



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110475851 A

(43)申请公布日 2019.11.19

(21)申请号 201880019539.8

(22)申请日 2018.01.26

(30)优先权数据

1750696 2017.01.27 FR

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/052004 2018.01.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/138288 FR 2018.08.02

(71)申请人 伊诺布拉克

地址 法国拉蒙维尔圣阿尼

(72)发明人 C·布瓦萨德 N·莫林

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494  
代理人 封新琴

(51)Int.Cl.

C12N 1/13(2006.01)

C12N 1/15(2006.01)

C12N 1/19(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 15/52(2006.01)

C12N 9/88(2006.01)

C12N 9/12(2006.01)

C12N 9/04(2006.01)

C12N 9/02(2006.01)

C12N 9/18(2006.01)

C12N 9/10(2006.01)

权利要求书1页 说明书24页

序列表3页 附图2页

(54)发明名称

用于产生感兴趣的分子的经基因优化的微生物

(57)摘要

本发明涉及一种表达功能性I型或II型RuBisCO酶和功能性磷酸核酮糖激酶(PRK)的经遗传修饰的微生物,且在该微生物中戊糖磷酸途径的非氧化分支至少部分地受抑制,所述微生物经遗传修饰使得它产生外源性分子和/或过产生内源性分子。本发明进一步涉及此类经遗传修饰的微生物用于产生或过产生感兴趣的分子的用途,且涉及用于合成或生物转化感兴趣的分子的方法。

1. 一种经遗传修饰的微生物,其表达功能性RuBisCO酶和功能性磷酸核酮糖激酶(PRK),且在该微生物中戊糖磷酸途径的非氧化分支至少部分地受抑制,所述微生物经遗传修饰以产生除RuBisCO酶和/或磷酸核酮糖激酶(PRK)之外的外源性的感兴趣的分子和/或过产生内源性的感兴趣的分子。

2. 根据权利要求1的经遗传修饰的微生物,所述微生物经遗传修饰以表达重组RuBisCO酶和/或PRK。

3. 根据权利要求1或2的经遗传修饰的微生物,所述微生物经遗传修饰以抑制核酮糖-5-磷酸产生下游的戊糖磷酸途径的非氧化分支。

4. 根据前述权利要求中任一项的经遗传修饰的微生物,其中编码转醛醇酶(E.C.2.2.1.2)和/或转酮醇酶(E.C.2.2.1.1)的基因的表达至少部分地受抑制。

5. 根据前述权利要求中任一项的经遗传修饰的微生物,其中该外源性的感兴趣的分子和/或该内源性的感兴趣的分子选自氨基酸、肽、蛋白质、维生素、甾醇、类黄酮、萜、类萜、脂肪酸、多元醇和有机酸。

6. 根据前述权利要求中任一项的经遗传修饰的微生物,所述微生物是真核细胞,优选地选自酵母、真菌、微藻、或原核细胞,优选细菌。

7. 根据前述权利要求中任一项的经遗传修饰的微生物,所述微生物是属酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的酵母,所述酵母经遗传修饰以表达功能性I型或II型RuBisCO和功能性磷酸核酮糖激酶(PRK),且在该酵母中TAL1和/或NQM1基因的表达至少部分地受抑制。

8. 根据前述权利要求中任一项的经遗传修饰的微生物用于产生或过产生除RuBisCO酶和/或磷酸核酮糖激酶(PRK)之外的感兴趣的分子的用途,该感兴趣的分子优选地选自氨基酸、肽、蛋白质、维生素、甾醇、类黄酮、萜、类萜、脂肪酸、多元醇和有机酸。

9. 用于产生除RuBisCO酶和/或磷酸核酮糖激酶(PRK)外的至少一种感兴趣的分子的生物技术方法,其特征在于所述方法包括在允许由所述微生物合成或生物转化所述感兴趣的分子的条件培养根据权利要求1-8中任一项的经遗传修饰的微生物的步骤,和任选的回收和/或纯化所述感兴趣的分子的步骤。

10. 根据权利要求9的生物技术方法,其中所述微生物根据所述生物技术方法被遗传修饰以表达至少一种涉及所述感兴趣的分子的生物转化或合成的酶。

11. 根据权利要求9或10的生物技术方法,其中所述微生物根据所述生物技术方法被遗传修饰以至少部分地抑制涉及所述感兴趣的分子的降解的酶。

12. 用于产生除RuBisCO酶和/或磷酸核酮糖激酶(PRK)之外的感兴趣的分子的方法,所述方法包括(i)将至少一个编码涉及所述感兴趣的分子的合成或生物转化的酶的序列插入根据权利要求1-8中任一项所述的重组微生物中,(ii)在允许表达所述酶的条件下培养所述微生物,和任选的(iii)回收和/或纯化所述感兴趣的分子。

13. 用于产生除RuBisCO酶和/或磷酸核酮糖激酶(PRK)之外的感兴趣的分子的方法,所述方法包括(i)在根据权利要求1-8中任一项所述的重组微生物中抑制至少一个编码涉及降解所述感兴趣的分子的酶的基因的表达,(ii)在允许表达所述酶的条件下培养所述微生物,和任选的(iii)回收和/或纯化所述感兴趣的分子。

## 用于产生感兴趣的分子的经基因优化的微生物

### 发明领域

[0001] 本发明涉及一种用于产生感兴趣的分子的经遗传修饰的微生物,其能够使用二氧化碳作为至少部分碳源。更具体地,本发明涉及一种其中至少戊糖磷酸途径的非氧化分支至少部分地受抑制的微生物。本发明还涉及使用此类微生物来产生至少一种感兴趣的分子的方法。

### [0002] 技术现状

[0003] 在过去的几年里,已经开发了许多微生物学方法以能够大量产生感兴趣的分子。

[0004] 例如,发酵方法用于通过微生物从可发酵的碳源(诸如葡萄糖)产生分子。

[0005] 还已经开发了生物转化方法以允许微生物将不能由微生物同化的共基质转变为感兴趣的分子。此时,对于实际产生感兴趣的分子,碳源不是必需的,但对于产生辅因子(且更特别的是NADPH,其是生物转化所必需的),碳源是必需的。通常,此类微生物学方法的产率低,主要是由于需要辅因子和平衡氧化还原代谢反应的困难。还存在此类分子的成本价格的问题,因为可被微生物同化的碳源仍是必需的。换句话说,目前,为了利用微生物学方法产生感兴趣的分子,必须提供确实具有较低工业价值的分子(葡萄糖或其它),但这足以使某些分子的生产在经济上不具有吸引力。

[0006] 同时,在目前的微生物学方法中很少使用(如果发生的话)二氧化碳(CO<sub>2</sub>,其在大气中的排放是不断增加的),而用于产生感兴趣的分子的微生物的二氧化碳消耗将不仅降低生产成本,还会解决某些生态问题。

[0007] 因此,仍需要能够以比目前方法更低的成本价格来大量产生感兴趣的分子的微生物学方法。

### [0008] 发明概述

[0009] 已经证明了使用经遗传修饰以与植物和光合微生物相同的方式来捕获CO<sub>2</sub>并将其用作主要碳源的非光合微生物的优势。例如,已经开发了经修饰以表达功能性RuBisCO(核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶-EC 4.1.1.39)和功能性PRK(磷酸核酮糖激酶-EC 2.7.1.19)以通过捕获二氧化碳分子再现卡尔文循环且将核酮糖-5-磷酸转变为两个3-磷酸甘油酸分子的微生物。

[0010] 通过利用由卡尔文循环提供的策略以使用CO<sub>2</sub>作为碳源来产生感兴趣的分子,发明人发现通过将卡尔文循环的一部分(PRK/RuBisCO)与戊糖磷酸途径的非氧化分支的至少部分抑制相偶联,有可能增加感兴趣的分子的产率。有趣的是,在产生核酮糖-5-磷酸的下游有利地进行的此抑制促进微生物对外源性CO<sub>2</sub>的消耗。因此,开发的微生物使得大规模且以工业上具有吸引力的产率产生大量感兴趣的分子(诸如氨基酸、有机酸、萜(terpene)、类萜(terpenoid)、肽、脂肪酸、多元醇等)成为可能。

[0011] 因此,本发明涉及一种表达功能性RuBisCO酶和功能性磷酸核酮糖激酶(PRK)的经遗传修饰的微生物,且在该微生物中戊糖磷酸途径的非氧化分支至少部分地受抑制,所述微生物经遗传修饰以便产生除RuBisCO和/或磷酸核酮糖激酶(PRK)酶之外的外源性的感兴趣的分子和/或以过产生内源性的感兴趣的分子。

[0012] 本发明还涉及根据本发明的经遗传修饰的微生物用于产生或过产生除RuBisCO酶和/或磷酸核酮糖激酶 (PRK) 之外的感兴趣的分子的用途,所述感兴趣的分子优选地选自氨基酸、肽、蛋白质、维生素、甾醇、类黄酮、萜、类萜、脂肪酸、多元醇和有机酸。

[0013] 本发明还涉及用于产生或过产生除RuBisCO酶和/或磷酸核酮糖激酶 (PRK) 之外的至少一种感兴趣的分子的生物技术方法,所述生物技术方法的表征在于它包括在允许通过根据本发明的经遗传修饰的微生物合成或生物转化所述感兴趣的分子的条件下培养所述微生物的步骤,和任选的回收和/或纯化所述感兴趣的分子的步骤。

[0014] 它还涉及用于产生除RuBisCO酶和/或磷酸核酮糖激酶 (PRK) 之外的感兴趣的分子的方法,所述方法包括 (i) 将至少一个编码涉及合成或生物转化所述感兴趣的分子的酶的序列插入根据本发明的重组微生物中, (ii) 在允许表达所述酶的条件下培养所述微生物,和任选的 (iii) 回收和/或纯化所述感兴趣的分子。

[0015] 附图简述

[0016] 图1:根据本发明的糖酵解、恩特纳-杜德洛夫途径和戊糖磷酸途径的示意图,其显示对戊糖磷酸途径的非氧化分支的抑制;

[0017] 图2:根据本发明的糖酵解和戊糖磷酸途径的示意图,其显示对戊糖磷酸途径的非氧化分支的抑制和PRK和RuBisCO对核酮糖-5-磷酸的管理。

[0018] 发明详述

[0019] 定义

[0020] 术语“重组微生物”、“经修饰的微生物”和“重组宿主细胞”在本文中可互换地使用,且是指已经经遗传修饰以表达或过表达内源性核苷酸序列,以表达异源核苷酸序列的微生物,或指内源性基因的表达改变的微生物。“改变”意指调控编码一个或多个多肽或多肽亚基的基因的表达,或编码一个或多个多肽或多肽亚基的RNA分子或等同RNA分子的水平,或一个或多个多肽或多肽亚基的活性,使得所述表达、水平或活性比在缺少修饰的情况下观察到的表达、水平或活性更高或更低。

[0021] 应理解术语“重组微生物”、“经修饰的微生物”和“重组宿主细胞”不仅是指特定的重组微生物,还指此类微生物的后代或潜在的后代。因为由于突变或环境影响可在随后的世代中发生一些修饰,所以这些后代可与母细胞不同,但在可理解它们仍本文所用的术语的范围内。

[0022] 在本发明的上下文中,至少部分地“受抑制的”或“失活的”代谢途径是指相较于相同野生型微生物(未经遗传修饰以抑制所述代谢途径),在所考虑的微生物中不再适当地起作用的经改变的代谢途径。特别地,代谢途径可被中断,这导致中间代谢产物的积累。例如,可通过抑制所考虑的代谢途径的中间代谢产物的降解所必需的酶和/或抑制编码此酶的基因的表达来实现此类中断。代谢途径还可被减弱,即减慢(slow down)。例如,可通过部分地抑制一个或多个涉及所考虑的代谢途径的酶,和/或部分地抑制编码这些酶中的至少一个的基因的表达,和/或通过开发某些反应所需的辅因子来实现此类减弱。表述“至少部分地受抑制的代谢途径”意指相较于野生型微生物中代谢途径的水平,所考虑的代谢途径的水平被降低至少20%,更优选为至少30%、40%、50%或更多。所述降低可以更大,且特别是至少大于60%、70%、80%、90%。根据本发明,在所考虑的代谢途径根本不再被所述微生物使用的意义上,抑制可以是完全的。根据本发明,此类抑制可能是暂时的或永久的。

