



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101010433 B

(45) 授权公告日 2012.03.07

(21) 申请号 200580023690.1

(22) 申请日 2005.07.11

(30) 优先权数据

04077046.3 2004.07.15 EP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2007.01.15

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2005/007606 2005.07.11

(87) PCT申请的公布数据

W02006/005603 EN 2006.01.19

(73) 专利权人 帝斯曼知识产权资产管理有限公司
司

地址 荷兰海牙

(72) 发明人 卡特林·艾浦勒玛恩

彼得吕斯·马蒂纳斯·马特乌斯·诺
斯恩

利昂·让·河尼·马莉亚·哈伊文

苏珊·玛丽亚·克里玛

马塞尔·格哈杜斯·乌博尔特斯

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

代理人 李剑

(51) Int. Cl.

C12P 13/00 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 9/10 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 0111062 A, 2001.02.15, 全文.

EP 0726240 A, 1996.08.14, 全文.

陈盛等. 滴定法测定鼠伤寒沙门氏菌鸟氨酸
脱羧酶的活性. 福建师范大学学报(自然科学
版) 第2期. 1987, (第2期), 66-69.

审查员 贾涛

权利要求书 3 页 说明书 15 页

序列表 5 页

(54) 发明名称

1,4-丁二胺的生物化学合成

(57) 摘要

本发明涉及一种方法,用于对 1,4-丁二胺进行生物化学合成,这是在下述微生物中进行的,所述微生物具有较之鸟氨酸脱羧酶活性的天然水平来说增加的鸟氨酸脱羧酶活性(增加的 ODC 活性)水平,其中,所述微生物中还存在较之所述微生物中 N-乙酰谷氨酸盐/酯形成活性的天然水平来说增加的 N-乙酰谷氨酸盐/酯形成活性,并且其中,微生物中产生的 1,4-丁二胺被排出到发酵培养液中,从发酵培养液中对其进行回收。本发明还涉及携带有相应增加的 ODC 活性以及增加的 N-乙酰谷氨酸盐/酯形成活性的载体、质粒和宿主。

1. 用于对 1,4- 丁二胺进行生物化学合成的方法,所述生物化学合成在下述微生物中进行,所述微生物具有较之鸟氨酸脱羧酶活性的天然水平来说增加的鸟氨酸脱羧酶活性水平,

其特征在于,

所述微生物中还存在较之所述微生物中 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性的天然水平来说增加的 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性,并且,所述微生物中产生的 1,4- 丁二胺被排出到发酵培养液中,从所述发酵培养液中对所述 1,4- 丁二胺进行回收,

并且,其中,所述增加的鸟氨酸脱羧酶活性是通过过量表达鸟氨酸脱羧酶编码基因 speF 或 speC 来获得的,所述增加的 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性是通过 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶编码基因 argA 和 / 或 N²- 乙酰基 -L- 鸟氨酸 :L- 谷氨酸盐 / 酯 N- 乙酰基转移酶编码基因 argJ 的过量表达来获得的。

2. 如权利要求 1 所述的方法,

其中,所述增加的鸟氨酸脱羧酶活性是通过过量表达下述鸟氨酸脱羧酶编码基因 speF 或 speC 来获得的,所述基因 speF 或 speC 来自选自埃希氏菌属 (*Escherichia*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、耶尔森氏菌属 (*Yersinia*) 和希瓦氏菌 (*Shewanella*) 构成的组的属之一。

3. 如权利要求 2 所述的方法,

其中,所述鸟氨酸脱羧酶编码基因来自选自大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、弗氏志贺氏菌 (*Shigella flexneri*)、*Salmonella typhimutium*、鼠疫耶尔森氏菌 (*Yersinia pestis*) 和 *Shewanella oneidensis* 构成的组的种之一。

4. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的方法,

其中,所述鸟氨酸脱羧酶编码基因是来自选自大肠杆菌、*Salmonella typhimutium* 和 *Shewanella oneidensis* 构成的组的种之一的 speF。

5. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的方法,

其中,所述增加的 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性是通过 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶编码基因 argA 和 / 或 N²- 乙酰基 -L- 鸟氨酸 :L- 谷氨酸盐 / 酯 N- 乙酰基转移酶编码基因 argJ 的过量表达来获得的。

6. 如权利要求 5 所述的方法,

其中,所述增加的 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性是通过过量表达下述 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶编码基因 argA 来获得的,所述基因 argA 来自选自埃希氏菌属、志贺氏菌属、沙门氏菌属、耶尔森氏菌属、发光杆菌属 (*Photobacterium*) 和 *Buchnera* 构成的组的属之一。

7. 如权利要求 6 所述的方法,

其中,所述增加的 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性是通过过量表达下述 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶编码基因 argA 来获得的,所述基因 argA 来自选自大肠杆菌、弗氏志贺氏菌、肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*)、鼠疫耶尔森氏菌、*Photobacterium luminescens* 和 *Buchnera aphidicola* 构成的组的种之一。

8. 如权利要求 5 所述的方法,

其中,所述增加的 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性是通过过量表达下述 N²- 乙酰基 -L- 鸟氨酸 :L- 谷氨酸盐 / 酯 N- 乙酰基转移酶编码基因 argJ 来获得的,所述基因 argJ

来自选自芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、李斯特菌属 (*Listeria*)、*Oceanobacillus*、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、分支杆菌属 (*Mycobacterium*)、*Thermobifida*、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*) 构成的组的属之一。

9. 如权利要求 8 所述的方法,

其中,所述增加的 N-乙酰谷氨酸盐/酯形成活性是通过过量表达下述 N²-乙酰基-L-鸟氨酸:L-谷氨酸盐/酯 N-乙酰基转移酶的编码基因来获得的,所述基因来自选自蜡状芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、单核增生性李斯特菌 (*Listeria monocytogenes*)、*Oceanobacillus iheyensis*、表皮葡萄球菌 (*Staphylococcus epidermis*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、乳酸乳杆菌 (*Lactobacillus lactis*)、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、麻风分支杆菌 (*Mycobacterium leprae*)、*Thermobifidafusca*、*Streptomyces coelicor* 和长双歧杆菌 (*Bifidobacterium longum*) 构成的组的种之一。

10. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的方法,

其中,还对于至少两种其它的酶获得增加的酶活性,这是通过过量表达下述酶来获得:

(i) 精氨酸脱羧酶编码基因 *speA* 和胍基丁胺酶编码基因 *speB*;或

(ii) 精氨酸脱羧酶编码基因 *speA* 和胍基丁胺亚氨基水解酶编码基因 *aguA* 以及 N-氨基甲酰腐胺酰胺水解酶编码基因 *aguB*,以及可选地,还有胍基丁胺酶编码基因 *speB*。

11. 如权利要求 10 所述的方法,

其中,所述过量表达的精氨酸脱羧酶编码基因是来自选自埃希氏菌属、志贺氏菌属、沙门氏菌属、耶尔森氏菌属、巴氏杆菌属 (*Pasteurella*) 和奈瑟菌属 (*Neisseria*) 构成的组的属之一的精氨酸脱羧酶基因 *speA*。

12. 如权利要求 11 所述的方法,

其中,所述过量表达的精氨酸脱羧酶编码基因是来自选自大肠杆菌、弗氏志贺氏菌、肠道沙门氏菌、鼠疫耶尔森氏菌、多杀性巴氏杆菌 (*Pasteurella multocida*) 和脑膜炎奈瑟氏球菌 (*Neisseria meningitidis*) 构成的组的种之一的精氨酸脱羧酶基因 *speA*。

13. 如权利要求 10 所述的方法,

其中,所述过量表达的胍基丁胺酶编码基因是来自选自埃希氏菌属、沙门氏菌属、变形杆菌属 (*Proteus*)、发光杆菌属、弧菌属 (*Vibrio*) 和奈瑟菌属构成的组的属之一的胍基丁胺酶基因 *speB*。

14. 如权利要求 13 所述的方法,

其中,所述过量表达的胍基丁胺酶编码基因是来自选自大肠杆菌、肠道沙门氏菌、奇异变形杆菌 (*Proteus mirabilis*)、*Photobacterium luminescens*、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) 和脑膜炎奈瑟氏球菌构成的组的种之一的胍基丁胺酶基因 *speB*。

15. 如权利要求 10 所述的方法,

其中,所述过量表达的胍基丁胺亚氨基水解酶编码基因和/或所述过量表达的 N-氨基甲酰腐胺酰胺水解酶编码基因是来自选自假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、链霉菌属、固氮菌属 (*Azotobacter*)、拟南芥属 (*Arabidopsis*)、新鞘脂

菌属 (*Novosphingobium*) 和芽孢杆菌属构成的组的属之一的胍基丁胺亚氨基水解酶基因 *aguA* 和 / 或 N- 氨基甲酰腐胺酰胺水解酶基因 *aguB*。

16. 如权利要求 15 所述的方法,

其中,

所述过量表达的胍基丁胺亚氨基水解酶编码基因和 / 或所述过量表达的 N- 氨基甲酰腐胺酰胺水解酶编码基因是来自选自铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、变形链球菌 (*Streptococcus mutans*)、阿维链霉菌 (*Streptomyces avermitilis*)、好气性固氮菌 (*Azotobacter vinelandii*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、*Novosphingobium aromaticivorans* 和蜡状芽孢杆菌构成的组的种之一的胍基丁胺亚氨基水解酶基因 *aguA* 和 / 或 N- 氨基甲酰腐胺酰胺水解酶基因 *aguB*。

17. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的方法,

其中,所述方法在选自酵母属的物种 (*Saccharomyces* sp.)、芽孢杆菌属的物种 (*Bacillus* sp.)、棒状杆菌属的物种 (*Corynebacterium* sp.)、埃希氏菌属的物种 (*Escherichia* sp.) 和毕赤酵母属的物种 (*Pichia* sp.) 构成的组的宿主生物中进行。

18. 如权利要求 1 至 3 中任意一项所述的方法,

其中,所述方法在选自啤酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、棒状杆菌属的物种和埃希氏菌属的物种构成的组的宿主生物中进行,并且,除增加的鸟氨酸脱羧酶活性和 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性水平之外,至少精氨酸脱羧酶连同胍基丁胺酶和 / 或胍基丁胺亚氨基水解酶以及 N- 氨基甲酰腐胺酰胺水解酶的活性水平也增加了,其中,所述增加的精氨酸脱羧酶是通过过量表达精氨酸脱羧酶编码基因 *speA* 来获得的,所述增加的胍基丁胺酶是通过过量表达胍基丁胺酶编码基因 *speB* 来获得的,所述增加的胍基丁胺亚氨基水解酶是通过过量表达胍基丁胺亚氨基水解酶编码基因 *aguA* 来获得的,所述增加的 N- 氨基甲酰腐胺酰胺水解酶是通过过量表达 N- 氨基甲酰腐胺酰胺水解酶编码基因 *aguB* 来获得的。

19. 微生物,所述微生物携带有如权利要求 1 至 4 中任意一项所述的、较之鸟氨酸脱羧酶的天然活性水平而言增加的鸟氨酸脱羧酶活性水平,以及如权利要求 1 和 5-9 中的任意一项所述的、较之 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯形成的天然活性水平而言增加的 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性水平,并且,其中,所述增加的鸟氨酸脱羧酶活性是通过过量表达鸟氨酸脱羧酶编码基因 *speF* 或 *speC* 来获得的,所述增加的 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性是通过 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶编码基因 *argA* 和 / 或 N²- 乙酰基 -L- 鸟氨酸 :L- 谷氨酸盐 / 酯 N- 乙酰基转移酶编码基因 *argJ* 的过量表达来获得的。

20. 如权利要求 19 所述的微生物,还携带有权利要求 10 至 18 中任意一项所述的其它酶活性中一种或多种的增加的活性水平。

1,4- 丁二胺的生物化学合成

[0001] 本发明涉及一种新的方法,用于对 1,4- 丁二胺 (CAS 编号 110-60-1 ;也被称为四亚甲基二胺的化合物 ;在生物化学文献中还被称为腐胺) 进行生物化学合成,所述生物化学合成是在下述微生物中进行的,所述微生物具有较之鸟氨酸脱羧酶活性的天然水平来说增加的鸟氨酸脱羧酶活性水平。鸟氨酸脱羧酶在下文中还将被称为“ODC”。通常,具有 ODC 活性的微生物已知能生产多胺,例如亚精胺和精胺,这分别是产品 N-(3- 氨基丙基)-1,4- 丁二胺和 N,N'- 二-(3- 氨基丙基)-1,4- 丁二胺的俗名。此类化合物,以及多种短的线性二胺自身,例如 1,4- 丁二胺和 1,5- 戊二胺(也被称为尸胺)通常在生物化学研究中被称为多胺,即使从严格化学定义多胺的角度来说,被预期有更高数量的氨基。但是,就本专利申请的的目的而言,术语多胺按照其生物化学含义来使用,因此其包括 1,4- 丁二胺。

[0002] 化合物 1,4- 丁二胺是生产一些主要工程塑料(聚酰胺-4,6,均聚物或共聚形式的,例如,与大约 5wt. %的聚酰胺-6 单体(己内酰胺)共聚)的重要原材料。均聚物聚酰胺-4,6(尼龙-4,6)早在 1938 年就被描述过了(US-A-2,130,948, Carothers)。这是单体 1,4- 丁二胺和己二酸的缩聚产物。目前,尤其是聚酰胺-4,6 的化合物是荷兰 DSM 以 STANYL®的商品名生产销售的。

[0003] 为合成 1,4- 丁二胺,已知大量化学途径。所有这些化学途径有如下缺点:起始材料不得不从被认为是不可更新的来源获得。但是人们非常需要提供新的可行途径,用于从可更新碳源以及使用活细胞内的生物化学方法(也被称为“生物转化”)来合成 1,4- 丁二胺。通常,多胺被认为对于生物化学生产中使用的任何细胞或微生物来说都是有毒的。因此,直到现在,人们仍相信此类通过生物化学合成的新途径是没有吸引力的。

[0004] 这可例如从下述参考文献中看到:Fukuchi et al., J. Biol. Chem., Vol. 270 (1995), pages 18831-18835 和 Suzuki et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 91 (1994), pages 8930-8934。

[0005] Fukuchi 清楚地描述了由于在亚精胺乙酰转移酶缺陷型 E. coli 细胞中(即,在缺乏乙酰转移酶 SpeG 的细胞中)亚精胺的积累导致的细胞存活率(以及对几乎所有种类蛋白质的合成)降低。应当注意到,Limsuwumet al. (J. Bacteriol. Vol. 182 (2000), pages 5373-5380) 已经显示,低温下,此类问题可通过专用的基因 speG 的过量表达来克服。亚精胺是细胞中从 1,4- 丁二胺生产的作为中间产物的产品。因此,对 1,4- 丁二胺生物合成不可避免也会导致亚精胺的产生。

[0006] Suzuki 一方面也展示了(在小鼠细胞中)ODC 的过量表达导致多胺尤其是亚精胺的积累,并且,加入少量亚精胺,甚至在非 speG 缺陷型的细胞中也已观察到了细胞死亡。Suzuki et al. 表示,该降低的细胞存活率是由于抗酶对 ODC 不足够的反馈抑制导致的,其可以通过合适的抗酶的过量生产来克服。对抗酶的此类过量生产还将减少细胞中多胺的产生,因此对于 DAB 生产来说是不可行的。

[0007] 此外,如 Kashiwagi et al. 在 J. Bacteriol. Vol. 170 (1988), pages 3131-3135 中所述,可通过鸟氨酸脱羧酶 (ODC) 编码基因(特别是组成型表达的 speC) 的过量表达来调节 E. coli 中多胺的含量。为进行他们的实验,由 Boyle et al. (Methods in Enzymology,

Vol. 94(1983), pages 117-121 生产的质粒 pODC 被用于克隆。明显地,鸟氨酸脱羧酶的上述过量生产不会导致细胞中 1,4- 丁二胺含量水平的大幅增加。70 倍水平的 ODC 下,如果不考虑加入到细胞中的鸟氨酸的量,观察到细胞中 1,4- 丁二胺含量的增加不超过 20%。但是另一方面,存在鸟氨酸的情况下培养的细胞显示出增加的 1,4- 丁二胺分泌。在 70 倍 ODC 水平下,发现了总共大约 8.5 倍高的 1,4- 丁二胺生产(产生的 1,4- 丁二胺的滴定浓度为大约 20-25mg/l,这是内外浓度的总和,即,非常低的浓度)。作者暗示,此类相当低的 1,4- 丁二胺生产效率可能是由于鸟氨酸的积累,他们尝试通过外界进料鸟氨酸来解决此问题,但是,仅获得了略微的改进。因此,看起来不可能提供能以显著高于 30mg/l 的水平生产 1,4- 丁二胺的生物化学合成方法。

[0008] 此外,上述研究不涉及对多胺(包括 1,4- 丁二胺)的合成,而是尝试获得分子水平上多胺生理功能的更多内容。细胞中存在更高水平的鸟氨酸时,还很可能会存在更多的精氨酸。根据 Kashiwagi 的教导,精氨酸的上述更高的量将对 1,4- 丁二胺的形成产生高度不利的影响。

[0009] EP-A-0726240 直到目前仍是涉及对多胺(包括 1,4- 丁二胺)进行生物化学合成的非常稀少的专利文献之一。但是,其除了其它方面之外,描述的是通过对含有蛋白质作为主要组分的天然产品进行发酵来生产 1,4- 丁二胺。在所述方法中,首先通过将其部分或完全降解来处理天然产品,然后在发酵步骤之前除去任何不想要的化合物(例如, Hg、Cr、As、Cd、Se 和 Pb)、细胞生长抑制剂、杀虫剂、抗生素、去垢剂、皂、脂肪、油、氰化物和苯酚。此类途径产生的腐胺和其它二胺被(再)利用作为肥料,但是含有不适合作为生产例如聚酰胺-4,6 的原材料的上述大量其它物质。

