述多种酶具有将4-HB转化成4-HB-CoA净反应。如下面在实施例中进一步所示例,丁酸激酶和磷酸转丁酰酶展示出BDO途径活性并且用4-HB底物催化图1中示例的转化。因此,这些酶在本文中也可以分别称为4-羟基丁酸激酶和磷酸转羟基丁酰酶。

[0148] 可以用于这些4-HB向BDO的体内转化的示例性醇和醛脱氢酶在下面的表1中列出。

[0149] 表1.用于将4-HB转化为BDO的醇和醛脱氢酶

醇脱氢酶

ec: 1.1.1.1 醇脱氢酶
ec: 1.1.1.2 醇脱氢酶(NADP+)
ec: 1.1.1.4 (R，R)-丁二醇脱氢酶
ec: 1.1.1.5 3-羟基丁酮脱氢酶
ec: 1.1.1.6 甘油脱氢酶
ec: 1.1.1.7 丙二醇-磷酸脱氢酶
ec: 1.1.1.8 甘油-3-磷酸脱氢酶(NAD+)
ec: 1.1.1.11 D-阿拉伯糖醇 4-脱氢酶
ec: 1.1.1.12 L-阿拉伯糖醇 4-脱氢酶
ec: 1.1.1.13 L-阿拉伯糖醇 2-脱氢酶
ec: 1.1.1.14 L-艾杜醇 2-脱氢酶
ec: 1.1.1.15 D-艾杜醇 2-脱氢酶
ec: 1.1.1.16 半乳糖醇 2-脱氢酶
ec: 1.1.1.17 甘露醇-1-磷酸盐 5-脱氢酶
ec: 1.1.1.18 纤维醇 2-脱氢酶
ec: 1.1.1.21 醛还原酶
ec: 1.1.1.23 组氨醇脱氢酶
ec: 1.1.1.26 乙醛酸还原酶

[0150] ec: 1.1.1.27 L-乳酸脱氢酶
ec: 1.1.1.28 D-乳酸脱氢酶
ec: 1.1.1.29 甘油酸脱氢酶
ec: 1.1.1.30 3-羟基丁酸脱氢酶
ec: 1.1.1.31 3-羟基异丁酸盐脱氢酶
ec: 1.1.1.35 3-羟酰-CoA 脱氢酶
ec: 1.1.1.36 乙酰乙酰基-CoA 还原酶
ec: 1.1.1.37 苹果酸脱氢酶
ec: 1.1.1.38 苹果酸脱氢酶(草酰乙酸-脱羧基)
ec: 1.1.1.39 苹果酸脱氢酶(脱羧基)
ec: 1.1.1.40 苹果酸脱氢酶(草酰乙酸-脱羧基)(NADP+)
ec: 1.1.1.41 异柠檬酸脱氢酶(NAD+)
ec: 1.1.1.42 异柠檬酸脱氢酶(NADP+)
ec: 1.1.1.54 烯丙-醇脱氢酶
ec: 1.1.1.55 乳醛还原酶(NADPH)
ec: 1.1.1.56 核糖醇 2-脱氢酶
ec: 1.1.1.59 3-羟基丙酸脱氢酶
ec: 1.1.1.60 2-羟基-3-氧代丙酸还原酶
ec: 1.1.1.61 4-羟基丁酸脱氢酶
ec: 1.1.1.66 ω-羟基癸酸脱氢酶

[0151]

ec: 1.1.1.67 甘露醇 2-脱氢酶
ec: 1.1.1.71 醇脱氢酶[NAD(P)+]
ec: 1.1.1.72 甘油脱氢酶(NADP+)
ec: 1.1.1.73 辛醇脱氢酶
ec: 1.1.1.75 (R)-氨丙醇脱氢酶
ec: 1.1.1.76 (S，S)-丁二醇脱氢酶
ec: 1.1.1.77 乳醛还原酶
ec: 1.1.1.78 甲基乙二醛还原酶(NADH-依赖性)
ec: 1.1.1.79 乙醛酸还原酶(NADP+)
ec: 1.1.1.80 异丙醇脱氢酶(NADP+)
ec: 1.1.1.81 羟基丙酮酸还原酶
ec: 1.1.1.82 苹果酸脱氢酶(NADP+)
ec: 1.1.1.83 D-苹果酸脱氢酶(脱羧基)
ec: 1.1.1.84 二甲基苹果酸脱氢酶
ec: 1.1.1.85 3-异丙基苹果酸脱氢酶
ec: 1.1.1.86 酮醇-酸还原异构酶
ec: 1.1.1.87 高异柠檬酸脱氢酶
ec: 1.1.1.88 甲羟戊二酸单酰-CoA 还原酶
ec: 1.1.1.90 芳基醇脱氢酶
ec: 1.1.1.91 芳基醇脱氢酶(NADP+)
ec: 1.1.1.92 草酰乙醇酸还原酶(脱羧基)
ec: 1.1.1.94 甘油-3-磷酸脱氢酶[NAD(P)+]
ec: 1.1.1.95 磷酸甘油酸脱氢酶
ec: 1.1.1.97 3-羟基苄基-醇脱氢酶
ec: 1.1.1.101 酰基甘油酮-磷酸还原酶
ec: 1.1.1.103 L-苏氨酸 3-脱氢酶
ec: 1.1.1.104 4-氧代脯氨酸还原酶
ec: 1.1.1.105 视黄醇脱氢酶
ec: 1.1.1.110 吲哚乳酸脱氢酶
ec: 1.1.1.112 茚满醇脱氢酶
ec: 1.1.1.113 L-木糖 1-脱氢酶
ec: 1.1.1.129 L-苏糖酸 3-脱氢酶
ec: 1.1.1.137 核糖醇-5-磷酸 2-脱氢酶
ec: 1.1.1.138 甘露醇 2-脱氢酶(NADP+)
ec: 1.1.1.140 山梨糖醇-5-磷酸 2-脱氢酶
ec: 1.1.1.142 D-松醇脱氢酶
ec: 1.1.1.143 红杉醇脱氢酶
ec: 1.1.1.144 紫苏醇-醇脱氢酶
ec: 1.1.1.156 甘油 2-脱氢酶(NADP+)
ec: 1.1.1.157 3-羟基丁酰-CoA 脱氢酶

[0152]

ec: 1.1.1.163 环戊醇脱氢酶
ec: 1.1.1.164 十六醇脱氢酶
ec: 1.1.1.165 2-炔-1-醇-脱氢酶
ec: 1.1.1.166 羟基环己烷甲酸脱氢酶
ec: 1.1.1.167 羟基丙二酸脱氢酶
ec: 1.1.1.174 环己胺-1，2-二醇脱氢酶
ec: 1.1.1.177 甘油-3-磷酸盐 1-脱氢酶(NADP+)
ec: 1.1.1.178 3-羟基-2-甲基丁酰-CoA 脱氢酶
ec: 1.1.1.185 L-乙二醇脱氢酶
ec: 1.1.1.190 吲哚-3-醇脱氢酶(NADH)
ec: 1.1.1.191 吲哚-3-醇脱氢酶(NADPH)
ec: 1.1.1.192 长链-醇脱氢酶
ec: 1.1.1.194 松柏基-醇脱氢酶
ec: 1.1.1.195 苯丙烯盐基-醇脱氢酶
ec: 1.1.1.198 (+)-冰片脱氢酶
ec: 1.1.1.202 1,3-丙二醇脱氢酶
ec: 1.1.1.207 (-)-薄荷醇脱氢酶
ec: 1.1.1.208 (+)-新薄荷醇脱氢酶
ec: 1.1.1.216 法呢醇脱氢酶
ec: 1.1.1.217 苄基-2-甲基-羟基丁酸脱氢酶
ec: 1.1.1.222 (R)-4-羟基苯基乳酸脱氢酶
ec: 1.1.1.223 异薄荷二烯醇脱氢酶
ec: 1.1.1.226 4-羟基环己烷甲酸脱氢酶
ec: 1.1.1.229 二乙基 2-甲基-3-氧代琥珀酸还原酶
ec: 1.1.1.237 羟基苯基丙酮酸还原酶
ec: 1.1.1.244 甲醇脱氢酶
ec: 1.1.1.245 环己醇脱氢酶
ec: 1.1.1.250 D-阿拉伯糖醇 2-脱氢酶
ec: 1.1.1.251 半乳糖醇 1-磷酸 5-脱氢酶
ec: 1.1.1.255 甘露醇脱氢酶
ec: 1.1.1.256 芴-9-醇脱氢酶
ec: 1.1.1.257 4-(羟甲基)苯磺酸脱氢酶
ec: 1.1.1.258 6-羟基己酸脱氢酶
ec: 1.1.1.259 3-羟基丁酰-CoA 脱氢酶
ec: 1.1.1.261 甘油-1-磷酸脱氢酶[NAD(P)+]
ec: 1.1.1.265 3-甲基丁醛还原酶
ec: 1.1.1.283 甲基乙二醛还原酶(NADH-依赖性)
ec: 1.1.1.286 异柠檬酸-高异柠檬酸脱氢酶
ec: 1.1.1.287 D-阿拉伯糖醇脱氢酶(NADP+)
丁醇脱氢酶

醛脱氢酶

[0153]

ec: 1.2.1.2	甲酸脱氢酶
ec: 1.2.1.3	醛脱氢酶(NAD+)
ec: 1.2.1.4	醛脱氢酶(NADP+)
ec: 1.2.1.5	醛脱氢酶 [NAD(P)+]
ec: 1.2.1.7	安息香醛脱氢酶(NADP+)
ec: 1.2.1.8	甜菜碱-醛脱氢酶
ec: 1.2.1.9	甘油醛-3-磷酸脱氢酶(NADP+)
ec: 1.2.1.10	乙醛脱氢酶(乙酰化)
ec: 1.2.1.11	天冬氨酸-半醛脱氢酶
ec: 1.2.1.12	甘油醛-3-磷酸脱氢酶(磷酸化)
ec: 1.2.1.13	甘油醛-3-磷酸脱氢酶(NADP+)(磷酸化)
ec: 1.2.1.15	丙二酸-半醛脱氢酶
ec: 1.2.1.16	琥珀酸-半醛脱氢酶[NAD(P)+]
ec: 1.2.1.17	乙醛酸脱氢酶(酰化)
ec: 1.2.1.18	丙二酸-半醛脱氢酶(乙酰化)
ec: 1.2.1.19	氨基丁醛脱氢酶
ec: 1.2.1.20	戊二酸-半醛脱氢酶
ec: 1.2.1.21	乙醇醛脱氢酶
ec: 1.2.1.22	乳醛脱氢酶
ec: 1.2.1.23	2-氧化醛脱氢酶(NAD+)
ec: 1.2.1.24	琥珀酸-半醛脱氢酶
ec: 1.2.1.25	2-氧代异戊酸脱氢酶(酰化)
ec: 1.2.1.26	2,5-二氧戊酸脱氢酶
ec: 1.2.1.27	甲基丙二酸-半醛脱氢酶(酰化)
ec: 1.2.1.28	安息香醛脱氢酶(NAD+)
ec: 1.2.1.29	芳基醛脱氢酶
ec: 1.2.1.30	芳基醛脱氢酶(NADP+)
ec: 1.2.1.31	L-氨基己二酸-半醛脱氢酶
ec: 1.2.1.32	氨基粘康酸-半醛脱氢酶
ec: 1.2.1.36	视黄醛脱氢酶
ec: 1.2.1.39	苯乙醛脱氢酶
ec: 1.2.1.41	谷氨酸-5-半醛脱氢酶
ec: 1.2.1.42	十六醛脱氢酶(酰化)
ec: 1.2.1.43	甲酸脱氢酶(NADP+)
ec: 1.2.1.45	4-羧基-2-羟基粘康酸-6-半醛脱氢酶
ec: 1.2.1.46	甲醛脱氢酶
ec: 1.2.1.47	4-三甲基铵基丁醛脱氢酶
ec: 1.2.1.48	长链-醛脱氢酶
ec: 1.2.1.49	2-氧化醛脱氢酶(NADP+)

	ec: 1.2.1.51	丙酮酸脱氢酶(NADP+)
	ec: 1.2.1.52	酮戊二酸脱氢酶(NADP+)
	ec: 1.2.1.53	4-羟基苯乙醛脱氢酶
	ec: 1.2.1.57	丁醛脱氢酶
	ec: 1.2.1.58	苯乙醛酸脱氢酶(酰化)
	ec: 1.2.1.59	甘油醛-3-磷酸脱氢酶(NAD(P)+)(磷酸化)
	ec: 1.2.1.62	4-甲酰基苯磺酸脱氢酶
[0154]	ec: 1.2.1.63	6-氧代己酸脱氢酶
	ec: 1.2.1.64	4-羟基苯甲醛脱氢酶
	ec: 1.2.1.65	水杨醛脱氢酶
	ec: 1.2.1.66	真菌硫醇-依赖性甲醛脱氢酶
	ec: 1.2.1.67	香草醛脱氢酶
	ec: 1.2.1.68	松柏基-醛脱氢酶
	ec: 1.2.1.69	氯乙醛脱氢酶
	ec: 1.2.1.71	琥珀酰谷氨酸-半醛脱氢酶

[0155] 其他示例性的酶和途径在此处公开(参见实施例)。此外,可以理解的是可利用酶用于完成底物不是自然底物的反应。虽然对于非自然底物的活性低于自然底物,可以理解的是可利用所述酶,无论其是自然存在的或利用如本文公开的直接进化或适应进化修饰的(也参见实施例)。

[0156] 通过本文公开的任何途径的BDO产生在某种程度上以用于前体转化至BDO的合适酶的鉴定为基础。已经鉴定了许多用于一些反应阶段的特异性酶。对于其中尚未鉴定对反应前体酶特异性的那些转化,已确定最适于催化所述反应步骤的酶候选物。如下所论述的,已显示酶对大量底物起作用。另外,蛋白质工程领域的进展也使得改变酶以有效作用于底物是可行的,即使其不是自然底物。如下所述的为适于BDO途径以及已用于开发酶以作用于非自然底物的方法而来自不同类别的广-特异性酶。

[0157] BDO途径的关键酶类为氧化还原酶,其相互转变酮或醛与醇(1.1.1)。该类中许多示例性的酶可对大量底物起作用。纯化自短杆菌属土壤菌KU1309(Hirano等,J.Biosc.Bioeng.100:318-322(2005))的醇脱氢酶(1.1.1.1)显示对脂族以及芳香醇的过剩以高活性起作用。表2显示所述酶的活性和其对不同醇的Km。所述酶是可逆的且对一些醛也具有很高的活性(表3)。

[0158] 表2.来自短杆菌属KU的醇脱氢酶对氧化各种醇的相对活性

[0159]

底物	相对活性(%)	K_m (mM)
2-苯基乙醇	100*	0.025
(S)-2-苯丙醇	156	0.157
(R)-2-苯丙醇	63	0.020
苄醇	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-苯基乙醇	46	
2-丙醇	54	

[0160] *2-苯基乙醇的活性,对应于19.2U/mg,作为100%。

[0161] 表3.来自短杆菌属KU 1309的醇脱氢酶还原各种羰基化合物的相对活性

[0162]

底物	相对活性(%)	K_m (mM)
苯乙醛	100	0.261
2-苯丙醛	188	0.864
1-辛基乙醛	87	
苯乙酮	0	

[0163] 来自真氧产碱杆菌的乳酸脱氢酶(1.1.1.27)为已证实对一些2-酮酸诸如2氧代丁酰,2-氧代戊酸和2-酮戊二酸(2-氧代己二酸的C5化合物)具有高活性的另外的酶(Steinbuchel和Schlegel,Eur.J.Biochem.130:329-334(1983))。表4列2表明来自罗尔斯通氏菌(旧名真养产碱菌)的IdhA对不同底物的活性(Steinbuchel和Schlegel,上文,1983)。

[0164] 表4.罗尔斯通氏菌IdhA(Steinbuchel和Schlegel,上文,1983)对不同底物的体外活性及其与对丙酮酸的体外活性的比较

[0165]

底物		活性(%)	
	来自真氧产碱菌的 L(+)-乳酸脱氢酶	来自兔肌肉的 L(+)-乳酸脱氢酶	来自赖氏乳杆菌的 D(-)-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-酮戊二酸	79.6	0.0	0.0
3-氟丙酮酸	33.6	74.3	40.0

[0166] 可转换2-酮酸至其酰基-CoA配对物(1.2.1)的氧化还原酶也显示接受多种底物。例如,支链2-酮酸脱氢酶复合物(BCKAD),亦称2-氧代异戊酸脱氢酶(1.2.1.25),参与支链氨基酸降解途径,转换缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的2-酮酸类衍生物至其酰基-CoA衍生物和CO2。在包括褐鼠(Paxton等,Biochem.J.234:295-303(1986))和酿酒酵母(Sinclair等,Biochem.Mol Biol.Int.32:911-922(1993)的一些生物体中,该复合物显示具有宽的底物范围,除了支链氨基酸前体外,包括线性氧代-酸类诸如2-氧代丁酸和α-酮戊二酸。

[0167] 已报道另一类酶的成员,即氨基转移酶(2.6.1)作用于多种底物。已鉴定了来自激烈热球菌的天冬氨酸转氨酶(aspAT),其在大肠杆菌中表达,重组蛋白质表征表明所述酶对天冬氨酸和α-酮戊二酸具有最高的活性,而对丙氨酸、谷氨酸和芳香族氨基酸具有较低但仍显著的活性(Ward等,Archaea133-141(2002))。另一种情况中,已报道从墨西哥利什曼原虫鉴定且在大肠杆菌中表达的氨基转移酶(Vernal等,FEMS Microbiol.Lett.229:217-222(2003))分别对酪氨酸(对酪氨酸的活性为100%)、苯丙氨酸(90%)、色氨酸(85%)、天冬氨酸(30%)、亮氨酸(25%)和蛋氨酸(25%)具有宽的底物特异性(Vernal等,Mol.Biochem.Parasitol 96:83-92(1998))。已报道来自克氏锥虫的酪氨酸氨基移换酶的类似的宽特异性,即使这两种酶仅具有6%序列同源性。后者酶可接受亮氨酸、蛋氨酸以及酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和丙氨酸作为有效的氨基供体(Nowicki等,Biochim.Biophys.Acta 1546:268-281(2001))。

[0168] 已表明CoA转移酶(2.8.3)具有作用于超过一种以上底物的能力。具体地,CoA移转酶纯化自丙酮丁醇梭菌并且报道其对乙酸盐、丙酸盐和丁酸盐具有最高的活性。其对戊酸盐、异丁酸盐和巴豆酸酯也具有显著的活性(Wiesenborn等,Appl.Environ.Microbiol.1055:323-329(1989))。另一研究中,大肠杆菌酶酰基-CoA:乙酸盐-CoA移转酶,亦称乙酸盐-CoA移转酶(EC 2.8.3.8),已显示从多种支链和线性酰基-CoA底物传送CoA部分至乙酸盐,包括异丁酸盐(Matthies和Schink,App.Environm.Microbiol.58:1435-1439(1992))、戊酸盐(Vanderwinkel等,Biochem.Biophys.Res Commun.33:902-908(1968b))和丁酸酯(Vanderwinkel等,Biochem.Biophys.Res Commun.33:902-908(1968a)。

[0169] 另有其他的酶类支持酶的宽底物特异性。一些异构酶(5.3.3)也证实对多种底物起作用。例如,来自施氏假单胞菌的L-鼠李糖异构酶催化各种醛糖和酮糖之间的异构化(Yoshida等,J.Mol.Biol.365:1505-1516(2007))。这些包括L-鼠李糖和L-鼠李树胶糖、L-甘露糖和L-果糖、L-木糖和L-木酮糖、D-核糖和D-核酮糖以及D-阿洛糖和D-阿洛酮糖之间的异构化。

[0170] 在又一类酶中,发现将L-高丝氨酸转变至L-高丝氨酸磷酸盐的来自大肠杆菌的磷酸转移酶(2.7.1),高丝氨酸激酶(2.7.1.39)磷酸化许多高丝氨酸类似物。这些底物中,R-位点的羧基功能基团已由酯取代或由羟甲基取代(Huo和Viola,Biochemistry 35:16180-16185(1996))。表5显示该激酶得宽底物特异性。

[0171] 表5.高丝氨酸激酶的底物特异性

[0172]

底物	$K_{催化}$	$\%k_{催化}$	K_m(mM)	$k_{催化}/K_m$
L-高丝氨酸	18.3±0.1	100	0.14±0.04	184±17
D-高丝氨酸	8.3±1.1	32	31.8±7.2	0.26±0.03
L-天冬氨酸β-半醛	2.1±0.1	8.2	0.28±0.02	7.5±0.3
L-2-氨基-1,4-丁二醇	2.0±0.5	7.9	11.6±6.5	0.17±0.06
L-2-氨基-5-羟基戊酸酯	2.5±0.4	9.9	1.1±0.5	2.3±0.3
L-高丝氨酸甲酯	14.7±2.6	80	4.9±2.0	3.0±0.6
L-高丝氨酸乙酯	13.6±0.8	74	1.9±0.5	7.2±1.7
L-高丝氨酸异丙酯	13.6±1.4	74	1.2±0.5	11.3±1.1
L-高丝氨酸正丙酯	14.0±0.4	76	3.5±0.4	4.0±1.2
L-高丝氨酸异丁酯	16.4±0.8	84	6.9±1.1	2.4±0.3
L-高丝氨酸正丁酯	29.1±1.2	160	5.8±0.8	5.0±0.5

[0173] BDO途径中有用的另一类酶为酸-硫羟连接酶(6.2.1)。类似于其他类的酶,已确定该类中的某些酶具有宽的底物特异性。例如,已表明来自恶臭假单胞菌的酰基CoA连接酶作用于一些脂族底物,包括酸、丙酸、酪酸、缬草酸、己酸、庚酸和辛酸并且作用于芳族化合物诸如苯乙酸和苯氧乙酸类(Fernandez-Valverde等,Appl.Environ.Microbiol.59:1149-1154(1993))。相关的酶,来自三叶草根瘤菌的丙二酰CoA合成酶(6.3.4.9)可将一些二酸,即乙基-、丙基-、烯丙基-、异丙基-、二甲基-、环丙基-、环丙基亚甲基-、环丁基-和苄基-丙二酸盐转化为其相应的硫代酯(Pohl等,J.Am.Chem.Soc.123:5822-5823(2001))。同样地,也已发现脱羧酶(4.1.1)具有宽的底物范围。丙酮酸脱羧酶(PDC),也称为酮酸脱羧酶,为酒精发酵、催化丙酮酸脱羧至乙醛的关键酶。分离自酿酒酵母的酶对脂族2-酮酸类,包括2-丁酮酸、2-戊酮酸、2-苯丙酮酸具有宽的底物范围(Li和Jordan,Biochemistry 38:10004-10012(1999))。同样地,苯甲酰甲酸脱羧酶具有宽的底物范围并且已成为酶工程研究的靶标。已广泛研究了来自恶臭假单胞菌的酶并且可得到该酶的晶体结构(Polovnikova等,Biochemistry42:1820-1830(2003);Hasson等,Biochemistry 37:9918-9930(1998))。已表明支链α-酮酸脱羧酶(BCKA)作用于链长为3至6碳的多种化合物(Oku和Kaneda,J.Biol.Chem.263:18386-18396(1998);Smit等,Appl.Environ.Microbiol.71:303-311(2005b))。乳酸乳球菌中的酶已用多种支链和线性底物包括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--氧代丁酸和异己酸表征(Smit等,

Appl.Environ.Microbiol.71:303-311(2005a))。

[0174] 有趣的是,已知具有一种主要活性的酶还报道催化非常不同的功能。例如,来自嗜热脂肪芽孢杆菌和枯草杆菌的辅因子-依赖性磷酸甘油酸变位酶(5.4.2.1)也已知作为磷酸酶起作用(Rigden等,Protein Sci.10:1835-1846(2001))。已知来自嗜热脂肪芽胞杆菌的酶对一些底物具有活性,包括3-磷酸甘油酸、α-萘基磷酸盐、对硝基苯磷酸盐、AMP、果糖-6-磷酸、核糖-5-磷酸和CMP。

[0175] 与其中所述酶天然具有宽的底物特异性的实施例相反,已利用直接进化修饰许多酶以扩大其对非自然底物的特异性。或者,利用直接进化还改变了所述酶的底物偏爱。因此,对于对自然底物的有效作用,例如改善的效率,或对非自然底物的有效作用,例如提高的效率而工程设计给定的酶是可行的。例如,已报道来自绿脓杆菌的脂肪酶的拮抗选择性被显著改善(Reetz等,Agnew.Chem.Int.Ed Engl.36:2830-2832(1997))。该酶以利于(S)-酸的仅2%对映体剩余(ee)水解对硝基苯基2-甲基癸酸酯。然而,在连续四轮易错诱变和筛选后,产生以81%ee催化必需反应的变体(Reetz等,Agnew.Chem.Int.Ed Engl.36:2830-2832(1997))。

[0176] 直接进化方法常用于修饰酶以作用于大量非自然的底物。铜绿假单胞菌中脂肪酶的底物特异性通过活性中心附近氨基酸残基的随机化而扩大。此允许接受该酶的α-取代羧酸酯(Reetz等,Agnew.Chem.Int.Ed Engl.44:4192-4196(2005))。在另一个成功的酶中,采用DNA改组以产生大肠杆菌氨基转移酶,其接受β支链底物,而该底物被野生型酶很难接受(Yano等,Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.95:5511-5515(1998))。具体地,在四轮改组结束时,天冬氨酸转氨酶对缬氨酸和2-氧代缬氨酸的活性提高了五个数量级,虽然其对自然底物天冬氨酸的活性降低了30倍。近来,一种算法用于设计逆醛缩酶,其可用于催化非自然和非-生物学底物,4-羟基-4-(6-甲氧基-2-萘基)-2-丁酮中的碳-碳链断裂(Jiang等,Science 319:1387-1391(2008))。这些算法使用四种不同催化基序的组合以设计新酶,并且用于实验表征的所选择设计的20种具有超过非催化反应四倍提高的速率(Jiang等,Science 319:1387-1391(2008))。因此,这些基因工程方法不仅能够扩大酶可以作用的系列底物,而且其允许设计和构建非常有效的酶。例如,已报道DNA改组方法(对瞬时模板或RACHITT的随意嵌合发生)产生基因工程改造的单加氧酶,其对复杂底物的脱硫作用具有改善的速率以及对非自然底物有快20倍的转化(Coco等,Nat.Biotechnol.19:354-359(2001))。同样地,惰性突变体磷酸丙糖异构化酶的比活性从1.3倍提高至19倍(Hermes等,Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.87:696-700(1990))。该比活性的提高通过利用全长蛋白质的随机诱变实现,并且所述改进可追溯到六个氨基酸残基的突变。

[0177] 改变酶对所需底物的底物特异性的蛋白质工程方法的有效性也在一些研究中证实。来自嗜热栖热菌的异丙基苹果酸脱氢酶通过改变活性中心附近的残基而修饰,使得其现在可以以苹果酸盐和D-乳酸作为作用底物(Fujita等,Biosci.Biotechnol.Biochem.65:2695-2700(2001))。在该研究以及其它研究中,有人指出一个或一些残基可经修饰改变底物特异性。例如,其中在假定的底物-结合区域中单个氨基酸改变的黄烷酮醇4-还原酶可优先还原二氢山奈酚(Johnson等,Plant.J.25:325-333(2001))。来自大肠杆菌的非常特异的异柠檬酸脱氢酶的底物特异性通过改变活性中心中的一个残基而改变,将异柠檬酸形成异丙基苹果酸(Doyle等,Biochemistry40:4234-4241(2001))。同样地,NAD+-依赖性的1,5-羟

前列腺素脱氢酶的辅因子特异性通过改变N-末端附近的一些残基而改变至NADP+依赖性的(Cho等,Arch.Biochem.Biophys.419:139-146(2003))。

[0178] 序列分析和分子模型分析用于鉴定用于修饰的关键残基,其进一步通过定点诱变研究。

[0179] 各种类别的酶存在于许多实例中,其中酶的作用被改变至对酶的非自然底物比对自然底物更有利。通过DNA改组和筛选从大肠杆菌半乳糖苷酶发展岩藻糖苷酶(Zhang等,Proc.Natl Acad.Sci.U.S.A.94:4504-4509(1997))。同样地,来自大肠杆菌的天冬氨酸转氨酶利用同源模型和定点诱变转化成酪氨酸转氨酶(Onuffer和Kirsch,Protein Sci.,4:1750-1757(1995))。据报道来自恶臭假单胞菌苯甲酰甲酸脱羧酶活性中心中两个残基的定点诱变改变了对自然和非自然底物的亲和力(Km)(Siegert等,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)经过直接分子演化以生成具有对标准的过氧化物酶底物甲基儿茶酚提高的活性的突变体,由此改变来自蛋白质细胞色素C的CCP对小有机分子的底物特异性。三轮DNA改组和筛选后,分离突变体,其相对于自然底物,拥有对甲基儿茶酚300倍提高的活性以及1000倍提高的特异性(Iffland等,Biochemistry 39:10790-10798(2000))。

[0180] 一些情形中,已经获得比任何一个亲本酶更具有不同底物偏爱的酶。例如,联苯-二氧化酶-介导的多氯化联苯的降解通过改组来自两种细菌类产碱假单胞菌和洋葱假单胞菌的基因而改进(Kumamaru等,Nat.Biotechnol.16:663-666(1998))。得到的嵌合联苯加氧酶显示与两种亲本酶不同的底物偏爱,以及对原为所述酶不适底物的有关联苯化合物和单芳环烃类诸如甲苯和纯苯提高的降解活性。

[0181] 除了改变酶的特异性,还可以增强对所述酶本来低活性的底物的活性。一个研究表明来自恶臭假单胞菌的氨基酸消旋酶,其具有宽的底物特异性(对赖氨酸、精氨酸、丙氨酸、丝氨酸、蛋氨酸、半胱氨酸、亮氨酸和组氨酸等)但具有对色氨酸的低活性,可通过随机诱变显著改进(Kino等,Appl.Microbiol.Biotechnol.73:1299-1305(2007))。同样地,牛BCKAD活性中心设计为有利于替代的底物乙酰CoA(Meng和Chuang,Biochemistry 33:12879-12885(1994))。这些方法有意思的方面是即使随机方法已应用于生成这些具有有效活性的突变酶,还是可以确定赋予活性改善的所述精确的突变或结构变化。例如,上述研究中,促进对色氨酸提高的活性的突变被追溯至两个不同的位点。

[0182] 直接进化还用于表达难以表达的蛋白质。例如,辣根过氧物酶经过随机诱变和基因重组,鉴定出具有比野生型超过14倍活性的突变体(Lin等,Biotechnol.Prog.15:467-471(1999))。

[0183] 直接进化的另一个实例显示广泛的修饰,酶可以经此而获得所需功能。来自嗜热脂肪芽孢杆菌的乳酸脱氢酶经过定点诱变,在被认为决定对不同醇酸特异性的位点生成三个氨基酸取代(Clarke等,Biochem.Biophys.Res.Commun.148:15-23(1987))。这些突变后,草酰乙酸比丙酮酸的特异性增至500,而相反,野生型酶具有1000的丙酮酸比草酰乙酸的催化特异性。该酶利用定点诱变进一步设计以对支链被取代的丙酮酸具有活性(Wilks等,Biochemistry 29:8587-8591(1990))。具体地,所述酶对α-酮异己酸的Kcat具有55倍的改进。同样的酶中生成三个结构修饰以改变从乳酸至苹果酸的底物特异性。所述酶对苹果酸高效且特异(Wilks等,Science 242:1541-1544(1988))。来自嗜热脂肪芽胞杆菌的同样的

酶随后设计为对具有正电荷侧链的α-酮酸类具有高催化活性，诸如包含铵基的那些(Hogan等，Biochemistry 34:4225-4230(1995))。所述酶102引入酸性氨基酸的突变体有利于所述侧链铵基的结合。获得的结果证实所述突变体呈现对ω-氨基-α-酮酸底物25倍的kcat/Km值改进。有趣的是，该酶还在结构上修饰以代替乳酸脱氢酶而作为苯乳酸脱氢酶起作用(Wilks等，Biochemistry 31:7802-7806 1992)。限制酶切位点被引入该酶的基因中，其允许所述基因区域被切除。该区域编码活动的多肽表面环(残基98-110)，其通常封闭来自大体积溶剂的活性位点并且为底物特异性的主要决定簇。插入可变长度和序列的环使得产生具有改变的底物特异性的醇酸脱氢酶。对于具有一个更长环的构建体，对丙酮酸的活性降低100万倍但对苯丙酮酸的活性基本不变。获得了390,000倍的特异性转换(kcat/Km)。该酶对苯丙酮酸比丙酮酸得1700:1选择性是苯乳酸脱氢酶所需要的。上述研究表明酶工程的各种方法可用于获得用于本文公开的BDO途径的酶。

[0184] 如本文公开的，可利用从许多中心代谢中间产物至1,4-丁二醇的生物合成途径，包括乙酰-CoA、琥珀酰-CoA、α-酮戊二酸、谷氨酸、4-氨基丁酸和高丝氨酸。乙酰-CoA、琥珀酰-CoA和α-酮戊二酸为三羧酸(TCA)循环的共同中间体，三羧酸循环为存在于利用氧进行细胞呼吸的几乎所有活细胞中的一系列反应，并且以截短形式存在于许多厌氧生物中。谷氨酸为源自α-酮戊二酸经过谷氨酸脱氢酶或任何许多氨基转移反应的氨基酸(参见图8B)。4-氨基丁酸可通过谷氨酸的脱羧作用形成或经过图9C中公开的途径而来自乙酰乙酰基-CoA。

[0185] 乙酰乙酰基-CoA源自于两个乙酰-CoA分子经由酶，乙酰-辅酶A乙酰转移酶或相等地，乙酰乙酰基-辅酶A硫基裂解酶的缩合。高丝氨酸为苏氨酸和蛋氨酸新陈代谢中的中间体，由草酰乙酸经过天冬氨酸形成。草酰乙酸转化至高丝氨酸需要一个NADH，两个NADPH和一个ATP。

[0186] 还可采用不同于以上所实例那些的途径以在非天然存在的微生物体中产生BDO的生物合成。在一实施方案中，可利用L-高丝氨酸至BDO途径实现生物合成(参见图13)。该途径具有0.90mol/mol葡萄糖的摩尔产量，其似乎受还原当量有效性的限制。第二种途径从乙酰乙酰基-CoA合成BDO并且能够实现1.091mol/mol葡萄糖的最大理论收率(参见图9)。任一途径的进行均可通过两种外源酶引入宿主生物体诸如大肠杆菌中而实现，并且两种途径可途经琥珀酰-CoA另外补充BDO的产生。途径酶、热动力学、理论收率和总可行性如下进一步描述。

[0187] 高丝氨酸途径还可设计以产生BDO-生产的微生物体。高丝氨酸为苏氨酸和蛋氨酸新陈代谢中的中间体，由草酰乙酸经过天冬氨酸形成。草酰乙酸转化至高丝氨酸需要一个NADH，两个NADPH和一个ATP(图2)。一旦形成，高丝氨酸就进入苏氨酸和甲硫氨酸的生物合成途径。在大部分生物体中，高水平的苏氨酸或甲硫氨酸反馈抑制高丝氨酸生物合成途径(Caspi等，Nucleic Acids Res.34:D511-D516(1990))。

[0188] 高丝氨酸向4-羟基丁酸(4-HB)的转化可以在本文所述的两个酶步骤中完成。该途径的第一个步骤是通过推定脱氨酶使高丝氨酸脱氨基。在步骤2中，产物烯烃--4-羟基丁-2-烯酸通过假定的还原酶消耗一个NADH被还原为4-HB。4-HB能因此转变成BDO。

[0189] 可用于催化上述转化的酶在本文公开。例如，在途径的步骤1中的脱氨酶非常类似于天冬氨酸脱氨酶(天冬氨酸酶)的化学性质。天冬氨酸酶是微生物中分布广泛的酶，并且

已经被充分表征(Viola,R.E.,Mol.Biol.74:295-341(2008))。大肠杆菌天冬氨酸酶的晶体结构已被解析(Shi等,,Biochemistry 36:9136-9144(1997)),因此,有可能直接改造酶活性部位中的突变,这使其底物特异性改变,以包含高丝氨酸。步骤2中的氧化还原酶具有类似于几种充分表征酶的化学性质,所述充分表征酶包括大肠杆菌TCA循环中的延胡索酸还原酶。因为该反应的热力学非常有利,所以具有广泛底物特异性的内源还原酶有可能能够还原4-羟基丁-2-烯酸。在厌氧条件下该途径的产量是0.9molBDO/mol葡萄糖。

[0190] 琥珀酰-CoA途径被发现具有更高的产量,这是由于其在能量上更加有效的事实。一个草酰乙酸分子经过高丝氨酸途径转化成BDO将需要消耗2个ATP当量。因为假定PEP羧激酶是可逆的,葡萄糖转化成两个草酰乙酸分子可以产生最多3个ATP分子,因此葡萄糖经过高丝氨酸全部转化成BDO具有负的能量产量。如所期望,如果我们假定能量可以通过呼吸作用产生,则高丝氨酸途径的最大产量增加至1.05mol/mol葡萄糖,其是琥珀酰-CoA途径产量的96%。琥珀酰-CoA途径可以引导一些碳通量(carbon flux)通过丙酮酸脱氢酶和TCA循环的氧化支路,产生还原当量和琥珀酰-CoA,而没有能量消耗。因而,它不会遭遇与高丝氨酸途径相同的能量问题,因为并不是所有的通量都通过草酰乙酸至琥珀酰-CoA引导至BDO。总之,高丝氨酸途径证实是得到BDO的适当高产量的路线。

[0191] 乙酰乙酸途径也可以被改造成以产生产BDO的微生物体。在大肠杆菌中,乙酰乙酸由丙酮和亮氨酸降解产生。乙酰乙酸也可以通过参与脂肪酸代谢的酶从乙酰-CoA形成,所述酶包括乙酰-CoA乙酰转移酶和乙酰乙酰-CoA转移酶(图7)。通过乙酰乙酸的生物合成路线在可以代谢单碳化合物诸如一氧化碳,二氧化碳或甲醇以形成乙酰-CoA的微生物体中也特别有用。

[0192] 从乙酰乙酸到琥珀酸半醛的三个步骤的路线(参见图9C)可以用于通过乙酰乙酸合成BDO。如图8B所示4-氨基丁酸可转变成琥珀酸半醛。琥珀酸半醛是一个从琥珀酰-CoA去除的还原步骤或是一个从α-酮戊二酸去除的脱羧步骤,其经过三个还原步骤后(图1)可以转化成BDO。简言之,该途径的步骤1涉及乙酰乙酰基-CoA通过例如atoA和atoD基因编码的大肠杆菌乙酰乙酰基-CoA移转酶转化成乙酰乙酸(Hanai等,Appl.Environ.Microbiol.73:7814-7818(2007))。乙酰乙酰基-CoA生物途径的步骤2必须使乙酰乙酸通过ω-转氨酶转化为3-氨基丁酸。来自反硝化产碱菌(Alcaligens denitrificans)的ω-氨基酸:丙酮酸转氨酶(ω-APT)在大肠杆菌中过量表达并且显示具有高的针对3-氨基丁酸的体外活性(Yun等,Appl.Environ.Microbiol.70:2529-2534(2004))。

[0193] 在步骤2中,假定的氨基变位酶将胺基团从碳骨架的3-位转移至4-位。在3-氨基丁酸上执行该功能的氨基变位酶没有被表征,但来自斯蒂克兰德氏梭菌(Clostridium sticklandii)的酶具有非常相似的机理(图9)。酶--D-赖氨酸-5,6-氨基变位酶--参与赖氨酸生物合成。

[0194] 自乙酰乙酰基-CoA到BDO的合成路线经过4-氨基丁酸,其是大肠杆菌中的代谢物,通常由谷氨酸脱羧形成。一旦形成,4-氨基丁酸可以通过4-氨基丁酸转氨酶(2.6.1.19)转化成琥珀酸半醛,4-氨基丁酸转氨酶是已经被生物化学表征的酶。

[0195] 在该途径中选择候选酶的一种考虑是参与步骤2和3的酶的立体选择性。反硝化产碱菌的ω-ABT对3-氨基丁酸的L-立体异构体是特异的,而D-赖氨酸-5,6-氨基变位酶有可能需要D-立体异构体。如果不能找到或改造具有互补立体选择性的酶,则必需加入第三个

酶至该途径,所述酶具有消旋酶活性,可以将L-3-氨基丁酸转化成D-3-氨基丁酸。尽管氨基酸消旋酶分布广泛,但这些酶是否可以对ω-氨基酸起作用并不知道。

[0196] 在厌氧条件下该途径的最大理论摩尔产量是1.091mol/mol葡萄糖。为了产生从乙酰乙酸至BDO的通量,必需假定乙酰-CoA:乙酰乙酰-CoA转移酶是可逆的。该酶在大肠杆菌中的功能是通过首先将短链脂肪酸转化为硫酯而使其代谢。

[0197] 虽然在消耗乙酸的方向上进行乙酰-CoA:乙酰乙酰-CoA转移酶操作在大肠杆菌中还没有实验证实,但对其它生物中相似的酶的研究支持该反应是可逆的这种假设。消化道微生物罗尔斯通氏菌属某种(Roseburia sp.)和F.prasnitzii中的酶--丁酰-CoA:乙酸:CoA转移酶,在利用乙酸的方向上操作,以产生丁酸(Duncan等,Appl.Environ.Microbiol 68:5186-5190(2002))。布氏锥虫(Trypanosoma brucei)中的另一非常相似的酶--乙酰:琥珀酸CoA-转移酶,也在利用乙酸的方向上操作。该反应具有接近于平衡状态的Δrxn G,因此高浓度的乙酸有可能能够将反应在感兴趣的方向推动。在1.09mol/mol葡萄糖的最大理论BDO生产速率下,模拟预测大肠杆菌可以产生1.098mol ATP/mol葡萄糖,而没有发酵副产物。该ATP产量对于细胞生长、维持和生产应当是足够的。乙酰乙酰基-CoA生物途径是一种从乙酰-CoA到BDO的高产量路线。

[0198] 因此,除了先前示例的用于在选择宿主中建立4-HB生物合成的各种修饰的任一个之外,产生BDO的微生物体可以包括4-HB途径代谢修饰的任意先前组合和变换以及CoA-非依赖性醛脱氢酶、CoA-依赖性醛脱氢酶或醇脱氢酶的任意表达组合,以产生GBL和/或BDO的生物合成途径。因此,本发明的BDO生产者可以具有例如1种、2种、3种、4种、5种、6种、7种、8种、9种或所有酶的外源表达,所述酶对应于4-HB途径酶的任一种和/或本文公开的BDO途径酶的任一种。

[0199] 设计和构建遗传修饰微生物体使用本领域中熟知的方法进行,以达到足以产生BDO的表达量。具体而言,本发明的非自然存在的微生物体可以实现BDO的生物合成,其产生在大约0.1至200mM之间或更多的胞内浓度,诸如上述的大约0.1至25mM或更多。例如,BDO胞内浓度在大约3-20mM之间,特别地在大约5-15mM之间以及更特别地在大约8-12mM之间,包括大约10mM或更多。在这些示例性范围中的每一个之间和以上的胞内浓度也可从本发明的非自然存在的微生物体实现。与4-HB生产者一样,BDO生产者也可以在厌氧条件下被维持、培养或发酵。

[0200] 本发明进一步提供生产4-HB的方法。该方法包括在基本上厌氧的条件下将具有4-羟基丁酸(4-HB)生物合成途径的、非自然存在的微生物体培养足够的时间期间以产生单体4-羟基丁酸(4-HB),所述途径包含至少一种外源核酸,所述核酸编码4-羟基丁酸脱氢酶、CoA-非依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、琥珀酰-CoA合成酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、谷氨酸:琥珀酸半醛转氨酶、α-酮戊二酸脱羧酶或谷氨酸脱羧酶。该方法另外可以包括例如将4-HB化学转化成GBL以及转化成BDO或THF。

[0201] 另外提供生产4-HB的方法。该方法包括在基本上厌氧的条件下将具有4-羟基丁酸(4-HB)生物合成途径的、非自然存在的微生物体培养足够的时间期间以产生单体4-羟基丁酸(4-HB),所述途径包括至少一种外源核酸,该核酸编码4-羟基丁酸脱氢酶、琥珀酰-CoA合成酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶或α-酮戊二酸脱羧酶。4-HB产物可以分泌进入培养基中。

[0202] 进一步提供生产BDO的方法。该方法包括将非自然存在的微生物生物催化剂或微生物体培养足够的时间期间以产生1,4-丁二醇(BDO),该生物催化剂或生物体包含具有4-羟基丁酸(4-HB)和1,4-丁二醇(BDO)生物合成途径的微生物体,该途径包含至少一种外源核酸,其编码4-羟基丁酸脱氢酶、琥珀酰-CoA合成酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、4-羟基丁酸:CoA转移酶、4-羟基丁酸激酶、磷酸转羟基丁酰酶、α-酮戊二酸脱羧酶、醛脱氢酶、醇脱氢酶或醛/醇脱氢酶。BDO产物可以分泌进入培养基中。

[0203] 另外提供通过培养具有本发明BDO途径的非天然存在的微生物体而生产BDO的方法。所述BDO途径包括编码在一定条件下以足够量表达而生产BDO并且表达足够的时间以产生BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括4-氨基丁酸CoA移转酶,4-氨基丁酰-CoA水解酶,4-氨基丁酸-CoA连接酶,4-氨基丁酰-CoA氧化还原酶(去氨基),4-氨基丁酰-CoA氨基转移酶或4-羟基丁酰-CoA脱氢酶(参见实施例VII和表17)。

[0204] 或者,所述BDO途径包括编码在一定条件下以足够量表达而生产BDO并且表达足够的时间以产生BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括4-氨基丁酸-CoA移转酶,4-氨基丁酰-CoA水解酶,4-氨基丁酸-CoA连接酶,4-氨基丁酰-CoA还原酶(醇形成),4-氨基丁酰-CoA还原酶,4-氨基丁-1-醇脱氢酶,4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)或4-氨基丁-1-醇氨基转移酶(参见实施例VII和表18)。

[0205] 另外,本文提供用于生产BDO的方法,包括培养具有BDO途径的非天然存在的微生物体,该途径包括编码在一定条件下以足够量表达而生产BDO并且表达足够的时间以产生BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括4-氨基丁酸激酶,4-氨基丁醛脱氢酶(磷酸化),4-氨基丁-1-醇脱氢酶,4氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基),4-氨基丁-1-醇氨基转移酶,[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸氧化还原酶(去氨基),[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸氨基转移酶,4-羟基丁酰-磷酸脱氢酶,或4-脱氢酶(磷酸化)(参见实施例VII和表19)。

[0206] 本发明进一步提供用于生产BDO的方法,包括培养具有BDO途径的非天然存在的微生物体,该途径包括编码在一定条件下以足够量表达而生产BDO并且表达足够的时间以产生BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括α-酮戊二酸5-激酶,2,5-二氧代戊酸半醛脱氢酶(磷酸化),2,5-二氧代戊酸还原酶,α-酮戊二酸CoA移转酶,α-酮戊二酸基-CoA水解酶,α-酮戊二酸基-CoA连接酶,α-酮戊二酸基-CoA还原酶,5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶,α-酮戊二酸基-CoA还原酶(醇形成),5羟基-2-氧代戊酸脱羧酶,或5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)(参见实施例VIII和表20)。

[0207] 本发明另外提供用于生产BDO的方法,包括培养具有BDO途径的非天然存在的微生物体,该途径包括编码在一定条件下以足够量表达而生产BDO并且表达足够的时间以产生BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括谷氨酸CoA移转酶,谷氨酰基-CoA水解酶,谷氨酰基-CoA连接酶,谷氨酸5-激酶,谷氨酸-5-半醛脱氢酶(磷酸化),谷氨酰基-CoA还原酶,谷氨酸-5-半醛还原酶,谷氨酰基-CoA还原酶(醇形成),2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶(去氨基),2-氨基-5-羟基戊酸氨基转移酶,5-羟基-2氧代戊酸脱羧酶,5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)(参见实施例IX和表21)。

[0208] 本发明另外包括用于生产BDO的方法,包括培养具有BDO途径的非天然存在的微生物体,该途径包括编码在一定条件下以足够量表达而生产BDO并且表达足够的时间以产生BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括3-羟基丁酰-CoA脱氢酶,3-羟基丁

酰-CoA脱水酶,乙烯基乙酰基-CoAα-异构酶或4-羟基丁酰-CoA脱水酶(参见实施例X和表22)。

[0209] 还提供用于生产BDO的方法,包括培养具有BDO途径的非天然存在的微生物体,该途径包括编码在一定条件下以足够量表达而生产BDO并且表达足够的时间以产生BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括高丝氨酸脱氨酶,高丝氨酸CoA移转酶,高丝氨酸-CoA水解酶,高丝氨酸-CoA连接酶,高丝氨酸-CoA脱氨酶,4-羟基丁-2-烯酰基-CoA移转酶,4-羟基丁-2-烯酰基-CoA水解酶,4-羟基丁-2-烯酰基-CoA连接酶,4-羟基丁-2-烯酸酯还原酶,4-羟基丁酰-CoA移转酶,4-羟基丁酰-CoA水解酶,4-羟基丁酰-CoA连接酶或4-羟基丁-2-烯酰基-CoA还原酶(参见实施例XI和表23)。

[0210] 本发明提供用于生产BDO的方法,包括培养具有BDO途径的非天然存在的微生物体,该途径包括编码在一定条件下以足够量表达而生产BDO并且表达足够的时间以产生BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括琥珀酰-CoA还原酶(醇形成),4-羟基丁酰-CoA水解酶,4-羟基丁酰-CoA连接酶,4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)。

[0211] 所述BDO途径可另外包括琥珀酰-CoA还原酶,4-羟基丁酸脱氢酶,4-羟基丁酰-CoA移转酶,4-羟基丁酸激酶,磷酸转-4-羟基丁酰酶,4-羟基丁酰-CoA还原酶,4-羟基丁酰-CoA还原酶(醇形成)或1,4-丁二醇脱氢酶。

[0212] 还提供用于生产BDO的方法,包括培养具有BDO途径的非天然存在的微生物体,该途径包括编码在一定条件下以足够量表达而生产BDO并且表达足够的时间以产生BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸,所述BDO途径包括谷氨酸脱氢酶,4-氨基丁酸氧化还原酶(去氨基),4-氨基丁酸氨基转移酶,谷氨酸脱羧酶,4-羟基丁酰-CoA水解酶,4-羟基丁酰-CoA连接酶,4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)。

[0213] 本发明另外提供利用本文公开的遗传修饰的生物体生产所需产物的方法,其允许通过增加产物或减少不需要的副产品而提高所需产物例如BDO的生产。因此,本发明提供用于生产1,4-丁二醇(BDO)的方法,包括在一定条件下和以培养足够的时间培养本文公开的非天然存在的微生物体以生产BDO。在一实施方案中,本发明提供利用非天然存在的微生物体生产BDO的方法,所述生物体包括具有1,4-丁二醇(BDO)途径的微生物体,该途径包含编码以足够量表达以生产BDO的BDO途径酶的至少一种外源核酸。在一实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源琥珀酰-CoA合成酶(参见实施例XII)。例如,所述琥珀酰-CoA合成酶可通过大肠杆菌sucCD基因编码。

[0214] 在另一实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源α-酮戊二酸脱羧酶(参见实施例XIII)。例如,α-酮戊二酸脱羧酶可通过牛分枝杆菌sucA基因编码。还另外的实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源琥珀酸半醛脱氢酶和4-羟基丁酸脱氢酶并且任选地表达4-羟基丁酰-CoA/乙酰-CoA移转酶(参见实施例XIII)。例如,所述琥珀酸半醛脱氢酶(CoA-依赖性),4-羟基丁酸脱氢酶和4-羟基丁酰-CoA/乙酰-CoA移转酶可通过牙龈卟啉单胞菌W83基因编码。另外的实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源丁酸激酶和磷酸转丁酰酶(参见实施例XIII)。例如,所述丁酸激酶和磷酸转丁酰酶可通过丙酮丁醇梭菌buk1和ptb基因编码。

[0215] 另一实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源4-羟基丁酰-CoA还原酶(参见实施例XIII)。例如,所述4-羟基丁酰-CoA还原酶可通过拜氏梭菌Ald基因编码。另外,

本发明的实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源4-羟基丁醛还原酶(参见实施例XIII)。例如,所述4-羟基丁醛还原酶可通过热葡糖苷酶地芽孢杆菌adh1基因编码。在另一实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源丙酮酸脱氢酶亚基(参见实施例XIV)。例如,所述外源丙酮酸脱氢酶可以是NADH不敏感的。所述丙酮酸脱氢酶亚单位可以通过克雷伯氏肺炎杆菌IpdA基因编码。具体的实施方案中,所述微生物体的丙酮酸脱氢酶亚单位基因可受丙酮酸甲酸盐裂解酶启动子调控。

[0216] 另外的实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以破坏编码需氧呼吸控制调节系统的基因(参见实施例XV)。例如,可以破坏arcA基因。所述生物体可进一步包含破坏编码苹果酸脱氢酶的基因。另外的实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源NADH不敏感的柠檬酸合成酶(参见实施例XV)。例如,所述NADH不敏感的柠檬酸合成酶可通过gltA,例如gltA的R163L突变体编码。在另一实施方案中,所述微生物体经遗传修饰以表达外源磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(参见实施例XVI)。例如,所述磷酸烯醇丙酮酸羧激酶可通过流感嗜血杆菌磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因编码。可以理解的是同样可使用用于提高BDO生产的本文示例的菌株,进行合适的修饰以生产其他所需的产物,例如4-羟基丁酸或本文公开的其他所需的产物。

[0217] 应当理解,在本发明的方法中,任意一种或更多种外源核酸可以被引入微生物体,以产生本发明的非自然存在的微生物体。核酸可以被引入,以便对微生物体赋予例如4-HB、BDO、THF或GBL生物合成途径。可选地,编码核酸可以被引入,以产生具有生物合成能力的中间微生物体,从而催化一些所需的反应,以赋予4-HB、BDO、THF或GBL生物合成能力。例如,具有4-HB生物合成途径的非自然存在的微生物体可以包含至少两种外源核酸,所述外源核酸编码期望的酶,诸如4-羟基丁酸脱氢酶和α-酮戊二酸脱羧酶的组合;4-羟基丁酸脱氢酶和CoA-非依赖性琥珀酸半醛脱氢酶的组合;4羟基丁酸脱氢酶和CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶的组合;CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶和琥珀酰-CoA合成酶的组合;琥珀酰-CoA合成酶和谷氨酸脱羧酶的组合等。因此,应当理解,生物合成途径的两种或更多种酶的任意组合可以包括在本发明的非自然存在的微生物体中。类似地,应当理解,如所期望,生物合成途径的三种或更多种酶的任意组合可以包括在本发明的非自然存在的微生物体中,例如,4-羟基丁酸脱氢酶、α-酮戊二酸脱羧酶和CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶;CoA-非依赖性琥珀酸半醛脱氢酶和琥珀酰-CoA合成酶;4-羟基丁酸脱氢酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶和谷氨酸:琥珀酸半醛转氨酶,等,只要期望的生物合成途径的酶的组合导致相应的期望产物产生。

[0218] 类似地,例如,就任意一种或更多种被引入以赋予BDO生产的外源核酸而言,具有BDO生物合成途径的非自然存在的微生物体可以包含至少两种编码期望酶的外源核酸,所述酶诸如4-羟基丁酸脱氢酶和α-酮戊二酸脱羧酶的组合;4-羟基丁酸脱氢酶和4-羟基丁酰CoA:乙酰-CoA转移酶的组合;4-羟基丁酸脱氢酶和丁酸激酶的组合;4-羟基丁酸脱氢酶和磷酸转丁酰酶的组合;4-羟基丁酰CoA:乙酰-CoA转移酶和醛脱氢酶的组合;4-羟基丁酰CoA:乙酰-CoA转移酶和醇脱氢酶的组合;4-羟基丁酰CoA:乙酰-CoA转移酶和醛/醇脱氢酶;4-氨基丁酸激酶和4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)的组合等。因此,应当理解,生物合成途径的两种或更多种酶的任意组合可以包括在本发明的非自然存在的微生物体中。类似地,应当理解,生物合成途径的三种或更多种酶的任意组合可以包含在本发明的非自然存

在的微生物体中，例如，4-羟基丁酸脱氢酶、α-酮戊二酸脱羧酶和4-羟基丁酰CoA：乙酰-CoA转移酶；4-羟基丁酸脱氢酶、丁酸激酶和磷酸转丁酰酶；4-羟基丁酸脱氢酶、4-羟基丁酰CoA：乙酰-CoA转移酶和醛脱氢酶；4-羟基丁酰CoA：乙酰-CoA转移酶、醛脱氢酶和醇脱氢酶；丁酸激酶、磷酸转丁酰酶和醛/醇脱氢酶；4-氨基丁酰-CoA水解酶，4-氨基丁酰-CoA还原酶和4-氨基丁-1-醇氨基转移酶；3-羟基丁酰-CoA脱氢酶，3-羟基丁酰-CoA脱水酶和4-羟基丁酰-CoA脱水酶等。类似地，如所期望的，本文公开的生物合成途径的四种、五种或更多种酶的任意组合可以包含在本发明的非自然存在的微生物体中，只要期望的生物合成途径酶的组合引起相应的期望产物产生。

[0219] 先前描述的非自然存在的微生物体的任一种可以被培养以产生和/或分泌本发明的生物合成产物。例如，4-HB生产者可以被培养用以生物合成产生4-HB。4-HB可以如下所述被分离或处理，以产生GBL、THF和/或BDO。类似地，BDO生产者可以被培养用以生物合成产生BDO。BDO可以被分离或经进一步处理，用于化学合成如本文公开的BDO家族化合物。

[0220] 生长培养基例如可以是能够向非自然存在的微生物提供碳源的任意碳水化合物来源。这类来源包括例如糖，诸如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、果糖和淀粉。其它碳水化合物来源包括，例如，可再生的原料和生物质。在本发明的方法中可以用作原料的生物质的示例性种类包括纤维素生物质、半纤维素生物质和木质素原料或部分原料。这些生物质原料包含，例如，用作碳源的碳水化合物底物，诸如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、果糖和淀粉。在本文提供的教导和指导下，本领域技术人员将理解，除上述示例的那些之外的可再生原料和生物质也可以用于培养本发明的微生物体，以产生本发明的4-HB或BDO和其它化合物。

[0221] 因此，在本文提供的教导和指导下，本领域技术人员将理解，当在诸如碳水化合物的碳源上生长时，非自然存在的微生物体可以被产生，其分泌本发明的生物合成的化合物。这些化合物包括，例如，4-HB、BDO和在4-HB途径、BDO途径和/或组合的4-HB和BDO途径中的任意中间代谢物。所需要的全部即是改造一种或更多种图1中显示的酶活性，以实现期望化合物或中间体的生物合成，这包括例如引入4-HB和/或BDO生物合成途径的一些或全部。因此，本发明提供非自然存在的微生物体，其当在碳水化合物上生长时分泌4-HB，当在碳水化合物上生长时分泌BDO，和/或当在碳水化合物上生长时分泌图1中显示的任意中间代谢物。本发明的产生BDO的微生物体可以从例如琥珀酸、琥珀酰-CoA、α-酮戊二酸、琥珀酸半醛、4-HB、4-羟基丁酰磷酸、4-羟基丁酰-CoA(4-HB-CoA)和/或4-羟基丁醛开始合成。

[0222] 在一些实施方式中，培养条件包括厌氧或基本上厌氧的生长或维持条件。示例性的厌氧条件先前已经进行了描述并且其在本领域是熟知的。用于发酵过程的示例性厌氧条件在下面的实施例中进行描述。所有这些条件以及本领域熟知的其它厌氧条件都可以用于非自然存在的微生物体。在这些厌氧的条件下，4-HB和BDO生产者可以分别合成单体4-HB和BDO，其胞内浓度为5-10mM或更高以及先前示例的所有其它浓度。

[0223] 对于本发明的产生4-HB和BDO的非自然存在的微生物体而言，也可以产生许多下游化合物。对于本发明的产生4-HB的微生物体，单体4-HB和GBL以平衡状态存在于培养基中。4-HB向GBL的转化可以通过例如将微生物体在酸性pH培养基中培养而有效地完成。小于或等于7.5的pH，特别是处于或低于5.5的pH，自发地将4-HB转化成GBL。

[0224] 使用本领域中熟知的各种方法，可以将所产生的GBL与4-HB和培养物中的其它组

分分离。这些分离方法包括例如在实施例中示例的萃取方法以及包括连续液-液萃取、全蒸发、膜式过滤、膜分离、反渗透、电渗析、蒸馏、结晶、离心、萃取过滤、离子交换色谱、空间排阻色谱、吸附色谱和超滤的方法。所有上述方法在本领域中都是熟知的。分离的GBL可以通过例如蒸馏进行进一步纯化。

[0225] 可以由本发明的产生4-HB的非自然存在的微生物体产生的另一个下游化合物包括例如BDO。该化合物可以通过例如GBL的化学氢化来合成。化学氢化反应在本领域是熟知的。一个示例性的方法包括将4-HB和/或GBL或源自培养物的这两种组分的混合物化学还原以产生1,4-丁二醇,其使用多相或均相氢化催化剂和氢,或化学计量或催化使用的氢化物基还原剂进行。

[0226] 在本领域熟知的其它方法可同样应用于上述化学反应,并且其包括例如WO第82/03854号(Bradley等),其描述了在氧化铜和氧化锌催化剂上在蒸汽相中的γ-丁内酯的氢解。英国专利第1,230,276号描述了使用氧化铜-氧化铬催化剂使γ-丁内酯氢化。氢化在液相中进行。也示例了具有高的总反应器压力的间歇式反应。反应器中反应物和产物分压完全在各自的露点以上。英国专利第1,314,126号描述了在镍-钴-钍氧化物催化剂上在液相中的γ-丁内酯的氢化。间歇式反应被示例,其具有高的总压力并且组分分压完全在各组分的露点以上。英国专利第1,344,557号描述了在氧化铜-氧化铬催化剂上在液相中的γ-丁内酯的氢化。汽相或含有蒸汽的混合相显示在一些情况中适用。示例了使用高的总反应器压力的连续流动管状反应器。英国专利第1,512,751号描述了在氧化铜-氧化铬催化剂上在液相中γ-丁内酯氢化为1,4-丁二醇。具有高的总反应器压力的间歇式反应被示例,并且在可测定的情况下,反应物和产物分压完全在各自的露点以上。美国专利第4,301,077号描述了在Ru-Ni-Co-Zn催化剂上γ-丁内酯氢化成1,4-丁二醇。该反应可以在液相或气相中或在混合的液-气相中进行。示例了在高的总反应器压力和相对低的反应器产率下的连续流动的液相反应。美国专利第4,048,196号描述了通过在氧化铜-氧化锌催化剂上液相氢化γ-丁内酯而产生1,4-丁二醇。进一步示例了在高的总反应器压力和高的反应物和产物分压下操作的连续流动管状反应器。以及美国专利第4,652,685号描述了内酯氢化成乙二醇。

[0227] 可以由本发明的产4-HB微生物体产生的另外的下游化合物包括例如THF。该化合物可以通过例如GBL的化学氢化来合成。适于将GBL转化成THF的本领域熟知的一个示例性的方法包括,例如,将4-HB和/或GBL或源自培养物的这两个组分的混合物化学还原以产生四氢呋喃,其使用多相或均相氢化催化剂和氢,或化学计量或催化使用的氢化物基还原剂进行。在本领路熟知的其它方法同样适用于上述化学反应并且包括例如美国专利第6,686,310号,其描述了高表面积溶胶-凝胶路线制备的氢化催化剂。也描述了将马来酸还原成四氢呋喃(THF)和1,4-丁二醇(BDO)以及将γ-丁内酯还原成四氢呋喃和1,4-丁二醇的方法。

[0228] 培养条件可以包括例如液体培养方法以及发酵和其它大规模培养方法。如下面的实施例中进一步所述,具体地,本发明的生物合成产物的特别有用的收率可以在厌氧或基本上厌氧的培养条件下获得。

[0229] 可利用熟知的方法完成合适的纯化和/或测定以检测4-HB或BDO的生产。可对每种改造的菌株培养合适的重复诸如三次重复培养用以检测。例如,可在设计的生产宿主中监测产物和副产品的形成。最终产物和中间体以及其他有机化合物可通过利用本领域熟知的常规流程的方法分析,诸如HPLC(高效液相色谱法),GC-MS(气相色谱分析-质谱分析)和LC-

MS(液相色谱法-质谱分析)或其他合适的分析方法。还可以用培养上清液检测发酵液中产物的释放。副产品和残留的葡萄糖可通过利用例如用于葡萄糖和醇的折射指数检测器和用于有机酸类的UV检测器的HPLC,或其他本领域熟知的合适的测定法和检测方法定量(Lin等,Biotechnol.Bioeng.90:775-779(2005))。还可利用本领域熟知的方法测定来自外源DNA序列的单一酶或蛋白质活性。

[0230] 4-HB或BDO产物可利用本领域熟知的多种方法与培养物中的其他组分分离。所述分离方法包括,例如萃取方法以及包括连续液-液萃取、全蒸发、膜式过滤、膜分离、反渗透、电渗析、蒸馏、结晶、离心、萃取过滤、离子交换色谱、空间排阻色谱、吸附色谱和超滤的方法。上述所有方法为本领域所熟知。

[0231] 本发明进一步提供制造4-HB的方法。该方法包括使具有4-羟基丁酸(4-HB)生物合成途径的、非自然存在的微生物体在基本上厌氧的条件下发酵足够的时间以产生单体4-羟基丁酸(4-HB),该途径包含至少一种外源核酸,其编码4-羟基丁酸脱氢酶、CoA-非依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、琥珀酰-CoA合成酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、谷氨酸:琥珀酸半醛转氨酶、α-酮戊二酸脱羧酶或谷氨酸脱羧酶,该方法包括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。

[0232] 上述培养和化学氢化也可以扩大规模并连续生长以生产4-HB、GBL、BDO和/或THF。示例性的生长方法包括,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。所有这些方法在本领域都是熟知的。使用4-HB生产者允许同时进行4-HB生物合成和化学转化成GBL、BDO和/或THF,采用上述氢化方法同时使用连续培养方法诸如发酵进行。其它氢化方法在本领域也是熟知的并且可以同样用于本发明的方法。

[0233] 发酵方法对于生物合成生产商业数量的4-HB和/或BDO特别有用。一般而言,如同非连续培养方法,连续和/或接近连续生产4-HB或BDO包括将本发明的非自然存在的产生4-HB或BDO的生物在充足的养分和培养基中培养,以维持和/或接近维持指数期的生长。在这些条件下的连续培养可以包括例如1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天或更多。

[0234] 另外,连续培养可以包括1周、2周、3周、4周或5周或更多周以及直至数月。可选地,如果适合具体应用,本发明的生物可以培养数小时。应当理解,连续的和/或接近连续的培养条件还可以包括在这些示例性时期之间的所有时间间隔。可进一步理解的是培养本发明微生物体的时间为生产足够量期望目的的产物的足够时间。

[0235] 发酵方法在本领域中是熟知的。简言之,用于生物合成产生本发明的4-HB、BDO或其它4-HB衍生产物的发酵可以用于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。本领域中熟知的分批和连续发酵方法的实例在下面的实施例中进一步示例。

[0236] 除了使用本发明的4-HB或BDO生产者用以分别连续生产大量的单体4-HB和BDO的上述发酵方法之外,4-HB生产者例如也可以同时经历如先前所述将单体4-HB化学转化成例如GBL、BDO和/或THF的化学合成方法。BDO生产者例如类似地也可以同时经历如先前所述将BDO化学转化成例如THF、GBL、吡咯烷酮和/或其它BDO家族化合物的化学合成方法。另外,4-HB和BDO生产者的产物可以从发酵培养物中分离并且继续进行化学转化,如本文所公开。

[0237] 简言之,在发酵培养液中可以如Frost等,Biotechnology Progress 18:201-211(2002)所述完成GBL的氢化。在发酵期间氢化的另一个方法包括例如在例如美国专利第5,

478,952号中描述的方法。该方法在下面的实施例中进一步示例。

[0238] 因此,本发明另外提供生产γ-丁内酯(GBL)、四氢呋喃(THF)或1,4-丁二醇(BDO)的方法。所述方法包括在基本上厌氧的条件下将非自然存在的微生物体发酵足够的时间以产生1,4-丁二醇(BDO)、GBL或THF,所述生物体具有4-羟基丁酸(4-HB)和/或1,4-丁二醇(BDO)生物合成途径,该途径包含至少一种外源核酸,其编码4-羟基丁酸脱氢酶、CoA-非依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、琥珀酰-CoA合成酶、CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶、4-羟基丁酸:CoA转移酶、谷氨酸:琥珀酸半醛转氨酶、α-酮戊二酸脱羧酶、谷氨酸脱羧酶、4-羟基丁酸激酶、磷酸转丁酰酶、CoA-非依赖性1,4-丁二醇半醛脱氢酶、CoA-依赖性1,4-丁二醇半醛脱氢酶、CoA-非依赖性1,4-丁二醇醇脱氢酶或CoA-依赖性1,4-丁二醇醇脱氢酶,所述发酵包括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。

[0239] 除本文所述的本发明的4-HB、BDO和其它产物的生物合成之外,本发明的非自然存在的微生物体和方法也可以彼此以各种组合来使用以及与本领域熟知的其它微生物体和方法的各种组合来使用,以通过其它路线实现产物生物合成。例如,除使用4-HB生产者和化学步骤之外或除直接使用BDO生产者之外,一种产生BDO的可选方法是添加另一种微生物体,其能够将本文示例的4-HB或4-HB产物转化成BDO。

[0240] 一种这样的方法包括例如将本发明的产生4-HB的微生物体发酵以产生4-HB,如上面和下面所述。4-HB然后可以用作第二微生物体的底物,该第二微生物体将4-HB转化成例如BDO、GBL和/或THF。4-HB可以被直接加入至第二生物体的另一培养物,或4-HB生产者的原始培养物可以通过例如细胞分离而除去这些微生物体,然后将第二生物体接着添加至发酵培养液可以用于产生终产物,无需中间纯化步骤。一种能够利用4-HB作为底物生物化学转化成BDO的示例性第二生物体例如是丙酮丁醇梭菌(参见例如,Jewell等,Current Microbiology,13:215-19(1986))。

[0241] 在其它实施方式中,本发明的非自然存在的微生物体和方法可以以许多种亚途径(subpathway)组合,以实现例如所述的4-HB和/或BDO的生物合成。在这些实施方式中,本发明的期望产物的生物合成途径可以分离到不同的微生物体中,并且不同的微生物体可以共同培养以产生终产物。在这种生物合成方案中,一种微生物体的产物是第二微生物体的底物,直至合成终产物。例如,BDO的生物合成可以如先前所述通过构建微生物体完成,该微生物体包含将底物诸如内源性琥珀酸通过4-HB转化成终产物BDO的生物合成途径。可选地,BDO也可以在同一容器中使用两种生物通过共同培养或共同发酵由微生物体生物合成产生。第一微生物体是4-HB生产者,其具有从琥珀酸产生4-HB的基因,以及第二微生物体是BDO生产者,其具有将4-HB转化成BDO的基因。

[0242] 在本文提供的教导和指导下,本领域的技术人员应当理解,对于本发明的非自然存在的微生物体和方法以及其它微生物体、其它具有亚途径的非自然存在的微生物体的共同培养物以及本领域中熟知的其它化学和/或生物化学方法的组合,存在许多种组合和变换,以产生本发明的4-HB、BDO、GBL和THF产物。

[0243] 为了产生更好的生产者,可利用代谢模型优化生长条件。模型还可以用于设计另外优化所述途径的应用的基因敲除(参见,例如美国专利公开US2002/0012939,US 2003/0224363,US 2004/0029149,US 2004/0072723,US2003/0059792,US 2002/0168654和US 2004/0009466,以及美国专利号7,127,379)。模拟分析允许获得对将新陈代谢朝着更有效

生产BDO的方向改变的细胞培养的可靠的结果预测。

[0244] 一种用于鉴定和设计有助于产物生物合成的代谢变化的计算方法是OptKnock计算框架,Burgard等,Biotechnol Bioeng,84:647-57(2003)。OptKnock是一种提出基因缺失策略的代谢模型化和模拟程序,该基因缺失策略产生遗传稳定的微生物,所述微生物大量产生目标产物。具体而言,该框架检查微生物的完整代谢和/或生物化学网络,以提出迫使期望的生物化学变成细胞生长的专性副产物的基因操作。通过将生物化学生产与细胞生长经由策略性设置的基因缺失或其它功能性基因破坏偶联,在生物反应器中经历长时间之后,施加给改造菌株的生长选择压力,作为强迫性生长相关的生物化学生产的结果,引起性能的改进。最后,当构建基因缺失时,设计的菌株恢复到它们的野生型状态的可能性很微小,这是因为通过OptKnock选择的基因被完全从基因组除去。因此,该计算方法可以用于鉴定引起所需产物生物合成的可选途径,或与非自然存在的微生物体结合使用,用以进一步优化所需产物的生物合成。

[0245] 简言之,OptKnock是在本文用于指模拟细胞代谢的计算方法和系统的术语。OptKnock程序涉及模型框架和方法,所述方法将具体的约束引入通量平衡分析(FBA)模型中。这些约束包括,例如,定性动力学信息、定性调控信息和/或DNA微阵列实验数据。OptKnock也计算各种代谢问题的解,其通过例如紧缩(tightening)由通量平衡模型产生的通量边界(flux boundary)以及随后在存在基因加成或缺失的情况下探究代谢网络的性能极限。OptKnock计算框架允许构建模型公式,该公式能够有效查询代谢网络的性能极限并且提供解决所产生的混合整数线性规划问题的方法。本文称为OptKnock的代谢模型化和模拟方法描述在例如2002年1月10日提交的美国公开2002/0168654,2002年1月10日提交的国际专利号PCT/US02/00660和2007年8月10日提交的美国专利申请序列号11/891,602中。

[0246] 鉴定和设计促成产物的生物合成产生的代谢变化的另一计算方法是称为SimPheny®的代谢模型化和模拟系统。该计算方法和系统描述在例如2002年6月14日提交的美国公开2003/0233218和2003年6月13日提交的国际专利申请No.PCT/US03/18838中。SimPheny®是一种计算系统,其可以用于产生在计算机芯片上的网络模型和模拟经过生物系统的化学反应的质量、能量或电荷通量,以限定包含该系统中化学反应的任意和全部可能功能性的解空间,从而确定该生物系统的允许活性范围。该方法被称为基于约束的模拟,这是因为解空间由约束限定,所述约束诸如所包含反应的已知化学计量学以及与通过反应的最大通量相关的反应热力学和容量约束。由这些约束限定的空间可以被询问以确定生物系统或其生物化学组分的表型性能和行为。

[0247] 这些计算方法与生物事实一致,这是因为生物系统是灵活的并且可以以许多不同的方式达到相同的结果。通过进化机理设计生物系统,该进化机理受所有生命系统必须面对的基础约束制约。因此,基于约束的模拟策略包含这些一般事实。进一步,通过紧缩约束对网络模型连续施加更多限制的能力引起解空间大小减小,从而提高用于预测生理学性能或表型的精确性。

[0248] 在本文提供的教导和指导下,本领域技术人员能够应用代谢模型化和模拟的各种计算框架,以设计和实施宿主微生物体中所需化合物的生物合成。这些代谢模型化和模拟方法包括例如上述示例的SimPheny®和OptKnock计算系统。为了说明本发明,本文参考

OptKnock模型化和模拟计算框架描述了一些方法。本领域技术人员知道如何使用OptKnock将代谢变化的鉴定、设计和实施应用于本领域中熟知的任何此类其它的代谢模型化和模拟计算框架和方法。

[0249] 上述方法将提供一组破坏的代谢反应。在该组中的每个反应或代谢修饰的消除可以在生物体的生长期产生所需产物作为专性产物。因为反应是已知的，双层OptKnock问题的解也会提供编码一种或多种酶的相关基因或多种基因，所述酶催化该组反应中的每个反应。对该组反应和其相应的编码参与每个反应的酶的基因的鉴定通常是一个自动的过程，通过关联反应与具有酶和编码基因之间关系的反应数据库来完成。

[0250] 一旦鉴定，待被破坏以实现所需产物生产的反应组在目标细胞或者生物中通过至少一种编码该组中的每一代谢反应的基因的功能破坏来实施。一种实现反应组功能破坏的特别有用的方法是通过每个编码基因的缺失。然而，在一些情况下，通过其它遗传畸变--例如包括诸如启动子或者调节因子的顺式结合部位的调节区的突变、缺失，或者通过在多个位置的任一处截短编码序列可以有利于破坏反应。例如当期望快速评估琥珀酸连接时，或者当遗传回复突变(genetic reversion)较不可能出现时，这些后面的畸变--产生小于基因组全部缺失--可以是有用的。

[0251] 为了确定上述双层OptKnock问题的另外多产的解--其导致了更多破坏反应组或者代谢修饰，所述反应组或代谢修饰可引起包括所需产物的生长相关生物合成在内的生物合成，可以实施被称为整数切割(integer cuts)的最优化方法。通过迭代求解上面示例的OptKnock问题，在每一次迭代引入被称为整数切割的另外约束，进行该方法。整数切割约束有效地防止求解过程选择在任意先前迭代所鉴定(确定)的完全相同的反应组，该反应组专性连接产物生物合成与生长。例如，如果先前确定的生长相关的代谢修饰指定反应1、2和3用于破坏，那么随后的约束防止相同的反应同时在随后的解中被考虑。整数切割方法在本领域是熟知的，并且可以发现描述于例如Burgard等，Biotechnol Prog，17:791-797(2001)中。如同本文描述的所有方法参考其与OptKnock代谢模型化和模拟的计算框架结合使用，在迭代计算分析中减少冗余的整数切割方法也可以与本领域熟知的其它计算框架一起应用，所述计算框架包括例如SimPheny®。

[0252] 以上示例的方法使得能够构建进行生物合成生产的细胞和生物，包括目标生物化学产物与被改造以含有已鉴定遗传变化的细胞或生物生长的专性偶联生产。因此，本文描述的计算方法能够进行代谢修饰的鉴定和实施，该代谢修饰通过利用选自OptKnock或SimPheny®的计算机方法来鉴定。代谢修饰组可以包括例如一种或者多种生物合成途径酶的添加和/或一种或者多种代谢反应的功能破坏，其包括例如通过基因缺失的破坏。

[0253] 如上文所讨论，OptKnock方法的开发是基于突变型微生物网络当经历长期生长选择时可朝向其以计算机预测的最大生长表型进化这一前提。换句话说，所述方法调节生物体在选择性压力下自我优化的能力。OptKnock框架允许对基于网络化学计量迫使生物化学生产与细胞生长偶联的基因缺失组合进行穷举。对于最佳基因/反应剔除的鉴别需要对双层优化问题求解，所述问题选择活性反应组，使得所得网络的最佳生长答案过量产生目的生物化学物(Burgard等，Biotechnol.Bioeng.84:647-657(2003))。

[0254] 大肠杆菌代谢的硅中化学计量模型可用于鉴别先前示例的代谢途径的必需基因，

且描述于例如美国专利公开US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、US2004/0072723、US2003/0059792、US2002/0168654和US2004/0009466，以及美国专利号7,127,379中。如本文所公开，OptKnock数学框架可用于定位导致期望产物的生长偶联型生产的基因缺失。此外，双层OptKnock问题的解决方案仅提供一组缺失。为了列举所有有意义的解决方案、即导致生长偶联型生产形成的所有剔除集合，可实施被称作整数切割的优化技术。这要求对OptKnock问题迭代求解，其中在每次迭代时引入被称为整数切割的另外约束，如上文所讨论。

[0255] 以上示例且在以下实施例中进一步举例说明的方法使得能够构建进行生物合成生产的细胞和生物，包括目标生物化学产物与被改造以含有已鉴定遗传变化的细胞或生物生长的专性偶联生产。在这点上，已经鉴定了引起4-HB和1,4-丁二醇生物合成的代谢改变。同未修饰的微生物体相比较，用已鉴定的代谢变化构建的微生物菌株产生了提高水平的4-HB或BDO。这些菌株可以有利地用于商业生成4-HB、BDO、THF和GBL，例如，以连续发酵过程，而无需经历阴性选择压力。

[0256] 因此，本文描述的计算方法能够进行代谢修饰的鉴定和实施，该代谢修饰通过利用选自OptKnock或SimPheny®的使能够机方法来鉴定。代谢修饰组可以包括例如一种或者多种生物合成途径酶的添加和/或一种或者多种代谢反应的功能破坏，其包括例如通过基因缺失的破坏。

[0257] 应当理解，基本上不影响本发明各种实施方式的活性的修改也包括在本文提供的本发明的定义中。因此，以下实施例是用来举例说明而不是限制本发明。

[0258] 先前描述的非自然存在的微生物体的任一种可以被培养以产生和/或分泌本发明的生物合成产物。例如，BDO生产者可以被培养用以生物合成产生BDO。

[0259] 为了产生BDO，在具有碳源以及其它必需营养物培养基中培养重组菌株。非常需要在发酵罐中维持厌氧条件以降低全过程的成本。所述条件可例如通过首先用氮气喷射培养基，然后用隔膜和螺旋盖密封烧瓶来获得。对于在厌氧条件下未观察到生长的菌株，可通过在隔膜上打出用于有限通气的小孔来应用微氧条件。示例性的厌氧条件先前已有描述且为本领域所熟知。例如2007年8月10日提交的美国专利申请2009/0047719描述了示例性需氧和厌氧条件。发酵可如本文所公开以分批、补料分批或连续方式进行。

[0260] 必要时，可通过根据需要添加碱(例如NaOH或其它碱)或酸使培养基维持在所需pH下而使培养基的pH维持在期望pH，尤其中性pH，例如约7的pH。生长速率可通过使用分光光度计(600nm)测量光学密度来测定，且葡萄糖摄取速率可通过监测碳源随时间的消耗来测定。

[0261] 除了诸如以上举例说明的那些可再生原料外，本发明生产BDO的微生物体还可经修饰用于在作为其碳源的合成气上培养。该具体的实施方案中，生产BDO的生物体中表达一种或多种蛋白质或酶以提供用于合成气或其他气体碳源应用的代谢途径。

[0262] 合成气体，亦称合成气或炉煤气，为煤和含碳材料诸如生物质材料，包括农作物和残渣的主要气化产物。合成气是主要由H_2和CO组成的混合物，可经由气化任何有机进料，包括但不限于煤、煤油、天然气、生物质或有机废物来获得。气化通常在高的燃料和氧气比率下进行。

[0263] 虽然合成气主要是H_2和CO，但也可包含少量的CO_2和其它气体。因此合成气提供一

种节省成本的气态碳源，例如CO和另外如CO_2。

[0264] Wood-Ljungdahl途径催化CO和H_2转化为乙酰-CoA和其它产物，例如乙酸。能利用CO和合成气的生物体一般也具有经由Wood-Ljungdahl途径所涵盖的相同的一组基础酶和转化作用利用CO_2和CO_2/H_2混合物的能力。微生物依赖于H_2将CO_2转化为乙酸早在CO也可被相同的微生物利用且涉及相同的途径揭示之前已被公认。已显示许多产乙酸菌可在CO_2存在下生长且产生例如乙酸等化合物，只要存在氢以便供应必需的还原当量即可(参见例如Drake,Acetogenesis,pp.3-60,Chapman and Hall,New York,(1994))。这可由以下等式概括：

[0265] $2CO_2+4H_2+nADP+nPi\rightarrow CH_3COOH+2H_2O+nATP$

[0266] 因此，具有Wood-Ljungdahl途径的非天然存在的微生物也可利用CO_2与H_2的混合物来产生乙酰-CoA和其它期望产物。

[0267] Wood-Ljungdahl途径在本领域中为人所熟知，且由可分为2个分支的12个反应组成：(1)甲基分支和(2)羰基分支。甲基分支将合成气转化为甲基四氢叶酸(甲基-THF)，而羰基分支则将甲基-THF转化为乙酰-CoA。甲基分支中的反应是由以下酶或蛋白质依次催化：铁氧还蛋白氧化还原酶、甲酸脱氢酶、甲酰四氢叶酸合成酶、次甲基四氢叶酸环化脱水酶、亚甲基四氢叶酸脱氢酶和亚甲基四氢叶酸还原酶。羰基分支中的反应是由以下酶或蛋白质依次催化：甲基四氢叶酸：类咕啉蛋白甲基转移酶(例如AcsE)、类咕啉铁硫蛋白、镍蛋白装配蛋白(例如AcsF)、铁氧还蛋白、乙酰-CoA合成酶、一氧化碳脱氢酶和镍蛋白装配蛋白(例如CooC)。按照本文提供的关于引入足够数量的编码核酸以便产生乙酰-CoA途径方面的教导和指导，所属领域技术人员将了解，也可实施同样的工程设计导入宿主生物体中没有的编码Wood-Ljungdahl酶或蛋白质的核酸。因此，将一种或多种编码核酸引入本发明的微生物体中，以致经修饰的生物体含有一个分支或完全Wood-Ljungdahl途径，这会赋予合成气利用能力。

[0268] 因此，在本文提供的教导和指导下，本领域技术人员将理解，当在诸如碳水化合物的碳源上生长时，非自然存在的微生物体可以被产生，其分泌本发明的生物合成的化合物。所述化合物包括，例如BDO和BDO途径中的任何中间代谢物。所需要的全部即是改造一种或更多种所需要的酶或蛋白质活性，以实现期望化合物或中间体的生物合成，这包括例如引入BDO生物合成途径的一些或全部。因此，本发明提供非天然存在的微生物体，其当在碳水化合物或其他碳源上生长时产生和/或分泌BDO，当在碳水化合物或其他碳源上生长时产生和/或分泌BDO途径中呈现的任意中间代谢物。如本文公开的，本发明产生BDO的微生物体可起始BDO途径中来自中间体的合成。

[0269] 为了产生更好的生产者，可利用代谢模型优化生长条件。

[0270] 模型还可以用于设计另外优化所述途径的应用的基因敲除(参见，例如美国专利公开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No.7,127,379)。模拟分析允许获得对将新陈代谢朝着更有效生产BDO的方向改变的细胞培养的可靠的结果预测。

[0271] 一种用于鉴定和设计有助于产物生物合成的代谢变化的计算方法是OptKnock计算框架，Burgard等，Biotechnol Bioeng,84:647-57(2003)。OptKnock是一种提出基因缺失策略的代谢模型化和模拟程序，该基因缺失策略产生遗传稳定的微生物，所述微生物大量

产生目标产物。具体而言，该框架检查微生物的完整代谢和/或生物化学网络，以提出迫使期望的生物化学变成细胞生长的专性副产物的基因操作。通过将生物化学生产与细胞生长经由策略性设置的基因缺失或其它功能性基因破坏偶联，在生物反应器中经历长时间之后，施加给改造菌株的生长选择压力，作为强迫性生长相关的生物化学生产的结果，引起性能的改进。最后，当构建基因缺失时，设计的菌株恢复到它们的野生型状态的可能性很微小，这是因为通过OptKnock选择的基因被完全从基因组除去。因此，该计算方法可以用于鉴定引起所需产物生物合成的可选途径，或与非自然存在的微生物体结合使用，用以进一步优化所需产物的生物合成。

[0272] 简言之，OptKnock是在本文用于指模拟细胞代谢的计算方法和系统的术语。OptKnock程序涉及模型框架和方法，所述方法将具体的约束引入通量平衡分析(FBA)模型中。这些约束包括，例如，定性动力学信息、定性调控信息和/或DNA微阵列实验数据。OptKnock也计算各种代谢问题的解，其通过例如紧缩(tightening)由通量平衡模型产生的通量边界(flux boundary)以及随后在存在基因加成或缺失的情况下探究代谢网络的性能极限。OptKnock计算框架允许构建模型公式，该公式能够有效查询代谢网络的性能极限并且提供解决所产生的混合整数线性规划问题的方法。本文称为OptKnock的代谢模型化和模拟方法描述在例如2002年1月10日提交的美国公开2002/0168654，2002年1月10日提交的国际专利号PCT/US02/00660和2007年8月10日提交的美国专利申请序列号11/891,602中。

[0273] 鉴定和设计促成产物的生物合成产生的代谢变化的另一计算方法是称为SimPheny®的代谢模型化和模拟系统。该计算方法和系统描述在例如2002年6月14日提交的美国公开2003/0233218和2003年6月13日提交的国际专利申请号PCT/US03/18838中。SimPheny®是一种计算系统，其可以用于产生在计算机芯片上的网络模型和模拟经过生物系统的化学反应的质量、能量或电荷通量，以限定包含该系统中化学反应的任意和全部可能功能性的解空间，从而确定该生物系统的允许活性范围。该方法被称为基于约束的模拟，这是因为解空间由约束限定，所述约束诸如所包含反应的已知化学计量学以及与通过反应的最大通量相关的反应热力学和容量约束。由这些约束限定的空间可以被询问以确定生物系统或其生物化学组分的表型性能和行为。

[0274] 这些计算方法与生物事实一致，这是因为生物系统是灵活的并且可以以许多不同的方式达到相同的结果。通过进化机理设计生物生物系统，该进化机理受所有生命系统必须面对的基础约束制约。因此，基于约束的模拟策略包含这些一般事实。进一步，通过紧缩约束对网络模型连续施加更多限制的能力引起解空间大小减小，从而提高用于预测生理学性能或表型的精确性。

[0275] 在本文提供的教导和指导下，本领域技术人员能够应用代谢模型化和模拟的各种计算框架，以设计和实施宿主微生物体中所需化合物的生物合成。这些代谢模型化和模拟方法包括例如上述示例的SimPheny®和OptKnock计算系统。为了说明本发明，本文参考OptKnock模型化和模拟计算框架描述了一些方法。本领域技术人员知道如何使用OptKnock将代谢变化的鉴定、设计和实施应用于本领域中熟知的任何此类其它的代谢模型化和模拟计算框架和方法。

[0276] 上述方法将提供一组破坏的代谢反应。在该组中的每个反应或代谢修饰的消除可

以在生物体的生长期产生所需产物作为专性产物。因为反应是已知的，双层OptKnock问题的解也会提供编码一种或多种酶的相关基因或多种基因，所述酶催化该组反应中的每个反应。对该组反应和其相应编码参与每个反应的酶的基因鉴定通常是一个自动的过程，通过关联反应与具有酶和编码基因之间关系的反应数据库来完成。

[0277] 一旦鉴定，待被破坏以实现所需产物生产的反应组在目标细胞或者生物中通过至少一种编码该组中的每一代谢反应的基因的功能破坏来实施。一种实现反应组功能破坏的特别有用的方法是通过每个编码基因的缺失。然而，在一些情况下，通过其它遗传畸变--例如包括诸如启动子或者调节因子的顺式结合部位的调节区的突变、缺失，或者通过在多个位置的任一处截短编码序列可以有利于破坏反应。例如当期望快速评估琥珀酸连接时，或者当遗传回复突变(genetic reversion)较不可能出现时，这些后面的畸变--产生小于基因组全部缺失--可以是有用的。

[0278] 为了确定上述双层OptKnock问题的另外多产的解--其导致了更多破坏反应组或者代谢修饰，所述反应组或代谢修饰可引起包括所需产物的生长相关生物合成在内的生物合成，可以实施被称为整数切割(integer cuts)的最优化方法。通过迭代求解上面示例的OptKnock问题，在每一次迭代引入被称为整数切割的另外约束，进行该方法。整数切割约束有效地防止求解过程选择在任意先前迭代所鉴定(确定)的完全相同的反应组，该反应组专性连接产物生物合成与生长。例如，如果先前确定的生长相关的代谢修饰指定反应1、2和3用于破坏，那么随后的约束防止相同的反应同时在随后的解中被考虑。整数切割方法在本领域是熟知的，并且可以发现描述于例如Burgard等，Biotechnol Prog，17:791-797(2001)中。如同本文描述的所有方法参考其与OptKnock代谢模型化和模拟的计算框架结合使用，在迭代计算分析中减少冗余的整数切割方法也可以与本领域熟知的其它计算框架一起应用，所述计算框架包括例如SimPheny®。

[0279] 以上示例的方法使得能够构建进行生物合成生产的细胞和生物，包括目标生物化学产物与被改造以含有已鉴定遗传变化的细胞或生物生长的专性偶联生产。因此，本文描述的计算方法能够进行代谢修饰的鉴定和实施，该代谢修饰通过利用选自OptKnock或SimPheny®的计算机方法来鉴定。代谢修饰组可以包括例如一种或者多种生物合成途径酶的添加和/或一种或者多种代谢反应的功能破坏，其包括例如通过基因缺失的破坏。

[0280] 如上文所讨论，OptKnock方法的开发是基于突变型微生物网络当经历长期生长选择时可朝向其以计算机预测的最大生长表型进化这一前提。换句话说，所述方法调节生物体在选择性压力下自我优化的能力。OptKnock框架允许对基于网络化学计量迫使生物化学生产与细胞生长偶联的基因缺失组合进行穷举。对于最佳基因/反应剔除的鉴别需要对二层优化问题求解，所述问题选择活性反应组，使得所得网络的最佳生长答案过量产生目的生物化学物(Burgard等，Biotechnol.Bioeng.84:647-657(2003))。

[0281] 大肠杆菌代谢的硅中化学计量模型可用于鉴别先前示例的代谢途径的必需基因，且描述于例如美国专利公开US2002/0012939、US2003/0224363、US2004/0029149、US2004/0072723、US2003/0059792、US2002/0168654和US2004/0009466，以及美国专利号7,127,379中。如本文所公开，OptKnock数学框架可用于定位导致期望产物的生长偶联型生产的基因缺失。此外，双层OptKnock问题的解决方案仅提供一组缺失。为了列举所有有意义的解决方

案、即导致生长偶联型生产形成的所有剔除集合，可实施被称作整数分割的优化技术。这要求对OptKnock问题迭代求解，其中在每次迭代时引入被称为整数切割的另外约束，如上文所讨论。

[0282] 应当理解，基本上不影响本发明各种实施方式的活性的修改也包括在本文提供的本发明的定义中。因此，以下实施例是用来举例说明而不是限制本发明。

[0283] 实施例I

[0284] 4-羟基丁酸的生物合成

[0285] 该实施例描述了4-HB生产的示例性生物化学途径。

[0286] 在微生物中4-HB合成的先前报道集中在该化合物作为在生物可降解塑料聚羟链烷酸酯(PHA)(美国专利号6,117,658)生产中的中间体。超过聚3-羟基丁酸聚合物(PHB)的4-HB/3-HB共聚物的应用可以产生脆性较小的塑料(Saito and Doi，Intl.J.Biol.Macromol.16:99-104(1994))。本文描述的单体4-HB生产由于以下数个原因是根本不同的过程：(1)产物被分泌，这与PHA相反，PHA胞内产生并保留在细胞中；(2)对于产生羟基丁酸聚合物的生物而言，没有产生游离的4-HB，相反，辅酶A衍生物为聚羟链烷酸酯合成酶所用；(3)在聚合物的情况下，颗粒状产物的形成改变了热力学；和(4)胞外pH对于聚合物的产生不是问题，然而它会影响4-HB是以游离酸存在还是以结合碱的状态存在，并且同时影响了4-HB和GBL之间的平衡。

[0287] 4-HB可以在两个酶还原步骤中从琥珀酸产生，琥珀酸是TCA循环的中心代谢物，其中琥珀酸半醛作为中间体(图1)。这些酶中的第一种，酶琥珀酸半醛脱氢酶，在包括大肠杆菌在内的多种生物中是天然的，在大肠杆菌中已经发现了NADH-和NADPH-依赖性酶(Donnelly and Cooper,Eur.J.Biochem.113:555-561(1981);Donnelly and Cooper，J.Bacteriol.145:1425-1427(1981);Marek and Henson,J.Bacteriol.170:991-994(1988))。也有证据支持在酿酒酵母(S.cerevisiae)中的琥珀酸半醛脱氢酶活性(Ramos等，Eur.J.Biochem.149:401-404(1985))，并且推定基因通过序列同源性已经鉴定。然而，大部分报告指出该酶在琥珀酸合成的方向进行，如在图1中显示(Donnelly and Cooper,同上；Lutke-Eversloh and Steinbuchel,FEMS Microbiol.Lett.181:63-71(1999))，其参与4-HB和γ-氨基丁酸的降解途径。

[0288] 琥珀酸半醛同时由某些微生物体如大肠杆菌通过TCA循环中间体α-酮戊二酸经过两种酶--谷氨酸:琥珀酸半醛转氨酶和谷氨酸脱羧酶--的作用自然产生。专性厌氧菌克氏梭状芽胞杆菌所用的降解琥珀酸的可选途径将琥珀酸活化为琥珀酰-CoA，然后使用已知在该方向起作用的可选的琥珀酸半醛脱氢酶，将琥珀酰-CoA转化为琥珀酸半醛(Sohling and Gottschalk,Eur.J.Biochem.212:121-127(1993))。然而，该路径具有将琥珀酸转化为琥珀酰-CoA所需的ATP能量损失。

[0289] 该途径的第二种酶--4-羟基丁酸脱氢酶--不是大肠杆菌或者酵母天然的，但是可见于各种不同的细菌中，如克氏梭状芽胞杆菌和富养罗尔斯通氏菌(Ralstonia eutropha)(Lutke-Eversloh和Steinbuchel,同上;Sohling和Gottschalk,J.Bacteriol.178:871-880(1996);Valentin等,Eur.J.Biochem.227:43-60(1995);Wolff和Kenealy,protein Expr.Purif.6:206-212(1995))。已知这些酶是NADH-依赖性的，虽然NADPH-依赖性形式也存在。从α-酮戊二酸到4-HB的另外途径在大肠杆菌中予以证实，其引起聚(4-羟基丁酸)聚

积(Song等,Wei Sheng Wu Xue.Bao.45:382-386(2005))。重组菌株需要三种异源基因--PHA合成酶(富养罗尔斯通氏菌(R.eutropha))、4-羟基丁酸脱氢酶(富养罗尔斯通氏菌(R.eutropha))和4-羟基丁酸:CoA转移酶(克氏梭状芽胞杆菌(C.kluyveri))--连同两种天然大肠杆菌基因--谷氨酸:琥珀酸半醛转氨酶和谷氨酸脱羧酶--的过量表达。在图1中的步骤4和5可以可选地通过α-酮戊二酸脱羧酶如在薄肌眼虫(Euglena gracilis)中鉴定的α-酮戊二酸脱羧酶实施(Shigeoka等,Biochem.J.282(Pt2):319-323(1992);Shigeoka and Nakano,Arch.Biochem.Biophys.288:22-28(1991);Shigeoka and Nakano,Biochem J.292(Pt 2):463-467(1993))。然而,该酶以前未被用来影响在任何生物体中的4-HB或者相关聚合物的生产。

[0290] 4-羟基丁酸的微生物生产能力在两种微生物大肠杆菌和酿酒酵母中进行了研究,其使用每种生物的计算机代谢模型。到4-HB的潜在途径经由琥珀酸、琥珀酰-CoA或者α-酮戊二酸作为中间体进行,如在图1中显示。

[0291] 从琥珀酸开始的4-HB生产途径中的第一个步骤包括了琥珀酸经由NADH-或者NADPH-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶转化为琥珀酸半醛。在大肠杆菌中,gabD是NADP-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶并且是参与4-氨基丁酸摄入和降解的基因簇的一部分(Niegemann等,Arch.Microbiol.160:454-460(1993);Schneider等,J.Bacteriol.184:6976-6986(2002))。

[0292] sad被认为编码NAD-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶活性的酶(上述Marek and Henson)。酿酒酵母只含有NADPH-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶,推定标记为UGA2,其定位到胞质溶胶(Huh等,Nature 425:686-691(2003))。假定在大肠杆菌和酿酒酵母中琥珀酸途径到4-HB的最大产量计算仅需要假定非天然4-HB脱氢酶已经被加入到它们代谢网络中。

[0293] 从琥珀酰-CoA到4-羟基丁酸的途径在美国专利No.6,117,658中进行了描述,其作为制造包含4-羟基丁酸单体单元的聚羟链烷酸酯过程的一部分。克氏梭状芽胞杆菌(Clostridium kluyveri)是一种已知具有CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶活性的样本生物(前述Sohling and Gottschalk;前述Sohling and Gottschalk)。在该研究中,假定来自于克氏梭状芽胞杆菌或者另外一种生物的酶是在大肠杆菌或酿酒酵母中与非自然的或者异源的4-HB脱氢酶一起表达,以完成从琥珀酰-CoA到4-HB的途径。从α-酮戊二酸到4-HB的途径在大肠杆菌中进行了说明,其产生达到干细胞重30%的聚(4-羟基丁酸)积聚(前述Song等)。因为大肠杆菌和酿酒酵母自然或者内源地具有谷氨酸:琥珀酸半醛转氨酶和谷氨酸脱羧酶两者(Coleman等,J.Biol.Chem.276:244-250(2001)),因此仅通过假定非自然4-HB脱氢酶是存在的,则可以在两种生物中完成从AKG到4-HB的途径。

[0294] 实施例II

[0295] 来自琥珀酸和α-酮戊二酸的1,4-丁二醇的生物合成

[0296] 该实施例说明了来自于微生物体的4-HB和BDO的构建和生物合成生产。在此公开了4-HB和BDO途径。

[0297] 有数种在上述路径中可以使用的可选的酶。用于将琥珀酸转化为琥珀酰-CoA(图1中的步骤1)的天然或者内源酶可以由CoA转移酶取代,如由克氏梭状芽胞杆菌cat1基因编码的CoA转移酶(Sohling,B.和G.Gottschalk,Eur.J Biochem.212:121-127(1993)),其以类似于步骤9的方式起作用。然而,由该酶生产乙酸可能不是最佳的,因为它可能被分泌而

不是被转化回乙酰-CoA。在这方面，它也可有益于消除在步骤9中的乙酸形成。作为这种CoA转移酶的一种可选方案，可以利用在其中4-HB首先通过ATP磷酸化然后转化为CoA衍生物的机制，其类似于在大肠杆菌中转化乙酸为乙酰-CoA的乙酸激酶/磷酸转乙酰酶途径。该路径的净消耗是一个ATP，其与从乙酸再生乙酰-CoA所需的相同。磷酸转丁酰酶(ptb)和丁酸激酶(bk)已知在非羟基化分子上实施这些步骤，用于在丙酮丁醇梭菌中产生丁酸(Cary等，Appl Environ Microbiol 56:1576-1583(1990);Valentine,R.C.and R.S.Wolfe,J Biol Chem.235:1948-1952(I960))。这些酶是可逆的，这允许合成在4-HB的方向进行。

[0298] 除了通过琥珀酸之外或者代替经由琥珀酸，BDO也可以经由α-酮戊二酸产生。如先前描述并在下面进一步示例的，完成产物生物合成的一种途径是借助使用内源酶经由α-酮戊二酸产生的琥珀酸半醛(图1，步骤4-5)。可选方案是使用能够以一步实现该转化的α-酮戊二酸脱羧酶(图2，步骤8;Tian等，Proc Natl Acad Sci U S.A102:10670-10675(2005))。

