



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103298923 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 11

(21) 申请号 201180063627. 6

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
11105

(22) 申请日 2011. 10. 28

代理人 宋莉

(30) 优先权数据

10290583. 3 2010. 10. 28 EP

61/407, 747 2010. 10. 28 US

(51) Int. Cl.

C12N 1/14 (2006. 01)

C12R 1/645 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 06. 28

(86) PCT申请的申请数据

PCT/EP2011/068971 2011. 10. 28

(87) PCT申请的公布数据

W02012/055998 EN 2012. 05. 03

(83) 生物保藏信息

CBS 127564 2010. 07. 21

CBS 127565 2010. 07. 21

CBS 127566 2010. 07. 21

(71) 申请人 道达尔炼油与销售部

地址 法国皮托

(72) 发明人 R. A. 韦斯特威斯 E. J. H. 沃伯特

J. 斯普林格 J. 范德奥斯特

G. 艾金克

权利要求书2页 说明书28页 附图34页

(54) 发明名称

红曲霉在有机酸生产中的用途

(57) 摘要

本发明提供用在低 pH 下耐受高有机酸浓度的红曲霉菌株生产有机酸的工具和方法。

1. 一种生产包含有机酸的组合物的方法,其包括步骤:
 - (i) 提供在低于 5.0 的 pH 耐受至少 50g/L 的有机酸浓度的红曲霉属微生物,为提高所述有机酸的产生该微生物已经过遗传修饰;和
 - (ii) 在存在己糖或戊糖或其组合作为唯一碳源的情况下,在高出有机酸 pKa 值不到 1.5 个单位的 pH 培养所述微生物。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述微生物在低于 3.0 的 pH 耐受至少 50g/L 的有机酸浓度。
3. 根据权利要求 1 或 2 的方法,其中所述微生物包含以下一或多项:
 - a) 一个或多个涉及所述有机酸生产的重组基因;和 / 或
 - b) 对涉及产生非目的有机酸的代谢物的内源代谢途径的基因的一种或多种工程化基因删除和 / 或失活,和 / 或其中所述内源代谢途径消耗目的有机酸。
4. 根据权利要求 1 至 3 中任一项的方法,其中所述微生物包含对涉及内源乙醇生产的基因的一或多种工程化基因删除和 / 或失活。
5. 根据权利要求 4 的方法,其中所述微生物包含对内源 PDC1、PDC2 和 / 或 PDC4 基因的一种或多种工程化基因删除和 / 或失活。
6. 根据权利要求 1 至 5 中任一项的方法,其中所述有机酸为乳酸、琥珀酸和 / 或延胡索酸。
7. 根据权利要求 6 的方法,其中所述有机酸是乳酸,且其中所述红曲霉菌株包含以下一或多项:
 - a) 编码 L-LDH 的重组基因;和
 - b) 对内源 D-乳酸生产或 L-乳酸消耗途径或编码产物涉及生产非乳酸代谢物的内源途径的基因的至少一种工程化基因删除和 / 或失活。
8. 根据权利要求 7 的方法,其中所述编码 L-LDH 的重组基因是异源或外源 LDH 基因。
9. 根据权利要求 7 或 8 的方法,其中所述红曲霉菌株在一种或多种编码选自下组酶的基因和所述基因的任意组合中包含工程化基因删除和 / 或失活:丙酮酸脱羧酶(pdc)、延胡索酸还原酶、乙醇脱氢酶(adh)、乙醛脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(ppc)、D-乳酸脱氢酶(d-ldh)、L-乳酸脱氢酶(l-ldh)。
10. 根据权利要求 7 至 9 中任一项的方法,其中所述红曲霉菌株在编码丙酮酸脱羧酶(pdc)、D-乳酸脱氢酶(d-ldh)和 / 或 L-乳酸脱氢酶(l-ldh)的内源基因内包含至少一种工程化基因删除和 / 或失活。
11. 根据权利要求 6 的方法,其中所述有机酸为琥珀酸和 / 或延胡索酸,且其包含以下一或多项:
 - a) 一或多种选自以下的异源或外源基因:磷酸烯醇丙酮酸(PEP)羧激酶基因、苹果酸脱氢酶基因、延胡索酸酶基因、延胡索酸还原酶基因、异柠檬酸裂合酶基因和 / 或苹果酸合酶基因;和 / 或
 - b) 对内源琥珀酸和 / 或延胡索酸消耗途径、或编码产物涉及产生非琥珀酸和 / 或延胡索酸的代谢物的内源途径的基因的至少一种工程化基因删除和 / 或失活。
12. 根据权利要求 11 的方法,其中所述有机酸为延胡索酸,且其中所述微生物包含一或多种选自丙酮酸脱羧酶基因、苹果酸脱氢酶基因和延胡索酸酶基因的异源基因。

13. 根据权利要求 11 或 12 的方法,其中所述微生物还包含在编码选自下组的酶的一种或多种基因或所述基因中的任意组合中的工程化基因删除和 / 或失活:丙酮酸脱羧酶(pdc)、醇脱氢酶(adh)、乙醛脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(ppc)、D- 乳酸脱氢酶(d-ldh)、L- 乳酸脱氢酶(l-ldh)、甘油 -3- 磷酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶。

14. 根据权利要求 11 至 13 中任一项的方法,其中所述有机酸是琥珀酸,且其在编码琥珀酸脱氢酶或延胡索酸还原酶的内源基因内包含至少一种工程化基因删除和 / 或失活。

15. 根据权利要求 1 至 14 中任一项的方法,其中从己糖或戊糖或其组合以至少 0.5g/L 的产率生产所述有机酸。

16. 权利要求 15 的方法,其中所述产率为至少 2g/L。

17. 根据权利要求 1 至 16 中任一项的方法,其中所述红曲霉属内的种为红色红曲霉(*Monascus ruber*)。

18. 一种生产纯化有机酸的方法,该方法包括权利要求 1 至 17 中任一项的方法且还包括从培养基回收所述有机酸的步骤。

19. 一种分离的红曲霉属的微生物,其在低于 5.0 的 pH 耐受至少 50g/L 的有机酸浓度,并且为提高所述有机酸的生产其已经过遗传修饰。

20. 权利要求 19 的微生物,其在低于 3.0 的 pH 耐受至少 50g/L 的有机酸浓度。

21. 根据权利要求 19 或 20 的微生物,其包括以下一或多项:

a) 一或多个涉及所述有机酸生产的重组基因;和 / 或

b) 对涉及产生非目的有机酸的代谢物的内源代谢途径的基因的一种或多种工程化基因删除和 / 或失活,和 / 或其中所述内源代谢途径消耗所述目的有机酸。

红曲霉在有机酸生产中的用途

发明领域

[0001] 本发明涉及用于生产有机酸的微生物及其应用。

[0002] 发明背景

[0003] 有机酸广泛用于食品、药品和纺织工业，被公认为生物炼制中的关键化学构建块之一。将有机酸用于生产用作可生物降解塑料的多聚体也是人们感兴趣的。

[0004] 许多微生物都能够通过有氧或厌氧发酵过程来生产有机酸。乳酸杆菌物种目前被广泛用于以淀粉为基础的乳酸生产工业。这些物种中大多数都缺乏发酵戊糖，比如木糖和阿拉伯糖，的能力。尽管戊糖乳杆菌(*Lactobacillus pentosus*)、短乳杆菌(*Lactobacillus brevis*)和乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*)能够将戊糖发酵为乳酸，但戊糖是经磷酸酮醇酶途径代谢的，该途径的乳酸生产效率低下。事实上，在磷酸酮醇酶途径中，5-磷酸木酮糖被切割为3-磷酸甘油醛和乙酰磷酸。经该途径，由于丢失两个碳原子给乙酸，使得乳酸的最大理论产率限于一乳酸每戊糖(0.6g 乳酸每克木糖)。

[0005] 在大多数比如大肠杆菌这样的平台宿主生物中，高滴度的有机酸生产要么是低效率的要么是有毒性的。在中性 pH 生产比如乳酸这样的有机酸通常导致产生乳酸钙，不得不通过添加硫酸使其转化成乳酸，结果形成 CaSO_4 (石膏)作为副产物。为了直接生产乳酸，必须在低 pH (优选比乳酸的 pKa 值 3.85 至少低一个单位)下完成发酵。然而乳酸对微生物是有毒性的，因为在其质子化形式下，它是破坏膜电势的解偶联剂。在提高比如琥珀酸和延胡索酸这样的其他有机酸生产时，也观察到类似的缺陷。因此，尽管有许多微生物能够耐受低 pH，却只有有限的微生物因能在低 pH 耐受有机酸而适于有机酸生产。

[0006] 细菌发酵的一个重要缺陷是成本。由于许多细菌不能合成为其生长和有效代谢糖类所需的某些氨基酸或蛋白质，因而常需向细菌饲以稍显复杂的营养包，这提高了进行发酵的直接开支。此外，液体培养基的复杂性提高也使得回收合理纯度形式的发酵产物更加困难，由此使得回收产物操作和资金成本提高。还有，使用玉米作为给料直接与食品和饲料业形成竞争。

[0007] 由此，仍然需要用于乳酸发酵工艺的改良生物催化剂。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供用于有机酸生产的改良微生物。更特别的是，本发明提供在低 pH 高度耐受高浓度有机酸并因此而适用于通过遗传工程生产有机酸的微生物。在更特别的实施方案中，本发明提供重组真菌，更特别的是红曲霉属内物种的重组真菌，所述重组真菌中特定外源和/或内源基因过表达和/或被抑制由此使其在发酵培养基中培养时可产生更高水平的有机酸。相应地，本发明的重组红曲霉菌株可用于在低 pH 提高有机酸生产并由此而提供更大量的食品和工业应用有机酸供应。

[0010] 因此本发明第一方面提供微生物，更特别的是，红曲霉属的微生物，其能够在低 pH 耐受高浓度的有机酸。在特别的实施方案中，它们可以在高于有机酸 pKa 值不到 1.5 个单位的 pH 耐受浓度提高的有机酸。更特别的是，本发明的微生物可在低于 5，更特别的是低于 4，甚至更特别的是低于 3，最特别的是低于 2.8 的 pH 耐受比如乳酸这样的有机酸。在更特

别的实施方案中,它们能够在含有 50g/L,最特别的是 100g/L 有机酸的培养基中生长,以及在具体的实施方案中在含有高达 150 至 175g/L 有机酸的培养基中,在低 pH,更特别的是低于 5,更特别的是低于 4,甚至更特别的是低于 3,最特别的是低于 2.8 的 pH 生长。在本发明的具体实施方案中,红曲霉属内的种是红色红曲霉(*Monascus ruber*)。该高酸耐受性使它们,甚至在厌氧或准厌氧条件下,尤其适用于有机酸的工业生产。

[0011] 在具体实施方案中,为进一步增强有机酸生产,这些微生物经遗传工程修饰。在具体实施方案中,本发明的微生物能够在己糖和戊糖中生长并在有机酸中转化这些糖。在更特别的实施方案中,本发明的微生物在浓度为至少 50g/L,更特别的是,浓度为至少 70g/L,至少 100g/L,至少 200g/L 或更高的葡萄糖和木糖中生长。

[0012] 本发明的具体实施方案提供,为提高有机酸生产对本发明的微生物进行遗传工程修饰,更特别的是,经以下一或多项:

[0013] a) 一或多个涉及有机酸生产的重组基因;和/或

[0014] b) 对涉及产生非目的有机酸的代谢物的内源代谢途径的基因进行一或多种工程化基因删除和/或失活,和/或所述内源代谢途径消耗该目的有机酸。

[0015] 在具体实施方案中,有机酸是乳酸、琥珀酸和/或延胡索酸。

[0016] 在更特别的实施方案中,对涉及产生非目的有机酸的代谢物的内源代谢途径的基因所进行的一或多种工程化基因删除和/或失活是对涉及内源乙醇生产的基因的删除和/或失活。更特别的是,根据本发明的红曲霉属的微生物是其中内源丙酮酸脱羧酶生产被失活的微生物。更特别的是,该微生物是红曲霉属的微生物,其中如本文所述的内源 PDC1、PDC2 和 PDC4 基因中的一或多个被失活。在更特别的实施方案中,一或多个被失活和/或删除的内源脱羧酶编码序列是对应于 SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4 和/或 SEQ NO:5 中一或多个的序列。

[0017] 在某些特定的实施方案中,本发明提供能够在低 pH 生产更高水平乳酸,尤其是 L-乳酸,的经遗传修饰或重组的红曲霉菌株。更特别的是, L-乳酸是以高产率从己糖和/或戊糖生产的。

[0018] 在具体实施方案中,根据本发明的微生物包含异源或外源 LDH 基因。相应地,在具体实施方案中,本发明提供包含异源或外源 LDH 基因的经遗传修饰或重组的红曲霉菌株。在进一步的特定实施方案中,根据本发明的经遗传修饰或重组的红曲霉菌株包含异源或外源 LDH 基因,其编码与由 SEQ IDNO:1 编码的蛋白质有至少 80% 同一性的功能性蛋白质。

[0019] 在某些特定的实施方案中,本发明提供经遗传修饰或重组的红曲霉菌株,其能够生产更高水平的琥珀酸和/或延胡索酸。在具体实施方案中,根据本发明的微生物包含一或多个选自磷酸烯醇丙酮酸(PEP)羧激酶基因、苹果酸脱氢酶基因、延胡索酸酶基因、延胡索酸还原酶基因、异柠檬酸裂合酶基因和/或苹果酸合酶基因的异源或外源基因。由此,在具体实施方案中,本发明提供经遗传修饰或重组的红曲霉菌株,其包含一或多个选自异源或外源磷酸烯醇丙酮酸(PEP)羧激酶基因、苹果酸脱氢酶基因、延胡索酸酶基因、延胡索酸还原酶基因、异柠檬酸裂合酶基因和/或苹果酸合酶基因的基因。

[0020] 在某些特定的实施方案中,本发明提供能够生产更高水平的延胡索酸的经遗传修饰或重组的红曲霉菌株,该微生物过表达丙酮酸脱羧酶基因、苹果酸脱氢酶基因和延胡索酸酶基因。在具体实施方案中,红曲霉菌株还包含一个编码用于跨膜运输的二羧酸载体的

基因。在更特别的实施方案中,该红曲霉菌株过表达内源丙酮酸脱羧酶基因和 / 或苹果酸脱氢酶基因且任选地还表达外源延胡索酸酶基因和 / 或二羧酸载体基因。

[0021] 本发明还涵盖,比如乳酸、琥珀酸和 / 或延胡索酸这样的有机酸的产率可通过使编码涉及内源代谢途径的蛋白质的内源红曲霉基因失活来进一步提高,所述内源代谢途径产生的代谢物非为目的有机酸和 / 或所述内源代谢途径消耗该有机酸。在具体实施方案中,非目的有机酸的代谢物的生产被减少。根据更特别的实施方案,根据本发明的微生物包含对消耗有机酸的内源途径、或者编码产物涉及产生非目的有机酸的代谢物的内源途径的基因的至少一种工程化基因删除和 / 或失活。

[0022] 在更特别的实施方案中,根据本发明的红曲霉属菌株微生物是重组微生物,其包含以下一或多项:编码涉及有机酸生产的外来基因的重组基因,和 / 或对其中消耗有机酸的内源途径、或者编码涉及产生代谢物非目的有机酸的内源途径的酶的基因进行至少一种工程化的基因删除和 / 或失活。

[0023] 在具体实施方案中,根据本发明的红曲霉属菌株微生物是重组微生物,其中所述有机酸是乳酸,其包含编码乳酸脱氢酶(LDH)的重组基因和 / 或对内源乳酸消耗途径、或涉及产生非乳酸代谢物的内源途径的酶的编码基因的至少一种工程化的基因删除和 / 或失活。

[0024] 在具体实施方案中,根据本发明的红曲霉属菌株微生物是重组微生物,其中所述有机酸是琥珀酸和 / 或延胡索酸,其包含一种或多种编码如上述例如异柠檬酸裂合酶和苹果酸合酶这样的乙醛酸循环的酶的基因的重组基因和 / 或对内源琥珀酸和 / 或延胡索酸消耗途径或编码产物涉及产生非琥珀酸和 / 或延胡索酸代谢物的内源途径的基因的至少一种工程化基因删除和 / 或失活。

[0025] 在具体实施方案中,本发明提供根据本发明的经遗传修饰或重组的红曲霉菌株,由此还包含至少一种工程化的基因删除或失活。

[0026] 在更特别的实施方案中,所述至少一种工程化的基因删除或失活是在编码选自下组的酶的基因以及所述基因的任意组合中:丙酮酸脱羧酶(pdc)、延胡索酸还原酶、醇脱氢酶(adh)、乙醛脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(ppc)、D- 乳酸脱氢酶(d-ldh)、L- 乳酸脱氢酶(l-ldh)的酶。

[0027] 在更特别的实施方案中,微生物经工程化以生产乳酸,以及包含对编码乳酸脱氢酶的内源基因的至少一种工程化基因删除和 / 或失活。另外或作为选择,该微生物经工程化从而包含对编码细胞色素 - 依赖性乳酸脱氢酶,比如细胞色素 B2- 依赖性 L- 乳酸脱氢酶的内源基因的至少一种工程化的内源基因删除或失活。更特别的是,该工程化的基因删除或失活是对包含编码序列 SEQ ID NO:2 和 / 或 SEQ ID NO:6 的基因的失活。

[0028] 本发明的具体实施方案提供根据本发明的经遗传修饰或重组的红曲霉菌株,其中所述有机酸是琥珀酸和 / 或延胡索酸,以及还包含至少一种工程化基因或失活。

[0029] 在更特别的实施方案中,所述至少一种工程化的基因删除或失活在编码选自下组的酶的基因以及所述基因的任意组合内:丙酮酸脱羧酶(pdc)、醇脱氢酶(adh)、乙醛脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(ppc)、D- 乳酸脱氢酶(d-ldh)、L- 乳酸脱氢酶(l-ldh)、甘油 -3- 磷酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶的酶,以及更特别的是,至少一种工程化的基因删除和 / 或失活发生在编码丙酮酸脱羧酶(pdc)、醇脱氢酶(adh)、异柠檬酸脱氢酶和 / 或甘

油-3-磷酸脱氢酶的内源基因内。

[0030] 在具体实施方案中,本发明提供根据本发明的经遗传修饰或重组的红曲霉菌株,其中所述有机酸是琥珀酸,其还在编码脱氢酶和 / 或延胡索酸还原酶的内源基因内包含至少一种工程化的基因删除和 / 或失活。

[0031] 在具体实施方案中,根据本发明的微生物能够以至少 0.5g/L 的产率从己糖或戊糖或其组合生产有机酸。更特别的是,产率为至少 2g/L,更特别的是至少 5g/L。在特别的实施方案中,所消耗的糖向有机酸的转化率为至少 50%。

[0032] 本发明的具体实施方案提供根据本发明的经遗传修饰或重组的红曲霉菌株,其能够以至少 2g/L 的产率从己糖和 / 或戊糖生产乳酸(比如 L-乳酸)、琥珀酸和 / 或延胡索酸。在具体实施方案中,形成乙醇作为副产物。

[0033] 另一方面,本发明涉及本文所提供的微生物用于工业生产有机酸和 / 或其衍生产物的用途,更特别的是,用于在高出有机酸 pKa 值不到 1.5 单位的 pH 工业生产有机酸。通常,这意味着在低于 5,更特别的是,在约 4 或更低的 pH 生产有机酸。事实上,本文所述微生物能够在低 pH 耐受有机酸的结果是,它们尤其适于以高产率生产有机酸而无需转化为盐离子。在本上下文中,尤其令人感兴趣的是能够在低 pH 以更高产率生产有机酸的经遗传修饰的菌株。事实上,本发明的微生物能够确保在有限的生产成本上的高产。因此,在特别的实施方案中,本发明提供生产包含有机酸的组合物的高产率方法,其包括步骤:(i) 提供根据本发明的经遗传修饰或重组的微生物,和(ii)在存在己糖或无糖或其组合作为唯一碳源的情况下,于 pH2.8 培养所述微生物。根据本发明的方法获得的组合物包含低 pH 的高水平乳酸、琥珀酸和 / 或延胡索酸,而不混有培养某些生物通常所需的有机营养物质。

[0034] 在具体实施方案中,提供了以高产率生产有机酸的方法,其包括步骤(i)提供红曲霉属内物种的经遗传修饰或重组的菌株,其在低 pH 耐受高有机酸浓度并已经过修饰使得能够以高产率从己糖或戊糖或己糖与戊糖的组合生产有机酸,和(ii)在己糖或戊糖或己糖与戊糖的组合存在下培养所述菌株。在具体实施方案中,根据本发明的方法还包括回收有机酸的步骤。

[0035] 在本发明方法的具体实施方案中,所生产的有机酸是乳酸、琥珀酸和 / 或延胡索酸。在更特别的实施方案中,该乳酸是 L-乳酸。

[0036] 在特定实施方案中,本发明的生产有机酸(包含有机酸的组合物)的方法得到的有机酸产率是至少 2g/L。在更特别的实施方案中,有机酸滴度为 50-100g/L,生产力为至少 1g/L/hr,更特别的是,为 2-3g/L/hr。

[0037] 附图简述

[0038] 本发明通过下图进行说明,这些图仅被视作示例且不得以任何方式限制本发明。

[0039] 图 1 图示根据本发明具体实施方案,可用于转化红曲霉菌株的转化载体的实例。

[0040] 图 2 图示根据本发明具体实施方案,用于载体构建的盒-模型的实例。

[0041] 图 3 图示根据本发明具体实施方案,用于转化红曲霉菌株的 pCGHT3 转化载体。

[0042] 图 4 图示经密码子优化的 Bt-L-LDH 基因序列。

[0043] 图 5 图示根据本发明具体实施方案,带有经密码子优化的(Bos taurus Bt)LDH 基因的转化载体 pCGHTGBtLT。

[0044] 图 6 图示根据本发明具体实施方案,带有基于 pUR5750 质粒的经密码子优化的

(*Bos taurus* Bt) LDH 基因的转化载体 pURGHTGBtLT。

[0045] 图 7 图示根据本发明具体实施方案,表达合成的 LDH 基因后大肠杆菌蛋白提取物中的 LDH 活性。

[0046] 图 8a 图示根据本发明具体实施方案,经 HPLC 测定的转化体 LF5-T1 和 LF5-T2 以及未转化的红色红曲霉对照 LF5 的培养基中的葡萄糖浓度。

[0047] 图 8b 图示根据本发明具体实施方案,转化体 LF5-T1 和 LF5-T2 以及未转化的红色红曲霉对照 LF5 中的乳酸浓度。

[0048] 图 9 图示根据本发明具体实施方案,两种转化体 LF5-T1 和 LF5-T2 和未转化红色红曲霉对照 LF5 的生物质中的 L-LDH 酶活性。

[0049] 图 10 图示根据本发明具体实施方案,转化体和野生型菌株 LF4、LF5 和 LF6 的葡萄糖消耗。

[0050] 图 11 图示根据本发明具体实施方案,转化体和野生型菌株 LF4、LF5 和 LF6 的乳酸生产。

[0051] 图 12 转化体和野生型菌株 LF4、LF5 和 LF6 的乙醇生产。菌株在 10ml YE PD 培养基中预培养三天。

[0052] 图 13 图示根据本发明具体实施方案,在有氧和厌氧条件下,转化体和野生型菌株 LF4 的糖类(葡萄糖和木糖)的消耗和产物(乙醇和乳酸)的形成。

[0053] 图 14 图示根据本发明具体实施方案,在重度有氧和厌氧条件下,转化体和野生型菌株 LF5 的糖(葡萄糖和木糖)消耗和产物(乙醇和乳酸)形成。

[0054] 图 15 图示根据本发明具体实施方案,在重度有氧和厌氧条件下,转化体和野生型菌株 LF6 的糖(葡萄糖和木糖)消耗和产物(乙醇和乳酸)形成。

[0055] 图 16 图示红色红曲霉 PDC1 开放阅读框的序列。

[0056] 图 17 图示红色红曲霉 PDC2 开放阅读框的序列。

[0057] 图 18 图示根据本发明具体实施方案,可用于利用遗传霉素选择来破坏红曲霉菌株 PDC1 的转化载体的例子。

[0058] 图 19 图示根据本发明具体实施方案,可用于利用遗传霉素选择来破坏红曲霉菌株 PDC2 的转化载体的例子。

[0059] 图 20 图示根据本发明具体实施方案,可用于利用 zeocin 选择来破坏红曲霉菌株 PDC2 的转化载体的例子。

[0060] 图 21 提供用于破坏 PDC1 基因的载体 pCH#PDC1 的示意图。

[0061] 图 22 提供用于同时破坏 PDC1 基因和插入 LDH 基因的载体 pCL1H#PDC1 的示意图。

[0062] 图 23 提供用于在 PDC1-LDH+ 转化体中破坏 PDC2 基因的载体 pCN#PDC2 的示意图。

[0063] 图 24 图示红色红曲霉 PDC4 开放阅读框的序列(SEQ ID No:5)。

[0064] 图 25 图示根据本发明具体实施方案,来自酿酒酵母(*Sc*)和红曲霉菌株 LF4、LF5、LF6、以及 CBS 菌株的蛋白质提取物中的 Cyt-LDH 活性。。

[0065] 图 26 图示红色红曲霉 CYB2 开放阅读框的序列(SEQ ID NO:2);基因组序列中的推定内含子以小写字母表示。

[0066] 图 27 图示编码细胞色素依赖性 L-LDH 的红色红曲霉 Mona00569 基因的序列(SEQ ID No:6)。

[0067] 图 28 图示编码丙酮酸羧化酶红色红曲霉基因序列(SEQ ID NO:7)。

[0068] 图 29 图示编码苹果酸脱氢酶红色红曲霉基因序列(SEQ ID NO:8, 图 29)。

[0069] 图 30 提供用于同时破坏 PDC1 基因和插入内源丙酮酸羧化酶基因的载体 pCPCH#PDC1 的示意图。

[0070] 图 31 提供用于同时破坏 PDC2 基因和插入内源苹果酸脱氢酶基因的载体 pCMDHN#PDC2 的示意图。

[0071] 图 32 提供用于同时破坏 PDC4 基因和插入米根霉(*Rhizopus oryzae*)延胡索酸酶基因(针对红色红曲霉经过密码子优化)的载体 pCNATFUM#PDC4 的示意图。

[0072] 图 33 图示经密码子优化的米根霉延胡索酸酶基因序列。

[0073] 图 34 提供用于导入源自裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)的二羧酸载体基因(针对红色红曲霉经过密码子优化)的载体 pCBDAC 的示意图。

[0074] 图 35 图示经密码子优化的裂殖酵母 Mae-1 基因的示意图。

[0075] 发明详述

[0076] 除非另外定义,所有用于公开本发明的术语,包括技术和科学术语,均具有本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的含义。通过进一步的指引,纳入术语定义以更好地理解本发明的教导。

