(19) Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 11 2019 005 312 T5** 2021.09.16

(12) # Veröffentlichung

der internationalen Anmeldung mit der
(87) Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2020/085879**
in der deutschen Übersetzung (Art. III § 8 Abs. 2 IntPatÜG)
(21) Deutsches Aktenzeichen: **11 2019 005 312.4**
(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/KR2019/014256**
(86) PCT-Anmeldetag: **28.10.2019**
(87) PCT-Veröffentlichungstag: **30.04.2020**
(43) Veröffentlichungstag der PCT Anmeldung in deutscher Übersetzung: **16.09.2021**

(51) Int Cl.: ***C12P 7/62*** (2006.01)
C12N 9/10 (2006.01)
C07K 14/195 (2006.01)
C07K 14/37 (2006.01)
C07K 14/39 (2006.01)
C07K 14/405 (2006.01)
C12P 1/00 (2006.01)

(30) Unionspriorität:
10-2018-0129090 26.10.2018 KR

(71) Anmelder:
Industry-Academic Cooperation Foundation Gyeongsang National University, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, KR; Kyungpook National University Industry-Academic Cooperation Foundation, Daegu, KR

(74) Vertreter:
Dr. Schön, Neymeyr & Partner mbB, 80336 München, DE

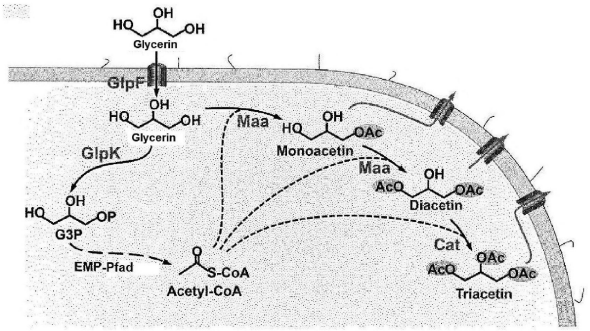
(72) Erfinder:
Kim, Seon Won, Sejong-si, KR; Jeong, Seong Hee, Gimhae-si, Gyeongsangnam-do, KR; Kim, Kyung Jin, Daegu, KR; Bakht, Zada, Jinju-si, Gyeongsangnam-do, KR

Prüfungsantrag gemäß § 44 PatG ist gestellt.

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen.

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN ZUR BIOLOGISCHEN HERSTELLUNG EINER ACETINVERBINDUNG**

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur biologischen Herstellung von Monoacetin, Diacetin oder Triacetin, bei dem eine Acetylgruppe unter Verwendung einer O-Acetyltransferase auf Glycerin übertragen wird, und betrifft ein Verfahren und eine Zusammensetzung zur Gewinnung von Acetin besserer Qualität, das bzw. die nachhaltig ist, keine Umweltverschmutzung verursacht und sicher ist.



Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die vorliegende Verbindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung einer Acetinverbindung und eine Zusammensetzung zur Herstellung von Acetin.

Beschreibung des Standes der Technik

[0002] Acetin ist eine Substanz, in welcher eine Acetylgruppe mit einer Hydroxylgruppe (-OH) von Glycerin esterverknüpft ist, wobei entsprechend der Anzahl an verknüpften Acetylgruppen eine Einteilung in Monoacetin, welches eine gebundene Acetylgruppe aufweist, Diacetin, welches zwei gebundene Acetylgruppen aufweist, und Triacetin, welches drei gebundene Acetylgruppen aufweist, erfolgt. Insbesondere ist Triacetin auch als Glycerintriacetat oder Triglycerid-1,2,3-triacetoxypropan bekannt.

[0003] Acetin wird als Nahrungsmitteladditiv, wie beispielsweise Duftstofflösemittel und -benetzungsmittel, verwendet und ferner als Feuchthaltemittel, Plastifizierungsmittel und Lösemittel in der pharmazeutischen Industrie eingesetzt. Triacetin kann als Antiklopfmittel zur Verringerung des Klopfen in einem Benzinmotor und als Kraftstoffadditiv zur Verbesserung der Niedertemperatur- und Viskositätseigenschaften von Biodiesel verwendet werden. Zur Herstellung von Acetin, das als Kraftstoffadditiv für Biodiesel verwendbar ist, unter Verwendung von Abfallglycerin, d.h. von in einer großen Menge erzeugten Nebenprodukten, gibt es auf dem einschlägigen Fachgebiet eine Technologie, die in der Lage ist, das Konzept „Null-Abfall“ zu realisieren, das gegenwärtig ein heißes Thema in der Bioraffinerie-Industrie ist, um Abfälle oder Nebenprodukte zu verringern oder zu recyclieren. Gemäß den von den Top fünf Tabakunternehmen veröffentlichten Berichten von 1994 ist Triacetin eines der Tabakadditive und wird auch als Plastifizierungsmittel in einem Verfahren zur Herstellung von Tabakfiltern verwendet. Ferner wird Triacetin auch als wichtiger Bestandteil in künstlichen Weltraumnahrungsmitteln zur Bereitstellung von mehr als der Hälfte der Energie, die Astronauten, die lange Weltraumflugmissionen unternehmen, benötigen. Die amerikanische Nahrungsmittel- und Arzneimittel-Behörde (FDA) sieht Triacetin als sehr sicheres Nahrungsmitteladditiv an („Allgemein als sicher anerkannt: GRAS“).

[0004] Mittlerweile ist ein Acetinmaterial eine viskose, farblose und geruchslose Flüssigkeit. Das existierende Acetinmaterial ist ein künstlich hergestelltes chemisches Material, in dem Essigsäure oder Essigsäureanhydrid über eine chemische Reaktion mit Glycerin kombiniert ist.

[0005] Es wurde bisher kein biologisches Verfahren zur Herstellung von Acetin offenbart. Es gibt jedoch fortlaufend Bedarf an einem Verfahren zur Herstellung eines Acetinmaterials mittels eines biologischen Verfahrens, das somit sicher ist und eine bessere Qualität besitzt und gleichzeitig keine Umweltprobleme hervorruft.

[0006] Die Erfinder der vorliegenden Erfindung haben festgestellt, dass Acetinverbindungen auf einem biologischen Wege unter Verwendung von Enzymen, die Acetylgruppen an Glycerin oder Derivate von Glycerin über eine Veresterungsreaktion binden, hergestellt werden können, wobei Spurenmengen von Monoacetin von einigen der Darmbakterien (Enterobacteriaceae) unter Verwendung von Glycerin als Kohlenstoffquelle in der Natur hergestellt werden.

[0007] Folglich haben die Erfinder der vorliegenden Erfindung einen rekombinanten Mikroorganismus mit der Fähigkeit zur Herstellung von Monoacetin, Diacetin und Triacetin unter Verwendung von Glycerin oder Glucose als Ausgangssubstrat hergestellt und die vorliegende Erfindung vollendet (**Fig. 1** und **Fig. 2**).

Zusammenfassung der Erfindung

Von der Erfindung zu lösende Probleme

[0008] Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein Verfahren zum biologischen Herstellen einer Acetinverbindung und eine Zusammensetzung zur Herstellung der Acetinverbindung bereitzustellen.

Mittel zum Lösen der Probleme

[0009] Um die obigen Aufgaben zu lösen, werden die folgenden technischen Lösungen gemäß der vorliegenden Erfindung eingesetzt.

1. Verfahren zur Herstellung von Acetin, einschließlich eines Umsetzens von Acetyl-CoA mit Glycerin in Gegenwart einer ersten O-Acetyltransferase zur Herstellung von Monoacetin oder Diacetin.

2. Verfahren gemäß obigem Punkt 1, wobei die erste O-Acetyltransferase Maltose-O-Acetyltransferase ist.

3. Verfahren gemäß obigem Punkt 1, wobei in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position **70** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparaginsäure (ASP) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **84** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparagin (ASN) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **114** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Histidin (HIS) ist, und die Aminosäure an einer Position, die der Position **126** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Glutaminsäure (GLU) ist.

4. Verfahren gemäß obigem Punkt 3, wobei in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position **15** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) oder Phenylalanin (PHE) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **26** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Glutamin (GLN) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **30** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Lysin (LYS) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **71** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) ist und die Aminosäure an einer Position, die der Position **82** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist.

5. Verfahren gemäß obigem Punkt 1, wobei die erste O-Acetyltransferase aus einer beliebigen Sequenz der SEQ ID Nrn. 1 bis 6 besteht.

6. Verfahren gemäß obigem Punkt 1, das ferner ein Umsetzen von Diacetin als Reaktionsprodukt mit Acetyl-CoA in Gegenwart einer zweiten O-Acetyltransferase umfasst, um so Triacetin herzustellen.

7. Verfahren gemäß obigem Punkt **6**, wobei in der zweiten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position **31** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Cystein (CYS) oder Leucin (LEU) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **102** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Isoleucin (ILE) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **143** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **166** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **170** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Valin (VAL), Isoleucin (ILE) oder Leucin (LEU) ist und die Aminosäure an einer Position, die der Position **193** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Histidin (HIS) ist.

8. Verfahren gemäß obigem Punkt **6**, wobei die zweite O-Acetyltransferase aus einer beliebigen Sequenz der SEQ ID Nrn. 7 bis 10 besteht.

9. Verfahren zur Herstellung von Acetin, dass ein Züchten eines Mikroorganismus, der ein Gen mit Codierung für eine erste O-Acetyltransferase exprimiert, in einem Glycerin enthaltenden Medium umfasst.

10. Verfahren gemäß obigem Punkt 9, wobei die erste O-Acetyltransferase Maltose-O-Acetyltransferase ist.

11. Verfahren gemäß obigem Punkt 9, wobei in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position **70** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparaginsäure (ASP) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **84** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparagin (ASN) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **114** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Histidin (HIS) ist und die Aminosäure an einer Position, die der Position **126** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Glutaminsäure (GLU) ist.

12. Verfahren gemäß obigem Punkt 9, wobei in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position **15** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) oder Phenylalanin (PHE) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **26** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Glutamin (GLN) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **30** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Lysin (LYS) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **71** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **82** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist.

13. Verfahren gemäß obigem Punkt 9, wobei das Gen mit Codierung für die erste O-Acetyltransferase aus einer beliebigen Sequenz der SEQ ID Nrn. 16 bis 21 besteht.

14. Verfahren gemäß obigem Punkt 9, wobei der Mikroorganismus ferner ein Gen mit Codierung für eine zweite O-Acetyltransferase, die eine Acetylgruppe auf Diacetin überträgt, exprimiert.

15. Verfahren gemäß obigem Punkt **14**, wobei in der zweiten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position **31** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Cystein (CYS) oder Leucin (LEU) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **102** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Isoleucin (ILE) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **143** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **166** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **170** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Valin (VAL), Isoleucin (ILE) oder Leucin (LEU) ist und die Aminosäure an einer Position, die der Position **193** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Histidin (HIS) ist.

16. Verfahren gemäß obigem Punkt **14**, wobei das Gen mit Codierung für die zweite O-Acetyltransferase aus einer beliebigen Sequenz der SEQ ID Nrn. 24 bis 27 besteht.

17. Verfahren gemäß obigem Punkt 9, wobei der Mikroorganismus ein Gen mit Codierung für Acetylesterase, das abgeschwächt oder deletiert ist, umfasst.

18. Verfahren gemäß obigem Punkt 9, wobei der Mikroorganismus ferner Gene mit Codierung für Glycerin-3-phosphatdehydrogenase und Glycerin-3-phosphatase („DL-Glycerin-3-phosphatase“) exprimiert und das Medium Glucose umfasst.

19. Zusammensetzung zur Herstellung von Acetin, die einen Mikroorganismus umfasst, der ein Gen mit Codierung für eine erste O-Acetyltransferase exprimiert.

20. Zusammensetzung gemäß obigem Punkt **19**, wobei die erste O-Acetyltransferase Maltose-O-Acetyltransferase ist.

21. Zusammensetzung gemäß obigem Punkt **19**, wobei in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position **70** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparaginsäure (ASP) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **84** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparagin (ASN) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **114** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Histidin (HIS) ist und die Aminosäure an einer Position, die der Position **126** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Glutaminsäure (GLU) ist.

22. Zusammensetzung gemäß obigem Punkt **19**, wobei in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position **15** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) oder Phenylalanin (PHE) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **26** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Glutamin (GLN) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **30** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Lysin (LYS) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **71** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **82** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist.

23. Zusammensetzung gemäß obigem Punkt **19**, wobei das Gen mit Codierung für die erste O-Acetyltransferase aus einer beliebigen Sequenz der SEQ ID Nrn. 16 bis 21 besteht.

24. Zusammensetzung gemäß obigem Punkt **19**, wobei der Mikroorganismus ferner ein Gen mit Codierung für eine zweite O-Acetyltransferase, die eine Acetylgruppe auf Diacetin überträgt, exprimiert.

25. Zusammensetzung gemäß obigem Punkt **24**, wobei in der zweiten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position **31** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Cystein (CYS) oder Leucin (LEU) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **102** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Isoleucin (ILE) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **143** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **166** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position **170** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Valin (VAL), Isoleucin (ILE) oder Leucin (LEU) ist und die Aminosäure an einer Position, die der Position **193** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Histidin (HIS) ist.

26. Zusammensetzung gemäß obigem Punkt **24**, wobei das Gen mit Codierung für die zweite O-Acetyltransferase aus einer beliebigen Sequenz der SEQ ID Nrn. 24 bis 27 besteht.

27. Zusammensetzung gemäß obigem Punkt **19**, wobei der Mikroorganismus ein Gen mit Codierung für Acetylesterase, das abgeschwächt oder deletiert ist, umfasst.

28. Zusammensetzung gemäß obigem Punkt **19**, wobei der Mikroorganismus ferner Gene mit Codierung für Glycerin-3-phosphatdehydrogenase und DL-Glycerin-3-phosphatase exprimiert.

Vorteilhafte Wirkungen

[0010] Gemäß der vorliegenden Erfindung wird ein Verfahren zur Herstellung eines Acetinmaterials mittels eines biologischen Verfahrens bereitgestellt, wobei das hergestellte Acetinmaterial nachhaltig und sicher ist und eine bessere Qualität aufweist und gleichzeitig keine Umweltverschmutzung hervorruft.

Figurenliste

Fig. 1 veranschaulicht einen Weg, auf dem Glycerin, das in Zellen eingeführt ist, in Monoacetin, Diacetin und Triacetin umgewandelt wird.

Fig. 2 veranschaulicht einen Weg, auf dem Glucose, die in Zellen eingeführt ist, in Monoacetin, Diacetin und Triacetin umgewandelt wird.

Fig. 3: (A) ist ein Strukturdiagramm der Plasmide pMD1 bis pMD8, die durch Auswählen der O-Acetyltransferasekandidatengene in E. coli, die in der Lage sind, eine Acetylgruppe auf Glycerin zu übertragen, um Monoacetin und Diacetin zu erzeugen, und Klonieren jedes Gens in einen pTrc99A-Expressionsvektor hergestellt wurden; (B) ist ein Diagramm, das einen Vergleich der Produktivität von Monoacetin und Diacetin in den rekombinanten E. coli-Zellen DH-MD1 bis DH-MD8, die mit den Plasmiden von (A) transformiert wurden, veranschaulicht (DH-MD0 zeigt eine rekombinante E. coli-Zelle, das mit einem leeren Vektor pTrc99A transformiert wurde); (C) ist ein Strukturdiagramm der Plasmide pMD9 bis pMD13, die durch Auswählen von aus anderen Mikroorganismen, bei denen auf Basis der Struktur und Aminosäuresequenz von E. coli-Maltose-O-Acetyltransferase (Maa) gefolgert wurde, dass sie eine Acetylgruppe auf Glycerin übertragen, und anschließendes Klonieren jedes Gens in den pTrc99A-Expressionsvektor hergestellt wurden; und (D) ist ein Diagramm, das einen Vergleich der Produktivität von Monoacetin und Diacetin in den rekombinanten E. coli-Zellen DH-MD9 bis DH-MD13, die mit den obigen Plasmiden transformiert wurden, veranschaulicht.

Fig. 4: (A) ist ein Strukturdiagramm der Plasmide pMD13, pMD14 und pMDT1, die durch Klonieren des Maa-Gens (Bs-maa) von B. subtilis, das die beste Monoacetin- und Diacetin-Produktivität besaß, in pTrc 99A-, pET28a- und pSTV28-Expressionsvektoren hergestellt wurden; (B) ist ein Diagramm, das einen Vergleich der Produktivität von Monoacetin, Diacetin und Triacetin in den rekombinanten E. coli-Zellen DH-MD13, DH-MD14 und DH-MDT1, die mit den obigen Plasmiden transformiert wurden, veranschaulicht; und (C) ist ein Diagramm, das einen Vergleich der Stämmeproliferation einer jeden rekombinanten E. coli-Zelle veranschaulicht.

Fig. 5: (A) ist ein Diagramm eines Gaschromatogramms, das eine GC-Analyse einer Mischung von Standardverbindungen (STD) aus Monoacetin (1), Diacetin (**2**) und Triacetin (3) und eines Kulturmediums der rekombinanten E. coli-Zellen DH-MD06, DHMD8 und DH-MDT1 nach Extraktion derselben mit Ethylacetat zeigt; und (B) ist ein Diagramm, das einen massenspektrometrischen Vergleich von Monoacetin, Diacetin und Triacetin, die in jeder Probe mittels GC-MS erhalten wurden, gegenüber der Analyse der Standardverbindungen veranschaulicht.

Fig. 6: (A) ist ein Strukturdiagramm des Plasmids pMDT2, das durch Klonieren des Chloramphenicol-O-Acetyltransferase-Gens (cat) und des Maa-Gens von B. subtilis (Bs-maa), die Diacetin in Triacetin umwandeln, in den pTrc99A- Expressionsvektor hergestellt wurde; (B) und (C) sind Diagramme, die jeweils einen Vergleich der Produktivität und Bestandteilszusammensetzung des Acetinkomplexes der rekombinanten E. coli-Zelle DH-MDT2, die mit dem obigen Plasmid transformiert wurde, gegenüber dem Vergleich DH-MDT1 veranschaulicht; und (D) veranschaulicht eine Veränderung der Produktivität in Abhängigkeit von der Kulturzeit des Acetinkomplexes in der rekombinanten E. coli-Zelle DH-MDT2.

Fig. 7: (A) ist ein Strukturdiagramm der Plasmide pMDT2 bis pMDT7, die durch Auffinden von Kandidatengenen in verschiedenen Mikroorganismen, bei denen auf Basis der Struktur und Aminosäuresequenz der Chloramphenicol-O-Acetyltransferase gefolgert wurde, dass sie eine Acetylgruppe auf Diacetin übertragen, und anschließendes Klonieren derselben in das Plasmid pMD13 hergestellt wurden; (B) ist ein Diagramm, das einen Vergleich der Produktionsmengen des Acetinkomplexes der rekombinanten Stämme DH-MDT2 bis DH-MDT7, die mit den obigen Plasmiden transformiert wurden, veranschaulicht; und (C) ist ein Diagramm, das einen Vergleich der Stämmeproliferation der rekombinanten Stämme veranschaulicht.

