

1. 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,该途径包括编码在一定条件下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- 羟基丁酰 - 辅酶 A 还原酶;和以表达外源的 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. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述琥珀酰 - 辅酶 A 合成酶由大肠杆菌 *sucCD* 基因编码。

3. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 α - 酮戊二酸脱羧酶由牛分枝杆菌 *sucA* 基因编码。

4. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述琥珀酸半醛脱氢酶(辅酶 A- 依赖性的)、4- 羟基丁酸脱氢酶和 4- 羟基丁酰 - 辅酶 A/ 乙酰 - 辅酶 A 移转酶由牙龈卟啉单胞菌 W83 基因编码。

5. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述丁酸激酶和磷酸转丁酰酶由丙酮丁醇梭菌 *buk1* 和 *ptb* 基因编码。

6. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 4- 羟基丁酰 - 辅酶 A 还原酶由拜氏梭菌 *Ald* 基因编码。

7. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 4- 羟基丁醛还原酶由热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌 *adh1* 基因编码。

8. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述外源的丙酮酸脱氢酶是 NADH 不敏感的。

9. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述外源的丙酮酸脱氢酶由肺炎克雷伯氏杆菌 *lpdA* 基因编码。

10. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述微生物体的一种或多种所述丙酮酸脱氢酶亚基基因在丙酮酸甲酸酯裂解酶启动子的调控下。

11. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述厌氧呼吸控制调节系统的破坏是对 *arcA* 基因的破坏。

12. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,进一步包括对编码苹果酸脱氢酶的基因的破坏。

13. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 NADH 不敏感的柠檬酸合成酶由 *gltA* 编码。

14. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 NADH 不敏感的柠檬酸合成酶由 *gltA* 的 R163L 突变体编码。

15. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述磷酸烯醇丙酮酸羧激酶由流感嗜血杆菌磷酸烯醇丙酮酸羧激酶基因编码。

16. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中编码所述外源表达酶的一种或多种基因整合入宿主生物体的 *fimD* 基因座中。

17. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述生物体表达非-磷酸转移酶蔗糖摄取系统。

18. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述生物体进一步包括对内源的乳酸脱氢酶、醇脱氢酶和丙酮酸甲酸酯裂解酶的破坏。

19. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 BDO 途径包括 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 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。

20. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 BDO 途径包括 4-氨基丁酸辅酶 A 移转酶、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。

21. 权利要求 20 的非天然存在的微生物体,其中所述 BDO 途径进一步包括 4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶(醇形成)、4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶或 1,4-丁二醇脱氢酶。

22. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 BDO 途径包括 4-氨基丁酸辅酶 A 移转酶、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。

23. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 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]磷酸氧化还原酶(去氨基)、[(4-氨基丁醇基)氧]磷酸氨基转移酶、4-羟基丁酰-磷酸盐脱氢酶或 4-羟基丁醛脱氢酶(磷酸化)。

24. 权利要求 23 的非天然存在的微生物体,其中所述 BDO 途径进一步包括 1,4-丁二醇脱氢酶。

25. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 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 -酮戊二酸辅酶 A 移转酶、 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)。

26. 权利要求 25 的非天然存在的微生物体,其中所述 BDO 途径进一步包括 4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶(醇形成)、4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶或 1,4-丁二醇脱氢酶。

27. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 BDO 途径包括谷氨酸辅酶 A 移转酶、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)。

28. 权利要求 27 的非天然存在的微生物体,其中所述 BDO 途径进一步包括 4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶(醇形成)、4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶或 1,4-丁二醇脱氢酶。

29. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 BDO 途径包括 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 Δ -异构酶或 4-羟基丁酰-辅

酶 A 脱水酶。

30. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 BDO 途径包括高丝氨酸脱氨酶、高丝氨酸-辅酶 A 移转酶、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 移转酶、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-烯酸酯还原酶、4-羟基丁酰-辅酶 A 移转酶、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。

31. 权利要求 30 的非天然存在的微生物体,其中所述 BDO 途径进一步包括 4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶(醇形成)、4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶或 1,4-丁二醇脱氢酶。

32. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 BDO 途径包括琥珀酰-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)。

33. 权利要求 32 的非天然存在的微生物体,其中所述 BDO 途径进一步包括琥珀酰-辅酶 A 还原酶、4-羟基丁酸脱氢酶、4-羟基丁酰-辅酶 A 移转酶、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、4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶(醇形成)或 1,4-丁二醇脱氢酶。

34. 权利要求 1 的非天然存在的微生物体,其中所述 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-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)。

35. 权利要求 34 的非天然存在的微生物体,其中所述 BDO 途径进一步包括 α -酮戊二酸脱羧酶、4-羟基丁酸脱氢酶、4-羟基丁酰-辅酶 A 移转酶、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、4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶(醇形成)或 1,4-丁二醇脱氢酶。

36. 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。

37. 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 1-36 中任一项权利要求的非天然存在的微生物体以生产 BDO。

生产 1,4- 丁二醇的微生物和相关方法

[0001] 发明背景

[0002] 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。

[0003] 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。

[0004] 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。

[0005] 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。

[0006] 期望通过可选的手段开发生产这些化学品的的方法,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。

[0007] 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。

[0008] 发明概述

[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。

[0010] 附图简述

[0011] 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。

[0012] 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。

[0013] 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, MG1655 Δ gabD lacIQ;3, MG1655 Δ gabD Δ aldA 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。

[0014] 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, MG1655 Δ gabD lacIQ;3, MG1655 Δ gabD Δ aldA lacIQ。条形图指在 24 和 48 小时时的浓度。

[0015] 图 5 显示在重组大肠杆菌菌株中从 10mM 4-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。

[0016] 图 6 显示由 MG1655 lacIQ pZE13-0004-0035-0002 pZA33-0034-0036 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 ^{13}C -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。

[0017] 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。

[0018] 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。

[0019] 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。

[0020] 图 10 显示示例性的来自 α -酮戊二酸的 BDO 途径。

[0021] 图 11 显示示例性的来自谷氨酸的 BDO 途径。

[0022] 图 12 显示示例性的来自乙酰-CoA 的 BDO 途径。

[0023] 图 13 显示示例性的来自高丝氨酸的 BDO 途径。

[0024] 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 操纵子编码的琥珀酰-CoA 合成酶亚单位的氨基酸序列。

[0025] 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 显示牛分枝杆菌 α -酮戊二酸脱羧酶的氨基酸序列(SEQ ID NO:)。

[0026] 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。

[0027] 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。

[0028] 图 18A 显示来自牙龈卟啉单胞菌的 α -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:)。

[0029] 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:)。

[0030] 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:)。

[0031] 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:)。

[0032] 图 22A 显示来自丙酮丁醇梭菌的丁酸激酶 (buk1) 的核苷酸序列 (SEQ ID NO:)，图 22B 显示编码的氨基酸序列 (SEQ ID NO:)。

[0033] 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。

[0034] 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。

[0035] 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。

[0036] 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。

[0037] 图 27A 显示天然拜氏梭菌 A1d 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:)。

[0038] 图 28A-28D 显示拜氏梭菌 A1d 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 ($A < B < C < D$)。

[0039] 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。

[0040] 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)。

[0041] 图 31A 显示来自热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌 (*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 :)。

[0042] 图 32A 显示大肠杆菌中热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌 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 (热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌 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。

[0043] 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 ; PTSlac0-025B ; PTSlac0-025B-026n。

[0044] 图 34 显示载体 pRE1 19-V2 的质粒图。

[0045] 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。

[0046] 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。

[0047] 图 37 显示菌株 AB3, MG1655AldhA 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。

[0048] 图 38 显示融合至 pf1B-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 : pf1B RBS。下划线 : FNR 结合位点。粗体 : pf1B-p6 启动子序列。

[0049] 图 39 显示菌株 ECKh-456 中 aceF-lpdA 区域的核苷酸序列 (SEQ ID NO :)。

[0050] 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)。

[0051] 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。

[0052] 图 42 显示菌株 ECKh-401 中 arc A 缺失区域的序列。

[0053] 图 43 显示包含菌株 ECKh-422 突变 gltA 基因的区域序列。

[0054] 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。

[0055] 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。

[0056] 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。

[0057] 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。

[0058] 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。

[0059] 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。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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 片段插入区域的菌株 ECKh-426 基因组 DNA 的核苷酸序列。

[0063] 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。

[0064] 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。

[0065] 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。

[0066] 图 56 显示 rrnC 操纵子中整合位点的示意图。

[0067] 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)。

[0068] 发明详述

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] 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。

[0072] 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。

[0073] 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。

[0074] 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)。

[0075] 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。

[0076] 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。

[0077] 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。

[0078] 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。

[0079] 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。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。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 如本文所用,术语“ γ -丁内酯”意欲指是具有化学式 $C_4H_6O_2$ 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。

[0083] 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 $C_4H_{10}O_2$ 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。

[0084] 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 C_4H_8O 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。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 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。

[0089] 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。

[0090] 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。

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 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%),不相关的蛋白质可以具有一定同源性,所述同源性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。

[0094] 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 BLASTP 2.0.8 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。

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] 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。

[0098] 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。

[0099] 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。

[0100] 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-氨基丁酰-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。

[0101] 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-氨基丁酰-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。

[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 4-氨基丁酸 CoA 移转酶，4-氨基丁酰-CoA 水解酶，4-氨基丁酰-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-氨基丁酰-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-氨基丁酰-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。

[0103] 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）。

[0104] 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 -酮戊二酰基-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 -酮戊二酰基-CoA 水解酶，或 α -酮戊二酰基-CoA 连接酶； α -酮戊二酰基-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 -酮戊二酰基-CoA 水解酶或 α -酮戊二酰基-CoA 连接酶； α -酮戊二酰基-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 -酮戊二酰基-CoA 水解酶或 α -酮戊二酰基-CoA 连接酶； α -酮戊二酰基-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 -酮戊二酰基-CoA 水解酶或 α -酮戊二酰基-CoA 连接酶； α -酮戊二酰基-CoA 还原酶（醇形成）；以及 5-羟基-2-氧代戊酸脱氢酶（脱羧）。

[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）。

[0106] 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-羟丁酰-CoA 脱水酶，乙烯基乙酰基-CoA-异构酶或 4-羟丁酰-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-羟丁酰-CoA 脱水酶；乙烯基乙酰基-CoA-异构酶；以及 4-羟丁酰-CoA 脱水酶。

[0107] 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-羟丁-2-烯酰基-CoA 移转酶，4-羟丁-2-烯酰基-CoA 水解酶，4-羟丁-2-烯酰基-CoA 连接酶，4-羟丁-2-烯酸酯还原酶，4-羟丁酰-CoA 移转酶，4-羟丁酰-CoA 水解酶，4-羟丁酰-CoA 连接酶或 4-羟丁-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-羟丁-2-烯酰基-CoA 移转酶，4-羟丁-2-烯酰基-CoA 水解酶，4-羟丁-2-烯酰基-CoA 连接酶；4-羟丁-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-羟丁-2-烯酸酯还原酶；以及 4-羟丁酰-CoA 移转酶，4-羟丁酰-CoA 水解酶或 4-羟丁酰-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-羟丁-2-烯酰基-CoA 还原酶。

[0108] 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-羟丁酰-CoA 水解酶，4-羟丁酰-CoA 连接酶，4-羟丁醛脱氢酶（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-羟丁酸脱氢酶，4-羟丁酰-CoA 移转酶，4-羟丁酸激酶，磷酸转-4-羟丁酰酶，4-羟丁酰-CoA 还原酶，4-羟丁酰-CoA 还原酶（醇形成）或 1,4-丁二醇脱氢酶。

[0109] 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。

[0110] 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。

[0111] 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。

[0112] 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 *bukI* 和 *ptb* 基因编码。

[0113] 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萄糖苷酶地芽孢杆菌 *adhI* 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亚基可以是 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。

[0114] 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。

[0115] 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。因此可以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 (pf1B) 的缺失 (参见实施例 XII-XIX 和表 28)。

[0116] 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。

[0117] 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。

[0118] 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]磷酸氧化还原酶 (去氨基),[(4-氨基丁醇基)氧]磷酸氨基转移酶,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。

[0119] 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。

[0120] 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,乙酰基乙酰基-CoA-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。

[0121] 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。

[0122] 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。

[0123] 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。

[0124] 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。

[0125] 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。

[0126] 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。

[0127] 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。

[0128] 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。

[0129] 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。

[0130] 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。

[0131] 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。

[0132] 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。

[0133] 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。

[0134] 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)。

[0135] 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。

[0136] 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 thermophilus*、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。

[0137] 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。

[0138] 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。

[0139] 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 50DS1 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))。

[0140] 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。

[0141] 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。

[0142] 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。

[0143] 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。

[0144] 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。

[0145] 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。

[0146] 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)。

[0147] 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。

[0148] 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。

[0149] 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。

[0150] 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。

[0151] 表 1. 用于将 4-HB 转化为 BDO 的醇和醛脱氢酶

[0152]

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

[0153]

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
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
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)

[0154]

- 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-羟基苜蓿-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 吡啶乳酸脱氢酶
- ec: 1.1.1.112 茛菪醇脱氢酶
- 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
- 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

[0155]

- ec: 1.1.1.185 L-乙二醇脱氢酶
ec: 1.1.1.190 吡啶-3-醇脱氢酶(NADH)
ec: 1.1.1.191 吡啶-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 苜蓿基-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-(羟基甲基)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**
- 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+)

[0156]

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
ec: 1.2.1.63	6-氧代己酸脱氢酶

[0157]

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	氟乙醛脱氢酶
ec: 1.2.1.71	琥珀酰谷氨酸-半醛脱氢酶

[0158] 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)。

[0159] 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。

[0160] 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 K_m 。所述酶是可逆的且对一些醛也具有很高的活性(表 3)。

[0161] 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

[0162]

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
苕醇	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	

[0163]

[0164] *2-苯基乙醇的活性,对应于 19.2U/mg,作为 100%。

[0165] 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

[0166]

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	

[0167] 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 (Steinbuechel 和 Schlegel, Eur. J. Biochem. 130 :329-334(1983))。表 4 列 2 表明来自罗尔斯通氏菌 (旧名真氧产碱菌) 的 IdhA 对不同底物的活性 (Steinbuechel 和 Schlegel, 上文, 1983)。

[0168] 表 4. 罗尔斯通氏菌 IdhA (Steinbuechel 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

[0169]

底物	来自真氧产碱菌 的 L(+)-乳酸脱氢 酶	活性(%) 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

[0170]

[0171] 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。

[0172] 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, *Archaea* 133-141 (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))。

[0173] 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.* 10 55 :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))。

[0174] 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。

[0175] 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。

[0176] 表 5. 高丝氨酸激酶的底物特异性

[0177]

底物	$K_{\text{催化}}$	% $k_{\text{催化}}$	K_m (mM)	$k_{\text{催化}}/K_m$
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

[0178] 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、缬氨酸、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, *Biochemistry* 42 : 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))。

[0179] 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孢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。

[0180] 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, *Angew. 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, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 36 : 2830-2832 (1997))。

[0181] 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, *Angew. 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-碳键断裂

(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。

[0182] 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, Biochemistry 40 :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))。

[0183] 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。

[0184] 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(K_m)(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))。

[0185] 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。

[0186] 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。

[0187] 直接进化还用于表达难以表达的蛋白质。例如, 辣根过氧化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))。

[0188] 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 K_{cat} 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))。来自嗜热脂肪芽孢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 k_{cat}/K_m 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 (k_{cat}/K_m)。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。

[0189] 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。

[0190] 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。

[0191] 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。

[0192] 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))。

[0193] 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,产物烯胺 --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。

[0194] 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。

[0195] 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。

[0196] 乙酰乙酸途径也可以被改造成以产生 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。

[0197] 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(*Alcaligenes 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))。

[0198] 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。

[0199] 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。

[0200] 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。

[0201] 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。

[0202] 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 $\Delta_{rxn}G$,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。

[0203] 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。

[0204] 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。

[0205] 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。

[0206] 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),所述途径包含至少一种外源核酸,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。

[0207] 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。

[0208] 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)。

[0209] 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)。

[0210] 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)。

[0211] 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)。

[0212] 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)。

[0213] 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-CoA α -异构酶或 4-羟基丁酰-CoA 脱水酶(参见实施例 X 和表 22)。

[0214] 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)。

[0215] 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)。

[0216] 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。

[0217] 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)。

[0218] 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。

[0219] 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 *bukI* 和 *ptb* 基因编码。

[0220] 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 可通过热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌 *adhI* 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。

[0221] 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。

[0222] 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。

[0223] 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。

[0224] 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。

[0225] 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。

[0226] 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。

[0227] 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。

[0228] 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。

[0229] 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。

[0230] 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。

[0231] 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-钽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。

[0232] 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。在本领域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。

[0233] 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。

[0234] 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。

[0235] 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。

[0236] 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。

[0237] 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。

[0238] 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。

[0239] 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。

[0240] 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。

[0241] 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。

[0242] 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。

[0243] 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。

[0244] 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。

[0245] 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))。

[0246] 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。

[0247] 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。

[0248] 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。

[0249] 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。

[0250] 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。

[0251] 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通过与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。

[0252] 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。

[0253] 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。

[0254] 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。

[0255] 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。

[0256] 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®**。

[0257] 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。

[0258] 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))。

[0259] 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。

[0260] 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。

[0261] 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。

[0262] 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。

[0263] 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。

[0264] 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。

[0265] 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。

[0266] 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。

[0267] 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 H₂ 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。

[0268] 虽然合成气主要是 H₂ 和 CO,但也可包含少量的 CO₂ 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 CO₂。

[0269] Wood-Ljungdahl 途径催化 CO 和 H₂ 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 CO₂ 和 CO₂/H₂ 混合物的能力。微生物依赖于 H₂ 将 CO₂ 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 CO₂ 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:

[0270] $2\text{CO}_2 + 4\text{H}_2 + n\text{ADP} + n\text{Pi} \rightarrow \text{CH}_3\text{COOH} + 2\text{H}_2\text{O} + n\text{ATP}$

[0271] 因此,具有 Wood-Ljungdahl 途径的非天然存在的微生物也可利用 CO₂ 与 H₂ 的混合物来产生乙酰 -CoA 和其它期望产物。

[0272] 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。

[0273] 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。

[0274] 为了产生更好的生产者，可利用代谢模型优化生长条件。

[0275] 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, US2004/0072723, 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。

[0276] 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。

[0277] 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。

[0278] 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通过与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。

[0279] 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。

[0280] 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。

[0281] 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。

[0282] 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。

[0283] 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®。

[0284] 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® 均计算机方法来鉴定。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。

[0285] 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))。

[0286] 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。

[0287] 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。

[0288] 实施例 I

[0289] 4-羟基丁酸的生物合成

[0290] 该实施例描述了 4-HB 生产的示例性生物化学途径。

[0291] 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。

[0292] 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。

[0293] 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。

[0294] 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 and Steinbuchel, 同上 ; Sohling and Gottschalk, J. Bacteriol. 178 :871-880(1996) ; Valentin 等, Eur. J. Biochem. 227 :43-60(1995) ; Wolff and 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。

[0295] 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。

[0296] 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))。

[0297] 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。

[0298] 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。

[0299] 实施例 II

[0300] 来自琥珀酸和 α - 酮戊二酸的 1,4- 丁二醇的生物合成

[0301] 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。

[0302] 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(1960))。这些酶是可逆的, 这允许合成在 4-HB 的方向进行。

[0303] 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 A 102 : 10670-10675(2005))。

[0304] 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,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。

[0305] 表 6. 在产生 BDO 的微生物体宿主中表达的基因

[0306]

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=nucleotide&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	adhE 2	丙酮丁醇梭菌 ATCC824	醛/醇脱氢酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=N_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=nucleotide&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=nucleotide&id=1228100	1
0009	7	4-HB d	富养罗尔斯通氏菌 H16	4-羟基丁酸脱氢酶(NAD-依赖性)	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=Y_P_726053.1	2
0010	7	4-HB d	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=nucleotide&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.Detail.Action.do?fromListFlag=true&featureType=1&orfId=1219	

[0307]

0012	12/13	yqhD	大肠杆菌	醛/醇脱氢酶	www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/pec/genes.List.Detail.Action.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
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,	α -酮戊二酸脱羧酶	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer.fcgi?val=Y_P_977400.1	5

[0308]

			巴斯德			
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=nucleotide&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.Detail.Action.do	

[0309] ¹Sohling 和 Gottschalk, Eur. J. Biochem. 212 :121-127 (1993) ;Sohling 和 Gottschalk, J. Bacteriol. 178 :871-880 (1996)

[0310] ²Nolling 等, J. , J. Bacteriol. 183 :4823-4838 (2001) 5

[0311] ³Pohlmann 等, Nat. Biotechnol. 24 :1257-1262 (2006)

[0312] ⁴Kosaka 等, Biosci. Biotechnol. Biochem. 71 :58-68 (2007)

[0313] ⁵Brosch 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 104 :5596-5601 (2007)

[0314] ⁶Henne 等, Appl. Environ. Microbiol. 65 :3901-3907 (1999)

[0315] 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 Acids Res 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:

[0316] lacZ α -RI

[0317] 5' GACGAATTCGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGTCCAATTCACT GGCCGTCGTTTTAC3'

[0318] lacZ α 3' BB

[0319] 5' -GACCCTAGGAAGCTTTCTAGAGTCGACCTATGCGGCATCAGAGCAGA-3'。

[0320] 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/Synthetic Biology :BioBricks](http://openwetware.Org/wiki/Synthetic_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。

[0321] 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 *PLtet0-1*、2 代表 *PLlac0-1*、3 代表 *PA1lac0-1* 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-YYYYY-...。

[0322] 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 A* 97 : 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_{Al1ac0-1}* 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 MG1655*lacI^q*。使用类似的过程将 *lacI^q* 引入缺失菌株。

[0323] 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）。

[0324] 使用菌株 MG1655*lacI^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。

[0325] 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°C 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 $1 \mu\text{mol}$ 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。

[0326] 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。

[0327] 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 $50 \mu\text{L}$ 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 $100 \mu\text{L}$ 的 100mM 的乙醛或者丁醛, 或者对于 ALD 为 $100 \mu\text{L}$ 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。

[0328] 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 $14,140 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 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 $50 \mu\text{L}$ 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 $50 \mu\text{L}$ 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。

[0329] 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。

[0330] 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。

[0331] 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 $\times$ 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 5 μL ,柱温度是 30 $^{\circ}\text{C}$,在 260nm 处监测 UV 吸收。

[0332] 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。

[0333] 表 7. 在来自 MG1655lacI^Q 的细胞提取物中的体外酶活性, MG1655lacI^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 1 μmol 底物所需的酶的数量。

[0334]

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

[0335] 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。

[0336] (c) 细胞蛋白以毫克蛋白质 / 毫升提取物给出。

[0337] 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)。

[0338] 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。

[0339]

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

[0340] (a) 归一化的 4-HB 浓度, μ M/OD600 单位

[0341] 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。

[0342] 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/LNa₂HPO₄、3.0g/L KH₂PO₄、0.5g/L NaCl、1.0g/LNH₄Cl、1mMMgSO₄、0.1mM CaCl₂) 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)、10 μ g/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)。

[0343] 从葡萄糖产生 4-HB 的可选途径是经由 α -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。

[0344] 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°C 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 pZE13-0004-0035-0002 pZA33-0034-0036。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。

[0345] 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°C 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。

[0346] 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。

[0347]

		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

[0348] 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)。

[0349] 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

[0350]

表达的基因	条件	BDO (μ M)	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

[0351] 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 1 μ M 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 1mMBDO (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。

[0352] 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 1655 Δ adhE lacI^Q。

[0353]

基因	宿主菌株	BDO (M)	OD (600nm)	BDO/O D
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

[0354] 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 1655lacI^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/LNa₂HPO₄、3.0g/L KH₂PO₄、0.5g/L NaCl、1.0g/L NH₄Cl、1mM MgSO₄、0.1mM CaCl₂) 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、10 μ g/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。

[0355] 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。

[0356]

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

[0357] 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 $1 \mu\text{M}$ 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。

[0358] 如下进行样品制备 : $100 \mu\text{L}$ 过滤的 ($0.2 \mu\text{m}$ 或 $0.45 \mu\text{m}$ 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-100H) 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 $20 \mu\text{L}$ 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 $100 \mu\text{L}$ 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°C 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。

[0359] 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 $30\text{m} \times 0.25\text{mm}$ 内径 (i. d.) $\times 0.25 \mu\text{m}$ 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 $1 \mu\text{L}$ 样品进行操作。注入口温度是 250°C 。氦气用作载气和流速维持在 $1.0\text{mL}/\text{min}$ 。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°C , 1 分钟, 然后以 $2^\circ\text{C}/\text{min}$ 斜线上升到 120°C , 接着以 $100^\circ\text{C}/\text{min}$ 快速斜线上升到 320°C , 最后在 320°C 维持 6 分钟。MS 接口传递线 (interface transfer line) 维持在 280°C 。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 (Agilent Technologies)) 处理 GCMS 数据。

[0360] 结果表明所产生的大部分 4-HB 和 BDO 是用 ^{13}C 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。

[0361] 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)。

[0362] 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。

[0363]

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

[0364] 实施例 III

[0365] 4-羟基丁酸、 γ -丁内酯和 1,4-丁二醇的生物合成

[0366] 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。

[0367] 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°C。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°C)。

[0368] 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, 并且以相同的速度回收液体。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℃)。

[0369] 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。

[0370] 直接产生 BDO 或 THF 的发酵和氢化方案(分批):细胞在用 N₂/CO₂ 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。

[0371] 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。

[0372] 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℃)。

[0373] 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℃)。

[0374] 实施例 IV 示例性的 BDO 途径

[0375] 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。

[0376] 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。

[0377] 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。

[0378]

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

[0379]

标记	功能
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	羧基裂解酶
4.2.1.a	水裂解酶
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

[0380] 1.1.1.a-氧化还原酶（醛至醇或酮至羟基）

[0381] 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 Bacteriology 174:7149-7158(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:

[0382]

<i>alrA</i>	BAB12273.1	不动杆菌菌株 M-1
<i>ADH2</i>	NP_014032.1	酿酒酵母
<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	丙酮丁醇梭菌
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	丙酮丁醇梭菌

[0383] 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。

[0384] 4hbd YP_726053.1 真氧产碱杆菌 H16

[0385] 4hbd L21902.1 克氏梭菌 DSM 555

[0386] 4hbd Q94B07 拟南芥

[0387] 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))。

[0388]

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

[0389] 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。

[0390]

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

[0391] 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))。

[0392] 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。

[0393]

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

[0394] 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))。

[0395]

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

[0396] 1.1.1.c 氧化还原酶 (2 步, 酰基 -CoA 至醇)

[0397] 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))。

[0398] adhE NP_415757.1 大肠杆菌

[0399] adhE2 AAK09379.1 丙酮丁醇梭菌

[0400] adhE AAV66076.1 肠膜明串珠菌

[0401] 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 gamma proteobacterium) HTCC2080 的其它生物体中的候选酶。

[0402]

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

[0403] 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))。

[0404] FAR AAD38039.1 加州希蒙得木

[0405] 1. 2. 1. b 氧化还原酶 (酰基 -CoA 至醛)

[0406] 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 of Bacteriology 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. Bacteriol. 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))。

[0407]

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

[0408] 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, Science 318 : 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 (*Sulfolobus tokodaii*) 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。

[0409]

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

[0410] 1. 2. 1. c- 氧化还原酶 (2- 含氧酸至酰基 -CoA, 脱羧作用)

[0411] 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 之间的分子量 (即大于核糖体)。

[0412] 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 (Aevansson 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。

[0413] 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(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))。

[0414]

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

[0415] 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*(E1 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*(E1 α), *Bckdhb*(E1 β), *Dbt*(E1) 和 *Did*(E3) 编码。恶臭假单胞菌 BCKAD 复合物的 E1 和 E3 组分已被结晶 (Aevansson 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))。

[0416]

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

[0417] 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, E1 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))。

[0418]

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

[0419] 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。

[0420] ST2300 NP_378302.1 超嗜热古菌硫化叶菌 7

[0421] 1. 2. 1. d- 氧化还原酶 (磷酸化 / 去磷酸)

[0422] 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))。

[0423]

<i>gapA</i>	P0A9B2.2	大肠杆菌
<i>asd</i>	NP_417891.1	大肠杆菌
<i>argC</i>	NP_418393.1	大肠杆菌
<i>proA</i>	NP_414778.1	大肠杆菌

[0424] 1. 3. 1. a- 氧化还原酶作用于 CH-CH 供体

[0425] 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))。

[0426]

<i>bcd</i>	NP_349317.1	丙酮丁醇梭菌
<i>etfA</i>	NP_349315.1	丙酮丁醇梭菌
<i>etfB</i>	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

[0427] 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(1):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*) (163 Rohdich 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 (163 Rohdich 等, 上文 (2001))。

[0428]

<i>fadH</i>	NP_417552.1	大肠杆菌
<i>enr</i>	ACA54153.1	肉毒梭菌 A3 菌株
<i>enr</i>	CAA71086.1	酪丁酸梭菌
<i>enr</i>	CAA76083.1	克氏梭菌
<i>enr</i>	YP_430895.1	热醋穆尔氏菌

[0429] 1. 4. 1. a 作用于氨基酸的氧化还原酶

[0430] 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 *ldh* 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 *gdhA1* (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 *ldh* 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))。

[0431]

<i>gdhA</i>	P00370	大肠杆菌
<i>gdh</i>	P96110.4	海栖热袍菌
<i>gdhA1</i>	NP_279651.1	盐沼盐杆菌
<i>ldh</i>	P0A393	蜡样芽胞杆菌
<i>nadX</i>	NP_229443.1	海栖热袍菌

[0432] 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 Δ 1-吡啶-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。

[0433] *lysDH* AB052732 嗜热脂肪芽孢杆菌

[0434] *lysDH* NP_147035.1 敏捷气热菌 K1

[0435] *ldh* P0A393 蜡样芽胞杆菌

[0436] 2.3.1. α -酰基转移酶(转移磷酸基)

[0437] 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。

[0438]

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

[0439] 2.6.1. α -氨基转移酶

[0440] 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(48,108,22548. 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))。

[0441]

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

[0442] 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))。

[0443]

<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	克氏酵母
<i>SkUGA1</i>	ABF58894.1	克氏酵母
<i>UGA1</i>	NP_011533.1	酿酒酵母
<i>Abat</i>	P50554.3	褐鼠
<i>Abat</i>	P80147.2	野猪
<i>Gta-1</i>	Q21217.1	秀丽隐杆线虫
<i>gabT</i>	P94427.1	芽孢杆菌
<i>gabT</i>	P22256.1	大肠杆菌 K12
<i>puuE</i>	NP_415818.1	大肠杆菌 K12

[0444] 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。

[0445] 2.7.2. α -磷酸转移酶, 羧基受体

[0446] 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 *buk1* 和 *buk2* 编码 (Walter 等, Gene 134(1) :107-111(1993) (Huang 等, J Mol 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))。

[0447]

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

[0448]

[0449] 2.8.3. a- 辅酶 -A 移转酶

[0450] 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*。

[0451]

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

[0452] 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))。

[0453] *cat1* P38946.1 克氏梭菌

[0454] *cat2* P38942.2 克氏梭菌

[0455] *cat3* EDK35586.1 克氏梭菌

[0456] 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 FEBS Lett. 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))。

[0457] *gctA* CAA57199.1 发酵氨基酸球菌

[0458] *gctB* CAA57200.1 发酵氨基酸球菌

[0459] 3.1.2. a- 硫羟酸酯水解酶 (CoA 特异性的)

[0460] 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*。

[0461] 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。

[0462]

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

[0463] 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))。

[0464] *tesB* NP_414986 大肠杆菌

[0465] *acot8* CAA15502 人类

[0466] *acot8* NP_570112 褐鼠

[0467] 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)), *paal*(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。

[0468]

<i>tesA</i>	NP_415027	大肠杆菌
<i>ybgC</i>	NP_415264	大肠杆菌
<i>paal</i>	NP_415914	大肠杆菌
<i>ybdB</i>	NP_415129	大肠杆菌

[0469] 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。

[0470] *acot12* NP_570103. 1 褐鼠

[0471] 4. 1. 1. α -羰基裂解酶

[0472] 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 : 1073-301075(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))。

[0473]

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

[0474] 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。

[0475] 已从许多生物分离且表征了 4- 草酰巴豆酸酯脱羧酶。

[0476] 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 *xylII* 和 *xylIII* (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))。

[0477]

<i>dmpH</i>	CAA43228.1	假单胞菌属 CF600
<i>dmpE</i>	CAA43225.1	假单胞菌属 CF600
<i>xylII</i>	YP_709328.1	恶臭假单胞菌
<i>xylIII</i>	YP_709353.1	恶臭假单胞菌
<i>Reut B5691</i>	YP_299880.1	真氧产碱杆菌 JMP134
<i>Reut B5692</i>	YP_299881.1	真氧产碱杆菌 JMP134

[0478] 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 *padI* (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孢杆菌的 *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))。

[0479]

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

[0480]

[0481] 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))。

[0482] *kgd* 050463.4 结核分枝杆菌

[0483] *gadA* NP_417974 大肠杆菌

[0484] *gadB* NP_416010 大肠杆菌

[0485] 酮酸脱羧酶

[0486] 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。

[0487]

基因	GenBank ID	生物
<i>pdC</i>	P06672.1	运动发酵单胞菌
<i>pdC1</i>	P06169	酿酒酵母
<i>pdC</i>	Q8L388	巴氏醋杆菌
<i>pdC1</i>	Q12629	乳酸克卢费氏酵母

[0488] 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))。

[0489]

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

[0490] 4.2.1. a- 水裂解酶

[0491] 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 thermophilus* 中发现。

[0492]

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

[0493] 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. J. Biochem. Cell Biol. 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 *fumI* 和来自谷氨酸棒杆菌的 *fumC*。

[0494]

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

[0495] 柠草酸水合酶,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.Microbiol168 :457-463(1997));然而编码该酶的基因至今没有测序。

[0496] 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 (Olivera 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)。

[0497]

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

[0498] 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- 羟基 - 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。

[0499]

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

[0500] 4.3.1. a- 氨-裂解酶

[0501] 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。

[0502]

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

[0503] 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梭状芽孢杆菌的 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。

[0504]

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

[0505] 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。

[0506]	ac12	CAG29275.1	丙酸梭菌
[0507]	ac11	CAG29274.1	丙酸梭菌
[0508]	MXAN_4385	YP_632558.1	黄色粘球菌

[0509] 5.3.3. a- 异构酶

[0510] 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 Δ 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 Δ 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。

[0511]	abfDYP_001396399.1	克氏梭菌 DSM 555
[0512]	abfDP55792	氨基丁酸梭菌
[0513]	abfDYP_001928843	牙龈卟啉单胞菌 ATCC 33277

[0514] 5.4.3. a- 氨基变位酶

[0515] 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 yod0 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。

[0516]	yod0	034676.1	芽孢杆菌
[0517]	kamA	Q9XBQ8.1	近端梭菌
[0518]	kamA	Q8RHX4	具核梭杆菌亚株 nuleatum

[0519] 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. A 101 :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))。

[0520]

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

[0521] 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。

[0522] oraE AAK72502 斯氏梭菌

[0523] oraS AAK72501 斯氏梭菌

[0524] 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。

[0525] 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。

[0526] 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)。

[0527] 6.2.1. α -酸-硫羟连接酶

[0528] 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-羧基己酸-辅酶 A 连接酶 (Bower 等, J Bacteriol 178 (14) :4122-4130 (1996))。

[0529]

<i>sucC</i>	NP_415256.1	大肠杆菌
<i>sucD</i>	AAC73823.1	大肠杆菌
<i>phl</i>	CAJ15517.1	产黄青霉
<i>phlB</i>	ABS19624.1	产黄青霉
<i>paaF</i>	AAC24333.2	恶臭假单胞菌
<i>bioW</i>	NP_390902.2	枯草杆菌

[0530] 实施例 V 来自琥珀酰 - 辅酶 A 的示例性的 BDO 途径

[0531] 该实施例描述了来自琥珀酰 - 辅酶 A 的示例性的 BDO 途径。

[0532] 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。

[0533] 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) (EC 6.2.1.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。

[0534]

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)	<i>sucD</i>	P38947.1	克氏梭菌	琥珀酰-辅酶 A
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	牙根叶咪卓胞菌	琥珀酰-辅酶 A
					<i>Msed_0709</i>	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	<i>4hbd</i>	YP_726053.1	真氧产碱杆菌 HI6	4-羟基丁酸
					<i>4hbd</i>	L21902.1	克氏梭菌 DSM 555	4-羟基丁酸
					<i>4hbd</i>	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)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	丙酮丁醇梭菌	丁基-辅酶 A
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	橙色绿屈挠菌	丙二酰基辅酶 A
					<i>FAR</i>	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 转移酶	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	克氏梭菌	琥珀酸酯, 4-羟基丁酸酯, 丁酸酯
					<i>gct4, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	发酵氨基酸球菌	戊二酸
					<i>ato4, atoD</i>	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	<i>tesB</i>	NP_414986	大肠杆菌	己二酰-辅酶 A
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	褐鼠	丁酰-辅酶 A
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	人类	3-羟基丙基-辅酶 A
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	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	大肠杆菌	琥珀酸酯

[0535]

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	接酶(或 4-羟基丁酰-辅酶 A 合成酶)				
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	产黄青霉	苯乙酸酯
					<i>bioW</i>	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	<i>ackA</i>	NP_416799.1	大肠杆菌	乙酸酯, 丙酸酯
					<i>buk1</i>	NP_349675	丙酮丁醇梭菌	丁酸酯
					<i>buk2</i>	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	<i>ptb</i>	NP_349676	丙酮丁醇梭菌	丁酰磷酸酯
					<i>ptb</i>	AAR19757.1	产丁酸酯-细菌 L2-50	丁酰磷酸酯
					<i>ptb</i>	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)	<i>asd</i>	NP_417891.1	大肠杆菌	L-4-天冬氨酸脱-磷酸酯
					<i>proA</i>	NP_414778.1	大肠杆菌	L-谷氨酸脱基-5-磷酸酯
					<i>gapA</i>	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)	<i>sucD</i>	P38947.1	克氏梭菌	琥珀酰-辅酶 A
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	牙龈卟啉单胞菌	琥珀酰-辅酶 A
					<i>Mised_0709</i>	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-辅酶 A	1,4-丁二醇	4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶(醇形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	丙酮丁醇梭菌	丁基-辅酶 A

[0536]

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 得的)	生物	已知底物
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	橙色绿屈挠菌	丙二酰基辅酶 A
					<i>F4R</i>	AAD38039.1	加州希蒙得木	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	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	克氏梭菌 DSM 555	琥珀酸半醛

- [0537] 实施例 VI
- [0538] 另外来自 α -酮戊二酸的示例性 BDO 途径

[0539] 该实施例描述了来自 α -酮戊二酸的示例性的 BDO 途径。

[0540] 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。

[0541] 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。

[0542]

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	<i>kgd</i>	O50463.4	结核分枝杆菌	α-酮戊二酸
					<i>gadA</i>	NP_417974	大肠杆菌	谷氨酸
					<i>gadB</i>	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	<i>gdhA</i>	P00370	大肠杆菌	谷氨酸
					<i>gdh</i>	P96110.4	海栖热袍菌	谷氨酸
					<i>gdhA1</i>	NP_279651.1	嗜酯杆菌	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)	<i>lysDH</i>	AB052732	嗜热脂肪土芽孢杆菌	赖氨酸
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	嗜热古细菌 K1	赖氨酸
					<i>ldh</i>	P0A393	蜡样芽孢杆菌	亮氨酸, 异亮氨酸, 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	<i>gabT</i>	P22256.1	大肠杆菌	4-氨基丁酸
					<i>puuE</i>	NP_415818.1	大肠杆菌	4-氨基丁酸
					<i>UGA1</i>	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	<i>gadA</i>	NP_417974	大肠杆菌	谷氨酸
					<i>gadB</i>	NP_416010	大肠杆菌	谷氨酸
					<i>kgd</i>	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	<i>hbd</i>	YP_726053.1	真氧产碱杆菌 H16	4-羟基丁酸
					<i>hbd</i>	L21902.1	克氏梭菌 DSM 555	4-羟基丁酸
					<i>hbd</i>	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	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2,	克氏梭菌	琥珀酸酯, 4-

[0543]

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 转移酶		EDK35586.1		羟基丁酸酯, 丁酸酯
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	发酵氨基酸球菌	戊二酸
					<i>atoA, atoD</i>	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	<i>tesB</i>	NP_414986	大肠杆菌	己二酰-辅酶 A
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	褐鼠	丁酰-辅酶 A
					<i>hibch</i>	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)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	大肠杆菌	琥珀酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	产黄青霉	苯乙酸酯
					<i>bioW</i>	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	<i>ackA</i>	NP_416799.1	大肠杆菌	乙酸酯, 丙酸酯
					<i>buk1</i>	NP_349675	丙酮丁醇梭菌	丁酸酯
					<i>buk2</i>	Q97III	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	<i>ptb</i>	NP_349676	丙酮丁醇梭菌	丁酰磷酸酯
					<i>ptb</i>	AAR19757.1	产丁酸酯-细菌 L2-50	丁酰磷酸酯
					<i>ptb</i>	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)	<i>asd</i>	NP_417891.1	大肠杆菌	L-4-天冬氨酸-磷酸酯

[0544]

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
					<i>proA</i>	NP_414778.1	大肠杆菌	L-谷氨酰基-5-磷酸酯
					<i>gcpA</i>	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)	<i>sucD</i>	P38947.1	克氏梭菌	琥珀酰-辅酶 A
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	牙根叶咪单胞菌	琥珀酰-辅酶 A
					<i>Msed_0709</i>	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)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	丙酮丁醇梭菌	丁基-辅酶 A
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	橙色绿屈挠菌	丙二酰基辅酶 A
					<i>FAR</i>	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	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	克氏梭菌 DSM 555	琥珀酸半醛

[0545] 实施例 VII 来自 4-氨基丁酸的 BDO 途径

[0546] 该实施例描述了来自 4-氨基丁酸的示例性的 BDO 途径。

[0547] 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。

[0548] 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。

[0549]

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-氨基丁酰辅酶 A 转移酶	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	克氏梭菌	琥珀酸酯, 4-羟基丁酸酯, 丁酸酯
					<i>gct4, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	发酵氨基酸球菌	戊二酸
					<i>atoA, atoD</i>	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	<i>tesB</i>	NP_414986	大肠杆菌	己二酰-辅酶 A
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	褐鼠	丁酰-辅酶 A
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	人类	3-羟基丙基-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)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	大肠杆菌	琥珀酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	产黄青霉	苯乙酸酯
					<i>bioW</i>	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)	<i>lysDH</i>	AB052732	嗜热脂肪芽孢杆菌	赖氨酸
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	敏捷气热菌 K1	赖氨酸
					<i>ldh</i>	P0A393	蜡样芽孢杆菌	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	<i>gabT</i>	P22256.1	大肠杆菌	4-氨基丁酸
					<i>abat</i>	P50554.3	褐鼠	3-氨基-2-丙酸甲