[0077] 如本文所使用的,除非上下文中有不同的清楚指示,单数形式“一个/一种/该”(“a”, “an” 和 “the”)同时包括指代物的单数和复数形式。

[0078] 本文所使用的术语“包含”和“由...构成”与“包括”或“含有”同义,而且是包括在内的或开放式的,并不排除附加的、未记述的成分、要素或方法步骤。当以含有特定要素或步骤的方式述及实施方案时,这暗示本发明还涵盖基本上由所述元素或步骤组成的实施方案。

[0079] 以端点记载的数值范围包括相应范围内包含的所有数值和分数以及所记载的端点。

[0080] 本文所使用的术语“约”当用于表示如参数、量、持续时间等这样的可测值时,意味着包括(自)该确定值的 $\pm 10\%$ 或更小、优选 $\pm 5\%$ 或更小、更优选 $\pm 1\%$ 或更小、以及更优选 $\pm 0.1\%$ 或更小的变化,只要这样的变化适于在本公开发明中实施。应理解,该修饰词“约”所指的值本身也是明确地且优选地公开的。

[0081] 如本文所使用的,术语“同源性”表示相同或不同分类单元的两种大分子之间,尤其是两种多肽或多核苷酸之间,的结构相似性,其中所述相似性源于共同的祖先。因此,术语“同源物”表示具有所述结构相似性的如此相关的大分子。

[0082] 本说明书中所引用的所有文件通过提述由此完整并入。

[0083] 如本文所使用的,两个多肽间的序列同一性可通过最优比对(两个蛋白质的最优比对是将配对得分总和减去任何引入的缺口罚分最大化的比对;并且可优选地通过计算机算法工具来完成,比如采用 Wilbur 和 Lipman 的比对算法的“Clustal”W, 1983 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:726-730)。可替代的方法包括采用 Needleman 和 Wunsch 算法的“Gap”1970 (J Mol Biol 148:443-453),或采用 Smith 和 Waterman 算法的“Bestfit”1981 (J Mol Biol 147:195-197),如可从 Accelrys 中例如 GCG™ v. 11.1.2 包获得的)多肽的氨基酸序列并通过以下进行打分,一方面,是多肽含有相同氨基酸残基的比对位置数,另一方

面,是两个多肽序列差异的比对位置数。若两条多肽在给定位置含有不同氨基酸残基(氨基酸取代),或者一条多肽在该位置含有氨基酸残基而另一条多肽不含或者正好相反(氨基酸插入或缺失),则这两条多肽的序列在比对中在该位置上不同。序列同一性以多肽包含相同氨基酸残基的比对位置相对比对位置总数的比例(百分数)来计算。在具体的实施方案中,完成序列比对和确定序列同一性的算法是以最初由 Altschul 等人 1990 (J Mol Biol215:403-10)描述的 Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)为基础的,更特别的是,由 Tatusova 和 Madden1999 (FEMS Microbiol Lett174:247-250)描述的“Blast2 序列”算法,比如利用其缺省设置。

[0084] 如本文所使用的,两多肽间的“序列相似性”可通过最优比对(参见上述)多肽氨基酸序列并通过以下进行打分,一方面是多肽含相同或相似(即保守取代)氨基酸残基的多肽的比对位置数,以及另一方面,两多肽序列不同的比对位置数。若两条多肽在给定位置含有非保守氨基酸残基,或者其中一条多肽在该位置含有氨基酸残基而另一条多肽不含或者正好相反(氨基酸插入或缺失),则这两条多肽的序列在该位置上不同。序列相似性以多肽包含相同或相似氨基酸残基的比对位置相对比对位置总数的比例(百分数)来计算。

[0085] 如本文所使用的术语“有机酸”指具有酸性特性的有机化合物。更特别的是,在本发明上下文中有有机酸化合物选自下组:乳酸(2-羟基丙酸)、琥珀酸、呋喃二羧酸、延胡索酸、马来酸、柠檬酸、谷氨酸、天冬氨酸、丙烯酸、草酸、和葡萄糖酸。更特别的是,在本发明上下文中有有机酸化合物选自下组:乳酸、琥珀酸和/或延胡索酸。

[0086] 术语“羧酸”指其特征为带有至少一个羧基的有机酸。带有两个或更多个羧基的酸也称作二羧酸、三羧酸等。羧酸的例子包括但不限于草酸和马来酸、和琥珀酸。

[0087] 本申请中的术语“乳酸”指游离酸或者盐形式的 2-羟基丙酸。乳酸的盐形式不论中和剂,即碳酸钙或氢氧化铵,均称作“乳酸盐”。如本文所使用的,乳酸可指乳酸的立体异构体形式(L-乳酸或 D-乳酸)之一。术语乳酸盐可指乳酸盐的立体异构体形式(L-乳酸盐或 D-乳酸盐)之一。当谈及乳酸生产,其包括生产乳酸或乳酸盐的单一异构体,或者乳酸或乳酸盐两种立体异构体的混合物。在具体的实施方案中,本发明的重组真菌专门生产单一的乳酸或乳酸盐立体异构体,所产生的乳酸或乳酸盐立体异构体被称作“手性纯的”。短语“手性纯的”是指没有可检测的乳酸或乳酸盐的一种立体异构体形式对另一种立体异构体形式的污染(指定立体异构体的手性纯度为至少大于(或大于或等于)99.9%)。

[0088] 本申请中的术语“琥珀酸”指游离酸或盐形式的丁二酸。琥珀酸的盐形式不论中和剂均称作“琥珀酸盐”。本申请中的术语“延胡索酸”指游离酸或盐形式的反式丁烯二酸(trans-butenedioic acid)。延胡索酸的盐形式不论中和剂均称作“延胡索酸盐”。

[0089] 已发现本发明的生物在低 pH 高度耐受有机酸。

[0090] 如本文所使用的术语“高有机酸浓度耐受性”,以及更特别的是“高乳酸、琥珀酸和/或延胡索酸浓度耐受性”指微生物在包含至少 50g/L,或至少 75g/L 但潜在高达大于 100g/L,或甚至高于 150g/L,比如 175g/L 或 200g/L 有机酸的培养基中生长的能力。在具体实施方案中,术语“高有机酸浓度”,可以指有机酸的饱和溶液。

[0091] 如本文所使用的术语“低 pH”指 2.0 至 5.0 的 pH,比如低于 4.0,更特别的是,低于 3.0,更特别的是,pH 为 2.8 或更低。

[0092] 技术人员应理解,在述及低 pH 的有机酸耐受性时,尤其相关的是在对应于或低于

该有机酸 pKa 值的 pH, 更特别的是, 在高于及低于该有机酸 pKa 值 1.5 单位之间的 pH, 耐受有机酸的能力。若有机酸有两个 pKa 值(由于存在两个酸性基团), 相关的 pKa 是最低的 pKa 值。

[0093] 如本文所使用的“乳酸脱氢酶活性”指该蛋白催化丙酮酸盐转变为乳酸盐的反应的能力。酶乳酸脱氢酶包括(但不限于)酶学委员会编号 EC1. 1. 1. 27 和 EC1. 1. 1. 28 分类的酶。

[0094] 如本文提到宿主生物、微生物或细胞时所使用的术语“重组的”或“经遗传修饰的”包括其中已被导入了核酸分子或以其他形式被遗传修饰的宿主生物、微生物或细胞, 以及这样的宿主生物、微生物或细胞的重组后代。这包括在基因组中非其天然位置的位置导入了内源基因序列的生物, 以及内源基因序列已被修饰或删除的生物。如本文在提到存在于宿主生物、微生物或细胞中的核苷酸序列时所使用的术语“重组”指并非天然存在于所述生物、微生物或细胞中的核苷酸序列。这包括对于所述生物、微生物或细胞而言是外来的核苷酸序列, 以及被导入到基因组中非其天然位置的位置的核苷酸序列和已被修饰的内源基因序列。在具体的实施方案中, 存在重组基因意指, 所述基因在宿主中的过表达, 也即, 所述宿主遗传修饰的结果是在宿主细胞中提高所述基因的表达。

[0095] 术语“转化体”包括比如重组核酸这样的外源核酸向宿主生物、微生物或细胞中的导入或转移。优选如此导入的核酸或所得的内源核酸删除在所述宿主生物、微生物或细胞的进一步生长和分裂中得以保持。任何一种常规的基因转移或遗传修饰方法均可用于实现转化, 比如但不限于电穿孔法、电渗透法、化学转化法、脂转染、病毒或噬菌体介导的转染, 等。

[0096] 本文通常所使用的术语“基因”指包含编码序列、启动子以及任何其他在宿主细胞中表达所需的调控区域的序列。

[0097] 如本文所使用的, 术语“启动子”指位于转录起始位点上游 50bp 以内的不翻译序列, 其控制结构基因的转录起始。通常其位于结构基因翻译起始密码子上游(也即 5') 约 1 至 1000bp, 优选 1-500bp, 尤其是 1-100bp 以内。类似的, 术语“终止子”指结构基因翻译终止密码子下游(也即 3') 的不翻译序列(通常在约 1 至 1000bp, 更典型地在 1-500bp, 以及尤其是 1-100bp 以内), 其控制结构基因转录终止。启动子或终止子与结构基因是“可操作性连接的”, 如果其在基因组中相对于结构基因的位置, 视情况而定, 使其执行其转录控制功能。

[0098] 如本文所使用的, 术语“异源的”或“外源的”指这样一个事实: 所考虑的基因或编码序列不是宿主天然或内源的。

[0099] 术语“天然的”或“内源的”在本文中用于指在野生型宿主菌株细胞基因组中发现(除不影响功能的个体间突变之外) 的遗传材料(例如, 基因、启动子或终止子)。

[0100] “编码”意指, 依据所论述的生物的遗传密码, 核酸序列或其部分对应于特定氨基酸序列, 例如期望的多肽或蛋白质的氨基酸序列。举例而言, “编码”特定多肽或蛋白质的核酸可包括基因组、hnRNA、前体 mRNA、mRNA、cDNA、重组或合成的核酸。

[0101] 优选地, 编码特定多肽或蛋白质的核酸可包含编码所述多肽或蛋白质的开放阅读框(ORF)。“开放阅读框”或“ORF”指一连串以本身已知的翻译起始密码子起始和以翻译终止密码子终止的编码核苷酸三联体(密码子), 且不包含任何内部符合读框的翻译终止密码

子,并潜在地能够编码多肽。因此,该术语可与本领域所使用的“编码序列”同义。

[0102] 根据本发明的红曲霉属的微生物,在低 pH 对高有机酸浓度有优良的耐受性。更特别的是,它们在高有机酸(最低)pKa 值不到 1.5 单位的 pH 耐受有机酸。在具体实施方案中,所述微生物耐受所有有机酸。更特别的是,它们在低 pH 耐受高浓度的羧基有机酸。

[0103] 根据本发明的微生物对有机酸的耐受性使得它们尤其适用于工业生产有机酸,例如但不限于乳酸、琥珀酸和 / 或延胡索酸。尽管实践中在工业环境下,可以在生产过程中提取目的有机酸从而不会维持极端的高浓度,但是菌株对有机酸的耐受性无论如何都是有利的。更特别的是,令人感兴趣的是能够在高出目的有机酸(最低) pKa 值不到 1.5 单位的 pH 维持菌株,更特别的是,微生物能够在低于目的有机酸(最低) pKa 值的 pH 耐受有机酸。有机酸的 pKa 值在约 3.5 至 6 变化。表 1 提供了非限制性的例示性有机酸、它们的 pKa 值及优选地生物为工业生产有机酸所生长的所在相应 pH 值范围。

[0104] 表 1. :例示性有机酸

[0105]

有机酸	pKa	pH 值范围
乳酸	3.85	2.5-5
苹果酸	3.4-5.11	2.0-4.5
琥珀酸	4.16-5.66	3.0-5.5
丙烯酸	4.25	3-5.5
延胡索酸	3.03-4.44	2.0-4.5
柠檬酸	3.13-4.76, 6.4	2.0-4.5

[0106] 已发现根据本发明的生物在低 pH 耐受一系列有机酸。在具体实施方案中,它们在高有机酸(最低)pKa 值不到 1.5 单位的 pH 耐受羧酸。在具体实施方案中,对不含双键 CH₂ 基团的有机酸的耐受性提高。在更特别的实施方案中,微生物在低于相关有机酸 pKa 值的 pH 耐受有机酸。更特别的是,本发明的微生物在低于 3 的 pH 尤其耐受乳酸、琥珀酸和 / 或延胡索酸。

[0107] 此外,已发现根据本发明的生物可被工程化以确保有机酸生产。更特别的是,可将其工程化从而可以高产率将简单的糖发酵为有机酸。在特别的实施方案中这些生物可在厌氧或准厌氧条件下培养,这一事实在工业生产方法背景中提供了额外的益处。

[0108] 根据本发明的微生物是红曲霉属内的种。令人惊讶地,已经发现,可以鉴定出在低 pH 下耐受高有机酸浓度的红曲霉菌株。通常这些微生物代表选自以下种的菌株:白色红曲霉(monascus albidulus)、阿根廷红曲霉(monascus argentinensis)、橙色红曲霉(monascus aurantiacus)、巴克红曲霉(monascus barkeri)、monascus bisporus、monascus eremophilus、佛罗里达红曲霉(monascus floridanus)、烟灰色红曲菌(monascus fuliginosus)、monascus fumeus、monascus kaoliang、新月红曲霉(monascus lunisporas)、monascus mucoroides、monascus olei、monascus pallens、monascus

paxii、丛毛红曲霉(*monascus pilosus*)、*monascus pubigerus*、紫红红曲霉(*monascus purpureus*)、红色红曲霉(*monascus ruber*)、*monascus rubropunctatus*、*monascus rutilus*、*monascus sanguineus*、*monascus serorubescens* 和 *monascus vitreus*。在本发明的具体的实施方案中,本发明的微生物是红色红曲霉种的菌株。

[0109] 根据本发明的示范性菌株(本文中也称作 LF4、LF5 和 LF6)已保藏于荷兰乌得勒支(Utrecht)的微生物菌种保藏中心(CBS),登录号分别为 CBS127564、CBS127565 和 CBS127566。

[0110] 在具体实施方案中,本发明涉及如上述红曲霉目的微生物,为提高有机酸产率其已被遗传工程化,更特别的是,从例如己糖或戊糖或己糖与戊糖的组合这样的简单糖类生产例如乳酸、琥珀酸和 / 或延胡索酸这样的有机酸。这可以通过互不排斥的不同途径实现。

[0111] 在具体实施方案中,在本发明上下文中涵盖的遗传工程技术其目的在于通过表达编码涉及目的有机酸生产的酶的(外源的)基因来提高有机酸生产。

[0112] 在具体实施方案中,目的有机酸为乳酸。更特别的是,涵盖(外源的)乳酸脱氢酶基因的过表达。乳酸脱氢酶催化糖类向乳酸转化的最后一步,其将丙酮酸盐转化为乳酸盐。由此,提高的 LDH 基因表达和 / 或活性确保乳酸产率提高。因此,在具体实施方案中,本发明提供经遗传修饰或重组的红曲霉菌株,其包含至少一个整合进其基因组中的功能性乳酸脱氢酶(LDH)基因。在具体实施方案中,该 LDH 基因包含异源或外源 LDH 编码序列。

[0113] 外源 LDH 基因的导入使得经修饰的红曲霉菌株能够生产更大量的 L- 和 / 或 D- 乳酸立体异构体。根据本发明的某些具体的实施方案,经遗传修饰或重组的红曲霉目的微生物包含(或仅含有)一或多种外源 L-LDH 基因(而非外源 D-LDH 基因),由此该生物能够产生光学或手性纯的 L- 乳酸。或者,通过导入外源 D-LDH 基因可生产手性纯 D- 乳酸。在本发明的特定实施方案中,本发明的红曲霉目的经遗传修饰或重组的生物包含一或多种外源 L-LDH 编码序列以及一或多种外源 D-LDH 编码序列,从而使该重组菌株生产 L- 和 D- 乳酸的外消旋混合物。

[0114] 本发明上下文中所使用的外源 LDH 基因是编码乳酸脱氢酶或其活性片段即具有乳酸脱氢酶活性的蛋白质的基因。

[0115] 在具体的实施方案中,外源 LDH 基因或编码序列是衍生于另一生物体的基因或编码序列,所述生物体为改进在红曲霉中的表达已经过遗传修饰(例如密码子被改变)。

[0116] 在本发明上下文中,适宜的 LDH 基因包括那些从细菌、真菌、酵母或哺乳动物来源获得的基因。特定的 L-LDH 基因的例子获自瑞士乳杆菌(*Lactobacillus helveticus*)、乳酸杆菌(*L. casei*)、巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*)、乳酸片球菌(*Pediococcus acidilactici*)、米根霉(*Rhizopus oryzae*)以及哺乳动物来源比如牛或猪。尤其是来源于牛(*Bos taurus*)。特定的 D-LDH 基因的例子获自瑞士乳杆菌(*L. helveticus*)、约氏乳酸杆菌(*L. johnsonii*)、保加利亚乳杆菌(*L. bulgaricus*)、德式乳杆菌(*L. delbrueckii*)、植物乳杆菌(*L. plantarum*)、戊糖乳杆菌(*L. pentosus*)和 *P. acidilactici*。相对于这些基因中的编码序列在氨基酸水平的同一性得分至少为 70% 且编码功能性蛋白质的功能性编码序列是适宜的。如果需要的话,可对从这些来源中任一来源获得的天然基因进行诱变从而提供从常见真菌起始密码子(ATG)起始,或者出于其他目的,的编码序列。在具体的实施方案中,L-LDH 基因获自瑞士乳杆菌或是与之具有至少 80%、85%、90% 或 95% 序列同一性的序列。

根据其它特定的实施方案, L-LDH 基因获自巨大芽孢杆菌或是与这类基因相比至少 80%、85%、90% 或 95% 的基因。根据另外的某些具体的实施方案, L-LDH 基因获自牛或者是与该基因相比具有至少 80%、85%、90% 或 95% 同一性得分的基因。在具体的实施方案中, D-LDH 基因获自瑞士乳杆菌或是与这类基因相比具有至少 80%、85%、90%, 更特别的至少 95% 得分的基因。

[0117] 特别适宜的 LDH 编码序列包括那些编码酶的序列, 所述酶的氨基酸序列与 SEQ ID NO:1 所确定的序列相比具有至少 80%、85% 或 95% 同一性得分。特别适宜的 LDH 基因还包括那些编码功能性酶的基因, 所述功能性酶具有与 SEQ ID NO1 所编码的蛋白质序列相比具有至少 80%、85% 或 95% 同一性得分的序列; 在具体的实施方案中, 适宜的 LDH 基因包括那些编码功能性酶并具有与 SEQ ID NO1 的序列相比具有至少 80%、85% 或 95% 同一性得分或与 SEQ ID NO:1 相同的序列的基因。本发明的经遗传修饰或重组的红曲霉菌株可包含编码参与目的有机酸生产的酶的单个外源基因或多个外源基因。由此, 例如, 重组菌株可包含单个外源 LDH 基因或多个外源 LDH 基因, 比如 1 至 10 个外源 LDH 基因, 尤其 1 至 5 个外源 LDH 基因。当转化菌株含有多个外源 LDH 基因时, 单个基因可以是相同基因的拷贝, 或包括两个或更多个不同的 LDH 基因拷贝。外源 LDH 基因的多个拷贝可整合进宿主菌株基因组中的一个基因座(由此它们可以彼此相邻)或数个基因座。

[0118] 在具体实施方案中, 目的有机酸为琥珀酸和 / 或延胡索酸。更特别的是, 涵盖一或多个选自(外源的) 磷酸烯醇丙酮酸(PEP) 羧激酶、丙酮酸羧化酶、苹果酸脱氢酶、延胡索酸酶和 / 或延胡索酸还原酶的基因的过表达和 / 或苹果酸酶(malic enzyme) 的过表达。磷酸烯醇丙酮酸(PEP) 羧激酶是糖异生代谢途径中裂合酶家族一员。它将草酰乙酸盐转化为磷酸烯醇丙酮酸和二氧化碳。尽管大多数糖异生反应可反向利用糖酵解酶, 但丙酮酸激酶是不可逆的。

[0119] 根据本发明的具体实施方案, 在可发酵碳源或甘油存在下, PEP 羧激酶在无氧或氧气限制条件下是有活性的。可发酵碳源可以是葡萄糖、果糖、半乳糖、棉子糖、阿拉伯糖或木糖。发现红曲霉包含根据本发明的 PEP 羧激酶也是有利的, 因为催化 PEP 向 OAA 转变的 PEP 羧激酶使二氧化碳固定并产生 ATP 形式的能量。在一种特别的实施方案中, 根据本发明的耐受有机酸的红曲霉菌株包含具有 PEP 羧激酶活性的酶, 其中所述酶是一种异源酶, 优选为衍生于细菌的异源酶, 更优选具有 PEP 羧激酶活性的该酶衍生于大肠杆菌、曼海姆氏菌属菌种(*Mannheimia* sp.)、放线杆菌属菌种(*Actinobacillus* sp.) 或厌氧螺菌属菌种(*Anaerobiospirillum* sp.), 更优选产琥珀酸曼海姆氏菌(*Mannheimia succiniciproducens*)、琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*)或产琥珀酸厌氧螺菌(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)。

[0120] 类似于编码具有 PEP 羧激酶活性的酶的核苷酸序列或者除其之外, 本发明的微生物还可用编码同源和 / 或异源酶的核苷酸序列进行遗传修饰或者转化, 所述同源和 / 或异源酶在微生物中催化反应从而提高朝向延胡索酸和 / 或琥珀酸的通量。

[0121] 在另外的具体实施方案中, 涉及琥珀酸和 / 或延胡索酸合成的内源酶过表达。丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇丙酮酸羧激酶提供了一条有效逆转丙酮酸激酶作用的备选途径。这些基因的增强表达和 / 或活性由此确保了琥珀酸产率的提高。更特别的是, 本发明人已经鉴定了编码催化 OAA 向苹果酸转化的丙酮酸羧化酶和苹果酸脱氢酶的内源红曲霉序列。因

此,在具体实施方案中,根据本发明的红曲霉菌株过表达分别由 SEQ ID NO:7 和 8 编码的丙酮酸脱羧酶和苹果酸脱氢酶。

[0122] 苹果酸酶催化丙酮酸盐经苹果酸盐向琥珀酸转化;延胡索酸还原酶将延胡索酸转变为琥珀酸;延胡索酸酶催化苹果酸向延胡索酸的转化。

[0123] 上述一或多个内源或外源基因的导入使得经修饰的红曲霉菌株能够产生更大量的琥珀酸和/或延胡索酸。

[0124] 生产其他有机酸所需的其他酶是技术人员已知的。

[0125] 编码目的酶的重组编码序列被置于一或多个启动子和一或多个终止子的转录控制之下,所述启动子和终止子在经修饰的真菌细胞中都是有功能性的。

[0126] 启动子和终止子序列对于红曲霉宿主菌株可以是天然的或者对细胞是外源的。有用的启动子和终止子序列包括那些在其功能区分别与对宿主菌株天然的启动子和终止子序列的功能性部分相比高度同一(也即,具有 90% 或更高、尤其是 95% 或更高、最优选 99% 或更高的同一性得分)的序列,尤其是当外源基因的插入靶向该菌株基因组中的特定位置时。

[0127] 在具体的实施方案中,启动子相对于真菌基因的天然启动子具有至少 90%、95% 或 99% 的同一性得分。更特别的是,启动子相对于红曲霉宿主菌株的天然基因启动子具有至少 90%、95% 或 99% 的同一性得分。在具体的实施方案中,终止子相对于真菌天然基因启动子具有至少 90%、95% 或 99% 的同一性得分。终止子相对于红曲霉宿主菌株的天然基因终止子可具有至少 90%、95% 或 99% 的同一性得分。使用(宿主菌株)天然的启动子和终止子,及其相应上下游侧翼区,能够允许重组基因靶向整合进宿主菌株基因组的特定基因座,并用于同时整合重组基因及删除另一天然基因。有可能将比如 LDH 编码序列这样的不同的外源编码序列置于不同类型的启动子和/或终止子的控制之下。

[0128] 重组基因可被随机整合进宿主菌株基因组中或者插入到一或多个靶向位置。靶向位置的例子包括欲删除或破坏的基因座。

[0129] 本发明人还涵盖在根据本发明的红曲霉目的微生物中提高有机酸生产,其通过限制宿主内源代谢物的生产和/或降低内源目的有机酸的消耗。事实上,这不仅阻止宿主浪费原料和能量,还推动宿主完全依赖于由重组基因导入创建的目的酶生产途径。

[0130] 在比如红曲霉这样的真菌中,在氧气存在下乳酸被消耗。这是由细胞色素依赖性乳酸脱氢酶保障的。由此,另外/备选地,根据本发明的特定实施方案,微生物经修饰以降低内源乳酸消耗。更特别的是,这是通过降低内源 LDH 基因的表达来保障的。这提高了有氧条件下的乳酸产率。

[0131] 因此,根据本发明的一个特定实施方案,本发明的微生物具有一或多个失活的内源细胞色素-依赖性 LDH 基因。本发明人还鉴定并表征了来自红色红曲霉的内源 LDH 基因。在具体的实施方案中,内源 LDH 含有 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:6 的编码序列。如下文详述的,源自红色红曲霉内源 LDH 基因的编码、非编码和/或调控序列可被用于阻止或降低红曲霉中的 LDH 表达。

[0132] 在另外的具体的实施方案中,在本发明上下文中所使用的遗传工程化技术旨在降低非目的乳酸的代谢物的内源生产。更特别的是,提供了重组微生物,其特征参与比如乙醇这样的非乳酸、琥珀酸和/或延胡索酸代谢物的生产的酶活性已被失活或者抑制。

[0133] 在本文中,“失活”意指基因的全部或部分编码区被消除(缺失),或者基因或其启

动子和 / 或终止子区经修饰(比如缺失、插入或突变)从而该基因不再产生有活性的酶,或产生活性严重降低的酶。失活还包括通过比如反义、三螺旋和核糖酶这样的方法沉默,所有都是技术人员已知的。

