



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107208118 A

(43)申请公布日 2017.09.26

(21)申请号 201580062513.8

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理

(22)申请日 2015.09.18

有限公司 44224

(30)优先权数据

代理人 胡杰 王雯雯

62/052,341 2014.09.18 US

(51)Int.Cl.

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C12P 7/16(2006.01)

2017.05.17

C12P 7/42(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/050923 2015.09.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/044713 EN 2016.03.24

(71)申请人 基因组股份公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 普里蒂·法克雅

安东尼·P·博加德

埃里克·罗兰·努涅斯万那米

权利要求书6页 说明书234页 附图11页

(54)发明名称

具有提高的能源效率的非天然微生物

(57)摘要

本发明提供了含有用于通过乙酰辅酶A或通过草酰乙酸和乙酰辅酶A提高碳通量的酶途径和/或代谢修饰的非天然微生物。本发明的实施例包括微生物，该微生物具有包含磷酸转酮酶的、获得乙酰辅酶A和草酰乙酸的途径(PK途径)。该微生物还具有(i)增强非磷酸转移酶(非PTS)系统的糖摄取活性的基因修饰，和/或(ii)在微生物的电子传递链(ETC)中的提高ATP生产效率的提高了还原当量可利用性的基因修饰，或两者兼有。所述微生物可以可选地包括(iii)维持、减弱或消除磷酸转移酶系统(PTS)的糖摄取活性的基因修饰。通过乙酰辅酶A和草酰乙酸而提高的碳通量，可用于生产生物衍生化合物，并且微生物可以进一步包括能够生产生物衍生化合物的途径。

1. 一种能够生产乙酰辅酶A或生产乙酰辅酶A和草酰乙酸的非天然微生物,所述微生物包含:

(a) 包含用于生产乙酰辅酶A的磷酸转酮酶的途径(PK途径);

(b) 用于糖摄取的非磷酸转移酶系统(非PTS),所述系统包括增加非PTS活性的修饰;和可选地

(c) 减弱或消除PTS活性的修饰。

2. 根据权利要求1所述的非天然微生物,其特征在于,其还包含所述微生物的电子传递链中的一种或多种修饰,所述修饰用于提高ATP生产效率,用于增强还原当量可利用性,或两者兼有。

3. 一种能够生产乙酰辅酶A或生产乙酰辅酶A和草酰乙酸的非天然微生物,所述微生物包含:

(a) 包含用于生产乙酰辅酶A的磷酸转酮酶的途径(PK途径);和

(b) 所述微生物的电子传递链中的一种或多种修饰,所述修饰用于提高ATP生产效率,用于增强还原当量可利用性,或两者兼有。

4. 根据权利要求3所述的非天然微生物,其特征在于,还包含(c) 用于糖摄取的非磷酸转移酶系统(非PTS),所述系统包括增加非PTS活性的修饰;(d) 减弱或消除PTS活性的修饰;或(c) 和(d) 两者兼有。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,所述PK途径包含编码PK途径酶的一种、两种或三种外源核酸,其中所述PK途径酶的表达量足以增加乙酰辅酶A的生产。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,所述PK途径包括:

(c1) 1T和1V;或

(c2) 1T、1W和1X;

其中1T是果糖-6-磷酸磷酸转酮酶,其中1V是磷酸转乙酰酶,其中1W是乙酸激酶,其中1X是乙酰CoA转移酶、乙酰辅酶A合成酶或乙酰辅酶A连接酶。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,所述PK途径包括:

(c3) 1U和1V;

(c4) 1U、1W和1X;

其中1U是木酮糖-5-磷酸磷酸转酮酶,其中1V是磷酸转乙酰酶,其中1W是乙酸激酶,其中1X是乙酰CoA转移酶、乙酰辅酶A合成酶或乙酰辅酶A连接酶。

8. 根据权利要求1或4所述的非天然微生物,其特征在于,所述减弱或消除PTS活性的修饰是对PTS酶或蛋白质的减弱或消除。

9. 根据权利要求8所述的非天然微生物,其特征在于,所述修饰降低PTS酶或蛋白质的表达从而减弱或消除PTS活性,或所述修饰降低PTS酶或蛋白质的活性以减弱或消除PTS活性。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,其具有减弱或消除的PTS酶或蛋白质的表达,其中所述PTS酶或蛋白质选自酶I(EI)、组氨酸磷酸载体蛋白(HPr)、酶II(EII)和跨膜酶IIC(EIIC)。

11. 根据上述权利要求中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,其具有通过改变E1

而引起的减弱或消除的PTS活性表达。

12. 根据上述权利要求中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,其具有由在大肠杆菌中的ptsI或大肠杆菌ptsI同系物而引起的减弱或消除的PTS活性。

13. 根据权利要求1、2或4-12中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,所述增加非PTS活性的修饰包括增加非PTS透性酶、非PTS糖激酶、易化蛋白或其组合的表达。

14. 根据权利要求13所述的非天然微生物,其特征在于,所述非PTS透性酶是葡萄糖透性酶,和/或所述非PTS糖激酶是葡萄糖激酶。

15. 根据权利要求13所述的非天然微生物,其特征在于,所述易化蛋白结合葡萄糖并由g1f编码。

16. 根据权利要求13或14所述的非天然微生物,其特征在于,所述葡萄糖激酶由大肠杆菌g1k或大肠杆菌g1k同系物编码,并且所述透性酶由大肠杆菌中的galP或大肠杆菌galP同系物编码。

17. 根据权利要求13-16中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,所述非PTS包含一种、两种、三种或更多种编码非-PTS酶或蛋白质的外源核酸,所述非-PTS酶或蛋白质表达量足以增加非PTS活性。

18. 根据上述权利要求中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,其能够具有的糖摄取速率比不包括所述增加非PTS活性的修饰的微生物的糖摄取速率至少高10%、25%、50%、75%、100%、125%或150%。

19. 根据前述权利要求中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,还包含减弱或消除丙酮酸激酶活性的修饰。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,还包含增强草酰乙酸合成的一种或多种修饰。

21. 根据权利要求20所述的非天然微生物,其特征在于,所述增强草酰乙酸合成的一种或多种修饰包括:增加磷酸烯醇丙酮酸(PEP)合成酶、丙酮酸羧化酶、磷酸烯醇丙酮酸羧化酶、苹果酸酶或其组合的表达或活性。

22. 根据权利要求21所述的非天然微生物,其特征在于,所述PEP合成酶由大肠杆菌中的ppsA或大肠杆菌ppsA同系物编码。

23. 根据权利要求21所述的非天然微生物,其特征在于,所述磷酸烯醇丙酮酸羧化酶由大肠杆菌中的ppc或大肠杆菌ppc同系物编码。

24. 根据权利要求21所述的非天然微生物,其特征在于,所述丙酮酸羧化酶由菜豆根瘤菌Rhizobium etli、乳酸乳球菌Lactococcus lactis中的pyc或菜豆根瘤菌Rhizobium etli或乳酸乳球菌Lactococcus lactis pyc同系物编码。

25. 根据权利要求21所述的非天然微生物,其特征在于,所述苹果酸酶由大肠杆菌中的sfcA或maeB、或者大肠杆菌sfcA或maeB同系物编码。

26. 根据权利要求1-25中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,其进一步包含引起一种或多种选自核糖-5-磷酸异构酶、核酮糖-5-磷酸表异构酶、转醛醇酶和转酮醇酶的酶的表达或增加表达的修饰。

27. 根据权利要求2-26中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,所述非天然微生物在所述微生物的电子传递链中具有增强ATP生产效率的一种或多种修饰,所述修饰包括(i)

减弱或消除不发生质子易位的NADH依赖性脱氢酶,或者 (ii) 减弱或消除第一细胞色素氧化酶,所述第一细胞色素氧化酶的每对电子的质子易位效率低于由所述微生物表达的具有较高质子易位效率的第二细胞色素氧化酶,或两者兼有,其中所述第一细胞色素氧化酶和第二细胞色素氧化酶是天然的或异源的。

28. 根据权利要求27所述的非天然微生物,其特征在于,所述第一细胞色素氧化酶和第二细胞色素氧化酶是天然细胞色素氧化酶,或所述第一细胞色素氧化酶是天然的而所述第二细胞色素氧化酶是异源的。

29. 根据权利要求27或28所述的非天然微生物,其特征在于,所述第一细胞色素氧化酶由cydAB、appBC、ygiN或其任意组合编码。

30. 根据权利要求27-29中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,所述NADH依赖性脱氢酶是Ndh、WrbA、YhdH、YieF、YtfG、Qor和MdaB中的一种或多种。

31. 根据权利要求27-30中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,所述在微生物的电子传递链中的提高ATP生产效率的一种或多种修饰,包括(i) 增加天然或异源NADH脱氢酶的表达;(ii) 通过减弱arcA而增加天然或异源细胞色素氧化酶的表达,或(i) 和(ii) 两者兼有。

32. 根据权利要求27-31中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,所述非天然微生物具有增强还原当量可利用性的一种或多种修饰,其中所述还原当量为NADH、NADPH或两者皆有。

33. 根据权利要求32所述的非天然微生物,其特征在于,所述用于增强还原当量可利用性的修饰包括减弱或消除非(质子)易位NADH脱氢酶。

34. 根据权利要求33所述的非天然微生物,其特征在于,所述非(质子)易位NADH脱氢酶选自大肠杆菌Ndh、WrbA、YhdH、YieF、YtfG、Qor、MdaB及其同系物。

35. 根据权利要求27所述的非天然微生物,其特征在于,在所述微生物中,所述用于增强还原当量可利用性的修饰包括(i) 增加丙酮酸脱氢酶的表达或活性,(ii) 增加丙酮酸甲酸裂解酶和生产NADH、NADPH或二者皆有的甲酸脱氢酶的表达或活性,(iii) 减弱或消除不生产NADH的天然甲酸脱氢酶,或(i)-(iii) 的任意组合。

36. 根据前述权利要求中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,还包含甲醛同化途径。

37. 根据权利要求36所述的非天然微生物,其特征在于,其包含从Xu5P至F6P或从核酮糖-5-磷酸(Ru5P)至F6P的途径。

38. 根据权利要求37所述的非天然微生物,其特征在于,所述从Xu5P或Ru5P到F6P的途径包括:

(d1) 1B和1C; 和/或

(d2) 1D和1Z;

其中1B是3-己糖-6-磷酸合成酶且1C是6-磷酸-3-己糖异构酶;1D是二羟基丙酮合成酶且1Z是果糖-6-磷酸醛缩酶。

39. 根据上述权利要求中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,还包含甲醇氧化途径。

40. 根据权利要求39所述的非天然微生物,其特征在于,其包含至少一种编码甲醇氧化

途径酶的外源核酸，所述甲醇氧化途径酶的表达量足以在甲醇存在下生产甲醛，其中所述甲醇氧化途径包括甲醇脱氢酶，并且可选地其中所述甲醇氧化途径酶是甲醇脱氢酶。

41. 根据前述权利要求中任一项所述的非天然微生物，其特征在于，其还包括减弱一种或多种选自DHA激酶、甲醇氧化酶、PQQ依赖性甲醇脱氢酶、DHA合成酶或其任意组合的内源性酶。

42. 根据前述权利要求中任一项所述的非天然微生物，其特征在于，其还包括减弱一种或多种竞争性甲醛同化或异化途径的内源酶。

43. 根据前述权利要求中任一项所述的非天然微生物，其特征在于，与用于不包括磷酸转酮酶途径的微生物生长的培养基相比，所述非天然微生物能够在具有较低比氧供应速率的培养基中生长。

44. 根据前述权利要求中任一项所述的非天然微生物，其特征在于，还包含能够生产琥珀酰辅酶A、丙二酰辅酶A、乙酰乙酰辅酶A或其任意组合的途径，其中所述途径将乙酰辅酶A转化为所述琥珀酰辅酶A、丙二酰辅酶A、乙酰乙酰辅酶A或其任意组合。

45. 根据前述权利要求中任一项所述的非天然微生物，其特征在于，还包含能够生产生物衍生化合物的途径。

46. 根据权利要求45所述的非天然微生物，其特征在于，所述生物衍生化合物是醇、二醇、有机酸、烯烃、二烯、类异戊二烯、有机胺、有机醛、维生素、营养制剂或药物。

47. 根据权利要求46所述的非天然微生物，其特征在于，所述醇选自：

(i) 生物燃料醇，其中所述生物燃料是包含C3至C10碳原子的伯醇、仲醇、二醇或三醇；

(ii) 正丙醇或异丙醇；和

(iii) 脂肪醇，其中所述脂肪醇包含C4至C27碳原子、C8至C18碳原子、C12至C18碳原子或C12至C14碳原子。

48. 根据权利要求47所述的非天然微生物，其特征在于，所述生物燃料醇是1-丙醇、异丙醇、1-丁醇、异丁醇、1-戊醇、异戊烯醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-1-丁醇、1-己醇、3-甲基-1-戊醇、1-庚醇、4-甲基-1-己醇和5-甲基-1-己醇。

49. 根据权利要求45所述的非天然微生物，其特征在于，所述生物衍生化合物选自：

(i) 1,4-丁二醇或其中间体，其中所述中间体任选为4-羟基丁酸(4-HB)或 γ -丁内酯；

(ii) 丁二烯(1,3-丁二烯)或其中间体，其中所述中间体任选为1,4-丁二醇、1,3-丁二醇、2,3-丁二醇、巴豆醇、3-丁烯-2-醇(甲基乙烯基甲醇)、异戊二烯或3-丁烯-1-醇；

(iii) 1,3-丁二醇或其中间体，其中所述中间体任选为3-羟基丁酸(3-HB)、3-羟基戊-4-烯酸、2,4-戊二烯酸、巴豆醇或3-丁烯-1-醇

(iv) 己二酸、6-氨基己酸、己内酰胺、己二胺、乙酰丙酸或其中间体，其中所述中间体任选为己二酰辅酶A或4-氨基丁酰辅酶A；

(v) 甲基丙烯酸或其酯、3-羟基异丁酸、2-羟基异丁酸或其中间体，其中所述酯任选为甲基丙烯酸甲酯或聚(甲基丙烯酸甲酯)；

(vi) 1,2-丙二醇(丙二醇)、1,3-丙二醇、甘油、乙二醇、二甘醇、三甘醇、二丙二醇、三丙二醇、新戊二醇、双酚A或其中间体；

(vii) 琥珀酸或其中间体；

(viii) 脂肪醇、脂肪醛或包含C4至C27碳原子、C8至C18碳原子、C12至C18碳原子或C12

至C14碳原子的脂肪酸,其中所述脂肪醇任选为十二烷醇(C12;月桂醇)、十三烷醇(C13;1-十三烷醇、十三烷醇、异十三烷醇)、肉豆蔻醇(C14;1-十四烷醇)、十五烷醇(C15;1-十五醇、十五烷醇)、十六烷醇(C16;1-十六烷醇)、十七烷醇(C17;1-正十七醇、十七醇)和硬脂醇(C18;1-十八烷醇)或棕榈油醇(C16不饱和;顺-9-十六碳烯-1-醇);和

(ix) 类异戊二烯,任选的所述类异戊二烯是异戊二烯或其中间体。

50. 根据权利要求45所述的非天然微生物,其特征在于,包含1,3-丁二醇途径。
51. 根据权利要求45所述的非天然微生物,其特征在于,包含巴豆醇途径。
52. 根据权利要求45所述的非天然微生物,其特征在于,包含丁二烯途径。
53. 根据权利要求45所述的非天然微生物,其特征在于,包含1,4-丁二醇途径。
54. 根据权利要求45所述的非天然微生物,其特征在于,包含己二酸途径。
55. 根据权利要求45所述的非天然微生物,其特征在于,包含6-氨基己酸途径。
56. 根据权利要求45所述的非天然微生物,其特征在于,还包含己内酰胺途径。
57. 根据权利要求45所述的非天然微生物,其特征在于,包含己二胺途径。
58. 根据权利要求45所述的非天然微生物,其特征在于,包含甲基丙烯酸途径。
59. 根据权利要求45所述的非天然微生物,其特征在于,包含2-羟基异丁酸途径。
60. 根据权利要求45所述的非天然微生物,其特征在于,包含异戊二烯途径。
61. 根据权利要求45所述的非天然微生物,其特征在于,包含生产2,4-戊二烯酸的途径。
62. 根据权利要求45所述的非天然微生物,其特征在于,包含生产甲基乙烯基甲醇的途径。
63. 根据权利要求45所述的非天然微生物,其特征在于,包含琥珀酰辅酶A途径。
64. 根据前述权利要求中任一项所述的非天然微生物,其特征在于,其是细菌、真菌或酵母。
65. 根据权利要求64所述的非天然微生物,其特征在于,其是埃希氏杆菌Escherichia、棒状杆菌Corynebacterium、芽孢杆菌Bacillus、毕赤酵母Pichia或酵母Saccharomyces。
66. 一种生产生物衍生化合物的方法,包括在生产所述生物衍生化合物的条件和足够的时间内培养如权利要求45-65中任一项所述的非天然微生物。
67. 根据权利要求66所述的方法,其特征在于,所述方法还包括将所述生物衍生化合物与培养物中的其它组件分离。
68. 根据权利要求67所述的方法,其特征在于,所述分离包括萃取、连续液-液萃取、渗透蒸发、膜过滤、膜分离、反渗透、电渗析、蒸馏、结晶、离心、萃取过滤、离子交换层析、吸收色谱法或超滤。
69. 一种能够生产乙酰辅酶A或乙酰辅酶A和草酰乙酸的非天然微生物,所述微生物包含:
 - (a) 包含用于生产乙酰辅酶A的磷酸转酮酶的途径(PK途径);
 - (b) 用于糖摄取的非磷酸转移酶系统(非PTS),其包括增加非PTS活性的修饰;
 - (c) 减弱或消除丙酮酸激酶活性的修饰;以及可选地
 - (d) 减弱或消除PTS活性的修饰。
70. 根据权利要求69所述的非天然微生物,其特征在于,所述非天然微生物还包括在所

述微生物的电子传递链中的一种或多种修饰,所述修饰提高ATP生产效率、提高还原当量可利用性,或两者兼有。

71.一种能够生产乙酰辅酶A、或能够生产乙酰辅酶A和草酰乙酸的非天然微生物,所述微生物包括:

(a) 包含用于生产乙酰辅酶A的磷酸转酮酶的途径 (PK途径) ;

(b) 所述微生物的电子传递链中的一种或多种修饰,所述修饰用于提高ATP生产效率,用于增强还原当量可利用性,或两者兼有;和

(c) 减弱或消除丙酮酸激酶活性的修饰。

72.根据权利要求70所述的非天然微生物,其特征在于,还包含 (c) 用于糖摄取的非磷酸转移酶系统 (非PTS) ,所述系统包括增加非PTS活性的修饰; (d) 减弱或消除PTS活性的修饰;或 (c) 和 (d) 两者兼有。

具有提高的能源效率的非天然微生物

[0001] 优先权要求

[0002] 本申请要求2014年9月18日提交的名称为“具有提高的能量效率的非天然微生物(NON-NATURAL MICROBIAL ORGANISMS WITH IMPROVED ENERGETIC EFFICIENCY)”的美国临时专利申请序列号62/052,341的优先权，其公开内容通过引用并入本申请。

发明内容

[0003] 本发明提供了含有增强到乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A的碳通量的酶途径的非天然微生物，以及用于生产生物产物的方法，以及使用所述微生物制备的生物产物。

[0004] 一般地，提供了一种微生物，其制造乙酰辅酶A或制造草酰乙酸和乙酰辅酶A、具有磷酸转酮酶途径(PK途径)并具有(i)提高用于非磷酸转移酶系统(非PTS)的糖摄取活性的基因修饰和/或(ii)在微生物的电子传递链(ETC)中的提高ATP生产效率、提高还原当量可利用性或两者兼有的基因修饰。所述修饰提高了修饰微生物的能量效率。可选地，微生物可以包括(iii)维持、减弱或消除磷酸转移酶系统(PTS)的糖摄取活性的基因修饰。

[0005] 通过与本发明相关的实验研究，已经发现PK途径与(i)和/或(ii)以及可选地与(iii)的组合，通过乙酰辅酶A或通过草酰乙酸和乙酰辅酶A提高碳通量。这由此增加了可用于提高所需产物或其中间体(生物衍生化合物)生产的乙酰辅酶A和草酰乙酸，同时有利地最小化不期望的化合物。因此，含有通过乙酰辅酶A或通过草酰乙酸和乙酰辅酶A两者提高碳通量的酶途径，且具有如本申请所述的修饰的非天然微生物，可以增加中间体或产物如醇的生产(例如丙二醇或丁二醇)、二醇、有机酸、烯烃、二烯(例如丁二烯)、类异戊二烯(例如异戊二烯)、有机胺、有机醛、维生素、营养剂和药物。

[0006] 因此，在一个方面(例如，第一方面)中，本发明提供了一种非天然微生物，其包括(a)乙酰辅酶A途径，或包含磷酸转酮酶途径的草酰乙酸和乙酰辅酶A的途径，和(b)增加糖摄取的非PTS活性的基因修饰。可选地，该微生物可以包括(c)维持、减弱或消除PTS糖摄取活性的基因修饰。该基因修饰包括改变PTS或非PTS的酶或蛋白质、其活性、该酶或蛋白质的编码基因或基因表达的修饰。该微生物还可以具有生物衍生化合物途径，以及通过提高乙酰辅酶A合成或草酰乙酸和乙酰辅酶A(其作为中间体)合成来提高非PTS活性以提高生物衍生化合物生产的修饰。对非PTS的修饰可以将来自磷酸烯醇丙酮酸(PEP)的通量平衡为草酰乙酸和丙酮酸，这对依赖于内源性PTS系统进行糖摄取的微生物而言是一项进步，并且其可有利地进入生物衍生化合物途径。

[0007] PTS和非PTS可以允许主要摄取C5、C6或C12糖及其低聚物。具有糖(例如C6、C12、糖醇和氨基糖)摄取的PTS的非天然微生物，能够通过将PEP转化成丙酮酸而使糖磷酸化。非PTS允许通过易化子或透性酶摄取糖并随后通过激酶磷酸化。非PTS还允许摄取C5糖如木糖，二糖如乳糖、蜜二糖和麦芽糖。其他底物如抗坏血酸可被特定的PTS或非PTS酶或蛋白质识别。磷酸化糖然后通过糖酵解中的大部分反应，生产与微生物的电子传递链(ETC)相关的还原当量和ATP。

[0008] 示例性的PK途径可以包括以下酶：

- [0009] 果糖-6-磷酸磷酸转酮酶(1T)和磷酸转乙酰酶(1V)；
- [0010] 所有三种果糖-6-磷酸磷酸转酮酶(1T)、乙酸激酶(1W)和乙酰CoA转移酶，乙酰辅酶A合成酶，或乙酰辅酶A连接酶(1X)；
- [0011] 木酮糖-5-磷酸磷酸转酮酶(1U)和磷酸转乙酰酶(1V)；要么
- [0012] 所有三种木酮糖-5-磷酸磷酸转酮酶(1U)、乙酸激酶(1W)和乙酰CoA转移酶，乙酰辅酶A合成酶，或乙酰辅酶A连接酶(1X)。
- [0013] 第一方面中的非天然微生物，具有(a)包含磷酸转酮酶的草酰乙酸途径、乙酰辅酶A途径或草酰乙酸途径和乙酰辅酶A的途径，和(b)提高非PTS活性的基因修饰，可以可选地进一步包括一种或多种对微生物的电子传递链进行的提高ATP生产效率、提高还原当量可利用性或两者兼有的修饰。
- [0014] 在另一方面(例如，第二方面)，本发明提供了一种非天然微生物，其包括(a)包含磷酸转酮酶途径的草酰乙酸途径、乙酰辅酶A途径或草酰乙酸途径和乙酰辅酶A的途径，和(b)一种或多种对微生物的电子传递链进行的提高ATP生产效率、提高还原当量可利用性或两者兼有的修饰。例如，如本申请所述的令到达细胞色素氧化酶或电子传递链的复合物IV的每电子对的易位质子数量提高的修饰，其增加了供ATP合成酶用于生产ATP的质子。因此，通过增加通过电子传输链引导的每对电子生产的ATP量，细胞的能量效率(也称为P/O比)提高。类似地，减弱或消除不传输或低效转运质子的NADH脱氢酶的修饰，增加了可用于更有效的NADH脱氢酶(如nuo)的NADH库。同样地，细胞的能量效率提高。
- [0015] 第二方面的微生物可以包括替代碳源(例如甲醇、合成气、甘油、甲酸、甲烷)的同化途径，例如，如果PTS和非PTS被修饰、不存在于微生物中，或以其他方式不能提供期望的碳氢能源的流入。因此，制造草酰乙酸和/或乙酰辅酶A并含有磷酸转酮酶途径的微生物，还可以包括使用非糖碳底物如甘油、合成气、甲酸、甲烷和甲醇的途径。
- [0016] 增强微生物ETC功能的修饰，包括减弱或消除与有效的电子传递链功能竞争的酶或蛋白质的表达或活性。其示例是：减弱或消除不会转移质子的NADH脱氢酶，或减弱或消除每对电子的质子易位效率较低的细胞色素氧化酶。ETC修饰还包括增强微生物的ETC的酶或蛋白质的功能，特别是当这种功能具有速率限制性时。在细菌中增强酶或蛋白质的修饰的例子是：增加ETC的复合物I的酶或蛋白质的活性，并减弱或消除全局负调控因子arcA。
- [0017] 具有PK途径的微生物还可以在合成乙酰辅酶A和草酰乙酸之后合成琥珀酰辅酶A，而琥珀酰辅酶A可以进一步用于生物衍生化合物的产物途径。草酰乙酸是从磷酸烯醇丙酮酸或丙酮酸经添补反应而生产的。通过氧化TCA循环生产琥珀酰辅酶A，其中以乙酰辅酶A和草酰乙酸作为前体，经由使用草酰乙酸作为前体的还原型TCA循环，或通过氧化还原型TCA分支的组合。具有PK途径的微生物可以可选地进一步包括增加一种或多种可以使更高通量成为草酰乙酸的酶的活性，当草酰乙酸与乙酰辅酶A组合时，其可导致通过氧化型TCA和由其衍生的产物带来更高通量，或通过还原性TCA分支增加通量以用于生产琥珀酰辅酶A。可以在细胞中增加活性的酶的示例包括PEP合成酶、丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇丙酮酸羧化酶，其可以存在于第一或第二方面的微生物中。
- [0018] 可选地，具有PK途径的生物可进一步包括减弱或消除一种或多种内源性酶，以便进一步通过乙酰辅酶A或通过乙酰辅酶A和草酰乙酸增强碳通量，或对一种或多种编码所述酶的内源核酸的基因破坏。例如，所述减弱或消除的内源性酶可以是丙酮酸激酶的同功酶

之一,可以令其在第一或第二方面或两者的微生物中删除。

[0019] 本申请所述的微生物中通过乙酰辅酶A或通过草酰乙酸和乙酰辅酶A而提高的碳通量,可用于生产生物衍生化合物。因此,在另外的方面,微生物可进一步包括能生产所需生物衍生化合物的途径。也就是说,第一或第二方面的微生物可进一步包括促进生物衍生化合物生产的一种或多种途径酶。

[0020] 生物衍生化合物包括醇、二醇、有机酸、烯烃、二烯、类异戊二烯、烯烃、有机胺、有机醛、维生素、营养剂和药物。在一些实施例中,生物衍生化合物是1,3-丁二醇、巴豆醇、丁二烯、3-丁烯-2-醇、1,4-丁二醇、己二酸、6-氨基己酸、己内酰胺、己二胺、丙烯、异戊二烯、甲基丙烯酸、2-羟基异丁酸或其中间体。一种或多种途径酶可以通过乙酰辅酶A或通过草酰乙酸和乙酰辅酶A两者而提高碳通量,作为促进生物衍生化合物生产的前体。

附图说明

[0021] 如图1-14所示的化合物缩写如下。MeOH或MEOH=甲醇;Fald=甲醛;GLC=葡萄糖;G6P=葡萄糖-6-磷酸;H6P=己糖-6-磷酸;F6P=果糖-6-磷酸;FDP=果糖二磷酸或果糖-1,6-二磷酸;13DPG:1,3-二磷酸甘油酸,3PG=3-磷酸甘油酸,2PG=2-磷酸甘油酸,DHA=二羟基丙酮;DHAP=磷酸二羟丙酮;G3P=甘油醛-3-磷酸;PEP:磷酸烯醇丙酮酸,PYR=丙酮酸;ACTP=乙酰磷酸;ACCOA=乙酰辅酶A;AACOA=乙酰乙酰辅酶A;MALCOA=丙二酰辅酶A;E4P=赤藓糖-4-磷酸:Xu5P=木酮糖-5-磷酸;Ru5P=核酮糖-5-磷酸;S7P=景天庚酮糖-7-磷酸:R5P=核糖-5-磷酸;XYL=木糖;TCA=三羧酸;PEP=磷酸烯醇丙酮酸;OAA=草酰乙酸;MAL=苹果酸;CIT=柠檬酸;ICIT=异柠檬酸;AKG= α -酮戊二酸;FUM=富马酸;SUCC=琥珀酸;SUCCOA=琥珀酰辅酶A;3HBCOA=3-羟基丁酰辅酶A;3-HB=3-羟基丁酸;3HBALD=3-羟基丁醛;13BD0=1,3-丁二醇;CROTCOA=巴豆酰辅酶A;CROT=巴豆酸;CROTALD=巴豆醛;CROTALC=巴豆醇;CROT-Pi=巴豆磷酸;CROT-PPi=巴豆二磷酸或2-丁烯基-4-二磷酸。

[0022] 图1显示了能够将示例性PTS和非PTS糖如葡萄糖(GLC)和木糖(XYL)转化成乙酰辅酶A(ACCOA)的示例性代谢途径,以及用于同化其它碳源如甲醇和甘油以形成乙酰辅酶A的途径。以字母表示的箭头表示前体化合物向中间体化合物的酶转化。如图所示的酶转化通过以下酶进行:A) 甲醇脱氢酶,B) 3-己糖-6-磷酸合成酶,C) 6-磷酸-3-己糖异构酶,D) 二羟基丙酮合成酶,E) 甲酸脱氢酶(NAD或NADP依赖性),F) 糖透性酶或易化蛋白(非PTS),G) 糖激酶(非pts),H) 糖转运的PTS系统,I) 核酮糖-5-磷酸-3-表异构酶,J) 转酮酶,K) 核酮糖-5-磷酸异构酶,L) 转醛醇酶,M) 转酮醇酶,Q) 丙酮酸甲酸裂解酶,R) 丙酮酸脱氢酶,丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶,或丙酮酸:NADP+氧化还原酶,S) 甲酸脱氢酶,T) 果糖-6-磷酸磷酸转酮酶,U) 木酮糖-5-磷酸磷酸转酮酶,V) 磷酸转乙酰酶,W) 乙酸激酶,X) 乙酰CoA转移酶、合成酶或连接酶,Y) 低糖酵解,包括甘油醛-3-磷酸脱氢酶,Z) 果糖-6-磷酸醛缩酶。图1还显示了用于可选的减弱或破坏的示例性内源酶靶标。内源性酶靶标包括DHA激酶,甲醇氧化酶(AOX),PQQ依赖性甲醇脱氢酶(PQQ)和/或DHA合成酶。图1还显示了乙酰辅酶A可以引入如图4所示的另一“中间体途径”,或引入“化合物途径”(生物衍生化合物途径),如图5-11所示的那些。

[0023] 图2显示了能形成草酰乙酸的途径。酶转化是:A) PEP羧化酶,B) 丙酮酸羧化酶,C) 丙酮酸激酶和D) PEP合成酶,E) 苹果酸酶

[0024] 图3显示了电子传递链(ETC)的各种酶和蛋白质(组件)。例如,显示了大肠杆菌的

ETC。NADH脱氢酶形成电子传递链的复合体I，并将电子转移到醌环。不转移质子的ETC组件是减弱或消除非天然微生物中表达或活性、以提高ATP生产效率的靶标。细胞色素氧化酶从醌池中接收电子并减少氧气。每对电子无质子移位或少量质子移位的细胞色素氧化酶是减弱或消除非天然微生物中表达或活性、以提高细胞中ATP生产的效率的标靶。

[0025] 图4显示了能够将糖酵解中间体甘油-3-磷酸(G3P)转化成乙酰辅酶A(ACCOA)和/或琥珀酰辅酶A(SUCCOA)的示例性代谢途径。图中显示的酶转化可以通过以下酶进行:A) PEP羧化酶或PEP羧基激酶,B) 苹果酸脱氢酶,C) 富马酸酶,D) 富马酸还原酶,E) 琥珀酰辅酶A合成酶或转移酶,F) 丙酮酸激酶或PTS依赖性底物输入,G) 丙酮酸脱氢酶、丙酮酸甲酸裂解酶或丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶,H) 柠檬酸合成酶,I) 乌头酸酶,J) 异柠檬酸脱氢酶,K) α-酮戊二酸脱氢酶,L) 丙酮酸羧化酶,M) 苹果酸酶,N) 异柠檬酸裂解酶和苹果酸合成酶。

[0026] 图5显示了能够从乙酰辅酶A生产1,3-丁二醇、巴豆醇和丁二烯的示例性途径。1,3-丁二醇、巴豆醇和丁二烯生产可以通过以下酶进行:A) 乙酰辅酶A羧化酶,B) 乙酰乙酰辅酶A合成酶,C) 乙酰辅酶A:乙酰辅酶A酰基转移酶,D) 乙酰乙酰辅酶A还原酶(还原酮),E) 3-羟基丁酰辅酶A还原酶(醛形成),F) 3-羟基丁酰辅酶A水解酶,转移酶或合成酶,G) 3-羟基丁酸还原酶,H) 3-羟基丁醛还原酶,I) 化学脱水,或图6,J) 3-羟基丁酰辅酶A脱水酶,K) 巴豆酰辅酶A还原酶(醛形成),L) 巴豆酰辅酶A水解酶、转移酶或合成酶,M) 巴豆酸还原酶,N) 巴豆醛还原酶,O) 巴豆醇激酶,P) 2-丁烯-4-磷酸激酶,Q) 丁二烯合成酶,R) 巴豆醇二磷酸激酶,S) 化学脱水或巴豆醇脱水酶,T) 丁二烯合成酶(单磷酸),T) 丁二烯合成酶(单磷酸),U) 巴豆酰辅酶A还原酶(醇形成),和V) 3-羟基丁酰辅酶A还原酶(醇形成)。

[0027] 图6显示了将1,3-丁二醇转化为3-丁烯-2-醇和/或丁二烯的示例性途径。3-丁烯-2-醇和丁二烯生产可以通过以下酶进行:A.1,3-丁二醇激酶,B.3-羟基丁酰磷酸激酶,C.3-羟基丁酰二磷酸裂解酶,D.1,3-丁二醇二磷酸激酶,E.1,3-丁二醇脱水酶,F.3-羟基丁酰磷酸裂解酶,G.3-丁烯-2-醇脱水酶或化学脱水。

[0028] 图7显示了能够从琥珀酰辅酶A生产1,4-丁二醇的示例性途径。1,4-丁二醇生产可以通过以下酶进行:A) 琥珀酰CoA转移酶或琥珀酰辅酶A合成酶,B) 琥珀酰辅酶A还原酶(醛形成),C) 4-HB脱氢酶,D) 4-HB激酶,E) 磷酸转移-4-羟基丁酸酶,F) 4-羟基丁酰辅酶A还原酶(醛形成),G) 1,4-丁二醇脱氢酶,H) 琥珀酸还原酶,I) 琥珀酰辅酶A还原酶(醇形成),J) 4-羟基丁酰CoA转移酶或4-羟基丁酰辅酶A合成酶,K) 4-HB还原酶,L) 4-羟基丁酰磷酸还原酶,和M) 4羟基丁酰基辅酶A还原酶(醇形成)。

[0029] 图8显示了能够从琥珀酰辅酶A和乙酰辅酶A生产己二酸,6-氨基己酸,己内酰胺和己二胺的示例性途径。己内酰胺和己二胺的生产可以通过以下酶进行:A) 3-氧化己二酰辅酶A硫解酶,B) 3-氧化己二酰辅酶A还原酶,C) 3-羟基己二酰辅酶A脱水酶,D) 5-羧基-2-戊烯酰辅酶A还原酶,E) 己二酰辅酶A还原酶(醛形成),F) 6-氨基己酸转氨酶或6-氨基己酸脱氢酶,G) 6-氨基己酰基辅酶A/酰基CoA转移酶或6-氨基己酰基辅酶A合成酶,H) 酰胺水解酶,I) 自发环化,J) 6-氨基己酰基辅酶A还原酶(醛形成),K) HMDA转氨酶或HMDA脱氢酶,L) 脂肪酰辅酶A水解酶、己二酰辅酶A连接酶、己二酰CoA转移酶,或磷酸转谷胱蛋白酶/己二酸激酶。

[0030] 图9显示了能够从琥珀酰辅酶A生产3-羟基异丁酸和甲基丙烯酸的示例性途径。通过以下酶进行3-羟基异丁酸和甲基丙烯酸的生产:A) 甲基丙二酰辅酶A变位酶,B) 甲基丙二酰辅酶A表异构酶,C) 甲基丙二酰辅酶A还原酶(醛形成),D) 甲基丙二酸半醛还原酶,E) 3-羟

基异丁酸脱水酶,F) 甲基丙二酰辅酶A还原酶(醇形成)。

[0031] 图10显示了能够从乙酰辅酶A生产2-羟基异丁酸和甲基丙烯酸的示例性途径。2-羟基异丁酸和甲基丙烯酸的生产可以通过以下酶进行:A) 乙酰辅酶A:乙酰辅酶A酰基转移酶,B) 乙酰乙酰辅酶A还原酶(还原酮),C) 3-羟基丁酰辅酶A变位酶,D) 2-羟基异丁酰辅酶A脱水酶,E) 甲基丙烯酰辅酶A合成酶、水解酶或转移酶,F) 2-羟基异丁酰辅酶A合成酶、水解酶或转移酶。

[0032] 图11显示了能够从乙酰辅酶A生产2,4-戊二酸(2,4PD)/丁二烯的示例性途径。以下酶可用于2,4-PD/丁二烯生产。酶名:A. 乙醛脱氢酶,B. 4-羟基-2-氧代戊酸醛缩酶,C. 4-羟基-2-氧代戊酸脱水酶,D. 2-氧代戊烯酸还原酶,E. 2-羟基戊烯酸脱水酶,F. 2,4-戊二烯酸脱羧酶,G. 2-氧代戊烯酸连接酶,H. 2-氧代戊烯酸乙酯:乙酰CoA转移酶,I. 2-氧代戊烯酰辅酶A还原酶,J. 2-羟基戊烯酸连接酶,K. 2-羟基戊烯酸乙酯:乙酰辅酶A CoA转移酶,L. 2-羟基戊烯酰辅酶A脱水酶,M. 2,4-二戊烯酰辅酶A水解酶,N. 2,4-二戊烯酰辅酶A:乙酰CoA转移酶。

[0033] 图12A-C显示了在使用PTS和非PTS葡萄糖转运系统的菌株中表达PK时,BDO滴度的增加和C3副产物如丙氨酸和丙酮酸的降低。钻石和方形符号表示不表达PK时的发酵实验。十字和三角形表示用p115启动子表达PK时的发酵实验。

[0034] 图13示出了如实施例1所述插入到PTS-细胞中的天然g1k和运动发酵单胞菌(*Zymomonas mobilis*)g1f的表达突变体的构建步骤和具有增强葡萄糖生长速率的突变体的选择步骤。

[0035] 图14A显示了如实施例1所述的g1k-g1f的表达变体的生长速率曲线,图14B显示了选择变体和亲本菌株的最大生长速率。

具体实施方式

[0036] 本公开提供能够通过以包含生产乙酰辅酶A的磷酸转酮酶途径(PK途径)而合成的乙酰辅酶A或草酰乙酸和乙酰辅酶A两者来增加碳通量的代谢过程、生物合成过程和非天然微生物。该非天然微生物可以在另一种化合物途径利用增加的乙酰辅酶A池或草酰乙酸和乙酰辅酶A池,生产生物衍生产物。

[0037] 为了通过乙酰辅酶A或通过草酰乙酸和乙酰辅酶A生产提高的碳通量,将包含磷酸转酮酶的途径与以下结合使用:(i)用于糖摄取的非磷酸转移酶系统(非PTS),包括对非-PTS组件的修饰以增加非PTS活性,和/或(ii)对生物的电子传递链中的一种或多种修饰,以提高ATP生产效率、提高还原当量的可利用性或合成,或两者兼有。可选地,非天然微生物可以包括(iii)磷酸转移酶系统(PTS)组件的减弱或消除PTS活性的基因修饰。

[0038] 本公开的第一方面涉及一种非天然微生物,其具有(a)包含磷酸转酮酶的乙酰辅酶A途径,或草酰乙酸和乙酰辅酶A两者的途径,(b)糖摄取的非PTS,其包含增加非PTS活性的非PTS组件基因修饰。可选地,该微生物还可以包括减弱或消除PTS活性的PTS组件基因修饰。

[0039] 图1中举例说明了包含用于生产乙酰辅酶A的磷酸转酮酶(PK途径)和糖摄取系统(例如非PTS)的途径。该非天然微生物可以在“化合物途径”中使用乙酰辅酶A或利用草酰乙酸和乙酰辅酶A(参见图4),以生产生物衍生产物(例如醇、二醇、有机酸、烯烃、二烯、有机

胺、有机醛、维生素、营养剂或药物)。因此、非天然微生物可进一步包括产物途径酶、以进行乙酰辅酶A或草酰乙酸和乙酰辅酶A两者向所需产物的转化(例如,将图1或图4的相关途径与如图5-11所示的途径相结合)。

[0040] 更进一步地,该非天然微生物可以可选地包括以下一种或多种:(e)该生物的电子传递链中的一种或多种修饰,(f)碳底物(例如甲醇,合成气等)利用途径,以增加流向乙酰辅酶A或草酰乙酸和乙酰辅酶A的碳通量,(g)合成琥珀酰辅酶A作为前体以进一步合成乙酰辅酶A和草酰乙酸的途径,(h)减弱或消除通过乙酰辅酶A或通过草酰乙酸和乙酰辅酶A提高碳通量的一种或多种内源酶(例如减弱丙酮酸激酶),和(i)增加一种或多种内源酶或异源酶的活性,其可以实现到草酰乙酸或琥珀酰辅酶A的更高通量(例如,PEP合成酶,丙酮酸羧化酶或磷酸烯醇丙酮酸羧化酶的增加)。

[0041] 本公开的第二方面涉及一种非天然微生物,其具有(a)通向草酰乙酸、乙酰辅酶A或两者的包含磷酸转酮酶的途径,和(b)微生物的电子传递链中的一种或多种修饰,所述修饰提高ATP生产效率、提高还原当量的可利用性或合成,或两者兼有。在这种非天然微生物中,对糖摄取的PTS和非PTS进行修饰不是必要的,但可选地也可以包括在内。作为PTS和非PTS的替代或补充,在非天然微生物内可以存在(c)碳底物(例如甲醇,合成气等)利用途径,以提供通向草酰乙酸、乙酰辅酶A或二者的碳通量。这种非天然微生物可以在(d)产物途径中使用草酰乙酸、乙酰辅酶A或二者,以生产包括产物途径酶的生物衍生产物(例如醇、二醇等)。更进一步地,这种非天然微生物可以可选地包括(e)合成作为前体的草酰乙酸或琥珀酰辅酶A的途径,(f)减弱或消除一种或多种通过乙酰辅酶A提高碳通量的内源性酶(例如,减弱丙酮酸激酶),或(g)增加一种或多种可以提高流向草酰乙酸或琥珀酰辅酶A的通量的酶活性(例如,增加PEP合成酶、丙酮酸羧化酶或磷酸烯醇丙酮酸羧化酶)。

[0042] 包含磷酸转酮酶的途径可以包括一种、二种、三种、四种或五种或多于五种酶,以提高乙酰辅酶A或草酰乙酸和乙酰辅酶A的通量。

[0043] 可以参考图1来理解包含磷酸转酮酶的乙酰辅酶A途径的一些示例性实施例。例如,在一些实施例中,乙酰辅酶A途径包含选自以下的途径:(1)1T和1V;(2)1T,1W和1X;(3)1U和1V;(4)1U,1W和1X;其中1T是果糖-6-磷酸磷酸转酮酶,其中1U是木酮糖-5-磷酸磷酸转酮酶,其中1V是磷酸转乙酰酶,其中1W是乙酸激酶,其中1X是乙酰CoA转移酶、乙酰辅酶A合成酶或乙酰辅酶A连接酶。在一些实施例中,乙酰辅酶A途径包括(1)1T和1V。在一些实施例中,乙酰辅酶A途径包括(2)1T,1W和1X。酶组(1)和(2)可以定义从果糖-6-磷酸(F6P)到乙酰辅酶A(AcCoA)的途径。

[0044] 在一些实施例中,乙酰辅酶A包含(3)1U和1V。在一些实施例中,乙酰辅酶A途径包括(4)1U,1W和1X。酶组(3)和(4)可以定义从果糖-6-磷酸(F6P)到乙酰辅酶A(AcCoA)的途径。在一些实施例中,甲醇代谢途径的酶或乙酰辅酶A途径的酶由至少一种外源核酸编码,并且表达量足以提高通过乙酰辅酶A的碳通量。

[0045] 任何包含磷酸转酮酶(1)1T和1V;(2)1T,1W和1X;(3)1U和1V;(4)1U,1W和1X的乙酰辅酶A途径,均可以存在于本公开的第一或第二方面的生物中。

[0046] PTS和非PTS可以允许主要摄取C5、C6或C12糖及其低聚物。具有糖(例如C6、C12、糖醇和氨基糖)摄取PTS的微生物能够通过将PEP转化成丙酮酸而使糖磷酸化。

[0047] 另一方面,非PTS使用与PTS不同的糖摄取酶和蛋白质(组件),这影响了进入细胞

的细胞内糖衍生中间体的平衡。除了葡萄糖之外,非PTS还允许通过易化子或透性酶更稳定地输入C5糖,例如木糖,二糖如乳糖、蜜二糖、麦芽糖和甘油,然后通过激酶进行磷酸化。其他底物如抗坏血酸可被特定的PTS或非PTS识别。

[0048] 参考图1,在一些实施例中,该非天然微生物包含乙酰辅酶A或草酰乙酸和乙酰辅酶A途径(也参见图4),所述途径包含磷酸转酮酶、糖摄取非PTS,以及用于糖摄取的包含透性酶或易化蛋白(1F)和激酶(1G)的糖摄取非PTS。

[0049] 非PTS可以包括非PTS透性酶(例如易化蛋白)、非PTS糖激酶或易化蛋白,并且这些可以被修饰以提高在具有(a)乙酰辅酶A途径,或含有草酰乙酸和乙酰辅酶A的途径且包含磷酸转酮酶的非天然微生物中的表达或活性。非PTS透性酶可以是葡萄糖透性酶,非PTS糖激酶可以是葡萄糖激酶。示例性的葡萄糖易化子蛋白质由运动发酵单胞菌(*Glycomonas mobilis* glf)编码。示例性的葡萄糖激酶由大肠杆菌glk编码,示例性的透性酶由大肠杆菌galP编码。

[0050] 对非PTS组件的增加非PTS活性的基因修饰,可以是多种形式中的任何一种或多种。例如,在一些实施例中,非PTS组件通过包含增强其表达的一种或多种基因修饰的启动子而表达。增强的表达可导致细胞糖摄取速率的活性增加。例如,摄取速率可以比不包括非PTS基因修饰的微生物的糖摄取速率高至少10%,至少25%,至少50%,至少75%,至少100%,至少125%或至少150%。示例性的摄取速率可以在10%至150%的范围内,或25%至125%的范围内。

[0051] 具有对非PTS酶或蛋白质的基因修饰以增加非PTS活性的微生物,可阻止PEP转化成与糖磷酸化相关的丙酮酸,因此能够获得从PEP到草酰乙酸和丙酮酸的通量的更好平衡。磷酸化糖然后通过糖酵解中的大部分反应,生产与微生物的电子传递链(ETC)相关的还原当量和ATP。

[0052] 在一些实施例中,非天然微生物包含减弱或消除PTS活性的PTS组件基因修饰。在包括糖摄取非PTS的非天然微生物系统中,用于减弱或消除PTS组件的基因修饰,可将糖摄取转向非PTS,从而增强糖衍生中间体库,所述中间体可以用于包含磷酸转酮酶的途径以用于乙酰辅酶A的生产或草酰乙酸和乙酰辅酶A的生产。

[0053] 在非天然微生物具有一种或多种减弱或消除PTS组件的表达或活性的基因修饰的实施例中。

[0054] PTS系统包括酶I(EI)、组氨酸磷酸载体蛋白(HPr)、酶II(EII)和跨膜酶II C(EIIC)。该系统允许特异性摄取糖到细胞中,糖沿磷酸化的浓度梯度递送。磷酸烯醇丙酮酸(PEP)是磷酸供体,磷酸通过(非糖特异性)酶EI和HPr转移到酶复合物EII。酶复合物EII包括组件A、B和C。根据糖的特异性和细菌的类型,这些组件可以是复合蛋白的结构域。组件/结构域C是透性酶并锚定于胞质膜。在大肠杆菌中,葡萄糖PTS EIIA是可溶性蛋白质,EIIB/C是膜结合的。在大肠杆菌中,两种非特异性组件由ptsI(Enzyme I)和ptsH(HPr)编码。糖依赖性组件由crr和ptsG编码。这些PTS酶或蛋白质(组件)中的任何一种或多种均可以靶向减弱或消除表达或活性。可选地,具有削弱或消除PTS酶或蛋白质表达的非天然微生物是由ptsI基因的改变如删除等引起的。

[0055] PTS可以包括特异摄取某些糖类的蛋白质。这些通常被称为“渗透酶”或“易化蛋白”。例如,PTS可以包含选自葡萄糖透性酶(EIICBA)、葡萄糖胺透性酶(EIICBA)、N-乙酰胞

壁酸特异性透性酶(EIIBC组件)、甘露醇透性酶、半乳甘露聚糖透性酶、海藻糖透性酶、麦芽糖透性酶、果糖透性酶、甘露糖透性酶、N-乙酰葡萄糖胺透性酶(EIICB组件)、果糖透性酶、蔗糖透性酶(高亲和力)、地衣多透性酶和 β -葡萄糖苷透性酶的一种或多种。本公开的非天然微生物可以包括减弱或消除一种或多种特异摄取某些糖物质的蛋白质的表达。

[0056] PTS的蛋白质可以由微生物的基因编码。例如，葡萄糖透性酶可以由PtSG编码，葡萄糖胺透性酶可由GamP编码，N-乙酰胞苷酸特异性透性酶可由MurP编码，甘露醇透性酶可以由Mt1A或Mt1F编码，半乳甘露聚糖透性酶由GmuA、GmuB或GmuC编码，海藻糖透性酶可由TreP编码，麦芽糖透性酶可由MalP编码，果糖透性酶可由FruA编码，甘露糖透性酶可由ManP编码，N-乙酰葡萄糖胺透性酶可以由NagP编码，果糖透性酶可以由LevD、LevE、LevF、LevG编码，蔗糖透性酶(高亲和力)可以由SacP编码，蔗糖透性酶(低亲和力)可以由SacY编码，地衣多糖透性酶可以由LicA、LicB或LicC编码， β -葡萄糖苷透性酶可由BglP编码。本公开的非天然微生物可包括一种或多种中减弱或消除所述基因的相应蛋白质表达的基因修饰。

[0057] 本公开的非天然微生物还可以包括微生物的电子传递链中的一种或多种提高ATP生产效率、提高还原当量可利用性或合成，或两者皆有的修饰。例如，本公开的第二方面提供了一种非天然微生物，其包括(a)包含磷酸转酮酶的通向草酰乙酸、乙酰辅酶A或二者的途径，和(b)对微生物电子传输链的一种或多种修饰。

[0058] 可选地，在具有PK途径的非天然微生物中，可以将微生物的电子传递链中的一种或多种修饰和包含对非PTS组件的基因修饰以增加非PTS活性的糖摄取非PTS联用。例如，在具有通过磷酸转酮酶的通量的微生物中，非氧化戊糖磷酸途径不生产任何ATP或还原当量，因此期望使电子传递链高效运行。当该生物体无论使用何种碳源均使用PK途径时，对ETC的这种修饰是有用的。例如，当使用甲醇、甲烷、甲酸、合成气或甘油作为碳源时，这种修饰将是有用的。

[0059] 增强微生物电子传递链功能的修饰，包括减弱与有效的电子传递链功能竞争的酶、蛋白质或辅因子。示例是减弱无质子易位的NADH-脱氢酶或减弱每对电子的质子易位效率较低的细胞色素氧化酶。增强微生物的电子传递链功能的修饰，包括增强生物体的电子传递链的酶、蛋白质或辅因子的功能，特别是当这种功能限制速率时。细菌中增强酶、蛋白质或辅因子的修饰的示例是增加电子传递链的NADH脱氢酶或所需细胞色素氧化酶cyo的活性，并减弱全局负调节因子arcA。

[0060] 在一些实施例中，本发明提供了非天然存在微生物，其中减弱或消除了与有效的电子传递链功能竞争的内源酶表达或活性，从而增强通过乙酰辅酶A或草酰乙酸成为所需产物的碳通量。消除内源性酶表达，可以通过对编码这种酶的一种或多种内源核酸的基因破坏进行。例如，在某些方面中，用于修饰的内源性酶的基因包括诸如大肠杆菌中的ndh、wrB、mdaB、yhdH、yieF、ytfG、qor、ygiN、appBC和cydAB之类。在其他微生物中，可以消除或修饰电子传递链的类似非有效组件。

[0061] 大肠杆菌的电子传递链具有多个质子易位能力不同的NADH脱氢酶和细胞色素氧化酶。例如，大肠杆菌中的NADH脱氢酶II是NADH消耗系统，其与质子易位($H^+/2e^- = 0$)不相关，而通过nuo编码的NADH脱氢酶I被报告为每对电子易位4个质子。Ndh-II的主要作用是氧化NADH并将电子送入呼吸链(Yun et al., 2005)。NdhII对NADH的亲和力相对较低(Hayashi et al., 1989)，已经有认为NdhII可以独立于能量生产地调节NADH池，并且当细菌生产能力

的能力超过需求时可能是重要的。已经证实ndh基因被fnr基因产物抑制,使得该表达在高氧浓度的条件下是最佳的。因此,删除ndh将有助于增强氧化还原可利用性,并因此有助于在NADH氧化时细胞的ATP可利用性。类似地,还有几种其他NADH脱氢酶已知无任何质子易位,因此不能帮助ATP生产,例如,由大肠杆菌中的wrbA、mdaB、yhdH、yieF、ytfG编码的那些。可以在其他微生物中发现其同系物并将其消除以增强每单位耗氧量的ATP生产。

[0062] 在电子传输链的电子输出侧,存在具有不同节能效率的多种细胞色素氧化酶。由cyo操纵子编码的细胞色素b复合物主动地泵送电子跨膜,其生产的H⁺/2e⁻化学计量为4。细胞色素bd-I复合物不主动泵送质子,但由于醣醇在膜的周质侧的的氧化和随后从膜的细胞质侧吸收质子并用于形成水,净电子转移得到的H⁺/2e⁻化学计量为2。这由cyd操纵子编码。直到最近,由appBC编码的细胞色素bd-II氧化酶的质子易位的化学计量学还是未知的,但现在已经确定这种氧化酶是非电致的[Bekker M, de VS, Ter BA, Hellingwerf KJ, de Mattos MJ. 2009. Respiration of Escherichia coli can be fully uncoupled via the nonelectrogenic terminal cytochrome bd-II oxidase. J Bacteriol 191:5510-5517.]。这些基因通常在进入稳定期或在碳和磷酸饥饿的条件下诱导。Atlung et al., 1997 (Atlung T, Knudsen K, Heerfordt L, Brondsted L. 1997. Effects of sigmaS and the transcriptional activator AppY on induction of the Escherichia coli hya and cbdAB-appA operons in response to carbon and phosphate starvation. J Bacteriol 179:2141-2146.)。因此,细胞色素氧化酶appBC和cydAB的删除,将通过氧化磷酸化提高每NADH的ATP形成,从而提高ATP生产效率。醣醇单加氧酶yg iN也属于这一类。

[0063] 除了减弱这种宿主功能之外或作为其替代方案,还可以通过提供提高酶、蛋白质或辅因子功能的修饰,来在含有乙酰辅酶A或乙酰辅酶A和草酰乙酸的途径的非天然微生物中,提供增强的电子传递功能,以提高ATP生产效率、生产还原当量或两者兼有,特别是当这些功能限制速率时。这些靶基因在细菌中的示例包括电子传递链的复合物I(其可以通过增加拷贝数、过度表达或增强活性变体的方法增加)和全局负调节因子arcA(其可以被减弱)。

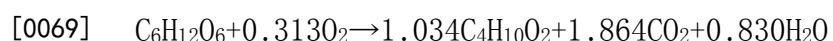
[0064] 另外,鉴于PK途径的非NADH生产性质,重要的是将生产NADH的机制引入用于制备还原产物的重组微生物中。例如,生产14BD0的微生物(实施例XI中所述)需要将丙酮酸转化成乙酰辅酶A。当将PK引入该微生物时,重要的是通过丙酮酸脱氢酶或通过丙酮酸甲酸裂解酶和生产NADH的甲酸脱氢酶的组合进行丙酮酸向乙酰辅酶A的转化。可以可选地删除不生产NADH的天然甲酸脱氢酶。在大肠杆菌中,这些甲酸脱氢酶是甲酸脱氢酶H、N和O。

[0065] 在一些其它实施例中,本发明提供了具有所描述的乙酰辅酶A途径以获得低于不具有这种途径的微生物的曝气过程的方法。

[0066] 由于通过磷酸转酮酶的通量不生产NADH,任何具有通过PK的通量的微生物,再生NAD所需要的氧都更少。例如,仅通过氧化TCA循环制造14BD0的化学计量如下所示:



[0068] 相比之下,可以通过使用PK提高其BD0产量的微生物,仍然仅使用氧化性TCA来将碳引入BD0途径时,将具有以下化学计量学,:



[0070] ,该生物每葡萄糖代谢的氧需求量是不使用PK的生物的60%。这会降低发酵过程中的曝气/氧气需求,同时提高产品的产率。

[0071] 还可以通过数种中心代谢反应中的任一种来从糖酵解中间体容易地获得还原当量, 中心代谢反应包括甘油醛-3-磷酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶、丙酮酸甲酸裂解酶和NAD(P)依赖型甲酸脱氢酶、异柠檬酸脱氢酶、 α -酮戊二酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶。此外, 可以从戊糖磷酸途径的葡萄糖-6-磷酸-1-脱氢酶和6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶生产还原当量。总的来说, 可以从C6糖酵解中间体(例如葡萄糖-6-磷酸、果糖-6-磷酸、果糖-1,6-二磷酸)获得至多12个还原当量, 并且可以从C3糖酵解中间体生产至多6个还原当量(例如, 磷酸二羟基丙酮、甘油醛-3-磷酸)。

[0072] 可选地, 本公开的具有PK途径的非天然微生物, 也可以使用乙酰辅酶A和草酰乙酸或琥珀酰辅酶A作为产物途径的前体。草酰乙酸是从磷酸烯醇丙酮酸或丙酮酸经添补反应而生产的。通过氧化TCA循环生产琥珀酰辅酶A, 其中以乙酰辅酶A和草酰乙酸作为前体, 经由使用草酰乙酸作为前体的还原型TCA循环, 或通过氧化还原型TCA分支的组合。第一或第二方面的非天然微生物可以进一步使用乙酰辅酶A和草酰乙酸或琥珀酰辅酶A作为前体。基因修饰可以包括增加一种或多种内源酶或异源酶的活性, 或减弱或消除一种或多种内源性酶以增加进入草酰乙酸或琥珀酰辅酶A的通量。

[0073] 在一些实施例中, 本发明提供了具有增加的一种或多种内源性酶活性的非天然微生物, 其与乙酰辅酶A (PK) 途径相结合, 使得产物能获得更高的通量。这些酶靶向为增加流入草酰乙酸的通量, 当与乙酰辅酶A组合时, 通过氧化型TCA和其衍生产物产生更高的通量。可选地, 通过还原性TCA分支, 可以将增加的进入草酰乙酸的通量用于生产琥珀酰辅酶A。这包括PEP合成酶、丙酮酸羧化酶和磷酸烯醇丙酮酸羧化酶。这种增加的活性可以通过增加内源或外源基因的表达来实现, 所述表达的增加通过在更强启动子下令其过度表达, 或通过度表达该基因的额外拷贝, 或通过添加非内源表达基因的拷贝来实现。

[0074] 本公开的实施例提供的非天然微生物, 包含生产乙酰辅酶A或乙酰辅酶A和草酰乙酸的磷酸转酮酶 (PK) 途径, 以及以下一种或多种: (i) 提高糖摄取非PTS系统活性的基因修饰, 和/或 (ii) 微生物的电子传递链中的一种或多种提高ATP生产效率、增加还原当量可利用性, 或两者兼有的修饰, 以及另外一种或多种增强流向草酰乙酸或琥珀酰辅酶A的通量的修饰。反过来, 这些修饰与产品途径相结合可以增加生物产物的生产。

[0075] 所述一种或多种增强流向草酰乙酸或琥珀酰辅酶A的通量的修饰, 可以是以下任何一种或多种。

[0076] 在一些实施例中, 该非天然微生物还包括减弱丙酮酸激酶。丙酮酸激酶导从PEP形成丙酮酸, 同时将ADP转化为ATP。

[0077] $PEP + ADP \rightarrow \text{丙酮酸} + ATP + H^+$

[0078] 该酶的减弱或删除, 将允许更多的PEP转化成草酰乙酸(而不是转化成丙酮酸并随后转化成乙酰辅酶A)。这允许流向草酰乙酸和乙酰辅酶A的碳通量更好地平衡。在大肠杆菌中, 该反应由两个同工酶pykA和pykF进行。删除其中哪怕一个, 均可能具有降低流向丙酮酸的PEP通量并将其增加到草酰乙酸中的期望效果。

[0079] 在一些实施例中, 通过在需要草酰乙酸作为生物产物前体的菌株中增强PEP合成酶活性, 来增加所述非天然微生物中的磷酸烯醇-丙酮酸的可利用性。该酶将丙酮酸转化成PEP, 其成本为两个ATP当量, 如下所示。这是细胞可用于平衡进入乙酰辅酶A的通量和进入PEP然后转化为草酰乙酸的碳通量的机制。

[0080] 丙酮酸+ATP+H₂O<=>磷酸烯醇丙酮酸+AMP+磷酸+2H⁺

[0081] 在一些实施例中,通过在需要草酰乙酸作为生物产物前体的菌株中增强丙酮酸羧化酶活性,来增加非天然微生物中的草酰乙酸的可利用性。丙酮酸羧化酶催化丙酮酸羧化为草酰乙酸,使用生物素和ATP作为辅因子,如下所示。

[0082] 丙酮酸+碳酸氢盐+ATP→草酰乙酸+ADP+磷酸+H⁺

[0083] 丙酮酸羧化酶存在于数种细菌中,如谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) 和分枝杆菌中,但不存在于大肠杆菌中。丙酮酸羧化酶可以通过本领域熟知的方法在大肠杆菌中异源表达。该酶的最佳表达能够足以生产草酰乙酸,并且还预期减少副产物如丙氨酸、丙酮酸、乙酸和乙醇的形成。

[0084] 在一些实施例中,通过在需要草酰乙酸作为生物产物前体的菌株中增强磷酸烯醇丙酮酸(PEP)羧化酶活性,来增加非天然微生物中的草酰乙酸的可利用性。基因ppc编码磷酸烯醇丙酮酸(PEP)羧化酶活性。净反应涉及将PEP和碳酸氢盐转化为草酰乙酸和磷酸。PEP羧化酶的过度表达导致更多的磷酸烯醇丙酮酸(PEP)转化为OAA,从而减少从PEP到丙酮酸并随后进入乙酰辅酶A的通量。这导致增加的通量进入TCA循环并由此进入所述途径。此外,这种过度表达还降低了可用于乙醇形成酶的细胞内乙酰辅酶A池,从而减少了乙醇和乙酸的形成。增加的流向草酰乙酸的通量也将降低丙酮酸和丙氨酸副产物。

[0085] 在一些实施例中,通过在需要草酰乙酸作为生物产物前体的菌株中增强PEP羧基激酶(pck)活性,来增加非天然微生物中的磷酸烯醇-丙酮酸的可利用性。PEP羧基激酶是将磷酸烯醇丙酮酸转化为草酰乙酸的替代酶,草酰乙酸同时形成ATP并羧化PEP。在大多数微生物中,PEP羧基激酶用于糖原生成功能,并以1个ATP的代价将草酰乙酸转化为PEP。酿酒酵母 (*S.cerevisiae*) 是一种这样的生物体,其天然PEP羧基激酶PCK1起到葡萄糖异生作用 (Valdes-Hevia et al., FEBS Lett. 258:313-316 (1989))。大肠杆菌是另一种这样的生物,因为PEP羧激酶在生产草酰乙酸的作用方面低于不会形成ATP的PEP羧化酶,这可能是由于PEP羧激酶的碳酸氢盐具有较高的K_m (Kim et al., Appl. Environ. Microbiol. 70:1238-1241 (2004))。尽管如此,最近在大肠杆菌K-12的ppc突变体中已经证实了天然大肠杆菌PEP羧基激酶从PEP向草酰乙酸的活性 (Kwon et al., J. Microbiol. Biotechnol. 16:1448-1452 (2006))。这些菌株没有显示生长缺陷,并且在高NaHCO₃浓度下琥珀酸生产提高。在一些实施例中,该非天然微生物可通过增加苹果酸酶的表达或活性来增加其草酰乙酸的可利用性,苹果酸酶可以用于以1个还原当量为代价将二氧化碳和丙酮酸转化为苹果酸。然后,苹果酸可以通过天然苹果酸脱氢酶转化成草酰乙酸。用于此目的的苹果酸可以包括但不限于苹果酸酶(NAD依赖性)和苹果酸酶(NADP依赖性)。例如,可以表达大肠杆菌苹果酸酶之一 (Takeo, J. Biochem. 66:379-387 (1969)) 或具有较高活性的类似酶,以使丙酮酸和二氧化碳转化成苹果酸。通过将碳固定为丙酮酸而不是PEP,苹果酸酶允许通过丙酮酸激酶保留来自PEP的高能磷酸键,由此在丙酮酸形成中或在转运葡萄糖的转铁蛋白系统中生产ATP。虽然苹果酸酶的作用通常认为是从苹果酸形成丙酮酸,但已经证明,在碳固定方向起作用,由maeA编码的NAD依赖性酶的过量表达,在无氧条件下增加了大肠杆菌中的琥珀酸生产,同时恢复了致死的δpf1-delta 1dhA表型 (pf1和1dhA无活性或删除) (Stols and Donnelly, Appl. Environ. Microbiol. 63 (7) 2695-2701 (1997))。在大肠杆菌中过量表达来自猪蛔虫 (*Ascaris suum*) 的苹果酸酶也得到了类似的观察结果 (Stols et al.,

Appl.Biochem.Biotechnol.63-65 (1), 153-158 (1997)。由maeB编码的第二种大肠杆菌苹果酸酶是NADP依赖性的,也能够对草酰乙酸和其他 α -酮酸的脱羧(Iwakura et al., J.Biochem.85 (5):1355-65 (1979))。

[0086] 在一些实施例中,非该天然微生物增加了非氧化戊糖磷酸途径活性、核糖-5-磷酸异构酶(在大肠杆菌中由rpiAB编码)、核酮糖-5-磷酸表异构酶(rpe)、转醛醇酶(talAB)和转酮醇酶(tktAB),以将C5糖转化为糖酵解中间体甘油醛-3-磷酸和果糖-6-磷酸,其是磷酸转酮酶途径的底物。

[0087] 非氧化戊糖磷酸途径包括的多种酶,具有将C5糖中间体转化为C3和C6糖酵解中间体(即甘油醛-3-磷酸和果糖-6-磷酸)的净效果。非氧化PP分支中所包括的酶是核糖-5-磷酸异构酶(由大肠杆菌中的rpiAB编码)、核酮糖-5-磷酸表异构酶(rpe)、转醛醇酶(talAB)和转酮醇酶(tktAB)。

[0088] 核糖-5-磷酸表异构酶催化核糖-5-磷酸和核酮糖-5-磷酸的相互转化。大肠杆菌中存在的两种不同的核糖-5-磷酸异构酶。RpiA编码组成型核糖-5-磷酸异构酶A,且通常占细胞中核糖-5-磷酸异构酶活性的99%以上。诱导型核糖-5-磷酸异构酶B可以代替RpiA的功能,如果其表达被诱导的话。

[0089] 核酮糖-5-磷酸-3-表异构酶(rpe)催化D-核酮糖-5-磷酸和木酮糖-5-磷酸的相互转化。转酮醇酶催化酮基在几个供体和受体底物之间的可逆转移。该酶是糖酵解与戊糖磷酸途径之间的可逆联系。该酶参与戊糖分解代谢、D-核糖-5-磷酸的形成,和D-赤藓糖-4-磷酸的提供。在大肠杆菌中有两种转酮醇酶,由tktA和tktB催化。转酮醇酶导致赤藓糖-4-磷酸和木酮糖-5-磷酸的可逆转化,以形成果糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸。由该酶催化的另一个反应,是景天庚酮糖-7-磷酸和甘油醛-3-磷酸的相互转化,以形成核糖-5-磷酸和5-木酮糖-5-磷酸。

[0090] 转醛醇酶是在戊糖磷酸途径和糖酵解之间形成可逆连接的另一种酶。它催化甘油醛-3-磷酸和景天庚酮糖-7-磷酸与果糖-6-磷酸和赤藓糖-4-磷酸的相互转化。大肠杆菌中有两个密切相关的转醛醇酶,由talA和talB编码。这些基因的同系物可以在其他微生物中发现,包括谷氨酸棒状杆菌、酿酒酵母、恶臭假单胞菌、枯草芽孢杆菌。为了令足量通量通过磷酸转酮酶,重要的是确保非氧化性PP酶的通量容量不受限制。

[0091] 当葡萄糖用作碳底物时,通过PTS和非PTS系统以及磷酸转酮酶的碳通量分布,可以进行修饰以增强生物衍生产物的生产。如果不使用非PTS系统,则必须令部分通量从丙酮酸转化为草酰乙酸。这可以通过酶如PEP合成酶与磷酸烯醇丙酮酸羧化酶或磷酸烯醇丙酮酸羧激酶或丙酮酸羧化酶的组合来完成。

[0092] 在一些实施例中,本公开提供具有乙酰辅酶A途径或草酰乙酸和乙酰辅酶A途径的非天然存在微生物,其包含磷酸转酮酶,以及以下一种或多种:(i)糖摄取的非PTS,其包含增加非PTS活性的一种或多种基因修饰,和/或(ii)微生物的电子传递链中的一种或多种提高ATP的效率、增强还原当量的合成或可利用性、或两者兼有的修饰,其中该微生物还包括一种或多种内源性酶的减弱,其增强通过乙酰辅酶A进入产物的碳通量。

[0093] 在一些实施例中,本公开提供具有乙酰辅酶A途径或草酰乙酸和乙酰辅酶A途径的非天然存在微生物,其包含磷酸转酮酶,和/或(ii)微生物电子运输链中的一种或多种提高ATP生产效率、增强还原当量的合成或可利用性、或两者皆有的修饰,其中所述微生物还包

括竞争性甲醛同化或异化途径的一种或多种内源性酶的减弱。这些内源性酶的示例在图1中公开并在实施例XIII中描述。应当理解，本领域技术人员能够容易地鉴定所述竞争途径的酶。所述竞争途径可以依赖于本申请所述的宿主微生物和/或引入微生物的外源核酸。因此，在本公开的某些方面中，所述微生物包括所述竞争性甲醛同化或异化途径的一种、二种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种或更多种内源酶的减弱。

[0094] 例如，在一些方面，内源性酶可以选自DHA激酶、甲醇氧化酶、PQQ依赖性甲醇脱氢酶、DHA合成酶或其任意组合。因此，在一些方面，减弱的是内源性酶DHA激酶。在一些方面，减弱的是内源性酶甲醇氧化酶。在一些方面，减弱的是内源性酶PQQ依赖性甲醇脱氢酶。在一些方面，减弱的是内源性酶DHA合成酶。本发明还提供一种微生物，其中减弱的是本申请所述的两种或三种内源性酶的任意组合。例如，本发明的微生物可以包括减弱DHA激酶和DHA合成酶，或者替代地，甲醇氧化酶和PQQ依赖性甲醇脱氢酶，或者DHA激酶、甲醇氧化酶和PQQ依赖性甲醇脱氢酶，或者DHA激酶、甲醇氧化酶和DHA合成酶。本发明还提供一种微生物，其中减弱的是本申请所述的所有内源性酶。例如，在一些方面，本申请所述的微生物包括减弱DHA激酶、甲醇氧化酶、PQQ依赖性甲醇脱氢酶和DHA合成酶。竞争途径可以依赖于本申请所述的宿主微生物和/或引入微生物的外源核酸。因此，在本发明的一些方面，所述微生物包括对编码竞争性甲醛同化或异化途径的酶的一种、二种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或更多种内源核酸的基因破坏。

[0095] 在基因破坏的情形中，一种特别有用的稳定基因改变是基因删除。使用基因删除来引入稳定的基因改变，对于在基因改变之前降低逆转到表型的可能性是特别有用的。例如，一种生物化学物的稳定生长偶联生产，可以通过，例如在一组代谢修饰中，删除编码催化一种或多种反应的酶的基因来实现。通过多重删除可以进一步提高生物化学生长偶联生产的稳定性，显著降低每次破坏活性发生多次补偿性逆转的可能性。

[0096] 还提供了一种用于生产具有乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A两者、或生物衍生化合物的稳定生长偶联生产的非天然存在微生物的方法。该方法可以包括在硅胶中鉴定一组增加乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的生产的一组代谢修饰，例如增加指数生长期间的产量；对生物进行基因修饰，以包含所述增加乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的生产的一组代谢修饰，以及培养所述经基因修饰的生物。根据需要，所述培养可以包括在需要生产乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的条件下，适应性地演变所述基因修饰生物。本发明的方法适用于细菌、酵母和真菌，以及本申请公开的各种其它细胞和微生物。

[0097] 因此，本发明提供了一种非天然存在微生物，其包含一种或多种可实现乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的合成或生产的基因破坏。在一个实施例中，所述一种或多种基因破坏，实现了乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的生长偶联生产，并且可以例如实现乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A两者、或生物衍生化合物的稳定生长偶联生产。在另一个实施例中，所述一种或多种基因破坏可以实现乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A两者、或生物衍生化合物生产与微生物生长的强制性偶联。所述一种或多种基因破坏，降低了相应的一种或多种编码酶的活性。

[0098] 所述非天然存在微生物，可以在编码本申请公开的酶或蛋白质的基因中具有一种或多种基因破坏。如本申请所公开的，所述一种或多种基因破坏可以是删除。如本申请所公

开的,本发明的这种非天然存在微生物包括细菌、酵母、真菌或适用于发酵过程的各种其它微生物中的任何一种。

[0099] 因此,本发明提供了非天然存在微生物,其包含一种或多种基因破坏,其中所述一种或多种基因破坏发生在编码蛋白质或酶的基因中,所述一种或多种基因破坏使得乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A二者、或生物衍生化合物的生产增加。乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的生产可以是生长偶联的或不生长偶联的。在一个具体实施例中,如本申请所公开的,乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的生产可以强制性偶联于微生物的生长。

[0100] 本发明提供具有基因改变的非天然存在微生物,例如增加乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的生产的基因破坏,例如乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的生长偶联生产。如本申请所公开的,产物生产可以,例如,通过细胞代谢途径的基因改变,而与微生物的指数生长期强制偶联。基因改变可以在生长期期间增加所需产物的产量,或者甚至使所需产物成为强制性产品。实现乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的生物合成的的生产增加和水平提高的代谢改变或转化,如本申请中示例。每个改变对应于应该在功能上被破坏的必要代谢反应。在一种或多种途径内的所有反应的功能性破坏,可导致工程化菌株在生长阶段期间生产乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物。

[0101] 每一种所述非天然存在的改变,在适当的培养条件下,与不含有这种代谢改变的微生物相比,例如在微生物的指数生长阶段中,均导致乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的生产增加、水平提高。合适的条件包括例如本申请公开的那些条件,包括诸如特定碳源或反应物的可利用性和/或适应性演变的条件。

[0102] 鉴于本申请提供的教导和指导,本领域技术人员将理解,为了引入诸如酶的减弱等代谢改变,可能需要破坏参与该反应的一种或多种酶的催化活性。可选地,代谢改变可以包括破坏酶活性或最大活性所必需的调节蛋白的表达。可以通过各种方法发生破坏,包括例如在一种或多种编码基因序列中引入编码基因的删除或基因改变。靶向破坏的编码基因可以是编码参与催化活性的酶的一种、部分或全部基因。例如,当单个酶参与靶向催化活性时,通过基因改变可以形成破坏,以减弱或消除编码基因产物的催化活性。类似地,当单个酶是多聚体(包括异聚体)时,通过基因改变可以形成破坏,以减少或破坏编码基因产物的一个或所有亚基的功能。活性的破坏可以通过丧失形成活性复合物所需的一种或多种亚单位的结合活性,通过破坏多聚体复合物的催化亚单位,或两者皆有来实现。本发明中,为了破坏代谢反应,也可以靶向多聚体蛋白缔合和活性的其它功能。这样的其他功能是本领域技术人员公知的。类似地,通过破坏修饰和/或活化靶酶的蛋白质或酶的表达,例如将脱辅基酶转化为全酶所需的分子,可以减弱或消除靶酶活性。此外,根据本发明,可以破坏单个多肽或多聚体复合物的部分或全部功能,以便减弱或消除参与本发明的反应或代谢修饰的一种或多种酶的催化活性。类似地,只要靶向反应减弱或消除,参与本发明的反应或代谢修饰的部分或全部酶就可能被破坏。

[0103] 鉴于本申请提供的教导和指导,本领域技术人员还将理解,可以通过减弱或消除由普通基因和/或该基因的一种或多种表现相似或基本相同活性的直系同源物编码的反应,来破坏酶反应。该普通基因和所有直系同源物的减少,可导致靶向反应的任何催化活性

完全消除。但是,普通基因或一种或多种直系同源物的破坏,可导致靶向反应的催化活性降低至足以促进生长与产物生物合成的偶联。本申请举例说明了编码各种代谢修饰的催化活性的普通基因及其直系同源物。本领域技术人员将理解,可以在本发明的方法中实施对编码靶向代谢反应的酶的部分或全部基因的破坏,并且并入本发明的非天然存在微生物中,以实现乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物或生长偶联产物生产的增加。

[0104] 鉴于本申请提供的教导和指导,本领域技术人员还将理解,酶活性或表达可以使用公知的方法减弱。如果还原导致酶活性降至通常作用途径所需临界水平以下,则所述酶的活性或量的减少可以模拟基因的完全破坏。通过各种技术降低酶活性而不使用基因破坏,对于生物的活力来说可能是重要的。导致基因破坏的相似或相同效果的降低酶活性的方法,包括但不限于:减少基因转录或翻译;使mRNA、蛋白质或催化性RNA失稳;和使影响酶活性或动力学的基因突变(参见Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Third Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001); 和Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999))。自然或强制的调节控制也可以实现酶减弱,包括:启动子替代(参见Wang et al., *Mol. Biotechnol.* 52 (2) :300–308 (2012));转录因子的丧失或改变(Dietrick et al., *Annu. Rev. Biochem.* 79:563–590 (2010); 和Simicevic et al., *Mol. Biosyst.* 6 (3) :462–468 (2010));引入抑制性RNA或肽如siRNA、反义RNA、RNA或肽/小分子结合适配体、核酶、适体酶和核糖开关(Wieland et al., *Methods* 56 (3) :351–357 (2012); O'Sullivan, *Anal. Bioanal. Chem.* 372 (1) :44–48 (2002); 和Lee et al., *Curr. Opin. Biotechnol.* 14 (5) :505–511 (2003));以及添加药物或其他减弱或消除酶活性的化学物质,例如酶抑制剂、抗生素或靶特异性药物。

[0105] 本领域技术人员还将理解并认识到,酶的减弱可以在各个水平进行。例如,在基因水平上,导致部分或全部无效表型的突变,例如基因破坏,或导致掩盖基因产物活性的上位遗传效应的突变(Miko, *Nature Education* 1 (1) (2008))可用于减弱酶。在基因表达水平上,减弱方法包括:将转录与内源性或外源性诱导物如异丙硫基-β-半乳糖苷(IPTG)偶联,然后在生产阶段加入少量诱导物或不诱导物(D. Donovan et al., *J. Ind. Microbiol.* 16 (3) :145–154 (1996); 和Hansen et al., *Curr. Microbiol.* 36 (6) :341–347 (1998));引入或修饰基因的正或负调节因子;在基因整合的真核染色体区域中修饰组蛋白乙酰化/脱乙酰化(Yang et al., *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13 (2) :143–153 (2003) and Kurdistani et al., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (4) :276–284 (2003));引入转座以破坏启动子或调节基因(Bleykasten-Brosshans et al., *C.R. Biol.* 33 (8–9) :679–686 (2011); 和McCue et al., *PLoS Genet.* 8 (2) :e1002474 (2012));翻转转座元件或启动子区域的方向以调节相邻基因的基因表达(Wang et al., *Genetics* 120 (4) :875–885 (1988); Hayes, *Annu. Rev. Genet.* 37: 3–29 (2003));在二倍体微生物中,删除一个导致杂合性丧失的等位基因(Daigaku et al., *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 600 (1–2) 177–183 (2006));引入增加RNA降解的核酸(Houseley et al., *Cell*, 136 (4) :763–776 (2009));或在细菌中,例如,引入转移信使RNA(tmRNA)标签,其可导致RNA降解和核糖体停滞(S. Sunohara et al., *RNA* 10 (3) :378–386 (2004); 和Sunohara et al.,

J.Biol.Chem.279:15368–15375 (2004)。在翻译水平上,减弱可以包括:引入稀有密码子来限制翻译(Angov, Biotechnol.J.6(6):650–659 (2011)) ;引入阻断翻译的RNA干扰分子(Castel et al., Nat.Rev.Genet.14(2):100–112 (2013); 和Kawasaki et al., Curr.Opin.Mol.Ther.7(2):125–131 (2005)) ;修饰编码序列外的区域,例如将二级结构引入非翻译区(UTR)以阻断翻译或降低翻译效率(Ringnér et al., PLoS Comput.Biol.1(7):e72 (2005)) ;添加用于快速转录物降解的RNA酶位点(Pasquinelli, Nat.Rev.Genet.13(4):271–282 (2012); 和Arraiano et al., FEMS Microbiol.Rev.34(5):883–932 (2010)) ;引入反义RNA寡聚体或反义转录物(Nashizawa et al., Front.Biosci.17:938–958 (2012)) ;引入RNA或肽适体、核酶、适体酶、核糖开关(Wieland et al., Methods56(3):351–357 (2012); O’ Sullivan, Anal.Bioanal.Chem.372(1):44–48 (2002); 和Lee et al., Curr.Opin.Biotechnol.14(5):505–511 (2003)) ;或引入涉及RNA结构的翻译调节元件,其可以预防或减少可以通过小分子的存在或不存在来控制的翻译(Araujo et al., Comparative and Functional Genomics, Article ID475731, 8pages (2012)) 在酶定位和/或寿命水平上,酶减弱可以包括:添加降解标签以用于更快的蛋白质周转(Hochstrasser, Annual Rev.Genet.30:405–439 (1996); 和Yuan et al., PLoS One 8(4):e62529 (2013)) ;或添加导致酶被分泌或位于真核细胞中的亚细胞区的定位标签,其中酶将不能与其正常底物反应(Nakai et al. Genomics 14(4):897–911 (1992); and Russell et al., J.Bact.189(21):7581–7585 (2007))。在翻译后调节水平,酶减弱可以包括:增加已知抑制剂的细胞内浓度;或修饰翻译后修饰位点(Mann et al., Nature Biotech.21:255–261 (2003))。在酶活性水平上,酶减弱可以包括:加入内源或外源抑制剂,如酶抑制剂、抗生素或靶特异性药物,以降低酶的活性;螯合酶活性所需的金属离子;或引入显性负突变。上述减弱技术的适用性,可以取决于给定的宿主微生物是否是原核或真核生物,并且应当理解,本领域技术人员可以容易地确定用于指定宿主的适当技术。

[0106] 在一些实施例中,可以基于所需产物的生长偶联形成,使用微有氧设计。为了检查这一点,可以为每种策略构建生产锥,通过首先最大化然后最小化网络中可能的不同生物量形成速率下的产物产量。如果突变体网络的所有可能的表型的最右边界是单点,这意味着在网络中可能的最大生物量形成速率下,产物具有单一最佳产量。在其他情形中,可能表型的最右边界是垂直线,表明在最大生物量点,网络可以生产计算值范围内的任何量的产品,包括垂直线最底点处的最低量。这种设计被赋予了低优先级。

[0107] 本申请限定的乙酰辅酶A、或草酰乙酸或乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的生产策略可以被破坏,以增加乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的生产。因此,本发明还提供具有代谢修饰的非天然存在微生物,所述修饰将乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的生产与微生物的生长相偶联,其中所述代谢修饰包括破坏选自编码本申请公开的各种表格中所示的蛋白质和/或酶的一种或多种基因。

[0108] 如果确定菌株设计不能充分增加乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的生成,和/或将生物物质的形成与生物量偶联,则每种菌株可以补充额外的删除。可选地,已知在生长条件下不具有显著活性的一些其它酶,可能由于适应性进化或随机诱变而变得活跃。此类活性也可能被敲除。但是,本申请公开的基因允许构建显示乙酰辅酶A、或乙酰辅酶A或草酰乙酸、或生物衍生化合物的高产量合成或生产的菌株,包括乙酰辅酶

A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A、或生物衍生化合物的生长偶联生产。

[0109] 对本申请的描述一般涉及代谢反应、其反应物或其产物，或具体指代编码与所参考代谢反应、其反应物或其产物相关或催化的酶或相关的蛋白质的一种或多种核酸或基因。除非本申请另有明确说明，本领域技术人员将理解，指代反应也包含对反应物和反应产物的指代。类似地，除非另有明确说明，否则指代反应物或产物也涉及反应，并且指代这些代谢组件中的任何一种，也涉及了编码参与所述反应、反应物或产物的蛋白质或催化的酶的一种或多种基因。同样，鉴于代谢生物化学、酶学和基因组学的已知领域，本申请指代的基因或编码核酸也涉及对相应编码的酶及其催化的反应或与反应相关的蛋白以及所述反应的反应物和产物。

