



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113186144 A

(43) 申请公布日 2021. 07. 30

(21) 申请号 202110477268.4

C12P 7/16 (2006.01)

(22) 申请日 2013.06.09

C12P 7/26 (2006.01)

(30) 优先权数据

C12N 15/53 (2006.01)

61/657,292 2012.06.08 US

C12N 15/74 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

C12R 1/145 (2006.01)

201380042293.3 2013.06.09

(71) 申请人 朗泽科技新西兰有限公司

地址 新西兰奥克兰

(72) 发明人 A·米勒 M·科普克

S·那加拉祖

(74) 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

公司 11285

代理人 孙占华 张广育

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

权利要求书1页 说明书33页

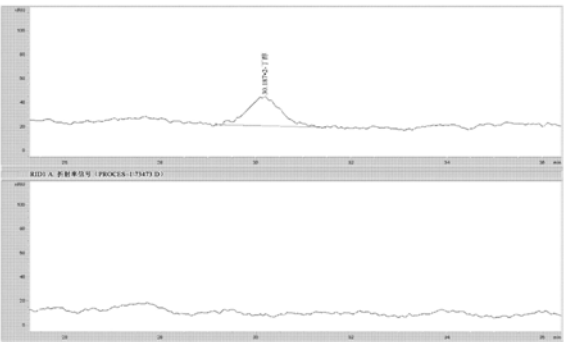
序列表17页 附图8页

(54) 发明名称

重组微生物和其用途

(57) 摘要

一氧化碳营养型产乙酸微生物不产生MEK和/或2-丁醇。它们缺乏产生这些产物的生物合成途径。另外,它们产生中间体(R,R)-2,3-丁二醇,而MEK和2-丁醇的产生需要产生中间体(R,S)-2,3-丁二醇。尽管如此,可以使用经改造用于表达或过表达MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的关键酶的重组微生物来实现MEK和/或2-丁醇的生产。这类微生物,如一氧化碳营养型产乙酸菌自产醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*),可以发酵包含CO的底物。总体方案涉及从(R,S)-2,3-丁二醇产生2-丁醇以及将(R)-乙偶姻转化成(S)-2,3-丁二醇。MEK和2-丁醇的产生都涉及这些步骤。这类发酵方法提供了利用来自工业过程的一氧化碳的方法,所述一氧化碳否则将被释放到大气中并且污染环境。



1. 遗传工程改造的一氧化碳营养型产乙酸的自产乙醇梭菌, 其包含编码内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶的外源性核酸和编码二醇/甘油脱水酶的外源性核酸, 籍此所述细菌表达所述酶。

2. 根据权利要求1所述的细菌, 其中所述细菌在D-(-) 2,3-丁二醇脱氢酶基因中具有敲除突变。

3. 根据权利要求1所述的细菌, 其进一步包含编码二醇/甘油脱水酶的再活化蛋白的外源性核酸。

4. 根据权利要求1所述的细菌, 其中在不存在所述核酸的情况下, 所述细菌不表达所述酶。

5. 根据权利要求1所述的细菌, 其在厌氧条件下表达所述酶。

6. 一种将CO和/或CO₂转化成2-丁醇的方法, 所述方法包括:

将含CO和/或含CO₂的气态底物传送到生物反应器, 所述生物反应器含有在培养基中的根据权利要求1所述的细菌的培养物, 使得所述细菌将CO和/或CO₂转化成2-丁醇, 并且从所述生物反应器回收所述丁醇。

7. 根据权利要求1所述的细菌, 其进一步在其醇脱氢酶基因中包含敲除突变。

8. 根据权利要求7所述的细菌, 其进一步在其D-(-) 2,3-丁二醇脱氢酶中包含敲除突变。

9. 根据权利要求7所述的细菌, 其进一步包含编码二醇/甘油脱水酶的再活化蛋白的外源性核酸。

10. 根据权利要求8所述的细菌, 其进一步包含编码二醇/甘油脱水酶的再活化蛋白的外源性核酸。

11. 一种将CO和/或CO₂转化成甲基乙基酮 (MEK) 的方法, 所述方法包括:

将含CO和/或含CO₂的气态底物传递到生物反应器, 所述生物反应器含有在培养基中的根据权利要求8所述的细菌的培养物, 使得所述细菌将CO和/或CO₂转化成MEK, 并且从所述生物反应器回收所述MEK。

12. 根据权利要求6或11所述的方法, 其中所述细菌在D-(-) 2,3-丁二醇脱氢酶基因中具有敲除突变。

13. 根据权利要求6或11所述的方法, 其中所述细菌进一步包含编码所述二醇/甘油脱水酶的再活化蛋白的外源性核酸。

14. 根据权利要求6或11所述的方法, 其中所述细菌在D-(-) 2,3-丁二醇脱氢酶基因中具有敲除突变并且具有编码所述二醇/甘油脱水酶的再活化蛋白的外源性核酸。

15. 根据权利要求1所述的细菌, 其中所述内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶是肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*) 内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶。

16. 根据权利要求1所述的细菌, 其中所述二醇/甘油脱水酶是产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*) 二醇/甘油脱水酶。

重组微生物和其用途

[0001] 本申请为分案申请,其原申请的申请日为2013年6月9日,申请号为201380042293.3(国际申请号PCT/US2013/044865),名称为“重组微生物和其用途”。

技术领域

[0002] 本发明涉及重组微生物和用于通过微生物发酵包含CO的底物来生产MEK和/或2-丁醇的方法。

背景技术

[0003] 2-丁醇是大规模生产的有机化合物,主要作为工业溶剂甲基乙基酮(MEK或丁酮)的前体。其通常通过利用硫酸催化剂的水合作用从石油化学产品(丁烯)生产。

[0004] MEK是油漆和墨水中的重要成分,具有正在以每年1.9%增长的20亿美元的全球市场。作为其合成中的中间体,对2-丁醇的需求与对丁酮的需求紧密相关。重要的是,2-丁醇也可被转化成在合成橡胶、树脂和粘着剂中使用的1,3-丁二烯。1,3-丁二烯的全球市场超过190亿美元,并且正在以每年2.7%增长。比乙醇更能量密集的2-丁醇也具有作为燃料以及作为丁二烯生产前体的潜在用途。

[0005] 本发明的一个目的是提供重组微生物和一种用于通过微生物发酵来生产MEK和/或2-丁醇的方法,这可以提供优于已知方法的一种或多种优势,或至少提供公众以有用的选择。

发明内容

[0006] 本发明在广义上尤其提供了用于通过微生物发酵包含CO和/或CO₂的底物来生产MEK和/或2-丁醇的方法以及用于所述方法的重组微生物。

[0007] 在第一方面中,本发明提供了一氧化碳营养型产乙酸重组微生物,其能够通过发酵包含CO的底物来产生MEK和/或2-丁醇以及任选地一种或多种其它产物。

[0008] 在一个具体实施方案中,微生物被改造以用于表达在重组微生物所来源的亲本微生物中不存在的MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的一种或多种酶(或其一个或多个亚基)。

[0009] 在另一个实施方案中,微生物被改造以用于过表达在重组微生物所来源的亲本微生物中存在的MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的一种或多种酶(或其一个或多个亚基)。

[0010] 在一个实施方案中,微生物被改造以用于表达在亲本微生物中不存在的MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的一种或多种酶(或其一个或多个亚基),且过表达在亲本微生物中存在的MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的一种或多种酶(或其一个或多个亚基)。

[0011] 在一个实施方案中,微生物被改造以用于表达以下酶中的一种或多种:

[0012] 催化(R)-乙偶姻转化成(R,S)-2,3-丁二醇的酶;

[0013] 催化(R,S)-2,3-丁二醇转化成MEK的酶;以及

[0014] 催化MEK转化成2-丁醇的酶。

[0015] 在一个实施方案中,微生物被改造以用于降低或基本上消除在亲本微生物中存在

的一或多种酶的活性。在一个实施方案中,所述一种或多种酶是MEK和/或2-丁醇生物合成途径的一部分。

[0016] 在一个实施方案中,所述微生物能够通过发酵包含CO的底物来产生2-丁醇,并且被改造用于表达或过表达2-丁醇生物合成途径中的选自以下的一种或多种酶:

[0017] (S)-2,3-丁二醇脱氢酶;

[0018] 二醇/甘油脱水酶;

[0019] 醇脱氢酶;以及,

[0020] 其中任何一种或多种的功能上等效的变体。

[0021] 在一个实施方案中,所述亲本微生物缺乏(S)-2,3-丁二醇脱氢酶和二醇/甘油脱水酶或其中任何一种或多种的功能上等效的变体,并且所述重组微生物被改造用于表达这两种酶。

[0022] 在一个实施方案中,所述亲本微生物包含(R)-2,3-丁二醇脱氢酶或其功能上等效的变体,并且所述重组微生物被改造用于降低或基本上消除这种酶的活性。

[0023] 在一个实施方案中,所述微生物能够通过发酵包含CO的底物来产生MEK并且被改造用于表达或过表达MEK生物合成途径中的选自以下的一种或多种酶:

[0024] (S)-2,3-丁二醇脱氢酶;

[0025] 二醇/甘油脱水酶;以及,

[0026] 其中任何一种或多种的功能上等效的变体。

[0027] 在一个实施方案中,所述亲本微生物缺乏(S)-2,3-丁二醇脱氢酶和二醇/甘油脱水酶或其中任何一种或多种的功能上等效的变体,并且所述重组微生物被改造用于表达这两种酶。

[0028] 在一个实施方案中,所述亲本微生物包含醇脱氢酶或其功能上等效的变体,并且所述重组微生物被改造用于减小或基本上消除这种酶的活性。

[0029] 在一个实施方案中,所述亲本微生物包含(R)-2,3-丁二醇脱氢酶或其功能上等效的变体,并且所述重组微生物被改造用于降低或基本上消除这种酶的活性。

[0030] 在一个实施方案中,所述微生物包含被改造以用于增加亲本微生物中存在的一种或多种核酸的表达的一种或多种外源性核酸,并且所述一种或多种核酸编码之前本文中提及的一种或多种酶(或其一个或多个亚基)。在一个实施方案中,一种或多种被改造用于增加表达的外源性核酸是调控元件。在一个实施方案中,所述调控元件是启动子。在一个实施方案中,所述启动子是组成型启动子。在一个实施方案中,所述启动子是选自Wood-Ljungdahl基因簇或磷酸转乙酰酶/乙酸激酶操纵子启动子。

[0031] 在一个实施方案中,所述微生物包含被改造以用于表达亲本微生物中不存在的之前本文中提及的一种或多种酶(或其一个或多个亚基)的一种或多种外源性核酸。在一个实施方案中,所述微生物包含一种或多种外源性核酸,其编码且被改造以用于表达所述酶中的至少两种或三种(或其一个或多个亚基)。

[0032] 在一个实施方案中,所述一种或多种外源性核酸是核酸构建体或载体,在一个具体实施方案中是质粒,其编码呈任何组合形式的上文提及的一种或多种酶。在一个实施方案中,所述外源性核酸是表达质粒。

[0033] 在一个实施方案中,所述微生物包含被改造以用于增加亲本微生物中存在的一种

或多种核酸的表达的一种或多种外源性核酸,以及被改造以用于表达亲本微生物中不存在的一种或多种酶的一种或多种外源性核酸。在另一个实施方案中,所述微生物包含被改造以用于降低或基本上消除亲本微生物中存在的酶的活性的一种或多种核酸。

[0034] 在一个具体实施方案中,亲本微生物选自包含以下的一氧化碳营养型产乙酸细菌:自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)、扬氏梭菌(*Clostridium ljungdahlii*)、拉氏梭菌(*Clostridium ragsdalei*)、食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)、德氏梭菌(*Clostridium drakei*)、粪味梭菌(*Clostridium scatologenes*)、乙酸梭菌(*Clostridium aceticum*)、甲酸乙酸梭菌(*Clostridium formicoaceticum*)、大梭菌(*Clostridium magnum*)、甲基营养丁酸杆菌(*Butyribacterium methylotrophicum*)、伍氏乙酸杆菌(*Acetobacterium woodii*)、巴氏嗜碱菌(*Alkalibaculum bacchii*)、*Blautia producta*、淤泥真杆菌(*Eubacterium limosum*)、热醋穆尔氏菌(*Moorella thermoacetica*)、热自养穆尔氏菌(*Moorella thermautotrophica*)、卵形鼠孢菌(*Sporomusa ovata*)、*Sporomusa silvacetica*、类球鼠孢菌(*Sporomusa sphaeroides*)、普氏产醋酸杆菌(*Oxobacter pfennigii*)以及凯伍热厌氧菌(*Thermoanaerobacter kiuvi*)。

[0035] 在一个实施方案中,所述亲本微生物是自产乙醇梭菌或扬氏梭菌。在一个具体实施方案中,所述微生物是自产乙醇梭菌DSM23693。在另一个具体实施方案中,所述微生物是扬氏梭菌DSM13528(或ATCC55383)。

[0036] 在一个实施方案中,所述亲本微生物缺乏以下一种或多种酶的活性:

[0037] 催化(R)-乙偶姻转化成(R,S)-2,3-丁二醇的酶;

[0038] 催化(R,S)-2,3-丁二醇转化成MEK的酶;以及

[0039] 催化MEK转化成2-丁醇的酶。

[0040] 在一个实施方案中,所述亲本微生物缺乏编码以下一种或多种酶的一种或多种基因:

[0041] 催化(R)-乙偶姻转化成(R,S)-2,3-丁二醇的酶;

[0042] 催化(R,S)-2,3-丁二醇转化成MEK的酶;以及

[0043] 催化MEK转化成2-丁醇的酶。

[0044] 在一个实施方案中,所述亲本微生物缺乏编码(S)-2,3-丁二醇脱氢酶、二醇/甘油脱水酶和醇脱氢酶和/或其中任何一种或多种的功能上等效的变体的一种或多种基因。

[0045] 在一个实施方案中,所述亲本微生物包含编码(R)-2,3-丁二醇脱氢酶、醇脱氢酶和/或其任何一种或多种的功能上等效的变体的一种或多种基因。

[0046] 在一个实施方案中,所述亲本微生物包含编码(R)-2,3-丁二醇脱氢酶、醇脱氢酶或其任何一种或多种的功能上等效的变体的一种或多种基因,并且缺乏编码(S)-2,3-丁二醇脱氢酶、二醇/甘油脱水酶和/或其任何一种或多种的功能上等效的变体的一种或多种基因。

[0047] 在第二方面中,本发明提供编码一种或多种酶(或其一个或多个亚基)的核酸,所述一种或多种酶(或其一个或多个亚基)当在微生物中表达时允许所述微生物通过发酵包含CO的底物来产生MEK和/或2-丁醇。

[0048] 在一个实施方案中,所述核酸编码两种或更多种酶(或其一个或多个亚基),所述

两种或更多种酶(或其一个或多个亚基)当在微生物中表达时允许所述微生物通过发酵包含CO的底物来产生MEK和/或2-丁醇。

[0049] 在一个实施方案中,核酸编码一种或多种选自如下的酶:

[0050] 催化(R)-乙偶姻转化成(R,S)-2,3-丁二醇的酶;

[0051] 催化(R,S)-2,3-丁二醇转化成MEK的酶;以及

[0052] 催化MEK转化成2-丁醇的酶。

[0053] 在一个实施方案中,所述酶是选自(S)-2,3-丁二醇脱氢酶、二醇/甘油脱水酶、醇脱氢酶和/或其中任何一种或多种的功能上等效的变体。

[0054] 在一个实施方案中,所述核酸包含以任何次序编码(S)-2,3-丁二醇脱氢酶、二醇/甘油脱水酶和/或其中任何一种或多种的功能上等效的变体的核酸序列。

[0055] 在一个实施方案中,本发明的核酸还包含启动子。在一个实施方案中,所述启动子允许所述基因在其控制下的组成型表达。在一个具体实施方案中,使用Wood-Ljungdahl簇启动子。在另一个具体实施方案中,使用磷酸转乙酰酶/乙酸激酶操纵子启动子。在一个具体实施方案中,所述启动子是来自自产乙醇梭菌。

[0056] 在另一方面中,本发明提供被改造以用于降低或消除亲本微生物中(R)-2,3-丁二醇脱氢酶、醇脱氢酶和/或其中任何一种或多种的功能上等效的变体的表达的核酸。

[0057] 在另一方面中,本发明提供被改造以用于当存在于亲本微生物中时增加(S)-2,3-丁二醇脱氢酶、二醇/甘油脱水酶、醇脱氢酶和/或其中任何一种或多种的功能上等效的变体中一种或多种的表达的核酸。

[0058] 在第三方面中,本发明提供包含一种或多种第二方面的核酸的核酸构建体或载体。

[0059] 在一个具体实施方案中,所述核酸构建体或载体是表达构建体或载体。在一个具体实施方案中,所述表达构建体或载体是质粒。

[0060] 在第四方面中,本发明提供宿主生物,其包含第二方面的核酸或第三方面的载体或构建体中的任何一种或多种。

[0061] 在第五方面中,本发明提供一种组合物,其包含本发明的第三方面提及的表达构建体或载体以及甲基化构建体或载体。

[0062] 优选地,所述组合物能够产生本发明的第一方面的重组微生物。

[0063] 在一个具体实施方案中,所述表达构建体/载体和/或甲基化构建体/载体是质粒。

[0064] 在第六方面中,本发明提供一种用于通过微生物发酵来产生MEK和/或2-丁醇和任选的一种或多种其它产物的方法,所述方法包含使用本发明第一方面的重组微生物发酵包含CO的底物。

[0065] 在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:

[0066] (a) 向含有本发明第一方面的一种或多种微生物的培养物的生物反应器提供包含CO的底物;并且

[0067] (b) 在所述生物反应器中厌氧发酵所述培养物以至少产生MEK和/或2-丁醇。

[0068] 在一个实施方案中,所述方法包括以下步骤:

[0069] a. 在由于工业过程产生的含CO的气体被释放到大气中之前捕获所述气体,

[0070] b. 利用含有本发明的第一方面的一种或多种微生物的培养物厌氧发酵所述含CO

的气体以至少产生MEK和/或2-丁醇。

[0071] 在该方法方面的具体实施方案中,所述微生物被维持在水性培养基中。

[0072] 在该方法方面的具体实施方案中,所述底物的发酵在生物反应器中进行。

[0073] 优选地,所述包含CO的底物是包含CO的气态底物。在一个实施方案中,所述底物包含工业废气。在某些实施方案中,所述气体是钢厂废气或合成气。

[0074] 在一个实施方案中,所述底物通常将含有较大比例的CO,如至少约20体积%至约100体积%CO,20体积%至70体积%CO,30体积%至60体积%CO,以及40体积%至55体积%CO。在具体的实施方案中,所述底物包含约25体积%、或约30体积%、或约35体积%、或约40体积%、或约45体积%、或约50体积%CO,或约55体积%CO,或约60体积%CO。

[0075] 在某些实施方案中,所述方法还包括从发酵液中回收MEK和/或2-丁醇和任选的一种或多种其它产物的步骤。

[0076] 在第七方面中,本发明提供通过第六方面的方法产生时的MEK和/或2-丁醇。

[0077] 在另一方面中,本发明提供一种用于产生本发明的第一方面的微生物的方法,其包括用一种或多种外源性核酸转化亲本微生物使得所述微生物能够通过发酵包含CO的底物来产生MEK和/或2-丁醇和任选的一种或多种其它产物,其中所述亲本微生物不能通过发酵包含CO的底物来产生MEK和/或2-丁醇。

[0078] 在一个具体实施方案中,用被改造以用于表达亲本微生物中不存在的MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的一种或多种酶的一种或多种外源性核酸来转化所述亲本微生物。在另一个实施方案中,用被改造以用于过表达亲本微生物中存在的MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的一种或多种酶的一种或多种核酸来转化所述亲本微生物。在另一个实施方案中,用一种或多种外源性核酸转化亲本微生物,所述一种或多种核酸被改造用于表达所述亲本微生物中不存在的MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的一种或多种酶并且过表达所述亲本微生物中天然存在的MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的一种或多种酶。在另一个实施方案中,亲本微生物被转化以降低或基本上消除可将2-丁酮转化成2-丁醇的一种或多种酶和/或可将(R)-乙偶姻转化成(R,R)-2,3-丁二醇的一种或多种酶的活性。在一个实施方案中,亲本微生物被转化以表达或过表达一种或多种酶并且降低或基本上消除一种或多种其它酶的活性。

[0079] 在某些实施方案中,所述一种或多种酶是如的。

[0080] 在某些实施方案中,亲本微生物是如上文所述的。

[0081] 提供了分离的遗传工程改造的一氧化碳营养型产乙酸细菌,其包含编码内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶的外源性核酸和编码二醇/甘油脱水酶的外源性核酸。细菌从这些核酸表达所述酶。所述两种酶可以在同一细菌中表达或其可以分别存在于不同细菌中。一般来说,所述细菌在天然状态下不表达所述酶。在一些情况下,所述细菌在D-(-)2,3-丁二醇脱氢酶基因中具有敲除突变。在其它情况下,所述细菌还可包含编码二醇/甘油脱水酶的再活化蛋白的外源性核酸。这些可延长脱水酶的活性寿命,所述脱水酶会在与其底物和/或产物长期接触之后失去活性。所述细菌通常可以在厌氧条件下表达所述酶。

[0082] 在一些实施方案中,所述细菌还可在其醇脱氢酶基因中包含敲除突变。这可以减少或防止所编码的醇脱氢酶的表达。这种突变将减少或防止2-丁醇的形成,导致MEK的积聚。MEK可以是发酵的所需产物,因此这种突变可以是高度合乎需要的。在一些实施方案中,

所述细菌还可在其D-(-)-2,3-丁二醇脱氢酶中包含敲除突变。这将减少或防止MEK或2-丁醇的产生所不需要的丁二醇异构体的形成。任选地,所述细菌还可包含编码二醇/甘油脱水酶的再活化蛋白的外源性核酸。这将有助于保持以所需水平从内消旋-2,3-丁二醇产生MEK。

[0083] 还提供了质粒,其可用于转化本文所述的发酵和转化过程中使用的一氧化碳营养型产乙酸细菌。所述质粒可以在一氧化碳营养型产乙酸细菌中复制,即其具有适合的复制起点。在一些情况下,所述质粒将包含编码内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶的核酸和编码二醇/甘油脱水酶的核酸,但是任一者可以单独存在于质粒中。当所述质粒被转化到所述细菌中时,合乎需要地是所述细菌表达所述酶。或者,如果使用诱导型启动子用于表达,那么它们可以仅在被诱导时表达。

[0084] 这类细菌和质粒可用于实施将CO和/或CO₂转化成2-丁醇的方法。含CO和/或含CO₂的气态底物被传送到含有上述一氧化碳营养型产乙酸细菌的培养物的生物反应器中。在使得所述细菌能够将CO和/或CO₂转化成2-丁醇的条件下在培养基中培养所述细菌。可以以连续或间断(episodic)方式从所述生物反应器回收丁醇。

[0085] 一些上文所讨论的细菌被很好地改造为适用于在将CO和/或CO₂转化成甲基乙基酮(MEK)的方法中使用。如上文所讨论的,所述细菌将合乎需要地具有降低或减少醇脱氢酶的活性或产生的突变。在所述方法中,含CO和/或含CO₂的气态底物被传送到含有适当的一氧化碳营养型产乙酸细菌的培养物的生物反应器中。在使得所述细菌将CO和/或CO₂转化成MEK的条件下在培养基中培养细菌。可以使用任何已知方法连续地或间断地(saltatorily)从生物反应器中回收MEK。在一些情况下,所用的细菌将在D-(-)-2,3-丁二醇脱氢酶基因中具有敲除突变以减少副产物的产生。在其它情况下,所述细菌还可包含编码二醇/甘油脱水酶的再活化蛋白的外源性核酸。这将使内消旋-2,3-丁二醇转化为MEK的步骤保持稳健。在一些情况下,所述细菌将同时具有D-(-)-2,3-丁二醇脱氢酶基因中的敲除突变和编码二醇/甘油脱水酶的再活化蛋白的外源性核酸。