[0010] 因此,人们仍需要高效的替代性生物合成途径,用于以显著高于大约 30mg/l 的滴定浓度来合成 1,4- 丁二胺,优选地,不需要外界进料(昂贵的)鸟氨酸。对 1,4- 丁二胺的提纯的可获得性的需要主要基于其作为起始材料的期望用途,例如用于生产聚酰胺-4,6。通常,至今已知的获得 1,4- 丁二胺的途径都相当麻烦费力,而且可能导致所述产品的质量(未经进一步纯化的情况下)难以用于生产尼龙。已知获得 1,4- 丁二胺的化学途径需要相对昂贵的起始材料和反应物(包括难以操作的反应物)以及多步骤和多反应器设计中关于温度和压力的相对严格的反应条件,以及要用到昂贵的催化剂体系。因此,人们仍需要替代性的获得 1,4- 丁二胺的途径,优选从廉价得多的原材料来进行,并且要避免操作(例如氢氰酸)的反应物的问题。已知天然生长的(因此可更新的)、来源于农业生产的材料是可用于发酵中的碳源例如葡萄糖(或其它合适碳源及其混合物)的基础。此类可更新的材料相对廉价并且资源丰富。通常,如果可更新材料可被用作针对所有种类的化学材料的起始材料,这会被认为是非常有利的。

[0011] 因此,本发明的一个目的是提供用于通过生物转化大规模工业生产 1,4- 丁二胺的改进可能性。

[0012] 本发明的发明人令人吃惊地发现,该目的可用于生物化学合成 1,4- 丁二胺的新方法来获得,所述生物合成在微生物中进行,所述微生物具有较之鸟氨酸脱羧酶活性的天然水平来说增加的鸟氨酸脱羧酶活性水平(增加的 ODC 活性),其中,所述微生物中还存在较之所述微生物中 N- 乙酰谷氨酸盐/酯形成活性的天然水平来说增加的 N- 乙酰谷氨酸盐/酯形成活性,并且其中,在此类微生物中产生的 1,4- 丁二胺被排出到发酵培养液中,从

发酵培养液中对其进行回收。

[0013] 本专利申请中,术语“生物化学合成”(在本专利申请上下文中,该术语或者可称为“生物转化”)不仅包括:除大量纯粹的化学反应步骤之外,还包括使用合适的生产菌株的全细胞进行的一种或多种生物催化反应的反应,而且还包括使用合适的生产菌株的全细胞进行的纯粹的生物化学方法。此类纯粹的生物化学方法,在生物化学合成起始自合适的碳源的情况下被称为发酵,在生物合成起始自己具有由其可获得待合成目标分子的碳骨架的中间产物的情况下被称为前体发酵。该方法可在需氧或厌氧条件下进行。

[0014] 本发明生物化学合成中的生物催化反应可在体内或体外进行。通常,体内方法是用活细胞进行的方法(术语“活细胞”由此包括所谓的静止细胞);另一方面,在体外方法中,通常是使用细胞裂解物或(部分)纯化的酶进行的。根据本发明的生物化学合成在微生物中进行。这可以用合适的生产菌株的全细胞来进行,也可以用透过的(permabilized)细胞来进行;但是体内和体外之间的差异对于可用透过的细胞或固定的宿主细胞进行的方法来说不会有多大意义。但是,明显地,本发明方法的各个生物催化步骤,例如用固定的酶来进行时,被认为与本申请上下文中生物化学合成中的此类步骤等同。

[0015] 鸟氨酸脱羧酶(即,具有鸟氨酸脱羧基活性的酶,或ODCs)是分类进E. C. 4. 1. 1. 17类的酶。可容易地在标准条件(存在鸟氨酸和PLP的情况下,37℃)下、不含细胞的提取物中、使用Sigma Diagnostics 二氧化碳检测试剂盒(Sigma),对如果过量生产的鸟氨酸脱羧酶的活性水平与鸟氨酸脱羧酶的天然(非过量生产的)水平加以比较;试验描述于Osterman, A. L. et al. 1994, Biochemistry 33, p. 13662-13667中。因此,技术人员能通过测定蛋白含量或通过测定RNA水平容易地判断:所用的ODC较之所用的微生物中鸟氨酸脱羧酶的天然水平是否具有增加的鸟氨酸脱羧酶活性水平(增加的ODC活性)。用于测定蛋白含量的多种标准流程,例如比色法或分光光度法在Lottspeich and Zorbas, Bioanalytik, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg/Berlin, ISBN3-8274-0041-4(1998), Chapters 3, 5, 21, 22 and 24中有所描述。用于测定蛋白水平以及RNA水平的方法,例如Northern杂交、RT-PCR和很多其它技术,描述于J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, Molecular Cloning, A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, ISBN0-87969-309-6(1989)中。但是,很多其它标准流程对于该分析领域的技术人员来说是已知的,无须在此提到。

[0016] 可用于本发明方法的合适的鸟氨酸脱羧酶是能对鸟氨酸进行脱羧的所有酶及其突变体。任何此类酶可以以增加的活性水平用于本发明的方法中,即,以过量产生的形式用于本发明的方法。此类增加的活性水平可通过技术人员已知的任何方法来获得,例如通过增加基因拷贝数,或者通过突变增加酶的内源活性或结构,或者使用被去调节的酶来获得。但是,最优选地,其还可以通过过量表达具有增加的转录和/或翻译效率的鸟氨酸脱羧酶基因来获得。此外还应注意,在本文中,针对任何具体命名的酶活性的术语“增加的活性水平”,还包括下述情况:其中,此类酶活性(例如鸟氨酸脱羧酶)的活性在反应于其中发生的微生物的天然来源中根本不存在,但是通过遗传修饰有目的地引入该微生物中。

[0017] 在根据本发明的方法中,需存在较之微生物中N-乙酰谷氨酸盐/酯形成活性的天然水平来说增加的N-乙酰谷氨酸盐/酯形成活性(下文中讨论到涉及从属权利要求的部分时会进一步定义)的水平。对N-乙酰谷氨酸盐/酯形成的增加的和天然的活性水平的

比较可以容易地进行,这类似于针对 ODCs 的测定,其中采用适当的检验反应,在标准条件下(在 Abadjieva, A., 2001, J. Biol. Chem., 276, p. 42869-42880 中所述的检验),于不含细胞的提取物中,通过放射检验来进行,其中使用 L-[¹⁴C] 谷氨酸盐/酯和乙酰辅酶 A 作为底物。

[0018] 根据本发明,1,4-丁二胺是在具有增加的 ODC 和 N-乙酰谷氨酸盐/酯形成活性的微生物中通过生物转化产生的,并被排出到微生物周围的发酵培养基中。因此,1,4-丁二胺被排出到发酵培养基中,并从中对其进行回收。

[0019] 因此根据本发明,提供了用于合成 1,4-丁二胺的改进生物化学方法,得到的 1,4-丁二胺非常适合用作为原材料,例如,用于生产聚酰胺-4,6。

[0020] 根据本发明 1,4-丁二胺以高产量产生是非常令人吃惊的,因为在不采取任何额外手段以避免多胺形成对细胞存活率的不利影响的情况下,增加的 ODC 活性(以及与增加的 N-乙酰谷氨酸盐/酯形成活性一起)被预期将导致细胞死亡。

[0021] 如上所述,任何 ODC 酶可以以增加的活性水平,即过量生产的形式用于本发明的方法。

[0022] 根据本发明,具有与来自 E. coli 对照酶的 ODC 足够的相同性,即至少 30%,更优选至少 45%,最优选至少 65% 的相同性,并能催化鸟氨酸脱羧反应的所有鸟氨酸脱羧酶都可使用。很多 ODC 已知与 E. coli 对照酶具有上述相对高水平的相同性。

[0023] 测定与对照酶的相同性百分比可通过技术人员已知的方法来进行,例如通过用对照酶的蛋白序列作为“查询序列”以针对公众数据库进行搜索来进行,例如,鉴定出其它家族成员或相关序列。此类搜索可使用 BLAST 程序(2.2 版),采用分别的程序的缺省参数来进行。见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。

[0024] 优选地,增加的 ODC 活性是通过过量表达下述鸟氨酸脱羧酶编码基因 speF 或 speC(每种属于 E. C. 4.1.1.17)来获得的,所述基因 speF 或 speC 来自选自 Escherichia、Shigella、Salmonella、Yersinia 和 Shewanella 构成的组的属之一。鸟氨酸脱羧酶 speF 是诱导型鸟氨酸脱羧酶;鸟氨酸脱羧酶 speC 是组成型鸟氨酸脱羧酶。

[0025] 更优选地,鸟氨酸脱羧酶编码基因是来自选自 Escherichia coli、Shigella flexneri、Salmonella typhimutium、Yersinia pestis 和 Shewanella oneidensis 构成的组的种之一的鸟氨酸脱羧酶基因。迄今为止,在文献中对 SpeC 的研究比对 SpeF 的研究要多得多。然而,最令人吃惊地,也是最优选地,根据本发明的最佳结果是鸟氨酸脱羧酶基因是 speF 的时候获得的,更具体地,来自选自 Escherichia coli、Salmonella typhimutium 和 Shewanella oneidensis 构成的组的种之一的 speF。当与用组成型鸟氨酸脱羧酶编码基因 speC 的过量表达获得的结果相比较时,迄今为止根据本发明的最佳结果事实上是使用 speF 的时候获得的。

