

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12N 15/31

C12N 1/21 C12P 7/60

C12P 1/00 C07K 14/24



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01815728.9

[43] 公开日 2004 年 1 月 21 日

[11] 公开号 CN 1469927A

[22] 申请日 2001.8.3 [21] 申请号 01815728.9

[30] 优先权

[32] 2000. 8. 4 [33] US [31] 09/633,294

[32] 2000. 9. 29 [33] US [31] 09/677,032

[86] 国际申请 PCT/US01/24600 2001.8.3

[87] 国际公布 WO02/12481 英 2002.2.14

[85] 进入国家阶段日期 2003.3.14

[71] 申请人 金克克国际有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 M·库玛 F·瓦勒

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

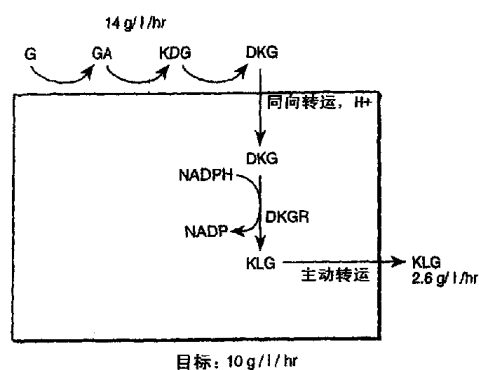
代理人 刘晓东

权利要求书 2 页 说明书 37 页 附图 19 页

[54] 发明名称 通过增加底物转运增强工业生产

[57] 摘要

本发明涉及一种增强宿主细胞生产期望的化合物的方法，该宿主细胞中此化合物的合成至少有部分的细胞内途径。这种方法包含选择宿主细胞，其具有至少一个使用细胞外底物的细胞内合成途径；增加该细胞外底物进入该宿主细胞的转运，且保持宿主细胞的完整性，培养宿主细胞使用该细胞外底物生产；合成期望的化合物。底物的转运增加通过给宿主细胞转化编码一或多种将底物转运到细胞内的酶的基因来完成。



I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种增强宿主细胞中衍生自其中至少部分细胞内途径的期望化合物的生物合成生产的方法，该方法包含：

- a) 选择含有利用胞外底物的至少部分细胞内途径的宿主细胞；
- b) 在维持宿主细胞的完整性时增加所说的细胞外底物向该宿主细胞的转运；
- c) 培养该宿主细胞以生产所说的细胞外底物；和
- d) 生产期望的化合物。

2. 权利要求 1 的方法，其中所说的增加该细胞外底物向该宿主细胞内的转运包括将 DNA 转化入该宿主细胞的步骤，其中所述 DNA 编码一种或多种能增加将该底物转运入所说的宿主细胞中的多肽。

3. 权利要求 2 的方法，其中所说的一种或多种多肽是转运促进蛋白。

4. 权利要求 2 的方法，其中所说的一种或多种多肽是一个主要易化物超家族转运蛋白。

5. 权利要求 4 的方法，其中所说的一种或多种多肽是阴离子/阳离子 H^+ 同向转运蛋白。

6. 一种增强宿主细胞中衍生自其中至少部分细胞内途径的期望化合物的生物合成生产的方法，该方法包含：

a) 选择含有利用胞外底物的至少部分细胞内合成途径的宿主细胞；

b) 在维持宿主细胞的完整性时增加所说的细胞外底物向该宿主细胞的转运，此处该底物进入该宿主细胞的转运是该宿主细胞生物合成生产中的一个速率限制步骤；

- c) 培养该宿主细胞以生产所说的细胞外底物；和
- d) 生产期望的化合物。

10. 增强底物跨内细胞膜进入细胞溶胶的转运的方法，该方法包

含:

选择宿主细胞; 和

把编码一或多种转运该底物进入该宿主细胞的酶的 DNA 转化进入该宿主细胞。

11. 权利要求 10 的方法, 其中所说的宿主细胞选自细菌和酵母。

12. 权利要求 11 的方法, 其中所说的宿主细胞是泛菌。

13. 一种过量表达阴离子/阳离子同向转运蛋白的方法, 包含以下步骤:

选择宿主细胞; 和

把编码一或多种阴离子/阳离子同向转运蛋白的 DNA 转化进入该宿主细胞。

通过增加底物转运增强工业生产

发明领域

本发明一般地涉及增强期望的终产物的生物转变，特别地涉及过量表达转运蛋白以促进底物从一个细胞部位穿膜转运到另一个细胞部位。本发明提供了在微生物中增强期望的终产物生产的表达载体、方法和系统。

发明背景

生物膜的脂双层通常对离子和极性分子是非通透性的。这些生物膜构成了细胞的区室，使细胞的不同部分相互隔开。因而被细胞利用以合成各种产物的底物以及被细胞利用以生成能量或生长的代谢物可与利用它们的合成和/或代谢反应分隔开。至于产物的合成，不同的合成途径或其部分可发现于在细胞的不同部分。一些氧化反应可发生在细胞溶胶的外面。例如，膜结合蛋白质可用于将碳源氧化为其他中间物。胞质反应或途径例如一些还原或脱氢作用也可用来将底物或中间物转变为另一种产物。当底物和合成装置位于膜的相反侧时，期望的产物的生产需要底物转位到合成反应的位置以使其能够转变为终产物。换句话说，在细胞膜内部生成的终产物需要从细胞内转位。由于细胞隔开的部分可能具有不同的环境参数例如溶质、离子、终产物等，浓度或者需要穿过通常非通透性的膜障碍物转运，所以需要一些形式的主动转运。

针对这些问题，出现了关于增加材料跨膜转运的研究。已用溶剂或裂解试剂来使膜破裂，以使得材料能够跨过膜。然而，这样的方法具有不利于宿主细胞生存力的作用。如果合成或代谢途径依赖于宿主细胞自身的代谢或分解代谢途径或由其提供能量，例如需要如 NADH 或 NADPH 的辅因子，那么破坏细胞的生存力即停止了宿主细胞进一步

的或连续的合成生产。另外，虽然已在增加细胞生长方面探索了葡萄糖或其他糖类转运的增加（Parker, C. 等人, Mol. Microbiol 15 (5):795-802 (1995)），但尚未认识到通过利用重组微生物的生物合成途径而改变细胞转运系统以增加化学终产物或中间物的工业生产。

Cornish (J. of Gen. Microbiol., 134:3111-3122 (1988)) 讨论了放射土壤杆菌 (*Agrobacterium radiobacter*) 葡萄糖转运和琥珀酰聚糖 (succinoglucan) 外聚糖 (exopolysaccharide) 生产之间的关系。Cornish 提出葡萄糖的摄入是琥珀酰聚糖生产的主要动力学控制点，并且应该可能通过利用重组 DNA 方法获得更高的琥珀酰聚糖生产速率。然而 Cornish 的生产速率不在符合工业生产规模需要。此外，葡萄糖转运中的高水平能量消耗和复杂的调节机制阻碍了而不是促使该转运的使用。

Volschenk, H. 等人 (Nat. Biotechnol. 15:253 (March 1997)) 描述了将苹果酸降解途径引入到酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中，这是通过克隆和表达编码所述途径的异源 DNA 而耗尽酒中苹果酸水平来实现的。Volschenk 主要关注从周围培养基中去除苹果酸，而并非任何期望的终产物的工业规模生产。

此外，有关转运系统涉及其中的起码知识很难保证能实现期望的终产物或中间物的增强生产。合成装置可能已经饱和，因而增加的底物的存在不定导致期望的终产物增加的生产。另外，增加对除作为生产底物用途之外还被直接或间接用作代谢物的底物的转运可能不会导致期望的增加的生产。

仅仅增加将底物转变为期望的终产物的酶的表达水平可能并不导致利用重组微生物的化学化合物增加的生产。需要有一种方法，能够利用重组微生物通过除增加细胞内底物表达水平之外的其它方法增加化学化合物的生产。

发明概述

微生物的底物转运装置容量可能成为期望的终产物生产的一个限制因子或瓶颈，尤其当终产物、中间物或前体生产分散在细胞的不同区域时。本发明提供了一种减轻所说的瓶颈的方法。

本发明部分基于增加底物穿越细胞膜的转运可以增加期望底物的总体生产这一发现的。

本发明也提供了增强具有至少部分细胞内途径的宿主细胞中生物合成期望化合物的改进方法。因此，提供了增强具有至少部分细胞内途径的宿主细胞中生物合成期望化合物的方法，该方法含有选择具有至少部分细胞内使用细胞外底物的合成途径的宿主细胞；增加该细胞外底物向宿主细胞的转运，且保持宿主细胞的完整性；培养宿主细胞生成该细胞外底物；生成期望的化合物。

在一个优选实施方案中，该底物进入该宿主细胞的转运是该宿主细胞生物合成中的一个限速步骤。

在一个优选实施方案中，宿主细胞选自克雷伯菌属 (*Klebsiella*) 和泛菌属 (*Pantoea*)。

在本发明的一个优选实施方案中，增加细胞外底物进入宿主细胞的转运包括，给宿主细胞转化编码一个或多个能增加底物转运到宿主细胞内的蛋白质的 DNA。在一个实施方案中，此蛋白质是转运促进物。在另一个实施方案中，此蛋白质是一个主要易化物 (facilitator) 超家族。然而，在另一个实施方案中，此蛋白质是阴离子/阳离子: H^+ 转运蛋白。

本发明进一步提供了过表达底物/ H^+ 同向转运蛋白的方法，其包含选择宿主细胞和把编码一个或多个底物/ H^+ 同向转运蛋白的基因转化到该宿主细胞这些步骤。

附图简述

图 1，表示产酸克雷伯氏杆菌 (*Klebsiella oxytoca*) YiaX2 的 DNA 和氨基酸序列；PE1 (环境通透酶)；PE6 (环境通透酶)；柠檬

泛菌 (*Pantoea citrea*) 的 PermA; 柠檬泛菌的 PermB; 柠檬泛菌的 YiaX2。

图 2 是一个表示从葡萄糖生产抗坏血酸前体 2-KLG 的合成途径的流程图。

图 3 是一个表示抗坏血酸前体 2-酮-L-古洛糖酸 (2-KLG) 的合成途径的示意图。

图 4 是一个表示可由葡萄糖得到 2-KLG 的各种合成途径的流程图。Boudrant, J., *Enzym Microb. Tech.*, 1990, 12, 322-329。

图 4A 是一个表示 D-山梨糖醇到 2-KLG 的合成途径的示意图, 显示了该途径中反应相对于其他反应的细胞内定位和底物跨过细胞膜的转运。Saito, Y. 等人, *Biotechnol. Bioeng.* 58 (2/3):305-315 (1998)。

图 5 表示 D-葡萄糖 (G) 到 2,5-DKG 再到 2-KLG 的合成途径, 显示了该途径中反应相对于其他反应的细胞内定位和各自的底物跨过细胞膜的转运。

图 6 是一个比较 DKG 转运速度与 KLG 生产速率的线图, 显示了 2,5-DKG 的摄入量随时间的变化 (nmoles/OD 600) ($-◆-$ = 果糖饲料 139-2a, $y=0.0486x+0.67$; $-▲-$ = 葡萄糖饲料 139-2a, $y=0.0497x+0.5877$; $-●-$ = 种子烧瓶 (seed flask) 139-2a, $y=0.0075x+0.0569$)。

图 7 是一个产酸克雷伯氏杆菌中抗坏血酸分解代谢的 yia 操纵子的示意图。

图 8 是一个表示由硅酮油转运测定测量的产酸克雷伯氏杆菌的 2,5-DKG 摄入量 (nmol) 图 ($-◆-$ = 实验者+异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 [IPTG]; $-▲-$ = $\Delta yiaaX2$ +IPTG; $-■-$ = 实验者-IPTG)

图 9 是一个表示对来自柠檬泛菌、产酸克雷伯氏杆菌和环境来源的通透酶的选择设计的示意图。

图 10 是一个表示产酸克雷伯氏杆菌菌株中 2,5-DKG 摄入活性的条线图 (YiaX2、pcp1、pcp10、pcp32、pK1、环境来源#1 和环境来

源#6)。

图 11 是一个表示具有各种 DKG 通透酶 (139-2A、139-2A+PCP32、139-2A+PCP10、139-2A+PK1、139-2A+PCP1) 和在相同质粒构建体 (pBCL 1920) 中的 139-2A+PE6 的摇瓶的 2,5-DKG 摄入测定的条线图, 在 28℃ 测量了 DKG 摄入速率 (g/l/hr)。

图 12 是一个表示由于超表达的 DKG 通透酶的比生产力增加/比 9A-9B. 生产速率 (g/L/hr) 的线图 (-◆- = 野生型; -x- = WT、prmA)

图 13 是一个膜表面 PermA 转运蛋白的示意图。推定的跨膜结构域编号为 I-XI。保守残基的位置以粗体显示。N 是氨基端, C 是羧基端。推定的柠檬泛菌通透酶 A (SEQ ID: __) 跨膜结构域是用从 <http://sosui.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosuiframe0.html> 上可得到的工具推断的。

图 14 是一个相应于残基 G119s 到 142 的保守的氨基酸序列。

详述

定义

转运蛋白定义

细菌通道转运蛋白指那些通常为 TC 分类#1.A 的转运蛋白 (Saier, M. 等人, 1998, 微生物生理学进展 (Advances in Microbial Physiology (Poole, R.K., d.) pp. 81-136, Academic Press, SanDiego, CA.)). (“TC”代表 “Transport Council”, 即一种考虑到转运蛋白的系统发育方面的分类系统。) 这些转运蛋白通常通过一种非能量依赖性易化扩散机制用一种跨膜孔道来转运底物、离子或其他材料。

初级转运蛋白指那些通常为 TC 分类 TC#3.A 的转运蛋白 (Saier, M. 等人, 1998), 即那些利用化学能完成底物的主动摄入和转运排出的, 一般以 ATP 水解形式作为能量偶联方式。

基团转位系统指 TC 分类为 TC#4.A 中的转运蛋白 (Saier, M. 等人, 1998), 即伴随转运而磷酸化其底物的转运蛋白。这类的成员通常是细菌特异性磷酸转移酶系统 (PTS) 的部分, 且其特征在于与磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 利用的氧化相偶联。

次级转运蛋白指那些通常为 TC 分类#2.A 的转运蛋白 (Saier, M. 等人, 1998), 即那些通常利用化学渗透能例如以质子梯度的形式提供能量以跨膜转运底物、离子或终产物的转运蛋白。

主要易化物超家族 (major facilitator superfamily, MFS) 指通常为 TC 分类#2 的次级转运蛋白 (Saier, M. 等人, 1998)。

转运蛋白指任何允许化学化合物跨膜转位而从一个细胞或细胞区室进或出的大分子。转运蛋白已知为或被称为通透酶。虽然不限于一个特定的理论, 但认为转运蛋白是一种与膜相互作用的蛋白质, 该蛋白质的部分从膜的外表面伸出、穿过膜且从膜的内表面伸出。

主动转运指与能量消耗例如腺苷三磷酸 (ATP) 或磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 的水解偶联的转运。

阴离子/阳离子同向转运蛋白 (symporter) 指利用化学渗透梯度来跨膜转运底物的转运蛋白 (TC 类 14)。它们也指底物/H⁺同向转运蛋白。

TMS 指跨膜结构域。

途径定义

胞质的”指位于内细胞膜内。

“外源底物”指在合成反应的隔膜相反面发现的材料, 例如当底物将被细胞内合成途径或合成途径的细胞内部分转变为期望的终产物或中间物时, 指内细胞膜外面。外源底物的例子包括己糖、包括葡萄糖、戊糖、包括木糖、阿拉伯糖、核糖、来苏糖、核苷、神经递质、药物、维生素、氨基酸、中间物或多种途径的前体、包括抗坏血酸。

“细胞外”或“内细胞膜外面”指位于与胞质相反的膜一侧的细

胞位置，包括但不局限于周质。

“内细胞膜”指将胞质与周质分隔开的障碍物。

“膜”指对底物有内在非通透性的脂双层。

“细胞内”指位于最靠近或作为细胞溶胶的膜一面的细胞部分。细胞内也包括胞质。

“细胞内反应”指位于胞质内的细胞材料即包含在内细胞膜内的材料的合成反应或生物转变。

“限速步骤”指生物合成途径的步骤，其中跨该步骤转变的增加可导致产物的增加。

“增强生产”指期望的合成反应中间物、终产物或前体的增加的效价（总量），通常以反应过程中获得的 gm/l/hour 的增加来测量。它也可指期望产物生产速度的增加，通常以 g/l 每单位时间的重组产物来测量，其中生产的终产物、中间物或前体作为 DNA 转化的结果而增加，该 DNA 编码至少一种在超表达的转运蛋白存在时增加底物跨膜转运的蛋白质。

“产率增加”是指产生的期望的终产物或中间物的量除以消耗量，计算出的重量百分比的增加。

“底物”指由合成反应进行生物转变的化合物，反应位置通常与底物是由膜分隔的，需要一种转运机制来把底物运送到反应位置。底物本身可能是终产物、中间物或随后的合成反应或随后的途径的前体。

“合成反应”指底物到中间物或终产物的生物转变。该反应可能是生物体内源的或可通过遗传工程在细胞装置中进行。

2, 5-DKG 还原酶指能够立体选择性地催化 2, 5-DKG 到 2-KLG 的转变的蛋白质。

2, 5-DKG 转运蛋白指能够将 2, 5-DKG 跨过内细胞膜转运以由 2, 5-KLG 还原酶将其转变为 2-KLG 的蛋白质。

表达定义

启动子指引导 RNA 聚合酶在适当位点启动基因转录以生成信使 RNA 的 DNA 元件, 该信使 RNA 一旦被细胞的翻译装置翻译则能够形成多肽。

“上游激活序列”是正作用性 DNA 结合调节物的结合位点。如其名字所显示的, 上游激活序列在转录起始位点的上游且是核酸。

调节区指 DNA 上调节基因表达的区域。这种修饰的一种机制是一些调节区充当蛋白质(也已知为阻抑物)的结合位点。一旦结合, 阻抑物可妨碍 RNA 聚合酶转录基因的能力。

表达系统包括一种或多种蛋白质和/或核酸, 当它们一起作用时可以增加宿主细胞中蛋白质的表达。表达系统可在一种或多种质粒中编码, 且可与编码目的蛋白质的基因在或不在相同的质粒上。