[0086] 还提供可用于转化在所选细菌中并在其中表达的核酸。一种可用的核酸编码针对自产乙醇梭菌进行密码子优化的内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶。另一可用的核酸编码针对自产乙醇梭菌进行密码子优化的二醇/甘油脱水酶。在一个具体实施方案中,所述内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶是肺炎克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶。在另一个具体实施方案中,所述核酸编码产酸克雷伯氏菌(*Klebsiella oxytoca*)二醇/甘油脱水酶。在另一个具体实施方案中,所述核酸编码产酸克雷伯氏菌二醇/甘油脱水酶。这些各种编码序列可以在一个或多个分子(如一个或多个质粒)上。如果欲使用多个质粒,那么其复制起点将合乎需要地是相容的。还可在适当的噬菌体上携带所述核酸。

[0087] 本发明还可以在广义上被说成单独地或共同地包含在本申请的说明书中提及或指示的部分、要素和特征,包含两个或更多个所述部分、要素或特征中的任何或所有组合,并且当具有本发明所涉及的领域中的已知等效物的特定整体在本文中被提到时,应认为所述已知等效物如被单独示出一般纳入本文中。

附图说明

[0088] 本发明的这些和其它方面(应被视为在所有其新颖方面中)将从以下仅以实例方式给出的参考附图的描述而变得显而易见,在所述附图中:

[0089] 图1:示出2-丁醇峰的样品色谱图。上部色谱图是来自携带含有pddABC的质粒的自产乙醇梭菌的样品且培养基中加入内消旋-2,3-丁二醇的色谱图。下部色谱图是来自野生型自产乙醇梭菌的样品且培养基中加入内消旋-2,3-丁二醇的色谱图。

[0090] 图2:着重示出转化的大肠杆菌(E.coli) JW1375中丁二醇产生的HPLC谱图。注释:两张图的Y轴比例是不同的。四个可见峰是在14.3分钟处的乙酸、在16.2分钟处的内消旋-2,3-丁二醇、在17.0分钟处的(D,L)-2,3-丁二醇以及在18.9分钟处的乙醇。A.示出了具有pMTL85145-ALS-ALDC-secAdh593的JW1375的谱图,未检测到内消旋-2,3-丁二醇,具有一些(D)-2,3-丁二醇。B.示出了具有pMTL85145-ALS-ALDC-_{Kp}budC的JW1375的谱图,具有产生的内消旋-2,3-丁二醇与一些(D)-2,3-丁二醇。

[0091] 图3:证实4个克隆中2,3bdh基因破坏的扩增。使用引物0g42f/0f43r的375bp PCR产物指示未经修饰的野生型2,3-bdh基因(W)。使用同一组引物扩增约2kb的PCR产物指示ClosTronII型内含子插入在靶基因中。由约2kb PCR产物(1-4)的扩增可见,就2,3-bdh基因而被靶向的所有4个克隆均是基因破坏阳性的。

[0092] 图4:通过HPLC证实12孔板中内消旋-2,3-丁二醇的产生。色谱图示出了内消旋-2,3-丁二醇和D-(-)-2,3-丁二醇的峰。测量到5.4:1的比率。

[0093] 图5:携带质粒pMTL83155-KpBDH的自产乙醇梭菌的反应器运作的代谢物谱图。在所选的点处,测量并成功地检测到内消旋-2,3-丁二醇。

[0094] 图6:通过HPLC证实连续培养物的3个样品中内消旋-2,3-丁二醇的产生。

[0095] 图7:证实内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶在自产乙醇梭菌中表达的扩增图。

[0096] 图8:从CO产生内消旋-2,3-BDO、MEK和2-丁醇的途径。

[0097] 图9:产生内消旋-2,3-BDO、MEK和2-丁醇的途径。

具体实施方式

[0098] 以下是对本发明的描述,包括在广义上给出的其优选实施方案。本发明由在下文中标题“实施例”下给出的公开内容进一步阐明,其提供支持本发明的实验性数据、本发明的各种方面的特定实例以及实施本发明的方式。

[0099] 本发明人想到使用被改造以用于表达或过表达MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的关键酶的重组微生物通过发酵包含CO的底物来从(R)-乙偶姻产生MEK和/或2-丁醇。其已证实在一氧化碳营养型产乙酸菌自产乙醇梭菌中从(R,S)-2,3-丁二醇产生2-丁醇,以及(R)-乙偶姻转化为(S)-2,3-丁二醇,这是在生产MEK和2-丁醇两者的中间步骤。这提供了用于生产MEK和/或2-丁醇的替代方式,所述方式可以具有优于当前用于生产MEK和/或2-丁醇的方法的益处。另外,其提供了使用来自工业过程的一氧化碳的方式,所述一氧化碳否则的话将被释放到大气中并且污染环境。

[0100] 已知一氧化碳营养型产乙酸微生物不产生MEK和/或2-丁醇。其缺乏制造这些产物的生物合成途径。另外,其产生中间体(R,R)-2,3-丁二醇,而MEK和2-丁醇的生产需要产生中间体(R,S)-2,3-丁二醇。

[0101] 虽然本发明人已证实本发明在自产乙醇梭菌中的功效,但其想到本发明适用于更广泛的一氧化碳营养型产乙酸微生物以及对包含CO的底物的发酵,如上文和本文中所进一步的论述。

[0102] 如本文中所提到的,“发酵液”是包含至少一种营养培养基和细菌细胞的培养基。

[0103] 如本文中所提到的,“穿梭微生物”是其中表达甲基转移酶并且不同于目标微生物的微生物。

[0104] 如本文中所提到的,“目标微生物”是其中表达构建体/载体上包含的基因并且不同于穿梭微生物的微生物。

[0105] 术语“主要发酵产物”意指以最高浓度和/或最高产率产生的一种发酵产物。

[0106] 术语“增加效率”、“增加的效率”等在用于发酵过程时,包括但不限于增加以下的一种或多种:催化发酵的微生物的生长速率、在较高产物浓度下的生长速率和/或产物产生速率、消耗每体积的底物所产生的所需产物的体积、所需产物的产生速率或产生水平、以及与发酵的其它副产物相比所产生的所需产物的相对比例。

[0107] 短语“包含一氧化碳的底物”和类似术语应理解为包括其中一氧化碳可被例如一种或多种细菌菌株获得用于生长和/或发酵的任何底物。

[0108] 短语“包含一氧化碳的气态底物”和类似短语和术语包括含有一定水平一氧化碳的任何气体。在某些实施方案中,所述底物含有至少约20体积%到约100体积%CO,20体积%到70体积%CO、30体积%到60体积%CO以及40体积%到55体积%CO。在具体的实施方案中,所述底物包含约25体积%、或约30体积%、或约35体积%、或约40体积%、或约45体积%、或约50体积%CO,或约55体积%CO,或约60体积%CO。

[0109] 虽然包含CO的底物未必含有任何氢气,但H₂的存在不应对根据本发明的方法的产物形成是不利的。在具体实施方案中,氢气的存在引起醇产生的总效率提高。举例来说,在具体实施方案中,所述底物可以包含约2:1、或1:1或1:2比率的H₂:CO。在一个实施方案中,所述底物包含约30体积%或更少H₂、20体积%或更少H₂、约15体积%或更少H₂或者约10体积%或更少H₂。在其它实施方案中,底物流包含低浓度的H₂,例如少于5%、或少于4%、或少于3%、或少于2%、或少于1%或基本上无氢气。所述底物还可含有一些CO₂,例如约1体积%到约80体积%CO₂,或1体积%到约30体积%CO₂。在一个实施方案中,所述底物包含少于或等于约20体积%CO₂。在具体实施方案中,所述底物包含少于或等于约15体积%CO₂、少于或等于约10体积%CO₂、少于或等于约5体积%CO₂或基本上无CO₂。

[0110] 在以下描述中,对本发明的实施方案的传送和发酵“含有CO的气态底物”的方面进行描述。然而,应了解气态底物可以替代形式提供。举例来说,可以提供溶解于液体中的含有CO的气态底物。基本上,将液体用含有一氧化碳的气体饱和,并且接着将所述液体加入到生物反应器中。这可以使用标准方法实现。例如,可使用微泡分布发生器(Hensirisak et.al.Scale-up of microbubble dispersion generator for aerobic fermentation; Applied Biochemistry and Biotechnology Volume 101,Number 3/October,2002)。又例如,含有CO的气态底物可以吸附到固体载体上。所述替代方法通过使用术语“含有CO的底物”等涵盖。

[0111] 在本发明的具体实施方案中,含CO的气态底物是工业废气(off or waste gass)。“工业废气”应广泛地被认为包括由工业过程产生的包含CO的任何气体,并且包括由铁金属产品制造、非铁产品制造、石油精炼过程、煤炭气化、生物质气化、电力生产、碳黑生产以及焦炭制造所产生的气体。其它实例可在本文其它地方提供。

[0112] 除非上下文另有要求,否则本文中所用的短语“发酵”、“发酵过程”或“发酵反应”

等意欲涵盖所述过程的生长期和产物生物合成期。如本文将进一步描述的,在一些实施方案中,生物反应器可以包含第一生长反应器和第二发酵反应器。因此,将金属或组合物加入到发酵反应中应理解为包括加入到这些反应器中的任一者或两者中。

[0113] 术语“生物反应器”包括由一个或多个容器和/或塔或管道排布组成的发酵装置,其包括连续搅拌槽反应器(CSTR)、固定化细胞反应器(ICR)、滴流床反应器(TBR)、气泡塔、气升式发酵罐、静态混合器或适用于气-液接触的其它容器或其它装置。在一些实施方案中,生物反应器可以包含第一生长反应器和第二发酵反应器。因此,在提及将底物加入到生物反应器或发酵反应中时,应理解包括在适当时加入到这些反应器中的任一者或两者中。

[0114] “外源性核酸”是源自待引入其的微生物之外的核酸。外源性核酸可来源于任何适当来源,包括但不限于待引入其的微生物、与待引入其的生物不同的微生物菌株或种,或者其可以人工方式或以重组方式制备。在一个实施方案中,外源性核酸代表已经(仅作为实例,天然地)存在于待引入其的微生物中的核酸序列,且将其引入以增加特定基因的表达或过表达(例如,通过增加序列(例如基因)的拷贝数,或引入强启动子或组成型启动子以增加表达)。在另一个实施方案中,外源性核酸代表通常(仅作为实例,天然地)不存在于待引入其的微生物中的核酸序列,且允许表达不存在于所述微生物中的产物或者增加所述微生物中已经存在的基因(仅作为实例,天然基因)的表达(例如在引入调节元件如启动子的情况下)。外源性核酸可以被改造以整合到待引入其的微生物的基因组中,或者保持染色体外的状态。

[0115] 应理解,可使用其序列不同于本文具体示例的序列的核酸来实施本发明,条件为其执行基本上相同的功能。对于编码蛋白质或肽的核酸序列,这意味着所编码的蛋白质或肽具有实质上相同的功能。对于代表启动子序列的核酸序列,所述变体序列应具有促进一个或多个基因表达的能力。这类核酸可在本文中被称作“功能上等效的变体”。举例来说,核酸的功能上等效的变体包括等位基因变体、基因片段、包括突变(缺失、插入、核苷酸置换等)和/或多态性的基因等。来自其它微生物的同源基因也可被视为是本文具体示例的序列的功能上等效的变体的实例。这些包括如梭菌属种(*Clostridium* sp.)、扬氏梭菌、丁酸梭菌(*Clostridium butyricum*)、*Clostridium diolis*、*Roseburia inulinivorans*、产酸克雷伯氏菌、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*)、克氏柠檬酸杆菌(*Citobacter koseri*)、肺炎克雷伯氏菌和大肠杆菌(*Escherichia coli*)的菌种中的同源基因,其详情可在网站如Genbank或NCBI上公开获得。短语“功能上等效的变体”还应被认为包括其序列因为针对特定生物而进行的密码子优化而改变的核酸。本文中,核酸的“功能上等效的变体”优选地与所鉴别的核酸具有至少约70%、优选约80%、更优选约85%、优选约90%、优选约95%或更高的核酸序列同一性。

[0116] 还应理解,可使用其序列不同于本文具体示例的氨基酸序列的多肽实施本发明。这些变体在本文中可称作“功能上等效的变体”。蛋白质或肽的功能上等效的变体包括与所鉴别的蛋白质或肽具有至少40%、优选50%、优选60%、优选70%、优选75%、优选80%、优选85%、优选90%、优选95%或更高的氨基酸同一性,并且具有与目的肽或蛋白质实质上相同功能的那些蛋白质或肽。这类变体在其范围内包括蛋白质或肽的片段,其中所述片段包含截短形式的多肽,其中缺失可为1到5个、到10个、到15个、到20个、到25个氨基酸,并且缺失可在多肽的任一末端延伸1到25个残基,并且其中缺失可以是所述区域内的任意长度;或

可以位于内部位置。本文中特定多肽的功能上等价的变体还应被认为包括由其它细菌种(例如前段中示例的)中的同源基因表达的多肽。

[0117] 如本文中所用的“基本上相同的功能”意指核酸或多肽的变体能够执行所述核酸或多肽的功能。举例来说,本发明的酶的变体能够催化与所述酶相同的反应。然而,不应理解为意指所述多肽或核酸的变异体与所述多肽或核酸具有相同的活性水平。

[0118] 可以使用任何数目的已知方法评估核酸或多肽的功能上等价的变体是否具有与所述核酸或多肽基本上相同的功能。然而,例如,在Biochem.Biophys.Res.Comm.,1976,69:475-80中,在Arch.Biochem.Biophys.1986:245:144-52中或在J.Bacteriol,1993,175:5079-5105中概述的方法可分别用于测量醇脱氢酶、二醇/甘油脱水酶、(S)-2,3-丁二醇脱氢酶和(R)-2,3-丁二醇脱氢酶的活性。

[0119] “过表达”和类似术语和短语在用于本发明时应被广义地认为包括在相同条件下与亲本微生物的一种或多种蛋白(包括编码一种或多种蛋白质的一种或多种核酸)表达水平相比所述蛋白(包括一种或多种核酸)表达的任何增加。不应被认为意指所述蛋白质(包括一种或多种核酸)以任何特定水平表达。

[0120] “亲本微生物”是用于产生本发明的重组微生物的微生物。亲本微生物可以是天然存在的微生物(即野生型微生物)或先前曾被改造过但是不表达或不过表达本发明的主题——一种或多种酶的微生物。因此,本发明的重组微生物已被修饰以表达或过表达在所述亲本微生物中不表达或不过表达的一种或多种酶。

[0121] 术语核酸“构建体”或“载体”和类似术语应被广义地认为包括适合用作将遗传物质转移到细胞中的载体的任何核酸(包括DNA和RNA)。所述术语应被认为包括质粒、病毒(包括噬菌体)、粘粒和人工染色体。构建体或载体可包括一种或多种调节元件、复制起点、多克隆位点和/或选择性标记物。在一个具体实施方案中,构建体或载体被改造以允许由所述构建体或载体编码的一种或多种基因表达。核酸构建体或载体包括裸核酸,以及用一种或多种有助于递送至细胞中的试剂配制的核酸(例如脂质体缀合的核酸、其中含有所述核酸的生物)。

[0122] “内消旋-2,3-丁二醇生物合成途径”是允许(R)-乙偶姻转化成内消旋-2,3-丁二醇的酶促途径。例如,所述途径可包括(R)-乙偶姻转化成(R,S)-2,3-丁二醇的步骤。例如,(S)-2,3-丁二醇脱氢酶可以催化(R)-乙偶姻转化成(R,S)-2,3-丁二醇,且二醇/甘油脱水酶可以催化(R,S)-2,3-丁二醇转化成MEK(图8和9)。

[0123] “MEK生物合成途径”是允许(R)-乙偶姻转化成MEK的酶促途径。例如,所述途径可包括以下步骤:(R)-乙偶姻转化成(R,S)-2,3-丁二醇,和(R,S)-2,3-丁二醇转化成MEK。例如,(S)-2,3-丁二醇脱氢酶可以催化(R)-乙偶姻转化成(R,S)-2,3-丁二醇,且二醇/甘油脱水酶可以催化(R,S)-2,3-丁二醇转化成MEK(图8和9)。

[0124] “2-丁醇生物合成途径”是允许(R)-乙偶姻转化成2-丁醇的酶促途径。例如,所述途径可包括以下步骤:(R)-乙偶姻转化成(R,S)-2,3-丁二醇,(R,S)-2,3-丁二醇转化成MEK,且MEK转化成2-丁醇。例如,(S)-2,3-丁二醇脱氢酶可以催化乙偶姻转化成(R,S)-2,3-丁二醇,二醇/甘油脱水酶可以催化(R,S)-2,3-丁二醇转化成MEK,且醇脱氢酶可以催化MEK转化成2-丁醇(图8和9)。

[0125] 除非上下文另有清楚的要求,否则提及MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的酶时应

被认为包括提及所述酶的任意一个或多个亚基。例如,丙二醇/甘油脱水酶可以包含三个亚基。

[0126] 提及“二醇/甘油脱水酶”时应被认为包括提及二醇脱水酶和单独地提及甘油脱水酶。不应被认为暗示单一酶具有两种活性。在一个具体实施方案中,二醇/甘油脱水酶是丙二醇/甘油脱水酶。

[0127] 在某些实施方案中,本发明涉及降低或基本上消除某些酶的活性。举例来说,一氧化碳营养型产乙酸菌可以天然地将(R)-乙偶姻转化成(R,R)-2,3-丁二醇(使用酶(R)-2,3-丁二醇脱氢酶),而对于产生MEK和2-丁醇来说,需要产生(R,S)-2,3-丁二醇。减少(R,R)-2,3-丁二醇的产生可以有助于增加产生MEK和/或2-丁醇的发酵效率。类似地,一氧化碳营养型产乙酸菌可以天然地将MEK转化成2-丁醇(例如使用醇脱氢酶)。这可以有助于产生2-丁醇,但会减少可以回收的MEK的量。降低醇脱氢酶的活性可以有助于增加可以从发酵回收的MEK的量。

[0128] “降低或基本上消除”酶的活性应被广义地认为包括所述酶的活性水平的任意降低。其可包括遗传修饰以破坏所述酶的表达和/或活性。在一个实施方案中,所述一种或多种遗传修饰破坏或敲除一种或多种编码所述酶的基因。在一个实施方案中,所述一种或多种遗传修饰破坏所述酶的表达或活性所需的化合物的活性。在一个实施方案中,所述一种或多种遗传修饰增加会抑制所述酶的表达或活性的一种或多种化合物的表达或活性。

[0129] 根据本发明的“破坏基因、酶的表达或活性的遗传修饰”(和类似术语)应被广义地认为包括会至少减少酶催化的产物的生物合成的任何遗传修饰。所述短语应被认为包括例如:对编码酶的基因的修饰,包括对参与基因表达的遗传调节元件的修饰;引入核酸,所述核酸产生降低或抑制酶活性的蛋白质,或其减少或阻止酶的表达;引入核酸,其表达被改造以阻断基因表达的核酸(例如asRNA(反义RNA)、siRNA(小干扰RNA)、CRISPR(成簇的规律间隔的短回文重复序列);通过引入对编码酶的表达或活性所需的蛋白质的基因的修饰来减少或抑制所述蛋白质。应了解,对于酶的表达或活性所需的蛋白质可以对基因或一种或多种酶直接起作用,或可经由另一化合物间接起作用。类似地,降低或抑制酶的活性或表达的蛋白质可以对所述酶的基因直接起作用,或可以经由另一化合物间接起作用。

[0130] “遗传修饰”应被广泛地理解且意欲包括例如将一种或多种外源性核酸引入到微生物中、将突变引入到基因位点中、向基因组中加入一或多个核苷酸或从基因组中去除一或多个核苷酸、用不同核苷酸置换一个或多个核苷酸、置换基因、去除基因、加入基因等。

[0131] 内消旋-2,3-丁二醇包括(R,S)-和(S,R)-2,3-丁二醇。(R,R)-2,3-丁二醇是D-(-)-2,3-丁二醇。(S,S)-2,3-丁二醇是L-(+)-2,3-丁二醇。(R)-乙偶姻是D-乙偶姻。(S)-乙偶姻是L-乙偶姻。

[0132] 微生物

[0133] 如本文中之前所论述,本发明提供一种重组微生物,其能够通过发酵包含CO的底物来产生MEK和/或2-丁醇和任选的一种或多种其它产物。

[0134] 在一个具体实施方案中,微生物被改造以用于表达作为其来源的亲本微生物中不存在的MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的一种或多种酶(或其一个或多个亚基)。在另一个实施方案中,微生物被改造以用于过表达亲本微生物中存在的MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的一种或多种酶(或其一个或多个亚基)。在一个实施方案中,微生物被改造以用于表

达亲本微生物中不存在的MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的一种或多种酶(或其一个或多个亚基),并且过表达亲本微生物中存在的MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的一种或多种酶(或其一个或多个亚基)。在一个实施方案中,微生物被改造以用于降低或基本上消除亲本微生物中存在的一种或多种酶的活性。在一个实施方案中,所述一种或多种酶是MEK和/或2-丁醇生物合成途径的一部分。应了解,在本发明中可使用破坏一种或多种酶的活性、过表达一种或多种酶以及引入一种或多种酶的组合。

[0135] 在一个实施方案中,微生物被改造以用于表达或过表达以下中的一种或多种:

[0136] 催化(R)-乙偶姻转化成(R,S)-2,3-丁二醇的酶;

[0137] 催化(R,S)-2,3-丁二醇转化成MEK的酶;以及

[0138] 催化MEK转化成2-丁醇的酶。

[0139] 在一个实施方案中,催化(R)-乙偶姻转化成(R,S)-2,3-丁二醇的酶是(S)-2,3-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.B20或EC1.1.1.76)或其功能上等效的变体。在一个实施方案中,催化(R,S)-2,3-丁二醇转化成MEK的酶是二醇/甘油脱水酶(EC 4.2.1.28/4.2.1.30)或其功能上等效的变体。在一个实施方案中,催化MEK转化成2-丁醇的酶是醇脱氢酶(EC 1.1.1.2)或其功能上等效的变体。

[0140] 在一个实施方案中,微生物能够通过发酵包含C0的底物来产生2-丁醇,并且被改造以用于表达或过表达2-丁醇生物合成途径中选自以下的一种或多种酶:

[0141] (S)-2,3-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.B20或EC1.1.1.76);

[0142] 二醇/甘油脱水酶(EC 4.2.1.28/4.2.1.30);

[0143] 醇脱氢酶(EC 1.1.1.2);以及

[0144] 其中任何一种或多种的功能上等效的变体。

[0145] 在一个实施方案中,亲本微生物缺乏(S)-2,3-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.B20或EC1.1.1.76)和二醇/甘油脱水酶(EC 4.2.1.28/4.2.1.30)或其任何一种或多种的功能上等效的变体,并且重组微生物被改造以用于表达这两种酶。

[0146] 在一个实施方案中,亲本微生物包含(R)-2,3-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.4)或其功能上等效的变体,并且重组微生物被改造以用于降低或基本上消除该酶的活性。

[0147] 在一个实施方案中,微生物能够通过发酵包含C0的底物来产生MEK,并且被改造以用于表达或过表达MEK生物合成途径中选自以下的一种或多种酶:

[0148] (S)-2,3-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.B20或EC1.1.1.76);

[0149] 二醇/甘油脱水酶(EC 4.2.1.28/4.2.1.30);以及

[0150] 其中任何一种或多种的功能上等效的变体。

[0151] 在一个实施方案中,亲本微生物缺乏(S)-2,3-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.B20或EC1.1.1.76)和二醇/甘油脱水酶(EC 4.2.1.28/4.2.1.30)或其中任何一种或多种的功能上等效的变体,并且重组微生物被改造以用于表达这两种酶。

[0152] 在一个实施方案中,亲本微生物包含醇脱氢酶(EC 1.1.1.2)或其功能上等效的变体,并且重组微生物被改造以用于降低或基本上消除这种酶的活性。

[0153] 在一个实施方案中,亲本微生物包含(R)-2,3-丁二醇脱氢酶(EC 1.1.1.4)或其功能上等效的变体,并且重组微生物被改造以用于降低或基本上消除这种酶的活性。

