



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102066551 B

(45) 授权公告日 2013. 10. 09

(21) 申请号 200980119404. X

(22) 申请日 2009. 03. 27

(30) 优先权数据

61/040, 059 2008. 03. 27 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 11. 26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/038663 2009. 03. 27

(87) PCT申请的公布数据

W02009/151728 EN 2009. 12. 17

(73) 专利权人 基因组股份公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 A·P·博加德 普里蒂·法克雅

罗宾·E·奥斯特豪特

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 陈建芳 阎斌斌

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006. 01)

C12P 13/04 (2006. 01)

C12P 7/44 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2003/0113886 A1, 2003. 06. 19,

CN 1501606 A, 2004. 06. 16,

CN 1193348 A, 1998. 09. 16,

审查员 刘树柏

权利要求书1页 说明书41页 附图9页

(54) 发明名称

用于产生己二酸和其他化合物的微生物

(57) 摘要

本发明提供了一种非天然存在的微生物生物体,其具有己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径。所述微生物生物体含有至少一种编码己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径中各自的酶的外源性核酸。本发明另外提供了产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的方法。该方法可以包括在产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的条件下和足以产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的时间内培养产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的微生物生物体,其中所述微生物生物体以足以产生各自产物的量表达至少一种编码己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径酶的外源性核酸。

1. 一种非天然存在的微生物生物体,包括具有己二酸途径的微生物生物体,所述己二酸途径包含以足以产生己二酸的量表达的编码己二酸途径酶的外源性核酸,所述己二酸途径包括:

(i) 琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶、和己二酰-CoA 合成酶;或

(ii) 琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶、磷酸己二酰转移酶和己二酸激酶。

2. 权利要求1所述的非天然存在的微生物生物体,其中所述外源性核酸编码琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶和己二酰-CoA 合成酶。

3. 权利要求1所述的非天然存在的微生物生物体,其中所述外源性核酸编码琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶、磷酸己二酰转移酶和己二酸激酶。

4. 权利要求1所述的非天然存在的微生物生物体,其中至少一种所述外源性核酸是异源核酸。

5. 权利要求1所述的非天然存在的微生物生物体,其中所述非天然存在的微生物生物体在基本上厌氧的培养基中。

6. 一种产生己二酸的方法,包括在产生己二酸的条件和足以产生己二酸的时间内培养具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体,所述途径包含以足以产生己二酸的量表达的编码己二酸途径酶的外源性核酸,所述己二酸途径包括:

(i) 琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶、和己二酰-CoA 合成酶;或

(ii) 琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶、磷酸己二酰转移酶和己二酸激酶。

7. 权利要求6所述的方法,其中所述非天然存在的微生物生物体在基本上厌氧的培养基中。

8. 权利要求6所述的方法,其中所述外源性核酸编码琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶和己二酰-CoA 合成酶。

9. 权利要求6所述的方法,其中所述外源性核酸编码琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶、磷酸己二酰转移酶和己二酸激酶。

10. 权利要求6所述的方法,其中至少一种所述外源性核酸是异源核酸。

## 用于产生己二酸和其他化合物的微生物

[0001] 本申请要求于 2008 年 3 月 27 日申请的美国临时系列号 61/040,059 的优先权权益,该申请的全部内容通过引用合并于此。

[0002] 发明背景

[0003] 本发明总体上涉及生物合成方法,且更具体地涉及具有己二酸、6-氨基己酸和己内酰胺生物合成能力的生物体。

[0004] 己二酸,一种分子量为 146.14 的二羧酸,是一种具有商业意义的化合物。其主要用途是制备尼龙 6,6,一种通过将己二酸与环己二胺缩合制备的线性聚酰胺,其主要用于制造不同种类的纤维。己二酸的其他用途包括其在增塑剂、不饱和聚酯和聚酯多元醇中的用途。其他用途包括用于制备聚氨酯、润滑剂组分,和作为调味剂和胶凝助剂用作食品成分。

[0005] 过去,己二酸使用氧化作用由各种脂肪制备。目前用于己二酸合成的商业方法依靠使用过量的浓硝酸氧化 KA 油——一种环己酮(酮或 K 组分)和环己醇(醇或 A 组分)的混合物,或氧化纯环己醇。此方案有几种变型,其区别在于产生 KA 或环己醇的途径。例如,苯酚是 KA 油制备中的替代原料,并且已经描述了用于从苯酚合成己二酸的方法。此方法的其他方式倾向于使用除硝酸以外的氧化剂,诸如过氧化氢、空气或氧。

[0006] 己内酰胺是一种有机化合物,其是 6-氨基己酸( $\epsilon$ -氨基己酸、氨基己酸)的内酰胺。或者其可以被认为是己酸的环酰胺。己内酰胺的主要工业应用是作为制备尼龙-6 的单体。大多数己内酰胺使用硫酸羟铵经脲化方法然后使用 Beckmann 重排工艺步骤通过催化重排合成自环己酮。

[0007] 因此,存在着用于有效地制备商业数量的化合物诸如己二酸和己内酰胺的可替代方法的需求。本发明满足了这种需求并且还提供了相关的优势。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供了具有己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径的非天然存在的微生物生物体。该微生物生物体含有至少一种编码己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径中各自的外源性核酸。本发明还提供了一种产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的方法。该方法可以包括在产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的条件下和足以产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的时间内培养产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的微生物生物体,其中所述微生物生物体以足以产生各自产物的量表达至少一种编码己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径酶的外源性核酸。

[0010] 附图简要说明

[0011] 图 1 显示在产黄青霉菌(*Penicillium chrysogenum*)的过氧化酶体中降解己二酸的示例性途径。

[0012] 图 2 显示经逆降解途径形成己二酸的示例性途径。对于己二酰-CoA 至己二酸的最终转变提供了几种选择。

[0013] 图 3 显示经 3-氧代己二酸途径形成己二酸的示例性途径。

[0014] 图 4 显示己二酸合成和还原性 TCA 循环的 3-氧代己二酸途径的最后三个步骤的类似酶化学。

[0015] 图 5 显示经顺, 顺-己二烯二酸从葡萄糖合成己二酸的示例性途径。生物合成中间体 (缩写): D-赤藓糖 4-磷酸 (E4P)、磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP)、3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸 7-磷酸 (DAHP)、3-脱氢奎尼酸 (DHQ)、3-脱氢莽草酸 (DHS)、原儿茶酸 (PCA)。酶 (编码基因) 或反应条件: (a) DAHP 合成酶 (aroFFBR)、(b) 3-脱氢奎尼酸合成酶 (aroB)、(c) 3-脱氢奎尼酸脱水酶 (aroD)、(d) DHS 脱水酶 (aroZ)、(e) 原儿茶酸脱羧酶 (aroY)、(f) 儿茶酚 1,2-双加氧酶 (catA)、(g) 10% Pt/C, H<sub>2</sub>, 3400kPa, 25°C。附图取自 Niu 等, *Biotechnol. Prog.* 18:201-211 (2002)。

[0016] 图 6 显示使用  $\alpha$ -酮戊二酸作为起点经  $\alpha$ -酮己二酸合成己二酸的示例性途径。

[0017] 图 7 显示使用赖氨酸作为起点合成己二酸的示例性途径。

[0018] 图 8 显示使用己二酰-CoA 作为起点的示例性己内酰胺合成途径。

[0019] 图 9 显示使用  $\alpha$ -酮己二酸作为起点的示例性己二酸合成途径。

[0020] 发明详述

[0021] 本发明涉及具有己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的生物合成性制备能力的细胞和生物体的设计和产生。本文所述的结果表明代谢途径可以被设计和重组改造,从而在大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 和其他细胞或生物体中实现己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的生物合成。通过构建具有设计的代谢基因型的菌株可以确认己二酸、6-氨基己酸和己内酰胺的生物合成性制备。这些代谢改造的细胞或生物体还可以进行适应进化以进一步增加己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的生物合成,包括在接近理论最大生长的条件下。

[0022] 如本文所公开的,描述了许多用于产生己二酸、6-氨基己酸和己内酰胺的代谢途径。发现两种途径——逆向己二酸降解途径和 3-氧代己二酸途径——在下列方面是有益的: (i) 己二酸产率 (以葡萄糖计, 92% 摩尔产率), (ii) 对于己二酸合成不需要氧, (iii) 相关的能量学, 和 (iv) 产生作为单一发酵产物的己二酸的理论能力。还描述了通过  $\alpha$ -酮己二酸或赖氨酸产生己二酸的代谢途径, 但其产率较低, 并且需要通气以达到最大产量。本文还公开了用于从己二酰-CoA 产生 6-氨基己酸或己内酰胺或两者的途径, 所述己二酰-CoA 是逆降解途径中的前体。

[0023] 如本文所公开的, 描述了许多生物合成己二酸的示例性途径。一种示例性途径包括经依赖于己二酸降解的可逆性的途径的己二酸合成, 如在生物体诸如产黄青霉菌中所描述 (参见实施例 I 和 II)。第二种示例性途径需要形成 3-氧代己二酸, 然后使其还原、脱水和再次还原以形成己二酸 (参见实施例 III 和 IV)。使用这两种途径的任一种的己二酸产率为 0.92 摩尔 / 摩尔消耗的葡萄糖。为了达到这些理论最大产率, 不需要摄取氧, 并且在厌氧条件下的能量学有利于生长和产物分泌。从葡萄糖来源的顺, 顺-己二烯二酸产生己二酸的方法以前有所描述 (Frost 等, 美国专利号 5, 487, 987, 于 1996 年 1 月 30 日授权) (参见实施例 V)。对本文公开的实施方案相对于此先前描述的方法的优势进行了讨论。通过  $\alpha$ -酮己二酸 (实施例 VI) 或赖氨酸 (实施例 VII) 前体产生己二酸的代谢途径的产率较低, 并且需要通气以达到最大产量。描述了从己二酰-CoA 产生 6-氨基己酸或己内酰胺或两者的途径, 所述己二酰-CoA 是逆降解途径中的前体 (参见实施例 VIII 和 IX)。用于产生己二酸的其他途径描述在实施例 X 和 XI 中。描述了构建具有这些能力的微生物所需的示例性基因和酶以及克隆和转化、监测产物形成和使用改造的微生物用于生产的方法。

[0024] 如本文所公开的, 描述了使用葡萄糖 / 蔗糖作为碳底物的己二酸合成的 6 种不同

的途径。对于所有最大产率计算,在给定途径中缺少的反应加入至 SimPheny 中的大肠杆菌化学计算网络中,其类似于以前所述的一种网络 (Reed 等, *Genome Biol.* 4 :R54 (2003))。己二酸在生理条件下是一种带电分子,并且其被假设需要以基于质子的同向转运系统形式的能量以被分泌出网络。如果在中性或接近中性 pH 下进行发酵,则此转运系统在热力学上是可行的。低 pH 己二酸形成将需要 ATP- 依赖性输出机制,例如,与质子同向转运相反的 ABC 系统。这些途径中的反应和实现这些途径的方法描述在实施例 I-XI 中。

[0025] 如本文所使用,术语“非天然存在的”当用来说明本发明的微生物生物体或微生物时意在指微生物生物体具有至少一个在参照物种的天然存在株中正常情况下不存在的遗传改变,所述天然存在株包括参照物种的野生株。遗传改变包括,例如,引入可表达的编码代谢多肽的核酸的修饰,其他核酸添加,核酸缺失和 / 或微生物遗传材料的其他功能性破坏。此类修饰包括,例如,参照物种的异源多肽、同源多肽或异源多肽和同源多肽两者的编码区和其功能片段。其他的修饰包括,例如,非编码调控区,其中所述修饰改变基因或操纵子的表达。示例性的代谢多肽包括己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成途径内的酶。

[0026] 代谢修饰指从其天然存在状态改变的生化反应。因此,非天然存在的微生物可以具有对编码代谢多肽的核酸或其功能片段的遗传修饰。示例性的代谢修饰公开在本文中。

[0027] 如本文所使用,术语“分离的”当用来说明微生物生物体时意在指生物体基本上不含有当参照微生物生物体在自然界中被发现时的至少一种成分。该术语包括微生物生物体与当其在自然环境中被发现时的一些或所有成分分开。该术语还包括微生物生物体与当微生物生物体在非天然存在的环境中被发现时的一些或所有成分分开。因此,分离的微生物生物体与当其在自然界中发现时或当其在非天然存在的环境中生长、保存或生存时的其他物质部分或全部地分离。分离的微生物生物体的具体实例包括部分纯的微生物、基本上纯的微生物和在非天然存在的在培养基中培养的微生物。

[0028] 如本文中所使用,术语“微生物”、“微生物生物体”或“微生物体”意在指包括在古细菌域、真细菌域或真核生物域的范围内的作为微型细胞存在的任何生物体。因此,该术语意在包括具有微型尺寸的原核或真核细胞或生物体,并且包括所有物种的细菌、古细菌和真细菌以及真核微生物诸如酵母和真菌。该术语还包括可被培养以产生生物化学物质的任何物种的细胞培养物。

[0029] 如本文所使用,术语“CoA”或“辅酶 A”意在指有机辅因子或辅基 (酶的非蛋白部分),其存在是许多酶 (脱辅基酶) 的活性形成活性酶体系所必需的。辅酶 A 在某些缩合酶中起作用,在乙酰基或其他酰基转移和在脂肪酸合成和氧化、丙酮酸氧化和在其他乙酰化中发挥作用。

[0030] 如本文所使用,具有化学式  $-OOC-(CH_2)_4-COO-$  (参见图 2) 的“己二酸盐 (adipate)” (IUPAC 名称 :hexanedioate) 是己二酸 (IUPAC 名称 :hexanedioic acid) 的离子化形式,并且要理解己二酸盐和己二酸通篇可以互换使用以指采取其中性或离子形式的任一种形式的化合物,包括其任何盐形式。技术人员要理解的是,具体形式将取决于 pH。

[0031] 如本文所使用,具有化学式  $-OOC-(CH_2)_5-NH_2$  (参见图 8) 的“6-氨基己酸盐 (6-aminocaproate)”是 6-氨基己酸 (IUPAC 名称 :6-aminohexanoic acid) 的离子形式,并且要理解 6-氨基己酸盐和 6-氨基己酸通篇可以互换使用以指采取其中性或离子形式的任一种形式的化合物,包括其任何盐形式。技术人员要理解的是,具体形式将取决于 pH。

[0032] 如本文所使用,“己内酰胺”(IUPAC 名称:azepan-2-one(氮杂环庚烷-2-酮))是6-氨基己酸的内酰胺(参见图8)。

[0033] 如本文所使用,术语“基本上厌氧的”当用来描述培养或生长条件时意在指氧量小于液体培养基中溶解氧饱和度的约10%。该术语还意在包括液体或固体培养基的密闭室保持以小于约1%氧的气氛。

[0034] 如本文所使用,“外源性”意在指参照分子或参照活性被引入指宿主微生物生物体中。该分子可以通过如下方法被引入,例如,通过将编码核酸引入宿主遗传物质中诸如通过整合至宿主染色体中或作为非染色体遗传物质诸如质粒引入。因此,该术语当用来说明编码核酸的表达时指编码核酸以可表达形式引入至微生物生物体中。当用来说明生物合成活性时,该术语指引入至宿主参照生物体中的活性。来源可以是,例如,同源或异源的编码核酸,其在引入至宿主微生物生物体中后表达参照活性。因此,术语“内源性”指参照分子或活性存在于宿主中。类似地,该术语当用来说明编码核酸的表达时指包含在微生物生物体内的编码核酸的表达。术语“异源的”指分子或活性来源于参照物种以外的来源,而“同源的”指分子或活性来源于宿主微生物生物体的。因此,本发明的编码核酸的外源性表达可以利用异源的编码核酸或同源的编码核酸或两者。

[0035] 本发明的非天然存在的微生物生物体可以含有稳定的遗传改变,其指微生物可以培养5代以上而没有丢失所述改变。通常,稳定的遗传改变包括持续10代以上的修饰,特别稳定的修饰将持续约25代以上,并且更特别地,稳定的遗传修饰将为50代以上,包括无限期。

[0036] 本领域技术人员将会理解,遗传改变,包括本文所列举的代谢修饰,参照适当的宿主生物体诸如大肠杆菌和它们相应的代谢反应或适合于所需的遗传物质诸如所需代谢途径的基因的来源生物体进行描述。然而,鉴于多种多样的生物体的全基因组测序和基因组学领域中的高技术水平,本领域技术人员将能够容易地将本文提供的教导和指导应用于基本上所有其他生物体。例如,本文列举的大肠杆菌代谢改变可以通过掺入来自参照物种以外的物种的相同的或类似的编码核酸而容易地应用于其他物种。此类遗传改变包括,例如,物种同源物的遗传改变,通常和特别地,直向同源物(ortholog)、旁系同源物(paralog)或非直向同源(nonorthologous)基因置换。

[0037] 直向同源物是通过垂直遗传而相关并且在不同的生物体中负责基本上相同或同一功能的一种基因或多种基因。例如,小鼠环氧化物水解酶和人环氧化物水解酶可以被认为是环氧化物水解的生物学功能的直向同源物。例如,当基因共享足以表明它们是同源量的序列相似性时,它们是通过垂直遗传而相关的,或由共同祖先进化而相关。如果基因共享足以表明它们已从共同祖先进化至一级序列相似性不可鉴定的程度的量的三维结构但不必然具有这样的量的序列相似性,它们也可被认为是直向同源物。直向同源的基因可以编码具有约25%-100%氨基酸序列同一性的序列相似性的蛋白质。如果其三维结构也显示相似性,则编码共享小于25%的氨基酸相似性的蛋白质的基因也可以被认为由垂直遗传而产生。丝氨酸蛋白酶家族的成员,包括组织纤溶酶原激活物和弹性蛋白酶,被认为从共同祖先通过垂直遗传而产生。

[0038] 直向同源物包括基因或它们编码的基因产物,它们通过,例如,进化,已经在结构上或总体活性上发生了趋异。例如,在一个物种编码显示两种功能的基因产物的情况下以

及在此类功能已经在第二物种中分离入不同基因的情况下,这三种基因和它们相应的产物被认为是直向同源物。对于生物化学产物的产生,本领域技术人员将理解具有待引入或待破坏的代谢活性的直向同源基因被选择用于构建非天然存在的微生物。显示可分离的活性的直向同源物的实例是在两个或多个物种之间或单个物种内不同的活性已经分离入不同的基因产物的情况。具体的实例是弹性蛋白酶蛋白水解和纤溶酶原蛋白水解(两种类型的丝氨酸蛋白酶活性)作为纤溶酶原激活物和弹性蛋白酶分离入不同分子。第二个实例是支原体 5' -3' 外切核酸酶和果蝇 (*Drosophila*) DNA 聚合酶 III 活性的分离。来自第一物种的 DNA 聚合酶可以被认为是来自第二物种的外切核酸酶或聚合酶或两者的直向同源物,且反之亦然。

[0039] 相反,旁系同源物是通过例如,复制然后通过进化趋异而相关的同源物,并且具有相似的或共有的、但不相同的功能。旁系同源物可以源自或来自,例如,相同的物种或不同的物种。例如,微粒体环氧化物水解酶(环氧化物水解酶 I)和可溶性环氧化物水解酶(环氧化物水解酶 II)可以被认为是旁系同源物,因为它们代表从共同祖先共同进化的两种不同的酶,它们在相同的物种中催化不同的反应并且具有不同的功能。旁系同源物是来自相同物种的彼此具有显著的序列相似性的蛋白质,表明它们是同源的,或通过从共同祖先共同进化而相关。旁系同源蛋白家族的组包括 HipA 同源物、萤光素酶基因、肽酶等。

[0040] 非直向同源基因置换是来自一个物种的非直向同源基因可以替代不同物种中的参照基因功能。置换包括,例如,能够在来源物种中执行与不同物种中的参照功能相比基本上相同或相似的功能。尽管通常非直向同源置换将被鉴定为与编码参照功能的已知基因结构上相关,然而结构上不太相关但功能上相似的基因和它们相应的基因产物将仍然落在该术语的范围内,如其在本文中所使用的那样。与编码寻求替代的功能的基因相比,功能相似性需要,例如,非直向同源基因产物的活性位点或结合区中的至少一些结构相似性。因此,非直向同源基因包括,例如,旁系同源物或不相关基因。

[0041] 因此,在鉴定和构建本发明的具有己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成能力的非天然存在的微生物生物体时,本领域技术人员将理解,将本文提供的教导和指导应用于具体物种,使得代谢修饰的鉴定可以包括直系同源物的鉴定和包含或失活。就编码催化相似或基本上相似的代谢反应的酶的旁系同源物和/或非直向同源基因置换存在于参照微生物中这一程度而言,本领域技术人员还可以利用这些进化上相关的基因。

[0042] 直系同源物、旁系同源物和非直向同源基因置换可以通过本领域技术人员所熟知的方法来确定。例如,对于两种多肽,核酸或氨基酸序列的检查将揭示比较的序列之间的序列同一性和相似性。基于这些相似性,本领域技术人员可以确定是否相似性足够高从而表明这些蛋白质通过从共同祖先进化而相关。本领域技术人员所熟知的算法,诸如 Align、BLAST、Clustal W 和其他算法比较和确定原始序列相似性或同一性,并且还确定序列中空位的存在或显著性,其可以被赋予权重或分值。此类算法在本领域中也是已知的,并且类似地可应用于确定核苷酸序列相似性或同一性。基于用于计算统计学相似性的公知方法、或在随机多肽中找到相似匹配的机会以及确定的匹配的显著性来计算足以确定关联性的相似性参数。如果需要,两条或多条序列的计算机比较也可以由本领域技术人员通过肉眼观察来优化。相关的基因产物或蛋白质可被预期具有高相似性,例如,25% -100% 序列同一性。如果扫描具有足够大小的数据库,不相关的蛋白质可以具有与如预期将偶然发生的那

样基本上相同的同一性（约 5%）。5% -24%之间的序列可以代表或不代表足以得出比较的序列是相关的结论的同源性。对于给定的数据库大小，可以进行用于确定此类匹配的显著性的其他统计学分析以确定这些序列的相关性。

[0043] 例如，使用 BLAST 算法确定两条或多条序列的关联性的示例性参数可如下所示。简言之，使用 BLASTP 2.0.8 版（1999 年 1 月 5 日）和下列参数执行氨基酸序列比对：矩阵：OBLOSUM62；空位开放：11；空位延伸：1；x\_dropoff：50；期望值：10.0；字长：3；过滤器：开。可以使用 BLASTN 2.0.6 版（1998 年 9 月 16 日）和下列参数执行核酸序列比对：匹配：1；错配：-2；空位开放：5；空位延伸：2；x\_dropoff：50；期望值：10.0；字长：11；过滤器：关。本领域技术人员将知道可以对上述参数作出何种修改来例如，增加或降低比较的严格性，和确定两条或多条序列的关联性。