短语“功能性连接的”或“功能性偶联的”表示调节元件(DNA 或蛋白质)为了发挥其功能而物理地相互作用。这可以是蛋白质/蛋白质的、DNA/蛋白质的或 DNA/DNA 的相互作用。例如, DNA 结合调节物与启动子相互作用, 但是编码它们的基因可位于染色体上的不同位点。同样地, 编码元件的基因相互间和与编码目的蛋白质的基因间可位于不同的质粒上而仍然一起发挥用来调节蛋白质的表达。

一般地, 当描述蛋白质和编码它们的基因时, 基因的术语不是大写的而是斜体的, 也就是 *permA*。蛋白质的术语通常为正常文字, 且首字母大写, 也就是 PermA。

生物体定义

“真菌”是指任何大量缺乏叶绿素的植物有机体, 包括酵母、霉菌和蘑菇。

“哺乳动物”是指任何多种温血脊椎动物, 标志为皮肤上有毛发覆盖。

“植物”是指相关植物, 包括单子叶植物、双子叶植物等。

“细菌”包括裂殖菌纲(Schizomycetes)的微生物。细菌可为革兰氏阴性的或革兰氏阳性的。革兰氏阴性细菌包括属大肠杆菌属

(*Escherichia*)、嗜血杆菌属(*Hemophilus*)、克雷伯氏杆菌属(*Klebsiella*)、变形杆菌属(*Proteus*)、假单胞杆菌属(*Pseudomonas*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、葡萄糖杆菌属(*Gluconobacter*)、醋杆菌属(*Acetobacter*)、耶尔森氏菌属(*Yersenia*)、志贺菌属(*Shigella*)、弧菌属(*Vibrio*)、不动杆菌属(*Acinetobacter*)、泛菌属(*Pantoea*)和沙雷氏菌属(*Serratia*)的成员。革兰氏阳性细菌包括芽孢杆菌属(*Bacillus*)、梭菌属(*Clostridium*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、链霉菌属(*Streptomyces*)、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)和乳球菌属(*Lactococcus*)的成员。

革兰氏阴性细菌可为泛菌(*pantoeans*)，是泛菌属成员的菌株。优选的细菌是柠檬泛菌。柠檬泛菌有时也被称为草生欧氏杆菌(*Erwinia herbicola*)。

如此处所用的术语“分离的”或“纯化的”指除去至少一种与其天然联合的成分的核酸或氨基酸。

优选实施方案详述

本发明提供了增强衍生自所述宿主细胞至少部分细胞内途径的期望化合物生物合成的新方法，该方法通过增加外源或细胞外底物转运来改善合成途径的瓶颈，增强期望的中间物或终产物的合成，尤其是当转运蛋白已经被重组导入并被宿主细胞过量表达时。

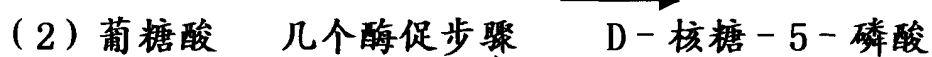
本发明的一个实施方案是用包括编码表达系统的核酸的质粒转化宿主细胞的方法。本发明的另一个实施方案是用包括编码一种或多种增加底物跨膜转运的蛋白质的DNA的质粒转化宿主细胞的方法。宿主细胞是本发明的质粒能够通过如转化而被插入的细胞。宿主细胞优选地为细菌，更优选地为柠檬泛菌、大肠杆菌；克雷伯氏杆菌属或芽孢杆菌属。

在另一个实施方案中，如果包括了调节元件，那么这样的表达系

统的元件来自大肠杆菌 (*E. coli*) 和枯草芽孢杆菌 (*B. subtilis*)。在一个实施方案中, 宿主细胞优选地为革兰氏阴性细菌。在另一个实施方案中, 宿主细胞是泛菌属。相同的宿主细胞可用另外一个包括编码一种或多种转运蛋白的核酸的质粒转化。优选地, 该转运蛋白为编码的 MFS 转运蛋白, 更优选地为阴离子/阳离子同向转运蛋白。可作为范例的转运蛋白包括那些柠檬泛菌或产酸克雷伯氏杆菌和异源来源的 *yiaX2*、*permA*、*permB*、*pe6*、*pe1* 编码或表达的蛋白。

合成反应

本发明提供了增加底物跨膜转运以增强底物的生产。增加的转运提供了底物跨过把细胞内合成反应位置分隔的膜的转位。合成反应可能是一个单个酶转变、一个合成途径的一部分或全部。本发明尤其用于包含细胞质和细胞外合成反应的合成途径, 其一个反应的终产物转运后被膜另一边的另一个反应使用。本发明涉及一个合成反应, 其可能发生在细胞溶胶中, 而且需要第五转运进入细胞溶胶; 或可能发生在细胞溶胶外的反应, 而且需要底物穿透膜转运到细胞外位置。因而, 本发明特别用于耦合需要本发明提及的辅助因子的反应, 例如 NADH 或 NADPH 反应、一般需要底物或中间物进行还原的反应、或还原反应相当的氧化反应。典型的反应包括, 但是并不局限于 2,5-DKG 到 2-KLG 的还原; L-山梨糖酮 (L-sorbose) 到 2-KLG 的还原; 5-酮-D-葡萄糖酸 (5-keto-D-Gluconic acid, 5-KDG) 到 L-艾杜糖酸 (L-idonic acid, IA) 的还原; 和 5-KDG 到 L-古洛糖酸 (L-gulonic acid, GA) 的还原。另外的反应包括:



在上面的反应 (1) 中, 可能设想在甘油-3-磷酸到甘油的生物转化中, 甘油-3-磷酸的转运可能是一个限速步骤。

在上面的反应 (2) 中, 葡萄糖酸通过一系列酶促步骤转化成 D-核

糖-5-磷酸。D-核糖-5-磷酸是有价值的化合物，可以转化成核糖、核苷酸、核黄素或气味增强剂类似肌苷单磷酸（Wulf & Vandame, 1997, Appl. Microbiol. Biotechnol. 48:141-148）。葡萄糖到其他产物的生物转化可能到达细胞内转运可能是一限速步骤的点。

另一个反应尤其可用于本发明的戊糖到乙醇的生物转化实验中。近来有报道木糖用于操纵大肠杆菌中的同型乙醇途径。（Tao, H, 等, J. bact. 2001, 183, 2979 - 2988）增加木糖到细胞溶胶的转运可以增强乙醇的生产。可以预想将植物来源的生物物质（它是增强这些戊糖到化学化合物合成的便宜来源）与这些糖的生产相偶联。以细菌质子相关转运系统（Henderson, P. J. Bioeng. Biomech 1990, 4, 525 - 569）或这些戊糖相关的类似产物、途径，来增加这些糖的转运。

发明者在此认为上面提供的反应仅仅是本发明的说明，对于理解本发明是有用的例子。本领域的技术人员能很容易地鉴定其他合成反应，由此本发明的应用将有效增加底物到期望的中间物或终产物的生产。同样的，根据本文的教导，普通技术人员能很容易选择合适化学生产或生物合成途径。例如，若终产物涉及作为生物体内源代谢一部分的途径或反应，其决定性转运步骤可用简单的方式确定。同样的，若将生成期望的终产物的途径引入细胞，可能使用此处提供的技术来确定关键途径元素和将有益于终产物生产的最适底物转运点。

在一个实施方案中，合成途径可能包含至少一个合成反应，其包括需转运入或转运出细胞的底物或产物。例如在这个实施方案中，待增强的反应包含至少部分细胞内或细胞溶胶内途径；和至少部分细胞外途径。外源底物在位于细胞溶胶内的合成反应或部分合成途径中使用。作为例子，酮糖衍生物（其中一些可以用做抗坏血酸前体或中间物）的生产可以用本发明进行优化。其他象 5-酮-D-葡萄糖酸可以用于酒石酸的制备（美国专利第 5,763,656 号）。本发明尤其可用于抗坏血酸中间体合成，例如 2,5-DKG 向 2-KLG 的转变；山梨糖或山梨醇通

过山梨糖酮到 2-KLG 的转变；5-酮-D-葡萄糖酸到 L-艾杜糖酸的还原；5-酮-D-葡萄糖酸到 L-古洛糖酸的还原。这些途径每个都有位于细胞质的合成途径和合成反应的部分，例如 2,5-DKG 被 2,5-DKG 还原酶的还原；L-山梨糖酮被山梨糖酮脱氢酶还原成 2-KLG；5-酮-D-葡萄糖酸被 5-KDG 脱氢酶还原成 L-艾杜糖酸；5-酮-D-葡萄糖酸被 5-KDG 还原酶还原成 L-古洛糖酸。这些途径特征均在于跨膜转运底物例如 2,5-DKG；L-山梨糖酮等的必要性，以通过胞质内的合成反应进行生物转化。

底物是通常在没有一些主动转运机制时不能有效地通过膜的物质。优选地，这些底物包括但不局限于抗坏血酸中间物（2,5-DKG、山梨糖酮）。发明者预想的其他底物如表 2 和表 3 所述。另外，底物是一种被转运以在工业规模上用作合成用途而通常不被宿主细胞用作代谢用途的物质。工业规模指效价和容量的生产力大于 1 gm/升/小时，优选地大于 2 g/l/h，更优选地大于 3 g/l/h，并且更加优选地大于 5 g/l/h。在另一个实施方案中，生产力效价在 2 到 14 gm/l/小时之间，优选地为 3 到 12 g/l/h 之间，更加优选地为 5 到 10 g/l/h 之间，为一个经济上可行的工业生产方法。另外，本发明可以增加合成途径的产量。在一个实施方案中，产量大于 50%（重量），在另一个实施方案中，产量大于 60%，在另一个实施方案中产量大于 70%。尤其优选的底物包括 2,5-DKG 和山梨糖酮。本发明的发明方面在这些实施方案中尤其有用。

在本发明的实践中尤其有用的一个反应是 2,5-DKG 的跨内细胞膜转运以被胞质内脱氢酶 2,5-DKG 还原酶将其进行胞质还原而生成 2-KLG。2,5-DKG 是由 2-酮-D-葡萄糖酸（2-KDG）被膜结合的 2-酮葡萄糖酸脱氢酶转变而来的。2-KDG 是从葡萄糖经过 D-葡萄糖酸（GA）的氧化作用转变而来的。2,5-DKG 跨内细胞膜转运到胞质还原为 2-KLG 的位点可通过 DNA 编码的 2,5-DKG 转运蛋白的增加来实现。（Boudrant, J. (1990) *Enzyme Microb. Technol.* 1990:322-329）

在本发明的实践中尤其有用的另一个反应是通过山梨糖、山梨糖

醇生产 2-KLG 的中间物, 即山梨糖酮的转运。(Saito, Y. 等人, Biotechnol. Bioeng. 58 (2/3):309-315 (1997)) 从山梨糖醇和/或山梨糖向山梨糖酮的转变是由山梨糖醇或山梨糖转变为 2-KLG 的途径中的一个步骤 (Boudrant, J., 1990; Saito (1997))。下面是对根据本发明的山梨糖酮转运蛋白工程化的讨论。

如图 4a 所示, D-山梨糖到 2-KLG 的途径包括 L-山梨糖脱氢酶 (SDH) 将 L-山梨糖氧化为 L-山梨糖酮, 随后是 L-山梨糖酮脱氢酶将 L-山梨糖酮氧化 2KLG。已描述了一个由膜结合的脱氢酶将 D-山梨糖醇转变为 L-山梨糖酮的重组宿主细胞 (Saito, Y. 等人 (1997))。然后 L-山梨糖酮被从细胞周质转运以被胞质内的 L-山梨糖酮脱氢酶还原。已认识到将山梨糖酮转运蛋白超表达而促进将山梨糖酮中间物转运到 2-KLG 转化途径中具有有利作用。

如图 4 所示, D-葡萄糖到 2-KLG 的一个可选择的途径包括将 D-葡萄糖酸氧化为 5-酮-D-葡萄糖酸 (5KDG), 后者再被还原为 L-艾杜糖酸 (IA) 或 L-古洛糖酸以氧化为 2KLG。(Boudrant, J., (1990))。可通过 5KDG 转运蛋白的超表达促进 5-酮-D-葡萄糖酸到细胞溶胶的转运, 以便由酮还原酶还原。

在另一个实施方案中, 合成反应可为胞质外的或相对于底物位于膜的外面。第一个反应的终产物可为中间底物, 用于位于膜的相反面的第二个反应中。例如, 在来自 Japanese persimmon 的氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) T-100 (FERM BP-4188) 中自 D-山梨糖醇合成 2-KLG 时, D-山梨糖醇被胞质内 L-山梨糖醇脱氢酶转变为 L-山梨糖, 产生一种中间物, 该中间物跨过细胞膜被转运出胞质, 以被膜结合的 L-山梨糖脱氢酶转变为 L-山梨糖酮。因而, 发明者预期可增加将胞质中间物即一种底物从内膜的胞质侧跨膜到膜外的转运以进行随后的转变。Saito, Y., (1997)

虽然一个优选实施方案包括位于单一的生物体里的合成反应或途径, 但位于不同的生物体内的不同反应也是本发明者所预期的。例如, 在从葡萄糖生产 2-KLG 的混合的培养系统中, 葡萄糖到中间物

2,5-DKG 的转变可发生在一种生物体中（醋单孢杆菌属（*Acetomonas*）、醋杆菌属、葡糖杆菌属或欧氏杆菌属），而该中间物向目的抗坏血酸中间物 2-KLG 的转变发生在第二个生物体中（短杆菌属（*Brevibacterium*）或棒状杆菌属（*Corynebacterium*））。参见授予 Sonoyama（1976）的美国专利第 3,963,574 号。也参见 Hoshino, 美国专利第 5,312,741 号。

在另一个实施例中，氨基酸 L-色氨酸已经以吲哚或邻氨基苯甲酸转化进行生产。在这个实践中，该产物被细胞用于进行蛋白质生物合成。（美国专利第 3,801,457 号）

因此，合成反应可生成一种自身可在由细胞膜分隔的另一个细胞位置被转变的中间物。在这个实施方案中，终产物可为随后的反应的中间底物。

确定限速步骤的方法

为了增加底物从第一个细胞位置到第二个细胞位置的转运的效果最大化，在一个优选实施方案中，底物穿膜转运组成了合成途径的限速步骤。确定这样一个步骤是否限速步骤是通过分析该途径、估定每一步骤的产量以及改变可被该途径用于转变的底物量以确定是否这种增加底物可导致该途径总产量的增加来完成的。在确定了底物的增加可增强期望终产物的生产时，如果底物是需要从一个细胞位置穿过细胞膜转运到另一个细胞位置，就可以确定增加底物转运将增强通过该途径的生产。

有多种方法可用于确定限制目的分子生产的瓶颈。大体上，他们大多依赖于生物合成途径中一个或多个组分的变化，而且可确定这些变化在过程中的效果。这些变化可在于底物转变成产物的合成速率、总累计量或产量。（Walsh & Koshland., 1985, PNAS 82:3577-3581）（Jensen 等人, 1993, Eur. J. Biochem. 211:181-191）

确定途径部分的限速状态的一个方法是在途径的各个点比较增加了一种特殊的生物转化物的存在之前或之后中间物的生产力。如果尽

管增加了中间物或超表达了转变途径，而终产物的生产并没有增加，那么该步骤不是限速性的，因而影响该合成反应的具体酶的超表达可能不导致生产增加。各中间物的量可由各种直接或间接方法确定。间接方法包括用线内（in-line）测量法如气体分压来测量呼吸参量的消耗或产生，如二氧化碳生产、氧气消耗。中间物的直接测量可通过各种本领域公知的分析技术来实现，它们描述于 Lazarus, *Analyt. Biochem* 157, 360-366 (1986) 及其中引用的参考文献描述（在此处引用作为参考），包括但不局限于纸、气体相、液相和薄层层析以及化学和酶促测定。高效液相层析方法学，尤其如 Lazarus, 1986 提出的，是尤其有用的。本发明者所使用的一种方法包括 Waters 2690 HPLC 和 Waters 410 差示折光计（differential refractometer），设置用流速为 1 ml/分的 50 mM 乙酸盐缓冲液作为洗脱介质和 Dyonex Ionpac AS-10 离子交换柱（4×250 mm）来分离并确定存在的化学化合物的量。

由本发明者使用的另一种确定在肉汤中生产的 2-klg 的纯度的方法是通过总碳分析的。

因而在一个实施方案中，转运的活性可通过测量在细胞外底物存在时产物的生产而在底物可被转变为产物的任何细胞中进行测量。例如，在天然地或重组地表达 2,5-DKG 还原酶的细胞中，细胞内 2,5-DKG 被转变为 2-KLG。当提供细胞外 2,5-DKG 时，在有 2,5-DKG 通透酶的表达时细菌细胞生产 2-KLG 的能力是表达的通透酶将 2,5-DKG 转运入细胞的能力的量度标准，因而也是其 2,5-DKG 通透酶活性的量度标准。例如，细胞内 2-KLG 可用 HPLC 或本领域公知的其他灵敏检测方法检测。2,5-DKG 的其他代谢产物也可经类似的方法检测。

期望底物的转运蛋白

本发明所用的转运蛋白包含使材料跨膜转运更容易的化合物。在一个实施方案中，转运蛋白类型选择自通道蛋白、初级主动转运蛋白、次级主动转运蛋白和基团转位蛋白的组。在另一个实施方案中，

转运蛋白类型是次级转运蛋白，优选是主要易化物超家族成员，更优选阴离子：阳离子同向转运蛋白成员，更加优选来自 *yiaX2*, *permA*, *permB*, *pe1* 和 *pe6* 编码的转运蛋白。

基于转运模式和能量偶联机制，有四种不同类型的功能性特征化的转运系统。第一种是细菌通道蛋白质（TC#1.A, Saier, 1998），其通过一种能量非依赖性易化扩散机制利用跨膜孔道进行转运。第二种转运系统即易化物（faciliators）和/或次级转运蛋白（secondary transporter）（第二类，TC#2.A）代表了转运蛋白的最大种类。第三类 ATP 驱动的初级主动转运蛋白利用 ATP 水解作为溶质主动摄入和/或排出的能量偶联模式。最后一类由在转运中使其底物磷酸化的转运蛋白组成（TC#4.A）。