[0299] 对于不同的产生BDO的微生物体菌株的构建，装配一系列适用的基因进行证实。简单地说，对于图1中显示的完整BDO-生产途径的每个步骤，使用可利用的文献资料、NCBI遗传资料库和同源性搜索，鉴定在4-HB和/或BDO生物合成途径中的一种或者多种基因。在该研究中克隆和评估的基因与适当指代(reference)和多肽序列的URL引用一起呈现在以下的表6中。如以下进一步讨论的，一些基因被合成以实现密码子优化，而其它则从天然或者野生型生物的基因组DNA通过PCR进行克隆。对于一些基因两种方法都可以使用，在该情况下，当在试验中使用时，天然基因通过基因识别号的后缀"n"标明。需要注意的是，仅DNA序列不同;而蛋白质是相同的。

[0300] 表6.在产生BDO的微生物体宿主中表达的基因

[0301]

基因ID编号	反应编号(图1)	基因名称	来源生物	酶名称	蛋白质序列链接	参考文献
0001	9	Cat2	克氏梭状芽胞杆菌DSM555	4-羟基丁酸辅酶A转移酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=1228100	1
0002	12/13	adhE	丙酮丁醇梭菌ATCC824	醛/醇脱氢酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=15004739	2
0003	12/13	adhE2	丙酮丁醇梭菌ATCC824	醛/醇脱氢酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_149325.1	2
0004	1	Cat1	克氏梭状芽胞杆菌DSM555	琥珀酸辅酶A转移酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=1228100	1
0008	6	sucD	克氏梭状芽胞杆菌DSM555	琥珀酸半醛脱氢酶(CoA-依赖性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=1228100	1
0009	7	4-HBd	富养罗尔	4-羟基丁酸脱	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=Y	2

[0302]

			斯通氏菌 H16	氢酶(NAD-依赖性)	P_726053.1	
0010	7	4-HBd	克氏梭状芽胞杆菌 DSM555	4-羟基丁酸脱氢酶(NAD-依赖性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=1228100	1
0011	12/13	adhE	大肠杆菌	醛/醇脱氢酶	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/genes.List.DetailAction.do?fromListFlag=true&featureType=1&orfId=1219	
0012	12/13	yqhD	大肠杆菌	醛/醇脱氢酶	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/genes.List.DetailAction.do	
0013	13	bdhB	丙酮丁醇梭菌 ATCC824	丁醇脱氢酶 II	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_349891.1	2
0020	11	ptb	丙酮丁醇梭菌 ATCC824	磷酸转丁酰酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=15896327	2
0021	10	buk1	丙酮丁醇梭菌 ATCC824	丁酸激酶 I	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=20137334	2
0022	10	buk2	丙酮丁醇梭菌 ATCC824	丁酸激酶 II	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=20137415	2
0023	13	adhEm	分离自厌氧污水消化罐微生物群的代谢物文库	醇脱氢酶		(37)d}
0024	13	adhE	热解纤维梭菌	醇脱氢酶	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cth:Cthe_0423	
0025	13	ald	拜氏梭菌	辅酶 A-酰化醛脱氢酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=49036681	(31)d}
0026	13	bdhA	丙酮丁醇梭菌 ATCC824	丁醇脱氢酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_349892.1	2
0027	12	bld	糖乙酸多丁醇梭菌	丁醛脱氢酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=31075383	4
0028	13	bdh	糖乙酸多丁醇梭菌	丁醇脱氢酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&id=124221917	4

[0303]

0029	12/13	adhE	破伤风梭菌	醛/醇脱氢酶	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?ctc:CTC01366	
0030	12/13	adhE	产气荚膜梭菌	醛/醇脱氢酶	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cpe:CPE2531	
0031	12/13	adhE	艰难梭菌	醛/醇脱氢酶	www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cdf:CD2966	
0032	8	sucA	牛分枝杆菌 BCG，巴斯德	α-酮戊二酸脱羧酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=YP_977400.1	5
0033	9	cat2	氨基丁酸梭菌	4-羟基丁酸辅酶 A 转移酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=6249316	
0034	9	cat2	牙龈卟啉单胞菌 W83	4-羟基丁酸辅酶 A 转移酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=protein&val=34541558	
0035	6	sucD	牙龈卟啉单胞菌 W83	琥珀酸半醛脱氢酶(CoA-依赖性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_904963.1	
0036	7	4-HBd	牙龈卟啉单胞菌 W83	NAD-依赖性 4-羟基丁酸脱氢酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=NP_904964.1	
0037	7	gbd	未培养的细菌	4-羟基丁酸脱氢酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?db=nuccore&id=5916168	6
0038	1	sucCD	大肠杆菌	琥珀酰-CoA 合成酶	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/genes.List.DetailAction.do	

[0304] [1]Sohling和Gottschalk,Eur.J.Biochem.212:121-127(1993);Sohling和Gottschalk,J.Bacteriol.178:871-880(1996)

[0305] [2]Nolling等,J.,J.Bacteriol.183:4823-4838(2001)5

[0306] [3]Pohlmann等,Nat.Biotechnol.24:1257-1262(2006)

[0307] [4]Kosaka等,Biosci.Biotechnol.Biochem.71:58-68(2007)

[0308] [5]Brosch等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.104:5596-5601(2007)

[0309] [6]Henne等,Appl.Environ.Microbiol.65:3901-3907(1999)

[0310] BDO途径表达载体的构建。从Dr.Rolf Lutz of Expressys(www.expressys.de/)获得载体骨架和一些菌株。载体和菌株基于由Dr.Rolf Lutz和Prof.Hermann Bujard(Lutz,R.and H.Bujard,Nucleic AcidsRes 25:1203-1210(1997))开发的pZ表达系统。获得的载体是pZE13luc、pZA33luc、pZS*13luc和pZE22luc,并含有荧光素酶基因作为填充片段。为了用适当的限制酶位点侧面的lacZ-α片段代替荧光素酶填充片段,首先从每个载体中通过用EcoRI和XbaI消化除去荧光素酶填充片段。用以下引物,从pUC19PCR扩增lacZ-α片段:

[0311] lacZα-RI

[0312] 5’GACGAATTCGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGTCCAATTCACTGGCCGTCGTTTTAC3’

[0313] lacZα3'BB

[0314] 5'-GACCCTAGGAAGCTTTCTAGAGTCGACCTATGCGGCATCAGAGCAGA-3'。

[0315] 这产生了带有EcoRI位点、NheI位点、核糖体结合位点、SalI位点和起始密码子的5'端的片段。在该片段的3'端上含有终止密码子、XbaI、HindIII和AvrII位点。PCR产物用EcoRI和AvrII消化并连接到用EcoRI和XbaI消化的基载体(base vectors)中(XbaI和AvrII有相容端和产生了非位点)。因为NheI和XbaI限制酶位点产生了可以连接在一起的相容端(但是产生了任一种酶都不消化的NheI/XbaI非位点),因此克隆到载体中的基因可能被"生物砖块围砌"("Biobricked")在一起(http://openwetware.Org/wiki/S ynthetic_Biology:BioBricks)。简单地说,该方法使用相同的2个限制位点使得能够将无限数量的基因连接到载体中(只要所述位点没有出现在所述基因内部),因为在每次加成之后,在基因之间的位点被破坏。

[0316] 所有载体具有pZ设计,其后面有字母和数字指示复制起点、抗生素抗性标记和启动子/调节单元。复制起点是第二个字母,并且用E表示ColE1、用A表示p15A和用S表示pSC101-基础的起点来指出。第一个数字代表了抗生素抗性标记(1代表氨苄青霉素、2代表卡那霉素、3代表氯霉素、4代表放线壮观素和5代表四环素)。最后的数字定义了调节感兴趣基因的启动子(1代表PLtetO-1、2代表PLlacO-1、3代表PA1lacO-1和4代表Plac/ara-1)。MCS和感兴趣的基因紧随其后。对于这里所讨论的工作,我们使用了两种基载体,pZA33和pZE13,其被修饰用于以上所讨论的生物砖块插入。一旦感兴趣的基因(或多个)已经克隆进入它们之中,所生成的质粒利用在表6中给出的四数字基因编码表示;例如pZA33-XXXX-YYYY-...。

[0317] 宿主菌株构建。在本文描述的所有研究中的亲株是大肠杆菌K-12菌株MG1655。在服务合同的情况下,通过第三方使用redET方法,在adhE、gabD和aldA中构建了无标记(Markerless)缺失菌株(Datsenko,K.A.and B.L.Wanner,Proc Natl Acad Sci U S.A97:6640-6645(2000))。经过噬菌体P1介导的转导构建随后的菌株(Miller,J.Experiments in Molecular Genetics,Cold Spring Harbor Laboratories,New York(1973))。从Expressys获得菌株C600Z1(laci^{q}、PN25-tetR、Sp^{R}、lacY1、leuB6、mcrB+、supE44、thi-1、thr-1、tonA21),并且其被用作P1转导的lacI^{q}等位基因来源。噬菌体P1vir在C600Z1大肠杆菌菌株上生长,该菌株具有连接到lacI^{q}的放线壮观素抗性基因。在C600Z1上生长的P1溶解产物用于利用放线壮观素抗性选择性侵染MG1655。随后通过测定转导子抑制与$P_{A1lacO-1}$启动子连接的基因表达的能力,筛查放线壮观素抗性菌落的连锁lacI^{q}。生成的菌株命名为MG1655lacI^{q}。使用类似的过程将lacI^{Q}引入缺失菌株。

[0318] 从琥珀酸生产4-HB。对于从琥珀酸构建4-HB生产者,从琥珀酸到4-HB和4-HB-CoA的基因编码步骤(在图2中的1、6、7和9)如下描述被装配到pZA3及pZE13载体。评估各种基因组合以及具有不完整途径作为对照的构建物(表7和8)。随后质粒被转化到含有lacI^{Q}的宿主菌株中,其通过异丙基β-D-1-硫代半乳糖苷(IPTG)的加成允许诱导型表达。测试了野生型和在编码天然琥珀酸半醛脱氢酶的基因中具有缺失的宿主(在图1中的步骤2)。

[0319] 使用菌株MG1655lacI^{Q}作为含有途径基因的质粒构建物的宿主,首先在体外测定中测试异源酶的活性。细胞在含有每种构建物的适当抗生素的LB培养基(Difco)中进行需氧生长,并且当光密度(OD600)达到大约0.5时,通过加入1mM的IPTG来诱导。在6个小时后收

获细胞,并且如下讨论的进行酶测定。

[0320] 体外酶测定。为了获得用于活性测定的粗提物,通过以4,500rpm离心(Beckman-Coulter,Allegera X-15R)10分钟收获细胞。沉淀重悬浮在含有Benzonase和溶菌酶的0.3mL BugBuster(Novagen)试剂中,并在室温轻摇下进行15分钟的溶胞。通过在4℃以14,000rpm离心(Eppendorf centrifuge 5402)30分钟,得到没有细胞的溶胞产物。使用Bradford等,Anal.Biochem.72:248-254(1976)的方法测定在样品中细胞蛋白质,并如以下描述进行具体酶测定。以单位/毫克蛋白质来报告活性,其中活性单位被定义为在室温在1分钟内转化1μmol底物所需的酶的数量。一般而言,报告的值是至少3次重复测定的平均值。

[0321] 依照先前描述的过程,Sohling和Gottschalk,J.Bacteriol.178:871-880(1996),通过监测自琥珀酰-CoA和乙酸形成乙酰-CoA,测定琥珀酰-CoA转移酶(Cat1)的活性。通过在ATP存在的情况下,依照自琥珀酸和CoA的琥珀酰-CoA的形成,测定琥珀酰-CoA合成酶(SucCD)的活性。试验依照由Cha and Parks,J.Biol.Chem.239:1961-1967(1964)描述的方法。通过在琥珀酸半醛和CoA存在的情况下,在340nm,依照NAD向NADH的转化来测定CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶(SucD)的活性(Sohling and Gottschalk,Eur.J.Biochem.212:121-127(1993))。通过在琥珀酸半醛存在的情况下,在340nm,监测NADH氧化为NAD,测定4-HB脱氢酶(4-HBd)的酶活性。试验依照公开的方法:Gerhardt等,Arch.Microbiol.174:189-199(2000)。使用来自于Scherf and Buckel,Appl.Environ.Microbiol.57:2699-2702(1991)的修改方法来测定4-HB辅酶A转移酶(Cat2)的活性。使用HPLC测定从乙酰-CoA和4-HB或者丁酸开始的4-HB-CoA形成或者丁酰-CoA形成。

[0322] 使用改编自数个文献来源的方法(Durre等,FEMS Microbiol.Rev.17:251-262(1995);Palosaari和Rogers,J.Bacteriol.170:2971-2976(1988);和Welch等,Arch.Biochem.Biophys.273:309-318(1989)),测定在还原方向上的醇(ADH)和醛(ALD)脱氢酶。NADH氧化,紧跟着在室温下每4秒读取340nM处的吸光度,总计240秒。在100mM MOPS(用KOH调节为pH 7.5)、0.4mM NADH和1到50μl的细胞提取物中进行还原测定。反应通过加入以下反应物开始:对于ADH为100μl的100mM的乙醛或者丁醛,或者对于ALD为100μl的1mM乙酰-CoA或者丁酰辅酶A。使分光光度计快速成为空白,随后开始动态读数。在340nM处每分钟吸光度减少所形成的斜率以及NAD(P)H在340nM(6000)的摩尔消光系数和提取物的蛋白质浓度,可以用于测定比活性。

[0323] PTB酶活性如在Cary等,J.Bacteriol.170:4613-4618(1988)中所述在丁酰辅酶A到丁酰-磷酸的方向测量。它提供了无机磷酸盐用于转化,并跟踪游离辅酶A及反应物5,5'-二硫代双-(2-硝基苯甲酸)或DTNB的增加。DTNB迅速与巯基基团如游离辅酶A反应以释放黄颜色的2-硝基-5-巯基苯甲酸(TNB),其在412nm处有吸收,具有14,140M cm^{-1}的摩尔消光系数。测定缓冲液含有150mM pH 7.4的磷酸钾、0.1mM DTNB和0.2mM丁酰辅酶A,而反应通过加入2到50μL的细胞提取物来开始。在丁酸到丁酰-磷酸形成的方向在消耗ATP的情况下测量BK的酶活性。该过程类似于Rose等,J.Biol.Chem.211:737-756(1954)先前描述的乙酸激酶测定。然而,我们已经发现了另一种乙酸激酶酶测定方案,该方案由Sigma提供,其更有用且更灵敏。该测定将通过乙酸激酶进行的ATP向ADP的转化与通过丙酮酸激酶进行的ADP和磷酸烯醇丙酮酸(PEP)向ATP和丙酮酸的转化连接起来,接着是通过乳酸脱氢酶进行的丙酮酸和NADH向乳酸和NAD+的转化。用丁酸取代乙酸是唯一的主要修改,以便能够实施测定而跟

踪BK酶活性。测定混合物含有80mM pH 7.6的三乙醇胺缓冲液、200mM丁酸钠、10mM $MgCl_2$、0.1mM NADH、6.6mM ATP、1.8mM磷酸烯醇丙酮酸。丙酮酸激酶、乳酸脱氢酶和肌激酶依照制造商的说明书加入。反应通过加入2到50μL细胞提取物开始，基于表示NADH氧化的340nm处的吸光度减少来监测反应。

[0324] 通过HPLC分析辅酶A衍生物。开发了基于HPLC的测定，以监测涉及辅酶A(CoA)转移的酶反应。通过定量测定存在于体外反应混合物中的辅酶A、乙酰辅酶A(AcCoA)、丁酰辅酶A(BuCoA)和4-羟基丁酸辅酶A(4-HBCoA)，所开发的方法能够进行酶活性表征。获得低至低μM的灵敏度，以及所有感兴趣辅酶A衍生物的良好分辨率。

[0325] 如下进行化学品和样品制备。简单地说，CoA、AcCoA、BuCoA和所有其它化学品从Sigma-Aldrich获得。溶剂甲醇和乙腈属于HPLC级。标准校准曲线在0.01-1mg/mL浓度范围内显示了良好的线性。酶反应混合物含有100mM Tris盐酸缓冲液(pH 7)，等分试样在不同的时间点获取，用乙酸(终浓度为0.04％)猝灭并通过HPLC直接分析。

[0326] 使用Agilent 1100HPLC系统进行HPLC分析，Agilent 1100HPLC系统装备有二元泵、脱气装置、恒温自动取样器和柱室，并且二极管阵列检测器(DAD)用于分析。使用反相柱Kromasil 1005um C18，4.6×150mm(Peeke Scientific)。25mM磷酸钾(pH 7)和甲醇或者乙腈用作水相和有机溶剂，流速1mL/min。开发了两种方法：具有较快梯度的短时方法用于分析充分分离的CoA、AcCoA和BuCoA，而较长(长时)的方法用于区分洗脱接近AcCoA和4-HBCoA。短时方法应用乙腈梯度(0分钟-5％，6分钟-30％，6.5分钟-5％，10分钟-5％)，对于CoA、AcCoA和BuCoA各自产生了2.7、4.1和5.5分钟的保留时间。在较长方法中，甲醇以以下的线性梯度使用：0分钟-5％、20分钟-35％、20.5分钟-5％、25分钟-5％。CoA、AcCoA、4-HBCoA和BuCoA的保留时间分别是5.8、8.4、9.2和16.0分钟。注射体积是5μL，柱温度是30℃，在260nm处监测UV吸收。

[0327] 结果说明了四种途径步骤中的每一种的活性(表7)，尽管活性明显取决于在载体中的基因来源、基因在载体中的位置和与被表达的基因在一起的其它基因的环境。例如，基因0035编码比由基因0008编码的琥珀酸半醛脱氢酶更有活性的琥珀酸半醛脱氢酶，而0036和0010n是比0009更有活性的4-HB脱氢酶基因。当在相同的操纵子上有另外一个在它前面的基因时，也显示出更好的4-HB脱氢酶活性。

[0328] 表7.在来自MG1655 $lacI^Q$的细胞提取物中的体外酶活性，MG1655$lacI^Q$含有表达4-HB-CoA途径中的基因的质粒。以单位/毫克蛋白质报告活性，其中活性单位定义为在室温下1分钟内转化1μmol底物所需的酶的数量。

[0329]

样品#	pZE13(a)	pZA33(b)	OD600	细胞蛋白(c)	Cat1	SucD	4HBd	Cat2
1	cat1(0004)		2.71	6.43	1.232	0.00		
2	cat1(0004)-sucD(0035)		2.03	5.00	0.761	2.57		
3	cat1(0004)-sucD(0008)		1.04	3.01	0.783	0.01		
4	sucD(0035)		2.31	6.94		2.32		
5	sucD(0008)		1.10	4.16		0.05		
6		4hbd(0009)	2.81	7.94	0.003		0.25	
7		4hbd(0036)	2.63	7.84			3.31	
8		4hbd(0010n)	2.00	5.08			2.57	
9	cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd(0009)	2.07	5.04	0.600	1.85	0.01	
10	cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd(0036)	2.08	5.40	0.694	1.73	0.41	

11	cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd(0010n)	2.44	4.73	0.679	2.28	0.37	
12	cat1(0004)-sucD(0008)	4hbd(0009)	1.08	3.99	0.572	-0.01	0.02	
13	cat1(0004)-sucD(0008)	4hbd(0036)	0.77	2.60	0.898	-0.01	0.04	
14	cat1(0004)-sucD(0008)	4hbd(0010n)	0.63	2.47	0.776	0.00	0.00	
15		cat2(0034)	2.56	7.86				1.283
16		cat2(0034)-4hbd(0036)	3.13	8.04			24.86	0.993
17		cat2(0034)-4hbd(0010n)	2.38	7.03			7.45	0.675
18		4hbd(0036)-cat2(0034)	2.69	8.26			2.15	7.490
19		4hbd(0010n)-cat2(0034)	2.44	6.59			0.59	4.101

[0330] 基因表达自pZE13上的Plac，pZE13是具有colE1起点和氨苄青霉素抗性的高拷贝质粒。基因识别号与表6中相同。基因表达自pZA33上的Plac，pZA33是具有pACYC起点和氯霉素抗性的中等拷贝质粒。

[0331] (c)细胞蛋白以毫克蛋白质/毫升提取物给出。

[0332] 随后评估了含有4-HB途径中基因的重组菌株在体内从中心代谢中间体生产4-HB的能力。细胞在LB培养基中进行厌氧生长到OD600约为0.4，随后用1mM IPTG诱导。1小时后，加入琥珀酸钠至10mM，在另外24和48小时后取样进行分析。如下所述，在培养液中的4-HB通过GC-MS来分析。结果表明，与在对照菌株中基本为零相比较，重组菌株在24小时后可以产生超过2mM的4-HB(表8)。

[0333] 表8.在大肠杆菌菌株中从琥珀酸生产4-HB，大肠杆菌菌株包埋了表达各种4-HB途径基因组合的质粒。

[0334]

				24 小时			48 小时		
样品#	宿主菌株	pZE13	pZA33	OD600	4HB, μM	4HB norm. (a)	OD600	4HB, μM	4HB norm. (a)
1	MG1655 laclq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	0.47	487	1036	1.04	1780	1711
2	MG1655 laclq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0027)	0.41	111	270	0.99	214	217
3	MG1655 laclq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	0.47	863	1835	0.48	2152	4484
4	MG1655 laclq	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	0.46	956	2078	0.49	2221	4533
5	MG1655 laclq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	0.38	493	1296	0.37	1338	3616
6	MG1655 laclq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0027)	0.32	26	81	0.27	87	323
7	MG1655 laclq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0.24	506	2108	0.31	1448	4672
8	MG1655 laclq	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0.24	78	324	0.56	233	416
9	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0009)	0.53	656	1237	1.03	1643	1595
10	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0027)	0.44	92	209	0.98	214	218
11	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0036)	0.51	1072	2102	0.97	2358	2431
12	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)-sucD (0035)	4hbd (0010n)	0.51	981	1924	0.97	2121	2186
13	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0009)	0.35	407	1162	0.77	1178	1530
14	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0027)	0.51	19	36	1.07	50	47
15	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0036)	0.35	584	1669	0.78	1350	1731
16	MG1655 laclq gabD	cat1 (0004)-sucD (0008)	4hbd (0010n)	0.32	74	232	0.82	232	283
17	MG1655 laclq	仅载体	仅载体	0.8	1	2	1.44	3	2
18	MG1655 laclq gabD	仅载体	仅载体	0.89	1	2	1.41	7	5

[0335] (a)归一化的4-HB浓度，μM/OD600单位

[0336] 使用辅酶A转移酶(cat1)从琥珀酸生产琥珀酰辅酶A的可选方案是使用编码琥珀酰-CoA合成酶的天然大肠杆菌sucCD基因。该基因簇与用于生成4-HB的剩余步骤的候选基因一起克隆到pZE13上，以产生pZE13-0038-0035-0036。

[0337] 从葡萄糖生产4-HB。虽然以上实验说明了从中心代谢中间体(琥珀酸)到4-HB的起作用途径，但是工业方法会要求从来自于低成本的碳水化合物原料如葡萄糖或蔗糖进行化学品的产生。因此，下面一组实验目的是确定由细胞在葡萄糖上生长期间产生的内源性琥珀酸是否能够给4-HB途径供燃料。细胞在M9基本培养基(6.78g/L Na_2HPO_4、3.0g/L KH_2PO_4、0.5g/L NaCl、1.0g/L NH_4Cl、1mM $MgSO_4$、0.1mM $CaCl_2$)中进行厌氧生长，M9基本培养基补充有20g/L葡萄糖、100mM可提高缓冲能力的3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)、10μg/mL硫胺和适当的抗生素。当OD600达到约0.2时，加入0.25mM IPTG，并且在诱导后每24小时取样用于4-HB

分析。在所有的情况中，在24小时后，4-HB到达平台期，在最好的菌株中最大量约为1mM(图3a)，而琥珀酸浓度继续上升(图3b)。这表明琥珀酸到该途径的供应可能不是有限的，瓶颈可能是在于这些酶自身的活性或者在于NADH的可用性。0035和0036明显分别是CoA-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶和4-HB脱氢酶的最佳候选基因。编码已知(gabD)或者推定(aldA)天然琥珀酸半醛脱氢酶的一个或两个基因的消除对性能有很小的影响。最后，应该注意，细胞在产生4-HB的菌株中比在对照中增长至低得多的OD(图3c)。

[0338] 从葡萄糖产生4-HB的可选途径是经由a-酮戊二酸。我们研究使用来自结核分支杆菌(Mycobacterium tuberculosis)的α-酮戊二酸脱羧酶--Tian等，Proc.Natl.Acad.Sci USA 102:10670-10675(2005)，以直接从α-酮戊二酸生产琥珀酸半醛(在图1中的步骤8)。为了证实这个基因(0032)在体内是起作用的，我们在pZE13上表达它，其在与pZA33上4-HB脱氢酶(基因0036)相同的宿主中。该菌株在用1mMIPTG诱导后的24小时内能够产生超过1.0mM 4-HB(图4)。由于该菌株不表达辅酶A依赖性琥珀酸半醛脱氢酶，因此消除经由琥珀酰-CoA进行的琥珀酸半醛生产的可能性。也可能是，负责产生琥珀酸半醛的天然基因可能在该途径中起作用(在图1中步骤4和5)；然而，当pZE13-0032质粒从宿主中省去时，产生的4-HB量是可忽略不计的。

[0339] 从4-HB产生BDO。从4-HB产生BDO要求两个还原步骤，其通过脱氢酶催化。醇和醛脱氢酶(分别是ADH和ALD)是NAD+/H和/或NADP+/H-依赖性酶，其一起可以将分子上的羧酸基团还原为醇基团，或者反之可以进行氧化醇为羧酸。该生物转化在野生型丙酮丁醇梭菌中已经显示(Jewell等，Current Microbiology，13:215-19(1986))，但是负责的酶和负责的基因都没被鉴定。另外，还不知道活化为4-HB-CoA是否是首先必需的(在图1中的步骤9)，或者是否醛脱氢酶(步骤12)可以直接作用在4-HB上。基于非羟基化类似物到4-HB和途径中间体的已知活性，或者通过与这些表征基因(表6)的相似性，我们开发了一系列来自于丙酮丁醇梭菌和相关生物的候选酶。因为一些候选酶是多功能的脱氢酶，它们可能潜在催化酸(或者辅酶A衍生物)到醛的NAD(P)H-依赖性还原以及催化醛到醇的NAD(P)H-依赖性还原。在利用在大肠杆菌中的这些基因开始工作之前，我们首先确证了上面所述的使用丙酮丁醇梭菌ATCC 824的相关结果。细胞在补充了10mM 4-HB的Schaedler培养液(Accumedia，Lansing，MI)中，在10％CO_2、10％H_2和80％N_2的厌氧气氛下于30℃下生长。定期获取培养样品，离心，并如下所述通过GC-MS分析培养液中的BDO。在1天、2天和7天温育后，分别检测到0.1mM、0.9mM和1.5mM的BDO浓度。在没有加入4-HB而生长的培养物中没有检测到BDO。为了说明产生的BDO源自葡萄糖，我们在补充有4g/L均匀标记的^{13}C-葡萄糖的M9基本培养中生长出最好的产生BDO的菌株MG1655 $lacI^Q$ pZE13-0004-0035-0002pZA33-0034-0036。在OD为0.67时用1mMIPTG诱导细胞，并在24小时后取样。通过质谱进行培养上清液的分析。

[0340] 当在大肠杆菌宿主MG1655$lacI^Q$中表达时，接下来测试了用于4-HB到BDO转化途径的候选基因的活性。含有在pZA33上表达的每种候选基因的重组菌株在0.25mM IPTG存在下在37℃生长4小时，以完全诱导酶的表达。在诱导后4小时，收获细胞和测定ADH和ALD活性，如上所述。因为4-HB-CoA和4-羟基丁醛不是商业可得的，因此使用非羟基化底物进行测定(表9)。丙酮丁醇梭菌adhE2(0002)和大肠杆菌adhE(0011)的4-碳和2-碳底物之间的活性比率类似于之前在文献Atsumi等，Biochim.Biophys.Acta.1207:1-11(1994)中所报告的那些。

[0341] 表9.在来自MG1655 lacI^{Q}的细胞提取物中的体外酶活性,MG1655 lacI^{Q}含有表达醛和醇脱氢酶的候选基因的pZA33。活性以μmol每分钟每毫克细胞蛋白质来表示,N.D.:未测定。

[0342]

		醛脱氢酶		醇脱氢酶	
基因	底物	丁酰-CoA	乙酰-CoA	丁醛	乙醛
0002		0.0076	0.0046	0.0264	0.0247
0003n		0.0060	0.0072	0.0080	0.0075
0011		0.0069	0.0095	0.0265	0.0093
0013		N.D.	N.D.	0.0130	0.0142
0023		0.0089	0.0137	0.0178	0.0235
0025		0	0.0001	N.D.	N.D.
0026		0	0.0005	0.0024	0.0008

[0343] 对于BDO生产试验,来自于牙龈卟啉单胞菌W83的cat2(基因0034)被包含在pZA33上,用于转化4-HB为4-HB-CoA,而候选的脱氢酶基因在pZE13上表达。宿主菌株是MG1655lacI^{Q}。连同候选的醇和醛脱氢酶一起,由于底物的相似性,我们也测试了辅酶A依赖性琥珀酸半醛脱氢酶(sucD)在这个步骤中起作用的能力。细胞在补充有10mM 4-HB的LB培养基中生长到OD为大约0.5,用1mM IPTG诱导,并在24个小时后获取培养液样品,并如以下描述分析BDO。最佳BDO生产出现在使用来自于丙酮丁醇梭菌的adhE2、来自于克氏梭状芽胞杆菌的sucD或者来自于牙龈卟啉单胞菌的sucD的情况(图5)。有趣的是,在需氧条件下生产的BDO绝对数量较高;然而,这主要由于在厌氧培养物中获得了较低的细胞密度。当归一化细胞OD时,每单元生物质的BDO生产在厌氧条件下更高(表10)。

[0344] 表10.表达来自丙酮丁醇梭菌的adhE2、来自克氏梭状芽胞杆菌的sucD或者来自牙龈卟啉单胞菌sucD的细胞培养物(数据来自于在图3中的实验2、9和10)以及阴性对照(实验1)的绝对和归一化BDO浓度

[0345]

表达的基因	条件	BDO (μM)	OD (600nm)	BDO/OD
没有	需氧	0	13.4	0
没有	微需氧	0.5	6.7	0.09
没有	厌氧	2.2	1.26	1.75
0002	需氧	138.3	9.12	15.2
0002	微需氧	48.2	5.52	8.73
0002	厌氧	54.7	1.35	40.5
0008n	需氧	255.8	5.37	47.6
0008n	微需氧	127.9	3.05	41.9
0008n	厌氧	60.8	0.62	98.1
0035	需氧	21.3	14.0	1.52
0035	微需氧	13.1	4.14	3.16
0035	厌氧	21.3	1.06	20.1

[0346] 如上所述,使用不产生乙酸作为副产物的转化4-HB到4-HB-CoA的路径可以是有利

的。为了这个目的，我们测试了使用来自丙酮丁醇梭菌的磷酸转丁酰酶(ptb)和丁酸激酶(bk)经过在图1中的步骤10和11实现该转化。克隆了来自丙酮丁醇梭菌(基因0020和0021)的天然ptb/bk操纵子并使其在pZA33中表达。获取含有生成构建物的细胞提取物并如在本文所述测定两种酶的活性。BK的比活性大约是65U/mg，而PTB的比活性大约是5U/mg。一个单位(U)活性定义为1μM底物在室温下在1分钟内的转化。最后，测试了参与4-HB到BDO转化的构建物。宿主菌株用所述的pZA33-0020-0021构建物和pZE13-0002转化，并与利用在上面图5中使用的需氧过程的cat2在BDO生产中的应用进行比较。与当使用cat2时的2mM比较，BK/PTB菌株产生1mM BDO(表11)。有趣的是，结果取决于宿主菌株在天然adhE基因中是否含有缺失。

[0347] 表11.细胞培养物的绝对和归一化BDO浓度，所述细胞表达了在pZE13中的来自丙酮丁醇梭菌的adhE2，以及在pZA33上的来自牙龈卟啉单胞菌的cat2(0034)或者来自丙酮丁醇梭菌的PTB/BK基因。宿主菌株是MG1655 $lacI^Q$或者MG 1655ΔadhE $lacI^Q$。

[0348]

基因	宿主菌株	BDO (M)	OD (600nm)	BDO/OD
0034	MG1655 $lacI^Q$	0.827	19.9	0.042
0020+0021	MG1655 $lacI^Q$	0.007	9.8	0.0007
0034	MG1655 adhE $lacI^Q$	2.084	12.5	0.166
0020+0021	MG1655 adhE $lacI^Q$	0.975	18.8	0.052

[0349] 来自于葡萄糖的BDO产生。途径证实的最后步骤是在大肠杆菌中表达途径的4-HB和BDO片段和在葡萄糖基本培养基中显示BDO的产生。构建新质粒，使得所有所需的基因装配在两种质粒上。一般而言，从pZE13表达cat1、adhEh和sucD基因，和从pZA33表达cat2和4-HBd。在MG 1655$lacI^Q$背景中测试了基因来源和基因次序的各种组合。细胞在M9基本培养基(6.78g/L Na_2HPO_4、3.0g/L KH_2PO_4、0.5g/L NaCl、1.0g/L NH_4Cl、1mM $MgSO_4$、0.1mM $CaCl_2$)中厌氧生长，M9基本培养基补充有20g/L葡萄糖、100mM 3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)--以提高缓冲能力、10μg/mL硫胺和适当的抗生素。在接种后大约15小时加入0.25mM IPTG，在诱导后24和48小时获取用于BDO、4-HB和琥珀酸分析的培养上清液样品。BDO生产似乎显示出依赖基因次序(表12)。超过了0.5mM的最高BDO生产首先利用所表达的cat2获得，接着是在pZA33上4-HBd，然后由在pZE13上的牙龈卟啉单胞菌sucD的cat1。在pZE13上的最后位置添加丙酮丁醇梭菌adhE2引起轻微提高。也产生了较高浓度的4-HB和琥珀酸。

[0350] 表12.在补充有20g/L葡萄糖的基本培养基中生长的、表达BDO途径基因组合的重组大肠杆菌菌株中的BDO、4-HB和琥珀酸的生产。浓度是以mM给出。

[0351]

样品	pZE13	pZA33	诱导OD	24小时				48小时			
				OD600nm	Su	4HB	BDO	OD600nm	Su	4HB	BDO
1	cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.92	1.29	5.44	1.37	0.240	1.24	6.42	1.49	0.280
2	cat1(0004)-sucD(0008N)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.36	1.11	6.90	1.24	0.011	1.06	7.63	1.33	0.011
3	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0035)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.20	0.44	0.34	1.84	0.050	0.60	1.93	2.67	0.119
4	cat1(0004)-sucD(0035)-adhE(0002)	4hbd (0036)-cat2(0034)	1.31	1.90	9.02	0.73	0.073	1.95	9.73	0.82	0.077
5	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0008N)	4hbd (0036)-cat2(0034)	0.17	0.45	1.04	1.04	0.008	0.94	7.13	1.02	0.017
6	cat1(0004)-sucD(0008N)-adhE(0002)	4hbd (0036)-cat2(0034)	1.30	1.77	10.47	0.25	0.004	1.80	11.49	0.28	0.003
7	cat1(0004)-sucD(0035)	cat2(0034)-4hbd(0036)	1.09	1.29	5.63	2.15	0.461	1.38	6.66	2.30	0.520
8	cat1(0004)-sucD(0008N)	cat2(0034)-4hbd(0036)	1.81	2.01	11.28	0.02	0.000	2.24	11.13	0.02	0.000
9	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0035)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0.24	1.99	2.02	2.32	0.106	0.89	4.85	2.41	0.186
10	cat1(0004)-sucD(0035)-adhE(0002)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0.98	1.17	5.30	2.08	0.569	1.33	6.15	2.14	0.640
11	adhE(0002)-cat1(0004)-sucD(0008N)	cat2(0034)-4hbd(0036)	0.20	0.53	1.38	2.30	0.019	0.91	8.10	1.49	0.034
12	cat1(0004)-sucD(0008N)-adhE(0002)	cat2(0034)-4hbd(0036)	2.14	2.73	12.07	0.16	0.000	3.10	11.79	0.17	0.002
13	仅载体	仅载体	2.11	2.62	9.03	0.01	0.000	3.00	12.05	0.01	0.000

[0352] 通过GCMS分析BDO、4-HB和琥珀酸。在发酵和细胞培养样品中的BDO、4-HB和琥珀酸通过硅烷化来衍生并使用改编自文献报道的方法((Simonov等,J.Anal Chem.59:965-971(2004))通过GCMS进行定量分析。开发的方法显示了低至1μM的良好灵敏性、达到至少25mM的线性以及优良的选择性和再现性。

[0353] 如下进行样品制备:100μL过滤的(0.2μm或0.45μm针筒式滤器)样品,如发酵培养液、细胞培养物或者标准溶液,在Speed VacConcentrator(Savant SVC-IOOH)在环境温度下干燥大约1小时,随后加入在二甲基甲酰胺中的20μL 10mM环己醇溶液作为内标。涡旋混合物,在水浴(Branson 3510)经声波处理15分钟,确保均一性。加入100μL硅烷化衍生反应物--含有1%三甲基氯硅烷的N,O-双(三甲基甲硅烷基)三氟-乙酰胺(BSTFA),然后混合物在70℃温育30分钟。衍生的样品离心5分钟,将透明(澄清)的溶液直接注射入GCMS中。除了从J.T.Baker购买的BDO外,所有的化学品和试剂来自Sigma-Aldrich。

[0354] 在Agilent气相色谱仪6890N上进行GCMS,其连接于以电子轰击离子化(EI)模式操作的质量选择性检测器(MSD)5973N用于分析。使用30m×0.25mm内径(i.d.)×0.25μm膜厚的DB-5MS毛细管柱(J&W Scientific,Agilent Technologies)。GC以分流注入模式以20:1的分流比引入1μL样品进行操作。注入口温度是250℃。氦气用作载气和流速维持在1.0mL/min。优化温度梯度程序,确保感兴趣分析物充分分离和最小的基质干扰。烘箱开始维持在80℃,1分钟,然后以2℃/min斜线上升到120℃,接着以100℃/min快速斜线上升到320℃,最后在320℃维持6分钟。MS接口传递线(interface transfer line)维持在280℃。使用'低质量'MS调准设置(MS tune settings)和30-400m/z质量范围扫描获得这些数据。总分析时间是29分钟,包括3分钟溶解的延迟。对于BSTFA衍生的环己醇、BDO、4-HB和琥珀酸,保留时间分别对应于5.2、10.5、14.0和18.2分钟。对于定量分析,选择以下具体质量片段(萃取的离子色谱):内标环己醇的m/z为157、BDO的m/z为116,而4-HB和琥珀酸两者的m/z为147。为了尽可能接近地与样品基质相配,使用在相应的细胞培养物或发酵培养基中的分析物溶液建立标准校准曲线。使用环境数据分析化学工作站软件(Environmental Data Analysis ChemStation software(AgilentTechnologies))处理GCMS数据。

[0355] 结果表明所产生的大部分4-HB和BDO是用13C标记的(图6,右侧)。显示在未标记葡萄糖中生长的平行培养物的质谱用于比较(图6,左侧)。需要注意的是,所观察的峰是含有来自代谢物的不同数目碳原子的衍生分子的片段的峰。衍生化反应物也贡献了一些天然存在标记分布的碳原子和硅原子,因此结果不是严格定量的。

[0356] 使用可选的途径从4-HB产生BDO。也测试了用于产生BDO的各种可选途径。这包括使用天然大肠杆菌SucCD酶以将琥珀酸转化为琥珀酰-CoA(表13,行2-3)、使用在α-酮戊二酸途径中的α-酮戊二酸脱羧酶(表13,行4)和使用PTB/BK作为可选方法以产生4-HB的辅酶A

衍生物(表13,行1)。构建含有表达表13中所示基因的质粒的菌株,其包含这些变体。结果显示在所有情况下,出现4-HB和BDO生产(表13)。

[0357] 表13.在不同BDO途径变体的重组大肠杆菌菌株基因中的BDO、4-HB和琥珀酸的生产,重组的大肠杆菌菌株基因在补充有20g/L葡萄糖的基本培养基中厌氧生长,并在用0.1mM IPTG诱导后24小时收获。浓度以mM给出。

[0358]

pZE13上的基因	pZA33上的基因	琥珀酸	4-HB	BDO
0002+0004+0035	0020n-0021n-0036	0.336	2.91	0.230
0038+0035	0034-0036	0.814	2.81	0.126
0038+0035	0036-0034	0.741	2.57	0.114
0035+0032	0034-0036	5.01	0.538	0.154

[0359] 实施例III

[0360] 4-羟基丁酸、γ-丁内酯和1,4-丁二醇的生物合成

[0361] 该实施例描述了使用发酵和其它生物过程生物合成生产4-羟基丁酸、γ-丁内酯和1,4-丁二醇。以下描述了使4-HB发酵步骤结合到生产纯化的GBL、1,4-丁二醇(BDO)和四氢呋喃(THF)的完整过程中的方法。因为4-HB和GBL处于平衡,发酵培养液会含有两种化合物。在低pH,该平衡向有利于GBL移动。因此,该发酵可以在pH 7.5或更低下操作(运转),通常在pH 5.5或者更低下操作。在除去生物质后,产物流进入了除去GBL的分离步骤,并且富集4-HB的剩余产物流被再循环。最后,蒸馏GBL以除去任何杂质。该过程以三种方式中的一种操作:1)料分批发酵和分批分离;2)补料分批发酵和连续分离;3)连续发酵和连续分离。这些模式中的前两种在图7中图解显示。下述结合的发酵过程也用于本发明的产BDO细胞,用于BDO和随后BDO家族产物的生物合成。

[0362] 产生4-HB/GBL的发酵方案(分批):生产生物在用N_2/CO_2混合物喷射(喷雾)的10L生物反应器中生长,使用含有5g/L硫酸钾、2.5g/L氯化铵、0.5g/L硫酸镁和30g/L玉米浆的5L培养液和20g/L的起始葡萄糖浓度。随着细胞生长和利用葡萄糖,另外70%的葡萄糖以大致平衡葡萄糖消耗的速度进料到生物反应器中。生物反应器的温度维持在30℃。生长继续大约24小时,直到4-HB达到20-200g/L之间的浓度,其中细胞密度在5与10g/L之间。pH不受控制,并且到试验结束时其一般会减小到pH 3-6。在培养期完成时,使发酵罐内含物经过细胞分离装置(例如离心机)以除去细胞和细胞碎片,而发酵培养液被转移到产物分离装置。4-HB和/或GBL的分离通过本领域从稀释水溶液中分离有机产物使用的标准分离方法进行,如使用水不混溶有机溶剂(例如甲苯)的液-液萃取,以提供4-HB/GBL的有机溶液。生成的溶液随后经受标准蒸馏方法以移出和再循环有机溶剂以及提供作为纯化液体分离的GBL(沸点204-205℃)。

[0363] 产生4-HB/GBL的发酵方案(完全连续):生产生物首先使用上述装置和培养基组成以分批模式长大,除了起始的葡萄糖浓度是30-50g/L之外。当葡萄糖被耗尽时,相同组成的饲养培养基以0.5L/hr和1L/hr之间的速度连续地提供,并且以相同的速度收回液体。在生物反应器中的4-HB浓度保持稳定在30-40g/L和细胞密度保持稳定在3-5g/L之间。温度维持在30℃,并根据需要使用浓NaOH和HCl将pH维持在4.5。生物反应器连续运转一个月,每天取样,以保证4-HB浓度一致性。在连续模式中,随着新饲养培养基被供应,发酵罐内含物被恒定地移出。含有细胞、培养基和产物4-HB和/或GBL的出口流随后经历连续产物分离过程,去

除或者不去除细胞和细胞碎片，并且通过本领域从稀释水溶液中分离有机产物使用的标准连续分离方法进行，如使用水不混溶有机溶剂(例如甲苯)的连续液-液萃取，以提供4-HB/GBL的有机溶液。生成的溶液随后经受标准连续蒸馏方法以移出和再循环有机溶剂以及提供作为纯化液体分离的GBL(沸点204-205℃)。

[0364] GBL还原方案：一旦如上所述分离和纯化GBL，它随后会经历本领域(引用的参考文献)熟知的那些还原方案以生产1,4-丁二醇或者四氢呋喃(THF)或者它们的混合物。熟知在氢气压下多相或者均相氢化催化剂与GBL结合可提供产物1,4-丁二醇或者四氢呋喃(THF)或者它们的混合物。重要的是要注意，如上述从发酵培养液中分离的4-HB/GBL产物混合物可以在GBL分离和纯化之前直接经历这些相同的还原方案，以提供产物1,4-丁二醇或者四氢呋喃(THF)或者它们的混合物。随后通过本领域熟知的方法分离和纯化生成的产物1,4-丁二醇和THF。

[0365] 直接产生BDO或THF的发酵和氢化方案(分批)：细胞在用N_2/CO_2混合物喷射的10L生物反应器中生长，使用含有5g/L硫酸钾、2.5g/L氯化铵、0.5g/L硫酸镁和30g/L玉米浆的5L培养液和20g/L的起始葡萄糖浓度。随着细胞生长和利用葡萄糖，另外70％的葡萄糖以大致平衡葡萄糖消耗的速度进料到生物反应器中。生物反应器的温度维持在30℃。生长继续大约24小时，直到4-HB达到20-200g/L之间的浓度，其中细胞密度在5与10g/L之间。pH不受控制，并且到试验结束时其一般会减小到pH 3-6。在培养期完成时，使发酵罐内含物经过细胞分离装置(例如离心机)以除去细胞和细胞碎片，而发酵培养液被转移到还原装置(例如，氢化容器)，在那里混合物4-HB/GBL被直接还原为1,4-丁二醇或THF或它们的混合物。在完成还原步骤之后，反应器内含物被转移至产物分离装置。1,4-丁二醇和/或THF的分离通过本领域从稀释水溶液中分离有机产物使用的标准分离方法进行，如使用水不混溶有机溶剂(例如甲苯)的液-液萃取，以提供1,4-丁二醇和/或THF的有机溶液。生成的溶液随后经受标准蒸馏方法以移出和再循环有机溶剂以及提供作为纯化液体分离的1,4-丁二醇和/或THF。

[0366] 直接产生BDO或者THF发酵和氢化方案(完全连续)：细胞首先使用上述装置和培养基组成以分批模式长大，除了起始的葡萄糖浓度是30-50g/L之外。当葡萄糖被耗尽时，相同组成的饲养培养基以0.5L/hr和1L/hr之间的速度连续地提供，并且以相同的速度收回液体。在生物反应器中的4-HB浓度保持稳定在30-40g/L和细胞密度保持稳定在3-5g/L之间。温度维持在30℃，并根据需要使用浓NaOH和HCl将pH维持在4.5。生物反应器连续运转一个月，每天取样，以保证4-HB浓度一致性。在连续模式中，随着新饲养培养基被供应，发酵罐内含物被恒定地移出。含有细胞、培养基和产物4-HB和/或GBL的出口流随后经过细胞分离装置(例如离心机)以除去细胞和细胞碎片，而发酵培养液被转移到连续的还原装置(例如，氢化容器)，在那里混合物4-HB/GBL被直接还原为1,4-丁二醇或THF或其混合物。在完成还原步骤之后，反应器内含物被转移至连续的产物分离装置。1,4-丁二醇和/或THF的分离通过本领域从稀释水溶液中分离有机产物使用的标准连续分离方法进行，如使用水不混溶有机溶剂(例如甲苯)的液-液萃取，以提供1,4-丁二醇和/或THF的有机溶液。生成的溶液随后经受标准蒸馏方法以移出和再循环有机溶剂以及提供作为纯化液体分离的1,4-丁二醇和/或THF。

[0367] 直接产生BDO的发酵方案(分批)：生产生物在用N_2/CO_2混合物喷射的10L生物反应器中生长，使用含有5g/L硫酸钾、2.5g/L氯化铵、0.5g/L硫酸镁和30g/L玉米浆的5L培养液

和20g/L的起始葡萄糖浓度。随着细胞生长和利用葡萄糖，另外70％的葡萄糖以大致平衡葡萄糖消耗的速度进料到生物反应器中。生物反应器的温度维持在30℃。生长继续大约24小时，直到BDO达到20-200g/L之间的浓度，其中细胞密度通常在5与10g/L之间。在培养期完成时，使发酵罐内含物经过细胞分离装置(例如离心机)以除去细胞和细胞碎片，而发酵培养液被转移到产物分离装置。BDO的分离通过本领域从稀释水溶液中分离有机产物使用的标准分离方法进行，如使用水不混溶有机溶剂(例如甲苯)的液-液萃取，以提供BDO的有机溶液。生成的溶液随后经受标准蒸馏方法以移出和再循环有机溶剂以及提供作为纯化液体分离的BDO(沸点228-229℃)。

[0368] 直接产生BDO的发酵方案(完全连续)：生产生物首先使用上述装置和培养基组成以分批模式长大，除了起始的葡萄糖浓度是30-50g/L之外。当葡萄糖被耗尽时，相同组成的饲养培养基以0.5L/hr和1L/hr之间的速度连续地提供，并且以相同的速度收回液体。在生物反应器中的BDO浓度保持稳定在30-40g/L和细胞密度保持稳定在3-5g/L之间。温度维持在30℃，并根据需要使用浓NaOH和HCl将pH维持在4.5。生物反应器连续运转一个月，每天取样，以保证BDO浓度一致性。在连续模式中，随着新饲养培养基被供应，发酵罐内含物被恒定地移出。含有细胞、培养基和产物BDO的出口流随后经历连续产物分离过程，去除或者不去除细胞和细胞碎片，并且通过本领域从稀释水溶液中分离有机产物使用的标准连续分离方法进行，如使用水不混溶有机溶剂(例如甲苯)的连续液-液萃取，以提供BDO的有机溶液。生成的溶液随后经受标准连续蒸馏方法以移出和再循环有机溶剂以及提供作为纯化液体(mpt20℃)分离的BDO(沸点228-229℃)。

[0369] 实施例IV示例性的BDO途径

[0370] 该实施例描述了用于1,4-丁二醇(BDO)合成途径的示例性酶和相应的基因。

[0371] 示例性的BDO合成途径在图8-13中呈现。图8-13中描述的途径为从共同的中心代谢中间产物至1,4-丁二醇。图8-13中描述的所有转化分为表14中所示的18种普通转化类别。以下描述了每一类别中大量已生化表征的候选基因。具体所列的为当在宿主生物体中克隆和表达时可用于催化图9-13中合适的转化的那些基因。用于图9-13中每一关键步骤的主要的三个示例性基因在表15-23中提供(见下文)。在此描述了提供用于图8中所述途径的示例性的基因。

[0372] 表14.转化共同的中心代谢中间产物至1,4-丁二醇所需的酶类型。每一标记的前三个数字与酶委员会编号前三个数字相对应，其代表不依赖底物特异性的总转化类型。

[0373]

标记	功能
1.1.1.a	氧化还原酶(酮至羟基或醛至醇)
1.1.1.c	氧化还原酶(2 步，酰基-CoA 至醇)
1.2.1.b	氧化还原酶(酰基-CoA 至醛)
1.2.1.c	氧化还原酶(2-含氧酸至酰基-CoA，脱羧作用)
1.2.1.d	氧化还原酶(磷酸化/去磷酸)
1.3.1.a	作用于 CH-CH 供体的氧化还原酶
1.4.1.a	作用于氨基酸的氧化还原酶
2.3.1.a	酰基转移酶(转移磷酸基)
2.6.1.a	氨基转移酶
2.7.2.a	磷酸转移酶，羧基受体
2.8.3.a	辅酶-A 移转酶
3.1.2.a	硫羟酸酯水解酶(CoA 特异性的)
4.1.1.a	羰基裂解酶
4.2.1.a	水裂解酶

[0374]

标记	功能
4.3.1.a	氨-裂解酶
5.3.3.a	异构酶
5.4.3.a	氨基变位酶
6.2.1.a	酸-硫羟连接酶

[0375] 1.1.1.a-氧化还原酶(醛至醇或酮至羟基)

[0376] 醛至醇。编码催化醛转化为醇的酶(即醇脱氢酶,或等同地称作醛还原酶)的示例性基因包括:编码C2-C14的中链醇脱氢酶的alrA(Tani等人,Appl.Environ.Microbiol.66:5231-5235(2000));来自酿酒酵母的ADH2(Atsumi等人,Nature 451:86-89(2008));来自大肠杆菌的yqhD,其偏好长于C(3)的分子(Sulzenbacher等人,Journal of Molecular Biology 342:489-502(2004));和来自丙酮丁醇梭菌的bdhI和bdhII,其将丁醛转化为丁醇(Walter等人,Journal of Bacteriology174:7149-7158(1992))。用于每种这些示例性基因产物的蛋白质序列如果是可得到的话,可用下列GenBank登录号找到:

	alrA	BAB12273.1	不动杆菌菌株M-1
	ADH2	NP_014032.1	酿酒酵母
[0377]	*yqhD*	NP_417484.1	大肠杆菌
	bdh I	NP_349892.1	丙酮丁醇梭菌
	bdh II	NP_349891.1	丙酮丁醇梭菌

[0378] 展现4-羟基丁酸脱氢酶活性的酶(EC 1.1.1.61)也属于此范畴。所述酶已在真氧产碱杆菌(Ralstonia eutropha)(Bravo等人,J.Forensic Sci.49:379-387(2004))、克氏梭菌(Wolff和Kenealy,Protein Expr.Purif.6:206-212(1995))和拟南芥(Arabidopsis thaliana)(Breitkreuz等人,J.Biol.Chem.278:41552-41556(2003))中得到表征。

[0379]	4hbd	YP_726053.1	真氧产碱杆菌H16
[0380]	4hbd	L21902.1	克氏梭菌DSM 555
[0381]	4hbd	Q94B07	拟南芥

[0382] 另一个示例性的酶为3-羟基异丁酸盐脱氢酶,其催化3-羟基异丁酸盐至甲基丙二酸半醛的可逆氧化。该酶参与缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸降解并且已在细菌,真核生物和哺乳动物中鉴定。由来自嗜热栖热菌HB8的P84067编码的该酶已在结构上进行了表征(Lokanath等,J Mol Biol 352:905-17(2005))。人3-羟基异丁酸盐脱氢酶的可逆性利用同位素-标记底物显示(Manning等,Biochem J 231:481-484(1985))。编码该酶的另外的基因包括人类(Hawes等,Methods Enzymol.324:218-228(2000))和兔(Chowdhury等,Biosci.Biotechnol Biochem.60:2043-2047(1996);Hawes等,Methods enzymol.324:218(2000)))中的3hidh,绿脓杆菌中的mmsb和恶臭假单胞菌中的dhat(Aberhart等,J Chem.Soc.[Perkin 1]6:1404-1406(1979);Chowdhury等,Biosci.Biotechnol Biochem.67:438-441(2003);Chowdhury等,Biosci.Biotechnol Biochem.60:2043-2047(1996))。

	P84067	P84067	嗜热栖热菌
	mmsb	P28811.1	绿脓杆菌
[0383]	*dhat*	Q59477.1	恶臭假单胞菌
	3hidh	P31937.2	人类
	3hidh	P32185.1	兔

[0384] 一些3-羟基异丁酸盐脱氢酶还显示将丙二酸半醛转化至3-羟基丙酸(3-HP)。表现出该活性的三个候选基因为来自绿脓杆菌PA01(62)的mmsB,来自恶臭假单胞菌KT2440的mmsB(Liao等,美国公开2005/0221466)和来自恶臭假单胞菌E23的mmsB(Chowdhury等,Biosci.Biotechnol.Biochem.60:2043-2047(1996))。还鉴定了粪产碱菌M3A中具有3-羟基丁酸脱氢酶活性的酶(Gokam等,美国专利No.7,393,676;辽河等,美国公开No.2005/0221466)。来自其他生物体包括球形红细菌得另外的候选基因可通过序列相似性推断。

[0385]

mmsB	AAA25892.1	绿脓杆菌
mmsB	NP_252259.1	绿脓杆菌 PAO1
mmsB	NP_746775.1	恶臭假单胞菌 KT2440
mmsB	JC7926	恶臭假单胞菌 E23
orfB1	AAL26884	球形红细菌

[0386] 丙二酸半醛转化至3-HP还可以通过两种其他的酶完成:NADH-依赖性3-羟基丙酸脱氢酶和NADPH-依赖性丙二酸半醛还原酶。NADH-依赖性3-羟基丙酸脱氢酶被认为参与来自细菌和植物中丙酸盐的β-丙氨酸生物合成途径(Rathinasabapathi,B.Journal of Plant Pathology 159:671-674(2002);Stadtman,E.R.J.Am.Chem.Soc.77:5765-5766(1955))。该酶迄今为止与任何生物体中的基因无关。NADPH-依赖性丙二酸半醛还原酶催化自养性CO2-固定细菌中的逆反应。虽然已经检测了勤奋金属球菌中的酶活性,但该基因本身仍未知(Alber等,J.Bacteriol.188:8551-8559(2006))。

[0387] 酮至羟基。存在一些示例性的醇脱氢酶,其将酮转化至羟基官能团。来自大肠杆菌的两种所述酶由苹果酸脱氢酶(mdh)和乳酸脱氢酶(IdhA)编码。另外,已表明来自真氧产碱杆菌的乳酸脱氢酶对各种链长的底物显示高活性,诸如乳酸,2-氧代丁酰,2-氧代戊酸和2-酮戊二酸(Steinbuchel,A.and H.G.Schlegel Eur.J.Biochem.130:329-334(1983))。α-酮己二酸转化为α-羟己二酸可由2-酮己二酸还原酶催化,其为已报道发现于鼠和人胎盘中的酶(Suda等,Arch.Biochem.Biophys.176:610-620(1976);Suda等,Biochem.Biophys.Res.Commun.77:586-591(1977))。用于该步骤的另外的候选物为来自人心脏的线粒体3-羟基丁酸脱氢酶(bdh),其已被克隆和表征(Marks等,J.Biol.Chem.267:15459-15463(1992))。该酶为作用于3-醇酸的脱氢酶。如拜氏梭菌(Ismaiel等,J.Bacteriol.175:5097-5105(1993))和布氏热厌氧杆菌(Lamed等,Biochem.J.195:183-190(1981);Peretz and Burstein Biochemistry 28:6549-6555 1989))中所示的,另一种示例性的醇脱氢酶将丙酮转化至异丙醇。

[0388]

mdh	AAC76268.1	大肠杆菌
ldhA	NP_415898.1	大肠杆菌
ldh	YP_725182.1	真氧产碱杆菌
bdh	AAA58352.1	人类
adh	AAA23199.2	拜氏梭菌 NRRL B593
adh	P14941.1	布氏热厌氧杆菌 HTD4

[0389] 将乙酰乙酰基-CoA转化为3-羟基丁酰-CoA的示例性的3-羟酰脱氢酶包括来自丙酮丁醇梭菌的hbd(Boynton等,Journal of Bacteriology 178:3015-3024(1996)),来自拜氏梭菌的hbd(Colby等,Appl Environ.Microbiol 58:3297-3302(1992)),和来自勤奋金属球菌的许多类似酶(Berg等,Archaea.Science.318:1782-1786(2007))。

[0390]

hbd	NP_349314.1	丙酮丁醇梭菌
hbd	AAM14586.1	拜氏梭菌
Msed_1423	YP_001191505	勤奋金属球菌
Msed_0399	YP_001190500	勤奋金属球菌
Msed_0389	YP_001190490	勤奋金属球菌
Msed_1993	YP_001192057	勤奋金属球菌

[0391] 1.1.1.c氧化还原酶(2步,酰基-CoA至醇)

[0392] 将酰基-CoA转化为醇的示例性2步氧化还原酶包括那些将例如乙酰-CoA等底物转化为乙醇(例如大肠杆菌的adhE)(Kessler等人,FEBS.Let t.281:59-63(1991))和将丁酰-CoA转化为丁醇(例如丙酮丁醇梭菌的adhE2)(Fontaine等人,J.Bacteriol.184:821-830(2002))的氧化还原酶。除了将乙酰-CoA还原为乙醇外,肠膜明串珠菌(Leuconostoc mesenteroides)的adhE所编码的酶已显示可将支链化合物异丁醛氧化为异丁酰-CoA(Kazahaya等,J.Gen.Appl.Microbiol.18:43-55(1972);Koo等人,Biotechnol Let t.27:505-510(2005))。

[0393] adhE NP_415757.1 大肠杆菌

[0394] adhE2 AAK09379.1 丙酮丁醇梭菌

[0395] adhE AAV66076.1 肠膜明串珠菌

[0396] 另一种示例性酶可将丙二酰辅酶A转化为3-HP。具有此活性的NADPH依赖性酶已在橙色绿屈挠菌(Chloroflexus aurantiacus)中得到表征,其中所述酶参与3-羟基丙酸循环(Hugler等人,J.Bacteriol.184:2404-2410(2000);Straus s和Fuchs,Eur.J.Biochem.215:633-643(1993))。所述酶的质量为300kDa,其具有高度的底物特异性且与其它已知的氧化还原酶显示很小的序列相似性(Hugler等人,J.Bacteriol.184:2404-2410(2002))。没有显示其它生物体中的酶可催化所述特异性反应;然而,存在生物信息学证据证明其它生物体可能具有类似的途径(Klatt等人,Environ.Microbiol.9:2067-2078(2007))。可通过序列相似性推断包括卡氏玫瑰弯菌(Roseiflexus castenholzii)、赤细菌属(Erythrobacter)NAP1和海洋γ变形杆菌(marine gammaproteobacterium)HTCC2080的其它生物体中的候选酶。

[0397]

mcr	AAS20429.1	橙色绿屈挠菌
Rcas_2929	YP_001433009.1	卡氏玫瑰弯菌
NAP1_02720	ZP_01039179.1	赤细菌属 NAP1
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	海洋γ变形杆菌 HTCC2080

[0398] 更长链的酰基-CoA分子可由酶诸如希蒙得木(加州希蒙得木)FAR还原,其编码醇-形成的脂肪酰基-CoA还原酶。其在大肠杆菌中过表达产生FAR活性和脂族醇的累积(Metz等,Plant Physiology 122:635-644(2000))。

[0399] FAR AAD38039.1 加州希蒙得木

[0400] 1.2.1.b氧化还原酶(酰基-CoA至醛)

[0401] 一些酰基-CoA脱氢酶能够将酰基-CoA还原为其对应的醛。编码所述酶的示例性基

因包括:醋酸钙不动杆菌(Acinetobacter calcoaceticus)acr1,其编码脂肪酰辅酶A还原酶(Reiser和Somerville,Journal ofBacteriology 179:2969-2975(1997));不动杆菌属(Acinetobacter sp.)M-1脂肪酰辅酶A还原酶(Ishige等人,Appl.Environ.Microbiol.68:1192-1195(2002));和克氏梭菌sucD基因,其编码辅酶A-和NADP-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶(Sohling和Gottschalk,J Bacteriol.178:871-880(1996))。牙龈卟啉菌的SucD是另一种琥珀酸半醛脱氢酶(Takahashi等人,J.Bacteri ol.182:4704-4710(2000))。假单胞菌属中由bphG编码的使乙醛脱氢酶酰化的酶是另一种有用的酶,因为其已被证实可氧化乙醛、丙醛、丁醛、异丁醛和甲醛并使其酰化(Powlowski等人,J Bacteriol.175:377-385(1993))。

[0402]

acr1	YP_047869.1	醋酸钙不动杆菌
acr1	AAC45217	巴氏不动杆菌
acr1	BAB85476.1	不动杆菌菌株 M-1
sucD	P38947.1	克氏梭菌
sucD	NP_904963.1	牙龈卟啉单胞菌
bphG	BAA03892.1	假单胞菌属

[0403] 将酰基辅酶A转化为其对应醛的另一种类型的酶是丙二酰辅酶A还原酶,其将丙二酰辅酶A转化为丙二酸半醛。丙二酰辅酶A还原酶是嗜热嗜酸古菌中经由3-羟基丙酸循环的自养碳固定中的关键酶(Berg等人,Science318:1782-1786(2007);Thauer,R.K.Science 318:1732-1733(2007))。所述酶利用NADPH作为辅因子且已在金属球菌和硫化叶菌(Sulfolobus spp)中得到表征(Alber等人,J.Bacteriol.188:8551-8559(2006);Hugler等人,J.Bacteriol.184:2404-2410(2002))。所述酶在勤奋金属球菌中是由Msed_0709编码(Alber等人,J.Bacteriol.188:8551-8559(2006);Berg等人,Science 318:1782-1786(2007))。将来自托氏硫化叶菌(Sulfolobustokodaii)的编码丙二酰辅酶A还原酶的基因在大肠杆菌中克隆并异源表达(Alber等人,J.Bacteriol.188:8551-8559(2006))。虽然这些酶的醛脱氢酶功能类似于来自橙色绿屈挠菌的双功能脱氢酶,但是其序列相似性却很小。这两种丙二酰辅酶A还原酶候选物与天门冬氨酸半醛脱氢酶具有高度的序列相似性,天门冬氨酸半醛脱氢酶是一种催化天冬氨酰-4-磷酸还原且同时脱磷酸成天门冬氨酸半醛的酶。可在包括硫磺矿硫化叶菌(Sulfolobus solfataricus)和嗜酸热硫化叶菌(Sulfolobus acidocaldarius)的其它生物体中通过与蛋白质的序列同源性来发现其它候选基因。

[0404]

Msed_0709	YP_001190808.1	勤奋金属球菌
mcr	NP_378167.1	托氏硫化叶菌
asd-2	NP_343563.1	硫磺矿硫化叶菌
Saci_2370	YP_256941.1	嗜酸热硫化叶菌

[0405] 1.2.1.c-氧化还原酶(2-含氧酸至酰基-CoA,脱羧作用)

[0406] 该家族的酶包括1)支链2-酮酸脱氢酶,2)α-酮戊二醛脱氢酶,和3)丙酮酸脱氢酶多酶复合物(PDHC)。这些酶为多酶复合物,其催化引起2-酮酸类酰化氧化脱羧的一系列不完全反应。每一2-酮酸脱氢酶复合物占据中间代谢的关键位置,且酶活性通常受紧密调节(Fries等,Biochemistry 42:6996-7002(2003))。该酶共有由三个催化组分的多拷贝组成

的复杂但共同的结构:α-酮酸脱羧酶(E1),二氢硫辛酰胺酰基转移酶(E2)和二氢硫辛酰胺脱氢酶(E3)。E3组分在所有生物体2-酮酸脱氢酶复合物中共有,而E1和E2组分由不同的基因编码。该酶组分以多拷贝存在于复合物中并且利用多种辅因子经底物通道催化直接的反应顺序。这些脱氢酶复合物的总的规模非常大,具有400和1000Da之间的分子质量(即大于核糖体)。

[0407] 大肠杆菌中缺氧状态下2-酮酸脱氢酶家族中的酶活性通常较低或有限。提高的NADH(或NADPH)产生可导致氧化还原-不平衡,并且NADH本身用作酶功能的抑制剂。基因工程工作提高了大肠杆菌丙酮酸脱氢酶复合物的厌氧活性(Kim等,Appl.Environ.Microbiol.73:1766-1771(2007);Kim等,J.Bacteriol.190:3851-3858)2008);Zhou等,Biotechnol.Lett.30:335-342(2008))。例如,NADH的抑制作用可通过在E3组分中设计H322Y突变而克服(Kim等,J.Bacteriol.190:3851-3858(2008))。单一组分和其如何在复合物中合作的结构研究提供了对该家族酶的催化机理和构造的了解(Aevarsson等,Nat.Struct.Biol.6:785-792(1999);Zhou等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.98:14802-14807(2001))。脱氢酶复合物的底物特异性在不同生物体中不同,但通常支链酮酸脱氢酶具有最宽的底物范围。

[0408] α-酮戊二醛脱氢酶(AKGD)将α-酮戊二酸转化为琥珀酰-CoA并且是通过三羧酸循环的代谢量控制的第一位置(Hansford,R.G.Curr.Top.Bioenerg.10:217-278(1980))。由大肠杆菌中基因sucA,sucB和Ipd编码,AKGD基因表达在缺氧状态下以及在葡萄糖上培养期间下调(Park等,Mol.Microbiol.15:473-482(1995))。虽然AKGD的底物范围有限,E2组分催化核心的结构研究精确定位了负责底物特异性得具体残基(Knapp等,J.Mol.Biol.280:655-668(1998))。枯草杆菌AKGD,由odhAB(E1和E2)和pdhD(E3,共有域)编码,在转录水平受调节并且依赖于碳源和生物体的生长期(Resnekov等,Mol.Gen.Genet.234:285-296(1992))。酵母中,编码E3组分的LPD1基因在转录水平受葡萄糖调节(Roy和Dawes J.Gen.Microbiol.133:925-933(1987))。由KGD1编码的E1组分,也受葡萄糖调节并且由HAP2和HAP3的产物激活(Repetto和Tzagoloff,Mol.Cell Biol.9:2695-2705 25(1989))。受产物NADH和琥珀酰-CoA抑制的AKGD酶复合物在哺乳动物系统中得到了很好的研究,如其受损的功能与一些神经学疾病相关联(Tretter and dam-Vizi Philos.Trans.R.Soc.Lond B Biol.Sci.360:2335-2345(2005))。

[0409]

sucA	NP_415254.1	大肠杆菌菌株K12亚株MG1655
sucB	NP_415255.1	大肠杆菌菌株K12亚株MG1655
lpd	NP_414658.1	大肠杆菌菌株K12亚株MG1655
odhA	P23129.2	枯草杆菌
odhB	P16263.1	枯草杆菌
pdhD	P21880.1	枯草杆菌
KGD1	NP_012141.1	酿酒酵母
KGD2	NP_010432.1	酿酒酵母
LPD1	NP_116635.1	酿酒酵母

[0410] 支链2-酮酸脱氢酶复合物(BCKAD),亦称2-氧代异戊酸脱氢酶,参与支链氨基酸降解途径,将缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸的2-酮酸类衍生物转化为其酰基-CoA衍生物和CO2。已在许多生物体中研究了该复合物,包括枯草杆菌(Wang等,Eur.J.Biochem.213:1091-1099(1993)),褐鼠(Namba等,J.Biol.Chem.244:4437-4447(1969))和恶臭假单胞菌(Sokatch J.Bacteriol.148:647-652(1981))。枯草杆菌中该酶由基因pdhD(E3组分),bfmBB(E2组分)bfmBAA和bfinBAB(El组分)编码(Wang等,Eur.J.Biochem.213:1091-1099(1993))。哺乳动物中,该复合物通过特定的磷酸酶和蛋白质激酶磷酸化而调节。已在鼠肝细胞中研究了该复合物(Chicco等,J.Biol.Chem.269:19427-19434(1994))以及其由基因Bckdha(Elα),Bckdhb(Elβ),Dbt(El)和Did(E3)编码。恶臭假单胞菌BCKAD复合物的El和E3组分已被结晶(Aevarsson等,Nat.Struct.Biol.6:785-792(1999);Mattevi Science 255:1544-1550(1992))并且已研究了该酶复合物(Sokatch等,J.Bacteriol.148:647-652(1981))。恶臭假单胞菌BCKAD基因的转录由bkdR的基因产物激活(Hester等,Eur.J.Biochem.233:828-836(1995))。一些生物体包括褐鼠(Paxton等,Biochem.J.234:295-303(1986))和酿酒酵母(Sinclair等,Biochem.Mol.Biol.Int.31:911-922(1993))中,已显示该复合物具有广泛的底物范围,除了支链氨基酸前体外,包括线性氧代-酸类诸如2-氧代丁酸和α-酮戊二酸。牛BCKAD活性中心设计为有利于替代的底物乙酰CoA(Meng和Chuang,Biochemistry 33:12879-12885(1994))。

[0411]

bfmBB	NP_390283.1	枯草杆菌
bfmBAA	NP_390285.1	枯草杆菌
bfmBAB	NP_390284.1	枯草杆菌
pdhD	P21880.1	枯草杆菌
lpdV	P09063.1	恶臭假单胞菌
bkdB	P09062.1	恶臭假单胞菌
bkdA1	NP_746515.1	恶臭假单胞菌
bkdA2	NP_746516.1	恶臭假单胞菌
Bckdha	NP_036914.1	褐鼠
Bckdhb	NP_062140.1	褐鼠
Dbt	NP_445764.1	褐鼠
Dld	NP_955417.1	褐鼠

[0412] 催化丙酮酸转化为乙酰-CoA的丙酮酸脱氢酶复合物也已进行了广泛研究。大肠杆菌酶中,El组分中特定的残基负责底物特异性(Bisswanger,H.J Biol Chem.256:815-822(1981);Eur.J Biochem.8:535-540(1969);Gong等,J Biol Chem.275:13645-13653(2000))。如前所提及的,酶工程工作改善了缺氧状态下大肠杆菌PDH的酶活性(Kim等,Appl.Environ.Microbiol.73:1766-1771(2007);Kim等,J.Bacteriol.190:3851-3858)2008);Zhou等,Biotechnol.Lett.30:335-342(2008))。与大肠杆菌PDH相反,枯草杆菌复合物在缺氧状态下有活性并且必需在缺氧状态下培养(Nakano J.Bacteriol.179:6749-6755(1997))。在甘油上培养期间表征的肺炎克雷伯氏菌PDH在缺氧状态下也有活性(Menzel等,

J.Biotechnol.56:135-142(1997))。来自牛肾地酶复合物的晶体结构(Zhou等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.98:14802-14807(2001))和来自棕色固氮菌的E2催化域是可得到的(Mattevi等,Science 255:1544-1550(1992))。一些哺乳动物PDH酶复合物可对替代底物诸如2-氧代丁酸起作用,虽然褐鼠PDH和BCKAD的比较动力学表明BCKAD对作为底物的2-氧代丁酸具有更高的活性(Paxton等,Biochem.J.234:295-303(1986))。

[0413]

aceE	NP_414656.1	大肠杆菌菌株 K12 亚株 MG1655
aceF	NP_414657.1	大肠杆菌菌株 K12 亚株 MG1655
lpd	NP_414658.1	大肠杆菌菌株 K12 亚株 MG1655
pdhA	P21881.1	枯草杆菌
pdhB	P21882.1	枯草杆菌
pdhC	P21883.2	枯草杆菌
pdhD	P21880.1	枯草杆菌
aceE	YP_001333808.1	肺炎克雷伯氏杆菌 MGH78578
aceF	YP_001333809.1	肺炎克雷伯氏杆菌 MGH78578
lpdA	YP_001333810.1	肺炎克雷伯氏杆菌 MGH78578
Pdha1	NP_001004072.2	褐鼠
Pdha2	NP_446446.1	褐鼠
Dlat	NP_112287.1	褐鼠
Dld	NP_955417.1	褐鼠

[0414] 作为以上所述大的多酶2-酮酸脱氢酶复合物的替代,一些厌氧生物利用2-酮酸氧化还原酶家族(OFOR)中的酶催化2-酮酸类的酰化氧化脱羧。不同于脱氢酶复合物,这些酶包含铁-硫簇,利用不同的辅因子,并且使用铁氧还蛋白或黄素氧还蛋白作为电子受体代替NAD(P)H。虽然该家族的大多数酶以丙酮酸作为特异性底物(POR)一些2酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶已显示接受大量2-酮酸作为底物,包括α-酮戊二酸和2-氧代丁酸(Fukuda and Wakagi Biochim.Biophys.Acta 1597:74-80(2002);Zhang等,J.Biochem.120:587-599(1996))。一种所述酶为来自嗜酸热两面菌超嗜热古菌硫化叶菌7的OFOR,其包含由基因ST2300编码的α和β亚基(Fukuda and Wakagi Biochim.Biophys.Acta 1597:74-80(2002);Zhang等,J.Biochem.120:587-599(1996))。基于质粒的表达系统已发展用于在大肠杆菌中有效表达该蛋白质(Fukuda等,Eur.J.Biochem.268:5639-5646(2001))并且测定了参与底物特异性的残基(Fukuda和Wakagi Biochim.Biophys.Acta 1597:74-80(2002))。来自嗜热泉生古细菌菌株K1的两种OFOR近来也被克隆入大肠杆菌,进行表征并且发现与大量2-酮酸反应(Nishizawa等,FEBS Lett.579:2319-2322(2005))。这些候选OFOR的基因序列为可得到的,虽然其至今不具有指定GenBank标识符。生物信息证据表明类似的酶存在于所有古细菌、一些厌氧细菌和无线粒体真核中(Fukuda和Wakagi Biochim.Biophys.Acta 1597:74-80(2005))。因为还原的铁氧还蛋白可用于通过铁氧还蛋白-NAD还原酶产生NADH,这类酶从能量观点上是令人感兴趣的(Petitdemange等,Biochim.Biophys.Acta 421:334-337(1976))。同时,由于大部分酶设计成能在缺氧状态下起作用,相对于2-酮酸脱氢酶复合物

家族中的酶在缺氧环境中的活性,仅需要少量酶工程设计。

[0415] ST2300 NP_378302.1 超嗜热古菌硫化叶菌7

[0416] 1.2.1.d-氧化还原酶(磷酸化/去磷酸)

[0417] 该类示例性的酶包括3-磷酸甘油醛脱氢酶,其将甘油醛-3-磷酸转化为D-甘油酸1,3-二磷酸盐(例如,大肠杆菌gapA(Branlant and Branlant Eur.J.Biochem.150:61-66(1985),天冬氨酸-半醛脱氢酶,其将L-天冬氨酸-4-半醛转化为L-4-天冬氨酰-磷酸盐(例如,大肠杆菌asd(Biellmann等,Eur.J.Biochem.104:53-58(1980)),N-乙酰-γ-谷氨酰基-磷酸盐还原酶,其将N-乙酰-L-谷氨酸-5-半醛转化为N-乙酰-L-谷氨酰基-5-磷酸盐(例如大肠杆菌argC(Parsot等,Gene 68:275-283(1988)),以及谷氨酸-5-半醛脱氢酶,其将L-谷氨酸-5-半醛转化为L-谷氨酰基-5-磷酸盐(例如,大肠杆菌proA(Smith等,J.Bacteriol.157:545-551(1984))。

[0418]

gapA	P0A9B2.2	大肠杆菌
asd	NP_417891.1	大肠杆菌
argC	NP_418393.1	大肠杆菌
proA	NP_414778.1	大肠杆菌

[0419] 1.3.1.a-氧化还原酶作用于CH-CH供体

[0420] 示例性的烯酰基-CoA还原酶为来自丙酮丁醇梭菌的bed基因产物(Atsumi等,Metab Eng(2007);Boynton等,Journal of Bacteriology 178:3015-3024(1996),其天然催化丁烯酰辅酶A还原为丁酰辅酶A。该酶的活性可通过bed与丙酮丁醇梭菌etfAB基因一起表达而增强,etfAB基因编码电子传递黄素蛋白。烯酰基-辅酶A还原酶步骤的另外的候选物为来自纤细裸藻的线粒体烯酰基-辅酶A还原酶(Hoffmeister等,Journal of Biological Chemistry 280:4329-4338(2005))。源自该序列的构建体在除去其线粒体靶向前导序列后克隆入大肠杆菌中产生有活性的酶(Hoffmeister等,上文,(2005))。该方法为表达真核基因领域的技术人员所熟知,尤其是具有可以将基因产物靶向至原核生物特定胞内区室的前导序列的那些。来自原核类齿垢密螺旋体的该基因的紧密同系物TDE0597代表第三种烯酰基-辅酶A还原酶,其已被克隆并在大肠杆菌中表达(Tucci and Martin FEBS Letters 581:1561-1566(2007))。

[0421]

bcd	NP_349317.1	丙酮丁醇梭菌
etfA	NP_349315.1	丙酮丁醇梭菌
etfB	NP_349316.1	丙酮丁醇梭菌
TER	Q5EU90.1	纤细裸藻

[0422]

TDE0597	NP_971211.1	齿垢密螺旋体

[0423] 示例性的2-烯酸酯还原酶(EC 1.3.1.31)已知催化多种α,β-不饱和羧酸类和醛类的NADH-依赖性还原(Rohdich等,J.Biol.Chem.276:5779-5787(2001))。2-烯酸酯还原酶由一些梭状芽孢杆菌种类中的enr编码(Giesel and Simon Arch Microbiol.135(1):p.51-57(2001),包括酪丁酸梭菌和热乙酸梭菌(现在称为热乙酸穆尔氏菌)(Rohdich等,上文,(2001))。在近来公开的克氏梭菌基因组序列中,已报道了9种烯酸酯还原酶编码序列,其中

之一已被表征(Seedorf等,Proc Natl Acad Sci U.S.A.105(6):2128-33(2008))。来自酪丁酸梭菌和热乙酸梭菌的enr基因已被克隆和测序并且彼此呈现59%同一性。还发现前者基因与克氏梭菌中已表征的基因具有大约75%相似性(Giesel and Simon Arch Microbiol135(l):51-57(1983))。已报道基于这些测序结果,enr非常类似于大肠杆菌中的双烯酰辅酶A还原酶(fadH)(163Rohdich等,上文(2001))。热乙酸梭菌enr基因还以酶切活性形式在大肠杆菌中表达(163Rohdich等,上文(2001))。

	fadH	NP_417552.1	大肠杆菌
	enr	ACA54153.1	肉毒梭菌 A3 菌株
[0424]	*enr*	CAA71086.1	酪丁酸梭菌
	enr	CAA76083.1	克氏梭菌
	enr	YP_430895.1	热醋穆尔氏菌

[0425] 1.4.1.a作用于氨基酸的氧化还原酶

[0426] 作用于氨基酸的大多数氧化还原酶以NAD+或NADP+作为受体催化α-氨基酸的氧化脱氨。作用于氨基酸的示例性的氧化还原酶包括谷氨酸脱氢酶(去氨基),由gdhA编码,亮氨酸脱氢酶(去氨基),由Idh编码,以及天冬氨酸脱氢酶(去氨基),由nadX编码。来自大肠杆菌的gdhA基因产物(Korber等,J.Mol.Biol.234:1270-1273(1993);McPherson and Wootton Nucleic.Acids Res.11:5257-5266(1983)),来自海栖热袍菌的gdh(Kort等,Extremophiles 1:52-60(1997);Lebbink,等,J.Mol.Biol.280:287-296(1998));Lebbink等,J.Mol.Biol.289:357-369(1999)),以及来自盐沼盐杆菌的gdhAl(Ingoldsby等,Gene 349:237-244(2005))催化谷氨酸至2-酮戊二酸和氨的可逆转换,同时分别或一起促成NADP(H),NAD(H)。蜡样芽胞杆菌的Idh基因编码LeuDH蛋白,其具有宽的底物范围,包括亮氨酸,异亮氨酸,缬氨酸和2-氨基丁酸(Ansorge and Kula Biotechnol Bioeng.68:557-562(2000);Stoyan等,J.Biotechnol 54:77-80(1997))。编码天冬氨酸脱氢酶的来自海栖热袍菌的nadX基因参与NAD的生物合成(Yang等,J.Biol.Chem.278:8804-8808(2003))。

	gdhA	P00370	大肠杆菌
	gdh	P96110.4	海栖热袍菌
[0427]	*gdhA1*	NP_279651.1	盐沼盐杆菌
	ldh	P0A393	蜡样芽胞杆菌
	nadX	NP_229443.1	海栖热袍菌

[0428] 由lysDH基因编码的赖氨酸6-脱氢酶(脱氨基)催化L-赖氨酸的ε氨基氧化脱氨以形成2-氨基己二酸-6-半醛,其随后非酶促循环以形成Δ1-哌啶-6-羧酸盐(Misono and Nagasaki J.Bacteriol.150:398-401(1982))。来自嗜热脂肪芽孢杆菌的lysDH基因编码嗜热的NAD-依赖的性赖氨酸6-脱氢酶(Heydari等,Appl Environ.Microbiol 70:937-942(2004))。另外,来自嗜热泉生古细菌K1的lysDH基因通过基因组计划的同源性鉴定。

[0429]	lysDH	AB052732	嗜热脂肪芽孢杆菌
[0430]	lysDH	NP_147035.1	敏捷气热菌K1
[0431]	ldh	P0A393	蜡样芽胞杆菌

[0432] 2.3.1.a-酰基转移酶(转移磷酸基)

[0433] 示例性的磷酸盐转移酰基转移酶包括磷酸转乙酰酶,由pta编码,以及磷酸转丁酰酶,由ptb编码。来自大肠杆菌的pta基因编码可将乙酰-CoA转化为乙酰磷酸盐,反之亦然的酶(Suzuki,T.Biochim.Biophys.Acta 191:559-569(1969))。该过程中该酶还可以利用丙酰基-CoA代替乙酰-CoA以形成丙酸盐(Hesslinger等,Mol.Microbiol 27:477-492(1998))。类似地,来自丙酮丁醇梭菌的ptb基因编码可将丁酰CoA转化为丁酰磷酸盐的酶(Walter等,Gene 134(1):p.107-11(1993));Huang等,J Mol Microbiol Biotechnol 2(1):p.33-38(2000))。可在产丁酸盐细菌L2-50(Louis等,J.Bacteriol.186:2099-2106(2004))和巨大芽孢杆菌(Vazquez等,Curr.Microbiol 42:345-349(2001))中发现另外的ptb基因。

[0434]

pta	NP_416800.1	大肠杆菌
ptb	NP_349676	丙酮丁醇梭菌
ptb	AAR19757.1	产丁酸盐细菌 L2-50
ptb	CAC07932.1	巨大芽孢杆菌

[0435] 2.6.1.a-氨基转移酶

[0436] 天冬氨酸转氨酶将来自天冬氨酸的氨基转移至α-酮戊二酸,形成谷氨酸和草酰乙酸。该转化由例如来自大肠杆菌的aspC(Yagi等,FEBS Lett.100:81-84(1979));Yagi等,Methods Enzymol.113:83-89(1985)),来自酿酒酵母的AAT2(Yagi等,J Biochem.92:35-43(1982))和来自拟南芥的ASP5(48,108,225 48.de la等,Plant J 46:414-425(2006);Kwok and Hanson J Exp.Bot.55:595-604(2004);Wilkie and Warren Protein Expr.Purif.12:381-389(1998))的基因产物催化。缬氨酸转氨酶催化缬氨酸和丙酮酸转化为2-酮异戊酸和丙氨酸。大肠杆菌基因avtA编码一种所述的酶(Whalen and Berg J.Bacteriol.150:739-746(1982))。该基因产物还催化α-丁酮酸的胺化以产生α-氨基丁酸,虽然该反应中的胺供体尚未鉴定(Whalen and Berg J.Bacteriol.158:571-574(1984))。大肠杆菌serC的基因产物催化两种反应,磷酸丝氨酸氨基转移酶和磷酸羟苏氨酸氨基转移酶(Lam and Winkler J.Bacteriol.172:6518-6528(1990)),并且不能检测到对非-磷酸化底物的活性(Drewke等,FEBS.Lett.390:179-182(1996))。

[0437]

aspC	NP_415448.1	大肠杆菌
AAT2	P23542.3	酿酒酵母
ASP5	P46248.2	拟南芥
avtA	YP_026231.1	大肠杆菌
serC	NP_415427.1	大肠杆菌

[0438] Cargill已开发了β-丙氨酸/α-酮戊二酸氨基转移酶用于从β-丙氨酸经丙二酰基半醛生产3-HP(PCT/US2007/076252(Jessen等,))。克氏酵母中SkPYD4的基因产物也表现出优先使用β-丙氨酸作为氨基供体(Andersen等,FEBS.J.274:1804-1817(2007))。SkUGA1编码酿酒酵母GABA氨基转移酶的同源物UGA1(Ramos等Eur.J.Biochem.149:401-404(1985)),而SkPYD4编码参与β-丙氨酸和GABA氨基转移的酶(Andersen等,FEBS.J.274:1804-1817

(2007))。3-氨基-2-丙酸甲酯氨基转移酶催化甲基丙二酸半醛转化为3-氨基-2-丙酸甲酯。该酶已在褐鼠和野猪中表征并且由Abat编码(Kakimoto等,Biochim.Biophys.Acta 156:374-380(1968);Tamaki等,Methods Enzymol.324:376-389(2000))。与3-氨基-2-丙酸甲酯氨基转移酶具有高序列同源性的其他生物中的候选酶包括线虫中的Gta-1和芽孢杆菌中的gabT。另外,由基因gabT编码的大肠杆菌中的一种天然GABA氨基转移酶已显示具有宽的底物特异性(Liu等,Biochemistry 43:10896-10905(2004);Schulz等,Appl Environ Microbiol 56:1-6(1990))。puuE的基因产物催化大肠杆菌中的另一种4-氨基丁酸氨基转移酶(Kurihara等,J.Biol.Chem.280:4602-4608(2005))。

[0439]

SkyPYD4	ABF58893.1	克氏酵母
SkUGA1	ABF58894.1	克氏酵母
UGA1	NP_011533.1	酿酒酵母
Abat	P50554.3	褐鼠
Abat	P80147.2	野猪

[0440]

Gta-1	Q21217.1	秀丽隐杆线虫
gabT	P94427.1	芽孢杆菌
gabT	P22256.1	大肠杆菌 K12
puuE	NP_415818.1	大肠杆菌 K12

[0441] 已报道了大肠杆菌4-氨基丁酸氨基转移酶未结合和结合抑制剂的X射线晶体结构(Liu等,Biochemistry 43:10896-10905(2004))。已研究和提示了该底物结合和底物特异性。通过定点诱变和X-射线晶体衍射研究了活性位点残基的作用(Liu等,Biochemistry 44:2982-2992(2005))。基于该结构信息,尝试设计大肠杆菌4-氨基丁酸氨基转移酶使其具有新的酶活性。蒂斯研究提供了开发用于BDO途径的氨基转移酶活性的基础。

[0442] 2.7.2.a-磷酸转移酶,羧基受体

[0443] 示例性的激酶包括大肠杆菌乙酰激酶,由ackA编码(Skarstedt and Silverstein J.Biol.Chem.251:6775-6783(1976)),丙酮丁醇梭菌丁酸激酶,由bukl和buk2编码(Walter等,Gene 134(1):107-111(1993)(Huang等,JMol Microbiol Biotechnol 2(1):33-38(2000)),和大肠杆菌γ-谷氨酰基激酶,由proB编码(Smith等,J.Bacteriol.157:545-551(1984))。该酶分别磷酸化乙酸盐,丁酸盐和谷氨酸盐。来自大肠杆菌的ackA基因产物还磷酸化丙酸盐(Hesslinger等,Mol.Microbiol 27:477-492(1998))。

[0444]

ackA	NP_416799.1	大肠杆菌
buk1	NP_349675	丙酮丁醇梭菌
buk2	Q97II1	丙酮丁醇梭菌
proB	NP_414777.1	大肠杆菌

[0445] 2.8.3.a-辅酶-A移转酶

[0446] 辅酶A-移转酶家族中,大肠杆菌酶酰基-CoA:乙酸盐-CoA移转酶,亦称乙酸盐-CoA移转酶(EC 2.8.3.8),已显示从多种支链和线性酰基-CoA底物转移CoA部分至乙酸盐,包括异丁酸盐(Matthies and Schink,App.Environ.Microbiol.58:1435-1439(1992))、戊酸盐

(Vanderwinkel等,Biochem.Biophys.Res Commun.33:902-908(1968))和丁酸酯(Vanderwinkel等,上文(1968a))。该酶由大肠杆菌K12的atoA(α亚基)和atoD(β亚基)(Korolev等,Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr.58:2116-2121(2002);Vanderwinkel,上文(1968))和谷氨酸棒杆菌ATCC 13032中的actA和cg0592(Duncan等,Appl Environ Microbiol 68:5186-5190(2002))编码。通过序列同源性发现的另外的基因包括大肠杆菌UT189中的atoD和atoA。

[0447]

atoA	P76459.1	大肠杆菌 K12
atoD	P76458.1	大肠杆菌 K12
actA	YP_226809.1	谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032
cg0592	YP_224801.1	谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032
atoA	ABE07971.1	大肠杆菌 UT189
atoD	ABE07970.1	大肠杆菌 UT189

[0448] 类似的转化由克氏梭菌的cat1,cat2和cat3基因产物催化,其显示分别表现出琥珀酰-CoA,4-羟基丁酰-CoA和丁酰CoA乙酰基转移酶活性(Seedorf等,Proc Natl Acad Sci U.S.A.105(6):2128-2133(2008);Sohling and Gottschalk/Bacteriol 178(3):871-880(1996))。

[0449] cat1 P38946.1 克氏梭菌

[0450] cat2 P38942.2 克氏梭菌

[0451] cat3 EDK35586.1 克氏梭菌

[0452] 来自厌氧菌发酵氨基酸球菌的戊烯二酸-CoA-移转酶(EC 2.8.3.12)与二酸戊烯二酰CoA和3-丁烯酰基-CoA反应(Mack and Buckel FEBSLett.405:209-212(1997))。编码该酶的基因为gctA和gctB。该酶对其他的CoA衍生物具有降低的但可检测的活性,包括戊二酰CoA,2-羟戊二基-CoA,-CoA和丙烯酰-CoA(Buckel等,Eur.J.Biochem.118:315-321(1981))。该酶已在大肠杆菌中克隆和表达(Mac等,Eur.J.Biochem.226:41-51(1994))。

[0453] gctA CAA57199.1 发酵氨基酸球菌

[0454] gctB CAA57200.1 发酵氨基酸球菌

[0455] 3.1.2.a-硫羟酸酯水解酶(CoA特异性的)

[0456] 在辅酶A水解酶家族中,酶3-羟异丁酰基-辅酶A水解酶对3-HIBCoA特异并且已描述其有效催化缬氨酸降解期间的所需转化(Shimomura等,J Biol Chem 269:14248-14253(1994))。编码该酶的基因包括褐鼠(Shimomura等,上文(1994);Shimomura等,Methods Enzymol.324:229-240(2000)和人类(Shimomura等,上文,2000)的hibch。

[0457] 具有序列同源性的候选基因包括酿酒酵母的hibch和蜡样芽胞杆菌的BC_2292。

[0458]

hibch	Q5XIE6.2	褐鼠
hibch	Q6NVY1.2	人类
hibch	P28817.2	酿酒酵母
BC_2292	Q81DR3	蜡样芽胞杆菌

[0459] 己二酰-辅酶A转化为己二酸酯可通过酰基-辅酶A水解酶或对等的硫酯酶进行。主

要的大肠杆菌候选基因为tesB(Naggert等,J Biol Chem.266(17):11044-11050(1991)),其呈现与人acoiH的高相似性,而acoiH为对己二酰-辅酶A具有活性的二羧酸乙酰基转移酶(Westin等,J Biol Chem 280(46):38125-38132(2005))。该活性还在鼠肝脏中被表征(Deana,Biochem Int.26(4):p.767-773(1992))。

[0460] tesB NP_414986 大肠杆菌

[0461] acot8 CAA15502 人类

[0462] acot8 NP_570112 褐鼠

[0463] 其他潜在的大肠杆菌硫羟酸酯水解酶包括tesA(Bonner and Bloch,J Biol Chem.247(10):3123-3133(1972)),ybgC(Kuznetsova等,FEMS Microbiol Rev.29(2):263-279(2005);Zhuang等,FEBS Lett.516(1-3):161-163 2002)),paaI(Song等,J Biol Chem.281(16):11028-11038(2006))以及ybdB(Leduc等,J Bacteriol.189(19):7112-7126(2007))的基因产物。

[0464]

tesA	NP_415027	大肠杆菌
ybgC	NP_415264	大肠杆菌
paaI	NP_415914	大肠杆菌
ybdB	NP_415129	大肠杆菌

[0465] 一些真核的乙酰-CoA水解酶(EC 3.1.2.1)具有宽的底物特异性。来自褐鼠脑的酶(Robinson等,Biochem.Biophys.Res.Commun.71:959-15 965(1976))可与丁酰辅酶A,己酰-辅酶A和丙二酰基辅酶A反应。

[0466] acot12 NP_570103.1 褐鼠

[0467] 4.1.1.a-羰基裂解酶

[0468] 示例性的羰基裂解酶为乙酰乳酸脱羧酶,其参与柠檬酸盐分解代谢和支链氨基酸生物合成,将2-乙酰乳酸转化为3-羟基丁酮。乳酸乳球菌的该酶由六个亚基组成,其由基因aldB编码,并且由缬氨酸,亮氨酸和异亮氨酸激活(Goupil等,Appl.Environ.Microbiol.62:2636-2640(1996);Goupil-Feuillerat等,J.Bacteriol.182:5399-5408(2000))。该酶已在大肠杆菌中过表达且表征(Phalip等,FEBS Lett.351:95-99(1994))。其他生物中该酶为二聚物,由嗜热链球菌中的aldC(Monnet等,Lett.Appl.Microbiol.36:399-405(2003)),短芽孢杆菌中的aldB(Diderichsen等,J.Bacteriol.172:4315-4321(1990);Najmudin等,Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.59:1073-1075(2003))以及来自产气肠杆菌的budA(Diderichsen等,J.Bacteriol.172:4315-4321(1990))编码。来自短芽孢杆菌的该酶已在枯草杆菌中克隆和过表达并且已经过晶体表征(Najmudin等,Acta Crystallogr.D.Biol.Crystallogr.59:1073-30 1075(2003))。另外,已纯化和表征了来自乳酸明串珠菌的酶但没有分离该基因(O'Sullivan等,FEMS Microbiol.Lett.194:245-249(2001))。

[0469]

aldB	NP_267384.1	乳酸乳球菌
aldC	Q8L208	嗜热链球菌
aldB	P23616.1	短芽孢杆菌
budA	P05361.1	产气肠杆菌

[0470] 乌头酸脱羧酶催化假丝酵母菌株以及丝状真菌土曲霉中衣康酸生物合成中的最后一步(Bonnarme等,J Bacteriol.177:3573-3578(1995);Willke and Vorlop Appl Microbiol Biotechnol 56:289-295(2001))。虽然衣康酸为生物技术目的化合物,但至今尚未报道乌头酸脱羧酶的基因或蛋白序列。

[0471] 已从许多生物分离且表征了4-草酰巴豆酸酯脱羧酶。

[0472] 编码该酶的基因包括假单胞菌属(菌株600)中的dmpH和dmpE(Shingler等,J Bacteriol.174:711-724(1992)),来自恶臭假单胞菌的xylll和xyllll(Kato和Asano Arch.Microbiol 168:457-463(1997);Lian和Whitman,J.Am.Chem.Soc.116:10403-10411(1994);Stanley等,Biochemistry 39:3514(2000))和来自真氧产碱杆菌JMP134的Reut_B5691和Reut_B5692(Hughes等,J Bacteriol.158:79-83(1984))。已克隆并在大肠杆菌中表达了来自假单胞菌属(菌株600)的编码该酶的基因(Shingler等,J Bacteriol.174:711-724(1992))。

[0473]

dmpH	CAA43228.1	假单胞菌属 CF600
dmpE	CAA43225.1	假单胞菌属 CF600
xylII	YP_709328.1	恶臭假单胞菌

[0474]

xylIII	YP_709353.1	恶臭假单胞菌
Reut_B5691	YP_299880.1	真氧产碱杆菌 JMP134
Reut_B5692	YP_299881.1	真氧产碱杆菌 JMP134

[0475] 已表征了另外的脱羧酶类,其催化肉桂酸盐(苯基丙烯酸盐)和替代的肉桂酸盐衍生物转化为对应的苯乙烯衍生物。这些酶在多种生物中为共同的且已克隆且在大肠杆菌中表达的那些酶的特定基因为:来自酿酒酵母的pad1(Clausen等,Gene 142:107-112(1994)),来自植物乳杆菌的pdc(Barthelmebs等,Appl Environ Microbiol 67:1063-1069(2001);Qi等,Metab Eng 9:268-27630(2007);Rodriguez等,J.Agric.Food Chem.56:3068-3072(2008)),来自产酸克雷伯氏菌(Hashidoko等,Biosci.Biotech.Biochem.58:217-218(1994);Uchiyama等,Biosci.Biotechnol.Biochem.72:116-123(2008)),戊糖片球菌的pofK(pad)(Barthelmebs等,Appl Environ Microbiol 67:1063-1069(2001)),和来自枯草杆菌和短小芽胞杆菌的padC(Lingen等,Protein Eng 15:585-593(2002))。还纯化和表征了来自荧光假单胞菌的阿魏酸脱羧酶(Huang等,J.Bacteriol.176:5912-5918(1994))。重要地,已显示该类酶是稳定的且不需要外源或内源结合辅因子,由此使得这些酶理论上适于生物转化(Sariaslani,Annu.Rev.Microbiol.61:51-69(2007))。

[0476]

pad1	AB368798	酿酒酵母
pdc	U63827	植物乳杆菌
pofK (pad)	AB330293	产酸克雷伯氏菌
padC	AF017117	枯草杆菌
pad	AJ276891	戊糖片球菌
pad	AJ278683	短小芽胞杆菌

[0477] 另外的脱羧酶可从α-酮戊二酸形成琥珀酸半醛。这些包括来自纤细裸藻的α-酮戊二酸脱羧酶(Shigeoka等,Biochem.J.282(Pt 2):319-323(1992);Shigeoka and Nakano Arch.Biochem.Biophys.288:22-28(1991);Shigeoka and Nakano Biochem.J.292(Pt 2):463-467(1993)),其相应的基因序列还有待于测定,以及来自结核分枝杆菌的α-酮戊二酸脱羧酶(Tian等,Proc Natl Acad Sci U.S.A.102:10670-10675(2005))。另外,谷氨酸脱羧酶可将谷氨酸盐转化为4-氨基丁酸,诸如大肠杆菌gadA和gadB基因的产物(De Biase等,Protein.Expr.Purif.8:430-438(1993))。

[0478] kgd 050463.4 结核分枝杆菌

[0479] gadA NP_417974 大肠杆菌

[0480] gadB NP_416010 大肠杆菌

[0481] 酮酸脱羧酶

[0482] 丙酮酸脱羧酶(PDC,EC 4.1.1.1),也称为酮酸脱羧酶,为酒精发酵、催化丙酮酸脱羧至乙醛的关键酶。该酶对脂族2-酮酸类,包括2-丁酮酸、2-戊酮酸、3-羟基丙酮酸和2-苯丙酮酸具有宽的底物范围(Berg等,Science 318:1782-1786 25(2007))。来自运动发酵单胞菌的PDC由pdc编码,已成为直接设计研究以改变对不同底物亲和力的主题(Siegert等,Protein Eng Des Sel 18:345-357(2005))。也对来自酿酒酵母的PDC进行了广泛研究,设计以改变活性,并且在大肠杆菌中功能性地表达(Killenberg-Jabs等,Eur.J.Biochem.268:1698-1704(2001);Li and Jordan Biochemistry 38:10004-10012(1999);ter Schure等,Appl.Environ.Microbiol.64:1303-1307(1998))。该酶的晶体结构是可得到的(Killenberg-Jabs Eur.J.Biochem.268:1698-1704(2001))。其他更好地表征的候选PDC包括来自巴氏醋杆菌(Chandra等,Arch.Microbiol.176:443-451(2001))和乳酸克卢费氏酵母(Krieger等,Eur.J.Biochem.269:3256-3263(2002))的酶。

[0483]

基因	GenBank ID	生物
pdc	P06672.1	运动发酵单胞菌
pdc1	P06169	酿酒酵母
pdc	Q8L388	巴氏醋杆菌
pdc1	Q12629	乳酸克卢费氏酵母