[0044] 本发明提供了能够产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的非天然存在的微生物生物体。例如，己二酸途径可以是逆向己二酸降解途径（参见实施例 I 和 II）。在一个实施方案中，本发明提供了具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体，其包含以足以产生己二酸的量表达的至少一种编码己二酸途径酶的外源性核酸，所述己二酸途径包括琥珀酰-CoA：乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶和己二酰-CoA 合成酶或磷酸己二酰转移酶/己二酸激酶或己二酰-CoA：乙酰-CoA 转移酶或己二酰-CoA 水解酶。另外，己二酸途径可以经由 3-氧代己二酸途径（参见实施例 III 和 IV）。在另一个实施方案中，本发明提供了具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体，其包含以足以产生己二酸的量表达的至少一种编码己二酸途径酶的外源性核酸，所述己二酸途径包括琥珀酰-CoA：乙酰-CoA 酰基转移酶、3-氧代己二酰-CoA 转移酶、3-氧代己二酸还原酶、3-羟基己二酸脱水酶和 2-烯酸还原酶。

[0045] 还在另一个实施方案中，本发明提供了具有 6-氨基己酸途径的非天然存在的微生物生物体，其包含以足以产生 6-氨基己酸的量表达的至少一种编码 6-氨基己酸途径酶的外源性核酸，所述 6-氨基己酸途径包括 CoA-依赖性醛脱氢酶和转氨酶（参见实施例 VIII 和 IX）。备选地，6-氨基己酸脱氢酶可以用来转变己二酸半醛以形成 6-氨基己酸（参见图 8）。在进一步的实施方案中，本发明提供了具有己内酰胺途径的非天然存在的微生物生物体，其包含以足以产生己内酰胺的量表达的至少一种编码己内酰胺途径酶的外源性核酸，所述己内酰胺途径包括 CoA-依赖性醛脱氢酶、转氨酶或 6-氨基己酸脱氢酶和酰胺水解酶（参见实施例 VIII 和 IX）。

[0046] 如本文所公开，本发明的产生 6-氨基己酸或己内酰胺的微生物生物体可以从己二酰-CoA 前体产生 6-氨基己酸和/或己内酰胺（参见图 8 和实施例 VIII 和 IX）。因此，要理解，产生 6-氨基己酸或己内酰胺的微生物生物体可以进一步包括产生己二酰-CoA 的途径。例如，己二酰-CoA 途径可以包括图 2 的酶，其通过己二酰-CoA 的产生利用琥珀酰-CoA 和乙酰-CoA 作为前体，即，缺少用于将己二酰-CoA 转变为己二酸的最终步骤的酶。因此，一个示例性的己二酰-CoA 途径可以包括琥珀酰-CoA：乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶和 5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶。

[0047] 另外，如图 1 中所示，己二酸降解途径包括通过己二酸 CoA 连接酶将己二酸转变为己二酰-CoA 的步骤。因此，己二酰-CoA 途径可以是进一步包括将己二酸转变为己二酰-CoA 的酶活性的己二酸途径，包括，例如，如图 1 的第一步骤中的己二酸-CoA 连接酶活性和以逆

向进行的图 2 的最终步骤中的任一种酶,例如,己二酰-CoA 合成酶(也称为己二酸 Co-A 连接酶)、磷酸己二酰转移酶/己二酸激酶、己二酰-CoA:乙酰-CoA 转移酶或己二酰-CoA 水解酶的任一种。具有己二酸转变为己二酰-CoA 活性的酶可以是内源性活性或可以作为编码该酶的外源性核酸而提供,如本文所公开的。因此,要理解,利用己二酸转变为己二酰-CoA 的酶活性,任何己二酸途径可以用来产生己二酰-CoA 途径。这样的途径可以包含在产生 6-氨基己酸或己内酰胺的微生物生物体中,从而为 6-氨基己酸和/或己内酰胺的产生提供己二酰-CoA 前体。

[0048] 其他示例性的己二酸途径利用  $\alpha$ -酮己二酸作为前体(参见图 6 和实施例 VI)。在又一个实施方案中,本发明提供了具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体,其包含以足以产生己二酸的量表达的至少一种编码己二酸途径酶的外源性核酸,所述己二酸途径包括高柠檬酸合成酶、高乌头酸酶、同分异构柠檬酸脱氢酶、2-酮己二酸还原酶、 $\alpha$ -羟基己二酸脱水酶和氧化还原酶。进一步示例性的己二酸途径利用赖氨酸降解途径(参见图 7 和实施例 VII)。本发明的另一实施方案提供了具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体,其包含以足以产生己二酸的量表达的至少一种编码己二酸途径酶的外源性核酸,所述己二酸途径包括碳氮裂合酶、氧化还原酶、转氨酶和氧化还原酶。

[0049] 还有另一个示例性的己二酸途径利用  $\alpha$ -酮己二酸作为前体(参见图 9 和实施例 X 和 XI)。因此,本发明另外提供了具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体,其包含以足以产生己二酸的量表达的至少一种编码己二酸途径酶的外源性核酸,所述己二酸途径包括  $\alpha$ -酮己二酰-CoA 合成酶、磷酸酮己二酰转移酶(phosphotransketoadipylase)/ $\alpha$ -酮己二酸激酶或  $\alpha$ -酮己二酰-CoA:乙酰-CoA 转移酶;2-羟基己二酰-CoA 脱氢酶;2-羟基己二酰-CoA 脱水酶;5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶;和己二酰-CoA 合成酶、磷酸己二酰转移酶(phosphotransadipylase)/己二酸激酶、己二酰-CoA:乙酰-CoA 转移酶或己二酰-CoA 水解酶。还在另一个实施方案中,本发明提供了具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体,其包含以足以产生己二酸的量表达的至少一种编码己二酸途径酶的外源性核酸,所述己二酸途径包括 2-羟基己二酸脱氢酶;2-羟基己二酰-CoA 合成酶、磷酸羟基己二酰转移酶/2-羟基己二酸激酶或 2-羟基己二酰-CoA:乙酰-CoA 转移酶;2-羟基己二酰-CoA 脱水酶;5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶;和己二酰-CoA 合成酶、磷酸己二酰转移酶/己二酸激酶、己二酰-CoA:乙酰-CoA 转移酶或己二酰-CoA 水解酶。

[0050] 在其他的实施方案中,本发明提供了具有己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径的非天然存在的微生物生物体,其中所述非天然存在的微生物生物体包含至少一种编码将底物转变为产物的多肽的外源性核酸,如本文所公开的那样。因此,本发明提供了含有至少一种编码多肽的外源性核酸的非天然存在的微生物生物体,其中所述多肽是转变己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径的底物和产物的酶或蛋白质,诸如图 2、3、8 和 9 中所示的那些。

[0051] 在一个实施方案中,本发明提供了具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体,其中所述微生物生物体含有至少一种编码将底物转变为产物的多肽的外源性核酸,所述的底物转变为产物选自琥珀酰-CoA 和乙酰-CoA 转变为 3-氧代己二酰-CoA;3-氧代己二酰-CoA 转变为 3-羟基己二酰-CoA;3-羟基己二酰-CoA 转变为 5-羧基-2-戊烯酰-CoA;5-羧基-2-戊烯酰-CoA 转变为己二酰-CoA;己二酰-CoA 转变为己二酸(参见图 2)。在另一个实施方案中,本发明提供了具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体,其中所

述微生物生物体含有至少一种编码将底物转变为产物的多肽的外源性核酸,所述的底物转变为产物选自琥珀酰-CoA 和乙酰-CoA 转变为 3-氧代己二酰-CoA;3-氧代己二酰-CoA 转变为 3-氧代己二酸;3-氧代己二酸转变为 3-羟基己二酸;3-羟基己二酸转变为己-2-烯二酸盐(hexa-2-enedioate);己-2-烯二酸盐转变为己二酸(参见图 3)。

[0052] 在其他的实施方案中,本发明提供了具有 6-氨基己酸途径的非天然存在的微生物生物体,其中所述微生物生物体含有至少一种编码将底物转变为产物的多肽的外源性核酸,所述的底物转变为产物选自己二酰-CoA 转变为己二酸半醛;和己二酸半醛转变为 6-氨基己酸(参见图 8)。还在另一个实施方案中,本发明提供了具有己内酰胺途径的非天然存在的微生物生物体,其中所述微生物生物体含有至少一种编码将底物转变为产物的多肽的外源性核酸,所述的底物转变为产物选自己二酰-CoA 转变为己二酸半醛;己二酸半醛转变为 6-氨基己酸;和 6-氨基己酸转变为己内酰胺。

[0053] 还在另一个实施方案中,本发明提供了具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体,其中所述微生物生物体含有至少一种编码将底物转变为产物的多肽的外源性核酸,所述的底物转变为产物选自  $\alpha$ -酮己二酸转变为  $\alpha$ -酮己二酰-CoA; $\alpha$ -酮己二酰-CoA 转变为 2-羟基己二酰-CoA;2-羟基己二酰-CoA 转变为 5-羧基-2-戊烯酰-CoA;5-羧基-2-戊烯酰-CoA 转变为己二酰-CoA;和己二酰-CoA 转变为己二酸(参见图 9)。另外,本发明提供了具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体,其中所述微生物生物体含有至少一种编码将底物转变为产物的多肽的外源性核酸,所述的底物转变为产物选自  $\alpha$ -酮己二酸转变为 2-羟基己二酸;2-羟基己二酸转变为 2-羟基己二酰-CoA;2-羟基己二酰-CoA 转变为 5-羧基-2-戊烯酰-CoA;5-羧基-2-戊烯酰-CoA 转变为己二酰-CoA;和己二酰-CoA 转变为己二酸(图 9)。

[0054] 在本文中一般地提及代谢反应、其反应物或产物、或具体提及编码与提及的代谢反应、反应物或产物相关的或催化提及的代谢反应、反应物或产物的酶的一种或多种核酸或基因来本发明进行描述。除非在本文中另外明确地指明,本领域技术人员将理解,对反应的提及还构成对该反应的反应物和产物的提及。类似地,除非在本文中另外明确地指明,对反应物或产物的提及也提及该反应,并且对这些代谢组分的任一种的提及也提及编码催化该提及的反应、反应物或产物的酶的一种基因或多种基因。同样,就代谢生物化学、酶学和基因组学的公知领域而言,本文对基因或编码核酸的提及也构成对相应编码的酶和其催化的反应以及该反应的反应物和产物的提及。

[0055] 本发明的非天然存在的微生物生物体可以通过引入可表达的编码一种或多种参与一个或多个己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成途径的酶的核酸来产生。取决于选择用于生物合成的宿主微生物生物体,可以表达用于一些或所有特定的己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成途径的核酸。例如,如果选择的宿主缺乏一种或多种用于所需生物合成途径的酶,则将可表达的用于一种或多种缺乏的酶的核酸引入至宿主中用于随后的外源表达。备选地,如果选择的宿主显示一些途径基因的内源性表达,但缺乏其他的基因表达,则需要编码一种或多种缺乏的酶的编码核酸以实现己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成。因此,本发明的非天然存在的微生物生物体可以通过引入外源酶活性以获得所需的生物合成途径来产生,或所需的生物合成途径可以通过引入一种或多种外源酶活性来获得,所述一种或多种外源酶活性与一种或多种内源酶一起产生所需产物诸如己二酸、6-氨

基己酸或己内酰胺。

[0056] 取决于所选择的宿主微生物生物体的己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成途径组分,本发明的非天然存在的微生物生物体包括至少一种外源性表达的编码己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径的核酸并且至多达一个或多个己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成途径的所有编码核酸。例如,己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成可以在缺乏途径酶的宿主中通过外源表达相应的编码核酸来建立。在缺乏己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径的所有酶的宿主中,可以包括外源表达途径中的所有酶,尽管要理解的是,即使宿主含有至少一种途径酶,也可以表达途径的所有酶。

[0057] 例如,在用于产生己二酸的途径中所有酶的外源表达可以包含在宿主生物体中,诸如琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶和己二酰-CoA 合成酶或磷酸己二酰转移酶/己二酸激酶或己二酰-CoA:乙酰-CoA 转移酶或己二酰-CoA 水解酶。特别地,宿主生物体可以含有己二酸途径酶:琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶和己二酰-CoA 合成酶。备选地,宿主生物体可以含有己二酸途径酶:琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶和磷酸己二酰转移酶/己二酸激酶。另外,宿主生物体可以含有己二酸途径酶:琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶和己二酰-CoA:乙酰-CoA 转移酶。此外,宿主生物体可以含有己二酸途径酶:琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶和己二酰-CoA 水解酶。

[0058] 在产生 6-氨基己酸的微生物生物体情况下,在用于产生 6-氨基己酸的途径中所有酶的外源表达可以包含在宿主生物体中,诸如 CoA-依赖性醛脱氢酶和转氨酶或 CoA-依赖性醛脱氢酶和 6-氨基己酸脱氢酶。对于产生己内酰胺的微生物生物体,在用于产生己内酰胺的途径中所有酶的外源表达可以包含在宿主生物体中,诸如 CoA-依赖性醛脱氢酶、转氨酶或 6-氨基己酸脱氢酶和酰胺水解酶。

[0059] 鉴于本文提供的教导和指导,本领域普通技术人员将理解,以可表达形式引入的编码核酸的数目将至少与所选择的宿主微生物生物体的己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径缺陷相配。因此,本发明的非天然存在的微生物生物体可以具有一种、两种、三种、四种或五种,至多所有编码构成己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成途径的上述酶的核酸。在一些实施方案中,非天然存在的微生物生物体还可以包括促进或优化己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成或赋予宿主微生物生物体以其他有用功能的其他遗传修饰。一种这样的其他功能性可以包括,例如,增加一种或多种己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径前体的合成,所述前体诸如在己二酸合成时的琥珀酰-CoA 和/或乙酰-CoA,或在 6-氨基己酸或己内酰胺合成时的己二酰-CoA,包括本文中公开的己二酸途径酶。

[0060] 在一些实施方案中,本发明的非天然存在的微生物生物体产生自含有酶促合成己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的能力的宿主。在此具体的实施方案中,其可以用来增加己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径产物的合成或积累,从而例如,驱使己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径反应朝向产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺。增加的合成或积累可以通

过,例如,编码一种或多种上述己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径酶的核酸的过度表达来实现。一种或多种己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径酶的过度表达可以,例如,通过一种或多种内源基因的外源表达,或通过一种或多种异源基因的外源表达来发生。因此,天然存在的生物体可以容易地生成为本发明的非天然存在的微生物生物体,例如,通过过度表达一种、两种、三种、四种、五种,即,所有编码己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成途径酶的核酸来产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺。另外,非天然存在的生物体可以通过诱导导致己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成途径中的酶活性增加的内源基因来生成。

[0061] 在特别有用的实施方案中,采用编码核酸的外源表达。外源表达赋予对宿主和应用定制调节表达和/或调控元件以达到由用户控制的所需表达水平的能力。然而,在其他实施方案中,也可以利用内源表达,诸如通过去除负调控效应器或当与诱导型启动子或其他调控元件连接时诱导基因的启动子。因此,具有天然存在的诱导型启动子的内源基因可以通过提供适当的诱导剂而上调,或内源基因的调控区可以被改造以结合诱导型调控元件,从而允许在所需的时间调控内源基因的增加表达。类似地,诱导型启动子可以被包含作为内源基因的调控元件引入至非天然存在的微生物生物体中。

[0062] 要理解,在本发明的方法中,一种或多种外源性核酸的任一种可以被引入至微生物生物体中以产生本发明的非天然存在的微生物生物体。核酸可以被引入以便将,例如,己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成途径赋予微生物生物体。备选地,编码核酸可以被引入以产生具有催化一些所需反应的生物合成能力的中间微生物生物体,以赋予己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成能力。例如,具有己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成途径的非天然存在的微生物生物体可以包含至少两种编码所需酶的外源性核酸。在产生己二酸的情况下,至少两种外源性核酸可以编码酶诸如琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶和 3-羟酰-CoA 脱氢酶,或琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶和 3-羟基己二酰-CoA 脱水酶,或 3-羟基己二酰-CoA 和 5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶,或 3-羟酰-CoA 和己二酰-CoA 合成酶的组合,等等。在产生己内酰胺的情况下,至少两种外源性核酸可以编码酶诸如 CoA-依赖性醛脱氢酶和转氨酶,或 CoA-依赖性醛脱氢酶和酰胺水解酶,或转氨酶和酰胺水解酶的组合。因此,要理解生物合成途径的两种或多种酶的任何组合可以包含在本发明的非天然存在的微生物生物体中。

[0063] 类似地,要理解,生物合成途径的三种以上的酶的任何组合可以包含在本发明的非天然存在的微生物生物体中,例如,在产生己二酸的情况下,如果需要,酶琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶和 3-羟基己二酰-CoA 脱水酶;或琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶和 5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶;或琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶和己二酰-CoA 合成酶;或 3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶和己二酰-CoA:乙酰-CoA 转移酶的组合,等等,只要所需生物合成途径的酶的组合导致产生相应的所需产物。类似地,如果需要,如本文所公开的生物合成途径的四种以上的酶的任意组合可以包含在本发明的非天然存在的微生物生物体中,只要所需生物合成途径的酶的组合导致产生相应的所需产物。

[0064] 除了如本文所描述的生物合己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺以外,本发明的非天然存在的微生物生物体和方法也可以以彼此以及与本领域中公知的其他微生物生物体和方法的各种组合来使用,从而通过其他途径实现产物合成。例如,除了使用己二酸、6-氨

基己酸或己内酰胺生产体以外,产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的一个替代方法是通过加入能够将己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径中间体转变为己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的另一微生物生物体。一种这样的步骤包括,例如,产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径中间体的微生物生物体的发酵。然后,己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径中间体可以用作第二微生物生物体的底物,所述第二微生物生物体将己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径中间体转变为己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺。己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径中间体可以直接加入至第二生物体的另一培养物中或己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径中间体生产体的初始培养物可以例如,通过细胞分离而去除这些微生物生物体,然后将第二生物体加入至发酵液中,从而可以用来产生最终产物而无需中间体纯化步骤。

[0065] 在其他实施方案中,本发明的非天然存在的微生物生物体和方法可以以大量的亚途径组装,从而实现,例如,己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的生物合成。在这些实施方案中,用于本发明的所需产物的生物合成途径可以分离至不同的微生物生物体中,并且所述不同的微生物生物体可以共培养以产生最终产物。在这样的生物合成路线中,一种微生物生物体的产物是第二种微生物生物体的底物,直至合成最终产物。例如,己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的生物合成可以通过构建含有用于将一种途径中间体转变为另一途径中间体或产物的生物合成途径的微生物生物体来实现。备选地,己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺还可以使用在同一容器中的两种微生物通过共培养或共发酵从微生物生物体中生物合成地产生,其中第一种微生物生物体产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺中间体,且第二种微生物生物体将该中间体转变为己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺。

[0066] 鉴于本文提供的教导和指导,本领域技术人员将理解,对于本发明的非天然存在的微生物生物体和方法与其他微生物生物体,与具有亚途径的其他非天然存在的微生物生物体的共培养,以及与本领域中公知的产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的其他化学和/或生物化学方法的组合,存在有大量的组合和排列。

[0067] 己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径酶的编码核酸的来源可以包括,例如,其中编码基因产物能够催化所参照的的任何物种。此类物种包括原核生物体和真核生物体,包括,但不限于,细菌,包括古细菌和真细菌,和真核生物,包括酵母、植物、昆虫、动物和哺乳动物,包括人。此类来源的示例性物种包括,例如,大肠杆菌、*Pseudomonas knackmussii*、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*)、肺炎克雷伯菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、变形斑沙雷菌 (*Serratia proteamaculans*)、链霉菌属 2065 (*Streptomyces* sp. 2065)、铜绿假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、富养产碱菌 (*Ralstonia eutropha*)、丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*)、小眼虫 (*Euglenagracilis*)、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)、克氏梭状芽孢杆菌 (*Clostridium kluyveri*)、智人 (*Homo sapiens*)、褐家鼠 (*Rattus norvegicus*)、不动杆菌属 ADP1 (*Acinetobacter* sp. ADP1)、天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*)、巴氏真杆菌 (*Eubacterium barkeri*)、不解糖消化链球菌 (*Peptostreptococcus saccharolyticus*)、肉毒梭菌 (*Clostridium botulinum*)、酪丁酸梭菌 (*Clostridium tyrobutyricum*)、热乙酸梭菌 (*Clostridium thermoaceticum*) (*Moorellathermoaceticum* (热乙酸穆尔氏菌))、乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*)、小家鼠 (*Mus musculus*)、野猪 (*Sus scrofa*)、黄杆菌属 (*Flavobacterium* sp)、金黄节杆菌 (*Arthrobacter*

aurescens)、产黄青霉菌 (*Penicillium chrysogenum*)、黑曲霉菌 (*Aspergillus niger*)、构巢曲霉菌 (*Aspergillus nidulans*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*)、曼海姆产琥珀酸菌 (*Mannheimia succiniciproducens*)、杨氏梭菌 (*Clostridium ljungdahlii*)、*Clostridium carboxydivorans*、嗜热脂肪土芽孢杆菌 (*Geobacillus stearothermophilus*)、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、反硝化无色杆菌 (*Achromobacter denitrificans*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*)、发酵氨基酸球菌 (*Acidaminococcus fermentans*)、梭菌属 M62/1 (*Clostridium* sp. M62/1)、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)，以及本文公开的或作为相应基因的来源生物体可获得的其他示例性物种 (参见实施例)。然而，在现在可以获得的 550 个以上的物种的全基因组序列 (这些中超过一半可在公共数据库诸如 NCBI 上获得)，包括 395 个微生物基因组和大量的酵母、真菌、植物、和哺乳动物基因组的情况下，对于相关或关系较远的物种中的一种或多种基因，鉴定编码必要的己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成活性的基因，包括例如已知基因的同源、直向同源物、旁系同源物和非直向同源基因置换，和生物体之间遗传改变的互换，是本领域中常规的和公知的。因此，能够实现本文关于特定生物体诸如大肠杆菌所描述的己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的生物合成的代谢改变可以容易地应用于其他微生物，同样地包括原核和真核生物。鉴于本文提供的教导和指导，本领域技术人员将知晓在一个生物体中举例说明的代谢改变可以同样地应用于其他生物体。

