



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118679240 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 20

(21) 申请号 202380017475.9

(22) 申请日 2023.01.23

(30) 优先权数据

22152702.1 2022.01.21 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2023/051537 2023.01.23

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/139255 EN 2023.07.27

(71) 申请人 阿西耶斯生物公司

地址 斯洛文尼亚卢布尔雅那

(72) 发明人 达维德·维兰特

亚历山大·约翰内斯·克鲁伊斯

托尼·纳戈德 格雷戈尔·科塞茨

(74) 专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理

有限公司 51258

专利代理师 张倩

(51) Int.Cl.

C12N 1/32 (2006.01)

C12N 9/12 (2006.01)

权利要求书1页 说明书57页

序列表(电子公布) 附图8页

(54) 发明名称

抗大量细胞裂解的基因修饰的细菌

(57) 摘要

本发明总体上涉及生物技术工程,并且具体地,涉及基因修饰的甲基菌属的细菌,其具有改善的特性,使得它们在大规模甲醇发酵中特别有用。更具体地,本发明提供了甲基菌属的细菌,其被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其他相同的细菌相比降低的胞外多糖(EPS)的产生。本发明还提供了用于使用本发明的经遗传修饰的细菌产生生化化合物的方法。

1. 一种基因工程化细菌,所述细菌是甲基菌 (*Methylobacillus*) 属并且被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达和/或活性。

2. 根据权利要求1所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达。

3. 根据权利要求1或2所述的细菌,其中,编码所述具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因已经失活。

4. 根据权利要求1或2所述的细菌,其中,编码所述具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因已经通过缺失部分或全部基因序列而失活。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的细菌,其还被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的具有酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 合酶活性的内源性多肽的表达和/或活性。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的具有酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 合酶活性的内源性多肽的表达。

7. 根据权利要求5或6所述的细菌,其中,编码所述具有酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 合酶活性的多肽的内源性基因已经失活。

8. 根据权利要求7所述的细菌,其中,编码所述具有酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 合酶活性的多肽的所述内源性基因已经通过部分或全部基因序列的缺失而失活。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的细菌,所述细菌选自鞭毛甲基菌 (*Methylobacillus flagellatus*)、糖原甲基菌 (*Methylobacillus glycyogenes*)、草原甲基菌 (*Methylobacillus pratensis*)、根际甲基菌 (*Methylobacillus rhizosphaerae*)、草状甲基菌 (*Methylobacillus gramineus*)、树状甲基菌 (*Methylobacillus arboreus*)、隆凸甲基菌 (*Methylobacillus caricis*) 和食甲基甲基菌 (*Methylobacillus methilovorans*)。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的细菌,其中,所述细菌为鞭毛甲基菌或糖原甲基菌。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的胞外多糖 (EPS) 的产生。

12. 根据权利要求11所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种内源性多肽的表达和/或活性。

13. 一种用于生产生物物质的方法,所述方法包括在合适的培养条件下培养根据权利要求1至12中任一项所述的细菌。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中,所述培养基包括甲醇。

15. 一种用于生产生物物质的方法,所述方法包括在合适的培养条件下培养根据权利要求1至12中任一项所述的细菌。

抗大量细胞裂解的基因修饰的细菌

技术领域

[0001] 本发明总体上涉及生物技术工程,并且具体地,涉及对大量细胞裂解表现出抗性的基因修饰的细菌,这使得它们在大规模发酵中特别有用。更具体地,本发明提供了一种经修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面都相同的细菌相比降低的具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达和/或活性的细菌。本发明还提供了用于使用本发明的基因修饰的细菌生产生化化合物的方法。

背景技术

[0002] 通过微生物发酵的生物技术化学生产是基于石油和其他化石燃料的生产的更加可持续和环境友好的替代方案。若干种可持续发酵底物已在商业上用于化工生产,主要是C6和C5碳水化合物,诸如葡萄糖和木糖。此类发酵中常用的生物尤其是大肠杆菌(*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)和谷氨酸棒杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)。

[0003] 虽然基于葡萄糖的发酵是可持续的,但是将所有化工生产转化为基于葡萄糖的发酵则将需要大量的耕地来生产足够的原料。一种避免这种情况并仍能实现可持续化工生产的方法是用一种不太占用土地的原料来代替葡萄糖。甲醇对于这一情况来说是可行的候选者。它可以由二氧化碳和氢气产生,从而避免了对土地的需求。它易于储存、运输并且能量密度比葡萄糖高。

[0004] 存在有能够利用甲醇作为唯一能源和碳源的许多细菌,诸如甲醇芽孢杆菌(*Bacillus methanolicus*)、扭脱甲基杆菌(*Methylobacterium extorquens*)、糖原甲基菌(*Methylobacillus glycogenes*)和鞭毛甲基菌(*Methylobacillus flagellatus*)。利用甲醇的细菌或甲基营养型细菌通常发现于难以获得营养物的恶劣自然环境中或植物内部/与植物密切相关。对这种条件的适应传达出工业发酵微生物所需的几种特性,诸如在基本培养基中快速生长的能力和对波动的营养物和氧供应的抗性。具体实例是在多聚磷酸盐激酶(ppK)酶的促进下,以不溶性多聚磷酸颗粒的形式储存储备磷酸盐的能力。这使得生物在磷酸盐可获得时吸收比生长所需更多的磷酸盐,并且在磷酸盐缺乏时利用储备。甲基菌属的成员具有许多这种有利的品质,并且是用于工业甲醇发酵的有前景的候选者。

[0005] 然而,在工业生物技术背景下,一些环境适应可能导致不期望的表型。程序性细胞死亡和其他细胞裂解机制是这种适应的实例。当营养物缺乏时,群体太高或作为对其他应激物的应答,如果大多数单个细菌经历裂解,则通常对群体整体有益。这将营养物释放给一小部分存活细胞,使它们能够在更大群体可能被完全消灭的地方存活下来。单细胞生物的程序性细胞死亡是一种知之甚少的现象,其直到最近才被科学界认为是真实的,因为它需要来自单细胞生物的一定程度的“无私”。虽然具体的触发因素尚不清楚,但它与群体感应机制有关。在细胞密度应该达到极高值的工业生物反应器中,这种行为是非常不期望的。在许多生物过程中,在达到最大细胞密度并且碳开始流向产物形成而不是生物质之后,大多数产物在稳定期形成。因此,在许多生物中,例如甲基菌属中,在生物过程的早期阶段发生

大量细胞溶裂解,这显著减少了可达到的产物产率和效价。

发明内容

[0006] 本发明的目的是克服生物过程中的缺点,特别是关于在其早期阶段发生的大量细胞裂解。这由已经进行工程化示出对大量细胞裂解有抗性的基因修饰的细菌的本发明人实现了。

[0007] 基于甲基菌属的模型细菌,本发明人观察到通过降低具有多聚磷酸盐激酶 (PPK) 活性的内源性多肽的表达和/或活性,意外地完全消除了突然的大量细胞裂解。尽管该基因或编码的蛋白之前从未与微生物中的细胞裂解或程序性细胞死亡相关联,但在包括内源性多聚磷酸激酶的细菌中降低(例如,破坏)其功能在非如此则将会导致裂解的所有测试条件下都阻止了细胞裂解。这显著改善了它们在化工生产中的有用性,因为它们可以被培养至更高的细胞密度,并在更长的时间内保持代谢活性并生产更多的产物。

[0008] 此外,本发明人已经观察到酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 合酶功能的降低(例如破坏)阻止了某些条件下(碳限制)的裂解。

[0009] 基于上述发现,本发明在第一方面提供了一种基因工程化细菌,其被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面都相同的细菌相比降低的具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达和/或活性。

[0010] 本发明还提供了一种用于生产生化化合物的方法,所述方法包括在合适的培养条件下培养本发明的细菌。

[0011] 本发明可以通过以下条目来概括:

[0012] 1. 一种基因工程化细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达和/或活性。

[0013] 2. 根据条目1所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达。

[0014] 3. 根据条目1或2所述的细菌,其中,与所述其他方面相同的细菌相比,所述具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达水平降低了至少50%,诸如降低了至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%。

[0015] 4. 根据条目1至3中任一项所述的细菌,其中,编码所述具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因已经失活。

[0016] 5. 根据条目4所述的细菌,其中,编码所述具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因已经通过部分或全部基因序列的缺失而失活。

[0017] 6. 根据条目3或4所述的细菌,其中,编码所述具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的所述内源性基因已经通过在所述细菌中引入或表达稀有切割内切核酸酶而失活,所述稀有切割内切核酸酶能够通过DNA切割选择性地使编码所述多肽的所述内源性基因失活。

[0018] 7. 根据条目6所述的细菌,其中,所述稀有切割内切核酸酶是转录激活因子样效应物 (TALE) 核酸酶、兆核酸酶、锌指核酸酶 (ZFN) 或RNA导向的内切核酸酶。

[0019] 8. 根据条目7所述的细菌,其中,所述RNA导向的内切核酸酶是催化失活的Cas9蛋白。

[0020] 9. 根据条目8所述的细菌,所述细菌包括(例如,表达)在细胞条件下与编码所述多

肽的基因组DNA特异性杂交(例如,结合)的单导向RNA(sgRNA)。

[0021] 10.根据条目1至3中任一项所述的细菌,其中,所述具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达通过编码所述多肽的内源性基因的转录和/或翻译阻遏来降低(例如,受到抑制)。

[0022] 11.根据条目1至3中任一项所述的细菌,其中,所述具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达通过在细菌中引入或表达抑制性核酸分子而降低(例如,受到抑制),所述抑制性核酸分子在细胞条件下与编码所述多肽的细胞mRNA和/或基因组DNA特异性杂交(例如,结合)。

[0023] 12.根据条目11所述的细菌,其中,所述抑制性核酸分子是反义寡核苷酸、核酶或干扰RNA(RNAi)分子。

[0024] 14.根据条目12所述的细菌,其中,所述干扰RNA分子是微小RNA(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)或短发夹RNA(shRNA)。

[0025] 15.根据条目1所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的微生物相比降低的具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的活性。

[0026] 16.根据条目15所述的细菌,其中,所述多肽的活性通过导致活性降低或丧失的至少一种活性位点突变而降低。

[0027] 17.根据条目16所述的细菌,其中,所述至少一种活性位点突变是非保守氨基酸置换。

[0028] 18.根据条目1至17中任一项所述的细菌,所述细菌还被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的表达和/或活性。

[0029] 19.根据条目1至18中任一项所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的表达。

[0030] 20.根据条目18或19所述的细菌,其中,与所述其他方面相同的细菌相比,所述具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的表达水平降低了至少50%,诸如降低了至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%。

[0031] 21.根据条目18至20中任一项所述的细菌,其中,编码所述具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因已经失活。

[0032] 22.根据条目21所述的细菌,其中,编码所述具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的所述内源性基因已经通过部分或全部基因序列的缺失而失活。

[0033] 23.根据条目21或22所述的细菌,其中,编码所述具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的所述内源性基因已经通过在所述细菌中引入或表达稀有切割内切核酸酶而失活,所述稀有切割内切核酸酶能够通过DNA切割选择性地使编码所述多肽的所述内源性基因失活。

[0034] 24.根据条目23所述的细菌,其中,所述稀有切割内切核酸酶是转录激活因子样效应物(TALE)核酸酶、兆核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)或RNA导向的内切核酸酶。

[0035] 25.根据条目24所述的细菌,其中,所述RNA导向的内切核酸酶是催化失活的Cas9

蛋白。

[0036] 26. 根据条目25所述的细菌,所述细菌包括(例如,表达)在细胞条件下与编码所述多肽的基因组DNA特异性杂交(例如,结合)的单导向RNA(sgRNA)。

[0037] 27. 根据条目18或19所述的细菌,其中,所述具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的表达通过编码所述多肽的所述内源性基因的转录和/或翻译阻遏而降低(例如,受到抑制)。

[0038] 28. 根据条目18或19所述的细菌,其中,所述具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的表达通过在所述细菌中引入或表达抑制性核酸分子而降低(例如,受到抑制),所述抑制性核酸分子在细胞条件下与编码所述多肽的细胞mRNA和/或基因组DNA特异性杂交(例如,结合)。

[0039] 29. 根据条目28所述的细菌,其中,所述抑制性核酸分子是反义寡核苷酸、核酶或干扰RNA(RNAi)分子。

[0040] 30. 根据条目29所述的细菌,其中,所述干扰RNA分子是微小RNA(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)或短发夹RNA(shRNA)。

[0041] 31. 根据条目18所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的微生物相比降低的具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的活性。

[0042] 32. 根据条目31所述的细菌,其中,所述多肽的活性通过导致活性降低或丧失的至少一种活性位点突变而降低。

[0043] 33. 根据条目32所述的细菌,其中,所述至少一种活性位点突变是非保守氨基酸置换。

[0044] 34. 根据条目1至33中任一项所述的细菌,所述细菌为嗜中温的甲基营养型细菌。

[0045] 35. 根据条目1至34中任一项所述的细菌,其中,所述细菌属于甲基菌(Methylobacillus)属、甲基杆菌(Methylobacterium)属或甲基红藻(Methylorubrum)属,优选甲基菌属或甲基杆菌属。

[0046] 36. 根据条目1至35中任一项所述的细菌,所述细菌选自鞭毛甲基菌(Methylobacillus flagellatus)、糖原甲基菌(Methylobacillus glycogenes)、草原甲基菌(Methylobacillus pratensis)、根际甲基菌(Methylobacillus rhizosphaerae)、草状甲基菌(Methylobacillus gramineus)、树状甲基菌(Methylobacillus arboreus)、隆凸甲基菌(Methylobacillus caricis)、食甲基甲基菌(Methylobacillus methilovorans)、甲基菌属(Methylobacillus sp)、扭脱甲基杆菌(Methylobacterium extorquens)、嗜有机甲基杆菌(Methylobacterium organophilum)和扭脱甲基红藻(Methylorubrum extorquens)。

[0047] 37. 根据条目1至36中任一项所述的细菌,所述细菌是甲基菌属。

[0048] 38. 根据条目1至37中任一项所述的细菌,所述细菌选自鞭毛甲基菌(Methylobacillus flagellatus)、糖原甲基菌(Methylobacillus glycogenes)、草原甲基菌(Methylobacillus pratensis)、根际甲基菌(Methylobacillus rhizosphaerae)、草状甲基菌(Methylobacillus gramineus)、树状甲基菌(Methylobacillus arboreus)、隆凸甲基菌(Methylobacillus caricis)、食甲基甲基菌(Methylobacillus methilovorans)和

甲基菌属种(*Methylobacillus* sp)。

[0049] 39. 根据条目1至38中任一项所述的细菌,其中,所述细菌为鞭毛甲基菌。

[0050] 40. 根据条目1至38中任一项所述的细菌,其中,所述细菌为糖原甲基菌。

[0051] 41. 根据条目37至40中任一项所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的胞外多糖 (EPS) 的产生。

[0052] 42. 根据条目41所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种内源性多肽的表达和/或活性。

[0053] 43. 根据条目41或42所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种内源性多肽的表达。

[0054] 44. 根据条目41至43中任一项所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少两种内源性多肽的表达。

[0055] 45. 根据条目41至44中任一项所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少三种内源性多肽的表达。

[0056] 46. 根据条目41至45中任一项所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少四种内源性多肽的表达。

[0057] 47. 根据条目41至46中任一项所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少五种内源性多肽的表达。

[0058] 48. 根据条目41至47中任一项所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少六种内源性多肽的表达。

[0059] 49. 根据条目1至8中任一项所述的细菌,所述细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的所有内源性多肽的表达。

[0060] 50. 根据条目42至49中任一项所述的细菌,其中,所述参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种多肽选自自由以下组成的组:a) 包括SEQ ID NO:27至64中任一种所示的氨基酸序列的多肽和b) 包括与SEQ ID NO:27至64中任一种具有至少70%序列同一性的氨基酸序列并且具有与参考多肽相同的功能特性的多肽。

[0061] 51. 根据条目42至50中任一项所述的细菌,其中,所述参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种多肽选自自由以下组成的组:a) 包括SEQ ID NO:27至52中任一种所示的氨基酸序列的多肽和b) 包括与SEQ ID NO:27至52中任一种具有至少70%序列同一性的氨基酸序列并且具有与参考多肽相同的功能特性的多肽。

[0062] 52. 根据条目42至50中任一项所述的细菌,其中,所述参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种多肽选自自由以下组成的组:a) 包括SEQ ID NO:53至64中任一种所示的

氨基酸序列的多肽和b)包括与SEQ ID NO:53至64中任一种具有至少70%序列同一性的氨基酸序列并且具有与参考多肽相同的功能特性的多肽。

[0063] 53.根据条目42至52中任一项所述的细菌,其中,所述参与所述细菌中产生胞外多糖(EPS)的至少一种多肽选自由以下组成的组:a)包括SEQ ID NO:65至112中任一种所示的氨基酸序列的多肽和b)包括与SEQ ID NO:65至112中任一种具有至少70%序列同一性的氨基酸序列并且具有与参考多肽相同的功能特性的多肽。

[0064] 54.根据条目42至53中任一项所述的细菌,其中,所述参与所述细菌中产生胞外多糖(EPS)的至少一种多肽选自由以下组成的组:a)包括SEQ ID NO:65至86中任一种所示的氨基酸序列的多肽和b)包括与SEQ ID NO:65至86中任一种具有至少70%序列同一性的氨基酸序列并且具有与参考多肽相同的功能特性的多肽。

[0065] 55.根据条目42至53中任一项所述的细菌,其中,所述参与所述细菌中产生胞外多糖(EPS)的至少一种多肽选自由以下组成的组:a)包括SEQ ID NO:87至112中任一种所示的氨基酸序列的多肽和b)包括与SEQ ID NO:87至112中任一种具有至少70%序列同一性的氨基酸序列并且具有与参考多肽相同的功能特性的多肽。

[0066] 56.根据条目42至55中任一项所述的细菌,其中,所述参与所述细菌中产生胞外多糖(EPS)的至少一种多肽选自由以下组成的组:具有肽基-脯氨酰基顺-反异构酶活性的多肽,能够充当多糖输出蛋白的多肽;充当链长决定蛋白的多肽;以及具有蛋白-酪氨酸激酶活性的多肽。

[0067] 57.根据条目56所述的细菌,其中,所述具有肽基-脯氨酰基顺-反异构酶活性的多肽包括与SEQ ID NO:32具有至少70%序列同一性的氨基酸序列,所述能够充当多糖输出蛋白的多肽包括与SEQ ID NO:33具有至少70%序列同一性的氨基酸序列,所述充当链长决定蛋白的多肽包括与SEQ ID NO:34具有至少70%序列同一性的氨基酸序列,以及所述具有蛋白-酪氨酸激酶活性的多肽包括与SEQ ID NO:35具有至少70%序列同一性的氨基酸序列。

[0068] 58.根据条目56所述的细菌,其中,所述具有肽基-脯氨酰基顺-反异构酶活性的多肽包括与SEQ ID NO:68具有至少70%序列同一性的氨基酸序列,所述能够充当多糖输出蛋白的多肽包括与SEQ ID NO:69具有至少70%序列同一性的氨基酸序列,所述充当链长决定蛋白的多肽包括与SEQ ID NO:70具有至少70%序列同一性的氨基酸序列,以及所述具有蛋白-酪氨酸激酶活性的多肽包括与SEQ ID NO:71具有至少70%序列同一性的氨基酸序列。

[0069] 59.根据条目42至58中任一项所述的细菌,其中,与所述其他方面相同的细菌相比,参与所述细菌中产生胞外多糖(EPS)的至少一种多肽的表达降低了至少50%,诸如降低了至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%。

[0070] 60.根据条目42至59中任一项所述的细菌,其中,与所述其他方面相同的细菌相比,参与所述细菌中产生胞外多糖(EPS)的至少一种多肽的表达被消除。

[0071] 61.根据条目42至60中任一项所述的细菌,其中,编码所述参与所述细菌中产生胞外多糖(EPS)的一种或多种多肽的一个或多个内源性基因已经失活。

[0072] 62.根据条目42至61中任一项所述的细菌,其中,编码所述参与所述细菌中产生胞外多糖(EPS)的一种或多种多肽的一个或多个内源性基因已经通过部分或全部基因序列的缺失而失活。

[0073] 63. 根据条目42至62中任一项所述的细菌, 其中, 编码所述参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的一种或多种多肽的一个或多个内源性基因已经通过在所述细菌中引入或表达相应的稀有切割内切核酸酶而失活, 所述稀有切割内切核酸酶能够通过DNA切割选择性地使编码所述多肽的所述内源性基因失活。

[0074] 64. 根据条目63所述的细菌, 其中, 所述稀有切割内切核酸酶选自以下组成的组: 转录激活因子样效应物 (TALE) 核酸酶、兆核酸酶、锌指核酸酶 (ZFN) 和RNA导向的内切核酸酶。

[0075] 65. 根据条目64所述的细菌, 其中, 所述RNA导向的内切核酸酶是催化失活的Cas9蛋白。

[0076] 66. 根据条目65所述的细菌, 所述细菌包括 (例如, 表达) 在细胞条件下与编码所述一种或多种酶的基因组DNA特异性杂交 (例如, 结合) 的至少一种单导向RNA (sgRNA)。

[0077] 67. 根据条目42至61中任一项所述的细菌, 其中, 所述参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的一种或多种多肽的表达通过编码所述一种或多种多肽的所述一个或多个内源性基因的转录和/或翻译阻遏而降低 (例如, 受到抑制)。

