



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102317464 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 29

(21) 申请号 200980156694. 5

(22) 申请日 2009. 12. 14

(30) 优先权数据

61/201, 576 2008. 12. 12 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 08. 12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/067895 2009. 12. 14

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/068944 EN 2010. 06. 17

(73) 专利权人 塞莱西翁有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 布莱恩·M·拜内斯

约翰·迈克尔·杰雷米亚

(74) 专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司

公司 11018

代理人 陈万青 王珍仙

(51) Int. Cl.

C12P 7/26 (2006. 01)

(56) 对比文件

ATSUMI SHOTA ET AL.. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain

higher alcohols as biofuels..

《NATURE》. 2008, 第 451 卷 (第 7174 期), 第 86-89 页.

DREVLAND RANDY M ET AL.. Methanogen homoaconitase catalyzes both hydrolyase reactions in coenzyme B biosynthesis.. 《THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY》. 2008, 第 283 卷 (第 43 期), 第 28888-28896 页.

PRATHER KRISTALA L JONES ET AL.. De novo biosynthetic pathways: rational design of microbial chemical factories.. 《CURRENT OPINION IN BIOTECHNOLOGY》. 2008, 第 19 卷 (第 5 期), 第 468-474 页.

审查员 姚进孝

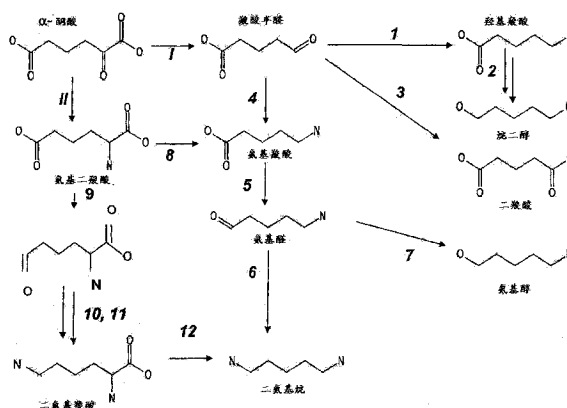
权利要求书5页 说明书30页 附图6页

(54) 发明名称

从 α -酮酸生物合成双官能烷烃

(57) 摘要

本发明各个方面涉及在宿主细胞中生产双官能烷烃的方法。具体地,本发明的各个方面描述了与在宿主细胞中从碳水化合物原料生产双官能烷烃有关的基因组件。更具体地,本发明的各个方面描述了用于经由 2-酮庚二酸生产己二酸、氨基己酸、己内酰胺和六亚甲基二胺的代谢途径。



1. 一种用于从 2- 酮酸生产双官能 C_n 烷的代谢工程化宿主细胞, 其中所述双官能 C_n 烷具有 $C1$ 和 Cn 末端官能团, 所述 $C1$ 和 Cn 末端官能团选自 $-OH$ 、 $-COOH$ 和 $-NH_2$ 的组, 其中 n 为 4 至 8 的整数, 其中所述代谢工程化宿主细胞通过至少一种包括编码选自高柠檬酸合酶、高乌头酸酶和同分异构高柠檬酸脱氢酶的至少一种 2- 酮酸链延长途径酶; 以及至少一种能够使用延长途径的 2- 酮酸产物作为底物的酶的至少一个核苷酸序列的核酸来进行遗传修饰。

2. 如权利要求 1 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述至少一个核苷酸序列编码两种或更多种 α - 酮酸链延长途径酶。

3. 如权利要求 1 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述细胞为原核细胞。

4. 如权利要求 1 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述细胞为厌氧型原核细胞。

5. 如权利要求 1 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述细胞选自大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌、黄色短杆菌和乳糖发酵短杆菌组成的组。

6. 如权利要求 1 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述 2- 酮酸为 2- 酮戊二酸, 且被转化为 2- 酮己二酸、2- 酮庚二酸或 2- 酮辛二酸。

7. 如权利要求 6 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述至少一个核苷酸序列编码高柠檬酸合酶、高乌头酸酶和同分异构高柠檬酸脱氢酶。

8. 如权利要求 7 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述高柠檬酸合酶选自 AcsA、NifV、hcs 和 Lys20/21 组成的组。

9. 如权利要求 7 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述高乌头酸酶选自 AcsD/E、LysT/U、Lys4 和 3- 异丙基苹果酸脱水酶大 / 小亚基组成的组。

10. 如权利要求 7 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述同分异构高柠檬酸脱氢酶选自 AcsF、Hicdh、Lys12、2- 氧代辛二酸合酶和 3- 异丙基苹果酸脱氢酶组成的组。

11. 如权利要求 7 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述双官能烷具有 6 个碳原子, 且选自氨基己酸、己二酸、六亚甲基二胺、6- 羟基六胺、1,6- 己烷二醇、6- 氨基己醛、6- 氨基己醇和 6- 羟基己酸组成的组。

12. 如权利要求 1 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述至少一个核苷酸序列编码脱羧酶和醛脱氢酶以用于从 2- 酮庚二酸生产己二酸。

13. 如权利要求 12 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述脱羧酶为催化 2- 酮庚二酸向己二酸半醛转化的 2- 酮 - 酸 - 脱羧酶, 且所述醛脱氢酶催化己二酸半醛向己二酸转化。

14. 如权利要求 12 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述脱羧酶选自 2- 酮戊二酸脱羧酶、2- 酮异戊酸脱羧酶、促转氨的氨基酸脱羧酶、苯甲酰甲酸脱羧酶、2- 酮精氨酸脱羧酶、磷酸基丙酮酸脱羧酶、丙酮酸脱羧酶同工酶、丙酮酸脱羧酶同工酶 2 和吡哆丙酮酸脱羧酶。

15. 如权利要求 12 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述醛脱氢酶为 6- 氧代己酸脱氢酶。

16. 如权利要求 1 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述至少一个核苷酸序列编码氨基转移酶和脱羧酶以用于从 2- 酮庚二酸生产氨基己酸。

17. 如权利要求 16 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述氨基转移酶催化 2- 酮庚二酸向 2- 氨基庚二酸的转化, 且其中所述脱羧酶催化 2- 氨基庚二酸向氨基己酸的转化。

18. 如权利要求 17 所述的代谢工程化宿主细胞, 其中所述氨基转移酶选自 α - 氨基

己二酸氨基转移酶-1、氨基己二酸氨基转移酶和二氨基庚二酸脱氢酶组成的组。

19. 如权利要求 17 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述脱羧酶为谷氨酸脱羧酶。

20. 如权利要求 19 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述谷氨酸脱羧酶由选自 Gad6/7、GadA、GadB 和 lysA 组成的组的基因编码。

21. 如权利要求 16 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述脱羧酶催化 2-酮庚二酸向己二酸半醛的转化,且所述氨基转移酶催化己二酸半醛向氨基己酸的转化。

22. 如权利要求 21 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述脱羧酶选自 2-酮戊二酸脱羧酶、2-酮异戊酸脱羧酶、促转氨的氨基酸脱羧酶、苯甲酰甲酸脱羧酶、2-酮精氨酸脱羧酶、磷酰基丙酮酸脱羧酶、丙酮酸脱羧酶同工酶、丙酮酸脱羧酶同工酶 2 和吡哆丙酮酸脱羧酶。

23. 如权利要求 21 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述氨基转移酶选自 GABA 转氨酶、Lys6 脱氢酶、鸟氨酸-氧代酸转氨酶、赖氨酸氨基转移酶、4-氨基丁酸氨基转移酶和酵母氨酸脱氢酶组成的组。

24. 如权利要求 16 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述至少一个核苷酸序列编码醛脱氢酶和氨基转移酶以用于从氨基己酸生产六亚甲基二胺。

25. 如权利要求 24 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述醛脱氢酶催化氨基己酸向 6-氨基己醛的转化,且所述氨基转移酶催化所述 6-氨基己醛向六亚甲基二胺的转化。

26. 如权利要求 25 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述醛脱氢酶为 ALDH 酶 (EC1.2.1-)。

27. 如权利要求 25 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述氨基转移酶选自 α -氨基己二酸氨基转移酶-1、氨基己二酸氨基转移酶和二氨基庚二酸脱氢酶组成的组。

28. 如权利要求 1 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述至少一个核苷酸序列编码氨基转移酶、还原酶、脱氢酶和脱羧酶以用于从 2-酮庚二酸生产六亚甲基二胺。

29. 如权利要求 28 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述氨基转移酶催化 2-酮庚二酸向 2-氨基庚二酸的转化,所述还原酶催化 2-氨基庚二酸向 2-氨基-7-氧代庚酸的转化,所述脱氢酶催化 2-氨基-7-氧代庚酸向 2,7-二氨基庚酸的转化,且所述脱羧酶催化 2,7-二氨基庚酸向六亚甲基二胺的转化。

30. 如权利要求 29 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述氨基转移酶选自 α -氨基己二酸氨基转移酶-1、氨基己二酸氨基转移酶和二氨基庚二酸脱氢酶组成的组。

31. 如权利要求 29 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述还原酶为氨基己二酸还原酶。

32. 如权利要求 31 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述氨基己二酸还原酶由 Sc-Lys2 编码。

33. 如权利要求 29 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述脱氢酶为酵母氨酸脱氢酶。

34. 如权利要求 33 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述酵母氨酸脱氢酶由 Sc-Lys9 或 Sc-Lys1 编码。

35. 如权利要求 28 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述脱羧酶选自赖氨酸脱羧酶和鸟氨酸脱羧酶组成的组。

36. 如权利要求 1 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述至少一个核苷酸序列编码醇脱氢酶以用于从 2-酮庚二酸生产 6-羟基己酸。

37. 如权利要求 36 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述至少一个核苷酸序列编码醇脱氢酶或醛脱氢酶以用于从 6-羟基己酸生产 1,6-己烷二醇。

38. 如权利要求 36 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述醇脱氢酶选自 6-羟基己酸脱氢酶、丁醇脱氢酶、ADHIV 脱氢酶、丙二醇氧化还原酶和 ADH6。

39. 一种用于从 2-酮戊二酸生产双官能 C_n 烷的方法,其中所述双官能 C_n 烷具有 C_1 和 C_n 末端官能团,所述 C_1 和 C_n 末端官能团选自 $-OH$ 、 $-COOH$ 和 $-NH_2$ 的组,其中 n 为 4 至 7 的整数,包括在足以生产双官能 C_n 烷的条件下培养权利要求 1 的宿主细胞;和分离所述双官能 C_n 烷。

40. 一种工程化宿主细胞,包括一种或多种外源核酸序列,所述一种或多种外源核酸序列编码选自高柠檬酸合酶 (EC2.3.3.)、高乌头酸酶、同分异构高柠檬酸脱氢酶 (EC1.1.1.-) 和它们的组合的至少一种 2-酮酸链延长途径的多肽,以及至少一种能够将延长途径的 2-酮酸产物用作底物的多肽。

41. 如权利要求 40 所述的工程化宿主细胞,其中所述一种或多种外源核酸序列编码 α -酮酸脱羧酶 (EC4.1.1.-) 和脱氢酶 (EC1.1.1.-)。

42. 如权利要求 41 所述的工程化宿主细胞,所述细胞生产 C_n 二羧酸,其中 n 为 4 至 7 的整数。

43. 如权利要求 41 所述的工程化宿主细胞,所述细胞生产 C_n 羟基羧酸,其中 n 为 4 至 7 的整数。

44. 如权利要求 42 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生己二酸。

45. 如权利要求 43 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 6-羟基己酸。

46. 如权利要求 41 所述的工程化宿主细胞,所述细胞产生 C_n 烷二醇,其中 n 为 4 至 7 的整数。

47. 如权利要求 46 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 1,6-己烷二醇。

48. 如权利要求 40 所述的工程化宿主细胞,其中所述一种或多种外源核酸序列编码选自 α -酮酸脱羧酶 (EC4.1.1.-)、氨基转移酶 (EC1.4.1.-)、氨基转移酶 (EC2.6.1.-) 和它们的组合的至少两种多肽。

49. 如权利要求 48 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生氨基己酸。

50. 如权利要求 40 所述的工程化宿主细胞,其中所述一种或多种外源核酸序列编码选自氨基己二酸转移酶 (EC2.6.1.39)、二氨基庚二酸脱氢酶 (EC1.4.1.16)、戊二酸脱羧酶 (EC4.1.1.-) 和它们的组合的至少一种多肽。

51. 如权利要求 50 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 C_n 氨基羧酸,其中 n 为 4 至 7 的整数。

52. 如权利要求 51 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生氨基己酸。

53. 如权利要求 48 所述的工程化宿主细胞,其中所述一种或多种外源核酸序列编码选自醛脱氢酶 (EC1.2.1.3) 的至少一种多肽。

54. 如权利要求 53 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 C_n 氨基醛或 C_n 二氨基烷,其中 n 为 4 至 7 的整数。

55. 如权利要求 54 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生六亚甲基二胺。

56. 如权利要求 54 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 6-羟基六胺。

57. 如权利要求 40 所述的工程化宿主细胞,其中所述一种或多种外源核酸序列编码选自 α -氨基己二酸-氨基转移酶 (EC2.6.1.39)、二氨基庚二酸脱氢酶 (EC1.4.1.16)、氨基己二酸还原酶 (EC1.2.1.31)、酵母氨酸脱氢酶 (EC1.5.1.-)、赖氨酸脱羧酶 (EC4.1.1.18)、鸟氨酸脱羧酶 (EC4.1.1.17) 和它们的组合的至少一种多肽。

58. 如权利要求 57 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 Cn 氨基醛或 Cn 二氨基烷,其中 n 为 4 至 7 的整数。

59. 如权利要求 57 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生六亚甲基二胺。

60. 如权利要求 40 所述的工程化宿主细胞,其中所述一种或多种外源核酸序列编码选自 3-氧代酰基-[酰基-载体-蛋白]还原酶 (EC1.1.1.100)、脂肪酸合酶 (EC2.3.1.-)、脱水酶 (EC4.2.1.59)、3-羟基辛酰基-[酰基-载体-蛋白]脱水酶 (EC4.2.1.59)、烯酰基-[酰基-载体-蛋白]还原酶 (EC1.3.1.9) 和它们的组合的至少一种多肽。

61. 如权利要求 60 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 Cn 二羧酸,其中 n 为 5 至 8 的整数。

62. 如权利要求 60 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生己二酸。

63. 如权利要求 60 所述的工程化宿主细胞,进一步包括一种或多种外源核酸序列,所述序列编码选自醛脱氢酶 (EC1.2.1.3) 的至少一种多肽。

64. 如权利要求 63 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 Cn 羟基羧酸,其中 n 为 5 至 8 的整数。

65. 如权利要求 63 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 Cn 烷二醇,其中 n 为 5 至 8 的整数。

66. 如权利要求 64 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 6-羟基己酸。

67. 如权利要求 65 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 1,6-己烷二醇。

68. 如权利要求 63 所述的工程化宿主细胞,其中所述一种或多种外源核酸序列编码选自氨基转移酶 (EC1.4.1.-) 和氨基转移酶 (EC2.6.1.-) 的至少一种多肽。

69. 如权利要求 68 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 Cn 氨基羧酸,其中 n 为 5 至 8 的整数。

70. 如权利要求 69 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生氨基己酸。

71. 如权利要求 70 所述的工程化宿主细胞,其中所述一种或多种外源核酸序列编码选自醛脱氢酶 (EC1.2.1.3)、氨基转移酶 (EC1.4.1.-) 和氨基转移酶 (EC2.6.1.-) 和它们的组合的至少两种多肽。

72. 如权利要求 71 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 1,n-二氨基烷,其中 n 为 5 至 8 的整数。

73. 如权利要求 72 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生六亚甲基二胺。

74. 如权利要求 71 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 n-氨基醇,其中 n 为 5 至 8 的整数。

75. 如权利要求 74 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 6-氨基己醇。

76. 如权利要求 40 所述的工程化宿主细胞,进一步包括一种或多种外源核酸序列,所述序列编码选自氨基转移酶 (EC2.6.1.7)、醛脱氢酶 (EC1.2.1.3)、谷氨酸半醛变位酶 (EC5.4.3.8)、3-氧代酰基-[酰基-载体-蛋白]还原酶 (EC1.1.1.100)、脂肪酸合

酶 (EC2. 3. 1. -)、脱水酶 (EC4. 2. 1. 59)、3- 羟基辛酰基-[酰基-载体-蛋白]脱水酶 (EC4. 2. 1. 59)、烯酰基-[酰基-载体-蛋白]还原酶 (EC1. 3. 1. 9) 和它们的组合的至少一种多肽。

77. 如权利要求 76 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生 n- 氨基酸,其中 n 为 5 至 8 的整数。

78. 如权利要求 76 所述的工程化宿主细胞,其中所述宿主细胞产生氨基己酸。

79. 一种用于从 2- 酮戊二酸生产双官能 C_n 烷的方法,所述双官能 C_n 烷具有 C1 和 Cn 末端官能团,所述 C1 和 Cn 末端官能团选自 -OH、-COOH 和 -NH₂ 的组,其中 n 为 5 至 8 的整数,包括在足以生产双官能 C_n 烷的条件下培养权利要求 42 的宿主细胞;和分离所述双官能 C_n 烷。

80. 如权利要求 14 或 22 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述 2- 酮戊二酸脱羧酶为 kgd,所述 2- 酮异戊酸脱羧酶为 kivD,所述促转氨的氨基酸脱羧酶为 ARO10,所述苯甲酰甲酸脱羧酶为 md1C,所述 2- 酮精氨酸脱羧酶为 aru1,所述膦酰基丙酮酸脱羧酶为 fom2,所述丙酮酸脱羧酶同工酶为 PDC6 或 PDC1,所述丙酮酸脱羧酶同工酶 2 为 PDC5、PDC1、PDC6、Aro10 或 KivD,所述吡啶丙酮酸脱羧酶为 ipdC。

81. 如权利要求 15 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述醛脱氢酶为 ChnE。

82. 如权利要求 18、27 或 30 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述 α - 氨基己二酸氨基转移酶-1 为 AADAT,所述氨基己二酸氨基转移酶为 LysN,所述二氨基庚二酸脱氢酶为 ddb 或 dapdh。

83. 如权利要求 23 所述的代谢工程化宿主细胞,其中所述酵母氨酸脱氢酶为 LYS9 或 LYS1。

从 α -酮酸生物合成双官能烷烃

技术领域

[0001] 本发明各方面涉及在宿主细胞中生产双官能烷烃的方法。具体地,本发明的多个方面描述了与在宿主细胞中从碳水化合物原料生产双官能烷烃有关的基因组件。更具体地,本发明的多个方面描述了用于经由 2-酮庚二酸生产己二酸、氨基己酸、己内酰胺、六亚甲基二胺的代谢途径。

背景技术

[0002] 原油是用于合成重要化学品和聚合物的第一原料。随着原油逐渐枯竭和昂贵,人们逐渐关注在化学品生产中使用活的微生物和它们纯化的酶对可再生原料进行生物加工。使用生物加工特别是发酵来生产饮料已有几个世纪。在过去的 50 年中,商业上已经使用微生物来生产诸如抗生素、维生素和氨基酸等化合物。然而,目前用微生物生产工业化学品的普遍性很低。最近已认识到微生物能为常规化学方法难以生产或昂贵生产的某些化合物提供经济的途径。

