



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104884629 A

(43) 申请公布日 2015. 09. 02

(21) 申请号 201380065497. 9 *C12P 7/40*(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 10. 14 *C12P 7/64*(2006. 01)

(30) 优先权数据 *C07C 53/00*(2006. 01)
61/714, 144 2012. 10. 15 US *C07C 57/00*(2006. 01)
C07C 29/00(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日 *C07C 31/02*(2006. 01)
2015. 06. 15 *C07C 33/00*(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据 *C07C 47/263*(2006. 01)
PCT/US2013/064827 2013. 10. 14 *C12N 1/00*(2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/062564 EN 2014. 04. 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 罗宾·E·奥斯特豪特
A·P·博加德

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262
代理人 郑霞

(51) Int. Cl.

C12P 7/04(2006. 01)

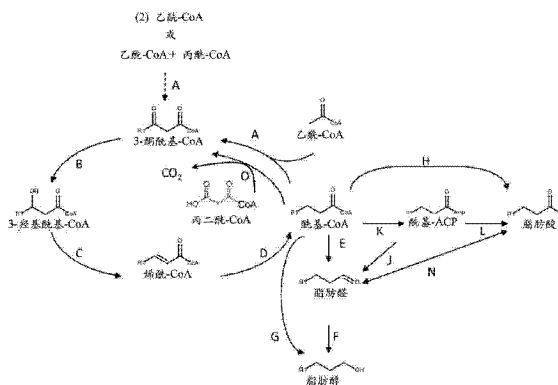
权利要求书7页 说明书166页 附图17页

(54) 发明名称

用于生产特定长度脂肪醇及相关化合物的微生物和方法

(57) 摘要

本发明提供含有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的非天然存在的微生物, 其中所述微生物选择性产生具有特定长度的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。另外还提供的是具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的非天然存在的微生物, 其中所述微生物还包括乙酰-CoA 途径。在有些方面, 本发明的微生物具有增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产的选择基因破坏或酶衰减。本发明另外还提供使用上述微生物生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的方法。



1. 非天然存在的微生物,其具有丙二酰-CoA 非依赖性脂肪酰-CoA 延长 (MI-FAE) 循环和 / 或丙二酰-CoA 依赖性脂肪酰-CoA 延长 (MD-FAE) 循环与终止途径的组合,

其中所述 MI-FAE 循环包含一种或多种硫解酶、一种或多种 3- 氧代酰基-CoA 还原酶、一种或多种 3- 羟基酰基-CoA 脱水酶及一种或多种烯酰-CoA 还原酶,

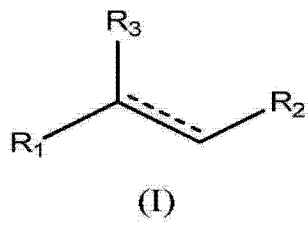
其中所述 MD-FAE 循环包含一种或多种延长酶、一种或多种 3- 氧代酰基-CoA 还原酶、一种或多种 3- 羟基酰基-CoA 脱水酶及一种或多种烯酰-CoA 还原酶,

其中所述终止途径包含选自以下的途径:

- (1) 1H;
- (2) 1K 和 1L;
- (3) 1E 和 1N;
- (4) 1K, 1J 和 1N;
- (5) 1E;
- (6) 1K 和 1J;
- (7) 1H 和 1N;
- (8) 1K, 1L 和 1N;
- (9) 1E 和 1F;
- (10) 1K, 1J 和 1F;
- (11) 1H, 1N 和 1F;
- (12) 1K, 1L, 1N 和 1F;和
- (13) 1G,

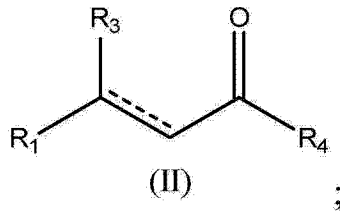
其中 1E 是酰基-CoA 还原酶 (醛形成),其中 1F 是醇脱氢酶,其中 1G 是酰基-CoA 还原酶 (醇形成),其中 1H 是酰基-CoA 水解酶、酰基-CoA 转移酶或酰基-CoA 合酶,其中 1J 是酰基-ACP 还原酶,其中 1K 是酰基-CoA:ACP 酰基转移酶,其中 1L 是硫酯酶,其中 1N 是醛脱氢酶 (酸形成) 或羧酸还原酶,

其中所述 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或终止途径的酶由至少一种外源核酸编码且以足以产生式 (I) 的化合物的量表达:



其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基; R_2 为 CH_2OH 、 CHO 或 $COOH$; R_3 为 H 、 OH 或氧代 ($=O$); 且 \equiv 代表单键或双键,前提条件是 R_3 所连接的碳原子的化合价为四价,

其中该 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和该终止途径的所述酶中的每一种酶的底物独立地选自式 (II) 的化合物、丙二酰-CoA、丙酰-CoA 或乙酰-CoA:



其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基 ; R_3 为 H、OH 或氧代 (=O) ; R_4 为 S-CoA、ACP、OH 或 H ; 且 ===== 代表单键或双键, 前提条件是 R_3 所连接的碳原子的化合价为四价 ;

其中该 MI-FAE 循环的所述一种或多种酶各自对 R_1 上的碳原子数不大于所述式 (I) 化合物的 R_1 上的碳原子数的式 (II) 化合物具有选择性,

其中该 MD-FAE 循环的所述一种或多种酶各自对 R_1 上的碳原子数不大于所述式 (I) 化合物的 R_1 上的碳原子数的式 (II) 化合物具有选择性, 和

其中该终止途径的所述一种或多种酶各自对 R_1 上的碳原子数不小于所述式 (I) 化合物的 R_1 上的碳原子数的式 (II) 化合物具有选择性。

2. 权利要求 1 的非天然存在的微生物, 其中 R_1 为 C_{1-17} 直链烷基。

3. 权利要求 2 的非天然存在的微生物, 其中 R_1 为 C_9 直链烷基、 C_{10} 直链烷基、 C_{11} 直链烷基、 C_{12} 直链烷基或 C_{13} 直链烷基。

4. 权利要求 1 的非天然存在的微生物, 其中所述微生物包含二、三或四种外源核酸, 各自编码所述 MI-FAE 循环或所述 MD-FAE 循环的酶。

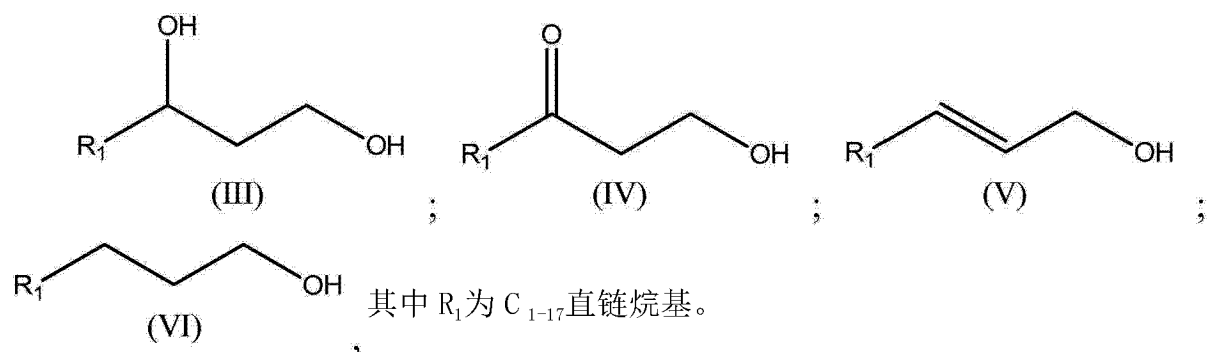
5. 权利要求 1 的非天然存在的微生物, 其中所述微生物包含二、三或四种外源核酸, 各自编码所述终止途径的酶。

6. 权利要求 3 的非天然存在的微生物, 其中所述微生物包含编码选自 (1)-(13) 的途径中的至少一种途径的各种酶的外源核酸。

7. 权利要求 1 的非天然存在的微生物, 其中所述至少一种外源核酸是异源核酸。

8. 权利要求 1 的非天然存在的微生物, 其中所述非天然存在的微生物是在基本上厌氧的培养基中。

9. 权利要求 1 的非天然存在的微生物, 其中该 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或终止途径的所述酶以足以产生选自式 (III)-(VI) 的化合物的量表达 :



10. 权利要求 9 的非天然存在的微生物, 其中 R_1 为 C_9 直链烷基、 C_{10} 直链烷基、 C_{11} 直链烷基、 C_{12} 直链烷基或 C_{13} 直链烷基。

11. 权利要求 1 的非天然存在的微生物, 其中所述微生物还包含乙酰 -CoA 途径和至少一种编码以足以产生乙酰 -CoA 的量表达的乙酰 -CoA 途径酶的外源核酸, 其中所述乙

酰 -CoA 途径包含选自以下的途径：

- (1) 2A 和 2B ；
- (2) 2A, 2C 和 2D ；
- (3) 2H ；
- (4) 2G 和 2D ；
- (5) 2E, 2F 和 2B ；
- (6) 2E 和 2I ；
- (7) 2J, 2F 和 2B ；
- (8) 2J 和 2I ；
- (9) 3A, 3B 和 3C ；
- (10) 3A, 3B, 3J, 3K 和 3D ；
- (11) 3A, 3B, 3G 和 3D ；
- (12) 3A, 3F 和 3D ；
- (13) 3N, 3H, 3B 和 3C ；
- (14) 3N, 3H, 3B, 3J, 3K 和 3D ；
- (15) 3N, 3H, 3B, 3G 和 3D ；
- (16) 3N, 3H, 3F 和 3D ；
- (17) 3L, 3M, 3B 和 3C ；
- (18) 3L, 3M, 3B, 3J, 3K 和 3D ；
- (19) 3L, 3M, 3B, 3G 和 3D ；
- (20) 3L, 3M, 3F 和 3D ；
- (21) 4A, 4B, 4D, 4H, 4I 和 4J ；
- (22) 4A, 4B, 4E, 4F, 4H, 4I 和 4J ；
- (23) 4A, 4B, 4E, 4K, 4L, 4H, 4I 和 4J ；
- (24) 4A, 4C, 4D, 4H 和 4J ；
- (25) 4A, 4C, 4E, 4F, 4H 和 4J ；
- (26) 4A, 4C, 4E, 4K, 4L, 4H 和 4J ；
- (27) 5A, 5B, 5D 和 5G ；
- (28) 5A, 5B, 5E, 5F 和 5G ；
- (29) 5A, 5B, 5E, 5K, 5L 和 5G ；
- (30) 5A, 5C 和 5D ；
- (31) 5A, 5C, 5E 和 5F ；和
- (32) 5A, 5C, 5E, 5K 和 5L,

其中 2A 是丙酮酸氧化酶（乙酸形成），其中 2B 是乙酰 -CoA 合成酶、乙酰 -CoA 连接酶或乙酰 -CoA 转移酶，其中 2C 是乙酸激酶，其中 2D 是磷酸转乙酰酶，其中 2E 是丙酮酸脱羧酶，其中 2F 是乙醛脱氢酶，其中 2G 是丙酮酸氧化酶（乙酰 - 磷酸形成），其中 2H 是丙酮酸脱氢酶、丙酮酸：铁氧还蛋白氧化还原酶、丙酮酸：NAD(P)H 氧化还原酶或丙酮酸甲酸裂合酶，其中 2I 是乙醛脱氢酶（酰基化），其中 2J 是苏氨酸醛缩酶，其中 3A 是磷酸烯醇丙酮酸（PEP）羧化酶或 PEP 羧激酶，其中 3B 是草酰乙酸脱羧酶，其中 3C 是丙二酸半醛脱氢酶（乙

酰基化),其中 3D 是乙酰 -CoA 羧化酶或丙二酰 -CoA 脱羧酶,其中 3F 是草酰乙酸脱氢酶或草酰乙酸氧化还原酶,其中 3G 是丙二酸半醛脱氢酶(酰基化),其中 3H 是丙酮酸羧化酶,其中 3J 是丙二酸半醛脱氢酶,其中 3K 是丙二酰 -CoA 合成酶或丙二酰 -CoA 转移酶,其中 3L 是苹果酸酶,其中 3M 是苹果酸脱氢酶或苹果酸氧化还原酶,其中 3N 是丙酮酸激酶或 PEP 磷酸酶,其中 4A 是柠檬酸合酶,其中 4B 是柠檬酸转运体,其中 4C 是柠檬酸 / 苹果酸转运体,其中 4D 是 ATP 柠檬酸裂合酶,其中 4E 是柠檬酸裂合酶,其中 4F 是乙酰 -CoA 合成酶或乙酰 -CoA 转移酶,其中 4H 是细胞溶质苹果酸脱氢酶,其中 4I 是苹果酸转运体,其中 4J 是线粒体苹果酸脱氢酶,其中 4K 是乙酸激酶,其中 4L 是磷酸转乙酰酶,其中 5A 是柠檬酸合酶,其中 5B 是柠檬酸转运体,其中 5C 是柠檬酸 / 草酰乙酸转运体,其中 5D 是 ATP 柠檬酸裂合酶,其中 5E 是柠檬酸裂合酶,其中 5F 是乙酰 -CoA 合成酶或乙酰 -CoA 转移酶,其中 5G 是草酰乙酸转运体,其中 5K 是乙酸激酶,和其中 5L 是磷酸转乙酰酶。

12. 权利要求 11 的非天然存在的微生物,其中所述微生物包含二、三、四、五、六、七或八种外源核酸,各自编码乙酰 -CoA 途径酶。

13. 权利要求 12 的非天然存在的微生物,其中所述微生物包含编码选自(1)-(32)的途径中的至少一种途径的各种乙酰 -CoA 途径酶的外源核酸。

14. 权利要求 1 的非天然存在的微生物,其还包含一个或多个基因破坏,所述一个或多个基因破坏在编码参与以下的蛋白质或酶的内源基因中出现:由所述微生物天然产生乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、CO₂、脂肪酸或丙二酰 -CoA;途径中间体向除细胞溶质以外的细胞区室转移;或由所述微生物天然降解 MI-FAE 循环中间体、MD-FAE 循环中间体或终止途径中间体,其中所述一个或多个基因破坏使得所述微生物中的该式(I)化合物的产生增加。

15. 权利要求 14 的非天然存在的微生物,其中所述蛋白质或酶选自由脂肪酸合酶、乙酰 -CoA 羧化酶、生物素:脱辅基酶连接酶、酰基载体蛋白、硫酯酶、酰基转移酶、ACP 丙二酰基转移酶、脂肪酸延长酶、酰基 -CoA 合成酶、酰基 -CoA 转移酶、酰基 -CoA 水解酶、丙酮酸脱羧酶、乳酸脱氢酶、醇脱氢酶、酸形成醛脱氢酶、乙酸激酶、磷酸转乙酰酶、丙酮酸氧化酶、甘油 -3- 磷酸脱氢酶、甘油 -3- 磷酸磷酸酶、线粒体丙酮酸载体、过氧化物酶体脂肪酸转运体、过氧化物酶体酰基 -CoA 转运体、过氧化物酶体肉毒碱 / 酰基肉毒碱转移酶、酰基 -CoA 氧化酶和酰基 -CoA 结合蛋白组成的组。

16. 权利要求 1 的非天然存在的微生物,其中该 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或该终止途径的一种或多种酶优先与 NADH 辅因子反应或者就与 NAD(P)H 辅因子反应而言具有减少的优先性,其中该 MI-FAE 循环或 MD-FAE 循环的所述一种或多种酶是 3- 酮酰基 -CoA 还原酶或烯酰 -CoA 还原酶,和其中该终止途径的所述一种或多种酶选自酰基 -CoA 还原酶(醛形成)、醇脱氢酶、酰基 -CoA 还原酶(醇形成)、醛脱羧基酶、酰基 -ACP 还原酶、醛脱氢酶(酸形成)和羧酸还原酶。

17. 权利要求 1 的非天然存在的微生物,其还包含一个或多个基因破坏,所述一个或多个基因破坏在编码蛋白质或酶的基因中出现,该蛋白质或酶导致存在于所述微生物的细胞溶质中的 NAD(P)H 与 NAD(P) 的比率在所述破坏之后增加。

18. 权利要求 17 的非天然存在的微生物,其中所述基因编码导致存在于所述微生物的细胞溶质中的 NAD(P)H 与 NAD(P) 的比率在所述破坏之后增加的蛋白质或酶,该蛋白质或酶选自由 NADH 脱氢酶、细胞色素氧化酶、甘油 -3- 磷酸脱氢酶、甘油 -3- 磷酸磷酸酶、醇脱氢

酶、丙酮酸脱羧酶、醛脱氢酶（酸形成）、乳酸脱氢酶、甘油-3-磷酸脱氢酶、甘油-3-磷酸：醌氧化还原酶、苹果酸酶和苹果酸脱氢酶组成的组。

19. 权利要求 14 或 17 的非天然存在的生物体，其中所述一个或多个基因破坏包含所述一个或多个基因的缺失。

20. 权利要求 1 的非天然存在的微生物，其中所述微生物是克拉布特里阳性的且是在包含过量葡萄糖的培养基中，从而增加存在于所述微生物的细胞溶质中的 NAD(P)H 与 NAD(P) 的比率。

21. 权利要求 1 的非天然存在的微生物，其还包含至少一种编码式 (I) 的化合物的细胞外转运体或细胞外转运系统的外源核酸。

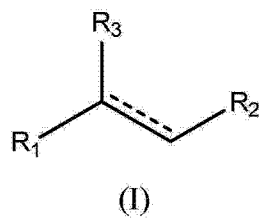
22. 权利要求 1 的非天然存在的微生物，其中一种或多种参与以下的内源酶具有衰减的酶活性或表达水平：由所述微生物天然产生乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、CO₂、脂肪酸或丙二酰-CoA；途径中间体向除细胞溶质以外的细胞区室转移；或由所述微生物天然降解 MI-FAE 循环中间体、MD-FAE 循环中间体或终止途径中间体。

23. 权利要求 22 的非天然存在的微生物，其中所述酶选自脂肪酸合酶、乙酰-CoA 羧化酶、生物素：脱辅基酶连接酶、硫酯酶、酰基载体蛋白、硫酯酶、酰基转移酶、ACP 丙二酰基转移酶、脂肪酸延长酶、酰基-CoA 合成酶、酰基-CoA 转移酶、酰基-CoA 水解酶、丙酮酸脱羧酶、乳酸脱氢酶、短链醇脱氢酶、酸形成醛脱氢酶、乙酸激酶、磷酸转乙酰酶、丙酮酸氧化酶、甘油-3-磷酸脱氢酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、线粒体丙酮酸载体、过氧化物酶体脂肪酸转运体、过氧化物酶体酰基-CoA 转运体、过氧化物酶体肉毒碱 / 酰基肉毒碱转移酶、酰基-CoA 氧化酶和酰基-CoA 结合蛋白组成的组。

24. 权利要求 1 的非天然存在的微生物，其中一种或多种参与 NAD(P)H 或 NADH 氧化的内源酶具有衰减的酶活性或表达水平。

25. 权利要求 24 的非天然存在的微生物，其中所述一种或多种内源酶选自 NADH 脱氢酶、细胞色素氧化酶、甘油-3-磷酸脱氢酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、醇脱氢酶、丙酮酸脱羧酶、醛脱氢酶（酸形成）、乳酸脱氢酶、甘油-3-磷酸脱氢酶、甘油-3-磷酸：醌氧化还原酶、苹果酸酶和苹果酸脱氢酶组成的组。

26. 用于生产式 (I) 的化合物的方法：



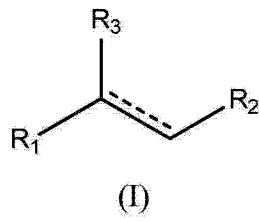
其中 R₁ 为 C₁₋₂₄ 直链烷基；R₂ 为 CH₂OH、CHO 或 COOH；R₃ 为 H、OH 或氧代 (=O)；且，----- 代表单键或双键，前提条件是 R₃ 所连接的碳原子的化合价为四价，包括将权利要求 1-25 中任一项的非天然存在的微生物在足以产生所述式 (I) 的化合物的条件下培养足够的时间周期。

27. 权利要求 26 的方法，其中所述方法还包括将该式 (I) 的化合物与培养物中的其它组分分离开。

28. 权利要求 27 的方法，其中所述分离包括萃取、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、吸附层析或超滤。

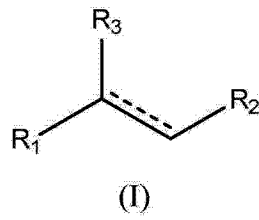
29. 培养基, 包含生物来源的式 (I) 的化合物:



其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基; R_2 为 CH_2OH 、 CHO 或 $COOH$; R_3 为 H 、 OH 或氧代 ($=O$); 且 ----- 代表单键或双键, 前提条件是 R_3 所连接的碳原子的化合价为四价, 其中所述生物来源的化合物具有反映大气二氧化碳摄取源的碳 -12、碳 -13 和碳 -14 同位素比率。

30. 权利要求 29 的培养基, 其中将所述培养基与具有丙二酰 -CoA 非依赖性脂肪酰 -CoA 延长 (MI-FAE) 循环和 / 或丙二酰 -CoA 依赖性脂肪酰 -CoA 延长 (MD-FAE) 循环与终止途径组合的非天然存在的微生物分离开。

31. 生物来源的式 (I) 的化合物:



其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基; R_2 为 CH_2OH 、 CHO 或 $COOH$; R_3 为 H 、 OH 或氧代 ($=O$); 且 ----- 代表单键或双键, 前提条件是 R_3 所连接的碳原子的化合价为四价, 其具有反映大气二氧化碳摄取源的碳 -12、碳 -13 和碳 -14 同位素比率。

32. 权利要求 31 的生物来源的化合物, 其中所述生物来源的化合物的 Fm 值为至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95% 或至少 98%。

33. 根据权利要求 26-28 中任一项的方法生产的生物来源的化合物。

34. 组合物, 包含权利要求 31-33 中任一项的生物来源的化合物和除所述生物来源的化合物以外的化合物。

35. 权利要求 34 的组合物, 其中所述的除所述生物来源的化合物以外的化合物是具有丙二酰 -CoA 非依赖性脂肪酰 -CoA 延长 (MI-FAE) 循环和 / 或丙二酰 -CoA 依赖性脂肪酰 -CoA 延长 (MD-FAE) 循环与终止途径组合的非天然存在的微生物的痕量细胞部分。

36. 组合物, 包含权利要求 31-33 中任一项的生物来源的化合物或其细胞溶解物或培养物上清液。

37. 生物基产品, 包含权利要求 31-33 中任一项的生物来源的化合物, 其中所述生物基产品是生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质或丙烯酸酯。

38. 权利要求 37 的生物基产品, 包含至少 5%、至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40% 或至少 50% 的所述生物来源的化合物。

39. 权利要求 37 或 38 的生物基产品, 其中所述生物基产品包含所述生物来源的化合物的一部分作为重复单元。

40. 通过模制权利要求 37-39 中任一项的生物基产品获得的模制产品,生物基产品是聚合物。

41. 用于生产权利要求 37-39 中任一项生物基产品的工艺,包括使所述生物来源的化合物在生产所述生物基产品的反应中与其自身或另一种化合物发生化学反应。

用于生产特定长度脂肪醇及相关化合物的微生物和方法

[0001] 本申请要求 2012 年 10 月 15 日申请的美国临时申请顺序号 61/714, 144 的优先权的权益, 该美国临时申请的全部内容通过引用结合到本文中。

[0002] 发明背景

[0003] 本发明总的来讲涉及生物合成过程, 更准确地讲涉及具有特定长度脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成能力的生物体。

[0004] 伯醇是一类具有多种工业应用的化合物产品, 其包括多种生物燃料和特殊化学品。伯醇也可以用于制造许多其它工业产品, 包括聚合物和表面活性剂。例如, 高级伯醇 (也称为脂肪醇 (C₄-C₂₄)) 及其乙氧基化物在世界范围内用作许多家用洗涤剂、清洁产品和个人护理产品 (例如洗衣粉和洗衣液、洗碟液和硬面清洁剂) 中的表面活性剂。它们也用于制造多种工业化学品及用于润滑油添加剂。特定长度脂肪醇 (例如辛醇和己醇) 具有适用的感官特性且已长期用作香料和调味物质。较小链长 C₄-C₈ 醇 (例如丁醇) 用作用于生产油漆、涂料和胶粘剂应用中的衍生物 (例如丙烯酸酯) 的化学中间体。

[0005] 脂肪醇目前由例如脂肪酸加氢、末端烯烃加氢甲酰化、正石蜡部分氧化和乙烯的 Al 催化聚合来生产。遗憾的是, 直接由基于石油的直链烃 (正石蜡) 氧化来生产脂肪醇在商业上不可行。此不切实际是因为正石蜡氧化主要产生仲醇、叔醇或酮或这些化合物的混合物, 但不产生高收率的脂肪醇。另外, 目前已知的用于生产脂肪醇的方法受以下缺陷的困扰: 其限于相对昂贵的原料, 尤其是经由石油热裂解来生产的乙烯。另外, 目前的方法需要若干步骤和若干催化剂类型。

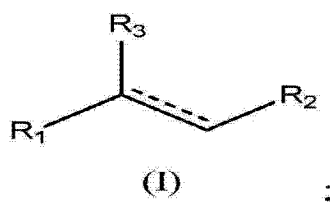
[0006] 通过微生物的脂肪醇生产涉及脂肪酸合成, 继而酰基还原步骤。已研究在大多数细胞中存在的通用脂肪酸生物合成途径用于生产脂肪醇和其它脂肪酸衍生物。目前可实现大量改良以向脂肪醇生产提供更有效的生物合成途径, 并使得理论产物和能量产率显著更高。

[0007] 因此, 存在对有效生产商业数量的脂肪醇的替代方法的需求。本发明满足了这种需求, 也提供了有关优势。

[0008] 发明概述

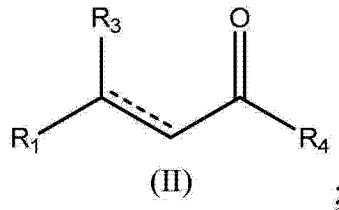
[0009] 本发明提供含有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的非天然存在的微生物 (non-naturally occurring microbial organisms)。在有些实施方案中, 本发明的非天然存在的微生物具有如图 1、图 6 和图 7 中所描绘的丙二酰 -CoA 非依赖性脂肪酰 -CoA 延长 (MI-FAE) 循环和 / 或丙二酰 -CoA 依赖性脂肪酰 -CoA 延长 (MD-FAE) 循环与终止途径的组合, 其中所述 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或终止途径的酶由至少一种外源核酸编码且足以产生式 (I) 的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的量表达:

[0010]



[0011] 其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基 ; R_2 为 CH_2OH 、 CHO 或 $COOH$; R_3 为 H 、 OH 或氧代 ($=O$) ; 且 ----- 代表单键或双键, 前提条件是 R_3 所连接的碳原子的化合价为四价, 其中该 MI-FAE 循环、该 MD-FAE 循环和该终止途径的所述酶中的每一种酶的底物独立地选自式 (II) 的化合物、丙二酰 -CoA、丙酰 -CoA 或乙酰 -CoA :

[0012]



[0013] 其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基 ; R_3 为 H 、 OH 或氧代 ($=O$) ; R_4 为 $S-CoA$ 、 ACP 、 OH 或 H ; 且 ----- 代表单键或双键, 前提条件是 R_3 所连接的碳原子的化合价为四价 ; 其中该 MI-FAE 循环的所述一种或多种酶各自对 R_1 上的碳原子数不大于所述式 (I) 化合物的 R_1 上的碳原子数的式 (II) 化合物具有选择性, 其中该 MD-FAE 循环的所述一种或多种酶各自对 R_1 上的碳原子数不大于所述式 (I) 化合物的 R_1 上的碳原子数的式 (II) 化合物具有选择性, 和其中该终止途径的所述一种或多种酶各自对 R_1 上的碳原子数不小于所述式 (I) 化合物的 R_1 上的碳原子数的式 (II) 化合物具有选择性。

[0014] 在有些实施方案中, 本发明提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的非天然存在的微生物, 其中所述微生物还包括乙酰 -CoA 途径和至少一种编码以足以产生乙酰 -CoA 的量表达的乙酰 -CoA 途径酶的外源核酸, 其中所述乙酰 -CoA 途径包括图 2、3、4 或 5 中所示的途径。

[0015] 在有些实施方案中, 本发明提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的非天然存在的微生物, 其中所述微生物具有一个或多个基因破坏, 其中所述一个或多个基因破坏在编码参与以下的蛋白质或酶的内源基因中出现 : 由所述微生物天然产生乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、 CO_2 、脂肪酸或丙二酰 -CoA ; 途径中间体向除细胞溶质 (cytosol) 以外的细胞区室转移 ; 或由该微生物天然降解 MI-FAE 循环中间体、MD-FAE 循环中间体或终止途径中间体, 所述一个或多个基因破坏使得该微生物中的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的产生增加。

[0016] 在有些实施方案中, 本发明提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的非天然存在的微生物, 其中该 MI-FAE 循环、该 MD-FAE 循环或该终止途径的一种或多种酶优先与 $NADH$ 辅因子反应或就与 $NAD(P)H$ 辅因子反应而言具有减少的优先性。

[0017] 在有些实施方案中, 本发明提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的非天然存在的微生物, 其中所述微生物在编码蛋白质或酶的基因中具有一个或多个基因破坏, 该蛋白质或酶导致存在于该微生物的细胞溶质中的 $NAD(P)H$ 与 $NAD(P)$ 的比率在该破坏之后增加。

[0018] 在有些实施方案中, 本发明的非天然存在的微生物是克拉布特里 (Crabtree) 阳性的且是在包含过量葡萄糖的培养基中。在这样的条件下。如本文中所述, 该微生物能导致增加存在于该微生物的细胞溶质中的 $NAD(P)H$ 与 $NAD(P)$ 的比率。

[0019] 在有些实施方案中, 本发明提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的非天然存在的微生物, 其中所述微生物具有至少一种编码本发明的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的细胞外转运体或细胞外转运系统的外源核酸。

[0020] 在有些实施方案中,本发明提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的非天然存在的微生物,其中所述微生物就参与以下的一种或多种内源酶而言具有衰减的酶活性或表达水平:由所述微生物天然产生乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、CO₂、脂肪酸或丙二酰-CoA;途径中间体向除细胞溶质以外的细胞区室转移;或由所述微生物天然降解 MI-FAE 循环中间体、MD-FAE 循环中间体或终止途径中间体。

[0021] 在有些实施方案中,本发明提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的非天然存在的微生物,其中所述微生物就参与 NAD(P)H 或 NADH 氧化的一种或多种内源酶而言具有衰减的酶活性或表达水平。

[0022] 本发明另外还提供使用上述微生物生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的方法,即将含有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的非天然存在的微生物在足以产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的条件下培养足够的时间周期。

[0023] 附图简述

[0024] 图 1 显示用于由 MI-FAE 循环或 MD-FAE 循环的酰基-CoA 中间体产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的示例性 MI-FAE 循环和 / 或 MD-FAE 循环与终止途径的组合。酶是:A. 硫解酶;B. 3-氧代酰基-CoA 还原酶;C. 3-羟基酰基-CoA 脱水酶;D. 烯酰-CoA 还原酶;E. 酰基-CoA 还原酶(醛形成);F. 醇脱氢酶;G. 酰基-CoA 还原酶(醇形成);H. 酰基-CoA 水解酶、转移酶或合酶(synthase);J. 酰基-ACP 还原酶;K. 酰基-CoA:ACP 酰基转移酶;L. 硫酯酶;N. 醛脱氢酶(酸形成)或羧酸还原酶;和 O. 延长酶(Elongase)。

[0025] 图 2 显示用于由丙酮酸或苏氨酸产生细胞溶质乙酰-CoA 的示例性途径。酶是:A. 丙酮酸氧化酶(乙酸形成);B. 乙酰-CoA 合成酶(synthetase)、连接酶或转移酶;C. 乙酸激酶;D. 磷酸转乙酰酶;E. 丙酮酸脱羧酶;F. 乙醛脱氢酶;G. 丙酮酸氧化酶(乙酰-磷酸形成);H. 丙酮酸脱氢酶、丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶、丙酮酸:NAD(P)H 氧化还原酶或丙酮酸甲酸裂合酶;I. 乙醛脱氢酶(酰基化);和 J. 苏氨酸醛缩酶。

[0026] 图 3 显示用于由磷酸烯醇丙酮酸(PEP)产生乙酰-CoA 的示例性途径。酶是:A. PEP 羧化酶或 PEP 羧激酶;B. 草酰乙酸脱羧酶;C. 丙二酸半醛脱氢酶(乙酰基化);D. 乙酰-CoA 羧化酶或丙二酰-CoA 脱羧酶;F. 草酰乙酸脱氢酶或草酰乙酸氧化还原酶;G. 丙二酸半醛脱氢酶(酰基化);H. 丙酮酸羧化酶;J. 丙二酸半醛脱氢酶;K. 丙二酰-CoA 合成酶或转移酶;L. 苹果酸酶;M. 苹果酸脱氢酶或氧化还原酶;和 N. 丙酮酸激酶或 PEP 磷酸酶。

[0027] 图 4 显示用于使用柠檬酸和苹果酸转运体由线粒体乙酰-CoA 产生细胞溶质乙酰-CoA 的示例性途径。酶是:A. 柠檬酸合酶;B. 柠檬酸转运体;C. 柠檬酸/苹果酸转运体;D. ATP 柠檬酸裂合酶;E. 柠檬酸裂合酶;F. 乙酰-CoA 合成酶或转移酶;H. 细胞溶质苹果酸脱氢酶;I. 苹果酸转运体;J. 线粒体苹果酸脱氢酶;K. 乙酸激酶;和 L. 磷酸转乙酰酶。

[0028] 图 5 显示用于使用柠檬酸和草酰乙酸转运体由线粒体乙酰-CoA 产生细胞溶质乙酰-CoA 的示例性途径。酶是:A. 柠檬酸合酶;B. 柠檬酸转运体;C. 柠檬酸/草酰乙酸转运体;D. ATP 柠檬酸裂合酶;E. 柠檬酸裂合酶;F. 乙酰-CoA 合成酶或转移酶;G) 草酰乙酸转运体;K) 乙酸激酶;和 L) 磷酸转乙酰酶。

[0029] 图 6 显示用于延长 R₁ 的直链烷基的示例性 MI-FAE 循环和 / 或 MD-FAE 循环。酶是:A. 硫解酶;B. 3-酮酰基-CoA 还原酶;C. 3-羟基酰基-CoA 脱水酶;D. 烯酰-CoA 还原酶;和 E. 延长酶。

[0030] 图 7 显示用于由图 6 的 MI-FAE 循环中间体或 MD-FAE 循环中间体中的任一个产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的示例性终止循环。酶是 :E. MI-FAE/MD-FAE 中间体 -CoA 还原酶 (醛形成) ;F. 醇脱氢酶 ;G. MI-FAE/MD-FAE 中间体 -CoA 还原酶 (醇形成) ;H. MI-FAE/MD-FAE 中间体 -CoA 水解酶、转移酶或合酶 ;J. MI-FAE/MD-FAE 中间体 -ACP 还原酶 ;K. MI-FAE/MD-FAE 中间体 -CoA:ACP 酰基转移酶 ;L. 硫酯酶 ;和 N. 醛脱氢酶 (酸形成) 或羧酸还原酶。R₁ 为 C₁₋₂₄ 直链烷基 ;R₃ 为 H、OH 或氧代 (=O) ;且 $\text{---}\text{---}\text{---}$ 代表单键或双键,前提条件是 R₃ 所连接的碳原子的化合价为四价。

[0031] 图 8 显示可使用图 6 中描绘的循环和图 7 中描绘的终止途径由四种 MI-FAE 或 MD-FAE 循环中间体产生的示例性化合物。R 为 C₁₋₂₄ 直链烷基。

[0032] 图 9 描绘在用包含编码各种 MI-FAE 循环和终止途径酶的基因的质粒转化的酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 中在有或无 pf1AV 或 PDH 旁路的情况下 1, 3- 丁二醇 (图 9A) 或乙醇 (图 9B) 的产生,如实施例 X 中所提供。

[0033] 图 10 描绘在用包含编码各种 MI-FAE 循环和终止途径酶的基因的质粒转化的酿酒酵母中在有或无 pf1AV 或 PDH 旁路的情况下丙酮酸 (图 10A)、琥珀酸 (图 12B)、乙酸 (图 12C) 或葡萄糖 (图 12D) 的产生,如实施例 X 中所提供。

[0034] 图 11 描绘在用包含编码各种 MI-FAE 循环和终止途径酶的基因的质粒转化的酿酒酵母中在有或无 pf1AV 或 PDH 旁路的情况下 1, 3- 丁二醇的产生,如实施例 X 中所提供。

[0035] 图 12 描绘五种硫解酶对大肠杆菌 (*E. coli*) 中的乙酰 -CoA 缩合活性的估计比活性,如实施例 XI 中所提供。

[0036] 图 13 描绘具有 1495 (3- 羟基丁酰 -CoA 脱氢酶) 的双启动子酵母载体中克隆的两种硫解酶 (1491 和 560) 对大肠杆菌中的乙酰 -CoA 缩合活性的估计比活性,如实施例 XI 中所提供。

[0037] 图 14 描绘 NADH 氧化的荧光检测的时程,其用于测量通过 3- 羟基丁酰 -CoA 脱氢酶由乙酰乙酰 -CoA 到 3- 羟基丁酰 -CoA 的代谢,如实施例 XI 中所提供。通过 3- 羟基丁酰 -CoA 脱氢酶将乙酰乙酰 -CoA 代谢为 3- 羟基丁酰 -CoA。该反应需要 NADH 的氧化,其可通过在 340nm 的激发波长和在 460nm 的发射波长下的荧光来监测。氧化形式 NAD⁺ 不发荧光。1495,即来自拜氏梭菌 (*Clostridium beijerinckii*) 的 Hbd 在含有 1491 (载体 id = pY3Hd17) 或 560 (载体 id = pY3Hd16) 的双启动子酵母载体中进行测定。

[0038] 图 15 描绘在 1 或 5ug/ml NADH 或 1 或 5ug/ml NADPH 存在下 NAD(P)H 氧化的水平,并且显示相对于 NADPH, Hbd 较偏好 NADH,如实施例 XI 中所提供。

[0039] 图 16 描绘将 3- 羟基丁酰 -CoA 转变成 3- 羟基丁醛且需要 NAD(P)H 氧化的醛还原酶的粗裂解物 (crude lysate) 的活性数据,该 NAD(P)H 氧化可用于监测酶活性,如实施例 XI 中所提供。将来自短乳杆菌 (*Lactobacillus brevis*) 的 Ald (基因 ID 707) 克隆于含有来自糖乙酸多丁醇梭菌 (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*) 的醇脱氢酶 (基因 ID 28) 的双载体中。将这两种酶克隆于含有 Leu 标记的另一双启动子酵母载体中。将来自大肠杆菌的 707 裂解物用作标准品。

[0040] 图 17 描绘 ADH (基因 28) 在具有 ALD (基因 707) 的双启动子载体中的评估,其中丁醛为 3- 羟基丁醛的替代底物。1, 3-BDO 由醇脱氢酶 (Adh) 形成,该醇脱氢酶 (Adh) 在 NAD(P)H 存在下还原 3- 羟基丁醛,且用 NAD(P)H 的氧化监测该反应。

[0041] 发明详述

[0042] 如本文所用的,术语“非天然存在的”当用于涉及本发明的微生物时,意指该微生物具有至少一个在正常情况下在参考菌种的天然存在的菌株(包括参考菌种的野生型菌株)中不存在的遗传改变。遗传改变包括例如引入编码代谢多肽的可表达核酸的修饰、其它核酸添加、核酸缺失和/或微生物遗传材料的其它功能破坏。这样的修饰包括例如参考菌种的异源多肽、同源多肽或者异源多肽和同源多肽二者的编码区及其功能片段。另外的修饰包括例如其中修饰改变了基因或操纵子的表达的非编码调节区。示例性的代谢多肽包括脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成途径内的酶或蛋白质。

[0043] 代谢修饰是指自其天然存在的状态被改变的生物化学反应。因此,非天然存在的微生物可具有针对编码代谢多肽的核酸或其功能片段的遗传修饰。在本文中公开了示例性的代谢修饰。

[0044] 如本文所用的,术语“分离的”当用于涉及微生物时,意指基本上不含随该参考微生物在自然界中发现的至少一种组分的生物体。该术语包括去除了随该微生物在其天然环境中被发现的某些或所有组分的微生物。该术语也包括去除了随该微生物在非天然存在的环境中被发现的某些或所有组分的微生物。因此,分离的微生物与随其在自然界中被发现或者随其在非天然存在的环境中生长、贮存或生存时被发现的其他物质部分或完全分离开。分离的微生物的具体实例包括部分纯的微生物、相当纯的微生物和在培养基即非天然存在的环境中培养的微生物。

[0045] 如本文所用的,术语“微生物”意指作为用显微镜可看见的细胞存在的任何生物体,它被包括在古细菌(archaea)、细菌(bacteria)或真核微生物(eukarya)的范围内。因此,该术语预计包括具有用显微镜可看见的大小的原核或真核细胞或者原核或真核生物,并且包括所有菌种的细菌、古细菌和真细菌以及真核微生物(例如酵母和真菌)。该术语也包括可以进行培养以用于生物化学生产的任何菌种的细胞培养物。

[0046] 如本文所用的,术语“CoA”或“辅酶A”意指有机辅因子或辅基(prosthetic group)(酶的非蛋白质部分),其存在为许多酶(脱辅基酶)的活性所必需以形成活性酶系统。辅酶A在某些缩合酶中发挥作用,在乙酰基或其它酰基基团转移中和在脂肪酸合成和氧化、丙酮酸氧化中和在其它乙酰化中起作用。

[0047] 如本文所用的,术语“ACP”或“酰基载体蛋白(acyl carrier protein)”是指与许多生物体(从细菌到植物)的脂肪酸合酶系统相关的任何相对较小的酸性蛋白质。ACPs可以含有一个通过磷酸酯键与丝氨酸残基的羟基基团共价结合的4'-磷酸泛酰巯基乙胺(4'-phosphopantetheine)辅基。4'-磷酸泛酰巯基乙胺部分的巯基基团在脂肪酸合成期间充当酰基中间体被(硫)酯化的锚定物。ACP的一个实例是大肠杆菌ACP,一种单独的单一蛋白质,含有77个氨基酸残基(8.85kDa),其中磷酸泛酰巯基乙胺基团与丝氨酸36相连。

[0048] 如本文所用的,术语“基本上厌氧的”当用于涉及培养或生长条件时,意指氧的量小于液体培养基中溶解氧饱和度的约10%。该术语也预计包括用小于约1%氧的气氛维持的液体或固体培养基的密闭室。

[0049] “外源的”当它被用在本文中时意指参考分子或参考活性被引入到宿主微生物中。该分子可以例如通过将编码核酸引入到宿主遗传材料中,例如通过整合到宿主染色体或作

为非染色体遗传材料例如质粒而引入。因此,该术语当用于涉及编码核酸的表达时,是指将编码核酸以可表达形式引入到微生物中。当用于涉及生物合成活性时,该术语是指被引入到宿主参比生物体中的活性。来源可以是例如在引入到宿主微生物之后表达参考活性的同源或异源编码核酸。因此,术语“内源的”是指宿主体内存在的参考分子或活性。类似地,该术语当用于涉及编码核酸的表达时,是指微生物体内所含有的编码核酸的表达。术语“异源的”是指从不是参考物种的来源获得的分子或活性,而“同源的”是指来源于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个或二者。

[0050] 应当理解,当在微生物中包括超过一种外源核酸时,超过一种外源核酸是指如上所论述的参考编码核酸或生物合成活性。还应当理解,正如本文所公开的,这样的超过一种外源核酸可以在独立的核酸分子上、在多顺反子核酸分子上或其组合上引入到宿主微生物中,并且仍然被视为超过一种外源核酸。例如,如本文所公开的,微生物可以经过工程改造以表达编码所需途径酶或蛋白质的两种或两种以上外源核酸。在将编码所需活性的两种外源核酸引入到宿主微生物的情况下,应当理解,这两种外源核酸可以作为一种核酸(例如在单个质粒上、在独立的质粒上)被引入,可以整合到宿主染色体的单个位点或多个位点上,并且仍然被视为两种外源核酸。类似地,应当理解,超过两种外源核酸可以以任何所需组合(例如在单个质粒上、在独立的质粒上)引入到宿主生物中,可以整合到宿主染色体的单个位点或多个位点上,并且仍然被视为两种或两种以上外源核酸,例如三种外源核酸。因此,参考外源核酸或生物合成活性的数目是指编码核酸的数目或生物合成活性的数目,而不是被引入到宿主生物中的独立核酸的数目。

[0051] 如本文所用的,术语“基因破坏”或其语法等价物意指使得所编码的基因产物无活性或衰减的遗传改变。遗传改变可以是例如整个基因的缺失、转录或翻译所需要的调节序列的缺失、导致产生截短的基因产物的一部分基因的缺失或使所编码的基因产物失活或衰减的各种突变策略中的任一种。一种特别有用的基因破坏方法是完整基因缺失,这是因为它减少或消除了本发明的非天然存在的微生物中遗传逆转(genetic reversion)的发生。基因破坏也包括无效突变(null mutation),无效突变是指基因或含有基因的区域内的突变,其导致基因不转录为RNA和/或不翻译为功能性基因产物。这样的无效突变可由许多类型的突变产生,该突变包括例如使点突变失活、一部分基因缺失、整个基因缺失或染色体区段缺失。

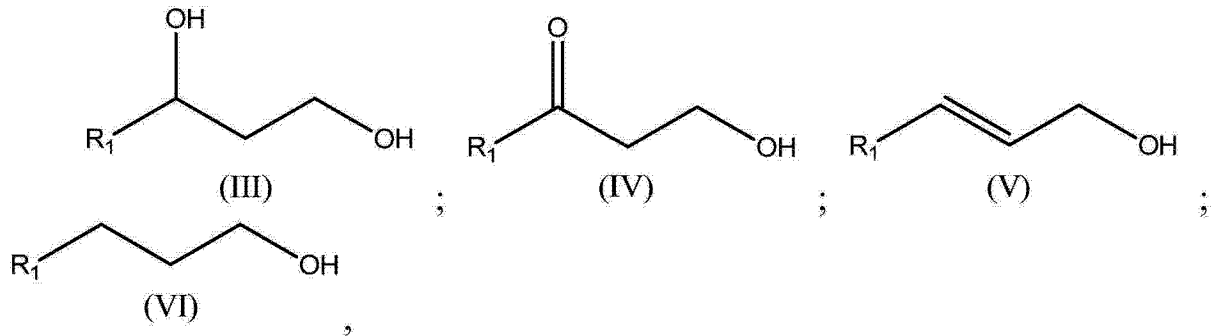
[0052] 如本文所用的,术语“生长耦合的(growth-coupled)”当用于涉及生物化学产物的产生时意指参考生物化学产物的生物合成在微生物的生长期期间产生。在一个特定的实施方案中,生长耦合产生可以是专性的,意味着所参考生物化学的生物合成是在微生物生长期期间产生的专性产物。

[0053] 如本文所用的,术语“衰减”或其语法等价物意指减弱、降低或减小酶或蛋白质的活性或量。如果酶或蛋白质的活性或量的衰减致使活性或量下降到给定途径起作用所需的临界水平以下,则该衰减可模拟完全破坏。然而,模拟一种途径的完全破坏的酶或蛋白质的活性或量的衰减仍可足以使另一途径继续起作用。例如,内源酶或蛋白质的衰减可足以模拟用于生产本发明的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸产物的相同酶或蛋白质的完全破坏,但酶或蛋白质的剩余活性或量仍可足以维持其它途径,例如对宿主微生物存活、繁殖或生长至关

重要的途径。酶或蛋白质的衰减也可以足以增加本发明的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸产物的产率但不一定模拟酶或蛋白质的完全破坏的量减弱、降低或减小酶或蛋白质的活性或量。

[0054] 如本文所用的术语“脂肪醇”意指含有一个或多个羟基基团且含有4个或4个以上碳原子的链的脂族化合物。脂肪醇具备基团 $-\text{CH}_2\text{OH}$ ，其可经氧化以便形成具有相同碳原子数目的相应醛或酸。脂肪醇也可以为饱和脂肪醇、不饱和脂肪醇、1,3-二醇或3-氧代-烷-1-醇。示例性的脂肪醇包括式 (III)-(VI) 的化合物：

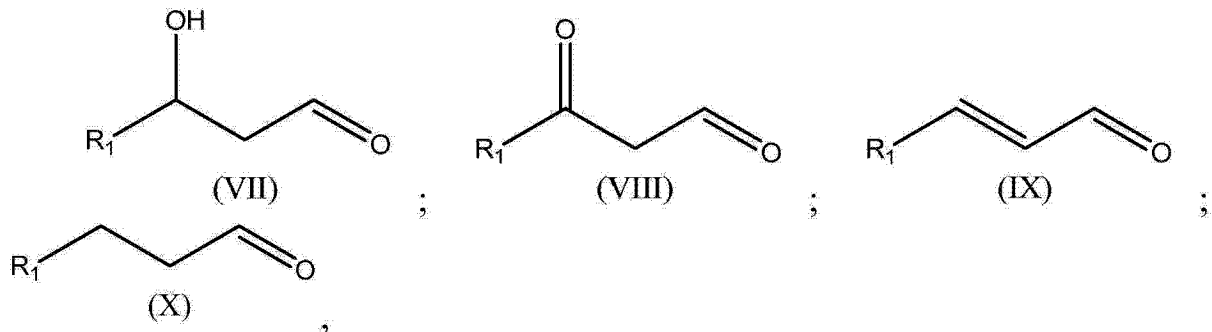
[0055]



[0056] 其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基。

[0057] 如本文所用的术语“脂肪醛”意指含有醛 (CHO) 基团且含有4个或4个以上碳原子的链的脂族化合物。脂肪醛可经还原形成具有相同碳原子数目的相应醇或经氧化形成具有相同碳原子数目的相应羧酸。脂肪醛也可以为饱和脂肪醛、不饱和脂肪醛、3-羟基醛或3-氧代醛。示例性的脂肪醛包括式 (VII)-(X) 的化合物：

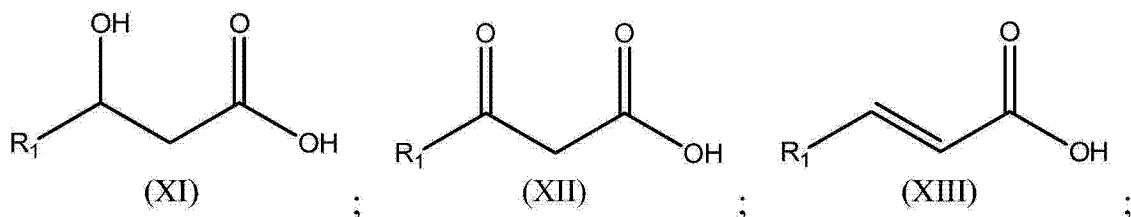
[0058]

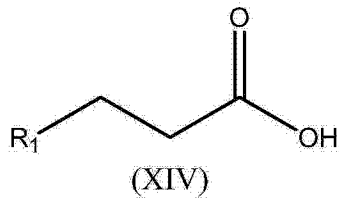


[0059] 其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基。

[0060] 如本文所用的术语“脂肪酸”意指含有羧酸基团且含有4个或4个以上碳原子的链的脂族化合物。脂肪酸可以经还原形成具有相同碳原子数目的相应醇或醛。脂肪酸也可以为饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、3-羟基酸或3-氧代酸。示例性的脂肪酸包括式 (XI)-(XIV) 的化合物：

[0061]





[0062] 其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基。

[0063] 术语“烷基”是指直链饱和单价烃。烷基可以为具有 1 至 24 (C_{1-24})、1 至 17 (C_{1-17}) 或 9 至 13 (C_{9-13}) 个碳原子的直链饱和单价烃。烷基基团的实例包括但不限于甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基和十二烷基。举例来说， C_{9-13} 烷基是指 9 至 13 个碳原子的直链饱和单价烃。