[0078] 68. 根据条目42至61中任一项所述的细菌, 其中, 所述参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的一种或多种多肽的表达通过在所述细菌中引入或表达至少一种抑制性核酸分子而降低 (例如, 受到抑制), 所述至少一种抑制性核酸分子在细胞条件下与编码所述一种或多种多肽的细胞mRNA和/或基因组DNA特异性杂交 (例如, 结合)。

[0079] 69. 根据条目68所述的细菌, 其中, 所述抑制性核酸分子是反义寡核苷酸、核酶或干扰RNA (RNAi) 分子。

[0080] 70. 根据条目69所述的细菌, 其中, 所述干扰RNA分子是微小RNA (miRNA)、小干扰RNA (siRNA) 或短发夹RNA (shRNA)。

[0081] 71. 根据条目42至70中任一项所述的细菌, 其中, 所述参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的一种或多种内源性多肽由包括在第一EPS基因簇和/或第二EPS基因簇中的一个或多个基因编码。

[0082] 72. 根据条目71所述的细菌, 其中, 所述第一EPS基因簇包括由以下限定的基因或与以下直系同源的基因: 在SEQ ID NO: 200或203中发现的开放阅读框 (ORF)。

[0083] 73. 根据条目71或72所述的细菌, 其中, 所述第一EPS基因簇包括基因epsD、epsE、epsF、epsG、epsB、epsL、epsH、epsI、epsJ和epsS, 或其直系同源物。

[0084] 74. 根据条目71或73中任一项所述的细菌, 其中, 所述第一EPS基因簇包括基因epsD、epsE、epsF和epsG, 或其直系同源物。

[0085] 75. 根据条目71至74中任一项所述的细菌, 其中, 所述第一EPS基因簇包括与SEQ ID NO: 200或203的核苷酸序列具有至少50%序列同一性的核苷酸序列。

[0086] 76. 根据条目71至74中任一项所述的细菌, 其中, 所述第一EPS基因簇包括与SEQ ID NO: 200的核苷酸序列具有至少50%序列同一性的核苷酸序列。

[0087] 77. 根据条目71至76中任一项所述的细菌, 其中, 所述第一EPS基因簇中的至少一个基因例如通过部分或全部基因序列的缺失而失活。

[0088] 78. 根据条目71至77中任一项所述的细菌, 其中, 选自epsD、epsE、epsF、epsG、epsB、epsL、epsH、epsI、epsJ和epsS或其直系同源物的至少一个基因失活, 例如通过部分或

全部基因序列的缺失而失活。

[0089] 79. 根据条目71至78中任一项所述的细菌, 其中, 选自epsD、epsE、epsF和epsG或其直系同源物的至少一个基因失活, 例如通过部分或全部基因序列的缺失而失活。

[0090] 80. 根据条目71至79中任一项所述的细菌, 其中, 所述基因epsD、epsE、epsF和epsG或其直系同源物失活, 例如通过部分或全部基因序列的缺失而失活。

[0091] 81. 根据条目79或80所述的细菌, 其中, 所述基因epsD编码包括与SEQ ID NO:32具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的多肽, 其中, 所述基因epsE编码包括与SEQ ID NO:33具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的多肽, 其中, 所述基因epsF编码包括与SEQ ID NO:34具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的多肽, 以及其中, 所述基因epsG编码包括与SEQ ID NO:35具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

[0092] 82. 根据条目81所述的细菌, 其中, 所述基因epsD包括与SEQ ID NO:118具有至少70%序列同一性的核苷酸序列, 所述基因epsE包括与SEQ ID NO:119具有至少70%序列同一性的核苷酸序列, 所述基因epsF包括与SEQ ID NO:120具有至少70%序列同一性的核苷酸序列, 以及所述基因epsG包括与SEQ ID NO:121具有至少70%序列同一性的核苷酸序列。

[0093] 83. 根据条目79或80所述的细菌, 其中, 所述基因epsD编码包括与SEQ ID NO:68具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的多肽, 其中, 所述基因epsE编码包括与SEQ ID NO:69具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的多肽, 其中, 所述基因epsF编码包括与SEQ ID NO:70具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的多肽, 以及其中, 所述基因epsG编码包括与SEQ ID NO:71具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

[0094] 84. 根据条目83所述的细菌, 其中, 所述基因epsD包括与SEQ ID NO:154具有至少70%序列同一性的核苷酸序列, 所述基因epsE包括与SEQ ID NO:155具有至少70%序列同一性的核苷酸序列, 所述基因epsF包括与SEQ ID NO:156具有至少70%序列同一性的核苷酸序列, 以及所述基因epsG包括与SEQ ID NO:157具有至少70%序列同一性的核苷酸序列。

[0095] 85. 根据条目71至84中任一项所述的细菌, 其中, 所述第一EPS基因簇失活。

[0096] 86. 根据条目71至85中任一项所述的细菌, 其中, 所述第一EPS基因簇通过所述簇的部分或全部序列的缺失而失活。

[0097] 87. 根据条目71至85中任一项所述的细菌, 其中, 所述第一EPS基因簇通过导致基因表达的缺乏的启动子和/或核糖体结合位点区域的修饰(例如, 通过在其中引入至少一个突变)而失活。

[0098] 88. 根据条目71至87中任一项所述的细菌, 其中, 所述第二EPS基因簇包括由以下限定的基因或与以下直系同源的基因: 在SEQ ID NO:201或205中发现的开放阅读框(ORF)。

[0099] 89. 根据条目71至88中任一项所述的细菌, 其中, 所述第二EPS基因簇包括与201或205的核苷酸序列具有至少50%序列同一性的核苷酸序列。

[0100] 90. 根据条目71至88中任一项所述的细菌, 其中, 所述第二EPS基因簇包括与201的核苷酸序列具有至少50%序列同一性的核苷酸序列。

[0101] 91. 根据条目71至90中任一项所述的细菌, 其中, 所述第二EPS基因簇中的至少一个基因失活, 例如通过部分或全部基因序列的缺失而失活。

[0102] 92. 根据条目71至91中任一项所述的细菌, 其中, 所述第二EPS基因簇失活。

[0103] 93. 根据条目71至92中任一项所述的细菌, 其中, 所述第二EPS基因簇通过所述簇

的部分或全部序列的缺失而失活。

[0104] 94. 根据条目71至92中任一项所述的细菌,其中,所述第二EPS基因簇通过导致基因表达的缺乏的启动子和/或核糖体结合位点区域的修饰(例如,通过在其中引入至少一个突变)而失活。

[0105] 95. 根据条目40至92中任一项所述的细菌,其中,编码所述参与所述细菌中产生胞外多糖(EPS)的酶的所有内源性基因失活,例如,缺失。

[0106] 96. 一种用于生产生物物质的方法,所述方法包括在合适的培养条件下培养根据条目1至95中任一项所述的细菌。

[0107] 97. 根据条目96所述的方法,包括在合适的培养条件下于培养基中培养根据条目40至95中任一项所述的细菌,所述培养基包括还原性单碳化合物,诸如甲醇,或不含碳-碳键的多碳化合物,诸如二甲醚和二甲胺。

[0108] 98. 根据条目97所述的方法,其中,所述培养基包括甲醇。

[0109] 99. 根据条目96至98中任一项所述的方法,其中,所述培养在生物反应器中进行。

[0110] 100. 根据条目96至99中任一项所述的方法,其中,所述生化化合物选自有机酸、氨基酸、脂肪酸及其衍生物。

[0111] 101. 一种用于生产生物物质的方法,所述方法包括在合适的培养条件下培养根据条目1至95中任一项所述的细菌。

附图说明

[0112] 图1:在放大400x下用DAPI染色的鞭毛甲基菌细胞的荧光图像,左边是野生型细胞,以及右边是ppK缺失细胞。箭头指向被DAPI染色剂染成黄色的多聚磷酸盐颗粒。

[0113] 图2:使用野生型鞭毛甲基菌(上图)和ppK缺乏的鞭毛甲基菌(下图)的发酵的生物物质产生的生物过程图。

[0114] 图3:使用表达谷氨酸脱氢酶的野生型鞭毛甲基菌(上图)和ppK缺乏的鞭毛甲基菌(下图)的发酵的GABA-产生的生物过程图。

[0115] 图4:antiSMASH算法输出的屏幕截图,其具有来自其他生物的已知N-酰基高丝氨酸内酯产生簇。

[0116] 图5:使用野生型鞭毛甲基菌(上图)和AHL-合酶缺乏的鞭毛甲基菌(下图)的发酵的生物物质产生生物过程图。

[0117] 图6:经水解的鞭毛甲基菌摇瓶上清液的糖含量。深灰色条代表以mg/L为单位的总葡萄糖,以及浅灰色条代表总单糖。误差棒是技术复制的标准偏差。

[0118] 图7:由鞭毛甲基菌的不同菌株产生的生物反应器发酵液的测量粘度。

[0119] 图8:经24小时的孵育后的野生型鞭毛甲基菌和糖原甲基菌培养物的照片。左边是野生型ABME 5和6,随后是鞭毛甲基菌中的单簇破坏,以及最后是双破坏。

[0120] 图9:在ABME 6和ABME 131的两个代表性生物反应器发酵期间添加消泡剂(y轴)与发酵时间(x轴)的关系图。

[0121] 图10:野生型鞭毛甲基菌(左)对比双破坏菌株ABME 131(右)的生物反应器发酵液的相差显微镜图像。

[0122] 图11:与亲代菌株相比,不含EPS的ABME131的生长得到改善。

[0123] 下面将更详细地描述本发明。

具体实施方式

[0124] 除非本文特别定义,否则所使用的所有技术和科学术语具有与生物化学、遗传学和微生物学领域的技术人员通常理解的相同的含义。

[0125] 与本文所述相似或等同的所有方法和材料都可以用于本发明的实践或测试,并且本文描述了合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利及其它参考文献均通过援引整体并入本文。在冲突的情况下,以本说明书(包括定义)为准。此外,除非另有说明,否则材料、方法和实例仅是说明性的,而非限制性的。

[0126] 除非另有说明,否则本发明的实践将采用细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学和重组DNA的常规技术,这些都在本领域的技术范围内。这些技术在文献中有充分的解释。参见,例如,Current Protocols in Molecular Biology(Frederick M.AUSUBEL,2000,Wiley and son Inc,Library of Congress,USA);Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Third Edition,(Sambrook et al,2001,Cold Spring Harbor,New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press);Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait ed.,1984);Mullis et al.美国专利号4,683,195;Nucleic Acid Hybridization(B.D.Harries&S.J.Higgins eds.1984);Transcription And Translation(B.D.Hames&S.J.Higgins eds.1984);Culture Of Animal Cells(R.I.Freshney,Alan R.Liss,Inc.,1987);Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press,1986);B.Perbal,A Practical Guide To Molecular Cloning(1984);Methods In ENZYMOLOGY系列(J.Abelson and M.Simon,eds.-in-chief,Academic Press,Inc.,New York),具体地,第154和155卷(Wu et al.eds.)以及第185卷,"Gene Expression Technology"(D.Goeddel,ed.);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J.H.Miller and M.P.Calos eds.,1987,Cold Spring Harbor Laboratory)。

[0127] 本发明的细菌

[0128] 如上所述,本发明基于意外且令人惊讶的发现,生物过程中的某些缺点,特别是大量细胞裂解,可以通过降低细菌中具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达和/或活性来克服。

[0129] 因此,本发明在第一方面提供了一种基因工程化细菌,其被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面都相同的细菌相比降低的具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达和/或活性。

[0130] “具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽”是催化以下反应的多肽:ATP+(磷酸盐)_n <=> ADP+(磷酸盐)_{n+1} (EC 2.7.4.1)。多聚磷酸盐激酶(PPK)由ppk基因编码,在许多细菌(包括甲基营养菌(methylotroph)诸如鞭毛甲基菌和糖原甲基菌)中高度保守,并在细菌适应营养严格和环境应激的能力中发挥重要作用。具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的非限制性实例以SEQ ID NO:1、3、5、7、9和11提供。

[0131] 根据一些实施方式,具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列

[0138] 根据一些实施方式,编码具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:8中所示的核酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:8中所示的核酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:8中所示的核酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核酸序列。

[0139] 根据一些实施方式,具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0140] 根据一些实施方式,编码具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:10中所示的核酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:10中所示的核酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:10中所示的核酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核酸序列。

[0141] 根据一些实施方式,具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:11中所示的氨基酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0142] 根据一些实施方式,编码具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:12中所示的核酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:12中所示的核酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:12中所示的核酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核酸序列。

[0143] 根据一些实施方式,本发明的细菌可以被修饰成具有与除不携带所述修饰之外其它方面都相同的细菌相比降低的具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达。

[0144] 根据一些实施方式,本发明的细菌可以被修饰成具有与除不携带所述修饰之外其它方面都相同的细菌相比降低的具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达。与其他方面相同的细菌相比,具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达水平可以,例如,降低了至少50%,诸如降低了至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%。

[0145] 根据一些实施方式,本发明的细菌可以被修饰成具有与除不携带所述修饰之外其它方面都相同的细菌相比降低的编码所述具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的内源

性基因的表达水平。与其他方面相同的细菌相比,内源性基因的表达水平可以,例如,降低了至少50%,诸如降低了至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%。

[0146] 根据一些实施方式,编码所述具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因已经失活,诸如通过部分或全部基因序列的缺失而失活。

[0147] 根据一些实施方式,编码所述具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因已经通过在微生物中引入或表达稀有切割内切核酸酶而失活,该稀有切割内切核酸酶能够通过DNA切割,优选地通过双链断裂,选择性地使编码所述酶的内源性基因失活。根据本发明用于使内源性基因失活的稀有切割内切核酸酶可以是,例如,转录激活因子样效应物 (TALE) 核酸酶、兆核酸酶、锌指核酸酶 (ZFN) 或RNA导向的内切核酸酶。

[0148] 使编码所述具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因失活的一种方法是使用CRISPRi系统。CRISPRi系统是作为用于靶向抑制基因表达或用于阻断基因组上靶向位置的工具而开发的。CRISPRi系统由无催化活性的“死亡”Cas9蛋白 (dCas9) 和限定dCas9与DNA的结合位点的导向RNA组成。

[0149] 因此,根据一些实施方式,通过在细菌中引入或表达RNA导向的内切核酸酶 (诸如无催化活性的Cas9蛋白) 以及在细胞条件下与编码所述多肽的基因组DNA特异性杂交 (例如,结合) 的单导向RNA (sgRNA),使编码所述具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的内源性基因失活。

[0150] 根据一些实施方式,所述具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达通过抑制而降低。

[0151] 对所述内源性多肽的表达的抑制可以通过本领域已知的任何合适的方法来实现。例如,可以通过涉及以下的基因沉默技术来抑制表达:使用抑制性核酸分子,诸如反义寡核苷酸、核酶,或者干扰RNA (RNAi) 分子,诸如微RNA (miRNA)、小干扰RNA (siRNA) 或短发夹RNA (shRNA)。

[0152] 根据一些实施方式,所述具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达通过编码所述多肽的内源性基因的转录和/或翻译阻遏而降低 (例如,受到抑制)。

[0153] 根据一些实施方式,具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的表达通过在细菌中引入或表达抑制性核酸分子而受到抑制。例如,抑制性核酸分子可以通过外源性核酸分子而引入,该外源性核酸分子包括与启动子 (诸如诱导型启动子) 可操作地连接的编码所述抑制性核酸分子的核苷酸序列,该启动子在细菌中起到引起产生所述抑制性核酸分子的作用。合适地,抑制性核酸分子是在细胞条件下与编码内源性多肽的细胞mRNA和/或基因组DNA特异性杂交 (例如,结合) 的一种核酸分子。取决于靶标,编码基因组DNA的转录和/或编码mRNA的翻译被抑制。

[0154] 根据一些实施方式,抑制性核酸分子是反义寡核苷酸、核酶或干扰RNA (RNAi) 分子。优选地,这种核酸分子包括编码目的多肽或酶的细胞mRNA和/或基因组DNA (例如,编码多肽的细胞mRNA和/或基因组DNA) 的互补序列的至少10个连续核苷酸。

[0155] 根据一些实施方式,抑制性核酸是反义寡核苷酸。这种反义寡核苷酸是在细胞条件下与编码多肽的细胞mRNA和/或基因组DNA特异性杂交 (例如,结合) 的核酸分子 (DNA或RNA)。

[0156] 根据一些实施方式,抑制性核酸分子是核酶,诸如锤头状核酶。核酶分子被设计成催化切割mRNA转录物以阻止多肽的翻译。

[0157] 根据一些实施方式,抑制性核酸分子是干扰RNA (RNAi) 分子。RNA干扰是一种生物过程,其中RNA分子抑制表达,通常破坏特异性mRNA。RNAi分子的示例性类型包括微RNA (miRNA)、小干扰RNA (siRNA) 和短发夹RNA (shRNA)。根据一些实施方式,RNAi分子是miRNA。根据一些实施方式,RNAi分子是siRNA。根据一些实施方式,RNAi分子是shRNA。

[0158] 根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰成具有与除不携带所述修饰之外其它方面都相同的细菌相比降低的具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的活性。

[0159] 具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽活性的降低可以通过本领域已知的任何合适的方法来实现。例如,活性可以通过在多肽的活性位点引入导致活性降低或丧失的一种或多种突变来降低。因此,根据一些实施方式,具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的活性通过导致活性降低或丧失的至少一种活性位点突变而降低。例如,至少一种活性位点突变可以是至少一种非保守氨基酸置换。

[0160] 作为实例,如果要在鞭毛甲基菌中降低具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的活性,则至少一种活性位点突变可以发生在SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列中的位置R379、S384、F492、P511、R568、R625、Q679、H439和H458中的任意一个位置处,这些位置形成活性位点的一部分。在具有多聚磷酸盐激酶活性的直系同源多肽的情况下,至少一种活性位点突变可以位于与SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列中的位置R379、S384、F492、P511、R568、R625、Q678、H439和H458中的任意一个位置相对应的位置处。

[0161] 作为另一实例,如果要在糖原甲基菌中降低具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的活性,则至少一种活性位点突变可以发生在SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列中的位置R79、S84、F192、P211、R268、R325、Q378、H139中的任意一个位置处,这些位置形成活性位点的一部分。在具有多聚磷酸盐激酶活性的直系同源多肽的情况下,至少一种活性位点突变可以位于与SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列中位置R79、S84、F192、P211、R268、R325、Q378、H139、H158中的任意一个位置相对应的位置处。

[0162] 作为另一实例,如果要在根际甲基菌中降低具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的活性,则至少一种活性位点突变可以发生在SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列中的位置R379、S384、F492、P511、R568、R625、Q678、H439和H458中的任意一个位置处,这些位置形成活性位点的一部分。在具有多聚磷酸盐激酶活性的直系同源多肽的情况下至少一种活性位点突变可以位于与SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列中的位置R379、S384、F492、P511、R568、R625、Q678、H439和H458中的任意一个位置相对应的位置处。

[0163] 作为另一实例,如果要在嗜有机甲基杆菌中降低具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的活性,则至少一种活性位点突变可以发生在SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列中的位置R392、S397、F505、P524、R581、R643、H452和H471中的任意一个位置处,这些位置形成活性位点的一部分。在具有多聚磷酸盐激酶活性的直系同源多肽的情况下,至少一种活性位点突变可以位于与SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列中的位置R392、S397、F505、P524、R581、R643、H452和H471中的任意一个位置相对应的位置处。

[0164] 作为另一实例,如果要在扭脱甲基红藻中降低具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的活性,则至少一种活性位点突变可以发生在SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列中的

位置R451、S456、F564、P583、R640、R702、H511和H530中的任何一个位置处,这些位置形成活性位点的一部分。在具有多聚磷酸盐激酶活性的直系同源多肽的情况下,至少一种活性位点突变可以位于与SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列中的位置R451、S456、F564、P583、R640、R702、H511和H530中的任意一个位置相对应的位置处。

[0165] 作为另一实例,如果要在大肠杆菌中降低具有多聚磷酸盐激酶活性的内源性多肽的活性,则至少一种活性位点突变可以发生在SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列中的位置R375、S380、F488、P507、R564、R621、Q674、H435和H454中的任意一个位置处,这些位置形成活性位点的一部分。在具有多聚磷酸盐激酶活性的直系同源多肽的情况下至少一种活性位点突变可以位于与SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列中的位置R375、S380、F488、P507、R564、R621、Q674、H435和H454中的任意一个位置相对应的位置处。

[0166] 这种细菌针对细胞裂解的抗性可以通过降低具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的表达和/或活性得到进一步改善,尤其是在某些条件诸如碳限制下。

[0167] 因此,根据一些实施方式,本发明的细菌可以被进一步修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的表达和/或活性。

[0168] “具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽”是催化以下反应的多肽:酰基-[酰基-负载体-蛋白]+S-腺苷-L-甲硫氨酸 $\rightleftharpoons$ [酰基-负载体-蛋白]+S-甲基-5'-硫代腺苷+N-酰基-L-高丝氨酸内酯(EC 2.3.1.184)。酰基高丝氨酸内酯(AHL)是被许多革兰氏阴性细菌使用的小信号传导分子,用于协调与它们种群密度有函数关系的它们的行为。基于生物合成和对这些分子信号的感应,这一过程被称为群体感应(QS),其调控各种基因表达,包括生长、毒力、生物膜形成和毒素产生。具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的非限制性实例以SEQ ID NO:13、15、17、19、21、23和25提供。