[0023] 根据本发明,“基因表达的抑制”意指相较于野生型微生物(未经遗传修饰以抑制基因表达的),在所考虑的微生物中不再表达该基因,或其表达是降低的,这导致缺少相应的蛋白质的产生或导致该蛋白质的产生显著降低,特别是多于20%,更优选为30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%的降低。在一个实施方案中,抑制可以是完全的,即根本不再产生由所述基因编码的蛋白质。可通过在所考虑的基因中缺失、突变、插入和/或替代一个或多个核苷酸来实现基因表达的抑制。优选地,通过完全缺失相应的核苷酸序列来实现基因表达的抑制。根据本发明,可使用本身本领域技术人员已知的且适用于微生物的任何基因抑制的方法。例如,基因表达的抑制可通过以下实现:同源重组(Datsenko等,Proc Natl Acad Sci U S A.2000;97:6640-5;Lodish等,Molecular Cell Biology4<sup>th</sup> ed.2000.W.H.Freeman and Company.ISBN0-7167-3136-3);随机或定向诱变以修饰基因表达和/或编码的蛋白质的活性(Thomas等,Cell.1987;51:503-12);修饰基因的启动子序列以改变其表达(Kaufmann等,Methods Mol Biol.2011;765:275-94.doi:10.1007/978-1-61779-197-0\_16);靶向基因组中诱导的局部损伤(TILLING);缀合等。另一特定的方法是通过插入天然或人工来源的外源序列(例如通过使用可移动的遗传元件(转座子)的转座子诱变)进行基因失活。根据另一优选的实施方案,基因表达的抑制是通过敲除技术实现的。还可通过使用干扰RNA、核酶或反义RNA沉默(extinguish)基因来实现基因表达的抑制(Daneholt,2006.Nobel Prize in Physiology or Medicine)。在本发明的上下文中,术语“干扰RNA”或“iRNA”是指可阻断靶基因的表达和/或促进相应的mRNA的降解的任何iRNA分子(例如单链的RNA或双链的RNA)。基因抑制还可通过允许对指定基因组进行定向遗传修饰的基因组编辑方法通过使用以下核酸酶来实现:锌指核酸酶(Kim等,PNAS;93:1156-1160),转录激活因子样效应物核酸酶或“TALEN”(Ousterout等,Methods Mol Biol.2016;1338:27-42.doi:10.1007/978-1-4939-2932-0\_3),Cas9核酸酶与规律间隔成簇短回文重复序列或“CRISPR”组合的系统(Mali等,Nat Methods.2013Oct;10(10):957-63.doi:10.1038/nmeth.2649),或大范围核酸酶(Daboussi等,Nucleic Acids Res.2012.40:6367-79)。还可通过使由所述基因编码的蛋白质失活来实现基因表达的抑制。

[0024] 在本发明的上下文中,“NADPH依赖性”或“NADPH消耗性”生物合成或生物转化意指其中一种或多种酶需要伴随供应通过NADPH辅因子的氧化获得的电子的所有生物合成或生物转化途径。“NADPH依赖性”生物合成或生物转化途径尤其涉及合成氨基酸(例如精氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、脯氨酸、谷氨酸、高丝氨酸、异亮氨酸、缬氨酸)、类萜和萜(例如法呢烯)、维生素和前体(例如泛解酸(pantoate)、泛酸、反式链孢红素、叶绿醌、生育酚)、甾醇(例如鲨烯、胆固醇、甾酮、孕酮、可的松)、类黄酮(例如羟基苯丙酮(frambinone)、vestinone)、有机酸(例如香豆酸、3-羟基丙酸)、多元醇(例如山梨醇、木糖醇、甘油)、多胺(例如亚精胺)、经由NADP依赖性细胞色素p450的来自立体特异性羟化的芳香族分子(例如苯丙素、萜、脂质、鞣酸类(tannins)、芳香剂、激素)。

[0025] 如本文所用的提及多种分子(核苷酸序列、肽、酶等)的术语“外源性”是指在所考虑的微生物中存在的或由所考虑的微生物非正常或天然产生的分子。相反地,术语“内源性”或“天然的”是指多种分子(核苷酸序列、肽、酶等),其指代在所考虑的微生物中存在的或由所考虑的微生物正常或天然产生的分子。

[0026] 微生物

- [0027] 本发明提出了用于产生内源性或外源性的感兴趣的分子的经遗传修饰的微生物。
- [0028] “经遗传修饰的”微生物意指微生物的基因组已经经修饰以并入编码涉及感兴趣的分子的生物合成或生物转化途径的酶的核酸序列或编码其生物学活性片段的核酸序列。可能已经通过任何合适的分子克隆方法将所述核酸序列引入所述微生物或其祖先之一的基因组中。在本发明的上下文中,微生物的基因组是指微生物中含有的所有遗传材料,包括例如质粒、附加体、合成性染色体等中含有的染色体外遗传材料。引入的核酸序列可以是异源序列(即不在所述微生物中天然存在的序列)或同源序列。有利地,在一个或多个启动子的控制下,具有感兴趣的核酸序列的转录单元被引入微生物的基因组中。此类转录单元还有利地包括常见的序列诸如转录终止子,和(如果需要的话)其他转录调控元件。
- [0029] 本发明中可使用的启动子包括组成型启动子,即在大部分细胞状态和环境条件下有活性的启动子,以及通过外源性物理或化学刺激来活化或抑制且因此取决于这些刺激的存在或缺少而诱导表达的可变状态的诱导型启动子。例如,当微生物是酵母时,可以使用组成型启动子,诸如TEF1、TDH3、PGI1、PGK、ADH1中的基因启动子。可在酵母中使用的诱导型启动子的实例是tet0-2、GAL10、GAL10-CYC1、PH05。
- [0030] 通常,根据本发明的经遗传修饰的微生物具有以下特征:
- [0031] -表达功能性RuBisCO (EC 4.1.1.39);
- [0032] -表达功能性PRK (EC 2.7.1.19);
- [0033] -至少部分地抑制戊糖磷酸途径的非氧化分支;和
- [0034] -表达至少一种涉及感兴趣的分子的合成和/或生物转化的基因,和/或抑制至少一种编码与感兴趣的分子的合成和/或生物转化竞争的活性的基因。
- [0035] 根据本发明,可使用任何微生物。优选地,所述微生物是真核细胞,其优选地选自酵母、真菌、微藻或原核细胞,其优选为细菌或蓝细菌。
- [0036] 在一个实施方案中,根据本发明的经遗传修饰的微生物是酵母,其优选地选自子囊菌纲(ascomycete)(蚀精霉科(Spermophthoraceae)和酵母菌科(Saccharomycetaceae)、担子菌纲(basidiomycete)(白冬孢酵母属(Leucosporidium)、红冬孢酵母属(Rhodosporidium)、锁掷酵母属(Sporidiobolus)、丝状黑粉酵母属(Filobasidium)和线黑粉菌属(Filobasidiella)和属于不完全菌纲(Fungi imperfecti)的半知菌纲酵母(掷孢酵母科(Sporobolomycetaceae)和隐球酵母科(Cryptococcaceae))。优选地,根据本发明的经遗传修饰的酵母属于毕赤酵母属(Pichia)、克鲁维酵母属(Kluyveromyces)、酵母菌属(Saccharomyces)、裂殖酵母属(Schizosaccharomyces)、念珠菌属(Candida)、油脂酵母属(Lipomyces)、红酵母属(Rhodotorula)、红冬孢酵母属(Rhodosporidium)、耶氏酵母属(Yarrowia)或德巴利氏酵母属(Debaryomyces)。更优选地,根据本发明的经遗传修饰的酵母选自巴斯德毕赤酵母(Pichia pastoris)、乳酸克鲁维酵母(Kluyveromyces lactis)、马克思克鲁维酵母(Kluyveromyces marxianus)、酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、卡尔酵母(Saccharomyces carlsbergensis)、糖化酵母(Saccharomyces diastaticus)、道格拉氏酵母(Saccharomyces douglasii)、克鲁弗酵母(Saccharomyces kluyveri)、诺地酵母(Saccharomyces norbensis)、卵形酵母(Saccharomyces oviformis)、粟酒裂殖酵母(Schizosaccharomyces pombe)、白色念珠菌(Candida albicans)、热带念珠菌(Candida tropicalis)、胶红类酵母菌(Rhodotorula

glutinis)、圆红冬孢酵母(*Rhodosporidium toruloides*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、汉氏德巴利氏酵母(*Debaryomyces hansenii*)和斯达油脂酵母菌(*Lipomyces starkeyi*)。

[0037] 在另一实施方案中,根据本发明的经遗传修饰的微生物是真菌,且更特别是“丝状”真菌。在本发明的上下文中,“丝状真菌”是指所有丝状形式的真菌亚门(Eumycotina)。例如,根据本发明的经遗传修饰的真菌属于曲霉属(*Aspergillus*)、木霉属(*Trichoderma*)、脉孢菌属(*Neurospora*)、柄孢壳菌属(*Podospira*)、内座壳属(*Endothia*)、毛霉属(*Mucor*)、旋孢腔菌属(*Cochliobolus*)或梨孢属(*Pyricularia*)。优选地,根据本发明的经遗传修饰的真菌选自构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、泡盛曲霉(*Aspergillus awomari*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、土曲霉(*Aspergillus terreus*)、粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)和绿色木霉(*Trichoderma viride*)。

[0038] 在另一实施方案中,根据本发明的经遗传修饰的微生物是微藻。在本发明的上下文中,“微藻”是指所有真核用显微镜可见的藻类,优选地属于纲或总纲绿藻纲(*Chlorophyceae*)、金藻纲(*Chrysophyceae*)、普林藻纲(*Prymnesiophyceae*)、硅藻纲(*Diatomae*)或硅藻门(*Bacillariophyta*)、裸藻纲(*Euglenophyceae*)、红藻纲(*Rhodophyceae*)、或共球藻纲(*Trebouxiophyceae*)。优选地,根据本发明的经遗传修饰的微藻选自拟微绿球藻属种(*Nannochloropsis* sp.) (例如眼点拟微绿球藻(*Nannochloropsis oculata*)、海洋富油拟微绿球藻(*Nannochloropsis gaditana*)、盐生拟微绿球藻(*Nannochloropsis salina*))、扁藻属种(*Tetraselmis* sp.) (例如心形扁藻(*Tetraselmis suecica*)、朱氏四片藻(*Tetraselmis chuii*))、小球藻属种(*Chlorella* sp.) (例如盐生小球藻(*Chlorella salina*)、原始小球藻(*Chlorella protothecoides*)、椭圆小球藻(*Chlorella ellipsoidea*)、浮水小球藻(*Chlorella emersonii*)、微小小球藻(*Chlorella minutissima*)、蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidosa*)、*Chlorella sorokiniana*、普通小球藻(*Chlorella vulgaris*))、衣藻属种(*Chlamydomonas* sp.) (例如莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*))杜氏藻属种(*Dunaliella* sp.) (例如*Dunaliella tertiolecta*、盐生杜氏藻(*Dunaliella salina*))、*Phaeodactylum tricornutum*、丛粒藻(*Botryococcus braunii*)、*Chroomonas salina*、*Cyclotella cryptica*、小环藻属种(*Cyclotella* sp.)、*Ettlia texensis*、纤细眼虫(*Euglena gracilis*)、裸甲藻(*Gymnodinium nelsoni*)、雨生红球藻(*Haematococcus pluvialis*)、球等鞭金藻(*Isochrysis galbana*)、*Monoraphidium minutum*、单针藻(*Monoraphidium* sp.)、富油新绿藻(*Neochloris oleoabundans*)、平滑菱形藻(*Nitzschia laevis*)、*Onoraphidium* sp.、路氏巴夫藻(*Pavlova lutheri*)、三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum*)、紫球藻(*Porphyridium cruentum*)、栅藻属(*Scenedesmus* sp.) (例如斜生栅藻(*Scenedesmus obliquus*)、*Scenedesmus quadricaula*、栅藻属种(*Scenedesmus* sp.))、杆裂丝藻(*Stichococcus bacillaris*)、钝顶螺旋藻(*Spirulina platensis*)、海链藻属种(*Thalassiosira* sp.)。

[0039] 在一个实施方案中,根据本发明的经遗传修饰的微生物是细菌,优选地选自酸杆菌门(*Acidobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、产水菌门(*Aquificae*)、拟杆菌门