[0064] 本文中所公开的发明至少部分基于能够使用丙二酰-CoA 非依赖性脂肪酸延长 (MI-FAE) 循环和 / 或丙二酰-CoA 依赖性脂肪酸延长循环 (MD-FAE) 循环与终止途径的组合合成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的重组微生物。在有些实施方案中,本发明的微生物可以利用与酰基-CoA 终止途径偶联的异源 MI-FAE 循环和 / 或 MD-FAE 循环来形成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。MI-FAE 循环可包括硫解酶、3- 氧代酰基-CoA 还原酶、3- 羟基酰基-CoA 脱水酶和烯酰-CoA 还原酶。MD-FAE 循环可包括延长酶、3- 氧代酰基-CoA 还原酶、3- 羟基酰基-CoA 脱水酶和烯酰-CoA 还原酶。通过 MI-FAE 循环和 / 或 MD-FAE 循环的每一次传代导致与进入延长循环的酰基-CoA 底物相比,延长单一两个碳单元的酰基-CoA 的形成。产物可为偶数或奇数链长,取决于进入酰基-CoA 延长途径的初始底物,即两个乙酰-CoA 底物、丙二酰-CoA 或一个乙酰-CoA 底物与一个丙酰-CoA 底物组合。两个乙酰-CoA 底物或丙二酰-CoA 的延长产生偶数链长产物,而用丙酰-CoA 底物延长产生奇数链长产物。终止途径催化 MI-FAE 中间体和 / 或 MD-FAE 中间体 (例如酰基-CoA) 转变成其相应的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸产物。MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和终止途径酶可以在该微生物的一个或多个区室中表达。例如,在一个实施方案中,所有 MI-FAE 循环和终止途径酶都在细胞溶质中表达。在另一个实施方案中,所有 MD-FAE 循环和终止途径酶都在细胞溶质中表达。另外,本发明的微生物可以经工程改造以任选地将所需产物分泌到培养基或发酵肉汤 (fermentation broth) 中用于进一步操作或分离。

[0065] 本发明的产物包括衍生自 MI-FAE 循环和 / 或 MD-FAE 循环的中间体的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。例如,醇产物可包括饱和脂肪醇、不饱和脂肪醇、1,3- 二醇和 3- 氧代-烷-1-醇。醛产物可包括饱和脂肪醛、不饱和脂肪醛、3- 羟基醛和 3- 氧代醛。酸产物可包括饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸、3- 羟基酸和 3- 氧代酸。这些产物可通过化学或酶促手段进一步转变成衍生物,例如脂肪酯。用于将脂肪醇转变成脂肪酯的方法是本领域众所周知的。

[0066] 本发明亦涵盖与宿主菌株工程改造策略结合的脂肪醇、脂肪醛和脂肪酸链长控制策略,以使得本发明的非天然存在的微生物有效地指导碳和还原当量 (reducing equivalents) 朝向特定链长的发酵产物。

[0067] 本发明的重组微生物可生产商业数量的链长范围为四个碳原子 (C_4) 至二十四个碳原子 (C_{24}) 或更多个碳原子的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。本发明的微生物可生产对于特别链长具有至少 50%、60%、70%、75%、85%、90%、95% 或 95% 以上选择性的所需产物。产

物的碳链长度受到 MI-FAE 循环的一种或多种酶（图 6 的步骤 A/B/C/D）和 / 或 MD-FAE 循环的一种或多种酶（图 6 的步骤 E/B/C/D）与一种或多种终止途径酶（图 7 的步骤 E-N）的组合控制。可以在延长循环期间通过对于碳原子数目不大于所需产物大小的 MI-FAE 循环底物表现出选择性的一种或多种 MI-FAE 循环酶（硫解酶、3- 氧代酰基 -CoA 还原酶、3- 羟基酰基 -CoA 脱水酶和 / 或烯酰 -CoA 还原酶）将链长封端。或者或另外，可以在延长循环期间通过一种或多种 MD-FAE 循环酶（延长酶、3- 氧代酰基 -CoA 还原酶、3- 羟基酰基 -CoA 脱水酶和 / 或烯酰 -CoA 还原酶）将链长封端。可以通过催化 MI-FAE 循环中间体转变成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸产物的一种或多种酶进一步约束链长，以使得一种或多种终止酶仅与碳原子数目不小于所需脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸产物的底物反应。

[0068] 催化 MI-FAE-CoA 中间体或 MD-FAE-CoA 中间体转变成脂肪醇的终止途径酶可包括脂肪酰 -CoA 还原酶（醇或醛形成）、脂肪醛还原酶、酰基 -ACP 还原酶、酰基 -CoA:ACP 酰基转移酶、硫酯酶、酰基 -CoA 水解酶和 / 或羧酸还原酶的组合（图 7 的途径 G ;E/F ;K/J/F ;H/N/F ;或 K/L/N/F）。用于将 MI-FAE-CoA 中间体或 MD-FAE-CoA 中间体转变成脂肪酸的终止途径酶可包括硫酯酶、CoA 水解酶、酰基 -CoA:ACP 酰基转移酶、醛脱氢酶和 / 或酰基 -ACP 还原酶的组合（图 7 的途径 H ;K/L ;E/N ;K/J/N）。为了生产脂肪醛，终止途径酶可包括脂肪酰 -CoA 还原酶（醛形成）、酰基 -ACP 还原酶、酰基 -CoA:ACP 酰基转移酶、硫酯酶、酰基 -CoA 水解酶和 / 或羧酸还原酶的组合（图 7 的途径 E ;K/J ;H/N ;或 K/L/N）。

[0069] 本发明的非天然存在的微生物也可以有效地引导细胞资源（包括碳、能量和还原当量）产生脂肪醇、脂肪醛和脂肪酸，从而导致相对于天然存在的生物体，产率、生产力和 / 或效价得到改进。在一个实施方案中，所述微生物经修饰以增加细胞溶质乙酰 -CoA 水平。在另一个实施方案中，所述微生物经修饰以有效地指导细胞溶质酰基 -CoA 成为脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸而非其它副产物或细胞过程。可导致副产物形成的酶或途径可衰减或缺失。示例性的副产物包括但不限于乙醇、甘油、乳酸、乙酸、酯和二氧化碳。另外的副产物可包括脂肪 - 酰基 -CoA 衍生物，例如醇、烯烃、烷烃、酯、酸和醛。因此，副产物可包括来自所关注产物转移碳和 / 或还原当量的任何发酵产物。

[0070] 在另一个实施方案中，还原当量的可利用性 (availability) 或氧化还原比增加。在又一个实施方案中，使该微生物的辅因子需求平衡，以使得在碳同化和中心代谢期间产生的相同还原型辅因子为 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和 / 或终止途径酶所利用。在又一个实施方案中，产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生物体表达从细胞输出脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的转运体。

[0071] 能够生产脂肪醇的微生物在本文中参考酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 遗传背景举例说明。然而，在现在可得到数千个物种的完整基因组序列（其中超过一半可在公共数据库（例如 NCBI）上获得）的情况下，一种或多种基因的替代性物种同源物（包括例如直系同源物、旁系同源物和非直系同源基因置换）的鉴别；及真核生物之间的遗传改变的互换为常规的且为本领域所熟知。因此，允许本文中参考特定生物体（例如酿酒酵母）所述的脂肪醇生产的代谢改变可容易地应用于其它微生物。考虑到本文提供的教导和指导，本领域技术人员理解，在一种生物体中例示的代谢改变可同等地适用于其它生物体。

[0072] 本发明的方法适用于各种原核生物和真核生物，例如细菌、酵母和真菌。例如，酵母可包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 和少根根霉 (*Rhizopus*

arrhizus)。示例性的真核生物也可包括克拉布特里 (Crabtree) 阳性和阴性酵母;及酵母属 (*Saccharomyces*)、克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*)、假丝酵母属 (*Candida*) 或毕赤酵母属 (*Pichia*) 中的酵母。更多示例性的真核菌种包括选自以下的那些: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*)、少根根霉 (*Rhizopus arrhizus*)、米根霉 (*Rhizopus oryzae*)、白色假丝酵母 (*Candida albicans*)、博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*)、萨纳瑞西斯假丝酵母 (*Candida sonorensis*)、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 和巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*)。另外,来自较大型真核生物的所选细胞也适用于本发明的方法。示例性的细菌包括选自以下的菌种:大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、产琥珀酸厌氧螺菌 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)、琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*)、产琥珀酸曼氏杆菌 (*Mannheimia succiniciproducens*)、豆根瘤菌 (*Rhizobium etli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、谷氨酸棒杆菌 (*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*)、天蓝色链霉菌 (*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*)。

[0073] 在本发明的有些方面,通过本文公开的 MI-FAE 循环和终止途径生产脂肪醇、脂肪醛和脂肪酸特别有用,这是因为该循环和途径导致比起通过天然存在的生物合成途径例如众所周知的丙二酰-CoA 依赖性脂肪酸合成途径,或在有些方面丙二酰-ACP 依赖性脂肪酸合成途径具有更高产物和 ATP 产率。例如,使用乙酰-CoA 作为 C₂ 延伸单元 (例如步骤 A, 图 1) 替代丙二酰-酰基载体蛋白 (丙二酰-ACP) 使得每单位通量进入 MI-FAE 循环的乙酰-CoA 节约一个 ATP 分子。MI-FAE 循环导致产生酰基-CoA 而非酰基-ACP, 并且可在乙酰-CoA 用作延伸单元时排除需要消耗 ATP 的酰基-CoA 合酶反应来产生辛醇和其它脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。本发明的生产脂肪醇、脂肪醛和脂肪酸的生物体可另外允许使用生物合成过程来转变低成本可再生原料以便制造化学产品。

[0074] 本发明的真核生物可经进一步工程改造以代谢和 / 或共同利用多种原料,包括葡萄糖、木糖、果糖、合成气、甲醇等。

[0075] 可使用高度活性酶与适用于所需脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成的合适底物范围的组合达成链长控制。可使用 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或终止途径的一种或多种酶来控制产物的链长。如本文中所述,可在 MI-FAE 循环期间通过一种或多种 MI-FAE 循环酶 (硫解酶、3-氧代酰基-CoA 还原酶、3-羟基酰基-CoA 脱水酶和 / 或烯酰-CoA 还原酶) 且在 MD-FAE 循环的情况下通过一种或多种 MD-FAE 循环酶 (延长酶、3-氧代酰基-CoA 还原酶、3-羟基酰基-CoA 脱水酶和 / 或烯酰-CoA 还原酶) 将链长封端,所述酶表现出对碳原子数目不大于所需产物大小的 MI-FAE 和 / 或 MD-FAE 循环底物具有选择性。由于酶是可逆的,因此延长途径酶中的任何一个可具有此能力。选择具有宽底物范围但规定链长边界的酶使得能够使用单种酶催化多个延长循环,同时赋予产物特异性。为了进一步增强特异性和防止较短副产物的累积,通过产物形成终止酶进一步约束选择性,以使得一种或多种酶对酰

基 -CoA 或碳原子数目不小于所需链长的其它终止途径底物具有选择性。产生不同链长产物的内源途径酶的缺失或衰减可进一步增强产物特异性。

[0076] 使用本文中概述的方法,本领域技术人员可自文献选择具有经表征的底物范围、选择性生产特定链长的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸产物的酶。为了选择性生产所需长度的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸,可以利用文献中如上所述的具有不同选择性范围的已知酶的组合。例如,生产 C₁₆脂肪醇的非天然存在的微生物可表达仅接受至多长度 C₁₆的底物的酶,例如褐家鼠 (*Rattus norvegicus*) Acaal 硫解酶和耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*) 的烯酰 -CoA 还原酶。将一种或两种链延长酶与 C₁₆-C₁₈脂肪酰 -CoA 还原酶(醇或醛形成)(例如霍霍巴 (*Simmondsia chinensis*) 的 FAR) 联合通过减少较短醇产物的合成进一步增加产物特异性。作为另一个实例,本发明的非天然存在的微生物可通过将拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 3-羟基酰基 -CoA 脱水酶与不动杆菌菌株 M-1 (*Acinetobacter* sp. Strain M-1) 的酰基 -CoA 还原酶 Acr1 组合而选择性生产长度 C₁₄的醇。为了生产长度 C₁₄的 3-氧代酸,可以例如将大鼠硫解酶与番茄 (*Solanum lycopersicum*) 的 3-氧代酰基 -CoA 水解酶组合。作为再一个实例,为了生产 C₁₈脂肪酸,可以将肠道沙门氏菌 (*Salmonella enterica*) fadE 烯酰 -CoA 还原酶与大肠杆菌 (*E. coli*) 的 tesB 硫酯酶组合。在又一个实例中,选择性生产 C₆醇通过将来自富养罗尔斯通氏菌 (*Ralstonia eutropha*) 的 paaH1 硫解酶与雷弗森菌 S749 (*Leifsonia* sp. S749) 醇脱氢酶 lsadh 组合而形成。

[0077] 示例性的 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和终止途径酶在实施例 I 中有详细描述。本文描述的生物合成酶表现出不同程度的底物特异性。在文献中表征的酶的示例性底物范围见下表并且在实施例 I 中有更详细描述。

[0078]

途径步骤	链长	基因	生物体
1A	C4	atoB	大肠杆菌
1A	C6	phaD	恶臭假单胞菌
1A	C6-C8	bktB	富养罗尔斯通氏菌
1A	C10-C16	Acaal	褐家鼠
1B	C4	hbd	丙酮丁醇梭菌
1B	C4-C6	paaH1	富养罗尔斯通氏菌
1B	C4-C10	HADH	野猪(<i>Sus scrofa</i>)
1B	C4-C18	fadB	大肠杆菌
1C	C4-C6	crt	丙酮丁醇梭菌
1C	C4-C7	pimF	沼泽红假单胞菌 (<i>Rhodopseudomonas palustris</i>)
1C	C4-C14	MFP2	拟南芥

[0079]

1D	C4-C6	ECR1	纤细裸藻(<i>Euglena gracilis</i>)
1D	C6-C8	ECR3	纤细裸藻
1D	C8-10	ECR2	纤细裸藻
1D	C8-C16	ECR	褐家鼠
1D	C10-C16	ECR	耻垢分枝杆菌
1D	C2-C18	fadE	肠道沙门氏菌
1E	C2-C4	bphG	假单胞菌
1E	C4	Bld	糖乙酸多丁醇梭菌
1E	C12-C20	ACR	醋酸钙不动杆菌(<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>)
1E	C14-C18	Acr1	不动杆菌菌株 M-1
1E	C16-C18	Rv1543, Rv3391	结核分枝杆菌(<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)
1F	C6-C7	lsadh	雷弗森菌 S749
1F	C2-C8	yqhD	大肠杆菌
1F	C3-C10	Adh	恶臭假单胞菌
1F	C2-C14	alrA	不动杆菌菌株 M-1
1F	C2-C30	ADH1	嗜热脱氮土芽孢杆菌 (<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>)
1G	C2	adhE	大肠杆菌
1G	C2-C8	adhe2	丙酮丁醇梭菌
1G	C14-C16	At3g11980	拟南芥
1G	C16	At3g44560	拟南芥
1G	C16-C18	FAR	霍霍巴
1H	C4	Cat2	克鲁维氏梭菌(<i>Clostridium kluyveri</i>)
1H	C4-C6	Acot12	褐家鼠
1H	C14	MKS2	番茄
1L	C8-C10	fatB2	萼距花(<i>Cuphea hookeriana</i>)
1L	C12	fatB	加州月桂(<i>Umbellularia californica</i>)
1L	C14-C16	fatB3	萼距花
1L	C18	tesA	大肠杆菌
1N	C12-C18	Car	艾奥瓦诺卡氏菌(<i>Nocardia iowensis</i>)
1N	C12-C16	Car	分枝杆菌(菌株 JLS)
1O	C4-C8	ELO1	布氏锥虫(<i>Trypanosoma brucei</i>)
1O	C10-C12	ELO2	布氏锥虫
1O	C14-C16	ELO3	布氏锥虫
1O	C14-C16	ELO1	酿酒酵母

[0080]

10	C18-C20	ELO2	酿酒酵母
10	C22-C24	ELO3	酿酒酵母

[0081] 考虑到各酶在 MI-FAE 循环或 MD-FAE 循环中的链长特异性差异,本领域技术人员可选择一种或多种酶用于催化各延长循环反应步骤(图 6 的步骤 A-D 或步骤 E/B/C/D)。例如,就 MI-FAE 循环的硫解酶步骤而言,一些硫解酶(例如富养罗尔斯通氏菌的 *bktB*)催化短链和中链酰基-CoA 中间体(C₆-C₈)的延长,而其它硫解酶(例如褐家鼠(*R. norvegicus*)的 *Acaal1a*)对较长链底物(C₁₀-C₁₆)有活性。因此,产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的微生物可包含硫解酶、延长酶、3-氧代酰基-CoA 还原酶、3-羟基酰基-CoA 脱水酶和/或烯酰-CoA 还原酶的一、二、三、四种或四种以上变异体。

[0082] 酶的链长特异性可通过本领域众所周知的方法进行测定(例如 Wrensford 等人, *Anal Biochem* 192:49-54(1991))。生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的酶的底物范围可通过本领域众所周知的方法进一步延伸或变窄。生物学存在的酶的变异体可例如通过如本文描述的合理和定向进化、诱变和酶改组来产生。作为一个实例,用于改变链长特异性的合理工程改造方法由 Denic 和 Weissman 进行(Denic 和 Weissman, *Cell* 130:663-77(2008))。Denic 和 Weissman 将负责链长的酵母延长酶蛋白质 ELOp 的区域作图,并且引入突变以改变脂肪酸产物的长度。在此情况下,疏水底物口袋的几何形状设定链长的上边界。类似的方法可用于改变 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和/或终止途径的酶的链长特异性。

[0083] 酶诱变、在宿主中的表达及针对脂肪醇生产的筛选是用于产生具有所需应用的改进特性的酶变异体的另一适用方法。例如,美国专利申请 2012/0009640 列举出栖藻海杆菌(*Marinobacter algicola*)和水油海杆菌(*Marinobacter aquaeolei*)FAR 酶的具有优于野生型酶的改进活性且改变产物分布型(profiles)的数百种变异体。

[0084] 酶诱变(随机或定向)并结合选择平台是另一适用方法。例如, Machado 及合作者开发出目的在于增加酰基-CoA 延长循环酶对较长链长底物的活性的选择平台(Machado 等人, *Met Eng* in press(2012))。Machado 等人鉴定出其途径(3-羟基酰基-CoA 脱氢酶)的链长限制步骤且使用厌氧生长拯救平台使其进化以获得对 C₆-C₈底物的改进活性。可用于生产脂肪醇的酶的其他变异体列于下表。

[0085]

酶	蛋白质/ GenBankID/ GI 编号	生物体	变异体	参考文献
3-酮酰基-CoA 硫 解酶	Acaa2 NP_569117.1GI:1842 6866	褐家鼠	H352A, H352E, H352K, H352Y	Zeng 等人, <i>Prot. Expr. Purif.</i> 35: 320-326 (2004)
3-羟基酰基-CoA 脱氢酶	Hadh NP_476534.1 GI:17105336	褐家鼠	S137A, S137C, S137T	Liu 等人, <i>Prot. Expr. Purif.</i> 37:344-351 (2004)。
烯酰-CoA 水合酶	Ech1 NP_072116.1 GI:12018256	褐家鼠	E144A, E144A/Q162L, E164A, Q162A, Q162L, Q162M	Kiema 等人, <i>Biochem.</i> 38:2991-2999 (1999)
烯酰-CoA 还原酶	InhA AAY54545.1 GI:66737267	结核分枝杆菌	K165A, K165Q, Y158F	Poletto, S 等人, <i>Prot. Expr. Purif.</i> 34: 118-125 (2004)。
酰基-CoA 还原酶	LuxC AAI00788.1 GI:46561111	明亮发光杆菌 (<i>Photobacterium</i> <i>phosphoreum</i>)	C171S, C279S, C286S	Lee, C. 等人, <i>Biochim. Biophys. Acta.</i> 1338: 215-222 (1997)。
醇脱氢酶	YADH-1 P00330.4 GI:1168350	酿酒酵母	D223G, D49N, E68Q, G204A, G224I, H47R, H51E, L203A	Lcskovac 等人, <i>FEMS Yeast Res.</i> 2(4):481-94 (2002)。
形成脂肪醇的酰基 -CoA 还原酶(FAR)	AdhE NP_415757.1GI:1612 9202	大肠杆菌	A267T/E568K, A267T	Membrillo 等人, <i>J. Biol. Chem.</i> 275(43): 333869-75 (2000)。

[0086] 本领域技术人员应当理解,遗传改变,包括本文例举的代谢修饰,可参照合适的宿主生物(例如大肠杆菌或酿酒酵母)和它们的相应代谢反应或者所需遗传材料(例如所

需代谢途径的基因)的合适来源生物体进行描述。然而,考虑到各种生物体的完整基因组测序和基因组学领域中技巧的高水平,本领域技术人员将能够容易地将本文提供的教导和指导应用到基本上所有的其它生物体。例如,本文例举的代谢改变可以通过掺入来自参考物种以外的其它物种的相同或类似编码核酸而容易地应用到其它物种。这样的遗传改变一般包括例如物种同源物(species homologs)的遗传改变,和具体包括例如直系同源物(orthologs)、旁系同源物(paralogs)或非直系同源基因置换(nonorthologous gene displacements)的遗传改变。

[0087] 直系同源物是有垂直亲缘(vertical descent)关系的并且在不同生物体中负责基本相同功能或完全相同功能的一个或多个基因。例如,小鼠环氧化物水解酶和人环氧化物水解酶可以因为环氧化物水解的生物功能而被视为直系同源物。当某些基因共享足够数量的序列相似性以表明它们是同源的,或者是从共同的祖先进化而有亲缘关系时,它们有垂直亲缘关系。如果某些基因共享三维结构但不一定共享足够数量的序列相似性以表明它们是从共同的祖先进化到一级序列相似性是不可辨识的程度,那么它们也可被视为直系同源物。作为直系同源的基因可以编码具有约 25%至 100%氨基酸序列同一性的序列相似性的蛋白质。编码共享氨基酸相似性小于(less than)25%的蛋白质的基因也可被视为因有垂直亲缘关系而提升,如果它们的三维结构也显示很高相似性的话。酶的丝氨酸蛋白酶家族成员,包括组织纤溶酶原激活物和弹性蛋白酶,都被视为因来自共同的祖先而有垂直亲缘关系而提升。

[0088] 直系同源物包括通过例如进化而在结构或总体活性上趋异的基因或它们的编码基因产物。例如,当一个物种编码表现出两种功能的基因产物并且当这样的功能已在第二个物种中分离到截然不同的基因上时,这三个基因及其相应的产物被视为直系同源物。为了生物化学产品的生产,本领域技术人员应当理解,为了构建非天然存在的微生物,必须对带有代谢活性的要被引入或破坏的直系同源基因进行选择。表现出可分离活性的直系同源物的一个实例是当截然不同的活性已在两个或两个以上物种之间或者在单一物种内分离到截然不同的基因产物上。一个具体的例子是弹性蛋白酶蛋白水解和纤溶酶原蛋白水解(丝氨酸蛋白酶活性的两种类型)已经作为纤溶酶原激活物和弹性蛋白酶分离成为两个截然不同的分子。第二个例子是支原体 5' -3' 外切核酸酶和果蝇(Drosophila)DNA 聚合酶 III 活性的分离。来自第一个物种的 DNA 聚合酶可被视为来自第二个物种的外切核酸酶或聚合酶中任一个或二者的直系同源物,反之亦然。

[0089] 相比之下,旁系同源物是因为例如复制后再进化趋异而有亲缘关系的同源物并且具有相似或共同的但不完全相同的功能。旁系同源物可起源于或来源于例如相同的物种或来自不同的物种。例如,微粒体环氧化物水解酶(环氧化物水解酶 I)和可溶性环氧化物水解酶(环氧化物水解酶 II)可被视为旁系同源物,因为它们代表了两种独特的酶,从共同的祖先共进化而来,它们催化不同的反应且在相同的物种中具有不同的功能。旁系同源物是来自相同的物种并且彼此具有显著序列相似性的蛋白质,提示它们是同源的,或者通过从共同的祖先共进化而有亲缘关系。旁系同源蛋白质家族的组包括 HipA 同源物、萤光素酶基因、肽酶等。

[0090] 非直系同源基因置换是来自一个物种的非直系同源基因,它可以在不同的物种中取代参考基因功能。取代包括例如,与在不同的物种中的参考功能相比,能够在原始的物种

中执行基本上相同或相似的功能。虽然一般而言,非直系同源基因置换将根据与编码参考功能的已知基因在结构上相关性而可鉴别,但是尽管如此,结构上相关性较少但功能上相似的基因及其相应基因产物将仍然落入该术语的含义之内,正如本文中使用的。与编码取代的功能的基因相比,在非直系同源基因产物的活性位点或结合区中,功能相似性需要例如至少某些结构相似性。因此,非直系同源基因包括例如旁系同源物(paralog)或无亲缘关系的基因(unrelated gene)。

[0091] 因此,在鉴定和构建本发明的具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成能力的非天然存在的微生物中,本领域技术人员应当知道将本文提供的教导和指导应用到某个具体的物种时,代谢修饰的鉴定可包括直系同源物的鉴定和纳入(inclusion)或失活。达到这种程度以致在编码催化相似或基本上相似代谢反应的酶的参考微生物中存在旁系同源物和/或非直系同源基因置换,本领域技术人员也可利用这些进化上相关的基因。类似地就基因破坏而言,也可以在宿主微生物中破坏或缺失进化上相关基因以减少或消除靶向破坏的酶促活性的功能冗余。

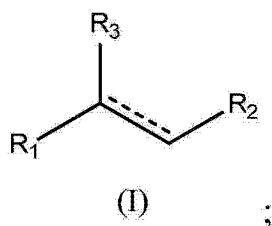
[0092] 直系同源物、旁系同源物和非直系同源基因置换可以通过本领域技术人员熟知的方法进行测定。例如,对于两种多肽,核酸或氨基酸序列的检查将揭示出比较序列之间的序列同一性和相似性。基于这样的相似性,本领域技术人员可以确定相似性是否足够高以表明蛋白质是来自共同的祖先通过进化相关的。本领域技术人员熟知的算法,例如 Align、BLAST、Clustal W 等算法比较并测定原序列的相似性或同一性,并且也测定可对比权重或评分的序列中空位(gaps)的存在或显著性。这样的算法也是本领域已知的并且可同样用于测定核苷酸序列相似性或同一性。具有足够的相似性以确定相关性(relatedness)的参数可基于熟知的方法输入计算机以计算统计相似性,或者在随机多肽中找到相似匹配的机会,并且测定匹配的显著性。两个或两个以上序列的计算机比较也可以(如果需要)由本领域技术人员用肉眼最优化。预期有相关性的基因产物或蛋白质可具有高度相似性,例如 25%至 100%序列同一性。无相关性的蛋白质可具有与预期偶然发生基本上相同的同一性,如果对足够大小的数据库扫描(约 5%)的话。5%和 24%之间的序列可能代表或不代表足够的同源性以得出结论是被比较序列是相关的。可以进行另外的统计分析以确定给出数据集大小的这类匹配的显著性,从而确定这些序列的关系。

[0093] 运用 BLAST 算法来测定两个或两个以上序列的相关性(relatedness)的示例性参数例如可以如下所示。简而言之,氨基酸序列比对可以使用 BLASTP 2.0.8 版本(1999 年 1 月 5 日)和以下参数进行:矩阵(matrix):0BLOSUM62;空位开放(gap open):11;空位延伸(gap extension):1;x_dropoff:50;期望值(expect):10.0;字大小(wordsize):3;过滤器(filter):开(on)。核酸序列比对可以使用 BLASTN 2.0.6 版本(1998 年 9 月 16 日)和以下参数进行:匹配(match):1;错配(mismatch):-2;空位开放(gapopen):5;空位延伸(gap extension):2;x_dropoff:50;期望值(expect):10.0;字大小(wordsize):11;过滤器(filter):关(off)。本领域技术人员将会知道对以上参数可以做出什么修改以或者增加或者减少例如比较的严格性和测定两个或两个以上序列的相关性。

[0094] 在有些实施方案中,本发明提供具有 MI-FAE 循环或 MD-FAE 循环与终止途径组合的非天然存在的微生物,其中所述 MI-FAE 循环包括一种或多种硫解酶、一种或多种 3-氧代酰基-CoA 还原酶、一种或多种 3-羟基酰基-CoA 脱水酶及一种或多种烯酰-CoA 还原酶,其

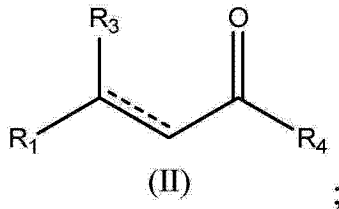
中所述 MD-FAE 循环包括一种或多种延长酶、一种或多种 3- 氧代酰基 -CoA 还原酶、一种或多种 3- 羟基酰基 -CoA 脱水酶及一种或多种烯酰 -CoA 还原酶, 其中所述终止途径包括图 1、图 6 或图 7 中所示的途径, 选自: (1) 1H; (2) 1K 和 1L; (3) 1E 和 1N; (4) 1K, 1J 和 1N; (5) 1E; (6) 1K 和 1J; (7) 1H 和 1N; (8) 1K, 1L 和 1N; (9) 1E 和 1F; (10) 1K, 1J 和 1F; (11) 1H, 1N 和 1F; (12) 1K, 1L, 1N 和 1F; 和 (13) 1G, 其中 1E 是酰基 -CoA 还原酶 (醛形成), 其中 1F 是醇脱氢酶, 其中 1G 是酰基 -CoA 还原酶 (醇形成), 其中 1H 是酰基 -CoA 水解酶、酰基 -CoA 转移酶或酰基 -CoA 合酶, 其中 1J 是酰基 -ACP 还原酶, 其中 1K 是酰基 -CoA:ACP 酰基转移酶, 其中 1L 是硫酯酶, 其中 1N 是醛脱氢酶 (酸形成) 或羧酸还原酶, 其中所述 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或终止途径的酶由至少一种外源核酸编码且足以产生式 (I) 的化合物的量表达:

[0095]



[0096] 其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基; R_2 为 CH_2OH 、 CHO 或 $COOH$; R_3 为 H 、 OH 或氧代 ($=O$); 且 $-----$ 代表单键或双键, 前提条件是 R_3 所连接的碳原子的化合价为四价, 其中该 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和该终止途径的所述酶中的每一种酶的底物独立地选自式 (II) 的化合物、丙二酰 -CoA、丙酰 -CoA 或乙酰 -CoA:

[0097]



[0098] 其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基; R_3 为 H 、 OH 或氧代 ($=O$); R_4 为 $S-CoA$ 、 ACP 、 OH 或 H ; 且 $-----$ 代表单键或双键, 前提条件是 R_3 所连接的碳原子的化合价为四价; 其中该 MI-FAE 循环的所述一种或多种酶各自对 R_1 上的碳原子数不大于所述式 (I) 化合物的 R_1 上的碳原子数的式 (II) 化合物具有选择性, 其中该 MD-FAE 循环的所述一种或多种酶各自对 R_1 上的碳原子数不大于所述式 (I) 化合物的 R_1 上的碳原子数的式 (II) 化合物具有选择性, 和其中该终止途径的所述一种或多种酶各自对 R_1 上的碳原子数不小于所述式 (I) 化合物的 R_1 上的碳原子数的式 (II) 化合物具有选择性。

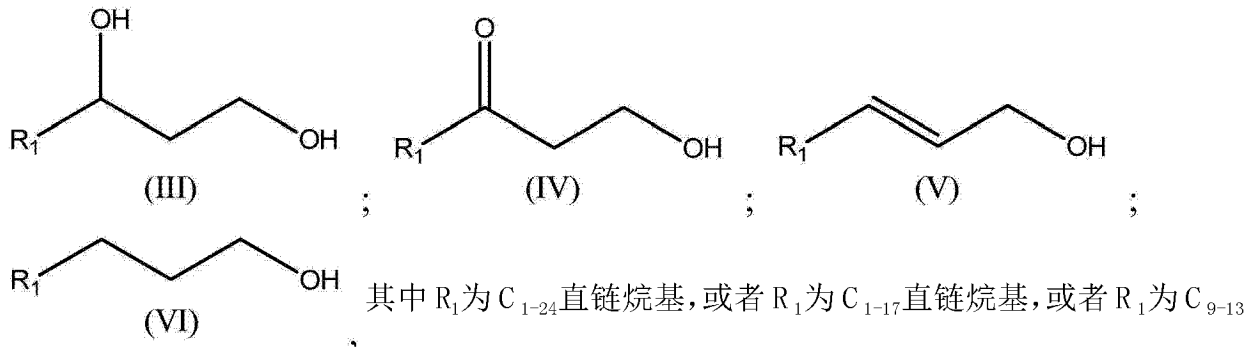
[0099] 在本发明的有些方面, 本发明的非天然存在的微生物可产生式 (I) 的化合物, 其中 R_1 为 C_{1-17} 直链烷基。在本发明的另一个方面, 式 (I) 的化合物的 R_1 是 C_1 直链烷基、 C_2 直链烷基、 C_3 直链烷基、 C_4 直链烷基、 C_5 直链烷基、 C_6 直链烷基、 C_7 直链烷基、 C_8 直链烷基、 C_9 直链烷基、 C_{10} 直链烷基、 C_{11} 直链烷基、 C_{12} 直链烷基或 C_{13} 直链烷基、 C_{14} 直链烷基、 C_{15} 直链烷基、 C_{16} 直链烷基、 C_{17} 直链烷基、 C_{18} 直链烷基、 C_{19} 直链烷基、 C_{20} 直链烷基、 C_{21} 直链烷基、 C_{22} 直链烷基、 C_{23} 直链烷基或 C_{24} 直链烷基。

[0100] 在本发明的有些方面, 所述微生物包括二、三或四种外源核酸, 各自编码该 MI-FAE

循环或该 MD-FAE 循环的酶。在本发明的有些方面,所述微生物包括二、三或四种外源核酸,各自编码该终止途径的酶。在本发明的有些方面,所述微生物包括编码选自 (1)-(13) 的途径中的至少一种途径的各种酶的外源核酸。在有些方面,所述至少一种外源核酸是异源核酸。在有些方面,所述非天然存在的微生物是在基本上厌氧的培养基中。

[0101] 在有些实施方案中,本发明提供非天然存在的微生物,其中所述 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或终止途径的一种或多种酶以足以产生选自式 (III)-(VI) 的脂肪醇的量表达:

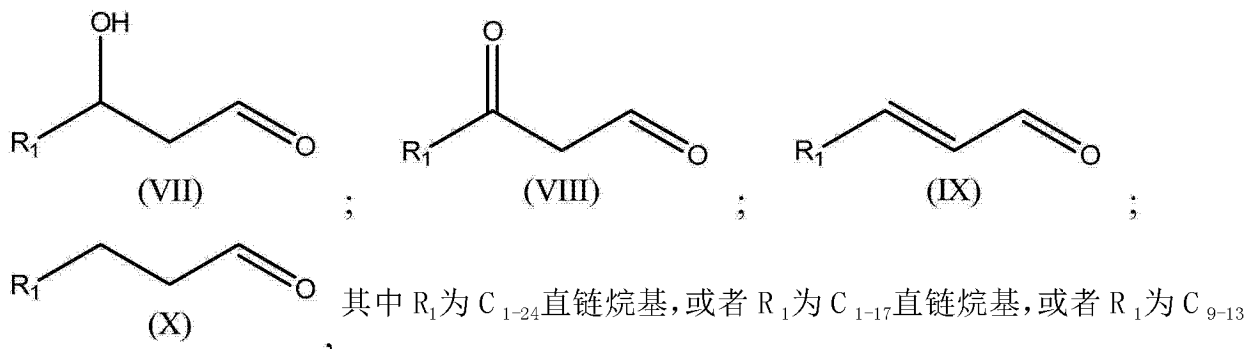
[0102]



直链烷基。在本发明的有些方面, R_1 为 C_1 直链烷基、 C_2 直链烷基、 C_3 直链烷基、 C_4 直链烷基、 C_5 直链烷基、 C_6 直链烷基、 C_7 直链烷基、 C_8 直链烷基、 C_9 直链烷基、 C_{10} 直链烷基、 C_{11} 直链烷基、 C_{12} 直链烷基或 C_{13} 直链烷基、 C_{14} 直链烷基、 C_{15} 直链烷基、 C_{16} 直链烷基、 C_{17} 直链烷基、 C_{18} 直链烷基、 C_{19} 直链烷基、 C_{20} 直链烷基、 C_{21} 直链烷基、 C_{22} 直链烷基、 C_{23} 直链烷基或 C_{24} 直链烷基。

[0103] 在有些实施方案中,本发明提供非天然存在的微生物,其中所述 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或终止途径的一种或多种酶以足以产生选自式 (VII)-(X) 的脂肪醛的量表达:

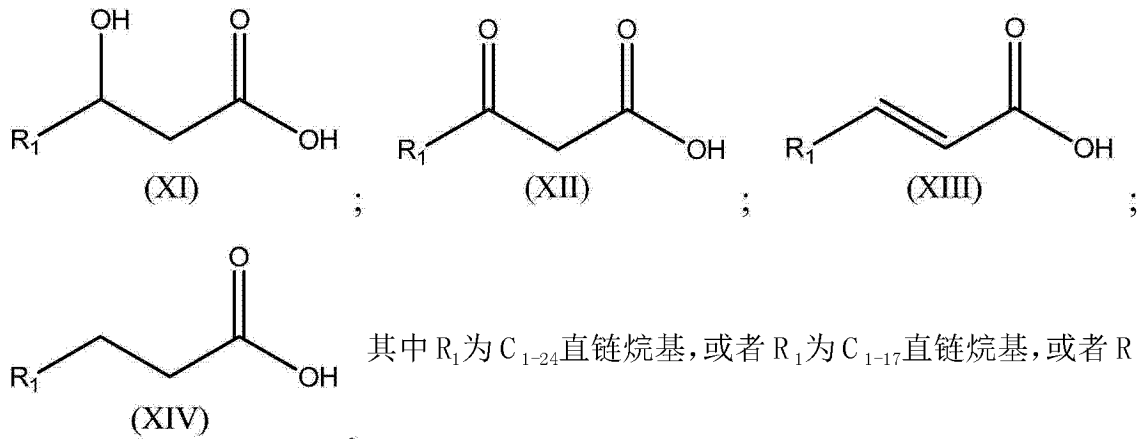
[0104]



直链烷基。在本发明的有些方面, R_1 为 C_1 直链烷基、 C_2 直链烷基、 C_3 直链烷基、 C_4 直链烷基、 C_5 直链烷基、 C_6 直链烷基、 C_7 直链烷基、 C_8 直链烷基、 C_9 直链烷基、 C_{10} 直链烷基、 C_{11} 直链烷基、 C_{12} 直链烷基或 C_{13} 直链烷基、 C_{14} 直链烷基、 C_{15} 直链烷基、 C_{16} 直链烷基、 C_{17} 直链烷基、 C_{18} 直链烷基、 C_{19} 直链烷基、 C_{20} 直链烷基、 C_{21} 直链烷基、 C_{22} 直链烷基、 C_{23} 直链烷基或 C_{24} 直链烷基。

[0105] 在有些实施方案中,本发明提供非天然存在的微生物,其中所述 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或终止途径的一种或多种酶以足以产生选自式 (XI)-(XIV) 的脂肪酸的量表达:

[0106]



直链烷基。在本发明的有些方面, R₁ 为 C₁ 直链烷基、C₂ 直链烷基、C₃ 直链烷基、C₄ 直链烷基、C₅ 直链烷基、C₆ 直链烷基、C₇ 直链烷基、C₈ 直链烷基、C₉ 直链烷基、C₁₀ 直链烷基、C₁₁ 直链烷基、C₁₂ 直链烷基或 C₁₃ 直链烷基、C₁₄ 直链烷基、C₁₅ 直链烷基、C₁₆ 直链烷基、C₁₇ 直链烷基、C₁₈ 直链烷基、C₁₉ 直链烷基、C₂₀ 直链烷基、C₂₁ 直链烷基、C₂₂ 直链烷基、C₂₃ 直链烷基或 C₂₄ 直链烷基。

[0107] 在有些实施方案中, 本发明提供如本文描述的非天然存在的微生物, 其中所述微生物还包括乙酰 -CoA 途径和至少一种编码以足以产生乙酰 -CoA 的量表达的乙酰 -CoA 途径酶的外源核酸, 其中所述乙酰 -CoA 途径包括图 2、3、4 或 5 中所示的途径, 选自: (1) 2A 和 2B; (2) 2A, 2C 和 2D; (3) 2H; (4) 2G 和 2D; (5) 2E, 2F 和 2B; (6) 2E 和 2I; (7) 2J, 2F 和 2B; (8) 2J 和 2I; (9) 3A, 3B 和 3C; (10) 3A, 3B, 3J, 3K 和 3D; (11) 3A, 3B, 3G 和 3D; (12) 3A, 3F 和 3D; (13) 3N, 3H, 3B 和 3C; (14) 3N, 3H, 3B, 3J, 3K 和 3D; (15) 3N, 3H, 3B, 3G 和 3D; (16) 3N, 3H, 3F 和 3D; (17) 3L, 3M, 3B 和 3C; (18) 3L, 3M, 3B, 3J, 3K 和 3D; (19) 3L, 3M, 3B, 3G 和 3D; (20) 3L, 3M, 3F 和 3D; (21) 4A, 4B, 4D, 4H, 4I 和 4J; (22) 4A, 4B, 4E, 4F, 4H, 4I 和 4J; (23) 4A, 4B, 4E, 4K, 4L, 4H, 4I 和 4J; (24) 4A, 4C, 4D, 4H 和 4J; (25) 4A, 4C, 4E, 4F, 4H 和 4J; (26) 4A, 4C, 4E, 4K, 4L, 4H 和 4J; (27) 5A, 5B, 5D 和 5G; (28) 5A, 5B, 5E, 5F 和 5G; (29) 5A, 5B, 5E, 5K, 5L 和 5G; (30) 5A, 5C 和 5D; (31) 5A, 5C, 5E 和 5F; 和 (32) 5A, 5C, 5E, 5K 和 5L, 其中 2A 是丙酮酸氧化酶 (乙酸形成), 其中 2B 是乙酰 -CoA 合成酶、乙酰 -CoA 连接酶或乙酰 -CoA 转移酶, 其中 2C 是乙酸激酶, 其中 2D 是磷酸转乙酰酶, 其中 2E 是丙酮酸脱羧酶, 其中 2F 是乙醛脱氢酶, 其中 2G 是丙酮酸氧化酶 (乙酰 - 磷酸形成), 其中 2H 是丙酮酸脱氢酶、丙酮酸: 铁氧还蛋白氧化还原酶、丙酮酸: NAD(P)H 氧化还原酶或丙酮酸甲酸裂合酶, 其中 2I 是乙醛脱氢酶 (酰基化), 其中 2J 是苏氨酸醛缩酶, 其中 3A 是磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 羧化酶或 PEP 羧激酶, 其中 3B 是草酰乙酸脱羧酶, 其中 3C 是丙二酸半醛脱氢酶 (乙酰基化), 其中 3D 是乙酰 -CoA 羧化酶或丙二酰 -CoA 脱羧酶, 其中 3E 是草酰乙酸脱氢酶或草酰乙酸氧化还原酶, 其中 3F 是草酰乙酸脱氢酶 (酰基化), 其中 3G 是丙二酸半醛脱氢酶 (酰基化), 其中 3H 是丙酮酸羧化酶, 其中 3J 是丙二酸半醛脱氢酶, 其中 3K 是丙二酰 -CoA 合成酶或丙二酰 -CoA 转移酶, 其中 3L 是苹果酸酶, 其中 3M 是苹果酸脱氢酶或苹果酸氧化还原酶, 其中 3N 是丙酮酸激酶或 PEP 磷酸酶, 其中 4A 是柠檬酸合酶, 其中 4B 是柠檬酸转运体, 其中 4C 是柠檬酸 / 苹果酸转运体, 其中 4D 是 ATP 柠檬酸裂合酶, 其中 4E 是柠檬酸裂合酶, 其中 4F 是乙酰 -CoA 合成酶或乙酰 -CoA

转移酶,其中 4H 是细胞溶质苹果酸脱氢酶,其中 4I 是苹果酸转运体,其中 4J 是线粒体苹果酸脱氢酶,其中 4K 是乙酸激酶,其中 4L 是磷酸转乙酰酶,其中 5A 是柠檬酸合酶,其中 5B 是柠檬酸转运体,其中 5C 是柠檬酸 / 草酰乙酸转运体,其中 5D 是 ATP 柠檬酸裂合酶,其中 5E 是柠檬酸裂合酶,其中 5F 是乙酰 -CoA 合成酶或乙酰 -CoA 转移酶,其中 5G 是草酰乙酸转运体,其中 5K 是乙酸激酶,和其中 5L 是磷酸转乙酰酶。

[0108] 在有些方面,本发明的微生物可包括二、三、四、五、六、七或八种外源核酸,各自编码乙酰 -CoA 途径酶。在有些方面,所述微生物包括编码选自 (1)-(32) 的途径中的至少一种途径的各种乙酰 -CoA 途径酶的外源核酸。

[0109] 在一个另外的实施方案中,本发明提供具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的非天然存在的微生物,其中所述非天然存在的微生物包含至少一种外源核酸,其编码选自由将以下的底物转变成以下的产物组成的组的酶或蛋白质:两个乙酰 -CoA 分子至 3- 酮酰基 -CoA, 乙酰 -CoA 加上丙酰 -CoA 至酮酰基 -CoA, 丙二酰 -CoA 至 3- 酮酰基 -CoA, 3- 酮酰基 -CoA 至 3- 羟基酰基 -CoA, 3- 羟基酰基 -CoA 至烯酰 -CoA, 烯酰 -CoA 至酰基 -CoA, 酰基 -CoA 加上乙酰 -CoA 至 3- 酮酰基 -CoA, 酰基 -CoA 加上丙二酰 -CoA 至 3- 酮酰基 -CoA, 酰基 -CoA 至脂肪醛, 脂肪醛至脂肪醇, 酰基 -CoA 至脂肪醇, 酰基 -CoA 至酰基 -ACP, 酰基 -ACP 至脂肪酸, 酰基 -CoA 至脂肪酸, 酰基 -ACP 至脂肪醛, 脂肪酸至脂肪醛, 脂肪醛至脂肪酸, 丙酮酸至乙酸, 乙酸至乙酰 -CoA, 丙酮酸至乙酰 -CoA, 丙酮酸至乙醛, 苏氨酸至乙醛, 乙醛至乙酸, 乙醛至乙酰 -CoA, 丙酮酸至乙酰 - 磷酸, 乙酸至乙酰 - 磷酸, 乙酰 - 磷酸至乙酰 -CoA, 磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 至丙酮酸, 丙酮酸至苹果酸, 苹果酸至草酰乙酸, 丙酮酸至草酰乙酸, PEP 至草酰乙酸, 草酰乙酸至丙二酸半醛, 草酰乙酸至丙二酰 -CoA, 丙二酸半醛至丙二酸, 丙二酸至丙二酰 -CoA, 丙二酸半醛至丙二酰 -CoA, 丙二酰 -CoA 至乙酰 -CoA, 丙二酸半醛至乙酰 -CoA, 草酰乙酸加上乙酰 -CoA 至柠檬酸, 柠檬酸至草酰乙酸加上乙酰 -CoA, 柠檬酸至草酰乙酸加上乙酸, 和草酰乙酸至苹果酸。本领域技术人员将会理解这些仅仅是示例性的, 并且根据本文的教导, 本领域技术人员可以容易地确定适合于生产所需产物及适用于适当活性为将底物转变成产物所需要的本文公开的底物 - 产物对中的任何一个。因此, 本发明提供含有至少一种编码酶或蛋白质的外源核酸的非天然存在的微生物, 其中该酶或蛋白质使脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径 (例如图 1-8 所示的途径) 的底物和产物发生转变。

[0110] 尽管本文一般性描述为含有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的微生物, 但是应当理解, 本发明另外还提供包含至少一种外源核酸的非天然存在的微生物, 该外源核酸编码以足以产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的中间体的量表达的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径酶或蛋白质。例如, 正如本文所公开的, 脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径在图 1-7 中举例说明。因此, 除了含有产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的微生物以外, 本发明另外还提供包含至少一种编码脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径酶的外源核酸的非天然存在的微生物, 其中所述微生物产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体, 例如, 3- 酮酰基 -CoA、3- 羟基酰基 -CoA、烯酰 -CoA、酰基 -CoA、酰基 -ACP、乙酸、乙醛、乙酰 - 磷酸、草酰乙酸、苹果酸 (malate)、丙二酸半醛、丙二酸、丙二酰 -CoA、乙酰 -CoA 或柠檬酸。

[0111] 应当理解, 本文公开的任何途径, 如在实施例中描述的和在附图中例举的, 包括图 1-7 的途径, 都可以用于产生非天然存在的微生物, 该微生物按需要产生任何途径中间体或产物。正如本文所公开的, 这样一种产中间体的微生物可以与表达下游途径酶以产生所需

产物的其它微生物联合使用。然而,应当理解,产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体的非天然存在的微生物可以用于生产作为所需产物的中间体。

[0112] 本文中一般参照代谢反应、其反应物或产物,或具体参照编码与参考代谢反应、反应物或产物相关的酶、或催化参考代谢反应、反应物或产物的酶、或与参考代谢反应、反应物或产物相关的蛋白质的一种或多种核酸或基因,对本发明进行了描述。除非本文另有明确的表述,否则本领域技术人员应当理解,参照反应也构成参照反应的反应物和产物。类似地,除非本文另有明确的表述,否则参照反应物或产物也参照反应,和参照这些代谢组分中的任何一个也参照编码催化参考反应、反应物或产物的酶或参与参考反应、反应物或产物的蛋白质的一个或多个基因。类似地,考虑到代谢生物化学、酶学和基因组学的公知领域,本文参照基因或编码核酸也构成参照相应的编码酶和它所催化的反应或与反应相关的蛋白质以及反应的反应物和产物。

[0113] 本发明的非天然存在的微生物可以通过引入编码一种或多种参与一种或多种脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成途径的酶或蛋白质的可表达核酸来产生。根据生物合成所选出的宿主微生物,可以表达具体的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成途径中的某些或全部的核酸。例如,如果所选宿主在所需生物合成途径的一种或多种酶或蛋白质中是有缺陷的,那么可以将这种有缺陷的酶或蛋白质的可表达核酸导入宿主中用于后续的外源表达。或者,如果所选宿主表现出某些途径基因的内源表达,但是其它的是有缺陷的,那么对于这种有缺陷的酶或蛋白质来说,需要编码核酸才能实现脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成。因此,本发明的非天然存在的微生物可以通过引入外源酶或蛋白质活性以获得所需生物合成途径来产生,或者所需生物合成途径可以通过引入一种或多种外源酶或蛋白质活性来获得,连同一种或多种内源酶或蛋白质,产生所需产物,例如脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。

[0114] 宿主微生物可选自以下及在以下中产生的非天然存在的微生物:例如,细菌、酵母、真菌,或可应用于或适合于发酵过程中的各式各样的其它微生物中的任何一种。示例性的细菌包括选自以下目、科、属的任何菌种:肠杆菌目(Enterobacteriales),肠杆菌科(Enterobacteriaceae),包括埃希氏菌属(*Escherichia*)和克雷伯氏菌属(*Klebsiella*);气单胞菌目(Aeromonadales),琥珀酸弧菌科(Succinivibrionaceae),包括厌氧螺菌属(*Anaerobiospirillum*);巴斯德氏菌目(Pasteurellales),巴斯德氏菌科(Pasteurellaceae),包括放线杆菌属(*Actinobacillus*)和曼氏杆菌属(*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),棒杆菌科(Corynebacteriaceae)和链霉菌科(Streptomycetaceae),分别包括棒杆菌属(*Corynebacterium*)和链霉菌属(*Streptomyces*);红螺菌目(Rhodospirillales),醋杆菌科(Acetobacteraceae),包括葡糖杆菌属(*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菌种包

括大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、产酸克雷伯氏菌 (*Klebsiella oxytoca*)、产琥珀酸厌氧螺菌 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)、琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*)、产琥珀酸曼氏杆菌 (*Mannheimia succiniciproducens*)、豆根瘤菌 (*Rhizobium etli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、谷氨酸棒杆菌 (*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*)、天蓝色链霉菌 (*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*)。

[0115] 类似地, 示例性的酵母或真菌菌种包括选自以下目、科、属的任何菌种: 酵母目 (*Saccharomycetales*), 酵母科 (*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*), 双足囊菌科 (*Dipodascaceae*), 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*); 毛霉目 (*Mucorales*), 毛霉科 (*Mucoraceae*), 包括根霉属 (*Rhizopus*)。宿主酵母或真菌的非限制性菌种包括酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、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*)、少根根霉 (*Rhizopus arrhizus*)、米根霉 (*Rhizobus oryzae*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 等。大肠杆菌是一种特别有用的宿主生物, 这是因为它适用于遗传工程改造的经充分表征的微生物。其它特别有用的宿主生物包括酵母, 例如酿酒酵母。应当理解, 任何合适的微生物宿主生物都可以用于引入代谢和 / 或遗传修饰以产生所需产物。