发明内容

[0003] 本发明各方面涉及用于从 α -酮酸生产 α, ω 双官能 C_n 烷烃的代谢工程化的宿主细胞,其中 α 和 ω 末端官能团选自 $-OH$ 、 $-COOH$ 和 $-NH_2$ 的组,并且其中 n 是 4-8 范围内的整数,所述代谢工程化的宿主细胞被包含编码至少一种生物合成途径酶的至少一个核苷酸序列的核酸进行遗传修饰。在一些实施方式中,所述核酸包含编码两个或多个基因产物的核苷酸序列。所述代谢工程化的宿主细胞可以是原核细胞。例如,在一些实施方式中,所述代谢工程化的宿主细胞可以是厌氧型原核细胞。所述代谢工程化的宿主细胞可选自大肠杆菌 (*E. Coli*)、谷氨酸棒杆菌 (*C. Glutanicum*)、黄色短杆菌 (*B. Flavum*) 和乳糖发酵短杆菌 (*B. lactofermentum*) 组成的组。

[0004] 在优选的实施方式中, α -酮酸是 α -酮戊二酸,并被转化成 α -酮己二酸、 α -酮庚二酸或 α -酮辛二酸。在优选的实施方式中,宿主细胞包含编码高柠檬酸合酶、高乌头酸酶和同分异构高柠檬酸脱氢酶的核酸序列。高柠檬酸合酶可选自由 *AksA*、*NifV*、*hcs* 和 *Lys20/21* 组成的组。高乌头酸酶可选自由 *AksD/E*、*LysT/U*、*Lys4*、3-异丙基苹果酸脱水酶大/小亚单位及其同源物组成的组。所述同分异构高柠檬酸脱氢酶可选自由 *AksF*、*Hicdh*、*Lys12*、2-氧代辛二酸合酶、3-异丙基苹果酸脱水酶及其同源物组成的组。

[0005] 在优选的实施方式中,所述 α, ω 双官能 C_n 烷烃具有 6 个碳原子,并且选自由氨基己酸、己二酸、六亚甲基二胺、6-羟基六胺、1,6-己二醇、6-氨基己醛、6-氨基己醇和 6-羟基己酸组成的组。

[0006] 本发明的方面涉及用于从 α -酮庚二酸生产己二酸的代谢工程化宿主细胞,所述宿主细胞还包含编码脱羧酶和醛脱氢酶的核酸。在一些实施方式中,所述脱羧酶是 2-酮脱羧酶,并且催化 α -酮庚二酸向己二酸半醛的转化;所述醛脱氢酶催化己二酸半醛向己二酸的转化。所述 2-酮脱羧酶可选自由 2-酮戊二酸脱羧酶 (*kgd*)、2-酮异戊酸脱羧酶

(kivD)、促转氨的氨基酸脱羧酶 (ARO10)、苯甲酰甲酸脱羧酶 (mdlC)、2- 酮精氨酸脱羧酶 (aruI)、膦酰基丙酮酸脱羧酶 (fom2)、丙酮酸脱羧酶同工酶 (PDC6、PDC1)、丙酮酸脱羧酶同工酶 2 (PDC5、PDC1、PDC6、Aro10、KivD)、吡啶丙酮酸脱羧酶 (ipdC 及其同源物组成的组。在一些实施方式中,所述脱羧酶与 2- 酮戊二酸脱羧酶 (kgd)、2- 酮异戊酸脱羧酶 (kivD)、促转氨的氨基酸脱羧酶 (ARO10)、苯甲酰甲酸脱羧酶 (mdlC)、2- 酮精氨酸脱羧酶 (aruI)、膦酰基丙酮酸脱羧酶 (fom2)、丙酮酸脱羧酶同工酶 (PDC6、PDC1)、丙酮酸脱羧酶同工酶 2 (PDC5、PDC1、PDC6、Aro10、KivD)、吡啶丙酮酸脱羧酶 (ipdC) 及其同源物具有至少 30% 同一性。在优选的实施方式中,所述醛脱氢酶是 6- 氧代己酸脱氢酶 (ChnE) 及其同源物。在其他优选实施方式中,所述醛脱氢酶与 6- 氧代己酸脱氢酶 (ChnE) 具有至少 30% 同一性。

[0007] 本发明的方面涉及用于从 α - 酮庚二酸生产氨基己酸的代谢工程化宿主细胞,所述宿主细胞还包含编码氨基转移酶和脱羧酶的核酸。在一些实施方式中,所述氨基转移酶催化 α - 酮庚二酸向 2- 氨基庚二酸的转化;所述脱氢酶催化 2- 氨基庚二酸向氨基己酸的转化。所述氨基转移酶可选自由 α - 氨基己二酸氨基转移酶 -1 (AADAT)、氨基己二酸氨基转移酶 (LysN)、二氨基庚二酸脱氢酶 (ddb 和 dapdh) 及其同源物组成的组。在一些实施方案中,脱羧酶是谷氨酸脱羧酶。在一些实施方式中,谷氨酸脱羧酶由选自 Gad6/7、GadA、GadB 和 lysA 的组的基因或片段编码。在一些实施方式中,所述脱羧酶催化 α - 酮庚二酸向己二酸半醛的转化;所述氨基转移酶催化己二酸半醛向氨基己酸的转化。所述酮脱羧酶可选自由 2- 酮戊二酸脱羧酶 (kgd)、2- 酮异戊酸脱羧酶 (kivD)、促转氨的氨基酸脱羧酶 (ARO10)、苯甲酰甲酸脱羧酶 (mdlC)、2- 酮精氨酸脱羧酶 (aruI)、膦酰基丙酮酸脱羧酶 (fom2)、丙酮酸脱羧酶同工酶 (PDC6、PDC1)、丙酮酸脱羧酶同工酶 2 (PDC5、PDC1、PDC6、Aro10、KivD)、吡啶丙酮酸脱羧酶 (ipdC) 及其同源物组成的组。所述氨基转移酶可选自由 GABA 转氨酶、Lys6 脱氢酶、鸟氨酸- 含氧酸转氨酶、赖氨酸氨基转移酶、4- 氨基丁酸氨基转移酶、4- 氨基丁酸氨基转移酶、酵母氨酸脱氢酶 (LYS9 和 LYS1) 或其任意同源蛋白组成的组。

[0008] 本发明的方面涉及用于从氨基己酸生产六亚甲基二胺的代谢工程化宿主细胞,所述宿主细胞包含编码醛脱氢酶和氨基转移酶的核酸。在一些实施方式中,所述醛脱氢酶催化氨基己酸向 6- 氨基己醛的转化;所述氨基转移酶催化 6- 氨基己醛向 6- 己二胺的转化。在优选的实施方式中,所述醛脱氢酶是 ALDH 酶 (EC 1.2.1-)。在一些实施方式中,所述氨基转移酶可选自由 α - 氨基己二酸氨基转移酶 -1 (AAADAT)、氨基己二酸氨基转移酶 (LysN)、二氨基庚二酸脱氢酶 (ddb 和 dapdh) 及其同源蛋白组成的组。

[0009] 本发明的方面涉及用于从 α - 酮庚二酸生产六亚甲基二胺的代谢工程化宿主细胞,所述宿主细胞包含编码氨基转移酶、还原酶、脱氢酶和脱羧酶的核酸。在一些实施方式中,所述氨基转移酶催化 α - 酮庚二酸向 2- 氨基庚二酸的转化;所述还原酶催化 2- 氨基庚二酸向 2- 氨基-7- 氧代庚酸的转化,所述脱氢酶催化 2- 氨基-7- 氧代庚酸向 2,7- 二氨基庚酸的转化,且所述脱羧酶催化 2,7- 二氨基庚酸向六亚甲基二胺的转化。所述氨基转移酶可选自由 α - 氨基己二酸氨基转移酶 -1 (AADAT)、氨基己二酸氨基转移酶 (LysN)、二氨基庚二酸脱氢酶 (ddb 和 dapdh) 及其变体组成的组。在一些实施方式中,所述还原酶是氨基己二酸还原酶或其同源物。在一些实施方式中,所述氨基己二酸还原酶由 Sc-Lys2 编码。在一些实施方式中,所述脱氢酶是酵母氨酸脱氢酶或其同源物,并且由 Sc-Lys9 或 Sc-Lys1 或

其变体编码。所述脱羧酶可选自由赖氨酸脱羧酶、鸟氨酸脱羧酶及其变体组成的组。

[0010] 本发明的一些方面涉及用于从 α -酮庚二酸生产 6-羟基己酸的代谢工程化宿主细胞,所述宿主细胞包含编码醇脱氢酶的核酸。本发明的方面涉及用于从 6-羟基己酸生产 1,6-己二醇的代谢工程化宿主细胞,所述宿主细胞包含编码醇脱氢酶或醛脱氢酶的核酸。所述醇脱氢酶可选自 6-羟基己酸脱氢酶、丁醇脱氢酶、ADHIV 脱氢酶、丙二醇脱氢酶、ADH6 及其同源物。

[0011] 本发明的方面涉及用于从 α -酮戊二酸生产 α , ω -双官能 C_n 烷烃的方法,其中 α 和 ω 末端官能团选自 -OH、-COOH 和 -NH₂ 基团,其中 n 是 4-7 范围内的整数,所述方法包含在足以生产 α , ω -双官能 C_n 烷烃的条件下培养所述宿主细胞,并分离 α , ω -双官能 C_n 烷烃。

[0012] 在一些方面,本发明涉及包含一个或多个外源核酸序列的宿主细胞,所述外源核酸序列编码选自高柠檬酸合酶 (EC 2.3.3.-)、高乌头酸酶 (EC 2.3.3.14)、同分异构高柠檬酸脱氢酶 (EC 1.1.1.-) 及其组合的至少一个多肽。在一些实施方式中,代谢工程化的宿主细胞从 α -酮戊二酸生产 α -酮己二酸、 α -酮庚二酸、 α -酮辛二酸或其组合。在一些方面,本发明涉及包含一个或多个外源核酸序列的宿主细胞,所述外源核酸序列编码选自 α -酮酸脱羧酶 (EC 4.1.1.-) 和脱氢酶 (EC 1.1.1.-) 及其组合的至少一个多肽。在一些实施方式中,所述工程化宿主细胞生产 C_n 二羧酸,其中 n 是 4-7 范围中的整数。例如所述工程化宿主细胞生产己二酸。在其他实施方式中,所述工程化宿主细胞生产 C_n 羟基羧酸,其中 n 是 4-7 范围中的整数。例如所述工程化宿主细胞生产 6-羟基己酸。在另一些实施方式中,所述工程化宿主细胞生产 C_n 烷二醇,其中 n 是 4-7 范围中的整数,例如 1,6-己二醇。

[0013] 在本发明的一些方面,本发明涉及从 α -酮戊二酸生产 α -酮己二酸、 α -酮庚二酸、 α -酮辛二酸或其组合的工程化宿主细胞,其包含编码选自 α -酮酸脱羧酶 (EC 4.1.1.-)、氨基转移酶 (EC 1.4.1.-)、氨基转移酶 (EC 2.6.1.-) 及其组合的至少一个多肽的一个或多个外源核酸序列。在优选的实施方式中,所述工程化宿主细胞生产氨基己酸。在一些实施方式中,所述工程化宿主细胞还进一步包括一个或多个编码选自醛脱氢酶 (EC 1.2.1.3) 的至少一个多肽的外源核酸序列,并且生产 C_n 氨基醛或 C_n 二氨基烷烃,其中 n 是 4-7 范围内的整数。例如,所述工程化宿主细胞生产六亚甲基二胺或 6-羟基六胺。

[0014] 在一些方面,所述工程化宿主细胞包含一个或多个外源核酸序列,所述外源核酸序列编码选自氨基己二酸转移酶 (EC 2.6.1.39)、二氨基庚二酸脱氢酶 (EC 1.4.1.16)、谷氨酸脱羧酶 (EC 4.1.1.-) 及其组合的至少一个多肽。在一些实施方式中,所述宿主细胞生产 C_n 氨基-羧酸,其中 n 是 4-7 范围中的整数。例如所述工程化宿主细胞生产氨基己酸。

[0015] 本发明的一些方面涉及从 α -酮酸生产 α , ω -双官能 C_n 烷烃的工程化宿主细胞,其包含编码选自 α -氨基己二酸-氨基转移酶 (EC 2.6.1.39)、二氨基庚二酸脱氢酶 (EC 1.4.1.16)、氨基己二酸还原酶 (EC 1.2.1.31)、酵母氨酸脱氢酶 (EC 1.5.1.-)、赖氨酸脱羧酶 (EC 4.1.1.18)、鸟氨酸脱羧酶 (EC 4.1.1.17) 及其组合的至少一个多肽的一个或多个外源核酸序列。在一些实施方式中,所述工程化宿主细胞生产 C_n 氨基醛或 C_n 二氨基烷烃,其中 n 是 4-7 范围中的整数。例如所述工程化宿主细胞生产六亚甲基二胺。在本发明的一些方面,所述工程化宿主细胞还包含一个或多个外源核酸序列,所述外源核酸序列编码 3-氧代酰基-[酰基-载体-蛋白]还原酶 (EC 1.1.1.100)、脂肪酸合酶 (EC 2.3.1.-)、脱

水酶 (EC 4.2.1.59)、3-羟基辛酰基-[酰基-载体-蛋白]脱水酶 (EC 4.2.1.59)、烯酰基-[酰基-载体-蛋白]还原酶 (EC 1.3.1.9) 及其组合的至少一个多肽。在一些优选实施方式中,所述工程化宿主细胞生产 C_n 二羧酸,其中 n 是 5-8 范围中的整数。例如所述工程化宿主细胞生产己二酸。在一些实施方式中,所述工程化宿主细胞还包括编码选自醛脱氢酶 (EC 1.2.1.3) 的至少一个多肽的一个或多个外源核酸序列,并且生产 C_n 羟基羧酸,其中 n 是 5-8 范围内的整数,例如,6-羟基己酸。在一些实施方式中,所述工程化宿主细胞生产 C_n 烷二醇,其中 n 是 5-7 范围中的整数,例如 1,6-己二醇。

[0016] 本发明的一些方面涉及从 α -酮酸生产 α , ω -双官能 C_n 烷烃的工程化宿主细胞,其包含编码选自 α -氨基己二酸-氨基转移酶(**EC2.6.1.39**)、二氨基庚二酸脱氢酶 (EC 1.4.1.16)、氨基己二酸还原酶 (EC 1.2.1.31)、酵母氨酸脱氢酶 (EC1.5.1.-)、赖氨酸脱羧酶 (EC 4.1.1.18)、鸟氨酸脱羧酶 (EC4.1.1.17) 及其组合的至少一个多肽的一个或多个外源核酸序列,选自 3-氧代酰基-[酰基-载体-蛋白]还原酶 (EC 1.1.1.100)、脂肪酸合酶 (EC 2.3.1.-)、脱水酶 (EC 4.2.1.59)、3-羟基辛酰基-[酰基-载体-蛋白]脱水酶 (EC 4.2.1.59)、烯酰基-[酰基-载体-蛋白]还原酶 (EC 1.3.1.9) 及其组合的至少一个多肽的一个或多个外源核酸序列,选自醛脱氢酶的至少一个多肽的一个或多个外源核酸序列,和编码选自氨基转移酶 (EC 1.4.1.-) 和氨基转移酶 (EC 2.6.1.-) 的至少一个多肽的一个或多个外源核酸序列。在一些实施方式中,所述工程化宿主细胞生产 C_n 氨基羧酸,其中 n 是 5-8 范围中的整数,例如氨基己酸。在一些方面,本发明涉及包含一个或多个外源核酸序列的宿主细胞,所述外源核酸序列编码选自醛脱氢酶 (EC 1.2.1.3)、氨基转移酶 (EC 1.4.1.-) 和氨基转移酶 (EC 2.6.1.-) 及其组合的至少一个多肽。在一些实施方式中,所述工程化宿主细胞生产 1, n -二氨基烷烃,其中 n 是 5-8 范围中的整数,例如六亚甲基二胺。在其他实施方式中,所述工程化宿主细胞生产 n -氨基醇,其中 n 是 5-8 范围中的整数,例如 6-氨基己醇。

[0017] 本发明的一些方面涉及工程化宿主细胞,其包含编码选自氨基转移酶 (EC 2.6.1.7)、醛脱氢酶 (EC 1.2.1.3)、谷氨酸半醛变位酶(**EC5.4.3.8**)、3-氧代酰基-[酰基-载体-蛋白]还原酶 (EC 1.1.1.100)、脂肪酸合酶(**EC2.3.1.-**)、脱水酶(**EC4.2.1.59**)、3-羟基辛酰基-[酰基-载体-蛋白]脱水酶 (EC 4.2.1.59)、烯酰基-[酰基-载体-蛋白]还原酶 (EC 1.3.1.9) 及其组合的至少一个多肽的一个或多个外源核酸序列。在一些实施方式中,所述工程化宿主细胞生产 n -氨基羧酸,其中 n 是 5-8 范围中的整数,例如氨基己酸。

[0018] 本发明的一些方面涉及用于从 α -酮戊二酸生产 α , ω -双官能 C_n 烷烃的方法,其中 α 和 ω 末端官能团选自 -OH、-COOH 和 -NH₂ 基团,其中 n 是 5-8 范围中的整数,所述方法包含在足以生产 α , ω -双官能 C_n 烷烃的条件下培养所述宿主细胞,并分离 α , ω -双官能 C_n 烷烃。

附图说明

[0019] 参考形成本申请部分的具体实施方式和附图可更充分地理解本发明。

[0020] 图 1 显示了己二酸的生物合成途径。通过 1 的步骤 a 描述了来自詹氏甲烷球菌 (*Methanococcus jannaschii*) 的辅酶 B 生物合成途径的 2-酮延长途径。标记步骤 a、b、c、

d、e、f、g、h、m 和 n 代表下面描述的底物向产物的转化。

[0021] 图 2 代表用于从 α -酮酸 C_n 开始生物生产双官能烷烃 $C_{(n-1)}$ 的流程图。

[0022] 图 3 代表用于从 α -酮庚二酸开始生物生产双官能己烷的流程图。

[0023] 图 4 代表用于从 α -酮酸 C_n 开始生物生产双官能烷烃 C_n 的流程图。

[0024] 图 5 代表用于从 α -酮己二酸开始生物生产双官能己烷的流程图。

具体实施方式

[0025] 本说明书中使用的以下术语具有下文所述的含义。除非另有说明，本文使用的所有科技术语具有与本领域普通技术人员通常理解相同的含义。

[0026] 除非文中清楚指明，否则单数形式（“a,” “an,” 和 “the”）包括复数涵义。

[0027] 所使用的术语“包含”（“comprise”和“comprising”）为开放式的包括，是指还可包括其他元素。

[0028] 所使用的术语“包括”是指“包括但不限于”。“包括”和“包括但不限于”可相互交换使用。

[0029] 本说明书中提到的所有公开均通过引用并入本文。本文讨论的公开仅用于提供其在本发明申请日之前的公开。本文中不应有任何内容被解释为承认本发明没有依靠在先发明而先于此公开的资格。

[0030] 本发明一方面提供了以快速、便宜且环境响应的方式生产目标有机脂肪族化合物的方法和材料。因此，本发明满足了多种商业和工业需要。术语“有机分子”是指，例如主要由碳和氢构成的任何分子，例如烷烃。目标有机化合物，例如双官能烷烃、二醇、二羧酸等可用于合成塑料、尼龙和通常原子石油和烃的其他产物。本发明的一方面涉及双官能 n -烷烃的合成，其中烃链 C_n 源自烃链 C_n 或 C_{n+1} ，其中 n 是从约 1 至约 8 的数，例如从约 2 至约 5，或从约 3 至约 4。在优选的实施方式中，所述双官能 n -烷烃源自 α -($n+1$) 或 n 酮酸。