在次级家族中，类型 II 家族中最大的是主要易化物超家族（MFS）和氨基酸多胺胆碱（amino acid polyamine choline, APC）家族（Reizer 等人, Protein Sci, 2(1):20-30(1993)）。这些次级转运蛋白超家族可进一步分为三类（1）质子动力（proton motive form, pmf）驱动的，（2）钠动力（sodium motive force, smf）驱动的，和（3）其他离子或溶质驱动的交流剂。这些转运系统催化溶质的单向转运、反向转运和/或同向转运。次级主动转运蛋白已在大肠杆菌、流感嗜血杆菌（*H. influenzae*）、幽门螺杆菌（*H. pylori*）、枯草芽孢杆菌（*B. subtilis*）、生殖道支原体（*M. genitalium*）、集胞蓝细菌属（*Synechocystis*）、詹氏甲烷球菌（*M. Jannaschii*）中鉴定（Paulsen 等人 1998 J. Mol. Biol. 277:573-592）。次级转运蛋白一般是多中心（polytopic）膜蛋白质，常常有 12 个 TMS。对于通常大多数初级载体，即一种能量驱动的基团转位的化学形式，是 ATP-依赖性系统，如同大多数 ATP-结合盒（ATP-binding cassette, ABC）超家族成员一样，或是用 PEP 作为糖类摄入和磷酸化的磷酰基供体的 PTS。次级转运蛋白与初级转运蛋白（ABC 转运蛋白）区别在初级转运蛋白利用 ATP，消耗细胞的能量。另外，ABC 转运蛋白的使用需要一种更加复杂的转运蛋白系统，即包

含两个疏水的膜内在结构域和两个 ATP-结合结构域 (Hosie 等人 *Molecul. Microbiol* (2001) 40 (6), 1449-1459)。那些负责溶质摄入的 ABC 转运蛋白也需要溶质结合蛋白质 (solute-binding protein, SBP) 的存在。因而改进的 ABC 转运系统的基因工程需要比次级转运蛋白性质更复杂的表达和转化。

本发明范围内的转运蛋白包括如表 I 和 II 所示的转运蛋白：

表 1, 根据细菌基因组分析对转运蛋白家族进行分类

家族名称	缩写	TC 编号 ^a	例子
I. 通道蛋白			
主要内在蛋白质	MIP	1. 1	GlpF Eco
高电导敏感离子通道	MscL	1. 3	MscL Eco
电压敏感离子通道	VIC	1. 5	Kch Eco
氯通道	CIC	1. 10	Gef1 Sce
II. 次级主动转运蛋白			
主要易化物超家族	MFS	2. 1	LacY Eco
糖苷-戊糖-己糖苷酸：阳离子同向转运蛋白	GPH	2. 2	MeIB Eco
氨基酸-聚胺-胆碱	APC	2. 3	PheP Eco
阳离子扩散易化物	CDF	2. 4	CzcD Aeu
抗肿瘤细胞分化	RND	2. 6	AcrB Eco
小型多药抗性	SMR	2. 7	Smr Sau
葡糖酸：H ⁺ 同向转运蛋白	GntP	2. 8	GntP Eco
L-鼠李糖转运蛋白	RhaT	2. 9	RhaT Eco
2-酮-e-脱氧葡糖酸转运蛋白	KdgT	2. 10	KdgT Eco
柠檬酸-Mg ²⁺ ：H ⁺ 同向转运蛋白	CitMHS	2. 11	CitM Bsu
C4-二羧酸摄入	Dcu	2. 13	DcuA Eco
乳酸通透酶	LctP	2. 14	LctP Eco
甜菜碱/肉毒碱/胆碱转运蛋白	BCCT	2. 15	BetT Eco
亚硝酸盐抗性/二羧酸转运蛋白	TDT	2. 16	TehA Eco
质子依赖型寡肽转运蛋白	POT	2. 17	Ptr2 Eco
Ca ²⁺ /阳离子反向转运蛋白	CaCA	2. 19	YrbG Eco
无机磷酸盐转运蛋白	PiT	2. 20	PitA Eco
钠：溶质同向转运蛋白	SSS	2. 21	PutP Eco
神经递质：钠同向转运蛋白	NSS	2. 22	Gat1 Hsa
二羧酸：阳离子 (Na ⁺ 或 H ⁺) 同向转运蛋白	DCS	2. 23	GltP Ecp

柠檬酸盐: Na ⁺ 同向转运蛋白	CSS	2. 24	CitS Kpn
丙氨酸: Na ⁺ 同向转运蛋白	ASS	2. 25	DagA Aha
支链氨基酸: Na ⁺ 同向转运蛋白	LIVSS	2. 26	BrnQ Sty
谷氨酸: Na ⁺ 同向转运蛋白	ESS	2. 27	GltS Eco
胆汁酸: Na ⁺ 同向转运蛋白	BASS	2. 28	NabA Rno
NhaA Na ⁺ : H ⁺ 反向转运蛋白	NhaA	2. 33	NhA Eco
NhaB Na ⁺ : H ⁺ 反向转运蛋白	NhaB	2. 34	NhB Eco
NhaC Na ⁺ : H ⁺ 反向转运蛋白	NhaC	2. 35	NhC Eco
单价阳离子: 质子反向转运蛋白-1	CPA-1	2. 36	Nhe1 Rno
单价阳离子: 质子反向转运蛋白-2	CPA-2	2. 37	KefC Eco
K ⁺ : H ⁺ 转运蛋白	Trk	2. 38	TrkHAE Eco
核苷碱基: 阳离子同向转运蛋白-1	NCS1	2. 39	CodB Eco
核苷碱基: 阳离子同向转运蛋白-2	NCS2	2. 40	UraA Eco
核苷摄入通透酶	NUP	2. 41	NupC Eco
芳香族氨基酸通透酶	ArAAP	2. 42	Mtr Eco
丝氨酸/苏氨酸通透酶	STP	2. 43	SdaC Eco
甲酸-亚硝酸盐转运蛋白	FNP	2. 44	FocA Eco
金属离子转运蛋白	MIT	2. 45	CorA Eco
苯甲酸盐: H ⁺ 同向转运蛋白	BenE	2. 46	BenE Aco
二价阴离子: Na ⁺ 同向转运蛋白	DASS	2. 47	NadC1 Has
铵转运蛋白	Amt	2. 49	HoxN Reu
Ni ²⁺ - Co ²⁺ 转运蛋白	NiCoT	2. 52	HoxN Reu
硫酸盐转运蛋白	SulP	2. 53	*Sul1 Sce
三联ATP-非依赖型周质转运蛋白	TRAP-T	2. 56	DctPQM Rca
磷酸盐: Na ⁺ 同向转运蛋白	PNaS	2. 58	NapT Rno

家族名称	缩写	TC 编号 ^a	例子
III. 初级主动转运蛋白			
ATP - 结合盒	ABC	3.1	MalEFGK Eco
H ⁺ 或 Na ⁺ 转位 - F - 型、V - 型和 A - 型	F-	3.2	UncA-H Eco
ATP 酶	ATPase		
阳离子转位 - P - 型 ATP 酶	P-	3.3	CadA Sau
	AtPase		
砷化物外向通量	Ars	3.4	ArsAb Eco
IV. 基团转位蛋白			
葡萄糖 - 葡萄糖苷磷酸转移酶系统	Glc	4.1	PtsG/Crr Eco
果糖 - 甘露醇磷酸转移酶系统	Fru	4.2	FruAB Eco
乳糖 - 纤维二糖磷酸转移酶系统	Lac	4.3	Cel ABC Eco
葡萄糖醇磷酸转移酶系统	Gut	4.4	GutAB Eco
半乳糖醇磷酸转移酶系统	Gat	4.5	GatABC Eco
甘露糖 - 果糖 - 山梨糖磷酸转移酶系统	Man	4.6	ManXYZ Eco
V. 未分类的			
多糖转运蛋白	PST	99.1	RfbX Eco
MerTP 汞离子 (Hg ²⁺) 通透酶	MerTP	99.2	MerTP Sau
烟酰胺单核苷摄入通透酶	NMN	99.4	PnuC Eco
K ⁺ 摄入通透酶	Kup	99.5	Kup Eco
L - 赖氨酸输出蛋白	LysE	99.6	LysE Cgl
铬酸盐离子转运蛋白	CIT	99.7	ChrA Aeu
亚铁离子摄入	FeoB	99.8	FeoB Eco
Mg ²⁺ 转运蛋白	Mgt	99.19	MgtE Pst

表 2, 根据细菌基因组分析对转运蛋白家族进行分类

家族名称	典型底物	Dist. ^c	参考文献
I. 通道蛋白			
主要内在蛋白质	甘油, 水	BE	Park 和 Saier(1996)
高电导敏感离子通道	离子	B	Sukarev 等人 (1996)
电压敏感离子通道	钾	BAE	Alexander 和 Peters (1997)
氯通道	氯化物	BAE	Saier 等人 (未发表); Jentsch 等人 (1995)
II. 次级主动转运蛋白			
主要易化物超家族	糖类、药物、代谢物、 神经递质、有机离子、 核苷、羧酸酯、有机和 无机阴离子	BAE	Pao 等人 (1998) (未发表结 果); Paulsen 和 Skurray (1993); Paulsen 等人 (1996a, b)
糖苷戊糖-己糖苷酸: 阳离子同向 转运蛋白	糖苷、戊糖、己糖苷酸	B	Poolman 等人 (1996)
氨基酸-聚胺-胆碱	氨基酸、胆碱、多胺	BAE	Reizer 等人 (1993)
阳离子扩散易化物	金属离子	BAE	Paulsen 和 Saier (1997)
抗肿瘤细胞分化	药物、金属离子、脂多 糖	B	Paulsen 等人 (1996b)
小型多种药物抗性	药物	B	Paulsen 等人 (1996b)
葡糖酸: H ⁺ 同向转运蛋白	葡糖酸	B	Peekhaus 等人 (1997)
L-鼠李糖转运蛋白	鼠李糖	B	Tate 等人 (1992)
2-酮-e-脱氧葡糖酸转运蛋白	2-酮-3-脱氧葡糖酸	B	Allen 等人 (1989)
柠檬酸-Mg ²⁺ : H ⁺ 同向转运蛋白	柠檬酸	G ⁺	Boorsma 等人 (1996)
C4-二羧酸摄入	二羧酸	G ⁻	Saier 等人 (未发表结果)
乳酸通透酶	乳酸	BA	Saier 等人 (未发表结果)
甜菜碱/肉毒碱/胆碱转运蛋白	甜菜碱、肉毒碱、胆碱	B	Saier 等人 (未发表结果)
亚砷酸盐抗性/二羧酸转运蛋白	亚砷酸盐、二羧酸	BA	Saier 等人 (未发表结果)
质子依赖型寡肽转运蛋白	肽	BE	Saier 等人 (未发表结果)
Ca ²⁺ /阳离子反向转运蛋白	Ca ²⁺ /Na ⁺ 或H ⁺	BAE	Saier 等人 (未发表结果)
无机磷酸盐转运蛋白	磷酸盐	BAE	Saier 等人 (未发表结果)
钠: 溶质同向转运蛋白	氨基酸、糖类、维生 素、核苷、无机阴离子	BE	Reizer 等人 (1993)
神经递质: 钠同向转运蛋白	神经递质	BAE	Reizer 等人 (1993)
二羧酸盐: 阳离子 (Na ⁺ 或H ⁺) 同 向转运蛋白	二羧酸盐、氨基酸	BE	Saier 等人 (未发表结果)
柠檬酸盐: Na ⁺ 同向转运蛋白	三和二羧酸盐	B	Kawai 等人 (1997)

丙氨酸: Na ⁺ 同向转运蛋白	丙氨酸	B	Reizer 等人 (1993)
支链氨基酸: Na ⁺ 同向转运蛋白	支链氨基酸	B	Reizer 等人 (1993)
谷氨酸盐: Na ⁺ 同向转运蛋白	谷氨酸盐	G-	Reizer 等人 (1993)
胆汁酸: Na ⁺ 同向转运蛋白	胆汁酸	BE	Reizer 等人 (1993)
NhaA Na ⁺ : H ⁺ 反向转运蛋白	Na ⁺ /H ⁺	G-	Gerchman 等人 (1993)
NhaB Na ⁺ : H ⁺ 反向转运蛋白	Na ⁺ /H ⁺	B	Pinner 等人 (1992)
NhaC Na ⁺ : H ⁺ 反向转运蛋白	Na ⁺ /H ⁺	B	Ivey 等人 (1991)
单价阳离子: 质子反向转运蛋白-1	Na/H ⁺	BAE	Saier 等人 (未发表结果); Orlowski 等人 (1992)
单价阳离子: 质子反向转运蛋白-2	K ⁺ , Na ⁺ /H ⁺	BAE	Saier 等人 (未发表结果); Stumpe 等人 (1996)
K ⁺ : H ⁺ 转运蛋白	K ⁺ /H ⁺	BAE	Saier 等人 (未发表结果); Stumpe 等人 (1996)
核苷碱基: 阳离子同向转运蛋白-1	胞嘧啶、尿嘧啶、尿囊素	BE	Saier 等人 (未发表结果)
核苷碱基: 阳离子同向转运蛋白-2	核苷	BE	Saier 等人 (未发表结果)
核苷摄入通透酶	核苷	BE	Saier 等人 (未发表结果)
芳香族氨基酸通透酶	氨基酸	G-	Sarsero 和 Pittard (1997)
丝氨酸/苏氨酸通透酶	氨基酸	G-	Shao 等人 (1994)
甲酸-亚硝酸盐转运蛋白	氨基酸、甲酸、亚硝酸盐	BAE	Saier 等人 (未发表结果)
金属离子转运蛋白	Mg ²⁺ 、Co ²⁺ 、Mn ²⁺ 、Al ³⁺	BA	Smith 等人 (1993)
苯甲酸: H ⁺ 同向转运蛋白	苯甲酸	G-	Neidle 等人 (1991)
二价阴离子: Na ⁺ 同向转运蛋白	NadC1 Hsa	BAE	Markovich 等人 (1993)
铵转运蛋白	铵	BAE	Saier 等人 (未发表结果)
Ni ²⁺ -Co ²⁺ 转运蛋白	Ni ²⁺ , Co ²⁺	B	Wolfram 等人 (1995)
硫酸盐转运蛋白	硫酸盐	BE	Saier 等人 (未发表结果); Smith 等人 (1995)
三联ATP-非依赖型周质转运蛋白	二羧酸盐	B	Forward 等人 (1997)
磷酸盐: Na ⁺ 同向转运蛋白	磷酸盐	BE	Magagnin 等人 (1993)
III. 初级主动转运蛋白			
ATP-结合盒	糖、氨基酸、药物、金属离子、代谢物、肽、维生素、蛋白质、复杂碳水化合物	BAE	Kuan 等人 (1995)
H ⁺ 或 Na ⁺ 转位-F-型、V-型和 A-型 ATP 酶	H ⁺ /Na ⁺	BAE	Blair 等人 (1996)

阳离子转位-P-型 ATP 酶	M ⁺ 、M ²⁺	BAE	Fagan 和 Saier (1994)
砷化物外向通量	亚砷酸盐、亚铋酸盐	BAE	Tsai 等人 (1997)
IV. 基团转位蛋白			
葡萄糖-葡萄糖苷磷酸转移酶系统	葡萄糖、蔗糖、β-葡糖苷、N-乙酰葡糖胺	B	Reizer 等人 (1996c)
果糖-甘露醇磷酸转移酶系统	果糖、甘露醇	B	Reizer 等人 (1996c)
乳糖-纤维二糖磷酸转移酶系统	乳糖、纤维二糖	B	Reizer 等人 (1996a)
葡萄糖醇磷酸转移酶系统	葡萄糖醇	B	Reizer 等人 (1996b)
半乳糖醇磷酸转移酶系统	半乳糖醇	G-	Nobelmann 和 Lengeler (1996)
甘露糖-果糖-山梨糖磷酸转移酶系统	甘露糖、果糖、山梨糖	B	Reizer 等人 (1996d)
V. 未分类的			
多糖转运蛋白	多糖	B	Paulsen 等人 (1997)
MerTP 汞离子 (Hg ²⁺) 通透酶	汞和重金属离子	B	Silver 和 Phung
烟酰胺单核苷酸摄入通透酶	烟酰胺单核苷酸	G-	Foster 等人 (1990)
K ⁺ 摄入通透酶	钾	BE	Banuelos 等人 (1995)
L-赖氨酸输出蛋白	赖氨酸	B	Vrljic 等人 (1996)
铬酸盐离子转运蛋白	铬酸离子	BA	Nies 和 Silver (1995)
亚铁离子摄入	亚铁离子	BA	Kammler 等人 (1993)
Mg ²⁺ 转运蛋白	Mg ²⁺ 、Co ²⁺	BA	Townsend 等人 (1995)

^aTC 编号，转运蛋白委员会的分类号 (Saier, 1998)

^b 引用的例子显示蛋白质的缩写，基于编码基因名称 (前四个字母)，再加上来源生物体的三字母缩写。(例如 Eco, 大肠杆菌; Sce, 酿酒酵母)

^c 下述生物体系统发生组内的家族成员表示如下：革兰氏阴性细菌，G-；革兰氏阳性细菌，G+；细菌，B；古生物，A；真核生物，E。

(Paulsen, I. T. 等人, J. Mol. Biol. 277, 573-592 (1998))，而且这儿引用地参考文献都合并做参考。

本发明范围内的次级转运蛋白如表 3 和 4 所述。

表 3

缩写	描述	门*
ExuT Eco	己糖醛酸转运蛋白	B
YcbE Bsu	推定的葡糖二酸转运蛋白	B
YcbE Ppu	推定的葡糖二酸转运蛋白	B
HpaX Eco	4-羟基苯乙酸转运蛋白	B
Orf f450 Eco	推定的葡糖二酸转运蛋白	B
Pht1 Ppu	邻苯二甲酸转运蛋白	B
TtuB Avi	酒石酸转运蛋白	B
TtuB1 Avi	酒石酸转运蛋白	B
YhaU Eco	推定的葡糖二酸转运蛋白	B
YidT Eco	半乳糖酸转运蛋白	B
Yyb0 Bsu	葡糖二酸转运蛋白	B
C11D3.18c Spo	C11D3.18c(推定的 Na ⁺ /磷酸盐 共转运蛋白)	Y
Dal5 Sce	尿囊酸(allantoate)通透酶	Y
L0578 Sce	未知功能	Y
Yal0670 Sce	未知功能	Y
Ycr28c Sce	未知功能	Y
Ygr260w Sce	未知功能	Y
Yil166c Sce	未知功能	Y
Ylr004c Sce	Orf Ylr004c(未知功能)	Y

表 4

缩写	生物体	大小 (残基数目)	接受号	数据库*
ExuT Eco	大肠杆菌	472	P42609	SP
YcbE Bsu	枯草芽孢杆菌	455	P42237	SP
YcbE Ppu	恶臭假单胞菌	456	P42205	SP
HpaX Eco	大肠杆菌	458	Z37980	GB
Orf f450 Eco	大肠杆菌	450	U29581	GB
Pht1 Ppu	恶臭假单胞菌	451	Q05181	SP
TtuB Avi	葡萄土壤杆菌	433	U25634	GB
TtuB1 Avi	葡萄土壤杆菌	449	U32375	GB
YhaU Eco	大肠杆菌	444	P42613	SP
YidT Eco	大肠杆菌	445	P31457	SP
Yyb0 Bsu	枯草芽孢杆菌	435	P37489	SP
C11D3.18c Spo	粟酒裂殖酵母	498	Z68166	GB
Dal5 Sce	酿酒酵母	543	P15365	SP
L0578 Sce	酿酒酵母	531	S50965	PIR
Yal0670 Sce	酿酒酵母	593	P39709	SP
Ycr28c Sce	酿酒酵母	512	P25621	SP
Ygr260w Sce	酿酒酵母	534	Z73044	GB
Yil166c Sce	酿酒酵母	542	P40445	SP
Ylr004c Sce	酿酒酵母	523	Z73176	GB

Pao, S. S. 等人, 1998, Microbiol. Mol. Biol. Rev. 62(1):1-34.