[0484] 如PDC,苯甲酰甲酸脱羧酶(EC 4.1.1.7)具有宽的底物范围并且已成为酶工程研究的靶标。已广泛研究了来自恶臭假单胞菌的酶并且可得到该酶的晶体结构(Hasson等,Biochemistry 37:9918-9930(1998);Polovnikova等,Biochemistry 42:1820-1830(2003))。来自恶臭假单胞菌酶活性中心中两个残基的定点诱变改变了对自然和非自然存

在底物的亲和力(Km)(Siegert等,Protein Eng Des Sel 18:345-357(2005))。该酶的性质进一步通过定点设计修饰(Lingen等,Protein Eng 15:585-593(2002));Lingen Chembiochem 4:721-726(2003))。来自绿脓杆菌的该酶由mdlC编码,也经过了实验表征(Barrowman等,FEMS Microbiology Letters 34:57-60(1986))。来自施氏假单胞菌,荧光假单胞菌和其他生物的另外的候选基因可通过序列同源性推断或利用恶臭假单胞菌中开发的培养选择系统鉴定(Henning等,Appl.Environ.Microbiol.72:7510-7517(2006))。

[0485]

mdlC	P20906.2	恶臭假单胞菌
mdlC	Q9HUR2.1	绿脓杆菌
dpgB	ABN80423.1	施氏假单胞菌
ilvB-1	YP_260581.1	荧光假单胞菌

[0486] 4.2.1.a-水裂解酶

[0487] 巴氏真细菌的2-(羟甲基)戊二酸脱水酶为示例性的水裂解酶。该酶已在烟酸盐分解代谢的内容中研究并且由hmd编码(Alhapel等,Proc Natl Acad Sci USA 103:12341-12346(2006))。具有高序列同源性的类似的酶在多毛拟杆菌,Anaerotruncus colihominis和Natranaerobius thermophilius中发现。

[0488]

hmd	ABC88407.1	巴氏真细菌
BACCAP_02294	ZP_02036683.1	多毛拟杆菌 ATCC 29799
ANACOL_02527	ZP_02443222.1	*Anaerotruncus colihominis* DSM 17241
NtherDRAFT_2368	ZP_02852366.1	*Natranaerobius thermophilus* JW/NM-WN-LF

[0489] 第二种示例性的水裂解酶为延胡索酸水化酶,其催化苹果酸盐至延胡索酸盐的脱水。该酶有很多现有的结构信息并且研究人员已成功设计该酶以改变活性,抑制作用和局限性(Weaver,T.Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr.61:1395-1401(2005))。另外的延胡索酸盐水化酶包括由来自大肠杆菌(Estevez等,Protein Sci.11:1552-1557(2002);Hong and Lee Biotechnol.Bioprocess Eng.9:252-255(2004);Rose and Weaver Proc Natl Acad Sci U S.A 101:3393-3397(2004)),空肠弯曲杆菌(Smith等,Int.JBiochem.CellBiol 31:961-975(1999))和嗜热栖热菌(Mizobata等,Arch.Biochem.Biophys.355:49-55(1998))的fumC,以及来自褐鼠的fumH(Kobayashi等,J Biochem.89:1923-1931(1981))编码的那些。具有高序列同源性的类似的酶包括来自拟南芥的fum1和来自谷氨酸棒杆菌的fumC。

[0490]

fumC	P05042.1	大肠杆菌 K12
fumC	O69294.1	空肠弯曲杆菌
fumC	P84127	嗜热栖热菌
fumH	P14408.1	褐鼠
fum1	P93033.2	拟南芥
fumC	Q8NRN8.1	谷氨酸棒杆菌

[0491] 柠苹酸水合酶,也称为2-苹果酸脱水酶,将2-苹果酸盐转化为中康酸盐。2-苹果酸脱水酶活性在谷氨酸盐降解VI途径环境中在破伤风形梭状芽胞杆菌,摩氏摩根氏菌,无丙

二酸柠檬酸杆菌中检测(Kato and Asano Arch.Microbiol 168:457-463(1997));然而编码该酶的基因至今没有测序。

[0492] 来自丙酮丁醇梭菌的crt基因产物催化3-羟基丁酰-CoA脱水为丁酰辅酶A(Atsumi等,Metab Eng 29(2007);Boynton等,Journal of Bacteriology 3-3024(1996))。恶臭假单胞菌的烯酰基-辅酶A水化酶,phaA和phaB被认为在苯乙酸盐分解代谢期间进行双链的羟基化;(Olivera等,Proc Natl Acad Sci USA 95(11):6419-6424(1998))。来自荧光假单胞菌的paaA和paaB催化类似的转化(140livera等,上文,1998))。最后,已显示许多大肠杆菌基因表现出烯酰CoA水合酶功能,包括maoC(Park and Lee J Bacteriol 185(18):5391-5397((2003)),paaF(Park and Lee Biotechnol Bioeng.86(6):681-686(2004a));Park and Lee Appl Biochem Biotechnol.113-116:30335-346(2004b));Ismail等,Eur J Biochem 270(14):p.3047-3054(2003),以及paaG(Park和Lee,上文,2004;Park和Lee上文,2004b;Ismail等,上文,2003)。

[0493]

maoC	NP_415905.1	大肠杆菌
paaF	NP_415911.1	大肠杆菌
paaG	NP_415912.1	大肠杆菌
crt	NP_349318.1	丙酮丁醇梭菌
paaA	NP_745427.1	恶臭假单胞菌
paaB	NP_745426.1	恶臭假单胞菌
phaA	ABF82233.1	荧光假单胞菌
phaB	ABF82234.1	荧光假单胞菌

[0494] 大肠杆菌基因fadA和fadB编码多酶复合物,其表现出酮脂酰-辅酶A硫基裂解酶,3-羟酰-辅酶A脱氢酶和烯酰CoA水合酶活性(Yang等,Biochemistry 30(27):p.6788-6795(1991);Yang等,J Biol Chem 265(18):p.10424-10429(1990);Yang等,J Biol Chem 266(24):p.16255(1991);Nakahigashi and Inokuchi Nucleic Acids Res 18(16):p.4937(1990))。fadI和fadJ基因编码类似的功能并且仅厌氧自然表达(Campbell等,Mol Microbiol 47(3):p.793-805(2003))。之前已经描述了用于在大肠杆菌中生产聚[(R)-3-羟基丁酸]的方法,其涉及激活fadB(通过基因敲除阴性调节者fadR)和共-表达非-天然的酮硫解酶(来自真氧产碱杆菌的phaA)(Sato等,J Biosci Bioeng 103(1):38-44(2007))。该工作清楚地表明β-氧化还原酶,尤其是编码3-羟酰-辅酶A脱氢酶和烯酰CoA水合酶活性的fadB的基因产物可作为途径的一部分起作用以从乙酰-CoA前体产生更长链的分子。

[0495]

fadA	YP_026272.1	大肠杆菌
fadB	NP_418288.1	大肠杆菌
fadI	NP_416844.1	大肠杆菌
fadJ	NP_416843.1	大肠杆菌
fadR	NP_415705.1	大肠杆菌

[0496] 4.3.1.a-氨-裂解酶

[0497] 催化天冬氨酸至延胡索酸去氨基的天冬氨酸酶(EC 4.3.1.1)为微生物中广泛分

布的酶，并且已经广泛表征(Viola,R.E.Adv.Enzymol.Relat Areas Mol.Biol 74:295-341(2000))。已经解析了由aspA编码的大肠杆菌天冬氨酸酶的晶体结构(Shi等,Biochemistry 36:9136-9144(1997))。大肠杆菌酶也显示与替代的底物天冬氨酸苯甲酯，天冬酰胺，苄基-天冬氨酸和苹果酸盐反应(Ma等,Ann N.Y.Acad Sci 672:60-65(1992))。在各个研究中，对该酶采用定向进化以改变底物特异性(Asano等,Biomol.Eng 22:95-101(2005))。还在流感嗜血杆菌(Sjostrom等,Biochim.Biophys.Acta 1324:182-190(1997))，荧光假单胞菌(Takagi等，J.Biochem.96:545-552(1984))，芽孢杆菌(Sjostrom等，Biochim.Biophys.Acta 1324:182-190(1997))和灵杆菌(Takagi和Kisumi J Bacteriol.161:1-6(1985))中表征了具有天冬氨酸酶功能的酶。

[0498]

aspA	NP_418562	大肠杆菌 K12 亚株 MG1655
aspA	P44324.1	流感嗜血杆菌
aspA	P07346.1	荧光假单胞菌
ansB	P26899.1	芽孢杆菌
aspA	P33109.1	灵杆菌

[0499] 3-甲基天冬氨酸酶(EC 4.3.1.2)，亦称β-甲基天冬氨酸酶或3-甲基天冬氨酸氨-裂解酶，催化对映-3-甲基天冬氨酸去氨基为中康酸盐。已经克隆了来自破伤风形梭状芽胞杆菌的3-甲基天冬氨酸酶，在大肠杆菌中功能性表达，并且结晶(Asuncion等,Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr.57:731-733(2001);Asuncion等,Biol Chem.277:8306-8311(2002);Botting等,Biochemistry 27:2953-2955(1988);Goda等,Biochemistry 31:10747-10756(1992)。无丙二酸柠檬酸杆菌中，该酶由BAA28709编码(Kato和Asano Arch.Microbiol 168:457-463(1997))。还从大肠杆菌YG1002结晶3-甲基天冬氨酸酶(Asano和Kato FEMS Microbiol Lett.118:255-258(1994))，虽然该蛋白质的序列没有登记在公共数据库诸如GenBank中。序列同源性可用于鉴定另外的候选基因，包括破伤风梭菌中的CTC_02563和大肠杆菌0157:H7中的ECs0761。

[0500]

MAL	AAB24070.1	破伤风形梭状芽胞杆菌
BAA28709	BAA28709.1	无丙二酸柠檬酸杆菌
CTC_02563	NP_783085.1	破伤风杆菌
ECs0761	BAB34184.1	大肠杆菌 0157: H7 菌株 Sakai

[0501] 形成烯酰基-辅酶A产物的候选氨-裂解酶包括β-丙氨酰辅酶A氨-裂解酶(EC 4.3.1.6)，其脱去β-丙氨酰辅酶A的氨基，以及3-氨基丁酰-辅酶A氨-裂解酶(EC 4.3.1.14)。已经在丙酸梭菌中鉴定和表征了两种β-丙氨酰辅酶A氨裂解酶(Herrmann等，FEBS J.272:813-821(2005))。至今尚未研究其他的β-丙氨酰辅酶A氨裂解酶，但可通过序列相似性鉴定候选基因。一种所述候选物为黄色粘球菌的MXAN_4385。

[0502] ac12 CAG29275.1 丙酸梭菌

[0503] acl1 CAG29274.1 丙酸梭菌

[0504] MXAN_4385 YP_632558.1 黄色粘球菌

[0505] 5.3.3.a-异构酶

[0506] 来自氨基丁酸梭菌和克氏梭菌的4-羟基丁酰-辅酶A脱水酶催化4-羟基丁酰-辅酶A与丁烯酰辅酶A的可逆转化并且具有内在的乙烯基乙酰基-辅酶A△异构酶活性(Scherf and Buckel Eur.J Biochem.215:421-429(1993);Scherf等,Arch.Microbiol 161:239-245(1994))。纯化和表征了两种天然的酶,包括N-末端氨基酸序列(Scherf and Buckel,上文,1993;Scherf等,上文,1994)。来自氨基丁酸梭菌和克氏梭菌的abfD基因与这些N-末端氨基酸序列精确匹配,因此编码4-羟基丁酰-辅酶A脱水酶/乙烯基乙酰基-辅酶A△异构酶。另外,通过基因组计划的同源性鉴定了来自牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277的abfD基因。

[0507] abfD YP_001396399.1 克氏梭菌DSM 555

[0508] abfD P55792 氨基丁酸梭菌

[0509] abfD YP_001928843 牙龈卟啉单胞菌ATCC 33277

[0510] 5.4.3.a-氨基变位酶

[0511] 赖氨酸2,3-氨基变位酶(EC 5.4.3.2)为将赖氨酸转化为(3S)-3,6-二氨基己酸酯的示例性的氨基变位酶,其将胺基从2位转移至3位。该酶在将赖氨酸发酵至乙酸和丁酸盐的那些细菌中发现,包括如具核梭杆菌(kamA)(Barker等,J.Bacteriol.152:201-207(1982))和近端梭菌(kamA)(Chirpich等,J.Biol.Chem.245:1778-1789(1970))。已经结晶了来自近端梭菌的该酶(Lepore等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 102:13819-13824(2005))。编码该功能的酶也由芽孢杆菌的yodO编码(Chen等,Biochem.J.348Pt 3:539-549(2000))。该酶利用吡哆醛5'-磷酸盐作为辅因子,需要通过S-腺苷甲硫氨酸激活,并且仅立体选择性地与L-赖氨酸反应。该酶尚未显示与替代底物反应。

[0512] yodO 034676.1 芽孢杆菌

[0513] kamA Q9XBQ8.1 近端梭菌

[0514] kamA Q8RHX4 具核梭杆菌亚株nuleatum

[0515] 第二种氨基变位酶,β-赖氨酸5,6-氨基变位酶(EC 5.4.3.3)催化赖氨酸发酵至乙酸和丁酸盐的下一步,其将(3S)-3,6-二氨基己酸酯转化为(3S,5S)-3,5-二氨基己酸酯,将末端胺基从6位点转移至5位。该酶还催化催化赖氨酸转化为2,5-二氨基己酸酯并且也称为赖氨酸-5,6-氨基变位酶(EC 5.4.3.4)。该酶已在斯氏梭菌中结晶(kamD,kamE)(Berkovitch等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A101:15870-15875(2004))。还表征了来自牙龈卟啉单胞菌的该酶(Tang等,Biochemistry 41:8767-8776(2002))。

[0516]

kamD	AAC79717.1	斯氏梭菌
kamE	AAC79718.1	斯氏梭菌
kamD	NC_002950.2	牙龈卟啉单胞菌 W83
kamE	NC_002950.2	牙龈卟啉单胞菌 W83

[0517] 鸟氨酸4,5-氨基变位酶(EC 5.4.3.5)将D-鸟氨酸转化为2,4-二氨基戊酸,还将末端胺转移至邻近的碳。来自斯氏梭菌的该酶由两种基因oraE和oraS编码,并且已经被克隆,测序且在大肠杆菌中表达(Chen等,J.Biol.Chem.276:44744-44750(2001))。至今尚未在其他生物中表征该酶。

[0518] oraE AAK72502 斯氏梭菌

[0519] oraS AAK72501 斯氏梭菌

[0520] 酪氨酸2,3-氨基变位酶(EC 5.4.3.6)参与酪氨酸的生物合成,通过将胺从2位转移至3位而可逆转化酪氨酸为3-氨基-3-(4-羟苯基)丙酸酯。球孢链霉菌中该酶还显示与酪氨酸衍生物反应(Christenson等,Biochemistry 42:12708-12718(2003))。目前没有序列信息。

[0521] 亮氨酸2,3-氨基变位酶(EC 5.4.3.7)在亮氨酸降解和生物合成期间将L-亮氨酸转化为β-亮氨酸。用于亮氨酸2,3-氨基变位酶的测定法检测了许多生物中的活性(Poston,J.M.Methods Enzymol.166:130-135(1988)),但编码该酶的基因至今没有鉴定。

[0522] Cargill已开发了新的2,3-氨基变位酶以将L-丙氨酸转化为P-丙氨酸,由此产生从丙酮酸至3-HP的四个生物化学步骤的途径(Liao等,美国公开No.2005-0221466)。

[0523] 6.2.1.a-酸-硫羟连接酶

[0524] 示例性的酸-硫羟连接酶为大肠杆菌sucCD的基因产物,其在消耗一个ATP时共同催化从琥珀酸形成琥珀酰-辅酶A,其为体内可逆反应(Buck等,Biochemistry 24(22):p.6245-6252(1985))。另外示例性的CoA-连接酶包括鼠乙基酯-辅酶A连接酶,其序列仍未表征(Vamecq等,Biochem J.230(3):p.683-693(1985)),来自产黄青霉的两个已表征苯乙酸盐-辅酶A连接酶的任何一个(Lamas-Maceiras等,Biochem J 395(1):147-155(2006);Wang等,Biochem Biophys Res Commun,360(2):453-458(2007)),来自恶臭假单胞菌的苯乙酸盐-辅酶A连接酶(Martinez-Bianco等,J Biol Chem.265(12):7084-7090(1990))和来自枯草杆菌的6-羰基己酸-辅酶A连接酶(Bower等,J Bacteriol 178(14):4122-4130(1996))。

[0525]	*sucC*	NP_415256.1	大肠杆菌
	sucD	AAC73823.1	大肠杆菌
	phl	CAJ15517.1	产黄青霉
	phlB	ABS19624.1	产黄青霉
	paaF	AAC24333.2	恶臭假单胞菌
[0526]	*bioW*	NP_390902.2	枯草杆菌

[0527] 实施例V来自琥珀酰-辅酶A的示例性的BDO途径

[0528] 该实施例描述了来自琥珀酰-辅酶A的示例性的BDO途径。

[0529] 来自琥珀酰-辅酶A的BDO途径在本文描述并且之前已被描述(参见2008年3月14日提交的美国申请系列No.12/049,256和2008年3月14日提交的PCT申请系列No.US08/57168,每篇在此作为参考引入)。另外的途径在图8A中显示。所述示例性的BDO途径的酶与编码这些酶的基因一起列于表15中。

[0530] 简要地,琥珀酰-辅酶A可通过琥珀酰-辅酶A还原酶(或琥珀酸半醛脱氢酶)(EC 1.2.1.b)转化为琥珀酸半醛。如前所述,琥珀酸半醛可通过4-羟基丁酸脱氢酶(EC 1.1.1.a)转变为4-羟基丁酸。或者,琥珀酰-辅酶A可通过琥珀酰-辅酶A还原酶(醇形成)(EC 1.1.1.c)转化为4-羟基丁酸。如前所述,4-羟基丁酸可通过4-羟基丁酰-辅酶A移转酶(EC 2.8.3.a),或通过4-羟基丁酰-辅酶A水解酶(EC 3.1.2.a)或4-羟基丁酰-辅酶A连接酶(或4-羟基丁酰-辅酶A合成酶)(EC6.2.1.a)转化为4-羟基丁酰-辅酶A。或者,如前所述4-羟基丁酸可通过4-羟基丁酸激酶(EC 2.7.2.a)转化为4-羟基丁酰-磷酸盐。如前所述,4-羟基丁

酰-磷酸盐可通过磷酸转-4-羟基丁酰酶(EC 2.3.1.a)转化为4-羟基丁酰-辅酶A。或者,4-羟基丁酰-磷酸盐可通过4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)(EC 1.2.1.d)转化为4-羟基丁醛。4-羟基丁酰-辅酶A可通过4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(或4-羟基丁醛脱氢酶)(EC 1.2.1.b)转化为4-羟基丁醛。或者,4-羟基丁酰-辅酶A可通过4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成)(1.1.1.c)转化为1,4-丁二醇。如前所述,4-羟基丁醛可通过1,4-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.a)转化为1,4-丁二醇。

[0531]

表15.自琥珀酰-辅酶A的BDO途径

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
8A	1.2.1.b	琥珀酰-辅酶A	琥珀酸半醛	琥珀酰-辅酶A还原酶(或琥珀酸半醛脱氢酶)	*sucD*	P38947.1	*克氏梭菌*	琥珀酰-辅酶A
					sucD	NP_904963.1	*牙垢卟啉单胞菌*	琥珀酰-辅酶A
					Msed_0709	YP_001190808.1	*勤奋金属球菌*	丙二酰基辅酶A
8A	1.1.1.a	琥珀酸半醛	4-羟基丁酸	4-羟基丁酸脱氢酶	*4hbd*	YP_726053.1	*真氧产碱杆菌H16*	4-羟基丁酸
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌DSM 555*	4-羟基丁酸
					4hbd	Q94B07	*拟南芥*	4-羟基丁酸
8A	1.1.1.c	琥珀酰-辅酶A	4-羟基丁酸	琥珀酰-辅酶A还原酶(醇形成)	*adhE2*	AAK09379.1	*丙酮丁醇梭菌*	丁基-辅酶A
					mcr	AAS20429.1	*橙色绿屈挠菌*	丙二酰基辅酶A
					FAR	AAD38039.1	*加州希蒙得木*	长链酰基-辅酶A
8A	2.8.3.a	4-羟基丁酸	4-羟基丁酰-辅酶A	4-羟基丁酰-辅酶A移转酶	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*克氏梭菌*	琥珀酸酯,4-羟基丁酸酯,丁酸酯
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*发酵氨基酸球菌*	戊二酸
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*大肠杆菌*	丁酸酯
8A	3.1.2.a	4-羟基丁酸	4-羟基丁酰-辅酶A	4-羟基丁酰-辅酶A水解酶	*tesB*	NP_414986	*大肠杆菌*	己二酰-辅酶A
					acot12	NP_570103.1	*溺疽*	丁酰-辅酶A
					hibch	Q6NVY1.2	*人类*	3-羟丙基-辅酶A

[0532]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
8A	6.2.1.a	4-羟基丁酸	4-羟基丁酰-辅酶 A	4-羟基丁酰-辅酶 A 连接酶(或 4-羟基丁酰-辅酶 A 合成酶)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*大肠杆菌*	琥珀酸酯
					phl	CAJ15517.1	*产黄青霉*	苯乙酸酯
					bioW	NP_390902.2	*枯草杆菌*	6-羧基己酸
8A	2.7.2.a	4-羟基丁酸	4-羟基丁酰-磷酸酯	4-羟基丁酸激酶	*ackA*	NP_416799.1	*大肠杆菌*	乙酸酯，丙酸酯
					buk1	NP_349675	*丙酮丁醇梭菌*	丁酸酯
					buk2	Q97II1	*丙酮丁醇梭菌*	丁酸酯
8A	2.3.1.a	4-羟基丁酰-磷酸酯	4-羟基丁酰-辅酶 A	磷酸转-4-羟基丁酰酶	*ptb*	NP_349676	*丙酮丁醇梭菌*	丁酰磷酸酯
					ptb	AAR19757.1	*产丁酸酯-细菌 L2-50*	丁酰磷酸酯
					ptb	CAC07932.1	*巨大芽孢杆菌*	丁酰磷酸酯
8A	1.2.1.d	4-羟基丁酰-磷酸酯	4-羟基丁醛	4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)	*asd*	NP_417891.1	*大肠杆菌*	L-4-天冬氨酰-磷酸酯
					proA	NP_414778.1	*大肠杆菌*	L-谷氨酰基-5-磷酸酯
					gapA	P0A9B2.2	*大肠杆菌*	甘油醛-3-磷酸酯
8A	1.2.1.b	4-羟基丁酰-辅酶 A	4-羟基丁醛	4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶(或 4-羟基丁醛脱氢酶)	*sucD*	P38947.1	*克氏梭菌*	琥珀酰-辅酶 A
					sucD	NP_904963.1	*牙龈卟啉单胞菌*	琥珀酰-辅酶 A
					Msed_0709	YP_001190808.1	*勤奋金属球菌*	丙二酰基辅酶 A
8A	1.1.1.c	4-羟基丁酰-辅	1,4-丁二醇	4-羟基丁酰-辅酶 A 还	*adhE2*	AAK09379.1	*丙酮丁醇梭菌*	丁基-辅酶 A

[0533]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
		酶 A		原酶(醇形成)				
					mcr	AAS20429.1	*橙色绿屈挠菌*	丙二酰基辅酶 A
					FAR	AAD38039.1	*加州赤蒙得木*	长链酰基-辅酶 A
8A	1.1.1.a	4-羟基丁醛	1,4-丁二醇	1,4-丁二醇脱氢酶	*ADH2*	NP_014032.1	*啤酒酵母*	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌 DSM 555*	琥珀酸半醛

[0534] 实施例VI

[0535] 另外来自α-酮戊二酸的示例性BDO途径

[0536] 该实施例描述了来自α-酮戊二酸的示例性的BDO途径。

[0537] 来自琥珀酰-辅酶A的BDO途径在本文描述并且之前已被描述(参见2008年3月14日提交的美国申请系列No.12/049,256和2008年3月14日提交的PCT申请系列No.US08/57168,每篇在此作为参考引入)。另外的途径在图8B中显示。所述示例性的BDO途径的酶与编码这些酶的基因一起列于表16中。

[0538] 简要地,如前所述,α-酮戊二酸可通过α-酮戊二酸脱羧酶(EC 4.1.1.a)转化为琥珀酸半醛。或者,α-酮戊二酸可通过谷氨酸脱氢酶(EC 1.4.1.a)转化为谷氨酸盐。4-氨基丁酸可通过4-氨基丁酸氧化还原酶(去氨基)(EC 1.4.1.a)或4-氨基丁酸氨基转移酶(EC 2.6.1.a)转化为琥珀酸半醛。谷氨酸盐可通过谷氨酸脱羧酶(EC 4.1.1.a)转化为4-氨基丁酸。如前所述,琥珀酸半醛可通过4-羟基丁酸脱氢酶(EC 1.1.1.a)转化为4-羟基丁酸。如前所述,4-羟基丁酸可通过4-羟基丁酰-辅酶A移转酶(EC 2.8.3.a)或通过4-羟基丁酰-辅酶A水解酶(EC 3.1.2.a),或4-羟基丁酰-辅酶A连接酶(或4-羟基丁酰-辅酶A合成酶(EC 6.2.1.a)转化为4-羟基丁酰-辅酶A。4-羟基丁酸可通过4-羟基丁酸激酶(EC 2.7.2.a)转化为4-羟基丁酰-磷酸盐。如前所述,4-羟基丁酰-磷酸盐可通过磷酸转-4-羟基丁酰酶(EC 2.3.1.a)转化为4-羟基丁酰-辅酶A。或者,4-羟基丁酰-磷酸盐可通过4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)(EC 1.2.1.d)转化为4-羟基丁醛。如前所述,4-羟基丁酰-辅酶A可通过4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(或4-羟基丁醛脱氢酶)(EC 1.2.1.b)转化为4-羟基丁醛。4-羟基丁酰-辅酶A可通过4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成)(EC 1.1.1.c)转化为1,4-丁二醇。如前所述,4-羟基丁醛可通过1,4-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.a)转化为1,4-丁二醇。

[0539]

表 16. 自 α-酮戊二酸的 BDO 途径

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
8B	4.1.1.a	α-酮戊二酸	琥珀酸半醛	α-酮戊二酸脱羧酶	*kgd*	O50463.4	*结核分枝杆菌*	α-酮戊二酸
					gadA	NP_417974	*大肠杆菌*	谷氨酸
					gadB	NP_416010	*大肠杆菌*	谷氨酸
8B	1.4.1.a	α-酮戊二酸	谷氨酸	谷氨酸脱羧酶	*gdhA*	P00370	*大肠杆菌*	谷氨酸
					gdh	P96110.4	*海栖热袍菌*	谷氨酸
					gdhA1	NP_279651.1	*嗜酪杆菌*	谷氨酸
8B	1.4.1.a	4-氨基丁酸	琥珀酸半醛	4-氨基丁酸 氧化还原酶(脱氨)	*lysDH*	AB052732	*嗜热脂肪土芽孢杆菌*	赖氨酸
					lysDH	NP_147035.1	*嗜热古细菌 K1*	赖氨酸
					ldh	P0A393	*蜡样芽孢杆菌*	壳氨酸，异壳氨酸，缬氨酸，2-氨基丁酸
8B	2.6.1.a	4-氨基丁酸	琥珀酸半醛	4-氨基丁酸转氨酶	*gabT*	P22256.1	*大肠杆菌*	4-氨基丁酸
					puuE	NP_415818.1	*大肠杆菌*	4-氨基丁酸
					UGA1	NP_011533.1	*酿酒酵母*	4-氨基丁酸
8B	4.1.1.a	谷氨酸	4-氨基丁酸	谷氨酸 脱羧酶	*gadA*	NP_417974	*大肠杆菌*	谷氨酸
					gadB	NP_416010	*大肠杆菌*	谷氨酸
					kgd	O50463.4	*结核分枝杆菌*	α-酮戊二酸
8B	1.1.1.a	琥珀酸半醛	4-羟基丁酸	4-羟基丁酸脱氢酶	*4hbd*	YP_726053.1	*真氧产碱杆菌 H16*	4-羟基丁酸
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌 DSM 555*	4-羟基丁酸
					4hbd	Q94B07	*拟南芥*	4-羟基丁酸
8B	2.8.3.a	4-羟基丁酸	4-羟基丁酰-辅	4-羟基丁酰-辅酶	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2,	*克氏梭菌*	琥珀酸酯，4-

[0540]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
			酶 A	A 移转酶		EDK35586.1		羟基丁酸酯，丁酸酯
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*发酵氨基酸球菌*	戊二酸
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*大肠杆菌*	丁酸酯
8B	3.1.2.a	4-羟基丁酸	4-羟基丁酰-辅酶 A	4-羟基丁酰-辅酶 A 水解酶	*tesB*	NP_414986	*大肠杆菌*	己二酰-辅酶 A
					acot12	NP_570103.1	*褐鼠*	丁酰-辅酶 A
					hibch	Q6NVY1.2	人类	3-羟基丙酰-辅酶 A
8B	6.2.1.a	4-羟基丁酸	4-羟基丁酰-辅酶 A	4-羟基丁酰-辅酶 A 连接酶(或 4-羟基丁酰-辅酶 A 合成酶)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*大肠杆菌*	琥珀酸
					phl	CAJ15517.1	*产黄青霉*	苯乙酸酯
					bioW	NP_390902.2	*枯草杆菌*	6-羧基己酸
8B	2.7.2.a	4-羟基丁酸	4-羟基丁酰-磷酸酯	4-羟基丁酸激酶	*ackA*	NP_416799.1	*大肠杆菌*	乙酸酯，丙酸酯
					buk1	NP_349675	*丙酮丁醇梭菌*	丁酸酯
					buk2	Q97II1	*丙酮丁醇梭菌*	丁酸酯
8B	2.3.1.a	4-羟基丁酰-磷酸酯	4-羟基丁酰-辅酶 A	磷酸转-4-羟基丁酰酶	*ptb*	NP_349676	*丙酮丁醇梭菌*	丁酰磷酸酯
					ptb	AAR19757.1	*产丁酸酯-细菌 L2-50*	丁酰磷酸酯
					ptb	CAC07932.1	*巨大芽孢杆菌*	丁酰磷酸酯
8B	1.2.1.d	4-羟基丁酰-磷酸酯	4-羟基丁醛	4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)	*asd*	NP_417891.1	大肠杆菌	L-4-天冬氨酰-磷酸酯

[0541]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
					proA	NP_414778.1	*大肠杆菌*	L-谷氨酰基-5-磷酸酯
					gapA	P0A9B2.2	*大肠杆菌*	甘油醛-3-磷酸酯
8B	1.2.1.b	*4-羟基丁酰-辅酶A*	*4-羟基丁醛*	*4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(或4-羟基丁醛脱氢酶)*	*sucD*	P38947.1	*克氏梭菌*	琥珀酰-辅酶A
					sucD	NP_904963.1	*牙龈卟啉单胞菌*	琥珀酰-辅酶A
					Msed_0709	YP_001190808.1	*勤奋金属球菌*	丙二酰基辅酶A
8B	1.1.1.c	*4-羟基丁酰-辅酶A*	*1,4-丁二醇*	*4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成)*	*adhE2*	AAK09379.1	*丙酮丁醇梭菌*	丁基-辅酶A
					mcr	AAS20429.1	*橙色绿屈挠菌*	丙二酰基辅酶A
					FAR	AAD38039.1	*加州希蒙得木*	长链酰基-辅酶A
8B	1.1.1.a	*4-羟基丁醛*	*1,4-丁二醇*	*1,4-丁二醇脱氢酶*	*ADH2*	NP_014032.1	*啤酒酵母*	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌DSM 555*	琥珀酸半醛

[0542] 实施例VII来自4-氨基丁酸的BDO途径

[0543] 该实施例描述了来自4-氨基丁酸的示例性的BDO途径。

[0544] 图9A描述了示例性的BDO途径，其中4-氨基丁酸转化为BDO。所述示例性的BDO途径的酶与编码这些酶的基因一起列于表17中。

[0545] 简要地，4-羟基丁酸可通过4-氨基丁酸辅酶A移转酶(EC 2.8.3.a)，4-氨基丁酰-辅酶A水解酶(EC 3.1.2.a)或4-4-氨基丁酸-辅酶A连接酶(或4-氨基丁酰-辅酶A合成酶)(EC 6.2.1.a)转化为4-氨基丁酰-辅酶A。4-氨基丁酰-辅酶A可通过4-氨基丁酰-辅酶A氧化还原酶(去氨基)(EC 1.4.1.a)或4-氨基丁酰-辅酶A氨基转移酶(EC 2.6.1.a)转化为4-氧代丁酰-辅酶A。4-氧代丁酰-辅酶A可通过4-氧代丁酰-辅酶A脱氢酶(EC 1.1.1.a)转化为4-羟基丁酰-辅酶A。4-羟基丁酰-辅酶A可通过4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成)(EC 1.1.1.c)转化为1,4-丁二醇。或者，4-羟基丁酰-辅酶A可通过4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(或4-羟基丁醛脱氢酶)(EC 1.2.1.b)转化为4-羟基丁醛。4-羟基丁醛可通过1,4-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.a)转化为1,4-丁二醇。

[0546]

表17. 自4-氨基丁酸的BDO途径

图	EC类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
9A	2.8.3.a	*4-氨基丁酸*	*4-氨基丁酰-辅酶A*	*4-氨基丁酸辅酶A移转酶*	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*无氏梭菌*	琥珀酸酯,4-羟基丁酸酯，丁酸酯
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*发酵氨基酸球菌*	戊二酸
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*大肠杆菌*	丁酸酯
9A	3.1.2.a	4-氨基丁酸	4-氨基丁酰-辅酶A	4-氨基丁酰-辅酶A水解酶	*tesB*	**NP_414986**	*大肠杆菌*	*己二酰-辅酶A*
					acot12	NP_570103.1	*褐鼠*	丁酰-辅酶A
					hibch	Q6NVY1.2	*人类*	3-羟丙基-辅酶A
9A	6.2.1.a	*4-氨基丁酸*	*4-氨基丁酰-辅酶A*	*4-4-氨基丁酸-辅酶A连接酶(或4-4-氨基丁酰-辅酶A合成酶)*	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*大肠杆菌*	琥珀酸
					phl	CAJ15517.1	*产黄青霉*	苯乙酸酯
					bioW	NP_390902.2	*枯草杆菌*	6-羧基己酸
9A	1.4.1.a	*4-氨基丁酰-辅酶A*	*4-氧代丁酰-辅酶A*	*4-氨基丁酰-辅酶A氧化还原酶(去氨基)*	*lysDH*	AB052732	*嗜热脂肪芽孢杆菌*	赖氨酸
					lysDH	NP_147035.1	*敏捷气热菌KI*	赖氨酸
					ldh	P0A393	*蜡样芽胞杆菌*	亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸，2-氨基丁酸
9A	2.6.1.a	4-氨基丁酰-辅酶A	4-氧代丁酰-辅酶A	4-氨基丁酰-辅酶A氨基转移酶	*gabT*	P22256.1	*大肠杆菌*	4-氨基丁酸
					abat	P50554.3	*褐鼠*	3-氨基-2-丙酸甲

[0547]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
								酯
					SkyPYD4	ABF58893.1	*克氏酵母*	β-丙氨酸
9A	1.1.1.a	4-氧代丁酰-辅酶 A	4-羟基丁酰-辅酶 A	4-羟基丁酰-辅酶 A 脱氢酶	*ADH2*	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌 DSM 555*	琥珀酸半醛
8	1.1.1.c	4-羟基丁酰-辅酶 A	1,4-丁二醇	4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶(醇形成)	*adhE2*	AAK09379.1	*丙酮丁醇梭菌*	丁基-辅酶 A
					mcr	AAS20429.1	*橙色绿屈挠菌*	丙二酰基辅酶 A
					FAR	AAD38039.1	*加州布莱得木*	长链酰基-辅酶 A
8	1.2.1.b	**4-羟基丁酰-辅酶 A**	**4-羟基丁醛**	**4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶(或 4-羟基丁醛脱氢酶)**	*sucD*	P38947.1	*克氏梭菌*	琥珀酰-辅酶 A
					sucD	NP_904963.1	*牙龈卟啉单胞菌*	琥珀酰-辅酶 A
					Msed_0709	YP_001190808.1	*勤奋金属球菌*	丙二酰基辅酶 A
8	1.1.1.a	**4-羟基丁醛**	**1,4-丁二醇**	**1,4-丁二醇脱氢酶**	*ADH2*	NP_014032.1	*啤酒酵母*	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌 DSM 555*	琥珀酸半醛

[0548] 图9A中显示用于将4-氨基丁酸转化为BDO的另一种示例性的BDO途径的酶。所述示例性的BDO途径的酶与编码这些酶的基因一起列于表18中。

[0549] 简要地,4-羟基丁酸可通过4-氨基丁酸辅酶A移转酶(EC 2.8.3.a),4-氨基丁酰-辅酶A水解酶(EC 3.1.2.a)或4-氨基丁酸-辅酶A连接酶(或4-氨基丁酰-辅酶A合成酶)(EC 6.2.1.a)转化为4-氨基丁酰-辅酶A。4-氨基丁酰-辅酶A可通过4-氨基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成)(EC 1.1.1.c)转化为4-氨基丁-1-醇。或者,4-氨基丁酰-辅酶A可通过4-氨基丁酰-辅酶A还原酶(或4-氨基丁脱氢酶)(EC 1.2.1.b)转化为4-氨基丁,并且4-氨基丁通过4-氨基丁-1-醇脱氢酶(EC 1.1.1.a)转化为4-氨基丁-1-醇。4-氨基丁-1-醇可通过4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)(EC 1.4.1.a)或4-氨基丁-1-醇氨基转移酶(EC 2.6.1.a)转化为4-羟基丁醛。4-羟基丁醛可通过1,4-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.a)转化为1,4-丁二醇。

[0550]

表 18. 自 4-氨基丁酸的 BDO 途径

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
9A	2.8.3.a	4-氨基丁酸	4-氨基丁酰-辅酶 A	4-氨基丁酸辅酶 A 移转酶	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*克氏梭菌*	琥珀酸酯，4-羟基丁酸酯，丁酸酯
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*发酵氨基酸球菌*	戊二酸
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*大肠杆菌*	丁酸酯
9A	3.1.2.a	4-氨基丁酸	4-氨基丁酰-辅酶 A	4-氨基丁酰-辅酶 A 水解酶	*tesB*	NP_414986	*大肠杆菌*	己二酰-辅酶 A
					acot12	NP_570103.1	*褐鼠*	丁酰-辅酶 A
					hibch	Q6NVY1.2	*人类*	3-羟丙基-辅酶 A
9A	6.2.1.a	4-氨基丁酸	4-氨基丁酰-辅酶 A	4-4-氨基丁酸-辅酶 A 连接酶(或 4-4-氨基丁酰-辅酶 A 合成酶)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*大肠杆菌*	琥珀酸
					phl	CAJ15517.1	*产黄青霉*	苯乙酸酯
					bioW	NP_390902.2	*枯草杆菌*	6-羧基己酸
9A	1.1.1.c	4-氨基丁酰-辅酶 A	4-氨基丁-1-醇	4-氨基丁酰-辅酶 A 还原酶(醇形成)	*adhE2*	AAK09379.1	*丙酮丁醇梭菌*	丁基-辅酶 A
					mcr	AAS20429.1	*橙色绿屈挠菌*	丙二酰基辅酶 A
					FAR	AAD38039.1	*加州帝葵得木*	长链酰基-辅酶 A
9A	1.2.1.b	4-氨基丁酰-辅酶 A	4-氨基丁醛	4-氨基丁酰-辅酶 A 还原酶(或 4-氨基丁脱氢酶)	*sucD*	P38947.1	*克氏梭菌*	琥珀酰-辅酶 A

[0551]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
					sucD	NP_904963.1	*牙龈卟啉单胞菌*	琥珀酰-辅酶A
					Msed_0709	YP_001190808.1	*勤奋金属球菌*	丙二酰基辅酶A
9A	1.1.1.a	4-氨基丁醛	4-氨基丁-1-醇	4-氨基丁-1-醇脱氢酶	*ADH2*	NP_014032.1	*啤酒酵母*	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌DSM 555*	琥珀酸半醛
9A	1.4.1.a	4-氨基丁-1-醇	4-羟基丁醛	4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)	*lysDH*	AB052732	*嗜热脂肪芽孢杆菌*	赖氨酸
					lysDH	NP_147035.1	*敏捷气热菌KI*	赖氨酸
					ldh	P0A393	*蜡样芽胞杆菌*	亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸，2-氨基丁酸
9A	2.6.1.a	4-氨基丁-1-醇	4-羟基丁醛	4-氨基丁-1-醇氨基转移酶	*gabT*	P22256.1	*大肠杆菌*	4-氨基丁酸
					abat	P50554.3	*褐鼠*	3-氨基-2-丙酸甲酯
					SkyPYD4	ABF58893.1	*克氏酵母*	β-丙氨酸
9A	1.1.1.a	4-羟基丁醛	1,4-丁二醇	1,4-丁二醇脱氢酶	*ADH2*	NP_014032.1	*啤酒酵母*	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌DSM 555*	琥珀酸半醛

[0552] 图9B描述了示例性的BDO途径，其中4-氨基丁酸转化为BDO。所述示例性的BDO途径的酶与编码这些酶的基因一起列于表19中。

[0553] 简要地,4-氨基丁酸可通过4-氨基丁酸激酶(EC 2.7.2.a)转化为[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸。[[4-氨基丁醇基)氧]膦酸可通过4-氨基丁醛脱氢酶(磷酸化)(EC 1.2.1.d)转化为4-氨基丁醛。4-氨基丁醛可通过4-氨基丁-1-醇脱氢酶(EC 1.1.1.a)转化为4-氨基丁-1-醇。4-氨基丁-1-醇可通过4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)(EC 1.4.1.a)或4-氨基丁-1-醇氨基转移酶(EC 2.6.1.a)转化为4-羟基丁醛。或者,[(4-氧代丁醇基)氧]膦酸可通过[(4-氧代丁醇基)氧]膦酸氧化还原酶(去氨基)(EC 1.4.1.a)或[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸氨基转移酶(EC 2.6.1.a)转化为[(4-氧代丁醇基)氧]膦酸。[(4-氧代丁醇基)氧]膦酸可通过4-羟基丁酰-磷酸盐脱氢酶(EC 1.1.1.a)转化为4-羟基丁酰-磷酸盐。4-羟基丁酰-磷酸盐可通过4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)(EC 1.2.1.d)转化为4-羟基丁醛。4-羟基丁醛可通过1,4-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.a)转化为1,4-丁二醇。

[0554]

表 19. 自 4-氨基丁酸的 BDO 途径

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
9B	2.7.2.a	**4-氨基丁酸**	[(4-氨基丁醇基-)氧]膦酸	4-氨基丁酸激酶	*ackA*	NP_416799.1	*大肠杆菌*	乙酸酯，丙酸酯
					buk1	NP_349675	*丙酮丁醇梭菌*	丁酸酯
					proB	NP_414777.1	*大肠杆菌*	谷氨酸酯
9B	1.2.1.d	[(4-氨基丁醇基-)氧]膦酸	4-氨基丁醛	4-氨基丁醛脱氢酶(磷酸化)	*asd*	NP_417891.1	*大肠杆菌*	L-4-天冬氨酰-磷酸酯
					proA	NP_414778.1	*大肠杆菌*	L-谷氨酰基-5-磷酸酯
					gapA	P0A9B2.2	*大肠杆菌*	甘油醛-3-磷酸酯
9B	1.1.1.a	4-氨基丁醛	4-氨基丁-1-醇	4-氨基丁-1-醇脱氢酶	*ADH2*	NP_014032.1	*啤酒酵母*	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌 DSM 555*	琥珀酸半醛
9B	1.4.1.a	4-氨基丁-1-醇	4-羟基丁醛	4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)	*lysDH*	AB052732	*嗜热脂肪芽孢杆菌*	赖氨酸
					lysDH	NP_147035.1	*敏捷气热菌 KI*	赖氨酸
					ldh	P0A393	*蜡样芽胞杆菌*	壳氨酸，异壳氨酸，烟氨酸，2-氨基丁酸
9B	2.6.1.a	4-氨基丁-1-醇	4-羟基丁醛	4-氨基丁-1-醇氨基转移酶	*gabT*	P22256.1	*大肠杆菌*	4-氨基丁酸
					abat	P50554.3	*猕猴*	3-氨基-2-丙酸甲酯
					SkyPYD4	ABF58893.1	*克氏酵母*	β-丙氨酸

[0555]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
9B	1.4.1.a	[(4-氨基丁醇基-)氧]膦酸	[(4-氧代丁醇基)氧]膦酸	[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸氧化还原酶(去氨基)	*lysDH*	AB052732	*嗜热脂肪芽孢杆菌*	赖氨酸
					lysDH	NP_147035.1	*嗜碱气热菌 K1*	赖氨酸
					ldh	P0A393	*蜡样芽胞杆菌*	亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸，2-氨基丁酸
9B	2.6.1.a	[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸	[(4-氧代丁醇基)氧]膦酸	[(4-氨基丁醇基-)氧]膦酸	*gabT*	P22256.1	*大肠杆菌*	4-氨基丁酸
					SkyPYD4	ABF58893.1	*克氏酵母*	β-丙氨酸
					serC	NP_415427.1	*大肠杆菌*	磷酸丝氨酸，磷酸羟苏氨酸
9B	1.1.1.a	[(4-氧代丁醇基)氧]膦酸	4-羟基丁酰-磷酸酯	4-羟基丁酰-磷酸酯脱氢酶	*ADH2*	NP_014032.1	*啤酒酵母*	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌 DSM 555*	琥珀酸半醛
9B	1.2.1.d	4-羟基丁酰-磷酸酯	4-羟基丁醛	4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)	*asd*	NP_417891.1	*大肠杆菌*	L-4-天冬氨酰-磷酸酯
					proA	NP_414778.1	*大肠杆菌*	L-谷氨酰基-5-磷酸酯
					gapA	P0A9B2.2	*大肠杆菌*	甘油醛-3-磷酸酯
9B	1.1.1.a	4-羟基丁醛	1,4-丁二醇	1,4-丁二醇脱氢酶	*ADH2*	NP_014032.1	*啤酒酵母*	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌 DSM555*	琥珀酸半醛

[0556] 图9C显示通过乙酰乙酸的示例性的途径。

[0557] 实施例VIII来自α-酮戊二酸的示例性的BDO途径

[0558] 该实施例描述了来自α-酮戊二酸的示例性的BDO途径。

[0559] 图10描述了示例性的BDO途径，其中α-酮戊二酸转化为BDO。所述示例性的BDO途径的酶与编码这些酶的基因一起列于表20中。

[0560] 简要地，α-酮戊二酸可通过α-酮戊二酸5-激酶(EC 2.7.2.a)转化为α-酮戊二酸基-磷酸盐。α-酮戊二酸基-磷酸盐可通过2,5-二氧代戊酸半醛脱氢酶(磷酸化)(EC 1.2.1.d)转化为2,5-二氧代戊酸。2,5-二氧代戊酸可通过2,5-二氧代戊酸还原酶(EC 1.1.1.a)转化为5-羟基-2-氧代戊酸。或者，α-酮戊二酸可通过α-酮戊二酸辅酶A移转酶(EC 2.8.3.a)，α-酮戊二酸基-辅酶A水解酶(EC 3.1.2.a)或α-酮戊二酸基-辅酶A连接酶(或α-酮戊二酸基-辅酶A合成酶)(EC 6.2.1.a)转化为α-酮戊二酸基-辅酶A。α-酮戊二酸基-辅酶A可通过α-酮戊二酸基-辅酶A还原酶(或2,5-二氧代戊酸脱氢酶)(EC 1.2.1.b)转化为2,5-二氧代戊酸。2,5-二氧代戊酸可通过5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶转化为5-羟基-2-氧代戊酸。或者，α-羟基丁酰-辅酶A可通过α-酮戊二酸基-辅酶A还原酶(醇形成)(EC 1.1.1.c)转化为5-羟基-2-氧代戊酸。5-羟基-2-氧代戊酸可通过5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶(EC 4.1.1.a)转化为4-羟基丁醛。4-羟基丁醛可通过1,4-丁二醇脱氢酶(EC1.1.1.a)转化为1,4-丁二醇。5-羟基-2-氧代戊酸可通过5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)(EC 1.2.1.c)转化为4-羟基丁酰-辅酶A。

[0561]

表 20. 自α-酮戊二酸的 BDO 途径

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
10	2.7.2.a	α-酮戊二酸	α-酮戊二酸基-磷酸酯	α-酮戊二酸 5-激酶	*ackA*	NP_416799.1	*大肠杆菌*	乙酸酯，丙酸酯
					buk1	NP_349675	*丙酮丁醇梭菌*	丁酸酯
					proB	NP_414777.1	*大肠杆菌*	谷氨酸酯
10	1.2.1.d	α-酮戊二酸基-磷酸酯	2，5-二氧代戊酸	2,5-二氧代戊酸半醛脱氢酶(磷酸化)	*proA*	NP_414778.1	*大肠杆菌*	L-谷氨酰基-5-磷酸酯
					asd	NP_417891.1	*大肠杆菌*	L-4-天冬氨酰-磷酸酯
					gapA	P0A9B2.2	*大肠杆菌*	甘油醛-3-磷酸酯
10	1.1.1.a	2,5-二氧代戊酸	5-羟基-2-氧代戊酸	2,5-二氧代戊酸还原酶	*ADH2*	NP_014032.1	*啤酒酵母*	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌 DSM 555*	琥珀酸半醛
10	2.8.3.a	α-酮戊二酸	α-酮戊二酸基-辅酶 A	α-酮戊二酸辅酶 A 移转酶	*cat1*，*cat2*，*cat3*	P38946.1，P38942.2，EDK35586.1	*克氏梭菌*	琥珀酸酯，4-羟基-丁酸酯，丁酸酯
					gctA, *gctB*	CAA57199.1，CAA57200.1	*发酵氨基酸球菌*	戊二酸
					atoA, *atoD*	P76459.1，P76458.1	*大肠杆菌*	丁酸酯
10	3.1.2.a	α-酮戊二酸	α-酮戊二酸基-辅酶 A	α-酮戊二酸基-辅酶 A 水解酶	*tesB*	NP_414986	*大肠杆菌*	己二酸-辅酶 A
					acot12	NP_570103.1	*褐沉*	丁酸-辅酶 A
					hibch	Q6NVY1.2	*人类*	3-羟丙酸-辅酶 A

[0562]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
10	6.2.1.a	α-酮戊二酸	α-酮戊二酸基-辅酶 A	α-酮戊二酸基-辅酶 A 连接酶(或 α-酮戊二酸基-辅酶 A 合成酶)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*大肠杆菌*	琥珀酸
					phl	CAJ15517.1	*产黄青霉*	苯乙酸酯
					bioW	NP_390902.2	*枯草杆菌*	6-羧基己酸
10	1.2.1.b	α-酮戊二酸基-辅酶 A	2，5-二氧代戊酸	α-酮戊二酸基-辅酶 A 还原酶(或 2，5-二氧代戊酸脱氢酶)	*sucD*	P38947.1	*克氏梭菌*	琥珀酰-辅酶 A
					Msed_0709	YP_001190808.1	*勤奋金属球菌*	丙二酰基辅酶 A
					bphG	BAA03892.1	*假单胞菌属*	乙醛，丙醛，丁醛，异丁醛和甲醛
10	1.1.1.a	2，5-二氧代戊酸	5-羟基-2-氧代戊酸	5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶	*ADH2* *yqhD* *4hbd*	NP_014032.1 NP_417484.1 L21902.1	*啤酒酵母* *大肠杆菌* *克氏梭菌 DSM 555*	常规的 >C3 琥珀酸半醛
10	1.1.1.c	α-酮戊二酸基-辅酶 A	5-羟基-2-氧代戊酸	α-酮戊二酸基-辅酶 A 还原酶(醇形成)	*adhE2*	AAK09379.1	*丙酮丁醇梭菌*	丁基-辅酶 A
					mcr	AAS20429.1	*橙色绿屈挠菌*	丙二酰基辅酶 A
					FAR	AAD38039.1	*加州布索得木*	长链酰基-辅酶 A
10	4.1.1.a	5-羟基-2-氧代戊酸	4-羟基丁醛	5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶	*pdc*	P06672.1	*运动发酵单胞菌*	2-氧代戊酸
					mdlC	P20906.2	*恶臭假单胞菌*	2-氧代戊酸

[0563]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
					pdc1	P06169	*酿酒酵母*	丙酮酸
10	1.1.1.a	4-羟基丁醛	1,4-丁二醇	1,4-丁二醇脱氢酶	*ADH2*	NP_014032.1	*啤酒酵母*	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌 DSM 555*	琥珀酸半醛
10	1.2.1.c	5-羟基-2-氧代戊酸	4-羟基丁酰-辅酶 A	5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)	*sucA, sucB, lpd*	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	*大肠杆菌*	α-酮戊二酸
					bfmBB, bfmBAA, bfmBAB, bfmBAB, pdhD	NP_390283.1, NP_390285.1, NP_390284.1, P21880.1	*枯草杆菌*	缬氨酸，亮氨酸和异亮氨酸的 2-酮酸类衍生物
					Bckdha, Bckdhb, Dbt, Dld	NP_036914.1, NP_062140.1, NP_445764.1, NP_955417.1	*褐鼠*	缬氨酸，亮氨酸和异亮氨酸的 2-酮酸类衍生物

[0564] 实施例IX来自谷氨酸盐的示例性的BDO途径

[0565] 该实施例描述了来自谷氨酸盐的示例性的BDO途径。

[0566] 图11描述了其中谷氨酸盐转化为BDO的示例性的BDO途径。所述示例性的BDO途径的酶与编码这些酶的基因一起列于表21中。

[0567] 简要地，谷氨酸盐可通过谷氨酸盐辅酶A移转酶(EC 2.8.3.a)，谷氨酰基辅酶A辅酶A水解酶(EC 3.1.2.a)或谷氨酰基-辅酶A连接酶(或谷氨酰基-辅酶A合成酶)(EC 6.2.1.a)转化为谷氨酰基辅酶A。或者，谷氨酸盐可通过谷氨酸盐5-激酶(EC 2.7.2.a)转化为谷氨酸盐-5-磷酸盐。谷氨酸盐-5-磷酸盐可通过谷氨酸盐-5-半醛脱氢酶(磷酸化)(EC 1.2.1.d)转化为谷氨酸盐-5-半醛。谷氨酰基辅酶A可通过谷氨酰基-辅酶A还原酶(或谷氨酸盐-5-半醛脱氢酶)(EC 1.2.1.b)转化为谷氨酸盐-5-半醛。谷氨酸盐-5-半醛可通过谷氨酸盐-5-半醛还原酶(EC 1.1.1.a)转化为2-氨基-5-羟基戊酸。或者，谷氨酰基-辅酶A可通过谷氨酰基-辅酶A还原酶(醇形成)(1.1.1.c)转化为2-氨基-5-羟基戊酸。2-氨基-5-羟基戊酸可通过2-氨基-5-羟基戊酸氧化还原酶(去氨基)(EC 1.4.1.a)或2-氨基-5-羟基戊酸氨基转移酶(EC 2.6.1.a)转化为5-羟基-2-氧代戊酸。5-羟基-2-氧代戊酸可通过5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶(EC 4.1.1.a)转化为4-羟基丁醛。4-羟基丁醛可通过1,4-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.a)转化为1,4-丁二醇。或者，5-羟基-2-氧代戊酸可通过5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)(EC 1.2.1.c)转化为4-羟基丁酰-辅酶A。

[0568]

表 21. 自谷氨酸的 BDO 途径

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
11	2.8.3.a	谷氨酸	谷氨酰基-辅酶 A	谷氨酸辅酶 A 移转酶	*cat1, cat2, cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*克氏梭菌*	琥珀酸酯，4-羟基丁酸酯，丁酸酯
					gctA, gctB	CAA57199.1, CAA57200.1	*发酵氨基酸球菌*	戊二酸
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*大肠杆菌*	丁酸酯
11	3.1.2.a	谷氨酸	谷氨酰基-辅酶 A	谷氨酰基-辅酶 A 水解酶	*tesB*	NP_414986	*大肠杆菌*	己二酰-辅酶 A
					acot12	NP_570103.1	*褐鼠*	丁酰-辅酶 A
					hibch	Q6NVY1.2	*人类*	3-羟丙基-辅酶 A
11	6.2.1.a	谷氨酸	谷氨酰基-辅酶 A	谷氨酰基-辅酶 A 连接酶(或谷氨酰基-辅酶 A 合成酶)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*大肠杆菌*	琥珀酸
					phl	CAJ15517.1	*产黄青霉*	苯乙酸酯
					bioW	NP_390902.2	*枯草杆菌*	6-羰基己酸
11	2.7.2.a	谷氨酸	谷氨酸-5-磷酸酯	谷氨酸 5-激酶	*ackA*	NP_416799.1	*大肠杆菌*	乙酸酯，丙酸酯
					buk1	NP_349675	*丙酮丁醇梭菌*	丁酸酯
					proB	NP_414777.1	*大肠杆菌*	谷氨酸
11	1.2.1.d	谷氨酸-5-磷酸酯	谷氨酸-5-半醛	谷氨酸-5-半醛脱氢酶(磷酸化)	*proA*	NP_414778.1	*大肠杆菌*	L-谷氨酰基-5-磷酸酯
					asd	NP_417891.1	*大肠杆菌*	L-4-天冬氨酰-磷酸酯

[0569]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
					gapA	P0A9B2.2	*大肠杆菌*	甘油醛-3-磷酸酯
11	1.2.1.b	谷氨酰基-辅酶 A	谷氨酸-5-半醛	谷氨酰基-辅酶 A 还原酶(或谷氨酸-5-半醛脱氢酶)	*sucD*	P38947.1	*克氏梭菌*	琥珀酰-辅酶 A
					Msed_0709	YP_001190808.1	*勤奋金属球菌*	丙二酰基辅酶 A
					bphG	BAA03892.1	*假单胞菌属*	乙醛，丙醛，丁醛，异丁醛和甲醛
11	1.1.1.a	谷氨酸-5-半醛	2-氨基-5-羟基戊酸	谷氨酸-5-半醛还原酶	*ADH2*	NP_014032.1	*啤酒酵母*	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌 DSM 555*	琥珀酸半醛
11	1.1.1.c	谷氨酰基-辅酶 A	2-氨基-5-羟基戊酸	谷氨酰基-辅酶 A 还原酶(醇形成)	*adhE2*	AAK09379.1	*丙酮丁醇梭菌*	丁基-辅酶 A
					mcr	AAS20429.1	*橙色绿屈挠菌*	丙二酰基辅酶 A
					FAR	AAD38039.1	*加州赤蒙得木*	长链酰基-辅酶 A
11	1.4.1.a	2-氨基-5-羟基戊酸	5-羟基-2-氧代戊酸	2-氨基-5-羟基戊酸酸氧化还原酶(去氨基)	*gdhA*	P00370	*大肠杆菌*	谷氨酸
					ldh	P0A393	*蜡样芽胞杆菌*	壳氨酸，异壳氨酸，缬氨酸，2-氨基丁酸
					nadX	NP_229443.1	*海栖热袍菌*	天冬氨酸
11	2.6.1.a	2-氨基-5-羟基戊酸	5-羟基-2-氧代戊酸	2-氨基-5-羟基戊酸氨基转移酶	*aspC*	NP_415448.1	*大肠杆菌*	天冬氨酸
					AAT2	P23542.3	*酿酒酵母*	天冬氨酸
					avtA	YP_026231.1	*大肠杆菌*	缬氨酸，α-氨基丁酸

[0570]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
11	4.1.1.a	5-羟基-2-氧代戊酸	4-羟基丁醛	5-羟基-2-氧代戊酸脱羧酶	*pdc*	P06672.1	*运动发酵单胞菌*	2-氧代戊酸
					mdlC	P20906.2	*恶臭假单胞菌*	2-氧代戊酸
					pdc1	P06169	*酿酒酵母*	丙酮酸
11	1.1.1.a	4-羟基丁醛	1,4-丁二醇	1,4-丁二醇脱氢酶	*ADH2*	NP_014032.1	*啤酒酵母*	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌 DSM 555*	琥珀酸半醛
11	1.2.1.c	5-羟基-2-氧代戊酸	4-羟基丁酰-辅酶 A	5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶(脱羧)	*sucA, sucB, lpd*	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	*大肠杆菌*	α-酮戊二酸
					bfmBB, bfmBAA, bfmBAB, bfmBAB, pdhD	NP_390283.1, NP_390285.1, NP_390284.1, P21880.1	*枯草杆菌*	缬氨酸，亮氨酸和异亮氨酸的 2-酮酸类衍生物
					Bckdha, Bckdhb, Dbt, Dld	NP_036914.1, NP_062140.1, NP_445764.1, NP_955417.1	*褐鼠*	缬氨酸，亮氨酸和异亮氨酸的 2-酮酸类衍生物

[0571] 实施例X来自乙酰乙酰基-CoA的示例性的BDO

[0572] 该实施例描述了来自乙酰乙酰基-CoA的示例性的BDO途径。

[0573] 图12描述了其中乙酰乙酰基-CoA转化为BDO的示例性的BDO途径。所述示例性的BDO途径的酶与编码这些酶的基因一起列于表22中。

[0574] 简要地，乙酰乙酰基-CoA可通过3-羟基丁酰-辅酶A脱氢酶(EC 1.1.1.a)转化为3-羟基丁酰-辅酶A。3-羟基丁酰-辅酶A可通过3-羟基丁酰-辅酶A脱水酶(EC 4.2.1.a)转化为巴豆酰-辅酶A。巴豆酰-辅酶A可通过乙烯基乙酰基-辅酶A△异构酶(EC 5.3.3.3)转化为乙烯基乙酰基-辅酶A。乙烯基乙酰基-辅酶A可通过4-羟基丁酰-辅酶A脱水酶(EC 4.2.1.a)转化为4-羟基丁酰-辅酶A。4-羟基丁酰-辅酶A可通过4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成)(EC 1.1.1.c)转化为1,4-丁二醇。或者，4-羟基丁酰-辅酶A可通过4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(或4-羟基丁醛脱氢酶)(EC 1.2.1.b)转化为4-羟基丁醛。4-羟基丁醛可通过1,4-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.a)转化为1,4-丁二醇。

[0575]

表 22. 自乙酰乙酰基-CoA 的 BDO 途径

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
12	1.1.1.a	乙酰乙酰基-CoA	3-羟基丁酰-辅酶A	3-羟基丁酰-辅酶A脱氢酶	*hbd*	NP_349314.1	*丙酮丁醇梭菌*	3-羟基丁酰-辅酶A
					hbd	AAM14586.1	*拜氏梭菌*	3-羟基丁酰-辅酶A
					Msed_1423	YP_001191505	*勃森金属球菌*	推测的3-羟基丁酰-辅酶A
12	4.2.1.a	3-羟基丁酰-辅酶A	巴豆酰-辅酶A	3-羟基丁酰-辅酶A脱水酶	*crt*	NP_349318.1	*丙酮丁醇梭菌*	3-羟基丁酰-辅酶A
					maoC	NP_415905.1	*大肠杆菌*	3-羟基丁酰-辅酶A
					paaF	NP_415911.1	*大肠杆菌*	3-羟己二酰-辅酶A
12	5.3.3.3	巴豆酰-辅酶A	乙烯基乙酰基-辅酶A	乙烯基乙酰基-辅酶△-异构酶	*abfD*	YP_001396399.1	*克氏梭菌DSM 555*	4-羟基丁酰-辅酶A
					abfD	P55792	*氨基丁酸梭菌*	4-羟基丁酰-辅酶A
					abfD	YP_001928843	*牙龈小啉单胞菌ATCC 33277*	4-羟基丁酰-辅酶A
12	4.2.1.a	乙烯基乙酰基-辅酶A	4-羟基丁酰-辅酶A	4-羟基丁酰-辅酶A脱水酶	*abfD*	YP_001396399.1	*克氏梭菌DSM 555*	4-羟基丁酰-辅酶A
					abfD	P55792	*氨基丁酸梭菌*	4-羟基丁酰-辅酶A
					abfD	YP_001928843	*牙龈小啉单胞菌ATCC 33277*	4-羟基丁酰-辅酶A
12	1.1.1.c	4-羟基丁酰-辅酶A	1,4-丁二醇	4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成)	*adhE2*	AAK09379.1	*丙酮丁醇梭菌*	丁基-辅酶A
					mcr	AAS20429.1	*橙色绿屈挠菌*	丙二酰基辅酶A
					FAR	AAD38039.1	*加州帝森得木*	长链酰基-辅酶A
12	1.2.1.b	4-羟基丁酰-辅酶A	4-羟基丁醛	4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(或4-羟	*sucD*	P38947.1	*克氏梭菌*	琥珀酰-辅酶A

[0576]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
				基丁醛脱氢酶)				
					sucD	NP_904963.1	*牙龈卟啉单胞菌*	琥珀酰-辅酶 A
					Msed_0709	YP_001190808.1	*勤奋金属球菌*	丙二酰基辅酶 A
12	1.1.1.a	4-羟基丁醛	1,4-丁二醇	1,4-丁二醇脱氢酶	*ADH2*	NP_014032.1	*啤酒酵母*	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌 DSM 555*	琥珀酸半醛

[0577] 实施例XI来自高丝氨酸的示例性的BDO途径

[0578] 该实施例描述了来自高丝氨酸的示例性的BDO途径。

[0579] 图13描述了其中高丝氨酸转化为BDO的示例性的BDO途径。所述示例性的BDO途径的酶与编码这些酶的基因一起列于表23中。

[0580] 简要地,高丝氨酸可通过高丝氨酸脱氨酶(EC 4.3.1.a)转化为4-羟基丁-2-烯酸酯。或者,高丝氨酸可通过高丝氨酸辅酶A移转酶(EC 2.8.3.a),高丝氨酸-氨基丁酰-辅酶A水解酶(EC 3.1.2.a)或高丝氨酸-辅酶A连接酶(或高丝氨酸-辅酶A合成酶)(EC 6.2.1.a)转化为高丝氨酸-辅酶A。高丝氨酸-辅酶A可通过高丝氨酸-辅酶A脱氨酶(EC 4.3.1.a)转化为4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A。4-羟基丁-2-烯酸酯可通过4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A移转酶(EC 2.8.3.a),4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A水解酶(EC 3.1.2.a)或4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A连接酶(或4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A合成酶)(EC 6.2.1.a)转化为4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A。或者,4-羟基丁-2-烯酸酯可通过4-羟基丁-2-烯酸酯还原酶(EC 1.3.1.a)转化为4-羟基丁酸。4-羟基丁酸可通过4-羟基丁酰-辅酶A移转酶(EC 2.8.3.a),4-羟基丁酰-辅酶A水解酶(EC 3.1.2.a)或4-羟基丁酰-辅酶A连接酶(或4-羟基丁酰-辅酶A合成酶)(EC 6.2.1.a)转化为4-羟基丁酰-辅酶A。4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A可通过4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A还原酶(EC 1.3.1.a)转化为4-羟基丁酰-辅酶A。4-羟基丁酰-辅酶A可通过4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(醇形成)(EC1.1.1.c)转化为1,4-丁二醇。或者,4-羟基丁酰-辅酶A可通过4-羟基丁酰-辅酶A还原酶(或4-羟基丁醛脱氢酶)(EC 1.2.1.b)转化为4-羟基丁醛。4-羟基丁醛可通过1,4-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.a)转化为1,4-丁二醇。

[0581]

表 23. 自高丝氨酸的 BDO 途径

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
13	4.3.1.a	高丝氨酸	4-羟基丁-2-烯酸酯	高丝氨酸脱氨酶	*aspA*	NP_418562	*大肠杆菌*	天冬氨酸
					aspA	P44324.1	*流感嗜血杆菌*	天冬氨酸
					aspA	P07346	*荧光假单胞菌*	天冬氨酸
13	2.8.3.a	高丝氨酸	高丝氨酸-辅酶 A 移转酶	高丝氨酸-辅酶 A 移转酶	*cat1*, *cat2*, *cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*克氏梭菌*	琥珀酸酯，4-羟基丁酸酯，丁酸酯
					gctA, *gctB*	CAA57199.1, CAA57200.1	*发酵氨基酸球菌*	戊二酸
					atoA, *atoD*	P76459.1, P76458.1	*大肠杆菌*	丁酸酯
13	3.1.2.a	高丝氨酸	高丝氨酸-辅酶 A	高丝氨酸-辅酶 A 水解酶	*tesB*	NP_414986	*大肠杆菌*	己二酰-辅酶 A
					acot12	NP_570103.1	*褐鼠*	丁酰-辅酶 A
					hibch	Q6NVY1.2	*人类*	3-羟丙基-辅酶 A
13	6.2.1.a	高丝氨酸	高丝氨酸-辅酶 A	高丝氨酸-辅酶 A 连接酶(或高丝氨酸-辅酶 A 合成酶)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*大肠杆菌*	琥珀酸
					phl	CAJ15517.1	*产黄青霉*	苯乙酸酯
					bioW	NP_390902.2	*枯草杆菌*	6-羧基己酸
13	4.3.1.a	**高丝氨酸-辅酶 A**	**4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶 A**	**高丝氨酸-辅酶 A 脱氨酶**	*acl1*	CAG29274.1	*丙酸梭菌*	β-丙氨酰-辅酶 A
					acl2	CAG29275.1	*丙酸梭菌*	β-丙氨酰-辅酶 A
					MXAN_4385	YP_632558.1	*黄色粘球菌*	β-丙氨酰-辅酶

[0582]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
								A
13	2.8.3.a	4-羟基丁-2-烯酸酯	4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A	4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A移转酶	*cat1*, *cat2*, *cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*克氏梭菌*	琥珀酸酯，4-羟基丁酸酯，丁酸酯
					gctA, *gctB*	CAA57199.1, CAA57200.1	*发酵氨基酸球菌*	戊二酸
					atoA, *atoD*	P76459.1, P76458.1	*大肠杆菌*	丁酸酯
13	3.1.2.a	4-羟基丁-2-烯酸酯	4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A	4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A水解酶	*tesB*	NP_414986	*大肠杆菌*	己二酰-辅酶A
					acot12	NP_570103.1	*褐鼠*	丁酰-辅酶A
					hibch	Q6NVY1.2	*人类*	3-羟丙基-辅酶A
13	6.2.1.a	4-羟基丁-2-烯酸酯	4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A	4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A连接酶(或4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶A合成酶)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*大肠杆菌*	琥珀酸
					phl	CAJ15517.1	*产黄青霉*	苯乙酸酯
					bioW	NP_390902.2	*枯草杆菌*	6-溴基己酸
13	1.3.1.a	4-羟基丁-2-烯酸酯	4-羟基丁酸	4-羟基丁-2-烯酸酯还原酶	*enr*	CAA71086.1	*酪丁酸梭菌*	
					enr	CAA76083.1	*克氏梭菌*	
					enr	YP_430895.1	*热醋穆尔氏菌*	
13	2.8.3.a	4-羟基丁酸	4-羟基丁酰-辅酶A	4-羟基丁酰-辅酶A移转酶	*cat1*, *cat2*, *cat3*	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	*克氏梭菌*	琥珀酸酯，4-羟基丁酸酯，丁酸酯
					gctA, *gctB*	CAA57199.1, CAA57200.1	*发酵氨基酸球菌*	戊二酸

[0583]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
					atoA, atoD	P76459.1, P76458.1	*大肠杆菌*	丁酸酯
13	3.1.2.a	4-羟基丁酸	4-羟基丁酰-辅酶 A	4-羟基丁酰-辅酶 A 水解酶	*tesB*	NP_414986	*大肠杆菌*	己二酰-辅酶 A
					acot12	NP_570103.1	*褐鼠*	丁酰-辅酶 A
					hibch	Q6NVY1.2	*人类*	3-羟丙基-辅酶 A
13	6.2.1.a	4-羟基丁酸	4-羟基丁酰-辅酶 A	4-羟基丁酰-辅酶 A 连接酶(或 4-羟基丁酰-辅酶 A 合成酶)	*sucCD*	NP_415256.1, AAC73823.1	*大肠杆菌*	琥珀酸
					phl	CAJ15517.1	*产黄青霉*	苯乙酸酯
					bioW	NP_390902.2	*枯草杆菌*	6-羧基己酸
13	1.3.1.a	4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶 A	4-羟基丁酰-辅酶 A	4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶 A 还原酶	*bcd, etfA, etfB*	NP_349317.1, NP_349315.1, NP_349316.1	*丙酮丁醇梭菌*	
					TER	Q5EU90.1	*纤细裸藻*	
					TDE0597	NP_971211.1	*齿垢密螺旋体*	
8	1.1.1.c	4-羟基丁酰-辅酶 A	1,4-丁二醇	4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶(醇形成)	*adhE2*	AAK09379.1	*丙酮丁醇梭菌*	丁基-辅酶 A
					mcr	AAS20429.1	*橙色绿屈挠菌*	丙二酰基辅酶 A
					FAR	AAD38039.1	*加州希蒙得木*	长链酰基-辅酶 A
8	1.2.1.b	4-羟基丁酰-辅酶 A	4-羟基丁醛	4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶(或 4-羟基丁醛脱氢酶)	*sucD*	P38947.1	*克氏梭菌*	琥珀酰-辅酶 A
					sucD	NP_904963.1	*牙龈卟啉单胞菌*	琥珀酰-辅酶 A
					Msed_070	YP_001190808.1	*勤奋金属球菌*	丙二酰基辅酶

[0584]

图	EC 类别	期望的底物	期望的产物	酶名称	基因名称	GenBank ID(如果可得到的)	生物	已知底物
					9			A
8	1.1.1.a	4-羟基丁醛	1,4-丁二醇	4-羟基丁醛	*ADH2*	NP_014032.1	*啤酒酵母*	常规的
					yqhD	NP_417484.1	*大肠杆菌*	>C3
					4hbd	L21902.1	*克氏梭菌 DSM 555*	琥珀酸半醛

[0585] 实施例XII

[0586] 表达琥珀酰-辅酶A合成酶的产BDO菌株

[0587] 该实施例描述了在表达琥珀酰-辅酶A合成酶的产BDO菌株中增加的BDO生产。

[0588] 如上所述，琥珀酸可通过转化为琥珀酰-辅酶A而用于BDO生产的前体(也参见WO2008/115840,WO 2009/023493,美国公开2009/0047719,美国公开2009/0075351)。因此，宿主菌株经遗传修饰以过表达大肠杆菌sucCD基因，其编码琥珀酰-辅酶A合成酶。大肠杆菌sucCD操纵子的核苷酸序列显示在图14A中，用于编码琥珀酰-辅酶A合成酶亚基的氨基酸序列显示在图14B和14C中。简要地，大肠杆菌sucCD基因通过从大肠杆菌染色体DNA PCR而克隆并且利用标准的分子生物学方法导入多拷贝质粒pZS*13,pZA13和pZE33的PAllacO-1启动子后(Lutz and Bujard,Nucleic Acids Res.25:1203-1210(1997))。

[0589] 过表达编码琥珀酰-辅酶A合成酶的大肠杆菌sucCD基因。结果表明相比天然表达水平或琥珀酰-CoA/乙酰-辅酶A移转酶cat1的表达，导入菌株sucCD以表达琥珀酰-辅酶A合成酶提高了各种菌株中BDO的产生。因此，通过过表达编码琥珀酰-辅酶A合成酶的天然大肠杆菌sucCD基因提高了BDO的产生。

[0590] 实施例XIII

[0591] 编码BDO途径酶的异源基因的表达

[0592] 该实施例描述了各种外源途径酶的表达以提供改进的BDO生产。

[0593] α-酮戊二酸脱羧酶。在宿主菌株中表达编码α-酮戊二酸脱羧酶的牛分枝杆菌sucA基因。牛分支杆菌sucA的过表达改进了BDO的生产(也参见WO2008/115840,WO 2009/023493,美国公开2009/0047719,美国公开2009/0075351)。牛分支杆菌sueA的核苷酸和氨基酸序列以及编码的α-酮戊二酸脱羧酶在图15中显示。

[0594] 为了构建牛分支杆菌sucA表达菌株，利用如下所示引物从牛分枝杆菌BCG的基因组DNA(ATCC 19015;American Type Culture Collection,Manassas VA)扩增编码α-酮戊二酸脱羧酶的sucA基因片断。通过四个扩增DNA片断的连接反应组装全长基因，并且克隆入表达载体pZS*13和pZE23的Pal lacO-1启动子后(Lutz and Bujard,Nucleic Acids Res.25:1203-1210(1997))。组装基因的核苷酸序列通过DNA测序验证。

[0595] 用于片断1的引物：

[0596] 5'-ATGTACCGCAAGTTCCGC-3'(SEQ ID NO:)

[0597] 5'-CAATTTGCCGATGCCCAG-3'(SEQ ID NO:)

[0598] 用于片断2的引物：

[0599] 5'-GCTGACCACTGAAGACTTTG-3'(SEQ ID NO:)

[0600] 5'-GATCAGGGCTTCGGTGTAG-3'(SEQ ID NO:)

[0601] 用于片断3的引物：

[0602] 5'-TTGGTGCGGGCCAAGCAGGATCTGCTC-3'(SEQ ID NO:)

[0603] 5'-TCAGCCGAACGCCTCGTCGAGGATCTCCTG-3'(SEQ ID NO:)

[0604] 用于片断4的引物：

[0605] 5'-TGGCCAACATAAGTTCACCATTCGGGCAAAAC-3'(SEQ ID NO:)

[0606] 5'-TCTCTTCAACCAGCCATTCGTTTTGCCCG-3'(SEQ ID NO:)

[0607] 利用体外和体内测定法证实了α-酮戊二酸脱羧酶的功能性表达。随后通过之前报道的方法测定SueA酶活性(Tian等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:10670-10675(2005))。该反应混合物包含50mM磷酸钾缓冲液，pH 7.0,0.2mM硫胺焦磷酸盐，1mM$MgCl_2$,0.8mM铁氰

化物,1mMα-酮戊二酸和细胞粗裂解物。通过铁氰化物在430nm的还原监测酶活性。利用大肠杆菌全细胞培养物验证SucA酶的体内功能。用编码SucA酶和4-羟基丁酸脱氢酶(4Hbd)的质粒转化的大肠杆菌MG1655 laclq的单克隆接种入含有合适抗生素的5mL LB培养基中。细胞在37℃有氧培养整夜。200μl过夜培养物引入补充20g/L葡萄糖,100mM 3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)以改善缓冲能力,以及10μg/mL硫胺和合适的抗生素的8mL M9基本培养基中(6.78g/L Na2HP04,3.0g/L KH_2PO_4,0.5g/L NaCl,1.0g/L NH4C1,1mMmgS04,0.1mM $CaCl_2$)。通过用氮气冲洗加盖的无氧瓶5分钟,接种后用23G针刺穿隔膜而建立微需氧条件。培养期间针保持在瓶中以允许少量空气进入瓶中。当培养达到中对数生长期时用0.2mM异丙基P-D-1-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)诱导蛋白质表达。作为对照,在同样的条件下培养仅用编码4-羟基丁酸脱氢酶的质粒和仅空载体转化的大肠杆菌MG1655 laclq菌株(参见表23)。利用LCMS方法监测培养基中4-羟基丁酸(4HB)的累积。仅表达分支杆菌α-酮戊二酸脱羧酶的大肠杆菌菌株产生显著量的4HB(参见图16)。

[0608] 表24.包含各种对照和编码sucA以及4-羟基丁酸脱氢酶的质粒的三个菌株。

[0609]

	宿主	pZE13	pZA33
1	MG1655 laclq	载体	载体
2	MG1655 laclq	载体	4hbd
3	MG1655 laclq	sucA	4hbd

[0610] 单独的实验表明α-酮戊二酸脱羧酶途径功能与还原的三羧酸循环无关。大肠杆菌菌株ECKh-401(△adhE△ldhA△pflB△lpdA::K.p.lpdA322△mdh△arcA)用作宿主菌株(参见表25)。所有三个构建体包含编码4HB脱氢酶(4Hbd)的基因。构建体1还包含编码α-酮戊二酸脱羧酶(sucA)的基因。构建体2包含编码琥珀酰-辅酶A合成酶的基因(sucCD)和辅酶A-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶基因(sucD),其为4HB经还原的三羧酸循环而合成所必需的。构建体3包含所有1和2的基因。除了第二个在微需氧条件下培养外,这三个大肠杆菌菌株在如上所述同样的条件下培养。通过表达SucA酶,构建体3比构建体2产生更多的4HB,其依赖于用于4HB合成的还原的三羧酸循环(参见图17)。

[0611] 通过流量分析实验提供α-酮戊二酸脱羧酶在4HB和BDO生产中贡献的进一步支持。染色体上包含sucCD-sucD和sucA的ECKh-432培养物在含有1-13C-葡萄糖(60%)和U-13C-葡萄糖(40%)混合物的M9基本培养基中培养。收集生物质,蛋白质分离且水解为氨基酸,通过如前所述的气相色谱-质谱分析法(GCMS)分析氨基酸的标记分布(Fischer and Sauer,Eur.J.Biochem.270:880-891(2003))。另外,通过WO2008115840A2中所述的GCMS分析分泌的4HB和BDO的标记分布。该数据用于利用已建立的方法计算胞内流量分布(Suthers等,Metab.Eng.9:387-405(2007))。结果表明56%和84%之间的α-酮戊二酸通过α-酮戊二酸脱羧酶途径进入BDO途径。其余的由α-酮戊二酸脱氢酶氧化,随后经过琥珀酰-辅酶A路径进入BDO。

[0612] 这些结果证实了包含在质粒上表达的来自牛分枝杆菌BCG的sucA基因的产4-羟基丁酸菌株。当编码该基因的质粒不存在时,没有表达sucD(辅酶A-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶)时可以忽略4-羟基丁酸的产生。牛分支杆菌基因为结核分枝杆菌基因的紧密同系物,其

酶产物之前已经表征(Tian等,上文,2005)。

[0613] 琥珀酸半醛脱氢酶(辅酶A-依赖性),4-羟基丁酸脱氢酶和4-羟基丁酰-辅酶A/乙酰-辅酶A移转酶。来自牙龈卟啉单胞菌W83的基因可以是1,4-丁二醇生产途径的有效组分(也参见WO2008/115840,WO 2009/023493,美国公开2009/0047719,美国公开2009/0075351)。来自牙龈卟啉单胞菌的辅酶A-依赖性琥珀酸半醛脱氢酶(sucD)的核苷酸序列在图18A中显示,其编码的氨基酸序列在图18B中显示。来自牙龈卟啉单胞菌的4-羟基丁酸脱氢酶(4hbd)的核苷酸序列在图19A中显示,其编码的氨基酸序列在图19B中显示。来自牙龈卟啉单胞菌的4-羟基丁酸辅酶A移转酶(cat2)的核苷酸序列在图20A中显示,其编码的氨基酸序列在图20B中显示。

[0614] 简要地,编码琥珀酸半醛脱氢酶(辅酶A-依赖性)和4-羟基丁酸脱氢酶,并且有时另外编码4-羟基丁酰-CoA/乙酰-辅酶A的来自牙龈卟啉单胞菌W83的基因通过从牙龈卟啉单胞菌染色体DNAPCR克隆并且利用标准的分子生物学方法导入多拷贝质粒pZS*13,pZA13和pZE33的PAllacO-1启动子后(Lutz and Bujard,Nucleic Acids Res.25:1203-1210(1997))。这些质粒随后被导入宿主菌株中。

[0615] 牙龈卟啉单胞菌W83基因被导入如上所述的生产菌株中。一些菌株仅包含琥珀酸半醛脱氢酶(辅酶A-依赖性)和4-羟基丁酸脱氢酶而没有4-羟基丁酰-辅酶A/乙酰-辅酶A移转酶。

[0616] 丁酸激酶和磷酸转丁酰酶。丁酸激酶(BK)和磷酸转丁酰酶(PTB)可用于产生4-羟基丁酰-辅酶A(也参见WO2008/115840,WO 2009/023493,美国公开2009/0047719,美国公开2009/0075351)。尤其,丙酮丁醇梭菌基因buk1和ptb可用于功能性BDO途径的一部分。

[0617] 最初的实验涉及天然丙酮丁醇梭菌PTB(020)和BK(021)基因的克隆和在中的表达。其中需要时,每个基因的起始密码子和终止密码子分别修饰为"ATG"和"TAA ",用于大肠杆菌中的更优化表达。丙酮丁醇梭菌基因序列(020N和021N)和其相应的翻译肽序列在图21和22中显示。

[0618] PTB和BK基因在丙酮丁醇梭菌中作为操纵子存在,PTB(020)基因先表达。两个基因通过序列"atta aagttaagtg gaggaatgtt aac"(SEQ ID NO:)连接,其包括用于下游BK(021)基因的重-起始核醣体结合位点。在这里两个基因融合至用于大肠杆菌中表达的表达载体中的lac-控制的启动子(Lutz and Bujard,Nucleic Acids Res.25:1203-1210(1997))。

[0619] 由于丙酮丁醇梭菌基因中密码子的高频率,而其在大肠杆菌中很少存在,发现来自这些载体构建体的两个蛋白质比其他的外源表达基因的表达要低。因此预测新的020和021基因改变了稀有密码子而替代以在大肠杆菌基因序列中更高频出现的密码子。该密码子优化方法遵循之前所述的算法(Sivaraman等,Nucleic Acids Res.36:e16(2008))。该方法根据在其两侧均有某些密码子时其出现频率的情况而预测密码子替换。

[0620] 测定用于020(图23)和021(图)的替代基因序列,其中基于其相邻密码子环境的发生率更多稀有密码子由更优势的密码子取代(A<B<C<D)。这些预测的序列中并未引入相比天然020和021肽序列在实际肽序列上的变化。

[0621] 由密码子优化引起的BK和PTB蛋白质表达的改进在图25A中显示。天然基因序列的表达在泳道2中显示,而020B-021B和020C-021C的表达分别在泳道3和4中显示。密码子-优

化操纵子020B-021B(2021B)和020C-021C(2021C)中更高水平的蛋白质表达还导致在同等-表达的大肠杆菌粗提取液中相比天然的操纵子(2021n)活性的提高(图25B)。

[0622] 密码子优化的操纵子在菌株ECKh-432(△adhE△ldhA△pflB△lpdA::K.p.lpdA322△mdh△arcA gltAR163L fimD::大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd fimD;;牛分支杆菌sucA,克氏梭菌4hbd)中的质粒上与丙酮丁醇梭菌醛脱氢酶一起表达以提供完全的BDO途径。在包含20g/L葡萄糖的M9基本培养基中培养细胞,如上所述利用23G针维持微需氧条件。测定得到的葡萄糖至最终产物BDO的转化。还测定了γ-丁内酯(GBL)的累积,其为源自4Hb-CoA的自发重排分子,PTB-BK酶对的直接产物。图26显示产生可比较BDO水平的替代酶功能Cat2(034)的天然2021n操纵子的表达,其能够将4HB和游离的辅酶A转化为4HB-辅酶A。034的GBL水平显著高于2021n,提示前者酶比来自天然基因表达的PTB-BK具有更多活性。然而当表达密码子-优化的变体2021B和2021C时BDO和GBL的水平高于034或2021n,表明用于PTB和BK的基因密码子优化显著提高其在大肠杆菌BDO合成中的贡献。

[0623] 这些结果证实丁酸激酶(BK)和磷酸转丁酰酶(PTB)可用于将4-羟基丁酸转化为4-羟基丁酰-辅酶A。这排除了对移转酶诸如4-羟基丁酰-辅酶A/乙酰辅酶A移转酶的需要,其在产生每摩尔4-羟基丁酰-辅酶A时产生一摩尔乙酸盐。来自丙酮丁醇梭菌的该酶存在于许多用于BDO生产的工程设计菌株中。

[0624] 4-羟基丁酰-辅酶A还原酶。拜氏梭菌Ald基因可用作功能性BDO途径的一部分(也参见WO2008/115840,WO 2009/023493,美国公开2009/0047719,美国公开2009/0075351)。拜氏梭菌Ald还可以用以降低产BDO菌株中的乙醇产生。另外,发现了特定的密码子-优化Ald变体(GNM0025B)以改进BDO生产。

[0625] 天然的拜氏梭菌Ald基因(025n)和该酶预测的蛋白质序列在图27中显示。如所见到的丙酮丁醇梭菌PTB和BK基因,该天然拜氏梭菌Ald基因在大肠杆菌中的表达极低。因此,预测了该基因的四个密码子-优化变体。图28A-28D显示了025的替代基因序列,其中基于其相邻密码子环境的发生率,更多的稀有密码子由更优势的密码子取代(A<B<C<D)(25A,P=0.05;25B,P=0.1;25C,P=0.15;25D,P=1)。这些预测的序列中并未引入相比天然025肽序列在实际肽序列上的变化。密码子优化显著提高拜氏梭菌Ald的表达(参见图29),其引起在表达完整BDO途径的细胞中明显更高的葡萄糖转化为BDO(图30A)。

[0626] 在宿主菌株ECKh-432(△adhE△ldhA△pflB△lpdA::K.p.lpdA322△mdh△arcAgltAR163L△ackA fimD::大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd fimD::牛分支杆菌sucA,克氏梭菌4hbd)中,该天然的和密码子-优化的基因与牙龈卟啉单胞菌Cat2一起在质粒上表达,由此包含了完全的BDO途径。如上所述细胞在含有20g/L葡萄糖的M9基本培养基中微需氧培养。通过拜氏梭菌Ald酶(表达自密码子-优化的变体基因025B)的BDO和乙醇相对产量与丙酮丁醇梭菌AdhE2酶相比较(参见图30B)。丙酮丁醇梭菌AdhE2酶(002C)产生几乎4倍于BDO的乙醇。比较起来,拜氏梭菌Ald(025B)(与内源的ADH活性联合)产生同等量的BDO,然而相比002C,该酶的BDO与乙醇产量的比率相反。此提示拜氏梭菌Ald比丙酮丁醇梭菌AdhE2对4HB-辅酶A及乙酰-CoA更特异,因此前者为BDO途径中所含的更优选的酶。

[0627] 拜氏梭菌Ald基因(Toth等,Appl.Environ.Microbiol.65:4973-4980(1999))检测

用于催化4-羟基丁酰-辅酶A转化为4-羟基丁醛的候选基因。筛选超过五十种醛脱氢酶的催化4-羟基丁酰-辅酶A转化为4-羟基丁醛的能力。选择拜氏梭菌Ald基因用于引入BDO-生产菌株中,因为与乙酰-CoA相反,该酶偏爱4-羟基丁酰-辅酶A作为底物。这很重要,因为大多数具有醛脱氢酶功能的其他酶(例如,来自丙酮丁醇梭菌的adhE2(Fontaine等,J Bacteriol.184:821-830(2002))优选转化乙酰-CoA为乙醛,其随后转化为乙醇。拜氏梭菌基因的应用降低了产BDO生物中作为副产品产生的乙醇的量。此外,该基因的密码子-优化型在大肠杆菌中很好地表达(Sivaraman等,Nucleic Acids Res.36:e16(2008))。

[0628] 4-羟基丁醛还原酶。利用来自热葡糖苷酶地芽孢杆菌(M10EXG)的adh1的4-羟基丁醛还原酶活性。此通过提高4-羟基丁醛还原酶活性超过内源水平而改进BDO的生产。

[0629] 筛选多个醇脱氢酶催化4-羟基丁醛还原为BDO的能力。对丁醛具有高活性的大多数醇脱氢酶对4-羟基丁醛表现出更低的活性。一个显著的例外为来自热葡糖苷酶地芽孢杆菌M10EXG的adh1基因(Jeon等,J.Biotechnol.135:127-133(2008))(GNM0084),其对4-羟基丁醛和丁醛均表现出高活性。

[0630] 来自热葡糖苷酶地芽孢杆菌的adh1基因的天然基因序列和编码的蛋白质序列在图31中显示。在大肠杆菌中表达热葡糖苷酶地芽孢杆菌ald1基因。

[0631] 该Adh1酶(084)在大肠杆菌中根据其天然基因很好地表达(参见图32A)。在ADH酶测定中,当丁醛或4HB-醛用作底物时大肠杆菌表达显示很高还原活性的酶(参见图32B)。测定的这些底物的Km值分别为1.2mM和4.0mM。这些活性值表明在所有检测的候选酶中Adh1酶对4HB-醛还原具有最高的活性。

[0632] 检测084酶与拜氏梭菌Ald联合时促进BDO生产的能力。084基因插入拜氏梭菌Ald变体025B基因后以产生引起两个基因偶联表达的合成操纵子。类似的构建体将025B与其他的ADH候选基因连接,并且检测了包括每个ADH与025B对BDO生产的作用。所用的宿主菌株为ECKh-459(△adhE ldhA△pflB△lpdA::fnr-pflB6-K.p.lpdA322△mdh△arcA gltAR163L fimD::大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd fimD::牛分支杆菌sueA,克氏梭菌4hbd fimD::丙酮丁醇梭菌buk1,丙酮丁醇梭菌ptb),其染色体上包含BDO途径其余的基因。当与仅025B(图33的左箭头)和与内源ADH功能偶联相比较时,与025B偶联表达的084ADH显示最高的BDO量(图33的右箭头)。当与025B配对时,其比其他的ADH酶产生更多的BDO,表示如下:026A-C,丙酮丁醇梭菌丁醇脱氢酶的密码子-优化变体;050,运动发酵单胞菌醇脱氢酶I;052,弗氏柠檬细菌1,3-丙二醇脱氢酶;053,短乳杆菌1,3-丙二醇脱氢酶;057,脆弱拟杆菌乳醛还原酶;058,大肠杆菌1,3-丙二醇脱氢酶;071,枯草杆菌168α-酮戊二酸半醛脱氢酶。标记为"PT5lac0"的构建体为其中基因由PT5lac0启动子驱动的那些。所有其他的情况中,使用PAllac0-1启动子。这表明BDO途径中包含084ADH提高了BDO的生产。

[0633] 实施例XIV表达丙酮酸脱氢酶的产BDO菌株

[0634] 该实施例描述了丙酮酸脱氢酶(PDH)的使用以增强BDO的生产。肺炎克雷伯氏杆菌lpdA基因的异源表达用于增强BDO的生产。

[0635] 理论计算上,生成NADH的丙酮酸转化为乙酰-CoA要求达到1,4-丁二醇的最大理论收率(也参见WO2008/115840,WO 2009/023493,美国公开2009/0047719,美国公开2009/0075351;WO 2008/018930;Kim等,Appl.Environ.Microbiol.73:1766-1771(2007);Kim等,

J.Bacteriol.190:3851-3858(2008);Menzel等,J.Biotechnol.56:135-142(1997))。缺乏PDH活性表现出降低BDO的最大无氧理论收率,如果不能获得磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)的活性则降低11%,如果可以获得PEPCK的活性则降低3%。然而更重要的是,在OptKnock菌株#_439中,描述于WO 2009/023493和美国公开2009/0047719中,其敲除了ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH和PFLi,缺乏PDH活性将降低最大无氧BDO产率,有或没有PEPCK活性时分别降低54%或43%。在存在外部电子受体时,PDH活性缺乏将降低敲除菌株的最高产量,假定有或没有PEPCK活性时分别降低10%或3%。

[0636] PDH为中心代谢最复杂的酶的一种,并且由24个丙酮酸脱羧酶拷贝(E1)和12个二氢硫辛酸脱氢酶(E3)组成,其结合二氢硫辛酸转乙酰酶(E2)核的外部。PDH受高NADH/NAD,ATP/ADP和乙酰辅酶A/辅酶A比率的抑制。该酶在诸如大肠杆菌的生物中有限氧或缺氧状态下自然表现出非常低的活性很大程度是由于由lpdA编码的E3对NADH的敏感导致的。为此,克隆和表达了来自肺炎克雷伯氏杆菌的NADH-不敏感的lpdA基因型以在NADH/NAD比率预计比较高的条件下提高PDH活性。

[0637] 天然lpdA的替换。肺炎克雷伯氏菌的丙酮酸脱氢酶操纵子与大肠杆菌的同等的操纵子在核苷酸水平有78和95%之间的同一性。之前显示肺炎克雷伯氏菌具有在存在甘油时厌氧培养的能力(Menzel等,J.Biotechnol.56:135-142(1997);Menzel等,Biotechnol.Bioeng.60:617-626(1998))。此外还显示大肠杆菌操纵子lpdA基因中的两个突变提高其厌氧培养的能力(Kim等,Appl.Environ.Microbiol.73:1766-1771(2007);Kim等,Bacteriol.190:3851-3858(2008))。利用基因组DNA(ATCC700721D)作为模板以及引物KP-lpdA-Bam(5'-acacgcggatccaacgtcccgg-3')(SEQ ID NO:)和KP-lpdA-Nhe(5'-agcggctccgctagccgcttatg-3')(SEQ ID NO:)通过PCR扩增肺炎克雷伯菌的IpdA基因。得到的片断克隆入载体pCR-Bluntll-TOPO(Invitrogen;Carlsbad CA),产生质粒pCR-KP-lpdA。

[0638] 利用非-复制型质粒和来自枯草杆菌的sacB基因作为反选择工具进行染色体的基因替换(Gay等,J.Bacteriol.153:1424-1431(1983))。使用的载体为缺失了oriT和IS序列的pRE118(ATCC87693),其大小为3.6kb并且携带有卡那霉素抗性基因。确定序列,并且该载体称为pRE1 18-V2(参见图34)。

[0639] 利用引物组合:EC-aceF-Pst(5'-aagccgttgctgcagctcttgagc-3')(SEQ ID NO:)+EC-aceF-Bam2(5'-atctccggcggtcggatccgtcg-3')(SEQ ID NO:)和EC-yacH-Nhe(5'-aaagcggctagccacgccgc-3')(SEQ ID NO:)+EC-yacH-Kpn(5'-attacacgaggtacccaacg-3')(SEQ ID NO:)通过PCR扩增大肠杆菌IpdA基因侧翼片断。从质粒pCR-KP-lpdA分离包含肺炎克雷伯菌IpdA基因的BamHI-Xbal片断并且随后连接至分别用PstI+BamHI和Nhel-Kpnl酶切的上述大肠杆菌片断以及用Kpnl和PstI酶切的pRE1 18-V2质粒。得到的质粒(称为pRE1 18-M2.1 IpdA yac)利用用于将His 322残基突变为Tyr残基的引物KP-lpdA-HisTyr-F(5'-atgctggcgtacaaaggtgtcc-3')(SEQ ID NO:)和(5'-ggacacctttgtacgccagcat-3')(SEQ ID NO:)或用于将Glu 354残基突变为Lys残基的引物KP-lpdA-GluLys-F(5'-atcgcctacactaaaccagaagtgg-3')SEQ ID NO:)和KP-lpdA-GluLys-R(5'-ccacttctggtttagtgtaggcgat-3')(SEQ ID NO:)组合进行定点诱变(SDM)。用聚合酶Pfu Turbo(Stratagene;San Diego CA)进行PCR。验证完整以及仅存在所需突变的片断序列。得到的质粒通过转化导入大肠杆菌AadhE::Frt-AldhA::Frt电感受态细胞中。在包含卡那霉

素(25或50mg/L)的LB琼脂平板上选择染色体中的第一个整合事件。利用2条引物通过PCR验证正确的插入,一条定位于插入区域的外部而一条定位于卡那霉素基因(5'-aggcagttccataggatggc-3')(SEQ ID NO:)。选择具有正确插入的克隆用于溶解。其在平板液体LB中在所需温度下亚培养两次并且在无盐-蔗糖10%平皿上进行平板系列稀释。在LB-低盐琼脂培养基上筛选在含有蔗糖的平板上培养的克隆中卡那霉素抗性基因的损失,并且通过PCR和所含区域的测序验证IpdA基因的替换。

[0640] 验证插入区域的序列,且如下所述。选择具有Glu354Lys突变的一个克隆(命名4-4-P1)。该克隆随后用产生ECKh-138菌株(△adhE△ldhA△ApflB△lpdA::K.p.lpdA322)的大肠杆菌APflB::Frt的PI裂解物转染。

[0641] 包含aceF和lpdA基因的ECKh-138区域的序列在图5中显示。肺炎克雷伯菌lpdA基因加下划线,Glu354Lys突变体中改变的密码子加阴影。天然大肠杆菌lpdA和突变体肺炎克雷伯菌lpdA的蛋白质序列对比在图36中显示。

[0642] 为了评价在产BDO菌株中利用肺炎克雷伯氏菌lpdA的益处,宿主菌株AB3和ECKh-138用从强的诱导型启动子表达完整BDO途径的质粒转化。具体地,大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd在中拷贝质粒pZA33上表达,而牙龈卟啉单胞菌Cat2和丙酮丁醇梭菌AdhE2在高拷贝质粒pZE13上表达。这些质粒已在文献中描述(Lutz和H.Bujard,Nucleic Acids Res 25:1203-1210(1997)),并且其用于BDO途径表达的用途在实施例XIII和WO2008/115840中描述。

[0643] 在补充的20g/L葡萄糖,100mM 3-(N-吗啉代)丙磺酸(MOPS)以改进缓冲能力,以及10ug/mL硫胺和合适的抗生素的M9基本培养基(6.78g/L Na2HPO4,3.0g/L KH2PO4,0.5g/L NaCl,1.0g/L NH4Cl,1mMmgSO4,0.1mM $CaCl_2$)中37℃下厌氧培养细胞。通过用氮气冲洗加盖的无氧瓶5分钟,接种后用23G针刺穿隔膜而建立微需氧条件。培养期间针保持在瓶中以允许少量空气进入瓶中。当OD600达到大约0.2时添加0.25mM IPTG以诱导该途径基因,并且在诱导后每24小时分析样品。如实施例II和WO2008/115840中所述分析培养物上清液的BDO,4HB和其他副产品。ECKh-138中的BDO和4HB产生48小时后显著高于AB3中的或上述工作所用的宿主MG1655 AldhA中的(图37)。

[0644] PDH启动子替代。之前已表明pdhR阻遏物通过包含Fnr结合位点,一个pflB启动子和其核糖体结合位点(RBS)的转录融合蛋白替代,由此导致aceEF-lpd操纵子由厌氧启动子表达,应当提高pdh的厌氧活性(Zhou等,Biotechnol.Lett.30:335-342(2008))。通过重叠PCR构建包含Fnr结合位点,pflB-p6启动子和RBS结合位点的融合蛋白。扩增两个片断,一个利用引物aceE-上游-RC(5'-tgacatgtaacacctaccttctgtgcctgtgccagtggttgctgtgatatagaag-3')(SEQ ID NO:)和pflBp6-上游-Nde(5'-ataataatacatatgaaccatgcgagttacgggcctataagccaggcg-3')(SEQ ID NO:),另一个利用引物aceE-EcoRV-EC(5'-agtttttcgatatctgcatcagacaccggcacattgaaacgg-3')(SEQ ID NO:)和aceE-上游(5'-ctggcacaggcacagaaggtaggtgttacatgtcagaacgtttacacaatgacgtggatc-3')(SEQ ID NO:)。通过重叠PCR组装这两片断,最终的DNA片断用限制酶NdeI和BamHI酶切。该片断随后利用如前所述的pRE1 18-V2导入大肠杆菌操纵子aceE基因的上游。在菌株ECKh-138和ECKh-422完成该替代。验证包含aceE基因5'区域的核苷酸序列并且在图37中显示。图37显示融合至pflB-p6启动子和核糖体结合位点(RBS)的aceE基因的5'末端核苷酸序列。5'斜体序列显示aroP基因的起始点,其