[0031] 本发明的一方面涉及在微生物中生产目标双官能烷烃，并且提供了在微生物中从碳水化合物源生产双官能烷烃的方法。本文使用的“双官能烷烃”是指具有两个官能团的烷烃。术语“官能团”是指，例如原子的排列方式决定了该基团以及与其相连分子的化学性质的基团。官能团的实例包括卤素原子，羟基（-OH）、羧基（-COOH）和氨基（-NH₂）等。“醇”是指，例如其中一个或多个氢原子被 -OH 基团取代的烷基部分。术语“伯醇”是指，例如 -OH 与末端或链末端碳原子结合的醇，例如 1-丁醇、1-己醇等。术语“仲醇”是指，例如 -OH 与结合一个氢原子和两个其他碳原子的碳原子结合的醇，例如 2-丁醇、2-己醇等。术语“叔醇”是指，例如 -OH 与结合三个其他碳原子的碳原子结合的醇，例如甲基丙醇（叔丁醇）等。“氨基”是指，例如其中一个或多个氢原子被 -NH₂ 基团取代的烷基部分。“羰基化合物”是指，例如包含羰基 $C=O$ 的有机化合物，例如具有通式 RCOH 的醛；具有通式 RCOR' 的酮；具有通式 RCOOH 的羧酸；和具有通式 RCOOR' 的酯。

[0032] 所述方法引入了能够生产以下目标双官能烷烃中至少一种的微生物，特别是己酸、氨基己酸、HMD、6-羟基己酸。其他目标双官能烷烃包括：1,3-丙二醇、丙三醇、丙烯酸、尸胺、3-羟基丙酸、五亚甲基二胺、马来酸、琥珀酸、己二酸、癸二酸、戊二酸和辛二酸等。现已描述了多个化学合成途径，例如用于己酸及其中间产物，例如粘康酸和己二酸半醛；用于己内酰胺及其中间产物，例如 6-氨基己酸；用于己烷，1,6-二氨基己烷或己烷亚甲基二胺；

用于 3- 羟基丙酸及其中间产物, 例如丙二酸半醛, 但仅公开了用于这些有机化学品中一部分的少数生物途径。因此, 本发明的方面提供了用于从可持续性给料生产双官能烷烃的工程化代谢途径、分离核酸或工程化核酸、多肽或工程化多肽、宿主细胞或基因工程化宿主细胞, 方法和材料。适合作为起始点的碳源包括碳水化合物和合成的中间产物。细胞能够代谢的碳水化合物的实例包括糖、右旋糖、甘油三酸酯和脂肪酸。来自代谢途径的中间产物, 例如丙酮酸、草酰乙酸、2- 酮戊二酸也可用作起始点。本发明的方面涉及工程化多肽和编码对天然或非天然底物具有活性或改进活性, 或具有宽底物特异性 (例如无差别催化, 例如无差别底物) 的酶的多核苷酸。在本文中可交换使用的术语“多肽”和属于“蛋白”和“肽”是指氨基酸的多聚物, 包括, 例如基因产物、天然存在的蛋白、同源物、直向同源物、旁系同源物、片段以及上述的等效物、变体和类似物。属于“具有酶活性的多肽”是指催化其他物质的化学反应, 而其本身在反应完成时不被破坏或改变的任何多肽。具有酶活性的多肽通常催化从一种或多种底物形成一种或多种产物。在本发明的一些方面, 一些酶的催化无差别性可以与蛋白工程化组合, 或者可用于新的代谢途径和生物合成应用。在一些实施方式中, 可修饰现有的酶以用于有机生物合成。在一些优选的实施方式中, 参与目标双官能 n- 烷烃生产的酶包括但不限于 2 氨基 - 脱羧酶、2- 酮脱羧酶、末端 - 氨基转移酶、2- 氨基转移酶、醇脱氢酶、醛脱氢酶、氨基 - 醛脱氢酶、脱氢酶和脱水酶。在一些实施方式中, 可改变酶的反应机制以催化新反应、改变、拓展或改进底物特异性。应理解, 如果酶结果 (例如结晶结果) 是已知的, 则可通过合理的再设计修饰酶的性质 (参见美国专利申请 US20060160138、US20080064610 和 US20080287320, 其通过引用全文并入本文)。酶性质的修饰或改进可来自于向多肽链中引入修饰, 其可有效干扰酶的结构 - 功能和 / 或与其他分子的相互作用 (例如底物和非天然底物)。本领域已知多肽的一些区域可能对酶活性至关重要。例如, 对参与催化的和 / 或底物结合域中氨基酸组成的小干扰将对酶功能产生显著的影响。一些氨基酸残基可位于对于维持酶的二级或三级结构重要的位置, 并因此在被修饰时产生显著变化的酶性质。在一些实施方式中, 潜在的途径组分是上述任一种的变体。此类变体可通过随机突变产生, 或通过合理设计产生以生产具有例如改变的底物特异性、增加的酶活性、较高的稳定性等酶活性。因此, 在一些实施方式中, 对参照母本酶进行的用于产生具有期望性质的修饰的数量可包括一个或多个氨基酸、2 个或更多氨基酸、5 个或更多氨基酸、10 个或更多氨基酸, 或 20 个或更多氨基酸, 至氨基酸总数的 10%、至氨基酸总数的 20%、至氨基酸总数的 30%、至构成所述参照酶的氨基酸总数的 40% 或至构成所述参照酶的氨基酸总数的 50%。

[0033] 本领域技术人员应理解, 本文例示的工程化途径的描述涉及但不限于物种、特异基因, 并且包括核酸或氨基酸序列的同源物或直向同源物。在使用本领域已知的方法比对时, 同源物或直向同源物序列具有相对高度的序列同一性 / 类似性。

[0034] 本发明的一方面涉及新微生物或“基因修饰的”微生物或宿主细胞, 其经工程化以具有新代谢能力或新代谢途径。本文使用的属于“基因修饰的”微生物是指具有通常不见于参照物种的野生型菌株中的至少一个基因变化。在一些实施方式中, 基因工程化的微生物经工程化以表达或过表达位于代谢途径关键点和 / 或阻断其他酶合成的至少一个具体酶, 以克服或避开代谢瓶颈。术语“代谢途径”是指两个或更多连续的酶反应, 其中一个酶反应的产物称为后一个酶反应的底物。在代谢途径的每一步, 中间产物化合物形成或被用作后

一步的底物。这些化合物可被称作“代谢中间产物”。每一步的产物也被称作“代谢物”。

[0035] 本发明的一方面提供了用于涉及和制造工程化代谢途径的方法。在本发明的一些方面,可在一个或多个宿主细胞或目标微生物中进行从一个或多个可得且可持续底物制备目标产物的可选途径。应理解,用于制造双官能烷烃的工程化途径可涉及多个酶,因此,通过该途径的流可能不是最适宜用于生产目标产物。因此,在本发明的一些方面,任选通过调整途径酶相对于另一种途径酶的活性水平来平衡流。在整个申请中提供了此类调整的实例。

[0036] 本发明一方面提供了基因修饰的宿主细胞或微生物,以及使用所述基因修饰的宿主细胞或微生物从 α -酮酸生产双官能 n -烷烃的方法。本文使用的宿主细胞是指体内或体外的真核细胞,原核细胞,或来自作为单细胞实体的多细胞生物的细胞(例如细胞系)。宿主细胞可以为原核细胞(例如细菌,如大肠杆菌(*E. coli*)或枯草杆菌(*B. subtilis*))或真核细胞(例如,酵母、哺乳动物或昆虫细胞)。例如,宿主细胞可以是细菌细胞(例如,大肠杆菌、枯草杆菌、分支杆菌属(*Mycobacterium* spp.)、结核分枝杆菌(*M. tuberculosis*)或其他适合的细菌细胞)、古核生物(例如,詹氏甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*)或海沼甲烷球菌(*Methanococcus maripaludis*)或其他适合的古核细胞)、酵母细胞(例如,酵母属(*Saccharomyces*)物种,例如,酿酒酵母(*S. cerevisiae*)、裂殖酵母(*S. pombe*)、毕赤酵母属(*Pichia*)物种、念珠菌属(*Candida*)物种,例如,白色念珠菌(*C. albicans*)或其他适合的酵母物种)。原核和真核宿主细胞可以是,或经过基因修饰(也称作“重组宿主细胞”、“代谢工程化细胞”或“基因工程化细胞”),并用作核酸的受体,例如包含编码一个或多个生物合成或工程化途径基因产物的核苷酸序列的表达载体。原核和真核宿主细胞还表示通过核酸进行基因工程化的初始细胞的后裔。在一些实施方式中,可根据其代谢性质选择宿主细胞。例如,如果选择或筛选涉及具体代谢途径,使用具有相关途径的宿主细胞是有帮助的。此宿主细胞可具有某些生理适应性,以允许其具有或输入或输出一种或多种中间产物或途径的产物。然而,在其他实施方式中,可选自不表达与目标具体途径相关的酶的宿主细胞,以能够使用适合的基因元件设置而不依赖于宿主细胞提供一个或多个缺失的步骤,从而鉴定出该途径所需的所有组分。

[0037] 在一些实施方式中,对厌氧细菌生物进行代谢工程化。本文使用的厌氧生物是生长不需要氧(即厌氧条件)的任何生物。有利地,细菌细胞可以是大肠杆菌、谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum*)、黄色短杆菌(*B. flavum*)或乳糖发酵短杆菌(*B. lactofermentum*)细胞;目前这些菌株在工业上应用以使用细菌发酵法制造氨基化合物。例如,谷氨酸棒杆菌(*C. glutamicum*)广泛用于生产氨基酸(例如,L-谷氨酸,L-赖氨酸,参见 Eggeling L et al., 2005, Handbook for *Corynebacterium glutamicum*. Boca Raton, USA :CRC Press)

[0038] 本发明的代谢工程化细胞是通过使用编码参与工程化代谢途径的酶的至少一个核苷酸序列转化宿主细胞而制成的。本文使用的术语“核苷酸序列”、“核酸序列”和“基因构建体”可互相交换使用,并且是指单链或双链的 RNA 或 DNA 聚合物,其任选包含合成、非天然或改变的核苷酸碱基。核苷酸序列可包含 cDNA、基因组 DNA、合成 DNA 或 RNA 的一个或多个片段。在优选的实施方式中,核苷酸序列经过密码子优化以反应宿主细胞的典型密码子使用,而不改变通过该核苷酸序列编码的多肽。在某些实施方式中,属于“密码子优化”或“密码子优化的”是指修饰核酸序列的密码子含量,而不修饰通过该核酸编码的多肽序列,

从而增强具体宿主细胞中的表达。在某些实施方式中,该属于是指包括修饰核酸序列的密码子含量,作为控制多肽表达水平的方式(例如,增加或降低表达水平)。因此,本发明的一方面包括编码参与工程化代谢途径的酶的核酸序列。在一些实施方式中,代谢工程化细胞可表达具有实施下述步骤所必须的酶活性的一个或多个多肽。例如,具体细胞可包含一个、两个、三个、四个、五个或多于五个的核酸序列,每个核酸序列编码实施 α -酮酸向双官能烷烃转化所必须的多肽。或者,单个核酸分析可编码一个或多于一个的多肽。例如,单个核酸分析可包含编码两个、三个、四个,乃至五个不同多肽的核酸序列。用于本文所述发明的核酸序列可以从多种途径获得,例如 cDNA 序列的扩增、DNA 文库、从头合成、基因组区段切除。随后,可使用标准分子生物学和/或重组 DNA 技术修饰由此来源获得的序列,从而产生具有期望修饰的核酸序列。核酸序列的修饰的示例方法包括,例如定点突变、PCR 突变、删除、插入、取代、使用限制性酶交换序列部分,任选与连接、同源重组、位点特异性重组或其各种组合进行组合。在其他实施方式中,核酸序列可以是合成的核酸序列。可以使用美国专利 7,323,320、共同待审申请 No. 11/804,996,和美国专利公开 Nos. 1006/0160138 和 2007/0269870 中描述的多种方法生产合成的多核苷酸序列。

[0039] 用于转化细菌、植物和动物细胞的方法是本领域熟知的。常见的细菌转化方法包括电穿孔和化学修饰。

[0040] 在一些实施方式中,基因修饰的宿主细胞经过基因修饰,从而在适合的培养基中进行体外培养时,产生水平在至少 0.1g/l,至少 1g/l 或至少 10g/l 的目标产物或中间产物。应理解,可通过多种方式控制基因修饰的宿主细胞产生的目标产物或其代谢中间产物的水平。在一些实施方式中,通过编码参与工程化途径的一种或多种酶的核酸序列的拷贝数量控制表达的水平(例如,高拷贝表达载体与中或低拷贝表达载体)。优选使用载体将核酸序列引入细胞。地拷贝表达载体通常提供少于每细胞 20 个载体拷贝(例如每个细胞 1 至约 5 个,5 至约 10 个,10 至约 15 个,15 至约 20 个拷贝的表达载体)。用于原核细胞的(例如大肠杆菌)适合的低拷贝表达载体包括但不限于 pAYC184、pBeloBac11、pBR332、pBAD33、pBBR1MCS 及其衍生物、pSC101、SuperCos(粘粒)和 pWE15(粘粒)。中拷贝数量的表达载体通常提供每细胞约 20 至约 50 个表达载体拷贝,或每细胞约 20 至 80 个表达载体拷贝。用于原核细胞的(例如大肠杆菌)适合的中拷贝表达载体包括但不限于 pTrc99A, pBAD24 和包含 ColE1 复制起点及其衍生物的载体。高拷贝表达载体通常提供每细胞约 80 至约 200 或更多的表达载体拷贝。用于原核细胞的(例如大肠杆菌)适合的高拷贝表达载体包括但不限于 pUC、PCV1、pBluescript、pGEM 和 pTZ 载体。

[0041] 本发明的一方面提供了表达编码参与工程化途径的多肽的核酸或其子序列的表达盒。在一些实施方式中,所述表达盒可包含操作性地连接到转录元件(例如启动子)和终止子的核酸。本文使用的术语“盒”是指如果将具体基因插入以操作性地连接到存在于所述核苷酸序列中的一个或多个调控序列,即能够给表达所述基因的核苷酸序列。因此,例如表达盒可包含期望在宿主细胞中表达的杂合基因。在一些实施方式中,可通过已知的重组技术向载体中引入一个或多个表达盒。启动子是启动并控制 RNA 聚合酶转录期望核酸序列的核苷酸序列。在一些实施方案中,启动子可以是诱导型。在一些实施方案中,启动子可以是组成型。用于原核宿主生物的适合的启动子的非限定性实例包括噬菌体 T7RNA 聚合酶启动子、trp 启动子、lac 操作子启动子等。用于原核宿主生物的适合的强启动子的非限定

性实例包括 lacUV5 启动子、T5, T7, Trc, Tac 等。用于真核宿主生物的适合的启动子的非限定性实例包括 CMV 立即早期启动子、HSV 早期或晚期启动子、胸腺嘧啶激酶启动子等。终止控制区也可源自原产于优选宿主的多种基因。

[0042] 在一些实施方式中, 工程化途径的第一酶可以受到第一启动子的控制, 而工程化途径的第二酶受到第二启动子的控制, 其中所述第一和第二启动子具有不同的强度。例如, 第一启动子可强于第二启动子, 或者第二启动子可强于第一启动子。因此, 通过增加第一酶的拷贝数量和 / 或通过提高与第一酶操作性连接的启动子的强度相对于与第二酶操作性连接的启动子的强度, 可提高工程化途径中第一酶的水平相对于第二酶的水平。在一些其他实施方式中, 工程化途径的多个酶受相同启动子的控制。在其他实施方式中, 改变核糖体结合位点影响途径中不同酶的相对翻译和表达。改变核糖体结合位点能够单独使用, 以控制途径中酶的相对表达, 或者可以与同样影响基因表达水平的上述启动子修饰和密码子优化一起使用。

[0043] 在示例性实施方式中, 潜在途径酶的表达可依赖于反应混合物中途径酶作用底物的存在。例如, 可通过培养基中 A 的存在诱导催化 A 向 B 转化的酶的表达。可通过添加导致诱导的化合物, 或通过所述化合物在生物合成途径过程中的天然装配 (例如, 诱导物可以是生物合成过程中产生的中间产物, 以产生期望的产物) 诱导此途径酶的表达。

[0044] 在一些实施方式中, 可使用计算机参与的设计技术以产生用于产生目标有机分子的可选途径。在一些实施方式中, 可使用包含有关基因组及其连接的信息的数据库来设计新的代谢途径。数据库的实例为 MetaCyc (代谢途径和酶的数据库)、明尼苏达大学生物催化 / 生物降解数据库 (微生物催化反应和有机化学化合物的生物降解途径的数据库)、LGAND (提供有关代谢物和其他化学化合物、体现代谢和其他反应的底物 - 产物相关性的信息, 以及有关酶分子信息的复合数据库)。途径成分数据库还可包含预期的、假定的或未知功能的成分。其还可包含具有限定功能的假组分, 其可具有不定的组成。在一些实施方式中, 程序可设计位于公共域 (例如, 未被专利权覆盖和 / 或需要执照费的域) 中调控和 / 或功能元件的组合。可产生可自由获得的基因元件的数据库和 / 或将其用作可组合的核酸序列的来源以产生可选途径。可设计、组装和 / 或测试包含已知的功能和 / 或调控元件 (例如来自不同物种) 的不同组合的可选途径。可使用包括酶元件区中变量的文库以确定不同类型的酶或相同酶的不同变体的相对作用。可使用包括酶元件区中变量的文库以确定一系列基因中的最优表达水平或调控水平。

[0045] 可组装编码不同途径的核酸。在一些实施方式中, 可通过使用适合的组装核酸转化宿主细胞或生物, 并分析工程化生物的性质, 从而在体内测试不同工程化途径的功能性质。在一些实施方式中, 可通过分离由组装核酸表达的成分, 并在体外系统中测试成分的适合组合, 从而在体外测试不同工程化途径的功能性质。

[0046] I. 用于生产 2- 酮酸 (C5 至 C8) 的工程化辅酶 B 合成途径

[0047] 本发明的多个方面提供了经由辅酶 B 生物合成中 α -酮酸链延长反应生产双官能正烷烃的新型工程化途径 (参见图 1)。如本文所用, α -酮酸或 2-氧代酸或 2-酮酸可互换使用, 且设计包含靠近羧酸基团的酮官能团的有机酸。本文所用的辅酶 B 生物合成中的 α -酮酸链延长反应 (也称为 2-氧代酸延长) 是指将 α -酮戊二酸 (C5 链) 和乙酰辅酶 A 转化为 α -酮辛二酸 (C8 链)、辅酶 B 的前体 (7-巯基庚酰苏氨酸磷酸) 和可能的生物素的

生物合成途径。许多生物体可经由草酰乙酸合成 α -酮戊二酸,此草酰乙酸经由酶 PEP 羧化酶从 PEP 产生或经由生物素依赖的酶丙酮酸羧化酶从丙酮酸产生。 α -酮戊二酸是三羧酸循环 (Krebs cycle) 中重要的中间产物,且起到 α -酮酸延长途径中原料的作用。 α -酮酸延长辅酶 B 途径包括催化以下步骤的酶:

[0048] (1) α -酮戊二酸和乙酰辅酶 A 缩合形成高柠檬酸(通过高柠檬酸合成酶如 AcsA、NifV、Hcs、Lys 20/21 的作用)

[0049] (2) 通过起到中间产物作用的顺式高乌头酸的脱水和水合变为 (2R,3S) 高异柠檬酸(通过高乌头酸酶如 AskD/E、LysT/U、Lys4,3-异丙基苹果酸脱水酶的作用)

[0050] (3) (2R,3S) 高异柠檬酸氧化脱羧为 α -酮己二酸(通过同分异构高柠檬酸脱氢酶如 AcsF、Hicdh、Lys12,2-氧代辛二酸合成酶、3-异丙基苹果酸脱水酶的作用)。