[0550]

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
					<i>SkyPYD4</i>	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	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	>C3
					<i>4hbd</i>	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)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	丙酮丁醇梭菌	丁基-辅酶 A
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	橙色绿屈挠菌	丙二酰基-辅酶 A
					<i>F4R</i>	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)	<i>sucD</i>	P38947.1	克氏梭菌	琥珀酰-辅酶 A
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	牙根叶咪单胞菌	琥珀酰-辅酶 A
					<i>Msed_0709</i>	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	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	克氏梭菌 DSM 555	琥珀酸半醛

[0551] 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。

[0552] 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(EC1.1.1.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。

[0553]

[0554]

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-氨基丁酰辅酶 A 转移酶	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	克氏梭菌	琥珀酸酯, 4-羧基丁酸酯, 丁酸酯
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	发酵氨基酸球菌	戊二酸
					<i>atoA, atoD</i>	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	<i>tesB</i>	NP_414986	大肠杆菌	己二酰-辅酶 A
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	褐鼠	丁酰-辅酶 A
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	人类	3-羧丙基-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)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	大肠杆菌	琥珀酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	产黄青霉	苯乙酸酯
					<i>bioW</i>	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)	<i>adhF2</i>	AAK09379.1	丙酮丁醇梭菌	丁基-辅酶 A
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	橙色绿屈挠菌	丙二酰基辅酶 A
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	加州希蒙得木	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-氨基丁酰-辅酶 A 还原酶)	<i>sucD</i>	P38947.1	克氏梭菌	琥珀酰-辅酶 A

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
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	牙龈卟啉单胞菌	琥珀酰-辅酶A
					<i>Msed_0709</i>	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	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	>C3
					<i>4hbd</i>	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)	<i>lysDH</i>	AB052732	嗜热脂肪芽孢杆菌	赖氨酸
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	敏捷气热菌 K1	赖氨酸
					<i>ldh</i>	P0A393	蜡样芽孢杆菌	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	<i>gabT</i>	P22256.1	大肠杆菌	4-氨基丁酸
					<i>abat</i>	P50554.3	褐鼠	3-氨基-2-丙酸甲酯
					<i>SkyPYD4</i>	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	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	克氏梭菌 DSM 555	琥珀酸半醛

[0555] 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。

[0556] 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)(EC1.2.1.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。

[0557]

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-氨基丁酸脱氢酶	<i>ackA</i>	NP_416799.1	大肠杆菌	乙酸酯, 丙酸酯
					<i>bukI</i>	NP_349675	丙酮丁醇梭菌	丁酸酯
					<i>proB</i>	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)	<i>asd</i>	NP_417891.1	大肠杆菌	L-4-天冬氨酰-5-磷酸酯
					<i>proA</i>	NP_414778.1	大肠杆菌	L-谷氨酰基-5-磷酸酯
					<i>gapA</i>	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	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	>C3
					<i>4hbd</i>	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-羧基丁醛	4-氨基丁-1-醇氧化还原酶(去氨基)	<i>lysDH</i>	AB052732	嗜热脂肪芽孢杆菌	赖氨酸
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	敏捷气热菌 K1	赖氨酸
					<i>ldh</i>	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-1-醇	4-羧基丁醛	4-氨基丁-1-醇氨基转移酶	<i>gabT</i>	P22256.1	大肠杆菌	4-氨基丁酸
					<i>abaI</i>	P50554.3	褐鼠	3-氨基-2-丙酸甲酯
					<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	克氏酵母	β -丙氨酸

[0558]

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)	<i>lysDH</i>	AB052732	嗜热脂肪芽孢杆菌	赖氨酸
					<i>lysDH</i>	NP_147035.1	敏捷气热菌 K1	赖氨酸
					<i>ldh</i>	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	<i>gabT</i>	P22256.1	大肠杆菌	4-氨基丁酸
					<i>SkyPYD4</i>	ABF58893.1	克氏酵母	β -丙氨酸
					<i>serC</i>	NP_415427.1	大肠杆菌	磷酸丝氨酸, 磷酸羧基氨基酸
9B	1.1.1.a	[(4-氧代丁醇基-)氧]膦酸	4-羧基丁酰-磷酸酯	4-羧基丁酰-磷酸酯脱氢酶	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	克氏梭菌 DSM 555	琥珀酸半醛
9B	1.2.1.d	4-羧基丁酰-磷酸酯	4-羧基丁醛	4-羧基丁醛脱氢酶(磷酸化)	<i>asd</i>	NP_417891.1	大肠杆菌	L-4-天冬氨酸-磷酸酯
					<i>proA</i>	NP_414778.1	大肠杆菌	L-谷氨酸基-5-磷酸酯
					<i>gapA</i>	P0A9B2.2	大肠杆菌	甘油醛-3-磷酸酯
9B	1.1.1.a	4-羧基丁醛	1,4-丁二醇	1,4-丁二醇脱氢酶	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	>C3
					<i>4hbd</i>	L21902.1	克氏梭菌 DSM555	琥珀酸半醛

[0559] 图 9C 显示通过乙酰乙酸的示例性的途径。

[0560] 实施例 VIII 来自 α -酮戊二酸的示例性的 BDO 途径

[0561] 该实施例描述了来自 α -酮戊二酸的示例性的 BDO 途径。

[0562] 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。

[0563] 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。

[0564]

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	<i>ack4</i>	NP_416799.1	大肠杆菌	乙酸酯, 丙酸酯
					<i>buk1</i>	NP_349675	丙酮丁醇梭菌	丁酸酯
					<i>proB</i>	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)	<i>proA</i>	NP_414778.1	大肠杆菌	L-谷氨酰基-5-磷酸酯
					<i>asd</i>	NP_417891.1	大肠杆菌	L-4-天冬氨酰-磷酸酯
					<i>gap4</i>	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-羧基-2-氧代戊酸	2,5-二氧代戊酸还原酶	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	>C3
					<i>4hbd</i>	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 转移酶	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	克氏梭菌	琥珀酸酯, 4-羧基丁酸酯, 丁酸酯
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	发酵氨基酸球菌	戊二酸
					<i>atoA, atoD</i>	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	<i>tesB</i>	NP_414986	大肠杆菌	己二酰-辅酶 A
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	褐鼠	丁酰-辅酶 A

[0565]

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
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	人类	3-羟丙酰-辅酶 A
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)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	大肠杆菌	琥珀酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	产黄青霉	苯乙酸酯
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	枯草杆菌	6-巯基己酸
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)	<i>sucD</i>	P38947.1	克氏梭菌	琥珀酰-辅酶 A
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	勤奋金属球菌	丙二酰基辅酶 A
					<i>bphG</i>	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	<i>ADH2 yqhD 4hbd</i>	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)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	丙酮丁醇梭菌	丁基-辅酶 A
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	橙色绿屈挠菌	丙二酰基辅酶 A
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	加州希蒙得木	长链酰基-辅酶 A
10	4.1.1.a	5-羟基-2-氧	4-羟基丁醛	5-羟基-2-氧代	<i>pdh</i>	P06672.1	运动发酵单胞菌	2-氧代戊酸

[0566]

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
		代戊酸		戊酸脱羧酶				
					<i>mdlC</i>	P20906.2	恶臭假单胞菌	2-氧代戊酸
					<i>pdcI</i>	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	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	>C3
					<i>4hbd</i>	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)	<i>sucA, sucB, lpd</i>	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	大肠杆菌	α -酮戊二酸
					<i>bimBB, bimB4A, bimB4B, bimB4B, pdhD</i>	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
					<i>Bckdha, Bckdhb, Ddbt, Dld</i>	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

[0567] 实施例 IX 来自谷氨酸盐的示例性的 BDO 途径

[0568] 该实施例描述了来自谷氨酸盐的示例性的 BDO 途径。

[0569] 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。

[0570] 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 (EC1.1.1.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。

[0571]

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	谷氨酰辅酶 A 转移酶	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	克氏梭菌	琥珀酸酯, 4-羟基丁酸酯, 丁酸酯
					<i>gct4, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	发酵氨基酸球菌	戊二酸
					<i>atoA, atoD</i>	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	<i>tesB</i>	NP_414986	大肠杆菌	己二酰-辅酶 A
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	褐鼠	丁酰-辅酶 A
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	人类	3-羧丙基-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)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	大肠杆菌	琥珀酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	产黄青霉	苯乙酸酯
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	枯草杆菌	6-羧基己酸
11	2.7.2.a	谷氨酸	谷氨酸-5-磷酸酯	谷氨酸 5-激酶	<i>ack4</i>	NP_416799.1	大肠杆菌	乙酸酯, 丙酸酯
					<i>buk1</i>	NP_349675	丙酮丁醇梭菌	丁酸酯
					<i>proB</i>	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)	<i>proA</i>	NP_414778.1	大肠杆菌	L-谷氨酰基-5-磷酸酯
					<i>asd</i>	NP_417891.1	大肠杆菌	L-4-天冬氨酰-磷酸酯
					<i>gap4</i>	P0A9B2.2	大肠杆菌	甘油醛-3-磷酸酯

[0572]

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	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)	<i>sucD</i>	P38947.1	克氏梭菌	琥珀酰-辅酶 A
					<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	勤希金属球菌	丙二酰基辅酶 A
					<i>bphG</i>	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	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	>C3
					<i>4hbd</i>	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)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	丙酮丁醇梭菌	丁基-辅酶 A
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	橙色绿屈挠菌	丙二酰基辅酶 A
					<i>F4R</i>	AAD38039.1	加州希蒙得木	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-羟基戊酸氧化还原酶(去氨基)	<i>gdh4</i>	P00370	大肠杆菌	谷氨酸
					<i>ldh</i>	P0A393	蜡样芽胞杆菌	亮氨酸, 异亮氨酸, 缬氨酸, 2-氨基丁酸
					<i>nadX</i>	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	<i>aspC</i>	NP_415448.1	大肠杆菌	天冬氨酸
					<i>AAT2</i>	P23542.3	酿酒酵母	天冬氨酸
					<i>avt4</i>	YP_026231.1	大肠杆菌	缬氨酸, α-氨基丁酸

[0573]

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	<i>pdC</i>	P06672.1	运动发酵单胞菌	2-氧代戊酸
					<i>mdlC</i>	P20906.2	恶臭假单胞菌	2-氧代戊酸
					<i>pdC1</i>	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	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	>C3
					<i>4hbd</i>	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)	<i>sucA, sucB, lpd</i>	NP_415254.1, NP_415255.1, NP_414658.1	大肠杆菌	α -酮戊二酸
					<i>bfmBB, bfmB4A, bfmB4B, bfmB4B, pdhD</i>	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
					<i>Bekdha, Bekdhh, Dbt, Dld</i>	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

[0574] 实施例 X 来自乙酰乙酰基 -CoA 的示例性的 BDO

[0575] 该实施例描述了来自乙酰乙酰基 -CoA 的示例性的 BDO 途径。

[0576] 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。

[0577] 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 Δ 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。

[0578]

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-羧基丁酰-辅酶 A	3-羧基丁酰-辅酶 A 脱氢酶	<i>hbd</i>	NP_349314.1	丙酮丁醇梭菌	3-羧基丁酰-辅酶 A
					<i>hbd</i>	AAM14586.1	拜氏梭菌	3-羧基丁酰-辅酶 A
					<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	勤奋金属球菌	推测的 3-羧基丁酰-辅酶 A
12	4.2.1.a	3-羧基丁酰-辅酶 A	巴豆酰-辅酶 A	3-羧基丁酰-辅酶 A 脱水酶	<i>crt</i>	NP_349318.1	丙酮丁醇梭菌	3-羧基丁酰-辅酶 A
					<i>maoC</i>	NP_415905.1	大肠杆菌	3-羧基丁酰-辅酶 A
					<i>paaf</i>	NP_415911.1	大肠杆菌	3-羧基丁酰-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 A 脱水酶	<i>abfD</i>	YP_001396399.1	克氏梭菌 DSM 555	4-羧基丁酰-辅酶 A
					<i>abfD</i>	P55792	氨基丁酸梭菌	4-羧基丁酰-辅酶 A
					<i>abfD</i>	YP_001928843	牙根叶咪单胞菌 ATCC 33277	4-羧基丁酰-辅酶 A
12	4.2.1.a	乙烯基乙酰基-辅酶 A	4-羧基丁酰-辅酶 A	4-羧基丁酰-辅酶 A 脱水酶	<i>abfD</i>	YP_001396399.1	克氏梭菌 DSM 555	4-羧基丁酰-辅酶 A
					<i>abfD</i>	P55792	氨基丁酸梭菌	4-羧基丁酰-辅酶 A
					<i>abfD</i>	YP_001928843	牙根叶咪单胞菌 ATCC 33277	4-羧基丁酰-辅酶 A
12	1.1.1.c	4-羧基丁酰-辅酶 A	1,4-丁二醇	4-羧基丁酰-辅酶 A 还原酶(醇形成)	<i>adhE2</i>	AAK09379.1	丙酮丁醇梭菌	丁基-辅酶 A
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	橙色绿屈挠菌	丙二酰基辅酶 A
					<i>FAR</i>	AAD38039.1	加州希蒙得木	长链酰基-辅酶 A
12	1.2.1.b	4-羧基丁酰-辅酶 A	4-羧基丁醛	4-羧基丁酰-辅酶 A 还原酶(或 4-羧基丁醛)	<i>sucD</i>	P38947.1	克氏梭菌	琥珀酰-辅酶 A

[0579]

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)				
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	牙龈卟啉单胞菌	琥珀酰-辅酶 A
					<i>Msed_0709</i>	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	<i>ADH2</i>	NP_014032.1	啤酒酵母	常规的
					<i>yqhD</i>	NP_417484.1	大肠杆菌	>C3
					<i>hbd</i>	L21902.1	克氏梭菌 DSM 555	琥珀酸半醛

[0580] 实施例 XI 来自高丝氨酸的示例性的 BDO 途径

[0581] 该实施例描述了来自高丝氨酸的示例性的 BDO 途径。

[0582] 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。

[0583] 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。

[0584]

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	<i>aspA</i>	NP_418562	大肠杆菌	天冬氨酸
					<i>aspA</i>	P44324.1	流感嗜血杆菌	天冬氨酸
					<i>aspA</i>	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	高丝氨酸-辅酶 A 转移酶	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	克氏梭菌	琥珀酸酯, 4-羧基丁酸酯, 丁酸酯
					<i>gclA, gclB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	发酵氨基酸球菌	戊二酸
					<i>atoA, atoD</i>	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	<i>tesB</i>	NP_414986	大肠杆菌	己二酰-辅酶 A
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	褐鼠	丁酰-辅酶 A
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	人类	3-羧丙基-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)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	大肠杆菌	琥珀酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	产黄青霉	苯乙酸酯
					<i>bioW</i>	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	<i>ac11</i>	CAG29274.1	丙酸梭菌	β-丙氨酸-辅酶 A
					<i>ac12</i>	CAG29275.1	丙酸梭菌	β-丙氨酸-辅酶 A
					<i>MXAN_4385</i>	YP_632558.1	黄色粘球菌	β-丙氨酸-辅酶 A

[0585]

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 转移酶	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	克氏梭菌	琥珀酸酯, 4-羟基丁酸酯, 丁酸酯
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	发酵氨基酸球菌	戊二酸
					<i>atoA, atoD</i>	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	<i>tesB</i>	NP_414986	大肠杆菌	己二酰-辅酶 A
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	褐鼠	丁酰-辅酶 A
					<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	人类	3-羟基丙基-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)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	大肠杆菌	琥珀酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	产黄青霉	苯乙酸酯
					<i>bioW</i>	NP_390902.2	枯草杆菌	6-羧基己酸
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	<i>enr</i>	CAA71086.1	酪丁酸梭菌	
					<i>enr</i>	CAA76083.1	克氏梭菌	
					<i>enr</i>	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 转移酶	<i>cat1, cat2, cat3</i>	P38946.1, P38942.2, EDK35586.1	克氏梭菌	琥珀酸酯, 4-羟基丁酸酯, 丁酸酯
					<i>gctA, gctB</i>	CAA57199.1, CAA57200.1	发酵氨基酸球菌	戊二酸

[0586]

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
					<i>atoA, atoD</i>	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	<i>tesB</i>	NP_414986	大肠杆菌	己二酰-辅酶 A
					<i>acot12</i>	NP_570103.1	褐鼠	丁酰-辅酶 A
					<i>hibch</i>	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)	<i>sucCD</i>	NP_415256.1, AAC73823.1	大肠杆菌	琥珀酸
					<i>phl</i>	CAJ15517.1	产黄青霉	苯乙酸酯
					<i>bioW</i>	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	<i>bcd, effA, effB</i>	NP_349317.1, NP_349315.1, NP_349316.1	丙酮丁醇梭菌	
					<i>TER</i>	Q5EU90.1	纤细裸藻	
					<i>TDE0597</i>	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)	<i>adhF2</i>	AAK09379.1	丙酮丁醇梭菌	丁基-辅酶 A
					<i>mcr</i>	AAS20429.1	橙色绿屈挠菌	丙二酰基辅酶 A
					<i>FAR</i>	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)	<i>sucD</i>	P38947.1	克氏梭菌	琥珀酰-辅酶 A
					<i>sucD</i>	NP_904963.1	牙龈卟啉单胞菌	琥珀酰-辅酶 A
					<i>Msed_070</i>	YP_001190808.1	勤奋金属球菌	丙二酰基辅酶

[0587]

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

- [0588] 实施例 XII
- [0589] 表达琥珀酰 - 辅酶 A 合成酶的产 BDO 菌株

[0590] 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。

[0591] 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 W02008/115840, W0 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 P_{allacO}-1 启动子后 (Lutz and Bujard, *Nucleic Acids Res.* 25 :1203-1210 (1997))。

[0592] 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。

[0593] 实施例 XIII

[0594] 编码 BDO 途径酶的异源基因的表达

[0595] 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。

[0596] 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支杆菌 *sucA* 基因。牛分支杆菌 *sucA* 的过表达改进了 BDO 的生产(也参见 W02008/115840, W0 2009/023493, 美国公开 2009/0047719, 美国公开 2009/0075351)。牛分支杆菌 *sucA* 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。

[0597] 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支杆菌 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 P_{allacO}-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。

[0598] 用于片断 1 的引物:

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

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

[0601] 用于片断 2 的引物:

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

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

[0604] 用于片断 3 的引物:

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

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

[0607] 用于片断 4 的引物:

[0608] 5' -TGGCCAACATAAGTTCACCATTCGGGCAAAAC-3' (SEQ ID NO :)

[0609] 5' -TCTCTCAACCAGCCATTCGTTTTGCCCG-3' (SEQ ID NO :)

[0610] 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, 1mM α -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 *lacIq* 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°C 有氧培养整夜。200 μ l 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 10 μ g/mL 硫胺和合适的抗生素的 8mL M9 基本培养基中 (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)。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 *lacIq* 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)。

[0611] 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。

[0612]

	宿主	pZE13	pZA33
1	MG1655 <i>lacIq</i>	载体	载体
2	MG1655 <i>lacIq</i>	载体	4hbd
3	MG1655 <i>lacIq</i>	<i>sucA</i>	4hbd

[0613] 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 ($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA$: :K. p. *lpdA322 \Delta mdh \Delta 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)。

[0614] 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- ^{13}C -葡萄糖 (60%) 和 U- ^{13}C -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 W02008115840 A2 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。

[0615] 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。牛分枝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)。

[0616] 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 W02008/115840, W0 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- 羟基丁酰辅酶 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。

[0617] 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 PA1lac0-1 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。

[0618] 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。

[0619] 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 W02008/115840, W0 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。

[0620] 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。

[0621] 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 aagttaagt gaggaatgtt aac " (SEQ ID NO :) 连接,其包括用于下游 BK (021) 基因的重 - 起始核糖体结合位点。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))。

[0622] 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。

[0623] 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。

[0624] 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)。

[0625] 密码子优化的操纵子在菌株 ECKh-432 ($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA$: :K. p. $lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA$ $gltAR163L$ $fimD$: :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。

[0626] 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。

[0627] 4-羟基丁酰-辅酶 A 还原酶。拜氏梭菌 A1d 基因可用作功能性 BDO 途径的一部分 (也参见 W02008/115840, W0 2009/023493, 美国公开 2009/0047719, 美国公开 2009/0075351)。拜氏梭菌 A1d 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 A1d 变体 (GNM0025B) 以改进 BDO 生产。

[0628] 天然的拜氏梭菌 A1d 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 A1d 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 A1d 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)。

[0629] 在宿主菌株 ECKh-432 ($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA$: :K. p. $lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA$ $gltAR163L \Delta ackA$ $fimD$: :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 A1d 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 A1d (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 A1d 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。

[0630] 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))。

[0631] 4-羟基丁醛还原酶。利用来自热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌 (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。

[0632] 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萄糖苷酶地芽孢杆菌 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。

[0633] 来自热葡萄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萄糖苷酶地芽孢杆菌 ald1 基因。

[0634] 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 K_m 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。

[0635] 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 ($\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pf1B$ $\Delta lpdA$::fnr-pf1B6-K. p. lpdA322 Δmdh $\Delta arcA$ 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 168 α -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 PA1lac0-1 启动子。这表明 BDO 途径中包含 084ADH 提高了 BDO 的生产。

[0636] 实施例 XIV 表达丙酮酸脱氢酶的产 BDO 菌株

[0637] 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。

[0638] 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 W02008/115840, W0 2009/023493, 美国公开 2009/0047719, 美国公开 2009/0075351; W0 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 W0 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%。

[0639] 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。

[0640] 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'-acacgcggatccaacgtcccg-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 lpdA 基因。得到的片断克隆入载体 pCR-Blunt11-TOPO(Invitrogen; Carlsbad CA), 产生质粒 pCR-KP-lpdA。

[0641] 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 pRE118-V2(参见图 34)。

[0642] 利用引物组合: EC-aceF-Pst(5'-aagccgttgctgcagctcttgagc-3')(SEQ ID NO:)+ EC-aceF-Bam2(5'-atctccggcggtcggatccgctcg-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 lpdA 基因侧翼片断。从质粒 pCR-KP-lpdA 分离包含肺炎克雷伯菌 lpdA 基因的 BamHI-XbaI 片断并且随后连接至分别用 PstI+BamHI 和 NheI-KpnI 酶切的上述大肠杆菌片断以及用 KpnI 和 PstI 酶切的 pRE118-V2 质粒。得到的质粒(称为 pRE118-M2.1 lpdA yac)利用用于将 His 322 残基突变为 Tyr 残基的引物 KP-lpdA-HisTyr-F(5'-atgctggcgctacaaaggtgtcc-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'-atcgccctacactaaaccagaagtgg-3')SEQ ID NO:)和 KP-lpdA-GluLys-R(5'-ccacttctggttttagtgttagcgcat-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丢失, 并且通过 PCR 和所含区域的测序验证 IpdA 基因的替换。

[0643] 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 ($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta Apf1B \Delta IpdA$: :K. p. IpdA322) 的大肠杆菌 APf1B : :Frt 的 PI 裂解物转染。

[0644] 包含 aceF 和 IpdA 基因的 ECKh-138 区域的序列在图 5 中显示。肺炎克雷伯菌 IpdA 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 IpdA 和突变体肺炎克雷伯菌 IpdA 的蛋白质序列对比在图 36 中显示。

[0645] 为了评价在产 BDO 菌株中利用肺炎克雷伯氏菌 IpdA 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 W02008/115840 中描述。

[0646] 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, 1mM MgSO₄, 0.1mM CaCl₂) 中 37°C 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 W02008/115840 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)。

[0647] 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 pf1B 启动子及其核糖体结合位点 (RBS) 的转录融合蛋白替代, 由此导致 aceEF-Ipd 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, pf1B-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'-tgacatgtaacacctaccttctgtgcctgtgccagtgggtgctgtgatatagaag-3') (SEQ ID NO :) 和 pf1Bp6- 上游 -Nde (5'-ataataatacatatgaaccatgcgagttacgggcctataagccaggcg-3') (SEQ ID NO :), 另一个利用引物 aceE-EcoRV-EC (5'-agtttttcgatatctgcatcagacacggcacattgaaacgg-3') (SEQ ID NO :) 和 aceE- 上游 (5'-ctggcacagcgacagaaggtaggtgttacatgtcagaacgtttacacaatgacgtggatc-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 *pf1B*-*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 :*pf1B* RBS。下划线 :FNR 结合位点。粗体 :*pf1B*-*p6* 启动子序列。

[0648] *IpdA* 启动子替代。利用染色体 DNA 模板和引物 *aceF*-*pf1Bp6*- 正向 (5' -*agacaaatcggttgccgtttgttaagccagcgagatatgatctatata*-3') (SEQ ID NO :) 和 *IpdA*-RBS-B- 反向 (5' -*gagttttgatttcagtactcatcatgtaacacctaccttcttgctgtgatata*-3') (SEQ ID NO :) 通过 PCR 扩增包含 *fnr* 结合位点, *pf1B*-*p6* 启动子和 *pf1B* 基因 RBS 的启动子区域。利用引物 B-RBS-*IpdA* 正向 (5' -*20ctatatcacagcaagaaggtaggtgttacatgatgagtactgaaatcaaaatc*-3') (SEQ ID NO :) 和 *pf1Bp6*-*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*-*IpdA* 区域的核苷酸序列在图 39 中显示。

[0649] 宿主菌株 *ECKh*-439 ($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta IpdA$: :K. p. *IpdA*322 $\Delta mdh \Delta arcA$ *gltA*R163L *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。

[0650] 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。

[0651] 实施例 XV

[0652] 表达柠檬酸合成酶和乌头酸酶的产 BDO 菌株

[0653] 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。

[0654] 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 W02008/115840, W02009/023493, 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 W02009/023493 和美国公开 2009/0047719, 其在此通过引用引入)。

[0655] W02009/023493 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) :

[0656] S - m d h - K a n 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' (SEQID NO :)

[0657] A S - m d h - K a n 5 ' -

CAA AAA ACC GGA GTC TGT GCT CCG GTT TTT

TAT TAT CCG CTA ATC AAT TACATA TGA ATA TCC TCC TTA G-3' (SEQID NO :)。

[0658] 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。

[0659] 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.USA 97 :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。

[0660] 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 arcA/JarcB 缺失提高 Idh, icd, gltA, mdh 和 gdh 基因的特异性活性 (SalmoB 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' -ataataatagaattcggttgctacctaattgccaaactaaatcgaaacagg-3') (SEQ ID NO :) 与 ArcA- 上游 -KpnI (5' -tattattatggtaccaatatcatgcagcaaacggtgcaacattgccg-3') (SEQ ID NO :) 和 ArcA- 下游 -EcoRI (5' -tgatctggaagaattcatcggtttaccaccgtcaaaaaaacggcg-3') (SEQ ID NO :) 与 ArcA- 下游 -PstI (5' -ataaaaccctgcagcggaacgaagttttatccatttttggttacctg-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 KpnI (上游片断) 以及 EcoRI 和 PstI (下游) 酶切。其随后连接入用 PstI 和 KpnI 酶切的 pRE118-V2 质粒,产生质粒 pRE118-AarcA。验证质粒 pRE118-AarcA 的序列。pRE118-AarcA 导入大肠杆菌菌株 ECKh-172 (Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA : :K. p. lpdA322 Δ 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。

[0661] 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' -ggaagagaggctggtaccagaagccacagcagga-3') (SEQ ID NO :) 和 gltA-PstI (5' -gtaatcactgcgtaagcgccatgccccggcggttaattc-3') (SEQ ID NO :) 通过 PCR 扩增大肠杆菌 MG1655 的 gltA 基因。扩增片断用 KpnI 和 PstI 酶切后克隆入 pRE118-V2。得到的质粒称为 pRE118-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 $\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA : : K. p. lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA gltAR163L$ 。如图 43 所示,通过测序验证包含菌株 ECKh-422 *gltA* 基因突变的区域。

[0662] 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°C, 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))。

[0663] 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。

[0664] 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。

[0665] 菌株 ECKh-401 和 ECKh-422 用表达全部 BDO 途径的质粒转化。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。

[0666] 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 W02009/023493 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（1-¹³C，仅葡萄糖分子的第一个碳原子用 ¹³C 标记；统一的 -¹³C，所有碳原子为 ¹³C）的 4g/L 总葡萄糖的 M9 基本培养基中培养（6.78g/L Na₂HPO₄, 3.0g/L KH₂PO₄, 0.5g/L NaCl, 1.0g/L NH₄Cl, 1mM MgSO₄, 0.1mM CaCl₂）：

[0667] 1. 80mol% 未标记的，20mol% 统一的 -¹³C

[0668] 2. 10mol% 未标记的，90mol% 统一的 -¹³C

[0669] 3. 90mol% 1-¹³C，10mol% 统一的 -¹³C

[0670] 4. 40mol% 1-¹³C，60mol% 统一的 -¹³C

[0671] 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 W02008115840 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。

[0672] 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。

[0673] 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 W02009/023493 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 NH₄OH 或 Na₂CO₃ 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。

[0674] 实施例 XVI

[0675] 表达磷酸烯醇丙酮酸羧激酶的 BDO 菌株

[0676] 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。

[0677] 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 W02008/115840, W02009/023493, 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%。

[0678] 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。

[0679] 表 26. 磷酸烯醇丙酮酸羧激酶序列的来源

[0680]

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

[0681] 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 P_{AI}lacO-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 W02008/115840 中描述。

[0682] 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。

[0683] 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

[0684]

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

[0685] 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。

[0686] 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。

[0687] 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 ($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB \Delta lpdA$: :K. p. lpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$

gltAR163L Δ 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。

[0688] 对 ECKh-439 的 Δ 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°C, pH 利用 2M NH₄OH 或 Na₂CO₃ 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 W02009/023493 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。

[0689] 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。

[0690] 实施例 XVII

[0691] BDO 途径编码基因在特定整合位置的整合

[0692] 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。

[0693] 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 (Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA : : K. p. lpdA322 Δ mdh Δ 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 Af1111 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。

[0694] 5' -GTTTGCACGCTATAGCTGAGGTTGTTGTCTTCCAGCAACGTACCGTATACAATAGGCGTATCACGA
GGCCCTTTC-3' (SEQ ID NO :)

[0695] 5' -GCTACAGCATGTCACACGATCTCAACGGTCGGATGACCAATCTGGCTGGTATGGGAATTAGCCATG
GTCC-3' (SEQ ID NO :)

[0696] DpnI 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。

[0697] 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。

[0698] 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)。

[0699] 实施例 XVIII

[0700] 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

[0701] 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。

[0702] 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。

[0703] 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 Mach1™ 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 K011 (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 LacI- 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 CGTGAC 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 GTT 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。

[0704] 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 rrnC 上游的 191 个核苷酸 (23S rRNA),

所有 rrnC rRNA gene 和 3 个 rrnC 下游核苷酸,并且用蔗糖操纵子取代。

[0705] 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::cscAKB 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($\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pflB \Delta lpdA$:;K. p. lpdA322 $\Delta mdh \Delta arcA$ 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。

[0706] 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。

[0707] 实施例 XIX

[0708] 产 BDO 菌株的概要

[0709] 这实施例描述了各种产 BDO 菌株。

[0710] 表 28 概述了以上实施例 XII-XVIII 中公开的各种产 BDO 菌株。

[0711] 表 28. 各种产 BDO 菌株的总结

[0712]

菌株 #	宿主菌株 #	宿主染色体	宿主描述	基于的质粒
1		Δ ldhA	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	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB	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	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::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	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ lpdA::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 bukI, 丙酮丁醇梭菌 ptb, 丙酮丁醇梭菌 AdhE2
5	ECKh-401	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ mdh Δ arcA Δ lpdA::K.p.lpdA322	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	Δ adhE Δ ldhA Δ pflB Δ mdh Δ arcA Δ lpdA::K.p.lpdA322		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

[0713]

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	$\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ 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	$\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ 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	$\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ 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	$\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ 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	$\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ 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	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	$\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ 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		丙酮丁醇梭菌 buk1, 丙酮丁醇梭菌 ptb, 拜氏梭菌 Ald

[0714]

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	$\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ $gltAR163L$ $\Delta ackA$ $fimD::$ 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	ECKh-432 乙 酰激酶缺失	牙龈卟啉单胞菌 Cat2, 拜氏梭菌 Ald
14	ECKh-453	$\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pflB$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ $gltAR163L$ $\Delta ackA$ $\Delta ppc::H.i.ppc$ $fimD::$ 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	$\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pflB$ $\Delta lpdA::fnr-pflB6-K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ $gltAR163L$ $fimD::$ 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	ECKh-432 中 用厌氧启动子 替代 $lpdA$ 启 动子	牙龈卟啉单胞菌 Cat2, 拜氏梭菌 Ald
16	ECKh-455	$\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pflB$ $\Delta lpdA::$ $K.p.lpdA322$ $\Delta pdhR::$ $fnr-pflB6$ Δmdh $\Delta arcA$ $gltAR163L$ $fimD::$ 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	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	$\Delta adhE$ $\Delta ldhA$ $\Delta pflB$ $\Delta lpdA::$ $K.p.lpdA322$ Δmdh $\Delta arcA$ $gltAR163L$ $fimD::$ 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 $fimD::$ 丙 酮丁醇梭菌 buk1, 丙酮丁醇	BK/PTB 整合 入 ECKh-432	拜氏梭菌 Ald

[0715]

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	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B \Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh \Delta arcA$ 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 fimD: : 丙 酮丁醇梭菌 buk1, 丙酮丁醇 梭菌 ptb		拜氏梭菌 Ald, 热葡 糖苷酶地芽孢杆菌 adh1
19	ECKh-463	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA$ 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	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	$\Delta adhE \Delta ldhA \Delta pf1B$ $\Delta lpdA::K.p.lpdA322 \Delta mdh$ $\Delta arcA$ 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		丙酮丁醇梭菌 buk1, 丙酮丁醇梭菌 ptb, 拜氏梭菌 Ald

[0716] 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, pf1B 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。

[0717] 菌株 3: 宿主菌株 ECKh-138, 内源 adhE, IdhA, pf1B 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, pf1B 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 buk1, 丙酮丁醇梭菌 ptb, 丙酮丁醇梭菌 AdhE2 的质粒。

[0718] 菌株 5: 宿主菌株 ECKh-401, 内源 adhE, IdhA, pf1B 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, pf1B 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。

[0719] 菌株 7: 宿主菌株 ECKh-422, 内源 adhE, IdhA, pf1B 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, pf1B 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: 宿主菌株 ECKh-422, 内源 adhE, IdhA, pf1B 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。

[0720] 菌株 10: 宿主菌株 ECKh-426, 内源 adhE, IdhA, pf1B 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-422 fimD 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, pf1B 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, pf1B 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 buk1, 丙酮丁醇梭菌 ptb, 拜氏梭菌 Ald 的质粒。

[0721] 菌株 13: 宿主菌株 ECKh-439, 内源 adhE, IdhA, pf1B 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, 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*, *pf1B* 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, 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 *sueA*, 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。

[0722] 菌株 15: 宿主菌株 ECKh-456, 内源 *adhE*, *IdhA*, *pf1B* 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, *lpdA* 启动子以 *fnr* 结合位点, *pf1B*-p6 启动子和 *pf1B* 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 *lpdA* 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*, *pf1B* 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, *pdhR* 和 *aceEF* 启动子以 *fnr* 结合位点, *pf1B*-p6 启动子和 *pf1B* 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。

[0723] 宿主菌株 17: 宿主菌株 ECKh-459, 内源 *adhE*, *IdhA*, *pf1B* 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; 丙酮丁醇梭菌 *buk1*, 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*, *pf1B* 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; 丙酮丁醇梭菌 *buk1*, 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*, 热葡萄糖苷酶地芽孢杆菌 *adh1* 的质粒。

[0724] 菌株 19: 宿主菌株 ECKh-463, 内源 *adhE*, *IdhA*, *pf1B* 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 蔗糖操纵子基因蔗糖透膜酶 (icscB),D- 果糖激酶 (cscK),蔗糖水解酶 (cscA) 和 LacI- 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, pf1B 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,glcA 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。

[0725] 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。

[0726] 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。

[0727] 表 29. 敲除的相应基因以阻止大肠杆菌中存在的特定反应。

[0728]

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	$[c] : ac + atp \rightleftharpoons actp + adp$	(b3115 或 b2296 或 b1849)
ACS	$[c] : ac + atp + coa \rightarrow accoa + amp + ppi$	b4069
ACt6	$ac[p] + h[p] \rightleftharpoons ac[c] + h[c]$	无关联基因
ADHEr	$[c] : etoh + nad \rightleftharpoons acald + h + nadh$	(b0356 或 b1478 或 b1241)
	$[c] : acald + coa + nad \rightleftharpoons accoa + h + nadh$	(b1241 或 b0351)
AKGD	$[c] : akg + coa + nad \rightarrow co2 + nadh + succoa$	(b0116 和 b0726 和 b0727)
ASNS2	$[c] : asp-L + atp + nh4 \rightarrow amp + asn-L + h + ppi$	b3744
ASPT	$[c] : asp-L \rightarrow fum + nh4$	b4139
ATPS4r	$adp[c] + (4) h[p] + pi[c] \rightleftharpoons atp[c] + (3) h[c] + h2o[c]$	((((b3736 和 b3737 和 b3738)和(b3731 和 b3732 和 b3733 和 b3734 和 b3735)) 或((b3736 和 b3737

[0729]

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 <==> akgl + 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

[0730]

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)

[0731]

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

[0732] 表 30. 对应于表 29 中所用缩写的代谢产物名称

[0733]

代谢产物缩写	代谢产物名称
10fthf	10- 甲酰基四氢叶酸
1pyr5c	1- 吡咯啉 -5- 羧酸酯
2ddg6p	2- 脱氢 -3- 脱氧 -D- 葡萄糖酸 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- 葡萄糖酸酯
6pgl	6- 磷酸 -D- 葡萄糖 -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

[0734]

代谢产物缩写	代谢产物名称
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
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 ₂ O
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	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸
nadph	烟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

[0735] 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。

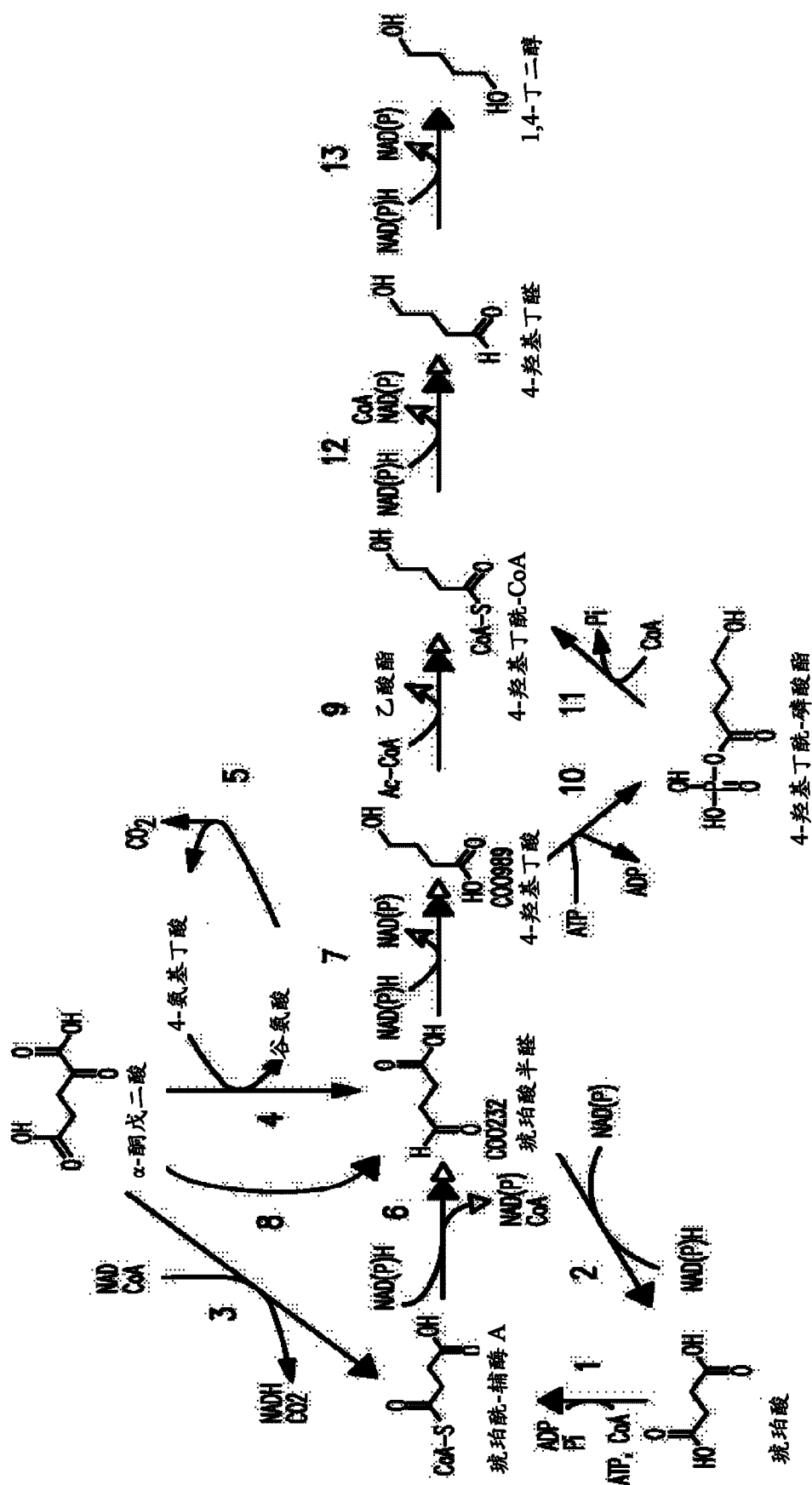


图 1

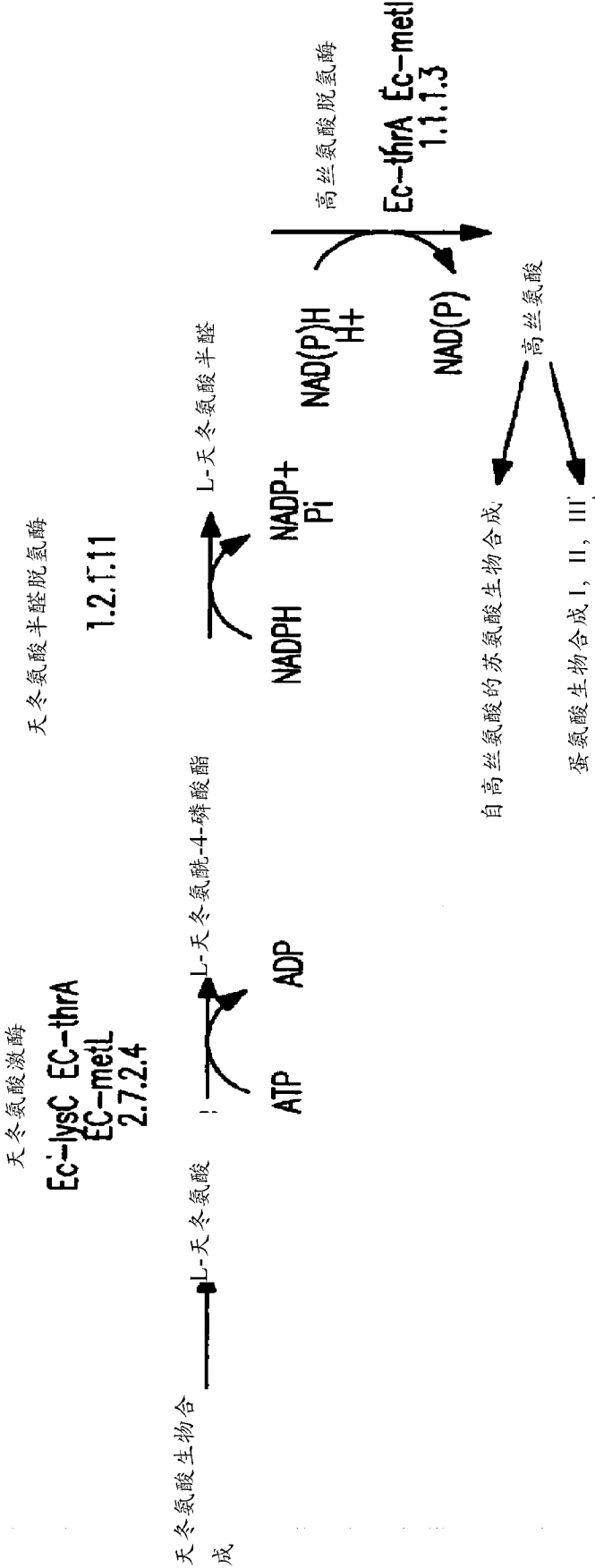


图 2

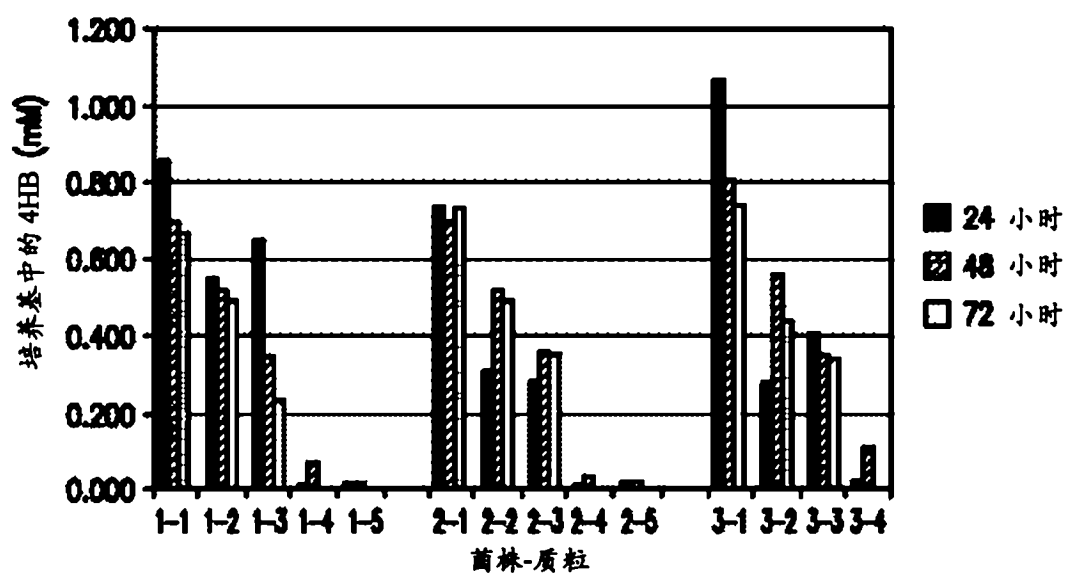


图 3(a)

