



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110678541 A

(43)申请公布日 2020.01.10

(21)申请号 201880021659.1

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(22)申请日 2018.01.26

代理人 封新琴

(30)优先权数据

1750694 2017.01.27 FR

(51)Int.Cl.

C12N 1/13(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.26

C12N 1/15(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/052005 2018.01.26

C12N 1/19(2006.01)

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/138289 FR 2018.08.02

C12N 1/21(2006.01)

(71)申请人 伊诺布拉克

地址 法国拉蒙维尔圣阿尼

C12N 15/52(2006.01)

(72)发明人 C·波伊萨特 N·莫林

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)

权利要求书2页 说明书53页

序列表26页 附图3页

(54)发明名称

用于产生感兴趣的分子的经遗传优化的微生物

(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,且在该微生物中糖醇解途径至少部分地受抑制,所述微生物经遗传修饰以产生外源性分子和/或过产生内源性分子。根据本发明,戊糖磷酸途径的氧化分支也可至少部分地受抑制。本发明还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. 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),且在该微生物中糖酵解途径至少部分地受抑制,即至少1,3-二磷酸-D-甘油酸(1,3-BPG)的产生的上游或3-磷酸甘油酸(3PG)的产生的上游以及甘油醛-3-磷酸(G3P)的产生的下游受抑制,所述微生物经遗传修饰以除RuBisCO酶和/或磷酸核酮糖激酶之外产生外源性感兴趣的分子和/或过产生内源性感兴趣的分子。

2. 根据权利要求1的经遗传修饰的微生物,其中戊糖磷酸途径的氧化分支也至少部分地受抑制。

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表达重组RuBisCO酶和/或PRK。

4. 根据权利要求2-3中任一项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-磷酸产生的上游的戊糖磷酸途径的氧化分支。

5. 根据权利要求4的经遗传修饰的微生物,其中所述外源性分子和/或所述内源性分子选自氨基酸、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. 根据权利要求1-5中任一项的经遗传修饰的微生物,其中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,优选是细菌。

7. 根据权利要求1-6中任一项的经遗传修饰的微生物,其中编码甘油醛3-磷酸脱氢酶的基因的表达至少部分地受抑制。

8. 根据权利要求1-7中任一项的经遗传修饰的微生物,其中编码磷酸甘油酸激酶的基因的表达至少部分地受抑制。

9. 根据权利要求7或8的经遗传修饰的微生物,其中编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶或6-磷酸葡萄糖酸内酯酶或6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶的基因的表达至少部分地受抑制。

10. 根据权利要求1-9中任一项的经遗传修饰的微生物,所述微生物是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)的酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)属的酵母,且其中TDH1、TDH2和/或TDH3基因的表达至少部分地受抑制。

11. 根据权利要求1-10中任一项的经遗传修饰的微生物,所述微生物是经遗传修饰以表达功能性I或II型RuBisCO和功能性磷酸核酮糖激酶(PRK)的酿酒酵母酵母,且其中PGK1基因的表达至少部分地受抑制。

12. 根据权利要求10或11的经遗传修饰的微生物,其中ZWF1基因的表达至少部分地受抑制。

13. 根据权利要求1-9中任一项的经遗传修饰的微生物,所述微生物是经遗传修饰以表达功能性I或II型RuBisCO和功能性磷酸核酮糖激酶(PRK)的曲霉属(*Aspergillus*)属的丝状真菌,且其中pgk和gsdA基因的表达至少部分地受抑制。

14. 根据权利要求1-9中任一项的经遗传修饰的微生物,所述微生物是经遗传修饰以表达功能性I或II型RuBisCO和功能性磷酸核酮糖激酶(PRK)的大肠杆菌(*E.coli*)细菌,且其中gapA和/或pgk基因以及任选的zwf基因的表达至少部分地受抑制。

15. 根据权利要求1-14中任一项的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,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。

16. 根据权利要求15的用途,用于产生或过产生谷氨酸、柠檬酸、衣康酸或GABA。

17. 用于产生至少一种感兴趣的分子的生物技术方法,其表征在于其包括培养根据权利要求1-14中任一项所述的经遗传修饰的微生物的步骤,所述培养在允许由所述微生物合成或生物转化出所述感兴趣的分子的条件下进行,和任选的回收和/或纯化所述感兴趣的分子的步骤。

18. 根据权利要求17的生物技术方法,其中所述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。

19. 根据权利要求17或18的生物技术方法,其中所述感兴趣的分子选自谷氨酸、柠檬酸、衣康酸或GABA。

20. 根据权利要求17-19中任一项的生物技术方法,其中所述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或合成的酶。

21. 根据权利要求17-19中任一项的生物技术方法,其中所述微生物经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。

22. 用于产生感兴趣的分子的方法,其包括 (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1-14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。

23. 用于产生感兴趣的分子的方法,其包括 (i) 在根据权利要求1-14中任一项所述的重组微生物中抑制至少一种编码涉及所述感兴趣的分子的降解的酶的基因的表达, (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遗传优化的微生物

### 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糖酵解途径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,但对于产生生物转化所必需的辅因子(且更特别的是NADPH),碳源是必需的。通常,此类微生物学方法的产量是低的,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,因为由微生物可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,有必要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( $\text{CO}_2$ ,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 $\text{CO}_2$ 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 $\text{CO}_2$ 作为碳源来产生感兴趣的分子,发明人发现通过将部分卡尔文循环(PRK/RuBisCO)与糖酵解的至少部分抑制的偶联,有可能增加感兴趣的分子的产率。发明人还已经发现有可能还通过至少部分地抑制戊糖磷酸途径的氧化分支,在产生感兴趣的分子期间增加外源性 $\text{CO}_2$ 的消耗。如此开发的微生物使得大规模且以工业上具有吸引力的产量产生大量感兴趣的分子(诸如氨基酸、有机酸、萜、类萜、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,且在该微生物中糖酵解途径至少部分地受抑制,所述微生物经遗传修饰以除RuBisCO和/或磷酸核酮糖激酶(PRK)酶之外产生外源性感兴趣的分子和/或以过产生的内源性感兴趣的分子。

[0012] 在一个特定的实施方案中,所述经遗传修饰的微生物具有也至少部分地受抑制的

戊糖磷酸途径的氧化分支。

[0013] 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。

[0014] 本发明还涉及用于产生或过产生至少一种感兴趣的分子的生物技术方法,其表征在于它包括培养根据本发明的经遗传修饰的微生物的步骤,所述培养在允许由所述微生物合成或生物转化成所述感兴趣的分子的条件下进行,和任选的回收和/或纯化所述感兴趣的分子的步骤。

[0015] 本发明还涉及用于产生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。

[0016] 附图简述

[0017] 图1:糖酵解、戊糖磷酸途径和恩特纳-杜德洛夫途径的总图;

[0018] 图2:根据本发明的糖酵解途径的抑制的图示;

[0019] 图3:根据本发明的糖酵解途径的抑制与戊糖磷酸途径的氧化分支的抑制相结合的图示。

[0020] 发明详述

[0021] 定义

[0022] 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。

[0023] 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。

[0024] 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。

[0025] 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 Biology 4<sup>th</sup> ed.2000.W.H.Freeman and Company.ISBN 0-7167-3136-3);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、核酸酶或反义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.2013 Oct;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。

[0026] 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)、 $\gamma$ -氨基丁酸、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、睾酮、孕酮、可的松)、类黄酮(例如羟基苯丙酮(frambinone)、vestinone)、有机酸(例如柠檬酸、琥珀酸、草酸、衣康酸、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)。

[0027] 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。

[0028] 微生物

[0029] 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。

[0030] “经遗传修饰的”微生物意指微生物的基因组已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。

[0031] 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tetO-2、GAL10、GAL10-CYC1、PH05。

[0032] 通常，根据本发明的经遗传修饰的微生物具有以下特征：

[0033] -表达功能性RuBisCO (EC 4.1.1.39)；

[0034] -表达功能性PRK (EC 2.7.1.19)；

[0035] -至少部分地抑制糖酵解；和

[0036] -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。

[0037] 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。

[0038] 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*)。

[0039] 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 (*Podospora*)、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*)。

[0040] 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*)、朱氏四爿藻 (*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.)。

[0041] 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(Bacteroidetes)、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)、热孢菌门(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(Arthospira)、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(Methyllobacterium)、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)、Scenedesmus、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 amyloliquefaciens)、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*)。

[0042] 功能性RuBisCO和功能性PRK的表达

[0043] 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。

[0044] 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)(古生菌或古细菌)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.*))。

[0045] 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)。

[0046] 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WO2015/107496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。

[0047] 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。

[0048] 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。

[0049] 表1:编码RuBisCO的序列的实例

基因	GenBank	GI	生物体
<i>rbcL</i>	BAD78320.1	56685098	细长聚球藻
<i>rbcS</i>	BAD78319.1	56685097	细长聚球藻
<i>cbbL2</i>	CAJ96184.1	113529837	钩虫贪铜菌
<i>cbbS</i>	P09658.2	6093937	钩虫贪铜菌
<i>cbbM</i>	YP_427487.1	132036	深红红螺菌
<i>cbbM</i>	Q21YM9.1	115502580	铁还原红螺菌( <i>Rhodoferax ferrireducens</i> )
<i>cbbM</i>	Q479W5.1	115502578	芳香族酸脱氯单胞菌( <i>Dechloromonas aromatica</i> )
<i>rbcL</i>	O93627.5	37087684	<i>Thermococcus kodakarensis</i>
<i>cbbL</i>	CQR50548.1	811260688	嗜盐古菌 <i>Arc-Hr</i>

[0050] 表2:编码PRK的序列的实例

基因	GenBank	GI	生物体
<i>prk</i>	BAD78757.1	56685535	细长聚球藻
<i>cXP</i>	P19923.3	125575	钩虫贪铜菌
<i>PRK</i>	P09559.1	125579	菠菜( <i>Spinacia oleracea</i> )
<i>cbbP</i>	P37100.1	585367	<i>Nitrobacter vulgaris</i>

[0054] 糖酵解的抑制

[0055] 根据本发明,糖酵解途径至少部分地受抑制,使得微生物不再能够正常使用此代谢途径(图1-糖酵解)。换句话说,所述微生物不再有能力以与其中糖酵解途径尚未受抑制(独立于任何其他遗传修饰)的野生型微生物相似的方式同化葡萄糖。

[0056] 在一个特定的实施方案中,所述微生物经遗传修饰以完全或部分地抑制甘油醛-3-磷酸(G3P)产生的下游的糖酵解。

[0057] 例如,在1,3-二磷酸-D-甘油酸(1,3-BPG)的产生的上游或3-磷酸甘油酸(3PG)的产生的上游抑制糖酵解。

[0058] 取决于微生物,甘油醛-3-磷酸(G3P)与3-磷酸甘油酸(3PG)之间涉及的反应可(i)通过伴随作用的两种酶,甘油醛-3-磷酸脱氢酶(EC 1.2.1.12,缩写为GAPDH或更少见为G3PDH)和磷酸甘油酸激酶(E.C.2.7.2.3,缩写为PGK),或(ii)通过单个非磷酸化的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(EC 1.2.1.9,缩写为GAPN)来管理。

[0059] 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)使用NAD<sup>+</sup>/NADH对作为电子供体/受体以反应反向催化G3P可逆转化为1,3-二磷酸-D-甘油酸(1,3-BPG)。取决于生物体,编码GAPDH的基因可被称为gapA、gapB、gapC(例如大肠杆菌、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*))、GAPDH、GAPD、G3PD、GAPDHS(例如智人(*Homo sapiens*))、TDH1、TDH2、TDH3(例如酿酒酵母)、gap、gap2、gap3(例如分支杆菌属种(*Mycobacterium sp.*))、念珠藻属种(*Nostoc sp.*)。

[0060] 磷酸甘油酸激酶(PGK)使用ATP/ADP对作为辅因子催化1,3-BPG可逆转化为3PG。取决于生物体,编码PGK的基因可被称为PGK、PGK1、PGK1、PGK2、PGK3、pgkA、PGKB、PGKC、cbbK、cbbKC、cbbKP(例如钩虫贪铜菌)。

[0061] 非磷酸化的甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPN)催化G3P转化为3PG,而不经过1,3-BPG。在辅因子对NADP<sup>+</sup>/NADPH的存在下催化此反应,辅因子对NADP<sup>+</sup>/NADPH作为电子受体起作用。取决于生物体,编码GAPN的基因可被称为GAPN(例如芽孢杆菌属种(*Bacillus sp.*))、链球菌属种(*Streptococcus sp.*))、GAPN1(例如衣藻属种(*Chlamydomonas sp.*))。

[0062] 在一个特定的实例中,所述微生物经遗传修饰,使得编码甘油醛3-磷酸脱氢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。

[0063] 可替换地或另外地,编码磷酸甘油酸激酶的基因的表达也可至少部分地受抑制。优选地,基因表达完全地受抑制。

[0064] 可替换地,所述微生物经遗传修饰,使得编码非磷酸化的甘油醛-3-磷酸脱氢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。

[0065] 作为实例,下面表3、4和5列出了编码甘油醛3-磷酸脱氢酶、磷酸甘油酸激酶和非磷酸化的甘油醛-3-磷酸脱氢酶的序列,所述甘油醛3-磷酸脱氢酶、磷酸甘油酸激酶和非磷酸化的甘油醛-3-磷酸脱氢酶可根据靶微生物受抑制。技术人员知晓取决于微生物哪个基因对应于待被抑制的感兴趣的酶。

[0066] 表3:编码GAPDH的序列的实例

基因	GenBank	GI	生物体
gapA	NP_416293.1	947679	大肠杆菌
TDH1	NP_012483.3	398364523	酿酒酵母
TDH2	NP_012542.1	6322468	酿酒酵母
TDH3	NP_011708.3	398366083	酿酒酵母
gap	ECC36949.1	378544675	结核分支杆菌
gap2	P34917.2	92090599	念珠藻属

[0068] 表4:编码PGK的序列的实例

基因	GenBank	GI	生物体
<i>pgk</i>	AKL94701.1	831186507	醋酸梭菌 ( <i>Clostridium aceticum</i> )
PGK1	NP_009938.2	10383781	酿酒酵母
<i>pgk</i>	BAG04189.1	166089481	铜绿微囊藻 ( <i>Microcystis aeruginosa</i> )
PGKA	AAG34561.2	22711882	盘基网柄菌 ( <i>Dictyostelium discoideum</i> )
PGKB	CAJ03534.1	68126221	硕大利什曼原虫 ( <i>Leishmania major</i> )
<i>cbbKC</i>	AAC43444.1	976365	钩虫贪铜菌
<i>pgk</i>	CAK45271.1	4982539	黑曲霉
<i>pgk</i>	EAU38870.1	4354973	土曲霉

[0069] 表5:编码GAPN的序列的实例

基因	GenBank	GI	生物体
gapN	CUB58597.1	924094571	枯草芽孢杆菌
GAPN	NP_358622.1	933338	肺炎链球菌 ( <i>Streptococcus pneumoniae</i> )
GAPN1	EDP03116.1	542583	菜茵衣藻

[0070] 通常,在根据本发明的经遗传修饰的微生物中,3-磷酸甘油酸(3PG)的产生不再可能通过糖酵解,或至少是显著降低的。

[0071] 在特定的示例性实施方案中,所述微生物是其中TDH1(基因ID:853395)、TDH2(基因ID:853465)和/或TDH3基因(基因ID:853106)的表达至少部分地受抑制的酿酒酵母属的酵母。

[0072] 在另一特定的示例性实施方案中,所述微生物是其中PGK1基因(基因ID:5230)的表达至少部分地受抑制的酿酒酵母属的酵母。

[0073] 在另一示例性实施方案中,所述微生物是其中PGK1基因(基因ID:5230)的表达、TDH1基因(基因ID:853395)的表达、TDH2(基因ID:853465)的表达和/或TDH3基因(基因ID:853106)的表达至少部分地受抑制的酿酒酵母属的酵母。

[0074] 在特定的示例性实施方案中,所述微生物是其中gapA基因(基因ID:947679)的表达至少部分地受抑制的大肠杆菌细菌。

[0075] 在另一特定的示例性实施方案中,所述微生物是其中pgk基因(基因ID:947414)的表达至少部分地受抑制的大肠杆菌细菌。

[0076] 在另一示例性实施方案中,所述微生物是其中pgk基因(基因ID:947414)的表达和/或gapA基因(基因ID:947679)的表达至少部分地受抑制的大肠杆菌细菌。

[0077] 根据本发明,表达功能性RuBisCO和功能性PRK的经遗传修饰的微生物在另一方面能够通过捕获CO<sub>2</sub>从由戊糖磷酸途径产生的核酮糖-5-磷酸产生3PG(图2)。

[0078] 由于3PG代谢为丙酮酸所必需的酶在微生物中不受抑制,因此所述微生物可代谢3PG以产生丙酮酸和ATP。

[0081] 因此,所述经遗传修饰的微生物能够使用CO<sub>2</sub>作为补充碳源来产生丙酮酸和NADPH辅因子。

[0082] 在本发明的上下文中,“补充”碳源意指除了由可发酵的糖(葡萄糖、半乳糖、蔗糖、果糖等)提供的碳源之外,微生物还使用CO<sub>2</sub>作为部分碳源,所述可发酵的糖构成丙酮酸产生的大部分或主要碳源。

[0083] 因此,根据本发明的经遗传修饰的微生物使得通过经由戊糖磷酸途径固定和使用在葡萄糖代谢期间正常损失的CO<sub>2</sub>来增加碳产量以产生丙酮酸(以及随后的感兴趣的分子)成为可能。

[0084] 戊糖磷酸途径的氧化分支的抑制

[0085] 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也以此类方式进行修饰,即戊糖磷酸途径的氧化分支也至少部分地受抑制。

[0086] 优选地,所述微生物经遗传修饰以抑制核酮糖-5-磷酸产生的上游的戊糖磷酸途径的氧化分支(图1-戊糖磷酸途径)。

[0087] 核酮糖-5-磷酸(Ru5P)产生的上游的戊糖磷酸途径的氧化分支的中断特异性靶向从葡萄糖-6-磷酸(G6P)开始的Ru5P合成过程中的一个或多个反应。此合成通常由三种酶的连续作用催化:(i)葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(EC.1.1.1.49,缩写为G6PDH),(ii)6-磷酸葡萄糖酸内酯酶(E.C.3.1.1.31,缩写为PGL),和(iii)6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(EC 1.1.1.44,缩写为PGD)。

[0088] 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G6PDH)催化戊糖磷酸途径的第一个反应,即将葡萄糖-6-磷酸氧化为6-磷酸葡萄糖酸内酯(6PGL),同时伴随着一分子的NADP<sup>+</sup>还原为NADPH。取决于生物体,编码G6PDH的基因可被称为G6PD(例如智人中)、G6pdx(例如小鼠(Musculus)中)、gsdA(例如构巢曲霉(Aspergillus nidulans)中)、zwf(例如大肠杆菌中),或ZWF1(例如酿酒酵母中)。

[0089] 6-磷酸葡萄糖酸内酯酶(PGL)是催化从6PGL合成6-磷酸葡萄糖酸(6PGA)的水解酶。取决于生物体,编码PGL的基因可被称为pgl(例如在大肠杆菌、集胞藻属种(Synechocystis sp.)中)、pgl1(例如红细菌科(Rhodobacteraceae)细菌中)或SOL(例如酿酒酵母中)。

[0090] 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(PGD)是催化从6PGA合成Ru5P的氧化还原酶,同时伴随着NADP<sup>+</sup>分子还原为NADPH并释放CO<sub>2</sub>分子。取决于生物体,编码PGD的基因可被称为gnd(例如大肠杆菌、酿酒酵母中)、PGD(例如智人中)、gntZ(例如枯草芽孢杆菌中)或6-PGDH(例如类丘状乳杆菌(Lactobacillus paracollinoides)中)。

[0091] 在一个特定的实例中,所述微生物经遗传修饰,使得编码葡萄糖-6-磷酸脱氢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。

[0092] 可替换地或另外地,所述微生物经遗传修饰,使得编码6-磷酸葡萄糖酸内酯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。

[0093] 可替换地或另外地,所述微生物经遗传修饰,使得编码6-磷酸葡萄糖酸脱氢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。

[0094] 作为实例,下面表6、7和8列出了编码葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸内酯酶和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶的序列,可取决于靶微生物抑制葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸

葡萄糖酸内酯酶和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶。技术人员知晓取决于微生物哪个基因对应于待被抑制的感兴趣的酶。

[0095] 表6:编码G6PDH的序列的实例

基因	GenBank	GI	生物体
zwf	BAA15660.1	946370	大肠杆菌
ZWF1	NP_014158.1	6324088	酿酒酵母
gsdA	CAA54841.1	1523786	构巢曲霉
gsdA	CAK37895.1	4979751	黑曲霉
gsdA	EAU38380.1	4316232	土曲霉

[0097] 表7:编码PGL的序列的实例

基因	GenBank	GI	生物体
pgl	BAA35431.1	4062334	大肠杆菌
pgl	BAK51770.1	339275283	集胞藻属
pgls	KPQ07176.1	938272062	<i>Rhodobacteraceae bacterium</i>
SOL3	KZV10901.1	1023943655	酿酒酵母

[0099] 表8:编码PGD的序列的实例

基因	GenBank	GI	生物体
gnd	ALI40222.1	937519736	大肠杆菌
GND1	EDN62420.1	151944127	酿酒酵母
gntZ	NP_391888.1	16081060	枯草芽孢杆菌

[0101]	6-PGDH	WP_054711110.1	938929230	类丘状乳杆菌
--------	--------	----------------	-----------	--------

[0102] 通常,在根据本发明经遗传修饰的微生物中,核酮糖-5-磷酸(Ru5P)的产生不再可能通过戊糖磷酸途径,或是至少显著降低的。

[0103] 在特定的示例性实施方案中,所述微生物是其中ZWF1基因的表达至少部分地受抑制的属酿酒酵母的酵母。

[0104] 在一个特定的实例中,所述属酿酒酵母的酵母经遗传修饰,使得TDH1、TDH2、TDH3和/或PGK1基因的表达,和ZWF1基因的表达至少部分地受抑制。

[0105] 在另一特定的示例性实施方案中,所述微生物是其中zwf基因的表达至少部分地受抑制的属大肠杆菌。

[0106] 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gapA和/或pgk基因的表达,和zwf基因的表达至少部分地受抑制。

[0107] 在另一实例中,所述微生物是曲霉属的丝状真菌,诸如黑曲霉或土曲霉,其经遗传修饰使得pgk和gsdA基因的表达部分地受抑制。

[0108] 根据本发明,该表达功能性RuBisCO和功能性PRK且其糖酵解途径和戊糖磷酸途径的氧化分支至少部分地受抑制的经遗传修饰的微生物不再能够经由糖酵解途径产生3PG或经由戊糖磷酸途径的氧化分支产生Ru5P。在另一方面,其能够通过使在糖酵解的起始(抑制

的上游)处产生的果糖-6-磷酸(F6P)和/或甘油醛-3-磷酸(G3P)的产生转向来产生Ru5P。此产生可能是由于在微生物中天然存在或有活性的转酮醇酶(EC 2.2.1.1)、转醛醇酶(EC 2.2.1.2)、核糖-5-磷酸异构酶(EC 5.3.1.6)、和核酮糖-5-磷酸差向异构酶(EC 5.1.3.1)(图3)。

[0109] 由于将3PG代谢为丙酮酸所必需的酶在根据本发明的微生物中是不受抑制的,则所述微生物可代谢3PG以产生丙酮酸和ATP。

[0110] 因此,所述经遗传修饰的微生物能够通过使用外源性CO<sub>2</sub>作为补充碳源来产生丙酮酸。

[0111] 因此,根据本发明的经遗传修饰的微生物使得通过固定和使用外源CO<sub>2</sub>来增加碳产量,以产生丙酮酸(以及随后的感兴趣的分子)成为可能。同样地,碳产量也有所增加。

[0112] 恩特纳-杜德洛夫(Entner-Doudoroff)途径的抑制

[0113] 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。

[0114] 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。

[0115] 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)。

[0116] 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i1vD(例如,分支杆菌属种(Mycobacterium sp.)中的)。

[0117] 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)。

[0118] 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。

[0119] 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。

[0120] 作为实例,下面表9和10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。

[0121] 表9:编码EDD的序列的实例

基因	GenBank	GI	生物体
[0122]	edd	NP_416365.1	16129804 大肠杆菌
	ilvD	CND70554.1	结核分支杆菌
	edd	AJQ65426.1	肠沙门氏菌 ( <i>Salmonella enterica</i> )

[0123] 表10:编码EDA的序列的实例

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

[0125] 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。

[0126] 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。

[0127] 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gapA和edd基因的表达至少部分地受抑制。

[0128] 根据本发明,表达功能性RuBisCO和功能性PRK且其戊糖磷酸途径和恩特纳-杜德洛夫途径至少部分地受抑制的所述经遗传修饰的微生物不再能够通过糖酵解产生3PG或通过恩特纳-杜德洛夫途径产生丙酮酸。因此,来自葡萄糖的碳流优选地针对PRK/RuBisCO工程。

#### [0129] 感兴趣的分子的产生

[0130] 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。

[0131] 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。

[0132] 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。

[0133] 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。

[0134] 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、缬氨酸和 $\gamma$ -氨基丁酸。

[0135] 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。

[0136] 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。

[0137] 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、睾酮、孕酮和可的松。

[0138] 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。

[0139] 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、3-羟基丙酸、柠檬酸、草酸、琥珀酸和衣康酸。

[0140] 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。

[0141] 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。

[0142] 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。

[0143] 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。

[0144] 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)。

[0145] 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。

[0146] 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。

[0147] 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、Fe、Mn、Co、Cu、Ca、Sn;Koller等, *Microbiology Monographs*, G.-Q.Chen, 14:85-119, (2010))。

特别是促进包括聚羟基丁酸酯(PHB)在内的聚羟基烷酸酯(PHA)的合成和细胞内积累的情况。

[0148] 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以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。

[0149] 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。

[0150] 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℃和40℃之间,优选地介于28℃和35℃之间,且更特别的是,对于酿酒酵母为大约30℃。对于钩虫贪铜菌,培养温度介于25℃和35℃之间,优选为30℃。

[0151] 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。

[0152] 本发明还涉及用于产生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条件下,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。

[0153] 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。

[0154] 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。

[0155] 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。

[0156] 例如,有可能通过经遗传修饰以表达功能性PRK和功能性I型或II型RuBisCO且其中pgk(基因ID:4982539)和gsdA(基因ID:497979751)基因的表达至少部分地受抑制的真菌,特别是丝状真菌(诸如黑曲霉)来过产生柠檬酸。