[0134] 根据特定实施方案,根据本发明的经遗传修饰或重组的红曲霉菌株含有至少一个工程化的基因缺失和 / 或失活,更特别的是,在编码参与乙醇生产途径的酶的内源基因中。在这些实施方案中,所述至少一个工程化的基因缺失或失活可以是例如在内源基因内,所述内源基因编码在宿主菌株中参与乙醇生产途径或其他非目的有机酸代谢物的生产的酶,比如编码选自由丙酮酸脱羧酶(pdc)、延胡索酸还原酶、醇脱氢酶(adh)、乙醛脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(ppc)、D- 乳酸脱氢酶(d-ldh)、L- 乳酸脱氢酶(l-ldh)、乳酸 2- 单加氧酶组成的组的酶的基因以及所述基因的组合。在更具体的实施方案中,至少一个工程化的基因缺失和 / 或失活可以在编码丙酮酸脱羧酶(pdc)的内源基因中。丙酮酸脱羧酶催化乙醇途径中的第一步。由此特别涵盖了具有实质上降低的丙酮酸脱羧酶(PDC)活性的微生物。术语“降低的丙酮酸脱羧酶活性”意指,或者细胞中的酶浓度减少(至少一种影响表达的遗传修饰的结果)和 / 或降低或没有酶的特异性催化活性(至少一种影响活性的遗传修饰的结果)。

[0135] 在具体的实施方案中,本发明提供了红曲霉目的微生物,其中丙酮酸脱羧酶活性接近零或者与野生型菌株中的正常丙酮酸脱羧酶活性相比活性降低。由此,在具体的实施方案中,本发明菌株的丙酮酸脱羧酶活性为例如比野生型菌株中可检测到的丙酮酸脱羧酶活性低至少 60%,优选低至少 80% 以及甚至更优选低至少 90%。

[0136] 根据本发明的具体的实施方案,提供了菌株,其特征在于所述菌株的乙醇生产接近零或者至少与野生型菌株中的本底乙醇生产相比被降低。由此,在具体的实施方案中,本发明菌株中的乙醇生产为例如比相应的野生型菌株中的乙醇生产低至少 60%,优选低至少 80% 以及甚至更优选低至少 90%。

[0137] 因此,根据本发明的具体实施方案,提供了微生物,其中所述有机酸为乳酸且其包含以下一或多项:

[0138] a) 编码 LDH 的重组基因;和

[0139] b) 对内源乳酸消耗途径或其编码产物涉及产生非乳酸代谢物的内源途径的基因的至少一种工程化的基因删除和 / 或失活。更特别的是,所述微生物在编码选自下组的酶的基因和所述基因的任意组合中包含工程化的基因删除和 / 或失活:丙酮酸脱羧酶(pdc)、延胡索酸还原酶、醇脱氢酶(adh)、乙醛脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(ppc)、D- 乳酸脱氢酶(d-ldh)、L- 乳酸脱氢酶(l-ldh)。并且更特别的是,在编码丙酮酸脱羧酶(pdc)、D- 乳酸脱氢酶(d-ldh)和 / 或 L- 乳酸脱氢酶(l-ldh)的内源基因内包含至少一种工程化的基因删除和 / 或失活。

[0140] 根据本发明的其他具体实施方案,提供了其中所述有机酸为琥珀酸和 / 或延胡索酸且包含以下一或多项的微生物:

[0141] a) 编码磷酸烯醇丙酮酸(PEP)羧激酶、苹果酸脱氢酶、延胡索酸酶和 / 或延胡索酸还原酶的重组基因和 / 或一或多种编码比如异柠檬酸裂合酶和苹果酸合酶这样的乙醛酸循环酶的重组基因;和

[0142] b) 对内源琥珀酸和 / 或延胡索酸消耗途径或编码产物涉及产生非琥珀酸和 / 或延

胡索酸代谢物的内源途径的基因的至少一种工程化的基因删除和 / 或失活。更特别的是,在编码选自下组的酶的基因和所述基因的组合中的工程化的所述基因删除和 / 或失活:丙酮酸脱羧酶(pdc)、醇脱氢酶(adh)、乙醛脱氢酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶(ppc)、D- 乳酸脱氢酶(d-ldh)、L- 乳酸脱氢酶(l-ldh)、甘油-3- 磷酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶。更特别的是,在编码丙酮酸脱羧酶(pdc)、醇脱氢酶(adh)、异柠檬酸脱氢酶和 / 或甘油-3- 磷酸脱氢酶的内源基因中包含至少一种工程化的基因删除和 / 或失活。

[0143] 特别地,根据本发明的微生物是其中至少一个编码醇脱氢酶的基因是非功能性的微生物。非功能性的醇脱氢酶基因在此处用于描述包含与其中所有编码醇脱氢酶的基因均为功能性的生物相比其醇脱氢酶活性降低的微生物。可通过本领域已知的方法使基因变得没有功能,例如通过突变、破坏或者删除。尤其是,微生物是比如红曲霉这样的真菌,其中一或多个编码醇脱氢酶的基因 adh1 和 / 或 adh2 被失活。

[0144] 特别地,根据本发明的微生物还包含至少一个编码非功能性甘油-3- 磷酸脱氢酶的基因。非功能性的甘油-3- 磷酸脱氢酶基因在此处用于描述包含降低的甘油-3- 磷酸脱氢酶活性从而导致与微生物相比甘油形成减少的微生物,所述活性的降低是通过例如编码甘油-3- 磷酸脱氢酶的基因的突变、破坏或删除造成的。令人惊讶地,发现包含降低的醇脱氢酶活性和 / 或甘油-3- 磷酸脱氢酶活性的微生物导致琥珀酸生产提高。

[0145] 根据本发明另外的具体实施方案,提供其中所述有机酸是琥珀酸且在编码琥珀酸脱氢酶和 / 或延胡索酸还原酶的内源基因内包含至少一种工程化的基因删除和 / 或失活的微生物。

[0146] 在一个具体实施方案中,根据本发明的重组微生物包含至少一个编码非功能性的琥珀酸脱氢酶的基因。非功能性琥珀酸脱氢酶在此处用于描述包含降低的琥珀酸脱氢酶活性从而导致与野生型细胞相比琥珀酸形成提高的微生物,所述活性的降低是通过编码琥珀酸脱氢酶的至少一个基因的突变、破坏或删除造成的。

[0147] 根据具体实施方案,根据本发明的经遗传修饰或重组的红曲霉菌株经进一步修饰以提高戊糖消耗,更特别的是,木糖消耗。这可以通过不同的途径实现。在特别的实施方案中,这通过向生物中导入编码木糖异构酶的核酸序列来实现。这样的核酸可来自不同起源,更特别的是,来自真核细胞,更特别的是来自厌氧性真菌。在一个具体实施方案中,木糖异构酶源自 *Pyromyces* 菌种、来自梭菌属(*Clostridium*)或梭形杆菌属(*Fusobacterium*)、或来自多形拟杆菌(*Bacteroides thetaiotaomicron*)或 *Cytlamyces*。适宜的木糖异构酶基因的例子是本领域已知的,且包括但不限于来自 *Pyromyces* 菌种的木糖异构酶。编码木糖异构酶的序列表达后赋予红曲霉将木糖转化为木酮糖的能力,木酮糖进一步在目的有机酸的生产过程中被红曲霉代谢。这样,红曲霉能够以木糖作为碳源生长,更特别的是,能够以木糖作为碳源生产目的有机酸,或者在具体实施方案中,以木糖作为唯一碳源。

[0148] 在更特别的实施方案中,重组红曲霉菌株通过向生物中导入编码木糖还原酶和 / 或木糖醇脱氢酶的核酸序列得到修饰。这样的核酸可来自不同起源,更特别的是,来自真核细胞,更特别的是来自毕赤酵母(*Pichia stipitis*)。编码木糖还原酶的序列在表达后赋予红曲霉从木酮糖生产有机酸的能力。

[0149] 宿主菌株的遗传修饰经设计和构建适宜载体以及用此载体转化宿主细胞的一个或多个步骤来完成。可以使用本领域已知的电穿孔法和 / 或化学(比如基于氯化钙或醋酸

锂)转化方法或根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导的转化方法。载体可以经特定的限制酶切割,也可以以环形 DNA 使用。用于遗传修饰宿主菌株的载体可以是任何载体,只要它能够整合进宿主菌株的基因组中。本发明的载体作为克隆载体或表达载体可以在所选择的宿主菌株中操作。许多载体都是本领域技术人员已知的,适宜载体的选择只是一个选择问题。载体可以是,例如 pUR5750 转化载体、pCGHT3 转化载体,等等。

[0150] 通常,制备含有目的编码序列及相关启动子和终止子序列的载体。该载体可含有各种类型的用于线性化或片段化的限制性位点。载体还可包含骨架部分(比如用于在大肠杆菌中增殖),其中许多都可方便地商购自酵母或细菌载体。载体优选包含一或多个选择标记基因盒。“选择标记基因”是编码转化细胞在选择性培养基中生存和/或生长所需的蛋白质的基因。典型的选择标记基因编码以下蛋白质:(a) 赋予抗生素或其他毒素抗性的蛋白质,例如 zeocin(来自印度斯坦链霉菌(*Streptoalloteichus hindustanus*)的 sh ble 基因)、遗传霉素、蜜二糖酶(MEL5)、潮霉素(来自大肠杆菌的氨基糖苷类抗生素抗性基因)、氨基青霉素、四环素或卡那霉素(Tn903 的卡那霉素抗性基因),(b) 补充细胞营养缺陷。两种突出的营养缺陷例子是氨基酸亮氨酸缺陷(例如,LEU2 基因)或尿嘧啶缺陷(例如,URA3 基因)。乳清苷-5'-磷酸脱羧酶阴性(ura3-)细胞不能在缺乏尿嘧啶的培养基上生长。这样,功能性 UBA3 基因可用作带有尿嘧啶缺陷的细胞的标记,并且可以在缺少尿嘧啶的培养基上选择成功的转化体。只有转化有功能性 URA3 基因的细胞能够在这样的培养基上合成尿嘧啶和生长。如果野生型菌株不具有尿嘧啶缺陷(例如,如在 *I. orientalis* 的情况下),为了利用 URA3 作为菌株的选择标记,必须制造带有该缺陷的营养突变体。其实现方法是本领域熟知的。

[0151] 优选的选择标记包括 zeocin 抗性基因、G418 抗性基因、潮霉素抗性基因。选择标记盒通常还包括启动子和终止子序列,其与选择标记基因可操作性连接,其在宿主红曲霉菌株中也是可操作的。

[0152] 通过利用标记基因贡献的特性,或者由所插入的基因贡献的其他特征(比如生产乳酸、琥珀酸和/或延胡索酸的能力,乙醇生产能力的缺失,或者在特定底物上生长的能力),可用已知方法选择出成功的转化体。筛选可通过 PCR 或 Southern 分析来完成以验证已经发生了目的插入和缺失,验证拷贝数,以及鉴定基因在宿主菌株基因组中的整合点。由所插入基因编码的酶的活性和/或由所删除基因所编码的酶的活性缺乏可用已知检测方法来证实。

[0153] 本文所涵盖的缺失或失活可通过遗传工程方法,迫使进化(forced evolution)或诱变和/或选择或筛选来实现。事实上,本领域现有技术提供了广泛的可用于基因失活、缺失或置换的技术。这样的分子技术包括但不限于:

[0154] (i) 基于天然基因沉默方法的基因失活技术,包括反义 RNA、核糖酶和三螺旋 DNA 形成,

[0155] (ii) 单基因突变技术,比如利用非复制质粒单交(single crossing over)的基因失活,以及利用能够进行双交染色体整合的非复制质粒或线性 DNA 片段的基因失活(Fincham,1989, *Microbiological Reviews*,53:148-170;Archer 等人,2006, *Basic Biotechnology*:95-126),和

[0156] (iii) 在同一菌株中的多个未标记突变技术,例如但不限于:

[0157] (a) 通过整合质粒的同源重组利用双交整合进行抗生素抗性基因对靶基因的删除与置换, 得到分离地高度稳定的突变体;

[0158] (b) 利用来自酿酒酵母的 F1p 重组酶系统除去抗生素抗性基因, 所述系统允许在同一菌株中重复使用多个未标记突变的构建方法; 和

[0159] (c) 产生删除编码尿嘧啶磷酸核糖转移酶 upp 基因的菌株, 由此可以利用 5- 氟尿嘧啶作为反向选择标记和对双交整合体的阳性选择。

[0160] 在具体的实施方案中, 根据 Oliveira 等人(2008) (Appl Microbiol Biotechnol 80, 917-924) 描述的方法来进行内源基因的缺失或破坏。

[0161] 在本发明的一个具体的非限制性实施方案中, 内源基因的缺失或破坏, 可包括导入一或多个功能性结构基因, 特别是编码参与目的有机酸生产的酶的基因, 比如上述 LDH 基因, 插入至宿主菌株内源基因的 5' 和 3' 侧翼区之间。功能性基因优选包括与结构基因可操作性相连的功能性启动子和终止子序列。该方法允许同时删除内源基因和插入功能性外源或异源基因。载体可包含选择标记基因代替或附加结构基因。选择标记基因也位于载体上被靶向的内源基因的 5' 和 3' 侧翼区之间, 最终插入功能性内源基因座。利用选择标记基因的好处是引入了用于选择成功转化体的方法。然而, 也可以基于所得的功能性特征来选择成功的转化体。例如, 依据所删除和导入的基因, 有可能依据降低或去除的在特定构建块上生长的能力、生产高浓度目的有机酸的能力或降低的生产比如乙醇这样的特定代谢物的能力, 进行筛选。

[0162] 由此, 本发明的又一方面提供了获得生产高产有机酸的微生物的方法, 该方法包括:

[0163] a) 从红曲霉属获得能够在低 pH 下高度耐受有机酸的微生物;

[0164] b) 用一或多个重组核酸序列转化微生物从而确保有机酸生产增强和 / 或内源代谢物生产降低; 和

[0165] c) 选择能够高产率生产有机酸的微生物。

[0166] 鉴定能够在低 pH 对有机酸具有高度耐受性的微生物这一步骤可通过在包含高浓度有机酸的培养基上选择微生物来完成。更特别的是, 通过在包含有机酸的培养基上在高出相关有机酸(最低) pKa 值不到 1.5 个单位的 pH 完成。在特别的实施方案中, 该 pH 高出相关 pKa 值不到 1 个单位。在更特别的实施方案中, 该 pH 低于 pKa 值。

[0167] 在具体实施方案中, 在含有 50g/L, 更特别的是 100g/L 有机酸的培养基上选择微生物, 和在特别的实施方案中, 在含有高达 150 至 175g/L 有机酸的培养基上选择微生物。

[0168] 在具体实施方案中, 有机酸是乳酸、琥珀酸和 / 或延胡索酸, 且 pH 低于 3.8, 更特别的是, 低于 3。

[0169] 本发明人惊讶地发现, 可以鉴定出红曲霉目的耐受高有机酸浓度的微生物, 例如但不限于, 在低 pH 的高乳酸、琥珀酸和 / 或延胡索酸浓度, 更特别的是, 在低于有机酸 pKa 的 pH。更特别的是, 已发现可以鉴定出在低于 3.0 的 pH 耐受增加的乳酸、琥珀酸和 / 或延胡索酸浓度的红曲霉目微生物。

[0170] 转化微生物的步骤详细描述于前文。如上所述, 涵盖提高有机酸生产产率的不同遗传修饰。

[0171] 选择能够高产量生产有机酸的微生物的步骤是技术人员已知的, 包括但不限于利用

本文实施例中描述的用于 LDH 的方法测定参与目的有机酸生产的酶活性。另外 / 或者, 根据本发明的方法中, 选择步骤可基于降低的乙醇生产、降低的有机酸消耗等。

[0172] 在另一方面, 本发明提供生产有机酸的方法, 更特别的是, 以高产率生产。事实上, 目的有机酸的高产率生产对于许多工业应用都是令人感兴趣的。本发明的方法对于生产有机酸用作酸化剂、调味剂(flavoring agent)、pH 缓冲剂或防腐剂这样的食品或饲料添加剂, 或者用于药品和化妆品, 以及用于去污剂和多聚物的生产, 都是令人感兴趣的。例如, 乳酸多聚物具有类似于石油衍生的塑料的特性却具有可生物降解和环境友好的优点。

[0173] 在具体实施方案中, 本发明的方法包括从红曲霉目获得在低 pH 耐受高浓度有机酸的微生物, 对其进行遗传修饰以提高有机酸产率, 以及在特定底物或化学构建块存在且在 pH 低于 5, 更特别的是, 低于 4, 更特别的是, 在高出有机酸 pKa 值不到 1.5 个单位的 pH 培养由此获得的微生物的步骤。

[0174] 在具体实施方案中, 本发明的方法包括步骤:

[0175] (i) 获得红曲霉目菌株, 其能够在低 pH, 更特别的是, 在高出有机酸 pKa 值不到 1.5 个单位的 pH 耐受有机酸; (ii) 修饰所述菌株使其能够从己糖或戊糖或己糖与戊糖的组合以高产率生产目的有机酸; 以及 (ii) 在适宜底物存在下培养所述菌株, 更特别的是, 在高出有机酸 pKa 值不到 1.5 个单位的 pH, 更特别的是 pH 低于 5, 更特别的是低于 4。

[0176] 在本发明方法的特别的实施方案中, 所生产的有机酸是羧酸, 甚至更特别的是乳酸、琥珀酸和 / 或延胡索酸。最特别的是, 所生产的有机酸是 L- 乳酸。

[0177] 从红曲霉目获得耐受有机酸的微生物的方法以及修饰所述生物以提高有机酸产率的方法如前文所述, 并在实施例部分示例阐述。

[0178] 在本发明方法的具体的实施方案中, 红曲霉目的微生物或菌株培养于含有可被所转化菌株发酵的糖的培养基中。该糖可以是己糖比如葡萄糖, 多糖或其他葡萄糖多聚物, 葡萄糖寡聚物, 比如麦芽糖、麦芽三糖和异麦芽三糖, 潘糖, 果糖和果糖寡聚物。在具体的实施方案中, 微生物被修饰从而具备发酵戊糖的能力, 并且培养基中包含戊糖比如木糖、木聚糖或其他木糖寡聚物。在具体的实施方案中, 在己糖和戊糖的组合上培养微生物。

[0179] 糖类可以是含半纤维素或纤维素的生物质的水解产物。在具体的实施方案中, 微生物经修饰从而确保生物质降解为单体(例如, 纤维素酶基因的表达)。由此, 在具体的实施方案中, 底物包含糖寡聚物或多聚物, 比如纤维素、半纤维素或果胶。

[0180] 另外 / 或者, 可以向培养基中加入酶以确保底物降解为可发酵单体。

[0181] 在本发明的具体的实施方案中, 培养基包含至少(当量的) 5g/L, 至少 10g/L, 至少 20g/L, 至少 30g/L, 更特别的是, 至少 40g/L, 以及甚至更特别的是, 至少 50g/L 葡萄糖。在更具体的实施方案中, 培养基包含至少 100g/L, 更特别的是, 至少 200g/L。

[0182] 培养基任选地还可以包含特定红曲霉菌株所需的营养物, 包括比如氨或铵盐等这样的无机氮源、矿物等。然而, 在更具体的实施方案中, 培养基是含有戊糖或己糖作为唯一碳源的完全矿物质培养基。本发明的菌株在该简单培养基上生长的能力大大降低了培养成本并简化所生产有机酸的纯化。

[0183] 其他生长条件, 比如温度、细胞密度等, 对于本发明而言并不严格, 并且对其进行一般性选择以提供一种经济的方法。各生长阶段和生产阶段期间的温度可以从培养基的结冰温度之上至约 50°C 变化。优选温度, 尤其是在生产阶段期间的, 为约 30-45° C。

[0184] 本发明方法的培养步骤可以在有氧、微氧或厌氧条件下进行。也可以采用准厌氧条件或限制氧条件,在此条件下除了生产过程起始时存在于培养基中的溶解氧之外在过程中不添加氧气。

[0185] 在具体的实施方案中,本发明的方法包括在厌氧或氧限制条件下培养表现出将糖类转化为有机酸的能力的红曲霉目微生物(菌株)。

[0186] 根据本发明此方面的方法的培养步骤可以以连续、分批、或其一些组合的方式进行。

[0187] 利用本发明的工具和方法获得的有机酸产率将依赖于所使用的培养条件。

[0188] 在某些实施方案中,根据本发明的生产有机酸的方法其得到的有机酸产率为至少 0.5g/L,尤其至少 2g/L,更特别的是,至少 4g/L,甚至更特别的是,至少 50g/L,以及最特别的是 50 至 100g/L。在更特别的实施方案中,产率约为 2-3g/L/ 小时。

[0189] 在具体的实施方案中,本发明的微生物能够转化至少 50%、更特别的是,至少 60%、甚至更特别的是,75%、更特别的是至少 95%、以及高达 100% 的所消耗的葡萄糖。实践中,在本发明方法的具体的实施方案中获得的产率为至少 0.5g/g 糖,更特别的是,至少 0.6g/g 糖,但可以高达 0.95g/g 糖。

[0190] 在另外的实施方案中,本发明提供用于生产有机酸的方法,除了以上详述的步骤之外,该方法还包括回收目的有机酸的步骤。在具体实施方案中,从微生物可以在仅包含糖类作为唯一碳源的矿物培养基上生长这一事实来看,在本发明的方法中从培养基中回收有机酸得到大大简化。可以通过本领域技术人员已知的方法,比如萃取、离子交换树脂、电渗析、纳米过滤等,来完成适宜的纯化。

[0191] 现将通过以下非限制性实施例进一步阐述本发明。

实施例

[0192] 实施例 1 :分离三个红色红曲霉菌株 LF4、LF5 和 LF6 作为高度有机酸耐受菌株

[0193] 通过在低 pH 培养基中温育、提高乳酸浓度以及改变葡萄糖浓度和木糖浓度,从土壤和玉米-小麦青贮饲料中分离菌株。

[0194] 通过 40°C 在含有 50g/l 葡萄糖、50g/l 木糖和 100g/l 乳酸的 pH2.8DSMZ402 培养基中温育,分离出一种菌株(LF4)。

[0195] 除 pH 为 2.4 外,如 LF4 所述地分离出另一种菌株(LF5)。

[0196] 通过 32°C 在含有 25g/l 木糖和 150g/l 乳酸的 pH2.8DSMZ402 培养基中温育,分离出第三种菌株(LF4)。

[0197] 发现红曲霉目,更具体地红色红曲霉的这 3 种菌株能够在高乳酸浓度(高达 150g/L)的存在下在低 pH (2-3) 生长。

[0198] 乳酸耐受菌株 LF4、LF5 和 LF6 于 2010 年 7 月 21 日根据布达佩斯条约由荷兰 Stichting Dienst Landbouwkundig Onderzoek, Bornseweilanden9,6708WG Wageningen 的食品和生物研究部(Food&Biobased Research department) 保藏,保藏号分别为 CBS127564, CBS127565 和 CBS127566。

[0199] 实施例 2 :用可选择标志基因稳定转化

[0200] 材料和方法

[0201] a) 转化

[0202] 大多数用于遗传修饰红色红曲霉的方案都涉及利用电穿孔法或者通过组合氯化钙及聚乙二醇来转化原生质体。然而这些方法常具有低转化效率和低有丝分裂稳定性。报道了在红色红曲霉(Yang2008)中利用根癌土壤杆菌介导的 DNA 整合的高效转化方法。

[0203] 我们已将该根癌土壤杆菌介导的转化系统应用于我们的红色红曲霉菌株 LF4、LF5 和 LF6 以及所选择的两种 CBS 菌株 CBS135. 60 和 CBS503. 70。

[0204] de Groot 等人,1998 所述的含有二元载体 pUR5750 的土壤杆菌菌株获自 Plant Research International,WUR。它们于 30℃ 生长于用卡那霉素(100 μ g/ml)补充的基本培养基中 48 小时。细胞($OD_{600} \sim 1.0$)用不含乙酰丁香酮(AS)的诱导培养基洗涤,并于 28℃ 在有和无 AS 条件下生长 6 小时。AS 用于诱导毒性和 T-DNA 转移。培养十天后,从 PDA 平板收集红色红曲霉的分生孢子(10^7 个孢子/ml)。转化分生孢子时,将等体积的分生孢子与等体积根癌土壤杆菌混合,涂布于置于含或不含 AS 的诱导培养基上的尼龙滤器上。平板于 25℃ 温育 4 天。之后将滤器转移到含 200 μ g/ml 头孢噻肟以杀死土壤杆菌细胞以及含 100 μ g/ml 潮霉素以选择转化体的 YM- 培养基上。

[0205] 10-14 天后,将快速生长的真菌菌落转移到新鲜 YM 平板 + 潮霉素和头孢噻肟上。生长五天后,再次将菌落边缘转移到新鲜 YM 平板 + 潮霉素和头孢噻肟上。

[0206] 应用该程序从所选择的各红曲霉菌株得到潮霉素抗性转化体(参见表 2)。

[0207] 表 2. 各红色红曲霉菌株的转化体数

[0208]

红色红曲霉菌株	转化体数
LF4	14
LF5	3
LF6	2
CBS503. 70	4

[0209] b) 转化体的稳定性

[0210] 我们处理的转化体的第一个特性是遗传稳定性。就此,遗传修饰菌株的以下两个特征是重要的:

[0211] (i) 靶基因必须整合进基因组中,以及

[0212] (ii) 即使是在无抗生素选择压力下该基因仍必须保持在位并有活性。

[0213] 首选通过 PCR 显示载体 DNA 存在于转化体中。

[0214] 从 7 种转化体(5 种 LF4 转化体和 2 种 CBS503. 70 转化体)和三种野生型菌株(LF4, CBS503. 70 和 CBS135. 60)中分离得到 DNA,并用能够显示潮霉素基因的引物对其进行 PCR。

[0215] 转化体 DNA 清楚地产生与来自对照载体 DNA 相同大小的 PCR 片段,而野生型菌株并不显示该 PCR 片段。这显示转化体中存在潮霉素基因。

[0216] 为了确定载体 DNA 整合进红色红曲霉转化体基因组 DNA,进行了 Southern 印迹分析。在用限制酶消化之前和之后,对基因组 DNA 进行印迹。将该印迹与显示潮霉素基因存

在的探针杂交。

[0217] 在基因组 DNA 的消化中,印迹上的信号与基因组 DNA 的位置一致,这意味着潮霉素基因整合进基因组中。在消化过的 DNA 消化中,可以在不同位置(= 不同 DNA 片段)看见信号,这意味着潮霉素基因的随机整合。

[0218] 总之,我们已经确定载体 DNA 在红色红曲霉菌株中的随机基因组整合。

[0219] 为了测试无抗生素选择压力下的转化体稳定性,使菌株在 PDA (马铃薯葡萄糖琼脂)平板上生长。生长约 14 天后,将培养物的一部分外侧边缘再次转移到不含潮霉素的新鲜 PDA 平板上。该过程重复三次。最后将培养物的一部分外侧边缘转移到含潮霉素的新鲜 PDA 平板上,以观察该菌株在该抗生素存在下是否仍然能够生长。

[0220] 记下在该步骤后在选择性平板上仍然能够生长的转化体数(表 3)。

[0221] 表 3. 筛选潮霉素抗性稳定性的红色红曲霉转化体。

[0222]