[0116] 根据所选宿主微生物的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成途径组分, 本发明的非天然存在的微生物将包括一种或多种脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成途径的至少一种外源表达的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径编码核酸和多达所有的编码核酸。例如, 可以在途径酶或蛋白质中有缺陷的宿主中通过相应编码核酸的外源表达来建立脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成。在脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的所有酶或蛋白质中有缺陷的宿主中, 可以包括所有酶或蛋白质在该途径中的外源表达, 虽然应当理解, 某一途径的所有酶或蛋白质可以表达, 即使该宿主含有途径酶或蛋白质中的至少一个。例如, 可以包括所有酶或蛋白质在产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的途径中的外源表达, 例如, 硫解酶、3-氧代酰基-CoA 还原酶、3-羟基酰基-CoA 脱水酶、烯酰-CoA 还原酶 (reductase)、酰基-CoA 还原酶 (醛形成) 和醇脱氢酶, 以用于生产脂肪醇。

[0117] 考虑到本文提供的教导和指导, 本领域技术人员应当理解, 以可表达形式引入的编码核酸的数目将至少平行于所选宿主微生物的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径缺陷。因此, 本发明的非天然存在的微生物可具有一、二、三、四、五、六、七或八种, 乃至多达所有编码本文公开的构成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成途径的酶或蛋白质的核酸。在有些实施方案中, 该非天然存在的微生物也可包括其它遗传修饰, 该遗传修饰促进或最优化脂肪醇、脂

肪醛或脂肪酸生物合成或者赋予宿主微生物其它有用的功能。一种这样的其它功能性可包括例如加强脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径前体中的一种或多种前体例如乙酰 -CoA、丙二酰 -CoA 或丙酰 -CoA 的合成。

[0118] 一般而言,对宿主微生物进行选择使得它产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的前体,该前体或者作为天然产生的分子或者作为工程产物,以或者提供所需前体的从头 (de novo) 产生或使由宿主微生物天然产生的前体的产生增加。例如,乙酰 -CoA 是在宿主生物(例如大肠杆菌)中天然产生的。宿主生物可以经过工程改造以增加前体的产生,正如本文所公开的。另外,经过了工程改造以产生所需前体的微生物可以用作宿主生物并且经过进一步工程改造以表达脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的酶或蛋白质。

[0119] 在有些实施方案中,本发明的非天然存在的微生物从含有合成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的酶促能力的宿主中产生。在这个具体的实施方案中,它可用于增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径产物的合成或累积,以例如驱动脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径反应朝向脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产。可以通过例如编码上述脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径酶或蛋白质中的一种或多种的核酸的过量表达来完成增加的合成或累积。例如,通过一个或多个内源基因的外源表达,或者通过一个或多个异源基因的外源表达,可以发生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的一种或多种酶和 / 或一种或多种蛋白质的过量表达。因此,天然存在的生物体可以容易地产生出本发明的非天然存在的微生物,例如产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的非天然存在的微生物,即通过一、二、三、四、五、六、七或八种,乃至多达所有编码脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成途径酶或蛋白质的核酸的过量表达。另外,非天然存在的生物体可以通过内源基因的诱变导致脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成途径中酶的活性增加来产生。

[0120] 在特别有用的实施方案中,采用了编码核酸的外源表达。外源表达赋予宿主定制表达和 / 或调节元件的能力并且用于达到由使用者控制的所需表达水平。然而,内源表达也可以用于其它的实施方案中,例如通过去除负调节效应子或者当与诱导性启动子或其它调节元件连接时诱导基因的启动子。因此,具有天然存在的诱导性启动子的内源基因可以通过提供适宜的诱导剂而上调,或者内源基因的调节区可以经过工程改造以掺入诱导性调节元件,从而允许在所需时间调节内源基因的表达增加。类似地,可以包括诱导性启动子作为调节元件以将外源基因引入到非天然存在的微生物中。

[0121] 应当理解,在本发明的方法中,可以将任何一种或多种外源核酸引入到某种微生物中以产生本发明的非天然存在的微生物。所述核酸可以被引入以例如赋予所述微生物脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成途径。或者,为了赋予脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成能力,编码核酸可以被引入以产生具有生物合成能力以催化某些所需反应的中间微生物。例如,具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成途径的非天然存在的微生物可包含至少两种编码所需酶或蛋白质的外源核酸,例如硫解酶和酰基 -CoA 还原酶的组合(醇形成),或者 2-氧代酰基 -CoA 还原酶和酰基 -CoA 水解酶的组合,或者烯酰 -CoA 还原酶和酰基 -CoA 还原酶的组合(醛形成),等等。因此,应当理解,本发明的非天然存在的微生物中可包括生物合成途径的两种或两种以上酶或蛋白质的任何组合。类似地,应当理解,本发明的非天然存在的微生物中根据需要可包括生物合成途径的三种或三种以上酶或蛋白质的任何组合,例如,硫解酶、烯酰 -CoA 还原酶和醛脱氢酶的组合(酸形成),或者 3-羟基酰基 -CoA 脱水酶、酰基 -CoA:ACP 酰基转移酶和硫酯酶的组合,或者 3-氧代酰基 -CoA 还原酶、酰基 -CoA 水解

酶和羧酸还原酶的组合,等等,只要所需生物合成途径的酶和 / 或蛋白质的组合可以导致产生相应的所需产物即可。类似地,本发明的非天然存在的微生物中根据需要可包括如本文公开的生物合成途径的四、五、六、七、八种或八种以上酶或蛋白质的任何组合,只要所需生物合成途径的酶和 / 或蛋白质的组合可以导致产生相应的所需产物即可。

[0122] 除了如本文描述的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生物合成以外,本发明的非天然存在的微生物和方法还可以彼此和 / 或与本领域熟知的其它微生物和方法以各种组合使用以达到产物通过其它路径的生物合成。例如,不使用脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产者来生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的一种替代方法是通过加入另一种能够将脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体转变成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的微生物。一种这样的程序包括例如生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体微生物的发酵。然后,脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体可以用作第二种微生物的底物,从而将脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体转变成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。可以将脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体直接加入到第二种生物体的另一种培养物中,或者脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体生产者的原始培养物可以通过例如细胞分离来清除掉这些微生物,然后可以向发酵肉汤中后续添加第二种生物体用于生产最终产物而无需中间纯化步骤。

[0123] 在其它实施方案中,本发明的非天然存在的微生物和方法可以按各种各样的亚途径装配以实现例如脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生物合成。在这些实施方案中,本发明所需产物的生物合成途径可以分离在不同的微生物中,并且这些不同的微生物可以共培养以产生最终产物。在这样一种生物合成方案中,一种微生物的产物是第二种微生物的底物直到最终产物被合成。例如,脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生物合成可以通过构建含有将一种途径中间体转变成另一种途径中间体或产物的生物合成途径的微生物来完成。或者,脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸也可以通过在同一容器中使用两种生物体的共培养或共发酵由微生物经生物合成生产,其中第一种微生物生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸中间体,而第二种微生物将此中间体转变成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。

[0124] 考虑到本文提供的教导和指导,本领域技术人员将会理解,存在着本发明的非天然存在的微生物和方法与其它微生物、与具有亚途径的其它非天然存在的微生物的共培养物 and 与本领域熟知的生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的其它化学和 / 或生物化学方法步骤的组合一起的各种组合和排列。

[0125] 类似地,本领域技术人员应当理解,宿主生物可基于引入一个或多个基因破坏以增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的产生所需要的特征进行选择。因此,应当理解,如果将遗传修饰引入到宿主生物中以破坏基因,则可以类似地破坏催化相似但不完全相同代谢反应的任何同源物、直系同源物或旁系同源物以确保所需代谢反应受到充分破坏。因为不同生物体之间在代谢网络中存在某些差异,所以本领域技术人员应当理解,给定生物体中被破坏的实际基因可能在生物体间不相同。然而,考虑到本文提供的教导和指导,本领域技术人员也将理解,本发明的方法可应用于任何合适的宿主微生物以鉴别构建将增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成的所关注物种中的生物体所需要的关联代谢改变。在一个特定的实施方案中,增加的生产将脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生物合成与生物体的生长耦合,且如果需要和正如本文所公开的,可将脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生产与生物体的生长强制耦合。

[0126] 脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径酶或蛋白质的编码核酸的来源可包括例如其中所编

码的基因产物能够催化参考反应的任何物种。这样的物种既包括原核生物又包括真核生物,包括但不限于细菌,包括古细菌 (archaea) 和真细菌 (eubacteria);和真核生物 (eukaryotes),包括酵母、植物、昆虫、动物和哺乳动物,包括人。这些来源的示例性物种包括例如大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、255956237 产黄青霉菌威斯康辛 54-1255 (255956237 *Penicillium chrysogenum* Wisconsin 54-1255)、巴斯德醋杆菌 (*Acetobacter pasteurians*)、发酵氨基酸球菌 (*Acidaminococcus fermentans*)、贝氏不动杆菌 (*Acinetobacter baylii*)、醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*)、不动杆菌 ADP1 (*Acinetobacter* sp. ADP1)、不动杆菌菌株 M-1 (*Acinetobacter* sp. Strain M-1)、琥珀酸放线杆菌 (*Actinobacillus succinogenes*)、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*)、根癌土壤杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*)、产金属嗜碱菌 QYMF (*Alkaliphilus metalliredigens* QYMF)、奥伦兰嗜碱菌 OhILAs (*Alkaliphilus oremlandii* OhILAs)、多变鱼腥藻 (*Anabaena variabilis*) ATCC 29413、产琥珀酸厌氧螺菌 (*Anaerobiospirillum succiniciproducens*)、冈比亚疟蚊菌株 PEST (*Anopheles gambiae* str. PEST)、蜜蜂 (*Apis mellifera*)、风产液菌 (*Aquifex aeolicus*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、闪烁古生球菌 (*Archaeoglobus fulgidus*)、闪烁古生球菌 DSM 4304 (*Archaeoglobus fulgidus* DSM 4304)、猪蛔虫 (*Ascaris suum*)、烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、黑曲霉 CBS 513.88 (*Aspergillus niger* CBS 513.88)、土曲霉 NIH2624 (*Aspergillus terreus* NIH2624)、棕色固氮菌 DJ (*Azotobacter vinelandii* DJ)、蜡样芽孢杆菌 (*Bacillus cereus*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、甲醇芽孢杆菌 MGA3 (*Bacillus methanolicus* MGA3)、甲醇芽孢杆菌 PB1、芽孢杆菌菌种 SG-1 (*Bacillus* sp. SG-1)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、韦氏芽孢杆菌 KBAB4 (*Bacillus weihenstephanensis* KBAB4)、脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*)、家蚕 (*Bombyx mori*)、牛 (*Bos taurus*)、日本慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*)、日本慢生根瘤菌 USDA110 (*Bradyrhizobium japonicum* USDA110)、欧洲油菜 (*Brassica napsus*)、不明确伯克霍尔德氏菌 AMMD (*Burkholderia ambifaria* AMMD)、多噬伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia multivorans*) ATCC 17616、瘤状伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia phymatum*)、稳定伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia stabilis*)、产丁酸菌 L2-50 (butyrate-producing bacterium L2-50)、布里吉沙耶隐杆线虫 AF16 (*Caenorhabditis briggsae* AF16)、秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*)、空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*)、白色假丝酵母 (*Candida albicans*)、博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*)、甲基假丝酵母 (*Candida methylica*)、近平滑假丝酵母 (*Candida parapsilosis*)、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)、热带假丝酵母 MYA-3404、变形虫原厚垣假丝酵母 (*Candidatus Protochlamydia amoebophila*)、犬科一家犬 (*Canis lupus familiaris*) (狗)、生氢氧化羧基嗜热菌 (*Carboxydothemus hydrogeniformans*)、红花 (*Carthamus tinctorius*)、莱茵衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*)、泥生绿菌 (*Chlorobium limicola*)、微温绿菌 (*Chlorobium tepidum*)、橙色绿屈挠菌 (*Chloroflexus aurantiacus*)、香橙 (*Citrus junos*)、丙酮丁醇梭菌 (*Clostridium acetobutylicum*)、氨基丁酸梭菌 (*Clostridium aminobutyricum*)、拜氏梭菌 (*Clostridium beijerinckii*)、拜氏梭菌 NCIMB 8052、嗜一氧化碳梭菌 P7 (*Clostridium carboxidivorans* P7)、克鲁维氏梭菌

(*Clostridium kluuyveri*)、克鲁维氏梭菌 DSM 555、巴斯德氏梭菌 (*Clostridium pasteurianum*)、糖乙酸多丁醇梭菌 (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*)、共生梭菌 (*Clostridium symbiosum*)、破伤风梭菌 E88 (*Clostridium tetani* E88)、冷红科尔韦氏菌 34H (*Colwellia psychrerythraea* 34H)、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、新型隐球菌变种 (*Cryptococcus neoformans* var)、小隐孢子虫 Iowa II (*Cryptosporidium parvum* Iowa II)、萼距花 (*Cuphea hookeriana*)、湿地萼距花 (*Cuphea palustris*)、钩虫贪铜菌 (*Cupriavidus necator*)、台湾贪铜菌 (*Cupriavidus taiwanensis*)、蓝菌属 PCC7001 (*Cyanobium* PCC7001)、蓝丝菌 (*Cyanothece* sp.) PCC 7425、斑马鱼 (*Danio rerio*)、食烯炔脱硫杆菌 AK-01 (*Desulfatibacillum alkenivorans* AK-01)、食油脱硫球菌 Hxd3 (*Desulfococcus oleovorans* Hxd3)、非洲脱硫弧菌 (*Desulfovibrio africanus*)、盘基网柄菌 (*Dictyostelium discoideum*)、盘基网柄菌 AX4 (*Dictyostelium discoideum* AX4)、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*)、赤杆菌 (*Erythrobacter* sp.) NAP1、大肠杆菌 K-12 MG1655、纤细裸藻 (*Euglena gracilis*)、黄杆菌 (*Flavobacteria bacterium*) BAL38、具核梭杆菌 (*Fusobacterium nucleatum*)、嗜热脱氮土芽孢杆菌 (*Geobacillus thermodenitrificans*)、流感嗜血菌 (*Haemophilus influenza*)、死海盐盒菌 (*Haloarcula marismortui*)、死海盐盒菌 (*Haloarcula marismortui*) ATCC 43049、盐单胞菌 HTNK1 (*Halomonas* sp. HTNK1)、向日葵 (*Helianthus annuus*)、幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*)、幽门螺杆菌 26695、智人 (*Homo sapiens*)、嗜热氢杆菌 (*Hydrogenobacter thermophilus*)、肺炎克雷伯氏菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、乳酸克鲁维酵母 (*Kluuyveromyces lactis*)、乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140、干酪乳杆菌 (*Lactobacillus casei*)、植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*)、罗伊氏乳杆菌 (*Lactobacillus reuteri*)、乳酸乳球菌 (*Lactococcus lactis*)、雷弗森菌 S749 (*Leifsonia* sp. S749)、肠系膜样明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*)、鞘丝藻 (*Lyngbya* sp.) PCC 8106、猕猴 (*Macaca mulatta*)、超磁螺菌 (*Magnetospirillum magneticum*) AMB-1、产琥珀酸曼氏杆菌 (*Mannheimia succiniciproducens*)、海洋 γ 变型杆菌 HTCC2080 (*marine gamma proteobacterium* HTCC2080)、水油海杆菌 (*Marinobacter aquaeolei*)、水油海杆菌 VT8 (*Marinobacter aquaeolei* VT8)、大黍 (*Megathyrsus maximus*)、百脉根中间根瘤菌 (*Mesorhizobium loti*)、瑟杜生金属球菌 (*Metallosphaera sedula*)、嗜热甲烷八叠球菌 (*Methanosarcina thermophila*)、热自养甲烷热杆菌 (*Methanothermobacter thermautotrophicus*)、外链甲基杆菌 (*Methylobacterium extorquens*)、短颈单领藻 (*Monosiga brevicollis*) MX1、热醋穆尔氏菌 (*Moorella thermoacetica*)、热醋穆尔氏菌 ATCC 39073、小家鼠 (*Mus musculus*)、鸟分枝杆菌副结核亚种 K-10 (*Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K-10)、牛分枝杆菌 BCG (*Mycobacterium bovis* BCG)、海分枝杆菌 M (*Mycobacterium marinum* M)、耻垢分枝杆菌 (*Mycobacterium smegmatis*)、耻垢分枝杆菌 MC2 155、分枝杆菌 (*Mycobacterium* sp.) (菌株 JLS)、分枝杆菌 MCS、分枝杆菌菌株 JLS、结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*)、黄色粘球菌 (*Myxococcus xanthus*) DK 1622、星状海葵 (*Nematostella vectensis*)、粗糙脉孢霉 (*Neurospora crassa*) OR74A、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、巴西诺卡氏菌 (*Nocardia brasiliensis*)、皮疽诺卡氏菌 (*Nocardia farcinica*) IFM 10152、艾奥瓦诺卡氏菌 (*Nocardia iowensis*)、泡沫节球藻

CCY9414(*Nodularia spumigena* CCY9414)、厚壁孢子念珠藻(*Nostoc azollae*)、念珠藻(*Nostoc* sp.)PCC 7120、丰祐菌(*Opitutaceae bacterium*)TAV2、脱氮副球菌(*Paracoccus denitrificans*)、产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)、海洋帕金虫(*Perkinsus marinus*)ATCC 50983、明亮发光杆菌(*Photobacterium phosphoreum*)、发光杆菌(*Photobacterium* sp.)SKA34、北美云杉(*Picea sitchensis*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、巴斯德毕赤酵母 GS115、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、牙龈卟啉单胞菌(*Porphyromonas gingivalis*)、牙龈卟啉单胞菌 W83、海洋原绿球藻 MIT 9312(*Prochlorococcus marinus* MIT 9312)、中度产丙酸菌(*Propionigenium modestum*)、绿脓假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、绿脓假单胞菌 PA01、荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*)、荧光假单胞菌 Pf0-1、克氏假单胞菌(*Pseudomonas knackmussii*)、克氏假单胞菌 (B13)、恶臭假单胞菌(*Pseudomonas putida*)、恶臭假单胞菌 GB-1、假单胞菌(*Pseudomonas* sp.)、假单胞菌 CF600、施氏假单胞菌(*Pseudomonas stutzeri*)、施氏假单胞菌 A1501、丁香假单胞菌(*Pseudomonas syringae*)、好氧火棒菌(*Pyrobaculum aerophilum*) 菌株 IM2、富养罗尔斯通氏菌(*Ralstonia eutropha*)、耐金属罗尔斯通氏菌(*Ralstonia metallidurans*)、褐家鼠(*Rattus norvegicus*)、吉祥草(*Reinekea* sp.)MED297、豆根瘤菌 CFN 42(*Rhizobium etli* CFN 42)、豌豆根瘤菌(*Rhizobium leguminosarum*)、类球红细菌(*Rhodobacter sphaeroides*)、红平红球菌(*Rhodococcus erythropolis*)、红球菌(*Rhodococcus* sp.)、沼泽红假单胞菌(*Rhodopseudomonas palustris*)、卡氏玫瑰弯菌(*Roseiflexus castenholzii*)、玫瑰变色菌(*Roseovarius* sp.) HTCC2601、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、酿酒酵母 s288c、肠道沙门氏菌(*Salmonella enteric*)、肠道沙门氏菌鼠伤寒肠道亚种血清型变种菌株 LT2(*Salmonella enterica* subsp.*enterica* serovar Typhimurium str.LT2)、鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)、鼠伤寒沙门氏菌 LT2、树干谢尔壶菌(*Scheffersomyces stipitidis*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、痢疾志贺氏菌(*Shigella dysenteriae*)、索氏志贺氏菌(*Shigella sonnei*)、霍霍巴(*Simmondsia chinensis*)、番茄(*Solanum lycopersicum*)、大孢粪壳(*Sordaria macrospora*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)、突变链球菌(*Streptococcus mutans*)、肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、血链球菌(*Streptococcus sanguinis*)、环圈链霉菌(*Streptomyces anulatus*)、阿维链霉菌(*Streptomyces avermitillis*)、肉桂色链霉菌(*Streptomyces cinnamonensis*)、天蓝色链霉菌(*Streptomyces coelicolor*)、灰色链霉菌灰色亚种 NBRC 13350(*Streptomyces griseus* subsp.*griseus* NBRC 13350)、苍黄链霉菌(*Streptomyces luridus*)、链霉菌(*Streptomyces* sp)CL190、链霉菌(*Streptomyces* sp.)K0-3988、绿紫链霉菌(*Streptomyces viridochromogenes*)、威德摩尔链霉菌(*Streptomyces wedmorensis*)、紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)、嗜酸热硫化叶菌(*Sulfolobus acidocaldarius*)、硫磺矿硫化叶菌(*Sulfolobus solfataricus*)、托氏硫化叶菌(*Sulfolobus tokodaii*)、地下硫氢菌(*Sulfurihydrogenibium subterraneum*)、脱氮硫单胞菌(*Sulfurimonas denitrificans*)、野猪(*Sus scrofa*)、细长聚球藻(*Synechococcus elongatus*)PCC 6301、细长聚球藻 PCC 7942、聚球藻(*Synechococcus* sp.)PCC 7002、弗氏

互营杆菌 (*Syntrophobacter fumaroxidans*)、酸养互养菌 (*Syntrophus aciditrophicus*)、黑青斑河豚 (*Tetraodon nigroviridis*)、嗜热厌氧乙醇杆菌 (*Thermoanaerobacter ethanolicus*) JW 200、嗜热厌氧假乙醇杆菌 (*Thermoanaerobacter pseudethanolicus*) ATCC 33223、海滨热球菌 (*Thermococcus litoralis*)、嗜中性热变形菌 (*Thermoproteus neutrophilus*)、海栖热孢菌 (*Thermotoga maritime*)、齿垢密螺旋体 (*Treponema denticola*)、赤拟谷盗 (*Tribolium castaneum*)、阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*) G3、小麦 (*Triticum aestivum*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、克氏锥虫 (*Trypanosoma cruzi*) 菌株 CL Brener、微变束村氏菌 (*Tsukamurella paurometabola*) DSM 20162、加州月桂 (*Umbellularia California*)、小韦荣氏球菌 (*Veillonella parvula*)、霍乱弧菌 (*Vibrio cholerae*) V51、热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*)、解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)、玉蜀黍 (*Zea mays*)、生枝动胶菌 (*Zoogloea ramiger*)、运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*)、运动发酵单胞菌运动亚种 ZM4 (*Zymomonas mobilis* subsp. *mobilis* ZM4) 以及本文公开的或作为相应基因的来源生物体可获得的其它示例性物种。然而,在现在可得到超过 550 个物种的完整基因组序列 (其中超过一半可在公共数据库 (例如 NCBI) 上获得) (包括 395 种微生物基因组和多种酵母、真菌、植物和哺乳动物基因组) 的情况下,编码近缘或远缘物种中的一种或多种基因所必需的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成活性的基因 (包括例如已知基因的同源物、直系同源物、旁系同源物和非直系同源基因置换) 的鉴别;以及生物体之间的遗传改变的互换为常规的且为本领域所熟知。因此,允许本文中参考特定生物体 (例如大肠杆菌) 所描述的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成的代谢改变可容易地应用于其它微生物,同样包括原核生物和真核生物。考虑到本文提供的教导和指导,本领域技术人员将会知道,在一种生物体中例示的代谢改变可同等地适用于其它生物体。

[0127] 在有些情况下,例如当无亲缘关系的物种中存在替代脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成途径时,脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成可通过例如来自无亲缘关系的物种的催化相似、但非完全相同的代谢反应以替代参考反应的一种或多种旁系同源物的外源表达而被赋予宿主物种。因为不同的生物体之间在代谢网络中存在某些差异,所以,本领域技术人员应当理解,在不同的生物体之间的实际基因使用可能不同。然而,考虑到本文提供的教导和指导,本领域技术人员也应当理解,采用本文例举的那些的关联 (cognate) 代谢改变以在目标物种中构建将合成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的微生物,本发明的教导和方法可适用于所有的微生物。编码本发明的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径酶或蛋白质的核酸分子也可以包括与本文中利用 SEQ ID NO、GenBank 和 / 或 GI 编号所公开的核酸杂交的核酸分子;或与编码本文中利用 SEQ ID NO、GenBank 和 / 或 GI 编号所公开的氨基酸序列的核酸分子杂交的核酸分子。杂交条件可包括高度严格、中等严格或低严格杂交条件,这是本领域技术人员众所周知的,例如本文描述的那些。类似地,可用于本发明的核酸分子可描述为与本文中利用 SEQ ID NO、GenBank 和 / 或 GI 编号所公开的核酸或者与编码本文中利用 SEQ ID NO、GenBank 和 / 或 GI 编号所公开的氨基酸序列的核酸分子杂交的核酸分子具有某一百分序列同一性。例如,核酸分子可以与本文描述的核酸具有至少 65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 序列同一性。

[0128] 严格杂交是指在所杂交的多核苷酸处于稳定时的条件。正如本领域技术人员所知,所杂交的多核苷酸的稳定性以杂交体的解链温度 (T_m) 反映。一般而言,所杂交多核苷

酸的稳定性是盐浓度（例如钠离子浓度）和温度的函数。杂交反应可以在较低严格性的条件下进行，随后进行具有不同但较高严格性的洗涤。提及杂交严格性涉及这样的洗涤条件。高度严格杂交包括仅允许在 65℃ 下在 0.018M NaCl 中形成稳定杂交的多核苷酸的那些核酸序列杂交的条件，例如，如果杂交体在 65℃ 下在 0.018M NaCl 中不稳定，那么其在如本文考虑的高严格性条件下将不稳定。高严格性条件可例如通过以下方式提供：在 42℃ 下在 50% 甲酰胺、5X Denhart 氏溶液、5X SSPE、0.2% SDS 中杂交，随后在 65℃ 下在 0.1X SSPE 和 0.1% SDS 中洗涤。也可以使用不同于高度严格杂交条件的杂交条件来描述本文公开的核酸序列。例如，短语中等严格杂交是指相当于以下的条件：在 42℃ 下在 50% 甲酰胺、5X Denhart 氏溶液、5X SSPE、0.2% SDS 中杂交，随后在 42℃ 下在 0.2X SSPE、0.2% SDS 中洗涤。短语低严格杂交是指相当于以下的条件：在 22℃ 下在 10% 甲酰胺、5X Denhart 氏溶液、6X SSPE、0.2% SDS 中杂交，随后在 37℃ 下在 1X SSPE、0.2% SDS 中洗涤。Denhart 氏溶液含有 1% Ficoll、1% 聚乙烯吡咯烷酮和 1% 牛血清白蛋白 (BSA)。20X SSPE (氯化钠、磷酸钠、乙二胺四乙酸 (EDTA)) 含有 3M 氯化钠、0.2M 磷酸钠和 0.025M (EDTA)。其它合适的低、中等和高严格性杂交缓冲液和条件是本领域技术人员众所周知的并且描述于 Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001); 和 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)。

[0129] 编码本发明的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径酶或蛋白质的核酸分子可与本文公开的核苷酸序列具有至少某一序列同一性。因此，在本发明的有些方面，编码脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径酶或蛋白质的核酸分子具有这样的核苷酸序列：与在本文中利用 SEQ ID NO、GenBank 和 / 或 GI 编号所公开的核酸或与编码在本文中利用 SEQ ID NO、GenBank 和 / 或 GI 编号所公开的氨基酸序列的核酸分子杂交的核酸分子有至少 65% 同一性、至少 70% 同一性、至少 75% 同一性、至少 80% 同一性、至少 85% 同一性、至少 90% 同一性、至少 91% 同一性、至少 92% 同一性、至少 93% 同一性、至少 94% 同一性、至少 95% 同一性、至少 96% 同一性、至少 97% 同一性、至少 98% 同一性或至少 99% 同一性。

[0130] 序列同一性（也称为同源性或相似性）是指两个核酸分子之间或两个多肽之间的序列相似性。可通过比较各序列中的位置来确定同一性，该位置可进行比对用于比较目的。当所比较序列中的位置被相同碱基或氨基酸占据时，则此分子在该位置上完全相同。序列之间的同一性程度随着序列所共享的匹配或同源位置数目而变化。测定其百分序列同一性的两个序列之间的比对可以使用本领域已知的软件程序来进行，该软件程序例如在以下文献中描述的那些：Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)。优选地，使用默认参数进行比对。本领域众所周知的可使用的一种比对程序是设定了默认参数的 BLAST。具体地说，程序是 BLASTN 和 BLASTP，使用下列默认参数：遗传密码 = 标准品；过滤器 = 无；股数 = 两股；截止值 (cutoff) = 60；期望值 (expect) = 10；矩阵 = BLOSUM62；描述 = 50 个序列；排序方式 = 高分值；数据库 = 非冗余, GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS 翻译 +SwissProtein+SPupdate+PIR。这些程序的详情可以在美国国家生物技术信息中心 (the National Center for Biotechnology Information) 获得。

[0131] 用于构建非天然存在的产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸宿主并测试其表达水平的方法

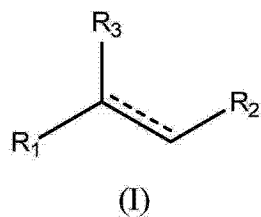
可以例如通过本领域众所周知的重组和检测方法来实现。这样的方法可以在例如以下文献中找到：Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (2001)；和 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD (1999)。

[0132] 采用本领域众所周知的技术, 包括但不限于接合、电穿孔、化学转化、转导、转染和超声转化, 可以将参与产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的途径的外源核酸序列稳定地或瞬时地导入宿主细胞中。对于在大肠杆菌或其它原核细胞中的外源表达, 真核生物核酸的基因或 cDNA 中的某些核酸序列可以编码靶向信号, 例如 N-端线粒体靶向信号或其它靶向信号, 这些靶向信号可以在转化到原核宿主细胞之前去除掉 (如果需要的话)。例如, 线粒体前导序列的去除导致在大肠杆菌中的表达增加 (Hoffmeister 等人, *J. Biol. Chem.* 280:4329-4338 (2005))。对于在酵母或其它真核细胞中的外源表达, 基因可以在细胞溶质中表达而无需添加前导序列, 或者可以靶向线粒体或其它细胞器, 或者通过添加合适的靶向序列例如适合宿主细胞的线粒体靶向信号或分泌信号而靶向分泌。因此, 应当理解, 为了去除或包括靶向序列而对核酸序列的适宜修饰可以被掺入到外源核酸序列中以带来所需要的特性。此外, 基因可以用本领域众所周知的技术进行密码子最优化以达到蛋白质的最佳表达。

[0133] 正如本文例举的, 可以构建一种或多种表达载体以包括一种或多种脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成途径编码核酸, 该编码核酸与宿主生物中有功能的表达调控序列操作性连接。适用于本发明的微生物宿主生物的表达载体包括例如质粒、噬菌体载体、病毒载体、附加体 (episomes) 和人工染色体, 包括可操作用于稳定整合到宿主染色体中的载体和选择序列或标记。另外, 表达载体可包括一个或多个选择标记基因和适宜的表达调控序列。也可包括例如提供对抗生素或毒素的抗性、代偿营养缺陷型缺乏或者供给培养基中没有的关键营养物的选择标记基因。表达调控序列可包括组成性和诱导性启动子、转录增强子、转录终止子等, 这些都是本领域众所周知的。当两种或两种以上外源编码核酸必须共表达时, 可以将两种核酸例如插入到一个表达载体中或者插入到独立的表达载体中。对于单个载体表达, 编码核酸可以与一个共同的表达调控序列操作性连接或者与不同的表达调控序列 (例如一个诱导性启动子和一个组成性启动子) 操作性连接。参与代谢或合成途径的外源核酸序列的转化可以使用本领域众所周知的方法来证实。这样的方法包括例如核酸分析法, 例如 mRNA 的 RNA 印迹法或聚合酶链式反应 (PCR) 扩增法, 或用于基因产物表达的免疫印迹法, 或测试引入的核酸序列或其相应基因产物表达的其它合适分析方法。本领域技术人员应当理解, 外源核酸以足以产生所需产物的量进行表达, 本领域技术人员还应当理解, 可以采用本领域众所周知的和本文公开的方法对表达水平进行最优化以获得足够的表达。

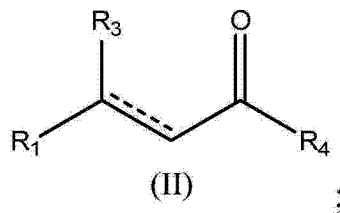
[0134] 在有些实施方案中, 本发明提供用于生产式 (I) 的化合物的方法:

[0135]



[0136] 其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基; R_2 为 CH_2OH 、 CHO 或 $COOH$; R_3 为 H 、 OH 或氧代 ($=O$); 且 ----- 代表单键或双键, 前提条件是 R_3 所连接的碳原子的化合价为四价, 包括将非天然存在的微生物在足以产生式 (I) 的化合物的条件下培养足够的时间周期, 其中所述非天然存在的微生物具有 MI-FAE 循环和 / 或 MD-FAE 循环与终止途径的组合, 其中所述 MI-FAE 循环包括一种或多种硫解酶、一种或多种 3- 氧代酰基 -CoA 还原酶、一种或多种 3- 羟基酰基 -CoA 脱水酶及一种或多种烯酰 -CoA 还原酶, 其中所述 MD-FAE 循环包括一种或多种延长酶、一种或多种 3- 氧代酰基 -CoA 还原酶、一种或多种 3- 羟基酰基 -CoA 脱水酶及一种或多种烯酰 -CoA 还原酶, 其中所述终止途径包括图 1、6 或 7 中所示的途径, 选自: (1) 1H; (2) 1K 和 1L; (3) 1E 和 1N; (4) 1K, 1J 和 1N; (5) 1E; (6) 1K 和 1J; (7) 1H 和 1N; (8) 1K, 1L 和 1N; (9) 1E 和 1F; (10) 1K, 1J 和 1F; (11) 1H, 1N 和 1F; (12) 1K, 1L, 1N 和 1F; 和 (13) 1G, 其中 1E 是酰基 -CoA 还原酶 (醛形成), 其中 1F 是醇脱氢酶, 其中 1G 是酰基 -CoA 还原酶 (醇形成), 其中 1H 是酰基 -CoA 水解酶、酰基 -CoA 转移酶或酰基 -CoA 合酶, 其中 1J 是酰基 -ACP 还原酶, 其中 1K 是酰基 -CoA:ACP 酰基转移酶, 其中 1L 是硫酯酶, 其中 1N 是醛脱氢酶 (酸形成) 或羧酸还原酶, 其中所述 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或终止途径的酶由至少一种外源核酸编码且以足以产生式 (I) 的化合物的量表达, 其中该 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和该终止途径的所述酶中的每一种酶的底物独立地选自式 (II) 的化合物、丙二酰 -CoA、丙酰 -CoA 或乙酰 -CoA:

[0137]



[0138] 其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基; R_3 为 H 、 OH 或氧代 ($=O$); R_4 为 $S-CoA$ 、 ACP 、 OH 或 H ; 且 ----- 代表单键或双键, 前提条件是 R_3 所连接的碳原子的化合价为四价; 其中该 MI-FAE 循环的所述一种或多种酶各自对 R_1 上的碳原子数不大于所述式 (I) 化合物的 R_1 上的碳原子数的式 (II) 化合物具有选择性, 其中该 MD-FAE 循环的所述一种或多种酶各自对 R_1 上的碳原子数不大于所述式 (I) 化合物的 R_1 上的碳原子数的式 (II) 化合物具有选择性, 和其中该终止途径的所述一种或多种酶各自对 R_1 上的碳原子数不小于所述式 (I) 化合物的 R_1 上的碳原子数的式 (II) 化合物具有选择性。

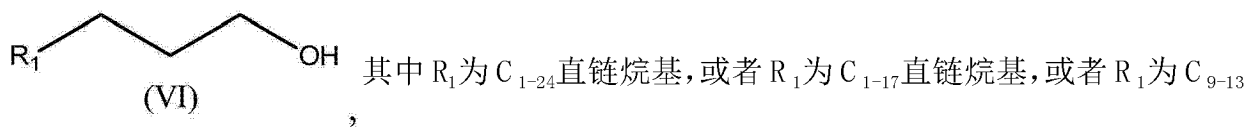
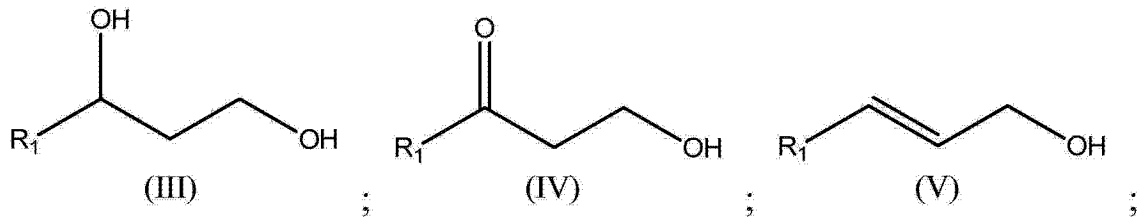
[0139] 在有些实施方案中, 本发明提供用于生产式 (I) 的化合物的方法, 其中 R_1 为 C_{1-17} 直链烷基。在本发明的另一个方面, 该式 (I) 的化合物的 R_1 是 C_1 直链烷基、 C_2 直链烷基、 C_3 直链烷基、 C_4 直链烷基、 C_5 直链烷基、 C_6 直链烷基、 C_7 直链烷基、 C_8 直链烷基、 C_9 直链烷基、 C_{10} 直链烷基、 C_{11} 直链烷基、 C_{12} 直链烷基或 C_{13} 直链烷基、 C_{14} 直链烷基、 C_{15} 直链烷基、 C_{16} 直链烷基、 C_{17} 直链烷基、 C_{18} 直链烷基、 C_{19} 直链烷基、 C_{20} 直链烷基、 C_{21} 直链烷基、 C_{22} 直链烷基、 C_{23} 直链烷基或 C_{24} 直链烷基。

[0140] 在本发明的有些方面, 本发明的方法中使用的微生物包括二、三或四种外源核酸, 各自编码该 MI-FAE 循环或该 MD-FAE 循环的酶。在本发明的有些方面, 本发明的方法中使用的微生物包括二、三或四种外源核酸, 各自编码该终止途径的酶。在本发明的有些方面,

本发明的方法中使用的微生物包括编码选自 (1)-(13) 的途径中的至少一种途径的各种酶的外源核酸。在有些方面,所述至少一种外源核酸是异源核酸。在有些方面,本发明的方法中使用的非天然存在的微生物是在基本上厌氧的培养基中。

[0141] 在有些实施方案中,本发明提供用于生产选自式 (III)-(VI) 的脂肪醇的方法:

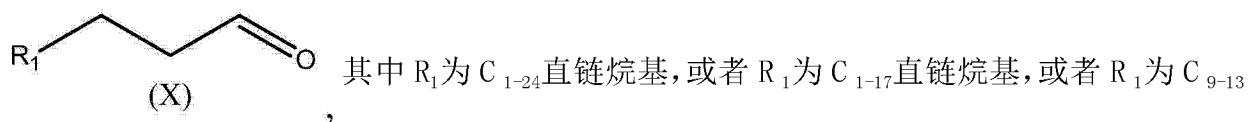
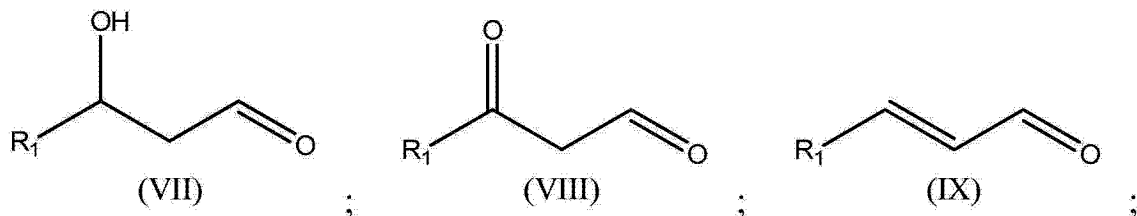
[0142]



直链烷基。在本发明的有些方面, R_1 为 C_1 直链烷基、 C_2 直链烷基、 C_3 直链烷基、 C_4 直链烷基、 C_5 直链烷基、 C_6 直链烷基、 C_7 直链烷基、 C_8 直链烷基、 C_9 直链烷基、 C_{10} 直链烷基、 C_{11} 直链烷基、 C_{12} 直链烷基或 C_{13} 直链烷基、 C_{14} 直链烷基、 C_{15} 直链烷基、 C_{16} 直链烷基、 C_{17} 直链烷基、 C_{18} 直链烷基、 C_{19} 直链烷基、 C_{20} 直链烷基、 C_{21} 直链烷基、 C_{22} 直链烷基、 C_{23} 直链烷基或 C_{24} 直链烷基。

[0143] 在有些实施方案中,本发明提供用于生产选自式 (VII)-(X) 的脂肪醛的方法:

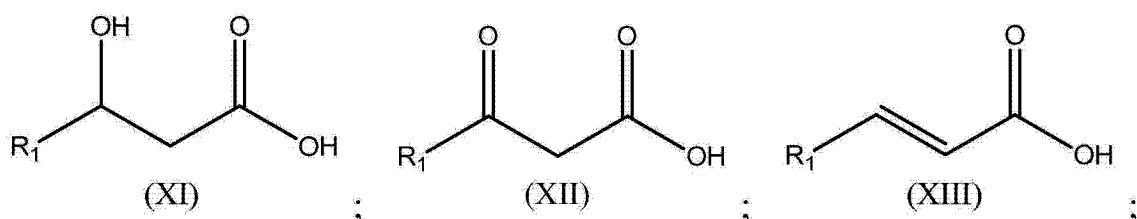
[0144]

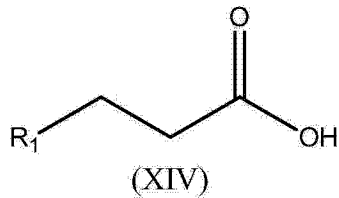


直链烷基。在本发明的有些方面, R_1 为 C_1 直链烷基、 C_2 直链烷基、 C_3 直链烷基、 C_4 直链烷基、 C_5 直链烷基、 C_6 直链烷基、 C_7 直链烷基、 C_8 直链烷基、 C_9 直链烷基、 C_{10} 直链烷基、 C_{11} 直链烷基、 C_{12} 直链烷基或 C_{13} 直链烷基、 C_{14} 直链烷基、 C_{15} 直链烷基、 C_{16} 直链烷基、 C_{17} 直链烷基、 C_{18} 直链烷基、 C_{19} 直链烷基、 C_{20} 直链烷基、 C_{21} 直链烷基、 C_{22} 直链烷基、 C_{23} 直链烷基或 C_{24} 直链烷基。

[0145] 在有些实施方案中,本发明提供用于生产选自式 (XI)-(XIV) 的脂肪酸的方法:

[0146]





其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基, 或者 R_1 为 C_{1-17} 直链烷基, 或者 R_1 为 C_{9-13}

直链烷基。在本发明的有些方面, R_1 为 C_1 直链烷基、 C_2 直链烷基、 C_3 直链烷基、 C_4 直链烷基、 C_5 直链烷基、 C_6 直链烷基、 C_7 直链烷基、 C_8 直链烷基、 C_9 直链烷基、 C_{10} 直链烷基、 C_{11} 直链烷基、 C_{12} 直链烷基或 C_{13} 直链烷基、 C_{14} 直链烷基、 C_{15} 直链烷基、 C_{16} 直链烷基、 C_{17} 直链烷基、 C_{18} 直链烷基、 C_{19} 直链烷基、 C_{20} 直链烷基、 C_{21} 直链烷基、 C_{22} 直链烷基、 C_{23} 直链烷基或 C_{24} 直链烷基。

[0147] 在有些实施方案中, 用于生产本文描述的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的方法包括使用具有乙酰 -CoA 途径和至少一种编码以足以产生乙酰 -CoA 的量表达的乙酰 -CoA 途径酶的外源核酸的非天然存在的微生物, 其中所述乙酰 -CoA 途径包括图 2、3、4 或 5 中所示的途径, 选自: (1) 2A 和 2B; (2) 2A, 2C 和 2D; (3) 2H; (4) 2G 和 2D; (5) 2E, 2F 和 2B; (6) 2E 和 2I; (7) 2J, 2F 和 2B; (8) 2J 和 2I; (9) 3A, 3B 和 3C; (10) 3A, 3B, 3J, 3K 和 3D; (11) 3A, 3B, 3G 和 3D; (12) 3A, 3F 和 3D; (13) 3N, 3H, 3B 和 3C; (14) 3N, 3H, 3B, 3J, 3K 和 3D; (15) 3N, 3H, 3B, 3G 和 3D; (16) 3N, 3H, 3F 和 3D; (17) 3L, 3M, 3B 和 3C; (18) 3L, 3M, 3B, 3J, 3K 和 3D; (19) 3L, 3M, 3B, 3G 和 3D; (20) 3L, 3M, 3F 和 3D; (21) 4A, 4B, 4D, 4H, 4I 和 4J; (22) 4A, 4B, 4E, 4F, 4H, 4I 和 4J; (23) 4A, 4B, 4E, 4K, 4L, 4H, 4I 和 4J; (24) 4A, 4C, 4D, 4H 和 4J; (25) 4A, 4C, 4E, 4F, 4H 和 4J; (26) 4A, 4C, 4E, 4K, 4L, 4H 和 4J; (27) 5A, 5B, 5D 和 5G; (28) 5A, 5B, 5E, 5F 和 5G; (29) 5A, 5B, 5E, 5K, 5L 和 5G; (30) 5A, 5C 和 5D; (31) 5A, 5C, 5E 和 5F; 和 (32) 5A, 5C, 5E, 5K 和 5L, 其中 2A 是丙酮酸氧化酶 (乙酸形成), 其中 2B 是乙酰 -CoA 合成酶、乙酰 -CoA 连接酶或乙酰 -CoA 转移酶, 其中 2C 是乙酸激酶, 其中 2D 是磷酸转乙酰酶, 其中 2E 是丙酮酸脱羧酶, 其中 2F 是乙醛脱氢酶, 其中 2G 是丙酮酸氧化酶 (乙酰 - 磷酸形成), 其中 2H 是丙酮酸脱氢酶、丙酮酸: 铁氧还蛋白氧化还原酶、丙酮酸: NAD(P)H 氧化还原酶或丙酮酸甲酸裂合酶, 其中 2I 是乙醛脱氢酶 (酰基化), 其中 2J 是苏氨酸醛缩酶, 其中 3A 是磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 羧化酶或 PEP 羧激酶, 其中 3B 是草酰乙酸脱羧酶, 其中 3C 是丙二酸半醛脱氢酶 (乙酰基化), 其中 3D 是乙酰 -CoA 羧化酶或丙二酰 -CoA 脱羧酶, 其中 3F 是草酰乙酸脱氢酶或草酰乙酸氧化还原酶, 其中 3G 是丙二酸半醛脱氢酶 (酰基化), 其中 3H 是丙酮酸羧化酶, 其中 3J 是丙二酸半醛脱氢酶, 其中 3K 是丙二酰 -CoA 合成酶或丙二酰 -CoA 转移酶, 其中 3L 是苹果酸酶, 其中 3M 是苹果酸脱氢酶或苹果酸氧化还原酶, 其中 3N 是丙酮酸激酶或 PEP 磷酸酶, 其中 4A 是柠檬酸合酶, 其中 4B 是柠檬酸转运体, 其中 4C 是柠檬酸 / 苹果酸转运体, 其中 4D 是 ATP 柠檬酸裂合酶, 其中 4E 是柠檬酸裂合酶, 其中 4F 是乙酰 -CoA 合成酶或乙酰 -CoA 转移酶, 其中 4H 是细胞溶质苹果酸脱氢酶, 其中 4I 是苹果酸转运体, 其中 4J 是线粒体苹果酸脱氢酶, 其中 4K 是乙酸激酶, 其中 4L 是磷酸转乙酰酶, 其中 5A 是柠檬酸合酶, 其中 5B 是柠檬酸转运体, 其中 5C 是柠檬酸 / 草酰乙酸转运体, 其中 5D 是 ATP 柠檬酸裂合酶, 其中 5E 是柠檬酸裂合酶, 其中 5F 是乙酰 -CoA 合成酶或乙酰 -CoA 转移酶, 其中 5G 是草酰乙酸转运体, 其中 5K 是乙酸激酶, 和其中 5L 是磷酸转乙酰酶。

[0148] 在有些方面, 本发明的方法中使用的微生物包括二、三、四、五、六、七或八种外源

核酸,各自编码乙酰 -CoA 途径酶。在有些方面,本发明的方法中使用的微生物包括编码选自 (1)-(32) 的途径中的至少一种途径的各种乙酰 -CoA 途径酶的外源核酸。

[0149] 可以采用众所周知的方法进行合适的纯化和 / 或测定以测试脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生产。对于每个待测的工程菌株,可以让合适的重复例如一式三份的培养物生长。例如,可以监测工程生产宿主中产物和副产物的形成。通过诸如 HPLC(高效液相层析)、GC-MS(气相层析-质谱法)和 LC-MS(液相层析-质谱法)的方法或者采用本领域众所周知的常规程序的其它合适分析方法,可以对最终产物和中间体、和其它有机化合物进行分析。发酵肉汤中产物的释放也可以用培养物上清液进行测试。采用例如折射率检测器(对于葡萄糖和醇)和 UV 检测器(对于有机酸)(Lin 等人, *Biotechnol. Bioeng.* 90:775-779(2005))或本领域众所周知的其它合适的测定和检测方法,副产物和残留葡萄糖可以通过 HPLC 进行定量。来自外源 DNA 序列的个体酶或蛋白质活性也可以用本领域众所周知的方法进行测定。

[0150] 采用本领域众所周知的各种方法,可以将脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸与培养物中的其它组分分离开来。这样的分离方法包括例如萃取程序以及包括连续液-液萃取、渗透蒸发、膜过滤、膜分离、反渗透、电渗析、蒸馏、结晶、离心、萃取过滤、离子交换层析、大小排阻层析、吸附层析和超滤的方法。所有的上述方法都是本领域众所周知的。

[0151] 本文描述的任何非天然存在的微生物可以进行培养以产生和 / 或分泌本发明的生物合成产物。例如,脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产者可以进行培养以经生物合成生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。因此,在有些实施方案中,本发明提供具有本文描述的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体的培养基。在有些方面,所述培养基也可以与产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体的本发明的非天然存在的微生物分离开。用于将微生物与培养基分离的方法是本领域众所周知的。示例性的方法包括过滤、絮凝、沉淀、离心、沉降等。

[0152] 为了生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸,将重组菌株在含碳源和其它必需营养物的培养基中进行培养。有时较为理想且可能为十分理想的是在发酵罐中维持厌氧条件以降低总过程的成本。这样的条件可以用下述方法获得:例如,首先在培养基中充入氮气,然后将带有隔片和皇冠盖(crimp-cap)的烧瓶密封。对于其中在厌氧条件下未观察到生长的菌株来说,可以采用微好氧条件或基本上厌氧条件,即在隔片上钻小洞供有限通气。示例性的厌氧条件先前已有描述并且是本领域众所周知的。示例性的好氧和厌氧条件描述于例如于 2007 年 8 月 10 日申请的美国专利申请 2009/0047719。发酵可按本文公开的分批方式、补料-分批方式或连续方式进行。发酵也可以分两个阶段进行,如果需要的话。第一个阶段可以是好氧的以允许高生长并因此有高生产率,后接高的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸产量的厌氧阶段。

[0153] 如有需要,可以将培养基的 pH 维持在所需要的 pH,特别是中性 pH,例如 pH 约为 7,即通过按需要加入碱(例如 NaOH 或其它碱)或酸以将培养基维持在所需要的 pH。生长速率可以通过使用分光光度计(600nm)测量光密度来测定,葡萄糖摄取速率可以通过监测碳源随时间的消耗量来测定。

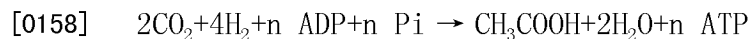
[0154] 生长培养基可包括例如可以给所述非天然存在的微生物供应碳源的任何碳水化合物来源。这样的来源包括例如糖,例如葡萄糖、木糖、阿拉伯糖、半乳糖、甘露糖、果糖、蔗糖和淀粉;或甘油,且应当理解,可使用单独作为唯一碳源或与本文描述的或本领域已知的其它碳源组合的碳源。碳水化合物的其它来源包括例如可再生贮存物(renewable

feedstocks) 和生物质 (biomass)。在本发明的方法中可用作贮存物的示例性生物质类型包括纤维素类生物质、半纤维素类生物质和木质素贮存物或贮存物部分。这样的生物质类贮存物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。考虑到本文提供的教导和指导,本领域技术人员将会理解,除了以上例举的那些以外的可再生贮存物和生物质也可以用来培养本发明的微生物以生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。