[0157] 有可能通过经遗传修饰以表达功能性PRK和功能性I型或II型RuBisCO且其中pgk(基因ID:4354973)和gsdA(基因ID:4316232)基因的表达至少部分地受抑制的真菌,特别是丝状真菌(诸如土曲霉或黑曲霉)来过产生衣康酸。

[0158] 相似地,有可能通过经遗传修饰以表达功能性PRK和功能性I型或II型RuBisCO(一种法呢烯合酶)且其中PGK1基因(基因ID:5230)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。

[0159] 还有可能通过经遗传修饰以表达功能性PRK和功能性I型或II型RuBisCO且其中

gapA基因(基因ID:947679)的表达至少部分地受抑制的细菌(诸如大肠杆菌)来过产生谷氨酸。此过产生还可在其中gapA基因的至少部分抑制与zwf基因(基因ID:946370)的至少部分抑制组合的菌株中发生。

[0160] 相似地,还有可能通过经遗传修饰以表达功能性PRK和功能性I型或II型RuBisCO,以及谷氨酸脱羧酶gadB(基因ID:946058)且其中gapA基因(基因ID:947679)的表达至少部分地受抑制的细菌(诸如大肠杆菌)来过产生 $\gamma$ -氨基丁酸。此过产生还可在其中gapA基因的至少部分抑制与zwf基因(基因ID:946370)的至少部分抑制组合的菌株中发生。

[0161] 相似地,有可能通过经遗传修饰以表达功能性PRK和功能性I型或II型RuBisCO,以及允许乙醛酸氧化为草酸的酶活性(优选为乙醛酸脱氢酶FPGLOXDH1(mRNA:BAH29964.1)、乙醛酸氧化酶GLO(mRNA:AOW73106.1)或乳酸脱氢酶LDHA(基因ID:3939))且其中gapA(基因ID:947679)和zwf(基因ID:946370)基因的表达至少部分地受抑制的细菌(诸如大肠杆菌)来过产生琥珀酸和草酸。

## 实施例

[0162] 实施例1:生物信息学分析

[0163] a) 理论产率的计算

[0164] i) 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从葡萄糖的碳固定产率的比较

[0165] 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率计算。

[0166] 分析两种情况:通过PRK-RuBisCO工程化改造提供的以下改善:(i)糖酵解受抑制的菌株中的NADPH依赖性生物合成途径(例如法呢烯合成)的产率,和(ii)糖酵解和戊糖磷酸途径的氧化分支受抑制的菌株中的感兴趣的生物合成途径(例如柠檬酸合成)的产率。

[0167] 在改善NADPH依赖性生物合成途径的背景下,根据以下等式(1)计算经由戊糖磷酸途径从葡萄糖形成NADPH和甘油醛-3-磷酸(G3-P)的理论平衡:

[0168] (1)  $3\text{葡萄糖} + 5\text{ATP} + 6\text{NADP}^+ + 3\text{H}_2\text{O} \rightarrow 5\text{G3-P} + 5\text{ADP} + 6\text{NADPH} + 11\text{H}^+ + 3\text{CO}_2$

[0169] 从G3P向下至丙酮酸形成,我们得出以下平衡:

[0170] (2)  $3\text{葡萄糖} + 5\text{ADP} + 6\text{NADP}^+ + 5\text{NAD}^+ + 5\text{P}_i \rightarrow 5\text{丙酮酸} + 5\text{ATP} + 6\text{NADPH} + 5\text{NADH} + 11\text{H}^+ + 3\text{CO}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$

[0171] 如果我们将平衡标准化为1摩尔葡萄糖,我们获得以下产率:

[0172] (3)  $\text{葡萄糖} + 1.67\text{ADP} + 2\text{NADP}^+ + 1.67\text{NAD}^+ + 1.67\text{P}_i \rightarrow 1.67\text{丙酮酸} + 1.67\text{ATP} + 2\text{NADPH} + 1.67\text{NADH} + 3.67\text{H}^+ + \text{CO}_2 + 0.67\text{H}_2\text{O}$

[0173] 因此,通过使用戊糖磷酸途径,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,在通过6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶(EC 1.1.1.44)形成核酮糖-5-磷酸时,通过脱羧丢失了1摩尔的碳。相比之下,通过糖酵解途径形成丙酮酸产生以下产率:

[0174] (4)  $\text{葡萄糖} + 2\text{ADP} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{P}_i \rightarrow 2\text{丙酮酸} + 2\text{ATP} + 2\text{NADH} + 2\text{H}^+ + 2\text{H}_2\text{O}$

[0175] 因此,通过戊糖磷酸途径的丙酮酸产生的最大理论产率为 $0.82\text{g丙酮酸/g葡萄糖}$ (g的合成的丙酮酸,消耗的每g葡萄糖),而通过糖酵解途径的丙酮酸产生的最大理论产率为 $0.98\text{g丙酮酸/g葡萄糖}$ 。

[0176] 通过将PRK/RuBisCO工程化改造整合至糖酵解受抑制的菌株中(例如酿酒酵母中的 $\Delta$ PGK1),碳固定通量被重定向至戊糖磷酸途径的氧化分支,然后至PRK/RuBisCO工程化改造(参见图2)。此通量涉及在3-磷酸甘油酸(3PG)形成的水平处的糖酵解途径的终止,具有以下产率:

[0177] (5) 葡萄糖+2ATP+2NADP<sup>+</sup>+2H<sub>2</sub>O→2 3PG+2ADP+2NADPH+6H<sup>+</sup>

[0178] 从3PG向下至丙酮酸形成,我们得出以下平衡:

[0179] (6) 葡萄糖+2NADP<sup>+</sup>→2丙酮酸+2NADPH+4H<sup>+</sup>

[0180] 将根据本发明的修饰整合至微生物中使得回收否则在戊糖途径中通过脱羧而丢失的碳分子成为可能。因此,最大理论碳固定产率为0.98g丙酮酸/g葡萄糖,其使通过戊糖磷酸途径产生丙酮酸获得的产率改善20.5%,同时产生NADPH。

[0181] 在第二种情况中(参见图3),PRK/RuBisCO工程化改造被整合至糖酵解(例如酿酒酵母情况中的PGK1)和戊糖磷酸途径的氧化分支(例如酿酒酵母的情况中的ZWF1)均受抑制的菌株中。从葡萄糖形成NADPH和3-磷酸甘油酸(3PG)的理论平衡则为:

[0182] (7) 2.5葡萄糖+6ATP+3CO<sub>2</sub>+3H<sub>2</sub>O→6 3PG+6ADP+12H<sup>+</sup>

[0183] 从3PG向下至丙酮酸形成,我们得出以下平衡:

[0184] (8) 2.5葡萄糖+3CO<sub>2</sub>→6丙酮酸++3H<sub>2</sub>O+6H<sup>+</sup>

[0185] 如果我们将平衡标准化为1摩尔葡萄糖,我们获得以下产率:

[0186] (9) 葡萄糖+1.2CO<sub>2</sub>→2.4丙酮酸+1.2H<sub>2</sub>O+2.4H<sup>+</sup>

[0187] 根据本发明的修饰的整合使得每消耗1摩尔葡萄糖固定1.2个另外的碳分子成为可能。对应的最大理论产率为1.17g丙酮酸/g葡萄糖,其相较于糖酵解的碳固定产率,改善~20%。

[0188] ii) 应用于柠檬酸产生

[0189] 在第二种情况中,将计算应用于酿酒酵母酵母菌中的柠檬酸产生,即应用于野生型菌株和并入PRK/RuBisCO工程化改造且缺失PGK1基因以抑制糖酵解途径以及缺失ZWF1基因以抑制戊糖途径的氧化分支的根据本发明修饰的经修饰的菌株。

[0190] 通过以下平衡反应式总结从丙酮酸产生柠檬酸:

[0191] (11) 2丙酮酸+ATP+NAD<sup>+</sup>+2H<sub>2</sub>O→柠檬酸+ADP+NADH+P<sub>i</sub>+3H<sup>+</sup>

[0192] 此合成并不需要NADPH,但需要2摩尔的丙酮酸。任选地,根据等式(4),野生型菌株通过糖酵解从1摩尔的葡萄糖获得这些2摩尔的丙酮酸,具有以下平衡:

[0193] (12) 葡萄糖+ADP+3NAD<sup>+</sup>+P<sub>i</sub>→柠檬酸+ATP+3NADH+5H<sup>+</sup>

[0194] 对应的g<sub>柠檬酸</sub>/g<sub>葡萄糖</sub>产率为1.07。

[0195] 在糖酵解途径和戊糖磷酸途径受抑制的根据本发明的经修饰菌株的背景下,仅用0.83摩尔的葡萄糖获得所需的2个丙酮酸(参见反应式9),具有以下平衡:

[0196] (13) 0.83葡萄糖+CO<sub>2</sub>+ATP+NAD<sup>+</sup>+H<sub>2</sub>O→柠檬酸+ADP+NADH+P<sub>i</sub>+5H<sup>+</sup>

[0197] 对应的g<sub>柠檬酸</sub>/g<sub>葡萄糖</sub>产率为1.28,相较于野生型菌株的产率,最大理论产率增加约20%。

[0198] b) 通过通量平衡分析模拟生物合成产率

[0199] 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。

[0200] 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。

[0201] i) 程序

[0202] 利用OptFlux软件 (Rocha等, BMC Syst Biol. 2010 Apr 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. 2009 Mar 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。

[0203] 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。

[0204] 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。

[0205] 在第二特定的示例性实施方案中,向所述模型添加乙酰乙酰-CoA还原酶 (EC 1.1.1.36) 和聚-羟基丁酸合酶 (EC 2.3.1.B2或2.3.1.B5) 反应以模拟β-羟基丁酸酯(聚羟基丁酸酯的单体)的异源产生途径。

[0206] 在另一特定的示例性实施方案中,添加谷氨酸脱羧酶反应 (EC 4.1.1.15) 用于γ-氨基丁酸的异源产生。

[0207] 在另一特定的示例性实施方案中,添加鸟头酸脱羧酶反应 (EC 4.1.1.6) 用于衣康酸的异源产生。

[0208] 在另一特定的示例性实施方案中,添加乳酸脱氢酶反应 (EC 4.1.1.27) 用于草酸的异源产生。

[0209] 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)下模拟酿酒酵母的体内培养条件。

[0210] 在特定的示例性实施方案中,通过实质上使酶PGK1(例如谷氨酸、β-羟基丁酸、法呢烯)和ZWF1(例如柠檬酸产生)的反应失活来进行模拟,以模拟根据本发明描述的糖酵解活性和戊糖途径的降低。

[0211] 在未经修饰的“野生型菌株”模型上平行地进行模拟,以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率的影响。

[0212] ii) 结果

[0213] 由本发明提供的获得的理论产率和改善百分比描述于下表11中。

[0214] 表11:通过FBA评估的野生型菌株和根据本专利的修饰用于产生不同分子的经修饰的菌株的最大理论产率

靶分子	模 拟 条 件	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 供的理论 质量效率 gx/gGLUC 的百分比 改善
		Mol <sub>X</sub> /Mol <sub>GLUC</sub>	CMol <sub>X</sub> /CMol <sub>GLUC</sub>	gx/gGLUC	Mol <sub>X</sub> /Mol <sub>GLUC</sub>	CMol <sub>X</sub> /CMol <sub>GLUC</sub>	gx/gGLUC	
[0215]	柠檬酸	ΔPGK1, ΔZWF1,	1	1	1.07	1.2	1.2	1.28 + 20 %
	衣康酸	ΔPGK1, ΔZWF1,	1	0.83	0.72	1.2	1	0.87 + 20 %
	谷氨酸	ΔPGK1	0.92	0.77	0.75	1.09	0.91	0.89 + 18.7 %
		ΔPGK1, ΔZWF1,	1	0.83	0.82	1.2	1	0.98 + 20 %
	GABA	ΔPGK1, ΔZWF1,	1	0.67	0.57	1.2	0.8	0.69 +20 %
	β-羟基丁 酸	ΔPGK1	0.92	0.61	0.53	1.09	0.73	0.63 + 18.2 %
	法呢烯	ΔPGK1	0.21	0.54	0.24	0.24	0.59	0.27 +12.5 %
	共产生 - 琥珀酸 - 草酸	ΔPGK1, ΔZWF1,	1	0.67	0.66	1.2	0.8	0.79 +20 %
			1	0.33	0.5	1.2	0.4	0.6 +20 %

[0216] Mol<sub>X</sub>/Mol<sub>GLUC</sub>: 相对于消耗的葡萄糖的摩尔数产生的分子X的摩尔数

[0217] CMol<sub>X</sub>/CMol<sub>GLUC</sub>: 相对于消耗的葡萄糖的碳的摩尔数产生的分子X的碳的摩尔数

[0218] gX/gGLUC: 相对于消耗的葡萄糖的g产生的分子X的g

[0219] 实施例2:酿酒酵母中法呢烯产生的改善

[0220] 衍生自市售菌株CEN.PK 113-7D (GenBank: [JRV00000000](#)) 的酿酒酵母酵母菌株, CEN.PK 1605 (Mat a HIS3 leu2-3.112trp1-289 ura3-52 MAL.28c) 经工程化改造以在无 CO<sub>2</sub>损失的情况下产生NADPH, 且因此允许提高来自葡萄糖的α-法呢烯产生。

[0221] a) 糖酵解途径的失活

[0222] 为此, 通过PGK1基因的缺失使糖酵解途径失活。一旦糖酵解被抑制, 所得的酵母菌株不再能够使用葡萄糖作为碳源和能量。因此, 有必要向生物质合成途径提供甘油, 并向能量途径供应乙醇。其中PGK1缺失的菌株在YPEG (酵母提取物蛋白胨甘油乙醇) 培养基上生长。

[0223] 如下获得PGK1基因的缺失:

[0224] 用寡核苷酸CB101 (SEQ ID NO:1) 和CB102 (SEQ ID NO:2) 扩增衍生自在质粒pUG6 (P30114-Euroscarf) 上含有的KanMX盒的G418抗性基因的编码区段 (coding phase) :

[0225] SEQ ID NO:1:CB101 (正向) : 5'-ACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTTACAACAAA TATAAAACAATGGGTAAAGGAAAAGACTCACGTTTC-3'

[0226] SEQ ID NO:2:CB102 (反向) : 5'-GGGAAAGAGAAAAGAAAAATTGATCTATCGATTCAATT CAATTCAATTAGAAAACATCGAGCATCAAATGAAAC-3'

[0227] 寡核苷酸的下划线部分完全地与Kan序列同源, 且其余序列对应于邻近酿酒酵母基因组上的PGK1基因的编码区段的区域, 以生成在其末端含有PGK1基因座的同源重组序列

的PCR扩增子。

[0228] 对于根据技术人员的转化反应(Methods in Yeast Genetics, Cold Spring Harbor lab course manual, 1997; Gietz和Schiest, 1995, Methods in Molecular and Cellular Biology 5[5]:225-269), 菌株CEN.PK 1605在30℃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400μL的100mM无菌醋酸锂中重悬。

[0229] 与此同时, 如下在2mL管中制备转化混合物: 250μL的50%PEG, 10μL的5mg/mL的“载体”DNA, 36μL的1M醋酸锂, 5或10μL的经纯化的PCR反应物(缺失盒)和350μL的水。

[0230] 重悬的细胞(50μL)被添加至转化混合物, 并在水浴中在42℃孵育40分钟。

[0231] 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YPGE(酵母提取物蛋白胨甘油乙醇)培养基中重悬, 转移至14mL管并在30℃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100μL的无菌水中, 且平铺在180μg/mL YPGE+G418上。

[0232] 获得的菌落进行基因分析以验证PGK1基因的缺失, 并命名为EQ-0134 (CEN.PK1605 Δ pgk1::kan)。

[0233] b) PRK-RuBisCO-α-法呢烯合酶的引入

[0234] 为了重构糖酵解的可替换途径并允许Δ pgk1菌株利用葡萄糖来生长, 所述菌株已经修饰以允许以下基因的组合表达:

[0235] • 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来得到核酮糖-1,5二P, 和

[0236] • I型RuBisCO(具有结构基因RbcL和RbcS和伴侣蛋白RbcX、GroES和GroEL)。RuBisCO消耗核酮糖-1,5二P和1摩尔的CO<sub>2</sub>以在糖酵解途径中的PGK1缺失的下游形成3-磷酸甘油酸。

[0237] 此替代途径再次允许菌株消耗葡萄糖作为其碳和能量的主要来源。

[0238] 为了产生α-法呢烯, 该酵母缺少α-法呢烯合酶基因(AFS1; SEQ ID NO:71; GenBank登录号AY182241)。

[0239] 而且, PRK-RuBisCO工程化改造所需的7个基因(表12)被克隆到四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不同的用于营养缺陷型互补或抗生素抗性的基因, 这允许含有三个或四个质粒构建体的菌株的选择。

[0240] 这些质粒中的两个是单拷贝的, 具有Ars/CEN复制起始位点, 且第三个质粒是具有2μ起始位点的多拷贝。

[0241] 表12: 表达盒和质粒组成的描述

	GenBank	密 码 子 优 化	启 动 子	终 止 子	ori	营 养 缺 陷 型 标 记	质 粒		
[0242]	RbcL	BAD78 320.1	是	TDH3p	ADH1t	2μ	URA3	pFP P45	
	RbcS	BAD78 319.1	是	TEF1p	PGK1t	2μ	URA3	pFP P45	
	RbcX	BAD80 711.1	是	TEF1p	PGK1t	ARS - CEN 6	LEU2	pFP P56	
	GroE S	U00096	否	PGI1p	CYC1t	ARS - CEN 6	LEU2	pFP P56	
	GroE L	AP009 048	否	TDH3p	ADH1t	ARS - CEN 6	LEU2	pFP P56	
	PRK	BAD78 757.1	是	Tet-OFF	CYC1t	RS4 16- CEN 4	TRP1	pFP P20	
	α-法 呢 烯 合 酶 (AFS 1)	AY182 241	是	TEF1p	PGK1t	2μ	NatMX		pL 4
	空			Tet-OFF	CYC1t	ARS 416- CEN 4	TRP1	pC M1 85	
[0243]	空					ARS - CEN 6	LEU2	pFL 36	
				TEF1p	PGK1t	2μ	URA3	pV5 1TE F	

[0244] 来自细长聚球藻的基因,诸如rbcL、rbcS、rbcX和prk(如WO 2015107496A1中描述的)和来自苹果(*Malus domestica*)的α-法呢烯合酶基因(Tippmann等Biotechnol Bioeng. 2016 Jan; 113 (1): 72-81)已经针对酿酒酵母中的密码子的使用进行优化。

[0245] 根据先前描述的用于酵母转化的方法,菌株EQ-0134在30℃在50mL体积的复杂丰富培养基YPGE(酵母提取物蛋白胨甘油乙醇)中培养。细胞在室温以2,500rpm离心5分钟。去除上清液,细胞在25mL的无菌水中重悬,并在室温以2,500rpm再次离心5分钟。在去除上清液后,细胞在400μL的100mM的无菌醋酸锂中重悬。与此同时,制备以下转化混合物:250μL的50%PEG,10μL的5mg/mL“载体”DNA,36μL的1M醋酸锂,10μL(3μg的以下组合之一,pFPP45+pFPP56+pFPP20或pL4+pFPP56+pFPP20或pL5+pFL36+pCM185)和350μL的水。

[0246] 添加重悬的细胞(50μL)至转化混合物,并在42℃在水浴中孵育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。细胞在具有甘油和乙醇的2mL YNB(包括硫酸铵的酵母氮基础)中重悬,转移至14mL管中并在富含10%CO<sub>2</sub>的空气下在30℃孵育2小时。最终混合物平铺在包括硫酸铵+无LUW(亮氨酸、尿嘧啶、色氨酸)的CSM+诺尔丝菌素(如果适用的话)的YNB琼脂培养基上,同时以甘油和乙醇作为碳源。

[0247] 根据先前描述的方法,用以下质粒组合来转化菌株CEN.PK 1605:pL4+pFL36+pCM185+pV51TEF。

[0248] 对获得的菌落进行针对所有工程化改造的基因的基因分析,然后在液体培养基YNB硫酸铵和葡萄糖上进行适应。

[0249] • EQ-0153 (CEN.PK1605 Δ pgk1::kan) (pFPP45+pFPP56+pFPP20)

[0250] • EQ-0253 (CEN.PK1605 Δ pgk1::kan) (pL4+pFPP56+pFPP20+pFPP45)

[0251] • EQ-0353 (CEN.PK1605) (pL4+pFL36+pCM185+pV51TEF)

[0252] c) 使菌株EQ-0153和EQ-0253适应以在具有葡萄糖和CO<sub>2</sub>的液体培养基中生长

[0253] 锥形瓶中的分批模式培养在适当的培养基和10%外源性CO<sub>2</sub>供应的情况下在震荡培养箱(120rpm,30℃)中进行,以使用EON分光光度计(BioTek Instruments)测量的0.05OD<sub>600nm</sub>接种。感兴趣的菌株在具有10g/L甘油和7.5g/L乙醇的YNB+CSM-LUW培养基上在不诱导PRK表达的条件下,且在诺尔丝菌素(如果适用的话)的存在下生长。在这些条件下,有必要在PGK1基因的缺失之前和之后补给菌株。

[0254] 在获得足够量的生物质后,在至少250mL的锥形瓶中接种体积大于或等于50mL的培养物,以便使菌株适应PRK/RuBisCO工程化改造的使用。此适应在具有20g/L葡萄糖的YNB+CSM-LUW培养基上进行,在诺尔丝菌素(如果必要的话)和如上所述的外源性CO<sub>2</sub>供应的存在下进行。

[0255] 在观察到开始显著生长后,菌株适应于无CSM-LUW中包含的氨基酸和含氮碱的最小矿物质培养基,即仅为具有20g/L葡萄糖、诺尔丝菌素(如果必要的话)和如上所述的外源性CO<sub>2</sub>供应的YNB。

[0256] d) 在锥形瓶中法呢烯的产生

[0257] 使糖酵解途径中PGK1基因缺失的酿酒酵母菌株EQ-0253生长以使用PRK和RuBisCO来产生法呢烯同时过产生NADPH而无CO<sub>2</sub>损失。

[0258] 此感兴趣的菌株与参考菌株EQ-0353比较,该参考菌株在不缺失PGK1或不添加PRK和RuBisCO的情况下引入异源α-法呢烯合酶后产生法呢烯。

[0259] 菌株EQ-0253 (CEN.PK1605 Δ pgk1::kan) (pL4+pFPP56+pFPP20+pFPP45) 和EQ-0353 (CEN.PK1605) (pL4+pFL36+pCM185+pV51TEF) 在具有20g/L D-葡萄糖的YNB培养基(其中添加了100μg/L的诺尔丝菌素)中生长。在0.05OD<sub>600nm</sub>处,将含有20mL的培养基的预培养物接种

至250mL折流锥形瓶中,在Minitron培养箱中在30℃以120rpm震荡24h,大气调节为10% CO<sub>2</sub>。在0.050D<sub>600nm</sub>处,将来自第一预培养物的50mL的培养基接种至250mL锥形瓶中,并在30℃、10% CO<sub>2</sub>以120rpm震荡24h。在0.050D<sub>600nm</sub>处,将也在锥形瓶(500mL,折流的)中进行的来自第二预培养物的培养物接种至100mL的相同培养基(其中添加了50μg/mL氨苄西林、10μL消泡剂(消泡剂204,Sigma,A6426)和10% (v/v) 十二烷)中(Tippman等,Talanta (2016), 146:100-106)。培养物在30℃在10% CO<sub>2</sub>的存在下以120rpm震荡。通过测量600nm处的浊度来监测生长。

[0260] 为了提取法呢烯,收集500μL的有机相,并以5,000g离心5分钟以使两相完全分离。在4℃保存有机相直至GC-MS分析。通过单四极杆质谱法进行α-法呢烯的检测和定量。使用Zebron ZB-FFAP柱,同时氢气作为载气,固定速率为2.95mL/分钟。入口温度为260℃,以不分流模式注射1μL的样品。初始柱箱温度为70℃(4分钟),然后其逐渐增加至160℃(7℃/分钟),然后达240℃(40℃/分钟),其维持1.05分钟。对于质谱检测,转移线路和源温度分别为250℃和200℃。在t=10分钟和t=20分钟之间进行质量采集。使用法呢烯异构体混合物(Sigma,W383902)进行包括7个点的外部校准,用于定量由菌株产生的α-法呢烯。

[0261] 为了定量由菌株消耗的葡萄糖,在相同的法呢烯提取OD处收集500μL的培养基,在4℃以5,000g离心5分钟。过滤上清液(Minicart RC4,Sartorius 0.45μm)并在-20℃保存在烧瓶中。通过装配有泵、8℃冷冻自动进样器和折光率(RI)检测器(Precision Instruments IOTA 2)的UltiMate 3000HPLC-UV(Thermo Scientific)对此样品中含有的葡萄糖定量。使用Rezex ROA-有机酸H<sup>+</sup>柱(8%) 150x 7.8mm,8μm颗粒大小(Phenomenex,00H-0138-K0),以及Carbo-H预柱4x 3.0mm。柱子的温度为35℃且流速设置为0.5mL/分钟。用水性流动相以5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>进行等度洗脱,并持续30分钟。每个样品注射20μL的体积。化合物的鉴定是基于与标准品的保留时间的比较。外部校准包括10个可变葡萄糖浓度点(0-20g/L)。

[0262] 碳产率Y<sub>α-法呢烯/Glc</sub>以两种菌株EQ-0253和EQ-0353的消耗每克葡萄糖产生的法呢烯的克数计算,

$$[0263] Y_{\alpha\text{-法呢烯}/\text{Glc}} = \frac{\text{法呢烯 (mg/L水溶液)}}{\text{葡萄糖 (mg/L水溶液)}}。$$

[0264] 表13:α-法呢烯与D-葡萄糖的质量产率

	菌株	Y <sub>α-法呢烯/葡萄糖(x 10<sup>-4</sup>)(g/g)</sub>	产率改善
[0265]	EQ-0253	12.5	+ 9.6%
	EQ-0353	11.4	

[0266] 对于菌株EQ-0253,相较于对照菌株EQ-0353,观察到的α-法呢烯与D-葡萄糖的质量产率增加9.6%。

[0267] 实施例3:酿酒酵母中柠檬酸产生的提高

[0268] a) 交配型MAT a的单倍体菌株中ZWF1基因和IDH1基因的失活

[0269] • ZWF1基因的失活

[0270] 用寡核苷酸Sdzwf1和Rdzwf1(表14)扩增衍生自hphMX盒(loxP-pAgTEF1-hph-tAgTEF1-loxP)且在质粒pUG75(P30671)-Euroscarf)上含有的潮霉素B抗性基因的编码区