红色红曲霉菌株	测试的转化体数量	三次转移后在潮霉素上生长的转化体数量
LF4	14	14
LF5	3	3
CBS 503.70	4	4

[0223] 第二种方法是,在无抗生素选择的三次转移后从平板收集孢子,并比较将其散布于含和不含潮霉素的 PDA 平板(选择性平板)上后出现的菌落数。孢子经过了玻璃绒过滤以将菌丝体片段污染降至最低。若潮霉素基因丢失或者失活,则选择性平板上的菌落数将减少。

[0224] 用所有菌株进行的测试均未显示选择性或非选择性平板上的菌落数的减少。

[0225] 总之,无证据表明红色红曲霉转化体中所导入的基因不稳定或者失活。

[0226] 作为最终测试,将连续转移到非选择性平板以及随后在无选择压力的培养基上生长后,用 27 种转基因菌株重复了前述 Southern 印迹实验。

[0227] 该 Southern 印迹证实了在生长于非选择性培养基中后,潮霉素基因存在于红色红曲霉转化体基因组中。

[0228] c) 转化载体的构建

[0229] 为了能够对红色红曲霉菌株进行连续转化,例如为了导入多个基因和 / 或将基因导入与基因敲除事件相结合,我们开始构建带有其他可选择标志的转化载体。

[0230] 描述于前述段落中的已用于转化的载体是 pUR5750 质粒。附图 1 显示该质粒的图谱(“RB”= 右边界;“LB”= 左边界;“Hpt”= 潮霉素磷酸转移酶基因)。

[0231] 转化过程中,RB(右边界)和 LB(左边界)间的 DNA 部分被转移进真菌基因组中。Hpt 基因位于该部分。该基因在 *gpd*⁻ 启动子和 *trpC*⁻ 终止子调控下的活性导致转化体中产生潮霉素抗性。为了便于克隆和该载体中启动子、基因和终止子的交换,我们设计了一个盒模型。如附图 2 所示,该克隆策略使我们不仅能够交换该载体中的启动子、终止子和基因,还能连续组合两个基因盒。

[0232] 我们已经使用的赋予潮霉素抗性的潮霉素磷酸转移酶基因是 Hpt。Ble 是赋予腐草霉素或 zeocin 抗性的博来霉素基因。NptII 是赋予新霉素(G418)抗性的新霉素磷酸转移酶基因。

[0233] 由于 pUR5750 转化载体是一个大载体,而且在插入其他基因后会变得更大(参见附图 2),我们决定还利用该载体的一个较短版本来转化红色红曲霉。通常认为,较小的载体在构建和转化实验中更易于操作。

[0234] 该较小的载体是 pUR5750 的衍生物,其代号为 pCB301 (Xiang 等人,1999)。从该质粒除去植物转化所需的典型 DNA 元件,pUR5750 基本序列的原始功能,余下 3574bp 载体。附图 3 显示包含 Hpt 盒的 pCB301,称作 pCGHT3 (“RB”= 右边界;“LB”= 左边界;“Hpt”= 潮霉素磷酸转移酶基因)。该载体是初始 Hpt 载体的一半大小。

[0235] 为了能够利用可选择标志,例如 Ble 或 NptII 基因,我们首先验证了红色红曲霉不能在含有最常用于真菌转化系统的 zeocin 或 G418 浓度的培养基中生长。来自红色红曲霉菌株 LF4 和 LF6 的分生孢子和孢子不能在含有 600 μ g/ml zeocin 或 200 μ g/ml G418 的 PDA 平板上生长。

[0236] 利用两种基本载体和三种可选择标志,制备了六种载体(表 4)。

[0237] 表 4. 构建的载体

[0238]

基本载体	标记基因	构建体	基本载体	标记基因	构建体
pUR5750	Hpt	pURGHT2	pCB301	Hpt	pCGHT3
	Ble	pURGBT1		Ble	pCGBT2
	NptII	pURNT3		NptII	pCGNT13

[0239] d) 用六个新构建的载体转化

[0240] 用上述六种载体转化来自红色红曲霉菌株 LF5 的分生孢子和子囊孢子混合物。在共培养步骤后,将带有长出的分生孢子和子囊孢子的滤器转移到选择性平板上。

[0241] 选择性平板包含带有 200 μ M 头孢噻肟以杀死土壤杆菌细胞和 100 μ g/ml 潮霉素或 200 μ g/ml zeocin 或 200 μ g/ml 遗传霉素以选择转化体的 YM- 培养基。

[0242] 约 12 天后,在选择性平板上可见首先生长的菌落。

[0243] 表 5 显示转化体计数。

[0244] 表 5. 获自 LF5 无性孢子的转化体

[0245]

载体	标记基因	转化体数量
pURGHT2	Hpt	7
pURGBT1	Ble	0*
pURGNT3	NptII	1

pCGHT3	Hpt	18
pCGBT2	Ble	0*
pCGNT3	NptII	9

[0246] * 总体分散生长, 未见特定菌落。

[0247] 将菌落转移到含适宜抗生素的 PDA 平板上, 充分生长后用作在含有抗生素的液体培养基 (YPD) 中生长的接种体。四天后收集菌丝体, 分离 DNA。

[0248] 为了确定选择标志基因整合进红色红曲霉 LF5 转化体中, 对多种转化体进行了两次 PCR 分析。第一次分析将显示可选择标志存在于分离的 DNA 中, 是用特异于标志基因的引物进行的 PCR。第二次 PCR 分析是用特异于根癌土壤杆菌 GPD (甘油醛磷酸脱氢酶) 基因的引物来完成的, 其排除了可能来源于存活的根癌土壤杆菌细菌的污染载体 DNA 的存在。

[0249] 总之, 已显示已根据盒策略构建的 Hpt 和 NptII 载体对于转化红色红曲霉是有效的。利用基于 pCB301 的较小载体看来比以 pUR5750 为基础的载体产生更多的转化体。PCR 分析显示, 可选择标志基因整合进红色红曲霉基因组中, 并显示根癌土壤杆菌细菌已被头孢噻肟有效地杀死。

[0250] 实施例 3 : 产生生产乳酸的红曲霉

[0251] a) 载体构建

[0252] 为了向红色红曲霉菌株基因组中导入至少一个拷贝的牛 (*Bos taurus*) LDH 基因, 最直接的方法是在上述盒中引入密码子优化的牛 LDH 基因。驱动 LDH 基因表达的启动子和终止子序列与驱动选择标志基因的那些相同。

[0253] 为进行密码子优化, 我们首先分析了红曲霉的密码子使用。由于仅能获得两种来自红色红曲霉的基因, 我们比较了丛毛红曲霉和紫红红曲霉的密码子使用与红色红曲霉基因的密码子使用。这三个物种关系紧密, 并且发现了这 3 个红曲霉物种的密码子偏好之间的大量相似性。

[0254] 基于密码子使用, 我们能够设计出优化的牛 LDH 基因用于在所选择的红色红曲霉中表达 (SEQ ID NO:1 和附图 4), 并且通过 Genscript 公司合成了这样的基因。在获得该基因后, 将其克隆进所构建的两种类型的 Hpt 载体中并进行测试。根据附图 2 所示的盒策略完成克隆, 该策略的优点是除了启动子 -LDH- 终止子盒的插入之外初始载体未被改变。由此得到基于 pCB301 质粒的载体 pCGHTGBtLT (附图 5) 和基于 pUR5750 质粒的载体 pURGHTGBtLT (附图 6)。

[0255] b) Bt-LDH 基因在大肠杆菌中的克隆和表达

[0256] 为了验证用于转化红色红曲霉的合成 LDH 基因的正确翻译及活性, 将该基因克隆进大肠杆菌表达载体。所使用的表达载体是 InVitrogen pBAD102 载体, 其在阿拉伯糖诱导后表达该蛋白质。

[0257] LDH 在大肠杆菌中高水平表达, 但被发现是部分可溶的。

[0258] 可溶的大肠杆菌蛋白质用于分析 LDH 酶活性。

[0259] 由该 btLDH 催化的反应为:

[0260] (L)- 乳酸盐 + NAD(+) <=> 丙酮酸盐 + NADH

[0261] 在该活性检测中,添加了过量的丙酮酸盐和 NADH,从而可以根据 NADH 向 NAD 的转化反应出活性,NAD 可在 340nm 处分光光度法测定。

[0262] 使用获自 Sigma-Aldrich 的 LDH 酶作为阳性对照。

[0263] 通过由于 NADH 氧化导致的 340nm 处的吸光度降低来确定反应速度。在规定的条件下,一个单位引起 25°C 及 pH7.3 下每分钟一微摩尔 NADH 的氧化。

[0264] 制备 0.2M Tris • HCl 缓冲液。LDH 酶在使用前在 Tris 缓冲液中稀释并冷藏保存以获得 0.02-0.04 ΔA/min 的速率。

[0265] 制备 2.8mL Tris • HCl,0.2M pH7.3 和 0.1mL6.6mM NADH 的反应混合物。

[0266] 测定添加和未添加底物的 LDH 活性,以监控本底 NADH 转化。

[0267] 合成 LDH 在大肠杆菌中的表达和活性分析显示,该合成基因编码具有正确 Mw 且有活性的蛋白质。这些大肠杆菌菌株随时间的葡萄糖和乳糖生产示于附图 7 (“大肠杆菌-LDH1、2 和 3”对应于含有所表达的合成 LDH 蛋白质的三份独立大肠杆菌提取物;“大肠杆菌-对照”是表达不同蛋白质的大肠杆菌提取物)。

[0268] c) 用 LDH 载体转化红色红曲霉。

[0269] 用 LDH 载体 pCGHTGBtLT 和 pURGHTGBtLT 转化来自红色红曲霉菌株 LF4、LF5 或 LF6 的分生孢子和子囊孢子混合物。因此总计完成了六次转化。在如前述实施转化程序并在含潮霉素的平板上进行选择之后,仅获得三种 LF5 转化体。

[0270] 一种转化体获自使用 pCGHTGBtLT 载体(LF5-t1),两种获自 pURGHTGBtLT 载体(LF5-t2, LF5-t5)。

[0271] d) 对红色红曲霉 LF5-T1 和 LF5-T2-LDH 转化体的分析

[0272] 在第一个实验中,分析了两种转化体 LF5-T1 和 LF5-T2。

[0273] 用 pCGHTGBtLT 转化 LF5-T1,和用 pURGHTGBtLT 转化 LF5-T2。

[0274] 为了分析 LDH 酶活性以及可能的 L- 乳酸盐生产,将两种转化体和 wt-LF5 菌株在 S. c. 培养基 +50g/L 葡萄糖 pH6.0 上生长。

[0275] 培养 24、48 和 72 小时后,从各培养物取培养基和生物质样品。

[0276] (i) 葡萄糖消耗和乳酸盐生产

[0277] 附图 8a 和 8b 清楚地显示在所有培养中的葡萄糖消耗,同时在来自 LF5-T2 的培养基中检测到乳酸浓度随时间提高(数字 24、48 和 72 表示生长 24、48 和 72 小时后来自两种分别的培养物的样品;“M”表示培养基)。LF5-T2 消耗约 8g/L 葡萄糖并产生约 1.5 至 2g/L 乳酸,这表示达到了 0.18 至 0.25g/g 的产率。最大理论产率为 1.00g/g。

[0278] (ii) 酶分析

[0279] 由于 HPLC 分析不能区分 L- 和 D- 乳酸,因此用酶法分析了多份样品。L- 乳酸分析试剂盒(Megazyme)证实 LF5-T2 样品中存在 L- 乳酸(附图 9)。

[0280] 所收获的生物质样品在液氮中冷冻,并用研钵和杵研磨。冷冻粉末在缓冲液(0.2M Tris • HCl, pH7.3)中解冻,涡旋提取蛋白质。上清液离心后并如前面段落所述进行蛋白质分析和 LDH- 酶活性分析。

[0281] 该分析清楚地显示 LF5-T2 转化体中存在 L-LDH 活性,而在对照中未发现活性(附图 9)。

[0282] (iii) Southern 印迹分析

[0283] 用 LDH 基因完成杂交。Southern 印迹分析证实在非选择性培养基上生长后红色红曲霉转化体 t2 基因组中有一个 LDH 基因整合。

[0284] 发现转化体 t1 不含 LDH 基因。用潮霉素基因进行的第二次 Southern 分析显示, 两种转化体中均有潮霉素基因的整合。这表明, 在转化体 t1 中, 两个边界间的基因盒、LDH 和潮霉素不是完整整合的。

[0285] (iv) 结论

[0286] 用所构建的转化载体结合可选择标志和合成的 LDH 基因, 获得了 27 种红色红曲霉转化体。一种转化体, LF5-T2, 在葡萄糖培养基上生长时显示乳酸生产。

[0287] 乳酸生产、L-LDH 活性和 Southern 印迹支持这一结论: 我们已经将一个 L-LDH 编码异源基因以其可被表达和具有代谢活性的方式插入到该红色红曲霉 LF5-T2 转化体的基因组中。

[0288] e) 对红色红曲霉 LF4-、LF5- 和 LF6-LDH 转化体的分析

[0289] 在下一个实验中, 总共分析了 35 种转化体, 也即, 4 种 LF4, 16 种 LF5 和 15 种 LF6。菌株在 10ml YEPD 培养基中预培养三天。生物质在 pH2.8 的含 10g/L 葡萄糖的 Sc 培养基中洗涤, 并在 15ml 相同组成的 Sc 培养基中培养。菌株的葡萄糖消耗示于附图 11。这些转化体中有十九种 (54%), 也即, 两种来自 LF4、十二种来自 LF5 和五种来自 LF6, 从葡萄糖生产乳酸 (附图 11)。在阳性实验中, 发现了不同量的乳酸, 范围为 0.5 至 3.3g/L, 对应于 5-33% 的最大理论产率 (附图)。形成乙醇作为副产物, 其浓度与乳酸浓度负相关 (附图 12)。

[0290] 从各菌株选择两种转化体 (4t3、4t4、5t2、5t21、6t4、6t5), 一种具有最高的乳酸生产, 另一种的乙醇生产最低。随后在摇瓶 (在葡萄糖或木糖 (均为 10g/L) 上) 中培养菌株, 在两种不同的通风条件下: 有氧的, 和严格限制氧的。

[0291] 在有氧条件下, 菌株在 100ml 摇瓶中 10ml YEPD 上预培养三天。然后用 25ml pH2.8 的 Sc 培养基洗涤培养物两次。用三角形的磁力搅拌棒将生物质在 10ml 相同培养基中均质化。750 微升用于接种 15ml Sc 培养基, pH2.8, 其中含有 10g/L 葡萄糖和木糖 (附图 13-15)。

[0292] 或者, 在严格限制氧条件下, 在瓶子里进行培养, 瓶口用安有铝帽的丁基橡胶塞封闭, 瓶塞上装有自行车管阀, 从而形成严格的氧气限制, 几乎是无氧条件。在 100ml 摇瓶中 10ml YEPD 上预培养三天。然后用 25ml S. c 培养基 pH2.8 洗涤培养物两次。用三角形磁力搅拌棒将生物质在 10ml 相同培养基均质化。750 微升用于接种 15ml Sc 培养基, pH2.8, 其中含有 10g/L 葡萄糖和木糖。

[0293] 在有氧培养中 (附图 13-15 左栏), 从葡萄糖生产了一些乳酸 (约 0.5-1g/L)。葡萄糖完全被消耗后乳酸被消耗。没有乙醇形成。在严格氧气限制条件下 (附图 13-15 右栏), 乳酸浓度为 2.0 至 3.3g/L, 乙醇产生浓度为 0.5 至 1.0g/L。

[0294] 实施例 4: 通过消除乙醇生产来进一步提高乳酸产率

[0295] a) 利用序列同源性鉴定丙酮酸脱羧酶基因

[0296] 为了进一步提高乳酸产率, 涵盖了基因敲除系统以一方面减少非乳酸产物的生产另一方面减少红曲霉对乳酸的代谢。更特别的是, 为了避免产生乙醇, 涵盖了基因敲除系统, 其基于编码丙酮酸脱羧酶 (EC4.1.1.1) 的酿酒酵母 PDC1 基因的红色红曲霉同源物的编码基因。

[0297] 红色红曲霉在氧气限制条件下产生乙醇。由于乙醇和乳酸都从丙酮酸盐产生, 因

此应当阻止乙醇的产生,因为它会降低乳酸产率。

[0298] 以酿酒酵母 PDC1 基因作为查询进行 BLAST,我们在黑曲霉基因组中发现了可能代表 PDC 编码基因的数种同源物。使用黑曲霉是因为它与红曲霉的关系近。基于这些序列我们设计了简并 PCR 引物以能够克隆部分红色红曲霉 PDC。

[0299] 对来自红色红曲霉菌株 LF6 的 RNA 进行的 RT-PCR 结果产生两个 1.3kB 的 DNA 片段,将其克隆进质粒。对这些克隆的 PCR 片段的测序证实了存在两种与黑曲霉 PDC 同源物具有高度同源性、与酿酒酵母 PDC1 基因间存在足够同源性的开放阅读框,从而得出结论认为,我们已经克隆了两种红色红曲霉 PDC1 类似物。

[0300] 红色红曲霉 PDC 基因 PDC1 和 PDC2 的开放阅读框示于 SEQ ID NO:3 和 4 (以及附图 16 和 17)。

[0301] b) 基因敲除载体的构建

[0302] i) PDC 基因的敲除

[0303] 利用 PCR,分离得到 PDC1 和 PDC2 基因的 5' 和 3' 半部,并在末端添加了限制性位点。然后将 5' 半部克隆至载体 pCGNT1 和 PCGBT2 的启动子-标志-终止子-盒的 5' 端(以及右边界序列的 3' 端)。除了使用 NPTII 和 BLE 基因而非 HPT 基因作为选择标志之外,这些载体与之前描述的载体 pCGHT3 相同。同样,相应的 3' 半部被克隆至启动子-标志-终止子-盒的 3' (以及右边界序列的 5')。以这种方式,产生了三种载体:

[0304] 1. pPDC1::NPT 用于利用遗传霉素选择来破坏 PDC1 (附图 18)

[0305] 2. pPDC2::NPT 用于利用遗传霉素选择来破坏 PDC2 (附图 19)

[0306] 3. pPDC2::BLE 用于利用 zeocin 选择来破坏 PDC2 (附图 20)

[0307] 这些载体用在之前构建的 PDC1::NPT 破坏体中。

[0308] ii) 组合的敲除和基因插入

[0309] 构建载体使得能够同时破坏靶基因和导入另一个基因。由于在载体中存在长段 DNA,为了在第二轮转化中使由于载体中存在长 DNA 区段而导致的不想要的重组的发生最小化,以及为了提高载体构建过程中的克隆效率,减小了新载体中启动子和终止子序列的大小。利用 PCR,将 GPD 启动子的大小从 2208bp 减至 538bp,以及 TrpC 终止子被从 763bp 减至 278bp。这些是载体 pCH#PDC1 和载体 pCL1H#PDC1 (参见附图 21 和 22)。pCH#PDC1 载体用于通过潮霉素选择来破坏 PDC1。pCL1H#PDC1 载体用于通过潮霉素选择来破坏 PDC1 和导入 LDH。从这些载体获得的转化体分别有被破坏的 PDC1 基因以及被破坏的 PDC1 基因和插入的 LDH 基因。构建载体 pCN#PDC2 是为利用遗传霉素选择来破坏 PDC2 基因(附图 23)。

[0310] c) 产生敲除转化体

[0311] i) PDC 基因的敲除

[0312] 从 LF6LDH 转化体 t4 和 t5 获得的孢子与敲除载体 pPDC1::NPT 或 pPDC2::NPT 用于转化实验。在用 G418 (遗传霉素)选择后,各菌株和载体的组合得到了 50-80 个遗传霉素抗性菌落。借助 PCR 用基因特异性引物测试了 40 个转化体(20 个 LF6t4+pPDC2::NPT 转化体和 20 个 LF6t5+pPDC2::NPT 转化体)DNA 中 NPTII 基因的存在以及 PDC2 基因的破坏。用敲除载体观察到了 PDC2 基因的破坏。

[0313] ii) 组合的敲除和基因插入

[0314] 根据我们的标准程序,载体 pCH#PDC1 和 PCL1H#PDC1 用于转化 40°C 从野生型菌株

LF6 收集的孢子。在含有潮霉素的选择性平板上生长十天后,观察到生长的菌落,将其中的 20 个转移到新的含潮霉素平板上,并用 PCR 测试 PDC1 基因敲除。

[0315] PCR 分析显示,来自 pCH#PDC1 的 20 个转化体中有一个,以及来自 pCL1#PDC1 的 20 个转化体中有三个,其中的 PDC1 基因已被破坏(表 6)。

[0316] 表 6 每种构建体的转化体数量

[0317]

构建体	菌落总数	转移的菌落数	PDC1 敲除
pCH#PDC1	53	20	1
pCL1H#PDC1	97	20	3

[0318] 载体 pCN#PDC2 用于转化来自第一轮转化得到的 PDC1 敲除菌株的孢子。在含有遗传霉素的选择性平板上生长十天后,观察到了数个生长菌落,将其中的 40 个转移到新的含遗传霉素的平板上,并用 PCR 测试 PDC2 基因敲除。

[0319] 菌株 LF6KL19 被证实为 PDC1 和 PDC2 的双敲除且含有重组的 LDH 基因。

[0320] d) 转化体的分析

[0321] 在 2L 的锥形瓶中,菌株 LF6KL19 预培养于含 50g/l 葡萄糖和 1g/l Junlon 的 300ml pH2.8 的 Sc 培养基中。初始孢子浓度为 1×10^5 个孢子 /mL。温育温度为 30 或 35℃,搅拌速度设为 75rpm。在 30℃消耗了 16.1g/l 葡萄糖,产生了 14.4g/l 乳酸,在 35℃消耗了 18.8g/l 葡萄糖,产生了 18.6g/l 乳酸,这表明实际产率介于 0.9 和 1.0g/g 之间。在这些条件下还获得了最高生产力:0.15g/l/h。

[0322] e) 基因组和转录组(transcriptome)分析

[0323] 对在不同底物上生长的红色红曲霉 LF6 的基因组和红色红曲霉 LF6 及红色红曲霉 LF6KL19 (双 PDC 敲除,引入了牛 LDH 拷贝)的转录组进行测序,并通过自动注解程序鉴定了基因组上参与乙醇生产的相关基因。RNA 序列信息用于改良这些基因的结构。在基因组上鉴定了许多参与乙醇形成的推定基因:丙酮酸脱羧酶(PDC)有 7 个和醇脱氢酶有 12 个。3 个推定的 PDC 基因在基因组中彼此相连,对 RNA 序列信息的分析显示,这三个推定的 PDC 基因属于一个基因。PDC2 产物(SEQ ID NO:2)与该基因的翻译序列部分相同。

[0324] PDC1 产物与 Mona10180 的推定 PDC 基因产物部分相同。编码 PDC1 和 PDC2 的两种基因在所有环境下都高表达。此外,还有另一个 PDC 基因(Mona07809 或 PDC4, SEQ ID NO:5,附图 24)在所有环境下都被转录,且可以从红色红曲霉被除去以降低乙醇的产生。

[0325] 实施例 5:通过消减内源乳酸代谢来进一步改进乳酸产率

[0326] a) 红色红曲霉中的 Cyt-LDH 活性分析

[0327] 从文献已知在真菌和酵母中乳酸通过(细胞色素)L-乳酸脱氢酶代谢。因此我们首先分析了在乳酸上生长的红色红曲霉的该酶活性。

[0328] 红色红曲霉菌株生长于补充有 5% 葡萄糖或 2% 乳酸作为碳源的 2% 酵母提取物、1% 蛋白胨培养基上。作为对照,酿酒酵母在相同条件下生长(Lodi 和 Guiard, 1991)。生长 24 小时后收集生物质。所收集的生物质样品在液氮中冷冻,并用研钵和杵研磨。冷冻粉末在缓冲液(0.067M 磷酸钠, pH7.4, 0.001M EDTA)中解冻,并涡旋提取蛋白质。离心后上清液进行

蛋白质分析和 cyt-LDH 酶活性分析。分光光谱测定 420nm 处的铁氰化钾的减少速率。检测之前将酶溶解于含 0.001M EDTA 的 0.067M 磷酸盐缓冲液 pH7.4 中,以获得 0.02-0.04 ΔA /分钟的速率。

[0329] 制备 2.0ml 0.1M 焦磷酸钠、0.5ml 0.5M DL 乳酸钠、0.3ml 0.01M EDTA 和 0.1ml 铁氰化钾的混合物,并将其移液至微滴定板。加入 10-20 μ l 适当稀释的样品,并记录 ΔA_{420} /min。

[0330] 附图 25 显示蛋白质样品中的 cyt-LDH 活性。“Gluc”意指在含有葡萄糖作为碳源的培养基上生长,“Lact”意指在含有 L-乳酸作为碳源的培养基上生长。Cyt-LDH 活性存在于所有被测试的红色红曲霉菌株中,并且通过以 L-乳酸作为碳源生长被诱导。

[0331] b) 分离基于序列同源性的 CYB2 基因的红色红曲霉同源物

[0332] 以酿酒酵母 CYB2 基因作为查询进行 BLAST,我们在黑曲霉基因组中发现了数种可以代表 cyt-LDH 编码基因的同源物。使用黑曲霉是因为其与红曲霉很近的关系。基于这些序列,我们设计了简并 PCR 引物以能够克隆部分红色红曲霉 cyt-LDH。

[0333] 对来自红色红曲霉菌株 LF6 的基因组 DNA 作 PCR,产生 1kb DNA 片段,其被克隆进质粒。对该克隆的 PCR 片段进行测序,证实了存在与黑曲霉 CYB2 同源物具有高同源性以及与酿酒酵母 CYB2 基因足够同源性的开放阅读框,使得能够推论,我们已经克隆了红色红曲霉的 CYB2 类似物。红色红曲霉 CYB2 基因的开放阅读框示于 SEQ ID NO:2 和附图 26;小写字母表示基因组序列中的推定内含子。

[0334] c) 乳酸代谢的基因组和转录组分析

[0335] 对在不同底物上生长的红色红曲霉 LF6 的基因组和红色红曲霉 LF6 及红色红曲霉 KL19 (双 PDC 敲除,引入了牛 LDH 拷贝)的转录组进行测序,并通过自动注解程序鉴定了基因组上参与乳酸代谢的相关基因。RNA 序列数据用于改良这些基因的结构。为两种乳酸异构体都预测了数种编码乳酸脱氢酶的基因。对于 L-乳酸,预测了 4 种细胞色素依赖性 LDH,也即, Mona02475 (部分对应于 SEQ ID NO:2)、Mona00569、Mona05565 和 Mona06119。由于发现 Mona00569 是活性最高且在乳酸存在下高度上调,因而这是最明显的用于消除的候选物。该基因的序列示于 SEQ ID No :6 (附图 27)。