Fig. 8 ist ein Diagramm, das einen Vergleich der Produktivität des Acetinkomplexes in Abhängigkeit von der E. coli-Spezies und der Glycerinkonzentration veranschaulicht, wobei: (A) einen Vergleich der Produktivität des Acetinkomplexes durch Züchten der rekombinanten E. coli-Zellen DH-MDT2, AC-MDT2, BW-MDT2, W3-MDT2 und MG-MDT2, die aus E. coli DH5α, AceCo, BW25113, W3110 und MG1655 mit dem Plasmid pMDT2 transformiert wurden, veranschaulicht; (B) einen Vergleich der Stämmeproliferation des obigen rekombinanten E. coli veranschaulicht; (C) die Produktivität des Acetinkomplexes in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration in der Kultur des rekombinanten Stamms MG-MDT2 veranschaulicht; und (D) einen Vergleich der Stämmeproliferation in Abhängigkeit von der Glycerinkonzentration der obigen Stämme veranschaulicht.

Fig. 9 veranschaulicht die Beobachtung der Veränderung der Acetinverbindung durch Amplifikation und Deletion des Acetylesterasegens (aes) in E. coli BW25113, wobei (A) und (B) die Beobachtung des Abbaumusters von Triacetin nach Impfen der rekombinanten Stämme BW-Empty und BW-Aes BW25113, die mit pTr99A bzw. pTAes transformiert wurden, in 2YT-Medium, das 15 g/L zugesetzte Triacetinstandardverbindung enthält, zeigen; (C) einen Vergleich der Produktivität des Acetinkomplexes durch Züchten der rekombinanten Stämme BW-MDT2 und BW-MDT2 (Daes), die aus dem BW25113-Stamm bzw. dem JW0465-Stamm mit deletiertem aes-Gen mit dem Plasmid pMDT2 transformiert wurden, in 2YT-Medium, das 10% (v/v) zugesetztes Glycerin enthält, veranschaulicht; und (D) einen Vergleich der Stämmeproliferation der obigen rekombinanten Stämme veranschaulicht.

Fig. 10: (A) ist ein Strukturdiagramm des Plasmids pMDT8, das durch Klonieren der von saccharomyces cerevisiae abgeleiteten, Glycerin produzierenden Gene Sc-gpd1 und Scgdp2 in das pMDT2-Plasmid zur Herstellung eines Acetinkomplexes aus Glucose hergestellt wurde; (B) veranschaulicht die Produktion des Acetinkomplexes aus Glucose eines mit dem obigen Plasmid transformierten, rekombinanten E. coli DH-MDT8; (C) veranschaulicht die Stämmeproliferation von E. coli; und (D) veranschaulicht die pH-Wertänderung des Kulturmediums.

Fig. 11 veranschaulicht eine Struktur der Substratbindungsstelle in BsMAA Maltoseacetyltransferase, wobei die Schlüsselreste der Glycerinacetylierung Asparaginsäure (ASP) an der Position **70**, Asparagin (ASN) an der Position **84**, Histidin (HIS) an der Position **114** und Glutaminsäure (GLU) an der Position **126** der Aminosäuresequenz sind.

Fig. 12 veranschaulicht die Ergebnisse einer Sequenzausrichtung der MAA-ähnlichen Enzyme von Bacillus subtilis.

Fig. 13 veranschaulicht eine Struktur der Substratsbindungsstelle in der CAT Chloramphenicol-O-Acetyltransferase, wobei die Schlüsselreste der Diacetinacetylierung Phenylalanin (PHE) an der Position **102**, Phenylalanin (PHE) an der Position **143** und Histidin (HIS) an der Position **193** der Aminosäuresequenz sind. In diesem Zusammenhang können die Reste an den Positionen **102** und **143** der Sequenz durch Aminosäuren mit ähnlichen Eigenschaften wie beispielsweise Isoleucin (ILE) bzw. Tyrosin (TYR) ersetzt werden. Dies ist in **Fig. 14** zum Vergleich der Aminosäuresequenzausrichtung der zweiten O-Acetyltransferase ersichtlich.

Fig. 14 veranschaulicht die Ergebnisse der Sequenzausrichtung der CAT-ähnlichen Enzyme.

Mittel zur Durchführung der Erfindung

[0011] Im Folgenden wird die vorliegende Erfindung detailliert beschrieben.

[0012] Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Acetin, dass die folgenden Schritte umfasst: Umsetzen von Acetyl-CoA mit Glycerin in Gegenwart einer ersten O-Acetyltransferase zur Herstellung von Monoacetin und Diacetin.

[0013] Die erste O-Acetyltransferase kann O-Acetyl in dem Acetyl-CoA auf Glycerin übertragen und kann beispielsweise Maltose-O-Acetyltransferase, ohne darauf beschränkt zu sein, sein.

[0014] Die erste O-Acetyltransferase kann von einem Organismus herrühren oder kann synthetisiert werden.

[0015] Darüber hinaus kann die erste O-Acetyltransferase in einem Mikroorganismus, der ein Gen mit Codierung für die erste O-Acetyltransferase aufweist, exprimiert werden, wobei das Gen mit Codierung für die erste O-Acetyltransferase in dem Mikroorganismus inhärent in dem entsprechenden Mikroorganismus vorhanden sein kann oder in den Mikroorganismus von außen durch gentechnische Verfahren eingeführt wurde. In die-

sem Fall können Glycerin und Acetyl-CoA in dem Mikroorganismus umgesetzt werden, es gibt jedoch keine Einschränkung dahingehend.

[0016] Das Acetin kann Monoacetin, Diacetin oder Triacetin oder eine Kombination hiervon umfassen.

[0017] Die erste O-Acetyltransferase kann als Katalysator in der Reaktion von Glycerin und Acetyl-CoA zur Erzeugung von Monoacetin fungieren und das Monoacetin kann abermals mit Acetyl-CoA in Gegenwart der ersten O-Acetyltransferase umgesetzt werden, wobei Diacetin hergestellt wird, es besteht jedoch keine Einschränkung dahingehend.

[0018] In der ersten O-Acetyltransferase kann die Aminosäure an der Position, die der Position **70** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparaginsäure (ASP) sein. In ähnlicher Weise kann die Aminosäure an einer Position, die der Position **84** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparagin (ASN) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **114** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Histidin (HIS) sein; und die Aminosäure an einer Position, die der Position **126** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Glutaminsäure (GLU) sein, wobei es keine Einschränkung hierauf gibt.

[0019] Ferner kann in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position **15** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) oder Phenylalanin (PHE) sein. In ähnlicher Weise kann die Aminosäure an einer Position, die der Position **26** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Glutamin (GLN) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **30** der Aminosäuresequenz der SEQ ID NR. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Lysin (LYS) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **71** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) sein; und die Aminosäure an einer Position, die der Position **82** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) sein, wobei es keine Einschränkung hierauf gibt.

[0020] Tyrosin (TYR) oder Phenylalanin (PHE), wobei es sich um die Aminosäure an der Position handelt, die der Position **15** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 der ersten O-Acetyltransferase; in ähnlicher Weise Arginin (ARG) oder Glutamin (GLN), wobei es sich um die Aminosäure an der Position handelt, die der Position **26** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht; Arginin (ARG) oder Lysin (LYS), wobei es sich um die Aminosäure an der Position handelt, die der Position **30** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht; Tyrosin (TYR), wobei es sich um die Aminosäure an der Position handelt, die der Position **71** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht; und Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR), wobei es sich um die Aminosäure an der Position handelt, die der Position **82** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, sind Reste, die jeweils eine Substratsbindungstasche bilden und relativ gut konserviert sind und eine wichtige Rolle bei der Produktion von Acetin spielen.

[0021] Asparaginsäure (ASP), bei der es sich um die Aminosäure an der Position handelt, die der Position **70** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 der ersten O-Acetyltransferase entspricht; in gleicher Weise Asparagin (ASN), bei der es sich um die Aminosäure an der Position handelt, die der Position **84** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht; und Glutaminsäure (GLU), bei der es sich um die Aminosäure an der Position handelt, die der Position **126** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, sind Aminosäurereste, die jeweils Glycerin stabilisieren, relativ gut konserviert sind und eine wichtige Rolle bei der Produktion von Acetin spielen.

[0022] Histidin (HIS), bei dem es sich um die Aminosäure an der Position handelt, die der Position **114** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 der ersten O-Acetyltransferase entspricht, ist ein Rest, der als Katalysator wirkt, relativ gut konserviert ist und einem Aminosäurerest entspricht, der eine wichtige Rolle bei der Produktion von Acetin spielt.

[0023] Ferner kann die Aminosäuresequenz der ersten O-Acetyltransferase eine 50%-ige oder höhere Homologie zu der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 aufweisen.

[0024] Die Maltose-O-Acetyltransferase kann beispielsweise Maltose-O-Acetyltransferase von Escherichia coli (SEQ ID Nr. 1), Maltose-O-Acetyltransferase von Staphylococcus carnosus (SEQ ID Nr. 2); Maltose-O-Acetyltransferase von Halakalicoccus jeotgali (SEQ ID Nr. 3); Maltose-O-Acetyltransferase von Lactobacillus brevis (SEQ ID Nr. 4), Maltose-O-Acetyltransferase von Bacillus subtilis (SEQ ID Nr. 5); oder Maltose-O-Acetyltransferase von Pseudomonas putida (SEQ ID Nr. 6), vorzugsweise Maltose-O-Acetyltransferase von Bacillus subtilis sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0025] Die Aminosäuresequenz von Maltose-O-Acetyltransferase von Escherichia coli (SEQ ID Nr. 1) weist eine 65%-ige Homologie zu der Aminosäuresequenz von Maltose-O-Acetyltransferase von Bacillus subtilis (SEQ ID Nr. 5) auf, während die Aminosäuresequenz von Maltose-O-Acetyltransferase von Staphylococcus carnosus (SEQ ID Nr. 2) eine 58%-iger Homologie zu der Aminosäuresequenz von Maltose-O-Acetyltransferase von Bacillus subtilis (SEQ ID Nr. 5) aufweist. Ferner weist die Aminosäuresequenz von Maltose-O-Acetyltransferase von Halalkalicoccus jeotgali (SEQ ID Nr. 3) eine 53%-iger Homologie zu der Aminosäuresequenz von Maltose-O-Acetyltransferase von Bacillus subtilis (SEQ ID Nr. 5) auf, während die Aminosäuresequenz von Maltose-O-Acetyltransferase von Lactobacillus brevis (SEQ ID Nr. 4) eine 55%ige Homologie zu der Aminosäuresequenz von Maltose-O-Acetyltransferase von Bacillus subtilis (SEQ ID Nr. 5) aufweist. Darüber hinaus weist die Aminosäuresequenz von Maltose-O-Acetyltransferase von Pseudomonas putida (SEQ ID Nr. 6) eine 50%-ige Homologie zu der Aminosäuresequenz von Maltose-O-Acetyltransferase von Bacillus subtilis (SEQ ID Nr. 5) auf.

[0026] Ferner kann das Verfahren zur Herstellung von Acetin gemäß der vorliegenden Erfindung ferner ein Umsetzen des Reaktionsprodukts, d.h. von Diacetin mit Acetyl-CoA in Gegenwart einer zweiten O-Acetyltransferase umfassen.

[0027] In der zweiten O-Acetyltransferase kann die Aminosäure an einer Position, die der Position **31** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Cystein (CYS) oder Leucin (LEU) sein; in gleicher Weise kann die Aminosäure an einer Position, die der Position **102** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Isoleucin (ILE) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **143** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **166** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **170** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Valin (VAL), Isoleucin (ILE) oder Leucin (LEU) sein; und die Aminosäure an einer Position, der Position **193** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, kann Histidin (HIS) sein, wobei es hierbei keine Einschränkungen gibt.

[0028] Die zweite O-Acetyltransferase kann Triacetin durch Übertragung einer Acetylgruppe auf Diacetin erzeugen und kann beispielsweise Chloramphenicol-O-Acetyltransferase umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0029] Chloramphenicol-O-Acetyltransferase kann beispielsweise aus der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 bestehen, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0030] Die Chloramphenicol-O-Acetyltransferase der SEQ ID Nr. 7 (SEQ ID Nr. 7) kann beispielsweise in; einem pSTV28-Vektor mit einem Chloramphenicol-Resistenz-Antibiotikum-Marker; einem Mikroorganismus mit einem Chloramphenicol-Resistenz-Antibiotikum-Marker; oder einem Mikroorganismus, in dem der pSTV 28-Vektor inhärent enthalten oder erworben wurde, exprimiert werden oder kann synthetisch hergestellt werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0031] Wenn das Glycerin und Acetyl-CoA in Gegenwart der ersten O-Acetyltransferase und der zweiten O-Acetyltransferase reagieren, kann ein Komplex von Monoactin, Diacetin und Triacetin hergestellt werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0032] Die zweite O-Acetyltransferase ist eine Chloramphenicaol-O-Acetyltransferase oder weist eine Proteinsequenz und Struktur auf, die dazu ähnlich sind, wodurch eine Acetylgruppe auf Diacetin übertragen wird und Triacetin hergestellt wird.

[0033] Die zweite O-Acetyltransferase kann in einem Mikroorganismus mit einem Gen mit Codierung für die zweite O-Acetyltransferase exprimiert werden, wobei das Gen mit Codierung für die zweite O-Acetyltransferase in dem Mikroorganismus inhärent in dem Mikroorganismus vorhanden sein kann oder in den Mikroorganismus von außen durch gentechnische Verfahren eingeführt wurde. In diesem Fall können Glycerin und Acetyl-CoA in dem Mikroorganismus umgesetzt werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0034] Die zweite O-Acetyltransferase kann von einem Organismus stammen oder synthetisiert worden sein.

[0035] In der zweiten O-Acetyltransferase kann eine beliebige von Cystein (CYS) oder Leucin (LEU), wobei es sich um eine Aminosäure an einer Position handelt, die der Position **31** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht; in gleicher Weise kann Threonin (THR) oder Prolin (PRO), wobei es sich um eine Aminosäure an

einer Position handelt, die der Position **93** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht; Phenylalanin (PHE) oder Isoleucin (ILE), wobei es sich um eine Aminosäure an einer Position handelt, die der Position **102** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht; Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (THR), wobei es sich um eine Aminosäure an einer Position handelt, die der Position **143** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht; Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (THR), wobei es sich um eine Aminosäure an einer Position handelt, die der Position **166** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht; oder Valin (VAL), Isoleucin (ILE) oder Leucin (LEU), bei der es sich um eine Aminosäure an einer Position handelt, die der Position **170** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, ein Rest sein, um eine Substratsbindungstasche zu bilden, ist relativ gut konserviert und entspricht einem Aminosäurerest, der eine wichtige Rolle bei der Produktion von Acetin spielt.

[0036] In der zweiten O-Acetyltransferase ist Histidin (HIS), bei der es sich um eine Aminosäure an einer Position handelt, die der Position **193** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, ein Rest, der als Katalysator wirkt, relativ gut konserviert ist und einem Aminosäurerest entspricht, der eine wichtige Rolle bei der Produktion von Acetin spielt.

[0037] Ferner kann die Aminosäuresequenz der zweiten O-Acetyltransferase eine 32%-ige oder höhere Homologie zu der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 aufweisen.

[0038] Speziell kann die zweite O-Acetyltransferase Chloramphenicol-O-Acetyltransferase der SEQ ID Nr. 7; O-Acetyltransferase von Bacillus cereus (SEQ ID Nr. 8), O-Acetyltransferase von Pseudomonas aeruginosa (SEQ ID Nr. 9); oder O-Acetyltransferase von Clostridium acetobutylicum (SEQ ID NR. 10); vorzugsweise O-Acetyltransferase von Bacillus cereus sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0039] Die Aminosäuresequenz der O-Acetyltransferase von Bacillus cereus (SEQ ID Nr. 8) weist eine 43%-ige oder höhere Homologie zu der Aminosäuresequenz von Chloramphenicol-O-Acetyltransferase (SEQ ID Nr. 7) auf, während die Aminosäuresequenz der O-Acetyltransferase von Pseudomonas aeruginiosa (SEQ ID Nr. 9) weist eine 62%-ige Homologie zu der Aminosäuresequenz von Chloramphenicol-O-Acetyltransferase (SEQ ID Nr. 7) aufweist. Ferner weist die Aminosäuresequenz von O-Acetyltransferase von Clostridium acetobutylicum (SEQ ID NR. 10) weist eine 32%-ige Homologie zu der Aminosäuresequenz von Chloramphenicol-O-Acetyltransferase (SEQ ID Nr. 7) auf.

[0040] Ferner kann das Verfahren zur Herstellung von Acetin gemäß der vorliegenden Erfindung ferner ein sequenzielles Umsetzen von Glucose mit Glycerin-3-phosphatdehydrogenase und Glycerin-3-phosphatase (d.h. DL-Glycerin-3-phosphatase) umfassen, um das obige Glycerin herzustellen.

[0041] Das oben beschriebene Glycerin kann durch Biosynthese zur Reaktion von Glucose mit einem Enzym erhalten werden, wobei als spezielles Beispiel Glycerin durch aufeinanderfolgendes Umsetzen von Glucose mit Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase (GPD1) und DL-Glycerin-3-phosphatase (GPP2) erhalten werden kann, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0042] In diesem Zusammenhang können Glycerin-3-phosphatdehydrogenase und DL-Glycerin-3-phosphatase chemisch synthetisiert werden.

[0043] Ferner können Glycerin-3-phosphatdehydrogenase und DL-Glycerin-3-phosphatase in einem Mikroorganismus mit Genen mit Kodierung für Glycerin-3-phosphatdehydrogenase und DL-Glycerin-3-phosphatase exprimiert werden. Hier können die Gene mit Codierung für Glycerin-3-phosphatdehydrogenase und DL-Glycerin-3-phosphatase inhärent in dem entsprechenden Mikroorganismus vorhanden sein. Alternativ können die Gene mit Codierung für Glycerin-3-phosphatdehydrogenase und DL-Glycerin-3-phosphatase in den Mikroorganismus von außen durch gentechnische Verfahren eingeführt werden. In diesem Fall kann Glycerin aus Glucose in dem Mikroorganismus erhalten werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0044] Die Glycerin-3-phosphatdehydrogenase kann in Abhängigkeit von dem Mikroorganismustyp unterschiedliche Aminosäuresequenzen aufweisen und kann eine beliebige Dehydrogenase sein, solange sie in der Lage ist, Glyceronphosphat (DHAP), bei dem es sich um einen Zwischenmetaboliten des Glycolysepfads in dem entsprechenden Mikroorganismus handelt, in Glycerin-3-phosphat (G3P) umzuwandeln. Beispielsweise kann im Falle von Saccharomyces cerevisiae Glycerin-3-phosphatdehydrogenase (GPD1) von Saccharomyces cerevisiae der SEQ ID Nr. 14 verwendet werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0045] Die oben beschriebene DL-Glycerin-3-phosphatase kann in Abhängigkeit von dem Mikroorganismustyp eine unterschiedliche Aminosäuresequenz aufweisen und kann eine beliebige Phosphatase sein, solange sie Glycerin-3-phosphat (G3P), bei dem es sich um einen Zwischenmetaboliten des Glycolysepfads in dem entsprechenden Mikroorganismus handelt, in Glycerin umwandeln kann. Beispielsweise kann im Falle von Saccharomyces cerevisiae DL-Glycerin-3-phosphatase (GPP2) von Saccharomyces cerevisiae der SEQ ID Nr. 15 verwendet werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0046] Die Glukose kann Glyceronphosphat (DHAP), wobei es sich um einen Zwischenmetaboliten handelt, auf dem Glycolysepfad (Embden-Meyerhof-Pfad) bilden, und das Glyceronphosphat kann mit Glycerin-3-phosphatdehydrogenase reagieren, um in Glycerin-3-phosphat umgewandelt zu werden. Ferner kann das Glycerin-3-phosphat (G3P) mit DL-Glycerin-3-phosphatase umgesetzt werden, wodurch Glycerin hergestellt wird, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0047] Ferner betrifft die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Acetin, das ein Züchten eines Mikroorganismus, der ein Gen mit Codierung für eine erste O-Acetyltransferase exprimiert, in einem Glycerin enthaltenden Medium umfasst.