与pdh操纵子相反的方向转录。3’斜体序列显示aceE基因的起始点。大写体:pflB RBS。下划线:FNR结合位点。粗体:pflB-p6启动子序列。

[0645] IpdA启动子替代。利用染色体DNA模板和引物aceF-pflBp6-正向(5’-agacaaatcggttgccgtttgttaagccaggcgagatatgatctatatc-3’)(SEQ ID NO:)和lpdA-RBS-B-反向(5’-gagttttgatttcagtactcatcatgtaacacctaccttcttgctgtgatatag-3’)(SEQ ID NO:)通过PCR扩增包含fnr结合位点,pflB-p6启动子和pflB基因RBS的启动子区域。利用引物B-RBS-lpdA正向(5’-20ctatatcacagcaagaaggtaggtgttacatgatgagtactgaaatcaaaactc-3’)(SEQ ID NO:)和pflBp6-aceF-反向(5’-gatatagatcatatctcgcctggcttaacaaacggcaaccgatttgtct-3’)(SEQ ID NO:)通过PCR扩增质粒2-4a。利用BPS克隆试剂盒(BPS Bioscience;San Diego CA)组装两个得到的片断。测序验证得到的构建体并且利用如上所述的pRE118-V2方法导入菌株ECKh-439中。产生的菌株ECKh-456中包含aceF-lpdA区域的核苷酸序列在图39中显示。

[0646] 宿主菌株ECKh-439(△adhE△ldhA△pflB△lpdA::K.p.lpdA322△mdh△arcA gltAR163L ackA fimD::大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd fimD::牛分支杆菌sueA,克氏梭菌4hbd),其构建描述如下,并且检测pdhR和IpdA启动子的替代衍生物ECKh-455和ECKh-456的BDO生产。菌株用含有牙龈卟啉单胞菌Cat2和拜氏梭菌Ald的pZS*13转化以提供完全的BDO途径。如上所述细胞在补充的20g/L葡萄糖的M9基本培养基中培养。用0.2mM IPTG诱导后48小时,BDO,4HB和丙酮酸的浓度在图40中显示。启动子替代的菌株比同基因的亲本产生稍微更多的BDO。

[0647] 这些结果表明产BDO菌株中丙酮酸脱氢酶的表达提高BDO的生产。

[0648] 实施例XV

[0649] 表达柠檬酸合成酶和乌头酸酶的产BDO菌株

[0650] 该实施例描述了提高柠檬酸合成酶和乌头酸酶的活性以提高BDO的生产。发现gltA中R163L突变改进BDO的生产。另外,arcA敲除用于改进BDO生产。

[0651] 理论计算上,确定了通过柠檬酸合成酶(CS)和乌头酸酶(ACONT)的流量要求达到1,4-丁二醇的最大理论收率(也参见WO2008/115840,WO2009/023493,美国公开2009/0047719,美国公开2009/0075351)。缺氧状态下CS或ACONT活性缺乏将降低14%地最大理论收率。存在外部电子受体时,假定存在或缺少PEPCK活性时,没有流经CS或ACONT时,最大产率分别减少了9%或6%。如同丙酮酸脱氢酶(PDH)一样,在其中ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH和PFLi被敲除的敲除菌株背景中CS和ACONT的重要性被极大地放大(参见WO2009/023493和美国公开2009/0047719,其在此通过引用引入)。

[0652] WO2009/023493和美国公开2009/0047719中所述的最小的OptKnock菌株设计除了ECKh-138外具有另外的缺失,编码苹果酸脱氢酶的mdh基因。该基因的缺失用来防止经过还原的三羧酸循环流向琥珀酸。利用λ红同源重组方法(Datsenko and Wanner,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:6640-6645(2000))进行mdh缺失。下列寡核苷酸用于从pKD3 PCR扩增侧翼为FRT位点的抗氯霉素基因(CAT):

S-mdh-Kan 5'- **TAT TGT GCA TAC AGA TGA ATT TTT ATG CAA ACA GTC AGC CCT GAA GAA GG**G TGT AGG CTG GAG CTG CTT C -3'(SEQ ID NO:)

[0653]

AS-mdh-Kan 5' - **CAA AAA ACC GGA GTC TGT GCT CCG GTT TTT TAT TAT CCG CTA ATC AAT TAC** ATA TGA ATA TCC TCC TTA G – 3' (SEQ ID NO:)。

[0654] 下划线区域表明与pKD3质粒的同源性而粗体序列指mdh ORF的上游和下游序列同源性。纯化后,PCR产物电穿孔入已用pRedET(tet)转化的ECKh-138电感受态细胞中并且按照厂家说明制备(www.genebridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modification%20Kit-version2.6-2007-screen.pdf)。如图41所示,设计PCR产物以使其整合入ECKh-138基因组的mdh基因上游区域。

[0655] 选择氯霉素抗性重组体并且薄层纯化。通过诊断PCR验证mdh基因的缺失和CAT的插入。为了除去CAT基因,包含FLP重组酶(Datsenko and Wanner,Proc.Natl.Acad.Sci.USA97:6640-6645(2000))的热敏质粒pCP20在30℃转化入该细胞并且选择氨苄青霉素抗性(AMP)。转化体在42℃过夜无选择性地培养以热诱导FLP合成并且导致质粒丢失。随后薄层纯化培养物,检测单一克隆的所有抗生素抗性丧失。大多数同时丧失FRT-侧翼的抗性基因和FLP辅助质粒。还存在"FRT"创痕残留物。得到的菌株命名为ECKh-172。

[0656] CS和ACONT在缺氧状态下没有高活性或高表达。为此,缺失编码三羧酸循环全程调节剂的arcA基因。ArcA在微需氧条件下作用以诱导基因产物表达,其提供中心代谢酶的活性,该酶对低氧含量,aceE,pflB和adhE敏感。显示微需氧时arcAJarcB缺失提高Idh,icd,gltA,mdh和gdh基因的特异性活性(Salmon等,J.Biol.Chem.280:15084-15096(2005);Shalel-Levanon等,Biotechnol.Bioeng.92(2):147-159(2005))。分别利用引物ArcA-上游-EcoRI(5'-ataataatagaattcgtttgctacctaaattgccaactaaatcgaaacagg-3')(SEQ ID NO:)与ArcA-上游-Kpnl(5'-tattattatggtaccaatatcatgcagcaaacggtgcaacattgccg-3')(SEQ ID NO:)和ArcA-下游-EcoRI(5'-tgatctggaagaattcatcggctttaccaccgtcaaaaaaaacggcg-3')(SEQ ID NO:)与ArcA-下游-Pstl(5'-ataaaaccctgcagcggaaacgaagttttatccatttttggttacctg-3')(SEQ ID NO:)通过PCR扩增大肠杆菌MG1655的arc A基因的上游和下游区。这些片断随后用限制性酶EcoRI和Kpnl(上游片断)以及EcoRI和PstI(下游)酶切。其随后连接入用PstI和Kpnl酶切的pRE118-V2质粒,产生质粒pRE118-AarcA。验证质粒pREl 18-AarcA的序列。pREl 18-AarcA导入大肠杆菌菌株ECKh-172(△adhE△ldhA△pflB△lpdA::K.p.lpdA322△mdh)的电感受态细胞中。如上所述在整合和溶解于LB-无盐-蔗糖平板上后,通过测序验证得到的菌株ECKh-401染色体中arc A基因的缺失并且显示在图42中。

[0657] 大肠杆菌gltA基因编码柠檬酸合成酶。之前已表明该基因由NADH别构抑制,并且已经鉴定了参与该抑制作用的氨基酸(Pereira等,J.Biol.Chem.269(1):412-417(1994);Stokell等,Biol.Chem.278(37):35435-35443(2003))。利用引物gltA-上游(5'-ggaagagaggctggtacccagaagccacagcagga-3')(SEQ ID NO:)和gltA-Pstl(5'-gtaatcactgcgtaagcg

ccatgccccggcgttaattc-3’)(SEQ ID NO:)通过PCR扩增大肠杆菌MG1655的gltA基因。扩增片断用Kpnl和PstI酶切后克隆入pRE1 18-V2。得到的质粒称为pRE1 18-gltA。质粒随后利用引物R163L-正向(5’-attgccgcgttcctcctgctgtcga-3’)(SEQ ID NO:)和R163L-反向(5’-cgacagcaggaggaacgcggcaat-3’)(SEQ ID NO:)经定点诱变(SDM)以将Arg 163残基改变为Lys残基。通过测序验证完整片断的序列。λ红同源重组方法的变型(Datsenko and Wanner,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:6640-6645(2000))用于用R163L突变体等位基因取代天然的gltA基因而不留Frt创痕。常规重组方法与如上所述用于产生mdh缺失的相同。首先,菌株ECKh-172通过利用λ红同源重组方法引入rpsL null突变而具有链霉素抗性。然后,用由卡那霉素抗性基因(kanR)和大肠杆菌rpsL基因的野生型拷贝组成的盒完成重组以取代该菌株中全部的野生型gltA编码区。当引入具有rpsL null突变的大肠杆菌菌株时,该盒造成细胞对抗链霉素药物向链霉素敏感的改变。包括gltA基因每一突变体型的DNA片断随后与合适的同源末端一起引入,并且在存在链霉素时检测得到的克隆培养物。此选择其中kanR/rpsL盒已由突变体gltA基因取代的菌株。通过PCR和DNA测序分析确定突变基因插入正确的基因座中。得到的菌株称为ECKh-422,并且具有基因型△adhE△ldhA△pflB△lpdA::K.p.lpdA322△mdh△arcA gltAR163L。如图43所示,通过测序验证包含菌株ECKh-422gltA基因突变的区域。

[0658] 随后评价菌株ECKh-401和gltAR163L突变体ECKh-422粗提取液的柠檬酸合成酶活性。通过在4,500rpm离心10min收集细胞(Beckman-Coulter,Allegera X-15R;Fullerton CA)。片状沉淀物重悬浮于具有benzonase和溶菌酶的0.3mL BugBuster(Novagen/EMD;San Diego CA)试剂中,且在室温下温和振荡15分钟进行裂解。通过在4℃,14,000rpm离心30min获得无细胞裂解物(Eppendorf centrifuge 5402;Hamburg Germany)。利用Bradford方法测定样品中的细胞蛋白质(Bradford,Anal.Biochem.72:248-254(1976))。

[0659] 通过形成游离辅酶A后(HS-CoA)测定柠檬酸合成酶活性,游离的辅酶A与草酰乙酸释放自乙酰-CoA反应。游离的HS-辅酶A硫醇基与5,5’-二硫双-(2-硝基苯甲酸)(DTNB)反应以形成5-硫代-2-硝基苯甲酸(TNB)。随后通过分光光度测定410nm的吸光率(最大在412nm)监测TNB的浓度。测定混合物包含100mM Tris/HCl缓冲液(pH 7.5),20mM乙酰-CoA,10mM DTNB,以及20mM草酰乙酸。为了评价NADH抑制作用,还添加0.4mM NADH至该反应。通过添加5微升细胞提取物起始该测定,并且通过随时间变化的吸光率测定反应速度。单位比活性定义为每毫克蛋白质每分钟转化的μ摩尔产物。

[0660] 图44显示野生型gltA基因产物和R163L突变体的柠檬酸合成酶活性。在没有或存在0.4mM NADH时进行该测定。

[0661] 菌株ECKh-401和ECKh-422用表达全部BDO途经的质粒转化。大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd和牛分支杆菌sucA在低拷贝质粒pZS*13上表达,牙龈卟啉单胞菌Cat2和丙酮丁醇梭菌AdhE2在中拷贝质粒pZE23上表达。这些菌株的培养物在如上所述补充20g/L葡萄糖和合适的抗生素的M9基本培养基中微需氧培养。来自重复培养物平均数的诱导后48小时的4HB和BDO浓度在图45中显示。ECKh-422中的浓度均比ECKh-401高,表明因gltA突变产生的增强的柠檬酸合成酶活性导致BDO途径流量的提高。

[0662] 本节所述的宿主菌株变体用来重定向经过氧化三羧酸循环的碳通量,其与WO2009/023493和美国公开2009/0047719中所述的OptKnock菌株设计一致。为了证实通量

确实通过该途径，利用菌株ECKh-432进行^{13}C通量分析，其为ECKh-422型，其中上游途径整合入染色体中(如实施例XVII所述)。为了完成BDO途径，从pZS*13表达牙龈卟啉单胞菌Cat2和拜氏梭菌Ald。四个平行培养物在含有四种不同标记比率(1_^{13}C，仅葡萄糖分子的第一个碳原子用^{13}C标记；统一的-^{13}C，所有碳原子为^{13}C)的4g/L总葡萄糖的M9基本培养基中培养(6.78g/L Na2HP04，3.0g/L KH2P04，0.5g/L NaCl，1.0g/L NH4C1，1mM MgS04，0.1mM CaCl2)：

[0663] 1.80mol％未标记的，20mol％统一的-^{13}C

[0664] 2.10mol％未标记的，90mol％统一的-^{13}C

[0665] 3.90mol％1-^{13}C，10mol％统一的-^{13}C

[0666] 4.40mol％1-^{13}C，60mol％统一的-^{13}C

[0667] 双份培养平行的未标记培养物，从其定时取样以评价生长速率，葡萄糖摄入率和产物形成率。晚期对数生长期中，收集标记的培养物，蛋白质分离且水解为氨基酸，通过如前所述的气相色谱-质谱分析法(GCMS)分析氨基酸的标记分布(Fischer and Sauer，Eur.J.Biochem.270:880-891(2003))。另外，通过WO2008115840中所述的GCMS分析来自标记培养物的发酵液中分泌的4HB和BDO的标记分布。该数据用于利用已建立的方法计算胞内流量分布(Suthers等，Metab.Eng.9:387-405(2007))。得到的中心代谢流量和相关的95％置信区间在图46中显示。数值为标准化至1mmol/h葡萄糖摄入率的摩尔量。结果表明碳量通过柠檬酸合成酶进入氧化方向并且大部分碳进入BDO途径而不是完成三羧酸循环。

[0668] 此外，由于该菌株中缺失mdh，证实基本上无苹果酸和草酰乙酸之间的流量。

[0669] 通过将ECKh-422的典型发酵方面与原始菌株ECKh-138的相比较观察利用敲除菌株诸如利用OptKnock设计用于BDO生产的菌株(参见WO2009/023493和美国公开2009/0047719)的优势，其中BDO经过还原的三羧酸循环从琥珀酸产生(参见图47)。利用补充20g/L葡萄糖的M9基本培养基在2L Biostat B+生物反应器(Sartorius;Cedex France)中以1L初始培养体积进行发酵。温度控制在37℃，pH利用2M NH_4OH或Na_2CO_3控制在7.0。细胞有氧培养至大约10的OD600，期间用0.2mM IPTG诱导培养物。诱导后一小时，空气流量降至0.02标准升/分种用于微需氧条件。搅拌速率设定为700rpm。给予浓缩的葡萄糖以维持容器中0.5和10g/L之间的葡萄糖浓度。如以上实施例所述两个菌株用包含完整BDO途径的质粒转化。ECKh-138中，乙酸盐，丙酮酸和4HB在发酵中占优势，而ECKh-422中BDO为主要产物。

[0670] 实施例XVI

[0671] 表达磷酸烯醇丙酮酸羧激酶的BDO菌株

[0672] 该实施例描述了利用磷酸烯醇丙酮酸羧激酶(PEPCK)以增强BDO的生产。流感嗜血杆菌PEPCK基因用于异源表达。

[0673] 理论计算上，确定了生成ATP的草酰乙酸至磷酸烯醇丙酮酸的转化要求达到1,4-丁二醇的最大理论收率(也参见WO2008/115840，WO2009/023493，美国公开2009/0047719，美国公开2009/0075351)。显示缺乏PEPCK活性降低BDO的最大的理论收率，假定为缺氧状态时降低12％而假定存在外部电子受体诸如硝酸盐或氧时降低3％。

[0674] 在诸如大肠杆菌的生物中，PEPCK以糖原异生和消耗ATP的草酰乙酸向磷酸烯醇丙酮酸的方向起作用。已假设大肠杆菌PEPCK的动力学限制阻止其有效催化从PEP形成草酰乙酸。PEP羧化酶(PPC)，其不产生ATP但为有效培养所必需，由大肠杆菌自然利用以从磷酸烯

醇丙酮酸形成草酰乙酸。因此，检测三个非天然PEPCK酶(Table 26)的大肠杆菌PPC突变菌株在葡萄糖基本培养基中补充培养的能力。

[0675] 表26.磷酸烯醇丙酮酸羧激酶序列的来源

[0676]

PEPCK来源菌株	登录号，GenBank参考序列
流感嗜血杆菌	NC_000907.1
琥珀酸放线杆菌	YP_001343536.1
产琥珀酸曼氏杆菌	YP_089485.1

[0677] 互补培养研究了获自Keio收集物的Δppc突变体大肠杆菌中候选基因表达的相关质粒(Baba等，Molecular Systems Biology 2:2006.0008(2006))。该基因克隆于表达载体pZA23(中拷贝)和pZE13(高拷贝)的PAllacO-1启动子后。之前已描述了这些质粒(Lutz and H.Bujard，Nucleic Acids Res 25:1203-1210(1997))，并且其用于表达BDO途径基因的用途之前已在WO2008/115840中描述。

[0678] 预培养物在具有4g/L葡萄糖的M9基本培养基中有氧培养。所有预培养物补充天冬氨酸(2mM)以提供Δppc突变体不依赖PEPCK的表达而生成三羧酸循环中间体的来源。具有4g/L葡萄糖的M9基本培养基也用于该检测条件中，但不添加天冬氨酸并且IPTG添加至0.5mM。表27显示互补培养研究的结果。

[0679] 表27.具有来自流感嗜血杆菌、产琥珀酸放线杆菌和产琥珀酸曼氏杆菌的PEPCK的Δppc突变体从载体pZA23或pZE13表达时的互补

[0680]

PEPCK来源菌株	载体	时间(h)	OD_{600}
流感嗜血杆菌	pZA23BB	40	0.950
Δppc对照	pZA23BB	40	0.038
产琥珀酸放线杆菌	pZA23BB	40	0.055
产琥珀酸曼氏杆菌	pZA23BB	40	0.214
产琥珀酸放线杆菌	pZE13BB	40	0.041
产琥珀酸曼氏杆菌	pZE13BB	40	0.024
Δppc对照	pZE13BB	40	0.042

[0681] 发现在基于筛选的质粒中所检测的基因之中，Δppc突变体大肠杆菌中流感嗜血杆菌PEPCK补充培养最好。随后利用用上述pRE118-V2的SacB反选择方法将该基因整合入野生型大肠杆菌(MG1655)的PPC基因座(Gay等，J.Bacteriol.153:1424-1431(1983))。PEPCK整合保留大肠杆菌天然PPC启动子，但利用外源PEPCK终止子。ppc由流感嗜血杆菌pepck替代后的该区域序列在图48中显示。pepck编码区为下划线的。

[0682] 用于适应性进化的技术被用于提高大肠杆菌突变体(Δppc::H.inf pepCK)的生长速率。具有4g/L葡萄糖和50mM碳酸氢钠的M9基本培养基用于在缺氧环境中培养和进化该菌株。高碳酸氢钠浓度用于推动PEPCK反应向草酰乙酸形成的平衡状态。为了维持指数生长，每当达到0.5的OD600时培养物稀释2倍。3个星期适应进化的大约100世代后，厌氧生长速率从大约8h提高至野生型的大约2h。进化后，分离单一克隆，比较初始突变体和野生型菌株的厌氧瓶中的培养(参见图49)。使用具有4g/L葡萄糖和50mM碳酸氢钠的M9培养基。

[0683] 随后重复如上所述的ppc/pepck基因替代方法，这次利用产BDO菌株ECKh-432(△adhE△ldhA△pflB△lpdA::K.p.lpdA322△mdh△arcA gltAR163L△ackA fimD::大肠杆菌

sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd fimD::牛分支杆菌sucA,克氏梭菌4hbd)和ECKh-439作为宿主。这些菌株包含上述增强的三羧酸循环且上游途径整合入染色体中。ECKh-439为ECKh-432的衍生物,其具有编码乙酰激酶的ackA基因缺失。利用如上所述的sacB反选择方法进行该缺失。

[0684] 对ECKh-439的△ppc::H.inf pepCK衍生物,称为ECKh-453进行发酵。下游BDO途径由包含牙龈卟啉单胞菌Cat2和拜氏梭菌Ald的pZS*13提供。利用补充20g/L葡萄糖和50mM NaHCO3的M9基本培养基在2L Biostat B+bioreactors(Sartorius;Cedex France)中以1L初始培养体积进行该发酵。温度控制在37℃,pH利用2M NH_4OH或Na_2CO_3控制在7.0。细胞有氧培养至大约2的OD600,期间用0.2mM IPTG诱导培养物。诱导后一小时,空气流量降至0.01标准升/分种用于微需氧条件。搅拌速率最初设定为700rpm。培养物密度增加时整个发酵期间曝气率逐渐提高。给予浓缩的葡萄糖溶液以维持容器中0.5和10g/L之间的葡萄糖浓度。产品分布显示在图50中。其中BDO和乙酸盐以大约一比一的摩尔比产生的观察的表型与WO2009/023493中用于设计#_439的所预测的非常类似(ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi)。靶向ASPT反应的缺失被认为是没必要的,因为经过天冬氨酸氨-裂解酶的自然流量较低。

[0685] OptKnock菌株的关键特性为目的代谢产物的产生通常与生长相关联,且进一步的,在指数生长和静止期均应存在代谢产物的产生。通过在微需氧瓶中培养而在对数生长期常取样而评价ECKh-432和ECKh-453的生长联合潜力。使用包含4g/L葡萄糖和10mM NaHCO3(用于ECKh-432)或50mM NaHCO3(用于ECKh-453)的M9培养基,并且接种培养时包括0.2mM IPTG。18G针用于ECKh-432的微需氧培养,而18G和27G针均用于ECKh-453的检测。更高尺寸的针引起更少的通风。如图51所示,在已经消耗了5g/L葡萄糖时,即相当于静止期开始时,ECKh-432不再开始产生BDO。ECKh-453在整个实验期间更均匀地产生BDO。另外,由于培养通风减少,培养联合提高。

[0686] 实施例XVII

[0687] BDO途径编码基因在特定整合位置的整合

[0688] 该实施例描述了各种BDO途径基因整合入fimD基因座以提供更有效的表达和稳定性。

[0689] 产生4HB的完整的上游BDO途径已整合入大肠杆菌染色体的fimD基因座。利用λ红同源重组方法将上游途径的琥珀酸分支整合入大肠杆菌染色体中(Datsenko and Wanner,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:6640-6645(2000))。受体大肠杆菌菌株为ECKh-422(△adhE△ldhA△pflB△lpdA::K.p.lpdA322△mdh△arcA gltAR163L)。包含启动子,sucCD基因,sucD基因和4hbd基因以及终止子序列的多顺反子DNA片断插入pKD3质粒的Afllll位置中。下列引物用于一起扩增操纵子和来自质粒的氯霉素标志物。下划线序列与靶标插入位置的序列同源。

[0690] 5’-GTTTGCACGCTATAGCTGAGGTTGTTGTCTTCCAGCAACGTACCGTATACAATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTC-3’(SEQ ID NO:)

[0691] 5’-GCTACAGCATGTCACACGATCTCAACGGTCGGATGACCAATCTGGCTGGTATGGGAATTAGCCATGGTCC-3’(SEQ ID NO:)

[0692] Dpnl处理和DNA电泳后,纯化的PCR产物用于转化含有质粒pKD46的大肠杆菌菌株。在包含氯霉素的平板上选择候选菌株。纯化候选菌株的基因组DNA。扩增插入序列并且通过

DNA测序确认。通过翻转酶从染色体除去氯霉素-抗性标志。插入物和标志除去后的该区域核苷酸序列在图52中显示。

[0693] 上游途径的α-酮戊二酸分支通过同源重组整合入染色体中。如实施例XIV中引用的,该变体中所用的质粒源自载体pRE118-V2,其包含卡那霉素-抗性基因,编码果聚糖蔗糖酶的基因(sacB)和R6K条件复制起始点。该整合质粒还包含具有启动子,sucA基因,克氏梭菌4hbd基因和插入两个1.5-kb DNA片断之间的终止子的多顺反子序列,该两个DNA片断与靶标插入物位置的侧翼区同源。得到的质粒用于转化大肠杆菌菌株。在包含卡那霉素的平板上选择整合的候选菌株。通过PCR验证正确的整合位置。为了从染色体消除抗生素标志,在包含蔗糖的培养基上培养而选择细胞。通过PCR和DNA测序验证最终的菌株。插入物和标志除去后的染色体区域的核苷酸序列在图53中显示。

[0694] 得到的上游途径整合菌株ECKh-432用含有下游途径基因的质粒转化。该构建体能够在基本培养基中从葡萄糖生产BDO(参见图54)。

[0695] 实施例XVIII

[0696] 使用非-磷酸转移酶蔗糖摄取系统降低丙酮酸副产品的形成

[0697] 该实施例描述了利用非-磷酸转移酶(PTS)蔗糖摄取系统降低蔗糖转化为BDO中作为副产品的丙酮酸。

[0698] 设计用于经过磷酸转移酶(PTS)系统利用蔗糖的菌株产生显著量的副产品丙酮酸。因此,利用非-PTS蔗糖系统可用于减少丙酮酸的形成,因为蔗糖的输入不会伴随磷酸烯醇丙酮酸(PEP)转化为丙酮酸。这将通过PPC或PEPCK提高PEP库和向草酰乙酸的流量。

[0699] 将非-PTS蔗糖操纵子插入rrnC区域。为了产生包含侧翼为与rrnC区域同源的区域的非-PTS蔗糖基因的PCR产物,两个寡核苷酸用于PCR扩增来自MachlTM的csc基因(Invitrogen,Carlsbad,CA)。该菌株为已知能够分解代谢蔗糖的大肠杆菌菌株W菌株的后代(Orencio-Trejo等,Biotechnology Biofuels 1:8(2008))。该序列源自大肠杆菌W菌株KOll(登录号AY314757)(Shukla等,Biotechnol.Lett.26:689-693(2004))并且包括编码蔗糖透膜酶(cscB),D-果糖激酶(cscK),蔗糖水解酶(cscA)和Lacl-相关的蔗糖-特异性阻遏物(cscR)的基因。cscR的前53个氨基酸通过AS引物除去。该寡核苷酸的序列为:

rrnC 23S del S –CSC 5'-**TGT GAG TGA AAG TCA CCT GCC TTA ATA TCT CAA AAC TCA TCT TCG GGT GA**C GAA ATA TGG CGT GAC TCG ATA C-3' (SEQ ID NO:) and rrnC 23S del AS –CSC 5'-**TCT GTA TCA GGC TGA AAA TCT TCT CTC ATC CGC CAA AAC AGC TTC GGC GT**T AAG ATG CGC GCT CAA GGA C-3' (SEQ ID NO:)。下划线区域表明与csc操纵子的同源性而粗体序列指rrnc区域ORF的上游和下游序列同源性。完整的PCR产物的序列在图55中显示。

[0700] 纯化后,PCR产物电穿孔入已用pRedET(tet)转化的MG1655电感受态细胞中并且按照厂家说明制备(www.genebridges.com/gb/pdf/K001%20Q%20E%20BAC%20Modification%20Kit-version2.6-2007-screen.pdf)。设计PCR产物使得其整合入基因组染色体的rrnC区域。如图56所示,其有效缺失rrlC上游的191个核苷酸(23S rRNA),所有rrlC rRNA gene和3个rrlC下游核苷酸,并且用蔗糖操纵子取代。

[0701] 转化体在具有0.4％蔗糖的M9基本盐培养基上培养并且通过诊断PCR在存在蔗糖时检测单一克隆。完整的rrnC::crcAKB区域通过PI转导(Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Third Ed.,Cold Spring Harbor Laboratory,New York(2001)转移入BDO宿主菌株ECKh-432中,产生ECKh-463(△adhE△ldhA△pflB△lpdA::K.p.lpdA322△mdh△arcA gltAR163L fimD::大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd fimD::牛分支杆菌sucA,克氏梭菌4hbd rrnC::cscAKB)。通过在蔗糖上培养选择重组体并且通过诊断PCR验证。

[0702] ECKh-463用含有牙龈卟啉单胞菌Cat2和拜氏梭菌Ald的pZS*13转化以提供完全的BDO途径。在补充20g/L葡萄糖M9基本培养基(6.78g/L Na2HPO4,3.0g/L KH2PO4,0.5g/L NaCl,1.0g/L NH4Cl,1mM MgSO4,0.1mM CaCl2)中培养细胞。培养开始时培养物中存在0.2mM IPTG。利用具有23G针的瓶维持缺氧状态。作为对照,包含同样质粒的ECKh-432在同样的培养基上培养,除了用10g/L葡萄糖代替蔗糖。图57显示培养48小时后的平均产物浓度,标准化至培养物OD600。所述数据为每种菌株的6次重复培养物。这表明ECKh-463在蔗糖上生产BDO与亲本在蔗糖上的类似。

[0703] 实施例XIX

[0704] 产BDO菌株的概要

[0705] 这实施例描述了各种产BDO菌株。

[0706] 表28概述了以上实施例XII-XVIII中公开的各种产BDO菌株。

[0707] 表28.各种产BDO菌株的总结

[0708]

菌株#	宿主菌株#	宿主染色体	宿主描述	基于的质粒
1		ΔldhA	大肠杆菌MG1655的单个缺失衍生物	*大肠杆菌sucCD，牙龈卟啉单胞菌sucD，牙龈卟啉单胞菌4hbd，牙龈卟啉单胞菌Cat2，丙酮丁醇梭菌AdhE2*
2	AB3	ΔadhE ΔldhA ΔpflB	产琥珀酸菌株；大肠杆菌MG1655的衍生物	*大肠杆菌sucCD，牙龈卟啉单胞菌sucD，牙龈卟啉单胞菌4hbd，牙龈卟啉单胞菌Cat2，丙酮丁醇梭菌AdhE2*
3	ECKh-138	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322	改进lpdA以提高丙酮酸脱氢酶流量	*大肠杆菌sucCD，牙龈卟啉单胞菌sucD，牙龈卟啉单胞菌4hbd，牙龈卟啉单胞菌Cat2，丙酮丁醇梭菌AdhE2*
4	ECKh-138	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322		*大肠杆菌sucCD，牙龈卟啉单胞菌sucD，牙龈卟啉单胞菌4hbd，丙酮丁醇梭菌bukl，丙酮丁醇梭菌ptb，丙酮丁醇梭菌AdhE2*
5	ECKh-401	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA	mdh和arcA缺失以引导流经氧化的三羧酸循环	*大肠杆菌sucCD，牙龈卟啉单胞菌sucD，牙龈卟啉单胞菌4hbd，牙龈卟啉单胞菌Cat2，丙酮丁醇梭菌AdhE2*
6	ECKh-401	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA		*牛分支杆菌sucA，大肠杆菌sucCD，牙龈卟啉单胞菌sucD，牙龈卟啉单胞菌4hbd，牙龈卟啉单胞菌*

[0709]

菌株 #	宿主菌株 #	宿主染色体	宿主描述	基于的质粒
				Cat2，丙酮丁醇梭菌 AdhE2
7	ECKh-422	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L	突变柠檬酸合成酶以提高厌氧活性	*大肠杆菌 sucCD，牙龈卟啉单胞菌 sucD，牙龈卟啉单胞菌 4hbd，牙龈卟啉单胞菌 Cat2，丙酮丁醇梭菌 AdhE2*
8	ECKh-422	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L		*牛分支杆菌 sucA，大肠杆菌 sucCD，牙龈卟啉单胞菌 sucD，牙龈卟啉单胞菌 4hbd，牙龈卟啉单胞菌 Cat2，丙酮丁醇梭菌 AdhE2*
9	ECKh-422	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L		*牛分支杆菌 sucA，大肠杆菌 sucCD，牙龈卟啉单胞菌 sucD，牙龈卟啉单胞菌 4hbd，牙龈卟啉单胞菌 Cat2，拜氏梭菌 Ald*
10	ECKh-426	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: 大肠杆菌 sucCD，牙龈卟啉单胞菌 sucD，牙龈卟啉单胞菌 4hbd	整合入 ECKh-422 的上游途径琥珀酸分支	*牙龈卟啉单胞菌 Cat2，拜氏梭菌 Ald*
11	ECKh-432	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: 大肠杆菌 sucCD，牙龈卟啉单胞菌 sucD，牙龈卟啉单胞菌 4hbd fimD：：牛分支杆菌 sucA，克氏梭菌 4hbd	整合入 ECKh-422 的琥珀酸和 α-酮戊二酸上游途径分支	*牙龈卟啉单胞菌 Cat2，拜氏梭菌 Ald*
12	ECKh-432	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: 大肠杆菌 sucCD，牙龈卟啉单胞菌 sucD，牙龈卟啉单胞菌 4hbd fimD：：牛分支杆菌		丙酮丁醇梭菌 bukl，丙酮丁醇梭菌 ptb，拜氏梭菌 Ald

[0710]

菌株#	宿主菌株#	宿主染色体	宿主描述	基于的质粒
		sucA，克氏梭菌 4hbd		
13	ECKh-439	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L ΔackA fimD:: 大肠杆菌 sucCD，牙龈卟啉单胞菌 sucD，牙龈卟啉单胞菌 4hbd fimD：：牛分支杆菌 sucA，克氏梭菌 4hbd	ECKh-432 乙酰激酶缺失	*牙龈卟啉单胞菌 Cat2，拜氏梭菌 Ald*
14	ECKh-453	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L ΔackA Δppc::H.i.ppck fimD:: 大肠杆菌 sucCD，牙龈卟啉单胞菌 sucD，牙龈卟啉单胞菌 4hbd fimD：：牛分支杆菌 sucA，克氏梭菌 4hbd	ECKh-432 的乙酰激酶缺失和 PPC/PEPCK 替代	*牙龈卟啉单胞菌 Cat2，拜氏梭菌 Ald*
15	ECKh-456	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::fnr-pflB6-K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: 大肠杆菌 sucCD，牙龈卟啉单胞菌 sucD，牙龈卟啉单胞菌 4hbd fimD：：牛分支杆菌 sucA，克氏梭菌 4hbd	ECKh-432 中用厌氧启动子替代 IpdA 启动子	*牙龈卟啉单胞菌 Cat2，拜氏梭菌 Ald*
16	ECKh-455	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 ΔpdhR::fnr-pflB6 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: 大肠杆菌 sucCD，牙龈卟啉单胞菌 sucD，牙龈卟啉单胞菌 4hbd fimD：：牛分支杆菌 sucA，克氏梭菌 4hbd	ECKh-432 中用厌氧启动子替代 pdhR 和 aceEF 启动子	*牙龈卟啉单胞菌 Cat2，拜氏梭菌 Ald*
17	ECKh-459	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD:: 大肠杆菌 sucCD，牙龈卟啉单胞菌 sucD，牙龈卟啉单胞菌 4hbd fimD：：牛分支杆菌 sucA，克氏梭菌 4hbd fimD：：丙酮丁醇梭菌 bukl，丙酮丁醇	BK/PTB 整合入 ECKh-432	*拜氏梭菌 Ald*

[0711]

菌株#	宿主菌株#	宿主染色体	宿主描述	基于的质粒
		梭菌 ptb		
18	ECKh-459	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD::大肠杆菌 sucCD，牙龈卟啉单胞菌 sucD，牙龈卟啉单胞菌 4hbd fimD::牛分支杆菌 sucA，克氏梭菌 4hbd fimD::丙酮丁醇梭菌 bukl，丙酮丁醇梭菌 ptb		*拜氏梭菌 Ald，热葡糖苷酶地芽孢杆菌 adhl*
19	ECKh-463	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD::大肠杆菌 sucCD，牙龈卟啉单胞菌 sucD，牙龈卟啉单胞菌 4hbd fimD::牛分支杆菌 sucA，克氏梭菌 4hbd rrnC::cscAKB	插入 ECKh-432 的非-PTS 蔗糖基因	*牙龈卟啉单胞菌 Cat2，拜氏梭菌 Ald*
20	ECKh-463	ΔadhE ΔldhA ΔpflB ΔlpdA::K.p.lpdA322 Δmdh ΔarcA gltAR163L fimD::大肠杆菌 sucCD，牙龈卟啉单胞菌 sucD，牙龈卟啉单胞菌 4hbd fimD::牛分支杆菌 sucA，克氏梭菌 4hbd rrnC::cscAKB		*丙酮丁醇梭菌 bukl，丙酮丁醇梭菌 ptb，拜氏梭菌 Ald*

[0712] 表28中总结的菌株如下。菌株1:大肠杆菌MG1655的单个缺失衍生物,具有内源IdhA;表达大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd,牙龈卟啉单胞菌Cat2,丙酮丁醇梭菌AdhE2的质粒。菌株2:宿主菌株AB3,产琥珀酸菌株,大肠杆菌MG2655的衍生物,具有内源adhE,IdhA,pflB的缺失;表达大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd,牙龈卟啉单胞菌Cat2,丙酮丁醇梭菌AdhE2的质粒。

[0713] 菌株3:宿主菌株ECKh-138,内源adhE,IdhA,pflB的缺失,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu354Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入;表达大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd,牙龈卟啉单胞菌Cat2,丙酮丁醇梭菌AdhE2的质粒;菌株提供lpdA的改进以提高丙酮酸脱氢酶流量。菌株4:宿主菌株ECKh-148,内源adhE,IdhA,pflB的缺失,内源lpdA的缺失以及具有Glu454Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入;表达大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd,丙酮丁醇梭菌bukl,丙酮丁醇梭菌ptb,丙酮丁醇梭菌AdhE2的质粒。

[0714] 菌株5:宿主菌株ECKh-401,内源adhE,IdhA,pflB的缺失,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu554Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失;表达大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd,牙龈卟啉单胞菌

Cat2,丙酮丁醇梭菌AdhE2的质粒;菌株具有mdh和arcA的缺失以引导流量经过氧化的三羧酸循环。菌株6:宿主菌株ECKh-401,内源adhE,IdhA,pflB的缺失,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu664Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失;表达牛分支杆菌sueA,大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd,牙龈卟啉单胞菌Cat2,丙酮丁醇梭菌AdhE2的质粒。

[0715] 菌株7:宿主菌株ECKh-422,内源adhE,IdhA,pflB的突变,内源lpdA的突变以及在lpdA基因座具有Glu774Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失,gltA以gltA Arg163Leu突变的染色体替代;表达大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd,牙龈卟啉单胞菌Cat2,丙酮丁醇梭菌AdhE2的质粒;菌株在柠檬酸合成酶中具有突变以提高厌氧活性。菌株8:宿主菌株ECKh-422,内源adhE,IdhA,pflB的突变,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu884Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失,gltA以gltA Arg163Leu突变的染色体替代;表达牛分支杆菌sucA,大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd,牙龈卟啉单胞菌Cat2,丙酮丁醇梭菌AdhE2的质粒。宿主菌株9:宿主宿主菌株ECKh-422,内源adhE,IdhA,pflB的突变,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu994Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失,gltA以gltA Arg163Leu突变的染色体替代;表达牛分支杆菌sucA,大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd,牙龈卟啉单胞菌Cat2,拜氏梭菌Ald的质粒。

[0716] 菌株10:宿主菌株ECKh-426,内源adhE,IdhA,pflB的缺失,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu354Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失,gltA以gltA Arg163Leu突变的染色体替代,大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd在fimD基因座的染色体插入表达牙龈卟啉单胞菌Cat2,拜氏梭菌Ald的质粒;菌株具有整合入菌株ECKh-422fimD基因座的琥珀酸分支上游途径。菌株11:宿主菌株ECKh-432,内源adhE,IdhA,pflB的缺失,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu354Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失,gltA以gltA Arg163Leu突变的染色体替代,大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,牛分支杆菌sue A,克氏梭菌4hbd在fimD基因座的染色体插入;表达牙龈卟啉单胞菌Cat2,拜氏梭菌Ald的质粒;菌株具有整合入菌株ECKh-422的琥珀酸和α-酮戊二酸上游途径分支。宿主菌株12:宿主菌株ECKh-432,内源adhE,IdhA,pflB的突变,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu354Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失,gltA以gltA Arg163Leu突变的染色体替代;大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,牛分支杆菌sue A,克氏梭菌4hbd在fimD基因座的染色体插入;表达丙酮丁醇梭菌bukl,丙酮丁醇梭菌ptb,拜氏梭菌Ald的质粒。

[0717] 菌株13:宿主菌株ECKh-439,内源adhE,IdhA,pflB的缺失,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu354Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失,gltA以gltAArg163Leu突变的染色体替代,内源ackA的缺失,大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,牛分支杆菌sue A,克氏梭菌4hbd在fimD基因座的染色体插入;表达牙龈卟啉单胞菌Cat2,拜氏梭菌Ald的质粒;菌株

具有菌株ECKh-432中的乙酰激酶缺失。菌株14:宿主菌株ECKh-453,内源adhE,IdhA,pflB的缺失,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu354Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失,gltA以gltAArgl63Leu突变的染色体替代,内源ackA的缺失,内源ppc的缺失和流感嗜血杆菌ppck在ppc基因座的插入,大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,牛分支杆菌sucA,克氏梭菌4hbd在fimD基因座的染色体插入;表达牙龈卟啉单胞菌Cat2,拜氏梭菌Ald的质粒;菌株具有菌株ECKh-432中的乙酰激酶缺失和PPC/PEPCK替代。

[0718] 菌株15:宿主菌株ECKh-456,内源adhE,IdhA,pflB的缺失,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu354Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失,gltA以gltA Argl63Leu突变的染色体替代,大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,牛分支杆菌sue A,克氏梭菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,IpdA启动子以fnr结合位点,pflB-p6启动子和pflB的RBS的替代,表达牙龈卟啉单胞菌Cat2,拜氏梭菌Ald的质粒;菌株具有菌株ECKh-432中的IpdA启动子以厌氧启动子的替代。菌株16:宿主菌株ECKh-455,内源adhE,IdhA,pflB的缺失,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu354Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失,gltA以gltA Argl63Leu突变的染色体替代,大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,牛分支杆菌sue A,克氏梭菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,pdhR和aceEF启动子以fnr结合位点,pflB-p6启动子和pflB的RBS的替代,表达牙龈卟啉单胞菌Cat2,拜氏梭菌Ald的质粒;菌株具有菌株ECKh-432中的pdhR和aceEF启动子以厌氧启动子的替代。

[0719] 宿主菌株17:宿主菌株ECKh-459,内源adhE,IdhA,pflB的突变,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu354Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失,gltA以gltA Argl63Leu突变的染色体替代;大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,牛分支杆菌sue A,克氏梭菌4hbd在fimD基因座的染色体插入;丙酮丁醇梭菌bukl,丙酮丁醇梭菌ptb在fimD基因座的染色体插入,表达拜氏梭菌Ald的质粒;菌株具有菌株ECKh-432中BK/PTB的整合。宿主菌株18:宿主菌株ECKh-459,内源adhE,IdhA,pflB的突变,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu354Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失,gltA以gltA Argl63Leu突变的染色体替代;大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,牛分支杆菌sue A,克氏梭菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,丙酮丁醇梭菌bukl,丙酮丁醇梭菌ptb在fimD基因座的染色体插入,表达的拜氏梭菌Ald,热葡糖苷酶地芽孢杆菌adhl的质粒。

[0720] 菌株19:宿主菌株ECKh-463,内源adhE,IdhA,pflB的缺失,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu354Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失,gltA以gltA Argl63Leu突变的染色体替代,大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,牛分支杆菌sue A,克氏梭菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,非-PTS蔗糖操纵子基因蔗糖透膜酶(icscB),D-果糖激酶(cscK),蔗糖水解酶(cscA)和Lacl-相关的蔗糖-特异性阻遏物(cscR)在rrnC基因座的插入;表达牙龈卟啉单胞菌Cat2,拜氏梭菌Ald的质粒;菌株具有菌株ECKh-432中非-PTS蔗糖基因的插入。宿主

菌株20:宿主菌株ECKh-463,内源adhE,IdhA,pflB的缺失,内源lpdA的缺失以及在lpdA基因座具有Glu354Lys突变的肺炎克雷伯氏菌lpdA的染色体插入,内源mdh和arcA的缺失,gltA以gltA Arg163Leu突变的染色体替代;大肠杆菌sucCD,牙龈卟啉单胞菌sucD,牙龈卟啉单胞菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,牛分支杆菌sue A,克氏梭菌4hbd在fimD基因座的染色体插入,非-PTS蔗糖操纵子在rrnC基因座的插入;表达丙酮丁醇梭菌buk1,丙酮丁醇梭菌ptb,拜氏梭菌Ald的质粒。

[0721] 除了本文公开的产BDO菌株,包括表28中公开的那些外,可以理解的是可引入另外的变体以进一步提高BDO的生产和/或降低不合需要的副产品。例如,产BDO菌株或表28的菌株可引入另外的敲除以进一步提高BDO的生产或降低不合需要的副产品。示例性的敲除之前已经描述(参见美国公开2009/0047719)。所述敲除菌株包括,但不限于,ADHEr,NADH6;ADHEr,PPCK;ADHEr,SUCD4;ADHEr,ATPS4r;ADHEr,FUM;ADHEr,MDH;ADHEr,PFLi,PPCK;ADHEr,PFLi,SUCD4;ADHEr,ACKr,NADH6;ADHEr,NADH6,PFLi;ADHEr,ASPT,MDH;ADHEr,NADH6,PPCK;ADHEr,PPCK,THD2;ADHEr,ATPS4r,PPCK;ADHEr,MDH,THD2;ADHEr,FUM,PFLi;ADHEr,PPCK,SUCD4;ADHEr,GLCpts,PPCK;ADHEr,GLUDy,MDH;ADHEr,GLUDy,PPCK;ADHEr,FUM,PPCK;ADHEr,MDH,PPCK;ADHEr,FUM,GLUDy;ADHEr,FUM,HEX1;ADHEr,HEX1,PFLi;ADHEr,HEX1,THD2;ADHEr,FRD2,LDH_D,MDH;ADHEr,FRD2,LDH_D,ME2;ADHEr,MDH,PGL,THD2;ADHEr,G6PDHy,MDH,THD2;ADHEr,PFLi,PPCK,THD2;ADHEr,ACKr,AKGD,ATPS4r;ADHEr,GLCpts,PFLi,PPCK;ADHEr,ACKr,ATPS4r,SUCOAS;ADHEr,GLUDy,PFLi,PPCK;ADHEr,ME2,PFLi,SUCD4;ADHEr,GLUDy,PFLi,SUCD4;ADHEr,ATPS4r,LDH_D,SUCD4;ADHEr,FUM,HEX1,PFLi;ADHEr,MDH,NADH6,THD2;ADHEr,ATPS4r,MDH,NADH6;ADHEr,ATPS4r,FUM,NADH6;ADHEr,ASPT,MDH,NADH6;ADHEr,ASPT,MDH,THD2;ADHEr,ATPS4r,GLCpts,SUCD4;ADHEr,ATPS4r,GLUDy,MDH;ADHEr,ATPS4r,MDH,PPCK;ADHEr,ATPS4r,FUM,PPCK;ADHEr,ASPT,GLCpts,MDH;ADHEr,ASPT,GLUDy,MDH;ADHEr,ME2,SUCD4,THD2;ADHEr,FUM,PPCK,THD2;ADHEr,MDH,PPCK,THD2;ADHEr,GLUDy,MDH,THD2;ADHEr,HEX1,PFLi,THD2;ADHEr,ATPS4r,G6PDHy,MDH;ADHEr,ATPS4r,MDH,PGL;ADHEr,ACKr,FRD2,LDH_D;ADHEr,ACKr,LDH_D,SUCD4;ADHEr,ATPS4r,FUM,GLUDy;ADHEr,ATPS4r,FUM,HEX1;ADHEr,ATPS4r,MDH,THD2;ADHEr,ATPS4r,FRD2,LDH_D;ADHEr,ATPS4r,MDH,PGDH;ADHEr,GLCpts,PPCK,THD2;ADHEr,GLUDy,PPCK,THD2;ADHEr,FUM,HEX1,THD2;ADHEr,ATPS4r,ME2,THD2;ADHEr,FUM,ME2,THD2;ADHEr,GLCpts,GLUDy,PPCK;ADHEr,ME2,PGL,THD2;ADHEr,G6PDHy,ME2,THD2;ADHEr,ATPS4r,FRD2,LDH_D,ME2;ADHEr,ATPS4r,FRD2,LDH_D,MDH;ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,PFLi;ADHEr,ATPS4r,GLCpts,NADH6,PFLi;ADHEr,ATPS4r,MDH,NADH6,PGL;ADHEr,ATPS4r,G6PDHy,MDH,NADH6;ADHEr,ACKr,FUM,GLUDy,LDH_D;ADHEr,ACKr,GLUDy,LDH_D,SUCD4;ADHEr,ATPS4r,G6PDHy,MDH,THD2;ADHEr,ATPS4r,MDH,PGL,THD2;ADHEr,ASPT,G6PDHy,MDH,PYK;ADHEr,ASPT,MDH,PGL,PYK;ADHEr,ASPT,LDH_D,MDH,SUCOAS;ADHEr,ASPT,FUM,LDH_D,MDH;ADHEr,ASPT,LDH_D,MALS,MDH;ADHEr,ASPT,ICL,LDH_D,MDH;ADHEr,FRD2,GLUDy,LDH_D,PPCK;ADHEr,FRD2,LDH_D,PPCK,THD2;ADHEr,ACKr,ATPS4r,LDH_D,SUCD4;ADHEr,ACKr,ACS,PPC,PPCK;ADHEr,GLUDy,LDH_D,PPC,PPCK;ADHEr,LDH_D,PPC,PPCK,THD2;ADHEr,ASPT,ATPS4r,GLCpts,MDH;ADHEr,G6PDHy,MDH,NADH6,THD2;ADHEr,MDH,NADH6,PGL,THD2;ADHEr,ATPS4r,G6PDHy,GLCpts,MDH;ADHEr,ATPS4r,GLCpts,MDH,PGL;ADHEr,ACKr,LDH_D,MDH,SUCD4。

[0722] 表29显示诸如大肠杆菌的宿主生物敲除相应的基因的反应。对应表29中缩写的相应的代谢产物在表30中显示。

[0723] 表29.敲除的相应基因以阻止大肠杆菌中存在的特定反应。

[0724]

反应缩写	反应化学计量法*	编码催化每个反应的酶的基因&
ACKr	[c] : ac + atp <==> actp + adp	(b3115 或 b2296 或 b1849)
ACS	[c] : ac + atp + coa --> accoa + amp + ppi	b4069
ACt6	ac[p] + h[p] <==> ac[c] + h[c]	无关联基因
ADHEr	[c] : etoh + nad <==> acald + h + nadh [c] : acald + coa + nad <==> accoa + h + nadh	(b0356 或 b1478 或 b1241) (b1241 或 b0351)
AKGD	[c] : akg + coa + nad --> co2 + nadh + succoa	(b0116 和 b0726 和 b0727)
ASNS2	[c] : asp-L + atp + nh4 --> amp + asn-L + h + ppi	b3744
ASPT	[c] : asp-L --> fum + nh4	b4139
ATPS4r	adp[c] + (4) h[p] + pi[c] <==> atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]	(((b3736 和 b3737 和 b3738)和(b3731 和 b3732 和 b3733 和 b3734 和 b3735)) 或((b3736 和 b3737

反应缩写	反应化学计量法*	编码催化每个反应的酶的基因&
		和 b3738)和(b3731 和 b3732 和 b3733 和 b3734 和 b3735)和 b3739))
CBMK2	[c] : atp + co2 + nh4 <==> adp + cbp + (2) h	(b0521 或 b0323 or b2874)
EDA	[c] : 2ddg6p --> g3p + pyr	b1850
ENO	[c] : 2pg <==> h2o + pep	b2779
FBA	[c] : fdp <==> dhap + g3p	(b2097 或 b2925 或 b1773)
FBP	[c] : fdp + h2o --> f6p + pi	(b4232 或 b3925)
FDH2	for[p] + (2) h[c] + q8[c] --> co2[c] + h[p] + q8h2[c] for[p] + (2) h[c] + mqn8[c] --> co2[c] + h[p] + mql8[c]	((b3892 和 b3893 和 b3894)或(b1474 和 b1475 和 b1476))
FRD2	[c] : fum + mql8 --> mqn8 + succ [c] : 2dmmql8 + fum --> 2dmmq8 + succ	(b4151 和 b4152 和 b4153 和 b4154)
FTHFD	[c] : 10fthf + h2o --> for + h + thf	b1232
FUM	[c] : fum + h2o <==> mal-L	(b1612 或 b4122 或 b1611)
G5SD	[c] : glu5p + h + nadph --> glu5sa + nadp + pi	b0243
G6PDHy	[c] : g6p + nadp <==> 6pgl + h + nadph	b1852
GLCpts	glc-D[p] + pep[c] --> g6p[c] + pyr[c]	((b2417 和 b1101 和 b2415 和 b2416)或(b1817 和 b1818 和 b1819 和 b2415 和 b2416)或(b2417 和 b1621 和 b2415 和 b2416))
GLU5K	[c] : atp + glu-L --> adp + glu5p	b0242
GLUDy	[c] : glu-L + h2o + nadp <==> akg + h + nadph + nh4	b1761
GLYCL	[c] : gly + nad + thf --> co2 + mlthf + nadh + nh4	(b2904 和 b2903 和 b2905 和 b0116)
HEX1	[c] : atp + glc-D --> adp + g6p + h	b2388
ICL	[c] : icit --> glx + succ	b4015
LDH_D	[c] : lac-D + nad <==> h + nadh + pyr	(b2133 或 b1380)
MALS	[c] : accoa + glx + h2o --> coa + h + mal-L	(b4014 或 b2976)
MDH	[c] : mal-L + nad <==> h + nadh + oaa	b3236
ME2	[c] : mal-L + nadp --> co2 + nadph + pyr	b2463
MTHFC	[c] : h2o + methf <==> 10fthf + h	b0529
NADH12	[c] : h + mqn8 + nadh --> mql8 + nad	b1109

[0725]

[0726]

反应缩写	反应化学计量法*	编码催化每个反应的酶的基因&
	[c] : h + nadh + q8 --> nad + q8h2 [c] : 2dmmq8 + h + nadh --> 2dmmql8 + nad	
NADH6	(4) h[c] + nadh[c] + q8[c] --> (3) h[p] + nad[c] + q8h2[c] (4) h[c] + mqn8[c] + nadh[c] --> (3) h[p] + mql8[c] + nad[c] 2dmmq8[c] + (4) h[c] + nadh[c] --> 2dmmql8[c] + (3) h[p] + nad[c]	(b2276 和 b2277 和 b2278 和 b2279 和 b2280 和 b2281 和 b2282 和 b2283 和 b2284 和 b2285 和 b2286 和 b2287 和 b2288)
PFK	[c] : atp + f6p --> adp + fdp + h	(b3916 或 b1723)
PFLi	[c] : coa + pyr --> accoa + for	(((b0902 和 b0903) 和 b2579)或(b0902 和 b0903)或(b0902 和 b3114)或(b3951 和 b3952))
PGDH	[c] : 6pgc + nadp --> co2 + nadph + ru5p-D	b2029
PGI	[c] : g6p <==> f6p	b4025
PGL	[c] : 6pgl + h2o --> 6pgc + h	b0767
PGM	[c] : 2pg <==> 3pg	(b3612 或 b4395 或 b0755)
PPC	[c] : co2 + h2o + pep --> h + oaa + pi	b3956
PPCK	[c] : atp + oaa --> adp + co2 + pep	b3403
PRO1z	[c] : fad + pro-L --> 1pyr5c + fadh2 + h	b1014
PYK	[c] : adp + h + pep --> atp + pyr	b1854 或 b1676)
PYRt2	h[p] + pyr[p] <==> h[c] + pyr[c]	无关联基因
RPE	[c] : ru5p-D <==> xu5p-D	(b4301 或 b3386)
SO4t2	so4[e] <==> so4[p]	(b0241 或 b0929 或 b1377 或 b2215)
SUCD4	[c] : q8 + succ --> fum + q8h2	(b0721 和 b0722 和 b0723 和 b0724)
SUCOAS	[c] : atp + coa + succ <==> adp + pi + succoa	(b0728 和 b0729)
SULabc	atp[c] + h2o[c] + so4[p] --> adp[c] + h[c] + pi[c] + so4[c]	((b2422 和 b2425 和 b2424 和 b2423)或(b0763 和 b0764 和 b0765)或(b2422 和 b2424 和 b2423 和 b3917))
TAL	[c] : g3p + s7p <==> e4p + f6p	(b2464 或 b0008)
THD2	(2) h[p] + nadh[c] + nadp[c] --> (2) h[c] + nad[c] + nadph[c]	(b1602 和 b1603)

[0727]

反应缩写	反应化学计量法*	编码催化每个反应的酶的基因&
THD5	[c] : nad + nadph --> nadh + nadp	(b3962 或(b1602 和 b1603))
TPI	[c] : dhap <==> g3p	b3919

[0728] 表30.对应于表29中所用缩写的代谢产物名称

代谢产物缩写	代谢产物名称
10fthf	10-甲酰基四氢叶酸
1pyr5c	l-吡咯啉-5-羧酸酯
2ddg6p	2-脱氢-3-脱氧-D-葡糖酸 6-磷酸酯
2dmmq8	2-烷基二甲基甲基萘醌类 8
2dmmql8	2-烷基二甲基甲基萘醇类 8
2pg	D-甘油酸酯 2-磷酸酯
3pg	3-磷酸-D-甘油酸酯
6pgc	6-磷酸-D-葡糖酸酯
6pgl	6-磷酸-D-葡糖-1,5-内酯
ac	乙酸酯
acald	乙醛
accoa	乙酰-CoA
actp	乙酰磷酸
adp	ADP
akg	2-酮戊二酸
amp	AMP
asn-L	L-天冬酰胺
asp-L	L-天冬氨酸
atp	ATP
cbp	氨基甲酰磷酸酯
co2	CO_2
coa	辅酶 A
dhap	二羟丙酮磷酸
e4p	D-赤藓糖 4-磷酸酯
etoh	乙醇
f6p	D-果糖 6-磷酸酯
fad	氧化的黄素腺嘌呤二核苷酸
fadh2	还原的黄素腺嘌呤二核苷酸
fdp	D-果糖 1,6-二磷酸酯
for	甲酸酯
fum	延胡索酸酯
g3p	3-磷酸甘油醛
g6p	D-葡萄糖 6-磷酸酯
glc-D	D-葡萄糖
glu5p	L-谷氨酸酯 5-磷酸酯

[0729]

[0730]

代谢产物缩写	代谢产物名称
glu5sa	L-谷氨酸酯-5-半醛
glu-L	L-谷氨酸酯
glx	乙醛酸
gly	甘氨酸
h	H^+
h2o	H_2O
icit	异柠檬酸酯
lac-D	D-乳酸
mal-L	L-苹果酸酯
methf	5,10-甲川四氢叶酸
mlthf	5,10-亚甲基四氢叶酸
mql8	甲基萘醇类 8
mqn8	甲基萘醌类 8
nad	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸
nadh	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸-还原的
nadp	咽酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸
nadph	咽酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸-还原的
nh4	铵
oaa	草酰乙酸
pep	磷酸烯醇丙酮酸
pi	磷酸酯
ppi	二磷酸酯
pro-L	L-脯氨酸
pyr	丙酮酸
q8	泛醌-8
q8h2	泛醇-8
ru5p-D	D-核酮糖 5-磷酸酯
s7p	景天庚酮糖 7-磷酸酯
so4	硫酸酯
succ	琥珀酸
succoa	琥珀酰-辅酶 A
thf	5,6,7,8-四氢叶酸
xu5p-D	D-木酮糖 5-磷酸酯

[0731] 整个申请中参考各种公开出版物。这些出版物的公开内容在此通过引用全部引入本申请以更充分地描述本发明所属领域的状况。虽然本发明已经描述了以上提供的实施例,但很清楚可在不背离本发明精神下进行各种改变。

序列表
<110> 基因组股份公司
<120> 生产1,4-丁二醇的微生物和相关方法
<130> 066662-0311
<140> PCT/US2010/037544
<141> 2010-06-04
<150> 61/184,311
<151> 2009-06-04
<160> 88
<170> PatentIn 第3.5版
<210> 1
<211> 59
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 1
gacgaattcg ctagcaagag gagaagtcga catgtccaat tcactggccg tcgttttac 59
<210> 2
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 2
gaccctagga agctttctag agtcgaccta tgcggcatca gagcaga 47
<210> 3
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 3
atgtaccgca agttccgc 18
<210> 4
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 4
caatttgccg atgcccag 18
<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 5
gctgaccact gaagactttg 20
<210> 6
<211> 19
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 6
gatcagggct tcggtgtag 19
<210> 7
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 7
ttggtgcggg ccaagcagga tctgctc 27
<210> 8
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 8
tcagccgaac gcctcgtcga ggatctcctg 30
<210> 9
<211> 32
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 9
tggccaacat aagttcacca ttcgggcaaa ac 32
<210> 10
<211> 29
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 10
tctcttcaac cagccattcg ttttgcccg 29
<210> 11
<211> 27
<212> DNA
<213> 丙酮丁醇梭菌
<400> 11
attaaagtta agtggaggaa tgttaac 27
<210> 12
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 12
acacgcggat ccaacgtccc gg 22
<210> 13
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 13
agcggctccg ctagccgctt atg 23
<210> 14
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引物
<400> 14
aagccgttgc tgcagctctt gagc 24
<210> 15
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成引物
<400> 15
atctccggcg gtcggatccg tcg 23
<210> 16
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成引物
<400> 16
aaagcggcta gccacgccgc 20
<210> 17
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成引物
<400> 17
attacacgag gtacccaacg 20
<210> 18
<211> 22
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成引物
<400> 18
atgctggcgt acaaaggtgt cc 22
<210> 19
<211> 22
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 19
ggacaccttt gtacgccagc at 22
<210> 20
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 20
atcgcctaca ctaaaccaga agtgg 25
<210> 21
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 21
ccacttctgg tttagtgtag gcgat 25
<210> 22
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 22
aggcagttcc ataggatggc 20
<210> 23
<211> 55
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 23
tgacatgtaa cacctacctt ctgtgcctgt gccagtggtt gctgtgatat agaag 55
<210> 24
<211> 48

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 24
ataataatac atatgaacca tgcgagttac gggcctataa gccaggcg 48
<210> 25
<211> 42
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 25
agtttttcga tatctgcatc agacaccggc acattgaaac gg 42
<210> 26
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 26
ctggcacagg cacagaaggt aggtgttaca tgtcagaacg tttacacaat gacgtggatc 60
<210> 27
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 27
agacaaatcg gttgccgttt gttaagccag gcgagatatg atctatatc 49
<210> 28
<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 28
gagttttgat ttcagtactc atcatgtaac acctaccttc ttgctgtgat atag 54
<210> 29

<211> 54
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 29
ctatatcaca gcaagaaggt aggtgttaca tgatgagtac tgaaatcaaa actc 54
<210> 30
<211> 49
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 30
gatatagatc atatctcgcc tggcttaaca aacggcaacc gatttgtct 49
<210> 31
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成寡核苷酸
<400> 31
tattgtgcat acagatgaat ttttatgcaa acagtcagcc ctgaagaagg gtgtaggctg 60
gagctgcttc 70
<210> 32
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成寡核苷酸
<400> 32
caaaaaaccg gagtctgtgc tccggttttt tattatccgc taatcaatta catatgaata 60
tcctccttag 70
<210> 33
<211> 51
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物

<400> 33
ataataatag aattcgtttg ctacctaaat tgccaactaa atcgaaacag g 51
<210> 34
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 34
tattattatg gtaccaatat catgcagcaa acggtgcaac attgccg 47
<210> 35
<211> 47
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 35
tgatctggaa gaattcatcg gctttaccac cgtcaaaaaa aacggcg 47
<210> 36
<211> 48
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 36
ataaaaccct gcagcggaaa cgaagtttta tccatttttg gttacctg 48
<210> 37
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 37
ggaagagagg ctggtaccca gaagccacag cagga 35
<210> 38
<211> 38
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 38
gtaatcactg cgtaagcgcc atgccccggc gttaattc 38
<210> 39
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 39
attgccgcgt tcctcctgct gtcga 25
<210> 40
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 40
cgacagcagg aggaacgcgg caat 24
<210> 41
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 41
gtttgcacgc tatagctgag gttgttgtct tccagcaacg taccgtatac aataggcgta 60
tcacgaggcc ctttc 75
<210> 42
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成引物
<400> 42
gctacagcat gtcacacgat ctcaacggtc ggatgaccaa tctggctggt atgggaatta 60
gccatggtcc 70
<210> 43
<211> 73

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸
<400> 43
tgtgagtgaa agtcacctgc cttaatatct caaaactcat cttcgggtga cgaaatatgg 60
cgtgactcga tac 73
<210> 44
<211> 70
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸
<400> 44
tctgtatcag gctgaaaatc ttctctcatc cgccaaaaca gcttcggcgt taagatgcgc 60
gctcaaggac 70
<210> 45
<211> 2036
<212> DNA
<213> 大肠杆菌
<400> 45
atgaacttac atgaatatca ggcaaaacaa ctttttgccc gctatggctt accagcaccg 60
gtgggttatg cctgtactac tccgcgcgaa gcagaagaag ccgcttcaaa aatcggtgcc 120
ggtccgtggg tagtgaaatg tcaggttcac gctggtggcc gcggtaaagc gggcggtgtg 180
aaagttgtaa acagcaaaga agacatccgt gcttttgcag aaaactggct gggcaagcgt 240
ctggtaacgt atcaaacaga tgccaatggc caaccggtta accagattct ggttgaagca 300
gcgaccgata tcgctaaaga gctgtatctc ggtgccgttg ttgaccgtag ttcccgtcgt 360
gtggtcttta tggcctccac cgaaggcggc gtggaaatcg aaaaagtggc ggaagaaact 420
ccgcacctga tccataaagt tgcgcttgat ccgctgactg gcccgatgcc gtatcaggga 480
cgcgagctgg cgttcaaact gggtctggaa ggtaaactgg ttcagcagtt caccaaaatc 540
ttcatgggcc tggcgaccat tttcctggag cgcgacctgg cgttgatcga aatcaacccg 600
ctggtcatca ccaaacaggg cgatctgatt tgcctcgacg gcaaactggg cgctgacggc 660
aacgcactgt tccgccagcc tgatctgcgc gaaatgcgtg accagtcgca ggaagatccg 720
cgtgaagcac aggctgcaca gtgggaactg aactacgttg cgctggacgg taacatcggt 780
tgtatggtta acggcgcagg tctggcgatg ggtacgatgg acatcgttaa actgcacggc 840
ggcgaaccgg ctaacttcct tgacgttggc ggcggcgcaa ccaaagaacg tgtaaccgaa 900
gcgttcaaaa tcatcctctc tgacgacaaa gtgaaagccg ttctggttaa catcttcggc 960
ggtatcgttc gttgcgacct gatcgctgac ggtatcatcg gcgcggtagc agaagtgggt 1020
gttaacgtac cggtcgtggt acgtctggaa ggtaacaacg ccgaactcgg cgcgaagaaa 1080

ctggctgaca gcggcctgaa tattattgca gcaaaaggtc tgacggatgc agctcagcag 1140
gttgttgccg cagtggaggg gaaataatgt ccattttaat cgataaaaac accaaggtta 1200
tctgccaggg ctttaccggt agccagggga ctttccactc agaacaggcc attgcatacg 1260
gcactaaaat ggttggcggc gtaaccccag gtaaaggcgg caccacccac ctcggcctgc 1320
cggtgttcaa caccgtgcgt gaagccgttg ctgccactgg cgctaccgct tctgttatct 1380
acgtaccagc accgttctgc aaagactcca ttctggaagc catcgacgca ggcatcaaac 1440
tgattatcac catcactgaa ggcatcccga cgctggatat gctgaccgtg aaagtgaagc 1500
tggatgaagc aggcgttcgt atgatcggcc cgaactgccc aggcgttatc actccgggtg 1560
aatgcaaaat cggtatccag cctggtcaca ttcacaaacc gggtaaagtg ggtatcgttt 1620
cccgttccgg tacactgacc tatgaagcgg ttaaacagac cacggattac ggtttcggtc 1680
agtcgacctg tgtcggtatc ggcggtgacc cgatcccggg ctctaacttt atcgacattc 1740
tcgaaatgtt cgaaaaagat ccgcagaccg aagcgatcgt gatgatcggt gagatcggcg 1800
gtagcgctga agaagaagca gctgcgtaca tcaaagagca cgttaccaag ccagttgtgg 1860
gttacatcgc tggtgtgact gcgccgaaag gcaaacgtat gggccacgcg ggtgccatca 1920
ttgccggtgg gaaagggact gcggatgaga aattcgctgc tctggaagcc gcaggcgtga 1980
aaaccgttcg cagcctggcg gatatcggtg aagcactgaa aactgttctg aaataa 2036

<210> 46
<211> 388
<212> PRT
<213> 大肠杆菌
<400> 46

Met Asn Leu His Glu Tyr Gln Ala Lys Gln Leu Phe Ala Arg Tyr Gly
1 5 10 15
Leu Pro Ala Pro Val Gly Tyr Ala Cys Thr Thr Pro Arg Glu Ala Glu
20 25 30
Glu Ala Ala Ser Lys Ile Gly Ala Gly Pro Trp Val Val Lys Cys Gln
35 40 45
Val His Ala Gly Gly Arg Gly Lys Ala Gly Gly Val Lys Val Val Asn
50 55 60
Ser Lys Glu Asp Ile Arg Ala Phe Ala Glu Asn Trp Leu Gly Lys Arg
65 70 75 80
Leu Val Thr Tyr Gln Thr Asp Ala Asn Gly Gln Pro Val Asn Gln Ile
85 90 95
Leu Val Glu Ala Ala Thr Asp Ile Ala Lys Glu Leu Tyr Leu Gly Ala
100 105 110
Val Val Asp Arg Ser Ser Arg Arg Val Val Phe Met Ala Ser Thr Glu
115 120 125
Gly Gly Val Glu Ile Glu Lys Val Ala Glu Glu Thr Pro His Leu Ile
130 135 140

His Lys Val Ala Leu Asp Pro Leu Thr Gly Pro Met Pro Tyr Gln Gly
145 150 155 160
Arg Glu Leu Ala Phe Lys Leu Gly Leu Glu Gly Lys Leu Val Gln Gln
165 170 175
Phe Thr Lys Ile Phe Met Gly Leu Ala Thr Ile Phe Leu Glu Arg Asp
180 185 190
Leu Ala Leu Ile Glu Ile Asn Pro Leu Val Ile Thr Lys Gln Gly Asp
195 200 205
Leu Ile Cys Leu Asp Gly Lys Leu Gly Ala Asp Gly Asn Ala Leu Phe
210 215 220
Arg Gln Pro Asp Leu Arg Glu Met Arg Asp Gln Ser Gln Glu Asp Pro
225 230 235 240
Arg Glu Ala Gln Ala Ala Gln Trp Glu Leu Asn Tyr Val Ala Leu Asp
245 250 255
Gly Asn Ile Gly Cys Met Val Asn Gly Ala Gly Leu Ala Met Gly Thr
260 265 270
Met Asp Ile Val Lys Leu His Gly Gly Glu Pro Ala Asn Phe Leu Asp
275 280 285
Val Gly Gly Gly Ala Thr Lys Glu Arg Val Thr Glu Ala Phe Lys Ile
290 295 300
Ile Leu Ser Asp Asp Lys Val Lys Ala Val Leu Val Asn Ile Phe Gly
305 310 315 320
Gly Ile Val Arg Cys Asp Leu Ile Ala Asp Gly Ile Ile Gly Ala Val
325 330 335
Ala Glu Val Gly Val Asn Val Pro Val Val Val Arg Leu Glu Gly Asn
340 345 350
Asn Ala Glu Leu Gly Ala Lys Lys Leu Ala Asp Ser Gly Leu Asn Ile
355 360 365
Ile Ala Ala Lys Gly Leu Thr Asp Ala Ala Gln Gln Val Val Ala Ala
370 375 380
Val Glu Gly Lys
385

<210> 47
<211> 289
<212> PRT
<213> 大肠杆菌
<400> 47

Met Ser Ile Leu Ile Asp Lys Asn Thr Lys Val Ile Cys Gln Gly Phe
1 5 10 15

Thr Gly Ser Gln Gly Thr Phe His Ser Glu Gln Ala Ile Ala Tyr Gly
20 25 30
Thr Lys Met Val Gly Gly Val Thr Pro Gly Lys Gly Gly Thr Thr His
35 40 45
Leu Gly Leu Pro Val Phe Asn Thr Val Arg Glu Ala Val Ala Ala Thr
50 55 60
Gly Ala Thr Ala Ser Val Ile Tyr Val Pro Ala Pro Phe Cys Lys Asp
65 70 75 80
Ser Ile Leu Glu Ala Ile Asp Ala Gly Ile Lys Leu Ile Ile Thr Ile
85 90 95
Thr Glu Gly Ile Pro Thr Leu Asp Met Leu Thr Val Lys Val Lys Leu
100 105 110
Asp Glu Ala Gly Val Arg Met Ile Gly Pro Asn Cys Pro Gly Val Ile
115 120 125
Thr Pro Gly Glu Cys Lys Ile Gly Ile Gln Pro Gly His Ile His Lys
130 135 140
Pro Gly Lys Val Gly Ile Val Ser Arg Ser Gly Thr Leu Thr Tyr Glu
145 150 155 160
Ala Val Lys Gln Thr Thr Asp Tyr Gly Phe Gly Gln Ser Thr Cys Val
165 170 175
Gly Ile Gly Gly Asp Pro Ile Pro Gly Ser Asn Phe Ile Asp Ile Leu
180 185 190
Glu Met Phe Glu Lys Asp Pro Gln Thr Glu Ala Ile Val Met Ile Gly
195 200 205
Glu Ile Gly Gly Ser Ala Glu Glu Glu Ala Ala Ala Tyr Ile Lys Glu
210 215 220
His Val Thr Lys Pro Val Val Gly Tyr Ile Ala Gly Val Thr Ala Pro
225 230 235 240
Lys Gly Lys Arg Met Gly His Ala Gly Ala Ile Ile Ala Gly Gly Lys
245 250 255
Gly Thr Ala Asp Glu Lys Phe Ala Ala Leu Glu Ala Ala Gly Val Lys
260 265 270
Thr Val Arg Ser Leu Ala Asp Ile Gly Glu Ala Leu Lys Thr Val Leu
275 280 285
Lys

<210> 48

<211> 3696

<212> DNA

<213> 牛分枝杆菌

<400> 48

atggccaaca taagttcacc attcgggcaa aacgaatggc tggttgaaga gatgtaccgc 60
aagttccgcg acgacccctc ctcggtcgat cccagctggc acgagttcct ggttgactac 120
agccccgaac ccacctccca accagctgcc gaaccaaccc gggttacctc gccactcgtt 180
gccgagcggg ccgctgcggc cgccccgcag gcacccccca agccggccga caccgcggcc 240
gcgggcaacg gcgtggtcgc cgcactggcc gccaaaactg ccgttccccc gccagccgaa 300
ggtgacgagg tagcggtgct gcgcggcgcc gccgcggccg tcgtcaagaa catgtccgcg 360
tcgttggagg tgccgacggc gaccagcgtc cgggcggtcc cggccaagct actgatcgac 420
aaccggatcg tcatcaacaa ccagttgaag cggacccgcg gcggcaagat ctcgttcacg 480
catttgctgg gctacgccct ggtgcaggcg gtgaagaaat tcccgaacat gaaccggcac 540
tacaccgaag tcgacggcaa gcccaccgcg gtcacgccgg cgcacaccaa tctcggcctg 600
gcgatcgacc tgcaaggcaa ggacgggaag cgttccctgg tggtggccgg catcaagcgg 660
tgcgagacca tgcgattcgc gcagttcgtc acggcctacg aagacatcgt acgccgggcc 720
cgcgacggca agctgaccac tgaagacttt gccggcgtga cgatttcgct gaccaatccc 780
ggaaccatcg gcaccgtgca ttcggtgccg cggctgatgc ccggccaggg cgccatcatc 840
ggcgtgggcg ccatggaata ccccgccgag tttcaaggcg ccagcgagga acgcatcgcc 900
gagctgggca tcggcaaatt gatcactttg acctccacct acgaccaccg catcatccag 960
ggcgcggaat cgggcgactt cctgcgcacc atccacgagt tgctgctctc ggatggcttc 1020
tgggacgagg tcttccgcga actgagcatc ccatatctgc cggtgcgctg gagcaccgac 1080
aaccccgact cgatcgtcga caagaacgct cgcgtcatga acttgatcgc ggcctaccgc 1140
aaccgcggcc atctgatggc cgataccgac ccgctgcggt tggacaaagc tcggttccgc 1200
agtcaccccg acctcgaagt gctgacccac ggcctgacgc tgtgggatct cgatcgggtg 1260
ttcaaggtcg acggctttgc cggtgcgcag tacaagaaac tgcgcgacgt gctgggcttg 1320
ctgcgcgatg cctactgccg ccacatcggc gtggagtacg cccatatcct cgaccccgaa 1380
caaaaggagt ggctcgaaca acgggtcgag accaagcacg tcaaacccac tgtggcccaa 1440
cagaaataca tcctcagcaa gctcaacgcc gccgaggcct ttgaaacgtt cctacagacc 1500
aagtacgtcg gccagaagcg gttctcgctg gaaggcgccg aaagcgtgat cccgatgatg 1560
gacgcggcga tcgaccagtg cgctgagcac ggcctcgacg aggtggtcat cgggatgccg 1620
caccggggcc ggctcaacgt gctggccaac atcgtcggca agccgtactc gcagatcttc 1680
accgagttcg agggcaacct gaatccgtcg caggcgcacg gctccggtga cgtcaagtac 1740
cacctgggcg ccaccgggct gtacctgcag atgttcggcg acaacgacat tcaggtgtcg 1800
ctgaccgcca acccgtcgca tctggaggcc gtcgacccgg tgctggaggg attggtgcgg 1860
gccaagcagg atctgctcga ccacggaagc atcgacagcg acggccaacg ggcgttctcg 1920
gtggtgccgc tgatgttgca tggcgatgcc gcgttcgccg gtcagggtgt ggtcgccgag 1980
acgctgaacc tggcgaatct gccgggctac cgcgtcggcg gcaccatcca catcatcgtc 2040
aacaaccaga tcggcttcac caccgcgccc gagtattcca ggtccagcga gtactgcacc 2100
gacgtcgcaa agatgatcgg ggcaccgatc tttcacgtca acggcgacga cccggaggcg 2160
tgtgtctggg tggcgcggtt ggcggtggac ttccgacaac ggttcaagaa ggacgtcgtc 2220
atcgacatgc tgtgctaccg ccgccgcggg cacaacgagg gtgacgaccc gtcgatgacc 2280

aacccctaca tgtacgacgt cgtcgacacc aagcgcgggg cccgcaaaag ctacaccgaa 2340
gccctgatcg gacgtggcga catctcgatg aaggaggccg aggacgcgct gcgcgactac 2400
cagggccagc tggaacgggt gttcaacgaa gtgcgcgagc tggagaagca cggtgtgcag 2460
ccgagcgagt cggtcgagtc cgaccagatg attcccgcgg ggctggccac tgcggtggac 2520
aagtcgctgc tggcccggat cggcgatgcg ttcctcgcct tgccgaacgg cttcaccgcg 2580
cacccgcgag tccaaccggt gctggagaag cgccgggaga tggcctatga aggcaagatc 2640
gactgggcct ttggcgagct gctggcgctg ggctcgctgg tggccgaagg caagctggtg 2700
cgcttgtcgg ggcaggacag ccgccgcggc accttctccc agcggcattc ggttctcatc 2760
gaccgccaca ctggcgagga gttcacacca ctgcagctgc tggcgaccaa ctccgacggc 2820
agcccgaccg gcggaaagtt cctggtctac gactcgccac tgtcggagta cgccgccgtc 2880
ggcttcgagt acggctacac tgtgggcaat ccggacgccg tggtgctctg ggaggcgcag 2940
ttcggcgact tcgtcaacgg cgcacagtcg atcatcgacg agttcatcag ctccggtgag 3000
gccaagtggg gccaattgtc caacgtcgtg ctgctgttac cgcacgggca cgaggggcag 3060
ggacccgacc acacttctgc ccggatcgaa cgcttcttgc agttgtgggc ggaaggttcg 3120
atgaccatcg cgatgccgtc gactccgtcg aactacttcc acctgctacg ccggcatgcc 3180
ctggacggca tccaacgccc gctgatcgtg ttcacgccca agtcgatgtt gcgtcacaag 3240
gccgccgtca gcgaaatcaa ggacttcacc gagatcaagt tccgctcagt gctggaggaa 3300
cccacctatg aggacggcat cggagaccgc aacaaggtca gccggatcct gctgaccagt 3360
ggcaagctgt attacgagct ggccgcccgc aaggccaagg acaaccgcaa tgacctcgcg 3420
atcgtgcggc ttgaacagct cgccccgctg cccaggcgtc gactgcgtga aacgctggac 3480
cgctacgaga acgtcaagga gttcttctgg gtccaagagg aaccggccaa ccagggtgcg 3540
tggccgcgat tcgggctcga actacccgag ctgctgcctg acaagttggc cgggatcaag 3600
cgaatctcgc gccgggcgat gtcagccccg tcgtcaggct cgtcgaaggt gcacgccgtc 3660
gaacagcagg agatcctcga cgaggcgttc ggctaa 3696

<210> 49
<211> 1231
<212> PRT
<213> 牛分枝杆菌
<400> 49

Met Ala Asn Ile Ser Ser Pro Phe Gly Gln Asn Glu Trp Leu Val Glu
1 5 10 15
Glu Met Tyr Arg Lys Phe Arg Asp Asp Pro Ser Ser Val Asp Pro Ser
20 25 30
Trp His Glu Phe Leu Val Asp Tyr Ser Pro Glu Pro Thr Ser Gln Pro
35 40 45
Ala Ala Glu Pro Thr Arg Val Thr Ser Pro Leu Val Ala Glu Arg Ala
50 55 60
Ala Ala Ala Ala Pro Gln Ala Pro Pro Lys Pro Ala Asp Thr Ala Ala
65 70 75 80

Ala Gly Asn Gly Val Val Ala Ala Leu Ala Ala Lys Thr Ala Val Pro
85 90 95
Pro Pro Ala Glu Gly Asp Glu Val Ala Val Leu Arg Gly Ala Ala Ala
100 105 110
Ala Val Val Lys Asn Met Ser Ala Ser Leu Glu Val Pro Thr Ala Thr
115 120 125
Ser Val Arg Ala Val Pro Ala Lys Leu Leu Ile Asp Asn Arg Ile Val
130 135 140
Ile Asn Asn Gln Leu Lys Arg Thr Arg Gly Gly Lys Ile Ser Phe Thr
145 150 155 160
His Leu Leu Gly Tyr Ala Leu Val Gln Ala Val Lys Lys Phe Pro Asn
165 170 175
Met Asn Arg His Tyr Thr Glu Val Asp Gly Lys Pro Thr Ala Val Thr
180 185 190
Pro Ala His Thr Asn Leu Gly Leu Ala Ile Asp Leu Gln Gly Lys Asp
195 200 205
Gly Lys Arg Ser Leu Val Val Ala Gly Ile Lys Arg Cys Glu Thr Met
210 215 220
Arg Phe Ala Gln Phe Val Thr Ala Tyr Glu Asp Ile Val Arg Arg Ala
225 230 235 240
Arg Asp Gly Lys Leu Thr Thr Glu Asp Phe Ala Gly Val Thr Ile Ser
245 250 255
Leu Thr Asn Pro Gly Thr Ile Gly Thr Val His Ser Val Pro Arg Leu
260 265 270
Met Pro Gly Gln Gly Ala Ile Ile Gly Val Gly Ala Met Glu Tyr Pro
275 280 285
Ala Glu Phe Gln Gly Ala Ser Glu Glu Arg Ile Ala Glu Leu Gly Ile
290 295 300
Gly Lys Leu Ile Thr Leu Thr Ser Thr Tyr Asp His Arg Ile Ile Gln
305 310 315 320
Gly Ala Glu Ser Gly Asp Phe Leu Arg Thr Ile His Glu Leu Leu Leu
325 330 335
Ser Asp Gly Phe Trp Asp Glu Val Phe Arg Glu Leu Ser Ile Pro Tyr
340 345 350
Leu Pro Val Arg Trp Ser Thr Asp Asn Pro Asp Ser Ile Val Asp Lys
355 360 365
Asn Ala Arg Val Met Asn Leu Ile Ala Ala Tyr Arg Asn Arg Gly His
370 375 380
Leu Met Ala Asp Thr Asp Pro Leu Arg Leu Asp Lys Ala Arg Phe Arg

385 390 395 400
Ser His Pro Asp Leu Glu Val Leu Thr His Gly Leu Thr Leu Trp Asp
405 410 415
Leu Asp Arg Val Phe Lys Val Asp Gly Phe Ala Gly Ala Gln Tyr Lys
420 425 430
Lys Leu Arg Asp Val Leu Gly Leu Leu Arg Asp Ala Tyr Cys Arg His
435 440 445
Ile Gly Val Glu Tyr Ala His Ile Leu Asp Pro Glu Gln Lys Glu Trp
450 455 460
Leu Glu Gln Arg Val Glu Thr Lys His Val Lys Pro Thr Val Ala Gln
465 470 475 480
Gln Lys Tyr Ile Leu Ser Lys Leu Asn Ala Ala Glu Ala Phe Glu Thr
485 490 495
Phe Leu Gln Thr Lys Tyr Val Gly Gln Lys Arg Phe Ser Leu Glu Gly
500 505 510
Ala Glu Ser Val Ile Pro Met Met Asp Ala Ala Ile Asp Gln Cys Ala
515 520 525
Glu His Gly Leu Asp Glu Val Val Ile Gly Met Pro His Arg Gly Arg
530 535 540
Leu Asn Val Leu Ala Asn Ile Val Gly Lys Pro Tyr Ser Gln Ile Phe
545 550 555 560
Thr Glu Phe Glu Gly Asn Leu Asn Pro Ser Gln Ala His Gly Ser Gly
565 570 575
Asp Val Lys Tyr His Leu Gly Ala Thr Gly Leu Tyr Leu Gln Met Phe
580 585 590
Gly Asp Asn Asp Ile Gln Val Ser Leu Thr Ala Asn Pro Ser His Leu
595 600 605
Glu Ala Val Asp Pro Val Leu Glu Gly Leu Val Arg Ala Lys Gln Asp
610 615 620
Leu Leu Asp His Gly Ser Ile Asp Ser Asp Gly Gln Arg Ala Phe Ser
625 630 635 640
Val Val Pro Leu Met Leu His Gly Asp Ala Ala Phe Ala Gly Gln Gly
645 650 655
Val Val Ala Glu Thr Leu Asn Leu Ala Asn Leu Pro Gly Tyr Arg Val
660 665 670
Gly Gly Thr Ile His Ile Ile Val Asn Asn Gln Ile Gly Phe Thr Thr
675 680 685
Ala Pro Glu Tyr Ser Arg Ser Ser Glu Tyr Cys Thr Asp Val Ala Lys
690 695 700

Met Ile Gly Ala Pro Ile Phe His Val Asn Gly Asp Asp Pro Glu Ala
705 710 715 720
Cys Val Trp Val Ala Arg Leu Ala Val Asp Phe Arg Gln Arg Phe Lys
725 730 735
Lys Asp Val Val Ile Asp Met Leu Cys Tyr Arg Arg Arg Gly His Asn
740 745 750
Glu Gly Asp Asp Pro Ser Met Thr Asn Pro Tyr Met Tyr Asp Val Val
755 760 765
Asp Thr Lys Arg Gly Ala Arg Lys Ser Tyr Thr Glu Ala Leu Ile Gly
770 775 780
Arg Gly Asp Ile Ser Met Lys Glu Ala Glu Asp Ala Leu Arg Asp Tyr
785 790 795 800
Gln Gly Gln Leu Glu Arg Val Phe Asn Glu Val Arg Glu Leu Glu Lys
805 810 815
His Gly Val Gln Pro Ser Glu Ser Val Glu Ser Asp Gln Met Ile Pro
820 825 830
Ala Gly Leu Ala Thr Ala Val Asp Lys Ser Leu Leu Ala Arg Ile Gly
835 840 845
Asp Ala Phe Leu Ala Leu Pro Asn Gly Phe Thr Ala His Pro Arg Val
850 855 860
Gln Pro Val Leu Glu Lys Arg Arg Glu Met Ala Tyr Glu Gly Lys Ile
865 870 875 880
Asp Trp Ala Phe Gly Glu Leu Leu Ala Leu Gly Ser Leu Val Ala Glu
885 890 895
Gly Lys Leu Val Arg Leu Ser Gly Gln Asp Ser Arg Arg Gly Thr Phe
900 905 910
Ser Gln Arg His Ser Val Leu Ile Asp Arg His Thr Gly Glu Glu Phe
915 920 925
Thr Pro Leu Gln Leu Leu Ala Thr Asn Ser Asp Gly Ser Pro Thr Gly
930 935 940
Gly Lys Phe Leu Val Tyr Asp Ser Pro Leu Ser Glu Tyr Ala Ala Val
945 950 955 960
Gly Phe Glu Tyr Gly Tyr Thr Val Gly Asn Pro Asp Ala Val Val Leu
965 970 975
Trp Glu Ala Gln Phe Gly Asp Phe Val Asn Gly Ala Gln Ser Ile Ile
980 985 990
Asp Glu Phe Ile Ser Ser Gly Glu Ala Lys Trp Gly Gln Leu Ser Asn
995 1000 1005
Val Val Leu Leu Leu Pro His Gly His Glu Gly Gln Gly Pro Asp

1010 1015 1020

His Thr Ser Ala Arg Ile Glu Arg Phe Leu Gln Leu Trp Ala Glu

1025 1030 1035

Gly Ser Met Thr Ile Ala Met Pro Ser Thr Pro Ser Asn Tyr Phe

1040 1045 1050

His Leu Leu Arg Arg His Ala Leu Asp Gly Ile Gln Arg Pro Leu

1055 1060 1065

Ile Val Phe Thr Pro Lys Ser Met Leu Arg His Lys Ala Ala Val

1070 1075 1080

Ser Glu Ile Lys Asp Phe Thr Glu Ile Lys Phe Arg Ser Val Leu

1085 1090 1095

Glu Glu Pro Thr Tyr Glu Asp Gly Ile Gly Asp Arg Asn Lys Val

1100 1105 1110

Ser Arg Ile Leu Leu Thr Ser Gly Lys Leu Tyr Tyr Glu Leu Ala

1115 1120 1125

Ala Arg Lys Ala Lys Asp Asn Arg Asn Asp Leu Ala Ile Val Arg

1130 1135 1140

Leu Glu Gln Leu Ala Pro Leu Pro Arg Arg Arg Leu Arg Glu Thr

1145 1150 1155

Leu Asp Arg Tyr Glu Asn Val Lys Glu Phe Phe Trp Val Gln Glu

1160 1165 1170

Glu Pro Ala Asn Gln Gly Ala Trp Pro Arg Phe Gly Leu Glu Leu

1175 1180 1185

Pro Glu Leu Leu Pro Asp Lys Leu Ala Gly Ile Lys Arg Ile Ser

1190 1195 1200

Arg Arg Ala Met Ser Ala Pro Ser Ser Gly Ser Ser Lys Val His

1205 1210 1215

Ala Val Glu Gln Gln Glu Ile Leu Asp Glu Ala Phe Gly

1220 1225 1230

<210> 50

<211> 1356

<212> DNA

<213> 牙龈卟啉单胞菌

<400> 50

atggaaatca aagaaatggt gagccttgca cgcaaggctc agaaggagta tcaagctacc 60

cataaccaag aagcagttga caacatttgc cgagctgcag caaaagttat ttatgaaaat 120

gcagctattc tggctcgcga agcagtagac gaaaccggca tgggcgttta cgaacacaaa 180

gtggccaaga atcaaggcaa atccaaaggt gtttggtaca acctccacaa taaaaaatcg 240

attggtatcc tcaatataga cgagcgtacc ggtatgatcg agattgcaaa gcctatcgga 300

gttgtaggag ccgtaacgcc gacgaccaac ccgatcgtta ctccgatgag caatatcatc 360
tttgctctta agacctgcaa tgccatcatt attgcccccc accccagatc caaaaaatgc 420
tctgcacacg cagttcgtct gatcaaagaa gctatcgctc cgttcaacgt accggaaggt 480
atggttcaga tcatcgaaga acccagcatc gagaagacgc aggaactcat gggcgccgta 540
gacgtagtag ttgctacggg tggtatgggc atggtgaagt ctgcatattc ttcaggaaag 600
ccttctttcg gtgttggagc cggtaacgtt caggtgatcg tggatagcaa catcgatttc 660
gaagctgctg cagaaaaaat catcaccggt cgtgctttcg acaacggtat catctgctca 720
ggcgaacaga gcatcatcta caacgaggct gacaaggaag cagttttcac agcattccgc 780
aaccacggtg catatttctg tgacgaagcc gaaggagatc gggctcgtgc agctatcttc 840
gaaaatggag ccatcgcgaa agatgtagta ggtcagagcg ttgccttcat tgccaagaaa 900
gcaaacatca atatccccga gggtacccgt attctcgttg ttgaagctcg cggcgtagga 960
gcagaagacg ttatctgtaa ggaaaagatg tgtcccgtaa tgtgcgccct cagctacaag 1020
cacttcgaag aaggtgtaga aatcgcacgt acgaacctcg ccaacgaagg taacggccac 1080
acctgtgcta tccactccaa caatcaggca cacatcatcc tcgcaggatc agagctgacg 1140
gtatctcgta tcgtagtgaa tgctccgagt gccactacag caggcggtca catccaaaac 1200
ggtcttgccg taaccaatac gctcggatgc ggatcatggg gtaataactc tatctccgag 1260
aacttcactt acaagcacct cctcaacatt tcacgcatcg caccgttgaa ttcaagcatt 1320
cacatccccg atgacaaaga aatctgggaa ctctaa 1356

<210> 51
<211> 451
<212> PRT
<213> 牙龈卟啉单胞菌
<400> 51

Met Glu Ile Lys Glu Met Val Ser Leu Ala Arg Lys Ala Gln Lys Glu
1 5 10 15
Tyr Gln Ala Thr His Asn Gln Glu Ala Val Asp Asn Ile Cys Arg Ala
20 25 30
Ala Ala Lys Val Ile Tyr Glu Asn Ala Ala Ile Leu Ala Arg Glu Ala
35 40 45
Val Asp Glu Thr Gly Met Gly Val Tyr Glu His Lys Val Ala Lys Asn
50 55 60
Gln Gly Lys Ser Lys Gly Val Trp Tyr Asn Leu His Asn Lys Lys Ser
65 70 75 80
Ile Gly Ile Leu Asn Ile Asp Glu Arg Thr Gly Met Ile Glu Ile Ala
85 90 95
Lys Pro Ile Gly Val Val Gly Ala Val Thr Pro Thr Thr Asn Pro Ile
100 105 110
Val Thr Pro Met Ser Asn Ile Ile Phe Ala Leu Lys Thr Cys Asn Ala
115 120 125

Ile Ile Ile Ala Pro His Pro Arg Ser Lys Lys Cys Ser Ala His Ala
130 135 140
Val Arg Leu Ile Lys Glu Ala Ile Ala Pro Phe Asn Val Pro Glu Gly
145 150 155 160
Met Val Gln Ile Ile Glu Glu Pro Ser Ile Glu Lys Thr Gln Glu Leu
165 170 175
Met Gly Ala Val Asp Val Val Val Ala Thr Gly Gly Met Gly Met Val
180 185 190
Lys Ser Ala Tyr Ser Ser Gly Lys Pro Ser Phe Gly Val Gly Ala Gly
195 200 205
Asn Val Gln Val Ile Val Asp Ser Asn Ile Asp Phe Glu Ala Ala Ala
210 215 220
Glu Lys Ile Ile Thr Gly Arg Ala Phe Asp Asn Gly Ile Ile Cys Ser
225 230 235 240
Gly Glu Gln Ser Ile Ile Tyr Asn Glu Ala Asp Lys Glu Ala Val Phe
245 250 255
Thr Ala Phe Arg Asn His Gly Ala Tyr Phe Cys Asp Glu Ala Glu Gly
260 265 270
Asp Arg Ala Arg Ala Ala Ile Phe Glu Asn Gly Ala Ile Ala Lys Asp
275 280 285
Val Val Gly Gln Ser Val Ala Phe Ile Ala Lys Lys Ala Asn Ile Asn
290 295 300
Ile Pro Glu Gly Thr Arg Ile Leu Val Val Glu Ala Arg Gly Val Gly
305 310 315 320
Ala Glu Asp Val Ile Cys Lys Glu Lys Met Cys Pro Val Met Cys Ala
325 330 335
Leu Ser Tyr Lys His Phe Glu Glu Gly Val Glu Ile Ala Arg Thr Asn
340 345 350
Leu Ala Asn Glu Gly Asn Gly His Thr Cys Ala Ile His Ser Asn Asn
355 360 365
Gln Ala His Ile Ile Leu Ala Gly Ser Glu Leu Thr Val Ser Arg Ile
370 375 380
Val Val Asn Ala Pro Ser Ala Thr Thr Ala Gly Gly His Ile Gln Asn
385 390 395 400
Gly Leu Ala Val Thr Asn Thr Leu Gly Cys Gly Ser Trp Gly Asn Asn
405 410 415
Ser Ile Ser Glu Asn Phe Thr Tyr Lys His Leu Leu Asn Ile Ser Arg
420 425 430
Ile Ala Pro Leu Asn Ser Ser Ile His Ile Pro Asp Asp Lys Glu Ile

435 440 445

Trp Glu Leu
450

<210> 52
<211> 1116
<212> DNA
<213> 牙龈卟啉单胞菌
<400> 52

atgcaacttt tcaaactcaa gagtgtaaca catcactttg acacttttgc agaatttgcc 60
aaggaattct gtcttggaga acgcgacttg gtaattacca acgagttcat ctatgaaccg 120
tatatgaagg catgccagct cccctgccat tttgttatgc aggagaaata tgggcaaggc 180
gagccttctg acgaaatgat gaataacatc ttggcagaca tccgtaatat ccagttcgac 240
cgcgtaatcg gtatcggagg aggtacggtt attgacatct ctaaactttt cgttctgaaa 300
ggattaaatg atgtactcga tgcattcgac cgcaaaatac ctcttatcaa agagaaagaa 360
ctgatcattg tgcccacaac atgcggaacg ggtagcgagg tgacgaacat ttctatcgca 420
gaaatcaaaa gccgtcacac caaaatggga ttggctgacg atgccattgt tgcagaccat 480
gccatcatca tacctgaact tctgaagagc ttgcctttcc acttctacgc atgcagtgca 540
atcgatgctc ttatccatgc catcgagtca tacgtatctc ctaaagccag tccatattct 600
cgtctgttca gtgaggcggc ttgggacatt atcctggaag tattcaagaa aatcgccgaa 660
cacggccctg aataccgctt cgaaaagctg ggagaaatga tcatggccag caactatgcc 720
ggtatagcct tcggaaatgc aggagtagga gccgtccacg cactatccta cccgttggga 780
ggcaactatc acgtgccgca tggagaagca aactatcagt tcttcacaga ggtattcaaa 840
gtataccaaa agaagaatcc tttcggctat atagtcgaac tcaactggaa gctctccaag 900
atactgaact gccagcccga atacgtatat ccgaagctgg atgaacttct cggatgcctt 960
cttaccaaga aacctttgca cgaatacggc atgaaggacg aagaggtaag aggctttgcg 1020
gaatcagtgc ttaagacaca gcaaagattg ctcgccaaca actacgtaga gcttactgta 1080
gatgagatcg aaggtatcta cagaagactc tactaa 1116

<210> 53
<211> 371
<212> PRT
<213> 牙龈卟啉单胞菌
<400> 53

Met Gln Leu Phe Lys Leu Lys Ser Val Thr His His Phe Asp Thr Phe
1 5 10 15
Ala Glu Phe Ala Lys Glu Phe Cys Leu Gly Glu Arg Asp Leu Val Ile
20 25 30
Thr Asn Glu Phe Ile Tyr Glu Pro Tyr Met Lys Ala Cys Gln Leu Pro
35 40 45
Cys His Phe Val Met Gln Glu Lys Tyr Gly Gln Gly Glu Pro Ser Asp

50 55 60

Glu Met Met Asn Asn Ile Leu Ala Asp Ile Arg Asn Ile Gln Phe Asp
65 70 75 80
Arg Val Ile Gly Ile Gly Gly Gly Thr Val Ile Asp Ile Ser Lys Leu
85 90 95
Phe Val Leu Lys Gly Leu Asn Asp Val Leu Asp Ala Phe Asp Arg Lys
100 105 110
Ile Pro Leu Ile Lys Glu Lys Glu Leu Ile Ile Val Pro Thr Thr Cys
115 120 125
Gly Thr Gly Ser Glu Val Thr Asn Ile Ser Ile Ala Glu Ile Lys Ser
130 135 140
Arg His Thr Lys Met Gly Leu Ala Asp Asp Ala Ile Val Ala Asp His
145 150 155 160
Ala Ile Ile Ile Pro Glu Leu Leu Lys Ser Leu Pro Phe His Phe Tyr
165 170 175
Ala Cys Ser Ala Ile Asp Ala Leu Ile His Ala Ile Glu Ser Tyr Val
180 185 190
Ser Pro Lys Ala Ser Pro Tyr Ser Arg Leu Phe Ser Glu Ala Ala Trp
195 200 205
Asp Ile Ile Leu Glu Val Phe Lys Lys Ile Ala Glu His Gly Pro Glu
210 215 220
Tyr Arg Phe Glu Lys Leu Gly Glu Met Ile Met Ala Ser Asn Tyr Ala
225 230 235 240
Gly Ile Ala Phe Gly Asn Ala Gly Val Gly Ala Val His Ala Leu Ser
245 250 255
Tyr Pro Leu Gly Gly Asn Tyr His Val Pro His Gly Glu Ala Asn Tyr
260 265 270
Gln Phe Phe Thr Glu Val Phe Lys Val Tyr Gln Lys Lys Asn Pro Phe
275 280 285
Gly Tyr Ile Val Glu Leu Asn Trp Lys Leu Ser Lys Ile Leu Asn Cys
290 295 300
Gln Pro Glu Tyr Val Tyr Pro Lys Leu Asp Glu Leu Leu Gly Cys Leu
305 310 315 320
Leu Thr Lys Lys Pro Leu His Glu Tyr Gly Met Lys Asp Glu Glu Val
325 330 335
Arg Gly Phe Ala Glu Ser Val Leu Lys Thr Gln Gln Arg Leu Leu Ala
340 345 350
Asn Asn Tyr Val Glu Leu Thr Val Asp Glu Ile Glu Gly Ile Tyr Arg
355 360 365