[0110] 取决于能够生产乙酰辅酶A和草酰乙酸、具有包含磷酸转酮酶的途径和用于糖摄取的非磷酸转移酶系统(非PTS)的非天然微生物，其包括对非PTS组件的用以增加非-PTS活性的基因修饰，和/或(ii)微生物的电子传递链中的用以提高ATP生产效率、增强还原当量可利用性、或两者兼有的一种或多种修饰，本发明的非天然存在微生物可以包括对来自包含磷酸转酮酶的途径、非PTS系统或ETC系统的核酸的至少一种外源修饰。所述非天然微生物还可以包括来自生物衍生化合物途径的一种或多种外源表达的核酸。

[0111] 例如，通过相应编码核酸的外源表达，可以在缺乏途径酶或蛋白质的宿主中建立乙酰辅酶A和草酰乙酸的生物合成。在缺乏乙酰辅酶A和草酰乙酸途径的所有酶或蛋白质的宿主中，可以包括所述途径中的所有酶或蛋白质的外源表达但是可以理解，即使宿主含有至少一种途径酶或蛋白质，也可以表达所有酶或蛋白质。例如，可以包括用于生产乙酰辅酶A或生物衍生化合物或用于甲醇利用的途径中的所有酶或蛋白质的外源表达，例如甲醇脱氢酶(参见例如图1)，果糖-6-磷酸磷酸转酮酶和磷酸转乙酰酶(参见例如图1)，或木酮糖-5-磷酸磷酸转酮酶和磷酸转乙酰酶(参见例如图1)，或甲醇脱氢酶、3-己糖-6-磷酸合成酶、6-磷酸-3-己糖异构酶，果糖-6-磷酸磷酸转酮酶和磷酸转乙酰(参见例如图1)，或乙酰辅酶A：乙酰辅酶A酰基转移酶、乙酰辅酶A还原酶(还原酮)、3-羟基丁酰辅酶A还原酶(醛形成)和3-羟基丁醛还原酶(参见例如图5)，或琥珀酰辅酶A还原酶(醛形成)、4-HB脱氢酶、4-HB激酶、磷酸转-4-羟基丁酸酶、4-羟基丁酰辅酶A还原酶(醛形成)和1,4-丁二醇脱氢酶(例如参见图7)，或3-氧化己二酰辅酶A硫解酶、3-氧化己二酰辅酶A还原酶、3-羟基己二酰辅酶A脱水酶、5-羧基-2-戊烯酰辅酶A还原酶、己二酰辅酶A还原酶(醛形成)，和6-氨基己酸转氨酶(参见例如图8)，或乙酰辅酶A：乙酰辅酶A酰基转移酶、乙酰乙酰辅酶A还原酶(还原酮)、3-羟基丁酰辅酶A变位酶、2-羟基异丁酰辅酶A脱水酶，和甲基丙烯酰辅酶A合成酶(参见例如图10)。

[0112] 鉴于本申请提供的教导和指导，本领域技术人员将理解，以可表达形式引入的编码核酸的数目，将至少相等于所选定的宿主微生物中所缺失的包含用于乙酰辅酶A和草酰乙酸生产的磷酸转酮酶的途径、非PTS系统和/或ETC系统。因此，本发明的非天然存在微生物可以具有一个、二个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十一个或十二个，直到多至构成本申请公开的包含磷酸转酮酶的通向乙酰辅酶A和草酰乙酸的非PTS或ETC组件途径中的全部核酸。在一些实施例中，所述非天然存在微生物还可以包括促进或优化乙酰辅酶A的生物合成和通过PTS或非PTS或ETC功能的糖摄取，或将其它有用功能赋予宿主微生物的其他基因修饰。一种另外的所述功能可以包括例如放大一种或多种乙酰辅酶A途径前体的

合成。可选地，所述微生物可以包括扩大一种或多种生物衍生化合物途径前体，如Fald、H6P、DHA、G3P、丙二酰辅酶A、乙酰乙酰辅酶A、PEP、PYR和琥珀酰辅酶A的合成。

[0113] 在一些实施例中，选择宿主微生物在于，使得其生产乙酰辅酶A和草酰乙酸的前体，以及可选地生物衍生化合物途径的前体，形式为提供所需前体的从头生产或提高由宿主微生物天然生产的前体生产的一种天然生产的分子或作为工程产品。例如，丙二酰辅酶A、乙酰乙酰辅酶A和丙酮酸在宿主生物如大肠杆菌中天然生产。如本申请所公开的，宿主微生物可被改造以增加前体的生产。此外，已经被工程化以生产所需前体的微生物可用作宿主微生物，并进一步工程化以表达乙酰辅酶A和草酰乙酸以及可选地生物衍生化合物途径的酶或蛋白质。

[0114] 在一些实施例中，本发明的非天然存在微生物，由含有合成乙酰辅酶A和草酰乙酸的酶能力的宿主来生产。在该具体实施例中，增加乙酰辅酶A和草酰乳酸途径产物的合成或积累，有利于例如增强生物衍生化合物途径反应。反过来，乙酰辅酶A和草酰乳酸的增加可用于增强所需生物衍生化合物的生产。所述增加的合成或积累，可以伴随着，例如，编码包含磷酸转酮酶的通向乙酰辅酶A和草酰乙酸的途径、非PTS和/或ETC系统、酶或蛋白质中的一种或多种的核酸的过度表达。所述包含磷酸酶的途径、非PTS和/或ETC系统的一种或多种酶和/或一种或多种蛋白质的过度表达，可以例如通过一种或多种内源基因的外源表达，或通过一种或多种异源基因的外源表达来实现。因此，可以容易地将天然存在的微生物生产为本发明的非天然存在微生物，例如通过过度表达一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十一个或十二个，直到多至编码乙酰辅酶A途径酶或蛋白质的所有核酸。另外，可以通过内源基因的诱变，导致一种或多种包含磷酸转酮酶的通向乙酰辅酶A和草酰乙酸的途径、非PTS系统和/或ETC系统中的酶活性增加，来生产非天然存在微生物。

[0115] 在特别有用的实施例中，使用了编码核酸的外源表达。外部表达实现了对主体和应用中的表达和/或调节元素的定制，以实现由用户控制的期望表达水平。但是，内源性表达也可以在其它实施例中使用，例如通过在与诱导型启动子或其他调节元件连接时，去除负调控效应物或引入诱导基因启动子。因此，具有天然存在的诱导型启动子的内源基因，可以通过提供合适的诱导剂来上调，或者内源基因的调控区域可通过工程化来加入诱导型调节元件，从而允许在期望的时间调节增加内源基因表达。类似地，可以包括诱导型启动子作为用在引入非天然存在微生物中的外源基因上的调节元件。

[0116] 应当理解，在本发明的方法中，可以将一种或多种外源核酸中的任何一种引入微生物，以生产本公开的非天然存在微生物。可以引入核酸以便在微生物中实现例如乙酰辅酶A途径。可选地，可以引入编码核酸，以生产具有催化一些实现乙酰辅酶A生物合成能力所需反应的生物合成能力的中间体微生物。例如，具有乙酰辅酶A途径的非天然存在微生物，可以包含至少两种编码所需酶或蛋白质的外源核酸，例如3-己糖-6-磷酸合成酶和果糖-6-磷酸磷酸转酮酶的组合，或者可选地，木酮糖-5-磷酸磷酸转酮酶和乙酰CoA转移酶，或者可选地，果糖-6-磷酸磷酸转酮酶和甲酸还原酶，或者可选地，木酮糖-5-磷酸磷酸转酮酶和甲醇脱氢酶等。因此，应当理解，可以在本发明的非天然存在微生物中，包括生物合成途径的两种或多种酶或蛋白质的任意组合。

[0117] 所述生物可以包括编码包含磷酸转酮酶的通向乙酰辅酶A和草酰乙酸的途径的酶或蛋白质的外源核酸，并且可以包括编码非PTS和/或ETC系统的酶或蛋白质的一种或多种

天然或外源核酸的修饰。例如,在一些实施例中,将编码包含磷酸转酮酶的通向乙酰辅酶A和草酰乙酸的途径的酶或蛋白质的一种或多种外源核酸引入该生物中,同时还向该生物引入用于提供或改进糖摄取的非磷酸转移酶系统(非PTS)的一种或多种修饰,其中所述修饰增加非PTS活性。例如,所述非PTS修饰可以是将所述糖摄取非PTS引入不具有非PTS的生物,或可以对具有内源(天然或天然)非PTS的生物进行修饰,以增加非PTS的一种或多种天然酶或蛋白质的活性或表达。可选地,该微生物还可以包括减弱或消除PTS活性的一种或多种基因修饰。

[0118] 在其它实施例中,例如,将编码包含磷酸转酮酶的通向乙酰辅酶A和草酰乙酸的途径的酶或蛋白质的一种或多种外源核酸,和对ETC组件的一种或多种基因修饰一起引入生物中。例如,可以提高ATP生产效率的基因修饰,可以是(i)减弱或消除无质子转位的NADH依赖性脱氢酶(例如,Ndh、WrbA或YhdH、YieF、YtfG、Qor、MdaB),或者(ii)减弱或消除每对电子的质子易位效率低于第二细胞色素氧化酶的第一细胞色素氧化酶(例如,CydAB或AppBC或YgiN)。由此,提高细胞的能量效率。基因修饰还可以增加天然或异源复合物I酶或蛋白质和细胞色素氧化酶的表达或活性,例如通过减弱arcA。在另一种方法中,所述增加还原当量的可利用性或合成的基因修饰,还可以通过使用基因修饰来增加丙酮酸脱氢酶、丙酮酸甲酸裂解酶的表达或活性以及NAD(P)H-生产甲酸脱氢酶来实现。

[0119] 类似地,应当理解,可以在本公开的非天然存在微生物中,包括生物合成途径的三种或更多种酶或蛋白质的任意组合,例如,根据需要,甲醇脱氢酶、果糖-6-磷酸醛缩酶和果糖-6-磷酸磷酸转酮酶,或者可选地,果糖-6-磷酸磷酸转酮酶和3-羟基丁醛还原酶,或者可选地,木酮糖-5-磷酸磷酸转酮酶、丙酮酸甲酯裂解酶和4-羟基丁酰辅酶A还原酶(醇形成),或者可选地,果糖-6-磷酸醛缩酶、磷酸转乙酰酶和3-羟基异丁酸脱水酶et al.,只要所需生物合成途径的酶和/或蛋白质的组合能得到相应所需产品的生产。类似地,如本申请所公开的生物合成途径的四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或更多种酶或蛋白质,可以根据需要包括在本发明的非天然存在微生物中,只要所需生物合成途径的酶和/或蛋白质的组合能得到相应所需产品的生产。

[0120] 除了如本申请所述的乙酰辅酶A和草酰乙酸的生物合成之外,本发明的非天然存在微生物和方法,还可以通过与彼此和/或与本领域熟知的其它微生物和方法的各种组合一起使用,从而通过其他途径实现产品生物合成。例如,可以使用具有包含磷酸转酮酶的乙酰辅酶A和草酰乙酸途径,且包括非PTS系统修饰或ETC系统修饰的非天然微生物,以生产乙酰辅酶A和草酰乙酸,其在转化可以被能够利用乙酰辅酶A和/或草酰乙酸作为生物衍生化合物途径中的前体的第二微生物用于生产所需产物。

[0121] 例如,乙酰辅酶A和/或草酰乙酸可以直接加入第二微生物的另一种培养物中,或者乙酰辅酶A和/或草酰乙酸的原始培养物可以通过例如细胞分离来除尽所述微生物,然后随后将第二微生物加入到发酵液中,以用于生产最终产物而无需中间纯化步骤。

[0122] 在其它实施例中,本发明的非天然存在微生物和方法可以在多种子途径中进行组合,以实现对例如乙酰辅酶A和草酰乙酸、或可选地在其途径中使用乙酰辅酶A和草酰乙酸的任何生物衍生化合物的生物合成。在这些实施例中,本公开的所需产物的生物合成途径可以分离成不同的微生物,并且可以共培养不同的微生物以生产最终产物。在这种生物合成方案中,一种微生物的产物是第二种微生物的底物,直到合成最终产物。例如,乙酰辅酶A

和草酰乙酸以及任选的任何生物衍生化合物的生物合成,可以通过构建含有将一种途径中间体转化到另一种途径中间体或产物的生物合成途径的微生物来实现。可选地,乙酰辅酶A和草酰乙酸以及任选的任何生物衍生化合物,也可以从微生物通过共同培养或共同发酵来合成生产,所述方法是使用同一容器中的两种微生物,其中第一微生物生产乙酰辅酶A和草酰乙酸或生物衍生化合物中间体,第二微生物将所述中间体、乙酰辅酶A或草酰乙酸转化为生物衍生化合物。

[0123] 鉴于本申请提供的教导和指导,本领域技术人员将理解,对于本发明的非天然存在微生物和方法以及其它微生物,存在多种组合和置换,以及其他具有亚路径的非天然存在微生物的共培养,以及本领域熟知的其它化学物和/或生物化学方法的组合,以生产乙酰辅酶A和草酰乙酸以及可选地生物衍生化合物。

[0124] 类似地,本领域技术人员应当理解,宿主生物的选择,可以基于引入一种或多种用以增加乙酰辅酶A和草酰乙酸以及可选地生物衍生化合物的合成或生产的基因破坏所需的特性。因此,应当理解,如果要在宿主微生物中引入基因修饰以破坏基因,则可以类似地破坏任何催化相似但不相同的代谢反应的同系物、直系同源物或旁系同源物,以确保所需的代谢反应充分破坏。由于不同微生物之间的代谢网络之间存在某些差异,所以本领域技术人员将理解,在给定微生物中破坏的实际基因在微生物之间可能不同。但是,鉴于本申请提供的教导和指导,本领域技术人员还将理解,本发明的方法可以应用于任何合适的宿主微生物,以鉴定以感兴趣的物种构建一种提高乙酰辅酶A和可选地生物衍生化合物的生物合成的生物所需的同源代谢改变。在一个特定的实施例中,增加的生产将乙酰辅酶A和草酰乙酸与生物衍生化合物的生物合成与生物生长偶联,并且如果需要,可以如本申请所公开的那样,将乙酰辅酶A和生物衍生化合物的生产强制性偶联到生物生长。

[0125] 要实现本发明的非天然存在微生物的生产,可以通过引入编码参与一种或多种含有磷酸磷酸转酮酶的乙酰辅酶A或乙酰辅酶A的和草酰乙酸途径的一种或多种酶的表达核酸, i i) 增强糖摄取非PTS的修饰,和/或 (i ii) 对微生物的电子传递链 (ETC) 的用以提高ATP生产效率、提高还原当量可利用性、或两者兼有的的一种或多种修饰,或生物衍生化合物的生物合成途径的一种或多种修饰。根据选择用于生物合成的宿主微生物,可以表达部分或全部所述途径或系统的核酸。例如,如果所选择的宿主缺乏一种或多种用于所需生物合成途径的酶或蛋白质,则将所缺失的酶或蛋白质的可表达核酸引入宿主中,以用于随后的外源表达。可选地,如果所选择的宿主表现出某些途径基因的内源性表达,但缺失其他途径基因,则需要编码缺乏的酶或蛋白的核酸,来实现乙酰辅酶A和草酰乙酸生产、PTS、非PTS、ETC修饰或生物衍生化合物生物合成。因此,可以通过引入外源酶或蛋白质活性来获得所需的生物合成途径,以生产本发明的非天然存在微生物,或者可以通过引入一种或多种外源酶或蛋白质活性,从而与一种或多种内源性酶或蛋白质一起,来获得所需的生物合成途径,以生产所需产物,例如乙酰辅酶A或生物衍生化合物。

[0126] 宿主微生物可以选自用例如细菌、酵母、真菌或适用于或适于发酵过程的各种其它微生物生产的非天然存在微生物。示例性细菌包括选自以下的任何物种:肠杆菌目(Enterobacteriales),肠杆菌科(Enterobacteriaceae),包括埃希氏菌属(Escherichia)属和克雷伯菌属(Klebsiella);气单胞菌目(Aeromonadales),琥珀酸弧菌科(Succinivibrionaceae),包括无氧螺菌属(Anaerobiospirillum);巴斯德氏菌目

(*Pasteurellales*) ,巴斯德毕赤科 (*Pasteurellaceae*) ,包括放线杆菌属 (*Actinobacillus*) 和曼海星属 (*Mannheimia*) ;根瘤菌目 (*Rhizobiales*) ,慢生根瘤菌科 (*Bradyrhizobiaceae*) ,包括根瘤菌属 (*Rhizobium*) ;芽孢杆菌目 (*Bacillales*) ,芽孢杆菌科 (*Bacillaceae*) ,包括芽孢杆菌属 (*Bacillus*) ;放线菌目 (*Actinomycetales*) ,棒状杆菌科 (*Corynebacteriaceae*) 和链霉菌科 (*Streptomycetaceae*) ,包括棒状杆菌 (*Corynebacterium*) 属和链霉菌 (*Streptomyces*) 属;红螺菌目 (*Rhodospirillales*) ,醋杆菌属 (*Acetobacteraceae*) ,包括葡萄杆菌属 (*Gluconobacter*) ;鞘脂单胞菌目 (*Sphingomonadales*) ,鞘脂单胞菌科 (*Sphingomonadaceae*) ,包括发酵单胞菌属 (*Zymomonas*) ;乳杆菌目 (*Lactobacillales*) ,乳杆菌科 (*Lactobacillaceae*) 和链球菌科 (*Streptococcaceae*) ,分别包括乳杆菌属 (*Lactobacillus*) 和乳球菌属 (*Lactococcus*) ;梭菌目 (*Clostridiales*) ,梭菌科 (*Clostridiaceae*) ,梭菌属 (*Clostridium*) ;和假单胞菌目 (*Pseudomonadales*) ,假单胞菌科 (*Pseudomonadaceae*) ,包括假单胞菌属 (*Pseudomonas*) 。宿主细菌的非限制性物种包括:大肠杆菌,产酸克雷伯杆菌 (*Klebsiella oxytoca*) ,产琥珀酸芽孢杆菌 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*) ,产琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*) ,产琥珀酸曼氏杆菌 (*Mannheimia succiniciproducens*) ,菜豆根瘤菌 (*Rhizobium etli*) ,枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) ,谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ,氧化葡萄糖杆菌 (*Gluconobacter oxydans*) ,运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) ,乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*) ,植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) ,天蓝链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) ,丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*) ,荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 和恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 。示例性的细菌甲基营养物质包括例如芽孢杆菌 (*Bacillus*) ,甲基杆菌 (*Methylobacterium*) ,*Methyloversatilis*,甲基球菌 (*Methylococcus*) ,甲基孢囊菌 (*Methylocystis*) 和生丝微菌 (*Hyphomicrobium*) 。

[0127] 类似地,酵母或真菌物种的示例性种类包括选自以下的物种:酵母目 (*Saccharomycetales*) ,酵母菌科 (*Saccaromycetaceae*) ,包括酵母属 (*Saccharomyces*) ,克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 和毕赤酵母属 (*Pichia*) ;酵母目 (*Saccharomycetales*) ,*Dipodascaceae*科,包括耶氏酵母属 (*Yarrowia*) ;裂殖酵母目 (*Schizosaccharomycetales*) ,裂殖酵母科 (*Schizosaccaromycetaceae*) ,包括裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*) ;散囊菌目 (*Eurotiales*) ,发菌科 (*Trichocomaceae*) ,包括曲霉属 (*Aspergillus*) ,和毛霉目 (*Mucorales*) ,毛霉菌科 (*Mucoraceae*) ,包括根霉属 (*Rhizopus*) 。宿主酵母或真菌的非限制性物种包括:酿酒酵母,粟酒裂殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) ,乳酸克鲁维酵母 (*Kluyveromyces lactis*) ,马克斯克鲁维酵母 (*Kluyveromyces marxianus*) ,土曲霉 (*Aspergillus terreus*) ,黑曲霉 (*Aspergillus niger*) ,巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) ,根霉菌 (*Rhizopus arrhizus*) ,米根霉 (*Rhizopus oryzae*) ,解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 等。大肠杆菌和谷氨酸棒状杆菌是特别有用的宿主生物,因为它们是经过良好表征的适合于遗传工程的微生物。其他特别有用的宿主微生物包括酵母,例如酿酒酵母,以及选自以下的酵母或真菌:酵母属 (*Saccharomyces*) 、裂殖酵母属 (*Schizosaccharomyces*) 、裂殖壶菌属 (*Schizochytrium*) 、红酵母属 (*Rhodotorula*) 、破囊壶菌属 (*Thraustochytrium*) 、曲霉属 (*Aspergillus*) 、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 、伊萨酵

母属(Issatchenkia)、耶氏酵母属(Yarrowia)、假丝酵母属(Candida)、毕赤酵母属(Pichia)、Ogataea酵母属、Kuraishia酵母属、汉逊酵母属(酵母属)和Komagataella酵母属。有用的宿主生物包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)、甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*)、博伊丁氏假丝酵母(*Candida boidinii*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、马克斯克鲁维酵母(*Kluyveromyces marxianus*)、土曲霉(*Aspergillus terreus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、根霉(*Rhizopus arrhizus*)、米根霉(*Rhizopus oryzae*)、解脂耶氏酵母(*Yarrowia lipolytica*)、东方伊萨酵母(*Issatchenkia orientalis*)等。应当理解,可以使用任何合适的微生物宿主生物来引入代谢和/或基因修饰以生产所需的产物。

[0128] 本申请所用的术语“非天然”和“非天然存在”用于本发明的一种或多种微生物时,意指生丝微生物有通常不存在于所称物种的天然存在菌株(包括所称物种的野生型菌株)中的至少一种基因改变。基因改变包括,例如,用于引入编码代谢多肽的可表达核酸的修饰、其他核酸添加、核酸删除和/或微生物遗传物质的其它功能性破坏。这样的修饰包括,例如,所称物种的异源、同源或异源和同源的多肽的编码区和功能片段。另外的修饰包括,例如,非编码调节区中的改变基因或操纵子表达的修饰。示例性代谢多肽包括通向乙酰辅酶A、或草酰乙酸和乙酰辅酶A的途径、或生物衍生化合物的生物合成途径中的酶或蛋白质。

[0129] 代谢修饰是指从天然存在状态改变的生化反应。因此,非天然存在微生物可以具有对编码代谢多肽或其功能片段的核酸的基因修饰。本申请公开了示例性代谢修饰。

[0130] 如本申请所用,术语“分离的(isolated)”用于指代一种基本上不含其在自然界中存在时的至少一种成分的微生物。该术语包括与其在天然环境中存在时的部分或全部成分分离的微生物。该术语还包括与其在非天然环境中存在时的部分或全部成分分离的微生物。因此,分离的微生物与其在自然中存在时或在非天然环境中生长、储存或存在时的其他物质部分或全部分离。分离的微生物的具体示例包括在部分纯微生物、基本纯微生物,和非天然存在的培养基中培养的微生物。

[0131] 如本申请所使用的术语“微生物的(microbial)”、“微生物(microbial organism)”或“微生物(microorganism)”旨在表示作为包含在古细菌、细菌或真核细胞领域内的微观细胞存在的任何微生物。因此,该术语旨在包括具有微观尺寸的原核或真核细胞或微生物,并且包括所有物种的细菌、古细菌和真细菌,以及真核微生物如酵母和真菌。该术语还包括可以培养来用于生产生物化学物质的任何物种的细胞培养物。术语“细菌的(bacterial)”和“细菌生物(bacterial organism)”微生物意指在细菌领域内作为微观细胞存在的任何微生物。

[0132] 如本申请所用,术语“CoA”或“辅酶A”意指一种有机辅因子或辅基(酶的非蛋白部分),其存在是许多酶(脱辅基酶)活性形成活性酶系统所必需的。辅酶A作用于某些缩合酶,作用于乙酰基或其他酰基转移以及脂肪酸合成和氧化、丙酮酸氧化和其他乙酰化。

[0133] 如本申请所用,当涉及培养或生长条件时,术语“基本无氧”旨在表示氧的量小于液体介质中溶解氧饱和度的约10%。该术语还旨在包括保持小于约1%氧气气氛的液体或固体介质密封室。

[0134] 本申请使用的“外源性”旨在表示所称分子或所称活性是引入宿主微生物中的。可

以例如通过将编码核酸引入宿主遗传物质,例如通过整合入宿主染色体或通过非染色体遗传物质如质粒来引入分子。因此,用于指代编码核酸的表达时,该术语是指将编码核酸以可表达形式引入微生物中。包括有编码多肽的任何核酸,其中其调节区,例如启动子、终止子、增强子,已从其天然序列改变。例如,通过以更弱或更强的启动子取代其启动子来修饰天然基因,得到编码所称多肽的外源核酸(或基因)。当用于指代生物合成活性时,该术语是指引入所称宿主微生物的活性。该生物合成活性可以通过修饰调节区域来实现,例如启动子、终止子、增强子,以在天然基因中产生生物合成活性。例如,通过用组成型或诱导型启动子代替其启动子来修饰天然基因,得到外源生物合成活性。其来源可以是例如,在引入宿主微生物之后表达所称活性的同源或异源编码核酸。因此,术语“内源性”是指存在于宿主中的所称分子或活性。类似地,当涉及编码核酸的表达时,该术语是指包含在微生物内的编码核酸的表达。术语“异源”是指来源于除所称物种之外的来源的分子或活性,而“同源”是指源自宿主微生物的分子或活性。因此,本发明的编码核酸的外源表达,可以利用异源或同源编码核酸中的任何一种或两种。

[0135] 应当理解,如果在微生物中包含多于一种的外源核酸,则所述多于一种的外源核酸是指所称的编码核酸或生物合成活性,如上所述。如本申请所公开的,进一步理解的是,可以将多于一种的外源核酸通过分离的核酸分子、多顺反子核酸分子或其组合引入宿主微生物中,并且仍被认为是多于一种外源核酸。例如,如本申请所公开的,微生物可被工程化以表达编码所需途径酶或蛋白质的两种或更多种外源核酸。在编码所需活性的两种外源核酸被引入宿主微生物的情形中,可以理解的是,所述两种外源核酸可以作为单个核酸引入,例如在单一质粒上,在分开的各个质粒上,可以整合到宿主染色体的单个位点或多个位点中,并且仍被认为是两种外源核酸。类似地,应当理解,可以以任何所需的组合将多于两种的外源核酸引入宿主微生物,例如在单独的质粒上,在分开的各个质粒上,可以整合到宿主染色体的单个位点或多个位点中,并且仍然被认为是两种或更多种外源核酸,例如三种外源核酸。因此,所称外源核酸或生物合成活性的数目,是指编码核酸的数量或生物合成活性的数目,而不是引入宿主微生物的分开的核酸的数量。

[0136] 如本申请所用,短语“提高碳通量”意指强化、增加或进一步增强通过或通向所需途径、途径产物、中间体或生物衍生化合物的代谢碳的程度或流量。所述强化、增加或增强可以是相对于所述途径产物、中间体或生物衍生化合物的预定基线而言。例如,使用本申请所述的磷酸转酮酶(参见例如图1),相对于不存在磷酸转酮酶的情形而言,提高每摩尔甲醇的乙酰辅酶A的产率。由于可以实现乙酰辅酶A产率的提高,本发明也可以实现乙酰辅酶A衍生化合物的提高,如1,3-丁二醇、巴豆醇、丁二烯、3-丁烯-2-醇、2,4-戊二烯酸、1,4-丁二醇、己二酸、6-氨基己酸、己内酰胺、己二胺、脂肪醇例如己醇、辛醇和十二烷醇,丙烯、异戊二烯、异丙醇、丁醇、甲基丙烯酸和2-羟基异丁酸。

[0137] 如本申请所用,术语“基因破坏”或其语法等同语,旨在表示使编码的基因产物无效或减弱的基因改变。基因改变可以是例如整个基因的删除、转录或翻译所需的调节序列的删除、产生截短基因产物的基因的部分删除,或通过令编码基因产物失活或减弱的各种突变策略中的任何一种,例如,用较弱的启动子替换基因的启动子,置换或插入编码蛋白质的一种或多种氨基酸以降低其活性、稳定性或浓度,或令基因的反式活化因子例如调控蛋白失活。基因破坏的一个特别有用的方法是完整的基因删除,因为它减少或消除了本发明

的非天然存在微生物中遗传逆转的发生。基因破坏还包括无效突变，其是指基因内的突变或含有导致基因不被转录成RNA和/或翻译成功能性基因产物的基因区域的突变。这种无效突变可以由许多类型的突变引起，包括例如失活点突变、基因部分删除、全基因删除或染色体区段删除。

[0138] 本申请所用的术语“生长偶联”用于指代生物化学产物的生产时，意指在微生物的生长阶段期间生产所称生物化学产物的生物合成。在一个具体实施例中，生长偶联生产可以是强制性的，这意味着所称生物化学物质的生物合成，是微生物生长阶段期间生产的强制产物。

[0139] 如本申请所用，术语“减弱”或其语法等同物旨在削弱、减少或消除酶或蛋白质相对于天然存在酶活性的活性或数量，其可以因不存在而为零。如果减弱导致活性或量降低到给定途径功能所需的临界水平以下，则酶或蛋白质的活性或量的减弱可以模拟完全破坏。但是，模拟一种途径完全破坏的酶或蛋白质的活性或量的减弱，仍然可能足以使另一途径继续发挥作用。例如，内源性酶或蛋白质的减弱，可以足以模拟本发明的生产乙酰辅酶A或生物衍生化合物的相同酶或蛋白质的完全破坏，但是剩余酶或蛋白质的活性或量，仍然可以足以维持其他途径，例如对宿主微生物存活、繁殖或生长至关重要的途径。所述酶或蛋白质的减弱也可以减弱、减少或消除酶或蛋白质的活性或量，其量足以提高本发明的乙酰辅酶A或生物衍生化合物的产量，但不一定模拟酶或蛋白质的完全破坏。如本申请所用，术语“消除”在指酶或蛋白质(或其他分子)或其活性时，是指酶或蛋白质或其活性不存在于细胞中。当通常编码酶或蛋白质的核酸不表达时，可以消除酶或蛋白质的表达。

[0140] 相对而言，如果酶或蛋白质(或其他分子)，例如修饰形式的蛋白质(或其他分子)表现出大于其野生型形式的活性，则其活性称为“增强”或“增加”。这包括在宿主生物中不存在待增强或增加的酶、蛋白质、其他分子或活性的修饰。例如，外源或异源核酸在以野生型形式不含核酸的宿主中被含和表达，可称为“增强”或“增加”。同样地，如果酶在非天然细胞中的表达量大于天然(未修饰)细胞中的表达量(包括起始细胞中酶不存在的情形)，其表达称为“增强”或“上调”。

[0141] 如本申请所用，术语“生物衍生(bioderived)”意指衍生自生物体或由生物体合成，并且可以被认为是可再生资源，因为其可以由生物体生产。这样的微生物，特别是本发明的微生物，可以利用本申请所述的各种碳源，包括原料或生物质，例如从农业、植物、细菌或动物来源获得的糖和碳水化合物。可选地，所述生物体可以利用例如大气碳和/或甲醇作为碳源。

[0142] 如本申请所用，术语“生物基(biobased)”是指本申请所述的全部或部分由本发明的生物衍生化合物组成的产物。生物基产品与石油基产品对比，石油基产品衍生自石油或石油化学原料，或由石油或石油化学原料合成。

[0143] 本申请使用的“生物衍生化合物”是指衍生自生物体或由生物体合成的靶分子或化学物质。在本发明的上下文中，工程微生物用于通过乙酰辅酶A生产生物衍生化合物或其中间体，包括可选地进一步通过乙酰乙酰辅酶A、丙二酰辅酶A和/或琥珀酰辅酶A。本发明的生物衍生化合物包括但不限于醇、二醇、有机酸、烯烃、二烯、有机胺、有机醛、维生素、营养剂和药物。

[0144] 本发明的非天然存在微生物可以含有稳定的基因改变，其是指可以培养大于5代

而不丢失所述改变的微生物。通常，稳定的基因改变包括持续大于10代的修饰，特别是所述稳定修饰将持续超过约25代，更特别地，所述稳定基因修饰将持续大于50代，包括无限期。

[0145] 在基因破坏的情形中，特别有用的稳定基因改变是基因删除。使用基因删除来引入稳定的基因改变，对于降低在基因改变之前逆转到表型的可能性是特别有用的。例如，生物化学物质的稳定生长偶联生产，可以通过例如通过在一组代谢修饰中删除编码催化一种或多种反应的酶的基因来实现。例如，本公开的非天然微生物可以包括丙酮酸激酶的基因删除、PTS的酶或蛋白质的基因删除，例如ptsI的删除，每电子的质子易位效率较低的细胞色素氧化酶的删除，例如CydAB或AppBC或YgiN的删除，或无质子转位的NADH依赖性脱氢酶的删除，例如Ndh、WrbA、YhdH、YieF、YtfG、Qor、MdaB，或其组合。通过多次删除可以进一步提高生物化学生长偶联生产的稳定性，显著降低每个被破坏的活性发生多次补偿性逆转的可能性。

[0146] 本领域技术人员将理解，本申请所例举的基因修饰，包括代谢修饰的描述，是相对于合适的宿主生物如大肠杆菌及其相应的代谢反应，或所需遗传物质的合适来源微生物，例如基因所需的代谢途径。但是，鉴于各种微生物的完整基因组测序和基因组学领域的高水平技术，本领域技术人员将容易地将本申请提供的教导和指导应用于基本上所有其他微生物。例如，本申请示例的大肠杆菌代谢变化可以通过从所称物种以外的物种引入相同或类似的编码核酸而容易地应用于其它物种。这种基因改变包括例如物种同系物的基因改变，一般而言，特别是直系同源、旁系同源或非直系同源的基因置换。

[0147] 直系同源物是与垂直亲缘相关的一种或多种基因，它们负责不同生物中基本上相同或相同的功能。例如，鼠环氧化物水解酶和人环氧化物水解酶可被认为是环氧化物水解生物功能的直系同源物。当基因与垂直亲缘相关时，例如，它们共享的序列相似性足以表明其同源性，或来自共同祖先的进化亲缘性。如果基因不一定具有序列相似性但共享的序列相似性，足以表明其从共同祖先发展到初级序列相似性不可识别的程度，则基因也可以被认为是直系同源物。直系同源基因可以编码具有约25%至100%氨基酸序列相似性的序列相似性的蛋白质。对于编码共享氨基酸相似性小于25%的蛋白质的基因，如果它们的三维结构也显示出相似性，则也可以被认为是来自垂直亲缘。丝氨酸蛋白酶家族的成员，包括组织纤溶酶原活化物和弹性蛋白酶，被认为是由共同的祖先垂直亲缘引起的。

[0148] 直系同源物包括通过例如进化在结构或整体活性上发生分化的基因或其编码的基因产物。例如，当一个物种编码表现出两个功能的基因产物，并且其中这些功能已经在第二个物种中分离成不同的基因时，这三个基因及其相应的产物被认为是直系同源物。本领域技术人员将理解，为了生产生物化学产品，选择待引入或破坏代谢活性的相关直系同源基因，用于构建非天然存在微生物。显示可分离活性的直系同源物的一个示例，是不同活性已经在两种或更多种之间或单种物种内分离成不同的基因产物。一个具体的例子是弹性蛋白酶蛋白水解和纤溶酶原蛋白酶分解(两种丝氨酸蛋白酶活性)分离成不同的分子，即纤溶酶原活化物和弹性蛋白酶。第二个例子是支原体5'-3'外切核酸酶和果蝇DNA聚合成酶III活性的分离。来自第一种物种的DNA聚合成酶可以被认为是来自第二种物种的外切核酸酶或聚合成酶中的任一个或两者的直系同源物，反之亦然。

[0149] 相比之下，旁系同源物是通过例如重复和随后的进化分歧相关，并且具有相似或共同但不相同的功能的同源物。旁系同源物可以来自或衍生自例如同一物种或不同物种。

例如,微粒体环氧化物水解酶(环氧化物水解酶I)和可溶性环氧化物水解酶(环氧化物水解酶II)可以被认为是旁系同源物,因为它们代表从共同的祖先共同进化的两种不同的酶,其催化不同的反应并在相同种类中具有不同的功能。旁系同源物是来自相同物种的蛋白质,其彼此具有显著的序列相似性以表明其同源的,或通过来自共同祖先的共同进化相关。旁系同源蛋白家族包括HipA同系物、荧光素酶基因、肽酶等。

[0150] 非直系同源基因置换,是指来自一个物种的非直系同源基因可以替代不同物种的参考基因功能。替代包括,例如,与不同物种中的参考功能相比,能够在原始物种中执行基本相同或相似的功能。尽管一般来说,非直系同源基因置换将被鉴定为与编码参考功能的已知基因结构相关,结构相关性较低但功能上相似的基因及其相应的基因产物仍将落在本申请所用术语的含义内。功能相似性需要,例如,与编码待置换的功能的基因相比,在非直系同源基因产物的活性位点或结合区域中至少有一些结构相似性。因此,非直系同源基因包括例如旁系同源基因或无亲缘性基因。

[0151] 因此,在鉴定和构建本发明的具有乙酰辅酶A或生物衍生化合物的生物合成能力的非天然存在微生物时,本领域技术人员将理解,将本申请提供的教导和指导应用于鉴定特定种类的代谢修饰,可以包括对直系同源物的鉴定和包含或失活。在编码催化相似或基本类似代谢反应的酶的参考微生物中存在旁系同源基因和/或非直系同源基因置换的情形中,本领域技术人员也可以利用这些进化相关基因。类似地,对于基因破坏,进化相关基因也可以在宿主微生物中被破坏或删除,以减弱或消除所述破坏所靶向的酶活性的功能冗余。

[0152] 直系同源物、旁系同源物和非直系同源基因置换,可以通过本领域技术人员熟知的方法来确定。例如,检查两个多肽的核酸或氨基酸序列,将揭示比较序列之间的序列相似性和相似性。基于这样的相似之处,本领域技术人员可以确定相似性是否足够高以表明蛋白质通过从共同祖先进化而相关。本领域技术人员熟知的算法,诸如Align、BLAST、Clustal W et al.,比较和确定原始序列相似性或身份,并且还确定序列中的空位的存在或重要性,可以对其分配权重或得分。这样的算法也是本领域已知的,并且类似地可用于确定核苷酸序列相似性或身份。基于用于计算统计学相似度(或在随机多肽中找到相似匹配的机会)以及确定匹配的显著性的公知方法,来计算相似性是否足以确定相关性的参数。根据需要,两个或更多个序列的计算机比较也可以由本领域技术人员视觉优化。可以预期,相关基因产物或蛋白质具有高相似性,例如25%至100%的序列相似性。如果扫描足够大小的数据库(约5%),则非相关蛋白质的身份可以与偶然发生的预期情形基本相同。5%至24%之间的序列,可能表示同源性足以或不足以得出对比序列具有相关性的结论。在给定数据集大小能够用于确定这些序列的相关性的前提下,可以进行额外的统计分析来确定匹配的显著性。

[0153] 使用BLAST算法确定两个或多个序列的相关性的示例性参数,可以如下所述。简单来说,氨基酸序列比对可以使用BLASTP版本2.0.8 (Jan-05-1999) 和以下参数进行:Matrix:OBLOSUM62;gap open:11;gap extension:1;x_dropoff:50;expect:10.0;wordsize:3;filter:on。核酸序列比对可以使用BLASTN版本2.0.6 (Sept-16-1998) 和以下参数进行:Match:1;mismatch:-2;gap open:5;gap extension:2;x_dropoff:50;expect:10.0;wordsize:11;filter:off。本领域技术人员知道,可以对上述参数进行改进以增加或减少

比较的严格性，并且确定两个或多个序列的相关性。

[0154] 本发明的非天然存在微生物可以含有稳定的基因改变，其是指可以培养大于5代而不丢失所述改变的微生物。通常，稳定的基因改变包括持续大于10代的修饰，特别是稳定的修饰将持续超过约25代，更特别地，稳定的基因修饰将大于50代，包括无限期。

[0155] 基因破坏的情形中，一种特别有用的稳定基因改变是基因删除。使用基因删除来引入稳定的基因改变，对于在基因改变之前降低逆转到表型的可能性是特别有用的。例如，一种生物化学物的稳定生长偶联生产，可以通过，例如在一组代谢修饰中，删除编码催化一种或多种反应的酶的基因来实现。通过多重删除可以进一步提高生物化学生长偶联生产的稳定性，显著降低每次破坏活性发生多次补偿性逆转的可能性。

[0156] 本领域技术人员将理解，本申请所例举的基因修饰，包括代谢修饰的描述，是相对于合适的宿主生物如大肠杆菌及其相应的代谢反应，或所需遗传物质的合适来源微生物，例如基因所需的代谢途径。但是，鉴于各种微生物的完整基因组测序和基因组学领域的高水平技术，本领域技术人员将容易地将本申请提供的教导和指导应用于基本上所有其他微生物。例如，本申请示例的大肠杆菌代谢变化可以通过从所称物种以外的物种引入相同或类似的编码核酸而容易地应用于其它物种。这种基因改变包括例如物种同系物的基因改变，一般而言，特别是直系同源、旁系同源或非直系同源的基因置换。

[0157] 本发明的醇，包括生物燃料醇，包括伯醇、仲醇、二醇和三醇，优选具有C3至C10的碳原子。醇包括正丙醇和异丙醇。生物燃料醇优选为C3-C10、包括1-丙醇、异丙醇、1-丁醇、异丁醇、1-戊醇、异戊醇、2-甲基-1-丁醇、3-甲基-1-丁醇、1-己醇、3-甲基-1-戊醇、1-庚醇、4-甲基-1-己醇和5-甲基-1-己醇。二醇包括丙二醇和丁二醇，包括1,4-丁二醇、1,3-丁二醇和2,3-丁二醇。脂肪醇包括C4-C27脂肪醇，包括C12-C18，特别是C12-C14，包括饱和或不饱和直链脂肪醇。

[0158] 本发明的其它示例性生物衍生化合物包括：(a) 1,4-丁二醇及其中间体，例如4-羟基丁酸(4-羟基丁酸乙酯、4-羟基丁酸(4-HB))；(b) 丁二烯(1,3-丁二烯)及其中间体，如1,4-丁二醇、1,3-丁二醇、2,3-丁二醇、巴豆醇、3-丁烯-2-醇(甲基乙烯基甲醇)、2,4-戊二烯酸和3-丁烯-1-醇；(c) 1,3-丁二醇及其中间体、如3-羟基丁酸(3-HB)、2,4-戊二烯酸、巴豆醇或3-丁烯-1-醇；(d) 己二酸、6-氨基己酸(6-ACA)、己内酰胺、己二胺(HMDA)和乙酰丙酸及其中间体，例如己二酰辅酶A、4-氨基丁酰辅酶A；(e) 甲基丙烯酸(2-甲基-2-丙烯酸)及其酯，如甲基丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸甲酯(共同称为甲基丙烯酸)、3-羟基异丁酸和/或2-羟基异丁酸及其中间体；(f) 二醇，包括1,2-丙二醇(丙二醇)、1,3丙二醇、甘油、甘油乙二醇、二甘醇、三甘醇、二丙二醇、三丙二醇、新戊二醇和双酚A及其中间体；(g) 其他烯烃，包括丙烯和类异戊二烯，(h) 琥珀酸及其中间体；和(i) 脂肪醇，其是含有一种或多种羟基和4个或更多个碳原子链的脂肪族化合物，或其脂肪酸和脂肪醛，其优选为C4-C27碳原子。脂肪醇包括饱和脂肪醇、不饱和脂肪醇和线性饱和脂肪醇。示例的脂肪醇包括丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基和十二烷基醇及其相应的氧化衍生物，即具有相同碳原子数的脂肪醛或脂肪酸。优选的脂肪醇、脂肪醛和脂肪酸具有C8至C18碳原子，特别是C12-C18、C12-C14和C16-C18，包括C12、C13、C14、C15、C16、C17和C18碳原子。优选的脂肪醇包括线性不饱和脂肪醇，例如十二烷醇(C12；月桂醇)、十三烷醇(C13；1-十三烷醇、十三烷醇、异十三烷醇)、肉豆蔻醇(C14；1-十四烷醇)、十五醇(C15；十六烷醇、十六烷醇)、十六烷醇(C16；1-

十六烷醇)、十七烷醇(C17;1-正十七烷醇、十七烷醇)和硬脂醇(C18;1-十八烷醇)和不饱和对应物包括棕榈油醇(C16不饱和;9-十六碳烯-1-醇)或其相应的脂肪醛或脂肪酸。

[0159] 1,4-丁二醇及其中间体,如4-羟基丁酸(4-羟基丁酸乙酯,4-羟基丁酸,4-HB)是生物衍生化合物,其可以通过本申请和下列出版物中描述的酶途径制备。合适的生物衍生化合物途径和酶、筛选方法和分离方法见于2008年9月25日公开的题为“Compositions and Methods for the Biosynthesis of 1,4-Butanediol and Its Precursors”的WO2008115840A2;2010年12月9日公开的题为“Process of Separating Components of A Fermentation Broth”的WO2010141780A1;2010年12月9日公开的,题为“Microorganisms for the Production of 1,4-Butanediol and Related Methods”的WO2010141920A2;2010年3月18日公开的题为“Microorganisms for the Production of 1,4-Butanediol”的WO2010030711A2;2010年6月24日公布的题为“Microorganisms and Methods for Conversion of Syngas and Other Carbon Sources to Useful Products”的WO2010071697A1;2009年7月30日出版公布的题为“Methods and Organisms for Utilizing Synthesis Gas or Other Gaseous Carbon Sources and Methanol”的WO2009094485A1;2009年2月19日公布的题为“Methods and Organisms for the Growth-Coupled Production of 1,4-Butanediol”的WO2009023493A1;和2008年9月25日公布的题为“Compositions and Methods for the Biosynthesis of 1,4-Butanediol and Its Precursors”的WO2008115840A2,其全部通过引用并入本申请。

[0160] 丁二烯及其中间体如1,4-丁二醇、2,3-丁二醇、1,3-丁二醇、巴豆醇、3-丁烯-2-醇(甲基乙烯基甲醇)和3-丁烯-1-醇,是可通过本申请和以下出版物中描述的酶途径制备的生物衍生化合物。除了直接发酵生产丁二烯之外,可以分离、纯化1,3-丁二醇、1,4-丁二醇、巴豆醇、3-丁烯-2-醇(甲基乙烯基甲醇)或3-丁烯-1-醇(用于任何用途),然后通过金属基催化剂化学脱水成丁二烯。合适的生物活性化合物途径和酶、筛选方法和分离方法见于:2011年11月10日公开的题为“Microorganisms and Methods for the Biosynthesis of Butadiene”的WO2011140171A2;2012年2月9日公开的题为“Microorganisms and Methods for the Biosynthesis of Aromatics,2,4-Pentadienoate and 1,3-Butadiene”的WO2012018624A2;2011年11月10日公开的题为“Microorganisms and Methods for the Biosynthesis of Butadiene”的WO2011140171A2;2013年3月21日公开的题为“Microorganisms and Methods for Producing Alkenes”的WO2013040383A1;2012年12月27日公开的题为“Microorganisms for Producing Butadiene and Methods Related thereto”的WO2012177710A1;2012年8月9日公开的题为“Microorganisms and Methods for the Biosynthesis of Butadiene”的WO2012106516A1,以及2013年2月28日公开的题为“Microorganisms and Methods for Producing 2,4-Pentadienoate,Butadiene,Propylene,1,3-Butanediol and Related Alcohols”的WO2013028519A1,其全部通过引用并入本申请。

[0161] 1,3-丁二醇及其中间体,如2,4-戊二烯酸、巴豆醇或3-丁烯-1-醇,是可通过本申请和下列出版物中描述的酶途径制备的生物衍生化合物。合适的生物衍生化合物途径和酶、筛选方法和分离方法见于:2011年6月16日公开的题为“Methods and Organisms for Converting Synthesis Gas or Other Gaseous Carbon Sources and Methanol to 1,3-

Butanediol”的W02011071682A1;2011年3月17日公开的题为“Microorganisms and Methods for the Co-Production of Isopropanol with Primary Alcohols,Diols and Acids”的W02011031897A;2010年11月4日公开的题为“Organisms for the Production of 1,3-Butanediol”的WO 201010127319A2;2013年5月16日公开的题为“Eukaryotic Organisms and Methods for Increasing the Availability of Cytosolic Acetyl-CoA, and for Producing 1,3-Butanediol”的W02013071226A1;2013年2月28日公开的题为“Microorganisms and Methods for Producing 2,4-Pentadienoate, Butadiene, Propylene, 1,3-Butanediol and Related Alcohols”的W02013028519A1;2013年3月14日公开的题为“Eukaryotic Organisms and Methods for Producing 1,3-Butanediol”的W02013036764A1;2013年1月24日公开的题为“Methods for Increasing Product Yields”的W02013012975A1;和于2012年12月27日公开的题为“Microorganisms for Producing 1,3-Butanediol and Methods Related Thereto”的W02012177619A2,其全部内容通过引用并入本申请。

[0162] 己二酸、6-氨基己酸、己内酰胺、己二胺和乙酰丙酸及其中间体,例如4-氨基丁酰辅酶A,是可通过本申请和下列出版物中描述的酶途径制备的生物衍生化合物。合适的生物活性化合物途径和酶、筛选方法和分离方法见于:2010年11月11日公开的题为“Microorganisms and Methods for the Biosynthesis of Adipate, Hexamethylenediamine and 6-Aminocaproic Acid”的W02010129936A1;2013年1月24日公开的题为“Methods for Increasing Product Yields”的W02013012975A1;2012年12月27日公开的题为“Microorganisms for Producing 6-Aminocaproic Acid”的W02012177721A1;2012年7月26日公开的题为“Methods for Increasing Product Yields”的W02012099621A1;以及2009年12月17日公开的题为“Microorganisms for the production of adipic acid and other compounds”的W02009151728,其全部通过引用并入本申请。

[0163] 甲基丙烯酸(2-甲基-2-丙烯酸)用于制备其酯,统称为甲基丙烯酸(例如甲基丙烯酸甲酯,其尤其是用于制造聚合物)。甲基丙烯酸如甲基丙烯酸甲酯、3-羟基异丁酸和/或2-羟基异丁酸及其中间体,是可通过本申请和下列出版物中描述的酶途径制备的生物衍生化合物。合适的生物衍生化合物途径和酶、筛选方法和分离方法见于:2012年10月4日公开的题为“Microorganisms for Producing Methacrylic Acid and Methacrylate Esters and Methods Related Thereto”的W02012135789A2;以及2009年11月5日公开的题为“Microorganisms for the Production of Methacrylic Acid”的W02009135074A2,其全部通过引用并入本申请。1,2-丙二醇(丙二醇)、正丙醇、1,3-丙二醇和甘油及其中间体,是可以通过本申请和下列出版物中描述的酶途径制备的生物衍生化合物。合适的生物衍生化合物途径和酶、筛选方法和分离方法见于:2009年11月9日公开的题为“Primary Alcohol Producing Organisms”的W02009111672A1;2011年3月17日公开的题为“Microorganisms and Methods for the Co-Production of Isopropanol with Primary Alcohols, Diols and Acids”的W02011031897A1;2012年12月27日公开的题为“Microorganisms for Producing N-Propanol 1,3-Propanediol, 1,2-Propanediol or Glycerol and Methods Related Thereto”的W02012177599A2,其全部通过引用并入本申请。

[0164] 可用于生产包括聚合物(如PBS)、1,4-丁二醇、四氢呋喃、吡咯烷酮、溶剂、油漆、除冰剂、塑料、燃料添加剂、织物、地毯、颜料和洗涤剂等产品的琥珀酸及其中间体。生物衍生化合物可以通过本申请和下列出版物中描述的酶途径制备。合适的生物衍生化合物途径和酶、筛选方法和分离方法见于2008年7月2日公开的题为“Methods and Organisms for the Growth-Coupled Production of Succinate”的EP1937821A2,其通过引用并入本申请。

[0165] 伯醇和脂肪醇(也称为长链醇),包括脂肪酸和其脂肪醛及其中间体,是可以通过以下出版物中的酶途径制备的生物衍生化合物。合适的生物衍生化合物途径和酶、筛选方法和分离方法见于2009年9月11日公开的题为“Primary Alcohol Producing Organisms”的WO2009111672;2012年12月27日公开的题为“Microorganism for Producing Primary Alcohols and Related Compounds and Methods Related Thereto”的WO2012177726,其全部内容通过引用并入本申请。

[0166] 烯烃包括类异戊二烯,其可以是生物衍生产物。用于在微生物中生产类异戊二烯的途径和酶以及具有这些途径和酶的微生物包括如下所述:题为“生产乙酰辅酶A衍生的类异戊二烯”的WO2013071172、题为“Production of acetyl-coenzyme A derived compounds”的WO2012154854、题为“Genetically modified microbes producing increased levels of acetyl-CoA derived compounds”的WO2012016172、题为“Genetic modified microbes produced increased levels of acetyl-CoA derived compounds”的WO2012016177、题为“Production of isoprenoid”的WO2008128159或题为“Production of acetyl-coenzyme A derived isoprenoids”的US专利8415136,其通过引用并入本申请。异戊二烯可以是半萜烯、单萜烯、二萜烯、三萜烯、四萜烯、倍半萜烯和多萜烯。类异戊二烯优选为C5-C20类异戊二烯。所述类异戊二烯可以是松香二烯、紫穗槐二烯、蒈烯、 α -法呢烯、 β -法呢烯、金合欢醇、香叶醇、香叶基香叶醇、异戊二烯醇、芳樟醇、芷烯、月桂烯、橙花叔醇、罗勒烯、广藿香醇、 β -蒎烯、桧烯、 γ -萜品烯、萜品油烯和戊烯。特别优选的类异戊二烯是异戊二烯。

[0167] 本发明还包括进一步合适的生物衍生化合物,其可以用本发明的微生物经由乙酰辅酶A生产,包括可选地进一步通过乙酰乙酰辅酶A和/或琥珀酰辅酶A。示例性的众所周知的生物衍生化合物、其生产途径和酶、筛选方法和分离方法可见于以下专利和出版物:琥珀酸(美国公开号2007/0111294、WO 2007/030830、WO 2013/003432)、3-羟基丙酸(3-羟基丙酸)(美国公开号2008/0199926、WO 2008/091627、美国公开号2010/0021978)、1,4-丁二醇(美国专利8067214、WO 2008/115840、美国专利7947483、WO 2009/023493、美国专利7858350、WO 2010/030711、美国公开号2011/0003355、WO 2010/141780、美国专利8129169、WO 2010/141920、美国公开号2011/0201068、WO 2011/031897、美国专利8377666、WO 2011/047101、美国公开号2011/0217742、WO 2011/066076,美国公开号2013/0034884、WO 2012/177943)、4-羟基丁酸(4-羟基丁酸乙酯、4-羟基丁酸)(美国专利第8067214号、WO2008/115840号、美国专利号US2008/专利7947483、WO 2009/023493、美国专利7858350、WO 2010/030711、美国公开号2011/0003355、WO 2010/141780、美国专利8129155、WO 2010/071697)、 γ -丁内酯(美国专利8067214、WO 2008/115840、美国专利7947483、WO 2009/023493、美国专利7858350、WO 2010/030711、美国公开号2011/0003355、WO 2010/141780、美国公开号2011/0217742、WO 2011/066076)、4-羟基丁酰基辅酶A(美国公开号2011/0003355、WO

2010/141780、美国公开号2013/0034884、WO 2012/177943)、4-羟基丁醛(美国公开号2011/0003355、WO 2010/141780、美国公开号2013/0034884、WO 2012/177943)、腐胺(美国公开号2011/0003355、WO 2010/141780、美国公开号2013/0034884、WO 2012/177943)、烯烃(例如丙烯酸和丙烯酸)(美国专利8026386、WO 2009/045637)、乙酰辅酶A(美国专利8323950、WO 2009/094485)、四氢叶酸甲酯(美国专利8323950、WO 2009/094485)、乙醇(美国专利8129155、WO 2010/071697)、异丙醇(美国专利8129155、WO 2010/071697、美国公开号2010/0323418、WO 2010/127303、美国公开号2011/0201068、WO 2011/031897)、正丁醇(美国专利8129155、WO 2010/071697)、异丁醇(US pa帐篷8129155、WO 2010/071697)、正丙醇(美国公开号2011/0201068、WO 2011/031897)、甲基丙烯酸(甲基丙烯酸)(美国公开号2011/0201068、WO 2011/031897)、伯醇(美国专利7977084、WO 2009/111672、WO 2012/177726)、长链醇(美国专利7977084、WO 2009/111672、WO 2012/177726)、己二酸(己二酸)(美国专利8062871、WO 2009/151728、美国专利8377680、WO 2010/129936、WO 2012/177721)、6-氨基己酸(6-氨基己酸)(美国专利8062871、WO 2009/151728、美国专利8377680、WO 2010/129936、WO 2012/177721)、己内酰胺(美国专利8062871、WO 2009/151728、美国专利8377680、WO 2010/129936、WO 2012/177721)、己二胺(美国专利8377680、WO 2010/129936、WO 2012/177721)、乙酰丙酸(美国专利8377680、WO 2010/129936)、2-羟基异丁酸(2-羟基异丁酸)(美国专利8241877、WO 2009/135074、美国公开号2013/0065279、WO 2012/135789)、3-羟基异丁酸(3-羟基异丁酸)(美国专利8241877、WO 2009/135074、美国公开号2013/0065279、WO 2012/135789)、甲基丙烯酸(甲基丙烯酸)(美国专利8241877、WO 2009/135074、美国公开号2013/0065279、WO 2012/135789)、富马酸(富马酸)(美国专利8129154、WO 2009/155382)、苹果酸(苹果酸)(美国专利8129154、WO 2009/155382)、丙烯酸(羧酸)(美国专利8129154、WO 2009/155382)、甲基乙基酮(美国公开号2010/0184173、WO 2010/057022、美国专利8420375、WO 2010/144746)、2-丁醇(美国公开号2010/0184173、WO 2010/057022、美国专利8420375、WO 2010/144746)、1,3-丁二醇(美国公开号2010/0330635、WO 2010/127319、美国公开号2011/0201068、WO 2011/031897、美国专利8268607、WO 2011/071682、美国公开号2013/0109064、WO 2013/028519、美国公开号2013/0066035、WO 2013/036764)、环己酮(美国公开号2011/0014668、WO 2010/132845)、对苯二甲酸(对苯二甲酸)(美国公开号2011/0124911、WO 2011/017560、美国公开号2011/0207185、WO 2011/094131、美国公开号2012/002147 8、WO 2012/018624)、粘康酸(粘康酸)(美国公开号2011/0124911、WO 2011/017560)、苯胺(美国公开号2011/0097767、WO 2011/050326)、对甲苯甲酸(对甲苯甲酸)(美国公开号2011/0207185、WO 2011/094131、美国公开号2012/0021478、WO 2012/018624)、(2-羟基-3-甲基-4-氧代丁氧基)膦酸(美国公开号2011/0207185、WO 2011/094131、美国公开号2012/0021478、WO 2012/018624)、乙烯乙二醇(US公开号2011/0312049、WO 2011/130378、WO 2012/177983)、丙烯(美国公开号2011/0269204、WO 2011/137198、美国公开号2012/0329119、美国公开号2013/0109064、WO 2013/028519)、丁二烯(1,3-丁二烯)(美国公开号2011/0300597、WO 2011/140171、美国公开号2012/0021478、WO 2012/018624、US公开号2012/0225466、WO 2012/106516、美国公开号2013/0011891、WO 2012/177710、美国公开号2013/0109064、WO 2013/028519)、甲苯(美国公开号2012/0021478、WO 2012/018624)、苯(美国公开号2012/0021478、WO 2012/018624)、(2-羟基-4-

氧代丁氧基)膦酸(美国公开号2012/0021478、WO 2012/018624)、苯甲酸(苯甲酸)(美国公开号2012/0021478、WO 2012/018624)、苯乙烯(美国公开号2012/0021478、WO 2012/018624)、2,4-戊二烯酸(美国公开号2012/0021478、WO 2012/018624、美国公开号2013/0109064、WO 2013/028519)、3-丁烯-1-醇(美国公开号2012/0021478、WO 2012/018624、美国公开号2013/0109064、WO 2013/028519)、3-丁烯-2-醇(美国公开号2013/0109064、WO 2013/028519)、1,4-环己烷二甲醇(美国公开号2012/0156740、WO 2012/082978)、巴豆醇(美国公开号2013/0011891、WO 2012/177710、美国公开号2013/0109064、WO 2013/028519)、烯烃(美国公开号2013/0122563、WO 2013/040383、US 2011/0196180)、羟基酸(WO 2012/109176)、酮酸(WO 2012/109176)、蜡酯(WO 2007/136762)或己内酯(美国公开号2013/0144029、WO 2013/067432)途径。上文列出的披露生物衍生化合物途径的专利和专利申请公开通过引用并入本申请。

[0168] 乙酰辅酶A是合成生物衍生化合物的直接前体,如图5-10所示。磷酸酶途径能够合成乙酰辅酶A而不需要丙酮酸脱羧(Bogorad et al,Nature,2013,2013年9月29日网上发表;美国公开号2006-0040365),其从碳水化合物和甲醇提供的本发明的生物衍生化合物的产量高于无磷酸转酮酶时可获得的产量。

[0169] 例如,使用甲醇脱氢酶(图1的步骤A)、甲醛同化途径(图1的步骤B、C、D)、戊糖磷酸途径和糖酵解从甲醇合成示例性脂肪醇,即十二烷醇,可提供的最大理论产量为0.0556摩尔十二烷醇/摩尔甲醇。

[0170] $18\text{CH}_4\text{O} + 9\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O} + 23\text{H}_2\text{O} + 6\text{CO}_2$

[0171] 但是,如果这些途径与包含磷酸酶的乙酰辅酶A途径组合(例如图1的步骤T、U、V、W、X),则可以获得0.0833摩尔十二烷醇/摩尔甲醇的最大理论产率(途径计算不去除任何用于细胞生长和维护要求的ATP)。

[0172] $12\text{CH}_4\text{O} \rightarrow \text{C}_{12}\text{H}_{26}\text{O} + 11\text{H}_2\text{O}$

[0173] 通过使用酶、糖酵解、TCA循环、戊糖磷酸途径和氧化磷酸化的几种组合,可以通过将甲醇氧化成二氧化碳,以降低最大理论产物产率的代价,合成ATP用于能量需求。

[0174] 类似地,使用甲醇脱氢酶(图1的步骤A)、甲醛同化途径(例如,图1的步骤B、C、D)、戊糖磷酸途径和糖酵解从甲醇合成异丙醇,可以提供的最大理论产率为0.1667摩尔异丙醇/摩尔甲醇。

[0175] $6\text{CH}_4\text{O} + 4.5\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_3\text{H}_8\text{O} + 8\text{H}_2\text{O} + 3\text{CO}_2$

[0176] 但是,如果这些途径与包含磷酸酶的乙酰辅酶A途径(例如图1的步骤T、U、V、W、X)组合使用,则可以获得的最大理论产率为0.250摩尔异丙醇/摩尔甲醇。

[0177] $4\text{CH}_4\text{O} + 1.5\text{O}_2 \rightarrow \text{C}_3\text{H}_8\text{O} + 4\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$

[0178] 总体途径是ATP和氧化还原阳性,能够从MeOH转化为异丙醇合成ATP和NAD(P)H。可以通过使用酶、糖酵解、TCA循环、戊糖磷酸途径和氧化磷酸化的几种组合,将甲醇氧化成二氧化碳,以降低最大理论产物产率为代价来合成额外的ATP。

[0179] 使用如本申请所述的一种或多种甲醇代谢酶,例如如图1和图2所示,在大多数生产宿主中,甲醇可以通过使用甲醇脱氢酶(图1,步骤A)以及甲醛同化途径而进入中枢代谢。如图1所示,是利用由甲醇氧化产生的甲醛的甲醛同化途径的一个示例,其包括通过己糖-6-磷酸合成酶令甲醛和D-核酮糖-5-磷酸缩合形成己糖-6-磷酸(H6P)(图1,步骤B)。可以使

用Mg²⁺或Mn²⁺达到最大的活性,但也可以使用其他金属离子,甚至可以考虑非金属离子依赖性机制。通过6-磷酸-3-己糖异构酶将H6P转化为果糖-6-磷酸(图1,步骤C)。另一个示例性途径涉及通过二羟基丙酮进行由甲醇氧化生产的甲醛的解毒和同化。二羟基丙酮合成酶(图1,步骤D)是转酮醇酶,其首先将木糖醛酸5-甲酯转运到甲醛中,导致二羟基丙酮(DHA)和甘油醛-3-磷酸(G3P)的形成,其为糖酵解中间体。然后可以通过DHA激酶将从DHA合成酶获得的DHA进一步磷酸化形成DHA磷酸。DHAP可以被同化入糖酵解,例如通过异构化为G3P,以及其他几种途径。可选地,DHA和G3P可由果糖-6-磷酸醛缩酶转化成果糖-6-磷酸(F6P)(图1,步骤Z)。

[0180] 使用甲醇脱氢酶(图1的步骤A)、甲醛同化途径(例如,图1的步骤B、C、D)、戊糖磷酸途径和糖酵解,从甲醇合成几种其它产物,可提供以下最大理论产率化学计量:

[0181]

产物	CH4O	O2	NH3		产物	H2O	CO2
1,3-丁二醇	6.000	3.500	0.000	-->	1.000	7.000	2.000
巴豆醇	6.000	3.500	0.000	-->	1.000	8.000	2.000
3-丁烯基-2-醇	6.000	3.500	0.000	-->	1.000	8.000	2.000
丁二烯	6.000	3.500	0.000	-->	1.000	9.000	2.000
2-羟基异丁酸	6.000	4.500	0.000	-->	1.000	8.000	2.000
甲基丙烯酸(经由2-羟基异丁酸)	6.000	4.500	0.000	-->	1.000	9.000	2.000
3-羟基异丁酸(氧化TCA循环)	6.000	4.500	0.000	-->	1.000	8.000	2.000
甲基丙烯酸(经由3-羟基异丁酸)	6.000	4.500	0.000	-->	1.000	9.000	2.000
1,4-丁二醇(氧化TCA循环)	6.000	3.500	0.000	-->	1.000	9.000	2.000
己二酸(氧化TCA循环)	9.000	7.000	0.000	-->	1.000	13.000	3.000
6-氨基己酸(氧化TCA循环)	9.000	6.000	1.000	-->	1.000	13.000	3.000
己内酰胺(经由6-氨基己酸)	9.000	6.000	1.000	-->	1.000	14.000	3.000
六亚甲基二胺(氧化TCA循环)	9.000	5.000	2.000	-->	1.000	13.000	3.000

[0182] 在标记为“氧化TCA循环”的产物中,最大产率化学计量假设还原性TCA循环酶(例如苹果酸脱氢酶、富马酸酶、富马酸还原酶和琥珀酰辅酶A连接酶)不用于产物形成。氧化TCA循环专门用于产物形成,对于琥珀酰辅酶A衍生产物如3-羟基异丁酸、1,4-丁二醇、己二酸、6-氨基己酸和己二胺是有利的,因为它能使所有的产物途径通量来自α-酮戊二酸脱氢酶,一种体内不可逆的酶。通过氧化型TCA分支生产琥珀酰辅酶A,使用乙酰辅酶A和草酰乙酸作为前体。

[0183] 但是,如果这些途径与包含磷酸酶的乙酰辅酶A途径组合应用(例如图1的步骤T、U、V、W、X),则可以获得如下所示的增加的甲醇最大理论产率:

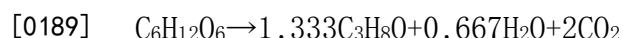
产物	CH4O	O2	NH3		产物	H2O	CO2	
1,3-丁二醇	4.000	0.500	0.000	-->	1.000	3.000	0.000	
巴豆醇	4.000	0.500	0.000	-->	1.000	4.000	0.000	
3-丁烯基-2-醇	4.000	0.500	0.000	-->	1.000	4.000	0.000	
丁二烯	4.000	0.500	0.000	-->	1.000	5.000	0.000	
2-羟基异丁酸	4.000	1.500	0.000	-->	1.000	4.000	0.000	
甲基丙烯酸(经由2-羟基异丁酸)	4.000	1.500	0.000	-->	1.000	5.000	0.000	
[0184]	3-羟基异丁酸 (氧化TCA循环)	5.000	3.000	0.000	-->	1.000	6.000	1.000
	甲基丙烯酸 (经由3-羟基异丁酸)	5.000	3.000	0.000	-->	1.000	7.000	1.000
	1,4-丁二醇 (氧化TCA循环)	5.000	2.000	0.000	-->	1.000	5.000	1.000
	己二酸 (氧化TCA循环)	7.000	4.000	0.000	-->	1.000	9.000	1.000
	6-氨基己酸 (氧化TCA循环)	7.000	3.000	1.000	-->	1.000	9.000	1.000
	己内酰胺 (经由6-氨基己酸)	7.000	3.000	1.000	-->	1.000	10.000	1.000
	六亚甲基二胺 (氧化TCA循环)	7.000	2.000	2.000	-->	1.000	9.000	1.000

[0185] 来自碳水化合物(包括但不限于葡萄糖、甘油、蔗糖、果糖、木糖、阿拉伯糖和半乳糖)的本发明的生物衍生化合物的理论产率也可以通过磷酸转酮酶增强。这是因为磷酸转酮酶提供具有100%碳转化效率的乙酰辅酶A合成(例如,每葡萄糖3个乙酰辅酶A,每木糖2.5个乙酰辅酶A,每甘油1.5个乙酰辅酶A)。

[0186] 例如,在没有磷酸转酮酶的情形中,从葡萄糖合成异丙醇可以达到的最大理论异丙醇产量为1.000摩尔异丙醇/摩尔葡萄糖。



[0188] 但是,如果图1的酶步骤T、U、V、W、X与糖酵解和戊糖磷酸途径结合使用,则最大理论产率可以提高到1.333摩尔异丙醇/摩尔葡萄糖。



[0190] 在不存在磷酸转酮酶活性的情形中,使用糖酵解、戊糖磷酸途径和TCA循环反应来构建途径前体,从碳水化合物源(例如葡萄糖)合成几种其它产物,可提供以下最大理论产率化学计量。

[0191]

产物	C6H12O6	O2	NH3		产物	H2O	CO2
1,3-丁二醇	1.000	0.500	0.000	→	1.000	1.000	2.000
巴豆醇	1.000	0.500	0.000	→	1.000	2.000	2.000
3-丁烯基-2-醇	1.000	0.500	0.000	→	1.000	2.000	2.000
丁二烯	1.000	0.500	0.000	→	1.000	3.000	2.000
2-羟基异丁酸	1.000	1.500	0.000	→	1.000	2.000	2.000
甲基丙烯酸(经由2-羟基异丁酸)	1.000	1.500	0.000	→	1.000	3.000	2.000
3-羟基异丁酸 (氧化TCA循环)	1.000	1.500	0.000	→	1.000	2.000	2.000
甲基丙烯酸 (经由3-羟基异丁酸)	1.000	1.500	0.000	→	1.000	3.000	2.000
1,4-丁二醇 (氧化TCA循环)	1.000	0.500	0.000	→	1.000	1.000	2.000
己二酸 (氧化TCA循环)	1.000	1.667	0.000	→	0.667	2.667	2.000
6-氨基己酸 (氧化TCA循环)	1.000	1.000	0.667	→	0.667	2.667	2.000
己内酰胺 (经由6-氨基己酸)	1.000	1.000	0.667	→	0.667	3.333	2.000
六亚甲基二胺 (氧化TCA循环)	1.000	0.333	1.333	→	0.667	2.667	2.000

[0192] 在标记为“氧化TCA循环”的产品中,最大产率化学计量假设TCA循环酶(例如苹果酸脱氢酶、富马酸酶、富马酸还原酶和琥珀酰辅酶A连接酶)不用于还原方向上的产物形成。氧化TCA循环专门用于产物形成,对于琥珀酰辅酶A衍生物如3-羟基异丁酸、1,4-丁二醇、己二酸、6-氨基己酸和己二胺是有利的,因为它能使所有的产物途径通量来自 α -酮戊二酸脱氢酶,一种体内不可逆的酶。

[0193] 值得注意的是,当这些产物途径与包含磷酸酶的乙酰辅酶A途径(例如图1的步骤T、U、V、W、X)组合施用时,可以获得如下所示的增加的最大理论产率:

[0194]

产物	C6H12O6	O2	NH3		产物	H2O	CO2
1,3-丁二醇	1.000	0.000	0.000	→	1.091	0.545	1.636
巴豆醇	1.000	0.000	0.000	→	1.091	1.636	1.636
3-丁烯基-2-醇	1.000	0.000	0.000	→	1.091	1.636	1.636
丁二烯	1.000	0.107	0.000	→	1.071	2.786	1.714
2-羟基异丁酸	1.000	0.014	0.000	→	1.330	0.679	0.679
甲基丙烯酸(经由2-羟基异丁酸)	1.000	0.014	0.000	→	1.330	2.009	0.679
3-羟基异丁酸 (氧化TCA循环)	1.000	0.600	0.000	→	1.200	1.200	1.200
甲基丙烯酸 (经由3-羟基异丁酸)	1.000	0.600	0.000	→	1.200	2.400	1.200
1,4-丁二醇 (氧化TCA循环)	1.000	0.124	0.000	→	1.068	0.658	1.727
己二酸 (氧化TCA循环)	1.000	0.429	0.000	→	0.857	1.714	0.857
6-氨基己酸 (氧化TCA循环)	1.000	0.000	0.800	→	0.800	2.000	1.200
己内酰胺 (经由6-氨基己酸)	1.000	0.000	0.800	→	0.800	2.800	1.200
六亚甲基二胺 (氧化TCA循环)	1.000	0.064	1.397	→	0.698	2.508	1.810
丁二烯 (经由2,4-戊二烯酸)	1	0.000	0.000	→	1.091	2.727	1.636

[0195] 与葡萄糖一样,对其它碳水化合物如甘油、蔗糖、果糖、木糖、阿拉伯糖和半乳糖上使用磷酸转酮酶也可以发生相似的产量增加。

[0196] 本申请所确定的途径,特别是以本申请提出的具体组合为例的途径,部分根据申请人基于属性的途径排序而优于其他途径。其他优点和优势方面包括以下一种或多种:最大理论化合物产量、最大碳通量、更好的ATP生产效率和还原当量可利用性、减少曝气需求、CO₂生成量最小化、途径长度、非天然步骤数、热力学可行性、对途径底物或结构类似底物的活性酶数、使用目前已表征的酶的步骤,以及此外,后者途径更为优选,因为其还至少具有最少量的非天然步骤,对途径底物或结构相似底物上已知的酶最多,以及从中央新陈代谢的步骤总数最少。

[0197] 在一些实施例中,本发明还提供了用于生产本申请所述的生物衍生化合物的方法。所述方法可以包括:在生产生物衍生化合物所需的条件和足够的时间内,培养本申请所述的非天然存在微生物。在另一个实施例中,该方法还包括将生物衍生化合物与培养物中的其它成分分离。在这方面,分离可以包括提取、连续液-液萃取、渗透蒸发、膜过滤、膜分离、反渗透、电渗析、蒸馏、结晶、离心、萃取过滤、离子交换层析、吸收色谱或超滤。

[0198] 在一些实施例中,取决于生物衍生化合物,本发明的方法还可包括将生物衍生化合物化学转化为定向最终化合物。例如,在一些实施例中,所述生物衍生化合物是丁二烯,本发明的方法还可以包括化学脱水1,3-丁二醇、巴豆醇或3-丁烯-2-醇以制备丁二烯。

[0199] 用于测试乙酰辅酶A、草酰乙酸或生物衍生化合物生产的合适纯化和/或测定法,可以使用公知的方法进行。对于待测试的每个工程化菌株,可以培养合适的重复试样,例如

三联试样培养物。例如,可以监测工程生产宿主中的产品和副产物形成。最终产物和中间体以及其它有机化合物,可通过HPLC(高效液相色谱)、GC-MS(气相色谱-质谱)和LC-MS(液相色谱-质谱)或其它使用本领域熟知常规程序的合适分析方法来进行。产物在发酵液中的释放,也可以用培养物上清液进行测试。副产物和残留的葡萄糖,可以通过使用例如葡萄糖和醇的折射率检测器,和有机酸的UV检测器(Lin et al., Biotechnol. Bioeng. 90:775-779 (2005)),或本领域公知的其它合适的测定和检测方法,通过HPLC进行定量。来自外源DNA序列的单个酶或蛋白质活性,也可以使用本领域熟知的方法进行测定。

[0200] 生物衍生化合物可以使用本领域众所周知的各种方法,与培养物中的其它组分分离。这种分离方法包括例如提取方法以及包括连续液-液萃取、渗透蒸发、膜过滤、膜分离、反渗透、电渗析、蒸馏、结晶、萃取过滤、离子交换层析、尺寸排阻色谱、吸附色谱和超滤。所有上述方法都是本领域熟知的。

[0201] 本申请所述的任何非天然存在微生物,均可以被培养以生产和/或分泌本发明的生物合成产物。例如,可以培养生物衍生化合物生产者,以进行本申请公开的生物衍生化合物的生物合成生产。因此,在一些实施例中,本发明提供具有本申请所述的生物衍生化合物或生物衍生化合物途径中间体的培养基。在一些方面,该培养基也可以与本发明的生产生物衍生化合物或生物衍生化合物途径中间体的非天然存在微生物分离。从培养基中分离微生物的方法是本领域熟知的。示例性的方法包括过滤、絮凝、沉淀、离心、沉降等。

[0202] 为了生产乙酰辅酶A、草酰乙酸或生物衍生化合物,将重组菌株在含有碳源和其他必需营养物的培养基中培养。有时需要并且非常希望在发酵罐中维持无氧条件,以降低整个过程的成本。这样的条件可以通过例如首先用氮气吹扫培养基,然后用塞子和卷边盖密封烧瓶来获得。对于无氧生长未观察到的菌株,可以通过用有限通气的小孔穿孔塞来施加微量无氧或基本上无氧的条件。先前已经描述了示例性的无氧条件,并且是本领域公知的。示例性的有氧和无氧条件描述于例如2007年8月10日提交的美国专利公开2009/0047719中。发酵可以按批次、补料分批或连续方式进行,如本申请所公开的。如果需要,发酵也可以分两个阶段进行。第一阶段可以是有氧的以允许高生长以及由此而得到高生产率,随后是乙酰辅酶A、草酰乙酸或生物衍生化合物高产率的无氧阶段。

[0203] 如果需要,可以根据需要通过加入碱如NaOH或其它碱或酸,来将培养基的pH保持在所需的pH,特别是中性pH,例如约7的pH值,以维持培养物培养基中所需的pH值。可以通过使用分光光度计(600nm)测量光密度来确定生长速率,并且通过监测随时间的碳源消耗来测定葡萄糖摄取率。

[0204] 所述生长培养基可以包括,例如,可向本发明的非天然存在微生物提供碳源的任何碳水化合物源。这些来源包括例如糖如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、果糖、蔗糖和淀粉;或甘油可单独作为唯一碳源或与本申请所述或本领域已知的其它碳源组合。在一个实施例中,所述碳源是糖。在一个实施例中,碳源是含糖生物质。在一些实施例中,所述糖是葡萄糖。在一个实施例中,所述糖是木糖。在另一个实施例中,糖所述是阿拉伯糖。在一个实施例中,所述糖是半乳糖。在另一个实施例中,所述糖是果糖。在其它实施例中,所述糖是蔗糖。在一个实施例中,所述糖是淀粉。在某些实施例中,所述碳源是甘油。在一些实施例中,所述碳源是粗甘油。在一个实施例中,所述碳源是未处理的粗甘油。在其它实施例中,所述碳源是甘油和葡萄糖。在另一个实施例中,所述碳源是甲醇和甘油。在一个实施例中,所

述碳源是二氧化碳。在一个实施例中，所述碳源是甲酸。在一个实施例中，所述碳源是甲烷。在一个实施例中，所述碳源是甲醇。在某些实施例中，单独使用甲醇作为唯一碳源，或与本申请所述或本领域已知的其它碳源组合。在一个具体实施例中，甲醇是唯一(唯一)碳源。在一个实施例中，碳源是化学电生成的碳(参见例如Liao et al. (2012) Science 335:1596)。在一个实施例中，所述化学电生成的碳是甲醇。在一个实施例中，所述化学电生成的碳是甲酸。在一个实施例中，所述化学电生成的碳是甲酸和甲醇。在一个实施例中，所述碳源是碳水化合物和甲醇。在一个实施例中，碳源是糖和甲醇。在另一个实施例中，碳源是糖和甘油。在其它实施例中，碳源是糖和粗甘油。在其它实施例中，碳源是糖和不经处理的粗甘油。在一个实施例中，碳源是含糖生物质和甲醇。在另一个实施例中，碳源是含糖生物质和甘油。在其它实施例中，碳源是含糖生物质和粗甘油。在其它实施例中，碳源是含糖生物质和不经处理的粗甘油。在一些实施例中，碳源是含糖生物质、甲醇和碳水化合物。碳水化合物的其他来源包括例如可再生原料和生物质。在本申请提供的方法中可用作原料的生物质的示例性类型，包括纤维素生物质、半纤维素生物质和木质素原料或该原料的一部分。这样的生物质原料含有例如可用作碳源的碳水化合物底物，例如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、果糖和淀粉。鉴于本申请提供的教导和指导，本领域技术人员将理解，除上述范例之外的可再生原料和生物质，也可用于培养本申请提供的用于生产琥珀酸和其它途径中间体的微生物。

[0205] 在一个实施例中，碳源是甘油。在某些实施例中，甘油碳源是粗甘油或无需进一步处理的粗甘油。在另一个实施例中，碳源包括甘油或粗甘油，以及糖或含糖生物质，例如葡萄糖。在一个具体实施例中，通过加入粗甘油或粗甘油和糖(例如葡萄糖)的混合物，来维持发酵液中甘油的浓度。在某些实施例中，提供糖以维持充分的菌株生长。在一些实施例中，糖(例如葡萄糖)以200:1至1:200的甘油与糖的摩尔浓度比提供。

[0206] 在一个实施例中，碳源是甲醇或甲酸。在某些实施例中，甲醇用作本申请提供的甲醛固定路径中的碳源。在一个实施例中，碳源是甲醇或甲酸。在其它实施例中，甲酸用作本申请提供的甲醛固定路径中的碳源。在具体实施例中，甲醇用作本申请提供的甲醇氧化途径中的碳源，其单独存在或与本申请提供的脂肪醇、脂肪醛、脂肪酸或异丙醇途径组合。在一个实施例中，碳源是甲醇。在另一个实施例中，碳源是甲酸。

[0207] 在一个实施例中，碳源包括甲醇和糖(例如葡萄糖)或含糖生物质。在另一个实施例中，碳源包括甲酸和糖(例如葡萄糖)或含糖生物质。在一个实施例中，碳源包括甲醇、甲酸和糖(例如葡萄糖)或含糖生物质。在具体实施例中，发酵饲料中的甲醇或甲酸或两者均与糖(例如葡萄糖)或含糖生物质形成混合物提供。在某些实施例中，提供糖以维持充分菌株生长。

[0208] 在某些实施例中，碳源包括甲酸和糖(例如葡萄糖)。在一些实施例中，糖(例如葡萄糖)以甲酸与糖的摩尔浓度比为200:1至1:200提供。因此，鉴于本申请提供的教导和指导，本领域技术人员将理解，当在诸如碳水化合物的碳源上生长时，可以生产分泌本发明的生物合成化合物的非天然存在微生物。这些化合物包括，例如，乙酰辅酶A或生物衍生化合物，以及乙酰辅酶A或生物衍生化合物途径中的任何中间体代谢物。仅需要改造一种或多种所需酶或蛋白质活性来实现所需化合物或中间体的生物合成，包括，例如，包括部分或全部乙酰辅酶A或生物衍生化合物生物合成途径。因此，本发明提供了一种非天然存在微生物，

其在碳水化合物或其它碳源上生长时生产和/或分泌乙酰辅酶A或生物衍生化合物，并且在碳水化合物或其它碳源上生长时生产和/或分泌所述乙酰辅酶A或生物衍生化合物途径中所示的任何中间代谢物。本发明的生产乙酰辅酶A或生物衍生化合物的微生物，可以从中间体启动合成，例如F6P、E4P、甲酸、甲酰辅酶A、G3P、PYR、DHA、H6P、3HBCOA、3HB、3-羟基丁酰磷酸、4-羟基丁酸、4-羟基丁酰辅酶A、己二酰辅酶A、己二酸半醛、3-羟基异丁酸或2-羟基异丁酰辅酶A。

[0209] 本发明的非天然存在微生物使用本领域众所周知的方法构建，从而对至少一种编码乙酰辅酶A或生物衍生化合物途径的酶或蛋白质的核酸进行外源表达，表达量足以生产乙酰基辅酶A或生物衍生化合物。应当理解，本发明的微生物在足以生产乙酰辅酶A或生物衍生化合物的条件下培养。根据本申请提供的教导和指导，本发明的非天然存在微生物可以实现生物衍生化合物的生物合成，使得细胞内浓度在约0.1-200mM之间或更高。通常，生物衍生化合物的细胞内浓度在约3-150mM之间，特别是在约5-125mM之间，特别是约8-100mM之间，包括约10mM、20mM、50mM、80mM或更多。每一个所述示例性范围中之间和之上的细胞内浓度也可以在本发明的非天然存在微生物中实现。

[0210] 在一些实施例中，培养条件包括无氧或基本上无氧生长或维持条件。示例性的无氧条件先前已经描述，并且是本领域公知的。发酵方法的示例性无氧条件在本申请中描述并且描述于例如2007年8月10日提交的美国公开号第2009/0047719中。这些条件中的任何一种，以及其他本领域众所周知的无氧条件，均可以用于所述非天然存在微生物。在这种无氧或基本上无氧条件下，赛事乙酰辅酶A或生物衍生化合物生产者可以以5-10mM或更高的细胞内浓度，以及本申请例示的所有其它浓度，合成生物衍生化合物。应当理解，即使上述描述涉及细胞内浓度，生产乙酰辅酶A或生物衍生化合物的微生物，可以在细胞内生产生物衍生化合物和/或将产物分泌到培养基中。