段。这可能生成在其末端含有葡萄糖-6-磷酸脱氢酶ZWF1基因座的同源重组序列的 $\Delta$  zwf1 PCR扩增子。

[0271] 表14:寡核苷酸

名称	序列
Sdzwf1 (SEQ ID NO : 3)	AAGAGTAAATCCAATAGAATAGAAAACCACATAAGGCA <u>AGATGGGTAAAAAGCCTGAACTCACCG</u>
Rdzwf1 (SEQ ID NO : 4)	ATTCAGTGACTTAGCCGATAAATGAATGTGCTTGCATT <del>TTTT</del> <u>TATT</u> CCTT <u>TGCCCTCGGACG</u>
[0272]	Sdpgk1 (SEQ ID NO : 5)
	ACAGATCATCAAGGAAGTAATTATCTACTTTACAACAAATATAAAACA <u>ATGGGTAAAGGAAAAGACTCACGTTTC</u>
	Rdpgk1 (SEQ ID NO : 6)
	GGGAAAGAGAAAAGAAAAAAATTGATCTATCGATTCAATTCAATTCAA <u>TTTAGAAAAACTCATCGAGCATCAAATGAAAC</u>
	Sdidh1 (SEQ ID NO : 7)
	TCTCCCTATCCTCATTCTTCTCCCTTTCCATAATTGTAAGAGAAAAAA <u>TGGGTACCACTCTTGACGACACGG</u>
Rdidh1 (SEQ ID NO : 8)	AATTTGAACACACTTAAGTTGCAGAACAAAAAAAGGGGAATTGTTTT <u>CATTAGGGGCAGGGCATGCTCATGTAGAGC</u>

[0273] 加下划线的寡核苷酸部分对应于与选择基因的序列完全同源的部分,其余序列对应于邻近酿酒酵母基因组上的待缺失的靶基因的编码区段的区域。

[0274] 用上述的 $\Delta$  zwf1 PCR片段转化先前所述的衍生自市售的菌株CEN.PK113-7D (GenBank:[JRIV00000000](#)) 的菌株CEN.PK 1605 (Mat a HIS3 leu2-3.112trp1-289 ura3-52 MAL.28c)。

[0275] 对于转化反应,菌株CEN.PK 1605在30℃在50mL体积的复杂丰富培养基YPD (酵母提取物蛋白胨右旋糖,具有20g/L葡萄糖) 中生长,直至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,且在25mL的无菌水中重悬细胞,并在室温以2,500rpm再次离心5分钟。在去除上清液后,在400 $\mu$ L的100mM无菌醋酸锂中重悬细胞。

[0276] 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。

[0277] 添加重悬的细胞(50 $\mu$ L)至转化混合物,并在水浴中在42℃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 (酵母提取物蛋白胨右旋糖) 培养基中重悬,转移至14mL管并在30℃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,且平铺在YPD+潮霉素B(200 $\mu$ g/mL)上。

[0278] 获得的菌落进行基因分析以验证ZWF1基因的缺失,并命名为EQSC-002 (CEN.PK 1605  $\Delta$  zwf1::hph)。

[0279] • IDH1基因的失活

[0280] 此基因的失活允许柠檬酸积累 (Rodriguez等, *Microb Cell Fact.* 2016 Mar 3; 15: 48)。

[0281] 用寡核苷酸Sdih1和Rdih1 (表13) 扩增诺尔丝菌素抗性基因的编码区段, 其衍生自在质粒 (pUG74 (P30670) -Euroscarf) 上含有的natMX盒 (loxP-pAgTEF1-nat-tAgTEF1-loxP)。这可能生成在其末端含有异柠檬酸脱氢酶IDH1亚基基因座的同源重组序列的 $\Delta$  idh1PCR扩增子。

[0282] 用该PCR片段转化先前描述的菌株, 即衍生自市售的菌株CEN.PK 113-7D (GenBank: JRDV00000000) 的EQSC-002 (CEN.PK 1605  $\Delta$  zwf1::hph) 和CEN.PK 1605 (Mat a HIS3 leu2-3.112trp1-289 ura3-52 MAL.28c) 用于IDH1基因失活。

[0283] 对于转化反应, 菌株EQSC-002和CEN.PK1605在50mL体积的复杂丰富培养基YPD (酵母提取物蛋白胨右旋糖, 具有20g/L葡萄糖) 中在30°C生长, 直至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, 且在25mL的无菌水中重悬细胞, 并在室温以2,500rpm再次离心5分钟。在去除上清液后, 在400 $\mu$ L的100mM无菌醋酸锂中重悬细胞。

[0284] 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。

[0285] 添加重悬的细胞 (50 $\mu$ L) 至转化混合物, 并在水浴中在42°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 (酵母提取物蛋白胨右旋糖) 中重悬, 转移至14mL管并在30°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, 且平铺在YPD+潮霉素B 200 $\mu$ g/mL、50 $\mu$ g/mL诺尔丝菌素上。

[0286] 获得的菌落进行基因分析以验证IDH1基因的缺失, 且被称为EQSC-003 (CEN.PK 1605  $\Delta$  zwf1::hph,  $\Delta$  idh1::nat) 和EQSC-005 (CEN.PK 1605  $\Delta$  idh1::nat)。

[0287] b) 交配型MAT $\alpha$ 的单倍体菌株中PGK1基因的失活

[0288] 用寡核苷酸Sdpgk1和Rdpgk1 (表13) 扩增来自在质粒pUG6 (P30114) -Euroscarf上含有的KanMX盒 (loxP-pAgTEF1-kanMX-tAgTEF1-loxP) 的G418抗性基因的编码区段, 以生成在其末端含有3-磷酸甘油酸激酶PGK1基因座的同源重组序列的 $\Delta$  pgk1PCR扩增子。

[0289] 用该PCR片段转化衍生自市售的菌株CEN.PK 113-7D (GenBank: JRDV00000000) 的菌株CEN.PK 1606 (Mat alpha HIS3 leu2-3.112trp1-289 ura3-52 MAL.28c) 用于PGK1基因失活。

[0290] 对于转化反应, 菌株CEN.PK 1606在50mL体积的复杂丰富培养基YPD (酵母提取物蛋白胨右旋糖, 具有20g/L葡萄糖) 中在30°C生长, 直至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, 且在25mL的无菌水中重悬细胞, 并在室温以2,500rpm再次离心5分钟。在去除上清液后, 在400 $\mu$ L的100mM无菌醋酸锂中重悬细胞。

[0291] 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。

[0292] 添加重悬的细胞 (50 $\mu$ L) 至转化混合物, 并在水浴中在42°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YPGE (酵母提取物蛋白胨20g/L甘油、30g/L乙醇) 中重悬, 转移至14mL管并在30°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100μL的无菌水中，且平铺在YPGE+150μg/mL G418上。

[0293] 获得的菌落进行基因分析以验证PGK1基因的缺失，并命名为EQSC-008 (CEN.PK 1605,  $\Delta$  pgk1::kan)。

[0294] c) 构建其中IDH1、ZWF1和PGK1已经通过杂交而失活的菌株

[0295] 相反交配型EQSC-003 (CEN.PK 1605  $\Delta$  zwf1::hph,  $\Delta$  idh1::nat) 和EQSC-008 (CEN.PK1606  $\Delta$  pgk1::kan) 的单倍体菌株在30°C在琼脂培养基上过夜生长：对于菌株EQSC-008，琼脂培养基为YPD (酵母提取物蛋白胨右旋糖)，且对于菌株EQSC003琼脂培养基为YPGE (酵母提取物蛋白胨甘油乙醇)。然后，通过在YPGE (酵母提取物蛋白胨甘油乙醇) 琼脂培养基+150μg/mL G418+200μg/mL潮霉素B上直接接触来使两种菌株杂交。G418和潮霉素B双选择排除两种亲本菌株，仅MAT a/MAT $\alpha$ 、ZWF1/  $\Delta$  zwf1::hph、IDH1/  $\Delta$  idh1::nat、PGK1/  $\Delta$  pgk1::kan二倍体菌株在此培养基上生长。收集来自此杂交的分离的二倍体克隆。通过在补充有150μg/mL G418或200μg/mL潮霉素B或50μg/mL诺尔丝菌素的YPGE (酵母提取物蛋白胨甘油乙醇) 琼脂培养基上的生长测试来验证3种盒  $\Delta$  zwf1::hph、 $\Delta$  idh1::nat、 $\Delta$  pgk1::kan的存在。获得的菌株命名为EQSC-009 (CEN.PK 1607、MAT a/MAT $\alpha$ 、ZWF1/  $\Delta$  zwf1::hph、IDH1/  $\Delta$  idh1::nat、PGK1/  $\Delta$  pgk1::kan)。

[0296] 先前所述的菌株EQSC-009 (CEN.PK 1607、MAT a/MAT $\alpha$ 、ZWF1/  $\Delta$  zwf1::hph、IDH1/  $\Delta$  idh1::nat、PGK1/  $\Delta$  pgk1::kan) 在30°C在YPGE (酵母提取物蛋白胨甘油乙醇) 琼脂培养基上过夜生长。然后，细胞被置于缺陷培养基 (Sporulation培养基, 1%醋酸钾+亮氨酸+尿嘧啶+色氨酸) 的液体培养中以诱导二倍体细胞的减数分裂，且因此导致含有4个单倍体孢子的四联球菌的形成。将该四联球菌平铺在YNB.GE培养基 (酵母氮基础、甘油、乙醇)+亮氨酸+尿嘧啶+色氨酸+1g/L谷氨酸+20mg/L甲硫氨酸+40mg/L半胱氨酸上，且立即 (使用显微解剖刀) 进行解剖以便在同一培养基上分离孢子。孢子在30°C萌发数天。通过在以下选择性培养基上生长来测试如此获得的单倍体细胞的基因含量：补充有150μg/mL G418或200μg/mL潮霉素B或50μg/mL诺尔丝菌素的YPGE (酵母提取物蛋白胨甘油乙醇)，且通过与交配型MAT a 或MAT $\alpha$ 的两种tectrix菌株杂交来测试它们的交配型。获得的菌落进行基因分析，以验证PGK1、IDH1、ZWF1基因的缺失，且在核糖核酸的逆转录后通过实时PCR来验证对应于这些基因的转录物的缺少。获得的菌株之一命名为EQSC-004 (CEN.PK 1606MAT $\alpha$   $\Delta$  zwf1::hph、 $\Delta$  idh1::nat、 $\Delta$  pgk1::kan)。

[0297] d) PRK-RuBisCO酶的引入

[0298] PRK-RuBisCO工程化改造所需的6个基因 (以下表15) 被克隆在3个能够自主复制的具有兼容的复制起始位点的质粒载体上，且每个质粒载体携带不同营养缺陷互补基因，这允许含有这3个质粒构建体的菌株 (参见W02015107496) 的选择。这些质粒中的两个是有Ars/CEN复制起始位点的单拷贝，且第三个质粒是具有2μ起始位点的多拷贝。

[0299] 表15:表达盒和质粒组成的描述

	GenBank	密 码 子 优 化	启动子	终止子	ori	营养缺陷 型标记	质粒
[0300]	RbcL	BAD78320. 1	是	TDH3p	ADH1t	2μ	URA3 pFPP45
	RbcS	BAD78319. 1	是	TEF1p	PGK1t	2μ	URA3 pFPP45
	RbcX	BAD80711. 1	是	TEF1p	PGK1t	ARS- CEN6	LEU2 pFPP56
	GroE S	U00096	否	PGI1p	CYC1t	ARS- CEN6	LEU2 pFPP56
	GroE L	AP009048	否	TDH3p	ADH1t	ARS- CEN6	LEU2 pFPP56
	PRK	BAD78757. 1	是	Tet-OFF	CYC1t	ARS416- CEN4	TRP1 pFPP20
	空			Tet-OFF		ARS416- CEN4	TRP1 pCM18 5
	空			TEF1p	PGK1t	2μ	URA3 pV51TE F
	空					ARS-CEN6	LEU2 pFL36

[0301] 根据先前描述的转化方法,菌株EQSC-004 (CEN.PK 1606 Δ zwf1::hph, Δ idh1::nat, Δ pgk1::kan) 在30℃在50mL体积的复杂丰富培养基YPGE (酵母提取物蛋白胨甘油乙醇) 中生长,直至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,细胞在25mL的无菌水中重悬,并在室温以2,500rpm再次离心5分钟。在去除上清液后,细胞在400μL的100mM的无菌醋酸锂中重悬。

[0302] 与此同时,如下在2mL管中制备转化混合物:250μL的50%PEG,10μL的5mg/mL“载体”DNA,36μL的1M醋酸锂,10μL(3μg)的pFPP45+pFPP56+pFPP20的组合,和350μL水。

[0303] 重悬的细胞(50μL)被添加至转化混合物,并在水浴中在42℃孵育40分钟。孵育后,在室温以5,000rpm离心1分钟,并弃掉上清液。细胞在2mL YPGE (酵母提取物蛋白胨甘油乙醇)+2mg/L强力霉素中重悬,转移至14mL管中并在30℃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,细胞在1mL的无菌水中重悬,并再次离心1分钟,重悬在100μL的无菌水中,并平铺在YNB.GE (酵母氮基础、甘油、乙醇)+1g/L谷氨酸+20mg/L甲硫氨酸+40mg/L半胱氨酸+2mg/L强力霉素上。获得菌株命名为:EQSC-006 (CEN.PK 1606 Δ zwf1::hph, Δ idh1::nat, Δ pgk1::kan) (pFPP45+pFPP56+pFPP20)。

[0304] 根据先前描述的转化方法,菌株EQSC-005 (CEN.PK 1605 Δ idh1::nat) 在30℃在50mL体积的复杂丰富培养基YPGE (酵母提取物蛋白胨甘油乙醇) 中生长,直至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,细胞在25mL的无菌水中重悬,并在室温以2,500rpm再次离心5分钟。在去除上清液后,细胞在400μL的100mM的无菌醋酸锂中重悬。

[0305] 与此同时,如下在2mL管中制备转化混合物:250μL的50%PEG,10μL的5mg/mL“载

体”DNA, 36 $\mu$ L的1M醋酸锂, 10 $\mu$ L (3 $\mu$ g) 的pV51TEF+pFL36+pCM185的组合, 和350 $\mu$ L水。

[0306] 添加加重悬的细胞 (50 $\mu$ L) 至转化混合物, 并在水浴中在42℃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 YPD (酵母提取物蛋白胨右旋糖) 中重悬, 转移至14mL管中并在30℃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, 细胞在1mL的无菌水中重悬, 并再次离心1分钟, 重悬在100 $\mu$ L的无菌水中, 并平铺在YNBD (酵母氮基础右旋糖) +2mg/L强力霉素上。获得的菌株命名为: EQSC-007 (CEN.PK 1605  $\Delta$  idh1::nat) (pV51TEF+pFL36+pCM185)。

[0307] d) 菌株EQSC-006和EQSC-007的适应和进化期

[0308] 使菌株EQSC-006和EQSC-007适应以在具有葡萄糖和CO<sub>2</sub>的YNB (酵母单基础) 液体培养基上生长。

[0309] 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℃) 中进行, 在使用EON分光光度计 (BioTek Instruments) 测量的0.050D<sub>600nm</sub>处接种。感兴趣的菌株在具有10g/L甘油和7.5g/L乙醇+50mg/L谷氨酸的YNB+CSM-LUW培养基上在不诱导PRK表达的条件下生长。

[0310] 在获得足够量的生物质后, 在至少250mL的锥形瓶中接种体积大于或等于50mL的培养物, 以使菌株适应PRK/RuBisCO工程化改造的使用。此适应在具有20g/L葡萄糖、50mg/L谷氨酸和如上所述的外源性CO<sub>2</sub>供应的YNB+CSM-LUW培养基上进行。

[0311] 在观察到开始显著生长后, 菌株适应于不含除了以下所示的氨基酸外的所有氨基酸和不含CSM-LUW中包含的含氮碱的最小矿物质培养基, 即仅为具有终浓度为20g/L葡萄糖、1g/L谷氨酸、40mg/L L-半胱氨酸和20mg/L L-甲硫氨酸和如上所述的外源性CO<sub>2</sub>供应的YNB。

[0312] e) 在锥形瓶中柠檬酸的产生

[0313] 糖酵解途径中PGK1基因、戊糖磷酸途径的氧化部分和克雷布斯循环 (Krebs cycle) 缺失的酿酒酵母菌株EQSC-006经生长以使用PRK和RuBisCO来产生柠檬酸而无CO<sub>2</sub>损失。此感兴趣的菌株与参考菌株EQSC-007比较, 该参考菌株在不缺失PGK1或ZWF1或不添加PRK和RuBisCO的情况下使IDH1基因失活后产生柠檬酸。

[0314] 菌株EQSC-006 (CEN.PK 1605  $\Delta$  zwf1::hph,  $\Delta$  idh1::nat,  $\Delta$  pgk1::kan, pFPP45+pFPP56+pFPP20) 和EQSC-007 (CEN.PK 1605  $\Delta$  idh1::nat, pV51TEF+pFL36+pCM185) 在补充有20g/L D-葡萄糖的酵母氮基础 (YNB) 培养基 (YNB D20) 中培养。

[0315] 为了确定柠檬酸盐与葡萄糖的质量产率, 在0.050D<sub>600nm</sub>处, 将含有20mL的培养基的预培养物接种至250mL折流锥形瓶中, 在30℃以120rpm震荡。在0.050D<sub>600nm</sub>处, 将50mL的来自第一预培养的培养基接种至250mL锥形瓶中, 并在30℃以120rpm震荡。在0.050D<sub>600nm</sub>处, 将来自第二预培养物的锥形瓶 (500mL, 折流的) 中进行的培养物接种至100mL的相同培养基, 在30℃以120rpm震荡。通过测量600nm处的浊度来监测生长。

[0316] 为了柠檬酸定量, 收集500 $\mu$ L的培养基, 在4℃以5,000g离心5分钟。过滤上清液 (Minicart RC4, Sartorius 0.45 $\mu$ m), 并在偶联单四极杆质谱法的HPLC分析 (Thermo Scientific UltiMate 3000HPLC) 前在-20℃保存于烧瓶中。每个样品 (20 $\mu$ L) 注射到Aminex HPX-87H H<sup>+</sup>柱, 300mm x 7.8mm (Bio-Rad, 125-0140)。用0.037% 甲酸 (v/v) 的水溶液以0.5mL/min的流速进行等度洗脱, 所述0.037% 甲酸 (v/v) 水溶液的pH由氢氧化铵调节至

4.5.柱温箱温度为65°C。质谱分析条件为:负电喷雾模式,源温度450°C,针电压3kV,锥电压50V。使用市售的柠檬酸钠溶液进行七点外部校准。

[0317] 为了定量由菌株消耗的葡萄糖,在与柠檬酸定量相同的培养物OD<sub>600</sub> nm处,收集500μL的培养基,在4°C以5,000g离心5分钟。过滤上清液(Minicart RC4,Sartorius 0.45μm)并在-20°C保存在烧瓶中。通过装配有泵、8°C冷冻自动进样器和折光率(RI)检测器(Precision Instruments IOTA 2)的HPLC-RI UltiMate 3000(Thermo Scientific)对此样品中含有的葡萄糖定量。使用Rezex ROA-有机酸H<sup>+</sup>柱(8%)150x 7.8mm,8μm颗粒大小(Phenomenex,00H-0138-K0),以及Carbo-H4 x 3.0mm预柱。柱温箱温度为35°C且流速设置为0.5mL/分钟。用水性流动相以5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>进行30分钟等度洗脱。每个样品注射20μL的体积。化合物的鉴定是基于与标准品的保留时间的比较。外部校准包括10个可变葡萄糖浓度点(0-20g/L)。

[0318] 质量产率Y<sub>α-柠檬酸/Glc</sub>以两种菌株EQSC-006和EQSC-007的消耗每克葡萄糖产生的柠檬酸的克数计算,  $Y_{\alpha\text{-柠檬酸}/\text{Glc}} = \frac{\text{柠檬酸}(\text{mg/L水溶液})}{\text{葡萄糖}(\text{mg/L水溶液})}$ 。

[0319] 表16:柠檬酸与D葡萄糖的质量产率

菌株	$Y_{\text{柠檬酸}/\text{葡萄糖}}(x 10^{-3})(\text{g/g})$	产率提高
EQSC-006	2.1	+19.5%
EQSC-007	1.8	

[0320] [0321] 对于菌株EQSC-006,相较于对照菌株EQSC-007,观察到柠檬酸与D-葡萄糖的质量产率增加19.5%。

[0322] 实施例4:大肠杆菌中谷氨酸产生的提高

[0323] α-酮戊二酸脱氢酶基因的缺失增加谷氨酸产生(Usuda等J Biotechnol.2010May 3;147(1):17-30.doi:10.1016/j.biote.2010.02.018)。

[0324] 在这些实例中,使用具有sucA基因缺失的大肠杆菌菌株K12 MG1655。此菌株衍生自大肠杆菌的基因缺失库(Baba等Mol Syst Biol.2006;2:2006.0008),且由Coli Genetic Stock Center提供,名称为JW0715-2,并命名为8786.(JW0715-2:MG1655 Δ sucA::Kan)。

[0325] 4A] 通过糖酵解的失活来提高谷氨酸产生

[0326] a) 通过F1p重组酶的FTR区的特异性重组来去除选择盒

[0327] 为了能够重复使用与上述用于构建菌株JW0715-2相同的缺失策略(Rodriguez等,2016),使用重组酶来使选择盒缺失。

[0328] 质粒p707-F1pe(由Gene Bridges的Quick&Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒提供)根据该试剂盒方法通过电穿孔来转化。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琼脂上选择细胞。通过验证其不再能够在补充有0.0015%卡那霉素的相同培养基上生长来进行获得的菌落的反选择。

[0329] 获得的菌株被称为EQ.EC002:MG1655 Δ sucA。

[0330] b) 编码恩特纳-杜德洛夫代谢途径的edd-eda操纵子的缺失

[0331] 通过同源重组和Quick&Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒(Gene Bridges)的使用根据供应商的方法来进行edd-eda操纵子的缺失。

[0332] 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(即在染色体上的位置1932065-1932115和1934604-1934654处)的邻近区同源的5'序列,因此在完整操纵子的每一侧上生成细菌基因组上的盒的重组臂。

[0333] 2. 根据试剂盒方法用质粒pRedET通过电穿孔来转化大肠杆菌K-12菌株EQ.EC002。在具有0.2%葡萄糖、0.0003%四环素的丰富复杂培养基LB琼脂上选择获得的菌落。

[0334] 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0.3%阿拉伯糖在液体LB中诱导1小时。为此,进行通过缺失盒的表达RedET的细胞的第二次电穿孔,并在补充有0.2%葡萄糖、0.0003%四环素并添加0.3%L-阿拉伯糖和0.0015%卡那霉素的LB琼脂上选择菌落。

[0335] 4. 质粒p707-F1pe(由Gene Bridges的Quick&Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒提供)根据该试剂盒方法通过电穿孔来转化。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琼脂上选择细胞。通过验证其不再能够在补充有0.0015%卡那霉素的相同培养基上生长来进行获得的菌落的反选择。

[0336] 5. 获得的菌株被称为EQ.EC003:MG1655 Δ sucA Δ edd-eda。

[0337] c) gapA基因的缺失

[0338] 通过同源重组和Quick&Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒(Gene Bridges)的使用根据供应商的方法来进行gapA基因的缺失。

[0339] 1. 寡核苷酸经设计以扩增RT-PKG-gb2-neo-FRT抗性基因表达盒,且具有超过50个核苷酸的与缺失座(即基因(gapA)(GenBank:X02662.1)的编码区段)的邻近区同源的5'序列,因此生成细菌基因组上的盒的重组臂。

[0340] 2. 根据试剂盒方法用质粒pRedET通过电穿孔来转化大肠杆菌K-12菌株EQ.EC003。在具有0.2%葡萄糖、0.0003%四环素的丰富复杂培养基LB琼脂上选择获得的菌落。

[0341] 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0.3%阿拉伯糖在液体LB中诱导1小时。为此,进行通过缺失盒的表达RedET的细胞的第二次电穿孔,并在补充有0.2%甘油、0.3%丙酮酸、0.0003%四环素并添加0.3%L-阿拉伯糖和0.0015%卡那霉素的LB琼脂上选择菌落。

[0342] 通过基因分析和测序验证缺失,获得的菌株名称为

[0343] • EQ.EC002:MG1655 Δ sucA

[0344] • EQ.EC003:MG1655 Δ sucA Δ edd-eda

[0345] • EQ.EC004:MG1655 Δ sucA Δ edd-eda Δ gapA::kan

[0346] d) 插入CO<sub>2</sub>固定所需的工程化改造

[0347] 为了在大肠杆菌中重组表达I型RuBisCO的不同组分,将下表17中所述的基因克隆为含有下表18中所述的基因的合成操纵子。

[0348] 表17:编码PRK和I型RuBisCO系统的基因

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				

[0350] 表18:表达盒的组成

质粒	载体pZA11中合成操纵子的结构								
	基 因 A	RBS1	基因B	RBS2	基因C	RBS3	基因D	RBS4	基因E
pZA11									
pEQEC005	<i>rbcS</i>	D	<i>rbcL</i>	B	<i>rbcX</i>	F			
pEQEC006	<i>rbcS</i>	D	<i>rbcL</i>	B	<i>rbcX</i>	F	<i>prk</i>		
pEQEC008	<i>prk</i>								

[0352] 为了控制这些基因的表达水平,在每个基因的编码区段之间插入具有可变翻译效率(Levin-Karp等,ACS Synth Biol.2013Jun 21;2 (6) :327-36.doi:10.1021/sb400002n;Zelcbuch等,Nucleic Acids Res.2013May;41 (9) :e98)的下表19中所示的核糖体结合序列(RBS)。通过依次插入至含有PLtetO-1启动子、p15A复制起点和氨苄西林抗性基因的pZA11载体(Expressys)中来构建通过RBS序列散置的每个编码区段的连续性。

[0353] 表19:RBS顺反子间区序列

名称	RBS序列
A (SEQ ID NO:9)	AGGAGGTTTGGAA
B (SEQ ID NO:10)	AACAAAATGAGGAGGTACTGAG
C (SEQ ID NO:11)	AAGTTAAGAGGCAAGA
D (SEQ ID NO:12)	TTCGCAGGGGGAAAG
E (SEQ ID NO:13)	TAAGCAGGACCGGCGCG
F (SEQ ID NO:14)	CACCATAACACTG