[0169] 根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0170] 根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:14中所示的核酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:14中所示的核酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:14中所示的核酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核酸序列。

[0171] 根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。根据一

些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0172] 根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:16中所示的核酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:16中所示的核酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:16中所示的核酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核酸序列。

[0173] 根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0174] 根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:18中所示的核酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:18中所示的核酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:18中所示的核酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核酸序列。

[0175] 根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0176] 根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:20中所示的核酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:20中所示的核酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:20中所示的核酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核酸序列。

[0177] 根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。根据一

些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:21中所示的氨基酸序列具有至少90%,诸如至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0178] 根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:22中所示的核酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:22中所示的核酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:22中所示的核酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核酸序列。

[0179] 根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0180] 根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:24中所示的核酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:24中所示的核酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:24中所示的核酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核酸序列。

[0181] 根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:25中所示的氨基酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:25中所示的氨基酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽包括与SEQ ID NO:25中所示的氨基酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0182] 根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:26中所示的核酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:26中所示的核酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核酸序列。根据一些实施方式,编码具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因包括与SEQ ID NO:26中所示的核酸序列具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核酸序列。

[0183] 根据一些实施方式,本发明的细菌可以被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的表达。

[0184] 根据一些实施方式,本发明的细菌可以被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的表达。与其他方面相同的细菌相比,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的表达水平可以,例如,降低了至少50%,诸如降低了至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%。

[0185] 根据一些实施方式,本发明的细菌可以被修饰成具有与除不携带所述修饰之外其它方面都相同的细菌相比降低的编码所述具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的内源性基因的表达水平。与其他方面相同的细菌相比,内源性基因的表达水平可以,例如,降低了至少50%,诸如降低了至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%。

[0186] 根据一些实施方式,编码所述具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因已经失活,诸如通过部分或全部基因序列的缺失而失活。

[0187] 根据一些实施方式,编码所述具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因已经通过在微生物中引入或表达稀有切割内切核酸酶而失活,该稀有切割内切核酸酶能够通过DNA切割,优选地通过双链断裂,选择性地使编码所述酶的内源性基因失活。根据本发明用于使内源性基因失活的稀有切割内切核酸酶可以是,例如,转录激活因子样效应物(TALE)核酸酶、兆核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)或RNA导向的内切核酸酶。

[0188] 使编码所述具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因失活的一种方法是使用CRISPRi系统。CRISPRi系统是作为用于靶向抑制基因表达或用于阻断基因组上靶向位置的工具而开发的。CRISPRi系统由无催化活性的“死亡”Cas9蛋白(dCas9)和限定dCas9与DNA的结合位点的导向RNA组成。

[0189] 因此,根据一些实施方式,通过在细菌中引入或表达RNA导向的内切核酸酶(诸如无催化活性的Cas9蛋白)以及在细胞条件下与编码所述多肽的基因组DNA特异性杂交(例如,结合)的单导向RNA(sgRNA),来使编码所述具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的多肽的内源性基因失活。

[0190] 根据一些实施方式,所述具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的表达通过抑制而降低。

[0191] 对所述内源性多肽的表达的抑制可以通过本领域已知的任何合适的方法来实现。例如,可以通过涉及以下的基因沉默技术来抑制表达:使用抑制性核酸分子,诸如反义寡核苷酸、核酶,或者干扰RNA(RNAi)分子,诸如微RNA(miRNA)、小干扰RNA(siRNA)或短发夹RNA(shRNA)。

[0192] 根据一些实施方式,所述具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的表达通过编码所述多肽的内源性基因的转录和/或翻译阻遏而降低(例如,受到抑制)。

[0193] 根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯(AHL)合酶活性的内源性多肽的表达通过在细菌中引入或表达抑制性核酸分子而受到抑制。例如,抑制性核酸分子可以通过外源性核酸分子而引入,该外源性核酸分子包括与启动子(诸如诱导型启动子)可操作地连接的编码所述抑制性核酸分子的核苷酸序列,该启动子在细菌中起到引起产生所述抑制性核酸分子的作用。合适地,抑制性核酸分子是在细胞条件下与编码内源性多肽的细胞mRNA和/或基因组DNA特异性杂交(例如,结合)的一种核酸分子。取决于靶标,编码基因组DNA的转录

和/或编码mRNA的翻译被抑制。

[0194] 根据一些实施方式,抑制性核酸分子是反义寡核苷酸、核酶或干扰RNA (RNAi) 分子。优选地,这种核酸分子包括编码目的多肽或酶的细胞mRNA和/或基因组DNA (例如,编码多肽的细胞mRNA和/或基因组DNA) 的互补序列的至少10个连续核苷酸。

[0195] 根据一些实施方式,抑制性核酸是反义寡核苷酸。这种反义寡核苷酸是在细胞条件下与编码多肽的细胞mRNA和/或基因组DNA特异性杂交 (例如,结合) 的核酸分子 (DNA或RNA)。

[0196] 根据一些实施方式,抑制性核酸分子是核酶,诸如锤头状核酶。核酶分子被设计成催化切割mRNA转录物以阻止多肽的翻译。

[0197] 根据一些实施方式,抑制性核酸分子是干扰RNA (RNAi) 分子。RNA干扰是一种生物过程,其中RNA分子抑制表达,通常破坏特异性mRNA。RNAi分子的示例性类型包括微RNA (miRNA)、小干扰RNA (siRNA) 和短发夹RNA (shRNA)。根据一些实施方式,RNAi分子是miRNA。根据一些实施方式,RNAi分子是siRNA。根据一些实施方式,RNAi分子是shRNA。

[0198] 根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰成具有与除不携带所述修饰之外其它方面都相同的细菌相比降低的具有酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 合酶活性的内源性多肽的活性。

[0199] 具有酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 合酶活性的多肽活性的降低可以通过本领域已知的任何合适的方法来实现。例如,活性可以通过在多肽的活性位点中引入导致活性降低或丧失的一种或多种突变来降低。因此,根据一些实施方式,具有酰基高丝氨酸内酯 (AHL) 合酶活性的内源性多肽的活性通过导致活性降低或丧失的至少一种活性位点突变而降低。例如,至少一种活性位点突变可以是例如至少一种非保守氨基酸置换。

[0200] 通常,本文所指的细菌可以是任何合适的细菌,只要其基因组中包含编码具有多聚磷酸盐激酶活性的多肽的基因。细菌可以是革兰氏阳性或革兰氏阴性的。优选地,细菌是革兰氏阴性细菌。革兰氏阴性细菌的非限制性实例包括来自以下属的物种:甲基菌属、甲基杆菌属、甲基红藻属、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、欧文氏菌属 (*Erwinia*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 和柠檬酸杆菌属 (*Citrobacter*)。革兰氏阳性细菌的非限制性实例包括来自以下属的物种:芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、乳球菌属 (*Lactococcus*)、乳杆菌属 (*Lactobacillus*)、地芽孢杆菌属 (*Geobacillus*)、片球菌属 (*Pediococcus*)、穆尔氏菌属 (*Moorella*)、梭菌属 (*Clostridium*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、链球菌属 (*Streptococcus*) 和纤维单胞菌属 (*Cellulomonas*)。

[0201] 根据一些实施方式,本发明的细菌是甲基营养型细菌,优选嗜中温的甲基营养型细菌。

[0202] 根据一些实施方式,本发明的细菌属于以下的科:嗜甲基菌科 (*Methylophilaceae*) 或甲基杆菌科 (*Methylobacteriaceae*)。

[0203] 根据一些实施方式,本发明的细菌属于嗜甲基菌科。

[0204] 根据一些实施方式,本发明的细菌属于甲基杆菌科。

[0205] 根据一些实施方式,本发明的细菌属于甲基菌属、甲基杆菌属或甲基红藻属。

[0206] 根据一些实施方式本发明的细菌属于甲基菌属或甲基杆菌属。

[0207] 根据一些实施方式,本发明的细菌属于甲基杆菌属或甲基红藻属。

[0208] 根据一些实施方式,本发明的细菌选自鞭毛甲基菌、糖原甲基菌、草原甲基菌、根

际甲基菌、草状甲基菌、树状甲基菌、隆凸甲基菌、食甲基甲基菌、甲基菌属、扭脱甲基杆菌、嗜有机甲基杆菌和扭脱甲基红藻。

[0209] 根据一些实施方式,本发明的细菌属于甲基菌属。

[0210] 根据一些实施方式,本发明的细菌选自鞭毛甲基菌、糖原甲基菌、草原甲基菌、根际甲基菌、草状甲基菌、树状甲基菌、隆凸甲基菌、食甲基甲基菌和甲基菌属。

[0211] 根据一些实施方式,本发明的细菌是鞭毛甲基菌。

[0212] 根据一些实施方式,本发明的细菌是糖原甲基菌。

[0213] 根据一些实施方式,本发明的细菌是根际甲基菌。

[0214] 根据一些实施方式,本发明的细菌属于肠杆菌科 (Enterobacteriaceae)。

[0215] 根据一些实施方式,本发明的细菌属于埃希菌属。

[0216] 根据一些实施方式,本发明的细菌是大肠杆菌。

[0217] 本发明人进一步研究了甲基菌中的一般EPS产生。基于鞭毛甲基菌和糖原甲基菌的基因组的生物信息学分析,本发明人鉴定了两个推定的产生EPS的基因簇。两个EPS簇的破坏导致了EPS产生的完全消除。

[0218] 在经修饰的鞭毛甲基菌和糖原甲基菌菌株中的意外和令人惊讶的观察结果是它们在生长培养物中的行为。当消除了甲基菌属细菌中胞外多糖 (EPS) 产生中涉及的一种或多种内源多肽的表达时,培养物示出许多令人惊讶和意想不到的有益于基于甲醇的生物过程开发的特性。意想不到的是,摇瓶和生物反应器中过量的培养物起泡减少了。此外,在未经修饰的亲代菌株中观察到细胞结团 (cell clumping),然而在经修饰的甲基菌培养物中这种现象有所减少或甚至不存在。当EPS产生被消除时,生物质的离心和过滤也得到改善。这些综合特征显著地改善了生物过程、菌株处理和下游加工,使得经修饰的甲基菌属细菌适用于大规模甲醇发酵。EPS合成的去除意想不到地还改善了鞭毛甲基菌和其他甲基菌属物种的甲醇耐受性。

[0219] 因此,根据一些实施方式,本发明的属于甲基菌属的细菌可以被进一步修饰,以具有与除不携带所述修饰之外其他相同的细菌相比降低的胞外多糖 (EPS) 的产生。更具体地,这种基因工程化的甲基菌属的细菌可以被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种内源性多肽的表达和/或活性。

[0220] 根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种,诸如至少两种内源性多肽的表达。

[0221] 根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少三种,诸如至少四种内源性多肽的表达。

[0222] 根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少五种,诸如至少六种内源性多肽的表达。

[0223] 根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少七种,诸如至少八种

内源性多肽的表达。

[0224] 根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少九种,诸如至少十种内源性多肽的表达。

[0225] 根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少十一种,诸如至少十二种内源性多肽的表达。

[0226] 根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少十三种,诸如至少十四种内源性多肽的表达。

[0227] 根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少十五种,诸如至少十六种内源性多肽的表达。

[0228] 根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比降低的参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的所有内源性多肽的表达。

[0229] 根据一些实施方式,参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种多肽选自由以下组成的组:a) 包括SEQ ID NO:27至64中任一种所示的氨基酸序列的多肽和b) 包括与SEQ ID NO:27至64中任一种具有至少70%,诸如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并具有与参考多肽相同的功能特性的多肽。

[0230] 根据一些实施方式,参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种多肽选自由以下组成的组:a) 包括SEQ ID NO:27至52中任一种所示的氨基酸序列的多肽和b) 包括与SEQ ID NO:27至52中任一种具有至少70%,诸如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并具有与参考多肽相同的功能特性的多肽。

[0231] 根据一些实施方式,参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种多肽选自由以下组成的组:a) 包括SEQ ID NO:53至64中任一种所示的氨基酸序列的多肽和b) 包括与SEQ ID NO:53至64中任一种具有至少70%,诸如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并具有与参考多肽相同的功能特性的多肽。

[0232] 根据一些实施方式,参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种多肽选自由以下组成的组:a) 包括SEQ ID NO:65至112中任一种所示的氨基酸序列的多肽和b) 包括与SEQ ID NO:65至112中任一种具有至少70%,诸如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并具有与参考多肽相同的功能特性的多肽。

[0233] 根据一些实施方式,参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种多肽选自由以下组成的组:a) 包括SEQ ID NO:65至86中任一种所示的氨基酸序列的多肽和b) 包括与SEQ ID NO:65至86中任一种具有至少70%,诸如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并具有与参考多肽相同的功能特性的多肽。

[0234] 根据一些实施方式,参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种酶选自由以下组成的组:a) 包括SEQ ID NO:87至112中任一种所示的氨基酸序列的多肽和b) 包括与SEQ ID NO:87至112中任一种具有至少70%,诸如至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并具有与参考多肽相同的功能特性的多肽。

[0235] 根据一些实施方式,参与所述细菌中产生胞外多糖(EPS)的至少一种多肽选自自由以下组成的组:具有肽基-脯氨酰基顺-反异构酶活性的多肽,能够充当多糖输出蛋白的多肽;充当链长决定蛋白的多肽;以及具有蛋白-酪氨酸激酶活性的多肽。

[0236] 根据一些实施方式,具有肽基-脯氨酰基顺-反异构酶活性的多肽包括与SEQ ID NO:32具有至少70%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0237] 根据一些实施方式,能够充当多糖输出蛋白的多肽包括与SEQ ID NO:33具有至少70%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0238] 根据一些实施方式,充当链长决定蛋白的多肽包括与SEQ ID NO:34具有至少70%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0239] 根据一些实施方式,具有蛋白-酪氨酸激酶活性的多肽包括与SEQ ID NO:35具有至少70%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0240] 根据一些实施方式,具有肽基-脯氨酰基顺-反异构酶活性的多肽包括与SEQ ID NO:68具有至少70%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0241] 根据一些实施方式,能够充当多糖输出蛋白的多肽包括与SEQ ID NO:69具有至少70%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0242] 根据一些实施方式,充当链长决定蛋白的多肽包括与SEQ ID NO:70具有至少70%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0243] 根据一些实施方式,具有蛋白-酪氨酸激酶活性的多肽包括与SEQ ID NO:71具有至少70%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。

[0244] 与其他方面相同的细菌相比,一种或多种内源性多肽的表达水平可以,例如,降低了至少50%,诸如降低了至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少100%。

[0245] 一种或多种内源性多肽的表达的降低可以通过本领域已知的任何合适的方法来实现。例如,表达可以通过来降低:使编码所述参与细菌中产生胞外多糖(EPS)的一种或多种多肽的一个或多个内源性基因失活(诸如由于部分或全部基因序列的缺失)。

[0246] 根据一些实施方式,与所述其他方面相同的细菌相比,所述参与所述细菌中产生胞外多糖(EPS)的至少一个多肽的表达被消除。

[0247] 根据一些实施方式,编码所述参与细菌中产生胞外多糖(EPS)的一种或多种多肽的一个或多个内源性基因已经失活,诸如通过部分或全部基因序列的缺失而失活。

[0248] 根据一些实施方式,编码所述参与所述细菌中产生胞外多糖(EPS)的一种或多种多肽的一个或多个内源性基因已经通过在细菌中引入或表达稀有切割内切核酸酶而失活,该稀有切割内切核酸酶能够通过DNA切割选择性地使编码所述酶的内源性基因失活。根据本发明用于使内源性基因失活的稀有切割内切核酸酶可以是,例如,转录激活因子样效应物(TALE)核酸酶、兆核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)或RNA导向的内切核酸酶。

[0249] 使编码参与细菌中产生胞外多糖(EPS)的多肽的内源性基因失活的一种方法是使用CRISPRi系统。CRISPRi系统是作为用于靶向抑制基因表达或用于阻断基因组上靶向位置的工具而开发的。CRISPRi系统由无催化活性的“死亡”Cas9蛋白(dCas9)和限定dCas9与DNA的结合位点的导向RNA组成。

[0250] 根据一些实施方式,参与细菌中产生胞外多糖(EPS)的内源性多肽的表达通过抑

制而降低。

[0251] 对所述多肽的表达的抑制可以通过本领域已知的任何合适的方法来实现。例如,可以通过涉及以下的基因沉默技术来抑制表达:使用抑制性核酸分子,诸如反义寡核苷酸、核酶,或者干扰RNA (RNAi) 分子,诸如微RNA (miRNA)、小干扰RNA (siRNA) 或短发夹RNA (shRNA)。

[0252] 根据一些实施方式,参与细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的内源性多肽的表达通过编码所述多肽的内源性基因的转录和/或翻译阻遏而降低 (例如,受到抑制)。

[0253] 根据一些实施方式,参与细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的内源性多肽的表达通过在细菌中引入或表达抑制性核酸分子而受到抑制。例如,抑制性核酸分子可以通过外源性核酸分子而引入,该外源性核酸分子包括与启动子 (诸如诱导型启动子) 可操作地连接的编码所述抑制性核酸分子的核苷酸序列,该启动子在细菌中起到引起产生所述抑制性核酸分子的作用。合适地,抑制性核酸分子是在细胞条件下与编码所提及的内源性多肽的细胞mRNA和/或基因组DNA特异性杂交 (例如,结合) 的一种核酸分子。取决于靶标,编码基因组DNA的转录和/或编码mRNA的翻译被抑制。

[0254] 根据一些实施方式,抑制性核酸分子是反义寡核苷酸、核酶或干扰RNA (RNAi) 分子。优选地,这种核酸分子包括编码所提及的多肽的细胞mRNA和/或基因组DNA的互补序列的至少10个连续核苷酸。

[0255] 根据一些实施方式,抑制性核酸是反义寡核苷酸。这种反义寡核苷酸是在细胞条件下与编码所提及的酶的细胞mRNA和/或基因组DNA特异性杂交 (例如,结合) 的核酸分子 (DNA或RNA)。

[0256] 根据一些实施方式,抑制性核酸分子是核酶,诸如锤头状核酶。核酶分子被设计成催化切割mRNA转录物以阻止所提及的多肽的翻译。

[0257] 根据一些实施方式,抑制性核酸分子是干扰RNA (RNAi) 分子。RNA干扰是一种生物过程,其中,RNA分子抑制表达,通常引起特定mRNA的破坏。RNAi分子的示例性类型包括微RNA (miRNA)、小干扰RNA (siRNA) 和短发夹RNA (shRNA)。根据一些实施方式,RNAi分子是miRNA。根据一些实施方式,RNAi分子是siRNA。根据一些实施方式,RNAi分子是shRNA。

[0258] 根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以具有与除不携带所述修饰之外其它方面相同的微生物相比降低的参与细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种多肽的功能 (例如,活性)。

[0259] 至少一种内源性多肽的功能 (例如,活性) 的降低可以通过本领域已知的任何合适的方法来实现。例如,如果多肽是酶,则活性可以通过在导致活性降低或丧失的酶的活性位点引入一种或多种突变而降低。因此,根据一些实施方式,参与细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的至少一种内源性酶的活性通过导致活性降低或丧失的至少一种活性位点突变而降低。例如,至少一种活性位点突变可以是例如至少一种非保守氨基酸置换。

[0260] 如上所述,本发明人已经在甲基菌属的基因组中鉴定了两个推定的EPS基因簇。参与产生胞外多糖 (EPS) 的一种或多种内源性多肽因此由包括在第一EPS基因簇和/或第二EPS基因簇中的一个或多个基因编码。

[0261] 根据一些实施方式,参与所述细菌中产生胞外多糖 (EPS) 的一种或多种内源性多肽通过包括在第一EPS基因簇和/或第二EPS基因簇中的一个或多个基因编码。

[0262] 根据一些实施方式,第一EPS基因簇包括由以下限定的基因或与以下直系同源的基因:在SEQ ID NO:200或203中发现的开放阅读框(ORF)。

[0263] 根据一些实施方式,第一EPS基因簇包括基因epsD、epsE、epsF、epsG、epsB、epsL、epsH、epsI、epsJ和epsS,或其直系同源物。

[0264] 根据一些实施方式,第一EPS基因簇包括基因epsD、epsE、epsF和epsG,或其直系同源物。

[0265] 根据一些实施方式,第一EPS基因簇包括与SEQ ID NO:200或203的核苷酸序列具有至少50%,诸如至少55%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,第一EPS基因簇包括与SEQ ID NO:200或203的核苷酸序列具有至少60%,诸如至少65%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,第一EPS基因簇包括与SEQ ID NO:200或203的核苷酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,第一EPS基因簇包括与SEQ ID NO:200或203的核苷酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,第一EPS基因簇包括与SEQ ID NO:200或203的核苷酸序列具有至少90%,诸如至少93%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,第一EPS基因簇包括与SEQ ID NO:200或203的核苷酸序列具有至少95%,诸如至少97%序列同一性的核苷酸序列。

[0266] 根据一些实施方式,第一EPS基因簇包括与SEQ ID NO:200的核苷酸序列具有以下序列同一性的核苷酸序列:至少50%,诸如至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。

[0267] 根据一些实施方式,第一EPS基因簇包括与SEQ ID NO:203的核苷酸序列具有以下序列同一性的核苷酸序列:至少50%,诸如至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。