[0026] 在本发明的上下文中,与编码上述鸟氨酸脱羧酶的任何基因同源,并且编码具有足以与所示鸟氨酸脱羧酶相当的鸟氨酸脱羧酶活性的酶的任何基因适用于本发明的方法。适合地,此类等同基因可通过技术人员已知的任何合适的克隆策略来获得,例如,通过本文实验部分描述的方法来获得。或者,此类等同鸟氨酸脱羧酶基因还可通过有目的的构建来获得。

[0027] 术语 N-乙酰谷氨酸盐/酯形成活性在本专利申请的上下文中代表能导致 N-乙酰

谷氨酸盐 / 酯细胞内形成的任何酶活,无论是由单种酶还是酶的组合导致的。

[0028] 根据本发明,具体地,具有与来自 *E. coli* 对照酶的 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶足够的相同性,即至少 30%,更优选至少 45%,进一步更优选至少 60%,最优选至少 75% 的相同性,并能催化 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯形成反应的所有 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶都可使用。很多 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶已知与 *E. coli* 对照酶具有上述相对高水平的相同性。

[0029] 优选地,增加的 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性是通过 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶编码基因 *argA* (属于 *E. C. 2. 3. 1. 1*) 和 / 或 N^2 -乙酰基-L-鸟氨酸:L-谷氨酸盐 / 酯 N-乙酰基转移酶编码基因 *argJ* (属于 *E. C. 2. 3. 1. 35*) 的过量表达来获得的。明显地,编码与上述酶之一具有相同功能性的酶或其突变体的任何基因将被认为与 *E. C. 2. 3. 1. 1* 或 *2. 3. 1. 35* 类之一的上述酶等同。

[0030] 在本发明的一种优选实施方式中,增加的 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性是通过过量表达下述 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶编码基因 *argA* (属于 *E. C. 2. 3. 1. 1*) 来获得的,所述基因来自选自 *Escherichia*、*Shigella*、*Salmonella*、*Yersinia*、*Photobacterium* 和 *Buchnera* 构成的组的属之一。这些 *ArgA* 酶需要辅酶 A 的存在 (或提供),以在其的 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯形成中具有活性。

[0031] 在该实施方式中,增加的 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性是通过过量表达下述 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶编码基因 *argA* 来获得的,所述基因来自选自 *Escherichia coli*、*Shigella flexneri*、*Salmonella enterica*、*Yersinia pestis*、*Photobacterium luminescens* 和 *Buchnera aphidicola* 构成的组的种之一。

[0032] 在本发明的又一种优选的实施方式中,增加的 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性是通过过量表达下述 N^2 -乙酰基-L-鸟氨酸:L-谷氨酸盐 / 酯 N-乙酰基转移酶编码基因 *argJ* (属于 *E. C. 2. 3. 1. 35*) 来获得的,所述基因来自选自 *Bacillus*、*Listeria*、*Oceanobacillus*、*Staphylococcus*、*Lactobacillus*、*Corynebacterium*、*Mycobacterium*、*Thermobifida*、*Streptomyces* 和 *Bifidobacterium* 构成的组的属之一。

[0033] 可用于本发明方法的合适的 N^2 -乙酰基-L-鸟氨酸:L-谷氨酸盐 / 酯 N-乙酰基转移酶是与来自 *Bacillus* 对照种的 N^2 -乙酰基-L-鸟氨酸:L-谷氨酸盐 / 酯 N-乙酰基转移酶具有足够的相同性,即至少 20%,更优选至少 30%,最优选至少 40% 的相同性,并能催化 N^2 -乙酰基-L-鸟氨酸:L-谷氨酸盐 / 酯 N-乙酰基转移反应的 N^2 -乙酰基-L-鸟氨酸:L-谷氨酸盐 / 酯 N-乙酰基转移酶。很多 N^2 -乙酰基-L-鸟氨酸:L-谷氨酸盐 / 酯 N-乙酰基转移酶已知与 *Bacillus* 对照酶具有上述水平的相同性。

[0034] 与 *ArgA* 酶相反,*ArgJ* 酶不需要辅酶 A 的存在 (或提供) 以在其的 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯形成中具有活性。因此,这些 *ArgJ* 酶在用于工业应用中时明显优于 *ArgA* 酶。

[0035] 在本发明的该又一种实施方式中,增加的 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性是通过过量表达下述 N^2 -乙酰基-L-鸟氨酸:L-谷氨酸盐 / 酯 N-乙酰基转移酶的编码基因 *argJ* 来获得的,所述基因来自选自 *Bacillus cereus*、*Listeria monocytogenes*、*Oceanobacillus iheyensis*、*Staphylococcus epidermis*、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus lactis*、*Corynebacterium glutamicum*、*Mycobacterium leprae*、*Thermobifida fusca*、*Streptomyces coelicolor* 和 *Bifidobacterium longum* 构成的组的种之一。

[0036] 在本发明的上下文中,与编码上述 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性的任何基因同

源,并且编码具有足以与所示 N-乙酰谷氨酸盐/酯形成活性相当的 N-乙酰谷氨酸盐/酯形成活性的酶的任何基因适用于本发明的方法。适合地,此类等同基因可通过技术人员已知的任何合适的克隆策略来获得,例如,通过本文实验部分描述的方法来获得。或者,此类等同 N-乙酰谷氨酸盐/酯形成基因还可通过有目的的构建来获得。

[0037] 在本发明的另一种优选的实施方式中,用于生物化学合成 1,4-丁二胺的方法在下述微生物中进行,其中,此外,对于至少两种其它的酶也获得增加的酶活性,这是通过过量表达下述酶来获得:

[0038] (i) 精氨酸脱羧酶编码基因 speA(属于 E. C. 4. 1. 1. 19) 和胍基丁胺酶编码基因 speB(属于 E. C. 3. 5. 3. 11;还被称为胍基丁胺脲水解酶 (agmatine ureahydrolase) 编码基因);或

[0039] (ii) 精氨酸脱羧酶编码基因 speA(属于 E. C. 4. 1. 1. 19) 和胍基丁胺亚氨基水解酶编码基因 aguA(属于 E. C. 3. 5. 3. 12;还被称为胍基丁胺脱亚氨基酶编码基因)以及 N-氨基甲酰腐胺酰胺水解酶编码基因 aguB(属于 E. C. 3. 5. 1. 53),以及可选地,还有胍基丁胺酶编码基因 speB(属于 E. C. 3. 5. 3. 11)。

[0040] 该另一种优选实施方式的优点是 1,4-丁二胺能以甚至更高的量形成。

[0041] 本文中所称的过量表达可通过技术人员已知的任何方法来获得;例如通过增加各个基因的翻译和/或转录效率来获得,还可以通过任何其它已知技术,例如增加基因拷贝数,或者通过突变增加酶的内源活性或结构,或者使用被去调节的酶来获得。在上述另一种优选实施方式的部分(i)中,SpeA 和 SpeB 的组合被用于代表 SpeA 和 SpeB 的任何功能型组合(无论是融合蛋白的形式,或单独的酶活性)。事实上,该组合还可被命名为 SpeAB。部分(ii)代表:在 SpeA 和 SpeB 的此类组合中,SpeB 部分自身可被 AguA 和 AguB 的任何功能性组合(无论是融合蛋白的形式,或单独的酶活性)替代。

[0042] Janowitz et al..FEBS Letters544(2003),258-261 已描述了胍基丁胺脱亚氨基酶 AguA 在高等植物中用于精氨酸脱羧酶途径。还从 Nakada et al., Microbiology, 149(2003),707-714 已知,SpeB 催化的转化还可由植物中存在的酶来催化,即,通过胍基丁胺脱亚氨基酶 AguA 与 N-氨基甲酰腐胺酰胺水解酶 AguB 的组合作用来催化。因此,AguB 和 AguB 在本发明的上下文中可代替 SpeB 或者甚至可以与其组合使用。此类 aguA 和 aguB 基因的来源可以是 Arabidopsis thaliana 和 Lycopersicon esculentum,但是在 Pseudomonas aeruginosa 的突变体中发现了相当的基因。

[0043] 在本发明的上下文中,与编码上述精氨酸脱羧酶的基因(分别是胍基丁胺酶或胍基丁胺亚氨基水解酶或 N-氨基甲酰腐胺酰胺水解酶)同源,并能编码具有足以与各个酶相比较的精氨酸脱羧酶(分别是胍基丁胺酶或胍基丁胺亚氨基水解酶或 N-氨基甲酰腐胺酰胺水解酶)活性的此类各个酶的任何基因根据情况,可被认为是其等同物,并且适合用于本发明方法的该另一种优选的实施方式。适合地,此类等同基因可通过技术人员已知的任何合适的克隆策略来获得,例如,通过本文实验部分描述的方法来获得。或者,此类等同基因还可通过有目的的构建来获得。

[0044] 因此,在本发明方法的该优选实施方式中,还使用过量表达的基因的其他组合,即编码(i)精氨酸脱羧酶以及胍基丁胺酶,或(ii)精氨酸脱羧酶以及胍基丁胺亚氨基水解酶以及 N-氨基甲酰腐胺酰胺水解酶,和可选地,胍基丁胺酶的基因。