[0068] 在一些情况下，诸如当可替代的己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成途径存在于不相关物种中时，己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成可以通过，例如，来自不相关物种的催化类似的但不相同的代谢反应以代替参照反应的一种或多种旁系同源物的外源表达而赋予宿主物种。因为在不同的生物体之间存在有代谢网络间的某些差异，因此本领域技术人员将理解不同生物体之间的实际基因利用可以发生变化。然而，鉴于本文提供的教导和指导，本领域技术人员还将理解本发明的教导和方法可以使用本文例举的那些的同类代谢改变应用于所有微生物生物体以构建将合成己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的目标物种的微生物生物体。

[0069] 宿主微生物生物体可以选自，并且非天然存在的微生物生物体可以产生自，例如，细菌、酵母、真菌或可应用于发酵方法的多种其他微生物中的任一种。示例性的细菌包括选自大肠杆菌、奥克西托克雷白杆菌 (*Klebsiella oxytoca*)、产琥珀酸厌氧螺旋菌 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)、产琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*)、曼海姆产琥珀酸菌、埃特里根瘤菌 (*Rhizobium etli*)、枯草芽孢杆菌、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*)、运动发酵单胞菌、乳酸乳球菌、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、天蓝色链霉菌、丙酮丁醇梭菌、荧光假单胞菌、和恶臭假单胞菌的物种。示例性的酵母或真菌包括选自酿酒酵母、裂殖酵母、克鲁维酵母、马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*)、土曲霉菌、黑曲霉菌和毕赤酵母的物种。例如，大肠杆菌是特别有用的宿主生物体，因为它是一种适合于遗传工程改造的受到充分表征的微生物生物体。其他特别有用的宿主生物体包括酵母诸如酿酒酵母。

[0070] 用于构建和测试非天然存在的产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的宿主的表

达水平的方法可以通过,例如,本领域中公知的重组和检测方法来进行。这些方法可参见,例如, Sambrook 等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (分子克隆:实验室指南), 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001); 和 Ausubel 等, *Current Protocols in Molecular Biology* (现代分子生物学技术), John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)。

[0071] 参与产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的途径中的外源核酸序列可以使用本领域中公知的技术而稳定地或瞬时地引入至宿主细胞中,所述技术包括,但不限于,接合、电穿孔、化学转化、转导、转染、和超声转化。对于在大肠杆菌或其他原核细胞中的外源表达,真核生物核酸的基因或 cDNA 中的一些核酸序列可以编码靶向信号诸如 N-端线粒体或其他靶向信号,如果需要它们可以在转化至原核生物宿主细胞中之前被去除。例如,线粒体前导序列的去除导致大肠杆菌中的增加表达 (Hoffmeister 等, *J. Biol. Chem.* 280 : 4329-4338 (2005))。对于在酵母或其他真核细胞中的外源表达,基因可以在胞液中表达,无需加入前导序列,或可以通过加入适合于宿主细胞的适当的靶向序列诸如线粒体靶向或分泌信号而靶向至线粒体或其他细胞器,或靶向分泌。因此,要理解,对核酸序列的去除或包含靶向序列的适合修饰可以结合至外源核酸序列中以赋予其所需的特性。此外,基因可以使用本领域中公知的技术进行密码子优化以实现蛋白质的最佳表达。

[0072] 可以构建一种或多种表达载体以包含与宿主生物体中有功能的表达控制序列可操作地连接的如本文所列举的一个或多个编码己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成途径的核酸。可应用于本发明的微生物宿主生物体的表达载体包括,例如,质粒、噬菌体载体、病毒载体、附加体和人工染色体,包括可操作用于稳定的整合入宿主染色体中的载体和选择序列或标记。另外,表达载体包括一个或多个选择性标记基因和适当的表达控制序列。例如,还可以包括提供对抗生素或毒素的抗性、补充营养缺陷性缺乏、或供应培养基中不包含的关键营养素的选择性标记基因。表达控制序列可以包括本领域中公知的组成型和诱导型启动子、转录增强子、转录终止子等。当两种或多种外源编码核酸要共表达时,两种核酸可以插入至,例如单一表达载体中或独立的表达载体中。对于单一载体表达,编码核酸可以可操作性地连接至一条共有表达控制序列或连接至不同的表达控制序列,诸如一个诱导型启动子和一个组成型启动子。参与代谢或合成途径的外源核酸序列的转化可以使用本领域中公知的方法来确认。此类方法包括,例如,核酸分析诸如 mRNA 的 Northern 印迹或聚合酶链式反应 (PCR) 扩增,或用于基因产物表达的免疫印迹,或用于测试引入的核酸序列或其相应的基因产物的表达的其他合适的分析方法。本领域技术人员要理解,外源核酸以足以产生所需产物的量表达,并且进一步要理解,表达水平可以使用本领域中公知的和如本文中公开的方法进行优化以获得充分的表达。

[0073] 本发明另外提供了用于产生所需产物诸如己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的方法。在一个实施方案中,本发明提供了一种用于产生己二酸的方法,包括在产生己二酸的条件和足以产生己二酸的时间内培养具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体,所述途径包含以足以产生己二酸的量表达的至少一种编码己二酸途径酶的外源性核酸,所述己二酸途径包括琥珀酰-CoA :乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶、3-羟基己二酰-CoA 脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶和己二酰-CoA 合成酶或磷酸己二酰转移酶/己二酸激酶或己二酰-CoA :乙酰-CoA 转移酶或己二酰-CoA 水解酶。在另一个实施方案中,本发

明提供了一种用于产生己二酸的方法,包括在产生己二酸的条件和足以产生己二酸的时间内培养具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体,所述途径包含以足以产生己二酸的量表达的至少一种编码己二酸途径酶的外源性核酸,所述己二酸途径包括琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-氧代己二酰-CoA 转移酶、3-氧代己二酸还原酶、3-羟基己二酸脱水酶和 2-烯酸还原酶。

[0074] 还在另一个实施方案中,本发明提供了一种用于产生 6-氨基己酸的方法,包括在产生 6-氨基己酸的条件和足以产生 6-氨基己酸的时间内培养具有 6-氨基己酸途径的非天然存在的微生物生物体,所述途径包含以足以产生 6-氨基己酸的量表达的至少一种编码 6-氨基己酸途径酶的外源性核酸,所述 6-氨基己酸途径包括 CoA-依赖性醛脱氢酶和转氨酶或 6-氨基己酸脱氢酶。在进一步的实施方案中,本发明提供了一种用于产生己内酰胺的方法,包括在产生己内酰胺的条件和足以产生己内酰胺的时间内培养具有己内酰胺途径的非天然存在的微生物生物体,所述途径包含以足以产生己内酰胺的量表达的至少一种编码己内酰胺途径酶的外源性核酸,所述己内酰胺途径包括 CoA-依赖性醛脱氢酶、转氨酶或 6-氨基己酸脱氢酶和酰胺水解酶。

[0075] 本发明另外提供了一种用于产生己二酸的方法,包括在产生己二酸的条件和足以产生己二酸的时间内培养具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体,所述途径包含以足以产生己二酸的量表达的至少一种编码己二酸途径酶的外源性核酸,所述己二酸途径包括  $\alpha$ -酮己二酰-CoA 合成酶、磷酸酮己二酰转移酶/ $\alpha$ -酮己二酸激酶或  $\alpha$ -酮己二酰-CoA:乙酰-CoA 转移酶;2-羟基己二酰-CoA 脱氢酶;2-羟基己二酰-CoA 脱水酶;5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶;和己二酰-CoA 合成酶、磷酸己二酰转移酶/己二酸激酶、己二酰-CoA:乙酰-CoA 转移酶或己二酰-CoA 水解酶。

[0076] 还在另一个实施方案中,本发明提供了一种用于产生己二酸的方法,包括在产生己二酸的条件和足以产生己二酸的时间内培养具有己二酸途径的非天然存在的微生物生物体,所述途径包含以足以产生己二酸的量表达的至少一种编码己二酸途径酶的外源性核酸,所述己二酸途径包括 2-羟基己二酸脱氢酶;2-羟基己二酰-CoA 合成酶、磷酸羟基己二酰转移酶/2-羟基己二酸激酶或 2-羟基己二酰-CoA:乙酰-CoA 转移酶;2-羟基己二酰-CoA 脱水酶;5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶;和己二酰-CoA 合成酶、磷酸己二酰转移酶/己二酸激酶、己二酰-CoA:乙酰-CoA 转移酶或己二酰-CoA 水解酶。

[0077] 可以使用公知的方法进行适当的纯化和/或检测己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的产生的测定。对于待检测的每种工程菌株可以生长适当的复制物诸如一式三份培养物。例如,可以监测被改造的生产宿主中的产物和副产物形成。终产物和中间体,和其他有机化合物可以通过诸如 HPLC(高效液相色谱)、GC-MS(气相色谱-质谱)和 LC-MS(液相色谱-质谱)的方法使用本领域中公知的常规操作来分析。产物在发酵液中的释放还可以使用培养上清液来检测。副产物和残余的葡萄糖可以使用,例如,用于葡萄糖和醇的折射率检测器,和用于有机酸的 UV 检测器通过 HPLC(Lin 等, *Biotechnol. Bioeng.* 90:775-779(2005)),或本领域中公知的其他适当的测定法和检测方法来定量。来自外源 DNA 序列的各酶的活性还可以使用本领域中公知的方法来测定。

[0078] 己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺可以使用本领域中公知的多种方法与培养物中的其他组分分离。所述分离方法包括,例如,萃取方法以及包括连续液-液萃取、渗透蒸发、膜

过滤、膜分离、反渗透、电渗析、蒸馏、结晶、离心、萃取过滤、离子交换色谱、尺寸排阻色谱、吸附色谱和超滤的方法。所有上述的方法在本领域中均是公知的。

[0079] 本文所述的任何非天然存在的微生物生物体可以被培养以产生和 / 或分泌本发明的生物合成产物。例如, 己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生产体可以被培养用于生物合成产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺。

[0080] 对于己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的产生, 重组株培养在含有碳源和其他必需营养素的培养基中。非常需要在发酵罐中保持厌氧条件以减少总工艺的成本。所述条件可以例如, 通过首先用氮气喷射培养基, 然后用隔膜和压线帽 (crimp-cap) 密封烧瓶来获得。对于在厌氧条件下未观察到生长的菌株, 可以通过将隔膜穿以小孔用于限量通气来施加微氧条件。示例性的厌氧条件先前已有描述并且在本领域中是公知的。示例性的需氧和厌氧条件描述在, 例如, 于 2007 年 8 月 10 日申请的美国专利申请系列号 11/891,602 中。发酵可以如本文公开的那样, 以分批、分批补料或连续的方式进行。

[0081] 如果需要, 培养基的 pH 可以根据需要通过加入碱, 诸如 NaOH 或其他碱, 或酸保持在所需的 pH, 尤其是中性 pH, 诸如约 7 的 pH, 从而将培养基保持在所需的 pH。生长速率可以通过使用分光光度计 (600nm) 测量光密度来测定, 葡萄糖摄取速率可以通过监测碳源随时间的消耗来确定。

[0082] 生长培养基可以是, 例如, 任何碳水化合物来源。其可以向非天然存在的微生物供应碳源。所述来源包括, 例如, 糖类诸如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、果糖和淀粉。碳水化合物的其他来源包括, 例如, 可再生的原料和生物质。可以用作本发明的方法中的原料的示例类型的生物质包括纤维质生物质、半纤维质生物质和木质素原料或原料的部分。此类生物质原料含有, 例如, 用作碳源的碳水化合物底物诸如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、果糖和淀粉。鉴于本文提供的教导和指导, 本领域技术人员会理解, 除了上面例举的那些以外的可再生的原料和生物质也可以用于培养本发明的微生物生物体以产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺。

[0083] 除了诸如上面所例举的那些可再生的原料以外, 本发明的己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺微生物生物体还可以被修饰用于靠合成气作为其碳源而生长。在此具体实施方案中, 一种或多种蛋白质或酶在产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的生物体中表达以提供用于利用合成气或其他气态碳源的代谢途径。

[0084] 合成气体, 也称为合成气或发生炉煤气, 是煤和含碳物质诸如生物质材料包括农作物和残渣的气化的主要产物。合成气是主要含有  $H_2$  和 CO 的混合物, 并且可以获自任何有机原料的气化, 所述有机原料包括但不限于煤、煤油、天然气、生物质和有机废料。气化通常在高燃料 / 氧比率下进行。尽管主要含  $H_2$  和 CO, 但合成气还可以包括较小量的  $CO_2$  和其他气体。因此, 合成气体提供气态碳诸如 CO 和另外地  $CO_2$  的廉价来源。

[0085] Wood-Ljungdahl 途径催化 CO 和  $H_2$  转变为乙酰 -CoA 和其他的产物诸如乙酸。能够利用 CO 和合成气的生物体还通常具有通过 Wood-Ljungdahl 途径所包含的相同的一组基本的酶和转变作用来利用  $CO_2$  和  $CO_2/H_2$  混合物的能力。在揭示 CO 也可以由同一微生物利用和相同的途径被包括在内之前很长一段时间以来, 认为微生物将  $CO_2$  转变为乙酸是  $H_2$ - 依赖性的。许多产乙酸菌已经显示在  $CO_2$  的存在下生长, 并且产生诸如乙酸的化合物, 只要存在氢以供应必需的还原当量 (参见, 例如, Drake, Acetogenesis, 3-60 页, Chapman 和 Hall,

New York, (1994))。这可以通过下列的等式来概括：



[0087] 因此,具有 Wood-Ljungdahl 途径的非天然存在的微生物可以同样地利用  $\text{CO}_2$  和  $\text{H}_2$  混合物以产生乙酰 -CoA 和其他所需的产物。

[0088] Wood-Ljungdahl 途径在本领域中是公知的,并且由 12 个反应组成,这些反应可以分成两个支路:(1) 甲基支路和 (2) 羰基支路。甲基支路将合成气转变为甲基四氢叶酸酯(甲基 -THF),而羰基支路将甲基 -THF 转变为乙酰 -CoA。甲基支路中的反应由以下酶按次序催化:铁氧还蛋白氧化还原酶、甲酸脱氢酶、甲酰四氢叶酸合成酶、次甲基四氢叶酸环化脱水酶、亚甲基四氢叶酸脱氢酶和亚甲基四氢叶酸还原酶。羰基支路中的反应由下列酶按次序催化:钴胺素类咕啉(cobalamide corrinoid)/铁-硫蛋白、甲基转移酶、一氧化碳脱氢酶、乙酰 -CoA 合成酶、乙酰 -CoA 合成酶二硫化物还原酶和氢化酶。根据本文提供的用于引入足够数量的编码核酸以产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径的教导和指导,本领域技术人员将理解,对于至少引入宿主生物体中缺少的编码 Wood-Ljungdahl 酶的核酸,也可以进行相同的改造设计。因此,将一种或多种编码核酸引入至本发明的微生物生物体中使得被修饰的生物体含有完整的 Wood-Ljungdahl 途径,将赋予合成气利用能力。

[0089] 鉴于本文提供的教导和指导,本领域技术人员将理解可以产生这样的非天然存在的微生物生物体,当其靠碳源诸如碳水化合物生长时其分泌本发明的生物合成化合物。此类化合物包括,例如,己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺和己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径中的任一种中间代谢物。所有必需的工作是改造一种或多种必需的酶活性以实现所需化合物或中间体的生物合成,包括,例如,包含己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生物合成途径的一些或全部。因此,本发明提供了一种非天然存在的微生物生物体,当其靠碳水化合物生长时产生和/或分泌己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺,并且当其靠碳水化合物生长时其产生和/或分泌己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径中显示的任一种中间代谢物。例如,本发明的产生己二酸的微生物生物体可以根据需要从中间体启动合成,所述中间体例如 3-氧代己二酰 -CoA、3-羟基己二酰 -CoA、5-羧基-2-戊烯酰 -CoA 或己二酰 -CoA(参见图 2)。另外,产生己二酸的微生物生物体可以从中间体,例如,3-氧代己二酰 -CoA、3-氧代己二酸、3-羟基己二酸或己-2-烯二酸盐启动合成(参见图 3)。本发明的产生 6-氨基己酸的微生物生物体可以从中间体启动合成,所述中间体例如,己二酸半醛(参见图 8)。本发明的产生己内酰胺的微生物生物体可以根据需要从中间体启动合成,所述中间体例如己二酸半醛或 6-氨基己酸(参见图 8)。

[0090] 本发明的非天然存在的微生物生物体使用如本文所列举的本领域中公知的方法来构建,从而外源性地以足以产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的量表达至少一种编码己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺途径酶的核酸。要理解,本发明的微生物生物体在足以产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的条件下培养。根据本文提供的教导和指导,本发明的非天然存在的微生物生物体可以实现产生约 0.1-200mM 之间或以上的细胞内浓度的己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的生物合成。通常,己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的细胞内浓度在约 3-150mM 之间,尤其是约 5-125mM 之间,和更优选约 8-100mM 之间,包括约 10mM、20mM、50mM、80mM 或更大。这些示例性范围中的每一个之间和以上的细胞内浓度也可以由本发明的非天然存在的微生物生物体来实现。

[0091] 在一些实施方案中,培养条件包括厌氧的或基本上厌氧的生长或维持条件。示例性的厌氧条件先前已有描述并且在本领域中是公知的。示例性的用于发酵工艺的厌氧条件描述在本文中,且描述在例如,于2007年8月10日申请的美国专利申请系列号11/891,602中。这些条件中的任一种条件以及本领域中公知的其他厌氧条件可以用于所述非天然存在的微生物生物体。在这些厌氧条件下,己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生产株可以以5-10mM或更高的细胞内浓度以及本文中例举的其他浓度合成己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺。要理解,即使上面的描述提到了细胞内浓度,产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的微生物生物体可以在细胞内产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺和/或将产物分泌至培养基中。

[0092] 培养条件可以包括,例如,液体培养方法以及发酵和其他大规模培养方法。如本文所述,在厌氧或基本上厌氧的培养条件下可以获得特别有用的产量的本发明的生物合成产物。

[0093] 如本文所述,用于实现己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的生物合成的一种示例性生长条件包括厌氧培养或发酵条件。在某些实施方案中,本发明的非天然存在的微生物生物体可以在厌氧或基本上厌氧的条件下维持、培养或发酵。简言之,厌氧条件指缺少氧的环境。基本上厌氧的条件包括,例如,培养基中的溶解氧浓度保持在0和10%之间的饱和度的培养、分批发酵或发酵。基本上厌氧的条件还包括使细胞在保持以小于1%氧的气氛的密封室内在液体培养基中或固体琼脂上生长或休眠。氧的百分比可以通过,例如,用N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>混合物或其他合适的一种或多种非氧气体喷射培养物来保持。

[0094] 本文所述的培养条件可以按比例放大和连续生长用于制造己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺。示例性的生长方法包括,例如,分批补料发酵和分批分离;分批补料发酵和连续分离,或连续发酵和连续分离。所有这些方法在本领域中是公知的。发酵方法对于生物合成商用量的己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺是特别有用的。通常,并且当采用非连续的培养方法,连续和/或接近连续的产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺将包括在充足的营养素和培养基中培养本发明的非天然存在的产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的生物体,从而将生长保持和/或几乎保持在指数生长期。在此类条件下的连续培养可以包括,例如,1天、2、3、4、5、6或7天或更多天。另外,连续培养可以包括1周、2、3、4或5或更多周,并且可达几个月。备选地,如果对于具体应用是合适的,本发明的生物体可以培养几小时。要理解,连续和/或接近连续的培养条件也可以包括这些示例性期间之间的所有时间间隔。要进一步理解,培养本发明的微生物生物体的时间持续足够的时间段以产生足量的产物用于所期望的目的。

[0095] 发酵方法在本领域中是公知的。简言之,用于生物合成产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的发酵可以被利用,例如,分批补料发酵和分批分离;分批补料发酵和连续分离,或连续发酵和连续分离。分批和连续发酵方法的实例在本领域中是公知的。

[0096] 除了上面使用本发明的己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生产株用于连续生产大量己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺的发酵方法以外,己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺生产株还可以,例如,同时地进行化学合成方法,从而将产物转变为其他化合物,或产物可以从发酵培养物中分离并且连续地进行化学转变作用,从而将产物转变为其他化合物,如果需要的话。如本文所述,利用3-氧代己二酸、己-2-烯二酸盐的己二酸途径中的中间体,可以通

过在铂催化剂上的化学氢化作用转变为己二酸（参见实施例 III）。

[0097] 为了生成较好的生产株，可以利用代谢建模来优化生长条件。还可以使用建模来设计基因敲除，从而额外地优化该途径的利用（参见，例如，美国专利公开号 US 2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US 2003/0059792、US 2002/0168654 和 US 2004/0009466，和美国专利号 7, 127, 379）。建模分析允许可靠的预测朝向更有效地产生己二酸、6-氨基己酸或己内酰胺来改变代谢对细胞生长的作用。

[0098] 用于鉴定和设计促进所需产物的生物合成的代谢改变的一种计算方法是 OptKnock 计算框架，Burgard 等，*Biotechnol. Bioeng* 84 :647-657 (2003)。OptKnock 是一个代谢建模和模拟程序，其推荐基因缺失策略，该策略产生遗传上稳定的过度产生靶产物的微生物。具体地，该框架检验微生物的整个代谢和 / 或生物化学网络以便推荐遗传操作，迫使所需的生物物质变成细胞生长的固有副产物。通过经由策略性放置的基因缺失或其他功能性基因破坏将生物物质生产与细胞生长相联系，作为强制性的与生长相联系的生物物质生产的结果，在生物反应器中对工程菌株上长时间地施加生长选择压力引起性能的改进。最后，当构建基因缺失时，设计菌株回复为其野生型状态的可能性可以忽略不计，因为由 OptKnock 选择的基因从基因组中被完全去除。因此，此计算方法学可以用来鉴定引起所需产物的生物合成的可替代途径或用来与非天然存在的微生物生物体结合以进一步优化所需产物的生物合成。