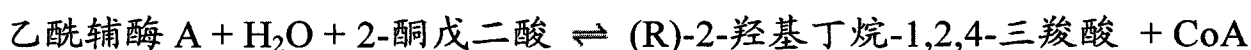
[0051] 所得的 α -酮己二酸(C6 链)随后经历两个连续的 α -酮酸链延长反应,以产生作为中间产物的 α -酮庚二酸和 α -酮辛二酸。由此一系列反应产生的 α -酮辛二酸随后经历非氧化脱羧作用,以形成 7-氧代庚酸(辅酶 B 的前体)。

[0052] α -酮酸延长途径的一个特征实例为詹氏甲烷球菌 (*Methanococcus jannaschii*) 的辅酶 B 生物合成途径。在此途径中,图 1 中有三种酶催化步骤 a-l。AcsA(催化步骤 a、e 和 i) 是高柠檬酸合酶;AcsD/E(催化步骤 b、c、f、g、j、k) 是 AcsD 和 AcsE 的异四聚体,且为高乌头酸酶;AcsF(催化步骤 d、h 和 l) 是同分异构高柠檬酸脱氢酶。这些酶全部显示出催化反应步骤,且詹氏甲烷球菌 AcsD/E 是目前唯一显示出催化两种水解酶反应的高乌头酸酶 (Howell et al., Biochem., 1998; Howell et al., J. Bacteriol., 2000; Drevland et al., JBC, 2008)。应注意詹氏甲烷球菌是嗜热的产甲烷菌,且全部 Acs 酶已经在 50-60°C 得到表征。在一些实施方式中,可使用来自在 37°C 繁殖的其它产甲烷菌的 Acs 同源物。此类 Acs 同源物已被鉴定且包括海沼甲烷球菌 (*Methanococcus maripaludis*) S2 基因 acsA (MMP0153)、MMP1480、MMP0381 和 acsF (MMP0880)。

[0053] 从 α -酮戊二酸(C5) 起始的途径具有依赖于延长循环的数目的不同的以下中间产物: α -酮己二酸(C6)、 α -酮庚二酸(C7) 和 α -酮辛二酸(C8)。因此,在本发明的一些方面中,依据所需产物的烃链长度(如 C4、C5、C6、C7),可能需要不延长(用于生产双官能丁烷)、仅单次延长循环(如步骤 a 至 d,用于生产双官能戊烷)、两次延长(如步骤 a 至 h,用于生产双官能己烷)或三次延长(如步骤 a 至 l,用于生产双官能庚烷)。因此,应理解,根据烃链的长度,可希望最大化 2-酮己二酸中间产物或酮庚二酸中间产物的利用率。在一些实施方式中,希望保持步骤 a 至 d 且消除步骤 e 至 l,以最大化 2-酮己二酸中间产物的利用率。在其它实施方式中,希望保持步骤 a 至 h 且消除步骤 i 至 l,以最大化酮庚二酸中间产物的利用率。

[0054] 如上所述,每个延长步骤包括三组酶:酰基转移酶或酰基转移酶同源物、高乌头酸酶或高乌头酸酶同源物,和同分异构高柠檬酸脱氢酶或同分异构高柠檬酸脱氢酶同源物。每个延长步骤的第一次反应由将酰基转化为烷基的酰基转移酶在转移时催化。在一些实施方式中,酰基转移酶是高柠檬酸合酶 (EC 2.3.3.14)。催化下列化学反应的高柠檬酸合酶:

[0055]



[0056] 产物 (R)-2-羟基丁烷-1,2,4-三羧酸也称为高柠檬酸。现已显示一些高柠檬酸合酶如 AksA 具有宽的底物范围且催化氧代己二酸和氧代庚二酸与乙酰辅酶 A 的缩合 (Howell et al., 1998, Biochemistry, Vol. 37, pp10108-10117)。本发明的一些方面提供了对酮戊二酸或酮戊二酸和酮己二酸具有底物特异性的高柠檬酸合酶。已知的优选高柠檬酸合酶为 EC 编号 2.3.3.14。通常,用于选择适合的酶的方法可包括通过检索来自其它生物体的同源物在天然多样性中检索酶,和 / 或构建和检索人工多样性并选择具有所选酶特异性和活性的变体。候选高柠檬酸合酶、候选高乌头酸酶和候选同分异构高柠檬酸脱氢酶列在表 1 中。

[0057] 表 1

[0058]

步骤	活性	候选酶
a	高柠檬酸合酶	AksA, NifV, Hcs, Lys20/21
b	高乌头酸酶	AksD/E, LysT/U, Lys4, 3-异丙基苹果酸脱水酶大/小

[0059]

步骤	活性	候选酶
c	高乌头酸酶	AksD/E, LysT/U, Lys4, 3-异丙基苹果酸脱水酶大/小
d	同分异构高柠檬酸脱氢酶	AksF, Hicdh, Lys 12, 2-氧代辛二酸合酶、 3-异丙基苹果酸脱氢酶
e	高 2 柠檬酸合酶	AksA, NifV
f	高 2 乌头酸酶	AksD/E、 3-异丙基苹果酸脱水酶大/小
g	高 2 乌头酸酶	AksD/E、 3-异丙基苹果酸脱水酶大/小
h	高 2 异柠檬酸脱氢酶	AksF、 2-氧代辛二酸合酶、 3-异丙基苹果酸脱氢酶
i	高 3 柠檬酸合酶	AksA
j	高 3 乌头酸酶	AksD/E、 3-异丙基苹果酸脱水酶大/小
k	高 3 乌头酸酶	AksD/E、 3-异丙基苹果酸脱水酶大/小
l	高 3 异柠檬酸脱氢酶	AksF、 2-氧代辛二酸合酶、 3-异丙基苹果酸脱氢酶

[0060] 在一些实施方式中,途径的第一步被工程化为由高柠檬酸合酶 NifV 或 NifV 同源物催化。NifV 的同源物存在于多种生物体中,包括但不限于棕色固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*)、肺炎克雷伯杆菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、圆褐固氮菌 (*Azotobacter chroococcum*)、弗兰克氏菌 (*Frankia* sp.) (菌株 FaCl)、鱼腥藻属 (*Anabaena* sp.) (菌株 PCC 7120)、巴西固氮螺菌 (*Azospirillum brasilense*)、巴斯德梭菌 (*Clostridium pasteurianum*)、球形红假单胞菌 (*Rhodobacter sphaeroides*)、荚膜红细菌 (*Rhodobacter capsulatus*)、桤木弗兰克氏菌 (*Frankia alni*)、生氢氧化碳嗜热菌 (*Carboxydotherrmus hydrogenoformans*) (菌株 Z-2901/DSM 6008)、鱼腥藻属 (*Anabaena* sp.) (菌株 PCC 7120)、

桤木弗兰克氏菌 (*Frankia alni*)、成团肠杆菌 (*Enterobacter agglomerans*)、胡萝卜软腐欧文氏菌马铃薯黑胫亚种 (*Erwinia carotovora* subsp. *Atroseptica*) (黑胫病菌 (*Pectobacterium atrosepticum*))、绿硫菌 (*Chlorobium tepidum*)、固氮弧菌属 (*Azoarcus* sp.) (菌株 BH72)、格瑞菲斯瓦尔德磁螺菌 (*Magnetospirillum gryphiswaldense*)、慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium* sp.) (菌株 ORS278)、*Bradyrhizobium* sp. (菌株 BTai1/ATCC BAA-1182)、梭状芽孢杆菌 (*Clostridium kluyveri*) (菌株 ATCC 8527/DSM 555/NCIMB 10680)、梭状芽孢杆菌 (菌株 ATCC 8527/DSM 555/NCIMB 10680)、酪酸梭菌 (*Clostridium butyricum*) 5521、本土根瘤菌 (*Cupriavidus taiwanensis*) (菌株 R1/LMG 19424)、*Ralstonia taiwanensis* (菌株 LMG 19424)、肉毒杆菌 (*Clostridium botulinum*) (菌株 Eklund 17B/type B)、肉毒杆菌 (菌株 Alaska E43/type E3)、聚球藻 (*Synechococcus* sp.) (菌株 JA-2-3B' a(2-13)) (*Cyanobacteria bacterium Yellowstone B-Prime*)、聚球藻 (菌株 JA-3-3Ab) (*Cyanobacteria bacterium Yellowstone A-Prime*)、硫还原地杆菌 (*Geobacter sulfurreducens*) 和运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*)。已显示 NifV 使用酮戊二酸 (酶促步骤 a) 和酮己二酸 (酶促步骤 e) 作为底物, 而未说明使用酮庚二酸作为底物 (参见 Zheng et al., (1997) *J. Bacteriol.* Vol. 179, pp5963-5966)。因此, 包括高柠檬酸合酶 NifV 的工程化的 2- 酮 - 延长途径消除了 2- 酮延长途径中的步骤 i 至 1, 且最大化了 2- 酮庚二酸中间产物的利用率。

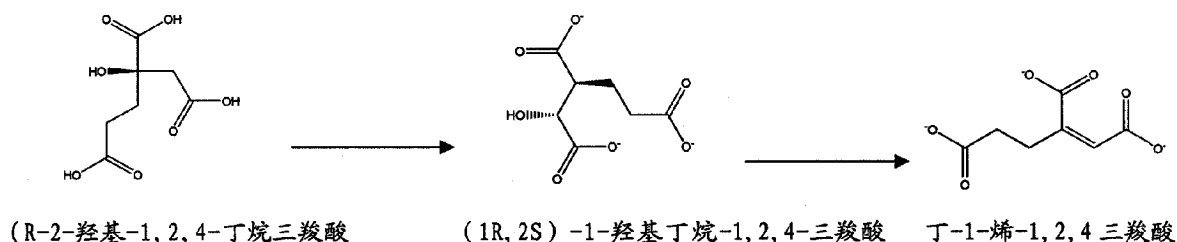
[0061] 在一些实施方式中, 途径的第一步被工程化以被高柠檬酸合酶 Lys 20 或 Lys 21 催化。Lys 20 和 Lys 21 为与酿酒酵母中赖氨酸生物合成途径第一步有关的两种高柠檬酸合酶同工酶。Lys 20 或 Lys 21 的同源物存在于多种生物体如树干毕赤酵母 (*Pichia stipitis*) 和极端嗜热菌 (*Thermus thermophilus*) 中。Lys20 和 Lys 21 酶已显示出使用酮戊二酸作为底物, 但不使用酮己二酸或酮庚二酸。因此, 包括 Lys20/21 的工程化的 2- 酮延长途径消除了 2- 酮延长途径中的步骤 e 至 1, 且最大化了 2- 酮己二酸的利用率。在一些实施方式中, 使用催化涉及乙酰辅酶 A 和 α - 酮酸作为底物的反应的酶将 α - 酮酸转化为高柠檬酸 (如 EC 2.3.3.-)。产甲烷太古菌包含三种紧密相关的 AksA 同源物: 2- 异丙基苹果酸合酶 (LeuA) 和将乙酰辅酶 A 与丙酮酸缩合的柠苹果酸 (2- 甲基马来酸) 合酶 (CimA)。认为此酶参与产甲烷菌和可能地其它缺少苏氨酸脱水酶的物种中异亮氨酸的生物合成。在一些实施方式中, 乙酰转移酶是异丙醇 (isopromylate) 合酶 (如 LeuA, EC 2.3.3.13) 或柠苹果酸合酶 (如 CimA, EC 2.3.1.182)。

[0062] 酮延长途径的第二步由高乌头酸酶催化。高乌头酸酶催化水合和脱水反应:

[0063]



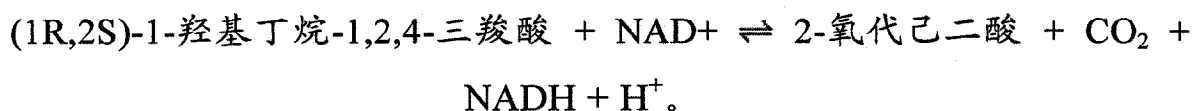
[0064]



[0065] 在一些实施方式中,高乌头酸酶为 AksD/E、lysT/U 或 lys4 或它们的同源物或变体。高乌头酸酶 AksD/E 和 lysT/U 已显出分别由两种多肽 AksD 和 AksE,以及 lysT 和 lysU 组成。

[0066] 每个酮延长循环的最后一步由同分异构高柠檬酸脱氢酶催化。同分异构高柠檬酸脱氢酶(如 EC 1.1.1.87)是催化化学反应的酶。

[0067]



[0068] 在一些实施方式中,高柠檬酸脱氢酶包括但不限于 AksF、Hicdh、lys12 和 LeuB(EC1.1.1.85)。LeuB 为 3-异丙基苹果酸脱氢酶(EC1.1.1.85)(IMDH),且催化细菌和真菌中亮氨酸生物合成的第三步,即将 3-异丙基苹果酸氧化脱羧为 2-氧代-4-甲基戊酸。已显出 2-酮异戊酸通过亮氨酸生物合成途径中 LeuA(2-异丙基苹果酸合酶)、LeuC、LeuD(3-异丙基苹果酸异构酶复合物)和 LeuB(3-异丙基苹果酸脱氢酶)的第三步骤延长循环被转化为 2-酮异己酸。人们应理解这些酶具有广泛的底物特异性(如 Zhang et al., (2008), P. N. A. S)且可催化 α -酮酸延长反应。在一些实施方式中,LeuA、LeuC、LeuD 和 LeuB 催化 α -酮戊二酸向 α -酮己二酸的延长和 α -酮己二酸向 α -酮庚二酸的延长。

[0069] II. 用于从 α -酮酸(C5 至 C8)生产双官能烷烃(C4 至 C7)的工程化途径

[0070] 如图 2 所示,有若干使用重组微生物从 α -酮酸生产双官能烷烃的潜在途径。本发明的多个方面涉及将 α -酮中间产物生物转化为双官能丁烷、双官能戊烷、双官能己烷、双官能庚烷分子。目的双官能丁烷分子包括但不限于 1,4-丁烷二醇、1-羟基丁酸、琥珀酸、1,4-二氨基丁烷、4-氨基丁醛和 4-氨基丁醇。目的双官能戊烷分子包括但不限于 1-羟基戊酸、1,5-戊二醇、戊二酸、尸胺(戊烷-1,5-二胺)、5-氨基戊醛和 5-氨基戊醇。目的双官能己烷分子包括但不限于 1-羟基己酸、1,6-己二醇、己二酸、六亚甲基二胺、氨基己酸、6-氨基己醛和 6-氨基己醇。目的双官能庚烷分子包括但不限于 1-羟基庚酸、1,7-庚二醇、庚二酸、1,7-二氨基庚烷、7-氨基庚醛和 7-氨基庚醇。

[0071] 在一些实施方式中,用于生产双官能烷烃的第一潜在途径包括第一 α -酮酸脱羧(酶促步骤 I)。本发明的一些步骤公开了通过非氧化脱羧去除羧基。这可通过在宿主细胞中表达具有基本类似于 α -酮酸脱羧酶的生物活性的蛋白以产生羧酸半醛来实现。术语“ α -酮酸”(KDCs)是指催化 α -酮酸转化为羧酸半醛和二氧化碳的酶。已知特别感兴趣的一些 KDCs 为以下 EC 编号:EC 4.1.1.1;EC 4.1.1.80、EC 4.1.1.72、4.1.1.71、4.1.1.7、4.1.1.75、4.1.1.82、4.1.1.74(参见下表 2)。一些 KDCs 具有广泛的底物范围,然而其它 KDCs 的底物特异性更高。KDCs 可商购自很多来源,包括但不限于酿酒酵母和细菌。在一些示例性实施方式中,所用的 KDCs 包括但不限于来自乳酸乳球菌(UniProt Q684J7)的 KivD、来自酿酒酵母的 ARO10(UniProt Q06408)、来自酿酒酵母的 PDC1(UniProt P06169),PDC5(UniProt P16467),PDC6(UniProt P26263),Thi3、来自结核分枝杆菌(M. tuberculosis)(UniProt 50463)的 kgd、来自荧光假单胞菌(P. putida)(UniProt P20906)的 mdlc、来自绿脓杆菌(P. aeruginosa)(UniProt AAG08362)的 aru1、来自威德摩尔链德菌(S. wedmorensis)(UniProt Q56190)的 fom2、来自梭菌属 Clostridium

acetobutylicum 的 Pdc、来自阴沟肠杆菌 (*E. coli*) (UniProt P23234) 的 ipdC、或来自相同或其它微生物物种的任何同源蛋白质。在一些实施方式中,酮酸脱羧酶为 EC 编号 EC 4.1.1.1 的丙酮酸脱羧酶。丙酮酸脱羧酶为催化丙酮酸脱羧为乙醛和二氧化碳的酶。丙酮酸脱羧酶可商购自很多来源,包括但不限于酿酒酵母和细菌(参见美国专利 20080009609,其通过引用并入)。在一些实施方式中, α -酮酸脱羧酶为自然催化 α -酮异戊酸转化为异丁醛和二氧化碳的 α -酮异戊酸脱羧酶 KivD。在一些实施方式中, α -酮酸脱羧酶为支链 α -酮酸脱羧酶 (EC 编号 4.1.1.72)。人们应理解因为一些 KDCs 已显示出具有广泛的底物范围,所以当选择基因来源时要重要考虑底物特异性。因此,在一些实施方式中,将丙酮酸脱羧酶工程化,以显示出相比于丙酮酸更优选 α -酮辛二酸、 α -酮庚二酸、 α -酮己二酸或 α -酮戊二酸。优选地,相比于丙酮酸,工程化的酶显示出增加至少 2 倍、至少 5 倍、至少 10 倍、至少 20 倍、至少 50 倍、至少 100 倍。

[0072] 在优选实施方式中,重组宿主细胞中表达的 KDC 催化 α -酮辛二酸转化为庚二酸半醛、或 α -酮庚二酸转化为己二酸半醛、或 α -酮己二酸转化为戊二酸半醛、或 α -酮戊二酸转化为琥珀酸二醛。

[0073] 在一些实施方式中,羧酸半醛(如琥珀酸半醛、戊二酸半醛、己二酸半醛和/或庚二酸半醛)通过将醛官能团转化为醇官能团的醇脱氢酶被转化为羟基羧酸(羟基丁酸、羟基戊酸、羟基己酸、羟基庚酸)(酶促步骤 1,图 2)。醇脱氢酶 (ADHs) (EC 1.1.1.1 和 EC 1.1.1.2) 催化酮和醛向醇的可逆还原 (NAD^+ 向 NADH 的还原)。在一些实施方式中,醇脱氢酶包括但不限于 adhA 或 adhB(来自运动发酵单胞菌 (*Z. mobilis*)),丁醇脱氢酶(来自丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*)),丙二醇氧化还原酶(来自大肠杆菌)和 ADHIV 醇脱氢酶(来自酵母属 *Saccharomyces*)、或 ADH6(来自酿酒酵母 *S. cerevisiae*)。

[0074] 在一些实施方式中,使用醇脱氢酶或醛脱氢酶(酶促步骤 2,图 2 和图 3)将羧酸脱氢,以产生烷二醇如 1,4-丁二醇、1,5-戊二醇、1,6-己二醇和/或 1,7-庚二醇。

[0075] 醛 $\text{NAD}(+)$ 脱氢酶活性和醇 $\text{NAD}(+)$ 脱氢酶活性可通过两种不同的多肽来进行,或通过单独多肽如来自大肠杆菌 (Goodlove 等, *Gene* 85:209-14, 1989; GenBank 登录号 M33504) 的多官能醛-醇脱氢酶 (EC 1.2.1.10) 来进行。具有醛脱氢酶 ($\text{NAD(P)}(+)$) (EC 1.2.1.-) 或醛脱氢酶 ($\text{NAD}(+)$) (EC 1.2.1.3) 活性的多肽可与醇脱氢酶组合使用,以将剩余的羧酸还原为醇,产生烷二醇。编码此类多肽的核酸可获得自不同物种,包括但不限于酿酒酵母。