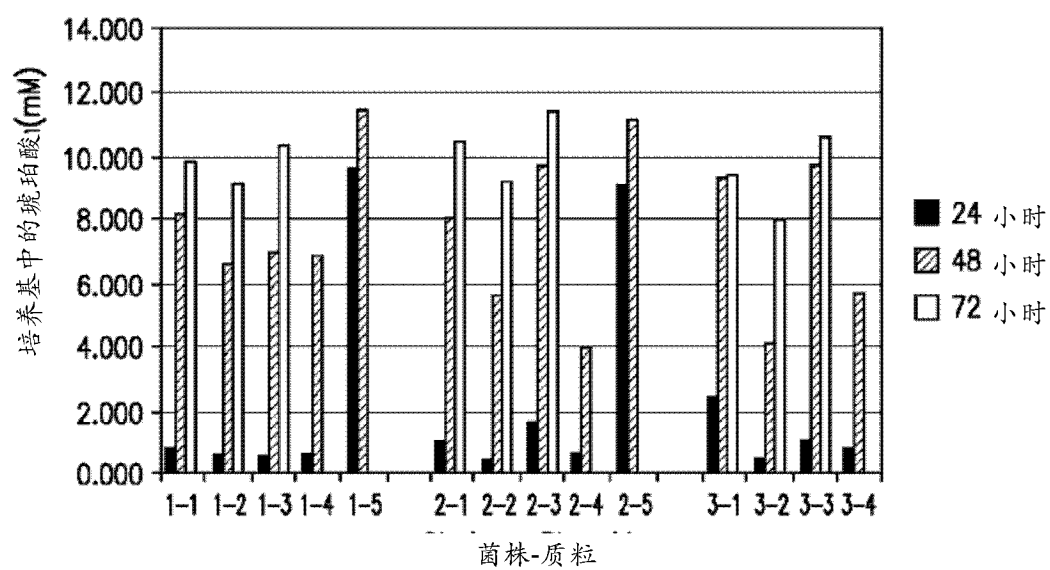


图 3(b)

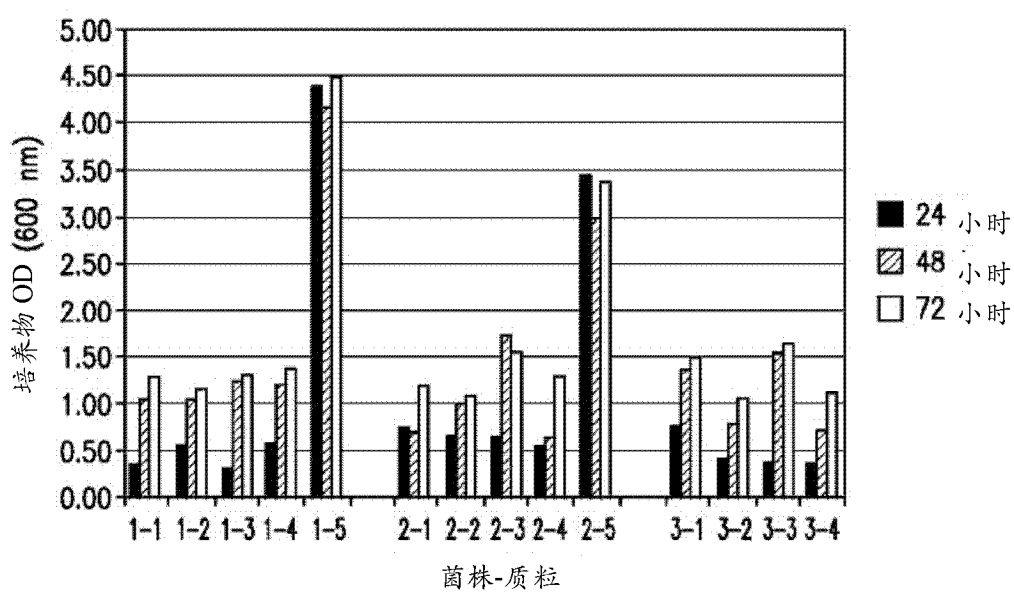


图 3(c)

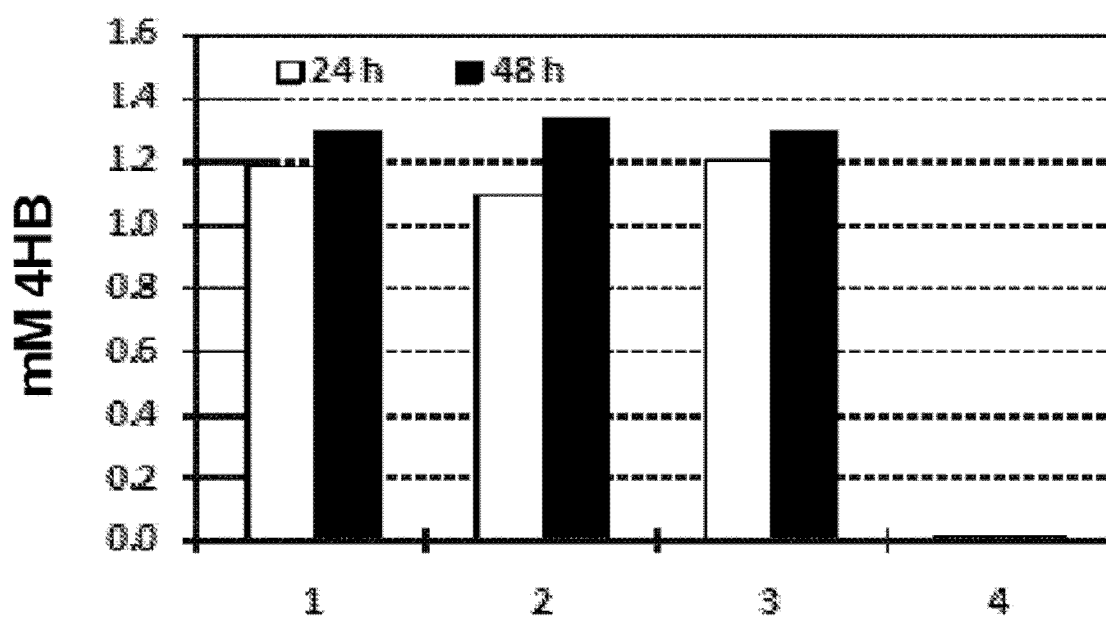


图 4

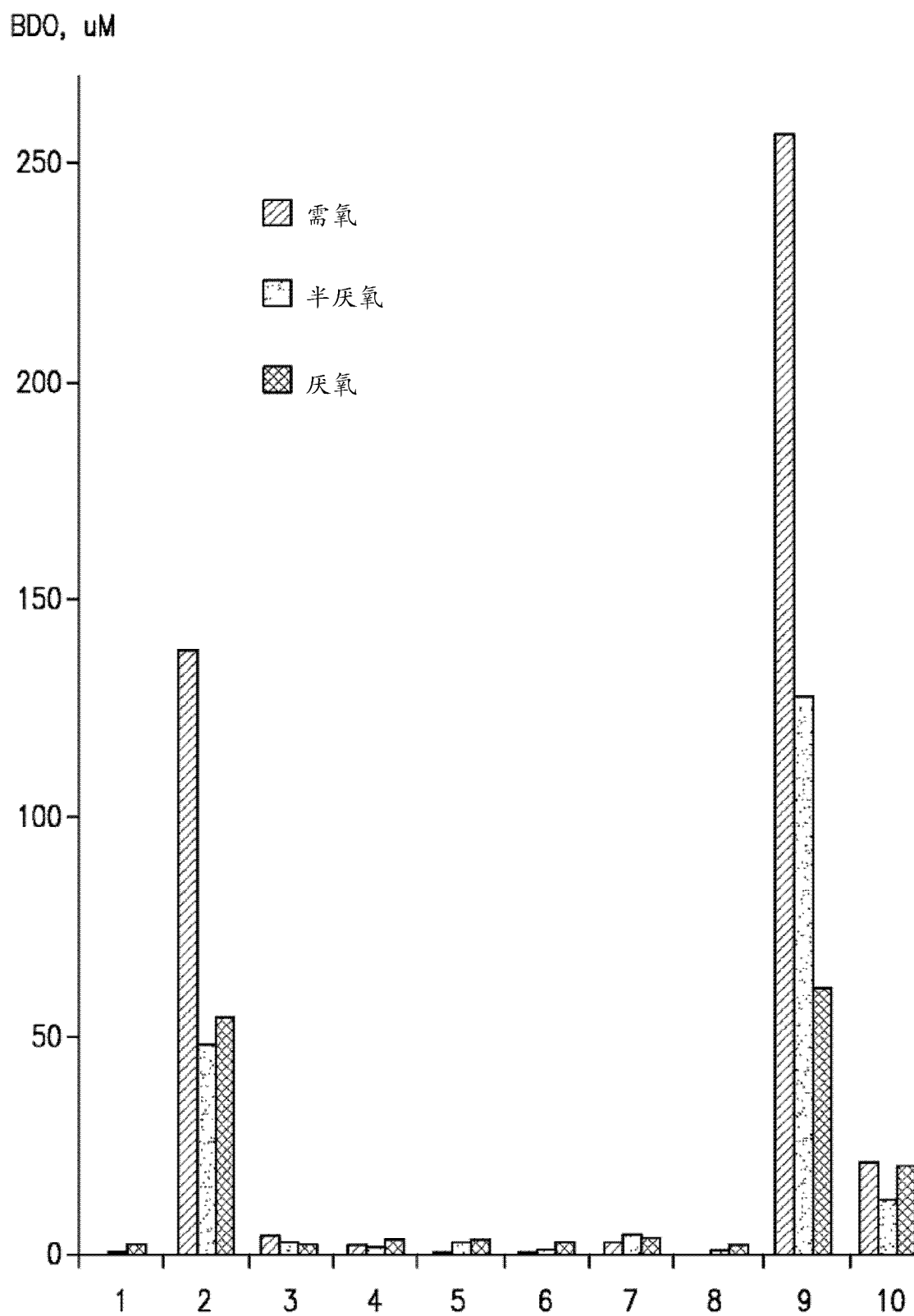


图 5

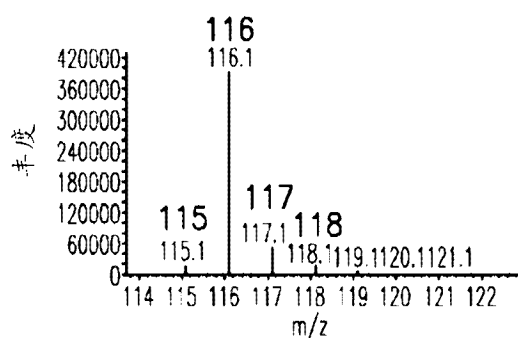


图 6(a)

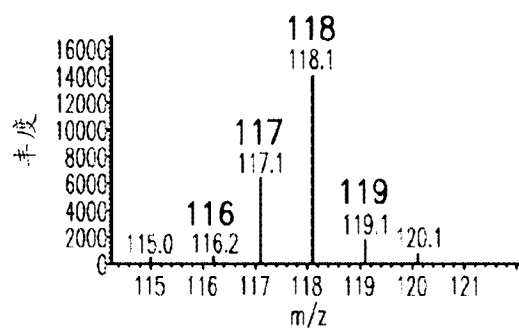


图 6(b)

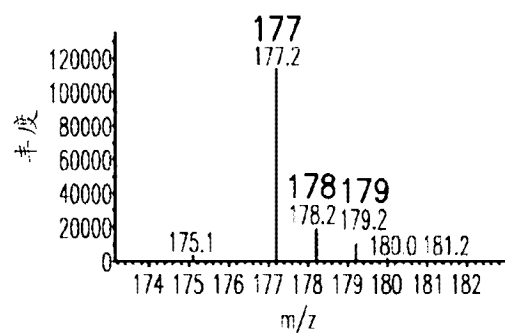


图 6(c)

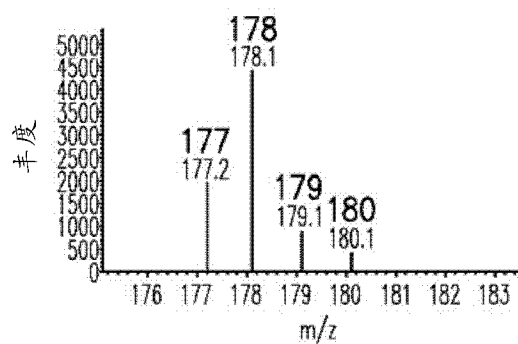


图 6(d)

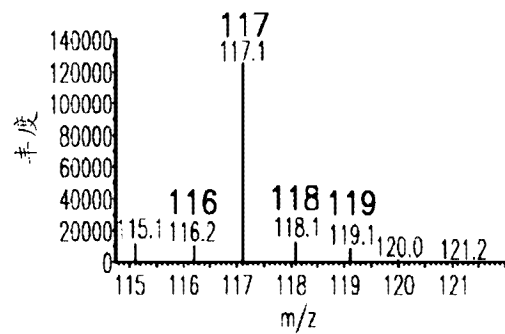


图 6(e)

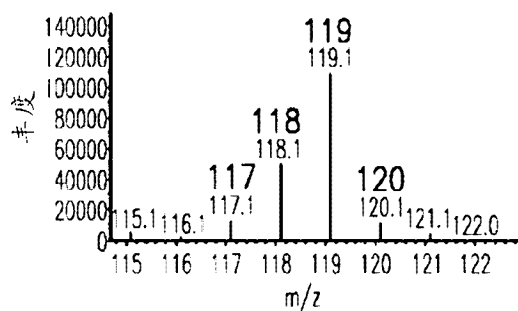


图 6(f)

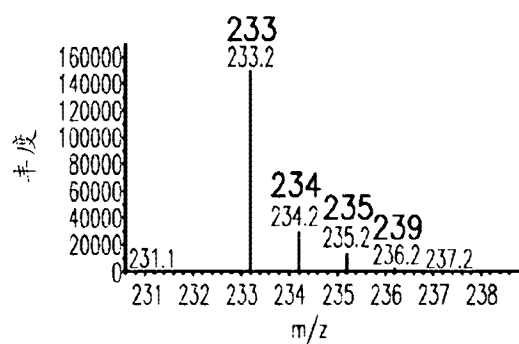


图 6 (g)

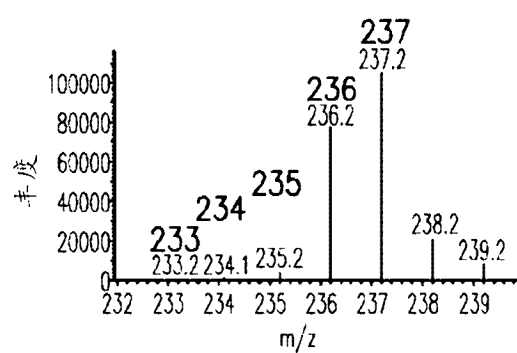


图 6 (h)

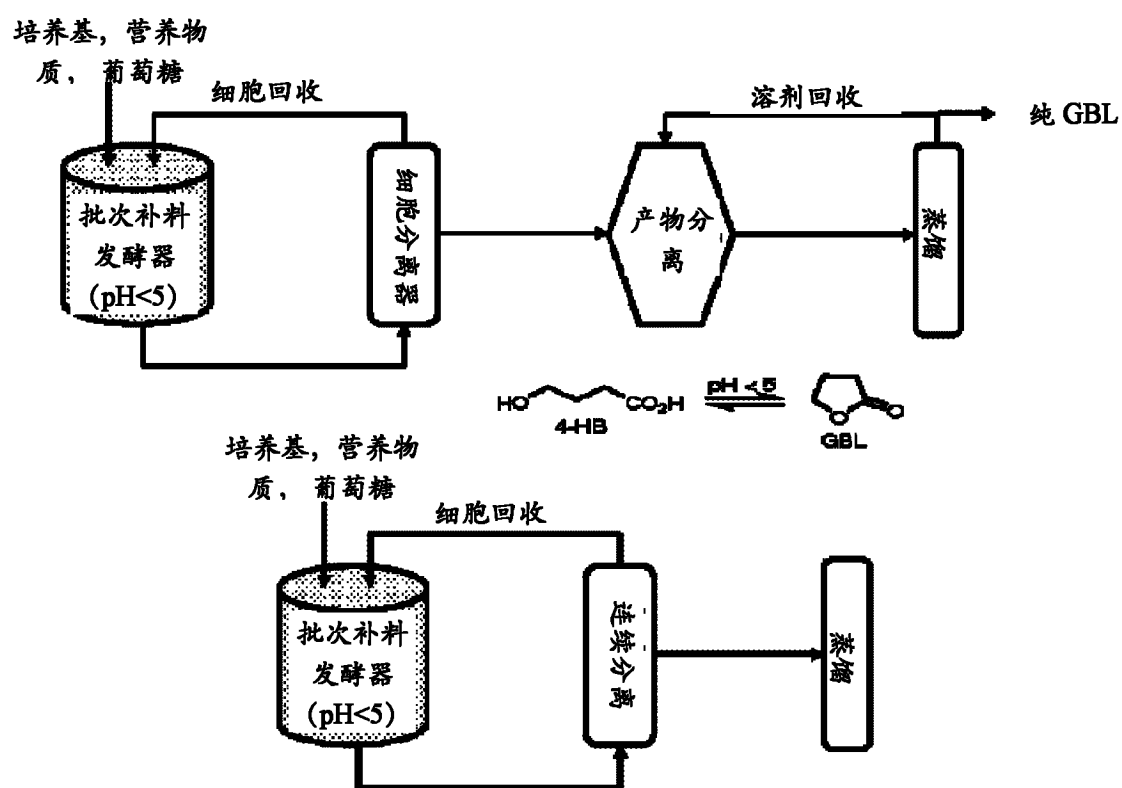


图 7

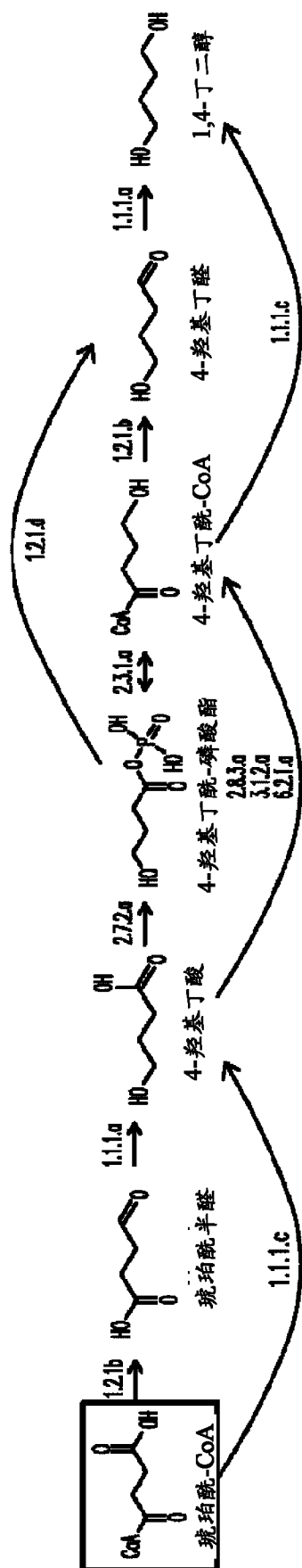


图 8A

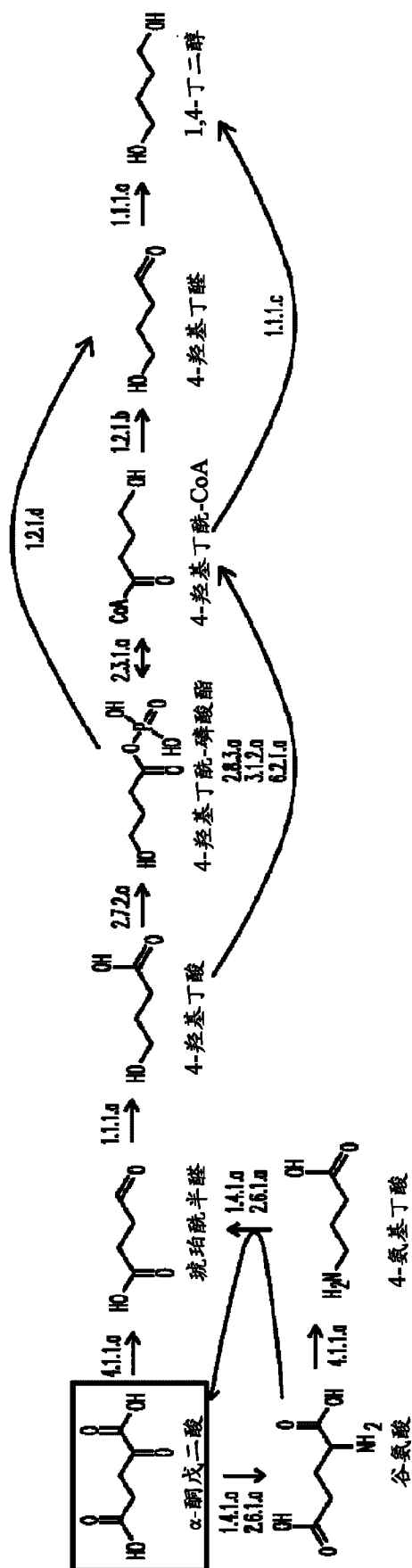


图 8B

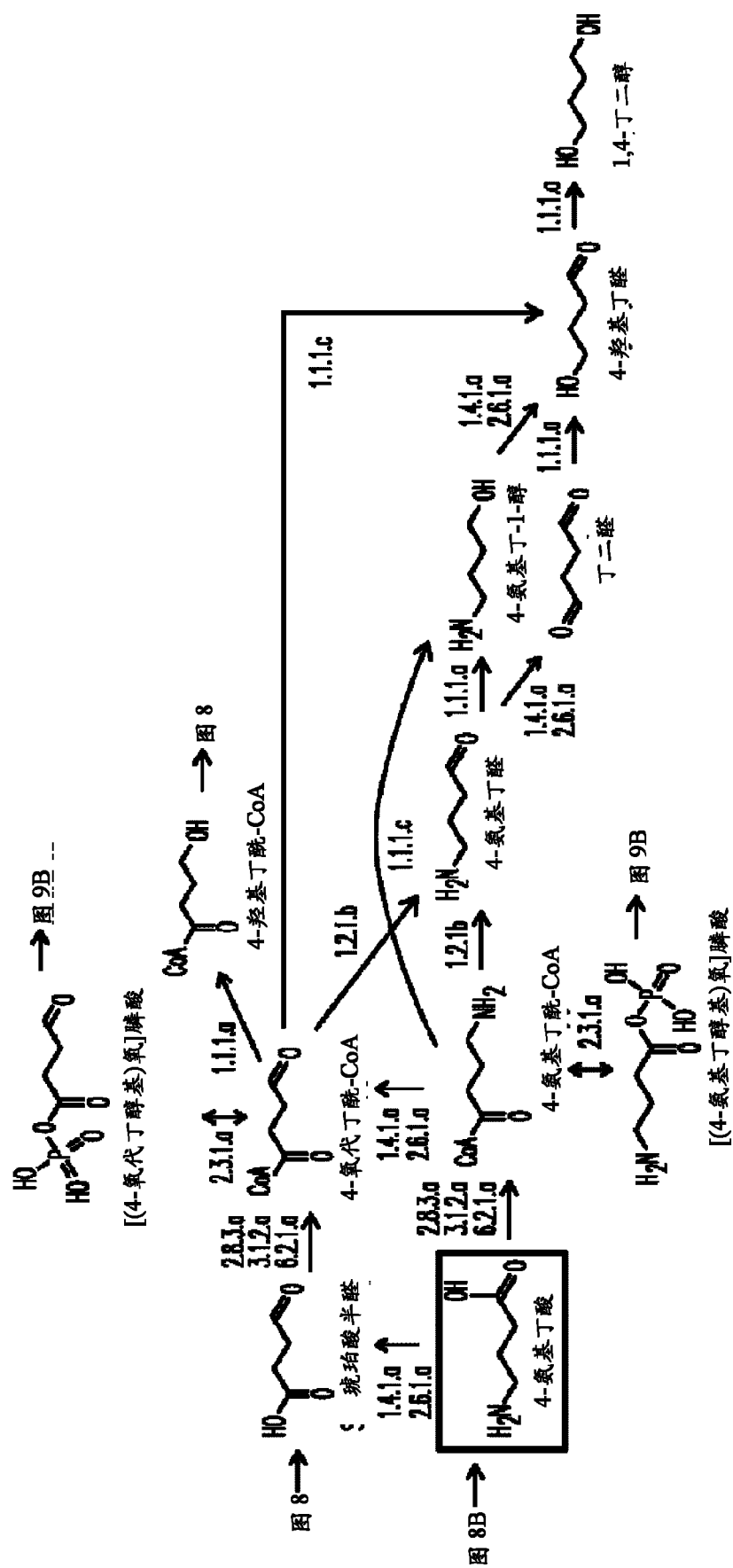


图 9A

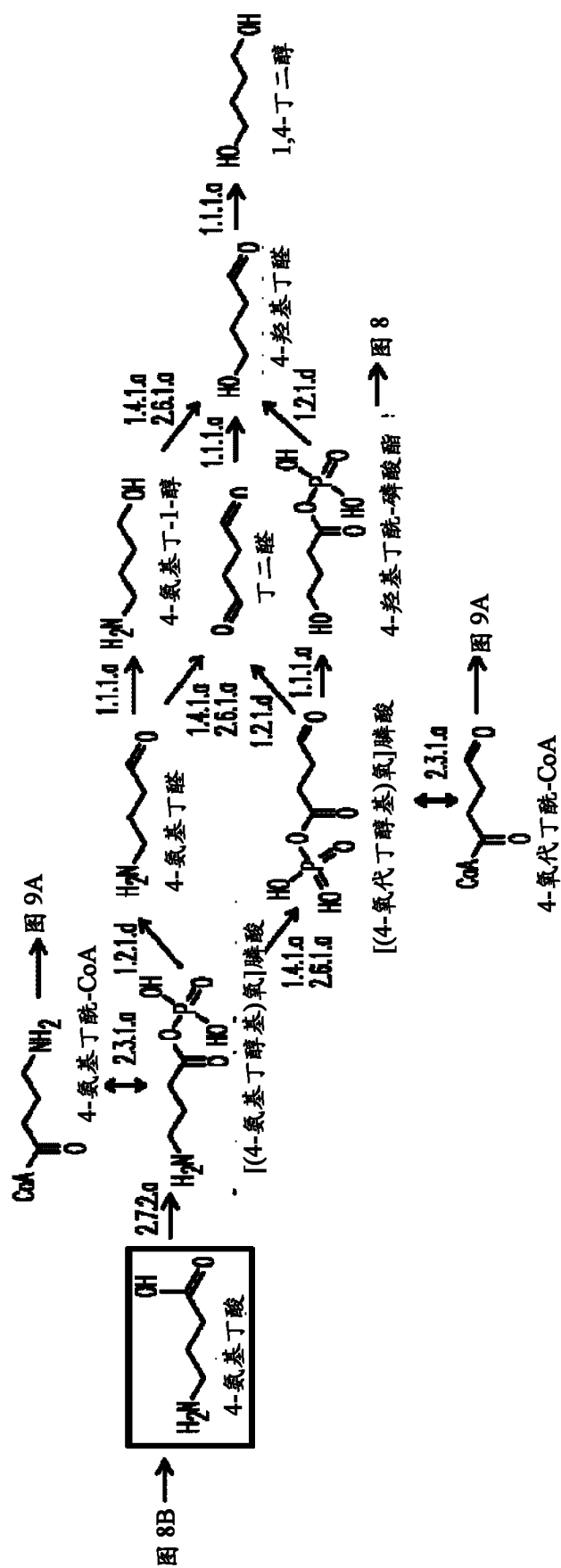


图 9B

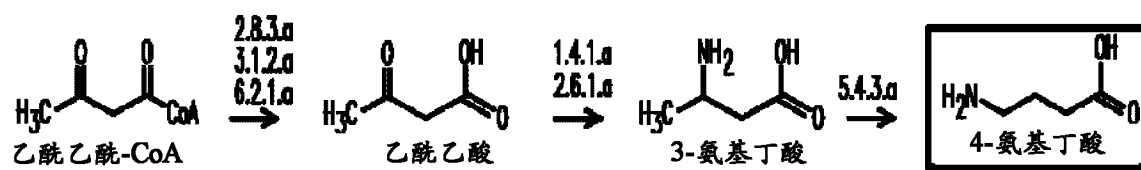


图 9C

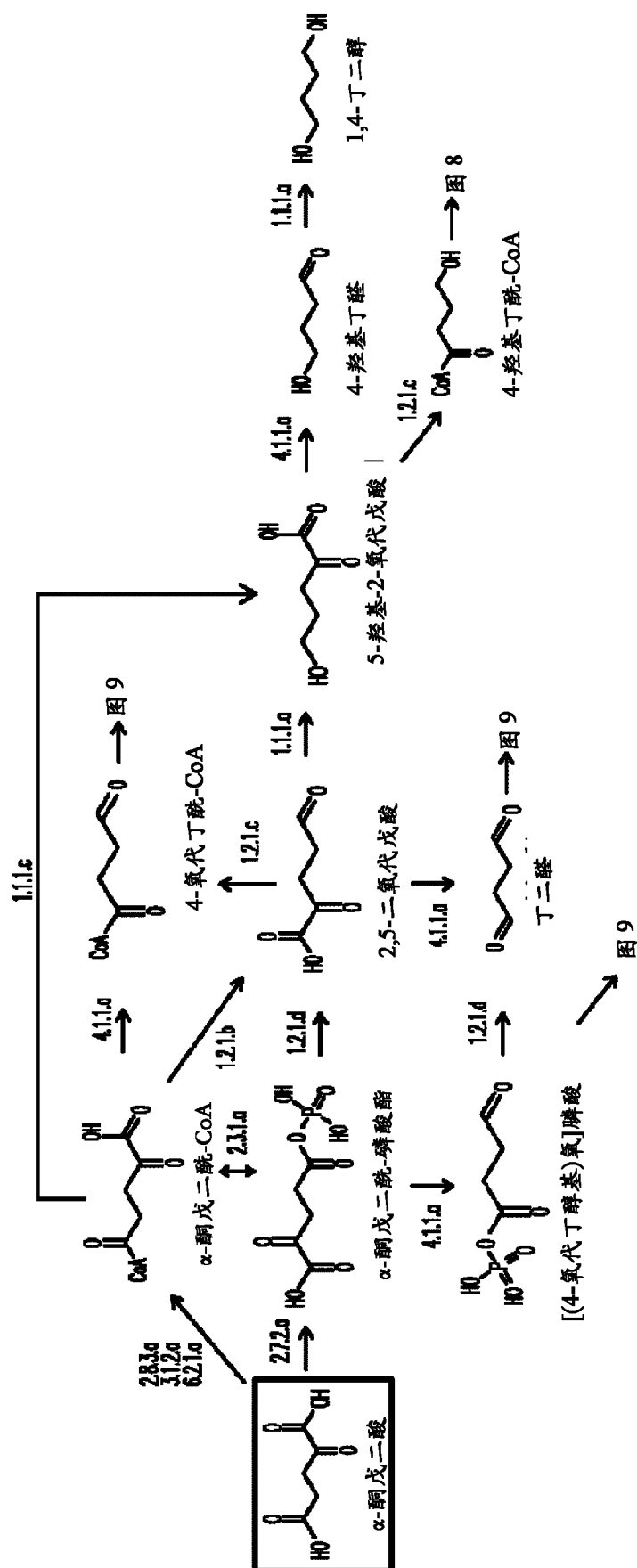


图 10

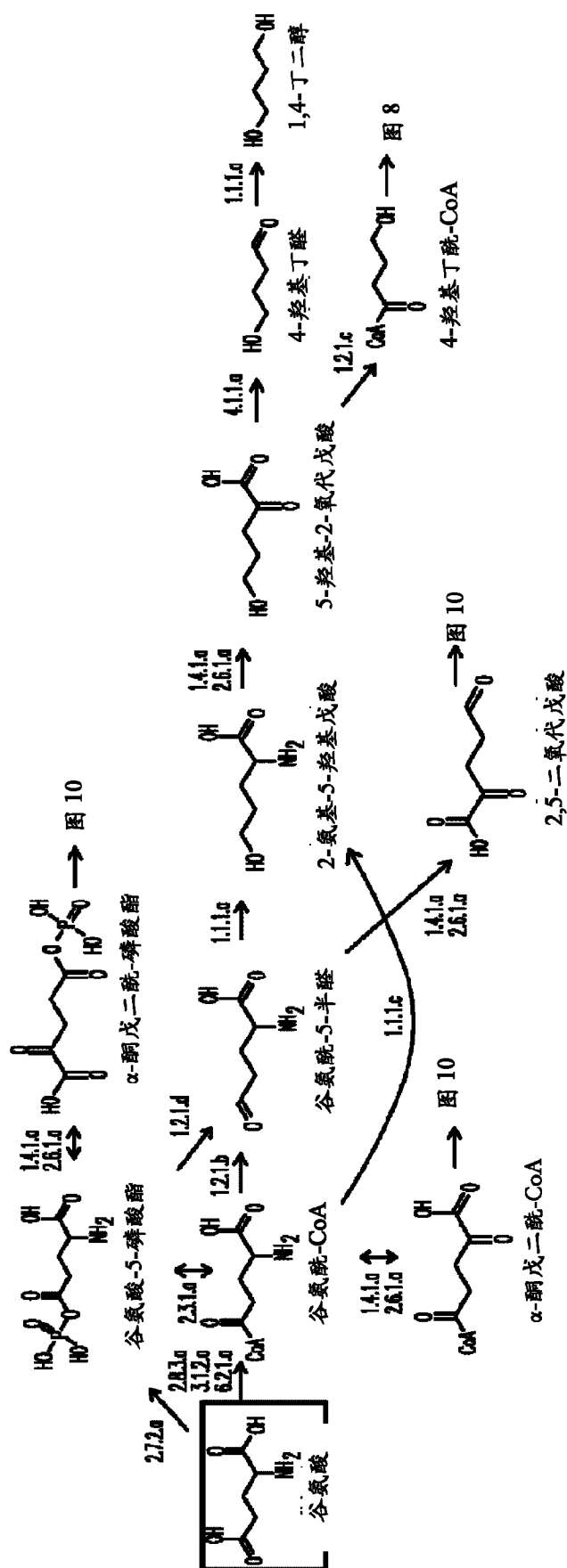


图 11

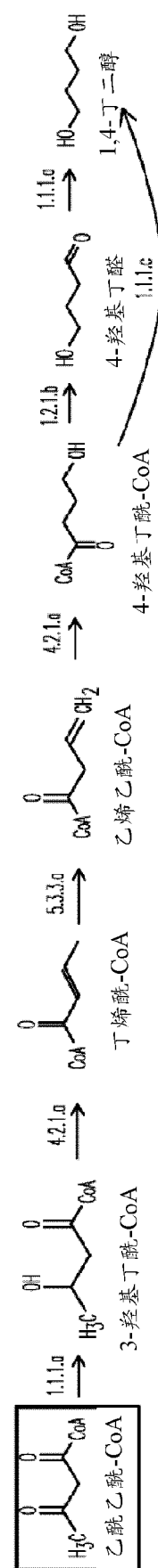


图 12

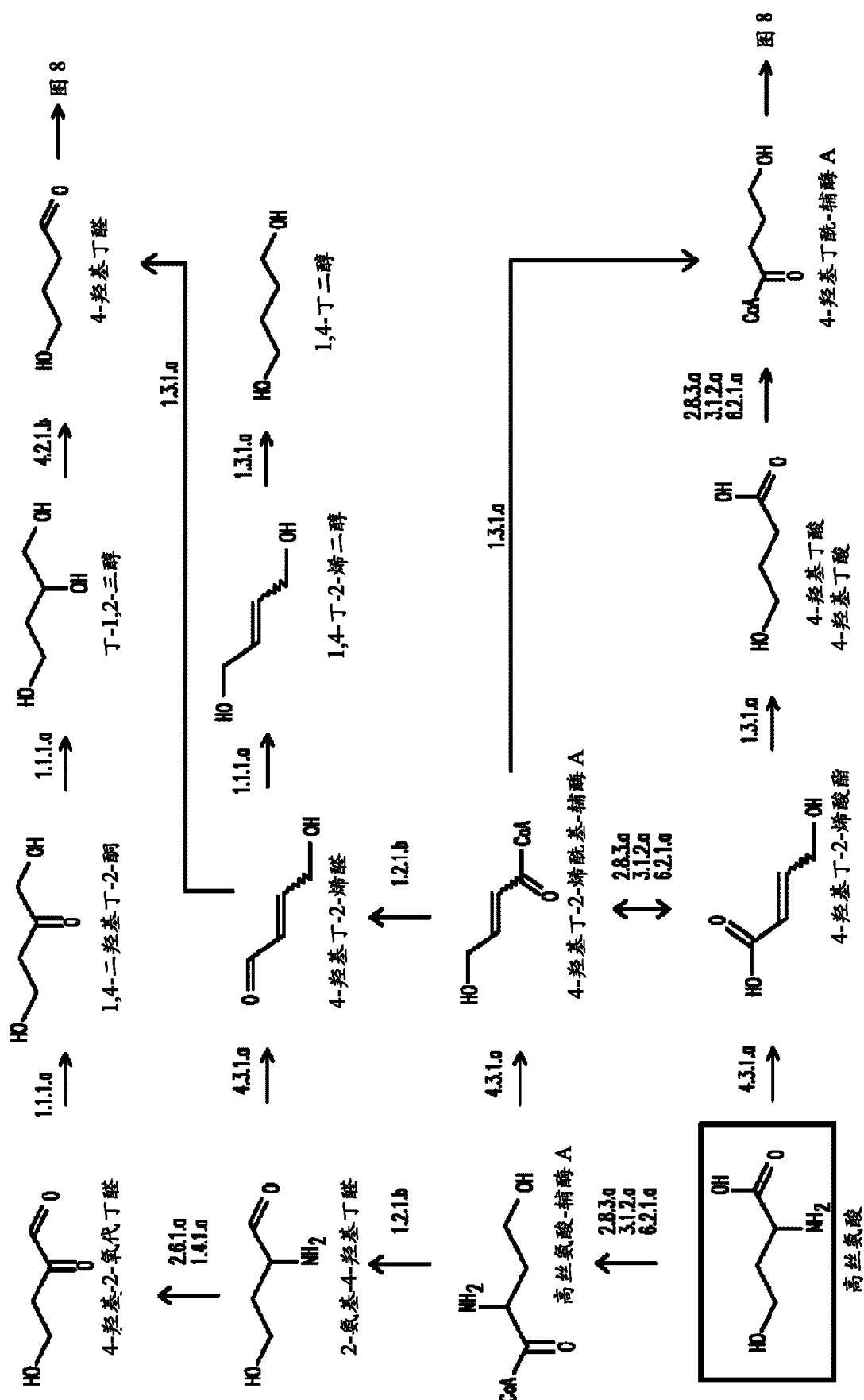


图 13

A.

