(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117769590 A
(43)申请公布日 2024.03.26

(21)申请号 202280051418.8
(22)申请日 2022.05.20
(30)优先权数据
63/190,954 2021.05.20 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.01.19
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/030364 2022.05.20
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/246270 EN 2022.11.24
(71)申请人 伯克利发酵科学公司
地址 美国加利福尼亚州
(72)发明人 R·李 C·丹比 J·鲁普
N·哈里斯 S·斯塔杜利斯
(74)专利代理机构 北京市铸成律师事务所 11313
专利代理师 陈艳娟 王艳波
(51)Int.Cl.
C12C 12/00(2006.01)

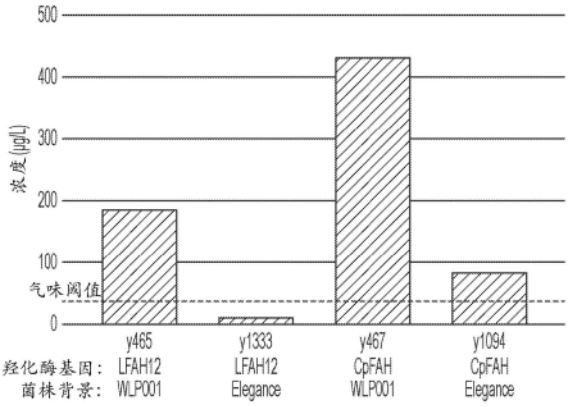
权利要求书6页 说明书49页
序列表29页 附图4页

(54)发明名称

发酵饮料中γ-癸内酯生物合成的方法和组合物

(57)摘要

本文提供了基因修饰酵母细胞,其重组表达编码脂肪酸羟化酶(FAH)酶(如油酸12-羟化酶)的基因,并且产生在气味阈值以上的γ-癸内酯水平。本文还提供了基因修饰酵母细胞,其重组表达编码脂肪酸羟化酶(FAH)酶的基因和一种或多种额外的基因,如酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)酶、失调转录因子和/或醇-O-酰基转移酶(AAT)酶。还提供了使用本文所述的基因修饰酵母细胞生产发酵饮料和包括乙醇的组合物的方法。



CN 117769590 A

1.一种基因修饰酵母细胞(修饰细胞),包括:

编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因;

其中,与不包括具有油酸12-羟化酶活性的酶的对应细胞产生的γ-癸内酯的水平相比,所述修饰细胞能够在缺乏脂肪酸补充的情况下产生具有增加水平的γ-癸内酯的发酵产物。

2.一种基因修饰酵母细胞(修饰细胞),包括:

编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因;

其中,所述修饰细胞能够在缺乏脂肪酸补充的情况下产生γ-癸内酯水平大于35μg/L的发酵产物。

3.根据权利要求1或2所述的修饰细胞,其中,具有油酸12-羟化酶活性的酶来自麦角菌、雷斯克懒勒、风筝果、Physaria lindheimeri或蓖麻。

4.根据权利要求3所述的修饰细胞,其中,具有油酸12-羟化酶活性的酶包括与SEQ ID NO:6或20-23中任一所述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。

5.根据权利要求4所述的修饰细胞,其中,具有油酸12-羟化酶活性的酶包括SEQ ID NO:6或20-23中任一叙述的氨基酸序列。

6.根据权利要求1-5中任一项所述的修饰细胞,其中,具有油酸12-羟化酶活性的酶包括与SEQ ID NO:6所述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。

7.根据权利要求6所述的修饰细胞,其中,具有油酸12-羟化酶活性的酶包括SEQ ID NO:6叙述的氨基酸序列。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的修饰细胞,进一步包括编码失调转录因子的基因,与未失调的对应转录因子相比,所述失调转录因子增加了过氧化物酶体的大小和数量,并增加了β-氧化。

9.根据权利要求8所述的修饰细胞,其中,所述失调转录因子是ADR1、PIP2、OAF1或OAF3。

10.根据权利要求9所述的修饰细胞,其中,所述失调转录因子是ADR1,并包括位置230处的丝氨酸的取代突变。

11.根据权利要求9或10所述的修饰细胞,其中,所述失调转录因子包括与SEQ ID NO:24叙述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。

12.根据权利要求11所述的修饰细胞,其中,所述失调转录因子包括SEQ ID NO:24叙述的氨基酸序列。

13.根据权利要求8-12中任一项所述的修饰细胞,其中,编码失调转录因子的基因与选自由pHEM13、pSPG1、pPRB1、pQCR10、pPGK1、pOLE1、pERG25、pHHF2、pTDH1、pTDH2、pTDH3、pENO2、pHSP26和pRPL18b组成的组的启动子可操作地连接。

14.根据权利要求1-13中任一项所述的修饰细胞,进一步包括编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因和/或编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因。

15.根据权利要求14所述的修饰细胞,其中,具有OLE1活性的酶源自于酿酒酵母。

16.根据权利要求14或15所述的修饰细胞,其中,具有OLE1活性的酶包括与SEQ ID NO:7所述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。

17.根据权利要求16所述的修饰细胞,其中,具有OLE1活性的酶包括SEQ ID NO:7叙述

的氨基酸序列。

18.根据权利要求14-17中任一项所述的修饰细胞,其中,编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因是编码具有OLE1活性的酶的内源基因的拷贝。

19.根据权利要求14-18中任一项所述的修饰细胞,其中,具有AAT活性的酶来自桃、草莓、番茄、苹果或甜瓜。

20.根据权利要求19所述的修饰细胞,其中,具有AAT活性的酶包括与SEQ ID NO:1-5或25中任一项叙述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。

21.根据权利要求20所述的修饰细胞,其中,具有AAT活性的酶包括SEQ ID NO:1-5或25中任一项叙述的氨基酸序列。

22.根据权利要求1-21中任一项所述的修饰细胞,其中,编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的基因与选自由pHEM13、pSPG1、pPRB1、pQCR10、pPGK1、pOLE1、pERG25、pHHF2、pTDH1、pTDH2、pTDH3、pENO2、pHSP26和pRPL18b组成的组的启动子可操作地连接。

23.根据权利要求8-22中任一项所述的修饰细胞,其中,编码失调转录因子的基因、编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因,和/或编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的基因与选自由pHEM13、pSPG1、pPRB1、pQCR10、pPGK1、pOLE1、pERG25、pHHF2、pTDH1、pTDH2、pTDH3、pENO2、pHSP26和pRPL18b组成的组的启动子可操作地连接。

24.根据权利要求1-23中任一项所述的修饰细胞,其中,酵母细胞属于酵母菌属。

25.根据权利要求24所述的修饰细胞,其中,所述酵母细胞属于酿酒酵母(S.cerevisiae)种。

26.根据权利要求25所述的修饰细胞,其中,所述酵母细胞是酿酒酵母加利福尼亚艾尔酵母菌株WLP001、EC-1118、Elegance、Red Star Côte des Blancs或Epernay II。

27.根据权利要求24所述的修饰细胞,其中,所述酵母细胞属于巴斯德酵母(S.pastorianus)种。

28.根据权利要求1-27中任一项所述的修饰细胞,其中,相对于不包括具有油酸12-羟化酶活性的酶的野生型酵母细胞,修饰细胞的生长速率基本上不被损害。

29.根据权利要求1-28中任一项所述的修饰细胞,其中,在开始发酵的一个月内,修饰细胞发酵的可发酵糖的量与不包括具有油酸12-羟化酶活性的酶的野生型酵母细胞发酵的可发酵糖的量相当。

30.根据权利要求29所述的修饰细胞,其中,在开始发酵的一个月内,修饰细胞将培养基中的可发酵糖的量减少至少95%。

31.根据权利要求1-30中任一项所述的修饰细胞,其中,在开始发酵的一个月内,在厌氧或半厌氧条件下,修饰细胞发酵的可发酵糖的量与不包括具有油酸12-羟化酶活性的酶的野生型酵母细胞发酵的可发酵糖的量相当。

32.一种基因修饰酵母细胞(修饰细胞),包括:

两种或多种基因,其中,所述两种或多种基因选自由以下组成的组:

编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的第一异源基因,

编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的第二异源基因,以及编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。

33.根据权利要求32所述的修饰细胞,其中,所述两种或多种基因包括编码具有醇-O-

酰基转移酶(AAT)活性的酶的第一异源基因和编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的第二异源基因。

34.根据权利要求32所述的修饰细胞,其中,所述两种或多种基因包括编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的第一异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。

35.根据权利要求32所述的修饰细胞,其中,所述两种或多种基因包括编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的第二异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。

36.根据权利要求32所述的修饰细胞,其中,所述两种或多种基因包括编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的第一异源基因、编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的第二异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。

37.根据权利要求32-34或36中任一项所述的修饰细胞,其中,具有AAT活性的酶源自于桃、草莓、番茄、苹果或甜瓜。

38.根据权利要求32-34、36或37中任一项所述的修饰细胞,其中,具有AAT活性的酶包括与SEQ ID NO:1-5或25中任一项叙述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。

39.根据权利要求38所述的修饰细胞,其中,具有AAT活性的酶包括SEQ ID NO:1-5或25中任一叙述的氨基酸序列。

40.根据权利要求39所述的修饰细胞,其中,具有AAT活性的酶包括SEQ ID NO:1叙述的氨基酸序列。

41.根据权利要求32、33或35-40中任一项所述的修饰细胞,其中,具有FAH活性的酶源自于麦角菌。

42.根据权利要求32、33或35-41中任一项所述的修饰细胞,其中,具有FAH活性的酶包括与SEQ ID NO:6或20-23所述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。

43.根据权利要求42所述的修饰细胞,其中,具有FAH活性的酶包括SEQ ID NO:6或20-23中叙述的氨基酸序列。

44.根据权利要求32或34-43中任一项所述的修饰细胞,其中,具有OLE1活性的酶源自于酿酒酵母。

45.根据权利要求32或34-44中任一项所述的修饰细胞,其中,具有OLE1活性的酶包括与SEQ ID NO:7所述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。

46.根据权利要求45所述的修饰细胞,其中,具有OLE1活性的酶包括SEQ ID NO:7叙述的氨基酸序列。

47.根据权利要求32或34-46中任一项所述的修饰细胞,其中,编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因是编码具有OLE1活性的酶的内源基因的拷贝。

48.根据权利要求32-47中任一项所述的修饰细胞,其中,每个基因都与选自由pHEM13、pSPG1、pPRB1、pQCR10、pPGK1、pOLE1、pERG25、pHHF2、pTDH1、pTDH2、pTDH3、pENO2和pHSP26组成的组的启动子可操作地连接。

49.根据权利要求32-48中任一项所述的修饰细胞,其中,至少一个基因编码与酶连接的定位信号。

50.根据权利要求49所述的修饰细胞,其中,具有AAT活性的酶包括定位信号。

51.根据权利要求50所述的修饰细胞,其中,所述定位信号是过氧化物酶体靶向信号。

52.根据权利要求32-51中任一项所述的修饰细胞,其中,酵母细胞属于酵母属。

53.根据权利要求52所述的修饰细胞,其中,酵母细胞属于酿酒酵母(S.cerevisiae)种。

54.根据权利要求53所述的修饰细胞,其中,酵母细胞是酿酒酵母加利福尼亚艾尔酵母菌株WLP001、EC-1118、Elegance、Red StarCôte des Blancs或Epernay II。

55.根据权利要求52所述的修饰细胞,其中,酵母细胞属于巴斯德酵母(S.pastorianus)种。

56.根据权利要求32-55中任一项所述的修饰细胞,其中,相对于不包括第一异源基因、第二异源基因和第三基因的野生型酵母细胞,修饰细胞的生长速率基本上不被损害。

57.根据权利要求56所述的修饰细胞,其中,在开始发酵的一个月内,修饰细胞发酵的可发酵糖的量与不包括第一异源基因、第二异源基因和/或第三基因的野生型酵母细胞发酵的可发酵糖的量相当。

58.根据权利要求57所述的修饰细胞,其中,在开始发酵的一个月内,修饰细胞将培养基中的可发酵糖的量减少至少95%。

59.根据权利要求32-58中任一项所述的修饰细胞,其中,在开始发酵的一个月内,在厌氧或半厌氧条件下,修饰细胞发酵的可发酵糖的量与不包括第一异源基因、第二异源基因和第三基因的野生型酵母细胞发酵的可发酵糖的量相当。

60.根据权利要求32-59中任一项所述的修饰细胞,进一步包括失调转录因子,所述失调转录因子增加了过氧化物酶体的大小和数量,并增加了β-氧化。

61.根据权利要求60所述的修饰细胞,其中,所述失调转录因子是ADR1、PIP2、OAF1或OAF3。

62.根据权利要求61所述的修饰细胞,其中,所述失调转录因子是ADR1,并包括在位置230处的丝氨酸的取代突变。

63.一种生产发酵产物的方法,包括:

将权利要求1-62中任一项所述的修饰细胞与包括至少一种可发酵糖的培养基接触,

其中在至少在第一发酵过程期间进行所述接触,以产生发酵产物。

64.根据权利要求63所述的方法,其中,所述培养基不包括补充的脂肪酸。

65.根据权利要求64所述的方法,其中,所述培养基不包括补充的油酸和/或蓖麻油酸。

66.根据权利要求63-65中任一项所述的方法,其中,在至少一种糖源中提供至少一种可发酵糖。

67.根据权利要求63-66中任一项所述的方法,其中,所述可发酵糖是葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖和/或麦芽三糖。

68.根据权利要求63-67中任一项所述的方法,其中,与不表达编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因的对应细胞产生的发酵产物相比,所述发酵产物包括增加水平的至少一种期望产物。

69.根据权利要求68所述的方法,其中,所述期望产物是γ-癸内酯。

70.根据权利要求63-69中任一项所述的方法,其中,与不表达编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因的对应细胞产生的发酵产物相比,所述发酵产物包括降低水平的至少

一种不期望产物。

71.根据权利要求70所述的方法,其中,所述至少一种不期望产物是乙酸乙酯。

72.根据权利要求63-71中任一项所述的方法,其中,所述发酵产物是发酵饮料。

73.根据权利要求72所述的方法,其中,所述发酵饮料是啤酒、葡萄酒、汽酒(香槟酒)、葡萄酒酷乐、斯普瑞兹鸡尾酒、硬苏打水、清酒、蜂蜜酒、康普茶或苹果酒。

74.根据权利要求63-73中任一项所述的方法,其中,所述糖源包括麦芽汁、未发酵或半发酵果浆、果汁、蜂蜜、稻淀粉或其组合。

75.根据权利要求74所述的方法,其中,在第一发酵过程之前对所述糖源进行预氧化。

76.根据权利要求63-75中任一项所述的方法,其中,第一发酵过程包括通气一段时间。

77.根据权利要求76所述的方法,其中,所述一段时间为至少3小时。

78.根据权利要求74-77中任一项所述的方法,其中,所述果汁是从至少一种水果中获得的汁,所述水果选自由葡萄、苹果、蓝莓、黑莓、树莓、醋栗果、草莓、樱桃、梨、桃子、油桃、橙子、菠萝、芒果和百香果组成的组。

79.根据权利要求74-77中任一项所述的方法,其中,所述糖源是麦芽汁,并且所述方法进一步包括产生培养基,其中产生所述培养基包括:

(a)将多种谷物与水接触;以及

(b)煮沸或浸泡所述水和谷物以产生麦芽汁。

80.根据权利要求79所述的方法,进一步包括向所述麦芽汁中添加至少一种啤酒花品种,以产生加啤酒花的麦芽汁。

81.根据权利要求79或80所述的方法,进一步包括向所述培养基中添加至少一种啤酒花品种。

82.根据权利要求74-77中任一项所述的方法,其中,所述糖源是未发酵或半发酵果浆,并且所述方法进一步包括产生所述培养基,其中产生所述培养基包括粉碎多种水果以生产未发酵或半发酵果浆。

83.根据权利要求82所述的方法,进一步包括从所述未发酵或半发酵果浆中去除固体水果材料,以产生果汁。

84.根据权利要求63-83中任一项所述的方法,进一步包括至少一种额外的发酵过程。

85.根据权利要求63-84中任一项所述的方法,进一步包括对所述发酵产物进行碳酸化。

86.一种通过权利要求63-85中任一项所述的方法产生、获得或可获得的发酵产物。

87.一种产生包括乙醇的组合物的方法,所述方法包括:

将权利要求1-62中任一项所述的修饰细胞与包括至少一种可发酵糖的培养基接触,

其中,在至少第一发酵过程期间进行所述接触,以生产所述包括乙醇的组合物。

88.根据权利要求87所述的方法,其中,在至少一种糖源中提供至少一种可发酵糖。

89.根据权利要求87或88所述的方法,其中,所述可发酵糖是葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖和/或麦芽三糖。

90.根据权利要求87-89中任一项所述的方法,其中,与不表达编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因的对应细胞或表达具有油酸12-羟化酶活性的野生型酶的对应细胞产生的包括乙醇的组合物相比,所述包括乙醇的组合物包括增加水平的至少一种期望产物。

91.根据权利要求90所述的方法,其中,所述期望产物是γ-癸内酯。

92.根据权利要求87-91中任一项所述的方法,其中,与不表达编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因的对应细胞或表达具有油酸12-羟化酶活性的野生型酶的对应细胞产生的包括乙醇的组合物相比,所述包括乙醇的组合物包括降低水平的至少一种不期望产物。

93.根据权利要求92所述的方法,其中,所述至少一种不期望产物是乙酸乙酯。

94.根据权利要求87-93中任一项所述的方法,其中,所述包括乙醇的组合物是发酵饮料。

95.根据权利要求94所述的方法,其中,所述发酵饮料是啤酒、葡萄酒、汽酒(香槟酒)、葡萄酒酷乐、斯普瑞兹鸡尾酒、硬苏打水、清酒、蜂蜜酒、康普茶或苹果酒。

96.根据权利要求88-95中任一项所述的方法,其中,糖源包括麦芽汁、未发酵或半发酵果浆、果汁、蜂蜜、稻淀粉或它其组合。

97.根据权利要求96所述的方法,其中,果汁是从至少一种水果中获得的汁,所述水果选自由葡萄、苹果、蓝莓、黑莓、树莓、醋栗果、草莓、樱桃、梨、桃子、油桃、橙子、菠萝、芒果和百香果组成的组。

98.根据权利要求96所述的方法,其中,所述糖源是麦芽汁,并且所述方法进一步包括产生所述培养基,其中产生所述培养基包括:

(a)将多种谷物与水接触;以及

(b)煮沸或浸泡所述水和谷物以生产麦芽汁。

99.根据权利要求98所述的方法,进一步包括向所述麦芽汁中添加至少一种啤酒花品种,以产生加啤酒花的麦芽汁。

100.根据权利要求87-99中任一项所述的方法,进一步包括向所述培养基中添加至少一种啤酒花品种。

101.根据权利要求96所述的方法,其中,所述糖源是未发酵或半发酵果浆,并且所述方法进一步包括产生所述培养基,其中产生所述培养基包括粉碎多种水果以生产所述未发酵或半发酵果浆。

102.根据权利要求101所述的方法,进一步包括从所述未发酵或半发酵果浆中去除固体水果材料,以产生果汁。

103.根据权利要求87-102中任一项所述的方法,进一步包括至少一种额外的发酵过程。

104.根据权利要求87-103中任一项所述的方法,进一步包括对所述包括乙醇的组合物进行碳酸化。

105.一种通过权利要求87-104中任一项所述的方法产生、获得或可获得的包括乙醇的组合物。

发酵饮料中γ-癸内酯生物合成的方法和组合物

[0001] 相关申请

[0002] 根据《美国法典》第35卷第119(e)条,本申请要求2021年5月20日提交的美国临时申请号63/190,954的权益,该申请通过引用整体并入本文。

[0003] 参考通过EFS-WEB以文本文件形式提交的序列表

[0004] 本申请包含序列表,该序列表通过EFS-Web以ASCII格式提交,并且在此通过引用整体并入本文。所述ASCII副本创建于2022年5月20日,命名为B150970002WO00-SEQ-CEW.txt,大小为68,582字节。

背景技术

[0005] 核果风味(如桃子、油桃和杏)在啤酒、葡萄酒(wine)和烈酒(spirit)行业中非常有吸引力。在葡萄酒行业中,杏和桃子的气味(note)通常与白葡萄酒品种(varietal)有关,特别是霞多丽(Siebert等,J.Agric.Food Chem.(2018)66:2838-2850;Gambatta等,J.Agric.Food Chem.(2014)62:6512-6534;Lorrain等,J.Agric.Food Chem.(2006)54:3973-3981;Lee等,J.Agric.Food Chem.(2003)51:8036-8044;Siebert等,Food Chem.(2018)256:286-296),其在所有葡萄酒风格中占最大的市场份额(Ecker(2019))。在啤酒行业中,桃子风味可以在大量干啤酒花(dry-hopped)和果味啤酒中找到(Hotchko(2014);Holt等,FEMS Microbiol.Rev.(2019)43:193-222),这些啤酒在过去的十年里变得越来越受欢迎(Watson(2018))。在麦芽威士忌的背景下,内酯带来甜美的果香,推动知名度以及对品质的认知(Wanikawa等,Journal of the Institute of Brewing(2000)106:39-44;Wanikawa等,Journal of the American Society of Brewing Chemists(2000)58:51-56)。

[0006] 存在于啤酒、葡萄酒和烈酒中的核果风味主要是由不同浓度的C6-C12内酯分子赋予的。在这些内酯中,γ-癸内酯(gamma-decalactone)是核果香气的贡献者(Wanikawa等,Journal of the Institute of Brewing(2000)106:39-44;Holt等,FEMS Microbiol.Rev.(2019)43:193-222;Pérez-Olivero等,J.Anal.Methods Chem.(2014)863019;Poisson等,J.Agric.Food Chem.(2008)56:5813-5819;Wanikawa等,Journal of the Institute of Brewing.(2001)107:253-259)。单独使用(In isolation),γ-癸内酯赋予浓郁的桃子香气和味道。与其他内酯以及额外的风味分子(如萜烯和酯类)结合,γ-癸内酯增强核果和其他果味的复杂性(Hotchko等,J.Am.Soc.Brew.Chem.(2017)75:27-34)。

发明内容

[0007] 本公开至少部分涉及能够生物合成γ-癸内酯(gamma-decalactone)的基因修饰酵母细胞,以及将其用于生产发酵饮料(如啤酒、葡萄酒和烈酒)和包括乙醇的组合物的方法。

[0008] 本公开的方面涉及基因修饰酵母细胞(修饰细胞(modified cell)),该细胞包括编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因;其中,与不包括具有油酸12-羟化酶活性的

酶的对应(counterpart)细胞产生的γ-癸内酯水平相比,修饰细胞能够在缺乏脂肪酸补充的情况下产生具有增加的γ-癸内酯水平的发酵产物。

[0009] 本公开的方面涉及基因修饰酵母细胞(修饰细胞),该细胞包括:编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因;其中,修饰细胞能够在缺乏脂肪酸补充的情况下产生γ-癸内酯水平大于35μg/L的发酵产物。

[0010] 在一些实施方式中,具有油酸12-羟化酶活性的酶来自麦角菌(Claviceps purpurea)、雷斯克懒勒(Lesquerella fendleri)、风筝果(Hiptage benghalensis)、Physaria lindheimeri或蓖麻(Ricinus communis)。在一些实施方式中,具有油酸12-羟化酶活性的酶包括与SEQ ID NO:6或20-23中任一项所述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方式中,具有油酸12-羟化酶活性的酶包括SEQ ID NO:6或20-23中任一项叙述的氨基酸序列。在一些实施方式中,具有油酸12-羟化酶活性的酶包括与SEQ ID NO:6所述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方式中,具有油酸12-羟化酶活性的酶包括SEQ ID NO:6叙述的氨基酸序列。

[0011] 在一些实施方式中,修饰细胞进一步包括编码失调(deregulate)转录因子的基因,与未失调的对应转录因子相比,失调转录因子增加了过氧化物酶体的大小和数量,并增加了β-氧化。在一些实施方式中,失调转录因子是ADR1、PIP2、OAF1或OAF3。在一些实施方式中,失调转录因子是ADR1,并包括位置230处丝氨酸的取代突变(substitution mutation)。在一些实施方式中,失调转录因子包括与SEQ ID NO:24叙述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,失调转录因子包括SEQ ID NO:24叙述的氨基酸序列。

[0012] 在一些实施方式中,编码失调转录因子的基因与选自由pHEM13、pSPG1、pPRB1、pQCR10、pPGK1、pOLE1、pERG25、pHHF2、pTDH1、pTDH2、pTDH3、pENO2、pHSP26和pRPL18b组成的组的启动子可操作地连接。

[0013] 在一些实施方式中,修饰细胞进一步包括编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因和/或编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因。在一些实施方式中,具有OLE1活性的酶源自于酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)。在一些实施方式中,具有OLE1活性的酶包括与SEQ ID NO:7所述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方式中,具有OLE1活性的酶包括SEQ ID NO:7叙述的氨基酸序列。在一些实施方式中,编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因是编码具有OLE1活性的酶的内源基因的拷贝(copy)。

[0014] 在一些实施方式中,具有AAT活性的酶来自桃(Prunus persica)、草莓(Fragaria x ananassa)、番茄(Solanum lycopersicum)、苹果(Malus domestica)或甜瓜(Cucumis melo)。在一些实施方式中,具有AAT活性的酶包括与SEQ ID NO:1-5或25中任一项叙述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方式中,具有AAT活性的酶包括SEQ ID NO:1-5或25中任一项叙述的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方式中,编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的基因与选自由pHEM13、pSPG1、pPRB1、pQCR10、pPGK1、pOLE1、pERG25、pHHF2、pTDH1、pTDH2、pTDH3、pENO2、pHSP26和pRPL18b组成的组的启动子可操作地连接。

[0016] 在一些实施方式中,编码失调转录因子的基因、编码具有酰基-CoA去饱和酶1

(OLE1)活性的酶的基因,和/或编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的基因与选自由pHEM13、pSPG1、pPRB1、pQCR10、pPGK1、pOLE1、pERG25、pHHF2、pTDH1、pTDH2、pTDH3、pENO2、pHSP26和pRPL18b组成的组的启动子可操作地连接。

[0017] 在一些实施方式中,酵母细胞属于酵母(Saccharomyces)属。在一些实施方式中,酵母细胞属于酿酒酵母(S.cerevisiae)种。在一些实施方式中,酵母细胞是酿酒酵母加利福尼亚艾尔酵母菌株WLP001、EC-1118、Elegance、Red Star Côte des Blancs或Epernay II。在一些实施方式中,酵母细胞属于巴斯德酵母(S.pastorianus)种。在一些实施方式中,相对于不包括具有油酸12-羟化酶活性的酶的野生型酵母细胞,修饰细胞的生长速率基本上不被损害。

[0018] 在一些实施方式中,在开始发酵的一个月内,修饰细胞发酵的可发酵糖的量与不包括具有油酸12-羟化酶活性的酶的野生型酵母细胞发酵的可发酵糖的量相当。在一些实施方式中,在开始发酵的一个月内,修饰细胞将培养基中的可发酵糖的量减少至少95%。在一些实施方式中,在开始发酵的一个月内,在厌氧或半厌氧条件下,修饰细胞发酵的可发酵糖的量与不包括具有油酸12-羟化酶活性的酶的野生型酵母细胞发酵的可发酵糖的量相当。

[0019] 本公开的方面涉及基因修饰酵母细胞(修饰细胞),该细胞包括两种或多种基因,其中两种或多种基因选自由以下组成的组:编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的第一异源基因、编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的第二异源基因,以及编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。在一些实施方式中,修饰细胞的两种或多种基因包括编码具有AAT活性的酶的第一异源基因和编码具有FAH活性的酶的第二异源基因。在一些实施方式中,修饰细胞的两种或多种基因包括编码具有FAH活性的酶的第二异源基因和编码具有OLE1活性的酶的基因。在一些实施方式中,修饰细胞的两种或多种基因包括编码具有AAT活性的酶的第一异源基因、编码具有FAH活性的酶的第二异源基因、以及编码具有OLE1活性的酶的基因。

[0020] 在一些实施方式中,具有AAT活性的酶源自于桃、草莓、番茄、苹果或甜瓜。在一些实施方式中,具有AAT活性的酶包括SEQ ID NO:1-5或25中任一项叙述的氨基酸序列。在一些实施方式中,具有AAT活性的酶包括SEQ ID NO:1叙述的氨基酸序列。

[0021] 在一些实施方式中,具有FAH活性的酶源自于麦角菌。在一些实施方式中,具有FAH活性的酶包括与SEQ ID NO:6或20-23所述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方式中,具有FAH活性的酶包括SEQ ID NO:6叙述的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方式中,具有OLE1活性的酶源自于酿酒酵母。在一些实施方式中,具有OLE1活性的酶包括与SEQ ID NO:7所述的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的序列。在一些实施方式中,具有OLE1活性的酶包括SEQ ID NO:7叙述的氨基酸序列。在一些实施方式中,编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因是编码具有OLE1活性的酶的内源基因的拷贝。

[0023] 在一些实施方式中,每个基因都与选自由pHEM13、pSPG1、pPRB1、pQCR10、pPGK1、pOLE1、pERG25、pHHF2、pTDH1、pTDH2、pTDH3、pENO2和pHSP26组成的组的启动子可操作地连接。在一些实施方式中,至少一个基因编码与酶连接的定位信号。在一些实施方式中,具有AAT活性的酶包括定位信号。在一些实施方式中,定位信号是过氧化物酶体靶向信号。

[0024] 在一些实施方式中,酵母细胞属于酵母属。在一些实施方式中,酵母细胞属于酿酒酵母(S.cerevisiae)种。在一些实施方式中,酵母细胞是酿酒酵母加利福尼亚艾尔酵母菌株WLP001、EC-1118、Elegance、Red StarCôte des Blancs或Epernay II。在一些实施方式中,酵母细胞属于巴斯德酵母(S.pastorianus)种。

[0025] 在一些实施方式中,相对于不包括第一异源基因、第二异源基因和第三基因的野生型酵母细胞,修饰细胞的生长速率基本上不被损害。在一些实施方式中,在开始发酵的一个月内,修饰细胞发酵的可发酵糖的量与不包括第一异源基因、第二异源基因和/或第三基因的野生型酵母细胞发酵的可发酵糖的量相当。在一些实施方式中,在开始发酵的一个月内,修饰细胞将培养基中的可发酵糖的量减少至少95%。在一些实施方式中,在开始发酵的一个月内,在厌氧或半厌氧条件下,修饰细胞发酵的可发酵糖的量与不包括第一异源基因、第二异源基因和第三基因的野生型酵母细胞发酵的可发酵糖的量相当。

[0026] 在一些实施方式中,修饰细胞进一步包括失调转录因子,该失调转录因子增加了过氧化物酶体的大小和数量,并增加了β-氧化。在一些实施方式中,失调转录因子是ADR1、PIP2、OAF1或OAF3。在一些实施方式中,失调转录因子是ADR1,并包括位置230处丝氨酸的取代突变。

[0027] 本公开的方面涉及生产发酵产物的方法,该方法包括将本文所述的任何修饰细胞与包括至少一种可发酵糖的培养基接触,其中在至少第一发酵过程期间进行接触,以产生发酵产物。在一些实施方式中,培养基不包括补充的脂肪酸。在一些实施方式中,培养基不包括补充的油酸和/或蓖麻油酸。

[0028] 在一些实施方式中,至少一种糖源中提供至少一种可发酵糖。在一些实施方式中,可发酵糖是葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖和/或麦芽三糖。在一些实施方式中,与不表达编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因的对应细胞产生的发酵产物相比,发酵产物包括增加水平的至少一种期望产物。在一些实施方式中,期望产物是γ-癸内酯。在一些实施方式中,与不表达编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因的对应细胞产生的发酵产物相比,发酵产物包括降低水平的至少一种不期望产物。在一些实施方式中,至少一种不期望产物是乙酸乙酯。

[0029] 在一些实施方式中,发酵产物是发酵饮料。在一些实施方式中,发酵饮料是啤酒、葡萄酒、汽酒(香槟酒)、葡萄酒酷乐(wine cooler)、斯普瑞兹鸡尾酒(wine spritzer)、硬苏打水(hard seltzer)、清酒(sake)、蜂蜜酒(mead)、康普茶(kombucha)或苹果酒。在一些实施方式中,糖源包括麦芽汁、未发酵或半发酵果浆(must)、果汁、蜂蜜、曲淀粉或其组合。在一些实施方式中,在第一发酵过程之前对糖源进行预氧化(pre-oxygenated)。在一些实施方式中,第一发酵过程包括通气一段时间。在一些实施方式中,一段时间为至少3小时。

[0030] 在一些实施方式中,果汁是从至少一种水果中获得的汁,所述水果选自由葡萄、苹果、蓝莓、黑莓、树莓、醋栗果、草莓、樱桃、梨、桃子、油桃、橙子、菠萝、芒果和百香果组成的组。

[0031] 在一些实施方式中,糖源是麦芽汁,并且方法进一步包括产生培养基,其中产生培养基包括:(a)将多种谷物与水接触;和(b)煮沸或浸泡水和谷物以产生麦芽汁。在一些实施方式中,该方法进一步包括向麦芽汁中添加至少一种啤酒花品种,以产生加啤酒花的麦芽汁。在一些实施方式中,该方法进一步包括向培养基中添加至少一种啤酒花品种。

[0032] 在一些实施方式中,糖源是未发酵或半发酵果浆,并且该方法进一步包括产生培养基,其中产生培养基包括粉碎多种水果以生产未发酵或半发酵果浆。在一些实施方式中,该方法进一步包括从未发酵或半发酵果浆中去除固体水果材料,以产生果汁。在一些实施方式中,该方法进一步包括至少一种额外的发酵过程。在一些实施方式中,该方法进一步包括对发酵产物进行碳酸化。

[0033] 本公开的方面涉及通过本文所述的任何方法生产、获得或可获得的发酵产物。

[0034] 本公开的方面涉及生产包括乙醇的组合物的方法,该方法包括将本文所述的任何修饰细胞与包括至少一种可发酵糖的培养基接触,其中在至少第一发酵过程期间进行此类接触,以生产包括乙醇的组合物。

[0035] 在一些实施方式中,在至少一种糖源中提供至少一种可发酵糖。在一些实施方式中,可发酵糖是葡萄糖、果糖、蔗糖、麦芽糖和/或麦芽三糖。在一些实施方式中,与不表达编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因的对应细胞或表达具有油酸12-羟化酶活性的野生型酶的对应细胞产生的包括乙醇的组合物相比,包括乙醇的组合物包括增加水平的至少一种期望产物。在一些实施方式中,期望产物是γ-癸内酯。

[0036] 在一些实施方式中,与不表达编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因的对应细胞或表达具有油酸12-羟化酶活性的野生型酶的对应细胞产生的包括乙醇的组合物相比,包括乙醇的组合物包括降低水平的至少一种不期望产物。

[0037] 在一些实施方式中,包括乙醇的组合物是发酵饮料。在一些实施方式中,发酵饮料是啤酒、葡萄酒、汽酒(香槟酒)、葡萄酒酷乐、斯普瑞兹鸡尾酒、硬苏打水、清酒、蜂蜜酒、康普茶或苹果酒。

[0038] 在一些实施方式中,在第一发酵过程之前对糖源进行预氧化。在一些实施方式中,第一发酵过程包括通气一段时间。在一些实施方式中,一段时间为至少3小时。

[0039] 在一些实施方式中,糖源包括麦芽汁、未发酵或半发酵果浆、果汁、蜂蜜、稻淀粉或其组合。在一些实施方式中,果汁是从至少一种水果中获得的汁,所述水果选自由葡萄、苹果、蓝莓、黑莓、树莓、醋栗果、草莓、樱桃、梨、桃子、油桃、橙子、菠萝、芒果和百香果组成的组。

[0040] 在一些实施方式中,糖源是麦芽汁,并且该方法进一步包括产生培养基,其中产生培养基包括:(a)将多种谷物与水接触;以及(b)煮沸或浸泡水和谷物以生产麦芽汁。在一些实施方式中,该方法进一步包括向麦芽汁中添加至少一种啤酒花品种,以产生加啤酒花的麦芽汁。在一些实施方式中,该方法进一步包括向培养基中添加至少一种啤酒花品种。

[0041] 在一些实施方式中,糖源是未发酵或半发酵果浆,并且该方法进一步包括产生培养基,其中产生培养基包括粉碎多种水果以生产未发酵或半发酵果浆。在一些实施方式中,该方法进一步包括从未发酵或半发酵果浆中去除固体水果材料,以产生果汁。在一些实施方式中,该方法进一步包括至少一种额外的发酵过程。在一些实施方式中,该方法进一步包括对包括乙醇的组合物进行碳酸化。