(Bacterioidetes)、衣原体(Chlamydia)、绿菌门(Chlorobi)、绿弯菌门(Chloroflexi)、产金菌门(Chrysiogenetes)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、脱铁杆菌门(Deferribacteres)、栖热链球菌门(Deinococcus-Thermus)、网团菌门(Dictyoglomi)、纤维杆菌门(Fibrobacteres)、硬壁菌门(Firmicutes)、梭杆菌门(Fusobacteria)、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、硝化螺旋菌门(Nitrospirae)、浮霉菌门(Planctomycetes)、变形杆菌门(Proteobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)、热脱硫杆菌门(Thermodesulfobacteria)、热微菌门(Thermomicrobia)、热袍菌门(Thermotogae)或疣微菌门(Verrucomicrobia)。优选地,根据本发明的经遗传修饰的细菌属于Acaryochloris、醋酸杆菌属(Acetobacter)、放线杆菌属(Actinobacillus)、农杆菌属(Agrobacterium)、脂环酸芽孢杆菌(Alicyclobacillus)、鱼腥藻属(Anabaena)、水花微囊藻(Anacystis)、厌氧螺菌属(Anaerobiospirillum)、产液菌属(Aquifex)、节杆菌属(Arthrobacter)、节旋藻属(Arthrospira)、固氮菌属(Azobacter)、杆菌属(Bacillus)、短杆菌属(Brevibacterium)、伯克霍尔德菌属(Burkholderia)、绿菌属(Chlorobium)、色素菌属(Chromatium)、绿棒菌属(Chlorobaculum)、梭菌属(Clostridium)、棒状杆菌属(Corynebacterium)、贪铜菌属(Cupriavidus)、蓝杆菌属(Cyanothece)、肠道细菌属(Enterobacter)、异常球菌属(Deinococcus)、欧文菌属(Erwinia)、埃希杆菌属(Escherichia)、地杆菌属(Geobacter)、粘杆菌属(Gloeobacter)、葡萄糖杆菌属(Gluconobacter)、氢杆菌属(Hydrogenobacter)、克雷白氏杆菌属(Klebsiella)、乳酸杆菌属(Lactobacillus)、乳球菌属(Lactococcus)、曼氏杆菌属(Mannheimia)、中慢生根瘤菌属(Mesorhizobium)、甲基杆菌属(Methylobacterium)、细杆菌属(Microbacterium)、微胞藻属(Microcystis)、硝化杆菌属(Nitrobacter)、亚硝化单孢菌属(Nitrosomonas)、硝化脊菌属(Nitrospina)、硝化螺菌属(Nitrospira)、念珠藻属(Nostoc)、席藻属(Phormidium)、原绿藻属(Prochlorococcus)、假单胞菌属(Pseudomonas)、罗尔斯通菌属(Ralstonia)、根瘤菌属(Rhizobium)、红细菌属(Rhodobacter)、红球菌属(Rhodococcus)、红假单胞菌属(Rhodopseudomonas)、红螺菌属(Rhodospirillum)、沙门氏菌属(Salmonella)、Scenedesmun、沙雷氏菌属(Serratia)、志贺菌属(Shigella)、葡萄球菌属(Staphylococcus)、链霉菌属(Streptomyces)、聚球菌属(Synechococcus)、集胞藻属(Synechocystis)、嗜热聚球藻属(Thermosynechococcus)、束毛藻属(Trichodesmium)或酵单胞菌属(Zymomonas)。还优选地,根据本发明的经遗传修饰的细菌选自根瘤土壤杆菌(Agrobacterium tumefaciens)、产琥珀酸厌氧螺菌(Anaerobiospirillum succiniciproducens)、产琥珀酸放线杆菌(Actinobacillus succinogenes)、超嗜热菌(Aquifex aeolicus)、嗜热菌(Aquifex pyrophilus)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、解淀粉芽孢杆菌(Bacillus amyloliquefacines)、产氨短杆菌(Brevibacterium ammoniagenes)、嗜氨短杆菌(Brevibacterium immariophilum)、巴氏固氮梭菌(Clostridium pasteurianum)、永达尔梭菌(Clostridium ljungdahlii)、丙酮丁醇梭菌(Clostridium acetobutylicum)、(Clostridium beigerinckii)、谷氨酸棒状杆菌(Corynebacterium glutamicum)、钩虫贪铜菌(Cupriavidus necator)、Cupriavidus metallidurans、阪崎肠杆菌(Enterobacter sakazakii)、大肠杆菌(Escherichia coli)、氧化葡萄糖杆菌属(Gluconobacter oxydans)、Hydrogenobacter thermophilus、奥克西托克雷白杆菌(Klebsiella oxytoca)、乳酸乳球菌(Lactococcus lactis)、植物乳杆菌

(*Lactobacillus plantarum*)、产琥珀酸曼氏杆菌 (*Mannheimia succiniciproducens*)、中慢生型百脉根根瘤菌 (*Mesorhizobium loti*)、绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、迈氏假单胞菌 (*Pseudomonas mevalonii*)、*Pseudomonas pudica*、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、菜豆根瘤菌 (*Rhizobium etli*)、荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*)、类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*)、深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*)、肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)、肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)、伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhi*)、鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*)、痢疾志贺氏菌 (*Shigella dysenteriae*)、弗氏志贺菌 (*Shigella flexneri*)、宋内志贺菌 (*Shigella sonnei*)、金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*)、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*)、运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*)、*Acaryochloris marina*、多变鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*)、钝顶螺旋藻 (*Arthrospira platensis*)、*Arthrospira maxa*、绿硫菌 (*Chlorobium tepidum*)、绿棒菌属 (*Chlorobaculum* sp.)、蓝杆藻属 (*Cyanothece* sp.)、无类囊体蓝藻 (*Gloeobacter violaceus*)、铜绿微囊藻 (*Microcystis aeruginosa*)、念珠藻 (*Nostoc punctiforme*)、原绿球藻 (*Prochlorococcus marinus*)、细长聚球藻 (*Synechococcus elongatus*)、集胞藻 (*Synechocystis* sp.)、*Thermosynechococcus elongatus*、红海束毛藻 (*Trichodesmium erythraeum*) 和沼泽红假单胞菌 (*Rhodopseudomonas palustris*)。

#### [0040] 功能性RuBisCO和功能性PRK的表达

[0041] 根据本发明,所述微生物可天然地表达功能性RuBisCO和功能性PRK。例如,光合作用微生物诸如微藻和蓝细菌就是这种情况。

[0042] 在自然界中存在若干形式的RuBisCO (Tabita等, *J Exp Bot.* 2008;59 (7) :1515-24. doi:10.1093/jxb/erm361)。第I、II和III形式催化核酮糖-1,5-二磷酸的羧化和氧化反应。第I形式存在于真核生物和细菌中。它由两种类型的亚基组成:大亚基 (RbcL) 和小亚基 (RbcS)。功能性酶复合物是由八个L亚基和八个S亚基组成的十六聚体。这些亚基的正确装配还需要至少一个特定伴侣分子的介入:RbcX (Liu等, *Nature.* 2010 Jan 14;463 (7278) :197-202. doi:10.1038/nature08651)。第II形式主要在变形菌门 (proteobacteria)、古生菌 (archaea) 和甲藻门 (dinoflagellate) 藻类中发现。其结构更简单:它是同型二聚体 (由两个相同的RbcL亚基组成)。取决于生物体,编码I型RuBisCO的基因可被称为rbcL/rbcS (例如细长聚球藻 (*Synechococcus elongatus*)) 或cbxLC/cbxSC、cfxLC/cfxSC、cbbL/cbbS (例如钩虫贪铜菌)。取决于生物体,编码II型RuBisCO的基因通常被称为cbbM (例如深红红螺菌)。第III形式存在于古生菌中。其通常以RbcL亚基的二聚体的形式或以二聚体的五聚体形式存在。取决于生物体,编码III型RuBisCO的基因可被称为rbcL (例如 *Thermococcus kodakarensis*)、cbbL (例如嗜盐古菌属种 (*Haloferax* sp.))。

[0043] 已知两类PRK:在变形菌门中发现的I类酶是八聚体,而在蓝细菌和植物中发现的II类酶是四聚体或二聚体。取决于生物体,编码PRK的基因可被称为prk (例如细长聚球藻)、prkA (例如莱茵衣藻)、prkB (例如大肠杆菌)、prk1、prk2 (例如鞘丝藻属种 (*Leptolyngbya* sp.))、cbbP (例如普通硝化杆菌 *Nitrobacter vulgaris*) 或cfxP (例如钩虫贪铜菌)。

[0044] 在所用的微生物不天然地表达功能性RuBisCO和功能性PRK的情况下,所述微生物经遗传修饰以表达异源RuBisCO和PRK。有利地,在此类情况下,转化该微生物以便将整合编

码所述蛋白质的序列和(有利地)合适的转录因子的一个或多个表达盒整合至基因组中。取决于待表达的RuBisCO的类型,还可能需要具有由该微生物表达的一个或多个伴侣蛋白,以便促进形成RuBisCO的亚基的正确装配。对于I型RuBisCO尤其如此,其中引入和表达编码特定伴侣分子(Rbcx)和通用伴侣分子(例如GroES和GroEL)的基因是获得功能性RuBisCO所必需的。申请W02015/107496详细描述了如何遗传修饰酵母以表达功能性I型RuBisCO和PRK。也可以参考GUADALUPE-MEDINA等(Biotechnology for Biofuels,6,125,2013)描述的方法。

[0045] 在一个实施方案中,所述微生物经遗传修饰以表达I型RuBisCO。在另一实施方案中,所述微生物经遗传修饰以表达II型RuBisCO。在另一实施方案中,所述微生物经遗传修饰以表达III型RuBisCO。

[0046] 作为实例,下面表1和2列出了编码RuBisCO和PRK的序列,该序列可用于转化微生物以表达功能性RuBisCO和功能性PRK。

[0047] 表1:编码RuBisCO的序列的实例

[0048]

基因	GenBank	GI	生物体
rbcL	BAD78320.1	56685098	细长聚球藻
rbcS	BAD78319.1	56685097	细长聚球藻
cbbL2	CAJ96184.1	113529837	钩虫贪铜菌
cbbS	P09658.2	6093937	钩虫贪铜菌
cbbM	P04718.1	132036	深红红螺菌
cbbM	Q21YM9.1	115502580	铁还原红育菌( <i>Rhodospirillum rubrum</i> )
cbbM	Q479W5.1	115502578	<i>Dechloromonas aromatica</i>
rbcL	O93627.5	37087684	<i>Thermococcus kodakarensis</i>
cbbL	CQR50548.1	811260688	嗜盐古菌属种 <i>Arc-Hr</i>

[0049] 表2:编码PRK的序列的实例

[0050]

基因	GenBank	GI	生物体
Prk	BAD78757.1	56685535	细长聚球藻
cfXP	P19923.3	125575	钩虫贪铜菌
PRK	P09559.1	125579	菠菜( <i>Spinacia oleracea</i> )
cbbP	P37100.1	585367	普通硝化杆菌

[0051] 戊糖磷酸途径的非氧化分支的抑制

[0052] 根据本发明,戊糖磷酸途径的非氧化分支至少部分地受抑制,使得该微生物不再能够通过戊糖磷酸途径连接糖酵解途径。

[0053] 优选地,该微生物经遗传修饰以抑制核酮糖-5-磷酸产生的下游的戊糖磷酸途径的非氧化分支(图1)。

[0054] 有利地通过至少部分抑制由微生物通常产生的转醛醇酶 (E.C.2.2.2.1.2) 来实现核酮糖-5-磷酸 (Ru5P) 产生下游的戊糖磷酸途径的非氧化分支的中断。

[0055] 转醛醇酶是催化代谢物对景天庚酮糖7-磷酸/甘油醛3-磷酸和赤藓糖-4-磷酸/果糖6-磷酸之间的转移酶型反应的酶。

[0056] 取决于生物体, 编码转醛醇酶的基因被称为tal、talA、talB (例如大肠杆菌、集胞藻属种中的基因)、TALD0、TALD01、TALDOR (例如智人 (*Homo sapiens*)、小鼠 (*Mus musculus*) 中的基因)、TAL1 (例如酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中的)、TAL2 (例如念珠藻中的)、talA1、talA2 (例如解没食子酸链球菌 (*Streptococcus gallolyticus*))、talB1、talB2 (例如棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*)) 或NQM1 (例如酿酒酵母中的)。