[0099] 简言之，OptKnock 在本文中是用来指用于对细胞代谢建模的计算方法和系统的术语。OptKnock 程序涉及将特定的约束条件加入至通量平衡分析 (FBA) 模型中的模型和方法的框架。这些约束条件包括，例如，定性动力学信息、定性调节信息和 / 或 DNA 微阵列试验数据。OptKnock 还通过例如，固定通过通量平衡模型得到的通量界限，随后在存在基因添加或缺失的条件下探测代谢网络的性能极限，来计算对各种代谢问题的求解。OptKnock 计算框架允许构建能够有效地查询代谢网络的性能极限的模型设计，并且提供用于解决所得到的混合的整数线性规划问题的方法。本文所提到的代谢建模和模拟方法描述在，例如，于 2002 年 1 月 10 日申请的美国公开号 2002/0168654，于 2002 年 1 月 10 日申请的国际专利号 PCT/US02/00660，和于 2007 年 8 月 10 日申请的美国专利申请系列号 11/891, 602。

[0100] 用于鉴定和设计促进产物的生物合成生产的代谢改变的另一计算方法是称为 **SimPheny®** 的代谢建模和模拟系统。此计算方法和系统描述在，例如，于 2002 年 6 月 14 日申请的美国公开号 2003/0233218，和于 2003 年 6 月 13 日申请的国际专利申请号 PCT/US03/18838 中。**SimPheny®** 是一种可以用来经计算机模拟产生网络模型并且模拟通过生物系统的化学反应的质量、能量或电荷的通量，从而确定含有系统中的化学反应的任何和所有可能的功能性的解空间，从而确定对于该生物系统的允许活动范围的计算系统。该方法称为基于约束条件的建模，因为解空间由约束条件来限定，所述约束条件诸如被包含的反应的已知化学计量以及与通过反应的最大通量相关的反应热力学和容量约束条件。由这些约束条件限定的空间可以被询问以确定生物系统或其生化组分的表型能力和行为。

[0101] 这些计算方法符合生物学真实性，因为生物系统是灵活的并且可以以许多不同的方式达到相同的结果。生物系统通过进化机制设计，该机制已经受到所有有生命系统所必须面对的基本约束条件的限制。因此，基于约束条件的建模策略包含这些普遍的真实性。此外，经由固定约束条件对网络模型连续施加进一步的限制的能力导致解空间的容量缩小，

从而增加了可以预测生理性能或表型的精确度。

[0102] 鉴于本文提供的教导和指导,本领域技术人员将能够应用代谢建模和模拟的各种计算框架以设计和实施在宿主微生物生物体中所需的化合物的生物合成。这些代谢建模和模拟方法包括,例如,上面作为**SimPheny®**和 OptKnock 例举的计算系统。为了举例说明本发明,在本文中参照用于建模和模拟的 OptKnock 计算框架进行描述了一些方法。本领域技术人员将知晓如何将使用 OptKnock 鉴定、设计和实施代谢改变应用于本领域公知的任一种此类其他代谢建模和模拟计算框架和方法中。

[0103] 上述的方法将提供一组待破坏的代谢反应。在该组内去除各种反应或代谢修饰可以在生物体的生长期期间以固有产物产生所需产物。因为反应是已知的,因此对双相(bilevel)OptKnock 问题的求解还将提供编码催化该组反应内的每个反应的一种或多种酶的一种或多种相关基因。鉴定一组反应和它们相应的编码参与每个反应的酶的基因通常是自动化过程,通过将所述反应与具有酶和编码基因之间的关系的反应数据库关联来完成。

[0104] 一旦被鉴定,待被破坏以便实现所需产物的产生的该组反应通过功能性破坏至少一种编码该组反应内的每个代谢反应的基因,而在靶细胞或生物体中实施。实现该反应组的功能性破坏的一种特别有用的方式是通过删除每种编码基因。然而,在一些情况下,通过下述方法来破坏反应可能是有益的,即通过其他遗传畸变,包括,例如,调控区诸如启动子或调控因子的顺式结合位点的突变、缺失,或通过许多位置中的任一个位置处截断编码序列。导致该组基因不足全部的缺失的后面这些畸变可能是有用的,例如,当需要快速评估产物的联系时,或当遗传回复变异不太可能发生时。

[0105] 为了鉴定对上述双相 OptKnock 问题的其他生产性解决方案,这些方案产生更多组被破坏的反应或可以产生生物合成(包括所需产物的生长偶联的生物合成)的代谢修饰,可以实施称为整数切割(integer cut)的优化方法。此方法通过采用在每次迭代求解时加入称为整数切割的附加约束条件来迭代求解上面例举的 OptKnock 问题而进行。整数切割约束条件有效地防止了求解程序选择在先前的任一次迭代中鉴定的同一组反应,该组反应强制性地使产物的生物合成与生长偶联在一起。例如,如果先前鉴定的与生长偶联的代谢修饰规定反应 1、2 和 3 用于破坏,则下面的约束条件阻止该相同的反应同时被随后的求解考虑。整数切割法在本领域中是公知的,并且其描述可参见,例如, Burgard 等, *Biotechnol. Prog.* 17 :791-797 (2001)。如参照与用于代谢建模和模拟的 OptKnock 计算框架的结合使用而采用本文所述的所有方法那样,在迭代计算分析中减少冗余度的整数切割法还可以本领域中公知的其他计算框架来应用,包括,例如, **SimPheny®**。

[0106] 本文例举的方法允许构建生物合成性产生所需产物的细胞和生物体,包括靶生物化产物的产生与被改造以携带经鉴定的遗传改变的细胞或生物体的生长的强制性偶联。因此,本文所述的计算方法允许鉴定和实施通过选自 OptKnock 或 **SimPheny®** 的计算机模拟方法鉴定的代谢修饰。该组代谢修饰可以包括,例如,加入一种或多种生物合成途径酶和/或一个或多个代谢反应的功能性破坏,包括,例如,通过基因缺失的破坏。

[0107] 如上所述, OptKnock 方法学的开发基于这样的前提,即,当进行长期的生长选择时,突变的微生物网络可以朝向其计算预测的最大生长表型进化。换句话说,该方法放大了生物体在选择压力下自我优化的能力。OptKnock 框架允许穷尽地列举基因缺失组合,该组合迫使生物物质的产生和细胞生长之间基于网络化学计量的偶联。最佳基因/反应敲除的

鉴定需要双相优化问题的求解,该求解选择一组活性反应使得用于所生成的网络的最佳生长解过量地产生目标生物物质 (Burgard 等, *Biotechnol. Bioeng.* 84 :647-657 (2003))。

[0108] 大肠杆菌代谢的计算机模拟化学计量模型可以用来鉴定用于代谢途径的必要基因,如先前所列举的和在例如,美国专利公开号 US 2002/0012939、US2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US 2003/0059792、US2002/0168654 和 US 2004/0009466,以及美国专利号 7,127,379 中所描述的那样。如本文所公开的,OptKnock 数学框架可以用来精确地定位引起与生长偶联地产生所需产物的基因缺失。此外,双相 OptKnock 问题的求解仅提供一组缺失。为了列举所有有意义的求解,即,引起与生长偶联的产物形成的所有敲除组,可以实施称为整数切割的优化技术。如上所述,这必需采用在每次迭代求解时加入称为整数切割的附加约束条件,而迭代求解 OptKnock 问题。

[0109] 要理解,在本文提供的本发明的定义内还提供了基本上不影响本发明的各种实施方案的作用的修改形式。因此,下面的实施例意在说明而非限制本发明。

[0110] 实施例 I

[0111] 逆向己二酸降解途径

[0112] 本实施例描述经由逆向己二酸降解途径的示例性的己二酸合成途径。

[0113] 诸如产黄青霉菌的生物体具有天然地降解己二酸的能力 (Thykaer 等, *Metab. Eng.* 4 :151-158. (2002))。该机制类似于脂肪酸的氧化 (参见图 1)。己二酸降解中的第一个步骤是 ATP 依赖性降解反应,该反应用 CoA 活化己二酸。第二个反应由从己二酰 -CoA 形成 5-羧基 -2-戊烯酰 -CoA 的脱氢酶催化。在过氧化物酶体己二酸降解期间,脱氢酶含有 FAD,其接受电子然后将它们直接传递给氧。过氧化氢酶分解通过氧的还原形成的  $H_2O_2$ 。在线粒体的脂肪酸氧化中,来自脱氢酶的 FAD 将电子直接传递给电子传递链。真核生物诸如酿酒酵母和产黄青霉菌中的多功能脂肪酸氧化蛋白执行下列的水合酶和脱氢酶步骤。最终步骤是酰基转移酶,其将 3-氧代己二酰 CoA 拆分为乙酰 -CoA 和琥珀酰 -CoA。

[0114] 通过遗传改变微生物使得类似的酶反应被用于从琥珀酰 -CoA 和乙酰 -CoA 合成己二酸,从而实现产生己二酸的高度有效的途径 (参见图 2)。此方法的成功实施必需表达合适的基因,定制它们的表达,并且改变培养条件使得高的乙酰 -CoA、琥珀酰 -CoA 和 / 或氧化还原 (例如, NADH/NAD<sup>+</sup>) 比将驱动代谢通量通过此途径朝向己二酸合成方向而非降解方向。与梭菌中的丁酸形成 (Kanehisa 和 Goto, *Nucl. Acids Res.* 28 :27-30 (2000)) 的非常类似之处,支持了下面的观点,即己二酸合成途径中的每个步骤在热力学上是可行的,其反应方向性通过由其中参与的代谢物的浓度控制。由己二酰 -CoA 形成己二酸的最终步骤可以经合成酶、磷酸己二酰转移酶 / 激酶、转移酶或水解酶机制发生。

[0115] 在存在和缺少外部电子受体诸如氧的两种条件下计算使用此途径己二酸的最大理论产率。这些计算显示该途径可以在厌氧条件下有效地将葡萄糖转变为己二酸和 CO<sub>2</sub>, 产率为 92 摩尔% (表 I)。使用此途径产生己二酸不需要摄取氧,因为 NAD<sup>+</sup> 可以在两个氢化酶步骤中再生,该氢化酶步骤形成 3-羟基己二酰 -CoA 和己二酰 -CoA (参见图 2)。此外,该途径在能量学方面是有利的,因为假设合成酶、磷酸己二酰转移酶 / 激酶或转移酶机制用于最终的转变步骤,在己二酸的最大理论产率时每摩尔消耗的葡萄糖形成至多达 1.55 摩尔的 ATP。如果假定磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PPCK) 在朝向草酰乙酸形成的 ATP 生成方向中发挥作用,则 ATP 产量可以进一步提高至每摩尔葡萄糖产生 2.47 摩尔 ATP。假设己

二酰 -CoA 转变为己二酸是水解步骤,则进行最大 ATP 产量计算。如果 PPCK 被假设为不可逆的和可逆的,则这将最大己二酸产量时的最大 ATP 产量分别降低至每摩尔消耗的葡萄糖 0.85 和 1.77 摩尔 ATP。然而,这些 ATP 产量足以用于细胞生长、维持和生产。

[0116] 表 1:使用逆分解途径每摩尔葡萄糖的己二酸的最大理论产率和相关的 ATP 产量,假设该途径中的最终步骤是合成酶、磷酸己二酰转移酶 / 激酶、或转移酶。

		需氧	厌氧
	己二酸产率	0.92	0.92
[0117]	最大 ATP 产量@ 最大己二酸产率	1.55	1.55
	最大 ATP 产量@ 最大己二酸产率 假设 PPCK	2.47	2.47

[0118] 成功地改造此途径包括鉴定适当组的具有充分的活性和特异性的酶。这必需鉴定适当组的酶,将其相应的基因克隆进生产宿主中,优化发酵条件和测定发酵后的产物形成。为了改造用于产生己二酸的生产宿主,一种或多种外源 DNA 序列在适当的宿主生物体中表达。另外,该微生物可以具有功能缺失的一种或多种内源基因。这些修饰作用允许使用可再生的原料产生己二酸。

[0119] 下面描述了许多已经生化表征的候选基因,它们编码催化生产宿主中逆向己二酸降解途径的每个步骤的酶。尽管使用大肠杆菌作为宿主生物体来改造该途径进行了描述,但可以使用基本上任何适当的宿主生物体。具体列举的是大肠杆菌的天然基因以及当被正确地克隆和表达时可以用来催化适当的转变作用的其他生物体中的基因。

[0120] 参照图 2,步骤 1 包括琥珀酰 CoA :乙酰 CoA 酰基转移酶 ( $\beta$ -酮硫解酶)。该途径中的第一个步骤将乙酰 -CoA 和琥珀酰 -CoA 化合以形成 3-氧代己二酰 -CoA。由假单胞菌株 B13 中的 *pcaF* (Kaschabek 等, J. Bacteriol. 184 :207-215(2002))、恶臭假单胞菌 U 中的 *phaD* (Olivera 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 :6419-6424(1998))、荧光假单胞菌 ST 中的 *paaE* (Di Gennaro 等, Arch. Microbiol. 188 :117-125(2007)) 和来自大肠杆菌的 *paaJ* (Nogales 等, Microbiol. 153 :357-365(2007)) 编码的基因产物催化芳族化合物诸如苯乙酸或苯乙烯的降解期间 3-氧代己二酰 -CoA 向琥珀酰 -CoA 和乙酰 -CoA 的转变。由于  $\beta$ -酮硫解酶催化可逆的转变作用,因此这些酶可以用于图 2 中显示的己二酸合成中的第一个步骤。例如,来自真氧产碱菌 (*R. eutropha*) 的酮硫解酶 *phaA* 将两分子的乙酰 -CoA 化合形成乙酰乙酰 -CoA (Sato 等, J. Biosci. Bioengineer. 103 :38-44(2007))。类似地,已经报道在真氧产碱菌中  $\beta$ -酮硫解酶 (*bktB*) 催化乙酰 -CoA 和丙酰 -CoA 缩合以形成  $\beta$ -酮戊酰 -CoA (Slater 等, J. Bacteriol. 180 :1979-1987(1998))。上面提到的基因产物的蛋白质序列在本领域中是公知的,并且可以使用下列的登录号而进入至公共数据库诸如 GenBank 中。

[0121] 基因名称 GenBank 登录号 # 生物体

[0122] *paaJ* NP\_415915.1 大肠杆菌

[0123] *pcaF* AAL02407 *Pseudomonas knackmussii* (B13)

[0124] *phaD* AAC24332.1 恶臭假单胞菌

[0125] *paaE* ABF82237.1 荧光假单胞菌

[0126] 这些示例性序列可以用来通过序列相似性搜索（例如，BLASTp）鉴定 GenBank 或其他数据库中的同源蛋白。得到的同源蛋白和它们相应的基因序列提供额外的外源 DNA 序列用于转化至大肠杆菌或其他合适的宿主微生物中以产生生产宿主。

[0127] 例如，使用下列的 GenBank 登录号可以发现来自大肠杆菌 K12 的 paaJ 的直向同源物：

[0128] YP\_001335140.1 肺炎克雷伯菌

[0129] YP\_001479310.1 变形斑沙雷菌

[0130] AAC24332.1 恶臭假单胞菌

[0131] 使用下列的 GenBank 登录号可以发现来自 *Pseudomonas knackmussii* 的 paaF 的直向同源物实例：

[0132] AAD22035.1 链霉菌属 2065

[0133] AAN67000.1 恶臭假单胞菌

[0134] ABJ15177.1 铜绿假单胞菌

[0135] 用于酮硫解酶步骤的其他天然候选基因包括 atoB（其可以催化 2 个乙酰-CoA 分子的可逆缩合（Sato 等, *J. Biosci. Bioengineer.* 103 :38-44(2007)））以及其同源物 yqeF。非天然候选基因包括来自真氧产碱菌的 phaA（Sato 等, 见前, 2007）和 bktB（Slater 等, *J. Bacteriol.* 180 :1979-1987(1998)），和来自丙酮丁醇梭菌的两种酮硫解酶, thiA 和 thiB（Winzer 等, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2 :531-541(2000)）。使用下列的 GenBank 登录号可以发现这些示例性基因产物的每一个的蛋白质序列：

[0136] atoB NP\_416728.1 大肠杆菌

[0137] yqeF NP\_417321.2 大肠杆菌

[0138] phaA YP\_725941 真氧产碱菌

[0139] bktB AAC38322.1 真氧产碱菌

[0140] thiA NP\_349476.1 丙酮丁醇梭菌

[0141] thiB NP\_149242.1 丙酮丁醇梭菌

[0142] 参照图 2, 步骤 2 包括 3- 羟酰-CoA 脱氢酶。该途径中的第二个步骤包括 3- 氧代己二酰-CoA 还原为 3- 羟基己二酰-CoA。由恶臭假单胞菌 U 中的 phaC（Olivera 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 :6419-6424(1998)）和荧光假单胞菌 ST 中的 paaC（Di Gennaro 等, *Arch. Microbiol.* 188 :117-125(2007)）编码的基因产物催化苯乙酸或苯乙烯的分解代谢期间的逆反应, 即, 氧化 3- 羟基己二酰-CoA 以形成 3- 氧代己二酰-CoA。由这些脱氢酶催化的反应是可逆的, 因此这些基因代表执行如图 2 中显示的己二酸合成的第二个步骤的候选基因。类似的转变作用也由丙酮丁醇梭菌中的 hbd 的基因产物执行（Atsumi 等, *Metab. Eng.* (epub Sep. 14, 2007) ; Boynton 等, *J. Bacteriol.* 178 :3015-3024(1996)）。此酶将乙酰乙酰-CoA 转变为 3- 羟基丁酰-CoA。最后, 鉴于苯乙酸降解操纵子中 paaH 与其他基因在大肠杆菌中接近（Nogales 等, *J. Microbiol.* 153 :357-365(2007)）以及 paaH 突变体不能依赖苯乙酸生长这一事实（Ismail 等, *Eur. J. Biochem.* 270 :3047-3054(2003)），预期大肠杆菌 paaH 基因编码 3- 羟酰-CoA 脱氢酶。使用下列的 GenBank 登录号可以发现这些示例性基因产物的每一个的蛋白质序列：

[0143] paaH NP\_415913.1 大肠杆菌

[0144] phaC NP\_745425.1 恶臭假单胞菌

[0145] paaC ABF82235.1 荧光假单胞菌

[0146] hbd NP\_349314.1 丙酮丁醇梭菌

[0147] 参照图 2, 步骤 3 包括 3- 羟基己二酰 -CoA 脱水酶。来自丙酮丁醇梭菌的 crt 的基因产物催化 3- 羟基丁酰 -CoA 脱水成为巴豆酰 -CoA (参见图 2) (Atsumi 等, 见前, 2007 ;Boynton 等, J. Bacteriol. 178 :3015-3024(1996))。此基因的同源物是执行图 2 中所列举的己二酸合成途径中的第三个步骤的强候选物。另外, 鉴于此类酶转变作用的可逆性, 已知催化烯酰 -CoA 化合物中双键的羟化的基因代表额外的候选物。例如, 恶臭假单胞菌的烯酰 -CoA 水合酶——phaA 和 phaB——被认为在苯乙酸分解代谢期间执行双键的羟化 (Olivera 等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 :6419-6424(1998)), 因此代表用于结合至大肠杆菌中的额外的候选物。这些基因的缺失导致在恶臭假单胞菌中不能降解苯乙酸。来自荧光假单胞菌的 paaA 和 paaB 催化类似的转变作用 (Olivera 等, 见前, 1998)。最后, 许多大肠杆菌基因已经显示证明了烯酰 -CoA 水合酶功能性, 包括 maoC (Park 和 Lee, J. Bacteriol. 185 :5391-5397(2003))、paaF (Ismail 等, Eur. J. Biochem. 270 :3047-3054(2003) ;Park 和 Lee, Biotechnol. Bioeng. 86 :681-686(2004) ;Park 和 Lee, Appl. Biochem. Biotechnol. 113-116 :335-346(2004)) 和 paaG (Ismail 等, 见前, 2003 ;Park 和 Lee, 见前, 2004 ;Park 和 Lee, 见前, 2004)。使用下列的 GenBank 登录号可以发现这些示例性基因产物的每一个的蛋白质序列:

[0148] maoC NP\_415905.1 大肠杆菌

[0149] paaF NP\_415911.1 大肠杆菌

[0150] paaG NP\_415912.1 大肠杆菌

[0151] crt NP\_349318.1 丙酮丁醇梭菌

[0152] paaA NP\_745427.1 恶臭假单胞菌

[0153] paaB NP\_745426.1 恶臭假单胞菌

[0154] phaA ABF82233.1 荧光假单胞菌

[0155] phaB ABF82234.1 荧光假单胞菌

[0156] 备选地,  $\beta$ -氧化基因是己二酸合成中前三个步骤的候选物。所提出的己二酸合成途径的候选基因还包括大肠杆菌的天然脂肪酸氧化基因和其他生物体中它们的同源物。大肠杆菌基因 fadA 和 fadB 编码多酶复合物, 所述多酶复合物显示酮脂酰 -CoA 硫解酶、3- 羟基酰 -CoA 脱氢酶和烯酰 -CoA 水合酶活性 (Yang 等, Biochem. 30 :6788-6795(1991) ; Yang 等, J. Biol. Chem. 265 :10424-10429(1990) ;Yang 等, J. Biol. Chem. 266 :16255(1991) ; Nakahigashi 和 Inokuchi, Nucl. Acids Res. 18 :4937(1990))。这些活性在机制上类似于图 2 中显示的前三种转变作用。fadI 和 fadJ 基因编码类似的功能, 并且仅在厌氧条件下天然地表达 (Campbell 等, Mol. Microbiol. 47 :793-805(2003))。这些基因产物天然地发生作用以将短链、中链和长链脂肪酰 -CoA 化合物降解为乙酰 -CoA, 而不是如图 2 中所提出的那样将琥珀酰 -CoA 和乙酰 -CoA 转变为 5- 羧基 -2- 戊烯酰 -CoA。然而, 众所周知, 酮脂酰 -CoA 硫解酶、3- 羟基酰 -CoA 脱氢酶和烯酰 -CoA 水合酶催化可逆的转变作用。此外, 定向进化和相关的方法可以用来定制大肠杆菌的天然  $\beta$ -氧化装置的底物特异性。因此, 这些酶或其同源物可以用于产生己二酸。如果天然基因发生作用在体内降解己二酸或其前体, 则作出

适当的遗传修饰以减弱或消除这些功能。然而,这可能不是必需的,因为已经描述了在大肠杆菌中产生聚[(R)-3-羟基丁酸]的方法,该方法包括通过敲除负调节物(fadR)并且共表达来自真氧产碱菌的非天然酮硫解酶(phaA)来活化fadB(Sato等, *J. Biosci. Bioeng.* 103:38-44(2007))。此工作显然证明 $\beta$ -氧化酶,尤其是编码3-烯酰-CoA脱氢酶和烯酰-CoA水合酶两者活性的fadB的基因产物可以作为途径的一部分起作用以从乙酰-CoA前体产生较长链分子。使用下列的GenBank登录号可以发现这些示例性基因产物的每一个的蛋白质序列:

[0157] fadA YP\_026272.1 大肠杆菌

[0158] fadB NP\_418288.1 大肠杆菌

[0159] fadI NP\_416844.1 大肠杆菌

[0160] fadJ NP\_416843.1 大肠杆菌

[0161] fadR NP\_415705.1 大肠杆菌

[0162] 参照图2,步骤4包括5-羧基-2-戊烯酰-CoA还原酶。尽管酮硫解酶、脱氢酶和烯酰-CoA水合酶步骤通常是可逆的,但烯酰-CoA还原酶步骤在生理条件下几乎总是氧化的和不可逆的(Hoffmeister等, *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338(2005))。在大肠杆菌中FadE催化此可能不可逆的转变作用(Campbell和Cronan, *J. Bacteriol.* 184:3759-3764(2002))。该途径需要可以还原2-烯酰-CoA中间体的酶,不需要仅将酰基-CoA氧化为2-烯酰-CoA化合物的酶诸如FadE。此外,尽管已经表明大肠杆菌天然地拥有用于烯酰-CoA还原的酶(Mizugaki等, *J. Biochem.* 92:1649-1654(1982);Nishimaki等, *J. Biochem.* 95:1315-1321(1984)),还没有一种拥有此功能的大肠杆菌被生化表征。

[0163] 用于烯酰-CoA还原酶步骤的一个候选基因是来自丙酮丁醇梭菌的bcd的基因产物(Atsumi等,见前,2007;Boynton等, *J. Bacteriol.* 178:3015-3024(1996)),其天然地催化巴豆酰-CoA还原为丁酰-CoA,一种在机制上类似于在己二酸合成途径中所需的5-羧基-2-戊烯酰-CoA还原为己二酰-CoA的反应。此酶的活性可以通过表达bcd结合以表达丙酮丁醇梭菌etfAB基因(其编码电子传递黄素蛋白)来增强。用于烯酰-CoA还原酶步骤的额外候选物是来自小眼虫(*E. gracilis*)的线粒体烯酰-CoA还原酶(Hoffmeister等, *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338(2005))。在去除此线粒体靶向前导序列后由此序列得到的构建物被克隆在大肠杆菌中,产生活性酶(Hoffmeister等,见前,2005)。此方法是在原核生物体中表达真核生物基因的领域中普通技术人员所公知的,所述真核生物基因尤其是具有可以将基因产物靶向至特定的细胞内区室的前导序列的那些基因。此基因的来自原核生物齿垢密螺旋体的近亲同源物,TDE0597,代表第三种烯酰-CoA还原酶,其已经在大肠杆菌中克隆和表达(Tucci和Martin, *FEBS Lett.* 581:1561-1566(2007))。使用下列的GenBank登录号可以发现这些示例性基因产物的每一个的蛋白质序列:

[0164] bcd NP\_349317.1 丙酮丁醇梭菌

[0165] etfA NP\_349315.1 丙酮丁醇梭菌

[0166] etfB NP\_349316.1 丙酮丁醇梭菌

[0167] TER Q5EU90.1 小眼虫

[0168] TDE0597 NP\_971211.1 齿垢密螺旋体

[0169] 参照图2,步骤5包括己二酰-CoA合成酶(也称为己二酸-CoA连接酶)、磷酸己

二酰转移酶 / 己二酸激酶、己二酰-CoA : 乙酰-CoA 转移酶、或己二酰-CoA 水解酶。从能量学的角度, 期望己二酸合成途径中的最终步骤被可保留己二酰-CoA 的硫酯键中储存的 ATP 当量的酶或酶对催化。大肠杆菌 *sucC* 和 *sucD* 基因的产物, 或其同源物可以潜在地催化图 2 中显示的最终转变作用, 如果它们显示对己二酰-CoA 的活性的话。*sucCD* 基因天然地形成琥珀酰-CoA 合成酶复合物, 其催化从琥珀酸形成琥珀酰-CoA, 伴随着消耗 1 个 ATP, 该反应在体内是可逆的 (Buck 等, *Biochem. J.* 24 :6245-6252 (1985))。鉴于琥珀酸和己二酸之间的结构相似性, 即, 两者均为直链二羧酸, 可以合理地预期 *sucCD* 酶对己二酰-CoA 的一些活性。当以与图 1 中所描绘的相反的生理方向工作时, 显示己二酰-CoA 连接酶活性的酶可以同样地从己二酰-CoA 产生己二酸并生成 ATP, 在此使用 AMP 和 PPi 作为辅因子。示例性的 CoA- 连接酶包括大鼠二羧酸-CoA 连接酶 (其序列还未被表征 (Vamecq 等, *Biochem. J.* 230 :683-693 (1985)))、来自产黄青霉菌的两种已表征的苯乙酰-CoA 连接酶的任一种 (Lamas-Maceiras 等, *Biochem. J.* 395, 147-155 (2005); Wang 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 360 :453-458 (2007))、来自恶臭假单胞菌的苯乙酰-CoA 连接酶 (Martinez-Blanco 等, *J. Biol. Chem.* 265 :7084-7090 (1990)) 和来自枯草芽孢杆菌的 6- 羧基己酸-CoA 连接酶 (Bower 等, *J. Bacteriol.* 178 :4122-4130 (1996))。使用下列的 GenBank 登录号可以发现这些示例性基因产物的每一个的蛋白质序列:

[0170] *sucC* NP\_415256.1 大肠杆菌

[0171] *sucD* AAC73823.1 大肠杆菌

[0172] 另一选择, 使用磷酸己二酰转移酶 / 己二酸激酶, 被来自丙酮丁醇梭菌的 *buk1*、*buk2* 和 *ptd* 的基因产物 (Walter 等, *Gene* 134 :107-111 (1993); Huang 等, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2 :33-38 (2000)), 或其同源物催化。*Ptb* 基因编码这样的酶, 其可以将丁酰-CoA 转变为丁酰-磷酸, 然后其经任一种 *buk* 基因产物转变为丁酸, 伴随着生成 ATP。类似的一组转变, 即, 己二酰-CoA 转变为己二酰-磷酸, 接着己二酰-磷酸转变为己二酸, 可以由 *buk1*、*buk2* 和 *ptb* 基因产物来执行。使用下列的 GenBank 登录号可以发现这些示例性基因产物的每一个的蛋白质序列:

[0173] *ptb* NP\_349676 丙酮丁醇梭菌

[0174] *buk1* NP\_349675 丙酮丁醇梭菌

[0175] *buk2* Q97III1 丙酮丁醇梭菌

[0176] 备选地, 可以应用能够将 CoA 基团从己二酰-CoA 传递至乙酸的乙酰转移酶。类似的转变作用通过克氏梭状芽孢杆菌的 *cat1*、*cat2* 和 *cat3* 的基因产物催化, 所述基因产物已经显示分别发挥琥珀酰-CoA、4- 羟基丁酰-CoA 和丁酰-CoA 乙酰转移酶活性 (Sohling 和 Gottschalk, *J. Bacteriol.* 178 :871-880 (1996); Seedorf 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 :2128-2133 (2008))。使用下列的 GenBank 登录号可以发现这些示例性基因产物的每一个的蛋白质序列:

[0177] *cat1* P38946.1 克氏梭状芽孢杆菌

[0178] *cat2* P38942.2 克氏梭状芽孢杆菌

[0179] *cat3* EDK35586.1 克氏梭状芽孢杆菌

[0180] 最后, 尽管从能量学的角度考虑不是所期望的, 但己二酰-CoA 转变为己二酸也可以由酰基-CoA 水解酶或等效地由硫酯酶来执行。首选的大肠杆菌基因候选物是

tesB(Naggert 等, *J. Biol. Chem.* 266 :11044-11050(1991)),其显示与人 acot8 的高度相似性,人 acot8 是对己二酰-CoA 有活性的二羧酸乙酰转移酶 (Westin 等, *J. Biol. Chem.* 280 :38125-38132(2005))。该活性还已经在大鼠肝脏中被表征 (Deana, *Biochem. Int.* 26 :767-773(1992))。使用下列的 GenBank 登录号可以发现这些示例性基因产物的每一个的蛋白质序列:

[0181] tesB NP\_414986 大肠杆菌

[0182] acot8 CAA15502 智人

[0183] acot8 NP\_570112 褐家鼠

[0184] 其他的天然候选基因包括 tesA(Bonner 和 Bloch, *J. Biol. Chem.* 247 :3123-3133(1972))、ybgC(Kuznetsova 等, *FEMS Microbiol. Rev.* 29 :263-279(2005); Zhuang 等, *FEBS Lett.* 516 :161-163(2002))、paaI(Song 等, *J. Biol. Chem.* 281 :11028-11038(2006)) 和 ybdB(Leduc 等, *J. Bacteriol.* 189 :7112-7126(2007))。使用下列的 GenBank 登录号可以发现这些示例性基因产物的每一个的蛋白质序列:

[0185] tesA NP\_415027 大肠杆菌

[0186] ybgC NP\_415264 大肠杆菌

[0187] paaI NP\_415914 大肠杆菌

[0188] ybdB NP\_415129 大肠杆菌

[0189] 上面的描述提供了借助于逆向己二酸降解途径的示例性己二酸合成途径。

[0190] 实施例 II

[0191] 具有逆降解途径的产生己二酸的微生物生物体的制备

[0192] 此实施例描述了能够使用逆降解途径产生己二酸的微生物生物体的产生。

[0193] 大肠杆菌用作靶生物体以改造如图 2 中所示的逆向己二酸降解途径。大肠杆菌提供用于生成能够产生己二酸的非天然存在的微生物的良好宿主。大肠杆菌易于进行遗传操作,并且已知能够在厌氧或微氧条件下有效地产生各种产物,如乙醇、乙酸、甲酸、乳酸和丁二酸。

[0194] 为了生成被改造以产生己二酸的大肠杆菌株,编码在逆降解途径中利用的酶的核酸使用公知的分子生物学技术在大肠杆菌中表达(参见,例如, Sambrook, 见前 2001; Ausubel 见前,1999)。具体地,分别编码琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶和 3-羟基己二酰-CoA 脱水酶活性的 paaJ(NP\_415915.1)、paaH(NP\_415913.1) 和 maoC(NP\_415905.1) 基因克隆进在 PA1/lacO 启动子控制下的 pZE13 载体 (Expressys, Ruelzheim, Germany) 中。另外,分别编码 5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶和己二酰-CoA 合成酶活性的 bcd(NP\_349317.1)、etfAB(349315.1 和 349316.1) 和 sucCD(NP\_415256.1 和 AAC73823.1) 基因克隆进在 PA1/lacO 启动子控制下的 pZA33 载体 (Expressys, Ruelzheim, Germany) 中。这两组质粒转化至大肠杆菌株 MG1655 中以表达经逆降解途径的己二酸合成所需的蛋白质和酶。

[0195] 得到的遗传改造的生物体遵循本领域中公知的方法在含葡萄糖的培养基中培养(参见,例如, Sambrook 等, 见前,2001)。逆降解途径基因的表达使用本领域中公知的用于确定多肽表达或酶活性的方法确认,包括,例如, Northern 印迹、mRNA 的 PCR 扩增、免疫印迹等。表达的酶的酶活性使用对各活性特异的测定法来确认。改造的大肠杆菌株产生己二酸

的能力使用 HPLC、气相色谱 - 质谱法 (GCMS) 和 / 或液相色谱 - 质谱法 (LCMS) 来确认。

[0196] 被改造具有功能性己二酸合成途径的微生物株通过优化该途径的有效利用而进一步增加。简言之,评估被改造的菌株以确定任一外源基因是否以限速水平表达。对于以可能限制通过该途径的通量的低水平表达的任何酶,例如通过引入额外的基因拷贝数增加其表达。

[0197] 为了生成较好的生产株,利用代谢建模来优化生长条件。建模还用来设计能另外地优化该途径的利用的基因敲除(参见,例如,美国专利公开号 US2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US2003/0059792、US 2002/0168654 和 US 2004/0009466,以及美国专利号 7,127,379)。建模分析允许可靠的预测朝向更有效地产生己二酸来改变代谢对细胞生长的作用。一种建模方法是双相优化法,OptKnock(Burgard 等, *Biotechnol. Bioengineer.* 84 :647-657(2003)),其被应用来选择基因敲除,所述基因敲除综合地产生更好的己二酸产量。适应进化也可以用来生成例如,乙酰-CoA 和琥珀酰-CoA 中间体或己二酸产物的更好的生产株。进行适应进化以改善生长和生产特性两者(Fong 和 Palsson, *Nat. Genet.* 36 :1056-1058(2004);Alper 等, *Science* 314 :1565-1568(2006))。基于这些结果,随后轮次的建模、遗传改造和适应进化可以应用于己二酸生产株以进一步增加产量。

[0198] 对于己二酸的大规模生产,含上述逆降解途径的生物体在发酵罐中使用本领域中已知的培养基在厌氧条件下培养以支持该生物体的生长。发酵以分批、分批补料或连续的方式进行。厌氧条件通过首先用氮气喷射培养基,然后用隔膜和压线帽密封培养容器(例如烧瓶)来保持。微氧条件也可以通过在隔膜中设置小孔用于限量通气来使用。通过加入酸,诸如 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,将培养基的 pH 保持在约 7 的 pH。生长速率通过使用分光光度计(600nm)测量光密度来测定,葡萄糖摄取速率可以通过监测碳源随时间的消耗来确定。通过 HPLC(Shimadzu, Columbia MD),例如使用 **Aminex®** 系列的 HPLC 柱(例如,HPX-87 系列)(BioRad, HerculesCA),使用用于葡萄糖和醇的折射率检测器和用于有机酸的 UV 检测器可以定量副产物诸如不合乎需要的醇、有机酸和残余的葡萄糖(Lin 等, *Biotechnol. Bioeng.* 775-779(2005))。

[0199] 此实施例描述了使用逆降解途径产生己二酸的微生物生物体的制备。

[0200] 实施例 III

[0201] 通过 3-氧代己二酸合成己二酸

[0202] 此实施例描述了通过 3-氧代己二酸的示例性己二酸合成途径。

[0203] 来自实施例 I 和 II 中描述的附加途径显示在图 3 中,其使用乙酰-CoA 和琥珀酰-CoA 作为用于形成己二酸的前体并且经过代谢中间体,3-氧代己二酸。在此途径中的前两个转变作用是用于反向操作的芳族和氯代芳族化合物的降解途径的最后两个步骤(Kaschabek 等, *J. Bacteriol.* 184 :207-215(2002);Nogales 等, *Microbiol.* 153 :357-365(2007);Ismail 等, *Eur. J. Biochem.* 270 :3047-3054(2003))。具体地,第一个步骤通过琥珀酰-和乙酰-CoA 的缩合形成 3-氧代己二酰 CoA。第二个步骤形成 3-氧代己二酸并且据报道在假单胞菌属 B13 中是可逆的(Kaschabek 等, *J. Bacteriol.* 184 :207-215(2002))。

[0204] 接下来的步骤包括 3-氧代己二酸还原为 3-羟基己二酸(酮基转变为羟基)、

3-羟基己二酸脱水产生己-2-烯二酸以及还原己-2-烯二酸以形成己二酸。该途径的这些步骤类似于草酰乙酸经还原性 TCA 循环转变为琥珀酸（参见图 4）。此支持了这样的观点，即，在适当的代谢物浓度下，该途径中的步骤在热力学上是有利的。最终的还原步骤可以经生化作用进行，或通过采用化学催化剂进行，从而将己-2-烯二酸转变为己二酸。可以使用活性炭上负载的 Pt 催化剂进行化学氢化作用，如（Niu 等，*Biotechnol. Prog.* 18 : 201-211 (2002)）中所述。

[0205] 使用此途径己二酸的最大理论产率为每摩尔消耗的葡萄糖产生 0.92 摩尔，并且不需要氧来获得这些产率（参见表 2）。相关的能量学与逆向己二酸途径相同。理论上，通过此途径利用的每摩尔葡萄糖观察到形成可达 1.55 摩尔的 ATP。如果假设磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶（PPCK）以 ATP 生成的方向工作，则 ATP 产量达到大约 2.47 摩尔。令人感兴趣的是，如果对于最后步骤使用化学氢化作用并假设催化剂的效率为 100%，则产物产率可以进一步增加至每摩尔消耗的葡萄糖产生 1 摩尔己二酸。在此方案下，在不采用 PPCK 的逆向功能性的情况下，理论上形成至多达 1.95 摩尔的 ATP。

[0206] 表 2：使用 3-氧代己二酸途径，每摩尔葡萄糖的己二酸的最大理论产率和相关的 ATP 产量。

	最终步骤，酶法		最终步骤，化学氢化	
	需氧	厌氧	需氧	厌氧
[0207] 己二酸产率	0.92	0.92	1.00	1.00
最大 ATP 产量@ 最大己二酸产率	1.55	1.55	1.95	1.95

[0208] 成功地改造此途径包括鉴定一组适当的具有充分的活性和特异性的酶。这必需鉴定一组适当的酶，将其相应的基因克隆进生产宿主中，优化发酵条件和测定发酵后的产物形成。为了改造用于产生己二酸的生产宿主，一种或多种外源 DNA 序列在适当的宿主生物体中表达。另外，该宿主微生物可以具有功能缺失的一种或多种内源基因。这些修饰作用允许使用可再生的原料产生己二酸。

[0209] 下面描述了许多已生化表征的候选基因，它们能够编码催化用于己二酸合成的 3-氧代己二酸途径的每个步骤的酶。尽管此方法对于大肠杆菌进行描述，但本领域技术人员可以将这些教导应用于任何其他适当的宿主生物体。具体地，下面列举的是大肠杆菌的天然基因以及当被正确地克隆和表达时可以用来催化适当的转变作用的其他生物体中的基因。

[0210] 参照图 3，步骤 1 包括琥珀酰 CoA : 乙酰 CoA 酰基转移酶（ $\beta$ -酮硫解酶）。该途径中的第一个步骤将乙酰 -CoA 和琥珀酰 -CoA 化合以形成 3-氧代己二酰 -CoA。由假单胞菌株 B13 中的 *pcaF* (Kaschabek 等, *J. Bacteriol.* 184 :207-215 (2002))、恶臭假单胞菌 U 中的 *phaD* (Olivera 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95 :6419-6424 (1998))、荧光假单胞菌 ST 中的 *paaE* (Di Gennaro 等, *Arch. Microbiol.* 188 :117-125 (2007)) 和来自大肠杆菌的 *paaJ* (Nogales 等, *Microbiol.* 153 :357-365 (2007)) 编码的基因产物催化芳族化合物诸如苯乙酸或苯乙烯的降解期间 3-氧代己二酰 -CoA 向琥珀酰 -CoA 和乙酰 -CoA 的转变。由于  $\beta$ -酮硫解酶催化可逆的转变作用，因此这些酶可以用于图 3 中显示的己二酸合成中

的第一个步骤。例如,来自真氧产碱菌的酮硫解酶 phaA 将两分子的乙酰 -CoA 化合形成乙酰乙酰 -CoA(Sato 等, J. Biosci. Bioengineer. 103 :38-44(2007))。类似地,已经报道在真氧产碱菌中  $\beta$ -酮硫解酶 (bktB) 催化乙酰 -CoA 和丙酰 -CoA 缩合以形成  $\beta$ -酮戊酰 -CoA(Slater 等, J. Bacteriol. 180 :1979-1987(1998))。上面提到的基因产物的蛋白质序列在本领域中是公知的,并且可以使用下列的登录号而进入至公共数据库诸如 GenBank 中。

[0211]	基因名称	GenBank 登录号 #	生物体
[0212]	paaJ	NP_415915.1	大肠杆菌
[0213]	pcaF	AAL02407	Pseudomonas knackmussii (B13)
[0214]	phaD	AAC24332.1	恶臭假单胞菌
[0215]	paaE	ABF82237.1	荧光假单胞菌

[0216] 这些序列可以用来通过序列相似性搜索(例如, BLASTp) 鉴定 GenBank 或其他数据库中的同源蛋白。得到的同源蛋白和它们相应的基因序列提供额外的外源 DNA 序列用于转化至大肠杆菌或其他宿主微生物中以产生生产宿主。

[0217] 例如,使用下列的 GenBank 登录号可以发现来自大肠杆菌 K12 的 paaJ 的直向同源物:

[0218]	YP_001335140.1	肺炎克雷伯菌
[0219]	YP_001479310.1	变形斑沙雷菌
[0220]	AAC24332.1	恶臭假单胞菌

[0221] 使用下列的 GenBank 登录号可以发现来自 Pseudomonas knackmussii 的 pcaF 的直向同源物实例:

[0222]	AAD22035.1	链霉菌属 2065
[0223]	AAN67000.1	恶臭假单胞菌
[0224]	ABJ15177.1	铜绿假单胞菌

[0225] 用于酮硫解酶步骤的其他天然候选基因包括 atoB(其可以催化 2 个乙酰 -CoA 分子的可逆缩合(Sato 等, J. Biosci. Bioengineer. 103 :38-44(2007))) 及其同源物 yqeF。非天然候选基因包括来自真氧产碱菌的 phaA(Sato 等, 见前, 2007) 和 bktB(Slater 等, J. Bacteriol. 180 :1979-1987(1998)), 和来自丙酮丁醇梭菌的两种酮硫解酶, thiA 和 thiB(Winzer 等, J. Mol. Microbiol. Biotechnol. 2 :531-541(2000))。使用下列的 GenBank 登录号可以发现这些示例性基因产物的每一个的蛋白质序列:

[0226]	atoB	NP_416728.1	大肠杆菌
[0227]	yqeF	NP_417321.2	大肠杆菌
[0228]	phaA	YP_725941	真氧产碱菌
[0229]	bktB	AAC38322.1	真氧产碱菌
[0230]	thiA	NP_349476.1	丙酮丁醇梭菌
[0231]	thiB	NP_149242.1	丙酮丁醇梭菌

[0232] 在此示例性途径中,不太期望使用大肠杆菌中脂肪酸降解途径中的基因,硫解酶编码基因 fadA 和 fadB。这些基因形成编码多种活性的复合物,这些活性中的大多数在此途径中是不需要的。