[0155] 除了可再生贮存物例如以上例举的那些以外,本发明的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸微生物也可以进行修饰以在作为其碳源的合成气上进行生长。在这个具体的实施方案中,使一种或多种蛋白质或酶在产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生物体中进行表达以提供利用合成气或其它气体碳源的代谢途径。

[0156] 合成气体 (synthesis gas), 也称为合成气 (syngas) 或发生炉煤气 (producer gas), 是煤的气化和含碳材料例如生物质材料 (包括农作物和残留物) 的气化的主要产物。合成气是主要为 H_2 和 CO 的混合物并且可以得自任何有机贮存物, 包括但不限于煤、煤油、天然气、生物质和废有机物质的气化。气化一般在高燃料 / 氧比率下进行。尽管主要是 H_2 和 CO , 但是合成气也可包括少量的 CO_2 和其它气体。因此, 合成气体提供了一种成本有效的的气体碳源例如 CO , 另外还有 CO_2 。

[0157] Wood-Ljungdahl 途径催化 CO 和 H_2 转变成乙酰 -CoA 和其它产物 (例如乙酸盐 (酯) (acetate))。能够利用 CO 和合成气的生物体一般也具有通过 Wood-Ljungdahl 途径所包括的一组相同的基础酶和转化作用来利用 CO_2 和 CO_2/H_2 混合物的能力。由微生物将 CO_2 经 H_2 依赖性转变成乙酸在揭示出 CO 也可以被相同的生物体所利用并且涉及相同的途径之前不久就被认识到。许多产乙酸菌 (acetogen) 已显示能在 CO_2 存在下生长并产生诸如乙酸盐的化合物, 只要有氢存在以供给必需的还原当量即可 (参见例如, Drake, Acetogenesis, pp. 3-60 Chapman and Hall, New York, (1994))。这可以用以下反应式概述:



[0159] 因此, 具备 Wood-Ljungdahl 途径的非天然存在的微生物也可以利用 CO_2 和 H_2 混合物来产生乙酰 -CoA 和其它所需产物。

[0160] Wood-Ljungdahl 途径是本领域众所周知的并且由 12 个反应组成, 这 12 个反应可分成两支: (1) 甲基支和 (2) 羰基支。甲基支将合成气转变成甲基 - 四氢叶酸 (甲基 -THF), 而羰基支将甲基 -THF 转变成乙酰 -CoA。甲基支中的反应由以下酶或蛋白质按顺序催化: 铁氧还蛋白氧化还原酶、甲酸脱氢酶、甲酰基四氢叶酸合成酶、次甲基四氢叶酸环化脱水酶、亚甲基四氢叶酸脱氢酶和亚甲基四氢叶酸还原酶。羰基支中的反应由以下酶或蛋白质按顺序催化: 甲基四氢叶酸: 类咕啉 (corrino) 蛋白甲基转移酶 (例如 AcsE)、类咕啉铁 - 硫蛋白、镍蛋白装配蛋白 (例如 AcsF)、铁氧还蛋白、乙酰 -CoA 合酶、一氧化碳脱氢酶和镍蛋白装配蛋白 (例如 CooC)。根据本文提供的用于引入足够数目的编码核酸以产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的教导和指导, 本领域技术人员应当理解, 就至少导入在宿主生物中不存在的编码 Wood-Ljungdahl 酶或蛋白质的核酸而论, 也可以进行相同的工程设计。因此, 将一种或多种编码核酸导入到本发明的微生物中使得经修饰的生物体含有完全 Wood-Ljungdahl 途径将会赋予合成气利用能力。

[0161] 另外,还原性(反向)三羧酸循环结合一氧化碳脱氢酶和/或加氢酶活性也可以用于将CO、CO₂和/或H₂转变成乙酰-CoA和其它产物(例如乙酸盐(酯))。通过还原性TCA途径能够固定碳的生物体可以利用下列酶中的一种或多种:ATP柠檬酸-裂合酶、柠檬酸裂合酶、乌头酸酶、异柠檬酸脱氢酶、 α -酮戊二酸:铁氧还蛋白氧化还原酶、琥珀酰-CoA合成酶、琥珀酰-CoA转移酶、延胡索酸还原酶、延胡索酸酶、苹果酸脱氢酶、NAD(P)H:铁氧还蛋白氧化还原酶、一氧化碳脱氢酶和加氢酶。具体地讲,通过一氧化碳脱氢酶和加氢酶从CO和/或H₂萃取的还原当量(reducing equivalents)用于通过还原性TCA循环将CO₂固定成为乙酰-CoA或乙酸盐(酯)。乙酸盐(酯)可通过例如乙酰-CoA转移酶、乙酸激酶/磷酸转乙酰酶和乙酰-CoA合成酶等酶转变成乙酰-CoA。乙酰-CoA可通过丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶和糖异生作用(gluconeogenesis)的酶转变成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸前体,3-磷酸甘油醛、磷酸烯醇丙酮酸和丙酮酸。根据本文提供的用于引入足够数目的编码核酸以产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的教导和指导,本领域技术人员应当理解,就至少导入在宿主生物中不存在的编码还原性TCA途径酶或蛋白质的核酸而论,也可以进行相同的工程设计。因此,将一种或多种编码核酸导入到本发明的微生物中使得经修饰的生物体含有还原性TCA途径可以赋予合成气利用能力。

[0162] 因此,考虑到本文提供的教导和指导,本领域技术人员应当理解,非天然存在的微生物当在碳源(例如碳水化合物)上生长时就可以产生并分泌本发明的生物合成化合物。这样的化合物包括例如脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸和在脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中的中间代谢物中的任一种。唯一需要的是对一种或多种所需酶或蛋白质活性进行工程改造以达到所需化合物或中间体(包括例如脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成途径中的某些或全部)的生物合成。因此,本发明提供非天然存在的微生物,当在碳水化合物或其它碳源上生长时能产生和/或分泌脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸并且当在碳水化合物或其它碳源上生长时能产生和/或分泌脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中所示的中间代谢物的任何一个。本发明的产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的微生物可以从例如以下的中间体开始合成:3-酮酰基-CoA、3-羟基酰基-CoA、烯酰-CoA、酰基-CoA、酰基-ACP、乙酸、乙醛、乙酰-磷酸、草酰乙酸、苹果酸(matate)、丙二酸半醛、丙二酸、丙二酰-CoA、乙酰-CoA或柠檬酸。

[0163] 使用本领域众所周知的方法(如本文列举的方法)构建本发明的非天然存在的微生物以外源性表达至少一种编码脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径酶或蛋白质的核酸,其表达量足以产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。应当理解,本发明的微生物在足以产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的条件下进行培养。根据本文提供的教导和指导,本发明的非天然存在的微生物可以实现生物合成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸,导致胞内浓度在约0.1-200mM之间或200mM以上。一般而言,脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的胞内浓度是在约3-150mM之间,特别是在约5-125mM约之间,和更特别是在约8-100mM之间,包括约10mM、20mM、50mM、80mM或80mM以上。在这些示例性范围中的每一个范围内或者高于它们的胞内浓度也可以由本发明的非天然存在的微生物实现。

[0164] 在有些实施方案中,培养条件包括厌氧或基本上厌氧的生长或维持条件。示例性的厌氧条件先前已有描述并且是本领域众所周知的。用于发酵过程的示例性厌氧条件在本文中有描述并且描述于2007年8月10日申请的美国专利公布2009/0047719。这些条件中的任何一个都可以与上述非天然存在的微生物以及本领域众所周知的其它厌氧条件一起

使用。在这样的厌氧或基本上厌氧的条件下,脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产者可以合成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸,达到胞内浓度为 5-10mM 或 10mM 以上以及本文例举的所有其它浓度。应当理解,即使上述描述指的是胞内浓度,但是产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸微生物可以在细胞内产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸和 / 或将该产物分泌到培养基中。

[0165] 示例性的发酵过程包括但不限于补料 - 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,使生产用生物体在大小合适的通入适当气体的生物反应器中生长。在厌氧条件下,培养物中通入惰性气体或例如氮气、 N_2/CO_2 混合气、氩气、氦气等气体的组合。随着细胞生长和利用碳源,将另外的碳源和 / 或其它营养物以大致平衡碳源和 / 或营养物消耗的速率投入生物反应器中。生物反应器的温度维持在所需要的温度,一般在 22-37 摄氏度的范围内,但是也可根据生产用生物体的生长特性和 / 或发酵过程的所需条件将温度维持在较高或较低温度下。生长持续一段所需时间周期以达到发酵罐中培养物的所需特征,例如细胞密度、产物浓度等。在分批发酵过程中,发酵的时间周期一般是在几小时到几天,例如 8 至 24 小时,或 1、2、3、4 或 5 天,或长达一周的范围内,这取决于所需要的培养条件。可视需要控制或不控制 pH,在此情况下,其中不控制 pH 的培养物在运行结束时典型地将降低至 pH 3-6。在培养期完成时,可使发酵罐内容物通过细胞分离单元(例如离心机、过滤单元及其类似单元)以移除细胞和细胞碎片。在所需产物在细胞内表达的情况下,可视需要在自发酵肉汤分离细胞之前或之后以酶促方式或以化学方式溶解或破坏细胞,以便释放另外的产物。可以将发酵肉汤转移到产物分离单元。产物的分离通过本领域使用的标准分离程序进行以自稀的水溶液分离所需产物。这样的方法包括但不限于适当时使用水不混溶有机溶剂(例如,甲苯或其它合适的溶剂,包括但不限于乙醚、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)、二噁烷、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲亚砜(DMSO)等)进行液-液萃取以提供产物的有机溶液;标准蒸馏方法;及类似方法,这取决于发酵过程的产物的化学特征。

[0166] 在示例性的完全连续发酵方案中,生产用生物体一般是首先以分批模式生长以便达到所需细胞密度。当碳源和 / 或其它营养物耗尽时,以所需速率连续供应相同组成的投料培养基,且以相同速率取出发酵液。在这样的条件下,生物反应器中的产物浓度以及细胞密度一般保持恒定。发酵罐的温度维持在所需温度下,如上所论述。在连续发酵阶段期间,一般理想的是维持合适的 pH 范围以实现最优化生产。pH 可使用常规方法监测并维持,该方法包括添加合适的酸或碱以维持所需 pH 范围。适当的时候且必要时,生物反应器连续地操作延长的时间周期,一般至少一周到几周,和长达一个月,或更长时间。发酵液和 / 或培养物视需要定期进行监测,包括多达每天取样,以确保产物浓度和 / 或细胞密度的一致性。在连续模式中,随着新投料培养基的供应,连续移除发酵罐内容物。一般对含有细胞、培养基和产物的出口流(exit stream)进行连续产物分离程序,视需要移除或不移除细胞和细胞碎片。本领域所用的连续分离方法可用于自稀的水溶液分离产物,包括但不限于使用水不混溶有机溶剂(例如,甲苯或其它合适的溶剂,包括但不限于乙醚、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)、二噁烷、二甲基甲酰胺(DMF)、二甲亚砜(DMSO)等)进行连续液-液萃取;标准连续蒸馏方法等或其它本领域众所周知的方法。

[0167] 除了本文公开的培养和发酵条件以外,用于实现脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合

成的生长条件还可包括往培养条件中添加渗透保护剂。在某些实施方案中,本发明的非天然存在的微生物可以在渗透保护剂存在下按本文所述方法进行保持、培养或发酵。简而言之,渗透保护剂是指起到渗透质 (osmolyte) 的作用并且有助于本文所述微生物在渗透胁迫下存活的化合物。渗透保护剂包括但不限于甜菜碱、氨基酸和糖 (如海藻糖)。这类渗透保护剂的非限制性实例有甘氨酸甜菜碱、果仁糖甜菜碱、二甲基噻亭、二甲基磺酸基 (sulfonio) 丙酸盐、3-二甲基磺酸基 (sulfonio)-2-甲基丙酸盐、哌啶甲酸 (pipercolic acid)、二甲基磺酸基乙酸盐、胆碱、L-肉毒碱和 (S)-2-甲基-1,4,5,6-四氢甲基嘧啶-4-羧酸 (ectoine)。在一个方面,所述渗透保护剂是甘氨酸甜菜碱。本领域普通技术人员应当理解,适合保护本文所述微生物免于渗透胁迫的渗透保护剂的含量和类型将取决于所使用的微生物。渗透保护剂在培养条件下的含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、不超过约 2.5mM、不超过约 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。

[0168] 在有些实施方案中,可以选择所述碳贮存物和其它细胞摄取来源例如磷酸酯、氨、硫酸酯、氯化物和其它卤素来改变脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或任何脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体中存在的原子的同位素分布。以上列举的各种碳贮存物和其它摄取来源在本文中统称为“摄取来源 (uptake sources)”。摄取来源可提供产物脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体中存在的任何原子的同位素富集,或者来自脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径以外的不同的反应中产生的副产物的同位素富集。可以对包括例如碳、氢、氧、氮、硫、磷、氯或其它卤素的任何靶原子实现同位素富集。

[0169] 在有些实施方案中,所述摄取来源可以进行选择以改变碳-12、碳-13 和碳-14 比率 (ratios)。在有些实施方案中,所述摄取来源可以进行选择以改变氧-16、氧-17 和氧-18 比率。在有些实施方案中,所述摄取来源可以进行选择以改变氢、氘和氚 (tritium) 比率。在有些实施方案中,所述摄取来源可以进行选择以改变氮-14 和氮-15 比率。在有些实施方案中,所述摄取来源可以进行选择以改变硫-32、硫-33、硫-34 和硫-35 比率。在有些实施方案中,所述摄取来源可以进行选择以改变磷-31、磷-32 和磷-33 比率。在有些实施方案中,所述摄取来源可以进行选择以改变氯-35、氯-36 和氯-37 比率。

[0170] 在有些实施方案中,靶原子的同位素比率 (isotopic ratio) 可以通过选择一种或多种摄取来源改变到所需比率。摄取来源可以从天然来源获取,如自然界中发现的或来自人造来源的,本领域技术人员可以选择天然来源、人造来源或它们的组合,以达到靶原子的所需同位素比率。人造摄取来源的一个实例包括例如至少部分来源于化学合成反应的摄取来源。这样的同位素富集的摄取来源可以从市场上购买或者在实验室中制备得到和/或任选与摄取来源的天然来源混合以达到所需的同位素比率。在有些实施方案中,摄取来源的靶原子同位素比率可以通过选择摄取来源 (如自然界中发现的) 的所需来源来达到。例如,如本文讨论的,天然来源可以是衍生自生物体或由生物体合成的生物基的 (biobased) 或者诸如基于石油的产物或大气的来源。在一些这样的实施方案中,例如,碳的来源可选自化石燃料来源的碳源,它可以相对耗竭碳-14;或者环境或大气碳源,例如 CO₂, 它可比其石油来源的对应物具有更大量的碳-14。

[0171] 不稳定的碳同位素碳-14 或放射性碳在地球大气中大致占到 1/10¹²碳原子,其半

衰期约为 5700 年。碳的贮量因为核反应而充满上层大气,包括宇宙射线和普通的氮 (^{14}N)。化石燃料不含有碳-14,因为在很久以前它就衰减了。化石燃料的燃烧降低了大气碳-14 分数,所谓的“休斯效应 (Suess effect)”。

[0172] 测定化合物中各原子的同位素比率的方法是本领域技术人员众所周知的。同位素富集可以容易地采用本领域已知的技术例如加速质谱法 (accelerated mass spectrometry, AMS)、稳定同位素比率质谱仪 (Stable Isotope Ratio Mass Spectrometry, SIRMS) 和点特异性天然同位素分馏核磁共振技术 (Site-Specific Natural Isotopic Fractionation by Nuclear Magnetic Resonance, SNIF-NMR) 通过质谱法来评价。这样的质谱技术可以与分离技术例如液相色谱法 (LC)、高效液相色谱法 (HPLC) 和 / 或气相色谱法等结合在一起。

[0173] 就碳而论, ASTM D6866 在美国被开发出来作为一种标准化分析方法,国际上由美国试验及材料标准学会 (the American Society for Testing and Materials, ASTM) 采用放射性碳年代测定法 (radiocarbon dating) 测定固体、液体和气体样品的生物基含量 (biobased content)。该标准是基于采用放射性碳年代测定法测定产物的生物基含量。ASTM D6866 首先在 2004 年公布,该标准的现行版本是 ASTM D6866-11 (2011 年 4 月 1 日生效)。放射性碳年代测定技术是本领域技术人员众所周知的,包括本文描述的那些。

[0174] 化合物的生物基含量通过碳-14 (^{14}C) 与碳-12 (^{12}C) 的比率来估计。准确地讲,现代碳的份数 (Fraction Modern, F_m) 根据公式 $F_m = (S-B)/(M-B)$ 计算得出,式中 B、S 和 M 分别代表空白、样品和现代参考物的 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比率。Fraction Modern 是来自“现代 (Modern)”的样品中的 $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比率偏差的度量。现代 (Modern) 定义为国家标准局 (National Bureau of Standards, NBS) 草酸 I (即,标准参考物质 (SRM) 4990b) 的放射性碳浓度 95% (在 AD 1950 中) 归一化至 $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -19\text{‰}$ (Olsson, The use of Oxalic acid as a Standard (应用草酸作为标准物质)。载于 Radiocarbon Variations and Absolute Chronology, Nobel Symposium, 12th Proc., John Wiley&Sons, New York (1970))。例如通过 ASM 测量的质谱结果运用国际上同意的根据 0.95 乘以 NBS 草酸 I (SRM 4990b) 的比活归一化至 $\delta^{13}\text{C}_{\text{VPDB}} = -19\text{‰}$ 的定义计算得出。这相当于绝对 (AD 1950) $^{14}\text{C}/^{12}\text{C}$ 比率为 $1.176 \pm 0.010 \times 10^{-12}$ (Karlen 等人, Arkiv Geofysik, 4:465-471 (1968))。标准计算考虑了一种同位素相对于另一种同位素的差异摄取,例如生物系统中的优先摄取是 C^{12} 优于 C^{13} 优于 C^{14} 并且这些校正值反映为针对 $\delta^{13}\text{C}$ 校正过的 F_m 。

[0175] 草酸标准 (SRM 4990b 或 HOx 1) 由 1955 个糖用甜菜的集合制定。虽然有 1000lbs 要做,但是这种草酸标准不再是市售的。草酸 II 标准 (HOx 2; N. I. S. T 命名为 SRM 4990 C) 由 1977 个法国甜菜糖蜜 (French beet molasses) 的集合制定。在 1980 年代早期,一个由 12 个实验室组成的小组测量了这两个标准的比率。草酸 II 与 I 的活性比率为 1.2933 ± 0.001 (加权平均值)。HOx II 的同位素比率为 -17.8‰ (-17.8per mil)。ASTM D6866-11 建议使用可获得的草酸 II 标准 SRM 4990 C (HOx2) 作为现行标准 (参见 discussion of original vs. currently available oxalic acid standards in Mann, Radiocarbon, 25(2):519-527 (1983))。 $F_m = 0\%$ 代表材料中碳-14 原子的完全缺乏,因此表明是一种化石 (例如基于石油的) 碳源。 $F_m = 100\%$, 在用 1950 年代后将碳-14 排放到大气校正 (来自核爆炸试验) 之后,表明全部是现代碳源。如本文描述的,这样一种“现代

(modern)”来源包括生物基的来源。

[0176] 如 ASTM D6866 中所述,现代碳百分比 (pMC) 可大于 100%,因为 1950 年代核试验计划 (the 1950s nuclear testing programs) 的继续但不断减小的效应,这导致了大气中碳-14 相当大的富集,如在 ASTM D6866-11 中所描述的。因为所有样品的碳-14 活性都是参照“原子弹爆炸前 (pre-bomb)”标准,并且因为几乎所有的新的生物基产物都在原子弹爆炸后 (post-bomb) 环境中产生,所以,所有的 pMC 值 (在对同位素分数校正之后) 必须乘以 0.95 (截至 2010 年) 以更好地反映出样品的真实生物基含量。大于 103% 的生物基含量提示或者分析误差已发生,或者生物基碳的来源超过了数个年头。

[0177] ASTM D6866 相对于材料的总有机物含量对生物基含量来定量并且不认为含有无机碳和其它非碳的物质存在。例如,根据 ASTM D6866,50% 基于淀粉的材料和 50% 水的产品将被认为具有生物基含量 = 100% (50% 有机物含量,也就是说 100% 生物基的)。在另一个实例中,50% 基于淀粉的材料、25% 基于石油的材料和 25% 水的产品将具有生物基含量 = 66.7% (75% 有机物含量但是该产品仅 50% 是生物基的)。在另一个实例中,50% 有机碳且是石油基产物的产品将被认为具有生物基含量 = 0% (50% 有机碳但来自化石来源)。因此,根据用于测定化合物或材料的生物基含量的众所周知的方法和已知的标准,本领域技术人员可容易地确定具有所需生物基含量且为本发明所利用的生物基含量和 / 或制得的下游产物。

[0178] 应用碳-14 年代测定技术定量测定材料的生物基含量 (bio-based content) 是本领域已知的 (Currie 等人, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B, 172:281-287 (2000))。例如,碳-14 年代测定法已经用来对含有对苯二甲酸酯的材料中的生物基含量进行定量 (Colonna 等人, Green Chemistry, 13:2543-2548 (2011))。值得注意的是,衍生自可再生 1,3-丙二醇和石油源性对苯二甲酸的聚对苯二甲酸丙二醇酯 (PPT) 聚合物导致 Fm 值接近 30% (即,由于聚合物碳的 3/11 来源于可再生的 1,3-丙二醇和 8/11 来源于化石终端成员对苯二甲酸) (Currie 等人, 同上, 2000)。相反,衍生自可再生的 1,4-丁二醇和可再生的对苯二甲酸二者的聚对苯二甲酸丁二醇酯聚合物导致生物基含量超过 90% (Colonna 等人, 同上, 2011)。

[0179] 因此,在有些实施方案中,本发明提供脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体,其碳-12、碳-13 和碳-14 比率反映出大气碳 (也称为环境碳) 摄取来源。例如,在有些方面,所述脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体可具有 Fm 值为至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 45%、至少 50%、至少 55%、至少 60%、至少 65%、至少 70%、至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或至多 100%。在一些这样的实施方案中,所述摄取来源是 CO₂。在有些实施方案中,本发明提供脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体,其碳-12、碳-13 和碳-14 比率反映出基于石油的碳摄取来源。在这个方面,所述脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体可具有 Fm 值为小于 95%、小于 90%、小于 85%、小于 80%、小于 75%、小于 70%、小于 65%、小于 60%、小于 55%、小于 50%、小于 45%、小于 40%、小于 35%、小于 30%、小于 25%、小于 20%、小于 15%、小于 10%、小于 5%、小于 2% 或小于 1%。在有些实施方案中,本发明提供脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体,其碳-12、碳-13 和碳-14 比率可通过

大气碳摄取来源与基于石油的摄取来源的组合获得。采用摄取来源的这样一种组合是一种可以改变碳-12、碳-13和碳-14比率的一种方式,并且相应的比率将反映出摄取来源的比例。

[0180] 进一步,本发明涉及如本文公开的生物学法生产的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体,和由其衍生的产物,其中所述脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体具有碳-12、碳-13和碳-14同位素比率约与环境中存在的CO₂的值相同。例如,在有些方面,本发明提供:生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体,其碳-12对碳-13对碳-14同位素比率约与环境中存在的CO₂的值相同或为本文公开的任何其它比率。应当理解,正如本文所公开的,产物可具有碳-12对碳-13对碳-14的同位素比率约与环境中存在的CO₂的值相同或为本文公开的任何其它比率。其中所述产物由如本文公开的生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体产生,其中所述生物来源的产物经化学改性得到最终产物。将脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或其中间体的生物来源的产物经化学改性得到所需产物的方法是本领域技术人员众所周知的,正如本文所描述的。本发明还提供生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质或丙烯酸酯,其碳-12对碳-13对碳-14同位素比率约与环境中存在的CO₂的值相同,其中所述生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质或丙烯酸酯直接由如本文公开的生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体或者与其组合来生产。

[0181] 脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸是用于商业和工业应用的化学品。这类应用的非限制性实例包括生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质和丙烯酸酯的生产。因此,在有些实施方案中,本发明提供生物基生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质和丙烯酸酯,其包含通过本发明的非天然存在的微生物生产的或使用本文公开的方法生产的一种或多种生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体。

[0182] 如本文所用的,术语“生物来源的(bioderived)”意指来源于生物体的或者由生物体合成的,并且因为它可以由生物体产生而可以被认为是一种可再生资源。这样一种生物体,特别是本文公开的本发明微生物可以利用由农业、植物、细菌或动物来源获得的贮存物或生物物质,例如糖类或碳水化合物。或者,所述生物体可以利用大气碳。如本文所用的,术语“生物基的(biobased)”意指全部或部分由本发明的生物来源的化合物组成的如上所述的产品。生物基的或生物来源的产品是与石油来源的产品相反的,其中这样一种产品由石油或石油化学贮存物获得或者由石油或石油化学贮存物合成。

[0183] 在有些实施方案中,本发明提供包含生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体的生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质或丙烯酸酯,其中所述生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体包括生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质或丙烯酸酯生产中使用的全部或部分脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体。

例如,最终的生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质或丙烯酸酯可含有在制造所述生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质或丙烯酸酯中使用的生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸、脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体或其部分。这样的制造可包括使生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体在生产最终生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质或丙烯酸酯的反应中与其自身或另一种化合物发生化学反应(例如化学转变、化学官能化、化学偶联、氧化、还原、聚合、共聚合等)。因此,在有些方面,本发明提供生物基的生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质或丙烯酸酯,其包含至少 2%、至少 3%、至少 5%、至少 10%、至少 15%、至少 20%、至少 25%、至少 30%、至少 35%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、至少 95%、至少 98% 或 100% 如本文公开的生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体。在有些方面,当产物是包括或得自本文描述的生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或者脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体的生物基聚合物时,所述生物基聚合物可以使用本领域众所周知的方法来模制。因此,在有些实施方案中,本文提供的是包含本文描述的生物基聚合物的模制产品。

[0184] 另外,在有些实施方案中,本发明提供组合物,其具有本文公开的生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体及除生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体以外的化合物。例如,在有些方面,本发明提供生物基生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质或丙烯酸酯,其中用于其生产的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体是生物来源的和石油来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体的组合。例如,生物基生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质或丙烯酸酯可使用 50% 生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸和 50% 石油来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或其它所需比率例如 60%/40%、70%/30%、80%/20%、90%/10%、95%/5%、100%/0%、40%/60%、30%/70%、20%/80%、10%/90% 的生物来源的 / 石油来源的前体来生产,只要至少一部分产物包含由本文公开的微生物生产的生物来源的产物即可。应当理解,使用本发明的生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径中间体生产生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质或丙烯酸酯的方法是本领域众所周知的。

[0185] 本发明进一步提供组合物,其包含生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸和除生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸以外的化合物。除生物来源的产物以外的化合物可以在本发明的具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径的非天然存在的微生物的存在下生产的细胞部分(例如,痕量的细胞部分)或者可以是发酵肉汤或培养基或其纯化或部分纯化部分。当通过如本文公开的具有降低副产物形成的生物体生产时,所述组合物可包含例如降低水平的副产物。所述组合物可包含例如本发明的微生物的生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或细胞溶解物或培养物上清液。

[0186] 在某些实施方案中,本文提供的是组合物,其包含本文提供的生物来源的脂肪醇、

脂肪醛或脂肪酸,例如,通过培养如本文提供的具有 MI-FAE 循环和 / 或 MD-FAE 循环与终止途径组合的非天然存在的微生物生产的生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在有些实施方案中,该组合物还包含除所述生物来源的生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸以外的化合物。在某些实施方案中,除所述生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸以外的化合物是具有 MI-FAE 循环和 / 或 MD-FAE 循环与终止途径组合的非天然存在的微生物的痕量的细胞部分。

[0187] 在有些实施方案中,本文提供的是生物基产品,其包含本文提供的生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在某些实施方案中,所述生物基产品是生物燃料、化学品、聚合物、表面活性剂、皂、洗涤剂、洗发香波、润滑油添加剂、香料、调味物质或丙烯酸酯。在某些实施方案中,所述生物基产品包含至少 5% 生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在某些实施方案中,所述生物基产品包含至少 10% 生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在有些实施方案中,所述生物基产品包含至少 20% 生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在其它实施方案中,所述生物基产品包含至少 30% 生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在有些实施方案中,所述生物基产品包含至少 40% 生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在其它实施方案中,所述生物基产品包含至少 50% 生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在一个实施方案中,所述生物基产品包含一部分作为重复单元的所述生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。在另一个实施方案中,本文提供的是通过模制本文提供的生物基产品获得的模制产品。在其它实施方案中,本文提供的是用于生产本文提供的生物基产品的工艺,包括将所述生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸与其自身或另一种化合物在生产所述生物基产品的反应中发生化学反应。在某些实施方案中,本文提供的是包含生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或通过转变生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸获得的聚合物。在其它实施方案中,本文提供的是用于生产聚合物的方法,包括将生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸经化学或酶促转变成聚合物。在又一些实施方案中,本文提供的是包含生物来源的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸或其细胞溶解物或培养物上清液的组合物。

[0188] 培养条件可包括例如液体培养程序以及发酵和其它大规模培养程序。如本文所述的,本发明的生物合成产物的特别有用的产率可以在厌氧或基本上厌氧培养条件下获得。

[0189] 如本文所述的,用于实现脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成的一种示例性生长条件包括厌氧培养或发酵条件。在某些实施方案中,本发明的非天然存在的微生物可以在厌氧或基本上厌氧的条件下进行保持、培养或发酵。简而言之,厌氧条件是指无氧的环境。基本上厌氧的条件包括例如培养、分批发酵或连续发酵使得培养基中的溶解氧浓度保持在 0 和 10% 饱和之间。基本上厌氧的条件也包括密封室里面的液体培养基中或固体琼脂上的生长细胞或静止细胞维持在小于 1% 氧的气氛下。氧的百分比可以通过例如在培养物中通入 N_2/CO_2 混合气或其它合适的一种或多种非氧气体来维持。

[0190] 为了制备脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸,可以将本文所述的培养条件连续放大和生长。示例性生长程序包括例如补料 - 分批发酵和分批分离;补料 - 分批发酵和连续分离;或连续发酵和连续分离。所有的这些过程都是本领域众所周知的。发酵程序特别适用于经生物合成生产商业数量的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。一般而言,并根据非连续培养程序,脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的连续和 / 或接近连续生产包括将本发明的非天然存在的产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物体在足够的营养物和培养基中进行培养以保持和 / 或几乎保持处于指数期的生长。在这样的条件下连续培养可以包括例如生长或培养 1 天, 2、3、4、5、6 或 7 天或更

长时间。另外,连续培养可包括 1 周、2、3、4 或 5 周或更多周,甚至达到数月的较长时间周期。或者,本发明的生物体可以培养数小时,如果适合具体应用的话。应当理解,连续和/或接近连续培养条件也可包括在这些示例性周期之间以内的所有时间间隔。还应当理解,本发明微生物的培养时间是产生足够量的产物用于所需目的的足够时间周期。

[0191] 发酵程序是本领域众所周知的。简而言之,用于生物合成性生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的发酵可用于例如补料-分批发酵和分批分离;补料-分批发酵和连续分离;或连续发酵和连续分离。分批和连续发酵程序的实例是本领域众所周知的。

[0192] 除了使用本发明的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产者来连续生产相当大量的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的上述发酵程序以外,所述脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产者也可以例如同时经历化学合成程序和/或酶促程序以将产物转变成其它化合物,或者产物可以从发酵培养物中分离出来后再经历化学转变或酶促转变以将产物转变成其它化合物,如果需要的话。

[0193] 为了产生更好的生产者,可以采用代谢建模来使生长条件最优化。建模也可用来设计另外最优化途径利用的基因敲除 (gene knockout) (参见例如,美国专利公布 US 2002/0012939、US 2003/0224363、US 2004/0029149、US 2004/0072723、US 2003/0059792、US 2002/0168654 和 US 2004/0009466 和美国专利第 7, 127, 379 号)。建模分析允许可靠地预测对代谢朝着更有效产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸转换的细胞生长的影响。

[0194] 除了以高产率、高效价和高生产力生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的活性和选择性酶以外,可有效地将碳和还原当量定向至脂肪醇、脂肪醛和脂肪酸生物合成的稳固宿主生物可以是有益的。本文描述的宿主修饰特别适用于与促进所需脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸产物形成的本文描述的选择性酶的组合。本文描述的若干宿主修饰需要将异源酶活性引入宿主生物中。其它修饰涉及相对于野生型水平过量表达或升高酶活性。还有的其它修饰包括破坏内源基因或使内源酶活性衰减。

[0195] 在本发明的一个实施方案中,所述微生物有效地将碳源和能量来源定向至生产乙酰-CoA,该乙酰-CoA 用作 MI-FAE 循环中的引物和延伸单元。在本发明的一个实施方案中,所述微生物有效地将碳源和能量来源定向至生产丙二酰-CoA,该丙二酰-CoA 用作 MD-FAE 循环中的引物和延伸单元。在未经修饰的微生物中,细胞溶质中的脂肪醇、脂肪醛和脂肪酸生产依赖于天然细胞机器以提供必需前体。因此,高浓度的细胞溶质乙酰-CoA 和/或丙二酰-CoA 对促进采用起源于乙酰-CoA 或丙二酰-CoA 的细胞溶质脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产途径是理想的。本文公开了用于增加细胞溶质乙酰-CoA 和丙二酰-CoA 的代谢工程改造策略。

[0196] 由于许多真核生物在依赖葡萄糖生长期间在线粒体中合成其大部分乙酰-CoA,因此增加细胞溶质中乙酰-CoA 的可利用性可以通过引入细胞溶质乙酰-CoA 生物合成途径而获得。因此,本文描述了乙酰-CoA 生物合成途径。在一个实施方案中,利用图 2 中所示的途径,乙酰-CoA 可以在细胞溶质中自丙酮酸或苏氨酸前体合成。在其它的实施方案中,乙酰-CoA 可以在细胞溶质中自磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 或丙酮酸合成 (图 3)。在又一个实施方案中,乙酰-CoA 可以在细胞区室中合成并转运至细胞溶质。例如,一种机制涉及将线粒体乙酰-CoA 转变成代谢中间体 (例如柠檬酸或柠苹果酸 (citramalate)), 将那些中间体转运至细胞溶质,然后使乙酰-CoA 再生 (参见图 4 和图 5)。示例性的乙酰-CoA 途径和相应的

酶在实施例 II-IV 中作了进一步描述。

[0197] 在另一个实施方案中,增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成的细胞溶质乙酰-CoA 可利用性是破坏或衰减利用乙酰-CoA 或其前体的竞争酶和途径。示例性的竞争酶活性包括但不限于丙酮酸脱羧酶、乳酸脱氢酶、短链醛和醇脱氢酶、乙酸激酶、磷酸转乙酰酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、丙酮酸氧化酶和乙酰-CoA 羧化酶。其破坏或衰减可改进脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产的示例性乙酰-CoA 消耗途径包括线粒体 TCA 循环、脂肪酸生物合成、乙醇产生和氨基酸生物合成。这些酶和途径在本文中作了进一步描述。

[0198] 用于增加细胞溶质乙酰-CoA 生产的又一个策略是增加细胞质中可获得的 CoA 库(pool)。这可以通过在细胞溶质中过量表达 CoA 生物合成酶来实现。具体地说,可使用泛酸激酶(EC 2.7.1.33)的表达。这种酶催化 CoA 生物合成的第一步骤和限速酶。对 CoA 反馈抑制具有抗性的示例性泛酸激酶变异体是本领域众所周知的(Rock 等人, J Bacteriol 185:3410-5(2003)) 并且描述于下表中。

[0199]

蛋白质	登录 #	GI 编号	生物体
coaA	AAC76952	1790409	大肠杆菌
CAB1	NP_010820.3	398366683	酿酒酵母
KLLA0C00869g	XP_452233.1	50304555	乳酸克鲁维酵母
YALI0D25476g	XP_503275.1	50551601	解脂耶氏酵母
ANI_1_3272024	XP_001400486.2	317028058	黑曲霉

[0200] 也可以使自本发明的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产递送酰基-CoA 底物的竞争酶和途径衰减或破坏。用于衰减的示例性酶包括 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或终止途径酶的酰基转移酶、肉毒碱穿梭酶和负调节物。

[0201] 将酰基部分自 CoA 转移至其它受体(例如 ACP、甘油、乙醇等)的酰基转移酶的破坏或衰减可增加用于脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产的酰基-CoA 的可利用性。例如,酰基-CoA:ACP 转酰基酶(EC 2.3.1.38;2.3.1.39)酶(例如大肠杆菌的 fabH(KASIII))将酰基部分自 CoA 转移至 ACP。FabH 对乙酰-CoA 和丁酰-CoA 有活性(Prescott 等人, Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol, 36:269-311(1972))。来自恶性疟原虫(Plasmodium falciparum)和阿维链霉菌(Streptomyces avermitillis)的乙酰-CoA:ACP 转酰基酶已在大肠杆菌中异源表达(Lobo 等人, Biochem 40:11955-64(2001))。在 fabH 缺陷型乳酸乳球菌(Lactococcus lactis)宿主中表达的来自恶性疟原虫(P. falciparum)的合成 KASIII(FabH)能够补充天然 fadH 活性(Du 等人, AEM 76:3959-66(2010))。来自菠菜(Spinacia oleracea)的乙酰-CoA:ACP 转酰基酶接受其它酰基-ACP 分子作为底物,包括丁酰-ACP(Shimakata 等人, Methods Enzym 122:53-9(1986))。丙二酰-CoA:ACP 转酰基酶包括大肠杆菌和欧洲油菜的 FabD(Verwoert 等人, J Bacteriol, 174:2851-7(1992); Simon 等人, FEBS Lett 435:204-6(1998))。欧洲油菜(B. napsus)的 FabD 能够补充 fabD 缺陷型大

肠杆菌。多功能真核脂肪合酶复合体(本文描述的)也催化这种活性。其它示例性的酰基转移酶包括二酰基甘油酰基转移酶,例如酿酒酵母的 LRO1 和 DGA1 及解脂耶氏酵母的 DGA1 和 DGA2;甘油脂质酰基转移酶,例如大肠杆菌的 plsB(GenBank: AAC77011. 2, GI: 87082362; Heath 和 Rock, J Bacteriol 180:1425-30(1998));固醇酰基转移酶,例如酿酒酵母的 ARE1 和 ARE2;乙醇酰基转移酶(EEB1, EHT1);推定的酰基转移酶(YMR210W)等。

[0202]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
fabH	AAC74175. 1	1787333	大肠杆菌
fadA	NP_824032. 1	29829398	阿维链霉菌
fabH	AAC63960. 1	3746429	恶性疟原虫
合成构建体	ACX34097. 1	260178848	恶性疟原虫
fabH	CAL98359. 1	124493385	乳酸乳球菌
fabD	AAC74176. 1	1787334	大肠杆菌
fabD	CAB45522. 1	5139348	欧洲油菜
LRO1	NP_014405. 1	6324335	酿酒酵母
DGA1	NP_014888. 1	6324819	酿酒酵母
DGA1	CAG79269. 1	49649549	解脂耶氏酵母
DGA2	XP_504700. 1	50554583	解脂耶氏酵母
ARE1	NP_009978. 1	6319896	酿酒酵母
ARE2	NP_014416. 1	6324346	酿酒酵母
EEB1	NP_015230. 1	6325162	酿酒酵母
EHT1	NP_009736. 3	398365307	酿酒酵母
YMR210W	NP_013937. 1	6323866	酿酒酵母
ALE1	NP_014818. 1	6324749	酿酒酵母

[0203] 增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产可使参与将乙酰 -CoA 和酰基 -CoA 分子自生物体的细胞溶质运输至其它区室(例如线粒体、内质网、脂蛋白体和过氧化物酶体)的酶破坏或衰减成为必要。在这些区室中,酰基 -CoA 中间体可降解或用作结构模块(building block)以合成脂肪酸、辅因子和其它副产物。

[0204] 定位于细胞溶质的乙酰-CoA 和酰基-CoA 分子可借助于载体分子肉毒碱经由肉毒碱穿梭而转运至其它细胞区室中 (van Roermund 等人, EMBO J 14:3480-86(1995))。细胞区室之间的酰基-肉毒碱穿梭已在酵母 (例如白色假丝酵母) 中表征 (Strijbis 等人, J Biol Chem 285:24335-46(2010))。在这些穿梭中, 酰基-CoA 的酰基部分通过酰基肉毒碱转移酶可逆地转移至肉毒碱。乙酰基肉毒碱可随后通过细胞器特异性酰基肉毒碱/肉毒碱移位酶跨膜转运。移位后, 酰基-CoA 通过乙酰基肉毒碱转移酶再生。适合于破坏或衰减的酶包括肉毒碱酰基转移酶、酰基肉毒碱移位酶、酰基肉毒碱载体蛋白和参与肉毒碱生物合成的酶。

[0205] 肉毒碱乙酰基转移酶 (CAT, EC 2.3.1.7) 将来自乙酰-CoA 的乙酰基单元可逆地连接至载体分子肉毒碱。白色假丝酵母编码三种 CAT 同工酶 (isozyme): Cat2、Yat1 和 Yat2 (Strijbis 等人, J Biol Chem 285:24335-46(2010))。Cat2 在线粒体和过氧化物酶体中表达, 而 Yat1 和 Yat2 在细胞溶质中表达。Cat2 转录物含有在不同碳源条件下调节的两个起始密码子。较长转录物含有线粒体靶向序列, 而较短转录物靶向过氧化物酶体。酿酒酵母的 Cat2 和构巢曲霉的 AcuJ 利用双定位的类似机制 (Elgersma 等人, EMBO J 14:3472-9(1995); Hynes 等人, Euk Cell 10:547-55(2011))。构巢曲霉 (*A. nidulans*) 的细胞溶质 CAT 由 facC 编码。其它示例性的 CAT 酶在褐家鼠和智人中被发现 (Cordente 等人, Biochem 45:6133-41(2006))。示例性的肉毒碱酰基转移酶 (EC 2.3.1.21) 是褐家鼠的 Cpt1 和 Cpt2 基因产物 (de Vries 等人, Biochem 36:5285-92(1997))。

[0206]

蛋白质	登录 #	GI 编号	生物体
Cat2	AAN31660.1	23394954	白色假丝酵母
Yat1	AAN31659.1	23394952	白色假丝酵母
Yat2	XP_711005.1	68490355	白色假丝酵母
Cat2	CAA88327.1	683665	酿酒酵母
Yat1	AAC09495.1	456138	酿酒酵母
Yat2	NP_010941.1	6320862	酿酒酵母
AcuJ	CBF69795.1	259479509	构巢曲霉
FacC	AAC82487.1	2511761	构巢曲霉
Crat	AAH83616.1	53733439	褐家鼠
Crat	P43155.5	215274265	智人
Cpt1	AAB48046.1	1850590	褐家鼠

Cpt2	AAB02339.1	1374784	褐家鼠
------	------------	---------	-----

[0207] 肉毒碱-酰基肉毒碱移位酶可催化肉毒碱和肉毒碱-脂肪酸复合体的双向转运。Cact 基因产物提供跨线粒体膜的转运酰基-肉毒碱底物的机制 (Ramsay 等人, *Biochim Biophys Acta* 1546:21-42(2001))。类似的蛋白质已在人类中进行了研究 (Sekoguchi 等人, *J Biol Chem* 278:38796-38802(2003))。酿酒酵母线粒体肉毒碱载体是 Crc1 (van Roermund 等人, 同上; Palmieri 等人, *Biochimica et Biophys Acta* 1757:1249-62(2006))。人肉毒碱移位酶能够补充酿酒酵母的 Crc1- 缺陷型菌株 (van Roermund 等人, 同上)。在黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) 和秀丽隐杆线虫 (*Caenorhabditis elegans*) 中发现的另外两种肉毒碱移位酶也能够补充 Crc1- 缺陷型酵母 (Oey 等人, *Mol Genet Metab* 85:121-24(2005))。基于与酵母和人转运体的序列同源性在布氏锥虫中鉴定出四种线粒体肉毒碱 / 乙酰基肉毒碱载体 (Colasante 等人, *Mol Biochem Parasit* 167:104-117(2009))。通过序列同源性也鉴定出白色假丝酵母的肉毒碱转运体。另外一种线粒体肉毒碱转运体是构巢曲霉的 acuH 基因产物, 其只定位于线粒体膜 (Lucas 等人, *FEMS Microbiol Lett* 201:193-8(2006))。

[0208]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
Cact	P97521.1	2497984	褐家鼠
Cac1	NP_001034444.1	86198310	智人
Ca019.2851	XP_715782.1	68480576	白色假丝酵母
Crc1	NP_014743.1	6324674	酿酒酵母
Dif-1	CAA88283.1	829102	秀丽隐杆线虫
colt	CAA73099.1	1944534	黑腹果蝇
Tb11.02.2960	EAN79492.1	70833990	布氏锥虫
Tb11.03.0870	EAN79007.1	70833505	布氏锥虫
Tb11.01.5040	EAN80288.1	70834786	布氏锥虫
Tb927.8.5810	AAX69329.1	62175181	布氏锥虫
acuH	CAB44434.1	5019305	构巢曲霉

[0209] 肉毒碱和酰基肉毒碱跨氧化物酶体膜的转运尚未充分表征。酵母中的特异性过氧化物酶体酰基肉毒碱载体蛋白迄今尚未鉴定。然而, 线粒体肉毒碱移位酶也可以在肉毒碱和乙酰基肉毒碱的过氧化物酶体转运中发挥功能。实验证据提示小家鼠 (*Mus musculus*) 的 OCTN3 蛋白是过氧化物酶体肉毒碱 / 酰基肉毒碱移位酶。

[0210] 又一个可能性是酰基-CoA 或酰基-肉毒碱通过酰基-CoA 转运体（例如酿酒酵母的 Pxa1 和 Pxa2/ABC 转运体或智人的 ALDP/ABC 转运体）跨越过氧化物酶体或线粒体膜转运 (van Roermund 等人, FASEB J 22:4201-8(2008))。Pxa1 和 Pxa2 (Pat1 和 Pat2) 在过氧化物酶体膜中形成杂二聚体复合体并且催化脂肪酰-CoA 酯 ATP- 依赖性转运至过氧化物酶体中 (Verleur 等人, Eur J Biochem 249:657-61(1997))。pxa1/pxa2 缺陷型酵母的突变表型可由 ALDP 异源表达拯救, 该 ALDP 显示转运一系列酰基-CoA 底物 (van Roermund 等人, FASEB J 22:4201-8(2008))。Pxa12 转运系统的缺失与过氧化物酶体脂肪酰-CoA 合成酶 (Faa2) 的缺失连在一起废除酿酒酵母中的过氧化物酶体 β -氧化。用于减少途径中间体或产物转运至过氧化物酶体中的又一个策略是通过干扰参与过氧化物酶体生物发生 (biogenesis) 的系统而衰减或消除过氧化物酶体功能。示例性的靶是解脂耶氏酵母的 Pex10 及同源物。

[0211]

蛋白质	登录 #	GI 编号	生物体
OCTN3	BAA78343.1	4996131	小家鼠
Pxa1	AAC49009.1	619668	酿酒酵母
Pxa2	AAB51597.1	1931633	酿酒酵母
Faa2	NP_010931.3	398364331	酿酒酵母
ALDP	NP_000024.2	7262393	智人
Pex10	BAA99413.1	9049374	解脂耶氏酵母

[0212] 肉毒碱生物合成途径酶也是用于破坏或衰减的合适候选者。在白色假丝酵母中, 例如, 肉毒碱在四个酶促步骤中自三甲基-L-赖氨酸合成 (Strijbis 等人, FASEB J 23:2349-59(2009))。肉毒碱途径前体三甲基赖氨酸 (TML) 在蛋白质降解期间产生。TML 双加氧酶 (Ca013.4316) 使 TML 羟基化以形成 3-羟基-6-N-三甲基赖氨酸。5'-磷酸吡哆醛依赖性醛缩酶 (Ca019.6305) 随后使 HTML 裂解生成 4-三甲基氨基丁醛。该 4-三甲基氨基丁醛随后由脱氢酶 (Ca019.6306) 氧化生成 4-三甲基氨基丁酸。在最后的步骤中, 4-三甲基氨基丁酸由 Ca019.7131 的基因产物羟基化形成肉毒碱。通过肉毒碱生物合成途径的通量受到途径底物的可利用性限制, 并且极低水平的肉毒碱似乎对正常肉毒碱穿梭活性是足够的 (Strijbis 等人, IUBMB Life 62:357-62(2010))。

[0213]

蛋白质	登录 #	GI 编号	生物体
Ca019.4316	XP_720623.1	68470755	白色假丝酵母
Ca019.6305	XP_711090.1	68490151	白色假丝酵母
Ca019.6306	XP_711091.1	68490153	白色假丝酵母

CaO19.7131	XP_715182.1	68481628	白色假丝酵母
------------	-------------	----------	--------

[0214] 朝向脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产的碳通量可通过缺失或衰减竞争途径来改进。酵母的典型发酵产物包括乙醇、甘油和 CO₂。这些副产物的消除或减少可通过本文描述的方法来实现。例如,可减少因呼吸所致的碳损失。其它潜在的副产物包括乳酸、乙酸、甲酸、脂肪酸和氨基酸。

[0215] 乙酰-CoA 转变成乙醇对于脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生产有害,因为此转变过程可使碳和还原当量自 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和终止途径离开。乙醇可在由丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶催化的两个酶促步骤中由丙酮酸形成。酿酒酵母具有三种丙酮酸脱羧酶(PDC1、PDC5 和 PDC6)。PDC1 是主要的同工酶并且在有活性的发酵细胞中强表达。PDC5 也在糖酵解发酵期间发挥作用,但仅在不存在 PDC1 时或在硫胺限制条件下表达。PDC6 在不可发酵碳源上生长期间发挥作用。缺失 PDC1 和 PDC5 可显著地减少乙醇产生;然而这些缺失可导致产生具有增加的 PDC6 表达的突变体。所有三种的缺失完全消除乙醇形成但是也可以引起生长缺陷,因为细胞无能力形成足够的乙酰-CoA 用于生物质形成。然而,这可以通过使细胞在减少量的 C2 碳源(乙醇或乙酸)存在下进化来克服(van Maris 等人, AEM 69:2094-9(2003))。也有报道指出,丙酮酸脱羧酶 PDC1 和 PDC5 的正调节因子 PDC2 的缺失使乙醇形成减少至野生型制造的乙醇的~10% (Hohmann 等人, Mol Gen Genet 241:657-66(1993))。PDC 酶的蛋白质序列和标识符列于实施例 II。

[0216] 或者,将乙醛转变成乙醇的醇脱氢酶和/或其它短链醇脱氢酶可被破坏或衰减以提供碳和还原当量用于 MI-FAE 循环、MD-FAE 或终止途径。迄今为止,已报道在酿酒酵母中的七种醇脱氢酶 ADH1-ADHVII(de Smidt 等人, FEMS Yeast Res 8:967-78(2008))。ADH1(GI:1419926) 是负责在细胞溶质中在厌氧条件下将乙醛还原成乙醇的关键酶。已报道,ADH1 中有缺陷的酵母菌株在厌氧时不能生长,这是因为活性呼吸链是用于使 NADH 再生且导致 ATP 净增益的唯一替代路径(Drewke 等人, J Bacteriol 172:3909-17(1990))。这种酶是用于下调以限制乙醇产生的理想候选者。ADH2 在葡萄糖存在下受到严重阻抑。在乳酸克鲁维酵母(*K. lactis*)中,两种 NAD- 依赖性细胞溶质醇脱氢酶已进行了鉴定和表征。这些基因也显示对其它脂族醇的活性。基因 ADH1(GI:113358) 和 ADHII(GI:51704293) 优先在葡萄糖生长细胞中表达(Bozzi 等人, Biochim Biophys Acta 1339:133-142(1997))。细胞溶质醇脱氢酶由白色假丝酵母(*C. albicans*)中的 ADH1(GI:608690)、粟酒裂殖酵母(*S. pombe*)中的 ADH1(GI:3810864)、解脂耶氏酵母(*Y. lipolytica*)中的 ADH1(GI:5802617)、树干毕赤酵母(*Pichia stipitis*)或树干谢尔壶菌(*Scheffersomyces stipiti*)中的 ADH1(GI:2114038) 和 ADHII(GI:2143328) 编码(Passoth 等人, Yeast 14:1311-23(1998))。候选醇脱氢酶见下表。