[0042] 本公开的方面涉及通过本文所述的任何方法产生、获得或可获得的包括乙醇的组合物。

[0043] 本发明的一个或多个实施方式的详细说明在下面的描述中被阐释。本发明的其他特征或优点将从下列附图和几个实施方式的详细描述中显而易见,并且从所附的权利要求

书中也显而易见。

附图说明

[0044] 随附的附图并不旨在按比例绘制。在附图中,各个图中示出的每个相同或几乎相同的组分都用类似的数字表示。为清楚起见,并非每个组分都可以在每个附图中标记。在附图中:

[0045] 图1是显示了在发酵饮料的生产中,从4-羟基癸酸(例如,来自葡萄/大麦)中自发或在酶催化合成γ-癸内酯的示意图。

[0046] 图2显示了示出本文所述的基因修饰酵母细胞中γ-癸内酯生物合成的生化途径的示意图。

[0047] 图3显示了工程化的葡萄酒酵母菌株在有氧生长24小时后产生的γ-癸内酯的浓度(μg/L)。亲本酿酒酵母Elegance菌株被工程化为在PGK1启动子的控制下表达指定的异源油酸12-羟化酶。菌株对应于表达CpFAH(y1094)的酿酒酵母、表达HbFAH(y1330)的酿酒酵母、表达PlFAH(y1331)的酿酒酵母、表达RcFAH(y1332)的酿酒酵母以及表达LFAH12(y1333)的酿酒酵母。虚线对应于葡萄酒中γ-癸内酯的气味阈值(35μg/L)。

[0048] 图4显示了工程化的啤酒酵母酿酒酵母加利福尼亚艾尔WLP001(WLP001)或葡萄酒酵母酿酒酵母Elegance菌株在有氧生长24小时后产生的γ-癸内酯的浓度(μg/L)。亲本啤酒酵母菌株和葡萄酒酵母菌株被工程化为在PGK1启动子的控制下表达指定的异源油酸12-羟化酶。菌株对应于表达LFAH12(y465)的酿酒酵母WLP001、表达LFAH12(y1333)的酿酒酵母Elegance、表达CpFAH(y467)的酿酒酵母WLP001以及表达CpFAH(y1094)的酿酒酵母Elegance。虚线对应于葡萄酒中γ-癸内酯的气味阈值(35μg/L)。

[0049] 图5显示了工程化的酵母菌株在有氧生长24小时后产生的γ-癸内酯的浓度(μg/L)。亲本葡萄酒酵母酿酒酵母Elegance菌株被工程化为表达指定的异源酶。菌株对应于在PGK1启动子的控制下表达CpFAH的酿酒酵母(y1094);在PGK1启动子的控制下表达CpFAH并且在ENO2启动子的控制下表达OLE1的酿酒酵母(y1070);以及在PGK1启动子的控制下表达CpFAH、在ENO2启动子的控制下表达OLE1、并且在RPL18B启动子的控制下表达ADR1(S230A)的酿酒酵母(y1341)。虚线对应于葡萄酒中γ-癸内酯的气味阈值(35μg/L)。

[0050] 图6显示了工程化的酵母菌株在指定的通气时长然后经过9天的发酵后产生的γ-癸内酯的浓度(μg/L)。亲本葡萄酒酵母酿酒酵母Elegance菌株被工程化为在TDH3启动子的控制下表达CpFAH,在ENO2启动子的控制下表达OLE1,在HSP26启动子的控制下表达MpAAT1 N385D V62A,在RPL18B启动子的控制下表达ADR1(S230A)(对应于y1185菌株)。条件对应于“厌氧发酵”,指的是无需氧生长期;“3小时通气”指的是3小时的需氧生长;以及“24小时通气”指的是在9天发酵之前的24小时的需氧生长。

具体实施方式

[0051] 在发酵饮料市场中,核果风味对消费者非常有吸引力。杏和桃子特别受欢迎,正如霞多丽葡萄酒和用核果香味啤酒花生产的啤酒的热销所证明的。水果和发酵饮料二者中这些风味的存在是由于各种风味活性分子,这些风味活性分子在饮用时会共同赋予独特的味道和香气。一种此类分子是γ-癸内酯,贡献许多果味和核果风味。独立地,γ-癸内酯被认

为是桃子的味道,但它也有助于许多其他水果的风味(Zhang等,Plant Cell Rep.36,829-842(2017))。本文所述的修饰酵母细胞和方法旨在提高发酵过程中产生的γ-癸内酯的浓度,如用于啤酒或葡萄酒的生产。虽然有几种微生物天然能够产生γ-癸内酯,如鲑色锁掷酵母菌(Sporoidiobolus salmonicolor)、梨孢镰刀菌(Fusarium poae)和棉阿舒囊霉(Ashbya gossypii),但这些生物体并不用于生产发酵产物,如发酵饮料。

[0052] 啤酒、葡萄酒和烈酒中存在的γ-癸内酯被认为起源于发酵过程中,通过源自于葡萄和大麦中的4-羟基癸酸的分子内酯化(图1)。这种分子内酯化或"内酯化"导致形成与六碳酰基链结合的含氧内酯环。在发酵过程中内酯化的生化细节尚未完全阐释。据认为,内酯化可在发酵过程中自发发生,但其也可由酵母编码的酶催化(参见,例如,Romero-Guido等,Appl.Microbiol.Biotechnol.(2011)89,535-547;Krzyczkowska,et al.,Fungal Metabolites(2017)89:461-498)。这两种内酯化的模式对发酵饮料中γ-癸内酯以及一般内酯的丰度的相对贡献是未知的。内酯生产受到脂肪酸前体的可用性的限制或内酯化反应本身的速率的限制的程度也是未知的。然而,普遍理解的是啤酒、葡萄酒和其他烈性酒中产生的内酯分子总浓度低,一般在1-6μg/L范围内(参见,例如,Pérez-Olivero等,J.Anal.Methods Chem.(2014)863019;Langen,et al.Rapid Commun.Mass Spectrom.(2013)27,2751-2759)。由于这个浓度远低于人体检测内酯的阈值,因此内酯(以及核果风味)对大多数发酵饮料的整体风味特征的贡献相对较小(参见,例如,Pérez-Olivero等,J.Anal.Methods Chem.(2014)863019;Cooke等,J.Agric.Food Chem.(2009)57,2462-2467;Hotchko等,J.Amer.Soc.of Brewing Chem.(2017)75 27-34)。

[0053] 产生γ-癸内酯的途径始于油酸,油酸是植物和真菌物种二者均可产生的含有18个碳链长度(C18)的单不饱和脂肪酸(图2)。第一步是油酸在C12位置的羟基化,以产生蓖麻油酸。然后将蓖麻油酸输入(import)过氧化物酶体中,在过氧化物酶体中蓖麻油酸被认为经历β-氧化,β-氧化是通过逐渐缩短C18碳氢链产生细胞乙酰-CoA的过程(参见,例如Waché等,Appl.and Environ.Microbiol.(2001)67:5700-5704)。虽然β-氧化能够氧化C18蓖麻油酸分子以产生9个乙酰-CoA分子,但与γ-癸内酯生物合成有关的是4-羟基癸酸,其是在四轮蓖麻油酸β-氧化后释放的C10代谢中间体。4-羟基癸酸是γ-癸内酯的直接前体。在从β-氧化中释放之后,4-羟基癸酸可以被内酯化以产生γ-癸内酯。在不希望受到任何特定理论的约束的情况下,据认为在植物和真菌中,内酯化发生在过氧化物酶体中,或者4-羟基癸酸从过氧化物酶体内转运出并且内酯化发生在细胞质中。对微生物进行基因工程以产生γ-癸内酯的努力依赖于用脂肪酸补充生长培养基,脂肪酸是γ-癸内酯生产的前体(如油酸和/或蓖麻油酸)。参见,例如,Braga等.World J.Microbiol.Biotechnol.(2016)32(10):169。

[0054] 本文所述的修饰细胞能够在没有补充γ-癸内酯产生的前体(如油酸和/或蓖麻油酸)的培养基中产生增加水平的γ-癸内酯。将油酸和/或蓖麻油酸添加到饮料发酵过程存在几个成本和监管问题。然而,本文所述的修饰细胞不需要补充γ-癸内酯产生的前体,并且能够产生在葡萄酒中的气味阈值(即,约35μ/L)以上的γ-癸内酯水平。

[0055] 本文中提供的是修饰酵母细胞,其已被工程化为表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶(例如,油酸12-羟化酶)的异源基因。在一些实施方式中,酵母进一步包括一个或多个额外的基因,如编码失调转录因子(例如,ADR1)的基因、编码具有酰基-CoA去饱和

酶1(OLE1)活性的酶的基因、和/或编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的基因。

[0056] 本文中还提供了修饰酵母细胞,其已被工程化为表达两种或多种编码以下的基因:具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶、失调转录因子、具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶、和/或具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶。在一些实施方式中,修饰酵母用于生产具有增加水平的γ-癸内酯的发酵产物。在一些实施方式中,修饰酵母生产具有降低水平的乙酸乙酯的发酵产物。

[0057] 在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶和具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因、失调转录因子和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因、失调转录因子、编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因和编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因。本文中还提供了生产发酵饮料的方法,该方法包含在发酵过程中将修饰酵母细胞与包括糖源的培养基接触,该糖源包括至少一种可发酵糖。本文中还提供了生产乙醇的方法,该方法包含在发酵过程中将修饰酵母细胞与包括糖源的培养基接触,该糖源包括至少一种可发酵糖。

[0058] 脂肪酸羟化酶(FAH)酶

[0059] 本文所述的修饰细胞可含有编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的基因。在一些实施方式中,具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶是油酸12-羟化酶(FAH12)酶。在一些实施方式中,基因是异源基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因和编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因、编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。

[0060] 在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因和失调转录因子(如ADR(例如,ADR S230A))。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因、编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因和编码失调转录因子(如ADR(例如,ADR S230A))的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因、编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因、编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因和编码失调转录因子(如ADR(例如,ADR S230A))的基因。

[0061] 脂肪酸羟化酶是催化脂肪酸的羟基化以产生羟基脂肪酸的酶。油酸12-羟化酶可将油酸转化为蓖麻油酸,这是来自油酸的γ-癸内酯的生物合成的关键步骤。在一些实施方式中,编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的异源基因是野生型脂肪酸羟化酶基因(例如,从生

物体中分离的基因),如野生型油酸12-羟化酶。在一些实施方式中,表达编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的异源基因的酵母能够在缺乏γ-癸内酯生物合成途径中的中间分子(例如,油酸、蓖麻油酸)的补充的情况下产生增加水平的γ-癸内酯。

[0062] 在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有油酸-12-羟化酶活性的酶的异源基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因和编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因、编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。

[0063] 在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有油酸-12-羟化酶活性的酶的异源基因和失调转录因子(如ADR(例如,ADR S230A))。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因、编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因和编码失调转录因子(如ADR(例如,ADR S230A))的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有油酸12-羟化酶活性的酶的异源基因、编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因、编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因和编码失调转录因子(如ADR(例如,ADR S230A))的基因。

[0064] 在一些实施方式中,编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的异源基因是野生型脂肪酸羟化酶基因(例如,从生物体中分离的基因)。在一些实施方式中,脂肪酸羟化酶是从细菌、真菌或植物中获得的。在一些实施方式中,脂肪酸羟化酶是从真菌中获得的。在一些实施方式中,脂肪酸羟化酶是从麦角菌中获得的。

[0065] 具有脂肪酸羟化酶活性的示例性酶来自麦角菌。麦角菌FAH由SEQ ID NO:6所叙述的氨基酸序列提供,该序列对应于UniProtKB登录号B4YQU.1。

[0066] MASATPAMSENAVLRHKAASTTGIDYESSAAVSPAESPRTSASSTSLSSLSSLDANEKKDEYAGLLDTYGNAFTPPDFSIKDIRAAIPKHCYERSTIKSYAYVLRDLLCLSTTFYLFHNFVTPENIPSNPLRFVLWSIYTVLQGLFATGLWVIGHECGHCAFSPSPFISDLTGWVIHSALLVPYFSWKFSHSAHHKGIGNMERDMVFLPRTREQQATRLGRAVEELGDLCEETPIYTALHLVGKQLIGWPSYLMTNATGHNFHERQREGRGKGKKNGFGGGVNHFDPRSPIFEARQAKYIVLSDIGLGLAIAALVYLGNRFGWANMAVWYFLPYLWVNHWLVAITFLQHTDPTLPHYNREEWNFVRGGACTIDRDLGFIGRHLFHGIADTHVVHHYVSRIPFYNADEASEAIKPIMGKHYRSDTAHGPVGFLHALWKTARWCQWVEPSADAQGAGKGILFYRNRNKLGTKPISMKTQ*(SEQ ID NO:6)

[0067] 在一些实施方式中,脂肪酸羟化酶是从植物中获得的。在一些实施方式中,脂肪酸羟化酶是从风筝果中获得的。具有脂肪酸羟化酶活性的示例性酶来自风筝果。风筝果FAH(HbFAH)由SEQ ID NO:20所叙述的氨基酸序列提供,该序列对应于GenBank编号KC533768.1;UniProtKB登录号R9WAV0。

[0068] MGAGGRMPTSVSKGQGMENEVKHGPCEKPPFTVGQLKRAIPPHCFERSLIRSSSYLLRDLFFVFVFYYVATSYFHLLPYPFNYAAWPIYWGFQGCALTGIWVLGHECGHHAFSDYQLVDDIVGLIIHTALLVPYFSWKISHRRHHSNTGSLEREEVFAPKPKAEIQWYLKHLNNPPGRAIVLLNTLLLGWPLYVAFNVAGRRYDRFACHFDPYSPIFSASERHLIYITDAGIYATTFILYRAAAAKGLTWLICVYGVPLVIVNAFLVLVTYLQHTHPVLPHYDNSEWDWLRGALVTVDRDYGILNEVFHHIADTHVAHHLFSKIPQYHGMEATKAIKPILGEYYQFDGTPFLKALWREARECVYVDRDEGDP

KRGVYWYGNKF*(SEQ ID NO:20)

[0069] 具有脂肪酸羟化酶活性的示例性酶来自Physaria lindheimeri。Physaria lindheimeri FAH(PlFAH)由SEQ ID NO:21所叙述的氨基酸序列提供,该序列对应于GenBank编号EF432246.1;UniProtKB登录号A5HB93。

[0070] MGAGGRIMVTPSSKKSKPEALRRGPGEKPPFTVQDLRKAIPRHCFKRSIPRSFSYLLTDIILASCFYY VATNYFSLLPQPLSTYFAWPLYWVCQGCVLTGVWVLGHECGHQAFSDYQWVDDTVGFIIHTFLLVPYFSWKYSHRR HHANNGSLERDEVFVPPKKAAVKWYVKYLNNPLGRTVVLIVQFVLGWPLYLAFNVSGRSYDGFASHFFPHAPIFKD RERLHIYITDAGILAVCYGLYRYAATKGLTAMIYVYGVPLLVVNFFLVLVTFLQHTHPSLPHYDSTEWDWIRGAMV TVDRDYGILNKVFHNITDTHVAHHLFATIPHYNAMEATEAIKPILGDYYHFDGTPWYVAMYREAKQCLYVEQDTEK KKGVYYYNNKL*(SEQ ID NO:21)

[0071] 具有脂肪酸羟化酶活性的示例性酶来自蓖麻。蓖麻FAH(RcFAH)由SEQ ID NO:22所叙述的氨基酸序列提供,该序列对应于GenBank编号U22378.1;UniProtKB登录号Q41131。

[0072] MGGGGRMSTVITSNNSEKKGGSSHLKRAPHTKPPFTLGDLKRAIPPHCFERSFVRSFSYVAYDVCLSF LFYSIATNFFPYISSPLSYVAWLVYWLFQGCILTGLWVIGHECGHHAFSEYQLADDIVGLIVHSALLVPYFSWKYS HRRHHSNIGSLERDEVFVPKSKSKISWYSKYSNNPPGRVLTLAATLLLGWPLYLAFNVSGRPYDRFACHYDPYGPI FSERERLQIYIADLGIFATTFVLYQATMAKGLAWVMRIYGVPLLIVNCFLVMITYLQHTHPAIPRYGSSEWDWLRG AMVTVDRDYGVLNKVFHNIADTHVAHHLFATVPHYHAMEATKAIKPIMGEYYRYDGTPFYKALWREAKECLFVEPD EGAPTQGVFWYRNKY*(SEQ ID NO:22)

[0073] 具有脂肪酸羟化酶活性的示例性酶来自雷斯克懒勒。雷斯克懒勒FAH(LFAH12)由SEQ ID NO:23所叙述的氨基酸序列提供,该序列对应于GenBank编号AF016103;UniProtKB登录号O81094。

[0074] MGAGGRIMVTPSSKKSETEALKRGPCEKPPFTVKDLKKAIPQHCFKRSIPRSFSYLLTDITLVSCFYY VATNYFSLLPQPLSTYLAWPLYWVCQGCVLTGIWVIGHECGHHAFSDYQWVDDTVGFIFHSFLLVPYFSWKYSHRR HHSNNGSLEKDEVFVPPKKAAVKWYVKYLNNPLGRILVLTVQFILGWPLYLAFNVSGRPYDGFASHFFPHAPIFKD RERLQIYISDAGILAVCYGLYRYAASQGLTAMICVYGVPLLIVNFFLVLVTFLQHTHPSLPHYDSTEWEWIRGALV TVDRDYGILNKVFHNITDTHVAHHLFATIPHYNAMEATEAIKPILGDYYHFDGTPWYVAMYREAKECLYVEPDTER GKKGVYYYNNKL*(SEQ ID NO:23)

[0075] 在一些实施方式中,异源基因编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶,使得与不表达该异源基因的细胞相比,表达该酶的细胞能够增加γ-癸内酯的产生。

[0076] 在一些实施方式中,具有脂肪酸羟化酶活性的酶具有与SEQ ID NO:6或20-23中任一所叙述的序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的氨基酸序列。

[0077] 在一些实施方式中,具有脂肪酸羟化酶活性的酶包括SEQ ID NO:6叙述的氨基酸序列。在一些实施方式中,具有脂肪酸羟化酶活性的酶由SEQ ID NO:6或20-23中任一项叙述的氨基酸序列组成。

[0078] 在一些实施方式中,编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因包括核酸序列,该核酸序列编码包括与SEQ ID NO:6或20-23中任一叙述的序列具有至少80%(例如,至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少

89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少95.5％、至少96％、至少96.5％、至少97％、至少97.5％、至少98％、至少98.5％、至少99％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％或至少99.9％)序列同一性的氨基酸序列的酶。在一些实施方式中,编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因包括核酸序列,该核酸序列编码由SEQ ID NO:6或20-23中任一叙述的氨基酸序列组成的酶。

[0079] 在一些实施方式中,具有脂肪酸羟化酶活性的酶具有与SEQ ID NO:6叙述的序列具有至少80％、81％、82％、83％、84％、85％、86％、87％、88％、89％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％、99.1％、99.2％、99.3％、99.4％、99.5％、99.6％、99.7％、99.8％或99.9％序列同一性的氨基酸序列。

[0080] 在一些实施方式中,具有脂肪酸羟化酶活性的酶包括SEQ ID NO:6叙述的氨基酸序列。在一些实施方式中,具有脂肪酸羟化酶活性的酶由SEQ ID NO:6叙述的氨基酸序列组成。

[0081] 在一些实施方式中,编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因包括核酸序列,该核酸序列编码包括与SEQ ID NO:6叙述的序列具有至少80％(例如,至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少95.5％、至少96％、至少96.5％、至少97％、至少97.5％、至少98％、至少98.5％、至少99％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％或至少99.9％)序列同一性的氨基酸序列的酶。在一些实施方式中,编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因包括核酸序列,该核酸序列编码由SEQ ID NO:6叙述的氨基酸序列组成的酶。

[0082] 可以进行具有脂肪酸羟化酶活性或预测具有脂肪酸羟化酶活性的额外的酶的鉴定,例如基于与脂肪酸羟化酶(如SEQ ID NO:6或20-23中任一(如SEQ ID NO:6)提供的脂肪酸羟化酶)的一个或多个结构域的相似性或同源性。在一些实施方式中,可以基于与活性结构域(如催化结构域(如与脂肪酸羟化酶活性相关的催化结构域))的相似性或同源性来鉴定用于本文所述的修饰细胞和方法的酶。在一些实施方式中,用于本文所述的修饰细胞和方法的酶在催化结构域的区域中可与参考脂肪酸羟化酶(例如野生型脂肪酸羟化酶(如SEQ ID NO:6或20-23中任一))具有相对高水平的序列同一性,但基于对酶的较大部分或遍及酶的全长的分析,与参考脂肪酸羟化酶具有相对低水平的序列同一性。在一些实施方式中,相对于参考脂肪酸羟化酶(例如,SEQ ID NO:6或20-23中任一项(例如,SEQ ID NO:6)),用于本文所述的修饰细胞和方法的酶在酶的催化结构域的区域中具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少95.5％、至少96％、至少96.5％、至少97％、至少97.5％、至少98％、至少98.5％、至少99％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％或至少99.9％序列同一性。

[0083] 在一些实施方式中,相对于参考脂肪酸羟化酶(例如,SEQ ID NO:6或20-23中任一(如,SEQ ID NO:6)),用于本文所述的修饰细胞和方法的酶在酶的催化结构域的区域中具有相对高水平的序列同一性,并且基于对酶的较大部分或遍及酶的全长的分析,与参考醇-O-酰基转移酶具有相对低水平的序列同一性。在一些实施方式中,相对于参考脂肪酸羟化酶(例如,SEQ ID NO:6或20-23中任一(如,SEQ ID NO:6)),基于酶的一部分或遍及酶的全

长,用于本文所述的修饰细胞和方法的酶具有至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少95.5%、至少96%、至少96.5%、至少97%、至少97.5%、至少98%、至少98.5%、至少99%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%序列同一性。

[0084] 失调转录因子

[0085] 在一些实施方式中,γ-癸内酯的产生是通过基因修饰(包含上调β-氧化)来增加的,例如通过增加过氧化物酶体的大小和数量。在过量脂肪酸存在下生长的酵母增加过氧化物酶体的大小和数量,随后通过几种转录因子(如ADR1、PIP2、OAF1和/或OAF3)的调节来上调β-氧化。在一些实施方式中,例如,与不表达转录因子的细胞相比,本文所述的基因修饰细胞表达或过表达编码促进过氧化物酶体生物发生和组织(包括增加过氧化物酶体的增殖和/或增加细胞中脂肪酸β-氧化)的转录因子的基因。在一些实施方式中,本文所述的基因修饰细胞包括失调转录因子,如ADR1、PIP2、OAF1和/或OAF3。

[0086] 在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因和编码失调转录因子(如ADR(例如,ADR S230A))的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因、编码失调转录因子(如ADR(例如,ADR S230A))的基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因、编码失调转录因子(如ADR(例如,ADR S230A))的基因、编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因和编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因。

[0087] 一种此类转录因子(ADR1)编码锌指转录因子,该锌指转录因子通过在丝氨酸残基(即,在位置230的丝氨酸(Ser230))上的磷酸化被抑制。在过量脂肪酸存在下生长的酵母被认为通过丝氨酸残基的去磷酸化来激活ADR1。丝氨酸残基的突变,例如突变为丙氨酸,导致ADR1的组成型(constitutive)激活,在缺乏脂肪酸的情况下(如在含有可发酵糖的培养基中)引起过氧化物酶体增殖以及上调的β-氧化。在一些实施方式中,本文所述的基因修饰细胞包括失调ADR1转录因子。在一些实施方式中,ADR1转录因子可以被突变以产生组成型地(constitutively)活跃的ADR1转录因子。在一些实施方式中,ADR1转录因子的组成型活性会导致过氧化物酶体增殖以及β-氧化的上调。在一些实施方式中,本文所述的基因修饰细胞包括失调ADR1转录因子,该ADR1转录因子包括在位置230的丝氨酸残基(Ser230)的取代突变。在一些实施方式中,在位置230(或对应于位置230)的丝氨酸残基被丙氨酸残基取代。

[0088] 示例性失调转录因子是来自酿酒酵母的ADR1,其中,在位置230的丝氨酸残基(Ser230,S230)被丙氨酸残基取代(ADR1(S230A)),其由SEQ ID NO:24叙述的氨基酸序列提供。

[0089] MANVEKPNDCSGFPVVDLNSCFSNGFNNGKQEIEMETDDSPILLMSSSASRENSNTFSVIQRTPDGKIITTNNNMNSKINKQLDKLPENLRLNGRTPSGKLRSFVCEVCTRAFARQEHLKRHYRSHTNEKPYPCGLCNRCFTRRDLLIRHAQKIHSGNLGETISHTKKVSRTITKARKNSASSVKFQTPTYGTPDNGNFLNRTTANTRRKASPEANVKRKYLKKLTRRAAFSAQSASSYALPDQSSLEQHPKDRVKFSTPELVPLDLKNPELDSSFDLNMNLDLNLNLDSNFNIALNRSDSSGSTMNLDYKLPESANNYTYSSGSPTRAYVGANTNSKNASFSDADLLSSSYWIKAYNDHLFSVSESDETSPMNSELNDTKLIVPDFKSTIHHLKDSRSSSWTVAIDNNSNNNKVSDNQPDFVDFQELLDNDTLGNDLLETTAVLKEF

ELLHDDSVSATATSNEIDLSHLNLSNSPISPHKLIYKNKEGTNDDMLISFGLDHPSNREDDLDKLCNMTRDVQAIF
SQYLKGEESKRSLEDFLSTSNRKEKPDSGNYTFYGLDCLTLSKISRALPASTVNNKQPSHSIESKLFNEPMRNMCI
KVLRYYEKFSHDSSESVMDSNPNLLSKELLMPAVSELNEYLDLFKNNFLPHFPIIHPSLLDLDLDSLQRYTNEDGY
DDAENAQLFDRLSQGTDKEYDYEHYQILSISKIVCLPLFMATFGSLHKFGYKSQTIELYEMSRRILHSFLETKRRC
RSTTVNDNYQNIWLMQSLILSFMFALVADYLEKIDSSLMKRQLSALCSTIRSNCLPTISANSEKSINNNNEPLTFG
SPLQYIIFESKIRCTLMAYDFCQFLKCFFHIKFDLSIKEKDVETIYIPDNESKWASESIICNGHVVQKQNFYDFRN
FYYSFTYGHLHSIPEFLGSSMIYYEYDLRKGTKSHVFLDRIDTKRLERSLDTSSYGNDNMAATNKNIAILIDDTII
LKNNLMSMRFIKQIDRSFTEKVRKGQIAKIYDSFLNSARLNFLKNYSVEVLCEFLVALNFSIRNISSLYVEEESDC
SQRMNSPELPRIHLNNQALSVFNLQGYYYCFILIIKFLLDFEATPNFKLLRIFIELRSLANSILLPTLSRLYPQEF
SGFPDVVFTQQFINKDNGMLVPGLSANEHHNGASAAVKTKLAKKINVEGLAMFINEILVNSFNDTSFLNMEDPIRN
EFSFDNGDRAVTDLPRSAHFLSDTGLEGINFSGLNDSHQTVSTLNLLRYGENHSSKHKNGGKGQGFAEKYQLSLKY
VTIAKLFFTNVKENYIHCHMLDKMASDFHTLENHLKGNS*(SEQ ID NO:24)

[0090] 可选地或另外,本文所述的基因修饰细胞可包括失调的PIP2和/或OAF1转录因子。在一些实施方式中,PIP2转录因子和/或OAF1转录因子被突变以使转录因子活性失调,导致转录因子的组成型活性。在一些实施方式中,PIP2和/或OAF1转录因子活性的失调导致过氧化物酶体增殖和β-氧化的上调。

[0091] 可选地或另外,本文所述的基因修饰细胞可包括基因修饰以删除(例如,敲除)、降低表达(例如,敲低)和/或下调转录抑制因子OAF3。在一些实施方式中,OAF3转录抑制因子被突变以减少或下调转录抑制因子活性。在一些实施方式中,OAF3转录抑制因子活性的减少或下调导致过氧化物酶体增殖和β-氧化的上调。

[0092] 编码转录因子(如ADR1、PIP2、OAF1和/或OAF3)的核酸序列的突变,优选地保留编码序列的氨基酸阅读框,并且优选地不会在核酸中产生可能杂交形成二级结构(如发夹或环)的区域,二级结构可能对酶的表达有害。

[0093] 突变可以通过选择氨基酸取代或通过在编码多肽的核酸中的选定位点的随机诱变来进行。如本文所述,变体(variant)多肽可以被表达并测试一种或多种活性,以确定哪种突变提供具有期望特性的变体多肽。可以对变体(或对非变体多肽)进行进一步突变,其对多肽的氨基酸序列沉默,但为特定宿主中的翻译提供了优选密码子(称为密码子优化)。核酸在例如酿酒酵母中的翻译的优选密码子对于本领域的普通技术人员来说是众所周知的。还可以对基因或cDNA克隆的非编码序列进行其他突变,以提高多肽的表达。如本文所公开的,ADR1转录因子、PIP2转录因子、OAF1转录因子或OAF3转录抑制因子变体的活性可通过下述来测试:将编码酶变体的基因克隆到表达载体中,将载体引入适当的宿主细胞,表达酶变体,并检测酶的功能能力。

[0094] 酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)酶

[0095] 本文所述的修饰细胞可含有编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。在一些实施方式中,该基因是编码具有OLE1活性的酶的内源基因的拷贝。本文使用的术语“内源基因”指的是对应于含有基因指令的核酸(例如,DNA)的序列的遗传单位,其来源于宿主生物体(例如,基因修饰细胞)并由宿主生物体表达。

[0096] 在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因、编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因和编码失调转录因子(如

ADR1(例如ADR1 S230A))的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因、编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因、编码失调转录因子(如ADR1(例如ADR1 S230A))的基因和编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因。

[0097] 在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因、编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。

[0098] 酰基-CoA去饱和酶1酶是催化硬脂酸转化为油酸的酶,并且也可被称为硬脂酰-CoA 9-去饱和酶。在一些实施方式中,由酰基-CoA去饱和酶I活性产生的油酸用于生产γ-癸内酯及其前体。在一些实施方式中,编码具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶的异源基因是野生型酰基-CoA去饱和酶1基因(例如,从生物体中分离的基因)。在一些实施方式中,编码酰基-CoA去饱和酶1的基因是从属于酵母属的真菌中获得的。在一些实施方式中,编码酰基-CoA去饱和酶1的基因是从真菌酿酒酵母中获得的。在一些实施方式中,编码酰基-CoA去饱和酶1的基因是从真菌巴斯德酵母中获得的。

[0099] 具有酰基-CoA去饱和酶1活性的示例性酶是来自酿酒酵母的OLE1。酿酒酵母OLE1由SEQ ID NO:7所叙述的氨基酸序列提供,该序列对应于UniProtKB登录号AAA34826.1。

[0100] MPTSGTTIELIDDQFPKDDSASSGIVDEVDLTEANILATGLNKKAPRIVNGFGSLMGSKEMVSVEFDK
KGNEKKSNLDRLLEKDNQEKEEAKTKIHISEQPWTLNNWHQHLNWLNMVLVCGMPMIGWYFALSGKVPLHLNVFLF
SVFYYAVGGVSITAGYHRLWSHRSYSAHWPLRLFYAIFGCASVEGSAKWWGHSHRIHHRYTDTLRDPYDARRGLWY
SHMGWMLLKPNPKYKARADITDMTDDWTIRFQHRHYILLMLLTAFVIPTLICGYFFNDYMGGLIYAGFIRVFVIQQ
ATFCINSMAHYIGTQPFDDRRTPRDNWITAIVTFGEGYHNFHHEFPTDYRNAIKWYQYDPTKVIIYLTSLVGLAYD
LKKFSQNAIEEALIQQEQKKINKKKAKINWGPVLTDLPMWDKQTFLAKSKENKGLVIISGIVHDVSGYISEHPGGE
TLIKTALGKDATKAFSGGVYRHSNAAQNVLADMRVAVIKESKNSAIRMASKRGEIYETGKFF*(SEQ ID NO:7)

[0101] 在一些实施方式中,该基因编码具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶,使得与不表达该基因或仅表达该基因的一个拷贝的细胞相比,表达该酶的细胞能够增加γ-癸内酯的产生。在一些实施方式中,该基因编码具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶,使得与表达具有野生型酰基-CoA去饱和酶1活性的酶的细胞相比,表达该酶的细胞能够产生增加水平的γ-癸内酯。

[0102] 在一些实施方式中,具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶具有与SEQ ID NO:7中任一项叙述的序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的氨基酸序列。

[0103] 在一些实施方式中,具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶包括SEQ ID NO:7叙述的氨基酸序列。在一些实施方式中,具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶由SEQ ID NO:7叙述的氨基酸序列组成。

[0104] 在一些实施方式中,编码具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶的基因包括核酸序列,

该核酸序列编码包括与SEQ ID NO:7叙述的序列具有至少80％(例如,至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少95.5％、至少96％、至少96.5％、至少97％、至少97.5％、至少98％、至少98.5％、至少99％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％或至少99.9％)序列同一性的氨基酸序列的酶。在一些实施方式中,编码具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶的基因包括核酸序列,该核酸序列编码由SEQ ID NO:7叙述的氨基酸序列组成的酶。

[0105] 可以进行具有酰基-CoA去饱和酶1活性或预测具有酰基-CoA去饱和酶1活性的额外的酶的鉴定,例如基于与酰基-CoA去饱和酶1(如SEQ ID NO:7提供的酰基-CoA去饱和酶1)的一个或多个结构域的相似性或同源性。在一些实施方式中,可以基于与活性结构域(如催化结构域(如与酰基-CoA去饱和酶1活性相关的催化结构域))的相似性或同源性来鉴定用于本文所述的修饰细胞和方法的酶。在一些实施方式中,用于本文所述的修饰细胞和方法的酶在催化结构域的区域中可与参考醇-O-酰基转移酶(例如野生型酰基-CoA去饱和酶1(如SEQ ID NO:7))具有相对高水平的序列同一性,但基于对酶的较大部分或遍及酶的全长的分析,与参考酰基-CoA去饱和酶1具有相对低水平的序列同一性。在一些实施方式中,相对于参考酰基-CoA去饱和酶1(例如,SEQ ID NO:7),用于本文所述的修饰细胞和方法的酶在酶的催化结构域的区域中具有至少80％、至少81％、至少82％、至少83％、至少84％、至少85％、至少86％、至少87％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少95.5％、至少96％、至少96.5％、至少97％、至少97.5％、至少98％、至少98.5％、至少99％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％或至少99.9％序列同一性。

[0106] 在一些实施方式中,相对于参考酰基-CoA去饱和酶1(例如,SEQ ID NO:7),用于本文所述的修饰细胞和方法的酶在酶的催化结构域的区域中具有相对高水平的序列同一性,并且基于对酶的较大部分或遍及酶的全长的分析,与参考醇-O-酰基转移酶具有相对低水平的序列同一性。在一些实施方式中,相对于参考酰基-CoA去饱和酶1(例如,SEQ ID NO:7),基于酶的一部分或遍及酶的全长,用于本文所述的修饰细胞和方法的酶具有至少10％、至少15％、至少20％、至少25％、至少30％、至少35％、至少40％、至少45％、至少50％、至少55％、至少60％、至少65％、至少88％、至少89％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少95.5％、至少96％、至少96.5％、至少97％、至少97.5％、至少98％、至少98.5％、至少99％、至少99.5％、至少99.6％、至少99.7％、至少99.8％或至少99.9％序列同一性。

[0107] 醇-O-酰基转移酶(AAT)酶

[0108] 本文所述的修饰细胞可含有编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的基因。在一些实施方式中,该基因是异源基因。本文使用的术语“异源基因”指的是含有基因指令的核酸(例如,DNA)的序列,该序列被引入宿主生物体(例如,基因修饰细胞)并由其表达,该宿主生物体不天然编码该引入的基因。异源基因可以编码通常不由细胞表达的酶、细胞通常不表达的酶的变体(例如,突变酶)、编码通常在细胞中表达的酶的基因的额外的拷贝、或编码通常由细胞表达但在不同调控情况下表达的酶的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因和编码具有脂肪酸羟化酶

(FAH)活性的酶的异源基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因、编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞不表达编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的基因。