[0048] In der ersten O-Acetyltransferase kann die Aminosäure an einer Position, die der Position **70** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparaginsäure (ASP) sein; in gleicher Weise kann die Aminosäure an einer Position, die der Position **84** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparagin (ASN) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **114** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, kann Histidin (HIS) sein; und die Aminosäure an einer Position, die der Position **126** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, kann Glutaminsäure (GLU) sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0049] Ferner kann in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position **15** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (THR) oder Phenylalanin (PHE) sein; in gleicher Weise kann die Aminosäure an einer Position, die der Position **26** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Glutamin (GLN) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **30** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, kann Arginin (ARG) oder Lysin (LYS) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **71** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, kann Tyrosin (THR) sein; und die Aminosäure an einer Position, die der Position **82** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, kann Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0050] Ferner kann die Aminosäuresequenz der ersten O-Acetyltransferase eine 50%-ige oder höhere Homologie zu der Aminosäuresequenz der SEQ ID NR. 5 aufweisen.

[0051] Das Gen mit Codierung für die erste O-Acetyltransferase kann beispielsweise ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase sein, wobei das Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase beispielsweise ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase von Escherichia coli (maa, SEQ ID Nr. 16), ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase von Staphylococcus carnosus (Sc-maa, SEQ ID Nr. 17), ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase von Halalkalicoccus jeotgali (Hj-maa, SEQ ID Nr. 18), ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase von Lactobacillus brevis (Lb-maa, SEQ ID Nr. 19), ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase von Bacillus subtilis (Bs-maa, SEQ ID Nr. 20) oder ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase von Pseudomonas putida (Pp-maa, SEQ ID Nr. 21), vorzugsweise ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase von Bacillus subtilis sein kann, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0052] Der Mikroorganismus kann in einem Medium zum Exprimieren einer ersten O-Acetyltransferase gezüchtet werden und die erste O-Acetyltransferase kann eine Reaktion von Glycerin und Acetyl-CoA zur Herstellung von Monoacetin katalysieren. Ferner kann die erste O-Acetyltransferase abermals eine Reaktion von Monoacetin und Acetyl-CoA zur Herstellung von Diacetin katalysieren.

[0053] Der Mikroorganismus kann ohne Einschränkung verwendet werden, solange es ein Mikroorganismus ist, der die erste O-Acetyltransferase exprimiert, und kann beispielsweise eine prokaryontische Zelle, eine eukaryontische Zelle oder eine isolierte tierische Zelle, die in einem flüssigen Medium gezüchtet werden kann, sein. Der Mikroorganismus kann beispielsweise Bakterien, Pilze oder eine Kombination hiervon umfassen. Die Bakterien können beispielsweise grampositive Bakterien, gramnegative Bakterien oder eine Kombination hiervon umfassen. Die gramnegativen Bakterien können von der Escherichia-Gattung sein. Die grampositiven Bakterien können von der Bacillus-Gattung, Corynebacterium-Gattung, Milchsäurebakterien usw. oder eine Kombination hiervon sein. Bei den Pilzen kann es sich um Saccaramyces cerevisiae, Kluberomyces usw. oder

eine Kombination hiervon handeln. Der Mikroorganismus kann speziell E. coli, spezieller DH5α, DH5α (DE3), AceCo, BW25113, W3110 oder MG1655 sein. Der Mikroorganismus ist vorzugsweise DH5α (DE3), BW25113, W3110 oder MG1655 im Hinblick auf die Produktivität unter E. coli und stärker bevorzugt MG1655, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0054] Der Mikroorganismus kann ein Mikroorganismus sein, der natürlich ein Gen mit Codierung für die erste O-Acetyltransferase besitzt, und ein Mikroorganismus, der das Gen durch biotechnische Techniken, wie beispielsweise Transformation und Transduktion usw. erwirbt und beibehält, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0055] Die Transformation kann durch Einführen eines rekombinanten Plasmids in den Mikroorganismus implementiert werden und das rekombinante Plasmid kann ein Gen mit Codierung für die erste O-Acetyltransferase in einem Vektor sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0056] Der Vektor kann beispielsweise pTrc99A (SEQ ID NR. 78), pET28a (SEQ ID NR. 79) oder pSTV28 (SEQ ID NR. 77) und vorzugsweise pSTV28 sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0057] Nach Insertieren des Gens kann der Vektor und das Gen mittels eines Restriktionsenzyms geschnitten und mit einer die Gase verknüpft werden und anschließend kloniert werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0058] Das Medium ist eine Substanz, die daraufhin ausgelegt ist, einen Ernährungszustand beizubehalten, der ähnlich ist zu der natürlichen Umgebung, in der die Mikroorganismen im allgemeinen zu Zwecken einer Proliferation oder Züchtung der Mikroorganismen überleben und sich reproduzieren. Speziell ist das Medium eine Flüssigkeit und ein Feststoff, die durch Zugeben aller zum Wachsen notwendigen Nährstoffe hergestellt wurden, und umfasst Acetyl-CoA sowie Glycerin, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0059] Ferner kann der erfindungsgemäße Mikroorganismus ferner ein Gen mit Codierung für die zweite O-Acetyltransferase, die eine Acetylgruppe auf Diacetin überträgt, exprimieren.

[0060] In der zweiten O-Acetyltransferase kann die Aminosäure an einer Position, die der Position **31** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr.7 entspricht, Cystein (CYS) oder Leucin (LEU) sein; in gleicher Weise kann die Aminosäure an einer Position, die der Position **102** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Isoleucin (ILE) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **143** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (THR) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **166** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (THR) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **170** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Valin (VAL), Isoleucin (ILE) oder Leucin (LEU) sein; und die Aminosäure an einer Position, die der Position **193** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Histidin (HIS) sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0061] Der Mikroorganismus wird in einem Medium gezüchtet und kann nicht nur die erste O-Acetyltransferase, sondern auch Chloramphenicol-O-Acetyltransferase oder die zweite O-Acetyltransferase exprimieren.

[0062] Das Gen (cat, SEQ ID Nr. 24) mit Codierung für die Chloramphenicol-O-Acetyltransferase (SEQ ID Nr. 7) kann in einem Vektor mit einem Chloramphenicol-Resistenz-Antibiotikummarker vorhanden sein, wobei der Vektor beispielsweise ein pSTV28-Vektor sein kann, und wenn der Vektor ein Mikroorganismus ist, kann der Vektor ohne Einschränkungen zum Exprimieren der Chloramphenicol-O-Acetyltransferase aus dem entsprechenden Mikroorganismus eingeführt werden. Beispielsweise kann der Vektor in E. coli zum Exprimieren der Chloramphenicol-O-Acetyltransferase aus E. coli eingeführt werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0063] Das Gen mit Codierung für die zweite O-Acetyltransferase kann beispielsweise ein Gen mit Codierung für Chloramphenicol-O-Acetyltransferase (cat, SEQ ID Nr. 24), ein Gen mit Codierung für O-Acetyltransferase von Bacillus cereus (Bc-Oat, SEQ ID Nr. 25), ein Gen mit Codierung für O-Acetyltransferase von Pseudomonas aeruginosa (Pa-Oat, SEQ ID Nr. 26), ein Gen mit Codierung für O-Acetyltransferase von Clostridium acetobutylicum (Ca-Oat, SEQ ID Nr. 27) und vorzugsweise ein Gen mit Codierung für O-Acetyltransferase von Bacillus cereus sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0064] Ferner kann die Aminosäuresequenz der zweiten O-Acetyltransferase eine 32%-ige oder höhere Homologie zu der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 aufweisen.

[0065] Ferner kann der Mikroorganismus gemäß der vorliegenden Erfindung ein Gen mit Codierung für Acetylesterase, das abgeschwächt oder deletiert ist, umfassen.

[0066] Acetin als eine Esterverbindung kann zu Glycerin und Acetat durch esterbindende Abbauenzyme (Esterasen) abgebaut werden, wobei ein Beispiel der Acetin abbauenden Esterasen Acetylesterase ist.

[0067] Im Falle eines Mikroorganismus, in dem das Gen mit Codierung für Acetylesterase abgeschwächt oder deletiert ist, wird die Acetylesterase nicht exprimiert, wodurch die Produktionsmenge an Acetin erhöht werden kann.

[0068] Die Acetylesterase kann in Abhängigkeit von dem Mikroorganismustyp eine unterschiedliche Sequenz aufweisen, und das Gen mit Codierung für dieselbige kann auch eine unterschiedliche Sequenz aufweisen. Folglich kann das Gen (aes) mit Codierung für die Acetylesterase in dem entsprechenden Mikroorganismus abgeschwächt oder deletiert sein. Beispielsweise kann im Falle von E. coli das Gen der SEQ ID Nr. 30 mit Codierung für die Acetylesterase der SEQ ID Nr. 13 abgeschwächt oder deletiert sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0069] Ferner kann der hier verwendete Mikroorganismus ein beliebiger Mikroorganismus ohne Einschränkungen sein, solange er die erste O-Acetyltransferase exprimiert. Speziell kann der Mikroorganismus ein beliebiger Mikroorganismus in dem obigen Bereich sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0070] Wenn die Konzentration eines anfänglichen Stamms während der Hauptzüchtung des Mikroorganismus der vorliegenden Erfindung in einem Bereich von 0,05 bis 0,15 bei OD_{600nm} liegt, kann die Konzentration des in dem Medium enthaltenen Glycerins in einem Bereich von 3% (v/v) bis 13% (v/v) liegen. Wenn die Konzentration des anfänglichen Stamms in einem Bereich von 0,08 bis 0,12 bei OD_{600nm} liegt, kann die Konzentration an Glycerin in einem Bereich von 5% (v/v) bis 11% (v/v) liegen, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0071] Wenn der Mikroorganismus bei der obigen Stämmekonzentration in dem Medium mit der obigen Glycerinkonzentration gezüchtet wird, kann eine große Menge an Acetin erzeugt werden.

[0072] Wenn die Glycerinkonzentration mehr als 13% (v/v) beträgt, können sowohl die Stämmeproliferation als auch die Acetinproduktion aufgrund einer übermäßigen Erhöhung des osmotischen Drucks verringert werden. Wenn andererseits die Glycerinkonzentration weniger als 3% (v/v) beträgt, kann die Produktionsmenge an Acetin aufgrund einer geringen Konzentration des Substrats verringert werden.

[0073] Ferner kann der erfindungsgemäße Mikroorganismus auch die Gene mit Codierung für Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase und DL-Glycerin-3-phosphatase exprimieren und das Medium kann Glucose enthalten, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0074] Wie oben beschrieben, exprimiert der Mikroorganismus Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase und DL-Glycerin-3-phosphatase, wobei Glukose in Glyceronphosphat auf einem Glycolysepfad umgewandelt und anschließend durch die Enzyme in Glycerin umgewandelt wird.

[0075] Das Gen (Gpd1) mit Codierung für Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase kann in Abhängigkeit von dem Mikroorganismustyp eine unterschiedliche Nukleotidsequenz aufweisen und kann ein beliebiges Gen sein, solange es Glyceronphosphat (DHAP), bei dem es sich um einen Zwischenmetaboliten des Glycolysepfads in dem entsprechenden Mikroorganismus handelt, in Glycerin-3-phosphat (G3P) umwandeln kann. Beispielsweise kann im Falle von Saccharomyces cerevisiae ein Gen mit Codierung für Glycerin-3-phosphat-dehydrogenase von Saccharomyces cerevisiae (Sc-gpd1) der SEQ ID NR. 31 verwendet werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0076] Das Gen (Gpp2) mit Codierung für DL-Glycerin-3-phosphatase kann in Abhängigkeit von dem Mikroorganismustyp eine unterschiedliche Nukleotidsequenz aufweisen und kann ein beliebiges Gen sein, solange es Glycerin-3-phosphat (G3P), bei dem es sich um einen Zwischenmetaboliten des Glycolysepfads in dem entsprechenden Mikroorganismus handelt, in Glycerin-3-phosphat in Glycerin umwandeln kann. Im Falle von Saccharomyces cerevisiae kann beispielsweise ein Gen mit Codierung für DL-Glycerin-3-phosphatase von Saccharomyces cerevisiae (Sc-gpp2) der SEQ ID Nr. 32 verwendet werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0077] Das Glycerin kann mittels der oben beschriebenen ersten O-Acetyltransferase und Chloramphenicol-O-Acetyltransferase oder der zweiten O-Acetyltransferase in einen Acetinkomplex umgewandelt werden.

[0078] Ferner betrifft die vorliegende Erfindung eine Zusammensetzung zur Herstellung von Acetin, die einen Mikroorganismus zum Exprimieren eines Gens mit Codierung für die erste O-Acetyltransferase umfasst.

[0079] Wenn sich die Zusammensetzung in Kontakt mit Glycerin befindet, kann Acetin in dem oben beschriebenen Bereich mittels des oben beschriebenen Verfahrens hergestellt werden.

[0080] In der ersten O-Acetyltransferase kann die Aminosäure an einer Position, die der Position **70** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr.5 entspricht, Asparaginsäure (ASP) sein; in gleicher Weise kann die Aminosäure an einer Position, die der Position **84** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparagin (ASN) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **114** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, kann Histidin (HIS) sein; und die Aminosäure an einer Position, die der Position **126** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, kann Glutaminsäure (GLU) sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0081] Ferner kann in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position **15** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) oder Phenylalanin (PHE) sein; in gleicher Weise kann die Aminosäure an einer Position, die der Position **26** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Glutamin (GLN) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **30** der Aminosäuresequenz der SEQ ID NR. 5 entspricht, kann Arginin (ARG) oder Lysin (LYS) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **71** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, kann Tyrosin (TYR) sein; und die Aminosäure an einer Position, die der Position **82** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, kann Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0082] Ferner kann die Aminosäuresequenz der ersten O-Acetyltransferase eine 50%-ige oder höhere Homologie zu der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 aufweisen.

[0083] Die erste O-Acetyltransferase kann Maltose-O-Acetyltransferase sein, spezieller kann sie Maltose-O-Acetyltransferase von Escherichia coli, Staphylococcus carnosus, Halakalicoccus jeotgali, Lactobacillus brevis, Bacillus subtilis oder Pseudomonas putida und vorzugsweise die Maltose-O-Acetyltransferase von Bacillus subtilis umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0084] Das Gen mit Codierung für die erste O-Acetyltransferase kann beispielsweise ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase sein, wobei das Gen mit Codierung für die Maltose-O-Acetyltransferase beispielsweise ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase von Escherichia coli (maa, SEQ ID Nr. 16), ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase von Staphylococcus carnosus (Sc-maa, SEQ ID Nr. 17), ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase von Halalkalicoccus jeotgali (Hj-maa, SEQ ID Nr. 18), ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase von Lactobacillus brevis (Lb-maa, SEQ ID Nr. 19), ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase von Bacillus subtilis (Bs-maa, SEQ ID Nr. 20) oder ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase von Pseudomonas putida (Pp-maa, SEQ ID Nr. 21), und vorzugsweise ein Gen mit Codierung für Maltose-O-Acetyltransferase von Bacillus subtilis sein kann, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0085] Ferner kann der Mikroorganismus des Weiteren ein Gen mit Codierung für die zweite O-Acetyltransferase, die eine Acetylgruppe auf Diacetin überträgt, exprimieren.

[0086] In der zweiten O-Acetyltransferase kann die Aminosäure an einer Position, die der Position **31** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Cystein (CYS) oder Leucin (LEU) sein; in gleicher Weise kann die Aminosäure an einer Position, die der Position **102** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Isoleucin (ILE) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **143** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **166** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) sein; die Aminosäure an einer Position, die der Position **170** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Valin (VAL), Isoleucin (ILE) oder Leucin (LEU) sein; und die Aminosäure an einer Position, der Position **193** der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Histidin (HIS) sein, wobei es hierbei keine Einschränkungen gibt.

[0087] Das Gen mit Codierung für Chloramphenicol-O-Acetyltransferase kann in einem Vektor mit einem Chloramphenicol-Resistenz-Antibiotikummarker vorhanden sein, beispielsweise kann der Vektor ein pSTV28-Vektor sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0088] Das Gen mit Codierung für die zweite O-Acetyltransferase kann beispielsweise Gene mit Codierung für O-Acetyltransferasen von Bacillus cereus, Pseudomonas aeruginosa oder Clostridium acetobutylicum, und vorzugsweise das Gen mit Codierung für O-Acetyltransferase von Bacillus cereus umfassen, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0089] Ferner kann die Aminosäuresequenz der zweiten O-Acetyltransferase eine 32%-ige oder höher Homologie zu der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 aufweisen.

[0090] Ferner kann der Mikroorganismus ein Gen mit Codierung für Acetylesterase, das abgeschwächt oder deletiert ist, umfassen.

[0091] Die Esterverbindung, d.h. Acetin kann zu Glycerin und Acetat durch esterbindende Abbauenzyme (Esterasen) abgebaut werden, wobei das esterbindende Abbauenzym zum Abbau von Acetin beispielsweise eine Acetylesterase sein kann.

[0092] Im Falle eines Mikroorganismus, in dem das Gen mit Codierung für Acetylesterase (aes) abgeschwächt oder deletiert ist, wird die Acetylesterase nicht exprimiert, wodurch die Produktionsmenge an Acetin erhöht wird.

[0093] Die Acetylesterase kann in Abhängigkeit von dem Mikroorganismustyp eine unterschiedliche Sequenz aufweisen und ein Gen mit Codierung für dieselbige kann auch eine unterschiedliche Sequenz aufweisen. Folglich kann das Gen mit Codierung für Acetylesterase in dem Mikroorganismus abgeschwächt oder deletiert sein. Im Falle von E. coli kann beispielsweise das Gen der SEQ ID Nr. 30 mit Codierung für die Acetylesterase der SEQ ID Nr. 13 abgeschwächt oder deletiert sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0094] Ferner kann der Mikroorganismus der gleiche wie oben beschrieben sein, jedoch kann er speziell E. coli, spezieller DH5α, DH5α (DE3), AceCo, BW25113, W3110 oder MG1655 und vorzugsweise MG1655 sein, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0095] Ferner kann der Mikroorganismus ferner Gene mit Codierung für Glycerin-3-phosphatdehydrogenase oder DL-Glycerin-3-phosphatase exprimieren.