[0076] 在其它实施方式中,羧酸半醛(如琥珀酸半醛、戊二酸半醛、己二酸半醛、庚二酸半醛)通过使用醛脱氢酶被转化为二羧酸(酶促步骤 3,图 2 和图 3),如己二酸、琥珀酸、戊二酸和/或庚二酸。

[0077] 在本发明的一个方面中,初始 α -酮酸脱羧步骤后为用于生产氨基酸的 1-氨基转移酶酶促步骤(酶促步骤 4,图 2 和图 3)。特别地,可使用此工程化途径合成的感兴趣的产物包括氨基己酸、氨基丁酸、氨基庚酸和/或氨基戊酸。在一些实施方式中,酶促步骤 4 包括羧酸半醛氨基转移酶。具有羧酸半醛氨基转移酶活性的酶商购自许多来源,包括但不限于枯草杆菌、酿酒酵母、智人 (*H. sapiens*)、黄木香 (*F. lutescens*)、棒状链霉菌 (*S. clavuligerus*)。能够催化氨基转移酶反应的示例性酶为鸟氨酸-氧代-酸转氨酶(来自枯草杆菌的 rodD、来自智人的 OAT、EC 2.6.1.13)、精氨酸-降解酶鸟氨酸转氨酶 (EC

2.6.1.13)、来自黄木香或棒状链霉菌的赖氨酸-氨基转移酶 (EC 2.6.1.36)、小鼠 (*Mus musculus*) 4-氨基丁酸氨基转移酶 (EC 2.6.1.19)、欧洲中部野猪 (*Sus scrofa*) 4-氨基丁酸氨基转移酶 (EC 2.6.1.19)、酿酒酵母 4-氨基丁酸氨基转移酶 (EC 2.6.1.19)、酵母氨酸脱氢酶 LYS9 和 LYS1 (分别为 EC 1.5.1.10 和 1.5.1.7)、或来自相同或其它微生物物种的任何同源蛋白。

[0078] 用于生产感兴趣的二氨基烷烃或氨基醇的两种潜在途径包括使用醛脱氢酶 (酶促步骤 5, 图 2 和图 3)、随后使用酶促步骤 6 或酶促步骤 7 将氨基酸转化为氨基-醛。在另一个实施方式中, 可用 2-氨基脱羧酶 (酶促步骤 8) 处理 2-氨基二羧酸, 产生氨基酸。在一些实施方式中, 酶促步骤 8 之后为由醛脱氢酶 (酶促步骤 5) 催化的脱氢步骤。所得的氨基醛代谢物额可用作两种不同酶促步骤的底物。酶促步骤 6 包括 1-氨基转移酶, 且催化氨基-醛转化为二氨基烷烃。或者, 包括醇脱氢酶的酶促步骤 7 催化氨基-醛转化为氨基-醇。酶促步骤 6 包括氨基转移酶, 且产生二氨基烷烃, 如六亚甲基二胺 (HDD), 尸胺 (或五亚甲基二胺), 二氨基丁烷和 / 或二氨基庚烷。酶促步骤 7 包括醇脱氢酶, 并产生氨基丁醇, 氨基戊醇, 氨基己醇 (或 6-羟基六胺 6HH) 和氨基庚醇。

[0079] 第二种潜在途径包括第一 2-氨基转移酶 (酶促步骤 II, 图 2 和图 3), 产生 2-氨基二羧酸。表现氨基转移酶活性的感兴趣的优选候选基因包括但不限于 *lysN* (编码来自嗜热菌 (*T. thermophilus*) EC 2.6.1.7 的 α -氨基己二酸氨基转移酶) 和同源物 (如 *kat2*); *aadat* (编码沟鼠 (*R. norvegicus*) 中的氨基己二酸氨基转移酶, EC 2.6.1.39)、*AADAT* (编码智人中的氨基己二酸氨基转移酶)。具有氨基转移酶活性的其它酶包括但不限于 *ddh* (来自谷氨酸棒杆菌, 编码间二氨基庚二酸 D-脱氢酶, EC 1.4.1.16) 和 *dapdh* (来自 *Lysinibacillus sphaericus*, 编码间二氨基庚二酸脱氢酶, EC 1.4.1.16)。表现氨基庚二酸脱羧酶活性的候选基因包括但不限于谷氨酸脱羧酶 (EC 4.1.1.15), 如 *gadA/B*, 编码大肠杆菌中的同种型 A 或同种型 B、*GAD1* (来自酿酒酵母)、*GAD1/2* (来自拟南芥 (*A. thaliana*))、*GAD1/2* (来自智人) 和它们的同源物或二氨基庚二酸脱羧酶, 如 *LysA* (EC 1.1.1.20, 来自大肠杆菌或枯草杆菌) 或 AT5G11880 (来自拟南芥) 或 AT3G14390 (来自拟南芥 *A. thaliana*)。

[0080] III. 用于从 α -酮庚二酸生产 C6 双官能烷烃的工程化途径

[0081] 本发明的多个方面涉及用于生产感兴趣的 C6 双官能烷烃的工程化途径。特别地, 本发明的多个方面涉及生产己二酸, 氨基己酸 (己内酰胺酸的稳定前体)、六亚甲基二胺和 6-羟基己酸 (图 3)。人们应理解对于生物生产 C6 双官能烷烃, 希望去除步骤 i 至 1, 以最大化用于生物转化为己二酸半醛的 2-酮庚二酸的利用率 (步骤 m)。在一些实施方式中, *AksA* 被 *NifV* 替代, 其是一种来自棕色固氮菌 (*A. vinelandii*), 且已显示出对 2-酮戊二酸和 2-酮己二酸均起作用但对 2-酮庚二酸不起作用的酶 (Howell et al., *Biochem.*, 1998; Howell et al., *J. Bacteriol.*, 2000; Drevland et al., *JBC*, 2008)。此替代将在 2-酮酸延长途径中消除步骤 i 至 1。应理解, 根据所需产物的烷链的长度, 可仅需要单次延长循环 (如步骤 a-d)。在一些示例性实施方式中, 戊二酸 (一种普通塑化剂和聚酯的前体且具有式 $\text{HO}_2\text{C}(\text{CH}_2)_3\text{CO}_2\text{H}$ (也称为戊二酸)) 可从 2-酮戊二酸生物生产, 此 2-酮戊二酸经历单次延长循环以产生酮己二酸。戊二酸用在聚酯如聚酯多元醇和聚酰胺的生产中。在一些实施方式中, 为了能够进行单次延长循环, *Hcs* 和 *Lys20/21* 酶 (来自酿酒酵母和嗜热菌的赖氨酸

生物合成途径)能够消除步骤 e-1,以最大化用于生物生产戊二酸的 2-酮己二酸的效率。

[0082] A. 用于生产己二酸的工程化途径

[0083] 1. 己二酸的综述:

[0084] 在 2005 年,全球对己二酸的需要为百万公吨。历史上,对己二酸的需要每年增加 2%,且预计到 2009 年增加 2-3%。己二酸连续排名美国生产的 50 种化学品之一。约 90% 的国产己二酸被用于生产尼龙-6,6。己二酸的其它用途包括生产润滑剂树脂、聚酯多元醇和塑化剂,以及作为食品酸化剂。

[0085] 有三种主要的商业生产方法:环己烷方法、环己醇方法、丁二烯羰基化方法。用于合成己二酸的主要工业化方法最初对环己烷进行空气氧化以产生被称为 KA(参见如美国专利第 5,221,800 号)的环己酮(酮)和环己醇(醇)的混合物。虽然此方法占全部己二酸生产的 2%,但商业上使用也酚加氢生产 KA。经由两种方法生产的 KA 被硝酸氧化以生产己二酸。还原的氮的氧化物(包括 NO₂、NO 和 N₂O)作为副产物产生且以不同程度变回硝酸。工业上和环境工程师越来越感兴趣使用非合成的生物途径生产己二酸。已描述了大量微生物途径。野生型和突变的生物体已显示出将可再生的原料如葡萄糖和其它烃转化为己二酸(参见如 W09507996 以及美国专利 5,272,073、US 5,487,987 和 US 5,616,496)。类似地,具有腈水解酶活性的生物体已显示出将腈转化为包括己二酸在内的羧酸(参见如美国专利第 5,629,190 号)。此外,野生型生物体已被用于将环己烷和环己醇和其它醇转化为己二酸(参见如美国专利 6,794,165;和美国专利申请 2003087403 和 20020127666)。例如,在一个酶促途径中,环己醇被转化为己二酸,此酶促途径包括分离自不动杆菌属(*Acinetobacter*)且编码羟基酰基辅酶 A 脱氢酶、烯酰基辅酶 A 水合酶、酰基辅酶 A 脱氢酶、泛醌氧化还原酶、一氧化物酶、醛脱氢酶的基因。已提示用于将环己醇转化为己二酸的另一种酶促途径包括中间产物环己醇、环己酮、2-羟基环己酮、 ϵ -己内酯、6-羟基己酸。已表明了此途径中的一些特定酶活性,包括环己醇脱氢酶、NADPH-连接的环己酮加氧酶、 ϵ -己内酯水解酶和 NAD(NADP)-连接的 6-羟基己酸脱氢酶(Tanaka et al., *Hakko Kogaku Kaishi* (1977), 55(2), 62-7)。已推测其它酶促途径包括环己醇,环己酮,1-氧代-2-氧代环庚烷,6-羟基己酸,6-氧代己酸和己二酸(Donoghue et al., *Eur. J Biochem.*, 1975, 60(1), 1-7)。

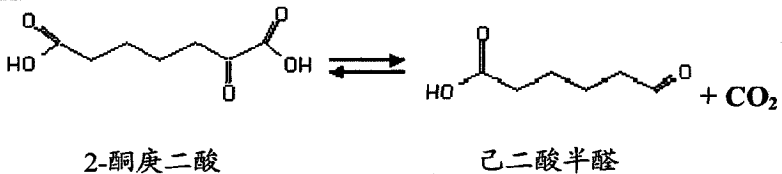
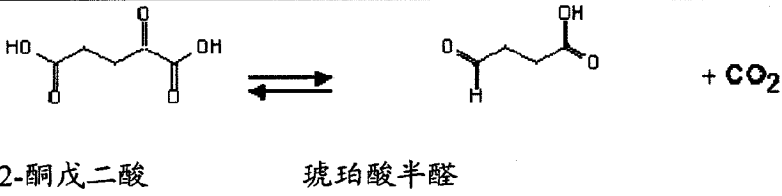
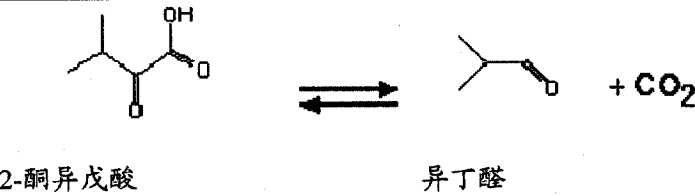
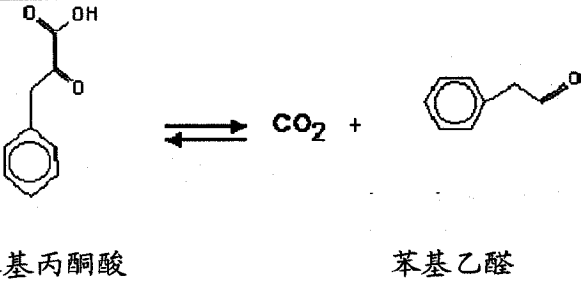
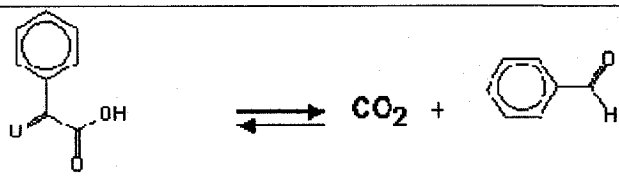
[0086] 因此,待解决的问题提供一种己二酸的合成途径,此途径不仅避免依赖环境敏感的原料如石油,而且有效利用非石化的、便宜的、可再生的来源。进一步希望提供一种己二酸的合成途径,此途径避免需要显著的能量输入,且最小化毒性副产物的形成。

[0087] 2. 经由 α -酮庚二酸途径的己二酸生物生产

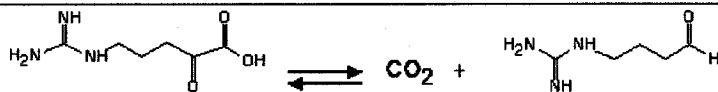
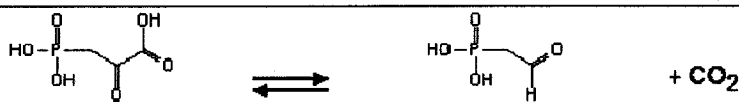
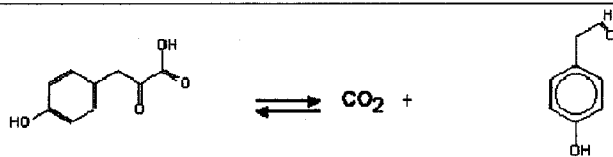
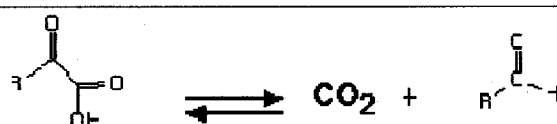
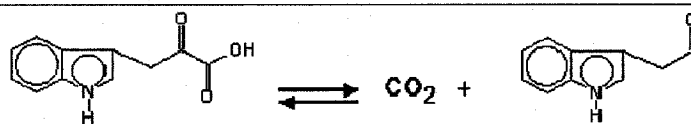
[0088] 本发明的一些方面涉及 2-酮庚二酸脱羧为己二酸半醛(或 6-氧代己酸)和己二酸半醛脱氢产生己二酸。在一些实施方式中,筛选用于候选 2-酮庚二酸脱羧酶的全部公布的 MetaCyc 脱羧酶反应。基于标准 (i) 2-酮羧酸的所示活性和 (ii) 蛋白序列信息的可用性来产生酶和活性的列表(参见表 2)。在一些实施方式中,在表 2 所列的酶中,筛选在所提议的工程化途径中对全部 2-酮酸(即 2-酮庚二酸、2-酮己二酸和 2-酮戊二酸)具有脱羧酶活性的酶。

[0089] 表 2

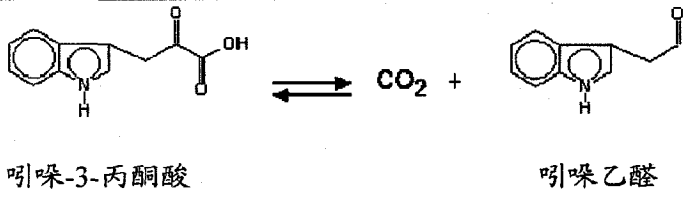
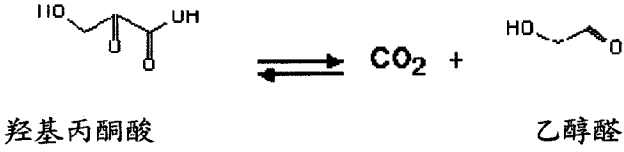
[0090]

所希望的底物和产物	 2-酮庚二酸 $\rightleftharpoons$ 己二酸半醛 + CO₂
• EC 4.1.1.71 • 2-酮戊二酸 脱羧酶 • 来自结核分枝杆菌的 <i>kgd</i> - UniProt: O50463	 2-酮戊二酸 $\rightleftharpoons$ 琥珀酸半醛 + CO₂
• EC 4.1.1.1 • 2-酮异戊酸脱羧酶 • 来自乳酸乳球菌的 <i>kivD</i> • UniProt: Q684J7	 2-酮异戊酸 $\rightleftharpoons$ 异丁醛 + CO₂
• EC 4.1.1.43 • 转氨的氨基酸脱羧酶 • 来自酿酒酵母的 <i>ARO10</i> • UniProt: Q06408	 苯基丙酮酸 $\rightleftharpoons$ 苯基乙醛 + CO₂
• EC 4.1.1.7 • 苯甲酰甲酸脱羧酶 • 来自荧光假单胞菌的 <i>mdlC</i>	 苯甲酰甲酸 $\rightleftharpoons$ 苯甲醛 + CO₂

[0091]

• 可得的晶体结构 - UniProt: P20906	2-氧代-2-苯基乙酸 苯甲醛  2-酮精氨酸 4-胍基丁醛
• EC 4.1.1.75 • 2-酮精氨酸脱羧酶 • <i>arl</i>; 绿脓杆菌 - NCBI AAG08362	
• EC 4.1.1.82 • 磷酰基丙酮酸 脱羧酶 • <i>fom2</i>; 威德摩尔链霉菌 • UniProt: Q56190 • NCBI AB016934	 3-磷酰基丙酮酸 磷酰基乙醛
	 4-羟基苯基丙酮酸 (4-羟基苯基)乙醛
• EC 4.1.1.1 • 丙酮酸 脱羧酶 同工酶 2 • <i>PDC5</i>, 酿酒酵母 • (以及 <i>PDC1</i>, <i>PDC6</i>, <i>Aro10</i>, <i>KivD</i>) • UniProt: P16467 •	 2-酮酸 醛
• EC 4.1.1.74 • 吲哚丙酮酸 脱羧酶 • <i>ipdC</i>; 成团泛生菌 • <i>ipdC</i>; 阴沟肠杆菌 • <i>P.a.</i> UniProt P71323	 吲哚-3-丙酮酸 吲哚乙醛

[0092]

• <i>E.c.</i> UniProt P23234	
• EC 4.1.1.74 • 吲哚-3-丙酮酸 脱羧酶 • <i>ipdC</i>; 成团泛生菌 • <i>ipdC</i>; 阴沟肠杆菌 • <i>P.a.</i> UniProt P71323 <i>E.c.</i> UniProt Q47305	 吲哚-3-丙酮酸 $\rightleftharpoons$ CO₂ + 吲哚乙醛
• EC 4.1.1.40 • 羟基丙酮酸 脱羧酶 • 未知基因	 羟基丙酮酸 $\rightleftharpoons$ CO₂ + 乙醇醛

[0093] 在优选实施方式中,己二酸半醛向己二酸(步骤n)的转化使用 ChnE 酶或 ChnE 酶的同源物催化。ChnE 是 NADP⁺-连接的 6-氧代己酸脱氢酶,且已显示出催化不动杆菌属的环己醇降解中 6-氧代己酸脱氢成为己二酸(参见 Iwaki et al., Appl. Environ. Microbiol. 1999, 65(11):5158-5162)。在另一个实施方式中,α-酮戊二酸半醛脱氢酶(EC 1.2.1.26,如 AraE)将己二酸半醛转化为己二酸。