[0109] 醇-O-酰基转移酶,其也可被称为乙酰-CoA:乙酰转移酶或醇乙酰转移酶,是催化酰基链从酰基辅酶A(CoA)供体向受体醇的转移,导致酰基酯的产生的双底物酶。发酵饮料中存在的酰基酯影响其风味。酯γ-癸内酯,其是通过4-羟基癸酸的内酯化形成的,赋予发酵饮料(如啤酒和葡萄酒)桃子风味。

[0110] 在一些实施方式中,编码具有醇-O-酰基转移酶活性的酶的异源基因是野生型醇-O-酰基转移酶基因(例如,从生物体中分离的基因)。在一些实施方式中,醇-O-酰基转移酶是从细菌或真菌中获得的。

[0111] 在一些实施方式中,醇-O-酰基转移酶是从植物(如农作物)中获得的。在一些实施方式中,醇-O-酰基转移酶是从桃子植物(peach plant)中获得的。在一些实施方式中,醇-O-酰基转移酶基因是从桃中获得的。

[0112] 具有醇-O-酰基转移酶活性的示例性酶是来自桃的PpAAT1。桃AAT由SEQ ID NO:1所叙述的氨基酸序列提供,该序列对应于UniProtKB登录号XP_007209131.1。

[0113] MGSLCPLLFPVNRFEPELITPAKPTPIETKQLSDIDDQDGLRFHFPVIISYKNNPSMKGNDAVMVIREALSRALVYYYPLAGRLREGPNRKLMVECNGEGVLFIEANADVTLEQLGDRILPPCPVLEEFLSNPPGSDGILGCPLLLVQVTRLTCGGFIFGLRINHAMCDAVGLAKFLNAIGEMAQGADSLSVPPVWARELLNARDPPTVTRWHYEYDQLLDSQGSFIAAIDQSNMAQRSFYFGPQQIRALRKHLPPHLSTCSSFELITACVWRCRTLSLRLNPKDTVRISCAVNARGKSINDLCLPSGFYGNAFSIPTAVSTVELLCASPLGYGVELVRKSKAQMDKEYMQSLADFFVIRGRPPLPMGWNVFIVSDNRHTGFGEFDVGWGRPLFAGLARAFSMISFYVRDNNQEEEFGTLVPICLPSTSLERFEEELKKMTLEHVEEISK*(SEQ ID NO:1)

[0114] 在一些实施方式中,具有醇-O-酰基转移酶活性的酶是来自草莓的SAAT。草莓AAT由SEQ ID NO:2所叙述的氨基酸序列提供,该序列对应于UniProtKB登录号AAG13130.1。

[0115] MGEKIEVSINSKHTIKPSTSSTPLQPYKLTLLDQLTPPAYVPIVFFYPITDHDFNLPQTAADLRQALSETLTLYYPLSGRVKNNLYIDDFEEGVPYLEARVNCDMTDFLRLRKIECLNEFVPIKPFSMEAISDERYPLLGVQVNVFDSGIAIGVSVSHKLIDGGTADCFLKSWGAVFRGCRENIIHPSLSEAALLFPPRDDLPEKYVDQMEALWFAGKKVATRRFVFGVKAISSIQDEAKSESVPKPSRVHAVTGFLWKHLIAASRALTSGTTSTRLSIAAQAVNLRTRMNMETVLDNATGNLFWWAQAILELSHTTPEISDLKLCDLVNLLNGSVKQCNGDYFETFKGKEGYGRMCEYLDFQRTMSSMEPAPDIYLFSSWTNFFNPLDFGWGRTSWIGVAGKIESASCKFIILVPTQCGSGIEAWVNLEEEKMAMLEQDPHFLALASPKTLI(SEQ ID NO:2)

[0116] 在一些实施方式中,具有醇-O-酰基转移酶活性的酶是来自番茄的SpAAT1。番茄AAT由SEQ ID NO:3所叙述的氨基酸序列提供,该序列对应于UniProtKB登录号NP_001310384.1。

[0117] MANTLPISINYHKPKLVVPSSVTPHETKRLSEIDDQGFIRFQIPILMFYKYNSSMKGKDPARIIEDGLSKTLVF
YHPLAGRLIEGPNKKLMVNCNGEGVLFIEGDANIELEKLGESIKPPCPYLDLLLHNVPGSDGIIGSPLLLIQVT
RFTCGGFAVGFRVSHTMMDGYGFKMFLNALSELIQGASTPSILPVWQRHLLSARSSPCITCSHHEFDEEIESKI
AWESMEDKLIQESFFFGNEEMEVIKNQIPPNYGCTKFELLMAFLWKCRTIALDLHPEEIVRLTYVINIRGKKSL
NIELPIGYYGNAFVTPVVVSKAGLLCSNPVTYAVELIKKVKDHINEEYIKSVIDLTVIKGRPELTKSWNFLVSD
NRYIGFDEFDFGWGNPIFGGISKATSFISFGVSVKNDKGEKGVLIAISLPPLAMKKLQDIYNMTFRVIIPRI
(SEQ ID NO: 3)

[0118] 在一些实施方式中,具有醇-O-酰基转移酶活性的酶是来自苹果的MpAAT1(也被称为MdAAT1)。苹果AAT由SEQ ID NO:4提供的氨基酸序列提供,该序列对应于UniProtKB登录号NP_001315675.1。

[0119] MMSFSVLQVKRLQPELITPAKSTPQETKFLSDIDDQESLRVQIPIIMCYKDNPSLNKNRNP**V**KAIREALS
RALVYYYPLAGRLREGPNRKLVVDCNGEGILFVEASADVTLEQLGDKILPPCPLLEEFLYNFPGSDGIID
CPLLLIQVTCLTCGGFILALRLNHTMCDAAGLLLFLTAIAEMARGAHAPSILPVWERELLFARDPPRITC
AHHEYEDVIGHSDGSYASSNQSNMVQRSFYFGAKEMRVLRKQIPPHLISTCSTFDLITACLWKCRTLALN
INPKEAVRVSCIVNARGKHNNVRLPLGYYGNAFAFPAAISKAEPLCKNPLGYALELVKKAKATMNEEYLR
SVADLLVLRGRPQYSSTGSYLIVSDNTRVGFGDV**N**FGWGQPVFAGPVKALDLISFYVQHKNNTEDGILVP
MCLPSSAMERFQQELERITQEPKEDICNNLRSTSQ (SEQ ID NO: 4)

[0120] 在一些实施方式中,具有醇-O-酰基转移酶活性的酶是MpAAT1,并且相对于野生型氨基酸序列(即,SEQ ID NO:4)包括一个或多个突变。对应于SEQ ID NO:4(MpAAT1)的位置62和385的氨基酸(在位置62的缬氨酸和在位置385的天冬酰胺)在上述SEQ ID NO:4中以黑体和下划线表示。在一些实施方式中,具有醇-O-酰基转移酶活性的酶是MpAAT1,如SEQ ID NO:25所示,MpAAT1已被突变为用丙氨酸取代位置62的缬氨酸,以及用天冬氨酸取代位置385的天冬酰胺。

[0121] MMSFSVLQVKRLQPELITPAKSTPQETKFLSDIDDQESLRVQIPIIMCYKDNPSLNKNRNP**A**KAIREALS
RALVYYYPLAGRLREGPNRKLVVDCNGEGILFVEASADVTLEQLGDKILPPCPLLEEFLYNFPGSDGIID
CPLLLIQVTCLTCGGFILALRLNHTMCDAAGLLLFLTAIAEMARGAHAPSILPVWERELLFARDPPRITC
AHHEYEDVIGHSDGSYASSNQSNMVQRSFYFGAKEMRVLRKQIPPHLISTCSTFDLITACLWKCRTLALN
INPKEAVRVSCIVNARGKHNNVRLPLGYYGNAFAFPAAISKAEPLCKNPLGYALELVKKAKATMNEEYLR
SVADLLVLRGRPQYSSTGSYLIVSDNTRVGFGDV**D**FGWGQPVFAGPVKALDLISFYVQHKNNTEDGILVP
MCLPSSAMERFQQELERITQEPKEDICNNLRSTSQ (SEQ ID NO: 25)

[0122] 在一些实施方式中,具有醇-O-酰基转移酶活性的酶是来自甜瓜的CmAAT1。甜瓜AAT由SEQ ID NO:5所叙述的氨基酸序列提供,该序列对应于UniProtKB登录号XP_008462821.1。

[0123] METMQTIDFSFHVRKCQPELIAPANPTPYEFKQLSDVDDQQSLRLQLPFVNIYPHNPSLEGRDPVKVIKE
AIGKALVFYYPLAGRLREGPGRKLFVECTGEGILFIEADADVSLEEFWDTLPYSLSSMQNNIIHNALNSD
EVLNSPLLLIQVTRLKCGGFIFGLCFNHTMADGFGIVQFMKATAEIARGAFAPSILPVWQRALLTARDPP
RITFRHYEYDQVVDMKSGLIPVNSKIDQLFFFSQLQISTLRQTLPAHLHDCPSFEVLTAYVWRLRTIALQ

[0124] FKPEEEVRFLCVMNLRSKIDIPLGYYGNAVVVPAVITTAAKLCGNPLGYAVDLIRKAKAKATMEYIKSTV
DLMVIKGRPYFTVVGSFMMSDLTRIGVENVDFGWGKAIFGGPTTTGARITRGLVSFCVPFMNRNGEKGTA
LSLCLPPPAMERFRANVHASLQVKQVVDAVDSHMQTIQSASK (SEQ ID NO: 5)

[0125] 在一些实施方式中,异源基因编码具有醇-O-酰基转移酶活性的酶,使得与不表达

该异源基因的细胞相比,表达该酶的细胞能够增加γ-癸内酯的产生。在一些实施方式中,异源基因编码具有醇-O-酰基转移酶活性的酶,使得与表达具有野生型醇-O-酰基转移酶活性的酶的细胞相比,表达该酶的细胞能够产生增加水平的γ-癸内酯。在一些实施方式中,异源基因编码具有醇-O-酰基转移酶活性的酶,使得与不表达该异源基因的细胞相比,表达该酶的细胞能够产生降低水平的乙酸乙酯。

[0126] 在一些实施方式中,具有醇-O-酰基转移酶活性的酶具有与SEQ ID NO:1-5或25中任一叙述的序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或99.9%序列同一性的氨基酸序列。

[0127] 术语“百分比同一性”、“序列同一性”、“%同一性”、“%序列同一性”和“%相同的”,它们在本文中可互换使用,是指两个序列(例如,核酸或氨基酸)之间相似性的定量量度。百分比同一性可以使用Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-68,1990的算法进行确定,可以如Karlin和Altschul,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-77,1993进行改进。此类算法被并入到Altschul等J.Mol.Biol.215:403-10,1990的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)中。可以使用XBLAST程序,得分=50,字长=3进行BLAST蛋白质搜索,以获得与感兴趣的蛋白质分子同源的氨基酸序列。当两个序列之间存在差距(gap)时,可以使用如Altschul等,Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402,1997中所述的Gapped BLAST。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用相应程序(例如XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0128] 当叙述百分比同一性或其范围(例如,至少、大于等)时,除非另有说明,否则端点应包括在内,以及范围(例如,至少70%同一性)应包括所引用的范围(例如至少71%、至少72%、至少73%、至少74%、至少75%、至少76%、至少77%、至少78%、至少79%、至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少95.5%、至少96%、至少96.5%、至少97%、至少97.5%、至少98%、至少98.5%、至少99%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%同一性)内的所有范围和其所有增量(例如百分之十分之一(即0.1%)、百分之百分之一(即0.01%)等)。

[0129] 在一些实施方式中,具有醇-O-酰基转移酶活性的酶包括SEQ ID NO:1-5或25中任一叙述的氨基酸序列。在一些实施方式中,具有醇-O-酰基转移酶活性的酶由SEQ ID NO:1-5或25中任一叙述的氨基酸序列组成。在一些实施方式中,具有醇-O-酰基转移酶活性的酶包括SEQ ID NO:1叙述的氨基酸序列。在一些实施方式中,具有醇-O-酰基转移酶活性的酶由SEQ ID NO:1叙述的氨基酸序列组成。

[0130] 在一些实施方式中,编码具有醇-O-酰基转移酶活性的酶的基因包括编码包含与SEQ ID NO:1-5和25的任一个所示的序列至少80%(例如至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少95.5%、至少96%、至少96.5%、至少97%、至少97.5%、至少98%、至少98.5%、至少99%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、或至少99.9%)序列同一性的氨基酸序列的酶的核酸序列。在一些实施方式中,编码具有醇-O-酰基转移酶活性的酶的基因包括编码由SEQ ID NO:1-5和12-25的任一个所示的氨基酸序列组成的酶的核酸序列。

[0131] 例如基于与醇-O-酰基转移酶(诸如SEQ ID NO:1-5和25的任一提供的醇-O-酰基转移酶)的一个或多个结构域的相似性或同源性,可以进行具有醇-O-酰基转移酶活性或预测具有醇-O-酰基转移酶活性的另外的酶的鉴定。在一些实施方式中,用于在本文所述的修饰细胞和方法中使用的酶可基于与活性结构域(诸如催化结构域,例如与醇-O-酰基转移酶活性相关的催化结构域)的相似性或同源性来鉴定。在一些实施方式中,用于在本文所述的修饰细胞和方法中使用的酶可在催化结构域的区域中与参考醇-O-酰基转移酶(例如野生型醇-O-酰基转移酶,诸如SEQ ID NO:1-5或25的任一个)具有相对高水平的序列同一性,但基于对酶的较大部分或跨酶的全长的分析与参考醇-O-酰基转移酶具有相对低水平的序列同一性。在一些实施方式中,用于在本文所述的修饰细胞和方法中使用的酶相对于参考醇-O-酰基转移酶(例如SEQ ID NO:1-5或25),在酶的催化结构域的区域中具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少95.5%、至少96%、至少96.5%、至少97%、至少97.5%、至少98%、至少98.5%、至少99%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%序列同一性。

[0132] 在一些实施方式中,相对于参考醇-O-酰基转移酶(例如,SEQ ID NO:1-5或25),用于本文所述的修饰细胞和方法的酶在酶的催化结构域的区域中具有相对高水平的序列同一性,并且基于对酶的较大部分或遍及酶的全长的分析,与参考醇-O-酰基转移酶具有相对低水平的序列同一性。在一些实施方式中,相对于参考醇-O-酰基转移酶(例如,SEQ ID NO:1-5或25),基于酶的一部分或遍及酶的全长,用于本文所述的修饰细胞和方法的酶具有至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少95.5%、至少96%、至少96.5%、至少97%、至少97.5%、至少98%、至少98.5%、至少99%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%序列同一性。

[0133] 在一些实施方式中,编码具有醇-O-酰基转移酶活性的酶的基因进一步包括定位信号。本文使用的术语“定位信号”指的是存在于新合成的蛋白质的末端(N-末端或C-末端)的短肽序列(通常少于70个氨基酸),该短肽序列促进新合成的蛋白质向细胞的靶向区域(例如,细胞膜或细胞器)的转运或贩运(trafficking)。

[0134] 在一些实施方式中,定位信号是过氧化物酶体靶向信号。本文使用的术语“过氧化物酶体靶向信号”指的是在新合成的蛋白质的N-末端的肽序列,该肽序列促进新合成的蛋白质向过氧化物酶体的转运或贩运。过氧化物酶体和线粒体是真核细胞中β-氧化的主要位点,其中β-氧化涉及γ-癸内酯的产生,如本文所述的(图2)。在不希望受到任何特定理论的约束的情况下,据认为将具有AAT活性的酶定位到过氧化物酶体可以增加β-氧化,并且因此增加γ-癸内酯的产生。在一些实施方式中,过氧化物酶体靶向信号被融合到具有AAT活性的酶的C-末端,如SEQ ID NO:1-5或25中任一项。

[0135] 在一些实施方式中,过氧化物酶体靶向信号包括氨基酸序列SKL(SEQ ID NO:17)。在一些实施方式中,过氧化物酶体靶向信号包括氨基酸序列GSLGRGRRSKL(SEQ ID NO:18)。

[0136] 基因工程的一般方法

[0137] 正如对本领域的普通技术人员而言也将是显而易见的,脂肪酸羟化酶、失调转录

因子、酰基-CoA去饱和酶1和/或醇-O-酰基转移酶中的所选残基的氨基酸位置序号与另一种脂肪酸羟化酶、转录因子、酰基-CoA去饱和酶1酶或醇-O-酰基转移酶(例如,参考酶)相比可具有不同的氨基酸位置序号。一般地,可以使用本领域已知的方法,例如通过比对(aligning)两种或多种酶的氨基酸序列,来确定其他脂肪酸羟化酶、失调转录因子、酰基-CoA去饱和酶1和/或醇-O-酰基转移酶中的相应位置。用于比对氨基酸(或核苷酸)序列的软件程序和算法是本领域已知的并且很容易获得的,例如Clustal Omega(Sievers等,2011)。

[0138] 本文所述的脂肪酸羟化酶、转录因子、酰基-CoA去饱和酶1和/或醇-O-酰基转移酶可进一步含有一种或多种修饰,例如,特异性地改变与其期望的生理活性无关的多肽的特征。可选地或另外,本文所述的脂肪酸羟化酶、转录因子、酰基-CoA去饱和酶1和/或醇-O-酰基转移酶可含有一种或多种突变,以调整酶在细胞中的表达和/或活性。

[0139] 编码脂肪酸羟化酶、转录因子、酰基-CoA去饱和酶1和/或醇-O-酰基转移酶的核酸的突变,优选地保留编码序列的氨基酸阅读框,并且优选地不会在核酸中产生可能杂交形成二级结构(如发夹或环)的区域,这些二级结构可能对酶的表达有害。

[0140] 突变可以通过选择氨基酸取代或通过在编码多肽的核酸中的选定位点的随机诱变来实现。如本文所述,变体多肽可以被表达并测试一种或多种活性,以确定哪种突变提供具有期望特性的变体多肽。可以对变体(或对非变体多肽)进行进一步突变,其对多肽的氨基酸序列沉默,但为特定宿主中的翻译提供了优选密码子(称为密码子优化)。核酸在例如酿酒酵母中的翻译的优选密码子对于本领域的普通技术人员来说是众所周知的。还可以对基因或cDNA克隆的非编码序列进行其他突变,以提高多肽的表达。如本文所公开的,脂肪酸羟化酶、转录因子、酰基-CoA去饱和酶1(酶)和/或醇-O-酰基转移酶变体的活性可通过以下来测试:将编码酶变体的基因克隆到表达载体中,将载体引入适当的宿主细胞,表达酶变体,并检测酶的功能能力。

[0141] 本文所述的脂肪酸羟化酶、转录因子、酰基-CoA去饱和酶1和/或醇-O-酰基转移可含有对应于参考脂肪酸羟化酶、转录因子、酰基-CoA去饱和酶1和/或醇-O-酰基转移酶(如,野生型转录因子或酶)的一个或多个位置的氨基酸取代。在一些实施方式中,脂肪酸羟化酶、转录因子、酰基-CoA去饱和酶1酶和/或醇-O-酰基转移酶在对应于参考脂肪酸羟化酶、转录因子、酰基-CoA去饱和酶1和/或醇-O-酰基转移酶的1、2、3、4、5或更多位置处含有氨基酸取代。在一些实施方式中,脂肪酸羟化酶、转录因子、酰基-CoA去饱和酶1和/或醇-O-酰基转移酶不是天然发生的醇-O-酰基转移酶、脂肪酸羟化酶和/或酰基-CoA去饱和酶1,例如,是基因修饰的。

[0142] 在一些实施方式中,脂肪酸羟化酶、转录因子、酰基-CoA去饱和酶1和/或醇-O-酰基转移酶变体还可以含有基本上不影响脂肪酸羟化酶、转录因子、酰基-CoA去饱和酶1和/或醇-O-酰基转移酶的活性和/或结构的一个或多个氨基酸取代。本领域技术人员还将认识到,可以在酶中进行保守氨基酸取代以提供前述多肽的功能等价变体,即变体保留多肽的功能能力。如本文所使用的,“保守氨基酸取代”是指不改变其中进行氨基酸取代的蛋白质的相对电荷或大小特征的氨基酸取代。可以根据本领域普通技术人员已知的用于改变多肽序列的方法来制备变体,诸如在汇编此类方法的参考文献中找到的方法,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook等编辑,第四版,纽约冷泉港冷泉港实验室出版社,2012,或Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等编辑,John

Wiley&Sons,Inc.,纽约。多肽的示例性的功能等价变体包括本文公开的蛋白质的氨基酸序列中的保守氨基酸取代。氨基酸的保守取代包括在以下组内的氨基酸之间进行的取代:(a)M、I、L、V;(b)F、Y、W;(c)K、R、H;(d)A、G;(e)S、T;(f)Q、N;和(g)E、D。

[0143] 如本领域普通技术人员所认识的,编码脂肪酸羟化酶、失调转录因子、酰基-CoA去饱和酶1和/或醇-O-酰基转移酶的活性的同源基因可以从其他种类获得,并且可以通过同源性搜索来鉴定,例如通过可从国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(NCBI)网站(ncbi.nlm.nih.gov)可得的蛋白质BLAST搜索。通过将酶的氨基酸序列与一种或多种参考酶进行比对和/或通过将相似或同源酶的二级或三级结构与一种或多种参考酶进行比较,本领域技术人员可以确定相似或同源酶中相应的氨基酸残基,并且可以确定相似或同源酶中突变的氨基酸残基。同样地,通过将转录因子的氨基酸序列与一个或多个参考转录因子进行比对和/或通过将相似或同源转录因子的二级或三级结构与一个或多个参考转录因子进行比较,可以确定相似或同源转录因子中相应的氨基酸残基,并可以确定相似或同源转录因子中用于突变的氨基酸残基。

[0144] 与本公开相关的基因可以从来自含有给定基因的DNA的任何来源的DNA获得(例如,通过PCR扩增)。在一些实施方式中,与本发明相关的基因是合成的,例如通过体外化学合成产生。获得编码本文所述的酶的基因的任何方式均与本文所述的修饰细胞和方法相容。

[0145] 本文提供的公开内容涉及编码脂肪酸羟化酶、失调转录因子、酰基-CoA去饱和酶1和/或醇-O-酰基转移酶的基因的重组表达、前述的功能修饰和变体,以及与其相关的用途。与本发明相关的核酸的同源物和等位基因可以通过常规技术来鉴定。本发明还涵盖在严格条件下与本文所述的核酸杂交的核酸。如本文所使用的,术语“严格条件”是指本领域熟悉的参数。核酸杂交参数可以在汇编此类方法的参考文献中找到,例如Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook等编辑,第四版,纽约冷泉港冷泉港实验室出版社,2012,或Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等编辑,John Wiley&Sons,Inc.,纽约。

[0146] 还可以使用产生类似严格程度的其他条件、试剂等。本领域技术人员将熟悉此类条件,并且因此这里不再给出。然而,应当理解,本领域技术人员将能够以允许清楚鉴定本发明核酸的同源物和等位基因的方式操纵条件(例如,通过使用较低的严格条件)。本领域技术人员还熟悉用于筛选表达此类分子的细胞和文库的方法,然后常规分离所述分子,随后是分离相关核酸分子并测序。

[0147] 本发明还包括简并核酸,其包含天然材料中存在的密码子的替代密码子。例如,丝氨酸残基由密码子TCA、AGT、TCC、TCG、TCT和AGC编码。这六个密码子中的每一个在用于编码丝氨酸残基的目的上都是等效的。因此,对于本领域普通技术人员显而易见的是,任何编码丝氨酸的核苷酸三联体均可用于在体外或体内指导蛋白质合成装置以将丝氨酸残基掺入延伸多肽中。类似地,编码其他氨基酸残基的核苷酸序列三联体包括但不限于:CCA、CCC、CCG和CCT(脯氨酸密码子);CGA、CGC、CGG、CGT、AGA和AGG(精氨酸密码子);ACA、ACC、ACG和ACT(苏氨酸密码子);AAC和AAT(天冬酰胺密码子);以及ATA、ATC和ATT(异亮氨酸密码子)。其他氨基酸残基可以类似地由多个核苷酸序列编码。因此,本发明涵盖由于基因密码的简并性而在密码子序列上不同于生物分离的核酸的简并核酸。本发明还涵盖密码子优化以适

合宿主细胞的最佳密码子使用。

[0148] 本发明还提供了修饰的核酸分子,其包括一个或多个核苷酸的添加、取代和缺失。在优选的实施方式中,这些修饰的核酸分子和/或它们编码的多肽保留未修饰的核酸分子和/或多肽的至少一种活性或功能,例如酶活性。在某些实施方式中,修饰的核酸分子编码修饰的多肽,优选具有如本文别处描述的保守氨基酸取代的多肽。修饰的核酸分子在结构上与未修饰的核酸分子相关,并且在优选的实施方式中,与未修饰的核酸分子在结构上充分相关,使得修饰的和未修饰的核酸分子在本领域技术人员已知的严格条件下杂交。

[0149] 例如,可以制备编码具有单个氨基酸变化的多肽的修饰的核酸分子。这些核酸分子中的每一个可以具有一个、两个或三个核苷酸取代,不包括对应于本文所述的基因密码简并性的核苷酸变化。同样,可以制备编码具有两个氨基酸变化的多肽的修饰的核酸分子,其具有例如2-6个核苷酸变化。本领域技术人员将容易想到许多类似这些的修饰的核酸分子,包括例如编码氨基酸2和3、2和4、2和5、2和6等的密码子中的核苷酸取代。在前述实例中,两个氨基酸的每个组合以及编码氨基酸取代的所有核苷酸取代都包括在修饰的核酸分子的组中。如本领域普通技术人员所容易想到的,也可以制备编码具有另外的取代(即,3个或多个)、添加或缺失(例如,通过引入终止密码子或剪接位点)的多肽的另外的核酸分子,并且其被本发明所涵盖。任何前述核酸或多肽可以通过常规实验来测试与本文公开的核酸和/或多肽的结构关系或活性的保留。

[0150] 在本公开的一个方面中,与本发明相关的一种或多种基因在重组表达载体中表达。如本文所使用的,“载体”可以是许多核酸的任一种,可通过限制和连接将期望序列插入其中,以在不同基因环境之间运输或在宿主细胞中表达。尽管RNA载体也是可得的,但载体通常包括DNA。载体包括但不限于:质粒、福斯质粒、噬菌粒、病毒基因组和人工染色体。

[0151] 克隆载体是一种能够自主复制或整合到宿主细胞基因组中的载体。在质粒的情况下,随着质粒在宿主细胞(诸如宿主细菌)内拷贝数的增加,期望序列的复制可发生多次,或者在宿主通过有丝分裂繁殖之前每个宿主仅发生一次。在噬菌体的情况下,复制可以在裂解期主动发生,或在溶原期被动发生。

[0152] 表达载体是一种可以通过限制和连接将期望DNA序列插入其中的载体,使得其可操作地连接至调节序列并且可以表达为RNA转录物。载体还可以含有一种或多种适合用于鉴定已经或尚未用载体转化或转染的细胞的标志物序列。标志物包括例如编码增加或减少对抗生素或其他化合物的抗性或敏感性的蛋白质的基因、编码其活性可通过本领域已知的标准测定法检测的酶(例如,β-半乳糖苷酶、萤光素酶或碱性磷酸酶)的基因,以及明显影响转化或转染的细胞、宿主、集落或噬斑表型(例如绿色荧光蛋白)的基因。优选的载体是那些能够自主复制并表达存在于它们可操作地连接的DNA片段中的结构基因产物的载体。

[0153] 如本文所使用的,当编码序列和调节序列以将编码序列的表达或转录置于调节序列的影响或控制之下的方式共价连接时,它们被称为“可操作地”接合或可操作地连接。如果期望将编码序列翻译成功能性蛋白质,则两个DNA序列称为可操作地接合或可操作地连接,条件是5’调节序列中启动子的诱导导致编码序列的转录并且如果两个DNA序列之间的连接类型不(1)导致移码突变的引入,(2)干扰启动子区域指导编码序列转录的能力,或(3)干扰相应RNA转录物翻译成蛋白质的能力。因此,如果启动子区域能够影响DNA序列的转录,使得所得转录物可以翻译成期望的蛋白质或多肽,则启动子区域将可操作地连接至编码序

列。

[0154] 当编码本公开的任何酶的核酸分子在细胞中表达时,多种转录控制序列(例如,启动子/增强子序列)可用于指导其表达。在一些实施方式中,每个基因可操作地连接至启动子(例如,每个基因连接至单独的启动子)。启动子可以是天然启动子,即在内源环境中的基因的启动子,其提供基因表达的正常调节。在一些实施方式中,启动子可以是组成型的,即,启动子不受调节,以允许其相关基因(例如,脂肪酸羟化酶、失调转录因子、酰基-CoA去饱和酶1、醇-O-酰基转移酶)的连续转录。还可以使用多种条件启动子,例如受分子的存在或不存在控制的启动子。

[0155] 基因表达所需的调节序列的精确性质可能因种类或细胞类型而异,但必要时通常包括分别涉及转录和翻译起始的5'非转录和5'非翻译序列,诸如TATA盒、加帽序列、CAAT序列等。特别地,此类5'非转录调节序列将包括启动子区域,其包括用于可操作地连接的基因的转录控制的启动子序列。根据需要,调节序列还可以包括增强子序列或上游激活子序列。本发明的载体可以任选地包括5'前导序列或信号序列。适当载体的选择和设计在本领域普通技术人员的能力和判断之内。

[0156] 含有所有表达所需元件的表达载体是商业可得的并且是本领域技术人员已知的。参见,例如Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第四版,冷泉港实验室出版社,2012。通过将异源DNA(RNA)引入细胞中来对细胞进行基因工程化。将该异源DNA(RNA)可置于转录元件的可操作控制下以允许异源DNA在宿主细胞中表达。如本领域普通技术人员将理解的,本文描述的任何酶也可以在其他酵母细胞中表达,包括用于生产葡萄酒、蜂蜜酒、清酒、苹果酒等的酵母菌株。

[0157] 可以使用本领域标准的方法和技术将编码本公开的酶的核酸分子引入一个或多个细胞中。例如,核酸分子可以通过标准方案诸如转化(包括化学转化和电穿孔、转导、粒子轰击等)引入。表达编码所要求保护的发明的酶的核酸分子也可以通过将核酸分子整合到基因组中来实现。

[0158] 基因的掺入可以通过将编码酶的核酸掺入酵母细胞的基因组中或通过将编码酶的新核酸瞬时或稳定维持为游离元件来实现。在真核细胞中,永久的、可遗传的基因改变通常通过将DNA引入细胞基因组中来实现。

[0159] 异源基因还可以包括表达编码的基因产物(例如,脂肪酸羟化酶、转录因子、酰基-CoA去饱和酶1、醇-O-酰基转移酶)所需的各种转录元件。例如,在一些实施方式中,基因可以包括启动子。在一些实施方式中,启动子可以可操作地接合至基因。在一些实施方式中,细胞是诱导型启动子。在一些实施方式中,启动子在发酵过程的特定阶段期间是有活性的。例如,在一些实施方式中,来自启动子的峰值表达是在发酵过程的早期,例如,在>50%的可发酵糖被消耗之前。在一些实施方式中,启动子的峰值表达在发酵过程的后期,例如,在50%的可发酵糖被消耗之后。

[0160] 培养基中的条件在发酵过程期间改变,例如,随着糖源和氧气的耗尽,营养物和氧气的可得性趋向在发酵过程中随着时间的推移而减少。此外,其他因素的存在,诸如细胞代谢产生的产物可增加。在一些实施方式中,启动子受发酵过程中的一种或多种条件(诸如一种或多种因素的存在或不存在)调节。在一些实施方式中,启动子受低氧条件调节。低氧激活基因的启动子的实例是本领域已知的。参见,例如Zitomer等,Kidney Int.(1997)51(2):

507-13;Gonzalez Siso等,Biotechnol.Letters(2012)34:2161-2173。

[0161] 在一些实施方式中,启动子是组成型启动子。用于酵母细胞中使用的组成型启动子的实例是本领域已知的,并且对于本领域普通技术人员来说是显而易见的。在一些实施方式中,启动子是酵母启动子,例如来自其中表达异源基因或外源基因的酵母细胞的天然启动子。

[0162] 用于本文所述的基因修饰细胞和方法的启动子的非限制性实例包括:HEM13启动子(pHEM13)、SPG1启动子(pSPG1)、PRB1启动子(pPRB1)、QCR10(pQCR10)、PGK1启动子(pPGK1)、OLE1启动子(pOLE1)、ERG25启动子(pERG25)、HHF2启动子(pHHF2)、TDH1启动子(pTDH1)、TDH2启动子(pTDH2)、TDH3启动子(pTDH3)、ENO2启动子(pENO2)、HSP26启动子(pHSP26)或RPL18b启动子(pRPL18b)。

[0163] 示例性HEM13启动子是来自酿酒酵母的pHEM13,其由SEQ ID NO:8所叙述的核苷酸序列提供。

[0164] TAATGTAGAAGGTTGAGAACAACCGGATCTTGCGGTCATTTTTCTTTTCGAGGAAAGTGCAAGTCTGCCACTTT
CCAGAAGGCATAGCCTTGCCCTTTTGTTGATATTTCTCCCCACCGTAATTGTTGCATTCGCGATCTTTTCAACA
ATACATTTTATCATCAAGCCCGCAAATCCTCTGGAGTTTGTCCTCTCGTTCACTGTTGGGAAAAACAATACGCC
TAATTCGTGATTAAGATTCTTCAAACCATTTCCTGCGGAGTTTTTACTGTGTGTTGAACGGTTCACAGCGTAAA
AAAAAGTTACTATAGGCACGGTATTTTAATTTCAATTGTTTAGAAAGTGCCTTCACACCATTAGCCCCTGGGAT
TACCGTCATAGGCACTTTCTGCTGAGCTCCTGCGAGATTTCTGCGCTGAAAGAGTAAAAGAAATCTTTCACAGC
GGCTCCGCGGGCCCTTCTACTTTTAAACGAGTCGCAGGAACAGAAGCCAAATTTCAAAGAACGCTACGCTTTCG
CCTTTTCTGGTTCTCCCACCAATAACGCTCCAGCTTGAACAAAGCATAAGACTGCAACCAAAGCGCTGACGGAC
GATCCGAAGATAAAGCTTGCTTTGCCCATTGTTCTCGTTTCGAAAGGCTATATAAGGACACGGATTTTCCtTTT
TTTTTTCCACCTATTGTCTTTCTTTGTTAAGCTTTTATTCTCCGGGTTTTTTTTTTTGAGCATATCAAAAGCT
TTCTTTTCGCAAATCAAACATAGCAAACCGAACTCTTCGAACACAATTAAATACACATAAA (SEQ ID NO: 8)

[0165] 示例性SPG1启动子是来自酿酒酵母的pSPG1,其由SEQ ID NO:9所叙述的核苷酸序列提供。

[0166] ATGAAGTTCACTTCACATCCAATGAGAAAAACAAAATCCGCAGGGCTATCACCCAGAACATCCTCCACTTCATC
TTCTTCAGGACAGAGAAAAGCGCATCACCACCACCATCACCACAACCACGTTTCAAGGACGAAAACTACCGAAA
GCACCAAATCAGGCAACAGCAAAAAGGACAGTTCCTCATCCTCAACAAACGACCATCAATTTAAAAGGTCTGAA
AAGAAGAAAAAAAGTAAATTTGGCTCGATCTTCAAAAAAGTTTTCGGATGAACCGGATTAATACAAGTAAAATC
AGCAAAGATATAGAAGACAAAATAAGCGTGAAAACAATCATAAACCACTCACAACGGGGGTTTTCAGCTGTTAC
TCCTCCATACATACATTTTGATAAAGATATAATGTTATATTTCTTTTCGTAATTTTGTTTTACTTCGGTTTGCT
CTATAGATTTCATCAGCCGCACCGAAAAGGGAGATCAATAAGGTACCCTTTAAAAGGGATAAGAAGCCTAACAT
CACCCCAATAAATGGAGTAATGGCCAGCATTGGATGAAGAGAAGAATTACGGGATACTGGGATAACACTGTTAA
AAATGCTTCGCGACGTGAGGGTCTTATATAAATTGAACTGCCAAATCTCTTTCACATTATCCAGGATAGTTTGG
AATGTGTGTTACTGAAAGATCAGAATCAATAAATACAATCAATACAAATATTTAGCGCATAAAATTCAAACAAA
GTTTACTGAA (SEQ ID NO: 9)