[0154] 微生物可以通过任何数目的重组方法被改造为用于表达或过表达所述一种或多

种酶(或其一个或多个亚基),所述重组方法包括例如增加微生物内天然基因的表达(例如通过引入强启动子或组成型启动子以驱动基因表达)、通过引入编码并且被改造为用于表达具体酶的外源性核酸来增加编码所述酶的基因的拷贝数,引入编码并且被改造为用于表达亲本微生物内不存在的酶的外源性核酸。

[0155] 在某些实施方案中,亲本微生物可以经转化以提供增加或过表达亲本微生物中天然的(包括天然存在或先前经转化而存在的)一种或多种基因和引入一种或多种对亲本微生物来说非天然的基因的组合。举例来说,编码MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的一种或多种酶的一种或多种基因对于亲本微生物来说可以是天然的,但其可能不包括编码所述途径中一种或多种其它酶的一种或多种其它基因。微生物可例如经工程改造以过表达天然醇脱氢酶并且引入编码用于将(R)-乙偶姻转化成(R,S)-2,3-丁二醇以及将(R,S)-2,3-丁二醇转化成MEK的一种或两种酶的一种或多种核酸。本领域技术人员将理解可用于本发明中的各种其它组合。

[0156] 在另一个实施方案中,本发明的微生物可以通过引入遗传修饰来从其亲本微生物进一步修饰,所述遗传修饰会降低或基本上消除醇脱氢酶和(R)-2,3-丁二醇脱氢酶中的一种或两种的活性。当产生MEK是优选的时,降低两种酶活性是优选的。当产生2-丁醇是优选的时,仅降低(R)-2,3-丁二醇脱氢酶活性。降低或基本上消除(R)-2,3-丁二醇脱氢酶的活性不是必需的,但在一个实施方案中其是优选的。

[0157] 仅作为实例,(S)-2,3-丁二醇脱氢酶的示例性氨基酸和核酸序列信息以来自肺炎克雷伯氏菌的H6VRF2和AFB82681.1的形式提供。

[0158] 仅作为实例,二醇/甘油脱水酶的示例性氨基酸和核酸序列信息在以下表1和2中提供。在某些情况下,二醇/甘油脱水酶是维生素B12依赖性的,且在其它情况中其是B12非依赖性的。一些二醇/甘油脱水酶在催化所述反应之后可能会失活,且需要可以通过补充辅因子而再活化所述酶的活化蛋白。在某些实施方案中,二醇/甘油脱水酶包含三个亚基(α 、 β 和 γ)。

[0159] 表1:

B12 非依赖性二醇脱水酶		
生物	脱水酶	活化蛋白
丁酸梭菌	ZP_02948838	ZP_02948836
	NZ_ABDT01000049.2:116638..119001	NZ_ABDT01000049.2:115696..116610
梭菌属种	AAY34226	ACF15539
	DQ901409.5:2754..3668	AY968605.2:2383..3297
<i>Clostridium diolis</i>	ACI39933	ACI39932
	FJ214109.1:<1..1920	FJ214109.1:1947..>2049
<i>Roseburia inulinivorans</i>	ZP_03753304	ZP_03753303
	NZ_ACFY01000062.1:43115..45646	NZ_ACFY01000062.1:45606..46457

[0161] 表2:

[0162]

B12 依赖性二醇脱水酶			
生物	α	β	γ
产酸克雷伯氏菌	1DIO_ABAA08099.1 GI:868006	1DIO_BBAA08100.1 GI:868007	1DIO_GBAA08101.1 GI:868008
肠道沙门氏菌	NP_460985 GI:16765370	NP_460986 GI:16765371	NP_460987 GI:16765372
克氏柠檬酸杆菌	YP_001452384 GI:157145065	YP_001452383 GI:157145064	YP_001452382 GI:157145063
肺炎克雷伯氏菌	YP_002236782 GI:206575748	YP_002236781 GI:206575747	YP_002236780 GI:206575746
大肠杆菌	YP_001463342 GI:157157290	YP_001463343 GI:157157291	YP_001463344 GI:157157292

[0163] 仅作为实例,醇脱氢酶的示例性氨基酸和核酸序列信息以P25984.2和P14941以及AF157307.2和X6484的形式提供。又例如,可使用如PCT/NZ2012/000022中所描述的醇脱氢酶。

[0164] 以上各种酶的序列信息的参考是GenBank和/或NCBI数据库参考。使用这些参考号可容易地在线获得所述序列信息。

[0165] 用于本发明的微生物中的酶(和编码其的任何相应基因)可以来源于任何适当来源,包括不同的细菌属和种或其它生物体。然而,在一个实施方案中,(S)-2,3-丁二醇脱氢酶是来源于肺炎克雷伯氏菌、产气肠杆菌(*Enterobacter aerogenes*)或多粘类芽孢杆菌(*Paenibacillus polymyxa*)的(S)-2,3-丁二醇脱氢酶。在一个实施方案中,(S)-2,3-丁二醇脱氢酶具有以上示例的氨基酸序列,或是其功能上等效的变体。在一个实施方案中,二醇/甘油脱水酶是来自产酸克雷伯氏菌的二醇脱水酶。在一个实施方案中,二醇/甘油脱水酶具有之前本文中示例的氨基酸序列,或是其功能上等效的变体。在一个实施方案中,醇脱氢酶来自自产乙醇梭菌。在一个实施方案中,醇脱氢酶具有之前本文中示例的氨基酸序列,或是其功能上等效的变体。

[0166] 在本发明中,(R)-2,3-丁二醇脱氢酶的活性被任选地降低或基本上消除。在这种情况下,所述基因和酶是亲本微生物中所含有的那些。这种酶的示例性序列信息包括来自自产乙醇梭菌的AEI90715和HQ876009,来自扬氏梭菌的YP_003780482.1和GI:300855498,以及来自拉氏梭菌的AEI90716和HQ876010。

[0167] 在一个实施方案中,微生物包含一种或多种外源性核酸,其被改造以用于增加亲本微生物中存在的一种或多种核酸的表达,且所述一种或多种核酸编码之前本文中提及的一种或多种酶(或其一个或多个亚基)。在一个实施方案中,所述一种或多种被改造以用于增加表达的外源性核酸是调节元件。在一个实施方案中,调节元件是启动子。在一个实施方案中,启动子是组成型启动子,其在适当发酵条件下优选地具有高度活性。还可使用诱导型启动子。在优选实施方案中,启动子是选自Wood-Ljungdahl基因簇或磷酸转乙酰酶/乙酸激酶操纵子启动子。本领域技术人员应了解可在适当发酵条件下指导表达、优选地高水平表达的其它启动子可有效作为示例性实施方案的替代方案。

[0168] 在一个实施方案中,微生物包含一种或多种外源性核酸,其编码且被改造以用于表达亲本微生物中不存在的之前本文中提及的一种或多种酶(或其一个或多个亚基)。在一个实施方案中,微生物包含一种或多种外源性核酸,其编码且被改造以用于表达所述酶中的至少两者或三者(或其一个或多个亚基)。

[0169] 在一个具体实施方案中,微生物能够产生2-丁醇,且包含一种或多种外源性核酸,所述一种或多种外源性核酸编码(S)-2,3-丁二醇脱氢酶和二醇/甘油脱水酶之一或优选地两者或其中任何一种或多种的功能上等价的变体。二醇/甘油脱水酶可以包含3个亚基,且每一亚基由不同基因编码。这些基因可以组合在单一核酸中或共同编码整个酶的两个或更多个核酸中。另外,具体的亲本微生物可以含有这些亚基中的仅一个、两个或三个的基因。因此,本发明涵盖使用一种或多种外源性核酸来改造微生物以仅表达所述亚基中的一个或两个。在一个实施方案中,微生物还包含被改造以用于增加亲本微生物中存在的醇脱氢酶的表达的一种或多种核酸。

[0170] 在一个具体实施方案中,微生物能够产生MEK,且包含一种或多种外源性核酸,所述一种或多种外源性核酸编码(S)-2,3-丁二醇脱氢酶和二醇/甘油脱水酶之一或优选地两者或其中任何一种或多种的功能上等价的变体。二醇/甘油脱水酶可以包含3个亚基,且每一亚基由不同基因编码。这些基因可以组合在单一核酸中或共同编码整个酶的两个或更多个核酸中。另外,具体的亲本微生物可以含有这些亚基中的仅一个、两个或三个的基因。因此,本发明涵盖使用一种或多种外源性核酸来改造微生物以仅表达所述亚基中的一个或两个。在一个实施方案中,微生物还包含被改造以用于降低或基本上消除亲本微生物中MEK到2-丁醇的转化的一种或多种核酸或遗传修饰。在一个实施方案中,微生物包含被改造以用于降低或基本上消除亲本微生物中存在的醇脱氢酶的活性的一种或多种核酸或遗传修饰。

[0171] 在一个实施方案中,(S)-2,3-丁二醇脱氢酶是由包含如本文中之前示例的序列或其功能上等价的变体的核酸编码。在一个实施方案中,二醇/甘油脱水酶是由包含如本文中之前示例的或其中任何一种或多种的功能上等价的变体的一种或多种核酸编码。在一个实施方案中,醇脱氢酶是由包含如本文中之前示例的或其中任何一种或多种的功能上等价的变体的一种或多种核酸编码。或者,酶可以由如可公开获得的数据库(例如之前本文中所列的数据库)中所描述的核酸序列编码。

[0172] 在一个实施方案中,当微生物能够产生MEK和2-丁醇之一或两者时,其任选地被改造以用于降低或基本上消除亲本微生物中(R)-乙偶姻到(R,R)-2,3-丁二醇的转化。在一个实施方案中,微生物包含被改造以用于降低或基本上消除亲本微生物中存在的(R)-2,3-丁二醇脱氢酶的活性的一种或多种核酸或遗传修饰。

[0173] 微生物可以包含一种或多种外源性核酸。当需要用两种或更多种遗传元件(如基因或调节元件(例如启动子))转化亲本微生物时,其可包含在一种或多种外源性核酸上。

[0174] 在一个实施方案中,所述一种或多种外源性核酸是核酸构建体或载体,在一个具体实施例中是质粒,其编码呈任何组合形式的上文提及的一种或多种酶。

[0175] 外源性核酸可以在转化亲本微生物之后保持在染色体外或可以整合到亲本微生物的基因组中。因此,其可包括其它核苷酸序列,所述其它核苷酸序列被改造以用于帮助整合(例如允许同源重组和靶向整合到宿主基因组中的区域)或表达和复制染色体外构建体(例如复制起点、启动子和其它调节元件或序列)。

[0176] 作为一般性实例,在将遗传因修饰引入到基因中或者破坏或敲除基因或蛋白质的情况下,可以设计适当的核酸构建体或载体以整合到亲本微生物的基因组中以破坏基因。所述构建体通常包括与待破坏的基因之内或侧翼的区域同源的核酸序列(臂),其允许发生同源重组,以及发生突变引入、从基因切除核酸区域或相反用核酸置换基因区域。虽然优选

的是构建体上的臂与其所靶向的基因组中的区域100%互补,但这并不是必需的,条件是序列的互补性足以允许与目的基因区的靶向重组。通常,所述臂将具有一定的同源性水平,其允许在严格条件(如Sambrook et al 1989所定义的)下与靶区域杂交。

[0177] 考虑到本文中提及的酶(尤其醇脱氢酶和(R)-2,3-丁二醇脱氢酶)的可获得的序列信息,本领域的技术人员将理解足以允许外源性核酸靶向同源重组和整合到亲本微生物的基因组中的核酸序列。

[0178] 在一个实施方案中,编码如本文中之前提及的一种或酶(或其一个或多个亚基)的外源性核酸将进一步包含启动子,所述启动子被改造为用于促进由所述外源性核酸编码的一种或多种酶的表达。在一个实施方案中,启动子是组成型启动子,其在适当发酵条件下优选地具有高度活性。还可使用诱导型启动子。在优选实施方案中,启动子是选自Wood-Ljungdahl基因簇或磷酸转乙酰酶/乙酸激酶启动子。本领域技术人员应了解可在适当发酵条件下指导表达、优选地高水平表达的其它启动子将有效作为示例实施方案的替代方案。

[0179] 在一个实施方案中,外源性核酸是表达质粒。

[0180] 在一个实施方案中,亲本微生物选自一氧化碳营养型产乙酸细菌。在某些实施方案中,微生物是选自:自产乙醇梭菌、扬氏梭菌、拉氏梭菌、食一氧化碳梭菌、德氏梭菌、粪味梭菌、乙酸梭菌、甲酸乙酸梭菌、大梭菌、甲基营养丁酸杆菌、伍氏乙酸杆菌、巴氏嗜碱菌、*Blautia producta*、淤泥真杆菌、热醋穆尔氏菌、热自养穆尔氏菌、卵形鼠孢菌、*Sporomusa silvacetica*、类球鼠孢菌、普氏产醋杆菌和凯伍热厌氧菌。

[0181] 在一个具体实施方案中,亲本微生物选自产乙醇、产乙酸梭菌属的簇,其包含以下菌种:自产乙醇梭菌、扬氏梭菌和拉氏梭菌以及相关分离株。这些包括但不限于菌株自产乙醇梭菌 JAI-1^T (DSM10061) [Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: *Clostridium autoethanogenum*, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch Microbiol 1994, 4:345-351]、自产乙醇梭菌 LBS1560 (DSM19630) [Simpson SD, Forster RL, Tran PT, Rowe MJ, Warner IL: Novel bacteria and methods thereof. 国际专利2009, WO/2009/064200]、自产乙醇梭菌 LBS1561 (DSM23693)、扬氏梭菌 PETC^T (DSM13528=ATCC 55383) [Tanner RS, Miller LM, Yang D: *Clostridium ljungdahlii* sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. Int J Syst Bacteriol 1993, 43:232-236]、扬氏梭菌 ERI-2 (ATCC 55380) [Gaddy JL: *Clostridium* stain which produces acetic acid from waste gases. 美国专利1997, 5, 593, 886]、扬氏梭菌 C-01 (ATCC 55988) [Gaddy JL, Clausen EC, Ko C-W: Microbial process for the preparation of acetic acid as well as solvent for its extraction from the fermentation broth. 美国专利, 2002, 6, 368, 819]、扬氏梭菌 0-52 (ATCC 55989) [Gaddy JL, Clausen EC, Ko C-W: Microbial process for the preparation of acetic acid as well as solvent for its extraction from the fermentation broth. 美国专利, 2002, 6, 368, 819]、拉氏梭菌 P11^T (ATCC BAA-622) [Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. 国际专利2008, WO 2008/028055]、相关的分离株如“*Clostridium coskatii*” [Zahn et al: Novel ethanologenic species *Clostridium coskatii* (美国专利申请号US20110229947)] 和“梭菌属种” (Tyurin et al., 2012, J. Biotech Res. 4:1-12), or mutated strains such as

C.ljungdahlii OTA-1 (Tirado-Acevedo O. Production of Bioethanol from Synthesis Gas Using Clostridium ljungdahlii. PhD thesis, North Carolina State University, 2010)。这些菌株在梭菌rRNA簇I内形成亚簇,并且其16SrRNA基因具有超过99%的同一性,具有类似的约30%的低GC含量。然而,DNA-DNA重新组合(reassociation)和DNA指纹识别实验表明,这些菌株属于不同种[Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. 国际专利2008, WO 2008/028055]。

[0182] 这一簇中的所有种具有类似形态和大小(对数生长的细胞在 $0.5-0.7 \times 3-5 \mu\text{m}$ 之间),是嗜温的(最适生长温度在 30°C 到 37°C 之间)严格厌氧生物[Tanner RS, Miller LM, Yang D: Clostridium ljungdahlii sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. Int J Syst Bacteriol 1993, 43:232-236; Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: Clostridium autoethanogenum, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch Microbiol 1994, 4:345-351; Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. 国际专利2008, WO 2008/028055]。此外,其全部具有相同的主要系统发生特性,如相同的pH范围(pH4-7.5,且最适初始pH为5.5-6),以类似生长速率依靠含CO的气体进行强的自养生长,以及具有以乙醇和乙酸作为主要发酵终产物并且在某些条件下形成的少量2,3-丁二醇和乳酸的类似代谢谱[Tanner RS, Miller LM, Yang D: Clostridium ljungdahlii sp. nov., an Acetogenic Species in Clostridial rRNA Homology Group I. Int J Syst Bacteriol 1993, 43:232-236; Abrini J, Naveau H, Nyns E-J: Clostridium autoethanogenum, sp. nov., an anaerobic bacterium that produces ethanol from carbon monoxide. Arch Microbiol 1994, 4:345-351; Huhnke RL, Lewis RS, Tanner RS: Isolation and Characterization of novel Clostridial Species. 国际专利2008, WO 2008/028055]。在所有三个种中也观察到吡嗪产生。然而,所述种之间的区别在于对不同糖(例如鼠李糖、阿拉伯糖)、酸(例如葡糖酸、柠檬酸)、氨基酸(例如精氨酸、组氨酸)或其它底物(例如甜菜碱、丁醇)的底物利用。此外,发现所述种中的一些对某些维生素(例如硫胺素、生物素)是营养缺陷型的,而其它则不是。

[0183] 在一个实施方案中,亲本菌株使用CO作为其唯一的碳源和能量来源。

[0184] 在一个实施方案中,亲本微生物是自产乙醇梭菌或扬氏梭菌。在一个具体实施方案中,微生物是自产乙醇梭菌DSM23693。在另一个具体实施方案中,微生物是扬氏梭菌DSM13528(或ATCC55383)。

[0185] 在一个实施方案中,亲本微生物缺乏以下中的一种或多种的活性:

[0186] 催化(R)-乙偶姻转化成(R,S)-2,3-丁二醇的酶;

[0187] 催化(R,S)-2,3-丁二醇转化成MEK的酶;以及

[0188] 催化MEK转化成2-丁醇的酶。

[0189] 在一个实施方案中,亲本微生物缺乏一种或多种编码以下中的一种或多种的基因:

[0190] 催化(R)-乙偶(R,S)-2,3-丁二醇的酶;

[0191] 催化(R,S)-2,3-丁二醇转化成MEK的酶;以及

[0192] 催化MEK转化成2-丁醇的酶。

[0193] 在一个实施方案中,亲本微生物缺乏编码(S)-2,3-丁二醇脱氢酶、二醇/甘油脱水酶和/或醇脱氢酶以及其中任何一种或多种的功能上等效的变体的一种或多种基因。

[0194] 在一个实施方案中,亲本微生物包含编码(R)-2,3-丁二醇脱氢酶、醇脱氢酶和/或其中任何一种或多种的功能上等效的变体的一种或多种基因。

[0195] 在一个实施方案中,亲本微生物包含编码(R)-2,3-丁二醇脱氢酶、醇脱氢酶和/或其中任何一种或多种的功能上等效的变体的一种或多种基因,并且缺乏编码(S)-2,3-丁二醇脱氢酶、二醇/甘油脱水酶和/或其中任何一种或多种的功能上等效的变体的一种或多种基因。

[0196] 核酸

[0197] 本发明还提供用于产生本发明的重组微生物的核酸和核酸构建体。

[0198] 在一个实施方案中,核酸包含编码MEK和/或2-丁醇生物合成途径中的一种或多种酶(或其一个或多个亚基)的一种或多种序列,当在微生物中表达时其允许所述微生物通过发酵包含C0的底物来产生MEK和/或2-丁醇。在一个具体实施方案中,本发明提供编码两种或更多种酶(或其一个或多个亚基)的核酸,当在微生物中表达时其允许所述微生物通过发酵包含C0的底物来产生MEK和/或2-丁醇。在另一个实施方案中,本发明提供编码所述酶中的三者的核酸。

[0199] 在一个具体实施方案中,酶选自本文中之前所述的那些酶。

[0200] 在一个实施方案中,本发明的核酸包含以任何次序编码(S)-2,3-丁二醇脱氢酶和二醇/甘油脱水酶和/或其中任何一种或多种的功能上等效的变体的一种或多种核酸序列。在一个实施方案中,核酸进一步包括编码醇脱氢酶的一种或多种核酸序列。

[0201] 本文提供了编码上述酶中的每一种的示例性氨基酸序列和核酸序列,或者其可从上文提及的GenBank获得。然而,考虑到本文中、GenBank中和其它数据库中含有的信息和遗传密码,本领域技术人员将容易地理解编码所述酶或其功能上等效的变体的替代核酸序列。

[0202] 在一个实施方案中,编码(S)-2,3-丁二醇脱氢酶的核酸序列具有如本文中之前所述的序列或是其功能上等效的变体。

[0203] 在一个实施方案中,编码二醇/甘油脱水酶的核酸序列具有如本文中之前所述的序列或是其功能上等效的变体。

[0204] 在一个实施方案中,编码醇脱氢酶的核酸序列具有如本文中之前所述的序列或是其功能上等效的变体。

[0205] 在一个实施方案中,本发明的核酸将进一步包含启动子。在一个实施方案中,所述启动子允许基因在其控制下的组成型表达。然而,也可采用诱导型启动子。本领域技术人员将容易地理解用于本发明中的启动子。优选地,所述启动子可以在适当发酵条件下指导高表达水平。在一个具体实施例中,使用Wood-Ljungdahl簇启动子。在另一个实施方案中,使用磷酸转乙酰酶/乙酸激酶启动子。在另一个实施方案中,丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶启动子、Rnf复合体操纵子启动子或ATP合酶操纵子启动子。在一个具体实施方案中,启动子来自自产乙醇梭菌。

[0206] 本发明的核酸可以在转化亲本微生物之后保持在染色体外或可以被改造以用于整合到微生物的基因组中。因此,本发明的核酸可包括其它核苷酸序列,所述其它核酸序列

被改造以用于帮助整合(例如允许同源重组和靶向整合到宿主基因组中的区域)或稳定表达和复制染色体外构建体(例如复制起点、启动子和其它调节序列)。

[0207] 在一个实施方案中,核酸是核酸构建体或载体。在一个具体实施例中,所述核酸构建体或载体是表达构建体或载体,但是本发明涵盖其它构建体和载体,如用于克隆的那些。在一个具体实施方案中,表达构建体或载体是质粒。

[0208] 应了解,本发明的表达构建体/载体除了含有启动子之外还可以含有任何数目的调节元件以及如果需要的话,适用于表达其它蛋白质的其它基因。在一个实施方案中,表达构建体/载体包括一个启动子。在另一个实施方案中,表达构建体/载体包括两个或更多个启动子。在一个具体实施方案中,表达构建体/载体针对每一个待表达的基因包括一个启动子。在一个实施方案中,表达构建体/载体包括一个或多个核糖体结合位点,优选地是针对每一个待表达的基因包括一个核糖体结合位点。

[0209] 本领域的技术人员应了解,本文中所述的核酸序列和构建体/载体序列可以含有标准接头核苷酸,例如核糖体结合位点和/或限制性位点所需的那些。所述接头序列不应被解释为必需的并且不产生对所定义的序列的限制。

[0210] 本发明的核酸和核酸构建体(包括表达构建体/载体)可以使用本领域中任何数目的标准技术构建。举例来说,可使用化学合成或重组技术。所述技术例如记载于Sambrook et al (Molecular Cloning:A laboratory manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,NY,1989)。其它示例性技术记载于下文实施例部分。基本上,各个基因和调节元件将彼此可操作地连接使得所述基因可以表达以形成所需蛋白质。本领域技术人员将了解适用于本发明的载体。然而,例如,以下载体可以是适合的:pMTL80000载体、pIMP1、pJIR750和下文实施例部分中示例的质粒。

[0211] 应了解,本发明的核酸可以呈任何适当形式,包括RNA、DNA或cDNA。

[0212] 本发明还提供宿主生物,尤其是微生物,并且包括病毒、细菌和酵母,其包含本文中所述的核酸中的任何一种或多种。

[0213] 所述一种或多种外源性核酸可以裸核酸形式递送到亲本微生物中,或可用一种或多种促进转化过程的试剂配制(例如脂质体缀合的核酸、其中含有所述核酸的生物)。所述一种或多种核酸适当时可可为DNA、RNA或其组合。限制性抑制剂可用于某些实施方案;参见例如Murray,N.E.et al. (2000) Microbial.Molec.Biol.Rev.64,412.)。