[0096] Wie oben beschrieben, kann der Mikroorganismus Glycerin-3-phosphatdehydrogenase oder DL-Glycerin-3-phosphatase exprimieren, wobei Glukose auf einem Glycolysepfad unter Verwendung der oben beschriebenen Enzyme in Glycerin umgewandelt werden kann.

[0097] Das Gen (Gpd1) mit Codierung für Glycerin-3-phosphatdehydrogenase kann in Abhängigkeit von dem Mikroorganismustyp eine unterschiedliche Nukleotidsequenz aufweisen und kann eine beliebige Dehydrogenase sein, solange sie Glyceronphosphat (DHAP), bei dem es sich um einen Zwischenmetaboliten eines Glycolysepfads in dem entsprechenden Mikroorganismus handelt, in Glycerin-3-phosphat (G34P) umwandeln kann. Im Falle von Saccharomyces cerevisiae kann beispielsweise das Gen mit Codierung für Glycerin-3-phosphatdehydrogenase von Saccharomyces cerevisiae (Sc-gpd1) der SEQ ID Nr. 31 verwendet werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0098] Das Gen (Gpp2) mit Codierung für DL-Glycerin-3-phosphatase kann in Abhängigkeit von dem Mikroorganismustyp eine unterschiedliche Nukleotidsequenz aufweisen und kann eine beliebige Phosphatase sein, solange sie Glycerin-3-phosphat (G3P), bei dem es sich um einen Zwischenmetaboliten eines Glycolysepfads in dem entsprechenden Mikroorganismus handelt, in Glycerin umwandeln kann. Im Falle von Saccharomyces cerevisiae kann beispielsweise das Gen mit Codierung für DL-Glycerin-3-phosphatase von Saccharomyces cerevisiae (Sc-gpp2) der SEQ ID Nr. 32 verwendet werden, ohne darauf beschränkt zu sein.

[0099] Das oben beschriebene Glycerin kann mittels der oben beschriebenen O-Acetyltransferase und Chloramphenicol-O-Acetyltransferase und dergleichen in einen Acetinkomplex umgewandelt werden.

[0100] Im Folgenden werden die folgenden Beispiele detailliert beschrieben, um die vorliegende Erfindung speziell darzustellen. Die in den folgenden Beispielen verwendeten Plasmide und Stämme sind in Tab. 1 zusammengefasst und die PCR-Primer sind in Tab. 2 aufgelistet.

[TABELLE 1]

Namen	Beschreibungen	Quellen
Plasmide		
pSTV28	P_{lac}-Expressionsvektor, pACYC184-Ursprung, lacZα, Cm^r	Takara Co., Ltd
pTrc99A	P_{trc}-Expressionvektor, pBR322-Ursprung, $lacI^q$, Amp^r	Amersham Bioscien ce
pET28a (+)	P_{T7}-Expressionsvektor, pBR322-Ursprung, lacI, und Kan^r	Novagen
pMD1	pTrc99A-Vektor enthaltend lacA aus E. coli	-
pMD2	pTrc99A-Vektor enthaltend cysE aus E. coli	-
pMD3	pTrc99A-Vektor enthaltend yjgM aus E. coli	-
pMD4	pTrc99A-Vektor enthaltend yjaB aus E. coli	-
pMD5	pTrc99A-Vektor enthaltend yiiD aus E. coli	-
pMD6	pTrc99A-Vektor enthaltend wecH aus E. coli	-
pMD7	pTrc99A-Vektor enthaltend nhoA aus E. coli	-
pMD8	pTrc99A-Vektor enthaltend maa aus E. coli	-
pMD9	pTrc99A-Vektor enthaltend maa aus S. carnosus	-
pMD10	pTrc99A-Vektor enthaltend maa aus H. jeotgali	-
pMD11	pTrc99A-Vektor enthaltend maa aus L. brevis	-
pMD12	pTrc99A-Vektor enthaltend maa aus P. putida	-
pMD13	pTrc99A-Vektor enthaltend maa aus B. subtilis	-
pMD14	pET28a-Vektor enthaltend maa aus B. subtilis	-
pT-CAT	pTrc99A-Vektor enthaltend cat aus pSTV28	-
pMDT1	pSTV28-Vektor enthaltend maa aus B. subtilis	-
pMDT2	pTrc99A-Vektor enthaltend cat aus pSTV28 und maa aus B. subtilis	-
pMDT3	pTrc99A-Vektor enthaltend oat aus B. cereus und maa aus B. subtilis	-
pMDT4	pTrc99A-Vektor enthaltend oat aus P. aeruginosa und maa aus B. subtilis	-
pMDT5	pTrc99A-Vektor enthaltend oat aus C. acetobutylicum und maa aus B. subtilis	-
pMDT6	pTrc99A-Vektor enthaltend oat aus M. abscessus und maa aus B. subtilis	-
pMDT7	pTrc99A-Vektor enthaltend oat aus L. brevis und maa aus B. subtilis	-
pMDT8	pMDT2 enthaltend gpd1 und gpp2 aus S. cerevisiae	-
Stämme		
MG1655	E. coli K-12; F^- $lambda^-$, $ilvG^-$, rfb-50, rph-1	ATCC 7009 26
DH5α	E. coli K-12; F^-, Φ80lacZΔM15, Δ(lacZYAargF)U169, de-oR, recA1, endA1, hsdR17(rK^-, mK^+) phoA, supE44, λ^-,thi-1	ATCC 9804 0
BW25113	Δ(araD-araB) 567, ΔlacZ4787(::rrnB-3), lamb-da^-, rph-1, Δ(rhaD-rhaB) 568, hsdR514	NBRP, NIG
AceCo	MG1655 ΔackA-pta, poxB, ldhA, dld, adhE, pps, atoDA	Ref. 1
W3110	E. coli K-12; F^-, λ^- IN (rrnD-rrnE) 1	ATCC 2732 5
DH5α (DE3)	E. coli K-12; F^-, Φ80lacZΔM15, Δ (lacZYAargF)U169, deoR, re-cA1, endA1, hsdR17 (rK^-, mK^+) phoA, supE44, λ^-,thi-1, A(DE3)	-

Namen	Beschreibungen	Quellen
JW0465	BW25113 Δ aes	NBRP, NIG
DH-MD0	E. coli DH5α beherbergend pTrc99A	-
DH-MD1	E. coli DH5α beherbergend pMD1	-
DH-MD2	E. coli DH5α beherbergend pMD2	-
DH-MD3	E. coli DH5α beherbergend pMD3	-
DH-MD4	E. coli DH5α beherbergend pMD4	-
DH-MD5	E. coli DH5α beherbergend pMD5	-
DH-MD6	E. coli DH5α beherbergend pMD6	-
DH-MD7	E. coli DH5α beherbergend pMD7	-
DH-MD8	E. coli DH5α beherbergend pMD8	-
DH-MD9	E. coli DH5α beherbergend pMD9	-
DH-MD10	E. coli DH5α beherbergend pMD10	-
DH-MD11	E. coli DH5α beherbergend pMD11	-
DH-MD12	E. coli DH5α beherbergend pMD12	-
DH-MD13	E. coli DH5α beherbergend pMD13	-
DH-MD14	E. coli DH5α (DE3) beherbergend pMD14	-
DH-MDT1	E. coli DH5α beherbergend pMDT1	-
DH-EMPT	E. coli DH5α beherbergend pTrc99A	-
DH-CAT	E. coli DH5α beherbergend pT-CAT	-
DH-MDT2	E. coli DH5α beherbergend pMDT2	-
DH-MDT3	E. coli DH5α beherbergend pMDT3	-
DH-MDT4	E. coli DH5α beherbergend pMDT4	-
DH-MDT5	E. coli DH5α beherbergend pMDT5	-
DH-MDT6	E. coli DH5α beherbergend pMDT6	-
DH-MDT7	E. coli DH5α beherbergend pMDT7	-
AC-MDT2	E. coli AceCo beherbergend pMDT2	-
BW-MDT2	E. coli BW25113 beherbergend pMDT2	-
W3-MDT2	E. coli W3110 beherbergend pMDT2	-
MG-MDT2	E. coli MG1655 beherbergend pMDT2	-
BW-Empty	E. coli BW25113 beherbergend pTrc99A	-
BW-Aes	E. coli BW25113 beherbergend pT-Aes	-
BW-MDT2 (Daes)	E. coli JW0465 beherbergend pMDT2	-
DH-MDT8	E. coli DH5α beherbergend pMDT8	-

[0101] Ref. 1: J.-H. Kim et al., Isoprene production by Escherichia coli through the exogenous mevalonate pathway with reduced formation of fermentation byproducts. Microbial Cell Factories 15, 214 (2016).

[TABELLE 2]

Primer[a, b, c]	Beschreibungen (5'-> 3')	Sequenz Nr.
Ec-lacA-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGGAACATGCCAATGACCG	33
Ec-lacA-R	GTTTCTAGATTAAACTGACGATTCAACTTTATAATC	34
Ec-cysE-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGTCGTGTGAAGAACTG-GAAATTG	35
Ec-cysE-R	GTTTCTAGATTAGATCCCATCCCCATACTC	36
Ec-yjgm-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGAATAACATTGCGCCGC	37
Ec-yjgM-R	GTTTCTAGATTAGAGTTCGCGCAACATCC	38
Ec-yjaB-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGGTTATTAGTATTCGCCGCTC	39
Ec-yjaB-R	GTTTCTAGATTACGCCCCCACATACGC	40
Ec-yiiD-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGAGCCAGCTTCCAGGG	41
Ec-nhoA-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGACGCCCATTCTGAATCAC	42
Ec-nhoA-R	GTTTCTAGATTATTTTCCCGCCTCCGGG	43
Ec-wecH-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGCAGCCCAAAATTTACTGG	44
Ec-WecH-R	GTTTCTAGATTAACTCACTAATCTGTTTCTGTCG	45
Ec-yiiD-R	GTTTCTAGATTACTCTTCTTCGTTCCCGC	46
Ec-maa-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGAGCACAGAAAAAGAAAAGATG	47
Ec-maa-R	GTTTCTAGATTACAATTTTTTAATTATTCTGGCTG	48
Sc-maa-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGACCACCGAGAAGGAAAAAATG	49
Sc-maa-R	GTTTCTAGATTAATCCAGCGGCACTTCAC	50
Hj-maa-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGACCAGCGAGAAGGAACG	51
Hj-maa-R	GTTTCTAGATTAATCAACGTCCTTCAGCACA	52
Lb-maa-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGGACAAGAGCGAGAAGG	53
Lb-maa-R	GTTTCTAGATTATTTCAGCGGCTTAATCAC	54
Pp-maa-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGAGCCTGAGCGAGAAGCAC	55

Pp-maa-R	GTTTCTAGATTATTGACCCTGATCCGGCTG	56
Bs-maa-F	CTGGATCC*AGGAGGTAATAAA*ATGCTGCGTACCGAGAAGG	57
Bs-maa-R	GTTTCTAGATTACAGTTGTTTCAGAATACGCGC	58
Cat-F	CTAGGAGCTC*AGGAGAAATATA*ATGGAGAAAAAAATCACTGGA-TATAC	60
Cat-R	CTGGATCCTTACGCCCCGCCCTGCC	61
Trc-Bs.maa-F	**AGATCT**GAGTCGACAGTATCGGCGGG	62
Trc-Bs.maa-R	**TATATTTCTCCT**GAGGATCCCCGGGTACCG	63
Bc-Oat-F	**CTCGGTACCCGGGGATCCTC***AGGAGAAATATA*ATGGACTTCCAC-CAGATC	64
Bc-Oat-R	**CCCGCCGATACT**GTCGACAGATCTTACAGCCATTCCTCAAAG	65
Ca-Oat-F	**CTCGGTACCCGGGGATCCTC***AGGAGAAATATA*AT-GAACAGCAACTTCCAC	66
Ca-Oat-R	**CCCGCCGATACT**GTCGACAGATCTTAACGAATCCACTCTTTC	67
Lb-Oat-F	**CTCGGTACCCGGGGATCCTC***AGGAGAAATATA*ATGACCGAGCT-GAACACCC	68
Lb-Oat-R	**CCCGCCGATACT**GTCGACAGATCTTACGCGGTCAGCCACAG	69
Ma-Oat-F	**CTCGGTACCCGGGGATCCTC***AGGAGAAATATA*ATGCCGGCG-GAGCACGCG	70
Ma-Oat-R	**CCCGCCGATACT**GTCGACAGATCTTAATCACGAAC-CCAATCCGGGTCCG	71
Pa-Oat-F	**CTCGGTACCCGGGGATCCTC***AGGAGAAATATA*ATGAGCTACAC-CCGTGTTG	72
Pa-Oat-R	**CCCGCCGATACT**GTCGACAGATCTTAGCCACCCGCTTCATC	73
Ec-aes-F	CTGGATCC*GTCACCCAACCCTTT*ATGAAGCCG-GAAAACAAACTACC	74
Ec-aes-R	TATCGTCGACTTAAAGCTGAGCGGTAAAGAACTG	75
Sc-gpd1-F	GCGGATCC*AGGAGGTAATAAAA*TGTCTGCTGCTGCTGATAG-ATTAAAC	76
Sc-gpd1-R	AATGCTGCAGTTAATCTTCATGTAGATCTAATTCTTCAATC	59
Sc-gpp2-F	TGCTGCAG*AGGAGGTAATTTATA*TGGGATTGACTACTAAAC-CTCTATC	22
Sc-gpp2-R	CCCAAGCTTACCATTTCAACAGATCGTCC	23

[a] Restriktionsenzymstellen sind unterstrichen. [b] RBS Sequenzen sind kursiv. [c] Die überlappenden Sequenzen sind fett gedruckt.

BEISPIEL

Herstellung von Monoacetin und Diacetin unter Verwendung von von E. coli abgeleiteten O-Acetyltransferase-Enzymen

[0102] Zur Herstellung von Monoacetin und Diacetin wurden acht (8) O-Acetyltransferase-Kandidatengene in E. coli mit der Fähigkeit zur Übertragung einer Acetylgruppe auf Glycerin ausgewählt und jedes Gen wurde in einen pTrc99A-Expressionsvektor (SEQ ID Nr. 78) kloniert, um die Plasmide pMD1 bis pMD8 zu konstruieren. Die Kandidatengene wurden durch PCR-Amplifikation von Galactosidose-O-Acetyltransferase, Maltose-O-Acetyltransferase (SEQ ID Nr. 1), Serin-Acetyltransferase, O-Acetyltransferase WecH, und lacA (SEQ ID NO: 80), maa (SEQ ID Nr.: 16), cysE (SEQ ID Nr.: 81), wecH (SEQ ID Nr.: 82) und nhoA (SEQ ID Nr.: 83), die jeweils Arylamin-N-Acetyltransferase codieren, und drei (3) mögliche O-Acetyl-transferasegene wie yjgm (SEQ ID Nr.: 84), yjaB (SEQ ID Nr.: 85) und yiiD (SEQ ID Nr.: 86) unter Verwendung von Chromosomen von E. coli MG1655 als Templat erhalten. In diesem Fall waren die hier verwendeten PCR-Primer Ec-lacA-F (SEQ ID Nr.: 33) /Ec-lacA-R (SEQ ID Nr.: 34), Ec-maa-F (SEQ ID Nr.: 47) /Ec-maa-R (SEQ ID Nr.: 48), Ec-cysE-F (SEQ ID Nr.: 35) /Ec-cysE-R (SEQ ID Nr.: 36), Ec-wecH-F (SEQ ID Nr.: 44) /Ec-wecH-R (SEQ ID Nr.: 45), Ec-nhoA-F (SEQ ID Nr.: 42) /Ec-nhoA-R (SEQ ID Nr.: 43), Ec-yjgm-F (SEQ ID Nr.: 37) /Ec-yjgM-R (SEQ ID Nr.: 38), Ec-yjaB-F (SEQ ID Nr.: 39) /Ec -yjaB-R (SEQ ID Nr.: 40) und Ec-yiiD-F (SEQ ID Nr.: 41) /Ec-yiiD-R (SEQ ID Nr.: 46). Das PCR-Reaktionsprodukt wurde unter Verwendung von BamHI und Xbal in einen pTrc 99A Vektor kloniert. Unter Verwendung der so konstruierten Plasmide pDM1 bis pDM8 wurde E. coli DH5α transformiert, wobei die rekombinanten Stämme DH-MD1 bis DH-MD8 gebildet und dieselben zur Analyse der Herstellung von Monoacetin und Diacetin verwendet wurden (**Fig. 3**).

[0103] Die Saatkultivierung wurde durch Rüttelkultivierung für etwa 12 Stunden bei 37 °C unter Verwendung von Komplexmedium (enthaltend 10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt und 10 g Natriumchlorid pro Liter) durchgeführt. Die Hauptkultivierung wurde durch Zugabe von 5 g/L Hefeextrakt und 2% (v/v) Glycerin zu M9 Minimalmedium (enthaltend $Na_2HPO_4 \cdot 7H_2O$, 12.8 g/L; KH_2PO_4, 3 g/L; NaCl, 0.5 g/L; NH_4Cl, 1 g/L; $MgSO_4$, 1 mM $CaCl_2$, 100 mM) und anschließende Inkubation des Gemisches bei 37 °C bei einer Rüttelgeschwindigkeit von 250 rpm für 48 Stunden durchgeführt. Abhängig vom antibiotischen Marker des in den rekombinanten Stamm eingeführten Plasmids wurden 100 mg/L Ampicillin-, 50 mg/L Chloramphenicol- oder 50 mg/L Kanamycin-Antibiotikum zugegeben. Eine anfängliche Stämmekonzentration der Kulturlösung betrug 0,1 bei OD_{600nm} und, um die in das Plasmid eingeführten Gene zu exprimieren, wurden 0,5 mM Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid (IPTG) zu Beginn der Kultivierung zugegeben.

[0104] Eine Analyse der Acetinverbindungen erfolgte durch GC (Agilent Technologies 7890A, USA), ausgerüstet mit einer HP-INNOVAX Säule (19091N-133, 30 m Länge, 0.250 mm interner Durchmesser und 0.25 µm Filmdicke), und GC-MS (GC-MS-QP2010, SHIMADZU, Japan). Die Acetin-Standardverbindung wurde von Sigma (USA) erworben. Ferner wurde der in der Hauptkultivierung hergestellte Acetinkomplex unter Verwendung von Ethylacetatlösemittel aus der Kultur extrahiert und 1 µL der extrahierten Probe wurde in die GC oder GC-MS injiziert. Eine Ofentemperatur der GC begann bei 50 °C und erreichte 90 °C bei einer Rate von 20 °C/min, gefolgt von einer sukzessiven Erhöhung der Temperatur auf 150 °C bei einer Rate von 15 °C/min, auf 190 °C bei einer Rate von 20 °C/min und anschließend auf 230 °C bei einer Rate von 15 °C/min. Daraufhin wurde die Endtemperatur 2 Minuten beibehalten. Ferner wurde eine Temperatur eines Flammenionisationsdetektors (FID) bei 280 °C gehalten. Dem obigen Analyseverfahren entsprechende analysierte Ergebnisse sind in **Fig. 5** dargestellt.