[0355] 通过电穿孔根据上述计划所示的不同载体产生几种菌株

[0356] EQ. EC 005→(EQ. EC 003+pZA11):MG1655 Δ sucA Δ edd-eda

[0357] EQ. EC 006→(EQ. EC 004+pEQEC005):MG1655 Δ sucA Δ edd-eda Δ gapA::kan (RuBisCO)

[0358] EQ. EC 007→(EQ. EC 004+pEQEC006):MG1655 Δ sucA Δ edd-eda Δ gapA::kan (RuBisCO+PRK)

[0359] EQ. EC 009→(EQ. EC 004+pEQEC008):MG1655 Δ sucA Δ edd-eda Δ gapA::kan (PRK)

[0360] 在补充有2g/L甘油和5g/L丙酮酸且具有100mg/L氨苄西林的LB培养基上选择克隆。在获得足够量的生物质后,在最小250mL的锥形瓶中接种体积大于或等于50mL的培养物,以使菌株适应PRK/RuBisCO工程化改造的使用。此适应在37℃在具有2g/L葡萄糖和外源性CO<sub>2</sub>供应的LB培养基上进行,如上所述。

[0361] e) 谷氨酸产生

[0362] 对于谷氨酸产生,将来自500mL的LB培养物的细胞接种至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氨苄西林)中,压力为0.1大气压CO<sub>2</sub>。

[0363] 用生物分析仪 (Sakura Seiki) 测量剩余谷氨酸和葡萄糖。碳产率  $Y_{p/s}$  以消耗每克葡萄糖产生的谷氨酸的克数计算。

[0364] 对于菌株 EQ.EC 007 (RuBisCO+PRK) ,相较于对照菌株 EQ.EC 005 (空)、EQ.EC 006 (仅RuBisCO) ,此产率显著增加10%。对照菌株 EQ.EC 009 (仅PRK) 不能存活。

[0365] 4B] 通过使糖酵解和戊糖磷酸氧化途径失活来提高产生

[0366] a) 通过F1p重组酶的FTR区的特异性重组来去除选择盒

[0367] 此步骤以与上述实施例4A]相同的方式进行。

[0368] 获得的菌株被称为 EQ.EC002:MG1655  $\Delta$  sucA。

[0369] b) zwf 基因的缺失

[0370] 通过同源重组和Quick&Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET® 重组试剂盒 (Gene Bridges) 的使用根据供应商的方法来进行 zwf 基因 (GeneID:946370) 的缺失,如实施例4A]详述的。

[0371] 获得的菌株被称为 EQ.EC010:MG1655  $\Delta$  sucA  $\Delta$  zwf。

[0372] c) gapA 基因的缺失

[0373] 通过同源重组和Quick&Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET® 重组试剂盒 (Gene Bridges) 的使用根据供应商的方法来进行大肠杆菌 K-12 菌株 EQ.EC010 中的 gapA 基因 (GeneID:946370) 的缺失,如实施例4A]详述的。

[0374] 通过基因分析和测序验证缺失,获得的菌株名称为:

[0375] • EQ.EC002:MG1655  $\Delta$  sucA

[0376] • EQ.EC010:MG1655  $\Delta$  sucA  $\Delta$  zwf

[0377] • EQ.EC011:MG1655  $\Delta$  sucA  $\Delta$  zwf  $\Delta$  gapA

[0378] d) 插入CO<sub>2</sub>固定所需的工程化改造

[0379] 为了在大肠杆菌中重组表达功能性PRK/RuBisCO系统不同组分,将表20中所述的编码I型RuBisCO、磷酸核酮糖激酶、伴侣蛋白和碳酸酐酶的基因克隆为含有以上所述的基因的合成操纵子(表21)。

[0380] 表20:编码I型RuBisCO、磷酸核酮糖激酶、伴侣蛋白和碳酸酐酶的基因

[0381]	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
	icfA	WP_011378036.1	细长聚球藻

[0382] 表21:质粒名称和表达盒组成

[0383]	质粒	载体 pZA11 中合成操纵子的结构								
		基因A	RBS1	基因B	RBS2	基因C	RBS3	基因D	RBS4	基因E
	pZA11									
	pEQEC006	rbcS	D	rbcL	B	rbcX	F	prk		
	pEQEC007	rbcS	D	rbcL	B	rbcX	F	prk	A	icfA

[0384] 为了控制这些基因的表达水平,在每个基因的编码区段之间插入具有可变翻译效率 (Levin-Karp等,ACS Synth Biol.2013Jun 21;2 (6) :327-36.doi:10.1021/sb400002n; Zelcbuch等,Nucleic Acids Res.2013May;41 (9) :e98) 的表17(参见实施例4A) 中所示的核糖体结合序列(RBS)。通过依次插入至含有PLtetO-1启动子、p15A复制起点和氨苄西林抗性基因的pZA11载体(Expressys) 中来构建通过RBS序列散置的每个编码区段的连续性。碳酸酐酶(icfA)的添加还允许碳酸氢根离子互变转换为可用的CO<sub>2</sub>分子并提高RuBisCO的效率。

[0385] 通过电穿孔根据以下计划所示的不同载体产生几种菌株

[0386] EQ. EC 012→(EQ. EC 002+pZA11) :MG1655 Δ sucA

[0387] EQ. EC 014→(EQ. EC 011+pEQEC006) :MG1655 Δ sucA Δ zwf Δ gapA (RuBisCO+PRK)

[0388] EQ. EC 015→(EQ. EC 011+pEQEC007) :MG1655 Δ sucA Δ zwf Δ gapA (RuBisCO+PRK+碳酸酐酶)

[0389] 在转化后,在补充有100mg/L氨苄西林的LB甘油、丙酮酸培养基上选择克隆。如实施例4A]所述的,进行具有PRK和RuBisCO工程化改造的菌株的适应和进化期。

[0390] e) 谷氨酸产生

[0391] 对于谷氨酸产生,将来自500mL的LB培养物的细胞接种至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氨苄西林)中,压力为0.1大气压CO<sub>2</sub>。

[0392] 用生物分析仪(YSI Inc.)测量剩余的谷氨酸和葡萄糖。碳产率Y<sub>p/s</sub>以消耗每克葡萄糖产生的谷氨酸的克数计算。

[0393] 对于菌株EQ. EC 014 (RuBisCO+PRK) 和EQ. EC 015 (RuBisCO+PRK+碳酸酐酶),相较于对照菌株EQ. EC 012(空),此产率显著增加15%。

[0394] 4C] 通过使糖酵解和氧化戊糖磷酸途径失活,和过表达丙酮酸脱羧酶和谷氨酸脱氢酶来提高产生

[0395] a) 通过使用F1p重组酶的FTR区的特异性重组来去除选择盒

[0396] 此步骤以与上述实施例4A]相同的方式进行。

[0397] 获得的菌株被称为EQ. EC002:MG1655 Δ sucA。

[0398] b) zwf基因的缺失

[0399] 通过同源重组和Quick&Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒(Gene Bridges)的使用根据供应商的方法来进行zwf基因(基因ID:946370)的缺失,如实施例4A]详述的。获得的菌株被称为EQ. EC010:MG1655 Δ sucA Δ zwf。

[0400] c) gapA基因的缺失

[0401] 通过同源重组和Quick&Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒(Gene Bridges)的使用根据供应商的方法来进行大肠杆菌K-12菌株EQ. EC010中的gapA基因(基因ID:946370)的缺失,如实施例4A]详述的。通过基因分析和测序验证缺失,获得的菌株名称为:

[0402] • EQ. EC002:MG1655 Δ sucA

[0403] • EQ. EC010:MG1655 Δ sucA Δ zwf

[0404] • EQ. EC011:MG1655 Δ sucA Δ zwf Δ gapA

[0405] d) 插入CO<sub>2</sub>固定所需的工程化改造

[0406] 为了在大肠杆菌中重组表达功能性PRK/RuBisCO系统不同组分,将下表22中所述的编码II型RuBisCO、磷酸核酮糖激酶和碳酸酐酶的基因克隆为含有上述基因的合成操纵子(表23)。

[0407] 表22:编码II型RuBisCO、磷酸核酮糖激酶、碳酸酐酶、谷氨酸脱氢酶和丙酮酸脱羧酶的基因

[0408]	基因	GenBank	生物体
	cbbM	YP_427487.1	深红红螺菌
	Prk	BAD78757.1	细长聚球藻
	CA	YP_427143.1	深红红螺菌
	gdhA	NP_416275.1	大肠杆菌K-12
	pycA	NP_389369.1	枯草芽孢杆菌

[0409] 表23:质粒名称和表达盒组成

质粒	载体pZA11中合成操纵子的结构								
	基因A	RBS 1	基因 B	RBS2	基因 C	RBS3	基因 D	RBS 4	基因 E
pZA11									
pEQEC009	cbbM	B	gdhA	C	pycA	E	prk		
pEQEC010	cbbM	B	gdhA	C	pycA	E	prk	D	CA
pEQEC011		B	gdhA	C	pycA				

[0411] 为了控制这些基因的表达水平,在每个基因的编码区段之间插入具有可变翻译效率的表17(参见实施例4A])中所示的核糖体结合序列(RBS)。通过依次插入至含有PLtetO-1启动子、p15A复制起点和氨苄西林抗性基因的pZA11载体(Expressys)中来构建通过RBS序列散置的每个编码区段的连续性。谷氨酸脱氢酶(gdhA)和丙酮酸羧化酶(pycA)的添加允许更好地产生谷氨酸。添加碳酸酐酶(CA)还允许碳酸氢根离子互变转化为可用的CO<sub>2</sub>分子并提高RuBisCO的效率。

[0412] 通过电穿孔根据以下计划所示的不同载体产生几种菌株:

[0413] EQ. EC 016→(EQ. EC 002+pEQEC011): MG1655 Δ sucA(谷氨酸脱氢酶+丙酮酸脱羧酶)

[0414] EQ. EC 017→(EQ. EC 011+pEQEC009): MG1655 Δ sucA Δ zwf Δ gapA(RuBisCO+PRK+谷氨酸脱氢酶+丙酮酸脱羧酶)

[0415] EQ. EC 018→(EQ. EC 011+pEQEC010): MG1655 Δ sucA Δ zwf Δ gapA(RuBisCO+PRK+碳酸酐酶+谷氨酸脱氢酶+丙酮酸脱羧酶+碳酸酐酶)

[0416] 在转化后,在补充有100mg/L氨苄西林的LB甘油、丙酮酸培养基上选择克隆。如实例4A]所述的,进行具有PRK和RuBisCO工程化改造的菌株的适应和进化期。

[0417] e) 谷氨酸产生

[0418] 对于谷氨酸产生,将来自500mL的LB培养物的细胞接种至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氨苄西林)中,压力为0.1大气压CO<sub>2</sub>。

[0419] 用生物分析仪(YSI Inc.)测量剩余的谷氨酸和葡萄糖。碳产率Y<sub>p/s</sub>以消耗每克葡

葡萄糖产生的谷氨酸的克数计算。

[0420] 对于菌株EQ.EC 017和EQ.EC 018,相较于对照菌株EQ.EC 016,此产率显著增加15%。

[0421] 实施例5:钩虫贪铜菌中聚羟基丁酸酯产生的提高

[0422] 通过根据本发明提出的遗传修饰获得的还原能力的增加也可以具有超过现有的代谢途径的相当大的收益。

[0423] 天然产生聚羟基丁酸酯(PHB)的细菌菌株钩虫贪铜菌ATCC 17699即是如此。此细菌能够在自养和异养条件下生长。gapA基因(甘油醛-3-磷酸脱氢酶NC\_008313.1)的缺失将代谢通量转移至戊糖磷酸途径并增加NADPH还原的核苷酸的库,从而增加PHB产量。

[0424] 此钩虫贪铜菌H16菌株具有大质粒pHG1和两条染色体。通过产生含有用于革兰氏阴性菌的枯草芽孢杆菌自杀基因sacB的载体来进行gapA基因的缺失(Quandt等, Gene. 1993 May 15; 127 (1) : 15-21; Lindenkamp等, Appl Environ Microbiol. 2010 Aug; 76 (16) : 5373-82 and Appl Environ Microbiol. 2012 Aug; 78 (15) : 5375-83)。

[0425] a) 恩特纳-杜德洛夫代谢途径的失活

[0426] 根据Srinivasan等(Appl Environ Microbiol. 2002 Dec; 68 (12) : 5925-32)描述的方法,通过限制性将对应于edd和eda基因的邻近区域(edd和eda下游)的两个PCR扩增子克隆到质粒pJQ200mp18Cm中。

[0427] 然后,通过氯化钙转化方法将修饰的质粒pJQ200mp18Cm::Δ edd-eda转化到大肠杆菌菌株S17-1中。将遗传物质转移到钩虫贪铜菌中是通过在琼脂上沉积少量钩虫贪铜菌培养物的在含有细胞单层S17-1细菌的培养皿上的接合来进行的。在30℃在10%蔗糖的存在下(以供选择)的营养肉汤(NT)培养基上进行选择(Hogrefe等,J Bacteriol. 1984 Apr; 158 (1) : 43-8),并在含有50μg/mL氯霉素的矿质培养基上进行验证。

[0428] 通过基因分析和测序验证缺失。因此,所得的菌株EQCN\_002具有恩特纳-杜德洛夫代谢途径edd-eda的基因的缺失。EQCN\_002:H16 Δ edd-eda。

[0429] b) 糖酵解途径的失活

[0430] 根据Lindenkamp等2012描述的方法,通过限制性将对应于gapA基因的邻近区域的两个PCR扩增子克隆到质粒pJQ200mp18Tc中。

[0431] 然后通过氯化钙转化方法将修饰的质粒pJQ200mp18Tc转化到大肠杆菌菌株S17-1中。将遗传物质转移到钩虫贪铜菌中是通过在琼脂上沉积少量钩虫贪铜菌培养物的在含有细胞单层S17-1细菌的平板上的接合来进行的。在30℃在为了选择目的的10%蔗糖的存在下的营养肉汤(NT)培养基上进行选择(Hogrefe等,J Bacteriol. 1984 Apr; 158 (1) : 43-8),并在含有25μg/mL四环素的矿质培养基上进行验证。

[0432] 通过基因分析和测序验证缺失。因此,所得的菌株EQCN\_003具有gapA的基因的缺失。EQCN\_003:H16 Δ edd-eda Δ gapA。

[0433] 糖酵解途径中gapA基因缺失和恩特纳-杜德洛夫途径中edd-eda基因缺失的菌株EQCN\_003经生长以经由PRK和RuBisCO酶的使用通过固定外源性CO<sub>2</sub>来提高PHB产生。

[0434] b) 生物反应器中PHB的产生

[0435] 将来自冷冻储存物的接种物以50至100μL的等级平铺在来自冷冻管的固体培养基上,在30℃在果糖的存在下孵育48至96小时。编码RuBisCO和PRK的基因的表达在异养有氧

条件下保持在钩虫贪铜菌 (Rie Shimizu等, Sci Rep. 2015; 5: 11617. 2015年7约1日在线公开) 中。

[0436] 锥形瓶中的分批培养 (50mL中有10mL, 然后250mL中有50mL) 在适当的培养基, 在20g/L果糖和10%外源性CO<sub>2</sub>供应下在震荡培养箱 (100–200rpm, 30°C) 中进行, 最小接种量为0.01。

[0437] 提高PHB产率的感兴趣的菌株EQCN\_003与在营养限制的存在下在异养条件下天然积累PHB的参考菌株H16进行比较。

[0438] 比较菌株生物反应器中的生产率。在上述条件下, 在生物反应器中进行的培养物从固体和/或液体扩增链中接种在锥形瓶中。将My-control型 (Applikon Biotechnology, Delft, Netherlands) 750mL或Biostat B型 (Sartorius Stedim, Göttingen, Germany) 2.5L的生物反应器以等同于0.010D<sub>620nm</sub>的密度接种。

[0439] PHB的积累与增长脱钩。培养温度控制在30°C, 通气量在0.1VVM(气体体积/液体体积/分钟) 和1VVM之间, 以便维持最低溶解氧浓度超过20% (30°C, 1bar), 根据所用生物反应器的规模使摇动适应。进口气流由任选补充有CO<sub>2</sub>的空气组成。二氧化碳补充量在1%至10%之间。用14%或7%氨溶液将pH调节至7。补料分批培养方法允许供应非限制性碳底物, 结合磷或氮的限制, 同时维持恒定的碳/磷或碳/氮比。根据Brandl等 (Appl Environ Microbiol. 2013 Jul; 79 (14): 4433–9) 的方法进行PHB提取和定量。该方法包括向10mg冻干细胞添加1mL的氯仿, 然后添加850μL甲醇和150μL硫酸。混合物在100°C加热2.5小时, 冷却并添加500μL水。通过离心分离两相, 并通过加入硫酸钠干燥有机相。如Müller等 (Appl Environ Microbiol. 2013 Jul; 79 (14): 4433–9) 所述的, 过滤和分析样品。

[0440] 野生型钩虫贪铜菌H16培养物和菌株EQCN\_003:H16 Δ edd–eda Δ gapA的比较显示碳产率增加5%, 这对应于消耗每克果糖的PHB克数的比率。

[0441] 实施例6: 大肠杆菌中GABA产生的提高

[0442] 还可以修饰根据实施例4B]进行的遗传修饰以增加其谷氨酸产生的大肠杆菌K-12菌株, 以允许组成型表达谷氨酸脱羧酶gadB(基因ID:946058), 从而增加γ-氨基丁酸产率。

[0443] α-酮戊二酸脱氢酶基因的缺失也增加了谷氨酸的产生 (Usuda等 J Biotechnol. 2010 May 3; 147 (1): 17–30. doi:10.1016/j.jbiotec.2010.02.018)。

[0444] 在此实施例中, 使用从实施例4B]中获得的以下菌株:

[0445] • EQ.EC002:MG1655 Δ sucA

[0446] • EQ.EC010:MG1655 Δ sucA Δ zwf

[0447] • EQ.EC011:MG1655 Δ sucA Δ zwf Δ gapA

[0448] a) gadB基因的组成型过表达

[0449] 将gadB基因的过表达亚克隆到细菌表达载体pZE21MCS (EXPRESSYS) 中。此载体具有ColE1复制起始位点和卡那霉素抗生素抗性基因。

[0450] 快速地, 用与涵盖位置1570595至1570645和1572095至1572045的大肠杆菌K-12基因组同源的引物从菌株MG1655 Δ sucA的基因组中扩增gadB基因(基因ID:946058)的编码区段。这些引物中的每一个与通过扩增除多克隆位点之外的载体pZE21MCS获得的片段末端的18个核苷酸同源的流动序列 (floating sequence) 偶联。根据In-Fusion®HD克隆试剂盒用户手册-Clontech的方法将两个扩增子组合以形成质粒pEQEC030, 从而允许gadB基因的组

成型过表达。

[0451] b) 插入CO<sub>2</sub>固定所需的工程化改造

[0452] 为了在大肠杆菌中重组表达功能性I型RuBisCO的不同组分,将表17(实施例4A)中所述的基因克隆为根据表22中所述的构建结构的合成操纵子。

[0453] 不同载体的组装

[0454] 扩增表24中所述的基因的编码序列(CDS),并根据NEBuilder®HiFi DNA Assembly Master Mix试剂盒(E2321)提供的方法组装成模块,以获得表24中所述的三个整合模块。然后根据In-Fusion®HD克隆试剂盒用户手册-Clontech的方法扩增每个模块以形成下表24中所述的质粒。

[0455] 表24:表达盒的组成

质粒	载体pZA11中合成性操纵子的结构						
	模块I			模块II		模块III	
	CDS A	RBS1	CDS B	RBS2	CDS C	RBS3	CDS D
pZA11							
pEQEC006	rbcS	D	rbcL	B	rbcX	F	prk

[0457] 为了控制这些基因的表达水平,在每个基因的编码区段之间插入具有可变翻译效率(Levin-Karp等,ACS Synth Biol.2013Jun 21;2(6):327-36.doi:10.1021/sb400002n;Zelcbuch等,Nucleic Acids Res.2013May;41(9):e98)的表17(参见实施例4A)中所示的核糖体结合序列(RBS)。通过依次插入至含有PLtetO-1启动子、p15A复制起点和氨苄西林抗性基因的pZA11载体(Expressys)中来构建通过RBS序列散置的每个编码区段的连续性。谷氨酸脱羧酶(gdhA)的添加还允许谷氨酸转化为γ-氨基丁酸(GABA)。

[0458] 通过电穿孔根据以下计划所示的不同载体产生几种菌株:

[0459] EQ. EC 013→(EQ. EC 002+pZA11+pEQ030):MG1655 Δ sucA+ (gadB)

[0460] EQ. EC 020→(EQ. EC 011+pEQ030+pEQEC006):MG1655 Δ sucA Δ zwf Δ gapA+ (gadB)+ (RuBisCO+PRK)

[0461] 在转化后,在补充有100mg/L氨苄西林和30mg/L卡那霉素的LB甘油、丙酮酸培养基上选择克隆。如实施例4A]所述的进行具有PRK和RuBisCO工程化改造的菌株的适应和进化期。

[0462] c) GABA产生

[0463] 对于GABA的产生,将来自500mL LB培养物的细胞接种至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氨苄西林和30mg/mL卡那霉素)中,压力为0.1大气压CO<sub>2</sub>,在30°CpH 3.5。

[0464] 使用OptimaPak C18柱(4.6x 150mm,RS Tech Corporation,大田市,韩国),通过高效液相色谱(HPLC)测量GABA浓度。样品以12,000rpm离心5分钟,将100μL上清液转移到新的Eppendorf管中。以下试剂被添加到这些管中:200μL1M碳酸氢钠缓冲液(pH 9.8),100μL 80g/L丹磺酰氯的乙腈溶液和600μL双蒸水。混合物在80°C孵育40分钟。通过添加100μL 2%乙酸来终止反应。将混合物以12,000rpm离心5分钟。然后将上清液通过0.2μm Millipore过

滤器过滤，并使用UV检测器在Agilent系统上通过HPLC分析。使用二元非线性梯度，使用洗脱液A[四氢呋喃/甲醇/乙酸钠50mM, pH 6.2 (5:75:420, 体积比)]和洗脱液B(甲醇)分离衍生的样品。用生物分析仪(YSI Inc.)测量残余葡萄糖。

[0465] 碳产率 $Y_{p/s}$ 以消耗每克葡萄糖产生的GABA的克数计算。

[0466] 对于菌株EQ.EC 020  $\Delta$  sucA  $\Delta$  zwf  $\Delta$  gapA (RuBisCO+PRK) + (GadB) ,相较于对照菌株EQ.EC 013  $\Delta$  sucA (GadB) ,此产率显著增加15%。

[0467] 实施例7:大肠杆菌中琥珀酸和草酸产生的提高

[0468] 经遗传修饰以允许组成型表达来自耐碱拟层孔菌(*Fomitopsis palustris*)的乙醛酸脱氢酶FPGLOXDH1(基因ID:946058) ,减少icd基因(Gene ID:945702)的表达,且使aceB(基因ID 948512)和sdhA(基因ID:945402)基因失活的大肠杆菌K-12菌株会增加琥珀酸和草酸产率。

[0469] 异柠檬酸脱氢酶(icd)表达的减少允许代谢通量被重定向至乙醛酸转轨(glyoxylic shunt)。苹果酸合酶(aceB)和琥珀酸脱氢酶(sdhA)的失活分别防止产生的乙醛酸和琥珀酸被重新消耗。琥珀酸脱氢酶基因的缺失增加了有氧条件下的琥珀酸产量(Yang等, *Microbiol res.* 2014 May-Jun; 169 (5-6) : 432-40)。苹果酸合酶基因的缺失允许乙醛酸的积累,所述乙醛酸将通过乙醛酸脱氢酶的组成型表达被转化为草酸。

[0470] 在此实施例中,使用其中已经使sdhA基因缺失的大肠杆菌K-12菌株MG1655。此菌株衍生自大肠杆菌K12的基因缺失库(Baba等 *Mol Syst Biol.* 2006; 2: 2006.0008) ,且由Coli Genetic Stock Center提供,名称为JW0715-2,并命名为8302. (JW0713-1:MG1655  $\Delta$  sdhA::Kan)。

[0471] a) 通过F1p重组酶的FTR区的特异性重组来去除选择盒

[0472] 为了能够重复使用与以上用于构建菌株JW0715-2相同的缺失策略(Rodriguez等, 2016) ,使用重组酶来使选择盒缺失。

[0473] 根据该试剂盒方法通过电穿孔来转化质粒p707-F1pe(由Gene Bridges的Quick& Easy *E.coli* Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒提供)。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琼脂上选择细胞。通过验证其不再能够在补充有0.0015%卡那霉素的相同培养基上生长来进行获得的克隆的反选择。

[0474] 获得的菌株被称为EQ.EC040:MG1655  $\Delta$  sdhA。

[0475] b) aceB基因的缺失

[0476] 通过同源重组和Quick&Easy *E.coli* Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒(Gene Bridges)的使用根据供应商的方法来进行aceB基因(基因ID:948512)的缺失。

[0477] 寡核苷酸经设计以扩增RT-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(即在染色体上的位置4215428-4215478. 和4217129.-4217079处)的邻近区同源的5'序列,因此在aceB基因编码序列的每一侧上生成细菌基因组上的盒的重组臂。

[0478] 根据试剂盒方法用通过电穿孔向大肠杆菌K-12菌株EQ.EC040转化质粒pRedET。在具有0.2%葡萄糖、0.0003%四环素的丰富复杂培养基LB琼脂上选择获得的菌落。

[0479] 在RedET重组酶的存在下在第一步中获得的扩增子的转化,由0.3%阿拉伯糖在液体LB中诱导1小时。为此,通过在表达RedET的细胞中的电穿孔进行缺失盒的第二次电穿孔,

并在补充有0.2%葡萄糖、0.0003%四环素并添加0.3%L-阿拉伯糖和0.0015%卡那霉素的LB琼脂上选择菌落。

[0480] 根据该试剂盒方法通过电穿孔来转化质粒p707-F1pe (由Gene Bridges的Quick&Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒提供)。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琼脂上选择细胞。通过验证其不再能够在补充有0.0015%卡那霉素的相同培养基上生长来进行获得的菌落的反选择。

[0481] 获得的菌株被称为EQ. EC041:MG1655 Δ *sdhA* Δ *aceB*。

[0482] c) *icd*基因启动子的改变

[0483] i. 策略

[0484] 由较弱的启动子取代*icd*基因 (基因ID:945702) 的天然启动子是通过同源重组和使用Quick&Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒 (Gene Bridges) 根据供应商的方法进行的。