[0214] 本发明的微生物可以使用任何数目的本领域中已知用于产生重组微生物的技术从亲本微生物和一种或多种外源性核酸制备。仅作为实例,转化(包括转导或转染)可以通过电穿孔、超声、聚乙二醇介导的转化、原生质体转化、化学或天然感受态、原噬菌体诱导或接合来实现。适合的转化技术记载于例如Sambrook J,Fritsch EF,Maniatis T:Molecular Cloning:A laboratory Manual,Cold Spring Harbour Labrotary Press,Cold Spring Harbour,1989。

[0215] 已经记载了电穿孔用于一些一氧化碳营养型产乙酸菌,如扬氏梭菌(Köpke et al.2010,Poc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.107:13087-92;PCT/NZ2011/000203;W02012/053905)、自产乙醇梭菌(PCT/NZ2011/000203;W02012/053905)或伍氏乙酸杆菌(Straetz et al.,1994,Appl.Environ.Microbiol.60:1033-37),并且是用于许多梭菌属的标准方法,所述梭菌属例如丙酮丁醇梭菌(*C.acetobutylicum*) (Mermelstein et al.,1992,Biotechnology,

10,190-195)、解纤维素梭菌(*C.cellulolyticum*) (Jennert et al.,2000,Microbiology, 146:3071-3080) 或热纤梭菌(*C.thermocellum*) (Tyurin et al.,2004, Appl.Environ.Microbiol.70:883-890)。已证实原噬菌体诱导用于一氧化碳营养型产乙酸菌以及粪味梭菌的情况(Prasanna Tamarapu Parthasarathy,2010,Development of a Genetic Modification System in *Clostridium scatologenes* ATCC 25775for Generation of Mutants,Masters Project Western Kentucky University),同时已记载了接合作为选择用于许多梭菌的方法,所述梭菌包括艰难梭菌(*Clostridium difficile*) (Herbert et al.,2003,FEMS Microbiol.Lett.229:103-110) 或丙酮丁醇梭菌(Williams et al.,1990,J.Gen.Microbiol.136:819-826),并且可以类似方式用于一氧化碳营养型产乙酸菌。可使用大肠杆菌供体菌株,如具有质粒R702的大肠杆菌HB101(Williams et al., 1990,J.Gen.Microbiol.136:819-826)。

[0216] 在某些实施方案中,由于在待转化的微生物中存在有活性的限制性系统,有必要将待引入到微生物中的核酸甲基化。这可以使用各种技术进行,包括下文所述的那些。

[0217] 例如,在一个实施方案中,本发明的重组微生物通过包含以下步骤的方法产生:

[0218] 将(i)本文中所述的表达构建体/载体和(ii)包含甲基转移酶基因的甲基化构建体/载体中引入到穿梭微生物;

[0219] 表达甲基转移酶基因;

[0220] 从穿梭微生物分离一种或多种构建体/载体;以及

[0221] 将一种或多种构建体/载体引入到目标微生物中。

[0222] 在一个实施方案中,步骤B的甲基转移酶基因是组成型表达的。在另一个实施方案中,步骤B的甲基转移酶基因的表达是被诱导的。

[0223] 所述穿梭微生物是微生物,优选地是限制性阴性微生物,其有助于构成表达构建体/载体的核酸序列的甲基化。在一个具体实施方案中,所述穿梭微生物是限制性阴性大肠杆菌、枯草芽胞杆菌(*Bacillus subtilis*)或乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)。

[0224] 甲基化构建体/载体包含编码甲基转移酶的核酸序列。

[0225] 一旦所述表达构建体/载体和甲基化构建体/载体被引入到穿梭微生物中,存在于甲基化构建体/载体上的甲基转移酶基因即被诱导。诱导可以通过任何适合的启动子系统进行,但是在本发明的一个具体实施方案中,甲基化构建体/载体包含诱导型lac启动子并且是通过加入乳糖或其类似物、更优选地是异丙基- β -D-硫代-半乳糖苷(IPTG)来诱导的。其它适合的启动子包括ara、tet或T7系统。在本发明的另一个实施方案中,甲基化构建体/载体启动子是组成型启动子。

[0226] 在一个具体实施方案中,甲基化构建体/载体具有特异性针对穿梭微生物的种类(identity)的复制起点,使得存在于甲基化构建体/载体上的任何基因都在所述穿梭微生物中表达。优选地,表达构建体/载体具有特异性针对目标微生物的种类的复制起点,使得存在于表达构建体/载体上的任何基因都在目标微生物中表达。

[0227] 甲基转移酶的表达引起存在于表达构建体/载体上的基因的甲基化。然后可以根据多种已知方法中的任一种从穿梭微生物中分离所述表达构建体/载体。

[0228] 在一个具体实施方案中,构建体/载体两者同时被分离。

[0229] 表达构建体/载体可以使用任何数目的已知方法引入到目标微生物中。然而,例

如,可使用下文实施例部记载的方法。由于表达构建体/载体被甲基化,故存在于表达构建体/载体上的核酸序列能够被纳入到目标微生物中并且成功地表达。

[0230] 应当想到的是,甲基转移酶基因可以被引入到穿梭微生物中并被过表达。因此,在一个实施方案中,所得甲基转移酶可以使用已知方法收集并且用于体外甲基化表达质粒。表达构建体/载体可以接着被引入到目标微生物中用于表达。在另一个实施方案中,甲基转移酶基因被引入到穿梭微生物的基因组中,接着将表达构建体/载体引入到穿梭微生物中,从穿梭微生物中分离一种或多种构建体/载体,并且然后将所述表达构建体/载体引入到目标微生物中。

[0231] 应当想到的是,如上所定义的表达构建体/载体和甲基化构建体/载体可以被组合起来以提供物质的组合物(a composition of matter)。所述组合物在避开限制性屏障机制中具有特别效用,从而产生本发明的重组微生物。

[0232] 在一个具体实施方案中,表达构建体/载体和/或甲基化构建体/载体是质粒。

[0233] 本领域技术人员将了解多种适合的适用于产生本发明的微生物的甲基转移酶。然而,例如,可使用枯草芽胞杆菌噬菌体ΦT1甲基转移酶和下文实施例中描述的甲基转移酶。在一个实施方案中,甲基转移酶具有PCT/NZ2011/000203 (W02012/053905)中描述的甲基转移酶的氨基酸序列,或是其功能上等效的变体。考虑到所需甲基转移酶的序列和遗传密码,将容易地认识到编码适合的甲基转移酶的核酸。在一个实施方案中,编码甲基转移酶的核酸包含PCT/NZ2011/000203 (W02012/053905)中描述的甲基转移酶的序列,或是其功能上等效的变体。

[0234] 任何数目的被改造以用于允许表达甲基转移酶基因的构建体/载体可用于产生甲基化构建体/载体。

[0235] 产生方法

[0236] 本发明提供一种通过微生物发酵来产生MEK和/或2-丁醇和任选的一种或多种其它产物的方法,所述微生物发酵包括使用本发明的重组微生物发酵包含CO的底物。优选地,MEK和/或2-丁醇是主要发酵产物。本发明的方法可用于减少来自工业过程的总大气碳排放。

[0237] 优选地,发酵包括以下步骤:在生物反应器中使用本发明的重组微生物厌氧发酵底物以至少产生MEK和/或2-丁醇。

[0238] 在一个实施方案中,所述方法包含以下步骤:

[0239] (a) 向含有本发明的一种或多种微生物的培养物的生物反应器中提供包含CO的底物;和

[0240] (b) 在生物反应器中厌氧发酵培养物以至少产生MEK和/或2-丁醇。

[0241] 在一个实施方案中,所述方法包含以下步骤:

[0242] (a) 在由于工业过程产生的含CO的气体被释放到大气中之前捕获所述气体;

[0243] (b) 利用含有本发明的一种或多种微生物的培养物厌氧发酵所述含CO的气体以至少产生MEK和/或2-丁醇。

[0244] 在本发明的一个具体实施方案中,通过微生物发酵的气态底物是含有CO的气态底物。所述气态底物可以是作为工业过程的副产物获得的或来自一些其它来源如来自汽车废气的含CO的废气。在某些实施方案中,所述工业过程选自:铁金属产品制造(如钢厂)、非铁

产品制造、石油精炼过程、煤炭气化、电力生产、碳黑生产、氨生产、甲醇生产以及焦炭制造。在这些实施方案中,可以使用任何方便的方法在含CO的气体排到大气中之前将其从工业过程中捕获。CO可以是合成气(包含一氧化碳和氢气的气体)的组分。由工业过程产生的CO通常被燃烧掉以产生CO₂并且因此本发明在减少CO₂温室气体排放以及产生适用作生物燃料的丁醇方面特别有用。取决于含CO的气态底物的组成,也可能需要在将其引入到发酵之前对其进行处理以去除任何不需要的杂质,如尘粒。举例来说,气态底物可以使用已知方法过滤或洗涤。

[0245] 应了解,为了发生细菌生长以及气体到至少MEK和/或2-丁醇,除了含CO的底物气体之外,还将需要将适合的液体营养培养基进料到生物反应器中。底物和培养基可以连续、分批或分批补料方式进料到生物反应器中。营养培养基含有足以允许所用微生物生长的维生素和矿物质。适于发酵以使用CO产生一种或多种产物的厌氧培养基是本领域中已知的。举例来说,Biebel (2001) 描述了适合的培养基。在本发明的一个实施方案中,培养基是下文实施例部分中所记载的培养基。

[0246] 发酵应合乎需要地在发生气体到至少MEK和/或2-丁醇发酵的适当条件下进行。应考虑到的反应条件包括压力、温度、气体流速、液体流速、培养基pH、培养基氧化还原电势、搅拌速率(如果使用连续搅拌槽反应器)、接种物水平、确保液相中的CO不会变成限制性的最大气体底物浓度以及避免产物抑制的最大产物浓度。

[0247] 另外,通常需要增加底物流中的CO浓度(气态底物中的CO分压)并且由此增加其中CO是底物的发酵反应的效率。在增加的压力下操作允许CO从气相到液相的转移速率的显著增加,在液相中CO可以被微生物作为碳源摄取以便至少产生MEK和/或2-丁醇。这又意味着当将生物反应器保持在高压而非大气压下时可以缩短滞留时间(被定义为生物反应器中的液体体积除以输入气体流速)。最佳反应条件将部分取决于所用的本发明的具体微生物。然而,一般来说,优选的是发酵在比环境压力高的压力下进行。此外,由于给定的CO到至少MEK和/或2-丁醇的转化速率在某种程度上是底物滞留时间的函数,并且获得所需滞留时间又规定了生物反应器的所需体积,故使用加压系统可以大大减小所需生物反应器的体积,并且因此减少发酵设备的资金成本。根据美国专利第5,593,886号中给出的实例,反应器体积的减小可以与反应器操作压力的增加成线形比例,即,在10大气压的压力下操作的生物反应器仅需要是在1大气压的压力下操作的生物反应器的体积的十分之一。

[0248] 例如,已描述了在较高压力下进行气体到乙醇发酵的益处。举例来说,WO 02/08438描述了在30psig和75psig的压力下进行的气体到乙醇发酵,分别得到150克/升/天和369克/升/天的乙醇产率。然而,发现使用类似的培养基和输入气体组合物在大气压下进行的示例性发酵1/20到1/10的乙醇/升/天。

[0249] 还需要的是,含CO的气态底物的引入速率是例如使得确保液相中的CO浓度不会变成限制性的。这是因为CO限制性条件的后果可能是一种或多种产物被培养物所消耗。

[0250] 用于进料发酵反应的气流的组成可对所述反应的效率和/或成本具有显著影响。举例来说,O₂可以降低厌氧发酵过程的效率。在发酵之前或之后对发酵过程各阶段中非所需或非必要的气体的处理会增加这些阶段的负担(例如当在气流进入生物反应器之前将其压缩时,不必要的能量可能用于压缩在发酵中非所需的气体)。因此,可能需要处理底物流,尤其是来源于工业来源的底物流,从而去除非所需组分并且增加所需组分的浓度。

[0251] 在某些实施方案中,本发明的微生物的培养物被维持在水性培养基中。优选地,所述水性培养基是基本厌氧微生物生长培养基。适合的培养基是本领域中已知的,并且记载于例如美国专利第5,173,429号和第5,593,886号和WO 02/08438中,并且如下文实施例部分中所描述。

[0252] MEK和/或2-丁醇或者含有MEK和/或2-丁醇和/或一种或多种其它产物的混合流可通过本领域中已知的方法(如分馏或蒸发、渗透蒸发、气提和萃取发酵,包括例如液-液萃取)从发酵液中回收。又例如,用于萃取丁醇的方法记载于: Köpke&Dürre, 2011, Biochemical production of biobutanol, In: Handbook of biofuels production: processes and technologies (Eds.: Luque, Campelo&Clark), Woodhead Publishing Ltd, Camebridge, UK: 221-257中。

[0253] 在本发明的某些优选实施方案中,MEK和/或2-丁醇和一种或多种产物通过以下方式从发酵液中回收:从生物反应器中连续移出一部分发酵液,从发酵液中分离微生物细胞(通过过滤方便地进行),并且从发酵液中回收一种或多种产物。醇可以例如通过蒸馏方便地回收。丙酮可例如通过蒸馏回收。任何产生的酸可例如通过吸附于活性炭上来回收。优选地,将分离的微生物细胞送回到发酵生物反应器中。已移出任何醇和酸之后剩余的无细胞渗透物也优选地被送回到发酵生物反应器中。其它营养物(如B族维生素)可被加入到所述无细胞渗透物中以补充所述营养物培养基,随后将其送回到生物反应器中。

[0254] 此外,如果如上文所述调整发酵液的pH以增强乙酸对活性炭的吸附,那么在被送回至生物反应器中之前,pH应被重新调整到与发酵生物反应器中的培养液的pH类似的pH。

[0255] 实施例

[0256] 现将参考以下非限制性实例更详细地描述本发明。

[0257] 微生物

[0258] 自产乙醇梭菌DSM10061和DSM23693 (DSM10061的衍生物)以及扬氏梭菌DSM13528是获自DSMZ (德国微生物和细胞培养物保藏中心,德国不伦瑞克市因霍芬斯特拉斯7B 38124 (Inhoffenstraße 7B, 38124 Braunschweig, Germany))。生长是在37℃下使用严格厌氧条件和技术 (Hungate, 1969, Methods in Microbiology, vol. 3B. Academic Press, New York: 117-132; Wolfe, 1971, Adv. Microb. Physiol., 6: 107-146) 进行的。使用化学成分确定的无酵母提取物的PETC培养基(表1)和30psi含有一氧化碳的钢厂废气(从位于新西兰格伦布鲁 (Glenbrook, NZ) 的新西兰钢厂收集;组成: 44%CO、32%N₂、22%CO₂、2%H₂)作为唯一的碳源和能量来源。

[0259] 表3: PETC培养基

[0260]	培养基组分	浓度/ 1.0 L 培养基
	NH ₄ Cl	1 g
	KCl	0.1 g
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 g
	NaCl	0.8 g
	KH ₂ PO ₄	0.1 g

[0261]

CaCl ₂	0.02 g
微量金属溶液	10 ml
沃尔夫维生素溶液 (Wolfe's vitamin solution)	10 ml
刃天青 (2 g/L 储液)	0.5 ml
NaHCO ₃	2 g
还原剂	0.006-0.008% (v/v)
蒸馏水	补足到 1 L, pH 5.5 (用 HCl 调整)

[0262]

沃尔夫维生素溶液	每L储液
生物素	2mg
叶酸	2mg
盐酸吡哆醇	10mg
核黄素	5mg
烟酸	5mg
D- (+) -泛酸钙	5mg
维生素B12	0.1mg
对氨基苯甲酸	5mg
硫辛酸	5mg
硫胺素	5mg
蒸馏水	补足到1L

[0263]

微量金属溶液	每L储液
次氨基三乙酸	2g
MnSO ₄ ·H ₂ O	1g
Fe (SO ₄) ₂ (NH ₄) ₂ ·6H ₂ O	0.8g
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.2g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.2mg
CuCl ₂ ·2H ₂ O	0.02g
NaMoO ₄ ·2H ₂ O	0.02g
Na ₂ SeO ₃	0.02g
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.02g
Na ₂ WO ₄ ·2H ₂ O	0.02g
蒸馏水	补足到1L

[0264]

还原剂储液	每 100 mL 储液
-------	-------------

[0265]

NaOH	0.9 g
Cystein.HCl	4 g
Na ₂ S	4 g
蒸馏水	补足到 100 mL

[0266] 分析代谢物

[0267] 为了去除蛋白质和其它细胞残余物,将400 μ l样品与100 μ l 2% (w/v) 5-磺基水杨酸混合,并且在14,000 \times g下离心3分钟以分离沉淀的残余物。接着将10 μ l上清液注射到HPLC中以便进行分析。2,3-丁二醇、2-丁醇和其它代谢物的HPLC分析是使用配备有在35 $^{\circ}$ C下操作的RID(折光率检测器)和保持在35 $^{\circ}$ C下的Aminex HPX-87H柱(300 \times 7.8mm,粒径9 μ m)的Agilent 1100系列HPLC系统进行。将略微酸化的水(0.005M H₂SO₄)用作流速为0.6ml/min的流动相。为了区分2,3-丁二醇立体异构体,使用配备有在35 $^{\circ}$ C下操作的RID(折光率检测器)和保持在60 $^{\circ}$ C下的Alltech IOA-2000有机酸柱(150 \times 6.5mm,粒径8 μ m)的Agilent 1100系列HPLC系统进行HPLC分析。将略微酸化的水(0.005M H₂SO₄)用作流速为0.25ml/min的流动相。

[0268] 在自产乙醇梭菌中利用醇脱氢酶将MEK转化成2-丁醇

[0269] 在一氧化碳营养型自产乙醇梭菌的基因组中鉴别出能够将MEK转化成2-丁醇的醇脱氢酶(Adh;EC 1.1.1.2)(记载在PCT/NZ2012/000022中)。该酶与记载的将MEK转化成2-丁醇的来自拜氏梭菌(*C.beijerinckii*)的醇脱氢酶具有同源性(Ismail et al., J.Bacteriol,1993,175:5079-5105)。

[0270] 为了证实这种活性,在具有PETC培养基(表1)和作为唯一的碳源和能量来源的钢厂废气(从位于新西兰格伦布鲁的新西兰钢厂收集;组成:44%CO、32%N₂、22%CO₂、2%H₂)的50mL血清瓶中对一氧化碳营养型产乙酸菌自产乙醇梭菌、扬氏梭菌和拉氏梭菌进行生长实验。在对数生长期,将5g/L MEK加入到所述培养物中。在生长结束时,无MEK剩余,但检测到等量的2-丁醇(表4)。根据Ismail et al.(J.Bacteriol,1993,175:5079-5105)使用自产乙醇梭菌的粗提取物进行酶测定,并且可使用MEK作为底物以及NADPH作为辅因子成功地检测到活性。

[0271] 表4:通过一氧化碳营养型产乙酸菌自产乙醇梭菌、扬氏梭菌、拉氏梭菌将MEK转化成2-丁醇

[0272]		所加入的 MEK	在生长结束时的 MEK	在生长结束时的 2-丁醇
	自产乙醇梭菌	5.0 g/L	0.1 g/L	5.0 g/L
[0273]	扬氏梭菌	5.1 g/L	0.1 g/L	4.8 g/L
	拉氏梭菌	5.3 g/L	0.3 g/L	4.4 g/L

[0274] 作为活性的进一步证明,将所述醇脱氢酶基因克隆到表达载体中,在大肠杆菌中过度产生并且测量将MEK转化成2-丁醇的活性。

[0275] 从基因组DNA中扩增所述基因并且经由KpnI和HindIII使用以下方案将其克隆到pBAD载体中。使用KpnI-HF和HindIII以类似方法消化扩增的ADH基因并且将其通过电穿孔将其转化到大肠杆菌MC1061细胞中。通过DNA测序来验证ADH基因的序列。将转化的细胞在37 $^{\circ}$ C下培养在具有氨苄青霉素的100mL LB中,直到OD₆₀₀达到0.8。此时,加入1mL 20%阿拉伯糖,并且将所得培养物在28 $^{\circ}$ C下孵育以便进行其余的表达。将细胞沉淀,并且倒出上清液。接着再将沉淀重悬在HEPES缓冲液(50mM Na-HEPES和0.2mM DTT,pH 8.0)中,加入各自0.2 μ L的Benzonase(Merck,25单位/微升)和rLysozyme(Merck,30kU/ μ L)。接着经由融合的N端His₆tag使用固定化金属亲和色谱纯化醇脱氢酶。将细胞在冰上孵育30分钟后,通过超声处理来裂解细胞,将不溶性碎片沉淀,并且使用0.2微米过滤器使上清液澄清。将澄清的上清液加入到已用裂解缓冲液彻底洗涤的Talon树脂(Clontech)中。500 μ L床体积用于纯化,

并且允许蛋白质在4℃下结合于Talon树脂一小时,并且接着用裂解缓冲液洗涤数次。使用补充有150mM咪唑的裂解缓冲液从所述柱洗脱蛋白质,并且将洗脱物收集在500μL洗脱份中。将整个纯化过程的各个阶段获取的等分试样以及所有洗脱级分在SDS PAGE凝胶上进行电泳,以证实蛋白质的存在并且确定纯化成功。使用Amicon Ultra-4离心过滤器装置(Millipore)将蛋白质交换到储存缓冲液(50mM磷酸钾、150mM NaCl、10%v/v甘油,pH 7.0)中。蛋白质当在大肠杆菌中表达时是高度可溶的,并且可易于纯化。使用浓度为0.2mM的NADPH作为辅因子以及3mM MEK作为底物在具有石英杯的UV/vis分光光度计中进行活性测定。所述测定混合物含有50mM Tris-HCl缓冲液(pH 7.5),具有1mM DTT。醇脱氢酶在以MEK作为底物的情况下展示出活性, K_{cat} 为 $44 \pm 2 \text{ sec}^{-1}$, K_M 为 $1.2 \pm 0.1 \text{ mM}$,并且所得 K_{cat}/K_M 为 $3.8 \times 10^4 \text{ sec}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 。

[0276] 使用来自产酸克雷伯氏菌的二醇脱水酶基因(pddABC)构建梭菌表达质粒

[0277] 使用标准重组DNA和分子克隆技术[Sambrook J,Fritsch EF,Maniatis T: Molecular Cloning:A laboratory Manual,Cold Spring Harbour Labrotary Press, Cold Spring Harbour,1989;Ausubel FM,Brent R,Kingston RE,Moore DD,Seidman JG, Smith JA,Struhl K:Current protocols in molecular biology.John Wiley&Sons, Ltd.,Hoboken,1987]。

[0278] 使用引物Ppta-ack-NotI-F (SEQ ID NO:2:GAGCGGCCGCAATATGATATTTATGTCC) 和 Ppta-ack-NdeI-R (SEQ ID NO:3:TTCCATATGTTTCATGTTTCATTCCTCC) 从自产乙醇梭菌 DSM10061的基因组DNA中扩增磷酸转乙酰酶-乙酸激酶操纵子的启动子区(Ppta-ack) (SEQ ID NO:1),并且使用NotI和NdeI限制位点将其克隆到大肠杆菌-梭菌穿梭载体pMTL83151 (FJ797647.1;Nigel Minton,University of Nottingham,UK) [Heap JT,Pennington OJ, Cartman ST,Minton NP.A modular system for Clostridium shuttle plasmids.J Microbiol Methods.2009,78:79-85]中,产生质粒pMTL83155。