[0211] 示例性发酵方法包括但不限于：补料分批发酵和分批分离；补料分批发酵和连续分离；和连续发酵和连续分离。在示例性的分批发酵方案中，生产者生物在适当尺寸的以合适气体充气的生物反应器中生长。在无氧条件下，用惰性气体或气体组合（例如氮气、N₂/CO₂混合物、氩气、氦气等）向培养物充气。随着细胞生长和利用碳源，额外的碳源和/或其他营养素以大致平衡碳源和/或营养物的消耗的速率，进料到生物反应器中。所述生物反应器的温度保持在所需温度，通常在22-37°C的范围内，但是所述温度可以维持在更高或更低的温度，这取决于生物的生长特性和/或所需条件发酵过程。生长持续需要的时间，以达到发酵罐中培养物的期望特征，例如细胞密度、产品浓度等。在分批发酵过程中，发酵的时间通常为数小时至数天，例如8至24小时，或1、2、3、4或5天或至多一周，取决于所需的培养条件。根据需要可以控制或不控制pH，在这种情形中，pH不受控制的培养物，通常在运行结束时降至pH 3-6。在培养期间完成后，发酵罐内容物可以通过细胞分离单元，例如离心机、过滤单元等，除去细胞和细胞碎片。在所需产物在细胞内表达的情形中，根据需要，在从发酵液分离细胞之前或之后，细胞可以被酶促或化学裂解或破裂，以便释放其它产物。所述发酵液可以转移到产品分离单元中。通过本领域中采用的标准分离方法分离产物，从而将所需产物与稀释的水溶液分离。这些方法包括但不限于，使用与水不混溶的有机溶剂（例如，甲苯或其它合适的溶剂，包括但不限于二乙醚、乙酸乙酯、四氢呋喃（THF）、二氯甲烷、氯仿、苯、戊烷、己烷、庚烷、石油醚、甲基叔丁基醚（MTBE）、二恶烷、二甲基甲酰胺（DMF）、二甲基亚砜

(DMSO) 等) 进行液液分离, 以提供产物的有机溶液, (如果合适的话) 标准蒸馏方法等, 这取决于发酵过程的产物的化学特性。

[0212] 在示例性的完全连续发酵方案中, 生产者生物通常首先以分批模式生长, 以获得所需的细胞密度。当碳源和/或其他营养物质耗尽时, 以期望的速率连续供应相同组成的饲料培养基, 并以相同的速率抽出发酵液。在这种条件下, 生物反应器中的产物浓度以及细胞密度通常保持恒定。如上所述, 发酵罐的温度保持在所需温度。在连续发酵期间, 通常需要保持适当的 pH 范围以优化生产。可以使用常规方法监测和维持 pH, 包括加入合适的酸或碱以保持所需的 pH 范围。生物反应器在适当和期望的情形中连续运行一段时间, 通常至少一周至几周、一个月或更长时间。周期性地监测发酵液和/或培养物, 包括根据需要每天进行采样, 以确保产品浓度和/或细胞密度的一致性。在连续模式下, 随着新的饲料培养基的供应, 发酵罐内容物被不断取出。包含细胞、培养基和产物的出口通常经过连续产品分离程序, 根据需要去除或不去除细胞和细胞碎片。可以使用本领域中使用的连续分离方法将产物与稀水溶液分离, 包括但不限于: 使用与水不混溶的有机溶剂(例如, 甲苯或其它合适的溶剂, 包括但不限于二乙基乙醚、乙酸乙酯、四氢呋喃(THF)、二氯甲烷、氯仿、苯、戊烷、己烷、庚烷、石油醚、甲基叔丁基醚(MTBE)、二恶烷、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲基亚砜(DMSO)等), 标准连续蒸馏法等, 或本领域熟知的其它方法。

[0213] 除了本申请公开的培养和发酵条件之外, 用于实现乙酰辅酶A或生物衍生化合物生物合成的生长条件, 可以包括在培养条件下加入渗透保护剂。在某些实施例中, 如本申请所述, 在渗透保护剂存在下, 本发明的非天然存在微生物可维持、培养或发酵。简而言之, 渗透保护剂是指用作渗透液, 并且帮助如本申请所述的微生物经受渗透胁迫的化合物。渗透保护剂包括但不限于甜菜碱、氨基酸和糖海藻糖。其非限制性示例是甘氨酸甜菜碱、脯氨酸甜菜碱、二甲基苯乙基、二甲基硫代丙酸、3-二甲基磺酰基-2-甲基丙酸、哌可酸、二甲基磺酰基乙酸、胆碱、L-肉毒碱和脯氨酸。在一个方面中, 渗透保护剂是甘氨酸甜菜碱。本领域普通技术人员应理解, 适用于保护本申请所述微生物不受渗透胁迫影响的渗透保护剂的量和类型, 将取决于所使用的微生物。所述培养条件下的渗透保护剂的量, 可以是例如不超过约0.1mM、不超过约0.5mM、不超过约1.0mM、不超过约1.5mM、不超过约2.0mM、不大于约2.5mM、不大于约3.0mM、不超过约5.0mM、不超过约7.0mM、不超过约10mM、不超过约50mM、不超过约100mM或不超过约500mM。

[0214] 在一些实施例中, 可以选择碳原料和其它细胞摄取源, 例如磷酸、氨、硫酸、氯化物和其它卤素, 来改变存在于乙酰辅酶A或生物衍生化合物、或任何乙酰辅酶A或生物化学化合物途径中间体的原子同位素分布。上文列举的各种碳原料和其他摄取源, 在本申请中将统称为“摄取源”。摄取源可以为存在于乙酰辅酶A、生物衍生化合物或途径中间体中的任何原子, 或为乙酰辅酶A或生物活性化合物途径之外的反应的副产物, 提供同位素富集。可以对任何目标原子(包括例如碳、氢、氧、氮、硫、磷、氯或其它卤素) 实现同位素富集。

[0215] 本发明进一步提供包含本申请所述的生物衍生化合物和除该生物衍生化合物以外的化合物的组合物。该生物衍生产物以外的化合物可以是, 本发明的天然存在的微生物的细胞部分, 例如微量的细胞部分, 或可以是在其存在下生产的发酵肉汤或培养基, 或其纯化或部分纯化的级分。如本申请所公开的, 当由具有降低的副产物形成的微生物生产时, 该组合物可以包含例如降低的副产物水平。该组合物可以包含例如生物衍生化合物, 或本发

明的微生物的细胞裂解物或培养物上清液。

[0216] 在某些实施例中,本申请提供的是ー种包含本申请提供的生物衍生化合物的组合物,其通过培养本申请所述的非天然存在微生物生产而成。在一些实施例中,该组合物还包含除所述生物衍生化合物以外的化合物。在某些实施例中,所述除生物衍生化合物之外的化合物,是痕量的本申请非天然存在微生物细胞部分。

[0217] 所述培养条件可以包括,例如,液体培养方法以及发酵和其他大范围培养方法。如此所述,本发明中尤为有用的生物合成产物产率,可以在无氧或基本无氧的培养条件下获得。

[0218] 如本申请所述,用于实现乙酰辅酶A或生物衍生化合物的生物合成的一个示例性生长条件,包括无氧培养或发酵条件。在某些实施例中,本发明的非天然存在微生物可以在无氧或基本上无氧条件下持续、培养或发酵。简而言之,无氧条件是指没有氧气的环境。基本上无氧条件包括例如使得培养基中的溶解氧浓度保持在0至10%的饱和度之间的培养、分批发酵或连续发酵。基本上无氧条件还包括:在保持小于1%氧气气氛的密封室内的液体培养基或固体琼脂中生长或静止的细胞。可以通过例如用N₂/CO₂混合物或其它一种或多种合适的非氧气体向培养物充气来维持氧气的百分比。

[0219] 本申请所述的培养条件可以按比例扩大并连续生长,以用于制造乙酰辅酶A或生物衍生化合物。示例性的生长方法包括,例如,补料分批发酵和批量分离;补料分批发酵和连续分离,或连续发酵和连续分离。所有这些方法都是本领域公知的。发酵程序对于生物合成生产商业数量的乙酰辅酶A或生物衍生化合物特别有用。通常,和非连续培养方法一样,乙酰辅酶A或生物衍生化合物的连续和/或近连续生产,包括在足以足够维持和/或近乎维持指数期增长的养分和培养基中,培养本发明的生产乙酰辅酶A或生物衍生化合物的非天然存在生物。所述条件下的连续培养,可以包括例如生长或培养1天、2天、3天、4天、5天、6或7天或更长时间。此外,连续培养可以包括1周、2周、3周、4或5周或更长周和长达几个月的较长时间段。可选地,如果适用于特定应用,则本发明的生物可以培养数小时。应当理解,所述连续和/或近连续的培养条件,还可以包括在这些示例性周期之间的所有时间间隔。还应当理解,培养本发明的微生物的时间是足够长以生产足够量的用于所需目的的产品的时间。

[0220] 发酵程序是本领域公知的。简言之,用于生物合成生产乙酰辅酶A或生物衍生化合物的发酵,可用于例如补料分批发酵和间歇分离;补料分批发酵和连续分离,或连续发酵和连续分离。所述分批和连续发酵程序的示例是本领域公知的。

[0221] 除了使用本发明的乙酰辅酶A或生物衍生化合物生产者以连续生产大量乙酰辅酶A或生物衍生化合物的上述发酵方法之外,所述乙酰辅酶A或生物衍生化合物生产者还可以,例如,同时进行化学合成和/或酶程序以将产物转化为其它化合物,或者所述产物可以与发酵培养物分离,并且根据需要,依次进行化学和/或酶转化,以将产物转化成其它化合物。

[0222] 应当理解,在本申请提供的本发明的概念内,还提供了实质上不影响本发明的各种实施例的活性的修饰。因此,以下实施例旨在举例说明而不是限制本发明。

[0223] 实施例I

[0224] 实施例I:g1k-g1f文库的构建

[0225] 通过从具有删除以除去竞争性副产物的大肠杆菌K12MG1655菌株中去掉ptsI,从

而使糖运输的PTS系统失活。预计该菌株的生长非常差。如上所述,对于具有其他遗传变化的大肠杆菌株,也观察到类似效果。该菌株未在M9琼脂+2%葡萄糖上形成菌落(在37℃下2天后),并且在MM9+2%葡萄糖培养基中显示很少生长/无生长。

[0226] 因此,制备了天然g1k和运动发酵单胞菌g1f(GI no:155589)的表达突变体,并将其插入到PTS-细胞中,且通过选择具有增强的葡萄糖生长速率的那些突变体,以增加葡萄糖消耗。通过将g1f基因插入到g1k基因附近的相异位置而构建突变体文库。伴随g1f基因的是分别调节g1f和g1k基因表达的分化和简并启动子。

[0227] 启动子-g1f盒结构:通过两轮PCR构建启动子-g1f盒(称为“PX2-g1f”)。第一轮PCR使用P115启动子区域的部分简并序列,从PZS*13S-P115-g1f扩增P115启动子-g1f-终止子序列。在第二轮PCR中,使用部分简并ultramer(IDT)构建全长盒。所得到的DNA文库在启动子中具有6个简并位点控制g1k表达,以及在启动子中具有3个简并位点控制g1f表达。

[0228] 将g1f文库插入到ptsI-菌株的染色体中:gblocks设计为,将sacB-kan盒(5'g1k-SBK)或PX2-g1f盒插入到上述ptsI-菌株的染色体中,g1k基因上游恰好20bp处。在蔗糖选择重组体后,测序显示所有9个启动子位点的核苷酸简并性。

[0229] 选择增强的葡萄糖生长:在生产突变体文库后,选择在蔗糖上生长的一部分细胞,以除去不具有PX2-g1f盒的非重组细胞。作为阴性对照,未用PX2-g1f盒处理的细胞平行繁殖。蔗糖选择后,将来自每个群体的细胞的等分试样接种在M9琼脂+2%葡萄糖上。对隔离物进行测序,并用Bioscreen仪器测试其在MM9+2%葡萄糖中的生长(变体25-36和61-84)。

[0230] 图13示出了g1k-g1f文库构建步骤。

[0231] 对增强葡萄糖消耗的直接选择:将PX2-g1f盒电穿孔至6972中后,将这些细胞的等分试样用于接种含有2%葡萄糖和100mM碳酸氢钠的1L加盖MM9培养基。作为阴性对照,令未用PX2-g1f盒处理的细胞平行繁殖。葡萄糖生长选择进行5天。3天和5天后取等份试样,接种在M9葡萄糖琼脂上。在M9葡萄糖琼脂平板上观察到不同的菌落大小,一般来说,用PX2-g1fDNA处理的群体中,菌落的生产速度更快。将隔离物测序并以Bioscreen仪器中测试其在MM9+2%葡萄糖中的生长(变体1-24,37-60,85-130)。Bioscreen生长结果:在葡萄糖中进行生长选择后,将变体在含有葡萄糖的M9琼脂板上分离为菌落。以Bioscreen测试了130个变体在MM9+2%葡萄糖上的生长,一式两份。对于每个选择条件下生长最快的变体,以Bioscreen再次测试10个重复试样的生长。生长实验中包括PTS+祖父母(6770)和PTS-亲本(6850)。PTS+祖父母6770是删除adhE、ldhA和frmR的MG1655。

[0232] 生长曲线如图14A所示,平均10个重复样本。基于10个重复试样,图14B中显示了选择变体和亲本菌株的最大生长速率(下方坐标轴,r_{max},单位为1/hr)。

[0233] 实施例二:

[0234] 在生产1,4-丁二醇的大肠杆菌细胞中共表达PTS和非PTS葡萄糖转运系统与PK

[0235] 将F6P磷酸转酮酶(EC 4.1.2.22,Genbank ID号118765289)从青春双歧杆菌(*Bifidobacterium adolescentis*)克隆到适于在大肠杆菌中表达的质粒,即得自R.Lutz(Expressys,Germany)的质粒pZS*13S。所述质粒基于pZ表达系统(Lutz,R.&Bujard,H.,Independent and tight regulation of transcriptional units in *Escherichia coli* via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2regulatory elements.Nucleic Acids Res.25,1203-1210(1997))。

[0236] 具有通过 α -酮戊二酸生产1,4-丁二醇的途径的大肠杆菌株MG1655变体(本申请命名为7542)用表达质粒转化,并用羧苄青霉素进行抗生素选择以选择和维持。该菌株具有插入到染色体中的如实施例1中描述的glk-glf盒。插入位点是glk的上游。

[0237] 具有和不具有磷酸转酮酶的宿主菌株的性能对比发酵测试,显示BDO滴度增加了约10g/L(图12A)。非常有趣的是,它导致丙酮酸和丙氨酸形成的减少(图12B和C),这是共表达PTS和非PTS葡萄糖转运系统的BDO生产菌株的典型情形。这是完全意想不到的结果。此外,亲本菌株中的丙酮酸生产表现出与丙酮酸的生产、消耗和再生产相一致的奇特特征。

[0238] 实施例III

[0239] 表达糖运输的非PTS系统和PK的菌株中的pykF减弱

[0240] 丙糖酸激酶同工酶pykF从前一个例子的大肠杆菌K12变体中删除,其具有丢失糖运输的PTS系统(通过ptsI删除),并且通过插入glk-glf盒#25表达非PTS系统,如上述实施例1所述。将果糖-6-磷酸磷酸转酮酶EC 4.1.2.22,Genbank ID号118765289从双歧杆菌双歧杆菌克隆到适合于从R.Lutz(Expressys,Germany)获得的大肠杆菌质粒pZS*13S中表达的质粒,其基于在pZ表达系统上(Lutz,R.&Bujard,H.,Independent and tight regulation of transcriptional units in Escherichia coli via the LacR/O, the TetR/O and AraC/I1-I2regulatory elements.Nucleic Acids Res.25,1203-1210(1997))。亲本菌株已经删除了PTS系统,非PTS系统如前所述增强。另外,不同强度的启动子表达PK。EV表示空载体,增加顺序的启动子强度为:p115<p105<p108<p100。结果显示每种菌株的PK表达水平最佳,这是由p108或p105启动子提供的水平。如下表所示,删除pykF结合PK的最佳水平导致BDO产量增加。相当有意思的是,它也导致丙酮酸生产减少,代谢副产物溢出,BDO生产菌株的关键挑战是单独表达葡萄糖转运的非PTS系统,或与PTS系统的PTS系统组合葡萄糖转运。早期(未显示)与具有PTS删除和非PTS增强的菌株的PK的过度表达(OE)的实验未显示丙酮酸的这种还原。

菌株	7245(glk-glf25ΔptsI)					7424(glk-glf25ΔptsIΔpykF)				
	p100-EV	p115-PK	p105-PK	p108-PK	p100-PK	p100-EV	p115-PK	p105-PK	p108-PK	p100-PK
BDO	157.02	159.57	173.21	166.43	125.79	109.42	158.59	187.51	208.03	157.92
4HB	0.95	1.27	2.67	1.3	1.6	1.51	3.93	13.57	13.2	3.26
Pyruvate	79.27	74.66	73.55	72.74	66.51	73.29	65.68	27.17	31.27	29.59
Acetate	2.07	3.64	5.84	13.92	23.63	5.38	7.12	8.03	8.64	16.43
Ethanol	5.13	5.27	7.41	8.89	8.68	1.79	2.37	3.84	5.13	7.31
OD	4.11	4.13	4.01	5.04	4.08	4.63	4.33	3.27	3.9	4.74

[0242] 实施例IV

[0243] 额外的途径和酶

[0244] 该实施例描述了用于将丙酮酸转化成甲醛的酶途径,并且可选地与如上文中所述的生产乙酰辅酶A和/或再生丙酮酸相组合。

[0245] 步骤Y,图1:甘油醛-3-磷酸脱氢酶和糖酵解较低的酶

[0246] 包含步骤Y,G3P至PYR的酶包括:甘油醛-3-磷酸脱氢酶;磷酸甘油酸激酶;磷酸甘油转移酶;烯醇化酶;丙酮酸激酶或PTS依赖性底物输入。

[0247] 甘油醛-3-磷酸脱氢酶包括:

[0248] NADP依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶,示例性酶是:

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
gapN	AAA91091.1	642667	变异链球菌 (<i>Streptococcus mutans</i>)
NP-GAPDH	AEC07555.1	330252461	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>
GAPN	AAM77679.2	82469904	小麦 <i>Triticum aestivum</i>
gapN	CAI56300.1	87298962	丙酮丁醇梭菌 <i>Clostridium acetobutylicum</i>
NADP-GAPDH	2D2I_A	112490271	细长聚球藻 (<i>Synechococcus elongatus</i>) PCC 7942
NADP-GAPDH	CAA62619.1	4741714	细长聚球藻 (<i>Synechococcus elongatus</i>) PCC 7942
GDP1	XP_455496.1	50310947	乳酸克鲁维酵母 (<i>Kluyveromyces lactis</i>) NRRL Y-1140
HP1346	NP_208138.1	15645959	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>) 26695

[0249] 和NAD依赖性甘油醛-3-磷酸脱氢酶,示例性酶是:

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
TDH1	NP_012483.1	6322409	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) s288c
TDH2	NP_012542.1	6322468	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) s288c
TDH3	NP_011708.1	632163	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) s288c
KLLA0A11858g	XP_451516.1	50303157	乳酸克鲁维酵母 (<i>Kluyveromyces lactis</i>) NRRL Y-1140
KLLA0F20988g	XP_456022.1	50311981	乳酸克鲁维酵母 (<i>Kluyveromyces lactis</i>) NRRL Y-1140
ANI_1_256144	XP_001397496.1	145251966	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>) CBS 513.88
YALI0C06369g	XP_501515.1	50548091	解脂耶氏酵母 (<i>Yarrowia lipolytica</i>)
CTRG_05666	XP_002551368.1	255732890	热带假丝酵母 (<i>Candida tropicalis</i>) MYA-3404
HPODL_1089	EFW97311.1	320583095	多形汉逊酵母 (<i>Hansenula polymorpha</i>) DL-1
gapA	YP_490040.1	388477852	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0251]

[0252] 磷酸甘油酸激酶包括：

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
PGK1	NP_009938.2	10383781	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) s288c
PGK	BAD83658.1	57157302	博伊丁假丝酵母 (<i>Candida boidinii</i>)
PGK	EFW98395.1	320584184	多形汉逊酵母 (<i>Hansenula polymorpha</i>) DL-1
Pgk	EIJ77825.1	387585500	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) MGA3
Pgk	YP_491126.1	388478934	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0253]

[0254] 磷酸甘油转移酶(又名磷酸甘油酸变位酶)包括:

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
GPM1	NP_012770.1	6322697	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) s288c
GPM2	NP_010263.1	6320183	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) s288c
GPM3	NP_014585.1	6324516	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) s288c
HPODL_1391	EFW96681.1	320582464	多形汉逊酵母 (<i>Hansenula polymorpha</i>) DL-1
HPODL_0376	EFW97746.1	320583533	多形汉逊酵母 (<i>Hansenula polymorpha</i>) DL-1
gpmI	EIJ77827.1	387585502	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) MGA3
gpmA	YP_489028.1	388476840	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
gpmM	AAC76636.1	1790041	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0255] 烯醇化酶(也称为磷酸甘油酸水合酶和2-磷酸甘油酸脱水酶)包括:

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
ENO1	NP_011770.3	398366315	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) s288c
ENO2	AAB68019.1	458897	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) s288c
HPODL_2596	EFW95743.1	320581523	多形汉逊酵母 (<i>Hansenula polymorpha</i>) DL-1
Eno	EIJ77828.1	387585503	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) MGA3
Eno	AAC75821.1	1789141	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0256] 丙酮酸激酶(也称为磷酸烯醇丙酮酸激酶和磷酸烯醇丙酮酸激酶)或PTS依赖性底物输入酶包括如下各项。丙酮酸激酶(也称为磷酸烯醇丙酮酸合成酶(EC 2.7.9.2)将丙酮酸和ATP转化为PEP和AMP。该酶在酿酒酵母中由PYK1(Burke et al., J.Biol.Chem.258: 2193-2201 (1983))和PYK2(Boles et al., J.Bacteriol.179:2987-2993 (1997))基因编码。在大肠杆菌中,该活性由pykF和pykA的基因产物催化。注意,pykA和pykF是编码潜在能够进行PYK反应的各个酶的基因。酿酒酵母酶的选定同系物也显示在下表中。

[0259]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
PYK1	NP_009362	6319279	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
PYK2	NP_014992	6324923	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
pykF	NP_416191.1	16129632	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
pykA	NP_416368.1	16129807	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
KLLA0F23397g	XP_456122.1	50312181	乳酸克鲁维酵母 (<i>Kluyveromyces lactis</i>)
CaO19.3575	XP_714934.1	68482353	白色假丝酵母 (<i>Candida albicans</i>)
CaO19.11059	XP_714997.1	68482226	白色假丝酵母 (<i>Candida albicans</i>)
YALI0F09185p	XP_505195	210075987	解脂耶氏酵母 (<i>Yarrowia lipolytica</i>)
ANI_1_1126064	XP_001391973	145238652	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)
MGA3_03005	EIJ84220.1	387591903	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) MGA3

[0260]

HPODL_1539	EFW96829.1	320582612	多形汉逊酵母 (<i>Hansenula polymorpha</i>) DL-1
------------	------------	-----------	---

[0261] PTS依赖性底物摄取系统催化磷酸转移级联反应,该级联反应将PEP向丙酮酸的转化与碳底物的转运和磷酸化偶联。例如,葡萄糖PTS系统输送葡萄糖,将葡萄糖-6-磷酸释放到细胞质中,同时将磷酸烯醇丙酮酸转化成丙酮酸。PTS系统由底物特异性和非底物特异性的酶或蛋白质(组件)组成。在大肠杆菌中,两种非特异性组件由ptsI(Enzyme I)和ptsH(HPr)编码。糖依赖组件由crr和ptsG编码。对Pts系统已经进行了广泛的研究,并在例如Postma et al, Microbiol Rev 57:543-94 (1993) 中进行了综述。

[0262]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
ptsG	AC74185.1	1787343	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
ptsI	AAC75469.1	1788756	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
ptsH	AAC75468.1	1788755	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
Crr	AAC75470.1	1788757	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0263] IIA[G1c]组件介导从组氨酸蛋白Hpr(ptsH)到IIB[G1c](ptsG)组件的磷酸基转移。将crr基因的截短变体导入1,4-丁二醇生产菌株。

[0264] 可选地,磷酸烯醇丙酮酸磷酸酶(EC 3.1.3.60)催化PEP水解成丙酮酸和磷酸。许

多磷酸酶催化这种活性,包括碱性磷酸酶(EC 3.1.3.1)、酸性磷酸酶(EC 3.1.3.2)、磷酸甘油酸磷酸酶(EC 3.1.3.20)和PEP磷酸酶(EC 3.1.3.60)。PEP磷酸酶已经在植物中表征,例如 *Vignia radiate*,海莲(*Bruguiera sexangula*)和黑芥菜(*Brassica nigra*)。来自烟曲霉的肌醇六磷酸酶,来自智人的酸性磷酸酶和大肠杆菌的碱性磷酸酶也催化PEP向丙酮酸的水解(Brugger et al.,Appl Microbiol Biotech 63:383-9(2004);Hayman et al.,Biochem J 261:601-9(1989);et al.,The Enzymes 3rd Ed.4:373-415(1971)))。类似的酶已经在空肠弯曲杆菌(van Mourik et al.,Microbiol.154:584-92(2008)),酿酒酵母(Oshima et al.,Gene 179:171-7(1996))和金黄色葡萄球菌(Shah and Blobel,J.Bacteriol.94:780-1(1967))中得到表征。酶工程和/或去除靶向序列可能需要碱性磷酸酶在细胞质中起作用。
[0265]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
phyA	O00092.1	41017447	烟曲霉 (<i>Aspergillus fumigatus</i>)
Acp5	P13686.3	56757583	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
phoA	NP_414917.2	49176017	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
phoX	ZP_01072054.1	86153851	空肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter jejuni</i>)
PHO8	AAA34871.1	172164	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
SaurJH1_2706	YP_001317815.1	150395140	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)

[0266] 步骤Q,图1:丙酮酸甲酸裂解酶

[0267] 丙酮酸甲酸裂解酶(PFL,EC 2.3.1.54),由大肠杆菌中的pf1B编码,可将丙酮酸转化为乙酰辅酶A和甲酸。PFL的活性可以通过由pf1A编码的活化酶来增强(Knappe et al., Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A 81:1332-1335(1984);Wong et al.,Biochemistry 32: 14102-14110(1993))。酮酸甲酸裂解酶(EC 2.3.1.-),也称为2-酮丁酸甲酸裂解酶(KFL)和丙酮酸甲酸裂解酶4,是大肠杆菌中tdcE的基因产物。该酶在无氧性苏氨酸降解过程中催化了2-酮基丁酸向丙酰辅酶A和甲酸的转化,并且还可以在无氧分解代谢中代替丙酮酸甲酸裂解酶(Simanshu et al.,J Biosci.32:1195-1206(2007))。该酶是氧敏感的,并且类似于Pf1B,可能需要PFL-AE的翻译后修饰来活化活性位点中的甘氨酰基(Hesslinger et al., Mol.Microbiol 27:477-492(1998))。来自超高热硫酸还原古细菌(*Archaeoglobus fulgidus*)的由pf1D编码的丙酮酸甲酸裂解酶已经被克隆、在大肠杆菌中表达并表征(Lehtio et al.,J Mol.Biol.357:221-235(2006);Leppanen et al.,Structure.7:733-744(1999))。*A.fulgidus*和*E.coli*酶的晶体结构已被解开(Lehtio et al.,J Mol.Biol.357:221-235(2006);Leppanen et al.,Structure.7:733-744(1999))。在乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) (Melchiorsen et al.,Appl Microbiol Biotechnol 58: 338-344(2002))和变形链球菌(*Streptococcus mutans*) (Takahashi-Abbe et al.,

Oral. Microbiol Immunol. 18:293–297 (2003) , 莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) (Hemschemeier et al., Eukaryot. Cell 7:518–526 (2008b); Atteia et al., J. Biol. Chem. 281:9909–9918 (2006)) 和巴斯德毕赤酵母 (*Clostridium pasteurianum*) (Weidner et al., J Bacteriol. 178:2440–2444 (1996)) 中发现了另外的PFL和PFL-AE候选物。

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
<i>pflB</i>	NP_415423	16128870	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>pflA</i>	NP_415422.1	16128869	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>tdcE</i>	AAT48170.1	48994926	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>pflD</i>	NP_070278.1	11499044	超高热硫酸还原古细菌 (<i>Archaeoglobus fulgidus</i>)
<i>Pfl</i>	CAA03993	2407931	乳酸乳球菌 (<i>Lactococcus lactis</i>)
<i>Pfl</i>	BAA09085	1129082	变异链球菌 (<i>Streptococcus mutans</i>)
<i>PFL1</i>	XP_001689719.1	159462978	莱茵衣藻 (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)
<i>pflA1</i>	XP_001700657.1	159485246	莱茵衣藻 (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)
<i>Pfl</i>	Q46266.1	2500058	巴斯德梭菌 (<i>Clostridium pasteurianum</i>)
<i>Act</i>	CAA63749.1	1072362	巴斯德梭菌 (<i>Clostridium pasteurianum</i>)

[0268]

[0269] 步骤R, 图1:丙酮酸脱氢酶、丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶、丙酮酸:NADP+氧化还原酶

[0270] 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 复合物催化丙酮酸转化为乙酰辅酶A (例如图1步骤R)。大肠杆菌PDH复合物由基因aceEF和lpdA编码。酶工程化研究增强了无氧条件下的大肠杆菌PDH酶活性 (Kim et al., J. Bacteriol. 190:3851–3858 (2008); Kim et al., Appl. Environ. Microbiol. 73:1766–1771 (2007); Zhou et al., Biotechnol. Lett. 30:335–342 (2008))。与大肠杆菌PDH相反, 枯草芽孢杆菌复合物需要无氧条件才有活性且能生长 (Nakano et al., 179:6749–6755 (1997))。肺炎克雷伯杆菌PDH在甘油生长过程中表征, 在无氧条件下也是有活性的 (Menzel et al., 56:135–142 (1997))。来自牛肾的酶复合物 (Zhou et al., 98:14802–14807 (2001)) 和来自固氮菌的E2催化结构域 (Mattevi et al., Science. 255:1544–1550 (1992)) 的晶体结构是已知的。一些哺乳动物PDH酶复合物可以在另外的底物如2-羟代丁酸上反应。褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) 的PDH和BCKAD的比较动力学研究表明, BCKAD对2-羟代丁酸底物具有较高的活性 (Paxton et al., Biochem. J. 234: 295–303 (1986))。酿酒酵母PDH复合物可以由结合E1 (PDA1, PDB1) 的E2 (LAT1) 核心, E3 (LPD1) 和蛋白X (PDX1) 组件组成 (Pronk et al., Yeast 12:1607–1633 (1996))。酿酒酵母的

PDH复合物通过PKP1 (PDH激酶I)、PTC5 (PDH磷酸酶I)、PKP2和PTC6参与的E1磷酸化来调节。这些调节剂的修饰也可以增强PDH活性。活化PDH酶复合物可能需要在细胞溶质中共同表达脂质体连接酶 (大肠杆菌的LplA和啤酒酵母中的AIM22) 和PDH。通过修饰代谢途径或使用脂酸补充培养基来增加脂质体脂酸供应,也可以增强PDH活性。

Gene	登录号.	GI 号	生物体
aceE	NP_414656.1	16128107	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
aceF	NP_414657.1	16128108	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
lpd	NP_414658.1	16128109	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
lplA	NP_418803.1	16132203	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
pdhA	P21881.1	3123238	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
pdhB	P21882.1	129068	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
pdhC	P21883.2	129054	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
pdhD	P21880.1	118672	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
[0271]	aceE	YP_001333808.1	克雷伯氏肺炎杆菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)
	aceF	YP_001333809.1	克雷伯氏肺炎杆菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)
	lpdA	YP_001333810.1	克雷伯氏肺炎杆菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)
	Pdha1	NP_001004072.2	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
Pdha2	NP_446446.1	16758900	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
Dlat	NP_112287.1	78365255	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
Dld	NP_955417.1	40786469	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
LAT1	NP_014328	6324258	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
PDA1	NP_011105	37362644	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
PDB1	NP_009780	6319698	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
LPD1	NP_116635	14318501	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0272]	PDX1	NP_011709	6321632	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	AIM22	NP_012489.2	83578101	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0273] 作为上述大型多酶PDH复合物的替代物,一些微生物利用2-酮酸氧化还原酶家族(OFOR)中的酶来催化2-酮酸的酰化氧化脱羧作用。与PDH复合物不同,PFOR酶含有铁-硫簇,利用不同的辅因子,并使用铁氧还蛋白或黄素氧还蛋白代替NAD(P)H作为电子受体。丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶(PFOR)可以催化丙酮酸氧化而形成乙酰辅酶A(如图1步骤R)。来自非洲脱硫弧菌(*Desulfovibrio africanus*)的PFOR已经在大肠杆菌中克隆并表达,得到在氧环境下稳定数天的活性重组酶(Pieulle et al., J Bacteriol. 179: 5684–5692 (1997))。PFOR的氧气稳定性相对来说不常见,并被认为是源于非洲脱硫弧菌的多肽链中的60个残基延伸。*M. Metacetica*的PFOR也得到很好地表征(Menon et al., Biochemistry 36: 8484–8494 (1997)),并且甚至在自养生长期间在丙酮酸合成方向上显示高活性(Furdui et al., J Biol Chem. 275: 28494–28499 (2000))。此外,大肠杆菌具有未表征的开放读框(ydbK),其编码与*M. Metacetica*的PFOR 51%相同的蛋白质。丙酮酸氧化还原酶在大肠杆菌中具有活性的证据已经得到描述(Blaschkowski et al., Eur. J Biochem. 123: 563–569 (1982))。Ragsdale, Chem. Rev. 103: 2333–2346 (2003) 描述了几种额外的PFOR酶。最后,黄素氧还蛋白还原酶(例如来自幽门螺杆菌或空肠弯曲杆菌的fqrB(St Maurice et al., J. Bacteriol. 189: 4764–4773 (2007)))或Rnf型蛋白质(Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S. A. 105: 2128–2133 (2008); Herrmann et al., J. Bacteriol. 190: 784–791 (2008))提供了用由PFOR产生的还原铁氧还蛋白生产NADH或NADPH的方法。这些蛋白质如下所示。

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
Por	CAA70873.1	1770208	非洲脱硫弧菌(<i>Desulfovibrio africanus</i>)
Por	YP_428946.1	83588937	热醋穆尔氏菌(<i>Moorella thermoacetica</i>)
ydbK	NP_415896.1	16129339	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)
fqrB	NP_207955.1	15645778	幽门螺杆菌(<i>Helicobacter pylori</i>)
fqrB	YP_001482096.1	157414840	空肠弯曲杆菌(<i>Campylobacter jejuni</i>)
RnfC	EDK33306.1	146346770	克氏梭菌(<i>Clostridium kluyveri</i>)
RnfD	EDK33307.1	146346771	克氏梭菌(<i>Clostridium</i>)

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
			<i>kluyveri</i>)
RnfG	EDK33308.1	146346772	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
RnfE	EDK33309.1	146346773	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
RnfA	EDK33310.1	146346774	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
RnfB	EDK33311.1	146346775	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)

[0275] [0276] 丙酮酸:NADP氧化还原酶(PNO)催化丙酮酸向乙酰辅酶A转化。与上述多亚单位PDH酶复合物相反,该酶由单个基因编码,且活性酶是同二聚体。辅因子即焦磷酸硫胺素可稳定化来自眼虫藻(*Euglena gracilis*)的该酶(Nakazawa et al., Arch Biochem Biophys 411: 183-8 (2003))。应该去除该酶的线粒体靶向序列,方可可在胞质溶胶中表达。眼虫藻的PNO蛋白和其他NADP依赖性丙酮酸:NADP+氧化还原酶列于下表中。

[0277]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
PNO	Q94IN5.1	33112418	眼虫藻 (<i>Euglena gracilis</i>)
cgd4_690	XP_625673.1	66356990	隐孢子虫 (<i>Cryptosporidium parvum</i>) Iowa II
TPP_PFOR_PNO	XP_002765111.11	294867463	海水帕金虫 (<i>Perkinsus marinus</i>) ATCC 50983

[0278] 实施例V

[0279] 还原当量的生产

[0280] 该实施例描述了额外的酶,包括可用于生产还原当量的酶。

[0281] 甲酸氢裂解酶(如图1,步骤Q)

[0282] 甲酸氢裂解酶可用于将甲酸转化为二氧化碳和氢。示例性的甲酸氢裂解酶可以在大肠杆菌中发现。大肠杆菌甲酸氢裂解酶由氢化酶3和甲酸脱氢酶-H组成(Maeda et al., Appl Microbiol Biotechnol 77:879-890 (2007))。它由fh1A的基因产物活化(Maeda et al., Appl Microbiol Biotechnol 77:879-890 (2007))。已证明添加微量元素硒、镍和钼到发酵液中能够增强甲酸氢裂解酶活性(Soini et al., Microb. Cell Fact. 7:26 (2008))。各种氢化酶3、甲酸脱氢酶和转录活化子基因如下所示。

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
hycA	NP_417205	16130632	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K-12 MG1655
hycB	NP_417204	16130631	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K-12 MG1655
hycC	NP_417203	16130630	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K-12 MG1655
hycD	NP_417202	16130629	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K-12 MG1655
hycE	NP_417201	16130628	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K-12 MG1655
[0283]	hycF	NP_417200	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K-12 MG1655
	hycG	NP_417199	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K-12 MG1655
	hycH	NP_417198	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K-12 MG1655
	hycI	NP_417197	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K-12 MG1655
	fdhF	NP_418503	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K-12 MG1655
	fhlA	NP_417211	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K-12 MG1655

[0284] 甲酸氢裂解酶也存在于超嗜热古细菌 (*Thermococcus litoralis*) (Takacs et al., BMC Microbiol 8:88 (2008)) 中。

蛋白 质	GenBank ID	GI号	生物体
mhyC	ABW05543	157954626	海滨嗜热球菌 (<i>Thermococcus litoralis</i>)
[0285]	mhyD	ABW05544	海滨嗜热球菌 (<i>Thermococcus litoralis</i>)
	mhyE	ABW05545	海滨嗜热球菌 (<i>Thermococcus litoralis</i>)

[0286]	myhF	ABW05546	157954629	海滨嗜热球菌 (<i>Thermococcus litoralis</i>)
	myhG	ABW05547	157954630	海滨嗜热球菌 (<i>Thermococcus litoralis</i>)
	myhH	ABW05548	157954631	海滨嗜热球菌 (<i>Thermococcus litoralis</i>)
	fdhA	AAB94932	2746736	海滨嗜热球菌 (<i>Thermococcus litoralis</i>)
	fdhB	AAB94931	157954625	海滨嗜热球菌 (<i>Thermococcus litoralis</i>)

[0287] 已经在鼠伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯杆菌、深红红螺菌、甲酸甲烷杆菌 (*Methanobacterium formicicum*) 中发现了另外的甲酸氢裂解酶系统 (Vardar-Scharr et al., *Microbial Biotechnology* 1:107-125 (2008))。

[0288] 氢化酶

[0289] 氢化酶可以将氢气转化为质子,并将电子转移到受体如铁氧还蛋白、NAD⁺或NADP⁺。真养劳尔氏菌 (*Ralstonia eutropha*) H16使用氢作为能量源,以氧作为末端电子受体。其膜结合摄取[NiFe]-氢化酶是一种“O₂耐受”氢化酶 (Cracknell, et al. *Proc Nat Acad Sci*, 106 (49) 20681-20686 (2009)), 其是质外导向的,并通过b型细胞色素连接到呼吸链 (Schink and Schlegel, *Biochim.Biophys.Acta*, 567, 315-324 (1979); Bernhard et al., *Eur.J.Biochem.* 248, 179-186 (1997))). 真养劳尔氏菌也包含由Hox操纵子编码的O₂-耐受性可溶性氢化酶,其在细胞质中并且以氢为代价直接还原NAD⁺ (Schneider and Schlegel, *Biochim.Biophys.Acta* 452, 66-80 (1976); Burgdorf, *J.Bact.* 187 (9) 3122-3132 (2005)). 可溶性氢化酶还存在于几种其他微生物中,包括金属还原泥土杆菌 (*Geobacter sulfurreducens*) (Coppi, *Microbiology* 151, 1239-1254 (2005)), 集胞藻 (*Synechocystis*) PCC 6803菌株 (Germer, *J.Biol.Chem.*, 284 (52), 36462-36472 (2009)) 和桃红菱硫菌 (*Thiocapsa roseopersicina*) (Rakhely, *Appl.Environ.Microbiol.* 70 (2) 722-728 (2004)). 集胞藻酶能够从氢生产NADPH。来自集胞藻 (*Synechocystis*) PCC 6803菌株的Hox操纵子和由念珠藻 (*Nostoc*) PCC7120菌株的Hyp操纵子编码的附属基因的过度表达,与Hox基因单独表达相比,得到了增加的氢化酶活性 (Germer, *J.Biol.Chem.* 284 (52), 36462-36472 (2009))。

[0290]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
HoxF	NP_942727.1	38637753	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>) H16
HoxU	NP_942728.1	38637754	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>) H16
HoxY	NP_942729.1	38637755	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>) H16
HoxH	NP_942730.1	38637756	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>) H16
HoxW	NP_942731.1	38637757	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>) H16
HoxI	NP_942732.1	38637758	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>) H16
HoxE	NP_953767.1	39997816	金属还原泥土杆菌 (<i>Geobacter sulfurreducens</i>)
HoxF	NP_953766.1	39997815	金属还原泥土杆菌 (<i>Geobacter sulfurreducens</i>)
HoxU	NP_953765.1	39997814	金属还原泥土杆菌 (<i>Geobacter sulfurreducens</i>)
HoxY	NP_953764.1	39997813	金属还原泥土杆菌 (<i>Geobacter sulfurreducens</i>)
HoxH	NP_953763.1	39997812	金属还原泥土杆菌 (<i>Geobacter sulfurreducens</i>)
GSU2717	NP_953762.1	39997811	金属还原泥土杆菌 (<i>Geobacter sulfurreducens</i>)
HoxE	NP_441418.1	16330690	集胞藻 (<i>Synechocystis</i>) str. PCC 6803
HoxF	NP_441417.1	16330689	集胞藻 (<i>Synechocystis</i>) str. PCC 6803

[0291]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
Unknown function	NP_441416.1	16330688	集胞藻 (<i>Synechocystis</i>) str. PCC 6803
HoxU	NP_441415.1	16330687	集胞藻 (<i>Synechocystis</i>) str. PCC 6803
HoxY	NP_441414.1	16330686	集胞藻 (<i>Synechocystis</i>) str. PCC 6803
Unknown function	NP_441413.1	16330685	集胞藻 (<i>Synechocystis</i>) str. PCC 6803
Unknown function	NP_441412.1	16330684	集胞藻 (<i>Synechocystis</i>) str. PCC 6803
HoxH	NP_441411.1	16330683	集胞藻 (<i>Synechocystis</i>) str. PCC 6803
HypF	NP_484737.1	17228189	念珠藻 (<i>Nostoc</i>) sp. PCC 7120
HypC	NP_484738.1	17228190	念珠藻 (<i>Nostoc</i>) sp. PCC 7120
HypD	NP_484739.1	17228191	念珠藻 (<i>Nostoc</i>) sp. PCC 7120
Unknown function	NP_484740.1	17228192	念珠藻 (<i>Nostoc</i>) sp. PCC 7120
HypE	NP_484741.1	17228193	念珠藻 (<i>Nostoc</i>) sp. PCC 7120
HypA	NP_484742.1	17228194	念珠藻 (<i>Nostoc</i>) sp. PCC 7120
HypB	NP_484743.1	17228195	念珠藻 (<i>Nostoc</i>) sp. PCC 7120
Hox1E	AAP50519.1	37787351	桃红莢硫菌 (<i>Thiocapsa roseopersicina</i>)
Hox1F	AAP50520.1	37787352	桃红莢硫菌 (<i>Thiocapsa roseopersicina</i>)
Hox1U	AAP50521.1	37787353	桃红莢硫菌 (<i>Thiocapsa roseopersicina</i>)
Hox1Y	AAP50522.1	37787354	桃红莢硫菌 (<i>Thiocapsa roseopersicina</i>)

[0292]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
Hox1H	AAP50523.1	37787355	桃红芽硫菌 (<i>Thiocapsa roseopersicina</i>)

[0293] 大肠杆菌和其他肠道细菌的基因组编码多达四种氢化酶(Sawers, G., Antonie Van Leeuwenhoek 66:57-88 (1994); Sawers et al., J Bacteriol. 164:1324-1331 (1985); Sawers and Boxer, Eur. J Biochem. 156:265-275 (1986); Sawers et al., J Bacteriol. 168:398-404 (1986))。鉴于酶活性的多样性,大肠杆菌或其他宿主微生物可以提供足够的氢化酶活性,来分离进入的分子氢并减少相应的受体。大肠杆菌的内源性氢裂解酶包括氢化酶3,其为一种使用铁氧还蛋白作为受体的膜结合成酶复合物,还包括同样使用铁氧还蛋白受体的氢化酶4。氢化酶3和4分别由hyc和hyf基因簇编码。大肠杆菌中的氢化酶活性也取决于hyp基因的表达,其相应蛋白质参与氢化酶复合物的组装(Jacobi et al., Arch. Microbiol 158:444-451 (1992); Rangarajan et al., J Bacteriol. 190:1447-1458 (2008))。热醋穆尔氏菌 (*Moorella thermoacetica*) 和永达尔梭菌 (*Clostridium ljungdahli*) 的氢化酶适用于缺乏足够的内源性氢化酶活性的宿主。热醋穆尔氏菌 (*Moorella thermoacetica*) 和永达尔梭菌 (*Clostridium ljungdahli*) 可以用CO₂作为单独碳源生长,表明其从H₂中提取还原当量以通过Wood-Ljungdahl途径进行乙酰辅酶A合成(Drake, H.L., J Bacteriol. 150:702-709 (1982); Drake and Daniel, Res Microbiol 155: 869-883 (2004); Kellum and Drake, J Bacteriol. 160:466-469 (1984))。热醋穆尔氏菌具有来自大肠杆菌的几种hyp、hyc和hyf基因的同源物。由这些基因编码的所述蛋白质序列的GenBank登录号如下。此外,编码氢化酶官能团的几个基因簇存在于热醋穆尔氏菌和永达尔梭菌(参见例如US2012/0003652)中。

[0294]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
HypA	NP_417206	16130633	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HypB	NP_417207	16130634	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HypC	NP_417208	16130635	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HypD	NP_417209	16130636	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HypE	NP_417210	226524740	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HypF	NP_417192	16130619	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HycA	NP_417205	16130632	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HycB	NP_417204	16130631	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HycC	NP_417203	16130630	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HycD	NP_417202	16130629	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HycE	NP_417201	16130628	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HycF	NP_417200	16130627	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0295]

HycG	NP_417199	16130626	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HycH	NP_417198	16130625	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HycI	NP_417197	16130624	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HyfA	NP_416976	90111444	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HyfB	NP_416977	16130407	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HyfC	NP_416978	90111445	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HyfD	NP_416979	16130409	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HyfE	NP_416980	16130410	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HyfF	NP_416981	16130411	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HyfG	NP_416982	16130412	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HyfH	NP_416983	16130413	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HyfI	NP_416984	16130414	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HyfJ	NP_416985	90111446	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
HyfR	NP_416986	90111447	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0296] 热醋穆尔氏菌 (*Moorella thermoacetica*) 中与大肠杆菌氢化酶基因同源的基因的蛋白质如下所示。

[0297]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
Moth_2175	YP_431007	83590998	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_2176	YP_431008	83590999	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_2177	YP_431009	83591000	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_2178	YP_431010	83591001	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_2179	YP_431011	83591002	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_2180	YP_431012	83591003	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_2181	YP_431013	83591004	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella</i>

			<i>thermoacetica</i>)
Moth_2182	YP_431014	83591005	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_2183	YP_431015	83591006	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_2184	YP_431016	83591007	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_2185	YP_431017	83591008	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_2186	YP_431018	83591009	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_2187	YP_431019	83591010	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_2188	YP_431020	83591011	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_2189	YP_431021	83591012	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
[0298]	Moth_2190	YP_431022	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
	Moth_2191	YP_431023	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
	Moth_2192	YP_431024	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
	Moth_0439	YP_429313	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
	Moth_0440	YP_429314	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
	Moth_0441	YP_429315	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
	Moth_0442	YP_429316	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
	Moth_0809	YP_429670	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
	Moth_0810	YP_429671	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)

Moth_0811	YP_429672	83589663	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_0812	YP_429673	83589664	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_0814	YP_429674	83589665	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_0815	YP_429675	83589666	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_0816	YP_429676	83589667	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_1193	YP_430050	83590041	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_1194	YP_430051	83590042	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_1195	YP_430052	83590043	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_1196	YP_430053	83590044	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_1717	YP_430562	83590553	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_1718	YP_430563	83590554	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_1719	YP_430564	83590555	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_1883	YP_430726	83590717	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_1884	YP_430727	83590718	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_1885	YP_430728	83590719	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_1886	YP_430729	83590720	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_1887	YP_430730	83590721	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_1888	YP_430731	83590722	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)

[0299]

[0300]	Moth_1452	YP_430305	83590296	<i>thermoacetica</i>) 热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
	Moth_1453	YP_430306	83590297	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
	Moth_1454	YP_430307	83590298	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)

[0301] 编码永达尔梭菌 (*Clostridium ljungdahli*) 的氢化酶的基因如下所示。

[0302]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>CLJU_c20290</i>	ADK15091.1	300435324	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c07030</i>	ADK13773.1	300434006	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c07040</i>	ADK13774.1	300434007	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c07050</i>	ADK13775.1	300434008	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c07060</i>	ADK13776.1	300434009	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c07070</i>	ADK13777.1	300434010	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c07080</i>	ADK13778.1	300434011	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c14730</i>	ADK14541.1	300434774	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c14720</i>	ADK14540.1	300434773	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)

[0303]

<i>CLJU_c14710</i>	ADK14539.1	300434772	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c14700</i>	ADK14538.1	300434771	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c28670</i>	ADK15915.1	300436148	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c28660</i>	ADK15914.1	300436147	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c28650</i>	ADK15913.1	300436146	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c28640</i>	ADK15912.1	300436145	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)

[0304] 在一些情形中, 氢化酶编码基因位于与CODH相邻的位置。在深红红螺菌(*Rhodospirillum rubrum*)中, 编码的CODH/氢化酶蛋白形成膜结合酶复合物, 其已证实是一个以CO和H₂O转化为CO₂和H₂而生产质子梯度能量的位点(Fox et al., J Bacteriol. 178: 6200–6208 (1996))。已经有人提出产氢菌*Carboxydothremus hydrogenoformans*的CODH-I及其相邻基因, 基于其与深红红螺菌CODH/氢化酶基因簇的相似性, 催化类似的功能性作用(Wu et al., PLoS Genet. 1:e65 (2005))。还已证实, 产氢菌*Carboxydothremus hydrogenoformans*的CODH-1在与电极连接时, 表现出强烈的CO氧化和CO₂还原活性(Parkin et al., J Am. Chem. Soc. 129:10328–10329 (2007))。

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
CooL	AAC45118	1515468	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)
CooX	AAC45119	1515469	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)
CooU	AAC45120	1515470	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)
CooH	AAC45121	1498746	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)
CooF	AAC45122	1498747	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)

[0305]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
			<i>rubrum</i>)
CODH (CooS)	AAC45123	1498748	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)
CooC	AAC45124	1498749	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)
CooT	AAC45125	1498750	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)
CooJ	AAC45126	1498751	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)
CODH-I (CooS-I)	YP_360644	78043418	产氢菌 <i>Carboxydotermus hydrogenoformans</i>
CooF	YP_360645	78044791	产氢菌 <i>Carboxydotermus hydrogenoformans</i>
HypA	YP_360646	78044340	产氢菌 <i>Carboxydotermus hydrogenoformans</i>
CooH	YP_360647	78043871	产氢菌 <i>Carboxydotermus hydrogenoformans</i>
CooU	YP_360648	78044023	产氢菌 <i>Carboxydotermus hydrogenoformans</i>
CooX	YP_360649	78043124	产氢菌 <i>Carboxydotermus hydrogenoformans</i>
CooL	YP_360650	78043938	产氢菌 <i>Carboxydotermus hydrogenoformans</i>
CooK	YP_360651	78044700	产氢菌 <i>Carboxydotermus hydrogenoformans</i>
CooM	YP_360652	78043942	产氢菌 <i>Carboxydotermus hydrogenoformans</i>
CooC	YP_360654.1	78043296	产氢菌 <i>Carboxydotermus hydrogenoformans</i>
CooA-1	YP_360655.1	78044021	产氢菌 <i>Carboxydotermus hydrogenoformans</i>

[0306]

[0307] 一些氢化酶和CODH酶将电子转移到铁氧还蛋白。铁氧还蛋白是含有一种或多种铁-硫簇的小酸性蛋白,其功能是作为具有低还原电位的细胞内电子载体。还原铁氧还蛋白将电子传递给铁依赖性酶,如铁氧还蛋白-NADP⁺氧化还原酶、丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶(PFOR)和2-氧戊二酸:铁氧还蛋白氧化还原酶(OFOR)。嗜热产氢杆菌(*Hydrogenobacter thermophilus*)的基因fdx1编码[4Fe-4S]型铁氧还蛋白,该蛋白是通过OFOR和PFOR分别对2-氧戊二酸和丙酮酸进行可逆羧化所必需的(Yamamoto et al., Extremophiles 14: 79-85

(2010))。与硫矿硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus*) 2-氧代酸:铁氧还蛋白还原酶相关的铁氧还蛋白,是单体二簇[3Fe-4S]/[4Fe-4S]型铁氧还蛋白 (Park et al. 2006)。虽然与该蛋白相关的基因尚未完全测序,但N端结构域与来自嗜酸乳杆菌 (*S. acidocaldarius*) 的zfx 铁氧还蛋白具有93%的同源性。大肠杆菌基因组编码具有未知生理功能的可溶性铁氧还蛋白 fdx。一些证据表明,这种蛋白质可以在铁-硫簇的组装中起作用 (Takahashi and Nakamura, 1999)。已经在幽门螺杆菌 (Mukhopadhyay et al. 2003) 和空肠弯曲杆菌 (van Vliet et al. 2001) 中表征了额外的铁氧还蛋白蛋白。来自巴斯德氏梭菌的2Fe-2S铁氧还蛋白已经在大肠杆菌中得到克隆并表达 (Fujinaga and Meyer, Biochemical and Biophysical Research Communications, 192 (3) : (1993))。预测产乙酸菌如热醋穆尔氏菌 (*Moorella thermoacetica*)、食一氧化碳梭菌 (*Clostridium carboxidivorans*) P7、永达尔梭菌 (*Clostridium ljungdahli*) 和深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*) 可以编码几种铁氧还蛋白,如下所列。

[0308]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
<i>fdx1</i>	BAE02673.1	68163284	嗜热产氢杆菌 (<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>)
M11214.1	AAA83524.1	144806	巴斯德梭菌 (<i>Clostridium pasteurianum</i>)
<i>Zfx</i>	AAY79867.1	68566938	高温酸热硫化叶菌 (<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)
<i>Fdx</i>	AAC75578.1	1788874	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>hp_0277</i>	AAD07340.1	2313367	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>)
<i>fdxA</i>	CAL34484.1	112359698	空肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter jejuni</i>)
<i>Moth_0061</i>	ABC18400.1	83571848	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
<i>Moth_1200</i>	ABC19514.1	83572962	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
<i>Moth_1888</i>	ABC20188.1	83573636	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
<i>Moth_2112</i>	ABC20404.1	83573852	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
<i>Moth_1037</i>	ABC19351.1	83572799	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)

[0309]

CcarbDRAF T_4383	ZP_05394383. 1	255527515	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
CcarbDRAF T_2958	ZP_05392958. 1	255526034	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
CcarbDRAF T_2281	ZP_05392281. 1	255525342	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
CcarbDRAF T_5296	ZP_05395295. 1	255528511	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
CcarbDRAF T_1615	ZP_05391615. 1	255524662	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
CcarbDRAF T_1304	ZP_05391304. 1	255524347	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
cooF	AAG29808.1	11095245	产氢菌 <i>Carboxydotothermus hydrogenoformans</i>
fdxN	CAA35699.1	46143	荚膜红细菌 (<i>Rhodobacter capsulatus</i>)
Rru_A2264	ABC23064.1	83576513	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)
Rru_A1916	ABC22716.1	83576165	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)
Rru_A2026	ABC22826.1	83576275	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)
cooF	AAC45122.1	1498747	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)
fdxN	AAA26460.1	152605	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>)
Alvin_2884	ADC63789.1	288897953	<i>Allochromatium vinosum DSM 180</i>
Fdx	YP_00280114 6.1	226946073	棕色固氮菌 (<i>Azotobacter vinelandii</i>) DJ
CKL_3790	YP_00139714 6.1	153956381	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>) DSM 555
fer1	NP_949965.1	39937689	沼泽红假单胞菌 (<i>Rhodopseudomonas palustris</i>) CGA009
Fdx	CAA12251.1	3724172	索氏菌 <i>Thauera aromatica</i>
CHY_2405	YP_361202.1	78044690	产氢菌 <i>Carboxydotothermus hydrogenoformans</i>
Fer	YP_359966.1	78045103	产氢菌 <i>Carboxydotothermus hydrogenoformans</i>
Fer	AAC83945.1	1146198	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)

[0310]

<i>fdx1</i>	NP_249053.1	15595559	绿脓假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>) PA01
<i>yfhL</i>	AP_003148.1	89109368	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K-12
<i>CLJU_c0093</i> 0	ADK13195.1	300433428	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c0001</i> 0	ADK13115.1	300433348	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c0182</i> 0	ADK13272.1	300433505	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c1798</i> 0	ADK14861.1	300435094	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c1797</i> 0	ADK14860.1	300435093	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c2251</i> 0	ADK15311.1	300435544	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c2668</i> 0	ADK15726.1	300435959	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
<i>CLJU_c2940</i> 0	ADK15988.1	300436221	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)

[0311] 铁氧还蛋白氧化还原酶将电子从铁氧还蛋白或黄素氧还蛋白转移到NAD(P)H。两种催化电子从还原铁氧还蛋白到NAD(P)+可逆转移的酶是铁氧还蛋白:NAD+氧化还原酶(EC 1.18.1.3)和铁氧还蛋白:NADP+氧化还原酶(FNR, EC 1.18.1.2)。铁氧还蛋白:NADP+氧化还原酶(FNR, EC 1.18.1.2)具有非共价结合的FAD辅因子,其促进电子从NADPH到低电位受体如铁氧还蛋白或黄素氧还蛋白的可逆转移(Blaschkowski et al., Eur. J. Biochem. 123: 563–569 (1982); Fujii et al., 1977)。由HP1164(fqrB)编码的幽门螺杆菌FNR,与丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶(PFOR)的活性相结合,得到丙酮酸依赖性NADPH生产(St et al. 2007)。在空肠弯曲杆菌中发现了类似的酶(St Maurice et al., J. Bacteriol. 189: 4764–4773 (2007))。铁氧还蛋白:NADP+氧化还原酶在大肠杆菌基因组中由fpr编码(Bianchi et al. 1993)。铁氧还蛋白:NAD+氧化还原酶利用还原铁氧还蛋白从NAD+生产NADH。在包括大肠杆菌在内的几种微生物中,该酶是多功能双加氧酶复合物的组件之一。由hcaD编码的大肠杆菌的铁氧还蛋白:NAD+氧化还原酶,是参与芳族酸利用的3-苯基丙酸双加氧体系的组成部分(Diaz et al. 1998)。NADH:铁氧还蛋白还原酶活性在嗜热产氢杆菌(*Hydrogenobacter thermophilus*)的细胞提取物中检测到,尽管尚未鉴定出具有该活性的基因(Yoon et al. 2006)。额外的铁氧还蛋白:NAD(P)+氧化还原酶已在食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)P7中找到。克氏梭菌中由nfnAB编码的NADH依赖性还原铁氧还蛋白:NADP氧化还原酶催化,用两当量NADPH催化对铁氧还蛋白和NAD+的伴随还原(Wang et al., J. Bacteriol. 192: 5115–5123 (2010))。最后,与节能膜相关的Rnf型蛋白质(Seedorf et al., PNAS 105: 2128–2133 (2008); 和Herrmann, J. Bacteriol. 190: 784–791 (2008))提供了从还原铁氧还蛋白生产NADH或NADPH。

[0312]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>fqrB</i>	NP_207955.1	15645778	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>)
<i>fqrB</i>	YP_001482096.1	157414840	空肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter jejuni</i>)
<i>RPA3954</i>	CAE29395.1	39650872	沼泽红假单胞菌 (<i>Rhodopseudomonas palustris</i>)
<i>Fpr</i>	BAH29712.1	225320633	嗜热产氢杆菌 (<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>)
<i>yumC</i>	NP_391091.2	255767736	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
<i>Fpr</i>	P28861.4	399486	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>hcaD</i>	AAC75595.1	1788892	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>LOC100282643</i>	NP_001149023.1	226497434	玉米 (<i>Zea mays</i>)
<i>NfnA</i>	YP_001393861.1	153953096	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>NfnB</i>	YP_001393862.1	153953097	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>CcarbDRAFT_2639</i>	ZP_05392639.1	255525707	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
<i>CcarbDRAFT_2638</i>	ZP_05392638.1	255525706	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
<i>CcarbDRAFT_2636</i>	ZP_05392636.1	255525704	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
<i>CcarbDRAFT_5060</i>	ZP_05395060.1	255528241	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7

[0313]

<i>CcarbDRAFT_2450</i>	ZP_05392450.1	255525514	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
<i>CcarbDRAFT_1084</i>	ZP_05391084.1	255524124	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
<i>RnfC</i>	EDK33306.1	146346770	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>RnfD</i>	EDK33307.1	146346771	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>RnfG</i>	EDK33308.1	146346772	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>RnfE</i>	EDK33309.1	146346773	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>RnfA</i>	EDK33310.1	146346774	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>RnfB</i>	EDK33311.1	146346775	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>CLJU_c11410</i> (<i>RnfB</i>)	ADK14209.1	300434442	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahlii</i>)
<i>CLJU_c11400</i> (<i>RnfA</i>)	ADK14208.1	300434441	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahlii</i>)
<i>CLJU_c11390</i> (<i>RnfE</i>)	ADK14207.1	300434440	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahlii</i>)
<i>CLJU_c11380</i> (<i>RnfG</i>)	ADK14206.1	300434439	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahlii</i>)
<i>CLJU_c11370</i> (<i>RnfD</i>)	ADK14205.1	300434438	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahlii</i>)
<i>CLJU_c11360</i> (<i>RnfC</i>)	ADK14204.1	300434437	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahlii</i>)
<i>MOTH_1518</i> (<i>NfnA</i>)	YP_430370.1	83590361	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
<i>MOTH_1517</i> (<i>NfnB</i>)	YP_430369.1	83590360	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
<i>CHY_1992</i> (<i>NfnA</i>)	YP_360811.1	78045020	产氢菌 <i>Carboxydothermus</i>

[0314]

			<i>hydrogenoformans</i>
<i>CHY_1993 (NfnB)</i>	YP_360812.1	78044266	产氢菌 <i>Carboxydotothermus hydrogenoformans</i>
<i>CLJU_c37220 (NfnAB)</i>	YP_003781850.1	300856866	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)

[0315] 甲酸脱氢酶

[0316] 甲酸脱氢酶(FDH)催化从甲酸向受体的电子可逆转移。参见图1步骤S。具有FDH活性的酶利用各种电子载体,例如NADH(EC 1.2.1.2)、NADPH(EC 1.2.1.43)、喹啉(EC 1.1.5.6)、细胞色素(EC 1.2.2.3)和氢化酶(EC 1.1.99.33)。已经在热醋穆尔氏菌(*Moorella thermoacetica*)中表征了FDH酶(Andreesen and Ljungdahl, J Bacteriol 116:867-873 (1973); Li et al., J Bacteriol 92:405-412 (1966); Yamamoto et al., J Biol Chem. 258:1826-1832 (1983))。位点Moth_2312负责编码甲酸脱氢酶的α亚基,而β亚基由Moth_2314编码(Pierce et al., Environ Microbiol (2008))。另一组编码具有CO₂还原性质的甲酸脱氢酶活性的基因,是由反氧化互营杆菌(*Syntrophobacter fumaroxidans*)的Sfum_2703至Sfum_2706编码(de Bok et al., Eur J Biochem. 270:2476-2485 (2003)); Reda et al., PNAS 105:10654-10658 (2008))。假定执行相同功能的相似基因集合由产氢菌*Carboxydotothermus hydrogenoformans*中的CHY_0731、CHY_0732和CHY_0733编码(Wu et al., PLoS Genet 1:e65 (2005))。还在许多额外的微生物中发现甲酸脱氢酶,包括食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)P7、甲醇芽孢杆菌(*Bacillus methanolicus*)、稳定伯克霍尔德菌(*Burkholderia stabilis*)、热醋穆尔氏菌(*Moorella thermoacetica*)ATCC 39073、博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)、假丝酵母(*Candida methylica*)和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)S288c。来自真养劳尔氏菌(*Ralstonia eutropha*)的可溶性甲酸脱氢酶还原NAD⁺(fdsG、-B、-A、-C、-D)(Oh and Bowien, 1998)。

[0317] 已经鉴定出对辅因子NADP的特异性高于NAD的几种甲酸脱氢酶。该酶被认为是NADP依赖性甲酸脱氢酶,且已在5种洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cepacia*)复合体中发现。其在多噬伯克霍尔德菌(*Burkholderia multivorans*)、稳定伯克霍尔德菌(*Burkholderia stabilis*)、吡咯伯克霍尔德菌(*Burkholderia pyrrocinia*)和洋葱伯克霍尔德菌(*Burkholderia cenocepacia*)的多种菌株中进行了测试和验证(Hatrongjit et al., Enzyme and Microbial Tech., 46:557-561 (2010))。已经表征了来自稳定伯克霍尔德菌(*Burkholderia stabilis*)的酶,且该酶对于甲酸、NADP和NAD的酶表观K_m分别为55.5mM、0.16mM和1.43mM。可以使用公开数据库(如NCBI、JGI和宏基因组数据库)中存储的蛋白质的序列同源性鉴定更多的候选基因。

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
Moth_2312	YP_431142	148283121	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Moth_2314	YP_431144	83591135	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
Sfum_2703	YP_846816.1	116750129	反氧化互营杆菌 (<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>)
Sfum_2704	YP_846817.1	116750130	反氧化互营杆菌 (<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>)
Sfum_2705	YP_846818.1	116750131	反氧化互营杆菌 (<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>)
Sfum_2706	YP_846819.1	116750132	反氧化互营杆菌 (<i>Syntrophobacter fumaroxidans</i>)
[0318]	CHY_0731	YP_359585.1	产氢菌 <i>Carboxydothermus hydrogenoformans</i>
	CHY_0732	YP_359586.1	产氢菌 <i>Carboxydothermus hydrogenoformans</i>
	CHY_0733	YP_359587.1	产氢菌 <i>Carboxydothermus hydrogenoformans</i>
	CcarbDRAFT_0901	ZP_05390901.1	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
CcarbDRAFT_4380	ZP_05394380.1	255527512	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
fdhA, MGA3_06625	EIJ82879.1	387590560	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) MGA3
fdhA, PB1_11719	ZP_10131761.1	387929084	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) PB1
fdhD, MGA3_06630	EIJ82880.1	387590561	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) MGA3
fdhD, PB1_11724	ZP_10131762.1	387929085	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus</i>

			<i>methanolicus</i>) PB1
fdh	ACF35003.	194220249	稳定伯克霍尔德菌 (<i>Burkholderia stabilis</i>)
FDH1	AAC49766.1	2276465	博伊丁假丝酵母 (<i>Candida boidinii</i>)
fdh	CAA57036.1	1181204	假丝酵母 <i>Candida methylica</i>
FDH2	P0CF35.1	294956522	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) S288c
FDH1	NP_015033.1	6324964	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) S288c
[0319] fdsG	YP_725156.1	113866667	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutrophpha</i>)
fdsB	YP_725157.1	113866668	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutrophpha</i>)
fdsA	YP_725158.1	113866669	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutrophpha</i>)
fdsC	YP_725159.1	113866670	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutrophpha</i>)
fdsD	YP_725160.1	113866671	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutrophpha</i>)

[0320] 图1步骤A-甲醇脱氢酶

[0321] NAD⁺依赖性甲醇脱氢酶(EC 1.1.1.244)催化甲醇和NAD⁺转化为甲醛和NADH,这是甲醇氧化途径的第一步。具有此活性的酶首先在甲醇芽孢杆菌(*Bacillus methanolicus*)中表征(Heggeset, et al., Applied and Environmental Microbiology, 78(15):5170-5181 (2012))。该酶是依赖于锌和镁的,并且酶活性通过act编码的活化酶得到增强(Kloosterman et al, J Biol Chem 277:34785-92 (2002))。该作用是Nudix水解酶。已经确定了这些候选物中的数种,并证实其具有甲醇活性。附加的NAD(P)⁺依赖性酶可以通过序列同源性鉴定。利用不同电子受体的甲醇脱氢酶也是本领域已知的。示例包括细胞色素依赖性酶,例如扭脱甲基杆菌(*Methylobacterium extorquens*)的mxaIF(Nunn et al, Nucl Acid Res 16:7722 (1988))。甲烷氧化菌,荚膜甲基球菌(*Methylococcus capsulatus*),在例如与甲烷单加氧酶(MMO)的复合物中起作用(Myronova et al, Biochem 45:11905-14 (2006))。甲醇也可以通过醇氧化酶如博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)的甲醇氧化酶(EC 1.1.3.13)氧化成甲醛(Sakai et al, Gene 114:67-73 (1992))。

[0322]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
mdh, MGA3_17392	EIJ77596.1	387585261	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) MGA3
mdh2, MGA3_07340	EIJ83020.1	387590701	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) MGA3
mdh3, MGA3_10725	EIJ80770.1	387588449	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) MGA3
act, MGA3_09170	EIJ83380.1	387591061	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) MGA3
mdh, PB1_17533	ZP_10132907.1	387930234	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) PB1
mdh1, PB1_14569	ZP_10132325.1	387929648	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) PB1
mdh2, PB1_12584	ZP_10131932.1	387929255	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) PB1
act, PB1_14394	ZP_10132290.1	387929613	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) PB1
BFZC1_05383	ZP_07048751.1	299535429	纺锤形赖氨酸芽孢杆菌 (<i>Lysinibacillus fusiformis</i>)
BFZC1_20163	ZP_07051637.1	299538354	纺锤形赖氨酸芽孢杆菌 (<i>Lysinibacillus fusiformis</i>)
Bspf_4187	YP_001699778.1	169829620	球形芽孢杆菌 (<i>Lysinibacillus sphaericus</i>)
Bspf_1706	YP_001697432.1	169827274	球形芽孢杆菌 (<i>Lysinibacillus sphaericus</i>)
mdh2	YP_004681552.1	339322658	钩虫贪铜菌 (<i>Cupriavidus necator</i>) N-1
nudF1	YP_004684845.1	339325152	钩虫贪铜菌 (<i>Cupriavidus necator</i>) N-1
BthaA_010200007655	ZP_05587334.1	257139072	泰国伯克霍尔德菌 (<i>Burkholderia thailandensis</i>) E264
BTH_I1076 (MutT/NUDIX NTP 焦磷酸酶)	YP_441629.1	83721454	泰国伯克霍尔德菌 (<i>Burkholderia thailandensis</i>) E264

[0323]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
BalcAV_11743	ZP_10819291.1	402299711	嗜碱芽孢杆菌 (<i>Bacillus alcalophilus</i>) ATCC 27647
BalcAV_05251	ZP_10818002.1	402298299	嗜碱芽孢杆菌 (<i>Bacillus alcalophilus</i>) ATCC 27647
乙醇脱氢酶	YP_001447544	156976638	哈维氏弧菌 (<i>Vibrio harveyi</i>) ATCC BAA-1116
P3TCK_27679	ZP_01220157.1	90412151	嗜压发光菌 (<i>Photobacterium profundum</i>) 3TCK
乙醇脱氢酶	YP_694908	110799824	产气荚膜梭菌 (<i>Clostridium perfringens</i>) ATCC 13124
adhB	NP_717107	24373064	奥奈达希瓦氏菌 (<i>Shewanella oneidensis</i>) MR-1
乙醇脱氢酶	YP_237055	66047214	丁香假单胞菌 (<i>Pseudomonas syringae</i>) pv. <i>syringae</i> B728a
乙醇脱氢酶	YP_359772	78043360	产氢菌 <i>Carboxydothermus hydrogenoformans</i> Z-2901
乙醇脱氢酶	YP_003990729	312112413	泥土芽孢杆菌 (<i>Geobacillus</i>) sp. Y4.1MC1
PpeoK3_0101000184 71	ZP_10241531.1	390456003	皮氏类芽孢杆菌 (<i>Paenibacillus peoriae</i>) KCTC 3763
OBE_12016	EKC54576	406526935	人类胃宏基因组
乙醇脱氢酶	YP_001343716	152978087	产琥珀酸放线杆菌 (<i>Actinobacillus succinogenes</i>) 130Z
dhaT	AAC45651	2393887	巴斯德梭菌 (<i>Clostridium pasteurianum</i>) DSM 525
乙醇脱氢酶	NP_561852	18309918	产气荚膜梭菌 (<i>Clostridium perfringens</i>) str. 13
BAZO_10081	ZP_11313277.1	410459529	产氮芽孢杆菌 (<i>Bacillus azotoformans</i>) LMG 9581
乙醇脱氢酶	YP_007491369	452211255	马氏甲烷八叠球菌 (<i>Methanosarcina mazei</i>) Tuc01
乙醇脱氢酶	YP_004860127	347752562	凝结芽孢杆菌 (<i>Bacillus coagulans</i>) 36D1

[0324]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
乙醇脱氢酶	YP_002138168	197117741	铁还原泥土杆菌(<i>Geobacter bemandjiensis</i> Bem)
DesmeDRAFT_1354	ZP_08977641.1	354558386	金属还原脱亚硫酸菌(<i>Desulfitobacterium metallireducens</i>) DSM 15288
乙醇脱氢酶	YP_001337153	152972007	克雷伯氏肺炎杆菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>) subsp. <i>pneumoniae</i> MGH 78578
乙醇脱氢酶	YP_001113612	134300116	还原脱硫肠状菌(<i>Desulfotomaculum reducens</i>) MI-1
乙醇脱氢酶	YP_001663549	167040564	高温无氧杆菌(<i>Thermoanaerobacter</i>) sp. X514
ACINNAV82_2382	ZP_16224338.1	421788018	鲍氏不动杆菌(<i>Acinetobacter baumannii</i>) Naval-82
乙醇脱氢酶	YP_005052855	374301216	非洲脱硫弧菌(<i>Desulfovibrio africanus</i>) str. Walvis Bay
乙醇脱氢酶	AGF87161	451936849	未培养生物
DesfrDRAFT_3929	ZP_07335453.1	303249216	脱硫弧菌 <i>Desulfovibrio fructosovorans</i> JJ
乙醇脱氢酶	NP_617528	20091453	乙酸甲烷八叠球菌(<i>Methanosarcina acetivorans</i>) C2A
乙醇脱氢酶	NP_343875.1	15899270	硫矿硫化叶菌(<i>Sulfolobus solfataricus</i>) P-2
adh4	YP_006863258	408405275	氨氧化古细菌 <i>Nitrososphaera gargensis</i> Ga9.2
Ta0841	NP_394301.1	16081897	嗜酸热原体菌(<i>Thermoplasma acidophilum</i>)
PTO1151	YP_023929.1	48478223	灼热嗜酸古菌(<i>Picrophilus torridus</i>) DSM9790
乙醇脱氢酶	ZP_10129817.1	387927138	甲醇芽孢杆菌(<i>Bacillus methanolicus</i>) PB-1

[0325]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
cgR_2695	YP_001139613.1	145296792	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) R
乙醇脱氢酶	YP_004758576.1	340793113	变异棒状杆菌 (<i>Corynebacterium variabile</i>)
HMPREF1015_01790	ZP_09352758.1	365156443	史氏芽孢杆菌 (<i>Bacillus smithii</i>)
ADH1	NP_014555.1	6324486	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
NADH 依赖性丁醇脱氢酶 A	YP_001126968.1	138896515	嗜热解烃泥土芽孢杆菌 (<i>Geobacillus themodenitrificans</i>) NG80-2
乙醇脱氢酶	WP_007139094.1	494231392	嗜冷黄杆菌 (<i>Flavobacterium frigoris</i>)
甲醇脱氢酶	WP_003897664.1	489994607	耻垢分枝杆菌 (<i>Mycobacterium smegmatis</i>)
ADH1B	NP_000659.2	34577061	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
PMI01_01199	ZP_10750164.1	399072070	柄杆菌 (<i>Caulobacter</i>) sp. AP07
YiaY	YP_026233.1	49176377	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
MCA0299	YP_112833.1	53802410	荚膜甲基球菌 (<i>Methylococcus capsulatus</i>)
MCA0782	YP_113284.1	53804880	荚膜甲基球菌 (<i>Methylococcus capsulatus</i>)
mxal	YP_002965443.1	240140963	扭脱甲基杆菌 (<i>Methylobacterium extorquens</i>)
mxaf	YP_002965446.1	240140966	扭脱甲基杆菌 (<i>Methylobacterium extorquens</i>)
AOD1	AAA34321.1	170820	博伊丁假丝酵母 (<i>Candida boidinii</i>)
假设蛋白GOS_19204 37	EDA87976.1	142827286	海洋宏基因组 (<i>Marine metagenome</i>) <i>JCVI_SCAF_1096627185304</i>

[0326]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
乙醇脱氢酶	CAA80989.1	580823	嗜热脂肪泥土芽孢杆菌 (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)

[0327] 开发了一种体内测定来确定甲醇脱氢酶的活性。该测定依赖于甲醛 (HCHO) 检测来测量酶的正向活性(甲醇的氧化)。为此,使用Lambda Red重组酶技术制备了包含BDOP并缺乏frmA、frmB、frmR的菌株 (Datsenko and Wanner, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 6 97 (12) : 6640-5 (2000)。将表达甲醇脱氢酶的质粒转化到菌株中,然后在37℃下,在LB培养基+抗生素中摇动生长至饱和。用空载体转化该菌株,作为阴性对照。以OD调整培养物,然后以1:10稀释到M9培养基+0.5%葡萄糖+抗生素中,并在37℃下振荡培养6-8小时,直到对数后期为止。将甲醇加入到2%v/v,并将培养物在37℃下进一步振荡培养30分钟。离心培养物,根据制造商的说明书,使用DETECTX甲醛检测试剂盒 (Arbor Assays; Ann Arbor, MI) 测定上清液中的甲醛生产量。frmA、frmB、frmR删除导致天然甲醛利用途径被删除,从而能够形成可用于检测非天然存在微生物中的甲醇脱氢酶活性的甲醛。

[0328] 使用上述测定法测量几种酶的活性。下面的表5提供了四个独立实验的结果。

[0329] 表5:体内测定的结果,显示各种包含有甲醇脱氢酶表达质粒的非天然存在微生物的甲醛 (HCHO) 生产。

[0330]

登录号	HCHO (μM)	登录号	HCHO (μM)	登录号	HCHO (μM)	登录号	HCHO (μM)
<u>实验 1</u>		<u>实验 2</u>		<u>实验 3</u>		<u>实验 4</u>	
EIJ77596.1	>50	EIJ77596.1	>50	EIJ77596.1	>50	EIJ77596.1	>20
EIJ83020.1	>20	NP_00659.2	>50	NP_561852	>50	ZP_11313277.1	>50
EIJ80770.1	>50	YP_004758576.1	>20	YP_002138168	>50	YP_001113612	>50
ZP_10132907.1	>20	ZP_09352758.1	>50	YP_026233.1	>50	YP_001447544	>20
ZP_10132325.1	>20	ZP_10129817.1	>20	YP_001447544	>50	AGF87161	>50
ZP_10131932.1	>50	YP_001139613.1	>20	宏文库	>50	EDA87976.1	>20
ZP_07048751.1	>50	NP_014555.1	>10	YP_359772	>50	空载体	-0.8
YP_001699778.1	>50	WP_007139094.1	>10	ZP_01220157.1	>50		
YP_004681552.1	>10	NP_343875.1	>1	ZP_07335453.1	>20		
ZP_10819291.1	<1	YP_006863258	>1	YP_001337153	>20		
空载体	2.33	NP_394301.1	>1	YP_694908	>20		

[0331]

	ZP_10750164. 1	>1	NP_717107	>20	
	YP_023929.1	>1	AAC45651	>10	
	ZP_08977641. 1	<1	ZP_11313277. 1	>10	
	ZP_10117398. 1	<1	ZP_16224338. 1	>10	
	YP_00410804 5.1	<1	YP_001113612	>10	
	ZP_09753449. 1	<1	YP_004860127	>10	
	空载体	0.17	YP_003310546	>10	
			YP_001343716	>10	
			NP_717107	>10	
			YP_002434746	>10	
			空载体	0.11	

[0332] 甲醛脱氢酶

[0333] 甲醛氧化成甲酸,由甲醛脱氢酶催化。当使用甲醇作为碳源时,宿主的天然甲醛脱氢酶可以作为消除或减弱的靶标,特别是当它与图1所示的甲醛同化反应竞争并令其降低时。恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的fdhA编码NAD⁺依赖性甲醛脱氢酶(Ito et al, J Bacteriol 176:2483-2491 (1994))。另外的甲醛脱氢酶包括来自查氏生丝微菌(*Hyphomicrobium zavarzinii*)的NAD⁺和谷胱甘肽独立性甲醛脱氢酶(Jerome et al, Appl Microbiol Biotechnol 77:779-88 (2007)),巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)的谷胱甘肽依赖性甲醛脱氢酶(Sunga et al, Gene 330:39-47 (2004))和嗜盐嗜碱甲烷氧化菌(*Methylobacter marinus*)的NAD(P)⁺依赖性甲醛脱氢酶(Speer et al, FEMS Microbiol Lett, 121 (3) :349-55 (1994))。

[0334]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>fdhA</i>	P46154.3	1169603	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>faoA</i>	CAC85637.1	19912992	查氏生丝微菌 (<i>Hyphomicrobium zavarzinii</i>)
<i>Fld1</i>	CCA39112.1	328352714	巴斯德毕赤酵母 (<i>Pichia pastoris</i>)
<i>fdh</i>	P47734.2	221222447	嗜盐嗜碱甲烷氧化菌 (<i>Methylobacter marinus</i>)

[0335] 除了上述甲醛脱氢酶之外,用于将甲醛转化为甲酸的替代酶和途径是本领域已知的。例如,许多微生物使用谷胱甘肽依赖性甲醛氧化途径,其中甲醛通过中间体S-羟甲基谷

胱甘肽和S-甲酰基谷胱甘肽三步转化为甲酸(Vorholt et al, J Bacteriol 182:6645-50 (2000))。该途径的酶是S-(羟甲基)谷胱甘肽合成酶(EC 4.4.1.22)、谷胱甘肽依赖性甲醛脱氢酶(EC 1.1.1.284)和S-甲酰基谷胱甘肽水解酶(EC 3.1.2.12)。

[0336] 一氧化碳脱氢酶(CODH)

[0337] CODH是一种可逆酶,其可以以获得或失去电子为代价令CO和CO₂相互转化。ACS/CODH复合物中的CODH的天然生理作用,是通过乙酰辅酶A合成酶将CO₂转化为CO以合入乙酰辅酶A。但是,由于这种CODH酶的可逆性质,其适于从CO中提取还原当量。在不存在ACS的情形中表达这样的CODH酶,可以使其在与其天然生理作用(即,CO氧化)相反的方向起作用。

[0338] 在热醋穆尔氏菌(*Moorella thermoacetica*),产氢菌*Carboxydothermus hydrogenoformans*,食一氧化碳梭菌(*Clostridium carboxidivorans*)P7和其他几种微生物中,额外的CODH编码基因位于ACS/CODH操纵子之外。这些酶提供了从一氧化碳向二氧化碳转化中提取电子(或还原当量)的方法。热醋穆尔氏菌基因(Genbank登录号:YP_430813)本身在操纵子中表达,并被认为在“乒乓”反应中将电子从CO转移到外部介体如铁氧还蛋白。然后,还原的介体偶联到其它还原的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NAD(P)H)载体或铁氧还蛋白依赖性细胞过程(Ragsdale, Annals of the New York Academy of Sciences 1125:129-136 (2008))。对编码产氢菌*Carboxydothermus hydrogenoformans*的CODH-II和相邻蛋白CooF的基因进行克隆并测序(Gonzalez and Robb, FEMS Microbiol Lett. 191: 243-247 (2000))。所得是膜结合复合物,但证实CODH-II的细胞质组分催化NADPH的形成,表明其具有合成代谢作用(Svetlitchnyi et al., J Bacteriol. 183:5134-5144 (2001))。CODH-II的晶体结构也是已知的(Dobbek et al., Science 293:1281-1285 (2001))。类似的无ACS的CODH酶可以在各种微生物中发现,包括金属还原泥土芽孢杆菌(*Geobacter metallireducens*)GS-15,褐杆状绿菌(*Chlorobium phaeobacteroides*)DSM 266,解纤维梭菌(*Clostridium cellulolyticum*)H10,硫酸脱硫弧菌(*Desulfovibrio desulfuricans*)subsp.*desulfuricans* str. ATCC27774,甲醇降解暗杆菌(*Pelobacter carbinolicus*)DSM 2380,永达尔梭菌(*Clostridium ljungdahli*)和曲形弯曲杆菌(*Campylobacter curvus*)525.92。

[0339]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
CODH(假定)	YP_430813	83590804	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
CODH-II(CooS-II)	YP_358957	78044574	产氢菌 <i>Carboxydothermus hydrogenoformans</i>
CooF	YP_358958	78045112	产氢菌 <i>Carboxydothermus hydrogenoformans</i>

[0340]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
CODH (假定)	ZP_05390164.1	255523193	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
CcarbDRAFT_0341	ZP_05390341.1	255523371	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
CcarbDRAFT_1756	ZP_05391756.1	255524806	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
CcarbDRAFT_2944	ZP_05392944.1	255526020	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7
CODH	YP_384856.1	78223109	硫还原泥土芽孢杆菌 (<i>Geobacter metallireducens</i>) GS-15
Cpha266_0148 (细胞色素c)	YP_910642.1	119355998	褐杆状绿菌 (<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>) DSM 266
Cpha266_0149 (CODH)	YP_910643.1	119355999	褐杆状绿菌 (<i>Chlorobium phaeobacteroides</i>) DSM 266
Ccel_0438	YP_002504800.1	220927891	解纤维梭菌 (<i>Clostridium cellulolyticum</i>) H10
Ddes_0382 (CODH)	YP_002478973.1	220903661	硫酸脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>) subsp. <i>desulfuricans</i> str. ATCC 27774
Ddes_0381 (CooC)	YP_002478972.1	220903660	硫酸脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>) subsp. <i>desulfuricans</i> str. ATCC 27774
Pcar_0057 (CODH)	YP_355490.1	7791767	甲醇降解暗杆菌 (<i>Pelobacter carbinolicus</i>) DSM 2380
Pcar_0058 (CooC)	YP_355491.1	7791766	甲醇降解暗杆菌 (<i>Pelobacter carbinolicus</i>) DSM 2380
Pcar_0058 (HypA)	YP_355492.1	7791765	甲醇降解暗杆菌 (<i>Pelobacter carbinolicus</i>) DSM 2380
CooS (CODH)	YP_001407343.1	154175407	曲形弯曲杆菌 (<i>Campylobacter curvus</i>) 525.92
CLJU_c09110	ADK13979.1	300434212	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)
CLJU_c09100	ADK13978.1	300434211	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)