在一个实施方案中, 编码所述至少一种可增加底物跨内细胞膜转运的蛋白质的 DNA 选自哺乳动物、植物、真菌或细菌细胞。作为植物细胞的例子, 下面有草本、树本、海草。作为真菌细胞的例子, 下面

有用的有酵母、丝状真菌、白腐真菌和粘菌。作为细菌细胞的例子，下面有用的有醋杆菌属、假单胞杆菌属、杆菌属（*Bacterium*）、蓝球菌属（*Cyanococcus*）、微球菌属、短杆菌属、节杆菌属（*Arthrobacter*）、葡萄球菌属、芽孢杆菌属、棒状杆菌属（*Corynebacterium*）、醋单孢菌属、葡糖杆菌属和欧氏杆菌属。优选的生物体选自大肠杆菌、泛菌属和克雷伯氏杆菌属。

II. 表达系统

本发明提供了增强微生物包括细菌和酵母中期望的异源或同源蛋白质的生产和转运的表达系统。

a. 编码序列

在本发明中，载体包含至少一个拷贝的编码转运蛋白的核酸，优选地包含多拷贝。转运蛋白的编码序列可以依照本领域熟练技术人员所知的常规和标准技术来获取。适当的启动和终止密码子，内含子、外显子相关问题和其他基因结构优化将容易用标准分子生物学方法来应用。

b. 载体序列

用于在微生物中表达本发明的转运蛋白的表达载体包含至少一种与启动子、终止序列和其他调控序列，这些是转运蛋白因子表达或过表达必需的或理想的，该启动子在宿主细胞中是有功能的。在本发明的一个实施方案中，启动子是所选择的转运蛋白的野生型启动子，而在本发明的另一个实施方案中，启动子对转运蛋白而言是异源的，但在宿主中仍然是有功能的。

与编码目的蛋白质或多肽的异源核酸相关联的额外的启动子可通过重组 DNA 技术而被引入。在本发明的一个实施方案中，宿主细胞能够过表达异源的蛋白质或多肽，并重组地引入编码一种或多种转运蛋白的核酸。在本发明的一个优选实施方案中，编码所述至少一种或多种增加底物转运的蛋白质的核酸可稳定地整合入微生物基因组。在另一个实施方案中，宿主细胞被加工成表达编码一种或多种增加所说的

底物转运入该宿主细胞的本发明蛋白质的 DNA，且编码异源蛋白质或多肽的核酸是通过重组技术引入的。本发明包含能够使本领域技术人员所公知的其它转运蛋白超表达的宿主细胞，包括但不限于那些在表 1、2 或 3 或本领域技术人员所公知的或将来鉴定的转运蛋白。

在一个优选实施方案中，表达载体包含多克隆位点盒，该盒优选地包含至少一个对载体是唯一的限制性内切酶位点，以使得对核酸的操作容易。在一个优选实施方案中，表达载体也包含一个或多个选择性标记。如在此处所用的，术语选择性标记指能够在革兰氏阳性宿主中表达、从而便于对那些含有载体的宿主进行选择标记的基因。这样的选择性标记的实施例包括但不限于抗生素如红霉素、壮观霉素 (spectinomycin)、氯霉素和四环素。也提供了其中的转运蛋白由与 SEQ ID NOS: [] 所示的 DNA 序列有至少 90% 的同源性的核酸编码的实施方案。优选地，同源性为至少 95%，更优选地为至少 98%。同源性可以通过将要求保护的氨基酸或 DNA 序列与另一序列比对起来并以总序列的百分比确定有多少氨基酸或核苷酸相匹配而确定。同源性也可用商业上可获得的序列分析软件程序之一来确定，例如序列分析软件包 6.0 版 (Sequence Analysis Software Package Version 6.0) 中的 TFASTA Data Searching Program (Genetic Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, Wis. 53705)。

可以利用如在此处所描述的杂交或利用简并引物的 PCR 来筛选同源序列。Chen 和 Suttle (1995) *Biotechniques* 18 (4):609-610, 612。在本发明的几个实施方案中，也提供了可在严格的条件下分别与 FIGS. 和 SEQ ID NOS: 所示的 DNA 或其片段杂交的核酸。严格的杂交条件包括本领域的技术人员所公知的严格的杂交和洗涤条件。杂交和适当的严格条件描述于 Sambrook 等人 1989 《分子克隆》 (Molecular Cloning) 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York。

在具有编码转运蛋白质的转化 DNA 的宿主细胞中增加重组肽生产的方法

增加底物从一个细胞位置到另一个细胞位置的转运的特别有力的方法涉及从转化的宿主细胞基因组中缺失代谢转移 (metabolic diversions) 及伴随提供可增加想要的底物的转运的 DNA。这可通过向细胞提供缺失-转运蛋白嵌合体或融合蛋白质而方便地实现, 其中缺失部分的代谢转移被最小化, 而转运蛋白能力部分是超表达的。化学地融合的多肽或基因组的改组部分是可能发生的, 但是重组蛋白质自然地是如此方式使用时最优选的。用于这样的嵌合体的适当通透酶片段的鉴定已在上面此处描述。

至于这些融合蛋白质的转运部分, 任何含有足够的一级序列信息以赋予嵌合体以转运活性的通透酶衍生序列在这种情况下都是有用的。然而, 经常优选地使用整个转运蛋白酶, 因为这在方法学方面是更直接的。此外, 可参看在各种发表的参考书目中提供的大量的信息以助于鉴定适当的转运蛋白或其片段。

转化

本发明也涵盖增大或增加细胞生产生物活性多肽的能力, 这样的多肽可增加底物从第一细胞位置跨膜转运到第二细胞位置。在一些情况, 这可通过使与底物向另一细胞位置转运以进行进一步生物转变有关的蛋白质超表达而实现, 例如次级转运蛋白阴离子/阳离子同向转运蛋白 (Saier, 1988), 在一个实施方案中为阴离子/阳离子 H^+ 同向转运蛋白。

与维持宿主细胞的生存力和生产能力尤其是转运能力有关的转运蛋白的表达是重要的。在所述途径是需要 NADPH 或 NADH 的反应的情况下, 宿主细胞持续的生存力是由想要的途径进行成功的连续生产所必要的。在确定维持生物体的生存力同时可被超表达的多拷贝数或启动子时应牢记某些需要考虑的事项和因子。通常, 转运蛋白的过度表

这对细胞是有害的，这是因为在膜中掺入转运蛋白的可用空间是有限的。因此，一种转运蛋白的非常过度的超生产可减少与其他养分从培养基的转运有关的其它转运蛋白在膜中的掺入。加工细胞类型特异性转录因子的超表达可增加或稳定工程改造的宿主细胞的转运蛋白性能。

细菌宿主细胞中 H⁺同向转运蛋白的稳定超表达适用于几个目的。它可在维持微生物的生存力时增加转基因的表达。同向转运蛋白的超表达比 ABC 转运蛋白的超表达更简单，这是因为同向转运蛋白不需要 ABC 转运蛋白的多重成分的大量编码。第三，通过使次级转运蛋白而不是 ATP 或 PTS 偶联转运蛋白质超表达，可使宿主细胞的能量需求的转移最小化。

在本发明的一个实施方案中，编码本发明一种或多种转运蛋白的核酸是通过能够在宿主细胞中复制的表达载体而引入宿主细胞的。适于泛菌属的复制型质粒描述于 Sambrook 等人 1989《分子克隆》(Molecular Cloning) 2d ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 在此特别地引入作为参考，这是基于泛菌属能维持与大肠杆菌相同质粒的复制的事实。

在另一个实施方案中，编码一种或多种转运蛋白的核酸被稳定地整合到微生物基因组中。优选的宿主细胞来自泛菌属。另一个优选的宿主细胞是产酸克雷伯氏杆菌。在文献中已经描述了几个将 DNA 整合到基因组中的策略（参见如 Balbas 等人，1996, Gene 172:65-69; LeBorge 等人，1998, Gene 223:213-219）。

柠檬泛菌的转化可采用对于大肠杆菌发展的规程由电穿孔方法来实现（Potter, H., 1988, Anal. Biochem. 174:361-373）。

III. 转化体的鉴定

将 DNA 引入到宿主中后，转化体是通过在载体中编码的抗生素抗性或通过选择通常在质粒中编码的功能来选择的。一旦转化体已经与

未转化的细胞区分开来，则可用标准规程来证实具有完整结构的质粒的存在（Sambrook 等人，1989）。

转运蛋白多核苷酸序列的存在可通过合适的基于序列或同源性设计的探针、部分或片段进行 DNA-DNA 或 DNA-RNA 杂交或扩增来检测。

IV. 转运测定

测定宿主细胞中底物转运水平、检测转运的底物的方法，易于用本领域普通技术人员容易地确定，而且包括使用蛋白质特异性的多克隆或单克隆抗体。实施例包括酶联免疫吸附测定（ELISA）、放射免疫测定（RIA）和荧光激活细胞分选术（fluorescent activated cell sorting, FACS）。这些和其他测定方法在 Hampton R 等人（1990, Serological Methods, 实验室手册, APS Press, St Paul Minn.）和 Maddox DE 等人（1983, J Exp Med 158: 1211）等的文献中有描述。

为了详细描述本发明，下面提供了测定 2-KLG 途径中抗坏血酸中间物水平的方法。然而，已经公开的一般概念和技术，以及本领域熟练技术人员的知识，将有助于设计策略以测定生物合成途径中的底物、中间物和终产物的水平。

举例来说，对于测定 KLG 生产途径中抗坏血酸中间物水平的方法，本领域中的技术人员将认识到 HPLC 方法学是一种测定化学化合物水平和评估相对产量和消耗的方法。

另外，许多种标记和缀合技术是本领域技术人员所公知的并可被用于各种核酸和氨基酸测定。生产经标记的杂交或 PCR 探针用于检测特定的多核苷酸序列的方法包括寡标记（oligolabeling）、切口平移、末端标记或用标记的核苷酸进行的 PCR 扩增。或者，可将核苷酸序列或其任何部分克隆入载体以生产 mRNA 探针。这样的载体是本领域所公知的，在商业上可得到，且可以通过添加适当的 RNA 聚合酶如 T7、T3 或 SP6 和标记的核苷酸而在体外用于合成 RNA 探针。

许多公司如 Pharmacia Biotech (Piscataway N.J.)、Promega (Madison Wis.) 和 US Biochemical Corp (Cleveland Ohio) 供应用于这些程序的商业试剂盒和规程。适当的报告分子或标记包括那些放射性核素、酶、荧光的、化学发光的或产色的试剂以及底物、辅因子、抑制剂、磁性颗粒等。讲授这样的标记的使用的专利包括美国专利号 3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149 和 4,366,241。同样,重组免疫球蛋白可如美国专利号 4,816,567 所示而生产,在此处引入作为参考。同样,重组免疫球蛋白可如美国专利号 4,816,567 所示而生产,在此引入作为参考。

实施例

实施例 1

材料和方法

a. 质粒、细菌菌株和培养基: 质粒 pBCL 1920、产酸克雷伯氏杆菌、柠檬泛菌 1392A, Murphy III 培养基含有果糖 0.5%、磷酸盐 1.6%、MgSO₄·7H₂O 0.2%、Soytone 0.2%、柠檬酸盐 0.01%、(NH₄)₂SO₄ 1%、ppm 范围的痕量盐如 Fe、Co、Mn、Zn 和维生素如烟酸、叶酸和 B12; M9 培养基含有 0.9%的磷酸盐、0.1%的 NaCl、0.1%的 NH₄Cl、MgSO₄ 0.0005%、CaCl₂ 0.025%; 发酵培养基含有磷酸钾 (Potassium Phosphate) 1%、MgSO₄ 0.15%、谷氨酸盐 1.5%、果糖 2.5%、硫酸铵 0.1%和含有生物素、硫胺素、吡哆醇、核黄素、烟酸、叶酸和 B12 的维生素混和物, 以及含有 10-100 ppm 水平的铁、Zn 和 Mn 离子的痕量金属混合物溶液; 转运测定培养基含有 100 mM 磷酸钾 pH 6.9; 抗生素壮观霉素 50 µg/ml 和四环素 20 µg/ml, IPTG 100 µM。

b. DNA 技术

c. 细胞生长: 使以重组方法构建的菌株以及野生型柠檬泛菌和产酸克雷伯氏杆菌生长在含有 DKG 作为唯一碳源的 M9 培养基或以果糖作为唯一碳源或的 MIII 培养基中, 或者具有混和碳源如 0.1%到 1%

范围内的果糖、葡糖酸和 DKG 的 MIII 培养基中。使细胞在 20-37℃ 之间生长，但优选地低于 30℃。细胞优选地生长在中性 pH，但是可以在 pH5-8 范围内。生长在来自种子瓶的发酵罐中的柠檬泛菌细胞使用以果糖或葡萄糖饲养的发酵培养基。

d. DKG 摄入生化测定：将含有细胞的发酵肉汤样品从各自的生长设备中取出并在冰水浴中骤冷。离心发酵肉汤并丢弃上清液。用 0.95 冰冷的盐溶液洗涤细胞沉淀，随后由 DKG 摄入测定缓冲液 100 mM 冰冷的磷酸钾 pH6.9 洗涤两次。将细胞重悬于相同的测定缓冲液中至 550 nm 的 OD 值为 12，然后在室温或优选地在 28℃ 温育。DKG 摄入测定是通过将细胞与富 C-14 放射性同位素标记 2, -5 DKG 混和而开始。DKG 摄入的时间进程是用基于用冰冷的测定缓冲液真空/滤器骤冷来进行的。DKG 摄入测量是由细胞中放射性同位素的掺入来完成的，将所获得的数据对时间绘图得到 DKG 摄入速率。

也进行了另一个用硅油对细胞 DKG 摄入和代谢研究的测定 (Johnson, J.D. 等人, J. Lab. Clin. Med., 1980, 95:429-439)。将 100 μ l 硅油加入到准备好进行测定的 epitube 中。将细胞和富 14C (U) 的 2, 5-DKG 混和，然后在定期的时间间隔取出 100 μ l 的细胞/底物混和物并将其加入到含有硅油的 epitube 中，离心 15 秒，然后迅速在干冰/乙醇浴中冷冻。5 分钟后，将含有细胞沉淀的 epitube 的顶端直接切入闪烁小瓶中。正好在试管剩余部分的冷冻部分上面再次切割并置入另一个含有闪烁液的小瓶中。在过夜以促进细胞沉淀从 epitube 顶部松散开之后记数。顶部记数的损失和沉淀中记数的出现的差异归因于细胞的代谢和释放的 CO₂。在摄入测定结束时，当细胞被透化时，低分子的细胞内容物泄露出来并提供了关于积累中输入底物和底物进一步代谢变为细胞成分的命运的信息。

e. DKG 还原酶测定：收集来自每个发酵罐的细胞沉淀并在 -70℃ 冷冻约 24 小时。将在 15 和 25 小时时间点的沉淀在冰上解冻并用弗氏压碎器在 pH 6.5 的 50 mM PIPES 缓冲液中压碎。将抽提液在台式离心机中以 14 K rpm 旋转 2 分钟，随后测量总蛋白质的浓度和还原

酶的活性。所有样品是通过蛋白质的 Bradford 和 BCA 测定法来测量的，并根据需要稀释以进行精确的分级测定。该测定是相对于背景等级 (background rate) 而测量的，其中的背景等级含有除 2,5-DKG 之外的所有成分 (低于总等级的 10%)。缓冲液含有: 50 mM PIPES pH 6.5、150 μ M NADPH 和 5 mM 2,5-DKG。

也进行了利用硅油对细胞的 DKG 摄入和代谢分析的另一个测定 (Johnson, J.D. 等人, J. Lab. Clin. Med., 1980, 95:429-439)。将 100 μ l 硅油加入到准备好进行测定的 epitube 中。将细胞和富 ^{14}C (U) 的 2,5-DKG 混和，然后在定期的时间间隔 (例如约每 10 秒钟) 取出 100 μ l 的细胞/底物混和物并将其加入到含有硅油的 epitube 中，离心 15 分钟，然后迅速在干冰/乙醇浴中冷冻。5 分钟后，将含有细胞沉淀的 epitube 的顶端直接切入闪烁小瓶中。正好在试管剩余部分的冷冻部分上面再次切割并置入另一个含有闪烁液的小瓶中。在过夜以促进细胞沉淀从 epi 顶部松散开之后记数。顶部记数的损失和沉淀中记数的出现的差异归因于细胞的代谢和释放的 CO_2 。在摄入测定结束时，当细胞被透化时，低分子的细胞内容物泄露出来并提供了关于积累的输入底物和底物进一步代谢变为细胞成分的命运的信息。