[0105] Gemäß der in **Fig. 3** dargestellten Kultivierungsergebnisse der rekombinanten Stämme DH-MD1 bis DH-MD8 wurden Monoacetin und Diacetin nur in dem mit dem pMD8 Plasmid transformierten DH-MD8 Stamm hergestellt. Dies zeigt, dass unter den acht (8) von E.-coli abgeleiteten O-Acetyltransferasekandidaten nur das Maltose-O-Acetyltransferasegen (maa) die Fähigkeit hat, eine Acetylgruppe auf Glycerol zu übertragen.

Herstellung von Monoacetin unter Verwendung von E. coli Maa-ähnlichen Enzymen

[0106] Um O-Acetyltransferasen, die eine höhere Aktivität als in E. coli gefundene Maa haben, aufzufinden, wurde eine BLAST-Suche mit der Aminosäuresequenz der E. coli Maa durchgeführt. Anschließend wurden bei den Mikroorganismen wie Staphylococcus carnosus, Halalkalicoccus jeotgali, Lactobacillus brevis, Bacillus subtilis und Pseudomonas putida weitere fünf (5) Maltose-O-Acetyltransferasen, nämlich Sc-mOat (SEQ ID Nr: 2), Hj-mOat (SEQ ID Nr: 3), Lb-mOat (SEQ ID Nr: 4), Bs-mOat (SEQ ID Nr: 5) and Pp-mOat (SEQ ID Nr: 6) erhalten, und daraufhin wurden selbige in E. coli exprimiert. Anschließend wurde die Produktivität von Monoacetin und Diacetin verglichen (**Fig. 3**).

[0107] Die von den Mikroorganismen stammenden Gene wurden gemäß der Verwendung der E. coli Codons in GenScript (USA) synthetisiert, um die Expression der Gene in dem Wirt E. coli zu optimieren. Die synthetisierten Gene wurden einer Amplifikation unter Verwendung der PCR-Primer Sc-maa-F (SEQ ID Nr: 49) / Sc-maa-R (SEQ ID Nr: 50), Hj-maa-F (SEQ ID Nr: 51) /Hj-maa-R (SEQ ID Nr: 52), Lb -maa-F (SEQ ID Nr: 53) /Lb-maa-R (SEQ ID Nr: 54), Pp-maa-F (SEQ ID Nr: 55) /Pp-maa-R (SEQ ID Nr: 56), Bs-maa-F (SEQ ID Nr: 57) /Bs-maa-R (SEQ ID Nr: 58) unterzogen, um Sc-maa- (SEQ ID Nr: 17), Hj-maa- (SEQ ID Nr: 18), Lb-maa- (SEQ ID Nr: 19), Pp-maa- (SEQ ID Nr: 21) und Bs-maa-Gene (SEQ ID Nr: 20) zu erhalten, die daraufhin unter Verwendung von BamHI und Xbal in den pTrc99A-Vektor kloniert wurden. Unter Verwendung der so konstruierten Plasmide pMD9 bis pMD13 wurde E. coli DH5α transformiert, wobei die rekombinanten Stämme DH-MD9 bis DH-MD13 gebildet und dieselben zum Vergleich der Produktivität von Monoacetin und Diacetin verwendet wurden (**Fig. 3**).

[0108] Als Ergebnis des Vergleichs wurde bestätigt, dass Maa aus B. subtilis (Bs-maa) die höchste Monoacetin- und Diacetin-Produktivität aufweist. Die Kultivierungsmethode und die Analysemethode sind dieselben wie in Beispiel 1.

Herstellung von Triacetin unter Verwendung von Chloramphenicol-O-Acetyltransferase

[0109] Zur optimalen Expression des Maa-Gens (Bs-maa) von B. subtilis, welches die höchste Produktivität von Monoacetin und Diacetin aufweist, wurde das Gen in verschiedene Vektoren wie pTrc99A (SEQ ID Nr: 78), pET28a (SEQ ID Nr: 79) und pSTV28 (SEQ ID Nr: 77) usw. kloniert, um pMD13-, pMD14- und pMDT1-Plasmide zu konstruieren, gefolgt von der Herstellung rekombinanter E. coli DH-MD13, DH-MD14, and DH-MDT1, die mit den obigen Plasmiden transformiert wurden. Dabei wurde E. coli DH5α (DE3) als Transformationswirtsstamm von pMD14 mit einem T7-Promotor verwendet. Der DH5α-(DE3)-Stamm wurde aus E. coli DH5α unter Verwendung eines ADE3-Lysogenization-Kits von Novagen (USA) hergestellt. Im DH-MDT1-Stamm war die Monoacetin- und Diacetin-Produktivität am höchsten und es wurde außerdem auch eine Triacetinherstellung beobachtet (**Fig. 4**).

[0110] Dies wird auf Grund des antibiotischen Markers der Chloramphenicol-O-Acetyltransferase (CAT, SEQ ID Nr: 7) des pSTV28-Vektors angenommen. Es ist bekannt, dass CAT auf Grund ihrer extensiven Substratspezifität Acetylgruppen auf verschiedene Substrate übertragen kann. Das pMDT2-Plasmid wurde vor dem Bs-maa-Gen des pMD13-Plasmids eingeführt und konstruiert, um die Expression des CAT-Enzymgens (cat, SEQ ID Nr: 24), welches Triazetin durch eine weitere Übertragung der Acetylgruppe auf Monoacetin und Diacetin herstellt, zu verstärken (**Fig. 6**).

[0111] Zu diesem Zweck wurde das cat-Gen durch PCR aus pSTV28 unter Verwendung von PCR-Primern von Cat-F (SEQ ID Nr: 60) /Cat-R (SEQ ID Nr: 61) amplifiziert, mit Sacl und BamHI geschnitten und in die entsprechende Restriktionsenzymstelle von pMD13 eingeführt. Für den in pMDT transformierten rekombinanten Stamm DH-MDT2 waren sowohl die Produktionsmenge eines Komplexes aus Monoacetin, Diacetin und Triacetin als auch das Verhältnis von Triacetin im Vergleich zu dem DH-MDT1-Stamm signifikant erhöht. Die Kultivierungsmethode und die Analysemethode sind dieselben wie in Beispiel 1.

Herstellung einer Triacetin-Verbindung unter Verwendung von CAT-ähnlichen Enzymen

[0112] Um ferner Enzyme aufzufinden, die Monoacetin und Diacetin in Triacetin umwandeln, wurde eine BLAST-Suche unter Verwendung der Aminosäuresequenz des CAT-Enzyms durchgeführt. Im Rahmen dieser Suche wurden fünf (5) O-Acetyltransferasen mit hoher Homologie, nämlich OAT, Bc-OAT (SEQ ID Nr: 8), Pa-OAT (SEQ ID Nr: 9), Ca-OAT (SEQ ID Nr: 10), Ma-OAT (SEQ ID Nr: 11) und Lb-OAT (SEQ ID Nr: 12) aus Bacillus cereus, Pseudomonas aeruginosa, Clostridium acetobutylicum, Mycobacterium abscessus und Lactobacillus brevis erhalten. Ferner wurden diese Enzyme gemäß der Verwendung von E. coli durch die Fa. GenScript (USA) synthetisiert, um deren Expression in dem Wirt E. coli zu optimieren.

[0113] Die von den Mikroorganismen stammenden, synthetischen Gene, nämlich Bc-Oat (SEQ ID Nr: 25), Pa-Oat SEQ ID Nr: 26), Ca-Oat SEQ ID Nr: 27), Ma-Oat SEQ ID Nr: 28) und Lb-Oat (SEQ ID Nr: 29) wurden unter Verwendung der PCR-Primer Bc.Oat-F (SEQ ID Nr: 64) /Bc.Oat-R (SEQ ID Nr: 65), Pa.Oat-F (SEQ ID Nr: 72) /Pa.Oat-R (SEQ ID Nr: 73), Ca.Oat-F (SEQ ID Nr: 66) /Ca.Oat-R (SEQ ID Nr: 67), Ma.Oat-F (SEQ ID Nr: 70) /Ma.Oat-R (SEQ ID Nr: 71), und Lb.Oat-F (SEQ ID Nr: 68) /Lb.Oat-R (SEQ ID Nr: 69) amplifiziert.

[0114] Fragmente von jedem dieser auf diese Weise amplifizierten Gene wurden mit dem pMD13-basierten Plasmidskelett durch HiFi-DNA-Zusammenbau verbunden, um so die Plasmide pMDT3 bis pMDT7 zu konstruieren (**Fig. 7**).

[0115] Der HiFi-DNA-Zusammenbau wurde mittels HiFi-DNA-Assembly-Kit der Firma NEB (USA) durchgeführt und ein pMD13-basiertes Plasmidskelett wurde durch PCR-Amplifikation mit PCR-Primern wie Trc-Bs. maa-F (SEQ ID Nr: 62) und Trc-Bs.maa-R (SEQ ID Nr: 63) unter Verwendung von pMD13 als Templat hergestellt. Die Herstellungsmengen der Acetinkomplexe der mit den pMDT3- bis pMDT7-Plasmiden transformierten rekombinanten Stämme DH-MDT2 bis DH-MDT7 wurden miteinander verglichen (**Fig. 7**).

[0116] Als Ergebnis wurde ein signifikanter Unterschied in der Herstellungsmenge des Acetinkomplexes in Abhängigkeit vom Typ des OAT-Gens erhalten. Ferner hatte die von L. brevis und M. abscessus stammende O-Acetyltransferase nicht die Fähigkeit, Triacetin herzustellen, während die aus B. cereus, P. aeruginosa und C. acetobutylicum stammende O-Acetyltransferase Triacetin herstellte, aber eine geringere Produktivität als die von CAT als antibiotischem Marker von pSTV28 aufwies. Das Kultivierungsverfahren und das Analyseverfahren sind dieselben wie in Beispiel 1.

Veränderung der Produktionsmenge von Acetinkomplex in Abhängigkeit von der Menge an E. coli Spezies und zugesetzter Menge an Glycerin

[0117] E. coli DH5α wurde in den vorherigen Beispielen als Wirt verwendet. Um die Produktivität der Acetin-Verbindungen in Abhängigkeit vom Typ von E. coli zu vergleichen, wurden in dem vorliegenden Beispiel die rekombinanten E. coli DH-MDT2, AC-MDT2, BW-MDT2, W3-MDT2 und MG-MDT2, die aus E. coli AceCo, BW 25113, W3110, und MG1655 als Wirte unter Verwendung des Plasmids pMDT2 transformiert wurden, kultiviert, gefolgt von einem Vergleich der Produktivität des Acetin-Komplexes (**Fig. 8A** und **Fig. 8B)**.

[0118] Da die Produktivität des Acetin-Komplexes in dem rekombinanten Stamm MG-MDT2 am höchsten war, wurde bestätigt, dass E. coli MG1655 der geeignetste Wirt für die Herstellung von Acetinverbindungen ist. Das Kultivierungsverfahren und das Analyseverfahren sind die gleichen wie in Beispiel 1.

[0119] Um die Produktivität der Acetinverbindung in Abhängigkeit von der Menge an Glycerin, die dem rekombinanten Stamm MG-MDT2, der die höchste Produktivität an Acetinverbindung aufwies, als Substrat zugesetzt wurde, zu untersuchen, sind alle hier verwendeten Kultivierungsbedingungen und Analyseverfahren die gleichen wie in Beispiel 1, außer dass eine Konzentration von zugesetztem Glycerin zwischen 2 bis 15 % (V/V) verändert wurde (**Fig. 8C** und **Fig. 8D**).

[0120] Die Herstellungsmenge an Acetin-Komplex war bei einer Erhöhung der Menge von Glycerin als Anfangssubstrat erhöht. Jedoch waren im Fall einer Zugabe von 15% Glycerin oder mehr als Ergebnis sowohl die Stämmeproliferation als auch die Acetinherstellung auf Grund der Wirkungen eines übermäßigen osmotischen Drucks verringert.

Verbesserung der Produktivität durch Entfernen der die Acetinverbindungen abbauenden Enzymgene

[0121] Da die Esterverbindung, d.h. Acetin, zu Glycerol und Acetat durch esterbindende Abbauenzyme (Esterasen, (SEQ ID Nr.: 13) abgebaut werden kann, wurden die Wirkungen der Amplifikation oder Deletion des Acetylesterase-Gens (aes, SEQ ID Nr.: 30) von E. coli in Betracht gezogen.

[0122] Aes-Genfragmente wurden durch PCR-Amplifikation unter Verwendung von Ec-aes-F (SEQ ID Nr.: 74) und Ec-aes-R (SEQ ID Nr.: 75) als Primer und dem Chromosom von E. coli MG1655 als Templat erhalten und anschließend in pTrc99A mit BamHI und Sall-Restriktionsenzymen kloniert, wodurch das Plasmid pTAes konstruiert wurde. Um den Abbau von Triacetin durch Aes-Enzym zu beobachten, wurden die rekombinanten Stämme EW-Empty und BW-Aes, die aus E. coli BW25113 mit einem leeren Vektor pTrc99A bzw. Plasmid pTAes transformiert wurden, hergestellt, worauf ein Kultivieren derselben in einem 15 g/L zugegebene Triacetin-Standardverbindung enthaltenden Medium folgte. Die Bedingungen der Kultivierung waren identisch mit den Herstellungsbedingungen des in den obigen Beispielen verwendeten Acetin-Komplexes (**Fig. 9A** und **Fig. 9B)**.

[0123] Obwohl ein Abbau der Triacetin-Standardverbindung sowohl in dem BW-Empty- als auch in dem BW-Aes-Stamm auftrat, wurde bestätigt, dass der Grad des Abbaus in dem das aes-Gen überexprimierenden BW-Aes viel höher war. Eine kleine Menge Diacetin wurde in dem Kulturmedium aufgrund eines Abbaus von

Triacetin nachgewiesen, es wurde jedoch kein Monoacetin nachgewiesen. Es wird angenommen, dass dies darauf beruht, dass der Abbau von Monoacetin schneller erfolgt.

[0124] Basierend auf den obigen Ergebnissen, dass die Acetinverbindungen durch aes abgebaut werden, wurden der JW0465-Stamm, in dem das aes-Gen deletiert ist, und der Wildtyp-Stamm BW25113 mit pMDT2 zur Herstellung der rekombinanten Stämme BW-MDT2 bzw. BW-MDT2 (Daes) transformiert, woraufhin die Produktion von Acetin-Komplex und die Stämmeproliferation in den obigen rekombinanten Stämmen verglichen wurden (**Fig. 9C** und **Fig. 9D**).

[0125] Der Stamm JW0465 ist ein Stamm, in dem das aes-Gen aus dem Stamm BW25113 deletiert ist, und wurde von NBRP (NIG, Japan) vertrieben. Der Stamm wurde in einem 2YT-Kompositmedium (enthaltend 16 g Trypton, 10 g Hefeextrakt und 5 g Natriumchlorid pro Liter) kultiviert, dem 10 % (V/V) Glycerin als Substrat zugegeben sind. Weitere Kultivierungs- und Analysebedingungen sind die gleichen wie in den obigen Beispielen.

[0126] Es wurde bestätigt, dass der Abbau von Acetin in dem BW-MDT2-(Daes)-Stamm, in dem das aes-Gen deletiert ist, inhibiert war, wobei die Produktionsmenge des Acetinkomplexes etwa zweimal höher war als die des BW-MDT2-Stamms. Auf der anderen Seite gab es keinen Unterschied in der Stämmeproliferation zwischen zwei rekombinanten Stämmen. Aus diesen Ergebnissen konnte festgestellt werden, dass aes in den Abbau der Acetinverbindung eingebunden ist und dass die Produktivität des Acetinkomplexes verbessert werden kann, wenn das aes-Gen deletiert ist.

Produktion von Acetinverbindung unter Verwendung von Glucose als Substrat

[0127] Wie in **Fig. 2** gezeigt, kann Glyceron-phosphat (DHAP), welches ein Zwischenmetabolit eines Glycolyse-Pfads (Embden-Meyerhof-Pfad) ist, in Glycerin über Glycerin-3-phosphat durch Glycerin-3-phosphatdehydrogenase und DL-Glycerin-3-phosphatase umgewandelt werden. Daher ist die Produktion eines Acetin-Komplexes basierend auf Glucose als Ausgangssubstrat durch zusätzliche Überexpression von Glycerin-3-phosphatdehydrogenase und DL-Glycerin-3-phosphatase ebenfalls möglich. Die hier verwendete Glycerin-3-phosphatdehydrogenase und DL-Glycerin-3-phosphatase waren Gpd1 (SEQ ID Nr.: 14) bzw. Gpp2 (SEQ ID Nr.: 15), die von Saccharomyces cerevisiae stammen.

[0128] In **Fig. 10** ist Abbildung (A) ein Strukturdiagramm von Plasmid pMDT8, das durch Klonieren der Glycerinproduktionsgene, d.h. Sc-gpd1 (SEQ ID Nr.: 31) and Sc-gpp2 (SEQ ID Nr.: 32), die von Saccharomyces cerevisiae stammen, in das pMDT2-Plasmid hergestellt wird, wodurch ein Acetin-Komplex aus Glucose hergestellt wird; und die Abbildungen (B), (C) und (D) zeigen die Produktion des Acetin-Komplexes aus Glucose des rekombinanten E. coli DH-MDT8, transformiert mit dem obigen Plasmid, die Stämmeproliferation hiervon und die Veränderung des pH-Werts des Kulturmediums im Vergleich zur Kontrolle, das heißt, DH-MDT2.

[0129] Sc-gpd1 wurde einer PCR-Amplifikation unter Verwendung von Sc-gpd1-F (SEQ ID Nr.: 76) und Sc-gpd1-R (SEQ ID Nr.: 59) als Primer und den Chromosomen von Saccharomyces cerevisiae als Templat unterzogen, während Sc-gpp2 einer PCR-Amplifikation unter Verwendung von Sc-gpp2-F (SEQ ID Nr.: 22) und Sc-gpp2-R (SEQ ID Nr.: 23) als Primer unterzogen wurde. Anschließend wurde ersterer mit BamHI- und PstI-Restriktionsenzymen geschnitten, während letzterer mit PstI- und HindIII-Restriktionsenzymen geschnitten wurde, gefolgt von dem Einführen jedes der behandelten Produkte in die entsprechenden Restriktionsenzymstellen von pMDT2-Plasmid, wodurch das Plasmid pMD8 konstruiert wird. Die Kultivierung wurde während 48 Stunden durch Animpfen der rekombinanten Stämme DH-MDT2 und DH-MDT8 in einem 2YT-Kompositmedium, dem 1% (Gew/Vol) an Stelle von Glycerin zugegeben war, durchgeführt. Weitere Kultivierungs- und Analysebedingungen sind die gleichen wie in den obigen Beispielen.