[0057] 可替换地或另外地, 可通过至少部分抑制由该微生物正常产生的转酮醇酶 (E.C.2.2.2.1.1) 而获得核酮糖-5-磷酸 (Ru5P) 产生下游的戊糖磷酸途径的非氧化分支的中断。

[0058] 转酮醇酶是催化代谢物对景天庚酮糖-7-磷酸/甘油醛3-磷酸和核糖-5-磷酸/木酮糖-5-磷酸之间的, 以及代谢物对果糖-6-磷酸/甘油醛3-磷酸和赤藓糖-4-磷酸/木酮糖-5-磷酸之间的转移酶反应的酶。取决于生物体, 编码转酮醇酶的基因被称为TKL、TKL1、TKL2 (例如酿酒酵母)、tklA、tklB (例如类球红细菌)、tktA、tktB (例如大肠杆菌)、TKT、TKT1、TKT2 (例如智人、盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*))、或TKTL1、TKTL2 (例如牛 (*Bos taurus*)) 或cbbT、cbbTC、cbbTP (例如钩虫贪铜菌、聚球藻属种 (*Synechococcus sp.*))。

[0059] 在一个特定的实施方案中, 该微生物是经遗传修饰的, 使得编码转醛醇酶的基因的表达至少部分地受抑制。优选地, 基因表达完全地受抑制。可替换地或另外地, 该微生物是经遗传修饰的, 使得编码转酮醇酶的基因的表达至少部分地受抑制。优选地, 基因表达完全地受抑制。

[0060] 作为实例, 下面表3和4列出了编码转醛醇酶或转酮醇酶的序列, 所述转醛醇酶或转酮醇酶可取决于靶微生物而受抑制。技术人员已知取决于微生物哪些基因对应于待抑制的感兴趣的酶。

[0061] 表3: 编码转醛醇酶的序列的实例

[0062]

基因	GenBank	GI	生物体
TAL1	P15019.4	1729825	酿酒酵母
NQM1	P53228.1	1729826	酿酒酵母
talA	BAA21821.1	2337774	大肠杆菌
talB	BAA16812.1	1651885	集胞藻属种

[0063] 表4: 编码转酮醇酶的序列的实例

[0064]

基因	GenBank	GI	生物体
TKL1	NP_015399.1	6325331	酿酒酵母
TKL2	NP_009675.3	398364879	酿酒酵母
tktA	AAA69102.1	882464	大肠杆菌
cbbT	AHF62567.1	572996306	集胞藻属种

[0065] 通常,在根据本发明的经遗传修饰的微生物中,戊糖磷酸途径和糖酵解途径之间的连接不再可能通过戊糖磷酸途径的非氧化分支,或是至少显著降低的。

[0066] 在特定的示范性实施方案中,该微生物是属酿酒酵母的酵母,其中NQM1和/或TAL1基因的表达至少部分地受抑制。

[0067] 在另一特定的示范性实施方案中,该微生物是大肠杆菌属的细菌,其中talA基因的表达至少部分地受抑制。

[0068] 根据本发明,该经遗传修饰的微生物(其表达功能性RuBisCO和功能性PRK,且其戊糖磷酸途径的非氧化分支至少部分地受抑制)不再能够经由戊糖磷酸连接糖酵解途径。在另一方面,其能够经由PRK和RuBisCO的异源表达,从由戊糖磷酸途径的氧化分支合成的Ru5P产生甘油醛-3-磷酸(G3P),同时固定另外的碳分子(图2)。

[0069] 因此,该经遗传修饰的微生物能够使用外源CO<sub>2</sub>(特别是大气CO<sub>2</sub>)作为补充碳源经由戊糖磷酸途径的氧化分支产生NADPH,且经由PRK和RuBisCO的异源表达产生G3P。

[0070] 因此,根据本发明的经遗传修饰的微生物通过固定和使用外源CO<sub>2</sub>来增加碳产率用于产生NADPH和G3P(以及随后的感兴趣的分子)成为可能。同样地,碳产率也有所增加。

[0071] 恩特纳-杜德洛夫(Entner-Doudoroff)途径的抑制

[0072] 在一个特定的实施方案中,根据本发明的经遗传修饰的微生物具有恩特纳-杜德洛夫途径,并且其至少部分地受抑制。此途径(其主要发现于细菌中,尤其是革兰氏阴性细菌)是糖酵解和戊糖途径的用于从葡萄糖产生丙酮酸的可替换途径。更确切地说,此途径在P-葡萄糖酸处连接至戊糖磷酸途径以供给糖酵解,特别是在丙酮酸处。

[0073] 优选地,该微生物经遗传修饰以抑制6-磷酸葡萄糖酸产生下游的恩特纳-杜德洛夫途径反应。此抑制消除可能的竞争途径,且确保6-磷酸葡萄糖酸作为底物用于PRK/RuBisCO工程化的可用性。

[0074] 6-磷酸葡萄糖酸产生下游的恩特纳-杜德洛夫途径的中断特异性靶向丙酮酸合成过程中从6-磷酸葡萄糖酸起始的一个或多个反应。此合成通过两种酶的连续作用起始:(i) 6-磷酸葡萄糖酸脱水酶(“EDD”-EC.4.2.1.12),和(ii) 2-脱氢-3-脱氧-磷酸葡萄糖酸醛缩酶(“EDA”-E.C.4.1.2.14)。

[0075] 6-磷酸葡萄糖酸脱水酶催化6-磷酸葡萄糖酸脱水为2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸。取决于生物体,编码6-磷酸葡萄糖酸脱水酶的基因被称为edd(GenBank NP\_416365,例如,大肠杆菌中的),或ilvD(例如,分支杆菌属种(Mycobacterium sp.)中的)。

[0076] 2-脱氢-3-脱氧-磷酸葡萄糖酸醛缩酶催化从由6-磷酸葡萄糖酸脱水酶产生的2-酮-3-脱氧-6-磷酸葡萄糖酸合成丙酮酸分子和甘油醛-3-磷酸分子。取决于生物体,编码2-脱氢-3-脱氧-磷酸葡萄糖酸醛缩酶的基因可被称为eda(GenBank NP\_416364,例如,在大肠杆菌中的),或kdgA(例如Thermoproteus tenax中的),或dgaF(例如鼠伤寒沙门氏菌中的)。

[0077] 在一个特定的实例中,该微生物经遗传修饰,使得编码6-磷酸葡萄糖酸脱水酶的基因的表达至少部分地受抑制。优选地,基因表达完全地受抑制。

[0078] 可替换地或另外地,该微生物经遗传修饰,使得编码2-脱氢-3-脱氧-磷酸葡萄糖酸醛缩酶的基因的表达至少部分地受抑制。优选地,基因表达完全地受抑制。

[0079] 作为实例,下面表5和6列出了编码6-磷酸葡萄糖酸脱水酶和2-脱氢-3-脱氧-磷酸葡萄糖酸醛缩酶的序列,所述6-磷酸葡萄糖酸脱水酶和2-脱氢-3-脱氧-磷酸葡萄糖酸醛缩

酶可取决于靶微生物受抑制。技术人员知晓取决于微生物哪个基因对应于待抑制的感兴趣的酶。

[0080] 表5:编码EDD的序列的实例

[0081]

基因	GenBank	GI	生物体
edd	NP_416365.1	16129804	大肠杆菌
ilvD	CND70554.1	893638835	结核分枝杆菌 ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> )
edd	AJQ65426.1	764046652	肠道沙门氏菌

[0082] 表6:编码EDA的序列的实例

[0083]

基因	GenBank	GI	生物体
eda	AKF72280.1	817591701	大肠杆菌
kdgA	Q704D1.1	74500902	<i>Thermoproteus tenax</i>
eda	068283.2	81637643	绿脓假单胞菌

[0084] 通常,在此实施方案中,丙酮酸产生不再可能经由恩特纳-杜德洛夫途径,或是至少显著减少的。

[0085] 在特定的示例性实施方案中,该微生物是其中edd基因的表达至少部分地受抑制的属大肠杆菌的细菌。

[0086] 在一个特定的实例中,所述属大肠杆菌的细菌经遗传修饰,使得talA和edd基因的表达至少部分地受抑制。

[0087] 根据本发明,所述经遗传修饰的微生物(其表达功能性RuBisCO和功能性PRK,且其戊糖磷酸途径的非氧化分支和恩特纳-杜德洛夫途径至少部分地受抑制)不再能够通过恩特纳-杜德洛夫途径或戊糖磷酸途径产生丙酮酸。因此,在NADPH的产生期间来自葡萄糖的碳通量优选地针对PRK/RuBisCO工程化。

[0088] 感兴趣的分子的产生

[0089] 根据本发明,所述经遗传修饰的微生物被转化以产生外源性的感兴趣的分子和/或以便过产生内源性的感兴趣的分子。

[0090] 在本发明的上下文中,感兴趣的分子优选地是指分子量小于或等于0.8kDa的有机小分子。

[0091] 通常,如上所述的对所述微生物进行的遗传修饰改善感兴趣的分子的合成和/或生物转化途径的碳产率。

[0092] 在本发明的上下文中,“改善的”产量是指成品的量。通常,在本发明的上下文中,碳产率对应于成品的量与可发酵糖的比率,特别是按重量计的量。根据本发明,置于相同培养条件下,相较于野生型微生物,根据本发明的经遗传修饰的微生物中的碳产率是增加的。有利地,碳产率增加了2%、5%、10%、15%、18%、20%、或更多。根据本发明的经遗传修饰的微生物可产生比一种由经遗传修饰以仅产生或过产生异源分子的微生物产生的该异源

分子更大量的感兴趣的分子(成品)。根据本发明,相较于野生型微生物,所述经遗传修饰的微生物还可过产生内源性分子。内源性分子的过产生主要是根据量来理解的。有利地,所述经遗传修饰的微生物产生比野生型微生物多至少20%、30%、40%、50%、或更多按重量计的内源性分子。有利地,根据本发明的微生物经遗传修饰以便产生或过产生氨基酸、萜、类萜、维生素和/或维生素前体、甾醇、类黄酮、有机酸、多元醇、多胺、经由NADP依赖性细胞色素p450等从立体特异性羟基化获得的芳香族分子中的至少一种分子。

[0093] 在一个特定的实例中,该微生物经遗传修饰以过产生至少一种氨基酸,优选地选自精氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苏氨酸、脯氨酸、谷氨酸、高丝氨酸、异亮氨酸和缬氨酸。

[0094] 在一个特定的实例中,所述微生物经遗传修饰以产生或过产生来自类萜途径的分子(诸如法呢烯),和来自萜途径的分子。

[0095] 在一个特定的实例中,所述微生物经遗传修饰以产生或过产生维生素或前体,优选地选自泛酸、泛酸盐、反式链孢红素、叶绿醌和生育酚。

[0096] 在一个特定的实例中,所述微生物经遗传修饰以产生或过产生固醇,优选地选自鲨烯、胆固醇、甾酮、孕酮和可的松。

[0097] 在一个特定的实例中,所述微生物经遗传修饰以产生或过产生类黄酮,优选地选自羟苯基丁酮(frambinone)和vestinone。

[0098] 在一个特定的实例中,所述微生物经遗传修饰以产生或过产生有机酸,优选地选自香豆酸和3-羟基丙酸。

[0099] 在一个特定的实例中,所述微生物经遗传修饰以产生或过产生多元醇,优选地选自山梨醇、木糖醇和甘油。

[0100] 在一个特定的实例中,所述微生物经遗传修饰以产生或过产生多胺,优选地亚精氨。

[0101] 在一个特定的实例中,所述微生物经遗传修饰以产生或过产生经由NADP依赖性细胞色素p450来自立体特异性羟基化的芳香族分子,优选地选自苯基丙酸类(phenylpropanoid)、萜、脂质、鞣酸类(tannins)、芳香剂(fragrances)、激素。

[0102] 在感兴趣的分子是通过生物转化获得的情况下,该经遗传修饰的微生物有利地在包括待被转化的底物的培养基中培养。通常,通过在技术人员已知的适当培养基中培养所述微生物实现通过根据本发明的经遗传修饰的微生物的感兴趣的分子的产生或过产生。