[0268] 根据一些实施方式,第二EPS基因簇包括由以下限定的基因或与以下直系同源的基因:在SEQ ID NO:201或205中发现的开放阅读框(ORF)。

[0269] 根据一些实施方式,第二EPS基因簇包括与SEQ ID NO:201或205的核苷酸序列具有至少50%,诸如至少55%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,第二EPS基因簇包括与SEQ ID NO:201或205的核苷酸序列具有至少60%,诸如至少65%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,第二EPS基因簇包括与SEQ ID NO:201或205的核苷酸序列具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,第二EPS基因簇包

括与SEQ ID NO:201或205的核苷酸序列具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,第二EPS基因簇包括与SEQ ID NO:201或205的核苷酸序列具有至少90%,诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列。

[0270] 根据一些实施方式,第二EPS基因簇包括与201的核苷酸序列具有以下的序列同一性的核苷酸序列:至少50%,诸如至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。

[0271] 根据一些实施方式,第二EPS基因簇包括与205的核苷酸序列具有以下的序列同一性的核苷酸序列:至少50%,诸如至少51%、至少52%、至少53%、至少54%、至少55%、至少56%、至少57%、至少58%、至少59%、至少60%、至少61%、至少62%、至少63%、至少64%、至少65%、至少66%、至少67%、至少68%、至少69%、至少70%、至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。

[0272] 根据一些实施方式,第一EPS基因簇中的至少一个基因失活,例如通过部分或全部基因序列的缺失而失活。

[0273] 根据一些实施方式,至少一个基因选自epsD、epsE、epsF、epsG、epsB、epsL、epsH、epsI、epsJ和epsS,或其直系同源物。

[0274] 根据一些实施方式,至少一个基因选自epsD、epsE、epsF和epsG,或其直系同源物。

[0275] 根据一些实施方式,基因epsD、epsE、epsF和epsG或其直系同源物失活,例如由于部分或全部基因序列的缺失而失活。

[0276] 根据一些实施方式,基因epsD编码包括与SEQ ID NO:32具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列的多肽,基因epsE编码包括与SEQ ID NO:33具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列的多肽,基因epsF编码包括与SEQ ID NO:34具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列的多肽,以及基因epsG编码包括与SEQ ID NO:35具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

[0277] 根据一些实施方式,基因epsD编码包括与SEQ ID NO:32具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列的多肽,基因epsE编码包括与SEQ ID NO:33具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列的多肽,基因epsF编码包括与SEQ ID NO:34具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列的多肽,以及基因epsG编码包括与SEQ ID NO:35具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

[0278] 根据一些实施方式,基因epsD编码包括与SEQ ID NO:32具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列的多肽,基因epsE编码包括与SEQ ID NO:33具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列的多肽,基因epsF编码包括与SEQ ID NO:34具有至

少90%，诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列的多肽，以及基因epsG编码包括与SEQ ID NO:35具有至少90%，诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

[0279] 根据一些实施方式，基因epsD包括与SEQ ID NO:118具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列，基因epsE包括与SEQ ID NO:119具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列，基因epsF包括与SEQ ID NO:120具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列，以及基因epsG包括与SEQ ID NO:121具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列。

[0280] 根据一些实施方式，基因epsD包括与SEQ ID NO:118具有至少80%，诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列，基因epsE包括与SEQ ID NO:119具有至少80%，诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列，基因epsF包括与SEQ ID NO:120具有至少80%，诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列，以及基因epsG包括与SEQ ID NO:121具有至少80%，诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列。

[0281] 根据一些实施方式，基因epsD包括与SEQ ID NO:118具有至少90%，诸如至少95%序列同一性的核苷酸序列，基因epsE包括与SEQ ID NO:119具有至少90%，诸如至少95%序列同一性的核苷酸序列，基因epsF包括与SEQ ID NO:120具有至少90%，诸如至少95%序列同一性的核苷酸序列，以及基因epsG包括与SEQ ID NO:121具有至少90%，诸如至少95%序列同一性的核苷酸序列。

[0282] 根据一些实施方式，基因epsD编码包括与SEQ ID NO:68具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列的多肽，基因epsE编码包括与SEQ ID NO:69具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列的多肽，基因epsF编码包括与SEQ ID NO:70具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列的多肽，以及基因epsG编码包括与SEQ ID NO:71具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

[0283] 根据一些实施方式，基因epsD编码包括与SEQ ID NO:68具有至少80%，诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列的多肽，基因epsE编码包括与SEQ ID NO:69具有至少80%，诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列的多肽，基因epsF编码包括与SEQ ID NO:70具有至少80%，诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列的多肽，以及基因epsG编码包括与SEQ ID NO:71具有至少80%，诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

[0284] 根据一些实施方式，基因epsD编码包括与SEQ ID NO:68具有至少90%，诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列的多肽，基因epsE编码包括与SEQ ID NO:69具有至少90%，诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列的多肽，基因epsF编码包括与SEQ ID NO:70具有至少90%，诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列的多肽，以及基因epsG编码包括与SEQ ID NO:71具有至少90%，诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列的多肽。

[0285] 根据一些实施方式，基因epsD包括与SEQ ID NO:154具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列，基因epsE包括与SEQ ID NO:155具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列，基因epsF包括与SEQ ID NO:156具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列，以及基因epsG包括与SEQ ID NO:157具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列。

[0286] 根据一些实施方式，基因epsD包括与SEQ ID NO:154具有至少80%，诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列，基因epsE包括与SEQ ID NO:155具有至少80%，诸如至少85%序

列同一性的核苷酸序列,基因epsF包括与SEQ ID NO:156具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列,以及基因epsG包括与SEQ ID NO:157具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列。

[0287] 根据一些实施方式,基因epsD包括与SEQ ID NO:154具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核苷酸序列,基因epsE包括与SEQ ID NO:155具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核苷酸序列,基因epsF包括与SEQ ID NO:156具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核苷酸序列,以及基因epsG包括与SEQ ID NO:157具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核苷酸序列。

[0288] 根据一些实施方式,本发明的基因工程化细菌被修饰以使第一EPS基因簇失活。

[0289] 根据一些实施方式,本发明的基因工程化细菌被(进一步)修饰以使第二EPS基因簇失活。

[0290] 根据一些实施方式,本发明的基因工程化细菌被修饰以使第一EPS基因簇和第二EPS基因簇失活。

[0291] 根据一些实施方式,第一EPS基因簇通过所述簇的部分或全部序列的缺失而失活。

[0292] 根据一些实施方式,第一EPS基因簇通过所述簇的全部编码序列的缺失而失活。

[0293] 根据一些实施方式,第一EPS基因簇通过所述簇的全部序列的缺失而失活。

[0294] 根据一些实施方式,第一EPS基因簇通过导致基因表达的缺乏的启动子和/或核糖体结合位点区域的修饰(例如,通过在其中引入至少一个突变)而失活。

[0295] 根据一些实施方式,第二EPS基因簇通过所述簇的部分或全部序列缺失而失活。

[0296] 根据一些实施方式,第二EPS基因簇通过所述簇的全部编码序列的缺失而失活。

[0297] 根据一些实施方式,第二EPS基因簇通过所述簇的全部序列的缺失而失活。

[0298] 根据一些实施方式,第二EPS基因簇通过导致基因表达的缺乏的启动子和/或核糖体结合位点区域的修饰(例如,通过在其中引入至少一个突变)而失活。

[0299] 根据一些实施方式,本发明的基因工程化细菌被修饰以缺失与SEQ ID NO:207或209具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,本发明的基因工程化细菌被修饰以缺失与SEQ ID NO:207或209具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,本发明的基因工程化细菌被修饰以缺失与SEQ ID NO:207或209具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核苷酸序列。

[0300] 根据一些实施方式,本发明的基因工程化细菌被修饰以缺失与SEQ ID NO:208或210具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,本发明的基因工程化细菌被修饰以缺失与SEQ ID NO:208或210具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,本发明的基因工程化细菌被修饰以缺失与SEQ ID NO:208或210具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核苷酸序列。

[0301] 根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以缺失与SEQ ID NO:207具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列并缺失与SEQ ID NO:208具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以缺失与SEQ ID NO:207具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列并缺失与SEQ ID NO:208具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以缺失与SEQ ID NO:207具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核苷酸序列并缺

失与SEQ ID NO:208具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核苷酸序列。

[0302] 根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以缺失与SEQ ID NO:209具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列并缺失与SEQ ID NO:210具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以缺失与SEQ ID NO:209具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列并缺失与SEQ ID NO:210具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的核苷酸序列。根据一些实施方式,本发明的细菌被修饰以缺失与SEQ ID NO:209具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核苷酸序列并缺失与SEQ ID NO:210具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的核苷酸序列。

[0303] 发明的方法

[0304] 本发明还提供了用于生产生化化合物的方法,该方法包括在合适的培养条件下培养根据本发明的细菌。该方法还可以包括从培养基中收集生化化合物。

[0305] 根据一些实施方式,本发明提供了用于产生GABA或其衍生物的方法。特别地,本发明提供了用于产生GABA或其衍生物的方法;所述方法包括在培养基中培养根据本发明的细菌。该方法还可以包括从培养基中收集GABA或其衍生物。根据一些实施方式,GABA衍生物选自2-吡咯烷酮、N-甲基-2-吡咯烷酮和聚丁内酰胺组成的组。

[0306] 所采用的培养基可以是适于培养所提及的细菌细胞的任何常规培养基,并且可以根据现有技术的原理组成。所述培养基通常包含各自细菌生长和存活所需的所有营养物,诸如碳源、氮源和其他无机盐。合适的培养基,例如基本培养基或复合培养基,可以从商业供应商处获得,或者可以根据公开的配方来制备,例如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)菌株目录。本领域技术人员公知的非限制性标准培养基包括Luria Bertani (LB) 肉汤、沙氏葡萄糖(Sabouraud Dextrose) (SD) 肉汤、MS肉汤、酵母蛋白胨葡萄糖(Yeast Peptone Dextrose)、BMMY、GMMY或酵母麦芽膏(Yeast Malt Extract) (YM) 肉汤,这些都可商购的。用于培养细菌细胞诸如大肠杆菌细胞的合适培养基的非限制性实例,包括基本培养基和富集培养基,诸如Luria肉汤(LB)、M9培养基、M17培养基、SA培养基、MOPS培养基、Terrific肉汤、YT等。

[0307] 碳源可以是本领域已知的任何合适的碳底物,并且特别是通常用于细菌培养和/或发酵的任何碳底物。合适的可发酵碳底物的非限制性实例包括碳水化合物(例如,C5糖诸如阿拉伯糖或木糖,或C6糖诸如葡萄糖)、甘油(glycerol/glycerine)、乙酸酯、二羟丙酮、单碳源、甲醇、甲烷、油、动物脂肪、动物油、植物油、脂肪酸、脂质、磷脂、甘油酯、甘油单酯、甘油二酯、甘油三酯、可再生碳源、多肽(例如,微生物或植物蛋白或肽)、酵母膏、来自酵母膏的组分、蛋白胨、酪蛋白氨基酸或前述两种或更多种的任意组合。

[0308] 根据一些实施方式,碳底物选自以下组成的组:C5糖(诸如阿拉伯糖或木糖)、C6糖(诸如葡萄糖或果糖)、乳糖、蔗糖、甘油(glycerol/glycerine)、乙酸酯、玉米浆、酵母膏、来自酵母膏的组分、蛋白胨、酪蛋白氨基酸或其组合。

[0309] 在本发明的细菌是甲基营养型细菌的情况下,培养基优选包括还原性单碳化合物,诸如甲醇或甲胺,或不含碳-碳键的多碳化合物,诸如二甲胺。因此,根据一些实施方式,培养基包括甲醇作为碳源。培养基中甲醇的浓度通常可以在以下范围:约0.5%w/v至约4%w/v,诸如约2%w/v至约4%w/v。根据一些实施方式,培养基中甲醇的浓度在约2.5%w/v至约3.5%w/v的范围内。

[0310] 作为氮源,可以使用各种铵盐诸如氨和硫酸铵,其它含氮化合物诸如胺,天然氮源诸如蛋白胨、大豆水解产物和消化的发酵微生物。作为矿物质,可以使用单磷酸钾、硫酸镁、氯化钠、硫酸亚铁、硫酸锰、氯化钙等。

[0311] 合适地,在适于生产所需产物的条件下培养细菌。适于培养相应的细菌的条件是技术人员所公知的。通常,细菌在以下范围的温度下培养:约20至约45°C,诸如约30至约38°C,诸如约37°C。培养可优选在以下进行:好氧条件,诸如通过振荡培养、通过搅拌培养或在具有曝气的生物反应器中,在约20至约45°C,诸如约30至38°C,优选在约37°C的温度下。培养物的pH通常高于5,诸如在以下的范围:约6至约8,优选约6.5至约7.5,更优选约6.8至约7.2。培养物的pH可以用氨、碳酸钙、各种酸、各种碱和缓冲液来调控。培养所进行的时间可以在10至70h的范围内,优选在24至60h的范围内,更优选在36至50h的范围内。

[0312] 培养后,可以通过离心或膜过滤从培养基中除去固体诸如细胞。生化化合物可以通过从培养基中分离并纯化化学化合物的常规方法来收集。公知的纯化程序包括,但不限于,离心或过滤、沉淀、离子交换、色谱方法诸如离子交换色谱法或凝胶过滤色谱法,以及结晶方法。该方法还可以包括从培养基中收集生化化合物。

[0313] 通过本发明的方法生产的生化化合物可以通过培养本发明的细菌获得的任何所需的化合物。非限制性实例包括有机酸、氨基酸、脂肪酸及其衍生物。有机酸的非限制性实例包括富马酸盐(根)、乙醇酸盐(根)、琥珀酸盐(根)、苹果酸盐(根)、丙二酸盐(根)、乳酸盐(根)及其衍生物。氨基酸的非限制性实例包括谷氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、苯丙氨酸及其衍生物。

[0314] 通常,当在生化化合物的产生中采用本发明的细菌时,该细菌将具有产生所述生化化合物的能力。这意指当细菌在培养基中培养时,细菌能够在培养基中或细菌中产生、排泄或分泌目的生化化合物和/或引起目的生化化合物的积累。如果细菌表达在产生生化化合物的生物合成途径中涉及的所有酶,则认为该细菌具有产生目的生化化合物的能力。该细菌可以固有地具有产生目的生化化合物的能力,或者可以通过使用例如DNA重组技术进行修饰以具有产生目的生化化合物的能力。在后者的情况下,细菌将被基因修饰以异源表达生化化合物生物合成所需的一种或多种酶。

[0315] 作为实例,如果待产生的生化化合物是GABA或其衍生物,那么细菌将具有产生GABA的能力。如果细菌表达在产生GABA或其衍生物的生物合成途径中涉及的所有酶,则认为该细菌具有产生GABA或其衍生物的能力。

[0316] 为了产生GABA,大多数产生GABA的细菌使用谷氨酸脱羧酶(GAD),该酶通过去除CO₂将谷氨酸转化为GABA。因此,具有产生GABA能力的细菌适当地包括(例如,表达)具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽(EC 4.1.1.15;由基因gadA或gadB或其直系同源物编码)。该细菌可以固有地具有产生GABA或其衍生物的能力,或者可以通过使用例如DNA重组技术进行修饰以具有产生GABA或其衍生物的能力。在后者的情况下,细菌将被基因修饰以异源表达具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽。

[0317] 如本文使用的,“具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽”或“多肽,其具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性”意指催化以下反应的多肽:L-谷氨酸 $\rightleftharpoons$ 4-氨基丁酸+CO₂(EC 4.1.1.15)。这种多肽的非限制性实例以SEQ ID NO:211-220以及其变体提供,该变体与其具有至少70%,例如至少80%,至少85%,至少90%,至少95%或至少97%的序列同一性。

[0318] 因此,根据一些实施方式,本发明的细菌表达具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽。

[0319] 根据一些实施方式,本发明的细菌表达具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽,其包括与SEQ ID NO 211至220所示的氨基酸序列中的任一种具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,本发明的细菌表达具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽,其包括与SEQ ID NO 211至220所示的氨基酸序列中的任一种具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式,本发明的细菌表达具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽,其包括与SEQ ID NO 211至220所示的氨基酸序列中的任一种具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0320] 在细菌中,GAD酶参与酸应激反应。当一些细菌暴露于低pH时,它们会增加gad基因的表达。这导致谷氨酸的快速脱羧,这消耗了细胞内质子并增加了pH。GABA则是在这个过程中产生的。由于GAD活性在酸性环境中是必需的,所以它在pH 4.0-5.0时示出最佳活性,但在中性pH 7.0时无活性。在正常的胞质溶胶生理条件下,特别是中性pH下,GAD活性的缺乏阻止了中性pH下GABA的持续产生。

[0321] 因此,尽管本发明考虑应用具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的野生型多肽(即在生物中天然发现的谷氨酸脱羧酶),但应用突变体GAD酶可能是有利的,特别是在pH 6至pH 8的pH范围内具有催化活性的突变体GAD酶。

[0322] 有两种方法用于改善GAD酶的pH范围。一种方法去除了GAD的部分C-末端,这样当环境pH为中性时,物理上阻断了GAD的催化位点。通过截短短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 和植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) GAD酶的C-末端,该酶的pH范围扩大到4.0-8.0 (Yu et al., 2012)。在第二种方法中,经由随机诱变使GAD酶上的特定位点突变,以获得在中性pH下有活性的突变酶。通过使大肠杆菌GAD (H465) 的倒数第二个His残基突变,C-末端再次不能阻断中性pH下的GAD活性 (Pennacchietti, et al., 2009)。大肠杆菌GAD中的E89Q突变也防止了中性pH下活性的丧失 (Thu Ho et al., 2013)。在其中引入了四种氨基酸变化 (T17I、D294G、E312S、Q346H) 的短乳杆菌GAD中观察到类似的效果。

[0323] 因此,根据一些实施方式,本发明的细菌表达具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽,并且在pH 6至pH 8的范围内,更优选在pH 7.0下显示出催化活性。

[0324] 根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽是GAD突变体,与衍生该多肽的野生型GAD酶相比,该GAD突变体在其氨基酸序列中包括至少一个氨基酸置换,使得该突变体在pH 6至pH 8的pH范围内具有活性。

[0325] 根据一些实施方式,至少一个氨基酸置换位于与SEQ ID NO:211的位置89和/或位置465相对应的位置处。因此,根据一些实施方式,GAD突变体在其氨基酸序列中包括与SEQ ID NO:211的位置89相对应的位置处氨基酸置换。根据一些实施方式,GAD突变体在其氨基酸序列中包括与SEQ ID NO:211的位置465相对应的位置处氨基酸置换。根据一些实施方式,GAD突变体在其氨基酸序列中包括与SEQ ID NO:211的位置89和位置465相对应的位置处的两个氨基酸置换。

[0326] 根据一些实施方式,多肽是GAD突变体,与衍生该多肽的野生型GAD酶相比,其C-末端缺失了2至20个氨基酸,诸如2至14个氨基酸。

[0327] 根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽选自以下任意一种:

[0328] a) 具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽, 该多肽包括与SEQ ID NO:211具有至少70%, 诸如至少80%, 至少85%, 至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:211中的位置89和/或位置465相对应的位置处的氨基酸置换;

[0329] b) 具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽, 该多肽包括与SEQ ID NO:212具有至少70%, 诸如至少80%, 至少85%, 至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:212中位置84和/或位置457相对应的位置处的氨基酸置换;

[0330] c) 具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽, 该多肽包括与SEQ ID NO:213具有至少70%, 诸如至少80%, 至少85%, 至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:213中位置93和/或位置467相对应的位置处的氨基酸置换;

[0331] d) 具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽, 该多肽包括与SEQ ID NO:214具有至少70%, 诸如至少80%, 至少85%, 至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:214中位置90和/或位置467相对应的位置处的氨基酸置换;

[0332] e) 具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽, 该多肽包括与SEQ ID NO:215具有至少70%, 诸如至少80%, 至少85%, 至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:215中位置85和/或位置462相对应的位置处的氨基酸置换;

[0333] f) 具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽, 该多肽包括与SEQ ID NO:216具有至少70%, 诸如至少80%, 至少85%, 至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:216中位置89和/或位置465相对应的位置处的氨基酸置换;

[0334] g) 具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽, 该多肽包括与SEQ ID NO:217具有至少70%, 诸如至少80%, 至少85%, 至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:217中位置89和/或位置466相对应的位置处的氨基酸置换;

[0335] h) 具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽, 该多肽包括与SEQ ID NO:218具有至少70%, 诸如至少80%, 至少85%, 至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:218中位置89和/或位置466相对应的位置处的氨基酸置换;

[0336] i) 具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽, 该多肽包括与SEQ ID NO:219具有至少70%, 诸如至少80%, 至少85%, 至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:219中位置89和/或位置463相对应的位置处的氨基酸置换;

[0337] j) 具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽, 该多肽包括与SEQ ID NO:220具有至少70%, 诸如至少80%, 至少85%, 至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:220中位置17、位置91、位置94、位置213、位置346和/或位置468相对应的位置处的氨基酸置换;以及

[0338] j) 具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽, 该多肽包括与其中从C-末端缺失2至20个氨基酸, 诸如2至14个氨基酸的SEQ ID NO:211、212、213、214、215、216、217、218、219或220具有至少70%, 诸如至少80%, 至少85%, 至少90%或至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0339] 根据一些实施方式, 具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与SEQ ID NO:211具有至少70%, 诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:211中位置89和/或位置465相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式, 具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与SEQ ID NO:211具有至少80%, 诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:211中位置89和/或位置465相对应的位置处的氨基酸置换。

根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:211具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:211中位置89和/或位置465相对应的位置处的氨基酸置换。