[0130] Von den zwei obigen rekombinanten Stämmen wurde der Acetin-Komplex lediglich in dem DH-MDT8-Stamm, in dem die Gene Sc-gpd1 und Sc-gpp2 exprimiert wurden, produziert, während die Stämmeproliferation und der pH-Wert des Kulturmediums gleich waren.

Es folgt ein Sequenzprotokoll nach WIPO ST.25. Dieses kann sowohl in DEPATISnet als auch im DPMAregister aufgerufen werden.

ZITATE ENTHALTEN IN DER BESCHREIBUNG

Diese Liste der vom Anmelder aufgeführten Dokumente wurde automatisiert erzeugt und ist ausschließlich zur besseren Information des Lesers aufgenommen. Die Liste ist nicht Bestandteil der deutschen Patent- bzw. Gebrauchsmusteranmeldung. Das DPMA übernimmt keinerlei Haftung für etwaige Fehler oder Auslassungen.

Zitierte Nicht-Patentliteratur

- J.-H. Kim et al., Isoprene production by Escherichia coli through the exogenous mevalonate pathway with reduced formation of fermentation byproducts. Microbial Cell Factories 15, 214 (2016) [0101]

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung von Acetin, umfassend ein Umsetzen von Acetyl-CoA mit Glycerin in Gegenwart einer ersten O-Acetyltransferase zur Herstellung von Monoacetin oder Diacetin.

2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die erste O-Acetyltransferase Maltose-O-Acetyltransferase ist.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position 70 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparaginsäure (ASP) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 84 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparagin (ASN) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 114 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Histidin (HIS) ist, und die Aminosäure an einer Position, die der Position 126 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Glutaminsäure (GLU) ist.

4. Verfahren gemäß Anspruch 3, wobei in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position 15 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) oder Phenylalanin (PHE) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 26 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Glutamin (GLN) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 30 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Lysin (LYS) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 71 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) ist und die Aminosäure an einer Position, die der Position 82 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist.

5. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die erste O-Acetyltransferase aus einer beliebigen Sequenz der SEQ ID Nrn. 1 bis 6 besteht.

6. Verfahren gemäß Anspruch 1, das ferner ein Umsetzen von Diacetin als Reaktionsprodukt mit Acetyl-CoA in Gegenwart von Chloramphenicol-O-Acetyltransferase oder einer zweiten O-Acetyltransferase umfasst, um so Triacetin herzustellen.

7. Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei in der zweiten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position 31 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Cystein (CYS) oder Leucin (LEU) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 102 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Isoleucin (ILE) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 143 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 166 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 170 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Valin (VAL), Isoleucin (ILE) oder Leucin (LEU) ist und die Aminosäure an einer Position, die der Position 193 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Histidin (HIS) ist.

8. Verfahren gemäß Anspruch 6, wobei die Chloramphenicol-O-Acetyltransferase aus der Sequenz der SEQ ID Nr. 7 besteht, während die zweite O-Acetyltransferase aus einer beliebigen Sequenz der SEQ ID Nrn. 8 bis 10 besteht.

9. Verfahren zur Herstellung von Acetin, das ein Züchten eines Mikroorganismus, der ein Gen mit Codierung für eine erste O-Acetyltransferase exprimiert, in einem Glycerin enthaltenden Medium umfasst.

10. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei die erste O-Acetyltransferase Maltose-O-Acetyltransferase ist.

11. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position 70 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparaginsäure (ASP) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 84 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparagin (ASN) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 114 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Histidin (HIS) ist und die Aminosäure an einer Position, die der Position 126 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Glutaminsäure (GLU) ist.

12. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position 15 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) oder Phenylalanin (PHE) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 26 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Glutamin (GLN) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 30

der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Lysin (LYS) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 71 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 82 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist.

13. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei das Gen mit Codierung für die erste O-Acetyltransferase aus einer beliebigen Sequenz der SEQ ID Nrn. 16 bis 21 besteht.

14. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei der Mikroorganismus ferner ein Gen mit Codierung für Chloramphenicol-O-Acetyltransferase oder eine zweite O-Acetyltransferase, die eine Acetylgruppe auf Diacetin überträgt, exprimiert.

15. Verfahren gemäß Anspruch 14, wobei in der zweiten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position 31 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Cystein (CYS) oder Leucin (LEU) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 102 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Isoleucin (ILE) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 143 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 166 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 170 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Valin (VAL), Isoleucin (ILE) oder Leucin (LEU) ist und die Aminosäure an einer Position, die der Position 193 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Histidin (HIS) ist.

16. Verfahren gemäß Anspruch 14, wobei das Gen mit Codierung für Chloramphenicol-O-Acetyltransferase aus der Sequenz der SEQ ID Nr. 24 besteht, während das Gen mit Codierung für die zweite O-Acetyltransferase aus einer beliebigen Sequenz der SEQ ID Nrn. 25 bis 27 besteht.

17. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei der Mikroorganismus ein Gen mit Codierung für Acetylesterase, das abgeschwächt oder deletiert ist, umfasst.

18. Verfahren gemäß Anspruch 9, wobei der Mikroorganismus ferner Gene mit Codierung für Glycerin-3-phosphatdehydrogenase und Glycerin-3-phosphatase („DL-Glycerin-3-phosphatase“) exprimiert und das Medium Glucose umfasst.

19. Zusammensetzung zur Herstellung von Acetin, die einen Mikroorganismus umfasst, der ein Gen mit Codierung für eine erste O-Acetyltransferase exprimiert.

20. Zusammensetzung gemäß Anspruch 19, wobei die erste O-Acetyltransferase Maltose-O-Acetyltransferase ist.

21. Zusammensetzung gemäß Anspruch 19, wobei in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position 70 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparaginsäure (ASP) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 84 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Asparagin (ASN) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 114 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Histidin (HIS) ist und die Aminosäure an einer Position, die der Position 126 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Glutaminsäure (GLU) ist.

22. Zusammensetzung gemäß Anspruch 19, wobei in der ersten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position 15 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) oder Phenylalanin (PHE) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 26 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Glutamin (GLN) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 30 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Arginin (ARG) oder Lysin (LYS) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 71 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 82 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 5 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist.

23. Zusammensetzung gemäß Anspruch 19, wobei das Gen mit Codierung für die erste O-Acetyltransferase aus einer beliebigen Sequenz der SEQ ID Nrn. 16 bis 21 besteht.

24. Zusammensetzung gemäß Anspruch 19, wobei der Mikroorganismus ferner ein Gen mit Codierung für Chloramphenicol-O-Acetyltransferase oder eine zweite O-Acetyltransferase, die eine Acetylgruppe auf Diacetin überträgt, exprimiert.

25. Zusammensetzung gemäß Anspruch 24, wobei in der zweiten O-Acetyltransferase die Aminosäure an einer Position, die der Position 31 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Cystein (CYS) oder Leucin (LEU) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 102 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Isoleucin (ILE) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 143 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 166 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Phenylalanin (PHE) oder Tyrosin (TYR) ist, die Aminosäure an einer Position, die der Position 170 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Valin (VAL), Isoleucin (ILE) oder Leucin (LEU) ist und die Aminosäure an einer Position, die der Position 193 der Aminosäuresequenz der SEQ ID Nr. 7 entspricht, Histidin (HIS) ist.

26. Zusammensetzung gemäß Anspruch 24, wobei das Gen mit Codierung für Chloramphenicol-O-Acetyltransferase aus der Sequenz der SEQ ID Nr. 24 besteht, während das Gen mit Codierung für die zweite O-Acetyltransferase aus einer beliebigen Sequenz der SEQ ID Nrn. 25 bis 27 besteht.

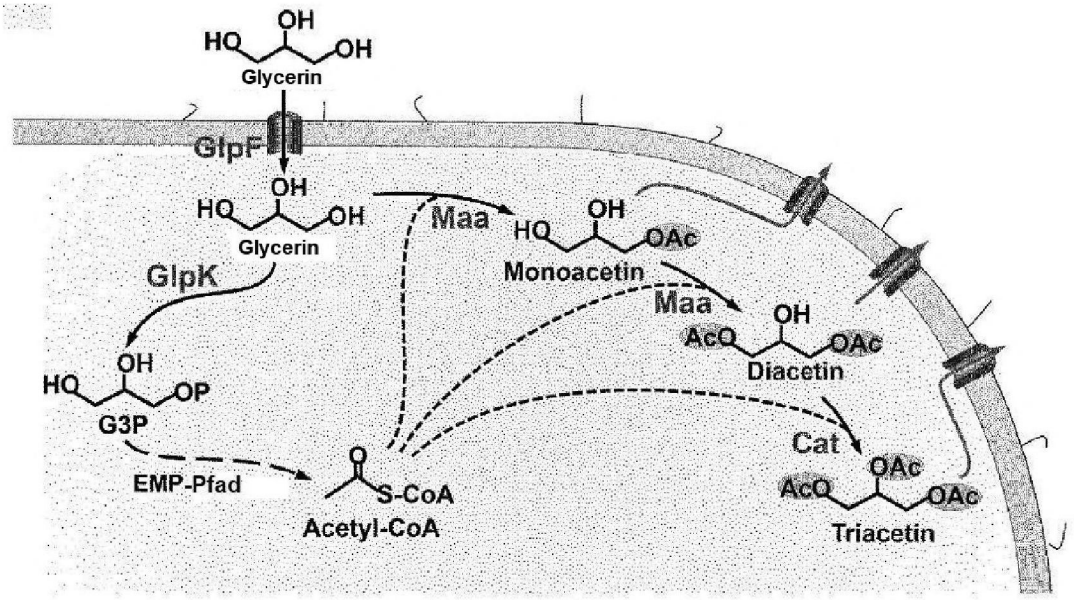
27. Zusammensetzung gemäß Anspruch 19, wobei der Mikroorganismus ein Gen mit Codierung für Acetylesterase, das abgeschwächt oder deletiert ist, umfasst.

28. Zusammensetzung gemäß Anspruch 19, wobei der Mikroorganismus ferner Gene mit Codierung für Glycerin-3-phosphatdehydrogenase und DL-Glycerin-3-phosphatase exprimiert.

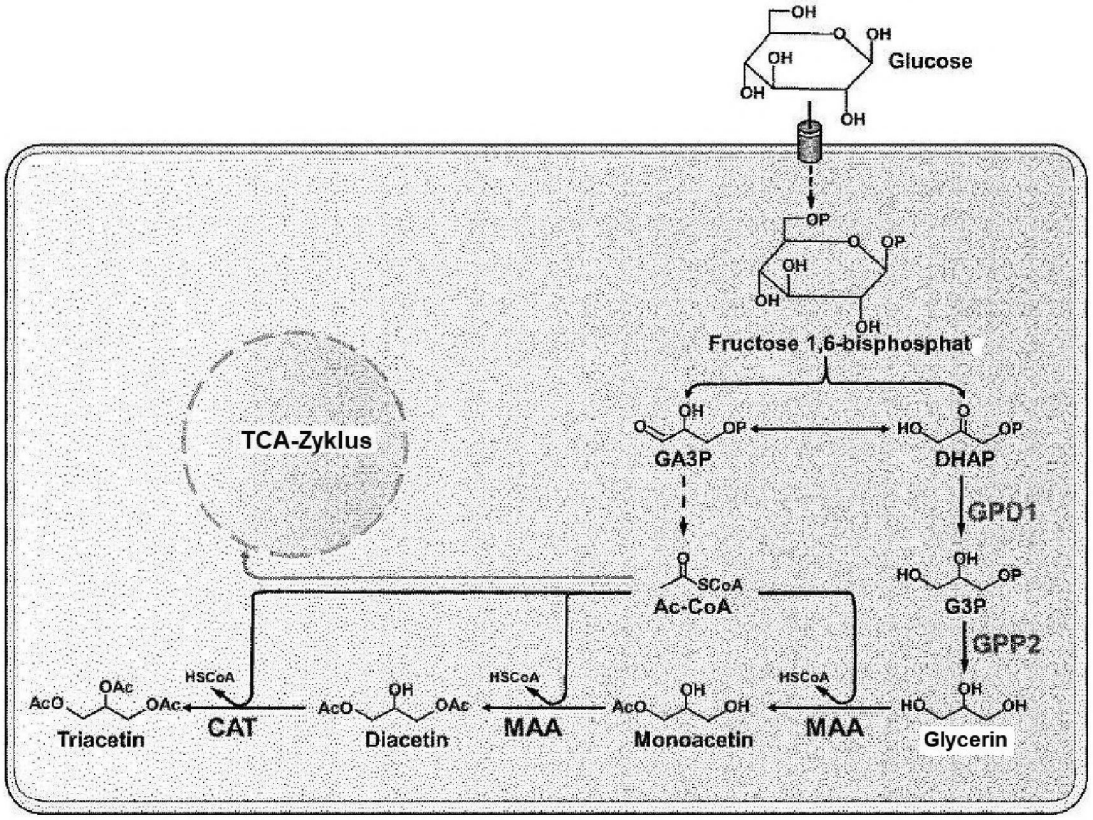
Es folgen 13 Seiten Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

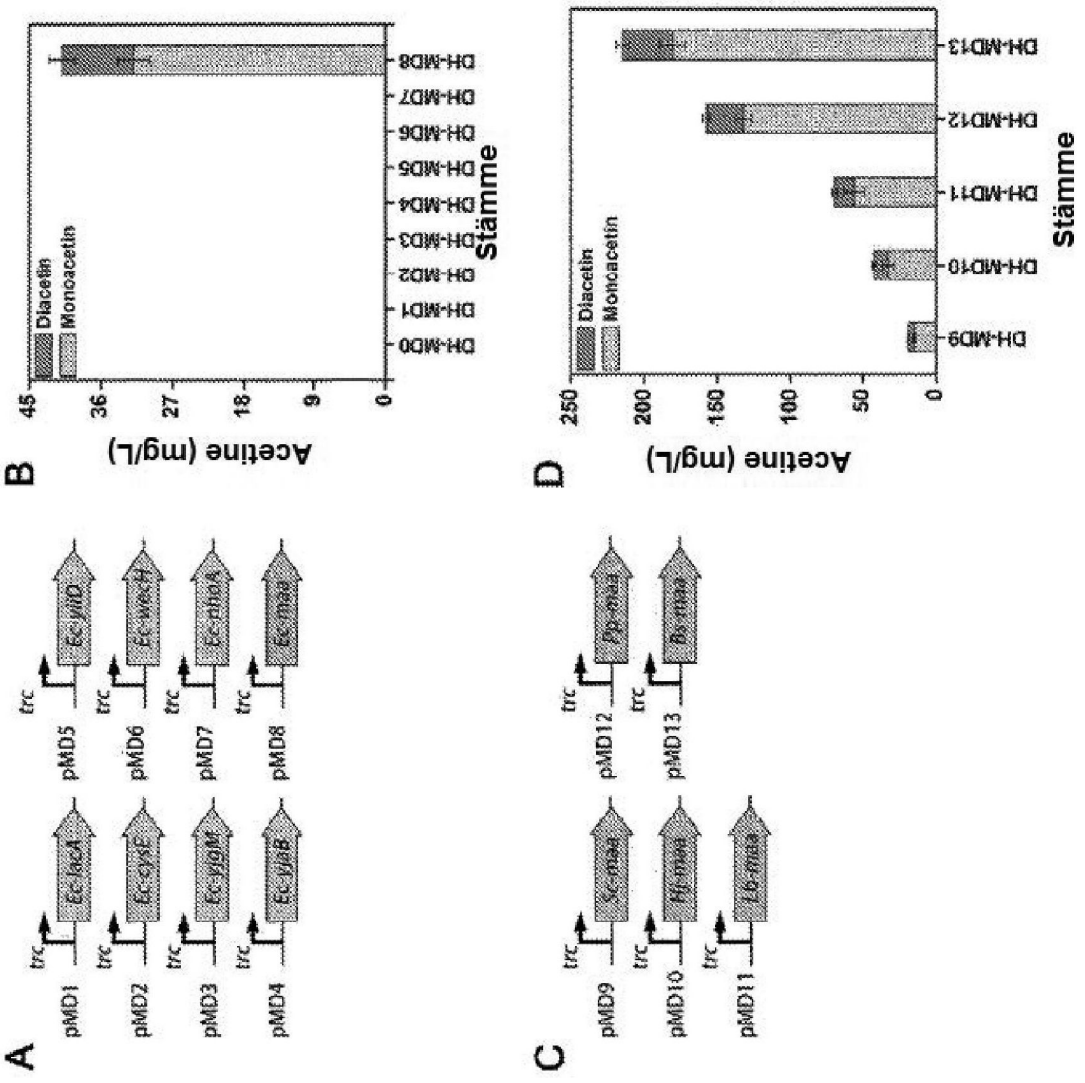
[FIG. 1]



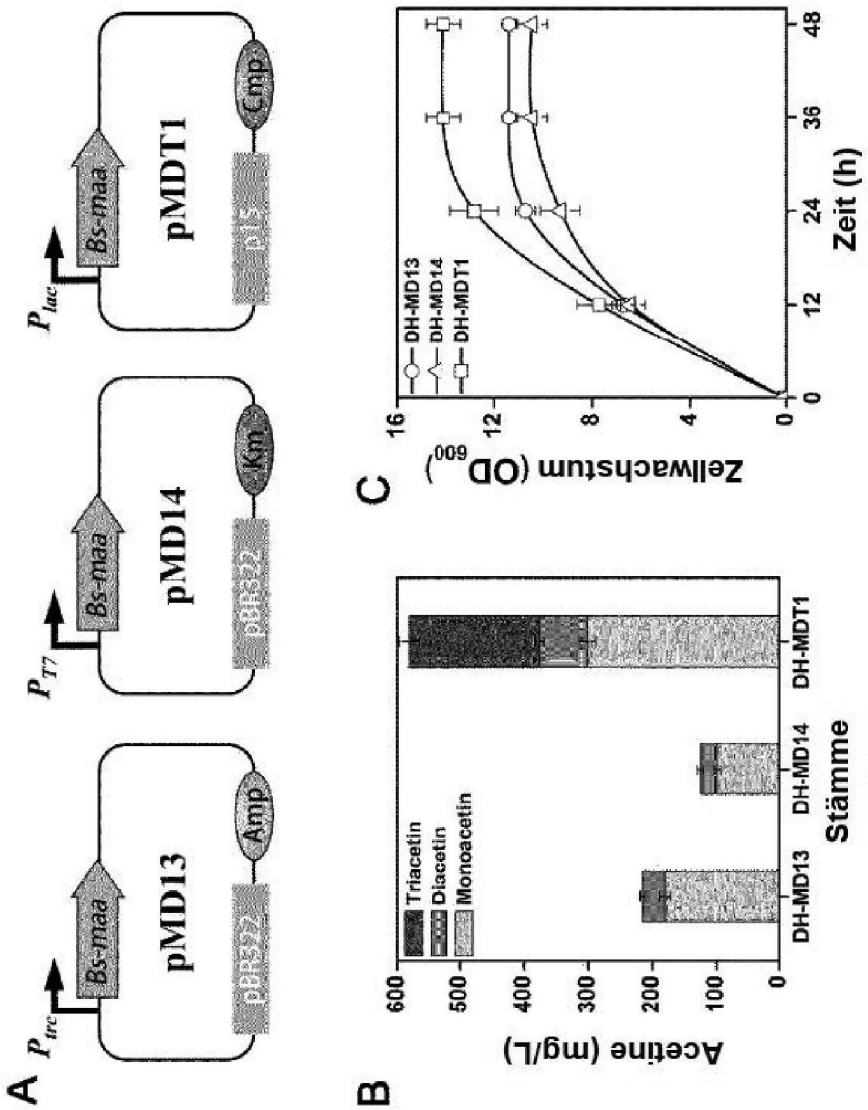
[FIG. 2]