[0336] 还发现红色红曲霉含有利用 D-乳酸作为底物的细胞色素依赖 LDH 的数个推定基因。又有一个基因 (Mona05697) 是最活跃的基因。由于 Mona05697 的表达仅导致乳酸非目的 D-异构体的消耗,可能无需删除该基因。

[0337] 实施例 6 :产生生产延胡索酸的红色红曲霉菌株

[0338] a) 鉴定涉及延胡索酸生产的内源红曲霉基因

[0339] 分析红曲霉 LF6 基因组中编码涉及延胡索酸生产的酶的序列的存在。发现红色红曲霉包含编码丙酮酸羧化酶的基因 (SEQ ID NO:7,附图 28) 和编码苹果酸脱氢酶的基因 (SEQ ID NO:8,附图 29)。选择这些序列用于在有机酸耐受的红曲霉菌种中生产延胡索酸。

[0340] b) 载体构建。

[0341] 用上述方法构建载体。产生以下载体:

[0342] -pCPCH#PDC1 (附图 30),潮霉素选择,PDC1 敲除,导入红曲霉 LF6 丙酮酸羧化酶基因。

[0343] -pCMDHN#PDC2 (附图 31),遗传霉素选择,PDC2 敲除,导入红曲霉 LF6 苹果酸脱氢

酶基因 (SEQ ID NO:8)

[0344] -pCNATFUM#PDC4 (附图 32), 诺尔丝菌素(noursethricin) 选择, PDC4 敲除, 导入针对红色红曲霉经密码子优化的米根霉延胡索酸酶基因 (SEQ ID NO:9, 附图 33)

[0345] -pCBDAC (附图 34, zeocin 选择, 导入来自粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) 的针对红色红曲霉经密码子优化的二羧酸载体基因 Mae-1 (SEQ ID NO:10, 附图 35)。

[0346] c) PDC 敲除与延胡索酸途径插入的组合

[0347] 根据上述标准程序, 于 40°C 用载体 pCPCH#PDC1、pCMDHN#PDC2、pCNATFUM#PDC4 和 pCBDAC 连续转化从红曲霉菌株收集的孢子。

[0348] 首先用载体 pCPCH#PDC1 转化来自野生型菌株 LF6 的孢子。

[0349] 在包含潮霉素的选择平板上生长十天后, 观察到生长的菌落, 将其中 20 个转移到包含潮霉素的新平板上, 并通过 PCR 测试 PDC1 基因敲除 (ko) 和丙酮酸羧化酶基因插入。其结果产生 LF6-(PDC1ko+PC)。

[0350] 获自 LF6-(PDC1ko+PC) 转化体的孢子用 pCMDHN#PDC2 载体转化。在包含 G418 (遗传霉素) 的选择平板上选择后, 观察到生长的菌落, 将其中 20 个转移到包含遗传霉素的新平板上, 并通过 PCR 测试 PDC2 基因敲除和苹果酸脱氢酶基因的插入。其结果产生 LF6-(PDC1/2ko+PC+MD)。

[0351] 获自 LF6-(PDC1/2ko+PC+MD) 转化体的孢子用 pCNATFUM#PDC4 载体转化。在包含诺尔丝菌素的选择平板上选择后, 观察到生长的菌落, 将其中 20 个转移到包含诺尔丝菌素的新平板上, 并通过 PCR 测试 PDC4 基因敲除和延胡索酸酶基因的插入。其结果产生 LF6-(PDC1/2/4ko+PC+MD+FU)。

[0352] 获自 LF6-(PDC1/2/4ko+PC+MD+FU) 转化体的孢子用 pCBDAC 载体转化。在包含 zeocin 的选择平板上选择后观察到, 生长的菌落, 将其中 20 个转移到包含 zeocin 的新平板上, 并通过 PCR 测试二羧酸载体基因的插入。其结果产生 LF6-(PDC1/2/4ko+PC+MD+FU+DAC)=LF6-1-PMFD#PDC。

[0353] 这一系列转化导致菌株 LF6-1-PMFD#PDC, 其经证实为 PDC1、2 和 4 敲除体且包含全部在组成型启动子终止子组合控制下的同源丙酮酸羧化酶基因、同源苹果酸脱氢酶、同源延胡索酸酶基因以及异源二羧酸载体基因。

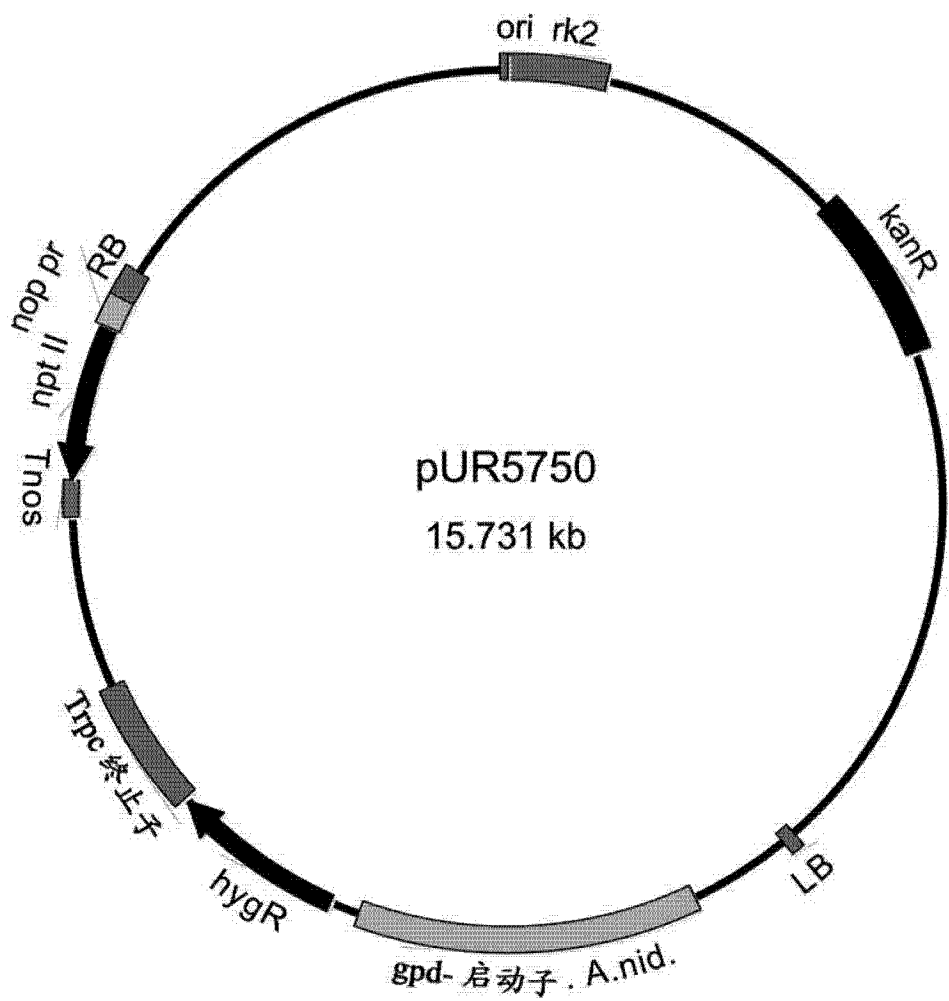


图 1

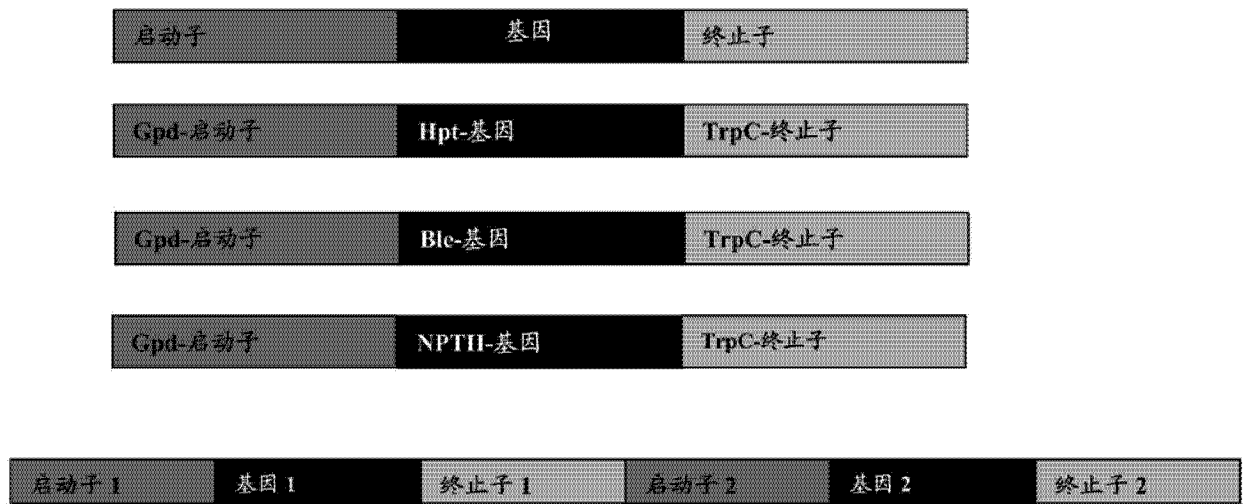


图 2

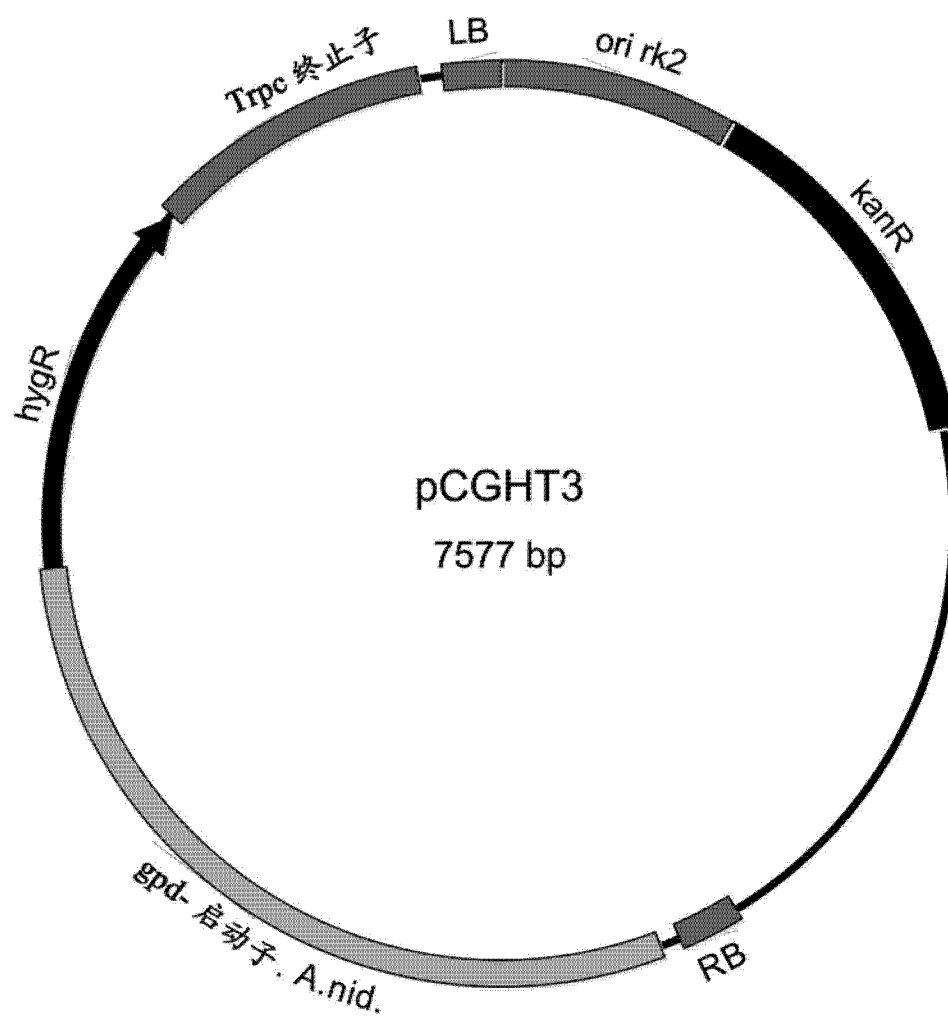


图 3

密码子优化的 Bt-L-LDH 基因 (Seq ID 1)

ATGGCAACCCTGAAGGACCAGCTTATCCAAAACCTGCTCAAGG
AAGAACACGTCCCCCAAACAAGATTACTATCGTCGGAGTCGG
TGCCGTTGGAATGGCCTGCGCTATCTCCATTCTGATGAAGGAC
CTCGCAGATGAGGTGGCGCTCGTCGACGTTATGGAGGATAAGC
TCAAGGGTGAAATGATGGACCTTCAGCATGGATCGCTTTTCTT
GCGCACACCCAAGATCGTCAGCGGCAAGGATTACAACGTTAC
AGCAAATTCCCGCCTTGTGATCATTACTGCAGGCGCGCGTCAG
CAAGAGGGTGAATCGAGACTGAACCTCGTCCAAAGGAACGTT
AATATCTTCAAGTTCATCATCCCCAACATTGTCAAGTACTCCCC
AAATTGTAAGCTGCTCGTCGTTTCTAATCCGGTTGACATCCTCA
CTTATGTGGCCTGGAAGATTTCTGGCTTCCCTAAGAACCGAGTT
ATCGGCTCGGGTTGCAATCTTGATAGCGCTCGATTTTCGGTATCT
TATGGGAGAGAGATTGGGCGTCCATCCCCTGTCCTGTCACGGC
TGGATCTTGGGAGAACACGGCGACTCCTCTGTGCCAGTCTGGT
CGGGTGTCAACGTGGCCGGAGTCAGCCTTAAGAATTTGCATCC
GGAGTTGGGCACCGACGCCGATAAGGAACAGTGGAAGGCTGT
CCACAAGCAAGTGGTCGACTCCGCATACGAGGTTATCAAGCTG
AAGGGATATACCTCCTGGGCGATTGGCCTCTCTGTGGCCGATC
TTGCTGAAAGCATCATGAAGAAGTTGCGCCGTGTCCATCCTAT
CTCCACGATGATTAAGGGTCTGTACGGAATTAAGGAAGACGTG
TTTTTGTCTGTCCCCTGCATCCTGGGCCAGAATGGTATTTTCGGA
TGTTGTGAAGGTCACCCTCACGCACGAGGAAGAGGCTTGCTTG
AAGAAGTCGGCGGACACTCTCTGGGGCATCCAAAAGGAACTC
CAATTTTAA