[0217]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
SADH	BAA24528.1	2815409	近平滑假丝酵母
ADH1	NP_014555.1	6324486	酿酒酵母 s288c

ADH2	NP_014032.1	6323961	酿酒酵母 s288c
ADH3	NP_013800.1	6323729	酿酒酵母 s288c
ADH4	NP_011258.2	269970305	酿酒酵母 s288c
ADH5(SFA1)	NP_010113.1	6320033	酿酒酵母 s288c
ADH6	NP_014051.1	6323980	酿酒酵母 s288c
ADH7	NP_010030.1	6319949	酿酒酵母 s288c
adhP	CAA44614.1	2810	乳酸克鲁维酵母
ADH1	P20369.1	113358	乳酸克鲁维酵母
ADH2	CAA45739.1	2833	乳酸克鲁维酵母

[0218]

ADH3	P49384.2	51704294	乳酸克鲁维酵母
ADH1	CAA57342.1	608690	白色假丝酵母
ADH2	CAA21988.1	3859714	白色假丝酵母
SAD	XP_712899.1	68486457	白色假丝酵母
ADH1	CAA21782.1	3810864	粟酒裂殖酵母
ADH1	AAD51737.1	5802617	解脂耶氏酵母
ADH2	AAD51738.1	5802619	解脂耶氏酵母
ADH3	AAD51739.1	5802621	解脂耶氏酵母
AlcB	AAx53105.1	61696864	黑曲霉
ANI_1_282024	XP_001399347.1	145231748	黑曲霉
ANI_1_126164	XP_001398574.2	317037131	黑曲霉
ANI_1_1756104	XP_001395505.2	317033815	黑曲霉
ADH2	CAA73827.1	2143328	树干谢尔壶菌

[0219] 一种或多种甘油-3-磷酸酶或甘油-3-磷酸(G3P)脱氢酶的衰减或破坏可消除或减少甘油的形成,从而保留碳和还原当量用于脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产。

[0220] G3P 磷酸酶催化 G3P 水解成甘油。具有这种活性的酶包括酿酒酵母 (GPP1 和 GPP2)、白色假丝酵母和巴夫杜氏藻 (*Dunaleilla parva*) 的甘油-1-磷酸酶 (EC 3.1.3.21) 酶 (Popp 等人, *Biotechnol Bioeng* 100:497-505(2008); Fan 等人, *FEMS Microbiol Lett* 245:107-16(2005))。巴夫杜氏藻 (*D. parva*) 基因迄今尚未鉴定。这些和另外的 G3P 磷酸酶见下表。

[0221]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
GPP1	DAA08494.1	285812595	酿酒酵母
GPP2	NP_010984.1	6320905	酿酒酵母
GPP1	XP_717809.1	68476319	白色假丝酵母
KLLA0C08217g	XP_452565.1	50305213	乳酸克鲁维酵母
KLLA0C11143g	XP_452697.1	50305475	乳酸克鲁维酵母
ANI_1_380074	XP_001392369.1	145239445	黑曲霉
ANI_1_444054	XP_001390913.2	317029125	黑曲霉

[0222] 酿酒酵母具有由细胞溶质中的 GPD1 和 GPD2 和线粒体中的 GUT2 编码的三种 G3P 脱氢酶。已知 GPD2 编码负责大多数甘油形成的酶并且负责维持在厌氧条件下的氧化还原平衡。GPD1 主要负责酿酒酵母对渗透胁迫的适应 (Bakker 等人, *FEMS Microbiol Rev* 24:15-37(2001))。GPD1、GPD2 和 / 或 GUT2 的衰减将减少甘油形成。GPD1 和 GUT2 编码解脂耶氏酵母中的 G3P 脱氢酶 (Beopoulos 等人, *AEM* 74:7779-89(2008))。GPD1 和 GPD2 编码粟酒裂殖酵母中的 G3P 脱氢酶。类似地, G3P 脱氢酶在热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*) 中由 CTRG_02011 编码, 且在白色假丝酵母中由 GI:20522022 所表示的基因编码。

[0223]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
GPD1	CAA98582.1	1430995	酿酒酵母
GPD2	NP_014582.1	6324513	酿酒酵母
GUT2	NP_012111.1	6322036	酿酒酵母
GPD1	CAA22119.1	6066826	解脂耶氏酵母
GUT2	CAG83113.1	49646728	解脂耶氏酵母
GPD1	CAA22119.1	3873542	粟酒裂殖酵母

GPD2	CAA91239.1	1039342	粟酒裂殖酵母
ANI_1_786014	XP_001389035.2	317025419	黑曲霉
ANI_1_1768134	XP_001397265.1	145251503	黑曲霉
KLLA0C04004g	XP_452375.1	50304839	乳酸克鲁维酵母
CTRG_02011	XP_002547704.1	255725550	热带假丝酵母
GPD1	XP_714362.1	68483412	白色假丝酵母
GPD2	XP_713824.1	68484586	白色假丝酵母

[0224] 形成酸副产物（例如乙酸、甲酸和乳酸）的酶也可以衰减或破坏。这样的酶包括乙酸激酶、磷酸转乙酰酶和丙酮酸氧化酶。丙酮酸甲酸裂合酶和甲酸脱氢酶的破坏或衰减能限制甲酸和二氧化碳的形成。这些酶在实施例 II 中作了进一步详细描述。

[0225] 将丙酮酸转变成乳酸的醇脱氢酶也是破坏或衰减的候选者。乳酸脱氢酶包括大肠杆菌的 *ldhA* 和来自富养罗尔斯通氏菌 (*Ralstonia eutropha*) 的 *ldh* (Steinbuchel 和 Schlegel, Eur. J. Biochem. 130:329-334(1983))。以上列举出的其它醇脱氢酶也可表现出 LDH 活性。

[0226]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
<i>ldhA</i>	NP_415898.1	16129341	大肠杆菌
<i>Ldh</i>	YP_725182.1	113866693	富养罗尔斯通氏菌

[0227] 下调线粒体丙酮酸脱氢酶复合体的活性将限制通向线粒体 TCA 循环的通量。在厌氧条件下且在培养基中的葡萄糖浓度较高的条件下,这种线粒体酶的能力非常有限并且不存在通过其的显著通量。然而,在有些实施方案中,这种酶可以破坏或衰减以增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产。示例性的丙酮酸脱氢酶基因包括 *PDB1*、*PDA1*、*LAT1* 和 *LPD1*。登录号和同源物列于实施例 II 中。

[0228] 减少通向 TCA 循环的通量的另一策略是通过下调或缺失线粒体丙酮酸载体来限制丙酮酸转运至线粒体。在酿酒酵母中丙酮酸转运至线粒体通过由 *MPC1* 和 *MPC2* 编码的杂合体催化 (Herzig 等人, Science 337:93-6(2012); Bricker 等人, Science 337:96-100(2012))。酿酒酵母编码另外五种推定的一元羧酸转运体 (*MCH1-5*), 其中有几种可定位至线粒体膜 (Makuc 等人, Yeast 18:1131-43(2001))。NDT1 是另一种推定的丙酮酸转运体, 尽管该蛋白质的作用在文献中有争议 (Todisco 等人, J Biol Chem 20:1524-31(2006))。示例性的丙酮酸和一元羧酸转运体见下表:

[0229]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体

MPC1	NP_011435.1	6321358	酿酒酵母
MPC2	NP_012032.1	6321956	酿酒酵母
MPC1	XP_504811.1	50554805	解脂耶氏酵母
MPC2	XP_501390.1	50547841	解脂耶氏酵母
MPC1	XP_719951.1	68471816	白色假丝酵母
MPC2	XP_716190.1	68479656	白色假丝酵母
MCH1	NP_010229.1	6320149	酿酒酵母
MCH2	NP_012701.2	330443640	酿酒酵母
MCH3	NP_014274.1	6324204	酿酒酵母
MCH5	NP_014951.2	330443742	酿酒酵母
NDT1	NP_012260.1	6322185	酿酒酵母
ANI_1_1592184	XP_001401484.2	317038471	黑曲霉
CaJ7_0216	XP_888808.1	77022728	白色假丝酵母
YALI0E16478g	XP_504023.1	50553226	解脂耶氏酵母
KLLA0D14036g	XP_453688.1	50307419	乳酸克鲁维酵母

[0230] 合成丙二酰-CoA 和脂肪酸的酶的破坏或衰减可增加可用于自乙酰-CoA 的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成的碳的供应。用于破坏或衰减的示例性酶包括脂肪酸合酶、乙酰-CoA 羧化酶、生物素：脱辅基酶连接酶、酰基载体蛋白、硫酯酶、酰基转移酶、ACP 丙二酰基转移酶、脂肪酸延长酶、酰基-CoA 合成酶、酰基-CoA 转移酶和酰基-CoA 水解酶。

[0231] 减少脂肪酸生物合成的另一策略是表达或过量表达阻抑脂肪酸形成基因的调节蛋白。乙酰-CoA 羧化酶 (EC 6.4.1.2) 在许多生物体中催化脂肪酸生物合成的第一步骤：乙酰-CoA ATP- 依赖性羧化生成丙二酰-CoA。这种酶利用生物素作为辅因子。示例性的 ACC 酶由大肠杆菌的 accABCD (Davis 等人, J Biol Chem 275:28593-8(2000))、酿酒酵母的 ACC1 和同源物 (Sumper 等人, Methods Enzym 71:34-7(1981)) 编码。酿酒酵母的线粒体乙酰-CoA 羧化酶由 HFA1 编码。乙酰-CoA 羧化酶全酶形成需要由生物素：脱辅基蛋白连接酶 (例如酿酒酵母的 BPL1) 连接生物素。

[0232]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体

ACC1	CAA96294.1	1302498	酿酒酵母
KLLA0F06072g	XP_455355.1	50310667	乳酸克鲁维酵母
ACC1	XP_718624.1	68474502	白色假丝酵母
YALI0C11407p	XP_501721.1	50548503	解脂耶氏酵母
ANI_1_1724104	XP_001395476.1	145246454	黑曲霉
accA	AAC73296.1	1786382	大肠杆菌
accB	AAC76287.1	1789653	大肠杆菌
accC	AAC76288.1	1789654	大肠杆菌
accD	AAC75376.1	1788655	大肠杆菌
HFA1	NP_013934.1	6323863	酿酒酵母
BPL1	NP_010140.1	6320060	酿酒酵母

[0233] 参与脂肪酸合成的蛋白质示于下文。酵母的脂肪酸合酶复合体由 FAS1 和 FAS2 两个多功能亚基组成,这两个亚基一起催化乙酰-CoA 和丙二酰-CoA 净转变成脂肪酸 (Lomakin 等人, Cell 129:319-32(2007))。另外与线粒体脂肪酸合成相关的蛋白质包括 OAR1、Mct1、ETR1、ACP1 和 PPT2。ACP1 是线粒体酰基载体蛋白,且 PPT2 编码磷酸泛酰巯基乙胺转移酶,该酶使线粒体 ACP 泛酰巯基乙胺化并且是线粒体中的脂肪酸生物合成所需的 (Stuible 等人, J Biol Chem:273:22334-9(1998))。用于降低脂肪酸合酶活性的一种非遗传策略是添加抑制剂(例如浅蓝菌素(cerulenin))。也可改变脂质生物合成的全局调节物以在长链醇或相关产物生产期间下调内源脂肪酸生物合成途径。示例性的全局调节物是解脂耶氏酵母和酿酒酵母的 SNF1。

[0234]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
FAS1	NP_012739.1	6322666	酿酒酵母
FAS2	NP_015093.1	6325025	酿酒酵母
FAS1	XP_451653.1	50303423	乳酸克鲁维酵母
FAS2	XP_452914.1	50305907	乳酸克鲁维酵母
FAS1	XP_716817.1	68478392	白色假丝酵母
FAS2	XP_723014.1	68465892	白色假丝酵母

FAS1	XP_500912.1	50546885	解脂耶氏酵母
FAS2	XP_501096.1	50547253	解脂耶氏酵母
FAS1	XP_001393490.2	317031809	黑曲霉
FAS2	XP_001388458.1	145228299	黑曲霉

[0235]

OAR1	NP_012868.1	6322795	酿酒酵母
MCT1	NP_014864.4	398365823	酿酒酵母
ETR1	NP_009582.1	6319500	酿酒酵母
ACP1	NP_012729.1	6322656	酿酒酵母
PPT2	NP_015177.2	37362701	酿酒酵母
SNF1	CAG80498.1	49648180	解脂耶氏酵母
SNF1	P06782.1	134588	酿酒酵母

[0236] 将酰基 -CoA 底物转变成较长链长脂肪酸的延长酶的破坏或衰减也可以用于增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产。延长酶在例如线粒体、内质网、脂蛋白体和过氧化物酶体等区室中被发现。例如,一些酵母(例如酿酒酵母)能够通过接受外源或内源酰基 -CoA 底物的线粒体延长酶来合成链长 C16 及 C16 以上的长链脂肪酸 (Bessoule 等人, FEBS Lett 214:158-162(1987))。这个系统需要 ATP 以达成活性。内质网也具有用于合成来自不同长度的酰基 -CoA 底物的极长链脂肪酸 (C18+) 的延长酶系统 (Kohlwein 等人, Mol Cell Biol 21:109-25(2001))。参与这个系统的基因包括 TSC13、ELO2 和 ELO3。ELO1 催化 C12 酰基 -CoA 延长生成 C16-C18 脂肪酸。

[0237]

蛋白质	登录 #	GI 编号	生物体
ELO2	NP_009963.1	6319882	酿酒酵母
ELO3	NP_013476.3	398366027	酿酒酵母
TSC13	NP_010269.1	6320189	酿酒酵母
ELO1	NP_012339.1	6322265	酿酒酵母

[0238] 将酰基 -CoA 途径中间体转变成酸副产物的天然酶也可以降低脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸产率。例如,CoA 水解酶、转移酶和合成酶可作用于酰基 -CoA 中间体以形成短链、中链或长链酸。内源 CoA 水解酶、CoA 转移酶 (transerases) 和 / 或可逆性 CoA 合成酶的破

坏或衰减可用于增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸产率。示例性的 (Exempalry) 酶见下表。

[0239]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
Tes1	NP_012553.1	6322480	酿酒酵母 s288c
ACH1	NP_009538.1	6319456	酿酒酵母 s288c
EHD3	NP_010321.1	6320241	酿酒酵母 s288c
YALIOF14729p	XP_505426.1	50556036	解脂耶氏酵母
YALIOE30965p	XP_504613.1	50554409	解脂耶氏酵母
KLLAOE16523g	XP_454694.1	50309373	乳酸克鲁维酵母
KLLAOE10561g	XP_454427.1	50308845	乳酸克鲁维酵母

[0240]

ACH1	P83773.2	229462795	白色假丝酵母
Ca019.10681	XP_714720.1	68482646	白色假丝酵母
ANI_1_318184	XP_001401512.1	145256774	黑曲霉
ANI_1_1594124	XP_001401252.2	317035188	黑曲霉
tesB	NP_414986.1	16128437	大肠杆菌
tesB	NP_355686.2	159185364	根癌土壤杆菌
atoA	2492994	P76459.1	大肠杆菌
atoD	2492990	P76458.1	大肠杆菌

[0241] 有利于产物、MI-FAE 循环中间体、MD-FAE 循环中间体 (intermeidates) 或终止途径中间体降解的酶也可以破坏或衰减。实例包括醛脱氢酶、醛脱羧基酶、氧化醇脱氢酶和不可逆脂肪酰-CoA 降解酶。

[0242] 为了生产本发明的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸,非特异性醛脱氢酶的缺失或衰减能改进产率。为了生产脂肪酸,这样的酶的表达可改进产物形成。这样的酶可以例如将乙酰-CoA 转变成乙醛、脂肪醛转变成脂肪酸或者脂肪醇转变成脂肪酸。使醛脱氢酶酰化描述于实施例 I。酸形成醛脱氢酶描述于实施例 III 和 IX。

[0243] 有利于逆方向的途径酶也可以破坏或衰减,如果它们对脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产有害的话。一个实例是有利于氧化方向的长链醇脱氢酶 (EC 1.1.1.192)。示例性的长链醇脱氢酶是嗜热脱氮土芽孢杆菌 (*Geobacillus thermodenitrificans*) 的 ADH1 和 ADH2,

其氧化链长长达 C30 的醇 (Liu 等人, *Physiol Biochem* 155:2078-85 (2009))。这些和其它示例性的脂肪醇脱氢酶列于实施例 I 和 II 中。如果形成醇的酰基 -CoA 还原酶被用于脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成,那么内源脂肪醇脱氢酶的缺失将实质上减少回通量。

[0244] β -氧化酶可以是可逆的并且以酰基 -CoA 合成方向操作。然而,如果它们是不可逆的或强烈有利于降解方向,那么它们是用于破坏或衰减的候选者。落入该目录的一种酶包括酿酒酵母的 FOX2,一种具有 3-羟基酰基 -CoA 脱氢酶和烯酰 -CoA 水合酶活性的多功能酶 (Hiltunen 等人, *J Biol Chem* 267:6646-6653 (1992))。另外的基因包括利用除 NAD(P)H (例如 EC 1.3.8.-) 以外的辅因子 (例如大肠杆菌的 *fadE*) 的降解性硫解酶,例如 POT1 和酰基 -CoA 脱氢酶。

[0245]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
POT1	NP_012106.1	6322031	酿酒酵母
FOX2	NP_012934.1	6322861	酿酒酵母
<i>fadE</i>	AAC73325.2	87081702	大肠杆菌

[0246] 脂肪酰 -CoA 氧化酶 (例如酿酒酵母的 POX1) 催化脂肪酰 -CoA 底物的氧 - 依赖性氧化。具有这种活性的酶可以破坏或衰减,如果它们在脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产条件下表达的话。POX1 (EC 1.3.3.6) 基因和同源物见下表。POX1 经受被 OAF1 调节, OAF1 也使参与过氧化物酶体 β -氧化、组构和生物发生的基因活化 (Luo 等人, *J Biol Chem* 271:12068-75 (1996))。具有类似于 OAF1 和过氧化物酶体脂肪酸转运体 PXA1 和 PXA2 的功能的调节物也是用于缺失的候选者。

[0247]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
POX1	NP_011310.1	6321233	酿酒酵母
OAF1	NP_009349.3	330443370	酿酒酵母
PXA1	NP_015178.1	6325110	酿酒酵母
PXA2	NP_012733.1	6322660	酿酒酵母
YAL10F10857g	XP_505264.1	50555712	解脂耶氏酵母
YAL10D24750p	XP_503244.1	50551539	解脂耶氏酵母
YAL10E32835p	XP_504703.1	50554589	解脂耶氏酵母
YAL10E06567p	XP_503632.1	50552444	解脂耶氏酵母

YALIOE27654p	XP_504475.1	50554133	解脂耶氏酵母
YALIOE23859p	XP_502199.1	50549457	解脂耶氏酵母
POX	XP_455532.1	50311017	乳酸克鲁维酵母
POX104	XP_721610.1	68468582	白色假丝酵母
POX105	XP_717995.1	68475844	白色假丝酵母
POX102	XP_721613.1	68468588	白色假丝酵母

[0248] 用于破坏或衰减的另一候选者是酰基 -CoA 结合蛋白。酿酒酵母的酰基结合蛋白 ACB1 例如结合酰基 -CoA 酯且将其穿梭移动至酰基 -CoA 利用过程 (Schjerling 等人, J Biol Chem 271:22514-21(1996))。这种蛋白质的缺失不影响生长速率且不导致较长链酰基 -CoA 分子的累积增加。酰基 -CoA 酯参与多种细胞过程, 包括脂质生物合成和内稳态 (homeostatis)、信号转导、生长调节和细胞分化 (Rose 等人, PNAS USA 89:11287-11291(1992))。

[0249]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
ACB1	P31787.3	398991	酿酒酵母
KLLA0B05643g	XP_451787.2	302309983	乳酸克鲁维酵母
YALIOE23185g	XP_002143080.1	210076210	解脂耶氏酵母
ANI_1_1084034	XP_001390082.1	145234867	黑曲霉

[0250] 为达到脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的高产率, 理想的是宿主生物可以充足量供应 MI-FAE 循环、MD-FAE 和 / 或终止途径所需要的辅因子。在若干生物体中, 特别是在真核生物 (例如酵母属 (Saccharomyces)、克鲁维酵母属 (Kluyveromyces)、假丝酵母属 (Candida)、曲霉属 (Aspergillus) 和耶氏酵母属 (Yarrowia) 的若干菌种) 中, NADH 在细胞溶质中由于其由糖酵解大量产生而比 NADPH 更丰富。甚至可通过细胞溶质中的异源或天然 NAD- 依赖性酶 (例如 NAD- 依赖性丙酮酸脱氢酶、NAD- 依赖性甲酸脱氢酶、NADH: 铁氧还蛋白氧化还原酶或 NAD- 依赖性酰基化乙酰基醛脱氢酶) 将丙酮酸转变成乙酰 -CoA 来使 NADH 更丰富。考虑到大多数生物体的细胞溶质中 NADH 的丰度, 它对于 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和 / 或终止途径的所有还原步骤均优先接受 NADH 作为还原剂而优于其它还原剂 (例如 NADPH) 是有益的。脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的高产率可通过例如以下方式来完成: 1) 鉴别和执行对 NADH 比对其还原当量 (例如 NADPH) 优先性更强的内源或外源 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和 / 或终止途径酶; 2) 使贡献 NADPH- 依赖性还原活性的一种或多种内源 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或终止途径酶衰减; 3) 改变内源或外源 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或终止途径酶的辅因子特异性, 致使其对 NADH 比对其天然形式更强的优先性; 或 4) 改变内源或外源

MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或终止途径酶的辅因子特异性,致使其对 NADPH 比对其天然形式更弱的优先性。

[0251] 用于工程改造有利于 NADH 的 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和 / 或终止途径的策略在实施例 V 中作了进一步详细描述。用于改变酶的辅因子特异性的方法是本领域众所周知的,且在实施例 VI 中描述了一个实例。

[0252] 如果 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和 / 或终止途径酶中的一种或多种利用 NADPH 作为辅因子,则对增加宿主生物中 NADPH 的产生是有益的。具体地说,如果在宿主生物的细胞溶质中存在 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和 / 或终止途径,则用于增加细胞溶质中的 NADPH 产生的方法可以是有益的。可以实施用于增加细胞溶质的 NADPH 产生的若干方法,包括引导相对于野生型增加量的通量通过戊糖磷酸途径的氧化分支、引导相对于野生型增加量的通量通过 Entner Doudoroff 途径、引入可溶性或膜结合的转氢酶以将 NADH 转变成 NADPH 或者采用下列酶的 NADP- 依赖性形式:磷酸化或非磷酸化甘油醛-3-磷酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶、甲酸脱氢酶或酰基化乙酰基醛脱氢酶。这些活性可通过破坏或衰减天然 NAD- 依赖性酶包括甘油醛-3-磷酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶、甲酸脱氢酶或酰基化乙酰基醛脱氢酶而加强。在实施例 VII 中描述了用于工程改造增加的 NADPH 可利用性的策略。

[0253] 细胞溶质中脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的合成可依赖于足够碳和还原当量的可利用性。因此,虽然不受任何具体操作理论的束缚,但是增加 NAD(P)H 与 NAD(P) 的氧化还原比率可帮助以向前方向驱动 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和 / 或终止途径。用于增加 NAD(P)H 与 NAD(P) 的氧化还原比率的方法包括限制呼吸,衰减或破坏产生还原的副产物(例如乙醇和甘油)的竞争途径,衰减或消除 NADH 被 NADH 脱氢酶利用,或衰减或消除区室之间的氧化还原穿梭。

[0254] 一种提供增加数目的还原当量(例如 NAD(P)H)用于形成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的示例性方法是约束在呼吸期间这样的还原当量的使用。呼吸可通过以下方式来限制:减少氧的可利用性,衰减 NADH 脱氢酶和 / 或细胞色素氧化酶活性,衰减 G3P 脱氢酶,和 / 或向克拉布特里阳性生物体提供过量的葡萄糖。

[0255] 通过在发酵罐中培养非天然存在的真核生物而限制氧可利用性是限制呼吸且从而增加 NAD(P)H 与 NAD(P) 比率的一个实例。NAD(P)H/NAD(P) 的比率随培养条件变得更厌氧而增加,其中完全厌氧条件提供最高的还原型辅因子与氧化型辅因子比率。例如,已报道,在大肠杆菌中,NADH/NAD 的比率在好氧条件下 = 0.02,在厌氧条件下 = 0.75(de Graes 等人, J Bacteriol 181:2351-57(1999))。

[0256] 呼吸也可以通过在好氧条件下在细胞中减少 NADH 脱氢酶和 / 或细胞色素氧化酶的表达或活性来限制。在这种情况下,呼吸可通过电子传递链的能力来限制。这样的方法已用于使大肠杆菌在完全好氧条件下能够厌氧代谢 (Portnoy 等人, AEM 74:7561-9(2008))。酿酒酵母可使用由 NDE1 和 NDE2 编码的外部 NADH 脱氢酶直接使细胞溶质 NADH 氧化。一种这样的 NADH 脱氢酶在解脂耶氏酵母中由 NDH2 编码 (Kerscher 等人, J Cell Sci 112:2347-54(1999))。这些和其它 NADH 脱氢酶列于下表。

[0257]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体

NDE1	NP_013865.1	6323794	酿酒酵母 s288c
NDE2	NP_010198.1	6320118	酿酒酵母 s288c
NDH2	AJ006852.1	3718004	解脂耶氏酵母
ANI_1_610074	XP_001392541.2	317030427	黑曲霉
ANI_1_2462094	XP_001394893.2	317033119	黑曲霉
KLLA0E21891g	XP_454942.1	50309857	乳酸克鲁维酵母
KLLA0C06336g	XP_452480.1	50305045	乳酸克鲁维酵母
NDE1	XP_720034.1	68471982	白色假丝酵母
NDE2	XP_717986.1	68475826	白色假丝酵母

[0258] 酿酒酵母的细胞色素氧化酶包括 COX 基因产物。COX1-3 是由线粒体基因组编码的三个核心亚基,而 COX4-13 由核基因编码。衰减或破坏细胞色素基因中的任何一个都导致呼吸生长的减少或阻断 (Hermann 和 Funes, Gene 354:43-52 (2005))。其它生物体中的细胞色素氧化酶基因可通过序列同源性推断。

[0259]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
COX1	CAA09824.1	4160366	酿酒酵母 s288c
COX2	CAA09845.1	4160387	酿酒酵母 s288c
COX3	CAA09846.1	4160389	酿酒酵母 s288c
COX4	NP_011328.1	6321251	酿酒酵母 s288c
COX5A	NP_014346.1	6324276	酿酒酵母 s288c
COX5B	NP_012155.1	6322080	酿酒酵母 s288c
COX6	NP_011918.1	6321842	酿酒酵母 s288c
COX7	NP_013983.1	6323912	酿酒酵母 s288c
COX8	NP_013499.1	6323427	酿酒酵母 s288c
COX9	NP_010216.1	6320136	酿酒酵母 s288c
COX12	NP_013139.1	6323067	酿酒酵母 s288c

COX13	NP_011324.1	6321247	酿酒酵母 s288c
-------	-------------	---------	------------

[0260] 细胞溶质 NADH 也可以通过呼吸链经由 G3P 脱氢酶穿梭来氧化, G3P 脱氢酶穿梭由细胞溶质 NADH- 连接的 G3P 脱氢酶和膜结合的 G3P: 泛醌氧化还原酶组成。G3P 脱氢酶的缺失或衰减也防止 NADH 氧化用于呼吸。本文描述了编码这些酶的候选酶。

[0261] 另外, 在克拉布特里阳性生物体中, 发酵代谢可以在过量的葡萄糖存在下实现。例如, 酿酒酵母甚至在好氧条件下制造乙醇。通过向克拉布特里阳性生物体投入过量的葡萄糖而将克拉布特里阳性生物体中乙醇和甘油的形成减少 / 消除且替换为脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生产。在另一个方面, 本文提供的是用于生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的方法, 包括将非天然存在的真核生物在足以产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的条件下培养足够的时间周期, 其中所述真核生物是包含至少一种编码 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和 / 或终止途径酶的外源核酸的克拉布特里阳性生物体, 和其中所述真核生物是在包含过量葡萄糖的培养基中。

[0262] 防止还原的发酵副产物的形成将增加碳和还原当量的可利用性用于脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产。在厌氧和微好氧条件下的两种关键还原副产物是乙醇和甘油。乙醇典型地在由丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶催化的两个酶促步骤中自丙酮酸形成。甘油通过甘油 -3- 磷酸脱氢酶和甘油 -3- 磷酸磷酸酶的酶自糖酵解中间体二羟基丙酮磷酸酯形成。这些酶活性中的一种或多种的衰减将增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的产率。本文描述了用于减少或消除乙醇和甘油形成的菌株工程改造策略。

[0263] 酵母 (例如酿酒酵母) 可产生甘油以允许 NAD(P) 在厌氧条件下再生。减少或消除甘油产生的另一方式是通过限氧培育 (Bakker 等人, 同上)。甘油形成仅在细胞的特异性氧摄取速率降低至低于生物合成中形成的 NADH 再氧化所需要的速率开始。

[0264] 除了以上列出的氧化还原吸收 (sinks) 之外, 苹果酸脱氢酶当其以还原方向发挥功能时可潜在地引开还原当量。相信在酿酒酵母中发挥功能的若干氧化还原穿梭利用这种酶转移在细胞溶质和线粒体之间的还原当量。这种氧化还原转移可通过衰减苹果酸脱氢酶和 / 或苹果酸酶活性而预防。可通过 mdh 衰减而阻断的氧化还原穿梭包括 (i) 苹果酸 - 天冬氨酸穿梭, (ii) 苹果酸 - 草酰乙酸穿梭, 和 (iii) 苹果酸 - 丙酮酸穿梭。编码苹果酸脱氢酶和苹果酸酶的基因列于下表。

[0265]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
MDH1	NP_012838.1	6322765	酿酒酵母
MDH2	NP_014515.2	116006499	酿酒酵母
MDH3	NP_010205.1	6320125	酿酒酵母
MAE1	NP_012896.1	6322823	酿酒酵母
MDH1	XP_722674.1	68466384	白色假丝酵母

MDH2	XP_718638.1	68474530	白色假丝酵母
MAE1	XP_716669.1	68478574	白色假丝酵母
KLLA0F25960g	XP_456236.1	50312405	乳酸克鲁维酵母
KLLA0E18635g	XP_454793.1	50309563	乳酸克鲁维酵母
KLLA0E07525g	XP_454288.1	50308571	乳酸克鲁维酵母
YALIOD16753p	XP_502909.1	50550873	解脂耶氏酵母
YALIOE18634p	XP_504112.1	50553402	解脂耶氏酵母
ANI_1_268064	XP_001391302.1	145237310	黑曲霉
ANI_1_12134	XP_001396546.1	145250065	黑曲霉
ANI_1_22104	XP_001395105.2	317033225	黑曲霉

[0266] 总的来说,以上提及的氧化还原吸收(sink)单独或与其它氧化还原吸收组合的破坏或衰减可消除或降低呼吸或副产物形成的还原能力的使用。已报道,外部NADH脱氢酶(NDE1和NDE2)和线粒体G3P脱氢酶(GUT2)的缺失几乎完全消除了酿酒酵母中的细胞溶质NAD⁺再生(Overkamp等人,J Bacteriol 182:2823-30(2000))。

[0267] 本发明的微生物产生脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸并且任选地将所产生的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸分泌到培养基中。带有异源脂肪醇形成活性的酿酒酵母、解脂耶氏酵母和大肠杆菌在细胞内积聚脂肪醇;然而在培养基中检测不到脂肪醇(Behrouzian等人,美国专利申请20100298612)。引入具有改进活性的脂肪酰-CoA还原酶导致较高水平的脂肪醇分泌到培养基中。或者,引入脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸转运体或转运系统可改进脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的细胞外累积。示例性的转运体列于下表。

[0268]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
Fatp	NP_524723.2	24583463	黑腹果蝇
AY161280.1:45..1757	AAN73268.1	34776949	红平红球菌
acrA	CAF23274.1	46399825	变形虫原厚垣假丝酵母
acrB	CAF23275.1	46399826	变形虫原厚垣假丝酵母
CER5	AY734542.1	52354013	拟南芥
AmiS2	JC5491	7449112	红球菌

ANI_1_1160064	XP_001391993.1	145238692	黑曲霉
YALIOE16016g	XP_504004.1	50553188	解脂耶氏酵母

[0269] 因此,在有些实施方案中,本发明提供如本文公开的具有一个或多个基因破坏的非天然存在的微生物,其中所述一个或多个基因破坏在编码参与以下的蛋白质或酶的内源基因中出现:由所述微生物天然产生乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、CO₂、脂肪酸或丙二酰-CoA;途径中间体向除细胞溶质以外的细胞区室转移;或由该微生物天然降解 MI-FAE 循环中间体、MD-FAE 循环中间体或终止途径中间体,所述一个或多个基因破坏使得该微生物中的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的产生增加。因此,所述蛋白质或酶可以是脂肪酸合酶、乙酰-CoA 羧化酶、生物素:脱辅基酶连接酶、酰基载体蛋白、硫酯酶、酰基转移酶、ACP 丙二酰基转移酶、脂肪酸延长酶、酰基-CoA 合成酶、酰基-CoA 转移酶、酰基-CoA 水解酶、丙酮酸脱羧酶、乳酸脱氢酶、醇脱氢酶、酸形成醛脱氢酶、乙酸激酶、磷酸转乙酰酶、丙酮酸氧化酶、甘油-3-磷酸脱氢酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、线粒体丙酮酸载体、过氧化物酶体脂肪酸转运体、过氧化物酶体酰基-CoA 转运体、过氧化物酶体肉毒碱/酰基肉毒碱转移酶、酰基-CoA 氧化酶或酰基-CoA 结合蛋白。在有些方面,所述一个或多个基因破坏包括一个或多个基因的缺失。

[0270] 在有些实施方案中,本发明提供如本文描述的非天然存在的微生物,其中该 MI-FAE 循环、该 MD-FAE 循环或该终止途径的一种或多种酶优先与 NADH 辅因子反应或者就与 NAD(P)H 辅因子反应而言具有减少的优先性。例如,该 MI-FAE 循环的一种或多种酶可以是 3-酮酰基-CoA 还原酶或烯酰-CoA 还原酶。对于终止途径,所述一种或多种酶可以是酰基-CoA 还原酶(醛形成)、醇脱氢酶、酰基-CoA 还原酶(醇形成)、醛脱羧基酶、酰基-ACP 还原酶、醛脱氢酶(酸形成)或羧酸还原酶。

[0271] 在有些实施方案中,本发明提供如本文描述的非天然存在的微生物,所述微生物在编码蛋白质或酶的基因中具有一个或多个基因破坏,该蛋白质或酶导致存在于该微生物的细胞溶质中的 NAD(P)H 与 NAD(P) 的比率在该破坏之后增加。因此,编码导致存在于该微生物的细胞溶质中的 NAD(P)H 与 NAD(P) 的比率在该破坏之后增加的蛋白质或酶的基因可以是 NADH 脱氢酶、细胞色素氧化酶、G3P 脱氢酶、G3P 磷酸酶、醇脱氢酶、丙酮酸脱羧酶、醛脱氢酶(酸形成)、乳酸脱氢酶、甘油-3-磷酸脱氢酶、甘油-3-磷酸:醌氧化还原酶、苹果酸酶和苹果酸脱氢酶。在有些方面,所述一个或多个基因破坏包括一个或多个基因的缺失。

[0272] 在有些实施方案中,本发明的非天然存在的微生物是克拉布特里阳性的且是在包含过量葡萄糖的培养基中。在这样的条件下,如本文中所述,该微生物能导致增加存在于该微生物的细胞溶质中的 NAD(P)H 与 NAD(P) 的比率。

[0273] 在有些实施方案中,本发明提供如本文描述的非天然存在的微生物,其具有至少一种编码用于本发明的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的细胞外转运体或细胞外转运系统的外源核酸。

[0274] 在有些实施方案中,本发明提供如本文描述的非天然存在的微生物,其中一种或多种参与以下的内源酶具有衰减的酶活性或表达水平:由所述微生物天然产生乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、CO₂、脂肪酸或丙二酰-CoA;途径中间体向除细胞溶质以外的细胞区室转

移；或由所述微生物天然降解 MI-FAE 循环中间体、MD-FAE 循环中间体或终止途径中间体。因此，所述内源酶可以是脂肪酸合酶、乙酰 -CoA 羧化酶、生物素：脱辅基酶连接酶、酰基载体蛋白、硫酯酶、酰基转移酶、ACP 丙二酰基转移酶、脂肪酸延长酶、酰基 -CoA 合成酶、酰基 -CoA 转移酶、酰基 -CoA 水解酶、丙酮酸脱羧酶、乳酸脱氢酶、醇脱氢酶、酸形成醛脱氢酶、乙酸激酶、磷酸转乙酰酶、丙酮酸氧化酶、甘油 -3- 磷酸脱氢酶、甘油 -3- 磷酸磷酸酶、线粒体丙酮酸载体、过氧化物酶体脂肪酸转运体、过氧化物酶体酰基 -CoA 转运体、过氧化物酶体肉毒碱 / 酰基肉毒碱转移酶、酰基 -CoA 氧化酶或酰基 -CoA 结合蛋白。

[0275] 在有些实施方案中，本发明提供如本文描述的非天然存在的微生物，其中一种或多种参与 NAD(P)H 或 NADH 氧化的内源酶具有衰减的酶活性或表达水平。因此，所述一种或多种内源酶可以是 NADH 脱氢酶、细胞色素氧化酶、G3P 脱氢酶、G3P 磷酸酶、醇脱氢酶、丙酮酸脱羧酶、醛脱氢酶（酸形成）、乳酸脱氢酶、甘油 -3- 磷酸脱氢酶、甘油 -3- 磷酸：醌氧化还原酶、苹果酸酶和苹果酸脱氢酶。

[0276] 本发明的非天然存在的微生物可含有稳定的遗传改变，它是指可培养五代以上而没有遗传改变损失的微生物。一般而言，稳定的遗传改变包括持续 10 代以上的修饰，具体地说，稳定的修饰将持续超过约 25 代，和更具体地说，稳定的遗传修饰将是多于 50 代，包括无限期地。

[0277] 就基因破坏而言，特别有用的稳定的遗传改变是基因缺失。应用基因缺失引入稳定的遗传改变对于降低向遗传改变之前的表型逆转的可能性特别有用。例如，生物化学物质的稳定生长耦合生产可例如通过编码催化一组代谢修饰内的一个或多个反应的酶的基因缺失来实现。生物化学物质的生长耦合生产的稳定性可通过多个缺失来进一步增强，从而显著地降低对于各破坏活性而言发生多个代偿逆转的可能性。

[0278] 也提供的是产生具有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的稳定生长耦合生产的非天然存在的微生物的方法。该方法可包括计算机模拟 (*in silico*) 鉴别增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产的一组代谢修饰，例如在指数生长期间增加生产的代谢修饰；遗传修饰生物体以含有一组增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产的代谢修饰；和培养经遗传修饰的生物体。如果需要，培养可包括经遗传修饰的生物体在需要脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产的条件下适应性进化。本发明的方法适用于如本文公开的细菌、酵母和真菌以及多种其它细胞和微生物。

[0279] 因此，本发明提供非天然存在的微生物，其包含一个或多个基因破坏，使得脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生产增加。在一个实施方案中，所述一个或多个基因破坏赋予脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生长耦合生产，并且可例如赋予脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的稳定生长耦合生产。在另一个实施方案中，所述一个或多个基因破坏可赋予脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产与该微生物生长的专性耦合。这样的—个或多个基因破坏降低相应的一种或多种编码酶的活性。

[0280] 所述非天然存在的微生物可具有编码本文公开的酶或蛋白质的基因中所包括的一个或多个基因破坏。如本文公开的，所述一个或多个基因破坏可以是缺失。本发明的此种非天然存在的微生物包括如本文公开的细菌、酵母、真菌或适用于发酵过程的多种其它微生物中的任何一种。

[0281] 因此，本发明提供非天然存在的微生物，包含一个或多个基因破坏，其中所述一个或多个基因破坏在编码蛋白质或酶的基因中出现，其中所述一个或多个基因破坏使得所述

生物体中脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生产增加。脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生产可以是生长耦合的或不是生长耦合的。在一个特定的实施方案中，脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生产可以与如本文公开的生物体生长专性耦合。

[0282] 本发明提供非天然存在的微生物，具有增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产（例如脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生长耦合生产）的遗传改变（例如基因破坏）。产物生产可以例如通过遗传改变如本文公开的细胞的代谢途径而强制性地与该微生物的指数生长期相关联。所述遗传改变可增加所需产物的生产或甚至使得所需产物成为在生长期期间的专性产物。本文举例说明了导致脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生物合成的生产增加或水平提高的代谢改变或转化。各改变对应于应该在功能上受到破坏的必要代谢反应。在一种或多种途径（pathways）内所有反应的功能破坏都能够通过在生长期期间工程改造菌株而导致脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生产增加。

[0283] 这些非天然存在的改变中的每一个都导致与不含有这类代谢改变的菌株相比，在适当的培养条件下，例如在该微生物的指数生长期期间，脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产增加及水平提高。适当的条件包括例如本文公开的那些，包括例如特定碳源或反应物可利用性和 / 或适应性进化等条件。

[0284] 考虑到本文提供的教导和指导，本领域技术人员应当理解，为了引入代谢改变（例如酶的衰减），可能必需破坏参与反应的一种或多种酶的催化活性。或者，代谢改变可包括破坏酶活性或最大活性所必需的调节蛋白或辅因子的表达。此外，酶促反应所必需的辅因子的遗传损失也可以具有与编码该酶的基因的破坏相同的作用。破坏可通过多种方法进行，包括例如缺失编码基因或在一种或多种编码基因序列中掺入遗传改变。靶向破坏的编码基因可以是编码参与催化活性的酶的基因中的一个、一些或全部。例如，在单种酶参与靶向的催化活性的情况下，破坏可通过减少或消除所编码基因产物的催化活性的遗传改变来进行。类似地，在该单种酶是多聚体的（包括杂聚体的）的情况下，破坏可通过减少或破坏所编码基因产物的一个或所有亚基的功能的遗传改变来进行。活性的破坏可以通过使形成活性复合体所需要的一个或多个亚基的结合活性损失、通过破坏多聚体的复合体的催化亚基或通过两者来完成。也可以靶向多聚体蛋白缔合和活性的其它功能以便破坏本发明的代谢反应。这样的其它功能是本领域技术人员众所周知的。类似地，靶酶活性可以通过破坏修饰和 / 或激活靶酶的蛋白质或酶（例如，将脱辅基酶转变成全酶所需要的分子）的表达进行减少或消除。此外，根据本发明所述可以破坏单一多肽或多聚体的复合体的一些或所有功能以减少或废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，可以破坏参与本发明的反应或代谢修饰的一些或所有酶，只要所靶向的反应得以减少或消除即可。

[0285] 考虑到本文提供的教导和指导，本领域技术人员也将理解，可以通过减少或消除由共同基因和 / 或通过由表现出相似或实质上相同活性的基因的一种或多种直系同源物编码的反应，破坏酶促反应。减少共同基因和所有直系同源物可导致所靶向反应的任何催化活性的完全废除。然而，共同基因或一种或多种直系同源物的破坏可导致足以促进生长与产物生物合成耦合的所靶向反应的催化活性减少。本文中举例说明的是编码多种代谢修饰的催化活性的共同基因以及它们的直系同源物。本领域技术人员应当理解，编码所靶向代谢反应的酶的一些或所有基因的破坏可以在本发明的方法中予以实践并且掺入到本发

明的非天然存在的微生物中以便达到脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产或生长耦合产物生产增加。

[0286] 考虑到本文提供的教导和指导,本领域技术人员也将理解酶促活性或表达可以使用所熟知的方法进行衰减。减少酶的活性或量可以模拟基因的完全破坏,如果减少引起酶的活性下降到发挥功能的途径所正常需要的临界水平以下。通过各种技术而不是使用基因破坏减少酶促活性对于生物体的活力可以是重要的。减少导致基因破坏的相似或完全相同作用的酶促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 RNA 去稳定化;和使影响酶活性或动力学的基因发生突变(参见, Sambrook 等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory, New York(2001); 和 Ausubel 等人, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Baltimore, MD(1999)。天然或施加的调节控制也可以实现酶衰减,包括:启动子置换(参见, Wang 等人, *Mol. Biotechnol.* 52(2):300-308(2012)); 转录因子的损失或改变(Dietrick 等人, *Annu. Rev. Biochem.* 79:563-590(2010); 和 Simicevic 等人, *Mol. Biosyst.* 6(3):462-468(2010)); 引入抑制性 RNA 或肽,例如 siRNA、反义 RNA、RNA 或肽/小分子结合适体 (aptamer)、核酶 (ribozyme)、适体酶 (aptazyme) 和核糖开关 (riboswitch) (Wieland 等人, *Methods* 56(3):351-357(2012); O' Sullivan, *Anal. Bioanal. Chem.* 372(1):44-48(2002); 和 Lee 等人, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14(5):505-511(2003)); 和添加减少或破坏酶促活性的药物或其它化学品(例如酶抑制剂、抗生素或靶特异性药物)。

[0287] 本领域技术人员也将理解并认识到,酶的衰减可以在不同的水平上进行。例如,在基因水平上,引起部分或完全失效表型的突变(例如基因破坏)或引起上位(epistatic)遗传效应以遮蔽基因产物活性的突变(Miko, *Nature Education* 1(1)(2008))可用于使酶衰减。在基因表达水平上,用于衰减的方法包括:使转录与内源或外源诱导物例如异丙基硫代- β -半乳糖苷(IPTG)偶联,然后在生产阶段期间添加少量的诱导物或不添加诱导物(Donovan 等人, *J. Ind. Microbiol.* 16(3):145-154(1996); 和 Hansen 等人, *Curr. Microbiol.* 36(6):341-347(1998)); 引入或修饰基因的正或负调节因子;修饰在基因经整合的真核染色体区域中的组蛋白乙酰化/脱乙酰化(Yang 等人, *Curr. Opin. Genet. Dev.* 13(2):143-153(2003) 和 Kurdistani 等人, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4(4):276-284(2003)); 引入转位以破坏启动子或调节基因(Bleykasten-Brosshans 等人, *C. R. Biol.* 33(8-9):679-686(2011); 和 McCue 等人, *PLoS Genet.* 8(2):e1002474(2012)); 翻转转位元件或启动子区域的取向以便调节相邻基因的基因表达(Wang 等人, *Genetics* 120(4):875-885(1988); Hayes, *Annu. Rev. Genet.* 37:3-29(2003); 在二倍体生物体中,缺失一个导致杂合性损失的等位基因(Daigaku 等人, *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 等人, *Cell*, 136(4):763-776(2009); 或在细菌中,例如,引入转移信使 RNA(tmRNA) 标签(tag),其导致 RNA 降解和核糖体失速(stalling)(Sunohara 等人, *RNA* 10(3):378-386(2004); 和 Sunohara 等人, *J. Biol. Chem.* 279:15368-15375(2004))。在翻译水平上,衰减可包括:引入罕用密码

子以限制翻译 (Angov, *Biotechnol. J.* 6(6):650-659(2011)); 引入阻断翻译的 RNA 干扰分子 (Castel 等人, *Nat. Rev. Genet.* 14(2):100-112(2013); 和 Kawasaki 等人, *Curr. Opin. Mol. Ther.* 7(2):125-131(2005); 修饰编码序列以外的区域, 例如在非翻译区 (UTR) 中引入二级结构以阻断翻译或降低翻译效率 (Ringnér 等人, *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 等人, *FEMS Microbiol. Rev.* 34(5):883-932(2010); 引入反义 RNA 寡聚体或反义转录物 (Nashizawa 等人, *Front. Biosci.* 17:938-958(2012)); 引入 RNA 或肽适体、核酶、适体酶、核糖开关 (Wieland 等人, *Methods* 56(3):351-357(2012); O'Sullivan, *Anal. Bioanal. Chem.* 372(1):44-48(2002); 和 Lee 等人, *Curr. Opin. Biotechnol.* 14(5):505-511(2003)); 或引入涉及 RNA 结构的翻译调节元件, 其可防止或减少可受小分子存在或不存在所控制的翻译 (Araujo 等人, *Comparative and Functional Genomics*, Article ID 475731, 8 页 (2012))。在酶定位和 / 或寿命的水平上, 酶衰减可包括: 添加用于更快蛋白质周转 (turnover) 的降解标签 (Hochstrasser, *Annual Rev. Genet.* 30:405-439(1996); 和 Yuan 等人, *PLoS One* 8(4):e62529(2013)); 或添加定位标签, 其导致酶在真核细胞中分泌或定位于亚细胞区室, 在该亚细胞区室中酶将不能与其正常底物反应 (Nakai 等人, *Genomics* 14(4):897-911(1992); 和 Russell 等人, *J. Bact.* 189(21):7581-7585(2007))。在翻译后调节水平上, 酶衰减可包括: 增加已知抑制剂的胞内浓度; 或修饰翻译后修饰位点 (Mann 等人, *Nature Biotech.* 21:255-261(2003))。在酶活性水平上, 酶衰减可包括: 添加内源或外源抑制剂 (例如酶抑制剂、抗生素或靶特异性药物) 以减少酶活性; 限制必要辅因子 (例如维生素 B12) 对需要辅因子的酶的可利用性; 使酶活性所需要的金属离子螯合; 或引入显性阴性突变。以上描述的衰减技术的适用性可依赖于给定宿主微生物是原核生物还是真核生物, 且应当理解, 对于给定宿主来说什么是适当技术的确定可以由本领域技术人员容易地做出。

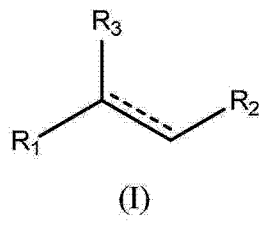
[0288] 在有些实施方案中, 微好氧设计可以基于所需产物的生长耦合形成来使用。为了检查这一点, 可通过在网络中可行的不同的生物质形成速率下首先将产物产率最大化且随后最小化来针对各策略构建生产锥体。如果突变网络的所有可能表型的最右边界为单一点, 则意味着在网络中可能的最大生物质形成速率下存在独特的最佳产物产率。在其它情况下, 可行表型的最右边界为垂直线, 表明在最大生物质的点上, 网络可产生在计算范围内产物的任何量, 包括在垂直线的最底点处的最低量。给予这样的设计低优先性。

[0289] 可以破坏本文公开的各表中鉴别的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产策略以增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生产。因此, 本发明也提供具有将脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产与生物体的生长耦合的代谢修饰的非天然存在的微生物, 其中代谢修饰包括一个或多个基因的破坏, 该基因选自编码本文公开的各表中所示的蛋白质和 / 或酶。

[0290] 如果确定菌株设计不足以增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产和 / 或将产物形成与生物质形成耦合, 则菌株中的每一个都可以补充另外的缺失。或者, 已知在生长条件下不具备显著活性的一些其它酶可以由于适应性进化或随机诱变而变得有活性。这样的活性也可以敲除。然而, 本文公开的基因缺失清单允许构建表现出高产率脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产 (包括脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生长耦合生产) 的菌株。

[0291] 在有些实施方案中,本发明提供用于生产式 (I) 的化合物的方法:

[0292]



[0293] 其中 R_1 为 C_{1-24} 直链烷基; R_2 为 CH_2OH 、 CHO 或 $COOH$; R_3 为 H 、 OH 或氧代 ($=O$); 且 $-----$ 代表单键或双键, 前提条件是 R_3 所连接的碳原子的化合价为四价, 包括将本文描述的非天然存在的微生物在足以产生所述式 (I) 的化合物的条件下培养足够的时间周期, 其中所述非天然存在的微生物具有一个或多个基因破坏, 其中所述一个或多个基因破坏在编码参与以下的蛋白质或酶的内源基因中出现: 由所述微生物天然产生乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、 CO_2 、脂肪酸或丙二酰-CoA; 途径中间体向除细胞溶质以外的细胞区室转移; 或由该微生物天然降解 MI-FAE 循环中间体、MD-FAE 循环中间体或终止途径中间体, 所述一个或多个基因破坏使得该微生物中的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的产生增加。因此, 所述蛋白质或酶可以是脂肪酸合酶、乙酰-CoA 羧化酶、生物素: 脱辅基酶连接酶、酰基载体蛋白、硫酯酶、酰基转移酶、ACP 丙二酰基转移酶、脂肪酸延长酶、酰基-CoA 合成酶、酰基-CoA 转移酶、酰基-CoA 水解酶、丙酮酸脱羧酶、乳酸脱氢酶、醇脱氢酶、酸形成醛脱氢酶、乙酸激酶、磷酸转乙酰酶、丙酮酸氧化酶、甘油-3-磷酸脱氢酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、线粒体丙酮酸载体、过氧化物酶体脂肪酸转运体、过氧化物酶体酰基-CoA 转运体、过氧化物酶体肉毒碱/酰基肉毒碱转移酶、酰基-CoA 氧化酶或酰基-CoA 结合蛋白。在有些方面, 所述一个或多个基因破坏包括一个或多个基因的缺失。