[0341]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
CLJU_c09090	ADK13977.1	300434210	永达尔梭菌 (<i>Clostridium ljungdahli</i>)

[0342] 实施例VI

[0343] 甲醛固定(或同化)方法

[0344] 在此提供的是甲醛利用的示例性途径,例如由甲醇的氧化(参见例如图1的步骤A)或甲酸同化产生的甲醛,其中将甲醛用于某些中心代谢途径的中间体形成,所述中间体可用于本申请公开的化合物的生产。

[0345] 甲醇氧化生产的甲醛的一个利用示例性途径如图1所示,其包括甲醛和D-核酮糖-5-磷酸在己糖-6-磷酸合成酶作用下缩合以形成己糖-6-磷酸(h6p)(图1,步骤B)。可以使用Mg²⁺或Mn²⁺得到最大的活性,但其他金属离子也是有用的,甚至可以考虑非金属离子依赖性机制。H6p通过6-磷酸-3-己糖异构酶转化为果糖-6-磷酸(图1,步骤C)。

[0346] 涉及由甲醇氧化生产的甲醛的解毒和同化的另一个示例性途径如图1所示,并通过二羟基丙酮进行。二羟基丙酮合成酶是一种特殊的转酮酶,它首先将糖醛基团从木酮糖-5-磷酸转移到甲醛中,从而形成二糖羟基丙酮(DHA)和甘油醛-3-磷酸(G3P),其是糖酵解的一个中间体(图1)。从DHA合成酶获得的DHA,可进一步磷酸化以形成DHA磷酸,并被同化为糖酵解和其他几种途径(图1)。可选地,或附加地,可以使用果糖-6-磷酸醛缩酶催化DHA和G3P转化为果糖-6-磷酸(图1步骤Z)。

[0347] 图1,步骤B和C:己糖-6-磷酸合成酶(步骤B)和6-磷酸-3-己糖异构酶(步骤C)

[0348] 己酮糖-6-磷酸合成酶和6-磷酸-3-己糖异构酶见于几种微生物中,其中包括甲醇营养生物和甲基生物,并从所述生物中进行纯化(Kato et al., 2006, BioSci Biotechnol Biochem. 70 (1): 10-21)。此外,这些酶已在异养菌如枯草芽孢杆菌中发现,并在其中参与甲醛解毒(Mitsui et al., 2003, AEM 69 (10): 6128-32, Yasueda et al., 1999. J Bac 181 (23): 7154-60)。甲基营养细菌胃分支杆菌(*Mycobacterium gastri*)MB19中的这两种酶的基因已经融合,并且携带hps-phi构建体的大肠杆菌株证实更有效地利用甲醛(Orita et al., 2007, Appl Microbiol Biotechnol. 76: 439-445)。在一些微生物中,这两种酶天然存在为双功能的融合型。

[0349] 己糖-6-磷酸合成酶的示例性候选基因是:

[0350]

蛋白 质	GenBank ID	GI 号	生物体
Hps	AAR39392.1	40074227	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) MGA3

[0351]

Hps	EIJ81375.1	387589055	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) PB1
RmpA	BAA83096.1	5706381	甲基单胞菌 <i>Methylomonas aminofaciens</i>
RmpA	BAA90546.1	6899861	胃分支杆菌 (<i>Mycobacterium gastri</i>)
YckG	BAA08980.1	1805418	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
Hps	YP_544362.1	91774606	鞭毛甲基菌 (<i>Methylobacillus flagellatus</i>)
Hps	YP_545763.1	91776007	鞭毛甲基菌 (<i>Methylobacillus flagellatus</i>)
Hps	AAG29505.1	11093955	氨基单胞菌 <i>Aminomonas aminovorus</i>
SgbH	YP_004038706.1	313200048	甲基菌 (<i>Methylovorus</i>) sp. MP688
Hps	YP_003050044.1	253997981	嗜葡萄糖甲基菌 (<i>Methylovorus glucosetrophus</i>) SIP3-4
Hps	YP_003990382.1	312112066	泥土芽孢杆菌 (<i>Geobacillus</i>) sp. Y4.1MC1
Hps	gb AAR91478.1	40795504	泥土芽孢杆菌 (<i>Geobacillus</i>) sp. M10EXG
Hps	YP_007402409.1	448238351	泥土芽孢杆菌 (<i>Geobacillus</i>) sp. GHH01

[0352] 6-磷酸-3-己糖异构酶的示例性候选基因是：

[0353]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
Phi	AAR39393.1	40074228	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) MGA3
Phi	EIJ81376.1	387589056	甲醇芽孢杆菌 (<i>Bacillus methanolicus</i>) PB1
Phi	BAA83098.1	5706383	甲基单胞菌 <i>Methylomonas aminofaciens</i>
RmpB	BAA90545.1	6899860	胃分支杆菌 (<i>Mycobacterium gastri</i>)
Phi	YP_545762.1	91776006	鞭毛甲基菌 (<i>Methylobacillus flagellatus</i>) KT
Phi	YP_003051269.1	253999206	嗜葡萄糖甲基菌 (<i>Methylovorus</i>)

[0354]

			<i>glucosetrophus</i>) SIP3-4
Phi	YP_003990383.1	312112067	泥土芽孢杆菌 (<i>Geobacillus</i>) sp. Y4.1MC1
Phi	YP_007402408.1	448238350	泥土芽孢杆菌 (<i>Geobacillus</i>) sp. GHH01

[0355] 将所述功能融合到单个开放阅读框中的候选酶包括以下

[0356]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
PH1938	NP_143767.1	14591680	掘越氏热球菌 (<i>Pyrococcus horikoshii</i>) OT3
PF0220	NP_577949.1	18976592	强烈热球菌 (<i>Pyrococcus furiosus</i>)
TK0475	YP_182888.1	57640410	超好热始原菌 (<i>Thermococcus kodakaraensis</i>)
PAB1222	NP_127388.1	14521911	深海热球菌 (<i>Pyrococcus abyssi</i>)
MCA2738	YP_115138.1	53803128	荚膜甲基球菌 (<i>Methylococcus capsulatus</i>)
Metal_3152	EIC30826.1	380884949	白色甲基微菌 (<i>Methylomicrobium album</i>) BG8

[0357] 图1,步骤D-二羟基丙酮合成酶

[0358] 博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*) 中的二羟基丙酮合成酶,使用焦磷酸硫胺素和Mg²⁺作为辅因子,并且位于过氧化物酶体中。来自甲醇生长的羧酸杆菌 (*Mycobacter* sp. strain JC1 DSM 3803) 的酶也被发现具有DHA合成酶和激酶活性 (Ro et al., 1997, JBac 179 (19) :6041-7)。来自该生物的DHA合成酶还具有与来自博伊丁假丝酵母的酶类似的辅因子要求。据报道,甲醛和木酮糖5-磷酸的K_ms分别为1.86mM和33.3μM。除了仅结核分枝杆菌外,其他几种分枝杆菌可以使用甲醇作为碳和能量的唯一来源,且据报道使用二羟基丙酮合成酶 (Part et al., 2003, JBac 185 (1) :142-7)。

[0359]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
DAS1	AAC83349.1	3978466	博伊丁假丝酵母 (<i>Candida boidinii</i>)
HPODL_2613	EFW95760.1	320581540	<i>Ogataea parapolymorpha</i> DL-1 (多)

[0360]			形汉逊酵母 (<i>Hansenula polymorpha</i>) DL-1)
	AAG12171.2	18497328	分支杆菌 (<i>Mycobacter</i>) sp. strain JC1 DSM 3803

[0361] 图1,步骤Z:果糖-6-磷酸醛缩酶

[0362] 果糖-6-磷酸醛缩酶(F6P醛缩酶)可以催化二羟基丙酮(DHA)和甘油醛-3-磷酸(G3P)结合形成果糖-6-磷酸。该活性最近在大肠杆菌中发现,相应的候选基因称为fsa(Schurmann and Sprenger, J.Biol.Chem., 2001, 276 (14), 11055-11061)。该酶具有窄底物特异性,不能使用果糖、果糖-1-磷酸、果糖1,6-二磷酸果糖或磷酸二羟丙酮。但是,它可以使用羟基丁酮和丙酮醇来代替DHA。纯化的酶显示的果糖6-磷酸裂解V_{max}(30℃, pH为8.5, 50mm甘氨酰甘氨酸缓冲液中)为7单位/mg蛋白质。对于醛醇化反应,V_{max}为45单位/mg蛋白质;果糖6-磷酸的底物V_{max}值为9mM,对于二羟基丙酮为35mM,对于甘油醛-3-磷酸为0.8mM。该酶优先相对于切割反应优先选择醛醇形成。

[0363] 通过引入点突变,可以增强大肠杆菌酶对DHA的选择性。例如,以Kcat/Km计,突变A129S令对DHA的反应性增强超过17倍(Gutierrez et al., Chem Commun (Camb), 2011, 47 (20), 5762-5764)。与野生型酶相比,相同的突变将对羟丙酰丙酮的催化效率降低了3倍以上,将对醛糖的亲和力降低了3倍以上(Castillo et al., Advanced Synthesis & Catalysis, 352 (6), 1039-1046)。通过序列同源性,在其他基因组中发现了类似于fsa的基因。下面列出了一些示例性的候选基因。

Gene	蛋白质 登录号.	GI 号	生物体
fsa	AAC73912.2	87081788	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
talC	AAC76928.1	1790382	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
fsa	WP_017209835.1	515777235	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
DR_1337	AAF10909.1	6459090	耐辐射奇球菌 (<i>Deinococcus radiodurans</i>) R1
talC	NP_213080.1	15605703	超耐热菌 (<i>Aquifex aeolicus</i>) VF5
MJ_0960	NP_247955.1	15669150	詹氏甲烷球菌 (<i>Methanocaldococcus janaschii</i>)
mipB	NP_993370.2	161511381	鼠疫杆菌 (<i>Yersinia pestis</i>)

[0365] 如下所述,在DHA途径中使用F6P醛缩酶具有能量优势。通过甲醇氧化形成的甲醛的同化,可以通过二羟基丙酮(DHA)途径(步骤D,图1)或核酮糖单磷酸(RuMP)途径(步骤B和C,图1)进行。在RuMP途径中,甲醛与核酮糖-5-磷酸结合形成F6P。然后F6P通过糖酵解代谢,或用于核酮糖-5-磷酸再生,以进一步进行甲醛同化。值得注意的是,通过RuMP途径从甲醛和核酮糖-5-磷酸形成F6P,不需要ATP水解。

[0366] 相比之下,在DHA途径中,甲醛与木酮糖-5-磷酸(X5P)结合形成二羟基丙酮(DHA)和甘油醛-3-磷酸(G3P)。部分DHA和G3P必须被代谢为F6P,以使木酮糖-5-磷酸再生。在标准DHA途径中,DHA和G3P通过三种酶转化为F6P:DHA激酶、果糖二磷酸醛缩酶和果糖二磷酸酶。DHA和G3P到F6P的净转化,需要ATP水解,如下所述。首先,以ATP为代价,通过DHA激酶使DHA磷酸化,形成DHA磷酸(DHAP)。然后,将DHAP和G3P通过果糖二磷酸醛缩酶合并,形成果糖-1,6-二磷酸(FDP)。FDP通过果糖二磷酸酶转化为F6P,从而浪费高能磷酸键。

[0367] 如果DHA合成酶与F6P醛缩酶组合起作用,而不是与DHA激酶、果糖二磷酸醛缩酶和果糖二磷酸酶组合,则能够实现更为ATP有效的反应序列。F6P醛缩酶可以直接将DHA和G3P转化为F6P,从而避免ATP水解的需要。总的来说,当与F6P醛缩酶组合时,DHA合成酶在能量需求方面与RuMP途径相同。在ATP需求方面,这两种甲醛同化选项(即RuMP途径、DHA合成酶+F6P醛缩酶)优于DHA合成酶与DHA激酶、果糖二磷酸醛缩酶和果糖二磷酸酶组合。

[0368] 实施例VII

[0369] 甲醇转化为CO₂的体内标记试验

[0370] 该实施例描述了微生物中的功能性甲醇途径。

[0371] 删除了功能性还原型TCA分支和丙酮酸甲酸裂解酶的菌株在LB培养基中有氧生长过夜,然后接种含有IPTG的M9高种子培养基并有氧生长4小时。在甲醛脱氢酶或甲酸脱氢酶存在和不存在下,这些菌株具有甲醇脱氢酶/ACT对。ACT是一种活化蛋白(Nudix水解酶)。此时,将菌株沉淀,重新悬浮于含有2%¹³CH₃OH的新鲜M9培养基高种子培养基中,并密封在无氧小瓶中。将顶部空间用氮气替代,菌株在37°C下生长40小时。在生长后,分析顶空中的¹³CO₂。检查介质中残留的甲醇以及1,4-丁二醇和副产物。与含有空载体对照的菌株相比,表达甲醇脱氢酶(MeDH)突变体和MeDH/ACT对的所有构建体生长到略低的OD值。这可能是由于这些结构的高表达(数据未显示)。在Fa1DH、FDH或无共表达蛋白存在下,一个构建体(2315/2317)相对于对照物显示出标记CO₂的显著积累。这表明大肠杆菌中具有功能性MeOH途径,并且内源性谷胱甘肽依赖性甲醛解毒基因(frmAB)足以携带由当前MeDH/ACT构建体生产的通量。

[0372] 2315是来自甲醇芽孢杆菌(*Bacillus methanolicus*)MGA3(GenBank登录号:EIJ77596.1;GI号:387585261)的MeDH的内部实验室命名,2317是来自同一微生物的活化蛋白(基因座标签:MGA3_09170;GenBank登录号:EIJ83380;GI号:387591061)的内部实验室命名。

[0373] 来自甲醇芽孢杆菌的NADH依赖性MeDH的序列分析,表明该酶属于醇脱氢酶家族III。它不含任何色氨酸残基,导致低消光系数(18,500M⁻¹,cm⁻¹),应通过考马斯染色在SDS凝胶上检测。

[0374] 该酶已被表征为由每个亚基含有1个Zn和1-2个Mg原子的43kDa亚基构建的多亚基复合物。电子显微镜和沉降研究确定它是十聚体,其中两个具有五倍对称的环彼此堆叠在一起(Vonck et al., J.Biol.Chem. 266:3949-3954,1991)。被描述为含有紧密但不共价结合的辅因子,并且需要外源NAD⁺作为e⁻受体来测量体外活性。在活化蛋白(ACT)(其是同二聚体(21kDa亚基)并且每个亚基含有1个Zn和1个Mg原子)的存在下,观察到体外活性的强烈增加(10-40倍)。

[0375] Kloosterman et al., J.Biol.Chem. 277:34785-34792,2002研究了所述活化的机

制,表明ACT是Nudix水解酶,Hektor et al.,J.Biol.Chem.277:46966–46973,2002表明MeDH中残基S97至G或T的突变改变了活化特征以及对辅因子的亲和力。虽然残基G15和D88的突变没有显著影响,但是有认为残基G13对于稳定性以及残基G95、D100和K103对活性有作用。两篇论文共同提出了一个假设,其中ACT切割MeDH结合的NAD⁺。MeDH保持AMP结合并进入活化循环,增加周转率。

[0376] ACT和MeDH之间的化学计量比在文献中没有很好的定义。上文的Kloosterman et al.确定了二聚体Act与十聚体MeDH在完全体外活化中的比例为10:1。相比之下,Arfman et al.J.Biol.Chem.266:3955–3960,1991确定了体外最大比例为3:1且显著活化比例为1:6,但观察到对稀释的高敏感性。基于两种蛋白质在芽孢杆菌中的表达,作者估计体内比例约为1:17.5。

[0377] 但是,我们用纯化的活化蛋白(2317A)和甲醇脱氢酶(2315A)进行体外实验,显示ACT与MeDH的比例为10:1。该体外试验用pH5.4的5M甲醇、2mM NAD和10μM甲醇脱氢酶2315A进行。

[0378] 实施例VIII

[0379] 磷酸转酮酶依赖性乙酰辅酶A合成酶

[0380] 本实施例提供了可用于通过使用磷酸转酮酶增强通过乙酰辅酶A的碳通量的基因。

[0381] 图1,步骤T:果糖-6-磷酸磷酸转酮酶

[0382] 果糖-6-磷酸和磷酸转化为乙酰磷酸和赤藓糖-5-磷酸,可以通过果糖-6-磷酸磷酸转酮酶(EC 4.1.2.22)进行。果糖-6-磷酸和磷酸转化为乙酰磷酸和赤藓糖-5-磷酸,是双歧杆菌(*Bifidobacterium*)分流中的关键反应之一。有证据表明双歧杆菌中存在两种不同的磷酸转酮酶(Sgorbati et al,1976, Antonie Van Leeuwenhoek, 42 (1-2) 49–57; Grill et al, 1995, Curr Microbiol, 31 (1) ; 49–54)。来自齿双歧杆菌(*Bifidobacterium dentium*)的酶似乎仅对果糖-6-磷酸(EC:4.1.2.22)有特异性,而来自假长双歧杆菌(*Bifidobacterium pseudolongum*) subsp.*globosum*的酶能够使用果糖-6-磷酸和D-木酮糖5-磷酸(EC:4.1.2.9)(Sgorbati et al,1976, Antonie Van Leeuwenhoek, 42 (1-2) 49–57)。由最初在动物双歧杆菌乳酸亚种中发现的*xfp*基因编码的酶是双特异性酶(Meile et al., 2001, J Bacteriol, 183, 2929–2936; Yin et al, 2005, FEMS Microbiol Lett, 246 (2) ; 251–257)。额外的磷酸转酮酶可以在肠系膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*) (Lee et al, Biotechnol Lett. 2005 Jun; 27 (12) : 853–8),丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*) ATCC 824 (Servinsky et al, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2012, 39, 1859–1867)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*) (Kocharin et al, 2013, Biotechnol Bioeng, 110 (8) , 2216–2224; Papini, 2012, Appl Microbiol Biotechnol, 95 (4) , 1001–1010),短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*) (Suzuki et al, 2010, Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun., 66 (Pt 8) : 941–3),类植物乳杆菌(*Lactobacillus paraplatnarum*) (Jeong et al, 2007, J Microbiol Biotechnol, 17 (5) , 822–9)中发现。

[0383]

蛋白质	GENBANK ID	GI号	生物体
xfp	YP_006280131.1	386867137	动物双歧杆菌乳酸亚种 (<i>Bifidobacterium animalis lactis</i>)
xfp	AAV66077.1	55818565	肠系膜明串珠菌 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)
CAC1343	NP_347971.1	15894622	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>) ATCC 824
xpkA	CBF76492.1	259482219	构巢曲霉 (<i>Aspergillus nidulans</i>)
xfp	WP_003840380.1	489937073	齿双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium dentium</i>) ATCC 27678
xfp	AAR98788.1	41056827	假长双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>) subsp. <i>globosum</i>
xfp	WP_022857642.1	551237197	假长双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>) subsp. <i>globosum</i>
xfp	ADF97524.1	295314695	短双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium breve</i>)
xfp	AAQ64626.1	34333987	类植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus paraplantarum</i>)

[0384] 图1,步骤U:纤维素-5-磷酸磷酸转酮酶

[0385] 果糖-6-磷酸和磷酸转化为乙酰磷酸和赤藓糖-5-磷酸,可以通过果糖-6-磷酸磷酸转酮酶(EC 4.1.2.22)进行。果糖-6-磷酸和磷酸转化为乙酰磷酸和赤藓糖-5-磷酸,是双歧杆菌(*Bifidobacterium*)分流中的关键反应之一。有证据表明双歧杆菌中存在两种不同的磷酸转酮酶(Sgorbati et al,1976, Antonie Van Leeuwenhoek, 42 (1-2) 49-57; Grill et al, 1995, Curr Microbiol, 31 (1) ; 49-54)。来自齿双歧杆菌(*Bifidobacterium dentium*)的酶似乎仅对果糖-6-磷酸(EC:4.1.2.22)有特异性,而来自假长双歧杆菌(*Bifidobacterium pseudolongum*) subsp. *globosum*的酶能够使用果糖-6-磷酸和D-木酮糖5-磷酸(EC:4.1.2.9)(Sgorbati et al,1976, Antonie Van Leeuwenhoek, 42 (1-2) 49-57)。许多表征的酶对木酮糖-5-磷酸和果糖-6-磷酸具有双重特异性。由最初在动物双歧杆菌乳酸亚种中发现的xfp基因编码的酶是双特异性酶(Meile et al., 2001, J Bacteriol, 183, 2929-2936; Yin et al, 2005, FEMS Microbiol Lett, 246 (2) ; 251-257)。额外的磷酸转酮酶可以在肠系膜明串珠菌(*Leuconostoc mesenteroides*) (Lee et al, Biotechnol Lett. 2005 Jun; 27 (12) : 853-8),丙酮丁醇梭菌(*Clostridium acetobutylicum*) ATCC 824 (Servinsky et al, Journal of Industrial Microbiology&Biotechnology, 2012, 39, 1859-1867)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*) (Kocharin et al, 2013, Biotechnol Bioeng, 110 (8) , 2216-2224; Papini, 2012, Appl Microbiol Biotechnol, 95 (4) , 1001-1010),短双歧杆菌(*Bifidobacterium breve*) (Suziki et al, 2010, Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun., 66 (Pt 8) : 941-3),类植物乳杆菌(*Lactobacillus paraplantarum*) (Jeong et al, 2007, J Microbiol Biotechnol, 17 (5) , 822-9)中发现。

[0386]

蛋白质	GENBANK ID	GI号	生物体
xfp	YP_006280131.1	386867137	动物双歧杆菌乳酸亚种 (<i>Bifidobacterium animalis lactis</i>)
xfp	AAV66077.1	55818565	肠系膜明串珠菌 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)
CAC1343	NP_347971.1	15894622	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>) ATCC 824
xpkA	CBF76492.1	259482219	构巢曲霉 (<i>Aspergillus nidulans</i>)
xfp	AAR98788.1	41056827	假长双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>) subsp. <i>globosum</i>
xfp	WP_022857642.1	551237197	假长双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium pseudolongum</i>) subsp. <i>globosum</i>
xfp	ADF97524.1	295314695	短双歧杆菌 (<i>Bifidobacterium breve</i>)
xfp	AAQ64626.1	34333987	类植物乳杆菌 (<i>Lactobacillus paraplantarum</i>)

[0387]

			<i>paraplantarum</i>)
--	--	--	------------------------

[0388] 图1,步骤V-磷酸转乙酰酶

[0389] 从乙酰-磷酸形成乙酰辅酶A,可以通过磷酸转乙酰酶(EC 2.3.1.8)催化。来自大肠杆菌的pta基因,编码将乙酰辅酶A可逆地转化成乙酰磷酸的酶(Suzuki, T., Biochim.Biophys.Acta 191:559-569 (969))。已经在枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*) (Rado and Hoch, Biochim.Biophys.Acta 321:114-125 (1973))、克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*) (Stadtman, E., Methods Enzymol. 1:5896-599 (1955)) 和海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*) (Bock et al., J.Bacteriol. 181:1861-1867 (1999)) 中发现了额外的转乙酰酶。该反应也可以由一些磷酸转乙酰酶(EC 2.3.1.19)催化,包括来自丙酮丁醇梭菌(*Pseudomonas bacterium*)的ptb基因产物(Wiesenborn et al., App.Environ.Microbiol.55:317-322 (1989); Walter et al., Gene 134:107-111 (1993))。另外的ptb基因存在于生产丁酸的细菌L2-50(Louis et al., J.Bacteriol. 186:2099-2106 (2004) and *Bacillus megaterium*(Vazquez et al., Curr.Microbiol. 42:345-349 (2001))和巨大芽孢杆菌(*Bacillus megaterium*) (Vazquez et al., Curr.Microbiol. 42:345-349 (2001))中。大肠杆菌pta基因的同源物存在于数种其他生物钟,包括肠道沙门氏菌

(*Salmonella enterica*) 和菜茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)。

[0390]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
Pta	NP_416800.1	71152910	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
Pta	P39646	730415	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
Pta	A5N801	146346896	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
Pta	Q9X0L4	6685776	海栖热袍菌 (<i>Thermotoga maritime</i>)
Ptb	NP_349676	34540484	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
Ptb	AAR19757.1	38425288	产丁酸细菌 L2-50
Ptb	CAC07932.1	10046659	巨大芽孢杆菌 (<i>Bacillus megaterium</i>)
Pta	NP_461280.1	16765665	肠道沙门氏菌 (<i>Salmonella enterica</i>) subsp. <i>enterica</i> serovar <i>Typhimurium</i> str. LT2
PAT2	XP_001694504.1	159472743	菜茵衣藻 (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)
PAT1	XP_001691787.1	159467202	菜茵衣藻 (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)

[0391] 图1,步骤W:乙酸激酶

[0392] 乙酸激酶 (EC 2.7.2.1) 可以催化乙酸到乙酰磷酸的可逆ATP依赖性磷酸化。已经在许多微生物中表征了示例性的乙酸激酶,包括大肠杆菌、丙酮丁醇梭菌和嗜热甲烷八叠球菌 (Ingram-Smith et al., J.Bacteriol. 187:2386-2394 (2005); Fox and Roseman, J.Biol.Chem. 261:13487-13497 (1986); Winzer et al., Microbiology 143 (Pt 10):3279-3286 (1997))。乙酸激酶活性也已经在大肠杆菌purT的基因产物中得到证实 (Marolewski et al., Biochemistry 33:2531-2537 (1994)),一些丁酸激酶 (EC 2.7.2.7),例如来自梭菌的buk1和buk2丙酮丁酸,也接受乙酸作为底物 (Hartmanis, M.G., J.Biol.Chem. 262:617-621 (1987))。同系物存在于其他几种微生物中,包括肠道沙门氏菌和菜茵衣藻。

[0393]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
ackA	NP_416799.1	16130231	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
Ack	AAB18301.1	1491790	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
Ack	AAA72042.1	349834	嗜热甲烷八叠球菌 (<i>Methanosarcina thermophila</i>)
purT	AAC74919.1	1788155	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
buk1	NP_349675	15896326	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
buk2	Q97II1	20137415	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
ackA	NP_461279.1	16765664	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)
ACK1	XP_001694505.1	159472745	菜茵衣藻 (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)
ACK2	XP_001691682.1	159466992	菜茵衣藻 (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)

[0394] 图1,步骤X:乙酰CoA转移酶、合成酶或连接酶

[0395] 乙酸到乙酰辅酶A的酰化,可以通过乙酰辅酶A合成酶、连接酶或转移酶活性的酶催化。可以催化该反应的两种酶是AMP形成乙酰辅酶A合成酶或连接酶(EC 6.2.1.1)和ADP形成乙酰辅酶A合成酶(EC 6.2.1.13)。AMP形成乙酰辅酶A合成酶(ACS)是乙酰辅酶A活化的主要酶。示例性的ACS酶存在于大肠杆菌(Brown et al., J.Gen.Microbiol.102:327-336 (1977))、真养劳尔氏菌(*Ralstonia eutropha*) (Priefert and Steinbuchel, J.Bacteriol.174:6590-6599 (1992))、热自养甲烷热杆菌(*Methanothermobacter thermautotrophicus*) (Ingram-Smith and Smith, Archaea 2:95-107 (2007))、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*) (Gulick et al., Biochemistry 42:2866-2873 (2003))和酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*) (Jogl and Tong, Biochemistry 43:1425-1431 (2004))中。ADP形成乙酰辅酶A合成酶是通常具有宽底物范围的可逆酶(Musfeldt and Schonheit,

J.Bacteriol.184:636–644 (2002)。ADP形成乙酰辅酶A合成酶的两个同功酶通过AF1211和AF1983 (Musfeldt and Schonheit, 同上 (2002)) 编码在古细菌弧菌基因组中。来自死海盐细菌 (*Haloarcula marismortui*) (称为琥珀酰辅酶A合成酶) 的酶也接受乙酸作为底物, 并表现出酶的可逆性 (Brasen and Schonheit, Arch.Microbiol.182:277–287 (2004))。由耐超高温热棒菌 (*Pyrobaculum aerophilum*) PAE3250编码的ACD, 所表现出的底物范围是所有表征过的ACD中最广的, 与乙酸、异丁酰辅酶A(优选底物) 和苯乙酰辅酶A (Brasen and Schonheit, 同上 (2004)) 反应。可以使用定向进化或工程化修饰该酶, 以在宿主生物的生理温度下起作用。来自火焰古球状菌 (*Archaeoglobus fulgidus*)、死海盐细菌 (*Haloarcula marismortui*) 和耐超高温热棒菌 (*Pyrobaculum aerophilum*) 的酶已经在大肠杆菌中被克隆、功能表达和表征 (Brasen and Schonheit, supra (2004); Musfeldt and Schonheit, 同上 (2002))。另外的候选物包括由sucCD在大肠杆菌中编码的琥珀酰辅酶A合成酶 (Buck et al., Biochemistry 24:6245–6252 (1985)) 和来自恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 的酰基辅酶A连接酶 (Fernandez-Valverde et al., Appl.Environ.Microbiol.59:1149–1154 (1993))。上述蛋白质如下所示。

[0396]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
<i>Acs</i>	AAC77039.1	1790505	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>acoE</i>	AAA21945.1	141890	真养劳氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>)
<i>acsI</i>	ABC87079.1	86169671	热自养甲烷热杆菌 (<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>)
<i>acsI</i>	AAL23099.1	16422835	肠道沙门氏菌 (<i>Salmonella enterica</i>)
<i>ACSI</i>	Q01574.2	257050994	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>AF1211</i>	NP_070039.1	11498810	火焰古球状菌 (<i>Archaeoglobus fulgidus</i>)

[0397]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
<i>AF1983</i>	NP_070807.1	11499565	火焰古球状菌 (<i>Archaeoglobus fulgidus</i>)
<i>Scs</i>	YP_135572.1	55377722	死海盐细菌 (<i>Haloarcula marismortui</i>)
<i>PAE3250</i>	NP_560604.1	18313937	耐超高温热棒菌 (<i>Pyrobaculum aerophilum</i>) str. IM2
<i>sucC</i>	NP_415256.1	16128703	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>sucD</i>	AAC73823.1	1786949	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>paaF</i>	AAC24333.2	22711873	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)

[0398] 可以利用乙酸作为CoA受体的乙酰CoA转移酶是由大肠杆菌 α (α 亚基)和 α (β 亚基)基因编码的乙酰乙酰CoA转移酶(Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res Commun. 33: 902-908 (1968); Korolev et al., Acta Crystallogr. D Biol Crystallogr. 58: 2116-2121 (2002))。还已经证实,该酶将CoA部分转移到各种支链和线性酰基辅酶A底物(包括异丁酸)(Matthies et al., Appl Environ Microbiol 58: 1435-1439 (1992))、戊酸(Vanderwinkel et al., 同上)和丁酸甲酯(Vanderwinkel et al., 同上)。类似的酶存在于谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032(Duncan et al., Appl Environ Microbiol 68: 5186-5190 (2002))、丙酮丁醇梭菌(Cary et al., Appl Environ Microbiol 56: 1576-1583 (1990))和梭菌*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*(Kosaka et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 71: 58-68 (2007))。这些蛋白质如下所示。

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
<i>atoA</i>	P76459.1	2492994	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
<i>atoD</i>	P76458.1	2492990	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
<i>actA</i>	YP_226809.1	62391407	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) ATCC 13032
<i>cg0592</i>	YP_224801.1	62389399	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) ATCC 13032
<i>ctfA</i>	NP_149326.1	15004866	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>ctfB</i>	NP_149327.1	15004867	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>ctfA</i>	AAP42564.1	31075384	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>

[0399]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
<i>ctfB</i>	AAP42565.1	31075385	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>

[0400] [0401] 额外的示例性乙酰CoA转移酶候选物,由克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)的cat1、cat2和cat3的基因产物分别催化,其已被证明显示琥珀酰辅酶A、4-羟基丁酰辅酶A和丁酰CoA转移酶活性(Seedorf et al., supra; Sohling et al., Eur. J. Biochem. 212: 121-127 (1993); Sohling et al., J. Bacteriol. 178: 871-880 (1996))。类似的CoA转移酶活性也存在于阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)中(van Grinsven et al., J. Biol. Chem. 283: 1411-1418 (2008))和Brypiosoma brucei(Riviere et al., J. Biol. Chem. 279: 45337-45346 (2004))。这些蛋白质如下所示。

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
[0402]	<i>cat1</i>	P38946.1	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
	<i>cat2</i>	P38942.2	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
	<i>cat3</i>	EDK35586.1	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
	<i>TVAG_395550</i>	XP_001330176	阴道毛滴虫 (<i>Trichomonas vaginalis</i>) G3
	<i>Tb11.02.0290</i>	XP_828352	布氏锥虫 (<i>Trypanosoma brucei</i>)

[0403] 实施例IX

[0404] 乙酰辅酶A、草酰乙酸和琥珀酰辅酶A合成酶

[0405] 本实施例提供可用于将糖酵解中间体甘油醛-3-磷酸(G3P)转化成乙酰辅酶A和/或琥珀酰辅酶A的基因,如图4的途径所示。

[0406] A. PEP羧化酶或PEP羧化酶。磷酸烯醇丙酮酸向草酰乙酸的羧化反应,由磷酸烯醇丙酮酸羧化酶催化。示例性的PEP羧化酶由大肠杆菌中的ppc(Kai et al., Arch.Biochem.Biophys.414:170-179(2003)、扭脱甲基杆菌(*Methyllobacterium extorquens*)AM1的ppcA(Arps et al., J.Bacteriol.175:3776-3783(1993)和谷氨酸棒状杆菌的ppc(Eikmanns et al., Mol.Gen.Genet.218:330-339(1989)编码。

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
[0407]	<i>Ppc</i>	NP_418391	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	<i>ppcA</i>	AAB58883	扭脱甲基杆菌 (<i>Methyllobacterium extorquens</i>)
	<i>Ppc</i>	ABB53270	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>)

[0408] 将磷酸烯醇丙酮酸转化为草酰乙酸的替代酶是PEP羧基激酶,其形成ATP同时羧化PEP。在大多数生物中,PEP羧基激酶用于葡萄糖异生功能,并以1个ATP的代价将草酰乙酸转化为PEP。酿酒酵母是此类生物体的一种,其天然PEP羧基激酶PCK1起到葡萄糖的作用

(Valdes-Hevia et al., FEBSLett. 258:313–316 (1989))。大肠杆菌是另一种此类生物,与不会形成ATP的PEP羧化酶相比,生产草酰乙酸的PEP羧激酶较少,这可能是由于PEP羧激酶的碳酸氢盐K_m较高(Kim et al., Appl. Environ. Microbiol. 70:1238–1241 (2004))。尽管如此,最近在大肠杆菌K-12的ppc突变体中已经证实了天然大肠杆菌PEP羧基激酶从PEP获得草酰乙酸的活性(Kwon et al., J. Microbiol. Biotechnol. 16:1448–1452 (2006))。这些菌株没有生长缺陷,并且在高NaHCO₃浓度下琥珀酸生产增加。大肠杆菌的突变株可以在适应性进化后采用Pck作为主要的CO₂固定酶(Zhang et al., 2009)在一些生物中,特别是瘤胃细菌,PEP羧激酶能够非常有效地从PEP生产草酰乙酸并生产ATP。已经克隆到大肠杆菌中的PEP羧基激酶基因的示例,包括来自曼海姆产琥珀酸菌(*Mannheimia succiniciproducens*)(Lee et al., Biotechnol. Bioprocess Eng. 7:95–99 (2002))、产琥珀酸无氧螺菌(*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)(Laivenieks et al., Appl. Environ. Microbiol. 63:2273–2280 (1997)和产琥珀酸放线杆菌(*Actinobacillus succinogenes*)(Kim et al., 同上)中的那些。由流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenza*)编码的PEP羧基激酶能够有效地从PEP形成草酰乙酸。

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
[0409]	PCK1	NP_013023	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	pck	NP_417862.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	pckA	YP_089485.1	曼海姆产琥珀酸菌 (<i>Mannheimia succiniciproducens</i>)
	pckA	O09460.1	产琥珀酸无氧螺菌

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
[0410]			(<i>Anaerobiospirillum succiniciproducens</i>)
	pckA	Q6W6X5	产琥珀酸放线杆菌 (<i>Actinobacillus succinogenes</i>)
[0411]	pckA	P43923.1	流感嗜血杆菌 (<i>Haemophilus influenza</i>)

[0411] B. 苹果酸脱氢酶。草酸乙酸通过苹果酸脱氢酶(EC 1.1.1.37)转化为苹果酸,这是一种在正向和反向方向均起作用的酶。酿酒酵母具有三个苹果酸脱氢酶拷贝,即MDH1(McAlister-Henn和Thompson, J. Bacteriol. 169:5157–5166 (1987)、MDH2(Minard and McAlister-Henn, Mol. Cell. Biol. 11:370–380 (1991); Gibson and McAlister-Henn, J. Biol. Chem. 278:25628–25636 (2003))和MDH3(Steffan and McAlister-Henn, J. Biol. Chem. 267:24708–24715 (1992)),其分别位于线粒体、细胞溶质和过氧化物酶体。已知大肠杆菌具有由mdh编码的活性苹果酸脱氢酶。

[0412]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>MDH1</i>	NP_012838	6322765	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>MDH2</i>	NP_014515	116006499	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>MDH3</i>	NP_010205	6320125	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>Mdh</i>	NP_417703.1	16131126	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0413] C. 富马酸酶。富马酸水合酶(EC 4.2.1.2)催化富马酸向苹果酸的可逆水合。由fumA、fumB和fumC编码的大肠杆菌的三个富马酸酶,在不同的氧气可利用性条件下调节。FumB是氧敏感的,在无氧条件下有活性。FumA在微量无氧条件下是有活性的,FumC在有氧生长条件下有活性(Tseng et al., J.Bacteriol.183:461-467 (2001); Woods et al., Biochim.Biophys.Acta 954:14-26 (1988); Guest et al., J.Gen.Microbiol.131:2971-2984 (1985))。酿酒酵母含有一个富马酸酶编码基因拷贝,即FUM1,其产物位于细胞溶质和线粒体(Sass et al., J.Biol.Chem.278:45109-45116 (2003))。额外的富马酸酶存在于空肠弯曲杆菌(Campylobacter jejuni)(Smith et al., Int.J.Biochem.Cell.Bios.31:961-975 (1999))、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*) (Mizobata et al., Arch.Biochem.Biophys.355:49-55 (1998))和褐家鼠(*Rattus norvegicus*) (Kobayashi et al., J.Biochem.89:1923-1931 (1981))中。具有高序列同源性的类似酶包括拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的fum1和谷氨酸棒状杆菌(*Corynebacterium glutamicum*)的fumC。来自嗜热丙酸互营细菌(*Pelotomaculum thermopropionicum*)的MmcBC富马酸酶,是具有两个亚基的另一类富马酸酶(Shimoyama et al., FEMS Microbiol.Lett.270:207-213 (2007))。

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>fumA</i>	NP_416129.1	16129570	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>fumB</i>	NP_418546.1	16131948	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>fumC</i>	NP_416128.1	16129569	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>FUM1</i>	NP_015061	6324993	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>fumC</i>	Q8NRN8.1	39931596	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>)
<i>fumC</i>	O69294.1	9789756	空肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter jejuni</i>)
<i>fumC</i>	P84127	75427690	嗜热栖热菌 (<i>Thermus thermophilus</i>)
<i>fumH</i>	P14408.1	120605	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
<i>MmcB</i>	YP_001211906	147677691	嗜热丙酸互营细菌 (<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>)
<i>MmcC</i>	YP_001211907	147677692	嗜热丙酸互营细菌 (<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>)

[0414]

[0415] D. 富马酸还原酶。富马酸还原酶催化富马酸还原成琥珀酸。由frdABCD编码的四个亚基组成的大肠杆菌的富马酸还原酶,在无氧条件下具有膜结合性和活性。该反应的电子供体是甲萘醌,在该反应中生产的两个质子对质子梯度没有贡献(Iverson et al., Science 284:1961-1966 (1999))。酵母基因组编码由FRDS1(Enomoto et al., DNA Res.3: 263-267 (1996))和FRDS2(Muratsubaki et al., Arch.Biochem.Biophys.352:175-181 (1998))编码的两种可溶性富马酸还原酶同功酶,其分别位于细胞质和原核细胞,并用于葡萄糖的无氧生长期(Arikawa et al., FEMS Microbiol.Lett.155:111-116 (1998))。

[0416]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>FRDS1</i>	P32614	418423	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces</i>)

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
			<i>cerevisiae</i>)
FRDS2	NP_012585	6322511	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
[0417] <i>frdA</i>	NP_418578.1	16131979	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>frdB</i>	NP_418577.1	16131978	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>frdC</i>	NP_418576.1	16131977	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>frdD</i>	NP_418475.1	16131877	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0418] E. 琥珀酰辅酶A合成酶或转移酶。琥珀酸至琥珀酰辅酶A的ATP依赖性酰化,由琥珀酰辅酶A合成酶(EC 6.2.1.5)催化。酿酒酵母的LSC1和LSC2基因以及大肠杆菌的sucC和sucD基因的产物,天然地形成琥珀酰辅酶A合成酶复合物,其催化琥珀酸形成琥珀酰辅酶A,同时消耗1个ATP,该反应在体内是可逆的(Buck et al., Biochemistry 24:6245–6252 (1985))。这些蛋白质如下所示:

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
LSC1	NP_014785	6324716	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
[0419] LSC2	NP_011760	6321683	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
sucC	NP_415256.1	16128703	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
sucD	AAC73823.1	1786949	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0420] 琥珀酰CoA转移酶,将琥珀酸和酰基辅酶A供体转化为琥珀酰辅酶A和酸。琥珀酰CoA转移酶包括大肠杆菌的ygfH和克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)的cat1(Seedorf et al., Proc.Natl.Acad.Sci USA 105:2128–2133 (2008); Sohling et al., J Bacteriol.178:871–880 (1996); Haller et al., Biochemistry,39 (16) 4622–4629)。同系物可以存在于例如杨氏柠檬酸杆菌(*Citrobacter youngae*) ATCC 29220、肠道沙门氏菌(*Salmonella enterica*) subsp.*arizonae* serovar 和中间耶尔森氏菌(*Yersinia intermedia*) ATCC 29909。琥珀酰CoA转移酶由恶臭假单胞菌中的pcaI和pcaJ编码(Pasiaba et al., J Bacteriol.184:207–215 (2002))。在不动杆菌属ADP1(Kowalchuk et al., Gene 146:23–30 (1994))、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*) 和斯氏假单胞菌(*Pseudomonas knackmussii*) (以前的sp.B13) (Gobel et al., J Bacteriol.184:216–223

(2002) ;Kaschabek等J.Bacteriol.184:207–215 (2002)) 中存在类似的酶。。已经在幽门螺杆菌(Corthesy-Theulaz et al., J Biol.Chem.227:25659–25667 (1997))、枯草芽孢杆菌(Stols et al., Protein Expr.Purif.53:396–403 (2007)) 和智人(Fukao,T.,et al., Genomics 68:144–151 (2000); Tanaka,H.,et al., Mol Hum Reprod 8:16–23 (2002))) 中表征了另外的示例性琥珀酰CoA转移酶。本申请所述的另外的CoA转移酶也是合适的选择物。

[0421]

<i>Gene</i>	GI #	Accession No.	<i>Organism</i>
<i>ygfH</i>	AAC75957.1	1789287	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>catI</i>	P38946.1	729048	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>CIT292_04485</i>	ZP_03838384.1	227334728	杨氏柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter youngae</i>)
<i>SARI_04582</i>	YP_001573497.1	161506385	肠道沙门氏菌 (<i>Salmonella enterica</i>)
<i>yinte0001_14430</i>	ZP_04635364.1	238791727	中间耶尔森菌 (<i>Yersinia intermedia</i>)
<i>pcaI</i>	24985644	AAN69545.1	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>pcaJ</i>	26990657	NP_746082.1	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>pcaI</i>	50084858	YP_046368.1	不动杆菌 (<i>Acinetobacter</i>) sp. ADP1
<i>pcaJ</i>	141776	AAC37147.1	不动杆菌 (<i>Acinetobacter</i>) sp. ADP1
<i>pcaI</i>	21224997	NP_630776.1	天蓝色链霉菌 (<i>Streptomyces coelicolor</i>)
<i>pcaJ</i>	21224996	NP_630775.1	天蓝色链霉菌 (<i>Streptomyces coelicolor</i>)
<i>catI</i>	75404583	Q8VPF3	斯氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas knackmussii</i>)
<i>catJ</i>	75404582	Q8VPF2	斯氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>)

[0422]

			<i>knackmussii</i>)
<i>HPAG1_0676</i>	108563101	YP_627417	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>)
<i>HPAG1_0677</i>	108563102	YP_627418	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>)
<i>ScoA</i>	16080950	NP_391778	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
<i>ScoB</i>	16080949	NP_391777	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
<i>OXCT1</i>	NP_000427	4557817	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
<i>OXCT2</i>	NP_071403	11545841	智人 (<i>Homo sapiens</i>)

[0423] F. 丙酮酸激酶或PTS依赖性底物输入。见此处其他地方。

[0424] G. 丙酮酸脱氢酶、丙酮酸甲酯裂解酶或丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶。丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶(PFOR)催化丙酮酸的可逆氧化形成乙酰辅酶A。示例性PFOR酶存在于非洲脱硫弧菌(*Desulfovibrio africanus*) (Pieulle et al., J.Bacteriol. 179: 5684-5692 (1997))和其他脱硫弧菌属物种(Vita et al., Biochemistry, 47: 957-64 (2008))中。热醋穆尔氏菌(*Moorella thermoacetica*)PFOR也得到很好地表征(Menon and Ragsdale, Biochemistry 36: 8484-8494 (1997)),并且证实在自养生长期间在丙酮酸合成方向上具有高活性(Furdui and Ragsdale, J.Biol.Chem. 275: 28494-28499 (2000))。此外,大肠杆菌具有未鉴定的开放阅读框,即ydbK,其编码与热醋穆尔氏菌(*Moorella thermoacetica*) (PFTA) 51%相同的蛋白质。已经描述了丙酮酸氧化还原酶在大肠杆菌中的活性的证据(Blaschkowski et al., Eur.J.Biochem. 123: 563-569 (1982))。最后,黄素氧还蛋白还原酶(例如,来自幽门螺杆菌或空肠弯曲杆菌的fqrB) (St Maurice et al., J.Bacteriol. 189: 4764-4773 (2007))或Rnf型蛋白(Seedorf et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105: 2128-2133 (2008); 和Herrmann, J.Bacteriol. 190: 784-791 (2008))提供了由PFOR生产的还原铁氧还蛋白生产NADH或NADPH的方法。

[0425]

<u>Protein</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI 号</u>	<u>Organism</u>
<i>DesfrDRAFT_0121</i>	ZP_07331646.1	303245362	脱硫弧菌 <i>Desulfovibrio fructosovorans JJ</i>
<i>Por</i>	CAA70873.1	1770208	非洲脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio africanus</i>)
<i>por</i>	YP_012236.1	46581428	普通脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio vulgaris</i>) str. Hildenborough

[0426]

Dde_3237	ABB40031.1	78220682	硫酸脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>) G20
Ddes_0298	YP_002478891.1	220903579	硫酸脱硫弧菌 (<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>) subsp. <i>desulfuricans</i> str. ATCC 27774
Por	YP_428946.1	83588937	热醋穆尔氏菌 (<i>Moorella thermoacetica</i>)
YdbK	NP_415896.1	16129339	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0427] 丙酮酸转化成乙酰辅酶A可以被几种其他酶或其组合催化。例如,丙酮酸脱氢酶可以将丙酮酸转化成乙酰辅酶A,同时将NAD分子还原成NADH。它是一种多酶复合物,催化一系列部分反应,导致对丙酮酸的酰化氧化脱羧作用。该酶由丙酮酸脱羧酶(E1)、二氢硫辛酰胺酰基转移酶(E2)和二氢硫辛酰胺脱氢酶(E3)三个亚基组成。这种酶天然存在于几种微生物中,包括大肠杆菌和酿酒酵母。在大肠杆菌中,E1组件中的特异性残基负责底物特异性(Bisswanger,H.,J.Biol.Chem.256:815-82(1981);Bremer,J.,Eur.J.Biochem.8:535-540(1969);Gong et al.,J.Biol.Chem.275:13645-13653(2000))。酶工程研究增强了无氧条件下的大肠杆菌PDH酶活性(Kim et al.,J.Bacteriol.190:3851-3858(2008);Kim et al.,Appl.Environ.Microbiol.73:1766-1771(2007);Zhou et al.,Biotechnol.Lett.30:335-342(2008))。与大肠杆菌PDH相反,枯草芽孢杆菌复合物有活性,并且是无氧条件下生长必需的(Nakano et al.,J.Bacteriol.179:6749-6755(1997))。在甘油生长过程中表征的肺炎克雷伯杆菌PDH在无氧条件下也有活性(5)。

[0428]

基因	登录号	GI #	生物
<i>aceE</i>	NP_414656.1	16128107	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>aceF</i>	NP_414657.1	16128108	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>lpd</i>	NP_414658.1	16128109	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>pdhA</i>	P21881.1	3123238	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
<i>pdhB</i>	P21882.1	129068	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
<i>pdhC</i>	P21883.2	129054	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
<i>pdhD</i>	P21880.1	118672	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
<i>LAT1</i>	NP_014328	6324258	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0429]

<i>PDA1</i>	NP_011105	37362644	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>PDB1</i>	NP_009780	6319698	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>LPD1</i>	NP_116635	14318501	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>PDX1</i>	NP_011709	6321632	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0430] 可以催化该转化的另一种酶是,丙酮酸甲酸裂解酶。该酶催化丙酮酸和CoA转化为乙酰辅酶A和甲酸。丙酮酸甲酸裂解酶是原核生物中常见的酶,用于帮助调节无氧氧化还原平衡。示例性的酶可以存在于大肠杆菌中由pf1B编码(Knappe和Sawers,FEMS.Microbiol Rev.6:383-398(1990))、乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*) (Melchiorsen et al.,Appl Microbiol Biotechnol 58:338-344(2002))和变形链球菌(Takahashi-Abbe et al., Oral.Microbiol Immunol.18:293-297(2003))。大肠杆菌具有由tdcE编码的额外丙酮酸甲酸裂解酶,其分别催化丙酮酸或2-羟代丁酸转化成乙酰辅酶A或丙酰辅酶A(Hesslinger et al.,Mol.Microbiol 27:477-492(1998)))。来自大肠杆菌的pf1B和tdcE都需要由pf1A编码的丙酮酸甲酸裂解酶活化酶的存在。此外,由大肠杆菌中的yfiD编码的短蛋白质,可以与氧切割丙酮酸甲酸裂解酶相关联并恢复活性(Vey et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105: 16137-16141(2008)。注意,来自大肠杆菌的pf1A和pf1B可在酿酒酵母中表达,从而增加用于丁醇生产的胞质乙酰辅酶A,如WO/2008/080124中所述]。额外的丙酮酸甲酯裂解酶和活化酶候选物,由存在于巴斯德梭菌(*Clostridium pasteurianum*)的pf1和act分别编码(Weidner et al.,J Bacteriol.178:2440-2444(1996))中发现。

[0431]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
<i>pf1B</i>	NP_415423	16128870	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>pf1A</i>	NP_415422.1	16128869	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>tdcE</i>	AAT48170.1	48994926	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>yfiD</i>	AAC75632.1	1788933	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>pf1</i>	Q46266.1	2500058	巴斯德梭菌 (<i>Clostridium pasteurianum</i>)
<i>act</i>	CAA63749.1	1072362	巴斯德梭菌 (<i>Clostridium pasteurianum</i>)

[0432] 此外,可以组合使用不同的酶,以通过多个步骤将丙酮酸转化成乙酰辅酶A。例如,在酿酒酵母中,要在细胞溶胶中获得乙酰辅酶A,首先使丙酮酸脱羧形成乙醛,后者通过乙醛脱氢酶氧化成乙酸,随后通过乙酰辅酶A合成酶活化形成乙酰辅酶A。乙酰辅酶A合成酶是包括大肠杆菌(Kumari et al.,J.Bacteriol.177:2878-2886(1995))、沙门氏菌(*Salaiella enterica*) (Starai et al.,Microbiology 151:3793-3801(2005);Starai et

al., J.Biol.Chem.280:26200–26205 (2005)) 和热醋穆尔氏菌(已经描述)在内的几种其他生物中的天然酶。可选地,可以通过乙酸激酶和磷酸转乙酰酶,活化乙酸形成乙酰辅酶A。乙酸激酶首先将乙酸转化为乙酰磷酸,同时使用1个ATP分子。接着将乙酰磷酸和辅酶A转化成乙酰辅酶A,并通过磷酸转乙酰酶释放1个磷酸。上文描述了编码乙酸激酶、乙酰辅酶A合成酶和磷酸转乙酸酶的示例性酶。

[0433] 将丙酮酸转化为乙酰辅酶A的另一种方法是通过丙酮酸氧化酶。丙酮酸氧化酶将丙酮酸转化成乙酸,使用泛醌作为电子受体。在大肠杆菌中,该活性由poxB编码。PoxB与酿酒酵母和运动发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶具有相似性。该酶具有硫代焦磷酸辅因子(Koland and Gennis, Biochemistry 21:4438–4442 (1982)) ; O'Brien et al., Biochemistry 16:3105–3109 (1977); O'Brien and Gennis, J.Biol.Chem.255:3302–3307 (1980)) 和黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)辅因子。乙酰辅酶A合成酶或乙酸激酶和磷酸转乙酰酶,可以将乙酸转化为乙酰辅酶A,如前所述。这些酶中的一部分也可以催化从乙酰辅酶A到丙酮酸的反向反应。

[0434] 柠檬酸合成酶。柠檬酸合成酶是本领域公知的。例如,大肠杆菌的gltA基因编码柠檬酸合成酶。之前已经证实,该基因被NADH别构调节抑制,并且已经鉴定了涉及该抑制的氨基酸(Pereira et al., J.Biol.Chem.269 (1):412–417 (1994); Stokell et al., et al., J.Biol.Chem.278 (37):35435–35443 (2003))。NADH不敏感的柠檬酸合成酶可由gltA编码,例如gltA的R163L突变体。其他柠檬酸合成酶对NADH敏感性较低,包括乙酸醋杆菌的aarA酶(Francois et al., Biochem 45:13487–99 (2006))。

[0435]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
gltA	NP_415248.1	16128695	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
AarA	P20901.1	116462	纹膜乙酸杆菌 (<i>Acetobacter aceti</i>)
CIT1	NP_014398.1	6324328	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
CS	NP_999441.1	47523618	野猪 (<i>Sus scrofa</i>)

[0436] I. 乌头碱。乌头碱(EC 4.2.1.3)是一种含铁硫蛋白,通过中间体顺乌头酸催化柠檬酸和异柠檬酸的可逆异构化。大肠杆菌的两种乌头碱酶由acnA和acnB编码。AcnB是主要的分解代谢酶,而AcnA更稳定,似乎在氧化或酸胁迫条件下具有活性(Cunningham et al., Microbiology 143 (Pt 12):3795–3805 (1997))。鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)中的两种乌头酸酶同功酶由acnA和acnB编码(Horswill and Escalante-Semerena, Biochemistry 40:4703–4713 (2001))。由AC01编码的酿酒酵母乌头酸酶位于线粒体中并于此参与TCA循环(Gangloff et al., Mol.Cell.Biol.10:3551–3561 (1990))并位于细胞质中,于此参与乙醛酸分流(Regev-Rudzki et al., Mol.Biol.Cell.16:4163–4171 (2005))。

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
<i>acnA</i>	AAC7438.1	1787531	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>acnB</i>	AAC73229.1	2367097	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>HP0779</i>	NP_207572.1	15645398	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>) 26695
<i>H16_B0568</i>	CAJ95365.1	113529018	真养劳氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>)
<i>DesfrDRAFT_3783</i>	ZP_07335307.1	303249064	脱硫弧菌 <i>Desulfovibrio fructosovorans JJ</i>
<i>Suden_1040</i> (<i>acnB</i>)	ABB44318.1	78497778	反硝化硫单胞菌 (<i>Sulfurimonas denitrificans</i>)
[0437] <i>Hydth_0755</i>	ADO45152.1	308751669	嗜热产氢杆菌 (<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>)
<i>CT0543 (acn)</i>	AAM71785.1	21646475	绿硫细菌 (<i>Chlorobium tepidum</i>)
<i>Clim_2436</i>	YP_001944436.1	189347907	泥生绿菌 (<i>Chlorobium limicola</i>)
<i>Clim_0515</i>	ACD89607.1	189340204	泥生绿菌 (<i>Chlorobium limicola</i>)
<i>acnA</i>	NP_460671.1	16765056	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)
<i>acnB</i>	NP_459163.1	16763548	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)
<i>ACO1</i>	AAA34389.1	170982	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0438] 异柠檬酸脱氢酶。异柠檬酸脱氢酶催化异柠檬酸脱羧为2-氧戊二酸,与NAD(P)⁺的还原偶联。酿酒酵母和大肠杆菌中的IDH酶分别由IDP1和icd编码(Haselbeck and McAlister-Henn, J.Biol.Chem. 266:2339-2345 (1991); Nimmo, HG, Biochem.J. 234:2332 (1986))。还原TCA循环中的反向反应,即2-氧戊二酸还原羧化为异柠檬酸,受到来自泥生绿菌 (*Chlorobium limicola*) 的NADPH依赖性CO₂固定IDH(Kanao et al.,

Eur.J.Biochem.269:1926–1931(2002))的青睐。除了下面列出的一些其他候选酶之外,在C.Tepidum基因组中也发现了具有95%序列相似性的类似酶。

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
Icd	ACI84720.1	209772816	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
IDPI	AAA34703.1	171749	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Idh	BAC00856.1	21396513	泥生绿菌 (<i>Chlorobium limicola</i>)
Icd	AAM71597.1	21646271	绿硫细菌 (<i>Chlorobium tepidum</i>)
icd	NP_952516.1	39996565	金属还原泥土杆菌 (<i>Geobacter sulfurreducens</i>)
icd	YP_393560.	78777245	反硝化硫单胞菌 (<i>Sulfurimonas denitrificans</i>)

[0439] [0440] AKG脱氢酶。 α -酮戊二酸脱氢酶(AKGD)将 α -酮戊二酸转化为琥珀酰辅酶A,且是控制通过TCA循环的代谢通量的主要位点(Hansford,Curr.Top.Bioenerg.10:217–278(1980))。在大肠杆菌中由sucA、sucB和lpd基因编码的AKGD基因表达在无氧条件下和葡萄糖生长期间下调(Park et al.,Mol Micro 15:473–482(1995))。在生物如枯草芽孢杆菌和酿酒酵母中发现了其它示例性的AKGDH酶-2705(Resnekov et al.,Mol.Gen.Genet.234:285–296(1992);Repetto et al.,Mol.Cell Biol.9:2695)(1989))。

Gene	GI #	Accession No.	Organism
sucA	16128701	NP_415254.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
sucB	16128702	NP_415255.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
lpd	16128109	NP_414658.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
odhA	51704265	P23129.2	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
odhB	129041	P16263.1	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
pdhD	118672	P21880.1	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
KGD1	6322066	NP_012141.1	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
KGD2	6320352	NP_010432.1	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0442]	LPDI	14318501	NP_116635.1	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
--------	------	----------	-------------	--

[0443] α -酮戊二酸转化为琥珀酰辅酶A,也可以由 α -酮戊二酸:铁氧还蛋白氧化还原酶(EC 1.2.7.3),也称为2-氧戊二酸合成酶或2-氧戊二酸:铁氧还蛋白氧化还原酶(OFOR)来

催化。OFOR和丙酮酸：铁氧还蛋白氧化还原酶(PFOR)是2-氧代酸：铁氧还蛋白(黄素氧还蛋白)氧化还原酶的不同家族成员,其利用焦磷酸硫胺素、CoA和铁-硫簇作为辅因子,铁氧还蛋白、黄素氧还蛋白和FAD作为电子载体(Adams et al., et al., Archaea. Adv. Protein Chem. 48:101-180 (1996))。示例性的OFOR酶存在于例如嗜热产氢杆菌(*Hydrogenobacter thermophilus*)嗜氢嗜酸芽孢杆菌(*Desulfobacter hydrogenophilus*)和绿菌属(*Chlorobium*)物种(Shiba et al., 1985; Evans et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 55: 92934 (1966); Buchanan, 1971)等生物中。嗜热产氢杆菌中由korAB编码的双亚基酶已经在大肠杆菌中克隆并表达(Yun et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 282: 589-594 (2001))。来自同一生物的具有对琥珀酰辅酶A的严格底物特异性的五亚基OFOR,由DABGE编码,最近在大肠杆菌中鉴定并表达(Yun et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 292: 280-286 (2002)))。另一个示例性OFOR由幽门螺杆菌中的oorDABC编码(Hughes et al., J. Bacteriol. 180: 1119-1128 (1998))。已报道在索氏菌*Thauera aromatica*中存在 α -酮戊二酸特异酶(Dorner and Boll, J. Bacteriol. 184 (14), 3975-83 (2002))。

[0444]

<u>Protein</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI 号</u>	<u>Organism</u>
<i>korA</i>	BAB21494	12583691	嗜热产氢杆菌 (<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>)
<i>korB</i>	BAB21495	12583692	嗜热产氢杆菌 (<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>)
<i>forD</i>	BAB62132.1	14970994	嗜热产氢杆菌 (<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>)
<i>forA</i>	BAB62133.1	14970995	嗜热产氢杆菌 (<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>)
<i>forB</i>	BAB62134.1	14970996	嗜热产氢杆菌 (<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>)
<i>forG</i>	BAB62135.1	14970997	嗜热产氢杆菌 (<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>)

[0445]

<i>forE</i>	BAB62136.1	14970998	嗜热产氢杆菌 (<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>)
<i>Clim_0204</i>	ACD89303.1	189339900	泥生绿菌 (<i>Chlorobium limicola</i>)
<i>Clim_0205</i>	ACD89302.1	189339899	泥生绿菌 (<i>Chlorobium limicola</i>)
<i>Clim_1123</i>	ACD90192.1	189340789	泥生绿菌 (<i>Chlorobium limicola</i>)
<i>Clim_1124</i>	ACD90193.1	189340790	泥生绿菌 (<i>Chlorobium limicola</i>)
<i>korA</i>	CAA12243.2	19571179	索氏菌 <i>Thauera aromatica</i>
<i>korB</i>	CAD27440.1	19571178	索氏菌 <i>Thauera aromatica</i>

[0446] L. 丙酮酸羧化酶。丙酮酸羧化酶(EC 6.4.1.1)以1个ATP的代价直接将丙酮酸转化为草酰乙酸。丙酮酸羧化酶由酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中的PYC1(Walker et al., *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 176:1210-1217 (1991) 和PYC2(Walker et al., 同上))编码,以及由在耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)中的pyc编码(Mukhopadhyay and Purwantini, *Biochim.Biophys.Acta* 1475:191-206 (2000))。

[0447]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物
PYC1	NP_011453	6321376	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
PYC2	NP_009777	6319695	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Pyc	YP_890857.1	118470447	耻垢分枝杆菌 (<i>Mycobacterium smegmatis</i>)

[0448] M. 果酸酶。可以应用苹果酸酶来将二氧化碳和丙酮酸转化为苹果酸,以1个还原当量为代价。用于此目的的苹果酸可以包括但不限于苹果酸酶(NAD依赖性)和苹果酸酶(NADP依赖性)。例如,可以表达大肠杆菌苹果酸之一(Takeo, *J.Biochem.* 66:379-387 (1969))或具有较高活性的类似酶,以允许丙酮酸和二氧化碳转化成苹果酸。通过将碳固定为丙酮酸而不是PEP,苹果酸允许丙酮酸激酶保留来自PEP的高能磷酸键,由此在丙酮酸形成中或通过葡萄糖转运铁蛋白系统生产ATP。虽然苹果酸通常被认为是从苹果酸向丙酮酸形成方向起作用,但已经证明由maeA编码的NAD依赖性酶的过量表达,在无氧条件下通过在碳固定方向起作用(Stols和Donnelly, *Appl.Environ.Microbiol.* 63 (7) 2695-2701 (1997)),增加了大肠杆菌中的琥珀酸生产,同时恢复了致死的δpf1-delta 1dhA表型(pf1和1dhA无活性或删除)。在大肠杆菌中过量表达来自猪蛔虫(*Ascaris suum*)的苹果酸酶,也观察到类似结果。

(Stols et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 63–65 (1), 153–158 (1997))。由maeB编码的第二种大肠杆菌苹果酸酶是NADP依赖性的,也是草酰乙酸和其他 α -酮酸的脱羧酶(Iwakura et al., J. Biochem. 85 (5) : 1355–65 (1979))。

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
[0449] <i>maeA</i>	NP_415996	90111281	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	NP_416958	16130388	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	P27443	126732	猪蛔虫 (<i>Ascaris suum</i>)

[0450] PEP合成酶:也称为丙酮酸水激酶,该酶将丙酮酸转化为PEP,代价是两个ATP当量。它将ATP转换成AMP。在大肠杆菌中,该酶由ppsA编码。它主要在糖异生过程中起作用,并提供生物质前体(Cooper and Kornberg, Biochim Biophys Acta, 104 (2) ; 618–20, (1965))。其活性由ppsR编码的调节蛋白调节,其催化 P_i 依赖性活化和PEP合成酶的ADP/ATP依赖性失活。通过丙酮酸的存在,可保护PEP合成酶免于失活(Brunell, BMC Biochem. 1 Jan 3;11:1, (2010))。已经证实该酶的过度表达,通过提高芳香族氨基酸生物合成途径的前体PEP的可利用性,来增加芳香族氨基酸的生产(Yi et al., Biotechnol Prog., 18 (6) :1141–8., (2002); Patnaik and Liao. Appl Environ Microbiol. 1994 Nov; 60 (11) :3903–8 (2001)))。已经在其他微生物中研究了该酶,例如强烈热球菌(*Pyrococcus furiosus*) (Hutchins et al., J Bacteriol., 183 (2) : 709–15 (2001)) and *Pseudomonas fluorescens* (J Biotechnol. 2013 Sep 10; 167 (3) : 309–15 (2013)) 和荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) (J Biotechnol., 2013年9月10日; 167 (3) : 309–15 (2013))。

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
[0451] <i>ppsA</i>	NP_416217.1	16129658	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	CAA56785.1	967060	强烈热球菌 (<i>Pyrococcus furiosus</i>)
	EFQ61998.1	311283408	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)

[0452] 实施例X

[0453] 1,3-丁二醇、巴豆醇、3-丁烯-2-醇和丁二烯合成酶

[0454] 本实施例提供可用于将乙酰辅酶A转化为1,3-丁二醇、巴豆醇、3-丁烯-2-醇、丁二烯的基因,如图5和6的途径所示。

[0455] 图5.将1,3-丁二醇转化为3-丁烯-2-醇和/或丁二烯的途径。A) 乙酰辅酶A羧化酶,B) 乙酰乙酰辅酶A合成酶,C) 乙酰辅酶A:乙酰辅酶A酰基转移酶,D) 乙酰乙酰辅酶A还原酶(酮还原),E) 3-羟基丁酰辅酶A还原酶(醛形成),F) 3-羟基丁酰辅酶A水解酶、转移酶或合成酶,G) 3-羟基丁酸还原酶,H) 3-羟基丁醛还原酶,I) 化学脱水或图6中相应的步骤,J) 3-羟基

丁酰基-CoA脱水酶,K)巴豆酰辅酶A还原酶(醛形成),L)巴豆酰辅酶A水解酶、转移酶或合成酶,M)巴豆酸还原酶,N)巴豆醛还原酶,O)巴豆醇激酶,P)2-丁烯-4-磷酸激酶,Q)丁二烯合成酶,R)巴豆醇二磷酸激酶,S)化学脱水或巴豆醇脱水酶,T)丁二烯合成酶(单磷酸),T)丁二烯合成酶(单磷酸)U)巴豆酰辅酶A还原酶(醇形成),和V)3-羟基丁酰辅酶A还原酶(醇形成)。

[0456] A. 乙酰辅酶A羧化酶。乙酰辅酶A羧化酶(EC 6.4.1.2)催化乙酰辅酶A向丙二酰辅酶A的ATP依赖性羧化作用。这种酶是生物素依赖性的,是几种生物中脂肪酸生物合成起始的第一反应。示例性酶由大肠杆菌的accABCD(Davis et al., J Biol Chem 275:28593-8 (2000)),酿酒酵母的ACC1和同系物(Sumper et al., Methods Enzym 71:34-7 (1981))编码。

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
ACCI	CAA96294.1	1302498	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
KLLA0F06072g	XP_455355.1	50310667	乳酸克鲁维酵母 (<i>Kluyveromyces lactis</i>)
ACCI	XP_718624.1	68474502	白色假丝酵母 (<i>Candida albicans</i>)
YALI0C11407p	XP_501721.1	50548503	解脂耶氏酵母 (<i>Yarrowia lipolytica</i>)
ANI_1_1724104	XP_001395476.1	145246454	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)
accA	AAC73296.1	1786382	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
accB	AAC76287.1	1789653	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
accC	AAC76288.1	1789654	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
[0457]			
accD	AAC75376.1	1788655	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
[0458]			

[0459] B. 乙酰乙酰辅酶A合成酶。丙二酰辅酶A和乙酰辅酶A底物转化为乙酰乙酰辅酶A,可由2.3.1酶家族中的CoA合成酶催化。催化CoA合成酶活性的几种酶已经在文献中描述并且代表合适的候选物。

[0460] 3-酰氧基-CoA产物,如乙酰乙酰辅酶A、3-氧化戊酰辅酶A、3-氧化-5-羟基戊酰辅酶A,可以由酰基辅酶A和丙二酰辅酶A底物,通过3-氧化酰基辅酶A合成酶合成。由于该类中的酶催化基本不可逆反应,它们特别适用于代谢工程应用,用于过量生产衍生自3-氧化酰

基辅酶A中间体如乙酰乙酰辅酶A的代谢物、燃料或化学物质。例如，乙酰乙酰辅酶A合成酶已经在生物合成丁醇和聚-(3-羟基丁酸) (Matsumoto et al., Biosci Biotech Biochem, 75:364–366 (2011)) 的生物中异源表达 (Lan et al., PNAS USA (2012))。在土壤细菌链霉菌属CL190中已经表征了乙酰乙酰辅酶A合成酶 (EC 2.3.1.194) 酶 (FhsA)，其参与甲羟戊酸生物合成 (Okamura et al., PNAS USA 107:11265–70 (2010)))。其他乙酰乙酰辅酶A合成酶基因可以通过与fhsA的序列同源性鉴定。

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
fhsA	BAJ83474.1	325302227	链霉菌 (<i>Streptomyces</i>) sp CL190
AB183750.1:11991..12971	BAD86806.1	57753876	链霉菌 (<i>Streptomyces</i>) sp. KO-3988
[0461]	epzT	ADQ43379.1	肉桂链霉菌 (<i>Streptomyces cinnamonensis</i>)
	ppzT	CAX48662.1	环圈链霉菌 (<i>Streptomyces anulatus</i>)
	O3I_22085	ZP_09840373.1	巴西诺卡氏菌 (<i>Nocardia brasiliensis</i>)

[0462] C. 乙酰辅酶A:乙酰辅酶A酰基转移酶(乙酰乙酰辅酶A硫解酶)。乙酰乙酰辅酶A硫解酶(也称为乙酰辅酶A乙酰转移酶)将两分子乙酰辅酶A转化为乙酰乙酰辅酶A和辅酶A各一分子。乙酰乙酰辅酶A硫解酶的示例包括来自大肠杆菌的atoB基因产物 (Martin et al., Nat. Biotechnol 21:796–802 (2003))、来自丙酮丁醇梭菌的thlA和thlB (Hanai et al., Appl Environ Microbiol 73:7814–7818 (2007); Winzer et al., J. Mol. Microbiol Biotechnol 2:531–541 (2000) 和来自酿酒酵母 (Hiser et al., J. Biol. Chem. 269:31383–31389 (1994))。来自生枝动胶菌 (*Zoogloea ramigera*) 的乙酰乙酰辅酶A硫解酶的生物合成方向不可逆的,且晶体结构已知 (Merilainen et al., Biochem 48:11011–25 (2009))。这些基因/蛋白质如在下表中所示。

Gene	GenBank ID	GI号	Organism
[0463]	AtoB	NP_416728	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	ThlA	NP_349476.1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
	ThlB	NP_149242.1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
	ERG10	NP_015297	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
	phbA	P07097.4	生枝动胶菌 (<i>Zoogloea ramigera</i>)

[0464] D.乙酰乙酰辅酶A还原酶。合适的酶活性是1.1.1.a氧化还原酶(氧代至醇)。见此处。此外,乙酰乙酰辅酶A还原酶(EC 1.1.1.36)催化乙酰乙酰辅酶A还原成3-羟基丁酰辅酶A。该酶参与了几种梭菌中的丁酸乙酰辅酶A发酵途径,并已详细研究(Jones et al., Microbiol Rev.50:484-524 (1986))。乙酰乙酰辅酶A还原酶还参与许多生物中的多羟基丁酸生物合成,并且也在代谢工程中用于过量生产PHB和3-羟基异丁酸(Liu et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 76: 811-818 (2007)); Qui et al., Appl. Microbiol. Biotechnol. 69:537-542 (2006))。丙酮丁醇梭菌中由hbd编码的酶已经在大肠杆菌(Youngleson et al., J Bacteriol. 171:6800-6807 (1989))中克隆并功能表达。另外的候选基因包括来自生枝动胶菌(*Zoogloea ramigera*)的PhbB(Ploux et al., Eur. J Biochem. 174:177-182 (1988))和来自类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)的phaB(Alber et al., Mol. Microbiol 61:297-309 (2006))。生枝动胶菌(*Zoogloea ramigera*)基因是NADPH依赖性的,并且该基因已经在大肠杆菌中表达(Peoples et al., Mol. Microbiol 3:349-357 (1989))。对基因的底物特异性研究的结论是,除了乙酰乙酰辅酶A之外,其海可以接受3-氧代丙酰基辅酶A作为底物(Ploux et al., Eur. J Biochem. 174:177-182 (1988))。额外的基因包括在脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)中的phaB,克氏梭菌中的Hbd1(C端结构域)和Hbd2(N端结构域)(Hillmer和Gottschalk,Biochim. Biophys. Acta 3334:12-23 (1974))和牛(*Bos taurus*)中的HSD17B10(Wakil et al., J Biol. Chem. 207: 631-638 (1954))。已经在大肠杆菌(Yabutani et al., FEMS Microbiol Lett. 133:85-90 (1995))中功能地表达和表征脱氮副球菌的酶。在其他梭菌品种和勤奋金属球菌(*Metallosphaera sedula*)中已经发现了许多类似的酶(Berg et al., Science. 318:1782-1786 (2007))。来自热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)的酶是过氧化物酶脂肪酸β-氧化多功能酶2型(MFE-2)的组件。该蛋白质的脱氢酶B结构域对乙酰乙酰辅酶A具有催化活性。该结构域在大肠杆菌中已功能表达,晶体结构已知,并且催化机制得到了很好的理解(Ylianttila et al., Biochem Biophys Res Commun 324:25-30 (2004); Ylianttila et al., J Mol Biol 358:1286-1295 (2006))。

[0465]

蛋白质	Genbank ID	GI 号	生物体
<i>fadB</i>	P21177.2	119811	大肠杆菌 (<i>ESCHERICHIA COLI</i>)
<i>fadJ</i>	P77399.1	3334437	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>paaH</i>	NP_415913.1	16129356	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>Hbd2</i>	EDK34807.1	146348271	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>Hbd1</i>	EDK32512.1	146345976	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>phaC</i>	NP_745425.1	26990000	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>paaC</i>	ABF82235.1	106636095	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
<i>HSD17B10</i>	O02691.3	3183024	牛 (<i>Bos taurus</i>)
<i>phbB</i>	P23238.1	130017	生枝动胶菌 (<i>Zoogloea ramigera</i>)
<i>phaB</i>	YP_353825.1	77464321	类球红细菌 (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)
<i>phab</i>	BAA08358	675524	脱氮副球菌 (<i>Paracoccus denitrificans</i>)
<i>Hbd</i>	NP_349314.1	15895965	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>Hbd</i>	AAM14586.1	20162442	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	146304189	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Msed_0399</i>	YP_001190500	146303184	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Msed_0389</i>	YP_001190490	146303174	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Msed_1993</i>	YP_001192057	146304741	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Fox2</i>	Q02207	399508	热带假丝酵母 (<i>Candida tropicalis</i>)

[0466] E) 3-羟基丁酰辅酶A还原酶(醛形成)。EC 1.2.1.b 氧化还原酶(酰基辅酶A到醛) 提供合适的酶活性。酰基辅酶A还原酶或酰化醛脱氢酶, 将酰基辅酶A还原成其相应的醛。示例性的酶包括脂肪酰辅酶A还原酶、琥珀酰辅酶A还原酶(EC 1.2.1.76)、乙酰辅酶A还原酶、丁酰辅酶A还原酶、丙酰辅酶A还原酶(EC 1.2.1.3)等等。

[0467]

EC号	酶名称
-----	-----

1.2.1.10	乙醛脱氢酶(乙酰化)
1.2.1.42	(脂肪)酰基辅酶A还原酶
1.2.1.44	肉桂酰基辅酶A还原酶
1.2.1.50	长链脂肪酰基辅酶A还原酶
1.2.1.57	丁醛脱氢酶
1.2.1.75	丙二醛半醛脱氢酶
1.2.1.76	琥珀酸半醛脱氢酶
1.2.1.81	磺酰乙醛脱氢酶
1.2.1.-	丙醛脱氢酶
1.2.1.-	己醛脱氢酶
1.2.1.-	4-羟基丁醛脱氢酶

[0468] 示例性的脂肪酰基辅酶A还原酶,由乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) (Reiser, *Journal of Bacteriology* 179:2969–2975 (1997)) 和不动杆菌属M-1 (Ishige et al., *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1192–1195 (2002))。具有琥珀酰基辅酶A还原酶活性的酶由克氏梭菌 (*Clostridium kluyveri*) 的sucD的sucD编码 (Sohling, *J. Bacteriol.* 178:871–880 (1996)) 和 *P. gingivalis* (Takahashi, *J. Bacteriol.* 182:4704–4710 (2000)))。额外的琥珀酰基辅酶A还原酶参与嗜热古细菌的3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环,包括勤奋金属球菌 (*Metallosphaera Sedula*) (Berg et al., *Science* 318:1782–1786 (2007)) 和中性热变形菌 (*Thermoproteus neutrophilus*) (Ramos-Vera et al., *J. Bacteriol.*, 191:4286–4297 (2009))。由Msed_0709编码的勤奋金属球菌酶严格依赖NADPH,也具有丙二酰基辅酶A还原酶活性。嗜中性粒细胞酶与NADPH和NADH均有活性。由bphG编码的假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp) 中的酰化乙醛脱氢酶的酶是另一个示例,已经证实其氧化和酰化乙醛、丙醛、丁醛、异丁醛和甲醛 (Pawlowski, *J. Bacteriol.* 175:377–385 (1993))。除了将乙酰基辅酶A还原成乙醇之外,已经证实肠粘膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 中由adhE编码的酶将支链化合物异丁醛氧化成异丁酰基辅酶A (Kazahaya, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18:43–55 (1972)); 和Koo et al., *Biotechnol Lett.* 27:505–510 (2005))。丁醛脱氢酶催化类似的反应,在产溶剂生物如梭菌 (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*) (Kosaka et al., *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71:58–68 (2007)) 中将丁酰基辅酶A转化为丁醛。丙酰基辅酶A还原酶的示例包括鼠伤寒沙门氏菌LT2的 pduP (Leal, *Arch. Microbiol.* 180:353–361 (2003)) 和来自大肠杆菌的eutE (Skrály, WO 2004/024876)。天然将丙酰CoA转化为丙醛的鼠伤寒沙门氏菌LT2的丙酰基辅酶A还原酶,也催化5-羟基戊酰基辅酶A还原成5-羟基戊醛 (WO 2010/068953A2)。

[0469]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>acr1</i>	YP_047869.1	50086359	乙酸钙不动杆菌 (<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>)
<i>acr1</i>	AAC45217	1684886	不动杆菌 <i>Acinetobacter baylyi</i>
<i>acr1</i>	BAB85476.1	18857901	不动杆菌 (<i>Acinetobacter</i>) sp. <i>Strain M-1</i>
<i>MSED_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera Sedula</i>)
<i>Tneu_0421</i>	ACB39369.1	170934108	中性热变形菌 (<i>Thermoproteus neutrophilus</i>)
<i>sucD</i>	P38947.1	172046062	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>sucD</i>	NP_904963.1	34540484	牙龈卟啉单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)
<i>bphG</i>	BAA03892.1	425213	假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>) sp
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	肠系膜明串珠菌 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)
<i>bld</i>	AAP42563.1	31075383	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>pduP</i>	NP_460996	16765381	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>) LT2
<i>eutE</i>	NP_416950	16130380	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0470] 将酰基辅酶A转化成其相应醛的另一种酶，是丙二酰辅酶A还原酶，其将丙二酰辅酶A转化成丙二醛。丙二酰辅酶A还原酶是通过热嗜酸古细菌中的3-羟基丙酸循环进行自养碳固定的关键酶(Berg, Science 318:1782-1786 (2007) ; 和Thauer, Science 318:1732-1733 (2007))。该酶利用NADPH作为辅因子，并已在金属球菌和硫化叶菌中得到表征。(Alber et al., J.Bacteriol.188:8551-8559 (2006) ; Hugler, J.Bacteriol.184:2404-2410 (2002))。该酶由勤奋金属球菌中的Msed_0709编码(Alber et al., J.Bacteriol.188: 8551-8559 (2006) ; 和Berg, Science 318:1782-1786 (2007))。编码来自超嗜热硫化叶菌 (*Sulfolobus tokodaii*) 的丙二酰辅酶A还原酶的基因，在大肠杆菌中克隆并异源表达(Alber et al., J.Bacteriol. 188:8551-8559 (2006)), 该酶也证实催化甲基丙二酰辅酶A到其相应的醛(WO2007141208 (2007))。虽然这些醛脱氢酶的功能与来自橙色绿屈挠菌 (*Chloroflexus aurantiacus*) 的双功能脱氢酶相似，但是几乎没有序列相似性，丙二酰辅酶A还原酶候选物与天冬氨酸-半醛脱氢酶(一种催化天冬氨酸-4-磷酸还原并同时脱磷酸

化成天冬氨酸半醛的酶)具有高的序列相似性,其他候选基因可以通过与其他微生物(包括硫矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)和硫酸硫杆菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)蛋白质的序列同源性来发现。另一种CoA酰化醛脱氢的候选酶是拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)的ald基因(Toth,Appl.Environ.Microbiol.65:4973-4980(1999))。据报道,该酶将乙酰辅酶A和丁酰辅酶A还原成其相应的醛。该基因与编码鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌的乙醛脱氢酶的eutE非常相似(Toth,Appl.Environ.Microbiol.65:4973-4980(1999))。

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	勤奋金属球菌 (<i>Metallocphaera sedula</i>)
<i>Mcr</i>	NP_378167.1	15922498	超嗜热硫化叶菌 (<i>Sulfolobus tokodaii</i>)
<i>asd-2</i>	NP_343563.1	15898958	硫矿硫化叶菌 (<i>Sulfolobus solfataricus</i>)
<i>Saci_2370</i>	YP_256941.1	70608071	嗜酸热硫化叶菌 (<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)
<i>Ald</i>	AAT66436	49473535	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>eutE</i>	AAA80209	687645	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)

[0471]

[0472] 4-羟基丁酰辅酶A还原酶,催化4-羟基丁酰辅酶A还原成其相应的醛。几种酰基辅酶A脱氢酶能够催化该活性。克氏梭菌和牙龈卟啉单胞菌的琥珀酸半醛脱氢酶(SucD)见参考文献(WO/2008/115840),其将4-羟基丁酰辅酶A转化成4-羟基丁醛,作为生产1,4-丁二醇的途径的一部分。许多丁醛脱氢酶在4-羟基丁醛上也是有活性的,包括酿酒酵母梭菌(*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*)的bld和假单胞菌属的bphG(Powlowski et al., J.Bacteriol.175:377-385(1993))。另一候选酶是来自拜氏梭菌(*Clostridium beijerinckii*)的ald基因(Toth,Appl.Environ.Microbiol.65:4973-4980(1999)),该基因非常类似于编码鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌的乙醛脱氢酶的eutE(Toth,Appl.Environ.Microbiol.65:4973-4980(1999))。

[0473] 这些和其它具有4-羟基丁酰辅酶A还原酶活性的蛋白质如下所述。

[0474]

<u>Protein</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI 号</u>	<u>Organism</u>
<i>bphG</i>	BAA03892.1	425213	假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>) sp
<i>ald</i>	YP_001310903.1	150018649	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>) NCIMB 8052
<i>Ald</i>	ZP_03778292.1	225569267	梭菌 <i>Clostridium hylemonae</i> DSM 15053
<i>Ald</i>	ZP_03705305.1	225016072	甲基戊糖梭菌 (<i>Clostridium methylpentosum</i>) DSM 5476
<i>Ald</i>	ZP_03715465.1	225026273	霍氏真杆菌 (<i>Eubacterium hallii</i>) DSM 3353
<i>Ald</i>	ZP_01962381.1	153809713	卵形瘤胃球菌 (<i>Ruminococcus obeum</i>) ATCC 29174
<i>Ald</i>	YP_003701164.1	297585384	还原硝酸芽孢杆菌 (<i>Bacillus selenitireducens</i>) MLS10
<i>Ald</i>	AAP42563.1	31075383	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i> N1-4
<i>Ald</i>	YP_795711.1	116334184	短乳杆菌 (<i>Lactobacillus brevis</i>) ATCC 367
<i>Ald</i>	YP_002434126.1	218782808	脱硫杆菌 <i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> AK-01
<i>Ald</i>	YP_001558295.1	160879327	梭菌 <i>Clostridium phytofermentans</i> ISDg
<i>Ald</i>	ZP_02089671.1	160942363	鲍氏梭菌 (<i>Clostridium bolteae</i>) ATCC BAA-613
<i>Ald</i>	ZP_01222600.1	90414628	嗜压发光菌 (<i>Photobacterium profundum</i>) 3TCK
<i>Ald</i>	YP_001452373.1	157145054	克氏柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter koseri</i>) ATCC BAA-895
<i>Ald</i>	NP_460996.1	16765381	伤寒肠道沙门氏菌
<i>Ald</i>	YP_003307836.1	269119659	白蚁塞巴鲁德氏菌 (<i>Sebaldella termitidis</i>) ATCC 33386
<i>Ald</i>	ZP_04969437.1	254302079	具核梭菌 (<i>Fusobacterium nucleatum</i>) subsp. <i>polymorphum</i> ATCC 10953