[0485] ii. 较弱启动子P<sub>oxb1</sub>的引入

[0486] *icd*基因启动子由偶联有启动子P<sub>oxb1</sub> (表征为弱启动子) 的盒和抗生素抗性基因盒取代,以允许选择具有抗生素抗性基因的P<sub>oxb1</sub>盒的插入。

[0487] 经设计以扩增RT-PKG-gb2-neo-FRT抗性基因表达盒,且具有超过50个核苷酸的与正义寡核苷酸的P<sub>icd</sub>启动子基因座 (基因组靶LA) (即在基因组上的位置1194911-1194961处) 和反向寡核苷酸的间隔区R序列 (表23) 的左侧邻近区同源的5'序列的寡核苷酸,允许可装配有P<sub>oxb1</sub>片段的片段的扩增。

[0488] 经设计以从质粒PSF-0XB1 (Sigma#0GS553) 扩增P<sub>oxb1</sub>启动子,且具有超过50个核苷酸的与P<sub>icd</sub>启动子基因座 (基因组靶LA) (即在基因组上的位置1195173-1195123处) (反向寡核苷酸) 和间隔区R序列 (表25) (该寡核苷酸) 的右侧邻近区同源的5'序列的寡核苷酸,产生P<sub>oxb1</sub>片段的扩增。

[0489] 使用NEBuilder®HiFi DNA Assembly Master Mix试剂盒 (E2321) 扩增融合片段,允许将取代启动子与抗生素选择盒结合。

[0490] 表25:用于扩增0XB1基因启动子的引物序列

	名称	与载体PSF-0XB1同源的序列
[0491]	POXB1-S(SEQ ID NO: 15)	TCGTTGCGTTACACACAC
[0492]	POXB1-R(SEQ ID NO: 16)	TGTGTCGAGTGGATGGTAG
	间隔区S(SEQ ID NO: 17)	GCATGAATTG
	间隔区R(SEQ ID NO: 18)	CGAATTCATGC

[0493] 根据试剂盒方法用质粒pRedET通过电穿孔来转化大肠杆菌K-12菌株EQ. EC041。在具有0.2%葡萄糖、0.0003%四环素的丰富复杂培养基LB琼脂上选择获得的菌落。

[0494] 在RedET重组酶的存在下在第一步中获得的扩增子的转化,由0.3%阿拉伯糖在液体LB中诱导1小时。为此,通过电穿孔在表达RedET的细胞中进行缺失盒的第二次转化,并在补充有0.2%葡萄糖、0.0003%四环素并添加0.3%L-阿拉伯糖和0.0015%卡那霉素的LB琼

脂上选择菌落。

[0495] 根据试剂盒方法通过电穿孔来转化质粒p707-F1pe (由Gene Bridges的Quick& Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒提供)。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琼脂上选择细胞。通过验证其不再能够在补充有0.0015%卡那霉素的相同培养基上生长来进行获得的菌落的反选择。

[0496] 获得的菌株被称为EQ.EC042:MG1655 Δ sdhA Δ aceB P<sub>icd</sub>::P<sub>oxb1</sub>。

[0497] d) zwf基因的缺失

[0498] 通过同源重组和Quick&Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒 (Gene Bridges) 的使用根据供应商的方法来进行 zwf 基因 (GeneID:946370) 的缺失。

[0499] 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同源的5'序列,即在染色体上的位置1934789-1934839和1936364-1936314处,因此在完整操纵子的每一侧上生成细菌基因组上的盒的重组臂。

[0500] 根据试剂盒方法用质粒pRedET通过电穿孔来转化大肠杆菌K-12菌株EQ.EC042。在具有0.2%葡萄糖、0.0003%四环素的丰富复杂培养基LB琼脂上选择获得的菌落。

[0501] 在RedET重组酶的存在下在第一步中获得的扩增子的转化,由0.3%阿拉伯糖在液体LB中诱导1小时。为此,在表达RedET的细胞中通过电穿孔进行缺失盒的第二次转化,并在补充有0.2%葡萄糖、0.0003%四环素并添加0.3%L-阿拉伯糖和0.0015%卡那霉素的LB琼脂上选择菌落。

[0502] 根据该试剂盒方法通过电穿孔来转化质粒p707-F1pe (由Gene Bridges的Quick& Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒提供)。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琼脂上选择细胞。通过验证其不再能够在补充有0.0015%卡那霉素的相同培养基上生长来进行获得的克隆的反选择。

[0503] 获得的菌株被称为EQ.EC043:MG1655 Δ sdhA Δ aceB P<sub>icd</sub>::P<sub>oxb1</sub> Δ zwf。

[0504] e) gapA基因的缺失

[0505] 通过同源重组和Quick&Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒 (Gene Bridges) 的使用根据供应商的方法来进行gapA基因的缺失。

[0506] 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即基因 (gapA) (GenBank:X02662.1) 的编码区段的邻近区同源的5'序列,因此生成细菌基因组上的盒的重组臂。

[0507] 根据试剂盒方法用质粒pRedET通过电穿孔来转化大肠杆菌K-12菌株EQ.EC043。在具有0.2%葡萄糖、0.0003%四环素的丰富复杂培养基LB琼脂上选择获得的菌落。

[0508] 在RedET重组酶的存在下在第一步中获得的扩增子的转化,由0.3%阿拉伯糖在液体LB中诱导1小时。为此,进行通过缺失盒的表达RedET的细胞的第二次电穿孔,并在补充有0.2%甘油和0.3%丙酮酸、0.0003%四环素并添加0.3%L-阿拉伯糖和0.0015%卡那霉素的LB琼脂上选择菌落。

[0509] 根据该试剂盒方法通过电穿孔来转化质粒p707-F1pe (由Gene Bridges的Quick& Easy E.coli Gene Deletion Red®/ET®重组试剂盒提供)。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琼脂上选择细胞。通过验证其不再能够在

补充有0.0015%卡那霉素的相同培养基上生长来进行获得的克隆的反选择。

[0510] 获得的菌株被称为EQ. EC044: MG1655  $\Delta$  *sdhA*  $\Delta$  *aceB*  $P_{icd}::P_{oxb1}$   $\Delta$  *zwf*  $\Delta$  *gapA*。

[0511] f) FPGLOXDH1和aceA基因的组成型过表达

[0512] 将FPGLOXDH1 (基因ID:946058) 和aceA (基因ID:948517) 基因的编码序列 (CDS) 亚克隆到细菌表达载体pZE21MCS (EXPRESSYS) 中作为根据表24中所述的合成性操纵子。该载体具有Co1E1复制起点和卡那霉素抗生素抗性基因。

[0513] 这些引物中的每一个与通过扩增除多克隆位点之外的载体pZE21MCS获得的片段的末端的18个核苷酸同源的流动序列 (floating sequence) 偶联。根据In-Fusion®HD克隆试剂盒用户手册-Clontech的方法将两个扩增子组合以形成质粒pEQEC035, 从而允许FPGLOXDH1和aceA基因的组成型过表达。

[0514] g) 插入CO<sub>2</sub>固定所需的工程化改造

[0515] 为了在大肠杆菌中重组表达功能性I型RuBisCO的不同组分, 将表17 (实施例4A]) 中所述的基因克隆为合成性操纵子的形式。

[0516] 扩增表2中所述的基因的编码序列 (CDS) , 并根据NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix试剂盒 (E2321) 提供的方法组装成模块, 以获得表26中所述的三个整合模块。然后根据In-Fusion®HD克隆试剂盒用户手册-Clontech的方法扩增每个模块以形成表24中以下所述的质粒。

[0517] 表26: 表达盒的组成

[0518]	质粒	载体类型	合成操纵子的结构						
			模块I			模块II		模块III	
			<i>CDS A</i>	<i>RBS1</i>	<i>CDS B</i>	<i>RBS2</i>	<i>CDS C</i>	<i>RBS3</i>	<i>CDS D</i>
	pZA11	pZA11							
	pEQEC006	pZA11	<i>rbcS</i>	D	<i>rbcL</i>	B	<i>rbcX</i>	F	<i>prk</i>
	pZE21MCS	pZE21MCS							
	pEQEC035	pZE21MCS	FPGLOXDH1	D	aceA				

[0519] 为了控制这些基因的表达水平, 在每个基因的编码区段之间插入具有可变翻译效率 (Levin-Karp等, ACS Synth Biol. 2013 Jun 21; 2 (6) :327-36. doi:10.1021/sb400002n; Zelcbuch等, Nucleic Acids Res. 2013 May; 41 (9) :e98) 的表19 (实施例4B]) 中所示的核糖体结合序列 (RBS)。通过连续插入至含有PLtetO-1启动子、p15A复制起点和氨苄西林抗性基因的pZA11载体 (Expressys) 中来构建通过RBS序列散置的每个编码区段的连续性。

[0520] 通过电穿孔根据以下计划所示的不同载体产生几种菌株:

[0521] EQ. EC045→ (EQ. EC042+pZA11+pZE21MCS) : MG1655  $\Delta$  *sdhA*  $\Delta$  *aceB*  $P_{icd}::P_{oxb1}$

[0522] EQ. EC046→ (EQ. EC045+pEQEC006+pEQEC035) : MG1655  $\Delta$  *sdhA*  $\Delta$  *aceB*  $P_{icd}::P_{oxb1}$   $\Delta$  *zwf*  $\Delta$  *gapA* (FPGLOXDH1+aceA) + (RuBisCO+PRK)

[0523] 在转化后, 在补充有100mg/L氨苄西林和30mg/L的卡那霉素的LB甘油、丙酮酸培养基上选择克隆。如实施例4A]所述的, 进行具有PRK和RuBisCO工程化改造的菌株的适应和进化期。

[0524] h) 琥珀酸和草酸的产生

[0525] 对于琥珀酸和草酸的产生,将来自500mL LB培养物的细胞接种至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氨苄西林和30mg/L的卡那霉素)中,压力为0.1大气压CO<sub>2</sub>,在30℃pH 3.5。

[0526] 通过高效液相色谱法(HPLC)测量琥珀酸浓度,培养物样品以12,000g离心5分钟。

[0527] i. 琥珀酸测定

[0528] 培养上清液通过0.2μm Millipore过滤器过滤,并在配置有阳离子交换柱(Aminex HPX87-H,Bio-Rad,Hercules,CA,USA)、UV吸光度检测器(Agilent Technologies,G1315D)和折光率(RI)检测器(Agilent Technologies,HP1047A)的Agilent HPLC系统(系列1100)上分析。样品在流速为0.4mL/min的5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>流动相中分离。柱温箱温度为65℃。

[0529] 用生物分析仪(Ysi Inc.)或通过具有Aminex HPX87-H柱的HPLC-折光测定法来测量剩余葡萄糖。

[0530] 碳产率Y<sub>p/s</sub>以消耗每克葡萄糖产生的琥珀酸的克数计算。

[0531] 对于工程化改造的菌株EQ.EC 046,相较于对照菌株EQ.EC 045(空),此产率显著显著增加6%。

[0532] ii) 草酸测定

[0533] 用含有2mM EDTA的10mM磷酸钾缓冲液(pH 7.5)洗涤沉淀两次,并储存在-20℃。将样品(1mL)转移到用0.75g玻璃珠(425-600μm)预冷却的管中,并引入至Fast Prep匀浆器(Thermo Scientific,Erembodegem,Netherlands)中,并以速度控制6进行4次20秒的破裂。将裂解物在4℃以36,000g离心20分钟。根据Lowry方法(Lowry等,1951)进行总蛋白质测定。如(Lenz等,1976)所述,使用对255nm处的草酰乙酸(OAA)的直接光学测定的改变来测量草酰乙酸乙酰水解酶(EC 3.7.1.1.1)活性。使用石英比色皿,在Hitachi Model 100-60分光光度计(Hitachi,Tokyo,Japan)中在25℃在255nm处检查OAA烯醇互变异构体的消失。1mL反应混合物含有100mM咪唑-HCl(pH 7.5)、0.9mM MnCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O、1mM OAA、20μL细胞提取物(用不同体积的细胞提取物对照确认酶活性与细胞提取物量之间的线性关系)。

[0534] 碳产率Y<sub>p/s</sub>以消耗每克葡萄糖产生的草酸的克数计算。

[0535] 对于菌株EQ.EC 046,相较于对照菌株EQ.EC 045(空),此产率显著增加3%。

[0536] 实施例8:黑曲霉中柠檬酸产生的提高

[0537] a) 策略

[0538] 导致糖酵解途径无功能性的pgkA基因(基因座标签An08g02260)的失活,以及抑制磷酸戊糖途径的氧化部分的gsdA基因(基因座标签An02g12140)的失活被用于整合用于PRK和RuBisCO酶的功能性表达的六个基因,即RbcS、RbcL、RbcX、GroES、GroEL和PRK用于CO<sub>2</sub>固定。

[0539] b) DNA构建

[0540] i) 靶向待失活的基因的指导RNA序列

[0541] 在这两个基因的每一个中,确定了由NGG基序(加下划线的CRISPR靶序列)识别(punctuate)的20个核苷酸的序列(表27)。在这两种情况中,此序列不仅对靶基因特异,而且在黑曲霉基因组中是独特的。这些序列用于表达指导RNA(gRNA),其通过与黑曲霉基因组

的同源区域形成异源双链体,指导CAS9内切核酸酶的作用以特异性地在所选基因座上诱导双链断裂。

[0542] 表27:gRNA靶序列

基 因 座	基 因	参考基因组	基因座标签	CRISPR序列
[0543]	1	pgkA CBS513-88	An08g02260)	CAACAAGGCCACTGGTGGCC <u>AGG</u> (SEQ ID NO: 19)
	2	gsdA CBS 513-88	An02g12140)	CATTTCCGGTCAATATGACA <u>AGG</u> (SEQ ID NO: 20)

[0544] Sarkari等 (Bioresour Technol. 2017 Dec; 245 (Pt B) : 1327-1333) 中所述的质粒 pFC332 (Addgene#87845) 含有gRNA表达盒、允许Cas9内切核酸酶功能性表达的盒和允许此质粒的选择的Hph盒。质粒还含有片段AMA1\_2.8,其允许质粒的瞬时增殖。最后,还存在大肠杆菌的复制起点。

[0545] 为了靶向另一个基因,FS A和FS B之间的gRNA盒可容易地交换。通过扩增此质粒的不同部分来修饰此质粒,以消除抗生素选择盒并修饰20个核苷酸,这允许gRNA的特异性有利于表27中描述的序列,以形成靶向pgkA的质粒pEQ0610和靶向gsdA的pEQ0611。

[0546] 供体质粒

[0547] 与基因组同源的区域

[0548] 供体质粒由在质粒pUC19 (GenBank : M77789.2) 与与选择用于整合的基因座同源的每个约1500bp的基因组靶向序列 (LA和RA) 之间的In-Fusion®HD克隆试剂盒用户手册-Clontech组装组成。LA和RA序列分别与由指导RNA靶向的基因座序列的5'和3'相邻。基因组DNA/指导RNA异二聚体由Cas9内切核酸酶识别以双链切割(基因座1:pgkA;基因座2:gsdA) (表28)。用pgkA基因和gsdA基因的引物 (表29) 扩增RA和LA片段。扩增子序列在序列表中给出 (SEQ ID NO:55至SEQ ID NO:58)。根据In-Fusion®HD克隆试剂盒用户手册-Clontech的方法,在三个片段的所有正向引物上添加18个核苷酸延伸,以允许质粒 (pEQ0600或pEQ0601) 的功能性组装和引入II型限制性内切核酸酶 (限制酶I-CeuI和I-Sce) I的两个限制性位点,所述II型限制性内切核酸酶具有大的不对称识别位点 (12至40个碱基对)。这些是18个碱基对的识别序列,非常罕见。切割在搜索位点处不对称的事实允许释放缺少细菌载体pUC19的序列的片段。这两种酶允许通过在大肠杆菌中克隆的扩增后通过限制性提取整合模块。

[0549] 表28:扩增pgkA基因的同源区

[0550]

扩增子	别名	引物位置	引物序列
5'pgkA_ 黑曲霉	LA1	正向	GGATCGCAGATACGGTCGC (SEQ ID NO: 21)
		反向	CCTCGGTGAAGACAAACGCTG (SEQ ID NO: 22)
3'pgkA_ 黑曲霉	RA1	正向	CTCCTTGAGAACCTGCGTTCC (SEQ ID NO: 23)
		反向	CTGAAGTACGTTTCCCAAGCC (SEQ ID NO: 24)

[0551] 表29:扩增gsdA基因的同源区

[0552]

扩增子	别名	引物位置	引物序列
5'gsdA_ 黑曲霉	LA2	正向	CGTTATCACAAAGAACGCCAGGTCC (SEQ ID NO: 25)
		反向	GCTGCTCTCGATTCCTTGGT (SEQ ID NO: 26)
3'gsdA_ 黑曲霉	RA2	正向	TCATCAACCTCAACAAGCACCTC (SEQ ID NO: 27)
		反向	GTGAAGACAGCGGCGGTCC (SEQ ID NO: 28)

[0553] 工程化改造表达盒

[0554] 基于GenBank数据鉴定启动子和终止子。选择的启动子从+1转录点确定并直至1.4kb上游以涵盖“核心”序列(TATA盒)和反式激活序列,这允许相关启动子的最佳功能。

[0555] 对于终止子,截止点是在基因的终止密码子后500bp处确定的。

[0556] 四个表达盒的每个整合模块的结构定义如下:第一水平由简单元件(即启动子)、编码序列(CDS)和终止子组成。其序列在序列表中提供的启动子(表30)和终止子(表31)元件(SEQ ID NO:59至62)元件根据表32用工程CDS扩增和组装。其序列(SEQ ID NO:63-66)在序列表中提供的CDS根据NEBuilder®HiFi DNA Assembly Master Mix试剂盒(E2321)提供的方法扩增,以获得表中汇编的功能性表达盒。组织四个基因的每个整合模块以包括四个不同的对(启动子/终止子),以便限制反式(trans)干扰。组织六个基因的每个整合模块以包括六个不同的对(启动子/终止子)以限制转录干扰。

[0557] 用于插入至基因组的靶基因座的供体片段

[0558] 根据In-Fusion®HD克隆试剂盒用户手册-Clontech的方法,扩增并在抗生素选择盒(表)周围组装不同的多表达盒(RbcS、RbcL和RbcX)或(GroES、GroEL和PRK),以形成供体质粒(pEQ0602或pEQ0603)。

[0559] 表30:在基因组学组合学中使用的黑曲霉启动子的天然位置,以将CO<sub>2</sub>固定工程化改造的六个基因插入黑曲霉基因组中。

启动子	生物体	基因ID	反向引物	正向引物
[0560]	PmbfA	黑曲霉	An02g12	TTTGAAGATGGATGAG
		CBS	390	AAGTCGG
			513-88	(SEQ ID NO: 33)
	PcoxA	黑曲霉	An07g07	TGTCCTGGTGGGTGGG
		CBS	390	TTG (SEQ ID NO: 34)
			513-88	
[0560]	PsrpB	黑曲霉	An16g08	CTCGAACGAGAATGGG
		CBS	910	AACC (SEQ ID NO: 35)
			513-88	
[0560]	PtdvA	黑曲霉	An04g01	GGCGGAATGAGATGCG
		CBS	530	ACAG (SEQ ID NO: 36)
			513-88	

[0561] 表31:用于在基因组学组合学中的黑曲霉终止子的天然位置,以将CO<sub>2</sub>固定工程化改造的六个基因插入黑曲霉基因组中。

终止子	生物体	基 因 ID	正向引物	反向引物
[0562]	TtrpC	构巢曲霉	AN064	TGATTTAACAGACTCATA
		8	ATGTCAACAAAG	GGAGAGTTG
		FGSC	(SEQ ID NO: 37)	(SEQ ID NO: 41)
		A4		
	TniaD	构巢曲霉	AN100	ACGGGTTCGCATAG
		6	GTGG	TCTGAGG
[0562]		FGSC	(SEQ ID NO: 38)	(SEQ ID NO: 42)
		A4		
	TglaA	黑曲霉	An03g	CGACCGCGACGGTG
[0562]		CBS	06550	ACTGAC
			513-88	(SEQ ID NO: 39)
	TgpdA	黑曲霉	An16g	GAATCAGGACGGCA
[0563]		CBS	01830	AACTGAAT
			513-88	(SEQ ID NO: 40)

[0563] 表32:表达盒的组装

表达盒	基因	GenBank	密码子优化	启动子	终止子
[0564]	CAS 1	RbcL	BAD78320.1	是	PmbfA <sub>p</sub> trpct
	CAS 2	RbcS	BAD78319.1	是	PcoxA <sub>p</sub> TniaD
	CAS 3	RbcX	BAD80711.1	是	PsrpB <sub>p</sub> glaAt
	CAS 4	Hph	pUG75(P30671)	否	picdA <sub>p</sub> TgpdA
	CAS 5	GroES	U00096	否	PmbfA <sub>p</sub> trpct
	CAS 6	GroEL	AP009048	否	PcoxA <sub>p</sub> TniaD
	CAS 7	PRK	BAD78757.1	是	PsrpB <sub>p</sub> glaAt
	CAS 8	Ble	pUG66(P30116)	否	picdA <sub>p</sub> TgpdA

[0565] 表33: 质粒组装

质粒	基因组序列	启动子	基因	终止子	基因组序列	ori	选择标记
pEQ06 00	LA1				RA1	coli	氨苄西林
pEQ06 01	LA2				RA2	coli	氨苄西林
pEQ06 02	LA2	PmbfA <sub>p</sub>	RbcL	trpct	RA2	coli	氨苄西林 和潮霉素B
		PcoxA <sub>p</sub>	RbcS	TniaD		coli	
		PsrpB <sub>p</sub>	RbcX	glaAt		coli	
		picdA <sub>p</sub>	Hph	TgpdA		coli	
pEQ06 03	LA1	PmbfA <sub>p</sub>	GroE S	Trpct	RA1	coli	氨苄西林 和博来霉素
		PcoxAp	GroE L	TniaD		coli	
		PsrpBp	PRK	glaAt		coli	
		picdAp	Blue	TgpdA		coli	

[0567] c) 黑曲霉的转化

[0568] 在黑曲霉中转化DNA受到真菌细胞壁的存在的限制,并且与酵母或大肠杆菌相比是极其无效的。然而,通过用细胞壁降解酶(例如来自哈茨木霉(*Trichoderma harzianum*)的Lysing Enzyme®、来自灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)的几丁质酶和来自罗马蜗牛(*Helix pomatia*)的β-葡萄糖醛酸酶的混合物)(de Bekker等, *J Microbiol Methods*. 2009 Mar; 76 (3): 305-6)处理从真菌菌丝或萌发的分生孢子制备的原生质体的转化,允许生成转化体。

[0569] 黑曲霉菌株CBS 513-88在30℃在具有250mL的转化培养基的1L锥形瓶中生长(Kusters-van Someren等,Curr Genet.1991 Sep;20(4):293-99)。在以250rpm生长16h后,菌丝体通过在Miracloth(Calbiochem)上过滤来收集,并用去离子水洗涤。在KMC(0.7M KC1、50mM CaCl<sub>2</sub>、20mM Mes/NaOH、pH 5.8)中的5g/L的来自哈茨木霉的裂解酶(Sigma Saint Louis, MO, USA)、0.075Uml-1来自灰色链霉菌的几丁质酶(Sigma)和460Uml-1来自罗马蜗牛的葡萄糖醛酸酶(Sigma)的存在下在37℃以120rpm 2小时来制备原生质体化。用显微镜每30分钟来监测原生质体(protoplasting)。原生质体通过Miracloth过滤器过滤,并通过以2000x g在4℃离心10分钟来收集。原生质体用冰冷STC(1.2M山梨醇、10mM Tris/HCl、50mM CaCl<sub>2</sub>,pH 7.5)洗涤,然后在100pi的STC中重悬,并直接用于转化。

[0570] 为了将代谢途径整合到黑曲霉基因组中,需要质粒和线性片段的共转化。质粒pEQ0610与供体片段共转化,以将部分工程化改造整合到基因组中,同时使pgkA基因失活。类似地,质粒pEQ0611与供体片段共转化以将工程化改造的其他部分整合到基因组中,同时使gsdA基因失活。这些序列既用作同源重组的基质(matrices)又用作选择标记:在与抗生素抗性基因Hph或Ble的功能性表达整合期间。在添加了潮霉素B或博来霉素(其允许直接选择整合事件)的基础培养基平板上直接选择菌株。由于存在复制起点AMA1\_2.8,质粒pCAS\_pyrG2容易丢失,这仅导致Cas9蛋白的瞬时表达,从而降低了非靶向的不良作用的风险。

[0571] 线性盒(10μg)和质粒(5μg)与100μL的含有至少10<sup>7</sup>个原生质体的STC溶液和330μL的新鲜制备的聚乙二醇(PEG)溶液(25%PEG 6000,50mM CaCl<sub>2</sub>,10mM Tris/HCl,pH 7.5)混合,并在冰上保持20分钟。在与另外的2mL PEG溶液混合并在室温孵育10分钟后,原生质体混合物用4mL的STC稀释。

[0572] 在添加有150μg/mL潮霉素B的MM平板或添加有50μg/mL博来霉素的MM平板上进行转化子的选择。通过从选择培养基中分离单菌落至少两次来纯化所有转化体。通过用合适的对照引物对靶基因座进行测序来验证片段的插入。

[0573] 使用Wizard®基因组DNA纯化试剂盒(Promega, Wisconsin, USA),用修改的方法来分离来自真菌细胞的基因组DNA。将菌丝体在CM(30℃,150rpm)中在290pi的50mMEDTA溶液和10pi的裂解酶(10mg/mL)中培养过夜以除去细胞壁。在37℃孵育90分钟后,将悬浮液离心并弃去上清液。菌丝体沉淀重悬于300μL细胞核裂解溶液和100μL蛋白质沉淀溶液中。样品在冰上孵育5分钟并离心。DNA用异丙醇沉淀,并用70%乙醇洗涤。用含有RNA酶(100μg/mL)的DNA再水合溶液将DNA沉淀再水化。通过PCR验证表达盒的成功转化和整合。

[0574] 表34:用于产率研究的菌株

菌株	基因组	遗传修饰
<i>EQ1500</i>	黑曲霉 CBS 513-88	
[0575] <i>EQ1501</i>	黑曲霉 CBS 513-88	<i>gsdA</i> :: PmbfA <sub>p</sub> -RbcL-trpc; PcoxA <sub>p</sub> -RbcS-TniaD; picdA <sub>p</sub> -Hph-TgpdA; PsrpB <sub>p</sub> -RbcX-glaAt
<i>EQ1502</i>	黑曲霉 CBS 513-88	<i>gsdA</i> :: PmbfA <sub>p</sub> -RbcL-trpc; PcoxA <sub>p</sub> -RbcS-TniaD; picdA <sub>p</sub> -Hph-TgpdA; PsrpB <sub>p</sub> -RbcX-glaAt <i>pgkA</i> :: PmbfA <sub>p</sub> -GrES-trpc; PcoxA <sub>p</sub> -GroEL-TniaD; picdA <sub>p</sub> -Ble-TgpdA; PsrpB <sub>p</sub> -PRK-glaAt