Arg Leu Tyr
370

<210> 54
<211> 1296
<212> DNA
<213> 牙龈卟啉单胞菌
<400> 54

atgaaagacg tattagcgga atatgcctcc cgaattgttt cggccgaaga agccgtaaaa 60
catatcaaaa atggagaacg ggtagctttg tcacatgctg ccggagttcc tcagagttgt 120
gttgatgcac tggtacaaca ggccgacctt ttccagaatg tcgaaattta tcacatgctt 180
tgtctcggcg aaggaaaata tatggcacct gaaatggccc ctcacttccg acacataacc 240
aattttgtag gtggtaattc tcgtaaagca gttgaggaaa atagagccga cttcattccg 300
gtattctttt atgaagtgcc atcaatgatt cgcaaagaca tccttcacat agatgtcgcc 360
atcgttcagc tttcaatgcc tgatgagaat ggttactgta gttttggagt atcttgcgat 420
tatagcaaac cggcagcaga aagcgctcat ttagttatag gggaaatcaa ccgtcaaatg 480
ccatatgtac atggcgacaa cttgattcac atatcgaagt tggattacat cgtgatggca 540
gactacccta tctattctct tgcaaagccc aaaatcggag aagtagaaga agctatcggg 600
cgtaattgtg ccgagcttat tgaagatggt gccacactcc aactcggtat cggcgcgatt 660
cctgatgcag ccctgttatt cctcaaggac aaaaaagatc tggggatcca taccgagatg 720
ttctccgatg gtgttgtcga attagttcgc agtggagtaa ttacaggaaa gaaaaagaca 780
cttcaccccg gaaagatggt cgcaaccttc ttaatgggaa gcgaagacgt atatcatttc 840
atcgacaaaa atcccgatgt agaactttat ccggtagatt acgtcaatga tccgcgagta 900
atcgctcaaa atgataatat ggtcagcatc aatagctgta tcgaaatcga tcttatggga 960
caagtcgtgt ccgaatgtat aggaagcaag caattcagcg gaaccggcgg tcaagtagat 1020
tatgttcgtg gagcagcatg gtctaaaaac ggcaaaagca tcatggcaat tccctcaaca 1080
gccaaaaacg gtactgcatc tcgaattgta cctataattg cagagggagc tgctgtaaca 1140
accctccgca acgaagtcga ttacgttgta accgaatacg gtatagcaca actcaaagga 1200
aagagtttgc gccagcgagc agaagctctt attgccatag cccacccgga tttcagagag 1260
gaactaacga aacatctccg caaacgtttc ggataa 1296

<210> 55
<211> 431
<212> PRT
<213> 牙龈卟啉单胞菌
<400> 55

Met Lys Asp Val Leu Ala Glu Tyr Ala Ser Arg Ile Val Ser Ala Glu
1 5 10 15
Glu Ala Val Lys His Ile Lys Asn Gly Glu Arg Val Ala Leu Ser His
20 25 30
Ala Ala Gly Val Pro Gln Ser Cys Val Asp Ala Leu Val Gln Gln Ala

35 40 45

Asp Leu Phe Gln Asn Val Glu Ile Tyr His Met Leu Cys Leu Gly Glu
50 55 60
Gly Lys Tyr Met Ala Pro Glu Met Ala Pro His Phe Arg His Ile Thr
65 70 75 80
Asn Phe Val Gly Gly Asn Ser Arg Lys Ala Val Glu Glu Asn Arg Ala
85 90 95
Asp Phe Ile Pro Val Phe Phe Tyr Glu Val Pro Ser Met Ile Arg Lys
100 105 110
Asp Ile Leu His Ile Asp Val Ala Ile Val Gln Leu Ser Met Pro Asp
115 120 125
Glu Asn Gly Tyr Cys Ser Phe Gly Val Ser Cys Asp Tyr Ser Lys Pro
130 135 140
Ala Ala Glu Ser Ala His Leu Val Ile Gly Glu Ile Asn Arg Gln Met
145 150 155 160
Pro Tyr Val His Gly Asp Asn Leu Ile His Ile Ser Lys Leu Asp Tyr
165 170 175
Ile Val Met Ala Asp Tyr Pro Ile Tyr Ser Leu Ala Lys Pro Lys Ile
180 185 190
Gly Glu Val Glu Glu Ala Ile Gly Arg Asn Cys Ala Glu Leu Ile Glu
195 200 205
Asp Gly Ala Thr Leu Gln Leu Gly Ile Gly Ala Ile Pro Asp Ala Ala
210 215 220
Leu Leu Phe Leu Lys Asp Lys Lys Asp Leu Gly Ile His Thr Glu Met
225 230 235 240
Phe Ser Asp Gly Val Val Glu Leu Val Arg Ser Gly Val Ile Thr Gly
245 250 255
Lys Lys Lys Thr Leu His Pro Gly Lys Met Val Ala Thr Phe Leu Met
260 265 270
Gly Ser Glu Asp Val Tyr His Phe Ile Asp Lys Asn Pro Asp Val Glu
275 280 285
Leu Tyr Pro Val Asp Tyr Val Asn Asp Pro Arg Val Ile Ala Gln Asn
290 295 300
Asp Asn Met Val Ser Ile Asn Ser Cys Ile Glu Ile Asp Leu Met Gly
305 310 315 320
Gln Val Val Ser Glu Cys Ile Gly Ser Lys Gln Phe Ser Gly Thr Gly
325 330 335
Gly Gln Val Asp Tyr Val Arg Gly Ala Ala Trp Ser Lys Asn Gly Lys
340 345 350

Ser Ile Met Ala Ile Pro Ser Thr Ala Lys Asn Gly Thr Ala Ser Arg
355 360 365
Ile Val Pro Ile Ile Ala Glu Gly Ala Ala Val Thr Thr Leu Arg Asn
370 375 380
Glu Val Asp Tyr Val Val Thr Glu Tyr Gly Ile Ala Gln Leu Lys Gly
385 390 395 400
Lys Ser Leu Arg Gln Arg Ala Glu Ala Leu Ile Ala Ile Ala His Pro
405 410 415
Asp Phe Arg Glu Glu Leu Thr Lys His Leu Arg Lys Arg Phe Gly
420 425 430

<210> 56
<211> 906
<212> DNA
<213> 丙酮丁醇梭菌
<400> 56
atgattaaga gttttaatga aattatcatg aaggtaaaga gcaaagaaat gaaaaaagtt 60
gctgttgctg tagcacaaga cgagccagta cttgaagcag taagagatgc taagaaaaat 120
ggtattgcag atgctattct tgttggagac catgacgaaa tcgtgtcaat cgcgcttaaa 180
ataggaatgg atgtaaatga ttttgaaata gtaaacgagc ctaacgttaa gaaagctgct 240
ttaaaggcag tagagcttgt atcaactgga aaagctgata tggtaatgaa gggacttgta 300
aatacagcaa ctttcttaag atctgtatta aacaaagaag ttggacttag aacaggaaaa 360
actatgtctc acgttgcagt atttgaaact gagaaatttg atagactatt atttttaaca 420
gatgttgctt tcaatactta tcctgaatta aaggaaaaaa ttgatatagt aaacaattca 480
gttaaggttg cacatgcaat aggaattgaa aatccaaagg ttgctccaat ttgtgcagtt 540
gaggttataa accctaaaat gccatcaaca cttgatgcag caatgctttc aaaaatgagt 600
gacagaggac aaattaaagg ttgtgtagtt gacggacctt tagcacttga tatagcttta 660
tcagaagaag cagcacatca taagggagta acaggagaag ttgctggaaa agctgatatc 720
ttcttaatgc caaacataga aacaggaaat gtaatgtata agactttaac atatacaact 780
gattcaaaaa atggaggaat cttagttgga acttctgcac cagttgtttt aacttcaaga 840
gctgacagcc atgaaacaaa aatgaactct atagcacttg cagctttagt tgcaggcaat 900
aaataa 906

<210> 57
<211> 301
<212> PRT
<213> 丙酮丁醇梭菌
<400> 57
Met Ile Lys Ser Phe Asn Glu Ile Ile Met Lys Val Lys Ser Lys Glu
1 5 10 15
Met Lys Lys Val Ala Val Ala Val Ala Gln Asp Glu Pro Val Leu Glu

20 25 30

Ala Val Arg Asp Ala Lys Lys Asn Gly Ile Ala Asp Ala Ile Leu Val
35 40 45

Gly Asp His Asp Glu Ile Val Ser Ile Ala Leu Lys Ile Gly Met Asp
50 55 60

Val Asn Asp Phe Glu Ile Val Asn Glu Pro Asn Val Lys Lys Ala Ala
65 70 75 80

Leu Lys Ala Val Glu Leu Val Ser Thr Gly Lys Ala Asp Met Val Met
85 90 95

Lys Gly Leu Val Asn Thr Ala Thr Phe Leu Arg Ser Val Leu Asn Lys
100 105 110

Glu Val Gly Leu Arg Thr Gly Lys Thr Met Ser His Val Ala Val Phe
115 120 125

Glu Thr Glu Lys Phe Asp Arg Leu Leu Phe Leu Thr Asp Val Ala Phe
130 135 140

Asn Thr Tyr Pro Glu Leu Lys Glu Lys Ile Asp Ile Val Asn Asn Ser
145 150 155 160

Val Lys Val Ala His Ala Ile Gly Ile Glu Asn Pro Lys Val Ala Pro
165 170 175

Ile Cys Ala Val Glu Val Ile Asn Pro Lys Met Pro Ser Thr Leu Asp
180 185 190

Ala Ala Met Leu Ser Lys Met Ser Asp Arg Gly Gln Ile Lys Gly Cys
195 200 205

Val Val Asp Gly Pro Leu Ala Leu Asp Ile Ala Leu Ser Glu Glu Ala
210 215 220

Ala His His Lys Gly Val Thr Gly Glu Val Ala Gly Lys Ala Asp Ile
225 230 235 240

Phe Leu Met Pro Asn Ile Glu Thr Gly Asn Val Met Tyr Lys Thr Leu
245 250 255

Thr Tyr Thr Thr Asp Ser Lys Asn Gly Gly Ile Leu Val Gly Thr Ser
260 265 270

Ala Pro Val Val Leu Thr Ser Arg Ala Asp Ser His Glu Thr Lys Met
275 280 285

Asn Ser Ile Ala Leu Ala Ala Leu Val Ala Gly Asn Lys
290 295 300

<210> 58

<211> 1068

<212> DNA

<213> 丙酮丁醇梭菌

<400> 58

atgtatagat tactaataat caatcctggc tcgacctcaa ctaaaattgg tatttatgac 60
gatgaaaaag agatatttga gaagacttta agacattcag ctgaagagat agaaaaatat 120
aacactatat ttgatcaatt tcaattcaga aagaatgtaa ttttagatgc gttaaaagaa 180
gcaaacatag aagtaagttc tttaaatgct gtagttggaa gaggcggact cttaaagcca 240
atagtaagtg gaacttatgc agtaaatcaa aaaatgcttg aagaccttaa agtaggagtt 300
caaggtcagc atgcgtcaaa tcttggtgga attattgcaa atgaaatagc aaaagaaata 360
aatgttccag catacatagt tgatccagtt gttgtggatg agcttgatga agtttcaaga 420
atatcaggaa tggctgacat tccaagaaaa agtatattcc atgcattaaa tcaaaaagca 480
gttgctagaa gatatgcaaa agaagttgga aaaaaatacg aagatcttaa tttaatcgta 540
gtccacatgg gtggaggtac ttcagtaggt actcataaag atggtagagt aatagaagtt 600
aataatacac ttgatggaga aggtccattc tcaccagaaa gaagtggtgg agttccaata 660
ggagatcttg taagattgtg cttcagcaac aaatatactt atgaagaagt aatgaaaaag 720
ataaacggca aaggcggagt tgttagttac ttaaatacta tcgattttaa ggctgtagtt 780
gataaagctc ttgaaggaga taagaaatgt gcacttatat atgaagcttt cacattccag 840
gtagcaaaag agataggaaa atgttcaacc gttttaaaag gaaatgtaga tgcaataatc 900
ttaacaggcg gaattgcgta caacgagcat gtatgtaatg ccatagagga tagagtaaaa 960
ttcatagcac ctgtagttag atatggtgga gaagatgaac ttcttgcact tgcagaaggt 1020
ggacttagag ttttaagagg agaagaaaaa gctaaggaat acaaataa 1068

<210> 59

<211> 355

<212> PRT

<213> 丙酮丁醇梭菌

<400> 59

Met Tyr Arg Leu Leu Ile Ile Asn Pro Gly Ser Thr Ser Thr Lys Ile
1 5 10 15
Gly Ile Tyr Asp Asp Glu Lys Glu Ile Phe Glu Lys Thr Leu Arg His
20 25 30
Ser Ala Glu Glu Ile Glu Lys Tyr Asn Thr Ile Phe Asp Gln Phe Gln
35 40 45
Phe Arg Lys Asn Val Ile Leu Asp Ala Leu Lys Glu Ala Asn Ile Glu
50 55 60
Val Ser Ser Leu Asn Ala Val Val Gly Arg Gly Gly Leu Leu Lys Pro
65 70 75 80
Ile Val Ser Gly Thr Tyr Ala Val Asn Gln Lys Met Leu Glu Asp Leu
85 90 95
Lys Val Gly Val Gln Gly Gln His Ala Ser Asn Leu Gly Gly Ile Ile
100 105 110
Ala Asn Glu Ile Ala Lys Glu Ile Asn Val Pro Ala Tyr Ile Val Asp

115 120 125
Pro Val Val Val Asp Glu Leu Asp Glu Val Ser Arg Ile Ser Gly Met
130 135 140
Ala Asp Ile Pro Arg Lys Ser Ile Phe His Ala Leu Asn Gln Lys Ala
145 150 155 160
Val Ala Arg Arg Tyr Ala Lys Glu Val Gly Lys Lys Tyr Glu Asp Leu
165 170 175
Asn Leu Ile Val Val His Met Gly Gly Gly Thr Ser Val Gly Thr His
180 185 190
Lys Asp Gly Arg Val Ile Glu Val Asn Asn Thr Leu Asp Gly Glu Gly
195 200 205
Pro Phe Ser Pro Glu Arg Ser Gly Gly Val Pro Ile Gly Asp Leu Val
210 215 220
Arg Leu Cys Phe Ser Asn Lys Tyr Thr Tyr Glu Glu Val Met Lys Lys
225 230 235 240
Ile Asn Gly Lys Gly Gly Val Val Ser Tyr Leu Asn Thr Ile Asp Phe
245 250 255
Lys Ala Val Val Asp Lys Ala Leu Glu Gly Asp Lys Lys Cys Ala Leu
260 265 270
Ile Tyr Glu Ala Phe Thr Phe Gln Val Ala Lys Glu Ile Gly Lys Cys
275 280 285
Ser Thr Val Leu Lys Gly Asn Val Asp Ala Ile Ile Leu Thr Gly Gly
290 295 300
Ile Ala Tyr Asn Glu His Val Cys Asn Ala Ile Glu Asp Arg Val Lys
305 310 315 320
Phe Ile Ala Pro Val Val Arg Tyr Gly Gly Glu Asp Glu Leu Leu Ala
325 330 335
Leu Ala Glu Gly Gly Leu Arg Val Leu Arg Gly Glu Glu Lys Ala Lys
340 345 350
Glu Tyr Lys
355

<210> 60
<211> 906
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 60
atgattaaga gttttaatga aattatcatg aaggtaaaga gcaaagaaat gaaaaaagtt 60

gctgttgctg tagcacaaga cgagccagta cttgaagcag tacgcgatgc taagaaaaat 120
ggtattgcag atgctattct tgttggcgac catgacgaaa tcgtgtcaat cgcgcttaaa 180
ataggcatgg atgtaaatga ttttgaaata gtaaacgagc ctaacgttaa gaaagctgct 240
ttaaaggcag tagagctggt atcaactgga aaagctgata tggtaatgaa gggacttgta 300
aatacagcaa ctttcttacg ctctgtatta aacaaagaag ttggactgag aacaggaaaa 360
actatgtctc acgttgcagt atttgaaact gagaaatttg atcgtctgtt atttttaaca 420
gatgttgctt tcaatactta tcctgaatta aaggaaaaaa ttgatatcgt aaacaattca 480
gttaaggttg cacatgcaat aggtattgaa aatccaaagg ttgctccaat ttgtgcagtt 540
gaggttataa accctaaaat gccatcaaca cttgatgcag caatgctttc aaaaatgagt 600
gacagaggac aaattaaagg ttgtgtagtt gacggaccgt tagcacttga tatcgcttta 660
tcagaagaag cagcacatca taagggcgta acaggagaag ttgctggaaa agctgatatc 720
ttcttaatgc caaacattga aacaggaaat gtaatgtata agactttaac atatacaact 780
gatagcaaaa atggcggaat cttagttgga acttctgcac cagttgtttt aacttcacgc 840
gctgacagcc atgaaacaaa aatgaactct attgcacttg cagctttagt tgcaggcaat 900
aaataa 906

<210> 61
<211> 906
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 61

atgattaaga gttttaatga aattatcatg aaggtaaaga gcaaagaaat gaaaaaagtt 60
gctgttgctg tagcacaaga cgagccagta cttgaagcag tacgcgatgc taagaaaaat 120
ggtattgccg atgctattct ggttggcgac catgacgaaa tcgtgtctat cgcgctgaaa 180
ataggcatgg atgtaaatga ttttgaaatt gttaacgagc ctaacgttaa gaaagctgcg 240
ttaaaggcag tagagctggt atcaactgga aaagctgata tggtaatgaa gggactggta 300
aataccgcaa ctttcttacg ctctgtatta aacaaagaag ttggtctgcg tacaggaaaa 360
accatgtctc acgttgcagt atttgaaact gagaaatttg atcgtctgtt atttttaaca 420
gatgttgctt tcaatactta tcctgaatta aaggaaaaaa ttgatatcgt taacaatagc 480
gttaaggttg cacatgccat tggtattgaa aatccaaagg ttgctccaat ttgtgcagtt 540
gaggttatta acccgaaaat gccatcaaca cttgatgcag caatgctttc aaaaatgagt 600
gaccgcggac aaattaaagg ttgtgtagtt gacggaccgc tggcacttga tatcgcttta 660
tcagaagaag cagcacatca taaaggcgta acaggagaag ttgctggaaa agctgatatc 720
ttcttaatgc caaacattga aacaggaaat gtaatgtata agacgttaac ctataccact 780
gatagcaaaa atggcggcat cctggttgga acttctgcac cagttgtttt aacttcacgc 840
gctgacagcc atgaaacaaa aatgaactct attgcactgg cagcgctggt tgcaggcaat 900
aaataa 906

<210> 62

<211> 906
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸
<400> 62
atgattaaga gttttaatga aattatcatg aaggtaaaga gcaaagaaat gaaaaaagtt 60
gctgttgctg ttgcacaaga cgagccggta ctggaagcgg tacgcgatgc taagaaaaat 120
ggtattgccg atgctattct ggttggcgac catgacgaaa tcgtctctat cgcgctgaaa 180
attggcatgg atgttaatga ttttgaaatt gttaacgagc ctaacgttaa gaaagctgcg 240
ctgaaggcgg tagagctggt ttccaccgga aaagctgata tggtaatgaa agggctggtg 300
aataccgcaa ctttcttacg cagcgtactg aacaaagaag ttggtctgcg taccggaaaa 360
accatgagtc acgttgcggt atttgaaact gagaaatttg atcgtctgct gtttctgacc 420
gatgttgctt tcaatactta tcctgaatta aaagaaaaaa ttgatatcgt taacaatagc 480
gttaaggttg cgcatgccat tggtattgaa aatccaaagg ttgctccaat ttgtgcagtt 540
gaggttatta acccgaaaat gccatcaaca cttgatgccg caatgcttag caaaatgagt 600
gaccgcggac aaattaaagg ttgtgtggtt gacggcccgc tggcactgga tatcgcgtta 660
agcgaagaag cggcacatca taaaggcgta accggcgaag ttgctggaaa agctgatatc 720
ttcctgatgc caaacattga aacaggcaat gtaatgtata aaacgttaac ctataccact 780
gatagcaaaa atggcggcat cctggttgga acttctgcac cagttgtttt aacctcacgc 840
gctgacagcc atgaaaccaa aatgaacagc attgcactgg cagcgctggt tgcaggcaat 900
aaataa 906
<210> 63
<211> 906
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸
<400> 63
atgattaaaa gttttaacga aattatcatg aaagtgaaaa gcaaagagat gaaaaaagtg 60
gcggttgcgg ttgcgcagga tgaaccggtg ctggaagcgg tgcgcgatgc caaaaaaaac 120
ggtattgccg atgccattct ggtgggcgat cacgatgaaa ttgtctctat tgcgctgaaa 180
attggcatgg atgttaacga ttttgaaatt gttaatgaac cgaacgtgaa aaaagcggcg 240
ctgaaagcgg ttgaactggt ttccaccggt aaagccgata tggtgatgaa agggctggtg 300
aataccgcaa ccttcctgcg cagcgtgctg aataaagaag tgggtctgcg taccggtaaa 360
accatgagtc atgttgcggt gtttgaaacc gaaaaatttg accgtctgct gtttctgacc 420
gatgttgcgt ttaataccta tccggaactg aaagagaaaa ttgatatcgt taataacagc 480
gtgaaagtgg cgcatgccat tggtattgaa aacccgaaag tggcgccgat ttgcgcggtt 540
gaagtgatta acccgaaaat gccgtcaacg ctggatgccg cgatgctcag caaaatgagc 600

gatcgcggtc aaatcaaagg ctgtgtggtt gatggcccgc tggcgctgga tatcgcgctt 660
agcgaagaag cggcgcatca taaaggcgtg accggcgaag tggccggtaa agccgatatt 720
ttcctgatgc cgaatattga aaccggcaac gtgatgtata aaacgctgac ctataccacc 780
gacagcaaaa acggcggcat tctggtgggt accagcgcgc cggtggtgct gacctcgcgc 840
gccgacagcc atgaaaccaa aatgaacagc attgcgctgg cggcgctggt ggccggtaat 900
aaataa 906

<210> 64
<211> 1068
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 64
atgtatcgtt tactgattat caatcctggc tcgacctcaa ctaaaattgg tatttatgac 60
gatgaaaaag agatatttga gaagacttta cgtcattcag ctgaagagat agaaaaatat 120
aacactatat ttgatcaatt tcagttcaga aagaatgtaa ttctcgatgc gttaaaagaa 180
gcaaacattg aagtaagttc tttaaatgct gtagttggac gcggcggact gttaaagcca 240
atagtaagtg gaacttatgc agtaaatcaa aaaatgcttg aagaccttaa agtaggcgtt 300
caaggtcagc atgcgtcaaa tcttggtgga attattgcaa atgaaatagc aaaagaaata 360
aatgttccag catacatcgt tgatccagtt gttgtggatg agcttgatga agtttcacgt 420
atatcaggaa tggctgacat tccacgtaaa agtatattcc atgcattaaa tcaaaaagca 480
gttgctagac gctatgcaaa agaagttgga aaaaaatacg aagatcttaa tttaatcgtg 540
gtccacatgg gtggcggtac ttcagtaggt actcataaag atggtagagt aattgaagtt 600
aataatacac ttgatggaga aggtccattc tcaccagaaa gaagtggtgg cgttccaata 660
ggcgatcttg tacgtttgtg cttcagcaac aaatatactt atgaagaagt aatgaaaaag 720
ataaacggca aaggcggcgt tgttagttac ttaaatacta tcgattttaa ggctgtagtt 780
gataaagctc ttgaaggcga taagaaatgt gcacttatat atgaagcttt cacattccag 840
gtagcaaaag agataggaaa atgttcaacc gttttaaaag gaaatgtaga tgcaataatc 900
ttaacaggcg gaattgcgta caacgagcat gtatgtaatg ccatagagga tagagtaaaa 960
ttcattgcac ctgtagttcg ttatggtgga gaagatgaac ttcttgcact tgcagaaggt 1020
ggactgcgcg ttttacgcgg agaagaaaaa gctaaggaat acaaataa 1068

<210> 65
<211> 1068
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 65
atgtatcgtt tactgattat caatcctggc tcgacctcaa ctaaaattgg tatttatgac 60

gatgaaaaag agatatttga gaagacgtta cgtcattcag ctgaagagat tgaaaaatat 120
aacactatat ttgatcaatt tcagttccgc aagaatgtga ttctcgatgc gttaaaagaa 180
gcaaacattg aagtcagttc tttaaatgct gtagttggac gcggcggact gttaaagcca 240
attgtcagtg gaacttatgc agtaaatcaa aaaatgcttg aagaccttaa agtgggcgtt 300
caaggtcagc atgccagcaa tcttggtggc attattgcca atgaaatcgc aaaagaaatc 360
aatgttccag catacatcgt tgatccggtt gttgtggatg agcttgatga agttagccgt 420
ataagcggaa tggctgacat tccacgtaaa agtatattcc atgcattaaa tcaaaaagca 480
gttgctcgtc gctatgcaaa agaagttggt aaaaaatacg aagatcttaa tttaatcgtg 540
gtccacatgg gtggcggtac ttcagtaggt actcataaag atggtcgcgt gattgaagtt 600
aataatacac ttgatggcga aggtccattc tcaccagaac gtagtggtgg cgttccaatt 660
ggcgatctgg tacgtttgtg cttcagcaac aaatatactt atgaagaagt gatgaaaaag 720
ataaacggca aaggcggcgt tgttagttac ctgaatacta tcgattttaa ggctgtagtt 780
gataaagcgc ttgaaggcga taagaaatgt gcactgattt atgaagcttt caccttccag 840
gtagcaaaag agattggtaa atgttcaacc gttttaaaag gaaatgttga tgccattatc 900
ttaacaggcg gcattgctta caacgagcat gtatgtaatg ccattgagga tcgcgtaaaa 960
ttcattgcac ctgtagttcg ttatggtggc gaagatgaac tgctggcact ggcagaaggt 1020
ggactgcgcg ttttacgcgg cgaagaaaaa gcgaaggaat acaaataa 1068

<210> 66
<211> 1068
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 66

atgtatcgtc tgctgattat caatcctggc tcgacctcaa ctaaaattgg tatttatgac 60
gatgaaaaag agatatttga gaaaacgtta cgtcatagcg ctgaagagat tgaaaaatat 120
aacactattt ttgatcaatt tcagttccgc aagaatgtga ttctcgatgc gctgaaagaa 180
gcaaacattg aagtcagttc gctgaatgcg gtagttggtc gcggcggtct gctgaagcca 240
attgtcagcg gcacttatgc ggtaaatcaa aaaatgctgg aagacctgaa agtgggcgtt 300
caggggcagc atgccagcaa tcttggtggc attattgcca atgaaatcgc caaagaaatc 360
aatgttccgg catacatcgt tgatccggtt gttgtggatg agctggatga agttagccgt 420
atcagcggaa tggctgacat tccacgtaaa agtattttcc atgcactgaa tcaaaaagcg 480
gttgcgcgtc gctatgcaaa agaagttggt aaaaaatacg aagatcttaa tctgatcgtg 540
gtgcatatgg gtggcggtac tagcgtcggt actcataaag atggtcgcgt gattgaagtt 600
aataatacac ttgatggcga aggtccattc tcaccagaac gtagcggtgg cgttccaatt 660
ggcgatctgg tacgtttgtg cttcagcaac aaatatacct atgaagaagt gatgaaaaag 720
ataaacggca aaggcggcgt tgttagttac ctgaatacta tcgattttaa ggcggtagtt 780
gataaagcgc tggaaggcga taagaaatgt gcactgattt atgaagcgtt caccttccag 840
gtggcaaaag agattggtaa atgttcaacc gttctgaaag gcaatgttga tgccattatc 900

ctgaccggcg gcattgctta caacgagcat gtttgtaatg ccattgagga tcgcgtaaaa 960
ttcattgcac ctgtggttcg ttatggtggc gaagatgaac tgctggcact ggcagaaggt 1020
ggtctgcgcg ttttacgcgg cgaagaaaaa gcgaaagaat acaaataa 1068

<210> 67
<211> 1068
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸
<400> 67

atgtatcgtc tgctgattat caacccgggc agcacctcaa ccaaaattgg tatttacgac 60
gatgaaaaag agatttttga aaaaacgctg cgtcacagcg cagaagagat tgaaaaatac 120
aacaccattt tcgatcagtt ccagttccgc aaaaacgtga ttctcgatgc gctgaaagaa 180
gccaatattg aagtctcctc gctgaatgcg gtggtcggtc gcggcggtct gctgaaaccg 240
attgtcagcg gcacttatgc ggttaatcag aaaatgctgg aagatctgaa agtgggcgtg 300
caggggcagc atgccagcaa tctcggcggc attatcgcca atgaaatcgc caaagagatc 360
aacgtgccgg cttatatcgt cgatccggtg gtggttgatg aactggatga agtcagccgt 420
atcagcggca tggcggatat tccgcgtaaa agcattttcc atgcgctgaa tcagaaagcg 480
gttgcgcgtc gctatgccaa agaagtgggt aaaaaatatg aagatctcaa tctgattgtg 540
gtgcatatgg gcggcggcac cagcgtcggt acgcataaag atggtcgcgt gattgaagtg 600
aataacacgc tggatggcga agggccgttc tcgccggaac gtagcggcgg cgtgccgatt 660
ggcgatctgg tgcgtctgtg tttcagcaat aaatacacct acgaagaagt gatgaaaaaa 720
atcaacggca aaggcggcgt ggttagctat ctgaatacca tcgattttaa agcggtggtt 780
gataaagcgc tggaaggcga taaaaaatgc gcgctgattt atgaagcgtt taccttccag 840
gtggcgaaag agattggtaa atgttcaacc gtgctgaaag gcaacgttga tgccattatt 900
ctgaccggcg gcattgctta taacgaacat gtttgtaatg ccattgaaga tcgcgtgaaa 960
tttattgcgc cggtggtgcg ttacggcggc gaagatgaac tgctggcgct ggcggaaggc 1020
ggtctgcgcg tgctgcgcgg cgaagaaaaa gcgaaagagt acaaataa 1068

<210> 68
<211> 1407
<212> DNA
<213> 拜氏梭菌
<400> 68

atgaataaag acacactaat acctacaact aaagatttaa aagtaaaaac aaatggtgaa 60
aacattaatt taaagaacta caaggataat tcttcatgtt tcggagtatt cgaaaatgtt 120
gaaaatgcta taagcagcgc tgtacacgca caaaagatat tatcccttca ttatacaaaa 180
gagcaaagag aaaaaatcat aactgagata agaaaggccg cattacaaaa taaagaggtc 240
ttggctacaa tgattctaga agaaacacat atgggaagat atgaggataa aatattaaaa 300
catgaattgg tagctaaata tactcctggt acagaagatt taactactac tgcttggtca 360

ggtgataatg gtcttacagt tgtagaaatg tctccatatg gtgttatagg tgcaataact 420
ccttctacga atccaactga aactgtaata tgtaatagca taggcatgat agctgctgga 480
aatgctgtag tatttaacgg acacccatgc gctaaaaaat gtgttgcctt tgctgttgaa 540
atgataaata aggcaattat ttcatgtggc ggtcctgaaa atctagtaac aactataaaa 600
aatccaacta tggagtctct agatgcaatt attaagcatc cttcaataaa acttctttgc 660
ggaactgggg gtccaggaat ggtaaaaacc ctcttaaatt ctggtaagaa agctataggt 720
gctggtgctg gaaatccacc agttattgta gatgatactg ctgatataga aaaggctggt 780
aggagcatca ttgaaggctg ttcttttgat aataatttac cttgtattgc agaaaaagaa 840
gtatttgttt ttgagaatgt tgcagatgat ttaatatcta acatgctaaa aaataatgct 900
gtaattataa atgaagatca agtatcaaaa ttaatagatt tagtattaca aaaaaataat 960
gaaactcaag aatactttat aaacaaaaaa tgggtaggaa aagatgcaaa attattctta 1020
gatgaaatag atgttgagtc tccttcaaat gttaaatgca taatctgcga agtaaatgca 1080
aatcatccat ttgttatgac agaactcatg atgccaatat tgccaattgt aagagttaaa 1140
gatatagatg aagctattaa atatgcaaag atagcagaac aaaatagaaa acatagtgcc 1200
tatatttatt ctaaaaatat agacaaccta aatagatttg aaagagaaat agatactact 1260
atttttgtaa agaatgctaa atcttttgct ggtgttggtt atgaagcaga aggatttaca 1320
actttcacta ttgctggatc tactggtgag ggaataacct ctgcaaggaa ttttacaaga 1380
caaagaagat gtgtacttgc cggctaa 1407

<210> 69
<211> 468
<212> PRT
<213> 拜氏梭菌
<400> 69

Met Asn Lys Asp Thr Leu Ile Pro Thr Thr Lys Asp Leu Lys Val Lys
1 5 10 15
Thr Asn Gly Glu Asn Ile Asn Leu Lys Asn Tyr Lys Asp Asn Ser Ser
20 25 30
Cys Phe Gly Val Phe Glu Asn Val Glu Asn Ala Ile Ser Ser Ala Val
35 40 45
His Ala Gln Lys Ile Leu Ser Leu His Tyr Thr Lys Glu Gln Arg Glu
50 55 60
Lys Ile Ile Thr Glu Ile Arg Lys Ala Ala Leu Gln Asn Lys Glu Val
65 70 75 80
Leu Ala Thr Met Ile Leu Glu Glu Thr His Met Gly Arg Tyr Glu Asp
85 90 95
Lys Ile Leu Lys His Glu Leu Val Ala Lys Tyr Thr Pro Gly Thr Glu
100 105 110
Asp Leu Thr Thr Thr Ala Trp Ser Gly Asp Asn Gly Leu Thr Val Val
115 120 125

Glu Met Ser Pro Tyr Gly Val Ile Gly Ala Ile Thr Pro Ser Thr Asn
130 135 140
Pro Thr Glu Thr Val Ile Cys Asn Ser Ile Gly Met Ile Ala Ala Gly
145 150 155 160
Asn Ala Val Val Phe Asn Gly His Pro Cys Ala Lys Lys Cys Val Ala
165 170 175
Phe Ala Val Glu Met Ile Asn Lys Ala Ile Ile Ser Cys Gly Gly Pro
180 185 190
Glu Asn Leu Val Thr Thr Ile Lys Asn Pro Thr Met Glu Ser Leu Asp
195 200 205
Ala Ile Ile Lys His Pro Ser Ile Lys Leu Leu Cys Gly Thr Gly Gly
210 215 220
Pro Gly Met Val Lys Thr Leu Leu Asn Ser Gly Lys Lys Ala Ile Gly
225 230 235 240
Ala Gly Ala Gly Asn Pro Pro Val Ile Val Asp Asp Thr Ala Asp Ile
245 250 255
Glu Lys Ala Gly Arg Ser Ile Ile Glu Gly Cys Ser Phe Asp Asn Asn
260 265 270
Leu Pro Cys Ile Ala Glu Lys Glu Val Phe Val Phe Glu Asn Val Ala
275 280 285
Asp Asp Leu Ile Ser Asn Met Leu Lys Asn Asn Ala Val Ile Ile Asn
290 295 300
Glu Asp Gln Val Ser Lys Leu Ile Asp Leu Val Leu Gln Lys Asn Asn
305 310 315 320
Glu Thr Gln Glu Tyr Phe Ile Asn Lys Lys Trp Val Gly Lys Asp Ala
325 330 335
Lys Leu Phe Leu Asp Glu Ile Asp Val Glu Ser Pro Ser Asn Val Lys
340 345 350
Cys Ile Ile Cys Glu Val Asn Ala Asn His Pro Phe Val Met Thr Glu
355 360 365
Leu Met Met Pro Ile Leu Pro Ile Val Arg Val Lys Asp Ile Asp Glu
370 375 380
Ala Ile Lys Tyr Ala Lys Ile Ala Glu Gln Asn Arg Lys His Ser Ala
385 390 395 400
Tyr Ile Tyr Ser Lys Asn Ile Asp Asn Leu Asn Arg Phe Glu Arg Glu
405 410 415
Ile Asp Thr Thr Ile Phe Val Lys Asn Ala Lys Ser Phe Ala Gly Val
420 425 430
Gly Tyr Glu Ala Glu Gly Phe Thr Thr Phe Thr Ile Ala Gly Ser Thr

435 440 445

Gly Glu Gly Ile Thr Ser Ala Arg Asn Phe Thr Arg Gln Arg Arg Cys

450 455 460

Val Leu Ala Gly

465

<210> 70

<211> 1407

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸

<400> 70

atgaataaag acacactaat acctacaact aaagatttaa aagtaaaaac aaatggtgaa 60

aacattaatt taaagaacta caaggataat tcttcatgtt tcggcgtatt cgaaaatgtt 120

gaaaatgcta taagcagcgc tgtacacgca caaaagatat tatcccttca ttatacaaaa 180

gagcaacgtg aaaaaatcat aactgagata agaaaggccg cattacaaaa taaagaggtc 240

ttggctacaa tgattctgga agaaacacat atgggacgtt atgaggataa aatattaaaa 300

catgaattgg tagctaaata tactcctggt acagaagatt taactactac tgcctggtca 360

ggtgataatg gtctgacagt tgtagaaatg tctccatatg gtgttattgg tgcaataact 420

ccttctacga atccaactga aactgtaata tgtaatagca taggcatgat tgctgctgga 480

aatgctgtag tatttaacgg acacccatgc gctaaaaaat gtgttgcctt tgctgttgaa 540

atgataaata aggcaattat ttcatgtggc ggtcctgaaa atctggtaac aactataaaa 600

aatccaacca tggagtctct ggatgcaatt attaagcatc cttcaataaa acttctttgc 660

ggaactgggg gtccaggaat ggtaaaaacc ctgttaaatt ctggtaagaa agctataggt 720

gctggtgctg gaaatccacc agttattgtc gatgatactg ctgatataga aaaggctggt 780

cgtagcatca ttgaaggctg ttcttttgat aataatttac cttgtattgc agaaaaagaa 840

gtatttgttt ttgagaatgt tgcagatgat ttaatatcta acatgctaaa aaataatgct 900

gtaattataa atgaagatca agtatcaaaa ttaatcgatt tagtattaca aaaaaataat 960

gaaactcaag aatactttat aaacaaaaaa tgggtaggaa aagatgcaaa attattcctc 1020

gatgaaatag atgttgagtc tccttcaaat gttaaatgca taatctgcga agtaaatgca 1080

aatcatccat ttgttatgac agaactgatg atgccaatat tgccaattgt acgcgttaaa 1140

gatatcgatg aagctattaa atatgcaaag atagcagaac aaaatagaaa acatagtgcc 1200

tatatttatt ctaaaaatat cgacaacctg aatcgctttg aacgtgaaat agatactact 1260

atttttgtaa agaatgctaa atcttttgct ggtgttggtt atgaagcaga aggatttaca 1320

actttcacta ttgctggatc tactggtgag ggaataacct ctgcacgtaa ttttacacgc 1380

caacgtcgct gtgtacttgc cggctaa 1407

<210> 71

<211> 1407

<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 71
atgaataaag acacactgat ccctacaact aaagatttaa aagtaaaaac aaatggtgaa 60
aacattaatt taaagaacta caaagataat agcagttgtt tcggcgtatt cgaaaatgtt 120
gaaaatgcta tcagcagcgc tgtacacgca caaaagatat tatcgctgca ttatacaaaa 180
gagcaacgtg aaaaaatcat cactgagata cgtaaggccg cattacaaaa taaagaggtg 240
ctggctacaa tgattctgga agaaacacat atgggacgtt atgaggataa aatattaaaa 300
catgaactgg tagctaaata tactcctggt acagaagatt taactactac tgcctggagc 360
ggtgataatg gtctgacagt tgtagaaatg tctccatatg gtgttattgg tgcaataact 420
ccttctacca atccaactga aactgtaatt tgtaatagca ttggcatgat tgctgctgga 480
aatgctgtag tatttaacgg acacccatgc gctaaaaaat gtgttgcctt tgctgttgaa 540
atgatcaata aggcaattat tagctgtggc ggtccggaaa atctggtaac aactataaaa 600
aatccaacca tggagtctct ggatgccatt attaagcatc cttcaataaa actgctttgc 660
ggaactggcg gtccaggaat ggtaaaaacc ctgttaaatt ctggtaagaa agctattggt 720
gctggtgctg gaaatccacc agttattgtc gatgatactg ctgatattga aaaggctggt 780
cgtagcatca ttgaaggctg ttcttttgat aataatttac cttgtattgc agaaaaagaa 840
gtatttgttt ttgagaatgt tgcagatgat ttaatatcta acatgctgaa aaataatgct 900
gtaattatca atgaagatca ggtatcaaaa ttaatcgatt tagtattaca aaaaaataat 960
gaaactcaag aatactttat caacaaaaaa tgggtaggta aagatgcaaa attattcctc 1020
gatgaaatcg atgttgagtc tccttcaaat gttaaatgca ttatctgcga agtgaatgcc 1080
aatcatccat ttgttatgac agaactgatg atgccaatat tgccaattgt gcgcgttaaa 1140
gatatcgatg aagctattaa atatgcaaag attgcagaac aaaatagaaa acatagtgcc 1200
tatatttata gcaaaaatat cgacaacctg aatcgctttg aacgtgaaat cgatactact 1260
atttttgtaa agaatgctaa atcttttgct ggtgttggtt atgaagcaga aggatttacc 1320
actttcacta ttgctggatc tactggtgag ggcataacct ctgcacgtaa ttttacccgc 1380
caacgtcgct gtgtactggc cggctaa 1407
<210> 72
<211> 1407
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 72
atgaataaag acacgctgat cccgacaact aaagatctga aagtaaaaac caatggtgaa 60
aacattaatc tgaagaacta caaagataat agcagttgtt tcggcgtatt cgaaaatgtt 120
gaaaatgcta tcagcagcgc ggtacacgca caaaagatac tctcgctgca ttataccaaa 180
gagcaacgtg aaaaaatcat cactgagatc cgtaaggccg cattacaaaa taaagaggtg 240

ctggcaacaa tgattctgga agaaacacat atgggacgtt atgaggataa aatactgaaa 300
catgaactgg tggcgaaata tacgcctggt actgaagatt taaccaccac tgcctggagc 360
ggtgataatg gtctgaccgt tgtggaaatg tcgccttatg gtgttattgg tgcaattacg 420
ccttcaacca atccaactga aacggtaatt tgtaatagca ttggcatgat tgctgctgga 480
aatgcggtag tatttaacgg tcacccctgc gctaaaaaat gtgttgcctt tgctgttgaa 540
atgatcaata aagcgattat tagctgtggc ggtccggaaa atctggtaac cactataaaa 600
aatccaacca tggagtcgct ggatgccatt attaagcatc cttcaatcaa actgctgtgc 660
ggcactggcg gtccaggaat ggtgaaaacc ctgctgaata gcggtaagaa agcgattggt 720
gctggtgctg gaaatccacc agttattgtc gatgatactg ctgatattga aaaagcgggt 780
cgtagcatca ttgaaggctg ttcttttgat aataatttac cttgtattgc agaaaaagaa 840
gtatttgttt ttgagaatgt tgccgatgat ctgatctcta acatgctgaa aaataatgcg 900
gtgattatca atgaagatca ggttagcaaa ctgatcgatc tggtattaca aaaaaataat 960
gaaactcaag aatactttat caacaaaaaa tgggtaggta aagatgcaaa actgttcctc 1020
gatgaaatcg atgttgagtc gccttcaaat gttaaatgca ttatctgcga agtgaatgcc 1080
aatcatccat ttgtgatgac cgaactgatg atgccaattt tgccgattgt gcgcgttaaa 1140
gatatcgatg aagcgattaa atatgcaaag attgcagaac aaaatcgtaa acatagtgcc 1200
tatatttata gcaaaaatat cgacaacctg aatcgctttg aacgtgaaat cgataccact 1260
atttttgtga agaatgctaa atcttttgct ggtgttggtt atgaagcaga aggttttacc 1320
actttcacta ttgctggaag caccggtgaa ggcattacct ctgcacgtaa ttttacccgc 1380
caacgtcgct gtgtactggc cggctaa 1407

<210> 73
<211> 1407
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 73

atgaataaag atacgctgat cccgaccacc aaagatctga aagtgaaaac caacggcgaa 60
aatatcaacc tgaaaaacta taaagataac agcagttgct ttggcgtgtt tgaaaacgtt 120
gaaaacgcca tctccagcgc ggtgcatgcg caaaaaattc tctcgctgca ttacaccaaa 180
gagcagcgtg aaaaaattat caccgaaatc cgtaaagcgg cgctgcaaaa caaagaagtg 240
ctggcaacca tgatcctgga agaaacgcat atggggcgtt atgaagataa aattctgaaa 300
catgaactgg tggcgaaata cacgccgggc actgaagatc tgaccaccac cgcctggagc 360
ggcgataacg gcctgaccgt ggtggagatg tcgccttatg gcgtgattgg cgcgattacg 420
ccgtcaacca acccgaccga aacggtgatt tgtaacagca ttggcatgat tgccgcgggt 480
aatgcggtgg tgtttaacgg tcatccctgc gcgaaaaaat gtgtggcgtt tgccgttgag 540
atgatcaaca aagcgattat cagctgcggc ggcccggaaa atctggtgac caccatcaaa 600
aatccgacca tggaatcgct ggatgccatt atcaaacatc cttccatcaa actgctgtgc 660
ggcaccggcg gcccgggcat ggtgaaaacg ctgctgaaca gcggtaaaaa agcgattggc 720

gcgggcgcgg gtaacccgcc ggtgattgtc gatgacaccg ccgatattga aaaagcgggg 780
cgtagcatta ttgaaggctg ttcttttgat aacaacctgc cctgcattgc cgaaaaagaa 840
gtgtttgtct ttgaaaacgt cgccgatgat ctgatcagca atatgctgaa aaacaacgcg 900
gtgattatca atgaagatca ggttagcaaa ctgatcgatc tggtgctgca aaaaaacaac 960
gaaacgcagg aatattttat caacaaaaaa tgggttggta aagatgccaa actgtttctc 1020
gatgaaatcg atgttgaatc gccgtctaac gtgaaatgta ttatctgcga agtgaacgcc 1080
aaccatccgt ttgtgatgac cgaactgatg atgccgattc tgccgattgt gcgcgtgaaa 1140
gatatcgatg aagcgattaa atatgccaaa attgccgaac aaaaccgtaa acacagcgcc 1200
tatatttaca gcaaaaatat cgataacctg aaccgctttg aacgtgaaat cgataccacc 1260
atttttgtga aaaatgccaa aagttttgcc ggcgttggtt atgaagcgga aggttttacc 1320
acctttacca ttgccggtag caccggcgaa ggcattacca gcgcccgtaa ttttacccgc 1380
cagcgtcgct gcgtgctggc gggctaa 1407

<210> 74
<211> 1023
<212> DNA
<213> 热葡糖苷酶地芽孢杆菌
<400> 74
atgaaagctg cagtagtaga gcaatttaag gaaccattaa aaattaaaga agtggaaaag 60
ccatctattt catatggcga agtattagtc cgcattaaag catgcggtgt atgccatacg 120
gacttgcacg ccgctcatgg cgattggcca gtaaaaccaa aacttccttt aatccctggc 180
catgaaggag tcggaattgt tgaagaagtc ggtccggggg taacccattt aaaagtggga 240
gaccgcgttg gaattccttg gttatattct gcgtgcggcc attgcgaata ttgtttaagc 300
ggacaagaag cattatgtga acatcaacaa aacgccggct actcagtcga cgggggttat 360
gcagaatatt gcagagctgc gccagattat gtggtgaaaa ttcctgacaa cttatcgttt 420
gaagaagctg ctcctatttt ctgcgccgga gttactactt ataaagcgtt aaaagtcaca 480
ggtacaaaac cgggagaatg ggtagcgatc tatggcatcg gcggccttgg acatgttgcc 540
gtccagtatg cgaaagcgat ggggcttcat gttgttgcag tggatatcgg cgatgagaaa 600
ctggaacttg caaaagagct tggcgccgat cttgttgtaa atcctgcaaa agaaaatgcg 660
gcccaattta tgaaagagaa agtcggcgga gtacacgcgg ctgttgtgac agctgtatct 720
aaacctgctt ttcaatctgc gtacaattct atccgcagag gcggcacgtg cgtgcttgtc 780
ggattaccgc cggaagaaat gcctattcca atctttgata cggtattaaa cggaattaaa 840
attatcggtt ccattgtcgg cacgcggaaa gacttgcaag aagcgcttca gttcgctgca 900
gaaggtaaag taaaaaccat tattgaagtg caacctcttg aaaaaattaa cgaagtattt 960
gacagaatgc taaaaggaga aattaacgga cgggttgttt taacgttaga aaataataat 1020
taa 1023

<210> 75
<211> 340
<212> PRT
<213> 热葡糖苷酶地芽孢杆菌

<400> 75

Met Lys Ala Ala Val Val Glu Gln Phe Lys Glu Pro Leu Lys Ile Lys
1 5 10 15
Glu Val Glu Lys Pro Ser Ile Ser Tyr Gly Glu Val Leu Val Arg Ile
20 25 30
Lys Ala Cys Gly Val Cys His Thr Asp Leu His Ala Ala His Gly Asp
35 40 45
Trp Pro Val Lys Pro Lys Leu Pro Leu Ile Pro Gly His Glu Gly Val
50 55 60
Gly Ile Val Glu Glu Val Gly Pro Gly Val Thr His Leu Lys Val Gly
65 70 75 80
Asp Arg Val Gly Ile Pro Trp Leu Tyr Ser Ala Cys Gly His Cys Glu
85 90 95
Tyr Cys Leu Ser Gly Gln Glu Ala Leu Cys Glu His Gln Gln Asn Ala
100 105 110
Gly Tyr Ser Val Asp Gly Gly Tyr Ala Glu Tyr Cys Arg Ala Ala Pro
115 120 125
Asp Tyr Val Val Lys Ile Pro Asp Asn Leu Ser Phe Glu Glu Ala Ala
130 135 140
Pro Ile Phe Cys Ala Gly Val Thr Thr Tyr Lys Ala Leu Lys Val Thr
145 150 155 160
Gly Thr Lys Pro Gly Glu Trp Val Ala Ile Tyr Gly Ile Gly Gly Leu
165 170 175
Gly His Val Ala Val Gln Tyr Ala Lys Ala Met Gly Leu His Val Val
180 185 190
Ala Val Asp Ile Gly Asp Glu Lys Leu Glu Leu Ala Lys Glu Leu Gly
195 200 205
Ala Asp Leu Val Val Asn Pro Ala Lys Glu Asn Ala Ala Gln Phe Met
210 215 220
Lys Glu Lys Val Gly Gly Val His Ala Ala Val Val Thr Ala Val Ser
225 230 235 240
Lys Pro Ala Phe Gln Ser Ala Tyr Asn Ser Ile Arg Arg Gly Gly Thr
245 250 255
Cys Val Leu Val Gly Leu Pro Pro Glu Glu Met Pro Ile Pro Ile Phe
260 265 270
Asp Thr Val Leu Asn Gly Ile Lys Ile Ile Gly Ser Ile Val Gly Thr
275 280 285
Arg Lys Asp Leu Gln Glu Ala Leu Gln Phe Ala Ala Glu Gly Lys Val
290 295 300

Lys Thr Ile Ile Glu Val Gln Pro Leu Glu Lys Ile Asn Glu Val Phe
305 310 315 320
Asp Arg Met Leu Lys Gly Glu Ile Asn Gly Arg Val Val Leu Thr Leu
325 330 335
Glu Asn Asn Asn
340

<210> 76
<211> 4090
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸
<400> 76

atggctatcg aaatcaaagt accggacatc ggggctgatg aagttgaaat caccgagatc 60
ctggtcaaag tgggcgacaa agttgaagcc gaacagtcgc tgatcaccgt agaaggcgac 120
aaagcctcta tggaagttcc gtctccgcag gcgggtatcg ttaaagagat caaagtctct 180
gttggcgata aaacccagac cggcgcactg attatgattt tcgattccgc cgacggtgca 240
gcagacgctg cacctgctca ggcagaagag aagaaagaag cagctccggc agcagcacca 300
gcggctgcgg cggcaaaaga cgttaacgtt ccggatatcg gcagcgacga agttgaagtg 360
accgaaatcc tggtgaaagt tggcgataaa gttgaagctg aacagtcgct gatcaccgta 420
gaaggcgaca aggcttctat ggaagttccg gctccgtttg ctggcaccgt gaaagagatc 480
aaagtgaacg tgggtgacaa agtgtctacc ggctcgctga ttatggtctt cgaagtcgcg 540
ggtgaagcag gcgcggcagc tccggccgct aaacaggaag cagctccggc agcggcccct 600
gcaccagcgg ctggcgtgaa agaagttaac gttccggata tcggcggtga cgaagttgaa 660
gtgactgaag tgatggtgaa agtgggcgac aaagttgccg ctgaacagtc actgatcacc 720
gtagaaggcg acaaagcttc tatggaagtt ccggcgccgt ttgcaggcgt cgtgaaggaa 780
ctgaaagtca acgttggcga taaagtgaaa actggctcgc tgattatgat cttcgaagtt 840
gaaggcgcag cgcctgcggc agctcctgcg aaacaggaag cggcagcgcc ggcaccggca 900
gcaaaagctg aagccccggc agcagcacca gctgcgaaag cggaaggcaa atctgaattt 960
gctgaaaacg acgcttatgt tcacgcgact ccgctgatcc gccgtctggc acgcgagttt 1020
ggtgttaacc ttgcgaaagt gaagggcact ggccgtaaag gtcgtatcct gcgcgaagac 1080
gttcaggctt acgtgaaaga agctatcaaa cgtgcagaag cagctccggc agcgactggc 1140
ggtggtatcc ctggcatgct gccgtggccg aaggtggact tcagcaagtt tggtgaaatc 1200
gaagaagtgg aactgggccg catccagaaa atctctggtg cgaacctgag ccgtaactgg 1260
gtaatgatcc cgcatgttac tcacttcgac aaaaccgata tcaccgagtt ggaagcgttc 1320
cgtaaacagc agaacgaaga agcggcgaaa cgtaagctgg atgtgaagat caccccggtt 1380
gtcttcatca tgaaagccgt tgctgcagct cttgagcaga tgcctcgctt caatagttcg 1440
ctgtcggaag acggtcagcg tctgaccctg aagaaataca tcaacatcgg tgtggcggtg 1500
gataccccga acggtctggt tgttccggta ttcaaagacg tcaacaagaa aggcatcatc 1560

gagctgtctc gcgagctgat gactatttct aagaaagcgc gtgacggtaa gctgactgcg 1620
ggcgaaatgc agggcggttg cttcaccatc tccagcatcg gcggcctggg tactacccac 1680
ttcgcgccga ttgtgaacgc gccggaagtg gctatcctcg gcgtttccaa gtccgcgatg 1740
gagccggtgt ggaatggtaa agagttcgtg ccgcgtctga tgctgccgat ttctctctcc 1800
ttcgaccacc gcgtgatcga cggtgctgat ggtgcccgtt tcattaccat cattaacaac 1860
acgctgtctg acattcgccg tctggtgatg taagtaaaag agccggccca acggccggct 1920
tttttctggt aatctcatga atgtattgag gttattagcg aatagacaaa tcggttgccg 1980
tttgttgttt aaaaattgtt aacaattttg taaaataccg acggatagaa cgacccggtg 2040
gtggttaggg tattacttca cataccctat ggatttctgg gtgcagcaag gtagcaagcg 2100
ccagaatccc caggagctta cataagtaag tgactggggt gagggcgtga agctaacgcc 2160
gctgcggcct gaaagacgac gggtatgacc gccggagata aatatataga ggtcatgatg 2220
agtactgaaa tcaaaactca ggtcgtggta cttggggcag gccccgcagg ttactccgct 2280
gccttccgtt gcgctgattt aggtctggaa accgtaatcg tagaacgtta caacaccctt 2340
ggcggtgttt gtctgaacgt gggttgtatc ccttctaaag cgctgctgca cgtggcaaaa 2400
gttatcgaag aagcgaaagc gctggccgaa cacggcatcg ttttcggcga accgaaaact 2460
gacattgaca agatccgcac ctggaaagaa aaagtcatca ctcagctgac cggtggtctg 2520
gctggcatgg ccaaaggtcg taaagtgaag gtggttaacg gtctgggtaa atttaccggc 2580
gctaacaccc tggaagtgga aggcgaaaac ggcaaaaccg tgatcaactt cgacaacgcc 2640
atcatcgcgg cgggttcccg tccgattcag ctgccgttta tcccgcatga agatccgcgc 2700
gtatgggact ccaccgacgc gctggaactg aaatctgtac cgaaacgcat gctggtgatg 2760
ggcggcggta tcatcggtct ggaaatgggt accgtatacc atgcgctggg ttcagagatt 2820
gacgtggtgg aaatgttcga ccaggttatc ccggctgccg acaaagacgt ggtgaaagtc 2880
ttcaccaaac gcatcagcaa gaaatttaac ctgatgctgg aagccaaagt gactgccgtt 2940
gaagcgaaag aagacggtat ttacgtttcc atggaaggta aaaaagcacc ggcggaagcg 3000
cagcgttacg acgcagtgct ggtcgctatc ggccgcgtac cgaatggtaa aaacctcgat 3060
gcaggtaaag ctggcgtgga agttgacgat cgcggcttca tccgcgttga caaacaaatg 3120
cgcaccaacg tgccgcacat ctttgctatc ggcgatatcg tcggtcagcc gatgctggcg 3180
cacaaaggtg tccatgaagg ccacgttgcc gcagaagtta tctccggtct gaaacactac 3240
ttcgatccga aagtgatccc atccatcgcc tacactaaac cagaagtggc atgggtcggt 3300
ctgaccgaga aagaagcgaa agagaaaggc atcagctacg aaaccgccac cttcccgtgg 3360
gctgcttccg gccgtgctat cgcttctgac tgcgcagatg gtatgaccaa actgatcttc 3420
gacaaagaga cccaccgtgt tatcggcggc gcgattgtcg gcaccaacgg cggcgagctg 3480
ctgggtgaga tcggcctggc tatcgagatg ggctgtgacg ctgaagacat cgccctgacc 3540
atccacgctc acccgactct gcacgagtcc gttggcctgg cggcggaagt gttcgaaggc 3600
agcatcaccg acctgccaaa cgccaaagcg aagaaaaagt aacttttct ttcaggaaaa 3660
aagcataagc ggctccggga gccgcttttt ttatgcctga tgtttagaac tatgtcactg 3720
ttcataaacc gctacacctc atacatactt taagggcgaa ttctgcagat atccatcaca 3780
ctggcggccg ctcgagcatg catctagcac atccggcaat taaaaaagcg gctaaccacg 3840
ccgctttttt tacgtctgca atttaccttt ccagtcttct tgctccacgt tcagagagac 3900

gttcgcatac tgctgaccgt tgctcgttat tcagcctgac agtatggtta ctgtcgttta 3960
gacgttgtgg gcggctctcc tgaactttct cccgaaaaac ctgacgttgt tcaggtgatg 4020
ccgattgaac acgctggcgg gcgttatcac gttgctgttg attcagtggg cgctgctgta 4080
ctttttcctt 4090

<210> 77
<211> 475
<212> PRT
<213> 大肠杆菌
<400> 77

Met Met Ser Thr Glu Ile Lys Thr Gln Val Val Val Leu Gly Ala Gly
1 5 10 15
Pro Ala Gly Tyr Ser Ala Ala Phe Arg Cys Ala Asp Leu Gly Leu Glu
20 25 30
Thr Val Ile Val Glu Arg Tyr Asn Thr Leu Gly Gly Val Cys Leu Asn
35 40 45
Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu Leu His Val Ala Lys Val Ile
50 55 60
Glu Glu Ala Lys Ala Leu Ala Glu His Gly Ile Val Phe Gly Glu Pro
65 70 75 80
Lys Thr Asp Ile Asp Lys Ile Arg Thr Trp Lys Glu Lys Val Ile Asn
85 90 95
Gln Leu Thr Gly Gly Leu Ala Gly Met Ala Lys Gly Arg Lys Val Lys
100 105 110
Val Val Asn Gly Leu Gly Lys Phe Thr Gly Ala Asn Thr Leu Glu Val
115 120 125
Glu Gly Glu Asn Gly Lys Thr Val Ile Asn Phe Asp Asn Ala Ile Ile
130 135 140
Ala Ala Gly Ser Arg Pro Ile Gln Leu Pro Phe Ile Pro His Glu Asp
145 150 155 160
Pro Arg Ile Trp Asp Ser Thr Asp Ala Leu Glu Leu Lys Glu Val Pro
165 170 175
Glu Arg Leu Leu Val Met Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu Glu Met Gly
180 185 190
Thr Val Tyr His Ala Leu Gly Ser Gln Ile Asp Val Val Glu Met Phe
195 200 205
Asp Gln Val Ile Pro Ala Ala Asp Lys Asp Ile Val Lys Val Phe Thr
210 215 220
Lys Arg Ile Ser Lys Lys Phe Asn Leu Met Leu Glu Thr Lys Val Thr
225 230 235 240

Ala Val Glu Ala Lys Glu Asp Gly Ile Tyr Val Thr Met Glu Gly Lys
245 250 255
Lys Ala Pro Ala Glu Pro Gln Arg Tyr Asp Ala Val Leu Val Ala Ile
260 265 270
Gly Arg Val Pro Asn Gly Lys Asn Leu Asp Ala Gly Lys Ala Gly Val
275 280 285
Glu Val Asp Asp Arg Gly Phe Ile Arg Val Asp Lys Gln Leu Arg Thr
290 295 300
Asn Val Pro His Ile Phe Ala Ile Gly Asp Ile Val Gly Gln Pro Met
305 310 315 320
Leu Ala His Lys Gly Val His Glu Gly His Val Ala Ala Glu Val Ile
325 330 335
Ala Gly Lys Lys His Tyr Phe Asp Pro Lys Val Ile Pro Ser Ile Ala
340 345 350
Tyr Thr Glu Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Leu Thr Glu Lys Glu Ala
355 360 365
Lys Glu Lys Gly Ile Ser Tyr Glu Thr Ala Thr Phe Pro Trp Ala Ala
370 375 380
Ser Gly Arg Ala Ile Ala Ser Asp Cys Ala Asp Gly Met Thr Lys Leu
385 390 395 400
Ile Phe Asp Lys Glu Ser His Arg Val Ile Gly Gly Ala Ile Val Gly
405 410 415
Thr Asn Gly Gly Glu Leu Leu Gly Glu Ile Gly Leu Ala Ile Glu Met
420 425 430
Gly Cys Asp Ala Glu Asp Ile Ala Leu Thr Ile His Ala His Pro Thr
435 440 445
Leu His Glu Ser Val Gly Leu Ala Ala Glu Val Phe Glu Gly Ser Ile
450 455 460
Thr Asp Leu Pro Asn Pro Lys Ala Lys Lys Lys
465 470 475

<210> 78
<211> 475
<212> PRT
<213> 肺炎克雷伯菌
<400> 78

Met Met Ser Thr Glu Ile Lys Thr Gln Val Val Val Leu Gly Ala Gly
1 5 10 15
Pro Ala Gly Tyr Ser Ala Ala Phe Arg Cys Ala Asp Leu Gly Leu Glu
20 25 30

Thr Val Ile Val Glu Arg Tyr Ser Thr Leu Gly Gly Val Cys Leu Asn
35 40 45
Val Gly Cys Ile Pro Ser Lys Ala Leu Leu His Val Ala Lys Val Ile
50 55 60
Glu Glu Ala Lys Ala Leu Ala Glu His Gly Ile Val Phe Gly Glu Pro
65 70 75 80
Lys Thr Asp Ile Asp Lys Ile Arg Thr Trp Lys Glu Lys Val Ile Thr
85 90 95
Gln Leu Thr Gly Gly Leu Ala Gly Met Ala Lys Gly Arg Lys Val Lys
100 105 110
Val Val Asn Gly Leu Gly Lys Phe Thr Gly Ala Asn Thr Leu Glu Val
115 120 125
Glu Gly Glu Asn Gly Lys Thr Val Ile Asn Phe Asp Asn Ala Ile Ile
130 135 140
Ala Ala Gly Ser Arg Pro Ile Gln Leu Pro Phe Ile Pro His Glu Asp
145 150 155 160
Pro Arg Val Trp Asp Ser Thr Asp Ala Leu Glu Leu Lys Ser Val Pro
165 170 175
Lys Arg Met Leu Val Met Gly Gly Gly Ile Ile Gly Leu Glu Met Gly
180 185 190
Thr Val Tyr His Ala Leu Gly Ser Glu Ile Asp Val Val Glu Met Phe
195 200 205
Asp Gln Val Ile Pro Ala Ala Asp Lys Asp Val Val Lys Val Phe Thr
210 215 220
Lys Arg Ile Ser Lys Lys Phe Asn Leu Met Leu Glu Ala Lys Val Thr
225 230 235 240
Ala Val Glu Ala Lys Glu Asp Gly Ile Tyr Val Ser Met Glu Gly Lys
245 250 255
Lys Ala Pro Ala Glu Ala Gln Arg Tyr Asp Ala Val Leu Val Ala Ile
260 265 270
Gly Arg Val Pro Asn Gly Lys Asn Leu Asp Ala Gly Lys Ala Gly Val
275 280 285
Glu Val Asp Asp Arg Gly Phe Ile Arg Val Asp Lys Gln Met Arg Thr
290 295 300
Asn Val Pro His Ile Phe Ala Ile Gly Asp Ile Val Gly Gln Pro Met
305 310 315 320
Leu Ala His Lys Gly Val His Glu Gly His Val Ala Ala Glu Val Ile
325 330 335
Ser Gly Leu Lys His Tyr Phe Asp Pro Lys Val Ile Pro Ser Ile Ala

340 345 350
Tyr Thr Lys Pro Glu Val Ala Trp Val Gly Leu Thr Glu Lys Glu Ala
355 360 365
Lys Glu Lys Gly Ile Ser Tyr Glu Thr Ala Thr Phe Pro Trp Ala Ala
370 375 380
Ser Gly Arg Ala Ile Ala Ser Asp Cys Ala Asp Gly Met Thr Lys Leu
385 390 395 400
Ile Phe Asp Lys Glu Thr His Arg Val Ile Gly Gly Ala Ile Val Gly
405 410 415
Thr Asn Gly Gly Glu Leu Leu Gly Glu Ile Gly Leu Ala Ile Glu Met
420 425 430
Gly Cys Asp Ala Glu Asp Ile Ala Leu Thr Ile His Ala His Pro Thr
435 440 445
Leu His Glu Ser Val Gly Leu Ala Ala Glu Val Phe Glu Gly Ser Ile
450 455 460
Thr Asp Leu Pro Asn Ala Lys Ala Lys Lys Lys
465 470 475

<210> 79
<211> 347
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 79
ataataatac atatgaacca tgcgagttac gggcctataa gccaggcgag atatgatcta 60
tatcaatttc tcatctataa tgctttgtta gtatctcgtc gccgacttaa taaagagaga 120
gttagtgtga aagctgacaa ccctttgat cttttacttc ctgctgcaat ggccaaagtg 180
gccgaagagg cgggtgtcta taaagcaacg aaacatccgc ttaagacttt ctatctggcg 240
attaccgccg gtgttttcat ctcaatcgca ttcaccactg gcacaggcac agaaggtagg 300
tgttacatgt cagaacgttt acacaatgac gtggatccta ttattat 347
<210> 80
<211> 4678
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 80
aagaggtaaa agaataatgg ctatcgaaat caaagtaccg gacatcgggg ctgatgaagt 60
tgaaatcacc gagatcctgg tcaaagtggg cgacaaagtt gaagccgaac agtcgctgat 120

caccgtagaa ggcgacaaag cctctatgga agttccgtct ccgcaggcgg gtatcgttaa 180
agagatcaaa gtctctgttg gcgataaaac ccagaccggc gcactgatta tgattttcga 240
ttccgccgac ggtgcagcag acgctgcacc tgctcaggca gaagagaaga aagaagcagc 300
tccggcagca gcaccagcgg ctgcggcggc aaaagacgtt aacgttccgg atatcggcag 360
cgacgaagtt gaagtgaccg aaatcctggt gaaagttggc gataaagttg aagctgaaca 420
gtcgctgatc accgtagaag gcgacaaggc ttctatggaa gttccggctc cgtttgctgg 480
caccgtgaaa gagatcaaag tgaacgtggg tgacaaagtg tctaccggct cgctgattat 540
ggtcttcgaa gtcgcgggtg aagcaggcgc ggcagctccg gccgctaaac aggaagcagc 600
tccggcagcg gcccctgcac cagcggctgg cgtgaaagaa gttaacgttc cggatatcgg 660
cggtgacgaa gttgaagtga ctgaagtgat ggtgaaagtg ggcgacaaag ttgccgctga 720
acagtcactg atcaccgtag aaggcgacaa agcttctatg gaagttccgg cgccgtttgc 780
aggcgtcgtg aaggaactga aagtcaacgt tggcgataaa gtgaaaactg gctcgctgat 840
tatgatcttc gaagttgaag gcgcagcgcc tgcggcagct cctgcgaaac aggaagcggc 900
agcgccggca ccggcagcaa aagctgaagc cccggcagca gcaccagctg cgaaagcgga 960
aggcaaatct gaatttgctg aaaacgacgc ttatgttcac gcgactccgc tgatccgccg 1020
tctggcacgc gagtttggtg ttaaccttgc gaaagtgaag ggcactggcc gtaaaggtcg 1080
tatcctgcgc gaagacgttc aggcttacgt gaaagaagct atcaaacgtg cagaagcagc 1140
tccggcagcg actggcggtg gtatccctgg catgctgccg tggccgaagg tggacttcag 1200
caagtttggt gaaatcgaag aagtggaact gggccgcatc cagaaaatct ctggtgcgaa 1260
cctgagccgt aactgggtaa tgatcccgca tgttactcac ttcgacaaaa ccgatatcac 1320
cgagttggaa gcgttccgta aacagcagaa cgaagaagcg gcgaaacgta agctggatgt 1380
gaagatcacc ccggttgtct tcatcatgaa agccgttgct gcagctcttg agcagatgcc 1440
tcgcttcaat agttcgctgt cggaagacgg tcagcgtctg accctgaaga aatacatcaa 1500
catcggtgtg gcggtggata ccccgaacgg tctggttgtt ccggtattca aagacgtcaa 1560
caagaaaggc atcatcgagc tgtctcgcga gctgatgact atttctaaga aagcgcgtga 1620
cggtaagctg actgcgggcg aaatgcaggg cggttgcttc accatctcca gcatcggcgg 1680
cctgggtact acccacttcg cgccgattgt gaacgcgccg gaagtggcta tcctcggcgt 1740
ttccaagtcc gcgatggagc cggtgtggaa tggtaaagag ttcgtgccgc gtctgatgct 1800
gccgatttct ctctccttcg accaccgcgt gatcgacggt gctgatggtg cccgtttcat 1860
taccatcatt aacaacacgc tgtctgacat tcgccgtctg gtgatgtaag taaaagagcc 1920
ggcccaacgg ccggcttttt tctggtaatc tcatgaatgt attgaggtta ttagcgaata 1980
gacaaatcgg ttgccgtttg ttaagccagg cgagatatga tctatatcaa tttctcatct 2040
ataatgcttt gttagtatct cgtcgccgac ttaataaaga gagagttagt cttctatatc 2100
acagcaagaa ggtaggtgtt acatgatgag tactgaaatc aaaactcagg tcgtggtact 2160
tggggcaggc cccgcaggtt actctgcagc cttccgttgc gctgatttag gtctggaaac 2220
cgtcatcgta gaacgttaca gcaccctcgg tggtgtttgt ctgaacgtgg gttgtatccc 2280
ttctaaagcg ctgctgcacg tggcaaaagt tatcgaagaa gcgaaagcgc tggccgaaca 2340
cggcatcgtt ttcggcgaac cgaaaactga cattgacaag atccgcacct ggaaagaaaa 2400
agtcatcact cagctgaccg gtggtctggc tggcatggcc aaaggtcgta aagtgaaggt 2460

ggttaacggt ctgggtaaat ttaccggcgc taacaccctg gaagtggaag gcgaaaacgg 2520
caaaaccgtg atcaacttcg acaacgccat catcgcggcg ggttcccgtc cgattcagct 2580
gccgtttatc ccgcatgaag atccgcgcgt atgggactcc accgacgcgc tggaactgaa 2640
atctgtaccg aaacgcatgc tggtgatggg cggcggtatc atcggtctgg aaatgggtac 2700
cgtataccat gcgctgggtt cagagattga cgtggtggaa atgttcgacc aggttatccc 2760
ggctgccgac aaagacgtgg tgaaagtctt caccaaacgc atcagcaaga aatttaacct 2820
gatgctggaa gccaaagtga ctgccgttga agcgaaagaa gacggtattt acgtttccat 2880
ggaaggtaaa aaagcaccgg cggaagcgca gcgttacgac gcagtgctgg tcgctatcgg 2940
ccgcgtaccg aatggtaaaa acctcgatgc aggtaaagct ggcgtggaag ttgacgatcg 3000
cggcttcatc cgcgttgaca aacaaatgcg caccaacgtg ccgcacatct ttgctatcgg 3060
cgatatcgtc ggtcagccga tgctggcgca caaaggtgtc catgaaggcc acgttgccgc 3120
agaagttatc tccggtctga aacactactt cgatccgaaa gtgatcccat ccatcgccta 3180
cactaaacca gaagtggcat gggtcggtct gaccgagaaa gaagcgaaag agaaaggcat 3240
cagctacgaa accgccacct tcccgtgggc tgcttccggc cgtgctatcg cttctgactg 3300
cgcagatggt atgaccaaac tgatcttcga caaagagacc caccgtgtta tcggcggcgc 3360
gattgtcggc accaacggcg gcgagctgct gggtgagatc ggcctggcta tcgagatggg 3420
ctgtgacgct gaagacatcg ccctgaccat ccacgctcac ccgactctgc acgagtccgt 3480
tggcctggcg gcggaagtgt tcgaaggcag catcaccgac ctgccaaacg ccaaagcgaa 3540
gaaaaagtaa ctttttcttt caggaaaaaa gcataagcgg ctccgggagc cgcttttttt 3600
atgcctgatg tttagaacta tgtcactgtt cataaaccgc tacacctcat acatacttta 3660
agggcgaatt ctgcagatat ccatcacact ggcggccgct cgagcatgca tctagcacat 3720
ccggcaatta aaaaagcggc taaccacgcc gctttttta cgtctgcaat ttacctttcc 3780
agtcttcttg ctccacgttc agagagacgt tcgcatactg ctgaccgttg ctcgttattc 3840
agcctgacag tatggttact gtcgtttaga cgttgtgggc ggctctcctg aactttctcc 3900
cgaaaaacct gacgttgttc aggtgatgcc gattgaacac gctggcgggc gttatcacgt 3960
tgctgttgat tcagtgggcg ctgctgtact ttttccttaa acacctggcg ctgctctggt 4020
gatgcggact gaatacgctc acgcgctgcg tctcttcgct gctggttctg cgggttagtc 4080
tgcattttct cgcgaaccgc ctggcgctgc tcaggcgagg cggactgaat gcgctcacgc 4140
gctgcctctc ttcgctgctg gatcttcggg ttagtctgca ttctctcgcg aactgcctgg 4200
cgctgctcag gcgaggcgga ctgataacgc tgacgagcgg cgtccttttg ttgctgggtc 4260
agtggttggc gacggctgaa gtcgtggaag tcgtcatagc tcccatagtg ttcagcttca 4320
ttaaaccgct gtgccgctgc ctgacgttgg gtacctcgtg taatgactgg tgcggcgtgt 4380
gttcgttgct gaaactgatt tgctgccgcc tgacgctggc tgtcgcgcgt tggggcaggt 4440
aattgcgtgg cgctcattcc gccgttgaca tcggtttgat gaaaccgctt tgccatatcc 4500
tgatcatgat agggcacacc attacggtag tttggattgt gccgccatgc catattctta 4560
tcagtaagat gctcaccggt gatacggttg aaattgttga cgtcgatatt gatgttgtcg 4620
ccgttgtgtt gccagccatt accgtcacga tgaccgccat cgtggtgatg ataatcat 4678

<210> 81

<211> 1114

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸
<220>
<221> CDS
<222> (323)..(958)
<400> 81

caaaaaaccg gagtctgtgc tccggttttt tattatccgc taatcaatta catatgaata 60
tcctccttag ttcctattcc gaagttccta ttctctagaa agtataggaa cttcggcgcg 120
cctacctgtg acggaagatc acttcgcaga ataaataaat cctggtgtcc ctgttgatac 180
cgggaagccc tgggccaact tttggcgaaa atgagacgtt gatcggcacg taagaggttc 240
caactttcac cataatgaaa taagatcact accgggcgta ttttttgagt tgtcgagatt 300
ttcaggagct aaggaagcta aa atg gag aaa aaa atc act gga tat acc acc 352
Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr
1 5 10
gtt gat ata tcc caa tgg cat cgt aaa gaa cat ttt gag gca ttt cag 400
Val Asp Ile Ser Gln Trp His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln
15 20 25
tca gtt gct caa tgt acc tat aac cag acc gtt cag ctg gat att acg 448
Ser Val Ala Gln Cys Thr Tyr Asn Gln Thr Val Gln Leu Asp Ile Thr
30 35 40
gcc ttt tta aag acc gta aag aaa aat aag cac aag ttt tat ccg gcc 496
Ala Phe Leu Lys Thr Val Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala
45 50 55
ttt att cac att ctt gcc cgc ctg atg aat gct cat ccg gaa tta cgt 544
Phe Ile His Ile Leu Ala Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Leu Arg
60 65 70
atg gca atg aaa gac ggt gag ctg gtg ata tgg gat agt gtt cac cct 592
Met Ala Met Lys Asp Gly Glu Leu Val Ile Trp Asp Ser Val His Pro
75 80 85 90
tgt tac acc gtt ttc cat gag caa act gaa acg ttt tca tcg ctc tgg 640
Cys Tyr Thr Val Phe His Glu Gln Thr Glu Thr Phe Ser Ser Leu Trp
95 100 105
agt gaa tac cac gac gat ttc cgg cag ttt cta cac ata tat tcg caa 688
Ser Glu Tyr His Asp Asp Phe Arg Gln Phe Leu His Ile Tyr Ser Gln
110 115 120
gat gtg gcg tgt tac ggt gaa aac ctg gcc tat ttc cct aaa ggg ttt 736
Asp Val Ala Cys Tyr Gly Glu Asn Leu Ala Tyr Phe Pro Lys Gly Phe

125 130 135

att gag aat atg ttt ttc gtc tca gcc aat ccc tgg gtg agt ttc acc 784
Ile Glu Asn Met Phe Phe Val Ser Ala Asn Pro Trp Val Ser Phe Thr
140 145 150

agt ttt gat tta aac gtg gcc aat atg gac aac ttc ttc gcc ccc gtt 832
Ser Phe Asp Leu Asn Val Ala Asn Met Asp Asn Phe Phe Ala Pro Val
155 160 165 170

ttc acc atg ggc aaa tat tat acg caa ggc gac aag gtg ctg atg ccg 880
Phe Thr Met Gly Lys Tyr Tyr Thr Gln Gly Asp Lys Val Leu Met Pro
175 180 185

ctg gcg att cag gtt cat cat gcc gtt tgt gat ggc ttc cat gtc ggc 928
Leu Ala Ile Gln Val His His Ala Val Cys Asp Gly Phe His Val Gly
190 195 200

aga tgc tta atg aat aca aca gta ctg cga tgagtggcag ggcggggcgt 978
Arg Cys Leu Met Asn Thr Thr Val Leu Arg
205 210

aaggcgcgcc atttaaatga agttcctatt ccgaagttcc tattctctag aaagtatagg 1038

aacttcgaag cagctccagc ctacaccctt cttcagggct gactgtttgc ataaaaattc 1098

atctgtatgc acaata 1114

<210> 82

<211> 212

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 82

Met Glu Lys Lys Ile Thr Gly Tyr Thr Thr Val Asp Ile Ser Gln Trp
1 5 10 15

His Arg Lys Glu His Phe Glu Ala Phe Gln Ser Val Ala Gln Cys Thr
20 25 30

Tyr Asn Gln Thr Val Gln Leu Asp Ile Thr Ala Phe Leu Lys Thr Val
35 40 45

Lys Lys Asn Lys His Lys Phe Tyr Pro Ala Phe Ile His Ile Leu Ala
50 55 60

Arg Leu Met Asn Ala His Pro Glu Leu Arg Met Ala Met Lys Asp Gly
65 70 75 80

Glu Leu Val Ile Trp Asp Ser Val His Pro Cys Tyr Thr Val Phe His
85 90 95

Glu Gln Thr Glu Thr Phe Ser Ser Leu Trp Ser Glu Tyr His Asp Asp

100 105 110
Phe Arg Gln Phe Leu His Ile Tyr Ser Gln Asp Val Ala Cys Tyr Gly
115 120 125
Glu Asn Leu Ala Tyr Phe Pro Lys Gly Phe Ile Glu Asn Met Phe Phe
130 135 140
Val Ser Ala Asn Pro Trp Val Ser Phe Thr Ser Phe Asp Leu Asn Val
145 150 155 160
Ala Asn Met Asp Asn Phe Phe Ala Pro Val Phe Thr Met Gly Lys Tyr
165 170 175
Tyr Thr Gln Gly Asp Lys Val Leu Met Pro Leu Ala Ile Gln Val His
180 185 190
His Ala Val Cys Asp Gly Phe His Val Gly Arg Cys Leu Met Asn Thr
195 200 205
Thr Val Leu Arg
210

<210> 83
<211> 2521
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 83

ttatttggtg atattggtac caatatcatg cagcaaacgg tgcaacattg ccgtgtctcg 60
ttgctctaaa agccccaggc gttgttgtaa ccagtcgacc agttttatgt catctgccac 120
tgccagagtc gtcagcaatg tcatggctcg ttcgcgtaaa gcttgcagtt gatgttggtc 180
tgccgttgca tcacttttcg ccggttgttg tattaatgtt gctaattgat agcaatagac 240
catcaccgcc tgccccagat tgagcgaagg ataatccgcc accatcggca caccagtaag 300
aacgtcagcc aacgctaact cttcgttagt caacccggaa tcttcgcgac caaacaccag 360
cgcggcatgg ctcatccatg aagatttttc ctctaacagc ggcaccagtt caactggcgt 420
ggcgtagtaa tgatatttcg cccgactgcg cgcagtggtg gcgacagtga aatcgacatc 480
gtgtaacgat tcagccaatg tcgggaaaac tttaatatta tcaataatat caccagatcc 540
atgtgcgacc cagcgggtgg ctggctccag gtgtgcctga ctatcgacaa tccgcagatc 600
gctaaacccc atcgttttca ttgcccgcgc cgctgcccca atattttctg ctctggcggg 660
tgcgaccaga ataatcgtta tacgcatatt gccactcttc ttgatcaaat aaccgcgaac 720
cgggtgatca ctgtcaactt attacgcggt gcgaatttac aaattcttaa cgtaagtcgc 780
agaaaaagcc ctttacttag cttaaaaaag gctaaactat ttcctgactg tactaacggt 840
tgagttgtta aaaaatgcta catatccttc tgtttactta ggataatttt ataaaaaata 900
aatctcgaca attggattca ccacgtttat tagttgtatg atgcaactag ttggattatt 960
aaaataatgt gacgaaagct agcatttaga tacgatgatt tcatcaaact gttaacgtgc 1020

tacaattgaa cttgatatat gtcaacgaag cgtagtttta ttgggtgtcc ggcccctctt 1080
agcctgttat gttgctgtta aaatggttag gatgacagcc gtttttgaca ctgtcgggtc 1140
ctgagggaaa gtacccacga ccaagctaat gatgttgttg acgttgatgg aaagtgcatc 1200
aagaacgcaa ttacgtactt tagtcatgtt acgccgatca tgttaatttg cagcatgcat 1260
caggcaggtc agggactttt gtacttcctg tttcgattta gttggcaatt taggtagcaa 1320
acgaattcat cggctttacc accgtcaaaa aaaacggcgc tttttagcgc cgtttttatt 1380
tttcaacctt atttccagat acgtaactca tcgtccgttg taacttcttt actggctttc 1440
attttcggca gtgaaaacgc ataccagtcg atattacggg tcacaaacat catgccggcc 1500
agcgccacca ccagcacact ggttcccaac aacagcgcgc tatcggcaga gttgagcagt 1560
ccccacatca caccatccag caacaacagc gcgagggtaa acaacatgct gttgcaccaa 1620
cctttcaata ccgcttgcaa ataaataccg ttcattatcg ccccaatcag actggcgatt 1680
atccatgcca cggtaaaacc ggtatgttca gaaagcgcca gcaagagcaa ataaaacatc 1740
accaatgaaa gccccaccag caaatattgc attgggtgta aacgttgcgc ggtgagcgtt 1800
tcaaaaacaa agaacgccat aaaagtcagt gcaatcagca gaatggcgta cttagtcgcc 1860
cggtcagtta attggtattg atcggctggc gtcgttactg cgacgctaaa cgccgggaag 1920
ttttcccagc cggtatcatt gcctgaagca aaacgctcac cgagattatt agcaaaccag 1980
ctgctttgcc agtgcgcctg aaaacctgac tcgctaactt cccgtttggc tggtagaaaa 2040
tcacctaaaa aactgggatg cggccagttg ctggttaagg tcatttcgct attacgcccg 2100
ccaggcacca cagaaagatc gccggtaccg cttaaattca gggccatatt cagcttcagg 2160
ttctgcttcc gccagtcccc ttcaggtaaa gggatatgca cgccctgccc gccttgctct 2220
aacccggtgc cgggttcaat ggtcagcgcc gttccgttaa cttcaggcgc tttcaccaca 2280
ccaataccac gcgcatcccc gacgctaatc acaataaatg gcttgcctaa ggtgatattt 2340
ggcgcgttga gttcgctaag acgcgaaaca tcgaaatcgg cttttaacgt taaatcactg 2400
tgccagacct gaccggtata aatccctatc ttgcgttctt ccacgttctg attgccatca 2460
accatcaatg actcaggtaa ccaaaaatgg ataaaacttc gtttccgctg cagggtttta 2520
t 2521

<210> 84
<211> 3010
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 84

aagccacagc aggatgccca ctgcaacaaa ggtgatcaca ccggaaacgc gatggagaat 60
ggacgctatc gccgtgatgg ggaaccggat ggtctgtagg tccagattaa caggtctttg 120
ttttttcaca tttcttatca tgaataacgc ccacatgctg ttcttattat tccctgggga 180
ctacgggcac agaggttaac tttctgttac ctggagacgt cgggatttcc ttcctccggt 240
ctgcttgcgg gtcagacagc gtcctttcta taactgcgcg tcatgcaaaa cactgcttcc 300
agatgcgaaa acgacacgtt acaacgctgg gtggctcggg attgcagggt gttccggaga 360

cctggcggca gtataggctg ttcacaaaat cattacaatt aacctacata tagtttgtcg 420
ggttttatcc tgaacagtga tccaggtcac gataacaaca tttatttaat ttttaatcat 480
ctaatttgac aatcattcaa caaagttgtt acaaacatta ccaggaaaag catataatgc 540
gtaaaagtta tgaagtcggt atttcaccta agattaactt atgtaacagt gtggaagtat 600
tgaccaattc attcgggaca gttattagtg gtagacaagt ttaataattc ggattgctaa 660
gtacttgatt cgccatttat tcgtcatcaa tggatccttt acctgcaagc gcccagagct 720
ctgtacccag gttttcccct ctttcacaga gcggcgagcc aaataaaaaa cgggtaaagc 780
caggttgatg tgcgaaggca aatttaagtt ccggcagtct tacgcaataa ggcgctaagg 840
agaccttaaa tggctgatac aaaagcaaaa ctcaccctca acggggatac agctgttgaa 900
ctggatgtgc tgaaaggcac gctgggtcaa gatgttattg atatccgtac tctcggttca 960
aaaggtgtgt tcacctttga cccaggcttc acttcaaccg catcctgcga atctaaaatt 1020
acttttattg atggtgatga aggtattttg ctgcaccgcg gtttcccgat cgatcagctg 1080
gcgaccgatt ctaactacct ggaagtttgt tacatcctgc tgaatggtga aaaaccgact 1140
caggaacagt atgacgaatt taaaactacg gtgacccgtc ataccatgat ccacgagcag 1200
attacccgtc tgttccatgc tttccgtcgc gactcgcatc caatggcagt catgtgtggt 1260
attaccggcg cgctggcggc gttctatcac gactcgctgg atgttaacaa tcctcgtcac 1320
cgtgaaattg ccgcgttcct cctgctgtcg aaaatgccga ccatggccgc gatgtgttac 1380
aagtattcca ttggtcagcc atttgtttac ccgcgcaacg atctctccta cgccggtaac 1440
ttcctgaata tgatgttctc cacgccgtgc gaaccgtatg aagttaatcc gattctggaa 1500
cgtgctatgg accgtattct gatcctgcac gctgaccatg aacagaacgc ctctacctcc 1560
accgtgcgta ccgctggctc ttcgggtgcg aacccgtttg cctgtatcgc agcaggtatt 1620
gcttcactgt ggggacctgc gcacggcggt gctaacgaag cggcgctgaa aatgctggaa 1680
gaaatcagct ccgttaaaca cattccggaa tttgttcgtc gtgcgaaaga caaaaatgat 1740
tctttccgcc tgatgggctt cggtcaccgc gtgtacaaaa attacgaccc gcgcgccacc 1800
gtaatgcgtg aaacctgcca tgaagtgctg aaagagctgg gcacgaagga tgacctgctg 1860
gaagtggcta tggagctgga aaacatcgcg ctgaacgacc cgtactttat cgagaagaaa 1920
ctgtacccga acgtcgattt ctactctggt atcatcctga aagcgatggg tattccgtct 1980
tccatgttca ccgtcatttt cgcaatggca cgtaccgttg gctggatcgc ccactggagc 2040
gaaatgcaca gtgacggtat gaagattgcc cgtccgcgtc agctgtatac aggatatgaa 2100
aaacgcgact ttaaaagcga tatcaagcgt taatggttga ttgctaagtt gtaaatattt 2160
taacccgccg ttcatatggc gggttgattt ttatatgcct aaacacaaaa aattgtaaaa 2220
ataaaatcca ttaacagacc tatatagata tttaaaaaga atagaacagc tcaaattatc 2280
agcaacccaa tactttcaat taaaaacttc atggtagtcg catttataac cctatgaaaa 2340
tgacgtctat ctatacccca ctatatttta ttcatcatac aacaaattca tgataccaat 2400
aatttagttt tgcatttaat aaaactaaca atatttttaa gcaaaactaa aaactagcaa 2460
taatcaaata cgatattctg gcgtagctat acccctattc tatatcctta aaggactctg 2520
ttatgtttaa aggacaaaaa acattggccg cactggccgt atctctgctg ttcactgcac 2580
ctgtttatgc tgctgatgaa ggttctggcg aaattcactt taaggggggag gttattgaag 2640
caccttgtga aattcatcca gaagatattg ataaaaacat agatcttgga caagtcacga 2700

caacccatat aaaccgggag catcatagca ataaagtggc cgtcgacatt cgcttgatca 2760
actgtgatct gcctgcttct gacaacggta gcggaatgcc ggtatccaaa gttggcgtaa 2820
ccttcgatag cacggctaag acaactggtg ctacgccttt gttgagcaac accagtgcag 2880
gcgaagcaac tggggtcggt gtacgactga tggacaaaaa tgacggtaac atcgtattag 2940
gttcagccgc gccagatctt gacctggatg caagctcatc agaacagacg ctgaactttt 3000
tcgcctggat 3010

<210> 85
<211> 4180
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述: 合成多核苷酸
<400> 85

cgcgatgtcg acgtcacgaa actgaaaaaa ccgctctaca ttctggcgac tgctgatgaa 60
gaaaccagta tggccggagc gcgttatttt gccgaaacta ccgccctgcg cccggattgc 120
gccatcattg gcgaaccgac gtcactacaa ccggtacgcg cacataaagg tcatatctct 180
aacgccatcc gtattcaggg ccagtcgggg cactccagcg atccagcacg cggagttaac 240
gctatcgaac taatgcacga cgccatcggg catattttgc aattgcgcga taacctgaaa 300
gaacgttatc actacgaagc gtttaccgtg ccatacccta cgctcaacct cgggcatatt 360
cacggtggcg acgcttctaa ccgtatttgc gcttgctgtg agttgcatat ggatattcgt 420
ccgctgcctg gcatgacact caatgaactt aatggtttgc tcaacgatgc attggctccg 480
gtgagcgaac gctggccggg tcgtctgacg gtcgacgagc tgcatccgcc gatccctggc 540
tatgaatgcc caccgaatca tcaactggtt gaagtggttg agaaattgct cggagcaaaa 600
accgaagtgg tgaactactg taccgaagcg ccgtttattc aaacgttatg cccgacgctg 660
gtgttggggc ctggctcaat taatcaggct catcaacctg atgaatatct ggaaacacgg 720
tttatcaagc ccacccgcga actgataacc caggtaattc accatttttg ctggcattaa 780
aacgtaggcc ggataaggcg ctcgcgccgc atccggcgct gttgccaaac tccagtgccg 840
caataatgtc ggatgcgatg cttgcgcatc ttatccgacc tacagtgact caaacgatgc 900
ccaaccgtag gccggataag gcgctcgcgc cgcatccggc actgttgcca aactccagtg 960
ccgcaataat gtcggatgcg atacttgcgc atcttatccg accgacagtg actcaaacga 1020
tgcccaactg taggccggat aaggcgctcg cgccgcatcc ggcactgttg ccaaactcca 1080
gtgccgcaat aatgtcggat gcgatacttg cgcatcttat ccgacctaca cctttggtgt 1140
tacttggggc gatttttaa catttccata agttacgctt atttaaagcg tcgtgaattt 1200
aatgacgtaa attcctgcta tttattcgtt tgctgaagcg atttcgcagc atttgacgtc 1260
accgctttta cgtggcttta taaaagacga cgaaaagcaa agcccgagca tattcgcgcc 1320
aatgctagca agaggagaag tcgacatgac agacttaaat aaagtggtaa aagaacttga 1380
agctcttggt atttatgacg taaaagaagt tgtttacaat ccaagctacg agcaattgtt 1440
cgaagaagaa actaaaccag gtttagaagg ctttgaaaaa ggtactttaa ctacgactgg 1500
tgcagtggca gtagatacag gtatcttcac aggtcgttct ccaaaagata aatatatcgt 1560

gttagatgaa aaaaccaaag atactgtttg gtggacatct gaaacagcaa aaaacgacaa 1620
caagccaatg aaccaagcta catggcaaag cttaaaagac ttggtaacca accagctttc 1680
tcgtaaacgc ttatttgtag ttgatggttt ctgtggtgcg agcgaacacg accgtattgc 1740
agtacgtatt gtcactgaag tagcgtggca agcacatttt gtaaaaaata tgtttattcg 1800
cccaactgaa gaacaactca aaaattttga accagatttc gttgtaatga atggttctaa 1860
agtaaccaat ccaaactgga aagaacaagg tttaaattca gaaaactttg ttgctttcaa 1920
cttgactgaa cgcattcaat taatcggtgg tacttggtac ggcggtgaaa tgaaaaaagg 1980
tatgttctca atcatgaact acttcctacc acttaaaggt gttggtgcaa tgcactgctc 2040
agctaacgtt ggtaaagatg gcgatgtagc aatcttcttc ggcttatctg gcacaggtaa 2100
aacaaccctt tcaacggatc caaaacgtga attaatcggt gacgatgaac acggctggga 2160
tgatgtgggt atctttaact ttgaaggtgg ttgctatgcg aaaaccattc acctttcaga 2220
agaaaatgaa ccagatattt accgcgctat ccgtcgcgac gcattattag aaaacgtggt 2280
tgttcgtgca gatggttctg ttgatttcga tgatggttca aaaacagaaa atactcgcgt 2340
gtcttaccca atttatcaca ttgataacat tgtaaaacca gtttctcgtg caggtcacgc 2400
aactaaagtg attttcttaa ctgcagatgc atttggcgta ttaccaccag tatctaaatt 2460
gacaccagaa caaactaaat actacttctt atctggtttc acagcaaaat tagcaggtac 2520
tgaacgtggt attactgaac caactccaac tttctcagca tgtttcggtg ctgcgttctt 2580
aacccttcac ccaactcaat atgcagaagt gttagtaaaa cgtatgcaag cagtgggtgc 2640
tgaagcttac ttagtaaata ctggttggaa tggcacaggc aaacgtatct caatcaaaga 2700
tactcgcgga atcattgatg caatcttaga tggctcaatt gaaaaagctg aaatgggcga 2760
attaccaatc tttaacttag ccattcctaa agcattacca ggtgtagatt ctgcaatctt 2820
agatcctcgc gatacttacg cagataaagc acaatggcaa tcaaaagctg aagacttagc 2880
aggtcgtttt gtgaaaaact ttgttaaata tgcaactaac gaagaaggca aagctttaat 2940
tgcagctggt cctaaagctt aatctagaaa gcttcctaga ggcatcaaat aaaacgaaag 3000
gctcagtcga aagactgggc ctttcgtttt atctgttgtt tgtcggtgaa cgctctcctg 3060
agtaggacga attcacttct gttctaacac cctcgttttc aatatatttc tgtctgcatt 3120
ttattcaaat tctgaatata ccttcagata tccttaagga attgtcgtta cattcggcga 3180
tatttttca agacaggttc ttactatgca ttccacagaa gtccaggcta aacctctttt 3240
tagctggaaa gccctgggtt gggcactgct ctacttttgg tttttctcta ctctgctaca 3300
ggccattatt tacatcagtg gttatagtgg cactaacggc attcgcgact cgctgttatt 3360
cagttcgctg tggttgatcc cggtattcct ctttccgaag cggattaaaa ttattgccgc 3420
agtaatcggc gtggtgctat gggcggcctc tctggcggcg ctgtgctact acgtcatcta 3480
cggtcaggag ttctcgcaga gcgttctgtt tgtgatgttc gaaaccaaca ccaacgaagc 3540
cagcgagtat ttaagccagt atttcagcct gaaaattgtg cttatcgcgc tggcctatac 3600
ggcggtggca gttctgctgt ggacacgcct gcgcccggtc tatattccaa agccgtggcg 3660
ttatgttgtc tcttttgccc tgctttatgg cttgattctg catccgatcg ccatgaatac 3720
gtttatcaaa aacaagccgt ttgagaaaac gttggataac ctggcctcgc gtatggagcc 3780
tgccgcaccg tggcaattcc tgaccggcta ttatcagtat cgtcagcaac taaactcgct 3840
aacaaagtta ctgaatgaaa ataatgcctt gccgccactg gctaatttca aagatgaatc 3900

gggtaacgaa ccgcgcactt tagtgctggt gattggcgag tcgacccagc gcggacgcat 3960
gagtctgtac ggttatccgc gtgaaaccac gccggagctg gatgcgctgc ataaaaccga 4020
tccgaatctg accgtgttta ataacgtagt tacgtctcgt ccgtacacca ttgaaatcct 4080
gcaacaggcg ctgacctttg ccaatgaaaa gaacccggat ctgtatctga cgcagccgtc 4140
gctgatgaac atgatgaaac aggcgggtta taaaaccttc 4180