[0340] 根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:212具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:212中位置84和/或位置457相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:212具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:212中位置84和/或位置457相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:212具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:212中位置84和/或位置457相对应的位置处的氨基酸置换。

[0341] 根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:213具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:213中位置93和/或位置467相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:213具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:213中位置93和/或位置467相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:213具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:213中位置93和/或位置467相对应的位置处的氨基酸置换。

[0342] 根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:214具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:214中位置90和/或位置467相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:214具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:214中位置90和/或位置467相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:214具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:214中位置90和/或位置467相对应的位置处的氨基酸置换。

[0343] 根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:215具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:215中位置85和/或位置462相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:215具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:215中位置85和/或位置462相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:215具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:215中位置85和/或位置462相对应的位置处的氨基酸置换。

[0344] 根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:216具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:216中位置89和/或位置465相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:216具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸

序列并且包括在与SEQ ID NO:216中位置89和/或位置465相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:216具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:216中位置89和/或位置465相对应的位置处的氨基酸置换。

[0345] 根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:217具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:217中位置89和/或位置466相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:217具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:217中位置89和/或位置466相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:217具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:217中位置89和/或位置466相对应的位置处的氨基酸置换。

[0346] 根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:218具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:218中位置89和/或位置466相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:218具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:218中位置89和/或位置466相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:218具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:218中位置89和/或位置466相对应的位置处的氨基酸置换。

[0347] 根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:219具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:219中位置89和/或位置463相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:219具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:219中位置89和/或位置463相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:219具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:219中位置89和/或位置463相对应的位置处的氨基酸置换。

[0348] 根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:220具有至少70%,诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:220中位置17、位置91、位置94、位置213、位置346和/或位置468相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:220具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:220中位置17、位置91、位置94、位置213、位置346和/或位置468相对应的位置处的氨基酸置换。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:220具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列并且包括在与SEQ ID NO:220中位置17、位置91、位置94、位置213、位置346和/或位置468相对应的位置处的氨基酸置换。

[0349] 根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与其中从C-末端缺失2至20个氨基酸的SEQ ID NO:211、212、213、214、215、216、217、218、219或220具有至少

70%，诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与其中从C-末端缺失2至20个氨基酸的SEQ ID NO:211、212、213、214、215、216、217、218、219或220具有至少80%，诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与其中从C-末端缺失2至20个氨基酸的SEQ ID NO:211、212、213、214、215、216、217、218、219或220具有至少90%，诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0350] 根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与其中从C-末端缺失2至14个氨基酸的SEQ ID NO:211、212、213、214、215、216、217、218、219或220具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与其中从C-末端缺失2至14个氨基酸的SEQ ID NO:211、212、213、214、215、216、217、218、219或220具有至少80%，诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与其中从C-末端缺失2至14个氨基酸的SEQ ID NO:211、212、213、214、215、216、217、218、219或220具有至少90%，诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0351] 根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与其中从C-末端缺失4至10个氨基酸的SEQ ID NO:211、212、213、214、215、216、217、218、219或220具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与其中从C-末端缺失4至10个氨基酸的SEQ ID NO:211、212、213、214、215、216、217、218、219或220具有至少80%，诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列。根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与其中从C-末端缺失4至10个氨基酸的SEQ ID NO:211、212、213、214、215、216、217、218、219或220具有至少90%，诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0352] 根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与SEQ ID NO:221具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列，条件是位置89处的氨基酸不是E，优选条件是位置89处的氨基酸是Q。根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与SEQ ID NO:221具有至少80%，诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列，条件是位置89处的氨基酸不是E，优选条件是位置89处的氨基酸是Q。根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与SEQ ID NO:221具有至少90%，诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列，条件是位置89处的氨基酸不是E，优选条件是位置89处的氨基酸是Q。

[0353] 根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与SEQ ID NO:223具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列，条件是位置84处的氨基酸不是E，优选条件是位置84处的氨基酸是Q。根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与SEQ ID NO:223具有至少80%，诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列，条件是位置84处的氨基酸不是E，优选条件是位置84处的氨基酸是Q。根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与SEQ ID NO:223具有至少90%，诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列，条件是位置84处的氨基酸不是E，优选条件是位置84处的氨基酸是Q。

[0354] 根据一些实施方式，具有谷氨酸脱羧酶 (GAD) 活性的多肽包括与SEQ ID NO:225具有至少70%，诸如至少75%序列同一性的氨基酸序列，条件是位置17处的氨基酸不是T，位置294处的氨基酸不是D，位置312处的氨基酸不是E和/或位置346处的氨基酸不是Q，优选条

件是位置17处的氨基酸是I,位置294处的氨基酸是G,位置312处的氨基酸是S和/或位置346处的氨基酸是H。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:225具有至少80%,诸如至少85%序列同一性的氨基酸序列,条件是位置17处的氨基酸不是T,位置294处的氨基酸不是D,位置213处的氨基酸不是E和/或位置346处的氨基酸不是Q,优选条件是位置17处的氨基酸是I,位置294处的氨基酸是G,位置312处的氨基酸是S和/或位置346处的氨基酸是H。根据一些实施方式,具有谷氨酸脱羧酶(GAD)活性的多肽包括与SEQ ID NO:225具有至少90%,诸如至少95%序列同一性的氨基酸序列,条件是位置17处的氨基酸不是T,位置294处的氨基酸不是D,位置312处的氨基酸不是E和/或位置346处的氨基酸不是Q,优选条件是位置17处的氨基酸是I,位置294处的氨基酸是G,位置312处的氨基酸是S和/或位置346处的氨基酸是H。

[0355] 为了实现生化化合物诸如GABA的生物合成所需的一种或多种酶的异源表达,已经将包括编码所述一种或多种酶的一种或多种核苷酸序列的一种或多种外源性核酸分子引入至细菌中。因此,基因修饰的细菌可以包括一种或多种外源性核酸分子,该一种或多种外源核酸分子包括编码所述一种或多种酶的一种或多种核苷酸序列。为了促进所述一种或多种酶在细菌中的表达,一种或多种外源性核酸分子可以包括合适的调控元件,诸如启动子,该启动子在细菌细胞中具有引起mRNA分子产生的功能,并且与编码所述一种或多种酶的一种或多种核苷酸序列可操作地连接。

[0356] 将外源性核酸分子诸如DNA分子引入细菌细胞的技术是本领域技术人员公知的并且包括转化(例如,热激或自然转化)等。

[0357] 合适地,外源性核酸分子包括至少一个转录单元,该转录单元从5'至3'包括启动子和转录终止子序列,该启动子在细菌中具有引起mRNA分子产生的功能并且与编码所提及的所述酶的核苷酸序列可操作地连接。

[0358] 根据本发明有用的启动子是任何已知的启动子,其在给定的宿主细胞中具有引起mRNA分子产生的功能。许多这样的启动子是技术人员已知的。这种启动子包括通常与其他基因缔合的启动子,和/或从任何细菌中分离的启动子。用于蛋白表达的启动子的使用通常是分子生物学领域的技术人员已知的,例如,参见Sambrook et al.,*Molecular cloning:A Laboratory Manual*,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989。所应用的启动子可以是诱导型的,诸如温度诱导型启动子(例如,pL或pR噬菌体λ启动子,它们中的每一种都可由温度敏感性λ阻遏物cI857控制)。启动子的上下文中使用的术语“诱导型”意指如果存在刺激,诸如温度变化或化学物质(“化学诱导物”)的存在,启动子仅指导可操作地连接的核苷酸序列的转录。如本文使用的,根据本发明的“化学诱导”是指将外源性或内源性物质(包括大分子,例如,蛋白或核酸)物理应用于宿主细胞。这具有引起宿主细胞中存在的靶启动子增加转录速率的效果。替代地,所应用的启动子可以是组成型的。启动子的上下文中使用的术语“组成型”意指启动子能够在不存在刺激(诸如热激、化学品等)的情况下指导可操作地连接的核苷酸序列的转录。

[0359] 例如,温度诱导系统通过应用受不耐热阻遏物抑制的启动子来工作。这些阻遏物在较低的温度(例如在30°C)下有活性,而在37°C下不能正确折叠且因此失活。因此,这种通路(circuit)可以用于直接调控目的基因(St-Pierre et al.2013),也可以通过基因连同阻遏物的基因组整合来实现。这种温度诱导型表达系统的实例基于受不耐热cI857阻遏物

调控的pL和/或pR λ 噬菌体启动子。类似于基因组整合的DE3系统,T7 RNA聚合酶基因的表达也可以使用温控启动子系统来控制(Mertens et al.1995),而目的基因的表达可以使用T7启动子来控制。

[0360] 在细菌中有功能的启动子的非限制性实例包括组成型启动子和诱导型启动子两者,诸如T7启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统;碱性磷酸酶(phoA)启动子、色氨酸(trp)启动子系统、四环素启动子、 λ 噬菌体启动子、核糖体蛋白启动子;和杂合启动子诸如tac启动子。其他细菌和合成启动子也是合适的。

[0361] 除了启动子之外,外源性核酸分子还可以包括选自5'非翻译区(5'UTR)和3'非翻译区(3'UTR)的至少一个调控元件。许多源自原核生物和真核生物的5'UTR和3'UTR是技术人员公知的。这种调控元件包括通常与其他基因缔合的5'UTR和3'UTR,和/或从任何细菌中分离的5'UTR和3'UTR。

[0362] 通常,5'UTR包含核糖体结合位点(RBS),也称为Shine Dalgarno序列,其通常是起始密码子上游的3-10个碱基对。

[0363] 外源性核酸分子可以是DNA构建体,诸如表达盒或载体。因此,外源性核酸分子可以是载体,诸如表达载体,或者这种载体的一部分,诸如这种载体所包括的表达盒。通常,这种载体在细菌细胞内保留于染色体外,这意味着它存在于细菌细胞的基因组之外。替代地,外源性核酸分子可以稳定地整合至细菌的基因组中(例如,通过随机或靶向插入)。具体地,外源性核酸分子可以是稳定地整合至细菌的基因组中(例如,通过随机或靶向插入)的表达盒。

[0364] 本发明还提供了可通过如上详述的方法获得的生化化合物。

[0365] 本发明还提供了用于生产生物质的方法,该方法包括在合适的培养条件下培养根据本发明的细菌。

[0366] 关于培养条件的细节,诸如培养基、温度等,已经在上面结合生产生物质的方法给出,并加以必要的修改。

[0367] 某些其他定义

[0368] 如本文使用的,“生化化合物”意指由活生物产生的任何碳基化合物。

[0369] 如本文在细菌的上下文中使用的术语“嗜中温的”意指细菌在中等温度下生长得最好,其中最佳生长范围为20至45°C。

[0370] 如本文在细菌的上下文中使用的术语“甲基营养型”意指细菌可以使用还原性单碳化合物(诸如甲醇、甲烷、甲酸盐或甲胺)作为其生长的碳源,以及不含碳-碳键的多碳化合物,诸如二甲醚和二甲胺。

[0371] “多肽”和“蛋白”在本文中可互换使用,表示由酰胺键共价连接的至少两个氨基酸的聚合物,无需考虑长度或翻译后修饰(例如,糖基化、磷酸化、脂质化、豆蔻酰化、泛素化等)。该定义包括D-氨基酸和L-氨基酸,以及D-氨基酸和L-氨基酸的混合物。

[0372] “核酸”或“多核苷酸”在本文中可互换使用,表示通过磷酸二酯键共价连接的至少两个核酸单体单位或碱基(例如,腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、胸腺嘧啶)的聚合物,无需考虑长度或碱基修饰。

[0373] 当涉及例如宿主细胞、核酸或多肽时,使用的“重组的”或“非天然存在的”是指一种材料,或对应于该材料的自然或天然形式的材料,其以自然界中不存在的其他方式进行

了修饰,或与其相同但由合成材料和/或通过使用重组技术的操作产生或衍生。非限制性实例尤其包括重组细菌细胞,其表达在细胞的天然(非重组)形式中不存在的基因,或表达以不同水平表达的天然基因。

[0374] 如本文在基因或核酸分子的上下文中使用的“异源”或“外源性”是指作为基因或核酸分子所存在的细菌的基因组的一部分不是天然存在的,或者是在基因组中不同于其天然存在的一个或多个位置处发现的基因或核酸分子(即DNA或RNA分子)。因此,“异源”或“外源性”基因或核酸分子对细菌来说不是内源性,而是外源性引入微生物的。“异源”基因或核酸分子DNA分子可以来自不同的生物、不同的物种、不同的属或不同的界,作为宿主DNA。

[0375] 如本文在多肽的上下文中使用的“异源”意指多肽通常不在宿主微生物中发现或不由宿主微生物产生(即表达),而是来源于不同的生物、不同的物种、不同的属或不同的界。

[0376] 如本文使用的,术语“直系同源物(ortholog)”或“直系同源物(orthologs)”是指来源于共同的祖先基因但存在于不同的物种中的基因、由其编码的核酸分子(即,mRNA)或由其编码的蛋白。

[0377] 基因的“降低的表达”意指经修饰的细菌与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比,由经修饰的细菌产生的转录产物的量,或相应地由所述基因编码的多肽(例如,酶)的量有所降低。更具体地,基因的“降低的表达”意指经修饰的细菌与除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌相比,由经修饰的细菌产生的转录产物的量,相应地由所述基因编码的多肽(例如,酶)的量降低至少10%,诸如至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%或至少100%。基因的表达的水平可以通过众所周知的方法来确定,包括PCR、Southern印迹法等。另外,基因表达的水平可以通过使用各种公知的方法,包括RNA印迹法、定量RT-PCR等,测量从基因转录的mRNA的量来估计。由该基因编码的多肽的量可以通过众所周知的方法测量,包括ELISA、免疫组织化学法或蛋白质印迹法等。

[0378] 通过在细菌的基因组中的基因中引入突变,可以降低基因的表达,使得由该基因编码的多肽的细胞内活性与除不携带所述突变之外相同的细菌相比有所降低。导致基因表达降低的突变包括将会引起由基因编码的多肽中的氨基酸置换(错义突变)的一个或多个核苷酸的替代,终止密码子的引入(无义突变),将会引起移码的核苷酸的缺失或插入,药物抗性基因的插入,或者部分基因或全部基因的缺失(Qiu and Goodman,1997;Kwon et al., 2000)。表达也可以通过修饰表达调控序列诸如启动子、Shine-Dalgarno(SD)序列等来降低。基因的表达也可以通过基因替代来降低(Datsenko和Wanner,2000),诸如“ λ -red介导的基因替代”。 λ -red介导的基因替代是一种特别适合于使如本文所述的一个或个种基因失活的方法。

[0379] 当在基因或基因簇的上下文中使用时,“使……失活”、“失活”和“失活的”意指所提及的基因或基因簇不再表达功能蛋白。由于基因或基因簇的部分或全部序列的缺失、基因或基因簇的阅读框移位、一种或多种错义/无义突变的引入、或者基因或基因簇的调控区的修饰,经修饰的DNA区可能不能天然表达基因或基因簇,包括控制基因表达的序列,诸如启动子、增强子、弱化子、核糖体结合位点等。优选地,目的基因或基因簇通过该基因或基因簇的部分或全部序列的缺失,诸如通过基因替代而失活。失活也可以通过引入或表达稀有

切割内切核酸酶来完成,该稀有切割内切核酸酶能够通过DNA切割,优选通过双链断裂,选择性使目的基因或基因簇失活。本发明的上下文中的“稀有切割内切核酸酶”包括转录激活因子样效应物(TALE)核酸酶、兆核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)和RNA导向的内切核酸酶。

[0380] 细菌的基因组中的基因或基因簇的存在或不存在可以通过众所周知的方法检测,包括PCR、Southern印迹法等。另外,基因表达的水平可以通过以下估计:使用各种众所周知的方法,包括RNA印迹法、定量RT-PCR等,测量从基因或基因簇转录的mRNA的量。由该基因或基因簇编码的多肽的量可以通过众所周知的方法来测量,包括SDS-PAGE随后是免疫印迹测定(蛋白质印迹法分析)等。

[0381] 如本文使用的,多肽(诸如本文所述的多肽)的“降低的”表达、使多肽的表达“降低”、多肽的表达“的降低”意指所述多肽在经修饰的细菌中的表达与所述多肽在除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌(对照)中的表达相比有所减少。多肽在经修饰的细菌中的表达与所述多肽在除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌(对照)中的表达相比减少了至少约10%,以及优选至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或100%或者在10%和100%之间的全部整数中的任何百分比(例如,6%、7%、8%等)。更具体地,多肽的“降低的”表达、使多肽的表达“降低”、多肽的表达“的降低”意指多肽在经修饰的细菌中的量与所述多肽在除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌(对照)中的量相比减少了至少约10%,以及优选至少约20%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或100%或者在10%和100%之间的全部整数中的任何百分比(例如,6%、7%、8%等)。多肽在细菌中的表达或量可以通过本领域已知的任何合适的方法来确定,包括以下技术诸如ELISA、免疫组织化学法、蛋白质印迹法或流式细胞术。

[0382] 如本文使用的,多肽(诸如本文所述的多肽)的“消除的”表达意指所述多肽在经修饰的细菌中的表达与所述多肽在除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌(对照)中的表达相比是无法检测到的。

[0383] 如本文使用的,多肽(诸如本文所述的酶)的“降低的”活性、使多肽的活性“降低”、多肽的活性“的降低”意指所述多肽在经修饰的细菌中的催化活性与所述多肽在除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌(对照)中的催化活性相比有所减少。多肽在经修饰的细菌中的活性与所述多肽在除不携带所述修饰之外其它方面相同的细菌(对照)中的表达相比减少了至少约10%,以及优选至少约20%、至少约25%、至少约30%、至少约35%、至少约40%、至少约45%、至少约50%、至少约55%、至少约60%、至少约65%、至少约70%、至少约75%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或100%或者在10%和100%之间的全部整数中的任何百分比(例如,6%、7%、8%等)。多肽在细菌中的活性可以通过任何合适的蛋白和酶活性测定来确定。

[0384] “表达”包括多肽(例如,经编码的酶)的产生中所涉及的任何步骤,包括但不限于转录、转录后修饰、翻译、翻译后修饰和分泌。

[0385] 如本文使用的,基因或基因簇的“调控区”是指影响编码序列表达的核酸序列。调

控区是本领域公知的,并且包括但不限于,启动子、增强子、转录终止子、聚腺苷酸化位点、基质附着区和/或调控编码序列表达的其他元件。

[0386] “置换”或“置换的”是指通过用另一个氨基酸残基替代一个氨基酸残基来修饰多肽,例如在多肽序列中用甘氨酸或丙氨酸残基替代丝氨酸残基是氨基酸置换。当用于多核苷酸时,“置换”或“置换的”是指通过用另一个核苷酸替代一个核苷酸来修饰多核苷酸,例如在多核苷酸序列中用胸腺嘧啶替代胞嘧啶是核苷酸置换。

[0387] 当用于多肽时,“保守置换”是指用具有相似侧链的不同残基置换氨基酸残基,并且因此通常涉及用相同或相似氨基酸类别内的氨基酸置换多肽中的氨基酸。作为实例而非限制,具有脂肪族侧链的氨基酸可以被另一种脂肪族氨基酸置换,例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;具有羟基侧链的氨基酸被具有羟基侧链的另一种氨基酸置换,例如,丝氨酸和苏氨酸;具有芳族侧链的氨基酸被具有芳族侧链的另一种氨基酸置换,例如,苯丙氨酸、酪氨酸、色氨酸和组氨酸;具有碱性侧链的氨基酸被具有碱性侧链的另一种氨基酸置换,例如,赖氨酸和精氨酸;具有酸性侧链的氨基酸被具有酸性侧链的另一种氨基酸置换,例如,天冬氨酸或谷氨酸;并且疏水性或亲水性氨基酸分别被另一种疏水性或亲水性氨基酸置换。

[0388] “非保守置换”,当用于多肽时,是指多肽中的氨基酸被具有显著不同侧链特性的氨基酸置换。非保守置换可以在确定的基团之间而不是之内使用氨基酸,并影响(a)置换的区域中肽骨架的结构(例如,用丝氨酸置换甘氨酸), (b) 电荷或疏水性,或(c) 侧链的体量(bulk)。作为实例而非限制,示例性非保守置换可以用碱性或脂肪族氨基酸置换酸性氨基酸;用小氨基酸置换芳香族氨基酸;以及用疏水性氨基酸置换亲水性氨基酸。

[0389] 如本文使用的,“载体”指能够转运与其连接的另一核酸分子的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指环状双链核酸环,额外的核酸片段可以连接到其中。某些载体能够指导与其可操作连接的基因的表达。此类载体在本文中被称为“表达载体”。某些其他载体能够促进外源性核酸分子插入至细菌的基因组。此类载体在本文中被称为“转化载体”。通常,在重组核酸技术中有用的载体通常是质粒的形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。大量合适的载体是本领域技术人员公知的,并且是可商购的。

[0390] 如本文使用的,“启动子”是指DNA序列,通常位于结构基因编码区的上游(5'),它通过为RNA聚合酶和转录起始所需的其它因子提供识别和结合位点来控制编码区的表达。启动子的选择将取决于目的核酸序列。合适的“启动子”通常是能够支持本发明细菌中转录的启动,从而引起mRNA分子的产生的启动子。

[0391] 如本文使用的,“可操作地连接”是指一种并置关系并置关系(juxtaposition),其中所述组分处于允许它们以其预期方式发挥功能的关系。与编码序列“可操作地连接”的控制序列以这样的方式连接,即在与控制序列相容的条件下实现编码序列的表达。当启动子序列与基因的转录起始位点足够接近以调控基因的转录时,启动子序列与基因是“可操作地连接”。