[0167] 示例性PRB1启动子是来自酿酒酵母的pPRB1,其由SEQ ID NO:10所叙述的核苷酸序列提供。

[0168] CGAGAAACAGGGGGGGAGAAAAGGGGAAAAGAGAAGGAAAGAAAGACTCATCTATCGCAGATAAGACAATCAAC
CCTCATGGCGCCTCCAACCACCATCCGCACTAGGGACCAAGCGCTCGCACCGTTAGCAACGCTTGACTCACAAA
CCAACTGCCGGCTGAAAGAGCTTGTGCAATGGGAGTGCCAATTCAAAGGAGCCGAATACGTCTGTTCGCCTTTT
AAGAGGCTTTTTGAACACTGCATTGCACCCGACAAATCAGCCACTAACTACGAGGTCACGGATACATATACCAA
TAGTTAAAAAATTACATATACTCTATATAGCACAGTAGTGTGATAAATAAAAAATTTTGCCAAGACTTTTTTAA
ACTGCACCCGACAGATCAGGTCTGTGCCTACTATGCACTTATGCCCGGGGTCCCGGGAGGAGAAAAAACGAGGG
CTGGGAAATGTCCGTGGACTTAAAACGCTCCGGGTTAGCAGAGTAGCAGGGCTTTCGGCTTTGGAAATTTAGGT
GACTTGTTGAAAAAGCAAAATTTGGGCTCAGTAATGCCACaGCAGTGGCTTATCACGCCAGGACTGCGGGAGTG
GCGGGGGCAAACACACCCGCGATAAAGAGCGCGATGAATATAAAAGGGGGCCAATGTTACGTCCCGTTATATTG
GAGTTCTTCCCATACAAACTTAAGAGTCCAATTAGCTTCATCGCCAATAAAAAAACAAACTAAACCTAATTCTA
ACAAGCAAAG (SEQ ID NO: 10)

[0169] 示例性QCR10启动子是来自酿酒酵母的pQCR10,其由SEQ ID NO:11所叙述的核苷酸序列提供。

[0170] GAGAGCTGGCCAAAAAGAGGGCCGAAGACGGCGTTGAATTTCATTCAAAACTATTTAGAAGGGCAGAGCCAGGT
GAGGATTTAGATTATTATATTTACAAGCACATCCCTGAAGGGACCGACAAGCATGAAGAACAGATCAGGAGCAT
TTTGGAAACTGCCCCGATTTTACCAGGACAGGCATTCACTGAAAAATTTTCTATTCCGGCTTATAAAAAGCATG
GAATCCAAAAGAATTAGGCTTCTCATTCTATTTTAATTATACTAGTACGATTTCTCACTCTGTAATTTAATATC
AGTGTAATATGCACCTAGTTATGGGTAGTTTTTGCTAACGTTACGAGCCGCGAAACTGTCCTCAATCTTCACCA
CTACCTCTAATGACTGAAGAATGCTATGCGATATAACGCTGCCGCACTTTGAATATATACTTATATTTACATAG
TTTTCAAGTGCGTATTACTATTGCAAAGTAGTATTTTGTCACGTGATTTTGATCCAATTAAAACTAAATATGGT
TCAACCCGTTGTTTCCGCATCAAAAAACCATACCATTTATCAAGGGGACGGGATATATCACATAACAGTTTGAA
TGCATAATTTGTTATAGATATCTTCTGGAATAATCTTCACAGCAAAAGCGCAAGTCGAATAATATATCGATAAA
TACAATCCATAAGACTTAAAACTAACCTCA (SEQ ID NO: 11)

[0171] 示例性TDH1启动子是来自酿酒酵母的pTDH1,其由SEQ ID NO:12叙述的核苷酸序列提供。

[0172] GCCCGCTTCTGAAAACTACAGTTGACTTGTATGCTAAAGGGCCAGACTAATGGGAGGAGAAAAAGAAACGAATG
TATATGCTCATTTACACTCTATATCACCATATGGAGGATAAGTTGGGCTGAGCTTCTGATCCAATTTATTCTAT
CCATTAGTTGCTGATATGTCCCACCAGCCAACACTTGATAGTATCTACTCGCCATTCACTTCCAGCAGCGCCAG
TAGGGTTGTTGAGCTTAGTAAAAATGTGCGCACCACAAGCCTACATGACTCCACGTCACATGAAACCACACCGT
GGGGCCTTGTTGCGCTAGGAATAGGATATGCGACGAAGACGCTTCTGCTTAGTAACCACACCACATTTTCAGGG
GGTCGATCTGCTTGCTTCCTTTACTGTCACGAGCGGCCCATAATCGCGCTTTTTTTTTAAAAGGCGCGAGACAG
CAAACAGGAAGCTCGGGTTTCAACCTTCGGAGTGGTCGCAGATCTGGAGACTGGATCTTTACAATACAGTAAGG
CAAGCCACCATCTGCTTCTTAGGTGCATGCGACGGTATCCACGTGCAGAACAACATAGTCTGAAGAAGGGGGGG
AGGAGCATGTTCATTCTCTGTAGCAGTAAGAGCTTGGTGATAATGACCAAAACTGGAGTCTCGAAATCATATAA
ATAGACAATATATTTTCACACAATGAGATTTGTAGTACAGTTCTATTCTCTCTCTTGCATAAATAAGAAATTCA
TCAAGAACTTGGTTTGATATTTCACCAACACACACAAAAAACAGTACTTCACTAAATTTACACACAAAACAAA
(SEQ ID NO: 12)

[0173] 示例性TDH2启动子是来自酿酒酵母的pTDH2,其由SEQ ID NO:13叙述的核苷酸序列提供。

CTAAATACTTCTGTGTTTTCATTAATTTATAAATTGTACTCTTTTAAGACATGGAAAGTACCAACATCGGTTGA
AACAGTTTTTCATTTACTTATGGTTTATTGGTTTTTCCAGTGAATGATTATTTGTCGTTACCCTTTCGTAAAAG
TTCAAACACGTTTTTAAGTATTGTTTAGTTGCTCTTTCGACATATATGATTATCCCTGCGCGGCTAAAGTTAAG
GATGCAAAAAACATAAGACAACTGAAGTTAATTTACGTCAATTAAGTTTTCCAGGGTAATGATGTTTTGGGCTT
CCACTAATTCAATAAGTATGTCATGAAATACGTTGTGAAGAGCATCCAGAAATAATGAAAAGAAACAACGAAAC
[0174] TGGGTCGGCCTGTTGTTTCTTTTCTTTACCACGTGATCTGCGGCATTTACAGGAAGTCGCGCGTTTTGCGCAGT
TGTTGCAACGCAGCTACGGCTAACAAAGCCTAGTGGAACTCGACTGATGTGTTAGGGCCTAAAACTGGTGGTGA
CAGCTGAAGTGAACTATTCAATCCAATCATGTCATGGCTGTCACAAAGACCTTGCGGACCGCACGTACGAACAC
ATACGTATGCTAATATGTGTTTTGATAGTACCCAGTGATCGCAGACCTGCAATTTTTTTGTAGGTTTGGAAGAA
TATATAAAGGTTGCACTCATTCAAGATAGTTTTTTTCTTGTGTGTCTATTCATTTTATTATTGTTTGTTTAAAT
GTTAAAAAAACCAAGAACTTAGTTTCAAATTAAATTCATCACACAAACAAACAAAACAAA (SEQ ID NO: 13)

[0175] 示例性TDH3启动子是来自酿酒酵母的pTDH3,其由SEQ ID NO:14叙述的核苷酸序列提供。

[0176] CAGTTCGAGTTTATCATTATCAATACTGCCATTTCAAAGAATACGTAAATAATTAATAGTAGTGATTTTCCTAA
CTTTATTTAGTCAAAAAATTAGCCTTTTAATTCTGCTGTAACCCGTACATGCCCAAAATAGGGGGCGGGTTACA
CAGAATATATAACATCGTAGGTGTCTGGGTGAACAGTTTATTCCTGGCATCCACTAAATATAATGGAGCCCGCT
TTTTAAGCTGGCATCCAGAAAAAAAAAGAATCCCAGCACCAAAATATTGTTTTCTTCACCAACCATCAGTTCAT
AGGTCCATTCTCTTAGCGCAACTACAGAGAACAGGGGCACAAACAGGCAAAAAACGGGCACAACCTCAATGGAG
[0177] TGATGCAACCTGCCTGGAGTAAATGATGACACAAGGCAATTGACCCACGCATGTATCTATCTCATTTTCTTACA
CCTTCTATTACCTTCTGCTCTCTCTGATTTGGAAAAAGCTGAAAAAAAAAGGTTGAAACCAGTTCCCTGAAATTA
TTCCCCTACTTGACTAATAAGTATATAAAGACGGTAGGTATTGATTGTAATTCTGTAAATCTATTTCTTAAACT
TCTTAAATTCTACTTTTATAGTTAGTCTTTTTTTTAGTTTTAAAACACCAAGAACTTAGTTTCGAATAAACACA
CATAAACAAACAAA (SEQ ID NO: 14)

[0178] 示例性ENO2启动子是来自酿酒酵母的pENO2,其由SEQ ID NO:15叙述的核苷酸序列提供。

ATTGAATACATTAGCAACGCGTCCAGCATTTTTCGGAAGTGTCTCATAAACTTTACTCAAGAGTTAAGTACTGA
AAAATTCGACTTTTATGATAGTTCAAGTGTCGACGCTGCGGGTATAGAAAGGGTTCTTTACTCTATAGTGCCTC
CTCGCTCAGCATCTGCTTCTTCCCAAAGATGAACGCGGCGTTATGTCACTAACGACGTGCACCAACTTGCGGAA
AGTGGAATCCCGTTCCAAAACTGGCATCCACTAATTGATACATCTACACACCGCACGCCTTTTTTCTGAAGCCC
[0179] ACTTTCGTGGACTTTGCCATATGCAAAATTCATGAAGTGTGATACCAAGTCAGCATACACCTCACTAGGGTAGT
TTCTTTGGTTGTATTGATCATTTGGTTCATCGTGGTTCATTAATTTTTTTTCTCCATTGCTTTCTGGCTTTGAT
CTTACTATCATTTGGATTTTTGTCGAAGGTTGTAGAATTGTATGTGACAAGTGGCACCAAGCATATATAAAAAA
AAAAGCATTATCTTCCTACCAGAGTTGATTGTTAAAAACGTATTTATAGCAAACGCAATTGTAATTAATTCTTA
TTTTGTATCTTTTCTTCCCTTGTCTCAATCTTTTATTTTTATTTTATTCTTCTTTTCTTAGTTTCTTTCATAAC
ACCAAGCAACTAATACTATAACATACAATAATA (SEQ ID NO: 15)

[0180] 示例性HSP26启动子是来自酿酒酵母的pHSP26,其由SEQ ID NO:16叙述的核苷酸序列提供。

CAATATTCTGCGCACATCAATCATTTTCTTACTACATACACTAACATTACTCCTAGTTTAATTTAATTGAATTT
TTAACTTTCTTTTCTTTTCATTTGGCAATTTGGCTCCTTGAAAACAAGACTATGGGTCTgTCTCATAAGCCTCA
GGGGGGGACCCCAAAAAAATAACGCGGCCATCTTGCATGCACCGTTGAACCTGTAGCTTACAGTAAGCCACAAT
TCTCTTACCTTCTTGGCAATGTGGCACAAAATAATCTGGTTATGTGTCTTCATTTGGTAATCACTGGGATGTTA
CTGGGGCAGCAGCAACTCCGTGTGTACCCCTAACTCCGTGTGTACCCCTAAAGAACCTTGCCTGTCAAGGTGCA
[0181] TTGTTGGATCGGAATAGTAACCGTCTTTACATGAACATCCACAACCAACGAAAGTGCTTTTTCAAGCATTGCTT
GATTTCTAGAAAGATCGATGGTTATTCCCTCCCCCTTATGCGTCCAAAAATATAGGGTGCTCGTAACAGTAAGG
TATTCGCACTTAGCGTGCTCGCAACACAAAATTAAGTAATATGCGAGTTTTAGATGTCCTTGCGGATCTATGCA
CGTTCTTGAGTGGTATTTCATAACAACGGTTCTTTTTCACCCTTATTCCTAAACATATAAATAGGACCTCCATT
AGTTAGAGATCTGTTTTTAATCCATTCACCTTTCATTCTACTCTCTTATACTAATAAAACCACCGATAAAGATA
TATCAGATCTCTATTAAAACAGGTATCCAAAAAAGCAAACAAACAAACTAAACAAATTAA (SEQ ID NO: 16)

[0182] 示例性RPL18b启动子是来自酿酒酵母的pRPL18b,其由SEQ ID NO:19叙述的核苷酸序列提供。

AAGAGGATGTCCAATATTTTTTTTAAGGAATAAGGATACTTCAAGACTAGATTCCCCCCTGCATTCCCATCAGA
ACCGTAAACCTTGGCGCTTTCCTTGGGAAGTATTCAAGAAGTGCCTTGTCCGGTTTCTGTGGCTCACAAACCAG
[0183] CGCGCCCGATATGGCTTTCTTTTCACTTATGAATGTACCAGTACGGGACAATTAGAACGCTCCTGTAACAATCT
CTTTGCAAATGTGGGGTTACATTCTAACCATGTCACACTGCTGACGAAATTCAAAGTAAAAAAAAAATGGGACCA
CGTCTTGAGAACGATAGATTTTCTTTATTTTACATTGAACAGTCGTTGTCTCAGCGCGCTTTATGTTTTCATTC
ATACTTCATATTATAAAATAACAAAAGAAGAATTTCATATTCACGCCCAAGAAATCAGGCTGCTTTCCAAATGC
AATTGACACTTCATTAGCCATCACACAAAACTCTTTCTTGCTGGAGCTTCTTTTAAAAAAGACCTCAGTACACC
[0184] AAACACGTTACCCGACCTCGTTATTTTACGACAACTATGATAAAATTCTGAAGAAAAAATAAAAAAATTTTCAT
ACTTCTTGCTTTTATTTAAACCATTGAATGATTTCTTTTGAACAAAACTACCTGTTTCACCAAAGGAAATAGAA
AGAAAAAATCAATTAGAAGAAAACAAAAAACAAA (SEQ ID NO: 19)

[0185] 基因修饰酵母细胞

[0186] 本公开的方面涉及基因修饰酵母细胞(修饰细胞)以及此类修饰细胞在生产发酵产物(例如,发酵饮料)的方法和生产乙醇的方法中的用途。本文所述的基因修饰酵母细胞是用编码酶的异源基因(具有编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的异源基因、编码失调转录因子的基因和/或编码具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶的基因)进行基因修饰的。在一些实施方式中,本文所述的细胞是用编码具有醇-O-酰基转移酶活性的酶的异源基因进行基因修饰的。

[0187] 术语“基因修饰细胞”、“基因修饰酵母细胞”和“修饰细胞”在本文中可互换使用,是指通过引入异源基因已经是或可以目前是修饰的真核细胞(例如,酵母细胞)。术语(例如,修饰细胞)包括已通过引入异源基因被基因修饰的原始细胞的后代。本领域技术人员应当理解,由于突变(即修饰细胞的核酸的天然、偶然或有意改变),单个细胞的后代在形态或基因组或总核酸互补方面不一定与原始亲本完全相同。

[0188] 用于在本文所述的方法中使用的酵母细胞优选能够发酵糖源(例如,可发酵糖)并产生乙醇(乙基醇)和二氧化碳。在一些实施方式中,酵母细胞是酵母属的酵母细胞。酵母属包括近500个不同的种类,其中许多用于食品生产。酿酒酵母(S.cerevisiae)就是一个例子,它通常被称为“啤酒酵母”或“面包酵母”,并且用于生产葡萄酒、面包、啤酒等产品。酵母属的其他成员包括但不限于野生酵母奇异酵母(Saccharomyces paradoxus),其是酿酒酵母的近亲;贝酵母(Saccharomyces bayanus)、巴斯德酵母(Saccharomyces pastorianus)、卡氏酵母(Saccharomyces carlsbergensis)、葡萄汁酵母(Saccharomyces uvarum)、布拉迪酵母(Saccharomyces cerevisiae var boulardii)、真贝酵母(Saccharomyces

eubayanus)。在一些实施方式中,酵母是酿酒酵母(S.cerevisiae)。

[0189] 酵母种类可以是单倍体(即,具有单个染色体组)、二倍体(即,具有成对染色体组)或多倍体(即,携带或含有多于两个同源染色体组)。例如用于啤酒酿造的酵母种类通常分为两类:上部发酵的艾尔菌株(例如酿酒酵母)和底部发酵的较大菌株(例如巴斯德酵母、卡氏酵母、葡萄汁酵母)。这些特征反映了它们在开放式方形发酵罐中的分离特性,以及诸如优选的发酵温度和实现的醇浓度的通常其他特性。

[0190] 尽管啤酒酿造和葡萄酒生产传统上主要集中于使用酿酒酵母菌株,但其他酵母种类和属在发酵饮料的生产中也受到重视。在一些实施方式中,酵母细胞属于非酵母属。参见,例如,Crauwels等,Brewing Science(2015)68:110-121;Esteves等,Microorganisms(2019)7(11):478。在一些实施方式中,酵母细胞属于以下属:克勒克酵母属(Kloeckera)、念珠菌属(Candida)、斯塔莫属(Starmerella)、孢汉逊酵母属(Hanseniaspora)、克鲁维酵母菌属(Kluyveromyces)/拉茜斯属(Lachance)、梅奇酵母属(Metschnikowia)、类酵母属(Saccharomycodes)、接合酵母属(Zygosaccharomyce)、德克酵母属(Dekkera)(也称为酒香酵母属(Brettanomyces))、威克汉姆酵母属(Wickerhamomyces)或孢圆酵母属(Torulaspora)。非酿酒酵母的实例包括但不限于葡萄汁有孢汉逊酵母属(Hanseniaspora uvarum)、季也蒙有孢汉逊酵母属(Hanseniaspora guillermondii)、葡萄园有孢汉逊酵母属(Hanseniaspora vinae)、美极梅奇酵母属(Metschnikowia pulcherrima)、耐热克鲁维酵母菌属(Kluyveromyce)/拉茜斯属(Lachancea thermotolerans)、杆状斯塔莫属(Starmerella bacillaris)(先前称为星型念珠菌属(Candida stellata)/泽普林念珠菌属(Candida zemplinina))、路德类酵母属(Saccharomycodes ludwigii)、鲁氏接合酵母属(Zygosaccharomyces rouxii)、布鲁塞尔德克酵母属(Dekkera bruxellensis)、异型德克酵母属(Dekkera anomala)、库斯特酒香酵母属(Brettanomyces custersianus)、纳氏酒香酵母属(Brettanomyces naardenensis)、纳努斯酒香酵母属(Brettanomyces nanus)、异常威克汉姆酵母属(Wickerhamomyces anomalus)和德尔布有孢圆酵母属(Torulaspora delbrueckii)。

[0191] 在一些实施方式中,本文所述的方法涉及使用多于一种基因修饰酵母。例如,在一些实施方式中,所述方法可以涉及使用多于一种属于酵母属的基因修饰酵母。在一些实施方式中,所述方法可以涉及使用多于一种属于非酵母属的基因修饰酵母。在一些实施方式中,所述方法可以涉及使用多于一种属于酵母属的基因修饰酵母和一种属于非酵母属的基因修饰酵母。可替选地或另外地,本文所述的任何方法可涉及使用一种或多种基因修饰酵母和一种或多种非基因修饰(野生型)酵母。

[0192] 在一些实施方式中,酵母是杂合菌株。如将对本领域普通技术人员显而易见的,术语酵母的“杂合菌株”是指由两种不同的酵母菌株杂交产生的酵母菌株,例如,以实现一种或多种期望的特性。例如,杂合菌株可以由属于相同属或相同种的两种不同酵母菌株杂交产生。在一些实施方式中,杂合菌株由酿酒酵母菌株和真贝酵母菌株杂交产生。参见,例如,Krogerus等,Microbial Cell Factories(2017)16:66。

[0193] 在一些实施方式中,酵母菌株是野生酵母菌株,诸如从天然来源分离并随后繁殖的酵母菌株。可替选地,在一些实施方式中,酵母菌株是驯化酵母菌株。驯化酵母菌株已经经受人类选择和育种以具有期望的特性。

[0194] 在一些实施方式中,基因修饰酵母细胞可用于具有其他酵母或细菌菌株的共生基质中。例如,酵母细胞和细菌菌株的共生基质可用于发酵饮料(如康普茶、酸乳酒(kefir)和姜汁啤酒)的生产。例如,脆壁酵母(Saccharomyces fragilis)是酸乳酒培养物的一部分,并且在乳清中所含的乳糖上生长。其他可用于具有基因修饰酵母细胞的共生基质中的细菌菌株包括动物双歧杆菌乳亚种(Bifidobacterium animalis subsp.lactis)、短双歧杆菌(Bifidobacterium breve)、乳酸杆菌属(Lactobacillus)中的细菌和小球菌属(Pediococcus)中的细菌。

[0195] 尽管许多发酵饮料是使用酿酒酵母菌株生产的,但其他酵母属在发酵饮料的生产中得到了赞赏,并且可以用于具有修饰酵母细胞的共生基质中。在一些实施方式中,其他酵母细胞属于非酿酒酵母菌属。参见,例如,Crauwels等.Brewing Science(2015)68:110-121;Esteves等.Microorganisms(2019)7(11):478。在一些实施方式中,其他酵母细胞属于以下属:克勒克酵母属(Kloeckera)、念珠菌属(Candida)、斯塔莫属(Starmerella)、孢汉逊酵母属(Hanseniaspora)、克鲁维酵母菌属(Kluyveromyces)/拉茜斯属(Lachance)、梅奇酵母属(Metschnikowia)、类酵母属(Saccharomycodes)、接合酵母属(Zygosaccharomyce)、德克酵母属(Dekkera)(也称为酒香酵母属(Brettanomyces))、威克汉姆酵母属(Wickerhamomyces)或孢圆酵母属(Torulaspora)。非酿酒酵母的实例包括但不限于葡萄汁有孢汉逊酵母属(Hanseniaspora uvarum)、季也蒙有孢汉逊酵母属(Hanseniaspora guillermondii)、葡萄园有孢汉逊酵母属(Hanseniaspora vinae)、美极梅奇酵母属(Metschnikowia pulcherrima)、耐热克鲁维酵母菌属(Kluyveromyce)/拉茜斯属(Lachancea thermotolerans)、杆状斯塔莫属(Starmerella bacillaris)(先前称为星型念珠菌属(Candida stellata)/泽普林念珠菌属(Candida zemplinina))、路德类酵母属(Saccharomycodes ludwigii)、鲁氏接合酵母属(Zygosaccharomyces rouxii)、布鲁塞尔德克酵母属(Dekkera bruxellensis)、异型德克酵母属(Dekkera anomala)、库斯特酒香酵母属(Brettanomyces custersianus)、纳氏酒香酵母属(Brettanomyces naardenensis)、纳努斯酒香酵母属(Brettanomyces nanus)、异常威克汉姆酵母属(Wickerhamomyces anomalus)和德尔布有孢圆酵母属(Torulaspora delbrueckii)。

[0196] 对酵母细胞进行基因修饰的方法是本领域已知的。在一些实施方式中,酵母细胞是二倍体,并且本文所述的编码具有醇-O-酰基转移酶活性的酶的异源基因的一个拷贝被引入该酵母基因组。

[0197] 在一些实施方式中,酵母细胞是二倍体,并且本文所述的编码具有脂肪酸合成酶活性的酶的基因的一个拷贝被引入该酵母基因组的两个拷贝中。在一些实施方式中,编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因的拷贝是相同的。在一些实施方式中,编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因的拷贝不是相同的,但基因编码相同的具有脂肪酸羟化酶活性的酶。在一些实施方式中,编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因的拷贝不是相同的,并且编码具有脂肪酸合成酶活性的酶的基因是不同的(例如,突变体、变体、其片段)。在一些实施方式中,细胞含有编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因,称为内源基因,并且还含有编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的第二基因,该酶可以是与由内源基因编码的具有脂肪酸羟化酶活性的酶相同或不同的酶。

[0198] 在一些实施方式中,酵母细胞是二倍体,并且本文所述的编码转录因子(例如,失

调转录因子)的基因的一个拷贝被引入酵母基因组的两个拷贝中。在一些实施方式中,基因的拷贝是相同的。在一些实施方式中,基因的拷贝不是相同的,但基因编码相同的转录因子或具有相同或基本上相似活性的转录因子。在一些实施方式中,基因的拷贝不是相同的,并且基因编码的转录因子是不同的(例如,突变体、变体、其片段)。

[0199] 在一些实施方式中,酵母细胞是二倍体,并且本文所述的编码具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶的异源基因的一个拷贝被引入酵母基因组的两个拷贝中。在一些实施方式中,异源基因的拷贝是相同的。在一些实施方式中,异源基因的拷贝不是相同的,但基因编码相同的具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶。在一些实施方式中,异源基因的拷贝不是相同的,并且基因编码的具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶是不同的(例如,突变体、变体、其片段)。

[0200] 在一些实施方式中,酵母细胞是二倍体,并且本文所述的编码具有醇-O-酰基转移酶活性的酶的异源基因的一个拷贝被引入酵母基因组的两个拷贝中。在一些实施方式中,异源基因的拷贝是相同的。在一些实施方式中,异源基因的拷贝不是相同的,但基因编码相同的具有醇-O-酰基转移酶活性的酶。在一些实施方式中,异源基因的拷贝不是相同的,并且基因编码的具有醇-O-酰基转移酶活性的酶是不同的(例如,突变体、变体、其片段)。

[0201] 在一些实施方式中,酵母细胞是四倍体。四倍体酵母细胞是保持四个完整的染色体组(即,在四个拷贝中的完整的染色体组)的细胞。在一些实施方式中,酵母细胞是四倍体,并且本文所述的编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因的拷贝被引入基因组的至少一个拷贝中。在一些实施方式中,酵母细胞是四倍体,并且本文所述的编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因的拷贝被引入基因组的不止一个拷贝中。在一些实施方式中,酵母细胞是四倍体,并且本文所述的编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因的拷贝被引入基因组的所有四个拷贝中。在一些实施方式中,编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因的拷贝是相同的。在一些实施方式中,编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因的拷贝不是相同的,但该基因编码相同的具有脂肪酸羟化酶活性的酶。在一些实施方式中,编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因的拷贝不是相同的,并且基因编码的具有脂肪酸合成酶活性的酶是不同的(例如,突变体、变体、其片段)。在一些实施方式中,细胞含有编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因,该基因被称为内源基因,并且还含有一个或多个编码具有脂肪酸羟化酶活性的酶的基因的额外的拷贝,该酶可以是与由内源基因编码的具有脂肪酸羟化酶活性的酶相同或不同的酶。

[0202] 在一些实施方式中,酵母细胞是四倍体,并且本文所述的编码转录因子(例如,失调转录因子)的基因的拷贝被引入基因组的至少一个拷贝中。在一些实施方式中,酵母细胞是四倍体,并且本文所述的编码转录因子的基因的拷贝被引入基因组的不止一个拷贝中。在一些实施方式中,酵母细胞是四倍体,并且本文所述的编码转录因子的基因的拷贝被引入基因组的所有四个拷贝中。在一些实施方式中,基因的拷贝是相同的。在一些实施方式中,基因的拷贝不是相同的,但基因编码相同的转录因子或具有相同或基本相似活性的转录因子。在一些实施方式中,基因的拷贝不是相同的,并且基因编码的转录因子是不同的(例如,突变体、变体、其片段)。

[0203] 在一些实施方式中,酵母细胞是四倍体,并且本文所述的编码具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶的异源基因的拷贝被引入基因组的至少一个拷贝中。在一些实施方式中,酵

母细胞是四倍体,并且本文所述的编码具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶的异源基因的拷贝被引入基因组的不止一个拷贝中。在一些实施方式中,酵母细胞是四倍体,并且本文所述的编码具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶的异源基因的拷贝被引入基因组的所有四个拷贝中。在一些实施方式中,异源基因的拷贝是相同的。在一些实施方式中,异源基因的拷贝不是相同的,但基因编码相同的具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶。在一些实施方式中,异源基因的拷贝不是相同的,并且基因编码的具有酰基-CoA去饱和酶1活性的酶是不同的(例如,突变体、变体、其片段)。

[0204] 在一些实施方式中,酵母细胞是四倍体,并且本文所述的编码具有醇-O-酰基转移酶活性的酶的异源基因的拷贝被引入基因组的至少一个拷贝中。在一些实施方式中,酵母细胞是四倍体,并且本文所述的编码具有醇-O-酰基转移酶活性的酶的异源基因的拷贝被引入基因组的不止一个拷贝中。在一些实施方式中,酵母细胞是四倍体,并且本文所述的编码具有醇-O-酰基转移酶活性的酶的异源基因的拷贝被引入基因组的所有四个拷贝中。在一些实施方式中,异源基因的拷贝是相同的。在一些实施方式中,异源基因的拷贝不是相同的,但基因编码相同的具有醇-O-酰基转移酶活性的酶。在一些实施方式中,异源基因的拷贝不是相同的,并且基因编码的具有醇-O-酰基转移酶活性的酶是不同的(例如,突变体、变体、其片段)。

[0205] 在一些实施方式中,相对于不包含第一异源基因和第二外源基因的野生型酵母细胞,修饰细胞的生长速率是基本上不受损的。测量和比较两种细胞的生长速率的方法对于本领域普通技术人员来说是已知的。可以在两种类型的细胞之间测量和比较的生长速率的非限制性实例是复制速率、出芽率、每单位时间产生的集落形成单位(CFU)以及每单位时间培养基中减少的可发酵糖的量。如果所测量的生长速率是野生型细胞的生长速率的至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少99%、或至少100%,修饰细胞的生长速率相对于野生型细胞是“基本上不受损的”。

[0206] 可用于本文所述的方法的酵母细胞菌株是本领域普通技术人员所公知的,并且包括用于酿造期望发酵饮料的酵母菌株以及商业可得的酵母菌株。常见的啤酒菌株的实例包括但不限于美国艾尔菌株(American ale strain)、比利时艾尔菌株(Belgian ale strain)、不列颠艾尔菌株(British ale strain)、比利时拉比克/酸艾尔菌株(Belgian lambic/sour ale strain)、大麦酒/帝国世涛菌株(Barleywine/Imperial Stout strain)、印度淡艾尔菌株(India Pale Ale strain)、棕色艾尔菌株(Brown Ale strain)、科隆和阿尔特菌株(Kolsch and Altbier strain)、世涛和波特菌株(Stout and Porter strain)以及小麦啤酒菌株。

[0207] 用于与本文所述的基因修饰细胞和方法一起使用的菌株的非限制性实例包括怀伊斯特美国艾尔1056(Wyeast American Ale 1056)、怀伊斯特美国艾尔II 1272(Wyeast American Ale II 1272)、怀伊斯特丹尼最爱501450(Wyeast Denny's Favorite 50 1450)、怀伊斯特西北艾尔1332(Wyeast Northwest Ale 1332)、怀伊斯特灵伍德艾尔1187(Wyeast Ringwood Ale 1187)、西贝尔学院美国艾尔BRY 96(Siebel Inst.American Ale BRY 96)、怀特实验室美国艾尔酵母混合WLP060(White Labs American Ale Yeast Blend WLP060)、怀特实验室加利福尼亚艾尔V WLP051(White Labs California Ale V WLP051)、怀特实验室加利福尼亚艾尔WLP001(White Labs California Ale WLP001)、怀特实验室老

索诺玛县艾尔WLP076(White Labs Old Sonoma Ale WLP076)、怀特实验室太平洋艾尔WLP041(White Labs Pacific Ale WLP041)、怀特实验室东海岸艾尔WLP008(White Labs East Coast Ale WLP008)、怀特实验室东米德兰艾尔WLP039(White Labs East Midlands Ale WLP039)、怀特实验室圣地亚哥超级酵母WLP090(White Labs San Diego Super Yeast WLP090)、怀特实验室圣弗朗斯西克拉格WLP810(White Labs San Francisco Lager WLP810)、怀特实验室中性谷物WLP078(White Labs Neutral Grain WLP078)、拉勒曼德美国西海岸艾尔BRY-97(Lallemand American West Coast Ale BRY-97)、拉勒曼德CBC-1(Lallemand CBC-1)(二次发酵啤酒酵母(Cask and Bottle Conditioning))、Brewferm Top、库珀斯纯酿造商的酵母(Coopers Pure Brewers'Yeast)、弗曼蒂斯US-05(Fermentis US-05)、真正酿造商酵母Lucky#7(Real Brewers Yeast Lucky#7)、Muntons Premium Gold、Muntons标准酵母、东海岸酵母东北艾尔ECY29(East Coast Yeast Northeast Ale ECY29)、东海岸酵母老纽瓦克艾尔ECY10(East Coast Yeast Old Newark Ale ECY10)、东海岸酵母老纽瓦克啤酒ECY12(East Coast Yeast Old Newark Beer ECY12)、弗曼蒂斯Safale US-05(Fermentis Safale US-05)、弗曼蒂斯Safbrew T-58(Fermentis Safbrew T-58)、真正酿造商酵母The One、红树杰克美国西海岸酵母(Mangrove Jack US West Coast Yeast)、红树杰克重负荷啤酒酵母(Mangrove Jack Workhorse Beer Yeast)、拉勒曼德修道院比利时艾尔(Lallemand Abbaye Belgian Ale)、怀特实验室寺院IV WLP540(White Labs Abbey IV WLP540)、怀特实验室美国农舍混合WLP670(White Labs American Farmhouse Blend WLP670)、怀特实验室安特卫普艾尔WLP515(White Labs Antwerp Ale WLP515)、东海岸酵母比利时修道院ECY09(East Coast Yeast Belgian Abbaye ECY09)、怀特实验室比利时艾尔WLP550(White Labs Belgian Ale WLP550)、红树杰克比利时艾尔酵母(Mangrove Jack Belgian Ale Yeast)、怀伊斯特比利时深艾尔3822-PC(Wyeast Belgian Dark Ale 3822-PC)、怀伊斯特比利时赛尚3724(Wyeast Belgian Saison 3724)、怀特实验室比利时赛尚I WLP565(White Labs Belgian Saison I WLP565)、怀特实验室比利时赛尚II WLP566(White Labs Belgian Saison II WLP566)、怀特实验室比利时赛尚III WLP585(White Labs Belgian Saison III WLP585)、怀伊斯特比利时斯海尔德艾尔3655-PC(Wyeast Belgian Schelde Ale 3655-PC)、怀伊斯特比利时世涛1581-PC(Wyeast Belgian Stout 1581-PC)、怀特实验室比利时风格艾尔酵母混合WLP575(White Labs Belgian Style Ale Yeast Blend WLP575)、怀特实验室比利时风格赛尚艾尔混合WLP568(White Labs Belgian Style Saison Ale Blend WLP568)、东海岸酵母比利时白ECY11(East Coast Yeast Belgian White ECY11)、拉勒曼德BelleSaison(Lallemand Belle Saison)、怀伊斯特法式窖藏啤酒3725-PC(Wyeast Biere de Garde 3725-PC)、怀特实验室酒香酵母属布鲁塞尔Trois Vrai WLP648(White Labs Brettanomyces Bruxellensis Trois Vrai WLP648)、Brewferm Top、怀伊斯特加拿大/比利时艾尔3864-PC(Wyeast Canadian/Belgian Ale 3864-PC)、拉勒曼德CBC-1(Lallemand CBC-1)(二次发酵啤酒酵母)、怀伊斯特农舍艾尔3726-PC(Wyeast Farmhouse Ale 3726-PC)、东海岸酵母农舍布雷特ECY03(East Coast Yeast Farmhouse Brett ECY03)、怀伊斯特法兰德斯金艾尔3739-PC(Wyeast Flanders Golden Ale3739-PC)、怀特实验室佛兰芒艾尔混合WLP665(White Labs Flemish Ale Blend WLP665)、怀特实验室法国艾尔WLP072(White Labs French Ale