<210> 86
<211> 4960
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 86

aataggcgta tcacgaggcc ctttcgtctt cacctcgaga attgtgagcg gataacaatt 60
gacattgtga gcggataaca agatactgag cacatcagca ggacgcactg accgaattca 120
attaagctag caagaggaga agtcgagatg aacttacatg aatatcaggc aaaacaactt 180
tttgcccgct atggcttacc agcaccggtg ggttatgcct gtactactcc gcgcgaagca 240
gaagaagccg cttcaaaaat cggtgccggt ccgtgggtag tgaaatgtca ggttcacgct 300
ggtggccgcg gtaaagcggg cggtgtgaaa gttgtaaaca gcaaagaaga catccgtgct 360
tttgcagaaa actggctggg caagcgtctg gtaacgtatc aaacagatgc caatggccaa 420
ccggttaacc agattctggt tgaagcagcg accgatatcg ctaaagagct gtatctcggt 480
gccgttgttg accgtagttc ccgtcgtgtg gtctttatgg cctccaccga aggcggcgtg 540
gaaatcgaaa aagtggcgga agaaactccg cacctgatcc ataaagttgc gcttgatccg 600
ctgactggcc cgatgccgta tcagggacgc gagctggcgt tcaaactggg tctggaaggt 660
aaactggttc agcagttcac caaaatcttc atgggcctgg cgaccatttt cctggagcgc 720
gacctggcgt tgatcgaaat caacccgctg gtcatcacca aacagggcga tctgatttgc 780
ctcgacggca aactgggcgc tgacggcaac gcactgttcc gccagcctga tctgcgcgaa 840
atgcgtgacc agtcgcagga agatccgcgt gaagcacagg ctgcacagtg ggaactgaac 900
tacgttgcgc tggacggtaa catcggttgt atggttaacg gcgcaggtct ggcgatgggt 960
acgatggaca tcgttaaact gcacggcggc gaaccggcta acttccttga cgttggcggc 1020
ggcgcaacca aagaacgtgt aaccgaagcg ttcaaaatca tcctctctga cgacaaagtg 1080
aaagccgttc tggttaacat cttcggcggt atcgttcgtt gcgacctgat cgctgacggt 1140
atcatcggcg cggtagcaga agtgggtgtt aacgtaccgg tcgtggtacg tctggaaggt 1200
aacaacgccg aactcggcgc gaagaaactg gctgacagcg gcctgaatat tattgcagca 1260
aaaggtctga cggatgcagc tcagcaggtt gttgccgcag tggaggggaa ataatgtcca 1320
ttttaatcga taaaaacacc aaggttatct gccagggctt taccggtagc caggggactt 1380
tccactcaga acaggccatt gcatacggca ctaaaatggt tggcggcgta accccaggta 1440
aaggcggcac cacccacctc ggcctgccgg tgttcaacac cgtgcgtgaa gccgttgctg 1500
ccactggcgc taccgcttct gttatctacg taccagcacc gttctgcaaa gactccattc 1560
tggaagccat cgacgcaggc atcaaactga ttatcaccat cactgaaggc atcccgacgc 1620

tggatatgct gaccgtgaaa gtgaagctgg atgaagcagg cgttcgtatg atcggcccga 1680
actgcccagg cgttatcact ccgggtgaat gcaaaatcgg tatccagcct ggtcacattc 1740
acaaaccggg taaagtgggt atcgtttccc gttccggtac actgacctat gaagcggtta 1800
aacagaccac ggattacggt ttcggtcagt cgacctgtgt cggtatcggc ggtgacccga 1860
tcccgggctc taactttatc gacattctcg aaatgttcga aaaagatccg cagaccgaag 1920
cgatcgtgat gatcggtgag atcggcggta gcgctgaaga agaagcagct gcgtacatca 1980
aagagcacgt taccaagcca gttgtgggtt acatcgctgg tgtgactgcg ccgaaaggca 2040
aacgtatggg ccacgcgggt gccatcattg ccggtgggaa agggactgcg gatgagaaat 2100
tcgctgctct ggaagccgca ggcgtgaaaa ccgttcgcag cctggcggat atcggtgaag 2160
cactgaaaac tgttctgaaa taatctagca agaggagaag tcgacatgga aatcaaagaa 2220
atggtgagcc ttgcacgcaa ggctcagaag gagtatcaag ctacccataa ccaagaagca 2280
gttgacaaca tttgccgagc tgcagcaaaa gttatttatg aaaatgcagc tattctggct 2340
cgcgaagcag tagacgaaac cggcatgggc gtttacgaac acaaagtggc caagaatcaa 2400
ggcaaatcca aaggtgtttg gtacaacctc cacaataaaa aatcgattgg tatcctcaat 2460
atagacgagc gtaccggtat gatcgagatt gcaaagccta tcggagttgt aggagccgta 2520
acgccgacga ccaacccgat cgttactccg atgagcaata tcatctttgc tcttaagacc 2580
tgcaatgcca tcattattgc cccccacccc agatccaaaa aatgctctgc acacgcagtt 2640
cgtctgatca aagaagctat cgctccgttc aacgtaccgg aaggtatggt tcagatcatc 2700
gaagaaccca gcatcgagaa gacgcaggaa ctcatgggcg ccgtagacgt agtagttgct 2760
acgggtggta tgggcatggt gaagtctgca tattcttcag gaaagccttc tttcggtgtt 2820
ggagccggta acgttcaggt gatcgtggat agcaacatcg atttcgaagc tgctgcagaa 2880
aaaatcatca ccggtcgtgc tttcgacaac ggtatcatct gctcaggcga acagagcatc 2940
atctacaacg aggctgacaa ggaagcagtt ttcacagcat tccgcaacca cggtgcatat 3000
ttctgtgacg aagccgaagg agatcgggct cgtgcagcta tcttcgaaaa tggagccatc 3060
gcgaaagatg tagtaggtca gagcgttgcc ttcattgcca agaaagcaaa catcaatatc 3120
cccgagggta cccgtattct cgttgttgaa gctcgcggcg taggagcaga agacgttatc 3180
tgtaaggaaa agatgtgtcc cgtaatgtgc gccctcagct acaagcactt cgaagaaggt 3240
gtagaaatcg cacgtacgaa cctcgccaac gaaggtaacg gccacacctg tgctatccac 3300
tccaacaatc aggcacacat catcctcgca ggatcagagc tgacggtatc tcgtatcgta 3360
gtgaatgctc cgagtgccac tacagcaggc ggtcacatcc aaaacggtct tgccgtaacc 3420
aatacgctcg gatgcggatc atggggtaat aactctatct ccgagaactt cacttacaag 3480
cacctcctca acatttcacg catcgcaccg ttgaattcaa gcattcacat ccccgatgac 3540
aaagaaatct gggaactcta atctagcaag aggagaagtc gacatgcaac ttttcaaact 3600
caagagtgta acacatcact ttgacacttt tgcagaattt gccaaggaat tctgtcttgg 3660
agaacgcgac ttggtaatta ccaacgagtt catctatgaa ccgtatatga aggcatgcca 3720
gctcccctgc cattttgtta tgcaggagaa atatgggcaa ggcgagcctt ctgacgaaat 3780
gatgaataac atcttggcag acatccgtaa tatccagttc gaccgcgtaa tcggtatcgg 3840
aggaggtacg gttattgaca tctctaaact tttcgttctg aaaggattaa atgatgtact 3900
cgatgcattc gaccgcaaaa tacctcttat caaagagaaa gaactgatca ttgtgcccac 3960

aacatgcgga acgggtagcg aggtgacgaa catttctatc gcagaaatca aaagccgtca 4020
caccaaaatg ggattggctg acgatgccat tgttgcagac catgccatca tcatacctga 4080
acttctgaag agcttgcctt tccacttcta cgcatgcagt gcaatcgatg ctcttatcca 4140
tgccatcgag tcatacgtat ctcctaaagc cagtccatat tctcgtctgt tcagtgaggc 4200
ggcttgggac attatcctgg aagtattcaa gaaaatcgcc gaacacggcc ctgaataccg 4260
cttcgaaaag ctgggagaaa tgatcatggc cagcaactat gccggtatag ccttcggaaa 4320
tgcaggagta ggagccgtcc acgcactatc ctacccgttg ggaggcaact atcacgtgcc 4380
gcatggagaa gcaaactatc agttcttcac agaggtattc aaagtatacc aaaagaagaa 4440
tcctttcggc tatatagtcg aactcaactg gaagctctcc aagatactga actgccagcc 4500
cgaatacgta tatccgaagc tggatgaact tctcggatgc cttcttacca agaaaccttt 4560
gcacgaatac ggcatgaagg acgaagaggt aagaggcttt gcggaatcag tgcttaagac 4620
acagcaaaga ttgctcgcca acaactacgt agagcttact gtagatgaga tcgaaggtat 4680
ctacagaaga ctctactaat ctagaaagct tcctagaggc atcaaataaa acgaaaggct 4740
cagtcgaaag actgggcctt tcgttttatc tgttgtttgt cggtgaacgc tctcctgagt 4800
aggacaaatc cgccgcccta gacctaggcg ttcggctgcg acacgtcttg agcgattgtg 4860
taggctggag ctgcttcgaa gttcctatac tttctagaga ataggaactt cggaatagga 4920
actaaggagg atattcatat ggaccatggc taattcccat 4960

<210> 87
<211> 5083
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 87

tcgagaaatt tatcaaaaag agtgttgact tgtgagcgga taacaatgat acttagattc 60
aattgtgagc ggataacaat ttcacacaga attcaattaa gctagcaaga ggagaagtcg 120
acatggccaa cataagttca ccattcgggc aaaacgaatg gctggttgaa gagatgtacc 180
gcaagttccg cgacgacccc tcctcggtcg atcccagctg gcacgagttc ctggttgact 240
acagccccga acccacctcc caaccagctg ccgaaccaac ccgggttacc tcgccactcg 300
ttgccgagcg ggccgctgcg gccgccccgc aggcaccccc caagccggcc gacaccgcgg 360
ccgcgggcaa cggcgtggtc gccgcactgg ccgccaaaac tgccgttccc ccgccagccg 420
aaggtgacga ggtagcggtg ctgcgcggcg ccgccgcggc cgtcgtcaag aacatgtccg 480
cgtcgttgga ggtgccgacg gcgaccagcg tccgggcggt cccggccaag ctactgatcg 540
acaaccggat cgtcatcaac aaccagttga agcggacccg cggcggcaag atctcgttca 600
cgcatttgct gggctacgcc ctggtgcagg cggtgaagaa attcccgaac atgaaccggc 660
actacaccga agtcgacggc aagcccaccg cggtcacgcc ggcgcacacc aatctcggcc 720
tggcgatcga cctgcaaggc aaggacggga agcgttccct ggtggtggcc ggcatcaagc 780
ggtgcgagac catgcgattc gcgcagttcg tcacggccta cgaagacatc gtacgccggg 840
cccgcgacgg caagctgacc actgaagact ttgccggcgt gacgatttcg ctgaccaatc 900

ccggaaccat cggcaccgtg cattcggtgc cgcggctgat gcccggccag ggcgccatca 960
tcggcgtggg cgccatggaa taccccgccg agtttcaagg cgccagcgag gaacgcatcg 1020
ccgagctggg catcggcaaa ttgatcactt tgacctccac ctacgaccac cgcatcatcc 1080
agggcgcgga atcgggcgac ttcctgcgca ccatccacga gttgctgctc tcggatggct 1140
tctgggacga ggtcttccgc gaactgagca tcccatatct gccggtgcgc tggagcaccg 1200
acaaccccga ctcgatcgtc gacaagaacg ctcgcgtcat gaacttgatc gcggcctacc 1260
gcaaccgcgg ccatctgatg gccgataccg acccgctgcg gttggacaaa gctcggttcc 1320
gcagtcaccc cgacctcgaa gtgctgaccc acggcctgac gctgtgggat ctcgatcggg 1380
tgttcaaggt cgacggcttt gccggtgcgc agtacaagaa actgcgcgac gtgctgggct 1440
tgctgcgcga tgcctactgc cgccacatcg gcgtggagta cgcccatatc ctcgaccccg 1500
aacaaaagga gtggctcgaa caacgggtcg agaccaagca cgtcaaaccc actgtggccc 1560
aacagaaata catcctcagc aagctcaacg ccgccgaggc ctttgaaacg ttcctacaga 1620
ccaagtacgt cggccagaag cggttctcgc tggaaggcgc cgaaagcgtg atcccgatga 1680
tggacgcggc gatcgaccag tgcgctgagc acggcctcga cgaggtggtc atcgggatgc 1740
cgcaccgggg ccggctcaac gtgctggcca acatcgtcgg caagccgtac tcgcagatct 1800
tcaccgagtt cgagggcaac ctgaatccgt cgcaggcgca cggctccggt gacgtcaagt 1860
accacctggg cgccaccggg ctgtacctgc agatgttcgg cgacaacgac attcaggtgt 1920
cgctgaccgc caacccgtcg catctggagg ccgtcgaccc ggtgctggag ggattggtgc 1980
gggccaagca ggatctgctc gaccacggaa gcatcgacag cgacggccaa cgggcgttct 2040
cggtggtgcc gctgatgttg catggcgatg ccgcgttcgc cggtcagggt gtggtcgccg 2100
agacgctgaa cctggcgaat ctgccgggct accgcgtcgg cggcaccatc cacatcatcg 2160
tcaacaacca gatcggcttc accaccgcgc ccgagtattc caggtccagc gagtactgca 2220
ccgacgtcgc aaagatgatc ggggcaccga tctttcacgt caacggcgac gacccggagg 2280
cgtgtgtctg ggtggcgcgg ttggcggtgg acttccgaca acggttcaag aaggacgtcg 2340
tcatcgacat gctgtgctac cgccgccgcg ggcacaacga gggtgacgac ccgtcgatga 2400
ccaaccccta catgtacgac gtcgtcgaca ccaagcgcgg ggcccgcaaa agctacaccg 2460
aagccctgat cggacgtggc gacatctcga tgaaggaggc cgaggacgcg ctgcgcgact 2520
accagggcca gctggaacgg gtgttcaacg aagtgcgcga gctggagaag cacggtgtgc 2580
agccgagcga gtcggtcgag tccgaccaga tgattcccgc ggggctggcc actgcggtgg 2640
acaagtcgct gctggcccgg atcggcgatg cgttcctcgc cttgccgaac ggcttcaccg 2700
cgcacccgcg agtccaaccg gtgctggaga agcgccggga gatggcctat gaaggcaaga 2760
tcgactgggc ctttggcgag ctgctggcgc tgggctcgct ggtggccgaa ggcaagctgg 2820
tgcgcttgtc ggggcaggac agccgccgcg gcaccttctc ccagcggcat tcggttctca 2880
tcgaccgcca cactggcgag gagttcacac cactgcagct gctggcgacc aactccgacg 2940
gcagcccgac cggcggaaag ttcctggtct acgactcgcc actgtcggag tacgccgccg 3000
tcggcttcga gtacggctac actgtgggca atccggacgc cgtggtgctc tgggaggcgc 3060
agttcggcga cttcgtcaac ggcgcacagt cgatcatcga cgagttcatc agctccggtg 3120
aggccaagtg gggccaattg tccaacgtcg tgctgctgtt accgcacggg cacgaggggc 3180
agggacccga ccacacttct gcccggatcg aacgcttctt gcagttgtgg gcggaaggtt 3240

cgatgaccat cgcgatgccg tcgactccgt cgaactactt ccacctgcta cgccggcatg 3300
ccctggacgg catccaacgc ccgctgatcg tgttcacgcc caagtcgatg ttgcgtcaca 3360
aggccgccgt cagcgaaatc aaggacttca ccgagatcaa gttccgctca gtgctggagg 3420
aacccaccta tgaggacggc atcggagacc gcaacaaggt cagccggatc ctgctgacca 3480
gtggcaagct gtattacgag ctggccgccc gcaaggccaa ggacaaccgc aatgacctcg 3540
cgatcgtgcg gcttgaacag ctcgccccgc tgcccaggcg tcgactgcgt gaaacgctgg 3600
accgctacga gaacgtcaag gagttcttct gggtccaaga ggaaccggcc aaccagggtg 3660
cgtggccgcg attcgggctc gaactacccg agctgctgcc tgacaagttg gccgggatca 3720
agcgaatctc gcgccgggcg atgtcagccc cgtcgtcagg ctcgtcgaag gtgcacgccg 3780
tcgaacagca ggagatcctc gacgaggcgt tcggctaatc tagcaagagg agaagtcgac 3840
atgaagttat taaaattggc acctgatgtt tataaatttg atactgcaga ggagtttatg 3900
aaatacttta aggttggaaa aggtgacttt atacttacta atgaattttt atataaacct 3960
ttccttgaga aattcaatga tggtgcagat gctgtatttc aggagaaata tggactcggt 4020
gaaccttctg atgaaatgat aaacaatata attaaggata ttggagataa acaatataat 4080
agaattattg ctgtaggggg aggatctgta atagatatag ccaaaatcct cagtcttaag 4140
tatactgatg attcattgga tttgtttgag ggaaaagtac ctcttgtaaa aaacaaagaa 4200
ttaattatag ttccaactac atgtggaaca ggttcagaag ttacaaatgt atcagttgca 4260
gaattaaaga gaagacatac taaaaaagga attgcttcag acgaattata tgcaacttat 4320
gcagtacttg taccagaatt tataaaagga cttccatata agtttttgt aaccagctcc 4380
gtagatgcct taatacatgc aacagaagct tatgtatctc caaatgcaaa tccttatact 4440
gatatgttta gtgtaaaagc tatggagtta attttaaatg gatacatgca aatggtagag 4500
aaaggaaatg attacagagt tgaaataatt gaggattttg ttataggcag caattatgca 4560
ggtatagctt ttggaaatgc aggagtggga gcggttcacg cactctcata tccaataggc 4620
ggaaattatc atgtgcctca tggagaagca aattatctgt tttttacaga aatatttaaa 4680
acttattatg agaaaaatcc aaatggcaag attaaagatg taaataaact attagcaggc 4740
atactaaaat gtgatgaaag tgaagcttat gacagtttat cacaactttt agataaatta 4800
ttgtcaagaa aaccattaag agaatatgga atgaaagagg aagaaattga aacttttgct 4860
gattcagtaa tagaaggaca gcagagactg ttggtaaaca attatgaacc tttttcaaga 4920
gaagacatag taaacacata taaaaagtta tattaatcta gaaagcttcc tagaggcatc 4980
aaataaaacg aaaggctcag tcgaaagact gggcctttcg ttttatctgt tgtttgtcgg 5040
tgaacgctct cctgagtagg acaaatccgc cgccctagac cta 5083

<210> 88
<211> 5097
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸
<400> 88
tctgtatcag gctgaaaatc ttctctcatc cgccaaaaca gcttcggcgt taagatgcgc 60

gctcaaggac gtaagccgtc gactctcgcc gtgctggcgc aggacacggc taccactcct 120
ttctctgttg atattctgct tgccattgag caaaccgcca gcgagttcgg ctggaatagt 180
tttttaatca atatttttc tgaagatgac gctgcccgcg cggcacgtca gctgcttgcc 240
caccgtccgg atggcattat ctatactaca atggggctgc gacatatcac gctgcctgag 300
tctctgtatg gtgaaaatat tgtattggcg aactgtgtgg cggatgaccc agcgttaccc 360
agttatatcc ctgatgatta cactgcacaa tatgaatcaa cacagcattt gctcgcggcg 420
ggctatcgtc aaccgttatg cttctggcta ccggaaagtg cgttggcaac agggtatcgt 480
cggcagggat ttgagcaggc ctggcgtgat gctggacgag atctggctga ggtgaaacaa 540
tttcacatgg caacaggtga tgatcactac accgatctcg caagtttact caatgcccac 600
ttcaaaccgg gcaaaccaga ttttgatgtt ctgatatgtg gtaacgatcg cgcagccttt 660
gtggcttatc aggttcttct ggcgaagggg gtacgaatcc cgcaggatgt cgccgtaatg 720
ggctttgata atctggttgg cgtcgggcat ctgtttttac cgccgctgac cacaattcag 780
cttccacatg acattatcgg gcgggaagct gcattgcata ttattgaagg tcgtgaaggg 840
ggaagagtga cgcggatccc ttgcccgctg ttgatccgtt gttccacctg atattatgtt 900
aacccagtag ccagagtgct ccatgttgca gcacagccac tccgtgggag gcataaagcg 960
acagttcccg ttcttctggc tgcggataga ttcgactact catcaccgct tccccgtcgt 1020
taataaatac ttccacggat gatgtatcga taaatatcct tagggcgagc gtgtcacgct 1080
gcgggagggg aatactacgg tagccgtcta aattctcgtg tgggtaatac cgccacaaaa 1140
caagtcgctc agattggtta tcaatataca gccgcattcc agtgccgagc tgtaatccgt 1200
aatgttcggc atcactgttc ttcagcgccc actgcaactg aatctcaact gcttgcgcgt 1260
tttcctgcaa aacatattta ttgctgattg tgcggggaga gacagattga tgctgctggc 1320
gtaacgactc agcttcgtgt accgggcgtt gtagaagttt gccattgctc tctgatagct 1380
cgcgcgccag cgtcatgcag cctgcccatc cttcacgttt tgagggcatt ggcgattccc 1440
acatatccat ccagccgata acaatacgcc gaccatcctt cgctaaaaag ctttgtggtg 1500
cataaaagtc atgcccgtta tcaagttcag taaaatgccc ggattgtgca aaaagtcgtc 1560
ctggcgacca cattccgggt attacgccac tttgaaagcg atttcggtaa ctgtatccct 1620
cggcattcat tccctgcggg gaaaacatca gataatgctg atcgccaagg ctgaaaaagt 1680
ccggacattc ccacatatag ctttcacccg catcagcgtg ggccagtacg cgatcgaagg 1740
tccattcacg caacgaactg ccgcgataaa gcaggatctg ccccgtgttg cctggatctt 1800
tcgccccgac taccatccac catgtgtcgg cttcacgcca cactttagga tcgcggaagt 1860
gcatgattcc ttctggtgga gtgaggatca caccctgttt ctcgaaatga ataccatccc 1920
gactggtagc cagacattgt acttcgcgaa ttgcatcgtc attacctgca ccatcgagcc 1980
agacgtgtcc ggtgtagata agtgagagga caccattgtc atcgacagca ctacctgaaa 2040
aacacccgtc tttgtcatta tcgtctcctg gcgctagcgc aataggctca tgctgccagt 2100
ggatcatatc gtcgctggtg gcatgtcccc agtgcattgg cccccagtgt tcgctcatcg 2160
gatgatgttg ataaaacgcg tgataacgat cgttaaacca gatcaggccg tttggatcgt 2220
tcatccaccc ggcaggaggc gcgaggtgaa aatggggata gaaagtgtta ccccggtgct 2280
catgaagttt tgctagggcg ttttgcgccg catgcaatcg agattgcgtc attttaatca 2340
tcctggttaa gcaaatttgg tgaattgtta acgttaactt ttataaaaat aaagtccctt 2400

actttcataa atgcgatgaa tatcacaaat gttaacgtta actatgacgt tttgtgatcg 2460
aatatgcatg ttttagtaaa tccatgacga ttttgcgaaa aagaggttta tcactatgcg 2520
taactcagat gaatttaagg gaaaaaaatg tcagccaaag tatgggtttt aggggatgcg 2580
gtcgtagatc tcttgccaga atcagacggg cgcctactgc cttgtcctgg cggcgcgcca 2640
gctaacgttg cggtgggaat cgccagatta ggcggaacaa gtgggtttat aggtcgggtg 2700
ggggatgatc cttttggtgc gttaatgcaa agaacgctgc taactgaggg agtcgatatc 2760
acgtatctga agcaagatga atggcaccgg acatccacgg tgcttgtcga tctgaacgat 2820
caaggggaac gttcatttac gtttatggtc cgccccagtg ccgatctttt tttagagacg 2880
acagacttgc cctgctggcg acatggcgaa tggttacatc tctgttcaat tgcgttgtct 2940
gccgagcctt cgcgtaccag cgcatttact gcgatgacgg cgatccggca tgccggaggt 3000
tttgtcagct tcgatcctaa tattcgtgaa gatctatggc aagacgagca tttgctccgc 3060
ttgtgtttgc ggcaggcgct acaactggcg gatgtcgtca agctctcgga agaagaatgg 3120
cgacttatca gtggaaaaac acagaacgat caggatatat gcgccctggc aaaagagtat 3180
gagatcgcca tgctgttggt gactaaaggt gcagaagggg tggtggtctg ttatcgagga 3240
caagttcacc attttgctgg aatgtctgtg aattgtgtcg atagcacggg ggcgggagat 3300
gcgttcgttg ccgggttact cacaggtctg tcctctacgg gattatctac agatgagaga 3360
gaaatgcgac gaattatcga tctcgctcaa cgttgcggag cgcttgcagt aacggcgaaa 3420
ggggcaatga cagcgctgcc atgtcgacaa gaactggaat agtgagaagt aaacggcgaa 3480
gtcgctctta tctctaaata ggacgtgaat tttttaacga caggcaggta attatggcac 3540
tgaatattcc attcagaaat gcgtactatc gttttgcatc cagttactca tttctctttt 3600
ttatttcctg gtcgctgtgg tggtcgttat acgctatttg gctgaaagga catctagggt 3660
tgacagggac ggaattaggt acactttatt cggtcaacca gtttaccagc attctattta 3720
tgatgttcta cggcatcgtt caggataaac tcggtctgaa gaaaccgctc atctggtgta 3780
tgagtttcat cctggtcttg accggaccgt ttatgattta cgtttatgaa ccgttactgc 3840
aaagcaattt ttctgtaggt ctaattctgg gggcgctatt ttttggcttg gggtatctgg 3900
cgggatgcgg tttgcttgat agcttcaccg aaaaaatggc gcgaaatttt catttcgaat 3960
atggaacagc gcgcgcctgg ggatcttttg gctatgctat tggcgcgttc tttgccggca 4020
tatttttag tatcagtccc catatcaact tctggttggt ctcgctattt ggcgctgtat 4080
ttatgatgat caacatgcgt tttaaagata aggatcacca gtgcgtagcg gcagatgcgg 4140
gaggggtaaa aaaagaggat tttatcgcag ttttcaagga tcgaaacttc tgggttttcg 4200
tcatatttat tgtggggacg tggtctttct ataacatttt tgatcaacaa ctttttcctg 4260
tcttttattc aggtttattc gaatcacacg atgtaggaac gcgcctgtat ggttatctca 4320
actcattcca ggtggtactc gaagcgctgt gcatggcgat tattcctttc tttgtgaatc 4380
gggtagggcc aaaaaatgca ttacttatcg gagttgtgat tatggcgttg cgtatccttt 4440
cctgcgcgct gttcgttaac ccctggatta tttcattagt gaagttgtta catgccattg 4500
aggttccact ttgtgtcata tccgtcttca aatacagcgt ggcaaacttt gataagcgcc 4560
tgtcgtcgac gatctttctg attggttttc aaattgccag ttcgcttggg attgtgctgc 4620
tttcaacgcc gactgggata ctctttgacc acgcaggcta ccagacagtt ttcttcgcaa 4680
tttcgggtat tgtctgcctg atgttgctat ttggcatttt cttcttgagt aaaaaacgcg 4740

agcaaatagt tatggaaacg cctgtacctt cagcaatata gacgtaaact ttttccggtt 4800
gttgtcgata gctctatatc cctcaaccgg aaaataataa tagtaaaatg cttagccctg 4860
ctaataatcg cctaatccaa acgcctcatt catgttctgg tacagtcgct caaatgtact 4920
tcagatgcgc ggttcgctga tttccaggac attgtcgtca ttcagtgacc tgtcccgtgt 4980
atcacggtcc tgcgaattca tcaaggaatg cattgcggag tgaagtatcg agtcacgcca 5040
tatttcgtca cccgaagatg agttttgaga tattaaggca ggtgactttc actcaca 5097

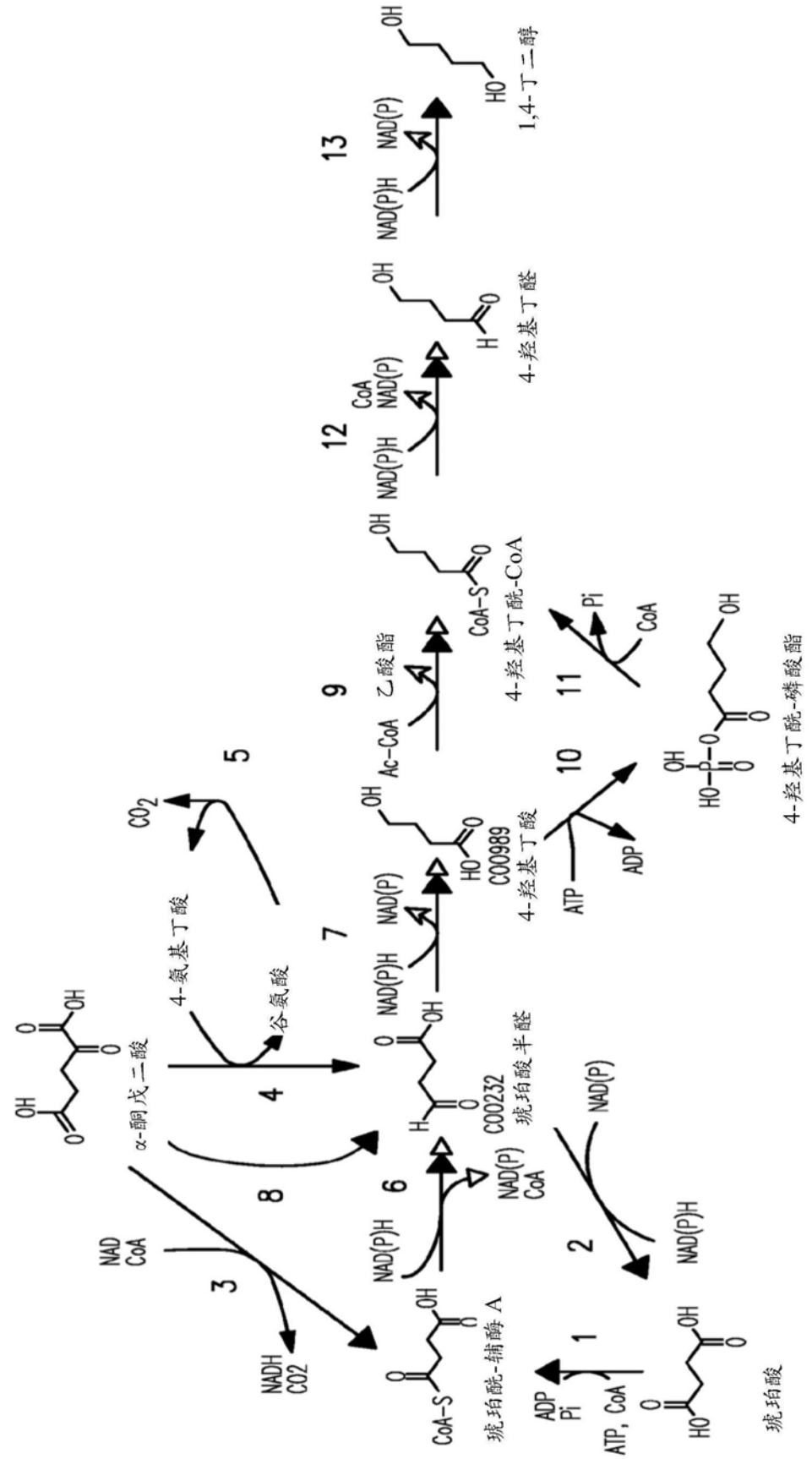

α-酮戊二酸
4-氨基丁酸
谷氨酸
CO2
NADH
CO2
NAD
CoA
NAD(P)H
NAD(P)
CoA
NAD(P)H
NAD(P)
NAD(P)H
NAD(P)
ATP
ADP
Ac-CoA
乙酸酯
CoA
Pi
ADP
Pi
ATP, CoA
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
CO0232
琥珀酸半醛
CO0989
4-羟基丁酸
4-羟基丁酰-CoA
4-羟基丁醛
1,4-丁二醇
琥珀酰-辅酶 A
琥珀酸
4-羟基丁酰-磷酸酯

图1

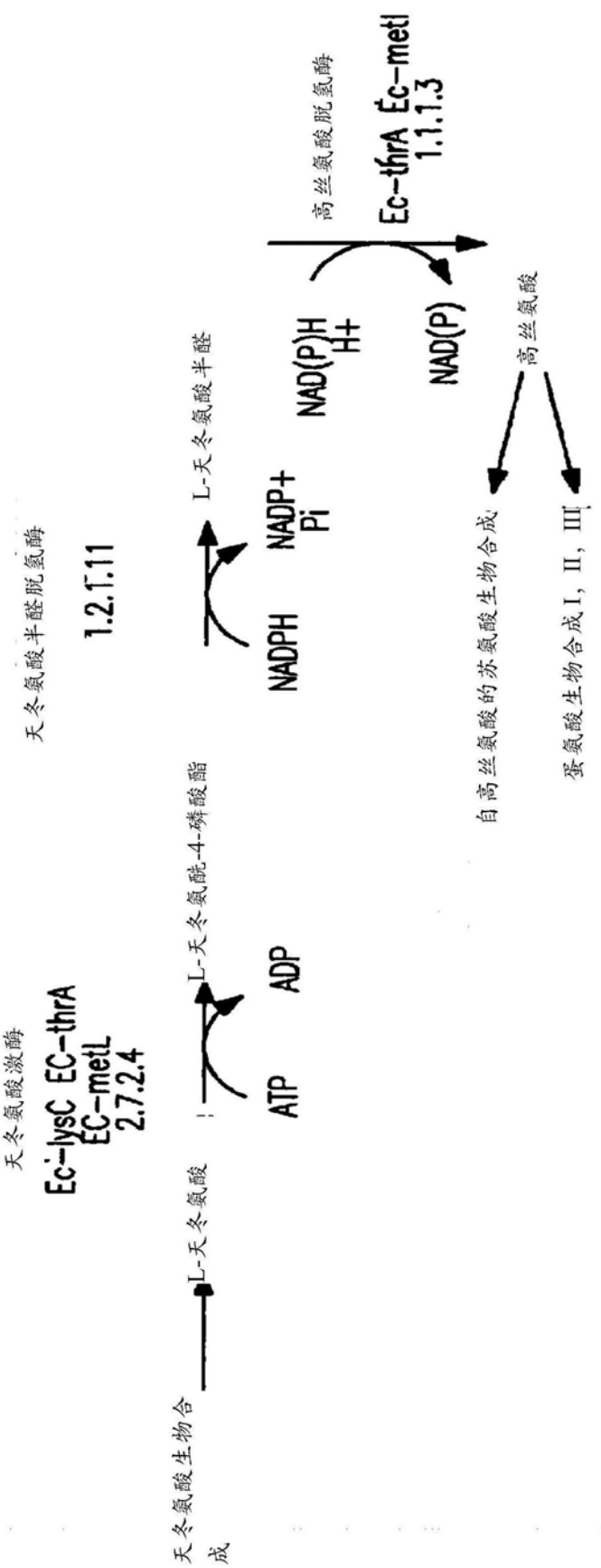

天冬氨酸生物合成
L-天冬氨酸
天冬氨酸激酶
Ec-lysC EC-thrA
EC-metL
2.7.2.4
ATP
ADP
L-天冬氨酰-4-磷酸酯
天冬氨酸半醛脱氢酶
1.2.1.11
NADPH
NADP+
Pi
L-天冬氨酸半醛
高丝氨酸脱氢酶
Ec-thrA Ec-metl
1.1.1.3
NAD(P)H
H+
NAD(P)
高丝氨酸
自高丝氨酸的苏氨酸生物合成
蛋氨酸生物合成 I，II，III

图2

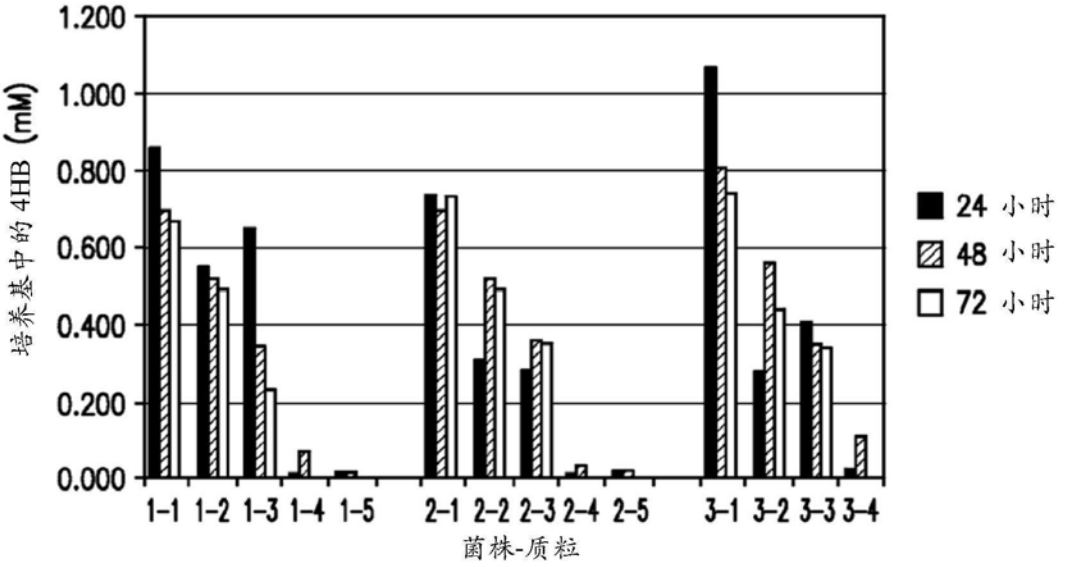

1.200
1.000
0.800
0.600
0.400
0.200
0.000
培养基中的 4HB (mM)
1-1 1-2 1-3 1-4 1-5 2-1 2-2 2-3 2-4 2-5 3-1 3-2 3-3 3-4
菌株-质粒
24 小时
48 小时
72 小时

图3(a)

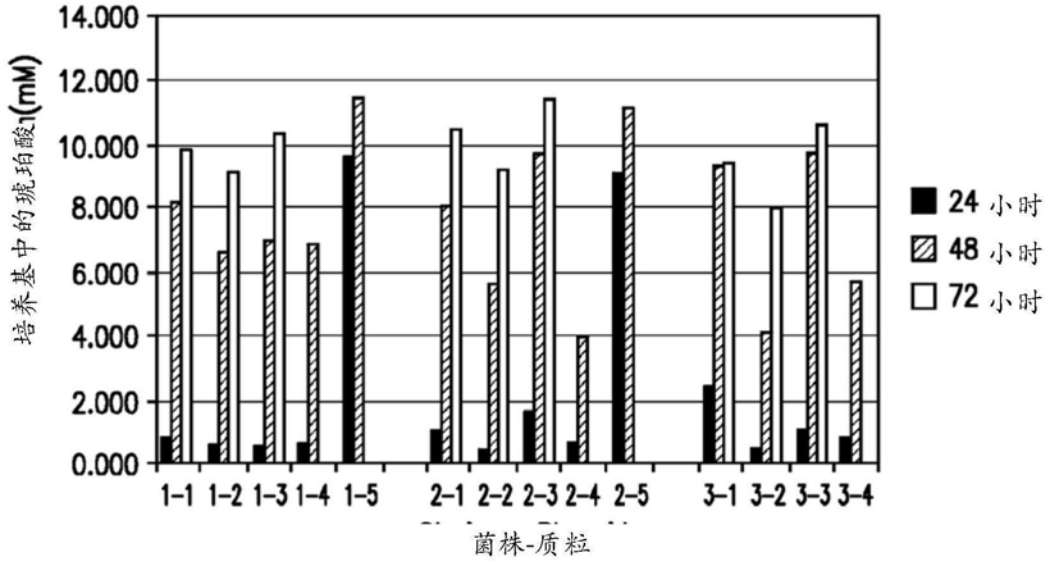

14.000
12.000
10.000
8.000
6.000
4.000
2.000
0.000
培养基中的琥珀酸(mM)
1-1 1-2 1-3 1-4 1-5 2-1 2-2 2-3 2-4 2-5 3-1 3-2 3-3 3-4
菌株-质粒
24 小时
48 小时
72 小时

图3(b)

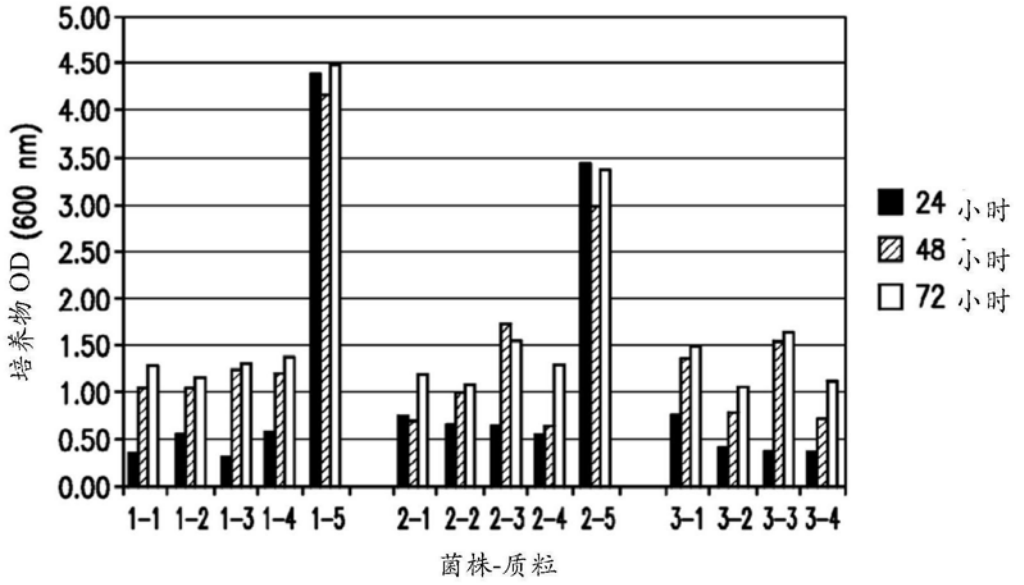

5.00
4.50
4.00
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
培养物 OD (600 nm)
1-1 1-2 1-3 1-4 1-5 2-1 2-2 2-3 2-4 2-5 3-1 3-2 3-3 3-4
菌株-质粒
24 小时
48 小时
72 小时

图3(c)

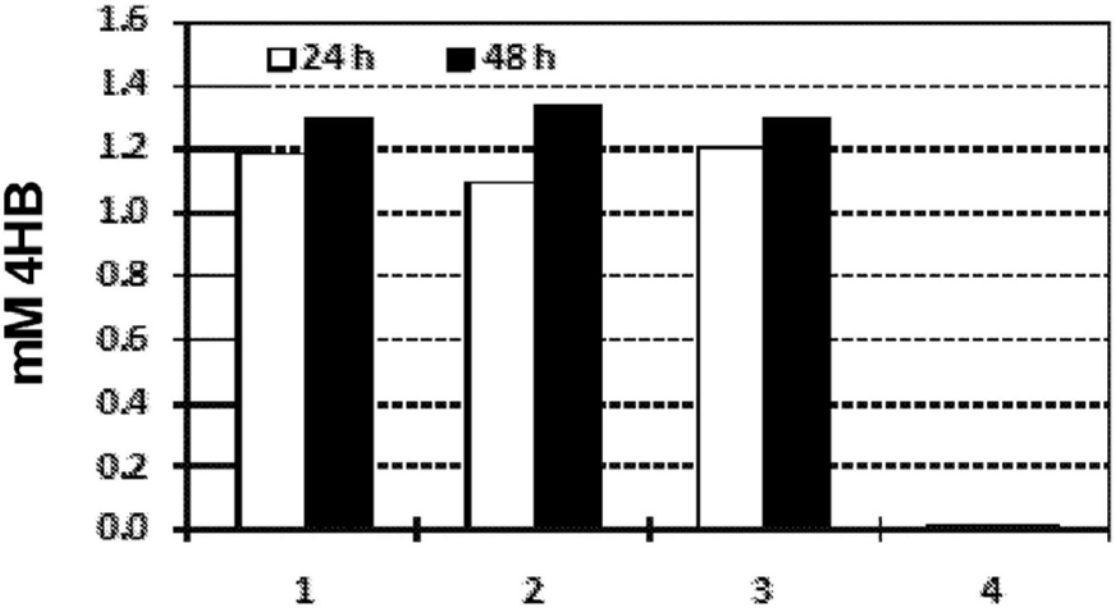

1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
mM 4HB
24 h
48 h
1
2
3
4

图4

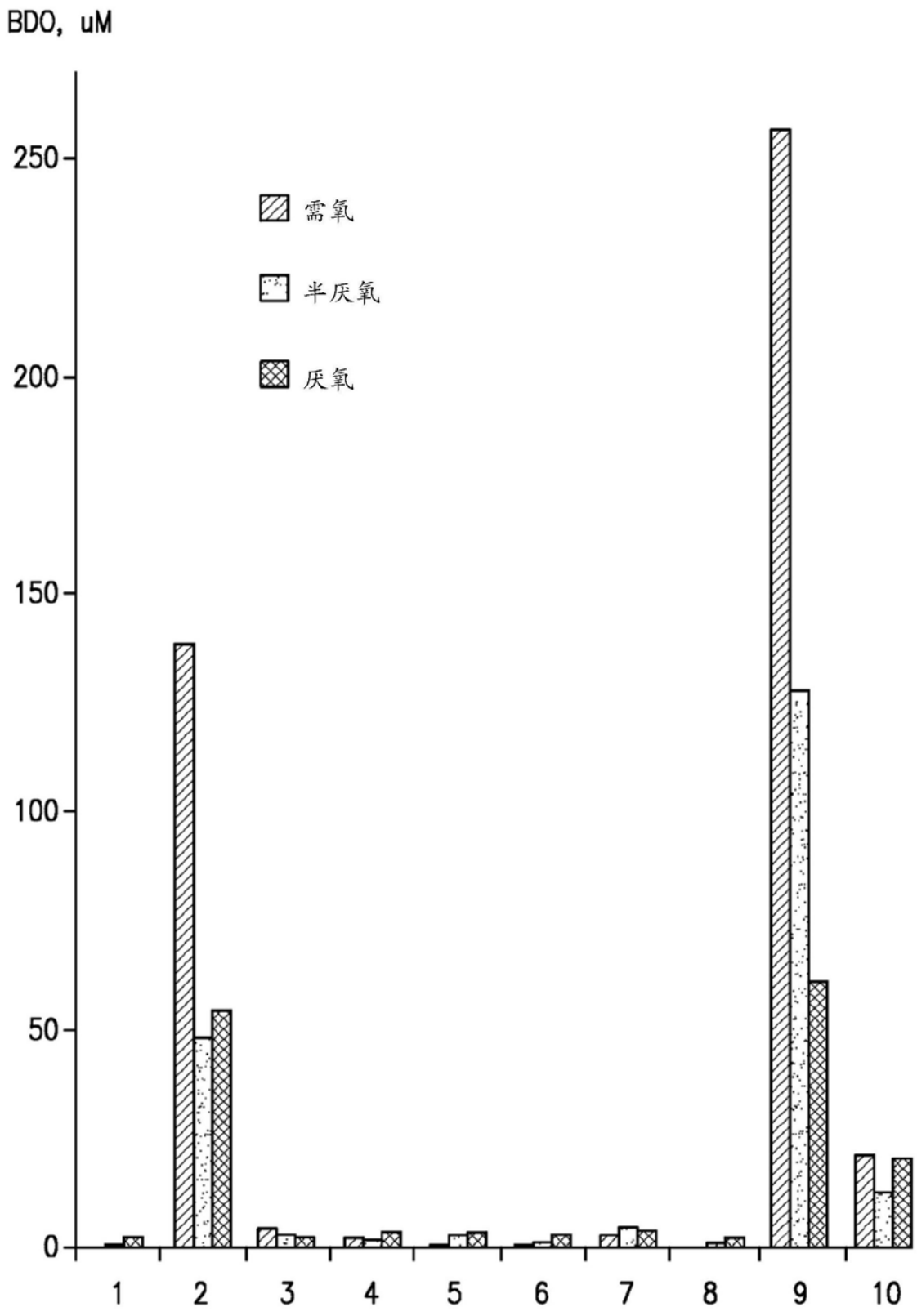


图5

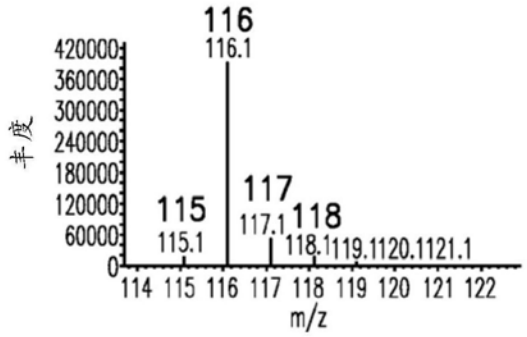

116
116.1
117
117.1
118
118.1
115
115.1
119.1
120.1
121.1
丰度
m/z

图6(a)

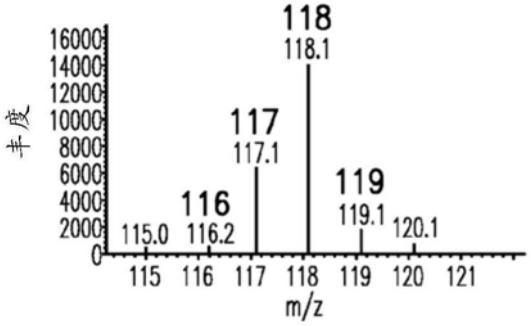

118
118.1
117
117.1
119
119.1
116
116.2
115.0
120.1
丰度
m/z

图6(b)

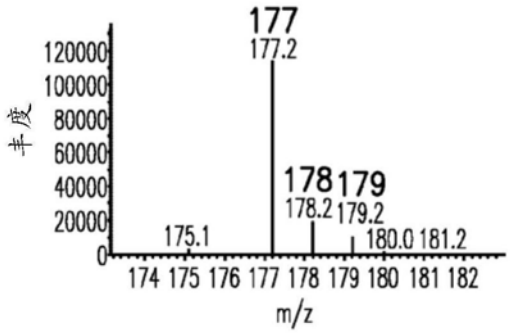

177
177.2
178
178.2
179
179.2
175.1
180.0
181.2
丰度
m/z

图6(c)

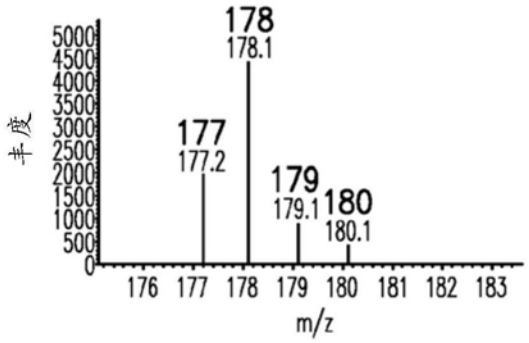

178
178.1
177
177.2
179
179.1
180
180.1
丰度
m/z

图6(d)

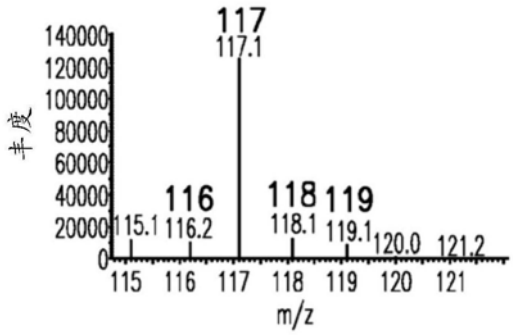

117
117.1
116
116.2
118
118.1
119
119.1
115.1
120.0
121.2
丰度
m/z

图6(e)

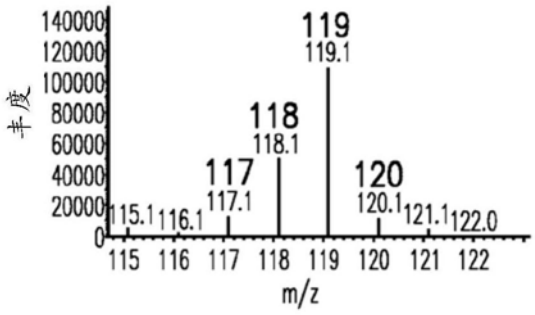

119
119.1
118
118.1
117
117.1
120
120.1
115.1
116.1
121.1
122.0
丰度
m/z

图6(f)

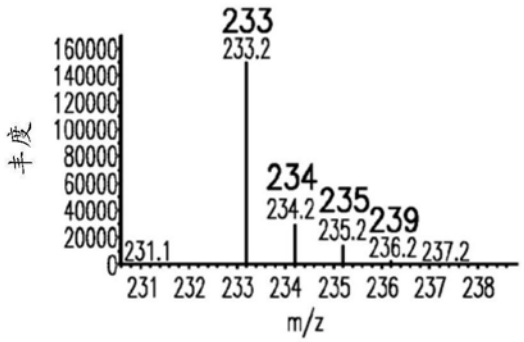

233
233.2
234
234.2
235
235.2
239
236.2
237.2
231.1
160000
140000
120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
丰度
231 232 233 234 235 236 237 238
m/z

图6(g)

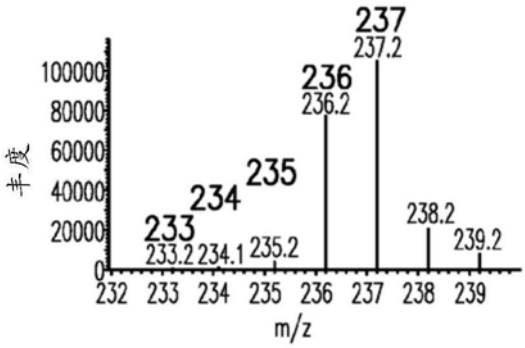

237
237.2
236
236.2
235
234
233
233.2
234.1
235.2
238.2
239.2
100000
80000
60000
40000
20000
0
丰度
232 233 234 235 236 237 238 239
m/z

图6(h)

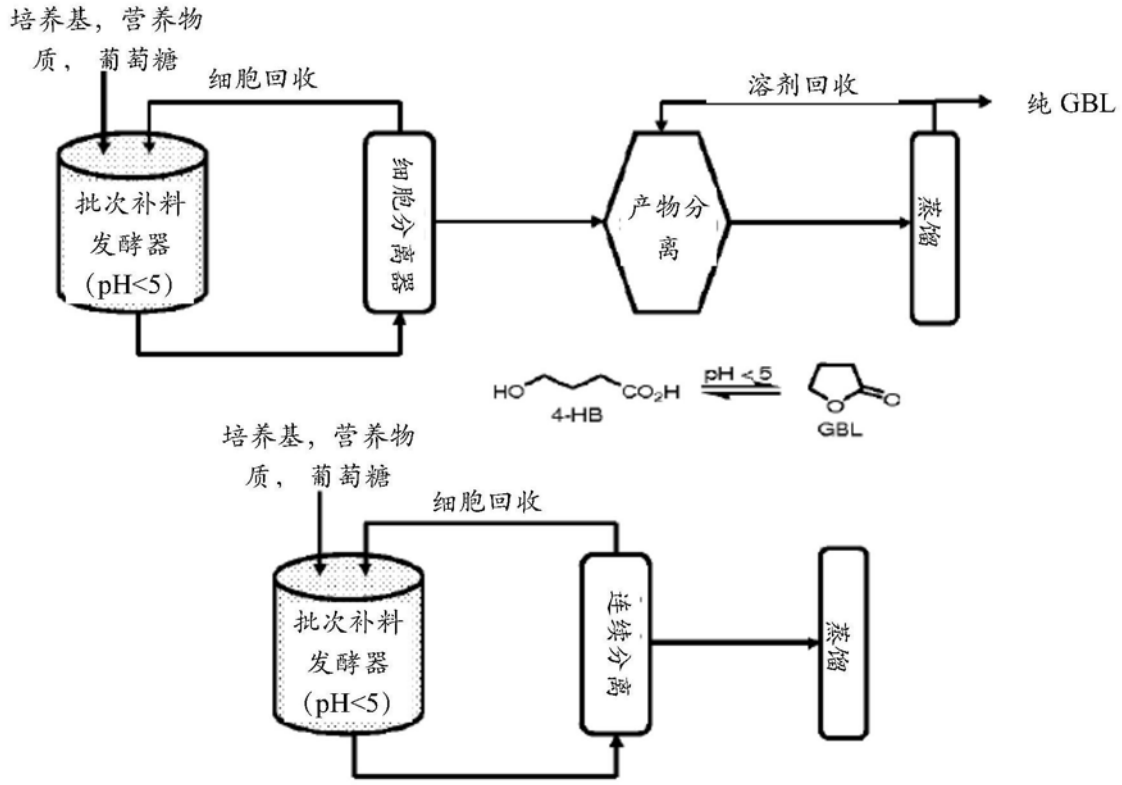

培养基，营养物质，葡萄糖
细胞回收
批次补料发酵器（pH<5）
细胞分离器
产物分离
溶剂回收
蒸馏
纯 GBL
HO
CO2H
4-HB
pH < 5
GBL
培养基，营养物质，葡萄糖
细胞回收
批次补料发酵器（pH<5）
连续分离
蒸馏

图7

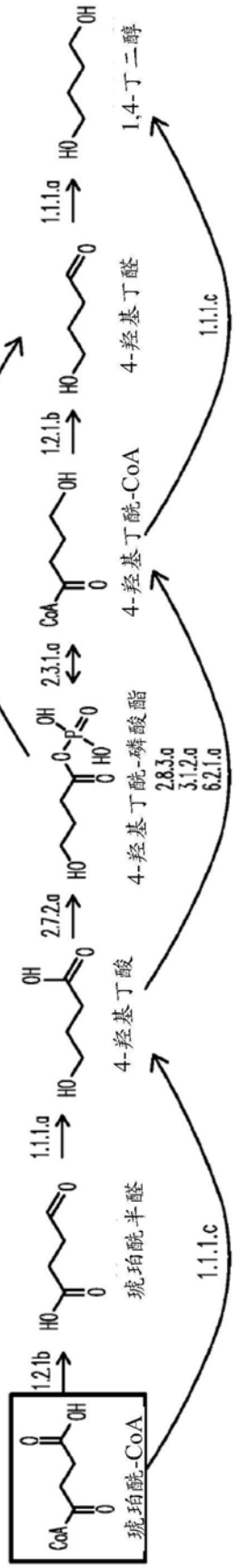

琥珀酰-CoA
1.2.1b
琥珀酰半醛
1.1.1.a
4-羟基丁酸
2.7.2.a
4-羟基丁酰-磷酸酯
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
2.3.1.a
4-羟基丁酰-CoA
1.2.1b
4-羟基丁醛
1.1.1.a
1,4-丁二醇
1.1.1.c
1.2.1.d
1.1.1.c

图8A

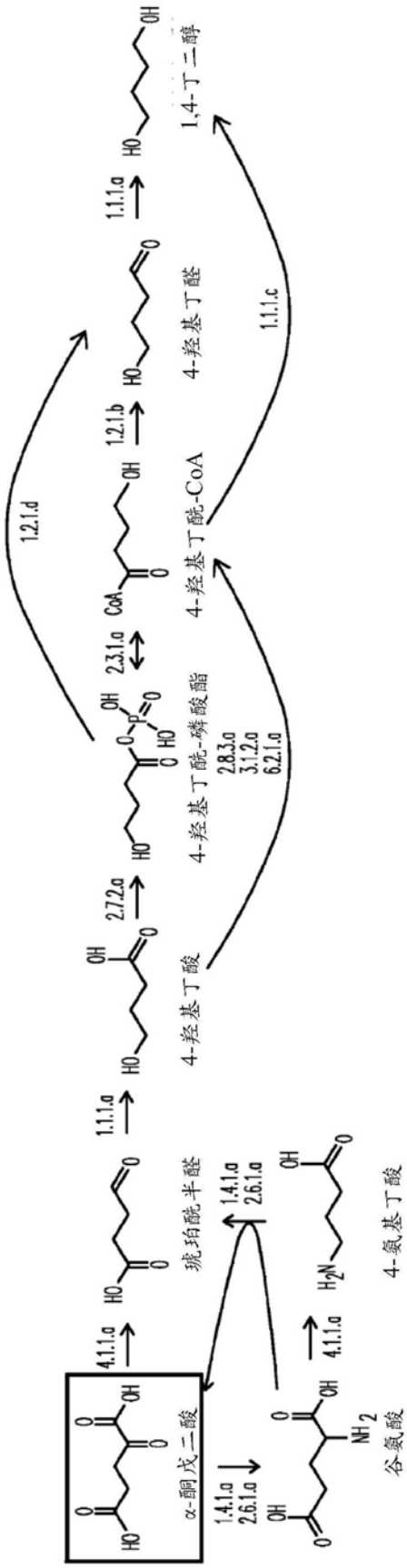

α-酮戊二酸
琥珀酰半醛
4-羟基丁酸
4-羟基丁酰-磷酸酯
4-羟基丁酰-CoA
4-羟基丁醛
1,4-丁二醇
谷氨酸
4-氨基丁酸
4.1.1.a
1.1.1.a
2.7.2.a
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
2.3.1.a
1.2.1.b
1.1.1.c
1.2.1.d
1.4.1.a
2.6.1.a

图8B

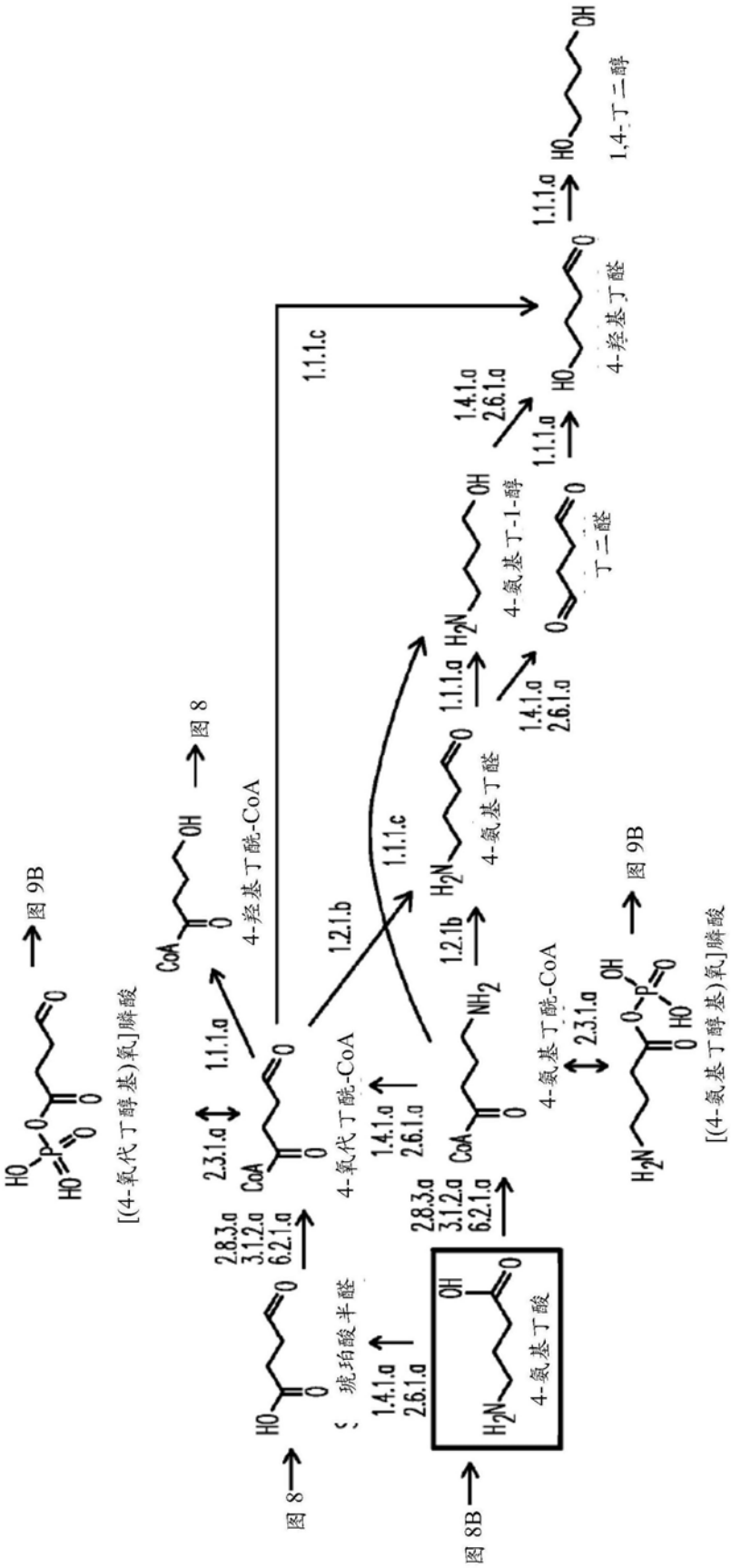

图 9B
[(4-氧代丁醇基)氧]膦酸
图 8
4-羟基丁酰-CoA
1.1.1.a
2.3.1.a
1.2.1.b
1.1.1.c
4-氧代丁酰-CoA
1.4.1.a
2.6.1.a
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
琥珀酸半醛
4-氨基丁酸
4-氨基丁醛
4-氨基丁-1-醇
丁二醛
4-羟基丁醛
1,4-丁二醇
4-氨基丁酰-CoA
图 8B
图 9B
[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸

图9A

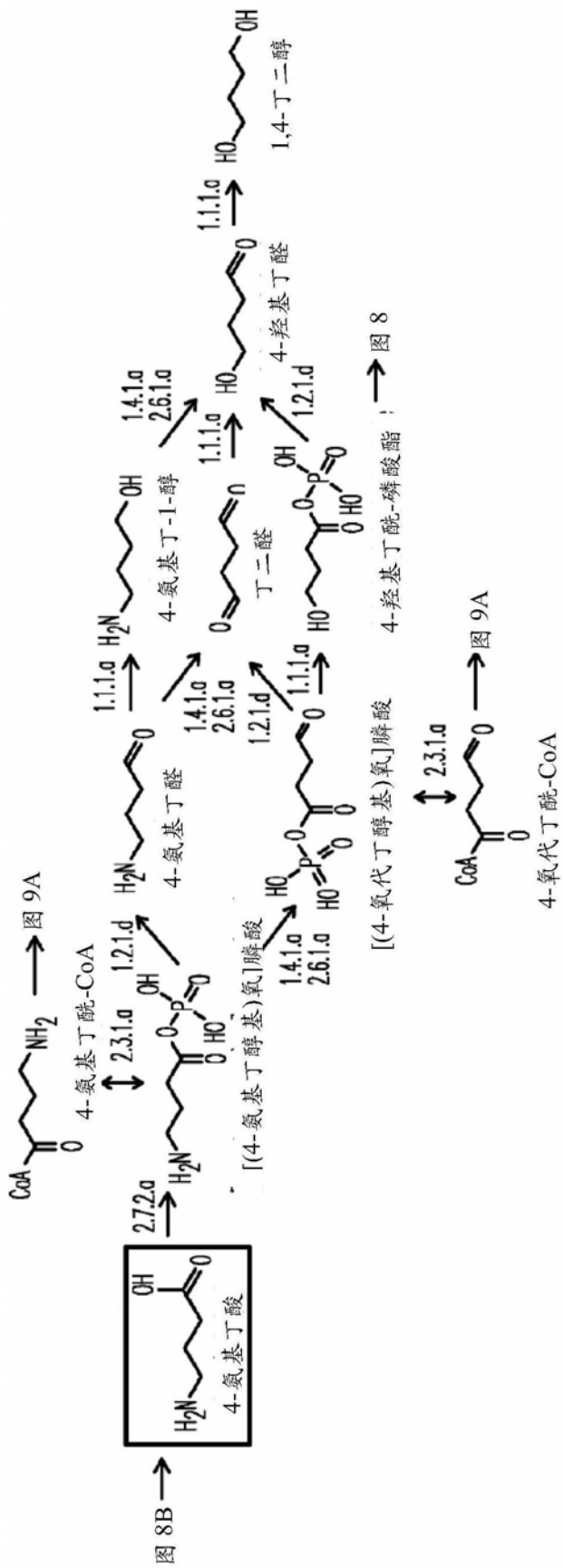

图 8B
4-氨基丁酸
2.7.2.a
[(4-氨基丁醇基)氧]膦酸
1.4.1.a
2.6.1.a
1.2.1.d
4-氨基丁醛
1.1.1.a
4-氨基丁-1-醇
1.4.1.a
2.6.1.a
1.1.1.a
4-羟基丁醛
1.2.1.d
1.1.1.a
1,4-丁二醇
丁二醛
[(4-氧代丁醇基)氧]膦酸
4-羟基丁酰-磷酸酯
图 8
2.3.1.a
4-氧代丁酰-CoA
图 9A
4-氨基丁酰-CoA
2.3.1.a
图 9A

图9B

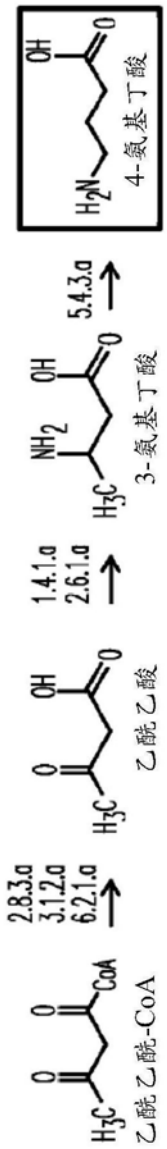


图9C

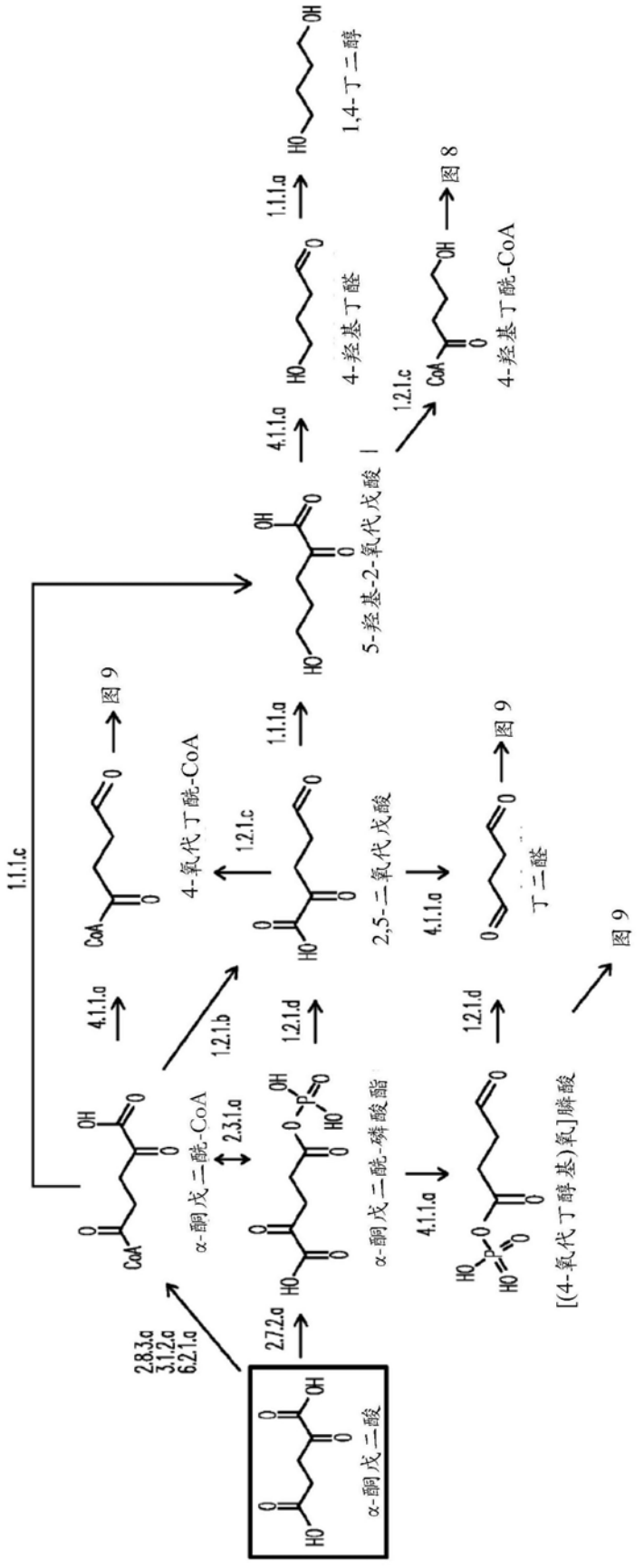

α-酮戊二酸
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
2.7.2.a
α-酮戊二酸-磷酸酯
α-酮戊二酸-CoA
2.3.1.a
4.1.1.a
1.2.1.b
1.2.1.d
4.1.1.a
1.2.1.d
[(4-氧代丁醇基)氧]膦酸
丁二醛
图 9
2,5-二氧代戊酸
1.1.1.a
1.2.1.c
4-氧代丁酰-CoA
图 9
1.1.1.c
5-羟基-2-氧代戊酸
4.1.1.a
1.2.1.c
4-羟基丁醛
1.1.1.a
1,4-丁二醇
4-羟基丁酰-CoA
图 8

图10

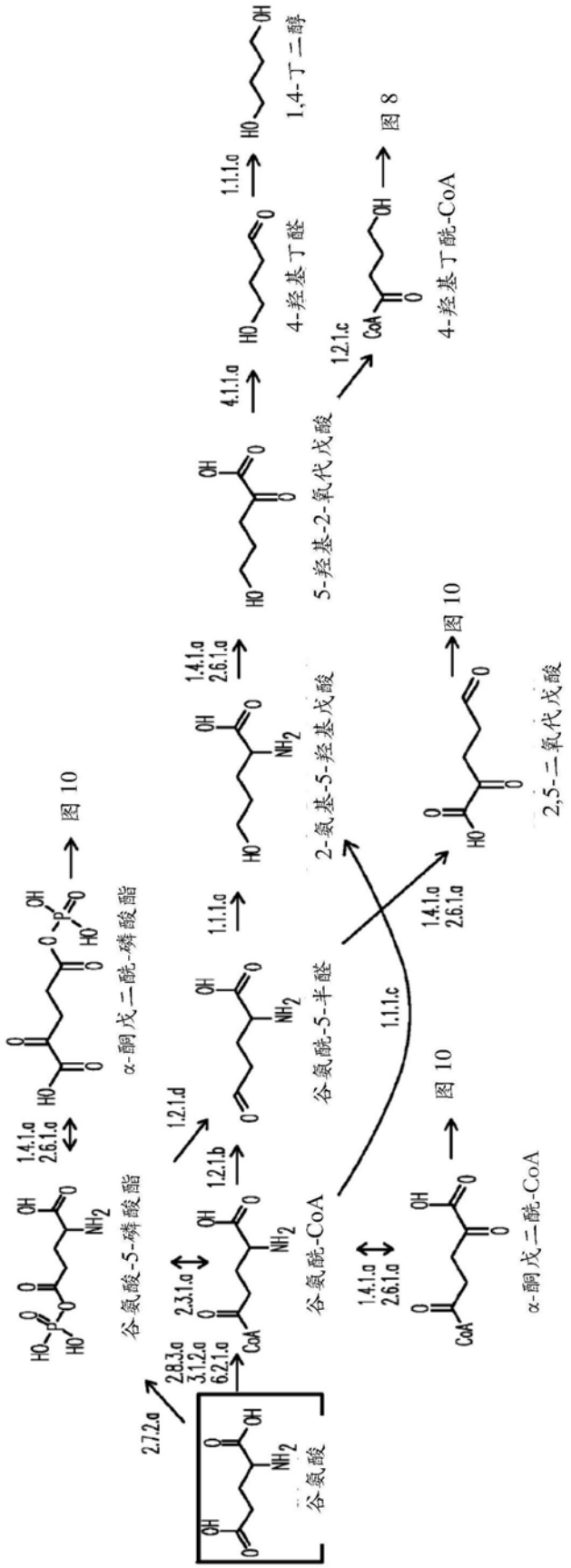

谷氨酸
谷氨酸-5-磷酸酯
α-酮戊二酰-磷酸酯
谷氨酰-5-半醛
2-氨基-5-羟基戊酸
5-羟基-2-氧代戊酸
4-羟基丁醛
1,4-丁二醇
谷氨酰-CoA
α-酮戊二酰-CoA
4-羟基丁酰-CoA
2,5-二氧代戊酸
图 10
图 8

图11

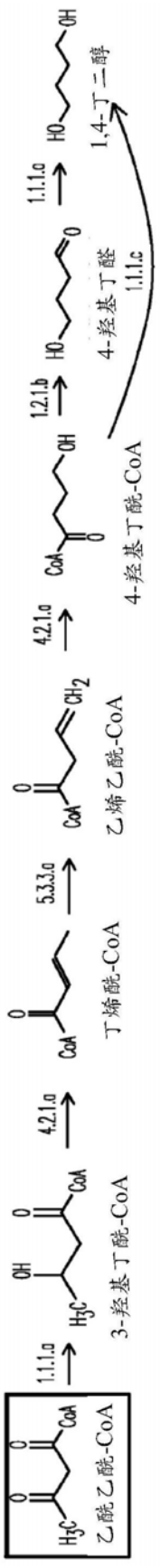

乙酰乙酰-CoA
1.1.1.a
3-羟基丁酰-CoA
4.2.1.a
丁烯酰-CoA
5.3.3.a
乙烯乙酰-CoA
4.2.1.a
4-羟基丁酰-CoA
1.2.1.b
4-羟基丁醛
1.1.1.c
1.1.1.a
1,4-丁二醇

图12

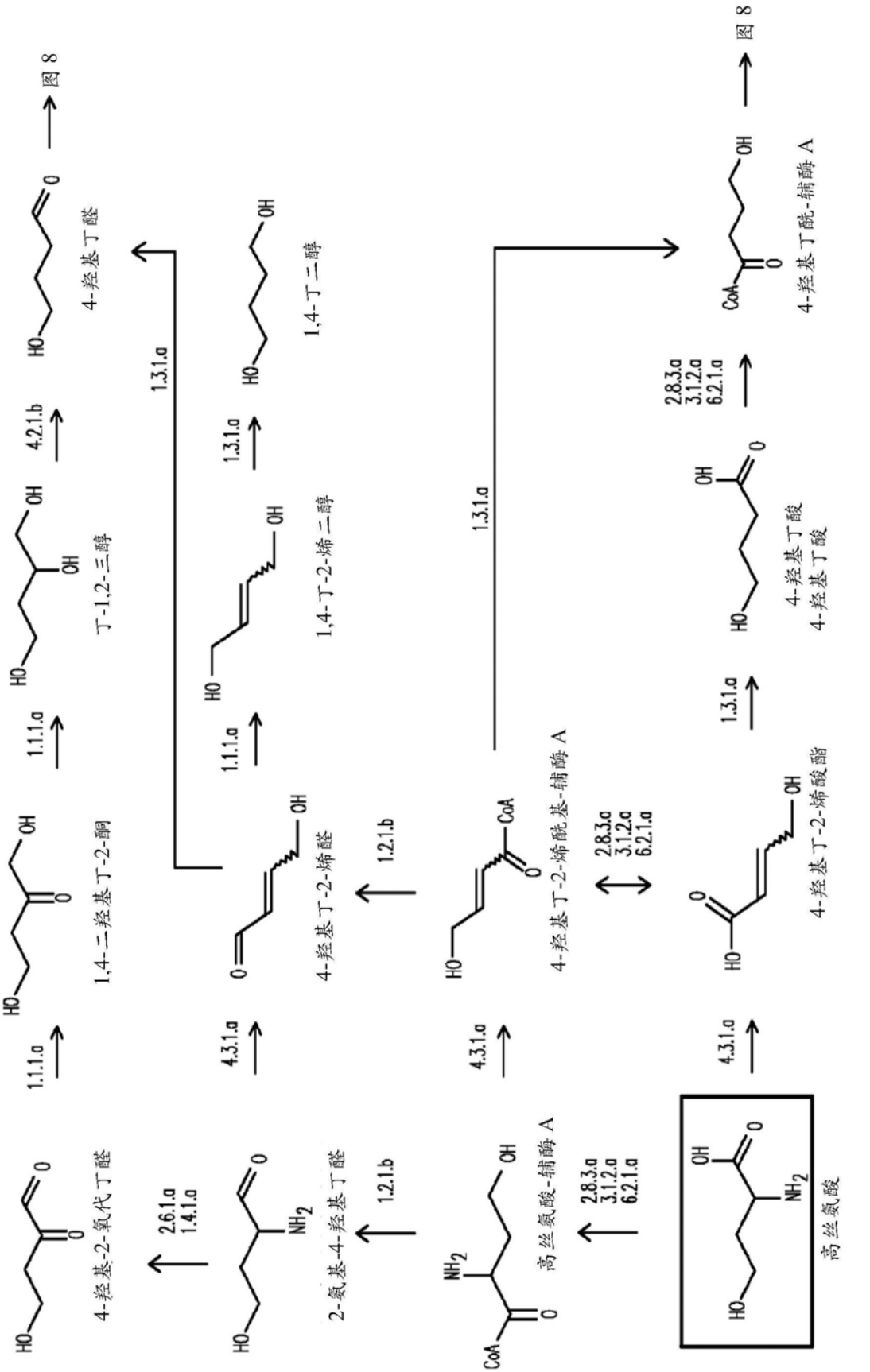

4-羟基-2-氧代丁醛
2-氨基-4-羟基丁醛
高丝氨酸
高丝氨酸-辅酶 A
4-羟基丁-2-烯酰基-辅酶 A
4-羟基丁-2-烯酸酯
4-羟基丁酸
4-羟基丁酰-辅酶 A
1,4-二羟基丁-2-酮
丁-1,2-三醇
4-羟基丁-2-烯醛
1,4-丁-2-烯二醇
4-羟基丁醛
1,4-丁二醇
图 8
1.1.1.a
2.6.1.a
1.4.1.a
4.3.1.a
1.2.1.b
2.8.3.a
3.1.2.a
6.2.1.a
1.3.1.a
4.2.1.b

图13

A.

ATGAACTTACATGAATATCAGGCAAAACAACTTTTTGCCCGCTATGGCTTACCAGCACCGGTGGGTT
ATGCCTGTACTACTCCGCGCGAAGCAGAAGAAGCCGCTTCAAAAATCGGTGCCGGTCCGTGGGTAG
TGAAATGTCAGGTTCACGCTGGTGGCCGCGGTAAAGCGGGCGGTGTGAAAGTTGTAAACAGCAAA
GAAGACATCCGTGCTTTTGCAGAAAACTGGCTGGGCAAGCGTCTGGTAACGTATCAAACAGATGCC
AATGGCCAACCGGTTAACCAGATTCTGGTTGAAGCAGCGACCGATATCGCTAAAGAGCTGTATCTCG
GTGCCGTTGTTGACCGTAGTTCCCGTCGTGTGGTCTTTATGGCCTCCACCGAAGGCGGCGTGGAAAT
CGAAAAAGTGGCGGAAGAAACTCCGCACCTGATCCATAAAGTTGCGCTTGATCCGCTGACTGGCCC
GATGCCGTATCAGGGACGCGAGCTGGCGTTCAAACTGGGTCTGGAAGGTAAACTGGTTCAGCAGTT
CACCAAAATCTTCATGGGCCTGGCGACCATTTTCCTGGAGCGCGACCTGGCGTTGATCGAAATCAAC
CCGCTGGTCATCACCAAACAGGGCGATCTGATTTGCCTCGACGGCAAACTGGGCGCTGACGGCAAC
GCACTGTTCCGCCAGCCTGATCTGCGCGAAATGCGTGACCAGTCGCAGGAAGATCCGCGTGAAGCA
CAGGCTGCACAGTGGGAACTGAACTACGTTGCGCTGGACGGTAACATCGGTTGTATGGTTAACGGC
GCAGGTCTGGCGATGGGTACGATGGACATCGTTAAACTGCACGGCGGCGAACCGGCTAACTTCCTT
GACGTTGGCGGCGGCGCAACCAAAGAACGTGTAACCGAAGCGTTCAAAATCATCCTCTCTGACGAC
AAAGTGAAAGCCGTTCTGGTTAACATCTTCGGCGGTATCGTTCGTTGCGACCTGATCGCTGACGGTA
TCATCGGCGCGGTAGCAGAAGTGGGTGTTAACGTACCGGTCGTGGTACGTCTGGAAGGTAACAACG
CCGAACTCGGCGCGAAGAAACTGGCTGACAGCGGCCTGAATATTATTGCAGCAAAAGGTCTGACGG
ATGCAGCTCAGCAGGTTGTTGCCGCAGTGGAGGGGAAATAATGTCCATTTTAATCGATAAAAACACC
AAGGTTATCTGCCAGGGCTTTACCGGTAGCCAGGGGACTTTCCACTCAGAACAGGCCATTGCATACG
GCACTAAAATGGTTGGCGGCGTAACCCCAGGTAAAGGCGGCACCACCCACCTCGGCCTGCCGGTGT
TCAACACCGTGCGTGAAGCCGTTGCTGCCACTGGCGCTACCGCTTCTGTTATCTACGTACCAGCACC
GTTCTGCAAAGACTCCATTCTGGAAGCCATCGACGCAGGCATCAAACTGATTATCACCATCACTGAA
GGCATCCCGACGCTGGATATGCTGACCGTGAAAGTGAAGCTGGATGAAGCAGGCGTTCGTATGATC
GGCCCGAACTGCCCAGGCGTTATCACTCCGGGTGAATGCAAAATCGGTATCCAGCCTGGTCACATTC
ACAAACCGGGTAAAGTGGGTATCGTTTCCCGTTCCGGTACACTGACCTATGAAGCGGTTAAACAGAC
CACGGATTACGGTTTCGGTCAGTCGACCTGTGTCGGTATCGGCGGTGACCCGATCCCGGGCTCTAAC
TTTATCGACATTCTCGAAATGTTCGAAAAAGATCCGCAGACCGAAGCGATCGTGATGATCGGTGAGA
TCGGCGGTAGCGCTGAAGAAGAAGCAGCTGCGTACATCAAAGAGCACGTTACCAAGCCAGTTGTGG
GTTACATCGCTGGTGTGACTGCGCCGAAAGGCAAACGTATGGGCCACGCGGGTGCCATCATTGCCG
GTGGGAAAGGGACTGCGGATGAGAAATTCGCTGCTCTGGAAGCCGCAGGCGTGAAAACCGTTCGC
AGCCTGGCGGATATCGGTGAAGCACTGAAAACTGTTCTGAAATAA

B.

MNLHEYQAKQLFARYGLPAPVGYACTTPREAEEAASKIGAGPWVVKCQVHAGGRGKAGGVKVVNSKE
DIRAFAENWLGKRLVTYQTDANGQPVNQILVEAATDIAKELYLGAVVDRSSRRVVFMASTEGGVEIEKV
AEETPHLIHKVALDPLTGPMPYQGRELAFKLGLEGKLVQQFTKIFMGLATIFLERDLALIEINPLVITKQGDL
ICLDGKLGADGNALFRQPDLREMRDQSQEDPREAQAAQWELNYVALDGNIGCMVNGAGLAMGTMD
IVKLHGGEPANFLDVGGGATKERVTEAFKIILSDDKVKAVLVNIFGGIVRCDLIADGIIGAVAEVGVNVPVV
VRLEGNNAELGAKKLADSGLNIIAAKGLTDAAQQVVAAVEGK

C.

MSILIDKNTKVICQGFTGSQGTFHSEQAIAYGTKMVGGVTPGKGGTTHLGLPVFNTVREAVAATGATAS
VIYVPAPFCKDSILEAIDAGIKLIITITEGIPTLDMLTVKVKLDEAGVRMIGPNCPGVITPGECKIGIQPGHIHK
PGKVGIVSRSGTLTYEAVKQTTDYGFGQSTCVGIGGDPIPGSNFIDILEMFEKDPQTEAIVMIGEIGGSAEE
EAAAYIKEHVTKPVVGYIAGVTAPKGKRMGHAGAIIAGGKGTADEKFAALEAAGVKTVRSLADIGEALKT
VLK

图14

A.

ATGGCCAACATAAGTTCACCATTCGGGCAAAACGAATGGCTGGTTGAAGAGATGTACCGCAAGTTC
CGCGACGACCCCTCCTCGGTCGATCCCAGCTGGCACGAGTTCCTGGTTGACTACAGCCCCGAACCCA
CCTCCCAACCAGCTGCCGAACCAACCCGGGTTACCTCGCCACTCGTTGCCGAGCGGGCCGCTGCGGC
CGCCCCGCAGGCACCCCCCAAGCCGGCCGACACCGCGGCCGCGGGCAACGGCGTGGTCGCCGCACT
GGCCGCCAAAACTGCCGTTCCCCCGCCAGCCGAAGGTGACGAGGTAGCGGTGCTGCGCGGCGCCG
CCGCGGCCGTCGTCAAGAACATGTCCGCGTCGTTGGAGGTGCCGACGGCGACCAGCGTCCGGGCG
GTCCCGGCCAAGCTACTGATCGACAACCGGATCGTCATCAACAACCAGTTGAAGCGGACCCGCGGC
GGCAAGATCTCGTTCACGCATTTGCTGGGCTACGCCCTGGTGCAGGCGGTGAAGAAATTCCCGAAC
ATGAACCGGCACTACACCGAAGTCGACGGCAAGCCCACCGCGGTCACGCCGGCGCACACCAATCTC
GGCCTGGCGATCGACCTGCAAGGCAAGGACGGGAAGCGTTCCCTGGTGGTGGCCGGCATCAAGCG
GTGCGAGACCATGCGATTCGCGCAGTTCGTCACGGCCTACGAAGACATCGTACGCCGGGCCCGCGA
CGGCAAGCTGACCACTGAAGACTTTGCCGGCGTGACGATTTCGCTGACCAATCCCGGAACCATCGGC
ACCGTGCATTCGGTGCCGCGGCTGATGCCCGGCCAGGGCGCCATCATCGGCGTGGGCGCCATGGAA
TACCCCGCCGAGTTTCAAGGCGCCAGCGAGGAACGCATCGCCGAGCTGGGCATCGGCAAATTGATC
ACTTTGACCTCCACCTACGACCACCGCATCATCCAGGGCGCGGAATCGGGCGACTTCCTGCGCACCA
TCCACGAGTTGCTGCTCTCGGATGGCTTCTGGGACGAGGTCTTCCGCGAACTGAGCATCCCATATCT
GCCGGTGCGCTGGAGCACCGACAACCCCGACTCGATCGTCGACAAGAACGCTCGCGTCATGAACTT
GATCGCGGCCTACCGCAACCGCGGCCATCTGATGGCCGATACCGACCCGCTGCGGTTGGACAAAGC
TCGGTTCCGCAGTCACCCCGACCTCGAAGTGCTGACCCACGGCCTGACGCTGTGGGATCTCGATCGG
GTGTTCAAGGTCGACGGCTTTGCCGGTGCGCAGTACAAGAAACTGCGCGACGTGCTGGGCTTGCTG
CGCGATGCCTACTGCCGCCACATCGGCGTGGAGTACGCCCATATCCTCGACCCCGAACAAAAGGAG
TGGCTCGAACAACGGGTCGAGACCAAGCACGTCAAACCCACTGTGGCCCAACAGAAATACATCCTC
AGCAAGCTCAACGCCGCCGAGGCCTTTGAAACGTTCCTACAGACCAAGTACGTCGGCCAGAAGCGG
TTCTCGCTGGAAGGCGCCGAAAGCGTGATCCCGATGATGGACGCGGCGATCGACCAGTGCGCTGAG
CACGGCCTCGACGAGGTGGTCATCGGGATGCCGCACCGGGGCCGGCTCAACGTGCTGGCCAACATC
GTCGGCAAGCCGTACTCGCAGATCTTCACCGAGTTCGAGGGCAACCTGAATCCGTCGCAGGCGCAC
GGCTCCGGTGACGTCAAGTACCACCTGGGCGCCACCGGGCTGTACCTGCAGATGTTCGGCGACAAC
GACATTCAGGTGTCGCTGACCGCCAACCCGTCGCATCTGGAGGCCGTCGACCCGGTGCTGGAGGGA
TTGGTGCGGGCCAAGCAGGATCTGCTCGACCACGGAAGCATCGACAGCGACGGCCAACGGGCGTT
CTCGGTGGTGCCGCTGATGTTGCATGGCGATGCCGCGTTCGCCGGTCAGGGTGTGGTCGCCGAGAC
GCTGAACCTGGCGAATCTGCCGGGCTACCGCGTCGGCGGCACCATCCACATCATCGTCAACAACCAG
ATCGGCTTCACCACCGCGCCCGAGTATTCCAGGTCCAGCGAGTACTGCACCGACGTCGCAAAGATGA
TCGGGGCACCGATCTTTCACGTCAACGGCGACGACCCGGAGGCGTGTGTCTGGGTGGCGCGGTTGG
CGGTGGACTTCCGACAACGGTTCAAGAAGGACGTCGTCATCGACATGCTGTGCTACCGCCGCCGCG
GGCACAACGAGGGTGACGACCCGTCGATGACCAACCCCTACATGTACGACGTCGTCGACACCAAGC
GCGGGGCCCGCAAAAGCTACACCGAAGCCCTGATCGGACGTGGCGACATCTCGATGAAGGAGGCC
GAGGACGCGCTGCGCGACTACCAGGGCCAGCTGGAACGGGTGTTCAACGAAGTGCGCGAGCTGGA
GAAGCACGGTGTGCAGCCGAGCGAGTCGGTCGAGTCCGACCAGATGATTCCCGCGGGGCTGGCCA
CTGCGGTGGACAAGTCGCTGCTGGCCCGGATCGGCGATGCGTTCCTCGCCTTGCCGAACGGCTTCAC
CGCGCACCCGCGAGTCCAACCGGTGCTGGAGAAGCGCCGGGAGATGGCCTATGAAGGCAAGATCG
ACTGGGCCTTTGGCGAGCTGCTGGCGCTGGGCTCGCTGGTGGCCGAAGGCAAGCTGGTGCGCTTGT
CGGGGCAGGACAGCCGCCGCGGCACCTTCTCCCAGCGGCATTCGGTTCTCATCGACCGCCACACTG
GCGAGGAGTTCACACCACTGCAGCTGCTGGCGACCAACTCCGACGGCAGCCCGACCGGCGGAAAGT
TCCTGGTCTACGACTCGCCACTGTCGGAGTACGCCGCCGTCGGCTTCGAGTACGGCTACACTGTGGG
CAATCCGGACGCCGTGGTGCTCTGGGAGGCGCAGTTCGGCGACTTCGTCAACGGCGCACAGTCGAT
CATCGACGAGTTCATCAGCTCCGGTGAGGCCAAGTGGGGCCAATTGTCCAACGTCGTGCTGCTGTTA

图15

CCGCACGGGCACGAGGGGCAGGGACCCGACCACACTTCTGCCCGGATCGAACGCTTCTTGCAGTTG
TGGGCGGAAGGTTCGATGACCATCGCGATGCCGTCGACTCCGTCGAACTACTTCCACCTGCTACGCC
GGCATGCCCTGGACGGCATCCAACGCCCGCTGATCGTGTTCACGCCCAAGTCGATGTTGCGTCACAA
GGCCGCCGTCAGCGAAATCAAGGACTTCACCGAGATCAAGTTCCGCTCAGTGCTGGAGGAACCCAC
CTATGAGGACGGCATCGGAGACCGCAACAAGGTCAGCCGGATCCTGCTGACCAGTGGCAAGCTGTA
TTACGAGCTGGCCGCCCGCAAGGCCAAGGACAACCGCAATGACCTCGCGATCGTGCGGCTTGAACA
GCTCGCCCCGCTGCCCAGGCGTCGACTGCGTGAAACGCTGGACCGCTACGAGAACGTCAAGGAGTT
CTTCTGGGTCCAAGAGGAACCGGCCAACCAGGGTGCGTGGCCGCGATTCGGGCTCGAACTACCCGA
GCTGCTGCCTGACAAGTTGGCCGGGATCAAGCGAATCTCGCGCCGGGCGATGTCAGCCCCGTCGTC
AGGCTCGTCGAAGGTGCACGCCGTCGAACAGCAGGAGATCCTCGACGAGGCGTTCGGCTAA

B.

MANISSPFGQNEWLVEEMYRKFRDDPSSVDPSWHEFLVDYSPEPTSQPAAEPTRVTSPLVAERAAAAA
PQAPPKPADTAAAGNGVVAALAAKTAVPPPAEGDEVAVLRGAAAAVVKNMSASLEVPTATSVRAVPA
KLLIDNRIVINNQLKRTRGGKISFTHLLGYALVQAVKKFPNMNRHYTEVDGKPTAVTPAHTNLGLAIDLQ
GKDGKRSLVVAGIKRCETMRFAQFVTAYEDIVRRARDGKLTTEDFAGVTISLTNPGTIGTVHSVPRLMPG
QGAIIGVGAMEYPAEFQGASEERIAELGIGKLITLTSTYDHRIIQGAESGDFLRTIHELLLSDGFWDEVFREL
SIPYLPVRWSTDNPDSIVDKNARVMNLIAAYRNRGHLMADTDPLRLDKARFRSHPDLEVLTHGLTLWDL
DRVFKVDGFAGAQYKKLRDVLGLLRDAYCRHIGVEYAHILDPEQKEWLEQRVETKHVKPTVAQQKYILSK
LNAAEAFETFLQTKYVGQKRFSLEGAESVIPMMDAAIDQCAEHGLDEVVIGMPHRGRLNVLANIVGKPY
SQIFTEFEGNLNPSQAHGSGDVKYHLGATGLYLQMFGDNDIQVSLTANPSHLEAVDPVLEGLVRAKQDL
LDHGSIDSDGQRAFSVVPLMLHGDAAFAGQGVVAETLNLANLPGYRVGGTIHIIVNNQIGFTTAPEYSRS
SEYCTDVAKMIGAPIFHVNGDDPEACVWVARLAVDFRQRFKKDVVIDMLCYRRRGHNEGDDPSMTNP
YMYDVVDTKRGARKSYTEALIGRGDISMKEAEDALRDYQGQLERVFNEVRELEKHGVQPSESVESDQMI
PAGLATAVDKSLLARIGDAFLALPNGFTAHPRVQPVLEKRREMAYEGKIDWAFGELLALGSLVAEGKLVR
LSGQDSRRGTFSQRHSVLIDRHTGEEFTPLQLLATNSDGSPTGGKFLVYDSPLSEYAAVGFEYGYTVGNPD
AVVLWEAQFGDFVNGAQSIIDEFISSGEAKWGQLSNVVLLLPHGHEGQGPDHTSARIERFLQLWAEGS
MTIAMPSTPSNYFHLLRRHALDGIQRPLIVFTPKSMLRHKAAVSEIKDFTEIKFRSVLEEPTYEDGIGDRNK
VSRILLTSGKLYYELAARKAKDNRNDLAIVRLEQLAPLPRRRLRETLDRYENVKEFFWVQEEPANQGAWP
RFGLELPELLPDKLAGIKRISRRAMSAPSSGSSKVHAVEQQEILDEAFG

图15(续)

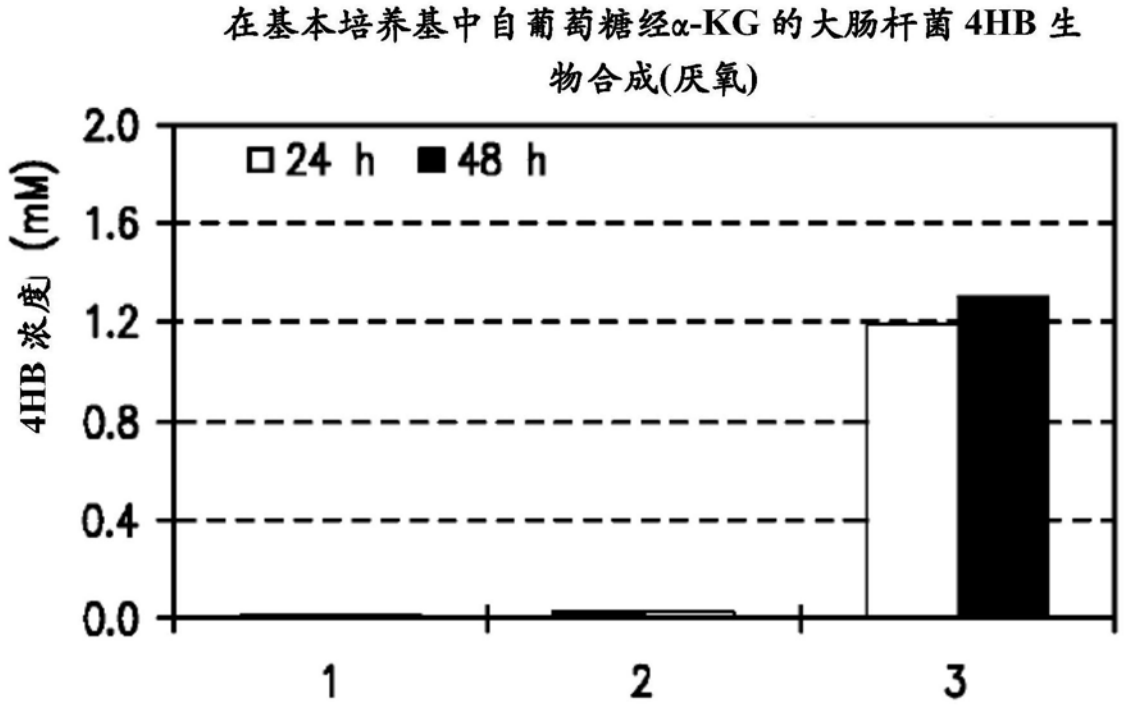

在基本培养基中自葡萄糖经α-KG 的大肠杆菌 4HB 生物合成(厌氧)
4HB 浓度 (mM)
24 h
48 h
2.0
1.6
1.2
0.8
0.4
0.0
1
2
3

图16

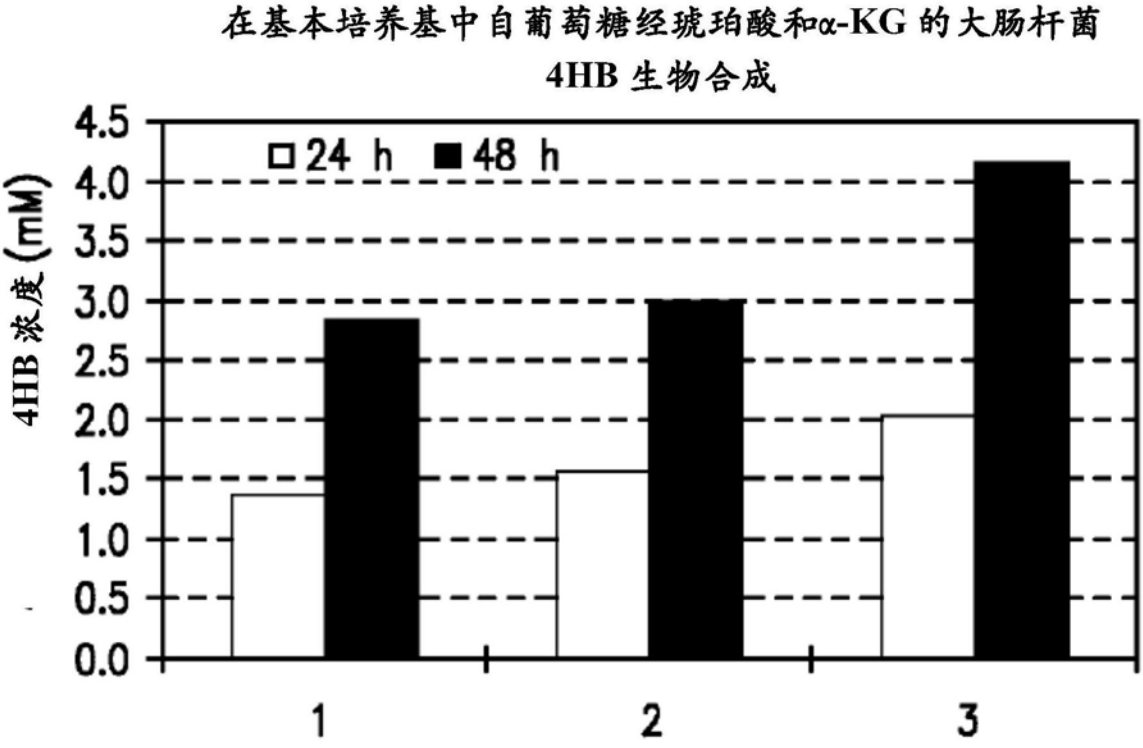

在基本培养基中自葡萄糖经琥珀酸和α-KG 的大肠杆菌 4HB 生物合成
4HB 浓度 (mM)
24 h
48 h
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
1
2
3

图17

A.

ATGGAAATCAAAGAAATGGTGAGCCTTGCACGCAAGGCTCAGAAGGAGTATCAAGCTACCCATAAC
CAAGAAGCAGTTGACAACATTTGCCGAGCTGCAGCAAAAGTTATTTATGAAAATGCAGCTATTCTGG
CTCGCGAAGCAGTAGACGAAACCGGCATGGGCGTTTACGAACACAAAGTGGCCAAGAATCAAGGC
AAATCCAAAGGTGTTTGGTACAACCTCCACAATAAAAAATCGATTGGTATCCTCAATATAGACGAGC
GTACCGGTATGATCGAGATTGCAAAGCCTATCGGAGTTGTAGGAGCCGTAACGCCGACGACCAACC
CGATCGTTACTCCGATGAGCAATATCATCTTTGCTCTTAAGACCTGCAATGCCATCATTATTGCCCCCC
ACCCCAGATCCAAAAAATGCTCTGCACACGCAGTTCGTCTGATCAAAGAAGCTATCGCTCCGTTCAA
CGTACCGGAAGGTATGGTTCAGATCATCGAAGAACCCAGCATCGAGAAGACGCAGGAACTCATGG
GCGCCGTAGACGTAGTAGTTGCTACGGGTGGTATGGGCATGGTGAAGTCTGCATATTCTTCAGGAA
AGCCTTCTTTCGGTGTTGGAGCCGGTAACGTTCAGGTGATCGTGGATAGCAACATCGATTTCGAAGC
TGCTGCAGAAAAAATCATCACCGGTCGTGCTTTCGACAACGGTATCATCTGCTCAGGCGAACAGAGC
ATCATCTACAACGAGGCTGACAAGGAAGCAGTTTTCACAGCATTCCGCAACCACGGTGCATATTTCT
GTGACGAAGCCGAAGGAGATCGGGCTCGTGCAGCTATCTTCGAAAATGGAGCCATCGCGAAAGAT
GTAGTAGGTCAGAGCGTTGCCTTCATTGCCAAGAAAGCAAACATCAATATCCCCGAGGGTACCCGTA
TTCTCGTTGTTGAAGCTCGCGGCGTAGGAGCAGAAGACGTTATCTGTAAGGAAAAGATGTGTCCCG
TAATGTGCGCCCTCAGCTACAAGCACTTCGAAGAAGGTGTAGAAATCGCACGTACGAACCTCGCCAA
CGAAGGTAACGGCCACACCTGTGCTATCCACTCCAACAATCAGGCACACATCATCCTCGCAGGATCA
GAGCTGACGGTATCTCGTATCGTAGTGAATGCTCCGAGTGCCACTACAGCAGGCGGTCACATCCAAA
ACGGTCTTGCCGTAACCAATACGCTCGGATGCGGATCATGGGGTAATAACTCTATCTCCGAGAACTT
CACTTACAAGCACCTCCTCAACATTTCACGCATCGCACCGTTGAATTCAAGCATTCACATCCCCGATG
ACAAAGAAATCTGGGAACTCTAA

B.