图 4

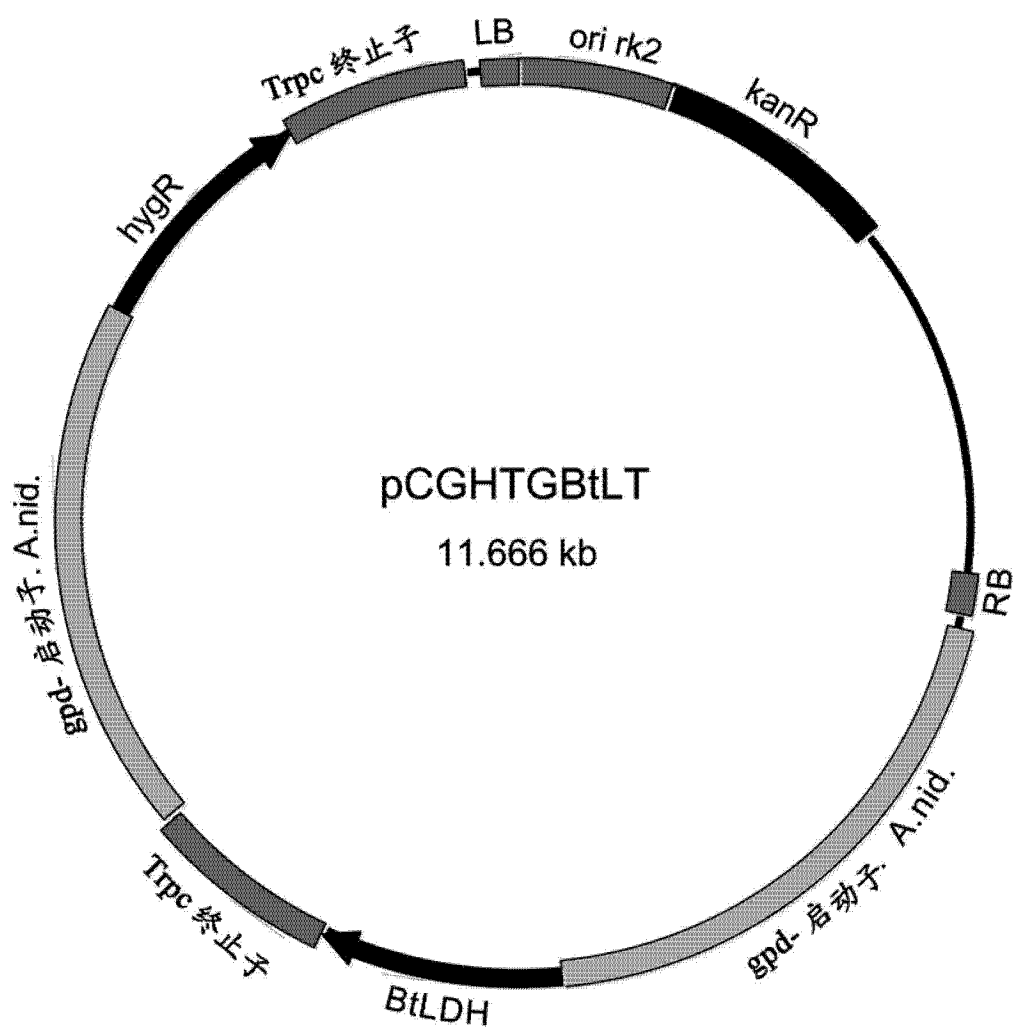


图 5

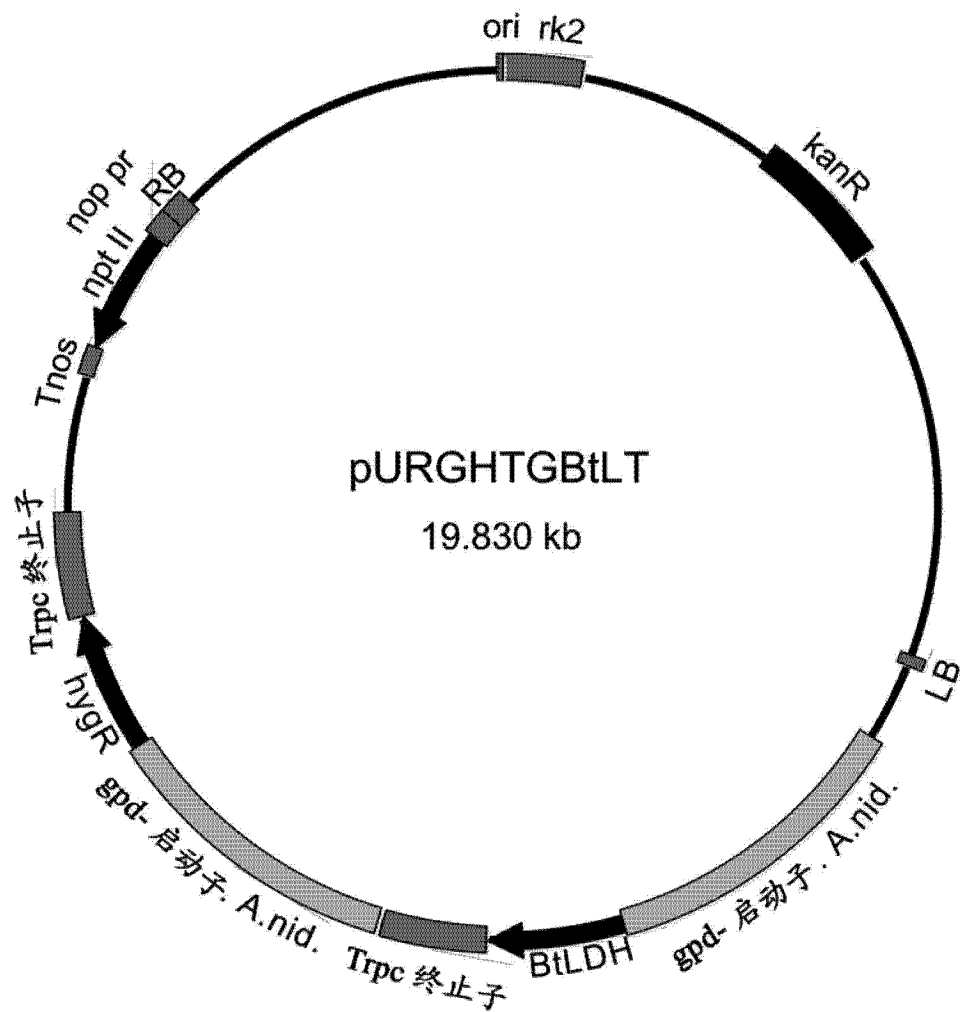


图 6

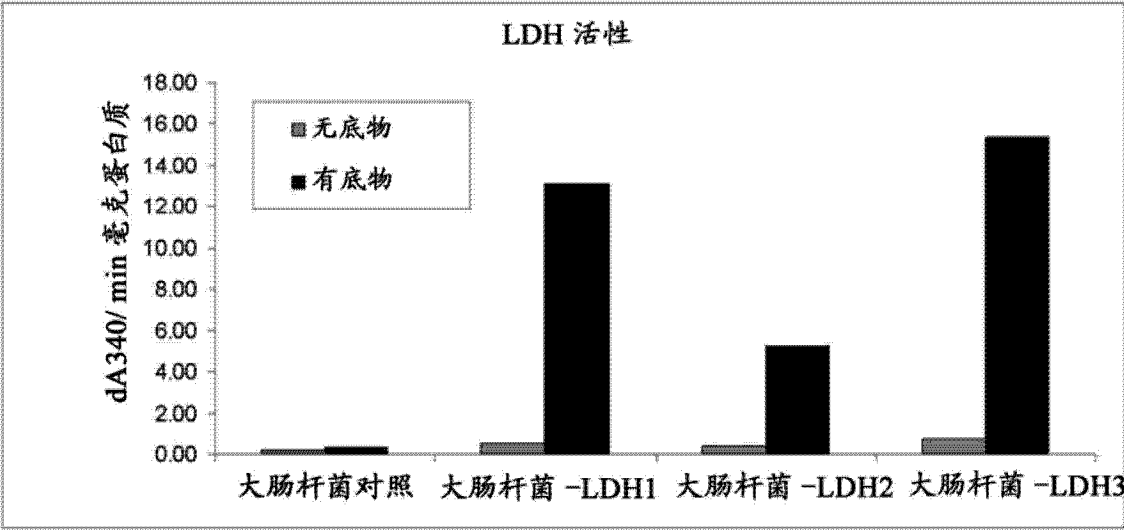


图 7

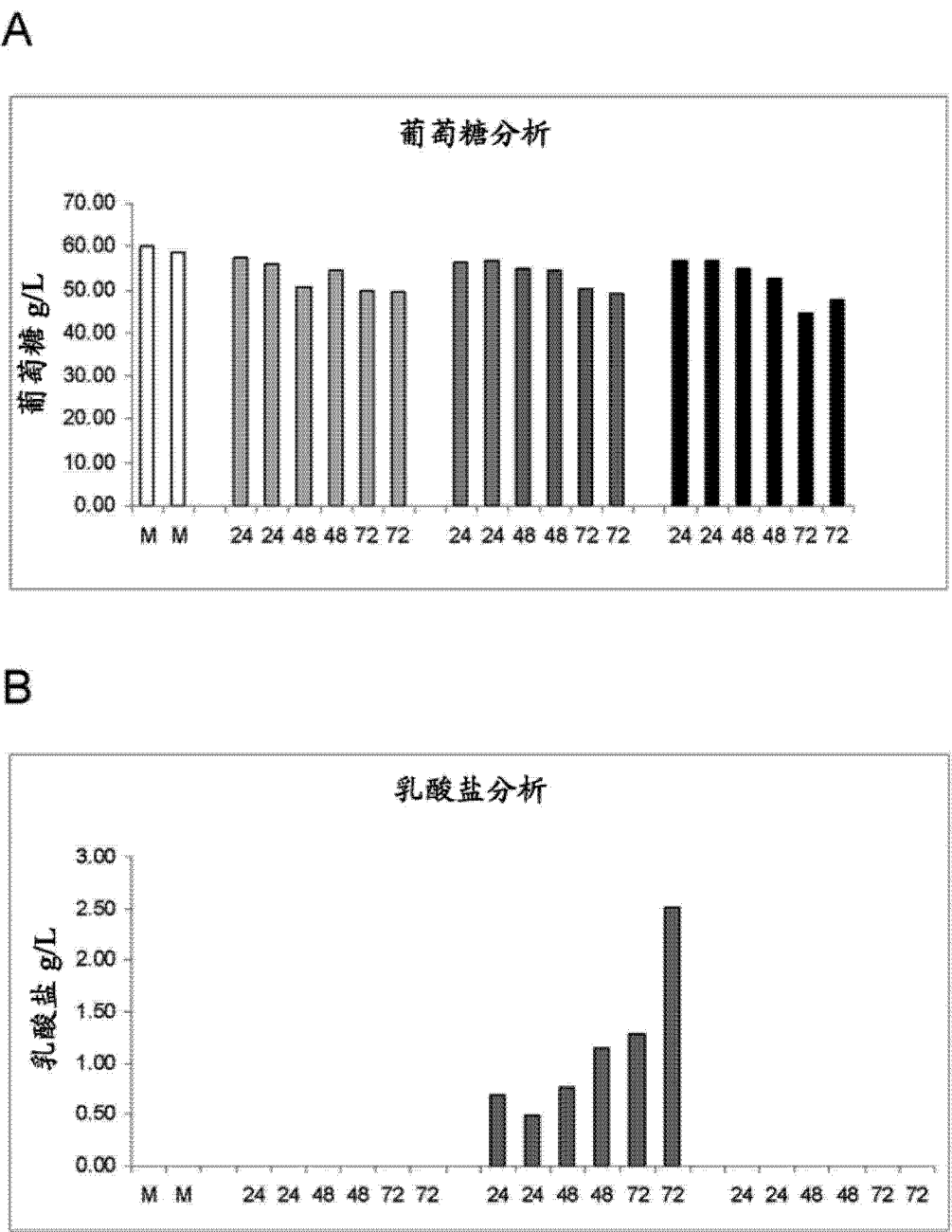


图 8

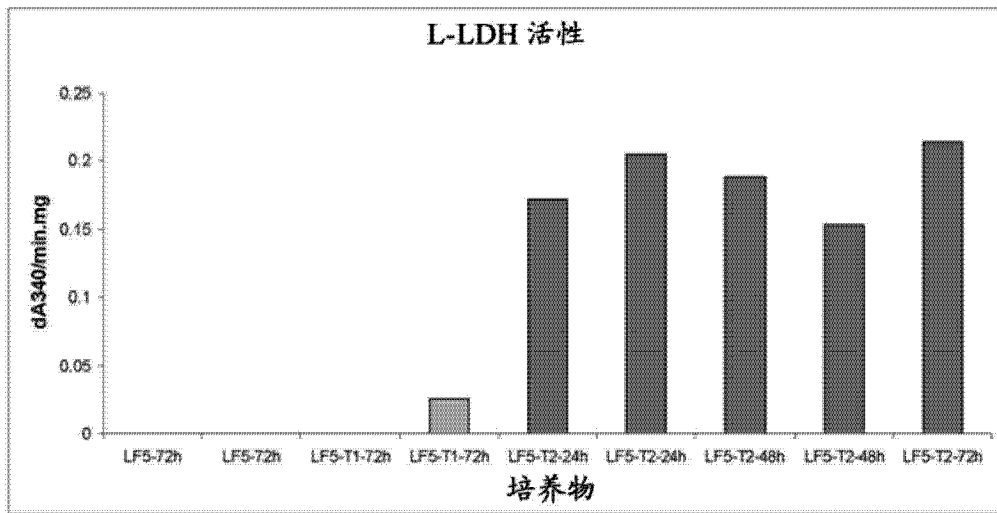


图 9

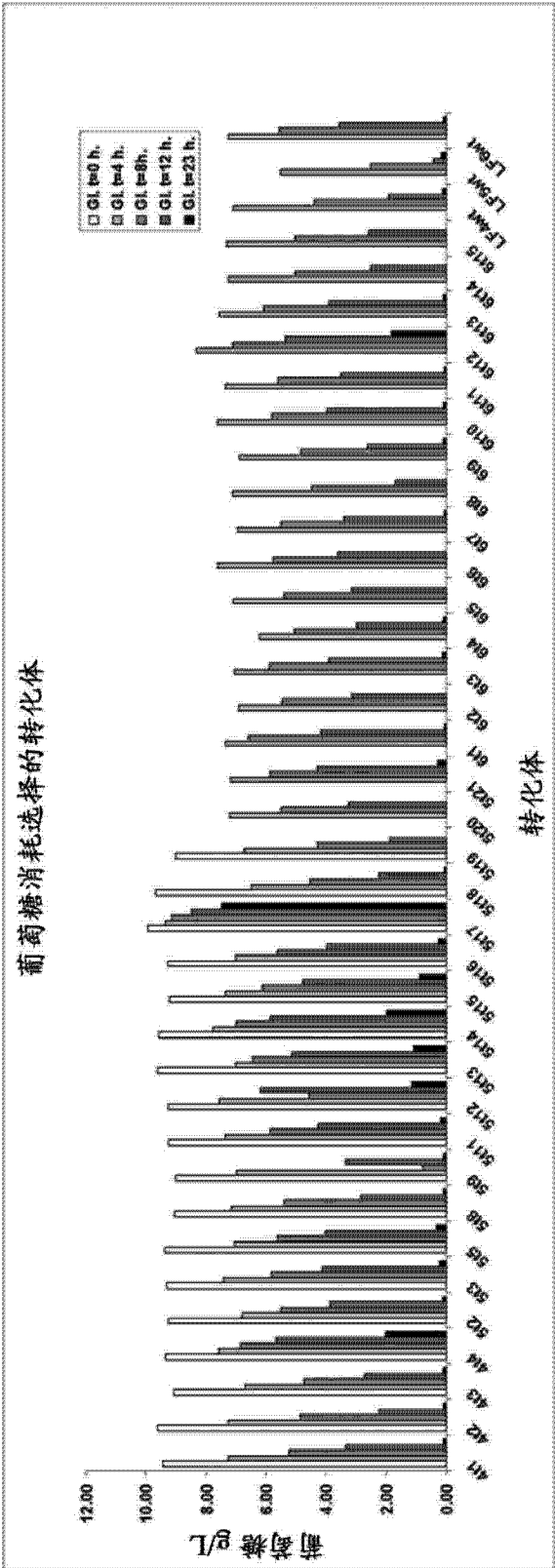


图 10

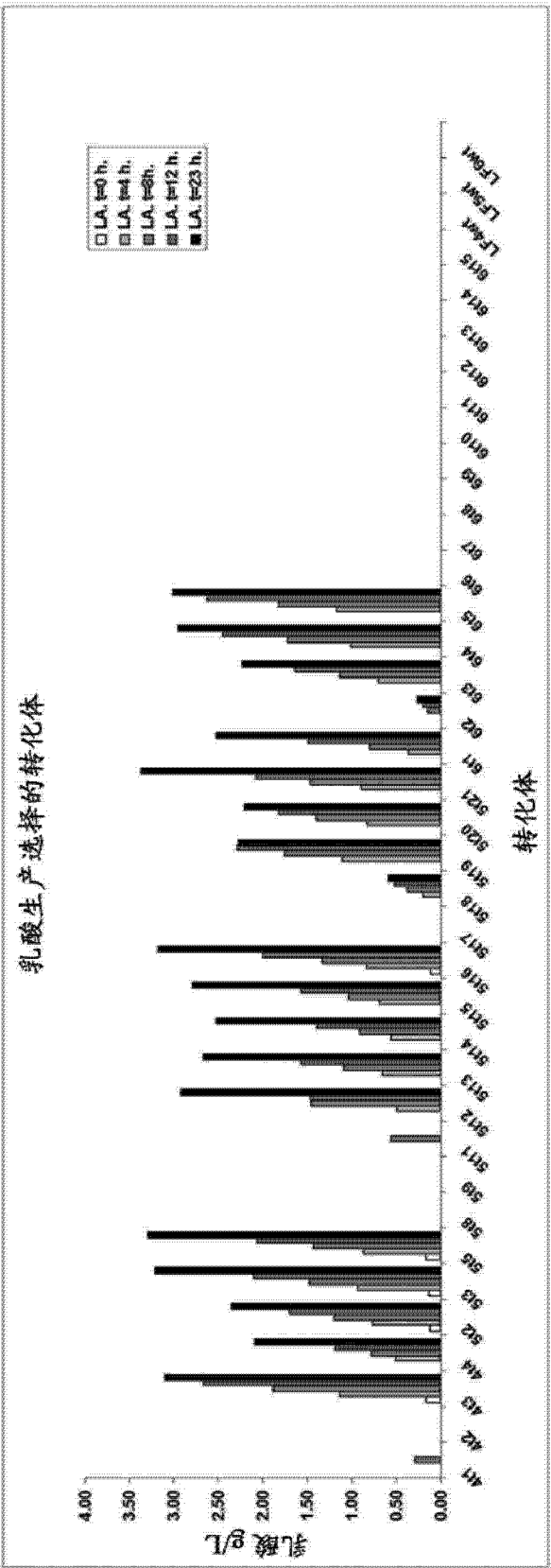


图 11

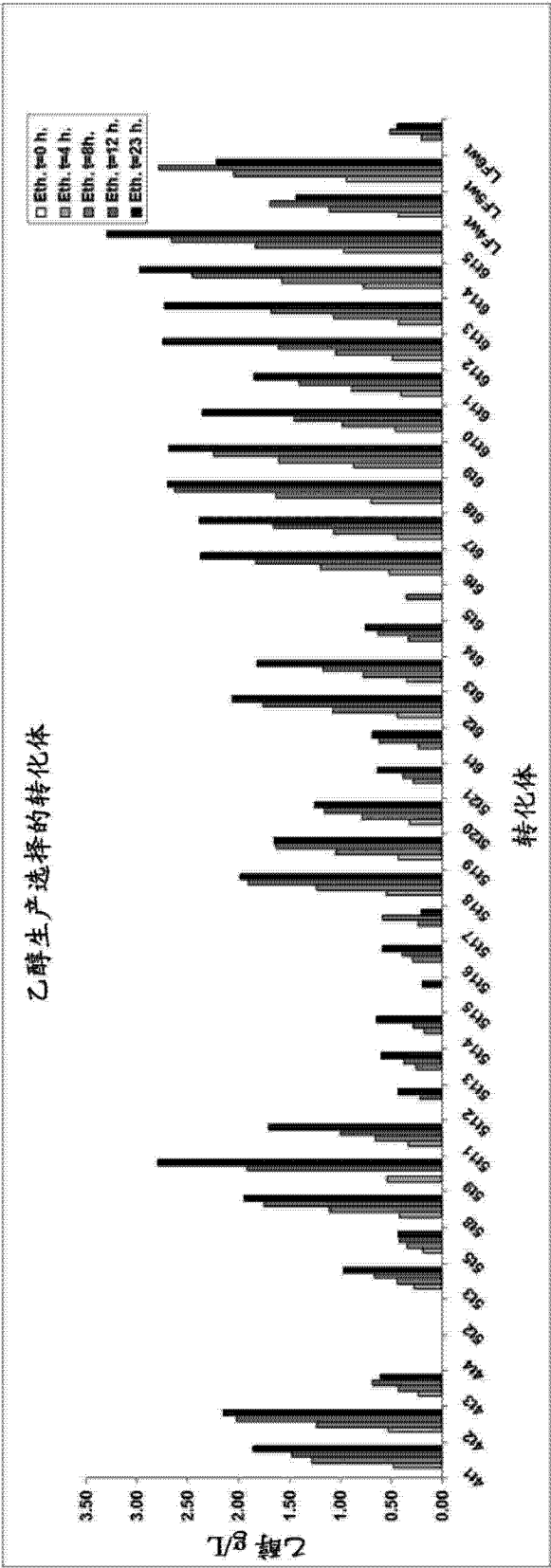


图 12

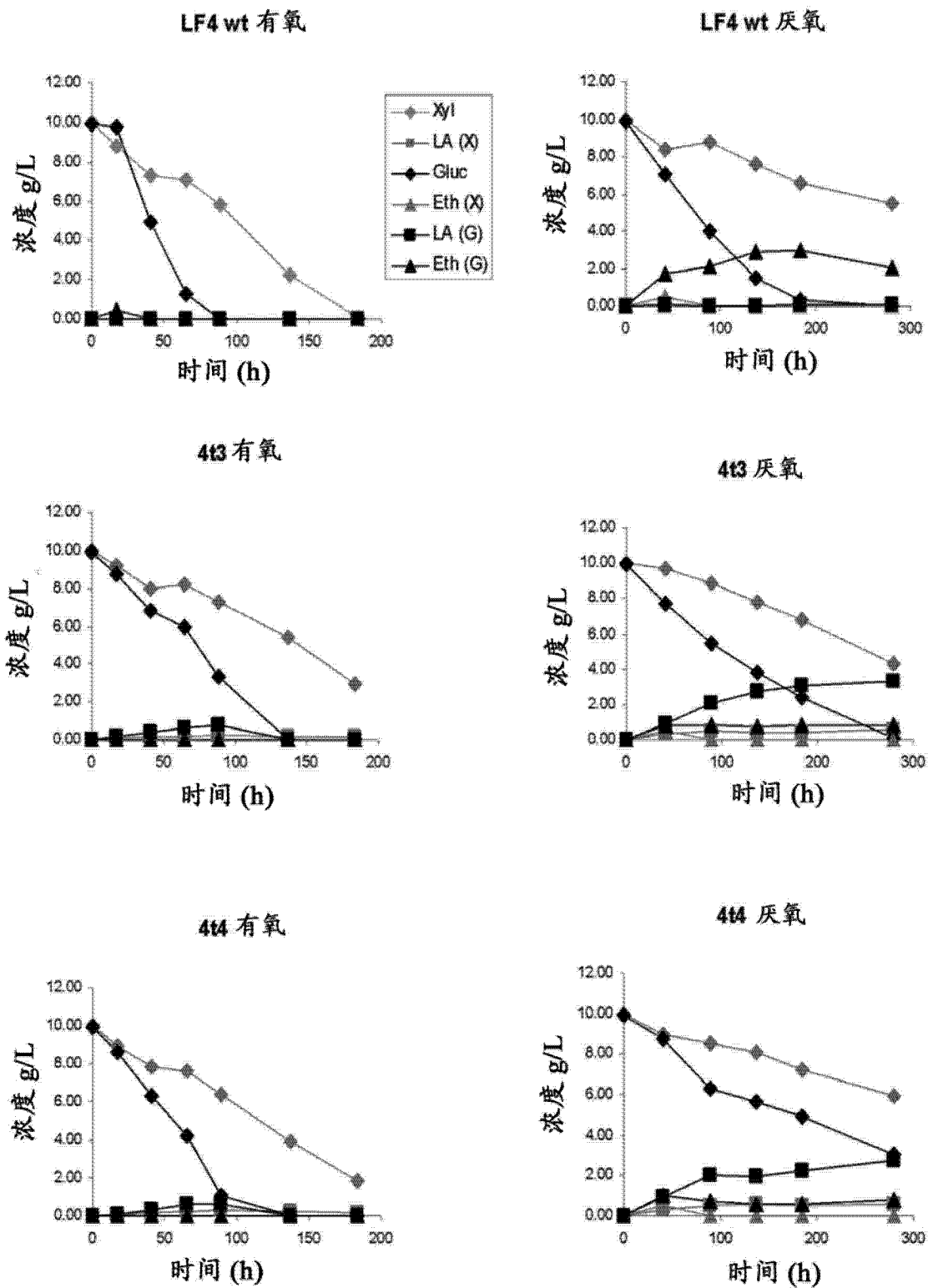


图 13

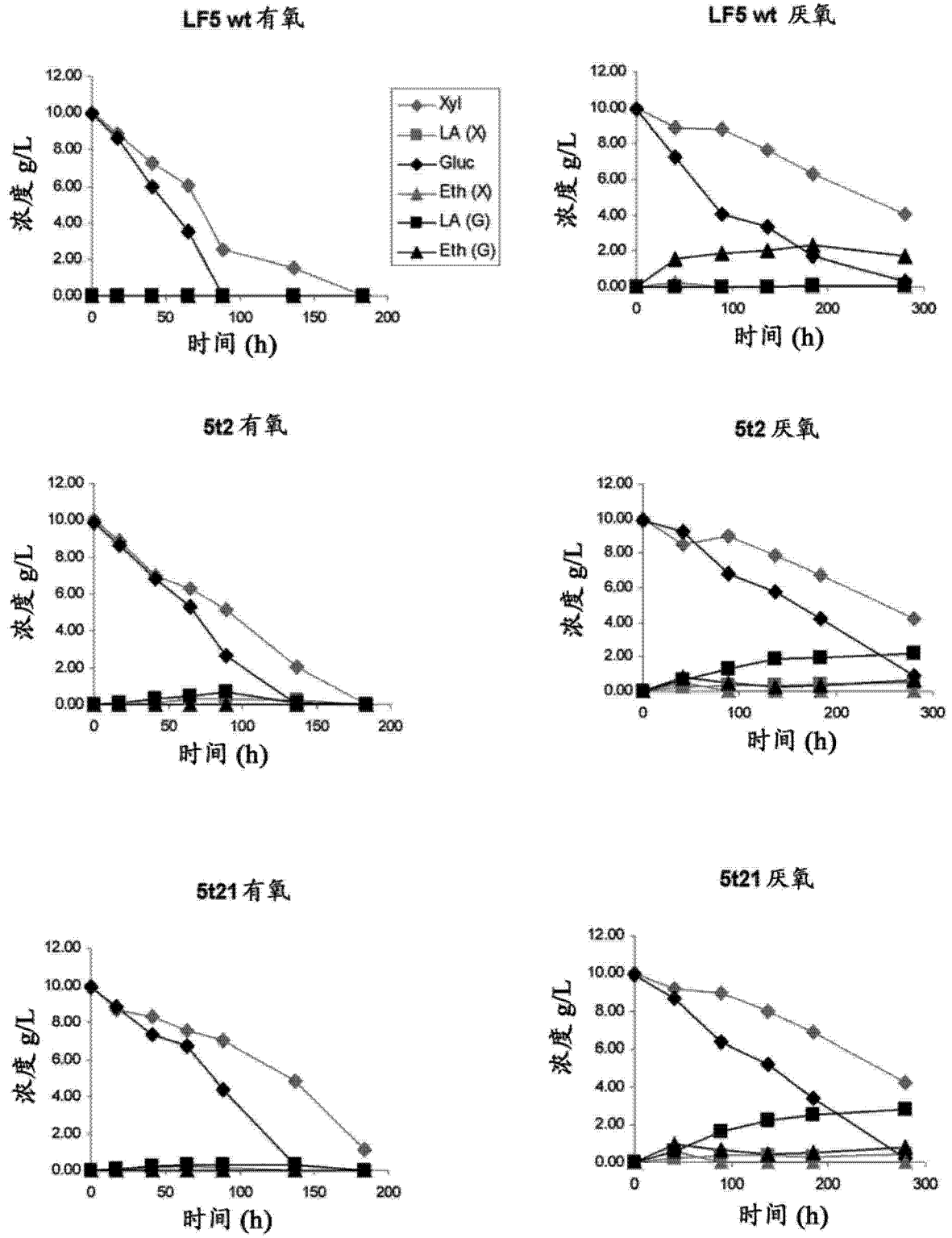


图 14

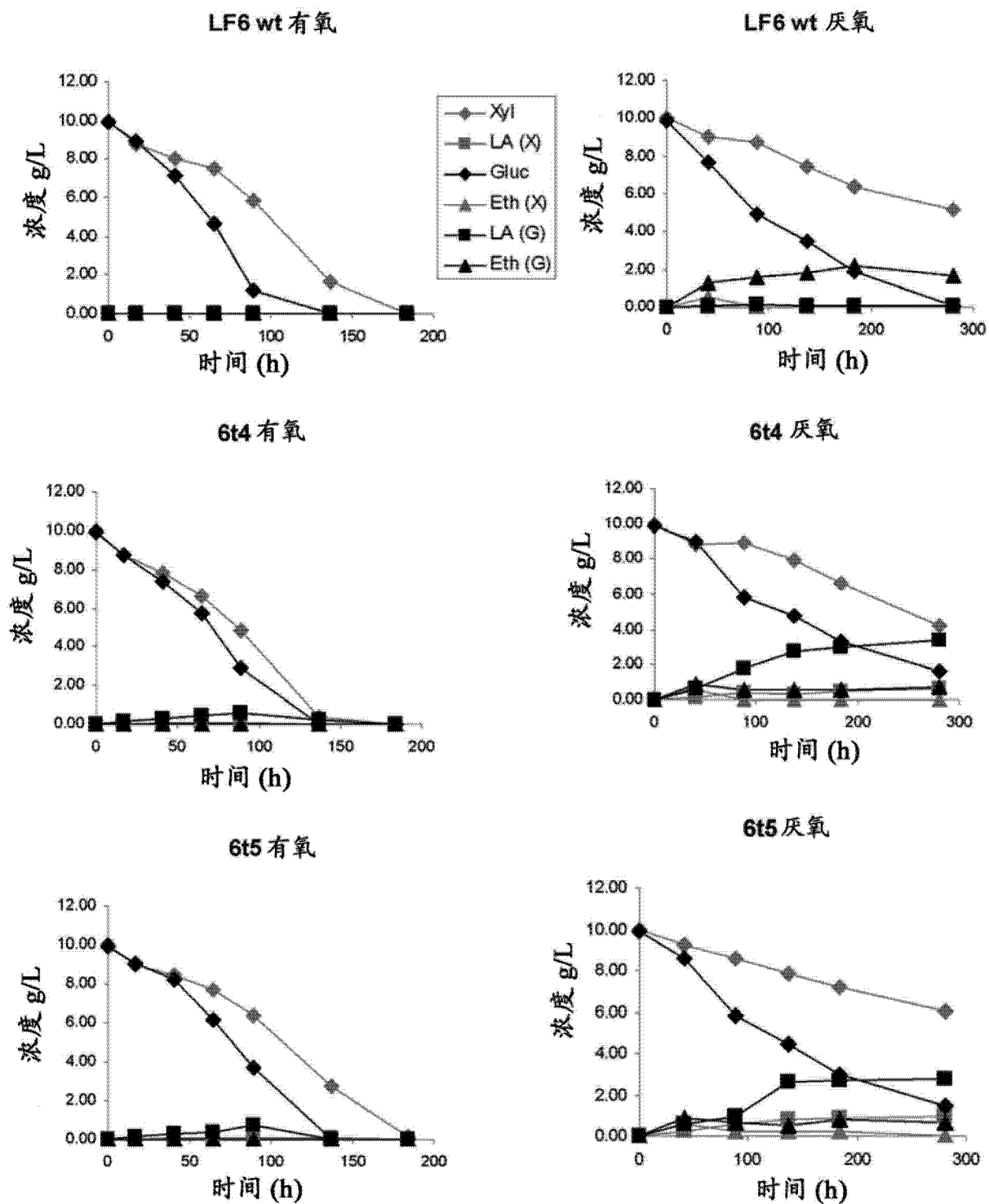


图 15

红色红曲霉 PDC1 开放阅读框 (Seq ID 3)

TGGGTGGGYAAYTGYAATGARCTGAATGCTGGTTACKCCGCCG
ATGGCTACGCTCGTATCAAGGGTATCTCTGCCCTGATCACCCT
TTCGGTGTCTGGTGAGCTCTCTGCCGCCAACGCCATCGCCGGTT
CCTACTCGGARCGGGTGCCCGTTGTCCACATTGTCTGGTGAGCC
CAGCACGGCATCCCAGAACAAACCGCCAGCTTCTGCACCACACC
CTCGGAAACGGTGACTTCGATGTCTTCGAGAAGATCTTCGCCA
AGATCTCTACTTCCGTCGTTAAGATTAGAGACCCCGCCAATGC
CGCCACCATGATCGACCACGTTCTCCGGGAATGTGTTATCCAG
AGCCGCCCCGTCTACATCGGTCTGCCCTCTGATATGGTTACCA
AGAAGGTTGAGGGAGCCCGCCTGAAGACCCCATCGACCTGTC
CCTCCCCGAGAACCCCAAGGAGAAGGAGGACTACGTCGTCAG
CGTCGTTCTCAAGTATCTGCACGCTGCCAAGAACCCTGTCATC
CTCGTCGATGCCGGTGTCAACCGCCACAATGCCCAGGCTGAGG
TGCACGAGCTGATCAAGAAGTCTGGAATCCCCACCTTCATCAC
CCCCATGGGCAAGGGCGGTGTTGACGAAACCCTCCCCAACTAC
GGCGGTGTCTACGCCGGTACCGGTTCCAACAGGGGCGTCCGCG
AGCGTGTCTGAGGAATCTGACCTCATCCTGAACATCGGACCTCT
CCAGTCCGACTTCAACACCACCGGCTTCTCCTACCGCACCAGC
CAGCTCAACACCATCGAGTTCGACCGCGACAGCGTCCAGGTCC
GCTACTCCTACTACCCCGACATCCAGCTTAAGGGAGTTCTCCA
GAACCTCATCGCCACCATGGGCGAACTCAACATCGAGCCTGGC
CCGACCCCTCCAACGCCCTCCCCGCCAACGGCGTTGACCACG
AAACTGCAGAGATCACCCACGAATGGCTCTGGCCCATGGTCGG
CAACTGGCTCCGCGAAGGTGATGTTGTCCTCACTGAAACCGGT
ACCGCCAACCTTCGGTATCTGGGAAACCCGCTTCCCCAAGAACG
TTCAGGCCATCTCCAGGTCTCTGGGGTTCCATCGGTTACTCC
GTCGGTGCCTGCTTGGGTGCTGCTCTCGCCGCTCGGGAACTTG
GCGACAACCGTGTCTACTCTTCGTCGGTGATGGTAGCTTYCA
GATGACCGCCAGGAGATCAGCACTATGATCCGTCAGGGATTG
AAGCCTATTGTCTTCGTCATCTGCAACAACGGCTACACMATCG
ARMGCTACATCCACGG

图 16

红色红曲霉 PDC2 开放阅读框 (SEQ ID 4)

CTGAACGCCGCTACGCCGCCGACGGATAYGCTCGTGTCAATG
GAATCGCTGCCTTGGTTACTACTTTTCGGTGTAGGAGAGCTGTC
AGCAGTGAACGCCATTGCGGGAGCCTACTCAGAGTATGTACCC
ATCGTTCACATTGTTGGCCAACCAAATACAAGGTCACAGAGAG
ATGGAATGCTGTTGCATCATACGTTGGGCAACGGCGACTTTGA
TGTCTTTACCAAGATGAGTGCTTCCATTTTCGTGCGCTGTTGCAA
AGTTGAACGACCCCCATGAAGCTGCAACGCTCATCGACCACGC
CATTCGGGAATGCTGGATTTCGCAGCAGACCGGTGTACATCACC
CTCCCTACAGACATCGTCACGAAGAAAGTCGAAGGTGAAAGG
CTGAAGACCCCAATTGACCTGACAATGCCAGAGAATGAAGCA
GAAAGGGAAGATTACGTGGTGGATGTTGTTTTGAAATACCTGC
AAGCCGCGAAAAACCCAGTCATTCTAGTTGACGCATGCGCAAT
CCGTCACAGGGTCCTGGACGAGGTACATGACCTTGTTAAGGCT
TCTGGCTTGCCAACCTTTGTGACCCAATGGGCAAAGGAGCAG
TGGACGAGACTCATCCAAATTATGGTGGTGTGTATGCTGGAGA
TGGGTCTAATACCGGCGTCCGTGAAGTTGTTGAAGCTTCCGAC
CTTATTCTGAGCATTGGCGCCATTAAATCCGATTTCAATACTGC
CGGCTTCACATAACCGCATCGGCCAACTTAACACGATCGACTTC
CATAGTACCTTCGTGCGAGTGAGGTATTTCGGAGTACCCGAACA
CAAACATGAAGGGTGTTCTAAGGAAGATCATCCAGAAAATGG
GCCCCCTCAGCAAGACGCCTATTCCAAAGACTATCAACAAGGT
TCCAGAACATATCAAAGCTTCTGGTGACACGCGGATTACTCAT
GCTTGGTTGTGGCCGACAGTCGGACAGTGGCTGCAGCCGGAGG
ATGTTGTCGTCCTGAGACTGGAAGTGCAAACTTTGGAATCTG
GGAAACCAGGTTCCCACACGGTGTACGGCTATAAGCCAAGTC
CTCTGGGGAAGCATTGGGTACACGGTTGGAGCATGTCAAGGCG
CCGCACTAGCTGCAAAGGAGATAGGCAACCGTCGCACTGTACT
TTTTGTTGGCGATGGCAGTTTCCAGCTTACCGCGCAGGAAGTG
AGCACCATGCTCAGAAATAAGCTGAACCCGATCATTTTTGTGA
TCTGTAACGAAGGGTAYACRATCGAGCGCTACATCCATGGC