WLP072)、怀伊斯特法国赛尚3711(Wyeast French Saison 3711)、怀伊斯特勒芬淡艾尔3538-PC(Wyeast Leuven Pale Ale 3538-PC)、弗曼蒂斯Safbrew T-58(Fermentis Safbrew T-58)、东海岸酵母赛尚啤酒店混合ECY08(East Coast Yeast Saison Brasserie Blend ECY08)、东海岸酵母赛尚单-菌株ECY14(East Coast Yeast Saison Single-Strain ECY14)、真正酿造商酵母The Monk、西贝尔学院特拉比斯特艾尔BRY 204(Siebel Inst.Trappist Ale BRY 204)、东海岸酵母特拉比斯特艾尔ECY13(East Coast Yeast Trappist Ale ECY13)、怀特实验室特拉比斯特艾尔WLP500(White Labs Trappist Ale WLP500)、怀伊斯特特拉比斯特混合3789-PC(Wyeast Trappist Blend 3789-PC)、怀伊斯特不列颠艾尔1098(Wyeast British Ale 1098)、怀伊斯特不列颠艾尔II 1335(Wyeast British Ale II 1335)、怀伊斯特不列颠桶装艾尔1026-PC(Wyeast British Cask Ale 1026-PC)、怀伊斯特英式特殊苦啤1768-PC(Wyeast English Special Bitter 1768-PC)、怀伊斯特爱尔兰艾尔1084(Wyeast Irish Ale 1084)、怀伊斯特伦敦艾尔1028(Wyeast London Ale1028)、怀伊斯特伦敦艾尔III 1318(Wyeast London Ale III 1318)、怀伊斯特伦敦ESB艾尔1968(Wyeast London ESB Ale 1968)、怀伊斯特灵伍德艾尔1187(Wyeast Ringwood Ale 1187)、怀伊斯特泰晤士河谷艾尔1275(Wyeast Thames Valley Ale 1275)、怀伊斯特泰晤士河谷艾尔II 1882-PC(Wyeast Thames Valley Ale II 1882-PC)、怀伊斯特西约克郡艾尔1469(Wyeast West Yorkshire Ale 1469)、怀伊斯特惠特布雷德艾尔1099(Wyeast Whitbread Ale1099)、红树杰克不列颠艾尔酵母(Mangrove Jack British Ale Yeast)、红树杰克伯顿联盟酵母(Mangrove Jack Burton Union Yeast)、红树杰克重负荷啤酒酵母(Mangrove Jack Workhorse Beer Yeast)、东海岸酵母不列颠温和艾尔ECY18(East Coast Yeast British Mild Ale ECY18)、东海岸酵母东北艾尔ECY29(East Coast Yeast Northeast Ale ECY29)、东海岸酵母伯顿联盟ECY17(East Coast Yeast Burton Union ECY17)、东海岸酵母老纽瓦克艾尔ECY10(East Coast Yeast Old Newark Ale ECY10)、怀特实验室贝德福德不列颠艾尔WLP006(White Labs Bedford British Ale WLP006)、怀特实验室不列颠艾尔WLP005(White Labs British Ale WLP005)、怀特实验室波顿艾尔WLP023(White Labs Burton Ale WLP023)、怀特实验室东米德兰艾尔WLP039(White Labs East Midlands Ale WLP039)、怀特实验室英格兰艾尔混合WLP085(White Labs English Ale Blend WLP085)、怀特实验室英格兰艾尔WLP002(White Labs English Ale WLP002)、怀特实验室艾塞克斯艾尔酵母WLP022(White Labs Essex Ale Yeast WLP022)、怀特实验室爱尔兰艾尔WLP004(White Labs Irish Ale WLP004)、怀特实验室伦敦艾尔WLP013(White Labs London Ale WLP013)、怀特实验室曼彻斯特艾尔WLP038(White Labs Manchester Ale WLP038)、怀特实验室老索诺玛县艾尔WLP076(White Labs Old Sonoma Ale WLP076)、怀特实验室圣地亚哥超级酵母WLP090(White Labs San Diego Super Yeast WLP090)、怀特实验室惠特布雷德艾尔WLP017(White Labs Whitbread Ale WLP017)、怀特实验室北约克郡艾尔WLP037(White Labs North Yorkshire Ale WLP037)、库珀斯纯酿造公司的酵母(Coopers Pure Brewers'Yeast)、西贝尔学院英格兰艾尔BRY 264(Siebel Inst.English Ale BRY 264)、Muntons Premium Gold、Muntons标准酵母、拉勒曼德诺丁汉(Lallemand Nottingham)、弗曼蒂斯Safale S-04(Fermentis Safale S-04)、弗曼蒂斯Safbrew T-58(Fermentis Safbrew T-58)、拉勒曼德温莎(Lallemand

Windsor)(不列颠艾尔)、真正酿造商酵母Ye Olde英格兰(Real Brewers Yeast Ye Olde English)、Brewferm Top、怀特实验室美国威士忌WLP065(White Labs American Whiskey WLP065)、怀特实验室干英格兰艾尔WLP007(White Labs Dry English Ale WLP007)、怀特实验室爱丁堡艾尔WLP028(White Labs Edinburgh Ale WLP028)、弗曼蒂斯Safbrew S-33(Fermentis Safbrew S-33)、怀伊斯特苏格兰艾尔1728(Wyeast Scottish Ale 1728)、东海岸酵母苏格兰重ECY07(East Coast Yeast Scottish Heavy ECY07)、怀特实验室超高浓WLP099(White Labs Super High Gravity WLP099)、怀特实验室惠特布雷德艾尔WLP017(White Labs Whitbread Ale WLP017)、怀伊斯特比利时拉比克混合3278(Wyeast Belgian Lambic Blend3278)、怀伊斯特比利时斯海尔德艾尔3655-PC(Wyeast Belgian Schelde Ale3655-PC)、怀伊斯特柏林白啤混合3191-PC(Wyeast Berliner-Weisse Blend3191-PC)、怀伊斯特酒香酵母属布鲁塞尔5112(Wyeast Brettanomyces Bruxellensis 5112)、怀伊斯特酒香酵母属拉比克5526(Wyeast Brettanomyces Lambicus 5526)、怀伊斯特乳酸菌5335(Wyeast Lactobacillus 5335)、怀伊斯特啤酒片球菌5733(Wyeast Pediococcus Cerevisiae 5733)、怀伊斯特鲁瑟拉勒艾尔混合3763(Wyeast Roeselare Ale Blend 3763)、怀伊斯特特拉比斯特混合3789-Pc(Wyeast Trappist Blend 3789-Pc)、怀特实验室比利时酸混合Wlp655(White Labs Belgian Sour Mix Wlp655)、怀特实验室柏林白啤混合Wlp630(White Labs Berliner Weisse Blend Wlp630)、怀特实验室酵母“布鲁塞尔”Trois Wlp644(White Labs Saccharomyces“Bruxellensis”Trois Wlp644)、怀特实验室酒香酵母属布鲁塞尔Wlp650(White Labs Brettanomyces Bruxellensis Wlp650)、怀特实验室酒香酵母属克劳森Wlp645(White Labs Brettanomyces Claussenii Wlp645)、怀特实验室酒香酵母属拉比克Wlp653(White Labs Brettanomyces Lambicus Wlp653)、怀特实验室佛兰芒艾尔混合Wlp665(White Labs Flemish Ale Blend Wlp665)、东海岸酵母柏林混合Ecy06(East Coast Yeast Berliner Blend Ecy06)、东海岸酵母布雷特异型Ecy04(East Coast Yeast Brett Anomala Ecy04)、东海岸酵母布雷特Bruxelensis Ecy05(East Coast Yeast Brett Bruxelensis Ecy05)、东海岸酵母布雷特库斯特Ecy19(East Coast Yeast Brett Custersianus Ecy19)、东海岸酵母布雷特纳努斯Ecy16(East Coast Yeast Brett Nanus Ecy16)、菌株#2、东海岸酵母BugCounty ECY20(East Coast Yeast BugCounty ECY20)、东海岸酵母BugFarm ECY01(East Coast Yeast BugFarm ECY01)、东海岸酵母农舍布雷特ECY03(East Coast Yeast Farmhouse Brett ECY03)、东海岸酵母佛兰芒艾尔ECY02(East Coast Yeast Flemish Ale ECY02)、东海岸酵母Oud Brune ECY23(East Coast Yeast Oud Brune ECY23)、怀伊斯特美国艾尔1056(Wyeast American Ale 1056)、西贝尔学院美国艾尔BRY 96(Siebel Inst.American Ale BRY 96)、怀特实验室美国艾尔酵母混合WLP060(White Labs American Ale Yeast Blend WLP060)、怀特实验室波本酵母WLP070(White Labs Bourbon Yeast WLP070)、怀特实验室加利福尼亚艾尔V WLP051(White Labs California Ale V WLP051)、怀特实验室加利福尼亚艾尔WLP001(White Labs California Ale WLP001)、怀特实验室干英格兰艾尔WLP007(White Labs Dry English ale WLP007)、怀特实验室东海岸艾尔WLP008(White Labs East Coast Ale WLP008)、怀特实验室中性谷物WLP078(White Labs Neutral Grain WLP078)、怀特实验室超高浓WLP099(White Labs Super High Gravity WLP099)、怀特实验室田纳西州WLP050(White Labs Tennessee

WLP050)、弗曼蒂斯US-05(Fermentis US-05)、真正酿造商酵母Lucky#7(Real Brewers Yeast Lucky#7)、弗曼蒂斯Safbrew S-33(Fermentis Safbrew S-33)、东海岸酵母苏格兰重ECY07(East Coast Yeast Scottish Heavy ECY07)、拉勒曼德温莎(Lallemand Windsor)(不列颠艾尔)、怀伊斯特美国艾尔1056、怀伊斯特美国艾尔II 1272、怀伊斯特不列颠艾尔1098、怀伊斯特不列颠艾尔II 1335、怀伊斯特丹尼最爱50 1450、怀伊斯特伦敦艾尔1028、怀伊斯特伦敦艾尔III 1318、怀伊斯特伦敦ESB艾尔1968、怀伊斯特西北艾尔1332、怀伊斯特灵伍德艾尔1187、西贝尔学院美国艾尔BRY 96、怀特实验室美国艾尔酵母混合WLP060、怀特实验室贝德福德不列颠艾尔WLP006、怀特实验室不列颠艾尔WLP005、怀特实验室波顿艾尔WLP023、怀特实验室加利福尼亚艾尔V WLP051、怀特实验室加利福尼亚艾尔WLP001、怀特实验室东海岸艾尔WLP008、怀特实验室英格兰艾尔WLP002、怀特实验室伦敦艾尔WLP013、怀特实验室艾塞克斯艾尔酵母WLP022、怀特实验室太平洋艾尔WLP041、怀特实验室圣地亚哥超级酵母WLP090、怀特实验室惠特布雷德艾尔WLP017、Brewferm Top、红树杰克伯顿联盟酵母、红树杰克美国西海岸酵母、红树杰克Workhorse啤酒酵母、库珀斯纯酿造公司的酵母、弗曼蒂斯US-05、弗曼蒂斯Safale S-04、弗曼蒂斯Safbrew T-58、真正酿造商酵母Lucky#7、真正酿造商酵母The One、Muntons Premium金、Muntons标准酵母、东海岸酵母东北艾尔ECY29、拉勒曼德诺丁汉、拉勒曼德温莎(不列颠艾尔)、怀伊斯特美国艾尔1056、怀伊斯特美国艾尔II 1272、怀伊斯特不列颠艾尔1098、怀伊斯特不列颠艾尔II 1335、怀伊斯特泰晤士河谷艾尔1275、怀伊斯特泰晤士河谷艾尔II 1882-PC、怀伊斯特西约克郡艾尔1469、怀伊斯特惠特布雷德艾尔1099、怀伊斯特不列颠Cask艾尔1026-PC、怀伊斯特英式特殊苦啤1768-PC、怀伊斯特伦敦艾尔1028、怀伊斯特伦敦艾尔III 1318、怀伊斯特伦敦ESB艾尔1968、怀伊斯特西北艾尔1332、怀伊斯特灵伍德艾尔1187、怀特实验室美国艾尔酵母混合WLP060、怀特实验室不列颠艾尔WLP005、怀特实验室贝德福德不列颠艾尔WLP006、怀特实验室不列颠艾尔WLP005、怀特实验室波顿艾尔WLP023、怀特实验室加利福尼亚艾尔V WLP051、怀特实验室加利福尼亚艾尔WLP001、怀特实验室东海岸艾尔WLP008、怀特实验室英格兰艾尔WLP002、怀特实验室艾塞克斯艾尔酵母WLP022、怀特实验室法国艾尔WLP072、怀特实验室伦敦艾尔WLP013、怀特实验室太平洋艾尔WLP041、怀特实验室惠特布雷德艾尔WLP017、Brewferm Top、东海岸酵母不列颠温和艾尔ECY18、库珀斯纯酿造公司的酵母、Muntons Premium Gold、Muntons标准酵母、红树杰克纽卡斯尔深艾尔酵母(Mangrove Jack Newcastle Dark Ale Yeast)、拉勒曼德CBC-1(二次发酵啤酒酵母)、拉勒曼德诺丁汉、拉勒曼德温莎(不列颠艾尔)、弗曼蒂斯Safale S-04、弗曼蒂斯US-05、西贝尔学院美国艾尔BRY 96、怀伊斯特美国小麦1010(Wyeast American Wheat 1010)、怀伊斯特德国艾尔1007(Wyeast German Ale 1007)、怀伊斯特科隆2565(Wyeast Kölsch 2565)、怀伊斯特科隆II 2575-PC(Wyeast Kolsch II 2575-PC)、怀特实验室比利时拉格WLP815(White Labs Belgian Lager WLP815)、怀特实验室杜塞尔多夫老式WLP036(White Labs Dusseldorf Alt WLP036)、怀特实验室欧洲艾尔WLP011(White Labs European Ale WLP011)、怀特实验室德国艾尔/科隆WLP029(White Labs German Ale/Kölsch WLP029)、东海岸酵母科隆啤酒ECY21(East Coast Yeast Kölschbier ECY21,)、红树杰克重负荷啤酒酵母、西贝尔学院老式艾尔BRY 144(Siebel Inst.Alt Ale BRY 144)、怀伊斯特美国艾尔1056(Wyeast American Ale 1056)、怀伊斯特美国艾尔II 1272(Wyeast American Ale II 1272)、怀伊

斯特不列颠艾尔1098、怀伊斯特不列颠艾尔II 1335、怀伊斯特丹尼最爱50 1450、怀伊斯特英式特殊苦啤1768-PC、怀伊斯特爱尔兰艾尔1084、怀伊斯特伦敦艾尔1028、怀伊斯特伦敦艾尔III 1318、怀伊斯特伦敦ESB艾尔1968、怀伊斯特西北艾尔1332、怀伊斯特灵伍德艾尔1187、怀伊斯特泰晤士河谷艾尔1275、怀伊斯特泰晤士河谷艾尔II 1882-PC、怀伊斯特西约克郡艾尔1469、怀伊斯特惠特布雷德艾尔1099、怀特实验室美国艾尔酵母混合WLP060、怀特实验室贝德福德不列颠艾尔WLP006、怀特实验室不列颠艾尔WLP005、怀特实验室波顿艾尔WLP023、怀特实验室加利福尼亚艾尔V WLP051、怀特实验室加利福尼亚艾尔WLP001、怀特实验室东海岸艾尔WLP008、怀特实验室东米德兰艾尔WLP039、怀特实验室英格兰艾尔WLP002、怀特实验室艾塞克斯艾尔酵母WLP022、怀特实验室爱尔兰艾尔WLP004、怀特实验室伦敦艾尔WLP013、怀特实验室老索诺玛县艾尔WLP076、怀特实验室太平洋艾尔WLP041、怀特实验室惠特布雷德艾尔WLP017、库珀斯纯酿造商的酵母、弗曼蒂斯US-05、Muntons Premium Gold、Muntons标准酵母、弗曼蒂斯Safale S-04、拉勒曼德诺丁汉、拉勒曼德温莎(不列颠艾尔)、西贝尔学院美国艾尔BRY 96、怀特实验室美国小麦啤酒艾尔320(White Labs American Hefeweizen Ale 320)、怀特实验室巴伐利亚威森艾尔351(White Labs Bavarian Weizen Ale 351)、怀特实验室比利时威特艾尔400(White Labs Belgian Wit Ale 400)、怀特实验室比利时威特艾尔II 410(White Labs Belgian Wit Ale II 410)、怀特实验室小麦啤酒艾尔300(White Labs Hefeweizen Ale300)、怀特实验室小麦啤酒IV艾尔380(White Labs Hefeweizen IV Ale 380)、怀伊斯特美国小麦1010(Wyeast American Wheat 1010)、怀伊斯特巴伐利亚小麦3638(Wyeast Bavarian Wheat 3638)、怀伊斯特巴伐利亚小麦混合3056(Wyeast Bavarian Wheat Blend 3056)、怀伊斯特比利时阿登高地3522(Wyeast Belgian Ardennes 3522)、怀伊斯特比利时小麦3942(Wyeast Belgian Wheat 3942)、怀伊斯特比利时威特啤酒3944(Wyeast Belgian Witbier3944)、怀伊斯特加拿大/比利时艾尔3864-PC、怀伊斯特禁果酵母3463(Wyeast Forbidden Fruit Yeast 3463)、怀伊斯特德国小麦3333(Wyeast German Wheat 3333)、怀伊斯特魏亨斯蒂芬威森3068(Wyeast Weihenstephan Weizen 3068)、西贝尔学院巴伐利亚威森BRY 235(Siebel Institute Bavarian Weizen BRY 235)、弗曼蒂斯Safbrew WB-06(Fermentis Safbrew WB-06)、红树杰克巴伐利亚小麦(Mangrove Jack Bavarian Wheat)、拉勒曼德Munich(Lallemand Munich)(德国小麦啤酒)、Brewferm布兰奇(Brewferm Blanche)、Brewferm拉格(Brewferm Lager)、东海岸酵母比利时白ECY11。在一些实施方式中,酵母是酿酒酵母菌株WLP001。

[0208] 在一些实施方式中,与本文所述的基因修饰细胞和方法一起使用的酵母菌株是葡萄酒酵母菌株。与本文所述的基因修饰细胞和方法一起使用的酵母菌株的实例包括但不限于红星梦特拉谢(Red Star Montrachet)、EC-1118、Elegance、红星白丘、Epernay II、红星至尊酒窖(Red Star Premier Cuvee)、红星巴斯德红(Red Star Pasteur Red)、红星巴斯德香槟酒(Red Star Pasteur Champagne)、弗曼蒂斯BCS-103(Fermentis BCS-103)和弗曼蒂斯VR44(Fermentis VR44)。在一些实施方式中,酵母是酿酒酵母菌株Elegance。

[0209] 在一些实施方式中,酵母菌株不是解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica)。

[0210] 方法

[0211] 本公开的方面涉及使用本文所述的任何基因修饰的酵母细胞产生发酵产物的方法。还提供了使用本文所述的任何基因修饰的酵母细胞产生乙醇的方法。

[0212] 发酵过程利用微生物将碳水化合物转化为醇和二氧化碳的自然过程。它是通过酶作用在有机底物中产生化学变化的代谢过程。在食品生产的背景下,发酵广义上是指微生物的活性给食品产品或饮料带来期望变化的任何过程。发酵条件和发酵的进行在本文中被称为“发酵过程”。

[0213] 在一些方面,本公开涉及产生发酵产物诸如发酵饮料的方法,其涉及在第一发酵过程中使本文所述的任何修饰细胞与包括至少一种可发酵糖的培养基接触,以生产发酵产物。如本文所使用的,“培养基”是指有助于发酵的液体,意指不抑制或阻止发酵过程的液体。在一些实施方式中,培养基是水。

[0214] 还如本文所使用的,术语“可发酵糖”是指可以通过微生物(诸如本文所述的任何细胞)被转化为醇和二氧化碳的碳水化合物。在一些实施方式中,可发酵糖通过酶诸如重组酶或表达该酶的细胞转化为醇和二氧化碳。可发酵糖的实例包括但不限于葡萄糖、果糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖和麦芽三糖。

[0215] 在一些实施方式中,可发酵糖以糖源提供。用于所要求保护的方法中的糖源可以取决于例如发酵产物和可发酵糖的类型。糖源的实例包括但不限于麦芽汁、谷物/谷类、果汁(例如葡萄汁和苹果汁/苹果酒)、蜂蜜、蔗糖、稻和曲(koji)。可获得果汁的水果的实例包括但不限于葡萄、苹果、蓝莓、黑莓、树莓、醋栗果、草莓、樱桃、梨、桃子、油桃、橙子、菠萝、芒果、和百香果。

[0216] 本公开的方面涉及修饰细胞,其能够产生对于人体受试者而言在特定培养基中的气味阈值以上的γ-癸内酯水平。如本领域的普通技术人员应当理解的,γ-癸内酯的气味阈值可随着培养基而改变,例如,葡萄酒或啤酒与水相比。例如,对人体受试者而言,葡萄酒中γ-癸内酯的气味阈值为约35μg/L。在一些实施方式中,修饰细胞能够产生至少35μg/L的γ-癸内酯水平。如本文所述,使用本文所述的修饰细胞的发酵是在一种或多种可发酵糖存在的情况下进行的。在一些实施方式中,使用本文所述的修饰细胞的发酵是在γ-癸内酯生物合成途径的中间分子缺乏的情况下进行的。在一些实施方式中,使用本文所述的修饰细胞的发酵是在γ-癸内酯生物合成途径的脂肪酸中间体缺乏的情况下进行的。在一些实施方式中,使用本文所述的修饰细胞的发酵是在培养基中缺乏油酸或蓖麻油酸的情况下进行的。

[0217] 在一些实施方式中,包括可发酵糖的培养基是预氧化的。如对本领域的普通技术人员显而易见的,预氧化是将氧气引入到培养基中,以增加微生物在培养中的可用氧的过程。在一些实施方式中,培养基在接种酵母之前进行预氧化。接种到预氧化培养基中的微生物迅速消耗可用氧,并能够增加发酵产物的产生。

[0218] 在一些实施方式中,本文所述的修饰细胞是在厌氧或半厌氧环境中培养的。厌氧细胞培养指的是在没有可用氧气的环境中培养微生物(如修饰酵母细胞)的技术。半厌氧细胞培养指的是在有限的氧可用性的环境中(如在已被预氧化的培养基中)培养微生物(如修饰酵母细胞)的技术。在一些实施方式中,本文所述的修饰细胞不在厌氧环境中培养。

[0219] 在一些实施方式中,本文所述的修饰细胞是在有氧环境中培养的。在一些实施方式中,本文所述的修饰细胞在有氧环境中培养一段时间,使得氧可用性在时间上受到限制。在一些实施方式中,本文所述的修饰细胞在有氧环境中培养一部分发酵过程。在一些实施方式中,本文所述的修饰细胞在有氧环境中培养至少30分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5

小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、36小时、48小时或更长时间。在一些实施方式中,本文所述的修饰细胞在有氧环境中培养一部分发酵过程,然后在厌氧环境中培养一部分发酵过程。

[0220] 在一些实施方式中,本文所述的修饰细胞在有氧环境中培养一部分发酵过程,然后在厌氧环境中培养一部分发酵过程。

[0221] 如将对本领域普通技术人员显而易见的是,在一些情况下,可能需要加工糖源以获得用于发酵的可发酵糖。以啤酒生产作为示例发酵饮料,谷物(谷类、大麦)被煮沸或浸泡在水中,使谷物水合并激活麦芽酶,将淀粉转化为可发酵糖,称为“糖化”。如本文所使用的,术语“麦芽汁”是指糖化过程中产生的液体,其含有可发酵糖。然后将麦芽汁暴露于发酵生物体(例如,本文所述的任何细胞),其允许发酵生物体的酶将麦芽汁中的糖转化为醇和二氧化碳。

[0222] 在一些实施方式中,谷物是发芽的、未发芽的、或包括发芽和未发芽的谷物的组合。用于本文所述的方法的谷物的实例包括但不限于大麦、燕麦、玉米、稻、黑麦、高粱、小麦、乌麦(karasumugi)和鸠麦(hatomugi)。

[0223] 在生产清酒的实例中,糖源是稻,将稻与曲霉(米曲霉(Aspergillus oryzae))一起孵育,将稻淀粉转化为可发酵糖,从而产生曲。然后将曲暴露于发酵生物体(例如,本文所述的任何细胞),其允许发酵生物体的酶将曲中的糖转化为醇和二氧化碳。

[0224] 在生产葡萄酒的实例中,收获葡萄、捣碎(例如压碎)成含有果皮、固体、果汁和种子的组合物。所得组合被称为“未发酵或半发酵果浆”。葡萄汁可以与未发酵或半发酵果浆分离并发酵,或者可以发酵全部未发酵或半发酵果浆(即,具有果皮、种子、固体)。然后将葡萄汁或未发酵或半发酵果浆暴露于发酵生物体(例如,本文所述的任何细胞),其允许发酵生物体的酶将葡萄汁或未发酵或半发酵果浆中的糖转化为醇和二氧化碳。

[0225] 在一些实施方式中,本文所述的方法涉及产生培养基,其可涉及加热或浸泡糖源,例如在水中。在一些实施方式中,水具有至少50摄氏度(50℃)的温度并与糖源一起孵育一段时间。在一些实施方式中,水具有至少75℃的温度并与糖源一起孵育一段时间。在一些实施方式中,水具有至少100℃的温度并与糖源一起孵育一段时间。优选地,在添加本文所述的任何细胞之前冷却培养基。

[0226] 在一些实施方式中,本文描述的方法还包括在发酵过程期间将至少一种(例如,1、2、3、4、5或更多种)酒花品种添加至例如培养基、麦芽汁中。酒花是酒花植物(酒花(Humulus lupulus))的花,经常用于发酵,为发酵产物赋予各种风味和香气。除了花香、果香和/或柑橘风味和香气之外,酒花还被认为赋予苦味,并且可以根据预期目的来表征。例如,苦味酒花由于酒花中存在α酸而给发酵产物带来一定程度的苦味,而芳香酒花具有较低的α酸含量并为发酵产物提供所需的香气和风味。

[0227] 是否将一种或多种酒花添加到培养基和/或麦芽汁中以及添加酒花的阶段可以基于各种因素,诸如酒花的预期目的。例如,典型地在麦芽汁的制备期间,例如在煮沸麦芽汁期间,添加旨在赋予发酵产物苦味的酒花。在一些实施方式中,将旨在赋予发酵产物苦味的酒花添加到麦芽汁中并与麦芽汁一起煮沸一段时间,例如约15-60分钟。而旨在赋予发酵产物期望香气的酒花通常晚于用于苦味的酒花添加。在一些实施方式中,在煮沸结束时或在

麦芽汁煮沸之后添加旨在赋予发酵产物期望香气的酒花(即“干式添加酒花”)。在一些实施方式中,可以在方法期间多次(例如,至少两次、至少三次或更多次)添加一种或多种酒花。

[0228] 在一些实施方式中,酒花以湿酒花或干酒花的形式添加并且可任选地与麦芽汁一起煮沸。在一些实施方式中,酒花是干酒花小球的形式。在一些实施方式中,将至少一种酒花添加到培养基中。在一些实施方式中,酒花是湿的(即,未干燥的)。在一些实施方式中,酒花被干燥,并且任选地可以在使用前进一步加工。在一些实施方式中,在发酵过程之前将酒花添加到麦芽汁中。在一些实施方式中,将酒花在麦芽汁中煮沸。在一些实施方式中,将酒花与麦芽汁一起煮沸,并且然后与麦芽汁一起冷却。

[0229] 许多品种的酒花是本领域已知的,并且可以用于本文所述的方法中。酒花品种的实例包括但不限于阿塔纳姆(Ahtanum)、亚麻黄(Amarillo)、阿波龙(Apollo)、卡斯卡特(Cascade)、世纪(Centennial)、奇努克(Chinook)、西楚(Citra)、克拉斯特(Cluster)、哥伦布(Columbus)、水晶(Crystal/Chrystal)、尤里卡(Eroica)、格里纳(Galena)、冰川(Glacier)、格林堡(Greenburg)、地平线(Horizon)、自由(Liberty)、千禧(Millennium)、摩西(Mosaic)、蒙特伍德(Mount Hood)、雷尼尔山(Mount Rainier)、纽波特(Newport)、努格特(Nugget)、芭乐西(Palisade)、桑蒂亚姆(Santiam)、西姆科(Simcoe)、斯特林(Sterling)、萨米特(Summit)、战斧(Tomahawk)、激进者(Ultra)、前锋(Vanguard)、勇士(Warrior)、威廉麦特(Willamette)、宙斯(Zeus)、海军上将(Admiral)、酿造金(Brewer's Gold)、金条(Bullion)、挑战者(Challenger)、首金(First Gold)、法格尔斯(Fuggles)、戈尔丁(Goldings)、先锋(Herald)、北唐(Northdown)、北酿(Northern Brewer)、菲尼克斯(Phoenix)、飞行员(Pilot)、开拓者(Pioneer)、进步(Progress)、塔吉特(Target)、惠特布雷德戈尔丁品种(Whitbread Golding Variety)(WGV)、哈拉道(Hallertau)、赫斯布鲁克(Hersbrucker)、萨兹(Saaz)、泰特南(Tettnang)、斯伯特(Spalt)、福柯考尔(Feux-Coeur Francais)、银河(Galaxy)、绿色子弹(Green Bullet)、莫图伊卡(Motueka)、尼尔森苏维(Nelson Sauvin)、太平洋宝石(Pacific Gem)、太平洋翡翠(Pacific Jade)、帕西菲卡(Pacifica)、灵伍德荣耀(Pride of Ringwood)、里瓦卡(Riwaka)、南方十字(Southern Cross)、卢布林(Lublin)、马格努门(Magnum)、佩勒(Perle)、波兰式卢布林(Polnischer Lublin)、索菲亚(Saphir)、萨图斯(Satus)、精选(Select)、斯迪赛尔斯伯特(Strisselspalt)、施蒂里亚戈尔丁(Styrian Goldings)、塔迪夫勃艮第(Tardif de Bourgogne)、传统(Tradition)、喝彩(Bravo)、卡里普索(Calypso)、奇兰(Chelan)、彗星(Comet)、埃尔德拉多(El Dorado)、圣胡安宝石红(San Juan Ruby Red)、萨图斯(Satus)、索奈特戈尔丁(Sonnet Golding)、超级格里纳(Super Galena)、蒂利克姆(Tillicum)、十字燕雀(Bramling Cross)、朝圣者(Pilgrim)、哈拉道大力神(Hallertauer Herkules)、哈拉道马格努门(Hallertauer Magnum)、哈拉道陶瑞思(Hallertauer Taurus)、默克(Merkur)、蛋白石(Opal)、祖母绿(Smaragd)、哈拉道欧罗拉(Halleratau Aroma)、库哈图(Kohatu)、拉考(Rakau)、斯特拉(Stella)、斯蒂克布莱克(Sticklebract)、夏日萨兹(Summer Saaz)、超级α(Super Alpha)、超级荣耀(Super Pride)、黄玉(Topaz)、威伊特(Wai-iti)、博尔(Bor)、约格(Junga)、玛琳卡(Marynka)、普莱米特(Premiant)、斯拉德克(Sladek)、施蒂里亚阿特拉斯(Styrian Atlas)、施蒂里亚欧若拉(Styrian Aurora)、施蒂里亚布贝克(Styrian Bobek)、施蒂里亚西里亚(Styrian Celeia)、西比拉空知王牌(Sybilla Sorachi Ace)、哈

拉道MF(Hallertauer Mittelfrueh)、哈拉道传统(Hallertauer Tradition)、泰特南(Tettnanger)、宋体(Tahoma)、三珍珠(Triple Pearl)、雅基玛金(Yakima Gold)和密歇根铜(Michigan Copper)。

[0230] 在一些实施方式中,包括至少一种可发酵糖的至少一种糖源的发酵过程可以进行约1天至约31天。在一些实施方式中,发酵过程进行约1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天或更长时间。在一些实施方式中,一种或多种可发酵糖的发酵过程可以是在约4℃至约30℃的温度下进行。在一些实施方式中,一种或多种可发酵糖的发酵过程可以在约8℃至约14℃或约18℃至约24℃的温度下进行。在一些实施方式中,一种或多种可发酵糖的发酵过程可以在约4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、11℃、12℃、13℃、14℃、15℃、16℃、17℃、18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃或30℃的温度下进行。

[0231] 在一些实施方式中,发酵导致培养基中存在的可发酵糖的量减少。在一些实施方式中,可发酵糖的量的减少发生在发酵开始的1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28天、29天、30天、31天或更长时间内。在一些实施方式中,可发酵糖的量减少至少5%、至少10%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%、至少99.9%或100%。在一些实施方式中,相对于野生型酵母细胞在相同时间量内发酵的可发酵糖的量,修饰细胞或细胞发酵相当量或更大量的可发酵糖。

[0232] 本文描述的方法可以涉及至少一种附加发酵过程。此类另外的发酵方法可称为二次发酵过程(也称为“陈化(aging)”或“熟化(maturing)”)。如本领域普通技术人员将理解的,二次发酵通常涉及将发酵饮料转移至第二容器(例如,玻璃大瓶、桶),其中将发酵饮料孵育一段时间。在一些实施方式中,二次发酵进行10分钟至12个月之间的一段时间。在一些实施方式中,二次发酵进行10分钟、20分钟、40分钟、40分钟、50分钟、60分钟(1小时)、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、13小时、14小时、15小时、16小时、17小时、18小时、19小时、20小时、21小时、22小时、23小时、24小时、1天、2天、3天、4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周、12周、13周、14周、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月或更长时间。在一些实施方式中,一种或多种可发酵糖的附加或二次发酵过程可以在约4℃至约30℃的温度下进行。在一些实施方式中,一种或多种可发酵糖的附加或二次发酵过程可以在约8℃至约14℃或约18℃至约24℃的温度下进行。在一些实施方式中,一种或多种可发酵糖的附加或二次发酵过程可以在约4℃、5℃、6℃、7℃、8℃、9℃、10℃、11℃、12℃、13℃、14℃、15℃、16℃、17℃、18℃、19℃、20℃、21℃、22℃、23℃、24℃、25℃、26℃、27℃、28℃、29℃或30℃的温度下进行。

[0236] 如对本领域普通技术人员将显而易见,附加或二次发酵过程的时间段和温度的选择将取决于诸如啤酒类型、期望的啤酒的特性以及方法中使用的酵母菌株等因素。

[0237] 在一些实施方式中,可以在发酵过程之前或之后将一种或多种另外的风味组分添

加到培养基中。实例包括酒花油、酒花芳香剂、酒花提取物、酒花苦味剂和异构酒花提取物。

[0238] 来自发酵过程的产物可在发酵过程期间或从发酵产物中挥发和消散。例如,使用本文所述的细胞的发酵期间产生的γ-癸内酯可挥发,导致发酵产物中γ-癸内酯的水平降低。在一些实施方式中,挥发的γ-癸内酯被捕获并在发酵过程后重新引入。

[0239] 发酵后可发生各种精制、过滤和陈化过程,然后将液体装瓶(例如,捕获并密封在容器中用于分发、储存或消费)。本文所述的任何方法还可涉及对发酵产物进行蒸馏、巴氏灭菌和/或碳酸化。在一些实施方式中,方法涉及对发酵产物进行碳酸化。对发酵饮料进行碳酸化的方法是本领域已知的,并且包括例如用气体(例如二氧化碳、氮气)强制碳酸化、通过向发酵饮料中添加另外的糖源的自然碳酸化以促进进一步发酵和二氧化碳的产生(例如,瓶内发酵(Bottle Conditioning))。

[0240] 在一些实施方式中,该方法包含将由本文所述的任何修饰细胞产生的发酵产物与发酵产物(例如,使用未经修饰以表达本文所述的任何酶的细胞产生的发酵产物)混合。在一些实施方式中,本文所述的修饰细胞用于产生包括增加水平的γ-癸内酯的产物,该产物随后与使用未经本文所述的修饰的细胞产生的发酵产物混合,例如,以增加γ-癸内酯水平。

[0241] 发酵产物

[0242] 本公开的方面涉及通过本文公开的任何方法产生的发酵产物。在一些实施方式中,发酵产物是发酵饮料。发酵饮料的实例包括但不限于啤酒、葡萄酒、清酒、蜂蜜酒、苹果酒、卡瓦酒、汽酒(香槟酒)、康普茶、姜汁啤酒、水酸乳酒。在一些实施方式中,饮料是啤酒。在一些实施方式中,饮料是葡萄酒。在一些实施方式中,饮料是汽酒。在一些实施方式中,饮料是香槟酒。在一些实施方式中,饮料是清酒。在一些实施方式中,饮料是蜂蜜酒。在一些实施方式中,饮料是苹果酒。在一些实施方式中,饮料是硬苏打水。在一些实施方式中,饮料是葡萄酒酷乐。