[0576] 接种来自菌株EQ1500和EQ1502的分生孢子( $10^8/L$ )，并在30℃在旋转振荡器(180rpm)中在含有Vogel培养基而无MnSO<sub>4</sub>、总葡萄糖含量为15%和总氮含量为0.2%和10%CO<sub>2</sub>的摇瓶中培养。如上所述在配置有Aminex HPX-87H柱(300x 7.8mm, Bio-Rad, Hercules, CA)的HPLC(Shimadzu, 京都; 日本)上进行葡萄糖和有机酸的测定(Blumhoff等, 2013; Steiger等, 2016)。折光率检测器(RID-10A, Shimadzu)用于检测葡萄糖和柠檬酸, 而PDA检测器(SPD-M20A, Shimadzu)用于在300nm处检测顺式乌头酸和反式乌头酸。该柱在60℃以0.6mL/min的流速使用, 并使用0.004M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>水溶液作为流动相。培养在三个生物学重复中进行。

[0577] d) 分析方法

[0578] 为了细胞外代谢物的定量, 培养物样品以14,000xg离心5分钟。通过孔径为0.45μm的过滤器过滤上清液。将滤液保持在-20℃直至分析。使用Amethyst C18-H柱(250x 4.6mm, Sepax Technologies, Newark, DE, USA)用210nm处的紫外光来检测并定量柠檬酸和草酸的浓度。在30℃用0.03%H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>以0.8mL/min的流速进行洗脱。用3,5-二硝基水杨酸法检测还原糖。生物质测定: 通过(Calbiochem, San Diego, CA, USA)过滤5mL样品以收集菌丝并用蒸馏水洗涤。菌丝在“Miracloth”中被加热至105℃。对于干细胞重量(DCW)的计算, 预先测量Miracloth的重量, 并从总重量中减去以得到净重, 然后将每单位体积的净重计算为DCW。

[0579] 在完全分析之后, 对于作为葡萄糖消耗的函数的柠檬酸产率的比较, 工程化改造的菌株EQ1502比野生型菌株EQ1500高18%。

[0580] 实施例9: 在土曲霉中衣康酸产生的提高

[0581] a) 策略

[0582] 导致糖酵解途径无功能性的pgkA基因(基因座标签ATEG\_00224)的失活, 以及抑制磷酸戊糖途径的氧化部分的gsdA基因(基因座标签ATEG\_01623)的失活被用于整合允许PRK和RuBisCO酶的功能性表达的六个基因, 即rbcS、rbcL、rbcX、groES、groEL和prk允许CO<sub>2</sub>固定。

[0583] b) DNA构建

[0584] i) 靶向待失活的基因的指导RNA序列

[0585] 在这两个基因的每一个中,确定了由NGG基序(加下划线的CRISPR靶序列)识别(punctuate)的20个核苷酸的序列(表35)。在这两种情况中,此序列不仅对靶基因特异,而且在土曲霉基因组中是独特的。这些序列用于表达指导RNA(gRNA),其通过与土曲霉基因组的同源区形成异源双链体,指导CAS9内切核酸酶的作用以特异性地在所选基因座上诱导双链断裂。对于pgkA,在第二内含子中鉴定的序列,前20个核苷酸在基因组中具有独特的模式,甚至允许两个错配。对于gsdA,在第四内含子中鉴定的序列,前20个核苷酸在基因组中具有独特的模式,甚至允许两个错配。

[0586] 表35:指导RNA靶序列

基 因 座	基因	参考基 因组	基因座标签	CRISPR序列
[0587]	3	pgkA NIH262	(ATEG 00224)	CTGCGTCGGCAAGGAAGTT <u>GAGG</u> (SEQ ID NO: 45)
	4	gsdA NIH2624	(ATEG 01623)	CATCAGCGGCCAATATGACAAGG (SEQ ID NO: 46)

[0588] Sarkari等(Bioresour Technol. 2017 Dec; 245 (Pt B) : 1327-1333)中所述的质粒pFC332 (Addgene#87845)含有gRNA表达盒、用于Cas9内切核酸酶功能性表达的盒和用于此质粒的选择的Hph盒。质粒还含有片段AMA1\_2.8,其允许质粒的瞬时增殖。最后,还存在用于大肠杆菌的复制起点。

[0589] 为了靶向另一个基因,FS A和FS B之间的gRNA盒可容易地交换。因此,此质粒通过扩增此质粒的不同部分来被修饰,以消除抗生素选择盒并修饰20个核苷酸,这允许gRNA的特异性有利于表35中描述的序列,以形成靶向土曲霉基因组中的pgkA的质粒pEQ0615和靶向土曲霉基因组中的gsdA的pEQ0616。

[0590] ii) 供体质粒

[0591] 与基因组同源的区域

[0592] 供体质粒由在质粒pUC19 (GenBank: M77789.2)与与选择用于整合的基因座同源的每个约1500bp的基因组靶向序列(LA和RA)之间可装配的In-Fusion®HD克隆试剂盒用户手册-Clontech组成。LA和RA序列分别与由指导RNA靶向的基因座序列的5'和3'相邻。基因组DNA/指导RNA异二聚体由Cas9内切核酸酶识别以双链切割(基因座1:pgkA;基因座2:gsdA)(表35)。用表36中所述的针对pgkA基因的引物和表37中所述的针对gsdA基因的引物扩增RA和LA片段。扩增子序列在序列表中(SEQ ID NO:67至SEQ ID NO:70)。

[0593] 根据In-Fusion®HD克隆试剂盒用户手册-Clontech的方法,在三个片段的所有正向引物上添加18个核苷酸延伸,以允许质粒(pEQ0604或pEQ0605)(33)的功能性组装和引入II型限制性内切核酸酶(限制酶I-CeuI和I-Sce)的两个限制性位点,所述II型限制性内切核酸酶具有大的不对称识别位点(12至40个碱基对)。这些是18个碱基对的识别序列,因此罕见,且并不存在于所述的组装中。裂解在搜索位点处不对称的事实允许缺少待从细菌载体pUC19释放的序列的片段。这两种酶允许通过在大肠杆菌中克隆的扩增后通过限制性提

取整合模块。

[0594] 表36:扩增pgkA基因的同源区

扩增子	引物位置	引物序列
5'pgkA_土曲霉	正向	CTTGGGAAATTGGGACACG (SEQ ID NO: 47)
	反向	TCTTGCCGATGAGCTTCTCC (SEQ ID NO: 48)
3'pgkA_土曲霉	正向	CAGATCATCCTCCTGGAGAAC (SEQ ID NO: 49)
	反向	ACGGCACGAATGTTCACCTG (SEQ ID NO: 50)

[0596] 表37:扩增gsdA基因的同源区

扩增子	引物位置	引物序列
5'gsdA_土曲霉	正向	ATTGGAAGCTGGCTCTATCTCACC (SEQ ID NO: 51)
	反向	GCTGTTCTTCGATTCCTTGGTG (SEQ ID NO: 52)
3'gsdA_土曲霉	正向	TCAACCTCACCAAGCACCTCG (SEQ ID NO: 53)
	反向	CAAACAGCCCGTCGCAACTG (SEQ ID NO: 54)

[0598] 工程话改造的表达盒

[0599] 基于GenBank数据鉴定启动子和终止子。选择的启动子从+1转录点确定并直至1.4kb上游以便涵盖“核心”序列(TATA盒)和反式激活序列,这允许相关启动子的最佳功能。

[0600] 对于终止子,截止点是在基因的终止密码子后500bp处确定的。

[0601] 四个表达盒的每个整合模块的结构定义如下:第一水平由简单元件(即启动子)、编码序列(CDS)和终止子组成。根据表32用工程化改造的CDS扩增和组装启动子(表30)和终止子(表31)元件。根据NEBuilder® HiFi DNA Assembly Master Mix试剂盒(E2321)提供的方法扩增CDS,以便获得该表中汇编的功能性表达盒。组织四个基因中的每个整合模块以包括四个不同的启动子/终止子对,以便限制反式(trans)干扰。组织六个基因中的每个整合模块以包括六个不同的终止子启动子对,以便限制转录干扰。

[0602] 用于插入至基因组的靶基因座的供体片段

[0603] 根据In-Fusion® HD克隆试剂盒用户手册-Clontech的方法,扩增并在抗生素选择盒(表38)周围组装不同的多表达盒(RbcS、RbcL和RbcX,或GroES、GroEL和PRK),以形成供体

质粒 (pEQ0606或pEQ0607)。

[0604] 表38: 质粒组装

质粒	基因组序 列	启动子	基因	终止子	基因组序 列	ori	选择标 记
pEQ0604	LA4				RA4	coli	氨苄西 林
pEQ0605	LA3				RA3	coli	氨苄西 林
[0605] pEQ0606	LA4	PmbfA <sub>p</sub>	rbcL	trpct	RA4	coli	氨苄西 林
		PcoxA <sub>p</sub>	rbcS	TniaD		coli	氨苄西 林和潮 霉素B
		PsrpB <sub>p</sub>	rbcX	glaAt		coli	
		picdA <sub>p</sub>	Hph	TgpdA		coli	
pEQ0607	LA3	PmbfA <sub>p</sub>	groES	trpct	RA3	coli	氨苄西 林和博 来霉素
		PcoxA <sub>p</sub>	groEL	TniaD		coli	
		PsrpB <sub>p</sub>	prk	glaAt		coli	
		picdA <sub>p</sub>	Ble	TgpdA		coli	

[0606] c) 土曲霉的转化

[0607] 使用土曲霉菌株NIH262根据应用于黑曲霉的策略 (实施例8) 进行土曲霉DNA的转化。

[0608] 表39: 用于产率研究的菌株

菌株	基因组	遗传修饰
EQ1600	土曲霉 NIH262	
EQ1601	土曲霉 NIH262	gsdA :: PmbfA <sub>p</sub> -RbcL-trpc; PcoxA <sub>p</sub> -RbcS-TniaD; picdA <sub>p</sub> - Hph-TgpdA; PsrpB <sub>p</sub> -RbcX-glaAt
EQ1602	土曲霉 NIH262	gsdA :: PmbfA <sub>p</sub> -RbcL-trpc; PcoxA <sub>p</sub> -RbcS-TniaD; picdA <sub>p</sub> - Hph-TgpdA; PsrpB <sub>p</sub> -RbcX-glaAt pgkA :: PmbfA <sub>p</sub> -GrES-trpc; PcoxA <sub>p</sub> -GroEL-TniaD; picdA <sub>p</sub> - Ble-TgpdA; PsrpB <sub>p</sub> -PRK-glaAt

[0610] 在3%葡萄糖上培养土曲霉菌株EQ1600和EQ1602。

[0611] 使用由Hevekerl等 (Appl Microbiol Biotechnol. 2014; 98:6983-6989) 描述的经优化的培养基组成。它每升含有0.8g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、3g NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>、1g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O、5g CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O、1.67mg FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O、8mg ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O和15mg CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O。为了模拟从用稀酸预处理 (0.75% v/v, 160°C, 10min) 和酶糖化 (pH 5.0, 45°C, 72h) 的麦秸水解产物 (150g/L) 获得的典型糖浓度, 使用适量的最高达30g/L的葡萄糖。添加来自无菌储备溶液的糖和所有其他组分。在接

种菌株EQ1600和EQ1602的孢子制备物之前,用0.5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>将不含CaCl<sub>2</sub>的培养基的pH调节至3.1。在125mL锥形烧瓶中的25mL培养基中在33℃在10%CO<sub>2</sub>的环境中在旋转振荡器中以200rpm振荡进行7-10天培养。在发酵过程中不检查pH。在用于时间研究的取样期间维持烧瓶的振荡以确保连续供应氧气。所有实验一式三份进行。所有培养基组分均获自Sigma Chemical, St. Louis, Missouri。对于这些实验,每种糖溶解于去离子水中,并通过Dowex 50-X8 (100/200mesh) 阳离子交换树脂(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) 的柱子 (440x 45mm) 以去除锰(如果需要的话)。

[0612] d) 分析步骤

[0613] 从干细胞重量测定细胞团浓度。通过以10,000g离心10分钟收集发酵液中存在的细胞团,并用去离子水小心冲洗三次。在80℃使经冲洗的细胞团完全干燥,直至获得恒重。在使用高效液相色谱(HPLC)分析葡萄糖、衣康酸和副产物(琥珀酸、 $\alpha$ -酮戊二酸、苹果酸、顺式乌头酸和反式乌头酸)之前,离心(10,000g,10分钟)后的发酵液储存在-20℃。使用Shimadzu Prominence HPLC系统(Shimadzu America, Inc., Columbia, MD)。两个柱子(具有除灰柱体和Carbo-P保护柱体的Aminex HPX-87P柱,300x 7.8mm,以及具有Microguard Cation H柱体的Aminex HPX 87H柱,300x 7.8mm(Bio-Rad))分别用于进行糖和有机酸分析。Aminex HPX 87P柱维持在85℃,并用Milli-Q酸化的去离子水(Millipore, Bedford, MA)以0.6mL/min的流速洗脱葡萄糖。

[0614] Aminex HPX 87H柱维持在65℃,并用使用Milli-Q去离子过滤水制备的5mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>以0.5mL/min的速率洗脱糖和有机酸。对于糖使用折光率检测器进行检测,且对于有机酸使用210nm UV检测器进行检测。使用丙酸(1%,重量/体积)作为内标来估计在7-10天的33℃,10%CO<sub>2</sub>下的好氧发酵期间的液体损失。所有HPLC标准品(包括有机酸)均购自Sigma。使用Optima 7000DV(Perkin-Elmer, Waltham, MA)电感耦合等离子体发射光谱仪(ICP-OES)通过Bakota等(Eur J Lipid Sci Technol. 2015;117:1452-1462所述的步骤来测定锰浓度(ppb水平)。

[0615] 基于从葡萄糖产生衣康酸的结果,相较于参考菌株EQ1600,观察到工程化改造的菌株EQ1602的来自葡萄糖的衣康酸的质量产率增量为15%。

## 序列表

<110> 伊诺布拉克

<120> 用于产生感兴趣的分子的经遗传优化的微生物

<130> B2422

<160> 71

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 76

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸CB101 (正向)

<400> 1

acagatcatc aaggaagtaa ttatctactt tttacaacaa atataaaaca atggtaagg 60

aaaagactca cgttcc 76

<210> 2

<211> 81

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸CB102 (反向)

<400> 2

gggaaagaga aaagaaaaaa attgatctat cgattcaat tcaattcaat ttagaaaaac 60

tcatcgagca tcaaattgaaa c 81

<210> 3

<211> 65

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Sdzwf1

<400> 3

aagagtaaat ccaatagaat agaaaaaccac ataaggcaag atggtaaaa agcctgaact 60

caccg 65

<210> 4

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> Rdzwf1  
<400> 4  
atttcagtga cttagccgat aaatgaatgt gcttgcattt ttttattcct ttgccctcg 60  
acg 63  
<210> 5  
<211> 76  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> Sdpgk1  
<400> 5  
acagatcatc aaggaagtaa ttatctactt tttacaacaa atataaaaca atggtaagg 60  
aaaagactca cgtttc 76  
<210> 6  
<211> 81  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> Rdpgk1  
<400> 6  
gggaaagaga aaagaaaaaa attgatctat cgattcaat tcaattcaat ttagaaaaac 60  
tcatcgagca tcaaattgaaa c 81  
<210> 7  
<211> 75  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> Sdih1  
<400> 7  
tctccctatc ctcattcttc tccctttcc tccataattg taagagaaaa atgggtacca 60  
ctcttgacga cacgg 75  
<210> 8  
<211> 78  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> Rdih1  
<400> 8  
aatttgaaca cacttaagtt gcagaacaaa aaaaagggga attgtttca ttagggcag 60

ggcatgctca ttagagc 78  
<210> 9  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 序列RBS  
<400> 9  
aggaggtttg ga 12  
<210> 10  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 序列RBS  
<400> 10  
aacaatga ggaggtactg ag 22  
<210> 11  
<211> 16  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 序列RBS  
<400> 11  
aagttaagag gcaaga 16  
<210> 12  
<211> 14  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 序列RBS  
<400> 12  
ttcgcagggg gaag 14  
<210> 13  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 序列RBS

<400> 13  
taagcaggac cggcggcg 18  
<210> 14  
<211> 12  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 序列RBS  
<400> 14  
caccatacac tg 12  
<210> 15  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> POXB1-S  
<400> 15  
tcgttgcgtt acacacac 18  
<210> 16  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> POXB1-R  
<400> 16  
tgtgtcgagt ggatggtag 19  
<210> 17  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 间隔区S  
<400> 17  
gcatgaattc g 11  
<210> 18  
<211> 11  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>

<223> 间隔区R  
<400> 18  
cgaattcatg c 11  
<210> 19  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> CRISPR pgkA的序列  
<400> 19  
caacaaggcc actggtgcc agg 23  
<210> 20  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> CRISPR gsdA的序列  
<400> 20  
cattccggc caatatgaca agg 23  
<210> 21  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 21  
ggatcgcaga tacggtcgc 19  
<210> 22  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 22  
cctcggtgaa gacaacgctg 20  
<210> 23  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<223> CTCCTTGAGAACCTGCGTTCC  
<400> 23  
ctccttgaga acctgcgtt cc 22  
<210> 24  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 24  
ctgaagtacg ttttcccaag cc 22  
<210> 25  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 25  
cgttatcaca aagaagccag gtcc 24  
<210> 26  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 26  
gctgctttc gatttccttg gt 22  
<210> 27  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 27  
tcatcaacct caacaaggcac ctc 23  
<210> 28  
<211> 19  
<212> DNA

<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 28  
gtgaagacag cggcggtcc 19  
<210> 29  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 29  
gccatgaaat ccaatcattt cc 22  
<210> 30  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 30  
gacggcattt gagcaacatc 20  
<210> 31  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 31  
ttagtcattt cagcaagctg cc 22  
<210> 32  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 32  
ttagtcattt cagcaagctg cc 22  
<210> 33  
<211> 23

<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 33  
tttgaagatg gatgagaagt cg 23  
<210> 34  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 34  
tgtcctggtg ggtgggttg 19  
<210> 35  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 35  
ctcgaacgag aatgggaacc 20  
<210> 36  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 36  
ggcggaatga gatgcgacag 20  
<210> 37  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 37  
tgatttaata gctccatgtc aacaag 26  
<210> 38

<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 38  
acgggttcgc atagggttgg 20  
<210> 39  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 39  
cgaccgcgac ggtgactgac 20  
<210> 40  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 40  
gaatcaggac ggcaaactga at 22  
<210> 41  
<211> 25  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 41  
gggttaaacga ctcataggag agttg 25  
<210> 42  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 42  
gggatatttg acacgattct gagg 24

<210> 43  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 43  
ccggagatcc tgatcatccg 20  
<210> 44  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 44  
cgtggtctag ctgccctcc 19  
<210> 45  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> CRISPR pgkA的序列  
<400> 45  
ctgcgtcggc aaggaagttg agg 23  
<210> 46  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> CRISPR gsdA的序列  
<400> 46  
catcagcggc caatatgaca agg 23  
<210> 47  
<211> 19  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 47

cttgggaaat tgggacacg 19  
<210> 48  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 48

tcttgccgat gagcttctcc 20  
<210> 49  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 49

cagatcatcc tcctggagaa cc 22  
<210> 50  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 50

acggcacgaa tgttcacctg 20  
<210> 51  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 51

attggaagct ggctctatct cacc 24  
<210> 52  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物

<400> 52  
gctgttcttc gatttccttg gtg 23  
<210> 53  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 53  
tcaacctcac caagcacctc g 21  
<210> 54  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 引物  
<400> 54  
caaacagccc gtgcgaactg 20  
<210> 55  
<211> 1881  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 扩增子\_5'pgkA\_黑曲霉  
<400> 55  
ggatgcaga tacggtcgca cagttaatca cggcttcaa ggctcggtga ggacgcaggc 60  
cctctgacag taacgatctt atttcaattg agatccatga cctcgataaa gagaagccgc 120  
ctgctcttgg agagctggga catgctagac atatgccgcc gcccttcgac ttcgagcc 180  
tgactcgctt tatgtcgtac ggtttcttca tggcccccgt tcagttccat tggttcggtt 240  
tcttgcgtccag ggcgttcccc cttaccaaga ggaacccgtc gattccgcg ctgaagagag 300  
tgtgcgtgga tcagctgatg ttgcgtcctt ttggatgaa ctgtctccga aggaagaaga 360  
aagctctttt ctcttagcta atattattac caggtctggc gtgcttcttc tccttcatga 420  
cggttgcaga gggaggagga aggagagcct tgacgcgaa gttccaggac gtctatctgc 480  
caaccctcaa ggccaacttt gtccttggc ccgctgttca gattctgaac ttccgtgtcg 540  
tacctatcca gttccagatt gtgagtagta ttgtgataaa actttgtgc actgttatac 600  
tgcattttct tttttcttcc agcccttcgt gtctccgctc ggaatgcct ggactgcgt 660  
tctgtcgctg accaactctt cggaggagga gtaatggtag tagcggcgc atatttggc 720  
tcccacaagg ttcccaatcg tttcttctgt caattgtctg tcattcttcc ttcccctgcg 780  
tcgtttcggt cttactggc gctgtaaatg aacttcgggg gttctgttat tcttcctctc 840

atgggtggtg tataaggctt cgtccagcag tgtgggtaca ccggagtcaa ttgcattgat 900  
 cgataaacca tgtcgacaaa atgaattata caccattttt tttcgggttt gaaccaggca 960  
 cgaatgatgg aatgtctcct gtaggcgggg ttgtcccccac gagcgagccg gcatccatag 1020  
 acgagaaata tcggaacgat tgcttgatag atccaccccc ggacgcagca gaagctccca 1080  
 tcgcagcaat gatccgagggc taaggggctc cgaacggggc ataacaggca taatgttcac 1140  
 ccctgaggcc ccggaccctt cggtcatcga ttgcggcgc ctgacatcag tccgcacatca 1200  
 gcccggaggcg cccgcgattt caacttctc caccggctc cccaccacca gcccataacca 1260  
 cttttacccc gccgcccgaac cgaatgaagt cgtagcttcc agtggaccaga ctgcgtcacc 1320  
 gcggacctat taagtaggca tttttccaa ttccttcattt cccctgggtg ctactaatac 1380  
 tacgtctctc cccctccaa tttctccctt ctctctttt ttgtcaccaccc acttccctat 1440  
 ctcccctca catcctctaa cccgcgtccga ctgtcgtaga accgtcggtc atcatgtctc 1500  
 ttaccaacaa gctcgctatc accgatgtcg acctcaagga caagcgtgtc ctgatccggg 1560  
 tatgttggc ccccgaaac ccccaccttt tcatcagtca cgcgtgtgg gtttaagatg 1620  
 agccttcaat gctaactagt ctgctcactg gacaggtcga cttcaacgtc cccctcaatg 1680  
 acaagaagga gatcaccaac aaccagcgta tcgtcggtgc tctgcccacc atcaagtacg 1740  
 ctatcgagaa tggtgccaaag gccgttgc tcatgtccca cctggccgc cccgacggca 1800  
 agaagaacga caagtacagc ctgaagcccg ttgttgccga gctggagaag ctgcttggcc 1860  
 gcagcgttgc cttcaccgag g 1881

〈210〉 56

〈211〉 1883

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉 扩增子\_3'pgkA\_黑曲霉

〈400〉 56

ctccttgaga acctgcgtt ccacgctgag gaggagggca gctccaagga tgccgaggc 60  
 aagaaggtca aggccgacaa ggagaaggc gctgagttcc gcaagggtct gactgcttt 120  
 ggtgatgtct acatcagtaa gtcattttt tctcacacct tccatcttgg gaggccacta 180  
 gtttatgagc tgtgtactaa tattccacac cacagacgac gcttcggca ctgcccaccg 240  
 tgctcactct tccatggcgt gttgtgaccc ttctcagaag gcttcgggtt tcctcgtaa 300  
 gaaggagctc gagtacttcg ccaaggctct cgagagcccc cagcgccct tccttgcac 360  
 cctgggttgt gccaaggctct ctgacaagat ccagctgatc gacaacctgc tgcccaaggt 420  
 caacagcctg atcatcaccc gtcacatggc tttcactttc aagaagaccc tcgagggtgt 480  
 caagatcgga aacagtctct tcgacgaggc tggcagcaag atcggtggcg aggtcggtca 540  
 gaaggccaag aagcacgacg tcaagatcg tctggccgtc gactacgtca ctgcccacaa 600  
 gttcgctgtct gatgccaaga ccggcactgc taccgacgct gaggttattc ccgacggcta 660  
 catgggtctg gatgttggcg agaagagtgt tgagctctac aagcagacca ttgctgaggc 720  
 caagaccatc ctctggaacg gtccccccgg tgtcttcgag ttggagccct tcgccaacgg 780  
 caccaagaag accctcgatg ccgtcgatc cgctgctcag tccggctcca tcgtcatcat 840

cgagggtggt gacactgcc a cggtgccgc caagtacggt gtcgaagaca agcttagcca 900  
 cgtctccacc ggtgggtggt cctctctgga gctcctggag ggcaaggagc tgcccggtgt 960  
 tgctgccctg tcgagtaagt aaatttgaac aaacatatta ccactctgga tatgcggaga 1020  
 tgctgcaaga caaaaatccgt ccatgtttct ttggaggagg atgagctgt gttgagcttc 1080  
 catgctcggg actagtggac aggccgctt gtagtacct gtcagccctc ccggccccc 1140  
 ttcaagacag ggaacaattt tacgaatgta atgtacaaag aatgataatt aatctcaaca 1200  
 aaatacgcgt ttaccttcat tatcaagatg atgcaatctc atgacttagt acgggtccga 1260  
 agctgtgagt ctagtttat caaatgcgag ctacgaagag gggccacaa gttgatggc 1320  
 ggtggacttg atccttcag taatgggtgt gtaaataatc gtagaaagta cataatgtgc 1380  
 tcatgcagca catacaccgc ttccagcgaa gtgcttagcct gtaccagatc tcccaccata 1440  
 gacgacttat cctctgcaga cgaatccctc acaaccacgc agctggctt gccaccggc 1500  
 cggcaccgcc aaagcagacg aatctttac tcaaacaagt ctatctagct ccaacattgt 1560  
 tcatcgctc gctaccgagc cgcgtgaggg taaagctgca cgtgtaatca agtgattat 1620  
 gcttcgtgga atttgcgtgt gttcatctca attaaaccga taaccgtca tctaaccataa 1680  
 tctattgatt agacgccccg accttctca gtcctctct gtatggtaa gcaaacatgt 1740  
 tagtccaatt ttagcttag atgaggtgta gatcaatggt aacatattgc gctcatagca 1800  
 ttgaccgatg aggttgggt tggttcggtt tggttcggtt tggttgggtt cggttggct 1860  
 tggcttggga aaacgtactt cag 1883