[0392] “序列同一性的百分比”、“序列同一性%”和“同一性百分比”是指核苷酸序列和参考核苷酸序列之间或者氨基酸序列和参考氨基酸序列之间的序列同一性。序列同一性可以通过比较每个序列中的位置来确定,为了比较的目的,可以对每个序列进行比对。当经比较

的序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,那么该分子在该位置是相同的。核苷酸或氨基酸序列之间的同一性程度分别是核苷酸或氨基酸序列共有位置上相同或匹配的核苷酸或氨基酸数目的函数。各种比对算法和/或程序可用于计算两个序列之间的同一性,包括FASTA或BLAST,其可作为GCG序列分析包(威斯康星大学,麦迪逊市(Madison),威斯康星州(Wis.))的一部分获得,并可以默认设置使用。

[0393] “参考序列”或“参考氨基酸序列”是指与另一序列进行比较的确定序列。在本发明的上下文中,参考氨基酸序列可以是例如SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列。

[0394] 如本文使用的,GABA的“衍生物”是指通过对GABA进行修饰而衍生自GABA的化合物。GABA“衍生物”的非限制性实例包括2-吡咯烷酮、N-甲基-2-吡咯烷酮和聚丁内酰胺(尼龙4)。

[0395] 如本文使用的,术语“约”意指所用数目的数值的加或减10%。

[0396] 在本文中说明数值限制或范围的情况下,包括端点。此外,数值限制或范围内的所有值和子范围都被特别包括在内,如同明确写出一样。

[0397] 如本文所用,除非上下文另有明确规定,否则不定冠词“一个/一种(a/an)”意指“至少一个/至少一种”或者“一个或多个/一种或多种”。

[0398] 如本文使用的,术语“包括(comprising)”、“包括(including)”、“具有”及其语法变体被认为是指定了所表述的特征、步骤或组分,但是不排除添加一个或多个额外的特征、步骤、组分或其组。

[0399] 已经对本发明进行了一般性描述,通过参考某些特定实施例可以获得进一步的理解,除非另有说明,否则这些实施例在本文中仅出于说明的目的而提供,并且不旨在限制。

[0400] 实施例

[0401] 实施例1:甲基菌属中多聚磷酸盐激酶(ppk)基因的鉴定

[0402] 根据标准物质公式,发现野生型甲基菌属消耗磷酸盐的量比生物物质形成所需磷酸盐的量高得多。多聚磷酸盐被鉴定为潜在的磷酸盐库(sink),并且用荧光显微术和用DAPI荧光染料进行的多聚磷酸盐特异性染色证实了细胞内多磷酸盐颗粒的存在。微生物中多聚磷酸激酶(ppk)催化多聚P的合成和降解。为了鉴定甲基菌属中负责多聚P形成的基因,使用来自大肠杆菌的已知ppk基因序列(SEQ ID NO:11)对来自甲基菌属的所有可用基因组进行BLAST搜索,其生成了10个命中(数据未示出)。对甲基杆菌属重复了同样的操作,产生了176个命中(数据未示出)。使用SnapGene版6.0软件进行了使用MAFT算法的序列比对。形成活性位点的残基(Zhu et al. 2005)和大肠杆菌酶中多聚磷酸盐合成活性所必需的残基是从文献中确定的(Tzeng and Kornberg,2000)。比对显示,在超过95%的分析序列中,对应于大肠杆菌ppk1(SEQ ID NO:11)R375、S380A、F488A、P507A、R564A、R621A、Q674A的位置处的关键氨基酸,以及对应于大肠杆菌(SEQ ID NO:11)氨基酸H435和H592的活性位点氨基酸是保守的(数据未示出)。

[0403] 实施例2:鞭毛甲基菌中多聚磷酸盐激酶基因的缺失

[0404] 鞭毛甲基菌的多聚磷酸盐激酶基因(SEQ ID NO:2)通过含有选择标志物的DNA构建体在原始ppk基因的基因座中的同源重组而在染色体中缺失。简言之,用PCR从基因组DNA中扩增ppk基因上游的2000个碱基对序列和该基因下游的2000个碱基对序列。将这些片段附加到抗生素抗性盒上,该盒包含自己的启动子、终止子和核糖体结合位点。通过电穿孔将

所得的线性构建体转化至甲基菌属菌株中。将在包含抗生素、以甲醇为碳源的基本培养基琼脂平板上的选择步骤用于鉴定成功的转化子。通过菌落PCR证实DNA整合至正确的基因座中。整合后的全部区域从基因组中扩增,并通过DNA测序检查。为了确保多聚磷酸盐基因不存在于基因组中,设计了一组PCR引物来特异性靶向该基因。利用这些内部引物的菌落PCR没有产生扩增片段,这进一步证明ppk基因不再存在。

[0405] 实施例3:糖原甲基菌中多聚磷酸盐激酶基因的缺失:

[0406] 糖原甲基菌的多聚磷酸盐激酶基因 (SEQ ID NO:4) 通过含有选择标志物的DNA构建体在原始ppk基因的基因座中的同源重组而在染色体中缺失。简言之,用PCR从基因组DNA中扩增ppk基因上游的2000个碱基对序列和该基因下游的2000个碱基对序列。将片段附加到卡那霉素抗性盒上,该盒包含自己的启动子和终止子,并且通过电穿孔将线性构建体转化至甲基菌属菌株中。将包含卡那霉素的基本甲醇培养基琼脂平板上的选择步骤用于鉴定成功的转化子,并通过菌落PCR证实DNA整合至正确的基因座中。整合后的全部区域从基因组中扩增,并通过DNA测序检查。为了确保多聚磷酸盐基因不存在于基因组中,设计了一组PCR引物来特异性靶向ppk基因。将利用内部引物的阴性菌落PCR结合其他证据用作ppk基因不再存在的指征。

[0407] 实施例4:WT和del-ppK菌株中多聚P颗粒的比较

[0408] 在5升生物反应器和摇瓶中,将缺失和未缺失ppK基因 (SEQ ID NO:2) 的鞭毛甲基菌培养物培养于基本甲醇培养基中。达到足够的细胞密度 ($OD_{600} \sim 2$) 后,用40微摩尔的4,6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI) 对来自每个培养物的样品进行染色。在pH 7的磷酸盐缓冲盐水中制备染色溶液。DAPI通常用作DNA染色剂,但其当以较高浓度(微摩尔范围)添加至样品时,它也可用于染色多聚磷酸盐颗粒。当与多聚磷酸盐颗粒结合时,染料的发射光谱经历了向更高波长的光谱移动,从蓝色至黄色。样品用紫外(405nm)光激发,并通过长通430发射滤光器观察。观察到表达ppK基因的细胞包含多聚磷酸盐颗粒,而ppK基因缺失的细胞不包含颗粒(图1)。

[0409] 实施例5:具有和不具有ppK破坏的发酵、生物质的产生的比较

[0410] 用具有和不具有ppK基因的鞭毛甲基菌菌株进行并排(Side to side)生物反应器发酵。使用包含 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 $MgSO_4$ 、 NH_4SO_4 和微量元素混合物的矿质培养基。经由使用在线专有甲醇传感器的反馈回路使甲醇浓度在整个发酵过程中动态保持在4-5g/L。通过自动添加氢氧化铵将pH保持在7,该氢氧化铵也用作氮源。定期测量生物过程参数,诸如光密度、CFU计数、全发酵液干重和游离磷酸盐。在非ppK缺失的生物过程中,一旦光密度达到 ~ 30 ,就发生快速的细胞裂解,这通过光密度的下降、菌落形成单位(CFU)降低99%以及甲醇和氢氧化铵的进料速率降低99%来观察得出。当ppK基因不存在时,光密度达到 $\sim 45-50$ 的较高值,CFU在达到稳定期后保持平稳,并且没有观察到进料速率的急剧下降,表明细胞在稳定期期间保持代谢活性。稳定期可以保持多天,在此期间可以发生产物合成(图2)。

[0411] 实施例6:具有或不具有ppK缺失的GABA产生的比较

[0412] 用具有或不具有ppK基因的产生GABA的鞭毛甲基菌进行并排(Side to side)生物反应器发酵。为了能够使菌株产生GABA,来自大肠杆菌的谷氨酸脱氢酶(Eco GAD突变体E89Q Δ C14)被表达(SEQ ID NO:222),该酶编码根据SEQ ID NO:221的蛋白。所表达的大肠杆菌GAD酶包含点突变E89Q,并通过去除最后14个氨基酸而在C-末端处被截短。引入这些修

饰以减轻天然大肠杆菌GAD酶的pH依赖性,并使GABA能够在中性pH下合成。基因在IPTG诱导型lac0/trc启动子的控制下从质粒中表达。

[0413] 使用包含 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 MgSO_4 、 NH_4SO_4 和微量元素混合物的矿质培养基。经由使用在线专有甲醇传感器的反馈回路使甲醇浓度在整个发酵过程中动态保持在4-5g/L。通过自动添加氢氧化铵将pH保持在7,该氢氧化铵也用作氮源。定期从两个生物反应器中取样,并通过HPLC分析GABA含量。在ppK基因存在的情况下,当培养物达到~30的光密度时,细胞裂解发生。随后是GABA产生的激增,因为伴有其他细胞内容物的所表达的GAD酶被释放到发酵液中。在这个初始激增之后,没有检测到GABA的进一步产生。在ppK缺失菌株的情况下,在整个过程中GABA的产生是平稳的,从而在稳定期期间积累(图3)。

[0414] 实施例7-酰基高丝氨酸内酯合酶的生物信息学分析

[0415] 程序性细胞死亡与群体感应机制有关。在革兰氏阴性细菌中,群体感应依赖于N-酰基高丝氨酸内酯(AHL),其由N-酰基高丝氨酸内酯合酶合成。为了搜索鞭毛甲基菌中与群体感应相关基因簇的存在,利用antiSMASH 6.0(Blin et al.,2021)算法预测基因簇,使用鞭毛甲基菌的全部基因组作为输入(NCBI登记号:NC_007947.1)。该算法试图将具有已知AHL合成功能的特征基因簇映射到所分析的基因组上(图4)。鉴定了单个高丝氨酸内酯产生簇(SEQ ID NO:227),其包括高丝氨酸内酯合酶基因(SEQ ID NO:14)。然后,我们使用BLAST在以下的基因组中鉴定鞭毛甲基菌酶(SEQ ID NO:13)的同源物:鞭毛甲基菌、糖原甲基菌、根际甲基菌、嗜有机甲基杆菌、扭脱甲基红藻和扭脱甲基红藻_AM1(*Methylorubrum extorquens*_AM1)。我们在生物中鉴定了若干种候选的AHL合酶蛋白(分别为SEQ ID NO:15、17、19、21、23和25)。

[0416] 实施例8-在鞭毛甲基菌中AHL合酶基因的缺失

[0417] 鞭毛甲基菌的AHL合酶基因(SEQ ID NO:14)通过包含选择标志物的DNA构建体在原始AHL合酶基因基因座中的同源重组而在染色体中缺失。简言之,用PCR从基因组DNA中扩增AHL合酶基因上游的2000个碱基对序列和该基因下游的2000个碱基对序列。将这些片段附加到抗生素抗性盒上,该盒包含自己的启动子、终止子和核糖体结合位点。通过电穿孔将所得的线性构建体转化至鞭毛甲基菌菌株中。将在包含抗生素、以甲醇为碳源的基本培养基琼脂平板上的选择步骤用于鉴定成功的转化子。通过菌落PCR证实DNA整合至正确的基因座中。整合后的全部区域从基因组中扩增,并通过DNA测序检查。为了确保AHL合酶基因不存在于基因组中,设计了一组PCR引物来特异性靶向该基因。利用这些内部引物的菌落PCR没有产生扩增片段,这进一步证明AHL合酶基因不再存在。

[0418] 实施例9-碳限制条件下具有或不具有AHL合酶缺失的生物物质产生的比较

[0419] 用具有和不具有AHL合酶基因(SEQ ID NO:14)的鞭毛甲基菌菌株进行并排(Side to side)生物反应器发酵。使用包含 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、 MgSO_4 、 NH_4SO_4 和微量元素混合物的矿质培养基。碳限制通过经由连接至溶解氧传感器以在整个发酵中将溶解氧保持在30%的速率的反馈回路以进料甲醇来实现。通过自动添加氢氧化铵将pH保持在7,该氢氧化铵也用作氮源。定期测量生物过程参数,诸如光密度、CFU计数、全发酵液干重和游离磷酸盐。在野生型的生物过程中,一旦光密度达到~26,就发生快速的细胞裂解,这通过光密度的下降、菌落形成单位(CFU)降低99%以及甲醇和氢氧化铵的进料速率降低99%来观察得出。当AHL合酶基因不存在时,OD和CFU在达到稳定期后保持平稳。稳定期可以得到保持,在此期间可以

发生产物合成(图5)。

[0420] 实施例10:鞭毛甲基菌和糖原甲基菌的产生EPS基因的鉴定

[0421] 基于生物信息学分析,选择若干个基因组基因座进行破坏。已报道有在鞭毛甲基菌中两个EPS相关的基因簇的遗传定位(Chistoserdova et al.,2007)。为了注释第一鞭毛甲基菌产生EPS的基因簇(SEQ ID NO:113-138)中的基因,使用Python编程语言中的定制脚本,经由NCBI BLAST蛋白搜索,将来自已经公开的甲基菌属12S methanolan合成簇的基因同源物(Yoshida et al.,2000)与鞭毛甲基菌基因组进行比较。基于由E值、查询覆盖和序列同一性组成的经计算的组合分数来选择最佳命中(Top hit)。然后在基因组序列中手动定位每个基因的单个最佳命中,并进行注释。这些最佳命中的位置与公开的第一簇的位置一致。由于没有为每个基因找到明确的同源物,在最远同源物之间的所有基因都被认为是该簇的一部分。大多数这种未注释的基因编码糖以及多糖相关的基因。将同样的程序用于鉴定糖原甲基菌中完全无注释的EPS簇(SEQ ID NO:151-172)。

[0422] 在鞭毛甲基菌的基因组序列中预测了第二EPS相关簇(SEQ ID NO:139-150)。进行BLAST搜索,将这些基因与methanolan簇进行比较,没有发现明确的同源物。经由针对所有非冗余蛋白序列的NCBI蛋白BLAST搜索来鉴定该簇中每个单个基因的蛋白产物,并如上所述选择每个基因的最佳命中。使用NCBI蛋白BLAST在糖原甲基菌基因组中交叉搜索来自该鞭毛甲基菌蛋白簇的每个基因的蛋白序列。发现所述最佳命中在糖原甲基菌中形成类似的簇(SEQ ID NO:173-198)。

[0423] 在每个EPS相关基因簇中鉴定出的开放阅读框(ORF)如下表1至4所示。

[0424] 表1:鞭毛甲基菌中EPS基因簇1的ORF

[0425]

氨基酸 序列 SEQ ID NO	核苷酸 序列 SEQ ID NO	S12 同 源物	预测的功能/特性
27	113	<i>espA</i>	转录调控因子, LuxR 家族
28	114	<i>espK</i>	环核苷酸结合结构域(cNMP-BD)蛋白
29	115	N/A	未知
30	116	<i>epsL</i>	外分选酶 B 相关的细胞外多糖生物合成 转运蛋白 EpsL
31	117	<i>epsB</i>	转移酶 epsB 家族
32	118	<i>epsD</i>	肽基-脯氨酰顺-反异构酶, EpsD 家族
33	119	<i>epsE</i>	多糖输出蛋白 EpsE
34	120	<i>epsF</i>	链长决定蛋白 EpsF
35	121	<i>epsG</i>	链长决定蛋白酪氨酸激酶 EpsG
36	122	<i>epsH</i>	外分选酶 B
37	123	<i>epsI</i>	EpsI 家族蛋白
38	124	N/A	多糖生物合成蛋白

[0426]

39	125	N/A	多糖丙酮酸转移酶
40	126	N/A	硝基还原酶
41	127	N/A	O-抗原聚合酶
42	128	<i>epsJ</i>	糖基转移酶, 家族 2
43	129	N/A	糖基转移酶, 家族 2
44	130	N/A	糖基转移酶, 组 1
45	131	N/A	糖苷水解酶, 家族 5
46	132	N/A	糖基转移酶, RfaG
47	133	N/A	甘露糖-1-磷酸鸟苷酸转移酶(GDP)
48	134	N/A	dTDP-4-脱氢鼠李糖还原酶
49	135	N/A	dTDP-4-脱氢鼠李糖 3,5-差向异构酶
50	136	N/A	葡萄糖-1-磷酸胸苷基转移酶
51	137	N/A	dTDP-葡萄糖 4,6-脱水酶
52	138	<i>epsS</i>	UDP-半乳糖 4-差向异构酶

[0427] 表2:鞭毛甲基菌中EPS基因簇2的ORF

[0428]

氨基酸 序列 SEQ ID NO	核苷酸 序列 SEQ ID NO	S12 同 源物	预测的功能/特性
53	139	N/A	甘露糖-6-磷酸异构酶, 2 型

[0429]

54	140	N/A	ABC 转运蛋白通透酶
55	141	N/A	NDP-己糖 3-C-甲基转移酶 TylCIII
56	142	N/A	GDP-甘露糖 4,6-脱水酶
57	143	N/A	NAD-依赖性差向异构酶/脱水酶
58	144	N/A	糖基转移酶
59	145	N/A	多糖输出蛋白
60	146	N/A	糖基转移酶
61	147	N/A	NAD-依赖性差向异构酶/脱水酶
62	148	N/A	糖转移酶
63	149	N/A	多糖生物合成蛋白 CapD
64	150	N/A	UDP-葡萄糖焦磷酸化酶

[0430] 表3:糖原甲基菌中EPS基因簇2的ORF

[0431]

氨基酸 序列 SEQ ID NO	核苷酸 序列 SEQ ID NO	S12 同 源物	预测的功能/特性
65	151	<i>epsA</i>	转录调控因子, LuxR 家族
66	152	<i>epsL</i>	外分泌酶 B 相关的细胞外多糖生物合成 转运蛋白 EpsL
67	153	N/A	十一碳烯基-磷酸葡萄糖磷酸转移酶
68	154	<i>epsD</i>	肽基-脯氨酰顺-反异构酶, EpsD 家族
69	155	<i>epsE</i>	多糖输出蛋白 EpsE
70	156	<i>epsF</i>	链长决定蛋白 EpsF
71	157	<i>epsG</i>	链长决定蛋白酪氨酸激酶 EpsG
72	158	<i>epsH</i>	外分泌酶 B

[0432]

73	159	<i>epsI</i>	EpsI 家族蛋白
74	160	<i>epsB</i>	糖基转移酶
75	161	N/A	寡糖重复单元聚合酶
76	162	N/A	含有右旋平行 β -螺旋重复的蛋白
77	163	N/A	酰基转移酶家族蛋白
78	164	N/A	糖基转移酶家族 4 蛋白
79	165	N/A	糖基转移酶家族 4 蛋白
80	166	N/A	核苷酸糖脱氢酶
81	167	<i>epsR</i>	未知
82	168	N/A	未知
83	169	N/A	寡糖翻转酶家族蛋白
84	170	N/A	多糖丙酮酸转移酶家族蛋白
85	171	N/A	酰基转移酶
86	172	<i>epsQ</i>	甘露糖 -1- 磷酸鸟苷酰转移酶 (mannose-1-phosphate guanylyltransferase)/甘露糖 -6-磷酸异构酶

[0433] 表4:糖原甲基菌中EPS基因簇2的ORF

[0434]

氨基酸 序列	核苷酸 序列	S12 同 源物	预测的功能/特性
SEQ ID NO	SEQ ID NO		
87	173	N/A	MarR 家族 EPS 相关的转录调控因子

[0435]

88	174	N/A	GDP-甘露糖 4,6-脱水酶
89	175	N/A	NAD-依赖性差向异构酶/脱水酶家族蛋白
90	176	N/A	未知
91	177	N/A	聚羟基脂肪酸酯合成阻遏物 PhaR
92	178	N/A	UDP-N-乙酰葡萄糖胺 2-差向异构酶(水解)neuC
93	179	N/A	咪唑甘油磷酸合酶亚基 HisF
94	180	N/A	咪唑甘油磷酸合酶亚基 HisH
95	181	N/A	N-乙酰糖酰胺转移酶
96	182	N/A	多糖丙酮酸转移酶家族蛋白
97	183	N/A	酰基转移酶
98	184	N/A	未知
99	185	N/A	ABC 转运蛋白 ATP 结合蛋白
100	186	N/A	FkbM 家族甲基转移酶
101	187	N/A	糖基转移酶
102	188	N/A	甲基转移酶, TIGR04325 家族
103	189	N/A	NAD-依赖性差向异构酶/脱水酶家族蛋白
104	190	N/A	DegT/DnrJ/EryC1/StrS 家族氨基转移氨酶

[0436]

105	191	N/A	糖基转移酶
106	192	<i>epsJ</i>	糖基转移酶
107	193	N/A	糖基转移酶
108	194	N/A	糖基转移酶
109	195	N/A	SDR 家族氧化还原酶
110	196	N/A	糖转移酶
111	197	N/A	SDR 家族 NAD(P)-依赖性氧化还原酶
112	198	<i>epsT</i>	UTP--葡萄糖-1-磷酸尿苷酰转移酶 (UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase) GalU