ATGAACTTACATGAATATCAGGCAAAACAACCTTTTGGCCGCTATGGCTTACCAGCACCGGTGGGTT
ATGCCTGTACTACTCCGCGCGAAGCAGAAGAAGCCGCTTCAAAAATCGGTGCCGGTCCGTGGGTAG
TGAAATGTCAGGTTACGCTGGTGCCGCGGTAAAGCGGGCGGTGTGAAAGTTGTAAACAGCAAA
GAAGACATCCGTGCTTTTGCAAAAACCTGGCTGGGCAAGCGTCTGGTAACGTATCAAACAGATGCC
AATGGCCAACCGGTTAACCAGATTCTGGTTGAAGCAGCGACCGATATCGCTAAAGAGCTGTATCTCG
GTGCCGTTGTTGACCGTAGTTCCCGTCGTGTGGTCTTTATGGCCTCCACCGAAGGCGGCGTGAAAT
CGAAAAAGTGGCGGAAGAACTCCGCACCTGATCCATAAAGTTGCGCTTGATCCGCTGACTGGCCC
GATGCCGTATCAGGGACGCGAGCTGGCGTTCAAACCTGGGTCTGGAAGGTAACTGGTTCAGCAGTT
CACCAAATCTTCATGGGCCTGGCGACCATTTTCCTGGAGCGCGACCTGGCGTTGATCGAAATCAAC
CCGCTGGTCATCACCAACAGGGCGATCTGATTTGCCTCGACGGCAAACCTGGGCGCTGACGGCAAC
GCACTGTTCCGCCAGCCTGATCTGCGCGAAATGCGTGACCAGTCGCAGGAAGATCCGCGTGAAGCA
CAGGCTGCACAGTGGGAACTGAACTACGTTGCGCTGGACGGTAACATCGGTTGTATGGTTAACGGC
GCAGGTCTGGCGATGGGTACGATGGACATCGTTAACTGCACGGCGGCGAACC GGCTAACTTCCTT
GACGTTGGCGGCGGCGCAACCAAGAACGTGTAACCGAAGCGTTCAAATCATCTCTCTGACGAC
AAAGTGAAAGCCGTTCTGGTTAACATCTTCGGCGGTATCGTTGTTGCGACCTGATCGCTGACGGTA
TCATCGGCGCGGTAGCAGAAGTGGGTGTTAACGTACCGGTCTGGTACGTCTGGAAGGTAACAACG
CCGAACTCGGCGCGAAGAACTGGCTGACAGCGGCCTGAATATTATTGCAGCAAAAGGTCTGACGG
ATGCAGCTCAGCAGGTTGTTGCCGAGTGGAGGGGAAATAATGTCCATTTAATCGATAAAAACACC
AAGGTTATCTGCCAGGGCTTTACCGGTAGCCAGGGGACTTTCCACTCAGAACAGGCCATTGCATACG
GCACTAAAATGGTTGGCGGCGTAACCCAGGTAAAGGCGGCACCAACCCACCTCGGCCTGCCGGTGT
TCAACACCGTGCGTGAAGCCGTTGCTGCCACTGGCGCTACCGCTTCTGTTATCTACGTACCAGCACC
GTTCTGCAAAGACTCCATTCTGGAAGCCATCGACGCAGGCATCAAACCTGATTATCACCATCACTGAA
GGCATCCCGACGCTGGATATGCTGACCGTGAAAGTGAAGCTGGATGAAGCAGGCGTTCGTATGATC
GGCCCGAACTGCCAGGCGTTATCACTCCGGGTGAATGCAAAATCGGTATCCAGCCTGGTCACATTC
ACAAACCGGGTAAAGTGGGTATCGTTTCCGTTCCGGTACACTGACCTATGAAGCGGTTAAACAGAC
CACGGATTACGTTTCGGTCAGTCGACCTGTGTCCGTATCGGCGGTGACCCGATCCCGGGCTCTAAC
TTTATCGACATTCTCGAAATGTTGAAAAAGATCCGCAGACCGAAGCGATCGTGATGATCGGTGAGA
TCGGCGGTAGCGCTGAAGAAGAAGCAGCTGCGTACATCAAAGAGCACGTTACCAAGCCAGTTGTGG
GTTACATCGCTGGTGTGACTGCGCCGAAAGGCAAACGTATGGGCCACGCGGGTGCCATCATTGCCG
GTGGGAAAGGGACTGCGGATGAGAAATTCGTGCTCTGGAAGCCGAGGCGTGAAAACCGTTCG
AGCCTGGCGGATATCGGTGAAGCACTGAAAACCTGTTCTGAAATAA

B.

MNLHEYQAKQLFARYGLPAPVGYACTTPREAEEAASKIGAGPWVVKQVHAGGRGKAGGVKVNNSKE
DIRAFAENWL GKRLV TYQTDANGQPVNQILVEAATDIAKELYLGAVVDRSSRRVFMASTEGGVEIEKV
AEETPHLIHKVALDPLTGMPYQGRELAFKLGLEGKLVQQFTKIFMGLATIFLERDLALIEINPLVITKQGD
ICLDGKLGADGNALFRQPDIREMRDQSQEDPREAQAAQWELNYVALDGNIGCMVNGAGLAMGTM
IVKLHGGE PANFLDVGGGATKERVTEAFKIILSDDKV KAVLVNIFGGIVRCDLIADGIIGAVA EVGVNVPV
VRLEGNNAELGAKKLADSGLNIIAAKGLTDAAQQVVA AVEGK

C.

MSILDKNTKVICQGFTGSQGTFFHSEQAIA YGTMVGGVTPGKGGTTHLGLPVFNTVREAVAATGATAS
VIYVPAPFCKDSILEAIDAGIKLIITITEGIPTLDMLTVKVKLDEAGVRMIGPNCPGVITPGECKIGIQPGHIHK
PGKVGIVSRSGTLTYEAVKQTTDYGFQSTCVGIGGDIPIGNSFIDILEMFEKDPQTEAIVMIGEIGGSAEE
EAAAYIKEHVTKPVVGYIAGVTAPKGRMGHAGAIAGGKGTADEKFAALEAAGVKTVRSLADIGEALKT
VLK

图 14

A.

ATGGCCAACATAAGTTCACCATTCGGGCAAACGAATGGCTGGTTGAAGAGATGTACCGCAAGTTC
CGCGACGACCCCTCCTCGGTCGATCCCAGCTGGCACGAGTTCCTGGTTGACTACAGCCCCGAACCCA
CCTCCCAACCAGCTGCCGAACCAACCCGGGTACCTCGCCACTCGTTGCCGAGCGGGCCGCTGCGGC
CGCCCCGCAGGCACCCCCCAAGCCGGCCGACACCCGCGGCCGCGGGCAACGGCGTGGTCGCCGCACT
GGCCGCCAAAACCTGCCGTTCCCCGCCAGCCGAAGGTGACGAGGTAGCGGTGCTGCGCGCGCGCG
CCGCGGCCGTGCTCAAGAACATGTCCGCGTCGTTGGAGGTGCCGACGGCGACCAGCGTCCGGGCG
GTCCCGGCCAAGCTACTGATCGACAACCGGATCGTCATCAACAACCAGTTGAAGCGGACCCGCGGC
GGCAAGATCTCGTTCACGCATTTGCTGGGCTACGCCCTGGTGACGGCGGTGAAGAAATCCCGAAC
ATGAACCGGCACTACACCGAAGTCGACGGCAAGCCACCCGCGGTACGCCGGCGCACACCAATCTC
GGCTGGCGATCGACCTGCAAGGCAAGGACGGGAAGCGTTCCCTGGTGGTGGCCGGCATCAAGCG
GTGCGAGACCATGCGATTGCGCGAGTTGCTCACGGCCTACGAAGACATCGTACGCCGGGCCCGCGA
CGGCAAGCTGACCACTGAAGACTTTGCCGGCGTGACGATTTGCTGACCAATCCCGGAACCATCGGC
ACCGTGCAATTCGGTGCCGCGGTGATGCCCCGCCAGGGCGCCATCATCGGCGTGGGCGCCATGGAA
TACCCCGCCGAGTTTCAAGGCGCCAGCGAGGAACGCATCGCCGAGCTGGGCATCGGCAAATTGATC
ACTTTGACCTCCACCTACGACCACCGCATCATCAGGGCGCGGAATCGGGCGACTTCTGCGACCA
TCCACGAGTTGCTGCTCTCGGATGGCTTCTGGGACGAGGTCTTCGCGAACTGAGCATCCCATATCT
GCCGGTGCGCTGGAGCACCGACAACCCCGACTCGATCGTCGACAAGAACGCTCGCGTCATGAACCT
GATCGCGGCCTACCGCAACCGCGGCCATCTGATGGCCGATACCGACCCGCTGCGGTTGGACAAAGC
TCGGTTCCGCACTCACCCCGACCTCGAAGTGCTGACCCACGGCCTGACGCTGTGGGATCTCGATCGG
GTGTTCAAGTCGACGGCTTTGCCGGTGCGCAGTACAAGAACTGCGCGACGTGCTGGGCTTGCTG
CGCGATGCCTACTGCCGCCACATCGGCGTGAGTACGCCCATATCCTCGACCCCGAACAAAAGGAG
TGGCTCGAACACGGGTGAGACCAAGCACGTCAAACCCACTGTGGCCCAACAGAAATACATCCTC
AGCAAGCTCAACGCCGCCGAGGCCCTTTGAAACGTTCTACAGACCAAGTACGTGGCCAGAAAGCGG
TTCTCGCTGGAAGGCGCCGAAAGCGTGATCCCGATGATGGACGCGGCGATCGACCAAGTGCCTGAG
CACGGCCTCGACGAGGTGGTCATCGGGATGCCGCACCCGGGGCCGGCTCAACGTGCTGGCCAACATC
GTCGGCAAGCCGTAATCGCAGATCTTCACCGAGTTCGAGGGCAACCTGAATCCGTGCGAGGCGCAC
GGCTCCGGTGACGTCAAGTACCACCTGGGCGCCACCGGGCTGTACCTGCAGATGTTGCGCGACAAC
GACATTGAGGTGTCGCTGACCGCCAACCCGTGCGATCTGGAGGCCGTGACCCGGTGTGAGGGGA
TTGGTGCGGGCCAAGCAGGATCTGCTCGACCACGGAAGCATCGACAGCGACGGCCAACGGGCGTT
CTCGGTGGTGCCGCTGATGTTGCATGGCGATGCCGCGTTCGCCGGTCAGGGTGTGGTCCCGAGAC
GCTGAACCTGGCGAATCTGCCGGGCTACCGCGTCGGCGGCACCATCCACATCATCGTCAACAACCAAG
ATCGGCTTCACCACCGCGCCCGAGTATTCCAGGTCCAGCGAGTACTGCACCGACGTGCAAGATGA
TCGGGGCACCGATCTTTACGTCAACGGCGACGACCCGGAGGCGTGTGTCTGGGTGGCGCGGTTGG
CGGTGGACTTCCGACAACGGTTCAAGAAGGACGTGTCATCGACATGCTGTGCTACCGCCGCCGCG
GGCACAACGAGGGTGACGACCCGTGATGACCAACCCCTACATGTACGACGTGTCGACACCAAGC
GCGGGGCCCCGAAAAGCTACACCGAAGCCCTGATCGGACGTGGCGACATCTCGATGAAGGAGGCC
GAGGACGCGCTGCGCGACTACAGGGCCAGCTGGAACGGGTGTTCAACGAAGTGCGCGAGCTGGA
GAAGCACGGTGTGACGCCGAGCGAGTCGGTCGAGTCCGACCAGATGATCCCGCGGGGCTGGCCA
CTGCGGTGGACAAGTCGCTGCTGGCCCGGATCGGCGATGCGTTCTCGCCTTGCCGAACGGCTTAC
CGCGCACCCGCGAGTCCAACCGGTGCTGGAGAAGCGCCGGGAGATGGCCTATGAAGGCAAGATCG
ACTGGGCCTTTGGCGAGCTGCTGGCGCTGGGCTCGCTGGTGGCCGAAGGCAAGCTGGTGGCTTGT
CGGGGCAGGACAGCCGCCGCGGCACCTTCTCCAGCGGCATTGCGTTCTCATCGACCGCCACACTG
GCGAGGAGTTCACACCACTGCAGCTGCTGGCGACCAACTCCGACGGCAGCCCCACCGGCGGAAAGT
TCCTGGTCTACGACTCGCCACTGTGCGAGTACGCCCGCGTGGCTTCGAGTACGGCTACACTGTGGG
CAATCCGGACGCGGTGGTGTCTGCGGAGGCGCAGTTGCGCGACTTCGTCAACGGCGCACAGTCGAT
CATCGACGAGTTCATCAGCTCCGGTGAGGCCAAGTGGGGCCAATTGTCCAACGTCGTGCTGCTGTTA

图 15

CCGCACGGGCACGAGGGGCAGGGACCCGACCACACTTCTGCCC GGATCGAACGCTTCTTGCA GTTG
TGGGCGGAAGGTTTCGATGACCATCGCGATGCCGTGCGACTCCGTGGA ACTACTTCCACCTGCTACGCC
GGCATGCCCTGGACGGCATCCAACGCCCGCTGATCGTGTTACGCCCCAAGTCGATGTTGCGTCACAA
GGCCGCCGTCAGCGAAATCAAGGACTTCACCGAGATCAAGTTCCGCTCAGTGCTGGAGGAACCCAC
CTATGAGGACGGCATCGGAGACCGCAACAAGGTCAGCCGGATCCTGCTGACCA GTGGCAAGCTGTA
TTACGAGCTGGCCGCCCGCAAGGCCAAGGACAACCGCAATGACCTCGCGATCGTGCGGCTTGAACA
GCTCGCCCCGCTGCCAGGCGTCGACTGCGTGAAACGCTGGACCGCTACGAGAACGTCAAGGAGTT
CTTCTGGGTCCAAGAGGAACCGGCCAACCAGGGTGCGTGGCCGCGATTGCGGGCTCGAACTACCCGA
GCTGCTGCCTGACAAGTTGGCCGGGATCAAGCGAATCTCGCGCCGGGCGATGTCAGCCCCGTCGTC
AGGCTCGTCGAAGGTGCACGCCGTCGAACAGCAGGAGATCCTCGACGAGGCGTTCGGCTAA

B.

MANISSPFGQNEWLVEEMYRKFRDDPSSVDPWSHEFLVDYSPEPTSQPAAEPTRVTSPLVAERAAAAA
PQAPPKPADTAAAGNGVVAALAAKTAVPPPAEGDEVAVLRGAAA AVVKNMSASLEVPTATSVRAVPA
KLLIDNRIVINNQLKRTRGGKISFTHLLGYALVQAVKKFPNMNRHYTEVDGKPTAVTPAHTNLGLIDLQ
GKDGRSLV VAGIKRCETMRFAQFVTAYEDIVRRARDGKLTTEDFAGVTISLTNPGTIGTVHSVPRLMPG
QGAIIGVGAMEYPAEFQGA SEERIAELGIGKLITLTSTYDHRIIQGAESGDFLRTIHELLLSDFWDEVFREL
SIPYLPVRWSTDNPDSIVDKNARVMNLIAAYRNRGHLMA DTDPLRLDKARFRSHPDLEVLTHGLTLWDL
DRVFKVDGFAGAQYKKLRDVLGLLRDAYCRHIGVEYAHILDPEQKEWLEQRVETKHKVPTVAQQKYILSK
LNAAEFETFLQTKYVGQKRFSLEGAESVIPMMDAAIDQCAEHGLDEVVIGMPHRGRLNLVLANIVGKPY
SQIFTEFEGNLNPSQAHGSGDVKYHLGATGLYLQMF GDNDIQVSLTANPSHLEAVDPVLEGLVRAKQDL
LDHGSIDSDGQRAFSVPLMLHGDAAFAGQGVVAETLNLANLPGYRVGGTIHIVNNQIGFTTAPEYSRS
SEYCTDVAKMIGAPIFHVNGDDPEACVWVARLAVDFRQRFKKDVVIDMLCYRRRGHNEGDDPSMTNP
YMYDVVDTKRGARKSYTEALIGRGDISMKEAEDALRDYQGQLERVFNEVRELEKHGVQPSESVESDQMI
PAGLATAVDKSLLARIGDAFLALPNGFTAHPRVQPVLEKRRE MAYEGKIDWAFGELLALGSLVAEGKLVR
LSGQDSRRGTF SQRHSLIDRHTGEEFTPLQLLATNSDGSPTGGKFLVYDSPLSEYAAVGFEYGYTVGNPD
AVVLWEAQFGDFVNGAQSIIDEFISSGEAKWGQLSNV LLLPHGHEGQGPDHTSARIERFLQLWAEGS
MTIAMPSTPSNYFHLLRRHALDGIQRPLIVFTP KSMRLRHKA AVSEIKDFTEIKFRSVLEEPTYEDGIGDRNK
VSRILLTSGKLYYELAARKAKDNRNDLAIVRLEQLAPL PRRRLRETLDRYENVKEFFWVQEEPANQGAWP
RFGLELPELLPKLAGIKRISRRAMSAPSSGSSKVHAVEQQEILDEAFG

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)

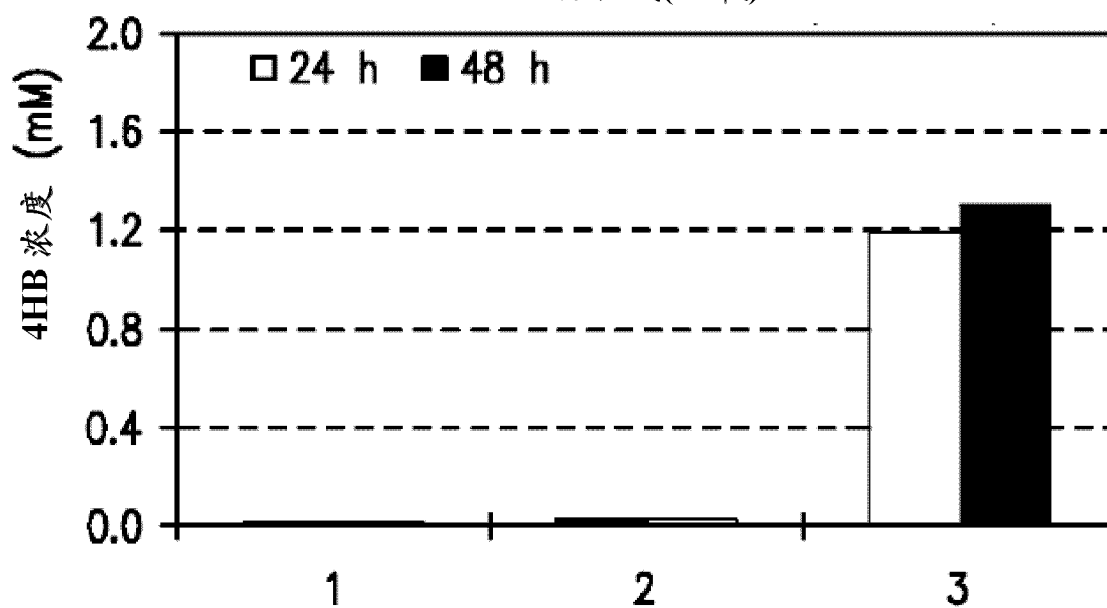


图 16

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

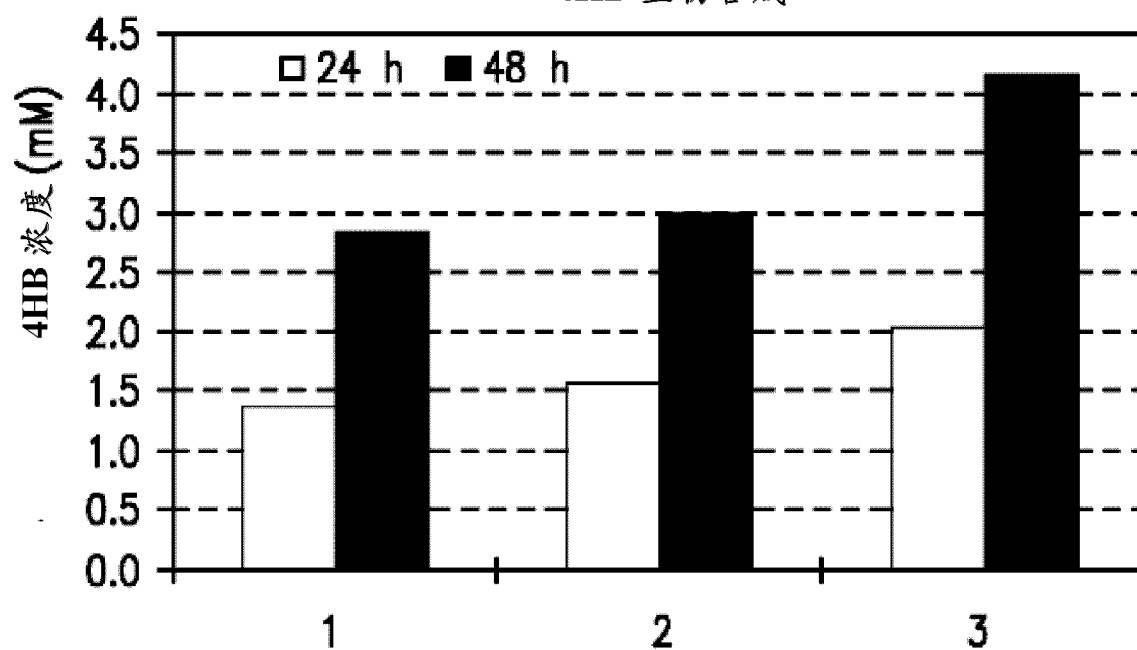


图 17

A.

ATGGAAATCAAAGAAATGGTGAGCCTTGACGCAAGGCTCAGAAGGAGTATCAAGCTACCCATAAC
CAAGAAGCAGTTGACAACATTTGCCGAGCTGCAGCAAAAGTTATTTATGAAAATGCAGCTATTCTGG
CTCGCGAAGCAGTAGACGAAACCGGCATGGGCGTTTACGAACACAAAGTGGCCAAGAATCAAGGC
AAATCCAAAGGTGTTTGGTACAACCTCCACAATAAAAAATCGATTGGTATCCTCAATATAGACGAGC
GTACCGGTATGATCGAGATTGCAAAGCCTATCGGAGTTGTAGGAGCCGTAAACGCCGACGACCAACC
CGATCGTTACTCCGATGAGCAATATCATCTTTGCTCTTAAGACCTGCAATGCCATCATTATTGCCCCC
ACCCAGATCCAAAAAATGCTCTGCACACGCAGTTCGTCTGATCAAAGAAGCTATCGCTCCGTTCAA
CGTACCGGAAGGTATGGTTCAGATCATCGAAGAACCCAGCATCGAGAAGACGCAGGAACATCATGG
GCGCCGTAGACGTAGTAGTTGCTACGGGTGGTATGGGCATGGTGAAGTCTGCATATTCTTCAGGAA
AGCCTTCTTTCGGTGTTGGAGCCGGTAACGTTCAGGTGATCGTGGATAGCAACATCGATTTGAAGC
TGCTGCAGAAAAATCATCACCGGTCGTGCTTTCGACAACGGTATCATCTGCTCAGGCGAACAGAGC
ATCATCTACAACGAGGCTGACAAGGAAGCAGTTTTCACAGCATTCCGCAACCACGGTGCATATTTCT
GTGACGAAGCCGAAGGAGATCGGGCTCGTGCAGCTATCTTCGAAAATGGAGCCATCGCGAAAGAT
GTAGTAGGTCAGAGCGTTGCCTTCATTGCCAAGAAAGCAAACATCAATATCCCCGAGGGTACCCGTA
TTCTCGTTGTTGAAGCTCGCGGCGTAGGAGCAGAAGACGTTATCTGTAAGGAAAAGATGTGTCCCG
TAATGTGCGCCCTCAGCTACAAGCACTTCGAAGAAGGTGTAGAAATCGCACGTACGAACCTCGCCAA
CGAAGGTAACGGCCACACCTGTGCTATCCACTCCAACAATCAGGCACACATCATCCTCGCAGGATCA
GAGCTGACGGTATCTCGTATCGTAGTGAATGCTCCGAGTGCCACTACAGCAGGCGGTCACATCCAAA
ACGGTCTTGCCGTAACCAATACGCTCGGATGCGGATCATGGGGTAATAACTCTATCTCCGAGAACTT
CACTTACAAGCACCTCCTCAACATTTACGCATCGCACCGTTGAATTCAAGCATTACATCCCCGATG
ACAAAGAAATCTGGGAACCTCTAA

B.

MEIKEMVSLARKAQKEYQATHNQEAVDNICRAAAKVIYENAAAILAREAVDETGMGVYEHKVAKNQGKS
KGVWYNLHNKKSIGILNIDERTGMIEIAKPIGVVGAVTPPTNPVTPMSNIIFALKTCNAIIAPHPRSKKCS
AHAVRLIKEAIAPFNVPEGMVQIIEEPSIEKTQELMGAVDVVVATGGMGVMVKSAYSSGKPSFVGAGN
VQVIVDSNIDFEAAAEKIITGRAFDNGIKSGEQSIYNEADKEAVFTA FRNHGAYFCDEAEGDRARAAIFE
NGAIAKDVGQSVAFIAKKANINIPEGTRILVVEARGVGAEDVICKEKMCPVMCALSYPKHFEEGVEIARTN
LANEGNGHTCAIHSNNQAHILAGSELTVSRIVYNAPSATTAGGHIQNGLAVTNTLGCGSWGNNISISNF
TYKHLLNISRIAPLNSSIHIPDDKEIWEL

图 18

A.

ATGCAACTTTTCAAACCAAGAGTGTAACACATCACTTTGACACTTTTGCAGAATTTGCCAAGGAATT
CTGCTTGGGAGAACGCGACTTGGAATTACCAACGAGTTCATCTATGAACCGTATATGAAGGCATGC
CAGCTCCCCTGCCATTTTGTATGTCAGGAGAAATATGGGCAAGGCGAGCCTTCTGACGAAATGATGA
ATAACATCTTGGCAGACATCCGTAATATCCAGTTCGACCGCGTAATCGGTATCGGAGGAGGTACGGT
TATTGACATCTCTAAACTTTTCGTTCTGAAAGGATTAATGATGTACTCGATGCATTGACCGCAAAA
TACCTCTTATCAAAGAGAAAGAACTGATCATTGTGCCCACAACATGCGGAACGGGTAGCGAGGTGA
CGAACATTTCTATCGCAGAAATCAAAAGCCGTACACCAAATGGGATTGGCTGACGATGCCATTGT
TGCAGACCATGCCATCATACCTGAACTTCTGAAGAGCTTGCCTTCCACTTCTACGCATGCAGTG
CAATCGATGCTCTTATCCATGCCATCGAGTCATACGTATCTCCTAAAGCCAGTCCATATTCTCGTCTGT
TCAGTGAGGCGGCTTGGGACATTATCCTGGAAGTATTCAAGAAAATCGCCGAACACGGCCCTGAAT
ACCGCTTCGAAAAGCTGGGAGAAATGATCATGGCCAGCAACTATGCCGGTATAGCCTTCGGAAATG
CAGGAGTAGGAGCCGTCCACGCACTATCCTACCCGTTGGGAGGCAACTATCACGTGCCGCATGGAG
AAGCAAATATCAGTTCTTACAGAGGTATTCAAAGTATACCAAAGAAGAATCCTTTCGGCTATAT
AGTCGAACTCAACTGGAAGCTCTCCAAGATACTGAACTGCCAGCCCGAATACGTATATCCGAAGCTG
GATGAACTTCTCGGATGCCTTCTTACCAAGAAACCTTTGCACGAATACGGCATGAAGGACGAAGAG
GTAAGAGGCTTTGCGGAATCAGTGCTTAAGACACAGCAAAGATTGCTCGCCAACAACCTACGTAGAG
CTTACTGTAGATGAGATCGAAGGTATCTACAGAAGACTCTACTAA

B.

MQLFKLKSVTHHFDTFAEFAKEFCLGERDLVITNEFIYEPYMKACQLPCHFVMQEKYGQGEPSDEMMN
NILADIRNIQFDRVIGIGGGTVIDISKLFVLKGLNDVLDADFDRKIPLIKEKELIIVPTTCGTGSEVTNISIAEIKSR
HTKMGLADDAIVADHAIIPPELLKSLPFH FYACSAIDALIHAIESYVSPKASPYSRLFSEAAWDIILEVFKKIAE
HGPEYRFEKLGEMIMASNYAGIAFGNAGVGAVHALSYPLGGNYHVPHEANYQFFTEVFKVYQKKNPF
GYIVELNWKLSKILNCQPEYVYPKLDLLGCLLTKKPLHEYGMKDEEVRGFAESVLKTQQRLLANNYVELT
VDEIEGIYRRLY

图 19

A.

ATGAAAGACGTATTAGCGGAATATGCCTCCGAATTGTTTCGGCCGAAGAAGCCGTAAAACATATCA
AAAATGGAGAACGGGTAGCTTTGTACATGCTGCCGGAGTTCCTCAGAGTTGTGTTGATGCACTGGT
ACAACAGGCCGACCTTTTCCAGAATGTCGAAATTTATCACATGCTTTGTCTCGGCCGAAGGAAAATAT
ATGGCACCTGAAATGGCCCCTCACTTCGACACATAACCAATTTTGTAGGTGGTAATTCTCGTAAAGC
AGTTGAGGAAAATAGAGCCGACTTCATTCCGGTATTCTTTTATGAAGTGCCATCAATGATTGCGAAA
GACATCCTTCACATAGATGTCGCCATCGTTCAGCTTTCAATGCCTGATGAGAATGGTTACTGTAGTTT
TGGAGTATCTTGCATTATAGCAAACCGGCAGCAGAAAGCGCTCATTTAGTTATAGGGGAAATCAA
CCGTCAAATGCCATATGTACATGGCGACAACCTTGATTCACATATCGAAGTTGGATTACATCGTGATG
GCAGACTACCTATCTATTCTTTGCAAAGCCCCAAAATCGGAGAAGTAGAAGAAGCTATCGGGCGTA
ATTGTGCCGAGCTTATTGAAGATGGTGCCACACTCCAACCTCGGTATCGGCGCGATTCTGATGCAGC
CCTGTTATTCTCAAGGACAAAAAAGATCTGGGGATCCATACCGAGATGTTCTCCGATGGTGTGTC
GAATTAGTTCGCAGTGGAGTAATTACAGGAAAGAAAAAGACACTTCACCCCGGAAAGATGGTCGCA
ACCTTCTTAATGGGAAGCGAAGACGTATATCATTTTCATCGACAAAAATCCCGATGTAGAAGTTTATCC
GGTAGATTACGTCAATGATCCGCGAGTAATCGCTCAAATGATAATATGGTCAGCATCAATAGCTGT
ATCGAAATCGATCTTATGGGACAAGTCGTGTCCGAATGTATAGGAAGCAAGCAATTCAGCGGAACC
GGCGGTCAAGTAGATTATGTTCTGTGGAGCAGCATGGTCTAAAAACGGCAAAGCATCATGGCAATT
CCCTCAACAGCCAAAAACGGTACTGCATCTCGAATTGTACCTATAATTGCAGAGGGAGCTGCTGTAA
CAACCTCCGCAACGAAGTCGATTACGTTGTAACCGAATACGGTATAGCACAACCTCAAAGGAAAGA
GTTTGCGCCAGCGAGCAGAAGCTCTTATTGCCATAGCCCACCCGGATTTCAGAGAGGAACTAACGA
AACATCTCCGCAAACGTTTCGGATAA

B.

MKDYLAEYASRIVSAEEAVKHIKNGERVALSHAAGVPQSCVDALVQQADLFQNVEIYHMLCLGEGKYM
APEMAPHFRHITNFVGGNSRKAVEENRADFIPVFFYEVPSMIRKDILHIDVAIVQLSMPDENGYSFGVS
CDYSKPAAESAHLVIGEINRQMPYVHGDNLHISKLDYIVMADYPIYSLAKPKIGEVEEAIGRNCAELIEDG
ATLQLGIGAIPDAALLFLKDKDLGIHTEMFSDGVVELVRSGVITGKKTLHPGKMVATFLMGSEDVYHFI
DKNPDELVPVDVNDPRVIAQNNDNMVSINSCEIDLMGQVVSECIGSKQFSGTGGQVDYVRGAWSK
NGKSIMAIPTAKNGTASRIVPIIAEGAAVTTLRNEVDYVVEYGIAQLKGKSLRQRAEALIAIHPDFREEL
TKHLRKRFG

图 20

A.

ATGATTAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTTGCTGTAGCACAAAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTAAGAGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCAGATGCTATTCTTGTGGAGACCATGACGAAATCGTGTCAATCGCGCTTAAAAATAGGA
ATGGATGTAAATGATTTTGAATAGTAAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCTTTAAAGGC
AGTAGAGCTTGTATCAACTGGAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTTGTAATAACAGCAA
CTTTCTTAAGATCTGTATTAAACAAAGAAGTTGGACTTAGAACAGSAAAACTATGTCTCAC
GTTGCAGTATTTGAAACTGAGAAATTTGATAGACTATTATTTTAAACAGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAAGGAAAAAATTGATATAGTAAACAATTCAGTTAAGGTTGCACATG
CAATAGGAATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATAAACCTAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACAGAGGACAAATTAAAGG
TTGTGTAGTTGACGGACCTTTAGCACTTGATATAGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
AGGGAGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATAGAAACA
GGAAATGTAATGTATAAGACTTTAACATATACAACTGATTCAAAAAATGGAGGAATCTTAGT
TGGAACCTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCAAGAGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAACT
CTATAGCACTTGACAGCTTTAGTTGCAGGCAATAAATAA

B.

MIKSFNEIIMKVKSKEKMKVAVAVAQDEPVLEAVRDAKNGIADAILVGDHDEIVSIALKIG
MDVNDFEIVNEPNVKKAAALKAVELVSTGKADMVMKGLVNTATFLRSVLNKEVGLRTGKTMSH
VAVFETEFDRLLFLTDVAFNTYPELKEKIDIVNNSVKVAHAIGIENPKVAPICAVEVINPK
MPSTLDAAMLSKMSDRGQIKGCVVDGPLALDIALSEEAHHKGVGTGEVAGKADIFLMPNIET
GNVMYKTLTYTTDSKNGGILVGTSAPVVLTSRADSHETKMNSIALAALVAGNK

图 21

A.

ATGTATAGATTACTAATAATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGA
TGAAAAAGAGATATTTGAGAAGACTTTAAGACATTCAGCTGAAGAGATAGAAAAATATAACA
CTATATTTGATCAATTTCAATTCAGAAAGAATGTAATTTTAGATGCGTTAAAAGAAGCAAAC
ATAGAAGTAAGTTCTTTAAATGCTGTAGTTGGAAGAGGCGGACTCTTAAAGCCAATAGTAAG
TGGAACCTTATGCAGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTAGGAGTTCAAGGTCAGC
ATGCGTCAAATCTTGGTGGAATTATTGCAAATGAAATAGCAAAGAAATAAATGTTCCAGCA
TACATAGTTGATCCAGTTGTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTTCAAGAATATCAGGAATGGC
TGACATTCCAAGAAAAAGTATATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTAGAAGATATG
CAAAAGAAGTTGGAAAAAATACGAAGATCTTAATTTAATCGTAGTCCACATGGGTGGAGGT
ACTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGTAGAGTAATAGAAGTTAATAATACACTTGATGGAGA
AGGTCCATTCTCACCAGAAAGAAAGTGGTGGAGTTCCAATAGGAGATCTTGTAAGATTGTGCT
TCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTAATGAAAAAGATAAACGGCAAAGGCGGAGTTGTT
AGTTACTTAAATACTATCGATTTTAAGGCIGTAGTTGATAAAGCTCTTGAAGGAGATAAGAA
ATGTGCACTTATATATGAAGCTTTTCACATTCCAGGTAGCAAAGAGATAGGAAAATGTTCAA
CCGTTTTTAAAGGAAATGTAGATGCAATAATCTTAACAGGCGGAATTGCGTACAACGAGCAT
GTATGTAATGCCATAGAGGATAGAGTAAAATTCATAGCACCTGTAGTTAGATATGGTGGAGA
AGATGAACTTCTTGCACTTGCAGAAGGTGGACTTAGAGTTTTAAGAGGAGAAGAAAAAGCTA
AGGAATACAAATAA

B.

MYRLLIINPGSTSTKIGIYDDEKEIFEKTLRHSAAEEIEKYNTIFDQFQFRKNVILDALKEAN
IEVSSLNAVVGRRGGLLKPIVSGTYAVNQKMLEDLKVGVOGQHASN LGGI IANEIAKEINVPA
YIVDPVVVDELDEVSRI SMADI PRKSIFHALNQAVARRYAKEV GKKYEDLNLIVVHMGGG
TSVGTHKDGRVIEVNNTLDGEGPFSERSGGVPIGDLVRLCFSNKYTYEEVMKKINGKGGVV
SYLNTIDFKAVVDKALEGDKKCALIYEAF TFQVAKEIGKCSTVLKGNVDAILTGGIAYNEH
VCNAIEDRVKFIAPVVRYGGEDELLALAEGGLRVL RGE EKAK EYK

图 22

A.

ATGATTAAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTTGCTGTAGCACAAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCAGATGCTATTCTTGTGGCGACCATGACGAAATCGTGTCAATCGCGCTTAAATAGGC
ATGGATGTAAATGATTTTGAATAGTAAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCTTTAAAGGC
AGTAGAGCTGGTATCAACTGGAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTTGTAATACAGCAA
CTTTCTTACGCTCTGTATTAAACAAAGAAGTTGGACTGAGAACAGGAAAACTATGTCTCAC
GTTGCAGTATTTGAAACTGAGAAATTTGATCGTCTGTTATTTTAAACAGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAGGAAAAAATTGATATCGTAAACAATTCAGTTAAGGTTGCACATG
CAATAGGTATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATAAACCCCTAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACAGAGGACAAATTAAAGG
TTGTGTAGTTGACGGACCGTTAGCACTTGATATCGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
AGGGCGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATTGAAACA
GGAAATGTAATGTATAAGACTTTAACATATACAACTGATAGCAAAAATGGCGGAATCTTAGT
TGGAACCTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCACGCGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAACT
CTATTGCACTTGCAGCTTTAGTTGCAGGCAATAAATAA

B.

ATGATTAAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTTGCTGTAGCACAAGACGAGCCAGTACTTGAAGCAGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCCGATGCTATTCTGGTTGGCGACCATGACGAAATCGTGTCTATCGCGCTGAAAATAGGC
ATGGATGTAAATGATTTTGAATTTGTTAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCGTTAAAGGC
AGTAGAGCTGGTATCAACTGGAAAAGCTGATATGGTAATGAAGGGACTGGTAAATACCGCAA
CTTTCTTACGCTCTGTATTAAACAAAGAAGTTGGTCTGCGTACAGGAAAAACCATGTCTCAC
GTTGCAGTATTTGAAACTGAGAAATTTGATCGTCTGTTATTTTAAACAGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAGGAAAAAATTGATATCGTTAACAATAGCGTTAAGGTTGCACATG
CCATTGGTATTGAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATTAACCCGAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCAGCAATGCTTTCAAAAATGAGTGACCGCGGACAAATTAAAGG
TTGTGTAGTTGACGGACCGCTGCCACTTGATATCGCTTTATCAGAAGAAGCAGCACATCATA
AAGGCGTAACAGGAGAAGTTGCTGGAAAAGCTGATATCTTCTTAATGCCAAACATTGAAACA
GGAAATGTAATGTATAAGACGTTAACCTATACCACTGATAGCAAAAATGGCGGCATCCTGGT
TGGAACCTCTGCACCAGTTGTTTTAACTTCACGCGCTGACAGCCATGAAACAAAAATGAACT
CTATTGCACTGGCAGCGCTGGTTGCAGGCAATAAATAA

图 23

C.

ATGATTAAAGAGTTTTAATGAAATTATCATGAAGGTAAAGAGCAAAGAAATGAAAAAAGTTGC
TGTTGCTGTTGCACAAGACGAGCCGGTACTGGAAGCGGTACGCGATGCTAAGAAAAATGGTA
TTGCCGATGCTATTCTGTTGGCGACCATGACGAAATCGTCTCTATCGCGCTGAAAAATTGGC
ATGGATGTTAATGATTTTGAATTTGTTAACGAGCCTAACGTTAAGAAAGCTGCGCTGAAGGC
GGTAGAGCTGGTTTCCACCGGAAAAGCTGATATGTAATGAAAGGGCTGGTGAATACCGCAA
CTTTCTTACGCAGCGTACTGAACAAAGAAGTTGGTCTGCGTACCGGAAAAACCATGAGTCAC
GTTGCGGTATTTGAAACTGAGAAATTTGATCGTCTGCTGTTTCTGACCGATGTTGCTTTCAA
TACTTATCCTGAATTAAAAGAAAAAATTGATATCGTTAACAATAGCGTTAAGGTTGCGCATG
CCATTGGTATTGAAAAATCCAAAGGTTGCTCCAATTTGTGCAGTTGAGGTTATTAACCCGAAA
ATGCCATCAACACTTGATGCCGCAATGCTTAGCAAAATGAGTGACCGCGGACAAATTAAAGG
TTGTGTGGTTGACGGCCCGCTGGCACTGGATATCGCGTTAAGCGAAGAAGCGGCACATCATA
AAGGCGTAACCGGCGAAGTTGCTGGAAGGCTGATATCTTCCTGATGCCAAACATTGAAACA
GGCAATGTAATGTATAAAACGTTAACCTATACCACTGATAGCAAAAATGGCGGCATCCTGGT
TGGAACCTCTGCACCAGTTGTTTTAACCTCACGCGCTGACAGCCATGAAACCAAATGAACA
GCATTGCACTGGCAGCGCTGGTTGCAGGCAATAATAA

D.

ATGATTAAAAGTTTTAACGAAATTATCATGAAAGTGAAAAGCAAAGAGATGAAAAAAGTGGC
GGTTGCGGTTGCGCAGGATGAACCGGTGCTGGAAGCGGTGCGCGATGCCAAAAAAACGGTA
TTGCCGATGCCATTCTGGTGGGCGATCACGATGAAATTGTCTCTATTGCGCTGAAAATTGGC
ATGGATGTTAACGATTTTGAATTTGTTAATGAACCGAACGTGAAAAAAGCGGCGCTGAAAGC
GGTTGAACTGGTTTCCACCGGTAAAGCCGATATGGTGTGATGAAAGGGCTGGTGAATACCGCAA
CCTTCCTGCGCAGCGTGCTGAATAAAGAAGTGGGTCTGCGTACCGGTAAAACCATGAGTCAT
GTTGCGGTGTTTGAACCGAAAAAATTTGACCGTCTGCTGTTTCTGACCGATGTTGCGTTTAA
TACCTATCCGGAAGTGAAGAGAAAAATTGATATCGTTAATAACAGCGTGAAAGTGGCGCATG
CCATTGGTATTGAAAACCGAAAAGTGGCGCGGATTTGCGCGGTTGAAGTGATTAACCCGAAA
ATGCCGTCAACGCTGGATGCCGCGATGCTCAGCAAAATGAGCGATCGCGGTCAAATCAAAGG
CTGTGTGGTTGATGGCCCGCTGGCGCTGGATATCGCGCTTAGCGAAGAAGCGGCGCATCATA
AAGGCGTGACCGGCGAAGTGGCCGGTAAAGCCGATATTTTCCTGATGCCGAATATTGAAACC
GGCAACGTGATGTATAAAACGCTGACCTATACCAACGACAGCAAAAACGGCGGCATTCTGGT
GGGTACCAGCGCGCCGGTGGTGTGACCTCGCGCGCCGACAGCCATGAAACCAAATGAACA
GCATTGCGCTGGCGGCGCTGGTGGCCGGTAATAATAA

图 23(续)

A.

ATGTATCGTTTACTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGATGA
AAAAGAGATATTTGAGAAGACCTTTACGTCATTCAGCTGAAGAGATAGAAAAATATAACACTATAT
TTGATCAATTTTCAGTTTCAGAAAGAATGTAATTCCTCGATGCGTTAAAAGAAGCAAACATTGAAGTA
AGTTCCTTTAAATGCTGTAGTTGGACGCGGCGGACTGTTAAAGCCAATAGTAAGTGGAACTTATGC
AGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTAGGCGTTCAAGGTGAGCATGCGTCAAATCTTG
GTGGAATTATTGCAAATGAAATAGCAAAAGAAATAAATGTTCCAGCATACATCGTTGATCCAGTT
GTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTTCACGTATATCAGGAATGGCTGACATTCCACGTAAAAGTAT
ATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTAGACGCTATGCAAAAGAAGTTGGAAAAAATACG
AAGATCTTAATTTAATCGTGGTCCACATGGGTGGCGGTACTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGT
AGAGTAATTGAAGTTAATAATACACTTGATGGAGAAGGTCCATTCTCACCAGAAAGAAGTGGTGG
CGTTCCAATAGGCGATCTTGTTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTAATGA
AAAAGATAAACGGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACTTAAATACTATCGATTTTAAAGGCTGTAGTT
GATAAAGCTCTTGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTTATATATGAAGCTTTCACATTCCAGGTAGC
AAAAGAGATAGGAAAATGTTCAACCGTTTTAAAAGGAAATGTAGATGCAATAATCTTAACAGGCG
GAATTGCGTACAACGAGCATGTATGTAATGCCATAGAGGATAGAGTAAAATTTCATTGCACCTGTA
GTTTCGTTATGGTGGAGAAGATGAACTTCTGCACTTGCAAGGTGGACTGCGCGTTTTACGCGG
AGAAGAAAAGCTAAGGAATACAAATAA

B.

ATGTATCGTTTACTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAATTGGTATTTATGACGATGA
AAAAGAGATATTTGAGAAGACGTTACGTCATTCAGCTGAAGAGATTGAAAAATATAACACTATAT
TTGATCAATTTTCAGTTCCGCAAGAATGTGATTCTCGATGCGTTAAAAGAAGCAAACATTGAAGTC
AGTTCCTTTAAATGCTGTAGTTGGACGCGGCGGACTGTTAAAGCCAATTGTCAGTGGAACTTATGC
AGTAAATCAAAAAATGCTTGAAGACCTTAAAGTGGGCGTTCAAGGTGAGCATGCCAGCAATCTTG
GTGGCATTATTGCCAATGAAATCGCAAAAGAAATCAATGTTCCAGCATACATCGTTGATCCGGTT
GTTGTGGATGAGCTTGATGAAGTTAGCCGTATAAGCGGAATGGCTGACATTCCACGTAAAAGTAT
ATTCCATGCATTAAATCAAAAAGCAGTTGCTCGTCGCTATGCAAAAGAAGTTGGTAAAAAATACG
AAGATCTTAATTTAATCGTGGTCCACATGGGTGGCGGTACTTCAGTAGGTACTCATAAAGATGGT
CGCGTGATTGAAGTTAATAATACACTTGATGGCGAAGGTCCATTCTCACCAGAACGTAGTGGTGG
CGTTCCAATTGGCGATCTGGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACTTATGAAGAAGTGATGA
AAAAGATAAACGGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACTGAATACTATCGATTTTAAAGGCTGTAGTT
GATAAAGCGCTTGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTGATTTATGAAGCTTTCACCTTCCAGGTAGC
AAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTTTTAAAAGGAAATGTTGATGCCATTATCTTAACAGGCG
GCATTGCTTACAACGAGCATGTATGTAATGCCATTGAGGATCGCGTAAAATTTCATTGCACCTGTA
GTTTCGTTATGGTGGCGAAGATGAACTGCTGGCACTGGCAGAAGGTGGACTGCGCGTTTTACGCGG
CGAAGAAAAGCGAAGGAATACAAATAA

图 24

C.

ATGTATCGTCTGCTGATTATCAATCCTGGCTCGACCTCAACTAAAAATTGGTATTTATGACGATGA
AAAAGAGATATTTGAGAAAACGTTACGTATAGCGCTGAAGAGATTGAAAAATATAACACTATTT
TTGATCAATTTTCAGTTCCGCAAGAATGTGATTCTCGATGCGCTGAAAGAAGCAAACATTGAAGTC
AGTTTCGCTGAATGCGGTAGTTGGTCGCGGCGGTCTGCTGAAGCCAATTGTCAGCGGCACATTATGC
GGTAAATCAAAAAATGCTGGAAGACCTGAAAGTGGGCGTTCAGGGGCAGCATGCCAGCAATCTTG
GTGGCATTATTGCCAATGAAATCGCCAAAGAAATCAATGTTCCGGCATAACATCGTTGATCCGGTT
GTTGTGGATGAGCTGGATGAAGTTAGCCGTATCAGCGGAATGGCTGACATTCCACGTAAAAGTAT
TTTCCATGCACTGAATCAAAAAGCGGTTGCGCGTCGCTATGCAAAGAAGTTGGTAAAAAATACG
AAGATCTTAATCTGATCGTGGTGCATATGGGTGGCGGTACTAGCGTCGGTACTCATAAAGATGGT
CGCGTGATTGAAGTTAATAACACTTGATGGCGAAGGTCCATTCTCACCAGAACGTAGCGGTGG
CGTTCCAATTGGCGATCTGGTACGTTTGTGCTTCAGCAACAAATATACCTATGAAGAAGTGATGA
AAAAGATAAACGGCAAAGGCGGCGTTGTTAGTTACCTGAATACTATCGATTTTAAGGCGGTAGTT
GATAAAGCGCTGGAAGGCGATAAGAAATGTGCACTGATTTATGAAGCGTTACCTTCCAGGTGGC
AAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTTCTGAAAGGCAATGTTGATGCCATTATCTGACCGGCG
GCATTGCTTACAACGAGCATGTTTGTAAATGCCATTGAGGATCGCGTAAAATTCATTGCACCTGTG
GTTCGTTATGGTGGCGAAGATGAACTGCTGGCACTGGCAGAAGGTGGTCTGCGCGTTTTACGCGG
CGAAGAAAAAGCGAAAGAATACAAATAA

D.

ATGTATCGTCTGCTGATTATCAACCCGGGCAGCACCTCAACC AAAAATTGGTATTTACGACGATGA
AAAAGAGATTTTTGAAAAAACGCTGCGTCACAGCGCAGAAGAGATTGAAAAATACAACACCATTT
TCGATCAGTTCCAGTTCCGCAAAAACGTGATTCTCGATGCGCTGAAAGAAGCCAATATTGAAGTC
TCCTCGCTGAATGCGGTGGTCCGTCGCGGCGGTCTGCTGAAACCGATTGTCAGCGGCACATTATGC
GGTTAATCAGAAAATGCTGGAAGATCTGAAAGTGGGCGTGCAGGGGCAGCATGCCAGCAATCTCG
GCGGCATTATCGCCAATGAAATCGCCAAAGAGATCAACGTGCCGGCTTATATCGTCGATCCGGTG
GTGGTTGATGAACTGGATGAAGTCAGCCGTATCAGCGGCATGGCGGATATTCCGCGTAAAAGCAT
TTTCCATGCGCTGAATCAGAAAGCGGTTGCGCGTCGCTATGCCAAAGAAGTGGGTAAAAAATATG
AAGATCTCAATCTGATTGTGGTGCATATGGGCGGCGGCACCAGCGTCGGTACGCATAAAGATGGT
CGCGTGATTGAAGTGAATAACACGCTGGATGGCGAAGGGCCGTTCTCGCCGGAACGTAGCGGCGG
CGTGCCGATTGGCGATCTGGTGCCTCTGTGTTTCAGCAATAAATACACCTACGAAGAAGTGATGA
AAAAAATCAACGGCAAAGGCGGCGTGGTTAGCTATCTGAATACCATCGATTTTAAAGCGGTGGTT
GATAAAGCGCTGGAAGGCGATAAAAAATGCGCGCTGATTTATGAAGCGTTTACCTTCCAGGTGGC
GAAAGAGATTGGTAAATGTTCAACCGTGCTGAAAGGCAACGTTGATGCCATTATTCTGACCGGCG
GCATTGCTTATAACGAACATGTTTGTAAATGCCATTGAAGATCGCGTGAATTTATTGCGCCGGTG
GTGCGTTACGGCGGCGAAGATGAACTGCTGGCGCTGGCGGAAGGCGGTCTGCGCGTGCTGCGCGG
CGAAGAAAAAGCGAAAGAGTACAAATAA

图 24(续)

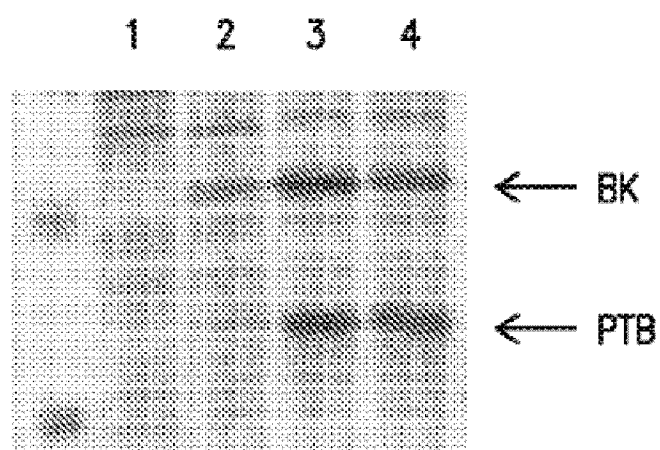


图 25A

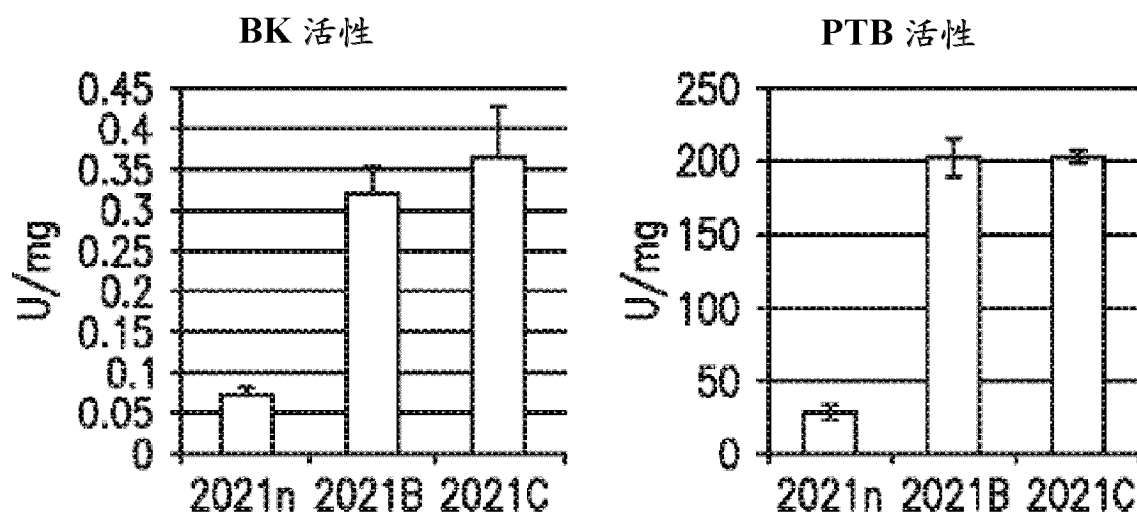


图 25B

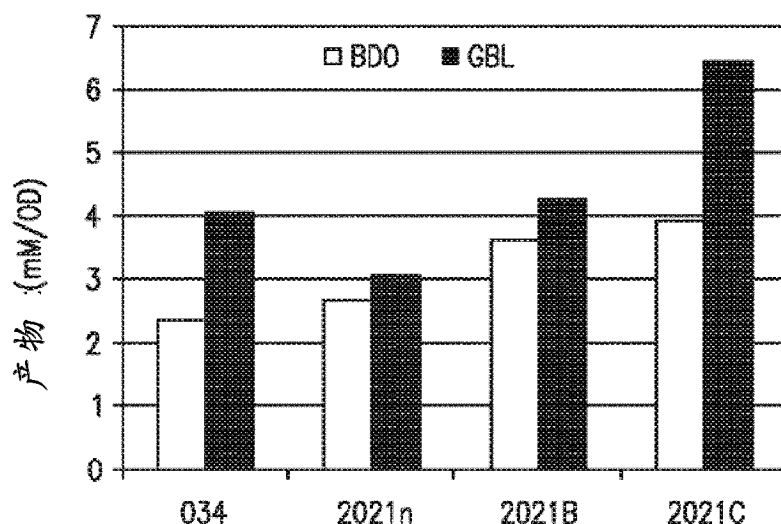


图 26

A.

ATGAATAAAGACACACTAATACCTACAACCTAAAGATTAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAACAT
 TAATTTAAAGAACTACAAGGATAATTCCTTCATGTTTCGGAGTATTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
 TAAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCCCTTCATTATACAAAAGAGCAAAGAGAAAA
 ATCATAACTGAGATAAGAAAGGCCGCAATACAAAATAAAGAGGTCTTGGCTACAATGATTCTAGA
 AGAAACACATATGGGAAGATATGAGGATAAAATATTAAACATGAATTGGTAGCTAAATATACTC
 CTGGTACAGAAGATTTAACTACTACTGCTTGGTCAGGTGATAATGGTCTTACAGTTGTAGAAATG
 TCTCCATATGGTGTATAGGTGCAATAACTCCTTCTACGAATCCAACCTGAAACTGTAATATGTAA
 TAGCATAGGCATGATAGCTGCTGGAAATGCTGTAGTATTTAACGGACACCCATGCGCTAAAAAAT
 GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATAAATAAGGCAATTATTTTCATGTGGCGGTCTGAAAATCTA
 GTAACAACATAAAAAATCCAACCTATGGAGTCTCTAGATGCAATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
 ACTTCTTTGCGGAACCTGGGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCTCTTAAATTTCTGGTAAGAAAGCTA
 TAGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTTGTAGATGATACTGCTGATATAGAAAAGGCTGGT
 AGGAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAGAAGTATT
 TGTTTTTGAGAAATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTAAAAAATAATGCTGTAATTATAA
 ATGAAGATCAAGTATCAAAATTAATAGATTTAGTATTACAAAAAATAATGAACTCAAGAATAC
 TTTATAACAAAAAATGGGTAGGAAAAGATGCAAAATTATTTCTTAGATGAAATAGATGTTGAGTC
 TCCTTCAAATGTAAATGCATAATCTGCGAAGTAAATGCAAATCATCCATTTGTTATGACAGAAC
 TCATGATGCCAATATTGCCAATTGTAAGAGTTAAAGATATAGATGAAGCTATTAAATATGCAAAG
 ATAGCAGAACAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATTCTAAAAATATAGACAACCTAAATAG
 ATTTGAAAGAGAAATAGATACTACTATTTTTGTAAAGAATGCTAAATCTTTTGCTGGTGTTGGTT
 ATGAAGCAGAAGGATTTACAACCTTTCACATATTGCTGGATCTACTGGTGAGGGAATAACCTCTGCA
 AGGAATTTTACAAGACAAAGAAGATGTGTACTTGCCGGCTAA

B.

MNKDTLIPTTKDLKVKTNNGENINLKNYKDNSSCFGVFENVENAISSAVHAQKILSLHYTKEQREK
 IITEIRKAALQNKEVLATMILEETHMGRYEDKILKHELVAKYTPGTEDLTTTAWSGDNGLTVVEM
 SPYGVIGAITPSTNPTETVICNSIGMIAAGNAVVFNGHPCAKKCVAFVAVEMINKAII SCGGPENL
 VTTIKNPTMESLDAAIKHPSIKLLCGTGPGMVKTLLNSGKKAI GAGAGNPPVIVDDTADIEKAG
 RSII EGCSFDNNLPCIAEKEVFVFENVADDLISNMLKNNAVI INEDQVSKLIDLVLQKNNETQEY
 FINKKWVGKDAKFLDEIDVESPSNVKCIICEVNANHPFVMTLMMPILPIVRVKDIDEAIKYAK
 IAEQNRKHSAYIYSKNIDNLNRFEREIDTTIFVKNAKSFAGVGVEAEGETTFTIAGSTGEGITSA
 RNFTRRQRCVLAG

图 27

A.

ATGAATAAAGACACACTAATACCTACAACCTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAACAT
TAATTTAAAGAACTACAAGGATAATTCTTCATGTTTCGGCGTATTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
TAAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCCCTTCATTATACAAAAGAGCAACGTGAAAAA
ATCATAACTGAGATAAGAAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTCTTGGCTACAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAAATATTAACCATGAATTGGTAGCTAAATATACTC
CTGGTACAGAAGATTTAACTACTACTGCCTGGTCAGGTGATAATGGTCTGACAGTTGTAGAAATG
TCTCCATATGGTGTTATTGGTGCAATAACTCCTTCTACGAATCCAACCTGAAACTGTAATATGTAA
TAGCATAGGCATGATTGCTGCTGGAAATGCTGTAGTATTTAACGGACACCCATGCGCTAAAAAAT
GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATAAATAAGGCAATTATTTTCATGTGGCGGTCTGAAAATCTG
GTAACAACTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCTCTGGATGCAATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
ACTTCTTTGCGGAACCTGGGGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCTGTTAAATTTCTGGTAAGAAAGCTA
TAGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTGCGATGATACTGCTGATATAGAAAAGGCTGGT
CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAGAAAGTATT
TGTTTTTGAGAAATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTAAAAAATAATGCTGTAATTATAA
ATGAAGATCAAGTATCAAAATTAATCGATTTAGTATTACAAAAAATAATGAACTCAAGAATAC
TTTATAAACAAAAATGGGTAGGAAAAGATGCAAAATTATTCCTCGATGAAATAGATGTTGAGTC
TCCTTCAAATGTTAAATGCATAATCTGCCAAGTAAATGCAATCATCCATTTGTTATGACAGAAC
TGATGATGCCAATATTGCCAATTGTACGCGTTAAAGATATCGATGAAGCTATTAAATATGCAAAG
ATAGCAGAACAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATTCTAAAAATATCGACAACCTGAATCG
CTTTGAACGTGAAAATAGATACTACTATTTTGTAAAGAAATGCTAAATCTTTTGCTGGTGTTGGTT
ATGAAGCAGAAGGATTTACAACTTTCACTATTGCTGGATCTACTGGTGAGGGAATAACCTCTGCA
CGTAATTTTACACGCCAACGTCGCTGTGTACTTGCCGGCTAA

B.

ATGAATAAAGACACACTGATCCCTACAACCTAAAGATTTAAAAGTAAAAACAAATGGTGAAAACAT
TAATTTAAAGAACTACAAAGATAATAGCAGTTGTTTCGGCGTATTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
TCAGCAGCGCTGTACACGCACAAAAGATATTATCGCTGCATTATACAAAAGAGCAACGTGAAAAA
ATCATCACTGAGATACGTAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTGCTGGCTACAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAAATATTAACCATGAACCTGGTAGCTAAATATACTC
CTGGTACAGAAGATTTAACTACTACTGCCTGGAGCGGTGATAATGGTCTGACAGTTGTAGAAATG
TCTCCATATGGTGTTATTGGTGCAATAACTCCTTCTACCAATCCAACCTGAAACTGTAATTTGTAA
TAGCATTTGGCATGATTGCTGCTGGAAATGCTGTAGTATTTAACGGACACCCATGCGCTAAAAAAT
GTGTTGCCTTTGCTGTTGAAATGATCAATAAGGCAATTATTAGCTGTGGCGGTCCGGAAAATCTG
GTAACAACTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCTCTGGATGCCATTATTAAGCATCCTTCAATAAA
ACTGCTTTGCGGAACCTGGCGGTCCAGGAATGGTAAAAACCCTGTTAAATTTCTGGTAAGAAAGCTA
TTGGTGCTGGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTGCGATGATACTGCTGATATTGAAAAGGCTGGT
CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAGAAAGTATT
TGTTTTTGAGAAATGTTGCAGATGATTTAATATCTAACATGCTGAAAAAATAATGCTGTAATTATCA
ATGAAGATCAGGTATCAAAATTAATCGATTTAGTATTACAAAAAATAATGAACTCAAGAATAC
TTTATCAACAAAAATGGGTAGGTAAAGATGCAAAATTATTCCTCGATGAAATCGATGTTGAGTC
TCCTTCAAATGTTAAATGCATTATCTGCCAAGTGAATGCCAATCATCC

图 28

ATTTGTTATGACAGAACTGATGATGCCAATATTGCCAATTGTGCGCGTTAAAGATATCGATGAAG
CTATTAAATATGCAAAGATTGCAGAACAAAATAGAAAACATAGTGCCTATATTTATAGCAAAAAT
ATCGACAACCTGAATCGCTTTGAACGTGAAATCGATACTACTATTTTGTAAAGAATGCTAAATC
TTTTGCTGGTGTGGTTATGAAGCAGAAGGATTACCACCTTCACTATTGCTGGATCTACTGGTG
AGGGCATAACCTCTGCACGTAATTTTACCCGCCAACGTGCTGTGTACTGGCCGGCTAA

C.

ATGAATAAAGACACGCTGATCCCGACAACCTAAAGATCTGAAAGTAAAAACCAATGGTGAAAAAT
TAATCTGAAGAACTACAAAGATAATAGCAGTTGTTTCGGCGTATTCGAAAATGTTGAAAATGCTA
TCAGCAGCGCGGTACACGCACAAAAGATACTCTCGCTGCATTATACCAAAGAGCAACGTGAAAAA
ATCATCACTGAGATCCGTAAGGCCGCATTACAAAATAAAGAGGTGCTGGCAACAATGATTCTGGA
AGAAACACATATGGGACGTTATGAGGATAAAAATACTGAAACATGAACTGGTGGCGAAATATACGC
CTGGTACTGAAGATTTAACCACCACTGCCTGGAGCGGTGATAATGGTCTGACCGTTGTGGAAATG
TCGCCTTATGGTGTATTGGTGCATTTACGCCTTCAACCAATCCAACCTGAAACGGTAATTTGTAA
TAGCATTGGCATGATTGCTGCTGGAAATGCGGTAGTATTTAACGGTCACCCCTGCGCTAAAAAAT
GTGTTGCCCTTTGCTGTTGAAATGATCAATAAAGCGATTATTAGCTGTGGCGGTCCGGAAAAATCTG
GTAACCACTATAAAAAATCCAACCATGGAGTCGCTGGATGCCATTATTAAGCATCCTTCAATCAA
ACTGCTGTGCGGCACCTGGCGGTCCAGGAATGGTGAAAACCCCTGCTGAATAGCGGTAAGAAAGCGA
TTGGTGTCTGGTGTGCTGGAAATCCACCAGTTATTGTGCTGATGATACTGCTGATATTGAAAAAGCGGT
CGTAGCATCATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAATAATTTACCTTGTATTGCAGAAAAAGAAGTATT
TGTTTTTGAGAATGTTGCCGATGATCTGATCTCTAACATGCTGAAAAATAATGCGGTGATTATCA
ATGAAGATCAGGTTAGCAAACTGATCGATCTGGTATTACAAAAAATAATGAACTCAAGAATAC
TTTATCAACAAAAAATGGGTAGGTAAAGATGCAAACTGTTCTCTGATGAAATCGATGTTGAGTC
GCCTTCAAATGTTAAATGCATTATCTGCGAAGTGAATGCCAATCATCCATTTGTGATGACCGAAC
TGATGATGCCAATTTTGCCGATTGTGCGCGTTAAAGATATCGATGAAGCGATTAAATATGCAAG
ATTGCAGAACAAAATCGTAAACATAGTGCCTATATTTATAGCAAAAATATCGACAACCTGAATCG
CTTTGAACGTGAAATCGATAACCACTATTTTGTGAAGAAATGCTAAATCTTTGCTGGTGTGGTT
ATGAAGCAGAAGGTTTACCACCTTCACTATTGCTGGAAGCACCGGTGAAGGCATTACCTCTGCA
CGTAATTTTACCCGCCAACGTGCTGTGTACTGGCCGGCTAA

D.

ATGAATAAAGATACGCTGATCCCGACCACCAAAGATCTGAAAGTAAAAACCAACGGCGAAAAATAT
CAACCTGAAAACTATAAAGATAACAGCAGTTGCTTTGGCGTGTTGAAAACGTTGAAAACGCCA
TCTCCAGCGCGGTGCATGCGCAAAAATCTCTCGCTGCATTACACCAAAGAGCAGCGTGAAAAA
ATTATCACCGAAATCCGTAAAGCGGCGCTGCAAAACAAAGAAGTGCTGGCAACCATGATCCTGGA
AGAAACGCATATGGGGCGTTATGAAGATAAAATCTGAAACATGAACTGGTGGCGAAATACACGC
CGGGCACTGAAGATCTGACCACCACCGCTGGAGCGGCGATAACGGCCTGACCGTGGTGGAGATG
TCGCCTTATGGCGTGATTGGCGCGGATTACGCCGTCAACCAACCCGACCGAAACGGTGATTTGTAA
CAGCATTGGCATGATTGCCGCGGGTAATGCGGTGGTGTTTAACGGTCATCCCTGCGCGAAAAAAT
GTGTGGCGTTTGCCGTTGAGATGATCAACAAAGCGATTATCAGCTGCGGCGGCCCGGAAAAATCTG
GTGACCACCATCAAAAATCCGACCATGGAATCGCTGGATGCCATTATCAACATCCTTCCATCAA
ACTGCTGTGCGGCACCGCGGCCCGGCGCATGGTGAAAACGCTGCTGAACAGCGGTAAAAAAGCGA
TTGGCGCGGGCGCGGGTAACCCGCGGTGATTGTGATGACACCGCCGATATT

图 28(续)

GAAAAAGCGGGGCGTAGCATTATTGAAGGCTGTTCTTTTGATAACAACCTGCCCTGCATTGCCGA
 AAAAGAAGTGTCTTTGCTTTTGAACCGTCGCCGATGATCTGATCAGCAATATGCTGAAAAACAACG
 CGGTGATTATCAATGAAGATCAGGTTAGCAAACCTGATCGATCTGGTGCTGCAAAAAACAACGAA
 ACGCAGGAATATTTTATCAACAAAAAATGGGTGTTAAAGATGCCAACTGTTTCTCGATGAAAT
 CGATGTTGAATCGCCGTCTAACGTGAAATGTATTATCTGCGAAGTGAACGCCAACCATCCGTTTG
 TGATGACCGAACTGATGATGCCGATTCTGCCGATTGTGCGCGTGAAAGATATCGATGAAGCGATT
 AAATATGCCAAAATTGCCGAACAAAACCGTAAACACAGCGCCTATATTTACAGCAAAAATATCGA
 TAACCTGAACCGCTTTGAACGTGAAATCGATACCACCATTTTGTGAAAAATGCCAAAAGTTTGTG
 CCGGCGTTGGTTATGAAGCGGAAGGTTTTACCACCTTACCATTGCCGGTAGCACCGCGGAAGGC
 ATTACCAGCGCCCGTAATTTTACCCGCCAGCGTCGCTGCGTGCTGGCGGGCTAA

图 28(续)

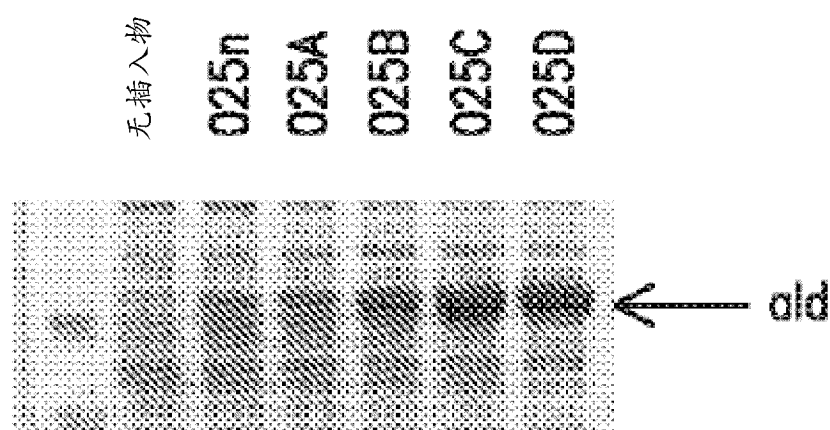


图 29

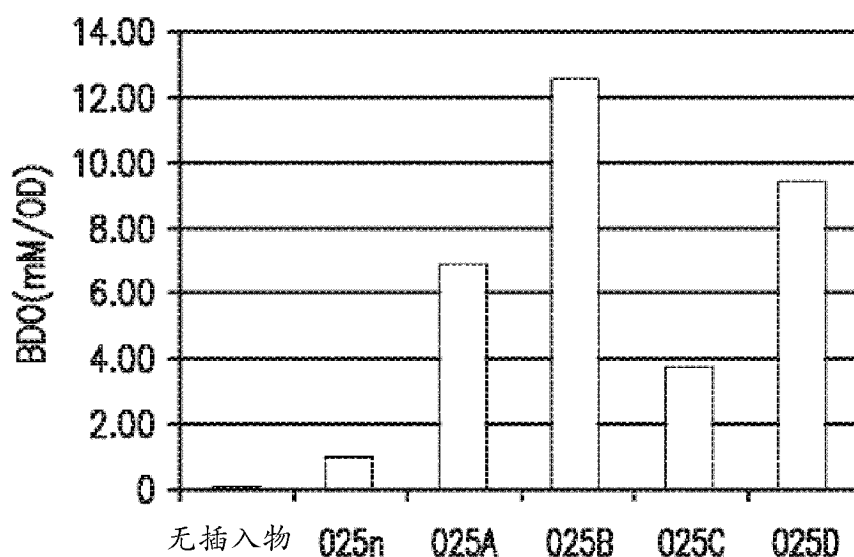


图 30A

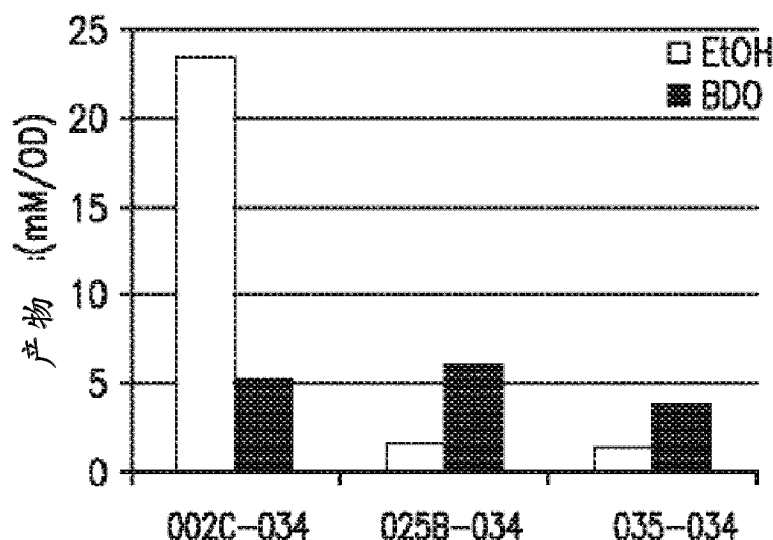


图 30B

A.

ATGAAAGCTGCAGTAGTAGAGCAATTAAAGGAACCATTAAAAATTAAAGAAGTGGAAGCCATC
TATTTTCATATGGCGAAGTATTAGTCCGCATTAAAGCATGCGGTGTATGCCATACGGACTTGCACG
CCGCTCATGGCGATTGGCCAGTAAACCAAACCTTCTTAATCCCTGGCCATGAAGGAGTCGGA
ATTGTTGAAGAAGTCGGTCCGGGGTAACCCATTAAAGTGGGAGACCGCGTTGGAATTCCTTG
GTTATATTCTGCGTGCGGCCATTGCGAATATTGTTAAAGCGGACAAGAAGCATTATGTGAACATC
AACAAAACGCCGGCTACTCAGTCGACGGGGTTATGCAGAATATTGCAGAGCTGCGCCAGATTAT
GTGGTGAAAATTCTGACAACTTATCGTTTGAAGAAGCTGCTCCTATTTTCTGCGCCGAGTTAC
TACTTATAAAGCGTTAAAGTCACAGGTACAAAACCGGGAGAATGGGTAGCGATCTATGGCATCG
GCGGCCTTGACATGTTGCCGTCCAGTATGCGAAAGCGATGGGGCTTCATGTTGTTGCAGTGGAT
ATCGGCGATGAGAACTGGAACCTGCAAAAGAGCTTGGCGCCGATCTTGTTGTAAATCCTGCAAA
AGAAAATGCGGCCCAATTTATGAAAGAGAAAGTCGGCGGAGTACACCGGCTGTTGTGACAGCTG
TATCTAAACCTGCTTTTCAATCTGCGTACAATCTATCCGCAGAGGCGGCACGTGCGTGCTTGTC
GGATTACCGCCGGAAGAAATGCCTATTCGAATCTTTGATACGGTATTAAACGGAATTAATAATTAT
CGGTTCCATTGTGCGGCACGCGGAAAGACTTGCAAGAAGCGCTTCAGTTCGCTGCAGAAGGTAAAG
TAAAAACCATTATTGAAGTGCAACCTCTTGAAAAAATTAACGAAGTATTTGACAGAATGCTAAAA
GGAGAAATTAACGACGGGTTGTTTAAACGTTAGAAAATAATAATTAA

B.

MKAAVVEQFKEPLKIKEVEKPSISYGEVLVRIKACGVCHTDLHAAHGDWPKPLPLIPGHEGVG
IVEEVGPGVTHLKVGDVRGIPWLYSACGHCEYCLSGQEALCEHQONAGYSVDGGYAEYCRAAPDY
VVKIPDNLSEEEAIPFCAGVTTYKALKVTGTPGEWVAIYGIGGLGHVAVQYAKAMGLHVAVD
IGDEKLELAKELGADLVVNPAKENAAQFMKEKVGGVHAHVAVTAVSKPAFQSAYNSIRGGTCVLV
GLPPEEMPIPIFDTVLNGIKIIGSIVGTRKDLQEQALQFAAEGKVKTIEVQPLEKINEVFDRMLK
GEINGRVVLTLENNN

图 31

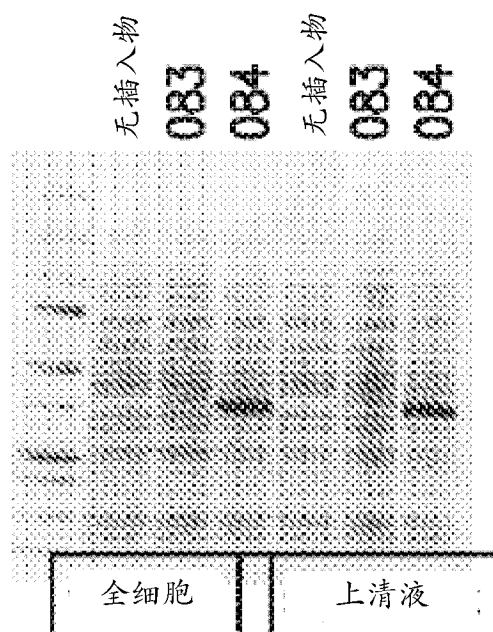


图 32A

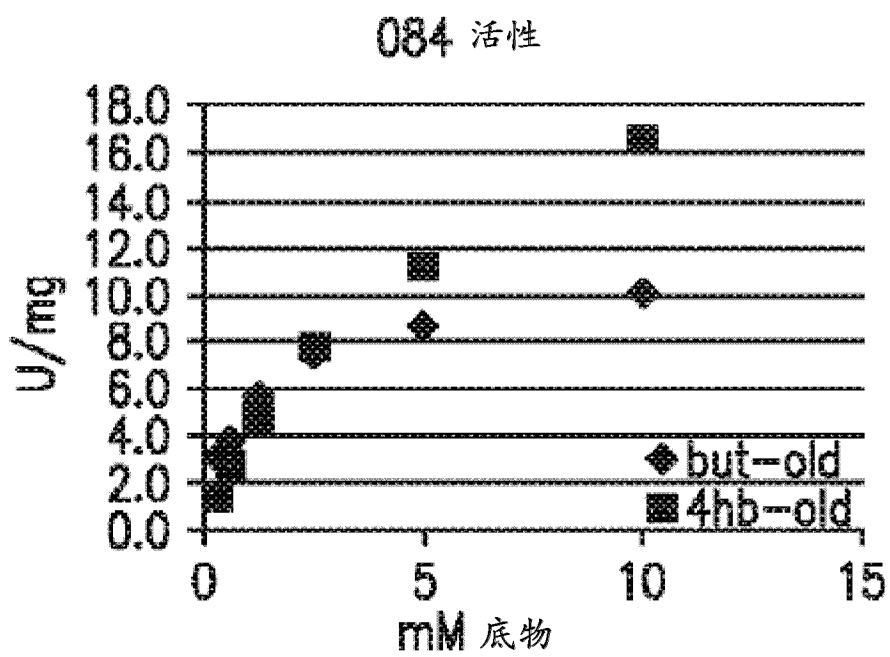


图 32B

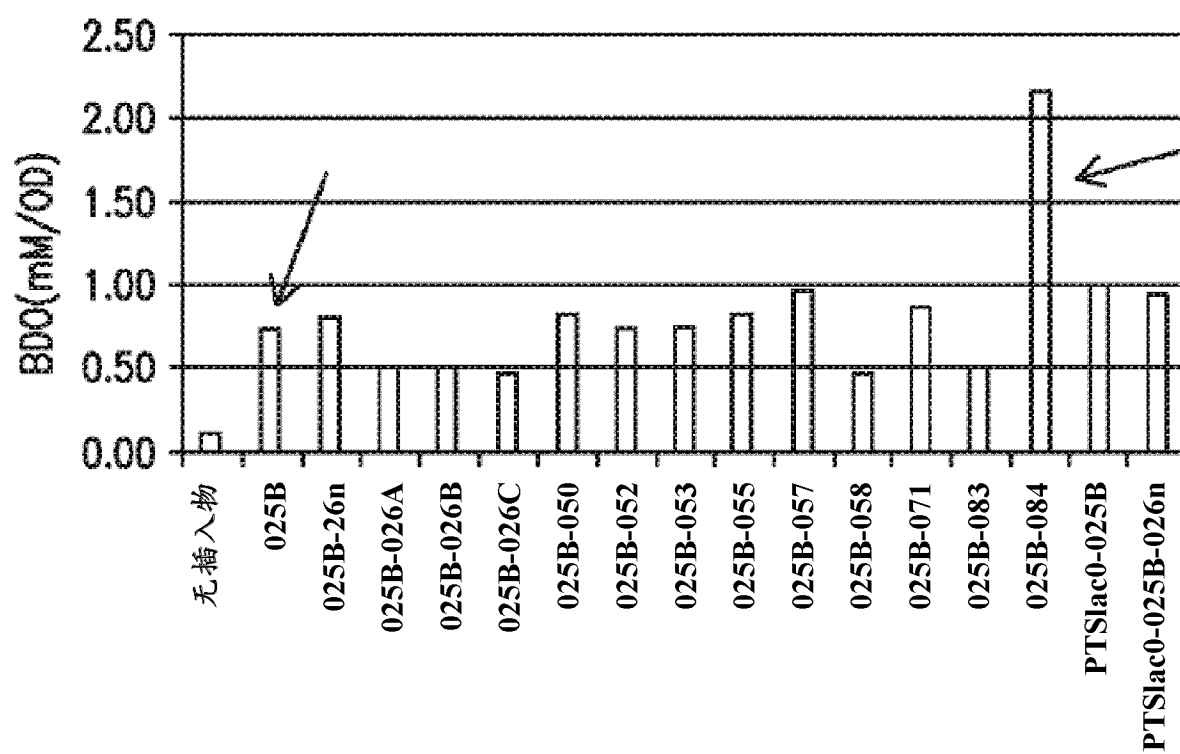


图 33

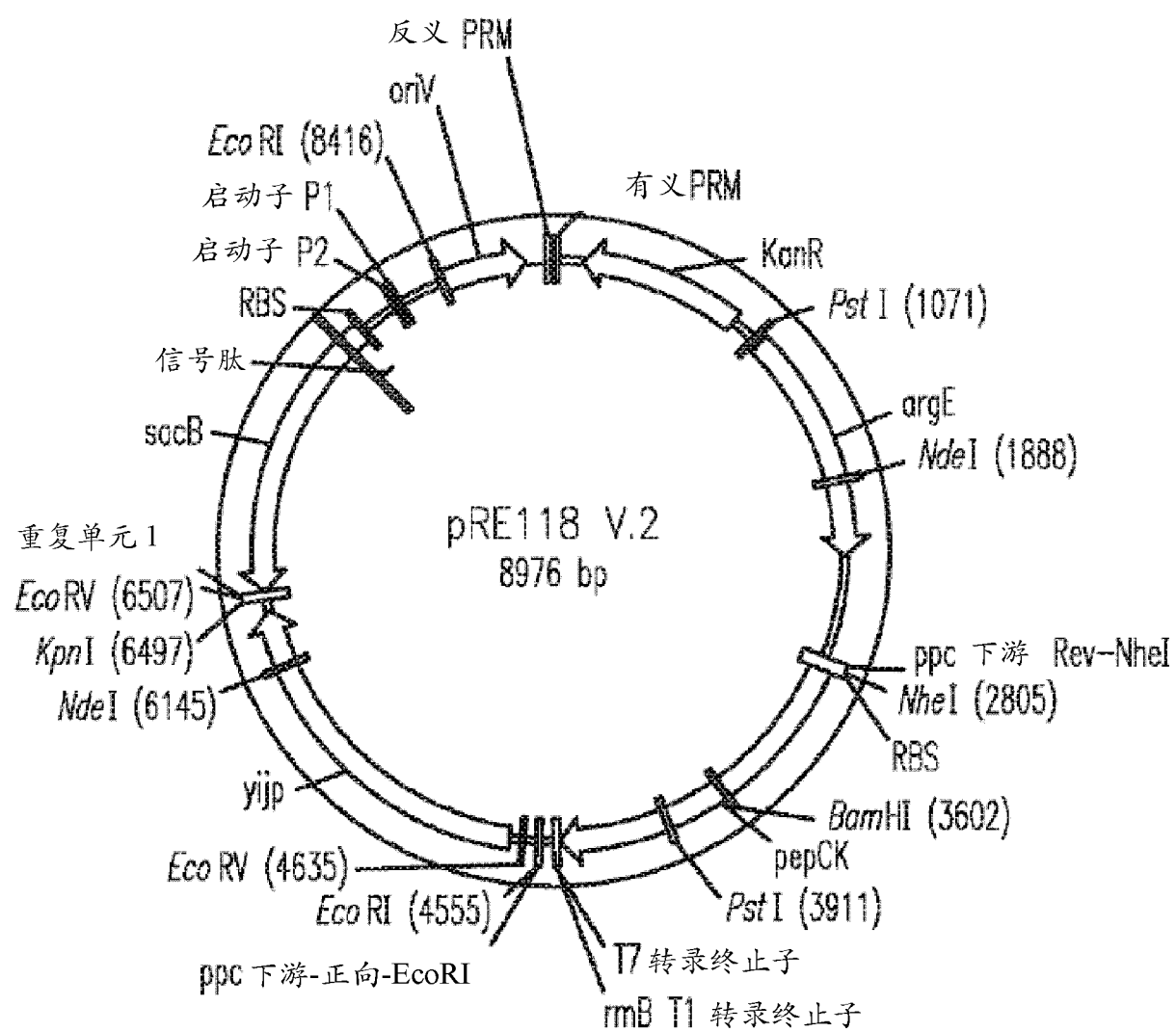


图 34

A.