MEIKEMVSLARKAQKEYQATHNQEAVDNICRAAAKVIYENAAILAREAVDETGMGVYEHKVAKNQGKS
KGVWYNLHNKKSIGILNIDERTGMIEIAKPIGVVGAVTPTTNPIVTPMSNIIFALKTCNAIIIAPHPRSKKCS
AHAVRLIKEAIAPFNVPEGMVQIIEEPSIEKTQELMGAVDVVVATGGMGMVKSAYSSGKPSFGVGAGN
VQVIVDSNIDFEAAAEKIITGRAFDNGIICSGEQSIIYNEADKEAVFTAFRNHGAYFCDEAEGDRARAAIFE
NGAIAKDVVGQSVAFIAKKANINIPEGTRILVVEARGVGAEDVICKEKMCPVMCALSYKHFEEGVEIARTN
LANEGNGHTCAIHSNNQAHIILAGSELTVSRIVVNAPSATTAGGHIQNGLAVTNTLGCGSWGNNSISENF
TYKHLLNISRIAPLNSSIHIPDDKEIWEL

图18

A.

ATGCAACTTTTCAAACTCAAGAGTGTAACACATCACTTTGACACTTTTGCAGAATTTGCCAAGGAATT
CTGTCTTGGAGAACGCGACTTGGTAATTACCAACGAGTTCATCTATGAACCGTATATGAAGGCATGC
CAGCTCCCCTGCCATTTTGTTATGCAGGAGAAATATGGGCAAGGCGAGCCTTCTGACGAAATGATGA
ATAACATCTTGGCAGACATCCGTAATATCCAGTTCGACCGCGTAATCGGTATCGGAGGAGGTACGGT
TATTGACATCTCTAAACTTTTCGTTCTGAAAGGATTAAATGATGTACTCGATGCATTCGACCGCAAAA
TACCTCTTATCAAAGAGAAAGAACTGATCATTGTGCCCACAACATGCGGAACGGGTAGCGAGGTGA
CGAACATTTCTATCGCAGAAATCAAAAGCCGTCACACCAAAATGGGATTGGCTGACGATGCCATTGT
TGCAGACCATGCCATCATCATACCTGAACTTCTGAAGAGCTTGCCTTTCCACTTCTACGCATGCAGTG
CAATCGATGCTCTTATCCATGCCATCGAGTCATACGTATCTCCTAAAGCCAGTCCATATTCTCGTCTGT
TCAGTGAGGCGGCTTGGGACATTATCCTGGAAGTATTCAAGAAAATCGCCGAACACGGCCCTGAAT
ACCGCTTCGAAAAGCTGGGAGAAATGATCATGGCCAGCAACTATGCCGGTATAGCCTTCGGAAATG
CAGGAGTAGGAGCCGTCCACGCACTATCCTACCCGTTGGGAGGCAACTATCACGTGCCGCATGGAG
AAGCAAACTATCAGTTCTTCACAGAGGTATTCAAAGTATACCAAAAGAAGAATCCTTTCGGCTATAT
AGTCGAACTCAACTGGAAGCTCTCCAAGATACTGAACTGCCAGCCCGAATACGTATATCCGAAGCTG
GATGAACTTCTCGGATGCCTTCTTACCAAGAAACCTTTGCACGAATACGGCATGAAGGACGAAGAG
GTAAGAGGCTTTGCGGAATCAGTGCTTAAGACACAGCAAAGATTGCTCGCCAACAACTACGTAGAG
CTTACTGTAGATGAGATCGAAGGTATCTACAGAAGACTCTACTAA

B.

MQLFKLKSVTHHFDTFAEFAKEFCLGERDLVITNEFIYEPYMKACQLPCHFVMQEKYGQGEPSDEMMN
NILADIRNIQFDRVIGIGGGTVIDISKLFVLKGLNDVLDAFDRKIPLIKEKELIIVPTTCGTGSEVTNISIAEIKSR
HTKMGLADDAIVADHAIIIPELLKSLPFHFYACSAIDALIHAIESYVSPKASPYSRLFSEAAWDIILEVFKKIAE
HGPEYRFEKLGEMIMASNYAGIAFGNAGVGAVHALSYPLGGNYHVPHGEANYQFFTEVFKVYQKKNPF
GYIVELNWKLSKILNCQPEYVYPKLDELLGCLLTKKPLHEYGMKDEEVRGFAESVLKTQQRLLANNYVELT
VDEIEGIYRRLY

图19

A.

ATGAAAGACGTATTAGCGGAATATGCCTCCCGAATTGTTTCGGCCGAAGAAGCCGTAAAACATATCA
AAAATGGAGAACGGGTAGCTTTGTCACATGCTGCCGGAGTTCCTCAGAGTTGTGTTGATGCACTGGT
ACAACAGGCCGACCTTTTCCAGAATGTCGAAATTTATCACATGCTTTGTCTCGGCGAAGGAAAATAT
ATGGCACCTGAAATGGCCCCTCACTTCCGACACATAACCAATTTTGTAGGTGGTAATTCTCGTAAAGC
AGTTGAGGAAAATAGAGCCGACTTCATTCCGGTATTCTTTTATGAAGTGCCATCAATGATTCGCAAA
GACATCCTTCACATAGATGTCGCCATCGTTCAGCTTTCAATGCCTGATGAGAATGGTTACTGTAGTTT
TGGAGTATCTTGCGATTATAGCAAACCGGCAGCAGAAAGCGCTCATTTAGTTATAGGGGAAATCAA
CCGTCAAATGCCATATGTACATGGCGACAACTTGATTCACATATCGAAGTTGGATTACATCGTGATG
GCAGACTACCCTATCTATTCTCTTGCAAAGCCCAAAATCGGAGAAGTAGAAGAAGCTATCGGGCGTA
ATTGTGCCGAGCTTATTGAAGATGGTGCCACACTCCAACTCGGTATCGGCGCGATTCCTGATGCAGC
CCTGTTATTCCTCAAGGACAAAAAAGATCTGGGGATCCATACCGAGATGTTCTCCGATGGTGTTGTC
GAATTAGTTCGCAGTGGAGTAATTACAGGAAAGAAAAAGACACTTCACCCCGGAAAGATGGTCGCA
ACCTTCTTAATGGGAAGCGAAGACGTATATCATTTCATCGACAAAAATCCCGATGTAGAACTTTATCC
GGTAGATTACGTCAATGATCCGCGAGTAATCGCTCAAAATGATAATATGGTCAGCATCAATAGCTGT
ATCGAAATCGATCTTATGGGACAAGTCGTGTCCGAATGTATAGGAAGCAAGCAATTCAGCGGAACC
GGCGGTCAAGTAGATTATGTTCGTGGAGCAGCATGGTCTAAAAACGGCAAAAGCATCATGGCAATT
CCCTCAACAGCCAAAAACGGTACTGCATCTCGAATTGTACCTATAATTGCAGAGGGAGCTGCTGTAA
CAACCCTCCGCAACGAAGTCGATTACGTTGTAACCGAATACGGTATAGCACAACTCAAAGGAAAGA
GTTTGCGCCAGCGAGCAGAAGCTCTTATTGCCATAGCCCACCCGGATTTCAGAGAGGAACTAACGA
AACATCTCCGCAAACGTTTCGGATAA

B.

MKDVLAEYASRIVSAEEAVKHIKNGERVALSHAAGVPQSCVDALVQQADLFQNVEIYHMLCLGEGKYM
APEMAPHFRHITNFVGGNSRKAVEENRADFIPVFFYEVPSMIRKDILHIDVAIVQLSMPDENGYCSFGVS
CDYSKPAAESAHLVIGEINRQMPYVHGDNLIHISKLDYIVMADYPIYSLAKPKIGEVEEAIGRNCAELIEDG
ATLQLGIGAIPDAALLFLKDKKDLGIHTEMFSDGVVELVRSGVITGKKKTLHPGKMVATFLMGSEDVYHFI
DKNPDVELYPVDYVNDPRVIAQNDNMVSINSCIEIDLMGQVVSECIGSKQFSGTGGQVDYVRGAAWSK
NGKSIMAIPSTAKNGTASRIVPIIAEGAAVTTLRNEVDYVVTEYGIAQLKGKSLRQRAEALIAIAHPDFREEL
TKHLRKRFG

图20

A.

ATGATTAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTTGCTGTAGCACAAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTAAGAGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCAGATGCTATTCTTGTTGGAGACCATGACGAAATCGTGTCAATCGCGCTTAAAATAGGA
ATGGATGTAAATGATTTTGAAATAGTAAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCTTTAAAGGC
AGTAGAGCTTGTATCAACTGGAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTTGTAAATACAGCAA
CTTTCTTAAGATCTGTATTAAACAAAGAAGTTGGACTTAGAACAGGAAAAACTATGTCTCAC
GTTGCAGTATTTGAAACTGAGAAATTTGATAGACTATTATTTTTAACAGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAAGGAAAAAATTGATATAGTAAACAATTCAGTTAAGGTTGCACATG
CAATAGGAATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATAAACCCTAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACAGAGGACAAATTAAAGG
TTGTGTAGTTGACGGACCTTTAGCACTTGATATAGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
AGGGAGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATAGAAACA
GGAAATGTAATGTATAAGACTTTAACATATACAACTGATTCAAAAAATGGAGGAATCTTAGT
TGGAACTTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCAAGAGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAACT
CTATAGCACTTGCAGCTTTAGTTGCAGGCAATAAATAA

B.

MIKSFNEIIMKVKSKEMKKVAVAVAQDEPVLEAVRDAKKNGIADAILVGDHDEIVSIALKIG
MDVNDFEIVNEPNVKKAALKAVELVSTGKADMVMKGLVNTATFLRSVLNKEVGLRTGKTMSH
VAVFETEKFDRLLFLTDVAFNTYPELKEKIDIVNNSVKVAHAIGIENPKVAPICAVEVINPK
MPSTLDAAMLSKMSDRGQIKGCVVDGPLALDIALSEEAAHHKGVTGEVAGKADIFLMPNIET
GNVMYKTLTYTTDSKNGGILVGTSAPVVLTSRADSHETKMNSIALAALVAGNK

图21

A.

ATGTATAGATTACTAATAATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGA
TGAAAAAGAGATATTTGAGAAGACTTTAAGACATTCAGCTGAAGAGATAGAAAAATATAACA
CTATATTTGATCAATTTCAATTCAGAAAGAATGTAATTTTAGATGCGTTAAAAGAAGCAAAC
ATAGAAGTAAGTTCTTTAAATGCTGTAGTTGGAAGAGGCGGACTCTTAAAGCCAATAGTAAG
TGGAACTTATGCAGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTAGGAGTTCAAGGTCAGC
ATGCGTCAAATCTTGGTGGAATTATTGCAAATGAAATAGCAAAAGAAATAAATGTTCCAGCA
TACATAGTTGATCCAGTTGTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTTCAAGAATATCAGGAATGGC
TGACATTCCAAGAAAAAGTATATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTAGAAGATATG
CAAAAGAAGTTGGAAAAAAATACGAAGATCTTAATTTAATCGTAGTCCACATGGGTGGAGGT
ACTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGTAGAGTAATAGAAGTTAATAATACACTTGATGGAGA
AGGTCCATTCTCACCAGAAAGAAGTGGTGGAGTTCCAATAGGAGATCTTGTAAGATTGTGCT
TCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTAATGAAAAAGATAAACGGCAAAGGCGGAGTTGTT
AGTTACTTAAATACTATCGATTTTAAGGCTGTAGTTGATAAAGCTCTTGAAGGAGATAAGAA
ATGTGCACTTATATATGAAGCTTTCACATTCCAGGTAGCAAAAGAGATAGGAAAATGTTCAA
CCGTTTTAAAAGGAAATGTAGATGCAATAATCTTAACAGGCGGAATTGCGTACAACGAGCAT
GTATGTAATGCCATAGAGGATAGAGTAAAATTCATAGCACCTGTAGTTAGATATGGTGGAGA
AGATGAACTTCTTGCACTTGCAGAAGGTGGACTTAGAGTTTTAAGAGGAGAAGAAAAAGCTA
AGGAATACAAATAA

B.

MYRLLIINPGSTSTKIGIYDDEKEIFEKTLRHSAEEIEKYNTIFDQFQFRKNVILDALKEAN
IEVSSLNAVVGRGGLLKPIVSGTYAVNQKMLEDLKVGVQGQHASNLGGIIANEIAKEINVPA
YIVDPVVVDELDEVSRISGMADIPRKSIFHALNQKAVARRYAKEVGKKYEDLNLIVVHMGGG
TSVGTHKDGRVIEVNNTLDGEGPFSPERSGGVPIGDLVRLCFSNKYTYEEVMKKINGKGGVV
SYLNTIDFKAVVDKALEGDKKCALIYEAFTFQVAKEIGKCSTVLKGNVDAIILTGGIAYNEH
VCNAIEDRVKFIAPVVRYGGEDELLALAEGGLRVLRGEEKAKEYK

图22

A.

ATGATTAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTTGCTGTAGCACAAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCAGATGCTATTCTTGTTGGCGACCATGACGAAATCGTGTCAATCGCGCTTAAAATAGGC
ATGGATGTAAATGATTTTGAAATAGTAAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCTTTAAAGGC
AGTAGAGCTGGTATCAACTGGAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTTGTAAATACAGCAA
CTTTCTTACGCTCTGTATTAAACAAAGAAGTTGGACTGAGAACAGGAAAAACTATGTCTCAC
GTTGCAGTATTTGAAACTGAGAAATTTGATCGTCTGTTATTTTTAACAGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAAGGAAAAAATTGATATCGTAAACAATTCAGTTAAGGTTGCACATG
CAATAGGTATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATAAACCCTAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACAGAGGACAAATTAAAGG
TTGTGTAGTTGACGGACCGTTAGCACTTGATATCGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
AGGGCGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATTGAAACA
GGAAATGTAATGTATAAGACTTTAACATATACAACTGATAGCAAAAATGGCGGAATCTTAGT
TGGAACTTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCACGCGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAACT
CTATTGCACTTGCAGCTTTAGTTGCAGGCAATAAATAA

B.

ATGATTAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTTGCTGTAGCACAAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCCGATGCTATTCTGGTTGGCGACCATGACGAAATCGTGTCTATCGCGCTGAAAATAGGC
ATGGATGTAAATGATTTTGAAATTGTTAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCGTTAAAGGC
AGTAGAGCTGGTATCAACTGGAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTGGTAAATACCGCAA
CTTTCTTACGCTCTGTATTAAACAAAGAAGTTGGTCTGCGTACAGGAAAAACCATGTCTCAC
GTTGCAGTATTTGAAACTGAGAAATTTGATCGTCTGTTATTTTTAACAGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAAGGAAAAAATTGATATCGTTAACAATAGCGTTAAGGTTGCACATG
CCATTGGTATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATTAACCCGAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACCGCGGACAAATTAAAGG
TTGTGTAGTTGACGGACCGCTGGCACTTGATATCGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
AAGGCGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATTGAAACA
GGAAATGTAATGTATAAGACGTTAACCTATACCACTGATAGCAAAAATGGCGGCATCCTGGT
TGGAACTTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCACGCGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAACT
CTATTGCACTGGCAGCGCTGGTTGCAGGCAATAAATAA

图23

C.

ATGATTAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTTGCTGTTGCACAAGACGAGCCGGTACTGGAAGCGGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCCGATGCTATTCTGGTTGGCGACCATGACGAAATCGTCTCTATCGCGCTGAAAATTGGC
ATGGATGTTAATGATTTTGAAATTGTTAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCGCTGAAGGC
GGTAGAGCTGGTTTCCACCGGAAAAGCTGATATGGTAATGAAAGGGCTGGTGAATACCGCAA
CTTTCTTACGCAGCGTACTGAACAAAGAAGTTGGTCTGCGTACCGGAAAAACCATGAGTCAC
GTTGCGGTATTTGAAACTGAGAAATTTGATCGTCTGCTGTTTCTGACCGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAAAGAAAAAATTGATATCGTTAACAATAGCGTTAAGGTTGCGCATG
CCATTGGTATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATTAACCCGAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCCGCAATGCTTAGCAAAATGAGTGACCGCGGACAAATTAAAGG
TTGTGTGGTTGACGGCCCGCTGGCACTGGATATCGCGTTAAGCGAAGAAGCGGCACATCATA
AAGGCGTAACCGGCGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCCTGATGCCAAACATTGAAACA
GGCAATGTAATGTATAAAACGTTAACCTATACCACTGATAGCAAAAATGGCGGCATCCTGGT
TGGAACTTCTGCACCAGTTGTTTTAACCTCACGCGCTGACAGCCATGAAACCAAAATGAACA
GCATTGCACTGGCAGCGCTGGTTGCAGGCAATAAATAA

D.

ATGATTAAAAGTTTTAACGAAATTATCATGAAAGTGAAAAGCAAAGAGATGAAAAAAGTGGC
GGTTGCGGTTGCGCAGGATGAACCGGTGCTGGAAGCGGTGCGCGATGCCAAAAAAAACGGTA
TTGCCGATGCCATTCTGGTGGGCGATCACGATGAAATTGTCTCTATTGCGCTGAAAATTGGC
ATGGATGTTAACGATTTTGAAATTGTTAATGAACCGAACGTGAAAAAAGCGGCGCTGAAAGC
GGTTGAACTGGTTTCCACCGGTAAAGCCGATATGGTGATGAAAGGGCTGGTGAATACCGCAA
CCTTCCTGCGCAGCGTGCTGAATAAAGAAGTGGGTCTGCGTACCGGTAAAACCATGAGTCAT
GTTGCGGTGTTTGAAACCGAAAAATTTGACCGTCTGCTGTTTCTGACCGATGTTGCGTTTAA
TACCTATCCGGAACTGAAAGAGAAAATTGATATCGTTAATAACAGCGTGAAAGTGGCGCATG
CCATTGGTATTGAAAACCCGAAAGTGGCGCCGATTTGCGCGGTTGAAGTGATTAACCCGAAA
ATGCCGTCAACGCTGGATGCCGCGATGCTCAGCAAAATGAGCGATCGCGGTCAAATCAAAGG
CTGTGTGGTTGATGGCCCGCTGGCGCTGGATATCGCGCTTAGCGAAGAAGCGGCGCATCATA
AAGGCGTGACCGGCGAAGTGGCCGGTAAAGCCGATATTTTCCTGATGCCGAATATTGAAACC
GGCAACGTGATGTATAAAACGCTGACCTATACCACCGACAGCAAAAACGGCGGCATTCTGGT
GGGTACCAGCGCGCCGGTGGTGCTGACCTCGCGCGCCGACAGCCATGAAACCAAAATGAACA
GCATTGCGCTGGCGGCGCTGGTGGCCGGTAATAAATAA

图23(续)

A.

ATGTATCGTTTACTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGATGA
AAAAGAGATATTTGAGAAGACTTTACGTCATTCAGCTGAAGAGATAGAAAAATATAACACTATAT
TTGATCAATTTCAGTTCAGAAAGAATGTAATTCTCGATGCGTTAAAAGAAGCAAACATTGAAGTA
AGTTCTTTAAATGCTGTAGTTGGACGCGGCGGACTGTTAAAGCCAATAGTAAGTGGAACTTATGC
AGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTAGGCGTTCAAGGTCAGCATGCGTCAAATCTTG
GTGGAATTATTGCAAATGAAATAGCAAAAGAAATAAATGTTCCAGCATACATCGTTGATCCAGTT
GTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTTCACGTATATCAGGAATGGCTGACATTCCACGTAAAAGTAT
ATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTAGACGCTATGCAAAAGAAGTTGGAAAAAAATACG
AAGATCTTAATTTAATCGTGGTCCACATGGGTGGCGGTACTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGT
AGAGTAATTGAAGTTAATAATACACTTGATGGAGAAGGTCCATTCTCACCAGAAAGAAGTGGTGG
CGTTCCAATAGGCGATCTTGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTAATGA
AAAAGATAAACGGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACTTAAATACTATCGATTTTAAGGCTGTAGTT
GATAAAGCTCTTGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTTATATATGAAGCTTTCACATTCCAGGTAGC
AAAAGAGATAGGAAAATGTTCAACCGTTTTAAAAGGAAATGTAGATGCAATAATCTTAACAGGCG
GAATTGCGTACAACGAGCATGTATGTAATGCCATAGAGGATAGAGTAAAATTCATTGCACCTGTA
GTTCGTTATGGTGGAGAAGATGAACTTCTTGCACTTGCAGAAGGTGGACTGCGCGTTTTACGCGG
AGAAGAAAAAGCTAAGGAATACAAATAA

B.

ATGTATCGTTTACTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGATGA
AAAAGAGATATTTGAGAAGACGTTACGTCATTCAGCTGAAGAGATTGAAAAATATAACACTATAT
TTGATCAATTTCAGTTCCGCAAGAATGTGATTCTCGATGCGTTAAAAGAAGCAAACATTGAAGTC
AGTTCTTTAAATGCTGTAGTTGGACGCGGCGGACTGTTAAAGCCAATTGTCAGTGGAACTTATGC
AGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTGGGCGTTCAAGGTCAGCATGCCAGCAATCTTG
GTGGCATTATTGCCAATGAAATCGCAAAAGAAATCAATGTTCCAGCATACATCGTTGATCCGGTT
GTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTAGCCGTATAAGCGGAATGGCTGACATTCCACGTAAAAGTAT
ATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTCGTCGCTATGCAAAAGAAGTTGGTAAAAAATACG
AAGATCTTAATTTAATCGTGGTCCACATGGGTGGCGGTACTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGT
CGCGTGATTGAAGTTAATAATACACTTGATGGCGAAGGTCCATTCTCACCAGAACGTAGTGGTGG
CGTTCCAATTGGCGATCTGGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTGATGA
AAAAGATAAACGGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACCTGAATACTATCGATTTTAAGGCTGTAGTT
GATAAAGCGCTTGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTGATTTATGAAGCTTTCACCTTCCAGGTAGC
AAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTTTTAAAAGGAAATGTTGATGCCATTATCTTAACAGGCG
GCATTGCTTACAACGAGCATGTATGTAATGCCATTGAGGATCGCGTAAAATTCATTGCACCTGTA
GTTCGTTATGGTGGCGAAGATGAACTGCTGGCACTGGCAGAAGGTGGACTGCGCGTTTTACGCGG
CGAAGAAAAAGCGAAGGAATACAAATAA

图24

C.

ATGTATCGTCTGCTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGATGA
AAAAGAGATATTTGAGAAAACGTTACGTCATAGCGCTGAAGAGATTGAAAAATATAACACTATTT
TTGATCAATTTCAGTTCCGCAAGAATGTGATTCTCGATGCGCTGAAAGAAGCAAACATTGAAGTC
AGTTCGCTGAATGCGGTAGTTGGTCGCGGCGGTCTGCTGAAGCCAATTGTCAGCGGCACTTATGC
GGTAAATCAAAAAATGCTGGAAGACCTGAAAGTGGGCGTTCAGGGGCAGCATGCCAGCAATCTTG
GTGGCATTATTGCCAATGAAATCGCCAAAGAAATCAATGTTCCGGCATACATCGTTGATCCGGTT
GTTGTGGATGAGCTGGATGAAGTTAGCCGTATCAGCGGAATGGCTGACATTCCACGTAAAAGTAT
TTTCCATGCACTGAATCAAAAAGCGGTTGCGCGTCGCTATGCAAAAGAAGTTGGTAAAAAATACG
AAGATCTTAATCTGATCGTGGTGCATATGGGTGGCGGTACTAGCGTCGGTACTCATAAAGATGGT
CGCGTGATTGAAGTTAATAATACACTTGATGGCGAAGGTCCATTCTCACCAGAACGTAGCGGTGG
CGTTCCAATTGGCGATCTGGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACCTATGAAGAAGTGATGA
AAAAGATAAACGGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACCTGAATACTATCGATTTTAAGGCGGTAGTT
GATAAAGCGCTGGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTGATTTATGAAGCGTTCACCTTCCAGGTGGC
AAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTTCTGAAAGGCAATGTTGATGCCATTATCCTGACCGGCG
GCATTGCTTACAACGAGCATGTTTGTAATGCCATTGAGGATCGCGTAAAATTCATTGCACCTGTG
GTTCGTTATGGTGGCGAAGATGAACTGCTGGCACTGGCAGAAGGTGGTCTGCGCGTTTTACGCGG
CGAAGAAAAAGCGAAAGAATACAAATAA

D.

ATGTATCGTCTGCTGATTATCAACCCGGGCAGCACCTCAACCAAAATTGGTATTTACGACGATGA
AAAAGAGATTTTTGAAAAAACGCTGCGTCACAGCGCAGAAGAGATTGAAAAATACAACACCATTT
TCGATCAGTTCCAGTTCCGCAAAAACGTGATTCTCGATGCGCTGAAAGAAGCCAATATTGAAGTC
TCCTCGCTGAATGCGGTGGTCGGTCGCGGCGGTCTGCTGAAACCGATTGTCAGCGGCACTTATGC
GGTTAATCAGAAAATGCTGGAAGATCTGAAAGTGGGCGTGCAGGGGCAGCATGCCAGCAATCTCG
GCGGCATTATCGCCAATGAAATCGCCAAAGAGATCAACGTGCCGGCTTATATCGTCGATCCGGTG
GTGGTTGATGAACTGGATGAAGTCAGCCGTATCAGCGGCATGGCGGATATTCCGCGTAAAAGCAT
TTTCCATGCGCTGAATCAGAAAGCGGTTGCGCGTCGCTATGCCAAAGAAGTGGGTAAAAAATATG
AAGATCTCAATCTGATTGTGGTGCATATGGGCGGCGGCACCAGCGTCGGTACGCATAAAGATGGT
CGCGTGATTGAAGTGAATAACACGCTGGATGGCGAAGGGCCGTTCTCGCCGGAACGTAGCGGCGG
CGTGCCGATTGGCGATCTGGTGCGTCTGTGTTTCAGCAATAAATACACCTACGAAGAAGTGATGA
AAAAAATCAACGGCAAAGGCGGCGTGGTTAGCTATCTGAATACCATCGATTTTAAAGCGGTGGTT
GATAAAGCGCTGGAAGGCGATAAAAAATGCGCGCTGATTTATGAAGCGTTTACCTTCCAGGTGGC
GAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTGCTGAAAGGCAACGTTGATGCCATTATTCTGACCGGCG
GCATTGCTTATAACGAACATGTTTGTAATGCCATTGAAGATCGCGTGAAATTTATTGCGCCGGTG
GTGCGTTACGGCGGCGAAGATGAACTGCTGGCGCTGGCGGAAGGCGGTCTGCGCGTGCTGCGCGG
CGAAGAAAAAGCGAAAGAGTACAAATAA

图24(续)

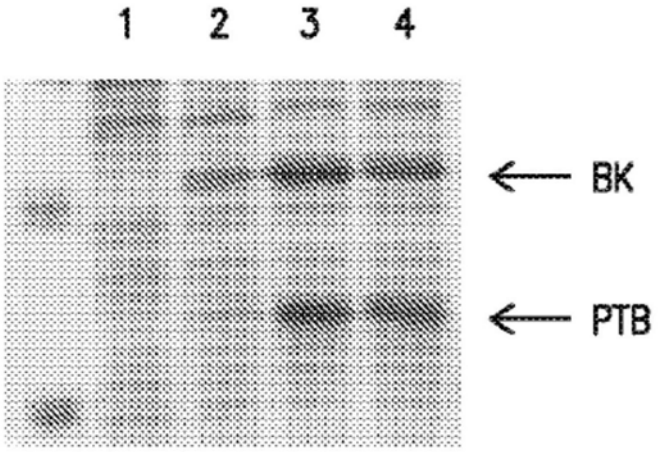

1
2
3
4
BK
PTB

图25A

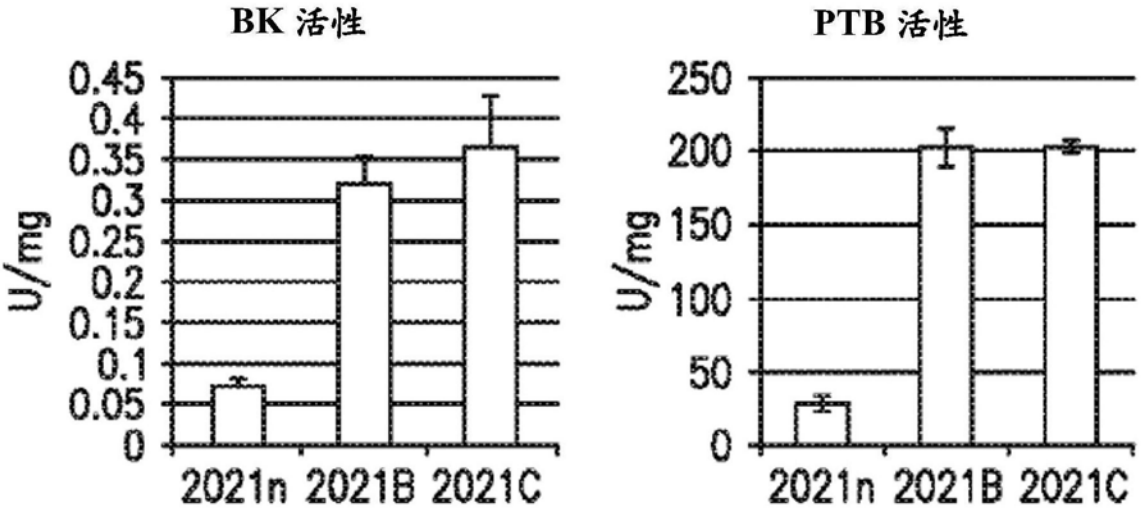

BK 活性
U/mg
0.45
0.4
0.35
0.3
0.25
0.2
0.15
0.1
0.05
0
2021n 2021B 2021C
PTB 活性
U/mg
250
200
150
100
50
0
2021n 2021B 2021C

图25B

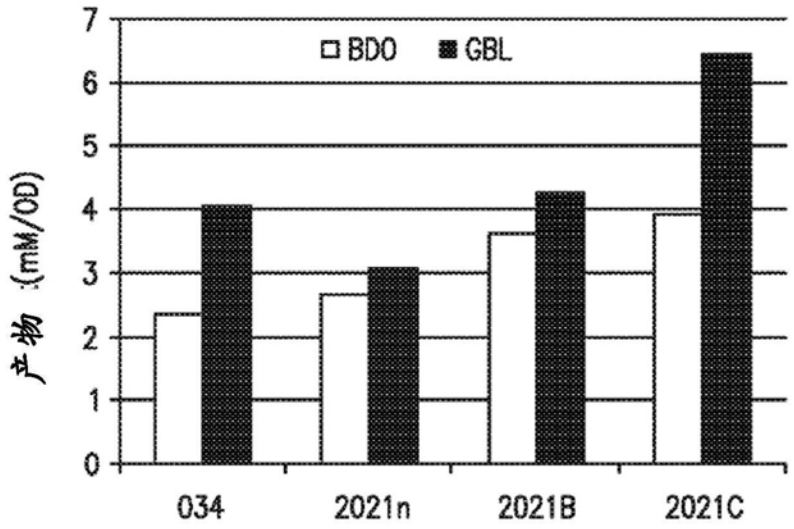


图26

A.

ATGAATAAAGACACACTAATACCTACAACTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAACAT
TAATTTAAAGAACTACAAGGATAATTCTTCATGTTTCGGAGTATTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
TAAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCCCTTCATTATACAAAAGAGCAAAGAGAAAAA
ATCATAACTGAGATAAGAAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTCTTGGCTACAATGATTCTAGA
AGAAACACATATGGGAAGATATGAGGATAAAATATTAAAACATGAATTGGTAGCTAAATATACTC
CTGGTACAGAAGATTTAACTACTACTGCTTGGTCAGGTGATAATGGTCTTACAGTTGTAGAAATG
TCTCCATATGGTGTTATAGGTGCAATAACTCCTTCTACGAATCCAACTGAAACTGTAATATGTAA
TAGCATAGGCATGATAGCTGCTGGAAATGCTGTAGTATTTAACGGACACCCATGCGCTAAAAAAT
GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATAAATAAGGCAATTATTTCATGTGGCGGTCCTGAAAATCTA
GTAACAACTATAAAAAATCCAACTATGGAGTCTCTAGATGCAATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
ACTTCTTTGCGGAACTGGGGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCTCTTAAATTCTGGTAAGAAAGCTA
TAGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTAGATGATACTGCTGATATAGAAAAGGCTGGT
AGGAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
TGTTTTTGAGAATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTAAAAAATAATGCTGTAATTATAA
ATGAAGATCAAGTATCAAAATTAATAGATTTAGTATTACAAAAAAATAATGAAACTCAAGAATAC
TTTATAAACAAAAAATGGGTAGGAAAAGATGCAAAATTATTCTTAGATGAAATAGATGTTGAGTC
TCCTTCAAATGTTAAATGCATAATCTGCGAAGTAAATGCAAATCATCCATTTGTTATGACAGAAC
TCATGATGCCAATATTGCCAATTGTAAGAGTTAAAGATATAGATGAAGCTATTAAATATGCAAAG
ATAGCAGAACAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATTCTAAAAATATAGACAACCTAAATAG
ATTTGAAAGAGAAATAGATACTACTATTTTTGTAAAGAATGCTAAATCTTTTGCTGGTGTTGGTT
ATGAAGCAGAAGGATTTACAACTTTCACTATTGCTGGATCTACTGGTGAGGGAATAACCTCTGCA
AGGAATTTTACAAGACAAAGAAGATGTGTACTTGCCGGCTAA

B.

MNKDTLIPTTKDLKVKTNGENINLKNYKDNSSCFGVFENVENAISSAVHAQKILSLHYTKEQREK
IITEIRKAALQNKEVLATMILEETHMGRYEDKILKHELVAKYTPGTEDLTTTAWSGDNGLTVVEM
SPYGVIGAITPSTNPTETVICNSIGMIAAGNAVVFNGHPCAKKCVAFAVEMINKAIISCGGPENL
VTTIKNPTMESLDAIIKHPSIKLLCGTGGPGMVKTLLNSGKKAIGAGAGNPPVIVDDTADIEKAG
RSIIEGCSFDNNLPCIAEKEVFVFENVADDLISNMLKNNAVIINEDQVSKLIDLVLQKNNETQEY
FINKKWVGKDAKLFLDEIDVESPSNVKCIICEVNANHPFVMTELMMPILPIVRVKDIDEAIKYAK
IAEQNRKHSAYIYSKNIDNLNRFEREIDTTIFVKNAKSFAGVGYEAEGFTTFTIAGSTGEGITSA
RNFTRQRRCVLAG

图27

A.

ATGAATAAAGACACACTAATACCTACAACTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAACAT
TAATTTAAAGAACTACAAGGATAATTCTTCATGTTTCGGCGTATTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
TAAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCCCTTCATTATACAAAAGAGCAACGTGAAAAA
ATCATAACTGAGATAAGAAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTCTTGGCTACAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAATATTAAAACATGAATTGGTAGCTAAATATACTC
CTGGTACAGAAGATTTAACTACTACTGCCTGGTCAGGTGATAATGGTCTGACAGTTGTAGAAATG
TCTCCATATGGTGTTATTGGTGCAATAACTCCTTCTACGAATCCAACTGAAACTGTAATATGTAA
TAGCATAGGCATGATTGCTGCTGGAAATGCTGTAGTATTTAACGGACACCCATGCGCTAAAAAAT
GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATAAATAAGGCAATTATTTCATGTGGCGGTCCTGAAAATCTG
GTAACAACTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCTCTGGATGCAATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
ACTTCTTTGCGGAACTGGGGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCTGTTAAATTCTGGTAAGAAAGCTA
TAGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTCGATGATACTGCTGATATAGAAAAGGCTGGT
CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
TGTTTTTGAGAATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTAAAAAATAATGCTGTAATTATAA
ATGAAGATCAAGTATCAAAATTAATCGATTTAGTATTACAAAAAAATAATGAAACTCAAGAATAC
TTTATAAACAAAAAATGGGTAGGAAAAGATGCAAAATTATTCCTCGATGAAATAGATGTTGAGTC
TCCTTCAAATGTTAAATGCATAATCTGCGAAGTAAATGCAAATCATCCATTTGTTATGACAGAAC
TGATGATGCCAATATTGCCAATTGTACGCGTTAAAGATATCGATGAAGCTATTAAATATGCAAAG
ATAGCAGAACAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATTCTAAAAATATCGACAACCTGAATCG
CTTTGAACGTGAAATAGATACTACTATTTTTGTAAAGAATGCTAAATCTTTTGCTGGTGTTGGTT
ATGAAGCAGAAGGATTTACAACTTTCACTATTGCTGGATCTACTGGTGAGGGAATAACCTCTGCA
CGTAATTTTACACGCCAACGTCGCTGTGTACTTGCCGGCTAA

B.

ATGAATAAAGACACACTGATCCCTACAACTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAACAT
TAATTTAAAGAACTACAAAGATAATAGCAGTTGTTTCGGCGTATTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
TCAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCGCTGCATTATACAAAAGAGCAACGTGAAAAA
ATCATCACTGAGATACGTAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTGCTGGCTACAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAATATTAAAACATGAACTGGTAGCTAAATATACTC
CTGGTACAGAAGATTTAACTACTACTGCCTGGAGCGGTGATAATGGTCTGACAGTTGTAGAAATG
TCTCCATATGGTGTTATTGGTGCAATAACTCCTTCTACCAATCCAACTGAAACTGTAATTTGTAA
TAGCATTGGCATGATTGCTGCTGGAAATGCTGTAGTATTTAACGGACACCCATGCGCTAAAAAAT
GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATCAATAAGGCAATTATTAGCTGTGGCGGTCCGGAAAATCTG
GTAACAACTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCTCTGGATGCCATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
ACTGCTTTGCGGAACTGGCGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCTGTTAAATTCTGGTAAGAAAGCTA
TTGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTCGATGATACTGCTGATATTGAAAAGGCTGGT
CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
TGTTTTTGAGAATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTGAAAAATAATGCTGTAATTATCA
ATGAAGATCAGGTATCAAAATTAATCGATTTAGTATTACAAAAAAATAATGAAACTCAAGAATAC
TTTATCAACAAAAAATGGGTAGGTAAAGATGCAAAATTATTCCTCGATGAAATCGATGTTGAGTC
TCCTTCAAATGTTAAATGCATTATCTGCGAAGTGAATGCCAATCATCC

图28

ATTTGTTATGACAGAACTGATGATGCCAATATTGCCAATTGTGCGCGTTAAAGATATCGATGAAG
CTATTAAATATGCAAAGATTGCAGAACAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATAGCAAAAAT
ATCGACAACCTGAATCGCTTTGAACGTGAAATCGATACTACTATTTTTGTAAAGAATGCTAAATC
TTTTGCTGGTGTTGGTTATGAAGCAGAAGGATTTACCACTTTCACTATTGCTGGATCTACTGGTG
AGGGCATAACCTCTGCACGTAATTTTACCCGCCAACGTCGCTGTGTACTGGCCGGCTAA

C.

ATGAATAAAGACACGCTGATCCCGACAACTAAAGATCTGAAAGTAAAAACCAATGGTGAAAACAT
TAATCTGAAGAACTACAAAGATAATAGCAGTTGTTTCGGCGTATTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
TCAGCAGCGCGGTACACGCACAAAAGATACTCTCGCTGCATTATACCAAAGAGCAACGTGAAAAA
ATCATCACTGAGATCCGTAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTGCTGGCAACAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAATACTGAAACATGAACTGGTGGCGAAATATACGC
CTGGTACTGAAGATTTAACCACCACTGCCTGGAGCGGTGATAATGGTCTGACCGTTGTGGAAATG
TCGCCTTATGGTGTTATTGGTGCAATTACGCCTTCAACCAATCCAACTGAAACGGTAATTTGTAA
TAGCATTGGCATGATTGCTGCTGGAAATGCGGTAGTATTTAACGGTCACCCCTGCGCTAAAAAAT
GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATCAATAAAGCGATTATTAGCTGTGGCGGTCCGGAAAATCTG
GTAACCACTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCGCTGGATGCCATTATTAAGCATCCTTCAATCAA
ACTGCTGTGCGGCACTGGCGGTCCAGGAATGGTGAAAACCCTGCTGAATAGCGGTAAGAAAGCGA
TTGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTCGATGATACTGCTGATATTGAAAAAGCGGGT
CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
TGTTTTTGAGAATGTTGCCGATGATCTGATCTCTAACATGCTGAAAAATAATGCGGTGATTATCA
ATGAAGATCAGGTTAGCAAACTGATCGATCTGGTATTACAAAAAAATAATGAAACTCAAGAATAC
TTTATCAACAAAAAATGGGTAGGTAAAGATGCAAAACTGTTCCTCGATGAAATCGATGTTGAGTC
GCCTTCAAATGTTAAATGCATTATCTGCGAAGTGAATGCCAATCATCCATTTGTGATGACCGAAC
TGATGATGCCAATTTTGCCGATTGTGCGCGTTAAAGATATCGATGAAGCGATTAAATATGCAAAG
ATTGCAGAACAAAATCGTAAACATAGTGCCTATATTTATAGCAAAAATATCGACAACCTGAATCG
CTTTGAACGTGAAATCGATACCACTATTTTTGTGAAGAATGCTAAATCTTTTGCTGGTGTTGGTT
ATGAAGCAGAAGGTTTTACCACTTTCACTATTGCTGGAAGCACCGGTGAAGGCATTACCTCTGCA
CGTAATTTTACCCGCCAACGTCGCTGTGTACTGGCCGGCTAA

D.

ATGAATAAAGATACGCTGATCCCGACCACCAAAGATCTGAAAGTGAAAACCAACGGCGAAAATAT
CAACCTGAAAAACTATAAAGATAACAGCAGTTGCTTTGGCGTGTTTGAAAACGTTGAAAACGCCA
TCTCCAGCGCGGTGCATGCGCAAAAAATTCTCTCGCTGCATTACACCAAAGAGCAGCGTGAAAAA
ATTATCACCGAAATCCGTAAAGCGGCGCTGCAAAACAAAGAAGTGCTGGCAACCATGATCCTGGA
AGAAACGCATATGGGGCGTTATGAAGATAAAATTCTGAAACATGAACTGGTGGCGAAATACACGC
CGGGCACTGAAGATCTGACCACCACCGCCTGGAGCGGCGATAACGGCCTGACCGTGGTGGAGATG
TCGCCTTATGGCGTGATTGGCGCGATTACGCCGTCAACCAACCCGACCGAAACGGTGATTTGTAA
CAGCATTGGCATGATTGCCGCGGGTAATGCGGTGGTGTTTAACGGTCATCCCTGCGCGAAAAAAT
GTGTGGCGTTTGCCGTTGAGATGATCAACAAAGCGATTATCAGCTGCGGCGGCCCGGAAAATCTG
GTGACCACCATCAAAAATCCGACCATGGAATCGCTGGATGCCATTATCAAACATCCTTCCATCAA
ACTGCTGTGCGGCACCGGCGGCCCGGGCATGGTGAAAACGCTGCTGAACAGCGGTAAAAAAGCGA
TTGGCGCGGGCGCGGGTAACCCGCCGGTGATTGTCGATGACACCGCCGATATT

图28(续)

GAAAAAGCGGGGCGTAGCATTATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAACAACCTGCCCTGCATTGCCGA
AAAAGAAGTGTTTGTCTTTGAAAACGTCGCCGATGATCTGATCAGCAATATGCTGAAAAACAACG
CGGTGATTATCAATGAAGATCAGGTTAGCAAACTGATCGATCTGGTGCTGCAAAAAAACAACGAA
ACGCAGGAATATTTTATCAACAAAAAATGGGTTGGTAAAGATGCCAAACTGTTTCTCGATGAAAT
CGATGTTGAATCGCCGTCTAACGTGAAATGTATTATCTGCGAAGTGAACGCCAACCATCCGTTTG
TGATGACCGAACTGATGATGCCGATTCTGCCGATTGTGCGCGTGAAAGATATCGATGAAGCGATT
AAATATGCCAAAATTGCCGAACAAAACCGTAAACACAGCGCCTATATTTACAGCAAAAATATCGA
TAACCTGAACCGCTTTGAACGTGAAATCGATACCACCATTTTTGTGAAAAATGCCAAAAGTTTTG
CCGGCGTTGGTTATGAAGCGGAAGGTTTTACCACCTTTACCATTGCCGGTAGCACCGGCGAAGGC
ATTACCAGCGCCCGTAATTTTACCCGCCAGCGTCGCTGCGTGCTGGCGGGCTAA

图28(续)

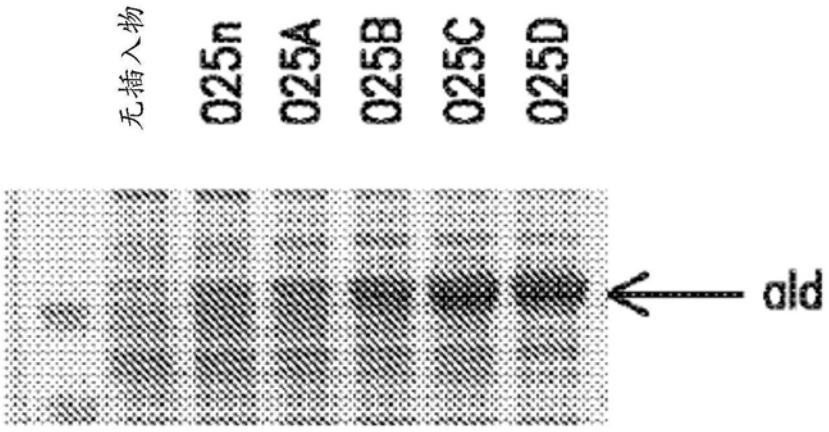


图29

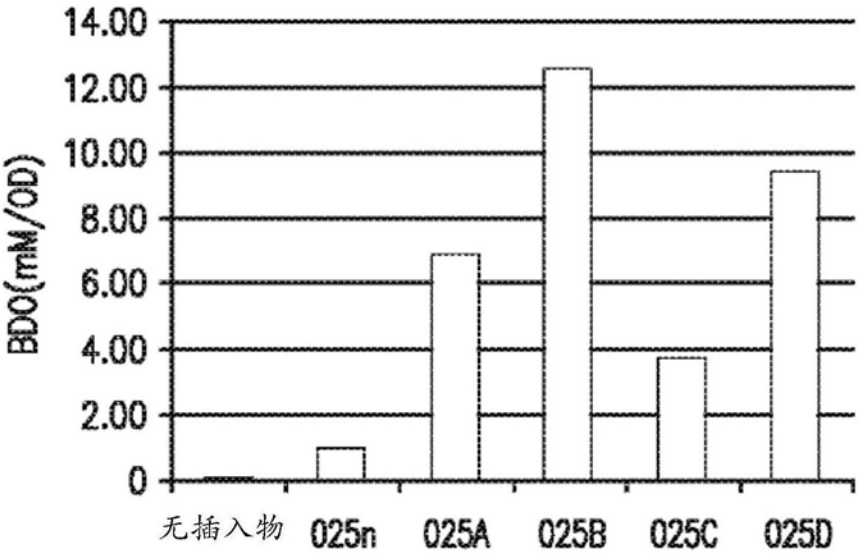


图30A

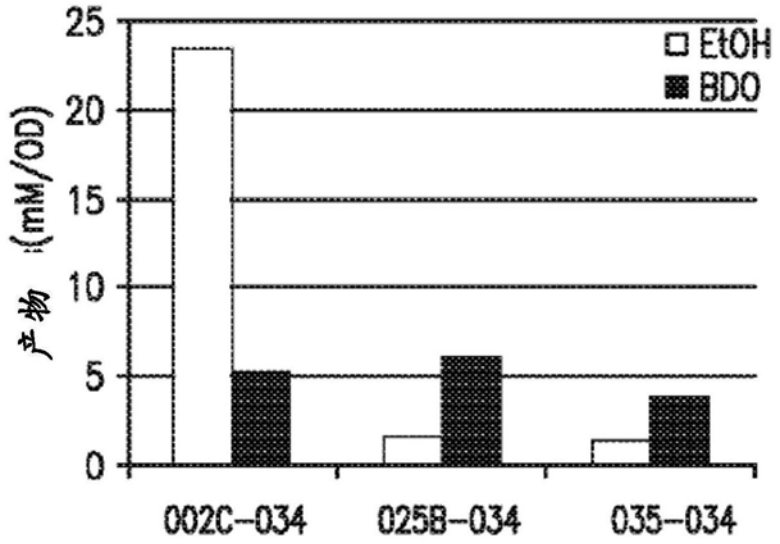


图30B

A.

ATGAAAGCTGCAGTAGTAGAGCAATTTAAGGAACCATTAAAAATTAAAGAAGTGGAAAAGCCATC
TATTTCATATGGCGAAGTATTAGTCCGCATTAAAGCATGCGGTGTATGCCATACGGACTTGCACG
CCGCTCATGGCGATTGGCCAGTAAAACCAAAACTTCCTTTAATCCCTGGCCATGAAGGAGTCGGA
ATTGTTGAAGAAGTCGGTCCGGGGGTAACCCATTTAAAAGTGGGAGACCGCGTTGGAATTCCTTG
GTTATATTCTGCGTGCGGCCATTGCGAATATTGTTTAAGCGGACAAGAAGCATTATGTGAACATC
AACAAAACGCCGGCTACTCAGTCGACGGGGGTTATGCAGAATATTGCAGAGCTGCGCCAGATTAT
GTGGTGAAAATTCCTGACAACTTATCGTTTGAAGAAGCTGCTCCTATTTTCTGCGCCGGAGTTAC
TACTTATAAAGCGTTAAAAGTCACAGGTACAAAACCGGGAGAATGGGTAGCGATCTATGGCATCG
GCGGCCTTGGACATGTTGCCGTCCAGTATGCGAAAGCGATGGGGCTTCATGTTGTTGCAGTGGAT
ATCGGCGATGAGAAACTGGAACTTGCAAAAGAGCTTGGCGCCGATCTTGTTGTAAATCCTGCAAA
AGAAAATGCGGCCCAATTTATGAAAGAGAAAGTCGGCGGAGTACACGCGGCTGTTGTGACAGCTG
TATCTAAACCTGCTTTTCAATCTGCGTACAATTCTATCCGCAGAGGCGGCACGTGCGTGCTTGTC
GGATTACCGCCGGAAGAAATGCCTATTCCAATCTTTGATACGGTATTAAACGGAATTAAAATTAT
CGGTTCCATTGTCGGCACGCGGAAAGACTTGCAAGAAGCGCTTCAGTTCGCTGCAGAAGGTAAAG
TAAAAACCATTATTGAAGTGCAACCTCTTGAAAAAATTAACGAAGTATTTGACAGAATGCTAAAA
GGAGAAATTAACGGACGGGTTGTTTTAACGTTAGAAAATAATAATTAA

B.

MKAAVVEQFKEPLKIKEVEKPSISYGEVLVRIKACGVCHTDLHAAHGDWPVKPKLPLIPGHEGVG
IVEEVGPGVTHLKVGDRVGIPWLYSACGHCEYCLSGQEALCEHQQNAGYSVDGGYAEYCRAAPDY
VVKIPDNLSFEEAAPIFCAGVTTYKALKVTGTKPGEWVAIYGIGGLGHVAVQYAKAMGLHVVAVD
IGDEKLELAKELGADLVVNPAKENAAQFMKEKVGGVHAAVVTAVSKPAFQSAYNSIRRGGTCVLV
GLPPEEMPIPIFDTVLNGIKIIGSIVGTRKDLQEALQFAAEGKVKTIIEVQPLEKINEVFDRMLK
GEINGRVVLTLENNN

图31

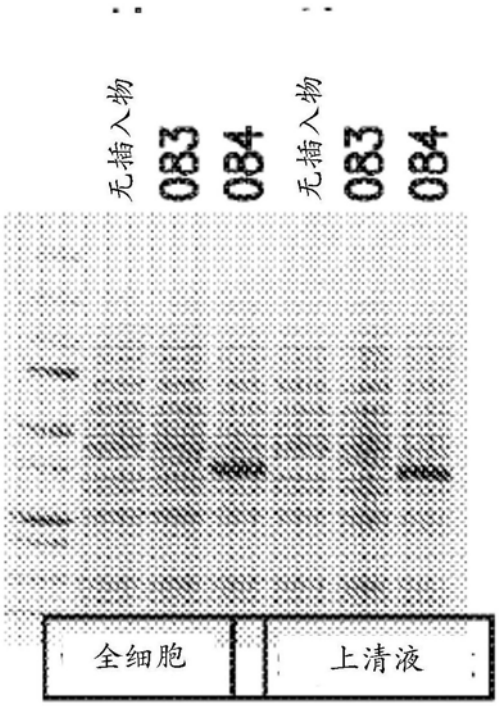

无插入物
083
084
无插入物
083
084
全细胞
上清液

图32A

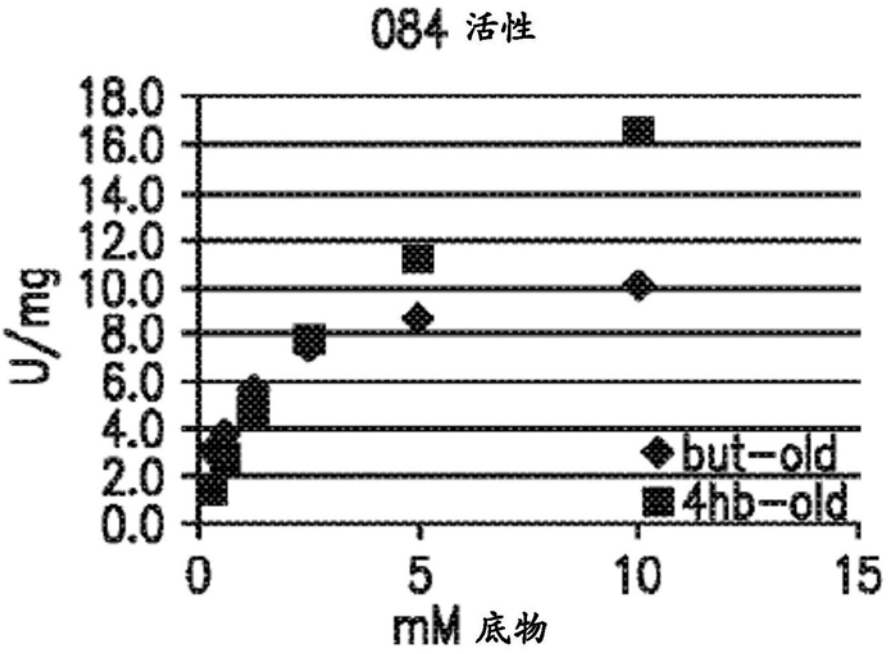

084 活性
U/mg
18.0
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
0.0
but-old
4hb-old
0
5
10
15
mM 底物

图32B

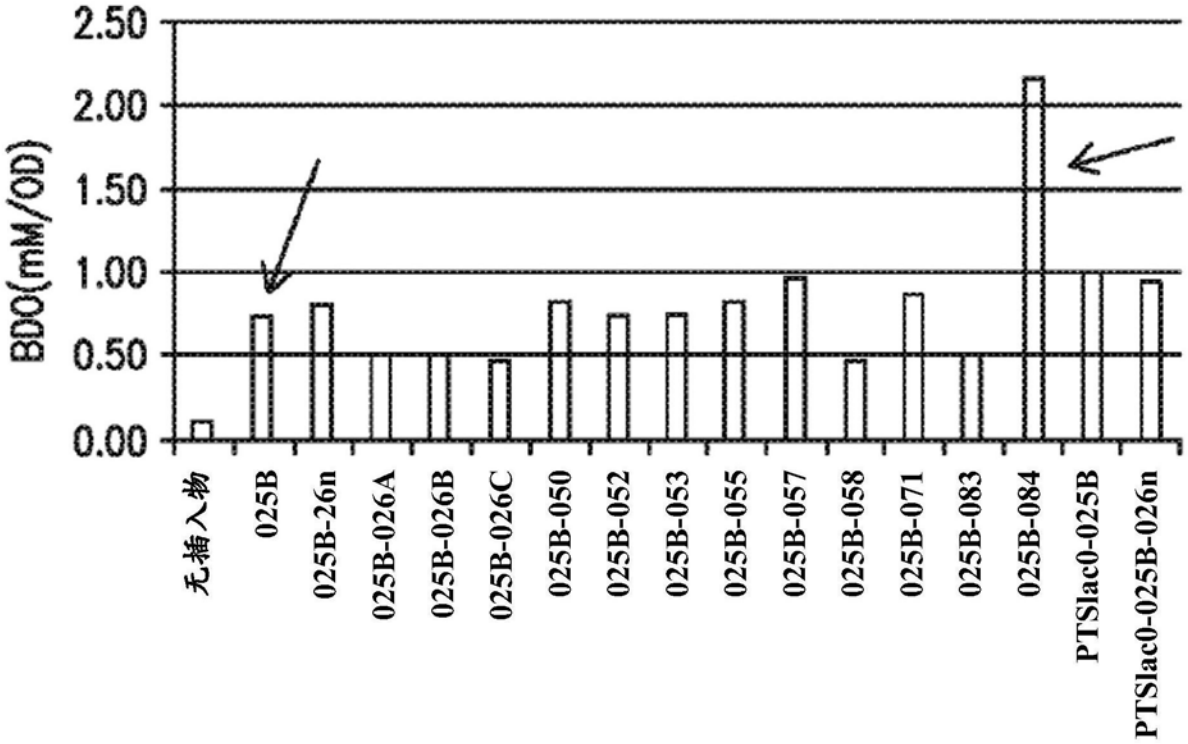

BDO(mM/OD)
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
无插入物
025B
025B-26n
025B-026A
025B-026B
025B-026C
025B-050
025B-052
025B-053
025B-055
025B-057
025B-058
025B-071
025B-083
025B-084
PTSlac0-025B
PTSlac0-025B-026n

图33

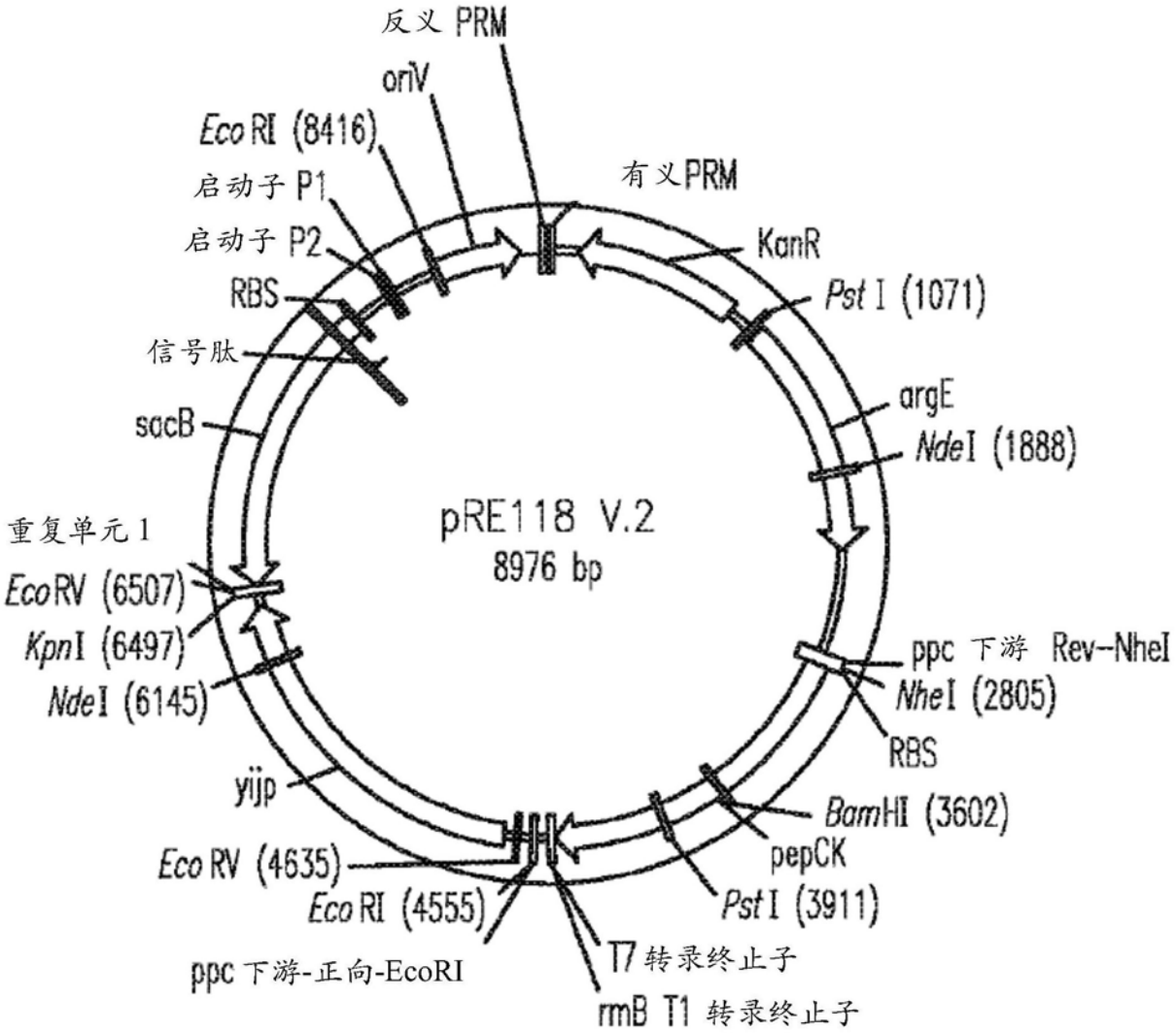

反义 PRM
oriV
EcoRI (8416)
启动子 P1
启动子 P2
RBS
信号肽
sacB
重复单元 1
EcoRV (6507)
KpnI (6497)
NdeI (6145)
yijp
EcoRV (4635)
EcoRI (4555)
ppc 下游-正向-EcoRI
T7 转录终止子
rrnB T1 转录终止子
pepCK
PstI (3911)
BamHI (3602)
RBS
NheI (2805)
ppc 下游 Rev-NheI
NdeI (1888)
argE
PstI (1071)
KanR
有义PRM
pRE118 V.2
8976 bp

图34

A.

aTGGCTATCGAAATCAAAGTACCGGACATCGGGGCTGATGAAGTTGAAATCACCGAGATCCTGGTC
AAAGTGGGCGACAAAGTTGAAGCCGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGGCGACAAAGCCTCTATG
GAAGTTCCGTCTCCGCAGGCGGGTATCGTTAAAGAGATCAAAGTCTCTGTTGGCGATAAAACCCAG
ACCGGCGCACTGATTATGATTTTCGATTCCGCCGACGGTGCAGCAGACGCTGCACCTGCTCAGGCAG
AAGAGAAGAAAGAAGCAGCTCCGGCAGCAGCACCAGCGGCTGCGGCGGCAAAAGACGTTAACGTT
CCGGATATCGGCAGCGACGAAGTTGAAGTGACCGAAATCCTGGTGAAAGTTGGCGATAAAGTTGAA
GCTGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGGCGACAAGGCTTCTATGGAAGTTCCGGCTCCGTTTGCTG
GCACCGTGAAAGAGATCAAAGTGAACGTGGGTGACAAAGTGTCTACCGGCTCGCTGATTATGGTCT
TCGAAGTCGCGGGTGAAGCAGGCGCGGCAGCTCCGGCCGCTAAACAGGAAGCAGCTCCGGCAGCG
GCCCCTGCACCAGCGGCTGGCGTGAAAGAAGTTAACGTTCCGGATATCGGCGGTGACGAAGTTGAA
GTGACTGAAGTGATGGTGAAAGTGGGCGACAAAGTTGCCGCTGAACAGTCACTGATCACCGTAGAA
GGCGACAAAGCTTCTATGGAAGTTCCGGCGCCGTTTGCAGGCGTCGTGAAGGAACTGAAAGTCAAC
GTTGGCGATAAAGTGAAAACTGGCTCGCTGATTATGATCTTCGAAGTTGAAGGCGCAGCGCCTGCG
GCAGCTCCTGCGAAACAGGAAGCGGCAGCGCCGGCACCGGCAGCAAAAGCTGAAGCCCCGGCAGC
AGCACCAGCTGCGAAAGCGGAAGGCAAATCTGAATTTGCTGAAAACGACGCTTATGTTCACGCGAC
TCCGCTGATCCGCCGTCTGGCACGCGAGTTTGGTGTTAACCTTGCGAAAGTGAAGGGCACTGGCCG
TAAAGGTCGTATCCTGCGCGAAGACGTTCAGGCTTACGTGAAAGAAGCTATCAAACGTGCAGAAGC
AGCTCCGGCAGCGACTGGCGGTGGTATCCCTGGCATGCTGCCGTGGCCGAAGGTGGACTTCAGCAA
GTTTGGTGAAATCGAAGAAGTGGAACTGGGCCGCATCCAGAAAATCTCTGGTGCGAACCTGAGCCG
TAACTGGGTAATGATCCCGCATGTTACTCACTTCGACAAAACCGATATCACCGAGTTGGAAGCGTTC
CGTAAACAGCAGAACGAAGAAGCGGCGAAACGTAAGCTGGATGTGAAGATCACCCCGGTTGTCTTC
ATCATGAAAGCCGTTGCTGCAGCTCTTGAGCAGATGCCTCGCTTCAATAGTTCGCTGTCGGAAGACG
GTCAGCGTCTGACCCTGAAGAAATACATCAACATCGGTGTGGCGGTGGATACCCCGAACGGTCTGG
TTGTTCCGGTATTCAAAGACGTCAACAAGAAAGGCATCATCGAGCTGTCTCGCGAGCTGATGACTAT
TTCTAAGAAAGCGCGTGACGGTAAGCTGACTGCGGGCGAAATGCAGGGCGGTTGCTTCACCATCTC
CAGCATCGGCGGCCTGGGTACTACCCACTTCGCGCCGATTGTGAACGCGCCGGAAGTGGCTATCCTC
GGCGTTTCCAAGTCCGCGATGGAGCCGGTGTGGAATGGTAAAGAGTTCGTGCCGCGTCTGATGCTG
CCGATTTCTCTCTCCTTCGACCACCGCGTGATCGACGGTGCTGATGGTGCCCGTTTCATTACCATCATT
AACAACACGCTGTCTGACATTCGCCGTCTGGTGATGTAAGTAAAAGAGCCGGCCCAACGGCCGGCT
TTTTTCTGGTAATCTCATGAATGTATTGAGGTTATTAGCGAATAGACAAATCGGTTGCCGTTTGTTGT
TTAAAAATTGTTAACAATTTTGTAAAATACCGACGGATAGAACGACCCGGTGGTGGTTAGGGTATTA
CTTCACATACCCTATGGATTTCTGGGTGCAGCAAGGTAGCAAGCGCCAGAATCCCCAGGAGCTTACA
TAAGTAAGTGACTGGGGTGAGGGCGTGAAGCTAACGCCGCTGCGGCCTGAAAGACGACGGGTATG
ACCGCCGGAGATAAATATATAGAGGTCATGATGAGTACTGAAATCAAAACTCAGGTCGTGGTACTT
GGGGCAGGCCCCGCAGGTTACTCCGCTGCCTTCCGTTGCGCTGATTTAGGTCTGGAAACCGTAATCG
TAGAACGTTACAACACCCTTGGCGGTGTTTGTCTGAACGTGGGTTGTATCCCTTCTAAAGCGCTGCT
GCACGTGGCAAAAGTTATCGAAGAAGCGAAAGCGCTGGCCGAACACGGCATCGTTTTCGGCGAACC
GAAAACTGACATTGACAAGATCCGCACCTGGAAAGAAAAAGTCATCACTCAGCTGACCGGTGGTCT
GGCTGGCATGGCCAAAGGTCGTAAAGTGAAGGTGGTTAACGGTCTGGGTAAATTTACCGGCGCTAA
CACCCTGGAAGTGGAAGGCGAAAACGGCAAAACCGTGATCAACTTCGACAACGCCATCATCGCGGC
GGGTTCCCGTCCGATTCAGCTGCCGTTTATCCCGCATGAAGATCCGCGCGTATGGGACTCCACCGAC
GCGCTGGAACTGAAATCTGTACCGAAACGCATGCTGGTGATGGGCGGCGGTATCATCGGTCTGGAA
ATGGGTACCGTATACCATGCGCTGGGTTCAGAGATTGACGTGGTGGAAATGTTCGACCAGGTTATC
CCGGCTGCCGACAAAGACGTGGTGAAAGTCTTCACCAAACGCATCAGCAAGAAATTTAACCTGATG
CTGGAAGCCAAAGTGACTGCCGTTGAAGCGAAAGAAGACGGTATTTACGTTTCCATGGAAGGTAAA
AAAGCACCGGCGGAAGCGCAGCGTTACGACGCAGTGCTGGTCGCTATCGGCCGCGTACCGAATGGT

图35

AAAAACCTCGATGCAGGTAAAGCTGGCGTGGAAGTTGACGATCGCGGCTTCATCCGCGTTGACAAA
CAAATGCGCACCAACGTGCCGCACATCTTTGCTATCGGCGATATCGTCGGTCAGCCGATGCTGGCGC
ACAAAGGTGTCCATGAAGGCCACGTTGCCGCAGAAGTTATCTCCGGTCTGAAACACTACTTCGATCC
GAAAGTGATCCCATCCATCGCCTACACTAAACCAGAAGTGGCATGGGTCGGTCTGACCGAGAAAGA
AGCGAAAGAGAAAGGCATCAGCTACGAAACCGCCACCTTCCCGTGGGCTGCTTCCGGCCGTGCTAT
CGCTTCTGACTGCGCAGATGGTATGACCAAACTGATCTTCGACAAAGAGACCCACCGTGTTATCGGC
GGCGCGATTGTCGGCACCAACGGCGGCGAGCTGCTGGGTGAGATCGGCCTGGCTATCGAGATGGG
CTGTGACGCTGAAGACATCGCCCTGACCATCCACGCTCACCCGACTCTGCACGAGTCCGTTGGCCTG
GCGGCGGAAGTGTTCGAAGGCAGCATCACCGACCTGCCAAACGCCAAAGCGAAGAAAAAGTAACT
TTTTCTTTCAGGAAAAAAGCATAAGCGGCTCCGGGAGCCGCTTTTTTTATGCCTGATGTTTAGAACTA
TGTCACTGTTCATAAACCGCTACACCTCATACATACTTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACA
CTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGCACATCCGGCAATTAAAAAAGCGGCTAACCACGCCGCTTT
TTTTACGTCTGCAATTTACCTTTCCAGTCTTCTTGCTCCACGTTCAGAGAGACGTTCGCATACTGCTGA
CCGTTGCTCGTTATTCAGCCTGACAGTATGGTTACTGTCGTTTAGACGTTGTGGGCGGCTCTCCTGAA
CTTTCTCCCGAAAAACCTGACGTTGTTCAGGTGATGCCGATTGAACACGCTGGCGGGCGTTATCACG
TTGCTGTTGATTCAGTGGGCGCTGCTGTACTTTTTCCTT

图35(续)

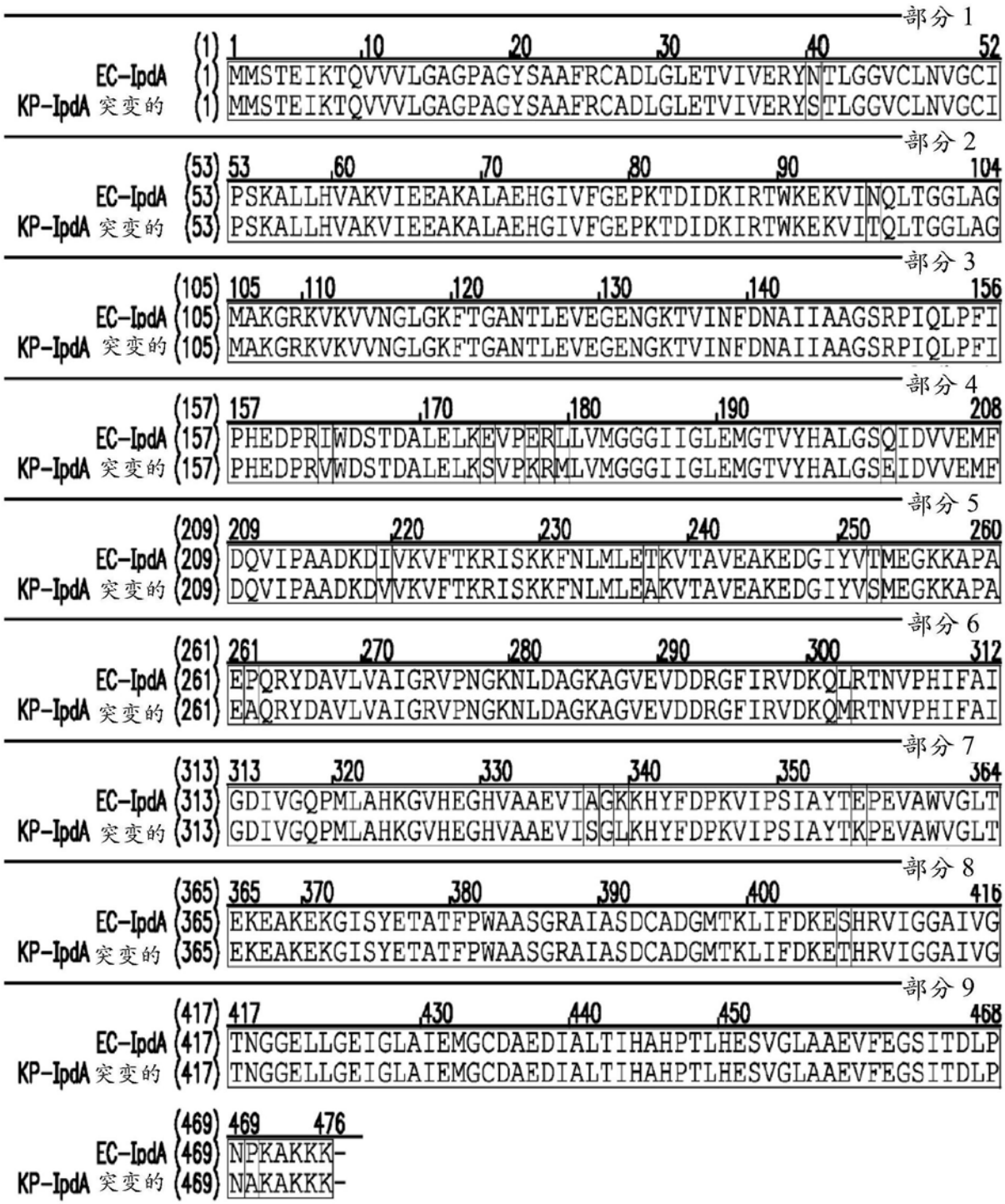

部分 1
EC-IpdA (1) MMSTEIKTQVVVLGAGPAGYSAAFRCADLGLETVIVERYNTLGGVCLNVGCI
KP-IpdA 突变的 (1) MMSTEIKTQVVVLGAGPAGYSAAFRCADLGLETVIVERYSTLGGVCLNVGCI
部分 2
EC-IpdA (53) PSKALLHVAKVIEEAKALAEHGIVFGEPKTDIDKIRTWKEKVINQLTGGLAG
KP-IpdA 突变的 (53) PSKALLHVAKVIEEAKALAEHGIVFGEPKTDIDKIRTWKEKVITQLTGGLAG
部分 3
EC-IpdA (105) MAKGRKVKVVNGLGKFTGANTLEVEGENGKTVINFDNAIIAAGSRPIQLPFI
KP-IpdA 突变的 (105) MAKGRKVKVVNGLGKFTGANTLEVEGENGKTVINFDNAIIAAGSRPIQLPFI
部分 4
EC-IpdA (157) PHEDPRIWDSTDALELKEVPERLLVMGGGIIGLEMGTVYHALGSQIDVVEMF
KP-IpdA 突变的 (157) PHEDPRVWDSTDALELKSVPKRMLVMGGGIIGLEMGTVYHALGSEIDVVEMF
部分 5
EC-IpdA (209) DQVIPAADKDIVKVFTKRISKKFNLMLETKVTAVEAKEDGIYVTMEGKKAPA
KP-IpdA 突变的 (209) DQVIPAADKDVVKVFTKRISKKFNLMLEAKVTAVEAKEDGIYVSMEGKKAPA
部分 6
EC-IpdA (261) EPQRYDAVLVAIGRVPNGKNLDAGKAGVEVDDRGFIRVDKQLRTNVPHIFAI
KP-IpdA 突变的 (261) EAQRYDAVLVAIGRVPNGKNLDAGKAGVEVDDRGFIRVDKQMRTNVPHIFAI
部分 7
EC-IpdA (313) GDIVGQPMLAHKGVHEGHVAAEVIAGKKHYFDPKVIPSIAYTEPEVAWVGLT
KP-IpdA 突变的 (313) GDIVGQPMLAHKGVHEGHVAAEVISGLKHYFDPKVIPSIAYTKPEVAWVGLT
部分 8
EC-IpdA (365) EKEAKEKGISYETATFPWAASGRAIASDCADGMTKLIFDKESHRVIGGAIVG
KP-IpdA 突变的 (365) EKEAKEKGISYETATFPWAASGRAIASDCADGMTKLIFDKETHRVIGGAIVG
部分 9
EC-IpdA (417) TNGGELLGEIGLAIEMGCDAEDIALTIHAHPTLHESVGLAAEVFEGSITDLP
KP-IpdA 突变的 (417) TNGGELLGEIGLAIEMGCDAEDIALTIHAHPTLHESVGLAAEVFEGSITDLP
EC-IpdA (469) NPKAKKK-
KP-IpdA 突变的 (469) NAKAKKK-

图36

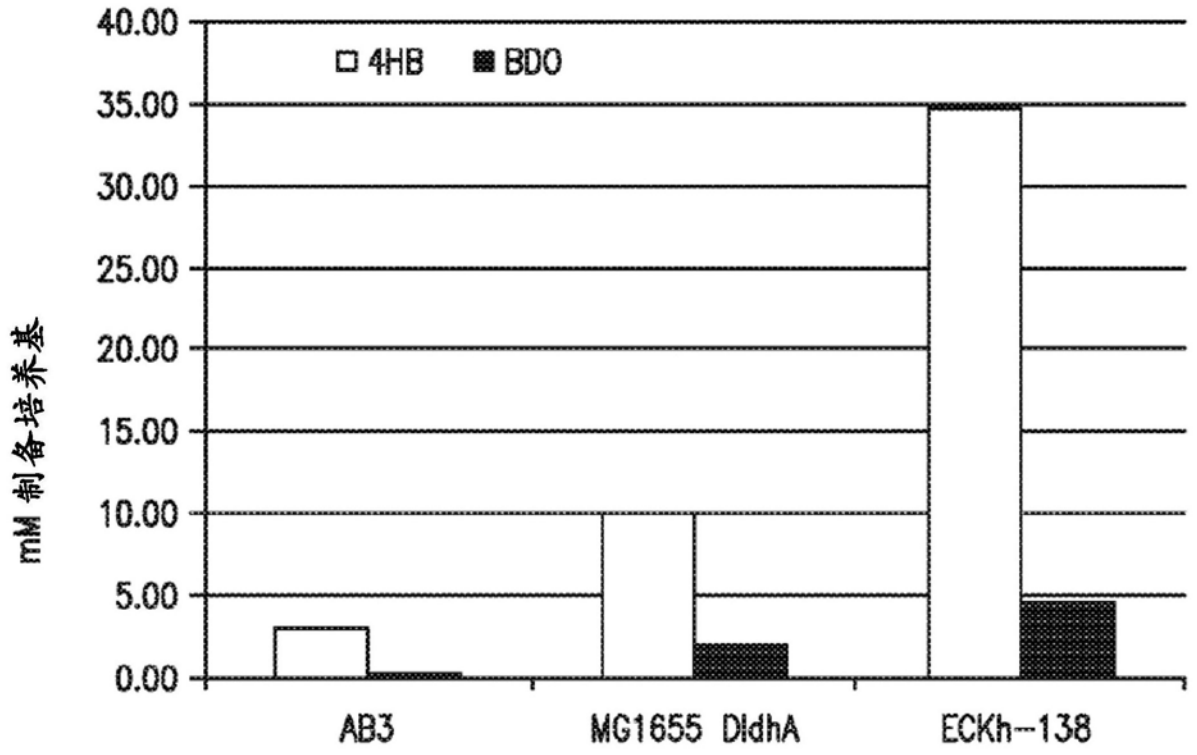


图37

*ataataatacatatgaaccat*gcgagttacgggcctat**aagccaggcgagatatgatctatatcaatttctcatctataatgctttgtta**
gtatctcgtcgccgacttaataaagagagagttagtgtgaaagctgacaacccttttgatcttttacttcctgctgcaatggccaaagtgg
ccgaagaggcgggtgtctataaagcaacgaaacatccgcttaagactttctatctggcgattaccgccggtgttttcatctcaatcgcattc
accactggcacaggcacaGAAGGTAGGTGTTACatgtcagaacgtttacaca*atgacgtggatcctattattat*

图38

AAGAGGTAAAAGAATAATGGCTATCGAAATCAAAGTACCGGACATCGGGGCTGATGAAGTTGAAAT
CACCGAGATCCTGGTCAAAGTGGGCGACAAAGTTGAAGCCGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGG
CGACAAAGCCTCTATGGAAGTTCCGTCTCCGCAGGCGGGTATCGTTAAAGAGATCAAAGTCTCTGTT
GGCGATAAAACCCAGACCGGCGCACTGATTATGATTTTCGATTCCGCCGACGGTGCAGCAGACGCT
GCACCTGCTCAGGCAGAAGAGAAGAAAGAAGCAGCTCCGGCAGCAGCACCAGCGGCTGCGGCGGC
AAAAGACGTTAACGTTCCGGATATCGGCAGCGACGAAGTTGAAGTGACCGAAATCCTGGTGAAAGT
TGGCGATAAAGTTGAAGCTGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGGCGACAAGGCTTCTATGGAAGT
TCCGGCTCCGTTTGCTGGCACCGTGAAAGAGATCAAAGTGAACGTGGGTGACAAAGTGTCTACCGG
CTCGCTGATTATGGTCTTCGAAGTCGCGGGTGAAGCAGGCGCGGCAGCTCCGGCCGCTAAACAGGA
AGCAGCTCCGGCAGCGGCCCCTGCACCAGCGGCTGGCGTGAAAGAAGTTAACGTTCCGGATATCGG
CGGTGACGAAGTTGAAGTGACTGAAGTGATGGTGAAAGTGGGCGACAAAGTTGCCGCTGAACAGT
CACTGATCACCGTAGAAGGCGACAAAGCTTCTATGGAAGTTCCGGCGCCGTTTGCAGGCGTCGTGA
AGGAACTGAAAGTCAACGTTGGCGATAAAGTGAAAACTGGCTCGCTGATTATGATCTTCGAAGTTG
AAGGCGCAGCGCCTGCGGCAGCTCCTGCGAAACAGGAAGCGGCAGCGCCGGCACCGGCAGCAAAA
GCTGAAGCCCCGGCAGCAGCACCAGCTGCGAAAGCGGAAGGCAAATCTGAATTTGCTGAAAACGA
CGCTTATGTTCACGCGACTCCGCTGATCCGCCGTCTGGCACGCGAGTTTGGTGTTAACCTTGCGAAA
GTGAAGGGCACTGGCCGTAAAGGTCGTATCCTGCGCGAAGACGTTCAGGCTTACGTGAAAGAAGCT
ATCAAACGTGCAGAAGCAGCTCCGGCAGCGACTGGCGGTGGTATCCCTGGCATGCTGCCGTGGCCG
AAGGTGGACTTCAGCAAGTTTGGTGAAATCGAAGAAGTGGAACTGGGCCGCATCCAGAAAATCTCT
GGTGCGAACCTGAGCCGTAACTGGGTAATGATCCCGCATGTTACTCACTTCGACAAAACCGATATCA
CCGAGTTGGAAGCGTTCCGTAAACAGCAGAACGAAGAAGCGGCGAAACGTAAGCTGGATGTGAAG
ATCACCCCGGTTGTCTTCATCATGAAAGCCGTTGCTGCAGCTCTTGAGCAGATGCCTCGCTTCAATAG
TTCGCTGTCGGAAGACGGTCAGCGTCTGACCCTGAAGAAATACATCAACATCGGTGTGGCGGTGGA
TACCCCGAACGGTCTGGTTGTTCCGGTATTCAAAGACGTCAACAAGAAAGGCATCATCGAGCTGTCT
CGCGAGCTGATGACTATTTCTAAGAAAGCGCGTGACGGTAAGCTGACTGCGGGCGAAATGCAGGG
CGGTTGCTTCACCATCTCCAGCATCGGCGGCCTGGGTACTACCCACTTCGCGCCGATTGTGAACGCG
CCGGAAGTGGCTATCCTCGGCGTTTCCAAGTCCGCGATGGAGCCGGTGTGGAATGGTAAAGAGTTC
GTGCCGCGTCTGATGCTGCCGATTTCTCTCTCCTTCGACCACCGCGTGATCGACGGTGCTGATGGTG
CCCGTTTCATTACCATCATTAACAACACGCTGTCTGACATTCGCCGTCTGGTGATGTAAGTAAAAGAG
CCGGCCCAACGGCCGGCTTTTTTCTGGTAATCTCATGAATGTATTGAGGTTATTAGCGAATAGACAA
ATCGGTTGCCGTTTGTTAAGCCAGGCGAGATATGATCTATATCAATTTCTCATCTATAATGCTTTGTTA
GTATCTCGTCGCCGACTTAATAAAGAGAGAGTTAGTCTTCTATATCACAGCAAGAAGGTAGGTGTTA
CATGATGAGTACTGAAATCAAAACTCAGGTCGTGGTACTTGGGGCAGGCCCCGCAGGTTACTCTGC
AGCCTTCCGTTGCGCTGATTTAGGTCTGGAAACCGTCATCGTAGAACGTTACAGCACCCTCGGTGGT
GTTTGTCTGAACGTGGGTTGTATCCCTTCTAAAGCGCTGCTGCACGTGGCAAAAGTTATCGAAGAAG
CGAAAGCGCTGGCCGAACACGGCATCGTTTTCGGCGAACCGAAAACTGACATTGACAAGATCCGCA
CCTGGAAAGAAAAAGTCATCACTCAGCTGACCGGTGGTCTGGCTGGCATGGCCAAAGGTCGTAAAG
TGAAGGTGGTTAACGGTCTGGGTAAATTTACCGGCGCTAACACCCTGGAAGTGGAAGGCGAAAACG
GCAAAACCGTGATCAACTTCGACAACGCCATCATCGCGGCGGGTTCCCGTCCGATTCAGCTGCCGTT
TATCCCGCATGAAGATCCGCGCGTATGGGACTCCACCGACGCGCTGGAACTGAAATCTGTACCGAA
ACGCATGCTGGTGATGGGCGGCGGTATCATCGGTCTGGAAATGGGTACCGTATACCATGCGCTGGG
TTCAGAGATTGACGTGGTGGAAATGTTCGACCAGGTTATCCCGGCTGCCGACAAAGACGTGGTGAA
AGTCTTCACCAAACGCATCAGCAAGAAATTTAACCTGATGCTGGAAGCCAAAGTGACTGCCGTTGAA
GCGAAAGAAGACGGTATTTACGTTTCCATGGAAGGTAAAAAAGCACCGGCGGAAGCGCAGCGTTA
CGACGCAGTGCTGGTCGCTATCGGCCGCGTACCGAATGGTAAAAACCTCGATGCAGGTAAAGCTGG
CGTGGAAGTTGACGATCGCGGCTTCATCCGCGTTGACAA

图39

ACAAATGCGCACCAACGTGCCGCACATCTTTGCTATCGGCGATATCGTCGGTCAGCCGATGCTGGCG
CACAAAGGTGTCCATGAAGGCCACGTTGCCGCAGAAGTTATCTCCGGTCTGAAACACTACTTCGATC
CGAAAGTGATCCCATCCATCGCCTACACTAAACCAGAAGTGGCATGGGTCGGTCTGACCGAGAAAG
AAGCGAAAGAGAAAGGCATCAGCTACGAAACCGCCACCTTCCCGTGGGCTGCTTCCGGCCGTGCTA
TCGCTTCTGACTGCGCAGATGGTATGACCAAACTGATCTTCGACAAAGAGACCCACCGTGTTATCGG
CGGCGCGATTGTCGGCACCAACGGCGGCGAGCTGCTGGGTGAGATCGGCCTGGCTATCGAGATGG
GCTGTGACGCTGAAGACATCGCCCTGACCATCCACGCTCACCCGACTCTGCACGAGTCCGTTGGCCT
GGCGGCGGAAGTGTTCGAAGGCAGCATCACCGACCTGCCAAACGCCAAAGCGAAGAAAAAGTAAC
TTTTTCTTTCAGGAAAAAAGCATAAGCGGCTCCGGGAGCCGCTTTTTTTATGCCTGATGTTTAGAACT
ATGTCACTGTTCATAAACCGCTACACCTCATACATACTTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCAC
ACTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGCACATCCGGCAATTAAAAAAGCGGCTAACCACGCCGCTT
TTTTTACGTCTGCAATTTACCTTTCCAGTCTTCTTGCTCCACGTTCAGAGAGACGTTCGCATACTGCTG
ACCGTTGCTCGTTATTCAGCCTGACAGTATGGTTACTGTCGTTTAGACGTTGTGGGCGGCTCTCCTGA
ACTTTCTCCCGAAAAACCTGACGTTGTTCAGGTGATGCCGATTGAACACGCTGGCGGGCGTTATCAC
GTTGCTGTTGATTCAGTGGGCGCTGCTGTACTTTTTCCTTAAACACCTGGCGCTGCTCTGGTGATGCG
GACTGAATACGCTCACGCGCTGCGTCTCTTCGCTGCTGGTTCTGCGGGTTAGTCTGCATTTTCTCGCG
AACCGCCTGGCGCTGCTCAGGCGAGGCGGACTGAATGCGCTCACGCGCTGCCTCTCTTCGCTGCTG
GATCTTCGGGTTAGTCTGCATTCTCTCGCGAACTGCCTGGCGCTGCTCAGGCGAGGCGGACTGATAA
CGCTGACGAGCGGCGTCCTTTTGTTGCTGGGTCAGTGGTTGGCGACGGCTGAAGTCGTGGAAGTCG
TCATAGCTCCCATAGTGTTCAGCTTCATTAAACCGCTGTGCCGCTGCCTGACGTTGGGTACCTCGTGT
AATGACTGGTGCGGCGTGTGTTCGTTGCTGAAACTGATTTGCTGCCGCCTGACGCTGGCTGTCGCGC
GTTGGGGCAGGTAATTGCGTGGCGCTCATTCCGCCGTTGACATCGGTTTGATGAAACCGCTTTGCCA
TATCCTGATCATGATAGGGCACACCATTACGGTAGTTTGGATTGTGCCGCCATGCCATATTCTTATCA
GTAAGATGCTCACCGGTGATACGGTTGAAATTGTTGACGTCGATATTGATGTTGTCGCCGTTGTGTT
GCCAGCCATTACCGTCACGATGACCGCCATCGTGGTGATGATAATCAT

图39(续)

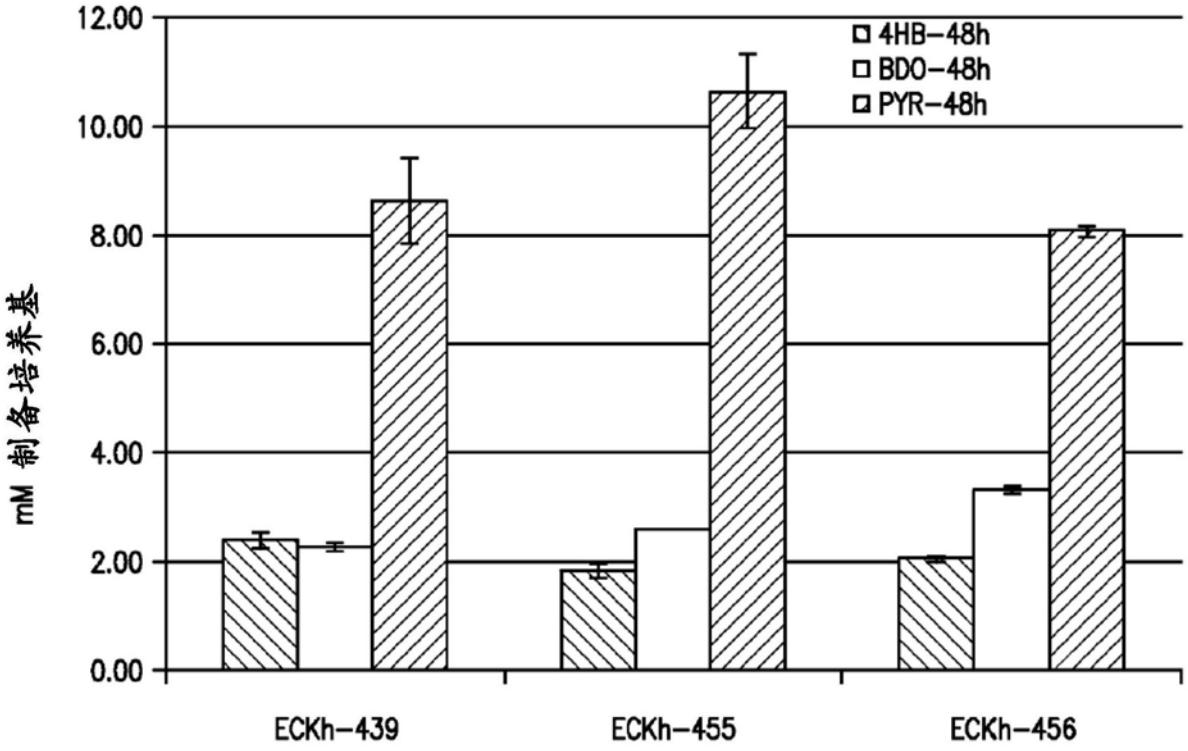

12.00
10.00
8.00
6.00
4.00
2.00
0.00
mM 制备培养基
4HB-48h
BDO-48h
PYR-48h
ECKh-439
ECKh-455
ECKh-456

图40

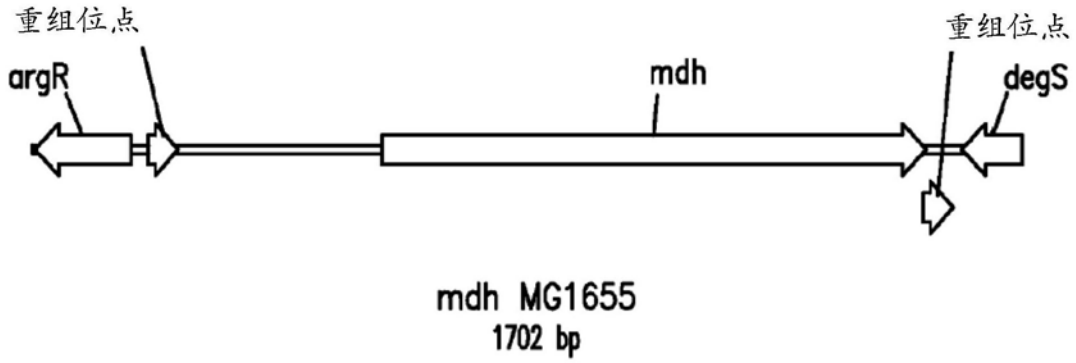

重组位点
argR
mdh
重组位点
degS
mdh MG1655
1702 bp

图41A

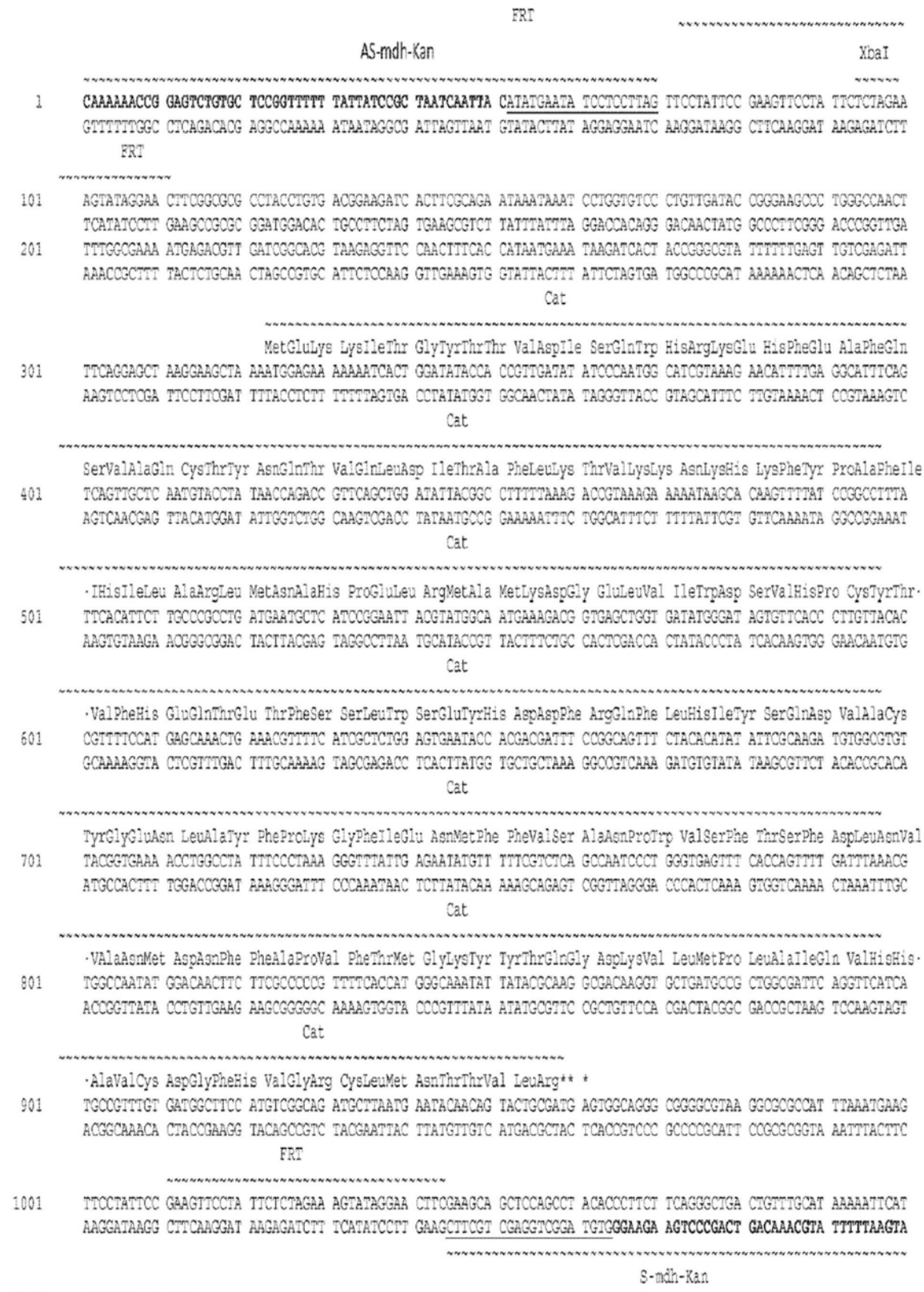


图41B

TTATTTGGTGATATTGGTACCAATATCATGCAGCAAACGGTGCAACATTGCCGTGTCTCGTTGCTCTA
AAAGCCCCAGGCGTTGTTGTAACCAGTCGACCAGTTTTATGTCATCTGCCACTGCCAGAGTCGTCAG
CAATGTCATGGCTCGTTCGCGTAAAGCTTGCAGTTGATGTTGGTCTGCCGTTGCATCACTTTTCGCCG
GTTGTTGTATTAATGTTGCTAATTGATAGCAATAGACCATCACCGCCTGCCCCAGATTGAGCGAAGG
ATAATCCGCCACCATCGGCACACCAGTAAGAACGTCAGCCAACGCTAACTCTTCGTTAGTCAACCCG
GAATCTTCGCGACCAAACACCAGCGCGGCATGGCTCATCCATGAAGATTTTTCCTCTAACAGCGGCA
CCAGTTCAACTGGCGTGGCGTAGTAATGATATTTCGCCCGACTGCGCGCAGTGGTGGCGACAGTGA
AATCGACATCGTGTAACGATTCAGCCAATGTCGGGAAAACTTTAATATTATCAATAATATCACCAGAT
CCATGTGCGACCCAGCGGGTGGCTGGCTCCAGGTGTGCCTGACTATCGACAATCCGCAGATCGCTA
AACCCCATCGTTTTCATTGCCCGCGCCGCTGCCCCAATATTTTCTGCTCTGGCGGGTGCGACCAGAAT
AATCGTTATACGCATATTGCCACTCTTCTTGATCAAATAACCGCGAACCGGGTGATCACTGTCAACTT
ATTACGCGGTGCGAATTTACAAATTCTTAACGTAAGTCGCAGAAAAAGCCCTTTACTTAGCTTAAAAA
AGGCTAAACTATTTCCTGACTGTACTAACGGTTGAGTTGTTAAAAAATGCTACATATCCTTCTGTTTA
CTTAGGATAATTTTATAAAAAATAAATCTCGACAATTGGATTCACCACGTTTATTAGTTGTATGATGC
AACTAGTTGGATTATTAAAATAATGTGACGAAAGCTAGCATTTAGATACGATGATTTCATCAAACTGT
TAACGTGCTACAATTGAACTTGATATATGTCAACGAAGCGTAGTTTTATTGGGTGTCCGGCCCCTCTT
AGCCTGTTATGTTGCTGTTAAAATGGTTAGGATGACAGCCGTTTTTGACACTGTCGGGTCCTGAGGG
AAAGTACCCACGACCAAGCTAATGATGTTGTTGACGTTGATGGAAAGTGCATCAAGAACGCAATTAC
GTACTTTAGTCATGTTACGCCGATCATGTTAATTTGCAGCATGCATCAGGCAGGTCAGGGACTTTTGT
ACTTCCTGTTTCGATTTAGTTGGCAATTTAGGTAGCAAACGAATTCATCGGCTTTACCACCGTCAAAA
AAAACGGCGCTTTTTAGCGCCGTTTTTATTTTTCAACCTTATTTCCAGATACGTAACTCATCGTCCGTT
GTAACTTCTTTACTGGCTTTCATTTTCGGCAGTGAAAACGCATACCAGTCGATATTACGGGTCACAAA
CATCATGCCGGCCAGCGCCACCACCAGCACACTGGTTCCCAACAACAGCGCGCTATCGGCAGAGTTG
AGCAGTCCCCACATCACACCATCCAGCAACAACAGCGCGAGGGTAAACAACATGCTGTTGCACCAAC
CTTTCAATACCGCTTGCAAATAAATACCGTTCATTATCGCCCCAATCAGACTGGCGATTATCCATGCC
ACGGTAAAACCGGTATGTTCAGAAAGCGCCAGCAAGAGCAAATAAAACATCACCAATGAAAGCCCC
ACCAGCAAATATTGCATTGGGTGTAAACGTTGCGCGGTGAGCGTTTCAAAAACAAAGAACGCCATA
AAAGTCAGTGCAATCAGCAGAATGGCGTACTTAGTCGCCCGGTCAGTTAATTGGTATTGATCGGCTG
GCGTCGTTACTGCGACGCTAAACGCCGGGAAGTTTTCCCAGCCGGTATCATTGCCTGAAGCAAAACG
CTCACCGAGATTATTAGCAAACCAGCTGCTTTGCCAGTGCGCCTGAAAACCTGACTCGCTAACTTCCC
GTTTGGCTGGTAGAAAATCACCTAAAAAACTGGGATGCGGCCAGTTGCTGGTTAAGGTCATTTCGCT
ATTACGCCCGCCAGGCACCACAGAAAGATCGCCGGTACCGCTTAAATTCAGGGCCATATTCAGCTTC
AGGTTCTGCTTCCGCCAGTCCCCTTCAGGTAAAGGGATATGCACGCCCTGCCCGCCTTGCTCTAACCC
GGTGCCGGGTTCAATGGTCAGCGCCGTTCCGTTAACTTCAGGCGCTTTCACCACACCAATACCACGC
GCATCCCCGACGCTAATCACAATAAATGGCTTGCCTAAGGTGATATTTGGCGCGTTGAGTTCGCTAA
GACGCGAAACATCGAAATCGGCTTTTAACGTTAAATCACTGTGCCAGACCTGACCGGTATAAATCCC
TATCTTGCGTTCTTCCACGTTCTGATTGCCATCAACCATCAATGACTCAGGTAACCAAAAATGGATAA
AACTTCGTTTCCGCTGCAGGGTTTTAT