图 17

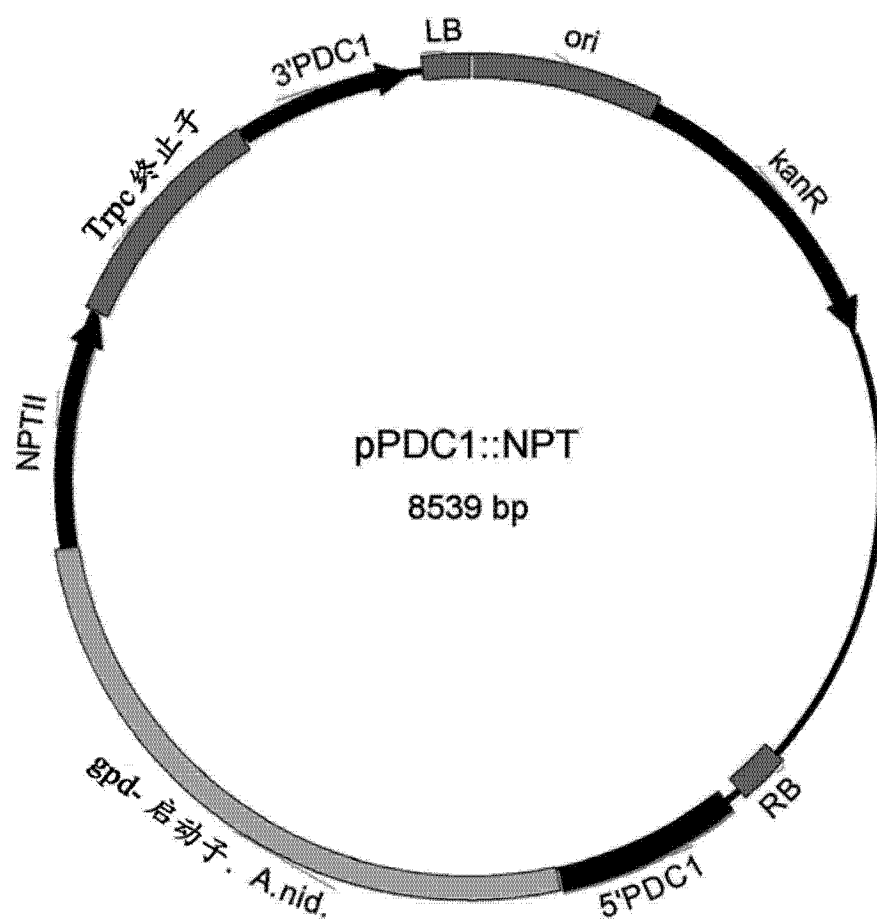


图 18

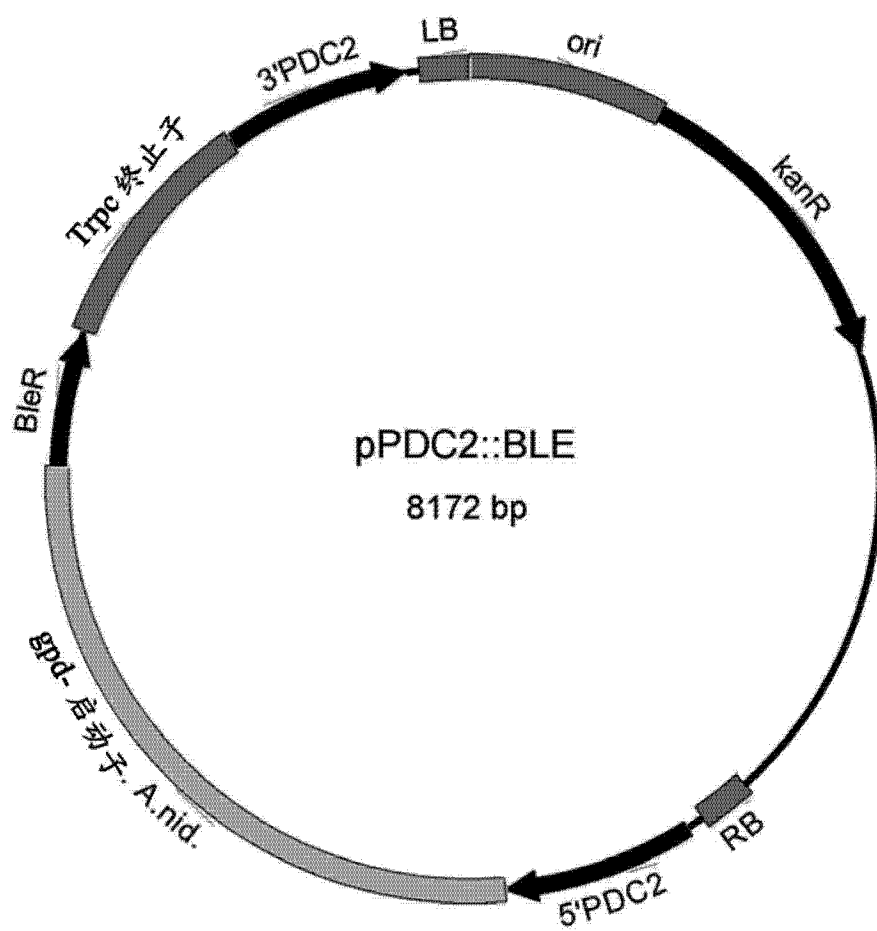


图 20

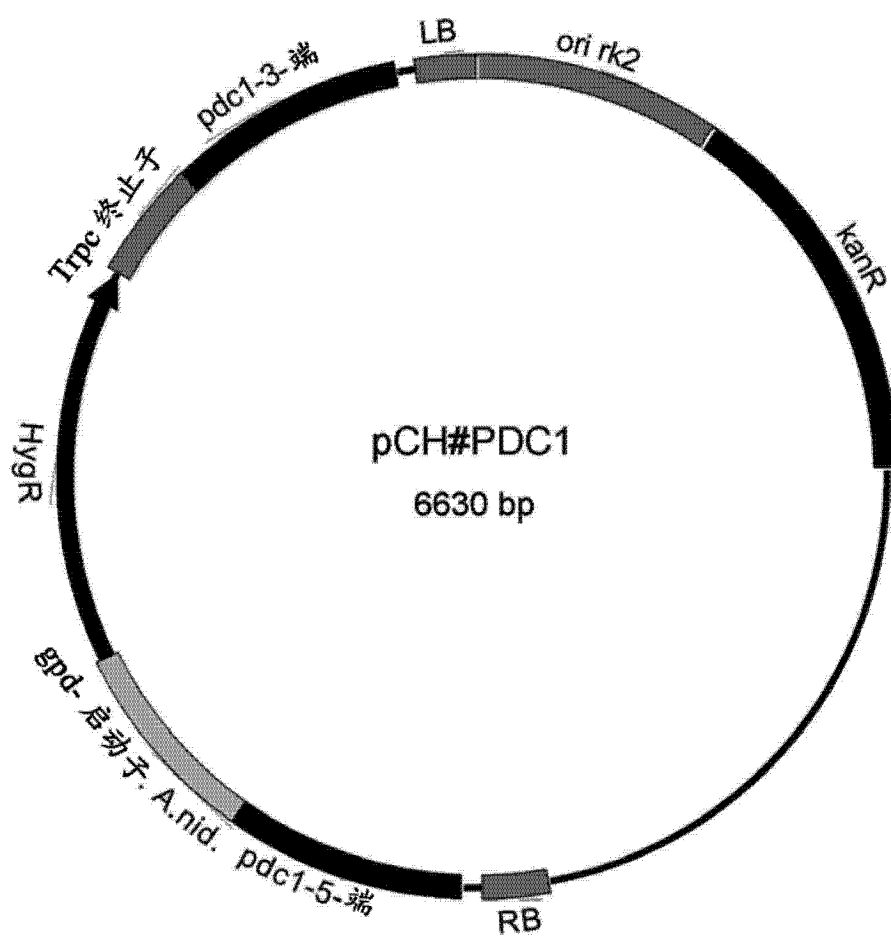


图 21

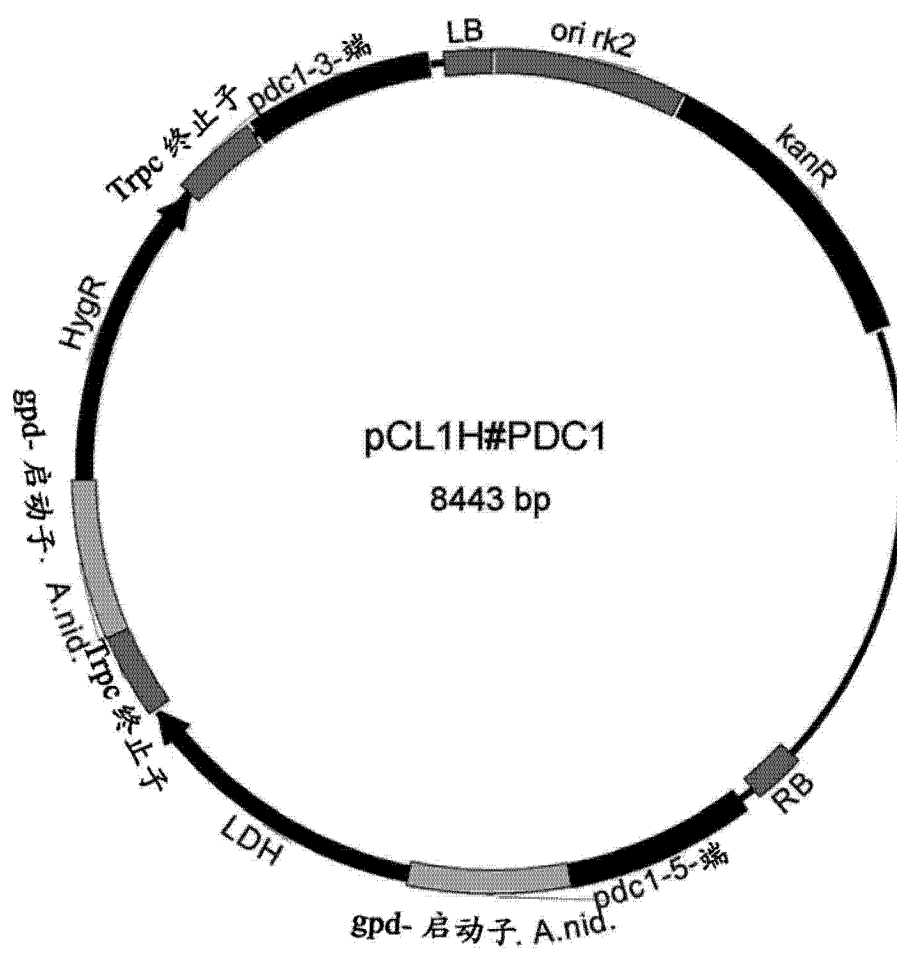


图 22

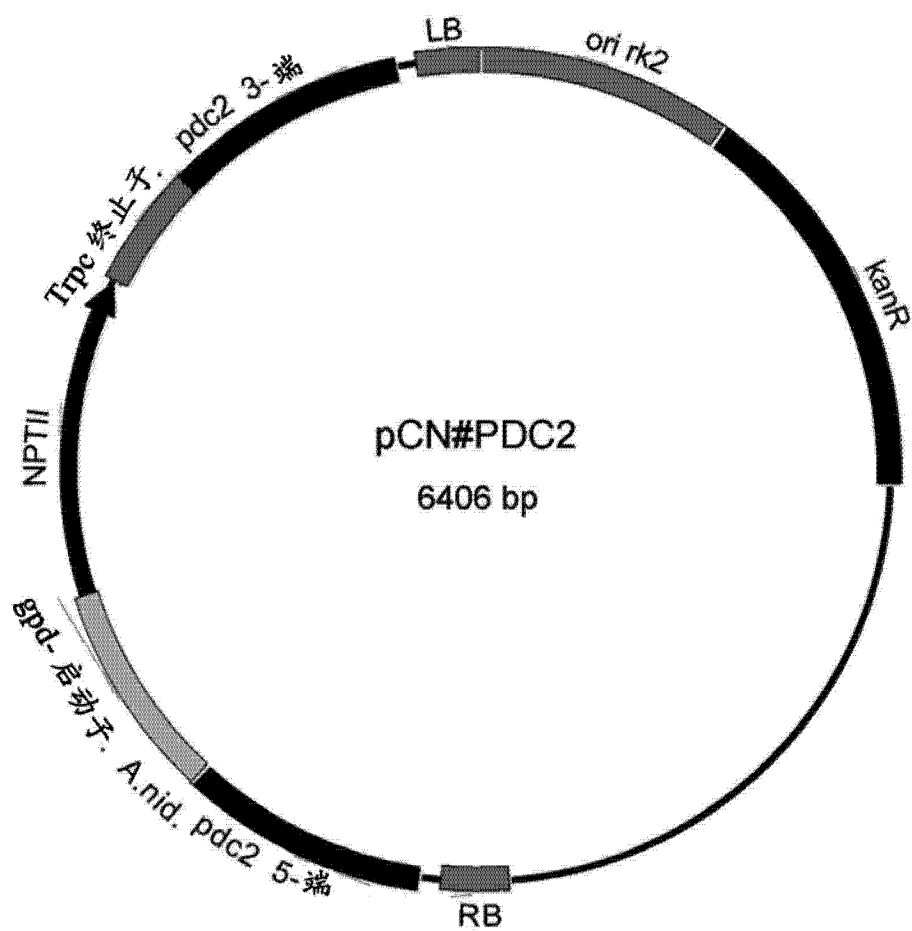


图 23

编码 PDC4 的基因 SEQ ID No: 5

ATGACCACTGTCGGAAGCTACCTCGCAGAAAGGCTCTCCCAAATTGGCATCGAGCGC
CACTTCGTTCGTCCCAGGCGACTACAACCTCATCCTCCTCGACAAACTCCAACAACAC
CCCAAACCTCGACGAAATCAACTGCACAAATGAACTAAACTGCTCCATGGCCGCGAGAA
GGCTACGCCCCGCGCAAAAGGCGTAGCCGCCTGCGTCGTGACGTTTCAGCGTCGGCGCA
TTCTCCGCATTCAACGGCATCGGCAGCGCATACGGTGAGAATCTCCCTGTCATCCTC
ATCTCCGGTTCCCCTAATAACCAACGATCTTGGCTCGTCGCATTTGCTGCATCATACG
ATCGGTACGCATAATTTTGACTACCAGCTTGAGATGGCGAAAAATATCACCTGCTGT
GCTGTTGCGATTTCGTTCGTGCCTCGGATGCGCCGCGGTTGATCGACGAGGCTATTGCG
ACCGCACTTCGGGCGCGGAAACCAGCGTATATTGAGATTCTTACGAACCTCTCGGGC
CAGCCGTGTTCCCTGCCCCGACCGGCGTCGGGGATTCTCAAGCCGGATACGAGTGAT
ATTGATACTCTTGCGGAAGCGCTGAAGGCAGCCAACGACTTCCTCTTACCCGGAAC
AAGGTGTCCTTACTGGTTGGCCCTAAGGTTTCGCGCAGCAGGCGCTGAACATGCCGTG
ATCCATCTTGCTCAAGCCCTGGGATGCGCGGTGGCCGTGCTACCCAGTGCCAAATCG
TTCTTCCCGGAGACTCATCCGCAGTTCGTGGGTGTATACTGGGGCGAAGTGAGCACG
AAGGGCGCGAATGCTATCGTCGACTGGTCCGATACCCTTATTTGCGTGGGGACGGTT
TACACCGACTACAGCACCGTTGGATGGACGGGGCTACCCGAAGCAGCCAGTCTGACC
ATTGACCTGGACCATGTCAGTTTCCCTGGATCCGATTACAACCAGATCCATATGCTG
GAGTTCGTGGCAGGACTGGCGAAGCTGGTGAAGAAGAACCCCTGACACTCGTCGAA
TATAACCGTCTGCAACCAGACCCTCTCGTTTACACGCCATCTCCGCCGGATCAACGA
CTGAGCCGGCGAGAAATGCAGTACCAGATCAGCCAGTTCTTGACGCGCAACACGACG
GTCGTTGTGGACACGGGCGACTCGTGGTTCAACGGGATGCAGATGGACCTTCCGGAC
GGAGTGAGATTTGAGGTTGAGATGCAATGGGGACACATCGGATGGTCCGTTCCAGCA
GCACTGGGTCTGGCCGCCGCAAACCCCGAGCGACAGATAGTCGTCATGGTAGGCGAT
GGGTGCTTCCAGATGACGGGCCACGAGGTGTCAAATATGACTCGATTAGGGCTACCG
ATTATCATCTTCCTGATCAACAATGACGGGTACACAATCGAAGTCGAGATCCACGAT
GGCATCTACAACAACATCAAGAACTGGGATTACGGCGCGTTTCGTGAGTCGTTCAATGCCAAGGAG
GGACATGGGAAGGGGTATCGTGTTACCACGGCGGGGGAAATGCACAGGGCCATTGAGGCGGCGAAGAAG
AATAAACAGGGGCCAACACTAATCGAGTGTGATATTGATCGCGATGATTGCAGTAAGGAGTTGATCAGT
TGGGGGCATTATGTGGCTGCTGCGAATGGCAAGCCTCCTGTTGCCAGGTGA

图 24

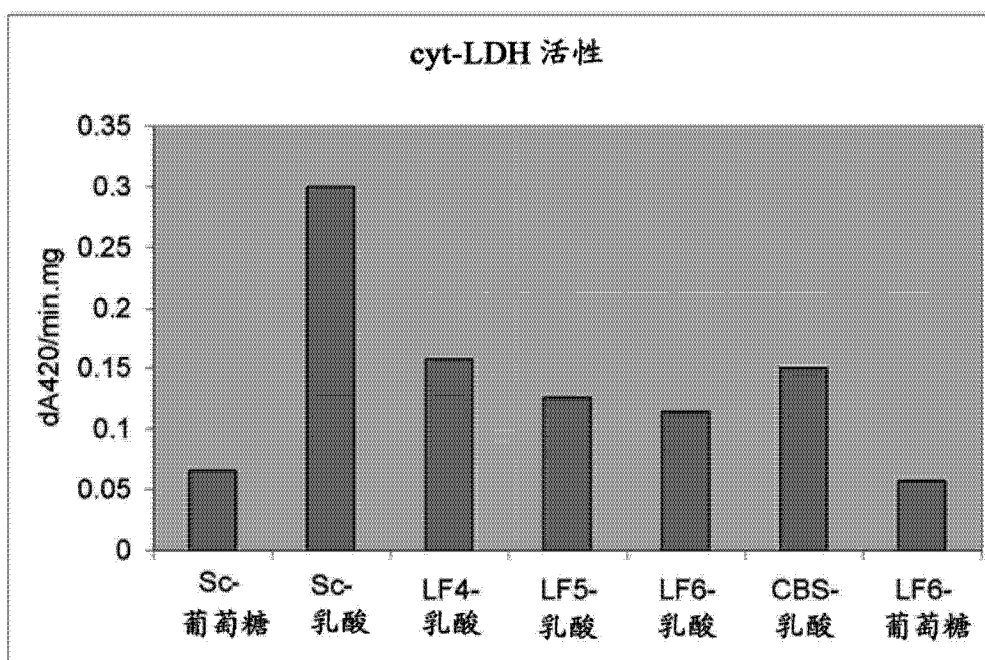


图 25

SEQ ID 2: 红色红曲霉 CYB2 开放阅读框

AAGTATGCGGGGCAGGATGCCACAAAGGCCTATTCTGAAGTTC
ACACTCCGAGCCTTATCAAATGGAATTTATCCCCAGACAAGCT
CAAGGGCACTCTCGGCCAATCCACTATTGACGATGAATGGATG
AAACCACCGCCAAATGAGAGCGACAAAGTTGTTTTAGAGAAC
GAGAAACCGCCGCTGCATATGCTGATAAACTCGCACGATTTTCG
AAGTCGTAGCTTCCAAGACTGCAAGTAAGAAGACCTGGGCCTT
CTATTCCAGCGCTGCAACGGACCTCATCACCCGTGATGCCAAT
AAGTCATGCTTTGACCGGATATGGTTCCGACCCCGGGTACTGA
GGAATGTGCGTACCGTCAAACGCGCACGAAGATCCTCGGGGT
TGACAGCAGTCTCCCACTTTTCGTGAGTCCAGCAGCTATGGCT
AAGCTCATTACCCAGATGGTGAGTGTGCCATAGCAAGGGCAT
GTGCAAATAAGGGTATCATTCAAGGTGTACggtcattgcagattgaacactt
cccggtctagttgcaaccttcttaacatcaatgtcgtagGTGTCGAATAACTCATCAT
TCCCAATCGAAGAGCTCCGGGAGGCGGCACCGTCTGGAAATTT
TATTTTCCAGTTATATGTGAATCGGGATCGAGAGAAATCTGCG
GAACTACTCCGCAGGTGCTCAGCTAACCCGAACATCAAGGCCA
TCTTCGTGACCGTTGACGCAGCCTGGCCCGGTAAACGTGAGGC
AGACGAACGAGTCAAAGCGGATGAGAGCCTGACAGTCCCCAT
GTCCCCATCGACAACACGCAACGACAAAAAGGGGGGCGGGCT
CGGGCGCGTTATGGCTGGGTTTCATCGACCCGGGGGCTCACCTGG
GAAGATCTGGCCTGGGTGCGACAACATAACCATCTCCCCGTTT
GTCTGAAGGGAATTATGTCCGCAGACGATGCCATTCTAGCCAT
GAAATTGGGACTAGATGGCATCCTGCTCTGCAACCACGGCGGC
CG

图 26

SEQ ID No: 6 编码细胞色素依赖性 L-LDH 的基因 Mona00569

ATGTCTCAAC	CTAAGCTTAC	CGGCGCTGAT	ATCGCCAAAC
ACAATTCCAA	GGACTCGTGC	TGGGTCATTG	TCCACGGGAA
AGCATACGAT	GTCACGGACT	TCCTGCCAGG	TATTGATTGA
CCCCCCTGTC	CGGGAATTCC	GAGATGCTGC	CTGCGTTCAT
TGAATACTGA	TTTGCATGAA	TTTGATCAAT	TATAGAACAT
CCCGGTGGCC	AGAAGATTAT	CCTGAAGTAT	GCCGGCAGAG
ATGCCACGGA	AGAATTCGAG	CCCATCCACC	CCCCGGATAC
CCTGGACAAG	TACCTCGACA	AGTCAAAGCA	CTTGGGCGAG
GTCGACATGG	CCACTGTCGC	ACACGACGAG	AAGGCTGTCG
ATCCCGAGGA	GACGGCTCGC	CAGGAAAGAA	TCAAGCTCAT
GCCATCGTTG	CAATCCTGCT	ACAATCTGAT	GGACTTTGAA
TCCGTGGCGC	AGCAGGTCAT	GAAGAAGACT	GCGTGGGCAT
ACTACTCAAG	TGGTGCTGAT	GATGAAATCG	TATGACCATA
TCTGGATTTC	TCGTTCCCTT	TGCAGCACAT	ACTGACTTGC
GTCTGTTTAC	AGACCCTGCG	AGAAAACCAC	ACTGCCTTCC
ATAAGATCTG	GTTCCGGCCG	CGAGTCCTAG	TCGACGTGGA
ACATGTCGAC	TACTCTACGA	CCATGCTGGG	AACCAAGGTC
TCCGCTCCCT	TCTATGTGAC	GGCCACAGCC	CTGGGCAAAC
TGGGACACCC	CGAGGGTGAG	GTCGTTCTCA	CCCGTTCCTC
CTACCGTCAC	AACGTCATCC	AGATGATTCC	CACGCTCGCC
TCGTGCTCCT	TTGACGAGAT	TATTGACGCC	CGCCAAGGCG
ATCAGGTCCA	GTGGCTGCAG	CTCTACGTCA	ACAAGAACCG
CGATATCACC	AAGCGCATTG	TGCAACATGC	CGAAGCCCGC

图 27

GGCTGCAAGG	GCCTCTTCAT	CACCGTCGAC	GCCCCGCAAT
TAGGTCGTCG	AGAGAAAGAC	ATGCGCTCCA	AGTTCTCCGA
CGAGGGCTCC	AACGTCCAGA	AAGAAGAGGG	TGAGGAGAAC
GTCGACCGCT	CTCAGGGTGC	CGCCCGTGCT	ATCTCCTCGT
TCATCGACCC	CGCCCTCTCC	TGGAAGGATA	TCCCCTGGTT
CCAATCCATC	ACGAAGATGC	CCATCGTCCT	GAAGGGTGTG
CAGTGCCTCG	AAGACGTTTT	CCGTGCTATC	GAAGCCGGAG
TCCAGGGTGT	TGTGCTGTCC	AATCACGGTG	GCCGTCAGCT
CGAGTTCGCA	CCATCGGCTG	TCGAGCTTCT	GGCCGAGGTT
ATGCCTGCGC	TGCGCCAGCG	CGGCTTGGAG	AACAGCATCG
AGGTGTACAT	CGACGGTGCC	ATCCGCAGAG	GCACTGATAT
CGTCAAGGCG	CTCTGCCTTG	GCGCCCAGGG	CGTGGGGATT
GGTCGTCCTT	TCCTGTACGC	CATGTCGGCG	TACGGCCAGG
CCGGTGTGCA	CAAGGCCATG	CAGCTTCTCA	AGGATGAGAT
GGAGATGAAC	ATGAGACTCA	TCGGAGCCAC	TAAGGTCTCC
GAGCTGAGCC	CCAGCCTCGT	CGATACCCGC	GGTCTTCTTG
GTGGTCACCA	CGCTCCTGTT	CCGTCCGACA	CGCTGGGCAT
GAAGGCGTAC	GATGCGCTCC	AGGCTCCGCG	GTTCAACGAA
AAGTCGAAGT	TGTAG		

图 27(续)

红色红曲霉 LF6 丙酮酸羧化酶基因 (SEQ ID NO:7)