[0294] 在有些实施方案中, 本发明提供使用如本文描述的非天然存在的微生物生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的方法, 其中该 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环或该终止途径的一种或多种酶优先与 NADH 辅因子反应或者就与 NAD(P)H 辅因子反应而言具有减少的优先性。例如, 该 MI-FAE 循环或 MD-FAE 循环的一种或多种酶可以是 3-酮酰基-CoA 还原酶或烯酰基-CoA 还原酶。对于该终止途径, 所述一种或多种酶可以是酰基-CoA 还原酶(醛形成)、醇脱氢酶、酰基-CoA 还原酶(醇形成)、醛脱羧基酶、酰基-ACP 还原酶、醛脱氢酶(酸形成)或羧酸还原酶。

[0295] 在有些实施方案中, 本发明提供使用如本文描述的非天然存在的微生物生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的方法, 该微生物在编码蛋白质或酶的基因中具有一个或多个基因破坏, 该蛋白质或酶导致存在于该微生物的细胞溶质中的 NAD(P)H 与 NAD(P) 的比率在该破坏之后增加。因此, 编码导致存在于该微生物的细胞溶质中的 NAD(P)H 与 NAD(P) 的比率在该破坏之后增加的蛋白质或酶的基因可以是 NADH 脱氢酶、细胞色素氧化酶、甘油-3-磷酸(G3P)脱氢酶、甘油-3-磷酸(G3P)磷酸酶、醇脱氢酶、丙酮酸脱羧酶、醛脱氢酶(酸形成)、乳酸脱氢酶、甘油-3-磷酸脱氢酶、甘油-3-磷酸: 醌氧化还原酶、苹果酸酶和苹果酸脱氢酶。在有些方面, 所述一个或多个基因破坏包括一个或多个基因的缺失。

[0296] 在有些实施方案中, 本发明提供使用本发明的非天然存在的微生物生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的方法, 该微生物是克拉布特里阳性的且是在包含过量葡萄糖的培养基

中。在这样的条件下,如本文中所述,该微生物能导致增加存在于该微生物的细胞溶质中的 NAD(P)H 与 NAD(P) 的比率。

[0297] 在有些实施方案中,本发明提供使用如本文描述的非天然存在的微生物生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的方法,该微生物具有至少一种编码本发明的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的细胞外转运体或细胞外转运系统的外源核酸。

[0298] 在有些实施方案中,本发明提供使用如本文描述的非天然存在的微生物生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的方法,其中一种或多种参与以下的内源酶具有衰减的酶活性或表达水平:由所述微生物天然产生乙醇、甘油、乙酸、甲酸、乳酸、CO₂、脂肪酸或丙二酰-CoA;途径中间体向除细胞溶质以外的细胞区室转移;或由所述微生物天然降解 MI-FAE 循环中间体、MD-FAE 循环中间体或终止途径中间体。因此,所述内源酶可以是脂肪酸合酶、乙酰-CoA 羧化酶、生物素:脱辅基酶连接酶、酰基载体蛋白、硫酯酶、酰基转移酶、ACP 丙二酰基转移酶、脂肪酸延长酶、酰基-CoA 合成酶、酰基-CoA 转移酶、酰基-CoA 水解酶、丙酮酸脱羧酶、乳酸脱氢酶、醇脱氢酶、酸形成醛脱氢酶、乙酸激酶、磷酸转乙酰酶、丙酮酸氧化酶、甘油-3-磷酸脱氢酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、线粒体丙酮酸载体、过氧化物酶体脂肪酸转运体、过氧化物酶体酰基-CoA 转运体、过氧化物酶体肉毒碱/酰基肉毒碱转移酶、酰基-CoA 氧化酶和酰基-CoA 结合蛋白。

[0299] 在有些实施方案中,本发明提供使用如本文描述的非天然存在的微生物生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的方法,其中一种或多种参与 NAD(P)H 或 NADH 氧化的内源酶具有衰减的酶活性或表达水平。因此,所述一种或多种内源酶可以是 NADH 脱氢酶、细胞色素氧化酶、甘油-3-磷酸脱氢酶、甘油-3-磷酸磷酸酶、醇脱氢酶、丙酮酸脱羧酶、醛脱氢酶(酸形成)、乳酸脱氢酶、甘油-3-磷酸脱氢酶、甘油-3-磷酸:醌氧化还原酶、苹果酸酶和苹果酸脱氢酶。

[0300] 如本文所公开的,脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸可以在该微生物培养期间例如在连续和/或接近连续培养期中的任何时间点收获或分离。一般而言,微生物在连续和/或接近连续生长期维持得愈久,可生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的量按比例如愈大。

[0301] 因此,本发明另外还提供用于生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的方法,包括培养如本文公开的具有一个或多个基因破坏的非天然存在的微生物。该破坏可在编码增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产的酶的一个或多个基因中出现,包括当基因破坏减少或消除酶活性时,任选地将脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产与该微生物生长耦合。例如,该破坏可对所述非天然微生物赋予脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的稳定生长耦合生产。

[0302] 在有些实施方案中,该基因破坏可包括完整基因缺失。在有些实施方案中,破坏基因的其它方法包括例如省略或添加寡核苷酸或通过致使基因不可操作的突变进行框移(frameshifting)。本领域技术人员将认识到基因缺失的优势,然而,因为稳定性,其使得非天然存在的生物体不会回复为未发生基因破坏的亲本表型。具体地说,所述基因破坏选自如本文公开的基因组。

[0303] 一旦计算预测由用于破坏以增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产的基因组构成,则可以对菌株进行构建、进化和测试。将基因破坏(包括基因缺失)通过本领域众所周知的方法引入宿主生物中。如本文所公开,用于基因破坏的一种特别有用的方法是通过同源重组。

[0304] 工程改造菌株可通过测量生长速率、底物摄取速率和 / 或产物 / 副产物分泌速率来表征。培养物可以生长并用作新鲜分批培养物的接种物,在指数生长期对其进行测量。生长速率可以通过使用分光光度计 (A600) 测量光密度来确定。培养物上清液中葡萄糖和其它有机酸副产物的浓度可以通过适合于如本文公开的所需产物分析的熟知方法 (例如 HPLC、GC-MS 或其它熟知分析方法) 来测定,且用于计算摄取和分泌速率。

[0305] 含有基因破坏的菌株可表现出次最佳生长速率直到它们的代谢网络已根据它们的缺失功能性进行调节。为了帮助这种调节。可使菌株进行适应性进化。通过使菌株适应性进化,细胞生长速率变为主要选择压力,且迫使突变细胞重新配置其代谢通量以便增强其生长速率。近来已证明几种大肠杆菌突变体的此代谢重程序化,该突变体已在各种底物上适应性进化以达到由计算机模拟模型 (in silico model) 预测的生长速率 (Fong 和 Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004))。由适应性进化带来的生长改进可伴随有脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产速率提高。菌株一般重复地进行适应性进化,平行操作,以解决可由宿主生物表现出的进化模式差异 (Fong 和 Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004); Fong 等人, J. Bacteriol. 185:6400-6408(2003); Ibarra 等人, Nature 420:186-189(2002)), 其可潜在地导致产生具有优于其它菌株的优越生产品质的一种菌株。进化可操作一段时间,典型地 2-6 周,这取决于所达到的生长速率改进。一般而言,一旦获得稳定的表型,即停止进化。

[0306] 在适应性进化过程之后,再次通过测量生长速率、底物摄取速率和产物 / 副产物分泌速率来表征新菌株。通过将实际生长和生产产率与来自代谢建模的生产包络线 (envelope) 一起绘制曲线来将这些结果与理论预测进行比较。选出最成功的设计 / 进化组合以进一步继续且在实验室规模分批和连续发酵中进行表征。本文公开的方法 (例如 OptKnock 方法) 背后的生长耦合生物化学生产概念也导致遗传稳定过度生产者的产生。因此,以连续模式维持培养物一段延长周期 (例如一个月或一个月以上) 以评估长期稳定性。可取周期性样品以确保维持产率和生产力。

[0307] 适应性进化是一项可用于增加突变或工程改造微生物菌株或者在非天然环境下生长的野生型菌株的生长速率的强大技术。对于通过导致生长耦合产物形成的方法例如 OptKnock 设计的菌株尤其有用。因此,朝向最佳生长菌株的进化也将间接地使生产最优化。通过基因敲除 (gene knockout) 和适应性进化产生大肠杆菌 K-12 MG1655 的独特菌株 (Fong 和 Palsson, Nat. Genet. 36:1056-1058(2004))。在此项工作中,所有适应性进化培养物都通过在达到稳定期之前将分批培养物系列传代至新鲜培养基中而维持在延长的指数生长,因此使得生长速率为主要的选择压力。构建敲除菌株并在补充不同碳底物 (每个敲除菌株四种) 的基本培养基上进化。进化培养物以一式两份或一式三份进行,得到总共 50 个进化敲除菌株。将进化培养物维持在指数生长直到达到稳定的生长速率。在所检查的 50 例中的 38 例中,计算预测值在预测敲除菌株的进化后生长速率方面为精确的 (在 10% 以内)。此外,OptKnock 设计与适应性进化的组合已导致改良乳酸生产菌株。(Fong 等人, Biotechnol. Bioeng. 91:643-648(2005))。相似的方法可应用于本文公开的菌株且应用于各种宿主菌株。

[0308] 存在多种已开发技术用于进行适应性进化。本文公开了示例性的方法。在有些实施方案中,本发明的非天然存在的生物体的最优化包括利用适应性进化技术增加生产菌株

的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产和 / 或稳定性。

[0309] 连续培养涉及将小体积的生长培养物反复转移到大得多的含有新鲜生长培养基的容器中。当在新容器中培养的生物体生长至饱和时,重复该过程。这种方法已在文献(Lenski 和 Travisano, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:6808-6814(1994)) 中在清楚地证明在一年内繁殖速率的一致改良的实验中达到持续培养物的最长久证明。典型地,培养物的转移通常在指数期期间进行,因此每天精确计算转移体积以维持贯穿下一个 24 小时周期的指数生长。人工系列稀释成本低且易于平行化。

[0310] 在连续培养物中,恒化器中的细胞生长代表保留极高分率细胞群体的极端稀释情况。随着培养物生长且变得饱和,以新鲜培养基替代小比例的生长培养物,从而允许培养物以接近于其最大群体大小连续生长。恒化器已用于证明繁殖速率的短期快速改进(Dykhuisen, Methods Enzymol. 613-631(1993))。这些装置的潜在有用性被认识到,但传统恒化器由于稀释抗性(静态)变异体的非期望选择而不能维持长期的选择来达成增加的繁殖速率。这些变异体能够通过粘附于恒化器的表面而抵抗稀释,且藉此胜过粘着性较小的个体,包括具有较高繁殖速率的个体,因此妨碍该装置的预期目的(Chao 和 Ramsdell, J. Gen. Microbiol 20:132-138(1985))。一种克服此缺点的可行方法是构建具有两个生长腔室的装置,其如先前所述定期地经历短暂灭菌阶段(Marliere 和 Mutzel, 美国专利第 6,686,194 号)。

[0311] Evolugator™是由 Evolugate, LLC(Gainesville, FL) 开发的连续培养装置,且表现出相对于传统进化技术明显省时省力(de Crecy 等人, Appl. Microbiol. Biotechnol. 77:489-496(2007))。细胞在达到稳定期之前通过将分批培养物连续传代到新鲜培养基中而维持在延长的指数生长。通过自动化光密度测量和液体处理, Evolugator™可使用大培养物体积以高速率进行系列转移,因此接近恒化器在细胞拟合进化中的效率。例如,翻译器的组件中有缺陷且具有严重受妨碍生长的不动杆菌(Acinetobacter sp)ADP1 的突变体在 200 代中进化至野生型生长速率的 80%。然而,与将细胞在单一容器中维持的恒化器相反,该机器通过在管线轴的再分区域中自一个“反应器”移动至下一个中来操作,因此消除关于壁生长的任何选择。转移体积是可调节的,且通常设定为约 50%。该装置的一个缺点是其较大且成本高,因此平行操作较大数目的进化不实际。此外,在当前装置配置下,气体添加未得到良好调节,且严格厌氧条件不能维持。尽管如此,这是使生产菌株适应性进化的一种替代方法。

[0312] 正如本文所公开的,可以将编码脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径所需活性的核酸导入宿主生物中。在有些情况下,可能理想的是改变脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径酶或蛋白质的活性以增加脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生产。例如,可以将增加蛋白质或酶活性的已知突变引入到编码核酸分子中。另外,最优化方法可以用来增加酶或蛋白质的活性和 / 或减少抑制活性,例如减少负调节物的活性。

[0313] 一种这样的最优化方法是定向进化(directed evolution)。定向进化是一种十分有效的方法,包括引入靶向特定基因的突变以便改进和 / 或改变酶的特性。经改进和 / 或改变的酶可以通过灵敏的高通量筛选测定的开发和实施来进行鉴别,该测定允许许多酶变异体(例如, $>10^4$) 的自动化筛选。通常要进行多轮重复的诱变和筛选才能获得具有最优化特性的酶。能够有助于鉴定诱变用基因的区域计算算法也已经开发出来并且可

以明显地减少需要产生和筛选的酶变异体数目。已开发出多项定向进化技术(关于综述参见 Hibbert 等人, *Biomol. Eng* 22:11-19(2005); Huisman 和 Lalonde, *Biocatalysis in the pharmaceutical and Biotechnology industries* (制药工业和生物技术工业中的生物催化), 第 717-742 页 (2007), Patel (编著), CRC Press; Otten 和 Quax, *Biomol. Eng* 22:1-9(2005); 和 Sen 等人, *Appl Biochem. Biotechnol* 143:212-223(2007)) 以在产生多样性变异体文库上有效, 并且这些方法已经成功地应用于横跨许多酶类别的多个特性的改进。已通过定向进化技术改进和/或改变的酶特征包括例如: 选择性/特异性, 用于非天然底物的转变; 温度稳定性, 用于严酷高温加工; pH 稳定性, 用于在较低或较高 pH 条件下的生物加工; 底物或产物耐受性, 使得可以达到高的产物效价; 结合 (K_m), 包括拓宽底物结合以包括非天然底物; 抑制 (K_i), 以去除被产物、底物或关键中间体抑制; 活性 (k_{cat}), 以提高酶促反应速率从而达到所需通量; 表达水平, 以增加蛋白质产率和总体途径通量; 氧稳定性, 用于在好氧条件下空气敏感酶的操作; 和厌氧活性, 用于在氧不存在时需氧酶的操作。

[0314] 下文更详细描述的是已经开发出来用于靶向特定酶所需特性的基因的诱变和多样化的示例性方法。这样的方法都是本领域技术人员众所周知的。这些方法中的任何一个都可以用于改变和/或最优化脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径酶或蛋白质的活性。

[0315] EpPCR (Pritchard 等人, *J Theor. Biol.* 234:497-509(2005)) 通过以下方式来引入随机点突变: 通过添加 Mn^{2+} 离子降低 PCR 反应中 DNA 聚合酶的保真度; 偏重 dNTP 浓度; 或其它条件变化。将诱变限于所关注靶基因的五步克隆过程涉及: 1) 所关注基因的易错 PCR 扩增; 2) 限制酶消化; 3) 所需 DNA 片段的凝胶纯化; 4) 连接到载体中; 5) 基因变异体转化到合适宿主并且筛选文库用于改良性能。这种方法可在单一基因中同时产生多个突变, 其可适用于筛选较大数目的具有所需活性的潜在变异体。可通过 EpPCR 产生高数目的突变体, 因此, 例如使用机器人的高通量筛选测定或选择方法可用于鉴定具有理想特征的那些。

[0316] 易错滚环扩增 (Error-prone Rolling Circle Amplification, epRCA) (Fujii 等人, *Nucleic Acids Res.* 32:e145(2004); 和 Fujii 等人, *Nat. Protoc.* 1:2493-2497(2006)) 具有许多与 epPCR 相同的元件, 只是使用完全环状质粒作为模板, 且使用在最后 2 个核苷酸上具有外切核酸酶抗性硫代磷酸酯键的随机 6-聚体来扩增质粒, 随后将其转化到细胞中, 在转化的细胞中, 质粒在串联重复上被重新环化。调节 Mn^{2+} 浓度可稍微改变突变速率。这项技术使用一种简单易错、单步骤方法以产生具有 3-4 个突变/kbp 的质粒的完整拷贝。不需要限制酶消化或特异性引物。另外, 这种方法典型地以商业上可获得的试剂盒形式可获得。

[0317] DNA 或家族改组 (Family Shuffling) (Stemmer, *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10747-10751(1994)); 和 Stemmer, *Nature* 370:389-391(1994)) 通常包括用核酸酶 (例如 Dnase I 或 EndoV) 消化两种或两种以上变异基因以产生随机片段库, 该随机片段库可在 DNA 聚合酶存在下通过退火和延伸的多次循环进行重新装配以产生嵌合基因文库。片段彼此引发且当一个拷贝引发另一个拷贝 (模板转换) 时发生重组。这种方法可以与 >1kbp DNA 序列一起使用。除了通过片段重新装配产生的突变重组体以外, 这种方法还在延伸步骤中以类似于易错 PCR 的速率引入点突变。该方法可用于移除有害、随机和中性突变。

[0318] 交错延伸 (Staggered Extension, StEP) (Zhao 等人, *Nat. Biotechnol.* 16:258-261(1998)) 需要模板引导, 随后经过 2 步 PCR 的重复循环, 并且经变性

和非常短持续时间的退火/延伸(短至5秒)。生长片段退火至不同模板并进一步延伸,将其重复直到产生全长序列为止。模板转换意味着大多数所得片段具有多个亲本。低保真度聚合酶(Taq和Mutazyme)的组合因相反突变谱而减小易错偏倚。

[0319] 在随机引导重组(Random Priming Recombination, RPR)中,使用随机序列引物来产生大量互补于模板不同区段(segment)的短DNA片段(Shao等人,Nucleic Acids Res 26:681-683(1998))。碱基错误掺入和通过epPCR的错误引发得到点突变。短DNA片段基于同源性彼此引发且通过重复热循环重组和重新装配成全长。在这个步骤之前移除模板可确保低亲本重组体。这种方法像大多数其它方法一样,可经历多个反覆来进行以进化区别特征。这项技术避免了序列偏倚,不依赖于基因长度且需要极少亲本DNA供应用。

[0320] 在异源双链体重组(Heteroduplex Recombination)中,使用线性化质粒DNA来形成被错配修复所修复的异源双链体(Volkov等人,Nucleic Acids Res. 27:e18(1999);和Volkov等人,Methods Enzymol. 328:456-463(2000))。错配修复步骤至少稍微诱发突变。异源双链体比线性同双链体更有效地转化。这种方法适合于大基因和整个操纵子。

[0321] 过渡模板随机嵌合生长(Random Chimeragenesis on Transient Templates, RACHITT)(Coco等人,Nat. Biotechnol. 19:354-359(2001))使用单链DNA(ssDNA)的Dnase I片段化和大小分级分离。同源片段在不存在聚合酶时与互补ssDNA骨架杂交。任何重叠未杂交的片段末端均通过外切核酸酶修剪。填平片段之间的缺口,然后连接以得到全长与骨架杂交的全长多样化链库,其含有U以排除扩增。随后破坏骨架并且通过PCR扩增以与多样化链互补的一条新链替代。该方法涉及仅来自一个亲本的一条链(骨架),而引发片段来源于其它基因,且针对亲本骨架进行选择。因此,不发生亲本片段再退火。重叠片段用外切核酸酶修剪。另外,这在概念上类似于DNA改组和StEP。因此,应该不存在同辈份物(siblings)、存在极少无活性物且不存在未改组亲本。这项技术的优势在于产生极少或不产生亲本基因且相对于标准DNA改组可得到多得多的交换体(crossovers)。

[0322] 截短模板重组延伸(Recombined Extension on Truncated templates, RETT)需要在用作模板库的单向ssDNA片段存在下模板转换来自引物的单向生长链(Lee等人,J. Molec. Catalysis 26:119-129(2003))。不使用DNA内切核酸酶。单向ssDNA由使用随机引物的DNA聚合酶或使用外切核酸酶的系列缺失产生。单向ssDNA仅为模板且不为引物。随机引发和外切核酸酶不引入序列偏倚作为DNA改组/RACHITT的酶促裂解的真相。RETT因为其使用正常PCR条件而非极短延伸,所以比StEP更易最佳化。重组作为PCR步骤的分项出现,即无直接改组。这种方法也可由于不存在暂停而比StEP更随机。

[0323] 在简并寡核苷酸基因改组(Degenerate Oligonucleotide Gene Shuffling, DOGS)中,使用简并引物来控制分子之间的重组;(Bergquist和Gibbs,Methods Mol. Biol. 352:191-204(2007);Bergquist等人,Biomol. Eng. 22:63-72(2005);Gibbs等人,Gene 271:13-20(2001))这可用于控制其它方法(例如DNA改组)使亲本基因再生的趋势。这种方法可以与所选基因区段的随机诱变(epPCR)组合。这可以是阻断亲本序列再形成的良好方法。不需要内切核酸酶。通过调节所产生区段的输入浓度,可向所需骨架(backbone)偏倚。这种方法允许在无限制酶消化的情况下自无关亲本进行DNA改组并且允许选择随机诱变方法。

[0324] 用渐增截短法产生杂合酶(Incremental Truncation for the Creation of

Hybrid Enzymes, ITCHY) 产生具有所关注基因或基因片段的 1 个碱基对缺失的组合文库 (Ostermeier 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:3562-3567(1999); 和 Ostermeier 等人, Nat. Biotechnol. 17:1205-1209(1999))。在 2 种不同基因碎片上以相反的方向引入截短。将这些连接在一起并将融合物克隆。这项技术不需要 2 个亲本基因之间的同源性。当 ITCHY 与 DNA 改组组合时, 将该系统称为 SCRATCHY (参见下文)。两者的主要优势是不需要亲本基因之间的同源性; 例如, 通过 ITCHY 产生了大肠杆菌基因和人基因之间的功能融合物。当产生 ITCHY 文库时, 所有可能的交换体均被捕获。

[0325] 用硫代渐增截短法产生杂合酶 (Thio-Incremental Truncation for the Creation of Hybrid Enzymes, THIO-ITCHY) 类似于 ITCHY, 只是使用硫代磷酸酯 dNTPs 产生截短物 (Lutz 等人, Nucleic Acids Res 29:E16(2001))。相对于 ITCHY, THIO-ITCHY 可以更易于最优化, 提供更多再现性及可调节性。

[0326] SCRATCHY 将 ITCHY 和 DNA 改组这两种重组基因的方法结合起来 (Lutz 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98:11248-11253(2001))。SCRATCHY 将 ITCHY 和 DNA 改组的最佳特征结合起来。首先, 使用 ITCHY 在基因的片段之间以 DNA 同源性非依赖性方式产生综合融合物组。这种人工家族然后经受 DNA- 改组步骤以增大交换体数目。可将计算预测值用于最佳化。当序列同一性在 80% 以下时, SCRATCHY 比 DNA 改组更有效。

[0327] 在随机漂移诱变 (Random Drift Mutagenesis, RNDM) 中, 通过 epPCR 产生突变, 然后进行筛选 / 选择并将有可利用活性的那些保留下来 (Bergquist 等人, Biomol. Eng. 22:63-72(2005))。然后, 将这些用于 DOGS 以产生具有在多种活性突变体之间或在活性突变性和一些其它所需亲本之间的融合物的重组体。经设计以促进中性突变的分离; 其目的是针对保留的催化活性进行筛选, 无论这种活性比是高于还是低于原始基因中的活性。当筛选能够检测到超过背景的活性时, RNDM 在高通量测定中很有用。RNDM 已在产生多样性中用作 DOGS 的前端。该技术强加在改组或其它后续步骤之前的活性要求; 表明导致中性漂移文库自较小文库产生活性的较高 / 较快改进。尽管公开使用 epPCR, 但是这项技术可应用于其它大规模诱变方法。

[0328] 序列饱和诱变 (Sequence Saturation Mutagenesis, SeSaM) 是一种随机诱变方法, 其: 1) 使用随机掺入硫代磷酸酯核苷酸并裂解来产生随机长度片段库; 该库用作模板以 2) 在“通用”碱基 (例如肌苷) 存在下延伸; 3) 含肌苷的互补随机复制得到碱基掺入并因此发生诱变 (Wong 等人, Biotechnol. J. 3:74-82(2008); Wong 等人, Nucleic Acids Res. 32:e26(2004); 和 Wong 等人, Anal. Biochem. 341:187-189(2005))。使用这项技术, 可能在 2 至 3 天内使用简单方法产生大的突变体文库。这项技术与 DNA 聚合酶的突变偏倚相比是非定向的。这种方法中的差异使得这项技术与 epPCR 互补 (或为其替代方法)。

[0329] 在合成改组 (Synthetic Shuffling) 中, 重叠寡核苷酸经设计以编码“靶标中的所有遗传多样性”并且允许经改组的子代的非常高多样性 (Ness 等人, Nat. Biotechnol. 20:1251-1255(2002))。在这项技术中, 可设计待改组的片段。这有助于提高子代的所得多样性。可设计序列 / 密码子偏倚以制造更多远缘相关序列以接近更密切相关序列所观察到的速率的速率重组。另外, 该技术不需要物理上具有模板基因。

[0330] 核苷酸交换和切除技术 (Nucleotide Exchange and Excision Technology, Next) 利用 dUTP 掺入随后相继用尿嘧啶 DNA 糖基化酶及嘧啶处理的组合以进行终点 DNA 片段化

(Muller 等人, *Nucleic Acids Res.* 33:e117(2005))。基因使用内部 PCR 引物延伸与校对 (proofreading) 聚合酶进行重新装配。改组尺寸可使用不同 dUPT::dTTP 比率直接控制。这是使用尿嘧啶掺入和裂解的简单方法的终点反应。其它核苷酸类似物 (例如 8-氧代-鸟嘌呤) 可以与这种方法一起使用。另外,该技术用非常短的片段 (86bp) 良好工作且错误率低。这项技术中使用的 DNA 的化学裂解导致产生极少未改组的克隆。

[0331] 在不依赖序列同源性的蛋白质重组 (Sequence Homology-Independent Protein Recombination, SHIPREC) 中,使用接头 (linker) 来促进两个远缘基因或无亲缘关系的基因之间的融合。使用核酸酶处理在这两种基因之间产生一系列嵌合体。这些融合导致产生单交换杂合体文库 (Sieber 等人, *Nat. Biotechnol.* 19:456-460(2001))。这产生了有限类型的改组且需要一种独立过程用于诱变。另外,由于不需要同源性,因此这项技术可产生具有不同分数的两种无亲缘关系的亲本基因中每一种基因的嵌合体的文库。SHIPREC 用与哺乳动物 CP450 的 N-末端区域融合的细菌 CP450 的血色素-结合结构域进行了测试;这在溶解性较高的酶中产生了哺乳动物活性。

[0332] 在基因位点饱和和诱变[™] (Gene Site Saturation Mutagenesis[™], GSSM[™]) 中,起始材料是含有插入片段和两种引物的超螺旋双链 DNA (dsDNA) 质粒,其在所要突变位点处发生简并 (Kretz 等人, *Methods Enzymol.* 388:3-11(2004))。携带所关注突变的引物退火至 DNA 相反链上的相同序列。该突变是典型地在引物中间且在每一侧侧接正确序列的大约 20 个核苷酸。该引物中的序列是 NNN 或 NNK (编码) 和 MNN (非编码) (N = 所有 4 个, K = G、T、M = A、C)。在延伸之后,用 DpnI 消化 dam 甲基化 DNA 以消除野生型模板。这项技术探索在给定基因座 (即,一个密码子) 的所有可能氨基酸取代。该技术有助于在没有无义密码子的单一位点上产生所有可能置换且导致以相等至接近相等的程度呈现最有可能的等位基因。这项技术不需要靶酶的结构、机制或结构域的先前知识。如果随后进行改组或基因重新装配,则这项技术产生含有单一位点向上突变 (single-site up-mutations) 的所有可能组合的重组体的多样化文库。已证明这项技术组合适用于超过 50 种不同酶的成功进化,以及给定酶中的超过一种特性。

[0333] 组合盒式诱变 (Combinatorial Cassette Mutagenesis, CCM) 涉及使用短寡核苷酸盒以替代具有大量可能氨基酸序列改变的限制区域 (Reidhaar-Olson 等人, *Methods Enzymol.* 208:564-586(1991); 和 Reidhaar-Olson 等人, *Science* 241:53-57(1988))。使用这项技术在两个或三个位点处同时取代是可能的。另外,该方法测试在有限范围的位点处可能序列变化的较大多重性。这项技术已用于探索 λ 阻抑因子 DNA-结合结构域的信息含量。

[0334] 组合多重盒式诱变 (Combinatorial Multiple Cassette Mutagenesis, CMCM) 基本上类似于 CCM,只是它用作较大程序的组成部分:1) 以高突变率使用 epPCR 以 2) 鉴定热点和热区域,且然后 3) 通过 CMCM 延伸以覆盖蛋白质序列空间的限定区域 (Reetz 等人, *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 40:3589-3591(2001))。如用 CCM,这种方法可测试覆盖靶区域上的事实上所有可能的改变。如果与产生随机突变和改组基因的方法一起使用,则它提供产生多样性、改组蛋白质的优异方式。这种方法将酶的对映选择性 (enantioselectivity) 成功增加 51 倍。

[0335] 在致突变菌株技术 (Mutator Strains technique) 中,条件性 ts 致突变质粒在

选择期间使随机和天然突变频率增加 20-4000 倍,而当不需要选择时阻断缺失突变的累积 (Selifonova 等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3645-3649 (2001))。这项技术基于质粒衍生的 mutD5 基因,该基因编码 DNA 聚合酶 III 的突变亚基。该亚基与内源 DNA 聚合酶 III 结合且在带有该质粒的任何菌株中损害聚合酶 III 的校对能力。发生各种碱基取代和框移突变。为了有效使用,致突变质粒一旦达到所需表型就应该立即移除;这通过温度敏感性 (ts) 复制起点来完成,该温度敏感性 (ts) 复制起点使得质粒在 41°C 下固化。应该注意到,已探索致突变菌株很长时间 (参见 Low 等人, *J. Mol. Biol.* 260:359-3680 (1996))。在这项技术中,观察到非常高的自发突变速率。条件特性将非所要背景突变减到最小。这项技术可与适应性进化组合以提高诱变速率并且更快速达到所需表型。

[0336] 精细诱变 (Look-through Mutagenesis, LTM) 是评估和最优化所选氨基酸的组合突变的一种多维诱变方法 (Rajpal 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:8466-8471 (2005))。不以所有可能的氨基酸变化使各位点饱和,选择一组九个变化以覆盖氨基酸 R 基团化学结构的范围。每个位点较少变化允许多个位点经受此诱变类型。通过这种方法已达到了从低摩尔浓度到皮克摩尔浓度的抗体的结合亲和力增加 >800 倍。这是将随机组合的数目降到最低的合理方法并且可通过大大减少待筛选的克隆数目来增加发现改良性状的能力。这已应用于抗体工程改造,特别是增加结合亲和力和 / 或降低解离。该技术可以与筛选或选择结合起来。

[0337] 基因重新装配 (Gene Reassembly) 是一种 DNA 改组方法,可一度应用到多基因或用来产生单一基因的嵌合体的大文库 (多个突变) (Tunable GeneReassembly™ (TGR™) Technology supplied by Verenum Corporation)。典型地,这项技术与超高通量筛选组合以查询所需改进的所代表序列空间。这项技术允许不依赖同源性的多基因重组。交换事件的精确数目和位置可以使用通过生物信息分析设计的片段来预先确定。这项技术导致产生非常高水平的多样性 (事实上无亲本基因重新形成) 和低水平的无活性基因。与 GSSM™ 组合,可以测试较大突变范围的改良活性。该方法允许 DNA 改组的“掺混”和“精细调节”,例如,密码子使用可经最优化。

[0338] 计算机模拟蛋白质设计自动化 (in Silico Protein Design Automation, PDA) 是一种最优化算法,可锚定具有特殊折叠的结构确定的蛋白质骨架,并检索可以稳定折叠和总体蛋白质动力学用于氨基酸取代的序列空间 (Hayes 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99:15926-15931 (2002))。这项技术使用基于计算机模拟结构的熵预测以便检索针对蛋白质氨基酸变异的结构耐受性。应用统计力学 (Statistical mechanics) 来计算每个位置的偶联相互作用。针对氨基酸取代的结构耐受性是偶联的一种度量。最终,这项技术经设计以在维持结构特征完整性的同时产生蛋白质特性的所需修饰。该方法利用计算方法评估并且允许过滤非常大量的可能序列变体 (10^{50})。选择待测序列变体与基于最有利热力学的预测相关。表面上只有稳定性或与稳定性有关的特性可用此项技术有效解决。该方法已成功地应用于一些治疗蛋白质,尤其是应用于工程改造免疫球蛋白。计算机模拟预测避免了测试超常规大量的潜在变体。基于现有三维结构的预测比基于假设结构的预测更有可能成功。这项技术可容易地预测并且允许多个同时突变的靶向筛选,由于此筛选因数目的指数增大有时不可能用纯粹实验技术实现。

[0339] 迭代饱和诱变 (Iterative Saturation Mutagenesis, ISM) 涉及:1) 利用

结构 / 功能知识来挑选用于酶改进的最可能位点 ;2) 使用诱变方法例如 Stratagene QuikChange(Stratagene ;San Diego CA) 在所选位点上进行饱和诱变 ;3) 筛选 / 选择所需特性 ;和 4) 使用改进的克隆,在另一个位点上重新开始并且继续重复直到获得所需要的活性 (Reetz 等人 ,Nat. Protoc. 2:891-903(2007) ;和 Reetz 等人 ,Angew. Chem. Int. Ed Engl. 45:7745-7751(2006))。这是一种经证明的方法,其确保产生在给定位置上的所有可能置换用于筛选 / 选择。

[0340] 任何上述用于诱变的方法可以单独使用或者以任何组合使用。另外,定向进化方法的任何一个或组合可以结合本文所述的适应性进化技术使用。

[0341] 应当理解,基本上不影响本发明各种实施方案的活性的修改也在本文提供的本发明定义内提供。因此,以下实施例意在说明而不是限制本发明。

[0342] 实施例 I

[0343] 通过 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和酰基 -CoA 终止途径生产脂肪醇和脂肪醛

[0344] 下文进一步举例说明了可用作赋予宿主微生物脂肪醇和脂肪醛生产能力的来源的编码核酸和物种。

[0345] 多酶复合体

[0346] 在一个示例性的实施方案中,基因 fadA 和 fadB 编码表现出丙二酰 -CoA 非依赖性 FAS 途径的三组分活性即酮酰基 -CoA 硫解酶、3- 羟基酰基 -CoA 脱氢酶和烯酰 -CoA 水合酶活性的多酶复合体 (Nakahigashi, K. 和 H. Inokuchi, Nucleic Acids Research 18:4937(1990) ;Yang 等人 ,Journal of Bacteriology 173:7405-7406(1991) ;Yang 等人 ,Journal of Biological Chemistry 265:10424-10429(1990) ;Yang 等人 ,Biochemistry 30:6788-6795(1990))。fadI 和 fadJ 基因编码类似活性,其可取代以上丙二酰 -CoA 非依赖性 FAS 赋予的基因 fadA 和 fadB。大肠杆菌的酰基 -CoA 脱氢酶由 fadE 编码 (Campbell 等人 ,J Bacteriol 184:3759-64)。这种酶催化 β -氧化的限速步骤 (O'Brien 等人 ,J Bacteriol 132:532-40(1977))。各种以上 fad 基因的核酸序列是本领域众所周知的并且可以在公共数据库 (例如 Genbank) 中使用以下登录号登录。

[0347]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
fadA	YP_026272.1	49176430	大肠杆菌
fadB	NP_418288.1	16131692	大肠杆菌
fadI	NP_416844.1	16130275	大肠杆菌
fadJ	NP_416843.1	16130274	大肠杆菌
fadR	NP_415705.1	16129150	大肠杆菌
fadE	AAC73325.2	87081702	大肠杆菌

[0348] 步骤 A. 硫解酶

[0349] 在本文 (图 1A 和图 6A) 中描述了适合于脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产的硫解

酶,也称为 β -酮硫解酶、酰基-CoA C-乙酰基转移酶、酰基-CoA:乙酰-CoA C-酰基转移酶、3-氧代酰基-CoA 硫解酶、3-酮酰基-CoA 硫解酶、 β -酮酰基-CoA 硫解酶和酰基-CoA 硫解酶。示例性的乙酰乙酰-CoA 硫解酶包括来自大肠杆菌的 atoB 和同源性 yqeF (Martin 等人, Nat. Biotechnol 21:796-802(2003))、来自丙酮丁醇梭菌的 th1A 和 th1B (Hanai 等人, Appl Environ Microbiol 73:7814-7818(2007); Winzer 等人, J. Mol. Microbiol Biotechnol 2:531-541(2000)) 和来自酿酒酵母的 ERG10 (Hiser 等人, J. Biol. Chem. 269:31383-31389(1994)) 的基因产物。酿酒酵母的降解性硫解酶由 POT1 编码。另一种候选硫解酶是富养罗尔斯通氏菌 (*R. eutropha*) 的 phaA 基因产物 (Jenkins 等人, Journal of Bacteriology 169:42-52(1987))。来自生枝动胶菌 (*Zoogloea ramigera*) 的乙酰乙酰-CoA 硫解酶在生物合成方向上是不可逆的并且其晶体结构是可获得的 (Merilainen 等人, Biochem 48:11011-25(2009))。在以下表格中包括了这些硫解酶和同源物的登录号。

[0350]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
atoB	NP_416728	16130161	大肠杆菌
yqeF	NP_417321.2	90111494	大肠杆菌
th1A	NP_349476.1	15896127	丙酮丁醇梭菌

[0351]

th1B	NP_149242.1	15004782	丙酮丁醇梭菌
ERG10	NP_015297	6325229	酿酒酵母
POT1	NP_012106.1	6322031	酿酒酵母
phaA	YP_725941	113867452	富养罗尔斯通氏菌
phbA	P07097.4	135759	生枝动胶菌
h16_A1713	YP_726205.1	113867716	富养罗尔斯通氏菌
pcaF	YP_728366.1	116694155	富养罗尔斯通氏菌
h16_B1369	YP_840888.1	116695312	富养罗尔斯通氏菌
h16_A0170	YP_724690.1	113866201	富养罗尔斯通氏菌
h16_A0462	YP_724980.1	113866491	富养罗尔斯通氏菌
h16_A1528	YP_726028.1	113867539	富养罗尔斯通氏菌

h16_B0381	YP_728545.1	116694334	富养罗尔斯通氏菌
h16_B0662	YP_728824.1	116694613	富养罗尔斯通氏菌
h16_B0759	YP_728921.1	116694710	富养罗尔斯通氏菌
h16_B0668	YP_728830.1	116694619	富养罗尔斯通氏菌
h16_A1720	YP_726212.1	113867723	富养罗尔斯通氏菌
h16_A1887	YP_726356.1	113867867	富养罗尔斯通氏菌
bktB	YP_002005382.1	194289475	台湾贪铜菌
Rmet_1362	YP_583514.1	94310304	耐金属罗尔斯通氏菌
Bphy_0975	YP_001857210.1	186475740	瘤状伯克霍尔德氏菌

[0352] 许多硫解酶催化较长链酰基-CoA 产物的形成。示例性的硫解酶包括例如 3-氧代己二酰-CoA 硫解酶 (EC 2.3.1.174) 和酰基-CoA 硫解酶 (EC 2.3.1.16)。3-氧代己二酰-CoA 硫解酶将琥珀酰-CoA 和乙酰-CoA 转变成 3-氧代己二酰-CoA, 并且是芳香族化合物降解的 β -酮己二酸途径的一个关键酶。该酶广泛分布于土壤细菌和真菌包括恶臭假单胞菌 (Harwood 等人, J Bacteriol. 176:6479-6488(1994)) 和醋酸钙不动杆菌 (Doten 等人, J Bacteriol. 169:3168-3174(1987)) 中。由假单胞菌 B13 菌株中的 *pcaF* (Kaschabek 等人, J Bacteriol. 184:207-215(2002))、恶臭假单胞菌 U 中的 *phaD* (Olivera 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 95:6419-6424(1998))、荧光假单胞菌 ST 中的 *paaE* (Di 等人, Arch. Microbiol. 188:117-125(2007)) 和来自大肠杆菌的 *paaJ* (Nogales 等人, Microbiology 153:357-365(2007)) 编码的基因产物也催化这种转化。若干 β -酮硫解酶表现出以形成 3-氧代己二酰-CoA 的方向有显著性和选择性活性, 包括来自恶臭假单胞菌的 *bkt*、来自绿脓假单胞菌 PA01 的 *pcaF* 和 *bkt*、来自不明确伯克霍尔德氏菌 AMMD 的 *bkt*、来自大肠杆菌的 *paaJ* 和来自恶臭假单胞菌的 *phaD*。富养罗尔斯通氏菌 (*Ralstonia eutropha*) (旧称真养产碱杆菌 (*Alcaligenes eutrophus*)) 的两种基因产物由基因 *bktB* 和 *bktC* 编码, 催化 3-氧代庚二酰-CoA 的形成 (Slater 等人, J. Bacteriol. 180:1979-1987(1998); Haywood 等人, FEMS Microbiology Letters 52:91-96(1988))。BktB 的蛋白质序列是已知的; 然而, BktC 的蛋白质序列尚未报道。BktB 对长度 C6 和 C8 的底物也有活性 (Machado 等人, Met Eng in press(2012))。沼泽红假单胞菌的 *pim* 操纵子也编码 β -酮硫解酶, 由 *pimB* 编码, 经预测在苯甲酰-CoA 降解期间以降解方向催化这种转化 (Harrison 等人, Microbiology 151:727-736(2005))。通过与 *bktB* 的序列同源性鉴定出酸养互养菌 (*S. aciditrophicus*) 中的一个 β -酮硫解酶候选者 (43% 同一性, e 值 = $1e-93$)。

[0353]

基因名称	GI#	GenBank 登录 #	生物体

paaJ	16129358	NP_415915.1	大肠杆菌
pcaF	17736947	AAL02407	克氏假单胞菌 (B13)
phaD	3253200	AAC24332.1	恶臭假单胞菌
pcaF	506695	AAA85138.1	恶臭假单胞菌
pcaF	141777	AAC37148.1	醋酸钙不动杆菌
paaE	106636097	ABF82237.1	荧光假单胞菌
bkt	115360515	YP_777652.1	不明确伯克霍尔德氏菌 AMMD
bkt	9949744	AAG06977.1	绿脓假单胞菌 PA01
pcaF	9946065	AAG03617.1	绿脓假单胞菌 PA01
bktB	YP_725948	11386745	富养罗尔斯通氏菌
pimB	CAE29156	39650633	沼泽红假单胞菌
syn_02642	YP_462685.1	85860483	酸养互养菌

[0354] 参与脂肪酸降解的 β -氧化循环的酰基-CoA 硫解酶 (EC 2.3.1.16) 酶表现出对不同链长的宽范围的酰基-CoA 底物具有活性。示例性的酰基-CoA 硫解酶在拟南芥 (Cruz 等人, *Plant Physiol* 135:85-94(2004))、智人 (Mannaerts 等人, *Cell Biochem Biophys* 32:73-87(2000))、向日葵 (*Helianthus annuus*) (Schiedel 等人, *Prot Expr Purif* 33:25-33(2004)) 中被发现。硫解酶的链长特异性可通过本领域众所周知的方法来测定 (Wrensford 等人, *Anal Biochem* 192:49-54(1991))。大鼠肝脏中发现的过氧化物酶体硫解酶催化来自辛酰-CoA 的较长链酰基-CoA 产物的乙酰-CoA 依赖性形成 (Horie 等人, *Arch Biochem Biophys* 274:64-73(1989); Hijikata 等人, *J Biol Chem* 265, 4600-4606(1990))。

[0355]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
AY308827.1:1..1350	AAQ77242.1	34597334	向日葵
KAT2	Q56WD9.2	73919871	拟南芥
KAT1	Q8LF48.2	73919870	拟南芥

[0356]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体

KAT5	Q570C8.2	73919872	拟南芥
ACAA1	P09110.2	135751	智人
LCTH10	AAF04612.1	6165556	野猪
Acaa1a	NP_036621.1	6978429	褐家鼠
Acaa1b	NP_001035108.1	90968642	褐家鼠
Acaa2	NP_569117.1	18426866	褐家鼠

[0357] 乙酰乙酰-CoA 也可以通过乙酰乙酰-CoA 合酶 (EC 2.3.1.194) 由乙酰-CoA 和丙二酰-CoA 合成。这种酶 (FhsA) 已在土壤细菌链霉菌 CL190 中进行了表征,在该菌中它参与甲羟戊酸生物合成 (Okamura 等人, PNAS USA 107:11265-70 (2010))。因为这种酶催化基本上不可逆的反应,所以它对过量产生由乙酰乙酰-CoA (例如长链醇) 衍生的代谢物、燃料或化学品的代谢工程应用特别有用。其它乙酰乙酰-CoA 合酶基因可通过与 fhsA 的序列同源性进行标识。酰基-CoA 合酶 (例如 fhsA) 和同源物可通过本领域已知的方法经工程改造或进化以接受较长酰基-CoA 底物。

[0358]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
fhsA	BAJ83474.1	325302227	链霉菌 CL190
AB183750.1:11991..12971	BAD86806.1	57753876	链霉菌 KO-3988
epzT	ADQ43379.1	312190954	肉桂色链霉菌
ppzT	CAX48662.1	238623523	环圈链霉菌
03I_22085	ZP_09840373.1	378817444	巴西诺卡氏菌

[0359] 以上描述的所选硫解酶的链长选择性概述于下表。

[0360]

链长	基因	生物体
C4	atoB	大肠杆菌
C6	phaD	恶臭假单胞菌
C6-C8	bktB	富养罗尔斯通氏菌
C10-C16	Acaa1a	褐家鼠

[0361] 步骤 B. 3-氧代酰基-CoA 还原酶

[0362] 3-氧代酰基-CoA还原酶(也称为3-羟基酰基-CoA脱氢酶、3-酮酰基-CoA还原酶、 β -酮酰基-CoA还原酶、 β -羟基酰基-CoA脱氢酶、羟基酰基-CoA脱氢酶和酮酰基-CoA还原酶)催化3-氧代酰基-CoA底物还原成3-羟基酰基-CoA产物(图1B和图6B)。这些酶经常参与脂肪酸 β -氧化和芳香族降解途径。例如,在大肠杆菌中,由fadB和fadJ编码的两个脂肪酸氧化复合体的亚基,作为3-羟基酰基-CoA脱氢酶发挥功能(Binstock等人,Methods Enzymol.71 Pt C:403-411(1981))。可以利用敲除由fadR编码的负调节物来激活fadB基因产物(Sato等人,J Biosci.Bioeng 103:38-44(2007))。来自大肠杆菌的另一种3-羟基酰基-CoA脱氢酶是paaH(Ismail等人,European Journal of Biochemistry 270:3047-3054(2003))。另外的3-氧代酰基-CoA酶包括恶臭假单胞菌中的phaC(Olivera等人,Proc.Natl.Acad.Sci U.S.A 95:6419-6424(1998))和荧光假单胞菌中的paaC(Di等人,188:117-125(2007))的基因产物。这些酶在苯乙酸或苯乙烯的分解代谢期间催化3-羟基己二酰-CoA可逆性氧化成3-氧代己二酰-CoA。其它合适的酶候选者包括来自纤细裸藻(E.gracilis)的AA072312.1(Winkler等人,Plant Physiology 131:753-762(2003))和来自恶臭假单胞菌的paaC(Olivera等人,PNAS USA 95:6419-6424(1998))。催化乙酰乙酰-CoA还原成3-羟基丁酰-CoA的酶包括的丙酮丁醇梭菌(Clostridium acetobutylicum)的hbd(Youngleson等人,J Bacteriol.171:6800-6807(1989))、来自生枝动胶菌(Zoogloea ramigera)的phbB(Ploux等人,Eur.J Biochem.174:177-182(1988))、来自类球红细菌(Rhodobacter sphaeroides)的phaB(Alber等人,Mol.Microbiol 61:297-309(2006))和富养罗尔斯通氏菌(Ralstonia eutropha)的paaH1(Machado等人,Met Eng, In Press(2012))。生枝动胶菌(Z.ramigera)酶是NADPH-依赖性的并且也接受3-氧代丙酰-CoA作为底物(Ploux等人,Eur.J Biochem.174:177-182(1988))。另外的基因包括脱氮副球菌(Paracoccus denitrificans)中的phaB、克鲁维氏梭菌(Clostridium kluyveri)中的Hbd1(C-末端结构域)和Hbd2(N-末端结构域)(Hillmer和Gottschalk,Biochim. Biophys. Acta 3334:12-23(1974))和牛(Bos taurus)中的HSD17B10(Wakil等人,J Biol. Chem. 207:631-638(1954))。这种来自脱氮副球菌的酶已在大肠杆菌中进行了功能性表达和表征(Yabutani等人,FEMS Microbiol Lett. 133:85-90(1995))。许多相似的酶已在梭菌属(Clostridia)的其它菌种和在瑟杜生金属球菌(Metallosphaera sedula)中被发现(Berg等人,Science. 318:1782-1786(2007))。这种来自热带假丝酵母(Candida tropicalis)的酶是过氧化物酶体脂肪酸 β -氧化多功能酶类型2(MFE-2)的组分。这种蛋白质的脱氢酶B结构域对乙酰乙酰-CoA具有催化活性。该结构域已在大肠杆菌中进行了功能性表达,其晶体结构是可获得的,并且催化机制十分清楚明白(Ylianttila等人,Biochem Biophys Res Commun 324:25-30(2004);Ylianttila等人,J Mol Biol 358:1286-1295(2006))。接受较长酰基-CoA底物的3-羟基酰基-CoA脱氢酶(例如EC 1.1.1.35)通常参与 β -氧化。一个实例是牛中的HSD17B10(Wakil等人,J Biol. Chem. 207:631-638(1954))。猪肝脏酶优先对短链和中链酰基-CoA底物具有活性,而心脏酶选择性较低(He等人,Biochim Biophys Acta 1392:119-26(1998))。酿酒酵母酶FOX2在 β -降解途径中有活性并且也具有烯酰-CoA水合酶活性(Hiltunen等人,J Biol Chem 267:6646-6653(1992))。

[0363]

蛋白质	Genbank ID	GI 编号	生物体
fadB	P21177.2	119811	大肠杆菌
fadJ	P77399.1	3334437	大肠杆菌
paaH	NP_415913.1	16129356	大肠杆菌
Hbd2	EDK34807.1	146348271	克鲁维氏梭菌
Hbd1	EDK32512.1	146345976	克鲁维氏梭菌
phaC	NP_745425.1	26990000	恶臭假单胞菌
paaC	ABF82235.1	106636095	荧光假单胞菌
HSD17B10	002691.3	3183024	牛
phbB	P23238.1	130017	生枝动胶菌
phaB	YP_353825.1	77464321	类球红细菌
paaH1	CAJ91433.1	113525088	富养罗尔斯通氏菌
phaB	BAA08358	675524	脱氮副球菌
Hbd	NP_349314.1	15895965	丙酮丁醇梭菌
Hbd	AAM14586.1	20162442	拜氏梭菌
Msed_1423	YP_001191505	146304189	瑟杜生金属球菌
Msed_0399	YP_001190500	146303184	瑟杜生金属球菌
Msed_0389	YP_001190490	146303174	瑟杜生金属球菌
Msed_1993	YP_001192057	146304741	瑟杜生金属球菌
Fox2	Q02207	399508	热带假丝酵母
HSD17B10	002691.3	3183024	牛
HADH	NP_999496.1	47523722	牛
3HCDH	AA072312.1	29293591	纤细裸藻