[0103] 术语“适当的培养基”通常是指提供用于所述微生物的维持和/或生长的基本和有益营养素的无菌培养基,诸如碳源;氮源诸如硫酸铵;磷源,例如,磷酸二氢钾;微量元素,例如,铜盐、碘盐、铁盐、镁盐、锌盐或钼酸盐;维生素和其它生长因子诸如氨基酸或其它生长促进剂。可按需添加消泡剂。根据本发明,此适当的培养基可以是化学上限定的或复杂的。因此,该培养基可与合成培养基在组分上相同或相似,如由Verduyn等(Yeast.1992.8:501-17)限定的,由Visser等(Biotechnology and bioengineering.2002.79:674-81)改造的,或者是可商购的,诸如酵母氮源基础(YNB)培养基(MP Biomedicals或Sigma-Aldrich)。

[0104] 特别地,该培养基可包括简单碳源,诸如葡萄糖、半乳糖、蔗糖、糖蜜、或这些糖的副产物,任选地补充有CO<sub>2</sub>作为碳共基质。根据本发明,简单碳源必须允许感兴趣的微生物的正常生长。在某些情况下,还可能使用复杂碳源,诸如木质纤维素生物质、稻草或淀粉。复杂碳源的使用通常需要在使用前进行预处理。

[0105] 在一个特定的实施方案中,该培养基含有单糖(诸如葡萄糖、木糖或阿拉伯糖)、二糖(诸如蔗糖)、有机酸(诸如醋酸、丁酸、丙酸或戊酸)中的至少一种碳源以促进不同种类的聚羟基链烷酸酯(PHA)、经处理或未经处理的甘油。

[0106] 取决于待产生和/或过产生的分子,可利用营养因子的供应(N、O、P、S、K<sup>+</sup>、Mg<sup>2+</sup>、Fe<sup>2+</sup>、Mn、Co、Cu、Ca、Sn;Koller等, *Microbiology Monographs*, G.-Q.Chen, 14:85-119, (2010))。特别是促进包括PHB在内的PHA的合成和细胞内积累的情况。

[0107] 根据本发明,可以考虑允许以工业规模产生感兴趣的分子的任何培养方法。有利地,可在生物反应器中进行培养,尤其是以分批、补料分批和/或连续培养的模式。优选地,与感兴趣的分子的产生相关联的培养是对应于一种或多种底物的受控供应的补料分批模式,例如通过添加浓度可以在200g/L和700g/L之间的浓缩葡萄糖溶液。在该过程期间维生素的受控供应也可有益于生产率(Alfenore等, *Appl Microbiol Biotechnol*.2002.60: 67-72)。还可能添加铵盐溶液以限制氮供应。

[0108] 发酵通常在生物反应器中进行,其具有在锥形瓶中进行固体和/或液体预培养的可能步骤,其含有产生感兴趣的分子所必需的含有至少一种简单的碳源和/或外源性CO<sub>2</sub>供应的适当的培养基。

[0109] 通常,根据本发明的微生物的培养条件可容易地由本领域技术人员来修改,这取决于微生物和/或待产生/过产生的分子。例如,对于酵母,培养温度介于20°C和40°C之间,优选地介于28°C和35°C之间,且更特别的是,对于酿酒酵母为大约30°C。对于钩虫贪铜菌,培养温度介于25°C和35°C之间,优选为30°C。

[0110] 因此,本发明还涉及根据本发明的经遗传修饰的微生物用于产生或过产生除RuBisCO酶和/或磷酸核酮糖激酶(PRK)之外的感兴趣的分子的用途,感兴趣的分子优选地选自氨基酸、肽、蛋白质、维生素、甾醇、类黄酮、萜、类萜、脂肪酸、多元醇和有机酸。

[0111] 本发明还涉及用于产生除RuBisCO酶和/或磷酸核酮糖激酶(PRK)之外的至少一种感兴趣的分子的生物技术方法,其表征在于它包括在允许由所述微生物合成或生物转化所述感兴趣的分子的情况下,培养根据本发明的经遗传修饰的微生物的步骤,和任选的回收和/或纯化所述感兴趣的分子的步骤。

[0112] 在一个特定的实施方案中,该微生物经遗传修饰以表达至少一种涉及所述感兴趣的分子的合成的酶。

[0113] 在另一特定的实施方案中,该微生物经遗传修饰以表达至少一种涉及所述感兴趣的分子的生物转化的酶。

[0114] 本发明还涉及用于产生感兴趣的分子的方法,该方法包括(i)将至少一个编码涉及所述感兴趣的分子的合成或生物转化的酶的序列插入根据本发明的重组微生物中,(ii)在允许表达所述酶的条件下培养所述微生物,和任选的(iii)回收和/或纯化所述感兴趣的分子。

[0115] 例如,可以通过经遗传修饰以表达功能性PRK和RuBisCO(一种法呢烯合酶)且其中TAL1基因(基因ID:851068)的表达至少部分地受抑制的酵母(诸如酿酒酵母)来产生法呢烯。

[0116] 还可以通过经遗传修饰以表达功能性PRK和RuBisCO且其中talA(基因ID:947006.)和sucA(基因ID:945303)基因的表达至少部分地受抑制的细菌(诸如属大肠杆菌

的细菌) 来过产生谷氨酸。

## 实施例

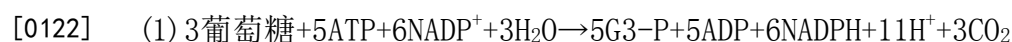
### [0117] 实施例1:生物信息学分析

[0118] a) 使用戊糖磷酸途径和糖酵解的野生型菌株与根据本发明的经修饰的菌株之间的来自葡萄糖的碳固定产量的比较

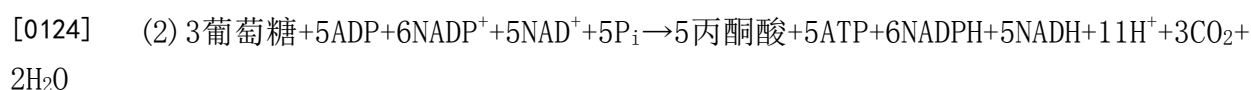
[0119] 为了评估根据本发明的修饰的益处,基于所涉及的反应的化学计量进行理论产量计算。

[0120] 在相同条件下,分析两种情况:(i) 野生型菌株,其使用戊糖磷酸途径以供应NADPH依赖性生物合成途径(例如法呢烯合成),和(ii) 根据本发明的经修饰的菌株。

[0121] 在改善NADPH依赖性生物合成途径的情况中,根据以下公式(1) 计算经由戊糖磷酸途径从葡萄糖开始的NADPH和甘油醛-3-磷酸(G3-P) 的理论平衡:



[0123] 从G3P向下至丙酮酸形成,我们实现以下平衡:



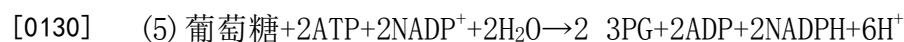
[0125] 如果我们将该平衡标准化为1摩尔葡萄糖,我们获得以下产量:



[0127] 通过戊糖途径,从1摩尔的葡萄糖产生1.67摩尔的丙酮酸和2摩尔的NADPH。然而,在经由6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(EC 1.1.1.44) 通过脱羧形成核酮糖-5-磷酸期间丢失1摩尔的碳。

[0128] 因此,通过戊糖磷酸途径产生2个NADPH时,最大理论丙酮酸产量为 $0.82\text{g}_{\text{丙酮酸}}/\text{g}_{\text{葡萄糖}}$ (g的合成的丙酮酸每消耗的葡萄糖)。

[0129] 通过将PRK/RuBisCO工程化整合至戊糖磷酸途径的非氧化分支受抑制的菌株中(例如酿酒酵母中的 $\Delta\text{TAL1}-\Delta\text{NQM1}$ ),碳固定通量从戊糖磷酸途径的氧化分支重定向至PRK/RuBisCO工程化(图2)。此通量涉及糖酵解途径在3-磷酸甘油酸(3PG) 形成位置处的结束,具有以下产量:



[0131] 从3PG向下至丙酮酸形成,我们实现以下平衡:



[0133] 根据本发明的修饰的整合使得回收在戊糖磷酸途径中通过脱羧而丢失的碳分子成为可能。因此,在通过工程化产生2个NADPH期间,丙酮酸合成的最大理论产量为 $0.98\text{g}_{\text{丙酮酸}}/\text{g}_{\text{葡萄糖}}$ ,其允许比戊糖磷酸途径获得的产量改善20.5%。

### [0134] b) 通过通量平衡分析模拟生物合成产量

[0135] 在生物信息学方法中,还进行通量平衡分析(FBA) 以模拟根据本发明描述的修饰对不同生物合成途径的产量的影响。

[0136] FBA基于模拟基因组规模的代谢网络的数学模型(Orth等,Nat Biotechnol.2010; 28:245-248)。重建的网络含有给定生物体的已知代谢反应并整合细胞的需要,特别是确保

细胞维持或生长。FBA使通过这些网络计算代谢流成为可能,这使得预测理论生长率以及代谢物产量成为可能。

[0137] i) 程序

[0138] 利用OptFlux软件 (Rocha等,BMC Syst Biol.2010Apr 19;4:45.doi:10.1186/1752-0509-4-45) 和酿酒酵母代谢模型iMM904 (Mo等,BMC Syst Biol.2009Mar 25;3:37.doi:10.1186/1752-0509-37) 进行FBA模拟。此模型已经经修饰以包括根据本发明描述的改善,所述改善包括具有以下的异源CO<sub>2</sub>固定途径:(i) 添加PRK型反应,(ii) 添加RuBisCO型反应。

[0139] 在特定的示例性实施方案中,还已经在所述模型中添加了模拟通过异源途径产生分子所必需的反应。

[0140] 在特定的示例性实施方案中,已经加入法呢烯合酶反应 (EC 4.2.3.46或EC 4.2.3.47) 用于异源产生法呢烯。

[0141] 在第二特定的示例性实施方案中,添加乙酰乙酰-CoA还原酶 (EC 1.1.1.36) 和聚-β-羟基丁酸合酶 (EC 2.3.1.B2或2.3.1.B5) 反应至所述模型以模拟β-羟基丁酸酯(聚羟基丁酸酯的单体)的异源产生途径。通过将技术人员可再现的一组约束条件应用于所述模型来进行模拟,目的是在根据本发明描述的条件(例如培养基中存在不受限制的葡萄糖,有氧培养条件)下模拟酿酒酵母菌株的体内培养条件。

[0142] 通过将技术人员可再现的一组约束条件应用于所述模型来进行模拟,目的是在根据本发明描述的条件(例如培养基中存在不受限制的葡萄糖,有氧培养条件)下模拟酿酒酵母菌株的体内培养条件。

[0143] 在特定的示例性实施方案中,通过实质上灭活转醛醇酶TAL1和INQM1的反应来进行模拟,以便模拟根据本发明描述的戊糖途径的非氧化分支的活性的降低。

[0144] 在未经修饰的“野生型菌株”模型上平行地进行模拟,以便评估根据本发明描述的改善对所测试的生物合成途径的产量的影响。

[0145] ii) 结果

[0146] 获得的理论产量和由本发明提供的改善百分比描述于下表7中。

[0147] 表7:通过FBA评估的野生型菌株和根据本发明的经修饰的菌株的不同分子产生的最大理论产量

[0148]

靶分子	野生型菌株的最大理论产率			根据本发明的经修饰的菌株的最大理论产率			本发明提供的相对于理论质量产率gx/gGLUC的百分比改善
	Mol <sub>x</sub> /Mol GLUC	CMol <sub>x</sub> / CMol GLUC	gx/gG LUC	Mol <sub>x</sub> /Mol GLUC	CMol <sub>x</sub> / CMol GLUC	gx/gG LUC	
谷氨酸	0.92	0.77	0.75	1	0.83	0.82	+9.3 %
β-羟基丁酸	0.92	0.61	0.53	1	0.67	0.58	+9.4 %

[0149]

法呢烯	0.21	0.54	0.24	0.22	0.56	0.25	+4.2 %
-----	------	------	------	------	------	------	--------

[0150] Mol<sub>X</sub>/Mol<sub>GLUC</sub>:产生的分子X的摩尔数相对于消耗的葡萄糖的摩尔数[0151] CMol<sub>X</sub>/CMol<sub>GLUC</sub>:产生的分子X的碳的摩尔数相对于消耗的葡萄糖的碳的摩尔数[0152] g<sub>X</sub>/g<sub>GLUC</sub>:产生的分子X的g相对于消耗的葡萄糖的g[0153] 实施例2:酿酒酵母中异源法呢烯产生的提高