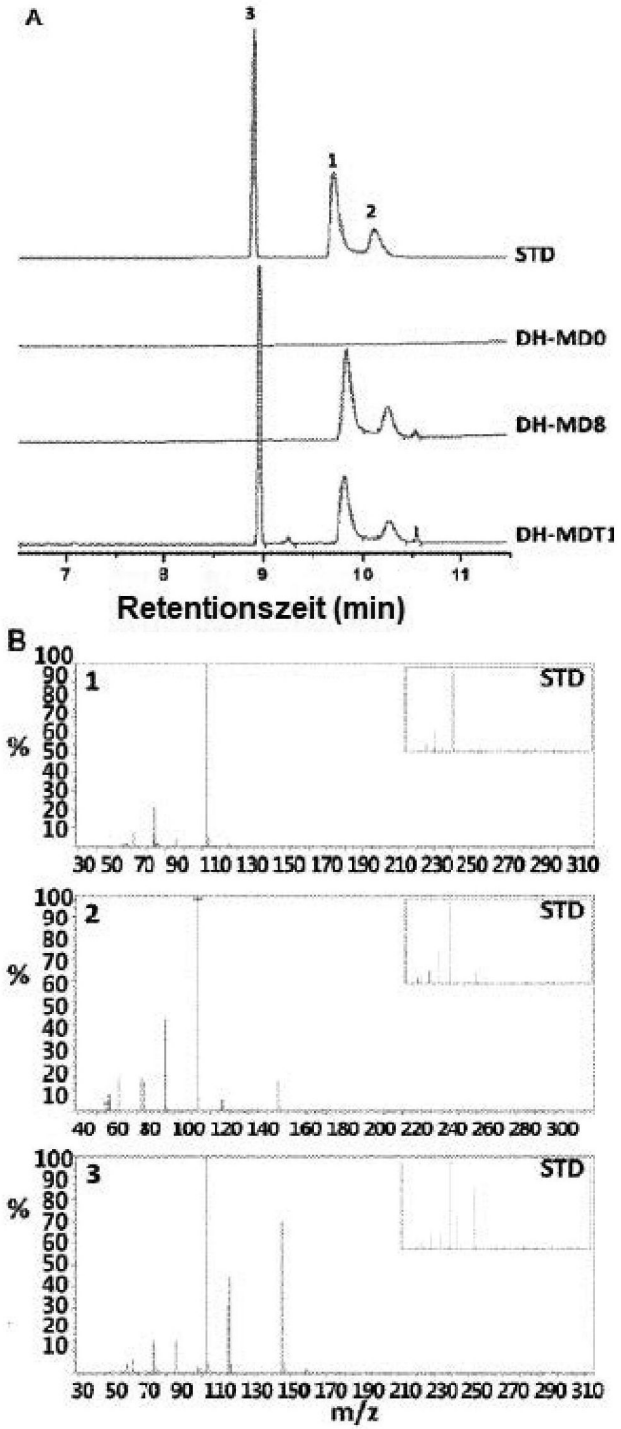
[FIG. 3]


A
pMD1
pMD2
pMD3
pMD4
pMD5
pMD6
pMD7
pMD8
trc
Ec-lacA
Ec-cysE
Ec-yqiM
Ec-yiaB
Ec-yjhD
Ec-wecH
Ec-nhoA
Ec-maa
B
Acetine (mg/L)
Diacetin
Monocacetin
Stämme
DH-MD0
DH-MD1
DH-MD2
DH-MD3
DH-MD4
DH-MD5
DH-MD6
DH-MD7
DH-MD8
C
pMD9
pMD10
pMD11
pMD12
pMD13
Sc-maa
Hj-maa
Lb-maa
Pp-maa
Bs-maa
D
DH-MD9
DH-MD10
DH-MD11
DH-MD12
DH-MD13

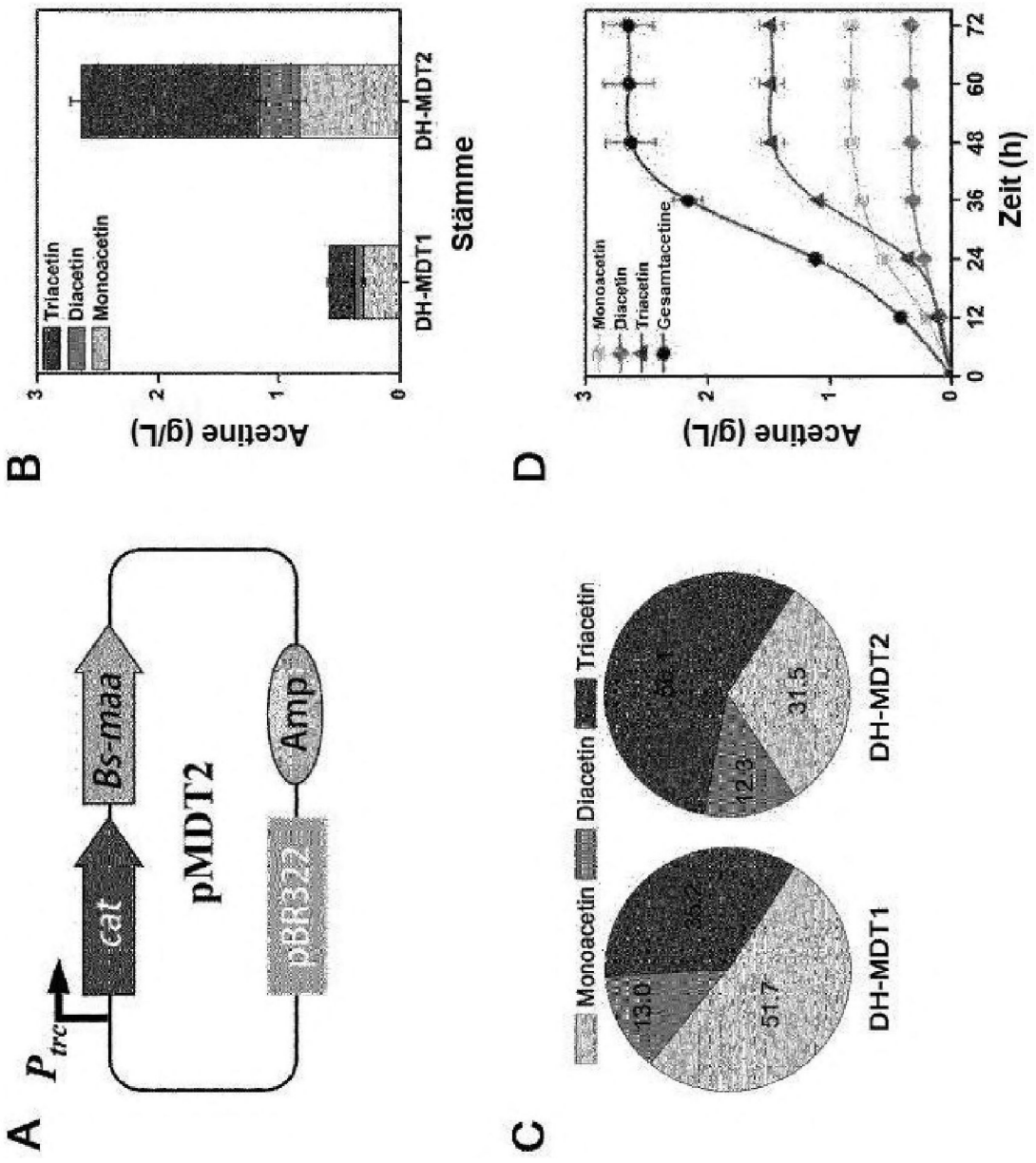
[FIG. 4]


A
P_{trc}
Bs-maa
pMD13
pBBR22
Amp
P_{T7}
Bs-maa
pMD14
pBBR22
Km
P_{lac}
Bs-maa
pMDT1
p15
Cmp
B
Acetine (mg/L)
600
500
400
300
200
100
0
Triacetin
Diacetin
Monoacetin
DH-MD13
DH-MD14
DH-MDT1
Stämme
C
Zellwachstum (OD_{600})
16
12
8
4
0
DH-MD13
DH-MD14
DH-MDT1
0
12
24
36
48
Zeit (h)

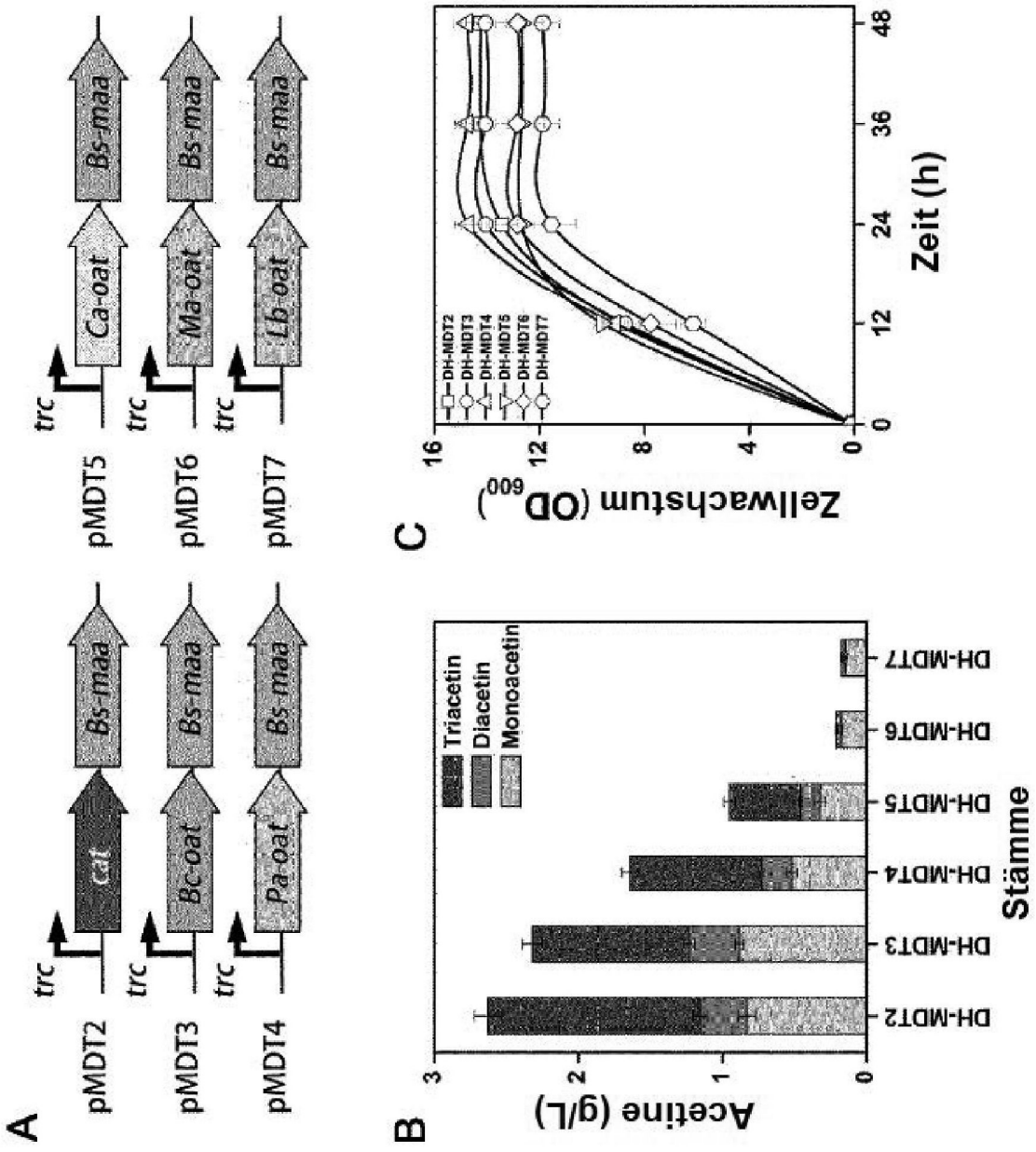
[FIG. 5]


A
3
1
2
STD
DH-MD0
DH-MD8
DH-MDT1
7
8
9
10
11
Retentionszeit (min)
B
1
STD
2
STD
3
STD
%
m/z

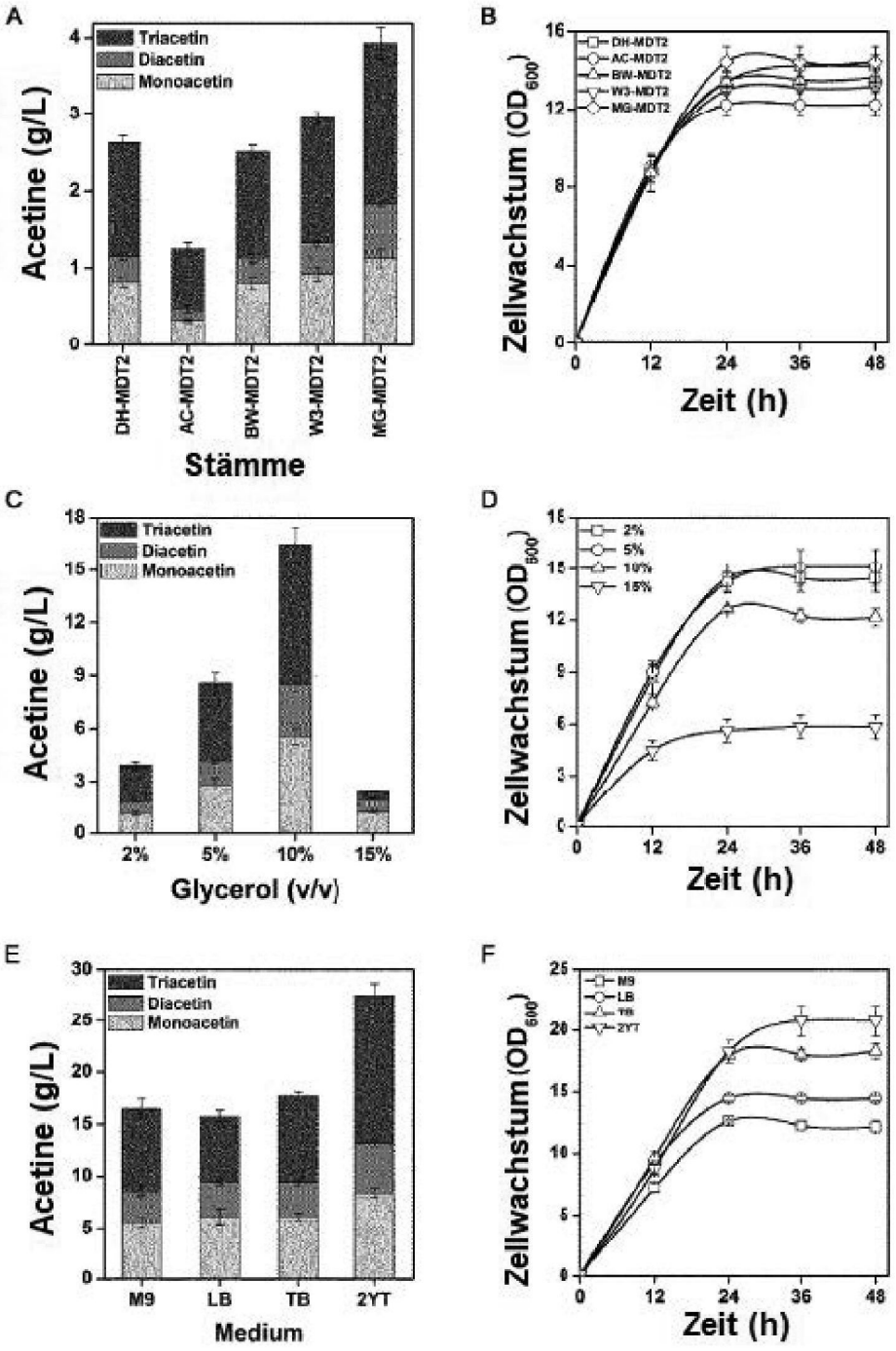
[FIG. 6]


A
P_{trc}
cat
Bs-maa
pMDT2
pBBR1
Amp
B
Triacetin
Diacetin
Monoacetin
Acetine (g/L)
DH-MDT1
DH-MDT2
Stämme
C
Monoacetin
Diacetin
Triacetin
13.0
35.2
51.7
DH-MDT1
12.3
31.5
56.2
DH-MDT2
D
Monoacetin
Diacetin
Triacetin
Gesamtacetine
Acetine (g/L)
Zeit (h)