〈210〉 57

〈211〉 1814

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉 扩增子\_5'gsdA\_黑曲霉

〈400〉 57

cgttatcaca aagaagccag gtcctgagct gacctacctg catgaatggg ctggggctg 60  
 ctccacaatt gccagtaaac tcgaggtgcg cgtccccgc gcatataacc aatgttagtac 120  
 agcgtcagac cgcaagaaac tcggcacctc tgcattgcg gcttccttt gtttaattc 180  
 cagaggataa aactgtcaga tcagggtcgg agggtaata ttactggat aagttgacgc 240  
 ggggggttcc gcatgcaaca gtaaggtgta ccttaagatg ggcacatcc gttccatgt 300  
 tggttctcag tggagctgg aggagattt cagcggaccc ggctcgata aatcagtccg 360  
 tctagaaaag aaaggctgt tagtcaaacc gatcatgctt ctgaaagaca gatagagtaa 420  
 gtcgagtgga ggatgctca tcgtaagcac tgatggat atatctagat tgtctcaagt 480  
 ggtagatagt agagtaagac tcatcgctt acctagcgat gatataagag atgggtgcc 540  
 acaacgggct cggaaagaga gaaggagttac tacagtatga gtggAACGG aggacgtac 600  
 aattttagggg atgaatgcta gggatgaaaa aggaaggcatt tcccgagta atcataccag 660  
 gggaaatactg gataagttga ggttaacttag caggcagtgt gtctttagt atgtaaaata 720  
 accccgaata atagaattgg ataacaacta ctactcactc ctcacgggtt cccgcggcag 780  
 caatcgacgt agtggaaagaa cccaaagccgg gcttcccagt aacaaagtag taacaaagct 840

gccccacccg ggctcaactca ctttgccca ccctgcagcc agcagctcct ctcctcgacg 900  
 agaggccctc cggtcttaaa aagtacttgc tccgcccggaa ctgttggat tttccaaca 960  
 aacctctctg tccttgctgt ctccctgtat cctcttatt tcctccttcc ccctcctcca 1020  
 ccgaatctct cacccatctcg tggttgttca cacatcaga aaacatggcc 1080  
 agcacaatag cacgcactga ggaacgccag aatgctgggt gagtttgcg gtctccctct 1140  
 ctgacatcac acccctcctc ccactccgt ccctcctgccc cgccgcccag acgtgaggat 1200  
 tcaccaccca cgactctcca taacaagccc cggtcgccaa acattcactg gcagggttcc 1260  
 cgctttccat tatttttcaa ttgtcacca ggattactcc ttggggctta acgaaaggac 1320  
 tattttctg actcaccacc aaccctcaact gcccctcctg catgctgtag cgactgcgg 1380  
 gcaccgaccc gcatcatcga tctacacccg atccctgtga cattatattc gtcaagctat 1440  
 agcctagcta acatggatgt ttacgttagc accatggagc tcaaagatga cactgtcatc 1500  
 atagtactgg gtgcctccgg agatcttgc aagaagaaga ccgtcagtga cgaccctcg 1560  
 attcatgtt acctgacaga aagctaacct ttacagttc ccggccctt tcggccttgt 1620  
 atgtcctctc ccagatccaa ttgcagttt actcaccagt atggttgctg atttgcgtt 1680  
 ccagtatcgc aacaagttcc tccccaaagg aatcaagatc gtggatatg cccggacaaa 1740  
 catggaccat gaggagtacc tgaggcgtgt gcgcctatac atcaagaccc ctaccaagga 1800  
 aatcgaagag cagc 1814

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 1837

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 扩增子\_3'gsdA\_黑曲霉

&lt;400&gt; 58

tcatcaacct caacaaggcac ctgcaggaga ttgagaaggg ccagaaggag cagaacagaa 60  
 tctactacat ggccctcccc cccagcggtt tcaccaccgt ttccgaccaa cttaaaggca 120  
 actgctaccc caagaacggc gttgcccgtt tcatcgtag tcaatcctgg gctggatatca 180  
 ccctgccatt ggtcatttatt ctactcgct tggtttccat tttcacaggt agagaagcct 240  
 ttggcaagg acttcagag ctgcgcgtt ctccaaaaag ccctggagcc taactggaag 300  
 gaagaggaga tcttcgtat cgaccactac ctggtaagg agatggtaa gaacatccctt 360  
 atcatgcgt tcggaaacga attttcaac gccacctgga accgtcacca catgcataac 420  
 gttcaggtac gacattgcgc tatccaattt gcctatttgc ttacttgcta aattgtcgct 480  
 tctatcatta gatcacattt aaggaggccct tcggactgaa gggacgtggt ggttacttgc 540  
 atgaattcgg catcatccgt gatgtcatgc agaaccgtac gttcaaagtc acgctcgaca 600  
 tctccgacat gatgtgtataaaaatcttc cttagaccc tccaggtgtt gacgctgctc 660  
 gctatggagc gccccatttc cttctccggcc gaggacatcc gtgacgagaa ggtacagtgt 720  
 gcgcttgact attgggtgtt ctgggttact gacacttaac caggtcggt tcctccgtgc 780  
 gatggacgccc attgagccca agaacgtcat tattggccag tacggaaagt ctctggatgg 840  
 cagcaagccc gcctacaagg aggacgagac cgttcccccag gattcccgct gccccaccc 900

ctgcgcctatg gtcgcctaca tcaagaacga gaggtgggac ggtgttcctt tcatcatgaa 960  
 ggctggcaag ggtatgtacc tcttccaag cgatcatagc accgatttgtt atactaataa 1020  
 ttcgcagcct tgaacgagca gaagaccgag atccgtatcc agttccgtga cgttacctcc 1080  
 ggaattttca aggacatccc tcgcaacgag ctcgttatcc gcgtccagcc caacgagtcc 1140  
 gtgtacatca agatgaactc caagctgcct ggcctgtcca tgcagacggt tgtgacttag 1200  
 ctcgaccta cctaccgccc cgcctctcc gacctaaga tccccgaagc ctacgagtct 1260  
 ctgatcctgg atgctctgaa gggcgaccac tccaacttcg tccgtgacga tgagctggat 1320  
 gccagctgga ggatcttcac ccctctcctg cactacctgg atgacaacaa ggagatcatc 1380  
 cccatggaat acccctacgg tacgtcaact tcttgcatttgtctaaatc gcttacatac 1440  
 tgaccaacgc gcaggctccc gcggacccgc cgtccttgat gacttcaccc cgtcctcgg 1500  
 ctacaagttc agcgatgctg ctggctacca gtggccctt acttccaccc ccaaccgtct 1560  
 gtaaataagg gcggtcggca gtttatgacg gatgaggatg aaaaaaaaaat tattgccaaa 1620  
 aaaggctaaa aaaaagatgt taatgcgatt gatttcggt cgagaatcat ggtatgacgg 1680  
 ggcatctggg atgatatgac agaaatgaag cactcggac tatttacgg tcggctggc 1740  
 aataactgga gttatctatt cgcaacccct ttttagaaac gaatgcagag aacgtaacga 1800  
 accacccccc gtcgggttggg accggcgctg tcttcac 1837  
 <210> 59  
 <211> 1494  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> PmbfA  
 <400> 59

gccatgaaat ccaatcattt cttctggcc gccctcgggc aagagatgt gcccgcagg 60  
 tctctcacag catctacatc tgcgaccgca acagccacca agcgaggcgc acatgagctt 120  
 gtcctccctt catgccaatgg tttggccctc ttctttctg tgcgtgttgc ggaagtcaaa 180  
 ctcgtcgatg ataggaccag atgggttgc aagggtcaac gcttccatg cttctggca 240  
 ccggtagtaa tgctcttctg caagggagac ttgacgttgc gatccgcgg gccccgggac 300  
 atgctggaag ggattttctg gctcaatacc acgtctgtat ttgacccttt ccagacagtt 360  
 aatccgctgc aggaggggcga actgttagctc ctcgttctcc ttgttagcgt tgatccagtc 420  
 tttttggatg ttgcacttgc ttggcctatg cttctcatat aatttgccc tgtcatagag 480  
 acgacgtctg agattgttagc gttcgtctt gatcacccgg agccagatag gcctgagtt 540  
 atctgacatt agatcaaagg gtctgtggat agtctccctc agcatcagcg acgcatgtga 600  
 ctcgcaagtc ggagagagct tgtgggtggat catctttgtt ggcgtccctt gctttccctt 660  
 gatttcggtt gattttttt cgaaagttaa gtctggcagt caagagaatc cttctgccag 720  
 acattatatt tacgtatact gacgttagtag aaacagcgatc agatgagga catgggtgtt 780  
 gctggaccac ggaatcatag ttcatcagta tattgggttg gacaataac gctgaggatg 840  
 tatatgtctt tacacactat aaaagccagc gaacgccaat aaaataggc atattgtatgt 900  
 gaaaatatga caccagttaa aagcagtgtt ttgattttat ctctttcac ctcggaccta 960

tactaccgt aacaagactc aacttacttc cagatatagt aatatacacc ctagggacga 1020  
 accagcacaa taattacagc caaacaacac cacccaaatg gcatattcct aatcagcact 1080  
 aagcacaat accactgtca tcacagcata atcaataaga atccagaca accgactcac 1140  
 tctgactcac cttacacaaa cccccaagca aagcgcagcc cagaacctca gccaacaatc 1200  
 gggcaacgt a cggggaaaga ttggccgatc catgatgtca gcagccctaa cccaaagcgg 1260  
 actagcgcac accgcccctc tgactccgac atcccaggc tcgagaagct tccgtggcgt 1320  
 cgatataat tcagcgggccc ttgaacatcc ctccttacga cacacctcac gcgatcgatt 1380  
 ttgacactca cgcaccgcca ccctcacatc ctccaccac accacacccc ttaatcaacc 1440  
 caccatcacc gctagaacgt ctatctcatc accgacttct catccatctt caaa 1494  
 <210> 60  
 <211> 1498  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> PcoxA  
 <400> 60  
 gacggcattt gagcaacatc atgcgaacgc gaccgtgtt a ctagcagcca ctcagcaacc 60  
 gtcagttcat gatatgtcgc agagcgttgt cctcgcccg cccagatgc tcccacgaca 120  
 cttccatgt cagtatccac ctgccagctt cgaatcccc cctatccagc gcgagaaaaaa 180  
 acgccccatcac tcggagaccg aagaggatgg gaaccccgac catggcctgc ggccgcagct 240  
 atcagtcctc tca gcttgacg cccctcacga accctcgac tctccgaaa tgctcttcgg 300  
 tgtccatggc gcatcatctc agcagcatcc catgtcaa ac catggcttg ggcccacgga 360  
 ctctgtggcc ctgccgcaac atcaccatca ccatcgactc ccgc cccatg cagcgctcgc 420  
 cgc cccaggg cgtcatggag tgaatgtgga atctcctcct ttgccctcgg gcccgcgag 480  
 tgtggtggc cagcctggaa tgcctgatcc agccccagg cctcgaggac caaaactgaa 540  
 gtttactccc gaagaggacg ctctactggt gtagttgaag gaaaacaaga acttgacgtg 600  
 gaagcaaatt gcagacttct tcccgcccg aacgagcggt accttgcaag tccgatactg 660  
 caccaagctg aaggctaagg atgttagctt gagtgacgaa atggttcgat ttgctcctga 720  
 tgtatttcta cgcctgtctc acacatgcta atgaaggaa taggtacaaa ggctgcagcg 780  
 ggcaatgcac gagtacgaga acgatcggt ggcgcattt gcaggaaagg ttggaaatgg 840  
 ctccacccca gctgcttgc ggcgagaaagc catgcagctc catgagtaaa agcgttgggg 900  
 aattttcata ttatatatcta ctgtcgccag attcgccct gcttggaccc tctgatctcc 960  
 ttactctcca tattggttca aatgtcggtt ctccgatagg gctgggtggc caggctgtt 1020  
 gtaggcacgg gaggatgatc agcataactc tgagtcaacta tagggacggg ttgatgttaag 1080  
 gtattaagtg atgtatgata attcattttt gcccggggaa acatatggcg ccggcattt 1140  
 ttcgttcgca atgaaccgac actagcgtcc gctctcgac ttttagcaccg gctgatcccg 1200  
 ggctgaacgc ggccatttgc cggccggggc atgtgttct tatctacggc agaccgcaga 1260  
 agaccactgg agcagattt agaccctaag ccctaagccg gacacccat cgagtaggtc 1320  
 tgcggaccag gtcactgcgg gcagccggag aagctccgca accaatcaat ccccgccgt 1380

gactaaggc aggcgaccac gggccgaagc ggctcaaac tcaccta ac ctccaaactc 1440  
 cctcatctcc aaacgtcctt gccttgtctg ccgtcattgc aacccacca ccaggaca 1498  
 <210> 61  
 <211> 1490  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> PsrpB  
 <400> 61

ttggcagggt cacgtagccg taattatTTT cggggaaaggT tggaatgcaa tggaaggaga 60  
 tttccgtagc tagggctttg atcgatgcgg ggagcactgc cggtaggagg tctgggtga 120  
 atgggtgat atgcaggcgc ttctgtatcg acggtgtggT cgtcattgc ccaatagata 180  
 gttagataga tacctgagta cggtagcagt gcaggtgacg gctaagaagt cggagggaaa 240  
 aaggtgcagt cacaagcgc ttcagcctaa caagtgttt tgatactcg tgagaaacaa 300  
 acttgagtag aataagacag aaagttcttT tgaatggtca caatggctt ccaacgaagc 360  
 atcaagcaga ccctgttgca atagatattc caagaccgaa aaattaatga taggatcagt 420  
 tattggccga gggattttcc gggccgccaa gaccgggtta tggagatgtg ggcgcaggcat 480  
 gccatcctca gccacaggtt tctgtgacat cccaaaagca ttgatcgaag ttggtataag 540  
 tttcattcta tctaccatgg tgacaaggaa gtacgggtgt agaaaagaaa aatctggtag 600  
 gaatagctca gcaacaaatg gcggaaatgt tcatgttgc ctcgtatgtt ccactgaaac 660  
 gagatgcaag ttgcaacagc aataaatggT tttcagcctc cattacaatg taacagtcgg 720  
 gcccatactc agccggagca ggattggcg ggtgaatagt ggtccggag agaaacgacc 780  
 aggtaatctt tcgtacggga ccagaccgaa cccggcctgc ttttagtta ccagctgtt 840  
 cttgttaat ccccgtaaaa cgatcagtaa ctgccattga tcttcctgtt cttttccctt 900  
 attccctttt cccctttga aacttatttt cttttccctc ttcatcgctt aactactaa 960  
 gtacttaggat tctcactcgc cactttccc caatatctaa aagtagtctt gctacgaaga 1020  
 tcccttcccc ctacattact ctcctcctt caacacaccc acccccccgtt gatccggccc 1080  
 cataccagtc ttcccgcggc taactaaagc ccgcacgtct gatctcatcg ccgtttccag 1140  
 ctgcaccc tcgtacgtcac atggccactc ggattcctt gcatcatctc tttttttccc 1200  
 atcccttccc cggccctacca actgagggtc ctctgaagtg tgctccat ttccttccct 1260  
 tcacttattt tggatcctca ttttctttct tcctctgttt cggggcgttc ttcaacatcg 1320  
 ctacttagtc acttctctcc tctcattacc ggacgggaac ttcgctccct tctccgcttt 1380  
 cttatccgga ccgcctcttgc ccaatctc acatcgatcctt aaccgtcat aatccagtc 1440  
 ctcaacccta ctattgtcga catacacgtc ggttccattt ctgttcgag 1490  
 <210> 62  
 <211> 1500  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>

<223> PtvdA

<400> 62

ttagtcatt cagcaagctg ccgttggat ccttggctc agccgtcaag ggctggcctc 60  
 gctttagcgg ctctttgctg aggaacacgg agaaaaagag gttagctgtc tgccagcaga 120  
 gaaccaggag gcctcctgaa atcaagggttc gcacgataac tccgaggatt ggcggataa 180  
 tgccgggagg gatatgcagcg gatctcgga aatcccagaa tagcttgca aagtacagt 240  
 tagtgctcca tgccgggcgc cgaggacga aggcgtatgc gaatggcaa agaatggaaa 300  
 ccaagatact cggttcatc ccatcttga tgagctgcgg caatgctgac tggaggcg 360  
 tagagatcga ttgctcctgc cggttatctt catcagcgga gccagcgacc ctccctggcaa 420  
 cgggaaagagg gacgcgatcg tagtcgtgt aaagatgaac cactgactgc gcgactgcca 480  
 ggagaaaagtg gtaggtataa aggtagattt ctcttcgtt taagcttgct cgttcgtag 540  
 gtcttagcata actagttagg cgagttcaag agaaccgcctt gagctcgctg tcgcaggaaa 600  
 cataccttagc tcggttcacc aattccaggt gtgcgtact tgaagaagac cacctgtaga 660  
 tttcagtgaa ccaccaggcg gagaacaagt accagccaaa agtctgtata acgtcgaggg 720  
 gaacgaggtt tttgaaggtg ctaagcggg aggaggttgt cctggcaccg atgtgcacatct 780  
 gaccaacacg gaggacgaag acaacgagac tgcagaggaa gagaagaact gtgcgaactc 840  
 cacatcctcc aatggggAAC caagcccaca agactatcga gatatcacag ctggttagcg 900  
 atcacagctt gtcaaacgcc gctcggtgtt ggtgtaaact tacaagatga cttatcgcca 960  
 atagcaaatg ccactacata gcagaccaga agcgccagtg ccgacgcatt aacgaatcgt 1020  
 ctgtgcagcg cagaggtcaa gatgcgccga tacggcgag gctgtgctgc agccatgggt 1080  
 caaggtggaa gaggactgt gagatctcta gggagagaag agacaaagca atttcactgc 1140  
 atgatcagat gacaggagga attgaggtat ccggtcagcc tgtcagaacg gaaagctccg 1200  
 aaggggggca agtggagctt caaggaggag tgtcggtgtc ggatgcgaca ataaagtgaa 1260  
 gctttcggg caaagcatca aaacacgcac cagccacaaa cggcatgtca tgtgacacccc 1320  
 caccagccat cgatggcggtc aggtgagtgg cagcctgcga atcatggcat ctgtcggtcc 1380  
 aggcaaccgt cgacacactga cagcgataac gtactactac ttttagcaggg agagagccgg 1440  
 ccgggttgcattt cggccgaatg atcccacctt catccatcca ctgtcgcatc tcattccgccc 1500

<210> 63

<211> 1064

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> TglaA

<400> 63

cgaccgcgac ggtgactgac acctggcggt agacaatcaa tccatttcgc tatagttaaa 60  
 ggatggggat gagggcaatt ggttatatga tcatgtatgt agtgggtgtc cataatagta 120  
 gtgaaatgga agccaagtca tgtgattgta atcgaccgac ggaattgagg atatccggaa 180  
 atacagacac cgtgaaagcc atggtcttc cttcggtgt aagaccagac agacagtccc 240  
 tgatttaccc ttgcacaaag cactagaaaa ttagcattcc atccttctct gcttgctctg 300

ctgatatac tgcattcaa tgcataagcca tgagctcatc ttagatccaa gcacgtaatt 360  
 ccatagccga ggtccacagt ggagcagcaa cattcccat cattgcttc cccagggcc 420  
 tcccaacgac taaatcaaga gtatatctct accgtccaat agatcgctt cgcttcaaaa 480  
 tctttgacaa ttccaagagg gtccccatcc atcaaaccga gttcaataat agccgagatg 540  
 catggtggag tcaatttaggc agtattgctg gaatgtcggg gccagttggc ccggtggtca 600  
 ttggccgcct gtgatgccat ctgccactaa atccgatcat tgcactccaccg cccacgaggc 660  
 gcgtcttgc ttttgcgcg gcgtccagggt tcaactctct ctgcagctcc agtccaacgc 720  
 tgactgacta gtttacctac tggctctgatc ggctccatca gagctatggc gttatcccgt 780  
 gccgttgctg cgcaatcgct atcttgcattc caaccttgcgatc ctcactcttgc tttaatagt 840  
 gatcttggtg acggagtgtc ggtgagtgtac aaccaacatc gtgcaaggga gattgatacg 900  
 gaattgtcgc tcccatcatg atgttgcattc cggcttgcattt ggccttattc gtggatgcg 960  
 atgcctcgc tgtgcagcag caggtactgc tggatgagga gccatcggtc tctgcacgca 1020  
 aacccaactt cctttcatt ctcacggatg atcaggatct ccgg 1064  
 <210> 64  
 <211> 549  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> TniaD  
 <400> 64  
 acgggttcgc atagggttgg gggttatct tggcgttggg acggactggg tatgggttt 60  
 ctttggata tatgacatga tatgtacacg gccgtgaatc tttaacttta tatcattata 120  
 gaaatgcact tgcacatttc aacacgctgc gagcagaatc tcgaagatttgc ttccgcaagt 180  
 attagatcat gagacattt tcatttcattt tcaggcagtgc ggagtaggatc atcctgaaaa 240  
 caaggcggcc actgttagact agtaataccct cttcatatcc aacccatcca gaagatgatc 300  
 aaacacattt cgcacatccac ctctcgccgc gaaagccatc ccggcccttc cggatccaa 360  
 tgccttgcattt gacgatgcca ccgcggccctt ggcaccatctt aggtacgca aatacccaac 420  
 aaaagcggcc atttgcttcc taaacactgc atacaaccgc ttgaccatgg cttcactctc 480  
 gtgcctcactt ccatgtgtcc catcattgcg cgacagagggc gcaaacctca gaatcggttc 540  
 aaatatccc 549  
 <210> 65  
 <211> 580  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> TgpdA  
 <400> 65  
 gaatcaggac ggcaaactga attcagaagt gtgctgtgag tgagactgat tgccgagcgc 60  
 agacgactct cgtggaaaccg ggcttgcgaa gaagtttgcgaa aaggctttaa ctccttagcgt 120

aaaagctcat gatgacgtac aatttaatga aatgatacaa tggcatatt tcccgtaa 180  
 atttccggcc ttggtcagtg cgtaagatgt ccacgattga atactaactc agtatgggtt 240  
 tggtagcatt ggcaatgtag ttataagcat gcaccggtt aagacgtcg cccagatgc 300  
 aatgctgcgg tggtgactaa gctctgcagt gaatgaaatg cgtttcttg atcgacttcg 360  
 gcgtgccgcg ggattttctc ggcgcttcta ctggcaga aaggacgata ccactggctt 420  
 tcggtccatg ccacatccca gtctccggg aaattcattg catacttaa gaaacaaact 480  
 gatctccata atttccgtct ttagagttca cttggtaatt ttgggtggat cgaggggtgt 540  
 ccgcggccat ccaagtcacg tggagggcag ctgaccacg 580  
 <210> 66  
 <211> 528  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> TtrpC  
 <400> 66

tgatttaata gctccatgtc aacaagaata aaacgcgtt cgggttacc tcttccagat 60  
 acagctcatc tgcaatgcattt gacctcgaa cccttagtacg cccttcaggc 120  
 tccggcgaag cagaagaata gcttagcaga gtctatttc attttcggga gacgagatca 180  
 agcagatcaa cggtcgtcaa gagacctacg agactgagga atccgctt ggctccacgc 240  
 gactatatat ttgtctctaa ttgtactttg acatgctcct cttcttact ctgatagctt 300  
 gactatgaaa attccgtcac cagccctgg gttcgcaaag ataattgcac tgtttcttcc 360  
 ttgaactctc aagcctacag gacacacattt catcgtaggt ataaacctcg aaaatcattc 420  
 ctactaagat gggtatacaa tagtaaccat ggttgcctag tgaatgctcc gtaacaccca 480  
 atacgcccgc cgaaactttt ttacaactct cctatgagtc gtttaccc 528  
 <210> 67  
 <211> 1713  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 扩增子\_5'pgkA\_土曲霉  
 <400> 67

ctggggaaat tgggacacgc caggaaccta ccgcggccgt ttgatttga gcgggttacc 60  
 cgtttcatgt cgtacggttt cttcatggcc ccgggtcgagt tccagtgggtt cgggttccctaa 120  
 tcgaggacct tccctctcac caagaagaac ccgaccatcc cggctctgaa gcgggtggcg 180  
 gttgatcagc ttatgttgc tccgttcggat atggacactga tggatgttgc cggatggaa 240  
 gatatccgc taatagaaat gaatataggt ctggatgtt tcttcacccat catgacaattt 300  
 gctgagggtg gggacggag agccttgact cggcaagttcc agatgtgtt cctggccaca 360  
 ctcaaggcga actttgtgct ctggcctgctt gtcggatcc tggatgttgc ggtgggtccc 420  
 atccaattcc agattgtgag tttgtcttc tccgtgacc cggccgttt tcatttagtta 480

ttgtatactg attgctttt ct当地cacagc catttgtgtc gtcgggtggg atcgcatgga 540  
 cc当地cataccgt gtctctgacc aactcttccg aggaggagta aggttaaggta cggggtttct 600  
 cgttgcattg gatggtttac acttgatacc tatgtttacc tggcggccc ttggcttgg 660  
 aaatcttctt tgtggattct ttcttcttcc cttgtgtgc gtggggatg tttacgcgt 720  
 tttcaatgct gtttgggg gttctgttcc tcattgggttgg tgtccggctt gtcacagggt 780  
 actctcaaag gtttcttctgt taggtattca aaaggcgcac aaatgctgga ttttagatcat 840  
 caacccaagc ggaagagact attcaaagga gtctccattc gcagggatg ggaactgcca 900  
 ttctatgacg ctttcggag aaatttccag gatttcgta ggtcgagaca cccacagagg 960  
 cacatgttagg gaccgcggg gacgatgatc ctatgaatgc ccgtacgacg agaattccga 1020  
 agcggctgtt tccaattccc gc当地gagatc cgaggctatc gagaacgc当地 agggacaatg 1080  
 ttcacccctg agagcccgga cc当地ccgtc atcgatcgacg gtggactgac atcagttccg 1140  
 catcagcccg atgcgtcagc gaatctctca cc当地gacccc caccacac tgctgctacc 1200  
 cc当地ccgtgg gccgaagtta tcatatggc tcaccgtgaa cggattgagc atttttccct 1260  
 ccttcttcca attcacctca cc当地ctctcc tgc当地ggtac tgctccctat ttctatccct 1320  
 ctagacccct gtggatcgc tgacccgacg cc当地ctccctc cctctccaaac ttcttcacca 1380  
 tgtcttttag caacaagctt gccatcactg acgtcgaccc caaggacaag cgtgtttga 1440  
 tccgggtatg tcacctccaa tggctgtggt atgatcggtc aatgctaacc acgctcacct 1500  
 cccaggtcga cttcaacgac cctctcgatg acaacaagaa cgtcaccaac ccccaagcgta 1560  
 tcggtgggtgc tctccccacc atcaagtacg ctgtcgagaa tggc当地caag gccggtgtcc 1620  
 tcatgtccca cctcggcgtc cctgacggca agaagaaccc caagtacagc ctgaagcccg 1680  
 tcgtgcccgt cctggagaag ct当地atcgac aga 1713