[0154] 衍生自商业菌株CEN.PK 113-7D (GenBank: JRIV00000000) 的酿酒酵母菌株, CEN.PK 1605 (Mat a HIS3 leu2-3.112trp1-289 ura3-52 MAL.28c) 经工程化以在无CO<sub>2</sub>损失的情况下产生NADPH, 并因此提高从葡萄糖产生法呢烯 $\alpha$ 。

[0155] a) 戊糖磷酸途径的非氧化分支的失活

[0156] 通过缺失TAL1基因及其旁系同源NQM1使戊糖磷酸途径的非氧化分支失活。

[0157] i) TAL1基因的失活:染色体XI (836350至837357, 互补链)

[0158] 为此,用寡核苷酸Sdtal1-Rdtal1 (表8) 扩增衍生自质粒pUG6 (P30114) -Euroscarf 上含有的KanMX盒的G418抗性基因的编码区段 (coding phase)。

[0159] 表8:寡核苷酸

[0160]

名称	序列
Sdtal1 (SEQ ID NO: 1)	<u>ACGATAGTAAAATACTTCTCGAACTCGTCACATATACGTG</u> <u>TACATAATGGGTAAGGAAAAGACTCACGTTTC</u>
Rdtal1 (SEQ ID NO: 2)	<u>ATCAAAAGAAACGTGCATAAGGACATGGCCTAAATTAAT</u> <u>ATTTCGAGATACTTCCTTAGAAAACTCATCGAGCATC</u> AAATGAAAC
Sdnqm1 (SEQ ID NO: 3)	<u>TTGCTAGCGTAAGTCATAAAAAATAGGAAATAATCACATA</u> <u>TATACAAGAAATTAATATGGGTAAAAAGCCTGAACTCA</u> CCG
Rdnqm1 (SEQ ID NO: 4)	<u>AGTGGTATATATATATTTATATATATAAGTAGGTACCTCTAC</u> <u>TCTTAATGATTATTCCTTTGCCCTCGGACG</u>

[0161] 寡核苷酸的加下划线部分与KanMX序列完美同源, 该序列的其余部分对应于紧邻酿酒酵母基因组上的TAL1基因的编码区段的区域, 以生成在其末端含有TAL1基因座的同源重组序列的PCR扩增子。

[0162] 对于转化反应, 菌株CEN.PK 1605在30°C在50mL体积的复杂丰富培养基YPD (酵母提取物蛋白胨右旋糖) 中生长, 至600nm处的光密度为0.8。细胞在室温以2,500rpm离心5分钟。去除上清液, 且细胞在25mL的无菌水中重悬, 并再次在室温以2,500rpm离心5分钟。在去除上清液后, 细胞在400 $\mu$ L的100mM无菌醋酸锂中重悬。

[0163] 与此同时, 如下在2mL管中制备转化混合物: 250 $\mu$ L的50% PEG, 10 $\mu$ L的5mg/mL的“载体”DNA, 36 $\mu$ L的1M醋酸锂, 10 $\mu$ L的经纯化的PCR反应物 (缺失盒) 和350 $\mu$ L的水。

[0164] 添加重悬的细胞 (50 $\mu$ L) 至转化混合物,并在水浴中在42 $^{\circ}$ C 孵育40分钟。

[0165] 孵育后,在室温以5,000rpm离心所述管1分钟,并弃掉上清液。细胞在2mL的YPD中重悬,转移至14mL管并在30 $^{\circ}$ C以200rpm孵育2小时。然后,细胞在室温以5,000rpm离心1分钟。去除上清液,并在1mL的无菌水中重悬细胞,并再次离心1分钟,并重悬在100 $\mu$ L的无菌水中,且铺在YPD+180 $\mu$ g/mL G418上。

[0166] 获得的菌落进行基因分型以验证TAL1基因的缺失,并提及为EQ-0520 (CEN.PK1605  $\Delta$  tal1::kan)。

[0167] ii) NQM1基因的失活:染色体VII (580435至581436,互补链)

[0168] 用寡核苷酸Sdnqm1和Rdnqm1 (表8) 扩增衍生自hphMX盒 (loxP-pAgTEF1-hphMX-tAgTEF1-loxP) 并包含在质粒pUG75 (P30671) -Euroscarf上的潮霉素B抗性基因的编码区段。这生成在其末端含有转醛醇酶NQM1基因座的同源重组序列的  $\Delta$  nqm1 PCR扩增子。

[0169] 对于转化反应,菌株EQ-0520 (CEN.PK1605  $\Delta$  tal1::kan) 在30 $^{\circ}$ C在50mL体积的复杂丰富培养基YPD (酵母提取物蛋白胍右旋糖) 中培养,至600nm处的光密度为0.8。细胞在室温以2,500rpm离心5分钟。去除上清液,且细胞在25mL的无菌水中重悬,并再次在室温以2,500rpm离心5分钟。在去除上清液后,细胞在400 $\mu$ L的100mM无菌醋酸锂中重悬。与此同时,如下在2mL管中制备转化混合物:250 $\mu$ L的50%PEG,5mg/mL的“载体”DNA,36 $\mu$ L的1M醋酸锂,10 $\mu$ L的经纯化的PCR反应物(缺失盒)和350 $\mu$ L的水。

[0170] 添加重悬的细胞 (50 $\mu$ L) 至转化混合物,并在水浴中在42 $^{\circ}$ C 孵育40分钟。孵育后,在室温以5,000rpm离心所述管1分钟,并弃掉上清液。细胞在2mL的YPD中重悬,转移至14mL管并在30 $^{\circ}$ C以200rpm孵育2小时。然后,在室温以5,000rpm离心1分钟。去除上清液,并在1mL的无菌水中重悬细胞,并再次离心1分钟,并重悬在100 $\mu$ L的无菌水中,铺在YPD+200 $\mu$ g/mL潮霉素B+180 $\mu$ g/mL G418上。

[0171] 获得的菌落进行基因分型以验证TAL1基因的缺失,并提及为EQ-0521 (CEN.PK1605  $\Delta$  tal1::kan  $\Delta$  nqm1::hph)。

[0172] b) 引入PRK/RuBisCO/法呢烯合酶

[0173] 为了创建糖酵解的可替换途径,并允许菌株EQ-0521 (CEN.PK1605  $\Delta$  tal1::kan  $\Delta$  nqm1::hph) 通过固定CO<sub>2</sub>来增加某些代谢产物的产率,修饰所述菌株以表达:

[0174] • 编码磷酸核酮糖激酶PRK的基因,所述磷酸核酮糖激酶PRK被转移到戊糖磷酸途径上通过消耗核酮糖-5P以得到核酮糖-1,5二P,和

[0175] • I型RuBisCO (具有结构基因RbcL和RbcS和伴侣分子RbcX、GroES和GroEL)。RuBisCO消耗核酮糖-1,5二P和1摩尔的CO<sub>2</sub>以形成3-磷酸甘油酸

[0176] 为了产生 $\alpha$ -法呢烯,从酵母中缺失 $\alpha$ -法呢烯合酶基因 (AFS1;GenBank登录号AY182241)。

[0177] 表9:表达盒和质粒组合物

[0178]

蛋白质	GenBank	密码子优化	启动子	终止子	ori	营养缺陷型标记	质粒		
RbcL	BAD78320.1	是	TDH3p	ADH1	2μ	URA3	pFPP45	pL4	
RbcS	BAD78319.1	是	TEF1p	PGK1	2μ	URA3	pFPP45	pL4	
RbcX	<a href="#">BAD80711.1</a>	是	TEF1p	PGK1	ARS-CEN6	LEU2	pFPP56		

[0179]

GroES	<a href="#">U00096</a>	否	PGI1p	CYC1	ARS-CEN 6	LEU2	pFPP5 6		
GroEL	<a href="#">AP009048</a>	否	TDH3	ADH1	ARS-CEN 6	LEU2	pFPP5 6		
PRK	BAD78 757.1	是	Tet-OFF	CYC1	ARS 416-CEN 4	TRP1	pFPP2 0		
$\alpha$ 法尼烯合酶	AY1822 41	是	PGI1p	CYC1	2 $\mu$	URA3		pL4	pL5
空			Tet-OFF	CYC1	ARS 416-CEN 4	TRP1	pCM1 85		
空					ARS-CEN 6	LEU2	pFL36		

[0180] 工程化所需的7个基因(表9)被克隆在三个能够自主复制的质粒载体上,该质粒载体具有兼容的复制起始位点,且每个质粒载体携带提供不同的营养缺陷型的基因,这允许对含有该三个质粒构建体的菌株进行选择。这些质粒中的两个是具有Ars/CEN复制起始位点的单拷贝,第三个质粒是具有2 $\mu$ 起始位点的多拷贝。

[0181] 来自细长聚球藻的基因,诸如RbcL、RbcS、RbcX和PRK(先前描述于WO 2015107496 A1中)和来自苹果(*Malus domestica*)的 $\alpha$ -法尼烯合酶基因(Tippmann等Biotechnol Bioeng.2016Jan;113(1):72-81)已经针对酿酒酵母中的密码子的使用进行优化。

[0182] 根据先前描述的方法,菌株EQ-0521在30℃在50mL体积的复杂丰富培养基YPD中培养,该培养基含有以下转化混合物:250 $\mu$ L的50%PEG,10 $\mu$ L的5mg/mL“载体”DNA,36 $\mu$ L的1M醋酸锂,10 $\mu$ L(3 $\mu$ g的组合pFPP45+pFPP56+pFPP20或pL4+pFPP56+pFPP20或pL5+pFL36+pCM185)

和350 $\mu$ L的水。

[0183] 添加重悬的细胞 (50 $\mu$ L) 至转化混合物,并在水浴中在42 $^{\circ}$ C孵育40分钟。孵育后,在室温以5,000rpm离心所述管1分钟,并弃掉上清液。细胞在2mL的补充有适于选择标记的商业培养基CSM(MP Biomedicals)的YNB(不含氮基补充有硫酸铵<sup>1</sup>、葡萄糖的酵母)中重悬,转移至14mL管中并在30 $^{\circ}$ C孵育2小时。最终混合物铺在YNB+硫酸铵+CSM-LUW(在20g/L葡萄糖和2 $\mu$ g/mL多西环素中含有亮氨酸,尿嘧啶,色氨酸)。

[0184] 获得的菌株是:

[0185] • EQ-0523 (CEN.PK1605  $\Delta$  tal1::kan  $\Delta$  nqm1::hph) (pFPP45+pFPP56+pFPP20)

[0186] • EQ-0524 (CEN.PK1605  $\Delta$  tal1::kan  $\Delta$  nqm1::hph) (pL4+pFPP56+pFPP20)

[0187] • EQ-0525 (CEN.PK1605) (pL5+pFL36+pCM185)

[0188] 菌株EQ-0523 (PRK/RuBisCO/  $\Delta$  tal1::kan  $\Delta$  nqm1::hph)、EQ-0524 (PRK/RuBisCO/  $\Delta$  tal1::kan  $\Delta$  nqm1::hph+法呢烯合酶)和EQ-0525 (法呢烯合酶)在具有20g/L葡萄糖和10%CO<sub>2</sub>的液体培养基YNB上生长。

[0189] 锥形瓶中的分批模式在适当的培养基和10%外源性CO<sub>2</sub>供应的情况下在震荡培养箱(120rpm,30 $^{\circ}$ C)中进行,在OD600nm处使用EON分光光度计(BioTek Instruments)测量为0.05时接种。感兴趣的菌株在具有20g/L葡萄糖和10%外源性CO<sub>2</sub>供应的YNB+CSM-LUW培养基上生长。

[0190] 在观察到开始显著生长后,菌株适应于包含在CSM-LUW中的无氨基酸和氮基的最低矿物质培养基,即仅为具有20g/L葡萄糖和10%外源性CO<sub>2</sub>供应的YNB

[0191] c) 在锥形瓶中产生法呢烯

[0192] 使戊糖磷酸途径的非氧化分支通过抑制TAL1和NQM1基因而受抑制的酿酒酵母菌株EQ-0524生长,以通过使用外源性PRK和RuBisCO产生NADPH而无CO<sub>2</sub>损失来产生法呢烯。将此感兴趣的菌株与添加异源法呢烯合酶但不缺失TAL1和NQM1或添加外源性PRK和RuBisCO产生法呢烯的参考菌株EQ-0525比较。锥形瓶中的分批模式在上述条件下进行。