FOX2	NP_012934.1	6322861	酿酒酵母
------	-------------	---------	------

[0364] 所选羟基酰基-CoA 脱氢酶的链长特异性如下所示。定向进化可提高酶对较长链底物的选择性。例如, Machado 及合作者开发了一种选择平台用于定向进化有利于较长酰基-CoA 底物的链延长酶。此研究小组使富养罗尔斯通氏菌的 paaH1 进化以达成对 3- 氧代-己酰-CoA 具有改进的活性 (Machado 等人, Met Eng, In Press(2012))。

[0365]

链长	基因	生物体
C4	hbd	丙酮丁醇梭菌
C5	phbB	生枝动胶菌
C4-C6	paaH1	富养罗尔斯通氏菌

[0366]

链长	基因	生物体
C4-C10	HADH	野猪
C4-C18	fadB	大肠杆菌

[0367] 步骤 C. 3- 羟基酰基-CoA 脱水酶

[0368] 3- 羟基酰基-CoA 脱水酶 (例如 EC 4.2.1.17, 也称为烯酰-CoA 水合酶) 催化一系列 3- 羟基酰基-CoA 底物的脱水 (Roberts 等人, Arch. Microbiol 117:99-108(1978); Agnihotri 等人, Bioorg. Med. Chem. 11:9-20(2003); Conrad 等人, J Bacteriol. 118:103-111(1974)) 并且可用于将 3- 羟基酰基-CoA 转变成烯酰-CoA (图 1C 和图 6C)。恶臭假单胞菌的 ech 基因产物催化 3- 羟基丁酰-CoA 转变成巴豆酰-CoA (Roberts 等人, Arch. Microbiol 117:99-108(1978))。这种转化也由丙酮丁醇梭菌的 crt 基因产物、克鲁维氏梭菌 (*C. kluyveri*) 的 crt1 基因产物和其它梭菌 (clostridial) 生物体催化 (Atsumi 等人, Metab Eng 10:305-311(2008); Boynton 等人, J Bacteriol. 178:3015-3024(1996); Hillmer 等人, FEBS Lett. 21:351-354(1972))。另外的烯酰-CoA 水合酶候选者是恶臭假单胞菌的 phaA 和 phaB, 和来自荧光假单胞菌 (*P. fluorescens*) 的 paaA 和 paaB (Olivera 等人, Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A 95:6419-6424(1998))。预测在沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*) 中 pimF 的基因产物编码参与庚二酰-CoA 降解的烯酰-CoA 水合酶 (Harrison 等人, Microbiology 151:727-736(2005))。最后, 多种大肠杆菌基因已显示证明烯酰-CoA 水合酶功能性, 包括 maoC (Park 等人, J Bacteriol. 185:5391-5397(2003))、paaF (Ismail 等人, Eur. J Biochem. 270:3047-3054(2003); Park 等人, Appl. Biochem. Biotechnol 113-116:335-346(2004); Park 等人, Biotechnol Bioeng 86:681-686(2004)) 和 paaG (Ismail 等人, Eur. J Biochem. 270:3047-3054(2003); Park 和 Lee, Appl. Biochem. Biotechnol 113-116:335-346(2004); Park 和 Yup, Biotechnol Bioeng

86:681-686(2004))。酿酒酵母中具有 3-羟基酰基-CoA 脱水酶活性的酶包括 PHS1 和 FOX2。

[0369]

基因	GenBank 登录号	GI 编号	生物体
ech	NP_745498.1	26990073	恶臭假单胞菌
crt	NP_349318.1	15895969	丙酮丁醇梭菌
crt1	YP_001393856	153953091	克鲁维氏梭菌
phaA	ABF82233.1	26990002	恶臭假单胞菌
phaB	ABF82234.1	26990001	恶臭假单胞菌
paaA	NP_745427.1	106636093	荧光假单胞菌
paaB	NP_745426.1	106636094	荧光假单胞菌
pimF	CAE29158.1	39650635	沼泽红假单胞菌

[0370]

maoC	NP_415905.1	16129348	大肠杆菌
paaF	NP_415911.1	16129354	大肠杆菌
paaG	NP_415912.1	16129355	大肠杆菌
FOX2	NP_012934.1	6322861	酿酒酵母
PHS1	NP_012438.1	6322364	酿酒酵母

[0371] 参与 β -氧化的烯酰-CoA 水合酶也可以用于脂肪醇、脂肪醛和脂肪酸生物合成途径。例如,拟南芥的多功能 MFP2 基因产物表现出选择性针对链长小于或等于 C14 的烯酰-CoA 还原酶活性 (Arent 等人, J Biol Chem 285:24066-77(2010))。或者, 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体,该多酶复合体表现出烯酰-CoA 水合酶活性 (Yang 等人, Biochemistry 30:6788-6795(1991); Yang, J Bacteriol. 173:7405-7406(1991); Nakahigashi 等人, Nucleic Acids Res. 18:4937(1990))。fadI 和 fadJ 基因编码类似的功能并且在厌氧条件下天然表达 (Campbell 等人, Mol. Microbiol 47:793-805(2003))。

[0372]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
MFP2	AAD18042.1	4337027	拟南芥

fadA	YP_026272.1	49176430	大肠杆菌
fadB	NP_418288.1	16131692	大肠杆菌
fadI	NP_416844.1	16130275	大肠杆菌
fadJ	NP_416843.1	16130274	大肠杆菌
fadR	NP_415705.1	16129150	大肠杆菌

[0373] 所选择的 3- 羟基酰基 -CoA 脱水酶的链长特异性如下所示。

[0374]

链长	基因	生物体
C4-C6	crt	丙酮丁醇梭菌
C4-C7	pimF	沼泽红假单胞菌
C4-C14	MFP2	拟南芥

[0375] 步骤 D. 烯酰 -CoA 还原酶

[0376] 烯酰 -CoA 还原酶 (也称为酰基 -CoA 脱氢酶、反式 -2- 烯酰 -CoA 还原酶或酰基 -CoA 氧化还原酶) 催化烯酰 -CoA 转变成酰基 -CoA (图 1 和图 6 的步骤 D)。示例性的酰基 -CoA 脱氢酶或烯酰 -CoA 还原酶 (ECR) 酶是大肠杆菌和肠道沙门氏菌的 fadE 的基因产物 (Iram 等人, J Bacteriol 188:599-608(2006))。来自丙酮丁醇梭菌的 bcd 基因产物 (Atsumi 等人, 10:305-311(2008); Boynton 等人, J Bacteriol. 178:3015-3024(1996)) 催化巴豆酰 -CoA 还原成丁酰 -CoA (EC 1.3.99.2)。这种酶在梭菌 (Clostridial species) 中参与生成丁酸的乙酰 -CoA 发酵途径 (Jones 等人, Microbiol Rev. 50:484-524(1986))。丁酰 -CoA 还原酶的活性可被表达 bcd 结合丙酮丁醇梭菌 etfAB 基因 (它编码电子传递黄素蛋白) 的表达来增强。烯酰 -CoA 还原酶步骤的另外一个候选者是来自纤细裸藻 (E. gracilis) 的烯酰 -CoA 还原酶 (EC 1.3.1.44) TER (Hoffmeister 等人, J Biol. Chem 280:4329-4338(2005))。由该序列衍生的并在去除了它的线粒体靶向前导序列之后得到的构建体在大肠杆菌中进行了克隆, 导致产生活性酶。来自原核生物齿垢密螺旋体 (Treponema denticola) 的由 TDE0597 编码的 ECR 蛋白质的近亲同源物 (close homolog), 也在大肠杆菌中进行了克隆和表达 (Tucci 等人, FEBS Lett, 581:1561-1566(2007))。酸养互养菌 (Syntrophus aciditrophicus) 中的六个基因已根据序列同源性鉴定为丙酮丁醇梭菌 bcd 基因产物。酸养互养菌 (S. aciditrophicus) 基因 syn_02637 和 syn_02636 与丙酮丁醇梭菌的 etfAB 基因携带高度序列同源性, 预测它们编码电子传递黄素蛋白的 α 亚基和 β 亚基。

[0377]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体

fadE	AAC73325.2	87081702	大肠杆菌
fadE	YP_005241256.1	379699528	肠道沙门氏菌
bcd	NP_349317.1	15895968	丙酮丁醇梭菌
etfA	NP_349315.1	15895966	丙酮丁醇梭菌
etfB	NP_349316.1	15895967	丙酮丁醇梭菌
TER	Q5EU90.1	62287512	纤细裸藻
TER	NP_612558.1	19924091	褐家鼠
TDE0597	NP_971211.1	42526113	齿垢密螺旋体
syn_02587	ABC76101	85721158	酸养互养菌
syn_02586	ABC76100	85721157	酸养互养菌
syn_01146	ABC76260	85721317	酸养互养菌
syn_00480	ABC77899	85722956	酸养互养菌
syn_02128	ABC76949	85722006	酸养互养菌
syn_01699	ABC78863	85723920	酸养互养菌
syn_02637	ABC78522.1	85723579	酸养互养菌
syn_02636	ABC78523.1	85723580	酸养互养菌

[0378] 另外的烯酰-CoA 还原酶候选酶在降解芳香族化合物的生物体中被发现。沼泽红假单胞菌 (*Rhodospseudomonas palustris*), 苯甲酸降解的一种模型生物体, 具有经由庚二酰-CoA 的 β -氧化降解庚二酸的酶促能力。pim 操纵子中的相邻基因, pimC 和 pimD, 携带与丙酮丁醇梭菌 bcd 的序列同源性并预测它们编码含有黄素 (flavin) 的庚二酰-CoA 脱氢酶 (Harrison 等人, 151:727-736 (2005))。固氮大豆共生生物 (symbiont) 日本慢生根瘤菌 (*Bradyrhizobium japonicum*) 的基因组也含有 pim 操纵子, 其由与沼泽红假单胞菌 (*R. palustris*) 的 pimC 和 pimD 具有高度序列相似性的基因组成 (Harrison 和 Harwood, *Microbiology* 151:727-736 (2005))。

[0379]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
pimC	CAE29155	39650632	沼泽红假单胞菌

pimD	CAE29154	39650631	沼泽红假单胞菌
pimC	BAC53083	27356102	日本慢生根瘤菌
pimD	BAC53082	27356101	日本慢生根瘤菌

[0380] 另外一个候选者是 2-甲基-支链烯酰-CoA 还原酶 (EC 1.3.1.52 和 EC 1.3.99.12), 一种催化空间位阻的反式-烯酰-CoA 底物还原的酶。该酶参与线虫猪蛔虫 (*Ascaris suum*) 中的支链脂肪酸合成并且能够还原各种各样的直链和支链底物, 包括 2-甲基戊酰-CoA、2-甲基丁酰-CoA、2-甲基戊酰-CoA、辛酰-CoA 和戊酰-CoA (Duran 等人, 268:22391-22396 (1993))。该酶中由基因 acad1 和 acad 编码的两个同工酶 (isoform) 已进行了表征。

[0381]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
acad1	AAC48316.1	2407655	猪蛔虫
acad	AAA16096.1	347404	猪蛔虫

[0382] 在纤细裸藻中至少存在三种线粒体烯酰-CoA 还原酶并且都可应用于本发明。纤细裸藻的三种线粒体烯酰-CoA 还原酶 (ECR1-3) 表现出不同的链长优先性 (Inui 等人, *European Journal of Biochemistry* 142:121-126 (1984)), 其对于指示所需脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸产物的链长特别有用。EST's ELL00002199、ELL00002335 和 ELL00002648 (它们全都注解为线粒体反式-2-烯酰-CoA 还原酶) 可用于通过本领域已知的方法将这些另外的烯酰-CoA 还原酶分离出来。来自大鼠肝脏微粒体的两种 ECR 酶也表现出不同的底物特异性 (Nagi 等人, *Arch Biochem Biophys* 226:50-64 (1983))。这些酶的序列迄今尚未鉴定。耻垢分枝杆菌烯酰-CoA 还原酶接受链长在 C10-C16 之间的酰基-CoA 底物 (Shimakata 等人, *J Biochem* 89:1075-80 (1981))。

[0383] 烯酰-CoA 还原酶及其链长特异性见下表。

[0384]

链长	基因	生物体
C4-C6	ECR1	纤细裸藻
C6-C8	ECR3	纤细裸藻

[0385]

链长	基因	生物体
C8-10	ECR2	纤细裸藻
C8-C16	长链 ECR	褐家鼠

C10-C16	ECR	耻垢分枝杆菌
C2-C18	fadE	肠道沙门氏菌

[0386] 步骤 E. 酰基 -CoA 还原酶 (醛形成)

[0387] 酰基 -CoA 还原成脂肪醇由表现出酰基 -CoA 还原酶和醇脱氢酶活性的单种酶或一对酶催化。将酰基 -CoA 还原成其相应的醛的酰基 -CoA 脱氢酶包括脂肪酰 -CoA 还原酶 (EC 1.2.1.42, 1.2.1.50)、琥珀酰 -CoA 还原酶 (EC 1.2.1.76)、乙酰 -CoA 还原酶、丁酰 -CoA 还原酶和丙酰 -CoA 还原酶 (EC 1.2.1.3)。经证明对酰基 -CoA、3-羟基酰基 -CoA 和 3-氧代酰基 -CoA 底物具有活性的形成醛的酰基 -CoA 还原酶在文献中是已知的。若干酰基 -CoA 还原酶对 3-羟基酰基 -CoA 底物具有活性。例如,一些来自梭菌属 (Clostridial) 生物体的丁酰 -CoA 还原酶对 3-羟基丁酰 -CoA 具有活性,而来自罗伊氏乳杆菌 (*L. reuteri*) 的丙酰 -CoA 还原酶对 3-羟基丙酰 -CoA 具有活性。将 3-氧代酰基 -CoA 底物转变成它们的相应醛的酶是丙二酰 -CoA 还原酶。在这一类别中证明对烯酰 -CoA 底物具有活性的酶迄今尚未鉴定。对特定底物的特异性可采用本领域已知的进化或酶工程方法来完善。

[0388] 示例性的脂肪酰 -CoA 还原酶由醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*) (Reiser, *Journal of Bacteriology* 179:2969-2975(1997)) 和不动杆菌 M-1 (*Acinetobacter* sp. M-1) (Ishige 等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1192-1195(2002)) 的 *acr1* 编码。来自结核分枝杆菌的两种基因产物接受长度 C16-C18 的较长链脂肪酰 -CoA 底物 (Harminder Singh, *U. Central Florida* (2007))。又一种脂肪酰 -CoA 还原酶是明亮发光杆菌 (*Photobacterium phosphoreum*) 的 *LuxC* (Lee 等人, *Biochim Biohys Acta* 1388:215-22(1997))。具有琥珀酰 -CoA 还原酶活性的酶由克鲁维氏梭菌 (*Clostridium kluveri*) 的 *sucD* (Sohling, *J. Bacteriol.* 178:871-880(1996)) 和牙龈卟啉单胞菌 (*P. gingivalis*) 的 *sucD* (Takahashi, *J. Bacteriol* 182:4704-4710(2000)) 编码。另外的琥珀酰 -CoA 还原酶参与了嗜热古细菌 (thermophilic archaea) 包括瑟杜生金属球菌 (*Metallosphaera sedula*) (Berg 等人, *Science* 318:1782-1786(2007)) 和嗜中性热变形菌 (*Thermoproteus neutrophilus*) (Ramos-Vera 等人, *J Bacteriol*, 191:4286-4297(2009)) 的 3-羟基丙酸 /4-羟基丁酸循环。瑟杜生金属球菌 (*M. sedula*) 酶,由 *Msed_0709* 编码,是严格地依赖 NADPH 的并且也具有丙二酰 -CoA 还原酶活性。嗜中性热变形菌 (*T. neutrophilus*) 酶对 NADPH 和 NADH 二者均具有活性。在假单胞菌 (*Pseudomonas* sp) 中,由 *bphG* 编码的酶—酰基化乙醛脱氢酶是又一种乙醛脱氢酶,已经证明该酶将乙醛、丙醛、丁醛、异丁醛和甲醛氧化和酰化 (Powlowski, *J. Bacteriol.* 175:377-385(1993))。除将乙酰 -CoA 还原成乙醇以外,由肠系膜样明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 中的 *adhE* 编码的酶已显示将支链化合物异丁醛氧化成异丁酰 -CoA (Kazahaya, *J. Gen. Appl. Microbiol.* 18:43-55(1972); 和 Koo 等人, *Biotechnol Lett.* 27:505-510(2005))。在产溶剂生物体 (solventogenic organism) 例如糖乙酸多丁醇梭菌 (*Clostridium saccharoperbutylacetonicum*) 中,丁醛脱氢酶催化类似的反应,即使丁酰 -CoA 转变成丁醛 (Kosaka 等人, *Biosci Biotechnol Biochem.*, 71:58-68(2007))。示例性的丙酰 -CoA 还原酶包括鼠伤寒沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) LT2 的 *pduP* (Leal, *Arch. Microbiol.* 180:353-361(2003)) 和来自大肠杆菌的 *eutE* (Skraly, WO

Patent No. 2004/024876)。鼠伤寒沙门氏菌 LT2 的丙酰 -CoA 还原酶, 它天然地将丙酰 -CoA 转变成丙醛, 也催化 5- 羟基戊酰 -CoA 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 具有宽的底物范围, 包括丁醛、戊醛和 3- 羟基丙醛 (Luo 等人, *Appl Microbiol Biotech*, 89:697-703 (2011))。另外, 一些酰基 -ACP 还原酶例如细长聚球藻 PCC7942 的 orf1594 基因产物也表现出形成醛的酰基 -CoA 还原酶活性 (Schirmer 等人, *Science*, 329:559-62 (2010))。酰基 -ACP 还原酶和同源物在实施例 IX 中有进一步详细描述。

[0389]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
acr1	YP_047869.1	50086359	醋酸钙不动杆菌
acr1	AAC45217	1684886	贝氏不动杆菌
acr1	BAB85476.1	18857901	不动杆菌菌株 M-1
Rv1543	NP_216059.1	15608681	结核分枝杆菌
Rv3391	NP_217908.1	15610527	结核分枝杆菌
LuxC	AAT00788.1	46561111	明亮发光杆菌
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	瑟杜生金属球菌
Tneu_0421	ACB39369.1	170934108	嗜中性热变形菌
sucD	P38947.1	172046062	克鲁维氏梭菌
sucD	NP_904963.1	34540484	牙龈卟啉单胞菌
bphG	BAA03892.1	425213	假单胞菌
adhE	AAV66076.1	55818563	肠系膜样明串珠菌
bld	AAP42563.1	31075383	糖乙酸多丁醇梭菌
pduP	NP_460996	16765381	鼠伤寒沙门氏菌 LT2
eutE	NP_416950	16130380	大肠杆菌

[0390]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
pduP	CCC03595.1	337728491	罗伊氏乳杆菌

[0391] 将酰基 -CoA 转变成它的相应醛的另外一种酶类型是丙二酰 -CoA 还原酶, 丙二

酰-CoA 还原酶将丙二酰-CoA 转化成丙二酸半醛。丙二酰-CoA 还原酶是嗜热嗜酸古细菌 (thermoacidophilic archaeal bacteria) 中经由 3- 羟基丙酸循环的自养生物的碳固定 (autotrophic carbon fixation) 的一种关键酶 (Berg, Science 318:1782-1786(2007) ; 和 Thauer, Science 318:1732-1733(2007))。该酶利用 NADPH 作为辅因子并且已在金属球菌属 (Metallosphaera) 和硫化叶菌 (Sulfolobus sp.) 中进行了表征 (Alber 等人, J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006) ; 和 Hugler, J. Bacteriol. 184:2404-2410(2002))。该酶在瑟杜生金属球菌 (Metallosphaera sedula) 中由 Msed_0709 编码 (Alber 等人, J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006) ; 和 Berg, Science 318:1782-1786(2007))。将来自托氏硫化叶菌 (Sulfolobus tokodaii) 的编码丙二酰-CoA 还原酶的基因在大肠杆菌 (E. coli) 中进行了克隆和异源性表达 (Alber 等人, J. Bacteriol. 188:8551-8559(2006))。该酶也已显示催化将甲基丙二酰-CoA 转变成它的相应醛 (WO2007141208(2007))。虽然这些酶的醛脱氢酶功能性类似于来自橙色绿屈挠菌 (Chloroflexus aurantiacus) 的双功能脱氢酶, 但是有很小的序列相似性。两种候选的丙二酰-CoA 还原酶与天冬氨酸-半醛脱氢酶 (一种催化天冬氨酸-4-磷酸还原成天冬氨酸半醛并且使其同时脱磷酸的酶) 具有高度序列相似性, 另外的候选基因可以在其它生物体 (包括硫磺矿硫化叶菌 (Sulfolobus solfataricus) 和嗜酸热硫化叶菌 (Sulfolobus acidocaldarius)) 中通过与蛋白质的序列同源性而被发现并且在下文列出。针对 CoA- 酰基化醛脱氢酶的又一个候选者是来自拜氏梭菌 (Clostridium beijerinckii) 的 ald 基因 (Toth, Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980(1999))。据报道, 该酶使乙酰-CoA 和丁酰-CoA 还原成它们的相应醛。这个基因与编码鼠伤寒沙门氏菌 (Salmonella typhimurium) 和大肠杆菌 (E. coli) 的乙醛脱氢酶的 eutE 非常类似 (Toth, Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980(1999))。

[0392]

基因	GenBank ID	GI 编号	生物体
Msed_0709	YP_001190808.1	146303492	瑟杜生金属球菌
mcr	NP_378167.1	15922498	托氏硫化叶菌
asd-2	NP_343563.1	15898958	硫磺矿硫化叶菌
Saci_2370	YP_256941.1	70608071	嗜酸热硫化叶菌
Ald	AAT66436	49473535	拜氏梭菌
eutE	AAA80209	687645	鼠伤寒沙门氏菌

[0393]

基因	GenBank ID	GI 编号	生物体
eutE	NP_416950	16130380	大肠杆菌

[0394] 所选择的形成醛的酰基-CoA 还原酶的链长特异性范围见下表。

[0395]

链长	基因	生物体
C2-C4	bphG	假单胞菌
C4	Bld	糖乙酸多丁醇梭菌
C12-C20	ACR	醋酸钙不动杆菌
C14-C18	Acr1	不动杆菌菌株 M-1
C16-C18	Rv1543, Rv3391	结核分枝杆菌

[0396] 步骤 G. 酰基 -CoA 还原酶 (醇形成)

[0397] 双功能形成醇的酰基 -CoA 还原酶催化图 1 和图 6 的步骤 G (即步骤 E 和 F)。具有这种活性的酶包括大肠杆菌的 adhE (Kessler 等人, FEBS. Lett. 281:59-63(1991)) 和丙酮丁醇梭菌的 adhE2 (Fontaine 等人, J. Bacteriol. 184:821-830(2002))。大肠杆菌酶对 C2 底物有活性, 而丙酮丁醇梭菌酶具有跨越 C2-C8 的宽底物范围 (Dekishima 等人, J Am Chem Soc 133:11399-11401(2011))。由 bdh I 和 bdh II 编码的丙酮丁醇梭菌酶 (Walter 等人, J. Bacteriol. 174:7149-7158(1992)) 将乙酰 -CoA 和丁酰 -CoA 分别还原成乙醇和丁醇。来自肠系膜样明串珠菌 (*Leuconostoc mesenteroides*) 的 adhE 基因产物对乙酰 -CoA 和异丁酰 -CoA 有活性 (Kazahaya 等人, J. Gen. Appl. Microbiol. 18:43-55(1972); Koo 等人, Biotechnol Lett, 27:505-510(2005))。其它生物体包括卡氏玫瑰弯菌 (*Roseiflexus castenholzii*)、赤杆菌 (*Erythrobacter* sp.) NAP1 和海洋 γ 变型杆菌 (marine gamma proteobacterium) HTCC2080 中的候选酶可以通过序列相似性进行推断。较长链酰基 -CoA 分子可以通过例如编码醇 - 形成脂肪酰基 -CoA 还原酶的霍霍巴 (*Simmondsia chinensis*) FAR 等酶被还原成它们的相应醇。它在大肠杆菌中的过量表达导致 FAR 活性和 C16-C18 脂肪醇的累积 (Metz 等人, Plant Physiol, 122:635-644(2000))。拟南芥中的 FAR 酶包括 At3g11980 和 At3g44560 的基因产物 (Doan 等人, J Plant Physiol 166(2006))。双功能原核 FAR 酶在水油海杆菌 VT8 (Hofvander 等人, FEBS Lett 3538-43(2011))、栖藻海杆菌 (*Marinobacter algicola*) 和海洋杆菌属 (*Oceanobacter*) 菌株 RED65 (美国专利申请 20110000125) 中被发现。其它合适的酶包括来自家蚕 (*Bombyx mori*) 的 bfar、来自小家鼠的 mfar1 和 mfar2; 来自小家鼠的 mfar2; 来自不动杆菌 M1 的 acrM1; 和来自智人 (*H. sapiens*) 的 hfar。

[0398]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
adhE	NP_415757.1	16129202	大肠杆菌
adhE2	AAK09379.1	12958626	丙酮丁醇梭菌
bdh I	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌

bdh II	NP_349891.1	15896542	丙酮丁醇梭菌
adhE	AAV66076.1	55818563	肠系膜样明串珠菌
mcr	AAS20429.1	42561982	橙色绿屈挠菌
Rcas_2929	YP_001433009.1	156742880	卡氏玫瑰弯菌
NAP1_02720	ZP_01039179.1	85708113	赤杆菌 NAP1
MGP2080_00535	ZP_01626393.1	119504313	海洋 γ 变型杆菌 HTCC2080
FAR	AAD38039.1	5020215	霍霍巴
At3g11980	NP_191229.1	15228993	拟南芥
At3g44560	NP_190042.2	145339120	拟南芥
FAR	YP_959486.1	120555135	水油海杆菌
bfar	Q8R079	81901336	家蚕

[0399] 所选择的形成醇的酰基 -CoA 还原酶的链长特异性范围见下表。

[0400]

链长	基因	生物体
C2	adhE	大肠杆菌
C2-C8	adhe2	丙酮丁醇梭菌
C14-C16	At3g11980	拟南芥
C16	At3g44560	拟南芥
C16-C18	FAR	霍霍巴
C14-C18	FAR	水油海杆菌

[0401] 步骤 F. 脂肪醛还原酶

[0402] 编码催化醛转变成醇的酶(即,醇脱氢酶或等同于醛还原酶)的示例性基因包括编码 C2-C14 的中链醇脱氢酶的 alrA(Tani 等人, Appl. Environ. Microbiol. 66:5231-5235(2000))、来自大肠杆菌的 yqhD 和 fucO(Sulzenbacher 等人, 342:489-502(2004)) 和来自丙酮丁醇梭菌 (*C. acetobutylicum*) 的 bdh I 和 bdh II(它使丁醛转变成丁醇)(Walter 等人, J Bacteriol 174:7149-7158(1992))。alrA 基因产物显示对长于 C14 的醛无活性并且有利于还原方向(Tani 等人, 同上)。YqhD 使用 NADPH 作为辅因子催化多种醛的还原, 其中链长度比 C(3) 长的优

先 (Sulzenbacher 等人, J Mol Biol 342:489-502(2004); Perez 等人, J Biol. Chem. 283:7346-7353(2008))。已经证明来自运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 的 adhA 基因产物对包括甲醛、乙醛、丙醛、丁醛和丙烯醛在内的多种醛具有活性 (Kinoshita 等人, Appl Microbiol Biotechnol 22:249-254(1985))。另外的候选醛还原酶由糖乙酸多丁醇梭菌 (*C. saccharoperbutylacetonicum*) 中的 bdh 和拜氏梭菌 (*C. Beijerinckii*) 中的 Cbei_1722、Cbei_2181 和 Cbei_2421 编码。来自雷弗森菌 S749 的醇脱氢酶显示对长度 C6-C7 的中等链长底物有最大活性 (Inoue 等人, AEM 71:3633-3641(2005))。恶臭假单胞菌的 adh 基因产物对长度 C3-C10 的底物有活性 (Nagashima 等人, J Ferment Bioeng 82:328-33(1996))。嗜热脱氮土芽孢杆菌 (*Geobacillus thermodenitrificans*) 的醇脱氢酶 ADH1 和 ADH2 将长达 C30 链长的醇氧化 (Liu 等人, Physiol Biochem 155:2078-85(2009))。

[0403]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
alrA	BAB12273.1	9967138	不动杆菌菌株 M-1
ADH2	NP_014032.1	6323961	酿酒酵母
yqhD	NP_417484.1	16130909	大肠杆菌
fucO	NP_417279.1	16130706	大肠杆菌
bdh I	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌
bdh II	NP_349891.1	15896542	丙酮丁醇梭菌
adhA	YP_162971.1	56552132	运动发酵单胞菌
bdh	BAF45463.1	124221917	糖乙酸多丁醇梭菌
Cbei_1722	YP_001308850	150016596	拜氏梭菌
Cbei_2181	YP_001309304	150017050	拜氏梭菌
Cbei_2421	YP_001309535	150017281	拜氏梭菌
lsadh	BAD99642.1	67625613	雷弗森菌 S749
adh			恶臭假单胞菌

[0404] 天然醇脱氢酶也将醛底物转变成醇产物。迄今为止, ADHI-ADHVII 等七种醇脱氢酶在酿酒酵母中已有报道 (de Smidt 等人, FEMS Yeast Res 8:967-78(2008))。ADH1 (GI:1419926) 是负责在细胞溶质中在厌氧条件下将乙醛还原成乙醇的关键酶。在乳酸克鲁维酵母中, 两种 NAD- 依赖性细胞溶质醇脱氢酶进行了鉴定和表征。这些基因也显示对

其它脂族醇有活性。基因 ADH1 (GI:113358) 和 ADHII (GI:51704293) 优先在葡萄糖生长细胞中表达 (Bozzi 等人, Biochim Biophys Acta 1339:133-142(1997))。细胞溶质醇脱氢酶由白色假丝酵母中的 ADH1 (GI:608690)、粟酒裂殖酵母中的 ADH1 (GI:3810864)、解脂耶氏酵母中的 ADH1 (GI:5802617)、树干毕赤酵母或树干谢尔壶菌中的 ADH1 (GI:2114038) 和 ADHII (GI:2143328) 编码 (Passoth 等人, 酵母 14:1311-23(1998))。候选醇脱氢酶见下表。

[0405]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
SADH	BAA24528.1	2815409	近平滑假丝酵母

[0406]

ADH1	NP_014555.1	6324486	酿酒酵母 s288c
ADH2	NP_014032.1	6323961	酿酒酵母 s288c
ADH3	NP_013800.1	6323729	酿酒酵母 s288c
ADH4	NP_011258.2	269970305	酿酒酵母 s288c
ADH5 (SFA1)	NP_010113.1	6320033	酿酒酵母 s288c
ADH6	NP_014051.1	6323980	酿酒酵母 s288c
ADH7	NP_010030.1	6319949	酿酒酵母 s288c
adhP	CAA44614.1	2810	乳酸克鲁维酵母
ADH1	P20369.1	113358	乳酸克鲁维酵母
ADH2	CAA45739.1	2833	乳酸克鲁维酵母
ADH3	P49384.2	51704294	乳酸克鲁维酵母
ADH1	YP_001126968.1	138896515	嗜热脱氮土芽孢杆菌
ADH2	YP_001125863.1	138895410	嗜热脱氮土芽孢杆菌

[0407] 所选醇脱氢酶的底物特异性范围见下表。

[0408]

链长	基因	生物体
C6-C7	lsadh	雷弗森菌 S749
C2-C8	yqhD	大肠杆菌

C3-C10	Adh	恶臭假单胞菌
C2-C14	alrA	不动杆菌菌株 M-1
C2-C30	ADH1	嗜热脱氨土芽孢杆菌

[0409] 步骤 0. 延长酶

[0410] 延长酶 (ELO) 酶利用丙二酰 -CoA 将 C2 单元添加到生长中的酰基 -CoA 链上。这个过程也涉及脱羧并因此基本上不可逆。已知布氏锥虫 (一种真核人类寄生虫) 使用延长酶系统产生长链脂肪酸。该过程由丁酰 -CoA 引发。具体地说, ELO 系统使生长脂肪酸链酯化成 CoA 中间体而不是 ACP 中间体, 如细菌和其它微生物对应物 (counterparts) (Lee 等人, Cell 126, 691-699, 2006 ; Cronan, Cell, 126, 2006)。这与典型细菌脂肪酸延长形成对比, 典型细菌脂肪酸延长在自丙二酰 -ACP 形成乙酰乙酰基酰基 -ACP 之后引发。迄今为止, 在布氏锥虫 (*T. brucei*) 中发现了与其动物对应物同源的四种 ELO (由 EL01 - 4 编码) (Lee 等人, Nature Reviews Microbiology, 第 5 卷, 287-297, 2007)。EL01 - 3 一起造成至多链长 C18 的饱和脂肪酸的合成。EL01 将 C4 转变成 C10, EL02 将链长自 C10 延长至肉豆蔻酸 (C14), EL03 将肉豆蔻酸延长至 C18。在 ELO 特异性方面存在一些重叠; 例如, EL01 可将 C10 引物延长至 C12, 尽管活性低。EL04 是对多不饱和脂肪酸 (PUFAs) 有特异性的 ELO 的一个实例。它将花生四烯酸 (C20:4) 延长两个碳原子。几种另外的 ELO 酶可通过序列同源性发现 (参见 Lee 等人, Nature Reviews Microbiology, 第 5 卷, 287-297, 2007)。

[0411] 延长酶在包括线粒体、内质网、脂蛋白体和过氧化物酶体在内的几种区室中被发现。例如, 一些酵母 (例如酿酒酵母) 能够通过接受外源或内源酰基 -CoA 底物的线粒体延长酶合成链长 C16 和 C16 以上的长链脂肪酸 (Bessoule 等人, FEBS Lett 214:158-162(1987))。这个系统需要 ATP 以达成活性。内质网也具有延长酶系统以自不同长度的酰基 -CoA 底物合成极长链脂肪酸 (C18+) (Kohlwein 等人, Mol Cell Biol 21:109-25(2001))。参与该系统的基因包括 TSC13、EL02 和 EL03。EL01 催化 C12 酰基 -CoA 延长至 C16-C18 脂肪酸。

[0412]

蛋白质	登录 #	GI 编号	生物体
EL02	NP_009963.1	6319882	酿酒酵母
EL03	NP_013476.3	398366027	酿酒酵母
TSC13	NP_010269.1	6320189	酿酒酵母
EL01	NP_012339.1	6322265	酿酒酵母
EL01	AAX70671.1	62176566	布氏锥虫
EL02	AAX70672.1	62176567	布氏锥虫
EL03	AAX70673.1	62176568	布氏锥虫

ELO4	AAX70768.1	62176665	布氏锥虫
ELO4	AAX69821.1	62175690	布氏锥虫

[0413] 本领域技术人员也可通过使用来自可获得来源的已知序列克隆来获得编码任何或所有丙二酰-CoA 非依赖性 FAS 途径或酰基-还原途径酶的核酸。例如,丙二酰-CoA 非依赖性 FAS 途径的任何或所有编码核酸可以使用本领域众所周知的方法从纤细裸藻容易获得,因为该途径在这种生物体中充分表征。纤细裸藻编码核酸可以使用已知序列的探针从例如纤细裸藻 cDNA 文库中分离。探针可以设计具有全部或部分来自以下 EST 序列的 DNA 序列,来自公共可获得的序列数据库 TBestDB(<http://tbestdb.bcm.umontreal.ca>)。可以将由这个过程产生的核酸插入到适当的表达载体中并转化到大肠杆菌或其它微生物中以产生本发明的产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生物体。

[0414] 硫解酶 (图 1A): ELL00002550, ELL00002493, ELL00000789

[0415] 3-羟基酰基-CoA 脱氢酶 (图 1B): ELL00000206, ELL00002419, ELL00006286, ELL00006656

[0416] 烯酰-CoA 水合酶 (图 1C): ELL00005926, ELL00001952, ELL00002235, ELL00006206

[0417] 烯酰-CoA 还原酶 (图 1D): ELL00002199, ELL00002335, ELL00002648

[0418] 酰基-CoA 还原酶 (图 1E; 1E/F): ELL00002572, ELL00002581, ELL00000108

[0419] 或者,以上 EST 序列可用于通过 BLAST 检索鉴别 GenBank 中的同源多肽。所得同源多肽及其相应基因序列提供另外的编码核酸用于转化到大肠杆菌或其它微生物中以产生本发明的产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的生物体。下面列举的是适用于本发明的非天然存在的生物体的示例性同源多肽及其在 GenBank 中的基因登录号。

[0420] 酮酰基-CoA 酰基转移酶 (或酮酰基-CoA 硫解酶)

[0421]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
Do1e_2160	YP_001530041	158522171	食油脱硫球菌 Hxd3
Da1kDRAFT_1939	ZP_02133627	163726110	食烯烴脱硫杆菌 AK-01
BSG1_09488	ZP_01860900	149182424	芽孢杆菌种 SG-1

[0422] 3-羟基酰基-CoA 脱氢酶

[0423]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
AaeL_AAEL002841	XP_001655993	157132312	埃及伊蚊
hadh	NP_001011073	58331907	热带爪蟾

hadh	NP_001003515	51011113	斑马鱼
------	--------------	----------	-----

[0424] 烯酰 -CoA 水合酶

[0425]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
Tb927. 3. 4850	XP_844077	72387305	布氏锥虫
Tc00. 1047053509701. 10	XP_802711	71399112	克氏锥虫菌株 CL Brener
PputGB1_3629	YP_001669856	167034625	恶臭假单胞菌 GB-1

[0426] 烯酰 -CoA 还原酶

[0427]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
mecr	XP_642118	66816217	盘基网柄菌 AX4
NEMVEDRAFT_v1g228294	XP_001639469	156402181	星状海葵
AaeL_AAEL003995	XP_001648220	157104018	埃及伊蚊

[0428] 除了以上示例性的编码核酸以外,也可以将除本发明的 MI-FAE 循环、MD-FAE 和 / 或终止途径内的核酸以外的核酸导入宿主生物中用于进一步生产脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。例如,富养罗尔斯通氏菌 BktB 和 PhbB 基因催化丁酰 -CoA 和乙酰 -CoA 的缩合以形成 β -酮基 - 己酰 -CoA 以及 β -酮基 - 己酰 -CoA 还原成 3- 羟基 - 己酰 -CoA (Fukui 等人, *Biomacromolecules* 3:618-624(2002))。为了改进脂肪醇的生产,可以在所关注生产宿主中表达编码这些特异性酶的外源 DNA 序列。此外,以上描述的酶可以经受定向进化以产生这些酶中具有高活性和高底物特异性的改进形式。类似的方法也可以与本发明的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产途径中的任何或所有其它酶促步骤一起使用以例如改进酶促活性和 / 或特异性和 / 或以产生一种或多种预定链长的脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸。

[0429] 实施例 II

[0430] 自细胞溶质丙酮酸生产细胞溶质乙酰 -CoA 的途径

[0431] 以下实施例描述了如图 2 中所示的将细胞溶质丙酮酸和苏氨酸转变成细胞溶质乙酰 -CoA 的示例性途径。

[0432] 将细胞溶质丙酮酸和苏氨酸转变成细胞溶质乙酰 -CoA 的途径可使得能够采用来源于乙酰 -CoA 的细胞溶质脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产途径。用于将细胞溶质丙酮酸转变成细胞溶质乙酰 -CoA 的几种途径示于图 2。丙酮酸直接转变成乙酰 -CoA 可以由丙酮酸脱氢酶、丙酮酸甲酸裂合酶、丙酮酸 :NAD(P) 氧化还原酶或丙酮酸 : 铁氧还蛋白氧化还原酶催化。如果利用丙酮酸甲酸裂合酶,则甲酸副产物可通过甲酸脱氢酶或甲酸氢裂合酶进一步转变成 CO_2 。

[0433] 丙酮酸间接转变成乙酰 -CoA 可通过几个替代路径进行。丙酮酸可以通过丙酮酸

脱羧酶转变成乙醛。乙醛然后可以通过酰基化 (CoA- 依赖性) 乙醛脱氢酶转变成乙酰 -CoA。或者, 由丙酮酸脱羧酶产生的乙醛可以通过“PDH 旁路”途径转变成乙酰 -CoA。在这个途径中, 乙醛通过乙醛脱氢酶氧化成乙酸, 乙酸然后通过 CoA 连接酶、合成酶或转移酶转变成乙酰 -CoA。在另一个实施方案中, 乙酸中间体通过乙酸激酶转变成乙酰 - 磷酸, 乙酰 - 磷酸然后通过磷酸转乙酰酶转变成乙酰 -CoA。在又一个实施方案中, 丙酮酸通过丙酮酸氧化酶 (乙酰 - 磷酸形成) 直接转变成乙酰 - 磷酸。丙酮酸转变成乙酸也由乙酸形成丙酮酸氧化酶催化。

[0434] 细胞溶质乙酰 -CoA 也可以通过表达天然或异源苏氨酸醛缩酶自苏氨酸合成 (图 5J) (van Maris 等人, AEM 69:2094-9(2003))。苏氨酸醛缩酶将苏氨酸转变成乙醛和甘氨酸。乙醛产物随后通过以上描述的各种途径转变成乙酰 -CoA。

[0435] 下文描述了图 2 中所示的用于形成乙酰 -CoA 的酶的候选基因。

[0436] 丙酮酸氧化酶 (乙酸形成) (图 2A) 或丙酮酸 : 醌氧化还原酶 (PQO) 可使用泛醌 (EC 1.2.5.1) 或醌 (EC 1.2.2.1) 作为电子受体催化丙酮酸氧化脱羧生成乙酸。大肠杆菌酶 PoxB 定位于内膜上 (Abdel-Hamid 等人, Microbiol 147:1483-98(2001))。该酶具有硫胺焦磷酸和黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD) 辅因子 (Koland 和 Gennis, Biochemistry 21:4438-4442(1982)); O'Brien 等人, Biochemistry 16:3105-3109(1977); O'Brien 和 Gennis, J. Biol. Chem. 255:3302-3307(1980))。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。谷氨酸棒杆菌的 pgo 转录物编码醌依赖性和乙酸形成丙酮酸氧化还原酶 (Schreiner 等人, J Bacteriol 188:1341-50(2006))。相似的酶可以通过序列同源性推断。

[0437]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
poxB	NP_415392.1	16128839	大肠杆菌
pgo	YP_226851.1	62391449	谷氨酸棒杆菌
poxB	YP_309835.1	74311416	索氏志贺氏菌
poxB	ZP_03065403.1	194433121	痢疾志贺氏菌

[0438] 乙酸酰基化生成乙酰 -CoA (图 2B) 可以由具有乙酰 -CoA 合成酶、连接酶或转移酶活性的酶催化。可催化这一反应的两种酶是 AMP 形成乙酰 -CoA 合成酶或连接酶 (EC 6.2.1.1) 和 ADP 形成乙酰 -CoA 合成酶 (EC 6.2.1.13)。AMP 形成乙酰 -CoA 合成酶 (ACS) 是将乙酸活化生成乙酰 -CoA 的主要酶。示例性的 ACS 酶在大肠杆菌 (Brown 等人, J. Gen. Microbiol. 102:327-336(1977))、富养罗尔斯通氏菌 (Priefert 和 Steinbuchel, J. Bacteriol. 174:6590-6599(1992))、热自养甲烷热杆菌 (Ingram-Smith 和 Smith, Archaea 2:95-107(2007))、肠道沙门氏菌 (Gulick 等人, Biochemistry 42:2866-2873(2003)) 和酿酒酵母 (Jogl 和 Tong, Biochemistry 43:1425-1431(2004)) 中被发现。ADP 形成乙酰 -CoA 合成酶是一般具有宽的底物范围的可逆酶 (Musfeldt 和 Schonheit, J. Bacteriol. 184:636-644(2002))。ADP 形成乙酰 -CoA 合成酶的两种同工酶在闪烁古生

球菌基因组中由 AF1211 和 AF1983 编码 (Musfeldt 和 Schonheit, 同上 (2002))。来自死海盐盒菌的酶 (注解为琥珀酰 -CoA 合成酶) 也接受乙酸作为底物且该酶的可逆性被证明 (Brasen 和 Schonheit, Arch. Microbiol. 182:277-287 (2004))。来自超嗜热泉古生菌 (hyperthermophilic crenarchaeon) 需氧热棒菌 (*Pyrobaculum aerophilum*) 的由 PAE3250 编码的 ACD 显示出所有被表征 ACD 的最宽的底物范围, 与乙酸、异丁酰 -CoA (优选的底物) 和苯基乙酰 -CoA 反应 (Brasen 和 Schonheit, 同上 (2004))。可使用定向进化或工程改造来对该酶进行修饰以在宿主生物的生理温度下操作。来自闪烁古生球菌 (*A. fulgidus*)、死海盐盒菌 (*H. marismortui*) 和需氧热棒菌 (*P. aerophilum*) 的酶已全部在大肠杆菌中进行了克隆、功能性表达和表征 (Brasen 和 Schonheit, 同上 (2004); Musfeldt 和 Schonheit, 同上 (2002))。另外一个候选者是由大肠杆菌中的 *sucCD* 编码的琥珀酰 -CoA 合成酶 (Buck 等人, Biochemistry 24:6245-6252 (1985)) 和来自恶臭假单胞菌的酰基 -CoA 连接酶 (Fernandez-Valverde 等人, Appl. Environ. Microbiol. 59:1149-1154 (1993))。以上提及的蛋白质如下所示。

[0439]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
acs	AAC77039.1	1790505	大肠杆菌
acoE	AAA21945.1	141890	富养罗尔斯通氏菌
acs1	ABC87079.1	86169671	热自养甲烷热杆菌
acs1	AAL23099.1	16422835	肠道沙门氏菌
ACS1	Q01574.2	257050994	酿酒酵母
AF1211	NP_070039.1	11498810	闪烁古生球菌
AF1983	NP_070807.1	11499565	闪烁古生球菌
scs	YP_135572.1	55377722	死海盐盒菌
PAE3250	NP_560604.1	18313937	好氧火棒菌菌株 IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	大肠杆菌
sucD	AAC73823.1	1786949	大肠杆菌
paaF	AAC24333.2	22711873	恶臭假单胞菌

[0440] 乙酸酰基化生成乙酰 -CoA 也可以由 CoA 转移酶催化 (图 2B)。众多酶使用乙酸作为 CoA 受体, 导致乙酰 -CoA 的形成。示例性的 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 (Korolev 等人, Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 58:2116-2121 (2002); Vanderwinkel 等人, 33:902-908 (1968))。

这种酶具有宽的底物范围 (Sramek 等人, Arch Biochem Biophys 171:14-26(1975)) 并且已显示将 CoA 部分自多种支链和直链酰基-CoA 底物转移至乙酸, 该底物包括异丁酸 (Matthies 等人, Appl Environ. Microbiol 58:1435-1439(1992))、戊酸 (Vanderwinkel 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908(1968)) 和 丁 酸 (Vanderwinkel 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 33:902-908(1968))。相似的酶存在于谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 (Duncan 等人, 68:5186-5190(2002))、丙酮丁醇梭菌 (Cary 等人, Appl Environ Microbiol 56:1576-1583(1990); Wiesenborn 等人, Appl Environ Microbiol 55:323-329(1989)) 和糖乙酸多丁醇梭菌 (Kosaka 等人, Biosci. Biotechnol Biochem. 71:58-68(2007)) 中。

[0441]

基因	GI#	登录号	生物体
atoA	2492994	P76459.1	大肠杆菌
atoD	2492990	P76458.1	大肠杆菌
actA	62391407	YP_226809.1	谷氨酸棒杆菌
cg0592	62389399	YP_224801.1	谷氨酸棒杆菌
ctfA	15004866	NP_149326.1	丙酮丁醇梭菌
ctfB	15004867	NP_149327.1	丙酮丁醇梭菌
ctfA	31075384	AAP42564.1	糖乙酸多丁醇梭菌
ctfB	31075385	AAP42565.1	糖乙酸多丁醇梭菌

[0442] 乙酸激酶 (EC 2.7.2.1) 可催化乙酸可逆性 ATP- 依赖性磷酸化生成乙酰磷酸 (图 2C)。示例性的乙酸激酶已经在包括大肠杆菌、丙酮丁醇梭菌和嗜热甲烷八叠球菌在内的许多生物体中表征 (Ingram-Smith 等人, J. Bacteriol. 187:2386-2394(2005); Fox 和 Roseman, J. Biol. Chem. 261:13487-13497(1986); Winzer 等人, Microbiol 143(Pt 10):3279-3286(1997))。乙酸激酶活性也在大肠杆菌 purT 的基因产物中得到了证明 (Marolewski 等人, Biochemistry 33:2531-2537(1994))。一些丁酸激酶 (EC 2.7.2.7), 例如来自丙酮丁醇梭菌的 buk1 和 buk2, 也接受乙酸作为底物 (Hartmanis, M. G., J. Biol. Chem. 262:617-621(1987))。同源物存在于包括肠道沙门氏菌和莱茵衣藻在内的若干其它生物体中。

[0443]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
ackA	NP_416799.1	16130231	大肠杆菌

Ack	AAB18301.1	1491790	丙酮丁醇梭菌
Ack	AAA72042.1	349834	嗜热甲烷八叠球菌
purT	AAC74919.1	1788155	大肠杆菌
buk1	NP_349675	15896326	丙酮丁醇梭菌
buk2	Q97III1	20137415	丙酮丁醇梭菌
ackA	NP_461279.1	16765664	鼠伤寒沙门氏菌
ACK1	XP_001694505.1	159472745	莱茵衣藻
ACK2	XP_001691682.1	159466992	莱茵衣藻

[0444] 自乙酰-磷酸形成乙酰-CoA可以由磷酸转乙酰酶(EC 2.3.1.8)催化(图2D)。来自大肠杆菌的pta基因编码将乙酰-CoA可逆地转变成乙酰-磷酸的酶(Suzuki, T., Biochim. Biophys. Acta 191:559-569(1969))。另外的乙酰基转移酶已经在枯草芽孢杆菌(Rado和Hoch, Biochim. Biophys. Acta 321:114-125(1973)、克鲁维氏梭菌(Stadtman, E., Methods Enzymol. 1:5896-599(1955)和海栖热孢菌(Thermotoga maritima)(Bock等人, J. Bacteriol. 181:1861-1867(1999))中进行了表征。该反应也可以由一些磷酸转丁酰酶(EC 2.3.1.19)催化,包括来自丙酮丁醇梭菌的ptb基因产物(Wiesenborn等人, App. Environ. Microbiol. 55:317-322(1989); Walter等人, Gene 134:107-111(1993))。另外的ptb基因在产丁酸菌L2-50(Louis等人, J. Bacteriol. 186:2099-2106(2004)和巨大芽孢杆菌(Vazquez等人, Curr. Microbiol. 42:345-349(2001)中被发现。大肠杆菌pta基因的同源物存在于包括肠道沙门氏菌和莱茵衣藻在内的若干其它生物体中。

[0445]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
Pta	NP_416800.1	71152910	大肠杆菌
Pta	P39646	730415	枯草芽孢杆菌
Pta	A5N801	146346896	克鲁维氏梭菌
Pta	Q9X0L4	6685776	海栖热孢菌
Ptb	NP_349676	34540484	丙酮丁醇梭菌
Ptb	AAR19757.1	38425288	产丁酸菌 L2-50
Ptb	CAC07932.1	10046659	巨大芽孢杆菌
Pta	NP_461280.1	16765665	肠道沙门氏菌肠道亚种血清型变种鼠伤寒菌株 LT2
PAT2	XP_001694504.1	159472743	莱茵衣藻
PAT1	XP_001691787.1	159467202	莱茵衣藻

[0446] 丙酮酸脱羧酶 (PDC) 是醇发酵中的一个关键酶,催化丙酮酸脱羧生成乙醛 (图 2E)。来自酿酒酵母的 PDC1 酶已经进行了广泛深入的研究 (Killenberg-Jabs 等人, Eur. J. Biochem. 268:1698-1704(2001); Li 等人, Biochemistry. 38:10004-10012(1999); ter Schure 等人, Appl. Environ. Microbiol. 64:1303-1307(1998))。其它充分表征的 PDC 酶在运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) (Siegert 等人, Protein Eng Des Sel 18:345-357(2005))、巴斯德醋杆菌 (Chandra 等人, 176:443-451(2001)) 和乳酸克鲁维酵母 (Krieger 等人, 269:3256-3263(2002)) 中被发现。酿酒酵母的 PDC1 和 PDC5 酶受到 PDC2 的正向转录调节 (Hohmann 等人, Mol Gen Genet 241:657-66(1993))。在由热带假丝酵母中的 CTRG_03826 (GI:255729208)、乳酸克鲁维酵母中的 PDC1 (GI No.:1226007)、解脂耶氏酵母中的 YALI0D10131g (GI:50550349)、巴斯德毕赤酵母中的 PAS_chr3_0188 (GI:254570575)、粟酒裂殖酵母中的丙酮酸脱羧酶 (GI:GI:159883897)、黑曲霉中的 ANI_1_1024084 (GI:145241548)、ANI_1_796114 (GI:317034487)、ANI_1_936024 (GI:317026934) 和 ANI_1_2276014 (GI:317025935) 编码的蛋白质中也具有丙酮酸脱羧酶活性。