[0243] 在一些实施方式中,发酵产物是发酵食品。发酵食品的实例包括但不限于培养酸奶、天贝(tempeh)、味噌、泡菜、酸菜(sauerkraut)、发酵香肠、面包和酱油。

[0244] 根据本发明的方面,通过在酵母细胞中重组表达与本发明相关的基因并在本文所述的方法中使用该细胞,产生增加的γ-癸内酯的滴度。如本文使用的,“增加的滴度”或“高滴度”指的是按微克每升(μg L-1)标度的滴度。给定产物产生的滴度将受多种因素(包括培养基的选择和发酵的条件)影响。

[0245] 在一些实施方式中,γ-癸内酯的滴度为至少1μg L^{-1},例如至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、200、210、220、230、240、250、260、270、280、290、300、310、320、330、340、350、360、370、380、390、400、410、420、430、440、450、460、470、480、490、500、510、520、530、540、550、560、570、580、590、600、610、620、630、640、650、660、670、680、690、700、710、720、730、740、750、760、770、780、790、800、810、820、830、840、850、860、870、880、890、900、910、920、930、940、950、960、970、980、990、1000μg L^{-1}或更多。在一些实施方式中、γ-癸内酯的滴度为至少1.05、1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10 g L^{-1}或更

多。

[0246] 在一些实施方式中，γ-癸内酯的滴度对人体受试者是可检测的，例如在人体受试者的气味阈值以上。在一些实施方式中，γ-癸内酯的滴度为至少约35μg L^{-1}，这通常被认为是人体受试者对葡萄酒中γ-癸内酯的气味阈值。

[0247] 本公开的方面涉及在产物的发酵期间减少不期望产物(例如，副产物、异味)的产生，如乙酸乙酯。在一些实施方式中，相对于使用野生型酵母细胞或不表达酶的酵母细胞产生的不期望产物(如乙酸乙酯)，在本文所述的基因修饰细胞中表达本文所述的任何酶(如脂肪酸羟化酶、酰基-CoA去饱和酶1和/或醇-O-酰基转移酶)导致不期望产物的产生减少约5％、10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或更多。

[0248] 如本文所述，乙酸乙酯的产生可赋予发酵产物类似溶剂的香气。在一些实施方式中，乙酸乙酯的滴度小于1000mg L^{-1}，例如小于1000、950、900、850、800、750、700、650、600、550、500、450、400、350、300、250、200、150、100、95、90、85、80、75、70、65、60、55、50、45、40、35、30、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1、0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1mg L^{-1}或更低。在一些实施方式中，乙酸乙酯的滴度低于人体检测极限。

[0249] 测量γ-癸内酯和/或乙酸乙酯的滴度/水平的方法对本领域的普通技术人员将是显而易见的。在一些实施方式中，γ-癸内酯和/或乙酸乙酯的滴度/水平是使用气相色谱质谱法(GC/MS)测量的。在一些实施方式中，γ-癸内酯和/或乙酸乙酯的滴度/水平是使用感官评定小组(sensory panels)(例如包括味觉测试人员)进行评估的。

[0250] 在一些实施方式中，发酵饮料含有按体积计(也称为“ABV”、“abv”或“alc/vol”)0.1％和30％之间的醇。在一些实施方式中，发酵饮料含有按体积计约0.1％、0.2％、0.3％、0.4％、0.5％、0.6％、0.07％、0.8％、0.9％、1.0％、1.1％、1.2％、1.3％、1.4％、1.5％、1.6％、1.7％、1.8％、1.9％、2％、3％、4％、5％、6％、7％、8％、9％、10％、11％、12％、13％、14％、15％、16％、17％、18％、19％、20％、21％、22％、23％、24％、25％、26％、27％、28％、29％、30％或更高的醇。在一些实施方式中，发酵饮料是不含醇的(例如，具有按体积计低于0.5％的醇)。

[0251] 试剂盒

[0252] 本公开的方面还提供了使用基因修饰酵母细胞的试剂盒，例如用于生产发酵饮料、发酵产物或乙醇。在一些实施方式中，该试剂盒含有修饰细胞，该修饰细胞含有编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因。

[0253] 在一些实施方式中，修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因和编码失调转录因子(例如，ADR1)的基因。在一些实施方式中，修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因、编码失调转录因子(例如，ADR1)的基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。在一些实施方式中，修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因和编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因。在一些实施方式中，修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因、编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因和编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因。在一些实施方式中，修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因、编码失调转录因子(例如，ADR1)的基因、

编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因和编码具有醇-O-乙酰转移酶(AAT)活性的酶的异源基因。在一些实施方式中,修饰酵母细胞表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因和编码具有醇-O-酰基转移酶(AAT)活性的酶的异源基因。

[0254] 在一些实施方式中,试剂盒含有修饰酵母细胞,其表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因和失调转录因子(如ADR(例如,ADR S230A))。在一些实施方式中,试剂盒含有修饰酵母细胞,其表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因、编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因和编码失调转录因子(如ADR(例如,ADR S230A))的基因。在一些实施方式中,试剂盒含有修饰酵母细胞,其表达编码具有脂肪酸羟化酶(FAH)活性的酶的异源基因、编码具有酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)活性的酶的基因、编码具有醇-O-乙酰转移酶(AAT)活性的酶的异源基因和编码失调转录因子(如ADR(例如,ADR S230A))的基因。

[0255] 在一些实施方式中,试剂盒用于产生发酵饮料。在一些实施方式中,试剂盒用于产生啤酒。在一些实施方式中,试剂盒用于产生葡萄酒。在一些实施方式中,试剂盒用于生产清酒。在一些实施方式中,试剂盒用于产生蜂蜜酒。在一些实施方式中,试剂盒用于产生苹果酒。

[0256] 试剂盒还可以包含用于本文所述的任何方法或用于本文所述的任何细胞的其他组分。例如,在一些实施方式中,试剂盒可包含谷物、水、麦芽汁、未发酵或半发酵果浆、酵母、酒花、汁或其他糖源。在一些实施方式中,试剂盒可含有一种或多种可发酵糖。在一些实施方式中,试剂盒可含有一种或多种另外的剂、成分或组分。

[0257] 用于执行本文所述的方法的说明书也可包含在本文描述的试剂盒中。

[0258] 试剂盒可被设计成指示含有本文所述的任何修饰细胞的单次使用的组合物。例如,单次使用的组合物(例如,待使用的量)可以是包装的组合物(例如,修饰细胞),诸如包装的(即,包含在包装中的)粉末、小瓶、安瓿、培养管、片剂、囊片、胶囊或含有液体的小袋。

[0259] 组合物(例如,修饰细胞)可以以干燥、冻干、冷冻或液体形式提供。在一些实施方式中,修饰细胞以在琼脂培养基上作为菌落提供。在一些实施方式中,修饰细胞以可直接投入到培养基中的起子培养物的形式提供。当试剂或组分以干燥形式提供时,通常通过添加溶剂(诸如培养基)来重构。溶剂可以以其它包装方式提供并且可以由本领域技术人员来选择。

[0260] 用于分配组合物(例如,修饰细胞)的许多包装或试剂盒是本领域技术人员已知的。在某些实施方式中,包装是带标签的泡罩包装、刻度盘分配器包装(dial dispenser package)、管、包、鼓状物或瓶。

[0261] 本文所述的任何试剂盒还可包含用于执行本文所述的方法的一个或多个容器,诸如大瓶或桶。

[0262] 一般技术

[0263] 除非另有说明,本公开的主题的实践将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规技术,其在本领域的技术范围内。此类技术在以下文献中被充分解释,诸如但不限于:Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook等编辑,第四版,纽约冷泉港冷泉港实验室出版社,2012;Oligonucleotide Synthesis(M.J.Gait编辑,1984);Methods in Molecular Biology,胡马纳出版社;Cell

Biology:ALaboratory Notebook(J.E.Cellis编辑,1998)学术出版社;Animal Cell Culture(R.I.Freshney编辑,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)普莱南出版社;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell编辑,1993-8)J.Wiley和Sons;Methods in Enzymology(学术出版社公司);Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编辑,1987);Current Protocols in Molecular Biology(F.M.Ausubel等编辑,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等编辑,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley和Sons,1999)。

[0264] 等同物和范围

[0265] 应当理解,本公开不限于本文明确描述的任何或所有特定实施方式,并且因此当然可以变化。还应当理解,本文所使用的术语仅是为了描述特定实施方式的目的,并且不旨在是限制性的。

[0266] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。尽管与本文所述的那些类似或等同的任何方法和材料也可以用于本公开的实践或测试,但是现在描述优选的方法和材料。

[0267] 本公开中引用的所有出版物和专利均被引用以公开和描述与所引用的出版物相关的方法和/或材料。所有此类出版物和专利均通过引用并入本文,如同每个单独的出版物或专利被具体且单独地指明以通过参考并入一样。这种通过参考的并入明确限于所引用的出版物和专利中描述的方法和/或材料,并且不扩展到所引用的出版物和专利中的任何词典编纂定义(即,所引用的出版物和专利中的未在本公开中明确重复的任何词典编纂定义术语不应被如此对待并且不应被解读为定义所附权利要求中出现的任何术语。如果任何并入的参考文献与本公开之间存在冲突,则以本公开为准。另外,落入现有技术内的本公开的任何特定实施方式可以被明确地从任何一项或多项根据权利要求中排除。因为这样的实施方式被认为是本领域普通技术人员已知的,所以即使本文没有明确阐述排除,它们也可以被排除。本公开的任何特定实施方式可以出于任何原因从任何权利要求排除,无论是否与现有技术的存在相关。

[0268] 任何出版物的引用是用于在申请日之前的其公开内容,并且不应被解释为承认本公开无权凭借在先公开而早于此类出版物。此外,所提供的公开日期可以与可需要独立确认的实际公开日期不同。

[0269] 如本领域技术人员在阅读本公开后将显而易见的是,本文描述和阐述的各个实施方式的每一个都具有分立的组分和特征,其可以容易地与其他若干实施方式中的任何一个的特征分离或组合,而不脱离本公开的范围或精神。任何所叙述的方法可以按照所叙述的事件的顺序或者以逻辑上可能的任何其他顺序来进行。

[0270] 在权利要求书中,诸如“一/一个/一种(a)”、“一/一个/一种(an)”和“该/这个/所述(the)”等的冠词可以指一个/一种或多于一个/多于一种,除非有相反指示或从上下文中是明显的。无论本文中何处使用,性别代词(例如,男性、女性、中性、其他等)应被解释为性别中性(即,解释为平等地指代所有性别),无论所暗示的性别如何,除非上下文明确指出或

另有要求。无论本文何处使用,以单数使用的词语包括复数,并且以复数使用的词语包括单数,除非上下文明确指出或另有要求。如果组成员的一个、多于一个或所有存在于给定产物或过程、被采用于给定产物或过程、或以其他方式与给定产物或过程相关,则在组的一个或多个成员之间包含“或”的声明或描述被认为得到满足,除非另有相反说明或从上下文中是明显。本公开包括这样的实施方式,其中组中的恰好一个成员存在于给定产物或过程中、被采用于给定产物或过程、或以其他方式与给定产物或过程相关。本公开包括这样的实施方式,其中组的多于一个或所有成员存在于给定产物或过程、被采用于给定产物或过程、或以其他方式与给定产物或过程相关。

[0271] 此外,本公开涵盖其中将一个或多个所列权利要求的一个或多个限定、要素、条款和描述性术语引入另一权利要求中的所有变化、组合和排列。例如,从属于另一权利要求的任何权利要求可以被修改为包括在从属于相同基础权利要求的任何其他权利要求中发现的一个或多个限定。当要素以列表的形式呈现时(例如,以马库什组形式),还公开了要素的每个子组,并且可以从该组中缺失任何要素。应当理解,一般来说,当本公开或本公开的方面被称为包括特定要素和/或特征时,本公开的某些实施方式或本公开的方面由此类要素和/或特征组成或基本上由此类元素和/或特征组成。为了简单起见,这些实施方式没有在本文中用同样的话具体陈述。还应当注意的是,术语“包括/包含(comprising)”和“包含/含有(containing)”旨在是开放的并且允许包含另外的要素或步骤。在给出范围的情况下,除非另有说明,否则端点包括在这样的范围内。此外,除非另有说明或从上下文和本领域普通技术人员的理解是明显的,否则表达为范围的值可以在本公开的不同实施方式中具有所述范围内的任何具体值或子范围,至范围下限单位的十分之一,除非上下文另有明确说明。

[0272] 本领域技术人员将认识到或能够仅使用常规实验来确定本文所述的具体实施方式的许多等同物。本文所述的本实施方式的范围不旨在限于以上描述,而是如所附权利要求中叙述的。本领域普通技术人员将理解,可以对本描述进行各种改变和修改而不脱离如所附权利要求所限定的本公开的精神或范围。

[0273] 实施例

[0274] 实施例1

[0275] 几个小组试图工程化酵母菌株,用于在发酵过程期间增加γ-癸内酯的产生。然而,这些努力尚未生产出商业上可行的具有增加的γ-癸内酯产生的酵母,这主要是由于在平衡增加γ-癸内酯的产生、不改变生长速度的菌株表型中的挑战。此外,用于γ-癸内酯产生的最常用的菌株(解脂耶氏酵母(Yarrowia lipolytica))不能够从油酸中产生蓖麻油酸,这是γ-癸内酯生物合成中的关键步骤。由于解脂耶氏酵母(Y.lipolytica)不能从油酸中产生蓖麻油酸,大多数试图利用这种酵母进行γ-癸内酯生物合成的研究是通过将蓖麻油酸加入到生长培养基中来供应蓖麻油酸。为了使通过β-氧化途径的蓖麻油酸的通量最大化,这些研究使用蓖麻油酸作为唯一的碳源,从而迫使酵母上调β-氧化作为生成生长所需的乙酰-CoA的方式。用蓖麻醇酸甲酯作为唯一碳源的野生型解脂耶氏酵母的生长已被证明产生达至1g/L γ-癸内酯(参见,例如,Waché等,J.Mol.Catalysis B:Enzymatic(2002)19-20 347-351;Gomes等,Biocat.and Biotransformation.(2010)28 227-234)。利用蓖麻油(包括90%蓖麻油酸)作为蓖麻油酸的来源的其他研究能够增加野生型解脂耶氏酵母的γ-癸内酯产生,在批量培养中下高达3.5g/L(或者在生物反应器条件中高达11g/L(参见,例

如,Soares等,Prep.Biochem.Biotechnol.(2017)47:633-637;Małajowicz等,Biotechnology&Biotechnological Equipment.(2020)34:330-340;Krzyczkowska等,Chem.Technol.(2012)61(3):58-61;U.S.Patent No.6,451,565)。

[0276] 其他小组试图通过β-氧化途径的基因工程来增加通过解脂耶氏酵母的γ-癸内酯产生。这些努力通常试图减少C10和更短的酰基-CoA分子的β-氧化,因为这会引起C10脂肪酸(包括4-羟基癸酸)的池(pool)的增加。在2000年,Wache等删除了POX3——编码负责4-羟基癸酸的持续氧化的短链特异性酰基CoA氧化酶的基因。当在5g/L蓖麻醇酸甲酯上生长时,所得的菌株在24小时后产生220mg/L γ-癸内酯,相对于野生型增加了5倍(参见,Waché等,Appl.Environ.Microbiol.(2000)66:1233-1236)。同一小组继续删除了POX5——编码对短链酰基CoAs具有弱活性的酰基CoA氧化酶的基因,并过量表达了POX2——编码长链特异性酰基CoA氧化酶的基因。所得菌株在4天内积累了γ-癸内酯,而通过野生型的γ-癸内酯产生在12小时达到峰值,然后下降。在2012年,Guo等通过在过表达POX2的解脂耶氏酵母菌株中删除了POX3采用了类似的工程方法。这个菌株在5%w/v蓖麻醇酸甲酯上生长时,在100小时产生了3.3g/L γ-癸内酯(Guo等,Microbiol.Res.167,246-252(2012))。

[0277] 在2020年,Marella等扩展了这项先前的工作,并将β-氧化的靶向工程与油酸水合酶基因在解脂耶氏酵母中的表达相结合(Marella等,Metab.Eng.(2020)61:427-436)。油酸水合酶的表达允许使用油酸作为初始途径底物生产十二内酯,或使用亚油酸作为初始途径底物生产δ-癸内酯。与过去的研究类似,这项工作中对β-氧化的修饰试图抑制10个碳原子或更少的酰基-CoA链的缩短。β-氧化工程化和水合酶表达的结合导致了产生达至74.6mg/L γ-癸内酯的解脂耶氏酵母菌株的生成。重要的是,这些实验依赖于30mg/L油酸的喂养作为γ-癸内酯产生的底物。Marella等没有报告任何描述在没有脂肪酸的补充的情况下产生的内酯产量的数据。与之前提供蓖麻油酸的工作相比,这些实验中产生的γ-癸内酯的较低浓度是值得注意的,因为这表明了油酸到蓖麻油酸的酶促转化可能是该途径中限速步骤。

[0278] 同样在2020年,从桃子中分离出了酰基转移酶基因,其能够催化4-羟基癸酸到γ-癸内酯的内酯化(Peng等,Plant Physiol.182,2065-2080(2020))。这种酰基转移酶(PpAAT1)在解脂耶氏酵母中表达,在这之后工程化菌株被固定并用于将蓖麻油酸生物转化为γ-癸内酯。在这个背景下,产生~3.5g/L γ-癸内酯,代表相对于未表达PpAAT1的对照菌株增加了7倍。相比之下,本文所述的修饰细胞能够产生增加的γ-癸内酯水平,减少异味(如乙酸乙酯)的水平,并且基本上不改变生长特性。

[0279] 生成用于改进的γ-癸内酯生物合成的修饰微生物

[0280] 为了在发酵饮料中产生桃子风味,微生物菌株被工程化以在啤酒和葡萄酒发酵期间增加γ-癸内酯水平。与之前在解脂耶氏酵母和其他真菌宿主中的生物合成努力相比,在饮料发酵期间对葡萄酒和啤酒酵母中的γ-癸内酯生物合成进行工程化存在一些额外的挑战。首先,酿酒酵母(S.cerevisiae)产生比解脂耶氏酵母更少的脂肪酸,因此限制了通过内酯生物合成途径的通量。其次,所有之前的研究都是通过让宿主生物体在脂肪酸上生长来促进β-氧化和内酯形成,脂肪酸将用作为内酯形成的底物。这在饮料发酵期间是不可行的,其中主要碳源是己糖,如葡萄糖、果糖和麦芽糖。用蓖麻油酸或其他脂肪酸补充饮料发酵在获得纯化的羟基化脂肪酸中成本过高,并且由于葡萄糖抑制β-氧化而具有挑战性。此外,解脂耶氏酵母编码六种酰基-CoA氧化酶,每种氧化酶具有不同的链长特异性,而酿酒酵母只

编码一种具有广泛特异性的酰基-CoA氧化酶。因此,不像解脂耶氏酵母,不可能简单地通过删除将该分子识别为底物的酰基CoA氧化酶的子集来减少γ-癸内酯前体(4-羟基癸酸)的β-氧化。此外,饮料发酵主要是厌氧或半厌氧过程。以前工程化γ-癸内酯生物合成的努力是在有氧环境中完成的,因为γ-癸内酯生物合成途径的许多步骤都需要氧(例如,脂肪酸去饱和、脂肪酸羟基化和β-氧化)。

[0281] 企图工程化白葡萄酒酵母菌株以产生γ-癸内酯,作为第一步,增加油酸(γ-癸内酯的前体)的产生。油酸被发现以低浓度存在于酿酒酵母中。为了增加可用于γ-癸内酯的生物合成的油酸量,在强启动子pENO2的转录控制下,将编码来自酿酒酵母的酰基-CoA去饱和酶1(OLE1)的核酸在酿酒酵母中过表达。

[0282] OLE1将可用的硬脂酸转化为油酸,从而增加油酸在酿酒酵母中的积累。为了从油酸中生成γ-癸内酯,首先要将油酸转化为蓖麻油酸。油酸可通过脂肪酸羟化酶转化为蓖麻油酸。接下来,对来自麦角菌的脂肪酸羟化酶(FAH)进行异源过表达。

[0283] 蓖麻油酸经历β-氧化被认为发生在酿酒酵母过氧化物酶体中,以产生4-羟基癸酸。最后,将编码来自桃子植物的醇-O-酰基转移酶的基因(桃(Prunus persica);PpAAT1)引入酿酒酵母中,以催化4-羟基癸酸向γ-癸内酯的内酯化。

[0284] 所得菌株(BY1019),表达OLE1、FAH和PpAAT1,在葡萄汁培养基或含2%葡萄糖作为碳源的合成限定酵母培养基任一中进行有氧生长。在这两种条件下,BY1019产生浓郁的桃子香气,由于乙酸乙酯的水平,培养物还具有浓郁的溶剂香气,表征为类似指甲油的香气。

[0285] 生成用于增加γ-癸内酯并减少乙酸乙酯的修饰微生物

[0286] 为了进一步增加γ-癸内酯水平的产生,同时也降低乙酸乙酯的产生,将PpAAT1靶向过氧化物酶体细胞器,基于该酶有助于乙酸乙酯产生的假设。简言之,将短的过氧化物酶体定位肽序列添加到在PpAAT1的C-末端。在不希望受到任何特定理论的约束的情况下,将PpAAT1定位于过氧化物酶体的目标是通过将PpAAT1定位于与β-氧化相同的区室,来增加4-羟基癸酸的内酯化以产生γ-癸内酯。为了实现这一目标,菌株BY1019的PpAAT1被修饰为包含过氧化物酶体标签,从而得到菌株BY1021。该菌株在葡萄汁培养基或含有2%葡萄糖作为碳源的酵母培养基任一中进行有氧生长。在这两种条件下,BY1021产生浓郁的桃子香气和极少的溶剂/乙酸乙酯相关香气。因此,据认为将PpAAT靶向过氧化物酶体大幅度地减少乙酸乙酯产生,同时保持类似或更高的γ-癸内酯产生。

[0287] 在半厌氧发酵期间生长修饰微生物以生成γ-癸内酯

[0288] 为了确定菌株BY1019还是BY1021能在模拟酿酒或酿造条件的半厌氧发酵条件期间产生增加水平的γ-癸内酯,将葡萄糖培养基通过剧烈振荡约5小时进行预氧化。培养物接种BY1019、BY1021或野生型非工程化菌株。发酵过程期间氧的存在允许酵母在发酵的早期阶段期间旺盛地生长,并且对某些啤酒和葡萄酒风格的生产至关重要。虽然氧长时间鼓泡进入发酵中预计会引起强烈的氧化异味分子的产生,但通过预氧化引入的氧会迅速被酵母消耗掉,且不会引起异味产生。使用预氧化培养物可表明菌株是否能够在商业发酵期间产生γ-癸内酯。

[0289] 在每个菌株消耗所有可发酵糖后,评估每个培养物是否存在桃子香气以及任何异味。野生型菌株没有产生任何桃子香气气味。菌株BY1019产生轻微的(mild)桃子香气,而菌株BY1021产生极少的桃子香味。菌株BY1019发酵物具有轻微的类似乙酸乙酯的香气,而来

自菌株BY1021的发酵物没有可感知的类似乙酸乙酯的香气。

[0290] 基于这些数据,有可能工程化酿酒酵母以在预氧化的发酵中产生γ-癸内酯,类似于啤酒和葡萄酒行业采用的条件。通过改进遗传或发酵参数,可以最小化乙酸乙酯异味的产生,并增加工程化菌株产生的γ-癸内酯的滴度。

[0291] 实施例2

[0292] 为了生成能够提高γ-癸内酯产生的酵母菌株,对示例性酿酒酵母葡萄酒酵母菌株Elegance进行了基因工程化以表达从不同来源(如麦角菌(CpFAH)、风筝果(HpFAH)、Physaria lindheimeri(PlFAH)、蓖麻(RcFAH)或雷斯克懒勒(LFAH12))中获得的油酸12-羟化酶。油酸12-羟化酶在PGK1启动子的控制下表达,并整合到PDC6基因组基因座(genomic locus)上。见表1。

[0293] 在24小时的有氧生长后,对样品进行评估,并测量产生的γ-癸内酯的水平,并与人体检测的气味阈值进行比较。见图3。

[0294] 为了确定油酸12-羟化酶的表达是否也会增加啤酒酵母菌株中γ-癸内酯的产生,酿酒酵母啤酒酵母菌株以及葡萄酒酵母菌株Elegance被工程化以表达LFH12或CpFAH,在PDGK1启动子的控制下并有氧培养24小时。如图4所示,在任一酵母菌株中表达CpFAH都会导致γ-癸内酯水平超过气味阈值。同样地,在啤酒菌株WLP001中表达LFAH12以后,也检测到γ-癸内酯的水平在气味阈值以上。

[0295] 为了进一步增加γ-癸内酯的产生,评估了几个额外的基因与油酸12-羟化酶在酿酒酵母菌株中的共同表达。如图2所示,在γ-癸内酯生物合成途径的组合中,具有OLE1活性的酶将可用的硬脂酸转化为油酸,这可增加油酸在酿酒酵母中的积累。进一步地,葡萄糖调节基因的正转录激活子ADR1的失调突变体也与油酸12-羟化酶和OLE1酶一起表达。在有氧生长24小时后,对样品进行评估,并测量产生的γ-癸内酯水平,并与人检测的气味阈值进行比较。观察发现,与仅油酸12-羟化酶的表达相比,具有OLE1活性的酶的表达增加了γ-癸内酯水平,γ-癸内酯水平在失调ADR1转录因子的额外表达之后进一步增加。见图5。

[0296] 氧可用性和γ-癸内酯的产生

[0297] 通常地,酵母菌株在厌氧条件下生长以促进发酵的过程。评估了氧可用性对工程化菌株产生γ-癸内酯的影响。表达CpFAH、OLE1、MpAAT(N385D V62A)的酿酒酵母Elegance菌株(y1185)在发酵的9天前经受不通气、通气3小时或通气24小时。观察发现,在缺乏有氧生长期的发酵之后,存在低水平的γ-癸内酯,在气味阈值以下。然而,当在发酵前对菌株进行24小时的有氧培养时,产生的γ-癸内酯水平大幅度增加。进行了进一步实验以确定有氧生长的时间长度如何影响γ-癸内酯产生。如图6所示,工程化菌株的有氧生长即使持续3小时也导致γ-癸内酯水平在气味阈值以上。这些结果并不取决于AAT的表达,因为不表达AAT的菌株也产生在葡萄酒中的气味阈值(即,35μg/L)以上的γ-癸内酯水平。

[0298] 表1:示例性酿酒酵母菌株

[0299]

名称	基因型	菌株背景
y465	ADE2::pPGK1-LFAH12	WLP001
y467	ADE2::pPGK1-CpFAH	WLP001
y1070	pPDC6::pPGK1-CpFAH、pENO2-OLE1	Elegance
y1094	pPDC6::pPGK1-CpFAH	Elegance
y1124	pPDC6::pPGK1-CpFAH 、 pENO2-OLE1 、 pHSP26-MpAAT1**N385D V62A	Elegance
y1185	pPDC6::pTDH3-CpFAH 、 pENO2-OLE1 、 pHSP26-MpAAT1**N385D V62A; FIG2::pRPL18B-ADR1*S230A	Elegance
y1330	pPDC6::pPGK1-HbFAH	Elegance
y1331	pPDC6::pPGK1-PlFAH	Elegance
y1332	pPDC6::pPGK1-RcFAH	Elegance
y1333	pPDC6::pPGK1-LFAH12	Elegance
y1341	pPDC6::pTDH3-CpFAH 、 pENO2-OLE1 、 pRPL18B-ADR1(S230A)	Elegance

序列表

<110> 伯克利发酵科学公司

<120> 发酵饮料中γ-癸内酯生物合成的方法和组合物

<130> B1509.70002WO00

<140> 尚未转让

<141> 同时附上

<150> US 63/190,954

<151> 2021-05-20

<160> 25

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 450

<212> PRT

<213> 桃(Prunus persica)

<400> 1

Met Gly Ser Leu Cys Pro Leu Leu Phe Pro Val Asn Arg Phe Glu Pro
1 5 10 15
Glu Leu Ile Thr Pro Ala Lys Pro Thr Pro Ile Glu Thr Lys Gln Leu
20 25 30
Ser Asp Ile Asp Asp Gln Asp Gly Leu Arg Phe His Phe Pro Val Ile
35 40 45
Ile Ser Tyr Lys Asn Asn Pro Ser Met Lys Gly Asn Asp Ala Val Met
50 55 60
Val Ile Arg Glu Ala Leu Ser Arg Ala Leu Val Tyr Tyr Tyr Pro Leu
65 70 75 80
Ala Gly Arg Leu Arg Glu Gly Pro Asn Arg Lys Leu Met Val Glu Cys
85 90 95
Asn Gly Glu Gly Val Leu Phe Ile Glu Ala Asn Ala Asp Val Thr Leu
100 105 110
Glu Gln Leu Gly Asp Arg Ile Leu Pro Pro Cys Pro Val Leu Glu Glu
115 120 125
Phe Leu Ser Asn Pro Pro Gly Ser Asp Gly Ile Leu Gly Cys Pro Leu
130 135 140
Leu Leu Val Gln Val Thr Arg Leu Thr Cys Gly Gly Phe Ile Phe Gly
145 150 155 160
Leu Arg Ile Asn His Ala Met Cys Asp Ala Val Gly Leu Ala Lys Phe
165 170 175
Leu Asn Ala Ile Gly Glu Met Ala Gln Gly Ala Asp Ser Leu Ser Val

180 185 190

Pro Pro Val Trp Ala Arg Glu Leu Leu Asn Ala Arg Asp Pro Pro Thr
195 200 205

Val Thr Arg Trp His Tyr Glu Tyr Asp Gln Leu Leu Asp Ser Gln Gly
210 215 220

Ser Phe Ile Ala Ala Ile Asp Gln Ser Asn Met Ala Gln Arg Ser Phe
225 230 235 240

Tyr Phe Gly Pro Gln Gln Ile Arg Ala Leu Arg Lys His Leu Pro Pro
245 250 255

His Leu Ser Thr Cys Ser Ser Phe Glu Leu Ile Thr Ala Cys Val Trp
260 265 270

Arg Cys Arg Thr Leu Ser Leu Arg Leu Asn Pro Lys Asp Thr Val Arg
275 280 285

Ile Ser Cys Ala Val Asn Ala Arg Gly Lys Ser Ile Asn Asp Leu Cys
290 295 300

Leu Pro Ser Gly Phe Tyr Gly Asn Ala Phe Ser Ile Pro Thr Ala Val
305 310 315 320

Ser Thr Val Glu Leu Leu Cys Ala Ser Pro Leu Gly Tyr Gly Val Glu
325 330 335

Leu Val Arg Lys Ser Lys Ala Gln Met Asp Lys Glu Tyr Met Gln Ser
340 345 350

Leu Ala Asp Phe Phe Val Ile Arg Gly Arg Pro Pro Leu Pro Met Gly
355 360 365

Trp Asn Val Phe Ile Val Ser Asp Asn Arg His Thr Gly Phe Gly Glu
370 375 380

Phe Asp Val Gly Trp Gly Arg Pro Leu Phe Ala Gly Leu Ala Arg Ala
385 390 395 400

Phe Ser Met Ile Ser Phe Tyr Val Arg Asp Asn Asn Gln Glu Glu Glu
405 410 415

Phe Gly Thr Leu Val Pro Ile Cys Leu Pro Ser Thr Ser Leu Glu Arg
420 425 430

Phe Glu Glu Glu Leu Lys Lys Met Thr Leu Glu His Val Glu Glu Ile
435 440 445

Ser Lys
450

<210> 2
<211> 453
<212> PRT
<213> 草莓

<400> 2

Met Gly Glu Lys Ile Glu Val Ser Ile Asn Ser Lys His Thr Ile Lys
1 5 10 15
Pro Ser Thr Ser Ser Thr Pro Leu Gln Pro Tyr Lys Leu Thr Leu Leu
20 25 30
Asp Gln Leu Thr Pro Pro Ala Tyr Val Pro Ile Val Phe Phe Tyr Pro
35 40 45
Ile Thr Asp His Asp Phe Asn Leu Pro Gln Thr Ala Ala Asp Leu Arg
50 55 60
Gln Ala Leu Ser Glu Thr Leu Thr Leu Tyr Tyr Pro Leu Ser Gly Arg
65 70 75 80
Val Lys Asn Asn Leu Tyr Ile Asp Asp Phe Glu Glu Gly Val Pro Tyr
85 90 95
Leu Glu Ala Arg Val Asn Cys Asp Met Thr Asp Phe Leu Arg Leu Arg
100 105 110
Lys Ile Glu Cys Leu Asn Glu Phe Val Pro Ile Lys Pro Phe Ser Met
115 120 125
Glu Ala Ile Ser Asp Glu Arg Tyr Pro Leu Leu Gly Val Gln Val Asn
130 135 140
Val Phe Asp Ser Gly Ile Ala Ile Gly Val Ser Val Ser His Lys Leu
145 150 155 160
Ile Asp Gly Gly Thr Ala Asp Cys Phe Leu Lys Ser Trp Gly Ala Val
165 170 175
Phe Arg Gly Cys Arg Glu Asn Ile Ile His Pro Ser Leu Ser Glu Ala
180 185 190
Ala Leu Leu Phe Pro Pro Arg Asp Asp Leu Pro Glu Lys Tyr Val Asp
195 200 205
Gln Met Glu Ala Leu Trp Phe Ala Gly Lys Lys Val Ala Thr Arg Arg
210 215 220
Phe Val Phe Gly Val Lys Ala Ile Ser Ser Ile Gln Asp Glu Ala Lys
225 230 235 240
Ser Glu Ser Val Pro Lys Pro Ser Arg Val His Ala Val Thr Gly Phe
245 250 255
Leu Trp Lys His Leu Ile Ala Ala Ser Arg Ala Leu Thr Ser Gly Thr
260 265 270
Thr Ser Thr Arg Leu Ser Ile Ala Ala Gln Ala Val Asn Leu Arg Thr
275 280 285
Arg Met Asn Met Glu Thr Val Leu Asp Asn Ala Thr Gly Asn Leu Phe
290 295 300

Trp Trp Ala Gln Ala Ile Leu Glu Leu Ser His Thr Thr Pro Glu Ile
305 310 315 320
Ser Asp Leu Lys Leu Cys Asp Leu Val Asn Leu Leu Asn Gly Ser Val
325 330 335
Lys Gln Cys Asn Gly Asp Tyr Phe Glu Thr Phe Lys Gly Lys Glu Gly
340 345 350
Tyr Gly Arg Met Cys Glu Tyr Leu Asp Phe Gln Arg Thr Met Ser Ser
355 360 365
Met Glu Pro Ala Pro Asp Ile Tyr Leu Phe Ser Ser Trp Thr Asn Phe
370 375 380
Phe Asn Pro Leu Asp Phe Gly Trp Gly Arg Thr Ser Trp Ile Gly Val
385 390 395 400
Ala Gly Lys Ile Glu Ser Ala Ser Cys Lys Phe Ile Ile Leu Val Pro
405 410 415
Thr Gln Cys Gly Ser Gly Ile Glu Ala Trp Val Asn Leu Glu Glu Glu
420 425 430
Lys Met Ala Met Leu Glu Gln Asp Pro His Phe Leu Ala Leu Ala Ser
435 440 445
Pro Lys Thr Leu Ile
450

<210> 3
<211> 442
<212> PRT
<213> 番茄
<400> 3

Met Ala Asn Thr Leu Pro Ile Ser Ile Asn Tyr His Lys Pro Lys Leu
1 5 10 15
Val Val Pro Ser Ser Val Thr Pro His Glu Thr Lys Arg Leu Ser Glu
20 25 30
Ile Asp Asp Gln Gly Phe Ile Arg Phe Gln Ile Pro Ile Leu Met Phe
35 40 45
Tyr Lys Tyr Asn Ser Ser Met Lys Gly Lys Asp Pro Ala Arg Ile Ile
50 55 60
Glu Asp Gly Leu Ser Lys Thr Leu Val Phe Tyr His Pro Leu Ala Gly
65 70 75 80
Arg Leu Ile Glu Gly Pro Asn Lys Lys Leu Met Val Asn Cys Asn Gly
85 90 95
Glu Gly Val Leu Phe Ile Glu Gly Asp Ala Asn Ile Glu Leu Glu Lys
100 105 110