[0193] 必须从发酵上清液中量化法呢烯浓度。简略地,细胞悬浮液在5000rpm离心5分钟。将十二烷相在己烷中稀释10倍并注射到GC-MS中,用于根据Tippman等(Biotechnol Bioeng.2016;1131:72-81)中描述的方法进行分析。

[0194] 相较于菌株EQ-0253,在菌株EQ-0253中观察到产量增加3%,其以每克消耗的葡萄糖的法呢烯的克数计。

[0195] 实施例3:大肠杆菌中谷氨酸产量的提高

[0196] 已经描述了 $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶基因的缺失增加谷氨酸产量(Usuda等,J Biotechnol.2010May 3;147(1):17-30.doi:10.1016/j.jbiotec.2010.02.018)。因此,在已经缺失了sucA基因的大肠杆菌K12菌株MG1655中进行以下所述的实验。此菌株衍生自大肠杆菌中的基因缺失库(Baba等,Mol Syst Biol.2006;2:2006.0008),且由Coli Genetic Stock Center以名称JW0715-2提供并提及为8786。(JW0715-2:MG1655  $\Delta$  sucA::Kan)。

[0197] a) 通过Flp重组通过FTR区的特异性重组去除选择盒

[0198] 为了能够再次使用与用于构建上述菌株JW0715-2相同的缺失策略,必须使用重组酶去除选择盒。

[0199] 根据试剂盒方案对质粒p707-Flpe(在Gene Bridges的Quick&EasyE.coli Gene

DeletionRed®/ET®重组试剂盒中提供)进行电穿孔。在补充有0.2%葡萄糖、0.0003%四环素并添加有0.3%L-阿拉伯糖的LB琼脂上对细胞进行选择。通过验证它们不再能够在补充有0.0015%卡那霉素的相同培养基上生长来进行所获得的克隆的反选择。

[0200] 获得的菌株被称为EQ.EC002:MG1655  $\Delta$  sucA。

[0201] b) 编码恩特纳-杜德洛夫代谢途径的edd-eda操纵子的缺失

[0202] 通过同源重组并根据供应商的方案使用Quick&EasyE.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒来进行edd-eda操纵子的缺失。

[0203] 1.寡核苷酸经设计以扩增FRT-PKG-gb2-neo-FRT抗性基因表达盒,且具有超过50个核苷酸的与染色体上的缺失基因座(位置1932065-1932115和1934604-1934654)的邻近区同源的5'序列,因此生成整个操纵子的每一侧上的细菌基因组上的盒的重组臂;

[0204] 2.根据试剂盒方案,通过电穿孔用质粒pRedET转化大肠杆菌K-12菌株EQ.EC002。在具有0.2%葡萄糖、0.0003%四环素的复杂丰富培养基LB琼脂上对获得的菌落进行选择。

[0205] 3.在RedET重组酶的存在下在第一步中获得的扩增子的转化,由液体LB中的0.3%阿拉伯糖诱导1h。为此,进行通过缺失盒的表达RedET的细胞进行第二次电穿孔,且在补充有0.2%葡萄糖和0.0003%四环素且添加有0.3%L-阿拉伯糖和0.0015%卡那霉素的LB琼脂上对菌落进行选择。

[0206] 4.根据试剂盒方案,通过电泳转化质粒p707-Flpe(由Gene Bridges的Quick&EasyE.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒中提供)。在补充有0.2%葡萄糖、0.0003%四环素且添加有0.3%L-阿拉伯糖的LB琼脂上对细胞进行选择。通过验证它们不再能够在补充有0.0015%卡那霉素的相同培养基上生长来进行所获得的克隆的反选择。

[0207] 5.获得的菌株被称为EQ.EC003:MG1655  $\Delta$  sucA  $\Delta$  edd-eda。

[0208] c) talA基因的缺失

[0209] 通过同源重组并根据供应商的方案使用Quick&EasyE.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒来进行talA基因的缺失。

[0210] 1.寡核苷酸经设计以扩增FRT-PKG-gb2-neo-FRT抗性基因表达盒,且具有超过50个核苷酸的与缺失基因座的邻近区(即该基因(talA)(基因ID:947006)的编码区段)同源的5'序列,因此生成在细菌基因组上的盒的重组臂;

[0211] 2.根据试剂盒方案,通过电穿孔用质粒pRedET转化大肠杆菌K-12菌株EQ.EC003。在具有0.2%葡萄糖、0.0003%四环素的复杂丰富培养基LB琼脂上对获得的菌落进行选择。

[0212] 3.在RedET重组酶的存在下,在第一步中获得的扩增子的转化,由液体LB中的0.3%阿拉伯糖诱导1h。为此,进行通过缺失盒的表达RedET的细胞的第二次电穿孔,且在补充有0.2%甘油和0.3%丙酮酸、0.0003%四环素且添加有0.3%L-阿拉伯糖和0.0015%卡那霉素的LB琼脂上对菌落进行选择。

[0213] 通过基因分型和测序验证缺失,获得的菌株的名称为:

[0214] • EQ.EC002:MG1655  $\Delta$  sucA

[0215] • EQ.EC003:MG1655  $\Delta$  sucA  $\Delta$  edd-eda

[0216] • EQ.EC020:MG1655  $\Delta$  sucA  $\Delta$  edd-eda  $\Delta$  talA::kan

[0217] d) 插入用于CO<sub>2</sub>固定的PRK/RuBisCO工程化

[0218] 为了在大肠杆菌中重组表达I型RuBisCO的不同组分,克隆下表中所述的基因作为含有下表中所述的基因的合成性操纵子。

[0219] 为了控制这些基因的表达水平,表中列出的具有不同的翻译效率的核糖体结合序列(RBS),如描述于Zelcbuch等(Zelcbuch等,Nucleic Acids Res.2013May;41(9):e98;Levin-Karp等,ACS Synth Biol.2013Jun 21;2(6):327-36.doi:10.1021/sb400002n)中,被插入在每个基因的编码区段之间。通过连续插入至pZA11载体(Expressys)中来构建由RBS序列分隔的每个编码区段的连续性,pZA11载体含有PLtet0-1启动子、p15A复制起始位点和氨苄青霉素抗性基因。

[0220] 表10:基因参考

[0221]

基因	GenBank	生物体
rbcL	BAD78320.1	细长聚球藻
rbcS	BAD78319.1	细长聚球藻
rbcX	BAD80711.1	细长聚球藻
Prk	BAD78757.1	细长聚球藻

[0222] 表11:质粒上的表达盒的组成

[0223]

质粒	载体pZA11中的合成性操纵子的结构								
	基因A	RBS1	基因B	RBS2	基因C	RBS3	基因D	RBS4	基因E
pZA11									
pEQEC005	rbcS	D	rbcL	B	RbcX	F			
pEQEC006	rbcS	D	rbcL	B	RbcX	F	Prk		
pEQEC008	Prk								

[0224] 表12:核糖体结合位点(RBS)顺反子间序列

[0225]

名称	RBS序列
A (SEQ ID NO:5)	AGGAGGTTTGGA
B (SEQ ID NO:6)	AACAAAATGAGGAGGTACTGAG
C (SEQ ID NO:7)	AAGTTAAGAGGCAAGA
D (SEQ ID NO:8)	TTCGCAGGGGGAAG
E (SEQ ID NO:9)	TAAGCAGGACCGGCGCG
F (SEQ ID NO:10)	CACCATACACTG

[0226] 通过电穿孔根据上述计划列出的不同载体产生若干菌株:

[0227] EQ.EC 020→(EQ.EC 003+pZA11):MG1655 Δ sucA Δ edd-eda

[0228] EQ.EC 021→(EQ.EC 004+pEQEC005):MG1655 Δ sucA Δ edd-eda-talA::kan (RuBisCO)

[0229] EQ.EC 022→(EQ.EC 004+pEQEC006):MG1655 Δ sucA Δ edd-eda talA::kan

(RuBisCO+PRK)

[0230] EQ.EC 024→(EQ.EC 003+pEQEC008):MG1655 Δ *sucA* Δ *edd-eda* Δ *talA*::kan (PRK)

[0231] 在补充有100mg/L氨苄青霉素的LB培养基上对克隆进行选择。在获得足够量的生物物质后,将体积大于或等于50mL的培养物接种在至少250mL的锥形瓶中,以使菌株适应PRK/RuBisCO工程化的使用。如上所述,在具有2g/L葡萄糖的LB培养基上,和在37°C以1个大气压的外源CO<sub>2</sub>供应进行此适应。

[0232] e) 谷氨酸产生

[0233] 为了谷氨酸产生,将来自500mL的LB培养物的细胞接种到0.1大气CO<sub>2</sub>的压力下的20mL的MS培养基(40g/L葡萄糖、1g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、20g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>、1g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、10mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、10mg/L MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、2g/L酵母提取物、30g/L CaCO<sub>3</sub>、100mg/L氨苄青霉素)中。

[0234] 用bioanalyzer (Sakura Seiki) 测量剩余谷氨酸和葡萄糖。碳产率Y<sub>p/s</sub>以每克消耗的葡萄糖产生的谷氨酸的克数计算。相较于对照菌株EQ.EC 020(空)、EQ.EC 021(仅RuBisCO),EQ.EC 022菌株(RuBisCO+PRK)中的此产率增加8%。对照菌株EQ.EC 024(仅PRK)是无活力的。

[0235] 实施例4:钩虫贪铜菌中PHB产生的提高

[0236] a) 戊糖磷酸途径的非氧化分支的抑制

[0237] 增加还原能力还可以显著提高现有代谢途径的效率。对于天然产生聚羟基丁酸酯(PHB)的细菌菌株富养罗尔斯通氏菌(*Ralstonia eutropha*) ATCC 17699(钩虫贪铜菌)就是这种情况。此细菌能够在自养和异养条件下生长。

[0238] 根据本发明的tal基因(转醛醇酶MF\_00492)的缺失使其可以通过增加NADPH还原的核苷酸的库来使代谢通量集中在氧化戊糖磷酸途径上,从而增加PHB产率还允许使用糖酵解途径。

[0239] 此钩虫贪铜菌菌株(*R. eutropha* H16)具有大质粒pHG1和两条染色体。通过生成含有针对革兰氏阴性细菌的SacA自杀基因的载体来实现tal基因的缺失,如Quandt等和Lindenkamp等(Quandt等,基因.1993May 15;127(1):15-21;Lindenkamp等,Appl Environ Microbiol.2010Aug;76(16):5373-82;Lindenkamp等,Appl Environ Microbiol.2012Aug;78(15):5375-83)中描述的。

[0240] 根据Lindenkamp等(Appl Environ Microbiol.2012Aug;78(15):5375-83)中描述的程序通过限制性使对应于tal基因的邻近区的两个PCR扩增子克隆进质粒pjQ200mp18Tc中。然后,通过氯化钙转化方法使经修饰的质粒pjQ200mp18Tc::Δtal转化到大肠杆菌菌株S17-1中。且遗传物质的转移是通过在含有S17-1细菌的细胞单层的培养皿上在琼脂上存放少量富养罗尔斯通氏菌培养物通过结合进行的,且在用于选择的10%蔗糖的存在下在30°C在营养肉汤(NT)培养基上进行选择(Hogrefe等,J Bacteriol.1984Apr;158(1):43-8.)并在含有25μg/mL四环素的矿物质培养基上进行验证。

[0241] 通过基因分型和测序验证缺失。因此,所得的菌株EQCN\_002具有tal基因的缺失。  
EQCN\_010:H16 Δtal

[0242] b) 恩特纳-杜德洛夫代谢途径的失活

[0243] 根据Srinivasan等(Appl Environ Microbiol.2002Dec;68(12):5925-32)中描述

的程序通过限制性将对应于edd和eda基因的邻近区(edd的上游和eda的下游)的两个PCR扩增子克隆进质粒pJQ200mp18Cm中。

[0244] 然后,通过氯化钙转化方法使经修饰的质粒pJQ200mp18Cm:  $\Delta$ edd-eda转化进大肠杆菌菌株S17-1。遗传物质的转移是通过含有S17-1细菌的细胞单层的培养皿上在琼脂上存放少量富养罗尔斯通氏菌EQCN\_010培养物通过结合来进行的,且在为了进行选择的10%蔗糖的存在下在30℃在营养肉汤(NT)培养基上进行选择(Hogrefe等, J Bacteriol.1984Apr;158(1):43-8.)并在含有50 $\mu$ g/mL氯霉素的矿物质培养基上进行验证。