[0475]

<i>Ald</i>	YP_002892893.1	237808453	甲苯单胞菌 <i>Tolumonas auensis</i> DSM 9187
<i>Ald</i>	YP_426002.1	83592250	深红红螺菌 (<i>Rhodospirillum rubrum</i>) ATCC 11170

[0476] F) 3-羟基丁酰辅酶A水解酶、转移酶或合成酶。EC 3.1.2.a CoA水解酶、EC 2.8.3.a CoA转移酶和/或EC 6.2.1.a CoA合成酶提供合适的酶活性。见下文和此处。

[0477] G) 3-羟基丁酸还原酶。EC 1.2.1.e 氧化还原酶(酸到醛) 提供合适活性。见下文和此处。

[0478] H) 3-羟基丁醛还原酶。EC 1.1.1.a 氧化还原酶(氧化到醇) 提供合适的活性。见此处。

[0479] I) 化学脱水,或者见图6中相应的酶途径。

[0480] J) 3-羟基丁酰辅酶A脱水酶。EC 4.2.1. 水解酶提供合适的酶活性,并在下文和此处中描述。由ech编码的恶臭假单胞菌的烯酰辅酶A水合酶,催化3-羟基丁酰辅酶A向巴豆酰辅酶A的转化(Roberts et al., Arch. Microbiol. 117:99–108 (1978))。这种转化也由丙酮丁醇梭菌的crt基因产物、克氏梭菌的crt1基因产物和其他梭菌生物(Atsumi et al., Metab Eng 10:305–311 (2008) Boynton et al., J Bacteriol. 178:3015–3024 (1996); Hillmer et al., FEBS Lett. 21:351–354 (1972)))催化。。另外的烯酰辅酶A水合酶候选物是恶臭假单胞菌的phaA和phaB和荧光假单胞菌的paaA和paaB(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:6419–6424 (1998))。预测番红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)中pimF的基因产物,编码了参与庚二酰辅酶A降解的烯酰辅酶A水合酶(Harrison et al., Microbiology 151:727–736 (2005))。最后,已经证实许多大肠杆菌基因表现出烯酰辅酶A水合酶的功能,包括maoC(Park et al., J Bacteriol. 185: 5391–5397 (2003))、paaF(Ismail et al., Eur. J Biochem 270:3047–3054 (2003); Park et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 113–116:335–346 (2004); Park et al., Biotechnol Bioeng 86:681–686 (2004)) 和paaG(Ismail et al., Eur. J Biochem. 270:3047–3054 (2003); Park and Lee, Appl. Biochem. Biotechnol. 113–116:335–346 (2004); Park and Yup, Biotechnol Bioeng 86:681–686 (2004))。

[0481]

蛋白质	GenBank No.	GI号	生物体
<i>ech</i>	NP_745498.1	26990073	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>crt</i>	NP_349318.1	15895969	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium Acetobutylicum</i>)
<i>crtl</i>	YP_001393856	153953091	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)

[0482]

<i>phaA</i>	ABF82233.1	26990002	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>phaB</i>	ABF82234.1	26990001	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>paaA</i>	NP_745427.1	106636093	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
<i>paaB</i>	NP_745426.1	106636094	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
<i>maoC</i>	NP_415905.1	16129348	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>paaF</i>	NP_415911.1	16129354	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
蛋白质	GenBank No.	GI No.	生物
<i>paaG</i>	NP_415912.1	16129355	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0483] K) 巴豆酰辅酶A还原酶(醛形成)。EC 1.2.1.b 氧化还原酶(酰基辅酶A到醛) 提供合适的酶活性。1.2.1族中的酰基辅酶A还原酶将酰基辅酶A还原成其相应的醛。几种酰基辅酶A还原酶已经在开放文献中描述,并且代表了该步骤的合适候选物。这些在上文和此处描述。

[0484] L) 巴豆酰辅酶A水解酶、转移酶或合成酶。EC 3.1.2.a CoA水解酶、EC 2.8.3.a CoA转移酶和/或EC 6.2.1.A CoA合成酶提供合适的酶活性,并在本申请和以下部分中描述。

[0485] EC 3.1.2.a CoA水解酶。3.1.2家族中的酶将酰基辅酶A分子水解成其相应的酸。已经在文献中描述了几种这样的酶,并且代表这些步骤的合适的候选物。

[0486] 例如,由来自褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) 脑的acot12编码的酶 (Robinson et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.71:959-965 (1976)) 可以与丁酰辅酶A、己酰辅酶A和丙二酰辅酶A反应。由acot8编码的人二羧酸硫酯酶,对戊二酰辅酶A、己二酰辅酶A、辛二酰辅酶A、癸二酰辅酶A和十二烷二酰辅酶A具有活性 (Westin et al., J.Biol.Chem.280:38125-38132 (2005)) 有火星。与该酶最接近的大肠杆菌同系物tesB,也可以水解一系列CoA巯基酯 (Naggert et al., J Biol Chem 266:11044-11050 (1991))。类似的酶也已经在大鼠肝脏中表征 (Deana R., Biochem Int 26:767-773 (1992))。在大肠杆菌中具有水解酶活性的其它酶,包括ybgC、paaI和ybdB (Kuznetsova et al., FEMS Microbiol Rev, 2005, 29 (2) : 263-279; Song et al., J Biol Chem, 2006, 281 (16) : 11028-38)。虽然其序列尚未报道,但是豌豆叶线粒体的酶具有广泛的底物特异性,对乙酰辅酶A、丙酰辅酶A、丁酰辅酶A、棕榈酰辅酶A、油酰辅酶A、琥珀酰辅酶A和巴豆酰辅酶A证实有活性 (Zeiher et al., Plant.Physiolog.94:20-27 (1990))。来自酿酒酵母的乙酰辅酶A水解酶ACH1,代表另一种候选水解酶 (Buu et al., J.Biol.Chem.278:17203-17209 (2003))。

蛋白质	GenBank 登录号.	GI 号	生物体
[0487]	acot12	NP_570103.1	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
	tesB	NP_414986	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	acot8	CAA15502	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
	acot8	NP_570112	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
	tesA	NP_415027	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	ybgC	NP_415264	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	paaI	NP_415914	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	ybdB	NP_415129	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	ACH1	NP_009538	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0488] 另外的水解酶包括3-羟基异丁酰辅酶A水解酶,其被描述为在缬氨酸降解期间有效催化3-羟基异丁酰辅酶A向3-羟基异丁酸转化(Shimomura et al., J Biol Chem. 269: 14248-14253 (1994))。编码这种酶的基因,包括褐家鼠(Shimomura et al., Methods Enzymol. 324:229-240 (2000))和智人(Shimomura et al., 同上)。也可以通过序列同源性鉴定类似的候选基因,包括酿酒酵母的hibch和蜡状芽孢杆菌的BC_2292。

[0489]

蛋白质	GenBank No.	GI号	生物体
hibch	Q5XIE6.2	146324906	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
hibch	Q6NVY1.2	146324905	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
hibch	P28817.2	2506374	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
BC_2292	AP09256	29895975	蜡样芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)

[0490] EC 2.8.3.a CoA转移酶。2.8.3家族中的酶催化CoA部分从一个分子到另一个分子的可逆转移。几种CoA转移酶已经在开放文献中描述并且代表这些步骤的合适的候选物。这些在下面描述。

[0491] 许多转移酶具有广泛的特异性,因此可以利用乙酸、琥珀酸、丙酸、丁酸、2-甲基乙酰乙酸、3-酮戊酸、戊酸、巴豆酸、3-巯基丙酸、丙酸、乙酸乙烯酯,丁酸等多种CoA受体。例如,来自罗氏菌(Roseburia) A2-183的一种酶证实具有丁酰辅酶A:乙酸:CoA转移酶和丙酰辅酶A:乙酸:CoA转移酶活性(Charrier et al., Microbiology 152, 179-185 (2006))。近缘同系物可以在例如肠罗氏菌(Roseburia intestinalis) L1-82、罗氏菌Roseburia

inulinivorans DSM 16841、直肠真杆菌 (*Eubacterium rectale*) ATCC 33656中找到。具有丙酰CoA转移酶活性的另一种酶可以丙酸梭菌 (Selmer et al., Eur J Biochem 269, 372–380 (2002)) 中找到。该酶可以使用乙酸、(R)-乳酸、(S)-乳酸、丙烯酸和丁酸作为CoA受体 (Selmer et al., Eur J Biochem 269, 372–380 (2002); Schweiger and Buckel, FEBS Letters, 171 (1) 79–84 (1984))。可以在例如诺维氏芽孢梭菌 (*Clostridium novyi*) NT、拜氏梭菌 (*Clostridium beijerinckii*) NCIMB 8052和肉毒梭菌 C str. Eklund中找到近缘同系物。YgfH在大肠杆菌中编码丙酰CoA:琥珀酸CoA转移酶 (Haller et al., Biochemistry, 39 (16) 4622–4629)。近缘同系物可以在例如杨氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter youngae*) ATCC 29220, 肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) subsp. 艾滋病血清型和耶尔森氏菌ATCC 29909。

[0492]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>Ach1</i>	AAX19660.1	60396828	罗氏菌 (<i>Roseburia</i>) sp. A2-183
<i>ROSINTL182_0712_1</i>	ZP_04743841.2	257413684	肠罗氏菌 (<i>Roseburia intestinalis</i>) L1-82
<i>ROSEINA2194_036_42</i>	ZP_03755203.1	225377982	罗氏菌 <i>Roseburia inulinivorans</i>
<i>EUBREC_3075</i>	YP_002938937.1	238925420	直肠真杆菌 (<i>Eubacterium rectale</i>) ATCC 33656
<i>Pct</i>	CAB77207.1	7242549	丙酸梭菌 (<i>Clostridium propionicum</i>)
<i>NT01CX_2372</i>	YP_878445.1	118444712	诺维氏芽孢梭菌 (<i>Clostridium novyi</i>) NT
<i>Cbei_4543</i>	YP_001311608.1	150019354	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>CBC_A0889</i>	ZP_02621218.1	168186583	肉毒杆菌 (<i>Clostridium botulinum</i>) C str. Eklund
<i>ygfH</i>	NP_417395.1	16130821	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>CIT292_04485</i>	ZP_03838384.1	227334728	杨氏柠檬酸杆菌 (<i>Citrobacter youngae</i>) ATCC 29220

[0493]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>SARI_04582</i>	YP_001573497.1	161506385	肠道沙门氏菌 (<i>Salmonella enterica</i>) subsp. <i>arizona</i> serovar
<i>yinte0001_14430</i>	ZP_04635364.1	238791727	中间耶尔森菌 (<i>Yersinia intermedia</i>) ATCC 29909

[0494] 另外的候选酶是在假单胞菌中由pcaI和pcaJ编码的双亚基酶,其已证实具有3-氧化己二酰辅酶A/琥珀酸转移酶活性 (Kaschabek et al., 同上)。基于同源性的类似酶存在

于不动杆菌sp. ADP1 (Kowalchuk et al., Gene 146:23-30 (1994)) 和天蓝色链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中。幽门螺杆菌 (Corthesy-Theulaz et al., J.Biol.Chem.227:25659-25667 (1997)) 和枯草芽孢杆菌 (Stols et al., 蛋白质) 中存在另外的示例性琥珀酰辅酶A:3:含氧酸-CoA转移酶. Expr.Purif.53:396-403 (2007))。这些蛋白质如下所示。

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>pcaI</i>	AAN69545.1	24985644	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>pcaJ</i>	NP_746082.1	26990657	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>pcaI</i>	YP_046368.1	50084858	不动杆菌 (<i>Acinetobacter</i>) sp. ADPI
<i>pcaJ</i>	AAC37147.1	141776	不动杆菌 (<i>Acinetobacter</i>) sp. ADPI
<i>pcaI</i>	NP_630776.1	21224997	天蓝色链霉菌 (<i>Streptomyces coelicolor</i>)
<i>pcaJ</i>	NP_630775.1	21224996	天蓝色链霉菌 (<i>Streptomyces coelicolor</i>)
<i>HPAG1_0676</i>	YP_627417	108563101	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>)
<i>HPAG1_0677</i>	YP_627418	108563102	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>)
<i>ScoA</i>	NP_391778	16080950	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
<i>ScoB</i>	NP_391777	16080949	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)

[0495]

[0496] 可以利用乙酸作为CoA受体的CoA转移酶,是由大肠杆菌atoA(α亚基)和atoD(β亚基)基因编码的乙酰乙酰CoA转移酶 (Vanderwinkel et al., Biochem.Biophys.Res Commun.33:902-908 (1968); Korolev et al., Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr.58:2116-2121 (2002))。还已经证实该酶将CoA部分从各种支链和线性酰基辅酶A底物转移到乙酸,包括异丁酸 (Matthies et al., Appl Environ Microbiol 58:1435-1439 (1992))、戊酸 (Vanderwinkel et al.) 和丁酸甲酯 (Vanderwinkel et al., 同上)。类似的酶存在于谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032 (Duncan et al., Appl Environ Microbiol 68: 5186-5190 (2002))、丙酮丁醇梭菌 (Cary et al., Appl Environ Microbiol 56:1576-1583 (1990)) 和梭菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka et al., Biosci.Biotechnol.Biochem.71:58-68 (2007)) 中。这些蛋白质如下所示。

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>atoA</i>	P76459.1	2492994	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
<i>atoD</i>	P76458.1	2492990	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
<i>actA</i>	YP_226809.1	62391407	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) ATCC 13032
<i>cg0592</i>	YP_224801.1	62389399	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) ATCC 13032
[0497] <i>ctfA</i>	NP_149326.1	15004866	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>ctfB</i>	NP_149327.1	15004867	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>ctfA</i>	AAP42564.1	31075384	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>ctfB</i>	AAP42565.1	31075385	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>

[0498] 附加的示例性转移酶候选物,由克氏梭菌 (*Clostridium kluyveri*) 的cat1、cat2和cat3的基因产物催化,后者分别显示出琥珀酰辅酶A、4-羟基丁酰辅酶A和丁酰CoA转移酶活性(Seedorf et al., Sohling et al., Eur.J Biochem. 212:121-127 (1993); Sohling et al., J Bacteriol. 178:871-880 (1996))。类似的CoA转移酶活性也存在于阴道毛滴虫 (van Grinsven et al., J.Biol.Chem. 283:1411-1418 (2008)) 和布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*) (Riviere et al., J.Biol.Chem. 279:45337-45346 (2004)) 中。这些蛋白质如下所示。

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
[0499] <i>cat1</i>	P38946.1	729048	克氏梭菌 (<i>Clostridium</i>)

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
[0500]			<i>kluyveri</i>)
<i>cat2</i>	P38942.2	172046066	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>cat3</i>	EDK35586.1	146349050	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>TVAG_395550</i>	XP_001330176	123975034	阴道毛滴虫 (<i>Trichomonas vaginalis</i>) G3
<i>Tb11.02.0290</i>	XP_828352	71754875	布氏锥虫 (<i>Trypanosoma brucei</i>)

[0501] 来自无氧细菌发酵氨基酸球菌 (*Acidaminococcus fermentans*) 的戊二酸CoA转移酶 (EC 2.8.3.12), 与二酸戊酰辅酶A和3-丁烯酰辅酶A反应 (Mack et al., FEBS Lett. 405: 209–212 (1997))。编码该酶的基因是 *gctA* 和 *gctB*。该酶与其他CoA衍生物 (包括戊二酰辅酶A、2-羟基戊二酰辅酶A、己二酰辅酶A和丙烯酰辅酶A) 具有降低但可检测的活性 (Buckel et al., Eur. J. Biochem. 118: 315–321 (1981))。该酶已经在大肠杆菌中克隆并表达 (Mack et al., Eur. J. Biochem. 226: 41–51 (1994))。这些蛋白质如下所示。

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
[0502]	<i>gctA</i>	CAA57199.1	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)
	<i>gctB</i>	CAA57200.1	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)

[0503] EC 6.2.1.a CoA合成酶 (酸-硫醇连接酶)。酰基辅酶A底物向其酸产物的转化, 可以由6.2.1家族酶中的CoA酸-硫醇连接酶或CoA合成酶催化, 其中几种是可逆的。在文献中已经描述了催化CoA酸-硫醇连接酶或CoA合成酶活性的几种酶, 并且代表这些步骤的合适候选物。

[0504] 例如, ADP形成乙酰辅酶A合成酶 (ACD, EC 6.2.1.13) 是一种通过ATP伴随合成, 将酰基辅酶A转化成其相应酸的酶。由AF1211编码的来自火焰古球状菌 (*Archaeoglobus fulgidus*) 的ACD I, 证实在各种线性和支链底物起作用, 包括异丁酸、异戊酸和富马酸 (Musfeldt et al., J Bacteriol. 184: 636–644 (2002))。火焰古球状菌 (*Archaeoglobus fulgidus*) 中由AF1983编码的第二个可逆ACD, 也证实具有对环状化合物苯乙酸和吲哚乙酸宽底物范围具有高活性 (Musfeldt and Schonheit, J Bacteriol. 184: 636–644 (2002))。来

自死海盐细菌 (*Haloarcula marismortui*) (注释为琥珀酰辅酶A合成酶) 的酶接受丙酸、丁酸和支链酸(异戊酸和异丁酸)作为底物，并显示其在正向和反向方向上运行 (Brasen et al., Arch Microbiol 182:277-287 (2004))。来自耐超高温热棒菌 (*Pyrobaculum aerophilum*) 通过PAE3250编码的ACD显示出在所有表征过的ACD中的最广泛底物范围，与乙酰辅酶A、异丁酰辅酶A(优选底物)和苯乙酰辅酶A(Brasen et al., 同上)反应。定向进化或工程化可用于修饰该酶以在宿主生物的生理温度下起作用。来自火焰古球状菌，死海盐细菌和耐超高温热棒菌的酶已经在大肠杆菌中克隆、功能表达和表征 (Brasen and Schonheit, 同上; Musfeldt and Schonheit, J Bacteriol. 184:636-644 (2002))。另外的候选物是琥珀酰辅酶A合成酶，由大肠杆菌的sucCD和酿酒酵母的LSC1和LSC2基因编码。这些酶在体内可逆的反应中催化从琥珀酸形成琥珀酰辅酶A，同时消耗1个ATP (Buck et al., Biochemistry 24:6245-6252 (1985))。已证明来自恶臭假单胞菌的酰基CoA连接酶可以在几种脂肪族底物起作用，其中包括乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸和辛酸，以及芳族化合物如苯乙酸和苯氧基乙酸 (Fernandez-Valverde et al., Appl. Environ. Microbiol. 59: 1149-1154 (1993))。来自豆根瘤菌 (*Rhizobium leguminosarum*) 的相关酶，即丙二酰辅酶A合成酶 (6.3.4.9)，可以将几种二酸，即乙基、丙基、烯丙基-、异丙基-、二甲基-、环丙基-、环丙基亚甲基-、环丁基-和苄基-丙二酸转化到其相应的单硫代酯 (Pohl et al., J. Am. Chem. Soc. 123:5822-5823 (2001))。

[0505]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
<i>AFI211</i>	NP_070039.1	11498810	火焰古球状菌 (<i>Archaeoglobus fulgidus</i>)
<i>AFI983</i>	NP_070807.1	11499565	火焰古球状菌 (<i>Archaeoglobus fulgidus</i>)
<i>Scs</i>	YP_135572.1	55377722	死海盐细菌 (<i>Haloarcula marismortui</i>)
<i>PAE3250</i>	NP_560604.1	18313937	耐超高温热棒菌 (<i>Pyrobaculum aerophilum</i>) str. IM2
<i>sucC</i>	NP_415256.1	16128703	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>sucD</i>	AAC73823.1	1786949	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>LSC1</i>	NP_014785	6324716	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0506]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
LSC2	NP_011760	6321683	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
paaF	AAC24333.2	22711873	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
matB	AAC83455.1	3982573	豆科根瘤菌 (<i>Rhizobium leguminosarum</i>)

[0507] 这些步骤的另一种候选酶是6-羧基己酸-CoA连接酶,也称为庚二酰辅酶A连接酶(EC 6.2.1.14),其在革兰氏阳性细菌的生物素合成过程中将庚二酸自然活化成庚二酰辅酶A。克隆到大肠杆菌中的来自门多萨假单胞菌(*Pseudomonas mendocina*)的酶,显示接受己二酸和壬二酸作为替代底物(Binieda et al., Biochem. J 340 (Pt 3) :793-801 (1999))。其他候选物存在于枯草芽孢杆菌(Bower et al., JBacteriol. 178:4122-4130 (1996))和球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*) (以前称为球形芽孢杆菌(*Bacillus sphaericus*)) (Ploux et al., Biochem. J 287 (Pt 3) :685-690 (1992))。

[0508]

蛋白	GenBank ID	GI号	生物体
bioW	NP_390902.2	50812281	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
bioW	CAA10043.1	3850837	门多萨假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>)
bioW	P22822.1	115012	球形芽孢杆菌 (<i>Bacillus sphaericus</i>)

[0509] 另外的CoA连接酶包括序列尚未表征的大鼠二羧酸-CoA连接酶(Vamecq et al., Biochem. J 230:683-693 (1985)),来自产黄青霉菌(*P. chrysogenum*)的两种已表征苯乙酸-CoA连接酶(Lamas-Maceiras et al., Biochem. J 395:147-155 (2006); Wang et al., 360: 453-458 (2007)),来自恶臭假单胞菌的苯乙酸-CoA连接酶(Martinez-Blanco等人,J Biol Chem 265:7084-7090 (1990))和来自枯草芽孢杆菌的6-羧基己酸-CoA连接酶(Bower等人J Bacteriol 178 (14) :4122-4130 (1996))。来自小家鼠(*Mus musculus*) (Hasegawa et al., Biochim Biophys Acta 1779:414-419 (2008))和智人(*Homo sapiens*) (Ohgami et al., Biochem. Pharmacol. 65:989-994 (2003))的乙酰乙酰辅酶A合成酶,天然地催化乙酰乙酸转化为乙酰乙酰辅酶A的ATP依赖性转化。

[0510]

蛋白质	登录号.	GI号	生物体
phl	CAJ15517.1	77019264	产黄青霉菌 (<i>Penicillium chrysogenum</i>)
phlB	ABS19624.1	152002983	产黄青霉菌 (<i>Penicillium chrysogenum</i>)
paaF	AAC24333.2	22711873	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
bioW	NP_390902.2	50812281	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus</i>)

[0511]			<i>subtilis</i>)
	AACS	NP_084486.1	21313520 小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
	AACS	NP_076417.2	31982927 智人 (<i>Homo sapiens</i>)

[0512] 与其他类别的酶一样,EC 6.2.1类中的某些酶已被确定为具有广泛的底物特异性。已证明来自恶臭假单胞菌的酰基CoA连接酶,可以在几种脂肪族底物起作用,其中包括乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸和辛酸,以及芳族化合物如苯乙酸和苯氧基乙酸(Fernandez-Valverde et al., Applied and Environmental Microbiology 59:1149-1154 (1993))。来自豆根瘤菌的相关酶,即丙二酰辅酶A合成酶(6.3.4.9)可以将几种二酸,即乙基-丙基-、烯丙基-、异丙基-、二甲基-、环丙基-、环丙基亚甲基-、环丁基-和苄基-丙二酸转化为相应的单硫代酯(Pohl et al., J.Am.Chem.Soc.123:5822-5823 (2001))。

[0513] M) 巴豆酸还原酶。合适的酶活性是1.2.1.e氧化还原酶(酸对醛),其包括以下。

[0514] 酸到醛的转化是热力学不利的,并且通常需要富含能量的辅因子和多个酶促步骤。通过单一酶将酸直接转化为醛,由1.2.1家族中的酸还原酶催化。示例性的酸还原酶包括羧酸还原酶、 α -氨基己二酸还原酶和视黄酸还原酶。在诺卡氏菌 *Nocardia iowensis* 中发现的羧酸还原酶(CAR)催化羧酸对其相应醛的镁、ATP 和 NADPH 依赖性还原(Venkitasubramanian et al., J Biol.Chem.282:478-485 (2007))。该酶的天然底物是苯甲酸,该酶显示出对芳族底物(包括对甲苯甲酸)的广泛接受性(Venkitasubramanian et al., Biocatalysis in Pharmaceutical and Biotechnology Industries, CRC press (2006))。由诺卡氏菌 (*Nocardia iowensis*) 中的 car 编码的酶在大肠杆菌(Venkitasubramanian et al., J Biol.Chem.282:478-485 (2007))中克隆并功能表达。CAR 需要通过将无活性载脂蛋白酶转化为活性全酶的磷酸泛酸转移酶(PPTase)进行翻译后活化(Hansen et al., Appl.Environ.Microbiol 75:2765-2774 (2009))。编码特异性PPTase 的npt基因的表达产物,增强酶的活性。在灰色链霉菌(*Streptomyces griseus*)中发现的其他酶候选物由griC和griD基因编码。据信这种酶将3-氨基-4-羟基苯甲酸转化为3-氨基-4-羟基苯甲醛,因为griC或griD的删除导致细胞外3-乙酰氨基-4-羟基苯甲酸的积累,3-氨基-4-羟基苯甲酸是3-氨基-4-羟基苯甲酸代谢的分流产物(Suzuki, et al., J.Antibiot.66 (6) :380-387 (2007))。使用griC和griD与诺卡氏菌 *Nocardia iowensis* npt 序列相似的酶SGR_665共表达,是有益的。

[0515]

基因	GenBank 登录号.	GI 号	生物体
car	AAR91681.1	40796035	诺卡氏菌 <i>Nocardia iowensis</i>
npt	ABI83656.1	114848891	诺卡氏菌 <i>Nocardia iowensis</i>
griC	YP_001825755.1	182438036	灰色链霉菌

[0516]

基因	GenBank 登录号.	GI 号	生物体
			(<i>Streptomyces griseus</i>)
<i>griD</i>	YP_001825756.1	182438037	灰色链霉菌 (<i>Streptomyces griseus</i>)

[0517] 可以基于序列同源性鉴定额外的car和npt基因。

[0518]

基因名称	GI 号	GenBank 登录号.	生物体
<i>fadD9</i>	121638475	YP_978699.1	牛结核分枝杆菌 (<i>Mycobacterium bovis</i>) BCG
<i>BCG_2812c</i>	121638674	YP_978898.1	牛结核分枝杆菌 (<i>Mycobacterium bovis</i>) BCG
<i>nfa20150</i>	54023983	YP_118225.1	鼻疽诺卡氏菌 (<i>Nocardia farcinica</i>) IFM 10152
<i>nfa40540</i>	54026024	YP_120266.1	鼻疽诺卡氏菌 (<i>Nocardia farcinica</i>) IFM 10152
<i>SGR_6790</i>	182440583	YP_001828302.1	灰色链霉菌 (<i>Streptomyces griseus</i>) subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350
<i>SGR_665</i>	182434458	YP_001822177.1	灰色链霉菌 (<i>Streptomyces griseus</i>) subsp. <i>griseus</i> NBRC 13350
<i>MSMEG_2956</i>	YP_887275.1	YP_887275.1	耻垢分枝杆菌 (<i>Mycobacterium smegmatis</i>) MC2 155

[0519]

基因名称	GI 号	GenBank 登录号.	生物体
MSMEG_5739	YP_889972.1	118469671	耻垢分枝杆菌 (<i>Mycobacterium smegmatis</i>) MC2 155
MSMEG_2648	YP_886985.1	118471293	耻垢分枝杆菌 (<i>Mycobacterium smegmatis</i>) MC2 155
MAP1040c	NP_959974.1	41407138	鸟结核分枝杆菌 (<i>Mycobacterium avium</i>) subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10
MAP2899c	NP_961833.1	41408997	鸟结核分枝杆菌 (<i>Mycobacterium avium</i>) subsp. <i>paratuberculosis</i> K-10
MMAR_2117	YP_001850422.1	183982131	海鱼分枝杆菌 (<i>Mycobacterium marinum</i>) M
MMAR_2936	YP_001851230.1	183982939	海鱼分枝杆菌 (<i>Mycobacterium marinum</i>) M
MMAR_1916	YP_001850220.1	183981929	海鱼分枝杆菌 (<i>Mycobacterium marinum</i>) M
TpauDRAFT_33060	ZP_04027864.1	227980601	微变冢氏菌 (<i>Tsukamurella paurometabola</i>) DSM 20162
TpauDRAFT_20920	ZP_04026660.1	ZP_04026660.1	微变冢氏菌 (<i>Tsukamurella paurometabola</i>) DSM 20162

[0520]

基因名称	GI号	GenBank 登录号.	生物体
<i>CPCC7001_1320</i>	ZP_05045132.1	254431429	蓝细菌 (<i>Cyanobium</i>) <i>PCC7001</i>
<i>DDBDRAFT_0187729</i>	XP_636931.1	66806417	盘基网柄菌 (<i>Dictyostelium discoideum</i>) AX4

[0521] 具有相似特征的酶,即 α -氨基己二酸还原酶(AAR,EC 1.2.1.31),参与一些真菌物种的赖氨酸生物合成途径。该酶天然地将 α -氨基己二酸还原成 α -氨基己二酸半醛。羧基首先通过腺苷酸的ATP依赖性形成活化,然后由NAD(P)H还原以生产醛和AMP。像CAR一样,该酶使用镁并需要通过PPTase活化。AAR及其相应PPT酶的候选酶,存在于酿酒酵母(Morris et al., Gene 98:141–145 (1991))、白色假丝酵母(Guo et al., Mol. Genet. Genomics 269: 271–279 (2003)))和栗酒裂殖酵母(Ford et al., Curr. Genet. 28:131–137 (1995))。来自栗酒裂殖酵母的AAR在大肠杆菌中表达时显示出显著的活性(Guo et al., Yeast 21:1279–1288 (2004))。来自产黄青霉菌的AAR接受S-羧甲基-L-半胱氨酸作为替代底物,但不与己二酸、L-谷氨酸或二氨基庚二酸反应(Hijarrubia et al., J Biol. Chem. 278:8250–8256 (2003))。编码产黄青霉菌PPT酶的基因迄今尚未确定,并且通过序列比较同源性检索没有鉴定出高信度命中。

基因	GenBank 登录号.	GI号	生物体
<i>LYS2</i>	AAA34747.1	171867	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>LYS5</i>	P50113.1	1708896	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>LYS2</i>	AAC02241.1	2853226	白色假丝酵母 (<i>Candida albicans</i>)
<i>LYS5</i>	AAO26020.1	28136195	白色假丝酵母 (<i>Candida albicans</i>)
<i>Lys1p</i>	P40976.3	13124791	栗酒裂殖酵母 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)
<i>Lys7p</i>	Q10474.1	1723561	栗酒裂殖酵母 (<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)
<i>Lys2</i>	CAA74300.1	3282044	产黄青霉菌 (<i>Penicillium chrysogenum</i>)

[0522]

[0523] N) 巴豆醛还原酶。合适的酶活性由EC 1.1.1.a氧化还原酶(氧代至醇)提供。EC 1.1.1.a氧化还原酶(氧代-醇)包括以下:

[0524] 通过戊二酸半醛还原酶将戊二酸半醛还原成5-羟基戊酸,需要将醛还原成相应的醇。具有戊二酸半醛还原酶活性的酶,包括由4hbd (WO 2010/068953A2) 编码的土曲霉 (*Aspergillus terreus*) 的ATEG_00539基因产物和拟南芥的4-羟基丁酸脱氢酶。在酵母中克隆并表征该拟南芥酶 (Breitkreuz et al., J.Biol.Chem.278:41552-41556 (2003))。

[0525]

蛋白质	GENBANK ID	GI号	生物体
ATEG_00539	XP_001210625.1	115491995	土曲霉 (<i>Aspergillus terreus</i>) NIH2624
4hbd	AAK94781.1	15375068	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)

[0526] 编码催化醛还原成醇(即醇脱氢酶或等效醛还原酶)的酶的其他基因,包括编码C2-C14中链醇脱氢酶的alrA (Tani et al., Appl. Environ. Microbiol. 66:

[0527] 5231-5235 (2000)),来自大肠杆菌的yqhD和fucO (Sulzenbacher et al., 342: 489-502 (2004)) 和来自丙酮丁醇梭菌的bdh I和bdh II,其将丁醛转化为丁醇 (Walter et al., 174:7149-7158 (1992))。YqhD催化广泛范围的醛的还原,使用NADPH作为辅因子,优选比C(3)长的链长度 (Sulzenbacher et al., 342:489-502 (2004); Perez et al., J Biol.Chem.283:7346-7353 (2008))。来自运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 的adhA基因产物,已被证明对许多醛类具有活性,包括甲醛、乙醛、丙醛、丁醛和丙烯醛 (Kinoshita et al., Appl Microbiol Biotechnol 22:249-254 (1985))。另外的醛还原酶候选物由梭菌 C.saccharoperbutylacetonicum的bdh和拜氏梭菌中的Cbei_1722、Cbei_2181和Cbei_2421编码。酿酒酵母中另外的醛还原酶候选基因,包括醛还原酶GRE3、ALD2-6和HFD1,乙醛酸还原酶GOR1和YPL113C,和甘油脱氢酶GCY1 (WO 2011/022651A1; Atsumi et al., Nature 451: 86-89 (2008))。先前描述的用于催化甲基乙二醛还原为丙酮醇或乳醛的酶候选物,也是合适的乳醛还原酶候选物。

[0528]

蛋白质	GENBANK ID	GI号	生物体
alrA	BAB12273.1	9967138	不动杆菌 (<i>Acinetobacter</i>) sp. strain M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
yqhD	NP_417484.1	16130909	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
fucO	NP_417279.1	16130706	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
bdh I	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)

[0529]

蛋白质	GENBANK ID	GI号	生物体
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	15896542	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>adhA</i>	YP_162971.1	56552132	运动发酵单胞菌 (<i>Zymomonas mobilis</i>)
<i>bdh</i>	BAF45463.1	124221917	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>Cbei_1722</i>	YP_001308850	150016596	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>Cbei_2181</i>	YP_001309304	150017050	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>Cbei_2421</i>	YP_001309535	150017281	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>GRE3</i>	P38715.1	731691	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>ALD2</i>	CAA89806.1	825575	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>ALD3</i>	NP_013892.1	6323821	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>ALD4</i>	NP_015019.1	6324950	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>ALD5</i>	NP_010996.2	330443526	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>ALD6</i>	ABX39192.1	160415767	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>HFD1</i>	Q04458.1	2494079	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>GOR1</i>	NP_014125.1	6324055	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>YPL113C</i>	AAB68248.1	1163100	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>GCY1</i>	CAA99318.1	1420317	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0530] 显示出4-羟基丁酸脱氢酶活性的酶(EC 1.1.1.61)也属于这一类别。这些酶在真养劳尔氏菌(*Ralstonia eutropha*) (Bravo et al., J Forens Sci, 49:379-387 (2004))和克氏梭菌(Wolff et al., Protein Expr.Purif.6:206-212 (1995))中得到表征。另一个基因是来自热葡萄糖苷酶芽孢杆菌(*Geobacillus thermoglucosidasius*)的酒精脱氢酶 $adhI$

(Jeon et al., J Biotechnol 135:127–133 (2008))。

[0531]

蛋白 质	GENBANK ID	GI 号	生物体
<i>4hbd</i>	YP_726053.1	113867564	真养劳尔氏菌 (<i>RALSTONIA EUTROPHA</i>) H16
<i>4hbd</i>	L21902.1	146348486	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>) DSM 555
<i>adhI</i>	AAR91477.1	40795502	热葡萄糖苷酶芽孢杆菌 (<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>)

[0532] 另一个典型的醛还原酶是甲基丙二酸酐半醛还原酶,也称为3-羟基异丁酸脱氢酶(EC 1.1.1.31)。该酶参与缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解,并已在细菌、真核生物和哺乳动物中鉴定。由嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)HB8的P84067编码的酶已得到结构表征(Lokanath et al., J Mol Biol, 352:905–17 (2005))。使用同位素标记底物证明了人3-羟基异丁酸脱氢酶的可逆性(Manning et al., Biochem J, 231:481–4 (1985))。编码该酶的另外的基因,包括在智人(Hawes et al., Methods Enzymol, 324:218–228 (2000))和家兔(*Oryctolagus cuniculus*) (Hawes et al., 同上; Chowdhury et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 66:2043–2047 (1996))中的*3hidh*,绿脓假单胞菌和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)中的*mmsB*,以及恶臭假单胞菌中的*dhat*(Aberhart et al., J Chem. Soc. [Perkin 1] 6:1404–1406 (1979); Chowdhury et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 62:2043–2047 (1996); Chowdhury et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 67:438–441 (2003))。已经在还原方向上表征了几种3-羟基异丁酸脱氢酶,包括来自绿脓假单胞菌(Gokarn et al., 美国专利739676 (2008))的*mmsB*和来自恶臭假单胞菌的*mmsB*。

[0533]

蛋白 质	GENBANK ID	GI 号	生物体
<i>P84067</i>	P84067	75345323	嗜热栖热菌 (<i>THERMUS THERMOPHILUS</i>)
<i>3hidh</i>	P31937.2	12643395	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
<i>3hidh</i>	P32185.1	416872	家兔 (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)
<i>mmsB</i>	NP_746775.1	26991350	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>mmsB</i>	P28811.1	127211	绿脓假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
<i>dhat</i>	Q59477.1	2842618	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)

[0534] 存在将酮转化为羟基官能团的几种典型的醇脱氢酶。来自大肠杆菌的两种这样的酶,由苹果酸脱氢酶(*mdh*)和乳酸脱氢酶(*ldhA*)编码。此外,已经证实来自真养劳尔氏菌(*Ralstonia eutropha*)的乳酸脱氢酶,在各种链长的2-酮酸上表现出高活性,包括乳酸、2-

氧化丁酸、2-氧代戊酸和2-氧戊二酸(Steinbuchel et al., Eur. J. Biochem. 130:329–334 (1983))。 α -酮己二酸转化成 α -羟基己二酸,可以由2-酮己二酸还原酶催化,这是一种报道在大鼠和人胎盘中发现的酶(Suda et al., Arch. Biochem. Biophys. 176:610–620 (1976); Suda et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 77:586–591 (1977))。另外的氧化还原酶是来自人心脏的线粒体3-羟基丁酸脱氢酶(bdh),其已经得到克隆和表征(Marks et al., J. Biol. Chem. 267:15459–15463 (1992))。拜氏梭菌(Ismaiel et al., J. Bacteriol. 175: 5097–5105 (1993))和布氏嗜热无氧杆菌(Thermoanaerobacter brockii)(Lamed et al., Biochem. J. 195:183–190 (1981); Peretz et al., Biochemistry. 28:6549–6555 (1989))的酒精脱氢酶将丙酮转化成异丙醇。甲基乙基酮还原酶催化MEK还原为2-丁醇。示例性的MEK还原酶可以在深红红球菌(Rhodococcus ruber)(Kosjek et al., Biotechnol Bioeng. 86: 55–62 (2004))和强烈热球菌(Pyrococcus furiosus)(van der Oost et al., Eur. J. Biochem. 268:3062–3068 (2001))中找到。

[0535]

蛋白质	Genbank ID	GI号	生物体
<i>mdh</i>	AAC76268.1	1789632	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	16129341	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>ldh</i>	YP_725182.1	113866693	真养劳氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>)
<i>bdh</i>	AAA58352.1	177198	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
<i>adh</i>	AAA23199.2	60592974	拜氏梭菌 (<i>Clostridium Beijerinckii</i>) NRRL B593
<i>adh</i>	P14941.1	113443	布氏嗜热无氧杆菌 (<i>Thermoanaerobacter brockii</i>) HTD4
<i>sadh</i>	CAD36475	21615553	深红红球菌 (<i>Rhodococcus ruber</i>)
<i>adhA</i>	AAC25556	3288810	强烈热球菌 (<i>Pyrococcus furiosus</i>)

[0536] 许多生物编码催化将3-氧化丁醇还原成1,3-丁二醇的基因,包括属于芽孢杆菌属、短杆菌属、假丝酵母属和克雷伯菌属的那些,如Matsuyama et al. J Mol Cat B Enz, 11:513–521 (2001)所述。这些酶中的一种,即来自假丝酵母属的SADH,在大肠杆菌中克隆并表征。还证实了突变的红球菌苯乙醛还原酶(Sar268)和Leifonia醇脱氢酶以高产率催化该转化(Itoh et al., Appl. Microbiol Biotechnol. 75:1249–1256 (2007))。

[0537]	蛋白质	Genbank ID	GI号	生物体
[0538]	<i>sadh</i>	BAA24528.1	2815409	近平滑假丝酵母 (<i>Candida parapsilosis</i>)

[0539] 0) 巴豆醇激酶。巴豆醇激酶可催化磷酸基转移到巴豆醇的羟基上。下文描述的酶

天然具有这种活性,或者可以被设计成展现出这种活性。催化磷酸基团转移到醇基团的激酶是EC 2.7.1酶类的成员。下表列出了EC 2.7.1酶类中几种有用的激酶。

酶委员会编号	酶名称	酶委员会编号	酶名称	酶委员会编号	酶名称
2.7.1.1	己糖激酶	2.7.1.48	尿苷激酶	2.7.1.94	酰基甘油激酶
2.7.1.2	葡糖激酶	2.7.1.49	羟基甲基嘧啶激酶	2.7.1.95	卡那霉素激酶
2.7.1.3	酮基己糖激酶	2.7.1.50	羟基乙基噻唑激酶	2.7.1.100	S-甲基-5-巯基核糖激酶
2.7.1.4	果糖激酶	2.7.1.51	L-墨角藻糖激酶	2.7.1.101	塔格糖激酶
2.7.1.5	鼠李树胶糖激酶	2.7.1.52	岩藻糖激酶	2.7.1.102	金缕梅糖激酶
2.7.1.6	半乳糖激酶	2.7.1.53	L-木酮糖激酶	2.7.1.103	紫霉素激酶
2.7.1.7	甘露聚糖酶	2.7.1.54	D-阿拉伯糖激酶	2.7.1.105	6-磷酸果糖-2-激酶
2.7.1.8	葡糖胺激酶	2.7.1.55	阿洛糖激酶	2.7.1.106	葡萄糖-1,6-二磷酸合成酶
2.7.1.10	磷酸葡萄糖激酶	2.7.1.56	1-磷酸果糖激酶	2.7.1.107	二酰基甘油激酶
2.7.1.11	6-磷酸果糖激酶	2.7.1.58	2-脱氢-3-脱氧半乳酸激酶	2.7.1.108	多萜醇激酶
2.7.1.12	葡萄糖激酶	2.7.1.59	N-乙酰氨基葡萄糖胺激酶	2.7.1.113	脱氧鸟苷激酶
2.7.1.13	脱氢葡萄糖激酶	2.7.1.60	N-乙酰基甘露糖胺激酶	2.7.1.114	AMP—胸苷激酶
2.7.1.14	景天庚酮糖激酶	2.7.1.61	酰基-磷酸—己糖磷酸转移酶	2.7.1.118	ADP—胸苷激酶
2.7.1.15	核糖激酶	2.7.1.62	磷酸胺—己糖磷酸转移酶	2.7.1.119	潮霉素-B7"-O-激酶
2.7.1.16	核酮糖激酶	2.7.1.63	聚磷酸—葡萄糖磷酸转移酶	2.7.1.121	磷酸烯醇丙酮酸—甘油酮磷酸转移酶
2.7.1.17	木酮糖激酶	2.7.1.64	肌醇 3-激酶	2.7.1.122	木糖醇激酶
2.7.1.18	磷核糖激酶	2.7.1.65	鲨-肌醇胺 4-激酶	2.7.1.127	肌醇-三磷酸 3-激酶
2.7.1.19	磷核酮糖激酶	2.7.1.66	十一萜醇激酶	2.7.1.130	四酰基二糖 4'-激酶
2.7.1.20	腺苷激酶	2.7.1.67	1-磷脂酰肌醇 4-激酶	2.7.1.134	肌醇-四磷酸 1-激酶
2.7.1.21	胸苷激酶	2.7.1.68	1-磷脂酰肌醇-4-磷酸 5-激酶	2.7.1.136	大环内酯 2'-激酶
2.7.1.22	核糖基烟酰胺激酶	2.7.1.69	蛋白-Np-磷酸组氨酸—糖磷酸转移酶	2.7.1.137	磷脂酰肌醇 3-激酶
2.7.1.23	NAD ⁺ 激酶	2.7.1.70	等同于 EC2.7.1.37.	2.7.1.138	神经酰胺激酶
2.7.1.24	脱磷酸-CoA 激酶	2.7.1.71	莽草酸激酶	2.7.1.140	肌醇-四磷酸 5-激酶
2.7.1.25	腺苷-硫酸激酶	2.7.1.72	链霉素 6-激酶	2.7.1.142	甘油—3-磷酸-葡萄糖磷酸转移酶

[0540]

酶委员会编号	酶名称	酶委员会编号	酶名称	酶委员会编号	酶名称
2.7.1.26	核黄素激酶	2.7.1.73	肌苷激酶	2.7.1.143	二磷酸-嘌呤核苷激酶
2.7.1.27	赤藓醇激酶	2.7.1.74	脱氧胞苷激酶	2.7.1.144	塔格糖-6-磷酸激酶
2.7.1.28	三激酶	2.7.1.76	脱氧腺苷激酶	2.7.1.145	脱氧核苷激酶
2.7.1.29	甘油酮激酶	2.7.1.77	核苷磷酸转移酶	2.7.1.146	ADP 依赖性磷酸果糖激酶
2.7.1.30	甘油激酶	2.7.1.78	聚核苷酸 5'-羟基-激酶	2.7.1.147	ADP 依赖性葡萄糖激酶
2.7.1.31	甘油酸激酶	2.7.1.79	二磷酸—甘油磷酸转移酶	2.7.1.148	4-(胞苷 5'-二磷酸)-2-C-甲基-D-赤藓醇激酶
2.7.1.32	胆碱激酶	2.7.1.80	二磷酸—丝氨酸磷酸转移酶	2.7.1.149	1-磷脂酰肌醇-5-磷酸 4-激酶
2.7.1.33	泛酸激酶	2.7.1.81	羟赖氨酸激酶	2.7.1.150	1-磷脂酰肌醇-3-磷酸 5-激酶
2.7.1.34	泛酰硫氢乙胺激酶	2.7.1.82	乙醇胺激酶	2.7.1.151	肌醇-聚磷酸多激酶
2.7.1.35	吡哆醛激酶	2.7.1.83	假尿苷激酶	2.7.1.153	磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸 3-激酶
2.7.1.36	甲羟戊酸激酶	2.7.1.84	烷基甘油酮激酶	2.7.1.154	磷脂酰肌醇-4-磷酸 3-激酶
2.7.1.39	高丝氨酸激酶	2.7.1.85	β-葡萄糖苷激酶	2.7.1.156	腺苷钴啉醇酰胺激酶
2.7.1.40	丙酮酸激酶	2.7.1.86	NADH 激酶	2.7.1.157	N-乙酰半乳糖胺激酶
2.7.1.41	葡萄糖-1-磷酸磷酸歧化酶	2.7.1.87	链霉素 3"-激酶	2.7.1.158	肌醇-五磷酸 2-激酶
2.7.1.42	核黄素磷酸转移酶	2.7.1.88	双氢链霉素-6-磷酸 3'a-激酶	2.7.1.159	肌醇-1,3,4-三磷酸 5/6-激酶
2.7.1.43	葡萄糖醛酸激酶	2.7.1.89	硫胺素激酶	2.7.1.160	2'-磷酸转移酶
2.7.1.44	半乳糖醛酸激酶	2.7.1.90	二磷酸—果糖-6-磷酸 1-磷酸转移酶	2.7.1.161	CTP 依赖性核黄素激酶
2.7.1.45	2-脱氢-3-脱氧葡萄糖酸激酶	2.7.1.91	鞘氨醇激酶	2.7.1.162	N-乙酰基己糖胺 1-激酶
2.7.1.46	L-阿拉伯糖激酶	2.7.1.92	5-脱氢-2-脱氧葡萄糖酸激酶	2.7.1.163	潮霉素 B4-O-激酶
2.7.1.47	D-核酮糖激酶	2.7.1.93	烷基甘油基激酶	2.7.1.164	O-磷酸丝氨酸酰基-tRNasec 激酶

[0541]

[0542] 甲羟戊酸激酶 (EC 2.7.1.36) 磷酸化甲羟戊酸的末端羟基。该步骤的候选基因包括来自酿酒酵母的erg12, 来自詹氏甲烷球菌 (*Methanocaldococcus jannaschii*) 的mvk, 来自智人的MVK和来自拟南芥col的mvk。另外的甲羟戊酸激酶候选物, 包括来自太古代马氏甲

烷八叠球菌 (*Methanosarcina mazei*) 的抗反馈甲羟戊酸激酶 (Primak et al., AEM, in press (2011)) 和来自肺炎链球菌的Mvk蛋白 (Andreassi et al., Protein Sci, 16:983-9 (2007))。来自酿酒酵母、肺炎链球菌和马氏甲烷八叠球菌的Mvk蛋白,在大肠杆菌中异源表达和表征 (Primak et al., 同上)。肺炎链球菌甲羟戊酸激酶在几个替代的底物上有活性,包括环丙基甲羟戊酸、乙烯甲羟戊酸和乙炔甲羟戊酸 (Kudoh et al., Bioorg Med Chem 18:1124-34 (2010)),随后的研究确定配体结合位点对于紧密、富电子的C(3)-取代基具有选择性 (Lefurgy et al., J Biol Chem 285:20654-63 (2010))。

[0543]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
erg12	CAA39359.1	3684	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
mvk	Q58487.1	2497517	詹氏甲烷球菌 (<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>)
mvk	AAH16140.1	16359371	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
mvk	NP_851084.1	30690651	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
mvk	NP_633786.1	21227864	马氏甲烷八叠球菌 (<i>Methanosarcina mazei</i>)
mvk	NP_357932.1	15902382	肺炎链球菌 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)

[0544] 甘油激酶还磷酸化甘油中的末端羟基以形成甘油-3-磷酸。这种反应发生在几种物种中,其中包括大肠杆菌、酿酒酵母和海栖热袍菌 (*Thermotoga maritime*)。已证实大肠杆菌甘油激酶可以接受诸如二羟基丙酮和甘油醛等替代底物 (Hayashi et al., J Biol. Chem. 242:1030-1035 (1967))。海栖热袍菌有两个甘油激酶 (Nelson et al., Nature 399:323-329 (1999))。已经证实甘油激酶具有广泛的底物特异性。Crans和Whiteside研究了来自四种不同生物 (大肠杆菌、酿酒酵母、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 和假丝酵母 (*Candida mycoderma*)) 的甘油激酶 (Crans et al., J. Am. Chem. Soc. 107:7008-7018 (2010); Nelson et al. (1999))。他们研究了66种不同的甘油类似物,并得出结论,该酶可以接受一系列取代基代替一个末端羟基,且C2处的氢原子可被甲基取代。有趣的是,所有四种微生物的酶的动力学常数非常相似。

[0545]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
glpK	AP_003883.1	89110103	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
glpK1	NP_228760.1	15642775	海栖热袍菌 (<i>Thermotoga maritime</i>) MSB8
glpK2	NP_229230.1	15642775	海栖热袍菌 (<i>Thermotoga maritime</i>) MSB8
Gut1	NP_011831.1	82795252	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0546] 高丝氨酸激酶是另一种可能的候选物。该酶也存在于许多生物中,包括大肠杆菌、链霉菌和酿酒酵母。已经证实大肠杆菌的高丝氨酸激酶在许多底物上具有活性,包括L-2-氨基、1,4-丁二醇、天冬氨酸半醛和2-氨基-5-羟基戊酸(Huo et al., Biochemistry 35: 16180-16185 (1996); Huo et al., Arch. Biochem. Biophys. 330:373-379 (1996))。该酶可以作用于α位羧基被酯或羟甲基取代的底物上。基因候选物是:

[0547]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
thrB	BAB96580.2	85674277	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
SACT1DRAFT_4809	ZP_06280784.1	282871792	链霉菌 (<i>Streptomyces</i>) sp. <i>ACT-1</i>
Thr1	AAA35154.1	172978	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0548] P) 2-丁烯-4-磷酸激酶。2-丁烯-4-磷酸激酶可催化磷酸基转移至2-丁烯-4-磷酸的磷酸基。下文描述的酶天然具有这种活性,或者可以被设计成展现出这种活性。催化磷酸基团转移到另一个磷酸基团的激酶,是EC 2.7.4酶类的成员。下表列出了EC 2.7.4酶类中的几种有用的激酶。

[0549]

酶委员会编号	酶名称
2.7.4.1	聚磷酸激酶
2.7.4.2	磷酸甲羟戊酸激酶
2.7.4.3	腺苷酸激酶
2.7.4.4	核苷-磷酸激酶
2.7.4.6	核苷-二磷酸激酶

[0550]

酶委员会编号	酶名称
2.7.4.7	磷酸甲基嘧啶激酶
2.7.4.8	鸟苷酸激酶
2.7.4.9	dTMP 激酶
2.7.4.10	核苷-三磷酸—腺苷酸激酶
2.7.4.11	(脱氧)腺苷酸激酶
2.7.4.12	T2-诱导性脱氧核苷酸激酶
2.7.4.13	(脱氧)核苷-磷酸激酶
2.7.4.14	胞苷酸激酶
2.7.4.15	硫胺素-二磷酸激酶
2.7.4.16	硫胺素-磷酸激酶
2.7.4.17	3-磷酸甘油基-磷酸—聚磷酸磷酸转移酶
2.7.4.18	法呢基-二磷酸激酶
2.7.4.19	5-甲基脱氧胞苷-5'-磷酸激酶
2.7.4.20	多萜基-二磷酸—聚磷酸磷酸转移酶
2.7.4.21	肌醇-六磷酸激酶
2.7.4.22	UMP 激酶
2.7.4.23	核糖 1,5-二磷酸磷酸激酶
2.7.4.24	二磷酸肌醇-五磷酸激酶
2.7.4.-	法呢基单磷酸激酶
2.7.4.-	香叶基-香叶基单磷酸激酶
2.7.4.-	植基-磷酸激酶

[0551] 对磷酸甲羟戊酸激酶具有特别的兴趣。磷酸甲羟戊酸激酶(EC 2.7.4.2)催化向2-丁烯-4-磷酸激酶的类似转化反应。这种酶由酿酒酵母(Tsay et al., Mol. Cell Biol. 11: 620-631 (1991))的erg8和肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌

(*Staphylococcus aureus*) 和粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 中的 mvaK2 (Doun et al., Protein Sci. 14:1134–1139 (2005); Wilding et al., J Bacteriol. 182:4319–4327 (2000)) 编码。肺炎链球菌和粪肠球菌的酶, 在大肠杆菌中克隆和表征 (Pilloff et al., J Biol. Chem. 278:4510–4515 (2003); Doun et al., Protein Sci. 14:1134–1139 (2005)))。肺炎链球菌的磷酸甲羟戊酸激酶在几种替代性底物上具有活性, 包括环丙基甲羟戊酸磷酸, 乙烯甲羟戊酸磷酸和乙炔甲羟戊酸酯磷酸。(Kudoh et al., Bioorg Med Chem 18:1124–34 (2010))。

[0552]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>Erg8</i>	AAA34596.1	171479	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>mvaK2</i>	AAG02426.1	9937366	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)
<i>mvaK2</i>	AAG02457.1	9937409	肺炎链球菌 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)
<i>mvaK2</i>	AAG02442.1	9937388	粪肠球菌 (<i>Enterococcus faecalis</i>)

[0553] 法呢基单磷酸激酶可催化法呢基单磷酸与法呢基二磷酸的CTP依赖性磷酸化。类似地, 香叶酰香叶酰磷酸激酶催化CTP依赖性磷酸化。在培养的烟草 (*Nicotiana tabacum*) 的微粒体组分中, 鉴定出具有这些活性的酶 (Thai et al., PNAS 96:13080–5 (1999))。但是, 迄今尚未确定相关基因。

[0554] Q) 丁二烯合成酶。丁二烯合成酶催化2-丁烯-4-二磷酸转化为1,3-丁二烯。下文描述的酶天然具有这种活性, 或者可以被设计成展现出这种活性。对磷酸起作用的碳氧裂解酶见于EC 4.2.3酶类。下表列出了EC 4.2.3类中的几种有用的酶。

[0555]

酶委员会编号	酶名称
4.2.3.15	月桂烯合成酶
4.2.3.26	芳樟醇合成酶
4.2.3.27	异戊二烯合成酶
4.2.3.36	萜烯三烯合成酶
4.2.3.46	(E,E)- α -法呢烯合成酶
4.2.3.47	B-法呢烯合成酶
4.2.3.49	橙花叔醇合成酶

[0556] 特别有用的酶包括异戊二烯合成酶、月桂烯合成酶和法呢烯合成酶。酶候选物如下所述。

[0557] 异戊二烯合成酶天然催化二甲基烯丙基二磷酸向异戊二烯的转化, 但也可以催化2-丁烯基-4-二磷酸合成1,3-丁二烯。异戊二烯合成酶可以在几种生物中发现, 这些生物包括银白杨 (*Populus alba*) (Sasaki et al., FEBS Letters, 2005, 579 (11), 2514–2518)、葛

麻姆(*Pueraria montana*) (Lindberg et al., *Metabolic Eng.*, 12(1) :70–79 (2010) ; Sharkey et al., *Plant Physiol.*, 137 (2) :700–712 (2005)) 和欧洲山杨(*Populus tremula*)x银白杨(*Populus alba*) ,也称为银灰杨(*Populus canescens*) (Miller et al., *Planta*, 2001, 213 (3) ,483–487)。银灰杨异戊二烯合成酶的晶体结构已经确定(Koksal et al., *J Mol Biol* 402:363–373 (2010))。另外的异戊二烯合成酶描述于(Chotani et al., WO/2010/031079, Systems Using Cell Culture for Production of Isoprene; Cervin et al., US Patent Application 20100003716, Isoprene Synthase Variants for Improved Microbial Production of Isoprene)中。

[0558]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>ispS</i>	BAD98243.1	63108310	银白杨 (<i>Populus alba</i>)
<i>ispS</i>	AAQ84170.1	35187004	葛麻姆 (<i>Pueraria montana</i>)
<i>ispS</i>	CAC35696.1	13539551	欧洲山杨 (<i>Populus tremula</i>) x 银白杨 (<i>Populus alba</i>)

[0559] 月桂烯合成酶催化香叶基二磷酸脱磷酸至β-月桂烯(EC 4.2.3.15)。示例性的月桂烯合成酶由西红柿(*Solanum lycopersicum*)的MST2(van Schie et al., *Plant Mol Biol* 64:D473–79 (2007))、挪威云杉(*Picea abies*)的Tice–Myr(Martin et al., *Plant Physiol* 135:1908–27 (2004))、北美冷杉(*Abies grandis*) (Bohlmann et al., *J Biol Chem* 272:21784–92 (1997))的g–myr和拟南芥的TPS10(Bohlmann et al., *Arch Biochem Biophys* 375:261–9 (2000))编码。这些酶在大肠杆菌中异源表达。

[0560]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
MST2	ACN58229.1	224579303	西红柿 (<i>Solanum lycopersicum</i>)
TPS–Myr	AAS47690.2	77546864	挪威云杉 (<i>Picea abies</i>)
G–myr	024474.1	17367921	北美冷杉 (<i>Abies grandis</i>)
TPS10	EC07543.1	330252449	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)

[0561] 法呢基二磷酸分别通过α–法呢烯合成酶和β–法呢烯合成酶转化为α–法呢烯和β–法呢烯。示例性的α–法呢烯合成酶,包括拟南芥的TPS03和TPS02(Falldt et al., *Planta* 216:745–51 (2003) ; Huang et al., *Plant Physiol* 153:1293–310 (2010))、黄瓜(*Cucumis sativus*)的Afc(Mercke等et al., *Plant Physiol* 135:2012–14 (2004)、苹果(*Malus x domestica*)的eafar(Green et al., *Phytochem* 68:176–88 (2007))、挪威云杉(*Picea abies*)的TPS–Far(Martin,同上)编码。示例性法呢烯合成酶由玉米(*Zea mays*)的TPS1编码(Schnee et al., *Plant Physiol* 130:2049–60 (2002))。

[0562]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
TPS03	A4FVP2.1	205829248	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
TPS02	P0CJ43.1	317411866	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)

[0563]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>TPS-Far</i>	AAS47697.1	44804601	挪威云杉 (<i>Picea abies</i>)
<i>afs</i>	AAU05951.1	51537953	黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>)
<i>eafar</i>	Q84LB2.2	75241161	苹果 (<i>Malus x domestica</i>)
<i>TPS1</i>	Q84ZW8.1	75149279	玉米 (<i>Zea mays</i>)

[0564] R) 巴豆醇二磷酸激酶。巴豆醇二磷酸酶催化二磷酸基转移到巴豆醇的羟基上。下文描述的酶天然具有这种活性,或者可以被设计成展现出这种活性。催化二磷酸转移的激酶是EC 2.7.6酶类的成员。下表列出了EC 2.7.6酶类中的几种有用的激酶。

[0565]

酶委员会编号	酶名称
2.7.6.1	核糖-磷酸二磷酸激酶
2.7.6.2	硫胺素二磷酸激酶
2.7.6.3	2-氨基-4-羟基-6-羟基甲基二氢蝶啶二磷酸激酶
2.7.6.4	核苷酸二磷酸激酶
2.7.6.5	GTP二磷酸激酶

[0566] 特别感兴趣的是已经在大肠杆菌 (Hove-Jenson et al., J Biol Chem, 1986, 261 (15); 6765-71) 和肺炎支原体 M129 (McElwain et al., International Journal of Systematic Bacteriology, 1988, 38: 417-423) 中鉴定的核糖-磷酸二磷酸激酶,以及硫胺素二磷酸激酶。在拟南芥中发现示例性硫胺素二磷酸激酶 (Ajjawi, Plant Mol Biol, 2007, 65 (1-2); 151-62)。

[0567]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>prs</i>	NP_415725.1	16129170	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>prsA</i>	NP_109761.1	13507812	肺炎支原体 (<i>Mycoplasma pneumoniae</i>) M129
<i>TPK1</i>	BAH19964.1	222424006	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) col
<i>TPK2</i>	BAH57065.1	227204427	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>) col

[0568] S) 化学脱水或巴豆醇脱水酶。使用巴豆醇脱水酶,将巴豆醇转化为丁二烯,可以包括将巴豆醇到3-丁烯-2-醇的酶促异构化活性与3-丁烯-2-醇脱水成丁二烯组合。具有异构酶和脱水酶活性的示例性双功能酶是解芳烃卡斯特兰尼氏菌 (*Castellaniella defragrans*) 的芳樟醇脱水酶/异构酶。该酶催化香叶醇到芳樟醇的异构化,以及芳樟醇至月桂烯的脱水,反应物结构与巴豆醇、3-丁烯-2-醇和丁二烯相似 (Brodkorb et al., J Biol Chem 285:30436-42 (2010))。下表列出了酶登记号和同系物。

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
<i>Ldi</i>	E1XUJ2.1	403399445	解芳烃卡斯特兰尼氏菌 (<i>Castellaniella defragrans</i>)
[0569] STEHIDRAFT_68678	EIM80109.1	389738914	粗毛硬革菌 (<i>Stereum hirsutum</i>) FP-91666 SS1
NECHADRAFT_82460	XP_003040778.1	302883759	鞭毛藻从赤壳菌 (<i>Nectria haematococca</i>) mpVI 77-13-4
AS9A_2751	YP_004493998.1	333920417	<i>Amycolicoccus subflavus</i> DQS3-9A1

[0570] 可选地,可以使用本领域熟知的方法,生产融合蛋白或蛋白质偶联物,以生产具有异构酶和脱水酶活性的双功能(双功能)酶。融合蛋白或蛋白质偶联物可以至少包括异构酶和脱水酶反应的酶活性域(或各自的基因)。第一步,将巴豆醇转化为3-丁烯-2-醇,酶转化可以由巴豆醇异构酶(分类为EC 5.4.4)催化。类似的异构化将2-甲基-3-丁烯-2-醇转化为3-甲基-2-丁烯-1-醇,由恶臭假单胞菌MB-1的细胞提取物催化(Malone et al., AEM65 (6) : 2622-30 (1999))。该提取物可以在体外使用,或者可以分离和使用与异构酶活性相关的蛋白质或基因,虽然它们至今未被鉴定。

[0571] 可选地,任一步骤或两个步骤可以通过化学转化,或通过酶转化(体内或体外),或其任意组合进行。具有将3-丁烯-2-醇转化为丁二烯所需活性的酶在本申请其他地方提供。

[0572] T) 丁二烯合成酶(单磷酸)。丁二烯合成酶(单磷酸)催化2-丁烯-4-磷酸转化为1,3-丁二烯。丁二烯合成酶是本申请所述的EC 4.2.3酶类,其具有这种活性或可被工程化以展现该活性。二磷酸裂解酶催化烷基二磷酸酯转化为烯烃。对磷酸起作用的碳氧裂解酶见于EC 4.2.3酶类。下表列出了EC 4.2.3类中的几种有用的酶。示例性的酶候选物也是磷酸裂解酶。

酶委员会编号	酶名称
4.2.3.5	分支酸合成酶
4.2.3.15	月桂烯合成酶
4.2.3.27	异戊二烯合成酶

酶委员会编号	酶名称
4.2.3.36	萜烯三烯合成酶
4.2.3.46	(E,E)- α -法呢烯合成酶
4.2.3.47	β -法呢烯合成酶

[0575] 磷酸裂解酶催化烷基磷酸转化为烯烃。对磷酸起作用的碳氧裂解酶见于EC 4.2.3酶类。下表列出了EC 4.2.3类中的几种相关酶。

[0576]

酶委员会编号	酶名称
4.2.3.5	分支酸合成酶
4.2.3.15	月桂烯合成酶
4.2.3.26	芳樟醇合成酶
4.2.3.27	异戊二烯合成酶
4.2.3.36	萜烯三烯合成酶
4.2.3.46	(E,E)- α -法呢烯合成酶
4.2.3.47	β -法呢烯合成酶
4.2.3.49	橙花叔醇合成酶
4.2.3.-	甲基丁烯醇合成酶

[0577] 异戊二烯合成酶催化二甲基烯丙基二磷酸向异戊二烯的转化。异戊二烯合成酶可以在几种生物中发现,这些生物包括银白杨(*Populus alba*) (Sasaki et al., FEBS Letters, 2005, 579 (11), 2514–2518)、葛麻姆(*Pueraria montana*) (Lindberg et al., Metabolic Eng, 12 (1) : 70–79 (2010); Sharkey et al., Plant Physiol., 137 (2) : 700–712 (2005)) 和欧洲山杨(*Populus tremula*) x 银白杨(*Populus alba*),也称为银灰杨(*Populus canescens*) (Miller et al., Planta, 2001, 213 (3), 483–487)。银灰杨异戊二烯合成酶的晶体结构已经确定(Koksal et al., J Mol Biol 402:363–373 (2010))。另外的异戊二烯合成酶描述于(Chotani et al., WO/2010/031079, Systems Using Cell Culture for Production of Isoprene; Cervin et al., US Patent Application 20100003716, Isoprene Synthase Variants for Improved Microbial Production of Isoprene)中。来自灰松(*Pinus sabiniana*)的另一种异戊二烯合成酶样酶,即甲基丁烯醇合成酶,催化2-甲基-3-丁烯-2-醇的形成(Gray et al., J Biol Chem 286:20582–90 (2011))。

[0578]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>ispS</i>	BAD98243.1	63108310	银白杨 (<i>Populus alba</i>)
<i>ispS</i>	AAQ84170.1	35187004	葛麻姆 (<i>Pueraria montana</i>)

[0579]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>ispS</i>	CAC35696.1	13539551	欧洲山杨 (<i>Populus tremula</i>) x 银白杨 (<i>Populus alba</i>)
Tps-MBO1	AEB53064.1	328834891	灰松 (<i>Pinus sabiniana</i>)

[0580] 分支酸合成酶(EC 4.2.3.5)参与莽草酸途径,催化5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸到分支酸的去磷酸化。该酶需要还原黄素单核苷酸(FMN)作为辅因子,尽管酶的净反应不涉及氧化还原改变。与在植物和细菌中发现的酶相反,真菌中的分支酸合成酶也能以消耗

NADPH为代价来还原FMN (Macheroux et al., *Planta* 207:325–334 (1999))。代表性的单功能酶由大肠杆菌 (White et al., *Biochem.J.* 251:313–322 (1988)) 和肺炎链球菌 (Maclean and Ali, *Structure* 11:1499–1511 (2003)) 的aroC编码。双功能真菌酶存在于粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) (Kitzing et al., *J.Biol.Chem.* 276:42658–42666 (2001)) 和酿酒酵母 (Jones et al., *Mol.Microbiol.* 5:2143–2152 (1991)) 中。

[0581]

基因	GenBank 登录号	GI 号	生物
<i>aroC</i>	NP_416832.1	16130264	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>aroC</i>	ACH47980.1	197205483	肺炎链球菌 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)
<i>U25818.1:19..1317</i>	AAC49056.1	976375	粗糙脉孢菌 (<i>Neurospora crassa</i>)
<i>ARO2</i>	CAA42745.1	3387	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0582] 月桂烯合成酶催化香叶基二磷酸至β-月桂烯的脱磷酸化 (EC 4.2.3.15)。示例性的月桂烯合成酶由西红柿 (*Solanum lycopersicum*) 的MST2 (van Schie et al., *Plant Mol Biol* 64:D473–79 (2007))、挪威云杉 (*Picea abies*) 的Tice-Myr (Martin et al., *Plant Physiol* 135:1908–27 (2004))、北美冷杉 (*Abies grandis*) (Bohlmann et al., *J Biol Chem* 272:21784–92 (1997)) 的g-myrl和拟南芥的TPS10 (Bohlmann et al., *Arch Biochem Biophys* 375:261–9 (2000)) 编码。这些酶在大肠杆菌中异源表达。

[0583]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>MST2</i>	ACN58229.1	224579303	西红柿 (<i>Solanum lycopersicum</i>)
<i>TPS-Myr</i>	AAS47690.2	77546864	挪威云杉 (<i>Picea abies</i>)
<i>G-myrl</i>	O24474.1	17367921	北美冷杉 (<i>Abies grandis</i>)

[0584]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>TPS10</i>	EC07543.1	330252449	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)

[0585] 法呢基二磷酸分别通过α-法呢烯合成酶和β-法呢烯合成酶转化为α-法呢烯和β-法呢烯。示例性的α-法呢烯合成酶，包括拟南芥的TPS03和TPS02 (Faldt et al., *Planta* 216:745–51 (2003); Huang et al., *Plant Physiol* 153:1293–310 (2010))、黄瓜 (*Cucumis sativus*) 的Afc (Mercke等et al., *Plant Physiol* 135:2012–14 (2004))、苹果 (*Malus x*

domestica) 的eafar (Green et al., *Phytochem* 68:176–88 (2007))、挪威云杉 (*Picea abies*) 的TPS-Far (Martin, 同上) 编码。示例性法呢烯合成酶由玉米 (*Zea mays*) 的TPS1编码 (Schnee et al., *Plant Physiol* 130:2049–60 (2002))。

[0586]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
<i>TPS03</i>	A4FVP2.1	205829248	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
<i>TPS02</i>	P0CJ43.1	317411866	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
<i>TPS-Far</i>	AAS47697.1	44804601	挪威云杉 (<i>Picea abies</i>)
<i>afs</i>	AAU05951.1	51537953	黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>)
<i>eafar</i>	Q84LB2.2	75241161	苹果 (<i>Malus x domestica</i>)
<i>TPS1</i>	Q84ZW8.1	75149279	玉米 (<i>Zea mays</i>)

[0587] U) 巴豆酰辅酶A还原酶(醇形成) 和V) 3-羟基丁酰辅酶A还原酶(醇形成)。通过具有酰基辅酶A还原酶(醛形成) 活性和醛还原酶或醇脱氢酶活性的双功能酶, 催化巴豆酰辅酶A和3-羟基丁酰辅酶A底物直接转化成其相应的醇。将酰基辅酶A转化为醇的示例性双功能氧化还原酶, 在本申请其他地方描述。

[0588] 图6显示了将1,3-丁二醇转化为3-丁烯-2-醇和/或丁二烯的途径。图6中的酶是A.1,3-丁二醇激酶,B.3-羟基丁酰磷酸激酶,C.3-羟基丁酰二磷酸裂解酶,D.1,3-丁二醇二磷酸激酶,E.1,3-丁二醇脱水酶,F.3-羟基丁酰磷酸裂解酶,G.3-丁烯-2-醇脱水酶或化学反应。

[0589] A.1,3-丁二醇激酶。1,3-丁二醇到3-羟基丁酰磷酸的磷酸化,由醇激酶催化。醇激酶可催化磷酸基转移至羟基。催化磷酸基团转移到醇基团的激酶是EC 2.7.1酶类的成员。下表列出了EC 2.7.1酶类中几种有用的激酶。

酶委员会 编号	酶名称	酶委员会 编号	酶名称	酶委员会 编号	酶名称
2.7.1.1	己糖激酶	2.7.1.48	尿苷激酶	2.7.1.94	酰基甘油激酶
2.7.1.2	葡糖激酶	2.7.1.49	羟基甲基嘧啶激 酶	2.7.1.95	卡那霉素激酶
2.7.1.3	酮基己糖激 酶	2.7.1.50	羟基乙基噻唑激 酶	2.7.1.100	S-甲基-5-巯基核糖 激酶
2.7.1.4	果糖激酶	2.7.1.51	L-墨角藻糖激酶	2.7.1.101	塔格糖激酶
2.7.1.5	鼠李树胶糖 激酶	2.7.1.52	岩藻糖激酶	2.7.1.102	金缕梅糖激酶
2.7.1.6	半乳糖激酶	2.7.1.53	L-木酮糖激酶	2.7.1.103	紫霉素激酶
2.7.1.7	甘露聚糖酶	2.7.1.54	D-阿拉伯糖激酶	2.7.1.105	6-磷酸果糖-2-激酶
2.7.1.8	葡糖胺激酶	2.7.1.55	阿洛糖激酶	2.7.1.106	葡萄糖-1,6-二磷酸 合成酶
2.7.1.10	磷酸葡萄糖 激酶	2.7.1.56	1-磷酸果糖激酶	2.7.1.107	二酰基甘油激酶
2.7.1.11	6-磷酸果糖 激酶	2.7.1.58	2-脱氢-3-脱氧半 乳酸激酶	2.7.1.108	多萜醇激酶
2.7.1.12	葡萄糖激酶	2.7.1.59	N-乙酰氨基葡萄 糖胺激酶	2.7.1.113	脱氧鸟苷激酶
2.7.1.13	脱氢葡萄糖 激酶	2.7.1.60	N-酰基甘露糖胺 激酶	2.7.1.114	AMP—胸苷激酶
2.7.1.14	景天庚酮糖 激酶	2.7.1.61	酰基-磷酸—己糖 磷酸转移酶	2.7.1.118	ADP—胸苷激酶
2.7.1.15	核糖激酶	2.7.1.62	磷酰胺—己糖磷 酸转移酶	2.7.1.119	潮霉素-B7"-O-激酶
2.7.1.16	核酮糖激酶	2.7.1.63	聚磷酸—葡萄糖 磷酸转移酶	2.7.1.121	磷酸烯醇丙酮酸— 甘油酮磷酸转移酶
2.7.1.17	木酮糖激酶	2.7.1.64	肌醇 3-激酶	2.7.1.122	木糖醇激酶
2.7.1.18	磷核糖激酶	2.7.1.65	鲨-肌醇胺 4-激酶	2.7.1.127	肌醇-三磷酸 3-激酶
2.7.1.19	磷核酮糖激 酶	2.7.1.66	十一萜醇激酶	2.7.1.130	四酰基二糖 4'-激酶
2.7.1.20	腺苷激酶	2.7.1.67	1-磷脂酰肌醇 4-激 酶	2.7.1.134	肌醇-四磷酸 1-激酶
2.7.1.21	胸苷激酶	2.7.1.68	1-磷脂酰肌醇-4- 磷酸 5-激酶	2.7.1.136	大环内酯 2'-激酶
2.7.1.22	核糖基烟酰 胺激酶	2.7.1.69	蛋白-Np-磷酸组氨 酸—糖磷酸转移 酶	2.7.1.137	磷脂酰肌醇 3-激酶
2.7.1.23	NAD ⁺ 激酶	2.7.1.70	等同于 EC2.7.1.37.	2.7.1.138	神经酰胺激酶
2.7.1.24	脱磷酸-CoA 激酶	2.7.1.71	莽草酸激酶	2.7.1.140	肌醇-四磷酸 5-激酶

酶委员会 编号	酶名称	酶委员会 编号	酶名称	酶委员会 编号	酶名称
2.7.1.25	腺苷-硫酸激 酶	2.7.1.72	链霉素 6-激酶	2.7.1.142	甘油—3-磷酸-葡萄 糖磷酸转移酶
2.7.1.26	核黄素激酶	2.7.1.73	肌苷激酶	2.7.1.143	二磷酸-嘌呤核苷激 酶
2.7.1.27	赤藓醇激酶	2.7.1.74	脱氧胞苷激酶	2.7.1.144	塔格糖-6-磷酸激酶
2.7.1.28	三激酶	2.7.1.76	脱氧腺苷激酶	2.7.1.145	脱氧核苷激酶
2.7.1.29	甘油酮激酶	2.7.1.77	核苷磷酸转移酶	2.7.1.146	ADP 依赖性磷酸果 糖激酶
2.7.1.30	甘油激酶	2.7.1.78	聚核苷酸 5'-羟基- 激酶	2.7.1.147	ADP 依赖性葡萄糖 激酶
2.7.1.31	甘油酸激酶	2.7.1.79	二磷酸—甘油磷 酸转移酶	2.7.1.148	4-(胞苷 5'-二磷酸)- 2-C-甲基-D-赤藓醇 激酶
2.7.1.32	胆碱激酶	2.7.1.80	二磷酸—丝氨酸 磷酸转移酶	2.7.1.149	1-磷脂酰肌醇-5-磷 酸 4-激酶
2.7.1.33	泛酸激酶	2.7.1.81	羟赖氨酸激酶	2.7.1.150	1-磷脂酰肌醇-3-磷 酸 5-激酶
2.7.1.34	泛酰硫氢乙 胺激酶	2.7.1.82	乙醇胺激酶	2.7.1.151	肌醇-聚磷酸多激酶
2.7.1.35	吡哆醛激酶	2.7.1.83	假尿苷激酶	2.7.1.153	磷脂酰肌醇-4,5-二 磷酸 3-激酶
2.7.1.36	甲羟戊酸激 酶	2.7.1.84	烷基甘油酮激酶	2.7.1.154	磷脂酰肌醇-4-磷酸 3-激酶
2.7.1.39	高丝氨酸激 酶	2.7.1.85	β-葡萄糖苷激酶	2.7.1.156	腺苷钴啉醇酰胺激 酶
2.7.1.40	丙酮酸激酶	2.7.1.86	NADH 激酶	2.7.1.157	N-乙酰半乳糖胺激 酶
2.7.1.41	葡萄糖-1-磷 酸磷酸歧化 酶	2.7.1.87	链霉素 3"-激酶	2.7.1.158	肌醇-五磷酸 2-激酶
2.7.1.42	核黄素磷酸 转移酶	2.7.1.88	双氢链霉素-6-磷 酸 3'a-激酶	2.7.1.159	肌醇-1,3,4-三磷酸 5/6-激酶
2.7.1.43	葡萄糖醛酸 激酶	2.7.1.89	硫胺素激酶	2.7.1.160	2'-磷酸转移酶
2.7.1.44	半乳糖醛酸 激酶	2.7.1.90	二磷酸—果糖-6- 磷酸 1-磷酸转移 酶	2.7.1.161	CTP 依赖性核黄素 激酶
2.7.1.45	2-脱氢-3-脱 氧葡萄糖羧 激酶	2.7.1.91	鞘氨醇激酶	2.7.1.162	N-乙酰基己糖胺 1- 激酶
2.7.1.46	L-阿拉伯糖 激酶	2.7.1.92	5-脱氢-2-脱氧葡 萄糖酸激酶	2.7.1.163	潮霉素 B4-O-激酶

[0591]

[0592]	酶委员会 编号	酶名称	酶委员会 编号	酶名称	酶委员会 编号	酶名称
	2.7.1.47	D-核酮糖激 酶	2.7.1.93	烷基甘油基激酶	2.7.1.164	O-磷酸丝氨酰基- tRNasec 激酶

[0593] 甲羟戊酸激酶 (EC 2.7.1.36) 磷酸化甲羟戊酸的末端羟基。该步骤的候选基因包括来自酿酒酵母的erg12, 来自詹氏甲烷球菌 (*Methanocaldococcus jannaschii*) 的mvk, 来自智人的MVK和来自拟南芥col的mvk。另外的甲羟戊酸激酶候选物, 包括来自太古代马氏甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina mazei*) 的抗反馈甲羟戊酸激酶 (Primak et al., *AEM*, in press (2011)) 和来自肺炎链球菌的Mvk蛋白 (Andreassi et al., *Protein Sci*, 16:983-9 (2007))。来自酿酒酵母、肺炎链球菌和马氏甲烷八叠球菌的Mvk蛋白, 在大肠杆菌中异源表达和表征 (Primak et al., 同上)。肺炎链球菌甲羟戊酸激酶在几个替代的底物上有活性, 包括环丙基甲羟戊酸、乙烯甲羟戊酸和乙炔甲羟戊酸 (Kudoh et al., *Bioorg Med Chem* 18:1124-34 (2010)), 随后的研究确定配体结合位点对于紧密、富电子的C(3)-取代基具有选择性 (Lefurgy et al., *J Biol Chem* 285:20654-63 (2010))。

[0594]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
erg12	CAA39359.1	3684	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
mvk	Q58487.1	2497517	詹氏甲烷球菌 (<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>)
mvk	AAH16140.1	16359371	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
mvk	NP_851084.1	30690651	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
mvk	NP_633786.1	21227864	马氏甲烷八叠球菌 (<i>Methanosarcina mazei</i>)
mvk	NP_357932.1	15902382	肺炎链球菌 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)

[0595] 甘油激酶还磷酸化甘油中的末端羟基以形成甘油-3-磷酸。这种反应发生在几种物种中, 其中包括大肠杆菌、酿酒酵母和海栖热袍菌 (*Thermotoga maritime*)。已证实大肠杆菌甘油激酶可以接受诸如二羟基丙酮和甘油醛等替代底物 (Hayashi et al., *J Biol. Chem.* 242:1030-1035 (1967))。海栖热袍菌有两个甘油激酶 (Nelson et al., *Nature* 399:323-329 (1999))。已经证实甘油激酶具有广泛的底物特异性。Crans和Whiteside研究了来自四种不同生物 (大肠杆菌、酿酒酵母、嗜热脂肪芽孢杆菌 (*Bacillus stearothermophilus*) 和假丝酵母 (*Candida mycoderma*)) 的甘油激酶 (Crans et al., *J. Am. Chem. Soc.* 107:7008-7018 (2010); Nelson et (1999))。他们研究了66种不同的甘油类似物, 并得出结论, 该酶可以接受一系列取代基代替一个末端羟基, 且C2处的氢原子可被甲基取代。有趣的是, 所有四种微生物的酶的动力学常数非常相似。

[0596]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
glpK	AP_003883.1	89110103	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
glpK1	NP_228760.1	15642775	海栖热袍菌 (<i>Thermotoga maritime</i>) MSB8
glpK2	NP_229230.1	15642775	海栖热袍菌 (<i>Thermotoga maritime</i>) MSB8
Gut1	NP_011831.1	82795252	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0597] 高丝氨酸激酶是另一种可能的候选物。该酶也存在于许多生物中,包括大肠杆菌、链霉菌和酿酒酵母。已经证实大肠杆菌的高丝氨酸激酶在许多底物上具有活性,包括L-2-氨基、1,4-丁二醇、天冬氨酸半醛和2-氨基-5-羟基戊酸(Huo et al., Biochemistry 35: 16180-16185 (1996); Huo et al., Arch. Biochem. Biophys. 330:373-379 (1996))。该酶可以作用于α位羧基被酯或羟甲基取代的底物上。基因候选物是:

[0598]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
thrB	BAB96580.2	85674277	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
SACT1DRAFT_4809	ZP_06280784.1	282871792	链霉菌 (<i>Streptomyces</i>) sp. ACT-1
Thr1	AAA35154.1	172978	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0599] B.3-羟基丁酰磷酸激酶。烷基磷酸激酶可催化磷酸基转移到烷基磷酸的磷酸基上。下文描述的酶天然具有这种活性,或者可以被设计成展现出这种活性。催化磷酸基团转移到另一个磷酸基团的激酶是EC 2.7.4酶类的成员。下表列出了EC 2.7.4酶类中的几种有用的激酶。

[0600]

酶委员会编号	酶名称
2.7.4.1	聚磷酸激酶
2.7.4.2	磷酸甲羟戊酸激酶
2.7.4.3	腺苷酸激酶
2.7.4.4	核苷-磷酸激酶
2.7.4.6	核苷-二磷酸激酶

[0601]

酶委员会编号	酶名称
2.7.4.7	磷酸甲基嘧啶激酶
2.7.4.8	鸟苷酸激酶
2.7.4.9	dTMP 激酶
2.7.4.10	核苷-三磷酸—腺苷酸激酶
2.7.4.11	(脱氧)腺苷酸激酶
2.7.4.12	T2-诱导性脱氧核苷酸激酶
2.7.4.13	(脱氧)核苷-磷酸激酶
2.7.4.14	胞苷酸激酶
2.7.4.15	硫胺素-二磷酸激酶
2.7.4.16	硫胺素-磷酸激酶
2.7.4.17	3-磷酸甘油基-磷酸—聚磷酸磷酸转移酶
2.7.4.18	法呢基-二磷酸激酶
2.7.4.19	5-甲基脱氧胞苷-5'-磷酸激酶
2.7.4.20	多萜基-二磷酸—聚磷酸磷酸转移酶
2.7.4.21	肌醇-六磷酸激酶
2.7.4.22	UMP 激酶
2.7.4.23	核糖 1,5-二磷酸磷酸激酶
2.7.4.24	二磷酸肌醇-五磷酸激酶
2.7.4.-	法呢基单磷酸激酶
2.7.4.-	香叶基-香叶基单磷酸激酶
2.7.4.-	植基-磷酸激酶