[0045] 在本发明的该优选的实施方式中,特别地,具有与来自 *E. coli* 对照酶的精氨酸脱羧酶足够的相同性,即至少 30%,更优选至少 45%,最优选至少 65%的相同性,并能催化精氨酸脱羧反应的所有精氨酸脱羧酶都可使用。很多精氨酸脱羧酶已知与 *E. coli* 对照酶具有上述相对高水平的相同性。

[0046] 此外,在所述实施方式中,特别地,具有与来自 *E. coli* 对照酶的胍基丁胺酶足够的相同性,即至少 30%,更优选至少 45%,最优选至少 60%的相同性,并能催化胍基丁胺酶反应的所有胍基丁胺酶都可使用。很多胍基丁胺酶已知与 *E. coli* 对照酶具有上述相对高水平的相同性。

[0047] 此外,在所述实施方式中,特别地,具有与来自 *Pseudomonas* 对照酶的胍基丁胺亚氨基水解酶和 / 或 N- 氨基甲酰腐胺酰胺水解酶足够的相同性,即至少 20%,更优选至少 30%,最优选至少 40%的相同性,并能催化胍基丁胺亚氨基水解酶、N- 氨基甲酰腐胺酰胺水解酶分别的反应的所有胍基丁胺亚氨基水解酶和 / 或 N- 氨基甲酰腐胺酰胺水解酶都可用于本发明的方法。很多胍基丁胺亚氨基水解酶和 N- 氨基甲酰腐胺酰胺水解酶已知与 *Pseudomonas* 对照酶具有上述相对高水平的相同性。

[0048] 本发明的上述优选实施方式中,过量表达的精氨酸脱羧酶编码基因优选是来自选自 *Escherichia*、*Shigella*、*Salmonella*、*Yersinia*、*Pasteurella* 和 *Neisseria* 构成的组的属之一的精氨酸脱羧酶基因 *speA*。更优选地,过量表达的精氨酸脱羧酶编码基因优选是来自选自 *Escherichia coli*、*Shigella flexneri*、*Salmonella enterica*、*Yersinia pestis*、*Pasteurella multocida* 和 *Neisseria meningitidis* 构成的组的种之一的精氨酸脱羧酶基因 *speA*。

[0049] 此外,在本发明的该优选实施方式中,过量表达的胍基丁胺酶编码基因优选是来自选自 *Escherichia*、*Salmonella*、*Proteus*、*Photobacterium*、*Vibrio* 和 *Neisseria* 构成的组的属之一的胍基丁胺酶基因 *speB*。更优选地,过量表达的胍基丁胺酶编码基因是来自选自 *Escherichia coli*、*Salmonella enterica*、*Proteus mirabilis*、*Photobacterium luminescens*、*Vibrio cholerae* 和 *Neisseria meningitidis* 构成的组的种之一的胍基丁胺酶基因 *speB*。

[0050] 在本发明的该另一种优选的实施方式中,此外,过量表达的胍基丁胺亚氨基水解酶编码基因和 / 或过量表达的 N- 氨基甲酰腐胺酰胺水解酶编码基因优选是来自选自 *Pseudomonas*、*Streptococcus*、*Streptomyces*、*Azotobacter*、*Arabidopsis*、*Novosphingobium* 和 *Bacillus* 构成的组的属之一的胍基丁胺亚氨基水解酶基因 *aguA* 和 / 或 N- 氨基甲酰腐胺酰胺水解酶基因 *aguB*。更优选地,过量表达的胍基丁胺亚氨基水解酶编码基因和 / 或过量表达的 N- 氨基甲酰腐胺酰胺水解酶编码基因是来自选自 *Pseudomonas aeruginosa*、*Streptococcus mutans*、*Streptomyces avermitilis*、*Azotobacter vinelandii*、*Arabidopsis thaliana*、*Novosphingobium aromaticivorans* 和 *Bacillus cereus* 构成的组的种之一的胍基丁胺亚氨基水解酶基因 *aguA* 和 / 或 N- 氨基甲酰腐胺酰胺水解酶基因 *aguB*。

[0051] 本发明的方法可在任何合适的宿主生物中进行。宿主可选自生物合成领域技术人员通常已知的生产用生物(或细胞)的组。此类生物可以来自真核生物来源,或者更优选地,来自原核生物来源。真核细胞,例如,可以是来自植物和真菌的细胞,以及来自多种其它

组的细胞,其它组可被合称为“原生生物界”。

[0052] 特别优选地,本发明的方法在选自 *Saccharomyces* sp.、*Bacillus* sp.、*Corynebacterium* sp.、*Escherichia* sp. 和 *Pichia* sp. 构成的组的宿主生物中进行。

[0053] 在本发明的方法中,尤其优选地,用作为宿主的微生物能生产鸟氨酸和 / 或精氨酸。对于大多数天然的微生物而言,该要求可达到,因为此类能力在所有野生型菌株中都是可获得的,因为精氨酸是必要的氨基酸。

[0054] 这些种中, *Escherichia* sp. 是优选的,因为它们易于通过遗传操作进行操纵,以提供具有想要的过量表达酶活性的菌株。此外, *Escherichia* sp. 已天然含有几乎每一种上述酶活性(即,除来自植物的 *agu* 基因之外),使得大多数过量表达的基因可被用作同源基因。此外, *Corynebacterium* sp. (虽然缺乏天然鸟氨酸脱羧酶)是特别优选的,因为它是合适的谷氨酸盐 / 酯生产菌株,易于在发酵过程中被操纵。

[0055] 在本发明的方法中,谷氨酸盐 / 酯是非常合适的前体。因此,该方法优选在能形成谷氨酸盐 / 酯的宿主菌株(例如, *Corynebacterium glutamicum*) 中进行。

[0056] 当根据本发明的方法在选自 *Saccharomyces cerevisiae*、*Corynebacterium* sp. 和 *Escherichia* sp. 构成的组的宿主生物中进行时,获得最佳结果,其中,除增加的鸟氨酸脱羧酶活性和 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性水平之外,至少精氨酸脱羧酶连同胍基丁胺酶和 / 或胍基丁胺亚氨基水解酶以及 N-氨基甲酰腐胺酰胺水解酶酶的活性水平也增加了。在本文中,针对每种提到的酶,增加的活性水平是相对宿主生物中各个所述酶活性的天然活性水平而言的。

[0057] 本发明的方法优选在也可用作发酵条件的反应条件下进行,这将是清楚的。该方法因此可以分批方式进行,如果需要的话也可以以补料方式进行。可以方便地确保用作宿主生物的生物具有或被提供了用于形成的 1,4-丁二胺的合适的出口系统:优选地,此类出口系统是天然的。

[0058] 本发明当然还包括下述所有载体、质粒和宿主,它们携带有较之 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯形成的天然活性水平而言增加的 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯形成活性水平,以及较之鸟氨酸脱羧酶的天然活性水平而言增加的鸟氨酸脱羧酶活性水平(增加的 ODC 活性)。特别地,对优选实施方式而言,本发明包括下述所有载体、质粒和宿主,它们额外携带有所附权利要求所述的其它上述酶活性中的一种或多种的增加的活性水平。

[0059] 一些实验结果将阐述本发明,但不以任何方式来限制本发明的范围。

[0060] 实验部分

[0061] 常规流程

[0062] 标准流程被用于所有 DNA 操作 (Sambrook, J. et al. (1989), *Molecular cloning. a laboratory manual*, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York)。如果没有另外指明的话, DNA 是从 *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, et al. (2000), *J. Bacteriol.* 182, 4443-4452)、*Bacillus subtilis* ATCC10783 或 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 的染色体 DNA 扩增来的。PCR 扩增是用校正型酶 SAWADY Pwo-DNA-聚合酶 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen, Germany) 或 Platinum Pfx DNA 聚合酶 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 按照厂商提供的方案来进行的,而对构建的菌株的验证是利用 Taq 聚合酶 READYMIX (Sigma, Taufkirchen, Germany) 通过菌落 PCR

来进行的。用于随后克隆以及进一步突变的限制性位点是用从 MWG-Biotech (Ebersberg, Germany) 购得的寡核苷酸引入的。DNA 片段是用 MinElute 凝胶提取试剂盒 (Qiagen, Hilden, Germany) 按照厂商提供的方案来纯化的。对质粒 DNA 的制备是利用 QIAprep spin Miniprep Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 来完成的。对构建的质粒的验证是通过限制性分析以及随后的测序来进行的 (Agowa, Berlin, Germany)。

[0063] 为高水平表达基因, 载体 pJF119EH (Fürste, J. P. et al. (1986), Gene 48, 119-131) 适合用于: 基于异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导型 tac 启动子和 lac 遏制子系统 ($lacI^q$) 的 IPTG 诱导蛋白生产。

[0064] 构建质粒

[0065] (i) 构建质粒 pDAB2 (pJF119EH-speF)

[0066] 将 E. coli LJ110 (Zeppenfeld, et al., 见常规流程) 的 (组成型、生物降解) 鸟氨酸脱羧酶编码基因 speF 克隆进表达载体 pJF119EH (Fürste, J. P. et al. (1986), Gene 48, 119-131)。该载体允许在基于异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导型 tac 启动子和 lac 遏制子系统 ($lacI^q$) 对克隆基因的转录控制下的高水平蛋白生产。为构建表达质粒 pDAB2 (pJF119EH-speF), 编码基因与原始的 RBS (核糖体结合位点)、起始密码子和终止密码子一起被克隆。