Leu Gly Glu Ser Ile Lys Pro Pro Cys Pro Tyr Leu Asp Leu Leu Leu
115 120 125
His Asn Val Pro Gly Ser Asp Gly Ile Ile Gly Ser Pro Leu Leu Leu
130 135 140
Ile Gln Val Thr Arg Phe Thr Cys Gly Gly Phe Ala Val Gly Phe Arg
145 150 155 160
Val Ser His Thr Met Met Asp Gly Tyr Gly Phe Lys Met Phe Leu Asn
165 170 175
Ala Leu Ser Glu Leu Ile Gln Gly Ala Ser Thr Pro Ser Ile Leu Pro
180 185 190
Val Trp Gln Arg His Leu Leu Ser Ala Arg Ser Ser Pro Cys Ile Thr
195 200 205
Cys Ser His His Glu Phe Asp Glu Glu Ile Glu Ser Lys Ile Ala Trp
210 215 220
Glu Ser Met Glu Asp Lys Leu Ile Gln Glu Ser Phe Phe Phe Gly Asn
225 230 235 240
Glu Glu Met Glu Val Ile Lys Asn Gln Ile Pro Pro Asn Tyr Gly Cys
245 250 255
Thr Lys Phe Glu Leu Leu Met Ala Phe Leu Trp Lys Cys Arg Thr Ile
260 265 270
Ala Leu Asp Leu His Pro Glu Glu Ile Val Arg Leu Thr Tyr Val Ile
275 280 285
Asn Ile Arg Gly Lys Lys Ser Leu Asn Ile Glu Leu Pro Ile Gly Tyr
290 295 300
Tyr Gly Asn Ala Phe Val Thr Pro Val Val Val Ser Lys Ala Gly Leu
305 310 315 320
Leu Cys Ser Asn Pro Val Thr Tyr Ala Val Glu Leu Ile Lys Lys Val
325 330 335
Lys Asp His Ile Asn Glu Glu Tyr Ile Lys Ser Val Ile Asp Leu Thr
340 345 350
Val Ile Lys Gly Arg Pro Glu Leu Thr Lys Ser Trp Asn Phe Leu Val
355 360 365
Ser Asp Asn Arg Tyr Ile Gly Phe Asp Glu Phe Asp Phe Gly Trp Gly
370 375 380
Asn Pro Ile Phe Gly Gly Ile Ser Lys Ala Thr Ser Phe Ile Ser Phe
385 390 395 400
Gly Val Ser Val Lys Asn Asp Lys Gly Glu Lys Gly Val Leu Ile Ala
405 410 415
Ile Ser Leu Pro Pro Leu Ala Met Lys Lys Leu Gln Asp Ile Tyr Asn

420 425 430

Met Thr Phe Arg Val Ile Ile Pro Arg Ile
435 440

<210> 4
<211> 455
<212> PRT
<213> 苹果
<400> 4

Met Met Ser Phe Ser Val Leu Gln Val Lys Arg Leu Gln Pro Glu Leu
1 5 10 15
Ile Thr Pro Ala Lys Ser Thr Pro Gln Glu Thr Lys Phe Leu Ser Asp
20 25 30
Ile Asp Asp Gln Glu Ser Leu Arg Val Gln Ile Pro Ile Ile Met Cys
35 40 45
Tyr Lys Asp Asn Pro Ser Leu Asn Lys Asn Arg Asn Pro Val Lys Ala
50 55 60
Ile Arg Glu Ala Leu Ser Arg Ala Leu Val Tyr Tyr Tyr Pro Leu Ala
65 70 75 80
Gly Arg Leu Arg Glu Gly Pro Asn Arg Lys Leu Val Val Asp Cys Asn
85 90 95
Gly Glu Gly Ile Leu Phe Val Glu Ala Ser Ala Asp Val Thr Leu Glu
100 105 110
Gln Leu Gly Asp Lys Ile Leu Pro Pro Cys Pro Leu Leu Glu Glu Phe
115 120 125
Leu Tyr Asn Phe Pro Gly Ser Asp Gly Ile Ile Asp Cys Pro Leu Leu
130 135 140
Leu Ile Gln Val Thr Cys Leu Thr Cys Gly Gly Phe Ile Leu Ala Leu
145 150 155 160
Arg Leu Asn His Thr Met Cys Asp Ala Ala Gly Leu Leu Leu Phe Leu
165 170 175
Thr Ala Ile Ala Glu Met Ala Arg Gly Ala His Ala Pro Ser Ile Leu
180 185 190
Pro Val Trp Glu Arg Glu Leu Leu Phe Ala Arg Asp Pro Pro Arg Ile
195 200 205
Thr Cys Ala His His Glu Tyr Glu Asp Val Ile Gly His Ser Asp Gly
210 215 220
Ser Tyr Ala Ser Ser Asn Gln Ser Asn Met Val Gln Arg Ser Phe Tyr
225 230 235 240
Phe Gly Ala Lys Glu Met Arg Val Leu Arg Lys Gln Ile Pro Pro His

245 250 255
Leu Ile Ser Thr Cys Ser Thr Phe Asp Leu Ile Thr Ala Cys Leu Trp
260 265 270
Lys Cys Arg Thr Leu Ala Leu Asn Ile Asn Pro Lys Glu Ala Val Arg
275 280 285
Val Ser Cys Ile Val Asn Ala Arg Gly Lys His Asn Asn Val Arg Leu
290 295 300
Pro Leu Gly Tyr Tyr Gly Asn Ala Phe Ala Phe Pro Ala Ala Ile Ser
305 310 315 320
Lys Ala Glu Pro Leu Cys Lys Asn Pro Leu Gly Tyr Ala Leu Glu Leu
325 330 335
Val Lys Lys Ala Lys Ala Thr Met Asn Glu Glu Tyr Leu Arg Ser Val
340 345 350
Ala Asp Leu Leu Val Leu Arg Gly Arg Pro Gln Tyr Ser Ser Thr Gly
355 360 365
Ser Tyr Leu Ile Val Ser Asp Asn Thr Arg Val Gly Phe Gly Asp Val
370 375 380
Asn Phe Gly Trp Gly Gln Pro Val Phe Ala Gly Pro Val Lys Ala Leu
385 390 395 400
Asp Leu Ile Ser Phe Tyr Val Gln His Lys Asn Asn Thr Glu Asp Gly
405 410 415
Ile Leu Val Pro Met Cys Leu Pro Ser Ser Ala Met Glu Arg Phe Gln
420 425 430
Gln Glu Leu Glu Arg Ile Thr Gln Glu Pro Lys Glu Asp Ile Cys Asn
435 440 445
Asn Leu Arg Ser Thr Ser Gln
450 455

<210> 5
<211> 462
<212> PRT
<213> 甜瓜
<400> 5

Met Glu Thr Met Gln Thr Ile Asp Phe Ser Phe His Val Arg Lys Cys
1 5 10 15
Gln Pro Glu Leu Ile Ala Pro Ala Asn Pro Thr Pro Tyr Glu Phe Lys
20 25 30
Gln Leu Ser Asp Val Asp Asp Gln Gln Ser Leu Arg Leu Gln Leu Pro
35 40 45
Phe Val Asn Ile Tyr Pro His Asn Pro Ser Leu Glu Gly Arg Asp Pro

50 55 60

Val Lys Val Ile Lys Glu Ala Ile Gly Lys Ala Leu Val Phe Tyr Tyr
65 70 75 80
Pro Leu Ala Gly Arg Leu Arg Glu Gly Pro Gly Arg Lys Leu Phe Val
85 90 95
Glu Cys Thr Gly Glu Gly Ile Leu Phe Ile Glu Ala Asp Ala Asp Val
100 105 110
Ser Leu Glu Glu Phe Trp Asp Thr Leu Pro Tyr Ser Leu Ser Ser Met
115 120 125
Gln Asn Asn Ile Ile His Asn Ala Leu Asn Ser Asp Glu Val Leu Asn
130 135 140
Ser Pro Leu Leu Leu Ile Gln Val Thr Arg Leu Lys Cys Gly Gly Phe
145 150 155 160
Ile Phe Gly Leu Cys Phe Asn His Thr Met Ala Asp Gly Phe Gly Ile
165 170 175
Val Gln Phe Met Lys Ala Thr Ala Glu Ile Ala Arg Gly Ala Phe Ala
180 185 190
Pro Ser Ile Leu Pro Val Trp Gln Arg Ala Leu Leu Thr Ala Arg Asp
195 200 205
Pro Pro Arg Ile Thr Phe Arg His Tyr Glu Tyr Asp Gln Val Val Asp
210 215 220
Met Lys Ser Gly Leu Ile Pro Val Asn Ser Lys Ile Asp Gln Leu Phe
225 230 235 240
Phe Phe Ser Gln Leu Gln Ile Ser Thr Leu Arg Gln Thr Leu Pro Ala
245 250 255
His Leu His Asp Cys Pro Ser Phe Glu Val Leu Thr Ala Tyr Val Trp
260 265 270
Arg Leu Arg Thr Ile Ala Leu Gln Phe Lys Pro Glu Glu Glu Val Arg
275 280 285
Phe Leu Cys Val Met Asn Leu Arg Ser Lys Ile Asp Ile Pro Leu Gly
290 295 300
Tyr Tyr Gly Asn Ala Val Val Val Pro Ala Val Ile Thr Thr Ala Ala
305 310 315 320
Lys Leu Cys Gly Asn Pro Leu Gly Tyr Ala Val Asp Leu Ile Arg Lys
325 330 335
Ala Lys Ala Lys Ala Thr Met Glu Tyr Ile Lys Ser Thr Val Asp Leu
340 345 350
Met Val Ile Lys Gly Arg Pro Tyr Phe Thr Val Val Gly Ser Phe Met
355 360 365

Met Ser Asp Leu Thr Arg Ile Gly Val Glu Asn Val Asp Phe Gly Trp
370 375 380
Gly Lys Ala Ile Phe Gly Gly Pro Thr Thr Thr Gly Ala Arg Ile Thr
385 390 395 400
Arg Gly Leu Val Ser Phe Cys Val Pro Phe Met Asn Arg Asn Gly Glu
405 410 415
Lys Gly Thr Ala Leu Ser Leu Cys Leu Pro Pro Pro Ala Met Glu Arg
420 425 430
Phe Arg Ala Asn Val His Ala Ser Leu Gln Val Lys Gln Val Val Asp
435 440 445
Ala Val Asp Ser His Met Gln Thr Ile Gln Ser Ala Ser Lys
450 455 460

<210> 6
<211> 477
<212> PRT
<213> 麦角菌
<400> 6

Met Ala Ser Ala Thr Pro Ala Met Ser Glu Asn Ala Val Leu Arg His
1 5 10 15
Lys Ala Ala Ser Thr Thr Gly Ile Asp Tyr Glu Ser Ser Ala Ala Val
20 25 30
Ser Pro Ala Glu Ser Pro Arg Thr Ser Ala Ser Ser Thr Ser Leu Ser
35 40 45
Ser Leu Ser Ser Leu Asp Ala Asn Glu Lys Lys Asp Glu Tyr Ala Gly
50 55 60
Leu Leu Asp Thr Tyr Gly Asn Ala Phe Thr Pro Pro Asp Phe Ser Ile
65 70 75 80
Lys Asp Ile Arg Ala Ala Ile Pro Lys His Cys Tyr Glu Arg Ser Thr
85 90 95
Ile Lys Ser Tyr Ala Tyr Val Leu Arg Asp Leu Leu Cys Leu Ser Thr
100 105 110
Thr Phe Tyr Leu Phe His Asn Phe Val Thr Pro Glu Asn Ile Pro Ser
115 120 125
Asn Pro Leu Arg Phe Val Leu Trp Ser Ile Tyr Thr Val Leu Gln Gly
130 135 140
Leu Phe Ala Thr Gly Leu Trp Val Ile Gly His Glu Cys Gly His Cys
145 150 155 160
Ala Phe Ser Pro Ser Pro Phe Ile Ser Asp Leu Thr Gly Trp Val Ile
165 170 175

His Ser Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Phe Ser His Ser
180 185 190
Ala His His Lys Gly Ile Gly Asn Met Glu Arg Asp Met Val Phe Leu
195 200 205
Pro Arg Thr Arg Glu Gln Gln Ala Thr Arg Leu Gly Arg Ala Val Glu
210 215 220
Glu Leu Gly Asp Leu Cys Glu Glu Thr Pro Ile Tyr Thr Ala Leu His
225 230 235 240
Leu Val Gly Lys Gln Leu Ile Gly Trp Pro Ser Tyr Leu Met Thr Asn
245 250 255
Ala Thr Gly His Asn Phe His Glu Arg Gln Arg Glu Gly Arg Gly Lys
260 265 270
Gly Lys Lys Asn Gly Phe Gly Gly Gly Val Asn His Phe Asp Pro Arg
275 280 285
Ser Pro Ile Phe Glu Ala Arg Gln Ala Lys Tyr Ile Val Leu Ser Asp
290 295 300
Ile Gly Leu Gly Leu Ala Ile Ala Ala Leu Val Tyr Leu Gly Asn Arg
305 310 315 320
Phe Gly Trp Ala Asn Met Ala Val Trp Tyr Phe Leu Pro Tyr Leu Trp
325 330 335
Val Asn His Trp Leu Val Ala Ile Thr Phe Leu Gln His Thr Asp Pro
340 345 350
Thr Leu Pro His Tyr Asn Arg Glu Glu Trp Asn Phe Val Arg Gly Gly
355 360 365
Ala Cys Thr Ile Asp Arg Asp Leu Gly Phe Ile Gly Arg His Leu Phe
370 375 380
His Gly Ile Ala Asp Thr His Val Val His His Tyr Val Ser Arg Ile
385 390 395 400
Pro Phe Tyr Asn Ala Asp Glu Ala Ser Glu Ala Ile Lys Pro Ile Met
405 410 415
Gly Lys His Tyr Arg Ser Asp Thr Ala His Gly Pro Val Gly Phe Leu
420 425 430
His Ala Leu Trp Lys Thr Ala Arg Trp Cys Gln Trp Val Glu Pro Ser
435 440 445
Ala Asp Ala Gln Gly Ala Gly Lys Gly Ile Leu Phe Tyr Arg Asn Arg
450 455 460
Asn Lys Leu Gly Thr Lys Pro Ile Ser Met Lys Thr Gln
465 470 475

<210> 7

<211> 510
<212> PRT
<213> 酿酒酵母
<400> 7

Met Pro Thr Ser Gly Thr Thr Ile Glu Leu Ile Asp Asp Gln Phe Pro
1 5 10 15
Lys Asp Asp Ser Ala Ser Ser Gly Ile Val Asp Glu Val Asp Leu Thr
20 25 30
Glu Ala Asn Ile Leu Ala Thr Gly Leu Asn Lys Lys Ala Pro Arg Ile
35 40 45
Val Asn Gly Phe Gly Ser Leu Met Gly Ser Lys Glu Met Val Ser Val
50 55 60
Glu Phe Asp Lys Lys Gly Asn Glu Lys Lys Ser Asn Leu Asp Arg Leu
65 70 75 80
Leu Glu Lys Asp Asn Gln Glu Lys Glu Glu Ala Lys Thr Lys Ile His
85 90 95
Ile Ser Glu Gln Pro Trp Thr Leu Asn Asn Trp His Gln His Leu Asn
100 105 110
Trp Leu Asn Met Val Leu Val Cys Gly Met Pro Met Ile Gly Trp Tyr
115 120 125
Phe Ala Leu Ser Gly Lys Val Pro Leu His Leu Asn Val Phe Leu Phe
130 135 140
Ser Val Phe Tyr Tyr Ala Val Gly Gly Val Ser Ile Thr Ala Gly Tyr
145 150 155 160
His Arg Leu Trp Ser His Arg Ser Tyr Ser Ala His Trp Pro Leu Arg
165 170 175
Leu Phe Tyr Ala Ile Phe Gly Cys Ala Ser Val Glu Gly Ser Ala Lys
180 185 190
Trp Trp Gly His Ser His Arg Ile His His Arg Tyr Thr Asp Thr Leu
195 200 205
Arg Asp Pro Tyr Asp Ala Arg Arg Gly Leu Trp Tyr Ser His Met Gly
210 215 220
Trp Met Leu Leu Lys Pro Asn Pro Lys Tyr Lys Ala Arg Ala Asp Ile
225 230 235 240
Thr Asp Met Thr Asp Asp Trp Thr Ile Arg Phe Gln His Arg His Tyr
245 250 255
Ile Leu Leu Met Leu Leu Thr Ala Phe Val Ile Pro Thr Leu Ile Cys
260 265 270
Gly Tyr Phe Phe Asn Asp Tyr Met Gly Gly Leu Ile Tyr Ala Gly Phe

275 280 285

Ile Arg Val Phe Val Ile Gln Gln Ala Thr Phe Cys Ile Asn Ser Met
290 295 300

Ala His Tyr Ile Gly Thr Gln Pro Phe Asp Asp Arg Arg Thr Pro Arg
305 310 315 320

Asp Asn Trp Ile Thr Ala Ile Val Thr Phe Gly Glu Gly Tyr His Asn
325 330 335

Phe His His Glu Phe Pro Thr Asp Tyr Arg Asn Ala Ile Lys Trp Tyr
340 345 350

Gln Tyr Asp Pro Thr Lys Val Ile Ile Tyr Leu Thr Ser Leu Val Gly
355 360 365

Leu Ala Tyr Asp Leu Lys Lys Phe Ser Gln Asn Ala Ile Glu Glu Ala
370 375 380

Leu Ile Gln Gln Glu Gln Lys Lys Ile Asn Lys Lys Lys Ala Lys Ile
385 390 395 400

Asn Trp Gly Pro Val Leu Thr Asp Leu Pro Met Trp Asp Lys Gln Thr
405 410 415

Phe Leu Ala Lys Ser Lys Glu Asn Lys Gly Leu Val Ile Ile Ser Gly
420 425 430

Ile Val His Asp Val Ser Gly Tyr Ile Ser Glu His Pro Gly Gly Glu
435 440 445

Thr Leu Ile Lys Thr Ala Leu Gly Lys Asp Ala Thr Lys Ala Phe Ser
450 455 460

Gly Gly Val Tyr Arg His Ser Asn Ala Ala Gln Asn Val Leu Ala Asp
465 470 475 480

Met Arg Val Ala Val Ile Lys Glu Ser Lys Asn Ser Ala Ile Arg Met
485 490 495

Ala Ser Lys Arg Gly Glu Ile Tyr Glu Thr Gly Lys Phe Phe
500 505 510

<210> 8

<211> 801

<212> DNA

<213> 酿酒酵母

<400> 8

taatgtagaa ggttgagaac aaccggatct tgcggtcatt tttcttttcg aggaaagtgc 60

aagtctgcca ctttccagaa ggcatagcct tgccctttg ttgatatttc tccccaccgt 120

aattgttgca ttcgcgatct tttcaacaat acattttatc atcaagcccg caaatcctct 180

ggagtttgtc ctctcgttca ctgttgggaa aaacaatacg cctaattcgt gattaagatt 240

cttcaaacca tttcctgcgg agtttttact gtgtgttgaa cggttcacag cgtaaaaaaa 300

agttactata ggcacggtat tttaatttca attgtttaga aagtgccttc acaccattag 360
cccctgggat taccgtcata ggcactttct gctgagctcc tgcgagattt ctgcgctgaa 420
agagtaaaag aaatctttca cagcggctcc gcgggccctt ctacttttaa acgagtcgca 480
ggaacagaag ccaaatttca aagaacgcta cgctttcgcc ttttctggtt ctcccaccaa 540
taacgctcca gcttgaacaa agcataagac tgcaaccaaa gcgctgacgg acgatccgaa 600
gataaagctt gctttgccca ttgttctcgt ttcgaaaggc tatataagga cacggatttt 660
ccttttttt ttccacctat tgtctttctt tgttaagctt ttattctccg ggtttttttt 720
ttttgagcat atcaaaagct ttcttttcgc aaatcaaaca tagcaaaccg aactcttcga 780
acacaattaa atacacataa a 801

<210> 9
<211> 750
<212> DNA
<213> 酿酒酵母

<400> 9
atgaagttca cttcacatcc aatgagaaaa acaaaatccg cagggctatc acccagaaca 60
tcctccactt catcttcttc aggacagaga aaagcgcatc accaccacca tcaccacaac 120
cacgtttcaa ggacgaaaac taccgaaagc accaaatcag gcaacagcaa aaaggacagt 180
tcctcatcct caacaaacga ccatcaattt aaaaggtctg aaaagaagaa aaaaagtaaa 240
tttggctcga tcttcaaaaa agttttcgga tgaaccggat taatacaagt aaaatcagca 300
aagatataga agacaaaata agcgtgaaaa caatcataaa ccactcacaa cgggggtttt 360
cagctgttac tcctccatac atacattttg ataaagatat aatgttatat ttcttttcgt 420
aattttgttt tacttcggtt tgctctatag atttcatcag ccgcaccgaa aagggagatc 480
aataaggtac cctttaaaag ggataagaag cctaacatca ccccaataaa tggagtaatg 540
gccagcattg gatgaagaga agaattacgg gatactggga taacactgtt aaaaatgctt 600
cgcgacgtga gggtcttata taaattgaac tgccaaatct ctttcacatt atccaggata 660
gtttggaatg tgtgttactg aaagatcaga atcaataaat acaatcaata caaatattta 720
gcgcataaaa ttcaaacaaa gtttactgaa 750

<210> 10
<211> 750
<212> DNA
<213> 酿酒酵母

<400> 10
cgagaaacag ggggggagaa aaggggaaaa gagaaggaaa gaaagactca tctatcgcag 60
ataagacaat caaccctcat ggcgcctcca accaccatcc gcactaggga ccaagcgctc 120
gcaccgttag caacgcttga ctcacaaacc aactgccggc tgaaagagct tgtgcaatgg 180
gagtgccaat tcaaaggagc cgaatacgtc tgttcgcctt ttaagaggct ttttgaacac 240
tgcattgcac ccgacaaatc agccactaac tacgaggtca cggatacata taccaatagt 300
taaaaaatta catatactct atatagcaca gtagtgtgat aaataaaaaa ttttgccaag 360
actttttaa actgcacccg acagatcagg tctgtgccta ctatgcactt atgcccgggg 420

tcccgggagg agaaaaaacg agggctggga aatgtccgtg gacttaaaac gctccgggtt 480
agcagagtag cagggctttc ggctttggaa atttaggtga cttgttgaaa aagcaaaatt 540
tgggctcagt aatgccacag cagtggctta tcacgccagg actgcgggag tggcgggggc 600
aaacacaccc gcgataaaga gcgcgatgaa tataaaaggg ggccaatgtt acgtcccgtt 660
atattggagt tcttcccata caaacttaag agtccaatta gcttcatcgc caataaaaaa 720
acaaactaaa cctaattcta acaagcaaag 750

<210> 11
<211> 696
<212> DNA
<213> 酿酒酵母

<400> 11
gagagctggc caaaaagagg gccgaagacg gcgttgaatt tcattcaaaa ctatttagaa 60
gggcagagcc aggtgaggat ttagattatt atatttacaa gcacatccct gaagggaccg 120
acaagcatga agaacagatc aggagcattt tggaaactgc cccgatttta ccaggacagg 180
cattcactga aaaattttct attccggctt ataaaaagca tggaatccaa aagaattagg 240
cttctcattc tattttaatt atactagtac gatttctcac tctgtaattt aatatcagtg 300
taatatgcac ctagttatgg gtagtttttg ctaacgttac gagccgcgaa actgtcctca 360
atcttcacca ctacctctaa tgactgaaga atgctatgcg atataacgct gccgcacttt 420
gaatatatac ttatatttac atagttttca agtgcgtatt actattgcaa agtagtattt 480
tgtcacgtga ttttgatcca attaaaacta aatatggttc aacccgttgt ttccgcatca 540
aaaaaccata ccatttatca aggggacggg atatatcaca taacagtttg aatgcataat 600
ttgttataga tatcttctgg aataatcttc acagcaaaag cgcaagtcga ataatatatc 660
gataaataca atccataaga cttaaaacta acctca 696

<210> 12
<211> 813
<212> DNA
<213> 酿酒酵母

<400> 12
gcccgcttct gaaaactaca gttgacttgt atgctaaagg gccagactaa tgggaggaga 60
aaaagaaacg aatgtatatg ctcatttaca ctctatatca ccatatggag gataagttgg 120
gctgagcttc tgatccaatt tattctatcc attagttgct gatatgtccc accagccaac 180
acttgatagt atctactcgc cattcacttc cagcagcgcc agtagggttg ttgagcttag 240
taaaaatgtg cgcaccacaa gcctacatga ctccacgtca catgaaacca caccgtgggg 300
ccttgttgcg ctaggaatag gatatgcgac gaagacgctt ctgcttagta accacaccac 360
attttcaggg ggtcgatctg cttgcttcct ttactgtcac gagcggccca taatcgcgct 420
tttttttaa aaggcgcgag acagcaaaca ggaagctcgg gtttcaacct tcggagtggt 480
cgcagatctg gagactggat ctttacaata cagtaaggca agccaccatc tgcttcttag 540
gtgcatgcga cggtatccac gtgcagaaca acatagtctg aagaaggggg ggaggagcat 600
gttcattctc tgtagcagta agagcttggt gataatgacc aaaactggag tctcgaaatc 660

atataaatag acaatatatt ttcacacaat gagatttgta gtacagttct attctctctc 720
ttgcataaat aagaaattca tcaagaactt ggtttgatat ttcaccaaca cacacaaaaa 780
acagtacttc actaaattta cacacaaaac aaa 813

<210> 13
<211> 800
<212> DNA
<213> 酿酒酵母

<400> 13

ctaaatactt ctgtgttttc attaatttat aaattgtact cttttaagac atggaaagta 60
ccaacatcgg ttgaaacagt ttttcattta cttatggttt attggttttt ccagtgaatg 120
attatttgtc gttacccttt cgtaaaagtt caaacacgtt tttaagtatt gtttagttgc 180
tctttcgaca tatatgatta tccctgcgcg gctaaagtta aggatgcaaa aaacataaga 240
caactgaagt taatttacgt caattaagtt ttccagggta atgatgtttt gggcttccac 300
taattcaata agtatgtcat gaaatacgtt gtgaagagca tccagaaata atgaaaagaa 360
acaacgaaac tgggtcggcc tgttgtttct tttctttacc acgtgatctg cggcatttac 420
aggaagtcgc gcgttttgcg cagttgttgc aacgcagcta cggctaacaa agcctagtgg 480
aactcgactg atgtgttagg gcctaaaact ggtggtgaca gctgaagtga actattcaat 540
ccaatcatgt catggctgtc acaaagacct tgcggaccgc acgtacgaac acatacgtat 600
gctaatatgt gttttgatag tacccagtga tcgcagacct gcaatttttt tgtaggtttg 660
gaagaatata taaaggttgc actcattcaa gatagttttt ttcttgtgtg tctattcatt 720
ttattattgt ttgtttaaat gttaaaaaaa ccaagaactt agtttcaaat taaattcatc 780
acacaaacaa acaaaacaaa 800

<210> 14
<211> 680
<212> DNA
<213> 酿酒酵母

<400> 14

cagttcgagt ttatcattat caatactgcc atttcaaaga atacgtaaat aattaatagt 60
agtgattttc ctaactttat ttagtcaaaa aattagcctt ttaattctgc tgtaacccgt 120
acatgcccaa aataggggggc gggttacaca gaatatataa catcgtaggt gtctgggtga 180
acagtttatt cctggcatcc actaaatata atggagcccg ctttttaagc tggcatccag 240
aaaaaaaaag aatcccagca ccaaaatatt gttttcttca ccaaccatca gttcataggt 300
ccattctctt agcgcaacta cagagaacag gggcacaaac aggcaaaaaa cgggcacaac 360
ctcaatggag tgatgcaacc tgcctggagt aaatgatgac acaaggcaat tgacccacgc 420
atgtatctat ctcattttct tacaccttct attaccttct gctctctctg atttggaaaa 480
agctgaaaaa aaaggttgaa accagttccc tgaaattatt cccctacttg actaataagt 540
atataaagac ggtaggtatt gattgtaatt ctgtaaatct atttcttaaa cttcttaaat 600
tctactttta tagttagtct ttttttagt tttaaaacac caagaactta gtttcgaata 660
aacacacata aacaaacaaa 680

<210> 15
<211> 699
<212> DNA
<213> 酿酒酵母
<400> 15
attgaataca ttagcaacgc gtccagcatt tttcggaagt gtctcataaa ctttactcaa 60
gagttaagta ctgaaaaatt cgacttttat gatagttcaa gtgtcgacgc tgcgggtata 120
gaaagggttc tttactctat agtgcctcct cgctcagcat ctgcttcttc ccaaagatga 180
acgcggcgtt atgtcactaa cgacgtgcac caacttgcgg aaagtggaat cccgttccaa 240
aactggcatc cactaattga tacatctaca caccgcacgc ctttttttctg aagcccactt 300
tcgtggactt tgccatatgc aaaattcatg aagtgtgata ccaagtcagc atacacctca 360
ctagggtagt ttctttggtt gtattgatca tttggttcat cgtggttcat taatttttt 420
tctccattgc tttctggctt tgatcttact atcatttgga tttttgtcga aggttgtaga 480
attgtatgtg acaagtggca ccaagcatat ataaaaaaaa aagcattatc ttcctaccag 540
agttgattgt taaaaacgta tttatagcaa acgcaattgt aattaattct tattttgtat 600
cttttcttcc cttgtctcaa tcttttattt ttattttatt cttcttttct tagtttcttt 660
cataacacca agcaactaat actataacat acaataata 699
<210> 16
<211> 800
<212> DNA
<213> 酿酒酵母
<400> 16
caatattctg cgcacatcaa tcattttctt actacataca ctaacattac tcctagttta 60
atttaattga atttttaact ttcttttctt ttcatttggc aatttggctc cttgaaaaca 120
agactatggg tctgtctcat aagcctcagg gggggacccc aaaaaaataa cgcggccatc 180
ttgcatgcac cgttgaacct gtagcttaca gtaagccaca attctcttac cttcttggca 240
atgtggcaca aaataatctg gttatgtgtc ttcatttggt aatcactggg atgttactgg 300
ggcagcagca actccgtgtg taccctaac tccgtgtgta cccctaaaga accttgcctg 360
tcaaggtgca ttgttggatc ggaatagtaa ccgtctttac atgaacatcc acaaccaacg 420
aaagtgcttt ttcaagcatt gcttgatttc tagaaagatc gatggttatt ccctcccccct 480
tatgcgtcca aaaatatagg gtgctcgtaa cagtaaggta ttcgcactta gcgtgctcgc 540
aacacaaaat taagtaatat gcgagtttta gatgtccttg cggatctatg cacgttcttg 600
agtggtattt cataacaacg gttctttttc acccttattc ctaaacatat aaataggacc 660
tccattagtt agagatctgt ttttaatcca ttcacctttc attctactct cttatactaa 720
taaaaccacc gataaagata tatcagatct ctattaaaac aggtatccaa aaaagcaaac 780
aaacaaacta aacaaattaa 800
<210> 17
<211> 3
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 17
Ser Lys Leu
1
<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 18
Gly Ser Leu Gly Arg Gly Arg Arg Ser Lys Leu
1 5 10
<210> 19
<211> 625
<212> DNA
<213> 酿酒酵母
<400> 19
ccgtaaacct tggcgctttc cttgggaagt attcaagaag tgccttgtcc ggtttctgtg 60
gctcacaaac cagcgcgccc gatatggctt tcttttcact tatgaatgta ccagtacggg 120
acaattagaa cgctcctgta acaatctctt tgcaaatgtg gggttacatt ctaaccatgt 180
cacactgctg acgaaattca aagtaaaaaa aaatgggacc acgtcttgag aacgatagat 240
tttctttatt ttacattgaa cagtcgttgt ctcagcgcgc tttatgtttt cattcatact 300
tcatattata aaataacaaa agaagaattt catattcacg cccaagaaat caggctgctt 360
tccaaatgca attgacactt cattagccat cacacaaaac tctttcttgc tggagcttct 420
tttaaaaaag acctcagtac accaaacacg ttacccgacc tcgttatttt acgacaacta 480
tgataaaatt ctgaagaaaa aataaaaaaa ttttcatact tcttgctttt atttaaacca 540
ttgaatgatt tcttttgaac aaaactacct gtttcaccaa aggaaataga aagaaaaaat 600
caattagaag aaaacaaaaa acaaa 625
<210> 20
<211> 383
<212> PRT
<213> 风筝果
<400> 20
Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Pro Thr Ser Val Ser Lys Gly Gln Gly
1 5 10 15
Met Glu Asn Glu Val Lys His Gly Pro Cys Glu Lys Pro Pro Phe Thr

20 25 30

Val Gly Gln Leu Lys Arg Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Glu Arg Ser

35 40 45

Leu Ile Arg Ser Ser Ser Tyr Leu Leu Arg Asp Leu Phe Phe Val Phe

50 55 60

Val Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Ser Tyr Phe His Leu Leu Pro Tyr Pro

65 70 75 80

Phe Asn Tyr Ala Ala Trp Pro Ile Tyr Trp Gly Phe Gln Gly Cys Ala

85 90 95

Leu Thr Gly Ile Trp Val Leu Gly His Glu Cys Gly His His Ala Phe

100 105 110

Ser Asp Tyr Gln Leu Val Asp Asp Ile Val Gly Leu Ile Ile His Thr

115 120 125

Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Ile Ser His Arg Arg His

130 135 140

His Ser Asn Thr Gly Ser Leu Glu Arg Glu Glu Val Phe Ala Pro Lys

145 150 155 160

Pro Lys Ala Glu Ile Gln Trp Tyr Leu Lys His Leu Asn Asn Pro Pro

165 170 175

Gly Arg Ala Ile Val Leu Leu Asn Thr Leu Leu Leu Gly Trp Pro Leu

180 185 190

Tyr Val Ala Phe Asn Val Ala Gly Arg Arg Tyr Asp Arg Phe Ala Cys

195 200 205

His Phe Asp Pro Tyr Ser Pro Ile Phe Ser Ala Ser Glu Arg His Leu

210 215 220

Ile Tyr Ile Thr Asp Ala Gly Ile Tyr Ala Thr Thr Phe Ile Leu Tyr

225 230 235 240

Arg Ala Ala Ala Ala Lys Gly Leu Thr Trp Leu Ile Cys Val Tyr Gly

245 250 255

Val Pro Leu Val Ile Val Asn Ala Phe Leu Val Leu Val Thr Tyr Leu

260 265 270

Gln His Thr His Pro Val Leu Pro His Tyr Asp Asn Ser Glu Trp Asp

275 280 285

Trp Leu Arg Gly Ala Leu Val Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile Leu

290 295 300

Asn Glu Val Phe His His Ile Ala Asp Thr His Val Ala His His Leu

305 310 315 320

Phe Ser Lys Ile Pro Gln Tyr His Gly Met Glu Ala Thr Lys Ala Ile

325 330 335

Lys Pro Ile Leu Gly Glu Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Pro Phe Leu
340 345 350
Lys Ala Leu Trp Arg Glu Ala Arg Glu Cys Val Tyr Val Asp Arg Asp
355 360 365
Glu Gly Asp Pro Lys Arg Gly Val Tyr Trp Tyr Gly Asn Lys Phe
370 375 380

<210> 21
<211> 383
<212> PRT
<213> Physaria lindheimeri
<400> 21

Met Gly Ala Gly Gly Arg Ile Met Val Thr Pro Ser Ser Lys Lys Ser
1 5 10 15
Lys Pro Glu Ala Leu Arg Arg Gly Pro Gly Glu Lys Pro Pro Phe Thr
20 25 30
Val Gln Asp Leu Arg Lys Ala Ile Pro Arg His Cys Phe Lys Arg Ser
35 40 45
Ile Pro Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Leu Thr Asp Ile Ile Leu Ala Ser
50 55 60
Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Asn Tyr Phe Ser Leu Leu Pro Gln Pro
65 70 75 80
Leu Ser Thr Tyr Phe Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Val Cys Gln Gly Cys
85 90 95
Val Leu Thr Gly Val Trp Val Leu Gly His Glu Cys Gly His Gln Ala
100 105 110
Phe Ser Asp Tyr Gln Trp Val Asp Asp Thr Val Gly Phe Ile Ile His
115 120 125
Thr Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg
130 135 140
His His Ala Asn Asn Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val Phe Val Pro
145 150 155 160
Pro Lys Lys Ala Ala Val Lys Trp Tyr Val Lys Tyr Leu Asn Asn Pro
165 170 175
Leu Gly Arg Thr Val Val Leu Ile Val Gln Phe Val Leu Gly Trp Pro
180 185 190
Leu Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Ser Tyr Asp Gly Phe Ala
195 200 205
Ser His Phe Phe Pro His Ala Pro Ile Phe Lys Asp Arg Glu Arg Leu
210 215 220