[0245] 通过基因分型和测序验证缺失。因此,所得的菌株EQCN\_003具有tal基因的缺失。EQCN\_011:H16  $\Delta$ tal  $\Delta$ edd-eda

[0246] c) 在生物反应器中PHB的产生

[0247] 将来自冷冻保存物的接种物从冷冻管以50至100 $\mu$ L的率(rate)铺在固体培养基上,在30℃在葡萄糖的存在下孵育48至96h。在异养需氧条件下在钩虫贪铜菌中维持编码RuBisCO和PRK的基因的表达(Rie Shimizu等, Sci Rep.2015;5:11617.2015年7月1日线上公开)。锥形瓶中的分批模式培养物(50mL中10mL,然后250mL中50mL)使用适当的培养基以20g/L葡萄糖和10%外源性CO<sub>2</sub>供应在震荡培养箱(100-200rpm,30℃)中进行,最小接种为0.010D<sub>620nm</sub>。

[0248] 在异养条件下在营养限制的存在下比较提高PHB产量的感兴趣的菌株EQCN\_011与天然累积PHB的参考菌株H16。

[0249] 比较生物反应器中的菌株的生产率。在上述条件下,将在生物反应器中进行的培养物从固体和/或液体扩增链(amplification chain)接种到锥形瓶中。以等同于0.010D<sub>620nm</sub>的最小浓度接种My-control (Applikon Biotechnology, Delft, Netherlands) 750mL型或Biostat B (Sartorius Stedim, Göttingen, Germany) 2.5L型的生物反应器。

[0250] PHB的累积与生长分离。将培养物调节在30℃,通气量维持在0.1VVM(气体体积/液体体积/分钟)与1VVM之间,以维持最低溶氧浓度在20%以上(30℃,1bar)。根据所用生物反应器的规模调整摇动。入口气流由任选补充有CO<sub>2</sub>的空气组成。CO<sub>2</sub>补充量在1%与10%之间。通过添加14%或7%氨溶液将pH调整至7。补料分批培养方法允许供应非限制性碳底物联合限制的磷或氮,同时维持恒定碳/磷比率或碳/氮比率。

[0251] 根据Brandl等(Appl Environ Microbiol.1988Aug;54(8):1977-82.)的方法进行PHB提取和定量。

[0252] 该方案在于向10mg的冻干细胞添加1mL的氯仿,随后加入850 $\mu$ L的甲醇和150 $\mu$ L的硫酸。混合物在100℃加热2.5小时,冷却并添加500 $\mu$ L的水。通过离心分离两相,且通过添加硫酸钠干燥有机相。

[0253] 如由Müller等(Appl Environ Microbiol.2013Jul;79(14):4433-9)描述的,过滤并分析样品。野生型钩虫贪铜菌H16的培养物与菌株EQCN\_011:H16  $\Delta$ tal  $\Delta$ edd-eda的培养物的比较分别显示PHB产率增加2%(以每克消耗的葡萄糖产生的PHB的克数计),这支持了根据本发明的经修饰的菌株。

## 序列表

<110> ENOBRAQ

<120> 用于产生感兴趣的分子的经基因优化的微生物

<130> B2423

<160> 10

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸Sdtal1

<400> 1

acgatagtaa aatacttctc gaactcgtca catatacgtg tacataatgg gtaaggaaaa 60

gactcacggt tc 72

<210> 2

<211> 87

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸Rdtal1

<400> 2

atcaaaagaa acgtgcataa ggacatggcc taaattaata tttccgagat acttccttag 60

aaaaactcat cgagcatcaa atgaaac 87

<210> 3

<211> 82

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸Sdnqml

<400> 3

ttgctagcgt aagtcataaa aaataggaaa taatcacata tatacaagaa attaaatag 60

ggtaaaaaagc ctgaactcac cg 82

<210> 4

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸Rdnqm1

<400> 4

agtggatat atatatat atataagt aggtacctct actcttaatg attattcctt 60  
tgccctcgga cg 72

<210> 5

<211> 12

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列RBS

<400> 5

aggagtttg ga 12

<210> 6

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列RBS

<400> 6

aacaaaatga ggagtactg ag 22

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列RBS

<400> 7

aagttaagag gcaaga 16

<210> 8

<211> 14

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 序列RBS

<400> 8

ttcgagggg gaag 14

<210> 9

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列  
<220>  
<223> 序列RBS  
<400> 9  
taagcaggac cggcggcg 18  
<210> 10  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 序列RBS  
<400> 10  
caccatacac tg 12

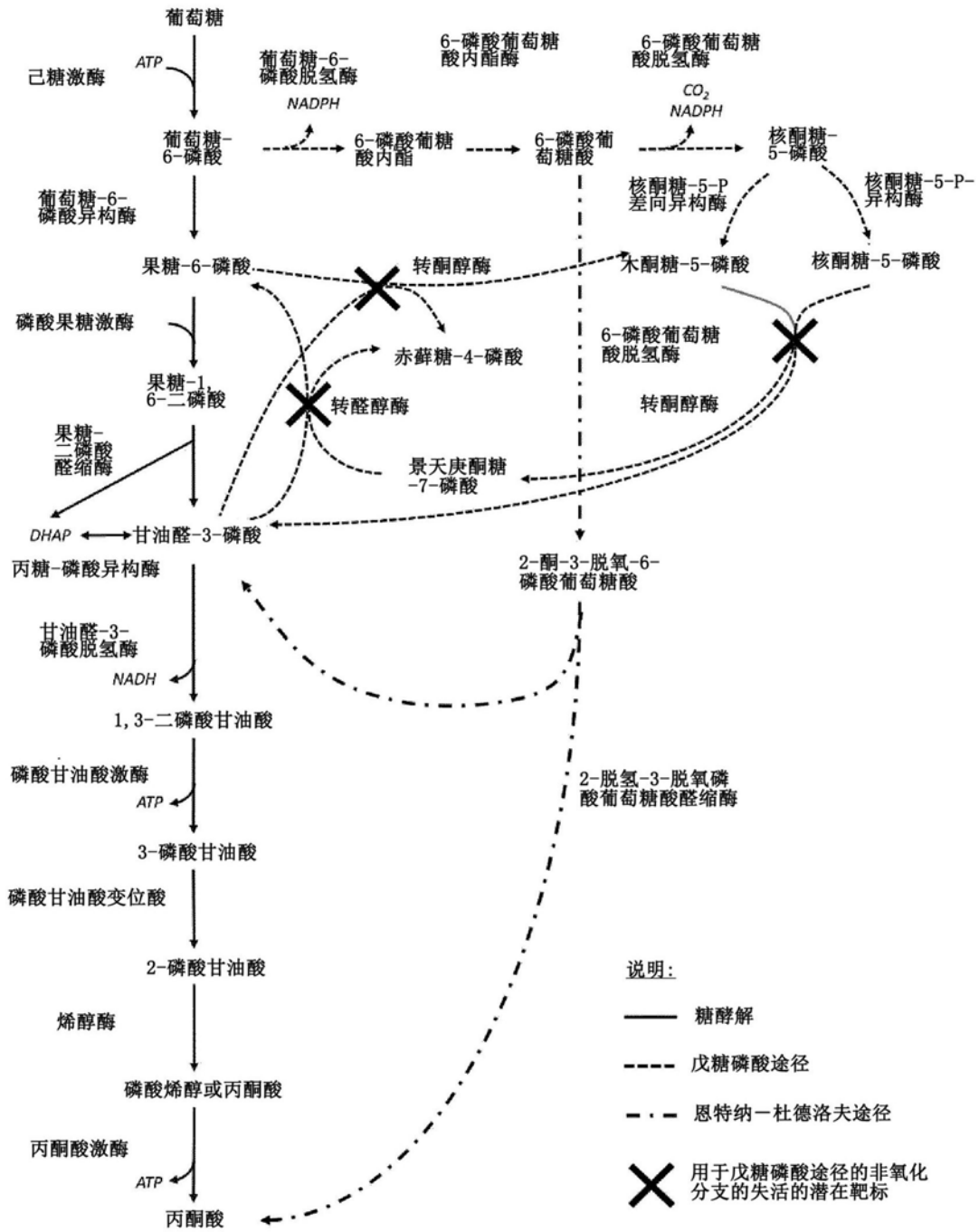


图1

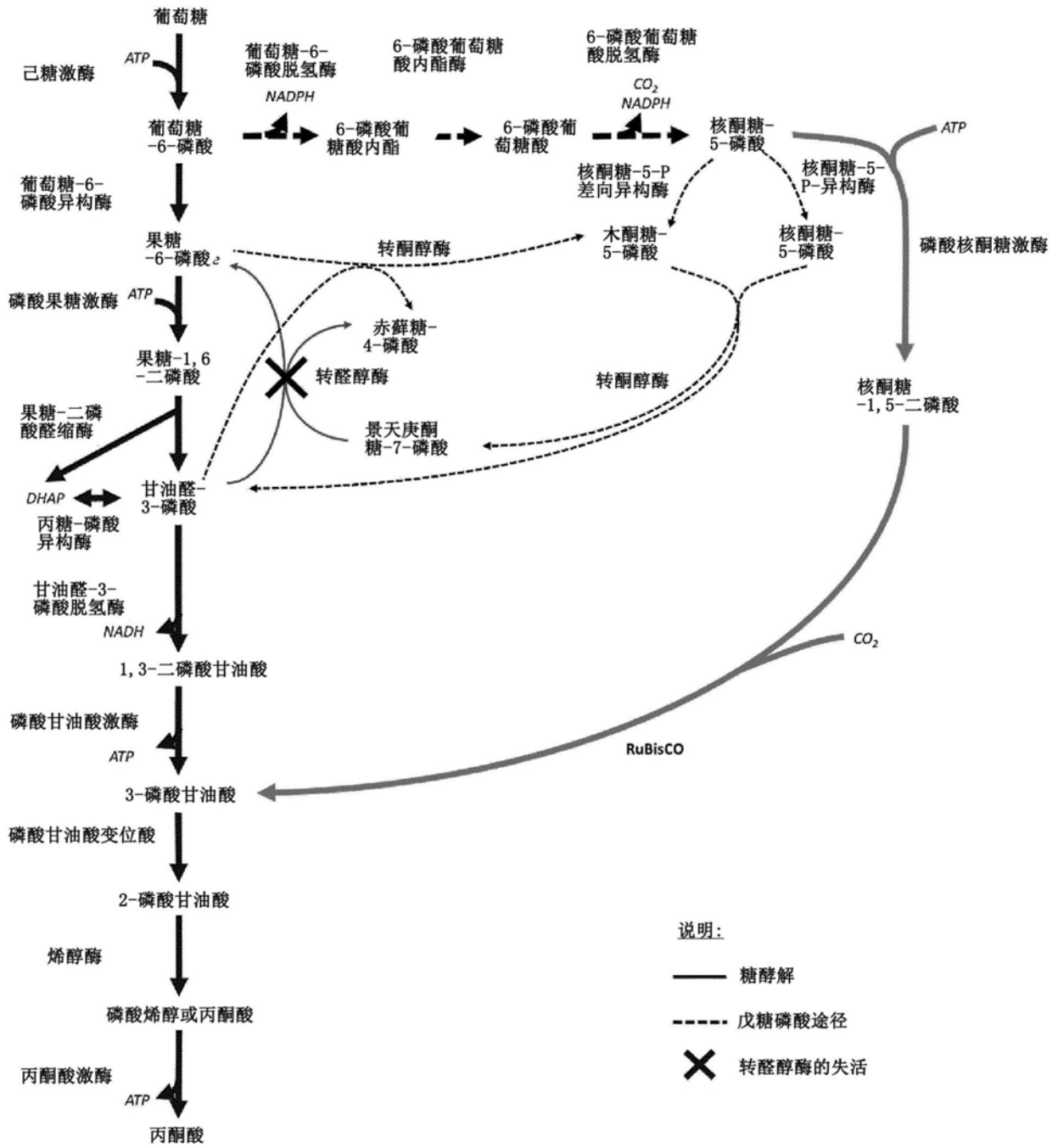


图2