aTGGCTATCGAAATCAAAGTACCGGACATCGGGGCTGATGAAGTTGAAATCACCGAGATCCTGGTC
AAAGTGGGCGACAAAGTTGAAGCCGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGGCGACAAAGCCTCTATG
GAAGTCCGCTCCCGCAGGCGGGTATCGTTAAAGAGATCAAAGTCTCTGTTGGCGATAAAACCCAG
ACCGGCGCACTGATTATGATTTTCGATTCCGCCGACGGTGCAGCAGACGCTGCACCTGCTCAGGCAG
AAGAGAAGAAAGAAGCAGCTCCGGCAGCAGCACCAGCGGCTGCGGCGGCAAAAGACGTTAACGTT
CCGGATATCGGCAGCGACGAAGTTGAAGTGACCGAAATCCTGGTGAAAGTTGGCGATAAAGTTGAA
GCTGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGGCGACAAGGCTTCTATGGAAGTTCCGGCTCCGTTTGCTG
GCACCGTGAAAGAGATCAAAGTGAACGTGGGTGACAAAGTGTCTACCGGCTCGCTGATTATGGTCT
TCGAAGTCGCGGTGAAGCAGGCGCGGCAGCTCCGGCCGCTAAACAGGAAGCAGCTCCGGCAGCG
GCCCCGCAACCAGCGGCTGGCGTGAAAGAAGTTAACGTTCCGGATATCGGCGGTGACGAAGTTGAA
GTGACTGAAGTGATGGTGAAAGTGGGCGACAAAGTTGCCGCTGAACAGTCACTGATCACCGTAGAA
GGCGACAAAGCTTCTATGGAAGTTCCGGCGCCGTTTGAGCGCTCGTGAAGGAACTGAAAGTCAAC
GTTGGCGATAAAGTGAAACTGGCTCGCTGATTATGATCTTCGAAGTTGAAGGCGCAGCGCCTGCG
GCAGCTCCTGCGAAACAGGAAGCGGCAGCGCCGGCACCGGCAGCAAAAGCTGAAGCCCCGGCAGC
AGCACCAGCTGCGAAAGCGGAAGGCAAATCTGAATTTGCTGAAAACGACGCTTATGTTACGCGAC
TCCGCTGATCCGCCGCTGCGCAGCGAGTTTGGTGTTAACCTTGCAGAAAGTGAAGGGCACTGGCCG
TAAAGTCTGATCCTGCGCGAAGACGTTCAAGCTTACGTGAAAGAAGCTATCAAACGTGCAGAAGC
AGCTCCGGCAGCGACTGGCGGTGGTATCCCTGGCATGCTGCCGTGGCGAAGGTGGACTTCAGCAA
GTTTGGTGAAATCGAAGAAGTGGAACTGGGCCGATCCAGAAAATCTCTGGTGCGAACCTGAGCCG
TAACTGGGTAAATGATCCCGCATGTTACTCACTTCGACAAAACCGATATCACCGAGTTGGAAGCGTTC
CGTAAACAGCAGAACGAAGAAGCGGCGAAACGTAAGCTGGATGTGAAGATACCCCCGTTGTCTTC
ATCATGAAAGCCGTTGCTGCAGCTCTTGAGCAGATGCCTCGCTTCAATAGTTGCTGTGCGAAGACG
GTCAGCGTCTGACCCTGAAGAAATACATCAACATCGGTGTGGCGGTGGATACCCGAACGGTCTGG
TTGTTCCGGTATTCAAAGACGTCAACAAGAAAGGCATCATCGAGCTGTCTCGCGAGCTGATGACTAT
TTCTAAGAAAGCGCGTGACGGTAAGCTGACTGCGGGCGAAATGCAGGGCGGTTGCTTCACCATCTC
CAGCATCGGCGGCCTGGGTACTACCCACTTCGCGCCGATTGTGAACCGCGCCGGAAGTGGCTATCCTC
GGCGTTTCCAAGTCCGCGATGGAGCCGGTGTGGAATGGTAAAGAGTTCTGTCCGCGCTGATGCTG
CCGATTTCTCTCTCTTCGACCACCGCGTGATCGACGGTGCTGATGGTGCCCGTTTCATTACCATCATT
AACAACACGCTGTCTGACATTGCGCGTCTGGTGATGTAAGTAAAGAGCCGGCCCAACGGCCGGCT
TTTTCTGGTAATCTCATGAATGTATTGAGGTTATTAGCGAATAGACAAATCGGTTGCCGTTTGTGT
TTAAAAATTGTTAACAATTTTGTAATAACCGACGGATAGAACGACCCGGTGGTGGTTAGGGTATTA
CTTCACATACCCTATGGATTCTGGGTGCAGCAAGGTAGCAAGCGCCAGAATCCCCAGGAGCTTACA
TAAGTAAGTGACTGGGGTGAGGGCGTGAAGCTAACGCCGCTGCGGCCTGAAAGACGACGGGTATG
ACCGCCGAGATAAATATATAGAGGTCATGATGAGTACTGAAATCAAACCTCAGGTCGTGGTACTT
GGGGCAGGCCCCGAGGTTACTCCGCTGCCCTCCGTTGCGCTGATTTAGGTCTGGAAACCGTAATCG
TAGAACGTTACAACACCCTTGGCGGTGTTTGTCTGAACGTGGGTTGTATCCCTTCTAAAGCGCTGCT
GCACGTGGCAAAAGTTATCGAAGAAGCGAAAGCGCTGGCCGAACACGGCATCGTTTTCGGCGAACC
GAAAACGACATTGACAAGATCCGCACCTGAAAAGAAAAAGTCATCACTCAGCTGACCGGTGGTCT
GGCTGGCATGGCCAAAGGTCGTAAAGTGAAGGTGGTTAACGGTCTGGGTAAATTTACCGGCGCTAA
CACCTGGAAGTGGAAGGCGAAAACGGCAAAACCGTGATCAACTTCGACAACGCCATCATCGCGGC
GGGTTCCCGTCCGATTGAGCTGCCGTTTATCCCGCATGAAGATCCGCGCGTATGGGACTCCACCGAC
GCGCTGGAACGAAATCTGTACCGAAACGCATGCTGGTGATGGGCGGCGGTATCATCGGTCTGGAA
ATGGGTACCGTATACCATGCGCTGGGTTAGAGATTGACGTGGTGGAATGTTGACACAGGTTATC
CCGGCTGCCGACAAAGACGTGGTGAAAGTCTTACCAAACGCATCAGCAAGAAATTTAACCTGATG
CTGGAAGCCAAAGTGAAGTCCGTTGAAGCGAAAGAAGACGGTATTTACGTTTCCATGGAAGGTAAA
AAAGCACCGGCGGAAGCGCAGCGTTACGACGCAAGTGTGGTGCCTATCGGCCGCTACCGAATGGT

图 35

AAAAACCTCGATGCAGGTAAAGCTGGCGTGGAAGTTGACGATCGCGGCTTCATCCGCGTTGACAAA
CAAATGCGCACCAACGTGCCGCACATCTTTGCTATCGGCGATATCGTCGGTCAGCCGATGCTGGCGC
ACAAAGGTGTCCATGAAGGCCACGTTGCCGCAGAAGTTATCTCCGGTCTGAAACACTACTTCGATCC
GAAAGTGATCCCATCCATCGCCTACACTAAACCAGAAAGTGGCATGGGTCTGACCGAGAAAGA
AGCGAAAGAGAAAGGCATCAGCTACGAAACCGCCACCTTCCCGTGGGCTGCTTCCGGCCGTGCTAT
CGCTTCTGACTGCGCAGATGGTATGACCAAACCTGATCTTCGACAAAGAGACCCACCGTGTTATCGGC
GGCGCGATTGTCGGCACCAACGGCGGCGAGCTGCTGGGTGAGATCGGCCTGGCTATCGAGATGGG
CTGTGACGCTGAAGACATCGCCCTGACCATCCACGCTCACCCGACTCTGCACGAGTCCGTTGGCCTG
GCGGCGGAAGTGTTCTGAAGGCAGCATCACCGACCTGCCAAACGCCAAAGCGAAGAAAAAGTAACT
TTTTCTTTCAGGAAAAAAGCATAAGCGGCTCCGGGAGCCGCTTTTTTTATGCCTGATGTTTAGAACTA
TGCTACTGTTTATAAACCCTACACCTCATACATACTTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCACA
CTGGCGGCCGCTCGAGCATGCATCTAGCACATCCGGCAATTAAAAAAGCGGCTAACCACGCCGCTTT
TTTACGTCTGCAATTTACCTTTCCAGTCTTCTTGCTCCACGTTTCTGAGAGACGTTTCGCTACTGCTGA
CCGTTGCTCGTTATTCAGCCTGACAGTATGGTTACTGTCGTTTAGACGTTGTGGGCGGCTCTCCTGAA
CTTTCTCCCGAAAAACCTGACGTTGTTGAGGTGATGCCGATTGAACACGCTGGCGGGCGTTATCACG
TTGCTGTTGATTGAGTGGGCGCTGCTGTACTTTTTCCTT

图 35(续)

		部分 1				
EC-IpdA	(1)	1	10	20	30	40
KP-IpdA 突变的	(1)	MMSTEIKTQVVVLGAGPAGYSAAFRCADLGLETVIVERYNTLGGVCLNVGCI				52
		部分 2				
EC-IpdA	(53)	53	60	70	80	90
KP-IpdA 突变的	(53)	PSKALLHVAKVIEEAKALAEHGIVFGEPKTDIDKIRTWKEKVINQLTGGLAG				104
		部分 3				
EC-IpdA	(105)	105	110	120	130	140
KP-IpdA 突变的	(105)	MAKGRKVKVVNGLGKFTGANTLEVEGENGKTVINFDAIIAAGSRPIQLPFI				156
		部分 4				
EC-IpdA	(157)	157	170	180	190	208
KP-IpdA 突变的	(157)	PHEDPRIWDSTDALELKEVPERLLVMGGGIIGLEMGTVYHALGSQIDVVEMF				
		部分 5				
EC-IpdA	(209)	209	220	230	240	250
KP-IpdA 突变的	(209)	DQVIPAADKDIKVKVFTKRISKKFNLMLETKVTAVEAKEDGIYVIMEGKKAPA				260
		部分 6				
EC-IpdA	(261)	261	270	280	290	300
KP-IpdA 突变的	(261)	EPQRYDAVLVAIGRPNGKNLDAGKAGVEVDDRGRFIRVDKQLRTNVPHFIFAI				312
		部分 7				
EC-IpdA	(313)	313	320	330	340	350
KP-IpdA 突变的	(313)	GDIVQPMLAHKGVHEGHVAAEVIAGKKHYFDPKVIPSIAYTEPEVAWVGLT				364
		部分 8				
EC-IpdA	(365)	365	370	380	390	400
KP-IpdA 突变的	(365)	EKEAKEKGISYETATFPWAASGRAIASDCADGMTKLIFDKESHVRVIGGAIVG				416
		部分 9				
EC-IpdA	(417)	417	430	440	450	468
KP-IpdA 突变的	(417)	TNGGELLGEIGLAIEMGCDAEDIALTIHAHPTLHESVGLAAEVFEGSITDLP				
		部分 10				
EC-IpdA	(469)	469	476			
KP-IpdA 突变的	(469)	NPKAKKK-				
		部分 11				
EC-IpdA	(469)	NAKAKKK-				

图 36

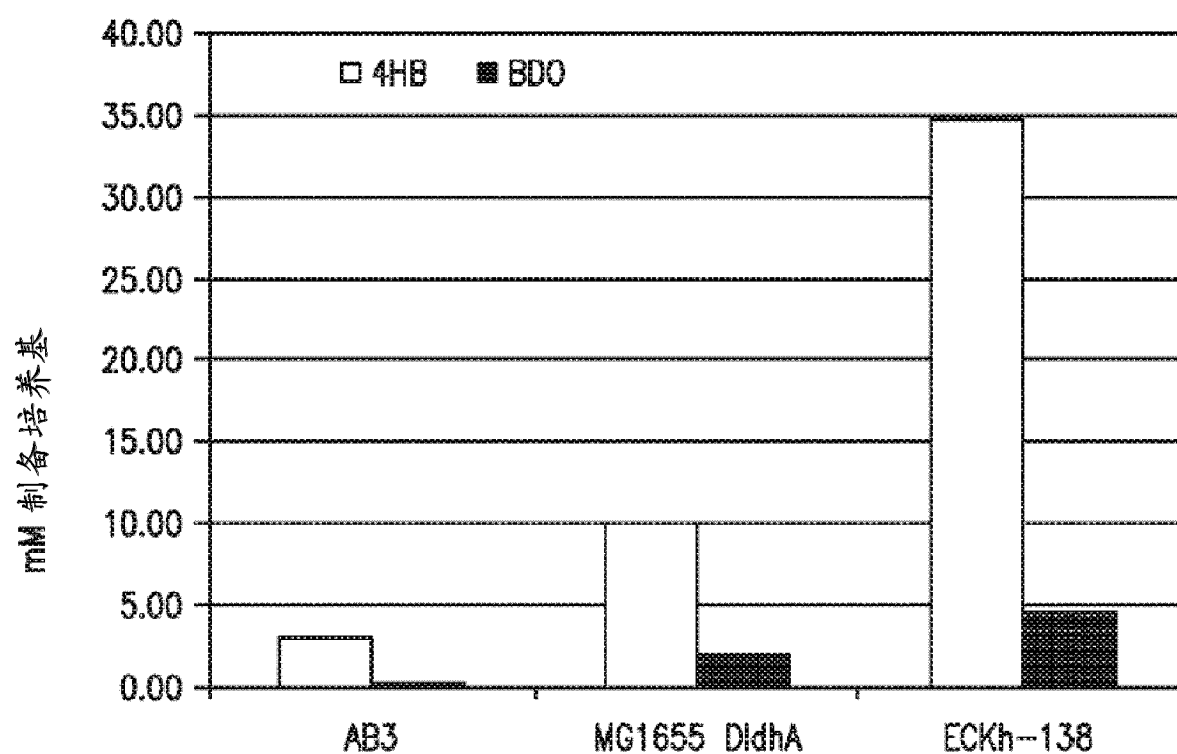


图 37

ataataatacatatgaaccatgcgagttacgggcctataagccaggcgagatatgatctatatcaatttctcatctataatgctttgta
gtatctcgtcgccgacttaataaagagagagtagtgtgaaagctgacaaccctttgatcttttacttctgctgcaatggccaaagtgg
 ccgaagaggcggtgtctataaagcaacgaaacatccgcttaagactttctatctggcgattaccgccggtgtttcatctcaatcgcattc
 accactggcacaggcacaGAAGGTAGGTGTTACatgtcagaacgtttacacaatgacgtggatcctattattat

图 38

AAGAGGTA AAAAGAATAATGGCTATCGAAATCAAAGTACCGGACATCGGGGCTGATGAAGTTGAAAT
CACCGAGATCCTGGTCAAAGTGGGCGACAAAGTTGAAGCCGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGG
CGACAAAGCCTCTATGGAAGTTCCGTCTCCGCAGGCGGGTATCGTTAAAGAGATCAAAGTCTCTGTT
GGCGATAAAACCCAGACCGGCGCACTGATTATGATTTTCGATTCCGCCGACGGTGCAGCAGACGCT
GCACCTGCTCAGGCAGAAGAGAAGAAAGAAGCAGCTCGGCAGCAGCACCAGCGGCTGCGGCGGG
AAAAGACGTTAACGTTCCGGATATCGGCAGCGACGAAGTTGAAGTGACCGAAATCCTGGTGAAAGT
TGGCGATAAAGTTGAAGCTGAACAGTCGCTGATCACCGTAGAAGGCGACAAGGCTTCTATGGAAGT
TCCGGCTCCGTTTGCTGGCACCGTGAAAGAGATCAAAGTGAACGTGGGTGACAAAGTGTCTACCGG
CTCGCTGATTATGGTCTTCGAAGTCGCGGGTGAAGCAGGCGCGGCAGCTCCGGCCGCTAAACAGGA
AGCAGCTCCGGCAGCGGCCCCTGCACCAGCGGCTGGCGTGAAAGAAGTTAACGTTCCGGATATCGG
CGGTGACGAAGTTGAAGTGACTGAAGTGATGGTGAAAGTGGGCGACAAAGTTGCCGCTGAACAGT
CACTGATCACCGTAGAAGGCGACAAAGCTTCTATGGAAGTTCCGGCGCCGTTTGACAGGCGTCTGTA
AGGAACTGAAAGTCAACGTTGGCGATAAAGTGAAACTGGCTCGCTGATTATGATCTTCGAAGTTG
AAGGCGCAGCGCCTGCGGCAGCTCCTGCGAAACAGGAAGCGGCAGCGCCGGCACCGGCAGCAAAA
GCTGAAGCCCCGGCAGCAGCACCAGCTGCGAAAGCGGAAGGCAAATCTGAATTTGCTGAAAACGA
CGCTTATGTTACGCGACTCCGCTGATCCGCCGTCTGGCACGCGAGTTTGGTGTTAACCTTGCGAAA
GTGAAGGGCACTGGCCGTAAAGGTCGTATCCTGCGCGAAGACGTTACAGGCTTACGTGAAAGAAGCT
ATCAAACGTGCAGAAGCAGCTCCGGCAGCGACTGGCGGTGGTATCCCTGGCATGCTGCCGTGGCCG
AAGGTGGACTTCAGCAAGTTTGGTGAAATCGAAGAAGTGGAAGTGGGCCGCATCCAGAAAATCTCT
GGTGCGAACCTGAGCCGTAAGTGGGTAATGATCCCGCATGTTACTCACTTCGACAAAACCGATATCA
CCGAGTTGGAAGCGTTCCGTAAACAGCAGAACGAAGAAGCGGCGAAACGTAAGCTGGATGTGAAG
ATCACCCCGGTTGTCTTCATCATGAAAGCCGTTGCTGCAGCTCTTGAGCAGATGCTCGCTTCAATAG
TTCGCTGTCGGAAGACGGTCAGCGTCTGACCCTGAAGAAATACATCAACATCGGTGTGGCGGTGGA
TACCCCGAACGGTCTGGTTGTTCCGGTATTCAAAGACGTCAACAAGAAAGGCATCATCGAGCTGTCT
CGCGAGCTGATGACTATTTCTAAGAAAGCGCGTGACGCTAAGCTGACTGCGGGCGAAATGCAGGG
CGGTTGCTTCACCATCTCCAGCATCGGCGGCCTGGGTACTACCCACTTCGCGCCGATTGTGAACGCG
CCGGAAGTGGCTATCCTCGGCGTTTCCAAGTCCGCGATGGAGCCGGTGTGGAATGGTAAAGAGTTC
GTGCCGCGTCTGATGCTGCCGATTTCTCTCTCTTCGACCACCGCGTGATCGACGGTGCTGATGGTG
CCGTTTTATTACCATCATTAAACAACACGCTGTCTGACATTCCCGCTCTGGTGATGTAAGTAAAAGAG
CCGGCCCCAACGGCCGGCTTTTTTCTGGTAATCTCATGAATGTATTGAGGTTATTAGCGAATAGACAA
ATCGGTTGCCGTTTGTTAAGCCAGGCGAGATATGATCTATATCAATTTCTCATCTATAATGCTTTGTTA
GTATCTCGTCGCCGACTTAATAAAGAGAGAGTTAGTCTTCTATATCACAGCAAGAAGGTAGGTGTTA
CATGATGAGTACTGAAATCAAACACTCAGGTCGTGGTACTTGGGGCAGGCCCCGCAGGTTACTCTGC
AGCCTTCCGTTGCGCTGATTTAGGTCTGGAAACCGTCATCGTAGAACGTTACAGCACCTCGGTGGT
GTTTGTCTGAACGTGGGTTGTATCCCTTCAAAGCGCTGCTGCACGTGGCAAAAGTTATCGAAGAAG
CGAAAGCGCTGGCCGAACACGGCATCGTTTTCGGCGAACCAGAAACTGACATTGACAAGATCCGCA
CCTGGAAAGAAAAAGTCATCACTCAGCTGACCGGTGGTCTGGCTGGCATGGCCAAAGGTCTGTAAG
TGAAGGTGGTTAACGGTCTGGGTAAATTTACCGGCGCTAACACCCTGGAAGTGGAAGGCGAAAACG
GCAAAACCGTGATCAACTTCGACAACGCCATCATCGCGGCGGGTCCCGTCCGATTACAGTGCCGTT
TATCCCGCATGAAGATCCGCGCGTATGGGACTCCACCGACGCGCTGGAAGTCAAATCTGTACCGAA
ACGCATGCTGGTGATGGGCGGCGGTATCATCGGTCTGGAATGGGTACCGTATACCATGCGCTGGG
TTCAGAGATTGACGTGGTGGAATGTTGACACAGGTTATCCCGGCTGCCGACAAAGACGTGGTGAA
AGTCTTCACCAAACGCATCAGCAAGAAATTTAACCTGATGCTGGAAGCCAAAGTGACTGCCGTTGAA
GCGAAAGAAGACGGTATTTACGTTTCCATGGAAGGTAAAAAAGCACCGGCGGAAGCGCAGCGTTA
CGACGCAGTGCTGGTCGCTATCGGCCGCGTACCGAATGGTAAAAACCTCGATGCAGGTAAGCTGG
CGTGGAAGTTGACGATCGCGGCTTCATCCGCGTTGACAA

图 39

ACAAATGCGCACCAACGTGCCGCACATCTTTGCTATCGGCGATATCGTCGGTCAGCCGATGCTGGCG
CACAAAGGTGTCCATGAAGGCCACGTTGCCGCAGAAGTTATCTCCGGTCTGAAACACTACTTCGATC
CGAAAGTGATCCCATCCATCGCCTACACTAAACCAGAAAGTGGCATGGGTCTGACCGAGAAAG
AAGCGAAAGAGAAAGGCATCAGCTACGAAACGCCACCTTCCCGTGGGCTGCTTCCGGCCGTGCTA
TCGCTTCTGACTGCGCAGATGGTATGACCAAACCTGATCTTCGACAAAGAGACCCACCGTGTTATCGG
CGGCGCGATTGTGCGGCACCAACGGCGGGCGAGCTGCTGGGTGAGATCGGCCTGGCTATCGAGATGG
GCTGTGACGCTGAAGACATCGCCCTGACCATCCACGCTCACCCGACTCTGCACGAGTCCGTTGGCCT
GGCGGGCGGAAGTGTTCTGAAGGCAGCATCACCGACCTGCCAAACGCCAAAGCGAAGAAAAAGTAAC
TTTTCTTTTACAGGAAAAAGCATAAGCGGCTCCGGGAGCCGCTTTTTTTATGCCTGATGTTAGAACT
ATGTCAGTGTTATAAACCGCTACACCTCATACATACTTTAAGGGCGAATTCTGCAGATATCCATCAC
ACTGGCGGGCGCTCGAGCATGCATCTAGCACATCCGGCAATTAAGGCGGCTAACCACGCCGCTT
TTTTACGTCTGCAATTTACCTTTCCAGTCTTCTTGCTCCACGTTAGAGAGACGTTCCGATACTGCTG
ACCGTTGCTCGTTATTAGCCTGACAGTATGGTTACTGTCGTTTAGACGTTGTGGGCGGCTCTCCTGA
ACTTTCTCCCGAAAAACCTGACGTTGTTGAGGTGATGCCGATTGAACACGCTGGCGGGCGTTATCAC
GTTGCTGTTGATTAGTGGGCGCTGCTGTACTTTTCCCTTAACACCTGGCGCTGCTCTGGTGATGCG
GACTGAATACGCTCACGCGCTGCGTCTCTTCGCTGCTGGTTCTGCGGGTTAGTCTGCATTTTCTCGCG
AACC GCCTGGCGCTGCTCAGGCGAGGCGGACTGAATGCGCTCACGCGCTGCCTCTCTTCGCTGCTG
GATCTTCGGGTTAGTCTGCATTCTCTCGCGAACTGCCTGGCGCTGCTCAGGCGAGGCGGACTGATAA
CGCTGACGAGCGGCGTCTTTTGTGCTGGGTGAGTGGTTGGCGACGGCTGAAGTCGTGGAAGTCG
TCATAGCTCCCATAGTGTTCAGCTTCATTAACCGCTGTGCCGCTGCCTGACGTTGGGTACCTCGTGT
AATGACTGGTGCGGCGTGTGTTGCTGCTGAACTGATTTGCTGCCGCTGACGCTGGCTGTCGCGC
GTTGGGGCAGGTAATTGCGTGCGCTCATTCCGCCGTTGACATCGGTTTGATGAAACCGCTTTGCCA
TATCCTGATCATGATAGGGCACACCATTACGGTAGTTTGGATTGTGCCGCCATGCCATATTCTTATCA
GTAAGATGCTCACCGGTGATACGGTTGAAATTGTTGACGTCGATATTGATGTTGTCGCCGTTGTGTT
GCCAGCCATTACCGTCACGATGACCGCCATCGTGGTGATGATAATCAT

图 39(续)

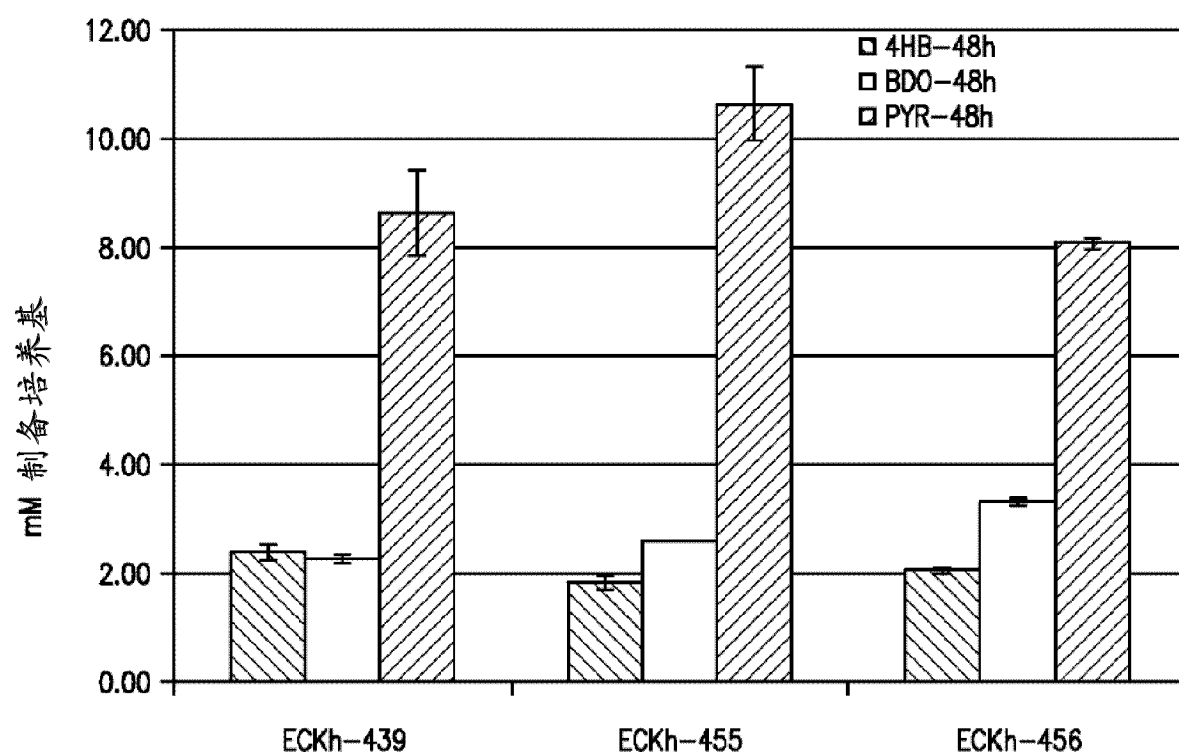


图 40

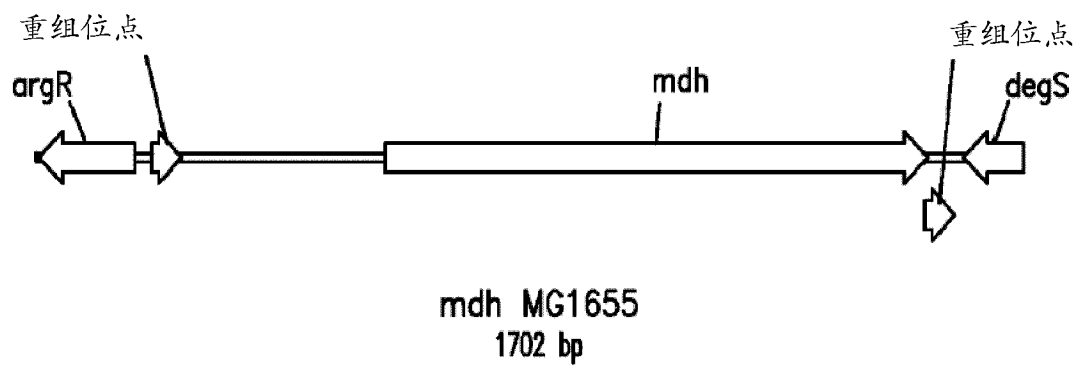


图 41A

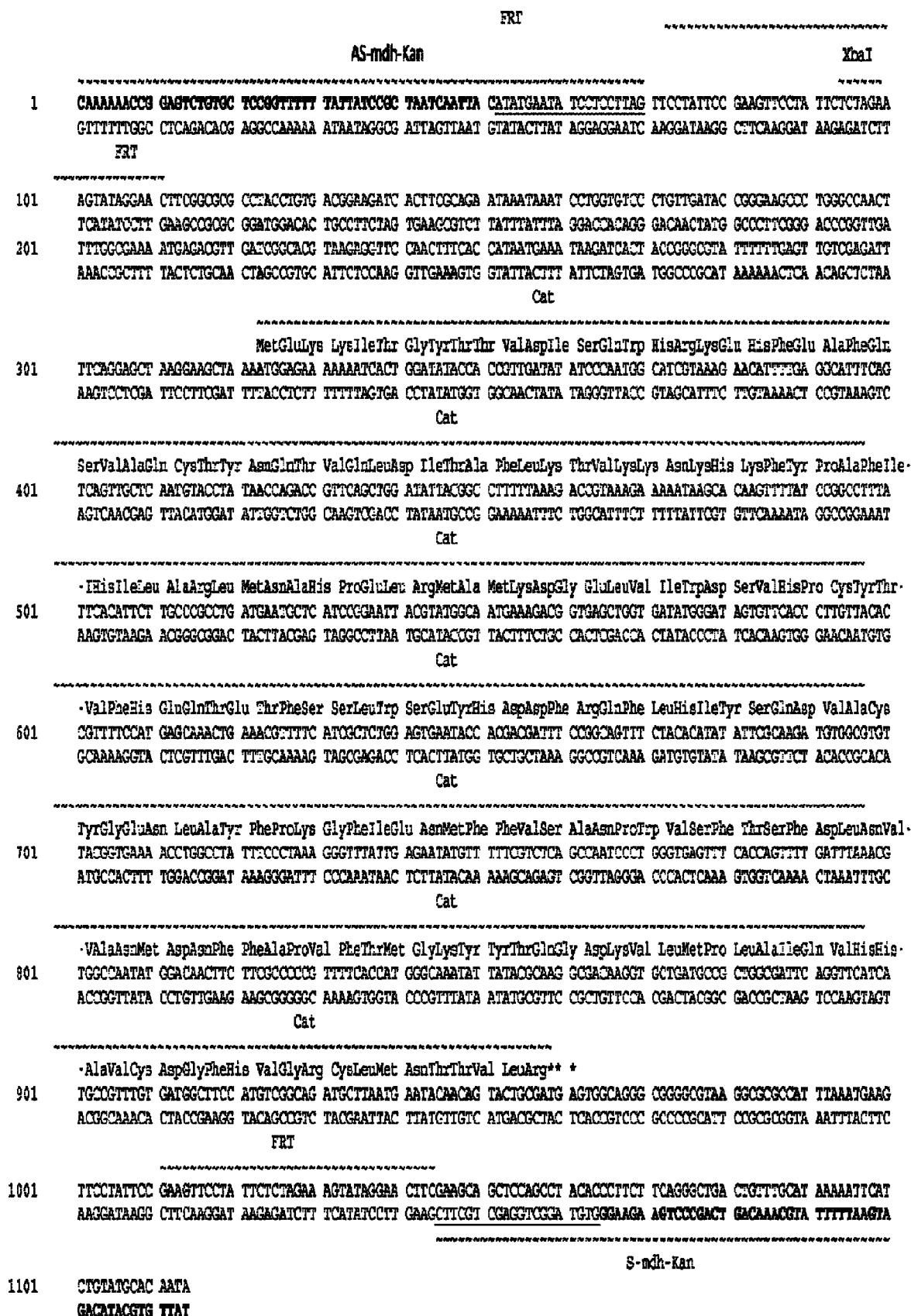


图 41B

TTATTTGGTGATATTGGTACCAATATCATGCAGCAAACGGTGCAACATTGCCGTGTCTCGTTGCTCTA
AAAGCCCCAGGCGTTGTTGTAACCAAGTCGACCAAGTTTTATGTCATCTGCCACTGCCAGAGTCGTCAG
CAATGTCATGGCTCGTTCGCGTAAAGCTTGCAAGTTGATGTTGGTCTGCCGTTGCATCACTTTTCGCCG
GTTGTTGTATTAATGTTGCTAATTGATAGCAATAGACCATCACCGCCTGCCCCAGATTGAGCGAAGG
ATAATCCGCCACCATCGGCACACCAGTAAGAACGTCAGCCAACGCTAACTCTTCGTTAGTCAACCCG
GAATCTTCGCGACCAAACACCAGCGCGGCATGGCTCATCCATGAAGATTTTCCCTCTAACAGCGGCA
CCAGTTCAACTGGCGTGGCGTAGTAATGATATTCGCCCGACTGCGCGCAGTGGTGGCGACAGTGA
AATCGACATCGTGTAACGATTAGCCAATGTGCGGAAAACCTTTAATATTATCAATAATATCACCAGAT
CCATGTGCGACCCAGCGGGTGGCTGGCTCCAGGTGTGCCTGACTATCGACAATCCGCAGATCGCTA
AACCCCATCGTTTTATTGCCCGCGCGCTGCCCAATATTTCTGCTCTGGCGGGTGCAGCCAGAAT
AATCGTTATACGCATATTGCCACTCTTCTTGATCAAATAACCGCGAACCAGGGTGATCACTGTCAACTT
ATTACGCGGTGCGAATTTACAAATCTAACGTAAGTCGCAGAAAAAGCCCTTACTTAGCTTAAAAA
AGGCTAACTATTTCTGACTGTACTAACGGTTGAGTTGTTAAAAAATGCTACATATCCTTCTGTTTA
CTTAGGATAATTTTATAAAAAATAAATCTCGACAATTGGATTACCACGTTTATTAGTTGTATGATGC
AACTAGTTGGATTATTAATAAATGTGACGAAAGCTAGCATTTAGATACGATGATTTTATCAAACTGT
TAACGTGCTACAATTGAACTTGATATATGTCAACGAAGCGTAGTTTTATTGGGTGTCCGGCCCTCTT
AGCCTGTTATGTTGCTGTTAAAATGGTTAGGATGACAGCCGTTTTTGACACTGTCGGGTCTGAGGG
AAAGTACCCACGACCAAGCTAATGATGTTGTTGACGTTGATGGAAAGTGCATCAAGAACGCAATTAC
GTACTTTAGTCATGTTACGCCGATCATGTTAATTTGCAGCATGCATCAGGCAGGTCAGGGACTTTTGT
ACTTCTGTTTCGATTTAGTTGGCAATTTAGGTAGCAAACGAATTCATCGGCTTTACCACCGTCAAAA
AAAACGGCGCTTTTTAGCGCCGTTTTATTTTTCAACCTTATTTCCAGATACGTAACCTCATCGTCCGTT
GTAACCTCTTTACTGGCTTTTATTTTCGGCAGTGAAAACGCATACCAGTCGATATTACGGGTCACAAA
CATCATGCCGGCCAGCGCCACCACAGCACACTGGTTCCCAACAACAGCGCGCTATCGGCAGAGTTG
AGCAGTCCCACATCACACCATCCAGCAACAACAGCGCGAGGGTAAACAACATGCTGTTGCACCAAC
CTTTCAATACCGCTTGCAAATAAATACCGTTCATTATCGCCCCAATCAGACTGGCGATTATCCATGCC
ACGGTAAAACCGGTATGTTGAGAAAGCGCCAGCAAGAGCAAATAAAACATCACCAATGAAAGCCCC
ACCAGCAAATATTGCATTGGGTGTAAACGTTGCGCGGTGAGCGTTTCAAAAACAAAGAACGCCATA
AAAGTCAGTGCAATCAGCAGAATGGCGTACTTAGTCGCCCCGTCAGTTAATTGGTATTGATCGGCTG
GCGTCGTTACTGCGACGCTAAACGCCGGGAAGTTTTCCAGCCGGTATCATTGCCTGAAGCAAAACG
CTCACCGAGATTATTAGCAAACCAGCTGCTTGGCAGTGCGCCTGAAAACCTGACTCGCTAACTCCC
GTTTGGCTGGTAGAAAATCACCTAAAAAACTGGGATGCGGCCAGTTGCTGGTTAAGGTCAATTCGCT
ATTACGCCCCGCCAGGCACACAGAAAGATCGCCGGTACCGCTTAAATTCAGGGCCATATTCAGCTTC
AGGTTCTGCTTCCGCCAGTCCCCTTCAGGTAAAGGGATATGCACGCCCTGCCCGCTTGCTCTAACCC
GGTGCCGGGTTCAATGGTCAGCGCCGTTCCGTTAACTTCAGGCGCTTTCACCACACCAATACCACGC
GCATCCCCGACGCTAATCACAATAAATGGCTTGCCTAAGGTGATATTTGGCGCGTTGAGTTGCTAA
GACGCGAAACATCGAAATCGGCTTTTAACGTTAAATCACTGTGCCAGACCTGACCGGTATAAATCCC
TATCTTGCGTTCTTCCACGTTCTGATTGCCATCAACCATCAATGACTCAGGTAACCAAAAATGGATAA
AACTTCGTTTCCGCTGCAGGGTTTTAT

图 42

AAGCCACAGCAGGATGCCACTGCAACAAAGGTGATCACACCGGAAACGCGATGGAGAATGGACG
CTATCGCCGTGATGGGGAACCGGATGGTCTGTAGGTCCAGATTAAACAGGTCTTTGTTTTTACATTT
CTTATCATGAATAACGCCACATGCTGTTCTTATTATCCCTGGGGACTACGGGCACAGAGGTTAACT
TTCTGTTACCTGGAGACGTCGGGATTTCTTCCTCCGGTCTGCTTGCGGGTGAGACAGCGTCCTTTCT
ATAACTGCGCGTCATGCAAAACACTGCTTCCAGATGCGAAAACGACACGTTACAACGCTGGGTGGCT
CGGGATTGCAGGGTGTTCGGGAGACCTGGCGGCAGTATAGGCTGTTACAAAATCATTACAATTAA
CCTACATATAGTTTGTGCGGTTTTATCCTGAACAGTGATCCAGGTCACGATAACAACATTTATTTAAT
TTTTAATCATCTAATTTGACAATCATTCAACAAAGTTGTTACAAACATTACCAGGAAAAGCATATAAT
GCGTAAAAGTTATGAAGTCGGTATTTACCTAAGATTAACCTATGTAACAGTGTGGAAGTATTGACC
AATTCATTGCGGACAGTTATTAGTGGTAGACAAGTTTAATAATTGCGATTGCTAAGTACTTGATTGCG
CATTTATTGTCATCAATGGATCCTTTACCTGCAAGCGCCAGAGCTCTGTACCCAGGTTTTCCCTCT
TTCACAGAGCGGCGAGCCAAATAAAAAACGGGTAAAGCCAGGTTGATGTGCGAAGGCAAATTTAA
GTTCCGGCAGTCTTACGCAATAAGGCGCTAAGGAGACCTTAAATGGCTGATACAAAAGCAAACCTC
ACCCTCAACGGGGATACAGCTGTTGAACTGGATGTGCTGAAAGGCACGCTGGGTCAAGATGTTATT
GATATCCGTACTCTCGGTTCAAAGGTGTGTTACCTTTGACCCAGGCTTCACTTCAACCGCATCCTG
CGAATCTAAAATTACTTTTATTGATGGTGTGAAGGTATTTTGTGTCACCGCGGTTTTCCCGATCGATC
AGCTGGCGACCGATTCTAACTACCTGGAAGTTTGTTACATCCTGCTGAATGGTGAAAAACCGACTCA
GGAACAGTATGACGAATTTAAACTACGGTGACCCGTATACCATGATCCACGAGCAGATTACCCGT
CTGTTCCATGCTTTCCGTGCGGACTCGCATCCAATGGCAGTCATGTGTGGTATTACCGGCGCGCTGG
CGGCGTTCTATCAGGACTCGCTGGATGTTAACAATCCTCGTCACCGTGAAATTGCCGCGTTCTCCTG
CTGTGCAAAATGCCGACCATGGCCGCGATGTGTTACAAGTATTCATTGGTCAGCCATTTGTTTACCC
GCGCAACGATCTCTCTACGCCGGTAACTTCCTGAATATGATGTTCTCCACGCCGTGCGAACCCTATG
AAGTTAATCCGATTCTGGAACGTGCTATGGACCGTATTCTGATCCTGCACGCTGACCATGAACAGAA
CGCCTCTACCTCCACCGTGCGTACCGCTGGCTCTTCGGGTGCGAACCCGTTTGCCTGTATCGCAGCA
GGTATTGCTTCACTGTGGGACCTGCGCACGGCGGTGCTAACGAAGCGGCGCTGAAAATGCTGGAA
GAAATCAGCTCCGTTAAACACATTCCGGAATTTGTTGTCGTGCGAAAGACAAAAATGATTCTTCCG
CCTGATGGGCTTCGGTCACCGCGTGTACAAAATTACGACCCGCGCGCCACCGTAATGCGTGAAACC
TGCCATGAAGTGCTGAAAGAGCTGGGCACGAAGGATGACCTGCTGGAAGTGGCTATGGAGCTGGA
AAACATCGCGCTGAACGACCCGTACTTTATCGAGAAGAACTGTACCCGAACGTGATTTCTACTCT
GGTATCATCCTGAAAGCGATGGGTATTCCGTCTTCATGTTACCGTCATTTTCGCAATGGCACGTAC
CGTTGGCTGGATCGCCACTGGAGCGAAATGCACAGTGACGGTATGAAGATTGCCGTCGCGCTCA
GCTGTATACAGGATATGAAAAACGCGACTTTAAAGCGATATCAAGCGTTAATGGTTGATTGCTAAG
TTGTAAATATTTAAACCCGCCGTTATATGGCGGGTTGATTTTTATATGCCTAAACACAAAAAATTGT
AAAAATAAATCCATTAACAGACCTATATAGATATTTAAAAAGAATAGAACAGCTCAAATTATCAGC
AACCCAATACTTTCAATTAAAAACTTCATGGTAGTCGCATTTATAACCCTATGAAAATGACGTCTATCT
ATACCCCCCTATATTTTATTCATCATACAACAAATTCATGATACCAATAATTTAGTTTTGCATTTAATAA
AACTAACAATATTTTAAAGCAAACTAAAACTAGCAATAATCAAATACGATATTCTGGCGTAGCTAT
ACCCCTATTCTATATCCTTAAAGGACTCTGTTATGTTTAAAGGACAAAAAACATTGGCCGCACTGGCC
GTATCTCTGCTGTTCACTGCACCTGTTTATGCTGCTGATGAAGGTTCTGGCGAAATTCATTTAAGGG
GGAGGTTATTGAAGCACCTTGTAATTCATCCAGAAGATATTGATAAAAAACATAGATCTTGGACAA
GTCACGACAACCCATATAAACCGGGAGCATCATAGCAATAAAGTGGCCGTCGACATTCGCTTGATCA
ACTGTGATCTGCCTGCTTCTGACAACGGTAGCGGAATGCCGGTATCCAAAGTTGGCGTAACCTTCGA
TAGCACGGCTAAGACAACCTGGTGCTACGCCTTTGTTGAGCAACACCAAGTGCAGGCGAAGCAACTGG
GGTCGGTGTACGACTGATGGACAAAATGACGGTAACATCGTATTAGGTTACGCCGCGCCAGATCT
TGACCTGGATGCAAGCTCATCAGAACAGACGCTGAACCTTTTCGCCTGGAT