实施例 II

实施例 II 提供了底物的转运蛋白可能是全细胞生物转变的限速因子的基础

本实施例解说了可被区室化为 4 个部分的从葡萄糖形成 2KLG 的关键步骤 (图 5)。利用三种周质酶在柠檬泛菌中以 14-15 g/l/hr 的速率对关键中间物 2,5-DKG 进行生产 (Sonoyama 等人, Appl. Environ. Microbiol., 1982, 43:1064-1069)。第二部分是需 DKG 在细胞的胞质空间内转运的速率。第三个是用 DKG 还原酶将 DKG 转化为 2KLG 的速率 (美国专利号 5,032,514)。当 DKG 还原酶超表达时，DKG 向 2KLG 的转变不是速率限制性的。在我们目前的 2KLG 生产发酵中，将诱导型质粒用于增加和减少相对于我们一般的发酵 (目

前使用 pD92) 而言的还原酶比活性, 其中的 DKG 还原酶是在组成型启动子 trp 控制下的。诱导型质粒 pD23 是在 taq 启动子控制下的, 可用 IPTG 诱导。运行了三个发酵罐, 一个用 pD92, 两个用 pD23 且其中的一个用 IPTG 诱导。对照的 pD92 和诱导的 pD23 生产了几乎同样水平的 2-KLG, 而未诱导的 pD23 的产量则低得多。还原酶比活性的测定显示, 相对于对照 pD92 而言, 未诱导的质粒生成的还原酶水平不到一半, 而诱导的 pD23 则生成了多于两倍。这些结果显示, 在我们生产 2KLG 的柠檬泛菌发酵中, 还原酶活性的水平不是 2-KLG 生产的瓶颈。

菌株	蛋白质浓度	还原酶活性	比活性
pD92 (对照)	3.2 mg/ml	25.0 u/ml	7.8 u/mg
pD23 (未诱导的)	3.7 mg/ml	12.0 u/ml	
	3.2 u/mg		
pD23 (诱导的)	3.9 mg/ml	73 u/ml	19 u/mg

第四部分是在细胞内生成的并需要输出的 2KLG 的转运。2KLG 在发酵中的生产速率 (2.2 g/l/hr-2.7 g/l/hr) 可认为与 2KLG 从细胞的输出速率相等。是这样论证的, 如果 2KLG 输出的速率是限制性的, 那么细胞将在细胞内积累 2KLG, 这样细胞将不能以其代谢潜力发挥功能并最终死亡。然而, 柠檬泛菌生产 2KLG 的细胞没有展示这些情形的任何一个, 并且细胞内 2KLG 的测量值保持在低于生产的 2KLG 最大浓度的十到二十分之一。因而可想象 2KLG 的输出也不是 2KLG 生产中的限速步骤。

实施例 III

实施例 III 提供了证实底物转运进入细胞以进行生物转变确实是限速步骤的证据

将来自发酵过程的三个不同时间即种子烧瓶 (seed-flask) 阶段、果糖饲养阶段和葡萄糖饲养阶段的细胞沉淀收集并如在实验中描述进行加工。利用这些细胞类型的 DKG 摄入测定, 确定出 DKG 摄入速率 (引入 DKG 以转变为 KLG) 为 0.5 g/l/hr、2.7 g/l/hr 和 2.75 g/l/hr (图 2)。DKG 输入的速率与 KLG 输出的速率相等。因而这个结果证明, DKG 到 KLG 的生物转变的速率依赖于 2,5-DKG 进入细胞的输入速率。因而本发明将证明, 通过以超表达来增加 DKG 摄入转运蛋白, 将增强 2,5-DKG 的输入速率, 并因而将增强 2KLG 的生产速率。本领域的专家可想象利用全细胞转变方法的各种生物转化中的关键限制因子实际上是底物进入细胞以进行生物转化的输入和输入速率。

实施例 IV

实施例 IV 说明利用 DKG 摄入测定发现产酸克雷伯氏杆菌中 2,5-DKG 转运蛋白的存在。WO 002170 描述了来自产酸克雷伯氏杆菌的称为 yia 操纵子的鉴定和序列测定, 该操纵子含有 8 个推定的开放阅读框。yia 操纵子中各开放阅读框编码的这些多肽的功能没有在 WO002170 中描述。该操纵子的破坏去除了产酸克雷伯氏杆菌利用抗坏血酸作为唯一碳源的能力。已知抗坏血酸是一种对氧化不稳定的物质, 它可通过空气氧化而分解为 2,3-DKG (Kimaya, S., Vitaminol. 1961, 7:19-26)。因而提出 2,3-DKG 才是生长的真正底物是合理的。Yia 操纵子中称为 yiaX2 的一个开放阅读框编码转运蛋白型跨膜蛋白质, 并因而被认为是 2,3-DKG 通透酶的候选物。根据寻求 2,5-DKG 通透酶的并行检索, 从而认识到 2,3-DKG 和 2,5-DKG 是类似分子, 可能 yiaX2 可转运 2,5-DKG 和其他糖类酮酸如 2KLG。

为了确定 yiaX2 是否可转运 2,5-DKG 和 2-KLG, 将该基因从产酸克雷伯氏杆菌菌株 M5a1 的染色体中缺失 (参见如 Streicher 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. 68:1174-1177 (1971))。称为 MGK002 的 yiaX2 缺失突变体是用本领域公知的标准分子生物学规程来构建的 (参见如 Hamilton 等人, J. Bacterial. 171:4617-4622

(1989))。另一种称为 Tester 菌株的产酸克雷伯氏杆菌菌株是通过将质粒编码的、受 lac 操纵子调节的 yiaX2 基因添加回产酸克雷伯氏杆菌菌株 MGK002 而创建的。利用 MGK002 和 Tester 菌株在 +/- IPTG 诱导下的 DKG 摄入测定证实 yiaX2 编码具有 2,5-DKG 转运活性的多肽 (图 9)。

实施例 V

实施例 V 提供了从微生物中筛选 2,5-DKG 通透酶的选择方法学

有了 yiaX2 基因编码具有 2,5-DKG 转运活性的转运蛋白的信息,就可能设计出选择宿主以找到柠檬泛菌和其他生物学来源的 2,5-DKG 转运蛋白。构建有 yiaX2 基因缺失并添加了表达参与 2,5-DKG 到葡糖酸的分解代谢中的酶的基因的产酸克雷伯氏杆菌,其对于生物体的中央代谢而言是可评估的。能够分解代谢 2,5-DKG 到葡糖酸的酶是由在一些革兰氏阴性生物体中存在的 tkr idnD idnO 操纵子的 tkr 和 idnO 基因编码的 (Bausch, C. 等人, J. Bacteriol., 1998, 180:3704-3710)。

结果所得的产酸克雷伯氏杆菌 tester 菌株是 yiaX2[tkr idnO],其除了不能将 DKG 输入到胞质外,含有所有以 2,5-DKG 作为唯一的碳源在其上生长所必需的成分。因此,编码 2,5-DKG 通透酶的核酸分子在 tester 菌株中表达后,应可以赋予 tester 菌株在 2,5-DKG 上生长的能力。这种选择方法学如图 9 所示。

用于构建柠檬泛菌基因组文库的克隆载体是质粒 pCI1920 (Lerner 等人, Nucleic Acid Res., 1994, 18:4621), 即携带有壮观霉素/链霉素抗性决定因子的低拷贝数表达载体。表达是由 lacP0 启动子/操纵基因区域驱动的, 当由宿主提供了 lacIq 基因产物时该区域可被该产物抑制。利用标准规程从柠檬泛菌 (ATCC39140) 中分离了基因组 DNA 并构建了基因组文库 (Sambrook 等人, 《分子克隆: 实验室手册》 (Molecular Cloning: A Laboratory manual), Cold Spring Harbor Laboratory, New

York (1992))。将扩增的文库以质粒 DNA 的形式贮藏以备将来用于寻找柠檬泛菌的 2, 5-DKG 通透酶。

实施例 VI

实施例 VI 提供了通过使 DKG 转运蛋白在宿主细胞中超表达可以增强 DKG 向细胞的输入速率的证据。

将基因组文库引入 tester 菌株产酸克雷伯氏杆菌 yiaX2[tkr idno] 菌株。用放射性标记的 ^{14}C (U) DKG 对在具有 2.5% 的 2, 5-DKG 和 0.1 mM IPTG 的 M9-琼脂平板显示能够在 2, 5-DKG 上生长的克隆检验 DKG 的摄入。发现各种克隆都比对照的 tester 菌株有改善的 DKG 摄入 (图 10)。将来自这些阳性克隆的基因组文库 DNA 转化入柠檬泛菌 (139-2A), 并且进行 DKG 摄入测定以测量超过柠檬泛菌 139-2A 菌株的 DKG 摄入改善。在转化体中观察到了 3 到 5 倍的 DKG 摄入速率改善, 该转化体通过基因组文库筛选和选择方法学而发现其含有编码 DKG 通透酶的质粒的额外拷贝 (图 11)。

实施例 VII

实施例 VII 提供了通过使 DKG 转运蛋白在宿主细胞中超表达可以改善 2KLG 的生产的证据。

当用低拷贝的载体 pBCL 1920 将编码柠檬泛菌 DKG 通透酶 PermA 的核酸分子 (seq ID no2) 亚克隆入适合从葡萄糖生物合成 2KLG 的柠檬泛菌菌株 139-2A 中时 (美国专利号 5, 032514), 2KLG 生产的生产速率从 2.5 g/l/hr 提高到 3.2 g/l/hr, 基于糖类的产量从 45% 提高到 53% (图 12)。

实施例 VIII

实施例 VIII 描述了来自柠檬泛菌的 2, 5-DKG 通透酶 PermA 的特征。

本实施例描述了柠檬泛菌的 PermA 的膜拓扑结构。PFAM 分析 (Hirokawa, T. 等人, Bioinformatics, 1998, 4 (4):378) 预测

PermA 含有 11 个跨膜结构域、8 个初级结构域和 3 个次级跨越结构域（图 13）。氨基末端位于周质而羧基末端位于胞质内。有两个大环和两个小环存在，且周质和胞质中都含有一个大环和一个小环。PermA 是疏水性为 0.62 的膜蛋白质，其分子量为 48 道尔顿。基于累积比例分析，它是一种 H⁺伴随性 2,5-DKG 同向转运蛋白（Lolkema, J.S. 等人，1996，生物物理学手册（Handbook of Biological Physics），Chapter 11, 229-260）。基于共有序列分析，它属于 MFS 的 ACS 家族（Pao, S.S. 等人，Microniol. Molecular Biol. Rev., 1998, 62;1-34）（图 14）。

在本领域的技术人员阅读过公开内容且不背离本发明的精神和范围后，前面的描述和实施例的各种其他的实施例和修饰对他们而言都是显然的，并且意图将所有这样的实施例或修饰都包括在附录权利要求书的范围内。此处参考的所有出版物和专利都特此整体引入。

SEQ. ID.1. 产酸克雷伯氏菌通透酶YiaX2

```

atg aat ata acc tct aac tct aca acc aaa gat ata cgc cgc
Met Asn Ile Thr Ser Asn Ser Thr Thr Lys Asp Ile Pro Arg

cag cgc tgg tta aga atc att ccg cct ata ctg atc act tgt att att
Gln Arg Trp Leu Arg Ile Ile Pro Pro Ile Leu Ile Thr Cys Ile Ile

tct tat atg gac cgg gtc aat att gcc ttt gcg atg ccc gga ggt atg
Ser Tyr Met Asp Arg Val Asn Ile Ala Phe Ala Met Pro Gly Gly Met

gat gcc gac tta ggt att tcc gcc acc atg gcg ggg ctg gcg ggc ggt
Asp Ala Asp Leu Gly Ile Ser Ala Thr Met Ala Gly Leu Ala Gly Gly

att ttc ttt atc ggt tat cta ttt tta cag gtt ccc ggc ggg aaa att
Ile Phe Phe Ile Gly Tyr Leu Phe Leu Gln Val Pro Gly Gly Lys Ile

gcc gtt cac ggt agc ggt aag aaa ttt atc gcc tgg tcg ctg gtc gcc
Ala Val His Gly Ser Gly Lys Lys Phe Ile Gly Trp Ser Leu Val Ala

tgg gcg gtc atc tcc gtg ctg acg ggg tta att acc aat cag tac cag
Trp Ala Val Ile Ser Val Leu Thr Gly Leu Ile Thr Asn Gln Tyr Gln

ctg ctg gcc ctg cgc ttc tta ctg gcc gtg gcg gaa ggc ggt atg ctg
Leu Leu Ala Leu Arg Phe Leu Leu Gly Val Ala Glu Gly Gly Met Leu

ccg gtc gtt ctc acg atg atc agt aac tgg ttc ccc gac gct gaa cgc
Pro Val Val Leu Thr Met Ile Ser Asn Trp Phe Pro Asp Ala Glu Arg

ggg cgc gcc aac gcg att gtc att atg ttt gtg ccg att gcc ggg att
Gly Arg Ala Asn Ala Ile Val Ile Met Phe Val Pro Ile Ala Gly Ile

atc acc gcc cca ctc tca gcc tgg att atc acg gtt ctc gac tgg cgc
Ile Thr Ala Pro Leu Ser Gly Trp Ile Ile Thr Val Leu Asp Trp Arg

tgg ctg ttt att atc gaa ggt ttg ctc tcg ctg gtt gtt ctg gtt ctg
Trp Leu Phe Ile Ile Glu Gly Leu Leu Ser Leu Val Val Leu Val Leu

tgg gca tac acc atc tat gac cgt ccg cag gaa gcg cgc tgg att tcc
Trp Ala Tyr Thr Ile Tyr Asp Arg Pro Gln Glu Ala Arg Trp Ile Ser

gaa gca gag aag cgc tat ctg gtc gag acg ctg gcc gcg gag caa aaa
Glu Ala Glu Lys Arg Tyr Leu Val Glu Thr Leu Ala Ala Glu Gln Lys

gcc att gcc ggc acc gag gtg aaa aac gcc tct ctg agc gcc gtt ctc
Ala Ile Ala Gly Thr Gln Val Lys Asn Ala Ser Leu Ser Ala Val Leu

tcc gac aaa acc atg tgg cag ctt atc gcc ctg aac ttc ttc tac cag
Ser Asp Lys Thr Met Trp Gln Leu Ile Ala Leu Asn Phe Phe Tyr Gln

acc ggc att tac ggc tac acc ctg tgg cta ccc acc att ctg aaa gaa
Thr Gly Ile Tyr Gly Tyr Thr Leu Trp Leu Pro Thr Ile Leu Lys Glu

ttg acc cat agc agc atg ggg cag gtc gcc atg ctt gcc att ctg ccg
Leu Thr His Ser Ser Met Gly Gln Val Gly Met Leu Ala Ile Leu Pro

```

图1A

```

tac gtc ggc gcc att gct ggg atg ttc ctg ttt tcc tcc ctt tca gac
Tyr Val Gly Ala Ile Ala Gly Met Phe Leu Phe Ser Ser Leu Ser Asp

cga acc ggt aaa cgc aag ctg ttc gtc tgc ctg ccg ctg att ggc ttc
Arg Thr Gly Lys Arg Lys Leu Phe Val Cys Leu Pro Leu Ile Gly Phe

gct ctg tgc atg ttc ctg tgc gtg gcg ctg aaa aac caa att tgg ctc
Ala Leu Cys Met Phe Leu Ser Val Ala Leu Lys Asn Gln Ile Trp Leu

tcc tat gcc gcg ctg gtc ggc tgc gga ttc ttc ctg caa tgc gcg gct
Ser Tyr Ala Ala Leu Val Gly Cys Gly Phe Phe Leu Gln Ser Ala Ala

ggc gtg ttc tgg acc atc ccg gca cgt ctg ttc agc gcg gaa atg gcg
Gly Val Phe Trp Thr Ile Pro Ala Arg Leu Phe Ser Ala Glu Met Ala

ggc ggc gcg cgc ggg gtt atc aac gcg ctt ggc aac ctc ggc gga ttt
Gly Gly Ala Arg Gly Val Ile Asn Ala Leu Gly Asn Leu Gly Gly Phe

tgt ggc cct tat gcg gtc ggg gtg ctg atc acg ttg tac agc aaa gac
Cys Gly Pro Tyr Ala Val Gly Val Leu Ile Thr Leu Tyr Ser Lys Asp

gct ggc gtc tat tgc ctg gcg atc tcc ctg gcg ctg gcc gcg ctg atg
Ala Gly Val Tyr Cys Leu Ala Ile Ser Leu Ala Leu Ala Ala Leu Met

gcg ctg ctg ctg ccg gcg aaa tgc gat gcc ggt gct gcg ccg gta aag
Ala Leu Leu Leu Pro Ala Lys Cys Asp Ala Gly Ala Ala Pro Val Lys

acg ata aat cca cat aaa cgc act gcg
Thr Ile Asn Pro His Lys Arg Thr Ala