〈210〉 68

〈211〉 1820

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉 扩增子\_3'pgkA\_土曲霉

〈400〉 68

cagatcatcc tc当地ggagaa cctgcgttcc cacgccc当地agg aggagggcag ctccaaaggac 60  
 gccc当地gggca agaaggtaaa ggccgacaag gccc当地gtcg aggagttccg caaggactg 120  
 accgctttg gtgacatcta catcagtaag tctatccc ctttggccca tggaccgtaa 180  
 ttgggttgc当地 cc当地actaactc gataccatcc agacgatgcc tttggaaccg cccaccgtgc 240  
 cc当地agctcc atggc当地ggcg tc当地acccccc tc当地aggct tccggctcc tggtaagaa 300  
 ggagcttgac tactc当地cca aggccc当地tca gaaccctct cgtccctcc tggccatcct 360  
 cggtggcgct aaggctccg acaagatcca gctgattgat aaccctcc ccaaggtaa 420  
 cagtctgatc atcaccggag ccatggccct taccttcaag aagaccctgg agaacgtcaa 480  
 gatcggcaag agtctttcg acgaggccgg cagcaagatc gtc当地ccgaga tc当地cgagaa 540  
 ggctaaagaag aacaacgtga agatcgtcct tc当地gtcgac tacgtcactg cc当地acaattt 600  
 cgctgccc当地 gccaagaccg gctacgctac cgtacccgac ggcatccctg acggcttcat 660

gggctctggat gtcggcgaga agagtgtcg a gctgtacaag cagactatcg ccgaggccaa 720  
 gacgatcctc tggAACGGCC cctgcggtgt cttcgagatg gagcccttc ccaacggcac 780  
 caagaagacc ctcgacaacg tcgttgcgc cgctcagtcc ggctccattt tcatacatcg 840  
 tggtggtgcac actgcttaccg tggccgcca gtacaacgcc gaggacaagc tcagccacgt 900  
 ctccactggc ggtgggtgcct ctctggagct tctggaggc aaggagctgc ctgggtgcac 960  
 tgctctgtca agtaagtaaa cttttacgac catgtaatgt gttggaggga cgagttgcag 1020  
 aatgagatcg tgcttgcctca tgtgtattgg gcgagccatg gctgcattcag gccgtgtttt 1080  
 ttttagcgtcc ctctccatcc cgctcgaggga tggcctttc tatgtatgtaa tgtacaggca 1140  
 ttaaaattaa tcaaaataag cgaaatgatt ttgtttctcg attcaagaag gtttctgatg 1200  
 aagtaatggc tactagtgc gggatctaaa ctgtgagatc agacgcttgc ctgtccatt 1260  
 gaaatggata ttcttattgc gtagagctc tcttatctt tctatcaaac aattgtttc 1320  
 ataggatgtc cgggagccat acaccgcag cgtccgtcac gatcatatat gcctggtaga 1380  
 tctggccaa ggaccccggt cgcttgcctca gtggctggg cgccgttccc ctgacgaac 1440  
 gaacggccat gacgatccca ggtgaacgca aggccggcg aactaccacc atagaacgga 1500  
 catgatgtcc taataaagaa gaatgttagca tcttgatgtat atagcttgc ttccatcatg 1560  
 gaaaaagagg gcaaaaatag ataattctt tcgttcgttc attcgcttc gggatattca 1620  
 gagtaccaca tgtccatccg tccatttagtgc agatgcctcg acctttcca gttcctctct 1680  
 gtagcacgaa gagaatatacg ttagtgc gtaggcgtca gaggagaag gggagcaacc 1740  
 gcactttagc tgttcgaaa agtcctccgc cgcatcgctc tcgtcccagc tctcctccca 1800  
 caggtgaaca ttctgtccgt 1820  
 <210> 69  
 <211> 1817  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 扩增子\_5'gsdA\_土曲霉  
 <400> 69  
 attggaagct ggctctatct caccctccct gacgaagacc tcagcagtgt acggtaact 60  
 ggagtttaagc tgtccgtctc cgccggacacc tgacgagctt agatagaggg tgggttggat 120  
 tatggaccac accccggccg cctttatatt tcttttctc ctttttgc gtcctggcct 180  
 tcgcctatca gaggagaatc ccactagatc ctaaactgac tggcgtaag attactagta 240  
 ccatgttagca tttggcgccgg ggcttaggagg tcagcatatc caagatgtgc ctctagagat 300  
 gcgtctccgg tccatgtacg gttccgggtc gagctcactg ggttgaattt tccagcggag 360  
 taggctcgga taaaactagt gttaagaagc agttgagcag aagggttcgg atgattgggg 420  
 acggtagtaa tacaaggtac aagcacccgc atcgggaagg atttccttcg tgcctctat 480  
 atccgagtgg gagggagttt gaacgggctg actgagtacc taggcaggcg tgagaggat 540  
 gatataatac cagtagctgt cgccacggcg gtggattcta gggagtaact actacgtaga 600  
 tgcgtaaaag gaaaaagaac tgataaaaga tgacagatta tctatctccg gaaaaaggc 660  
 gggcacccga ggctatagtt atactacgaa gcataaataa aataataaaa acacctaatt 720

aaatccaaca cgaagatatac ctaggttccc aaagcccaagt tgtatgtat ttctctccag 780  
 ttaggtttt tcttacccag gccaccggac ggggctcgcg gcaacaatcg acgccccacc 840  
 gtgtactgta atcgagagtc accctgcagc aactgcagct cctcgactgc tgctacgact 900  
 aagcagagtc cctctcacgg cgtaaaaaag tacttgctcc gccggaactg ttggggattt 960  
 ttccaacaaa cctttctct ttccctcgt actccctcgt ctcccttca ttccaagctt 1020  
 catttccctt ccttaacagt cggtgttca ttttggtgc ctgcacaaac tcccgccgt 1080  
 caccatgacc agcacaatag cccgcactga ggaacgccag aacgctgggt gagtctgac 1140  
 tgccggccgc gcctccctct ctgacatcac acccctcctc cgtccccctc tacgtcttc 1200  
 ttttcttccc acccgtctgc cacctgctcg atgccttcc tcaggacagt caatatcagt 1260  
 caattcgacc ccagattttc cacttccctt cggtgaatgc cccgagctct tccaatttgc 1320  
 ttttttagaaa ttgtcgagca gctctagttt tcaattcccc ctttccga tcgcgctggc 1380  
 aaatccctgt gatcgacatc atacagcttc ccctgctcag ccagtaacct tcgattcgct 1440  
 actaacatgg atgtctcgcg tagcaccatt gaactgaaag atgacacggc catcggtggc 1500  
 ctcggcgcct ccggagatct cgcaaaagaag aagacggtag gtgttctacc ctaaaaaggc 1560  
 ttggccggtg aagccgatcg gagactgact aggttccata gttccctgca ctgttggc 1620  
 ttgtaagtat acgatgacgg tccgagtaaa gtatcgctgc gtgggttggc attgaccatg 1680  
 cattttagtac cgtaacaaat tcctcccaa ggggatcaag atcgtcgat atgctcgac 1740  
 gaacatggac cacgaagaat atctgagacg ggtgcgctcg tacatcaaga ccccccaccaa 1800  
 ggaaatcgaa gaacagc 1817  
 <210> 70  
 <211> 1825  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 扩增子\_3'gsdA\_土曲霉  
 <400> 70  
 tcaacccac caagcaccc gaggacgtcg agaagggcca taaggaacag aacagagtct 60  
 tctacatggc gctgcctcct agcgtcttca ttaccgtgtc ggtcaattt aagagaaact 120  
 gctaccccaa gaacggcatt gcccgtatta ttgtgagtcg ccaacacaaa agctttgttt 180  
 ctaccgagggc atatgcttac gcgtttttc tttgtgtcta caggtcgaga agcccttcgg 240  
 caaggatctc cagagttctc gtgaccccca gaaggccctt gagcccaact ggaaggagga 300  
 ggagatctc cgtattgacc actacctggg taaggagatg gtcaagaaca ttctcatcat 360  
 gcgcttcgga aacgagttct tcaacgctac ctggaaaccgt caccacattt ataacgtgca 420  
 ggtatgatgtt gaatgttttc aggacgaccg gtgcagatgc taagctctt tcgcagatca 480  
 cattcaagga gccgttcgge acggaggggcc gtggaggtta ctttgcgttgc ttccggcatca 540  
 ttcgtatgtt catgcagaac cgtatgttca acaaaaaaaat gacccatggacg gctaattatgt 600  
 gcaagtgcata atgtccttat ctagacccctc tgcaggtgtt gacgcttctt gccatggagc 660  
 gtcccatctc tttctctgtt gaagacattc gtgtatggaa ggtatgttttgcgatccctt 720  
 atcccacccgg cggcaactaa cgtaagtgcac aggtgcgtgt tctgcgcgcg atggacccca 780

ttgagccaaa gaacgtcatc atcgccagt acggaaagtc gctcgacggt agcaagcccg 840  
 cctacaagga ggatgatact gtccctcaag actcgcgctg cccgactttc tgcgccatgg 900  
 ttgcgtacat caagaacgag agatggatg gcgttccctt catcatgaag gccggtaaag 960  
 gtatgtatcc tggatcttat ggcagcacgc cctggacttg gtgtactcac atcttcgaca 1020  
 gcccgtgaacg agcagaagac cgagatccgt atccagttcc gtgacgtcac ttccggcatc 1080  
 ttcaaggaca tcccccgcaa cgaacttgtt attcgcgtcc agccaaacga gtcgggtgtac 1140  
 attaagatga actccaagct gccgggtctc tccatgcaga cggtcgttac cgagcttgac 1200  
 cttacccattc gccggccgtt ctccgacctc aagatcccg aggcttacga gtctctgatt 1260  
 ctggatgctc tgaagggtga ccactcgaac tttgtccgtg acgatgaact tgactcgagc 1320  
 tggaagatct tcacccctct gctgcactac ctggacgaca acaaggagat catccccatg 1380  
 gaataccct acggtaagcg gcgaatgcgc catctgcgaa acaaataatt tcttttgagt 1440  
 tccagttactg acaatgttat caggctctcg cggacctgct gtgctcgacg acttcaccgc 1500  
 atcggttcggg tacaagttca gtgatgctgc tggctaccag tggccctga ctgcggcccc 1560  
 caacagactg taaatgaaaa atattatgtat cgtttaagca atgaaaaggaa aaagaaggaa 1620  
 aatgggttaa tgtgagcact accgggttcc atagcatgtat cggatggtcc tcgagggtgg 1680  
 gatggcacga tattggaga cgggtttcc agatcggcca tggtgacca gacgctcccc 1740  
 tgggtcccta gaaacgaatg aagtactgt tacgaatcaa acacgatgtat attgattccc 1800  
 tcttgcagtt gcgacggcgt gtttg 1825

〈210〉 71

〈211〉 1731

〈212〉 DNA

〈213〉 人工序列

〈220〉

〈223〉  $\alpha$ -法呢烯的基因

〈400〉 71

atggaattca gagtccactt acaagccgat aacgaacaaa agatattcca aaaccaaattg 60  
 aaaccagaac cagaagcctc ctacttaattt aatcaaagaa gatcagctaa ctacaagcca 120  
 aacatctgga agaacgattt ctggatcaa tcattgtatct ctaagtacga tggtgacgaa 180  
 tacagaaagt tatcagaaaa gttgatcgaa gaagttaaga tctatatttc tgctgaaact 240  
 atggattttgg ttgcaaggtt ggaatttgcattt gattctgtt gaaagttggg tttagctaat 300  
 ttgttcgaaa aggaaattaa agaagcattt gattcaatcg ctgcaatcgat atctgataat 360  
 ttgggtacta gagatgattt gtacggtaca gctttgcattt tcaagatttt gagacaacat 420  
 ggttacaaag ttccacaaga tatcttcggt agattcatgg atgaaaaggaa tactttggaa 480  
 aaccatcatt tcgctcattt gaagggcatg ttgaaattgt tcgaagcatc taattttgggt 540  
 ttgcgaaggta aagatatctt ggatgaagctt aaagcatcat tgacatttgc tttgagagat 600  
 tctggtcata tctgttaccc agattcaaattt ttgtcttagag atttgttca ttcatttagaa 660  
 ttgcgcatttc atagaagagt tcaatggttc gatgttaagt ggcaaattaa tgcttacgaa 720  
 aaggatatctt gtagagttaa cgctactttt gttgaaattgg caaagttgaa cttcaatgtt 780  
 gttcaagcac aattgcaaaa gaatttgaga gaagttctta gatggtggc aaattttgggt 840

atcgctgata atttgaagtt cgctagagat agattgggtg aatgtttgc ttgtgcagtt 900  
ggtgttgcata tcgaaccaga acattcttct tttagaatct gtttgacaaa agttattaaat 960  
ttggtttga ttattgatga tgtttatgat atctatggtt cagaagaaga attgaagcat 1020  
ttcactaatg ctgttgatag atgggattct agagaaacag aacaattgcc agaatgtatg 1080  
aagatgttt tccaagttt gtacaacact acatgtgaaa tcgcaagaga aatcgaagaa 1140  
gaaaatggtt ggaaccaagt tttgccacaa ttgactaagg tttggcaga ttttgtaaa 1200  
gctttgttgg ttgaagcaga atggtacaat aagtcacata tcccaacatt ggaagaatac 1260  
ttgagaaacg gttgtatctc ttcatctgtt tctgtttgt tggttcattc tttctttct 1320  
atcactcatg aaggtacaaa ggaaatggct gatttctgc ataagaacga agatttgg 1380  
tacaacatct cattaattgt tagattgaat aatgatttgg gtacttcagc tgcagaacaa 1440  
gaaagagggtg actctccatc atctatcggt tgttacatga gagaagttaa tgcttctgaa 1500  
gaaacagcaa gaaagaatat caaggatgt atcgataacg cttggaagaa agttaacggt 1560  
aatgtttca ctacaaacca agttccattt ttatcatctt ttatgaataa tgcaacaaat 1620  
atggcttagag ttgcacattc tttgtacaaa gatggtgacg gttttggta ccaagaaaaa 1680  
ggtccaagaa cccacatatt atcatttta ttccaaccat tagtaaactg a 1731

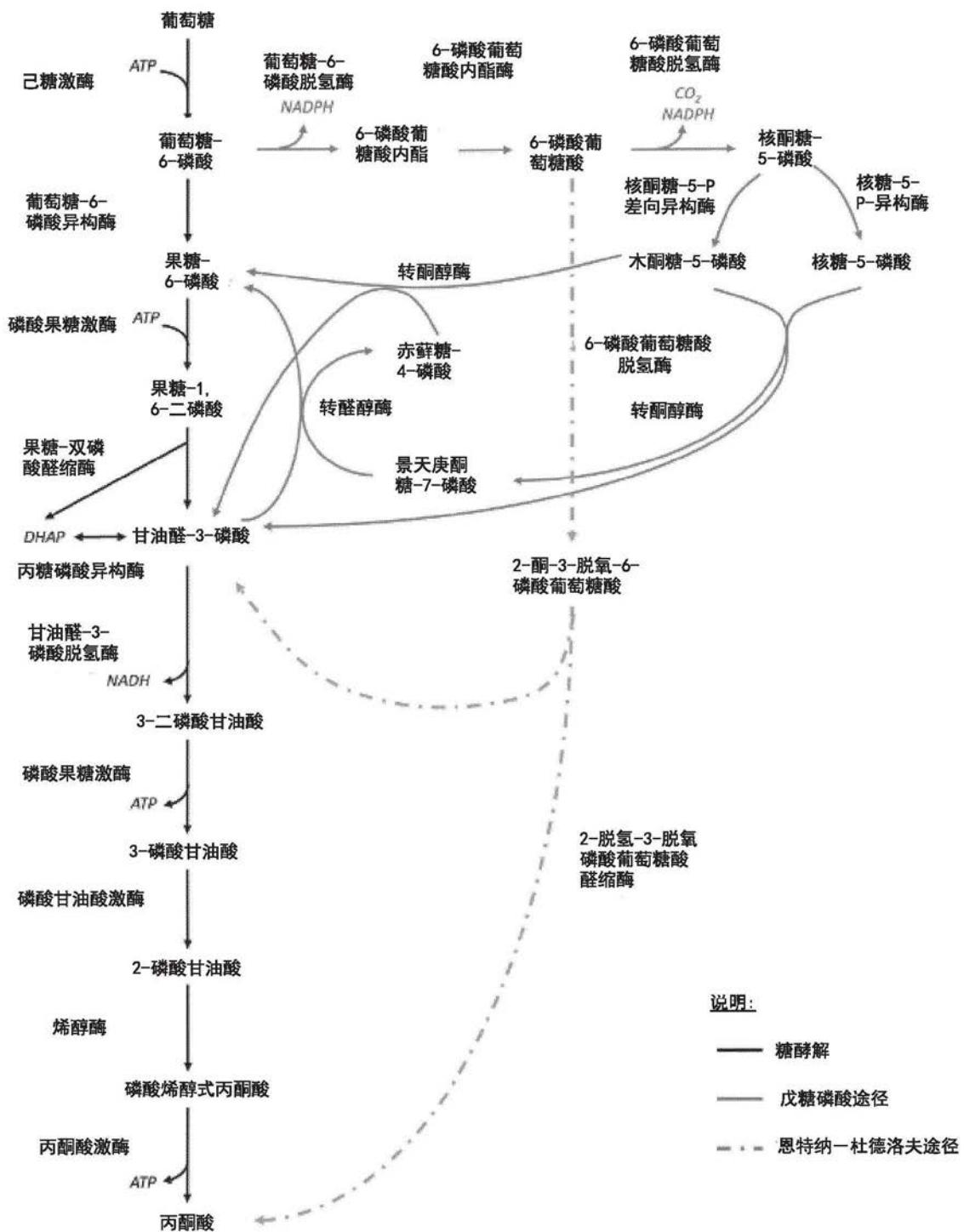


图1

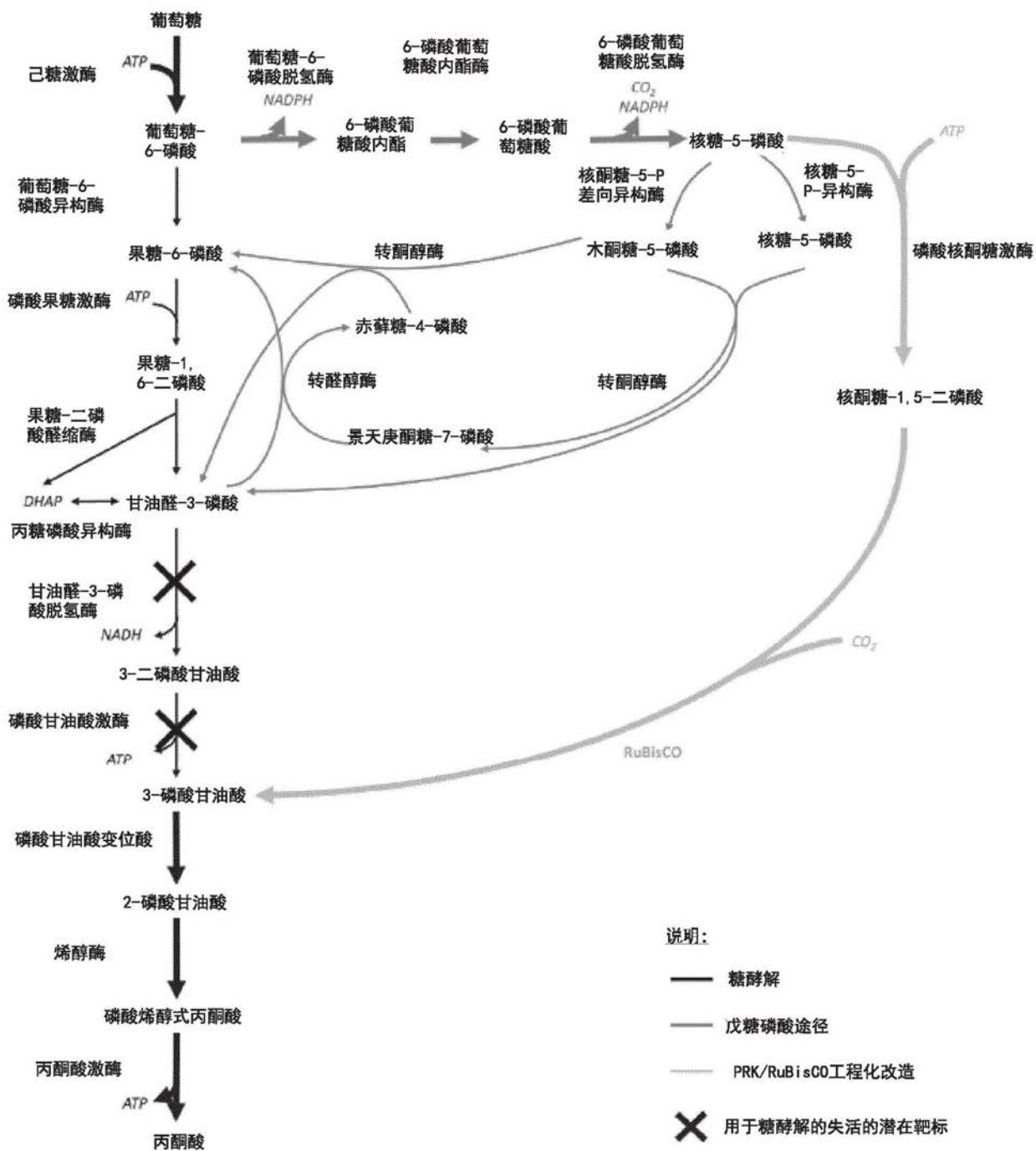


图2

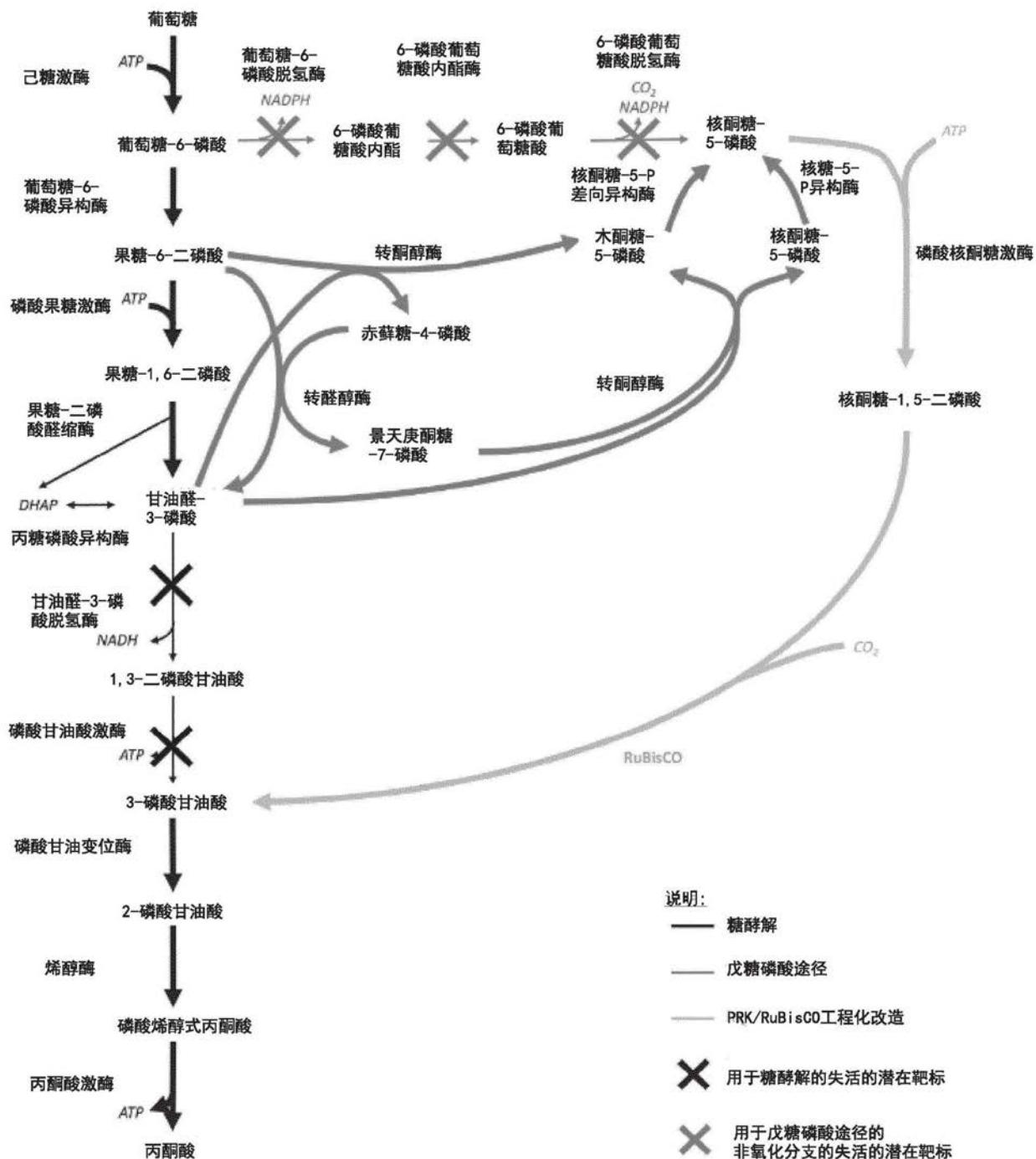


图3