[0094] B. 用于生产己内酰胺的工程化途径

[0095] 1. 己内酰胺综述

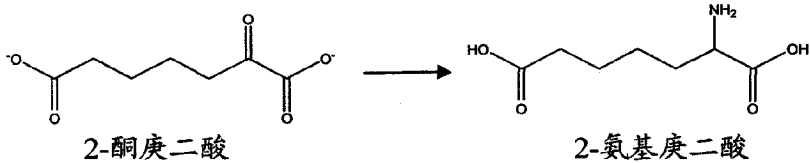
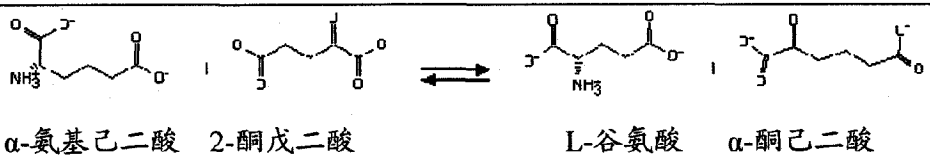
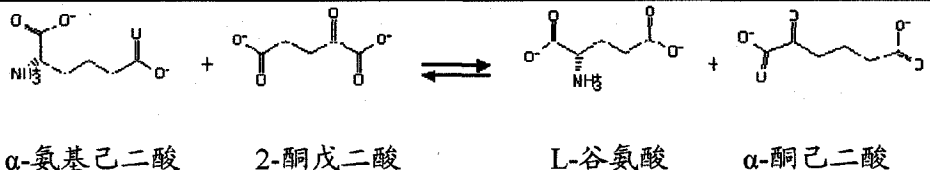
[0096] 己内酰胺主要用于生产合成纤维,特别是用在鬃刷、织物硬化剂、膜涂料、人造革、塑料、塑化剂、载体(vehicles)、聚氨酯的交联中的尼龙 6,和赖氨酸的合成。世界上每年生产月 25 亿吨尼龙 6。尼龙 6 的生产通过单体 ε-己内酰胺的开环聚合完成。用于生产 ε-己内酰胺的化学原料时被转化为环己烷或苯酚的苯,且或者化学品经由环己酮被转化为环己酮肟,随后此中间产物在硫酸中加热。因此,待解决的问题提供一种己酸的合成途径,此途径不仅避免依赖环境敏感的原料如石油,而且有效利用非石化的、便宜的、可再生的来源。进一步希望提供一种己酸的合成途径,此途径避免需要显著的能量输入,且最小化毒性副产物的形成。

[0097] 用于生产己内酰胺的工程化途径

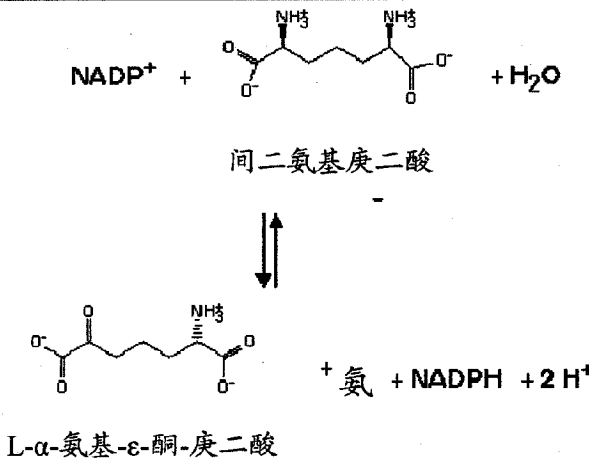
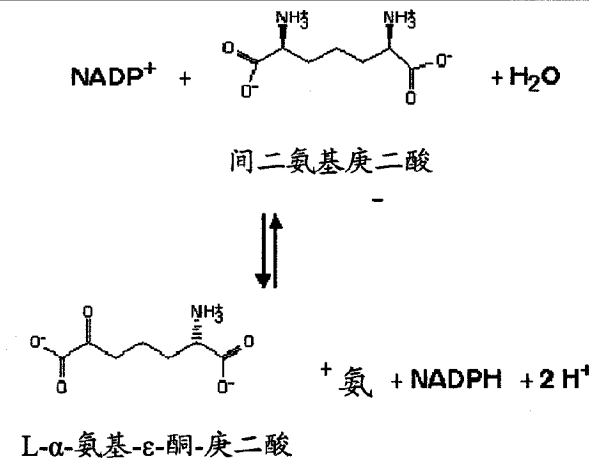
[0098] 本发明的多个方面涉及从 α-酮庚二酸生物生产氨基己酸的两种工程化途径。第一种潜在途径包括第一酮庚二酸氨基转移酶(酶促步骤 II,图 2 和图 3),随后氨基庚二酸脱羧酶(酶促步骤 8)。表现酮庚二酸氨基转移酶活性的感兴趣的候选基因包括但不限于 lysN(编码来自嗜热菌 EC 2.6.1.7 的 α-氨基己二酸氨基转移酶)和同源物(如 kat2); aadat(编码 R. norvegicus 中的氨基己二酸氨基转移酶)和 AADAT(编码智人中的氨基己二酸氨基转移酶)。基于标准(i)在戊二酸存在下 2-酮庚二酸向 2-氨基庚二酸潜在转化和(ii)蛋白序列信息的可用性来产生候选酶和活性的列表(参见表 3)。

[0099] 表 3

[0100]

所希望的底物和产物	 2-酮庚二酸 → 2-氨基庚二酸
候选酶	反应
α-氨基己二酸-氨基转移酶-1 • EC 2.6.1.39 • Q8N5Z0 • Gene:AADAT • 智人	 α-氨基己二酸 + 2-酮戊二酸 ⇌ L-谷氨酸 + α-酮己二酸
氨基己二酸-氨基转移酶 • EC 2.6.1.39 • Q7X567 • <i>lysN</i> • 嗜热菌	 α-氨基己二酸 + 2-酮戊二酸 ⇌ L-谷氨酸 + α-酮己二酸

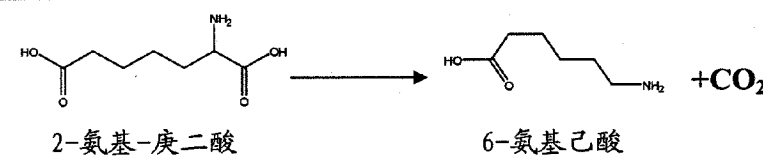
[0101]

二氨基庚二酸 脱氢酶 • EC 1.4.1.16 • P04964 • <i>ddb</i> • 谷氨酸棒杆菌	 间二氨基庚二酸 L-α-氨基-ε-酮-庚二酸
二氨基庚二酸 脱氢酶 • EC 1.4.1.16 • Q9KWR0 • <i>Dapdh</i> • 球形芽孢杆菌	 间二氨基庚二酸 L-α-氨基-ε-酮-庚二酸

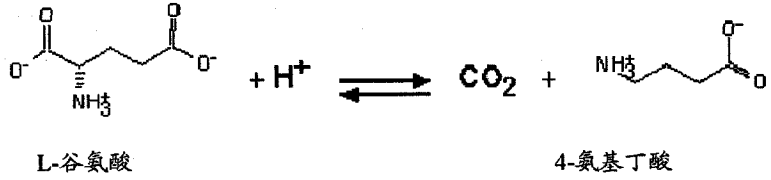
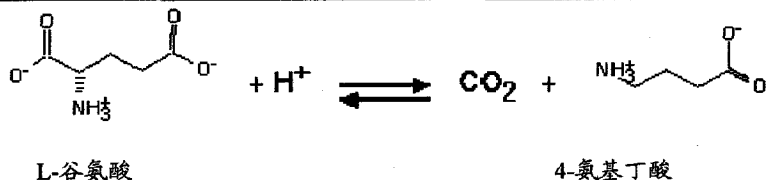
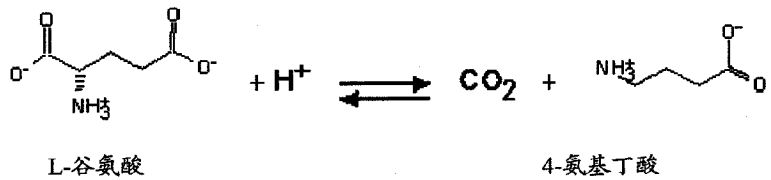
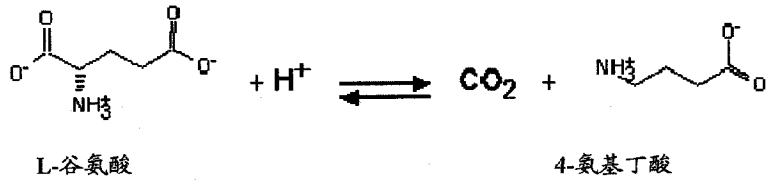
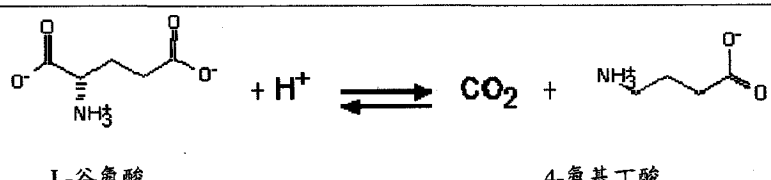
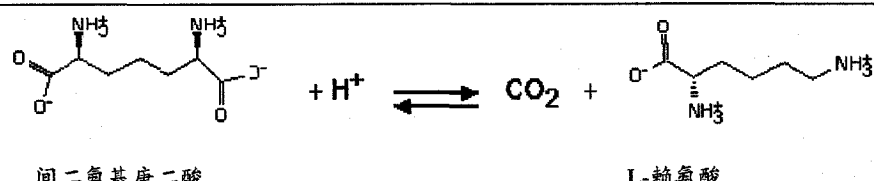
[0102] 表达氨基庚二酸脱羧酶活性的候选基因包括但不限于谷氨酸脱羧酶 (*gadA/B*, 编码大肠杆菌 (*E. Coli*) 中的同种型 A 或同种型 B、酿酒酵母中的 *GAD1*、拟南芥中的 *GAD1/2*、智人中的 *GAD1/2*) 和它们的同源物。基于标准 (i) 在戊二酸存在下 2-氨基庚二酸向 6-氨基己酸潜在转化和 (ii) 蛋白序列信息的可用性来产生候选酶和活性的列表 (参见表 4)。

[0103] 表 4

[0104]

所希望的反应	 2-氨基-庚二酸 6-氨基己酸
候选酶	反应

[0105]

谷氨酸 脱羧酶 • EC 4.1.1.15 • Q99259 • <i>Gad6/5</i> • 智人	 L-谷氨酸 4-氨基丁酸
谷氨酸 脱羧酶 • EC 4.1.1.15 • <i>Gad6/7</i> • 智人	 L-谷氨酸 4-氨基丁酸
谷氨酸 脱羧酶 • EC 4.1.1.15 • Q07346 • 矮牵牛	 L-谷氨酸 4-氨基丁酸
谷氨酸 脱羧酶 • EC 4.1.1.15 • <i>GadA</i> • 大肠杆菌(<i>E. Coli</i>)	 L-谷氨酸 4-氨基丁酸
谷氨酸 脱羧酶 • EC4.1.1.15 • <i>GadB</i> • 大肠杆菌	 L-谷氨酸 4-氨基丁酸
谷氨酸脱羧酶 • EC 4.1.1.20 • <i>lysA</i> • 大肠杆菌	 间二氨基庚二酸 L-赖氨酸

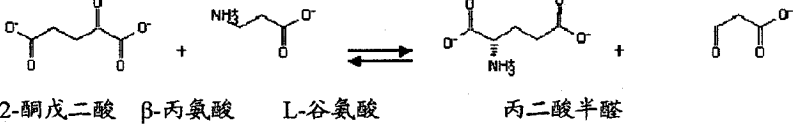
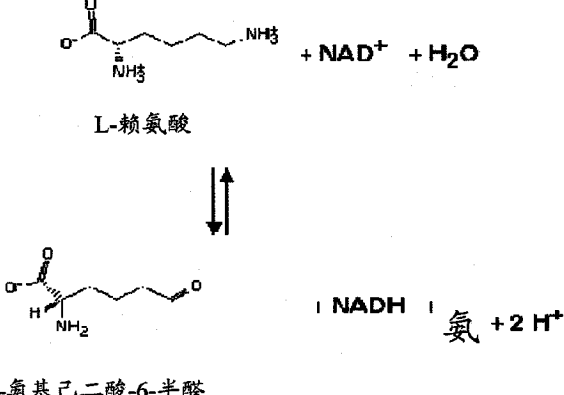
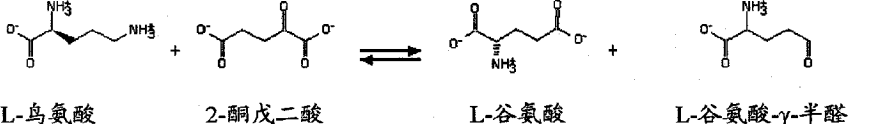
[0106] 第二种潜在途径包括第一酮庚二酸脱羧酶（酶促步骤 I），随后己二酸半醛氨基转移酶（酶促步骤 4）。

[0107] 在一些实施方式中，催化脱羧的酶为 KivD 酶（如上所述）或 KivD 酶的同源物。在一些实施方式中，第二工程化途径中所用的己二酸半醛氨基转移酶包括但不限于鸟氨

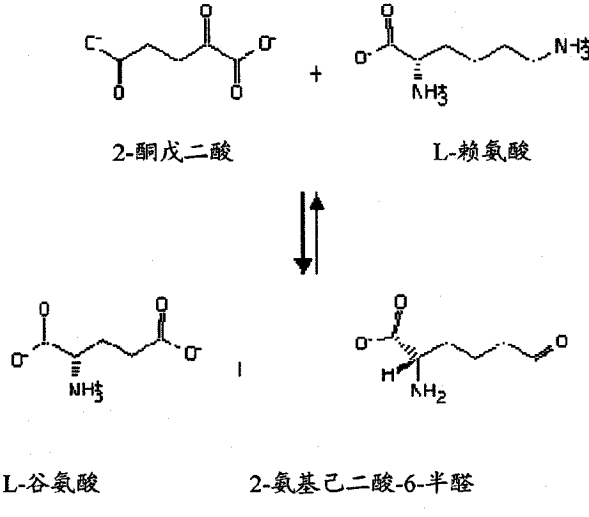
酸-氧代-酸转氨酶(来自枯草杆菌的 rodD、来自智人的 OAT, EC 2.6.1.13)、精氨酸-降解酶鸟氨酸转氨酶 (EC 2.6.1.13)、来自黄木香或棒状链霉菌的赖氨酸-氨基转移酶 (EC 2.6.1.36)、小鼠 4-氨基丁酸氨基转移酶 (EC 2.6.1.19)、欧洲中部野猪 4-氨基丁酸氨基转移酶 (EC 2.6.1.19)、酿酒酵母 4-氨基丁酸氨基转移酶 (EC 2.6.1.19)、酿酒酵母酵母氨酸脱氢酶 LYS9 和 LYS1 (分别为 EC 1.5.1.10 和 1.5.1.7), 或或来自相同或其它微生物物种的任何同源蛋白。

[0108] 表 5

[0109]

GABA 转氨酶或 4-氨基丁酸转氨酶 EC 2.6.1.19 β-丙氨酸氨基转移 酶 (褐家鼠)	 2-酮戊二酸 β-丙氨酸 L-谷氨酸 丙二酸半醛
Lys6 脱氢酶 EC 1.4.1.18 lysDH	 L-赖氨酸 + NAD⁺ + H₂O 2-氨基己二酸-6-半醛 + NADH + 2 H⁺
鸟氨酸-氧代-酸转 氨酶 rodD, 枯草杆菌	 L-鸟氨酸 2-酮戊二酸 L-谷氨酸 L-谷氨酸-γ-半醛

[0110]

EC 2.6.1.13 鸟氨酸 氨基转移酶 : aruC (绿脓杆菌) 鸟氨酸 氨基转移酶 : CAR2 (酿酒酵母 S288c) 鸟氨酸 氨基转移酶 : OAT (智人) 鸟氨酸 δ-转氨酶 (梨型四膜虫) 鸟氨酸 δ-氨基转移酶 : OAT (乌头叶豇豆) 鸟氨酸 氨基转移酶 : rocD (枯草杆菌) 鸟氨酸 氨基转移酶 (Clostridium sticklandii)	
赖氨酸-氨基转移酶 EC 2.6.1.36 赖氨酸 ϵ-氨基转移酶 : lat (棒状链霉菌) L-赖氨酸 6-氨基转移酶 : lat (黄木香)	 2-酮戊二酸 + L-赖氨酸 L-谷氨酸 + 2-氨基己二酸-6-半醛

[0111] C. 用于生产六亚甲基二胺 (HMD) 的工程化途径

[0112] 本发明的多个方面涉及从 α -酮庚二酸生物生产六亚甲基二胺的工程化途径。六亚甲基二胺最常用于生产尼龙 6,6、Nylon 6,10、Nylon 6,66。尼龙 6,6 和 Nylon 6,10 可制成各种种类的尼龙树脂和尼龙纤维。

[0113] 图 2 和 3 所示的第一工程化途径包括在上述氨基己二酸工程化途径中的 2-酮庚二酸向氨基己酸的第一脱羧 (酶促步骤 I, 随后为酶促步骤 4, 或酶促步骤 II, 随后为酶促步

骤 8)。在一些实施方式中,醛脱氢酶被表达并催化氨基己酸转化为 6-氨基己醛中间产物(酶促步骤 5),且 1-转氨酶被表达并催化 6-氨基己醛转化为 HMD(酶促步骤 6)。或者,工程化途径包括上述脱氢和氨基转移酶促反应之前的磷酸化步骤(使用激酶)。人们应理解磷酸化步骤和脱氢步骤类似于磷酸化步骤(由天冬氨酸激酶 EC 2.7.2.4 催化),和赖氨酸途径中参与天冬氨酸半醛合成的脱氢步骤(由 EC 1.2.1.11 酶催化)。

[0114] 根据第二工程化途径,由 α -酮庚二酸产生的 2-氨基庚二酸(酶促步骤 II,图 3)向六亚甲基二胺的转化由步骤 9、10 或 11 和 12 组成,其合并并在赖氨酸生物合成 IV 途径中表征的酶或同源酶。此途径包括将以下底物向产物的转化:

[0115] 酶促步骤 9:2-氨基庚二酸至 2-氨基-7-氧代庚酸(或 2-氨基庚二酸 7 半醛),由如氨基己二酸还原酶或同源酶(如 Sc-Lys2, EC 1.2.1.31)催化;

[0116] 酶促步骤 10 或 11:氨基-7-氧代庚酸至 2,7-二氨基庚酸,由如酵母氨酸脱氢酶(如 Sc-Lys9, EC 1.5.1.10 或 Sc-Lys1, EC 1.5.1.7)催化;

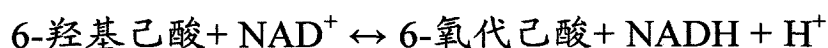
[0117] 酶促步骤 12:1,7-di 氨基庚酸至六亚甲基二胺,由如赖氨酸脱羧酶或鸟氨酸脱羧酶催化。

[0118] 人们应理解从 α -酮己二酸起始,类似的途径将导致尸胺的产生。

[0119] D. 用于生产 6-羟基己酸(6HH)的工程化途径

[0120] 本发明的一个方面公开了从己二酸半醛(上述己二酸工程化途径的中间产物)生物生产 6-羟基己酸(6HH)的工程化途径。6HH 是可环化为己内酯或直接聚合以产生聚酯塑料(聚羟基烷酸 PHA)的 6-碳羟基烷酸。在一些实施方式中,己二酸半醛通过简单的加氢被转化为 6HH,且此反应被醇脱氢酶(EC 1.1.1.1)催化。此酶属于氧化还原酶家族,特别是那些通过受体 NAD^+ 或 NADP^+ 作用于供体 CH-OH 基团的那些。在一些实施方式中,使用催化以下化学反应的 6-羟基己酸脱氢酶(EC 1.1.1.258)。

[0121]



[0122] 其它醇脱氢酶包括但不限于 adhA 或 adhB(来自运动发酵单胞菌)、丁醇脱氢酶(来自 *Clostridium acetobutylicum*)、丙二醇氧化还原酶(来自大肠杆菌和 ADHIV 醇脱氢酶(来自酵母属))。