[0233] 参照图 3, 步骤 2 包括 3-氧代己二酰-CoA 转移酶。在此步骤中, 3-氧代己二酸通过 CoA 基团从 3-氧代己二酰-CoA 传递至琥珀酸而形成。此活性被报道为由假单胞菌属中的 *pcaI* 和 *pcaJ* 编码的双单位酶的形式 (Kaschabek 等, *J. Bacteriol.* 184 :207-215(2002))。该酶催化可逆的转变作用。使用下列的 GenBank 登录号可以发现该复合物的亚单位 A 的示例性基因产物的蛋白质序列:

[0234] *pcaI* AAN69545.1 恶臭假单胞菌

[0235] *pcaI* YP\_046368.1 不动杆菌属 ADP1

[0236] *pcaI* NP\_630776.1 天蓝色链霉菌

[0237] 使用下列的 GenBank 登录号可以发现该复合物的亚单位 B 的示例性基因产物的蛋白质序列:

[0238] *pcaJ* NP\_746082.1 恶臭假单胞菌

[0239] *pcaJ* NP\_630775.1 天蓝色链霉菌

[0240] *pcaJ* AAC37147.1 不动杆菌属 ADP1

[0241] 参照图 3, 步骤 3 包括 3-氧代己二酸还原酶。大肠杆菌具有几种候选的醇脱氢酶; 具有类似功能的两种是苹果酸脱氢酶 (*mdh*) 和乳酸脱氢酶 (*ldhA*)。尽管没有显示这两种酶在大肠杆菌中具有广泛的底物特异性, 但来自真氧产碱菌的乳酸脱氢酶已经显示证明对各种链长的底物诸如乳酸、2-氧代丁酸、2-氧代戊酸和 2-氧代戊二酸的高活性 (Steinbuechel 和 Schlegel, *Eur. J. Biochem.* 130 :329-334(1983))。此步骤的其他非天然酶候选物是来自人心脏的线粒体 3-羟基丁酸脱氢酶 (*bdh*), 其已经被克隆和表征 (Marks 等, *J. Biol. Chem.* 267 :15459-15463(1992))。该酶是特别令人感兴趣的, 因为它是作用于 3-羧酸的脱氢酶。鉴于该脱氢酶一般是可逆的, 预期该基因产物, 或其同源物, 将能够使 3-氧代酸, 例如, 3-氧代己二酸还原为相应的 3-羧酸, 例如, 3-羟基己二酸。使用下列的 GenBank 登录号可以发现这些示例性基因产物的每一个的蛋白质序列:

[0242] *mdh* AAC76268.1 大肠杆菌

[0243] *ldhA* NP\_415898.1 大肠杆菌

[0244] *ldh* YP\_725182.1 真氧产碱菌

[0245] *bdh* AAA58352.1 智人

[0246] 参照图 3, 步骤 4 包括 3-羟基己二酸脱水酶。在此反应中, 3-羟基己二酸脱水成为己-2-烯二酸。尽管还没有鉴定到此酶促转变的直接证据, 但大多数脱水酶催化水的  $\alpha$ ,  $\beta$ -消除。这包括吸电子羰基、羧化物或 CoA-硫醇酯基团对  $\alpha$ -氢的活化以及羟基从  $\beta$ -位上的去除 (Martins 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 :15645-15649(2004); Buckel 和 Golding, *FEMS Microbiol. Rev.* 22 :523-541(1998))。使用下列的 GenBank 登录号可以发现这些示例性基因产物的蛋白质序列:

[0247] *acnA* P25516.3 大肠杆菌

[0248] *fumB* P14407.2 大肠杆菌

[0249] *ilvD* AAA24013.1 大肠杆菌

[0250] 执行此功能的其他良好候选物是丝氨酸脱水酶。在如此脱水步骤中所需要的从丝氨酸除去氨时, 这些酶催化相似的转变作用。使用下列的 GenBank 登录号可以发现示例性基因产物的蛋白质序列:

[0251] dsdA P00926 大肠杆菌

[0252] 此转变作用的非天然基因候选物也已经被鉴定。例如,来自不解糖消化链球菌 (*Peptostreptococcus asaccharolyticus*) 的多亚单位 L- 丝氨酸脱水酶显示补充 L- 丝氨酸脱水酶活性缺陷的大肠杆菌 (Hofmeister 等, *J. Bacteriol.* 179 :4937-4941 (1997))。此外,由巴氏真杆菌 (*Eubacterium barkeri*) 中的基因 hmd 编码的推定的 2-(羟甲基) 戊二酸脱水酶显示与含 [4Fe-4S]- 的细菌丝氨酸脱水酶的  $\alpha$ - 和  $\beta$ - 亚单位两者的相似性 (Alhapel 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 :12341-12346 (2006))。使用下列的 GenBank 登录号可以发现示例性基因产物的蛋白质序列:

[0253] hmd ABC88407.1 巴氏真杆菌

[0254] 参照图 3, 步骤 5 包括 2- 烯酸还原酶。3- 氧代己二酸途径中的最终步骤是还原己-3- 烯二酸中的双键以形成己二酸。生物化学上, 此转变作用由 2- 烯酸还原酶 (EC 1.3.1.31) 催化, 该酶已知催化大量的  $\alpha$ ,  $\beta$ - 不饱和羧酸和醛类的 NADH- 依赖性还原 (Rohdich 等, *J. Biol. Chem.* 276 :5779-5787 (2001))。该酶由梭状芽孢杆菌的一些物种中的 enr 编码 (Giesel 和 Simon, *Arch. Microbiol.* 135 :51-57 (1983)), 这些物种包括酪丁酸梭菌和热乙酸梭菌 (现在称为热乙酸穆尔氏菌) (Rohdich, 等, *J. Biol. Chem.* 276 :5779-5787 (2001))。在最近发表的克氏梭状芽孢杆菌的基因组序列中, 已经报道了烯酸还原酶的 9 个编码序列, 其中一个已经被表征 (Seedorf 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 :2128-2133 (2008))。来自酪丁酸梭菌和热乙酸梭菌两者的 enr 基因已经被克隆和测序, 并且彼此显示 59% 同一性。前一基因也发现与克氏梭状芽孢杆菌中表征的基因具有约 75% 的相似性 (Giesel 和 Simon, *Arch. Microbiol.* 135 :51-57 (1983))。基于这些序列结果, 已经报道 enr 非常类似于于大肠杆菌 (fadH) 中的二烯酰 CoA 还原酶 (Rohdich 等, *J. Biol. Chem.* 276 :5779-5787 (2001))。因此, 对于催化 3- 氧代己二酸途径中的此最后步骤存在着几种基因候选物, 并且列举在下面。热乙酸梭菌 enr 基因已在大肠杆菌中以酶活性形式表达 (Rohdich 等, 见前, 2001)。使用下列的 GenBank 登录号可以发现示例性基因产物的蛋白质序列:

[0255] fadH NP\_417552.1 大肠杆菌

[0256] enr ACA54153.1 肉毒梭状芽孢杆菌 A3str

[0257] enr CAA71086.1 酪丁酸梭菌

[0258] enr CAA76083.1 克氏梭状芽孢杆菌

[0259] 上面的描述提供了借助于 3- 氧代己二酸途径的示例性己二酸合成途径。

[0260] 实施例 IV

[0261] 具有 3- 氧代己二酸途径的产生己二酸的微生物生物体的制备

[0262] 此实施例描述了生成能够使用 3- 氧代己二酸途径产生己二酸的微生物生物体。

[0263] 大肠杆菌用作靶生物体以改造如图 3 中所示的 3- 氧代己二酸途径。大肠杆菌提供用于生成能够产生己二酸的非天然存在的微生物的良好宿主。大肠杆菌易于进行遗传操作, 并且已知能够在厌氧或微氧条件下有效地产生各种产物, 如乙醇、乙酸、甲酸、乳酸和丁二酸。

[0264] 为了生成被改造以产生己二酸的大肠杆菌株, 编码在 3- 氧代己二酸途径中利用的酶的核酸使用公知的分子生物学技术在大肠杆菌中表达 (参见, 例如, Sambrook, 见前

2001 ;Ausubel 见前,1999)。具体地,分别编码琥珀酰-CoA :乙酰-CoA 酰基转移酶、3-氧代己二酰-CoA 转移酶和3-氧代己二酸还原酶活性的 paaJ(NP\_415915.1)、pcaIJ(AAN69545.1 和 NP\_746082.1) 和 bdh(AAA58352.1) 基因克隆进在 PA1/lacO 启动子控制下的 pZE13 载体 (Expressys, Ruelzheim, Germany) 中。另外,分别编码 3-羟基己二酸脱水酶和 2-烯酸还原酶活性的 acnA(P25516.3) 和 enr(ACA54153.1) 基因克隆进在 PA1/lacO 启动子控制下的 pZA33 载体 (Expressys, Ruelzheim, Germany) 中。这两组质粒转化至大肠杆菌株 MG1655 中以表达经 3-氧代己二酸途径的己二酸合成所需的蛋白质和酶。

[0265] 得到的遗传改造的生物体遵循本领域中公知的方法在含葡萄糖的培养基中培养 (参见,例如,Sambrook 等,见前,2001)。用于己二酸合成的 3-氧代己二酸途径基因的表达使用本领域中公知的用于确定多肽表达或酶活性的方法确认,包括,例如,Northern 印迹、mRNA 的 PCR 扩增、免疫印迹等。表达的酶的酶活性使用对各活性特异的测定法来确认。改造的大肠杆菌株产生己二酸的能力使用 HPLC、气相色谱-质谱法 (GCMS) 和 / 或液相色谱-质谱法 (LCMS) 来确认。

[0266] 被改造具有功能性己二酸合成途径的微生物株通过优化该途径的有效利用而进一步增加。简言之,评估被改造的菌株以确定任一外源基因是否以限速水平表达。对于以可能限制通过该途径的通量的低水平表达的任何酶,例如通过引入额外的基因拷贝数增加其表达。

[0267] 为了生成较好的生产株,利用代谢建模来优化生长条件。建模还用来设计能另外地优化该途径的利用的基因敲除 (参见,例如,美国专利公开号 US2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US2003/0059792、US 2002/0168654 和 US 2004/0009466,以及美国专利号 7,127,379)。建模分析允许可靠的预测朝向更有效地产生己二酸来改变代谢对细胞生长的作用。一种建模方法是双相优化法,OptKnock (Burgard 等, *Biotechnol. Bioengineer.* 84 :647-657 (2003)), 其被应用来选择基因敲除,所述基因敲除综合地产生更好的己二酸产量。适应进化也可以用来生成例如,乙酰-CoA 和琥珀酰-CoA 中间体或己二酸产物的更好的生产株。进行适应进化以改善生长和生产特性两者 (Fong 和 Palsson, *Nat. Genet.* 36 :1056-1058 (2004) ;Alper 等, *Science* 314 :1565-1568 (2006))。基于这些结果,随后轮次的建模、遗传改造和适应进化可以应用于己二酸生产株以进一步增加产量。

[0268] 对于己二酸的大规模生产,含 3-氧代己二酸途径的生物体在发酵罐中使用本领域中已知的培养基在厌氧条件下培养以支持该生物体的生长。发酵以分批、分批补料或连续的方式进行。厌氧条件通过首先用氮气喷射培养基,然后用隔膜和压线帽密封培养容器,例如,烧瓶来保持。微氧条件也可以通过在隔膜中设置小孔用于限量通气来使用。通过加入酸,诸如 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 将培养基的 pH 保持在约 7 的 pH。生长速率通过使用分光光度计 (600nm) 测量光密度来测定,葡萄糖摄取速率可以通过监测碳源随时间的消耗来确定。通过 HPLC (Shimadzu), 例如使用 **Aminex®** 系列的 HPLC 柱 (例如, HPX-87 系列) (BioRad), 使用用于葡萄糖和醇的折射率检测器和用于有机酸的 UV 检测器可以定量副产物诸如不合乎需要的醇、有机酸和残余的葡萄糖 (Lin 等, *Biotechnol. Bioeng.* 775-779 (2005))。

[0269] 此实施例描述了含有 3-氧代己二酸途径的产生己二酸的微生物生物体的制备。

[0270] 实施例 V

[0271] 经顺,顺-己二烯二酸的己二酸合成

[0272] 此实施例描述先前描述的己二酸合成途径(参见Niu等, *Biotechnol. Prog.* 18(2):p. 201-11. 2002; Frost等, 于1996年1月30日授权的美国专利号5, 487, 987)。

[0273] 以前已经描述了经组合的生物学和化学转变过程的己二酸合成(Niu等, *Biotechnol. Prog.* 18:201-211(2002))并且显示在图5中。该方法进一步描述在美国专利号5, 487, 987中。通过此途径的己二酸合成必需将三个异源基因引入至可以将脱氢莽草酸转变为顺,顺-己二烯二酸的大肠杆菌中(Niu等, 见前, 2002)。最终的化学氢化步骤导致形成己二酸。在此步骤中, 含有150mM顺,顺-粘康酸的预处理发酵液与10%活性炭负载的铂(Pt)混合。氢化反应在3400Kpa的氢压下在250℃进行2.5小时并搅拌。在表3中显示计算的己二酸产率, 假设酶促催化或化学催化步骤的任一个用来将顺,顺-粘康酸转变为己二酸。在需氧条件下, 如果采用化学反应用于氢化则可获得85%摩尔产率的己二酸, 如果使用基于NADH的氢化酶则获得75%摩尔产率。

[0274] 表3:使用顺,顺-己二烯二酸途径, 每摩尔葡萄糖的己二酸的最大理论产率

[0275]

	最终步骤, 酶法		最终步骤, 化学氢化	
	需氧	厌氧	需氧	厌氧
己二酸产率	0.75	0.00	0.85	0.00

[0276] 尽管这是示例性的方法, 但该方法与其他方法(诸如实施例I-IV中所述的方法)相比是有缺点的。例如, 此方法的第一个限制是与逆向己二酸降解和3-氧代己二酸途径相比理论产率较低。第二个限制是此途径的ATP产量是可以忽略不计的。此途径的第三个限制是其包括双加氧酶, 必须向生物反应器供应氧并且不能选择厌氧发酵。

[0277] 上面的描述提供了借助于顺,顺-己二烯二酸途径的示例性己二酸合成途径。

[0278] 实施例VI

[0279] 经 $\alpha$ -酮己二酸合成己二酸

[0280] 此实施例描述经 $\alpha$ -酮己二酸途径的示例性己二酸合成途径。

[0281]  $\alpha$ -酮己二酸是酿酒酵母中赖氨酸生物合成中的已知中间体, 并且此信息被用来鉴定己二酸生物合成的附加途径(参见图6)。 $\alpha$ -酮戊二酸至 $\alpha$ -酮己二酸的转变由高柠檬酸合成酶、高乌头酸酶和同分异构柠檬酸脱氢酶催化, 如图6中的虚线箭头所指示。 $\alpha$ -酮己二酸至 $\alpha$ -羟基己二酸的转变可以由2-酮己二酸还原酶催化, 该酶据报道发现于大鼠和人胎盘中(Suda等, *Arch. Biochem. Biophys.* 176:610-620(1976); Suda等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77:586-591(1977))。随后的步骤包括脱水酶, 用于将 $\alpha$ -羟基己二酸转变为己-2-烯二酸, 然后将其还原为己二酸。此最终步骤可以由酶催化或可以通过实施例II中所描述的化学反应发生。如实施例I-IV中所述, 鉴定编码 $\alpha$ -酮己二酸途径的酶的基因。

[0282] 与此途径相关的己二酸产率显示在表4中。因为在乙酰-CoA至己二酸的转变期间损失了两个CO<sub>2</sub>分子, 因此仅67%的葡萄糖可以转变为己二酸。这反映在需氧条件下此途径的摩尔产率中。在缺少氧摄取的条件产率进一步降低。此外, 因为在厌氧条件下最

大 ATP 产量是可忽略的,因此在这些条件下改造的生物体将不得不利用其他的底物来形成能量用于细胞生长和维持。

[0283] 表 4:使用  $\alpha$ -酮己二酸途径,每摩尔葡萄糖的己二酸的最大理论产率和相关的 ATP 产量。

	最终步骤, 酶法		最终步骤, 化学氢化	
	需氧	厌氧	需氧	厌氧
[0284] 己二酸产率	0.67	0.45	0.67	0.40
最大 ATP 产量@ 最大己二酸产率	6.17	0.00	7.50	0.00

[0285] 上述的描述提供了借助于  $\alpha$ -酮己二酸途径的示例性己二酸合成途径。

[0286] 实施例 VII

[0287] 经赖氨酸降解的己二酸合成

[0288] 此实施例提供经赖氨酸降解途径的示例性己二酸合成途径。

[0289] 用于己二酸合成的两个附加途径依赖于赖氨酸降解以形成己二酸。一个途径从  $\alpha$ -酮戊二酸开始以形成赖氨酸(大肠杆菌的非天然途径,并且见于酿酒酵母中),且另一个途径使用天冬氨酸作为起点用于赖氨酸生物合成(大肠杆菌的天然途径)。图 7 显示从赖氨酸形成己二酸。使用大肠杆菌化学计量模型,在存在和缺少氧的条件下己二酸的最大理论产率显示在表 5 和表 6 中, $\alpha$ -酮戊二酸和天冬氨酸分别作为赖氨酸的起点。伴随这些理论产率的最大 ATP 产量也进行计算并且显示在同一个表中。与实施例 I-IV 中所述的其他途径相比,这些产率或产量较低。如实施例 I-IV 中所描述,鉴定编码  $\alpha$ -酮己二酸途径酶的基因。

[0290] 表 5:每摩尔葡萄糖的己二酸的最大理论产率和伴随的 ATP 产量,假设赖氨酸生物合成途径使用  $\alpha$ -酮戊二酸作为起点。

	需氧	厌氧
[0291] 己二酸产率	0.40	0.20
最大 ATP 产量@ 最大己二酸产率	5.60	0.00

[0292] 表 6:每摩尔葡萄糖的己二酸的最大理论产率和伴随的 ATP 产量,假设赖氨酸生物合成途径使用天冬氨酸作为起点。

	需氧	厌氧
[0293] 己二酸产率	0.50	0.34
最大 ATP 产量@ 最大己二酸产率	0.50	0.04

[0294] 上述的描述提供了借助于赖氨酸降解途径的示例性己二酸合成途径。

[0295] 实施例 VIII

[0296] 经己二酰-CoA 产生己内酰胺和 6-氨基己酸

[0297] 此实施例描述了经己二酰-CoA 途径的示例性己内酰胺和 / 或 6-氨基己酸合成途

径。

[0298] 使用己二酰-CoA 作为前体的用于形成己内酰胺和 / 或 6-氨基己酸的示例性途径显示在图 8 中。该途径包括可以将己二酰-CoA 还原为己二酸半醛的 CoA- 依赖性醛脱氢酶和可以将此分子转化为 6-氨基己酸的转氨酶或 6-氨基己酸脱氢酶。将 6-氨基己酸转变为己内酰胺的最终步骤可以经酰胺水解酶或经化学转变来实现 (Guit 和 Buijs, 于 2002 年 3 月 7 日授权的美国专利号 6,353,100; Wolters 等, 于 1997 年 12 月 23 日授权的美国专利号 5,700,934; Agterberg 等, 于 2003 年 12 月 9 日授权的美国专利号 6,660,857)。假设逆向己二酸降解途径使用图 8 中显示的反应方案来补充, 则己内酰胺的最大理论产率计算为每摩尔消耗的葡萄糖产生 0.8 摩尔 (参见表 7)。该途径在能量学方面是有利的, 因为在己内酰胺的最大理论产率时每摩尔消耗的葡萄糖形成至多达 0.78 摩尔的 ATP。如果假定磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 (PPCK) 在朝向草酰乙酸形成的 ATP 生成方向中发挥作用, 则 ATP 产量可以进一步提高至每摩尔葡萄糖产生 1.63 摩尔 ATP。

[0299] 最终的酰胺水解酶步骤在能量学和氧化还原反应上是中性的, 并且因此与 6-氨基己酸产生相关的产物和 ATP 摩尔产量与己内酰胺产生相关的那些等价。因此, 可选地, 可以设想一种微生物和相关的发酵方法, 其形成 6-氨基己酸代替己内酰胺, 接着进行将 6-氨基己酸脱水 / 环化成己内酰胺的附加单元操作。表 7: 每摩尔葡萄糖的己内酰胺的最大理论产率和伴随的 ATP 产量, 假设逆向脂肪酸降解途径使用图 8 中的反应方案来补充。

	需氧	厌氧
己内酰胺产率	0.80	0.80
[0300] 最大 ATP 产量@ 最大己内酰胺产率	0.78	0.78
最大 ATP 产量@ 最大己内酰胺产率 假设 PPCK	1.63	1.63

[0301] 成功地改造此途径包括鉴定一组适当的具有充分的活性和特异性的酶。这必需鉴定一组适当的酶, 将其相应的基因克隆进生产宿主中, 优化发酵条件和测定发酵后的产物形成。为了改造用于产生 6-氨基己酸或己内酰胺的生产宿主, 一种或多种外源 DNA 序列可在适当的宿主生物体中表达。另外, 该微生物可以具有功能缺失的一种或多种内源基因。这些修饰作用允许使用可再生的原料产生 6-氨基己酸或己内酰胺。

[0302] 下面描述了许多已经生化表征的候选基因, 它们能够编码催化图 8 中所述的己内酰胺形成途径的每个步骤的酶。尽管使用大肠杆菌来描述, 但本领域技术人员可以将这些教导应用于任何其他适当的宿主生物体。具体列举的是大肠杆菌的天然基因以及当被正确地克隆和表达时可以用来催化适当的转变作用的其他生物体中的基因。

[0303] 参照图 8, 步骤 1 包括 CoA- 依赖性醛脱氢酶。编码催化酰基-coA 还原为其相应的醛的酶的示例性基因包括编码脂肪酰-CoA 还原酶 (Reiser 和 Somerville, . J. Bacteriol. 179 :2969-2975 (1997))、不动杆菌 M-1 脂肪酰-CoA 还原酶 (Ishige 等, Appl. Environ. Microbiol. . 68 :1192-1195 (2002)) 的乙酸钙不动杆菌 *acr1* 和来自克氏梭状芽孢杆菌的 *sucD* 基因 (Sohling 和 Gottschalk, J. Bacteriol. 178 :871-880 (1996)), 它们可以将琥珀酰-CoA 转变为琥珀酸半醛。