[0602] 对磷酸甲羟戊酸激酶具有特别的兴趣。磷酸甲羟戊酸激酶(EC 2.7.4.2)催化磷酸甲羟戊酸的磷酸化。这种酶由酿酒酵母(Tsay et al., Mol. Cell Biol. 11:620-631 (1991))的erg8和肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus*

aureus) 和粪肠球菌 (*Enterococcus faecalis*) 中的mvaK2 (Doun et al., Protein Sci.14: 1134–1139 (2005); Wilding et al., J Bacteriol.182:4319–4327 (2000)) 编码。肺炎链球菌和粪肠球菌的酶,在大肠杆菌中克隆和表征 (Pilloff et al., J Biol.Chem.278:4510–4515 (2003); Doun et al., Protein Sci.14:1134–1139 (2005)))。肺炎链球菌的磷酸甲羟戊酸激酶在几种替代性底物上具有活性,包括环丙基甲羟戊酸磷酸,乙烯甲羟戊酸磷酸和乙炔甲羟戊酸酯磷酸。(Kudoh et al., Bioorg Med Chem 18:1124–34 (2010))。

[0603]

蛋白	GenBank ID	GI号	生物
Erg8	AAA34596.1	171479	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
mvaK2	AAG02426.1	9937366	金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>)
mvaK2	AAG02457.1	9937409	肺炎链球菌 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)
mvaK2	AAG02442.1	9937388	粪肠球菌 (<i>Enterococcus faecalis</i>)

[0604] 法呢基单磷酸激酶可催化法呢基单磷酸与法呢基二磷酸的CTP依赖性磷酸化。类似地,香叶酰香叶酰磷酸激酶催化CTP依赖性磷酸化。在培养的烟草 (*Nicotiana tabacum*) 的微粒体组分中,鉴定出具有这些活性的酶 (Thai et al., PNAS 96:13080–5 (1999))。但是,迄今尚未确定相关基因。

[0605] C.3-羟基丁酰二磷酸裂解酶。二磷酸裂解酶催化烷基二磷酸转化为烯烃。对磷酸起作用的碳氧裂解酶见于EC 4.2.3酶类。下表列出了EC 4.2.3类中的几种有用的酶。在此描述。示例性的酶候选物还包括本申请所述的磷酸裂解酶。

[0606]

酶委员会编号	酶名称
4.2.3.5	分支酸合成酶
4.2.3.15	月桂烯合成酶
4.2.3.27	异戊二烯合成酶
4.2.3.36	萜烯三烯合成酶
4.2.3.46	(E,E)- α -法呢烯合成酶
4.2.3.47	β -法呢烯合成酶

[0607] D.1,3-丁二醇脱水酶。适用于将1,3-丁二醇脱水为3-丁烯-2-醇的示例性脱水酶,包括油酸水合酶、无环1,2-水合酶和芳樟醇脱水酶。示例性的酶候选物如上所述。

[0608] E.1,3-丁二醇二磷酸激酶。二磷酸激酶催化二磷酸基转移到醇基。下面描述的酶天然具有这样的活性。催化二磷酸转移的激酶是EC 2.7.6酶类的成员。下表列出了EC 2.7.6酶类中的几种有用的激酶。

[0609]

酶委员会编号	酶名称
2.7.6.1	核糖-磷酸二磷酸激酶
2.7.6.2	硫胺素二磷酸激酶
2.7.6.3	2-氨基-4-羟基-6-羟基甲基二氢蝶啶二磷酸激酶
2.7.6.4	核苷酸二磷酸激酶
2.7.6.5	GTP二磷酸激酶

[0610] 特别感兴趣的是已经在大肠杆菌 (Hove-Jenson et al., J Biol Chem, 1986, 261 (15) ; 6765-71) 和肺炎支原体M129 (McElwain et al., International Journal of Systematic Bacteriology, 1988, 38: 417-423) 中鉴定的核糖-磷酸二磷酸激酶, 以及硫胺素二磷酸激酶。在拟南芥中发现示例性硫胺素二磷酸激酶 (Ajjawi, Plant Mol Biol, 2007, 65 (1-2) ; 151-62)。

[0611]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
prs	NP_415725.1	16129170	大肠杆菌 (Escherichia coli)
prsA	NP_109761.1	13507812	肺炎支原体 (Mycoplasma pneumoniae) M129
TPK1	BAH19964.1	222424006	拟南芥 (Arabidopsis thaliana) col
TPK2	BAH57065.1	227204427	拟南芥 (Arabidopsis thaliana) col

[0612] F.3-羟基丁酰磷酸裂解酶。磷酸裂解酶催化烷基磷酸转化为烯烃。对磷酸起作用的碳氧裂解酶见于EC 4.2.3酶类。下表列出了EC 4.2.3类中的几种相关酶。

[0613]

酶委员会编号	酶名称
4.2.3.5	分支酸合成酶
4.2.3.15	月桂烯合成酶
4.2.3.26	芳樟醇合成酶
4.2.3.27	异戊二烯合成酶
4.2.3.36	萜烯三烯合成酶
4.2.3.46	(E,E)- α -法呢烯合成酶
4.2.3.47	B-法呢烯合成酶
4.2.3.49	橙花叔醇合成酶
4.2.3.-	甲基丁烯醇合成酶

[0614] 异戊二烯合成酶催化二甲基烯丙基二磷酸向异戊二烯的转化。异戊二烯合成酶可以在几种生物中发现, 这些生物包括银白杨 (Populus alba) (Sasaki et al., FEBS Letters, 2005, 579 (11) , 2514-2518)、葛麻姆 (Pueraria montana) (Lindberg et al., Metabolic Eng, 12 (1) : 70-79 (2010) ; Sharkey et al., Plant Physiol., 137 (2) : 700-712 (2005)) 和欧洲山杨 (Populus tremula) x 银白杨 (Populus alba), 也称为银灰杨 (Populus

canescens) (Miller et al., *Planta*, 2001, 213(3), 483–487)。银灰杨异戊二烯合成酶的晶体结构已经确定 (Koksal et al., *J Mol Biol* 402:363–373 (2010))。另外的异戊二烯合成酶描述于 (Chotani et al., WO/2010/031079, Systems Using Cell Culture for Production of Isoprene; Cervin et al., US Patent Application 20100003716, Isoprene Synthase Variants for Improved Microbial Production of Isoprene) 中。来自灰松 (*Pinus sabiniana*) 的另一种异戊二烯合成酶样酶, 即甲基丁烯醇合成酶, 催化2-甲基-3-丁烯-2-醇的形成 (Gray et al., *J Biol Chem* 286:20582–90 (2011))。

[0615]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>ispS</i>	BAD98243.1	63108310	银白杨 (<i>Populus alba</i>)
<i>ispS</i>	AAQ84170.1	35187004	葛麻姆 (<i>Pueraria montana</i>)
<i>ispS</i>	CAC35696.1	13539551	欧洲山杨 (<i>Populus tremula</i>) x 银白杨 (<i>Populus alba</i>)
Tps-MBO1	AEB53064.1	328834891	灰松 (<i>Pinus sabiniana</i>)

[0616] 分支酸合成酶 (EC 4.2.3.5) 参与莽草酸途径, 催化5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸到分支酸的去磷酸化。该酶需要还原黄素单核苷酸 (FMN) 作为辅因子, 尽管酶的净反应不涉及氧化还原改变。与在植物和细菌中发现的酶相反, 真菌中的分支酸合成酶也能以消耗 NADPH 为代价来还原 FMN (Macheroux et al., *Planta* 207:325–334 (1999))。代表性的单功能酶由大肠杆菌 (White et al., *Biochem. J.* 251:313–322 (1988)) 和肺炎链球菌 (Maclean and Ali, *Structure* 11:1499–1511 (2003)) 的 *aroC* 编码。双功能真菌酶存在于粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*) (Kitzing et al., *J. Biol. Chem.* 276:42658–42666 (2001)) 和酿酒酵母 (Jones et al., *Mol. Microbiol.* 5:2143–2152 (1991)) 中。

[0617]

基因	GenBank 登录号.	GI 号	生物体
<i>aroC</i>	NP_416832.1	16130264	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>aroC</i>	ACH47980.1	197205483	肺炎链球菌 (<i>Streptococcus pneumoniae</i>)
<i>U25818.1:19..1317</i>	AAC49056.1	976375	粗糙脉孢菌

[0618]

			(<i>Neurospora crassa</i>)
<i>ARO2</i>	CAA42745.1	3387	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0619] 月桂烯合成酶催化香叶基二磷酸至β-月桂烯的脱磷酸化 (EC 4.2.3.15)。示例性的月桂烯合成酶由西红柿 (*Solanum lycopersicum*) 的 MST2 (van Schie et al., *Plant Mol*

Biol 64:D473-79 (2007))、挪威云杉 (*Picea abies*) 的Tice-Myr (Martin et al., Plant Physiol 135:1908-27 (2004))、北美冷杉 (*Abies grandis*) (Bohlmann et al., J Biol Chem 272:21784-92 (1997)) 的g-myrl 和拟南芥的TPS10 (Bohlmann et al., Arch Biochem Biophys 375:261-9 (2000)) 编码。这些酶在大肠杆菌中异源表达。

[0620]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
<i>MST2</i>	ACN58229.1	224579303	西红柿 (<i>Solanum lycopersicum</i>)
<i>TPS-Myr</i>	AAS47690.2	77546864	挪威云杉 (<i>Picea abies</i>)
<i>G-myrl</i>	O24474.1	17367921	北美冷杉 (<i>Abies grandis</i>)
<i>TPS10</i>	EC07543.1	330252449	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)

[0621] 法呢基二磷酸分别通过α-法呢烯合成酶和β-法呢烯合成酶转化为α-法呢烯和β-法呢烯。示例性的α-法呢烯合成酶,包括拟南芥的TPS03和TPS02 (Faldt et al., Planta 216:745-51 (2003); Huang et al., Plant Physiol 153:1293-310 (2010))、黄瓜 (*Cucumis sativus*) 的Afc (Mercke等et al., Plant Physiol 135:2012-14 (2004)、苹果 (*Malus x domestica*) 的eafar (Green et al., Phytochem 68:176-88 (2007))、挪威云杉 (*Picea abies*) 的TPS-Far (Martin, 同上) 编码。示例性法呢烯合成酶由玉米 (*Zea mays*) 的TPS1 编码 (Schnee et al., Plant Physiol 130:2049-60 (2002))。

[0622]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
<i>TPS03</i>	A4FVP2.1	205829248	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
<i>TPS02</i>	P0CJ43.1	317411866	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
<i>TPS-Far</i>	AAS47697.1	44804601	挪威云杉 (<i>Picea abies</i>)
<i>afs</i>	AAU05951.1	51537953	黄瓜 (<i>Cucumis sativus</i>)
<i>eafar</i>	Q84LB2.2	75241161	苹果 (<i>Malus x domestica</i>)
<i>TPS1</i>	Q84ZW8.1	75149279	玉米 (<i>Zea mays</i>)

[0623] G.G.3-丁烯-2-醇脱水酶。3-丁烯-2-醇向丁二烯脱水,由3-丁烯-2-醇脱水酶或化学脱水催化。适用于3-丁烯-2-醇脱水的示例性脱水酶包括油酸水合酶,无环1,2-水合酶和芳樟醇脱水酶。示例性的酶如上所述。

[0624] 实施例11

[0625] 1,4-丁二醇合成酶

[0626] 本实施例提供了可用于将琥珀酰辅酶A转化为1,4-丁二醇的基因,如图7的途径所示。

[0627] 图7展示了A)琥珀酰CoA转移酶或琥珀酰辅酶A合成酶,B)琥珀酰辅酶A还原酶(醛形成),C)4-HB脱氢酶,D)4-HB激酶,E)磷酸转移-4-羟基丁酸酶,F)4-羟基丁酰辅酶A还原酶(醛形成),G)1,4-丁二醇脱氢酶,H)琥珀酸还原酶,I)琥珀酰辅酶A还原酶(醇形成),J)4-羟基丁酰CoA转移酶或4-羟基丁酰辅酶A合成酶,K)4-HB还原酶,L)4-羟基丁酰磷酸还原酶,和M)4羟基丁酰基辅酶A还原酶(醇形成)。

[0628] A)琥珀酰辅酶A转移酶(称为EB1)或琥珀酰-CoA合成酶(称为EB2A)。催化琥珀酸向琥珀酰-CoA的转化。

[0629] B)琥珀酰辅酶A还原酶(醛形成)。具有琥珀酰辅酶A还原酶活性的酶由克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*)的sucD(Sohling, J.Bacteriol. 178:871-880 (1996))和牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)的sucD编码(Takahashi, J.Bacteriol 182:4704-4710 (2000))).另外的琥珀酰辅酶A还原酶参与嗜热古细菌的3-羟基丙酸/4-HB循环,例如勤奋金属球菌(Berg et al., Science 318:1782-1786 (2007))和嗜中性热变形细菌(*Thermoproteus neutrophilus*) (Ramos-Vera et al., J Bacteriol, 191:4286-4297 (2009)).这些和其它示例性琥珀酰辅酶A还原酶如上所述。

[0630] C)4-HB脱氢酶(称为EB4)。表现出EB4活性的酶(EC 1.1.1.61)已在真养劳尔氏菌(*Ralstonia eutropha*) (Bravo et al., J.Fontnsic Sci.49:379-387 (2004))、克氏梭菌(*Clostridium kluyveri*) (Wolff和Kenealy, Protein Expr. Pubif. 6:206-212 (1995))和拟南芥(Breitkreuz et al., J.Biol.Chem. 278:41552-41556 (2003))中得到表征。其他EB4酶存在于牙龈卟啉单胞菌和未培养细菌的gbd中。这些基因列在下表中。

[0631]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI号</u>	<u>生物体</u>
4hbd	YP_726053.1	113867564	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>) H16
4hbd	L21902.1	146348486	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>) DSM 555
4hbd	Q94B07	75249805	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)

[0632]

4-hBd	NP_904964.1	34540485	牙龈卟啉单胞菌(<i>Porphyromonas gingivalis</i>) W83
gbd	AF148264.1	5916168	未培养细菌

[0633] D)4-HB激酶(称为EB5)。4-HB对4-羟基丁酰磷酸的活化由EB5催化。EC 2.7.2类中的磷酸转移酶将羧酸转化为膦酸,同时水解1个ATP。适于催化该反应的酶包括丁酸激酶、乙酸激酶、天冬氨酸激酶和γ-谷氨酰激酶。丁酸激酶在丙酸丁醇梭菌(Cary et al., Appl. Environ. Microbiol. 56:1576-1583 (1990))的酸生成过程中进行丁酸磷酸向丁酸的可逆转化。这种酶由两种buk基因产物中的任一种编码(Huang et al.,

J.Mol.Biotechnol.2:33–38 (2000))。其他丁酸激酶可见于丁酸梭菌、拜氏梭菌和破伤风梭菌 (*C.tetanomorphum*) (Twarog and Wolfe, J.Bacteriol.86:112–117 (1963))。来自海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) 的相关酶异丁酸激酶也已经在大肠杆菌中表达并结晶 (Diao et al., Acta Crystallogr.Biol.Crystallogr.59:1100–1102 (2003); Diao and Hasson, J.Bacteriol.191:2521–2529 (2009))。天冬氨酸激酶催化天冬氨酸的ATP依赖性磷酸化，并参与几种氨基酸的合成。大肠杆菌中的由lysC编码的天冬酰胺激酶III酶，具有宽的底物范围，并且已经阐明了涉及底物特异性的催化残基 (Keng and Viola, Arch.Biochem.Biophys.335:73–81 (1996))。大肠杆菌中另外两种激酶也是良好的候选物质：乙酸激酶和 γ -谷氨酰激酶。大肠杆菌中由ackA (Skarstedt and Silverstein, J.Biol.Chem.251:6775–6783 (1976)) 编码的乙酸激酶，除了乙酸之外还有磷酸化丙酸 (Hesslinger et al., Mol.Microbiol.27:477–492 (1998))。由proB (Smith et al., J.Bacteriol.157:545–551 (1984)) 编码的大肠杆菌 γ -谷氨酰激酶，磷酸化谷氨酸的 γ 碳酸基团。

[0634]

<u>Gene</u>	<u>登录号.</u>	<u>GI号</u>	<u>生物体</u>
buk1	NP_349675	15896326	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
buk2	Q97II1	20137415	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
buk2	Q9X278.1	6685256	海栖热袍菌 (<i>Thermotoga maritima</i>)
lysC	NP_418448.1	16131850	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
ackA	NP_416799.1	16130231	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
proB	NP_414777.1	16128228	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0635]

			<i>coli</i>)
buk	YP_001307350.1	150015096	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
buk2	YP_001311072.1	150018818	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)

[0636] E) 磷酸-4-羟基丁酸酶(称为EB6)。EB6催化4-羟基丁酰基从磷酸转移到CoA。适用于催化该反应的酰基转移酶，包括磷酸转乙酰酶和磷酸转丁酰酶。来自大肠杆菌的pta基因编码可以将乙酰-磷酸转化成乙酰辅酶A的酶 (Suzuki, Biochim.Biophys.Acta 191:559–

569 (1969)。该酶也可以利用丙酰辅酶A代替乙酰辅酶A (Hesslinger et al., Mol. Microbiol. 27:477-492 (1998))。类似地,丙酮丁醇梭菌的ptb基因编码可以将丁酰辅酶A转化为丁酰磷酸的酶 (Walter et al., Gene 134:107-111 (1993)); Huang et al., J Mol. Microbiol. Biotechnol. 12:33-38 (2000)。另外的ptb基因可以在梭菌生物、产丁酸细菌L2-50 (Louis et al., J. Bacteriol. 186:2099-2106 (2004)) 和巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*) (Vazquez et al., Curr. Microbiol. 42:345-349 (2001))。

[0637]

<u>Gene</u>	<u>登录号.</u>	<u>GI 号</u>	<u>生物体</u>
<i>pta</i>	NP_416800.1	16130232	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>ptb</i>	NP_349676	15896327	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>ptb</i>	YP_001307349.1	150015095	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>ptb</i>	AAR19757.1	38425288	产丁酸细菌 L2-50
<i>ptb</i>	CAC07932.1	10046659	巨大芽孢杆菌 (<i>Bacillus megaterium</i>)

[0638] F) 4-羟基丁酰辅酶A还原酶(醛形成)。具有此活性的酶如上所述。

[0639] G) 1,4-丁二醇脱氢酶(称为EB8)。EB8催化4-羟基丁醛还原成1,4-丁二醇。编码此活性的示例性基因,包括不动杆菌属菌株M-1的alrA (Tani et al., Appl. Environ. Microbiol. 66:5231-5235 (2000))、来自大肠杆菌的yqhD和fucO (Sulzenbacher et al., J Mol Biol 342:489-502 (2004)) 和来自丙酮丁醇梭菌的bdh I和bdh II (Walter et al., J. Bacteriol. 174:7149-7158 (1992))。另外的EB8酶由梭菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* 中的bdh和拜氏梭菌中的Cbei_1722、Cbei_2181和Cbei_2421编码。这些和其他具有1,4-丁二醇活性的酶列于下表中。

[0640]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI 号</u>	<u>生物体</u>
<i>alrA</i>	BAB12273.1	9967138	不动杆菌 (<i>ACINETOBACTER</i>) sp. strain M-1
<i>ADH2</i>	NP_014032.1	6323961	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>fucO</i>	NP_417279.1	16130706	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>yqhD</i>	NP_417484.1	16130909	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	15896542	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>bdh</i>	BAF45463.1	124221917	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>Cbei_1722</i>	YP_001308850	150016596	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>Cbei_2181</i>	YP_001309304	150017050	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>Cbei_2421</i>	YP_001309535	150017281	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>14bdh</i>	AAC76047.1	1789386	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K-12 MG1655
<i>14bdh</i>	YP_001309304.1	150017050	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>) NCIMB 8052
<i>14bdh</i>	P13604.1	113352	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium saccharobutylicum</i>)
<i>14bdh</i>	ZP_03760651.1	225405462	梭菌 <i>Clostridium asparagiforme</i> DSM 15981
<i>14bdh</i>	ZP_02083621.1	160936248	鲍氏梭菌 (<i>Clostridium bolteae</i>) ATCC BAA-613
<i>14bdh</i>	YP_003845251.1	302876618	嗜纤维梭菌 (<i>Clostridium cellulovorans</i>) 743B
<i>14bdh</i>	ZP_03294286.1	210624270	梭菌 <i>Clostridium hiranonis</i> DSM 13275
<i>14bdh</i>	ZP_03705769.1	225016577	甲基戊糖梭菌 (<i>Clostridium methylpentosum</i>) DSM 5476

[0641]

<i>14bdh</i>	YP_003179160.1	257783943	极小奇异菌 (<i>Atopobium parvulum</i>) DSM 20469
<i>14bdh</i>	YP_002893476.1	237809036	甲苯单胞菌 <i>Tolumonas auensis</i> DSM 9187
<i>14bdh</i>	ZP_05394983.1	255528157	食一氧化碳梭菌 (<i>Clostridium carboxidivorans</i>) P7

[0642] H) 琥珀酸还原酶。琥珀酸直接还原琥珀酸半醛,由羧酸还原酶催化。用于催化该转化的示例性酶,也是下文和此处中针对K) 4-羟基丁酸还原酶所述的酶。

[0643] I) 琥珀酰辅酶A还原酶(醇形成)(称为EB10)。EB10酶是将琥珀酰辅酶A转化为4-HB的双功能氧化还原酶。下文和此处所述的用于M) 4羟基丁酰辅酶A还原酶(醇形成)的酶候选物也适用于催化琥珀酰辅酶A的还原。

[0644] J) 4-羟基丁酰CoA转移酶或4-羟基丁酰辅酶A合成酶(称为EB11)。4-HB转化为4-羟基丁酰辅酶A,由CoA转移酶或合成酶催化。EB11酶包括克氏梭菌cat1、cat2和cat3的基因产物(Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:2128–2133 (2008); Sohling et al., J. Bacteriol. 178:871–880 (1996))。类似的CoA转移酶活性也存在于阴道毛滴虫、布氏锥虫、氨基丁酸梭菌(*Clostridium aminobutyricum*)和牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*) (Riviere et al., J. Biol. Chem. 279:45337–45346 (2004); van Grinsven et al., J. Biol. Chem. 283:1411–1418 (2008))。

[0645]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>cat1</i>	P38946.1	729048	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>cat2</i>	P38942.2	172046066	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>cat3</i>	EDK35586.1	146349050	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>TVAG_395550</i>	XP_001330176	123975034	阴道毛滴虫 (<i>Trichomonas vaginalis</i>) G3
<i>Tb11.02.0290</i>	XP_828352	71754875	布氏锥虫 (<i>Trypanosoma brucei</i>)
<i>cat2</i>	CAB60036.1	6249316	氨基丁酸梭菌 (<i>Clostridium aminobutyricum</i>)
<i>cat2</i>	NP_906037.1	34541558	牙龈卟啉单胞菌 (<i>Porphyromonas</i>)

[0646]

			<i>gingivalis</i>) W83
--	--	--	-------------------------

[0647] 4HB-CoA合成酶催化4-HB向4-羟基丁酰辅酶A的ATP依赖性转化。AMP形成4-HB-CoA合成酶存在于通过二羧酸/羟基丁酸循环或3-羟基丙酸/4-HB循环同化碳的生物体中。具有此活性的酶已经在嗜中性热变形菌和勤奋金属球菌中得到表征 (Ramos-Vera et al., J Bacteriol 192:5329-40 (2010); Berg et al., Science 318:1782-6 (2007))。其他可以通过序列同源性推断。ADP形成CoA合成酶,如EB2A,也是合适的候选物。

[0648]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI号</u>	<u>生物体</u>
<i>Tneu_0420</i>	ACB39368.1	170934107	中性热变形菌 (<i>Thermoproteus neutrophilus</i>)
<i>Caur_0002</i>	YP_001633649.1	163845605	橙色绿屈挠菌 (<i>Chloroflexus aurantiacus</i>) J-10-fl
<i>Cagg_3790</i>	YP_002465062	219850629	聚集绿屈挠菌 (<i>Chloroflexus aggregans</i>) DSM 9485
<i>acs</i>	YP_003431745	288817398	嗜热产氢杆菌 (<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>) TK-6
<i>Pisl_0250</i>	YP_929773.1	119871766	冰岛热棒菌 (<i>Pyrobaculum islandicum</i>) DSM 4184
<i>Msed_1422</i>	ABP95580.1	145702438	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)

[0649] K) 4-HB还原酶。4-HB还原为4-羟基丁醛由羧酸还原酶(CAR)催化,如诺卡氏菌(*Nocardia iowensis*)中发现的Car酶。该酶和其它羧酸还原酶如上所述(参见EC 1.2.1.e)。

[0650] L) 4-羟基丁酰磷酸还原酶(称为EB14)。EB14催化4-羟基丁酰磷酸还原为4-羟基丁醛。迄今尚未确定催化该转化的酶。但是,类似的酶包括EC1.2.1类中的磷酸还原酶。示例性磷酸还原酶包括G3P脱氢酶(EC 1.2.1.12)、天冬氨酸半醛脱氢酶(EC 1.2.1.11)、乙酰谷氨酰磷酸还原酶(EC 1.2.1.38)和谷氨酸-5-半醛脱氢酶(EC 1.2.1.-)。天冬氨酸半醛脱氢酶(ASD, EC1.2.1.11)催化4-天冬氨酸磷酸到天冬氨酸-4-半醛的NADPH依赖性还原。ASD参与氨基酸生物合成,最近作为抗微生物靶标进行研究(Hadfield et al., Biochemistry 40: 14475-14483 (2001))。已经解开了大肠杆菌ASD结构(Hadfield et al., J Mol. Biol. 289: 991-1002 (1999)),并且已经证实该酶接受替代底物β-3-甲基天冬酰磷酸(Shames et

al., J Biol. Chem. 259:15331–15339 (1984))。流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*) 酶已经成为酶工程研究的主题,以改变活性位点的底物结合亲和力(Blanco et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60:1388–1395 (2004); Blanco et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 60:1808–1815 (2004))。在结核分枝杆菌 (Shafiani et al., J Appl Microbiol 98:832–838 (2005))、詹氏甲烷球菌 (Faehnle et al., J Mol. Biol. 335:1055–1068 (2005)) 和感染性微生物霍乱弧菌和幽门螺杆菌 (Moore et al., Protein Expr. Purif. 25:189–194 (2002)) 中发现了其他ASD候选物。相关的酶候选物是乙酰谷氨酰磷酸还原酶 (EC 1.2.1.38),其是在酿酒酵母 (Pauwels et al., Eur. J Biochem. 270:1014–1024 (2003))、枯草芽孢杆菌 (O'Reilly et al., Microbiology 140 (Pt 5):1023–1025 (1994))、大肠杆菌 (Parsot et al., Gene 68:275–283 (1988)) 和其他微生物中发现的将乙酰谷氨酰磷酸天然降解成乙酰谷氨酸-5-半醛的酶。大肠杆菌的另外的磷酸还原酶包括甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (gapA (Branlant et al., Eur. J. Biochem. 150:61–66 (1985))) 和谷氨酸-5-半醛脱氢酶 (proA (Smith et al., et al., J. Bacteriol. 157:545–551 (1984)))。编码来自鼠伤寒沙门氏菌 (Mahan et al., J Bacteriol. 156:1249–1262 (1983)) 和空肠弯曲杆菌 (Louie et al., Mol. Gen. Genet. 240:29–35 (1993)) 的谷氨酸-5-半醛脱氢酶的基因,在大肠杆菌中克隆并表达。

[0651]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI号</u>	<u>生物体</u>
<i>asd</i>	NP_417891.1	16131307	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>asd</i>	YP_248335.1	68249223	流感嗜血杆菌 (<i>Haemophilus influenzae</i>)
<i>asd</i>	AAB49996	1899206	结核分枝杆菌 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
<i>VC2036</i>	NP_231670	15642038	霍乱弧菌 (<i>Vibrio cholera</i>)
<i>asd</i>	YP_002301787.1	210135348	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>)
<i>ARG5,6</i>	NP_010992.1	6320913	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>argC</i>	NP_389001.1	16078184	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
<i>argC</i>	NP_418393.1	16131796	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0652]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI 号</u>	<u>生物体</u>
			<i>coli</i>)
<i>gapA</i>	P0A9B2.2	71159358	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>proA</i>	NP_414778.1	16128229	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>proA</i>	NP_459319.1	16763704	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)
<i>proA</i>	P53000.2	9087222	空肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter jejuni</i>)

[0653] M) 4-羟基丁酰辅酶A还原酶(醇形成) (称为EB15)。EB15酶是将4-羟基丁酰辅酶A转化为1,4-丁二醇的双功能氧化还原酶。具有此活性的酶包括来自大肠杆菌的adhE、丙酮丁醇梭菌的adhE2 (Fontaine et al., J.Bacteriol.184:821-830 (2002)) 和由bdh I和bdh II 编码的丙酮丁醇梭菌酶 (Walter, et al., J.Bacteriol.174:7149-7158 (1992))。除了将乙酰辅酶A还原成乙醇之外,已经证实肠粘膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 中由adhE编码的酶,将支链化合物异丁醛氧化成异丁酰辅酶A (Kazahaya et al., J.Gen.Appl.Microbiol.18:43-55 (1972); Koo et al., Biotechnol Lett,27:505-510 (2005))。

[0654]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI 号</u>	<u>生物体</u>
<i>adhE</i>	NP_415757.1	16129202	大肠杆菌 (<i>Escherichia Coli</i>)
<i>adhE2</i>	AAK09379.1	12958626	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	15896542	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	肠系膜明串珠菌 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)
<i>adhE</i>	NP_781989.1	28211045	破伤风梭菌 (<i>Clostridium tetani</i>)

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
[0655] <i>adhE</i>	NP_563447.1	18311513	产气荚膜梭菌 (<i>Clostridium perfringens</i>)
	YP_001089483.1	126700586	艰难梭菌 (<i>Clostridium difficile</i>)

[0656] 实施例12

[0657] 己酸、6-氨基己酸、己内酰胺和己二胺合成酶

[0658] 该实施例提供可用于将琥珀酰辅酶A和乙酰辅酶A转化为己二酸、6-氨基己酸、己内酰胺和己二胺的基因，如图8的途径所示。

[0659] 图8展示了A) 3-氧化己二酰辅酶A硫解酶,B) 3-氧化己二酰辅酶A还原酶,C) 3-羟基己二酰辅酶A脱水酶,D) 5-羧基-2-戊烯酰辅酶A还原酶,E) 己二酰辅酶A还原酶(醛形成),F) 6-氨基己酸转氨酶或6-氨基己酸脱氢酶,G) 6-氨基己酰基辅酶A/酰基CoA转移酶或6-氨基己酰基辅酶A合成酶,H) 酰胺水解酶,I) 自发环化,J) 6-氨基己酰基辅酶A还原酶(醛形成),K) HMDA转氨酶或HMDA脱氢酶,L) 脂肪酰辅酶A水解酶、己二酰辅酶A连接酶、己二酰CoA转移酶,或磷酸转谷胱蛋白酶/己二酸激酶。

[0660] 图8中所示的转化，属于下表所示的至少10个一般转化类别。每个标签的前三位数字对应于酶委员会号码的前三位数字，表示与底物特异性无关的一般转化类型。下面描述了每个类别中的许多生化表征的候选基因。具体列出的是可用于催化图8中适当转化的克隆和表达的示例性基因。

[0661]

步骤	标记	功能
图8, 步骤B	1.1.1.a	氧化还原酶(酮到羟基或醛到醇)
图8, 步骤E和J	1.2.1.b	氧化还原酶(酰基辅酶A到醛)
图8, 步骤D	1.3.1.a	氧化还原酶, 作用于CH-CH供体
图8, 步骤F和K	1.4.1.a	氧化还原酶, 作用于氨基酸
图8, 步骤A	2.3.1.b	酰基转移酶
图8, 步骤F和K	2.6.1.a	氨基转移酶
图8, 步骤G和L	2.8.3.a	辅酶A转移酶
图8, 步骤G和L	6.2.1.a	酸-硫醇连接酶
图8, 步骤H	6.3.1.a/6.3.2.a	酰胺合成酶/肽合成酶
图8, 步骤I	不需要酶	自发环化

[0662] 图8,步骤A:3-氧化己二酰辅酶A硫解酶。

[0663] EC 2.3.1.b酰基转移酶。该途径的第一步将乙酰辅酶A和琥珀酰辅酶A结合，形成3-氧化己二酰辅酶A。步骤A可涉及3-氧化己二酰辅酶A硫解酶，或相仿地，琥珀酰辅酶A:乙酰辅酶A酰基转移酶(β -酮硫解酶)。由假单胞菌菌株B13(Kaschabek et al., J.Bacteriol.184:207-215 (2002))中的pcaF、恶臭假单胞菌中的phaD(Oliviera et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 95:6419-6424 (1998)),荧光假单胞菌ST中的paaE(Di Gennaro

et al., Arch. Microbiol. 189:117–125 (2007)) 和来自大肠杆菌的paaJ (Nogales et al., Microbiol. 153:357–365 (2007)) 所编码的基因产物, 在芳族化合物如苯乙酸或苯乙烯的降解过程中, 催化3-氧化己二酰辅酶A向琥珀酰辅酶A和乙酰辅酶A的转化。由于β-酮硫解酶催化可逆转化, 这些酶可用于合成3-氧化己二酰辅酶A。例如, 来自真养劳尔氏菌的酮硫解酶phaA, 将两个乙酰辅酶A分子结合形成乙酰乙酰辅酶A (Sato et al., J Biosci Bioeng 103:38–44 (2007)) 。类似地, 已经报道了β-酮硫解酶(bktB)在真养劳尔氏菌中催化乙酰辅酶A和丙酰辅酶A缩合, 形成β-酮戊酰基辅酶A (Slater et al., J. Bacteriol. 180:1979–1987 (1998))。上述基因产物的蛋白质序列是本领域熟知的, 可以使用以下登录号在诸如GenBank的公共数据库中进行访问。

[0664]

<u>基因名 称</u>	<u>GI 号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
paaJ	16129358	NP_415915.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
pcaF	17736947	AAL02407	斯氏假单胞菌 (<i>Pseudomonas knackmussii</i>) (B13)
phaD	3253200	AAC24332.1	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
paaE	106636097	ABF82237.1	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)

[0665] 这些示例性序列, 可以用于通过序列相似性搜索(例如, BLASTp)在GenBank或其他数据库中鉴定同源蛋白。得到的同源蛋白及其相应的基因序列能提供额外的外源DNA序列, 用于转化到大肠杆菌或其它合适的宿主微生物中, 以得到生产宿主。

[0666] 例如, 可以使用以下GenBank登录号找到大肠杆菌K12的paaJ的直系同源物:

<u>GI 号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
152970031	YP_001335140.1	克雷伯氏肺炎杆菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)
157371321	YP_001479310.1	变形斑沙雷菌 (<i>Serratia</i>)

[0667]

		<i>proteamaculans</i>)
3253200	AAC24332.1	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)

[0668]

[0669] 使用以下GenBank登录号可以找到来自斯氏假单胞菌 (*Pseudomonas knackmussii*) 的pcaF的直链同系物:

<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
[0670]	4530443	链霉菌 (<i>Streptomyces</i>) sp. 2065
	24982839	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i> <i>putida</i>)
	115589162	绿脓假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i>)

[0671] 用于酮硫解酶步骤的另外的天然候选基因包括atoB,其可以催化2个乙酰辅酶A分子的可逆缩合(Sato et al., J.Biosci.Bioengineer.103:38–44 (2007)),还包括及其同系物yqeF。非天然候选基因包括来自真养劳尔氏菌的phaA (Sato et al., 同上, 2007) 和bktB (Slater et al., J.Bacteriol.180:1979–1987 (1998)), 和来自丙酮丁醇梭菌的两种酮硫解酶, thiA和thiB (Winzer et al., J.Mol.Biotechnol.2:531–541 (2000))。这些示例性基因产物中的每一个的蛋白质序列可以使用以下GenBank登录号找到:

<u>基因名称</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
[0672]	atoB	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	yqeF	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	phaA	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>)
	bktB	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>)
	thiA	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
	thiB	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)

[0673] 2-氨基-4-氧代戊酸(AKP)硫解酶或AKP硫解酶(AKPT)酶,为进行步骤A提供额外的候选物。AKPT是参与梭菌(*Clostridium sticklandii*)的鸟氨酸降解的吡哆醛磷酸依赖性酶(Jeng et al., Biochemistry 13:2898–2903 (1974); Kenklies et al., Microbiology 145:819–826 (1999))。最近鉴定了编码AKPT的α和β亚基的基因簇(或-2(ortA)和or-3(ortB)),并表征了酶的生化特性(Fonknechten et al., J.Bacteriol.In Press (2009))。该酶能够在两个方向起作用并且与丙氨酸的D-异构体天然地反应。来自梭菌(*Clostridium sticklandii*)的AKPT已被表征,但其蛋白质序列尚未公开。具有高序列同源性的酶在艰难梭菌、嗜碱菌*Alkaliphilus metallireducens* QYF、热无氧杆菌属(*Thermoanaerobacter*)X514和腾冲嗜热无氧菌(*Thermoanaerobacter tengcongensis*)MB4 (Fonknechten et al., 同上)中发现。

[0674]

基因名称	GI号	GenBank ID	生物体
<i>ortA</i> (α)	126698017	YP_001086914.1	艰难梭菌 (<i>Clostridium difficile</i>) 630
<i>ortB</i> (β)	126698018	YP_001086915.1	艰难梭菌 (<i>Clostridium difficile</i>) 630
<i>Amet_2368</i> (α)	150390132	YP_001320181.1	嗜碱菌 <i>Alkaliphilus metallireducens</i> QYF
<i>Amet_2369</i> (β)	150390133	YP_001320182.1	嗜碱菌 <i>Alkaliphilus metallireducens</i> QYF
<i>Teth514_1478</i> (α)	167040116	YP_001663101.1	高温无氧杆菌 (<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514)
<i>Teth514_1479</i> (β)	167040117	YP_001663102.1	高温无氧杆菌 (<i>Thermoanaerobacter</i> sp. X514)
<i>TTE1235</i> (α)	20807687	NP_622858.1	腾冲嗜热无氧菌 (<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>) MB4
<i>thrC</i> (β)	20807688	NP_622859.1	腾冲嗜热无氧菌 (<i>Thermoanaerobacter tengcongensis</i>) MB4

[0675] 步骤B:3-氧化己二酰辅酶A还原酶。

[0676] EC 1.1.1.a 氧化还原酶。图8所示的某些转化,涉及将酮官能团转化为羟基的氧化还原酶。例如,如图8所示,步骤B涉及将3-氧化酰基辅酶A还原为3-羟基酰基辅酶A。

[0677] 可将3-羟基酰基辅酶A分子(例如3-氧化己二酰辅酶A)转化为3-羟基酰基辅酶A分子(例如3-羟基己二酰辅酶A)的示例性酶,包括具有脂肪酸 β -氧化或苯乙酸分解代谢的天然生理作用的酶。例如,大肠杆菌中的由fadB和fadJ编码的两种脂肪酸氧化复合物的亚基,用作3-羟基酰基辅酶A脱氢酶(Binstock et al., Methods Enzymol. 71:403–411 (1981))。此外,由恶臭假单胞菌U的phaC(Oliviera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6419–6424 (1998))和荧光假单胞菌ST中的paaC(DiGennaro et al., Arch. Microbiol. 1988:117–125 (2007))编码的基因产物,催化图8中步骤B的反向反应,也就是说,在苯乙酸或苯乙烯的分解代谢过程中,3-羟基己二酰辅酶A到3-氧化己二酰辅酶A的氧化反应。注意,由这些酶催化的反应是可逆的。丙酮丁醇梭菌中的hbd也可进行类似的转化(Atsumi et al., Metab. Eng. (epub Sep. 14, 2007)); Boynton et al., J. Bacteriol. 178:3015–3024 (1996))。该酶将乙酰乙酰辅酶A转化为3-羟基丁酰辅酶A。此外,鉴于大肠杆菌中paaH与苯乙酸降解操纵子中的其他基因的接近程度(Nogales et al., Microbiology 153:357–365 (2007))以及paaH突变体不能在苯乙酸上生长的事实(Ismail et al., Eur. J. Biochem. 270:3047–3054 (2003)),预期大肠杆菌paaH基因编码3-羟基酰基辅酶A脱氢酶。

[0678]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>fadB</i>	119811	P21177.2	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>fadJ</i>	3334437	P77399.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>paaH</i>	16129356	NP_415913.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>phaC</i>	26990000	NP_745425.1	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>paaC</i>	106636095	ABF82235.1	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)

[0679] 能够将3-羟基酰基辅酶A分子转化成其相应的3-羟酰基辅酶A分子的另外示例性氧化还原酶,包括3-羟基丁酰基辅酶A脱氢酶。丙酮丁醇梭菌的由hbd编码的酶已经在大肠杆菌 (Youngleson et al., J.Bacteriol. 171:6800–6807 (1989)) 中克隆和功能表达。另外的候选基因包括克氏梭菌 (Hellmer et al., FEBS Lett. 21:351–354 (1972)) 中的Hbd1 (C端结构域) 和Hbd2 (N端结构域) 和牛 (Bos taurus) 中的HSD17B10 (Wakil et al., J.Biol.Chem. 207:631–638 (1954))。证实可将乙酰乙酰基辅酶A还原为3-羟基丁酰基辅酶A的其他候选基因,是来自生枝动胶菌 (*Zoogloea ramigera*) 的PhbB (Ploux et al., Eur.J.Biochem. 174:177–182 (1988)) 和来自类球红细菌 (*Rhodobacter sphaeroides*) 的phaB (Alber et al., et al., Mol.Microbiol 61:297–309 (2006))。前一候选基因是NADPH依赖性的,其核苷酸序列已被确定 (Peoples et al., Mol.Microbiol 3:349–357 (1989)),并且该基因已经在大肠杆菌中表达。对基因的底物特异性研究得出的结论是,除了乙酰乙酰基辅酶A之外,它还可以接受3-氧代丙酰基辅酶A作为底物 (Ploux et al., 同上)。

[0680]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>hbd</i>	18266893	P52041.2	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>Hbd2</i>	146348271	EDK34807.1	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>Hbd1</i>	146345976	EDK32512.1	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>HSD17B10</i>	3183024	O02691.3	牛 (<i>Bos taurus</i>)
<i>phbB</i>	130017	P23238.1	生枝动胶菌 (<i>Zoogloea ramigera</i>)
<i>phaB</i>	146278501	YP_001168660.1	类球红细菌 (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)

[0681] 在其他种类的梭菌和勤奋金属球菌中已经发现了许多相似的酶 (Berg et al., Science 318:1782–1786 (2007))。

[0682]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>hbd</i>	15895965	NP_349314.1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>hbd</i>	20162442	AAM14586.1	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>Msed_1423</i>	146304189	YP_001191505	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Msed_0399</i>	146303184	YP_001190500	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Msed_0389</i>	146303174	YP_001190490	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Msed_1993</i>	146304741	YP_001192057	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)

[0683] 步骤C:3-羟基己二酰辅酶A脱水酶。步骤C可涉及3-羟基己二酰辅酶A脱水酶。丙酮丁醇梭菌的crt的基因产物,催化3-羟基丁酰辅酶A脱水为巴豆酰辅酶A(Atsumi et al., Metab. Eng. (Epub Sep. 14, 2007); Boynton et al., J. Bacteriol. 178:3015–3024 (1996))。该基因的同系物是在图8中举例说明的合成途径中进行第三步(步骤C)的强候选物。此外,已知在烯酰辅酶A化合物中催化双键羟基化的基因,代表了这种酶转化的可逆性的另外的候选物。例如,恶臭假丝酵母的烯酰辅酶A水合酶phaA和phaB,被认为在苯乙酸分解代谢过程中进行双键羟基化(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6419–6424 (1998)),并因此代表了可加入到大肠杆菌中的其他候选物。这些基因的删除,排除了恶臭假单胞菌中的苯乙酸降解。来自荧光假单胞菌的paaA和paaB催化类似的转化(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6419–6424 (1998))。最后,已经证实许多大肠杆菌基因表现出烯酰-CoA水合酶的功能,包括maoC(Park和Lee, J. Bacteriol. 185:5391–5397 (2003))、paaF(Ismail et al., Eur. J. Biochem. 270:3047–3054 (2003); Park and Lee, Biotechnol. Bioeng. 86:681–686 (2004); Park and Lee, Appl. Biochem. Biotechnol. 113–116:335–346 (2004)),和paaG(Ismail et al., supra, 2003; Park and Lee, supra, 2003; Park and Lee, supra, 2004),和paaG(Ismail et al., 同上, 2003; Park and Lee, 同上, 2003; Park and Lee, 同上, 2004)。这些示例性基因产物中的每一个的蛋白质序列可以使用以下GenBank登录号找到:

<u>基因名称</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
maoC	NP_415905.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
paaF	NP_415911.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
paaG	NP_415912.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
crt	NP_349318.1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
[0684] paaA	NP_745427.1	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
paaB	NP_745426.1	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
phaA	ABF82233.1	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
phaB	ABF82234.1	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)

[0685] 可选地, β -氧化基因是己二酸合成中前三个步骤的候选物。建议的己二酸合成途径的候选基因, 还包括大肠杆菌的天然脂肪酸氧化基因及其在其他微生物中的同系物。大肠杆菌基因fadA和fadB编码了具有酮酰基辅酶A硫解酶、3-羟基酰基辅酶A脱氢酶和烯酰基辅酶A水合酶活性的多酶复合物 (Yang et al., *Biochem.* 30:6788-6795 (1991); Yang et al., *J. Biol. Chem.* 265:10424-10429 (1990); Yang et al., *J. Biol. Chem.* 266:16255 (1991); Nakahigashi 和 Inokuchi, *Nucl. Acids Res.* 18:4937 (1990))。这些活性在机械上类似于图8所示的前三个转化。fadI和fadJ基因编码相似的功能, 并且天然地仅无氧表达 (Campbell et al., *Mol. Microbiol.* 47:793-805 (2003))。这些基因产物天然地将短、中、长链脂肪酰基辅酶A化合物降解为乙酰辅酶A, 而不是将琥珀酰辅酶A和乙酰辅酶A转化为5-羧基-2-戊烯酰辅酶A, 如图8所示。但是, 众所周知, 酮酰基辅酶A硫解酶、3-羟基酰基辅酶A脱氢酶和烯酰基辅酶A水合酶催化的是可逆转化。此外, 定向进化和相关方法, 可以用于定制大肠杆菌的天然 β -氧化机构的底物特异性。因此, 这些酶或其同系物可用于己二酸生产。如果天然基因用于在体内降解己二酸或其前体, 则进行适当的基因修饰以减弱或消除这些功能。但是, 这可能没有必要, 因为 (Sato et al., *J. Biosci. Bioeng.* 103:38-44 (2007)) 中已经描述了在大肠杆菌中生产聚[(R)-3-羟基丁酸]的方法, 涉及通过敲除负调节子fadR来活化fadB, 并共表达非天然酮硫解酶, 即来自真养劳尔氏菌 (*Ralstonia eutropha*) 的phaA。这项研究清楚地表明, 氧化酶, 特别是编码3-羟基酰基辅酶A脱氢酶和烯酰基辅酶A水合酶活性的fadB的基因产物, 可以作为从乙酰辅酶A生产更长链分子途径的一部分前体。这些示例性基因产物中的每一个的蛋白质序列可以使用以下GenBank登录号找到:

基因名称	GenBank ID	生物体
fadA	YP_026272.1	大肠杆菌 (Escherichia coli)
[0686]	fadB	大肠杆菌 (Escherichia coli)
	fadI	大肠杆菌 (Escherichia coli)
	fadJ	大肠杆菌 (Escherichia coli)
	fadR	大肠杆菌 (Escherichia coli)

[0687] 步骤D:5-羧基-2-戊烯酰辅酶A还原酶。EC 1.3.1.a对CH-CH供体起作用的氧化还原酶。步骤D涉及5-羧基-2-戊烯酰辅酶A还原酶将5-羧基-2-戊烯酰辅酶A转化为己二酰辅酶A。烯酰-CoA还原酶是适合这种转化的酶。

[0688] 尽管酮硫解酶、脱氢酶和烯酰辅酶A水合酶步骤通常是可逆的,但烯酰辅酶A还原酶步骤在生理条件下几乎总是氧化和不可逆的(Hoffmeister et al., J.Biol.Chem.280: 4329-4338 (2005))。FadE催化这种在大肠杆菌中可能不可逆的转化(Campbell and Cronan, J.Bacteriol.184:3759-3764 (2002))。该途径可能涉及一种能够将2-烯酰基辅酶A中间体还原的酶,而不是如FadE仅仅将酰基辅酶A氧化成2-烯酰辅酶A化合物。此外,尽管已经认为大肠杆菌天然具有烯酰辅酶A还原酶(Mizugaki et al., J.Biochem.92:1649-1654 (1982); Nishimaki et al., J.Biochem.95:1315-1321 (1984)),但还没有具有该功能的大肠杆菌基因得到生物化学表征。

[0689] 示例性的一个烯酰辅酶A还原酶是来自丙酮丁醇梭菌的bcd的基因产物(Boynton et al., J.Bacteriol.178:3015-3024 (1996); Atsumi et al., Metab. Eng. 2008 10 (6) :305-311 (2008) (2007年10月14日, Epub), 其天然地催化巴豆酰辅酶A还原成丁酰辅酶A, 该酶的活性可通过与编码电子传递黄素蛋白的丙酮丁醇梭菌etfAB基因表达结合地表达bcd而增强。烯酰辅酶A还原酶步骤的另一个候选物,是来自眼虫藻(Euglena gracilis)的线粒体烯酰辅酶A还原酶(Hoffmeister et al., J.Biol.Chem.280:4329-4338 (2005))。该序列去除其线粒体靶向前导序列后所衍生的构建体克隆到大肠杆菌中,得到活性酶(Hoffmeister et al., 同上),该方法是表达真核基因的技术领域的技术人员所熟知的,特别是在原核生物内具有可将基因产物靶向特定细胞隔室的前导序列的真核基因。来自原核齿垢密螺旋体(Treponema denticola)的基因TDE0597的近缘同系物,代表已经在大肠杆菌中克隆并表达的第三种烯酰辅酶A还原酶(Tucci et al., FEBS Letters 581:1561-1566 (2007))。

[0690]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>bcd</i>	15895968	NP_349317.1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>etfA</i>	15895966	NP_349315.1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>etfB</i>	15895967	NP_349316.1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
TER	62287512	Q5EU90.1	眼虫藻 (<i>Euglena gracilis</i>)
TDE0597	42526113	NP_971211.1	齿垢密螺旋体 (<i>Treponema denticola</i>)

[0691] 步骤E:己二酰辅酶A还原酶(醛形成)。EC 1.2.1.b氧化还原酶(酰基辅酶A与醛)。在步骤E中将己二酰辅酶A转化为己二酸半醛,可以包括能够将酰基辅酶A还原成其相应醛的酰基辅酶A脱氢酶。EC 1.2.1.b氧化还原酶(酰基辅酶A到醛)提供合适的酶活性。本申请和上文描述了该类中的示例性酶(例如参见3-羟基丁酰辅酶A还原酶(醛形成)的描述)。

[0692] 步骤F:6-氨基己酸转氨酶或6-氨基己酸脱氢酶。

[0693] EC 1.4.1.a对氨基酸起作用的氧化还原酶。步骤F描述了将己二酸半醛转化为6-氨基己酸的还原胺化。

[0694] 对氨基酸起作用的大多数氧化还原酶,以NAD⁺或NADP⁺为受体催化α-氨基酸的氧化脱氨基,但是反应通常是可逆的。对氨基酸起作用的示例性氧化还原酶,包括由gdhA编码的谷氨酸脱氢酶(脱氨基),由1dh编码的亮氨酸脱氢酶(脱氨酸)和由nadX编码的天冬氨酸脱氢酶(脱氨基)。来自大肠杆菌的gdhA基因产物(McPherson et al., Nucleic Acids Res. 11:5257-5266 (1983); Korber et al., J. Mol. Biol. 234:1270-1273 (1993)),来自海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)的gdh(Kort et al., Extremophiles 1:52-60 (1997); Lebbink et al., J. Mol. Biol. 280:287-296 (1998); Lebbink et al., J. Mol. Biol. 289: 357-369 (1999))和来自盐生盐杆菌(*Halobacterium salinarum*)的gdhA1(Ingoldsby et al., Gene 349:237-244 (2005)),催化谷氨酸到2-氧戊二酸和氨的可逆相互转化,同时分别青睐NADP(H)、NAD(H)或两者。蜡状芽孢杆菌的1dh基因编码的LeuDH蛋白具有广泛底物范围,包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸和2-氨基丁酸(Stoyan et al., J. Biotechnol 54:77-80 (1997); Ansorge et al., Biotechnol Bioeng. 68:557-562 (2000))。来自海栖热袍菌的编码天冬氨酸脱氢酶的nadX基因,参与NAD的生物合成(Yang et al., J. Biol. Chem. 278: 8804-8808 (2003))。

[0695]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
gdhA	118547	P00370	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
gdh	6226595	P96110.4	海栖热袍菌 (<i>Thermotoga maritima</i>)
gdhA1	15789827	NP_279651.1	盐生盐杆菌 (<i>Halobacterium salinarum</i>)
1dh	61222614	P0A393	蜡样芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)

nadX	15644391	NP_229443.1	海栖热袍菌 (<i>Thermotoga maritima</i>)
------	----------	-------------	--------------------------------------

[0696] 由lysDH基因编码的赖氨酸6-脱氢酶(脱氨基),催化L-赖氨酸的ε-氨基的氧化脱氨基反应,形成2-氨基己二酸-6-半醛,其随后经过非酶促环化,形成Δ¹-哌啶-6-羧酸(Misono et al., J.Bacteriol.150:398-401(1982))。典型的酶可以存在于嗜热脂肪泥土芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*) (Heydari et al., Appl Environ.Microbiol 70:937-942 (2004))、根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) (Hashimoto et al., J Biochem 106:76-80 (1989); Misono et al., supra) 和反硝化无色杆菌(*Achromobacter denitrificans*) (Ruldeekulthamrong et al., BMB.Rep.41:790-795 (2008))。鉴于己二酸半醛与2-氨基己二酸-6-己醛之间的结构相似性,所述酶是将己二酸半醛转化为6-氨基己酸的特别好的候选物。

[0697]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
lysDH	13429872	BAB39707	嗜热脂肪泥土芽孢杆菌 (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)
lysDH	15888285	NP_353966	根癌土壤杆菌 (<i>Agrobacterium tumefaciens</i>)
lysDH	74026644	AAZ94428	反硝化无色杆菌 (<i>Achromobacter denitrificans</i>)

[0698] EC 2.6.1.a氨基转移酶。图8的步骤F在某些实施例中还可以涉及6-醛向胺的转氨基反应。这种转化可以被γ-氨基丁酸转氨酶(GABA转氨酶)催化。一种大肠杆菌GABA转氨酶由gabT编码并将氨基从谷氨酸转移到琥珀酰半醛的末端醛(Bartsch et al., J.Bacteriol.172:7035-7042 (1990))。puuE的基因产物在大肠杆菌中催化另一种4-氨基丁酸转氨酶(Kurihara et al., J.Biol.Chem.280:4602-4608 (2005))。已经证实小家鼠(*Mus musculus*)、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)和野猪(*Sus scrofa*)中的GABA转氨酶与6-氨基己酸反应(Cooper, Methods Enzymol.113:80-82 (1985); Scott et al., J.Biol.Chem.234:932-936 (1959))。

[0699]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
gabT	16130576	NP_417148.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
puuE	16129263	NP_415818.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
abat	37202121	NP_766549.2	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
gabT	70733692	YP_257332.1	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
abat	47523600	NP_999428.1	野猪 (<i>Sus scrofa</i>)

[0700] 另外的酶候选物包括腐胺氨基转移酶或其他二胺氨基转移酶。这种酶特别适用于将6-氨基己酸半醛转化为己二胺。大肠杆菌腐胺氨基转移酶由ygjG基因编码,纯化的酶也能够令尸胺和亚精胺转氨基(Samsonova et al., BMC Microbiol 3:2 (2003))。此外,已经报道了该酶对1,7-二氨基庚烷和除了2-氧戊酸(例如丙酮酸、2-氧代丁酸)以外的氨基受体的活性(Samsonova et al., 同上; Kim, KH, J Biol Chem 239:783-786 (1964))。一种以丙酮酸作为氨基受体比 α -酮戊二酸活性更高的腐胺转氨酶,来自绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)的spuC基因(Lu et al., J Bacteriol 184:3765-3773 (2002))。

[0701]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
ygjG	145698310	NP_417544	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
spuC	9946143	AAG03688	绿脓假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)

[0702] 另外的候选酶包括从 β -丙氨酸生产丙二酸半醛的 β -丙氨酸/ α -酮戊二酸转氨酶(WO08027742)。克氏酵母(*Saccharomyces kluyveri*)中SkPYD4的基因产物也证实优先使用 β -丙氨酸作为氨基供体(Andersen et al., FEBS.J. 274:1804-1817 (2007))。SkUGA1编码了酿酒酵母GABA氨基转移酶UGA1的同系物(Ramos et al., Eur.J.Biochem., 149:401-404 (1985)),而SkPYD4编码了参与丙氨酸和GABA转氨酶的酶(Andersen et al., 同上)。3-氨基-2-甲基丙酸转氨酶,催化从甲基丙二酸酐半醛向3-氨基-2-甲基丙酸的转化。这种酶已在褐家鼠(*Rattus norvegicus*)和野猪(*Sus scrofa*)中表达,并由Abat编码(Tamaki et al., Methods Enzymol, 324:376-389 (2000))。

[0703]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
SkyPYD4	98626772	ABF58893.1	克氏酵母 (<i>Saccharomyces kluyveri</i>)
SkUGA1	98626792	ABF58894.1	克氏酵母 (<i>Saccharomyces kluyveri</i>)
UGA1	6321456	NP_011533.1	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0704]

<i>Abat</i>	122065191	P50554.3	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
<i>Abat</i>	120968	P80147.2	野猪 (<i>Sus scrofa</i>)

[0705] 步骤G:6-氨基己酰辅酶A/酰基CoA转移酶或6-氨基己酰辅酶A合成酶。

[0706] 2.8.3.aCoA转移酶。CoA转移酶催化了将CoA部分从一个分子转移到另一个分子的可逆反应。例如,步骤G可以由6-氨基己酰辅酶A/酰基CoA转移酶催化。这些步骤的一个候选酶,是在假单胞菌中由pcaI和pcaJ编码的一个双亚基酶,其已证实具有3-氧代己二酰辅酶A/琥珀酸转移酶活性(Kaschabek and Reineke, J.Bacteriol. 177:320-325 (1995); 和 Kaschabek and Reineke, J.Bacteriol. 175:6075-6081 (1993))。在不动杆菌属ADP1(Kowalchuk et al., Gene 146:23-30 (1994) 和天蓝链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)中存在基于同源性的类似酶。另外的示例性琥珀酰辅酶A:3:含氨酸-CoA转移酶,存在于幽门螺杆菌(Corthesy-Theulaz et al., J.Biol.Chem. 227:25659-25667 (1997))和枯草芽孢杆菌

菌(Stols et al., Protein Expr Purif. 53:396–403 (2007)) 中。

[0707]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
pcaI	24985644	AAN69545.1	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
pcaJ	26990657	NP_746082.1	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
pcaI	50084858	YP_046368.1	不动杆菌 (<i>Acinetobacter</i>) sp. ADP1
pcaJ	141776	AAC37147.1	不动杆菌 (<i>Acinetobacter</i>) sp. ADP1
pcaI	21224997	NP_630776.1	天蓝色链霉菌 (<i>Streptomyces coelicolor</i>)
pcaJ	21224996	NP_630775.1	天蓝色链霉菌 (<i>Streptomyces coelicolor</i>)
HPAG1_0676	108563101	YP_627417	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>)
HPAG1_0677	108563102	YP_627418	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>)
ScoA	16080950	NP_391778	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
ScoB	16080949	NP_391777	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)

[0708] 可以利用乙酸作为CoA受体的3-氧化酰基CoA转移酶,是由大肠杆菌atoA(α亚基)和atoD(β亚基)基因编码的乙酰乙酰CoA转移酶(Vanderwinkel et al., Biochem Biophys Res Commun. 33:902–908 (1968); Korolev et al., Acta Crystallogr D Biol Crystallogr. 58:2116–2121 (2002))。还已经证实,该酶将CoA部分转移到各种支链和线性酰基辅酶A底物,包括异丁酸(Matthies et al., Appl Environ Microbiol 58:1435–1439 (1992))、戊酸(Vanderwinkel et al., 同上)和丁酸甲酯(Vanderwinkel et al., 同上)。类似的酶存在于谷氨酸棒状杆菌ATCC 13032(Duncan et al., Appl Environ Microbiol 68:5186–5190 (2002))、丙酮丁醇梭菌(Cary et al., Appl Environ Microbiol 56:1576–1583 (1990))和梭菌Clostridium saccharoperbutylacetonicum(Kosaka et al., Biosci Biotechnol Biochem. 71:58–68 (2007))中。

[0709]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>atoA</i>	2492994	P76459.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
<i>atoD</i>	2492990	P76458.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
<i>actA</i>	62391407	YP_226809.1	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) ATCC 13032
<i>cg0592</i>	62389399	YP_224801.1	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) ATCC 13032
<i>ctfA</i>	15004866	NP_149326.1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>ctfB</i>	15004867	NP_149327.1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>ctfA</i>	31075384	AAP42564.1	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>ctfB</i>	31075385	AAP42565.1	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>

[0710] 如步骤G中,上述酶也可以表现出对6-氨基己酸和6-氨基己酰基辅酶A的所需活性。但是,额外的示例性转移酶候选物由克氏梭菌 (*Clostridium kluyveri*) 的cat1、cat2和cat3的基因产物催化,其分别显示琥珀酰辅酶A、4-羟基丁酰辅酶A和丁酰CoA转移酶活性 (Seedorf et al., 同上; Sohling et al., Eur.J Biochem. 212:121-127 (1993); Sohling et J.Bacteriol. 178:871-880 (1996))。

[0711]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
cat1	729048	P38946.1	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
cat2	172046066	P38942.2	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
cat3	146349050	EDK35586.1	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)

[0712] 来自无氧细菌发酵氨基酸球菌 (*Acidaminococcus fermentans*) 的戊二酸CoA转移酶 (EC 2.8.3.12),与二酸戊酰辅酶A和3-丁烯酰辅酶A反应 (Mack et al., FEBS Lett. 405: 209-212 (1997))。编码该酶的基因是gctA和gctB。该酶与其他CoA衍生物(包括戊二酰辅酶A、2-羟基戊二酰辅酶A、己二酰辅酶A和丙烯酰辅酶A)具有降低但可检测的活性 (Buckel et al., Eur.J.Biochem. 118:315-321 (1981))。该酶已经在大肠杆菌中克隆并表达 (Mack et al., Eur.J.Biochem. 226:41-51 (1994))。

[0713]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>gctA</i>	559392	CAA57199.1	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)
<i>gctB</i>	559393	CAA57200.1	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)

[0714] EC 6.2.1.a酸-硫醇连接酶。步骤G还可以涉及酸-硫醇连接酶或合成酶功能(术语连接酶(ligase)、合酶(synthetase)和合成酶(synthase)在本申请中可互换使用并且指代相同的酶类)。编码所述转化酶的示例性基因,包括天然形成琥珀酰辅酶A合成酶复合物的大肠杆菌的sucCD基因。该酶复合物天然地催化琥珀酸形成琥珀酰辅酶A,同时消耗1个ATP,是体内可逆反应(Buck et al., Biochem. 24:6245-6252 (1985))。鉴于琥珀酸和己二酸之间的结构相似性,即两者都是直链二羧酸,可以合理地预测sucCD酶对己二酰辅酶A的一些活性。

[0715]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
sucC	16128703	NP_415256.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
sucD	1786949	AAC73823.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0716] 另外的示例性CoA连接酶包括序列尚未表征的大鼠二羧酸-CoA连接酶(Vamecq et al., Biochemical Journal 230:683-693 (1985))、来自产黄青霉菌(*Penicillium chrysogenum*)的两种特征性苯乙酸-CoA连接酶(Lamas-Maceiras et al., Biochem. J. 395: 147-155 (2005); Wang et al., Biochem Biophys Res Commun 360 (2) :453-458 (2007))、来自恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)的乙酸苯酯-CoA连接酶(Martinez-Blanco et al., J. Biol. Chem. 265:7084-7090 (1990))和来自枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)的6-羧基己酸-CoA连接酶(Bower et al., J. Bacteriol. 178 (14) :4122-4130 (1996))。另外的候选酶是来自小家鼠(*Mus musculus*) (Hasegawa et al., Biochim Biophys Acta 1779:414-419 (2008))和智人(*Homo sapiens*) (Ohgami et al., Biochem Pharmacol 65:989-994 (2003))的乙酰乙酰辅酶A合成酶,其中天然催化乙酰乙酸向乙酰乙酰辅酶A的ATP依赖转化。

[0717]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>phl</i>	77019264	CAJ15517.1	产黄青霉菌 (<i>Penicillium chrysogenum</i>)
<i>phlB</i>	152002983	ABS19624.1	产黄青霉菌 (<i>Penicillium</i>)

[0718]

			<i>chrysogenum</i>)
<i>paaF</i>	22711873	AAC24333.2	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>bioW</i>	50812281	NP_390902.2	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
<i>AACS</i>	21313520	NP_084486.1	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
<i>AACS</i>	31982927	NP_076417.2	智人 (<i>Homo sapiens</i>)

[0719] ADP形成乙酰辅酶A合成酶(ACD,EC 6.2.1.13)是另一种候选酶,其将酰基辅酶A酯向其相应酸的转化与ATP的同时合成偶联。文献中已经描述了具有广泛底物特异性的几种酶。来自火焰古球状菌 (*Archaeoglobus fulgidus*) 的由AF1211编码的ACD I证实对各种线性和支链底物起作用,包括乙酰辅酶A、丙酰辅酶A、丁酰辅酶A、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸、琥珀酸、富马酸、苯乙酸、吲哚乙酸 (Musfeldt et al., J Bacteriol 184:636-644 (2002))。来自死海盐细菌 (*Haloarcula marismortui*) (注释为琥珀酰辅酶A合成酶) 的酶接受丙酸、丁酸和支链酸(异戊酸和异丁酸)作为底物,并显示其在正向和反向方向上运行 (Brasen et al., Arch Microbiol 182:277-287 (2004))。来自耐超高温热棒菌 (*Pyrobaculum aerophilum*) 通过PAE3250编码的ACD显示出在所有表征过的ACD中的最广泛底物范围,与乙酰辅酶A、异丁酰辅酶A(优选底物)和苯乙酰辅酶A (Brasen et al., 同上) 反应。定向进化或工程化可用于修饰该酶以在宿主生物的生理温度下起作用。来自火焰古球状菌,死海盐细菌和耐超高温热棒菌的酶已经在大肠杆菌中克隆、功能表达和表征 (Musfeldt et al., 同上; Brasen et al., 同上)。

[0720]

<u>基因名 称</u>	<u>GI 号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>AF1211</i>	11498810	NP_070039.1	火焰古球状菌 (<i>Archaeoglobus fulgidus</i>) DSM 4304
<i>Scs</i>	55377722	YP_135572.1	死海盐细菌 (<i>Haloarcula marismortui</i>) ATCC 43049
<i>PAE3250</i>	18313937	NP_560604.1	耐超高温热棒菌 (<i>Pyrobaculum aerophilum</i>) str. IM2

[0721] 另一个选择是使用一组具有净连接酶或合成酶活性的酶。例如,磷酸转己二酰酶和己二酸激酶由来自丙酮丁醇梭菌的buk1、buk2和ptb的基因产物催化 (Walter et al., Gene 134:107-111 (1993); Huang et al., J.Mol.Biol.Microbiol.Biotechnol.2:33-38 (2000))。ptb基因编码可将丁酰辅酶A转化为丁酰基磷酸的酶,然后通过其中一种buk基因产物转化为丁酸,同时生产ATP。

[0722]

<u>基因名 称</u>	<u>GI 号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>ptb</i>	15896327	NP_349676	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium</i>)

[0723]

			<i>acetobutylicum</i>)
<i>buk1</i>	15896326	NP_349675	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>buk2</i>	20137415	Q97II1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)

[0724] 步骤H:酰胺水解酶。EC 6.3.1.a/6.3.2.a酰胺合成酶/肽合成酶。如步骤H中6-氨基己酸与己内酰胺的直接转化,可涉及形成分子内肽键。在翻译过程中将氨基酸组装成蛋白质的核糖体,是自然界最丰富的肽键形成催化剂。非核糖体肽合成酶,是不涉及信使mRNA的肽键形成催化剂(Schwarzer et al., Nat Prod. Rep. 20:275-287 (2003))。能够形成肽键的其他酶,包括来自绿叶假单胞菌(*Pseudomonas chlororaphis*)的酰基辅酶A合成酶(Abe et al., J Biol Chem 283:11312-11321 (2008)),来自大肠杆菌的 γ -谷氨酰腐胺合成酶(Kurihara et al., J Biol (2008))和来自棒状链霉菌(*Streptomyces clavuligerus*)的 β -内酰胺合成酶(Bachmann et al., Proc Natl Acad Sci USA 95:9082-9086 (1998); Bachmann et al., Biochemistry 39:11187-11193 (2000); Miller et al., Nat Struct. Biol 8:684-689 (2001); Miller et al., Proc Natl Acad Sci USA 99:14752-14757 (2002); Tahlan et al., Antimicrob. Agents. Chemother. 48:930-939 (2004))。

[0725]

<u>基因名 称</u>	<u>GI 号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>acsA</i>	60650089	BAD90933	绿叶假单胞菌 (<i>Pseudomonas chlororaphis</i>)
<i>puuA</i>	87081870	AAC74379	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>bls</i>	41016784	Q9R8E3	棒状链霉菌 (<i>Streptomyces clavuligerus</i>)

[0726] 步骤I:自发环化。6-氨基己酰基辅酶A向己内酰胺的转化,可以通过自发环化发生。因为6-氨基己酰基辅酶A可以自发地环化成己内酰胺,因此不需要专门的酶用于该步骤。使用形成吡咯烷酮的4-氨基丁酰基辅酶A,观察到类似的自发环化(Oh sugi et al., J Biol Chem 256:7642-7651 (1981))。

[0727] 步骤J-6-氨基己酰基辅酶A还原酶(醛形成)。如步骤J中,6-氨基己酰基辅酶A向6-氨基己酸半醛的转化,可涉及能够将酰基辅酶A还原成其相应醛的酰基辅酶A脱氢酶。EC 1.2.1.b氧化还原酶(酰基辅酶A到醛)提供合适的酶活性。该类中的示例性酶在本申请及以上描述。

[0728] 步骤K:HMDA转氨酶或HMDA脱氢酶。

[0729] EC 1.4.1.a对氨基酸起作用的氧化还原酶。步骤K描绘了还原氨基化，并且需要将6-氨基己酸半醛转化为己二胺。

[0730] 对氨基酸起作用的大多数氧化还原酶，催化以NAD⁺或NADP⁺作为受体的α-氨基酸的氧化脱氨基反应，尽管反应通常是可逆的。对氨基酸起作用的示例性氧化还原酶包括由gdhA编码的谷氨酸脱氢酶(脱氨基)，由ldh编码的亮氨酸脱氢酶(脱氨酸)和由nadX编码的天冬氨酸脱氢酶(脱氨基)。来自大肠杆菌的gdhA基因产物(McPherson et al., Nucleic Acids Res.11:5257-5266 (1983); Korber et al., J.Mol.Biol.234:1270-1273 (1993))，gdh来自海藻(海栖热袍菌(*Thermotoga maritima*)) (Kort et al., Extremophiles 1:52-60 (1997); Lebbink et al., J.Mol.Biol.280:287-296 (1998); Lebbink et al., J.Mol.Biol.289:357-369 (1999)) 和来自盐生盐杆菌(*Halobacterium salinarum*)的gdhA1(Ingoldsby et al., Gene.349:237-244 (2005))催化谷氨酸到2-氧戊二酸和氨的可逆相互转化，同时有利于NADP(H), NAD(H)或两者。蜡状芽孢杆菌的ldh基因编码具有广泛范围的底物的LeuD蛋白，包括亮氨酸，异亮氨酸，缬氨酸和2-氨基丁酸(Stoyan et al., J.Biotechnol 54:77-80 (1997); Ansorge et al., Biotechnol Bioeng.68:557-562 (2000))。来自海栖热袍菌编码天冬氨酸脱氢酶的nadX基因参与NAD的生物合成(Yang et al., J.Biol.Chem.278:8804-8808 (2003))。

[0731]

基因名称	GI号	GenBank ID	生物体
gdhA	118547	P00370	大肠杆菌(<i>Escherichia coli</i>)
gdh	6226595	P96110.4	海栖热袍菌(<i>Thermotoga maritima</i>)
gdhA1	15789827	NP_279651.1	盐生盐杆菌(<i>Halobacterium salinarum</i>)
ldh	61222614	P0A393	蜡样芽孢杆菌(<i>Bacillus cereus</i>)
nadX	15644391	NP_229443.1	海栖热袍菌(<i>Thermotoga maritima</i>)

[0732] 由lysDH基因编码的赖氨酸6-脱氢酶(脱氨基)，催化L-赖氨酸的ε-氨基的氧化脱氨基反应，形成2-氨基己二酸-6-半醛，其随后经过非酶促环化，形成Δ¹-哌啶-6-羧酸(Misono et al., J.Bacteriol.150:398-401 (1982))。典型的酶可以存在于嗜热脂肪泥土芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*) (Heydari et al., Appl Environ.Microbiol 70:937-942 (2004))、根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) (Hashimoto et al., J Biochem 106:76-80 (1989); Misono et al., supra) 和反硝化无色杆菌(*Achromobacter denitrificans*) (Ruldeekulthamrong et al., BMB.Rep.41:790-795 (2008))。鉴于己二酸半醛与2-氨基己二酸-6-己醛之间的结构相似性，所述酶是将己二酸半醛转化为6-氨基己酸的特别好的候选物。

[0733]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>lysDH</i>	13429872	BAB39707	嗜热脂肪泥土芽孢杆菌 (<i>Geobacillus stearothermophilus</i>)
<i>lysDH</i>	15888285	NP_353966	根瘤土壤杆菌 (<i>Agrobacterium</i>)

[0734]

			<i>tumefaciens</i>)
<i>lysDH</i>	74026644	AAZ94428	反硝化无色杆菌 (<i>Achromobacter denitrificans</i>)

[0735] EC 2.6.1.a氨基转移酶。步骤K,在某些实施例中,可涉及6-醛向胺的氨基转移。这种转化可以被 γ -氨基丁酸转氨酶(GABA转氨酶)催化。一种大肠杆菌GABA转氨酶由gabT编码并将氨基从谷氨酸转移到琥珀酰半醛的末端醛(Bartsch et al., J.Bacteriol.172: 7035-7042 (1990))。puuE的基因产物在大肠杆菌中催化另一种4-氨基丁酸转氨酶(Kurihara et al., J.Biol.Chem.280:

[0736] 4602-4608 (2005))。已经证实小家鼠 (*Mus musculus*)、荧光假单胞菌 (*Pseudomonas fluorescens*) 和野猪 (*Sus scrofa*) 中的GABA转氨酶与6-氨基己酸反应(Cooper, Methods Enzymol.113:80-82 (1985); Scott et al., J.Biol.Chem.234:932-936 (1959))。

[0737]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>gabT</i>	16130576	NP_417148.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>puuE</i>	16129263	NP_415818.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>abat</i>	37202121	NP_766549.2	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
<i>gabT</i>	70733692	YP_257332.1	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
<i>abat</i>	47523600	NP_999428.1	野猪 (<i>Sus scrofa</i>)

[0738] 另外的酶候选物包括腐胺氨基转移酶或其他二胺氨基转移酶。这种酶特别适用于将6-氨基己酸半醛转化为己二胺。大肠杆菌腐胺氨基转移酶由ygjG基因编码,纯化的酶也能够令尸胺和亚精胺转氨基(Samsonova et al., BMC Microbiol 3:2 (2003))。此外,已经报道了该酶对1,7-二氨基庚烷和除了2-氧戊酸(例如丙酮酸、2-氧代丁酸)以外的氨基受体的活性(Samsonova et al., 同上; Kim, KH, J Biol Chem 239:783-786 (1964))。一种以丙酮酸作为氨基受体比 α -酮戊二酸活性更高的腐胺转氨酶,来自绿脓假单胞菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 的spuC基因(Lu et al., J Bacteriol 184:3765-3773 (2002))。

[0739]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>ygjG</i>	145698310	NP_417544	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>spuC</i>	9946143	AAG03688	绿脓假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)

[0740] 另外的候选酶包括从β-丙氨酸生产丙二酸半醛的β-丙氨酸/α-酮戊二酸转氨酶(WO08027742)。克氏酵母(*Saccharomyces kluyveri*)中SkPYD4的基因产物也证实优先使用β-丙氨酸作为氨基供体(Andersen et al., FEBS.J. 274:1804-1817 (2007))。SkUGA1编码了酿酒酵母GABA氨基转移酶UGA1的同系物(Ramos et al., Eur.J.Biochem., 149:401-404 (1985)),而SkPYD4编码了参与丙氨酸和GABA转氨酶的酶(Andersen et al., 同上)。3-氨基-2-甲基丙酸转氨酶,催化从甲基丙二酸酐半醛向3-氨基-2-甲基丙酸的转化。这种酶已在褐家鼠(*Rattus norvegicus*)和野猪(*Sus scrofa*)中表征,并由Abat编码(Tamaki et al., Methods Enzymol, 324:376-389 (2000))。

[0741]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
SkyPYD4	98626772	ABF58893.1	克氏酵母(<i>Saccharomyces kluyveri</i>)
SkUGA1	98626792	ABF58894.1	克氏酵母(<i>Saccharomyces kluyveri</i>)
UGA1	6321456	NP_011533.1	酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
Abat	122065191	P50554.3	褐家鼠(<i>Rattus norvegicus</i>)
Abat	120968	P80147.2	野猪(<i>Sus scrofa</i>)

[0742] 步骤L:己二酰辅酶A水解酶、己二酰辅酶A连接酶,己二酰CoA转移酶或磷脂转己二酰酶/己二酸激酶。步骤L可以包括己二酰辅酶A合成酶(也称为己二酸-CoA连接酶)、磷酸转己二酰酶/己二酸激酶、己二酰辅酶A:乙酰CoA转移酶或己二酰辅酶A水解酶。从能量的观点来看,希望通过酶或酶对催化己二酸合成途径中的最终步骤,其可以保存存储在己二酰辅酶A的硫酯键中的ATP等效物。大肠杆菌的sucC和sucD基因或其同系物的产物,若其表现出对己二酰辅酶A的活性,则可能可以催化图8所示的最终转化。sucCD基因天然形成琥珀酰辅酶A合成酶复合物,其催化琥珀酸形成琥珀酰辅酶A,同时消耗1个ATP,是体内可逆反应(Buck et al., Biochem. 24:6245-6252 (1985))。鉴于琥珀酸和己二酸之间的结构相似性,即两者都是直链二羧酸,可以合理地预测sucCD酶对己二酰辅酶A的一些活性。显示己二酰辅酶A连接酶活性的酶,可以在相反的生理作用下,使用AMP和PPi作为辅因子,等同地使用己二酰辅酶A生成ATP。示例性的辅酶A连接酶,包括序列尚未表征的大鼠二羧酸-CoA连接酶(Vamecq et al., Biochem.J. 230:683-693 (1985)),其为来自产黄青霉菌的两种己表征的苯乙酸-CoA连接酶中的任一种(Lamas-Maceiras et al., Biochem.J. 395, 147-155 (2005); Wang et al., Biochem.Biophys.Res.Commun. 360:453-458 (2007))、来自恶臭假单胞菌的苯乙酸-CoA连接酶(Martinez-Blanco et al., J.Biol.Chem. 265:7084-7090 (1990))和来自枯草芽孢杆菌的6-羧基己酸-CoA连接酶(Bower et al., J.Bacteriol. 178:4122-4130 (1996))。这些示例性基因产物中的每一个的蛋白质序列都可以使用以下GI号和/或

GenBank ID找到:

[0743]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
sucC	16128703	NP_415256.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
sucD	1786949	AAC73823.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0744] 另一个选择,即使用磷酸转己二酰酶/己二酸激酶,由来自丙酮丁醇梭菌的buk1、buk2和ptb的基因产物催化(Walter et al., Gene 134:107-111 (1993); Huang et al., J.Mol.Microbiol.Biotechnol.2:33-38 (2000))或其同系物。ptb基因编码可将丁酰辅酶A转化为丁酰基磷酸的酶,然后通过其中一种buk基因产物转化为丁酸,同时生产ATP。通过buk1、buk2和ptb基因产物可以进行类似的转化,即将己二酰辅酶A转化为己二酸磷酸,然后将己二酸磷酸转化为己二酸。这些示例性基因产物中的每一个的蛋白质序列可以使用以下GI号和/或GenBank ID找到:

[0745]

<u>基因名 称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
ptb	15896327	NP_349676	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
buk1	15896326	NP_349675	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
buk2	20137415	Q97II1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)

[0746] 可选地,可以应用能够将CoA基团从己二酰辅酶A转移到乙酸的乙酰转移酶。类似的转化分别由克氏梭菌 (*Clostridium kluyveri*) 的cat1、cat2和cat3的基因产物催化,其已经证实出分别表现出琥珀酰辅酶A、4-羟基丁酰辅酶A和丁酰辅酶A乙酰转移酶活性(Sohling and Gottschalk, J.Bacteriol 178:871-880 (1996); Seedorf et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA 105:2128-2133 (2008))。这些示例性基因产物中的每一个的蛋白质序列可以使用以下GI号和/或GenBank ID找到:

[0747]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
cat1	729048	P38946.1	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
cat2	172046066	P38942.2	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
cat3	146349050	EDK35586.1	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)

[0748] 最后,虽然从能量的观点来看不合乎需要,但是己二酰辅酶A转化为己二酸,也可以通过酰基辅酶A水解酶或等效的硫酯酶进行。最佳大肠杆菌候选基因是tesB(Naggert et al., J.Biol.Chem.266:11044-11050 (1991)),其与人类acot8高度相似,是对酰基辅酶A具有活性的二羧酸乙酰转移酶(Westin et al., J.Biol.Chem.280:38125-38132 (2005))。该活性也在大鼠肝脏中表征(Deana, Biochem.Int.26:767-773 (1992))。这些示例性基因产物中的每一个的蛋白质序列可以使用以下GI号和/或GenBank ID找到:

	<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
[0749]	<i>tesB</i>	16128437	NP_414986	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
	<i>acot8</i>	3191970	CAA15502	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
[0750]	<i>acot8</i>	51036669	NP_570112	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)

[0751] 其他天然候选基因包括tesA (Bonner和Bloch, J.Biol.Chem. 247:3123-3133 (1972))、ybgC (Kuznetsova et al., FEMS Microbiol.Rev. 29:263-279 (2005); Zhuang et al., FEBS Lett. 516:161-163 (2002))、paaI (Song et al., J.Biol.Chem. 281:11028-11038 (2006)), and ybdB (Leduc et al., J.Bacteriol. 189:7112-7126 (2007))。这些示例性基因产物中的每一个的蛋白质序列可以使用以下GI号和/或GenBank ID找到:

[0752]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
tesA	16128478	NP_415027	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
ybgC	16128711	NP_415264	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
paaI	16129357	NP_415914	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
ybdB	16128580	NP_415129	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0753] EC 2.8.3.a CoA转移酶。CoA转移酶催化涉及将CoA部分从一个分子转移到另一个分子的可逆反应。例如,步骤L可以由己二酰CoA转移酶催化。该步骤的一个候选酶是在假单胞菌中由pcaI和pcaJ编码的双亚基酶,其已证实具有3-羟代己二酰辅酶A/琥珀酸转移酶活性 (Kaschabek和Reineke, J.Bacteriol. 177:320-325 (1995); 和Kaschabek和Reineke, J.Bacteriol. 175:6075-6081 (1993))。基于同源性的类似酶存在于不动杆菌ADP1 (Kowalchuk et al., Gene 146:23-30 (1994)) 和天蓝链霉菌 (*Streptomyces coelicolor*) 中。另外的示例性琥珀酰辅酶A:3:含氨酸-CoA转移酶存在于幽门螺杆菌 (Corthesy-Theulaz et al., J.Biol.Chem. 227:25659-25667 (1997)) 和枯草芽孢杆菌 (Stols et al., Protein Expr.Purif. 53:396-403 (2007)) 中。

[0754]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>pcaI</i>	24985644	AAN69545.1	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>pcaJ</i>	26990657	NP_746082.1	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>pcaI</i>	50084858	YP_046368.1	不动杆菌 (<i>Acinetobacter</i>) sp. ADP1
<i>pcaJ</i>	141776	AAC37147.1	不动杆菌 (<i>Acinetobacter</i>) sp. ADP1
<i>pcaI</i>	21224997	NP_630776.1	天蓝色链霉菌 (<i>Streptomyces coelicolor</i>)
<i>pcaJ</i>	21224996	NP_630775.1	天蓝色链霉菌 (<i>Streptomyces</i>

[0755]

			<i>coelicolor</i>)
<i>HPAG1_0676</i>	108563101	YP_627417	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>)
<i>HPAG1_0677</i>	108563102	YP_627418	幽门螺杆菌 (<i>Helicobacter pylori</i>)
<i>ScoA</i>	16080950	NP_391778	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
<i>ScoB</i>	16080949	NP_391777	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)

[0756] 可以利用乙酸作为CoA受体的3-氧化酰基CoA转移酶是由大肠杆菌atoA (α 亚基) 和atoD (β 亚基) 基因编码的乙酰乙酰CoA转移酶 (Vanderwinkel et al., Biochem.Biophys.Res Commun.33:902-908(1968); Korolev et al., Acta Crystallogr.D Biol Crystallogr.58:2116-2121(2002))。还已经证实,该酶将CoA部分转移到各种支链和线性酰基辅酶A底物(包括异丁酸) (Matthies et al., Appl Environ Microbiol 58:1435-1439(1992))、戊酸(Vanderwinkel et al.,同上) 和丁酸甲酯(Vanderwinkel et al.,同上)。类似的酶存在于谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*) ATCC 13032 (Duncan et al., Appl Environ Microbiol 68:5186-5190(2002))、丙酮丁醇梭菌 (Cary et al., Appl Environ Microbiol 56:1576-1583(1990)) 和梭菌 *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* (Kosaka et al., Biosci.Biotechnol Biochem.71:58-68 (2007))。

[0757]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>atoA</i>	2492994	P76459.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
<i>atoD</i>	2492990	P76458.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
<i>actA</i>	62391407	YP_226809.1	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) ATCC 13032
<i>cg0592</i>	62389399	YP_224801.1	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>) ATCC 13032
<i>ctfA</i>	15004866	NP_149326.1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>ctfB</i>	15004867	NP_149327.1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>ctfA</i>	31075384	AAP42564.1	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>ctfB</i>	31075385	AAP42565.1	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>