[0067] 从 E. coli LJ110 的染色体 DNA 扩增得到 2247bp 的含 speF 的 DNA 片段 (编号 AE000172; 10242-12468 位核苷酸), 其中使用下述寡核苷酸:

[0068] 5' -GAC CTG CTG GTA CCT AAA ATA AAG AGA TGA AA-3' [SEQ ID: No. 1]

[0069] (突变以粗体显示, KpnI 限制性位点以斜体显示)

[0070] 以及

[0071] 5' -TCG ATC TAG ACT GAC TCA TAA TTT TTC CCC-3' [SEQ ID: No. 2]

[0072] (突变以粗体显示, XbaI 限制性位点以斜体显示)

[0073] 用限制性内切核酸酶 KpnI 和 XbaI 对该片段进行末端修饰, 并连接进以同样手段切割的表达载体 pJF119EH 中。转化进 E. coli DH5 α 细胞 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 后, 在含有 100rg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化子。制备之后, 对获得的质粒 pDAB2 (pJF119EH-speF, 7502bp) 的验证通过限制性分析和随后的测序来进行。

[0074] (ii) 构建质粒 pDAB4 (pJF119EH-speC)

[0075] 将 E. coli LJ110 (Zeppenfeld, et al., 见常规流程) 的 (组成型、生物合成) 鸟氨酸脱羧酶编码基因 speC 克隆进表达载体 pJF119EH (Fürste, J. P. et al. (1986), 见 (i)), 允许在基于异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导型 tac 启动子和 lac 遏制子系统 ($lacI^q$) 的转录控制下的强基因表达。因此, 编码基因 speC 与原始的起始密码子和终止密码子一起被克隆。因为利用硅片上研究没有确定针对 speC 的保守核糖体结合位点 (RBS), 通过诱变向 speC 起始密码子上游 7bp 处引入优化的 RBS。

[0076] 从 E. coli LJ110 的染色体 DNA 扩增得到 2235bp 的含 speC 的 DNA 片段 (编号 AE000379; 2650-4867 位核苷酸), 其中使用下述寡核苷酸:

[0077] 5' -GAG CTC TAG ACC AGT TTG AGG AAT ATC T-3' [SEQ ID: No. 3]

[0078] (突变以粗体显示, XbaI 限制性位点以斜体显示)

[0079] 以及

[0080] 5' -TTT TGC ATG CTT ACT TCA ACA CAT AAC CGT AC-3' [SEQ ID :No. 4]

[0081] (突变以粗体显示, SphI 限制性位点以斜体显示)

[0082] 用内切核酸酶 XbaI 和 SphI 进行末端修饰之后, 将 PCR 产物连接进以同样手段切割的质粒 pJF119EH 中。转化进 *E. coli* DH5 α 细胞 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 后, 在含有 100mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化子。制备之后, 对获得的质粒 pDAB4(pJF119EH-speC, 7491bp) 的验证通过限制性分析和随后的测序来进行。

[0083] (iii) 构建质粒 pDAB1(pJF119EH-argA)

[0084] 将 *E. coli* LJ110(Zeppenfeld, et al., 见常规流程) 的 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶编码基因 argA 克隆进表达载体 pJF119EH(Fürste, J.P. et al. (1986), 见 (i))。该基因与原始 RBS(核糖体识别位点) 和终止密码子一起被克隆。但是, 翻译起始位点从 GTG 变为 ATG。

[0085] 从 *E. coli* LJ110 的染色体 DNA 扩增得到 1365bp 的 argA 编码 DNA 片段(编号 AE000365 ;3312-4643 位核苷酸), 其中使用下述寡核苷酸:

[0086] 5' -ATA AGA ATT CAA AGA GGT GTG CCA TGG TAA AG-3' [SEQ ID :No. 5]

[0087] (突变以粗体显示, EcoRI 限制性位点以斜体显示)

[0088] 以及

[0089] 5' -TTT TGG TAC CTT ACC CTA AAT CCG CCA T-3' [SEQ ID :No. 6]

[0090] (突变以粗体显示, KpnI 限制性位点以斜体显示)

[0091] 用限制性内切核酸酶 EcoRI 和 KpnI 对该片段进行末端修饰, 并连接进以同样手段切割的表达质粒 pJF119EH 中。转化进 *E. coli* DH5 α 细胞 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 后, 在含有 100mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化子。制备之后, 对获得的质粒 pDAB1(pJF119EH-argA, 6627bp) 的验证通过限制性分析和随后的测序来进行。

[0092] (iv) 构建质粒 pDAB5(pJF119EH-argA-speF)

[0093] 为允许鸟氨酸脱羧酶 SpeF 和 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶 ArgA 的平行表达, 将 *E. coli* LJ110(Zeppenfeld, et al., 见常规流程) 的 speF 编码基因克隆进 argA 表达载体 pDAB1(见 (iii))。

[0094] 通过用内切核酸酶 KpnI 和 XbaI 进行消化从构建的质粒 pDAB2(见 A. 1) 上切下含 speF 的 DNA 片段(2225bp), 将其连接进以同样手段切割的含 argA 质粒 pDAB1(见 (iii)) 中。转化进 *E. coli* DH5 α 细胞 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 后, 在含有 100mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化子。制备之后, 通过限制性分析针对 SpeF 和 ArgA 的平行生产对获得的质粒 pDAB5(pJF119EH-argA-speF, 8841bp) 进行验证。

[0095] (v) 构建质粒 pDAB6(pJF119EH-argA-speC)

[0096] 为允许鸟氨酸脱羧酶 SpeC 和 N-乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶 ArgA 的平行表达, 将 *E. coli* LJ110(Zeppenfeld, et al., 见常规流程) 的 speC 编码基因克隆进 argA 表达载体 pDAB1(见 (iii))。

[0097] 通过用内切核酸酶 XbaI 和 SpnAI 对构建的质粒 pDAB4(见 (ii)) 进行消化, 分离出 2225bp 的 DNA 片段, 其中含有 speC 基因, 并具有优化的 RBS。随后将该片段连接进以同样手段切割的含 argA 质粒 pDAB1(见 (i)) 中。转化进 *E. coli* DH5 α 细胞 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 后, 在含有 100mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化子。制

备之后,通过限制性分析和随后的测序对获得的允许 speC 和 argA 的平行表达的质粒 pDAB6 (pJF119EH-argA-speC, 8830bp) 进行验证。

[0098] (vi) 构建质粒 pDAB7 (pJF119EH-speAB)

[0099] 将 *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, et al., 见常规流程) 的编码胍基丁胺酶的 speB 和精氨酸脱羧酶编码基因 speA 克隆进表达载体 pJF119EH (Fürste, J. P. et al. (1986), 见 (i))。以这种方式,保留了基因的原始操纵子结构以及 RBS、起始密码子和终止密码子。

[0100] 从 *E. coli* LJ110 的染色体 DNA 扩增得到 3079bp 的含 speAB 的 DNA 片段 (编号 AE000377 ;1190-4247 位核苷酸),其中使用下述寡核苷酸:

[0101] 5' -ACA CTT TCT AGA ATA ATT TGA GGT TCG CTA TG-3' [SEQ ID :No. 7]

[0102] (突变以粗体显示, XbaI 限制性位点以斜体显示)

[0103] 以及

[0104] 5' -CAT GGC ATG CGG TGC TTA CTC G-3' [SEQ ID :No. 8]

[0105] (突变以粗体显示, SphI 限制性位点以斜体显示)

[0106] 用限制性内切核酸酶 XbaI 和 SphI 进行末端修饰之后,将 DNA 片段连接进以同样手段切割的表达质粒 pJF119EH 中。转化进 *E. coli* DH5 α 细胞 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 后,在含有 100mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化子。制备之后,对获得的质粒 pDAB7 (pJF119EH-speAB, 8339bp) 的验证通过限制性分析和随后的测序来进行。

[0107] (vii) 构建质粒 pDAB8 (pJF119EH-speF-speAB)

[0108] 为允许平行生产鸟氨酸脱羧酶 SpeF、精氨酸脱羧酶 SpeA 和胍基丁胺酶 SpeB,将 *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, et al., 见常规流程) 的 speAB 基因克隆进 speF 表达载体 pDAB2 (见 (i))。

[0109] 通过用限制性内切核酸酶 XbaI 和 SphI 对质粒 pDAB7 (见 (vi)) 进行消化,分离出 3067bp 的包含 speAB 基因的操纵子,将其连接进以同样手段切割的含 speF 的质粒 pDAB2 (见 (i)) 中。转化进 *E. coli* DH5 α 细胞 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 后,在含有 100mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化子。制备之后,对获得的允许对 SpeFAB 进行平行生产的质粒 pDAB8 (pJF119EH-speFAB, 10547bp) 的验证通过限制性分析来进行。

[0110] (viii) 构建质粒 pDAB10 (pJF119EH-argA-speF-speAB)

[0111] 为允许平行生产鸟氨酸脱羧酶 SpeF、精氨酸脱羧酶 SpeA、胍基丁胺酶 SpeB 和 N-乙酰谷氨酸盐/酯合酶 ArgA,将 *E. coli* LJ110 (Zeppenfeld, et al., 见常规流程) 的 speAB 基因克隆进 argA-speF 表达载体 pDAB5 (见 (iv))。