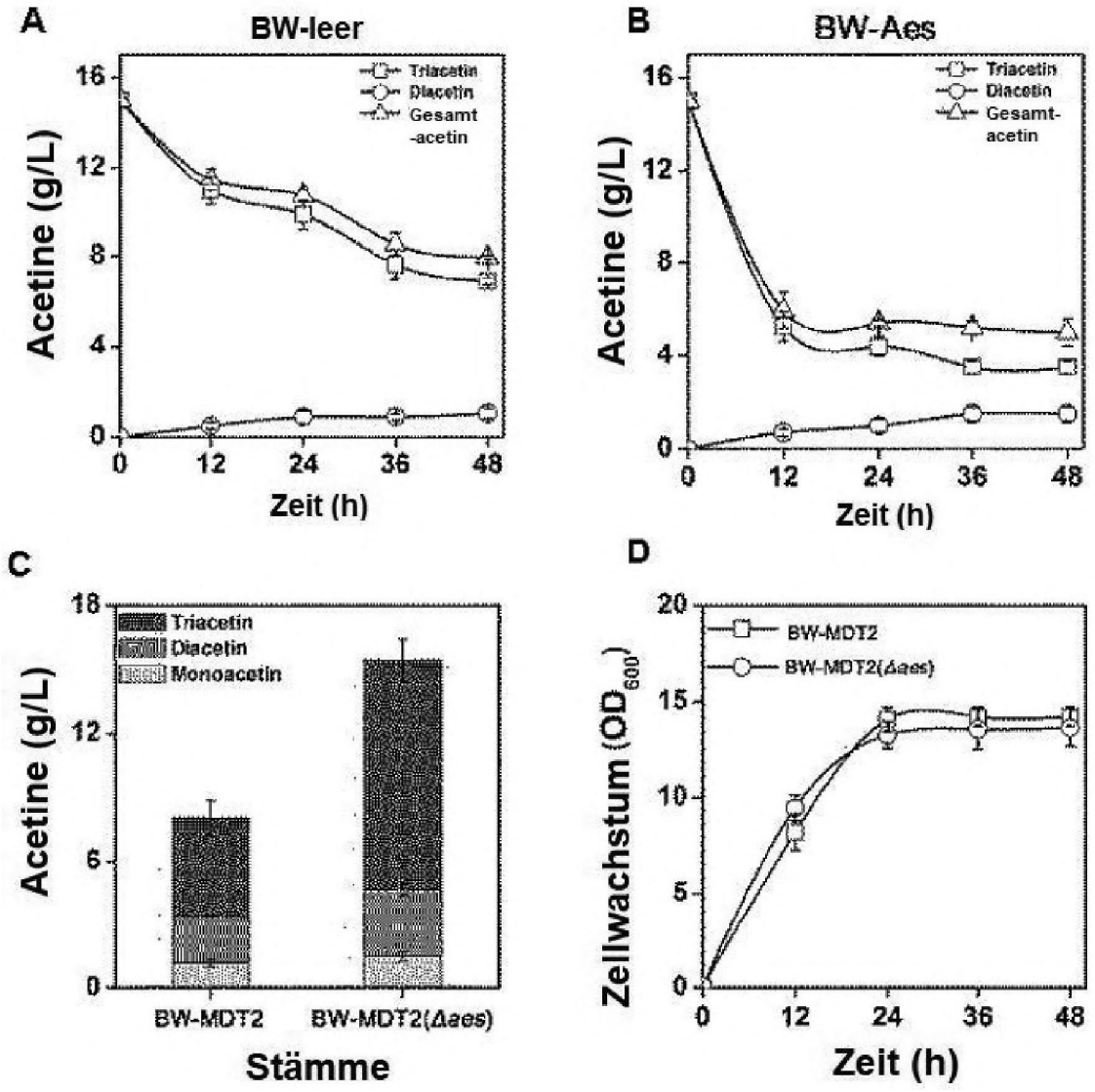
[FIG. 7]


A
pMDT2
pMDT3
pMDT4
pMDT5
pMDT6
pMDT7
trc
cat
Bc-oat
Pa-oat
Ca-oat
Ma-oat
Lb-oat
Bs-maa
B
Acetine (g/L)
Triacetin
Diacetin
Monoacetin
DH-MDT2
DH-MDT3
DH-MDT4
DH-MDT5
DH-MDT6
DH-MDT7
Stämme
C
Zellwachstum (OD600)
Zeit (h)

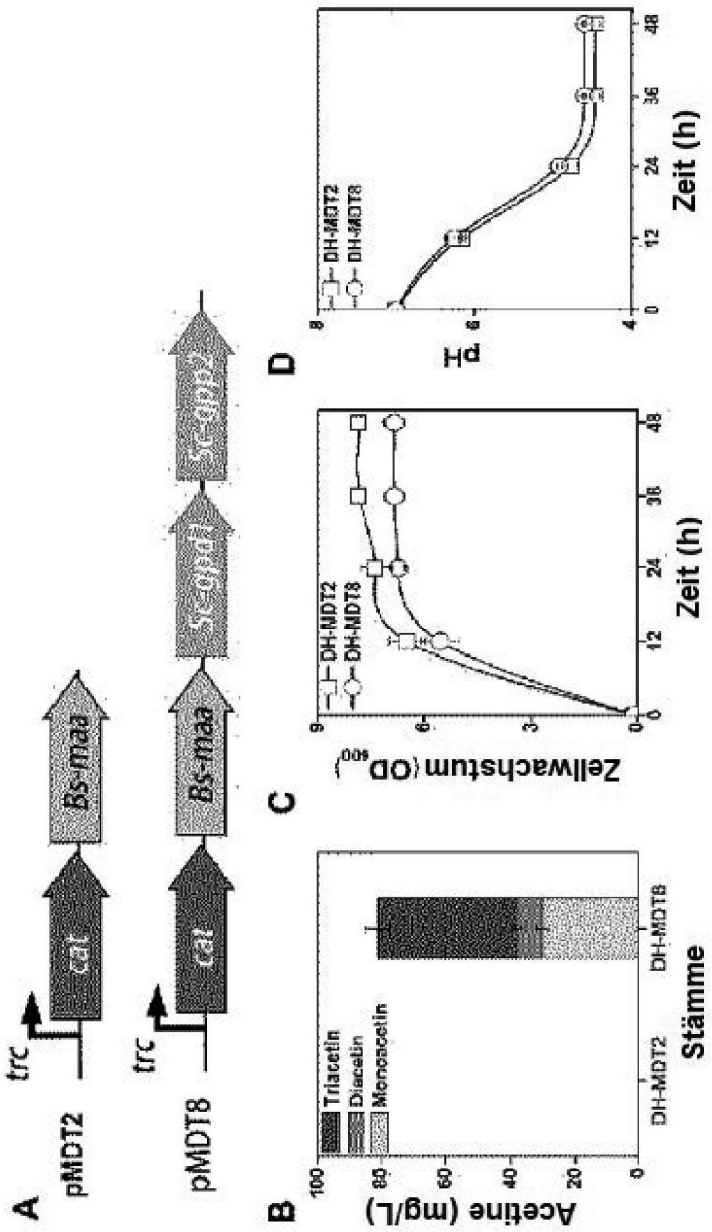
[FIG. 8]


A
Triacetin
Diacetin
Monoacetin
Acetine (g/L)
DH-MDT2
AC-MDT2
BW-MDT2
W3-MDT2
MG-MDT2
Stämme
B
Zellwachstum (OD600)
Zeit (h)
C
Glycerol (v/v)
D
2%
5%
10%
15%
E
M9
LB
TB
2YT
Medium
F

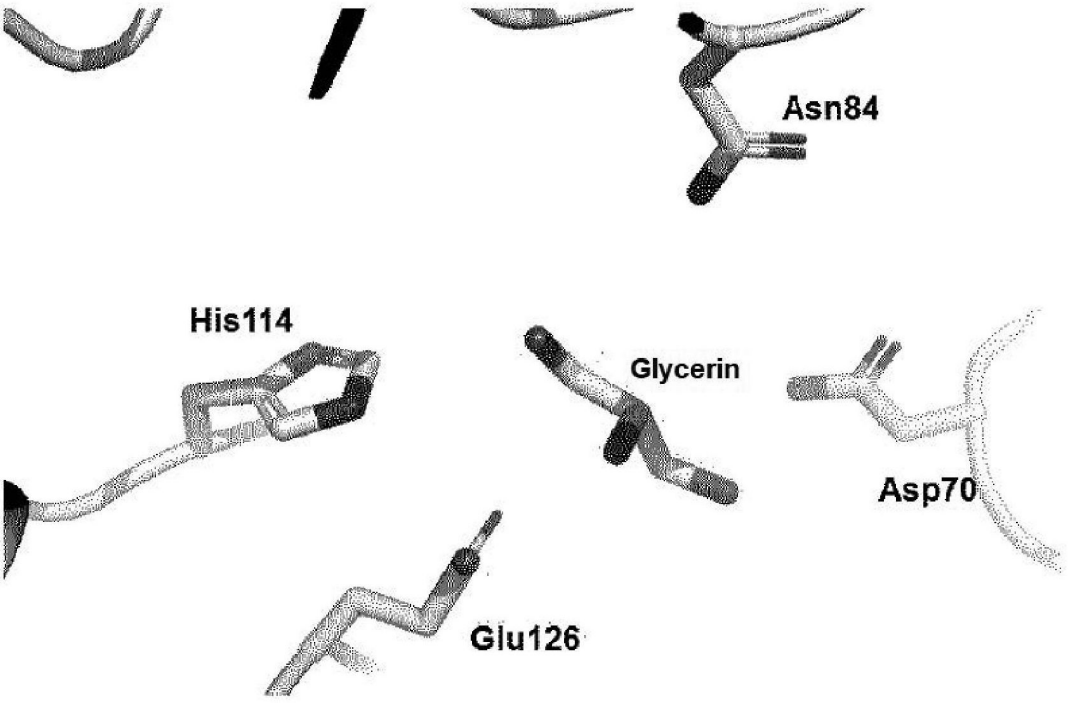
[FIG. 9]


A
BW-leer
Triacetin
Diacetin
Gesamt
-acetin
Acetine (g/L)
Zeit (h)
B
BW-Aes
Triacetin
Diacetin
Gesamt-
acetin
Acetine (g/L)
Zeit (h)
C
Triacetin
Diacetin
Monoacetin
Acetine (g/L)
BW-MDT2
BW-MDT2(Δaes)
Stämme
D
BW-MDT2
BW-MDT2(Δaes)
Zellwachstum (OD600)
Zeit (h)

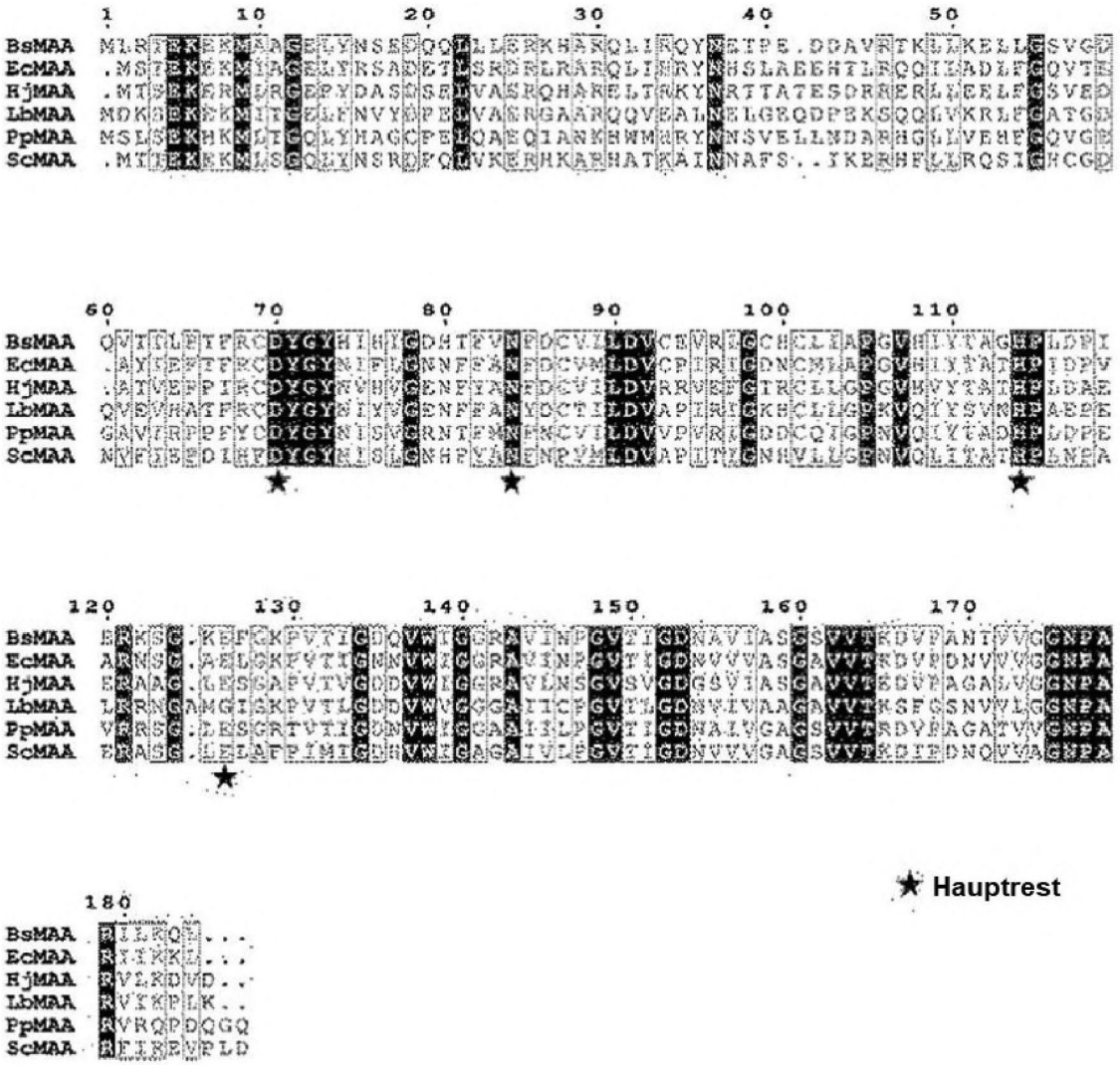
[FIG. 10]


A
pMDT2
trc
cat
Bs-maa
pMDT8
trc
cat
Bs-maa
Sc-qhpd1
Sc-qhpd2
B
Acetine (mg/L)
Triacetin
Diacetin
Monoacetin
DH-MDT2
DH-MDT8
Stämme
C
Zellwachstum (OD600)
DH-MDT2
DH-MDT8
Zeit (h)
D
pH
DH-MDT2
DH-MDT8
Zeit (h)

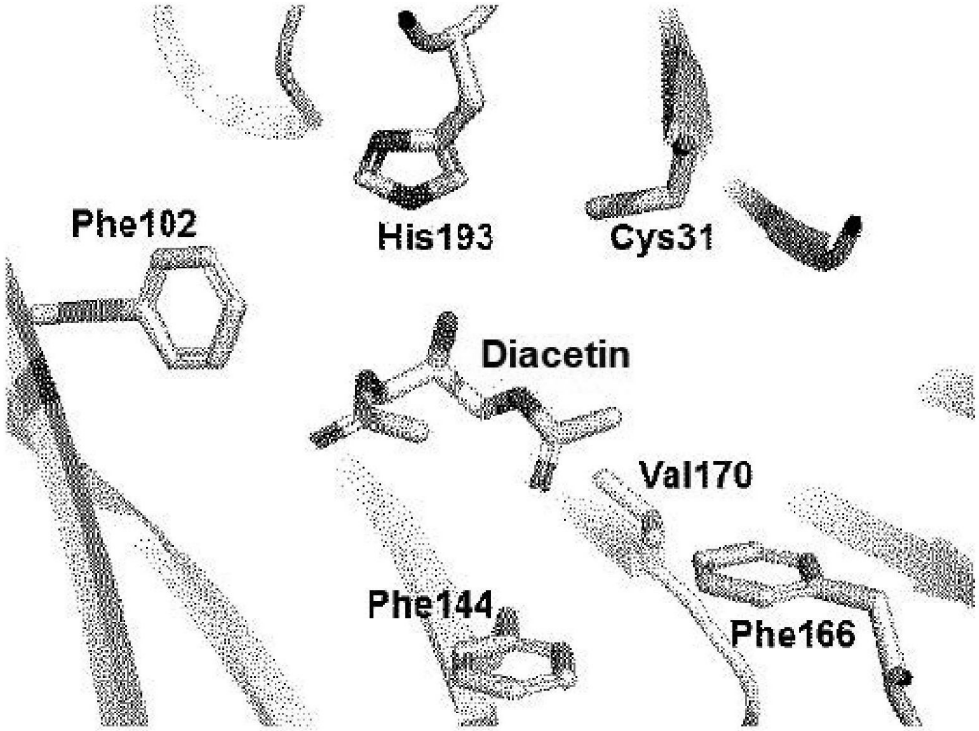
[FIG. 11]



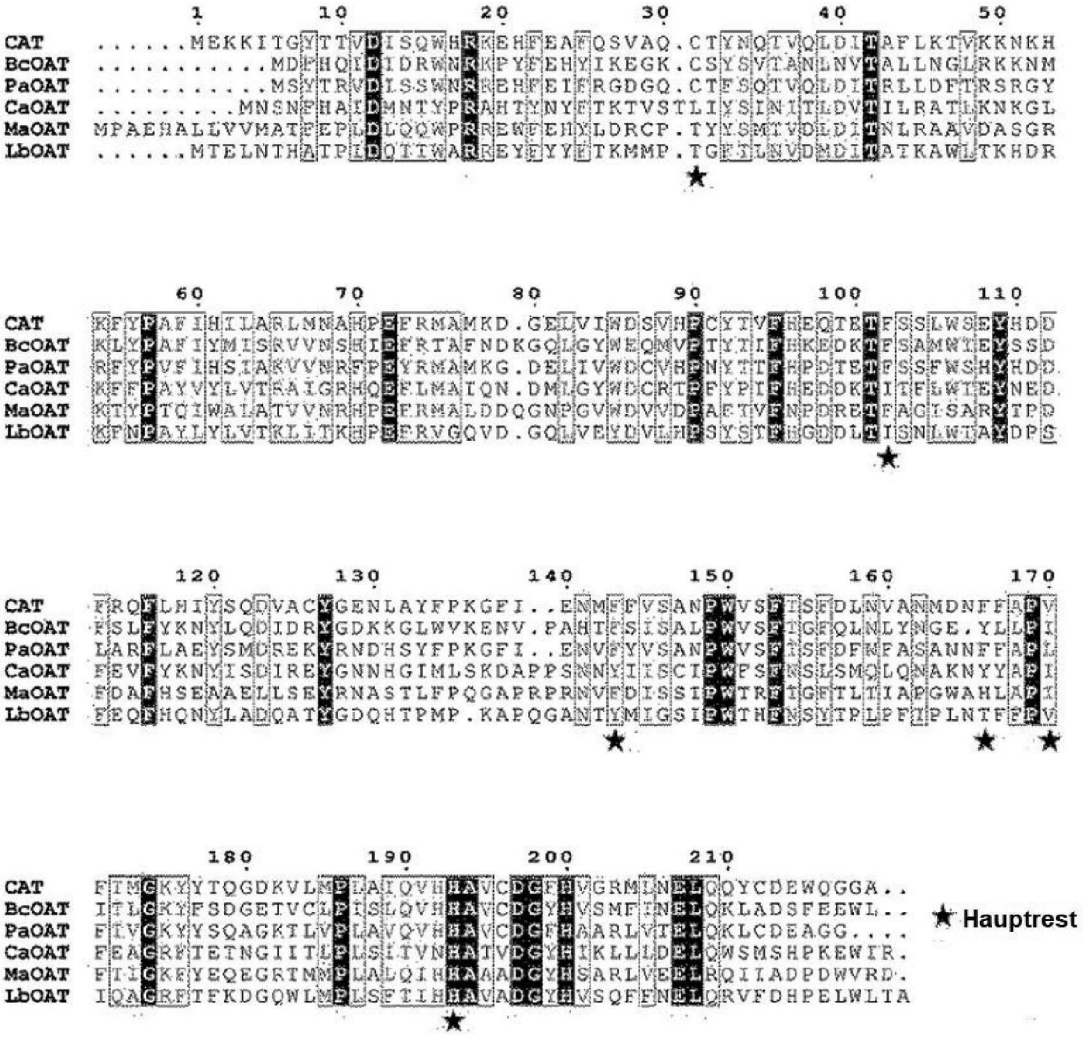
[FIG. 12]



[FIG. 13]



[FIG. 14]



 Das Dokument wurde durch die Firma Jouve hergestellt.