[0304] 基因名称    GenBank 登录号 #    生物体

- [0305] acr1 YP\_047869.1 乙酸钙不动杆菌  
 [0306] BAB85476.1 不动杆菌 M-1 株  
 [0307] sucD P38947.1 克氏梭状芽孢杆菌

[0308] 参照图 8, 步骤 2 包括转氨酶。该途径中的第二个步骤是 6- 醛转变为胺。此转变作用可以同样地由  $\gamma$ - 氨基丁酸转氨酶 (GABA 转氨酶) 来实现, 该酶是由 gabT 编码的天然酶, 其将氨基从谷氨酸传递至琥珀酰半醛的末端醛 (Bartsch 等, J. Bacteriol. 172 : 7035-7042(1990))。已经显示小家鼠、荧光假单胞菌和野猪中的 GABA 转氨酶与 6- 氨基己酸反应 (Cooper, Methods Enzymol. 113 :80-82(1985) ;Scott 和 Jakoby, J. Biol. Chem. 234 : 932-936(1959))。使用下列的 GenBank 登录号可以发现示例性基因产物的蛋白质序列 :

- [0309] gabT NP\_417148.1 大肠杆菌  
 [0310] abat NP\_766549.2 小家鼠  
 [0311] gabT YP\_257332.1 荧光假单胞菌  
 [0312] abat NP\_999428.1 野猪

[0313] 参考图 8, 步骤 2 可以备选地包括 6- 氨基己酸脱氢酶, 其包括还原氯化己二酸半醛以形成 6- 氨基己酸。此转变作用可以由赖氨酸 -6- 脱氢酶来实现, 该酶天然地将 L- 赖氨酸转变为 2- 氨基己二酸 -6- 半醛。示例性的酶可以在嗜热脂肪土芽孢杆菌 (Heydari 等, Appl. Environ. Microbiol. 70(2) :937-942(2004))、根癌农杆菌 (Hashimoto 等, J. Biochem. (Tokyo), 106(1) :76-80(1989) ;Misoho 等, J. Biochem. (Tokyo), 105(6) :1002-1008(1989)) 和反硝化无色杆菌 (Ruldeekulthamrong 等, BMB Reports 790-795(2008)) 中发现。

- [0314] lysDH BAB39707 嗜热脂肪土芽孢杆菌  
 [0315] lysDH NP\_353966 根癌农杆菌  
 [0316] lysDH AAZ94428 反硝化无色杆菌

[0317] 参照图 8, 步骤 3 包括酰胺水解酶。己内酰胺合成的最终步骤是 6- 氨基己酸的环化作用。此转变作用在酶学上还没有被表征, 但其非常类似于由来自罗伦隐球酵母 (Cryptococcus laurentii) 的 D- 赖氨酸内酰胺酶 (EC 3.5.2.11) 对赖氨酸的环化作用 (Fukumura 等, FEBS Lett. 89 :298-300(1978))。然而, 此酶的蛋白质和核苷酸序列目前还未知, 并且迄今为止, 赖氨酸内酰胺酶活性还没有在其他生物体中被证明。

[0318] 包含在分离自土壤中的几个假单胞菌属菌株中的质粒已经显示赋予了在靠己内酰胺作为单一碳源而生长的能力 (Boronin 等, FEMS Microbiol. Lett. 22 : 167-170(1984)) ;然而, 至今还没有相关基因或蛋白质序列与此功能相关联。

[0319] 具有可获得的序列信息的最相关的候选酶是 6- 氨基己酸 - 环二聚体水解酶, 其已经在假单胞菌属和黄杆菌属中表征。来自假单胞菌属 NK87 的 ny1B 基因产物在大肠杆菌中克隆和表达 (Kanagawa 等, J. Gen. Microbiol. 139 :787-795(1993))。该酶的底物特异性在黄杆菌属 K172 中测试并且显示与 6- 氨基己酸的高次低聚物反应但不与己内酰胺反应 (Kinoshita 等, Eur. J. Biochem. 116 :547-551(1981))。可以进一步测试 6- 氨基己酸二聚体水解酶在其他生物体中与所需底物以目标方向反应的可逆性和能力。使用下列的 GenBank 登录号可以发现示例性基因产物的蛋白质序列 :

- [0320] ny1B AAA24929.1 假单胞菌属 NK87

[0321] nylB P13397 黄杆菌属 K172

[0322] nylB YP\_949627.1 金黄节杆菌 TC1

[0323] 上述的描述提供了借助于己二酰-CoA 途径的产生己内酰胺和 / 或 6-氨基己酸的示例性途径。

[0324] 实施例 IX

[0325] 具有 3-氧代己二酸途径的产生 6-氨基己酸或己内酰胺的微生物生物体的制备

[0326] 此实施例描述了能够使用逆降解途径产生己二酸并且将细胞内己二酸转变为 6-氨基己酸和 / 或己内酰胺的微生物生物体的生成。

[0327] 大肠杆菌用作靶生物体以改造用于己二酸、6-氨基己酸和 / 或己内酰胺合成的必需基因 (参见图 2 和图 8)。大肠杆菌提供用于生成能够产生己二酸、6-氨基己酸和 / 或己内酰胺的非天然存在的微生物的良好宿主。大肠杆菌易于进行遗传操作,并且已知能够在厌氧或微氧条件下有效地产生各种产物,如乙醇、乙酸、甲酸、乳酸和丁二酸。

[0328] 为了生成被改造以产生 6-氨基己酸和 / 或己内酰胺的大肠杆菌株,编码在逆向己二酸降解途径和 6-氨基己酸或己内酰胺合成途径中利用的酶的核酸使用公知的分子生物学技术在大肠杆菌中表达 (参见,例如, Sambrook, 见前 2001 ; Ausubel 见前, 1999)。具体地,分别编码琥珀酰-CoA:乙酰-CoA 酰基转移酶、3-羟酰-CoA 脱氢酶和 3-羟基己二酰-CoA 脱水酶活性的 paaJ (NP\_415915.1)、paaH (NP\_415913.1) 和 maoC (NP\_415905.1) 基因克隆进在 PA1/lacO 启动子控制下的 pZE13 载体 (Expressys, Ruelzheim, Germany) 中。另外,分别编码 5-羧基-2-戊烯酰-CoA 还原酶和己二酰-CoA 合成酶活性的 bcd (NP\_349317.1)、etfAB (349315.1 和 349316.1) 和 sucCD (NP\_415256.1 和 AAC73823.1) 基因克隆进在 PA1/lacO 启动子控制下的 pZA33 载体 (Expressys, Ruelzheim, Germany) 中。最后,编码 CoA-依赖性醛脱氢酶、转氨酶和酰胺水解酶活性的 acrl (YP\_047869.1)、gabT (NP\_417148.1) 和 nylB (AAA24929.1) 基因克隆进第三个相容的在 PA1/lacO 启动子控制下的质粒 pZS23 中。pZS23 通过公知的分子生物学技术用卡那霉素抗性组件代替 pZS13 载体 (Expressys, Ruelzheim, Germany) 的氨比西林抗性组件而获得。这三组质粒转化至大肠杆菌株 MG1655 中以表达 6-氨基己酸和 / 或己内酰胺合成所需的蛋白质和酶。

[0329] 得到的遗传改造的生物体遵循本领域中公知的方法在含葡萄糖的培养基中培养 (参见,例如, Sambrook 等, 见前, 2001)。6-氨基己酸和己内酰胺合成基因的表达使用本领域中公知的用于确定多肽表达或酶活性的方法确认,包括,例如, Northern 印迹、mRNA 的 PCR 扩增、免疫印迹等。表达的酶的酶活性使用对各活性特异的测定法来确认。改造的大肠杆菌株产生 6-氨基己酸和 / 或己内酰胺的能力使用 HPLC、气相色谱-质谱法 (GCMS) 和 / 或液相色谱-质谱法 (LCMS) 来确认。

[0330] 被改造具有合成 6-氨基己酸和 / 或己内酰胺的功能性途径的微生物株通过优化该途径的有效利用而进一步增加。简言之,评估被改造的菌株以确定任一外源基因是否以限速水平表达。对于以可能限制通过该途径的通量的低水平表达的任何酶,例如通过引入额外的基因拷贝数增加其表达。

[0331] 为了生成较好的生产株,利用代谢建模来优化生长条件。建模还用来设计能另外地优化该途径的利用的基因敲除 (参见,例如,美国专利公开号 US2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US2003/0059792、US 2002/0168654

和 US 2004/0009466, 以及美国专利号 7, 127, 379)。建模分析允许可靠的预测朝向更有效地产生 6-氨基己酸和 / 或己内酰胺来改变代谢对细胞生长的作用。一种建模方法是双相优化法, OptKnock (Burgard 等, *Biotechnol. Bioengineer.* 84 :647-657 (2003)), 其被应用来选择基因敲除, 所述基因敲除综合地产生更好的 6-氨基己酸和 / 或己内酰胺产量。适应进化也可以用来生成例如, 产物的乙酰 -CoA 和琥珀酰 -CoA 中间体的更好的生产株。进行适应进化以改善生长和生产特性两者 (Fong 和 Palsson, *Nat. Genet.* 36 :1056-1058 (2004); Alper 等, *Science* 314 :1565-1568 (2006))。基于这些结果, 随后轮次的建模、遗传改造和适应进化可以应用于 6-氨基己酸和 / 或己内酰胺生产株以进一步增加产量。

[0332] 对于 6-氨基己酸和 / 或己内酰胺的大规模生产, 上述生物体在发酵罐中使用本领域中已知的培养基在厌氧条件下培养以支持该生物体的生长。发酵以分批、分批补料或连续的方式进行。厌氧条件通过首先用氮气喷射培养基, 然后用隔膜和压线帽密封培养容器, 例如, 烧瓶来保持。微氧条件也可以通过在隔膜中设置小孔用于限量通气来使用。通过加入酸, 诸如  $H_2SO_4$ , 将培养基的 pH 保持在约 7 的 pH。生长速率通过使用分光光度计 (600nm) 测量光密度来测定, 葡萄糖摄取速率可以通过监测碳源随时间的消耗来确定。通过 HPLC (Shimadzu), 例如使用 **Aminex®** 系列的 HPLC 柱 (例如, HPX-87 系列) (BioRad), 使用用于葡萄糖和醇的折射率检测器和用于有机酸的 UV 检测器可以定量副产物诸如不合乎需要的醇、有机酸和残余的葡萄糖 (Lin 等, *Biotechnol. Bioeng.* 775-779 (2005))。

[0333] 实施例 X

[0334] 经 2-羟基己二酰 -CoA 合成己二酸

[0335] 此实施例描述两个示例性己二酸合成途径, 该途径从  $\alpha$ -酮己二酸开始并且经过 2-羟基己二酰 -CoA 中间体。

[0336] 如实施例 VI 中所述,  $\alpha$ -酮己二酸是赖氨酸生物合成中的已知中间体, 其可以经高柠檬酸合成酶、高乌头酸酶和同分异构柠檬酸脱氢酶由  $\alpha$ -酮戊二酸形成。 $\alpha$ -酮己二酸可以通过图 9 中所描绘的两个途径转变为 2-羟基己二酰 -CoA。接着, 2-羟基己二酰 -CoA 可以被脱水和还原为己二酰 -CoA, 然后后者可以转变为己二酸, 如图 9 中所示。经这些途径从葡萄糖形成己二酸的最大产率为 0.67mol/mol。

[0337]  $\alpha$ -酮己二酸至 2-羟基己二酸的转变可以由 2-酮己二酸还原酶催化, 该酶据报道发现于大鼠和人胎盘中 (Suda 等, *Arch. Biochem. Biophys.* 176 :610-620 (1976); Suda 等, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 77 :586-591 (1977))。备选地, 能够将  $\alpha$ -酮戊二酸还原为 2-羟基戊二酸的酶还可以显示对  $\alpha$ -酮己二酸的活性,  $\alpha$ -酮己二酸仅长一个碳原子。一种拥有  $\alpha$ -酮戊二酸还原酶活性的此类酶是大肠杆菌的 serA (Zhao 和 Winkler, *J. Bacteriol.* 178(1) :232-9 (1996))。其他示例性的酶可以见于拟南芥 (Ho, 等, *J. Biol. Chem.* 274(1) :397-402 (1999)) 和流感嗜血杆菌。

[0338] serA NP\_417388.1 大肠杆菌

[0339] PGDH NP\_564034 拟南芥

[0340] serA P43885 流感嗜血杆菌

[0341] 参照图 9, 2-羟基己二酸可能通过实施例 I 中所述的合成酶、转移酶、磷酸己二酰转移酶和激酶转变为 2-羟基己二酰 -CoA。备选地, 具有 2-羟基戊二酸 CoA-转移酶或戊烯二酸 CoA-转移酶活性的酶可能适合于将 CoA 部分传递给 2-羟基己二酸。此类酶的一

个实例由发酵氨基酸球菌的 *gctA* 和 *gctB* 基因编码 (Buckel, 等, *Eur. J. Biochem.* 118(2) : 315-321 (1981) ;Mack, 等, *Eur. J. Biochem.* 226(1) :41-51 (1994))。类似地, 需要合成酶、转移酶或磷酸己二酰转移酶和激酶活性来将  $\alpha$ -酮己二酸转变为  $\alpha$ -酮己二酰-CoA, 如图 9 中所描绘。 $\alpha$ -酮己二酰-CoA 至 2-羟基己二酰-CoA 的转变可以由  $\alpha$ -羟酰-CoA 脱氢酶来执行。在适应丙酸的大肠杆菌细胞中报道有类似的活性, 该细胞的提取物催化乳酰-CoA 氧化以形成丙酮酰-CoA (Megraw 等, *J. Bacteriol.* 90(4) :984-988 (1965))。其他的羟酰-CoA 脱氢酶描述在实施例 I 中。

[0342] *gctA* Q59111 发酵氨基酸球菌

[0343] *gctB* Q59112 发酵氨基酸球菌

[0344] 2-羟基己二酰-CoA 脱水形成 5-羧基-2-戊烯酰-CoA 可以由 2-羟酰-CoA 脱水酶执行。2-羟基戊二酰-CoA 脱水酶系统已经在发酵氨基酸球菌中表征并且需要 *hgdA* 和 *hgdB* 亚基两者, 和需要激活蛋白 *hgdC* 以获得最佳活性 (Dutschko 等, *Eur. J. Biochem.* 181(3) :741-746 (1989) ;Locher 等 *J. Mol. Biol.* 307(1) :297-308 ;Muller 和 Buckel, *Eur. J. Biochem.* 230(2) :698-704 (2001) ;Schweiger 等 *Eur. J. Biochem.* 169(2) : 441-448 (1987))。此酶系统在机制上类似于丙酸梭菌的乳酰-CoA 脱水酶 (Hofmeister 和 Buckel, *Eur. J. Biochem.* 206(2) :547-552 (1992) ;Kuchta 和 Abeles, *J. Biol. Chem.* 260(24) :13181-13189 (1985))。*hgdA*、*hgdB* 和 *hgdC* 的同源物存在于几种生物体中。

[0345] *hgdA* P11569 发酵氨基酸球菌

[0346] *hgdB* P11570 发酵氨基酸球菌

[0347] *hgdC* P11568 发酵氨基酸球菌

[0348] *hgdA* ZP\_03731126.1 梭菌属 M62/1

[0349] *hgdB* ZP\_03731125.1 梭菌属 M62/1

[0350] *hgdC* ZP\_03731127.1 梭菌属 M62/1

[0351] *hgdA* NP\_603114.1 具核梭杆菌 ATCC 25586

[0352] *hgdB* NP\_603115.1 具核梭杆菌 ATCC 25586

[0353] *hgdC* NP\_603113.1 具核梭杆菌 ATCC 25586

[0354] 5-羧基-2-戊烯酰-CoA 至己二酸的转化由实施例 I 中所述的酶执行。

[0355] 上面的描述提供了借助于 2-羟基己二酰-CoA 途径的示例性己二酸合成途径。

[0356] 实施例 XI

[0357] 具有 2-羟基己二酰-CoA 途径的产生己二酸的微生物生物体的制备

[0358] 此实施例描述了生成能够使用 2-羟基己二酰-CoA 途径产生己二酸的微生物生物体。

[0359] 大肠杆菌用作靶生物体以改造用于己二酸合成的必需基因 (参见图 9)。大肠杆菌提供用于生成能够产生己二酸的非天然存在的微生物的良好宿主。大肠杆菌易于进行遗传操作, 并且已知能够在厌氧或微氧条件下有效地产生各种产物, 如乙醇、乙酸、甲酸、乳酸和丁二酸。

[0360] 为了生成被改造以产生己二酸的大肠杆菌株, 编码在 2-羟基己二酰-CoA 至己二酸途径中利用的酶的核酸使用公知的分子生物学技术在大肠杆菌中表达 (参见, 例如, Sambrook, 见前 2001 ;Ausubel 见前, 1999)。具体地, 分别编码 2-羟基己二酸脱氢

酶和 2- 羟基己二酰 -CoA :乙酰 -CoA 转移酶活性的 serA(NP\_417388.1)、gctA(Q59111) 和 gctB(Q59112) 基因克隆进在 PA1/lacO 启动子控制下的 pZE13 载体 (Expressys, Ruelzheim, Germany) 中。另外,分别编码 2- 羟基己二酰 -CoA 脱水酶活性的 hgdA(P11569)、hgdB(P11570) 和 hgdC(P11568) 基因克隆进在 PA1/lacO 启动子控制下的 pZA33 载体 (Expressys, Ruelzheim, Germany) 中。此外,编码 5- 羧基 -2- 戊烯酰 -CoA 还原酶和己二酰 -CoA 合成酶活性的 bcd(NP\_349317.1)、etfAB(349315.1 和 349316.1) 和 sucCD(NP\_415256.1 和 AAC73823.1) 基因克隆进第三个相容的在 PA1/lacO 启动子控制下的质粒 pZS23 中。pZS23 通过公知的分子生物学技术用卡那霉素抗性组件代替 pZS13 载体 (Expressys, Ruelzheim, Germany) 的氨比西林抗性组件而获得。这三组质粒转化至大肠杆菌株 MG1655 中以表达己二酸合成所需的蛋白质和酶。

[0361] 得到的遗传改造的生物体遵循本领域中公知的方法在含葡萄糖的培养基中培养 (参见,例如, Sambrook 等,见前,2001)。用于己二酸合成的 2- 羟基己二酰 -CoA 途径基因的表达使用本领域中公知的用于确定多肽表达或酶活性的方法确认,包括,例如, Northern 印迹、mRNA 的 PCR 扩增、免疫印迹等。表达的酶的酶活性使用对各活性特异的测定法来确认。改造的大肠杆菌株产生己二酸的能力使用 HPLC、气相色谱 - 质谱法 (GCMS) 和 / 或液相色谱 - 质谱法 (LCMS) 来确认。

[0362] 被改造具有功能性己二酸合成途径的微生物株通过优化该途径的有效利用而进一步增加。简言之,评估被改造的菌株以确定任一外源基因是否以限速水平表达。对于以可能限制通过该途径的通量的低水平表达的任何酶,例如通过引入额外的基因拷贝数增加其表达。

[0363] 为了生成较好的生产株,利用代谢建模来优化生长条件。建模还用来设计能另外地优化该途径的利用的基因敲除 (参见,例如,美国专利公开号 US2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US2003/0059792、US 2002/0168654 和 US 2004/0009466,以及美国专利号 7,127,379)。建模分析允许可靠的预测朝向更有效地产生己二酸来改变代谢对细胞生长的作用。一种建模方法是双相优化法, OptKnock (Burgard 等, Biotechnol. Bioengineer. 84 :647-657 (2003)), 其被应用来选择基因敲除,所述基因敲除综合地产生更好的己二酸产量。适应进化也可以用来生成例如,  $\alpha$  - 酮己二酸中间体或己二酸产物的更好的生产株。进行适应进化以改善生长和生产特性两者 (Fong 和 Palsson, Nat. Genet. 36 :1056-1058 (2004) ;Alper 等, Science 314 :1565-1568 (2006))。基于这些结果,随后轮次的建模、遗传改造和适应进化可以应用于己二酸生产株以进一步增加产量。

[0364] 对于己二酸的大规模生产,含 2- 羟基己二酰 -CoA 途径的生物体在发酵罐中使用本领域中已知的培养基在厌氧条件下培养以支持该生物体的生长。发酵以分批、分批补料或连续的方式进行。厌氧条件通过首先用氮气喷射培养基,然后用隔膜和压线帽密封培养容器,例如,烧瓶来保持。微氧条件也可以通过在隔膜中设置小孔用于限量通气来使用。通过加入酸,诸如  $H_2SO_4$ , 将培养基的 pH 保持在约 7 的 pH。生长速率通过使用分光光度计 (600nm) 测量光密度来测定,葡萄糖摄取速率可以通过监测碳源随时间的消耗来确定。通过 HPLC (Shimadzu), 例如使用 **Aminex®** 系列的 HPLC 柱 (例如, HPX-87 系列) (BioRad), 使用用于葡萄糖和醇的折射率检测器和用于有机酸的 UV 检测器可以定量副产物诸如不合乎需要的醇、有机酸和残余的葡萄糖 (Lin 等, Biotechnol. Bioeng. 775-779 (2005))。

[0365] 此实施例描述了含有 2-羟基己二酰-CoA 途径的产生己二酸的微生物生物体的制备。

[0366] 在整个本申请中已经参考了许多出版物。这些出版物的公开内容整体地通过引用合并于本申请中,以便更充分地描述本发明所属领域的技术水平。尽管本发明已经参照上面提供的实施例进行了描述,但应当理解在不背离本发明的精神的前提下可以作出各种改动。