[0437] 表5:簇的全序列

[0438]

SEQ ID NO	生物	簇	链
199	鞭毛甲基菌	1	顶链
200	鞭毛甲基菌	1	底链
201	鞭毛甲基菌	2	顶链
202	鞭毛甲基菌	2	底链
203	糖原甲基菌	1	顶链
204	糖原甲基菌	1	底链
205	糖原甲基菌	2	顶链

[0439]

206	糖原甲基菌	2	底链
-----	-------	---	----

[0440] 注释为epsD、epsE、epsF和epsG的ORF (鞭毛甲基菌中的SEQ ID NO:32-35,糖原甲基菌中的SEQ ID NO:68-71) 基于它们与甲基菌属菌株12中产生EPS的必需基因的相似性而

被选择进行缺失(Yoshida et al.,2003)。由于第二EPS簇在其他表征的EPS簇中没有明确的同源物,因此选择鞭毛甲基菌中的所有12个ORF(SEQ ID NO:53-64)和糖原甲基菌中的所有26个ORF(SEQ ID NO:87-112)进行缺失。

[0441] 实施例11:DNA缺失

[0442] 制备了ABME 5和ABME 6的经修饰的菌株,其中一者缺失产生EPS的簇或两者都缺失产生EPS的簇。通过引入线性DNA片段实现基因组编辑,该DNA片段由卡那霉素(kanamycin)或利福平(rifampicin)抗性盒组成,侧翼为整合位点上游和下游的2kb长序列。通过电穿孔将DNA片段转化至ABME 5和ABME 6中。将转化子铺板在包含20g/L琼脂、50μg/mL卡那霉素或5μg/mL利福平的选择性PM7平板上24-48h。将ABME 5衍生菌株在30℃下孵育。将ABME 6衍生菌株在37℃下培养。通过菌落PCR确认正确的克隆。通过DNA缺失制备的菌株列于表6中。

[0443] 表6:用基因组整合制备的菌株列表。

[0444]

菌株	物种	基因型	缺失序列
ABME 5	糖原甲基菌 DSM 5685	野生型	
ABME 76	糖原甲基菌 DSM 5685	epsDEFG :: kanR	SEQ ID NO: 207
ABME 190TH	糖原甲基菌 DSM 5685	EPS2 :: kanR	SEQ ID NO: 208

[0445]

ABME 191TH	糖原甲基菌 DSM 5685	epsDEFG :: kanR, EPS2 :: rifR	SEQ ID NO: 207 和 SEQ ID NO: 208
ABME 6	鞭毛甲基菌 DSM 6875	野生型	
ABME 80	鞭毛甲基菌 DSM 6875	EPS2 :: kanR	SEQ ID NO: 210
ABME 82	鞭毛甲基菌 DSM 6875	epsDEFG :: kanR	SEQ ID NO: 209
ABME 131	鞭毛甲基菌 DSM 6875	epsDEFG :: kanR, EPS2 :: rifR	SEQ ID NO: 209 和 SEQ ID NO: 210
ABME 145	甲基菌属 DSM 1758	野生型	

[0446] 实施例12:鞭毛甲基菌中EPS基因破坏前后摇瓶培养物中总EPS的测量

[0447] 为了评价ABME 6中缺失产生EPS的基因的效果,如实施例11所述制备了三种经修饰的ABME 6菌株(ABME 80、ABME 82和ABME 131),并测试了EPS产生。

[0448] 将经证实的转化子在PM7+50 μ g/mL卡那霉素琼脂平板上生长过夜。将单菌落重悬于在带挡板的250mL摇瓶中的25mL PM7培养基+25 μ g/mL卡那霉素中,并以200rpm孵育过夜。第二天,用2.5mL过夜培养物接种在带挡板的250mL摇瓶中的50mL PM7培养基+25 μ g/mL卡那霉素。将所有ABME 5衍生菌株在30 $^{\circ}$ C下培养,并将所有ABME 6衍生菌株在37 $^{\circ}$ C下培养。然后将培养物在冰上冷却,等分到2mL Eppendorf管中,并在4 $^{\circ}$ C下于标准台式离心机上以15000rpm离心15分钟。当细胞沉淀上方可见一层EPS时,将其混合回上清液中。储存培养物上清液用于EPS水解。通过添加一半体积的6M TFA(三氟乙酸)上清液进行水解,使得最终TFA浓度为3M。将试管放入加热至120 $^{\circ}$ C的热循环仪(thermoblockb)中并孵育6小时。水解后,使液体(包括TFA)在80 $^{\circ}$ C蒸发,直到完全干燥。将干物质重悬浮于0.5M NaOH(与原始培养物等分样品的体积相同)中,并在HPLC上分析单体糖。

[0449] 表7:用于摇瓶实验的PM7培养基的组成

[0450]

化合物	Per 1L
MeOH	10 g
KH ₂ PO ₄	0.65 g
NA ₂ HPO ₄	1.05 g
MgSO ₄ * 7H ₂ O	0.1 g
NH ₄ Cl	0.2 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	2 g
TE1 1000X	1 mL
d-生物素	0.1 mg
硫胺素*HCl	0.1 mg
核黄素	0.1 mg
吡哆醇*HCl	0.1 mg
泛酸盐	0.1 mg
烟酰胺	0.1 mg
对氨基苯甲酸	0.02 mg
叶酸	0.01 mg
维生素 B12	0.01 mg

[0451]	硫辛酸	0.01 mg
	CaCl ₂ * 2H ₂ O	3.3 mg
	FeSO ₄ * 7H ₂ O	1.3 mg
	MnSO ₄ * H ₂ O	0.1 mg
	ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0.13 mg
	CuSO ₄ * 5H ₂ O	0.04 mg
	Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0.04 mg
	CoCl ₂ * 6H ₂ O	0.04 mg
	H ₃ BO ₃	0.03 mg
	pH	7.0
	琼脂(用于固体培养基)	20 g

[0452] 离心后, ABME 6在细胞沉淀的顶部产生了可见的黏液层, 水解后总单体糖总计达 ~ 1g/L。单簇破坏 (ABME 80和ABME 82) 没有可见的黏液层, 但仍产生 ~ 500mg/L的总糖。有趣的是, 葡萄糖与总糖的比率取决于哪个基因簇被破坏而反转, 很可能是由于产生了两种不同类型的EPS。当两个簇都被破坏时 (菌株ABME 131), 糖低于检测极限。

[0453] 实施例13: EPS基因破坏前后鞭毛甲基菌的反应器培养物的粘度的测量

[0454] 为了评估破坏EPS产生前后的发酵液的粘度的变化, 将菌株在氧限制下于5升生物反应器发酵中进行比较。生物反应器种子培养物一贯如下制备。在250mL带挡板的摇瓶中的25mL的PM7培养基接种250uL的菌株冷冻原液, 其中原液OD调节至5, 以产生0.05的起始OD。将培养物在37°C下以200rpm孵育过夜。早上, 用10% (20mL) 过夜培养物接种在2L带挡板的摇瓶中的200mL的PM7培养基, 并生长直至OD ~ 1 (+/-0.2)。然后, 使用培养物接种在5-L生物反应器中的2.5L起始体积的无菌PM3培养基 (8%接种物)。通过自动添加NH₄OH将pH保持在7, 并使温度保持在37°C。

[0455] 对于氧限制过程, 自动进料甲醇以保持浓度在3至6g/L之间。将反应器曝气和搅拌保持在最大, 尽管在该过程期间氧浓度总是下降到0%。定期对发酵液取样进行OD、矿物质和代谢物测量。在过程结束时测量粘度, 并且结果总结在图7中。在400厘泊取样时, 野生型鞭毛甲基菌发酵液是高度粘稠的。也测量了不同种类的甲基菌属ABME 145, 并产生了类似的422厘泊的粘稠发酵液。双破坏得到了粘度明显较低的发酵液, 其可以使用标准tabletop设备进行离心和过滤——这是用以前的样品所无法实现的。粘度计证实了这一评估, 粘度测量为35cP或其粘度减少至几乎1/10。还测量了大肠杆菌发酵液的代表性样品用于比较。

[0456] 实施例14: 鞭毛甲基杆菌中EPS基因消除前后摇瓶中减少的起泡的测量

[0457] 我们观察到EPS缺乏的菌株示出明显更少的起泡。为了比较ABME 6与EPS缺乏的突变菌株 (ABME 82和ABME 131) 的泡沫形成, 如实施例12所述培养这些菌株。

[0458] 为了测量泡沫的形成,将烧瓶从振荡器上取下,并使液体静置5分钟。用卷尺测量液体顶部的泡沫层(图8)。野生型培养物在液体的顶部产生0.5-1cm的泡沫层,而单簇破坏物(disruption)仅在液体弯月面处积累有~1mm的泡沫。在双破坏培养物中根本看不到泡沫。

[0459] 实施例15:鞭毛甲基菌中EPS基因破坏前后生物反应器培养中减少的泡沫的测量

[0460] 为了评估破坏EPS产生前后的发酵液的起泡的变化,将菌株在5升生物反应器发酵中进行比较。泡沫形成的量由添加的抗起泡剂(SAG 5693)的量来估算。发酵是在碳限制下进行的。

[0461] 如实施例12所述接种反应器。为了实现碳限制,在以最高曝气和搅拌设置使得pO₂值保持在大约30%的动态计算的速率下将50%甲醇自动进料到反应器中。所添加的甲醇立即被消耗,并保持低于检测水平。当泡沫到达放置在发酵液弯月面上方的检测器时,自动加入抗起泡剂。以这种方式测试ABME 6和ABME 131。在ABME 131的情况下,抗起泡剂的添加开始于5h后。取决于发酵时间,在ABME 131发酵中添加的抗起泡剂少了大约60%(图9)。

[0462] 实施例16:无EPS的鞭毛甲基菌的改善的甲醇耐受性

[0463] 对高甲醇浓度的耐受性是有效生物过程的关键参数。为了证实在不能产生EPS的菌株中甲醇耐受性没有降低,在ABME 6及其产生EPS的衍生菌株ABME 131中测试了在增加甲醇浓度下的生长。

[0464] 如实施例13所述,在摇瓶中测试菌株。为了测试甲醇耐受性,将初始甲醇浓度增加高达4.5%。24h后测量OD₆₀₀。

[0465] 令人惊讶的是,ABME 131的甲醇耐受性与ABME 6相比更高。例如,在2.75%的初始甲醇浓度下,无EPS的ABME 131生长至的OD₆₀₀为1.6,而野生型ABME 6仅生长至的OD₆₀₀为0.3。在2.75%下,生长的差异最为显著。然而,与ABME 6相比,ABME 131在所有甲醇浓度下都有明显的改善的生长(图11)。

[0466] 实施例17:通过插入终止子在转录水平破坏多聚磷酸盐激酶。

[0467] RNA聚合酶需要启动子序列来启动基因到mRNA的转录。一旦RNA聚合酶到达终止子序列,转录就终止,这导致它从转录复合物中释放出来。因此,基因的转录可以通过去除启动子序列或在基因前或基因内插入终止子序列来破坏。这两种干预都是在鞭毛甲基菌中通过直接在基因前面插入终止子序列诸如λ终止子(SEQ ID 230)进行的。这使得RNA聚合酶在成功转录基因之前释放。简言之,用PCR从基因组DNA中扩增ppk基因上游的2000个碱基对序列和该基因内的2000个碱基对序列。将这些片段附加到在3'端处带有终止子序列的抗生素抗性盒上。将所得的含有第一2000bp的ppk基因的线性构建体(其中在起始密码子的正前方带有终止子)通过电穿孔转化到甲基菌属菌株中。将在含有抗生素、以甲醇为碳源的基本培养基琼脂平板上的选择步骤用于鉴定成功的转化子。通过菌落PCR证实DNA整合到正确的基因座中。将整合后的全部区域从基因组中扩增,并通过DNA测序进行检查,以确保终止子序列直接位于染色体中基因的上游。

[0468] 实施例18:通过核糖体结合位点的突变在翻译水平破坏多聚磷酸盐激酶表达。

[0469] 核糖体需要与16S核糖体亚单位3'端互补的6个核苷酸的核糖体结合位点(RBS)来结合转录的mRNA分子并启动翻译。翻译水平取决于16S核糖体亚单位对RBS的亲合力。基于16S核糖体亚单位(SEQ ID 228)的序列,用“AGGAGA”的RBS实现了鞭毛甲基菌的最佳结合亲

和力。用较低亲和力的序列诸如“AT AT AT”替换RBS降低了蛋白的表达。这种置换是通过同源重组在鞭毛甲基菌中进行的。由于基因的准确RBS难以预测,将ppk基因的起始密码子前的20个碱基对用10个“AT”重复替换。简言之,用PCR从基因组DNA中扩增ppk基因上游的2000个碱基对序列和该基因下游的2000个碱基对序列。将这些片段附加到抗生素抗性盒以及阴性选择标志物上,其包含自己的启动子、终止子和核糖体结合位点。

[0470] 通过电穿孔将所得的线性构建体转化到甲基菌属菌株中以使原始ppk缺失。将在含有抗生素、以甲醇为碳源的基本培养基琼脂平板上的选择步骤用于鉴定成功的转化子。通过菌落PCR证实DNA整合到正确的基因座中。整合后的全部区域从基因组中扩增,并通过DNA测序检查。然后通过经由PCR扩增野生型鞭毛甲基菌的基因组中的ppk序列来制备第二线性片段,所用引物在起始密码子前包括20个“A”重复。然后将具有“A”重复的ppk基因与2000bp的上游和下游片段连接,并转化至缺失菌株中。使用阴性选择标志物筛选成功的转化子,其中只有去除了原始抗性盒而支持经修饰的序列的细胞得以存活并形成菌落。最后,通过DNA测序验证20个“AT”重复的整合。

[0471] 实施例19:通过移码突变在蛋白功能水平上破坏多聚磷酸盐激酶基因。

[0472] 移码突变是由不能被3整除的任意数量的核苷酸的插入或缺失引起的。结果是阅读框架的转移,这完全改变了翻译的蛋白的氨基酸序列,从而使其失去功能。移码突变在鞭毛甲基菌中通过以下进行:首先使天然ppk序列缺失,然后用其中位置4的“T”核苷酸(直接终止密码子后)被去除的经修饰的DNA序列(SEQ ID 229)替换。简言之,用PCR从基因组DNA中扩增ppk基因上游的2000个碱基对序列和该基因下游的2000个碱基对序列。将这些片段附加到抗生素抗性盒以及阴性选择标志物上,其包含自己的启动子、终止子和核糖体结合位点。通过电穿孔将所得的线性构建体转化到甲基菌属菌株中以使原始ppk缺失。将在含有抗生素、以甲醇为碳源的基本培养基琼脂平板上的选择步骤用于鉴定成功的转化子。通过菌落PCR证实DNA整合到正确的基因座中。整合后的全部区域从基因组中扩增,并通过DNA测序检查。然后通过PCR扩增野生型鞭毛甲基菌的基因组中的ppk序列制备第二线性片段,所用引物不包括ppk基因的位置4的“T”。

[0473] 然后将经修饰的ppk基因与2000bp的上游和下游片段连接,并转化到缺失菌株中。使用阴性选择标志物筛选成功的转化子,其中只有去除了原始抗性盒而支持经修饰的序列的细胞得以存活并形成菌落。最后,通过DNA测序验证20个“AT”重复的整合。

[0474] 实施例20:具有和不具有ppK破坏的甲基菌属菌株的发酵、生物质的产生的比较。

[0475] 用具有和不具有ppK基因的甲基菌属菌株进行并排(Side to side)生物反应器发酵。使用包含KH₂PO₄、Na₂HPO₄、MgSO₄、NH₄SO₄和微量元素混合物的矿质培养基。经由使用在线专有甲醇传感器的反馈回路使甲醇浓度在整个发酵过程中动态保持在4-5g/L。通过自动添加氢氧化铵将pH保持在7,该氢氧化铵也用作氮源。定期测量生物过程参数,诸如光密度、CFU计数、全发酵液干重和游离磷酸盐。在非ppK缺失的生物过程中,一旦光密度达到~30,就发生快速的细胞裂解,这通过光密度的下降、菌落形成单位(CFU)降低99%以及甲醇和氢氧化铵的进料速率降低99%来观察得出。当ppK基因不存在时,光密度达到~45-50的较高值,CFU在达到稳定期后保持平稳,并且没有观察到进料速率的急剧下降,表明细胞在稳定期期间保持代谢活性。稳定期可以保持多天,在此期间可以发生产物合成(图2)。

[0476] 说明书中引用的参考文献列表

- [0477] Pennacchietti E, Lammens TM, Capitani G, Franssen MC, John RA, Bossa F, De Biase D., 2009. Mutation of His465 alters the pH-dependent spectroscopic properties of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase and broadens the range of its activity toward more alkaline pH. *J Biol Chem*. 284(46):31587-96. doi: 10.1074/jbc.M109.049577.
- [0478] Thu Ho, N.A., Hou, C.Y., Kim, W.H., Kang, T.J., 2013. Expanding the active pH range of *Escherichia coli* glutamate decarboxylase by breaking the cooperativeness. *J. Biosci. Bioeng.* <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2012.09.002>
- [0479] Yu, K., Lin, L., Hu, S., Huang, J., Mei, L., 2012. C-terminal truncation of glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis* CGMCC 1306 extends its activity toward near-neutral pH. *Enzyme Microb. Technol.* 50, 263-269. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2012.01.010>
- [0480] Blin, K. et al. (2021) "antiSMASH 6.0: improving cluster detection and comparison capabilities", *Nucleic Acids Res.*, 49(W1):W29-W35. doi:10.1093/nar/gkab335.
- [0481] Chistoserdova, L. et al. (2007) 'Genome of *Methylobacillus flagellatus*, Molecular Basis for Obligate Methylo-trophy, and Polyphyletic Origin of Methylo-trophy', *Journal of Bacteriology*. American Society for Microbiology Journals, 189(11):4020-4027.
- [0482] Yoshida, T. et al. (2000) 'Saccharide production from methanol by transposon 5 mutants derived from the extracellular polysaccharide-producing bacterium *Methylobacillus* sp. strain 12S', *Applied Microbiology and Biotechnology*. doi:10.1007/s002530000407.
- [0483] Yoshida, T. et al. (2003) 'Genes involved in the synthesis of the exopolysaccharide methanolan by the obligate methylo-troph *Methylobacillus* sp. strain 12S', *Microbiology*. Microbiology Society, pp.431-444. doi:10.1099/mic.0.25913-0.
- [0484] Qiu Z and Goodman MF: The *Escherichia coli* polB locus is identical to dinA, the structural gene for DNA polymerase II. Characterization of Pol II purified from a polB mutant. *J Biol Chem*. 1997, 272(13):8611-8617.
- [0485] Kwon DH, Peña JA, Osato MS, Fox JG, Graham DY, Versalovic J: Frameshift mutations in rdxA and metronidazole resistance in North American *Helicobacter pylori* isolates. *J Antimicrob Chemother* 2000, 46(5):793-796
- [0486] Datsenko KA, Wanner BL: One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000, 97:6640-6645.
- [0487] Zhu Y, Huang W, Lee SS, Xu W. Crystal structure of a polyphosphate kinase and its implications for polyphosphate synthesis. *EMBO Rep*. 2005; 6(7):681-7.
- [0488] Tzeng CM, Kornberg A. The multiple activities of polyphosphate kinase

of Escherichia coli and their subunit structure determined by radiation target analysis.J Biol Chem.2000;275(6):3977-83。