ATGGCTGCCGTCGCCAATGGCTCCGCCGCCAACGGCGCCCTTCACCA CGA
CGAGCACGATGACCACCATGCACACCACCGCGACTCGGTCCACCGCCGTT
TGCGGGGCCAATTCCACCATCATGCACTTTCAAAAGATCCTGGTCGCCAATC
GTGGTGAAATCCCCATCCGTATCTTCCGTACCGCCCACGAGCTGTCTCTGC
AGACCGTGGCCATTTTCTCCTACGAGGACCGTCTGTCCATGCACCGTCAGA
AGGCCGACGAGGCCTACCAGATTGGCCATCGGGGCCAATACTCCGGTC
GGCGCCTATCTCGCCATTGACGAGATCATCAAGATTGCCCTGGAACACGA
CGTTCACCTGATCCACCCTGGCTATGGCTTTCTGTCCGAGAATGCCGAATT
CGCCCGCAAGGTCGAGGAGGCCGGCATGATCTTCATTGGTCCCACCCCGG
AGACCATCGAGAGCCTTGGCGACAAGGTTTCGGCTCGAGAACTAGCCCTT
CGTGCTGACGTGCCCCGTCGTTCTGGCACTGACGGTCCCGTGGAACGCTA
CGAGGAGGTCAAGGCCCTTACCGACAAGTATGGCTTCCCGTCATTATCA
AGGCCGCCCTTCGGTGGTGGCGGTCTGTTGCGTGTGTGCGCGGCGAA
GCCGAGCTGCGTGACTCACTCGAGCGTGCCACTTCCGAGGCCAAGTCGGC
CTTCGGCAACGGCACTGTCTTTGTGCGAGCGCTTCCTCGACAAGCCCAAGC
ACATCGAGGTTCAAGCTCCTGGGTGACAACCACGGCAACATCATCCACCTG
TTCGAGCGTGACTGCTCCGTCCAGCGTCGTCACCAGAAGGTCGTCGAGAT
TGCCCCCGCAAGGAGCTGCCCTCTGACGTCCGCGACCGCATCTTGGCCG
ATGCCGTGAAGCTGGCCAAGACCGCCCGTTACCGCAACGCCGGTACCGCG
GAGTTCCTGGTTGACCAGCAGAACCGCCACTACTTTATTGAGATCAACCC
CGTATCCAGGTCGAGCACACCATCACCGAGGAGATCACCGGCATCGATAT
CGTTGCCGCGCAGATTCAGATCGCCGCTGGTGCCACCCTCGAGCAGCTGG
GCCTTACTCAGGAGCGCATCTCCGCCCGTGGCTTCGCCATCCAGTGCCGTA
TCACCACAGAAGACCCCGCAAGGGCTTCTCTCCAGACACCGGCCGCATT
GAAGTCTACCGTTCCTCCGGTGGCAATGGCGTGCGTCTGGACGGTGGTAA
TGGCTTCGCGGGTGCTACCATCACCCCTCACTATGACTCCATGTTGGTCAA
GTGTACTTGCCGTGGTTCCACATACGAGATCGCGCGCCGCAAGATGCTGC
GTGCCCTGGTCGAATTCCGCATCCGCGGTGTCAAGACCAACATTCCCTTCC
TGGCCTCGCTGCTGAGTCACCCGACTTTCATCGACGGCAACTGCTGGACC
ACCTTCATCGACGACACCCCGAACTGTTCCGCCCTCGTGGGCAGCCAGAA
TCGTGCCCAGAAATTGCTGGCCTACCTTGGTGACGTGCTGTCAACGGAA
GCAGCATCAAGGGCCAAGTTGGCGAGCCCAAGTTCAAGGGCGAAATCATC
CGTCCCTACGTTGCTGGATGACGCTGGCAAGCCCTCGATGTCTCCGAACCC
TGCACCAAGGGCTGGAAGGAGATCATCGATAAAGAAGGCCCCGATGCCTT
TGCAAAGGCCGTCCGTGCCTACAAGGGTTGCCTTATCATGGATAACACCT

图 28

GGCGTGATGCCCACCAGTCCCTGCTGGCGACCCGTGTCCGTACGATCGAC
ATGCTGAACATTGCTCACGAGACCAGCCACGCCCTCTCCAACGCCTACAG
TCTGGAATGCTGGGGAGGTGCCACCTTCGATGTGGCCATGCGCTTCCTTTA
CGAGGACCCATGGGACCGTCTGCGCAAGTTCCGCAAGGCTGTTCCCAACA
TCCCCTTCCAGATGCTGCTCCGTGGCGCCAACGGTGTGCGATACTCTTCCC
TCCCCGACAATGCTATTTACCACTTCTGCAAGCAGGCTAAGAAGTACGGA
GTCGACATCTTCCGTGTCTTTGACGCTCTAAATGATATAAATCAGCTCGAG
GTCGGAATCAAGGCCGTCAAGGCTGCGGGTGGTGTGTCGAGGCCACCGT
CTGCTACAGCGGTGACATGTTGAACCCCAAGAAGAAGTACAACCTGCAGT
ACTACCTTGATCTGGTTGACAAGATTGTCAAGCTCGGCACCCATGTTCTGG
GTATCAAGGATATGGCTGGTGTCTCAAGCCCCAGGCAGCCCGCATCCTC
ATCGGCTCCATCCGCTCTCGGTACCCCGACCTGCCCATTCACGTCCACACC
CACGATTCCGCGGGTACTGGTGTGCGGTCCATGGTCGCTTGCGCTCAGGCT
GGTGCCGACGCCGTTGATGCGGCCACCGATAGCTTGTCCGGCATGACTTC
CCAGCCCAGCATCGGCGCCATCCTGGCCTCGCTGGAGGGCACCAGCATG
ATCCTAAACTCAACCTCTCCCACGTGAGAGCCCTCGACAGCTACTGGGCC
CAGTTGCGGTTGTTGTACTCGCCTTTCGAGGCCGGACTGACTGGCCCCGAT
CCCGAGGTCTACGAGCATGAGATCCCCGGCGGTCAATTGACCAACCTGAT
CTTCCAGGCCAGCCAGCTCGGGTTGGGTGAGCAGTGGGCCGAGACCAAGA
AGGCGTACGAACTGGCCAACGATCTGTTGGGTGACATCGTCAAGGTCACC
CCAACCTCCAAGGTCGTGGGTGACTTGGCTCAGTTCATGGTCTCCAACAAA
CTCTCGCCTCAGGATGTCATTGACCGTGCGGGTGAAGTCGATTTCCCCGGC
TCCGTTCTGGAGTTCCTTGAGGGTCTTATGGGTGAGCCGTACGGTGGATTTC
CCAGAGCCACTGCGCTCCAGGGCCCTGCGGAACCGCCGCAAGCTTGACAA
GCGTCCTGGTCTCTTCCTGGAGCCGCTCGACCTGGCCAAGATCAAGAACG
ATATCCGCGAGAAGTGGGGTTCGCCACCGAGTGCGATGTTGCTAGCTAC
GCCATGTACCCCAAGGTCTTTGAGGACTACAAGAAATTCGTACAGAAATA
CGGTGATCTCTCCGTGTTGCCCACCCAGTACTTCCTGTCCAGGCCGGAGAT
CGGCGAGGAATTCCACGTGGAAGTCGAGAAGGGTAAGGTCCTGATCCTGA
AGTTACTGGCGATCGGCCCCCTCTCGGAACAGAAGGGCCAGCGTGAGGTC
TTCTACGAGGTCAACGGTGAAGTGCGTCAGGTCACCATTGACGACAAGAA
CGCTTCTGTTGAGAATACTACGCGCGCCAAGGCCGACCCGCAGGACAGCA
GCCAAGTCGGAGCGCCCATGAGCGGTGTTGTGGTTGAGATCCGCGTCCAT
GATGGACATGATGTCAAGAAGGGTGACCCAATTGCTGTACTCAGCGCCAT
GAAGATGGTAAGCATCTTGCACTTCCAGTCTCCTTTTCTCTCCTCATTGGA
GAACGAGTACTAACAATTCTCATAGGAAATGGTTATCTCCGCTCCTCATAG
TGGAAGGTATCCGGCATGCTCGTCCGGGAAGGAGACTCGGTGACGGTC
AGGATCTTATCTGCAAGATATCCAAGGCTTAG

图 28(续)

红色红曲霉 LF6 苹果酸脱氢酶基因 (SEQ ID NO:8)

ATGGAACAGTCAAAGGAAAGATTATATGTCACCTCTTCCAATGCAAAGAG
CTTCACAGAATCCATATTAACAGCCAATGGCACTCCACCGGACCATGCTT
CAATCGTGGCCAATAGTCTAGTCCTCGCCGATCTACGAGGCGTAGACACC
CACGGAATCAACCGTATTCCATCTTATATGGAGAGAATCCGACAAGGTGT
GCTGGATGCAGCAGCAATCCCGACGATAACTCAGATCACCCCCGTGTCG
CGCAAGTCGATGGCAAGAACGGGTTCGGGTTCGTAGCGGCGCATAAGGG
GATGGCGCGTGCTATTGAAATGGCTCAGGAATTTGGAATTGGCTTTGTATC
AGTGAACACTCGAATCATTTCCGTATGTCTGCGTGGGTCTGCCAACAGG
CATTGGATGCCGGGATGATGAGTCTGGTGTTTACGAACTCATCTCCTGCCC
TGCCGGTCTGGGGCGGGAAGGAGAACTCATGGGCGTGTCACCTATTGCA
TGTGGAGCTCCAGCTGGACGTGAAAGGCCATTTATTTTGGACATGGCACC
GTCCATCGCTGCGAGGGGGAAGATATATAAAGCCGCTCGCCGTGGGGAGA
AGATCCCCCAGACTGGGCTCTGGATGCTGAAGGGAAGCCTACTGAAAAT
CCAGAGAAAGCACTCAAAGGTGTCATGCTTCCCATGGGTGGCCCGAAGGG
GTCGGCCCTTGCTATCATGATGGATGTCTTCTCCGGAGTGTTGTCTGGTTC
TGCATTTGCCGGGCATGTAACCAATCCGTACGATCCGTGCGGGCCAGCAG
ACGTGGGACATTTTCTGATTGCTTTGAAACCAGATCTGTTTCATAGATCTTG
AGGATTTCAAGAACCGGATGGATTATCTCTATCAACGAGTTGTGGGTCA
GAAAGGATGGCTGGTGTGGAGAGAATATATTATCCGGGCGAAATCGAGC
AGATGATACATGAGAAAAGATTGCAGACAGGAATTCCGTACGTCCAGGCA
GAGATTGACGCTCTGAATAATGAGGCAGAGAAGGCTGGGACTGGAAAGA
TTATTACCTCGTAA

图 29

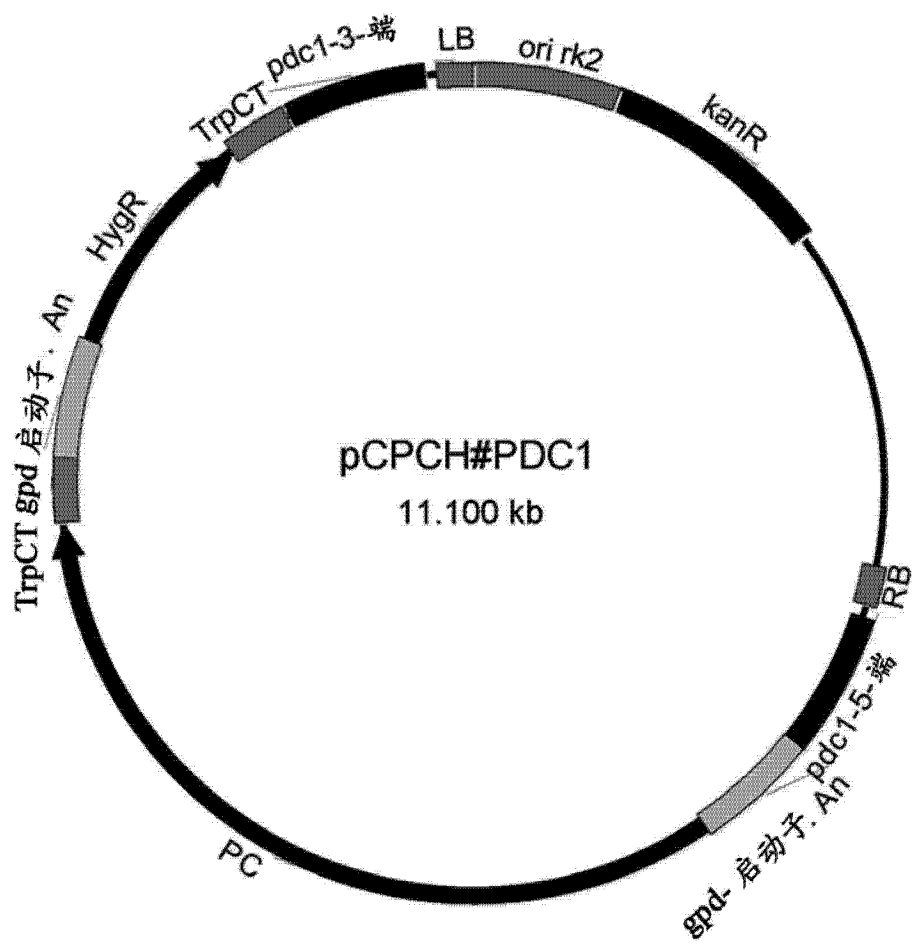


图 30

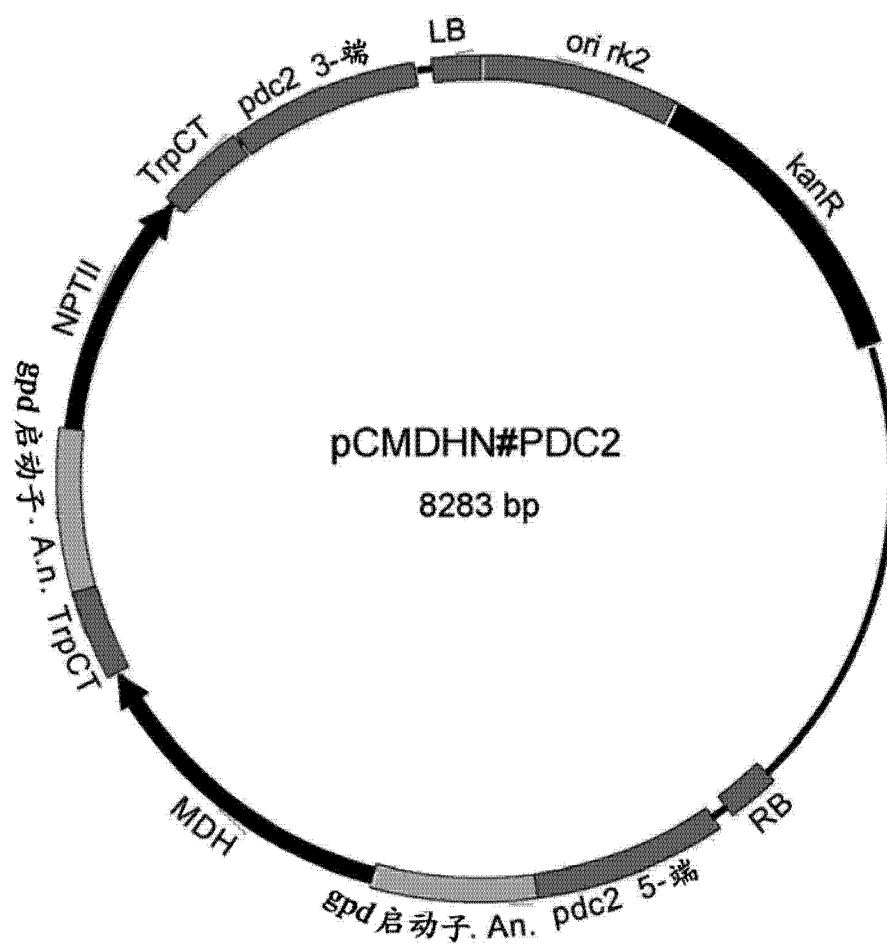


图 31

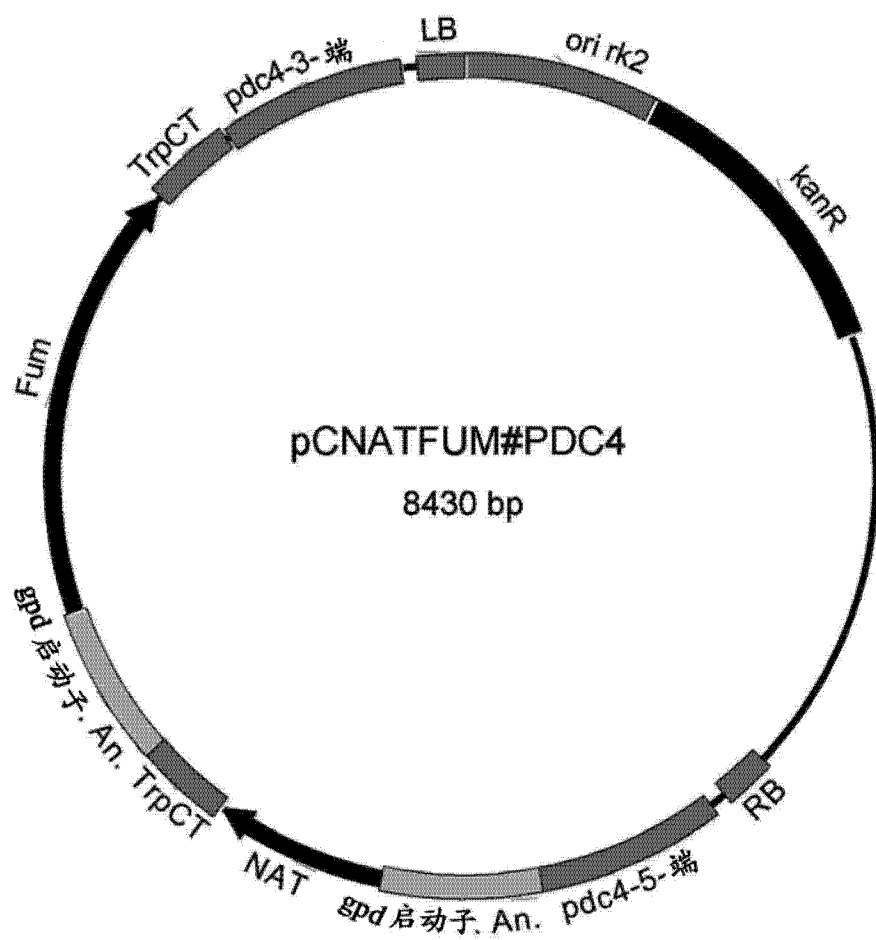


图 32

针对红色红曲霉经密码子优化的 Fum-1 基因 (SEQ ID NO: 9)

ATGAACAAC TCCCCCGCCTCTTCTCCTCCGCCTCCGCCGCCCTCCAGAAG
TTCCGCGCCGAGCGCGACACCTTCGGTGACCTCCAGGTCCCCGCCGACCG
CTACTGGGGTGCCCAGACCCAGCGCTCCCTCCAGAACTTCGACATCGGTG
GTCCCACCGAGCGCATGCCGAGCCCCTCATCCGCGCCTTCGGTGTCCTCA
AGAAGGCCGCCGCCACCGTCAACATGACCTACGGTCTCGACCCCAAGGTC
GGTGAGGCCATCCAGAAGGCCGCCGACGAGGTCATCGACGGTTCCTCAT
CGACCACTTCCCCCTCGTCGTCTGGCAGACCGGTTCCGGTACCCAGACCA
AGATGAACGTCAACGAGGTCATCTCCAACCGCGCCATCGAGCTCCTCGGT
GGTGAGCTCGGTTCCAAGGCCCCCGTCCACCCCAACGACCACGTCAACAT
GTCCCAGTCTCCAACGACACCTTCCCCACCGCCATGCACGTCGCCGCCGT
CGTCGAGATCCACGGTCGCCTCATCCCCGCCCTCACCACTCCGCGACGC
CCTCCAGGCCAAGTCCGCCGAGTTCGAGCACATCATCAAGATCGGTTCGCA
CCCACCTCCAGGACGCCACCCCCCTCACCTCGGTTCAGGAGTTCTCCGGTT
ACACCCAGCAGCTCACCTACGGTATCGCCCGCGTCCAGGGTACCTTCGAG
CGCCTCTACAACCTCGCCCAGGGTGGTACCGCCGTTCGGTACCGGTCTCAA
CACCCGCAAGGGTTTCGACGCCAAGGTGCGCGAGGCCATCGCCTCCATCA
CCGGTCTCCCCTTCAAGACCGCCCCCAACAAGTTCGAGGCCCTCGCCGCC
CACGACGCCCTCGTCGAGGCCACCGGTGCCCTCAACACCGTCGCCTGCTC
CCTCATGAAGATCGCCAACGACATCCGCTACCTCGGTTCGGTCCCCGCTG
CGGTCTCGGTGAGCTCTCCCTCCCCGAGAACGAGCCCGGTTCTCCATCAT
GCCCGGTAAGGTCAACCCACCCAGTGCGAGGCCATGACCATGGTCTGCG
CCCAGGTCATGGGTAAACAACACCGCCATCTCCGTGCGCGGTTCCAACGGT
CAGTTCGAGCTCAACGTCTTCAAGCCCGTCATGATCAAGAACCTCATCCA
GTCCATCCGCCTCATCTCCGACGCCTCCATCTCCTTCACCAAGAACTGCGT
CGTCGGTATCGAGGCCAACGAGAAGAAGATCTCCTCCATCATGAACGAGT
CCCTCATGCTCGTCACCGCCCTCAACCCCAACATCGGTTACGACAAGGCC
GCCAAGTGCGCCAAGAAGGCCCAACAAGGAGGGTACCACCTCAAGGAGG
CCGCCCTCTCCCTCGGTTACCTCACCTCCGAGGAGTTCGACCAGTGGGTCC
GCCCCGAGGACATGATCTCCGCCAAGGAC

图 33

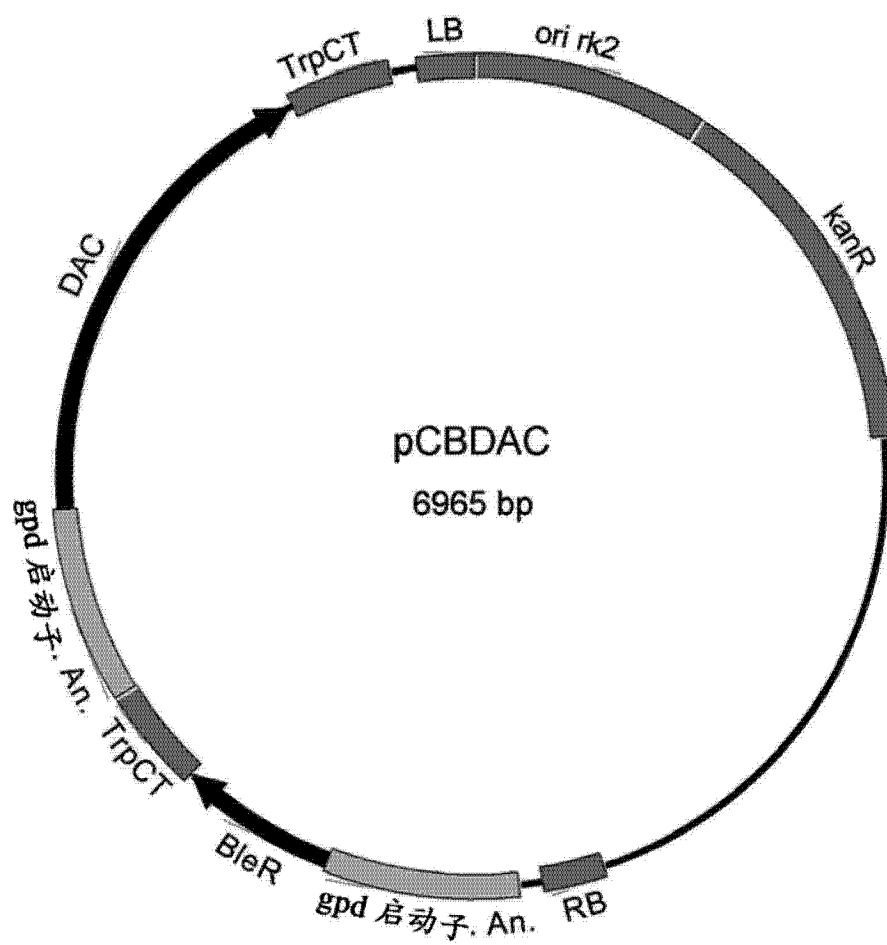


图 34

针对红色红曲霉经密码子优化的 Mae-1 基因 (SEQ ID NO:10)

ATGGGTGAGCTCAAGGAGATCCTCAAGCAGCGCTACCAACGAGCTCCTCGA
CTGGAACGTCAAGGCCCCCAGTCCCCCTCTCCCAGCGCCTCAAGCACTT
CACCTGGTCCTGGTTCGCCTGCACCATGGCCACCGGTGGTGTCCGGTCTCAT
CATCGGTTCCCTTCCCCCTTCCGCTTCTACGGTCTCAACACCATCGGTAAGAT
CGTCTACATCCTCCAGATCTTCTCTTCTCCCTCTTCGGTTCCTGCATGCTC
TTCCGCTTCATCAAGTACCCCTCCACCATCAAGGACTCCTGGAACCACCAC
CTCGAGAAGCTCTTCATCGCCACCTGCCTCCTCTCCATCTCCACCTTCATC
GACATGCTCGCCATCTACGCCTACCCCGACACCGGTGAGTGGATGGTCTG
GGTCATCCGCATCCTCTACTACATCTACGTGCGCGTCTCCTTCATCTACTG
CGTCATGGCCTTCTTCACCATCTTCAACAACCACGTCTACACCATCGAGAC
CGCCTCCCCCGCCTGGATCCTCCCCATCTTCCCCCCCATGATCTGCGGTGT
CATCGCCGGTGCCGTCAACTCCACCCAGCCCGCCACCAGCTCAAGAACA
TGGTCATCTTCGGTATCCTCTTCCAGGGTCTCGGTTTCTGGGTCTACCTCCT
CCTCTTCGCCGTCAACGTCTCCGCTTCTTCACCGTCGGTCTCGCCAAGCC
CCAGGACCGCCCCGGTATGTTTCATGTTTCGTTCGGTCCCCCGCCTTCTCCGG
TCTCGCCCTCATCAACATCGCCCGCGGTGCCATGGGTTCCCGCCCCCTACAT
CTTCGTTCGGTGCCAACTCCTCCGAGTACCTCGGTTTCGTCTCCACCTTCAT
GGCCATCTTCATCTGGGGTCTCGCCGCCTGGTGCTACTGCCTCGCCATGGT
CTCCTTCTCGCCGGTTTCTTCACCCGCGCCCCCTCAAGTTCGCCTGCGG
TTGGTTCGCCTTCATCTTCCCCAACGTTCGGTTTCGTCAACTGCACCATCGA
GATCGGTAAAGATGATCGACTCCAAGGCCTTCCAGATGTTTCGGTCACATCA
TCGGTGTATCCTCTGCATCCAGTGGATCCTCCTCATGTACCTCATGGTCC
GCGCCTTCTCGTCAACGACCTCTGCTACCCCGGTAAAGACGAGGACGCC
CACCCCCCCCCAAGCCCAACACCGGTGTCCTCAACCCACCTTCCCCCCC
GAGAAGGCCCCCGCCTCCCTCGAGAAGGTGACACCCACGTCACCTCCAC
CGGTGGTGAGTCCGACCCCCCTCCTCCGAGCACGAGTCCGTC

图 35