图 43

gltA 活性分析, 野生型

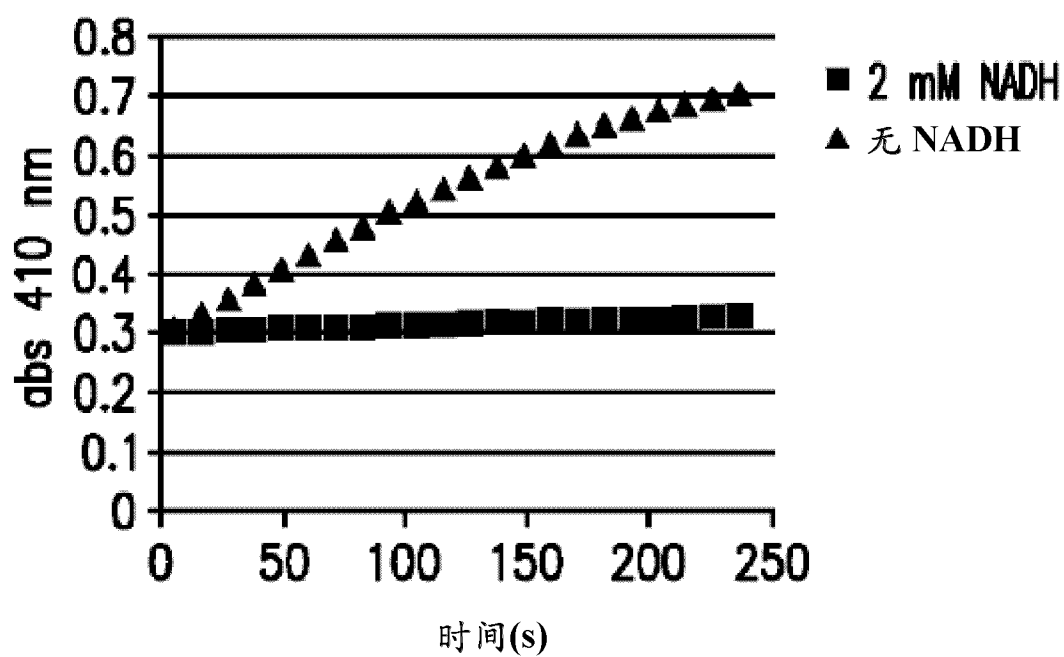


图 44A

gltA 活性分析, R163L 突变体

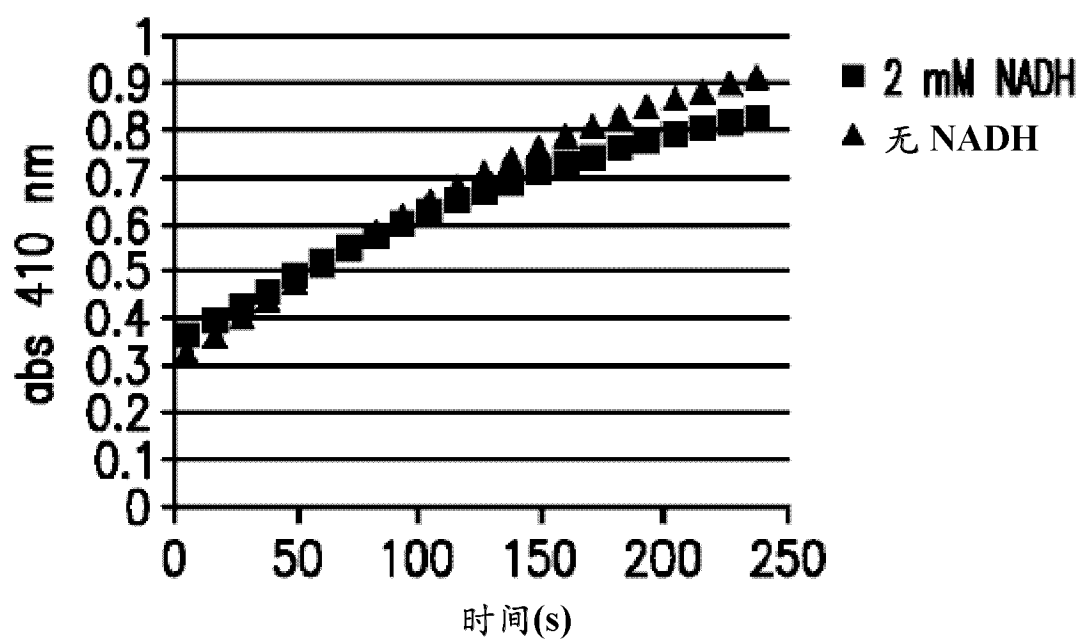


图 44B

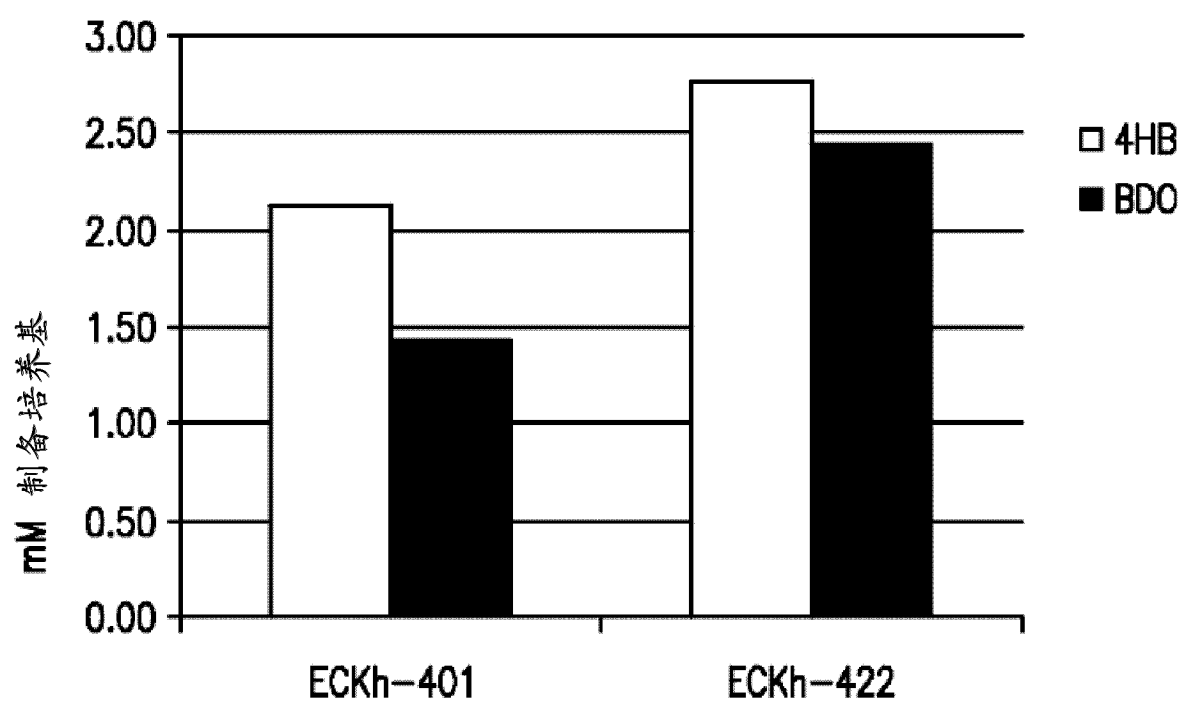


图 45

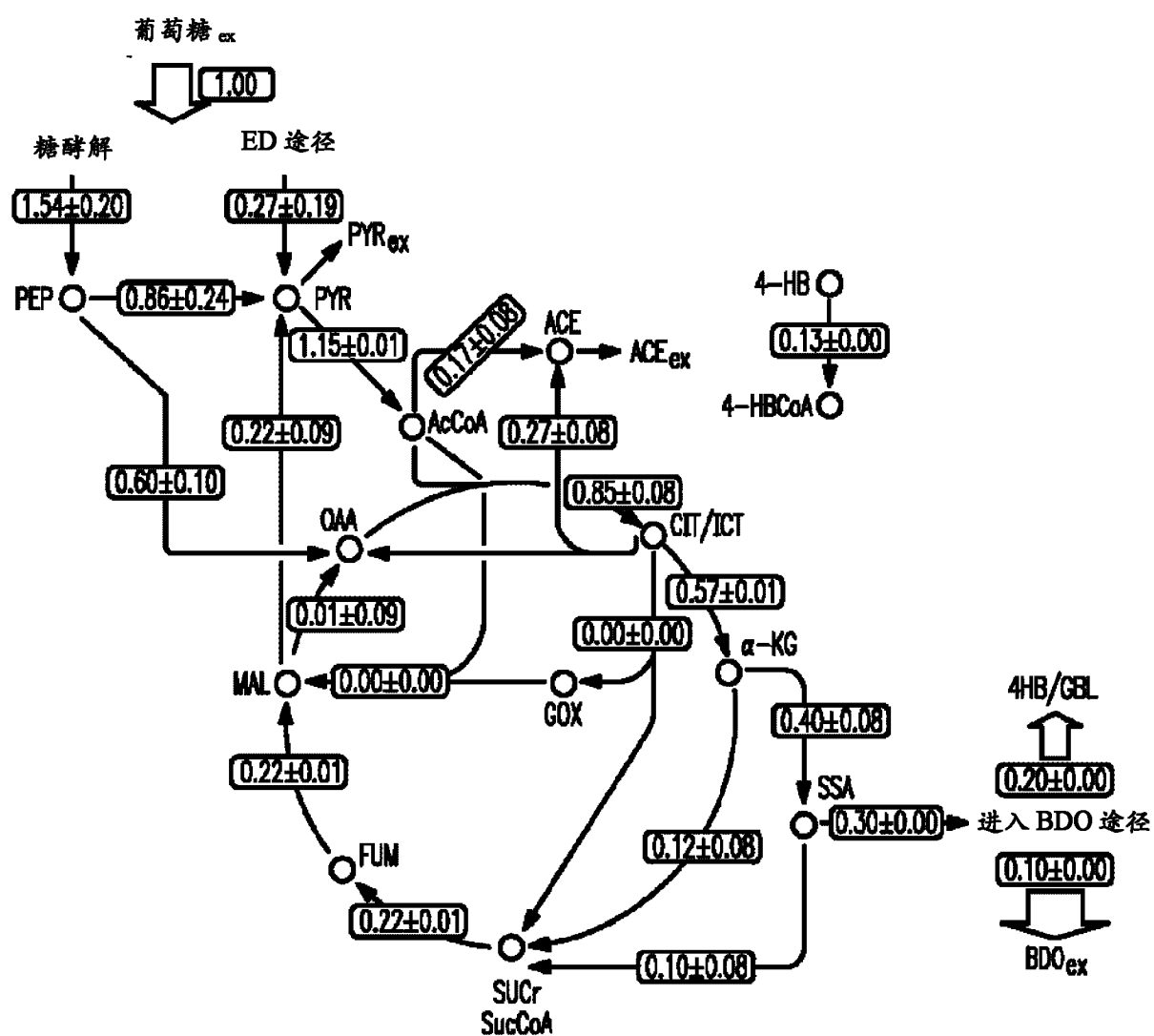


图 46

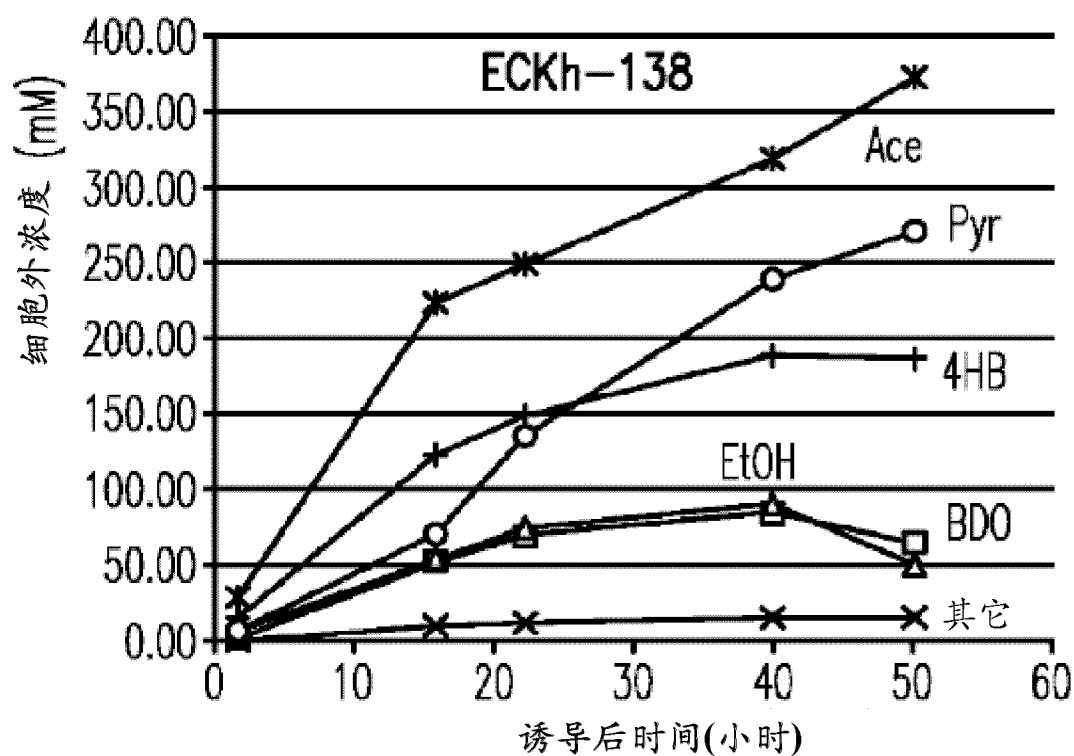


图 47A

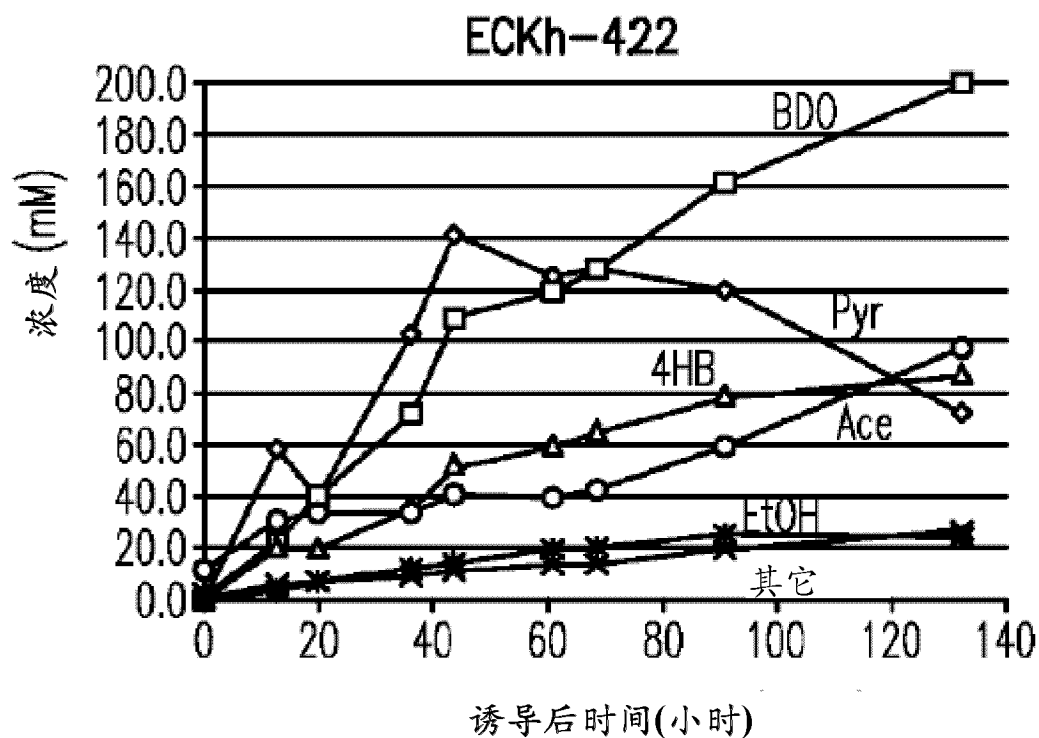


图 47B

CGCGATGTCGACGTCACGAACTGAAAAACCGCTCTACATTCTGGCGACTGCTGATGAAGAAACC
AGTATGGCCGGAGCGCGTTATTTGCCGAACTACCGCCCTGCGCCCGGATTGCGCCATCATTGGCG
AACCGACGTCCTACAACCGGTACGCGCACATAAAGGTCATATCTCTAACGCCATCCGTATTCAGGG
CCAGTCGGGGCACTCCAGCGATCCAGCACGCGGAGTTAACGCTATCGAACTAATGCACGACGCCAT
CGGGCATATTTTGAATTGCGCGATAACCTGAAAGAACGTTATCACTACGAAGCGTTTACCGTGCCA
TACCTACGCTCAACCTCGGGCATATTACGGTGGCGACGCTTCTAACCGTATTTGCGTTGCTGTGA
GTTGCATATGGATATTCGTCCGCTGCCTGGCATGACACTCAATGAACCTAATGGTTTGTCAACGATG
CATTGGCTCCGGTGAGCGAACGCTGGCCGGTCTGTCTGACGGTCGACGAGCTGCATCCGCCGATCC
CTGGCTATGAATGCCACCGAATCATCAACTGGTTGAAGTGGTTGAGAAATTGCTCGGAGCAAAAA
CCGAAGTGGTGAACACTGTACCGAAGCGCCGTTTATTCAAACGTTATGCCCGACGCTGGTGTGGG
GCCTGGCTCAATTAATCAGGCTCATCAACCTGATGAATATCTGGAAACACGTTTATCAAGCCCACCC
GCGAACTGATAACCCAGGTAATTCACCATTTTTGCTGGCATTAAACGTAGGCCGGATAAGGCGCTC
GCGCCGCATCCGGCGCTGTTGCCAACTCCAGTGCCGCAATAATGTCGGATGCGATGCTTGCGCATC
TTATCCGACCTACAGTGACTCAAACGATGCCCAACCGTAGGCCGGATAAGGCGCTCGCGCCGCATCC
GGCACTGTTGCCAACTCCAGTGCCGCAATAATGTCGGATGCGATACTTGCGCATCTTATCCGACCG
ACAGTGACTCAAACGATGCCCAACTGTAGGCCGGATAAGGCGCTCGCGCCGCATCCGGCACTGTTG
CCAACTCCAGTGCCGCAATAATGTCGGATGCGATACTTGCGCATCTTATCCGACCTACACCTTTGGT
GTTACTTGGGGCGATTTTTAACATTTCCATAAGTTACGCTTATTTAAAGCGTCGTGAATTTAATGAC
GTAAATTCCTGCTATTTATTCGTTTGTGAAGCGATTTGCGAGCATTGACGTCACCGCTTTTACGTG
GCTTTATAAAAGACGACGAAAAAGCAAAGCCCGAGCATATTGCGCCAATGCTAGCAAGAGGAGAAG
TCGACATGACAGACTTAAATAAAGTGGTAAAAGAACTGAAGCTCTTGGTATTTATGACGTAAAAGA
AGTTGTTTACAATCCAAGCTACGAGCAATTGTTCAAGAAGAACTAAACCAGGTTAGAAGGCTTT
GAAAAAGGTACTTTAACTACGACTGGTGCAGTGCCAGTAGATACAGGTATCTTCACAGGTCGTTCTC
CAAAAGATAAATATATCGTGTTAGATGAAAAACCAAAGATACTGTTTGGTGGACATCTGAAACAGC
AAAAACGACAACAAGCCAATGAACCAAGCTACATGGCAAAGCTTAAAGACTTGGTAACCAACCA
GCTTTCTCGTAAACGCTTATTTGTAGTTGATGGTTTCTGTGGTGGAGCGAACACGACCGTATTGCA
GTACGTATTGTCACTGAAGTAGCGTGGAAGCACATTTTGTAAAAAATATGTTTATTCGCCCAACTGA
AGAACAACCTAAAAATTTTGAACCAGATTTCTGTTGTAATGAATGGTTCTAAAGTAACCAATCCAACT
GGAAAGAACAAGGTTTAAATTCAGAAAACTTTGTTGCTTTCAACTGACTGAACGCATTCAATTAATC
GGTGGTACTTGGTACGGCGGTGAAATGAAAAAGGTATGTTCTCAATCATGAACTACTTCTACCAC
TAAAGGTGTTGGTGCAATGCACTGCTCAGCTAACGTTGGTAAAGATGGCGATGTAGCAATCTTCTT
CGGCTTATCTGGCACAGGTAAAACAACCTTTCAACGGATCCAAAACGTGAATTAATCGGTGACGAT
GAACACGGCTGGGATGATGTGGGTATCTTTAACTTTGAAGGTGGTTGCTATGCGAAAACCATTCACC
TTTCAGAAGAAAATGAACCAGATATTTACCGCGCTATCCGTGCGGACGCATTATTAGAAAACGTGGT
TGTTCTGTCAGATGGTTCTGTTGATTTGATGATGGTTCAAAAACAGAAAATACTCGCGTGTCTTACC
CAATTTATCACATTGATAACATTGTAACCAAGTTTCTCGTGCAAGTCACGCAACTAAAGTGATTTTC
TAACTGCAGATGCATTTGGCGTATTACCACAGTATCTAAATTGACACCAGAACAACTAAATACTA
CTTCTTATCTGGTTTCACAGCAAAATTAGCAGGTACTGAACGTGGTATTACTGAACCAACTCCAATT
TCTCAGCATGTTTCGGTGCTGCGTTCTTAACCTTCACCCAACTCAATATGCAGAAGTGTTAGTAAAA
CGTATGCAAGCAGTGGGTGCTGAAGCTTACTTAGTAAATACTGGTTGGAATGGCACAGGCAACGT
ATCTCAATCAAAGATACTCGCGGAATCATTGATGCAATCTTAGATGGCTCAATTGAAAAAGCTGAAA
TGGGCGAATTACCAATCTTTAACTTAGCCATTCTAAAGCATTACCAGGTGTAGATTCTGCAATCTTA
GATCCTCGCGATACTTACGCAGATAAAGCACAATGGCAATCAAAAGCTGAAGACTTAGCAGGTGCTT
TTGTGAAAACTTTGTTAAATATGCAACTAACGAAGAAGGCAAAGCTTTAATTGCAGCTGGTCCTAA
AGCTTAATCTAGAAAGCTTCTAGAGGCATCAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCC
TTTCGTTTTATCTGTTGTTTGTGGTGAACGCTCTCTGAGT

图 48

AGGACGAATTCACCTTCTGTTCTAACACCCCTCGTTTTCAATATATTTCTGTCTGCATTTTATTCAAATCT
 GAATATACCTTCAGATATCCTTAAGGAATTGTCGTTACATTGCGCGATATTTTTCAAGACAGGTTCT
 TACTATGCATTCCACAGAAAGTCCAGGCTAAACCTCTTTTAGCTGGAAAGCCCTGGGTTGGGCACTG
 CTCTACTTTTGGTTTTCTCTACTCTGCTACAGGCCATTATTTACATCAGTGGTTATAGTGGCACTAAC
 GGCATTGCGGACTCGCTGTTATTAGTTGCTGTGGTTGATCCCGGTATTCTCTTTCCGAAGCGGAT
 TAAAATTATTGCGCAGTAATCGGCGTGGTGCTATGGGCGGCCCTCTGCGCGGCGCTGTGCTACTAC
 GTCATCTACGGTCAGGAGTTCTCGCAGAGCGTTCTGTTTGTGATGTTGAAACCAACACCAACGAAG
 CCAGCGAGTATTTAAGCCAGTATTTAGCCTGAAAATTGTGCTTATCGCGCTGGCCTATACGGCGGT
 GGCAGTTCTGCTGTGGACACGCCTGCGCCCGGTCTATATCCAAAGCCGTGGCGTTATGTTGTCTCTT
 TTGCCCTGCTTATGGCTTGATTCTGCATCCGATCGCCATGAATACGTTTATCAAAAACAAGCCGTTT
 GAGAAAACGTTGGATAACCTGGCCTCGCGTATGGAGCCTGCCGCACCGTGGCAATTCCTGACCGGC
 TATTATCAGTATCGTCAGCACTAACTCGCTAACAAAGTTACTGAATGAAAATAATGCCTTGCCGCC
 ACTGGCTAATTTCAAAGATGAATCGGGTAACGAACCGCGCACTTTAGTGCTGGTGATTGGCGAGTC
 GACCCAGCGCGGACGCATGAGTCTGTACGTTATCCGCGTGAAACCACGCCGGAGCTGGATGCGCT
 GCATAAAACCGATCCGAATCTGACCGTGTTAATAACGTAGTTACGTCTCGTCCGTACACCATTGAAA
 TCCTGCAACAGGCGCTGACCTTTGCCAATGAAAAGAACCCGGATCTGTATCTGACGCAGCCGTCGCT
 GATGAACATGATGAAACAGGCGGGTTATAAAACCTTC

图 48(续)

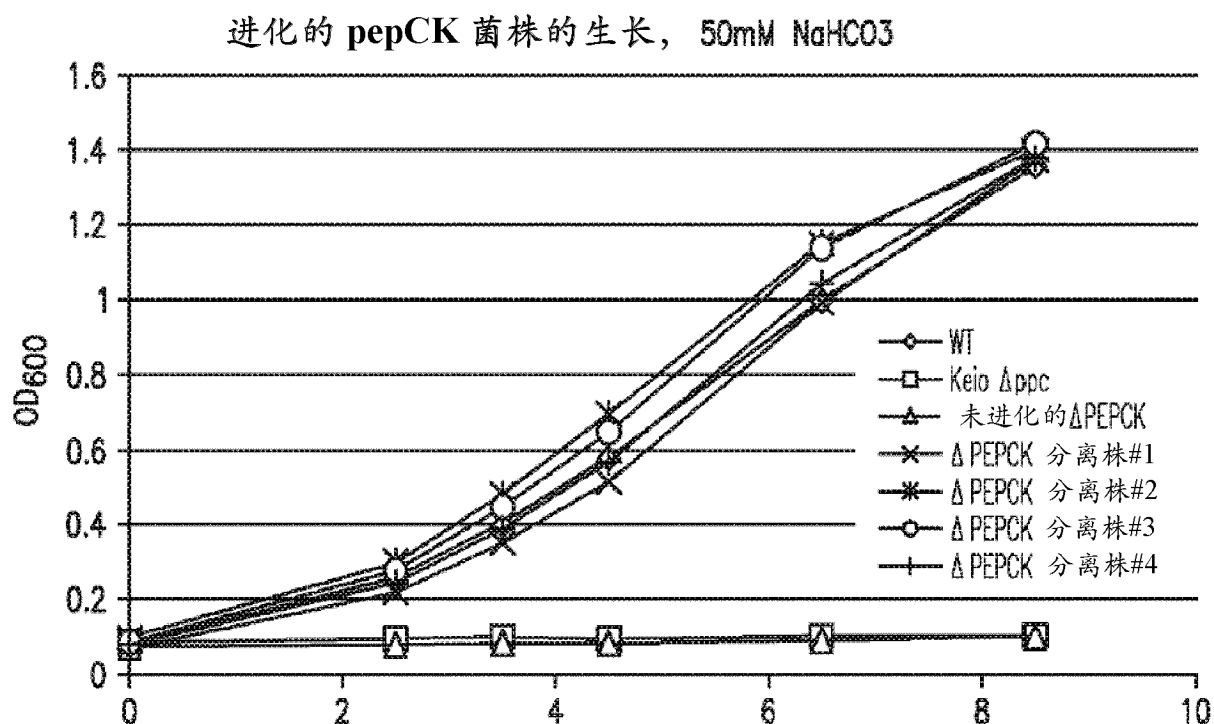


图 49

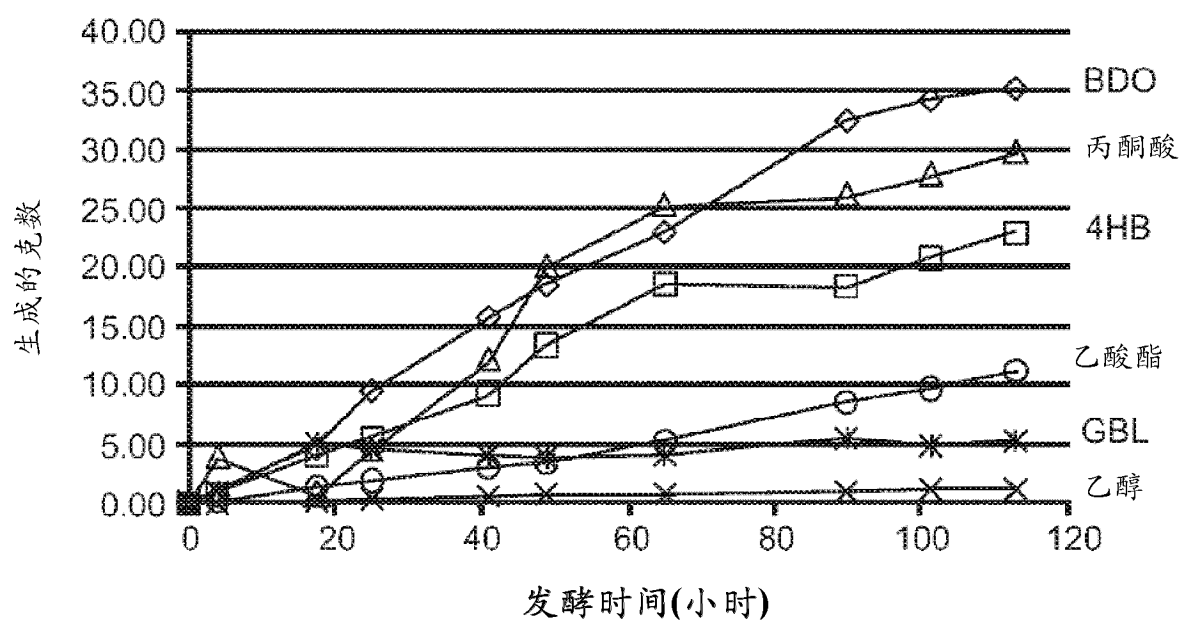


图 50

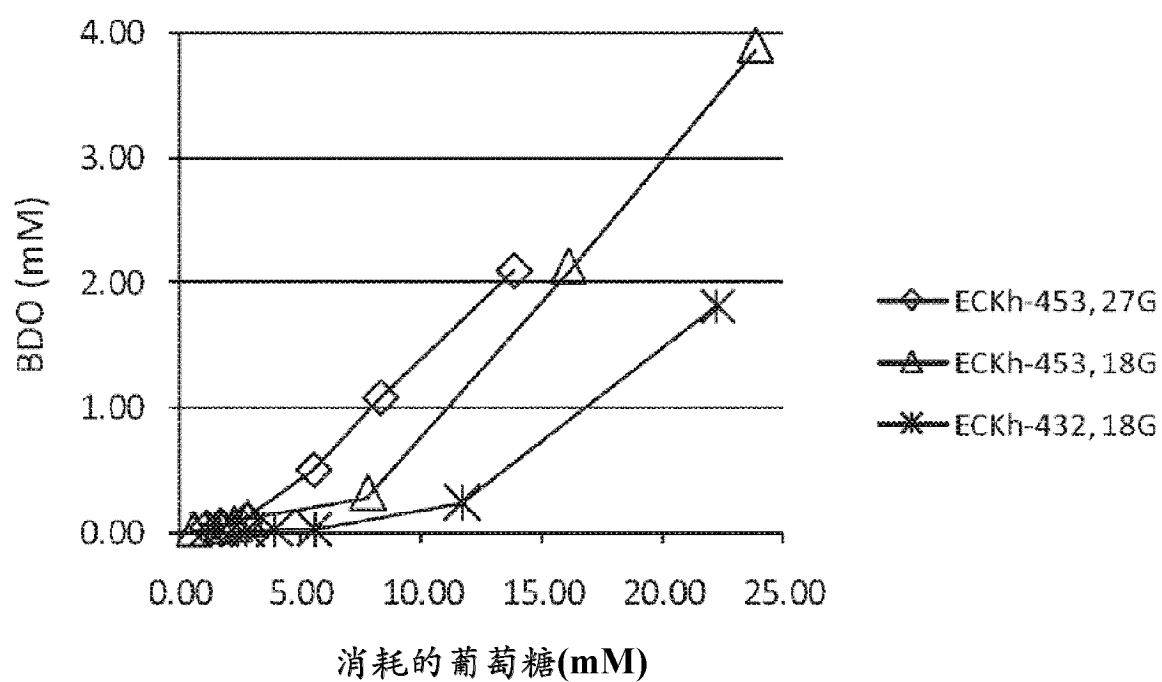


图 51

AATAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTCTTCACCTCGAGAATTGTGAGCGGATAACAATTGACATTG
TGAGCGGATAACAAGATACTGAGCACATCAGCAGGACGCACTGACCGAATTC AATTAAGCTAGCAA
GAGGAGAAGTCGAGATGAACTTACATGAATATCAGGCAAAACAACCTTTTGCCCGCTATGGCTTACC
AGCACCGGTGGGTATGCCTGTACTACTCCGCGCGAAGCAGAAGAAGCCGCTTCAAAAATCGGTGC
CGGTCCGTGGGTAGTGAAATGTCAGGTTACGCTGGTGGCCGCGGTAAAGCGGGCGGTGTGAAAG
TTGTAAACAGCAAAGAAGACATCCGTGCTTTTGCAGAAAACCTGGCTGGGCAAGCGTCTGGTAACGT
ATCAAACAGATGCCAATGGCCAACCGTTAACCAGATTCTGGTTGAAGCAGCGACCGATATCGCTAA
AGAGCTGTATCTCGGTGCCGTTGTTGACCGTAGTTCCCGTCGTGTGGTCTTTATGGCCTCCACCGAA
GGCGGCGTGGAAATCGAAAAAGTGGCGGAAGAACTCCGCACCTGATCCATAAAGTTGCGCTTGAT
CCGCTGACTGGCCCGATGCCGTATCAGGGACGCGAGCTGGCGTTCAAACCTGGGTCTGGAAGGTA
CTGGTTCAGCAGTTCACCAAATCTTCATGGGCCTGGCGACCATTTTCTGGAGCGCGACCTGGCGT
TGATCGAAATCAACCCGCTGGTCATCACCAAACAGGGCGATCTGATTTGCCTCGACGGCAAACCTGGG
CGCTGACGGCAACGCACTGTTCCGCCAGCCTGATCTGCGCGAAATGCGTGACCAGTCGCAGGAAGA
TCCGCGTGAAGCACAGGCTGCACAGTGGGAACTGAACTACGTTGCGCTGGACGGTAACATCGGTTG
TATGGTTAACGGCGCAGGTCTGGCGATGGGTACGATGGACATCGTTAACTGCACGGCGGCGAACC
GGCTAACTTCTTGACGTTGGCGGCGGCGCAACCAAAGAACGTGTAACCGAAGCGTTCAAAATCAT
CCTCTCTGACGACAAAGTGAAAGCCGTTCTGGTTAACATCTTCGGCGGTATCGTTCGTTGCGACCTG
ATCGCTGACGGTATCATCGGCGCGGTAGCAGAAGTGGGTGTTAACGTACCGTCTGTTACGTTCTG
GAAGGTAACAACGCCGAACCTCGGCGCGAAGAACTGGCTGACAGCGGCCTGAATATTATTGCAGCA
AAAGGTCTGACGGATGCAGCTCAGCAGGTTGTTGCCGCACTGGAGGGGAAATAATGTCCATTTTAA
TCGATAAAACACCAAGGTTATCTGCCAGGGCTTACCAGGTAGCCAGGGGACTTTCCACTCAGAACA
GGCCATTGCATACGGCACTAAATGGTTGGCGGCGTAACCCAGGTAAAGGCGGCACCAACCCACCT
CGGCCTGCCGGTGTCAACACCGTGCGTGAAGCCGTTGCTGCCACTGGCGCTACCGCTTCTGTTATC
TACGTACCAGCACCGTTCTGCAAAGACTCCATTCTGGAAGCCATCGACGCAGGCATCAAACCTGATTA
TCACCATCACTGAAGGCATCCCGACGCTGGATATGCTGACCGTGAAAGTGAAGCTGGATGAAGCAG
GCGTTCGTATGATCGGCCCGAACTGCCAGGCGTTATCACTCCGGGTGAATGCAAAATCGGTATCCA
GCTGGTACATTACAAACCGGGTAAAGTGGGTATCGTTTCCCGTTCGGGTACACTGACCTATGAA
GCGGTTAAACAGACCACGGATTACGGTTTCGGTCAGTCGACCTGTGTGGTATCGGCGGTGACCCG
ATCCCGGGCTCTAACTTTATCGACATTCTCGAAATGTTCGAAAAAGATCCGCAGACCGAAGCGATCG
TGATGATCGGTGAGATCGGCGGTAGCGCTGAAGAAGAAGCAGCTGCGTACATCAAAGAGCACGTT
ACCAAGCCAGTTGTGGGTTACATCGCTGGTGTGACTGCGCCGAAAGGCAAACGTATGGGCCACGCG
GGTGCCATCATTGCCGGTGGGAAAGGGACTGCGGATGAGAAATTCGCTGCTCTGGAAGCCGCAGG
CGTGAAAACCGTTTCGCAGCCTGGCGGATATCGGTGAAGCACTGAAAACCTGTTCTGAAATAATCTAGC
AAGAGGAGAAGTCGACATGGAAATCAAAGAAATGGTGAGCCTTGACGCAAGGCTCAGAAGGAGT
ATCAAGCTACCCATAACCAAGAAGCAGTTGACAACATTTGCCGAGCTGCAGCAAAAGTTATTTATGA
AAATGCAGCTATTCTGGCTCGCGAAGCAGTAGACGAAACCGGCATGGGCGTTTACGAACACAAAGT
GGCCAAGAATCAAGGCAAATCCAAAGGTGTTTGGTACAACCTCCACAATAAAAAATCGATTGGTATC
CTCAATATAGACGAGCGTACCGGTATGATCGAGATTGCAAAGCCTATCGGAGTTGTAGGAGCCGTA
ACGCCGACGACCAACCCGATCGTTACTCCGATGAGCAATATCATCTTTGCTCTTAAGACCTGCAATGC
CATCATTATTGCCCCCACCACAGATCCAAAAATGCTCTGCACACGCAGTTTCGTCTGATCAAAGAAG
CTATCGCTCCGTTCAACGTACCGGAAGGTATGGTTCAGATCATCGAAGAACCAGCATCGAGAAGAC
GCAGGAACTCATGGGCGCCGTAGACGTAGTAGTTGCTACGGGTGGTATGGGCATGGTGAAGTCTG
CATATTCTTCAGGAAAGCCTTCTTTCGGTGTTGGAGCCGGTAACGTTCAGGTGATCGTGGATAGCAA
CATCGATTCGAAGCTGCTGCAGAAAAATCATCAC