[0758] 上述酶在步骤L中也可以表现出对己二酰辅酶A和己二酸的所需活性。但是，另外示例性的转移酶候选物，由克氏梭菌的cat1、cat2和cat3的基因产物催化，其已被证实分别显示琥珀酸辅酶A、4-羟基丁酰辅酶A和丁酰CoA转移酶活性 (Seedorf et al., Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A 105:2128-2133 (2008); Sohling et al., Eur.J Biochem.212:121-127 (1993); Sohling et al., J Bacteriol.178:871-880 (1996))。

[0759]

<u>基因名称</u>	<u>GI号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
cat1	729048	P38946.1	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
cat2	172046066	P38942.2	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
cat3	146349050	EDK35586.1	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)

[0760] 来自无氧细菌发酵氨基酸球菌 (*Acidaminococcus fermentans*) 的戊二酸CoA转移酶 (EC 2.8.3.12)，与二酸戊酰辅酶A和3-丁烯酰辅酶A反应 (Mack et al., FEBS Lett.405: 209-212 (1997))。编码该酶的基因是gctA和gctB。该酶与其他CoA衍生物 (包括戊二酰辅酶A、2-羟基戊二酰辅酶A、己二酰辅酶A和丙烯酰辅酶A) 具有降低但可检测的活性 (Buckel et al., Eur.J.Biochem.118:315-321 (1981))。该酶已经在大肠杆菌中克隆并表达 (Mack et al., Eur.J.Biochem.226:41-51 (1994))。

[0761]

<u>基因名 称</u>	<u>GI 号</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>生物体</u>
<i>gctA</i>	559392	CAA57199.1	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)
<i>gctB</i>	559393	CAA57200.1	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)

[0762] 实施例13[0763] 甲基丙烯酸合成酶

[0764] 本实施例提供可用于将琥珀酰辅酶A转化为甲基丙烯酸的基因,如图9的途径所示。

[0765] 图9表示3-羟基异丁酸和甲基丙烯酸的生产由以下酶进行:A) 甲基丙二酰辅酶A变位酶,B) 甲基丙二酰辅酶A表异构酶,C) 甲基丙二酰辅酶A还原酶(醛形成),D) 甲基丙二酸半醛还原酶,E) 3-羟基异丁酸脱水酶,F) 甲基丙二酰辅酶A还原酶(醇形成)。

[0766] 步骤A:甲基丙二酰辅酶A变位酶(命名为EMA2)。甲基丙二酰辅酶A变位酶(MCM)(EMA2)(EC 5.4.99.2),是将琥珀酰辅酶A转化为甲基丙二酰辅酶A的钴胺素依赖性酶。在大肠杆菌中,可逆的腺苷钴胺素依赖性变位酶,参与导致琥珀酸转化为丙酸的三步途径(Haller et al., Biochemistry 39:4622-4629 (2000))。可以使用EMA2候选基因的过度表达以及YgfG的删除,来防止甲基丙二酰基辅酶A脱羧成为丙酰辅酶A,并使可用于MAA合成的甲基丙二酰辅酶A最大化。EMA2由大肠杆菌中的基因spcA(Bobik and Rasche, Anal.Bioanal.Chem.375:344-349 (2003); Haller et al., Biochemistry 39:4622-4629 (2000))和智人中的mutA(Padovani和Banerjee, Biochemistry 45:9300-9306 (2006))编码。在其他几种微生物中,EMA2含有α和β亚基,由两个基因编码。编码双亚基蛋白的示例性候选基因,是费氏丙酸杆菌谢氏亚种(*Propionibacterium freudenreichii* sp.*shermanii*)的mutA和mutB(Korotkova和Lidstrom, J.Biol.Chem.279:13652-13658 (2004))、扭脱甲基杆菌(*Methylobacterium extorquens*)的mcmA和mcmB(Korotkova和Lidstrom,同上,2004),和真养劳尔氏菌(*Ralstonia eutropha*)的sbm1和sbm2(Peplinski et al., Appl.Microbiol.Biootech.88:1145-59 (2010))。基于与大肠杆菌spcA基因产物高度同源性鉴定的其他酶候选物也列在下面。

[0767]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI号</u>	<u>生物体</u>
<i>scpA</i>	NP_417392.1	16130818	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
<i>mutA</i>	P22033.3	67469281	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
<i>mutA</i>	P11652.3	127549	费氏丙酸杆菌 (<i>Propionibacterium freudenreichii</i>) sp. <i>shermanii</i>
<i>mutB</i>	P11653.3	127550	费氏丙酸杆菌 (<i>Propionibacterium freudenreichii</i>) sp. <i>shermanii</i>
<i>mcmA</i>	Q84FZ1	75486201	扭脱甲基杆菌 (<i>Methylobacterium extorquens</i>)
<i>mcmB</i>	Q6TMA2	75493131	扭脱甲基杆菌 (<i>Methylobacterium extorquens</i>)
<i>Sbm1</i>	YP_724799.1	113866310	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>) H16
<i>Sbm2</i>	YP_726418.1	113867929	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>) H16
<i>sbm</i>	NP_838397.1	30064226	弗氏志贺菌 (<i>Shigella flexneri</i>)
<i>SARI_04585</i>	ABX24358.1	160867735	肠道沙门氏菌 (<i>Salmonella enterica</i>)
<i>YfreA_01000861</i>	ZP_00830776.1	77975240	费氏耶尔森菌 (<i>Yersinia frederiksenii</i>)

[0768] 这些示例性序列,可以用于通过序列相似性搜索(例如,BLASTp)在GenBank或其他数据库中鉴定同源蛋白。得到的同源蛋白及其相应的基因序列能提供额外的外源DNA序列,用于转化到大肠杆菌或其它合适的宿主微生物中,以得到生产宿主。其他候选基因包括基于与大肠杆菌spcA基因产物的高同源性鉴定的如下各项。

[0769] 还有证据表明,与EMA2催化基因相邻的基因可促进最大活性。例如,已经证明,来自扭脱甲基杆菌的meaB基因与EMA2形成复合物,刺激体外变位酶活性,并且可能保护其免于不可逆失活(Korotkova和Lidstrom,J.Biol.Chem.279:13652–13658(2004))。扭脱甲基杆菌meaB基因产物与大肠杆菌中的scpA的argK基因产物高度相似(BLASTp:45%相似性,e值:4e-67)。GenBank中没有收录与费氏丙酸杆菌中的meaB同系物。但是,痤疮丙酸杆菌(*Propionibacterium acnes*)KPA171202的基因产物YP_055310.1与扭脱甲基杆菌meaB蛋白

质51%相同，其基因也在染色体上与EMA2基因相邻。类似的基因由真养劳尔氏菌(*Ralstonia eutropha*)H16的H16_B1839编码。

[0770]

<u>Gene</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI号</u>	<u>生物体</u>
<i>argK</i>	AAC75955.1	1789285	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) K12
<i>PPA0597</i>	YP_055310.1	50842083	痤疮丙酸杆菌 (<i>Propionibacterium acnes</i>)
KPA171202	2QM8_B	158430328	扭脱甲基杆菌 (<i>Methylobacterium extorquens</i>)
H16_B1839	YP_841351.1	116695775	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>) H16

[0771] 只有当提供中间体钴啉醇酰胺或钴胺素时,大肠杆菌才可以合成腺苷钴胺素,这是该反应的必需辅因子(Lawrence and Roth.J.Bacteriol.177:6371-6380(1995);Lawrence and Roth,Genetics 142:11-24(1996))。可选地,在异源基因表达之后,在大肠杆菌中赋予从头合成钴胺素的能力(Raux et al.,J.Bacteriol.178:753-767(1996))。

[0772] 可选地,异丁酰辅酶A变位酶(ICM)(EC 5.4.99.13)可以催化附图中步骤B所示的转化。ICM是EMA2家族中的钴胺素依赖型甲基变位酶,可逆地将丁酰辅酶A的碳骨架重新排列成异丁酰辅酶A(Ratnatilleke et al.,J.Biol.Chem.274:31679-31685(1999))。最近对*Methylibium petroleiphilum*中的新型ICM的研究,以及以前的研究,证明改变活性位点附近的单个氨基酸,会改变酶的底物特异性(Ratnatilleke et al.,J.Biol.Chem.274:31679-31685(1999);Rohwerder et al.,Appl.Environ.Microbiol.72:4128-4135(2006))。这表明,如果天然酶不能催化4HB-CoA转化为3HIB-CoA或显示低活性,则可以合理地改造该酶以增加该活性。编码同二聚体酶的示例性ICM基因,包括天蓝色链霉菌A3(Alhapel et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 103:12341-12346(2006))中的icmA和*Methylibium petroleiphilum* PM1中的Mpe_B0541(Ratnatilleke et al.,J.Biol.Chem.274:31679-31685(1999);Rohwerder et al.,Appl.Environ.Microbiol.72:4128-4135(2006))。编码异二聚体酶的基因包括在肉桂链霉菌(*Streptomyces cinnamonensis*)的icm和icmB(Ratnatilleke et al.,J.Biol.Chem.274:31679-31685(1999);Vrijbloed et al.,J.Bacteriol.181:5600-5605。(1999);Zerbe-Burkhardt et al.,J.Biol.Chem.273:6508-6517(1998))。由阿维链霉菌MA-4680中的icmA和icmB基因编码的酶与已知的ICM具有高度的相似性。这些基因/蛋白质如下所示。

<u>Gene</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI 号</u>	<u>生物体</u>
[0773]	<i>icmA</i>	CAB40912.1	天蓝色链霉菌 (<i>Streptomyces coelicolor</i>) A3(2)
	<i>Mpe_B0541</i>	YP_001023546.1	<i>Methylibium petroleiphilum PM1</i>
	<i>icm</i>	AAC08713.1	肉桂链霉菌 (<i>Streptomyces cinnamonensis</i>)
	<i>icmB</i>	CAB59633.1	肉桂链霉菌 (<i>Streptomyces cinnamonensis</i>)
	<i>icmA</i>	NP_824008.1	阿维链霉菌 (<i>Streptomyces avermitilis</i>)
	<i>icmB</i>	NP_824637.1	阿维链霉菌 (<i>Streptomyces avermitilis</i>)

[0774] 步骤B: 甲基丙二酰辅酶A表异构酶(命名为EMA3)。甲基丙二酰辅酶A表异构酶(MMCE)(EMA3)是(R)-甲基丙二酰辅酶A和(S)-甲基丙二酰辅酶A之间相互转化的酶。EMA3是奇数脂肪酸和氨基酸缬氨酸、异亮氨酸和甲硫氨酸分解中的必需酶。EMA3活性被认为不是在大肠杆菌基因组中编码的(Boynton et al., J.Bacteriol. 178:3015-3024 (1996)),但存在于其他生物如智人(YqjC)(Fuller和(J.Biol.Chem. 276:37194-37198 (2001))、褐家鼠(Rattus norvegicus)(Mcee)(Bobik and Rasche, J.Biol.Chem. 276:37194-37198 (2001))、费氏丙酸杆菌(*Propionibacterium freudenreichii*) (AF454511)(Fuller and Leadlay, Biochem.J. 213:643-650 (1983); Haller et al., Biochemistry 39:4622-4629 (2000); McCarthy et al., Structure 9:637-646. 2001))和秀丽隐杆线虫(Caenorhabditis elegans) (mmce) (Kuhnle et al., FEBS J. 272:1465-1477 (2005))重。另外的候选基因,即蜡状芽孢杆菌中的AE016877,与其他特征酶具有高序列同源性。根据用于将甲基丙二酰辅酶A转化为3-HIB的一种或多种酶的立体定向性,该酶步骤可能是必需或不必要的。这些基因/蛋白质如下所述。

[0775]

<u>Gene</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI 号</u>	<u>生物体</u>
<i>YqjC</i>	NP_390273	255767522	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
<i>MCEE</i>	Q96PE7.1	50401130	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
<i>Mcee_predicted</i>	NP_001099811.1	157821869	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
<i>AF454511</i>	AAL57846.1	18042135	费氏丙酸杆菌 (<i>Propionibacterium freudenreichii</i>) sp. <i>shermanii</i>
<i>Mmce</i>	AAT92095.1	51011368	秀丽隐杆线虫 (<i>Caenorhabditis elegans</i>)
<i>AE016877</i>	AAP08811.1	29895524	蜡样芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>) ATCC 14579

[0776] 步骤C:甲基丙二酰辅酶A还原酶(醛形成)(称为EMA4)。甲基丙二酰辅酶A还原成其相应的醛,即甲基丙二酸半醛,由CoA依赖性醛脱氢酶(EC 1.2.1.-)催化。甲基丙二酰辅酶A转化成甲基丙二醛半醛,由CoA依赖性醛脱氢酶完成。由来自超嗜热硫化叶菌(*Sulfolobus tokodaii*) (Alber et al., J.Bacteriol. 188 (24) : 8551–8559 (2006)) 的丙二酰辅酶A还原酶基因编码的酶,已经证实催化甲基丙二酰辅酶A转化为其相应的醛(WO2007141208)。勤奋金属球菌(*Metallosphaera sedula*) 中存在类似的酶(Alber et al., J.Bacteriol. 188 (24) : 8551–8559 (2006))。几种额外的CoA脱氢酶也能够将酰基辅酶A还原成其相应的醛。甲基丙二酰辅酶A还原成其相应的醛,即甲基丙二酸半醛,由CoA依赖性醛脱氢酶催化。示例性的酶包括脂肪酰辅酶A还原酶、琥珀酰辅酶A还原酶(EC 1.2.1.76)、乙酰辅酶A还原酶和丁酰辅酶A还原酶。示例性的脂肪酰辅酶A还原酶,由乙酸钙不动杆菌(*Acinetobacter calcoaceticus*) 的acr1 (Reiser 和 Somerville. J.Bacteriol. 179:2969–2975 (1997)) 和不动杆菌M-1的脂肪酰辅酶A还原酶(Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol. 68:1192–1195 (2002)) 编码。还已知由克氏梭菌中的sucD基因((Sohling and Gottschalk, J.Bacteriol. 178:871–880 (1996); Sohling and Gottschalk, J.Bacteriol. 178:871–880 (1996)) 和牙龈卟啉单胞菌的sucD (Takahashi, J.Bacteriol. 182:4704–4710 (2000)) 编码的CoA和NADP依赖性琥珀酸半醛脱氢酶(也称为琥珀酰辅酶A还原酶)。额外的琥珀酰辅酶A还原酶参与嗜热古细菌的3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环,包括勤奋金属球菌(Berg et al., Science 318:1782–1786 (2007)) 和中性热变形菌(Ramos-Vera et al., J Bacteriol. 191: 4286–4297 (2009))。由Msed_0709编码的勤奋金属球菌酶严格依赖NADPH,并也具有丙二酰辅酶A还原酶活性。中性热变形菌酶对NADPH和NADH均有活性。假单胞菌属(*Pseudomonas* sp) 中由bphG编码的邻乙醛脱氢酶发生酰化的酶,也是一个很好的选择,因为已经证明其氧化和酰化乙醛、丙醛、丁醛、甲醛和支链化合物异丁醛(Powlowski et al., J.Bacteriol. 175:377–385 (1993))。除了将乙酰辅酶A还原成乙醇之外,已经证实肠粘膜明串珠菌中由adhE 编码的酶,将支链化合物异丁醛氧化成异丁酰辅酶A(Kazahaya, J.Gen. Appl. Microbiol. 18:43–55 (1972)); 和Koo et al., Biotechnol Lett. 27:505–510

(2005))。丁醛脱氢酶催化类似的反应，在产溶剂生物如梭菌 (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*) 中将丁酰辅酶A转化为丁醛 (Kosaka et al., Biosci Biotechnol Biochem., 71:58-68 (2007))。

[0777]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI号</u>	<u>生物体</u>
<i>acrI</i>	YP_047869.1	50086359	乙酸钙不动杆菌 (<i>Acinetobacter Calcoaceticus</i>)
<i>acrI</i>	AAC45217	1684886	不动杆菌 <i>Acinetobacter baylyi</i>
<i>acrI</i>	BAB85476.1	18857901	不动杆菌 (<i>Acinetobacter</i>) sp. Strain M-1
<i>MSED_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera Sedula</i>)
<i>Tneu_0421</i>			中性热变形菌 (<i>Thermoproteus neutrophilus</i>)
<i>sucD</i>	P38947.1	172046062	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>sucD</i>	NP_904963.1	34540484	牙龈卟啉单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)
<i>bphG</i>	BAA03892.1	425213	假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>) sp
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	肠系膜明串珠菌 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)
<i>bld</i>	AAP42563.1	31075383	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>

[0778] 将酰基辅酶A转化成其相应醛的另一种酶，是丙二酰辅酶A还原酶，其将丙二酰辅酶A转化成丙二醛。丙二酰辅酶A还原酶是通过热嗜酸古细菌中的3-羟基丙酸循环进行自养碳固定的关键酶 (Berg, Science 318:1782-1786 (2007); 和 Thauer, Science 318:1732-1733 (2007))。该酶利用NADPH作为辅因子，并已在金属球菌和硫化叶菌中得到表征。(Alber et al., J.Bacteriol. 188:8551-8559 (2006); Hugler, J.Bacteriol. 184:2404-2410 (2002))。该酶由勤奋金属球菌中的Msed_0709编码 (Alber et al., J.Bacteriol. 188: 8551-8559 (2006); 和 Berg, Science 318:1782-1786 (2007))。编码来自超嗜热硫化叶菌 (*Sulfolobus tokodaii*) 的丙二酰辅酶A还原酶的基因，在大肠杆菌中克隆并异源表达 (Alber et al., J.Bacteriol. 188:8551-8559 (2006)), 该酶也证实催化甲基丙二酰辅酶A到其相应的醛 (W02007141208 (2007))。虽然这些醛脱氢酶的功能与来自橙色绿屈挠菌 (*Chloroflexus aurantiacus*) 的双功能脱氢酶相似，但是几乎没有序列相似性，丙二酰辅酶A还原酶候选物与天冬氨酸-半醛脱氢酶 (一种催化天冬氨酸-4-磷酸还原并同时脱磷酸化成天冬氨酸半醛的酶) 具有高的序列相似性，其他候选基因可以通过与其他微生物(包括硫矿硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus*) 和硫酸硫杆菌 (*Sulfolobus acidocaldarius*) 的蛋白质的序列同源性来发现。另一种CoA酰化醛脱氢的候选酶是拜氏梭菌 (*Clostridium*

beijerinckii) 的 ald 基因 (Toth, Appl. Environ. Microbiol. 65:4973–4980 (1999))。据报道, 该酶将乙酰辅酶A和丁酰辅酶A还原成其相应的醛。该基因与编码鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌的乙醛脱氢酶的 eutE 非常相似 (Toth, Appl. Environ. Microbiol. 65:4973–4980 (1999))。 [0779]

<u>基因</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI 号</u>	<u>生物体</u>
<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Mcr</i>	NP_378167.1	15922498	超嗜热硫化叶菌 (<i>Sulfolobus tokodaii</i>)
<i>asd-2</i>	NP_343563.1	15898958	硫矿硫化叶菌 (<i>Sulfolobus solfataricus</i>)
<i>Saci_2370</i>	YP_256941.1	70608071	嗜酸热硫化叶菌 (<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)
<i>Ald</i>	AAT66436	49473535	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>eutE</i>	AAA80209	687645	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)
<i>eutE</i>	P77445	2498347	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0780] 具有酰基辅酶A还原酶和醇脱氢酶活性的双功能酶, 可以将甲基丙二酰辅酶A直接转化为3-HIB。将酰基辅酶A转化为醇的示例性双功能氧化还原酶, 包括将底物例如乙酰辅酶A转化为乙醇(例如, 来自大肠杆菌的adhE (Kessler et al., FEBS Lett. 281:59–63 (1991)) 和将丁酰辅酶A转化为丁醇(例如, 来自丙酮丁醇梭菌的adhE2 (Fontaine et al., J. Bacteriol. 184:821–830 (2002)) 的酶。由 bdh I 和 bdh II 编码的丙酮丁醇梭菌酶 (Walter et al., J. Bacteriol. 174:7149–7158 (1992)), 分别将乙酰辅酶A和丁酰辅酶A还原成乙醇和丁醇, 除了将乙酰辅酶A还原成乙醇外, 肠系膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 中由 adhE 编码的酶, 已经证实将支链化合物异丁醛氧化成异丁酰辅酶A (Kazahaya et al., J. Gen. Appl. Microbiol. 18:43–55 (1972); Koo et al., Biotechnol Lett, 27:505–510 (2005))。另一个典型的酶可以将丙二酰辅酶A转化为3-HP。具有该活性的NADPH依赖性酶在橙色绿屈挠菌 (*Chloroflexus aurantiacus*) 中已被表征, 其中它参与3-羟基丙酸循环 (Hugler et al., J Bacteriol, 184:2404–2410 (2002); Strauss et al., Eur J Biochem, 215:633–643 (1993))。该质量为300kDa的酶具有高度的底物特异性, 与其他已知的氧化还原酶几乎没有序列相似性 (Hugler et al., 同上)。其他生物中没有酶显示出催化这种特异性反应;但是, 有生物信息学证据表明其他生物可能具有相似的途径 (Klatt et al., Env Microbiol, 9:2067–2078 (2007))。其他生物中的酶候选物, 包括光合玫瑰菌 (*Roseiflexus castenholzii*), 赤杆菌 (*Erythrobacter*) NAP1 和 海洋 γ 变形细菌 HTCC2080, 可以通过序列相似性推断。

[0781]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI号</u>	<u>生物体</u>
<i>adhE</i>	NP_415757.1	16129202	大肠杆菌 (<i>ESCHERICHIA COLI</i>)
<i>adhE2</i>	AAK09379.1	12958626	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	肠系膜明串珠菌 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	15896542	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>Mcr</i>	AAS20429.1	42561982	橙色绿屈挠菌 (<i>Chloroflexus Aurantiacus</i>)
<i>Rcas_2929</i>	YP_001433009.1	156742880	光合玫瑰菌 (<i>Roseiflexus castenholzii</i>)
<i>NAPI_02720</i>	ZP_01039179.1	85708113	赤杆菌 (<i>Erythrobacter</i>) sp. <i>NAPI</i>
<i>MGP2080_00535</i>	ZP_01626393.1	119504313	海洋γ 变形细菌 HTCC2080

[0782] 步骤D:甲基丙二酸酐半醛还原酶(命名为EMA5)。通过EMA5或3-HIB脱氢酶,催化甲基丙二酸半醛还原为3-HIB。该酶参与缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸降解,并已在细菌、真核生物和哺乳动物中鉴定。由嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*)HB8的P84067编码的酶已得到结构表征(Lokanath et al., J.Mol.Biol.352:905-917 (2005))。使用同位素标记底物证明了人3-羟基异丁酸脱氢酶的可逆性(Manning et al., Biochem J, 231:481-4 (1985))。编码该酶的另外的基因,包括在智人(Hawes et al., Methods Enzymol, 324:218-228 (2000))和家兔(*Oryctolagus cuniculus*) (Hawes et al., 同上; Chowdhury et al., Biosci.Biotechnol Biochem.66:2043-2047 (1996))中的3hidh,绿脓假单胞菌和恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)中的mmsB,以及恶臭假单胞菌中的dhat(Aberhart et al., J Chem.Soc.[Perkin 1]6:1404-1406 (1979); Chowdhury et al., Biosci.Biotechnol Biochem.62:2043-2047 (1996); Chowdhury et al., Biosci.Biotechnol Biochem.67:438-441 (2003))。已经在还原方向上表征了几种3-羟基异丁酸脱氢酶,包括来自绿脓假单胞菌(Gokarn et al., 美国专利739676 (2008))的mmsB和来自恶臭假单胞菌的mmsB。

[0783]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI号</u>	<u>生物体</u>
P84067	P84067	75345323	嗜热栖热菌 (<i>Thermus Thermophilus</i>)
3hidh	P31937.2	12643395	智人 (<i>Homo sapiens</i>)

3hidh	P32185.1	416872	家兔 (<i>Oryctolagus cuniculus</i>)
mmsB	NP_746775.1	26991350	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
mmsB	P28811.1	127211	绿脓假单胞菌 (<i>Pseudomonas aeruginosa</i>)
dhat	Q59477.1	2842618	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)

[0784] 步骤E:3-HIB脱水酶(命名为EMA6)。

[0785] 3-HIB到MAA的脱水,由具有EMA6活性的酶(EC 4.2.1.-)催化。最后一步涉及3-HIB脱水为MAA。3-HIB脱水为MAA由具有EMA6活性的酶催化。虽然没有确定这种特异性酶转化的直接证据,但大多数脱水酶催化水的α、β-消除,其涉及通过吸电子羰基、羧酸或CoA-硫醇酯基团活化α-氢,并从β-位置去除羟基(Buckel and Barker, J Bacteriol. 117:1248-1260 (1974); Martins et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101:15645-15649 (2004))。这是甲基丙烯酸途径中最后一步提出的转化的确切类型。此外,所提出的转化与巴氏真杆菌(*Eubacterium barkeri*)的2-(羟甲基)戊二酸脱水酶高度相似,该酶催化2-羟甲基戊二酸转化为2-亚甲基戊二酸。该酶已经在烟酸分解代谢的背景下进行了研究,并由hmd编码(Alhapel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:12341-12346 (2006))。具有高序列同源性的类似酶,存在于多毛类杆菌(*Bacteroides capillosus*)、无氧球菌*Anaerotruncus colihominis*和嗜热盐碱无氧菌(*Natranaerobius thermophilus*)。已知有几种酶催化羟基的α、β消除。示例性酶包括2-(羟甲基)戊二酸脱水酶(EC 4.2.1.-)、富马酸酶(EC4.2.1.2)、2-酮-4-戊烯酸脱水酶(EC 4.2.1.80)、柠檬酸水解酶和马来酸二甲酯水合酶。

[0786] 2-(羟甲基)戊二酸脱水酶,是可令2-(羟甲基)戊二酸脱水成2-亚甲基-戊二酸的含[4Fe-4S]酶,其在巴氏真杆菌(*Eubacterium barkeri*) (以前称为巴氏梭菌(*Clostridium barkeri*))中的烟酸代谢中的作用已经得到了研究(Alhapel et al., Proc Natl Acad Sci USA 103:12341-12346 (2006))。具有高序列同源性的类似酶,存在于多毛类杆菌(*Bacteroides capillosus*)、无氧球菌*Anaerotruncus colihominis*和嗜热盐碱无氧菌(*Natranaerobius thermophilus*)。这些酶也与含[4Fe-4S]的细菌丝氨酸脱水酶的α-亚基和β-亚基同源,例如由tdcG、sdhB和sdaA编码的大肠杆菌酶。在巴氏真杆菌中具有相似功能的酶是马来酸二甲酯水合酶,其是乌头碱家族中,令马来酸二甲酯水合形成(2R,3S)-2,3-二甲基苹果酸的可逆Fe 2+依赖性氧敏感性酶。该酶由dmdAB编码(Alhapel et al., Proc Natl Acad Sci USA 103:12341-6 (2006); Kollmann-Koch et al., Hoppe Seylers Z. Physiol Chem. 365:847-857 (1984))。

[0787]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI号</u>	<u>生物体</u>
<i>Hmd</i>	ABC88407.1	86278275	巴氏真杆菌 (<i>Eubacterium barkeri</i>)
<i>BACCAP_02294</i>	ZP_02036683.1	154498305	多毛类杆菌 (<i>Bacteroides capillosus</i>)
<i>ANACOL_02527</i>	ZP_02443222.1	167771169	无氧球菌 <i>Anaerotruncus colihominis</i>
<i>NtherDRAFT_2368</i>	ZP_02852366.1	169192667	嗜热盐碱无氧菌 (<i>Natranaerobius thermophilus</i>)
<i>dmdA</i>	ABC88408	86278276	巴氏真杆菌 (<i>Eubacterium barkeri</i>)
<i>dmdB</i>	ABC88409	86278277	巴氏真杆菌 (<i>Eubacterium barkeri</i>)

[0788] 富马酸水合酶,其天然催化富马酸到苹果酸的可逆水合。尽管没有描述富马酸水合酶与作为底物的带有3-氧化丁醇的支链底物反应的能力,但是该酶的大量结构信息是已知的,并且其他研究人员成功地将酶改造,以改变活性、抑制和定位(Weaver, *Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.* 61:1395–1401 (2005))。大肠杆菌有三种富马酸酶:受生长条件调控的FumA、FumB和FumC。FumB是氧敏感的,仅在无氧条件下有活性。FumA在微量无氧条件下是有活性的,FumC是有氧生长中唯一有活性的酶(Tseng et al., *J.Bacteriol.* 183:461–467 (2001); Woods et al., *Biochem.Biophys.Acta* 954:14–26 (1988); Guest et al., *J Gen Microbiol* 131:2971–2984 (1985))。示例性的酶候选物包括由来自大肠杆菌的fumC编码的酶(Estevez et al., *Protein Sci.* 11:1552–1557 (2002); Hong and Lee, *Biotechnol.Bioprocess Eng.* 9:252–255 (2004); Rose and Weaver, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101:3393–3397 (2004))和在空肠弯曲杆菌(Smith et al., *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 31:961–975 (1999))、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*) (Mizobata et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 355:49–55 (1998))和褐家鼠(*Rattus norvegicus*) (Kobayashi et al., *J.Biochem.* 89:1923–1931 (1981))中发现的酶。具有高序列同源性的类似酶,包括拟南芥中的fum1和谷氨酸棒状杆菌的fumC。来自嗜热丙酸互营细菌(*Pelotomaculum thermopropionicum*)的MmcBC富马勒酸是另一类具有两个亚基的富马酸酶(Shimoyama et al., *FEMS Microbiol Lett.* 270:207–213 (2007))。

[0789]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI 号</u>	<u>生物体</u>
<i>fumA</i>	NP_416129.1	16129570	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>fumB</i>	NP_418546.1	16131948	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>fumC</i>	NP_416128.1	16129569	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>fumC</i>	O69294	9789756	空肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter jejuni</i>)
<i>fumC</i>	P84127	75427690	嗜热栖热菌 (<i>Thermus thermophilus</i>)
<i>fumH</i>	P14408	120605	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
<i>fumI</i>	P93033	39931311	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
<i>fumC</i>	Q8NRN8	39931596	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>)
<i>MmcB</i>	YP_001211906	147677691	嗜热丙酸互营细菌 (<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>)
<i>MmcC</i>	YP_001211907	147677692	嗜热丙酸互营细菌 (<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>)

[0790] 4-羟基-2-氧代戊酸脱氢为2-氧代戊烯酸,由4-羟基-2-氧代戊酸水合酶(EC 4.2.1.80)催化。该酶参与芳香降解途径,并且通常与编码4-羟基-2-氧代戊酸醛缩酶活性酶的基因共转录。示例性基因产物由大肠杆菌的mhpD(Ferrandez et al., J Bacteriol.179:2573-2581(1997); Pollard et al., Eur J Biochem.251:98-106(1998))、恶臭假单胞菌的todG和(Lau et al., Gene 146:7-13(1994); Eaton, J Bacteriol.178: 1351-1362(1996))、丛毛单胞菌(Comamonas)CNB-1的cnbE(Ma et al., Appl Environ Microbiol 73:4477-4483(2007))和伯克霍尔德菌Burkholderia xenovorans的mhpD(Wang et al., FEBS J 272:966-974(2005))编码。一个密切近缘的酶,2-氧代庚-4-烯-1,7-二酸水合酶,参与4-羟基苯乙酸降解,其中它使用镁作为辅因子将2-氧代-庚-4-烯-1,7-二酸(OHED)转化为2-氧代-4-羟基-庚-1,7-二酸(Burks et al., J Am Chem Soc.120: (1998))。已经在大肠杆菌C(Roper et al., Gene 156:47-51(1995); Izumi et al., J Mol Biol.370:899-911(2007))和大肠杆菌W(Prieto et al., J Bacteriol.178:111-120(1996))中鉴定和表征了OHED水合酶候选物。序列比较揭示了广泛范围的细菌、植物和动物中的同系物。具有高度相似序列的酶包含在克雷伯氏肺炎杆菌(91%相似性,评估=2e-138)和肠道沙门氏菌(91%相似性,评估=4e-138)等中。

[0791]

<u>基因</u>	<u>GenBank 登录号.</u>	<u>GI 号</u>	<u>生物体</u>
<i>mhpD</i>	AAC73453.2	87081722	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>cmtF</i>	AAB62293.1	1263188	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>todG</i>	AAA61942.1	485738	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>cnbE</i>	YP_001967714.1	190572008	丛毛单胞菌 (<i>Comamonas</i>) sp. CNB-1
<i>mhpD</i>	Q13VU0	123358582	伯克霍尔德菌 <i>Burkholderia xenovorans</i>
<i>hpcG</i>	CAA57202.1	556840	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) C
<i>hpaH</i>	CAA86044.1	757830	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) W
<i>hpaH</i>	ABR80130.1	150958100	克雷伯氏肺炎杆菌 (<i>Klebsiella pneumoniae</i>)
<i>Sari_01896</i>	ABX21779.1	160865156	肠道沙门氏菌 (<i>Salmonella enterica</i>)

[0792] 另一种酶候选物是柠檬酸水解酶(EC 4.2.1.34),一种将2-甲基苹果酸脱水成中康酸的酶。这种酶在詹氏甲烷球菌(*Methanocaldococcus jannaschii*)的生成2-氧桥丁酸的丙酮酸途径中已经得到研究,证实其具有广泛的底物特异性(Drevland et al., J Bacteriol. 189:4391-4400 (2007))。这种酶活性也在破伤风梭菌(*Clostridium tetanomorphum*)、摩氏摩根氏菌(*Morganella morganii*)、无丙二酸柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*)中被检测到,并在其中被认为参与谷氨酸降解(Kato et al., Arch. Microbiol. 168:457-463 (1997))。詹氏甲烷球菌蛋白质序列与这些生物中的基因不具有显著的同源性。

[0793]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI 号</u>	<u>生物体</u>
<i>leuD</i>	Q58673.1	3122345	詹氏甲烷球菌 (<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>)

[0794] 马来酸二甲酯水合酶(EC 4.2.1.85)是乌头碱家族中,令马来酸二甲酯水合形成(2R,3S)-2,3-二甲基苹果酸的可逆Fe 2+依赖性氧敏感性酶。该酶由马氏体杆菌中的dmdAB编码(Alhapel et al., 同上; Kollmann-Koch et al., Hoppe Seylers Z. Physiol Chem. 365:847-857 (1984))。

[0795]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI号</u>	<u>生物体</u>
<i>dmdA</i>	ABC88408	86278276	巴氏真杆菌 (<i>Eubacterium barkeri</i>)
<i>dmdB</i>	ABC88409.1	86278277	巴氏真杆菌 (<i>Eubacterium barkeri</i>)

[0796] 步骤F: 甲基丙二酰辅酶A还原酶(醇形成) (称为EMA7)。步骤F可涉及醇/醛脱氢酶(EC 1.2.1.-)组合。甲基丙二酰辅酶A可以通过具有双酰基辅酶A还原酶和醇脱氢酶活性的多功能酶一步还原成3-HIB。尽管甲基丙二酰辅酶A直接转化为3-HIB尚未有报道,但该反应与常规转化相似,例如乙酰辅酶A向乙醇和丁酰辅酶A向丁醇的共同转化,其由具有醛与醇脱氢酶活性的CoA依赖性酶催化。候选基因包括大肠杆菌adhE (Kessler et al., FEBS Lett. 281: 59-63 (1991)) 和丙酮丁醇梭菌bdh I和bdh II (Walter et al., J.Bacteriol. 174: 7149-7158 (1992)), 其可以分别将乙酰辅酶A和丁酰辅酶A还原成乙醇和丁醇。除了将乙酰辅酶A还原成乙醇之外,已经证实肠系膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 中的adhE编码的酶,将支链化合物异丁醛氧化成异丁酰辅酶A (Kazahaya et al., J.Gen.Appl.Microbiol. 18: 43-55 (1972); Koo et al., Biotechnol.Lett. 27: 505-510 (2005))。另外的用于将甲基丙二酰辅酶A直接转化为3-HIB的候选酶,由来自橙色绿屈挠菌 (*Chloroflexus aurantiacus*) 的丙二酰辅酶A还原酶编码 (Hügler et al., J.Bacteriol. 184 (9): 2404-2410 (2002))。

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI号</u>	<u>生物体</u>
<i>Mcr</i>	YP_001636209.1	163848165	橙色绿屈挠菌 (<i>Chloroflexus aurantiacus</i>)
<i>adhE</i>	NP_415757.1	16129202	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>bdh II</i>	NP_349891.1	15896542	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	肠系膜明串珠菌 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)

[0798] 实施例14

[0799] 甲基丙烯酸和2-羟基异丁酸合成酶

[0800] 该实施例提供了可用于将乙酰辅酶A转化为甲基丙烯酸和2-羟基异丁酰的基因,如图10的途径所示。

[0801] 图10:能够从乙酰辅酶A生产2-羟基异丁酸和甲基丙烯酸的示例性途径。通过以下

酶进行2-羟基异丁酸和甲基丙烯酸生产:A)乙酰辅酶A:乙酰辅酶A酰基转移酶,B)乙酰乙酰辅酶A还原酶(还原酮),C)3-羟基丁酰辅酶A变位酶,D)2-羟基异丁酰辅酶A脱水酶,E)甲基丙烯酰辅酶A合成酶、水解酶或转移酶,F)2-羟基异丁酰辅酶A合成酶、水解酶或转移酶。

[0802] MAA生物合成可以在最少五个酶促步骤中从乙酰辅酶A进行(参见图10)。在该途径中,将两分子的乙酰辅酶A合并形成乙酰乙酰辅酶A,然后将其还原为3-羟基丁酰辅酶A。可选地,4-羟基丁酰辅酶A可以通过4-羟基丁酰辅酶A脱水酶和巴豆酸酶转化为3-羟基丁酰辅酶A(Martins et al., Proc.Nat.Acad.Sci.USA 101(44) 15645–15649 (2004); Jones and Woods, Microbiol.Rev. 50:484–524 (1986); Berg et al., Science 318 (5857) 1782–1786 (2007))。然后甲基变位酶将3-羟基丁酰辅酶A的碳骨架重排为2-羟基异丁酰辅酶A,然后脱水形成甲基丙烯酰辅酶A。可选地,2-羟基异丁酰辅酶A可以转化为2-羟基异丁酸,并作为产物分泌和收集。将甲基丙烯酰辅酶A转化为MAA的最终步骤,可以通过图中所示的单一酶或一系列酶进行。

[0803] A)乙酰辅酶A:乙酰辅酶A酰基转移酶。步骤A涉及乙酰乙酰辅酶A硫解酶(EC 2.3.1.9)。由乙酰辅酶A巯基酶催化两单位的乙酰辅酶A形成乙酰乙酰辅酶A。该酶天然存在于大肠杆菌,由基因atoB编码,通常在脂肪酸氧化过程中在乙酰乙酸降解的方向起作用(Duncombe and Frerman, Arch.Biochem.Biophys. 176:159–170 (1976); Frerman and Duncombe, Biochim.Biophys.Acta 580:289–297 (1979))。将来自丙酮丁醇梭菌的基因thlA工程化改造成大肠杆菌异丙醇生产菌株(Hanai et al., Appl.Environ.Microbiol. 73: 7814–7818 (2007); Stim-Herndon et al., Gene 154:81–85 (1995))。另外的候选基因包括来自巴斯德梭菌(*Clostridium pasteurianum*)的thl(Meng 和 Li. Cloning, Biotechnol.Lett. 28:1227–1232 (2006))和来自酿酒酵母的ERG10(Hiser et al., J Biol Chem 269:31383–89 (1994))。

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
atoB	NP_416728	16130161	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
thlA	NP_349476.1	15896127	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
thlB	NP_149242.1	15004782	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
thl	ABA18857.1	75315385	巴斯德梭菌 (<i>Clostridium pasteurianum</i>)
ERG10	NP_015297	6325229	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)

[0804]

[0805] B)乙酰乙酰辅酶A还原酶(酮还原)。步骤B涉及乙酰乙酰辅酶A还原酶(EC#: 1.1.1.35)。该第二步需要通过乙酰乙酰辅酶A还原酶,将乙酰乙酰辅酶A还原为3-羟基丁酰辅酶A。该酶参与了几种梭菌品种中的通向丁酸的乙酰辅酶A发酵途径,并已详细研究(Jones and Woods, Microbiol.Rev. 50:484–524 (1986))。来自丙酮丁醇梭菌的由hbd编码的酶已经在大肠杆菌(Youngleson et al., J.Bacteriol. 171:6800–6807 (1989))中克隆和功能表达。此外,大肠杆菌中由fadB和fadJ编码的两种脂肪酸氧化复合物的亚基,充当了3-

羟基酰基辅酶A脱氢酶(Binstock and Schulz,Methods Enzymol.71 Pt C:403-411 (1981))。其他证实将乙酰乙酰辅酶A还原为3-羟基丁酰辅酶A的基因,是来自生枝动胶菌(*Zoogloea ramigera*)的PhbB(Ploux et al.,Eur.J Biochem.174:177-182(1988))和来自类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)的phaB(Alber et al.,Mol.Microbiol 61:297-309(2006))。前一种基因是NADPH依赖性的,其核苷酸序列已被确定(Peoples et al., Mol.Microbiol 3:349-357(1989)),并且该基因已在大肠杆菌中表达。对该基因的底物特异性研究得出的结论是,除了乙酰乙酰辅酶A之外,它还可以接受3-氧化丙酰基辅酶A作为底物(Ploux et al.,Eur.J Biochem.174:177-182(1988))。额外的基因包括脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)中的phaB、克氏梭菌中的Hbd1(C端结构域)和Hbd2(N端结构域)(Hillmer和Gottschalk,Biochim.Biophys.Acta 3334:12-23(1974))和牛(*Bos taurus*)中的HSD17B10(Wakil et al.,J Biol.Chem.207:631-638(1954))。来自脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)的酶已经在大肠杆菌(Yabutani et al.,FEMS Microbiol Lett.133:85-90(1995))中功能地表达和表征。许多类似的酶已经在其他梭菌品种和勤奋金属球菌(*Metallosphaera sedula*)中发现(Berg et al.,Science.318:1782-1786(2007))。来自热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)的酶是过氧化物酶脂肪酸β-氧化多功能酶2型(MFE-2)的组件。该蛋白质的脱氢酶B结构域对乙酰乙酰辅酶A具有催化活性。该结构域在大肠杆菌中已被功能表达,晶体结构已知,并且催化机制得到了很好的理解(Ylianttila et al.,Biochem Biophys Res Commun 324:25-30(2004);Ylianttila et al.,J Mol Biol 358:1286-1295(2006))。

[0806]

蛋白质	GENBANK ID	GI号	生物体
<i>fadB</i>	P21177.2	119811	大肠杆菌 (<i>ESCHERICHIA COLI</i>)
<i>fadJ</i>	P77399.1	3334437	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>Hbd2</i>	EDK34807.1	146348271	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>Hbd1</i>	EDK32512.1	146345976	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>HSD17B10</i>	O02691.3	3183024	牛 (<i>Bos taurus</i>)
<i>phbB</i>	P23238.1	130017	生枝动胶菌 (<i>Zoogloea ramigera</i>)
<i>phaB</i>	YP_353825.1	77464321	类球红细菌 (<i>Rhodobacter</i>)

[0807]

			<i>sphaeroides</i>)
<i>phB</i>	BAA08358	675524	脱氮副球菌 (<i>Paracoccus denitrificans</i>)
<i>Hbd</i>	NP_349314.1	15895965	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>Hbd</i>	AAM14586.1	20162442	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	146304189	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Msed_0399</i>	YP_001190500	146303184	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Msed_0389</i>	YP_001190490	146303174	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Msed_1993</i>	YP_001192057	146304741	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Fox2</i>	Q02207	399508	热带假丝酵母 (<i>Candida tropicalis</i>)

[0808] C) 3-羟基丁酰辅酶A变位酶。步骤C涉及3-羟基丁酰辅酶A变位酶(EC 5.4.99.-)。在该步骤中,3-羟基丁酰辅酶A由3-羟基丁酰辅酶A变位酶重排形成2-羟基异丁酰辅酶A(2-HIBCoA)。该酶是最近在*Methylibium petroleiphilum*中发现和表征的新型ICM样甲基失活酶(Ratnatilleke et al., J.Biol.Chem.274:31679-31685 (1999); Rohwerder et al., Appl.Environ.Microbiol.72:4128-4135 (2006))。这种在*Methylibium petroleiphilum* PM1中由*Mpe_B0541*编码的酶,与其他微生物中的甲基丙二酰辅酶A变位酶的大亚基具有高度的序列同源性,包括类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)中的*Rspf17029_3657*和自养黄色杆菌(*Xanthobacter autotrophicus*)中的*Xaut_5021*。对活性位点附近的单个氨基酸的改变,改变了酶的底物特异性(Ratnatilleke et al., 同上,1999; Rohwerder et al., 同上,2006),因此在该位点对相似酶的定向工程,例如前述的甲基丙二酰-CoA变位酶或异丁烯酰辅酶A变位酶,可用于实现所需的反应性。

[0809]

基因	GenBank ID	GI号	生物体
<i>Mpe_B0541</i>	YP_001023546.1	124263076	<i>Methylibium petroleiphilum PM1</i>
<i>Rspf17029_3657</i>	YP_001045519.1	126464406	类球红细菌 (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)
<i>Xaut_5021</i>	YP_001409455.1	154243882	自养黄色杆菌 (<i>Xanthobacter autotrophicus</i>) Py2

[0810] D) 2-羟基异丁酰辅酶A脱水酶。步骤D涉及2-羟基异丁酰辅酶A脱水酶。2-羟基酰基

辅酶A如2-羟基异丁酰辅酶A的脱水,可以通过一种特殊类型的氧敏感酶催化,其通过自由基机制使2-羟基酰基辅酶A衍生物脱水(Buckel and Golding, Annu. Rev. Microbiol. 60: 27-49 (2006); Buckel et al., Curr. Opin. Chem. Biol. 8: 462-467 (2004); Buckel et al., Biol. Chem. 386: 951-959 (2005); Kim et al., FEBS J. 272: 550-561 (2005); Kim et al., FEMS Microbiol. Rev. 28: 455-468 (2004); Zhang et al., Microbiology 145 (Pt 9): 2323-2334 (1999))。这种酶的一个示例是来自丙酸梭菌(*Clostridium propionicum*)的乳酰基辅酶A脱水酶,其催化乳酰基辅酶A的脱水以形成丙烯酰基辅酶A(Kuchta and Abeles, J. Biol. Chem. 260: 13181-13189 (1985); Hofmeister and Buckel, Eur. J. Biochem. 206: 547-552 (1992))。另外的示例是由发酵氨基酸球菌(*Acidaminococcus fermentans*)的编码的2-羟基戊二酰辅酶A脱水酶(Müller and Buckel, Eur. J. Biochem. 230: 698-704 (1995); Schweiger et al., Eur. J. Biochem. 169: 441-448 (1987))。另一个示例是艰难梭菌的由hadBC催化并由hadI活化的2-羟基异己酰基辅酶A脱水酶(Darley et al., FEBS J. 272: 550-61 (2005))。发酵氨基酸球菌和艰难梭菌的相应序列如下所示。完整的丙酸梭菌乳酸丙酰辅酶A脱水酶的序列尚未列在公开的数据库中。但是,β亚基的序列对应于GenBank登录号AJ276553(Selmer et al., Eur. J. Biochem., 269: 372-80 (2002))。

[0811]

基因	GenBank 登录号.	GI 号	生物体
<i>hgda</i>	P11569	296439332	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)
<i>hgdb</i>	P11570	296439333	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)
<i>hgdc</i>	P11568	2506909	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)
<i>hadB</i>	YP_001086863	126697966	艰难梭菌 (<i>Clostridium difficile</i>)
<i>hadC</i>	YP_001086864	126697967	艰难梭菌 (<i>Clostridium difficile</i>)
<i>hadI</i>	YP_001086862	126697965	艰难梭菌 (<i>Clostridium difficile</i>)
<i>lcdB</i>	AJ276553	7242547	丙酸梭菌 (<i>Clostridium propionicum</i>)

[0812] E) 甲基丙烯酰辅酶A合成酶、水解酶或转移酶,和F) 2-羟基异丁酰辅酶A合成酶、水解酶或转移酶。步骤E和F分别涉及对甲基丙烯酸或2-羟基异丁酸具有活性的转移酶(EC 2.8.3.-)、水解酶(EC 3.1.2.-)或合成酶(EC 6.2.1.-)。通过CoA转移酶、合成酶或水解酶,可以将甲基丙烯酰辅酶A直接转化为MAA或将2-羟基异丁酰辅酶A转化为2-羟基异丁酸。如果采用CoA转移酶或CoA合成酶来完成这种转化,则途径能量最有利。在转移酶家族中,酰基辅酶A:乙酸-CoA转移酶(也称为乙酸-CoA转移酶)是催化所需2-羟基异丁酰辅酶A或甲基丙

烯酰CoA转移酶活性的合适候选物,因为其广泛的底物特异性包括支链酰基辅酶A底物 (Matthies and Schink, Appl. Environ. Microbiol. 58:1435–1439 (1992); Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902–908 (1968))。ADP形成乙酰辅酶A合成酶(ACD)是对结构相似的支链化合物起作用的CoA合成酶家族中的有潜力的酶(Brasen and Schonheit, Arch. Microbiol. 182:277–287 (2004); Musfeldt and Schonheit, J. Bacteriol. 184:636–644 (2002))。在CoA水解酶家族中,已经证实酶3-羟基异丁酰辅酶A水解酶对各种支链酰基辅酶A底物起作用,包括3-羟基异丁酰辅酶A、甲基丙二酰辅酶A和3-羟基-2-甲基丁酰基辅酶A(Hawes et al., Methods Enzymol. 324:218–228 (2000); Hawes et al., J. Biol. Chem. 271:26430–26434 (1996); Shimomura et al., J. Biol. Chem. 269: 14248–14253 (1994))。CoA转移酶、合成酶和水解酶的其他示例性候选基因在上文别处讨论。

[0813] 实施例15

[0814] 内源性酶的减弱或破坏

[0815] 该实施例提供用于减弱或破坏的内源性酶靶标,其可用于提高通过甲醇脱氢酶和甲醛同化途径的碳通量。

[0816] DHA激酶

[0817] 甲基营养酵母通常利用胞质DHA激酶催化DHA到DHAP的ATP依赖性活化。DHAP与G3P组合,通过FBP醛缩酶形成果糖-1,6-二磷酸(FBP)。然后通过果糖二磷酸酶将FBP水解成F6P。与上述F6P醛缩酶途径相比,通过该途径将DHA和G3P转化为F6P的净转化能量消耗高(1个ATP),如上所述且如图1所示。DHA激酶还与F6P醛缩酶竞争DHA底物。因此内源性DHA激酶活性的减弱,将增强甲醛同化途径的能量动力学,并且还增加DHA对DHA合成酶的细胞内可利用性。由DAK1和DAK2编码的酿酒酵母的DHA激酶,能够使生物维持低DHA细胞内水平(Molin et al., J Biol Chem 278:1415–23 (2003))。在甲基营养酵母中,DHA激酶对甲醇生长至关重要(Luers et al., 酵母菌14:759–71 (1998))。汉逊酵母多形酵母和巴斯德毕赤酵母的DHA激酶由DAK编码(van der Klei et al., Curr Genet 34:1–11 (1998); Luers et al., 同上)。其他微生物中的DAK酶可以通过与已知酶的序列相似性来鉴定。

[0818]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
DAK1	NP_013641.1	6323570	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
DAK2	NP_116602.1	14318466	酿酒酵母

[0819]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
			(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>DAK</i>	AAC27705.1	3171001	多形汉逊酵母 (<i>Hansenula polymorpha</i>)
<i>DAK</i>	AAC39490.1	3287486	巴斯德毕赤酵母 (<i>Pichia pastoris</i>)
<i>DAK2</i>	XP_505199.1	50555582	解脂耶氏酵母 (<i>Yarrowia lipolytica</i>)

[0820] 甲醇氧化酶

[0821] 氧化还原低效的内源性甲醇氧化酶的减弱,加上细胞溶质NADH依赖性甲醇脱氢酶的表达增加,将允许细胞质中甲醇到甲醛的氧化还原有效氧化。甲醇氧化酶,也称为醇氧化酶(EC 1.1.3.13),催化甲醇到甲醛和过氧化氢的氧依赖性氧化。在真核生物中,醇氧化酶位于过氧化物酶体中。示例性甲醇氧化酶由博伊丁假丝酵母(*Candida boidinii*)的AOD(Sakai and Tani, Gene 114:67–73 (1992));和多形汉逊酵母、多聚甲醛,甲醇毕赤酵母和巴斯德毕赤酵母(*Pichia methanolica*)的AOX(Ledeboer et al, Nucl Ac Res 13:3063–82 (1985); Koutz et al, Yeast 5:167–77 (1989); Nakagawa et al, Yeast 15:1223–1230 (1999))。

[0822]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>AOX2</i>	AAF02495.1	6049184	甲醇毕赤酵母 (<i>Pichia methanolica</i>)
<i>AOXI</i>	AAF02494.1	6049182	甲醇毕赤酵母 (<i>Pichia methanolica</i>)
<i>AOXI</i>	AAB57849.1	2104961	巴斯德毕赤酵母 (<i>Pichia pastoris</i>)
AOX2	AAB57850.1	2104963	巴斯德毕赤酵母 (<i>Pichia pastoris</i>)
<i>AOX</i>	P04841.1	113652	多形汉逊酵母 (<i>Hansenula polymorpha</i>)
<i>AOD1</i>	Q00922.1	231528	博伊丁假丝酵母 (<i>Candida boidinii</i>)
<i>AOXI</i>	AAQ99151.1	37694459	<i>Ogataea pini</i>

[0823] PQQ依赖型甲醇脱氢酶

[0824] 来自扭脱甲基杆菌 (*mxaIF*) 的PQQ依赖性甲醇脱氢酶, 使用细胞色素作为电子载体 (Nunn et al., Nucl Acid Res 16:7722 (1988))。甲烷氧化菌(例如荚膜甲基球菌 (*Methylococcus capsulatis*))的甲醇脱氢酶, 与甲烷单加氧酶(MMO)形成复合物而起作用 (Myronova et al., Biochem 45:11905–14 (2006))。请注意, 在辅助蛋白中, 活性甲醇脱氢酶需要细胞色素CL和PQQ生物合成酶。这些所需辅助蛋白质中的一种或多种的减弱, 或者将所述酶重新定位到不同的细胞区室, 也将具有减弱PQQ依赖性甲醇脱氢酶活性的作用。

[0825]

<u>蛋白质</u>	<u>GenBank ID</u>	<u>GI号</u>	<u>生物体</u>
MCA0299	YP_112833.1	53802410	荚膜甲基球菌 (<i>Methylococcus capsulatis</i>)
MCA0782	YP_113284.1	53804880	荚膜甲基球菌 (<i>Methylococcus capsulatis</i>)
<i>mxaI</i>	YP_002965443.1	240140963	扭脱甲基杆菌 (<i>Methylobacterium extorquens</i>)
<i>mxaF</i>	YP_002965446.1	240140966	扭脱甲基杆菌 (<i>Methylobacterium extorquens</i>)

[0826] DHA合成酶和其他竞争性甲醛同化和分解途径

[0827] 通过减弱竞争性甲醛同化和异化途径, 可以增强碳高效的甲醛同化。真核生物中的示例性竞争同化途径, 包括DHA合成酶对甲醛的过氧化物酶异化, 以及用于将DHA转化为F6P的DHA激酶途径。竞争性内源异化途径的示例包括图1所示的一种或多种酶。

[0828] 甲醇营养酵母通常在甲醇生长过程中将选定的甲醇同化和异构酶靶向过氧化物酶, 包括甲醇氧化酶、DHA合成酶和S-(羟甲基)-谷胱甘肽合成酶(见Yurimoto et al., 同上)。所述过氧化物酶体靶向机制, 包括过氧化物酶体靶向序列与其相应过氧化物酶体受体之间的相互作用 (Lametschwandtner et al., J Biol Chem 273:33635–43 (1998))。甲基营养生物中的过氧化物甲醇途径酶, 包含与过氧化物酶体受体结合的PTS1靶向序列, 例如博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*) 中的Pex5p (Horiguchi et al., J Bacteriol 183: 6372–83 (2001))。对参与过氧化物酶体生物发生的PTS1靶向序列、Pex5p受体和/或基因的破坏, 将允许DHA合成酶、S-(羟甲基)-谷胱甘肽合成酶或其他甲醇诱导型过氧化物酶的胞质表达。甲基营养酵母的PTS1靶向序列是本领域已知的 (Horiguchi et al., 同上)。可以使用生物信息学方法(例如, Neuberger et al., J Mol Biol 328:581–92 (2003)))来预测未知酶的过氧化物酶体靶向序列。

[0829] 实施例16

[0830] 通过甲醇脱氢酶和核酮糖单磷酸途径的甲醇同化

[0831] 该实施例表明, 核酮糖单磷酸(RuMP)途径的活性酶的共表达可以有效吸收甲醇衍

生的碳。

[0832] 设计了一个实验系统来测试MeDH与RuMP途径的酶H6P合成酶(HPS)和6-磷酸-3-己糖异构酶(PHI)的结合能力,以将甲醇碳吸收到糖酵解途径和TCA循环中。构建大肠杆菌株ECh-7150(Δ lacIA、Δ pf1B、Δ ptsI、Δ PpckA(pckA)、Δ Pg1k(glk)、glk::g1fB、Δ hycE、Δ frmR、Δ frmA、Δ frmB),以除去FrmA和FrmB酶所编码的谷胱甘肽依赖性甲醛解毒能力。然后用含有或缺少编码HPS和PHI酶的融合物的基因2616A的质粒pZA23S变体转化该菌株。然后将这两个转化的菌株用包含基因2315L(编码活性MeDH)、或基因2315RIP2(编码催化无活性MeDH)、或没有基因插入的pZS*13S变体进行转化。基因2315和2616是来自甲醇芽孢杆菌MGA3的NAD依赖性甲醇脱氢酶的内部命名,2616是Orita et al. (2007) Appl Microbiol Biotechnol 76:439-45所述的融合phs-hpi构建体。

[0833] 将6个所得菌株在含有1%阿拉伯糖和0.6M 13C-甲醇以及100μg/ml 琥珀酸青霉素和25μg/ml 卡那霉素的5ml基本培养基中,一式四份地有氧培养,以维持质粒选择,以及以1mM IPTG诱导甲醇脱氢酶和HPS-PHI融合成酶的表达。在37℃培养18小时后,以600nm波长分光光度法测量细胞密度,并提供每种培养基的澄清样品进行分析,以检测标记甲醇碳掺入到TCA循环衍生代谢物中的证据。通过删除与核酮糖-5-磷酸竞争的基因araD,可以进一步富集该标记。

[0834] 据发现,实验中提供的来自标记甲醇的¹³C碳,显著富集在丙酮酸、乳酸、琥珀酸、富马酸、苹果酸、谷氨酸和柠檬酸的代谢物,但仅在共同表达催化活性MeDH 2315L和HPS-PHI融合物2616A的菌株中发现(数据未显示)。此外,该菌株生长显著优于表达催化活性MeDH但缺乏HPS-PHI融合物表达的菌株(数据未显示),表明HPS-PHI酶能够降低在该菌株背景中不能通过其他方式解毒的甲醛生长抑制水平。这些结果表明,活性MeDH和RuMP途径的酶的共表达,可以有效同化甲醇衍生的碳,并将其导入TCA循环衍生产物。

[0835] 实施例17

[0836] 以下实施例描述了生产2,4-戊二烯酸和丁二烯所需的酶和候选基因,如图11所示。

[0837] 步骤A,图11:乙醛脱氢酶

[0838] 乙酰辅酶A还原为乙醛,可以通过NAD(P)+依赖性乙醛脱氢酶(EC 1.2.1.10)催化。大肠杆菌的酰化乙醛脱氢酶由adhE和mhpF编码(Ferrandez et al., J Bacteriol 179: 2573-81 (1997))。假单胞菌CF600的酶由dmpF编码,并参与间位裂解途径,与4-羟基-2-氧化戊酸醛缩酶形成复合物(Shingler et al., J Bacteriol 174:711-24 (1992))。BphJ是一种非磷酸化酰化醛脱氢酶,在NAD(+)和辅酶A(CoA)的存在下催化醛转化形成酰基辅酶A(Baker et al., Biochemistry, 2012年6月5日;51 (22)):4558-67。Epub 2012 May 21)。产溶剂生物,例如丙酮丁醇梭菌,编码具有醇脱氢酶和乙醛脱氢酶活性的双功能酶。双功能丙酮丁醇梭菌酶是由bdh I和adhE2编码的(Walter et al., J. Bacteriol. 174: 7149-7158 (1992); Fontaine et al., J. Bacteriol. 184: 821-830 (2002))。另一种酰化乙醛脱氢酶的候选物,是来自拜氏梭菌(Clostridium beijerinckii)的ald基因(Toth, Appl. Environ. Microbiol. 65: 4973-4980 (1999)),该基因与鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)和大肠杆菌的eut E乙醛脱氢酶基因非常相似(Toth, Appl. Environ. Microbiol. 65: 4973-4980 (1999))。

[0839]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
<i>adhE</i>	NP_415757.1	16129202	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>mhpF</i>	NP_414885.1	16128336	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>dmpF</i>	CAA43226.1	45683	假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>) sp. CF600
<i>adhE2</i>	AAK09379.1	12958626	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>bdh I</i>	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>Ald</i>	AAT66436	49473535	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>eutE</i>	NP_416950	16130380	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>eutE</i>	AAA80209	687645	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>)
<i>bphJ</i>	CAA54035.1	520923	伯克霍尔德菌 <i>Burkholderia xenovorans LB400</i>

[0840] 将酰基辅酶A还原成其相应醛的其他酰基辅酶A脱氢酶,包括脂肪酰基辅酶A还原酶(EC 1.2.1.42, 1.2.1.50)、琥珀酰基辅酶A还原酶(EC 1.2.1.76)、乙酰基辅酶A还原酶、丁酰基辅酶A还原酶和丙酰基辅酶A还原酶(EC 1.2.1.3)。醛形成酰基辅酶A还原酶已证实对酰基辅酶A、3-羟基酰基辅酶A和3-氧代酰基辅酶A底物具有活性,在文献中是已知的。几种酰基辅酶A还原酶对3-羟基酰基辅酶A底物上是有活性的。例如,来自梭菌的一些丁酰基辅酶A还原酶,对3-羟基丁酰基辅酶A有活性,罗伊氏乳杆菌的丙酰基辅酶A还原酶对3-羟基丙酰基辅酶A有活性。用于将3-氧基酰基辅酶A底物转化成其相应醛的酶,是丙二酰基辅酶A还原酶。该类中的酶,可以使用本领域已知的进化或酶工程方法来精制,以对烯酰基辅酶A底物具有活性。

[0841] 示例性的脂肪酰基辅酶A还原酶,由乙酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) (Reiser, Journal of Bacteriology 179:2969-2975 (1997)) 和不动杆菌属M-1 (Ishige et al., Appl. Environ. Microbiol. 68:1192-1195 (2002))。来自结核分枝杆菌的两种基因产物接受长度为C16-C18的长链脂肪酰基辅酶A底物 (Harminder Singh, U. Med Florida (2007))。另一种脂肪酰基辅酶A还原酶是明亮发光杆菌 (*Photobacterium*

phosphoreum) 的LuxC(Lee et al., *Biochim Biohys Acta* 1388:215–22 (1997))。具有琥珀酰辅酶A还原酶活性的酶由克氏梭菌 (*Clostridium kluyveri*) 的sucD的sucD编码 (Sohling, *J.Bacteriol.* 178:871–880 (1996)) 和 *P.gingivalis* (Takahashi, *J.Bacteriol* 182:4704–4710 (2000)))。额外的琥珀酰辅酶A还原酶参与嗜热古细菌的3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环,包括勤奋金属球菌 (*Metallosphaera Sedula*) (Berg et al., *Science* 318: 1782–1786 (2007)) 和中性热变形菌 (*Thermoproteus neutrophilus*) (Ramos-Vera et al., *J Bacteriol.*, 191:4286–4297 (2009))。由Msed_0709编码的勤奋金属球菌酶严格依赖 NADPH,也具有丙二酰辅酶A还原酶活性。嗜中性粒细胞酶与NADPH和NADH均有活性。由bphG 编码的假单胞菌属 (*Pseudomonas* sp) 中的酰化乙醛脱氢酶的酶是另一个示例,已经证实其氧化和酰化乙醛、丙醛、丁醛、异丁醛和甲醛 (Powłowski, *J.Bacteriol.* 175:377–385 (1993))。除了将乙酰辅酶A还原成乙醇之外,已经证实肠粘膜明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 中由adhE编码的酶将支链化合物异丁醛氧化成异丁酰辅酶A (Kazahaya, *J.Gen.Appl.Microbiol.* 18:43–55 (1972)) ; 和Koo et al., *Biotechnol Lett.* 27:505–510 (2005))。丁醛脱氢酶催化类似的反应,在产溶剂生物如梭菌 (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*) (Kosaka et al., *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71:58–68 (2007)) 中将丁酰辅酶A转化为丁醛。丙酰辅酶A还原酶的示例包括鼠伤寒沙门氏菌LT2的 pduP (Leal, *Arch.Microbiol.* 180:353–361 (2003)) 和来自大肠杆菌的eutE (Skraly, WO 2004/024876)。天然将丙酰CoA转化为丙醛的鼠伤寒沙门氏菌LT2的丙酰辅酶A还原酶,也催化5-羟基戊酰辅酶A还原成5-羟基戊醛 (WO 2010/068953A2)。罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*) 的丙醛脱氢酶 (PduP) 具有广泛的底物范围,包括丁醛、戊醛和3-羟基丙醛 (Luo et al., *Appl Microbiol Biotech*, 89:697–703 (2011))。另外,一些酰基-ACP还原酶如细长聚球藻 (*Synechococcus elongatus*) PCC7942的orf1594基因产物,也表现出醛形成酰基辅酶A还原酶活性 (Schirmer et al., *Science*, 329:559–62 (2010))。

[0842]

s 蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>acrI</i>	YP_047869.1	50086359	乙酸钙不动杆菌

[0843]

s 蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
			(<i>Acinetobacter Calcoaceticus</i>)
<i>acr1</i>	AAC45217	1684886	不动杆菌 <i>Acinetobacter baylyi</i>
<i>acr1</i>	BAB85476.1	18857901	不动杆菌 (<i>Acinetobacter</i>) sp. Strain M-1
<i>Rv1543</i>	NP_216059.1	15608681	结核分枝杆菌 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
<i>Rv3391</i>	NP_217908.1	15610527	结核分枝杆菌 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
<i>LUXC</i>	AAT00788.1	46561111	明亮发光杆菌 (<i>Photobacterium phosphoreum</i>)
<i>MSED_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera Sedula</i>)
<i>Tneu_0421</i>	ACB39369.1	170934108	中性热变形菌 (<i>Thermoproteus neutrophilus</i>)
<i>sucD</i>	P38947.1	172046062	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>sucD</i>	NP_904963.1	34540484	牙龈卟啉单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>)
<i>bphG</i>	BAA03892.1	425213	假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>) sp
<i>adhE</i>	AAV66076.1	55818563	肠系膜明串珠菌 (<i>Leuconostoc mesenteroides</i>)
<i>Bld</i>	AAP42563.1	31075383	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>pduP</i>	NP_460996	16765381	鼠伤寒沙门氏菌 (<i>Salmonella typhimurium</i>) LT2

[0844]

s 蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>eutE</i>	NP_416950	16130380	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>pduP</i>	CCC03595.1	337728491	罗伊氏乳杆菌 (<i>Lactobacillus reuteri</i>)

[0845] 另外,一些酰基-ACP还原酶,如细长聚球藻 (*Synechococcus elongatus*) PCC7942 的orf1594基因产物,也表现出醛形成酰基辅酶A还原酶活性 (Schirmer et al., *Science*, 329:559–62 (2010))。细长聚球藻的PCC7942酰基-ACP还原酶在一钟似乎在大多数蓝细菌生物体中保守的操作子中与醛脱羧酶共表达。这种酶在大肠杆菌中与醛脱羧酶共表达,赋予了生成烷烃的能力。*P. marinus* AAR也被克隆到大肠杆菌中,并证实与脱羧基酶一起生成烷烃(参见例如美国申请2011/0207203)。

[0846]

基因	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>orf1594</i>	YP_400611.1	81300403	细长聚球藻 (<i>Synechococcus elongatus</i>) PCC7942
<i>PMT9312_0533</i>	YP_397030.1	78778918	原绿球藻 (<i>Prochlorococcus marinus</i>) MIT 9312
<i>syc0051_d</i>	YP_170761.1	56750060	细长聚球藻 (<i>Synechococcus elongatus</i>) PCC 6301
<i>Ava_2534</i>	YP_323044.1	75908748	鱼腥藻 (<i>Anabaena variabilis</i>) ATCC 29413
<i>alr5284</i>	NP_489324.1	17232776	念珠藻 (<i>Nostoc</i>) sp. PCC 7120
<i>Aazo_3370</i>	YP_003722151.1	298491974	念珠藻 (<i>Nostoc azollae</i>)
<i>Cyan7425_0399</i>	YP_002481152.1	220905841	蓝丝菌 (<i>Cyanothece</i>) sp. PCC 7425
<i>N9414_21225</i>	ZP_01628095.1	119508943	泡沫节球藻 (<i>Nodularia spumigena</i>) CCY9414
<i>L8106_07064</i>	ZP_01619574.1	119485189	林氏藻 (<i>Lyngbya</i>) sp. PCC 8106

[0847] 将酰基辅酶A转化成其相应醛的另一种酶,是丙二酰辅酶A还原酶,其将丙二酰辅酶A转化成丙二醛。丙二酰辅酶A还原酶是通过热嗜酸古细菌中的3-羟基丙酸循环进行自养碳固定的关键酶 (Berg, *Science* 318:1782–1786 (2007); 和 Thauer, *Science* 318:1732–1733 (2007))。该酶利用NADPH作为辅因子,并已在金属球菌和硫化叶菌中得到表征。(Alber et al., *J.Bacteriol.* 188:8551–8559 (2006); Hugler, *J.Bacteriol.* 184:2404–2410 (2002))。该酶由勤奋金属球菌中的Msed_0709编码 (Alber et al., *J.Bacteriol.* 188:

8551–8559 (2006) ; 和Berg, Science 318:1782–1786 (2007))。编码来自超嗜热硫化叶菌 (*Sulfolobus tokodaii*) 的丙二酰辅酶A还原酶的基因, 在大肠杆菌中克隆并异源表达 (Alber et al., J.Bacteriol 188:8551–8559 (2006)) , 该酶也证实催化甲基丙二酰辅酶A 到其相应的醛 (W02007141208 (2007)) 。虽然这些醛脱氢酶的功能与来自橙色绿屈挠菌 (*Chloroflexus aurantiacus*) 的双功能脱氢酶相似, 但是几乎没有序列相似性, 丙二酰辅酶A还原酶候选物与天冬氨酸-半醛脱氢酶 (一种催化天冬氨酰-4-磷酸还原并同时脱磷酸化成天冬氨酸半醛的酶) 具有高的序列相似性, 其他候选基因可以通过与其他微生物 (包括 硫矿硫化叶菌 (*Sulfolobus solfataricus*) 和硫酸硫杆菌 (*Sulfolobus acidocaldarius*) 的蛋白质的序列同源性来发现。另一种CoA酰化醛脱氢的候选酶是拜氏梭菌 (*Clostridium beijerinckii*) 的ald基因 (Toth, Appl. Environ. Microbiol. 65:4973–4980 (1999))。据报道, 该酶将乙酰辅酶A和丁酰辅酶A还原成其相应的醛。该基因与编码鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌的乙醛脱氢酶的eutE非常相似 (Toth, Appl. Environ. Microbiol. 65:4973–4980 (1999))。

[0848]

基因	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>Msed_0709</i>	YP_001190808.1	146303492	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>mcr</i>	NP_378167.1	15922498	超嗜热硫化叶菌 (<i>Sulfolobus tokodaii</i>)
<i>asd-2</i>	NP_343563.1	15898958	硫矿硫化叶菌 (<i>Sulfolobus solfataricus</i>)
<i>Saci_2370</i>	YP_256941.1	70608071	嗜酸热硫化叶菌 (<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>)

[0849] 步骤B, 图11:4-羟基-2-氧代戊酸醛缩酶

[0850] 丙酮酸和乙醛到4-羟基-2-氧代戊酸的缩合, 由4-羟基-2-氧代戊酸醛缩酶 (EC 4.1.3.39) 催化。该酶参与苯酚、甲酚和儿茶酚的降解途径。由mhpE编码的大肠杆菌酶, 对乙醛作为受体具有高度特异性, 但接受替代底物2-酮基丁酸或苯丙酮酸作为供体 (Pollard et al., Appl Environ Microbiol 64:4093–4094 (1998))。类似的酶由恶臭假单胞菌的 cmtG和todH基因编码 (Lau et al., Gene 146:7–13 (1994) ; Eaton, J.Bacteriol. 178:1351–1362 (1996))。在假单胞菌CF600中, 该酶是由dmpFG (Manjasetty et al., Acta Crystallogr.D.Biol Crystallogr. 57:582–585 (2001)) 编码的双功能醛缩酶-脱氢酶异二聚体的一部分。脱氢酶官能团相互转化乙醛和乙酰辅酶A, 提供减少对一些细胞有毒的乙醛的细胞浓度的优点。最近已经证实, 在NAD的存在下, 可以在该酶内产生底物通道, 并且还鉴定了可以在将乙醛引入DmpF位点中起重要作用的残基。

基因	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>mhpE</i>	AAC73455.1	1786548	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>cmtG</i>	AAB62295.1	1263190	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>todH</i>	AAA61944.1	485740	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>dmpG</i>	CAA43227.1	45684	假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>) sp. CF600
<i>dmpF</i>	CAA43226.1	45683	假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>) sp. CF600
<i>bphI</i>	CAA54036.1	520924	伯克霍尔德菌 <i>Burkholderia xenovorans LB400</i>

[0851] [0852] 步骤C,图11:4-羟基-2-氧代戊酸脱水酶

[0853] 4-羟基-2-氧代戊酸脱氢为2-氧代戊烯酸,由4-羟基-2-氧代戊酸水合酶(EC 4.2.1.80)催化。该酶参与芳香降解途径,并且通常与编码4-羟基-2-氧代戊酸醛缩酶活性酶的基因共转录。示例性基因产物由大肠杆菌的*mhpD*(Ferrandez et al., J Bacteriol.179:2573-2581(1997); Pollard et al., Eur J Biochem.251:98-106(1998))、恶臭假单胞菌的*todG*和(Lau et al., Gene 146:7-13(1994); Eaton, J Bacteriol.178: 1351-1362(1996))、丛毛单胞菌(Comamonas) CNB-1的*cnbE*(Ma et al., Appl Environ Microbiol 73:4477-4483(2007))和伯克霍尔德菌*Burkholderia xenovorans*的*mhpD*(Wang et al., FEBS J 272:966-974(2005))编码。一个密切近缘的酶,2-氧代庚-4-烯-1,7-二酸水合酶,参与4-羟基苯乙酸降解,其中它使用镁作为辅因子将2-氧代-庚-4-烯-1,7-二酸(OHED)转化为2-氧代-4-羟基-庚-1,7-二酸(Burks et al., J Am Chem Soc.120: (1998))。已经在大肠杆菌C(Roper et al., Gene 156:47-51(1995); Izumi et al., J Mol Biol.370:899-911(2007))和大肠杆菌W(Prieto et al., J Bacteriol.178:111-120(1996))中鉴定和表征了OHED水合酶候选物。序列比较揭示了广泛范围的细菌、植物和动物中的同系物。具有高度相似序列的酶包含在克雷伯氏肺炎杆菌(91%相似性,评估=2e-138)和肠道沙门氏菌(91%相似性,评估=4e-138)等中。

[0854]

基因	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>mhpD</i>	AAC73453.2	87081722	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>cmtF</i>	AAB62293.1	1263188	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>)

[0855]

			<i>putida</i>)
<i>todG</i>	AAA61942.1	485738	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>cnbE</i>	YP_001967714.1	190572008	丛毛单胞菌 (<i>Comamonas</i>) sp. CNB-1
<i>mhpD</i>	Q13VU0	123358582	伯克霍尔德菌 <i>Burkholderia xenovorans</i>
<i>hpcG</i>	CAA57202.1	556840	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) C
<i>hpaH</i>	CAA86044.1	757830	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>) W
<i>hpaH</i>	ABR80130.1	150958100	肺炎克雷伯菌 (<i>Klebsiella pneumonia</i>)
<i>Sari_01896</i>	ABX21779.1	160865156	肠道沙门氏菌 (<i>Salmonella enterica</i>)

[0856] 2-(羟甲基)戊二酸脱水酶,是可令2-(羟甲基)戊二酸脱水成2-亚甲基-戊二酸的含[4Fe-4S]酶,其在巴氏真杆菌 (*Eubacterium barkeri*) (以前称为巴氏梭菌 (*Clostridium barkeri*)) 中的烟酸代谢中的作用已经得到了研究 (Alhapel et al., Proc Natl Acad Sci USA 103:12341-12346 (2006))。具有高序列同源性的类似酶,存在于多毛类杆菌 (*Bacteroides capillosus*)、无氧球菌 *Anaerotruncus colihominis* 和嗜热盐碱无氧菌 (*Natranaerobius thermophilus*)。这些酶也与含[4Fe-4S]的细菌丝氨酸脱水酶的α-亚基和β-亚基同源,例如由 *tdcG*、*sdhB* 和 *sdaA* 编码的大肠杆菌酶。在巴氏真杆菌中具有相似功能的酶是马来酸二甲酯水合酶,其是乌头碱家族中,令马来酸二甲酯水合形成(2R,3S)-2,3-二甲基苹果酸的可逆Fe 2+ 依赖性氧敏感性酶。该酶由 *dmdAB* 编码 (Alhapel et al., Proc Natl Acad Sci USA 103:12341-6 (2006); Kollmann-Koch et al., Hoppe Seylers Z. Physiol Chem. 365:847-857 (1984))。

[0857]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>hmd</i>	ABC88407.1	86278275	巴氏真杆菌 (<i>Eubacterium barkeri</i>)
<i>BACCAP_02294</i>	ZP_02036683.1	154498305	多毛类杆菌 (<i>Bacteroides capillosus</i>)
<i>ANACOL_02527</i>	ZP_02443222.1	167771169	无氧球菌 <i>Anaerotruncus colihominis</i>
<i>NtherDRAFT_2368</i>	ZP_02852366.1	169192667	嗜热盐碱无氧菌

[0858]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
			(<i>Natranaerobius thermophilus</i>)
<i>dmdA</i>	ABC88408	86278276	巴氏真杆菌 (<i>Eubacterium barkeri</i>)
<i>dmdB</i>	ABC88409	86278277	巴氏真杆菌 (<i>Eubacterium barkeri</i>)

[0859] 步骤D,图11:2-氧代戊烯酸还原酶

[0860] 2-氧代戊烯酸还原为2-羟基戊烯酸,是通过还原酮基的醇脱氢酶进行的。几种典型的醇脱氢酶可以催化这种转化。来自大肠杆菌的两种这样的酶,由苹果酸脱氢酶(mdh)和乳酸脱氢酶(ldhA)编码。此外,来自真养劳尔氏菌(*Ralstonia eutropha*)的乳酸脱氢酶,已经证实对各种链长的2-酮酸具有高活性,包括乳酸、2-氧代丁酸、2-氧代戊酸和2-氧戊二酸(Steinbuchel et al., Eur.J.Biochem.130:329-334 (1983))。 α -酮己二酸转化成 α -羟基己二酸可以由2-酮己二酸还原酶催化,这是一种报道在大鼠和人胎盘中发现的酶(Suda et al., Arch.Biochem.Biophys.176:610-620 (1976); Suda et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.77:586-591 (1977))。另外的氧化还原酶是来自人心脏的线粒体3-羟基丁酸脱氢酶(bdh),其已经被克隆和表征(Marks et al., J.Biol.Chem.267:15459-15463 (1992))。拜氏梭菌(Ismaiel et al., J.Bacteriol.175:5097-5105 (1993))和布氏嗜热无氧杆菌(Lamed et al., Biochem.J.195:183-190 (1981); Peretz et al., Biochemistry.28:6549-6555 (1989))的酒精脱氢酶将丙酮转化成异丙醇。甲基乙基酮还原酶催化MEK还原为2-丁醇。示例性的MEK还原酶可以在深红红球菌(*Rhodococcus ruber*) (Kosjek et al., Biotechnol Bioeng.86:55-62 (2004))和强烈热球菌(*Pyrococcus furiosus*) (van der et al., Eur.J.Biochem.268:3062-3068 (2001))中发现。

[0861]

基因	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>Mdh</i>	AAC76268.1	1789632	大肠杆菌 (<i>Escherichia Coli</i>)
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	16129341	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>Ldh</i>	YP_725182.1	113866693	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>)
<i>Bdh</i>	AAA58352.1	177198	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
<i>Adh</i>	AAA23199.2	60592974	拜氏梭菌 (<i>Clostridium Beijerinckii</i>) NRRL B593
<i>Adh</i>	P14941.1	113443	布氏嗜热无氧杆菌

			(<i>Thermoanaerobacter brockii</i>) HTD4
[0862]	<i>Sadh</i>	CAD36475	21615553 深红红球菌 (<i>Rhodococcus ruber</i>)
	<i>adhA</i>	AAC25556	3288810 强烈热球菌 (<i>Pyrococcus furiosus</i>)

[0863] 步骤E,图11:2-羟基戊烯酸脱水酶

[0864] 脱水2-羟基戊烯酸的酶候选物(图1步骤E)包括富马酸酶(EC 4.2.1.2)、柠檬酸水合酶(EC 4.2.1.34)和马来酸二甲酯水合酶(EC 4.2.1.85)。富马酸酶天然催化苹果酸到富马酸的可逆脱水。尽管文献中尚未描述富马酸酶与2-羟基戊烯酸反应的能力,但是该酶的大量结构信息是已知的,并且其他研究人员成功地将酶改造,以改变活性、抑制和定位(Weaver, *Acta Crystallogr.D Biol.Crystallogr.* 61:1395–1401 (2005))。大肠杆菌有三种富马酸酶:受生长条件调控的FumA、FumB和FumC。FumB是氧敏感的,仅在无氧条件下有活性。FumA在微量无氧条件下是有活性的,FumC是有氧生长中唯一有活性的酶(Tseng et al., *J.Bacteriol.* 183:461–467 (2001); Woods et al., *Biochem.Biophys.Acta* 954:14–26 (1988); Guest et al., *J Gen Microbiol* 131:2971–2984 (1985))。另外的酶候选物在空肠弯曲杆菌(Smith et al., *Int.J.Biochem.Cell Biol.* 31:961–975 (1999))、嗜热栖热菌(*Thermus thermophilus*) (Mizobata et al., *Arch.Biochem.Biophys.* 355:49–55 (1998))和褐家鼠(*Rattus norvegicus*) (Kobayashi et al., *J.Biochem.* 89:1923–1931 (1981))中发现的酶。具有高序列同源性的类似酶,包括拟南芥中的fum1 和谷氨酸棒状杆菌的fumC。来自嗜热丙酸互营细菌(*Pelotomaculum thermopropionicum*)的MmcBC富马勒酸是另一类具有两个亚基的富马酸酶(Shimoyama et al., *FEMS Microbiol Lett.* 270:207–213 (2007))。这种酶活性也在破伤风梭菌(*Clostridium tetanomorphum*)、摩氏摩根氏菌(*Morganella morganii*)、无丙二酸柠檬酸杆菌(*Citrobacter amalonaticus*)中被检测到,并在其中被认为参与谷氨酸降解(Kato et al., *Arch.Microbiol* 168:457–463 (1997))。詹氏甲烷球菌蛋白质序列与这些生物中的基因不具有显著的同源性。马来酸二甲酯水合酶(EC 4.2.1.85)是乌头碱家族中,令马来酸二甲酯水合形成(2R,3S)-2,3-二甲基苹果酸的可逆Fe 2+依赖性氧敏感性酶。该酶由马氏体杆菌中的dmdAB编码(Alhapel et al., 同上; Kollmann-Koch et al., *Hoppe Seylers.Z.Physiol Chem.* 365:847–857 (1984))。

[0865]

基因	GenBank ID	GI号	生物体
<i>fumA</i>	NP_416129.1	16129570	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>fumB</i>	NP_418546.1	16131948	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0866]

基因	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>fumC</i>	NP_416128.1	16129569	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>fumC</i>	O69294	9789756	空肠弯曲杆菌 (<i>Campylobacter jejuni</i>)
<i>fumC</i>	P84127	75427690	嗜热栖热菌 (<i>Thermus thermophilus</i>)
<i>fumH</i>	P14408	120605	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
<i>fumI</i>	P93033	39931311	拟南芥 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
<i>fumC</i>	Q8NRN8	39931596	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>)
<i>mmcB</i>	YP_001211906	147677691	嗜热丙酸互营细菌 (<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>)
<i>mmcC</i>	YP_001211907	147677692	嗜热丙酸互营细菌 (<i>Pelotomaculum thermopropionicum</i>)
<i>leuD</i>	Q58673.1	3122345	詹氏甲烷球菌 (<i>Methanocaldococcus jannaschii</i>)
<i>dmdA</i>	ABC88408	86278276	巴氏真杆菌 (<i>Eubacterium barkeri</i>)
<i>dmdB</i>	ABC88409.1	86278277	巴氏真杆菌 (<i>Eubacterium barkeri</i>)

[0867] 油酸水合酶催化非活化烯烃到其相应的醇的可逆水合。这些酶代表WO2011076691中提出的另外合适的候选物。已经表征了来自脑膜炎败血伊利莎白菌 (*Elizabethkingia meningoseptica*) 和酿脓链球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 的油酸水合酶 (WO 2008/119735)。示例包括以下蛋白质。

[0868]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>Ohya</i>	ACT54545.1	254031735	脑膜炎败血伊利莎白菌 (<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>)
<i>HMPREF0841_1446</i>	ZP_07461147.1	306827879	酿脓链球菌 (<i>Streptococcus</i>)

[0869]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
			pyogenes) ATCC 10782
P700755_13397	ZP_01252267.1	91215295	扭曲冷弯曲菌 (Psychroflexus torquis) ATCC 700755
RPB_2430	YP_486046.1	86749550	沼泽红假单胞菌 (Rhodopseudomonas palustris)

[0870] 步骤F,图11:2,4-戊二烯酸脱羧酶

[0871] 2,4-戊二烯酸到丁二烯的脱羧反应(图1的步骤F)由烯酸脱羧酶催化。

[0872] 示例性的酶是山梨酸脱羧酶、乌头酸脱羧酶、4-草酸巴豆酸脱羧酶和肉桂酸脱羧酶。山梨酸脱羧酶将山梨酸转化为1,3-戊二烯。通过黑曲霉进行的山梨酸脱羧需要三个基因:padA1、ohbA1和sdrA (Plumridge et al. Fung. Genet. Bio, 47:683–692 (2010)。PadA1称为苯基丙烯酸脱羧酶,ohbA1是推定的4-羟基苯甲酸脱羧酶,sdrA是山梨酸脱羧酶调节剂。其他种类也证实可对山梨酸脱羧,包括几种真菌和酵母菌种 (Kinderlerler and Hatton, Food Addit Contam., 7 (5) :657–69 (1990); Casas et al., Int J Food Micro., 94 (1) :93–96 (2004); Pinches and Apps, Int.J.Food Microbiol.116:182–185 (2007))。例如已经证实米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和费氏新萨托菌(*Neosartorya fischeri*)对山梨酸脱羧,并且具有padA1,ohbA1和sdrA的近缘同系物。