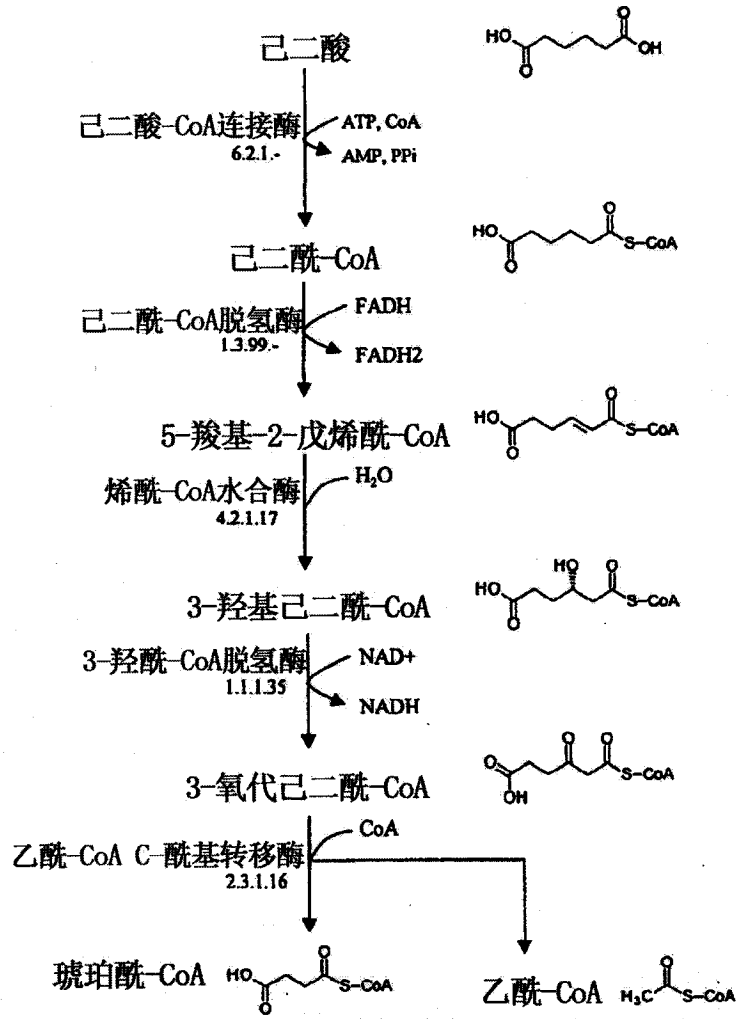


图 1

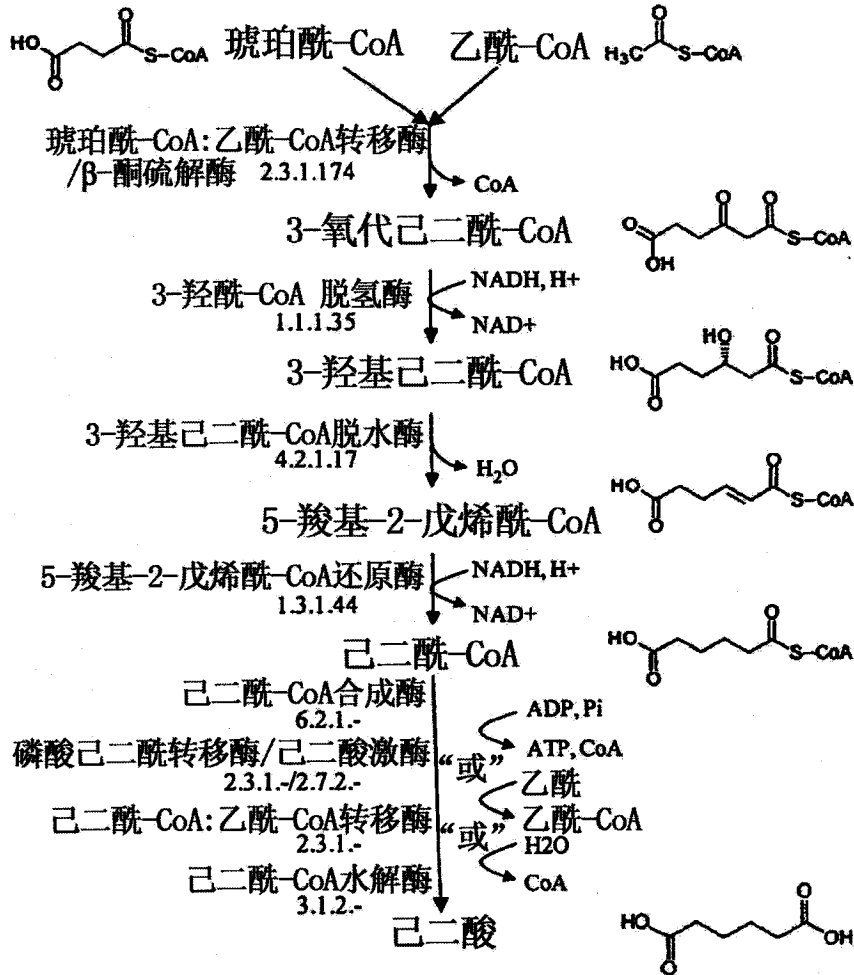


图 2

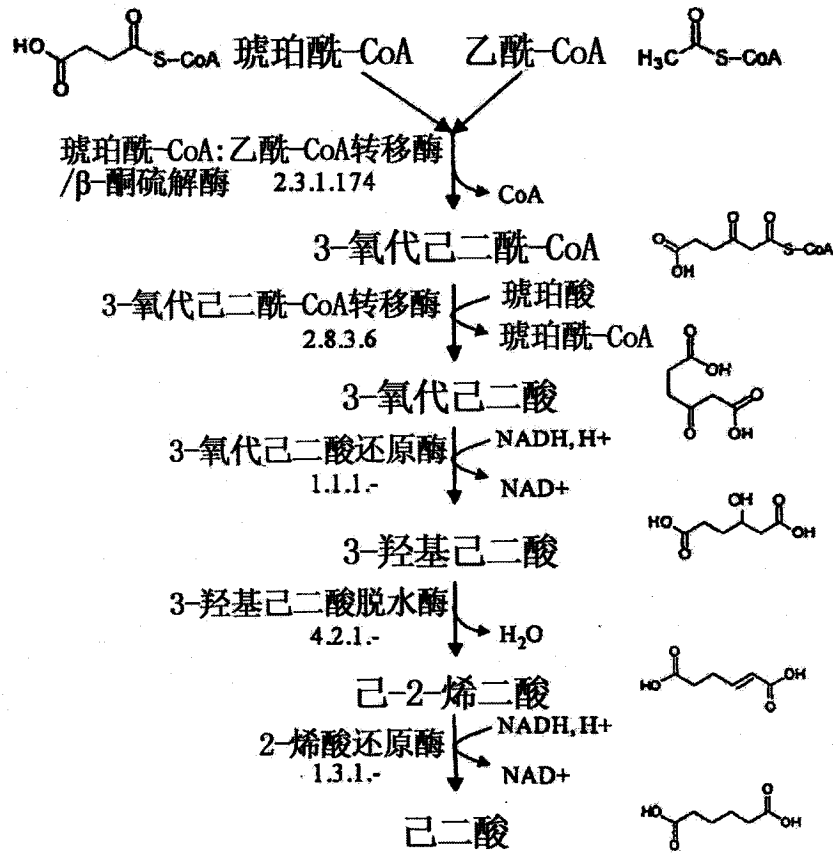


图 3

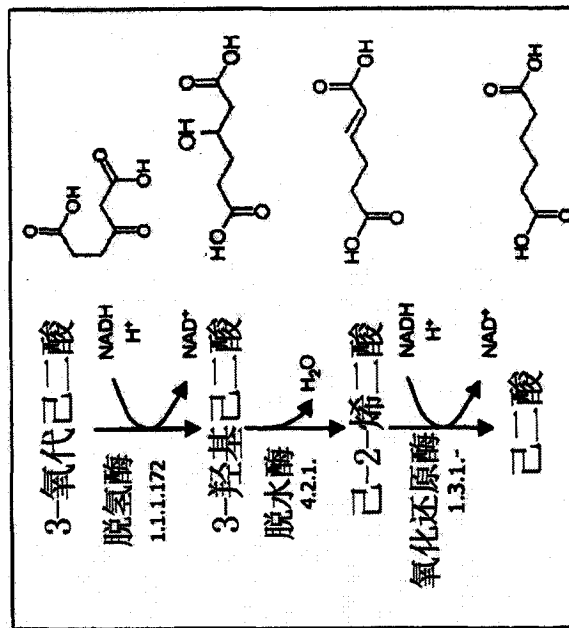
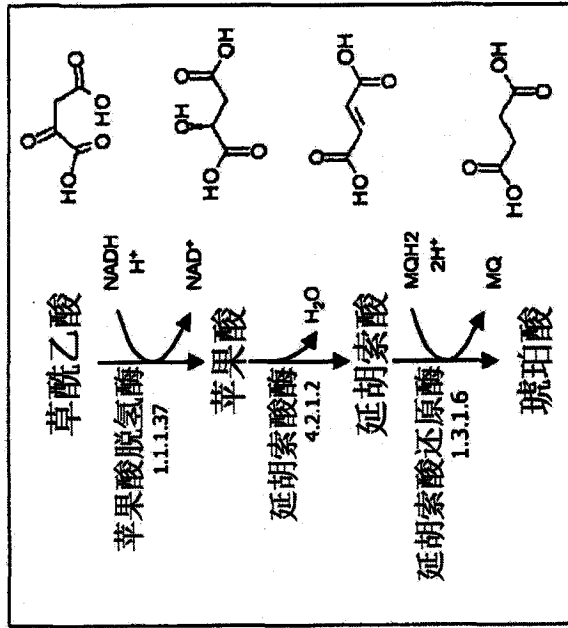


图 4

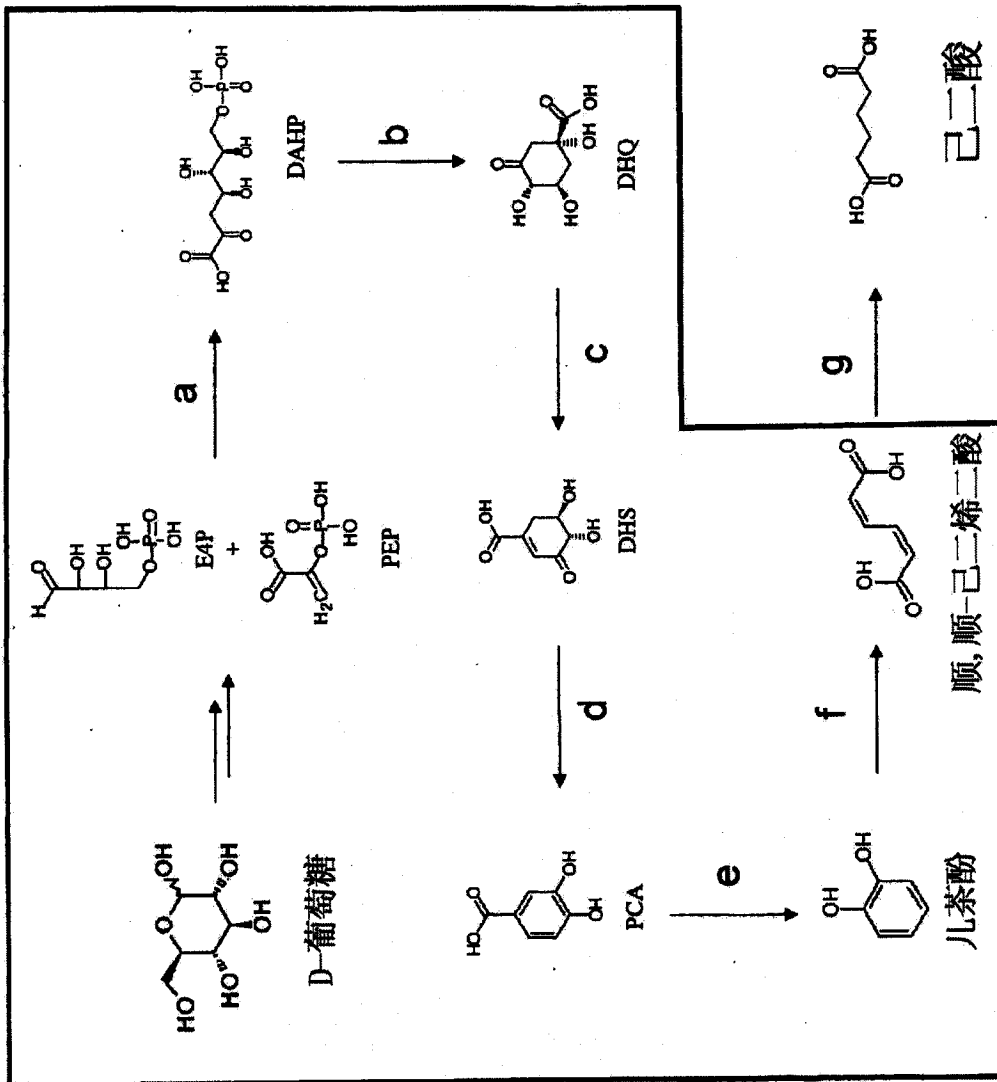


图 5

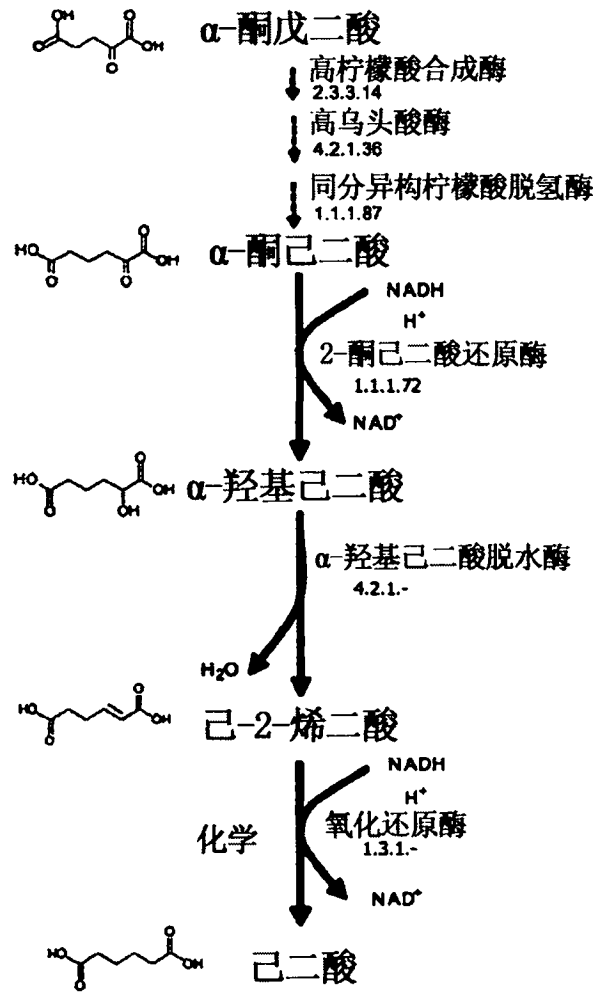


图 6

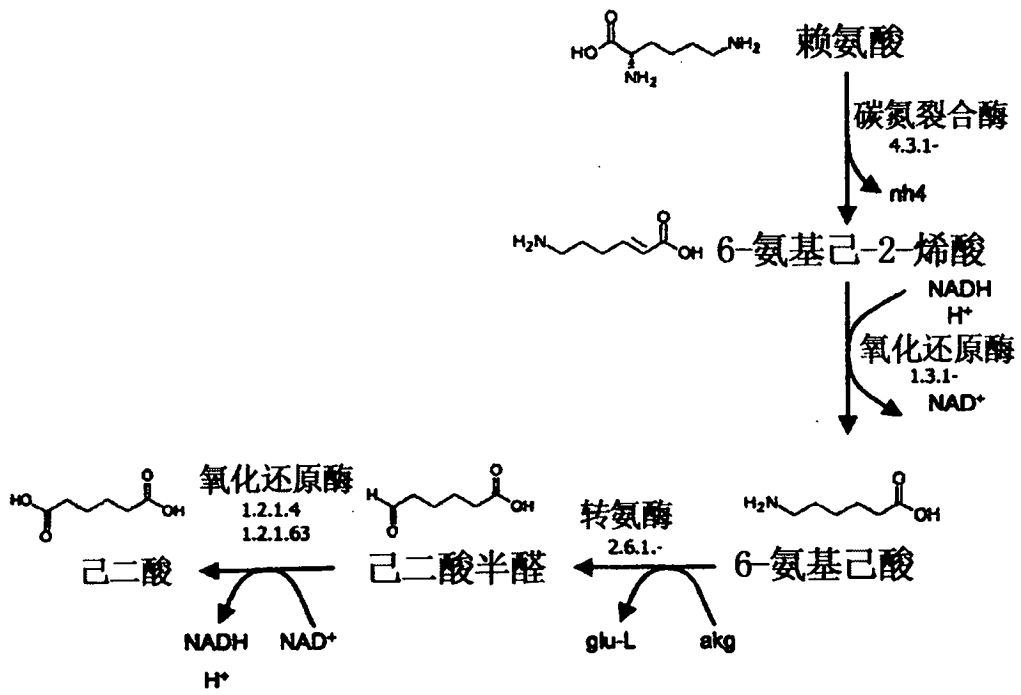


图 7

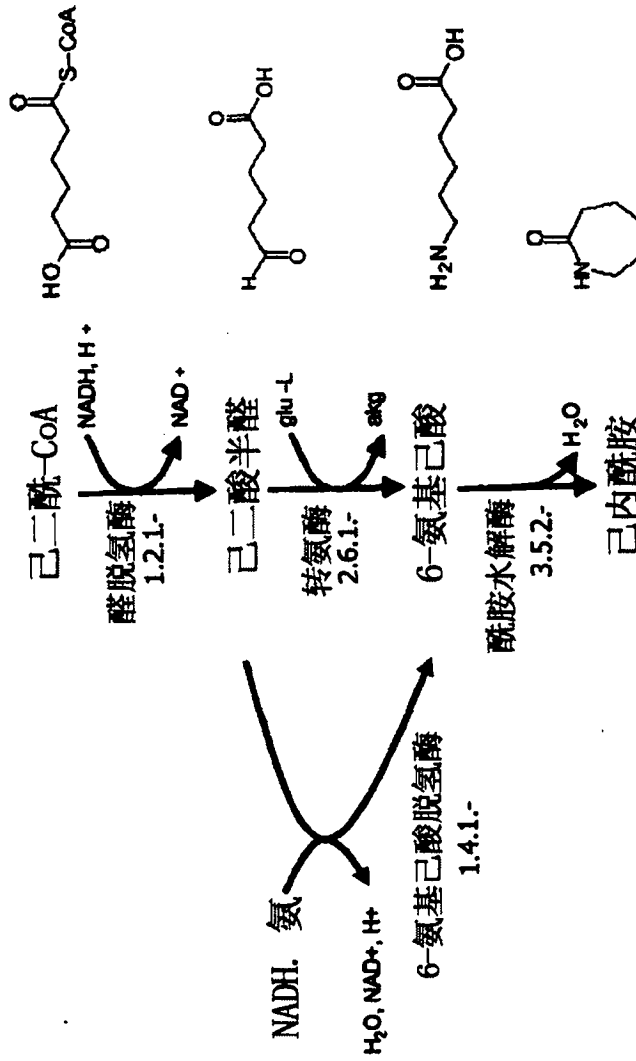


图 8

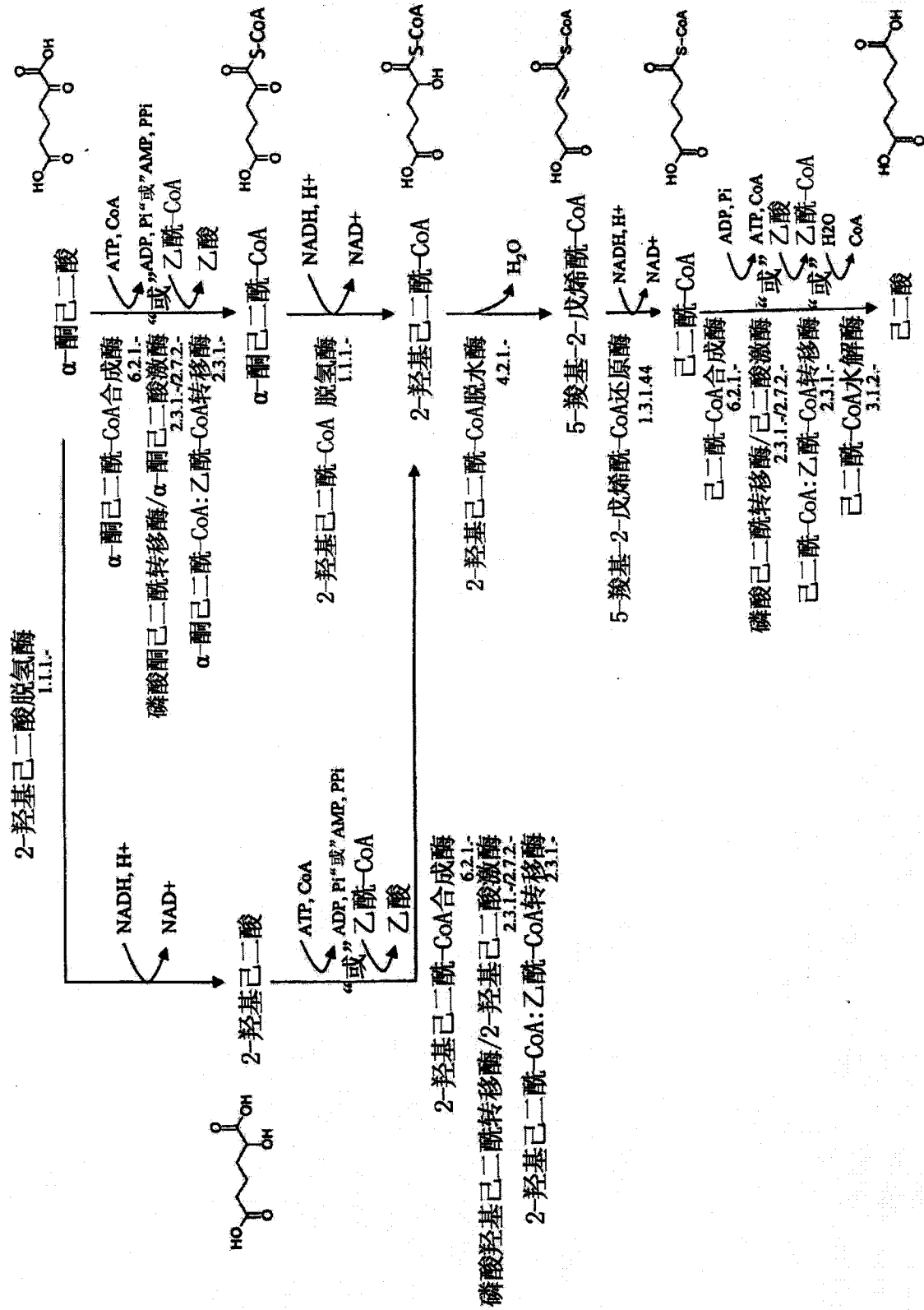


图 9