[0112] 通过用限制性内切核酸酶 XbaI 和 SphI 对质粒 pDAB7 (见 (vi)) 进行消化,分离出 3067bp 的包含 speAB 基因的操纵子,将其连接进以同样手段切割的含 argA-speF 的质粒 pDAB5 (见 (iv)) 中。转化进 *E. coli* DH5 α 细胞 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 后,在含有 100mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化子。制备之后,对获得的允许对 ArgA 和 SpeFAB 进行平行生产的质粒 pDAB10 (pJF119EH-argA-speFAB, 11886bp) 的验证通过限制性分析来进行。

[0113] (ix) 构建质粒 pDAB37 (pJF119EH-argJBs-speF)

[0114] 为允许对鸟氨酸脱羧酶 SpeF 和来自 *Bacillus subtilis* ATCC10783 的 N²-乙酰基-L-鸟氨酸:L-谷氨酸盐/酯 N-乙酰基转移酶编码基因 ArgJ 进行平行生产,将

B. subtilis 的 *argJ* 编码基因克隆进 *speF* 表达载体 pDABA5(见 (iv)), 这是通过替换存在的 *argA* 基因来进行的。基因与原始的 RBS 和终止密码子一起克隆。

[0115] 从 *Bacillus subtilis* ATCC10783 的染色体 DNA 扩增得到 1279bp 的含 *argJ* 的 DNA 片段 (编号 Z99109(*B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168, 完整基因组 (21 节中的第 6 节 (section 6 of 21))) ;184321-185600 位核苷酸), 其中使用下述寡核苷酸:

[0116] 5' -TCA CGC GAA TTC ATC CAT AGA ACG GGA GAG-3' [SEQ ID :No. 9]

[0117] (突变以粗体显示, EcoRI 限制性位点以斜体显示)

[0118] 以及

[0119] 5' -CTT CAT TTC GGT ACC CTT TAT TAC GTG CGA TAG CTC-3' [SEQ ID :No. 10]

[0120] (突变以粗体显示, KpnI 限制性位点以斜体显示)。寡核苷酸是根据存在于 *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 菌株基因组中的 *argJ* 的序列来构建的。

[0121] 用内切核酸酶 EcoRI 和 KpnI 对扩增得到的 DNA 片段和质粒 pDAB5 进行限制性切割。在 pDAB5 的情况下, 获得 1355bp 和 7486bp 的两条片段。分离出包含载体 pJF119EH 和基因 *speF* 的 7486bp 的片段, 将其与扩增的 DNA 片段连接。转化进 *E. coli* DH5 α 细胞 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 后, 在含有 100mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化子。制备之后, 对获得的质粒 pDAB37 (pJF119EH-*argJBs-speC*, 8749bp) 的验证通过限制性分析和随后的测序来进行。序列分析揭示, 从 *B. subtilis* ATCC10783 克隆的 *argJ* 基因不同于针对 *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 报道的 *argJ* 基因。较之 *B. subtilis* subsp. *subtilis* str. 168 的蛋白 ArgJ (编号 CAB12961), 存在于质粒 pDAB37 上的 *argJ* 基因编码的蛋白 ArgJ 展示出下述替换: H72Q、P74A、T75A、L95I、F105L、G110D、H134Q、E142Q、A169T、R181A、T216I、A242G、D255E、N353H、I363L、A380D、D383E。

[0122] (x) 构建质粒 pDAB38 (pJE119EH-*argJCg-speF*)

[0123] 为允许对鸟氨酸脱羧酶 *SpeF* 和来自 *Corynebacterium glutamicum* 的 N²-乙酰基-L-鸟氨酸:L-谷氨酸盐/酯 N-乙酰基转移酶编码基因 *ArgJ* 进行平行生产, 将 *C. glutamicum* ATCC13032 的 *argJ* 编码基因克隆进 *speF* 表达载体 pDABA5(见 (iv)), 这是通过替换存在的 *argA* 基因来进行的。基因与原始的 RBS 和终止密码子一起克隆。

[0124] 从 *C. glutamicum* ATCC13032 的染色体 DNA 扩增得到 1219bp 的含 *argJ* 的 DNA 片段 (编号 NC006958(*C. glutamicum* ATCC13032, 完整基因组)) ;146650-1467869 位核苷酸), 其中使用下述寡核苷酸:

[0125] 5' -ACA CAT CGA ATT CAG TAG GAG TTC CAC ATG G-3' [SEQ ID :No. 11]

[0126] (突变以粗体显示, EcoRI 限制性位点以斜体显示)

[0127] 以及

[0128] 5' -AGT GCT GGT ACC TTT TAA GAG CTG TAC GC3' [SEQ ID :No. 12]

[0129] (突变以粗体显示, KpnI 限制性位点以斜体显示)。

[0130] 用内切核酸酶 EcoRI 和 KpnI 对扩增得到的 DNA 片段和质粒 pDAB5 进行限制性切割。在 pDAB5 的情况下, 获得 1355bp 和 7486bp 的两条片段。分离出包含载体 pJF119EH 和基因 *speF* 的 7486bp 的片段, 将其与扩增的 DNA 片段连接。转化进 *E. coli* DH5 α 细胞 (Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 后, 在含有 100mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化子。制备之后, 对获得的质粒 pDAB38 (pJF119EH-*argJCg-speF*, 8749bp) 的验证通过限

制性分析和随后的测序来进行。

[0131] (xi) 构建质粒 pDAB3(pJF119EH-speC_{nRBS})

[0132] 将 E. coli LJ110(Zeppenfeld, et al., 见常规流程) 的(组成型、生物合成) 鸟氨酸脱羧酶编码基因 speC 克隆进表达载体 pJF119EH(Fürste, J. P. et al. (1986), Gene48, 119-131), 允许在基于异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG) 诱导型 tac 启动子和 lac 遏制子系统(lacI^q) 的转录控制下的强基因表达。因此, 编码基因 speC 与原始 RBS、起始密码子和终止密码子一起被克隆。

[0133] 从 E. coli LJ110 的染色体 DNA 扩增得到 2235bp 的含 speC_{nRBS} 的 DNA 片段(编号 AE000379; 2650-4867 位核苷酸), 其中使用下述寡核苷酸:

[0134] 5' -GAG CTC TAG ACC AGT TTG ACC CAT ATC T-3' [SEQ ID: No. 13]

[0135] (突变以粗体显示, XbaI 限制性位点以斜体显示)

[0136] 以及

[0137] 5' -TTT TGC ATG CTT ACT TCA ACA CAT AAC CGT AC-3' [SEQ ID: No. 14]

[0138] (突变以粗体显示, SphI 限制性位点以斜体显示)

[0139] 用内切核酸酶 XbaI 和 SphI 进行末端修饰之后, 将 PCR 产物连接进以同样手段切割的质粒 pJF119EH 中。转化进 E. coli DH5α 细胞(Invitrogen, Karlsruhe, Germany) 后, 在含有 100mg/l 氨苄青霉素的 LB 琼脂平板上选择转化子。制备之后, 对获得的质粒 pDAB3(pJF119EH-speC_{nRBS}, 7491bp) 的验证通过限制性分析和随后的测序来进行。

[0140] 比较实验 A 通过在 IPTG 诱导的基因表达下, 仅过量表达鸟氨酸脱羧酶 speC 来生产 1,4-丁二胺(摇瓶)

[0141] 在携带有质粒 pDAB3(见(ix)) 的 E. coli 宿主菌株 LJ110(Zeppenfeld, et al., 见常规流程) 中对鸟氨酸脱羧酶编码基因 speC 的过量表达对于 DAB 生产的影响进行了研究。

[0142] 在摇瓶实验中, 利用最小程度盐培养基对该菌株进行了检验, 所述培养基由 MgSO₄·7H₂O(300mg/l)、CaCl₂·2H₂O(15mg/l)、KH₂PO₄(3g/l)、K₂HPO₄(12g/l)、NaCl(100mg/l)、(NH₄)₂SO₄(5g/l)、柠檬酸钠·3H₂O(1g/l)、FeSO₄·7H₂O(75mg/l)、硫胺·HCl(维生素 B1)(5mg/l) 以及微量元素 Al₂(SO₄)₃·18H₂O(3mg/l)、CoCl₂·6H₂O(1.05mg/l)、CuSO₄·5H₂O(3.75mg/l)、H₃BO₃(0.75mg/l)、MnCl₂·4H₂O(30mg/l)、Na₂MoO₄·2H₂O(4.5mg/l)、NiSO₄·6H₂O(3mg/l) 和 ZnSO₄·7H₂O(22.5mg/l) 构成。单独对葡萄糖贮液(500g/l) 进行高压灭菌, 加入到灭菌培养基中, 达到 10g/l 的终浓度。

[0143] 用 1-5 μl/ml 贮液接种含有 100mg/l 氨苄青霉素的最小程度盐培养基的预培养物, 在 33°C、180rpm 下温育 16 小时, 直到 OD₆₂₀ 为 2。随后将 5ml 该培养物用于接种由 50ml 同样的培养基构成的主培养物, 其在 33°C 和 180rpm 下温育 24 小时。自从细胞达到 1.5 的 OD_{620nm}(大约 7 小时后), 通过加入 10 μM IPTG 来诱导基因表达。