[0279] 使用经修改的Bertram and Dürre (1989)的方法分离来自自产乙醇梭菌DSM 10061的基因组DNA。将100ml过夜培养物收集($6,000 \times g$,15分钟,4℃),用磷酸钾缓冲液洗涤(10mM,pH 7.5)并且悬浮于1.9ml STE缓冲液(50mM Tris-HCl,1mM EDTA,200mM蔗糖;pH 8.0)中。加入300μl溶菌酶(约100,000U),并且将所得混合物在37℃下孵育30分钟,接着加入280μl 10% (w/v) SDS溶液并且再孵育10分钟。通过加入240μl EDTA溶液(0.5M,pH 8)、20 μl Tris-HCl (1M,pH 7.5)和10μl RNase A (Fermentas)来在室温下消化RNA。接着,加入100 μl蛋白酶K (0.5U),并且在37℃下进行蛋白水解1-3小时。最后,加入600μl高氯酸钠(5M),接着进行酚-氯仿萃取以及异丙醇沉淀。以分光光度法检查DNA数量和质量。

[0280] 将编码来自产酸克雷伯氏菌的二醇脱水酶(EC 4.2.1.28,登录号D45071)的基因pddABC,所述基因pddABC合成在针对自产乙醇梭菌进行密码子优化的单一操纵子(SEQ ID NO:4)中,侧翼为NdeI和EcoRI限制位点用于进行进一步亚克隆。接着使用限制性酶NdeI和EcoRI将pddABC操纵子由pUC57载体亚克隆到pMTL83155中。

[0281] 将pddABC表达质粒引入到自产乙醇梭菌中

[0282] 使用上述方法将质粒pMTL83155-pddABC用于转化自产乙醇梭菌。在含有 $15 \mu\text{g mL}^{-1}$ 甲砒霉素(thiamphenicol)的YTF-琼脂(8g/L胰蛋白胨、5g/L酵母提取物、2g/LNaCl、2.5g/L果糖以及7.5g/L琼脂,pH 5.8)上进行外生长(outgrowth),并且在37℃下在30psi真正厂气

(Real Mill Gas) 中孵育。将单菌落重新划线在含有 $15\mu\text{g mL}^{-1}$ 甲砒霉素的PETC-MES-琼脂(表1,以MES代替碳酸盐缓冲液且无果糖)上,接着重新划线在含有 $15\mu\text{g mL}^{-1}$ 甲砒霉素和0.5%果糖的PETC-MES-琼脂上。从具有果糖的板中挑取多个克隆,并且在具有30psi真正厂气的鲍尔奇管(Balch tube)中在3mL具有0.5%果糖的PETC-MES中生长。通过PCR验证质粒的存在。

[0283] 测试自产乙醇梭菌中二醇脱水酶的体内活性

[0284] 将携带pMTL83155-pddABC的自产乙醇梭菌菌株在存在内消旋-2,3-丁二醇的情况下生长并且与作为对照的野生型相比。当生长培养基补充有 5g L^{-1} 内消旋-2,3-丁二醇时,在生长92小时之后,在转化的菌株的培养物中检测到 12mg L^{-1} 2-丁醇,而在野生型中未检测到(表5)。在不受理论束缚下,本发明人相信二醇脱水酶将内消旋-2,3-BDO转化成MEK,而如上文所述自产乙醇梭菌中存在的醇脱氢酶活性接着将MEK转化成2-丁醇。

[0285] 表5:在存在和不存在内消旋-2,3-丁二醇的情况下来自表达和不表达pddABC基因的自产乙醇梭菌的关键代谢物。数值代表三次重复的平均值加上或减去一个标准偏差。

[0286]	样品	乙酸 (g L^{-1})	乙醇 (g L^{-1})	2-丁醇 (mg L^{-1})
	携带 pddABC 的自产乙醇梭菌+内消旋-2,3-丁二醇	2.97 ± 0.15	1.33 ± 0.06	12.33 ± 1.53
	携带 pddABC 的自产乙醇梭菌	3.00 ± 0.00	1.47 ± 0.06	ND
	自产乙醇梭菌野生型+内消旋-2,3-丁二醇	2.67 ± 0.06	0.97 ± 0.06	ND
	自产乙醇梭菌野生型	3.07 ± 0.72	1.17 ± 0.06	ND

[0287] 通过再活化蛋白ddrAB的共表达改进内消旋-BDO到MEK的转化

[0288] 二醇脱水酶PddABC酶复合体与2,3-丁二醇的反应,在引起产物形成的同时也可引起所述酶复合体的失活(Bachovin et al,1977)。在天然生物例如产酸克雷伯氏菌中,存在能够再活化被破坏的酶复合体的其它酶(Mori K et al,1997)。为了提高内消旋-2,3-丁二醇到MEK的转化效率,使适当的再活化蛋白(YP_005016278和)与二醇脱水酶基因共表达。合成针对自产乙醇梭菌而进行密码子优化的来自产酸克雷伯氏菌的再活化蛋白基因(GeneID:11660428和) ddrAB (SEQ ID NO:6),其侧接限制性位点SacI和KpnI。用限制性酶SacI和KpnI将ddrAB操纵子克隆到pMTL83155-pddABC中。所产生的载体pMTL83155-pddABC-ddrAB用于如上文所述转化自产乙醇梭菌以改进内消旋-2,3-丁二醇到MEK和2-丁醇的转化。

[0289] 构建具有用于产生内消旋-2,3-丁二醇的基因的表达质粒以及在大肠杆菌中的体内测试

[0290] 对在自产乙醇梭菌中产生内消旋-2,3-丁二醇的关注中,本发明人将来自肺炎克雷伯氏菌的budC (EC 1.1.1.303,登录号YP_001335719) 鉴别为能够将(R)-乙偶姻(其作为中间体存在于自产乙醇梭菌中)转化成内消旋-2,3-丁二醇。合成这种基因,并且针对自产乙醇梭菌进行密码子优化(SEQ ID NO:5)并且将其接受在由SalI和XhoI限制性位点侧接的克隆载体pBSK中以便进一步亚克隆。从丙酮酸合成乙偶姻要求乙酰乳酸合酶(ALS)和乙酰乳酸脱羧酶(ALDC)的连续作用,因此构建了包含这两种基因的质粒。首先,使用引物Ppta-ack-NotI-F (SEQ ID NO:2:GAGCGGCCGCAATATGATATTTATGTCC)和Ppta-ack-NdeI-R (SEQ ID NO:3:TTCCATATGTTTCATGTTTCATTTCTCC)从自产醇梭菌DSM10061的基因组DNA中扩增磷酸转乙酰酶-乙酸激酶操纵子的启动子区(Ppta-ack) (SEQ ID NO:1),并且使用NotI和NdeI限制

性位点将其克隆到大肠杆菌-梭菌穿梭载体pMTL85141 (FJ797651.1; Nigel Minton, University of Nottingham, UK) [Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP. A modular system for Clostridium shuttle plasmids. J Microbiol Methods. 2009, 78:79-85] 中, 产生质粒pMTL85145。在那之后, 使用引物als-NdeI-F (SEQ ID NO:7: GGAAGTTTCATATGAATAGAGATAT) 和 als-EcoRI-R (SEQ ID NO:8: GGTATAGAATTCTGGTTTAATAGATAATGC) 扩增来自自产乙醇梭菌的基因als, 并且使用NdeI和EcoRI限制性位点将所得扩增子克隆到pMTL85145中。接着通过使用引物ALDC-EcoRI-F (SEQ ID NO:9: GCGAATTCGACATAGAGGTGAATGTAATATGG) 和ALDC-SacI-R (SEQ ID NO:10: GCGAGCTCTTATTTTCAACACTTGTTATCTCA) 的扩增将ALDC加入到该质粒中, 并且接着使用限制性位点EcoRI和SacI进行克隆, 产生质粒pMTL85145-ALS-ALDC。将budC基因克隆到pMTL85145-ALS-ALDC中。将该构建体用于转化从大肠杆菌遗传库存中心 (Genetic Coli Stock Centre, GCSC) 获得的大肠杆菌JW1375-1 (ldhA744 (del)::kan)。所得菌株在具有2%葡萄糖的M9培养基中厌氧生长, 使用携带pMTL85145-ALS-ALDC-secAdh593的菌株作为对照。对照菌株产生(D)-(-)-2,3-丁二醇, 并且无可检测到的内消旋-2,3-丁二醇(图2)。携带具有budC的构建体的菌株产生310mg L⁻¹内消旋-(R,S)-2,3-丁二醇和少量(D)-(R,R)-2,3-丁二醇(图2)。

[0291] 从一氧化碳产生内消旋-BDO

[0292] 自产乙醇梭菌DSM23693的D-(-)-2,3-丁二醇脱氢酶的失活:

[0293] 使用ClosTron II型内含子介导的基因破坏工具将在自产乙醇梭菌DSM23693中参与产生D-(-)-2,3-BDO的2,3-丁二醇脱氢酶(2,3-bdh)基因失活(Heap et al., 2010)。使用ClosTron.com提供的Perutka算法鉴别已合成并传递到pMTL007C-E5载体中的2,3-bdh基因的有义链上468与469位碱基之间的II型内含子靶位点。最终载体pMTL007C-E5-2,3bdh-468!469s (SEQ ID NO:11) 含有反转录转座作用活化的ermB标记物(Retro-transposition-Activated ermB Marker) (RAM), 其在插入到靶位点中之后赋予对抗生素克拉霉素(Clarithromycin)的抗性。

[0294] 如上文所述将pMTL007C-E5-2,3bdh-468!469s质粒引入到自产乙醇梭菌DSM23693中。依次进行单克隆的划线: 首先在含有15μg/ml甲砒霉素的PETC-MES培养基上, 接着在具有含有5μg/ml克拉霉素的PETC-MES培养基的琼脂板上。使用引物0g42f (SEQ ID NO:12) 和0g43r (SEQ ID NO:13) (侧接2,3-bdh基因中的II型内含子插入位点) 通过PCR随机筛选每种质粒4个菌落中的II型内含子插入片段。Maxime PCR预混试剂盒用于PCR。也使用引物fD1 (SEQ ID NO:14) 和rP2 (SEQ ID NO:15) 以及Maxime PCR预混试剂盒进行PCR扩增16S rDNA。

[0295] 确认2,3bdh基因破坏:

[0296] 使用引物0g42f/0f43r扩增375bp的PCR产物, 表明未经修饰的野生型2,3-bdh基因。使用同一组引物扩增约2kb的PCR产物, 表明ClosTronII型内含子插入在靶因中。就2,3-bdh基因而被靶向的所有4个克隆均是基因破坏阳性的, 如通过扩增约2kb PCR产物所见的(图3)。这些结果证实自产乙醇梭菌DSM23693中2,3-bdh基因的破坏。

[0297] 产生内消旋-2,3-丁二醇的脱氢酶的表达

[0298] 表达载体的构建:

[0299] 对在自产乙醇梭菌中产生内消旋-2,3-丁二醇的关注中, 本发明人将来自肺炎克

雷伯氏菌的budC (EC 1.1.1.303, 登录号YP_001335719) 鉴别为能够将(R)-乙偶姻(其作为中间体存在于自产乙醇梭菌中)转化成内消旋-2,3-丁二醇。合成这种基因并针对在自产乙醇梭菌而进行了密码子优化(SEQ ID NO:5),并侧接NdeI和EcoRI限制性位点以便进一步进行亚克隆。首先,将磷酸转乙酰酶-乙酸激酶操纵子的启动子区(Ppta-ack)从pMTL85145 NotI和NdeI限制性位点切割下来并克隆到经NotI和NdeI切割的pMTL83151 (FJ797651.1; Nigel Minton, University of Nottingham, UK) [Heap JT, Pennington OJ, Cartman ST, Minton NP. A modular system for Clostridium shuttle plasmids. J Microbiol Methods. 2009, 78:79-85中,产生pMTL83155。通过使用限制性位点NdeI和EcoRI,将来自肺炎克雷伯氏菌的budC基因克隆到pMTL83155中,产生pMTL83155-KpBDH。

[0300] 自产乙醇梭菌的转化:

[0301] 为了从C0产生内消旋-2,3-丁二醇,将表达质粒pMTL83155-KpBDH用于转化自产乙醇梭菌DSM23693,以及使用上述方法在甲砒霉素(15mg L^{-1})选择下产生的具有破坏的2,3-bdh的突变体。

[0302] 在转化的自产乙醇梭菌中产生内消旋-2,3-丁二醇:

[0303] 为了测试内消旋-2,3-丁二醇的产生,使转化的菌株在2bar (g) 下在2mL培养物中依靠真实厂气生长。在具有破坏的天然2,3-bdh基因的突变体的背景中,产生内消旋-2,3-丁二醇, $370 \pm 70\text{mg L}^{-1}$ (九个样品的平均值 \pm 一个标准偏差) (图4),且内消旋-2,3-丁二醇与D-(-)-2,3-丁二醇的比率为5.4:1。通过qRT-PCR分析这种生长实验的样品的内消旋-丁二醇脱氢酶基因的表达(参见下文)。

[0304] 在连续搅拌槽反应器(CSTR)中转化的自产乙醇梭菌中的内消旋-2,3-丁二醇的产生:

[0305] 将约1500mL溶液A(表6)转移到1.5L发酵罐中并用氮气鼓泡。加入刃天青($1.5\text{mL } 2\text{g/L}$ 溶液)和 H_3PO_4 (85%溶液, 2.25mL),并使用浓 NH_4OH (水溶液) 将pH调整到5.0。加入次氨基三乙酸($0.3\text{mL } 0.15\text{M}$ 溶液),随后加入1.5mL溶液C(表6)。这之后是 NiCl_2 ($0.75\text{mL } 0.1\text{M}$ 溶液)和 Na_2WO_3 ($1.5\text{mL } 0.01\text{M}$ 溶液)。加入15mL溶液B(表6),并使用 N_2 鼓泡溶液,随后切换成50毫升/分钟含CO的气体($50\%\text{CO}; 28\%\text{N}_2, 2\%\text{H}_2, 20\%\text{CO}_2$)。接着将发酵罐使用200mL具有质粒pMTL83155-KpBDH和被破坏的D-(-)-2,3-丁二醇脱氢酶基因的自产乙醇梭菌培养物接种。将所述发酵罐维持在 37°C 下并在200rpm下搅拌。在这实验期间,以约0.1毫升/小时的速率加入 Na_2S 溶液(0.2M 溶液)。根据微生物培养物的需求而增加底物供应。

[0306] 发酵概况在图5中示出。在连续发酵中经多个采样点证实内消旋-BDO的产生,浓度为 0.2g/L 且与D-(-)-形式的比率为1:1(图5+6)。通过qRT-PCR分析这种反应器的样品的内消旋-丁二醇脱氢酶基因的表达(参见下文)。

[0307] 表6:用于CSTR操作的培养基:

[0308]

溶液 A			
NH ₄ Ac	3.083g	KCl	0.15g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.4g	NaCl (任选的)	0.12g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.294g	蒸馏水	补足到 1L
溶液 B			
生物素	20.0 mg	D-(*)-泛酸钙	50.0 mg
叶酸	20.0 mg	维生素 B12	50.0 mg
盐酸吡哆醇	10.0 mg	对氨基苯甲酸	50.0 mg
盐酸硫胺素	50.0 mg	硫辛酸	50.0 mg
核黄素	50.0 mg	蒸馏水	补足到 1 升
烟酸	50.0 mg		
溶液 C			
组分	mmol/L H ₂ O	组分	mmol/L H ₂ O
FeCl ₃	0.1	Na ₂ SeO ₃	0.01
CoCl ₂	0.05	Na ₂ MoO ₄	0.01
NiCl ₂	0.05	ZnCl ₂	0.01
H ₃ BO ₃	0.01	MnCl ₂	0.01
		Na ₂ WO ₃	0.01

[0309] 采样和分析程序

[0310] 在每一发酵过程中间隔地从CSTR反应器获取培养基样品。每次采样培养基时，应小心以确保不使气体进入到反应器中或从反应器中逸出。

[0311] HPLC:

[0312] HPLC系统Agilent 1100系列。流动相:0.0025N硫酸。流动和压力:0.800mL/min。柱:Alltech I0A;目录号#9648,150×6.5mm,粒径5μm。柱温:60℃。检测器:折光率。检测器温度:45℃。

[0313] 样品制备方法:

[0314] 将400μL样品、50μL 0.15M ZnSO₄和50μL 0.15M Ba(OH)₂上样于微量离心管中。将所述管在12,000rpm下4℃离心10分钟。将200μL上清液转移到HPLC小瓶中,且将5μL注射到HPLC仪器中。

[0315] 顶空分析:

[0316] 在具有两个安装通道的Varian CP-4900微型GC上进行测量。通道1是10m分子筛柱,在70℃、200kPa氩气下运行,且倒冲时间(backflush time)是4.2秒,而通道2是10m PPQ柱,在90℃、150kPa氩气下运行,且无倒冲。两个通道的注射器温度是70℃。运行时间被设定成120秒,但所有目的峰将通常在100秒之前洗脱。

[0317] 细胞密度:

[0318] 细胞密度是通过计数在确定的发酵液等分试样中的细菌细胞来测定。或者,在600nm(分光光度计)下测量样品的吸光度,且干质量是根据公开的程序通过计算测定。

[0319] 内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶budC基因表达的表达:

[0320] 进行qRT-PCR实验以在12孔板和上述连续发酵的生长研究中证实自产乙醇梭菌中引入的内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶budC基因的成功表达。使用寡核苷酸对KpBDH-F和R时在野生型菌株中未观察到扩增,而在两个生长研究中,测量到携带质粒pMTL83155-KpBDH的菌

株的类似水平的信号,证实内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶budC基因的成功表达(图7)。

[0321] 从12孔板获取1mL生长实验样品(实验1),并从连续反应器获取4,5mL样品(实验2)。在收集之后立即提取样品。将培养物离心(5,000×RPM,10分钟,4℃)。总RNA根据方案使用RiboPure™(Ambion)分离。使用BeadBeater(Biospec)以三个循环进行细胞破坏,每个循环包含1分钟振荡和1分钟冰,在50μL无RNA酶/DNA酶的水中进行洗脱。在使用TURBOTM DNA酶(Ambion)进行DNA酶I处理之后,接着使用SuperScript III逆转录酶试剂盒(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)进行逆转录步骤。使用NanoDrop 2000(Thermo Scientific)检查RNA。对每一寡核苷酸对进行非RT对照。所有qRT-PCR反应均使用MyiQ™单色检测系统(Bio-Rad Laboratories,Carlsbad,CA,USA)在具有2ng/μL cDNA模板、67nM各寡核苷酸(表7)和1×iQ™SYBR®Green Supermix(Bio-Rad Laboratories,Carlsbad,CA,USA)的25μL总反应体积中一式三份地进行。反应条件是95℃持续10分钟,接着是40个循环:95℃持续15秒和72℃持续1分钟。为了检测扩增的寡核苷酸二聚化或其它假象(artifact),在完成qPCR(以0.5℃/秒从40℃到95℃的111个循环)之后立即进行解链曲线分析。

[0322] 表7:用于qRT-PCR的寡核苷酸

靶	寡核苷酸名称	DNA 序列 (5'到3')	SEQ ID NO:
[0323] 鸟苷酸激酶 (<i>gmk</i>)	GnK-F	TCAGGACCTTCTGGAAGTGG	35
	GnK-R	ACCTCCCCTTTTCTTGGAGA	36
	FoT4L-F	CAGGTTTCGGTGCTGACCTA	37
	FoT4L-R	AACTCCGCCGTTGTATTTCA	38
内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶 <i>budC</i>	KpBDH -F	AAGTTTCTGAGGCTGCAGGT	39
内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶 <i>budC</i>	KpBDH -R	GCTGCAACATCTTCAGGTTCA	40

[0324] 从一氧化碳产生MEK和2-丁醇

[0325] 为了从CO产生2-丁醇,将来自肺炎克雷伯氏菌的内消旋-2,3-丁二醇脱氢酶基因budC和来自产酸克雷伯氏菌的二醇脱水酶基因pddABC同时引入到一氧化碳营养型产乙酸菌如自产乙醇梭菌中。为了产生MEK而非2-丁醇,将醇脱氢酶敲除。

[0326] 表达载体的构建

[0327] 从CO产生MEK或2-丁醇需要产生内消旋-2,3-丁二醇的丁二醇脱氢酶和能够将2,3-丁二醇转化成MEK的二醇脱水酶。为此目的,构建表达载体以表达两种基因。使用SalI和XhoI将来自肺炎克雷伯氏菌的经密码子优化的budC基因从pBSK-KpBDH切割下来并将其克隆到pMTL83155-pddABC的SalI位点中。

[0328] 自产乙醇梭菌和衍生菌株的转化

[0329] 这种载体用于转化如上文所述的具有失活的天然脱氢酶的自产乙醇梭菌和衍生菌株。各个产生的菌株接着依靠厂气生长并测试所需代谢物的产生。

[0330] D-(-)-2,3-丁二醇脱氢酶和醇脱氢酶两者的敲除

[0331] 为了消除D-(-)-2,3-丁二醇的产生以及MEK到2-丁醇的转化两者,消除天然D-(-)-丁二醇脱氢酶和醇脱氢酶两者。

[0332] 这可以通过以下两种方式来实现:(a)同源重组和(b)如实施例1和实施例3中解释的使用ClosTron工具进行无标记基因破坏。

[0333] (a)通过同源重组的Δ2,3bdhΔSecAdh双基因敲除自产乙醇梭菌DSM23693菌株:

[0334] 使用自产乙醇梭菌DSM23693基因组DNA对2,3bdh基因的约1kb的5'(SEQ ID NO:

16)和3' (SEQ ID NO:17)同源臂进行PCR扩增。引物Og13f (SEQ ID NO:18)/Og14r (SEQ ID NO:19)和Og15f (SEQ ID NO:20)/Og16r (SEQ ID NO:21)分别用于扩增5'和3'同源臂。将两种PCR产物克隆到pMTL85151质粒的Sbf1/Not1与Nhe1/Asc1位点之间,以得到pMTL85151-2,3bdh-KO。将该质粒通过接合或通过电穿孔引入到自产乙醇梭菌DSM23693中,如上述实施例中所述。在甲砒霉素板上选择之后,使用侧接2,3bdh的同源臂的引物Og33f (SEQ ID NO:22)和Og34r (SEQ ID NO:23)筛选转化体中的2,3bdh基因敲除,以便进行PCR和该PCR产物的测序。

[0335] 可以类似地构建SecAdh基因敲除的质粒。使用自产乙醇梭菌DSM23693基因组DNA对2,3bdh基因的约1kb的5' (SEQ ID NO:24)和3' (SEQ ID NO:25)同源臂进行PCR扩增。引物Sec5f (SEQ ID NO:26)/Sec5r (SEQ ID NO:27)和Sec3f (SEQ ID NO:28)/Sec3r (SEQ ID NO:29)分别用于扩增5'和3'同源臂。将两种PCR产物克隆到pMTL85151质粒的Sbf1/Not1与Nhe1/Asc1位点之间,以得到pMTL85151-SecAdh-KO。在甲砒霉素板上选择之后,可以使用侧接SecAdh基因的同源臂的引物Sec05f (SEQ ID NO:30)和Sec05r (SEQ ID NO:31)筛选转化体的SecAdh基因敲除,以便进行PCR。

[0336] 一旦在自产乙醇梭菌DSM23693中实现2,3bdh或者SecAdh基因的敲除,就使用pMTL85151-2,3bdh-KO或者pMTL85151-SecAdh-KO质粒靶向这些单一突变体中的第二基因。通过如上文所述的电穿孔将所述质粒引入到单一基因敲除突变体中。可以使用侧接相应基因的同源臂的引物筛选所述转化体的第二基因敲除。

[0337] (b) 使用ClosTron的 Δ 2,3bdh Δ SecAdh双基因破坏:

[0338] ClosTron II型内含子构建体中的RAM ermB盒侧接有翻转酶重组位点(Flippase Recombination site,Frt)。通过接合或者通过电穿孔将翻转酶重组酶引入到 Δ 2,3bdh ClosTron突变体中,可以将约1.3kb的RAM ermB标记物从所述突变体的基因组中去除并且由此可以回收ermB标记物。约0.8kb的II型内含子片段将留在基因组上。这可以通过以下方式确认:(i)测试其对克拉霉素的敏感性,和(ii)使用侧接II型内含子插入位点的引物使用引物Og42f (SEQ ID NO:12)和Og43r (SEQ ID NO:13)进行PCR并对PCR产物进行测序。一旦获得无RAM ermB标记物的 Δ 2,3bdh ClosTron突变体(Δ 2,3bdh-ermB ClosTron),就使用ClosTron II型内含子插入失活工具以类似方式靶向所述突变体中的SecAdh基因。已使用ClosTron.com提供的Perutka算法在SecAdh基因中鉴别出在399与400位碱基之间的内含子插入位点,并已设计出内含子靶向盒(SEQ ID NO:22)。内含子靶向盒是通过DNA2.0商业地合成并且被递送到pMTL007C-E2载体成为pMTL007C-E5-SecAdh-399!400s,其可通过接合或者电穿孔引入到 Δ 2,3bdh-ermB ClosTron突变体中。所述转化体可以在甲砒霉素和克拉霉素琼脂板上依序选择并且如上文所解释通过PCR使用引物SecCTf (SEQ ID NO:33)和SecCTr (SEQ ID NO:34)进行筛选。

[0339] 本文中已参考某些优选实施方案描述本发明,以便使得读者无需过度实验就能实施本发明。然而,本领域普通技术人员将容易地认识到,许多组分和参数可在不脱离本发明的范围的情况下在一定程度上加以改变或修改或被替换成已知等效物。应了解,所述修改和等效物如同被单独阐述般并入本文中。提供题目、标题等以增强读者对本文的理解,并且不应被解读为限制本发明的范围。

[0340] 如果存在的话,上文和下文引用的所有申请、专利和出版物的全部公开内容特此

以引用的方式并入。然而，本说明书中的任何申请、专利和出版物的引用不是且不应被视为承认或以任何形式建议它们在任何国家中构成有效的现有技术或形成公共常识的一部分。

[0341] 除非上下文另有要求，否则在本说明书通篇和随附的任何权利要求中，词语“包含”、“包括”等应被理解为与排他性意义相反的包含性意义，也就是说，“包括但不限于”的意义。

序列表

<110> LanzaTech New Zealand Limited

<120> 重组微生物和其用途

<130> LT81

<160> 40

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 479

<212> DNA

<213> 自产乙醇梭菌(*Clostridium autoethanogenum*)

<400> 1

```
aatatgatat ttatgtccat tgtgaaaggg attatattca actattattc cagttacgtt 60
catagaaatt ttcctttcta aaatatattta ttccatgtca agaactctgt ttatttcatt 120
aaagaactat aagtacaaag tataaggcat ttgaaaaaat aggctagtat attgattgat 180
tattttatttt aaaatgccta agtgaaatat atacatatta taacaataaa ataagtatta 240
gtgtaggatt tttaaataga gtatctatatt tcagattaaa tttttgatta tttgatttac 300
attatataat attgagtataa gtattgacta gcaaaatttt ttgatacttt aatttgtgaa 360
atttccttattc aaaagttata tttttgaata atttttattg aaaaatacaa ctaaaaagga 420
ttatagtata agtgtgtgta attttgtgtt aaatttaaag ggaggaaatg aacatgaaa 479
```

<210> 2

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 Ppta-ack-NotI-F

<400> 2

```
gagcggccgc aatatgatat ttatgtcc 28
```

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 Ppta-ack-NdeI-R

<400> 3

```
ttccatatgt ttcatgttca tttcctcc 28
```

<210> 4

<211> 2951

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 密码子优化的pddABC操纵子

<400> 4

```

catatgagaa gtaaaagatt tgaggcatta gcaaaaagac cagttaatca agatggattt 60
gtaaaagaat ggattgaaga aggtttcata gcaatggaat ctccaaatga tccaaaacca 120
agtattaaaa ttgtaaatgg tgctgtaaca gaacttgatg gaaaacctgt atctgatttt 180
gacttaatat atcattttat agcaagatat ggaataaact taaatagagc tgaagaagtt 240
atggctatgg atagtgttaa acttgctaata atgctttgtg atcctaattg aaaaagattc 300
gagattgtac ctttaactac agcaatgact cctgctaaga tagtagaagt tgtatcacac 360
atgaatgtag tagagatgat gatggcaatg cagaaaatga gagctagaag aactccatca 420
caacaagcac atgtaactaa cgttaaagat aaccagtagc aatagcagc agatgctgca 480
gaaggtgctt ggagagggtt tgacgaacaa gaaactacag ttgcagttgc aagatatgct 540
ccttttaatg ctattgctct tttagttgga tcacaggttg gtagaccagg tgtacttaca 600
caatgtagtt tagaagaagc tactgagctt aaattaggaa tgcttggaca tacatgttat 660
gcagaaacta taagtgttta cggaacagaa cctgttttta cagatgggtg tgatactcca 720
tggtctaagg gatttcttgc atcatcatal gcatcaagag gtttaaagat gagatttact 780
tctggatctg gatctgaagt tcagatggga tatgctgaag gtaagagtat gttatatctt 840
gaagctagat gtatatatat aacaaaagct gcaggtgttc aaggattaca aaacggatca 900
gtatcatgca taggtgtacc aagtgcagtt ccatcaggaa ttagagctgt tcttgctgaa 960
aacttaatat gtagttcatt agatttagag tgcgcaagtt ctaatgatca gacatttact 1020
cattcagata tgagaagaac agctagatta cttatgcagt ttcttcctgg aactgatttc 1080
ataagtcttg gatattcagc tgtacctaat tacgataata tgtttgctgg aagtaatgaa 1140
gatgctgaag actttgatga ttataatgta atacaaagag acttaaaggt agacgggtgt 1200
ttaagaccag taagagaaga agatgtaata gcaataagaa ataaggctgc tagagcactt 1260
caggcagtat tcgcaggtat gggtttacct cctataacag atgaagaagt tgaagcagct 1320
acttatgctc atggttctaa ggatattgct gaaagaaata ttgttgaaga tataaagttc 1380
gctcaggaaa ttataaataa gaatagaaat ggacttgaag tagttaaagc attagcacag 1440
ggtgggtttta ctgatgttgc acaagatatg cttaatattc agaaagctaa attactggt 1500
gattattttac acacatcagc aataattgtt ggtgacggac aagtattatc agcagtaaac 1560
gatgtaaatg actatgctgg accagctaca ggatatagac ttcaagggtg aagatgggaa 1620
gagataaaga atataccagg tgcaattgat ccaaatgaaa tagattaatt gaacacacaa 1680
aaaaaataat taataaggag gcaaacaat ggaaataaat gaaaaacttt taagacagat 1740
aattgaagat gtactttcag aaatgaaagg aagtataaa cctgtatcat ttaatgcacc 1800
tgctgctagt gcagctcctc aagcaactcc tcctgctggt gacggattct taactgaagt 1860
tggtgaagct agacaaggaa cacaacaaga tgaagtaata atagctgttg gaccagcatt 1920
tggttagct cagactgtaa atatagtagg tattccacac aatcaatac ttagagaagt 1980
tatagctgga atagaagaag aaggtataaa ggcaagagtt attagatgtt ttaagtcttc 2040
tgatgtagca tttgttgctg ttgaaggtaa tagactttct ggatcaggaa taagtattgg 2100

```

aatacaatca aaaggaacaa cagttattca tcagcaagga ttaccaccac ttagtaacct 2160
tgaacttttt cctcaagcac cattattaac attagagact tatagacaaa taggtaagaa 2220
tgctgctaga tacgcaaaaa gagagtcacc acagccagta ccaactttaa acgatcaaat 2280
ggcaagacct aaatatcagg caaaatctgc aattttacat ataaaagaga ctaaatatgt 2340
agtaacagga aagaatccac aggaacttag agtagcatta taaaaataaa tagtagatat 2400
ataaagtaaa aggaggtaag ataatgaata cagacgcaat agaataatg gtaagagatg 2460
tactttcaag aatgaactct ttacaaggag aagctccagc agcagctcca gcagcaggtg 2520
gtgcaagtag aagtgctaga gtttcagatt atccattagc taataagcat cctgaatggg 2580
ttaaaactgc aacaaacaaa acttttagatg attttactct tgaaaatgtt ctttcaaata 2640
aagtaactgc tcaggatatg agaattactc cagaaacact tagattacag gctagtatat 2700
ctaaggatgc tggaagagac agattagcta tgaattttga aagagcagct gagttaactg 2760
ctgttcctga tgatagaata ttagaaatat acaatgctct tagaccttat agatctacaa 2820
aagaagaact tttagcaata gcagatgatc ttgagtctag atatcaagca aaaatttgtg 2880
cagcattcgt aagagaagca gctacacttt atgtagagag aaagaaatta aaaggagatg 2940
attaagaatt c 2951

<210> 5

<211> 780

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 密码子优化的budC基因

<400> 5

catatgaaaa aggttgcatt agttacagga gcaggacaag gtataggaaa ggctatagca 60
cttagacttg taaaagatgg atttgcagtt gctattgcag attataacga tactacagct 120
aaagcagttg cttcagaaat taatcaagca ggtggtagag caatggctgt aaaagttgat 180
gttagtgata gagaccaggt ttttgctgct gttgaacaag ctagaaagac attaggtggt 240
tttgatgtaa tagttaataa tgctggtgta gtcctcatca ctccaattga atctataact 300
ccagaaatag tagacaaagt atataatata aacgtaaaag gtgtaatatg gggtatacaa 360
gcagcagtag aagcattcaa gaaagaagga cacggtggta aaataataaa tgcttgttct 420
caggctggtc atgtaggtaa tccagaatta gcagtatact catcatcaaa gtttgcagta 480
agaggtctta cacaaacagc agctagagat cttgctccat taggaattac agtaaattga 540
tattgccctg gaattgttaa gactcctatg tgggcagaga ttgatagaca agtttctgag 600
gctgcaggta aacctttagg atatggaact gcagagtttg caaagagaat tactcttggt 660
agacttagtg aacctgaaga tgttgcagct tgtgtaagtt atttagcttc acctgatagt 720
gattatatga caggacagtc tcttttaatt gacggtggta tggtatttaa ttaagaattc 780

<210> 6

<211> 2254

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 密码子优化的ddrAB操纵子

<400> 6

gagctcagga ggtttactca tgagatatat agctggaata gatataggaa atagtagtac 60
 tgaagtagca ttagcaactt tagatgaagc tggagcatta actataactc atagtgcatt 120
 agcagaaaact actggaataa aaggaacttt aagaaatgta tttggaatac aagaagcatt 180
 agcattagta gcaagaggag ctggaatagc agtaagtgat ataagtttaa taagaataaa 240
 tgaagcaact cctgtaatag gagatgtagc aatggaaact ataactgaaa ctataataac 300
 tgaagtagtact atgataggac ataatcctaa aacacctgga ggagcaggat taggaactgg 360
 aataactata acacctcaag aattattaac tagacctgca gatgcacctt atatattagt 420
 agtaagtagt gcatttgatt ttgcagatat agcaagtgta ataaatgcaa gtttaagagc 480
 aggatatcaa ataactggag taatattaca aagagatgat ggagtattag taagtaatag 540
 attagaaaaa cctttaccta tagtagatga agttttatat atagatagaa taccttttagg 600
 aatgttagca gcaatagaag tagcagtacc tggaaaagta atagaaactt taagtaatcc 660
 ttatggaata gcaactgtat ttaatttaag tcctgaagaa actaaaaata tagtacctat 720
 ggcaagagca ttaataggaa atagatctgc agtagtagta aaaactccta gtggagatgt 780
 aaaagcaaga gcaataacctg ctggaaattt agaattatta gcacaaggaa gatctgtaag 840
 agtagatgta gctgctggag ctgaagcaat aatgaaagca gtagatggat gtggaagatt 900
 agataatgta actggagaaa gtggaacaaa tataggagga atgttagaac atgtaagaca 960
 aactatggca gaattaacta ataaacctag tagtgaaata ttatacaag atttattagc 1020
 agtagatact agtgtacctg taagtgtaac tggaggatta gctggagaat ttagttttaga 1080
 acaagcagta ggaatagcaa gtatggtaaa aagtgataga ttacaaatgg caatgatagc 1140
 aagagaaaata gaacaaaaat taaatataga tgtacaaata ggaggagcag aagcagaagc 1200
 agcaatatta ggagcattaa caacacctgg aactactaga ccttttagcaa tattagattt 1260
 aggagcagga tctactgatg caagtataat aaatcctaaa ggagatataa tagcaactca 1320
 ttttagctgga gctggagata tggtaactat gataatagct agagaattag gattagaaga 1380
 tagatatatta gcagaagaaa taaaaaaata tccttttagca aaagtagaaa gtttattttca 1440
 ttttaagacat gaagatggaa gtgtacaatt ttttagtact cctttacctc ctgcagtatt 1500
 tgcaagagta tgtgtagtaa aagcagatga attagtacct ttacctggag atttagcatt 1560
 agaaaaagta agagctataa gaagatctgc aaaagaaaga gtatttgtaa ctaatgcatt 1620
 aagagcttta agacaagtaa gtcctactgg aaatataaga gatatacctt ttgtagtatt 1680
 agttggagga agtagtttag attttgaagt acctcaatta gtaactgatg cattagcaca 1740
 ttatagatta gtagctggaa gaggaaatat aagaggatct gaaggacctt gaaatgcagt 1800
 agcaacagga ttaatatataa gttggcataa agaatttgca catgaaagat aacaatgtag 1860
 gaggttaact atgaatggaa atcatagtgc accagcaata gcaatagcag taatagatgg 1920
 atgtgatgga ttatggagag aagtattatt aggaatagaa gaagaaggaa taccttttag 1980
 attacaacat catcctgctg gagaagtagt agatagtgca tggcaagcag caagaagtag 2040
 tcctttatta gtaggaatag catgtgatag acatatgtta gtagtacatt ataaaaattt 2100
 acctgcaagt gcacctttat ttactttaat gcatcatcaa gatagtcaag cacatagaaa 2160

tactggaaat aatgcagcaa gattagtaaa aggaatacca tttagagatt taaatagtga 2220
agcaactgga gaacaacaag atgaataagg tacc 2254
<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸 als-NdeI-F
<400> 7
ggaagtttca tatgaataga gatata 25
<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸 als-EcoRI-R
<400> 8
ggaagtttca tatgaataga gatata 25
<210> 9
<211> 32
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸 als-NdeI-F
<400> 9
gcgaattcga catagaggtg aatgtaatat gg 32
<210> 10
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸 als-EcoRI-R
<400> 10
gcgagctctt atttttcaac acttggtatc tca 33
<210> 11
<211> 9052
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>

<223> 质粒pMTL007C-E5-2,3bdh-468!469s

<400> 11

```

cctgcagggt gtagtagcct gtgaaataag taaggaaaaa aaagaagtaa gtgttatata 60
tgatgattat tttgtagatg tagataggat aatagaatcc atagaaaata taggttatac 120
agttatataa aaattacttt aaaaattaat aaaaacatgg taaaatataa atcgtataaa 180
gttgtgtaat ttttaagcta aaaaagctta taattatcct tagcactcgt tgagggtcgc 240
ccagataggg tgtaaagtca agtagtttaa ggtactactc tgtaagataa cacagaaaac 300
agccaaccta accgaaaagc gaaagctgat acgggaacag agcacggttg gaaagcgatg 360
agttaccta agacaatcgg gtacgactga gtcgcaatgt taatcagata taaggtataa 420
gttgtgttta ctgaacgcaa gtttctaatt tcgattagtg ctcgatagag gaaagtgtct 480
gaaacctcta gtacaaagaa aggtaagtta ggctcaacga cttatctgtt atcaccacat 540
ttgtacaatc tggtaaatc ttaggagaa cctatgggaa cgaaacgaaa gcgatgccga 600
gaatctgaat ttaccaagac ttaacactaa ctggggatag cctaaacaag aatgcctaata 660
agaaaggagg aaaaaggcta tagcactaga gcttgaaaat cttgcaaggg tacggagtac 720
tcgtagtagt ctgagaaggg taacgccctt tacatggcaa aggggtacag ttattgtgta 780
ctaaaattaa aaattgatta gggaggaaaa cctcaaatg aaaccaacaa tggcaatttt 840
agaaagaatc agtaaaaaatt cacaagaaaa tatagacgaa gtttttataa gactttatcg 900
ttatctttta cgtccagata tttattacgt ggcgacgcgt gaagttccta tactttctag 960
agaataggaa cttcgcgact catagaatta tttcctcccg ttaaataata gataactatt 1020
aaaaatagac aatacttgct cataagtaac ggtacttaaa ttgtttactt tggcgtgttt 1080
cattgcttga tgaaactgat ttttagtaaa cagttgacga tattctcgat tgaccatttt 1140
tgaaacaaag tacgtatata gcttccaata tttatctgga acatctgtgg tatggcgggt 1200
aagttttatt aagacactgt ttacttttgg ttaggatga aagcattccg ctggcagctt 1260
aagcaattgc tgaatcgaga cttgagtgtg caagagcaac cctagtgttc ggtgaatata 1320
caaggtagcg ttgtagaatc cttcttcaac aatcagatag atgtcagacg catggctttc 1380
aaaaaccact tttttaataa tttgtgtgct taaatggtaa ggaatactcc caacaatttt 1440
atacctctgt ttgttaggga attgaaactg tagaatatct tgggtgaatta aagtacacg 1500
agtattcagt ttttaatttt ctgacgataa gttgaataga tgactgtcta attcaataga 1560
cgttacctgt ttacttattt tagccagttt cgtcgttaaa tgccctttac ctgttccaat 1620
ttcgtaaacg gtatcggttt cttttaaatt caattgtttt attatttggg tgagtacttt 1680
ttcactcgtt aaaaagtttt gagaatattt tatatttttg ttcataccag caccagaagc 1740
accagcatct cttgggttaa ttgaggctg agtataaggt gacttatact tgtaatctat 1800
ctaaacgggg aacctctcta gtagacaatc ccgtgctaaa ttgtaggact gccctttaat 1860
aaatacttct atatttaaaag aggtatttat gaaaagcgga atttatcaga ttaaaaatac 1920
tttctctaga gaaaatttcg tctggattag ttacttatcg tgtaaaatct gataaatgga 1980
attggttcta cataaatgcc taacgactat ccctttgggg agtaggggtca agtgactcga 2040
aacgatagac aacttgcttt aacaagttgg agatatagtc tgctctgcat ggtgacatgc 2100
agctggatat aattccgggg taagattaac gaccttatct gaacataatg ccatatgaat 2160
ccctcctaata ttatacgttt tctctaacaa cttaattata cccactatta ttatttttat 2220

```

caatatagaa gttcctatac tttctagaga ataggaactt cacgcgttgg gaaatggcaa 2280
tgatagcgaa acaacgtaaa actcttggtg tatgctttca ttgtcatcgt cacgtgattc 2340
ataaacacaa gtgaatgtcg acagtgaatt tttacgaacg aacaataaca gagccgtata 2400
ctccgagagg ggtacgtacg gttcccgaag aggggtggtgc aaaccagtca cagtaatgtg 2460
aacaaggcgg tacctcccta cttcaccata tcattttctg cagcccccta gaaataattt 2520
tgttttaactt taagaaggag atatacatat atggctagat cgtccattcc gacagcatcg 2580
ccagtcacta tggcgtgctg ctagcgtat atgcgttgat gcaatttcta tgcactcgta 2640
gtagtctgag aagggtaacg ccctttacat ggcaaagggg tacagttatt gtgtactaaa 2700
attaaaaatt gattagggag gaaaacctca aaatgaaacc aacaatggca attttagaaa 2760
gaatcagtaa aaattcaciaa gaaaatatag acgaagtttt tacaagactt tatcgttatc 2820
ttttacgtcc agatatttat tacgtggcgt atcaaaattt atattccaat aaaggagctt 2880
ccacaaaagg aatattagat gatacagcgg atggcttttag tgaagaaaaa ataaaaaaga 2940
ttattcaatc tttaaaagac ggaacttact atcctcaacc tgtacgaaga atgtatattg 3000
caaaaaagaa ttctaaaaag atgagacctt taggaattcc aactttcaca gataaattga 3060
tccaagaagc tgtgagaata attcttgaat ctatctatga accggtattc gaagatgtgt 3120
ctcacggttt tagacctcaa cgaagctgtc acacagcttt gaaaacaatc aaaagagagt 3180
ttggcggcgc aagatggttt gtggaggag atataaaagg ctgcttcgat aatatagacc 3240
acgttacact cattggactc atcaatctta aaatcaaaga tatgaaaatg agccaattga 3300
tttataaatt tctaaaagca gggtatctgg aaaactggca gtatcacaaa acttacagcg 3360
gaacacctca aggtggaatt ctatctcctc ttttgccaa catctatctt catgaattgg 3420
ataagtttgt tttacaactc aaaatgaagt ttgaccgaga aagtccagaa agaataacac 3480
ctgaatatcg ggagctccac aatgagataa aaagaatttc tcaccgtctc aagaagttgg 3540
agggtgaaga aaaagctaaa gttcttttag aatatcaaga aaaacgtaaa agattacca 3600
cactcccctg tacctcacag acaataaag tattgaaata cgtccggtat gcggacgact 3660
tcattatctc tgftaaagga agcaaaggag actgtcaatg gataaaagaa caattaaaac 3720
tttttattca taacaagcta aaaatggaat tgagtgaaga aaaaacactc atcacacata 3780
gcagtcaacc cgctcgtttt ctgggatatg atatacagat aaggagatct ggaacgataa 3840
aacgatctgg taaagtcaaa aagagaacac tcaatgggag tgtagaactc cttattcctc 3900
ttcaagacaa aattcgtaaa tttatTTTTg acaagaaaat agctatccaa aagaaagata 3960
gctcatgggt tccagttcac aggaaatatc ttattcgttc aacagactta gaaatcatca 4020
caattttataa ttctgaactc cgcgggattt gtaattacta cggcttagca agtaatttta 4080
accagctcaa ttattttgct tatcttatgg aatacagctg tctaaaaacg atagcctcca 4140
aacataaggg aacactttca aaaaccattt ccatgtttta agatggaagt ggttcgtggg 4200
ggatcccgtg tgagataaag caaggtaacg agcgccgtta ttttgcaat tttagtgaat 4260
gtaaatcccc ttatcaattt acggatgaga taagtcaagc tcctgtattg tatggctatg 4320
cccgaatac tcttgaaaac aggttaaaag ctaaagtgtg tgaattatgt gggacgtctg 4380
atgaaaatac ttcctatgaa attcaccatg tcaataaggt caaaaatctt aaaggcaaag 4440
aaaaatggga aatggcaatg atagcgaaac aacgtaaaac tcttgttgta tgctttcatt 4500
gtcatcgtca cgtgattcat aaacacaagt gaatgtcgag caccggttct cggagcactg 4560