图42

AAGCCACAGCAGGATGCCCACTGCAACAAAGGTGATCACACCGGAAACGCGATGGAGAATGGACG
CTATCGCCGTGATGGGGAACCGGATGGTCTGTAGGTCCAGATTAACAGGTCTTTGTTTTTTCACATTT
CTTATCATGAATAACGCCCACATGCTGTTCTTATTATTCCCTGGGGACTACGGGCACAGAGGTTAACT
TTCTGTTACCTGGAGACGTCGGGATTTCCTTCCTCCGGTCTGCTTGCGGGTCAGACAGCGTCCTTTCT
ATAACTGCGCGTCATGCAAAACACTGCTTCCAGATGCGAAAACGACACGTTACAACGCTGGGTGGCT
CGGGATTGCAGGGTGTTCCGGAGACCTGGCGGCAGTATAGGCTGTTCACAAAATCATTACAATTAA
CCTACATATAGTTTGTCGGGTTTTATCCTGAACAGTGATCCAGGTCACGATAACAACATTTATTTAAT
TTTTAATCATCTAATTTGACAATCATTCAACAAAGTTGTTACAAACATTACCAGGAAAAGCATATAAT
GCGTAAAAGTTATGAAGTCGGTATTTCACCTAAGATTAACTTATGTAACAGTGTGGAAGTATTGACC
AATTCATTCGGGACAGTTATTAGTGGTAGACAAGTTTAATAATTCGGATTGCTAAGTACTTGATTCGC
CATTTATTCGTCATCAATGGATCCTTTACCTGCAAGCGCCCAGAGCTCTGTACCCAGGTTTTCCCCTCT
TTCACAGAGCGGCGAGCCAAATAAAAAACGGGTAAAGCCAGGTTGATGTGCGAAGGCAAATTTAA
GTTCCGGCAGTCTTACGCAATAAGGCGCTAAGGAGACCTTAAATGGCTGATACAAAAGCAAAACTC
ACCCTCAACGGGGATACAGCTGTTGAACTGGATGTGCTGAAAGGCACGCTGGGTCAAGATGTTATT
GATATCCGTACTCTCGGTTCAAAAGGTGTGTTCACCTTTGACCCAGGCTTCACTTCAACCGCATCCTG
CGAATCTAAAATTACTTTTATTGATGGTGATGAAGGTATTTTGCTGCACCGCGGTTTCCCGATCGATC
AGCTGGCGACCGATTCTAACTACCTGGAAGTTTGTTACATCCTGCTGAATGGTGAAAAACCGACTCA
GGAACAGTATGACGAATTTAAAACTACGGTGACCCGTCATACCATGATCCACGAGCAGATTACCCGT
CTGTTCCATGCTTTCCGTCGCGACTCGCATCCAATGGCAGTCATGTGTGGTATTACCGGCGCGCTGG
CGGCGTTCTATCACGACTCGCTGGATGTTAACAATCCTCGTCACCGTGAAATTGCCGCGTTCCTCCTG
CTGTCGAAAATGCCGACCATGGCCGCGATGTGTTACAAGTATTCCATTGGTCAGCCATTTGTTTACCC
GCGCAACGATCTCTCCTACGCCGGTAACTTCCTGAATATGATGTTCTCCACGCCGTGCGAACCGTATG
AAGTTAATCCGATTCTGGAACGTGCTATGGACCGTATTCTGATCCTGCACGCTGACCATGAACAGAA
CGCCTCTACCTCCACCGTGCGTACCGCTGGCTCTTCGGGTGCGAACCCGTTTGCCTGTATCGCAGCA
GGTATTGCTTCACTGTGGGGACCTGCGCACGGCGGTGCTAACGAAGCGGCGCTGAAAATGCTGGAA
GAAATCAGCTCCGTTAAACACATTCCGGAATTTGTTCGTCGTGCGAAAGACAAAAATGATTCTTTCCG
CCTGATGGGCTTCGGTCACCGCGTGTACAAAAATTACGACCCGCGCGCCACCGTAATGCGTGAAACC
TGCCATGAAGTGCTGAAAGAGCTGGGCACGAAGGATGACCTGCTGGAAGTGGCTATGGAGCTGGA
AAACATCGCGCTGAACGACCCGTACTTTATCGAGAAGAAACTGTACCCGAACGTCGATTTCTACTCT
GGTATCATCCTGAAAGCGATGGGTATTCCGTCTTCCATGTTCACCGTCATTTTCGCAATGGCACGTAC
CGTTGGCTGGATCGCCCACTGGAGCGAAATGCACAGTGACGGTATGAAGATTGCCCGTCCGCGTCA
GCTGTATACAGGATATGAAAAACGCGACTTTAAAAGCGATATCAAGCGTTAATGGTTGATTGCTAAG
TTGTAAATATTTTAACCCGCCGTTCATATGGCGGGTTGATTTTTATATGCCTAAACACAAAAAATTGT
AAAAATAAAATCCATTAACAGACCTATATAGATATTTAAAAAGAATAGAACAGCTCAAATTATCAGC
AACCCAATACTTTCAATTAAAAACTTCATGGTAGTCGCATTTATAACCCTATGAAAATGACGTCTATCT
ATACCCCCCTATATTTTATTCATCATACAACAAATTCATGATACCAATAATTTAGTTTTGCATTTAATAA
AACTAACAATATTTTTAAGCAAAACTAAAAACTAGCAATAATCAAATACGATATTCTGGCGTAGCTAT
ACCCCTATTCTATATCCTTAAAGGACTCTGTTATGTTTAAAGGACAAAAAACATTGGCCGCACTGGCC
GTATCTCTGCTGTTCACTGCACCTGTTTATGCTGCTGATGAAGGTTCTGGCGAAATTCACTTTAAGGG
GGAGGTTATTGAAGCACCTTGTGAAATTCATCCAGAAGATATTGATAAAAACATAGATCTTGGACAA
GTCACGACAACCCATATAAACCGGGAGCATCATAGCAATAAAGTGGCCGTCGACATTCGCTTGATCA
ACTGTGATCTGCCTGCTTCTGACAACGGTAGCGGAATGCCGGTATCCAAAGTTGGCGTAACCTTCGA
TAGCACGGCTAAGACAACTGGTGCTACGCCTTTGTTGAGCAACACCAGTGCAGGCGAAGCAACTGG
GGTCGGTGTACGACTGATGGACAAAAATGACGGTAACATCGTATTAGGTTCAGCCGCGCCAGATCT
TGACCTGGATGCAAGCTCATCAGAACAGACGCTGAACTTTTTCGCCTGGAT

图43

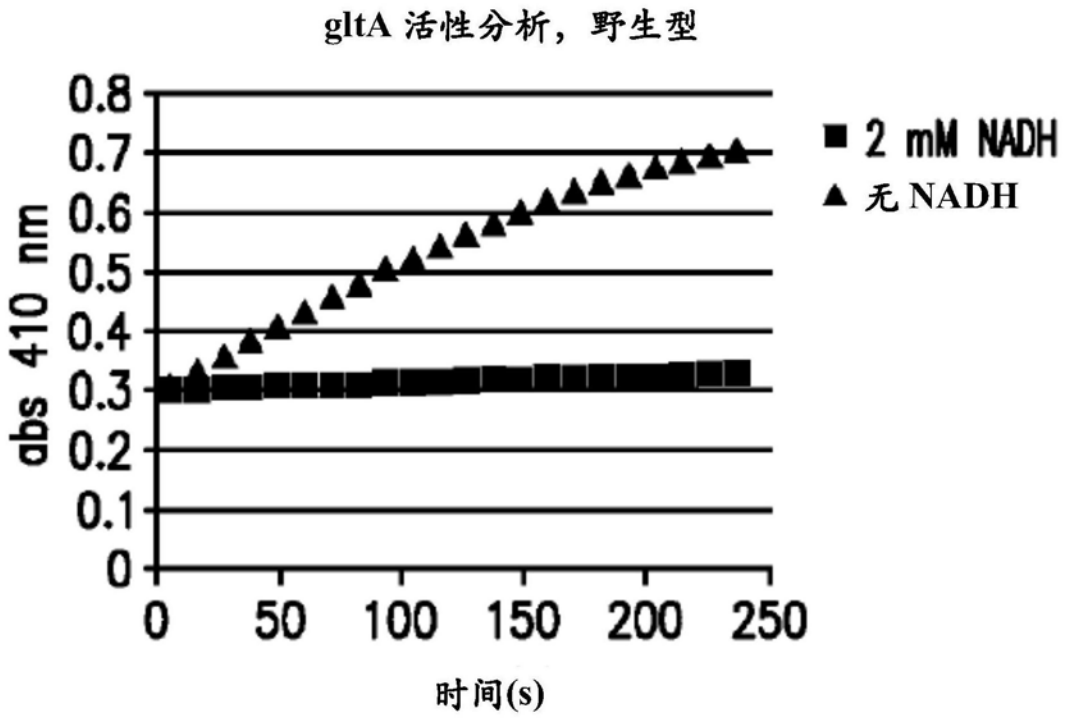

gltA 活性分析，野生型
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
abs 410 nm
0
50
100
150
200
250
时间(s)
2 mM NADH
无 NADH

图44A

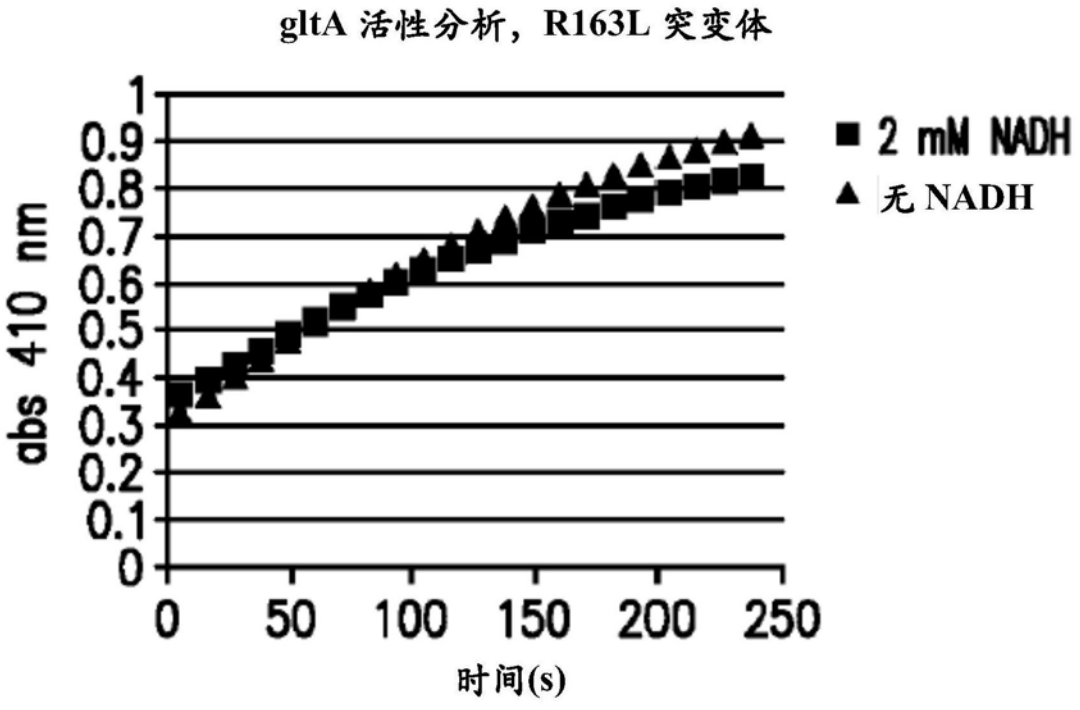

gltA 活性分析，R163L 突变体
1
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0
abs 410 nm
0
50
100
150
200
250
时间(s)
2 mM NADH
无 NADH

图44B

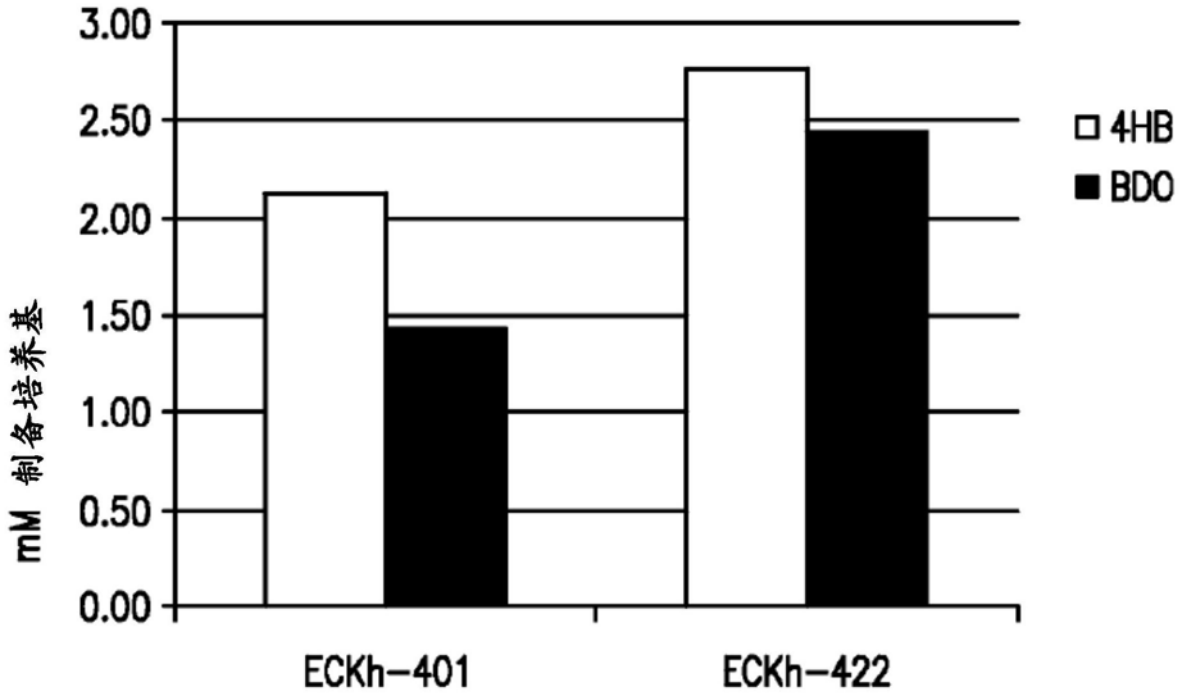


图45

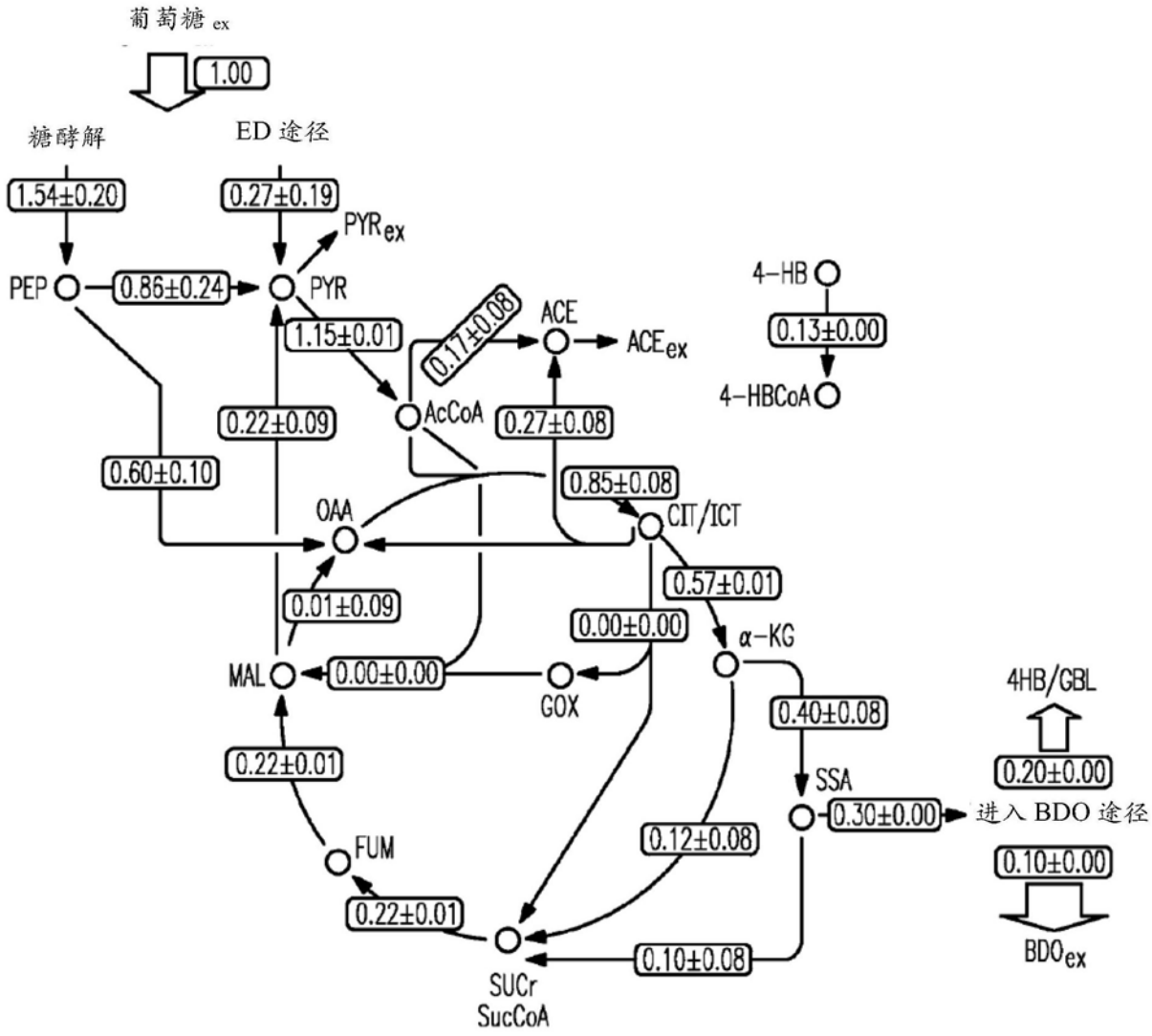

葡萄糖 ex
1.00
糖酵解
ED 途径
1.54±0.20
0.27±0.19
PYRex
PEP
0.86±0.24
PYR
1.15±0.01
0.17±0.08
ACE
ACEex
4-HB
0.13±0.00
4-HBCoA
AcCoA
0.22±0.09
0.27±0.08
0.60±0.10
0.85±0.08
OAA
CIT/ICT
0.57±0.01
0.01±0.09
0.00±0.00
α-KG
MAL
0.00±0.00
GOX
4HB/GBL
0.40±0.08
0.20±0.00
SSA
0.22±0.01
0.30±0.00
进入 BDO 途径
0.12±0.08
FUM
0.10±0.00
0.22±0.01
BDOex
0.10±0.08
SUCr
SucCoA

图46

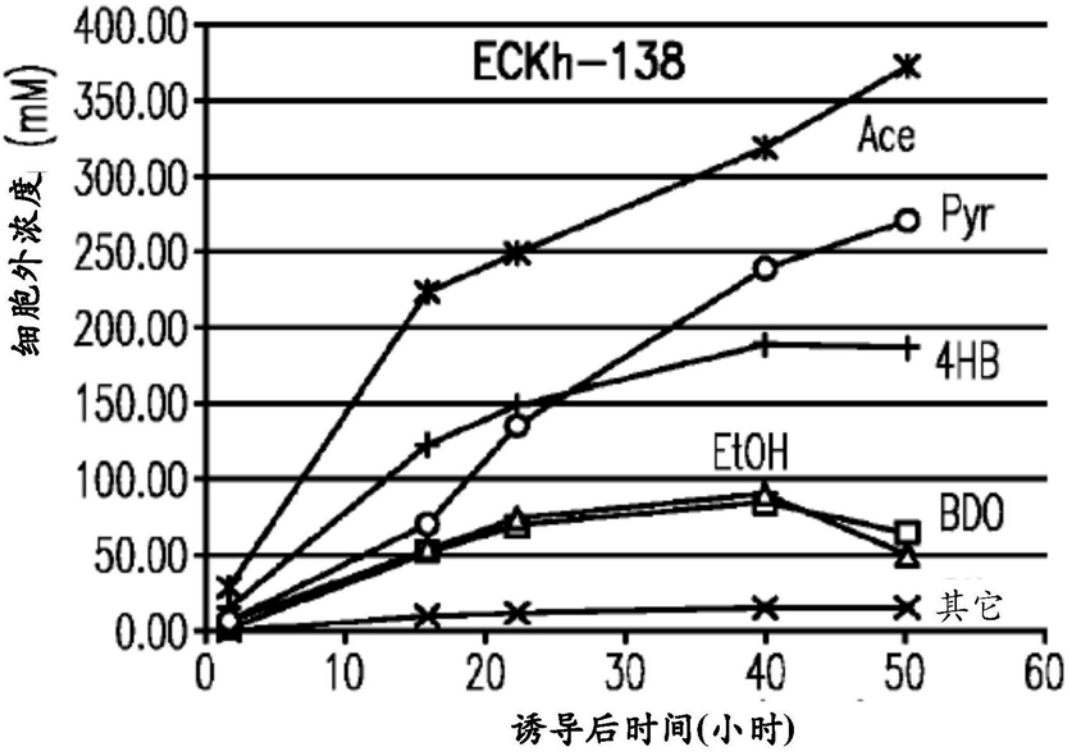

ECKh-138
细胞外浓度 (mM)
400.00
350.00
300.00
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
0
10
20
30
40
50
60
Ace
Pyr
4HB
EtOH
BDO
其它
诱导后时间(小时)

图47A

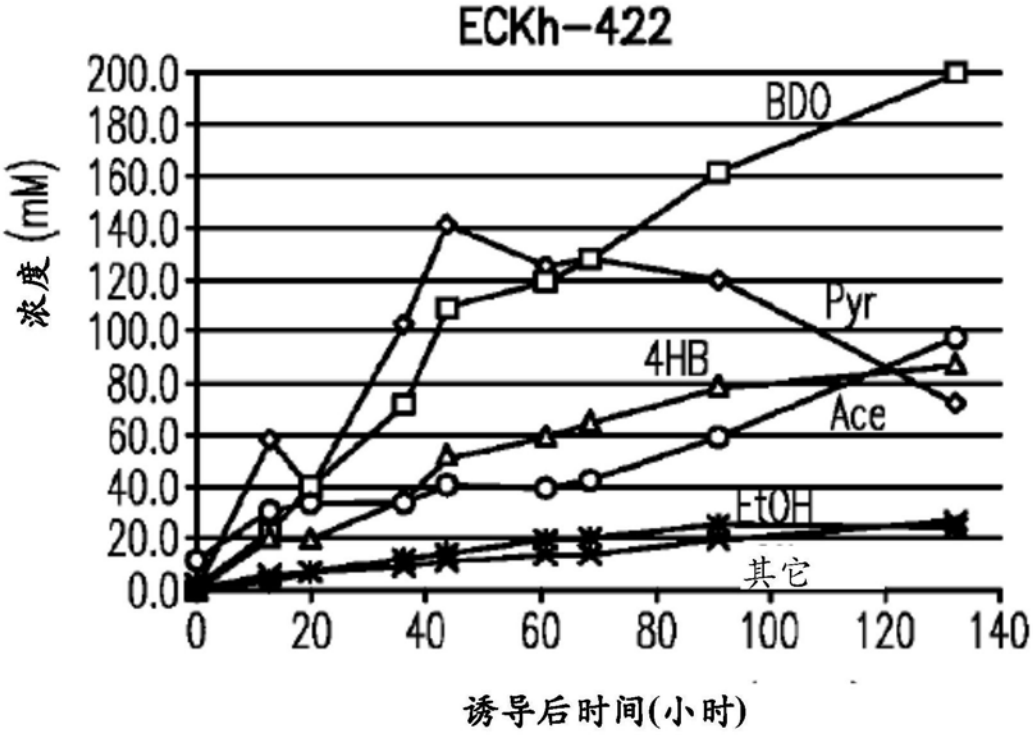

ECKh-422
浓度 (mM)
200.0
180.0
160.0
140.0
120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
0
20
40
60
80
100
120
140
BDO
Pyr
4HB
Ace
EtOH
其它
诱导后时间(小时)

图47B

CGCGATGTCGACGTCACGAAACTGAAAAAACCGCTCTACATTCTGGCGACTGCTGATGAAGAAACC
AGTATGGCCGGAGCGCGTTATTTTGCCGAAACTACCGCCCTGCGCCCGGATTGCGCCATCATTGGCG
AACCGACGTCACTACAACCGGTACGCGCACATAAAGGTCATATCTCTAACGCCATCCGTATTCAGGG
CCAGTCGGGGCACTCCAGCGATCCAGCACGCGGAGTTAACGCTATCGAACTAATGCACGACGCCAT
CGGGCATATTTTGCAATTGCGCGATAACCTGAAAGAACGTTATCACTACGAAGCGTTTACCGTGCCA
TACCCTACGCTCAACCTCGGGCATATTCACGGTGGCGACGCTTCTAACCGTATTTGCGCTTGCTGTGA
GTTGCATATGGATATTCGTCCGCTGCCTGGCATGACACTCAATGAACTTAATGGTTTGCTCAACGATG
CATTGGCTCCGGTGAGCGAACGCTGGCCGGGTCGTCTGACGGTCGACGAGCTGCATCCGCCGATCC
CTGGCTATGAATGCCCACCGAATCATCAACTGGTTGAAGTGGTTGAGAAATTGCTCGGAGCAAAAA
CCGAAGTGGTGAACTACTGTACCGAAGCGCCGTTTATTCAAACGTTATGCCCGACGCTGGTGTTGGG
GCCTGGCTCAATTAATCAGGCTCATCAACCTGATGAATATCTGGAAACACGGTTTATCAAGCCCACCC
GCGAACTGATAACCCAGGTAATTCACCATTTTTGCTGGCATTAAAACGTAGGCCGGATAAGGCGCTC
GCGCCGCATCCGGCGCTGTTGCCAAACTCCAGTGCCGCAATAATGTCGGATGCGATGCTTGCGCATC
TTATCCGACCTACAGTGACTCAAACGATGCCCAACCGTAGGCCGGATAAGGCGCTCGCGCCGCATCC
GGCACTGTTGCCAAACTCCAGTGCCGCAATAATGTCGGATGCGATACTTGCGCATCTTATCCGACCG
ACAGTGACTCAAACGATGCCCAACTGTAGGCCGGATAAGGCGCTCGCGCCGCATCCGGCACTGTTG
CCAAACTCCAGTGCCGCAATAATGTCGGATGCGATACTTGCGCATCTTATCCGACCTACACCTTTGGT
GTTACTTGGGGCGATTTTTTAACATTTCCATAAGTTACGCTTATTTAAAGCGTCGTGAATTTAATGAC
GTAAATTCCTGCTATTTATTCGTTTGCTGAAGCGATTTCGCAGCATTTGACGTCACCGCTTTTACGTG
GCTTTATAAAAGACGACGAAAAGCAAAGCCCGAGCATATTCGCGCCAATGCTAGCAAGAGGAGAAG
TCGACATGACAGACTTAAATAAAGTGGTAAAAGAACTTGAAGCTCTTGGTATTTATGACGTAAAAGA
AGTTGTTTACAATCCAAGCTACGAGCAATTGTTCGAAGAAGAAACTAAACCAGGTTTAGAAGGCTTT
GAAAAAGGTACTTTAACTACGACTGGTGCAGTGGCAGTAGATACAGGTATCTTCACAGGTCGTTCTC
CAAAAGATAAATATATCGTGTTAGATGAAAAAACCAAAGATACTGTTTGGTGGACATCTGAAACAGC
AAAAAACGACAACAAGCCAATGAACCAAGCTACATGGCAAAGCTTAAAAGACTTGGTAACCAACCA
GCTTTCTCGTAAACGCTTATTTGTAGTTGATGGTTTCTGTGGTGCGAGCGAACACGACCGTATTGCA
GTACGTATTGTCACTGAAGTAGCGTGGCAAGCACATTTTGTAAAAAATATGTTTATTCGCCCAACTGA
AGAACAACTCAAAAATTTTGAACCAGATTTCGTTGTAATGAATGGTTCTAAAGTAACCAATCCAAACT
GGAAAGAACAAGGTTTAAATTCAGAAAACTTTGTTGCTTTCAACTTGACTGAACGCATTCAATTAATC
GGTGGTACTTGGTACGGCGGTGAAATGAAAAAAGGTATGTTCTCAATCATGAACTACTTCCTACCAC
TTAAAGGTGTTGGTGCAATGCACTGCTCAGCTAACGTTGGTAAAGATGGCGATGTAGCAATCTTCTT
CGGCTTATCTGGCACAGGTAAAACAACCCTTTCAACGGATCCAAAACGTGAATTAATCGGTGACGAT
GAACACGGCTGGGATGATGTGGGTATCTTTAACTTTGAAGGTGGTTGCTATGCGAAAACCATTCACC
TTTCAGAAGAAAATGAACCAGATATTTACCGCGCTATCCGTCGCGACGCATTATTAGAAAACGTGGT
TGTTCGTGCAGATGGTTCTGTTGATTTCGATGATGGTTCAAAAACAGAAAATACTCGCGTGTCTTACC
CAATTTATCACATTGATAACATTGTAAAACCAGTTTCTCGTGCAGGTCACGCAACTAAAGTGATTTTC
TTAACTGCAGATGCATTTGGCGTATTACCACCAGTATCTAAATTGACACCAGAACAAACTAAATACTA
CTTCTTATCTGGTTTCACAGCAAAATTAGCAGGTACTGAACGTGGTATTACTGAACCAACTCCAACTT
TCTCAGCATGTTTCGGTGCTGCGTTCTTAACCCTTCACCCAACTCAATATGCAGAAGTGTTAGTAAAA
CGTATGCAAGCAGTGGGTGCTGAAGCTTACTTAGTAAATACTGGTTGGAATGGCACAGGCAAACGT
ATCTCAATCAAAGATACTCGCGGAATCATTGATGCAATCTTAGATGGCTCAATTGAAAAAGCTGAAA
TGGGCGAATTACCAATCTTTAACTTAGCCATTCCTAAAGCATTACCAGGTGTAGATTCTGCAATCTTA
GATCCTCGCGATACTTACGCAGATAAAGCACAATGGCAATCAAAAGCTGAAGACTTAGCAGGTCGTT
TTGTGAAAAACTTTGTTAAATATGCAACTAACGAAGAAGGCAAAGCTTTAATTGCAGCTGGTCCTAA
AGCTTAATCTAGAAAGCTTCCTAGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCC
TTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGT

图48

AGGACGAATTCACTTCTGTTCTAACACCCTCGTTTTCAATATATTTCTGTCTGCATTTTATTCAAATTCT
GAATATACCTTCAGATATCCTTAAGGAATTGTCGTTACATTCGGCGATATTTTTTCAAGACAGGTTCT
TACTATGCATTCCACAGAAGTCCAGGCTAAACCTCTTTTTAGCTGGAAAGCCCTGGGTTGGGCACTG
CTCTACTTTTGGTTTTTCTCTACTCTGCTACAGGCCATTATTTACATCAGTGGTTATAGTGGCACTAAC
GGCATTCGCGACTCGCTGTTATTCAGTTCGCTGTGGTTGATCCCGGTATTCCTCTTTCCGAAGCGGAT
TAAAATTATTGCCGCAGTAATCGGCGTGGTGCTATGGGCGGCCTCTCTGGCGGCGCTGTGCTACTAC
GTCATCTACGGTCAGGAGTTCTCGCAGAGCGTTCTGTTTGTGATGTTCGAAACCAACACCAACGAAG
CCAGCGAGTATTTAAGCCAGTATTTCAGCCTGAAAATTGTGCTTATCGCGCTGGCCTATACGGCGGT
GGCAGTTCTGCTGTGGACACGCCTGCGCCCGGTCTATATTCCAAAGCCGTGGCGTTATGTTGTCTCTT
TTGCCCTGCTTTATGGCTTGATTCTGCATCCGATCGCCATGAATACGTTTATCAAAAACAAGCCGTTT
GAGAAAACGTTGGATAACCTGGCCTCGCGTATGGAGCCTGCCGCACCGTGGCAATTCCTGACCGGC
TATTATCAGTATCGTCAGCAACTAAACTCGCTAACAAAGTTACTGAATGAAAATAATGCCTTGCCGCC
ACTGGCTAATTTCAAAGATGAATCGGGTAACGAACCGCGCACTTTAGTGCTGGTGATTGGCGAGTC
GACCCAGCGCGGACGCATGAGTCTGTACGGTTATCCGCGTGAAACCACGCCGGAGCTGGATGCGCT
GCATAAAACCGATCCGAATCTGACCGTGTTTAATAACGTAGTTACGTCTCGTCCGTACACCATTGAAA
TCCTGCAACAGGCGCTGACCTTTGCCAATGAAAAGAACCCGGATCTGTATCTGACGCAGCCGTCGCT
GATGAACATGATGAAACAGGCGGGTTATAAAACCTTC

图48(续)

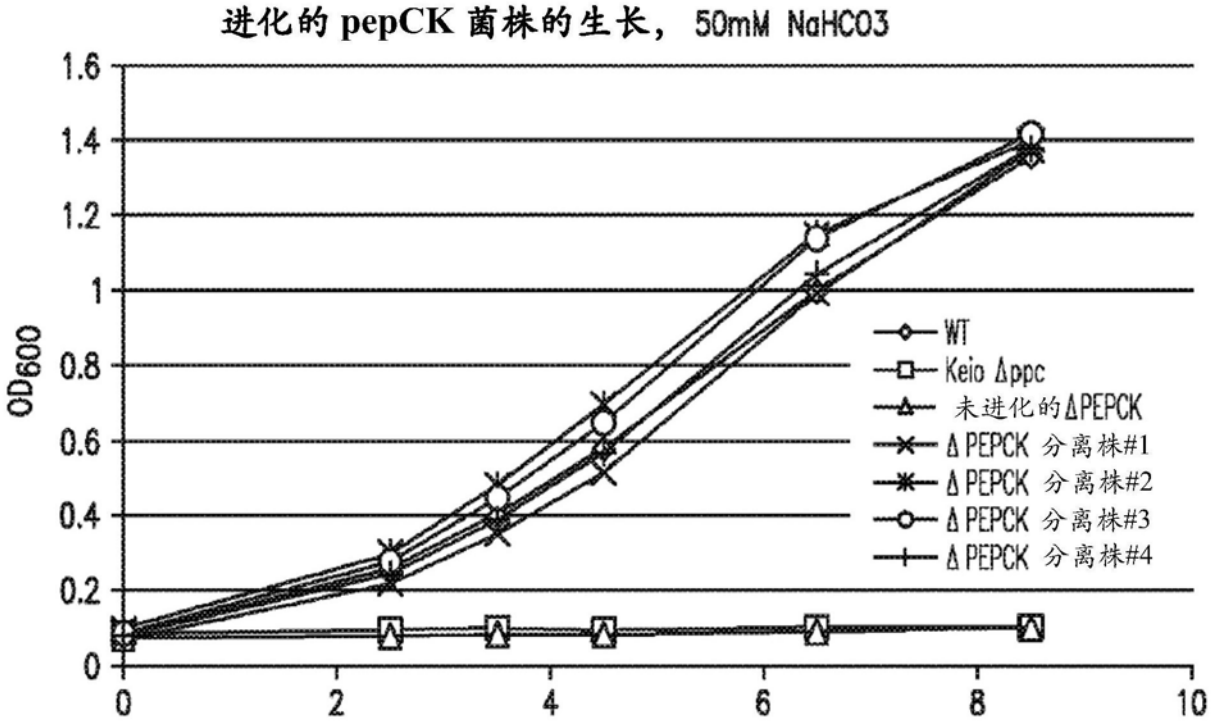


图49

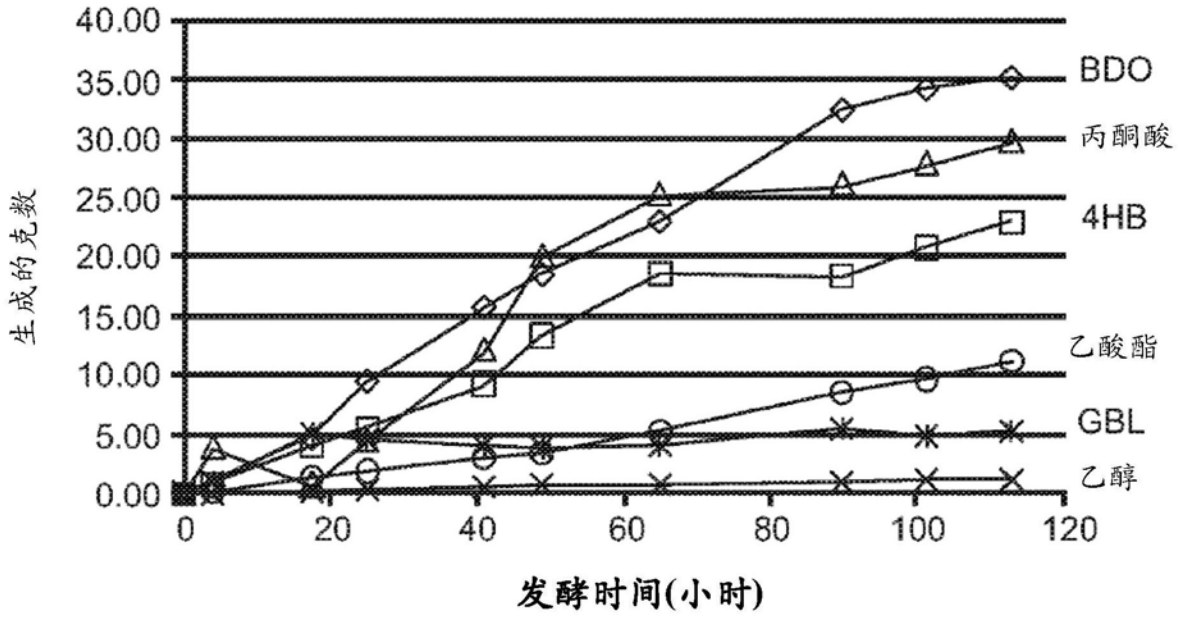

40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
生成的克数
0
20
40
60
80
100
120
发酵时间(小时)
BDO
丙酮酸
4HB
乙酸酯
GBL
乙醇

图50

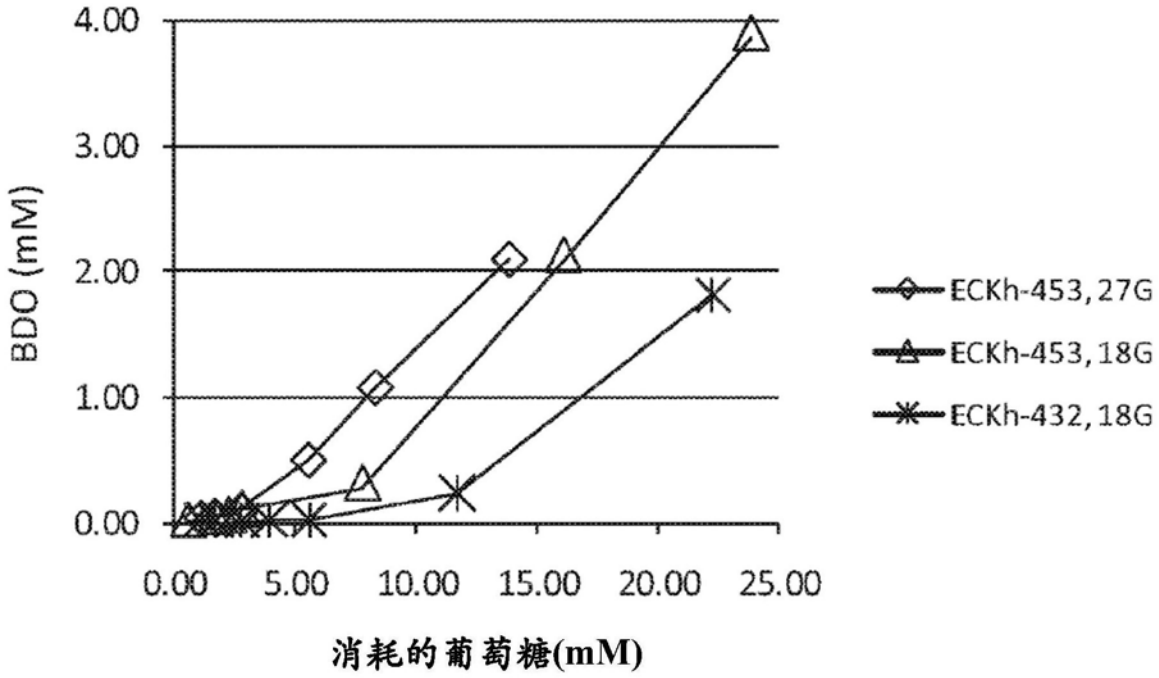

4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
BDO (mM)
0.00
5.00
10.00
15.00
20.00
25.00
消耗的葡萄糖(mM)
ECKh-453,27G
ECKh-453,18G
ECKh-432,18G

图51

AATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCACCTCGAGAATTGTGAGCGGATAACAATTGACATTG
TGAGCGGATAACAAGATACTGAGCACATCAGCAGGACGCACTGACCGAATTCAATTAAGCTAGCAA
GAGGAGAAGTCGAGATGAACTTACATGAATATCAGGCAAAACAACTTTTTGCCCGCTATGGCTTACC
AGCACCGGTGGGTTATGCCTGTACTACTCCGCGCGAAGCAGAAGAAGCCGCTTCAAAAATCGGTGC
CGGTCCGTGGGTAGTGAAATGTCAGGTTCACGCTGGTGGCCGCGGTAAAGCGGGCGGTGTGAAAG
TTGTAAACAGCAAAGAAGACATCCGTGCTTTTGCAGAAAACTGGCTGGGCAAGCGTCTGGTAACGT
ATCAAACAGATGCCAATGGCCAACCGGTTAACCAGATTCTGGTTGAAGCAGCGACCGATATCGCTAA
AGAGCTGTATCTCGGTGCCGTTGTTGACCGTAGTTCCCGTCGTGTGGTCTTTATGGCCTCCACCGAA
GGCGGCGTGGAAATCGAAAAAGTGGCGGAAGAAACTCCGCACCTGATCCATAAAGTTGCGCTTGAT
CCGCTGACTGGCCCGATGCCGTATCAGGGACGCGAGCTGGCGTTCAAACTGGGTCTGGAAGGTAAA
CTGGTTCAGCAGTTCACCAAAATCTTCATGGGCCTGGCGACCATTTTCCTGGAGCGCGACCTGGCGT
TGATCGAAATCAACCCGCTGGTCATCACCAAACAGGGCGATCTGATTTGCCTCGACGGCAAACTGGG
CGCTGACGGCAACGCACTGTTCCGCCAGCCTGATCTGCGCGAAATGCGTGACCAGTCGCAGGAAGA
TCCGCGTGAAGCACAGGCTGCACAGTGGGAACTGAACTACGTTGCGCTGGACGGTAACATCGGTTG
TATGGTTAACGGCGCAGGTCTGGCGATGGGTACGATGGACATCGTTAAACTGCACGGCGGCGAACC
GGCTAACTTCCTTGACGTTGGCGGCGGCGCAACCAAAGAACGTGTAACCGAAGCGTTCAAAATCAT
CCTCTCTGACGACAAAGTGAAAGCCGTTCTGGTTAACATCTTCGGCGGTATCGTTCGTTGCGACCTG
ATCGCTGACGGTATCATCGGCGCGGTAGCAGAAGTGGGTGTTAACGTACCGGTCGTGGTACGTCTG
GAAGGTAACAACGCCGAACTCGGCGCGAAGAAACTGGCTGACAGCGGCCTGAATATTATTGCAGCA
AAAGGTCTGACGGATGCAGCTCAGCAGGTTGTTGCCGCAGTGGAGGGGAAATAATGTCCATTTTAA
TCGATAAAAACACCAAGGTTATCTGCCAGGGCTTTACCGGTAGCCAGGGGACTTTCCACTCAGAACA
GGCCATTGCATACGGCACTAAAATGGTTGGCGGCGTAACCCCAGGTAAAGGCGGCACCACCCACCT
CGGCCTGCCGGTGTTCAACACCGTGCGTGAAGCCGTTGCTGCCACTGGCGCTACCGCTTCTGTTATC
TACGTACCAGCACCGTTCTGCAAAGACTCCATTCTGGAAGCCATCGACGCAGGCATCAAACTGATTA
TCACCATCACTGAAGGCATCCCGACGCTGGATATGCTGACCGTGAAAGTGAAGCTGGATGAAGCAG
GCGTTCGTATGATCGGCCCGAACTGCCCAGGCGTTATCACTCCGGGTGAATGCAAAATCGGTATCCA
GCCTGGTCACATTCACAAACCGGGTAAAGTGGGTATCGTTTCCCGTTCCGGTACACTGACCTATGAA
GCGGTTAAACAGACCACGGATTACGGTTTCGGTCAGTCGACCTGTGTCGGTATCGGCGGTGACCCG
ATCCCGGGCTCTAACTTTATCGACATTCTCGAAATGTTCGAAAAAGATCCGCAGACCGAAGCGATCG
TGATGATCGGTGAGATCGGCGGTAGCGCTGAAGAAGAAGCAGCTGCGTACATCAAAGAGCACGTT
ACCAAGCCAGTTGTGGGTTACATCGCTGGTGTGACTGCGCCGAAAGGCAAACGTATGGGCCACGCG
GGTGCCATCATTGCCGGTGGGAAAGGGACTGCGGATGAGAAATTCGCTGCTCTGGAAGCCGCAGG
CGTGAAAACCGTTCGCAGCCTGGCGGATATCGGTGAAGCACTGAAAACTGTTCTGAAATAATCTAGC
AAGAGGAGAAGTCGACATGGAAATCAAAGAAATGGTGAGCCTTGCACGCAAGGCTCAGAAGGAGT
ATCAAGCTACCCATAACCAAGAAGCAGTTGACAACATTTGCCGAGCTGCAGCAAAAGTTATTTATGA
AAATGCAGCTATTCTGGCTCGCGAAGCAGTAGACGAAACCGGCATGGGCGTTTACGAACACAAAGT
GGCCAAGAATCAAGGCAAATCCAAAGGTGTTTGGTACAACCTCCACAATAAAAAATCGATTGGTATC
CTCAATATAGACGAGCGTACCGGTATGATCGAGATTGCAAAGCCTATCGGAGTTGTAGGAGCCGTA
ACGCCGACGACCAACCCGATCGTTACTCCGATGAGCAATATCATCTTTGCTCTTAAGACCTGCAATGC
CATCATTATTGCCCCCCACCCCAGATCCAAAAAATGCTCTGCACACGCAGTTCGTCTGATCAAAGAAG
CTATCGCTCCGTTCAACGTACCGGAAGGTATGGTTCAGATCATCGAAGAACCCAGCATCGAGAAGAC
GCAGGAACTCATGGGCGCCGTAGACGTAGTAGTTGCTACGGGTGGTATGGGCATGGTGAAGTCTG
CATATTCTTCAGGAAAGCCTTCTTTCGGTGTTGGAGCCGGTAACGTTCAGGTGATCGTGGATAGCAA
CATCGATTTCGAAGCTGCTGCAGAAAAAATCATCAC

图52

CGGTCGTGCTTTCGACAACGGTATCATCTGCTCAGGCGAACAGAGCATCATCTACAACGAGGCTGAC
AAGGAAGCAGTTTTCACAGCATTCCGCAACCACGGTGCATATTTCTGTGACGAAGCCGAAGGAGAT
CGGGCTCGTGCAGCTATCTTCGAAAATGGAGCCATCGCGAAAGATGTAGTAGGTCAGAGCGTTGCC
TTCATTGCCAAGAAAGCAAACATCAATATCCCCGAGGGTACCCGTATTCTCGTTGTTGAAGCTCGCG
GCGTAGGAGCAGAAGACGTTATCTGTAAGGAAAAGATGTGTCCCGTAATGTGCGCCCTCAGCTACA
AGCACTTCGAAGAAGGTGTAGAAATCGCACGTACGAACCTCGCCAACGAAGGTAACGGCCACACCT
GTGCTATCCACTCCAACAATCAGGCACACATCATCCTCGCAGGATCAGAGCTGACGGTATCTCGTAT
CGTAGTGAATGCTCCGAGTGCCACTACAGCAGGCGGTCACATCCAAAACGGTCTTGCCGTAACCAAT
ACGCTCGGATGCGGATCATGGGGTAATAACTCTATCTCCGAGAACTTCACTTACAAGCACCTCCTCA
ACATTTCACGCATCGCACCGTTGAATTCAAGCATTCACATCCCCGATGACAAAGAAATCTGGGAACT
CTAATCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGCAACTTTTCAAACTCAAGAGTGTAACACATCACTTTGA
CACTTTTGCAGAATTTGCCAAGGAATTCTGTCTTGGAGAACGCGACTTGGTAATTACCAACGAGTTC
ATCTATGAACCGTATATGAAGGCATGCCAGCTCCCCTGCCATTTTGTTATGCAGGAGAAATATGGGC
AAGGCGAGCCTTCTGACGAAATGATGAATAACATCTTGGCAGACATCCGTAATATCCAGTTCGACCG
CGTAATCGGTATCGGAGGAGGTACGGTTATTGACATCTCTAAACTTTTCGTTCTGAAAGGATTAAAT
GATGTACTCGATGCATTCGACCGCAAAATACCTCTTATCAAAGAGAAAGAACTGATCATTGTGCCCA
CAACATGCGGAACGGGTAGCGAGGTGACGAACATTTCTATCGCAGAAATCAAAAGCCGTCACACCA
AAATGGGATTGGCTGACGATGCCATTGTTGCAGACCATGCCATCATCATACCTGAACTTCTGAAGAG
CTTGCCTTTCCACTTCTACGCATGCAGTGCAATCGATGCTCTTATCCATGCCATCGAGTCATACGTATC
TCCTAAAGCCAGTCCATATTCTCGTCTGTTCAGTGAGGCGGCTTGGGACATTATCCTGGAAGTATTCA
AGAAAATCGCCGAACACGGCCCTGAATACCGCTTCGAAAAGCTGGGAGAAATGATCATGGCCAGCA
ACTATGCCGGTATAGCCTTCGGAAATGCAGGAGTAGGAGCCGTCCACGCACTATCCTACCCGTTGGG
AGGCAACTATCACGTGCCGCATGGAGAAGCAAACTATCAGTTCTTCACAGAGGTATTCAAAGTATAC
CAAAAGAAGAATCCTTTCGGCTATATAGTCGAACTCAACTGGAAGCTCTCCAAGATACTGAACTGCC
AGCCCGAATACGTATATCCGAAGCTGGATGAACTTCTCGGATGCCTTCTTACCAAGAAACCTTTGCAC
GAATACGGCATGAAGGACGAAGAGGTAAGAGGCTTTGCGGAATCAGTGCTTAAGACACAGCAAAG
ATTGCTCGCCAACAACTACGTAGAGCTTACTGTAGATGAGATCGAAGGTATCTACAGAAGACTCTAC
TAATCTAGAAAGCTTCCTAGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTC
GTTTTATCTGTTGTTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAGACCTAGGC
GTTCGGCTGCGACACGTCTTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTCGAAGTTCCTATACTTTCTA
GAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTCATATGGACCATGGCTAATTCCCAT

图52(续)

TCGAGAAATTTATCAAAAAGAGTGTTGACTTGTGAGCGGATAACAATGATACTTAGATTCAATTGTG
AGCGGATAACAATTTCACACAGAATTCAATTAAGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGGCCAACAT
AAGTTCACCATTCGGGCAAAACGAATGGCTGGTTGAAGAGATGTACCGCAAGTTCCGCGACGACCC
CTCCTCGGTCGATCCCAGCTGGCACGAGTTCCTGGTTGACTACAGCCCCGAACCCACCTCCCAACCA
GCTGCCGAACCAACCCGGGTTACCTCGCCACTCGTTGCCGAGCGGGCCGCTGCGGCCGCCCCGCAG
GCACCCCCCAAGCCGGCCGACACCGCGGCCGCGGGCAACGGCGTGGTCGCCGCACTGGCCGCCAA
AACTGCCGTTCCCCCGCCAGCCGAAGGTGACGAGGTAGCGGTGCTGCGCGGCGCCGCCGCGGCCG
TCGTCAAGAACATGTCCGCGTCGTTGGAGGTGCCGACGGCGACCAGCGTCCGGGCGGTCCCGGCCA
AGCTACTGATCGACAACCGGATCGTCATCAACAACCAGTTGAAGCGGACCCGCGGCGGCAAGATCT
CGTTCACGCATTTGCTGGGCTACGCCCTGGTGCAGGCGGTGAAGAAATTCCCGAACATGAACCGGC
ACTACACCGAAGTCGACGGCAAGCCCACCGCGGTCACGCCGGCGCACACCAATCTCGGCCTGGCGA
TCGACCTGCAAGGCAAGGACGGGAAGCGTTCCCTGGTGGTGGCCGGCATCAAGCGGTGCGAGACC
ATGCGATTCGCGCAGTTCGTCACGGCCTACGAAGACATCGTACGCCGGGCCCGCGACGGCAAGCTG
ACCACTGAAGACTTTGCCGGCGTGACGATTTCGCTGACCAATCCCGGAACCATCGGCACCGTGCATT
CGGTGCCGCGGCTGATGCCCGGCCAGGGCGCCATCATCGGCGTGGGCGCCATGGAATACCCCGCC
GAGTTTCAAGGCGCCAGCGAGGAACGCATCGCCGAGCTGGGCATCGGCAAATTGATCACTTTGACC
TCCACCTACGACCACCGCATCATCCAGGGCGCGGAATCGGGCGACTTCCTGCGCACCATCCACGAGT
TGCTGCTCTCGGATGGCTTCTGGGACGAGGTCTTCCGCGAACTGAGCATCCCATATCTGCCGGTGCG
CTGGAGCACCGACAACCCCGACTCGATCGTCGACAAGAACGCTCGCGTCATGAACTTGATCGCGGC
CTACCGCAACCGCGGCCATCTGATGGCCGATACCGACCCGCTGCGGTTGGACAAAGCTCGGTTCCGC
AGTCACCCCGACCTCGAAGTGCTGACCCACGGCCTGACGCTGTGGGATCTCGATCGGGTGTTCAAG
GTCGACGGCTTTGCCGGTGCGCAGTACAAGAAACTGCGCGACGTGCTGGGCTTGCTGCGCGATGCC
TACTGCCGCCACATCGGCGTGGAGTACGCCCATATCCTCGACCCCGAACAAAAGGAGTGGCTCGAA
CAACGGGTCGAGACCAAGCACGTCAAACCCACTGTGGCCCAACAGAAATACATCCTCAGCAAGCTC
AACGCCGCCGAGGCCTTTGAAACGTTCCTACAGACCAAGTACGTCGGCCAGAAGCGGTTCTCGCTG
GAAGGCGCCGAAAGCGTGATCCCGATGATGGACGCGGCGATCGACCAGTGCGCTGAGCACGGCCT
CGACGAGGTGGTCATCGGGATGCCGCACCGGGGCCGGCTCAACGTGCTGGCCAACATCGTCGGCA
AGCCGTACTCGCAGATCTTCACCGAGTTCGAGGGCAACCTGAATCCGTCGCAGGCGCACGGCTCCG
GTGACGTCAAGTACCACCTGGGCGCCACCGGGCTGTACCTGCAGATGTTCGGCGACAACGACATTC
AGGTGTCGCTGACCGCCAACCCGTCGCATCTGGAGGCCGTCGACCCGGTGCTGGAGGGATTGGTGC
GGGCCAAGCAGGATCTGCTCGACCACGGAAGCATCGACAGCGACGGCCAACGGGCGTTCTCGGTG
GTGCCGCTGATGTTGCATGGCGATGCCGCGTTCGCCGGTCAGGGTGTGGTCGCCGAGACGCTGAAC
CTGGCGAATCTGCCGGGCTACCGCGTCGGCGGCACCATCCACATCATCGTCAACAACCAGATCGGCT
TCACCACCGCGCCCGAGTATTCCAGGTCCAGCGAGTACTGCACCGACGTCGCAAAGATGATCGGGG
CACCGATCTTTCACGTCAACGGCGACGACCCGGAGGCGTGTGTCTGGGTGGCGCGGTTGGCGGTGG
ACTTCCGACAACGGTTCAAGAAGGACGTCGTCATCGACATGCTGTGCTACCGCCGCCGCGGGCACA
ACGAGGGTGACGACCCGTCGATGACCAACCCCTACATGTACGACGTCGTCGACACCAAGCGCGGGG
CCCGCAAAAGCTACACCGAAGCCCTGATCGGACGTGGCGACATCTCGATGAAGGAGGCCGAGGAC
GCGCTGCGCGACTACCAGGGCCAGCTGGAACGGGTGTTCAACGAAGTGCGCGAGCTGGAGAAGCA
CGGTGTGCAGCCGAGCGAGTCGGTCGAGTCCGACCAGATGATTCCCGCGGGGCTGGCCACTGCGG
TGGACAAGTCGCTGCTGGCCCGGATCGGCGATGCGTTCCTCGCCTTGCCGAACGGCTTCACCGCGCA
CCCGCGAGTCCAACCGGTGCTGGAGAAGCGCCGGGAGATGGCCTATGAAGGCAAGATCGACTGGG
CCTTTGGCGAGCTGCTGGCGCTGGGCTCGCTGGTGGCCGAAGGCAAGCTGGTGCGCTTGTCGGGGC
AGGACAGCCGCCGCGGCACCTTCTCCCAGCGGCATTCGGTTCTCATCGACCGCCACACTGGCGAGG
AGTTCACACCACTGCAGCTGCTGGCGACCAACTCCGACGGCAGCCCGACCGGCGGAAAGTTCCTGG
TCTACGACTCGCCACTGTCGGAGTACGCCGCCGTCGGCTTCGAGTACGGCTACACTGTGGGCAATCC
GGACGCCGTGGTGCTCTGGGAGGCGCAGTTCGGCGACTTCGTCAACGGCGCACAGTCGATCATCGA

图53

CGAGTTCATCAGCTCCGGTGAGGCCAAGTGGGGCCAATTGTCCAACGTCGTGCTGCTGTTACCGCAC
GGGCACGAGGGGCAGGGACCCGACCACACTTCTGCCCGGATCGAACGCTTCTTGCAGTTGTGGGCG
GAAGGTTCGATGACCATCGCGATGCCGTCGACTCCGTCGAACTACTTCCACCTGCTACGCCGGCATG
CCCTGGACGGCATCCAACGCCCGCTGATCGTGTTCACGCCCAAGTCGATGTTGCGTCACAAGGCCGC
CGTCAGCGAAATCAAGGACTTCACCGAGATCAAGTTCCGCTCAGTGCTGGAGGAACCCACCTATGA
GGACGGCATCGGAGACCGCAACAAGGTCAGCCGGATCCTGCTGACCAGTGGCAAGCTGTATTACGA
GCTGGCCGCCCGCAAGGCCAAGGACAACCGCAATGACCTCGCGATCGTGCGGCTTGAACAGCTCGC
CCCGCTGCCCAGGCGTCGACTGCGTGAAACGCTGGACCGCTACGAGAACGTCAAGGAGTTCTTCTG
GGTCCAAGAGGAACCGGCCAACCAGGGTGCGTGGCCGCGATTCGGGCTCGAACTACCCGAGCTGCT
GCCTGACAAGTTGGCCGGGATCAAGCGAATCTCGCGCCGGGCGATGTCAGCCCCGTCGTCAGGCTC
GTCGAAGGTGCACGCCGTCGAACAGCAGGAGATCCTCGACGAGGCGTTCGGCTAATCTAGCAAGA
GGAGAAGTCGACATGAAGTTATTAAAATTGGCACCTGATGTTTATAAATTTGATACTGCAGAGGAGT
TTATGAAATACTTTAAGGTTGGAAAAGGTGACTTTATACTTACTAATGAATTTTTATATAAACCTTTCC
TTGAGAAATTCAATGATGGTGCAGATGCTGTATTTCAGGAGAAATATGGACTCGGTGAACCTTCTGA
TGAAATGATAAACAATATAATTAAGGATATTGGAGATAAACAATATAATAGAATTATTGCTGTAGGG
GGAGGATCTGTAATAGATATAGCCAAAATCCTCAGTCTTAAGTATACTGATGATTCATTGGATTTGTT
TGAGGGAAAAGTACCTCTTGTAAAAAACAAAGAATTAATTATAGTTCCAACTACATGTGGAACAGGT
TCAGAAGTTACAAATGTATCAGTTGCAGAATTAAAGAGAAGACATACTAAAAAAGGAATTGCTTCA
GACGAATTATATGCAACTTATGCAGTACTTGTACCAGAATTTATAAAAGGACTTCCATATAAGTTTTT
TGTAACCAGCTCCGTAGATGCCTTAATACATGCAACAGAAGCTTATGTATCTCCAAATGCAAATCCTT
ATACTGATATGTTTAGTGTAAAAGCTATGGAGTTAATTTTAAATGGATACATGCAAATGGTAGAGAA
AGGAAATGATTACAGAGTTGAAATAATTGAGGATTTTGTTATAGGCAGCAATTATGCAGGTATAGCT
TTTGGAAATGCAGGAGTGGGAGCGGTTCACGCACTCTCATATCCAATAGGCGGAAATTATCATGTGC
CTCATGGAGAAGCAAATTATCTGTTTTTTACAGAAATATTTAAAACTTATTATGAGAAAAATCCAAAT
GGCAAGATTAAAGATGTAAATAAACTATTAGCAGGCATACTAAAATGTGATGAAAGTGAAGCTTAT
GACAGTTTATCACAACTTTTAGATAAATTATTGTCAAGAAAACCATTAAGAGAATATGGAATGAAAG
AGGAAGAAATTGAAACTTTTGCTGATTCAGTAATAGAAGGACAGCAGAGACTGTTGGTAAACAATT
ATGAACCTTTTTCAAGAGAAGACATAGTAAACACATATAAAAAGTTATATTAATCTAGAAAGCTTCCT
AGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTC
GGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAGACCTA

图53(续)

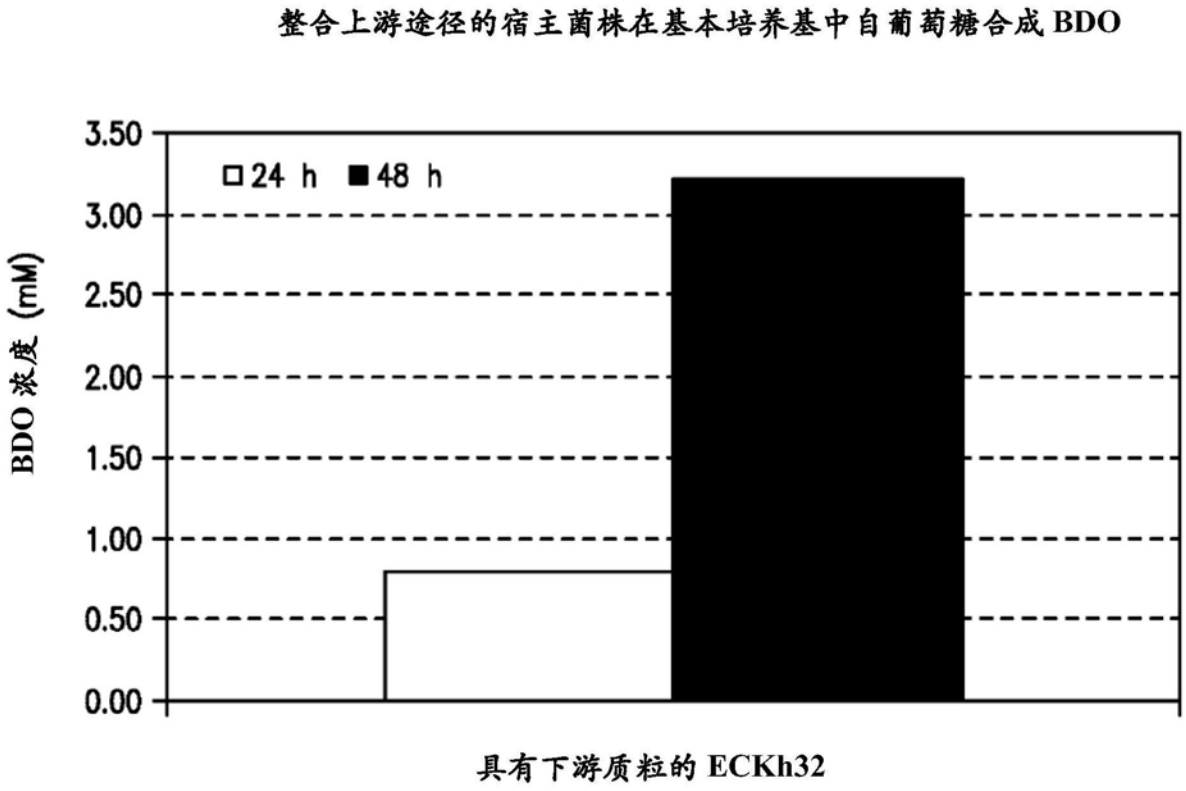

整合上游途径的宿主菌株在基本培养基中自葡萄糖合成 BDO
3.50
3.00
2.50
2.00
1.50
1.00
0.50
0.00
24 h
48 h
BDO 浓度 (mM)
具有下游质粒的 ECKh32

图54

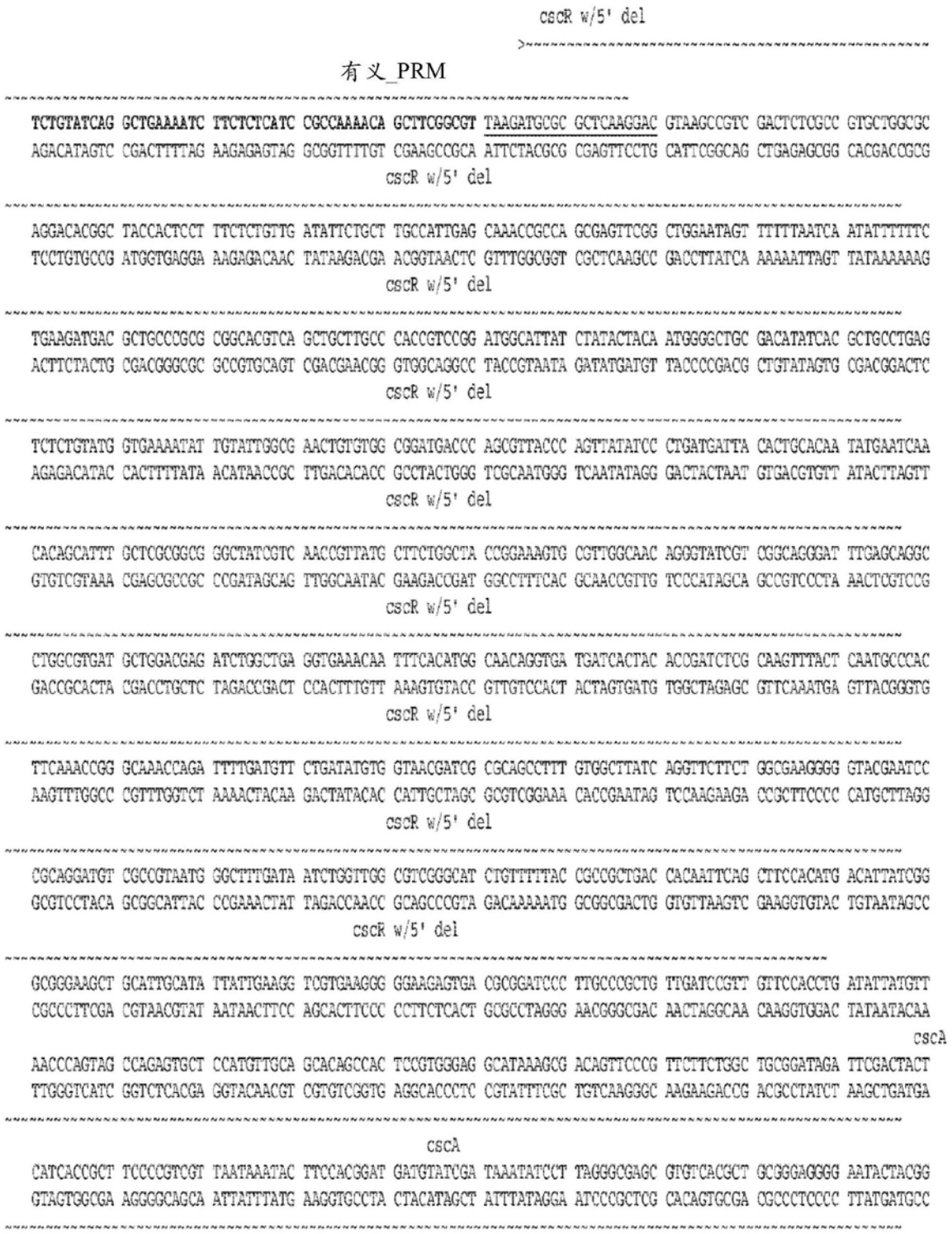

cscR w/5' del
有义_PRM
1 TCTGTATCAG GCTGAAAATC TTCTCTCATC CGCCAAAACA GCTTCGGCGT TAAGATGCGC GCTCAAGGAC GTAAGCCGTC GACTCTCGCC GTGCTGGCGC
AGACATAGTC CGACTTTTAG AAGAGAGTAG GCGGTTTTGT CGAAGCCGCA ATTCTACGCG CGAGTTCCTG CATTCGGCAG CTGAGAGCGG CACGACCGCG
cscR w/5' del
101 AGGACACGGC TACCACTCCT TTCTCTGTTG ATATTCTGCT TGCCATTGAG CAAACCGCCA GCGAGTTCGG CTGGAATAGT TTTTTAATCA ATATTTTTTC
TCCTGTGCCG ATGGTGAGGA AAGAGACAAC TATAAGACGA ACGGTAACTC GTTTGGCGGT CGCTCAAGCC GACCTTATCA AAAAATTAGT TATAAAAAAG
cscR w/5' del
201 TGAAGATGAC GCTGCCCGCG CGGCACGTCA GCTGCTTGCC CACCGTCCGG ATGGCATTAT CTATACTACA ATGGGGCTGC GACATATCAC GCTGCCTGAG
ACTTCTACTG CGACGGGCGC GCCGTGCAGT CGACGAACGG GTGGCAGGCC TACCGTAATA GATATGATGT TACCCCGACG CTGTATAGTG CGACGGACTC
cscR w/5' del
301 TCTCTGTATG GTGAAAATAT TGTATTGGCG AACTGTGTGG CGGATGACCC AGCGTTACCC AGTTATATCC CTGATGATTA CACTGCACAA TATGAATCAA
AGAGACATAC CACTTTTATA ACATAACCGC TTGACACACC GCCTACTGGG TCGCAATGGG TCAATATAGG GACTACTAAT GTGACGTGTT ATACTTAGTT
cscR w/5' del
401 CACAGCATTT GCTCGCGGCG GGCTATCGTC AACCGTTATG CTTCTGGCTA CCGGAAAGTG CGTTGGCAAC AGGGTATCGT CGGCAGGGAT TTGAGCAGGC
GTGTCGTAAA CGAGCGCCGC CCGATAGCAG TTGGCAATAC GAAGACCGAT GGCCTTTCAC GCAACCGTTG TCCCATAGCA GCCGTCCCTA AACTCGTCCG
cscR w/5' del
501 CTGGCGTGAT GCTGGACGAG ATCTGGCTGA GGTGAAACAA TTTCACATGG CAACAGGTGA TGATCACTAC ACCGATCTCG CAAGTTTACT CAATGCCCAC
GACCGCACTA CGACCTGCTC TAGACCGACT CCACTTTGTT AAAGTGTACC GTTGTCCACT ACTAGTGATG TGGCTAGAGC GTTCAAATGA GTTACGGGTG
cscR w/5' del
601 TTCAAACCGG GCAAACCAGA TTTTGATGTT CTGATATGTG GTAACGATCG CGCAGCCTTT GTGGCTTATC AGGTTCTTCT GGCGAAGGGG GTACGAATCC
AAGTTTGGCC CGTTTGGTCT AAAACTACAA GACTATACAC CATTGCTAGC GCGTCGGAAA CACCGAATAG TCCAAGAAGA CCGCTTCCCC CATGCTTAGG
cscR w/5' del
701 CGCAGGATGT CGCCGTAATG GGCTTTGATA ATCTGGTTGG CGTCGGGCAT CTGTTTTTAC CGCCGCTGAC CACAATTCAG CTTCCACATG ACATTATCGG
GCGTCCTACA GCGGCATTAC CCGAAACTAT TAGACCAACC GCAGCCCGTA GACAAAAATG GCGGCGACTG GTGTTAAGTC GAAGGTGTAC TGTAATAGCC
cscR w/5' del
801 GCGGGAAGCT GCATTGCATA TTATTGAAGG TCGTGAAGGG GGAAGAGTGA CGCGGATCCC TTGCCCGCTG TTGATCCGTT GTTCCACCTG ATATTATGTT
CGCCCTTCGA CGTAACGTAT AATAACTTCC AGCACTTCCC CCTTCTCACT GCGCCTAGGG AACGGGCGAC AACTAGGCAA CAAGGTGGAC TATAATACAA
cscA
901 AACCCAGTAG CCAGAGTGCT CCATGTTGCA GCACAGCCAC TCCGTGGGAG GCATAAAGCG ACAGTTCCCG TTCTTCTGGC TGCGGATAGA TTCGACTACT
TTGGGTCATC GGTCTCACGA GGTACAACGT CGTGTCGGTG AGGCACCCTC CGTATTTCGC TGTCAAGGGC AAGAAGACCG ACGCCTATCT AAGCTGATGA
cscA
1001 CATCACCGCT TCCCCGTCGT TAATAAATAC TTCCACGGAT GATGTATCGA TAAATATCCT TAGGGCGAGC GTGTCACGCT GCGGGAGGGG AATACTACGG
GTAGTGGCGA AGGGGCAGCA ATTATTTATG AAGGTGCCTA CTACATAGCT ATTTATAGGA ATCCCGCTCG CACAGTGCGA CGCCCTCCCC TTATGATGCC

图55

```
                                                    cscA
1101    TAGCCGTCTA AATTCTCGTG TGGGTAATAC CGCCACAAAA CAAGTCGCTC AGATTGGTTA TCAATATACA GCCGCATTCC AGTGCCGAGC TGTAATCCGT
        ATCGGCAGAT TTAAGAGCAC ACCCATTATG GCGGTGTTTT GTTCAGCGAG TCTAACCAAT AGTTATATGT CGGCGTAAGG TCACGGCTCG ACATTAGGCA
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                    cscA
1201    AATGTTCGGC ATCACTGTTC TTCAGCGCCC ACTGCAACTG AATCTCAACT GCTTGCGCGT TTTCCTGCAA AACATATTTA TTGCTGATTG TGCGGGGAGA
        TTACAAGCCG TAGTGACAAG AAGTCGCGGG TGACGTTGAC TTAGAGTTGA CGAACGCGCA AAAGGACGTT TTGTATAAAT AACGACTAAC ACGCCCCTCT
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                    cscA
1301    GACAGATTGA TGCTGCTGGC GTAACGACTC AGCTTCGTGT ACCGGGCGTT GTAGAAGTTT GCCATTGCTC TCTGATAGCT CGCGCGCCAG CGTCATGCAG
        CTGTCTAACT ACGACGACCG CATTGCTGAG TCGAAGCACA TGGCCCGCAA CATCTTCAAA CGGTAACGAG AGACTATCGA GCGCGCGGTC GCAGTACGTC
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                    cscA
1401    CCTGCCCATC CTTCACGTTT TGAGGGCATT GGCGATTCCC ACATATCCAT CCAGCCGATA ACAATACGCC GACCATCCTT CGCTAAAAAG CTTTGTGGTG
        GGACGGGTAG GAAGTGCAAA ACTCCCGTAA CCGCTAAGGG TGTATAGGTA GGTCGGCTAT TGTTATGCGG CTGGTAGGAA GCGATTTTTC GAAACACCAC
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                    cscA
1501    CATAAAAGTC ATGCCCGTTA TCAAGTTCAG TAAAATGCCC GGATTGTGCA AAAAGTCGTC CTGGCGACCA CATTCCGGGT ATTACGCCAC TTTGAAAGCG
        GTATTTTCAG TACGGGCAAT AGTTCAAGTC ATTTTACGGG CCTAACACGT TTTTCAGCAG GACCGCTGGT GTAAGGCCCA TAATGCGGTG AAACTTTCGC
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                    cscA
1601    ATTTCGGTAA CTGTATCCCT CGGCATTCAT TCCCTGCGGG GAAAACATCA GATAATGCTG ATCGCCAAGG CTGAAAAAGT CCGGACATTC CCACATATAG
        TAAAGCCATT GACATAGGGA GCCGTAAGTA AGGGACGCCC CTTTTGTAGT CTATTACGAC TAGCGGTTCC GACTTTTTCA GGCCTGTAAG GGTGTATATC
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                    cscA
1701    CTTTCACCCG CATCAGCGTG GGCCAGTACG CGATCGAAGG TCCATTCACG CAACGAACTG CCGCGATAAA GCAGGATCTG CCCCGTGTTG CCTGGATCTT
        GAAAGTGGGC GTAGTCGCAC CCGGTCATGC GCTAGCTTCC AGGTAAGTGC GTTGCTTGAC GGCGCTATTT CGTCCTAGAC GGGGCACAAC GGACCTAGAA
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                    cscA
1801    TCGCCCCGAC TACCATCCAC CATGTGTCGG CTTCACGCCA CACTTTAGGA TCGCGGAAGT GCATGATTCC TTCTGGTGGA GTGAGGATCA CACCCTGTTT
        AGCGGGGCTG ATGGTAGGTG GTACACAGCC GAAGTGCGGT GTGAAATCCT AGCGCCTTCA CGTACTAAGG AAGACCACCT CACTCCTAGT GTGGGACAAA
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                    cscA
1901    CTCGAAATGA ATACCATCCC GACTGGTAGC CAGACATTGT ACTTCGCGAA TTGCATCGTC ATTACCTGCA CCATCGAGCC AGACGTGTCC GGTGTAGATA
        GAGCTTTACT TATGGTAGGG CTGACCATCG GTCTGTAACA TGAAGCGCTT AACGTAGCAG TAATGGACGT GGTAGCTCGG TCTGCACAGG CCACATCTAT
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                    cscA
2001    AGTGAGAGGA CACCATTGTC ATCGACAGCA CTACCTGAAA AACACCCGTC TTTGTCATTA TCGTCTCCTG GCGCTAGCGC AATAGGCTCA TGCTGCCAGT
        TCACTCTCCT GTGGTAACAG TAGCTGTCGT GATGGACTTT TTGTGGGCAG AAACAGTAAT AGCAGAGGAC CGCGATCGCG TTATCCGAGT ACGACGGTCA
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                    cscA
2101    GGATCATATC GTCGCTGGTG GCATGTCCCC AGTGCATTGG CCCCCAGTGT TCGCTCATCG GATGATGTTG ATAAAACGCG TGATAACGAT CGTTAAACCA
        CCTAGTATAG CAGCGACCAC CGTACAGGGG TCACGTAACC GGGGGTCACA AGCGAGTAGC CTACTACAAC TATTTTGCGC ACTATTGCTA GCAATTTGGT
~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~
                                                    cscA
```

图55(续)

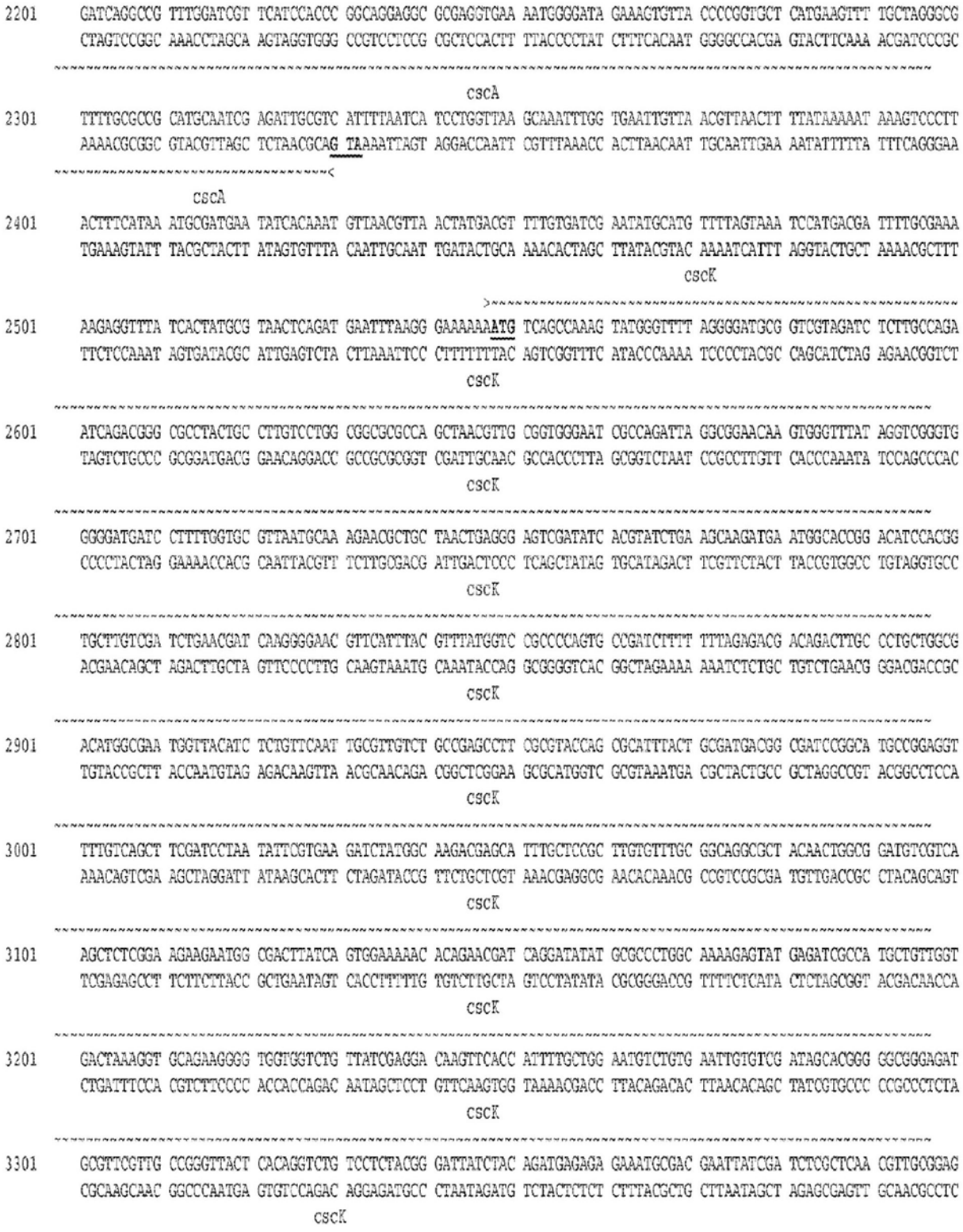

2201
GATCAGGCCG TTTGGATCGT TCATCCACCC GGCAGGAGGC GCGAGGTGAA AATGGGGATA GAAAGTGTTA CCCCGGTGCT CATGAAGTTT TGCTAGGGCG
CTAGTCCGGC AAACCTAGCA AGTAGGTGGG CCGTCCTCCG CGCTCCACTT TTACCCCTAT CTTTCACAAT GGGGCCACGA GTACTTCAAA ACGATCCCGC
cscA
2301
TTTTGCGCCG CATGCAATCG AGATTGCGTC ATTTTAATCA TCCTGGTTAA GCAAATTTGG TGAATTGTTA ACGTTAACTT TTATAAAAAT AAAGTCCCTT
AAAACGCGGC GTACGTTAGC TCTAACGCAG TAAAATTAGT AGGACCAATT CGTTTAAACC ACTTAACAAT TGCAATTGAA AATATTTTTA TTTCAGGGAA
cscA
2401
ACTTTCATAA ATGCGATGAA TATCACAAAT GTTAACGTTA ACTATGACGT TTTGTGATCG AATATGCATG TTTTAGTAAA TCCATGACGA TTTTGCGAAA
TGAAAGTATT TACGCTACTT ATAGTGTTTA CAATTGCAAT TGATACTGCA AAACACTAGC TTATACGTAC AAAATCATTT AGGTACTGCT AAAACGCTTT
cscK
2501
AAGAGGTTTA TCACTATGCG TAACTCAGAT GAATTTAAGG GAAAAAAATG TCAGCCAAAG TATGGGTTTT AGGGGATGCG GTCGTAGATC TCTTGCCAGA
TTCTCCAAAT AGTGATACGC ATTGAGTCTA CTTAAATTCC CTTTTTTTAC AGTCGGTTTC ATACCCAAAA TCCCCTACGC CAGCATCTAG AGAACGGTCT
cscK
2601
ATCAGACGGG CGCCTACTGC CTTGTCCTGG CGGCGCGCCA GCTAACGTTG CGGTGGGAAT CGCCAGATTA GGCGGAACAA GTGGGTTTAT AGGTCGGGTG
TAGTCTGCCC GCGGATGACG GAACAGGACC GCCGCGCGGT CGATTGCAAC GCCACCCTTA GCGGTCTAAT CCGCCTTGTT CACCCAAATA TCCAGCCCAC
cscK
2701
GGGGATGATC CTTTTGGTGC GTTAATGCAA AGAACGCTGC TAACTGAGGG AGTCGATATC ACGTATCTGA AGCAAGATGA ATGGCACCGG ACATCCACGG
CCCCTACTAG GAAAACCACG CAATTACGTT TCTTGCGACG ATTGACTCCC TCAGCTATAG TGCATAGACT TCGTTCTACT TACCGTGGCC TGTAGGTGCC
cscK
2801
TGCTTGTCGA TCTGAACGAT CAAGGGGAAC GTTCATTTAC GTTTATGGTC CGCCCCAGTG CCGATCTTTT TTTAGAGACG ACAGACTTGC CCTGCTGGCG
ACGAACAGCT AGACTTGCTA GTTCCCCTTG CAAGTAAATG CAAATACCAG GCGGGGTCAC GGCTAGAAAA AAATCTCTGC TGTCTGAACG GGACGACCGC
cscK
2901
ACATGGCGAA TGGTTACATC TCTGTTCAAT TGCGTTGTCT GCCGAGCCTT CGCGTACCAG CGCATTTACT GCGATGACGG CGATCCGGCA TGCCGGAGGT
TGTACCGCTT ACCAATGTAG AGACAAGTTA ACGCAACAGA CGGCTCGGAA GCGCATGGTC GCGTAAATGA CGCTACTGCC GCTAGGCCGT ACGGCCTCCA
cscK
3001
TTTGTCAGCT TCGATCCTAA TATTCGTGAA GATCTATGGC AAGACGAGCA TTTGCTCCGC TTGTGTTTGC GGCAGGCGCT ACAACTGGCG GATGTCGTCA
AAACAGTCGA AGCTAGGATT ATAAGCACTT CTAGATACCG TTCTGCTCGT AAACGAGGCG AACACAAACG CCGTCCGCGA TGTTGACCGC CTACAGCAGT
cscK
3101
AGCTCTCGGA AGAAGAATGG CGACTTATCA GTGGAAAAAC ACAGAACGAT CAGGATATAT GCGCCCTGGC AAAAGAGTAT GAGATCGCCA TGCTGTTGGT
TCGAGAGCCT TCTTCTTACC GCTGAATAGT CACCTTTTTG TGTCTTGCTA GTCCTATATA CGCGGGACCG TTTTCTCATA CTCTAGCGGT ACGACAACCA
cscK
3201
GACTAAAGGT GCAGAAGGGG TGGTGGTCTG TTATCGAGGA CAAGTTCACC ATTTTGCTGG AATGTCTGTG AATTGTGTCG ATAGCACGGG GGCGGGAGAT
CTGATTTCCA CGTCTTCCCC ACCACCAGAC AATAGCTCCT GTTCAAGTGG TAAAACGACC TTACAGACAC TTAACACAGC TATCGTGCCC CCGCCCTCTA
cscK
3301
GCGTTCGTTG CCGGGTTACT CACAGGTCTG TCCTCTACGG GATTATCTAC AGATGAGAGA GAAATGCGAC GAATTATCGA TCTCGCTCAA CGTTGCGGAG
CGCAAGCAAC GGCCCAATGA GTGTCCAGAC AGGAGATGCC CTAATAGATG TCTACTCTCT CTTTACGCTG CTTAATAGCT AGAGCGAGTT GCAACGCCTC
cscK

图55(续)

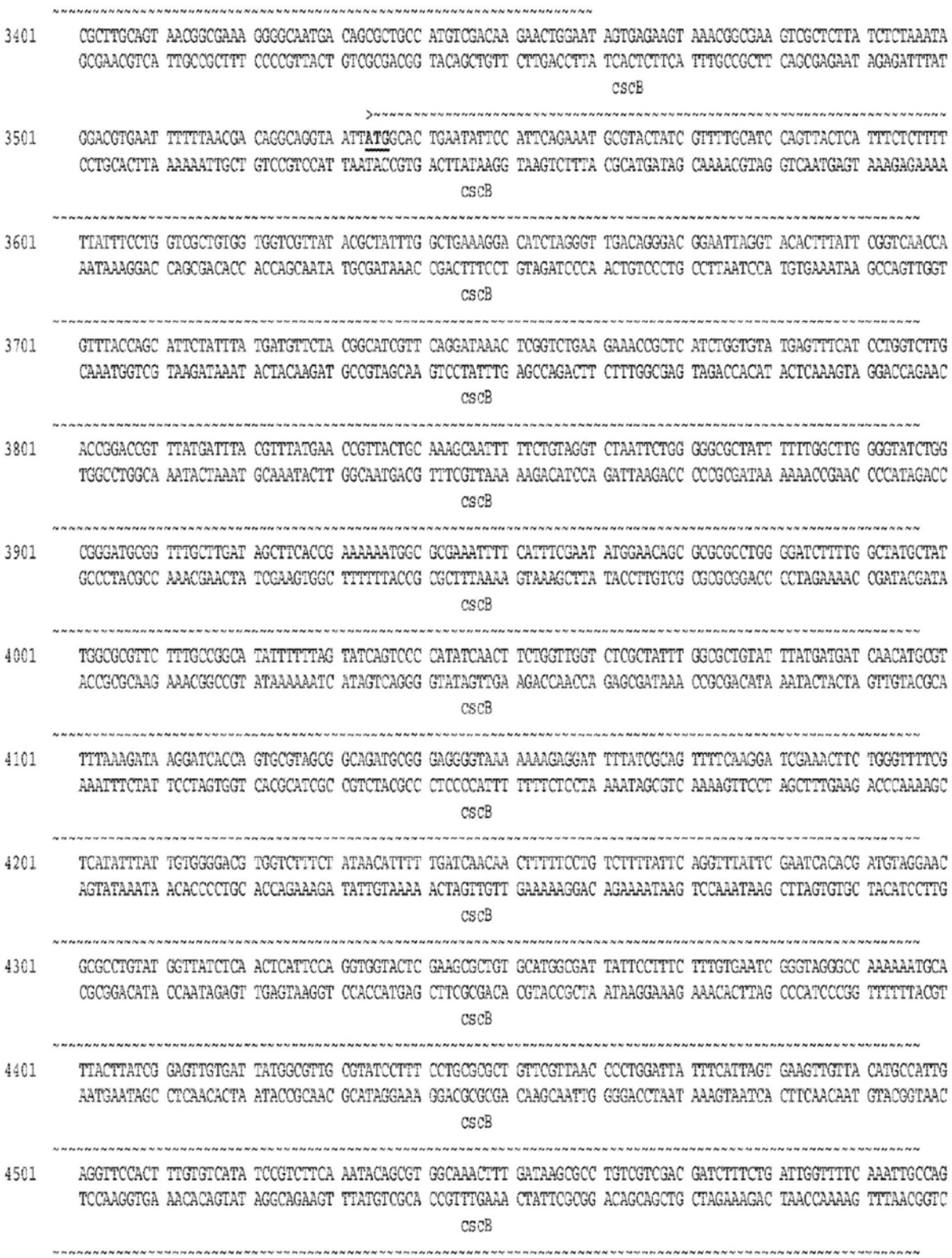

3401 CGCTTGCAGT AACGGCGAAA GGGGCAATGA CAGCGCTGCC ATGTCGACAA GAACTGGAAT AGTGAGAAGT AAACGGCGAA GTCGCTCTTA TCTCTAAATA
GCGAACGTCA TTGCCGCTTT CCCCGTTACT GTCGCGACGG TACAGCTGTT CTTGACCTTA TCACTCTTCA TTTGCCGCTT CAGCGAGAAT AGAGATTTAT
cscB
3501 GGACGTGAAT TTTTTAACGA CAGGCAGGTA ATTATGGCAC TGAATATTCC ATTCAGAAAT GCGTACTATC GTTTTGCATC CAGTTACTCA TTTCTCTTTT
CCTGCACTTA AAAAATTGCT GTCCGTCCAT TAATACCGTG ACTTATAAGG TAAGTCTTTA CGCATGATAG CAAAACGTAG GTCAATGAGT AAAGAGAAAA
cscB
3601 TTATTTCCTG GTCGCTGTGG TGGTCGTTAT ACGCTATTTG GCTGAAAGGA CATCTAGGGT TGACAGGGAC GGAATTAGGT ACACTTTATT CGGTCAACCA
AATAAAGGAC CAGCGACACC ACCAGCAATA TGCGATAAAC CGACTTTCCT GTAGATCCCA ACTGTCCCTG CCTTAATCCA TGTGAAATAA GCCAGTTGGT
cscB
3701 GTTTACCAGC ATTCTATTTA TGATGTTCTA CGGCATCGTT CAGGATAAAC TCGGTCTGAA GAAACCGCTC ATCTGGTGTA TGAGTTTCAT CCTGGTCTTG
CAAATGGTCG TAAGATAAAT ACTACAAGAT GCCGTAGCAA GTCCTATTTG AGCCAGACTT CTTTGGCGAG TAGACCACAT ACTCAAAGTA GGACCAGAAC
cscB
3801 ACCGGACCGT TTATGATTTA CGTTTATGAA CCGTTACTGC AAAGCAATTT TTCTGTAGGT CTAATTCTGG GGGCGCTATT TTTTGGCTTG GGGTATCTGG
TGGCCTGGCA AATACTAAAT GCAAATACTT GGCAATGACG TTTCGTTAAA AAGACATCCA GATTAAGACC CCCGCGATAA AAAACCGAAC CCCATAGACC
cscB
3901 CGGGATGCGG TTTGCTTGAT AGCTTCACCG AAAAAATGGC GCGAAATTTT CATTTCGAAT ATGGAACAGC GCGCGCCTGG GGATCTTTTG GCTATGCTAT
GCCCTACGCC AAACGAACTA TCGAAGTGGC TTTTTTACCG CGCTTTAAAA GTAAAGCTTA TACCTTGTCG CGCGCGGACC CCTAGAAAAC CGATACGATA
cscB
4001 TGGCGCGTTC TTTGCCGGCA TATTTTTTAG TATCAGTCCC CATATCAACT TCTGGTTGGT CTCGCTATTT GGCGCTGTAT TTATGATGAT CAACATGCGT
ACCGCGCAAG AAACGGCCGT ATAAAAAATC ATAGTCAGGG GTATAGTTGA AGACCAACCA GAGCGATAAA CCGCGACATA AATACTACTA GTTGTACGCA
cscB
4101 TTTAAAGATA AGGATCACCA GTGCGTAGCG GCAGATGCGG GAGGGGTAAA AAAAGAGGAT TTTATCGCAG TTTTCAAGGA TCGAAACTTC TGGGTTTTCG
AAATTTCTAT TCCTAGTGGT CACGCATCGC CGTCTACGCC CTCCCCATTT TTTTCTCCTA AAATAGCGTC AAAAGTTCCT AGCTTTGAAG ACCCAAAAGC
cscB
4201 TCATATTTAT TGTGGGGACG TGGTCTTTCT ATAACATTTT TGATCAACAA CTTTTTCCTG TCTTTTATTC AGGTTTATTC GAATCACACG ATGTAGGAAC
AGTATAAATA ACACCCCTGC ACCAGAAAGA TATTGTAAAA ACTAGTTGTT GAAAAAGGAC AGAAAATAAG TCCAAATAAG CTTAGTGTGC TACATCCTTG
cscB
4301 GCGCCTGTAT GGTTATCTCA ACTCATTCCA GGTGGTACTC GAAGCGCTGT GCATGGCGAT TATTCCTTTC TTTGTGAATC GGGTAGGGCC AAAAAATGCA
CGCGGACATA CCAATAGAGT TGAGTAAGGT CCACCATGAG CTTCGCGACA CGTACCGCTA ATAAGGAAAG AAACACTTAG CCCATCCCGG TTTTTTACGT
cscB
4401 TTACTTATCG GAGTTGTGAT TATGGCGTTG CGTATCCTTT CCTGCGCGCT GTTCGTTAAC CCCTGGATTA TTTCATTAGT GAAGTTGTTA CATGCCATTG
AATGAATAGC CTCAACACTA ATACCGCAAC GCATAGGAAA GGACGCGCGA CAAGCAATTG GGGACCTAAT AAAGTAATCA CTTCAACAAT GTACGGTAAC
cscB
4501 AGGTTCCACT TTGTGTCATA TCCGTCTTCA AATACAGCGT GGCAAACTTT GATAAGCGCC TGTCGTCGAC GATCTTTCTG ATTGGTTTTC AAATTGCCAG
TCCAAGGTGA AACACAGTAT AGGCAGAAGT TTATGTCGCA CCGTTTGAAA CTATTCGCGG ACAGCAGCTG CTAGAAAGAC TAACCAAAAG TTTAACGGTC
cscB

图55(续)

```
4601    TTCGCTTGGG ATTGTGCTGC TTTCAACGCC GACTGGGATA CTCTTTGACC ACGCAGGCTA CCAGACAGTT TTCTTCGCAA TTTCGGGTAT TGTCTGCCTG
        AAGCGAACCC TAACACGACG AAAGTTGCGG CTGACCCTAT GAGAAACTGG TGCGTCCGAT GGTCTGTCAA AAGAAGCGTT AAAGCCCATA ACAGACGGAC
                                          cscB
~~~
```

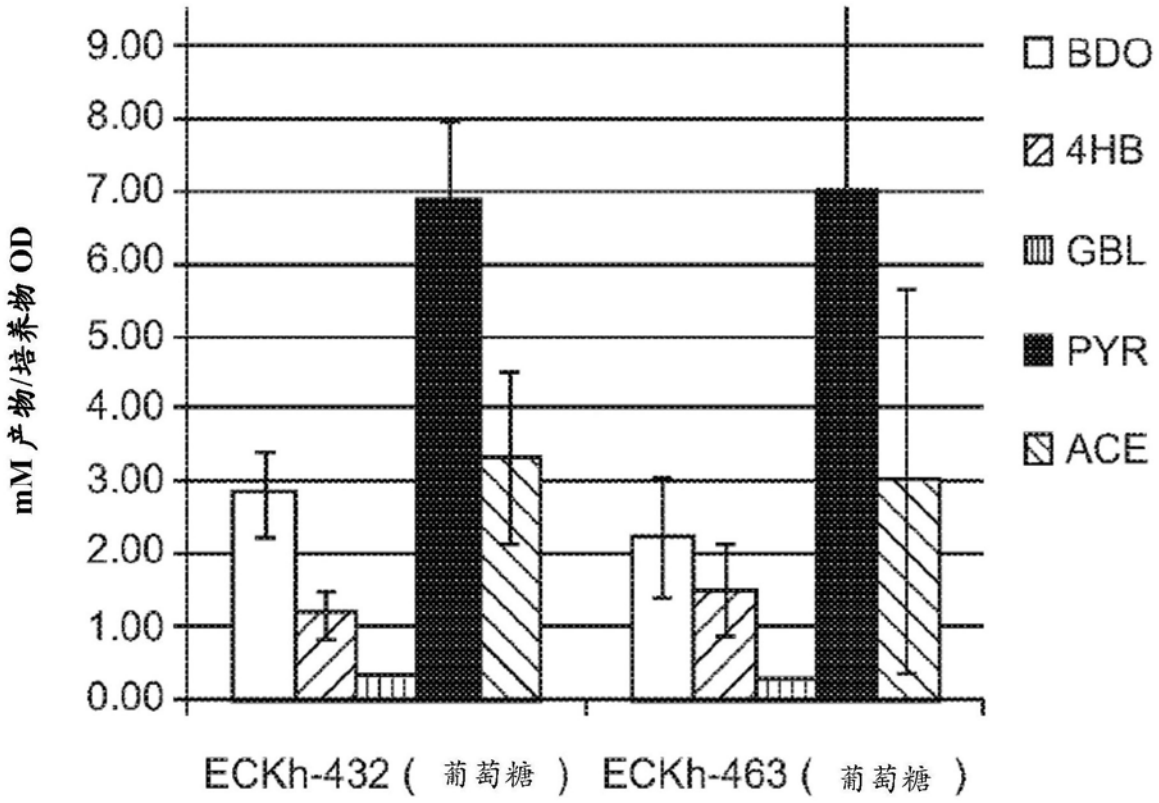

9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
mM 产物/培养物 OD
BDO
4HB
GBL
PYR
ACE
ECKh-432 (葡萄糖)
ECKh-463 (葡萄糖)

图57