```

图1B

SEQ. ID.2. 环境来源通透酶PE1

atg aac agc tct acc aat gca
 Met Asn Ser Ser Thr Asn Ala

 acg aaa cgc tgg tgg tac atc atg cct atc gtg ttt atc acg tat agc
 Thr Lys Arg Trp Trp Tyr Ile Met Pro Ile Val Phe Ile Thr Tyr Ser

 ctg gcg tat ctc gac cgc gca aac ttc agc ttt gct tcg gca gcg ggc
 Leu Ala Tyr Leu Asp Arg Ala Asn Phe Ser Phe Ala Ser Ala Ala Gly

 att acg gaa gat tta ggc att acc aaa ggc atc tcg tcg ctt ctt ggc
 Ile Thr Glu Asp Leu Gly Ile Thr Lys Gly Ile Ser Ser Leu Leu Gly

 gca ctt ttc ttc ctc ggc tat ttc ttc ttc cag atc ccg ggg gcg att
 Ala Leu Phe Phe Leu Gly Tyr Phe Phe Phe Gln Ile Pro Gly Ala Ile

 tac gcg gaa cgc cgt agc gta cgg aag ctg att ttc atc tgt ctg atc
 Tyr Ala Glu Arg Arg Ser Val Arg Lys Leu Ile Phe Ile Cys Leu Ile

 ctg tgg ggc gcc tgc gcc tcg ctt gac cgg gat ggt gca caa tat tcc
 Leu Trp Gly Ala Cys Ala Ser Leu Asp Arg Asp Gly Ala Gln Tyr Ser

 agc gct ggc tgg cga tcc gtt tta ttc tcg gct gtc gtg gaa gcg gcg
 Ser Ala Gly Trp Arg Ser Val Leu Phe Ser Ala Val Val Glu Ala Ala

 gtc atg ccg gcg atg ctg att tac atc agt aac tgg ttt acc aaa tca
 Val Met Pro Ala Met Leu Ile Tyr Ile Ser Asn Trp Phe Thr Lys Ser

 gaa cgt tca cgc gcc aac acc ttc tta atc ctc ggc aac cgg gtc acg
 Glu Arg Ser Arg Ala Asn Thr Phe Leu Ile Leu Gly Asn Pro Val Thr

 gta ctg tgg atg tcg gtg gtc tcc ggc tac ctg att cag tcc ttc ggc
 Val Leu Trp Met Ser Val Val Ser Gly Tyr Leu Ile Gln Ser Phe Gly

 tgg cgt gaa atg ttt att att gaa ggc gtt ccg gcc gtc ctc tgg gcc
 Trp Arg Glu Met Phe Ile Ile Glu Gly Val Pro Ala Val Leu Trp Ala

 ttc tgc tgg tgg gtg ctg gtc aaa gtt aaa ccg tcg cag gtg aac tgg
 Phe Cys Trp Trp Val Leu Val Lys Val Lys Pro Ser Gln Val Asn Trp

 ttg tcg gaa aac gag aaa gcc gcg ctg cag gcg cag ctg gag agc gag
 Leu Ser Glu Asn Glu Lys Ala Ala Leu Gln Ala Gln Leu Glu Ser Glu

 cag cag ggt att aaa gcc gtg cgt aac tac ggc gaa gcc ttc cgc tca
 Gln Gln Gly Ile Lys Ala Val Arg Asn Tyr Gly Glu Ala Phe Arg Ser

 cgc aac gtc att cta ctg tgc atg cag tat ttt gcc tgg agt atc ggc
 Arg Asn Val Ile Leu Leu Cys Met Gln Tyr Phe Ala Trp Ser Ile Gly

 gtg tac ggt ttt gtg ctg tgg ttg ccg tca att att cgc agc ggc ggc
 Val Tyr Gly Phe Val Leu Trp Leu Pro Ser Ile Ile Arg Ser Gly Gly

 gtc aat atg ggg atg gtg gaa gtc gcc tgg ctc tct tcg gtg cct tat
 Val Asn Met Gly Met Val Glu Val Gly Trp Leu Ser Ser Val Pro Tyr

图1C

ctg gcc gcg act att gcg atg atc gtc gtc tcc tgg gct tcc gat aaa
 Leu Ala Ala Thr Ile Ala Met Ile Val Val Ser Trp Ala Ser Asp Lys

 atg cag aac cgt aaa ctg ttc gtc tgg ccg ctg ctg ctg att ggc gga
 Met Gln Asn Arg Lys Leu Phe Val Trp Pro Leu Leu Leu Ile Gly Gly

 ctg gct ttt att ggc tca tgg gcc gtc gcc gct aac cat ttc tgg gcc
 Leu Ala Phe Ile Gly Ser Trp Ala Val Gly Ala Asn His Phe Trp Ala

 tct tat acc ctg ctg gtg att gcc aat gcg gca atg tac gcc cct tac
 Ser Tyr Thr Leu Leu Val Ile Ala Asn Ala Ala Met Tyr Ala Pro Tyr

 ggt ccg ttt ttc gcc atc att ccg gaa atg ctg ccg cgt aac gtc gcc
 Gly Pro Phe Phe Ala Ile Ile Pro Glu Met Leu Pro Arg Asn Val Ala

 ggt ggc gca atg gcg ctc atc aac agc atg ggg gcc tta ggt tca ttc
 Gly Gly Ala Met Ala Leu Ile Asn Ser Met Gly Ala Leu Gly Ser Phe

 ttt ggt tcg tgg ttc gtg gcc tac ctg aac ggc acc acc ggc agt cca
 Phe Gly Ser Trp Phe Val Gly Tyr Leu Asn Gly Thr Thr Gly Ser Pro

 tca gcc tca tac att ttc atg gga gtg gcg ctt ttc gcc tcg gta tgg
 Ser Ala Ser Tyr Ile Phe Met Gly Val Ala Leu Phe Ala Ser Val Trp

 ctt act tta att gtt aag cct gct aac aat caa aag ctc ccc atc ggc
 Leu Thr Leu Ile Val Lys Pro Ala Asn Asn Gln Lys Leu Pro Ile Gly

 gct cgt cac gcc
 Ala Arg His Ala

图1D

SEQ. ID.3.环境来源通透酶PE6

```

          atg aat aca gcc tct gtt tct
          Met Asn Thr Ala Ser Val Ser

gtc acc caa agc cag gcg atc ccc aaa tta cgc tgg ttg aga ata gtg
Val Thr Gln Ser Gln Ala Ile Pro Lys Leu Arg Trp Leu Arg Ile Val

ccg cct att ctt att acc tgc att att tcc tat atg gac cgg gtg aac
Pro Pro Ile Leu Ile Thr Cys Ile Ile Ser Tyr Met Asp Arg Val Asn

atc gcc ttc gcc atg ccc ggc ggc atg gac gat gaa ctg ggc atc acc
Ile Ala Phe Ala Met Pro Gly Gly Met Asp Asp Glu Leu Gly Ile Thr

gcc tcg atg gcc ggg ttg gcc ggc ggt att ttc ttt atc ggt tat ctg
Ala Ser Met Ala Gly Leu Ala Gly Gly Ile Phe Phe Ile Gly Tyr Leu

ttc ttg cag gta ccc ggc ggc aag ctg gcg gtg tac ggc aac ggc aag
Phe Leu Gln Val Pro Gly Gly Lys Leu Ala Val Tyr Gly Asn Gly Lys

aaa ttc atc ggt tgg tgg ttg ttg gcc tgg gcg gtg att tcc gtg ctg
Lys Phe Ile Gly Trp Ser Leu Leu Ala Trp Ala Val Ile Ser Val Leu

acc ggg ctg gtc acg aat cag tat caa ttg ctg ttc ctg cgc ttc gcc
Thr Gly Leu Val Thr Asn Gln Tyr Gln Leu Leu Phe Leu Arg Phe Ala

ctc ggc cgt ttc cga agc ggc atg ctg cgg tgg gtg ctg acc atg atc
Leu Gly Arg Phe Arg Ser Gly Met Leu Arg Trp Val Leu Thr Met Ile

agc aac tgg ttc ccg gac aag gaa cgc ggg cgc gcc aac gcc atc gtc
Ser Asn Trp Phe Pro Asp Lys Glu Arg Gly Arg Ala Asn Ala Ile Val

atc atg ttc gtg ccg atc gcc ggc atc ctt acc gca ccg ctg tcc ggc
Ile Met Phe Val Pro Ile Ala Gly Ile Leu Thr Ala Pro Leu Ser Gly

tgg atc atc acc gcc tgg gac tgg cgc atg ctg ttc ctg gtc gag ggc
Trp Ile Ile Thr Ala Trp Asp Trp Arg Met Leu Phe Leu Val Glu Gly

gcg ctg tcg ctg gtc gtg atg gtg ctg tgg tat ttc acc atc agc aac
Ala Leu Ser Leu Val Val Met Val Leu Trp Tyr Phe Thr Ile Ser Asn

cgt cca caa gag gcc aaa agg att tcg cag gcg gaa aaa gat tat ctg
Arg Pro Gln Glu Ala Lys Arg Ile Ser Gln Ala Glu Lys Asp Tyr Leu

atc aaa acg ctg cac gac gaa cag ttg ctg atc aaa ggc aaa acg gtg
Ile Lys Thr Leu His Asp Glu Gln Leu Leu Ile Lys Gly Lys Thr Val

cgc aac gcc tcg ctg cgt cgg gtg ctg ggc gac aaa atc atg tgg aag
Arg Asn Ala Ser Leu Arg Arg Val Leu Gly Asp Lys Ile Met Trp Lys

ttc ttc tac cag acc ggg ata tac ggc tac acc ctg tgg ctg ccg acc
Phe Phe Tyr Gln Thr Gly Ile Tyr Gly Tyr Thr Leu Trp Leu Pro Thr

att ctc aag ggg ctc acc aac ggc aat atg gag cag gtc ggg atg ctg
Ile Leu Lys Gly Leu Thr Asn Gly Asn Met Glu Gln Val Gly Met Leu

```


图1E

gct atc ctg ccc tat atc ggc gcc atc ttc ggc atg ctg atc att tcc
 Ala Ile Leu Pro Tyr Ile Gly Ala Ile Phe Gly Met Leu Ile Ile Ser

 acc ctc tcc gat cgc acc ggc aag cgc aaa gtg ttc gtc gca ctg ccg
 Thr Leu Ser Asp Arg Thr Gly Lys Arg Lys Val Phe Val Ala Leu Pro

 ctg gcc tgc ttt gcc atc tgc atg gcg ctg tcg gtg ctg ctg aag gat
 Leu Ala Cys Phe Ala Ile Cys Met Ala Leu Ser Val Leu Leu Lys Asp

 cac atc tgg tgg tcg tac gcg gcg ctg gtg ggc tgt ggc gtc ttt acc
 His Ile Trp Trp Ser Tyr Ala Ala Leu Val Gly Cys Gly Val Phe Thr

 cag gcc gcc gcc ggg gtg ttc tgg acc att ccg ccc aag ctg ttt aac
 Gln Ala Ala Ala Gly Val Phe Trp Thr Ile Pro Pro Lys Leu Phe Asn

 gcc gaa atg gcc ggc gcc gcg cgc gcc gtg atc aat gca ctg ggc aac
 Ala Glu Met Ala Gly Gly Ala Arg Gly Val Ile Asn Ala Leu Gly Asn

 ctc ggc ggt ttc tgc ggc ccc tat atg gtc ggc gtg ttg atc acc ttg
 Leu Gly Gly Phe Cys Gly Pro Tyr Met Val Gly Val Leu Ile Thr Leu

 ttc agc aaa gac gtc ggc gtt tac agc ctc gcg gtg tcg ctg gcc tcc
 Phe Ser Lys Asp Val Gly Val Tyr Ser Leu Ala Val Ser Leu Ala Ser

 gcc tcg gtg ctg gcg ttg atg ctg ccg aac aga tgc gac caa aaa gcg
 Ala Ser Val Leu Ala Leu Met Leu Pro Asn Arg Cys Asp Gln Lys Ala

 ggg gcc gaa
 Gly Ala Glu

图1F

SEQ. ID.4. 柠檬泛菌通透酶A.**DNA序列**

ATGCAAAAATCACAGCCGGAACCCGCTGGTTTCGGATTATTGTGCCGATC
 CTGATAGCCTGCATCATGTCGTTTATGGATCGGGTAAATATCAGTTTCGCAT
 TGCCGGGCGGTATGGAGCAGGATCTGCTGATGTCCAGCCAGATGGCCGGG
 GTAGTTAGCGGTATTTCTTTATTGGTTATCTGTTTTGCAGGTTCTTGGTGG
 GCATATCGCAGTACGTGGCAGTGGTAAACGTTTTATTGCCTGGTCGCTTGT
 GCCTGGGCGGTTGTTTCTGTCGCTACCGGGTTTGTGACTCATCAGTACCAG
 CTGTTGATTTTACGTTTTGCACTGGGGGTCTCTGAAGGTGGGATGTTGCCG
 GTAGTTCTGACAATGGTCAGCAACTGGTTTCTGAAAAAGAGCTGGGGCGT
 GCTAATGCATTTGTCATGATGTTCCGCCCGCTTGGCGGAATGATTACCGCC
 CCTGTCTCCGGATGGATTATTGCACTGCTAGACTGGCGCTGGTTATTTATTA
 TCGAAGGATTACTGTCGGTAGTGGTTCTGGCAGTCTGGTGGCTGATGGTCA
 GTGACCGCCCTGAAGATGCCCGTTGGCTGCCGGCAGCAGAACGGGAATAT
 CTGCTGCGCGAAATGGCCCGTGACAAGGCCGAGCGGAGCAAACCTCCCTCC
 GATCAGTCATGCTCCCTGCAAGAGGTTTTCCATAACCCGGGCCTGATGAA
 GTTAGTGATTCTGAACTTTTCTATCAGACAGGTGATTACGGATACACTCTGT
 GGCTGCCGACTATTATCAAAAACCTGACCGGAGCTAGTATTGGTAACGTCG
 GTTTGCTGACAGTGCTACCTTTTATCGCGACGTTATCAGGGATTTATGTCGT
 CTCTTACCTGAGCGATAAAACCGGCAAACGTCGGCAATGGGTGATGATTC
 TCTGTTCTGTTTTCGGCCCTGCCTGTTGGCCTCAGTCCTGTTACGTGAATTT
 GTGCTGGCTGCTTATCTGGCTCTGGTGGCTTGGCGCTTTTTCTGAAAGCA
 GCCACCAGCCCGTTCTGGAGTATTCCGGGACGTATTGCACCGCCGGAAGC
 AGCCGGTAGTGCCCGTGGTGTAATTAACGGAAGTGGGGAATCTGGGCGGTTT
 CTGCGGCCCTGGCTGGTCCGATTAATGATCTACCTGTACGGACAGAATGC
 AGCCGTTGTTACTCTGGCAGGCTCTCTGATCATTGCCGGGATTATTGCGGC
 ATTAAGTCCAAACGAGTGTGATCTGCGCCCGGCAGAGGCACGGCAGCAGA
 ATTTACCCACGTATTCATGATGCCAAA

蛋白质序列

MQKSQPGTRWFRIIVPILACIMSFMDRVNISFALPGGMEQDLLMSSQMAGVVS
 GIFFIGYLFQVPGGHIAVRGSGKRFIAWSLVAVAVVSVATGFVTHQYQLLILRF
 ALGVSEGGMLPVVLTMVSNWFPEKELGRANAFVMMFAPLGGMITAPVSGWIIA
 LLDWRWLFIIIEGLLSVVLAWWWLMVSDRPEDARWLPAAEREYLLREMARDKA
 ERSKLPPISHAPLQEVFHNPLMKLVILNFFYQTGDYGYTLWLPTIKNLTGASIG
 NVGLLTVLPFIATLSGIYVVSYSKDTGKRRQWWMISLFCFAACLLASVLLREFVL
 AAYLALVACGFFLKAATSPFWSIPGRIAPPEAAGSARGVINGLGNLGGFCGPWL
 VGLMIYLYGQNAAVVTLAGSLIAGIIAALLPTQCDLRPAEARQQNFTPRIHDAK

图1G

SEQ. ID.5. 柠檬泛菌通透酶B.**DNA 序列**

ATGCCGGTGATTTTTATTACCTTACAGCCTGGCATATCTGGATCGGGCCAACT
ACGGCTTTGCTGCTGCCTCTGGGATTGAAGCAGATCTTGGAATTAGCCGTG
GCACCTCCTCTCTGATTGGAGCACTGTTCTTTCTCGGCTACTTCATTTTTCA
GGTGCCCGGGGCAATTTATGCAGTGAACGCAGTGTCCTAAACTGGTGTT
TACCAGCCTGCTGTTGTGGGGATTTTGTGCCGCTGCGACCGGACTTATCAG
CAATATTCGGGCTCTGATGGTGATCCGCTTTGTTCTGGGTGTTGTTGAAGCC
GCAGTGATGCCAGCGATGCTGATTTACATCAGCAACTGGTTCACCCGTCAG
GAACGTTACGGGCTAATACCTTTCTGGTATTAGGTAACCCGGTCACGGTG
TTATGGATGTCTATTGTTTCCGGATATCTGATCAATGCTTTTGGCTGGCGGG
AAATGTTTATTTTCGAGGGTGTGCCTGCCTTAATCTGGGCCATCTTCTGGTG
GTTTATTGTCCGGGACAAACCGGAGCAGGTGAGCTGGCTGACAGAAACAGA
AAAGCAGCAACTGGCCAGTGCAATGGCTGAAGAGCAGCAGGCAATACCAC
CGATGCGCAATGTGCCGCAGGCCCTGCGTTCCCGCAATGTGGTGGTACTG
TGCCTGTTACACGCTCTGTGGAGCATCGGAGTGATGGTTTTATGATGTGGA
TGCCATCGATACTGCGTAGCGCTGCATCAATGGACATTGTCCGGGTAGGCT
GGCTGGCCCGCAGTTCGGTATCTGCCCGCGATTATTACTATGCTGGTGATT
CATGGCTGTCAGATAAAACCGGGCTGCGTCGGCTTTTTATCTGGCCATTATT
GCTGATTGCGTCAGTTACTTTTTTGGGTCTGGTACTTGGGAGCTACTCA
TTCTGGTTTTCTATGGCTTGCTGGTACTGGCTGCTGCTTGTATGTATGCC
CGTATGGACCGTTTTTTGCGTTGATTCTGAATTGCTGCCAAAAAATGTGGC
GGGGATTTCTATCGGGTTAATTAACGTGTGCGGGGCGCTGGGAGCTTTTGC
CGGAGCCTGGCTGGTGGGCTATCTTAATGGTCTGACCGGTGGTCCGGGGG
CTTCTTACACTTTTATGGCCATTGCATTGCTGGTTTCTGTAGGGTTGGTGT
TTCCTGAAAGTCCCTTCAGGGAATTTGGTCACTCGTCGGTTGCTGAAAGGT
GATGCAAAG

蛋白质序列

MPVIFITYSLAYLDRANYGFAAASGIEADLGISRGTSSLIGALFFLG YFIFQVPGAI
YAVKRSVRKLVFTSLLLWGFCAAATGLISNIPALMVIRFVLGVVEAVMPAMLIYI
SNWFRQERSRANTFLVLGNPVTVLWMSIVSGYLINAFGWREMFIFEGVPALIW
AIFWWFIVRDKPEQVSWLTETEKQLASAMAEQQAIPPMRNVPQALRSRNVV
VLCLLHALWSIGVYGFMWMP SILRSAASMDIVRVGWLAAPYLAIIITMLVISW
LSDKTGLRRLFIWPLLLIASVTFFGSWLLGSYSFWFSYGLLVLAAACMYAPYGP
FFALIPELLPKNVAGISIGLINCCGALGAFAGAWLVGYLNGLTGGPGASYTFMAI
ALLVSVGLVFFLKVP SGNLVTRRLKGD AK