[0123] E. 用于生产 1,6-己二醇的工程化途径

[0124] 本发明的一个方面公开了从己二酸半醛(上述己二酸工程化途径的中间产物)生物生产 1,6-己二醇的工程化途径。1,6-己二醇是化工中有价值的中间产物。其应用于各种聚合物的合成,如用于生产聚氨酯弹性体和聚合塑化剂的聚酯,且也用在汽油精制中。

[0125] 在一些实施方式中,己二酸半醛通过醇脱氢酶(酶促步骤 1,图 2)被转化为 6-羟基己酸,且随后通过醇脱氢酶或醛脱氢酶(酶促步骤 2,图 2)的作用被转化为 1,6-己二醇。

[0126] 醇脱氢酶(ADHs)(EC 1.1.1.1 和 1.1.1.2)催化酮和醛向醇的可逆还原以及 NAD^+ 向 NADH 的还原。在一些实施方式中,醇脱氢酶包括但不限于 adhA 或 adhB(来自运动发酵单胞菌),丁醇脱氢酶(来自 *Clostridium acetobutylicum*)、丙二醇氧化还原酶(来自大肠杆菌)和 ADHIV 醇脱氢酶(来自酵母属)、或 ADH6(来自酿酒酵母)。

[0127] 醛 $\text{NAD}(+)$ 脱氢酶活性和醇 $\text{NAD}(+)$ 脱氢酶活性可通过两种不同的多肽来进行,或通过单独多肽如来自大肠杆菌(Goodlove 等. Gene 85:209-14,1989;GenBank 登录号

M33504) 的多官能醛-醇脱氢酶 (EC 1.2.1.10) 来进行。具有醛脱氢酶 (NAD(P)⁺) (EC 1.2.1.-) 或醛脱氢酶 (NAD⁺) (EC 1.2.1.3) 活性的多肽以及编码此多肽的核酸可从包括但不限于酿酒酵母的各种物种获得。

[0128] F. 用于生产 6-氨基己醇的工程化途径

[0129] 在一些实施方式中, Cn ω -氨基醇可通过偶联 γ -氨基丁醛脱氢酶 (EC 1.2.1.3 或 1.2.1.19 或 1.2.1.47) 和醇脱氢酶从 Cn 末端氨基酸产生, 其中碳的数量在 4 和 7 之间。在优选实施方式中, 6-氨基己醇通过偶联 γ -氨基丁醛脱氢酶 (EC 1.2.1.3 或 1.2.1.19 或 1.2.1.47) 和用于氨基己酸的代谢途径的上述醇脱氢酶从氨基己酸产生。

[0130] IV. 用于从 α -酮酸 (C5 至 C8) 生产双官能烷烃 (C5 至 C8) 的工程化途径

[0131] 如图 5 所示, 有若干使用重组微生物从 α -酮酸 (Cn) 源生产双官能烷烃 (Cn) 的潜在途径。本发明的多个方面涉及将 α -酮中间产物生物转化为双官能戊烷、双官能己烷、双官能庚烷、双官能辛烷分子。感兴趣的双官能戊烷分子包括但不限于 1-羟基戊酸、1,5-戊烷二醇、戊二酸、尸胺 (戊烷-1,5-二胺)、5-氨基戊醛和 5-氨基戊醇。目的双官能己烷分子包括但不限于 1-羟基己酸、1,6-己二醇、己二酸、六亚甲基二胺、氨基己酸、6-氨基己醛和 6-氨基己醇。感兴趣的双官能庚烷分子包括但不限于 1-羟基庚酸、1,7-庚烷二醇、庚二酸、1,7-二氨基庚烷、7-氨基庚醛和 7-氨基庚醇。感兴趣的双官能辛烷分子包括但不限于 1,4-辛烷二醇、1-羟基辛酸、辛酸、1,4-二氨基辛烷、4-氨基辛醛和 4-氨基辛醇。

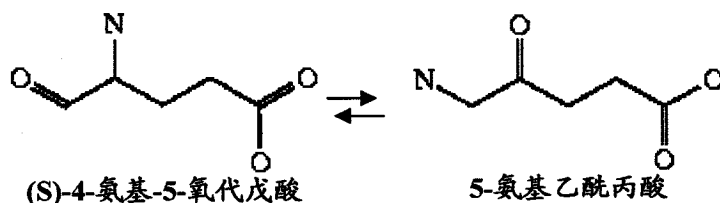
[0132] 本发明的一个方面涉及用于生产双官能烷烃的工程化途径, 其包括上述 2-氨基转移酶 (酶促步骤 II)。根据第一工程化途径, 由 α -酮酸 Cn 向双官能 Cn 烷烃转化由酶促步骤 II、21、22、23 和上述步骤 5、6 和 7 组成, 此步骤包括以下酶和向产物转化的底物:

[0133] ●酶促步骤 II: α -酮酸 Cn 至 2-氨基 1,n-二羧酸, 由如 2-氨基转移酶或同源物酶 (如 lysN (EC 2.6.1.7)、kat2; aadat 和 AADAT) 催化。

[0134] ●酶促步骤 21: 2-氨基 1,n-二羧酸至 (n-1)-氨基 -n-氧代羧酸, 由如氨基醛脱氢酶催化。

[0135] ●酶促步骤 22: (n-1)-氨基 -n-氧代羧酸至 (n-1)-氧代 -n-氨基羧酸, 由 2-氨基醛变位酶催化。在示例性实施方式中, 氨基醛变位酶为谷氨酸-1-半醛 2,1-氨基变位酶 (EC 5.4.3.8)。谷氨酸-1-半醛 2,1-氨基变位酶 (GSAM) 已描述在卟啉生物合成途径中, 且催化 (S)-4-氨基-5-氧代戊酸向 5-氨基乙酰丙酸的反应。

[0136]



[0137] 在一些实施方式中, 氨基醛变位酶包括来自 *thermosynechococcus elongates*、来自嗜热菌和来自超嗜热古菌 (*aeropyrum pernix*) (gene heml) 的谷氨酸-1-半醛 2,1-氨基变位酶, 以及由如聚球藻的 gsa 基因形式编码的多肽。

[0138] ●酶促步骤 23: (n-1)-氧代 -n-氨基羧酸至 n-氨基羧酸, 由三种酶催化: 脱氢酶 (步骤 23a) 将酮基转化为仲醇基。脱氢之后是脱水, 其由催化仲醇基转化为烯烃 (步骤 23b) 的脱水酶和由催化烯烃转化为烷烃 (步骤 23c) 的脱氢酶催化。

[0139] ●酶促步骤 5 :n-氨基羧酸至 n-氨基醛,由醛脱氢酶(如 EC 1.2.1.3)、随后由酶促步骤 6 或酶促步骤 7 催化。

[0140] ●酶促步骤 6 :n-氨基羧酸至 n-氨基醇,由醇脱氢酶如醇脱氢酶(EC 1.1.1.1 和 EC 1.1.1.2)催化。

[0141] ●酶促步骤 7 :n-氨基醛至 1,n-二氨基烷,由 1-氨基转移酶催化。

[0142] 本发明的另一个方面涉及用于从相同长度(C5 至 C8)的 α -酮酸生物生产感兴趣的双官能烷烃(C5 至 C8)的第二途径。第二工程化途径包括第一 α -酮去除步骤(酶促步骤 III)。在一些实施方式中,酮去除为三步酶促反应,包括脱氢酶催化酮基团向仲醇转化;脱水酶催化仲醇向烯烃转化,和脱氢酶催化烯烃向烷烃转化。在示例性实施方式中,己二酸通过第一脱氢酶、脱水酶和第二脱氢酶的共同活性由 α -酮己二酸合成。在一些实施方式中,第一和第二脱氢酶相同。

[0143] 在一些实施方式中,脱氢酶为 3-氧代酰基-[酰基-载体蛋白]还原酶(EC 1.1.1.100),期显示出催化脂肪酸生物合成超途径中的以下反应:

[0144]



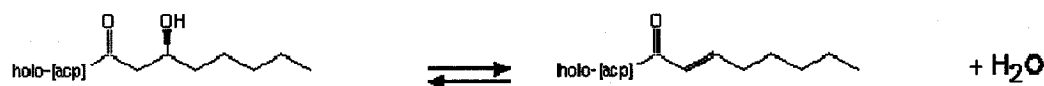
(3R)-3-羟基酰基-[acp]

β -酮酰基-[acp]

[0145] 在一些实施方式中,脱氢酶为 β -酮酰基-[酰基-载体蛋白]还原酶(来自大肠杆菌(E. Coli)的 FabG 基因)、脂肪酸合酶(来自酿酒酵母的 Fas2 基因)或脂肪酸合酶(来自智人的 FASN 基因)。

[0146] 在一些实施方式中,脱水酶为 3-羟基辛酰基-[酰基-载体蛋白]脱水酶(EC4.2.1.59),其催化以下反应:

[0147]



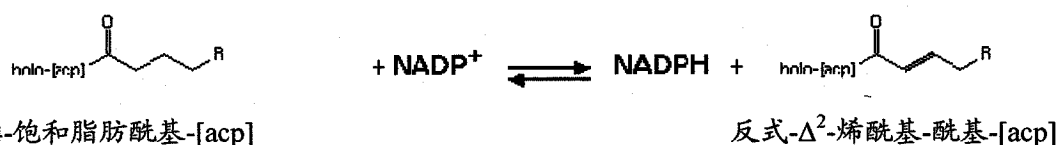
(R)-3-羟基辛酰基-[acp]

反式辛-2-烯酰基-[acp]

[0148] 3-羟基辛酰基-[酰基-载体蛋白]脱水酶包括但不限于来自菠菜(Spinacia oleracea)的 3-羟基酰基-ACP 脱水酶、 β -羟基酰基-ACP 脱水酶(来自大肠杆菌的 FabA 基因)、 β -羟基酰基-ACP 脱水酶(来自大肠杆菌的 FabZ 基因)。

[0149] 在一些实施方式中,第二脱氢酶为烯酰基酰基载体蛋白还原酶(EC 1.3.1.9),如显出催化以下反应的烯酰基-ACP 还原酶(来自大肠杆菌的 fabI 基因)。

[0150]



2,3,4-饱和脂肪酰基-[acp]

反式- Δ^2 -烯酰基-酰基-[acp]

[0151] 在一些实施方式中,第一和第二脱氢酶为相同的(脂肪酸合酶(来自酿酒酵母的Fas2基因或来自智人的FASN基因))。

[0152] 双官能烷烃生产包括酶促步骤30,随后为取决于感兴趣的代谢物或终产物的不同的酶促步骤。用于生产n-羟基羧酸和1,n-烷二醇的生物工程化途径包括一种或多种醇和/或醛脱氢酶。在一个实施方式中,如下所述以及图4和图5所示,工程化途径包括酶促步骤30,随后为酶促步骤1和2,或酶促步骤30,随后为酶促步骤31。在一些实施方式中,用于生产n-氨基羧酸、n-氨基醛、n-氨基醇或1,n-二氨基烷烃的生物工程化途径包括一种或多种氨基转移酶(酶促步骤4和6)、醛脱氢酶(酶促步骤5)和醇脱氢酶(酶促步骤7)。在示例性实施方式中,氨基己酸通过包括醛脱氢酶(酶促步骤30)和随后氨基转移酶(酶促步骤4)的工程化途径从6-氧代己酸产生。随后,氨基己酸可通过醛脱氢酶(酶促步骤5)和随后的氨基转移酶(酶促步骤6)被转化为六亚甲基二胺。酶促步骤和底物向产物的转化列在下方且在图4和图5中示出:

[0153] ●酶促步骤30:二羧酸至羧酸半醛,由醛脱氢酶催化;

[0154] ●酶促步骤1:羧酸半醛至羟基1羧酸,由醇脱氢酶催化;

[0155] ●酶促步骤2:羟基羧酸至1,n-烷二醇,由醛脱氢酶或醇脱氢酶催化。

[0156] ●酶促步骤31:羧酸半醛至1,n-烷二醇,由醛脱氢酶或醇脱氢酶催化。

[0157] ●酶促步骤4:羧酸半醛至n-氨基羧酸至n-氨基醛,由醛脱氢酶催化;

[0158] ●酶促步骤6:n-氨基醛至1,n-二氨基醛,由1-氨基转移酶催化;

[0159] ●酶促步骤7:n-氨基醛至n-氨基醇,由醇脱氢酶催化。

[0160] 筛选技术

[0161] 根据本文所述的方法,可在允许细胞生长和/或孵育的任何容器中进行用于途径开发的反应混合物。例如,反应混合物可为生物反应器、细胞培养烧瓶或板、多孔板(如96、384、1056孔微滴定板等)、培养烧瓶、发酵器、或用于细胞培养或孵育的其它容器。

[0162] 筛选可通过检测选择型标记的表达来进行,此标记在一些遗传环境中允许细胞表达标记以存活而其它细胞死亡(或反之亦然)。需要有效的筛选技术以使用本文所述方法的新型途径来提供有效的开发。优选地,用于酶促途径生产的化合物的适合筛选技术允许快速和敏感筛选感兴趣的性质。此时视觉(量热)分析为最佳,且易于应用于具有适合光吸收性质的化合物。更复杂的筛选工艺包括如高通量HPLC-MS分析、SPME(固相微提取)和GC-MS(气相色谱-质谱)(参见Handbook of analytical derivatization reaction, D. R. Knapp; John Wiley & Sons, 1979)。在一些情况中,将筛选机器人与HPLC-MS系统连接,以用于自动注射和快速样品分析。这些技术允许高通量检测和定量最终所希望的任何化合物。

[0163] 感兴趣的生物法生产的产物可使用本领域已知方法从发酵培养基或细胞提取物分离。例如,固体或细胞残渣可通过离心或过滤去除。感兴趣的生物产物可通过蒸馏、液液提取、膜蒸发、吸附或本领域已知的任何方法分离。

[0164] 在一些实施方式中,感兴趣的产物的鉴定使用HPLC进行。例如,标准样品通过培养基中已知量的有机产物制备(如己二酸、氨基己酸)。随后可将产生的己二酸的保留时间与可靠的标准保留时间进行比较。在一些实施方式中,感兴趣的产物的鉴定可使用GC-MS进行。随后将溶解的样品通过质量选择检测器分析,且与在先质谱和可靠标准的保留时间

进行比较。

[0165] 在一些实施方式中,可根据酶活性筛选细胞提取物。例如,氧代己酸脱氢酶活性可通过如Donoghue and Trudgill (Eur. J. Biochem., 1975, 60 :1-7) 所述在 340nm 下测定吸光度的增加率来检测。

[0166] 除非另有说明,本发明方法的实施将使用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组 DNA、和免疫学、工程学、机扑学、光学、计算机软件和集成的常规技术。此技术和步骤通过根据本领域和各种文献中的常规方法进行,这在本领域人员技术范围内。此技术在文献中详细说明。参见,如 Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. by Sambrook, Fritsch and Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press :1989) ;DNA Cloning, Volumes I and II (D.N.Glover ed., 1985) ;Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait ed., 1984) ;Mullis et al. U.S. Patent No :4,683,195 ;nucleic acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984) ;Transcription And Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984) ;Culture Of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc., 1987) ;Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986) ;B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984) ;the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.) ;Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds., 1987, Cold Spring Harbor Laboratory) ;Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu et al. eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds., Academic Press, London, 1987) ;Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV (D. M. Weir and C. C. Blackwell, eds., 1986) ;Manipulating the Mouse Embryo, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 1986) ;Lakowicz, J. R. Principles of Fluorescence Spectroscopy, New York :Plenum Press (1983), and Lakowicz, J. R. Emerging Applications of Fluorescence Spectroscopy to Cellular Imaging :Lifetime Imaging, Metal-ligand Probes, Multi-photon Excitation and Light Quenching, Scanning Microsc. Suppl VOL. 10 (1996) pages 213-24, for fluorescent techniques, Optics Guide 5 Melles Griot. RTM. Irvine Calif. for general optical methods, Optical Waveguide Theory, Snyder & Love, published by Chapman & Hall, and Fiber Optics Devices and Systems by Peter Cheo, published by Prentice-Hall for fiber optic theory and materials.

[0167] 等价形式

[0168] 本发明提供了用于代谢工程化的其它组合物和方法。尽管已经讨论了本发明的具体实施方式,但以上描述是说明性而非限制。基于本发明的评论,本发明的许多变化对本领域技术人员是显然的。本发明的全部范围应参照权利要求以及它们等价物的全部范围,和说明书,以及此变化来确定。

[0169] 通过参考并入

[0170] 本文所述的全部出版物和专利,包括以下列出的条目通过参考整体并入本文,如具体且单独地表明通过参考并入每个单独的出版物或专利。在冲突的情况下,以本申请,包括本文的任何定义为准。