基因名称	GenBankID	GI号	生物体
padA1	XP_001390532.1	145235767	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)
ohbA1	XP_001390534.1	145235771	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)
sdrA	XP_001390533.1	145235769	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)
[0873]	padA1	XP_001818651.1	米曲霉 (<i>Aspergillus oryzae</i>)
	ohbA1	XP_001818650.1	米曲霉 (<i>Aspergillus oryzae</i>)
	sdrA	XP_001818649.1	米曲霉 (<i>Aspergillus oryzae</i>)
padA1	XP_001261423.1	119482790	费氏新萨托菌 (<i>Neosartorya</i>)

[0874]

基因名称	GenBankID	GI号	生物体
			<i>fischeri</i>)
<i>ohbA1</i>	XP_001261424.1	119482792	费氏新萨托菌 (<i>Neosartorya fischeri</i>)
<i>sdrA</i>	XP_001261422.1	119482788	费氏新萨托菌 (<i>Neosartorya fischeri</i>)

[0875] 乌头酸脱羧酶(EC 4.1.1.6)催化假丝酵母菌株和丝状真菌土曲霉中的衣康酸生物合成的最后步骤(Bonnarme et al.J Bacteriol.177:3573-3578(1995);Willke and Vorlop,Appl Microbiol.Biotechnol 56:289-295(2001))。已经从土曲霉中纯化和表征了顺式乌头酸脱羧酶(CAD)(EC 4.1.16)(Dwiarti et al.,J.Biosci.Bioeng.94(1):29-33(2002))。最近,该基因被克隆和功能表征(Kanamasa et al.,Appl.Microbiol Biotechnol 80:223-229(2008))和(WO/2009/014437)。以下列出了几种CAD近缘同系物(EP 2017344A1; WO 2009/014437A1)。先前报道了CAD的基因和蛋白质序列(EP 2017344A1; WO 2009/014437A1),以及下表中列出的几个密切同系物。

[0876]

基因名称	GenBankID	GI号	生物体
<i>CAD</i>	XP_001209273	115385453	土曲霉 (<i>Aspergillus terreus</i>)
	XP_001217495	115402837	土曲霉 (<i>Aspergillus terreus</i>)
	XP_001209946	115386810	土曲霉 (<i>Aspergillus terreus</i>)
	BAE66063	83775944	米曲霉 (<i>Aspergillus oryzae</i>)
	XP_001393934	145242722	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)
	XP_391316	46139251	玉米赤霉 (<i>Gibberella zeae</i>)
	XP_001389415	145230213	黑曲霉 (<i>Aspergillus niger</i>)
	XP_001383451	126133853	树干毕赤酵母 (<i>Pichia stipitis</i>)

[0877]

	YP_891060	118473159	耻垢分枝杆菌 (<i>Mycobacterium smegmatis</i>)
	NP_961187	41408351	鸟结核分枝杆菌 (<i>Mycobacterium avium</i>) subsp. <i>pratuberculosis</i>
	YP_880968	118466464	鸟结核分枝杆菌 (<i>Mycobacterium avium</i>)
	ZP_01648681	119882410	海蚯蚓盐孢菌 (<i>Salinispora arenicola</i>)

[0878] 已经表征了另外一类脱羧酶,其催化肉桂酸(苯基丙烯酸)和取代肉桂酸衍生物转化为相应的苯乙烯衍生物。这些酶常见于各种微生物中,已经在大肠杆菌中克隆和表达的编码这些酶的特异性基因是:来自酿酒酵母的pad 1 (Clausen et al., Gene 142:107-112 (1994))、来自植物乳杆菌(*Lactobacillus plantarum*)的pdc (Barthelmebs et al., Appl Environ Microbiol. 67:1063-1069 (2001); Qi et al., Metab Eng 9:268-276 (2007); Rodriguez et al., J. Agric. Food Chem. 56:3068-3072 (2008)),来自产酸克雷伯菌(*Klebsiella oxytoca*)的pofK (pad) (Uchiyama et al., Biosci. Biotechnol. Biochem. 72: 116-123 (2008); Hashidoko et al., Biosci. Biotech. Biochem. 58:217-218 (1994))、戊糖片球菌(*Pedicoccus pentosaceus*) (Barthelmebs et al., Appl Environ Microbiol. 67: 1063-1069 (2001)),和来自枯草芽孢杆菌和短小芽孢杆菌的padC (Shingler et al., J. Bacteriol. 174:711-724 (1992))。来自荧光假单胞菌的阿魏酸脱羧酶也已被纯化和表征(Huang et al., J. Bacteriol. 176:5912-5918 (1994))。重要的是,这类酶已被证明是稳定的,不需要外源或内部结合的辅因子,因此使这些酶理想地适合于生物转化(Sariaslani, Annu. Rev. Microbiol. 61:51-69 (2007))。

[0879]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
pad1	AAB64980.1	1165293	酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
ohbA1	BAG32379.1	188496963	酿酒酵母(<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
pdc	AAC45282.1	1762616	植物乳杆菌(<i>Lactobacillus plantarum</i>)
pad	BAF65031.1	149941608	产酸克雷伯菌(<i>Klebsiella oxytoca</i>)
padC	NP_391320.1	16080493	枯草芽孢杆菌(<i>Bacillus subtilis</i>)
pad	YP_804027.1	116492292	戊糖片球菌(<i>Pedicoccus pentosaceus</i>)
pad	CAC18719.1	11691810	短小芽孢杆菌(<i>Bacillus pumilus</i>)

[0880] 4-草酸巴豆酸脱羧酶,催化4-草酸巴豆酸向2-氧代戊酸脱羧。该酶已经从许多微生物中分离出来并进行表征。该脱羧酶通常在与乙烯基丙酮酸水合酶的复合物中起作用。编码该酶的基因包括假单胞菌(菌株600)中的dmpH和dmpE (Shingler et al., J. Bacteriol., 174:711-724 (1992))、来自恶臭假单胞菌的xyIII和xyIIII (Kato et al., Arch. Microbiol. 168:457-463 (1997); Stanley et al., Biochemistry 39:3514 (2000); Lian et al., J. Am. Chem. Soc. 116:10403-10411 (1994))和来自真养劳尔氏菌(*Ralstonia*

eutropha) JMP134的Reut_B5691和Reut_B5692(Hughes et al., J Bacteriol, 158: 79-83 (1984))。编码来自假单胞菌(菌株600)的酶的基因已经在大肠杆菌中克隆并表达(Shingler et al., J. Bacteriol. 174: 711-724 (1992))。在恶臭假单胞菌中由xylII编码的4-草酸巴豆酸脱羧酶在与乙烯基丙酮酸水合酶的复合物中起作用。缺乏水合酶活性并保留野生型脱羧酶活性的该酶的重组形式,已经得到表征(Stanley et al., Biochem. 39: 718-26 (2000))。在皮氏罗尔斯顿菌(*Ralstonia pickettii*) (原为皮氏假单胞菌(*Pseudomonas pickettii*)) (Kukor et al., J Bacteriol. 173: 4587-94 (1991)) 中发现了类似的酶。

[0881]

基因	GenBank	GI号	生物体
<i>dmpH</i>	CAA43228.1	45685	假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>) sp. CF600
<i>dmpE</i>	CAA43225.1	45682	假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>) sp. CF600
<i>xylII</i>	YP_709328.1	111116444	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>xylIII</i>	YP_709353.1	111116469	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>Reut_B5691</i>	YP_299880.1	73539513	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>) JMP134
<i>Reut_B5692</i>	YP_299881.1	73539514	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>) JMP134
<i>xylI</i>	P49155.1	1351446	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>tbuI</i>	YP_002983475.1	241665116	皮氏罗尔斯顿菌 (<i>Ralstonia pickettii</i>)
<i>nbaG</i>	BAC65309.1	28971626	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>) KU-7

[0882] 许多已经表征的酶令氨基酸和类似化合物脱羧,包括天冬氨酸脱羧酶、赖氨酸脱羧酶和鸟氨酸脱羧酶。天冬氨酸脱羧酶(EC 4.1.1.11)使天冬氨酸脱羧形成β-丙氨酸。该酶参与泛酸生物合成,并由大肠杆菌中的基因panD编码(Dusch et al., Appl. Environ. Microbiol. 65: 1530-1539 (1999); Ramjee et al., Biochem. J. 323 (Pt 3)): 661-669 (1997); Merkel et al., FEMS Microbiol Lett. 143: 247-252 (1996); Schmitzberger et al., EMBO J. 22: 6193-6204 (2003))。来自结核分枝杆菌(Chopra et al., Protein Expr. Purif. 25: 533-540 (2002))和谷氨酸棒状杆菌(Dusch et al., Appl. Environ. Microbiol. 65: 1530-1539 (1999))的酶已经在大肠杆菌中表达和表征。

[0883]

蛋白 质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>panD</i>	P0A790	67470411	大肠杆菌 (<i>ESCHERICHIA COLI</i>) K12
<i>panD</i>	Q9X4N0	18203593	谷氨酸棒杆菌 (<i>Corynebacterium glutanicum</i>)
<i>panD</i>	P65660.1	54041701	结核分枝杆菌 (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)

[0884] 赖氨酸脱羧酶(EC 4.1.1.18)催化赖氨酸向尸胺的脱羧。该酶的两个同功酶在大肠杆菌基因组中通过基因cadA和ldcC编码。CadA参与耐酸性，并受到cadC基因产物的正调节(Lemonnier et al., *Microbiology* 144 (Pt 3) : 751-760 (1998))。CadC接受羟基赖氨酸和S-氨基乙基半胱氨酸作为替代底物，2-氨基庚二酸和6-氨基己酸作为该酶的竞争性抑制剂(Sabo et al., *Biochemistry* 13:662-670 (1974))。组成型表达的ldc基因产物的活性低于CadA(Lemonnier and Lane, *Microbiology* 144 (Pt 3) : 751-760 (1998))。最近在副溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*) (Tanaka et al., *J Appl Microbiol* 104:1283-1293 (2008))中鉴定出类似于CadA的赖氨酸脱羧酶。来自反刍月形单胞菌(*Selenomonas ruminantium*)的由ldc编码的赖氨酸脱羧酶，与真核鸟氨酸脱羧酶具有序列相似性，并且接受L-赖氨酸和L-鸟氨酸作为底物(Takatsuka et al., *Biosci.Biotechnol Biochem.* 63: 1843-1846 (1999))。对活性位点残基进行鉴定和改造，以改变酶的底物特异性(Takatsuka et al., *J Bacteriol.* 182:6732-6741 (2000))。几种鸟氨酸脱羧酶(EC 4.1.1.17)也表现出对赖氨酸和其他类似化合物的活性。这种酶存在于粘毛烟草(*Nicotiana glutinosa*) (Lee et al., *Biochem.J* 360:657-665 (2001))、乳杆菌30a (*Lactobacillus sp.*30a (Guirard et al., *J Biol.Chem.* 255:5960-5964 (1980)) 和创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*) (Lee et al., *J Biol.Chem.* 282:27115-27125 (2007)) 中。来自乳杆菌30a (Momany et al., *J Mol.Biol.* 252:643-655 (1995)) 和创伤弧菌的酶已经结晶。创伤弧菌的酶有效地催化赖氨酸脱羧，并且已经鉴定了涉及底物特异性的残基(Lee et al., *J Biol.Chem.* 282:27115-27125 (2007))。类似的酶已经在阴道毛滴虫中表征(Yarlett et al., *Biochem.J* 293 (Pt 2) : 487-493 (1993))。

[0885]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
<i>cadA</i>	AAA23536.1	145458	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>ldcC</i>	AAC73297.1	1786384	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>Ldc</i>	O50657.1	13124043	反刍月形单胞菌 (<i>Selenomonas ruminantium</i>)
<i>cadA</i>	AB124819.1	44886078	副溶血弧菌 (Vibrio parahaemolyticus)
<i>AF323910.1:1..1299</i>	AAG45222.1	12007488	粘毛烟草 (<i>Nicotiana glutinosa</i>)
<i>odcI</i>	P43099.2	1169251	乳杆菌 (<i>Lactobacillus</i>) sp. 30a
<i>VV2_1235</i>	NP_763142.1	27367615	创伤弧菌 (Vibrio vulnificus)

[0886] 步骤G和J,图11:2-氧代戊烯酸连接酶和2-羟基戊烯酸连接酶

[0887] 具有广泛底物特异性的ADP和AMP形成CoA连接酶(6.2.1)已经在文献中描述。来自火焰古球状菌(*Archaeoglobus fulgidus*)的由AF1211编码的ADP形成乙酰辅酶A合成酶(ACD, EC 6.2.1.13),证实对各种线性和支链底物起作用,包括异丁酸、异戊酸和富马酸(Musfeldt et al., JBacteriol. 184:636–644 (2002))。由AF1983编码的火焰古球状菌(*Archaeoglobus fulgidus*)中的第二个可逆ACD,也被认为具有宽的底物范围(Musfeldt et al., 同上)。来自死海盐细菌(*Haloarcula marismortui*)的酶,称为琥珀酰辅酶A合成酶,接受丙酸、丁酸和支链酸(异戊酸和异丁酸)作为底物,并证实其在正向和反向方向上起作用(Brasen et al., Arch. Microbiol 182:277–287 (2004))。由耐超高温热棒菌(*Pyrobaculum aerophilum*)PAE3250编码的ACD,所表现出的底物范围是所有表征过的ACD中最广的,与乙酸、异丁酰辅酶A(优选底物)和苯乙酰辅酶A(Brasen and Schonheit, 同上(2004))反应。可以使用定向进化或工程化修饰该酶,以在宿主生物的生理温度下起作用。来自火焰古球状菌(*Archaeoglobus fulgidus*)、死海盐细菌(*Haloarcula marismortui*)和耐超高温热棒菌(*Pyrobaculum aerophilum*)的酶已经在大肠杆菌中被克隆、功能表达和表征(Brasen and Schonheit, supra (2004); Musfeldt and Schonheit, 同上 (2002))。另外的酶由大肠杆菌中的sucCD编码,其天然催化琥珀酸形成琥珀酰辅酶A,伴随着1个ATP的消耗,这是体内可逆反应(Buck et al., Biochemistry 24:6245–6252 (1985))。已证明来自恶臭假单胞菌的酰基CoA连接酶可以在几种脂肪族底物起作用,其中包括乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸和辛酸,以及芳族化合物如苯乙酸和苯氧基乙酸(Fernandez-Valverde et al., Appl. Environ. Microbiol. 59:1149–1154 (1993))。来自豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)的相关酶,即丙二酰辅酶A合成酶(6.3.4.9),可以将几种二酸,即乙基、丙基、烯丙基-、异丙基-、二甲基-、环丙基-、环丙基亚甲基-、环丁基-和苄基-丙二酸转化到其相应的单硫代酯(Pohl et al., J. Am. Chem. Soc. 123:5822–5823 (2001))。最近,在产丙酸丙酸杆菌(*Propionibacterium acidipropionicum*)ATCC 4875 (Parizzi et al., BMC

Genomics.212;13:562) 中也鉴定了CoA依赖性乙酰辅酶A连接酶。该酶不同于AMP依赖性乙酰辅酶A合成酶,而与ADP形成琥珀酰辅酶A合成酶复合物(SCSC)相关。在痤疮丙酸杆菌KPA171202和积磷小月菌(*Microlunatus phosphovorus*)NM-1中也发现了SCSC(α和β亚基)复合物的相关基因。

[0888] 乙酸到乙酰辅酶A的酰化反应,由具有乙酰辅酶A合成酶活性的酶催化。催化该反应的两种酶是AMP形成乙酰辅酶A合成酶(EC 6.2.1.1)和ADP形成乙酰辅酶A合成酶(EC 6.2.1.13)。AMP形成乙酰辅酶A合成酶(ACS)是乙酸到乙酰辅酶A的活化的主要酶。示例性ACS酶存在于大肠杆菌(Brown et al., J.Gen.Microbiol 102:327-336 (1977))、真养劳尔氏菌(*Ralstonia eutropha*) (Priefert et al., J.Bacteriol 174:6590-6599 (1992))、热自养甲烷热杆菌(*Methanothermobacter thermautotrophicus*) (Ingram-Smith et al., Archaea.2:95-107 (2007))、肠道沙门氏菌(Gulick et al., Biochemistry 42:2866-2873 (2003))和酿酒酵母(Jogl et al., Biochemistry, 43:1425-1431 (2004))。

[0889] 来自沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*) (MatB)的甲基丙二酰辅酶A合成酶,分别将丙二酸甲酯和丙二酸转化为甲基丙二酰辅酶A和丙二酰辅酶A。这种酶的基于结构的诱变,增强了CoA合成酶对替代底物丙二酸二乙酯和丁基丙二酸的活性(Crosby et al., AEM, in press (2012))。

[0890]

基因	GenBank 登录号.	GI 号	生物体
<i>AF1211</i>	NP_070039.1	11498810	火焰古球状菌 (<i>Archaeoglobus fulgidus</i>)
<i>AF1983</i>	NP_070807.1	11499565	火焰古球状菌 (<i>Archaeoglobus fulgidus</i>)
<i>Scs</i>	YP_135572.1	55377722	死海盐细菌 (<i>Haloarcula marismortui</i>)
<i>PAE3250</i>	NP_560604.1	18313937	耐超高温热棒菌 (<i>Pyrobaculum aerophilum</i>) str. IM2
<i>sucC</i>	NP_415256.1	16128703	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>sucD</i>	AAC73823.1	1786949	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>paaF</i>	AAC24333.2	22711873	恶臭假单胞菌

[0891]

基因	GenBank 登录号.	GI 号	生物体
			(<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>matB</i>	AAC83455.1	3982573	豆科根瘤菌 (<i>Rhizobium leguminosarum</i>)
<i>Acs</i>	AAC77039.1	1790505	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>acoE</i>	AAA21945.1	141890	真养劳氏菌 (<i>Ralstonia eutropha</i>)
<i>acsI</i>	ABC87079.1	86169671	热自养甲烷热杆菌 (<i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i>)
<i>acsI</i>	AAL23099.1	16422835	肠道沙门氏菌 (<i>Salmonella enterica</i>)
<i>ACS1</i>	Q01574.2	257050994	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>LSC1</i>	NP_014785	6324716	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>LSC2</i>	NP_011760	6321683	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>bioW</i>	NP_390902.2	50812281	枯草芽孢杆菌 (<i>Bacillus subtilis</i>)
<i>bioW</i>	CAA10043.1	3850837	门多萨假单胞菌 (<i>Pseudomonas mendocina</i>)
<i>bioW</i>	P22822.1	115012	球形芽孢杆菌 (<i>Bacillus sphaericus</i>)
<i>Phl</i>	CAJ15517.1	77019264	产黄青霉菌 (<i>Penicillium chrysogenum</i>)
<i>phlB</i>	ABS19624.1	152002983	产黄青霉菌 (<i>Penicillium chrysogenum</i>)
<i>paaF</i>	AAC24333.2	22711873	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>PACID_02150</i>	YP_006979420.1	410864809	产丙酸丙酸杆菌 (<i>Propionibacterium acidipropionici</i>) ATCC

[0892]

基因	GenBank 登录号.	GI 号	生物体
			4875
PPA1754	AAT83483.1	50840816	痤疮丙酸杆菌 (<i>Propionibacterium acnes</i>) KPA171202
PPA1755	AAT83484.1	50840817	痤疮丙酸杆菌 (<i>Propionibacterium acnes</i>) KPA171202
Subunit alpha	YP_004571669.1	336116902	积磷小月菌 (<i>Microlunatus phosphovorus</i>) NM-1
Subunit beta	YP_004571668.1	336116901	积磷小月菌 (<i>Microlunatus phosphovorus</i>) NM-1
AACS	NP_084486.1	21313520	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)
AACS	NP_076417.2	31982927	智人 (<i>Homo sapiens</i>)

[0893] 4HB-CoA合成酶催化4-羟基丁酸向4-羟基丁酰辅酶A的ATP依赖转化。AMP形成4-HB-CoA合成酶，在通过二羧酸/羟基丁酸循环或3-羟基丙酸/4-羟基丁酸循环同化碳的生物中发现。具有此活性的酶已经在中性热变形菌 (*Thermoproteus neutrophilus*) 和勤奋金属球菌 (*Metallosphaera sedula*) 中得到表征 (Ramos-Vera et al., J Bacteriol 192:5329–40 (2010); Berg et al., Science 318:1782–6 (2007))。其他可以通过序列同源性推断。

[0894]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
Tneu_0420	ACB39368.1	170934107	中性热变形菌 (<i>Thermoproteus neutrophilus</i>)
Caur_0002	YP_001633649.1	163845605	橙色绿屈挠菌 (<i>Chloroflexus aurantiacus</i>) J-10-fl
Cagg_3790	YP_002465062	219850629	聚集绿屈挠菌 (<i>Chloroflexus aggregans</i>) DSM 9485
Acs	YP_003431745	288817398	嗜热产氢杆菌 (<i>Hydrogenobacter thermophilus</i>) TK-6
Pisl_0250	YP_929773.1	119871766	冰岛热棒菌 (<i>Pyrobaculum</i>)

[0895]

			islandicum) DSM 4184
Msed_1422	ABP95580.1	145702438	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)

[0896] 步骤I,图11:2-氧代戊酰辅酶A还原酶

[0897] 2-氧代戊酰辅酶A还原为2-羟基己酰基辅酶A,可以通过3-氧代酰基辅酶A还原酶(EC 1.1.1.35)来实现,其通常将3-氧基酰基辅酶A分子转化为3-羟基酰基辅酶A分子,并经常参与脂肪酸β-氧化或苯乙酸分解代谢。例如,大肠杆菌中的由fadB和fadJ编码的两种脂肪酸氧化复合物的亚基,充当3-羟基酰基辅酶A脱氢酶(Binstock et al., Methods Enzymol. 71 Pt C: 403-411 (1981))。鉴于大肠杆菌中,paah与苯乙酸降解操纵子中其他基因的邻近程度(Nogales et al.,微生物学,153:357-365 (2007))以及paah突变体不能在苯乙酸上生长的事实(Ismail et al., Eur. J Biochem. 270:3047-3054 (2003)),预期大肠杆菌paah基因也编码3-羟基酰基辅酶A脱氢酶。额外的3-氧基酰基辅酶A酶包括恶臭假单胞菌中的phaC(Olivera et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:6419-6424 (1998))和荧光假单胞菌中的paaC(Di et al., Arch. Microbiol. 188:117-125 (2007))的基因产物。在苯乙酸或苯乙烯的分解代谢过程中,这些酶催化3-羟基己二酰辅酶A向3-氧代己二酰辅酶A的可逆氧化。

[0898] 乙酰乙酰辅酶A还原酶参与了几种梭菌中的丁酸乙酰辅酶A发酵途径,并已详细研究(Jones et al., Microbiol Rev. 50:484-524 (1986))。丙酮丁醇梭菌中由hbd编码的所述酶已经在大肠杆菌中克隆并在功能上表达(Youngleson et al., J Bacteriol. 171:6800-6807 (1989))。其他证实将乙酰乙酰辅酶A还原为3-羟基丁酰辅酶A的基因,是来自生枝动胶菌(Zoogloea ramigera)的PhbB(Ploux et al., Eur. J Biochem. 174:177-182 (1988))和来自类球红细菌(Rhodobacter sphaeroides)的phaB(Alber et al., Mol. Microbiol. 61:297-309 (2006))。前一种基因是NADPH依赖性的,其核苷酸序列已被确定(Peoples et al., Mol. Microbiol. 3:349-357 (1989)),并且该基因已在大肠杆菌中表达。对该基因的底物特异性研究得出的结论是,除了乙酰乙酰辅酶A之外,它还可以接受3-氧代丙酰基辅酶A作为底物(Ploux et al., Eur. J Biochem. 174:177-182 (1988))。额外的基因包括脱氮副球菌(Paracoccus denitrificans)中的phaB、克氏梭菌中的Hbd1(C端结构域)和Hbd2(N端结构域)(Hillmer和Gottschalk, Biochim. Biophys. Acta 3334:12-23 (1974))和牛(Bos taurus)中的HSD17B10(Wakil et al., J Biol. Chem. 207:631-638 (1954))。来自脱氮副球菌(Paracoccus denitrificans)的酶已经在大肠杆菌(Yabutani et al., FEMS Microbiol Lett. 133:85-90 (1995))中功能地表达和表征。许多类似的酶已经在其他梭菌品种和勤奋金属球菌(*Metallosphaera sedula*)中发现(Berg et al., Science. 318:1782-1786 (2007))。来自热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)的酶是过氧化物酶脂肪酸β-氧化多功能酶2型(MFE-2)的组件。该蛋白质的脱氢酶B结构域对乙酰乙酰辅酶A具有催化活性。该结构域在大肠杆菌中已被功能表达,晶体结构已知,并且催化机制得到了很好的理解(Ylianttila et al., Biochem Biophys Res Commun 324:25-30 (2004); Ylianttila et

al., J Mol Biol 358:1286–1295 (2006)。接受较长酰基辅酶A底物的3-羟基酰基辅酶A脱氢酶(例如EC 1.1.1.35),通常参与β-氧化。一个例子是牛(Bos taurus)的HSD17B10(WAKIL et al., J Biol. Chem. 207:631–638 (1954))。来自钩虫贪铜菌(Cupriavidus necator)的phbB编码3-羟基戊酰基辅酶A脱氢酶活性。

[0899]

蛋白质	GENBANK ID	GI号	生物体
<i>fadB</i>	P21177.2	119811	大肠杆菌 (<i>ESCHERICHIA COLI</i>)
<i>fadJ</i>	P77399.1	3334437	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>paaH</i>	NP_415913.1	16129356	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>Hbd2</i>	EDK34807.1	146348271	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>Hbd1</i>	EDK32512.1	146345976	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>phaC</i>	NP_745425.1	26990000	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>paaC</i>	ABF82235.1	106636095	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
<i>HSD17B10</i>	O02691.3	3183024	牛 (<i>Bos taurus</i>)
<i>phbB</i>	P23238.1	130017	生枝动胶菌 (<i>Zoogloea ramigera</i>)
<i>phaB</i>	YP_353825.1	77464321	类球红细菌 (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)
<i>phaB</i>	BAA08358	675524	脱氮副球菌 (<i>Paracoccus denitrificans</i>)
<i>phbB</i>	AEI82198.1	338171145	钩虫贪铜菌 (<i>Cupriavidus necator</i>)
<i>Hbd</i>	NP_349314.1	15895965	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>Hbd</i>	AAM14586.1	20162442	拜氏梭菌 (<i>Clostridium beijerinckii</i>)
<i>Msed_1423</i>	YP_001191505	146304189	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Msed_0399</i>	YP_001190500	146303184	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Msed_0389</i>	YP_001190490	146303174	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)

[0900]

<i>Msed_1993</i>	YP_001192057	146304741	勤奋金属球菌 (<i>Metallosphaera sedula</i>)
<i>Fox2</i>	Q02207	399508	热带假丝酵母 (<i>Candida tropicalis</i>)
<i>HSD17B10</i>	O02691.3	3183024	牛 (<i>Bos taurus</i>)

[0901] 可进行该反应的其它示例性酶是2-羟基酸脱氢酶。所述酶在嗜盐古细菌地中海嗜盐菌 (*Haloferax mediterranei*) 中表征,催化2-酮羧酸的可逆立体特异性还原成相应的D-2-羟基羧酸。该酶严格依赖于NAD,并且主链青睐具有3-4个碳原子的底物(丙酮酸和2-氧代丁酸)。对4-甲基-2-氧代戊酸的活性低10倍。来自大肠杆菌的两种这样的酶,由苹果酸脱氢酶(*mdh*)和乳酸脱氢酶(*ldhA*)编码。此外,来自真养劳尔氏菌 (*Ralstonia eutrophpha*) 的乳酸脱氢酶,已经证实对各种链长的2-酮酸具有高活性,包括乳酸、2-氧代丁酸、2-氧代戊酸和2-氧戊二酸 (Steinbuchel et al., Eur.J.Biochem.130:329-334 (1983))。 α -酮己二酸转化成 α -羟基己二酸可以由2-酮己二酸还原酶催化,这是一种报道在大鼠和人胎盘中发现的酶 (Suda et al., Arch.Biochem.Biophys.176:610-620 (1976); Suda et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.77:586-591 (1977))。另外的氧化还原酶是来自人心脏的线粒体3-羟基丁酸脱氢酶(*bdh*),其已经被克隆和表征 (Marks et al., J.Biol.Chem.267: 15459-15463 (1992))。拜氏梭菌 (Ismaiel et al., J.Bacteriol.175:5097-5105 (1993)) 和布氏嗜热无氧杆菌 (Lamed et al., Biochem.J.195:183-190 (1981); Peretz et al., Biochemistry.28:6549-6555 (1989)) 的酒精脱氢酶将丙酮转化成异丙醇。甲基乙基酮还原酶催化MEK还原为2-丁醇。示例性的MEK还原酶可以在深红红球菌 (*Rhodococcus ruber*) (Kosjek et al., Biotechnol Bioeng.86:55-62 (2004)) 和强烈热球菌 (*Pyrococcus furiosus*) (van der et al., Eur.J.Biochem.268:3062-3068 (2001)) 中发现。

[0902]

基因	GenBank 登录号.	GI 号	生物体
<i>mdh</i>	AAC76268.1	1789632	大肠杆菌 (<i>ESCHERICHIA COLI</i>)
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	16129341	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>ldh</i>	YP_725182.1	113866693	真养劳尔氏菌 (<i>Ralstonia eutrophpha</i>)
<i>bdh</i>	AAA58352.1	177198	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
<i>adh</i>	AAA23199.2	60592974	拜氏梭菌 (<i>Clostridium Beijerinckii</i>) NRRL B593
<i>adh</i>	P14941.1	113443	布氏嗜热无氧杆菌 (<i>Thermoanaerobacter brockii</i>)

[0903]

			HTD4
sadh	CAD36475	21615553	深红红球菌 (<i>Rhodococcus ruber</i>)
adhA	AAC25556	3288810	强烈热球菌 (<i>Pyrococcus furiosus</i>)
BM92_14160	AHZ23715.1	631806019	地中海嗜盐菌 (<i>Haloferax mediterranei</i>) ATCC 33500

[0904] 步骤M,图11:2,4-戊二烯酰辅酶A水解酶

[0905] 2,4-戊二烯酰辅酶A的辅酶A水解,可以由EC类3.1.2的CoA水解酶或硫酯酶催化。具有广泛底物范围的几种CoA水解酶,是用于水解这些中间体的合适的酶。例如,由来自褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) 脑的acot12编码的酶 (Robinson et al., Biochem.Biophys.Res.Commun.71:959-965 (1976)) 可以与丁酰辅酶A、己酰辅酶A和丙二酰辅酶A反应。由acot8编码的人二羧酸硫酯酶,对戊二酰辅酶A、己二酰辅酶A、辛二酰辅酶A、癸二酰辅酶A和十二烷二酰辅酶A具有活性 (Westin et al., J.Biol.Chem.280:38125-38132 (2005)) 有火星。与该酶最接近的大肠杆菌同系物tesB,也可以水解一系列CoA巯基酯 (Naggert et al., J Biol Chem 266:11044-11050 (1991))。类似的酶也已经在大鼠肝脏中表征 (Deana R., Biochem Int 26:767-773 (1992))。在大肠杆菌中具有水解酶活性的其它酶,包括ybgC、paaI和ybdB (Kuznetsova et al., FEMS Microbiol Rev, 2005, 29 (2) :263-279; Song et al., J Biol Chem, 2006, 281 (16) :11028-38)。虽然其序列尚未报道,但是豌豆叶线粒体的酶具有广泛的底物特异性,对乙酰辅酶A、丙酰辅酶A、丁酰辅酶A、棕榈酰辅酶A、油酰辅酶A、琥珀酰辅酶A和巴豆酰辅酶A证实有活性 (Zeiher et al., Plant.Physiolog.94:20-27 (1990))。来自酿酒酵母的乙酰辅酶A水解酶ACH1,代表另一种候选水解酶 (Buu et al., J.Biol.Chem.278:17203-17209 (2003))。

[0906]

基因名称	GenBank Accession #	GI#	生物体
acot12	NP_570103.1	18543355	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
tesB	NP_414986	16128437	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
acot8	CAA15502	3191970	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
acot8	NP_570112	51036669	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
tesA	NP_415027	16128478	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
ybgC	NP_415264	16128711	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
paaI	NP_415914	16129357	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
ybdB	NP_415129	16128580	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0907]

<i>ACH1</i>	NP_009538	6319456	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>yciA</i>	NP_415769.1	16129214	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0908] 另一种候选水解酶是来自发酵氨基酸球菌的戊二酸CoA转移酶。该酶通过定点诱变转化成对戊二酰辅酶A、乙酰辅酶A和3-丁烯酰辅酶A具有活性的酰基辅酶A水解酶 (Mack et al., FEBS Lett. 405: 209–212 (1997))。这表明编码琥珀酰辅酶A:3-酮酸-CoA转移酶和乙酰乙酰辅酶A:乙酰CoA转移酶的酶,也可以作为该反应步骤的候选物,但是需要某些突变来改变它们的功能。

[0909]

基因名称	GenBank Accession #	GI#	生物体
<i>gctA</i>	CAA57199	559392	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)
<i>gctB</i>	CAA57200	559393	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)

[0910] 另外的水解酶包括3-羟基异丁酰辅酶A水解酶,其被描述为在缬氨酸降解期间有效催化3-羟基异丁酰辅酶A向3-羟基异丁酸转化 (Shimomura et al., J Biol Chem. 269: 14248–14253 (1994))。编码这种酶的基因包括褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) (Shimomura et al., Methods Enzymol. 324: 229–240 (2000)) 和智人 (Shimomura et al., 同上) 的 *hibch*。也可以通过序列同源性鉴定类似的候选基因,包括酿酒酵母的 *hibch* 和蜡状芽孢杆菌的 *BC_2292*。

[0911]

基因名称	GenBank Accession #	GI#	生物体
<i>hibch</i>	Q5XIE6.2	146324906	褐家鼠 (<i>Rattus norvegicus</i>)
<i>hibch</i>	Q6NVY1.2	146324905	智人 (<i>Homo sapiens</i>)
<i>hibch</i>	P28817.2	2506374	酿酒酵母 (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)
<i>BC_2292</i>	AP09256	29895975	蜡样芽孢杆菌 (<i>Bacillus cereus</i>)

[0912] 甲基丙二酰辅酶A通过甲基丙二酰辅酶A水解酶 (EC 3.1.2.7) 转化为丙二酸甲酯。该酶从褐家鼠的肝脏分离,对丙二酰辅酶A和丙酰辅酶A作为替代底物也具有活性 (Kovachy et al., J. Biol. Chem., 258: 11415–11421 (1983))。

[0913] 步骤H、K和N,图11:2-氧代戊烯酸:乙酰CoA转移酶、2-羟基戊烯酸:乙酰辅酶A CoA转移酶、2,4-戊二烯酰辅酶A:乙酰辅酶A CoA转移酶

[0914] 若干转化需要CoA转移酶将羧酸活化成它们相应的酰基辅酶A衍生物。CoA转移酶

已经在开放文献中描述，并且代表这些步骤的合适的候选物。这些在下面描述。

[0915] 克氏梭菌 (*Clostridium kluyveri*) 的 cat1、cat2 和 cat3 的基因产物，已经证实分别显示出琥珀酰辅酶 A、4-羟基丁酰辅酶 A 和 丁酰 CoA 转移酶活性 (Seedorf et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:2128–2133 (2008); Sohling et al., J. Bacteriol. 178: 871–880 (1996))。类似的 CoA 转移酶活性也存在于阴道毛滴虫、布氏锥虫、氨基丁酸梭菌和牙龈卟啉单胞菌中 (Riviere et al., J. Biol. Chem. 279:45337–45346 (2004)); van Grinsven et al., J. Biol. Chem. 283:1411–1418 (2008))。

[0916]

蛋白质	GenBank ID	GI 号	生物体
cat1	P38946.1	729048	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
cat2	P38942.2	172046066	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
cat3	EDK35586.1	146349050	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	阴道毛滴虫 (<i>Trichomonas vaginalis</i>) G3
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	布氏锥虫 (<i>Trypanosoma brucei</i>)
cat2	CAB60036.1	6249316	氨基丁酸梭菌 (<i>Clostridium aminobutyricum</i>)
cat2	NP_906037.1	34541558	牙龈卟啉单胞菌 (<i>Porphyromonas gingivalis</i>) W83

[0917] 使用乙酰辅酶 A 作为 CoA 供体的脂肪酰 CoA 转移酶，是由大肠杆菌 atoA (α 亚基) 和 atoD (β 亚基) 基因编码的乙酰乙酰 CoA 转移酶 (Korolev et al., Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 58:2116–2121 (2002); Vanderwinkel et al., 33:902–908 (1968))。该酶在链长度 C3–C6 的底物上具有宽底物范围 (Sramek et al., Arch Biochem Biophys 171:14–26 (1975))，并已显示从各种支链和线性 3– 氧代和酰基辅酶 A 底物将 CoA 部分转到乙酸，包括异丁酸 (Matthies et al., Appl Environ. Microbiol 58:1435–1439 (1992))、戊酸 (Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902–908 (1968)) 和 丁酸 (Vanderwinkel et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902–908 (1968))。该酶由乙酰乙酸在转录水平诱导，因此调节控制的修饰可能是将该酶工程化成途径所必需的 (Pauli et al., Eur. J. Biochem. 29:553–562 (1972))。类似的酶存在于谷氨酸棒状杆菌 ATCC 13032 (Duncan et al., Appl Environ. Microbiol, 68:5186–5190 (2002))、丙酮丁醇梭菌 (Cary et al., Appl Environ. Microbiol 56:1576–1583 (1990)); Wiesenborn et al., et al., Appl Environ. Microbiol 55:323–329 (1989)) 和 梭菌 (*Clostridium*

saccharoperbutylacetonicum) (Kosaka et al., Biosci.Biotechnol.Biochem.71:58–68 (2007)) 中。

[0918]

基因	GI #	登录号.	生物体
<i>atoA</i>	2492994	P76459.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>atoD</i>	2492990	P76458.1	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>actA</i>	62391407	YP_226809.1	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>)
<i>cgo592</i>	62389399	YP_224801.1	谷氨酸棒状杆菌 (<i>Corynebacterium glutamicum</i>)
<i>ctfA</i>	15004866	NP_149326.1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>ctfB</i>	15004867	NP_149327.1	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium acetobutylicum</i>)
<i>ctfA</i>	31075384	AAP42564.1	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>
<i>ctfB</i>	31075385	AAP42565.1	梭菌 <i>Clostridium saccharoperbutylacetonicum</i>

[0919] 步骤L,图11:2-羟基戊烯酰辅酶A脱水酶

[0920] 2-羟基戊烯酰辅酶A的脱水,可以通过一种特殊类型的氧敏感酶催化,其通过自由基机制使2-羟基酰基辅酶A衍生物脱水(Buckel and Golding, Annu.Rev.Microbiol.60: 27–49 (2006); Buckel et al., Curr.Opin.Chem.Biol.8:462–467 (2004); Buckel et al., Biol.Chem.386:951–959 (2005); Kim et al., FEBS J.272:550–561 (2005); Kim et al., FEMS Microbiol.Rev.28:455–468 (2004); Zhang et al., Microbiology 145 (Pt 9):2323–2334 (1999))。这种酶的一个示例是来自丙酸梭菌 (*Clostridium propionicum*) 的乳酰基辅酶A脱水酶,其催化乳酰基辅酶A的脱水以形成丙烯酰辅酶A (Kuchta and Abeles, J.Biol.Chem.260:13181–13189 (1985); Hofmeister and Buckel, Eur.J.Biochem.206: 547–552 (1992))。另外的示例是由发酵氨基酸球菌 (*Acidaminococcus fermentans*) 的hgdABC编码的2-羟基戊二酰辅酶A脱水酶 (Muëller and Buckel, Eur.J.Biochem.230:698–704 (1995); Schweiger et al., Eur.J.Biochem.169:441–448 (1987))。从发酵氨基酸球菌中纯化脱水酶,产生A和D两种组件。组件A (HgdC) 充当脱水的活化剂或引发剂。组件D是实际的脱水酶,由HgdAB编码。这种酶的变异已经在共生梭菌 (*Clostridium symbiosum*) 和具核梭菌 (*Fusobacterium nucleatum*) 中发现。来自发酵氨基酸球菌的活化剂组件A,对来自共生梭菌的实际脱水酶(组件D)有活性,据报道其比活度为每秒60,相比之下,来自发酵氨基酸球菌的组件D为每分钟10。另一个示例是艰难梭菌的由hadBC催化并由hadI活化的2-羟基异己酰基辅酶A脱水酶 (Darley et al., FEBS J.272:550–61 (2005))。完整的丙酸梭菌 (*C.propionicum*) 乳酰基辅酶A脱水酶的序列,尚未列在公开的数据库中。但是,β亚基的序列

对应于GenBank登录号AJ276553 (Selmer et al., Eur J Biochem, 269:372-80 (2002))。来自生孢梭菌 (*Clostridium sporogens*) 的脱水酶, 将苯基乳酰辅酶A脱水为肉桂酰辅酶A, 也是该步骤的潜在候选酶。该酶由三个亚基组成, 其中一个是CoA转移酶。第一步包括从肉桂酰辅酶A到苯基乳酸的CoA转移, 从而形成苯基乳酰-CoA和肉桂酸。产品肉桂酸被释放。然后, 所述脱水酶将苯基乳酰-CoA转化成肉桂酰辅酶A。F1dA是CoA转移酶, F1dBC与来自发酵氨基酸球菌的脱水酶(组件D)的 α 和 β 亚基相关。

[0921]

基因	GenBank 登录号.	GI 号	生物体
<i>hgda</i>	P11569	296439332	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)
<i>hgdb</i>	P11570	296439333	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)
<i>hgdc</i>	P11568	2506909	发酵氨基酸球菌 (<i>Acidaminococcus fermentans</i>)
<i>hgda</i>	AAD31676.1	4883832	共生梭菌 (<i>Clostridum symbiosum</i>)
<i>hgdb</i>	AAD31677.1	4883833	共生梭菌 (<i>Clostridum symbiosum</i>)
<i>hgdc</i>	AAD31675.1	4883831	共生梭菌 (<i>Clostridum symbiosum</i>)
<i>hgda</i>	EDK88042.1	148322792	具核梭菌(<i>Fusobacterium nucleatum</i>)
<i>hgdb</i>	EDK88043.1	148322793	具核梭菌(<i>Fusobacterium nucleatum</i>)
<i>hgdc</i>	EDK88041.1	148322791	具核梭菌(<i>Fusobacterium nucleatum</i>)
<i>FldB</i>	Q93AL9.1	75406928	生孢梭菌 (<i>Clostridium sporogens</i>)
<i>FldC</i>	Q93AL8.1	75406927	生孢梭菌 (<i>Clostridium</i>)

[0922]

			<i>sporogens</i>)
<i>hadB</i>	YP_001086863	126697966	艰难梭菌 (<i>Clostridium difficile</i>)
<i>hadC</i>	YP_001086864	126697967	艰难梭菌 (<i>Clostridium difficile</i>)
<i>hadI</i>	YP_001086862	126697965	艰难梭菌 (<i>Clostridium difficile</i>)
<i>lcdB</i>	AJ276553	7242547	丙酸梭菌 (<i>Clostridium propionicum</i>)

[0923] 另一种可能进行这种生物转化的脱水酶,是恶臭假单胞菌的烯酰辅酶A水合酶(4.2.1.17),其由催化3-羟基丁酰辅酶A转化为巴豆酰辅酶A的ech编码(Roberts et al., Arch.Microbiol 117:99-108 (1978))。这种转化也由丙酮丁醇梭菌的crt基因产物、克氏梭菌和其他梭菌生物的crt1基因产物催化(Atsumi et al., Metab Eng 10:305-311 (2008); Boynton et al., J Bacteriol.178:3015-3024 (1996); Hillmer et al., FEBS Lett.21:351-354 (1972))。另外的烯酰辅酶A水合酶候选物是:恶臭假单胞菌的phaA和phaB,来自荧光假单胞菌的paaA和paaB(Olivera et al., Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A 95:6419-6424 (1998))。预测沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)中pimF的基因产物,编码参与庚二酰基辅酶A降解的烯酰辅酶A水合酶(Harrison et al., Microbiology 151:727-736 (2005))。最后,已经证实许多大肠杆菌基因表现出烯酰辅酶A水合酶的功能,包括maoC(Park et al., J Bacteriol.185:5391-5397 (2003))、paaF(Ismail et al., Eur.J Biochem.270:3047-3054 (2003); Park et al., Appl.Biochem.Biotechnol 113-116:335-346 (2004); Park et al., Biotechnol Bioeng 86:681-686 (2004))和paaG(Ismail et al., Eur.J Biochem.270:3047-3054 (2003); Park and Lee, Appl.Biochem.Biotechnol 113-116:335-346 (2004); Park and Yup, Biotechnol Bioeng 86:681-686 (2004))。

[0924]

基因	GenBank 登录号.	GI 号	生物体
<i>ech</i>	NP_745498.1	26990073	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>)
<i>crt</i>	NP_349318.1	15895969	丙酮丁醇梭菌 (<i>Clostridium Acetobutylicum</i>)
<i>crtl</i>	YP_001393856	153953091	克氏梭菌 (<i>Clostridium kluyveri</i>)
<i>phaA</i>	NP_745427.1	26990002	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas</i>

[0925]

			<i>putida</i>) KT2440
<i>phaB</i>	NP_745426.1	26990001	恶臭假单胞菌 (<i>Pseudomonas putida</i>) KT2440
<i>paaA</i>	ABF82233.1	106636093	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
<i>paaB</i>	ABF82234.1	106636094	荧光假单胞菌 (<i>Pseudomonas fluorescens</i>)
<i>maoC</i>	NP_415905.1	16129348	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>paaF</i>	NP_415911.1	16129354	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)
<i>paaG</i>	NP_415912.1	16129355	大肠杆菌 (<i>Escherichia coli</i>)

[0926] 可选地, fadA和fadB的大肠杆菌基因产物,编码参与脂肪酸氧化的多酶复合物,其表现出烯酰辅酶A水合酶活性(Yang et al., Biochemistry 30:6788-6795 (1991); Yang, JBacteriol. 173:7405-7406 (1991); Nakahigashi et al., Nucleic Acids Res. 18:4937 (1990))。敲除由fadR编码的负调节因子,可用于活化fadB基因产物(Sato et al., J Biosci. Bioeng. 103:38-44 (2007))。fadI和fadJ基因编码相似的功能,并且在无氧条件下天然表达(Campbell et al., Mol. Microbiol. 47:793-805 (2003))。

[0927]

蛋白质	GenBank ID	GI号	生物体
fadA	YP_026272.1	49176430	大肠杆菌 (ESCHERICHIA COLI)
fadB	NP_418288.1	16131692	大肠杆菌 (Escherichia coli)
fadI	NP_416844.1	16130275	大肠杆菌 (Escherichia coli)
fadJ	NP_416843.1	16130274	大肠杆菌 (Escherichia coli)
fadR	NP_415705.1	16129150	大肠杆菌 (Escherichia coli)

[0928] 在本申请中,引用了各种出版物。这些出版物的(包括GenBank和GI号出版物)的公开内容全文通过引用并入本申请中,以更全面地描述本发明所属领域的现状。尽管已经参考上面提供的实施例描述了本发明,但是应当理解,在不脱离本发明的精神的前提下,可以进行各种改进。

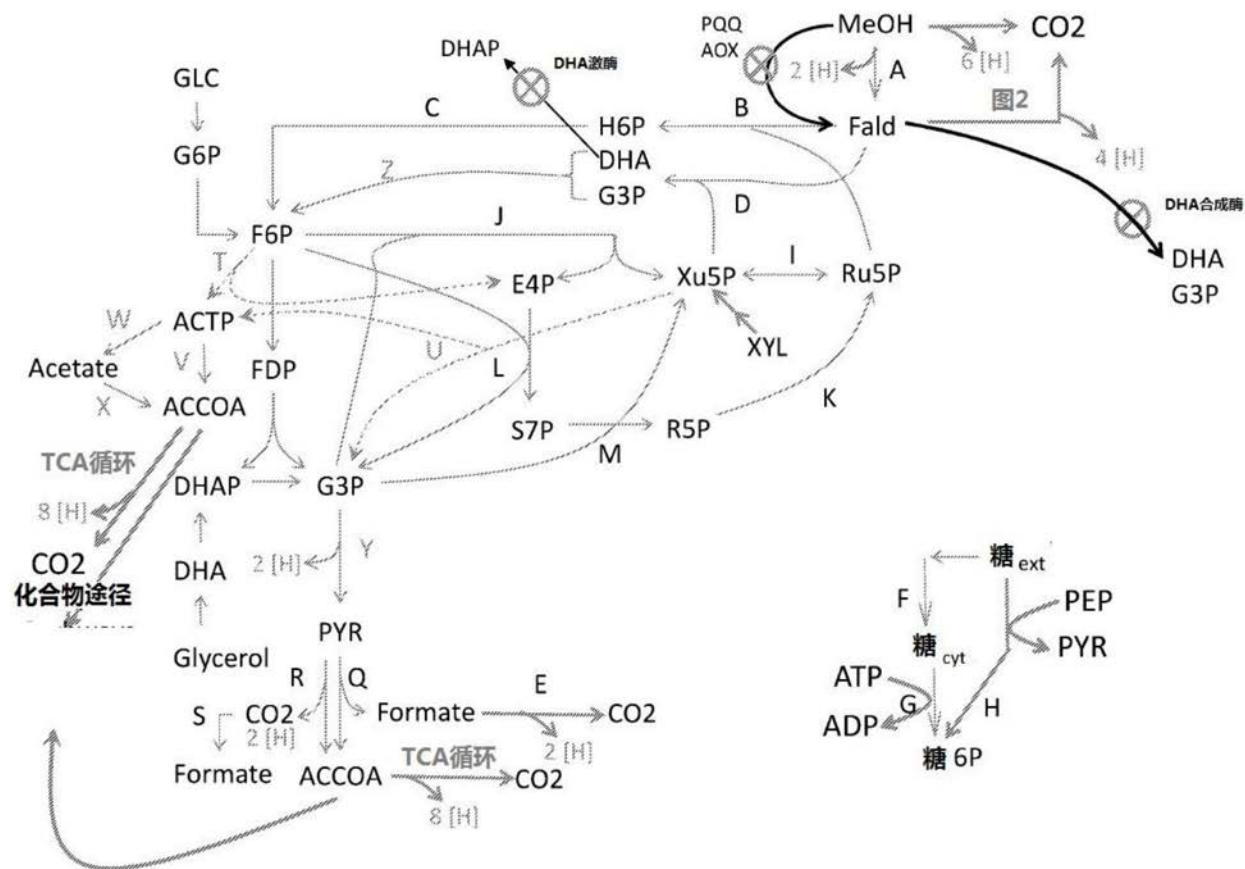
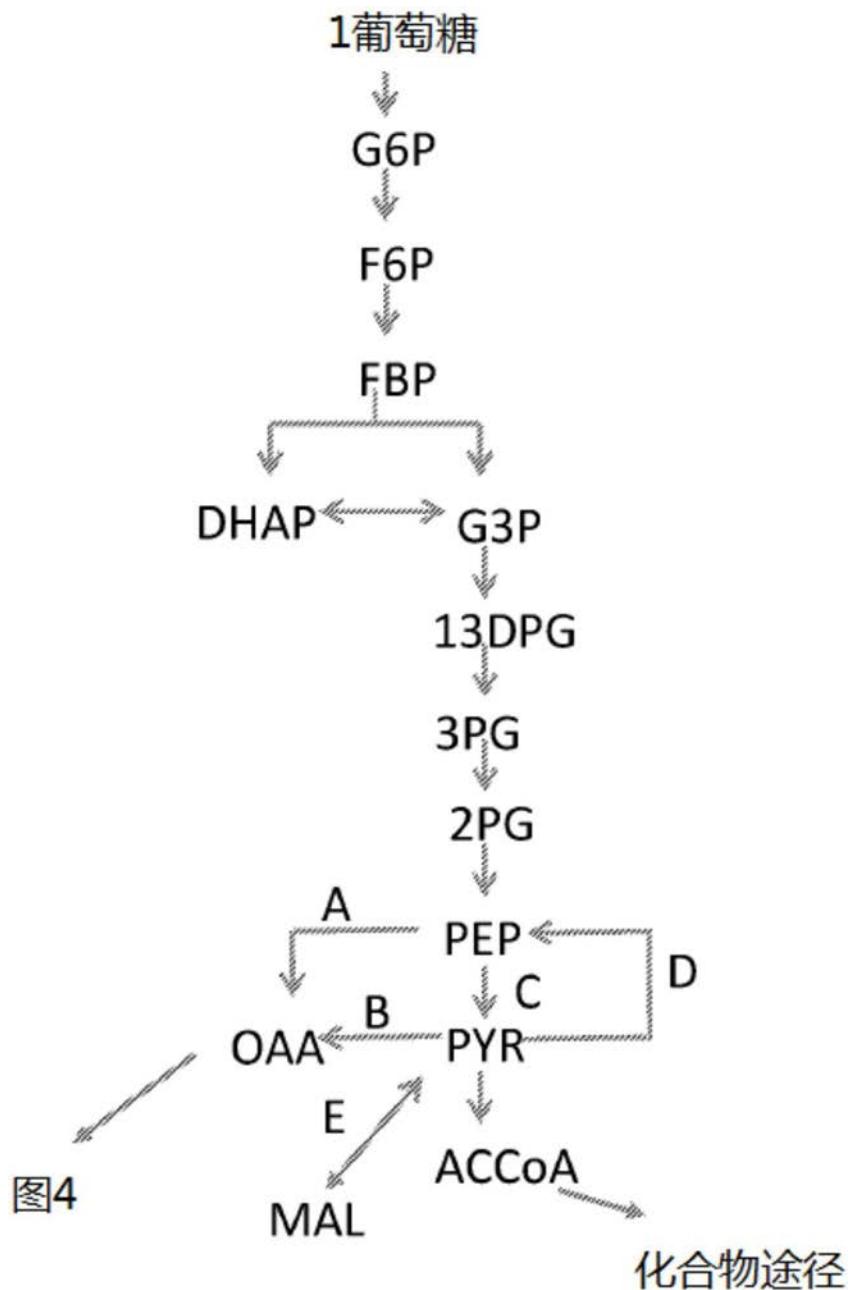


图1



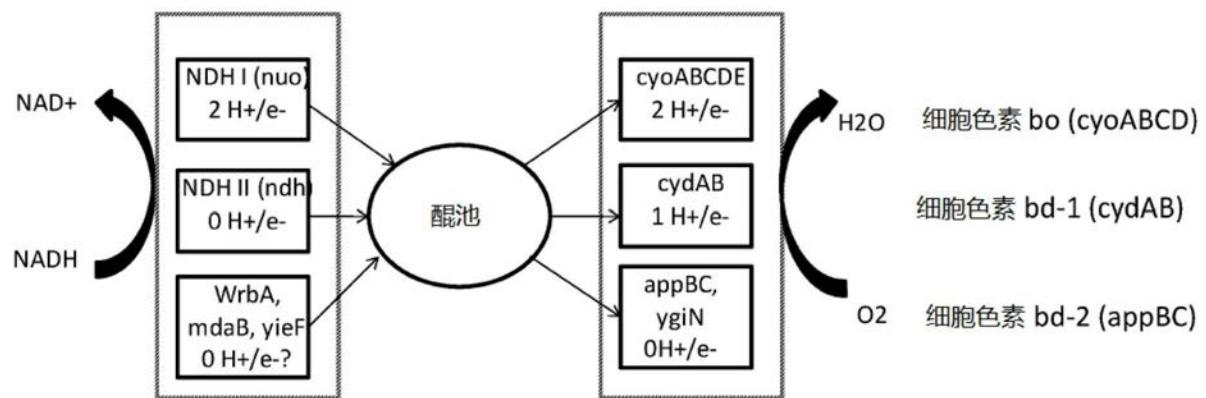


图3

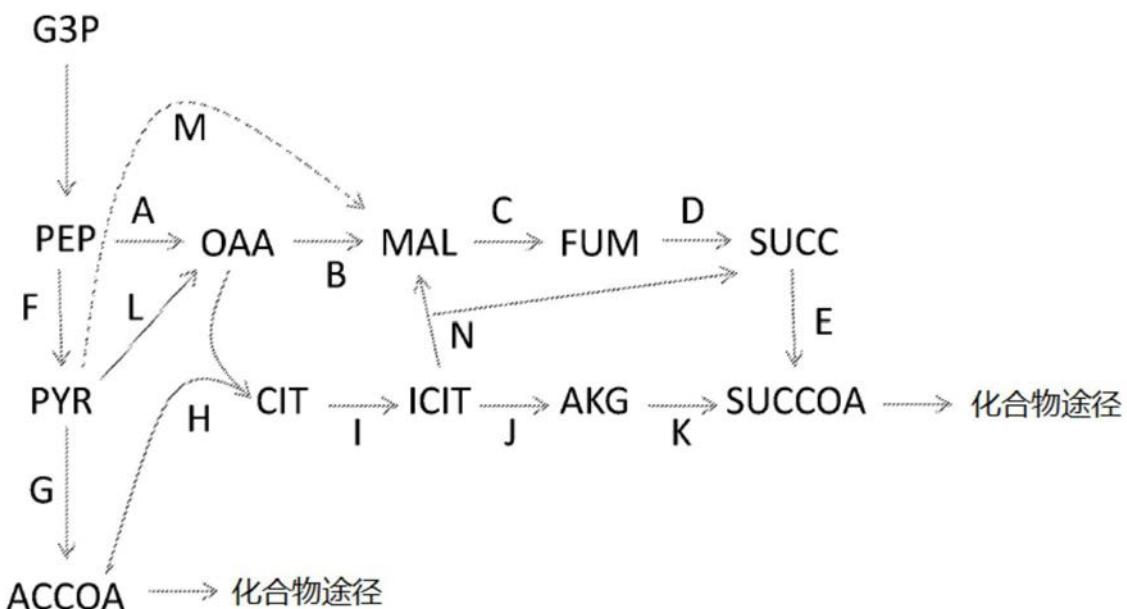


图4

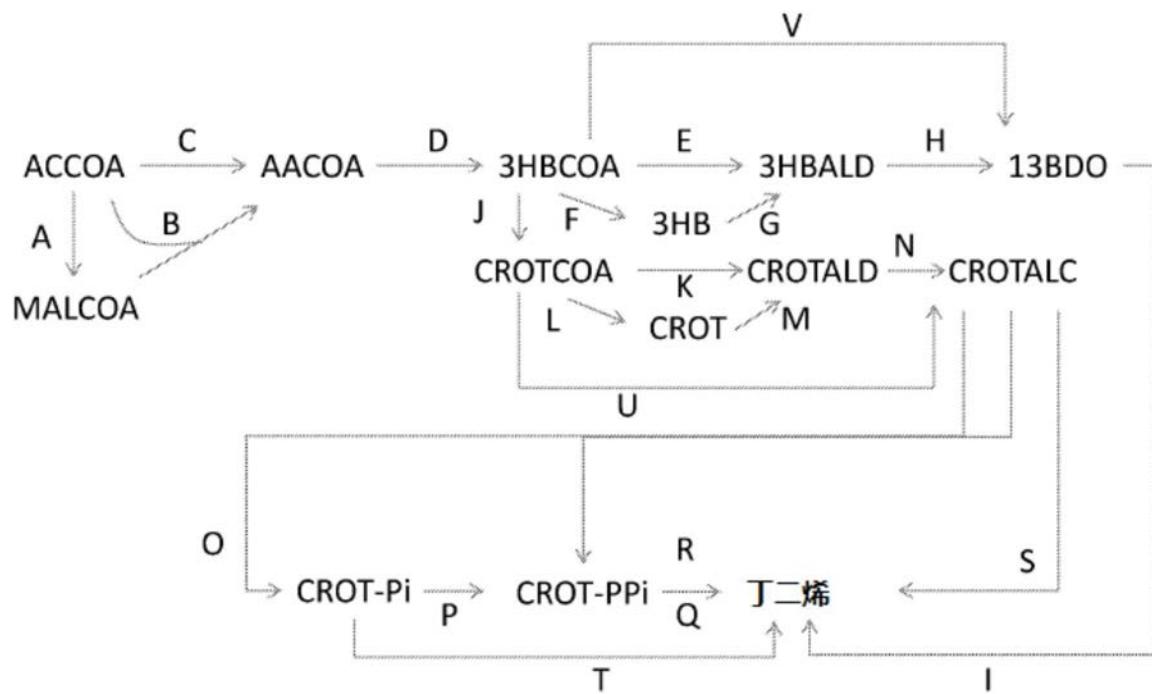


图5

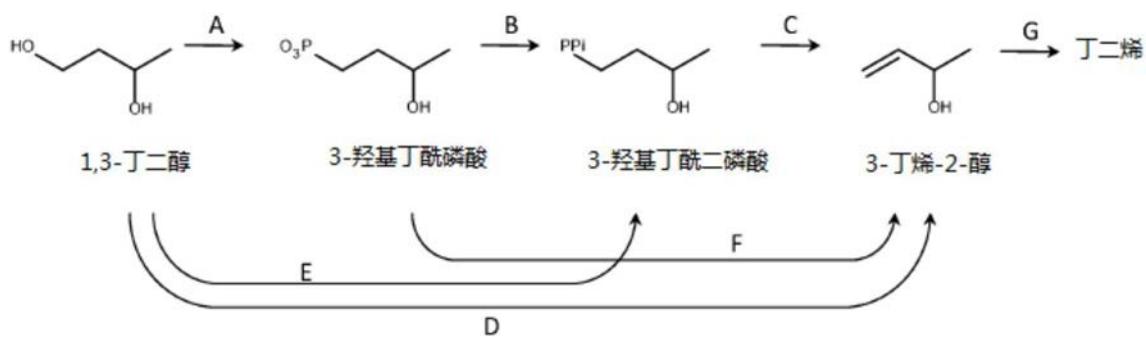


图6

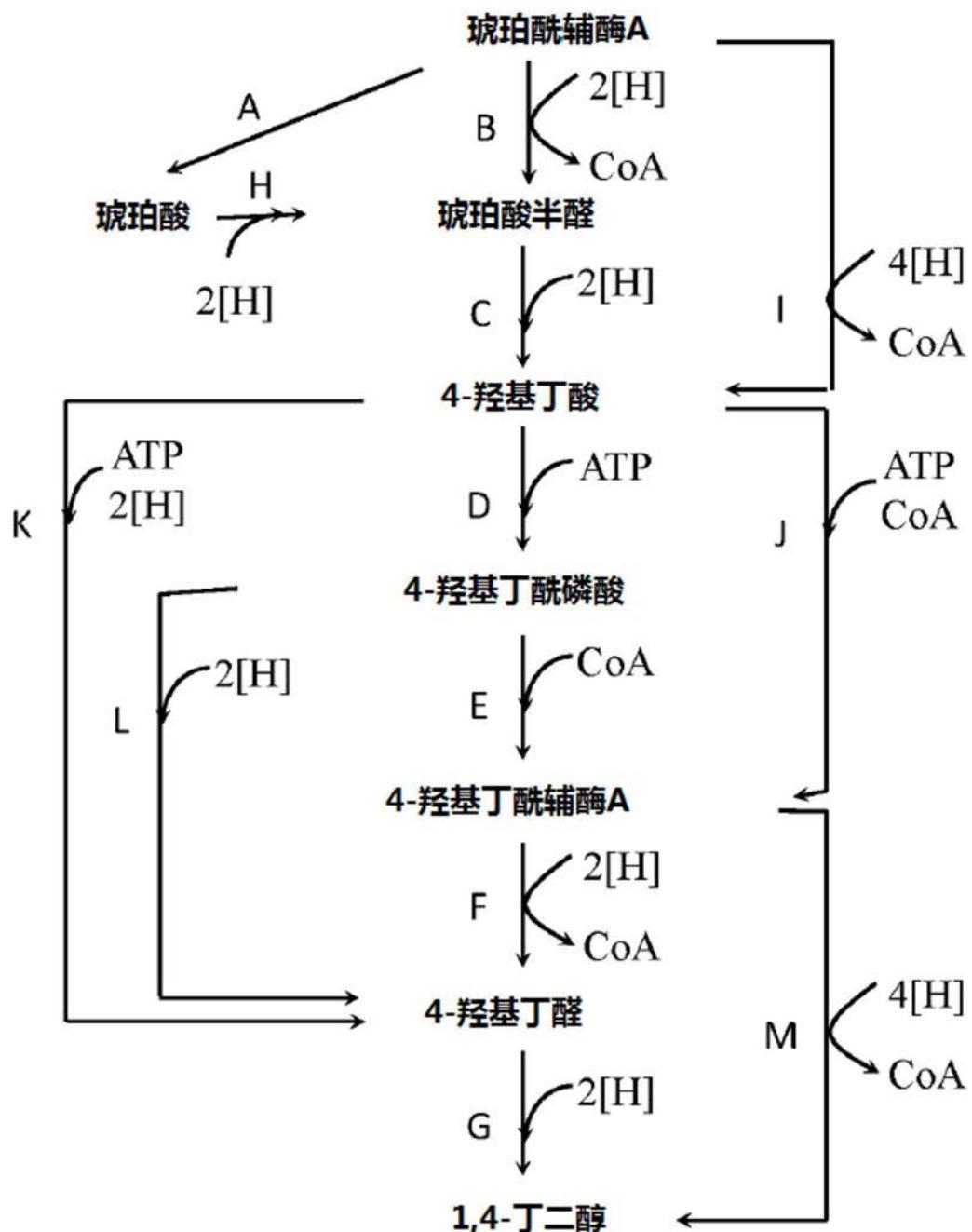


图7

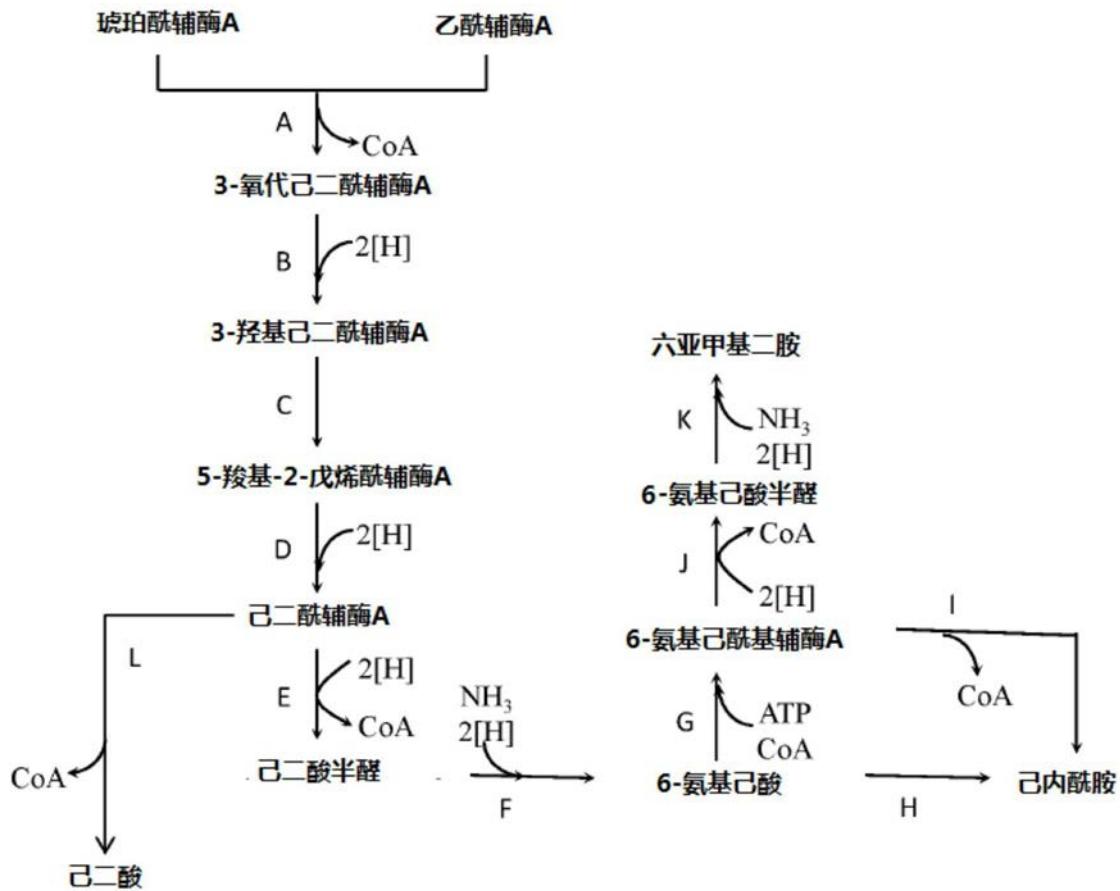


图8

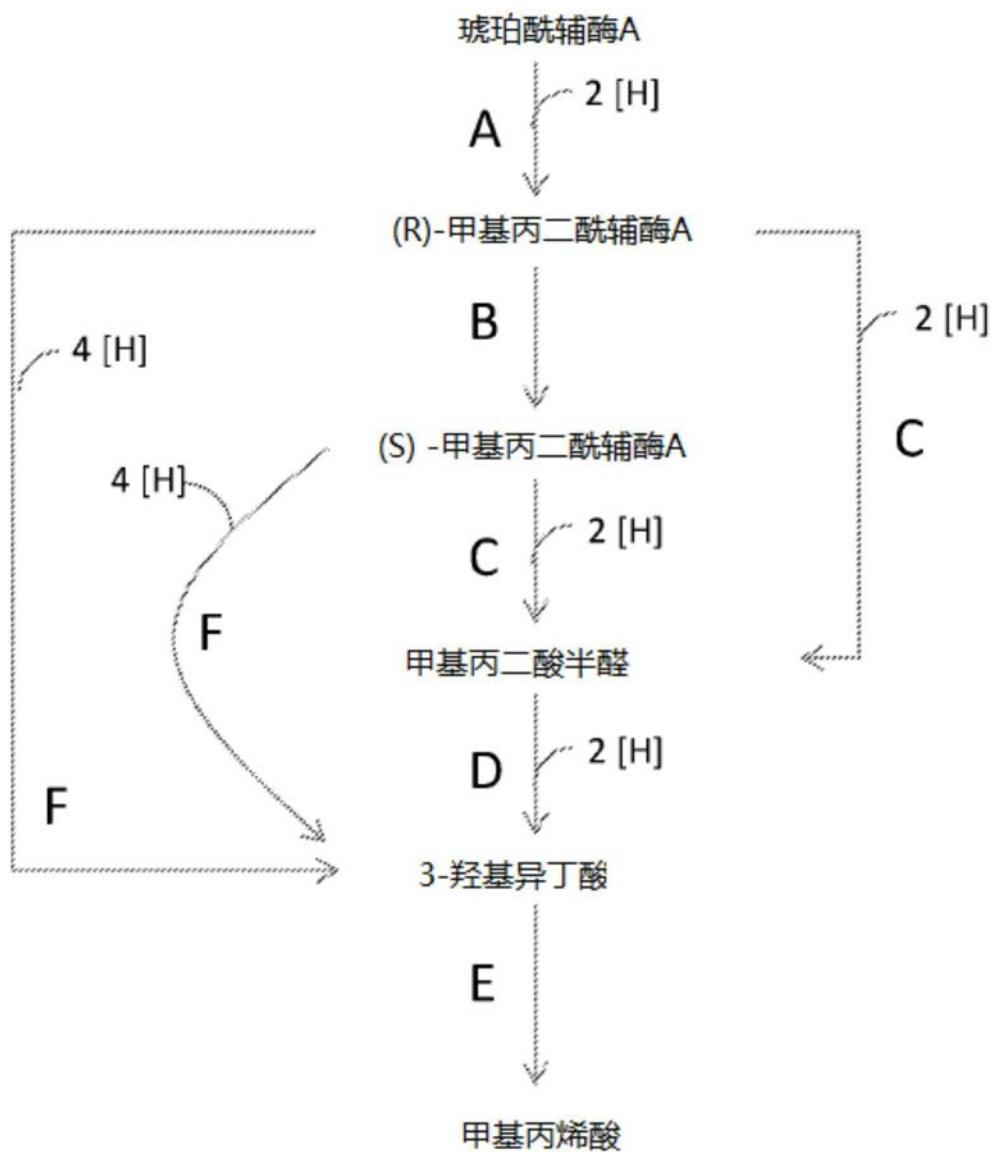


图9

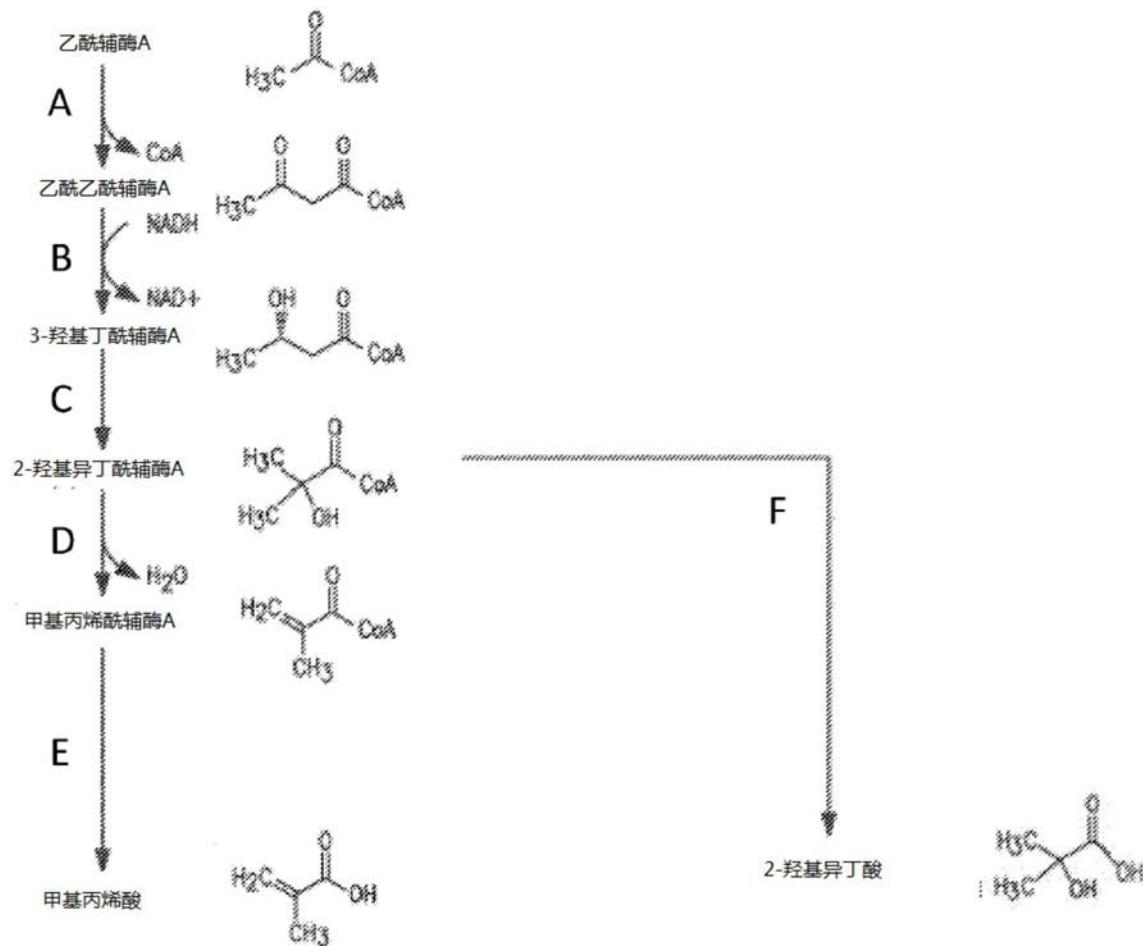


图10

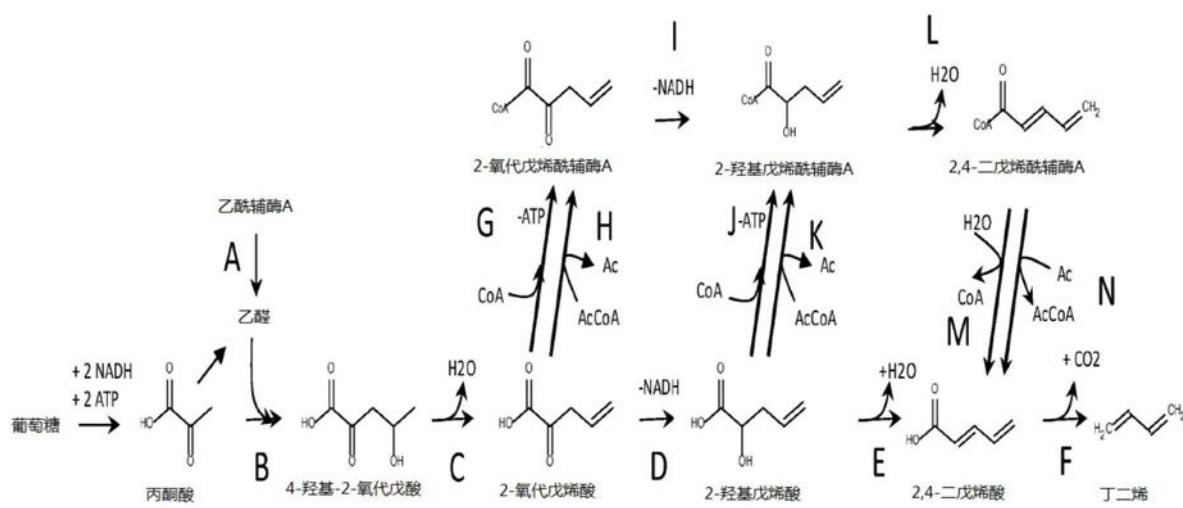


图11

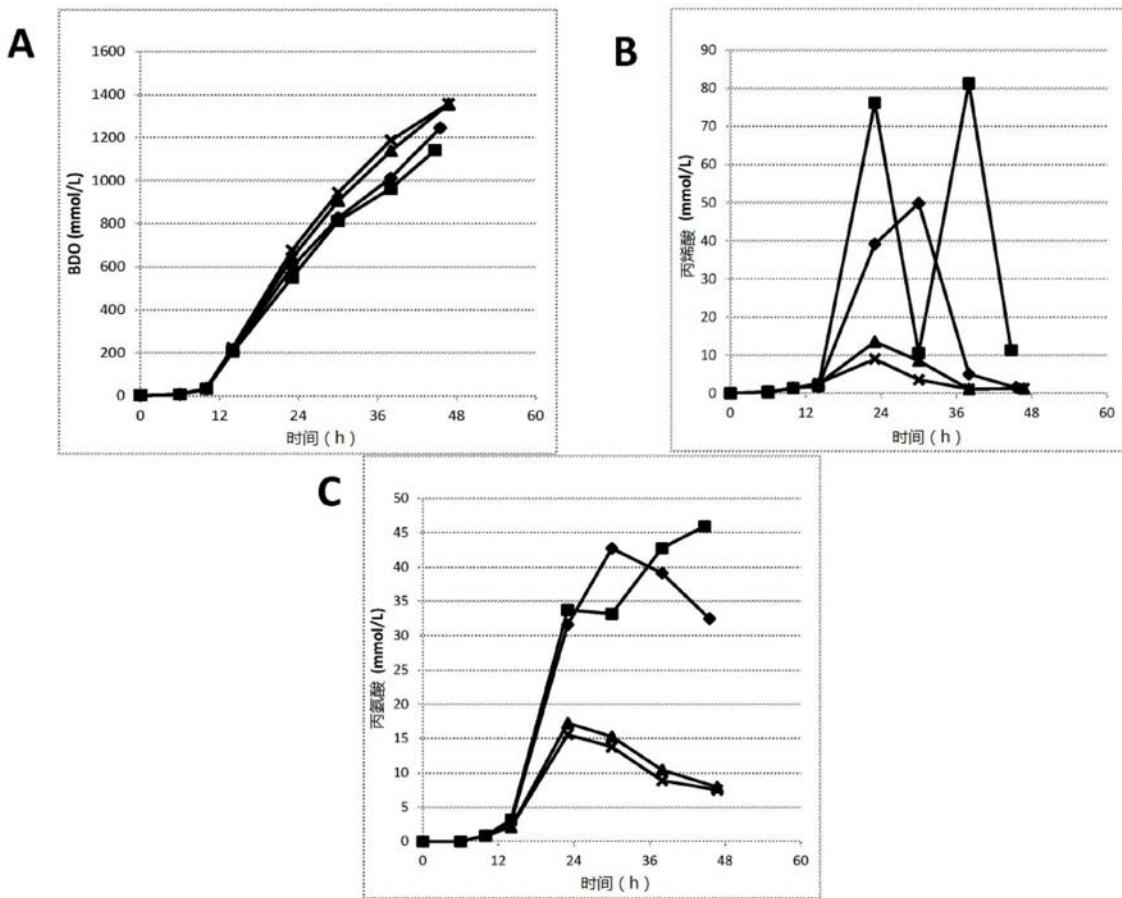


图12

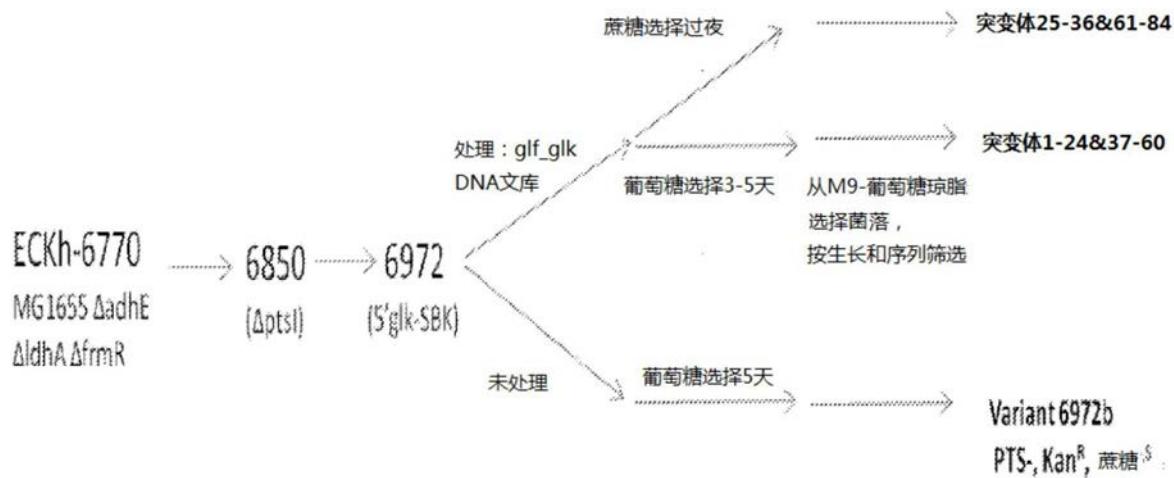


图13

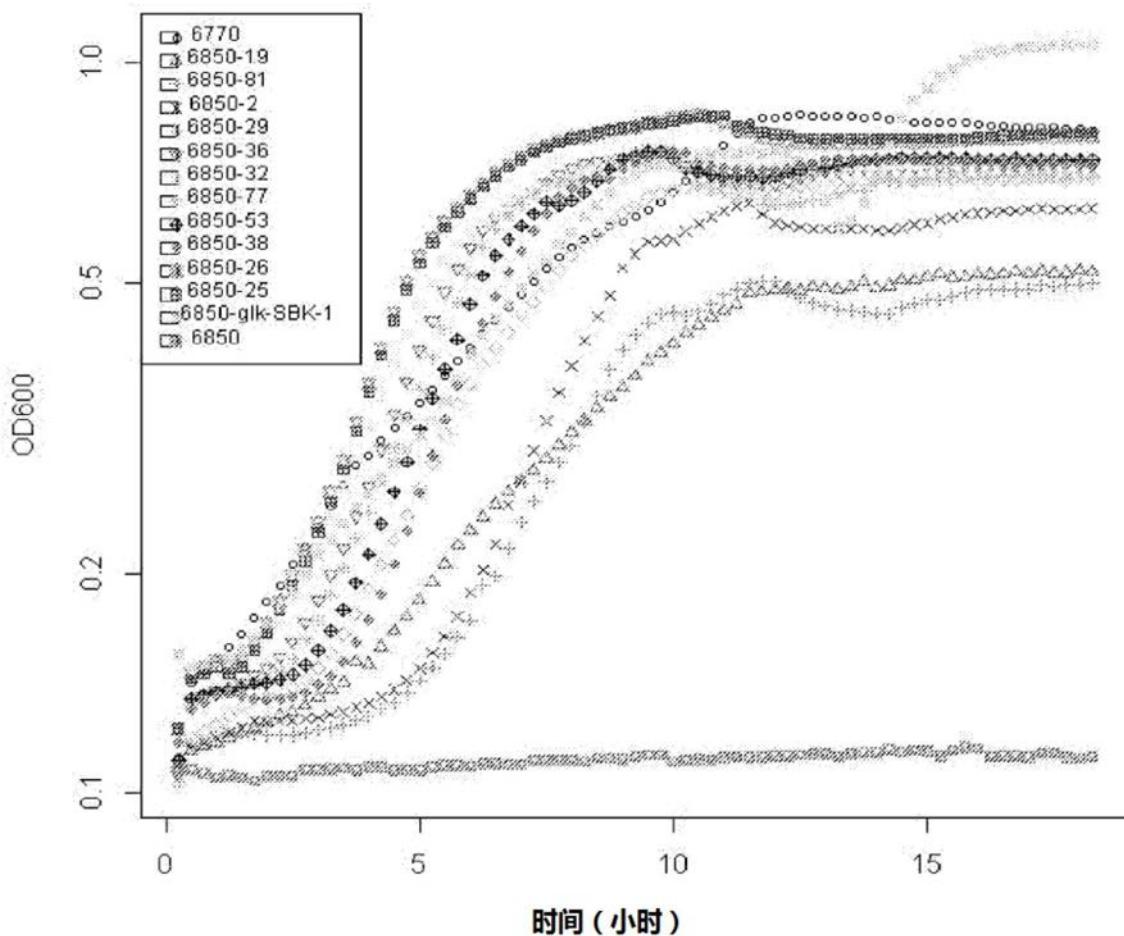
MM9 + 2 % 葡萄糖

图14A