His Ile Tyr Ile Thr Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Cys Tyr Gly Leu
225 230 235 240
Tyr Arg Tyr Ala Ala Thr Lys Gly Leu Thr Ala Met Ile Tyr Val Tyr
245 250 255
Gly Val Pro Leu Leu Val Val Asn Phe Phe Leu Val Leu Val Thr Phe
260 265 270
Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp
275 280 285
Asp Trp Ile Arg Gly Ala Met Val Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile
290 295 300
Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His
305 310 315 320
Leu Phe Ala Thr Ile Pro His Tyr Asn Ala Met Glu Ala Thr Glu Ala
325 330 335
Ile Lys Pro Ile Leu Gly Asp Tyr Tyr His Phe Asp Gly Thr Pro Trp
340 345 350
Tyr Val Ala Met Tyr Arg Glu Ala Lys Gln Cys Leu Tyr Val Glu Gln
355 360 365
Asp Thr Glu Lys Lys Lys Gly Val Tyr Tyr Tyr Asn Asn Lys Leu
370 375 380

<210> 22
<211> 387
<212> PRT
<213> 蓖麻
<400> 22

Met Gly Gly Gly Gly Arg Met Ser Thr Val Ile Thr Ser Asn Asn Ser
1 5 10 15
Glu Lys Lys Gly Gly Ser Ser His Leu Lys Arg Ala Pro His Thr Lys
20 25 30
Pro Pro Phe Thr Leu Gly Asp Leu Lys Arg Ala Ile Pro Pro His Cys
35 40 45
Phe Glu Arg Ser Phe Val Arg Ser Phe Ser Tyr Val Ala Tyr Asp Val
50 55 60
Cys Leu Ser Phe Leu Phe Tyr Ser Ile Ala Thr Asn Phe Phe Pro Tyr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Pro Leu Ser Tyr Val Ala Trp Leu Val Tyr Trp Leu Phe
85 90 95
Gln Gly Cys Ile Leu Thr Gly Leu Trp Val Ile Gly His Glu Cys Gly
100 105 110

His His Ala Phe Ser Glu Tyr Gln Leu Ala Asp Asp Ile Val Gly Leu
115 120 125
Ile Val His Ser Ala Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser
130 135 140
His Arg Arg His His Ser Asn Ile Gly Ser Leu Glu Arg Asp Glu Val
145 150 155 160
Phe Val Pro Lys Ser Lys Ser Lys Ile Ser Trp Tyr Ser Lys Tyr Ser
165 170 175
Asn Asn Pro Pro Gly Arg Val Leu Thr Leu Ala Ala Thr Leu Leu Leu
180 185 190
Gly Trp Pro Leu Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp
195 200 205
Arg Phe Ala Cys His Tyr Asp Pro Tyr Gly Pro Ile Phe Ser Glu Arg
210 215 220
Glu Arg Leu Gln Ile Tyr Ile Ala Asp Leu Gly Ile Phe Ala Thr Thr
225 230 235 240
Phe Val Leu Tyr Gln Ala Thr Met Ala Lys Gly Leu Ala Trp Val Met
245 250 255
Arg Ile Tyr Gly Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Cys Phe Leu Val Met
260 265 270
Ile Thr Tyr Leu Gln His Thr His Pro Ala Ile Pro Arg Tyr Gly Ser
275 280 285
Ser Glu Trp Asp Trp Leu Arg Gly Ala Met Val Thr Val Asp Arg Asp
290 295 300
Tyr Gly Val Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Ala Asp Thr His Val
305 310 315 320
Ala His His Leu Phe Ala Thr Val Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala
325 330 335
Thr Lys Ala Ile Lys Pro Ile Met Gly Glu Tyr Tyr Arg Tyr Asp Gly
340 345 350
Thr Pro Phe Tyr Lys Ala Leu Trp Arg Glu Ala Lys Glu Cys Leu Phe
355 360 365
Val Glu Pro Asp Glu Gly Ala Pro Thr Gln Gly Val Phe Trp Tyr Arg
370 375 380
Asn Lys Tyr
385

<210> 23
<211> 384
<212> PRT

<213> 雷斯克懒勒

<400> 23

Met Gly Ala Gly Gly Arg Ile Met Val Thr Pro Ser Ser Lys Lys Ser
1 5 10 15
Glu Thr Glu Ala Leu Lys Arg Gly Pro Cys Glu Lys Pro Pro Phe Thr
20 25 30
Val Lys Asp Leu Lys Lys Ala Ile Pro Gln His Cys Phe Lys Arg Ser
35 40 45
Ile Pro Arg Ser Phe Ser Tyr Leu Leu Thr Asp Ile Thr Leu Val Ser
50 55 60
Cys Phe Tyr Tyr Val Ala Thr Asn Tyr Phe Ser Leu Leu Pro Gln Pro
65 70 75 80
Leu Ser Thr Tyr Leu Ala Trp Pro Leu Tyr Trp Val Cys Gln Gly Cys
85 90 95
Val Leu Thr Gly Ile Trp Val Ile Gly His Glu Cys Gly His His Ala
100 105 110
Phe Ser Asp Tyr Gln Trp Val Asp Asp Thr Val Gly Phe Ile Phe His
115 120 125
Ser Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg
130 135 140
His His Ser Asn Asn Gly Ser Leu Glu Lys Asp Glu Val Phe Val Pro
145 150 155 160
Pro Lys Lys Ala Ala Val Lys Trp Tyr Val Lys Tyr Leu Asn Asn Pro
165 170 175
Leu Gly Arg Ile Leu Val Leu Thr Val Gln Phe Ile Leu Gly Trp Pro
180 185 190
Leu Tyr Leu Ala Phe Asn Val Ser Gly Arg Pro Tyr Asp Gly Phe Ala
195 200 205
Ser His Phe Phe Pro His Ala Pro Ile Phe Lys Asp Arg Glu Arg Leu
210 215 220
Gln Ile Tyr Ile Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Cys Tyr Gly Leu
225 230 235 240
Tyr Arg Tyr Ala Ala Ser Gln Gly Leu Thr Ala Met Ile Cys Val Tyr
245 250 255
Gly Val Pro Leu Leu Ile Val Asn Phe Phe Leu Val Leu Val Thr Phe
260 265 270
Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp
275 280 285
Glu Trp Ile Arg Gly Ala Leu Val Thr Val Asp Arg Asp Tyr Gly Ile

290 295 300
Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His
305 310 315 320
Leu Phe Ala Thr Ile Pro His Tyr Asn Ala Met Glu Ala Thr Glu Ala
325 330 335
Ile Lys Pro Ile Leu Gly Asp Tyr Tyr His Phe Asp Gly Thr Pro Trp
340 345 350
Tyr Val Ala Met Tyr Arg Glu Ala Lys Glu Cys Leu Tyr Val Glu Pro
355 360 365
Asp Thr Glu Arg Gly Lys Lys Gly Val Tyr Tyr Tyr Asn Asn Lys Leu
370 375 380

<210> 24
<211> 1323
<212> PRT
<213> 酿酒酵母
<400> 24

Met Ala Asn Val Glu Lys Pro Asn Asp Cys Ser Gly Phe Pro Val Val
1 5 10 15
Asp Leu Asn Ser Cys Phe Ser Asn Gly Phe Asn Asn Gly Lys Gln Glu
20 25 30
Ile Glu Met Glu Thr Asp Asp Ser Pro Ile Leu Leu Met Ser Ser Ser
35 40 45
Ala Ser Arg Glu Asn Ser Asn Thr Phe Ser Val Ile Gln Arg Thr Pro
50 55 60
Asp Gly Lys Ile Ile Thr Thr Asn Asn Asn Met Asn Ser Lys Ile Asn
65 70 75 80
Lys Gln Leu Asp Lys Leu Pro Glu Asn Leu Arg Leu Asn Gly Arg Thr
85 90 95
Pro Ser Gly Lys Leu Arg Ser Phe Val Cys Glu Val Cys Thr Arg Ala
100 105 110
Phe Ala Arg Gln Glu His Leu Lys Arg His Tyr Arg Ser His Thr Asn
115 120 125
Glu Lys Pro Tyr Pro Cys Gly Leu Cys Asn Arg Cys Phe Thr Arg Arg
130 135 140
Asp Leu Leu Ile Arg His Ala Gln Lys Ile His Ser Gly Asn Leu Gly
145 150 155 160
Glu Thr Ile Ser His Thr Lys Lys Val Ser Arg Thr Ile Thr Lys Ala
165 170 175
Arg Lys Asn Ser Ala Ser Ser Val Lys Phe Gln Thr Pro Thr Tyr Gly

180 185 190

Thr Pro Asp Asn Gly Asn Phe Leu Asn Arg Thr Thr Ala Asn Thr Arg

195 200 205

Arg Lys Ala Ser Pro Glu Ala Asn Val Lys Arg Lys Tyr Leu Lys Lys

210 215 220

Leu Thr Arg Arg Ala Ala Phe Ser Ala Gln Ser Ala Ser Ser Tyr Ala

225 230 235 240

Leu Pro Asp Gln Ser Ser Leu Glu Gln His Pro Lys Asp Arg Val Lys

245 250 255

Phe Ser Thr Pro Glu Leu Val Pro Leu Asp Leu Lys Asn Pro Glu Leu

260 265 270

Asp Ser Ser Phe Asp Leu Asn Met Asn Leu Asp Leu Asn Leu Asn Leu

275 280 285

Asp Ser Asn Phe Asn Ile Ala Leu Asn Arg Ser Asp Ser Ser Gly Ser

290 295 300

Thr Met Asn Leu Asp Tyr Lys Leu Pro Glu Ser Ala Asn Asn Tyr Thr

305 310 315 320

Tyr Ser Ser Gly Ser Pro Thr Arg Ala Tyr Val Gly Ala Asn Thr Asn

325 330 335

Ser Lys Asn Ala Ser Phe Ser Asp Ala Asp Leu Leu Ser Ser Ser Tyr

340 345 350

Trp Ile Lys Ala Tyr Asn Asp His Leu Phe Ser Val Ser Glu Ser Asp

355 360 365

Glu Thr Ser Pro Met Asn Ser Glu Leu Asn Asp Thr Lys Leu Ile Val

370 375 380

Pro Asp Phe Lys Ser Thr Ile His His Leu Lys Asp Ser Arg Ser Ser

385 390 395 400

Ser Trp Thr Val Ala Ile Asp Asn Asn Ser Asn Asn Asn Lys Val Ser

405 410 415

Asp Asn Gln Pro Asp Phe Val Asp Phe Gln Glu Leu Leu Asp Asn Asp

420 425 430

Thr Leu Gly Asn Asp Leu Leu Glu Thr Thr Ala Val Leu Lys Glu Phe

435 440 445

Glu Leu Leu His Asp Asp Ser Val Ser Ala Thr Ala Thr Ser Asn Glu

450 455 460

Ile Asp Leu Ser His Leu Asn Leu Ser Asn Ser Pro Ile Ser Pro His

465 470 475 480

Lys Leu Ile Tyr Lys Asn Lys Glu Gly Thr Asn Asp Asp Met Leu Ile

485 490 495

Ser Phe Gly Leu Asp His Pro Ser Asn Arg Glu Asp Asp Leu Asp Lys
500 505 510
Leu Cys Asn Met Thr Arg Asp Val Gln Ala Ile Phe Ser Gln Tyr Leu
515 520 525
Lys Gly Glu Glu Ser Lys Arg Ser Leu Glu Asp Phe Leu Ser Thr Ser
530 535 540
Asn Arg Lys Glu Lys Pro Asp Ser Gly Asn Tyr Thr Phe Tyr Gly Leu
545 550 555 560
Asp Cys Leu Thr Leu Ser Lys Ile Ser Arg Ala Leu Pro Ala Ser Thr
565 570 575
Val Asn Asn Lys Gln Pro Ser His Ser Ile Glu Ser Lys Leu Phe Asn
580 585 590
Glu Pro Met Arg Asn Met Cys Ile Lys Val Leu Arg Tyr Tyr Glu Lys
595 600 605
Phe Ser His Asp Ser Ser Glu Ser Val Met Asp Ser Asn Pro Asn Leu
610 615 620
Leu Ser Lys Glu Leu Leu Met Pro Ala Val Ser Glu Leu Asn Glu Tyr
625 630 635 640
Leu Asp Leu Phe Lys Asn Asn Phe Leu Pro His Phe Pro Ile Ile His
645 650 655
Pro Ser Leu Leu Asp Leu Asp Leu Asp Ser Leu Gln Arg Tyr Thr Asn
660 665 670
Glu Asp Gly Tyr Asp Asp Ala Glu Asn Ala Gln Leu Phe Asp Arg Leu
675 680 685
Ser Gln Gly Thr Asp Lys Glu Tyr Asp Tyr Glu His Tyr Gln Ile Leu
690 695 700
Ser Ile Ser Lys Ile Val Cys Leu Pro Leu Phe Met Ala Thr Phe Gly
705 710 715 720
Ser Leu His Lys Phe Gly Tyr Lys Ser Gln Thr Ile Glu Leu Tyr Glu
725 730 735
Met Ser Arg Arg Ile Leu His Ser Phe Leu Glu Thr Lys Arg Arg Cys
740 745 750
Arg Ser Thr Thr Val Asn Asp Asn Tyr Gln Asn Ile Trp Leu Met Gln
755 760 765
Ser Leu Ile Leu Ser Phe Met Phe Ala Leu Val Ala Asp Tyr Leu Glu
770 775 780
Lys Ile Asp Ser Ser Leu Met Lys Arg Gln Leu Ser Ala Leu Cys Ser
785 790 795 800
Thr Ile Arg Ser Asn Cys Leu Pro Thr Ile Ser Ala Asn Ser Glu Lys

805 810 815
Ser Ile Asn Asn Asn Asn Glu Pro Leu Thr Phe Gly Ser Pro Leu Gln
820 825 830
Tyr Ile Ile Phe Glu Ser Lys Ile Arg Cys Thr Leu Met Ala Tyr Asp
835 840 845
Phe Cys Gln Phe Leu Lys Cys Phe Phe His Ile Lys Phe Asp Leu Ser
850 855 860
Ile Lys Glu Lys Asp Val Glu Thr Ile Tyr Ile Pro Asp Asn Glu Ser
865 870 875 880
Lys Trp Ala Ser Glu Ser Ile Ile Cys Asn Gly His Val Val Gln Lys
885 890 895
Gln Asn Phe Tyr Asp Phe Arg Asn Phe Tyr Tyr Ser Phe Thr Tyr Gly
900 905 910
His Leu His Ser Ile Pro Glu Phe Leu Gly Ser Ser Met Ile Tyr Tyr
915 920 925
Glu Tyr Asp Leu Arg Lys Gly Thr Lys Ser His Val Phe Leu Asp Arg
930 935 940
Ile Asp Thr Lys Arg Leu Glu Arg Ser Leu Asp Thr Ser Ser Tyr Gly
945 950 955 960
Asn Asp Asn Met Ala Ala Thr Asn Lys Asn Ile Ala Ile Leu Ile Asp
965 970 975
Asp Thr Ile Ile Leu Lys Asn Asn Leu Met Ser Met Arg Phe Ile Lys
980 985 990
Gln Ile Asp Arg Ser Phe Thr Glu Lys Val Arg Lys Gly Gln Ile Ala
995 1000 1005
Lys Ile Tyr Asp Ser Phe Leu Asn Ser Ala Arg Leu Asn Phe Leu
1010 1015 1020
Lys Asn Tyr Ser Val Glu Val Leu Cys Glu Phe Leu Val Ala Leu
1025 1030 1035
Asn Phe Ser Ile Arg Asn Ile Ser Ser Leu Tyr Val Glu Glu Glu
1040 1045 1050
Ser Asp Cys Ser Gln Arg Met Asn Ser Pro Glu Leu Pro Arg Ile
1055 1060 1065
His Leu Asn Asn Gln Ala Leu Ser Val Phe Asn Leu Gln Gly Tyr
1070 1075 1080
Tyr Tyr Cys Phe Ile Leu Ile Ile Lys Phe Leu Leu Asp Phe Glu
1085 1090 1095
Ala Thr Pro Asn Phe Lys Leu Leu Arg Ile Phe Ile Glu Leu Arg
1100 1105 1110

Ser Leu Ala Asn Ser Ile Leu Leu Pro Thr Leu Ser Arg Leu Tyr
1115 1120 1125
Pro Gln Glu Phe Ser Gly Phe Pro Asp Val Val Phe Thr Gln Gln
1130 1135 1140
Phe Ile Asn Lys Asp Asn Gly Met Leu Val Pro Gly Leu Ser Ala
1145 1150 1155
Asn Glu His His Asn Gly Ala Ser Ala Ala Val Lys Thr Lys Leu
1160 1165 1170
Ala Lys Lys Ile Asn Val Glu Gly Leu Ala Met Phe Ile Asn Glu
1175 1180 1185
Ile Leu Val Asn Ser Phe Asn Asp Thr Ser Phe Leu Asn Met Glu
1190 1195 1200
Asp Pro Ile Arg Asn Glu Phe Ser Phe Asp Asn Gly Asp Arg Ala
1205 1210 1215
Val Thr Asp Leu Pro Arg Ser Ala His Phe Leu Ser Asp Thr Gly
1220 1225 1230
Leu Glu Gly Ile Asn Phe Ser Gly Leu Asn Asp Ser His Gln Thr
1235 1240 1245
Val Ser Thr Leu Asn Leu Leu Arg Tyr Gly Glu Asn His Ser Ser
1250 1255 1260
Lys His Lys Asn Gly Gly Lys Gly Gln Gly Phe Ala Glu Lys Tyr
1265 1270 1275
Gln Leu Ser Leu Lys Tyr Val Thr Ile Ala Lys Leu Phe Phe Thr
1280 1285 1290
Asn Val Lys Glu Asn Tyr Ile His Cys His Met Leu Asp Lys Met
1295 1300 1305
Ala Ser Asp Phe His Thr Leu Glu Asn His Leu Lys Gly Asn Ser
1310 1315 1320

<210> 25
<211> 455
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 25

Met Met Ser Phe Ser Val Leu Gln Val Lys Arg Leu Gln Pro Glu Leu
1 5 10 15
Ile Thr Pro Ala Lys Ser Thr Pro Gln Glu Thr Lys Phe Leu Ser Asp
20 25 30

Ile Asp Asp Gln Glu Ser Leu Arg Val Gln Ile Pro Ile Ile Met Cys
35 40 45
Tyr Lys Asp Asn Pro Ser Leu Asn Lys Asn Arg Asn Pro Ala Lys Ala
50 55 60
Ile Arg Glu Ala Leu Ser Arg Ala Leu Val Tyr Tyr Tyr Pro Leu Ala
65 70 75 80
Gly Arg Leu Arg Glu Gly Pro Asn Arg Lys Leu Val Val Asp Cys Asn
85 90 95
Gly Glu Gly Ile Leu Phe Val Glu Ala Ser Ala Asp Val Thr Leu Glu
100 105 110
Gln Leu Gly Asp Lys Ile Leu Pro Pro Cys Pro Leu Leu Glu Glu Phe
115 120 125
Leu Tyr Asn Phe Pro Gly Ser Asp Gly Ile Ile Asp Cys Pro Leu Leu
130 135 140
Leu Ile Gln Val Thr Cys Leu Thr Cys Gly Gly Phe Ile Leu Ala Leu
145 150 155 160
Arg Leu Asn His Thr Met Cys Asp Ala Ala Gly Leu Leu Leu Phe Leu
165 170 175
Thr Ala Ile Ala Glu Met Ala Arg Gly Ala His Ala Pro Ser Ile Leu
180 185 190
Pro Val Trp Glu Arg Glu Leu Leu Phe Ala Arg Asp Pro Pro Arg Ile
195 200 205
Thr Cys Ala His His Glu Tyr Glu Asp Val Ile Gly His Ser Asp Gly
210 215 220
Ser Tyr Ala Ser Ser Asn Gln Ser Asn Met Val Gln Arg Ser Phe Tyr
225 230 235 240
Phe Gly Ala Lys Glu Met Arg Val Leu Arg Lys Gln Ile Pro Pro His
245 250 255
Leu Ile Ser Thr Cys Ser Thr Phe Asp Leu Ile Thr Ala Cys Leu Trp
260 265 270
Lys Cys Arg Thr Leu Ala Leu Asn Ile Asn Pro Lys Glu Ala Val Arg
275 280 285
Val Ser Cys Ile Val Asn Ala Arg Gly Lys His Asn Asn Val Arg Leu
290 295 300
Pro Leu Gly Tyr Tyr Gly Asn Ala Phe Ala Phe Pro Ala Ala Ile Ser
305 310 315 320
Lys Ala Glu Pro Leu Cys Lys Asn Pro Leu Gly Tyr Ala Leu Glu Leu
325 330 335
Val Lys Lys Ala Lys Ala Thr Met Asn Glu Glu Tyr Leu Arg Ser Val

340 345 350

Ala Asp Leu Leu Val Leu Arg Gly Arg Pro Gln Tyr Ser Ser Thr Gly

355 360 365

Ser Tyr Leu Ile Val Ser Asp Asn Thr Arg Val Gly Phe Gly Asp Val

370 375 380

Asp Phe Gly Trp Gly Gln Pro Val Phe Ala Gly Pro Val Lys Ala Leu

385 390 395 400

Asp Leu Ile Ser Phe Tyr Val Gln His Lys Asn Asn Thr Glu Asp Gly

405 410 415

Ile Leu Val Pro Met Cys Leu Pro Ser Ser Ala Met Glu Arg Phe Gln

420 425 430

Gln Glu Leu Glu Arg Ile Thr Gln Glu Pro Lys Glu Asp Ile Cys Asn

435 440 445

Asn Leu Arg Ser Thr Ser Gln

450 455

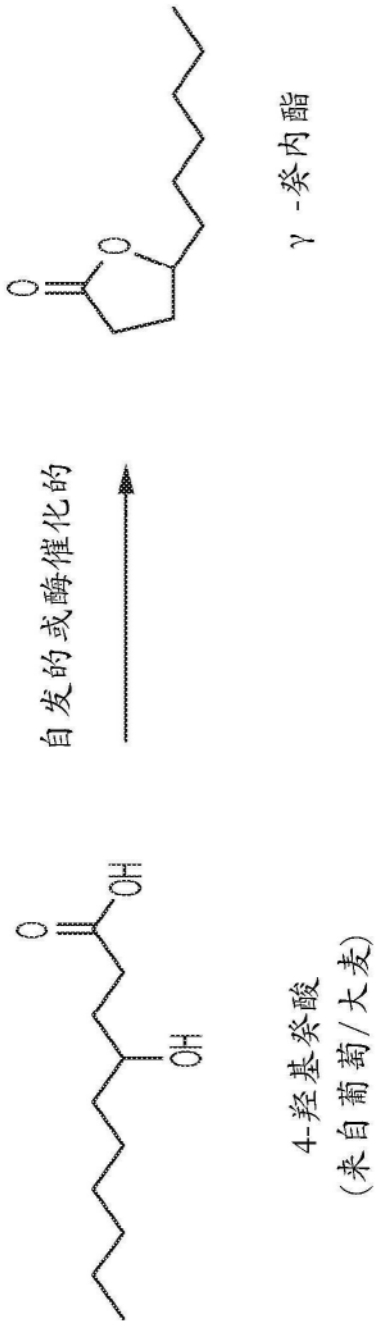


图1

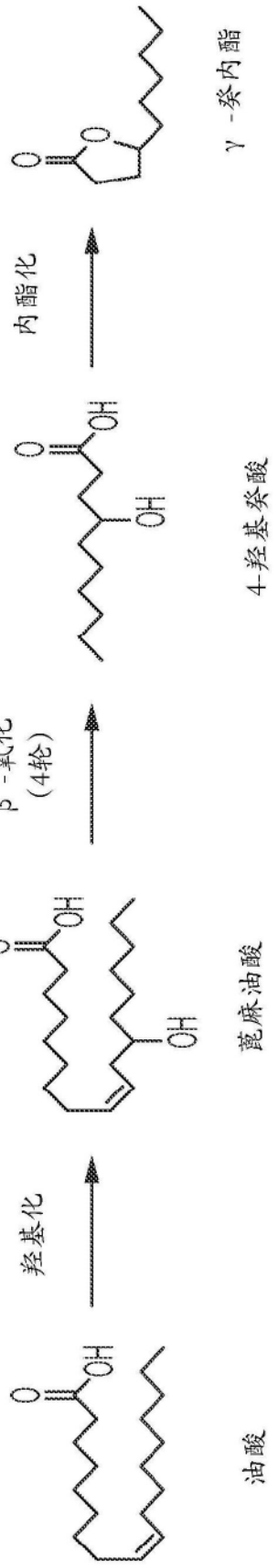


图2

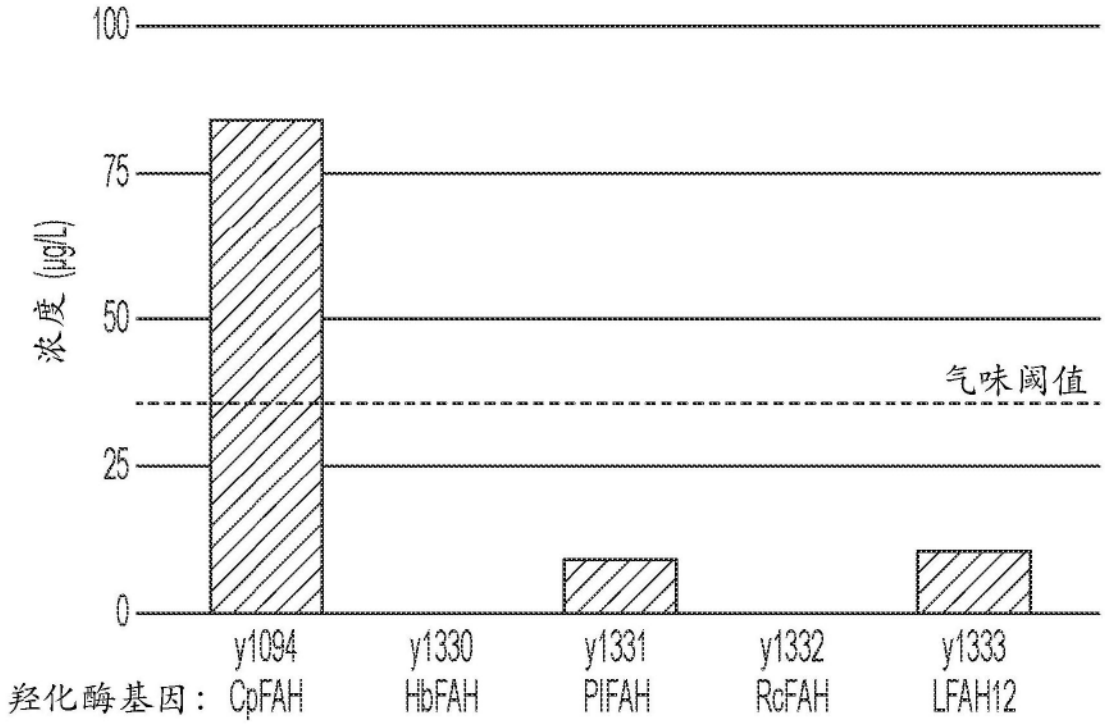

100
75
50
25
0
浓度(μg/L)
气味阈值
y1094
y1330
y1331
y1332
y1333
羟化酶基因：
CpFAH
HbFAH
PlFAH
RcFAH
LFAH12

图3

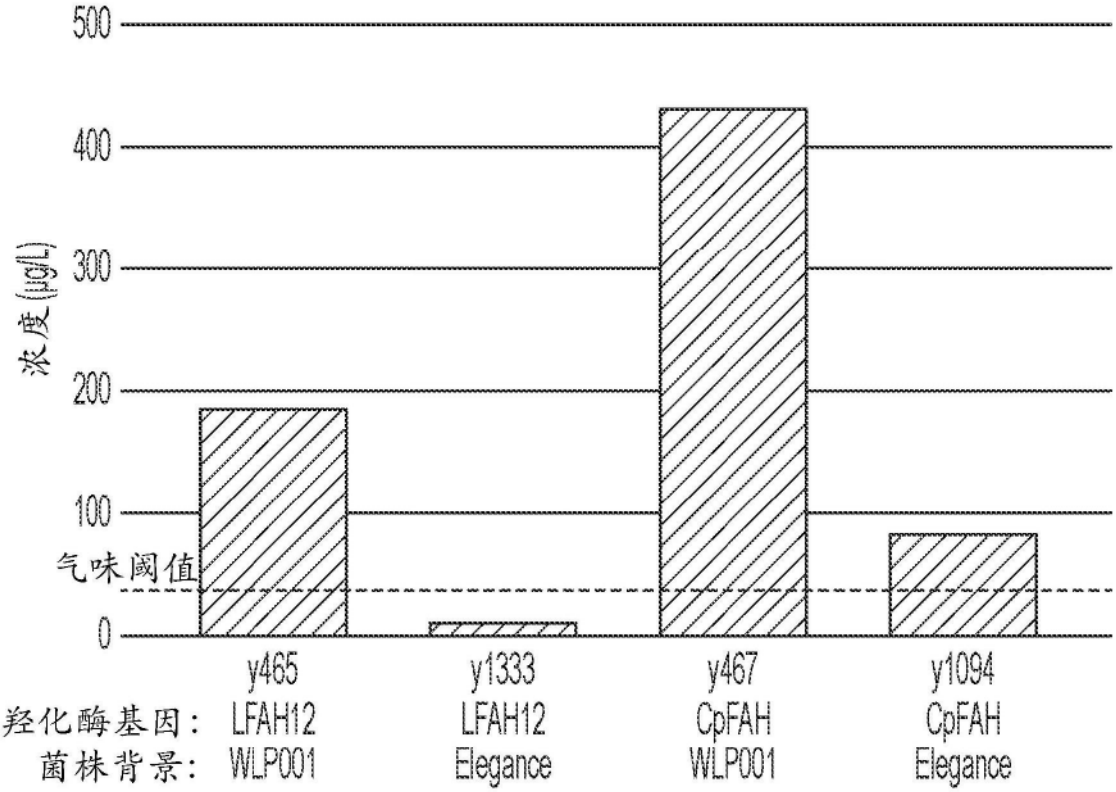

500
400
300
200
100
0
浓度(μg/L)
气味阈值
y465
y1333
y467
y1094
羟化酶基因：
LFAH12
LFAH12
CpFAH
CpFAH
菌株背景：
WLP001
Elegance
WLP001
Elegance

图4

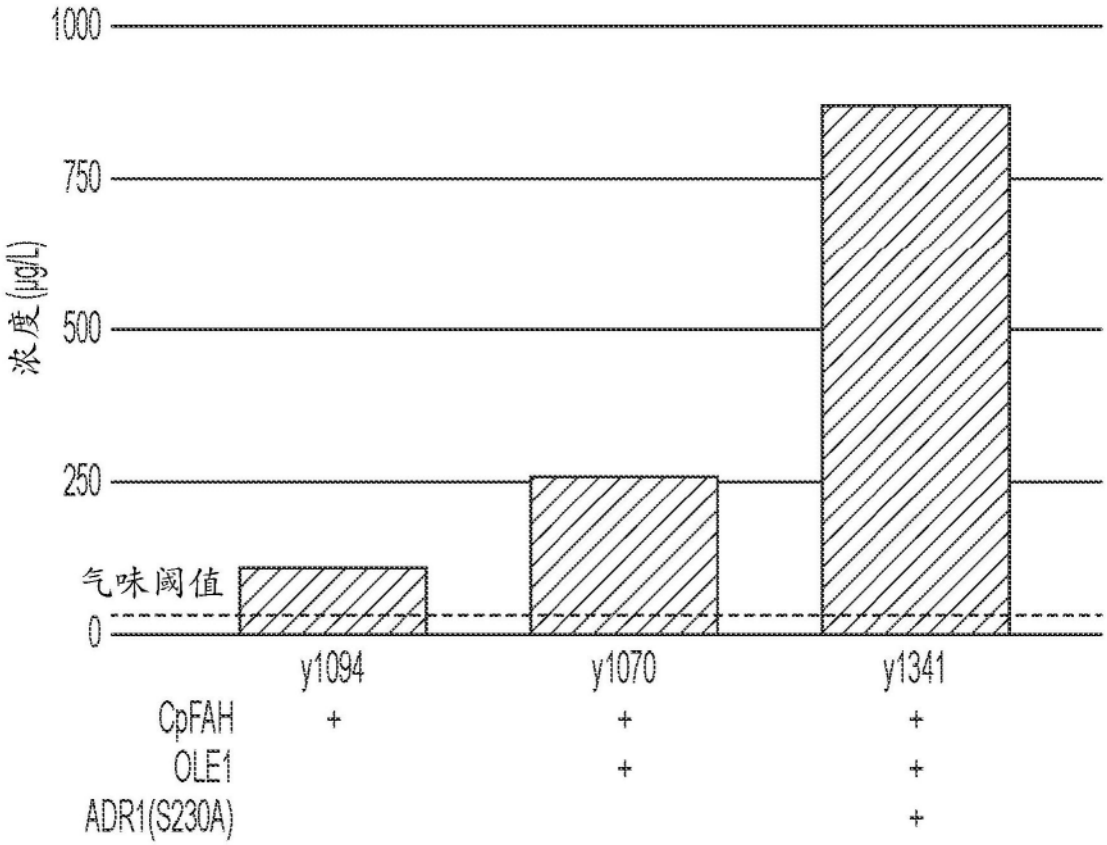

1000
750
500
250
0
浓度(μg/L)
气味阈值
y1094
y1070
y1341
CpFAH
OLE1
ADR1(S230A)
+
+
+
+
+
+

图5

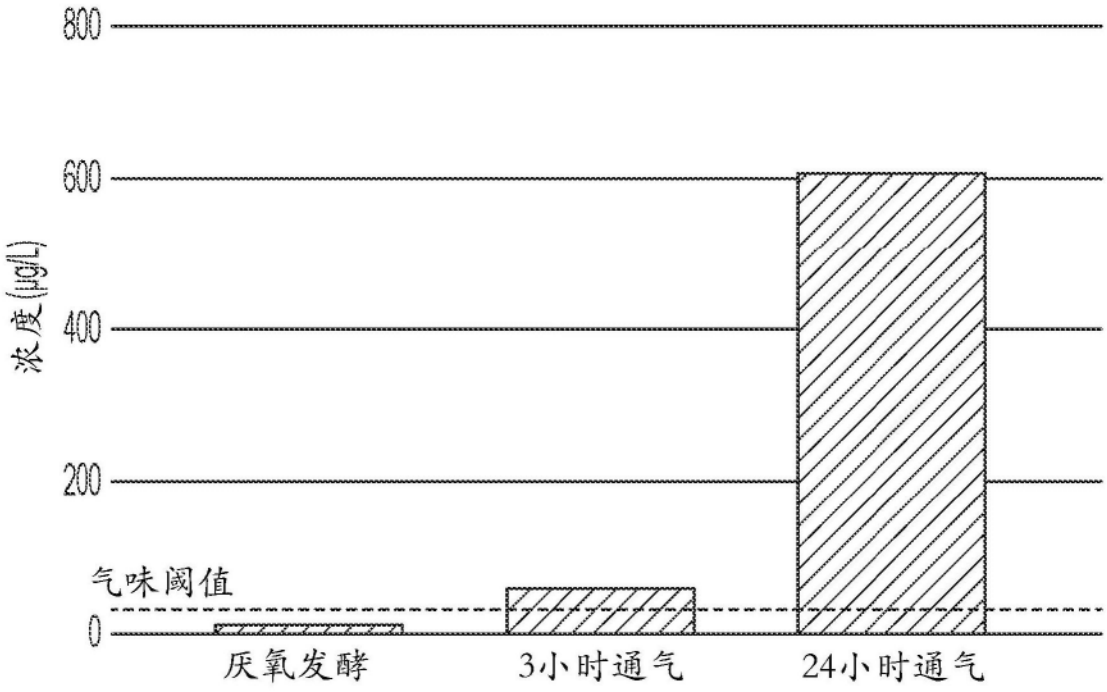

800
600
400
200
0
浓度(μg/L)
气味阈值
厌氧发酵
3小时通气
24小时通气

图6