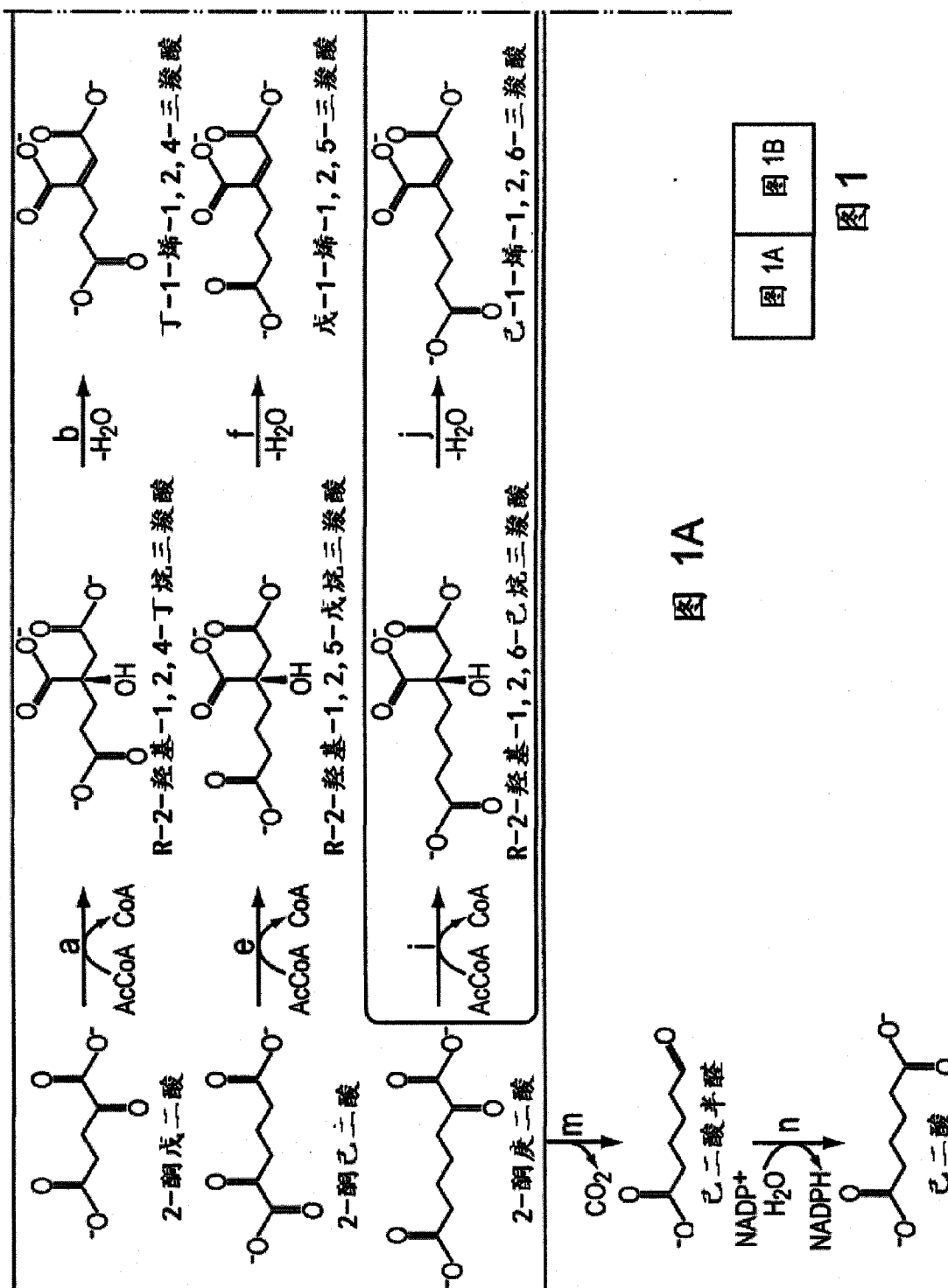


图 1A

图 1A



1

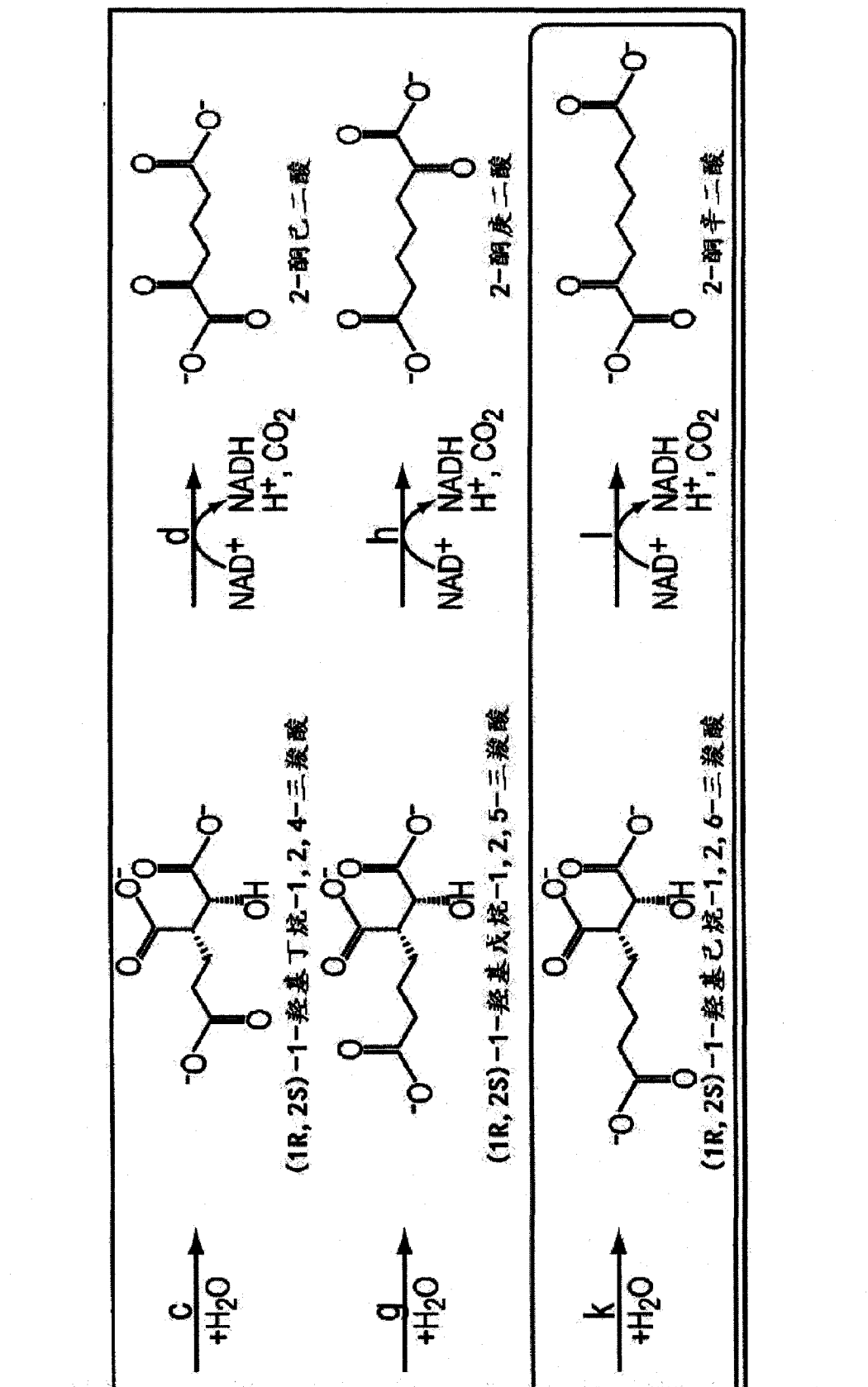


图 1B

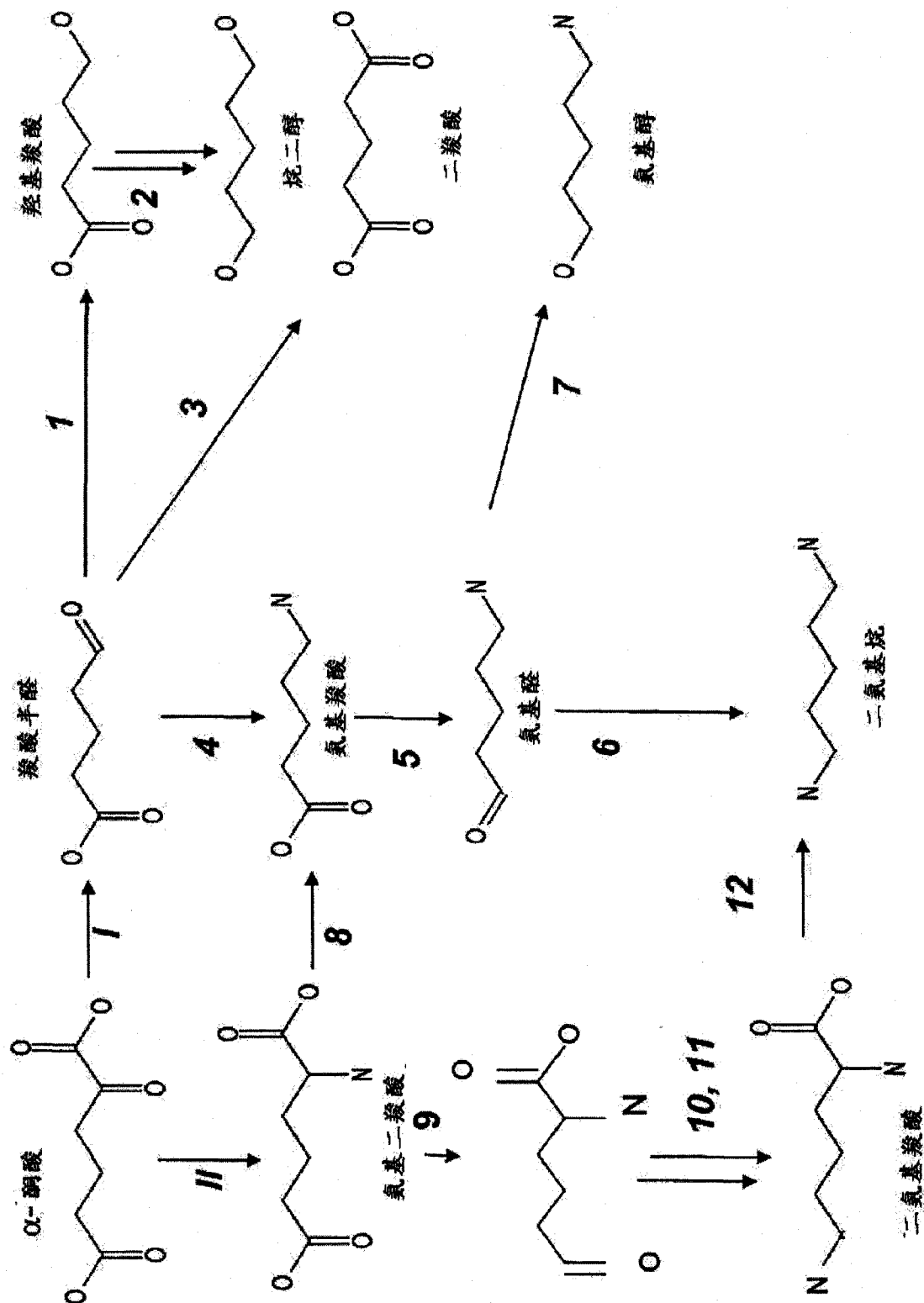


图 2

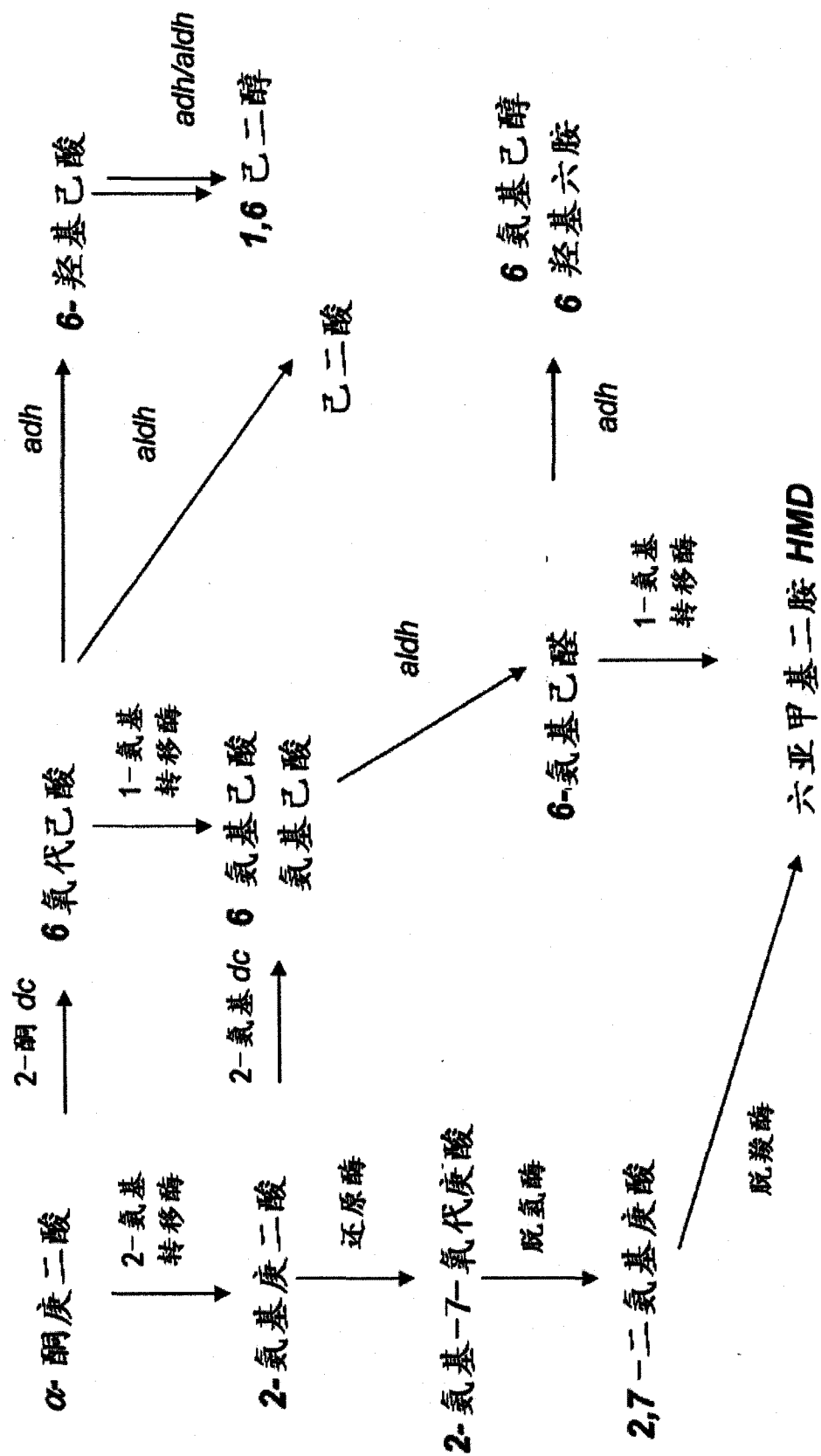


图 3

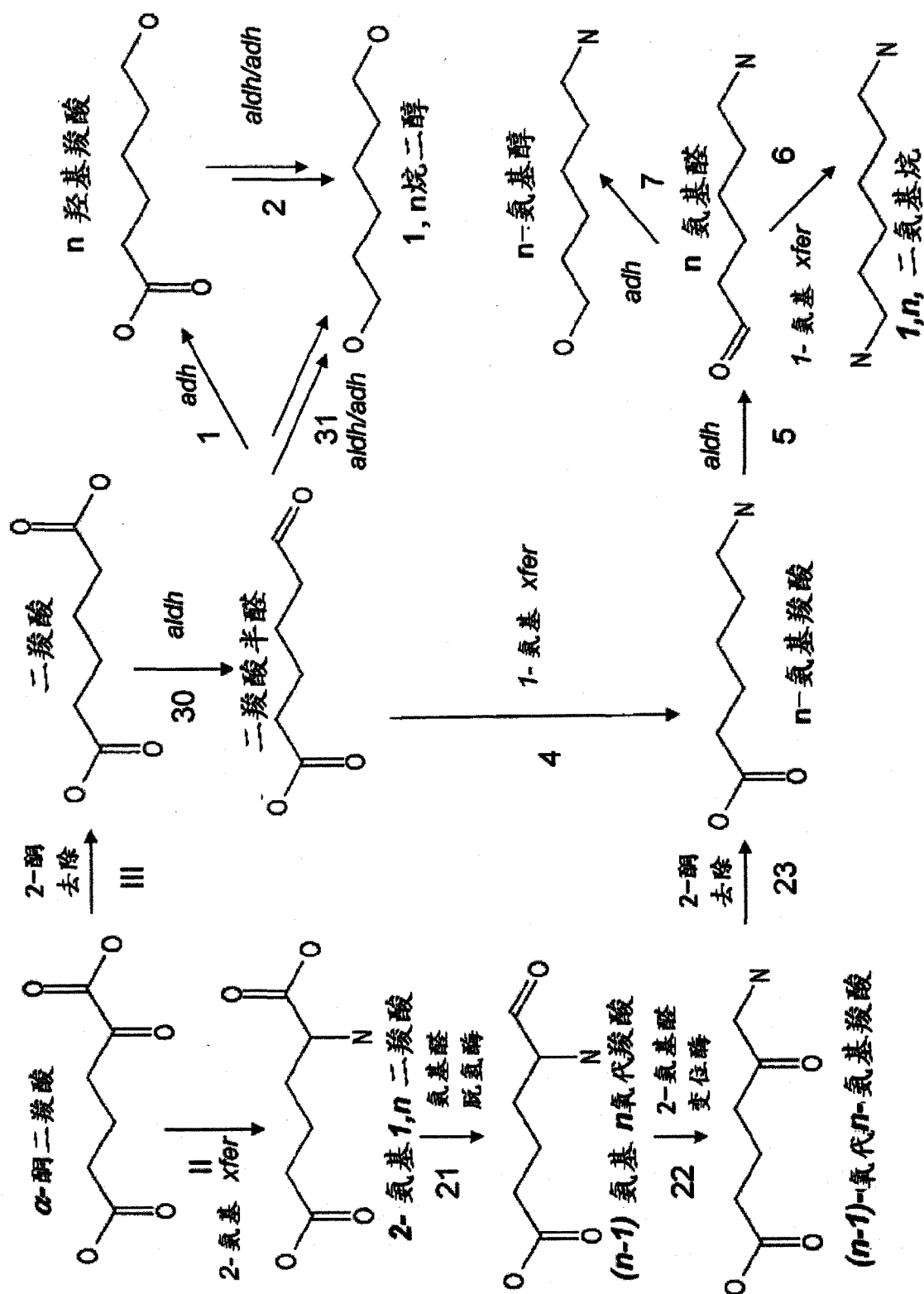


图 4

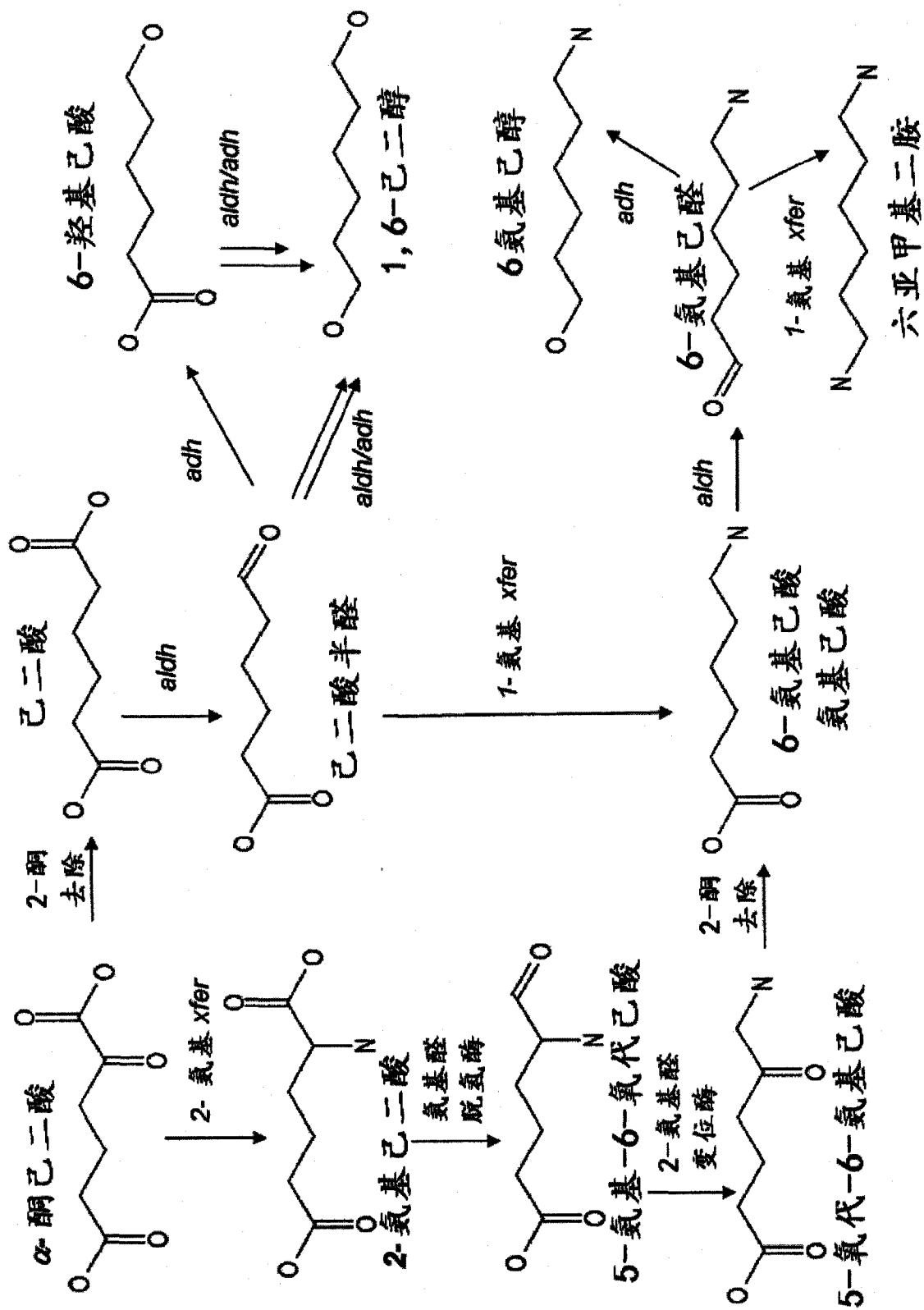


图 5