图1H

SEQ. ID.6. 柠檬泛菌通透酶YiaX2.**DNA**

ATGAATACTCATCAGGCAGCCAAAGGTATTGCTATACCTAAACAACGGTGGC
 TGAGAATTATCTCGCCAATAATTATCACCTGCATTATTTCTTATATGGACCGG
 GTCAATATTGCTTTTGCCATGCCTGGAGGAATGGATAAAGATTTATCCGTCT
 CTGCCAGTATGGCCGGATTGGCCGGCGGAATATTTTTATAGGTTATCTGTT
 CTTACAGGTTCCCGGTGGAAAAATAGCCGTACACGGTAGTGGAAGAAATT
 TATTGGCTGGTCACTGGTGGCCTGGGCAGTAATTCAGTTCTGACCGGCAT
 GGTTACTAACCAGTATCAGTTGCTGTTTTACGCTTTCTTCTGGGGGTATCA
 GAAGGGGGTATGTTGCCTGTTGTTCTCACTATCATCAGTAACTGGTTTCCAG
 ATCGTGAACGCGGCAGAGCCAACTCAATCGTGATTATGTTGTACCCATCG
 CCGGAATAATCTCCGCCCGCTGGCAGGCTGGTTAATCTCTTCTCTGGACT
 GGCGCTGGCTGTTTTATATTGAAGGTTTACTTTCTCTGGCGGTACTGCTGCT
 GTGGGCACTGACTATTTCTGACCGCCCCGCCGAAGCACGCTGGATCTCCC
 GGGCCGAAAAAGATTATCTGCTCAAAACCTTGCGGGAAGAGCAGATAGCTC
 ACCAACCCCTTTGCGTAAAGTCACTCTGTCTGTCAGTGCTGGAAAACAGAA
 CTTTATGGCTGCTGATTGCACTTAATTTTTCTATCAGGCCGGAATCTATGGC
 TACACATTGTGGCTGCCGACCATTTTAAAGATATGGCGCATAGCAGCATGT
 CCCTGGTCGGTTTACTGGCAATTCTGCCTTATGTCGCCGCCATGGCCGGTA
 TGTTCTGTTTTCCCGGTTATCGGATAAGAGTGGCAAACGGCGCCGTTATGT
 CATTCTGCCCTTGTTGCGATTGCGGTTATGCATGGCATTGTCAGTAATCAGC
 CAGGGCCATTTATGGATTTCTTACAGCGCACTGATTGGCTGTGGTTTTTTCC
 TGCAGTCAGCTGCGGGTGTGTTGGGCAATTCCGGCCCGGTTGTTTAGTG
 CCGAGGTGCGCAGGCAGTGCCCGTGGGGTAATTAATGCCTTAGGTAATCTTG
 GCGGTTTTGTGGCCCCTATCTGGTCGGCATCTTTATTACTTTTTATAGCCA
 GGCGGCCCGGTGTCTATTTCTGGCAATTCGCTGGCGATTGCCGGAGCTCT
 GGCATTTGCTGCCACGCCGCTGCGATATGTCAGCCAGCGAAATCGCCGC
 TGAAGATGCAAAGATTGAACCGCTGCCCGGACATGCCGGGAGGGTATTA

蛋白质序列

MNTHQAAKGIAIPKQRWLRISPIITCIISYMDRVNIAFAMPGGMDKDL SVSASMA
 GLAGGIFFIGYFLQVPGGKIAVHGS GKKFIGWSLVAVAVISVLTGMVTNQYQLL
 FLRFLLVSEGGMLPVVLTII SNWFPDRERGRANSIVIMFVPIAGIISAPLAGWLIS
 SLDWRWLFYIEGLLSLAVLLWALTISDRPAEARWISRAEKDYLLKTLREEQIAH
 QPPLRKVTLSSVLENRTLWLLIALNFFYQAGIYGYTLWLPTILKDMAHSSMSLVG
 LLAILPYVAAMAGMFLFSRLSDKSGKRRRYVILPLFGFALCMALSVISQGHLWIS
 YSALIGCGFFLQSAAGVFWAIPARLFSAEVAGSARGVINALGNLGGFCGPYLVG
 IFITFYQAAGVYFLAISLAAGALAFCLPRRCDSASEIAAEDAKIEPLPGHAGR
 VL

图 11

葡萄糖向抗坏血酸转化的完整示意图

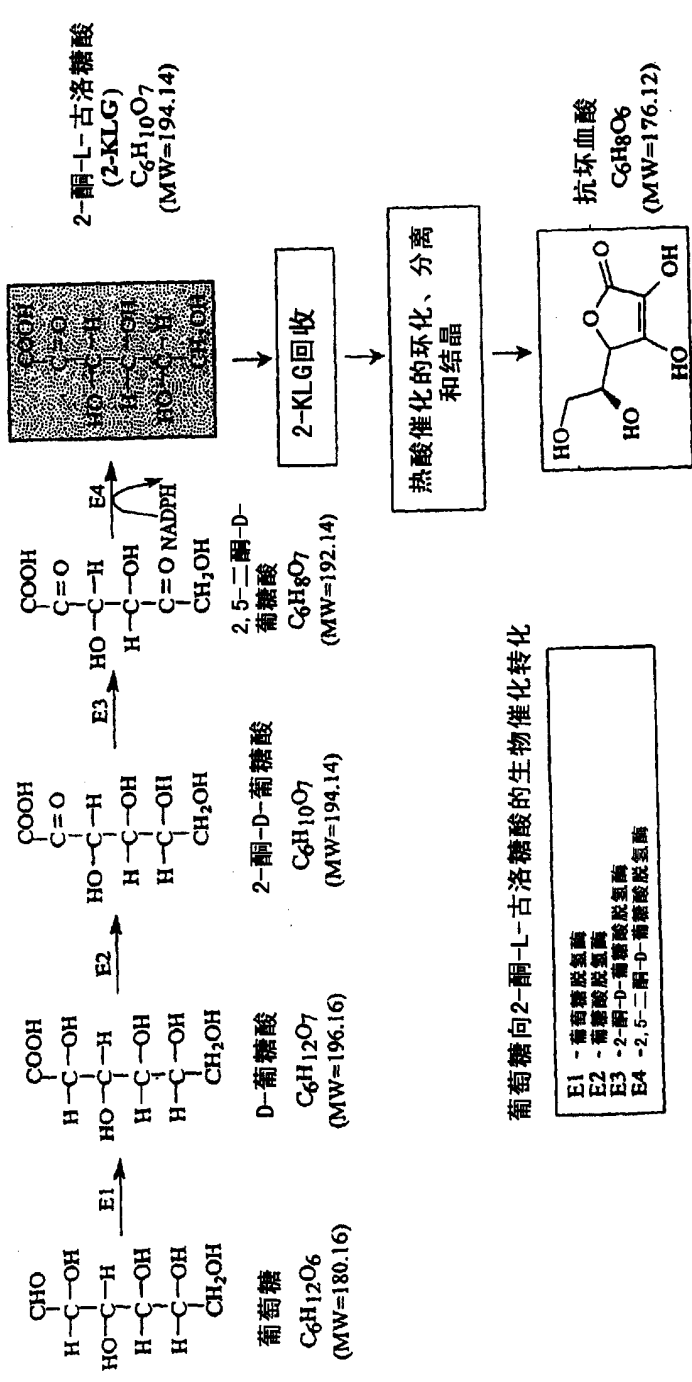


图2

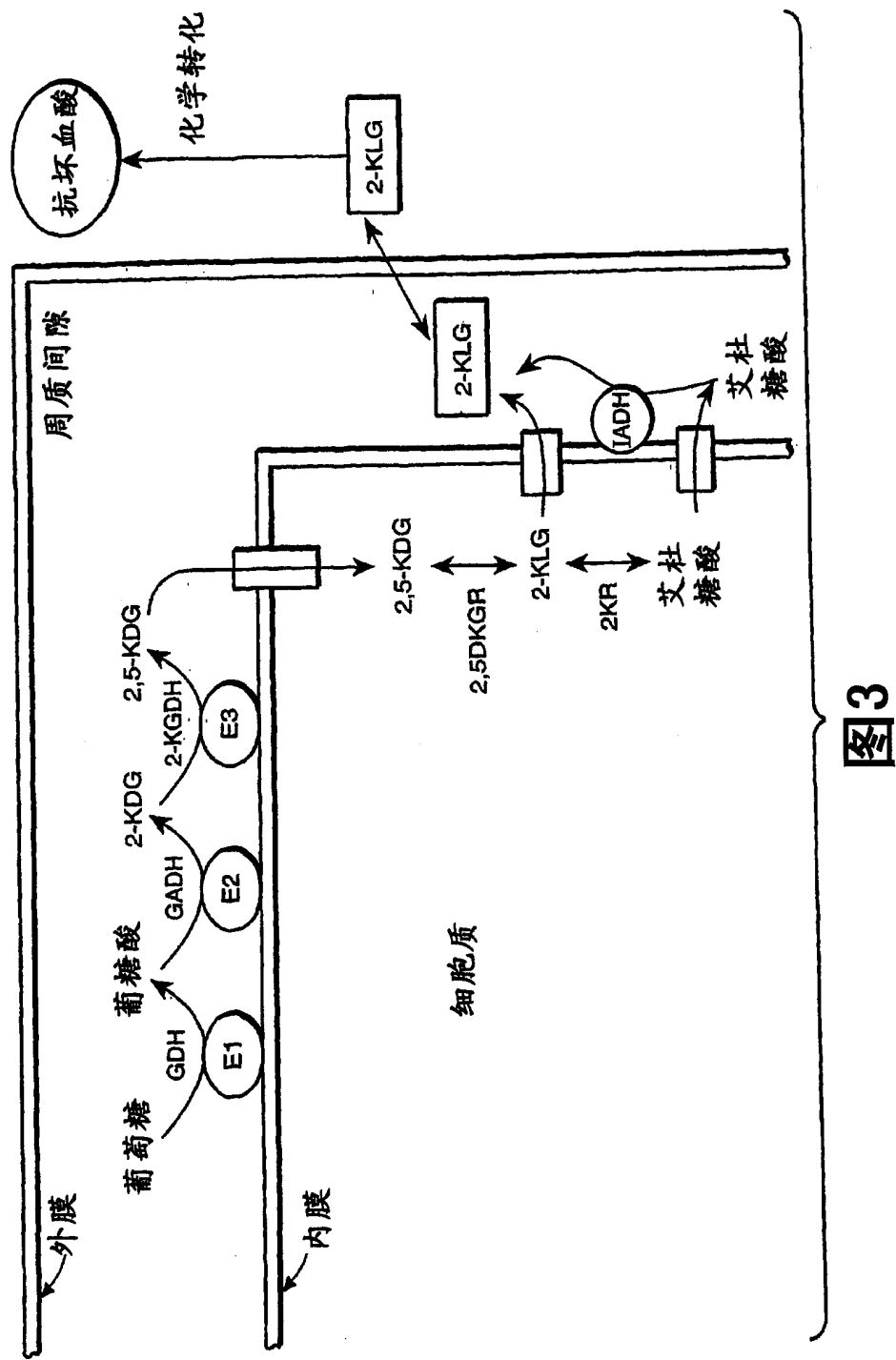


图3

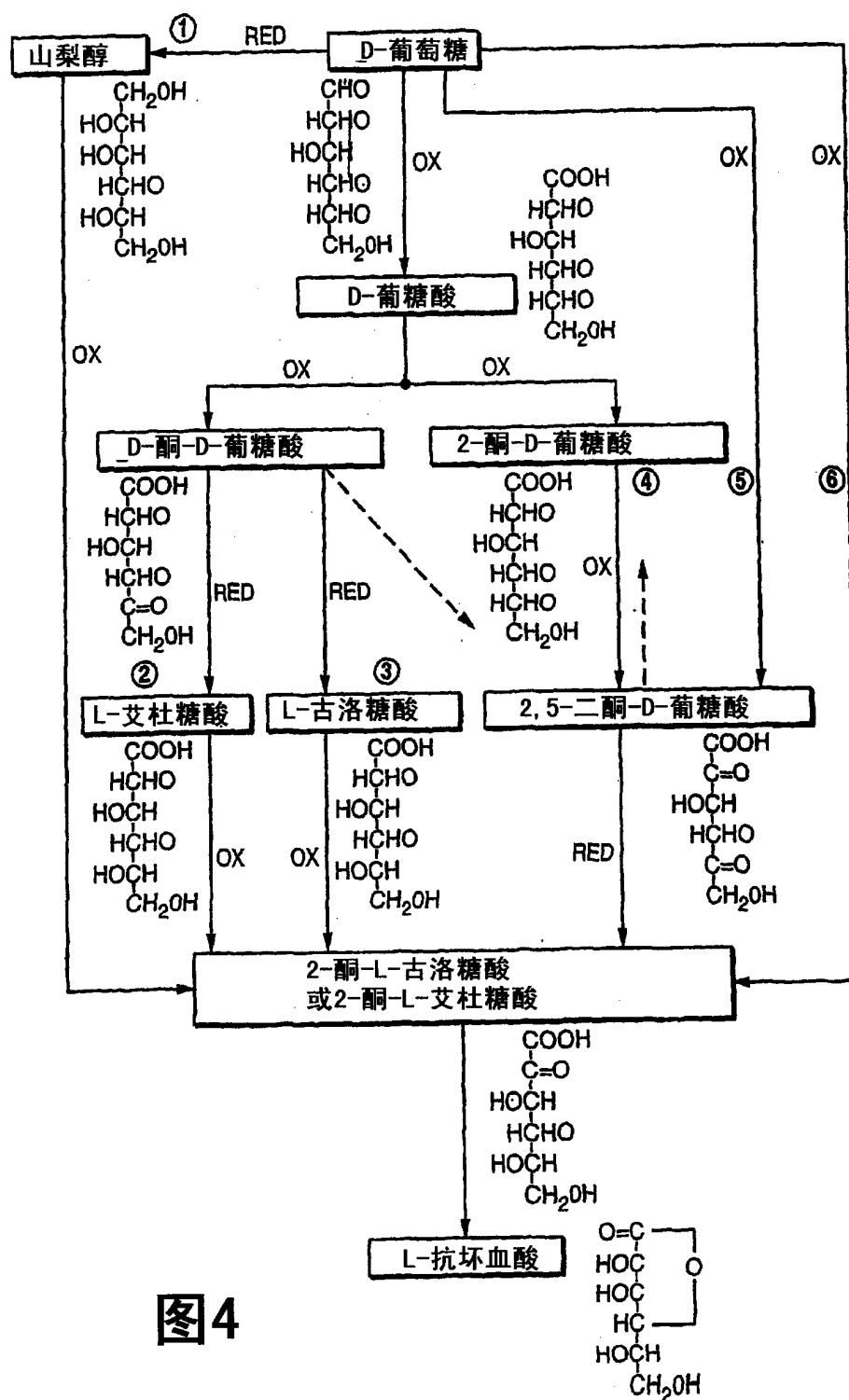


图4

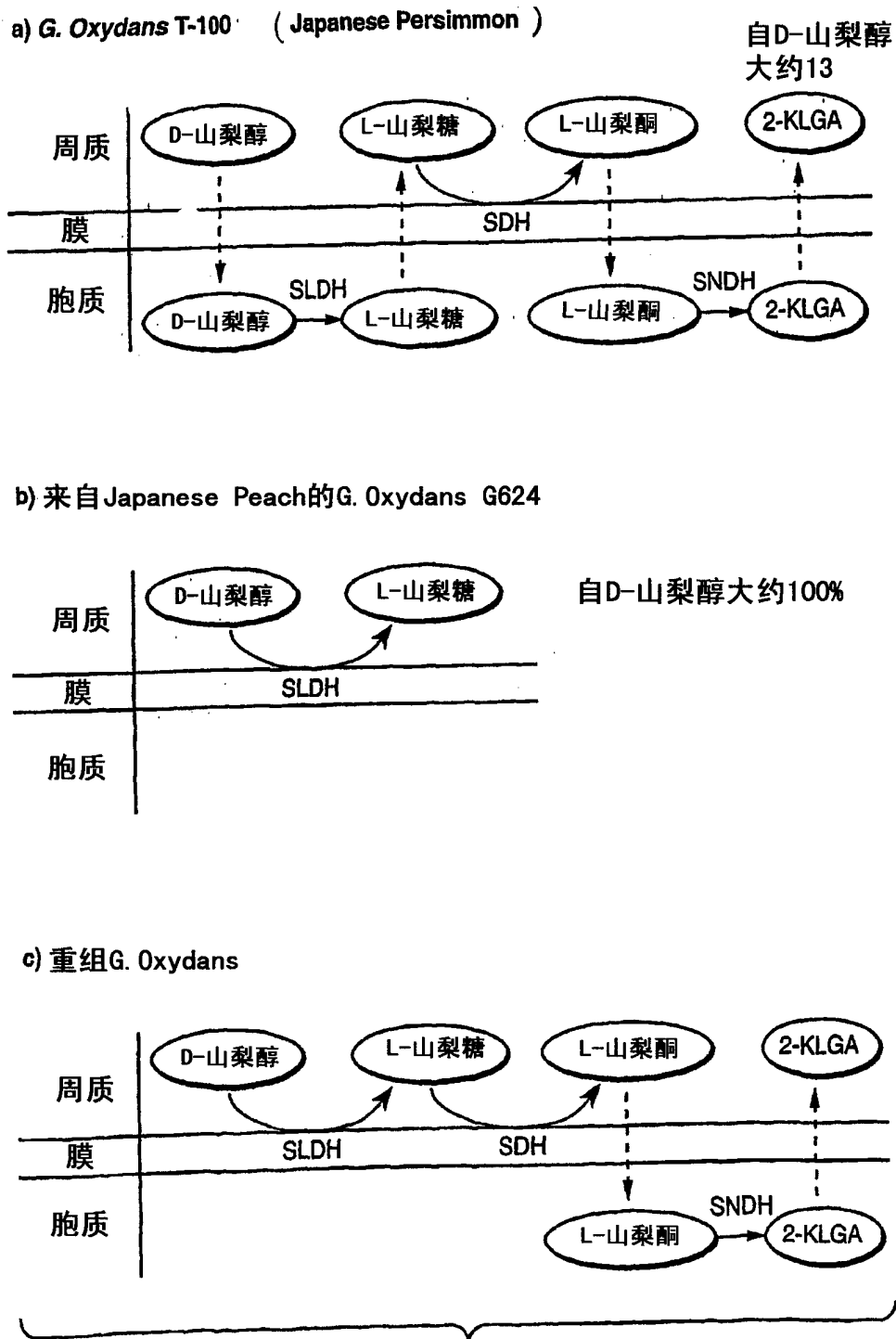


图4A

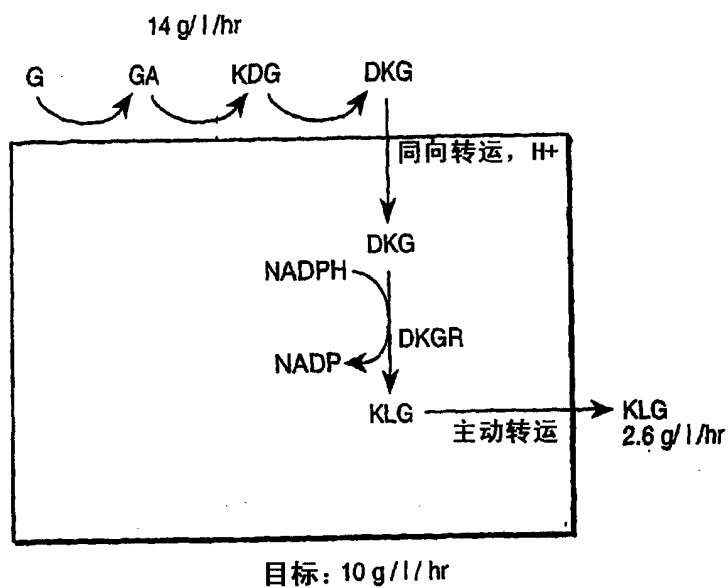


图5

DKG转运速率, 与KLG生产速率相同: 可诱导的
2, 5-DKG通透酶

2-KLG柠檬泛菌生产菌株139-2A中的DKG转运
(2.75 g/l/hr/80 OD)