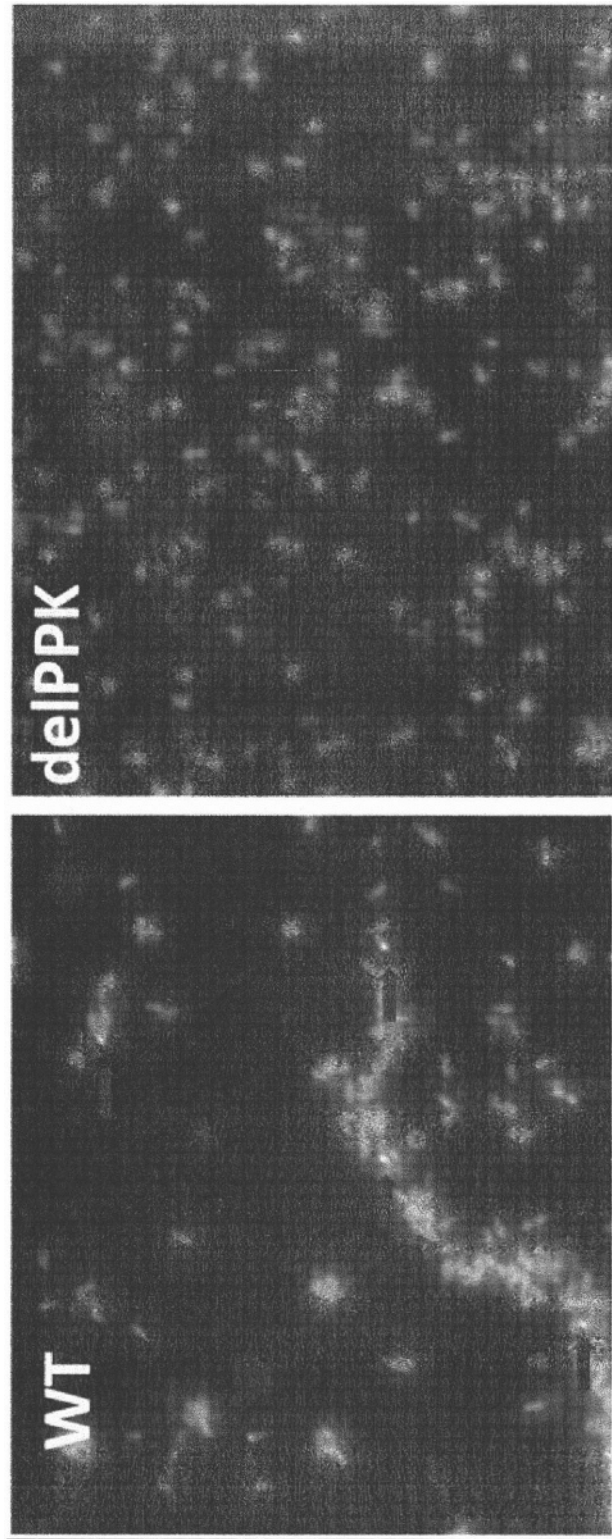


图1

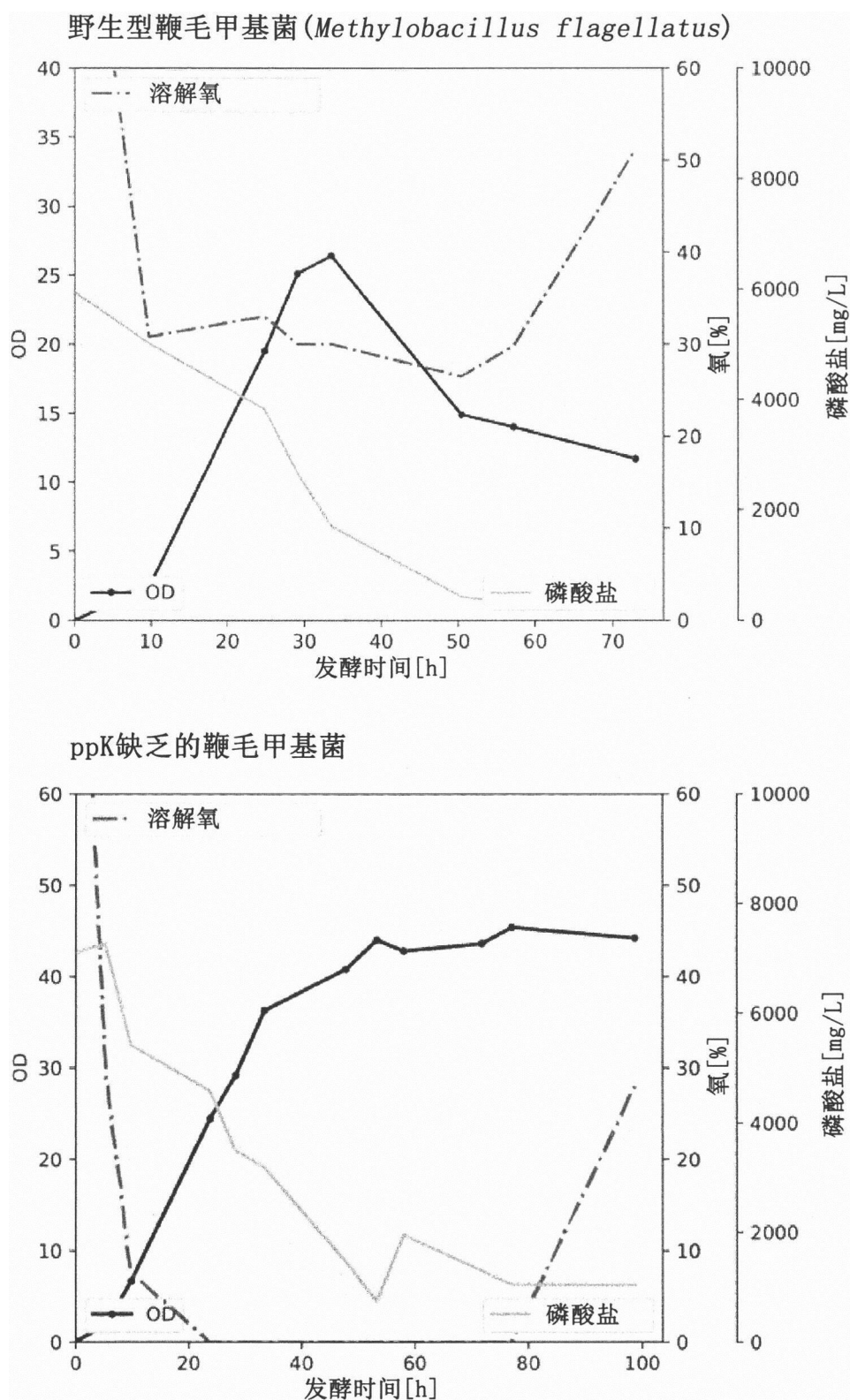


图2

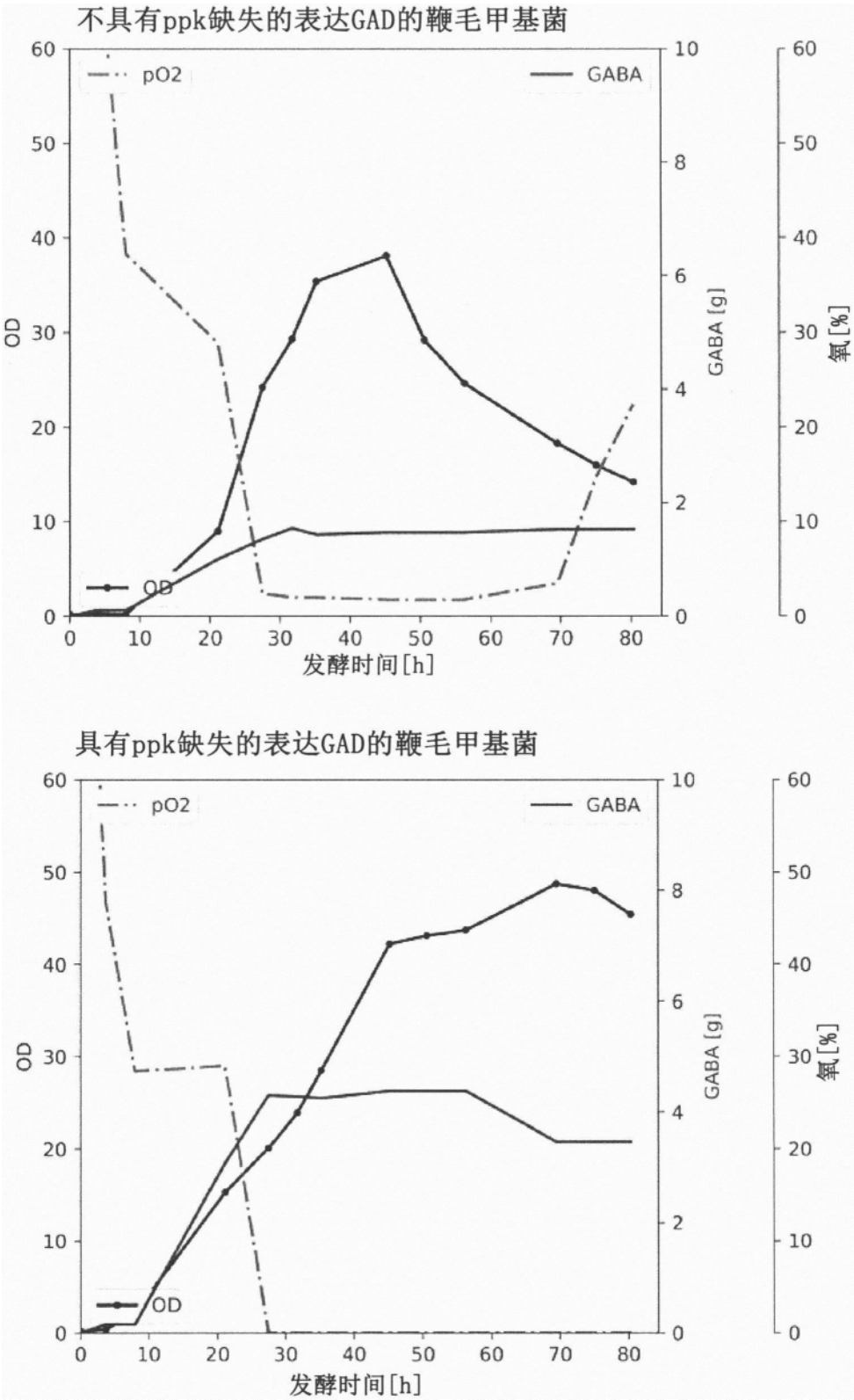


图3

查询序列



图4

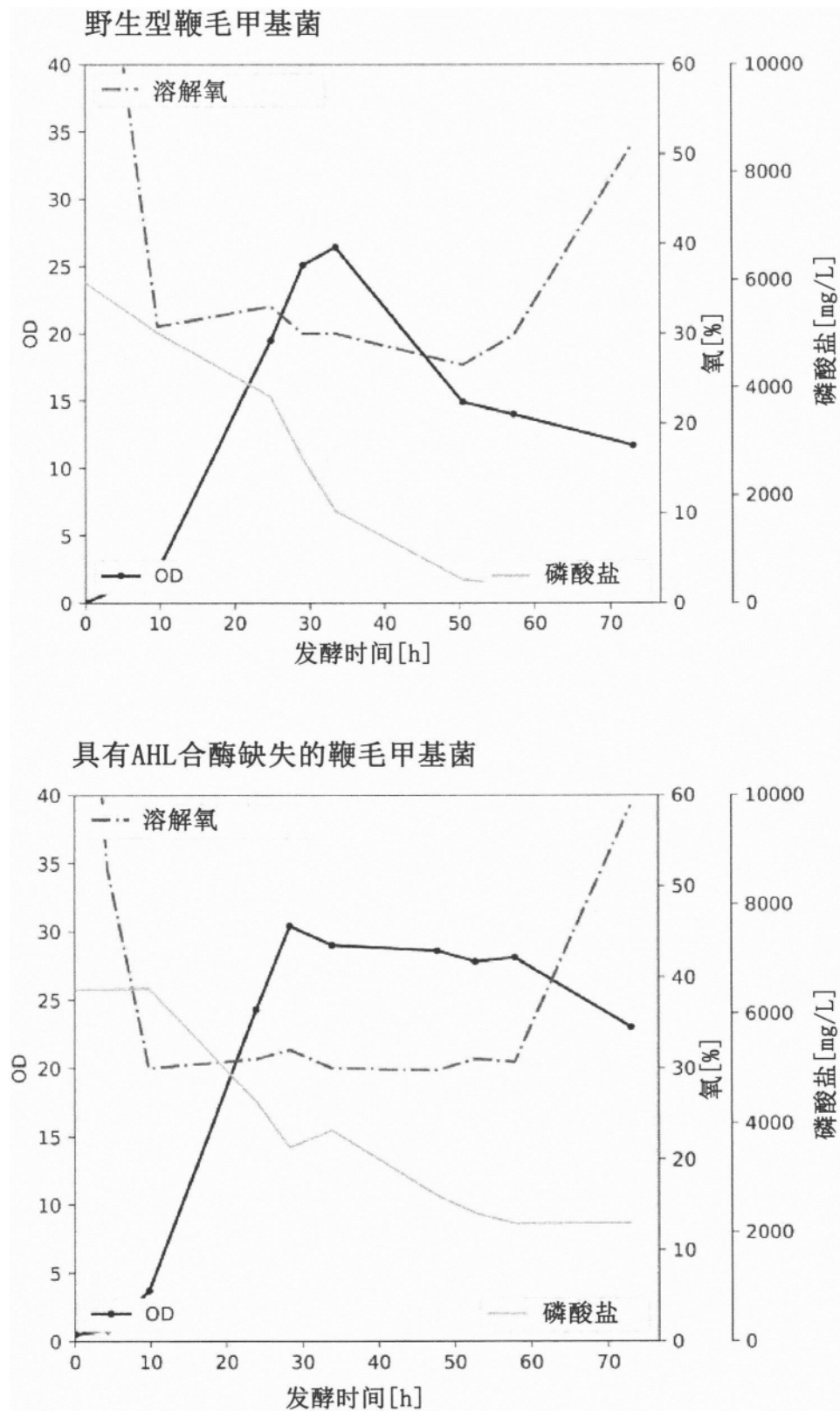


图5

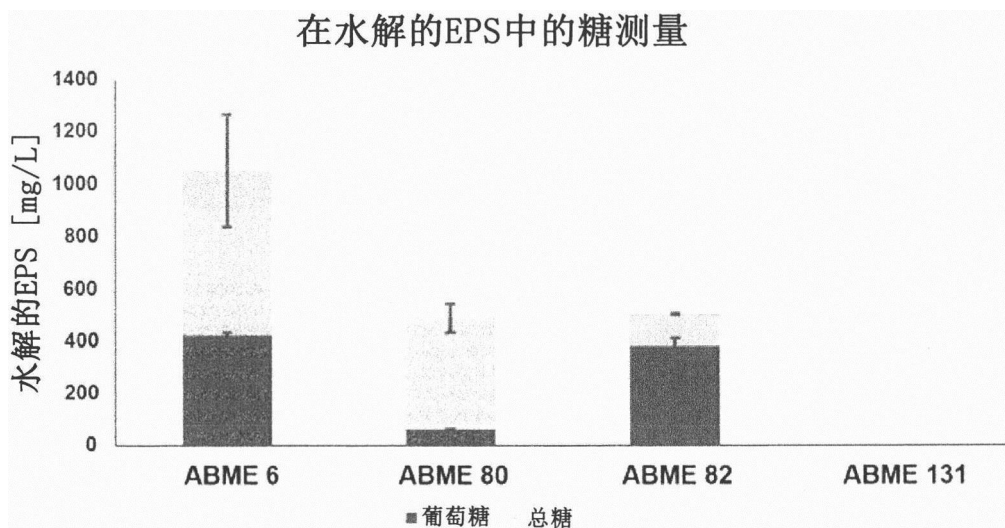


图6

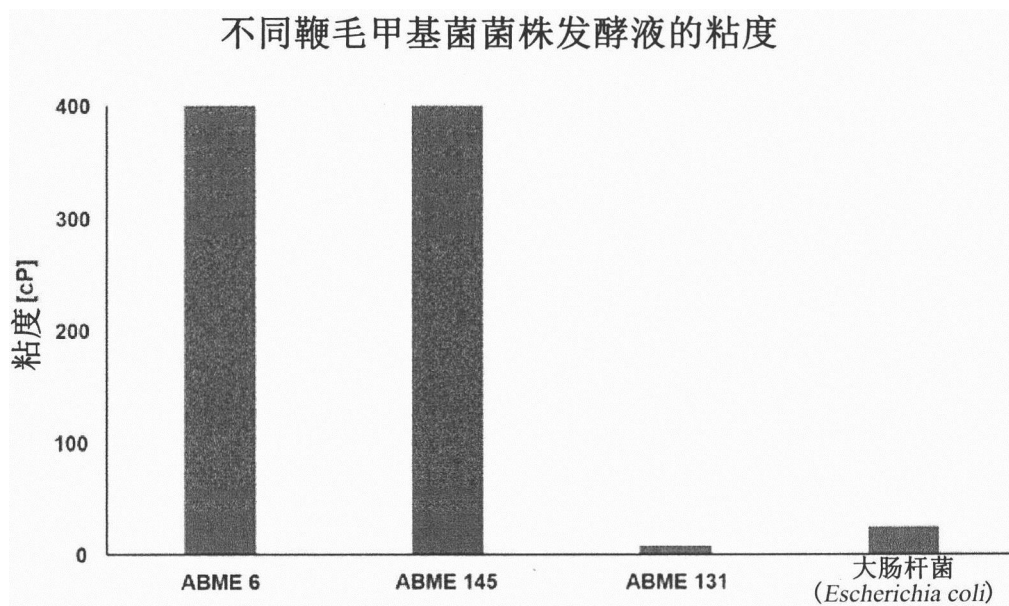


图7

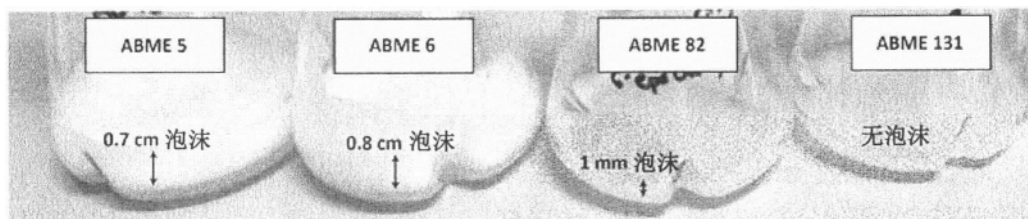


图8

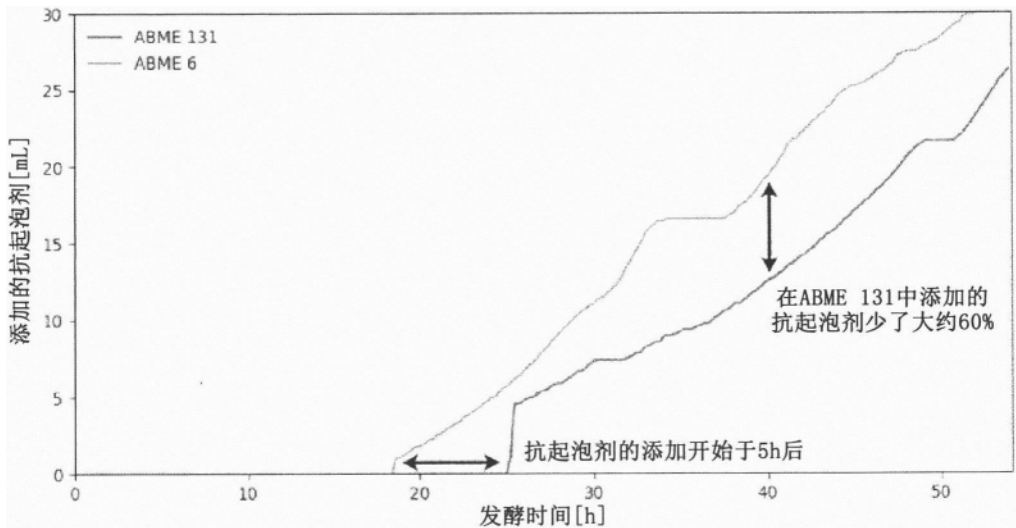


图9

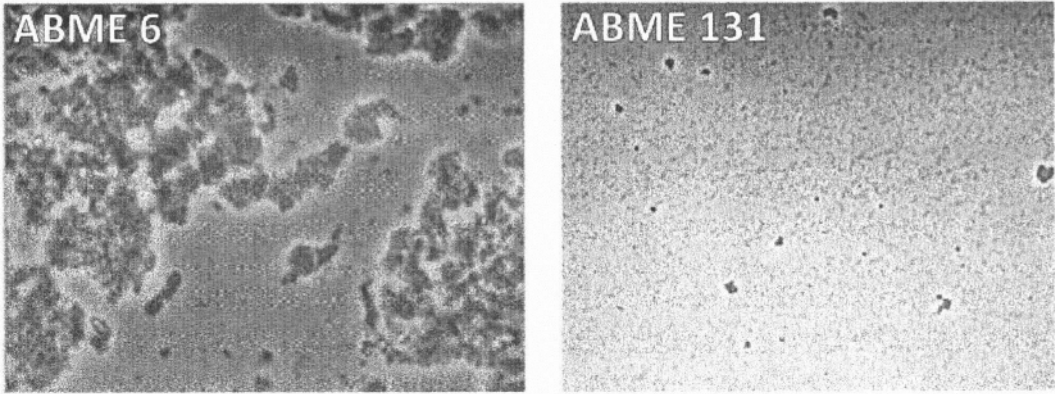


图10

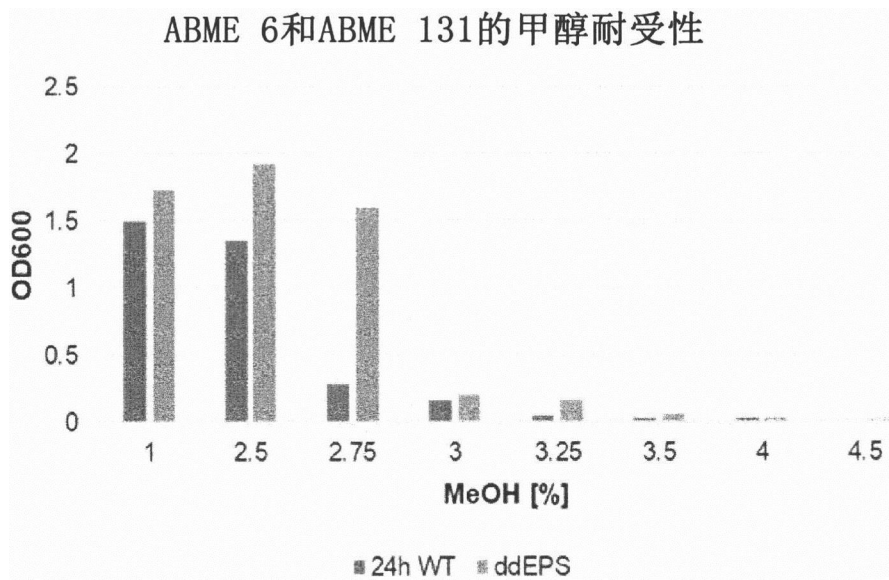


图11