tccgaccgct ttggccgccg cccagtcctg ctcgcttcgc tacttggagc cactatcgac 4620
tacgcgatca tggcgaccac acccgtcctg tggatcgcca agccgccgat ggtagtgtgg 4680
ggtctcccca tgcgagagta gggaactgcc aggcatcaaa taaaacgaaa ggctcagtcg 4740
aaagactggg cctttcgttt tatctgttgt ttgtcgggtga acgctctcct gagtaggaca 4800
aatccgcccg gagcggattt gaacgttgcg aagcaacggc ccggagggtg gcgggcagga 4860
cgccccccat aaactgccag gcatcaaatt aagcagaagg ccatcctgac ggatggcctt 4920
tttgcgtttc tacaaaactct tcctgtcgtc atatctacaa gccatccccc cacagatacg 4980
ggcgcgccgc cattatTTTT ttgaacaatt gacaattcat ttcttatttt ttattaagtg 5040
atagtcaaaa ggcataacag tgctgaatag aaagaaattt acagaaaaga aaattataga 5100
atttagtatg attaattata ctcatTTtat aatgtTTtaT tgaatacaaa aaaaaatact 5160
tgttatgtat tcaattacgg gttaaaatat agacaagttg aaaaattTta taaaaaata 5220
agtcctcagc tcttatatat taagctacca acttagtata taagccaaaa cttaaattgtg 5280
ctaccaacac atcaagccgt tagagaactc tatctatagc aatatttcaa atgtaccgac 5340
atacaagaga aacattaact atatatattc aatttatgag attatcttaa cagatataaa 5400
tgtaaattgc aataagtaag atttagaagt ttatagcctt tgtgtatttg aagcagtacg 5460
caaaggcttt tttatttgat aaaaattaga agtatattta ttttttcata attaatTTat 5520
gaaatgaaa gggggtgagc aaagtgcagc aggaaagcag tatcttatca aataacaagg 5580
tattagcaat atcattattg acttttagcag taaacattat gacttttata gtgcttgtag 5640
ctaagtagta cgaaaggggg agctttaaaa agctccttg aatacataga attcataaat 5700
taatttatga aaagaagggc gtatatgaaa acttgtaaaa attgcaaaga gtttattaaa 5760
gatactgaaa tatgcaaaat acattcgttg atgattcatg ataaaacagt agcaacctat 5820
tgcagtaaat acaatgagtc aagatgttta cataaaggga aagtccaatg tattaattgt 5880
tcaaagatga accgatatgg atgggtgtgc ataaaaatga gatgttttac agaggaagaa 5940
cagaaaaaag aacgtacatg cattaaatat tatgcaagga gctttaaaa agctcatgta 6000
aagaagagta aaaagaaaaa ataatttatt tattaattta atattgagag tgccgacaca 6060
gtatgcacta aaaaatatat ctgtgggtga gtgagccgat acaaaaggat agtcactcgc 6120
attttcataa tacatcttat gttatgatta tgtgtcgggtg ggacttcacg acgaaaaccc 6180
acaataaaaa aagagttcgg ggtagggtta agcatagttg aggcaactaa acaatcaagc 6240
taggatatgc agtagcagac cgtaaggctg ttgttttaggt gtgttgtaat acatacgcta 6300
ttaagatgta aaaaatacga taccaatgaa gggaaaagta taatttttg atgtagtttg 6360
tttgttcatc tatgggcaaa ctacgtccaa agccgtttcc aaatctgcta aaaagtatat 6420
cctttctaaa atcaaaagtca agtatgaaat cataaataaa gtttaatttt gaagttatta 6480
tgatattatg tttttctatt aaaataaatt aagtatatag aatagtttaa taatagtata 6540
tacttaatgt gataagtgtc tgacagtgtc acagaaagga tgattgttat ggattataag 6600
cggccggcca gtgggcaagt tgaaaaattc acaaaaatgt ggtataatat ctttgttcat 6660
tagagcgata aacttgaatt tgagaggga cttagatggt atttgaaaa attgataaaa 6720
atagttggaa cagaaaagag tatTTtgacc actactttgc aagtgtacct tgtacctaca 6780
gcatgaccgt taaagtggat atcacacaaa taaaggaaaa gggaatgaaa ctatatcctg 6840
caatgcttta ttatatTgca atgattgtaa accgccattc agagtttagg acggcaatca 6900

atcaagatgg tgaattgggg atatatgatg agatgatacc aagctataca atatttcaca 6960
 atgatactga aacattttcc agcctttgga ctgagtgtaa gtctgacttt aaatcatttt 7020
 tagcagatta tgaaagtgat acgcaacggg atggaaacaa tcatagaatg gaaggaaagc 7080
 caaatgctcc ggaaaacatt tttaatgtat ctatgatacc gtggtcaacc ttcgatggct 7140
 ttaatctgaa tttgcagaaa ggatatgatt atttgattcc tttttttact atggggaaat 7200
 attataaaga agataacaaa attatacttc ctttggcaat tcaagttcat cacgcagtat 7260
 gtgacggatt tcacatttgc cgttttgtaa acgaattgca ggaattgata aatagttaac 7320
 ttcaggtttg tctgtaacta aaaacaagta ttttaagcaa aacatcgtag aaatacgggtg 7380
 ttttttgtaa ccctaagttt aaactccttt ttgataatct catgaccaa atcccttaac 7440
 gtgagttttc gttccactga gcgtcagacc ccgtagaaaa gatcaaagga tcttcttgag 7500
 atcctttttt tctgcgcgta atctgctgct tgcaaacaaa aaaaccaccg ctaccagcgg 7560
 tggtttgttt gccggatcaa gagctaccaa ctctttttcc gaaggtaact ggcttcagca 7620
 gagcgcagat accaaatact gttcttctag tgtagccgta gttaggccac cacttcaaga 7680
 actctgtagc accgcctaca tacctcgtc tgctaatect gttaccagtg gctgctgcca 7740
 gtggcgataa gtcgtgtctt accgggttgg actcaagacg atagttaccg gataaggcgc 7800
 agcggtcggg ctgaacgggg ggttcgtgca cacagcccag cttggagcga acgacctaca 7860
 ccgaactgag atacctacag cgtgagctat gagaaagcgc cacgcttccc gaagggagaa 7920
 aggcggacag gtatccggtg agcggcaggg tcggaacagg agagcgcacg agggagcttc 7980
 cagggggaaa cgcttggtat ctttatagtc ctgtcgggtt tcgccacctc tgacttgagc 8040
 gtcgattttt gtgatgctcg tcaggggggc ggagcctatg gaaaaacgcc agcaacgcgg 8100
 ccttttttacg gttcctggcc ttttgctggc cttttgctca catgttcttt cctgcgttat 8160
 cccctgattc tgtggataac cgtattaccg ctttgagtg agctgatacc gctcgccgca 8220
 gccgaacgac cgagcgcagc gagtcagtga gcgaggaagc ggaagagcgc ccaatacgca 8280
 gggccccctg cttcggggtc attatagcga ttttttcggt atatccatcc tttttcgca 8340
 gatatacagg attttgcaa agggttcgtg tagactttcc ttggtgtatc caacggcgctc 8400
 agccgggcag gataggtgaa gtagggccac ccgcgagcgg gtgttccttc ttcactgtcc 8460
 cttattcgca cctggcgggt ctcaacggga atcctgctct gcgaggctgg ccggctaccg 8520
 ccggcgtaac agatgagggc aagcggatgg ctgatgaaac caagccaacc aggaagggca 8580
 gcccacctat caaggtgtac tgccttcag acgaacgaag agcgattgag gaaaaggcgg 8640
 cggcgccgg catgagcctg tcggcctacc tgctggccgt cggccagggc taaaaatca 8700
 cgggcgtcgt ggactatgag cacgtccgcg agctggcccc catcaatggc gacctgggcc 8760
 gcctgggcgg cctgctgaaa ctctggtcga ccgacgacc gcgcacggcg cggttcgggtg 8820
 atgccacgat cctcgccctg ctggcgaaga tcgaagagaa gcaggacgag cttggcaagg 8880
 tcatgatggg cgtgggtccgc ccgagggcag agccatgact tttttagccg ctaaacggc 8940
 cgggggggtgc gcgtgattgc caagcacgtc cccatgcgt ccatcaagaa gagcgacttc 9000
 gcggagctgg tgaagtacat caccgacgag caaggcaaga ccgatcgggc cc 9052

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 0g42f

<400> 12

ctgcacctaa aaccaaagca gtatt 25

<210> 13

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 0g43r

<400> 13

atcctttaag caagagtact gcacc 25

<210> 14

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 fd1

<400> 14

ctgcacctaa aaccaaagca gtatt 25

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 rP2

<400> 15

atcctttaag caagagtact gcacc 25

<210> 16

<211> 1160

<212> DNA

<213> 自产乙醇梭菌

<400> 16

agtggcactg gaaaagaact cttagctcaa tctattcaca attatagtga aagatgtgaa 60
ggcccttttg tagctataaa ttgtagttct atacctagag aacttgtaga aagtgagctt 120
tttggttatg aaaaaggagc ttttacggga gctttaaaagc aaggaaagcc tggaaagttt 180
gaattagcag atggagggaac tatttttttg gatgaagtag gagagcttcc tcttgatata 240
cagtcaaagc ttttaagggt tcttgataat aataaaatta caagagttgg aggaacttat 300

gaaaaacagc taaatgtaag gataatagga gctacaaaca gggtgctcaa ggatgaaatt 360
 aaaaagaaaa atttcagaag tgacctttat tatagattga gtgtgatgaa tataaaaaact 420
 gtcccaactta gggaaagaaa agaagatata gagcttttaa ttaaattttt tatggaagaa 480
 ttgaattcta aaagtttgtg taagaagaaa gtagtggaag aagcatacat agaaaagatt 540
 aaagcttatg attggcctgg aaatgttaga gaacttagaa atgtaataga gagggattac 600
 tatttaagtg aggataagat ggcccctttg gattatttag aaaaagaagt ttatgaaaaa 660
 aatgtctcct ctgatccagt aaatattagt gtgcttccaa tggatgtttt agaaaaagaa 720
 aacattgaaa atgcacttaa aaagtgtgaa ggaaatatat taaaagctgc aaaatcctta 780
 aatatcagta gatctaccat gtatagaaaa atgaaaaagt atggaataaa aagtgtgtca 840
 aaatgaccag aaaagagtaa gattctcaaa ataggacact aagtatgtgt cataatggca 900
 catagtgatt ttaaattgtc ttttaacagg tttcttgttt ttggtatggc ttttgcttat 960
 aaaatatagt gaatatatta acaggtatat gtaaatttta atattgccat actattataa 1020
 aaaaggagag ataattatga aagctgtatt gtggtatgat aaaaagatg taagagtaga 1080
 ggaaattgag gaacctaaag taaaagaaaa tgctgtaaaa attaaagtga aatggtgtgg 1140
 tatatgtggt tctgacttgc 1160

<210> 17

<211> 834

<212> DNA

<213> 自产乙醇梭菌

<400> 17

tattgaggag gccaaaaatg agctttaaga aaaatgtata cgatacaatg agggaactaa 60
 tatctgtgcc aagcatactt ggtacaaaag aagagtgtgc ggcagcagaa aaaatatatg 120
 aaaaaatttt ggaaatacct tattttaagg acaatcctga aaatctagga atagagcaaa 180
 ttgaagatga tccttttagga agaagctttg tatgggcagt agtaaattga aatgaaaatt 240
 caccaaattc gtttataact tcaggtcatt tggatgtagt tggagtagaa gaatttgac 300
 attttaaatac tatggctttt gatgtagatg aatgtactaa aagaatctca gaattgaatt 360
 tagatgaaga tgctatggag gattttaaat caggagattg gatatttgga aggggaactg 420
 cagacatgaa gtttgagagt gccctcaata tggaactttt aagagaattc agtaaagaga 480
 gaaactttta gggaaactta ttacttttag tagttcctgg tgaagagagt aattccgaag 540
 gaatgattgc tgcagctcca tttcttctta aattaaagga agagaggaag tacaattact 600
 gtggtatgat aatatcagag ccaagtatac ctgaaagagg agaaaaagaa ggcaagagat 660
 tatatatagg tagttagagt aaaattatgc ctttattttt ttgtgtggga aaagaaactc 720
 atgtagggga atctttaaga ggattgaatc caaatttgct agtttcagag ataaacaaat 780
 taatggaatg taatccagat ctctcagata gcgtttatga tactgtgact ccac 834

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 0g13f
<400> 18
attcatcctg caggagtggc actggaaaag aactcttag 39
<210> 19
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸 0g14r
<400> 19
gactgcggcc gcgcaagtca gaaccacata taccaca 37
<210> 20
<211> 35
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸 0g15f
<400> 20
atatgctagc tattgaggag gccaaaaatg agctt 35
<210> 21
<211> 37
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸 0g16r
<400> 21
gactggcgcg ccgtggagtc acagtatcat aaacgct 37
<210> 22
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸 0g33f
<400> 22
aatggcaggg cagataattg taatg 25
<210> 23
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 0g34r

<400> 23

aaggcattct gagccagttc tttta 25

<210> 24

<211> 1062

<212> DNA

<213> 自产乙醇梭菌

<400> 24

acagttaaaa agcatatcta acagtccttc cactgtacta attcaaggcg aaagcggtag 60
 aggtaaaagaa cttattgcgc agtccatcca caatgacagc agcagaaaaa ataacagctt 120
 tatagcaata aattgcggtg ccatacccaa aaatttaata gaaagtgaat tattcggata 180
 tgaagatgga tcattcacag gtgcaaaaca tggagggcgt gcaggaaaat ttgaacttgc 240
 aaatggtggt actttatttt tagatgaaat tggggaaatg ccttttagata tgcaagtaaa 300
 tcttttaaga gttctccaag aaaactgtat tacaagaata ggcgggaaca gatgtgtaaa 360
 aatagatata agaatcattg cagctactaa taaaaatttg agggaagaaa tacataaagg 420
 aacttttcgc gaagatttat actatagact aaatgtaata cctatatatg taccaccact 480
 gcgggaaaga gatatggata ttaaaatact gataaactat tttttaaaga taaaagcttt 540
 taaacttaaa aaacctattc caatagtaag acctgatata tatcaaaagc tcttaaat 600
 taattggccc ggaaatgtaa gagaattgga aaattgtatt gaaaatatcg taaatatgaa 660
 tggaaataca tctttcaact tcgaaaatag tatttcagta aatacgcaaa ctagtccttg 720
 tactacaaaa tttaaatatg atatgtattc attaaaagag ttggaaaaag aagcaataac 780
 aaattgtatg agtaattgca atggtaacat tgcaaaagct tctaaaattc tgggaataaa 840
 tagaagtact ttgtatacaa aaataaaaaa atatcaaatt aatttttctt aaagtgtatg 900
 taaacacaac tttgttgtaa aaagcaacat tattttctta aaaaatgttg ctttttacag 960
 catTTTTTcaa ttatatatat taaccttata aagtcctacc cccctaaatt caaccttttc 1020
 atgataaaaa acatactggc acaacatttg cttatatatt ta 1062

<210> 25

<211> 823

<212> DNA

<213> 自产乙醇梭菌

<400> 25

cgtatTTTTta attgcgaact taagatttaa ttaatatcta ctatgagtaa gtcaacatat 60
 atacctaaat tatgataaaa ttatatatta taatttcaaa ataaacataa ctataataat 120
 aactaagat aaagctatTT atctgatggc tacctactgt aacactccct cttctatcaa 180
 agtgagagat aacagtagct acgccccatg ataattcatc taaacttagt gggagaaaca 240
 aaactctaaa gagaaagcga ttcactttaa atcaaagatt tgagatatct gcttctccca 300
 ctaagtaaga ttcatgata taaaaaggaa ggtaatctaa taatgtttaa accatttact 360
 catagtgaag tagtcagtag gtctcttaat agatgcatta aataccatat agaaaaaggt 420

ataccaaaac ctaaacgaac acttagtcgc aaagaattgg acaacttaat aaaagaaaac 480
aacgatatta taaaaatagc aaaaccattt atggaaatac tttatgattt ttttaagtga 540
tcaggtttct cattatatct cacagacaaa aatggaattg tattaactat cataggtgac 600
aaagatatgt taatggagca ggcaaaggct ggaatagcag aaggtattga tctgagtga 660
caaagtgcag gtacaaatgc agcaggaact gctatTTTTG aaaatttGtc agttcaactt 720
tcaggcaaaG aacattttat aaatactttt cagatttata cctgctctgc atctgtcata 780
cataacgaac aaggaaatat aatcggatgt ctaactttaa ctg 823

<210> 26

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 Sec5f

<400> 26

attcatcctg caggacagtt aaaaagcata tctaacagt 39

<210> 27

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 Sec5r

<400> 27

gactgcggcc gctaaatata taagcaaagc ttgtgcc 37

<210> 28

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 Sec3f

<400> 28

atatgctagc gtattttttaa ttgcgaactt aaga 34

<210> 29

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 Sec3r

<400> 29

gactggcgcg ccagttaaag ttagacatcc gattat 36

<210> 30
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸 Sec0f
<400> 30
ttggaatttt agctgtagat aacaa 25
<210> 31
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸 Sec0r
<400> 31
taagtgattt tcaatggact ttact 25
<210> 32
<211> 344
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 针对醇脱氢酶的内含子靶区域
<400> 32
aagcttataa ttatccttag atatcaatct tgtgcgccca gatagggtgt taagtcaagt 60
agtttaaggt actactctgt aagataacac agaaaacagc caacctaacc gaaaagcgaa 120
agctgatacg ggaacagagc acggttgga agcgatgagt tacctaaaga caatcgggta 180
cgactgagtc gcaatgttaa tcagatataa ggtataagtt gtgtttactg aacgcaagtt 240
tctaatttcg attatatctc gatagaggaa agtgtctgaa acctctagta caaagaaagg 300
taagtttagca agattgactt atctgttatc accacatttg taca 344
<210> 33
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> SecCTf的寡核苷酸
<400> 33
tgatttttagg ccatgaagct gtagg 25
<210> 34
<211> 24

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> SecCTr的寡核苷酸
<400> 34
catgatttgt tcaactatat cacc 24
<210> 35
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸 GnK-F
<400> 35
tcaggacctt ctggaactgg 20
<210> 36
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸 GnK-R
<400> 36
acctccccctt ttcttggaga 20
<210> 37
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸 FoT4L-F
<400> 37
caggtttcgg tgctgacctta 20
<210> 38
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 寡核苷酸 FoT4L-F
<400> 38
aactccgccg ttgtatttca 20
<210> 39