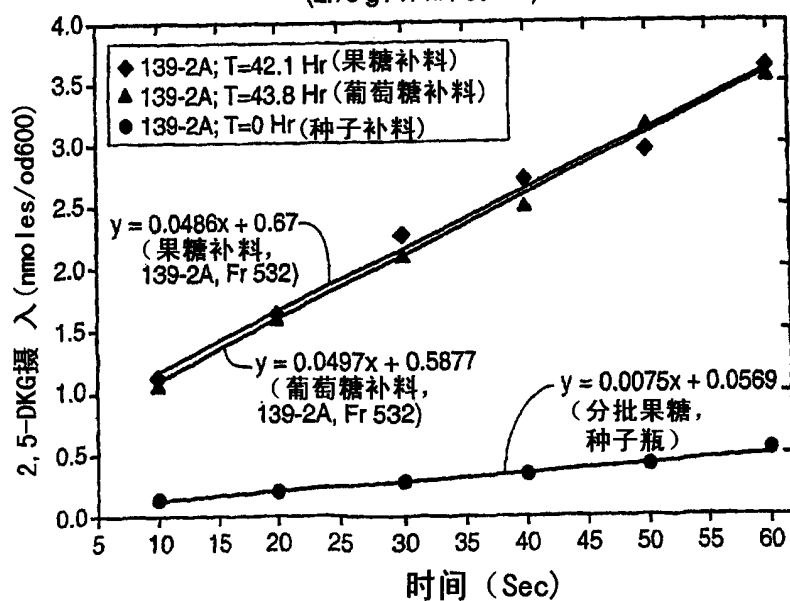


图6

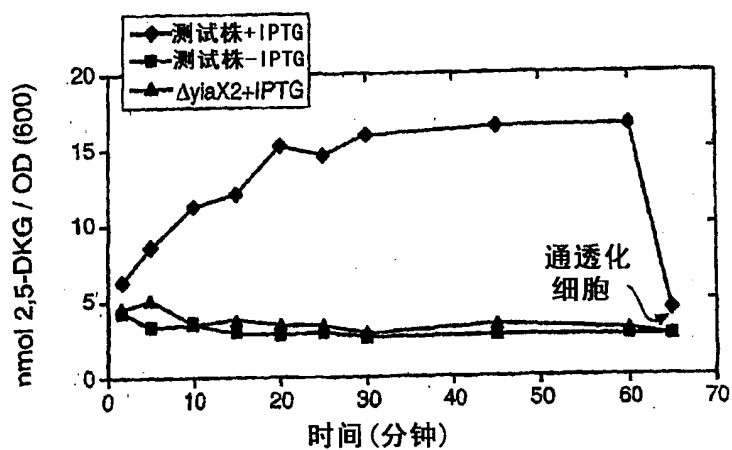
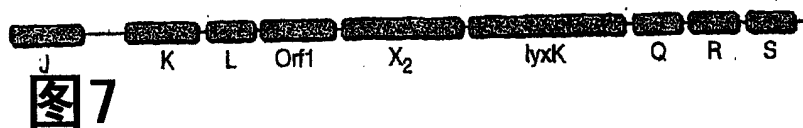
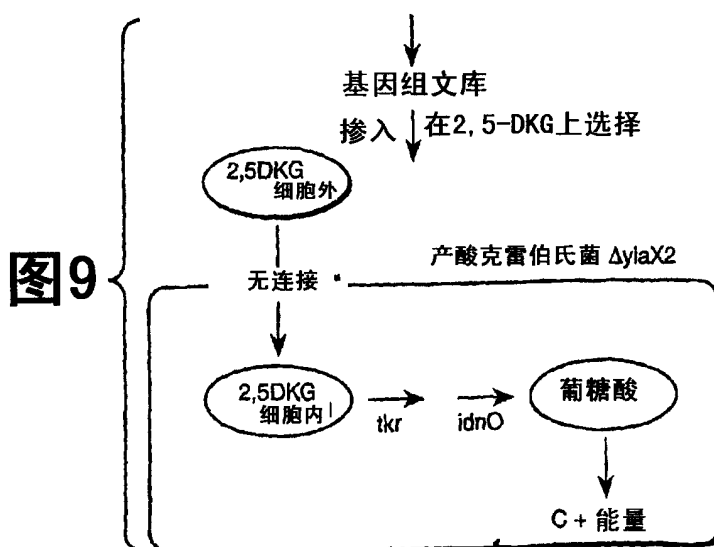
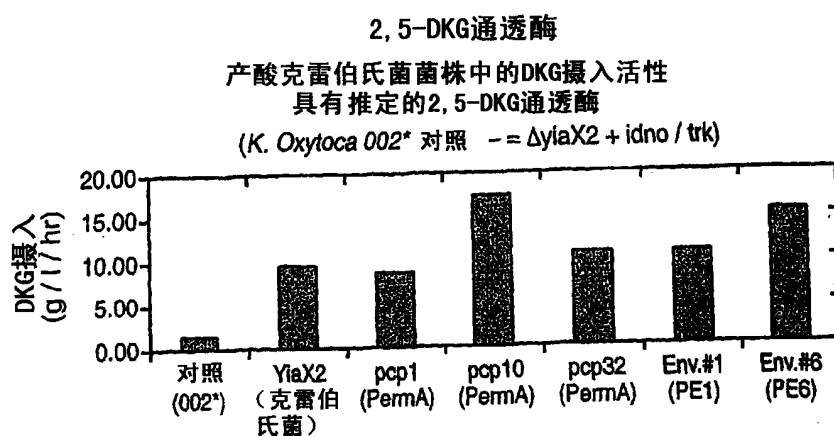


图8



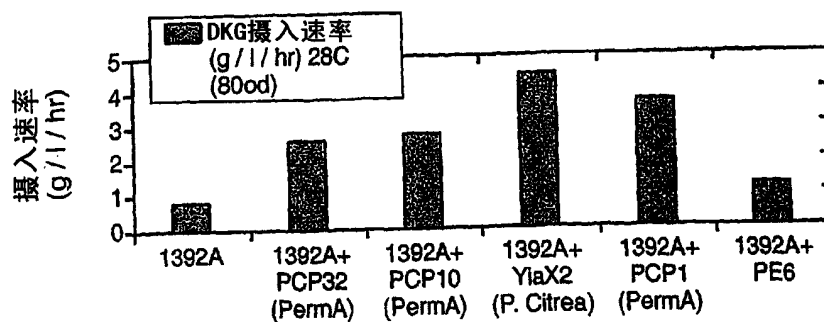


产酸克雷伯氏菌株

图10

2, 5-DKG通透酶

摇瓶培养的139-2A/pD92细胞中的DKG摄入检验
具有处于质粒载体构建体 (pBCL1920)
中的各种DKG通透酶的柠檬泛菌



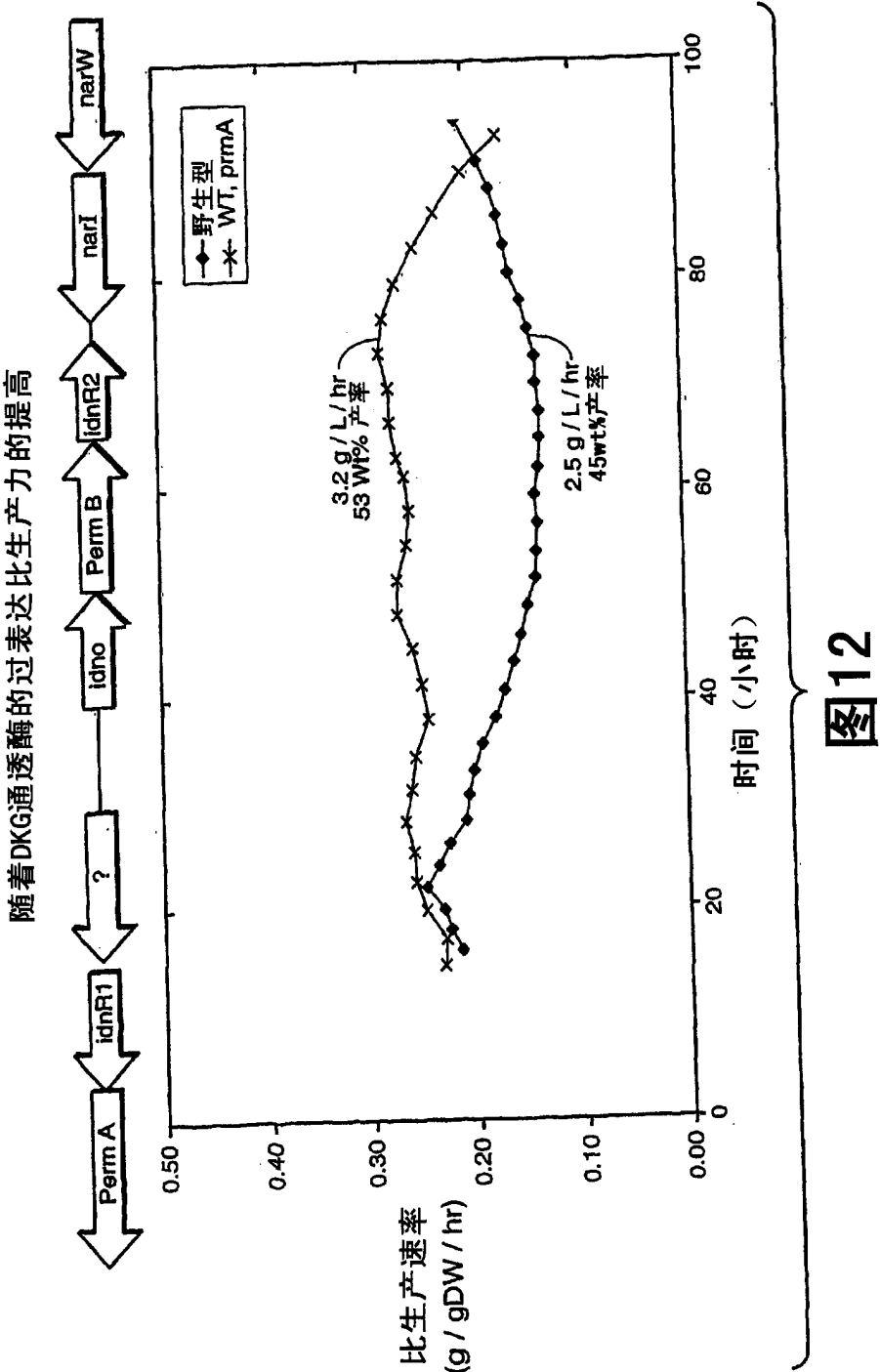
含有 2, 5-DKG通透酶的柠檬泛菌株

图11

PermA 特征

• 共有序列 : G--E----P-----W-P--ER-----

图14



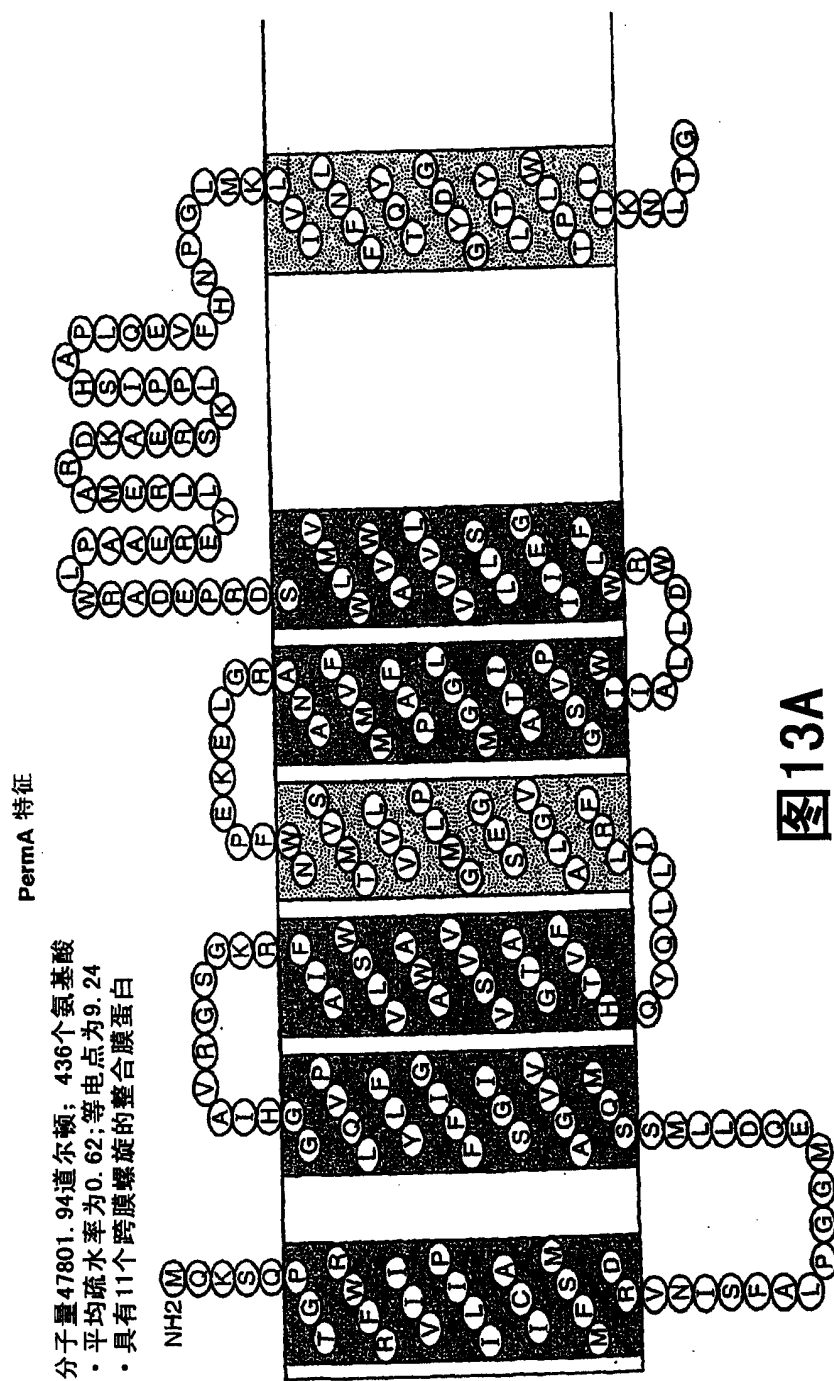


图 13A

13B

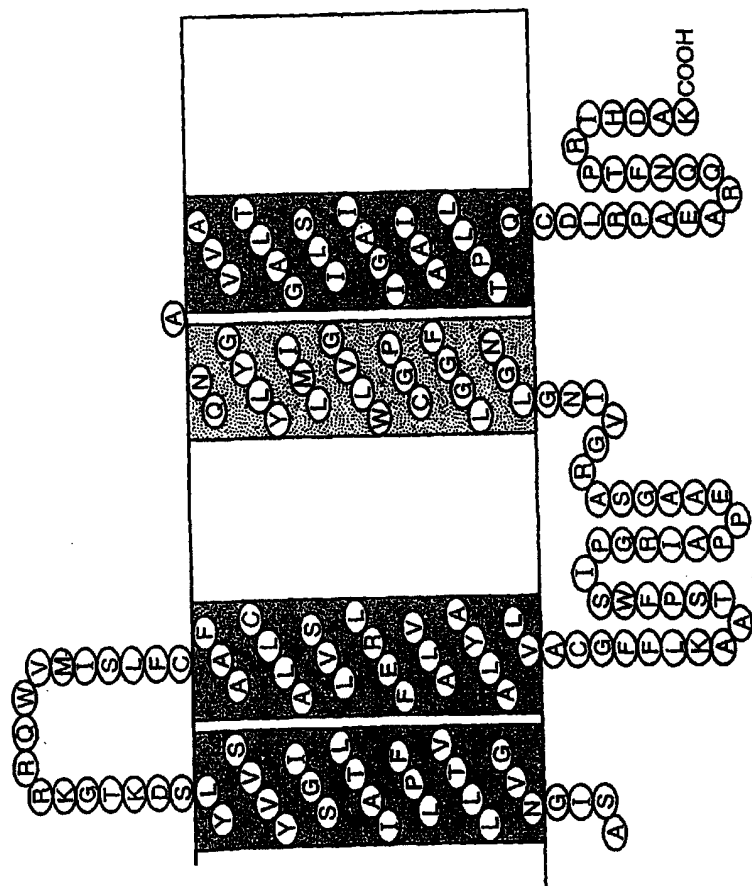


圖 13

图13A：图13B