图 52

CGGTCGTGCTTTCGACAACGGTATCATCTGCTCAGGCGAACAGAGCATCATCTACAACGAGGCTGAC
AAGGAAGCAGTTTTTCACAGCATTCCGCAACCACGGTGATATTTCTGTGACGAAGCCGAAGGAGAT
CGGGCTCGTGACGCTATCTTCGAAAATGGAGCCATCGCGAAAGATGTAGTAGGTCAGAGCGTTGCC
TTCATTGCCAAGAAAGCAAACATCAATATCCCCGAGGGTACCCGTATTCTCGTTGTTGAAGCTCGCG
GCGTAGGAGCAGAAGACGTTATCTGTAAGGAAAAGATGTGTCCCGTAATGTGCGCCCTCAGCTACA
AGCACTTCGAAGAAGGTGTAGAAATCGCACGTACGAACCTCGCCAACGAAGGTAACGGCCACACCT
GTGCTATCCACTCCAACAATCAGGCACACATCATCCTCGCAGGATCAGAGCTGAOGGTATCTCGTAT
CGTAGTGAATGCTCCGAGTGCCACTACAGCAGGCGGTACATCCAAAACGGTCTTGCCGTAACCAAT
ACGCTCGGATGCGGATCATGGGGTAATAACTCTATCTCCGAGAACTTCACTTACAAGCACCTCCTCA
ACATTTACGCATCGCACCGTTGAATTCAGCATTACATCCCCGATGACAAAGAAATCTGGGAACT
CTAATCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGCAACTTTTCAAACCTCAAGAGTGTAAACACATCACTTTGA
CACTTTTGCGAATTTGCCAAGGAATTCTGTCTTGAGAACGCGACTTGGAATTACCAACGAGTTC
ATCTATGAACCGTATATGAAGGCATGCCAGCTCCCTGCCATTTTGTTATGCAGGAGAAATATGGGC
AAGGCGAGCCTTCTGACGAAATGATGAATAACATCTTGGCAGACATCCGTAATATCCAGTTCGACCG
CGTAATCGGTATCGGAGGAGGTACGGTTATTGACATCTCTAACTTTTCGTTCTGAAAGGATTAAAT
GATGTACTCGATGCATTGACCGCAAAATACCTCTTATCAAAGAGAAAGAACTGATCATTGTGCCCA
CAACATGCGGAACGGGTAGCGAGGTGACGAACATTTCTATCGCAGAAATCAAAGCCGTACACCA
AAATGGGATTGGCTGACGATGCCATTGTTGCAGACCATGCCATCATCATACCTGAACTTCTGAAGAG
CTTGCCTTTCACTTCTACGCATGCAGTGCAATCGATGCTCTTATCCATGCCATCGAGTCATACGTATC
TCCTAAAGCCAGTCCATATTCTCGTCTGTTCAGTGAGGCGGCTTGGGACATTATCCTGGAAGTATTCA
AGAAAATCGCCGAACACGGCCCTGAATACCGCTTCGAAAAGCTGGGAGAAATGATCATGGCCAGCA
ACTATGCCGGTATAGCCTTCGGAAATGCAGGAGTAGGAGCCGTCCACGCACTATCCTACCCGTTGGG
AGGCAACTATCACGTGCCGCATGGAGAAGCAAACCTATCAGTTCTTACAGAGGTATTCAAAGTATAC
CAAAAGAAGAATCCTTTCCGGCTATATAGTCGAACTCAACTGGAAGCTCTCCAAGATACTGAACTGCC
AGCCCGAATACGTATATCCGAAGCTGGATGAACTTCTCGGATGCCTTCTTACCAAGAAACCTTTGCAC
GAATACGGCATGAAGGACGAAGAGGTAAGAGGCTTTGCGGAATCAGTGCTTAAGACACAGCAAAG
ATTGCTCGCCAACAACCTACGTAGAGCTTACTGTAGATGAGATCGAAGGTATCTACAGAAGACTCTAC
TAATCTAGAAAGCTTCTAGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTTC
GTTTTATCTGTTGTTGTCGGTGAACGCTCTCCTGAGTAGGACAAATCCGCCGCCCTAGACCTAGGC
GTTCCGGCTGCGACACGTCTTGAGCGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTGAAGTTCTATACTTTCTA
GAGAATAGGAACTTCGGAATAGGAACTAAGGAGGATATTATATGGACCATGGCTAATTCCCAT

图 52(续)

TCGAGAAATTTATCAAAAAGAGTGTGACTTGTGAGCGGATAACAATGATACTTAGATTCAATTGTG
AGCGGATAACAATTTACACAGAATTCATTAAGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGGCCAACAT
AAGTTCACCATTCGGGCAAAACGAATGGCTGGTTGAAGAGATGTACCGCAAGTTCCGCGACGACCC
CTCCTCGGTGATCCCAGCTGGCAGGAGTTCTGGTTGACTACAGCCCCGAACCCACCTCCCAACCA
GCTGCCGAACCAACCCGGGTTACCTCGCCACTCGTTGCCGAGCGGGCCGCTGCGGCCGCCCGCAG
GCACCCCCAAGCCGGCCGACACCGCGGCCGCGGCAACGGCGTGGTGGCCGCACTGGCCGCCAA
AACTGCCGTTCCCCGCCAGCCGAAGGTGACGAGGTAGCGGTGCTGCGCGGCGCCGCCGCGGCCG
TCGTCAAGAACATGTCCGCGTCGTTGGAGGTGCCGACGGCGACCAGCGTCCGGGCGGTCCCGGCCA
AGCTACTGATCGACAACCGGATCGTCATCAACAACCAAGTTGAAGCGGACCCGCGGCGGCAAGATCT
CGTTCACGCATTTGCTGGGCTACGCCCTGGTGCAGGCGGTGAAGAAATTCCGAACATGAACCGGC
ACTACACCGAAGTCGACGGCAAGCCCACCGCGGTACGCCGGCGCACACCAATCTCGGCCTGGCGA
TCGACCTGCAAGGCAAGGACGGGAAGCGTTCCCTGGTGGTGGCCGGCATCAAGCGGTGCGAGACC
ATGCGATTGCGCGAGTTCGTACGGCCTACGAAGACATCGTACGCCGGGCCCCGCGACGGCAAGCTG
ACCACTGAAGACTTTGCCGGCGTGACGATTTGCTGACCAATCCCGGAACCATCGGCACCGTGATT
CGGTGCCGCGCTGATGCCCGGCCAGGGCGCCATCATCGGCGTGGGCGCCATGGAATACCCCGCC
GAGTTTCAAGGCGCCAGCGAGGAACGCATCGCCGAGCTGGGCATCGGCAAATTGATCACTTTGACC
TCCACCTACGACCACCGCATCATCCAGGGCGCGGAATCGGGCGACTTCCTGCGCACCATCCACGAGT
TGCTGCTCTCGGATGGCTTCTGGGACGAGGTCTTCGCGAACTGAGCATCCCATATCTGCCGGTGCG
CTGGAGCACCGACAACCCCGACTCGATCGTCGACAAGAACGCTCGCGTCATGAACTTGATCGCGGC
CTACCGCAACCGCGGCCATCTGATGGCCGATACCGACCCGCTGCGGTTGGACAAAGCTCGGTTCCGC
AGTCACCCCGACCTCGAAGTGCTGACCCACGGCCTGACGCTGTGGGATCTCGATCGGGTGTTCAAG
GTCGACGGCTTTGCCGGTGCGCAGTACAAGAACTGCGCGACGTGCTGGGCTTGCTGCGCGATGCC
TACTGCCGCCACATCGGCGTGGAGTACGCCCATATCCTCGACCCCGAACAAAAGGAGTGGCTCGAA
CAACGGGTGAGACCAAGCACGTCAAACCCACTGTGGCCCAACAGAAATACATCCTCAGCAAGCTC
AACGCCGCCGAGGCCTTTGAAACGTTCTACAGACCAAGTACGTGCGCCAGAAGCGGTTCTCGCTG
GAAGGCGCCGAAAGCGTGATCCCGATGATGGACGCGGCGATCGACCAGTGGCTGAGCACGGCCT
CGACGAGGTGGTCATCGGGATGCCGCACCGGGGGCGGCTCAACGTGCTGGCCAACATCGTCGGCA
AGCCGTA CTGCGAGATCTTACCGAGTTCGAGGGCAACCTGAATCCGTGCGAGGCGCACGGCTCCG
GTGACGTCAAGTACCACCTGGGCGCCACCGGGCTGTACCTGCAGATGTTGGGCGACAACGACATTC
AGGTGTCGCTGACCGCCAACCGTCGCATCTGGAGGCCGTGACCCGGTGCTGGAGGGATTGGTGC
GGGCCAAGCAGGATCTGCTCGACCACGGAAGCATCGACAGCGACGGCCAACGGGCGTTCTCGGTG
GTGCCGCTGATGTTGCATGGCGATGCCGCGTTCGCCGGTCAGGGTGTGGTGGCCGAGACGCTGAAC
CTGGCGAATCTGCCGGGCTACCGCGTCGGCGGCAACCATCCACATCATCGTCAACAACAGATCGGCT
TCACCACCGCGCCCCGAGTATTCCAGGTCCAGCGAGTACTGCACCGACGTGCGAAAGATGATCGGGG
CACCGATCTTTCACGTCAACGGCGACGACCCGGAGGGCGTGTGTCTGGGTGGCGCGGTTGGCGGTGG
ACTTCCGACAACGGTTCAAGAAGGACGTGTCATCGACATGCTGTGCTACCGCGCCGCGGGCACA
ACGAGGGTGACGACCCGTCGATGACCAACCCCTACATGTACGACGTCGTCGACACCAAGCGCGGGG
CCCGCAAAAGCTACACCGAAGCCCTGATCGGACGTGGCGACATCTCGATGAAGGAGGCCGAGGAC
GCGCTGCGGACTACCAGGGCCAGCTGGAACGGGTGTTCAACGAAGTGCGCGAGCTGGAGAAGCA
CGGTGTGACGCCGAGCGAGTCGGTCGAGTCCGACCAGATGATTCCCGCGGGGCTGGCCACTGCGG
TGGACAAGTCGCTGCTGGCCCGGATCGGCGATGCGTTCCTCGCCTTGCCGAACGGGTTACCGCGCA
CCCGCGAGTCCAACCGGTGCTGGAGAAGCGCCGGGAGATGGCCTATGAAGGCAAGATCGACTGGG
CCTTTGGCGAGCTGCTGGCGCTGGGCTCGCTGGTGGCCGAAGGCAAGCTGGTGGCTTGTGGGGC
AGGACAGCCGCCGCGGCACCTTCTCCAGCGGCATTGCGTTCTCATCGACCGCCACACTGGCGAGG
AGTTCACACCACTGCAGCTGCTGGCGACCAACTCCGACGGCAGCCCGACCGGCGGAAAGTTCCTGG
TCTACGACTCGCCACTGTGCGAGTACGCCGCCGTGCGCTTCGAGTACGGCTACACTGTGGGCAATCC
GGACGCCGTGGTGCTCTGGGAGGCGAGTTCGGCGACTTCGTCAACGGCGCACAGTCGATCATCGA

图 53

CGAGTTCATCAGCTCCGGTGAGGCCAAGTGGGGCCAATTGTCCAACGTCGTGCTGCTGTTACCGCAC
GGGCACGAGGGGCGAGGGACCCGACCACACTTCTGCCCCGGATCGAACGCTTCTTGACAGTTGTGGGCG
GAAGGTTTCGATGACCATCGCGATGCCGTCGACTCCGTCGAACTACTTCCACCTGCTACGCCGGCATG
CCCTGGACGGCATCCAACGCCCGCTGATCGTGTTACGCCCCAAGTCGATGTTGCGTCACAAGGCCGC
CGTCAGCGAAATCAAGGACTTCACCGAGATCAAGTTCGCTCAGTGCTGGAGGAACCCACCTATGA
GGACGGCATCGGAGACCGCAACAAGGTCAGCCGGATCCTGCTGACCAAGTGGCAAGCTGTATTACGA
GCTGGCCGCCCGCAAGGCCAAGGACAACCGCAATGACCTCGCGATCGTGCGGCTTGAACAGCTCGC
CCCCTGCCCAGGCGTCGACTGCGTGAAACGCTGGACCGCTACGAGAACGTCAAGGAGTTCTTCTG
GGTCCAAGAGGAACCGGCCAACCAGGGTGCGTGCGCGGATTGCGGCTCGAACTACCCGAGCTGCT
GCCTGACAAGTTGGCCGGGATCAAGCGAATCTCGCGCCGGGCGATGTCAGCCCCGTGCTCAGGCTC
GTCAAGGTGCACGCCGTGAACAGCAGGAGATCCTCGACGAGGCGTTGCGCTAATCTAGCAAGA
GGAGAAGTCGACATGAAGTTATTAATAATTGGCACCTGATGTTTATAAATTTGATACTGCAGAGGAGT
TTATGAAATACTTTAAGGTTGGAAAAGGTGACTTTATACTTACTAATGAATTTTTATATAAACCTTTCC
TTGAGAAATTCAATGATGGTGAGATGCTGTATTTAGGAGAAATATGGACTCGGTGAACCTTCTGA
TGAAATGATAAACAATATAATTAAGGATATTGGAGATAAACAATATAATAGAATTATTGCTGTAGGG
GGAGGATCTGTAATAGATATAGCCAAAATCCTCAGTCTTAAGTATACTGATGATTCATTGGATTGTT
TGAGGGAAAAGTACCTCTTGTAAAAAACAAAGAATTAAATTATAGTTCCAACCTACATGTGGAACAGGT
TCAGAAGTTACAAATGTATCAGTTGCAGAATTAAGAGAAAGACATACTAAAAAAGGAATTGCTTCA
GACGAATTATATGCAACTTATGCAGTACTTGTACCAGAATTTATAAAAGGACTTCCATATAAGTTTTT
TGTAACCAGCTCCGTAGATGCCTTAATACATGCAACAGAAGCTTATGTATCTCAAATGCAAATCCTT
ATACTGATATGTTTAGTGTAAGGCTATGGAGTTAATTTAAATGGATACATGCAAATGGTAGAGAA
AGGAAATGATTACAGAGTTGAAATAATTGAGGATTTTGTATAGGCAGCAATTATGCAGGTATAGCT
TTTGGAATGCAGGAGTGGGAGCGGTTACGCACTCTCATATCCAATAGGCGGAAATTATCATGTGC
CTCATGGAGAAGCAAATTATCTGTTTTTACAGAAATATTTAAACTTATTATGAGAAAAATCCAAAT
GGCAAGATTAAAGATGTAATAAACTATTAGCAGGCATACTAAAATGTGATGAAAGTGAAGCTTAT
GACAGTTTATCACAACCTTTTAGATAAATTATTGTCAAGAAAACCATTAAGAGAATATGGAATGAAAG
AGGAAGAAATTGAACTTTTGCTGATTCAGTAATAGAAGGACAGCAGAGACTGTTGGTAAACAATT
ATGAACCTTTTTCAAGAGAAGACATAGTAAACACATATAAAAAGTTATATTAATCTAGAAAGCTTCCT
AGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGACTGGGCCTTCGTTTTATCTGTTGTTGTC
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

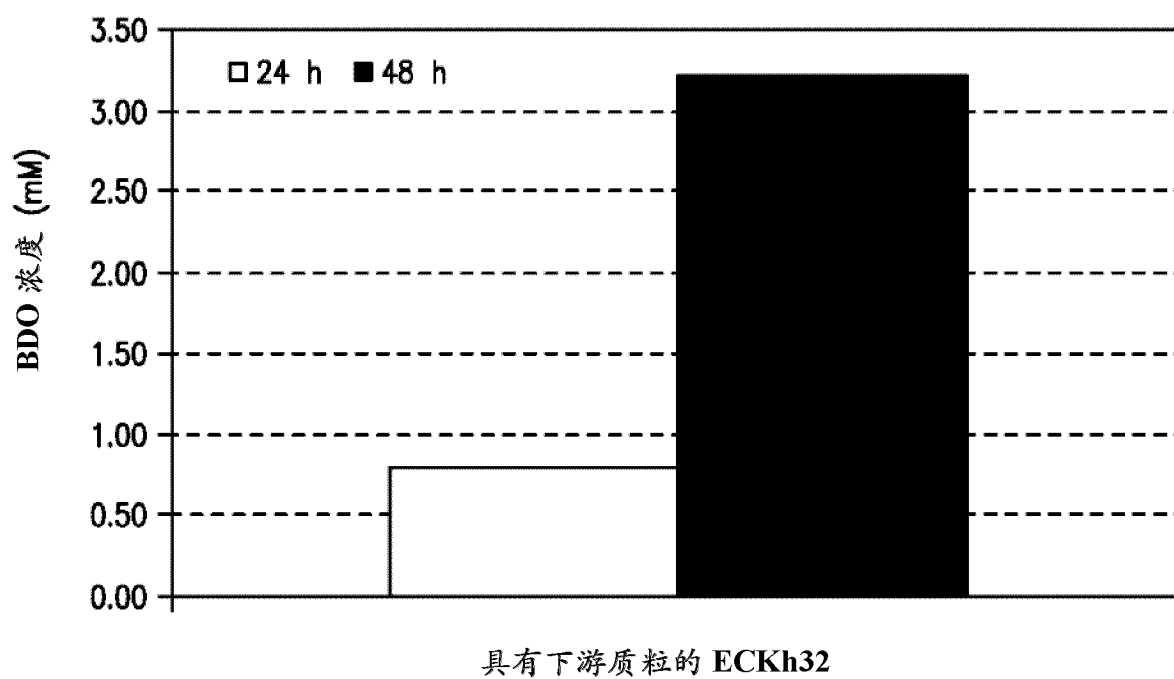


图 54

cscR w/5' del

>... ..

有义_PRM

... ..

1 TCTGTATCAG GCTGAAATC TTCTCTATC GSCCAAACA GCTTGGGCT TAAGTTCGC GTCAGGAC GTAGCCCTC GACTCTGCC GTGCTGGCG
AGACATAGTC CGACTTTTAG AAGAGAGTAG GGGTITTTGT CGAGCCGCA ATTCTACGC CGAGTTCTG CATTCGGCAG CTGAGAGCG CAGGACCGC
cscR w/5' del

... ..

101 AGGACACGGC TACCACTCT TTCTGTGTG ATATTCTGCT TGCCATIGAG CAACCCGCA GCGAGTTCG CTGGAATAGT TTTTAAATCA ATATTITTC
TCTGTGCGG ATGGTGAGGA AAGAGACAAC TATAAGACGA ACGTAACTC GTTTCGCCGT CGTCAAGCC GACCTTAATCA AAAAATTAGT TATAAAAAA
cscR w/5' del

... ..

201 TGAAGATGAC GCTGCCCGC CGGCACGTCA GCTGCTGCC CACCGTCCG ATGGCATTAT CTATACTACA ATGGGCTGC GACATATCAC GCTGCTGAG
ACTTCTACTG CGACGGGCG CCGGTGCAGT CGACGAACCG GTGGCAGGCC TACCGTAATA GATATGATGT TACCCGACG CTGTATAGTG CGACGACTC
cscR w/5' del

... ..

301 TCTCTATG GTGAAATAT TGTATTGGG AACTGTGTG CGGATGACC AGCGTTACC AGTATATCC CTGATGATA CACTGCACAA TATGAATCA
AGAGACATAC CACTTTTATA ACATACCCG TTGACACACC GCTACTGGG TCGAATGGG TCAATATAGG GACTACTAAT GTGAGTGTT ATACTAGTT
cscR w/5' del

... ..

401 CACAGCATTT GCTCGCGCG GCGTATGTC AACGTTATG CTTCGGCTA CCGGAAAGTG CGTGGCAAC AGGATATCGT CGCAGGGAT TTGACAGGC
GTGTCGTAAA CGAGCGCGC CGATAGCAG ITGGCAATAC GAAGACGAT GGCCTTCAC GCAACGTTG TCCCATAGCA GCGTCCCTA AACTGTCG
cscR w/5' del

... ..

501 CTGGCGTAT GCTGGACGAG ATCTGGCTG GTGAAACAA TTTCATATG CAACAGTGA TGATCACTAC ACCGATCTG CAAGTTACT CAATGCCAC
GACGCACTA CGACTGCTC TAGACCGACT CCACITTTGT AAGTGTACC GTTGCCACT ACTAGTATG TGGCTAGGC GTTCAATGA GTTACGGTG
cscR w/5' del

... ..

601 TTCAAACCG GCAACACGA TTTTATGTT CTGATATGT GTACGATCG CGCAGCCTT GTGGCTATC AGTTCTTCT GCGAAGGGG GTACGATTC
AAGTTGGCC CGTTGGTCT AAACTACAA GACTATACAC CATGCTAGC GCGTCGAAA CACGAATAG TCCAAGAAGA CCGTTCGCC CATGCTAGG
cscR w/5' del

... ..

701 CGCAGGATGT CGCGTAATG GCGTTGATA ATCTGGTGG COTCGGCAT CTGTTTTAC CGCGCTGAC CACAATTCAG CTTCACATG ACATTATCG
GGTCTCTACA GCGGCATTAC CCGAACTAT TAGACCAACC GCAGCCGTA GACAAAATG GCGGCGACTG GTGTAATTC GAAGGTGAC TGTAAATGCC
cscR w/5' del

... ..

801 GCGGGAAGCT GCATTGCATA TTATTGAAG TGTGAAGG GGAGAGTGA CCGGATCCC TTGCGGCTG TTGATCCGT GTTCACCTG ATATTAGTT
CGCCCTTGA GTAAAGTAT AATACTTCC AGCACTTCC CTTCTCACT GCGCTAGG AACGGGCGAC AACTAGGCA CAAGGTGAC TATAATCAA
cscA

901 AACCCAGTAG CCAGATGCT CCATGTGCA GCACAGCCAC TCGTGGGAG GCATAAGCG ACAGTTCGG TTCTTCTGC TGCGATAGA TTGACTACT
TTGGGTATC GGTCTCAGA GGTACAAGT GGTGCGGTG AGGACCCCTC GGTATTTCG TGTAAAGCG AAGAAGCCG ACBCCTATCT AAGCTGATGA

... ..

cscA

1001 CATCACGCT TCCCGTGT TAATAAATC TTCCAGGAT GATGATCGA TAAATATCT TAGGGGAGC GTGTACGCT GCGGAGGGG AATACTAGG
GTAGTGGGA AGGGGACGA ATTATTATG AAGTGCCTA CTACTAGCT ATTATAGGA ATCCGCTCG CACAGTGGG CCGCTCCCC TTATGATGC

... ..

图 55

cscA

1101 TAGCGTCTA AATICTCGTG TGGTAATAC CGCCACAAA CAAGTGGCTC AGATTGGTTA TCAATATACA GCGCATTCC AGTGCCGAGC TGTAAATCCGT
ATCGGCAGAT TTAAGAGCAC ACCATTATG GCGTGTTTT GTTCAGCGAG TCTAACCAAT AGTTATATGT CCGCCTAAGG TCACGGCTCG ACATTAGGCA

cscA

1201 AATGTTCCGC ATCACTGTTT TTCAGCGCC ACTGCAACTG AATCTCACT GCTTGCGGT TTCTCTCAA AACATAITTA TTGCTGATTG TCGGGGAGA
TTACAAGCCG TAGTGACAG AAGTCCCGG TGAAGTTGAC TTGAGTTGA CGAACGCGA AAGGACGTT TTGTATAAAT AACGACTAAC ACGCCCTCTT

cscA

1301 GACAGATTGA TGCTGCTGC GTAACGACTC AGCTTCTGT ACCGGCGGT GTAGAAGTTT GCCATTGCTC TCTGATAGCT CCGCGGCCAG COTCATGCAG
CTGTCTAAT ACAGCAGCG CATCTCTGAG TCGAAGCACA TGGCCCGCAA CATCTTCAA CGGTAAAGAG AGACTATGA GCGCGCGTC GCAGTACGT

cscA

1401 CCTGCCCATC CTTCAGTTT TGAGGCAAT GCGATTCCC ACATATCCAT CCAGCGATA ACAATAGCC GACCATCTT CGCTAAAAG CTTTGTGTG
GGACGGTAG GAAGTCAAA ACTCCGTAA CCGCTAAGG TGTATAGTA GTTCGGCTAT TGTATGCG CTGGTAGAA GCGATTTTC GAAACACCAC

cscA

1501 CATAAAGTC ATGCCGTTA TCAAGTTAG TAAATGCC GGAATGTCA AAAAGTCTC CTGGGACCA CACTCCGGT AITAGCCAC TTTGAAAGG
GTATTTTAC TAGCGCAAT AGTTCAAGT ATTTACGG CTAACAGT TTTTACAG GACCGCTGT GTAAGGCCA TAATCGGT AAACTTCCG

cscA

1601 ATTCGGTAA CTGTATCCT CGGCATTCAT TCCCTGCGG GAAACATCA GATAATCTG ATCGCCAAG CTGAAAAGT CCGGACATTC CCACATATAG
TAAAGCCAT GACATAGGA GCCGTAGTA AGGACGCCC CTTTGTAGT CTATTACGAC TAGCGITCC GACTTTTCA GGCCTGTAG GGTGTATATC

cscA

1701 CTTTCACCG CATCAGGTG GGCAGTACG GATCGAAGG TCCATTACG CAACGAAGT CCGGATAAA GCGAGATCG CCGCTGTG CTTGGATCT
GAAAGTGGC GTAGTGCAC CCGTCATGC CTAGCTTCC AGTAAAGTC GTTCTTAC GCGCTATTT CCGCTAGAC GCGGCACAC GACCTAGAA

cscA

1801 TCGCCCGAC TACCATCCAC CATGTGTGG CTTCAGGCA CACTTAGGA TCGCGAAGT GCATGATTC TTCTGGTGA GTGAGATCA CACCTGTT
AGCGGGCTG ATGTTAGTG GTACACAGC GAAGTGGGT GTGAAATCT AGCGCTTCA CTTACTAAG AMACCACT CACTCTAGT GTGGGACAA

cscA

1901 CTCGAAATGA ATACCATCC GACTGGTAG CAGACATTGT ACTTCGGAA TTGCATGTC ATTACCTGA CCATCGAGC AGAGTGTCC GGTGTAGATA
GAGCTTACT TATGGTAGG CTGACATCG GTCTGTAACA TGAAGGCTT AACGTAGCG TAATGGAGT GGTAGCTCG TCTGCACAG CCACATCTAT

cscA

2001 AGTGAGAGGA CACCATGTC ATGCACAGA CTACCTGAA AACACCCGTC TTTGCAITA TGTCTCTG GCGTAGCGC AATAGGCTCA TGCTGCCAGT
TCACTCTCT GTGTAACAG TAGCTGTCT GATGACTTT TTGTGGCAG AACAGTAAT AGCAGAGGAC CCGATCGG TTATCGAGT ACGAGGCTCA

cscA

2101 GGATCATATC GTGCTGGTG GCATGTCCC AGTGCAITGG CCCCAGTGT TCGCTCATG GATGATGTT ATAAAAGCG TGATAAGAT CGTTAAACCA
CCTAGTATAG CAGCGACCAC GTACAGGG TCAGTAACC GGGGTACA AGCGAGTAG CTACTCAAC TAETTTGCG ACTATGCTA GCAATTTGGT

cscA

图 55(续)

2201 GATCAGGCGG TTGCGATCGT TCATCCACCC GGCAGGAGGC GCGAGGTGAA AATGGGGATA GAAAGTGTTA CCCCCTGCT CATGAAGTTT TGCTAGGGCG
CTAGTCCGCG AAACCTAGCA AGTAGGTGGG CGTCCTCCG CGTCCACTT TTACCCCTAT CTTTCACAAAT GGGGCCACGA GTACTTCAAA ACSATCCCGC

cscA

2301 TTTTGGCGCG CATGCAATCG AGATGGCGTC ATTTTAATCA TCCTGGTTAA GCAATTTGG TGAATTGTTA ACGTTAACTT TTATAAAAT AAAGTCCCTT
AAAACGCGGC GTACGTTAGC TCTAACGCAG TAAATTAGT AGGACCAATT CGTTTAAACC ACTTAACAAT TSCAATTGAA AATATTTTAA TTTCAGGGAA

cscA

2401 ACTTTCATAA ATGCGATGAA TATCACAAT GTTAACGTTA ACTATGACGT TTTGTGATCG AATATGCGATG TTTTAGTAAA TCCATGACGA TTTTGGGAAA
TGAAAGTATT TACGCTACTT ATAGTGTTTA CAATTGCAT TGATACTGCA AACACTAGC TTATACGTAC AAAATCAATT AGTACTGCT AAAACGCTTT

cscK

2501 AAGAGGTTTA TCACTATGCG TAACTCAGAT GAATTAAAGG GAAAAAATG TCAGCCAAG TATGGGTTTT AGGGATGCG GTCTAGATC TCCTGCCAGA
TTCTCCAAAT AGTGATAGC ATTGAGTCTA CTTAAATCC CTTTTTTTAC AGTCGGTTTC ATACCCAAA TCCCTACGC CAGCATCTAG AGAACGGTCT

cscK

2601 ATCAGACGGG CGCTACTGC CTGTCTCGG CGGCGCGCA GCTAACGTTG CGGTGGGAAT CGCCAGATTG GCGGAACAA GTGGTTTAT AGTCCGGTG
TAGTCTGCC GCGATGACG GAACAGGACC GCGCGCGGT CGATTGCAAC GCCACCTTA GCGTCTAAT CCGCTTGT CACCCAATA TCCAGCCAC

cscK

2701 GGGGATGATC CTTTGGTGC GTTAATGCA AGAAGCTGC TAACTGAGG AGTCGATATC ACGTATCTGA AGCAAGATGA ATGGCACCG ACATCCACG
CCCTACTAG GAAACCACG CAATTAGCTT TCTTGCAGC ATTGACTCC TCAGCTAG TGCAAGACT TCGTCTACT TACCGTGGC TGTAGTGCC

cscK

2801 TGCTTGTGCA TCTGAACGAT CAGGGGAAC GTTCATTAC GTTTATGTC CGCCACAGT CGATCTTTT TTTAGAGAGC ACAGACTTGC CTTGCTGGG
ACGAACAGCT AGACTTGCTA GTTCCCTTG CAGTAAATG CAATACAGG GCGGGCTAC GGCTAGAAA AATCTCTGC TGTCTGAGC GGAAGACGC

cscK

2901 ACATGGCGAA TGGTACATC TCTGTTCAAT TCGTGTCTT GCGAGCTTT CGCTACCG CGCATTTACT GCGATGACG CGATCCGCA TGGCGAGGT
TGTACCGCTT ACCAATGTAG AGACAAGTTA ACGCAACAGA CGCTCGGAA GCGCATGCTC GGTAAATGA CGTACTGCC GCTAGGCGT ACGGCTCCA

cscK

3001 TTTGTACGT TCGATCTAA TATTCTGAA GATCTATGC AAGACAGCA TTTGCTCGC TTGTGTTGC GGCAGGCGT ACAACTGGG GATGTGTCA
AAACAGTGA AGCTAGGATT ATAAGCACTT CTAGATACG TTCTGCTGT AAACGAGGCG AACACAAAG CGTCCGCGA TGTGACGCG CTACAGCAGT

cscK

3101 AGCTCTCGA AGAAGAATGG CGACTTATCA GTGAAAAAC ACAGAACGAT CAGATATAT GCGCCCTGG AAAAGAGTAT GAGATCGCA TGCTGTTGT
TOGAGAGCT TCTCTTACC GCTGAATAGT CACCTTTTG TGTCTGTCA GTCTATATA CCGGGGACG TTTTCTATA CTCTAGCGT ACAGAACCA

cscK

3201 GACTAAAGGT GCAGAGGGG TGGTGTCTG TTATCGAGG CAGTTTACC APTTGTCTG AATGTCTGT AATTGTCTG ATAGCACGG GCGGGAGAT
CTGATTCCA CGTCTTCCC ACCACGAGC AATAGCTCT GTTCAAGTG TAAACGACC TTACAGACAC TTACACAGC TATCTGCCC CCGCTCTCA

cscK

3301 GCGTCTGTG CCGGTTACT CACAGTCTG TCCTCTACG GATTATCTAC AGATGAGAGA GAAATGGAC GAATTATGCA TCTCGCTCA CGTGGGAG
CGCAGCAAC GCGCAATGA GTGTCCAGC AGCAGATCC CTAATAGAT TCTACTCTT CTTTACGCT CTAATAGCT AGAGCGAGT GCAAGCCTC

cscK

图 55(续)

```

3401  CGCTTGCGAGT AACGGCGAAA GGGGCAATGA CAGCGCTGCC ATGTGACAAA GAACGGAAT AGTGAGAAT AAAAGGCGAA GTGCGTCTTA TCTCTAATA
    OCGAACGTCA TTGCGCTTTT CCGCGTACT GTGCGGACCG TACAGCTGTT CTGACCTTA TCACTCTTCA TTGCGCGCTT CAGCGAGAAT AGAGATTAT
                                     CS cB
>~~~~~
3501  GGACGTGAAT TTTTAAAGG CAGGCAAGTA ATTATGGCAC TGAATATTC ATTCAGAAAT GCGTACTATC GTTTTGCATC CAGTTACTCA TTTCTCTTT
    CCTGCACATA AAAAATTGCT GTCCGTGCTT TAATACCTTG ACTTATAAGG TAGTCTTTA CCGATGATG CAAACGCTAG GTCAATGAGT AAGAGAAAA
                                     CS cB
~~~~~
3601  TTATTTCTCT GTGCGTCTTG TGTCTCTAT ACCCTATTG GGTGAAGGA CATCTAGGT TACAGGGAC GGAATTAGT ACATTTTAT CCGTCAACCA
    AATAAGGAC CAGCGACACC ACCAGCAATA TGGGATAAAC CAGCTTTCT GTAGATCCA ACTGTCCCTG CCTTAATCCA TGTGAATAA GCCAGTTGGT
                                     CS cB
~~~~~
3701  GTTTACCAGC ATTCTATTTA TGATGTCTA CCGCTTCCTT CAGGATAAAC TCGTCTGAA GAAACGCTC ATCTGGTGA TGAGTTTAT CCGGTCTTG
    CAATGTCTG TAAGATAAT ACTACAAGT GCGTAGCA GTCTATTTG AGCCAGACTT CTTGGCGAG TAGACCACAT ACTCAAGTA GGACCAAGC
                                     CS cB
~~~~~
3801  ACCGGACCGT TTATGATTA CGTTATGAA CCGTACTGC AAGCAATTT TTCTAGGT CTAATCTGG GGGCGCTATT TTTGGCTTG GGTATCTTG
    TGGCTTCCA AATACAAAT GCAATACTT GGCATGACG TTTCTGAAA AAGACATCA GATTAAGACC CCGCGCTAA AAAACCGAAC CCGTAGACC
                                     CS cB
~~~~~
3901  CCGGATGCGG TTGCTTCTAT AGCTTCACG AAAAATGCG GCGAATTTT CATTCTGAAT ATGGAACAGC GGGCGCTTG GATCTTTTG GCTATCTAT
    GCGCTAGCC AACGAACTA TCGAGTGGC TTTTTCACG CCGTTTAAA GTAAAGCTTA TACCTTGTG CCGCGCGACC CTTAGAAAC CGTACGATA
                                     CS cB
~~~~~
4001  TGGCGCGTTC TTGCGCGCA TATTTTATG TATCAGTCC CATATCACT TCGTGTGGT CTGCTATTT GCGCTGAT TTATGATGAT CAACATGCT
    ACCGCGCAG AAACGCGCT ATAAAAATC ATAGTCAGG GTATAGTTGA AGACCAACA GAGCGATAA CCGCGACATA AATACTACTA GTTGTAGCA
                                     CS cB
~~~~~
4101  TTTAAGATA AGGATACCA GTGCTAGCG CGAGTGGCG GAGGCTTAA AAAAGAGAT TTATCGCGG TTTTCAAGGA TCGAATCTC TGGGTTTTG
    AAATTTCTAT TCTAGTGGT CAGCGACCG CTTCTACGC CTCCCATTT TTTCTCTA AAATAGCGC AAAAGTTCT AGCTTTGAG ACCCAAAAGC
                                     CS cB
~~~~~
4201  TCATATTTAT TGTGGGAGC TGTCTTTCT ATAACATTT TGATCAACA CTTTTCTG TCTTTTATC AGGTTTATC GAATCAGC AGTAGGAAC
    AGTATAATA ACACCCCTGC ACCAGAAAG TATTGTAAG ACTAGTTGT GAAAAGGAC AGAAATAAG TCCAATAG CITAGTGTG TACATCTTG
                                     CS cB
~~~~~
4301  GCGCTGTAT GTTACTCA ATCATCTCA GGTGTAATC GAGCGCTGT GATGGCGAT TATCTCTTC TTTGCAATC GGTAGCGCC AAAAATGCA
    CCGCGACATA CCAATAGAT TGAGTAGGT CCACATGAG CTTCGCGACA CTAACGCTA ATAAGGAAAG AAACACTAG CCAATCCCG TTTTTCGT
                                     CS cB
~~~~~
4401  TTACTTATG GAGTTGTGAT TATGCGTGT GTATCTTTT CCGCGCGCT GTTCTTAA CCGTGGATTA TTTGATTAGT GAATGTGTA CATGCCATT
    AATGAATAG CTACACTA ATACCGAAC GATAGGAAA GACCGCGCA CAGCAATTG GAGCTTAA AAGTAATCA CTTCACAAT GTACGTAAC
                                     CS cB
~~~~~
4501  AGGTTCCACT TTGTGCTA TCGTCTTCA AATACAGGT GCGCACTTT GATAAGGCG TTTCTGCGC GATTTTCTG ATGCTTTTC AATGCGAG
    TCGAGGTGA AACACGAT AGGCAAGT TTATGTCGA CCGTTTAAA CTATTGCGG ACAGCGCTG CTAGAAAGC TAACCAAG TTAACCGTC
                                     CS cB
~~~~~

```

图 55(续)

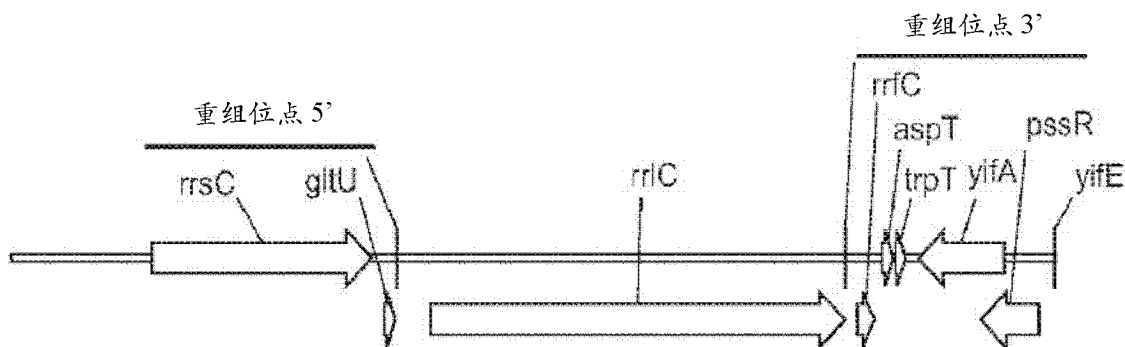
```

4501   TTGCTTGGG ATTGTGCTGC TTTCACGCC GACTGGGATA CTCTTTGACC ACGCAGGCTA CCAGACAGTT TTCTTCGCCA TTTCGGGTAT TGTCTGCCCTG
      AAGCGAAGCC TACACGAGCG AAGCTTGGCG CTGACCCCTAT GAGAACTGG TCGTCCGAT GGTCTGTCAA AAGAGCGGT AAAGCCGATA ACAGACGGAC
      cscB
      ~~~~~
4701   ATGTTGCTAT TTGGCATTIT CTCTTGAGT AAAAAAGCG AGCAATAGT TATGAAACG CTTGTACCTT CAGCAATATA GAGGTAAACT TTTTCGGTT
      TACAACGATA AACCGTAAAA GAAGAACTCA TTTTTCGCG TCGTTTATCA ATACCTTTGC GACATGGAA GTGTTTATAT CTGCATTGCA AAAGGCCAA
4801   GTTGTGATA GCTCTATATC CCTCAACCGG AAAATAATAA TAGTAAATG CTTAGCCCTG CTANTAATCG CTAATCCAA ACGCCTCATT CATGTTCTCG
      CACAGCTAT CGAGATATAG GGACTTGGCC TTTTATTATT ATCATTTTAC GAATCGGGAC GATTATTAGC GGATTAGGTT TCGGGAGTAA GTACAAGACC
4901   TACACTGCTT CAATGTACT TCAGATGCGC GGTTCGCTGA TTCCAGGAC ATTGTGCTCA TTCAGTGACC TGTCCGCTGT ATCAGCTCC TCGGAATCA
      ATGTCAGCA GTTTACATCA AGTCTACCG CCAAGCGACT AAAGGTCTG TAACAGCAGT AAGTCACTGG ACAGGGCACA TAGTGCCAGG ACGCTTAAGT
5001   TCAAGGAATG CATTGCGGAG TGAAGTATCG AGTCAGCCA TATTTGCTCA CCGAAGATG AGTTTGGAGA TATTAGGCA GTGACTTTC ACTCACA
      AGTTCCTTAC GTAACGCTC ACTTCATAG TCAGTGGCGT ATAAAGCAGT GGGCTTCTAC TCAAACTCT ATATTCCTGT CCACTGAAAG TGAGTGT
      ~~~~~

```

反义_PRM

图 55(续)



rrnC 操纵子@2
7330 bp

图 56

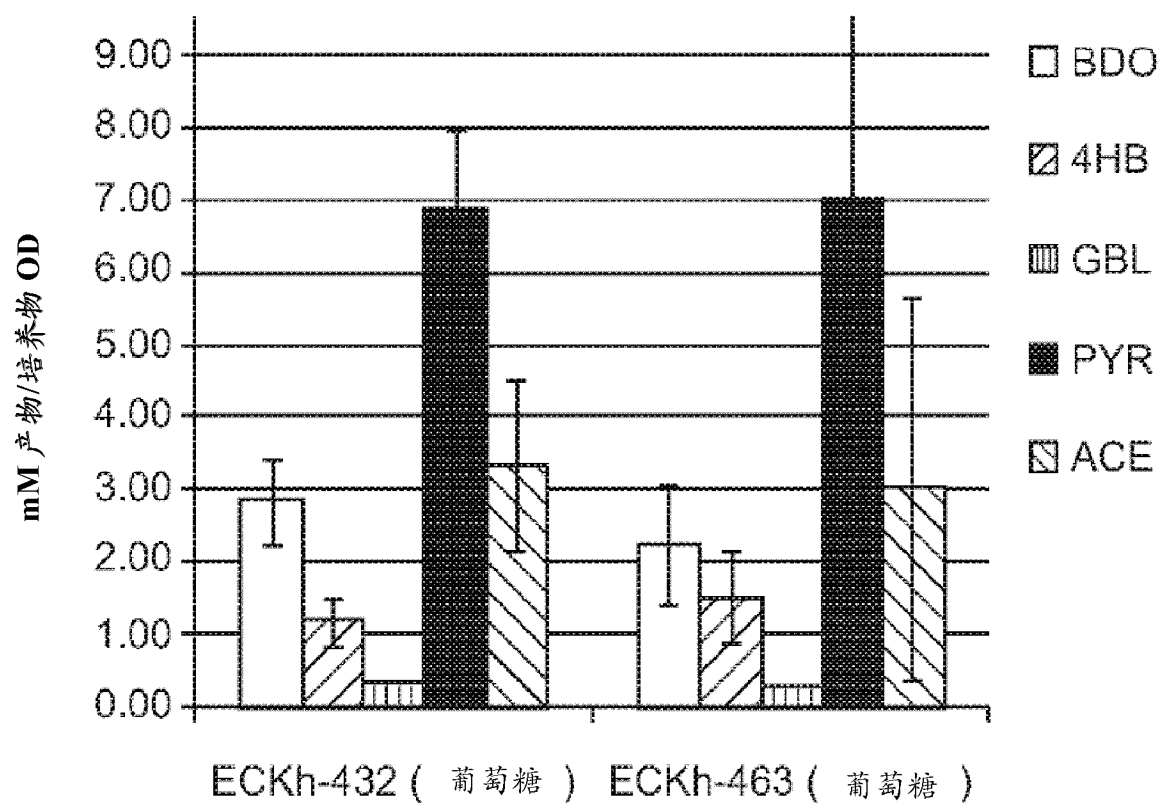


图 57