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 KpBDH -F

<400> 39

aagttttctga ggctgcaggt 20

<210> 40

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 寡核苷酸 KpBDH -R

<400> 40

aagttttctga ggctgcaggt 20

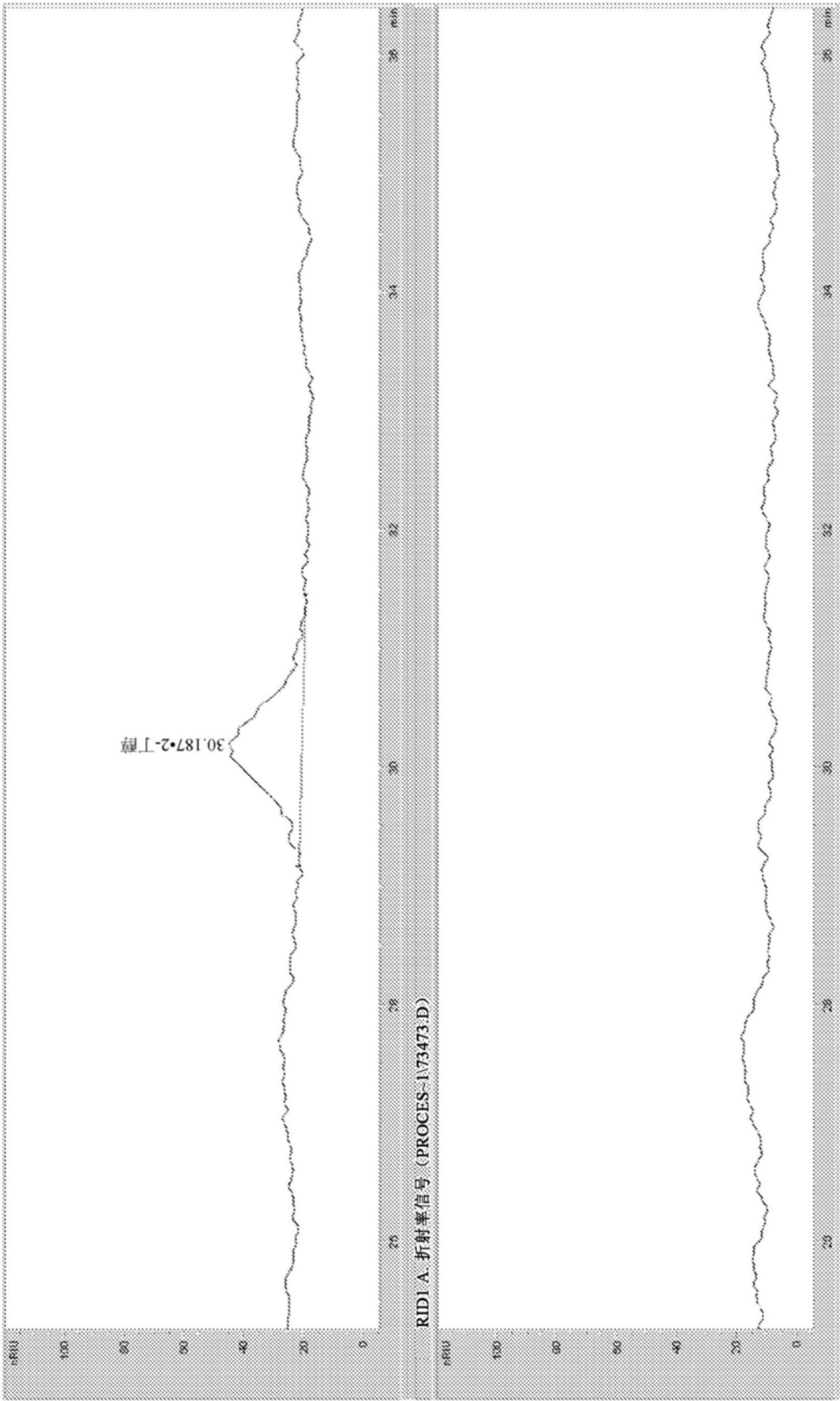


图1

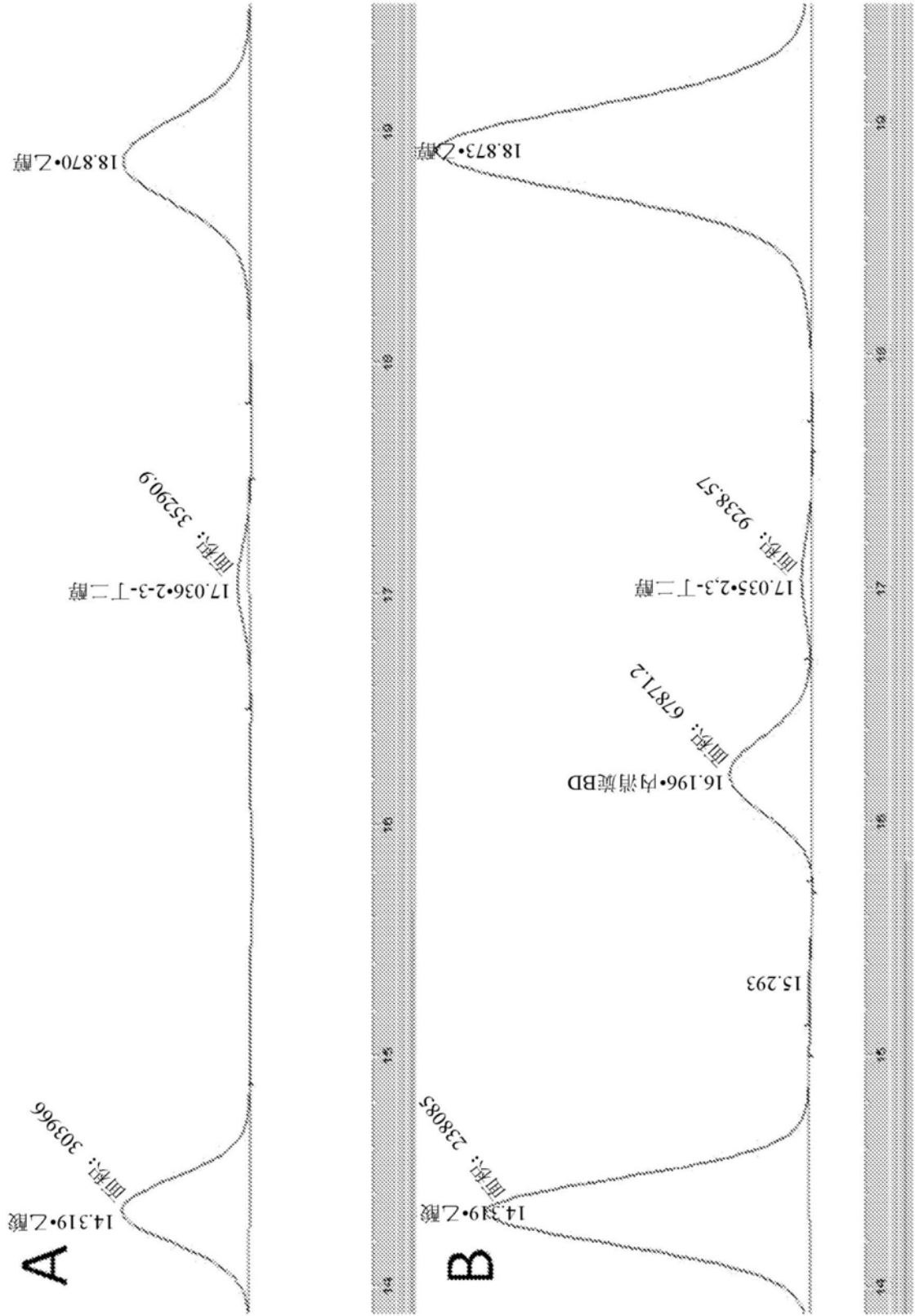


图2

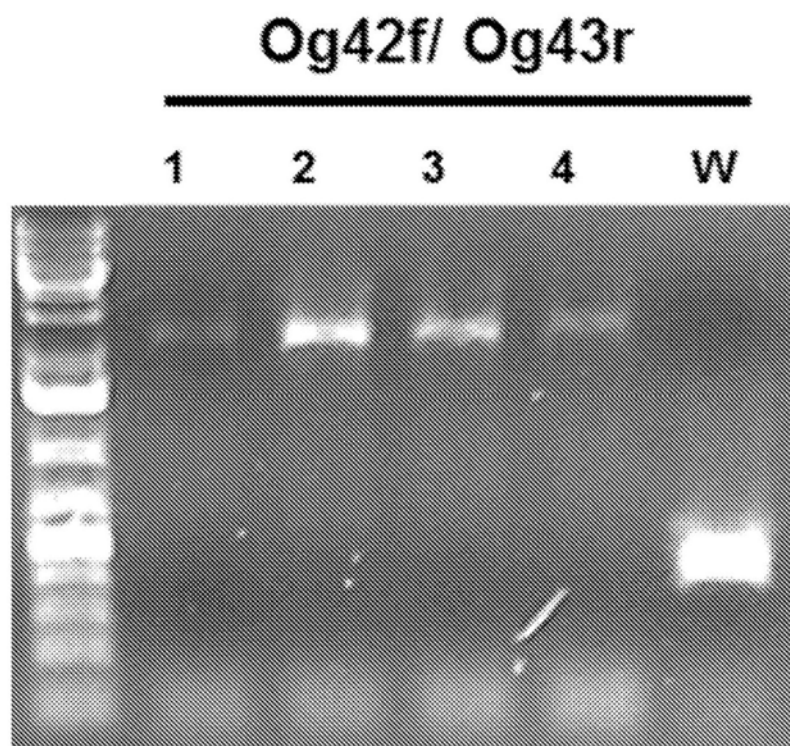


图3

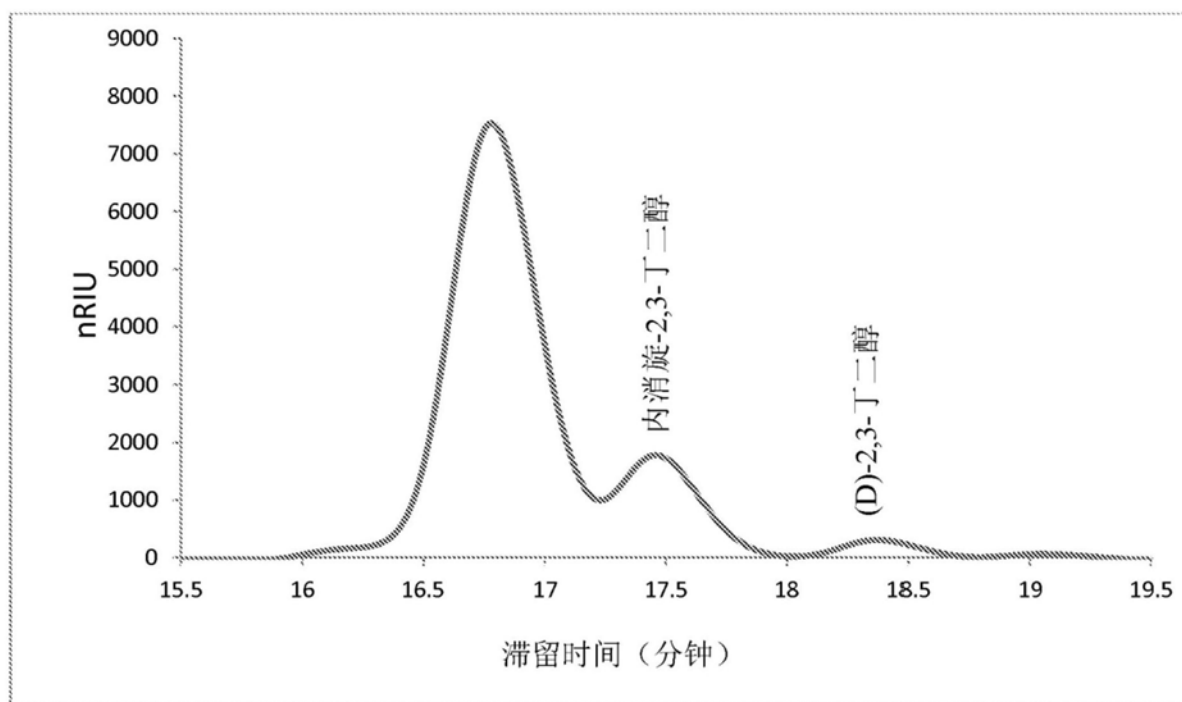


图4

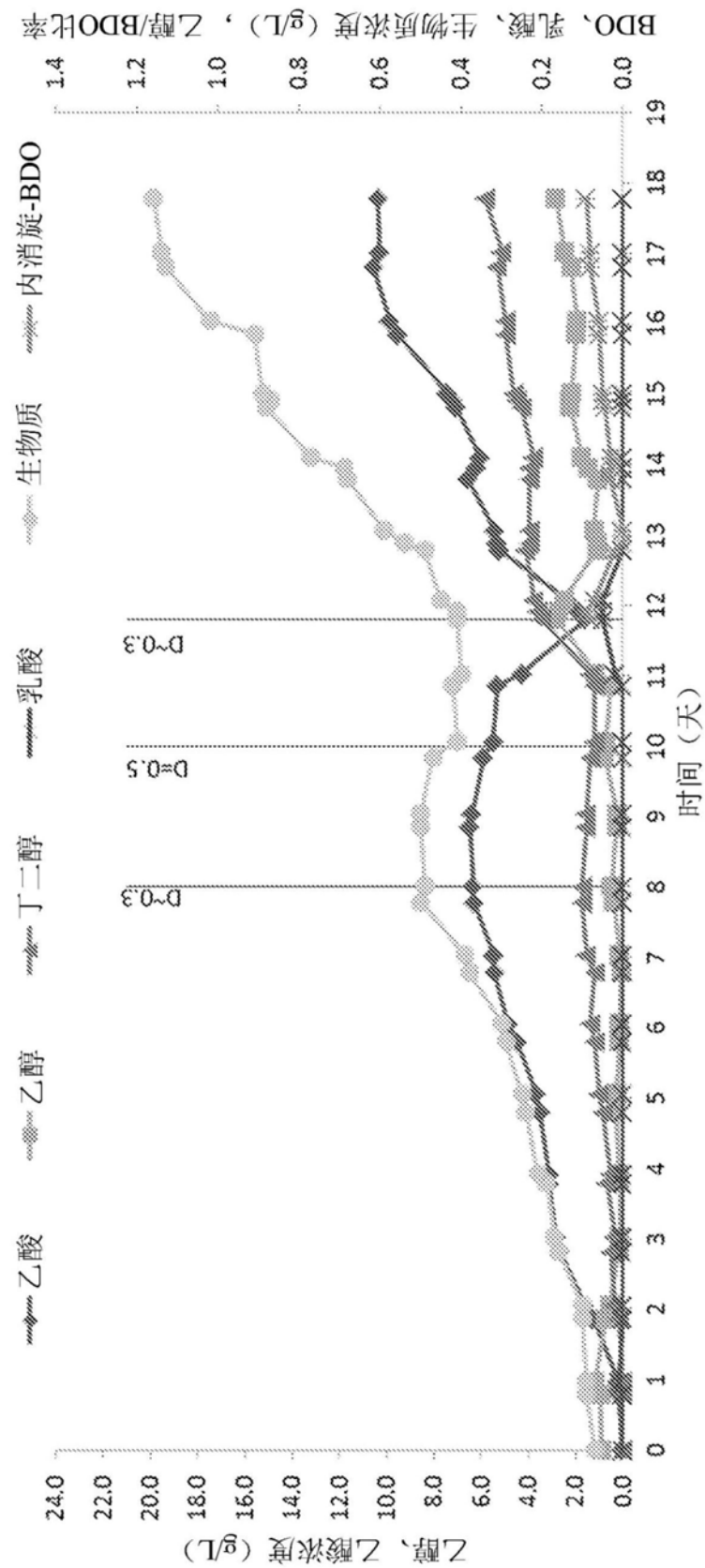


图5

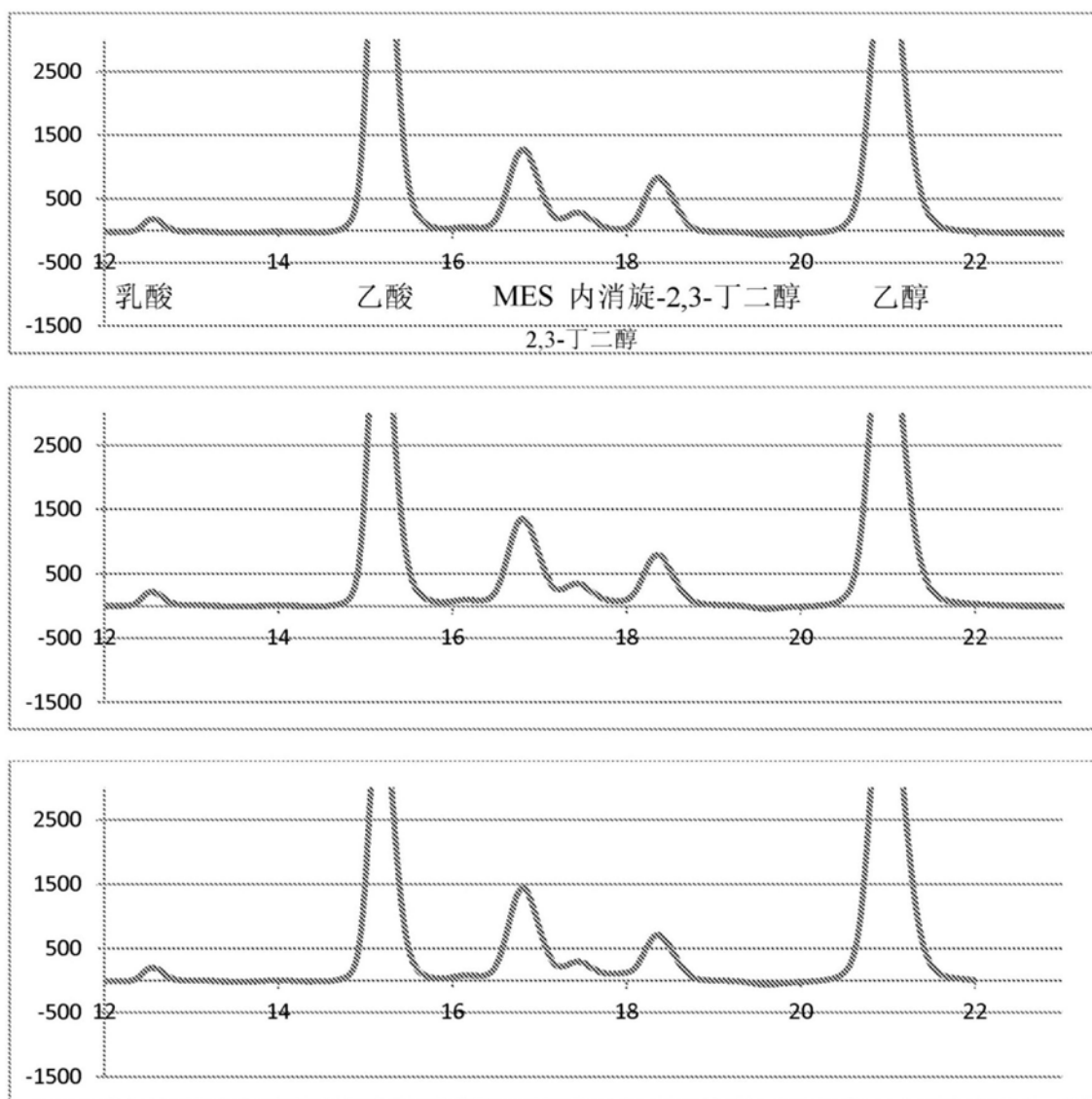


图6

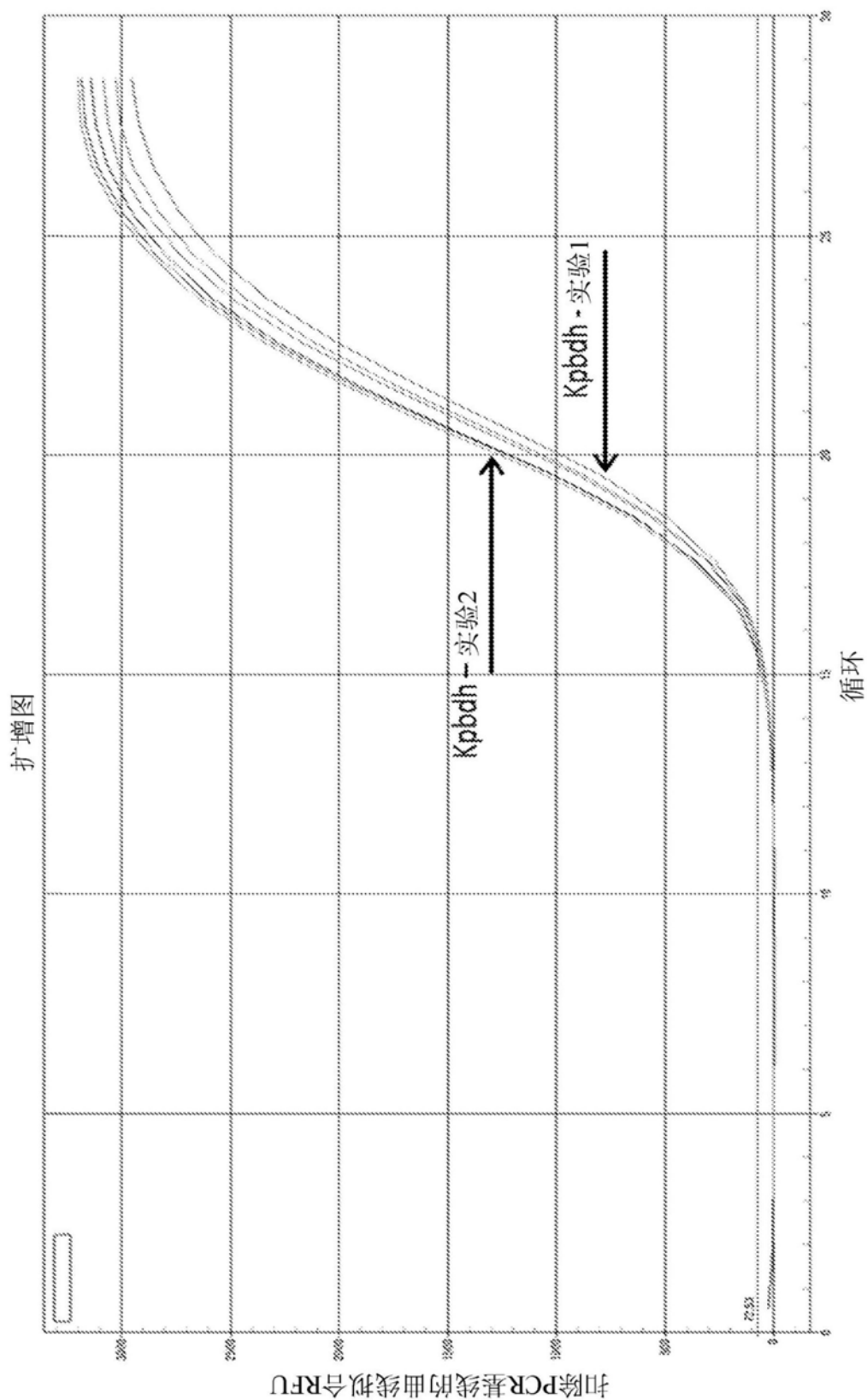


图7

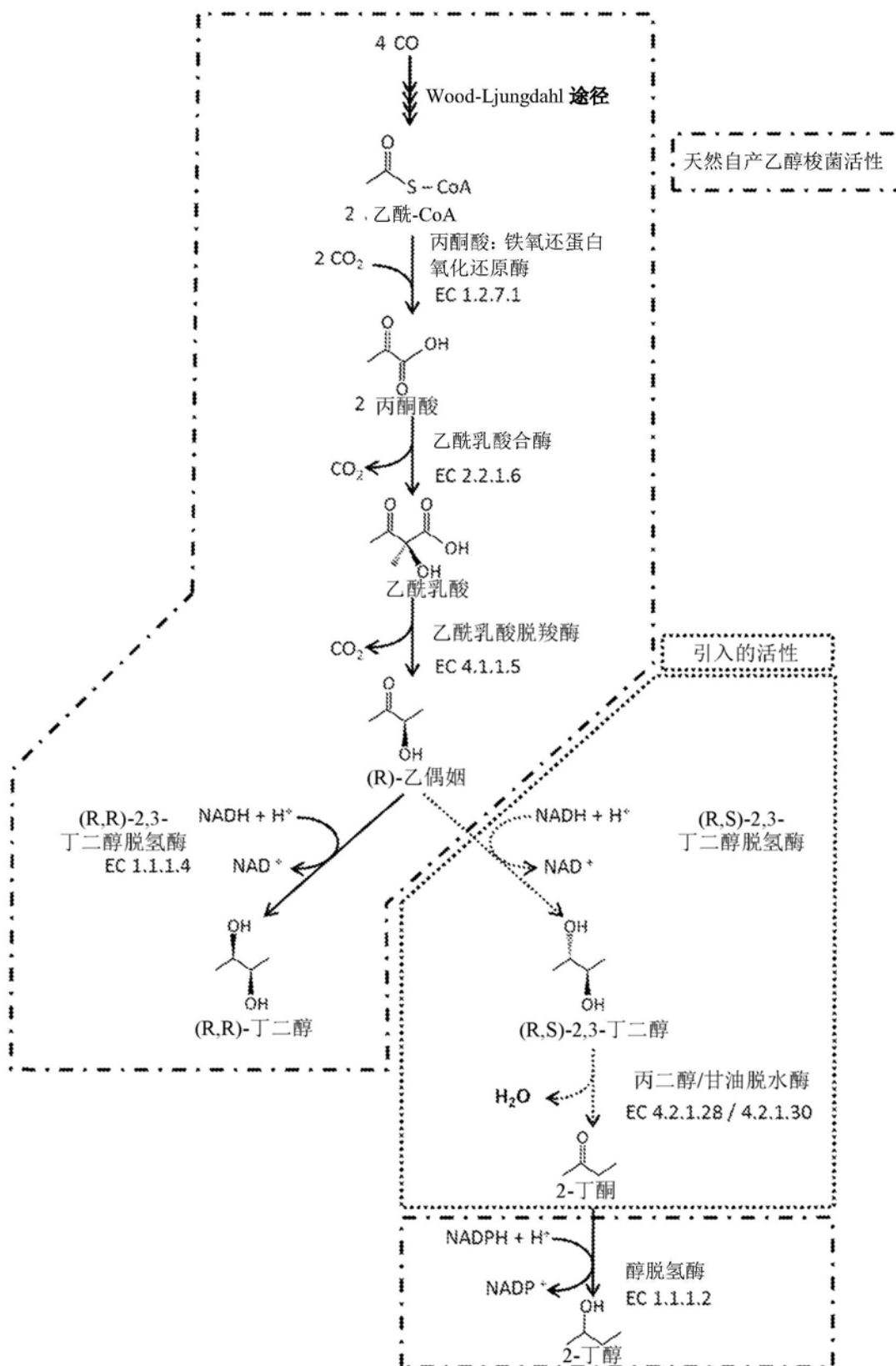


图8

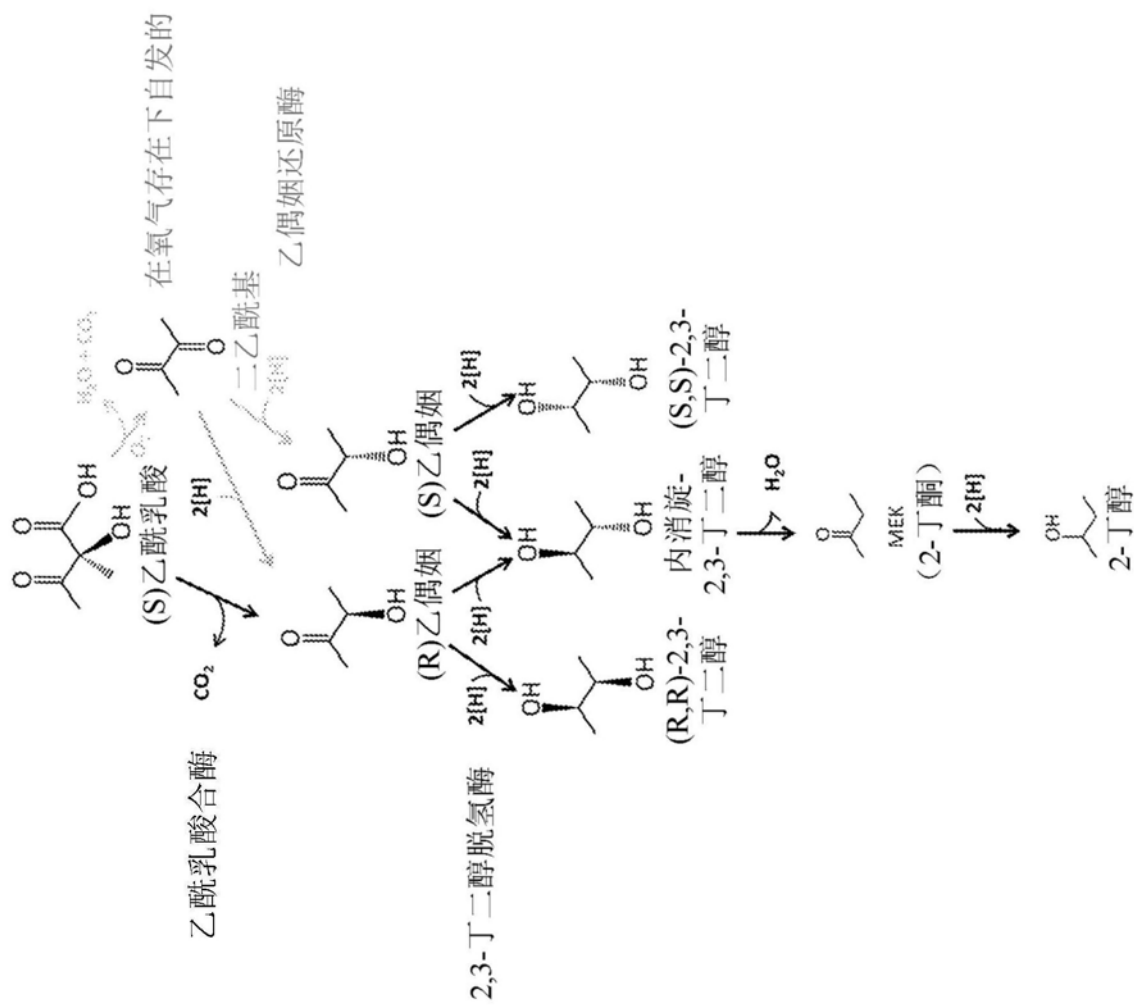


图9