[0144] 为观察依赖时间的 DAB 生产, 在培养期间的不同时间点取样。利用离心分离细胞之后, 通过 HPLC 来分析稀释的上清液。此时, 使用平衡为 50% 缓冲液 B(缓冲液 A, 0.1M 乙酸钠, pH7.2; 缓冲液 B 甲醇) 的 C18-反相柱(Nucleosil120-5C18, Macherey & Nagel, Düren, Germany), 在 Hewlett-Parkard 1100 Series 仪器上, 于 230nm 处, 含有的胺作为邻苯二醛(OPA) 衍生物被检测。为进行分离, 应用下述梯度: 1-7 分钟线性梯度, 从 50% 至

75%的缓冲液 B,流速为 0.5ml/分钟;7-13 分钟,75%至 85%的缓冲液 B,流速为 0.5ml/分钟;13-14.5 分钟,85%至 50%的缓冲液 B,流速为 1ml/分钟;14.5-17 分钟,50%的缓冲液 B,流速为 1ml/分钟;以及 17-20 分钟,以 50%的缓冲液 B 进行,流速为 0.5ml/分钟。

[0145] 通过利用标准物质用于校正,可以测定下述 DAB 浓度(见表 1),通过 NMR 光谱法进行验证。

[0146]

所用的菌株	表达的基因	DAB 浓度 (mg/l)
LJ110pDAB3	speC	50

[0147] 表 1:利用在 *E. coli* 中的 ODC 过量生产获得的 DAB 形成

[0148] 实施例通过增加的鸟氨酸脱羧酶活性组合增加的 N-乙酰谷氨酸盐/酯形成活性对 1,4-丁二胺生产的提高

[0149] 实施例 1 利用 ODC 以及 ArgA 过量生产对 1,4-丁二胺进行生产(摇瓶)

[0150] 在携带有质粒 pDAB5(见(iv))或 pDAB6(见(v))的 *E. coli* 宿主菌株 LJ110(Zeppenfeld, et al., 见常规流程)中对 N-乙酰谷氨酸合酶 ArgA(催化从谷氨酸盐/酯起始的鸟氨酸生物合成的第一个步骤)和鸟氨酸脱羧酶 SpeF 或 SpeC 的平行生产对 DAB 生产的影响进行了研究。

[0151] 在摇瓶实验中,在最小程度盐培养基(见比较实验 A)中,对这些菌株进行了检验。因此,用 1-5 μ l/ml 贮液接种含有 100mg/l 氨苄青霉素的最小程度盐培养基的预培养物,在 33°C、180rpm 下温育 16 小时,直到 620nm 处的光密度为 2。随后将 5ml 该培养物用于接种由 50ml 同样的培养基构成的主培养物,其在 33°C 和 180rpm 下温育 24 小时。自从细胞达到 1.5 的 OD_{620nm}(大约 7 小时后),通过加入 10pM IPTG 来诱导基因表达。

[0152] 为观察依赖时间的 DAB 生产,在培养期间的不同时间点取样。利用离心分离细胞之后,通过 HPLC(见比较实验 A)来分析上清液。通过利用标准物质用于校正,可以测定下述 DAB 浓度(见表 2)。

[0153]

所用的菌株	表达的基因	DAB 浓度 (mg/l)
LJ110pDAB5	argA speF	893
LJ110pDAB6	argA speC	1064

[0154] 表 2:利用在 *E. coli* 中对 ArgA 和 ODC 进行平行过量生产获得的 DAB 形成

[0155] 实施例 2 利用 ODC 以及 ArgJ 过量生产对 1,4-丁二胺进行生产(摇瓶)

[0156] 在携带有质粒 pDAB37(见(ix))或 pDAB38(见(x))的 *E. coli* 宿主菌株 LJ110(Zeppenfeld, et al., 见常规流程)中,对来自 *C. glutamicum* 或 *B. subtilis* 的 N²-乙酰基-L-鸟氨酸:L-谷氨酸盐/酯 N-乙酰基转移酶编码基因 ArgJ(催化从 L-谷氨酸盐/酯和 N-乙酰鸟氨酸形成 N-乙酰谷氨酸盐/酯和鸟氨酸)和鸟氨酸脱羧酶 SpeF 或 SpeC 的平行生产对 DAB 生产的影响进行了研究。

[0157] 在摇瓶实验中,在最小程度盐培养基(见比较实验 A)中,对这些菌株进行了检验。因此,用 1-5 μ l/ml 贮液接种含有 100mg/l 氨苄青霉素的最小程度盐培养基的预培养物,在 33°C、180rpm 下温育 16 小时,直到 620nm 处的光密度为 2。随后将 5ml 该培养物用于接种由 50ml 同样的培养基构成的主培养物,其在 33°C 和 180rpm 下温育 24 小时。自从细胞达到 1.5 的 OD_{620nm}(大约 7 小时后),通过加入 50 μ M IPTG 来诱导基因表达。

[0158] 为观察依赖时间的 DAB 生产,在培养期间的不同时间点取样。利用离心分离细胞之后,通过 NMR 来分析上清液。将培养物上清液样品的 pH 调节为 5.8,冻干,重新溶解于 D₂O。323K 处的 600MHz ¹H-NMR 显示了预期的共振谱,少量 DAB 的峰验证了 DAB 的存在。通过利用标准物质用于校正,可以测定下述 DAB 浓度(见表 3)。

[0159]

所用的菌株	表达的基因	DAB 浓度 (mg/l)
LJ110pDAB37	argJBs speF	1050
LJ110pDAB38	argJCg speF	1130

[0160] 表 3:利用在 E. coli 中对 ArgJ 和 ODC 进行平行过量生产获得的 DAB 形成

[0161] 实施例 3 从鸟氨酸以及精氨酸起始的分批过程中,对 1,4- 丁二胺生产的提高(摇瓶)

[0162] 为展示起始自鸟氨酸以及精氨酸的 DAB 形成的进一步提高,对鸟氨酸脱羧酶 SpeF、精氨酸脱羧酶 SpeA 和胍基丁胺酶 SpeB 的组合过量生产的影响进行了研究。此外,为确保正确的前体供应,这些研究与采用对 N- 乙酰谷氨酸盐 / 酯合酶 ArgA(催化从谷氨酸盐 / 酯起始的鸟氨酸生物合成的第一个步骤)进行过量生产的进一步实验组合。

[0163] 因此,通过利用分别携带有质粒 pDAB8 和 pDAB10(见 2.2 和 2.3)的 E. coli 宿主菌株 LJ110(Zeppenfeld, et al., 见常规流程),在最小程度盐培养基(见 A.3)中进行摇瓶培养。因此,用 1-5 μl/ml 贮液接种含有 100mg/l 氨苄青霉素的最小程度盐培养基的预培养物,在 33℃、180rpm 下温育 16 小时,直到 620nm 处的光密度为 2。随后将 5ml 该培养物用于接种由 50ml 同样的培养基构成的主培养物,其在 33℃和 180rpm 下温育 24 小时。自从细胞达到 1.5 的 OD_{620nm}(大约 7 小时后),通过加入 10 μM IPTG 来诱导基因表达。

[0164] 为观察依赖时间的 DAB 生产,在培养期间的不同时间点取样。利用离心分离细胞之后,通过 HPLC(见比较实验 A)来分析上清液。通过利用标准物质用于校正,可以测定下述 DAB 浓度(见表 4)。

[0165]

所用的菌株	表达的基因	DAB 浓度 (mg/l)
LJ110pDAB8	speFAB	1025
LJ110pDAB10	argA speFAB	1433

[0166] 表 4:在 E. coli 中从鸟氨酸和精氨酸起始的 DAB 形成

序列表

<110> 帝斯曼知识产权资产管理有限公司

<120> 1,4- 丁二胺的生物化学合成

<130> 21371W0

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 1

gacctgctgg tacctaaaat aaagagatga aa
32

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400> 2

tcgatctaga ctgactcata atttttcccc
30

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>3

gagctctaga ccagtttgag gaatatct

28

<210>4

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>4

ttttgcatgc ttacttcaac acataaccgt ac

32

<210>5

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>5

ataagaattc aaagaggtgt gccatggtaa ag

32

<210>6

<211>28

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>6

tttttggtacc ttaccctaaa tccgccat

28

<210>7

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>7

acacttttcta gaataatttg aggttcgcta tg

32

<210>8

<211>22

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>8

catggcatgc ggtgcttact cg

22

<210>9

<211>30

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>9

tcacgcgaat tcatccatag aacgggagag

30

<210>10

<211>36

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>10

cttcatttcg gtacccttta ttacgtgcga tagctc

36

<210>11

<211>31

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>11

acacatcgaa ttcagtagga gttccacatg g

31

<210>12

<211>29

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>12

agtgctggta ccttttaaga gctgtacgc

29

<210>13

<211>28

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>13

gagctctaga ccagtttgac ccatatct

28

<210>14

<211>32

<212>DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 引物

<400>14

ttttgcatgc ttacttcaac acataaccgt ac

32