[0447]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
pdc	P06672.1	118391	运动发酵单胞菌
pdc1	P06169	30923172	酿酒酵母
Pdc2	NP_010366.1	6320286	酿酒酵母
Pdc5	NP_013235.1	6323163	酿酒酵母
CTRG_03826	XP_002549529	255729208	热带假丝酵母,
CU329670.1:585597.587312	CAA90807	159883897	粟酒裂殖酵母
YALI0D10131g	XP_502647	50550349	解脂耶氏酵母
PAS_chr3_0188	XP_002492397	254570575	巴斯德毕赤酵母
pdc	Q8L388	20385191	巴斯德醋杆菌
pdc1	Q12629	52788279	乳酸克鲁维酵母
ANI_1_1024084	XP_001393420	145241548	黑曲霉
ANI_1_796114	XP_001399817	317026934	黑曲霉
ANI_1_936024	XP_001396467	317034487	黑曲霉
ANI_1_2276014	XP_001388598	317025935	黑曲霉

[0448] EC 1.2.1 类中的醛脱氢酶催化乙醛氧化成乙酸 (图 2F)。上文描述了编码这种活性的示例性基因。将乙醛氧化成乙酸也可以由具有乙醛氧化酶活性的醛氧化酶催化。这样的酶可以将乙醛、水和 O₂ 转变成乙酸和过氧化氢。已显示催化这种转化的示例性醛氧化酶可以在牛和小家鼠中被发现 (Garattini 等人, Cell Mol Life Sci 65:1019-48(2008); Cabre 等人, Biochem Soc Trans 15:882-3(1987))。另外的醛氧化酶基因候选者包括由玉蜀黍的 zmA0-1 和 zmA0-2 编码的两种含有黄素和钼的醛氧化酶 (Sekimoto 等人, J Biol Chem 272:15280-85(1997))。

[0449]

基因	GenBank 登录号	GI 编号	生物体
zmA0-1	NP_001105308.1	162458742	玉蜀黍
zmA0-2	BAA23227.1	2589164	玉蜀黍
Aox1	054754.2	20978408	小家鼠
XDH	DAA24801.1	296482686	牛

[0450] 丙酮酸氧化酶 (乙酰 - 磷酸形成) 可催化丙酮酸、氧和磷酸转变成乙酰 - 磷酸和过氧化氢 (图 2G)。这种丙酮酸氧化酶类型是可溶的并且需要辅因子硫胺二磷酸和黄素腺嘌呤二核苷酸 (FAD)。形成乙酰 - 磷酸的丙酮酸氧化酶可以在乳酸细菌德氏乳杆菌 (*Lactobacillus delbrueckii*) 和植物乳杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 中被发现 (Lorquet 等人, J Bacteriol 186:3749-3759(2004); Hager 等人, Fed Proc 13:734-38(1954))。植物乳杆菌 (*L. plantarum*) 酶的晶体结构已被解析 (Muller 等人, (1994))。在血链球菌 (*Streptococcus sanguinis*) 和肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*) 中, 形成乙酰 - 磷酸的丙酮酸氧化酶由 spxB 基因编码 (Spellerberg 等人, Mol Micro 19:803-13(1996); Ramos-Montanez 等人, Mol Micro 67:729-46(2008))。已显示 SpxR 在肺炎链球菌 (*S. pneumoniae*) 中正调节 spxB 的转录 (Ramos-Montanez 等人, 同上)。血链球菌 (*S. sanguinis*) 中的类似调节物通过序列同源性鉴别。过氧化氢酶活性的引入或修饰可减少过氧化氢产物的累积。

[0451]

基因	GenBank 登录号	GI 编号	生物体
poxB	NP_786788.1	28379896	植物乳杆菌
spxB	L39074.1	1161269	肺炎链球菌
Spd_0969(spxR)	YP_816445.1	116517139	肺炎链球菌
spxB	ZP_07887723.1	315612812	血链球菌
spxR	ZP_07887944.1GI:	315613033	血链球菌

[0452] 丙酮酸脱氢酶 (PDH) 复合体催化将丙酮酸转变成乙酰 -CoA (图 2H)。大肠杆菌 PDH 复合体由基因 aceEF 和 lpdA 编码。酶工程改造成就改进在厌氧条件下大肠杆菌 PDH 酶活性 (Kim 等人, J. Bacteriol. 190:3851-3858(2008); Kim 等人, Appl. Environ. Microbiol. 73:1766-1771(2007); Zhou 等人, Biotechnol. Lett. 30:335-342(2008))。与大肠杆菌 PDH 相反, 枯草芽胞杆菌 (*B. subtilis*) 复合体在厌氧条件下有活性并且是生长所需要的 (Nakano 等人, 179:6749-6755(1997))。在甘油上生长期间表征的肺炎克雷伯氏菌 PDH 在厌氧条件下也有活性 (Menzel 等人, 56:135-142(1997))。来自牛肾的酶复合体 (Zhou 等人, 98:14802-14807(2001)) 和来自棕色固氮菌的 E2 催化结构域的晶体结构是可获得的 (Mattevi 等人, Science. 255:1544-1550(1992))。一些哺乳动物 PDH 酶复合体可以在替代底物例如 2- 氧代丁酸上反应。褐家鼠 PDH 和 BCKAD 的比较动力学表明 BCKAD 对 2- 氧代丁酸作为底物具有较高活性 (Paxton 等人, Biochem. J. 234:295-303(1986))。酿酒酵母 PDH 复合体由结合 E1 (PDA1, PDB1)、E3 (LPD1) 和蛋白质 X (PDX1) 组分的 E2 (LAT1) 核心组成 (Pronk 等人, Yeast 12:1607-1633(1996))。酿酒酵母的 PDH 复合体由涉及 PKP1 (PDH 激酶 I)、PTC5 (PDH 磷酸酶 I)、PKP2 和 PTC6 的 E1 的磷酸化来调节。这些调节物的修饰也可以增强 PDH 活性。脂酰连接酶 (大肠杆菌的 Lp1A 和酿酒酵母中的 AIM22) 与 PDH 在细胞溶质中的共表达对于激活 PDH 酶复合体可能是必需的。通过修饰代谢途径或用脂酸进行培养基补充增加细胞溶质脂酸的供应也可以改进 PDH 活性。

[0453]

基因	登录号	GI 编号	生物体
aceE	NP_414656.1	16128107	大肠杆菌
aceF	NP_414657.1	16128108	大肠杆菌
lpd	NP_414658.1	16128109	大肠杆菌
lp1A	NP_418803.1	16132203	大肠杆菌
pdhA	P21881.1	3123238	枯草芽胞杆菌
pdhB	P21882.1	129068	枯草芽胞杆菌
pdhC	P21883.2	129054	枯草芽胞杆菌
pdhD	P21880.1	118672	枯草芽胞杆菌
aceE	YP_001333808.1	152968699	肺炎克雷伯氏菌
aceF	YP_001333809.1	152968700	肺炎克雷伯氏菌
lpdA	YP_001333810.1	152968701	肺炎克雷伯氏菌
PdhA1	NP_001004072.2	124430510	褐家鼠

Pdha2	NP_446446.1	16758900	褐家鼠
Dlat	NP_112287.1	78365255	褐家鼠
Dld	NP_955417.1	40786469	褐家鼠
LAT1	NP_014328	6324258	酿酒酵母
PDA1	NP_011105	37362644	酿酒酵母
PDB1	NP_009780	6319698	酿酒酵母
LPD1	NP_116635	14318501	酿酒酵母
PDX1	NP_011709	6321632	酿酒酵母
AIM22	NP_012489.2	83578101	酿酒酵母

[0454] 作为以上描述的大型多酶 PDH 复合体的替代物,一些生物体利用 2- 酮酸氧化还原酶家族 (OFOR) 中的酶催化 2- 酮 - 酸的酰基化氧化脱羧。与 PDH 复合体不一样,PFOR 酶含有铁 - 硫聚簇,利用不同的辅因子和使用铁氧还蛋白或黄素氧还蛋白作为电子受体代替 NAD(P)H。丙酮酸铁氧还蛋白氧化还原酶 (PFOR) 可催化丙酮酸的氧化以形成乙酰 -CoA (图 2H)。来自非洲脱硫弧菌 (*Desulfovibrio africanus*) 的 PFOR 已在大肠杆菌中进行了克隆和表达,导致在氧存在下稳定数天的活性重组酶 (Pieulle 等人, *J. Bacteriol.* 179:5684-5692(1997))。氧稳定性在 PFOR 中相对罕见,且相信由非洲脱硫弧菌 (*D. africanus*) 酶的多肽链中的 60 个残基延伸所赋予。热醋穆尔氏菌 (*M. thermoacetica*) PFOR 也进行了充分表征 (Menon 等人, *Biochemistry* 36:8484-8494(1997)) 并且甚至显示在丙酮酸合成的方向上在自养生长期间具有高活性 (Furdui 等人, *J. Biol. Chem.* 275:28494-28499(2000))。此外,大肠杆菌具有未经表征的开放读框 (open reading frame) ydbK, 其编码与热醋穆尔氏菌 PFOR 有 51% 同一性的蛋白质。大肠杆菌中丙酮酸氧化还原酶活性的证据已有描述 (Blaschkowski 等人, *Eur. J. Biochem.* 123:563-569(1982))。几种另外的 PFOR 酶描述于 Ragsdale, *Chem. Rev.* 103:2333-2346(2003)。最后,黄素氧还蛋白还原酶 (例如,来自幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*) 或空肠弯曲杆菌 (*Campylobacter jejuni*) 的 fqrB (St Maurice 等人, *J. Bacteriol.* 189:4764-4773(2007))) 或 Rnf 型蛋白 (Seedorf 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:2128-2133(2008); Herrmann 等人, *J. Bacteriol.* 190:784-791(2008)) 提供自由 PFOR 产生的还原型铁氧还蛋白产生 NADH 或 NADPH 的方式。这些蛋白质在下文进行了标识。

[0455]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
Por	CAA70873.1	1770208	非洲脱硫弧菌

Por	YP_428946.1	83588937	热醋穆尔氏菌
ydbK	NP_415896.1	16129339	大肠杆菌
fqrB	NP_207955.1	15645778	幽门螺杆菌
fqrB	YP_001482096.1	157414840	空肠弯曲杆菌
RnfC	EDK33306.1	146346770	克鲁维氏梭菌
RnfD	EDK33307.1	146346771	克鲁维氏梭菌
RnfG	EDK33308.1	146346772	克鲁维氏梭菌
RnfE	EDK33309.1	146346773	克鲁维氏梭菌
RnfA	EDK33310.1	146346774	克鲁维氏梭菌
RnfB	EDK33311.1	146346775	克鲁维氏梭菌

[0456] 丙酮酸甲酸-裂合酶 (PFL, EC 2.3.1.54) (图 2H), 由大肠杆菌中的 pflB 编码, 可将丙酮酸转变成乙酰-CoA 和甲酸。PFL 的活性可通过由 pflA 编码的活化酶而增强 (Knappe 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 81:1332-1335(1984); Wong 等人, Biochemistry 32:14102-14110(1993))。酮-酸甲酸-裂合酶 (EC2.3.1.-), 也称为 2-酮丁酸甲酸-裂合酶 (KFL) 和丙酮酸甲酸-裂合酶 4, 是大肠杆菌中 tdcE 的基因产物。这种酶在厌氧苏氨酸降解期间催化将 2-酮丁酸转变成乙酰-CoA 和甲酸并且也可以在厌氧分解代谢中取代丙酮酸甲酸-裂合酶 (Simanshu 等人, J Biosci. 32:1195-1206(2007))。该酶是氧敏感性的, 并同 PflB 一样, 可能需要由 PFL-AE 翻译后修饰以激活活性位点中的甘氨酸基团 (Hesslinger 等人, Mol. Microbiol. 27:477-492(1998))。来自闪烁古生球菌的由 pflD 编码的丙酮酸甲酸-裂合酶已经在大肠杆菌中进行了克隆、表达和表征 (Lehtio 等人, Protein Eng Des Sel 17:545-552(2004))。闪烁古生球菌和大肠杆菌酶的晶体结构已被解析 (Lehtio 等人, J Mol. Biol. 357:221-235(2006); Leppanen 等人, Structure. 7:733-744(1999))。另外的 PFL 和 PFL-AE 候选者在乳酸乳球菌 (Melchiorson 等人, Appl Microbiol Biotechnol 58:338-344(2002)) 和突变链球菌 (Takahashi-Abbe 等人, Oral. Microbiol Immunol. 18:293-297(2003))、莱茵衣藻 (Hemschemeier 等人, Eukaryot. Cell 7:518-526(2008b); Atteia 等人, J. Biol. Chem. 281:9909-9918(2006)) 和巴斯德氏梭菌 (Weidner 等人, J Bacteriol. 178:2440-2444(1996)) 中被发现。

[0457]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
pflB	NP_415423	16128870	大肠杆菌
pflA	NP_415422.1	16128869	大肠杆菌

tdcE	AAT48170.1	48994926	大肠杆菌
pf1D	NP_070278.1	11499044	闪烁古生球菌
pf1	CAA03993	2407931	乳酸乳球菌
pf1	BAA09085	1129082	突变链球菌
PFL1	XP_001689719.1	159462978	莱茵衣藻
pf1A1	XP_001700657.1	159485246	莱茵衣藻
pf1	Q46266.1	2500058	巴斯德氏梭菌
act	CAA63749.1	1072362	巴斯德氏梭菌

[0458] 如果利用丙酮酸甲酸裂合酶将丙酮酸转变成乙酰-CoA, 则甲酸脱氢酶或甲酸氢裂合酶的共表达会将甲酸转变成二氧化碳。甲酸脱氢酶 (FDH) 催化来自甲酸的电子可逆转移至受体上。具有 FDH 活性的酶使用各种不同的电子载体, 例如 NADH (EC 1.2.1.2)、NADPH (EC 1.2.1.43)、醌醇 (EC 1.1.5.6)、细胞色素 (EC 1.2.2.3) 和氢化酶 (EC 1.1.99.33)。FDH 酶已经自热醋穆尔氏菌表征 (Andreesen 和 Ljungdahl, J Bacteriol 116:867-873(1973); Li 等人, J Bacteriol 92:405-412(1966); Yamamoto 等人, J Biol Chem. 258:1826-1832(1983)。基因座 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 等人, Environ Microbiol (2008))。另一组编码甲酸脱氢酶活性 (具有 CO_2 还原倾向) 的基因由弗氏互营杆菌中的 Sfum_2703 至 Sfum_2706 编码 (de Bok 等人, Eur J Biochem. 270:2476-2485(2003)); Reda 等人, PNAS 105:10654-10658(2008))。据推测实现相同功能的一组类似基因由生氢氧化羧基嗜热菌 (*C. hydrogenoformans*) 中的 CHY_0731、CHY_0732 和 CHY_0733 编码 (Wu 等人, PLoS Genet 1:e65(2005))。甲酸脱氢酶也在许多另外的生物体包括嗜一氧化碳梭菌 P7 (*C. carboxidivorans* P7)、甲醇芽孢杆菌 (*Bacillus methanolicus*)、稳定伯克霍尔德氏菌 (*Burkholderia stabilis*)、热醋穆尔氏菌 ATCC 39073、博伊丁假丝酵母 (*Candida boidinii*)、甲基假丝酵母 (*Candida methylica*) 和酿酒酵母 S288c 中被发现。

[0459]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
-----	------------	-------	-----

[0460]

Moth_2312	YP_431142	148283121	热醋穆尔氏菌
Moth_2314	YP_431144	83591135	热醋穆尔氏菌
Sfum_2703	YP_846816.1	116750129	弗氏互营杆菌
Sfum_2704	YP_846817.1	116750130	弗氏互营杆菌

Sfum_2705	YP_846818.1	116750131	弗氏互营杆菌
Sfum_2706	YP_846819.1	116750132	弗氏互营杆菌
CHY_0731	YP_359585.1	78044572	生氢氧化羧基嗜热菌
CHY_0732	YP_359586.1	78044500	生氢氧化羧基嗜热菌
CHY_0733	YP_359587.1	78044647	生氢氧化羧基嗜热菌
CcarbDRAFT_0901	ZP_05390901.1	255523938	嗜一氧化碳梭菌 P7
CcarbDRAFT_4380	ZP_05394380.1	255527512	嗜一氧化碳梭菌 P7
fdhA, MGA3_06625	EIJ82879.1	387590560	甲醇芽孢杆菌 MGA3
fdhA, PB1_11719	ZP_10131761.1	387929084	甲醇芽孢杆菌 PB1
fdhD, MGA3_06630	EIJ82880.1	387590561	甲醇芽孢杆菌 MGA3
fdhD, PB1_11724	ZP_10131762.1	387929085	甲醇芽孢杆菌 PB1
fdh	ACF35003.	194220249	稳定伯克霍尔德里氏菌
FDH1	AAC49766.1	2276465	博伊丁假丝酵母
fdh	CAA57036.1	1181204	甲基假丝酵母
FDH2	POCF35.1	294956522	酿酒酵母 S288c
FDH1	NP_015033.1	6324964	酿酒酵母 S288c

[0461] 或者,甲酸氢裂合酶可用于将甲酸转变成二氧化碳和氢。示例性的甲酸氢裂合酶可以在大肠杆菌中被发现。大肠杆菌甲酸氢裂合酶由氢化酶 3 和甲酸脱氢酶 -H 组成 (Maeda 等人, Appl Microbiol Biotechnol 77:879-890 (2007))。它由 fh1A 的基因产物激活 (Maeda 等人, Appl Microbiol Biotechnol 77:879-890 (2007))。已显示向发酵肉汤中添加痕量元素硒、镍和钼可增强甲酸氢裂合酶活性 (Soini 等人, Microb. Cell Fact. 7:26 (2008))。下文显示了各种氢化酶 3、甲酸脱氢酶和转录活化基因。甲酸氢裂合酶也存在于超嗜热泉古生菌 (hyperthermophilic archaeon)、海滨热球菌 (Takacs 等人, BMC Microbiol 8:88 (2008)) 中。另外的甲酸氢裂合酶系统已在鼠伤寒沙门氏菌、肺炎克雷伯氏菌、深红红螺菌 (*Rhodospirillum rubrum*)、甲酸甲烷杆菌 (*Methanobacterium formicicum*) 中被发现 (Vardar-Schara 等人, 微生物 Biotechnology 1:107-125 (2008))。

[0462]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体

hycA	NP_417205	16130632	大肠杆菌 K-12 MG1655
hycB	NP_417204	16130631	大肠杆菌 K-12 MG1655
hycC	NP_417203	16130630	大肠杆菌 K-12 MG1655

[0463]

hycD	NP_417202	16130629	大肠杆菌 K-12 MG1655
hycE	NP_417201	16130628	大肠杆菌 K-12 MG1655
hycF	NP_417200	16130627	大肠杆菌 K-12 MG1655
hycG	NP_417199	16130626	大肠杆菌 K-12 MG1655
hycH	NP_417198	16130625	大肠杆菌 K-12 MG1655
hycI	NP_417197	16130624	大肠杆菌 K-12 MG1655
fdhF	NP_418503	16131905	大肠杆菌 K-12 MG1655
fh1A	NP_417211	16130638	大肠杆菌 K-12 MG1655
mhyC	ABW05543	157954626	海滨热球菌
mhyD	ABW05544	157954627	海滨热球菌
mhyE	ABW05545	157954628	海滨热球菌
myhF	ABW05546	157954629	海滨热球菌
myhG	ABW05547	157954630	海滨热球菌
myhH	ABW05548	157954631	海滨热球菌
fdhA	AAB94932	2746736	海滨热球菌
fdhB	AAB94931	157954625	海滨热球菌

[0464] 丙酮酸:NADP氧化还原酶(PNO)催化将丙酮酸转变成乙酰-CoA。这种酶由单一基因编码并且该活性酶是同二聚体,这与以上描述的多亚基PDH酶复合体相反。来自纤细裸藻的酶由其辅因子硫胺焦磷酸稳定化(Nakazawa等人,Arch Biochem Biophys 411:183-8(2003))。应该移除这种酶的线粒体靶向序列用于在细胞溶质中表达。纤细裸藻蛋白质和其它NADP-依赖性丙酮酸:NADP⁺氧化还原酶的PNO蛋白列于下表。

[0465]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
PNO	Q94IN5.1	33112418	纤细裸藻
cgd4_690	XP_625673.1	66356990	小隐孢子虫 Iowa II
TPP_PFOR_PNO	XP_002765111.11	294867463	海洋帕金虫 ATCC 50983

[0466] 乙醛 NAD(P)⁺依赖性氧化成乙酰-CoA(图 2I) 可以由酰基化乙醛脱氢酶 (EC 1.2.1.10) 催化。大肠杆菌的酰基化乙醛脱氢酶由 adhE、eutE 和 mhpF 编码 (Ferrandez 等人, J Bacteriol 179:2573-81(1997))。由 dmpF 编码的假单胞菌 CF600 酶参与间位-裂解途径并且与 4-羟基-2-氧代戊酸醛缩酶形成复合体 (Shingler 等人, J Bacteriol 174:711-24(1992))。产溶剂性生物体 (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由 bdh I 和 adhE2 编码 (Walter 等人, J. Bacteriol. 174:7149-7158(1992); Fontaine 等人, J. Bacteriol. 184:821-830(2002))。酰基化乙醛脱氢酶的又一个候选者是来自拜氏梭菌的 ald 基因 (Toth, Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980(1999))。这个基因非常类似于鼠伤寒沙门氏菌和大肠杆菌的 eutE 乙醛脱氢酶基因 (Toth, Appl. Environ. Microbiol. 65:4973-4980(1999))。

[0467]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
adhE	NP_415757.1	16129202	大肠杆菌
mhpF	NP_414885.1	16128336	大肠杆菌
dmpF	CAA43226.1	45683	假单胞菌 CF600
adhE2	AAK09379.1	12958626	丙酮丁醇梭菌
bdh I	NP_349892.1	15896543	丙酮丁醇梭菌
Ald	AAT66436	49473535	拜氏梭菌
eutE	NP_416950	16130380	大肠杆菌
eutE	AAA80209	687645	鼠伤寒沙门氏菌

[0468] 苏氨酸醛缩酶 (EC 4.1.2.5) 催化苏氨酸裂解生成甘氨酸和乙醛 (图 2J)。酿酒酵母和白色假丝酵母酶由 GLY1 编码 (Liu 等人, Eur J Biochem 245:289-93(1997); McNeil 等人, Yeast 16:167-75(2000))。大肠杆菌的 ltaE 和 glyA 基因产物也编码具有这种活性的酶 (Liu 等人, Eur J Biochem 255:220-6(1998))。

[0469]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体

GLY1	NP_010868.1	6320789	酿酒酵母
GLY1	AAB64198.1	2282060	白色假丝酵母
ItaE	AAC73957.1	1787095	大肠杆菌
glyA	AAC75604.1	1788902	大肠杆菌

[0470] 实施例 III

[0471] 自 PEP 和丙酮酸生产乙酰 -CoA 的途径

[0472] 用于将细胞溶质磷酸烯醇丙酮酸 (PEP) 和丙酮酸转变成细胞溶质乙酰 -CoA 的途径也能够采用来自乙酰 -CoA 的细胞溶质脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产途径。图 3 显示用于将 PEP 和丙酮酸转变成乙酰 -CoA 的多个途径。

[0473] 将 PEP 转变成草酰乙酸在一、二或三个酶促步骤中催化。草酰乙酸通过丙二酸半醛或丙二酰 -CoA 中间体进一步转变成乙酰 -CoA。在一种途径中, PEP 羧化酶或 PEP 羧激酶将 PEP 转变成草酰乙酸 (步骤 A); 草酰乙酸脱羧酶将草酰乙酸转变成丙二酸 (步骤 B); 和丙二酸半醛脱氢酶 (乙酰基化) 将丙二酸半醛转变成乙酰 -CoA (步骤 C)。在另一种途径中, 丙酮酸激酶或 PEP 磷酸酶将 PEP 转变成丙酮酸 (步骤 N); 丙酮酸羧化酶将丙酮酸转变成 (步骤 H); 草酰乙酸脱羧酶将草酰乙酸转变成丙二酸 (步骤 B); 和丙二酸半醛脱氢酶 (乙酰基化) 将丙二酸半醛转变成乙酰 -CoA (步骤 C)。在另一种途径中, 丙酮酸激酶或 PEP 磷酸酶将 PEP 转变成丙酮酸 (步骤 N); 苹果酸酶将丙酮酸转变成苹果酸 (步骤 L); 苹果酸脱氢酶或氧化还原酶将苹果酸转变成草酰乙酸 (步骤 M); 草酰乙酸脱羧酶将草酰乙酸转变成丙二酸 (步骤 B); 和丙二酸半醛脱氢酶 (乙酰基化) 将丙二酸半醛转变成乙酰 -CoA (步骤 C)。在另一种途径中, PEP 羧化酶或 PEP 羧激酶将 PEP 转变成草酰乙酸 (步骤 A); 草酰乙酸脱羧酶将草酰乙酸转变成丙二酸半醛 (步骤 B); 丙二酰 -CoA 还原酶将丙二酸半醛转变成丙二酰 -CoA (步骤 G); 和丙二酰 -CoA 脱羧酶将丙二酰 -CoA 转变成乙酰 -CoA (步骤 D)。在另一种途径中, 丙酮酸激酶或 PEP 磷酸酶将 PEP 转变成丙酮酸 (步骤 N); 丙酮酸羧化酶将丙酮酸转变成草酰乙酸 (步骤 H); (草酰乙酸脱羧酶将草酰乙酸转变成丙二酸半醛 (步骤 B); 丙二酰 -CoA 还原酶将丙二酸半醛转变成丙二酰 -CoA (步骤 G); 和丙二酰 -CoA 脱羧酶将丙二酰 -CoA 转变成乙酰 -CoA (步骤 D)。在另一种途径中, 丙酮酸激酶或 PEP 磷酸酶将 PEP 转变成丙酮酸 (步骤 N); 苹果酸酶将丙酮酸转变成苹果酸 (步骤 L); 苹果酸脱氢酶或氧化还原酶将苹果酸转变成草酰乙酸 (步骤 M); 草酰乙酸脱羧酶将草酰乙酸转变成丙二酸半醛 (步骤 B); 丙二酰 -CoA 还原酶将丙二酸半醛转变成丙二酰 -CoA (步骤 G); 和丙二酰 -CoA 脱羧酶将丙二酰 -CoA 转变成乙酰 -CoA (步骤 D)。在另一种途径中, PEP 羧化酶或 PEP 羧激酶将 PEP 转变成草酰乙酸 (步骤 A); 草酰乙酸脱羧酶将草酰乙酸转变成丙二酸半醛 (步骤 B); 丙二酸半醛脱氢酶将丙二酸半醛转变成丙二酸 (步骤 J); 丙二酰 -CoA 合成酶或转移酶将丙二酸转变成丙二酰 -CoA (步骤 K); 和丙二酰 -CoA 脱羧酶将丙二酰 -CoA 转变成乙酰 -CoA (步骤 D)。在另一种途径中, 丙酮酸激酶或 PEP 磷酸酶将 PEP 转变成丙酮酸 (步骤 N); 丙酮酸羧化酶将丙酮酸转变成草酰乙酸 (步骤 H); 草酰乙酸脱羧酶将草酰乙酸转变成丙二酸半醛 (步骤 B); 丙二酸半醛脱氢酶将丙二酸半醛转变成丙二酸 (步骤 J);

丙二酰-CoA 合成酶或转移酶将丙二酸转变成丙二酰-CoA (步骤 K); 和丙二酰-CoA 脱羧酶将丙二酰-CoA 转变成乙酰-CoA (步骤 D)。在另一种途径中, 丙酮酸激酶或 PEP 磷酸酶将 PEP 转变成丙酮酸 (步骤 N); 苹果酸酶将丙酮酸转变成苹果酸 (步骤 L); 苹果酸脱氢酶或氧化还原酶将苹果酸转变成草酰乙酸 (步骤 M); 草酰乙酸脱羧酶将草酰乙酸转变成丙二酸半醛 (步骤 B); 丙二酸半醛脱氢酶将丙二酸半醛转变成丙二酸 (步骤 J); 丙二酰-CoA 合成酶或转移酶将丙二酸转变成丙二酰-CoA (步骤 K); 和丙二酰-CoA 脱羧酶将丙二酰-CoA 转变成乙酰-CoA (步骤 D)。在另一种途径中, PEP 羧化酶或 PEP 羧激酶将 PEP 转变成草酰乙酸 (步骤 A); 草酰乙酸脱氢酶或草酰乙酸氧化还原酶将草酰乙酸转变成丙二酰-CoA (步骤 F); 和丙二酰-CoA 脱羧酶将丙二酰-CoA 转变成乙酰-CoA (步骤 D)。在另一种途径中, 丙酮酸激酶或 PEP 磷酸酶将 PEP 转变成丙酮酸 (步骤 N); 丙酮酸羧化酶将丙酮酸转变成草酰乙酸 (步骤 H); 草酰乙酸脱氢酶或草酰乙酸氧化还原酶将草酰乙酸转变成丙二酰-CoA (步骤 F); 和丙二酰-CoA 脱羧酶将丙二酰-CoA 转变成乙酰-CoA (步骤 D)。在另一种途径中, 丙酮酸激酶或 PEP 磷酸酶将 PEP 转变成丙酮酸 (步骤 N); 苹果酸酶将丙酮酸转变成苹果酸 (步骤 L); 苹果酸脱氢酶或氧化还原酶将苹果酸转变成草酰乙酸 (步骤 M); 草酰乙酸脱氢酶或草酰乙酸氧化还原酶将草酰乙酸转变成丙二酰-CoA (步骤 F); 和丙二酰-CoA 脱羧酶将丙二酰-CoA 转变成乙酰-CoA (步骤 D)。

[0474] 下文描述了用于图 3 中所示的反应的候选酶。

[0475]

1. 1. n. a	氧化还原酶 (醇至氧代)	M
1. 1. 1. d	苹果酸酶	L
1. 2. 1. a	氧化还原酶 (醛至酸)	J
1. 2. 1. b	氧化还原酶 (酰基-CoA 至醛)	G
1. 2. 1. f	氧化还原酶 (酰基-CoA 脱羧至醛)	C
2. 7. 2. a	激酶	N
2. 8. 3. a	CoA 转移酶	K
3. 1. 3. a	磷酸酶	N
4. 1. 1. a	脱羧酶	A, B, D
6. 2. 1. a	CoA 合成酶	K
6. 4. 1. a	羧化酶	D, H

[0476] 图 3 中的一些酶的候选酶在本文中别处有描述。这些包括乙酰-CoA 羧化酶、乙酰乙酰-CoA 合酶、乙酰乙酰-CoA 硫解酶、丙二酰-CoA 还原酶 (也称为丙二酸半醛脱氢酶 (酰基化)、苹果酸脱氢酶。

[0477] 1.1.n.a 氧化还原酶（醇至氧代）

[0478] 苹果酸脱氢酶或氧化还原酶催化苹果酸氧化成草酰乙酸。不同的载体可充当此类中酶的电子受体。苹果酸脱氢酶利用 NADP 或 NAD 作为电子受体。以上在实施例 1(表 7.23) 中描述了候选苹果酸脱氢酶（步骤 M）酶。苹果酸：醌氧化还原酶 (EC 1.1.5.4) 是膜缔合的并且利用醌、黄素蛋白或维生素 K 作为电子受体。大肠杆菌、幽门螺杆菌和丁香假单胞菌的苹果酸：醌氧化还原酶由 mgo 编码 (Kather 等人, J Bacteriol 182:3204-9(2000); Mellgren 等人, J Bacteriol 191:3132-42(2009))。谷氨酸棒杆菌 (*C. glutamicum*) 的 Cgl2001 基因也编码 MQO 酶 (Mitsubishi 等人, Biosci Biotechnol Biochem 70:2803-6(2006))。

[0479]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
mgo	NP_416714.1	16130147	大肠杆菌
mgo	NP_206886.1	15644716	幽门螺杆菌
mgo	NP_790970.1	28868351	丁香假单胞菌
Cgl2001	NP_601207.1	19553205	谷氨酸棒杆菌

[0480] 1.1.1.d 苹果酸酶

[0481] 苹果酸酶（苹果酸脱氢酶）催化丙酮酸可逆氧化羧化生成苹果酸。大肠杆菌编码两种苹果酸酶 MaeA 和 MaeB (Takeo, J. Biochem. 66:379-387(1969))。虽然典型地设想苹果酸酶在自苹果酸形成丙酮酸的方向上操作, 但是已经证明由 maeA 编码的 NAD- 依赖性酶在碳固定方向上操作 (Stols 和 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*) 的苹果酸酶时得到类似的观察结果 (Stols 等人, 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依赖 NADP 的并且使草酰乙酸和其它 α -酮酸脱羧 (Iwakura 等人, J. Biochem. 85(5):1355-65(1979))。另一合适的候选酶是来自玉蜀黍的 mel (Furumoto 等人, Plant Cell Physiol 41:1200-1209(2000))。

[0482]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
maeA	NP_415996	90111281	大肠杆菌
maeB	NP_416958	16130388	大肠杆菌
NAD-ME	P27443	126732	猪蛔虫
Mel	P16243.1	126737	玉蜀黍

[0483] 1.2.1.a 氧化还原酶（醛至酸）

[0484] 丙二酸半醛氧化成丙二酸由丙二酸半醛脱氢酶 (EC 1.2.1.15) 催化。这种酶在绿脓假单胞菌中进行了表征 (Nakamura 等人, *Biochim Biophys Acta* 50:147-52(1961))。纤细裸藻 (*Euglena gracilis*) 的 NADP 和 NAD⁻ 依赖性琥珀酸半醛脱氢酶接受丙二酸半醛作为底物 (Tokunaga 等人, *Biochem Biophys Act* 429:55-62(1976))。编码这些酶的基因迄今尚未鉴定。来自真核生物体例如酿酒酵母、白色假丝酵母、解脂耶氏酵母和黑曲霉 (*A. niger*) 的醛脱氢酶典型地具有宽的底物特异性并且是合适的候选者。这些酶和其它形成酸的醛脱氢酶和醛氧化酶较早前已有描述并且列于表 9 和表 30 中。另外的候选 MSA 脱氢酶包括 NAD(P)⁺- 依赖性醛脱氢酶 (EC 1.2.1.3)。在人肝脏中发现的两种醛脱氢酶 ALDH-1 和 ALDH-2 对于多种脂族、芳香族和多环醛均具有宽的底物范围 (Klyosov, *Biochemistry* 35:4457-4467(1996a))。活性 ALDH-2 已使用 GroEL 蛋白作为伴侣蛋白 (chaperonins) 在大肠杆菌中有效表达 (Lee 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 298:216-224(2002))。大鼠线粒体醛脱氢酶也具有宽的底物范围 (Siew 等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 176:638-649(1976))。大肠杆菌基因 *astD* 和 *aldH* 编码 NAD⁺- 依赖性醛脱氢酶。*AstD* 对琥珀酸半醛有活性 (Kuznetsova 等人, *FEMS Microbiol Rev* 29:263-279(2005)), *aldH* 对宽范围的芳香族和脂族底物有活性 (Jo 等人, *Appl Microbiol Biotechnol* 81:51-60(2008))。

[0485]

基因	GenBank 登录号	GI 编号	生物体
<i>astD</i>	P76217.1	3913108	大肠杆菌
<i>aldH</i>	AAC74382.1	1787558	大肠杆菌
ALDH-2	P05091.2	118504	智人
ALDH-2	NP_115792.1	14192933	褐家鼠

[0486] 1.2.1.f 氧化还原酶 (酰基 -CoA 脱羧生成醛)

[0487] 丙二酸半醛脱氢酶 (乙酰基化) (EC 1.2.1.18) 催化丙二酸半醛氧化脱羧生成乙酰 -CoA。示例性的酶由盐单胞菌 HTNK1 的 *ddcC* (Todd 等人, *Environ Microbiol* 12:237-43(2010)) 和干酪乳杆菌的 *Io1A* (Yebra 等人, *AEM* 73:3850-8(2007)) 编码。*DdcC* 酶具有黑曲霉和白色假丝酵母中的同源物, 见下表。褐家鼠中的丙二酸半醛脱氢酶 *Mmsdh* 也将丙二酸半醛转变成乙酰 -CoA (US 8048624)。丙二酸半醛脱氢酶 (乙酰基化) 酶也在荧光假单胞菌中进行了表征, 虽然基因迄今尚未鉴定 (Hayaishi 等人, *J Biol Chem* 236:781-90(1961))。甲基丙二酸半醛脱氢酶 (乙酰基化) 酶 (EC 1.2.1.27) 也是合适的候选者, 因为该类中的若干酶接受丙二酸半醛作为底物, 包括枯草芽孢杆菌的 *Msdh* (Stines-Chaumeil 等人, *Biochem J* 395:107-15(2006)) 和褐家鼠的甲基丙二酸半醛脱氢酶 (Kedishvii 等人, *Methods Enzymol* 324:207-18(2000))。

[0488]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体

ddcC	ACV84070.1	258618587	盐单胞菌 HTNK1
ANI_1_1120014	XP_001389265.1	145229913	黑曲霉
ALD6	XP_710976.1	68490403	白色假丝酵母
YALIO01859g	XP_501343.1	50547747	解脂耶氏酵母
mmsA_1	YP_257876.1	70734236	荧光假单胞菌
mmsA_2	YP_257884.1	70734244	荧光假单胞菌
PA0130	NP_248820.1	15595328	绿脓假单胞菌
Mmsdh	Q02253.1	400269	褐家鼠

[0489]

msdh	NP_391855.1	16081027	枯草芽孢杆菌
IolA	ABP57762.1	145309085	干酪乳杆菌

[0490] 2.7.2.a 激酶

[0491] 丙酮酸激酶 (步骤 10N), 也称为磷酸烯醇丙酮酸合酶 (EC 2.7.9.2), 将丙酮酸和 ATP 转变成 PEP 和 AMP。这种酶由酿酒酵母中的 PYK1 (Burke 等人, J. Biol. Chem. 258:2193-2201 (1983)) 和 PYK2 (Boles 等人, J. Bacteriol. 179:2987-2993 (1997)) 基因编码。在大肠杆菌中, 这种活性由 pykF 和 pykA 的基因产物催化。所选择的酿酒酵母酶的同源物也示于下表。

[0492]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
PYK1	NP_009362	6319279	酿酒酵母
PYK2	NP_014992	6324923	酿酒酵母
pykF	NP_416191.1	16129632	大肠杆菌
pykA	NP_416368.1	16129807	大肠杆菌
KLLA0F23397g	XP_456122.1	50312181	乳酸克鲁维酵母
Ca019.3575	XP_714934.1	68482353	白色假丝酵母
Ca019.11059	XP_714997.1	68482226	白色假丝酵母
YALIOF09185p	XP_505195	210075987	解脂耶氏酵母

ANI_1_1126064	XP_001391973	145238652	黑曲霉
---------------	--------------	-----------	-----

[0493] 2.8.3.a CoA 转移酶

[0494] 丙二酸活化成丙二酰 -CoA 由 EC 2.8.3.a 类中的 CoA 转移酶催化。丙二酰 -CoA: 乙酸 CoA 转移酶 (EC 2.8.3.3) 酶已在包括荧光假单胞菌和恶臭假单胞菌在内的假单胞菌菌种进行了表征 (Takamura 等人, *Biochem Int* 3:483-91(1981); Hayaishi 等人, *J Biol Chem* 215:125-36(1955))。与这些酶相关的基因迄今尚未鉴定。褐家鼠肝脏中发现的线粒体 CoA 转移酶也催化这个反应并且能够利用一定范围的 CoA 供体和受体 (Deana 等人, *Biochem Int* 26:767-73(1992))。以上描述的几种 CoA 转移酶也可以适用于催化图 10 的步骤 K。这些酶包括乙酰 -CoA 转移酶 (表 26)、3-HB CoA 转移酶 (表 8)、乙酰乙酰 -CoA 转移酶 (表 55)、SCOT (表 56) 和其它 CoA 转移酶 (表 57)。

[0495] 3.1.3.a 磷酸酶

[0496] 磷酸烯醇丙酮酸磷酸酶 (EC 3.1.3.60, 步骤 10N) 催化 PEP 水解生成丙酮酸和磷酸。多种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 磷酸酶已在植物例如绿豆 (*Vigna radiate*)、海莲 (*Bruguiera sexangula*) 和甘蓝 (*Brassica nigra*) 中进行了表征。来自烟曲霉 (*Aspergillus fumigates*) 的植酸酶、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 水解成丙酮酸 (Brugger 等人, *Appl Microbiol Biotech* 63:383-9(2004); Hayman 等人, *Biochem J* 261:601-9(1989); 等人, *The Enzymes*, 第 3 版, 4:373-415(1971))。相似的酶已在空肠弯曲杆菌 (*van Mourik* 等人, *Microbiol.* 154:584-92(2008))、酿酒酵母 (*Oshima* 等人, *Gene* 179:171-7(1996)) 和金黄色葡萄球菌 (*Shah* 和 *Blobel*, *J. Bacteriol.* 94:780-1(1967)) 中进行了表征。酶工程改造和 / 或移除靶向序列可为碱性磷酸酶在细胞质中发挥功能所需。

[0497]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
phyA	000092.1	41017447	烟曲霉
Acp5	P13686.3	56757583	智人
phoA	NP_414917.2	49176017	大肠杆菌
phoX	ZP_01072054.1	86153851	空肠弯曲杆菌
PH08	AAA34871.1	172164	酿酒酵母
SaurJH1_2706	YP_001317815.1	150395140	金黄色葡萄球菌

[0498] 4.1.1.a 脱羧酶

[0499] 图 10 中的若干反应由 EC 4.1.1 类中的脱羧酶包括草酰乙酸脱羧酶 (步骤 B)、丙二酰 -CoA 脱羧酶 (步骤 D) 和丙酮酸羧化酶或羧激酶 (步骤 A) 催化。

[0500] 磷酸烯醇丙酮酸羧化生成草酰乙酸由磷酸烯醇丙酮酸羧化酶 (EC

4.1.1.31) 催化。示例性的 PEP 羧化酶由大肠杆菌中的 ppc(Kai 等人, Arch. Biochem. Biophys. 414:170-179(2003)、外链甲基杆菌 AM1 中的 ppcA(Arps 等人, J. Bacteriol. 175:3776-3783(1993) 和谷氨酸棒杆菌中的 ppc(Eikmanns 等人, Mol. Gen. Genet. 218:330-339(1989) 编码。

[0501]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
Ppc	NP_418391	16131794	大肠杆菌
ppcA	AAB58883	28572162	外链甲基杆菌
Ppc	ABB53270	80973080	谷氨酸棒杆菌

[0502] 用于将磷酸烯醇丙酮酸羧化生成草酰乙酸的一种替代酶是 PEP 羧激酶 (EC 4.1.1.32, 4.1.1.49), 其同时形成 ATP 或 GTP。在大多数生物体中, PEP 羧激酶具有糖异生功能, 在消耗一个 ATP 的情况下将草酰乙酸转变成 PEP。酿酒酵母是一种这样的生物体, 其天然 PEP 羧激酶 PCK1 起到糖异生的作用 (Valdes-Hevia 等人, FEBS Lett. 258:313-316(1989)。大肠杆菌是另一种这样的生物体, 因为相信 PEP 羧激酶在产生草酰乙酸中的作用当与 PEP 羧化酶相比时微小 (Kim 等人, Appl. Environ. Microbiol. 70:1238-1241(2004))。尽管如此, 来自 PEP 的天然大肠杆菌 PEP 羧激酶针对草酰乙酸的活性最近已经在大肠杆菌 K-12 的 ppc 突变体中得到证明 (Kwon 等人, J. Microbiol. Biotechnol. 16:1448-1452(2006))。这些菌株没有表现出生长缺陷并且在高 NaHCO_3 浓度下增加了琥珀酸产生。在适应性进化后, 大肠杆菌的突变菌株可采用 Pck 作为固定 CO_2 的主要酶 (Zhang 等人, 2009)。在一些生物体、特别是瘤胃细菌中, PEP 羧激酶在由 PEP 产生草酰乙酸并产生 ATP 中是十分有效的。已克隆到大肠杆菌中的 PEP 羧激酶基因的实例包括来自产琥珀酸曼氏杆菌 (Lee 等人, Biotechnol. Bioprocess Eng. 7:95-99(2002))、产琥珀酸厌氧螺菌 (Laivenieks 等人, Appl. Environ. Microbiol. 63:2273-2280(1997) 和琥珀酸放线杆菌 (Kim 等人, 同上) 的那些。由流感嗜血菌编码的 PEP 羧激酶在由 PEP 形成草酰乙酸时是有效的。另一合适的候选者是来自大黍的 PEPCK 酶, 其对于 CO_2 (一种被认为是大肠杆菌酶中限速的底物) 具有低 K_m (Chen 等人, Plant Physiol 128:160-164(2002); Cotelesage 等人, Int. J. Biochem. Cell Biol. 39:1204-1210(2007))。来自钩虫贪铜菌的 GTP- 依赖性 pepck 基因产物的动力学有利于草酰乙酸形成 (US8048624 和 Lea 等人, Amino Acids 20:225-41(2001))。

[0503]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
PCK1	NP_013023	6322950	酿酒酵母
pck	NP_417862.1	16131280	大肠杆菌
ppcA	YP_089485.1	52426348	产琥珀酸曼氏杆菌

pckA	009460.1	3122621	产琥珀酸厌氧螺菌
pckA	Q6W6X5	75440571	琥珀酸放线杆菌
pckA	P43923.1	1172573	流感嗜血菌
AF532733.1:1..1929	AAQ10076.1	33329363	大黍
pepck	YP_728135.1	113869646	钩虫贪铜菌

[0504] 草酰乙酸脱羧酶催化草酰乙酸脱羧生成丙二酸半醛。催化这个反应的酶包括结核分枝杆菌的 kgd (GenBank ID:050463.4, GI:160395583)。对草酰乙酸具有改进活性和 / 或底物特异性的自 kgd 进化的酶也有描述 (美国专利 8048624)。另外的可用于催化这个反应的酶包括下表中所示的酮 - 酸脱羧酶。

[0505]

EC 编号	名称
4.1.1.1	丙酮酸脱羧酶
4.1.1.7	苯甲酰甲酸脱羧酶
4.1.1.40	羟基丙酮酸脱羧酶

[0506]

4.1.1.43	酮苯基丙酮酸脱羧酶
4.1.1.71	α -酮戊二酸脱羧酶
4.1.1.72	支链酮 - 酸脱羧酶
4.1.1.74	吡啶丙酮酸脱羧酶
4.1.1.75	2-酮精氨酸脱羧酶
4.1.1.79	磺基丙酮酸脱羧酶
4.1.1.80	羟基苯基丙酮酸脱羧酶
4.1.1.82	膦酰丙酮酸脱羧酶

[0507] 酮 - 酸的脱羧由具有不同底物特异性的多种酶包括丙酮酸脱羧酶 (EC 4.1.1.1)、苯甲酰甲酸脱羧酶 (EC 4.1.1.7)、 α -酮戊二酸脱羧酶和支链 α -酮酸脱羧酶催化。丙酮酸脱羧酶 (PDC), 也称为酮 - 酸脱羧酶, 是醇发酵中的一个关键酶, 催化丙酮酸脱羧生成乙醛。来自酿酒酵母的 PDC1 酶对脂族 2-酮酸包括 2-酮丁酸、2-酮戊酸、3-羟基丙酮酸和 2-苯基丙酮酸 (22) 具有宽的底物范围。这种酶已在大肠杆菌中进行了广泛

深入研究、工程改造以达成改变的活性并且功能性表达 (Killenberg-Jabs 等人, Eur. J. Biochem. 268:1698-1704(2001); Li 等人, Biochemistry. 38:10004-10012(1999); terSchure 等人, Appl. Environ. Microbiol. 64:1303-1307(1998))。来自运动发酵单胞菌 (*Zymomonas mobilis*) 的由 pdc 编码的 PDC 也具有宽的底物范围并且经过定向工程改造研究以改变对不同底物的亲和力 (Siegert 等人, Protein Eng Des Sel 18:345-357(2005))。这种酶的晶体结构是可获得的 (Killenberg-Jabs 等人, Eur. J. Biochem. 268:1698-1704(2001))。其它充分表征的 PDC 候选者包括来自巴斯德醋杆菌 (Chandra 等人, 176:443-451(2001)) 和乳酸克鲁维酵母 (Krieger 等人, 269:3256-3263(2002)) 的酶。

[0508]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
pdc	P06672.1	118391	运动发酵单胞菌
pdc1	P06169	30923172	酿酒酵母
pdc	Q8L388	20385191	巴斯德醋杆菌
pdc1	Q12629	52788279	乳酸克鲁维酵母

[0509] 像 PDC 一样, 苯甲酰甲酸脱羧酶 (EC 4.1.1.7) 具有宽的底物范围并且一直是酶工程改造研究的靶标。来自恶臭假单胞菌的酶已进行了广泛深入的研究且这种酶的晶体结构是可获得的 (Polovnikova 等人, 42:1820-1830(2003); Hasson 等人, 37:9918-9930(1998))。在恶臭假单胞菌酶的活性位点中的两个残基的位点定向诱变改变了天然和非天然存在的底物的亲和力 (Km) (Siegert 等人, Protein Eng Des Sel 18:345-357(2005))。这种酶的特性已通过定向工程改造进一步修饰 (Lingen 等人, Chembiochem. 4:721-726(2003); Lingen 等人, Protein Eng 15:585-593(2002))。来自绿脓假单胞菌的由 md1C 编码的酶也通过实验进行了表征 (Barrowman 等人, 34:57-60(1986))。另外的来自施氏假单胞菌、荧光假单胞菌和其它生物体的候选基因可通过序列同源性推断或使用在恶臭假单胞菌中开发的生长选择系统来鉴定 (Henning 等人, Appl. Environ. Microbiol. 72:7510-7517(2006))。

[0510]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
md1C	P20906.2	3915757	恶臭假单胞菌
md1C	Q9HUR2.1	81539678	绿脓假单胞菌
dpgB	ABN80423.1	126202187	施氏假单胞菌
ilvB-1	YP_260581.1	70730840	荧光假单胞菌

[0511] 能够使 2- 氧代酸脱羧的第三种酶是 α - 酮戊二酸脱羧酶 (KGD, EC 4.1.1.71)。

该类酶的底物范围迄今尚未研究。一种示例性的 KDC 由结核分枝杆菌中的 kad 编码 (Tian 等人, PNAS 102:10670-10675(2005))。KDC 酶活性已经也在根瘤菌 (rhizobia) 包括日本慢生根瘤菌和百脉根中间根瘤菌等几种菌种进行了检测 (Green 等人, J Bacteriol 182:2838-2844(2000))。虽然尚未在这些生物体中分离出编码 KDC 的基因, 但是其基因组序列是可获得的并且各基因组中的几个基因注解为推定的 KDC。来自纤细裸藻的 KDC 也进行了表征, 但是与这种活性相关的基因迄今尚未鉴定 (Shigeoka 等人, Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28(1991))。自 N- 端开始的前二十个氨基酸经测序为 MTYKAPVKDKVFLLDKVFVKV (Shigeoka 和 Nakano, Arch. Biochem. Biophys. 288:22-28(1991))。该基因可通过测试含有该 N- 端序列的候选基因的 KDC 活性而鉴别。最近在蓝细菌 (例如聚球藻 PCC 7002) 及同源物中鉴定出一类新的 AKG 脱羧酶 (Zhang 和 Bryant, Science 334:1551-3(2011))。

[0512]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
kgd	O50463.4	160395583	结核分枝杆菌
kgd	NP_767092.1	27375563	日本慢生根瘤菌 USDA110
kgd	NP_105204.1	13473636	百脉根中间根瘤菌
ilvB	ACB00744.1	169887030	聚球藻 PCC 7002

[0513] 用于催化这个反应的第四种候选酶是支链 α - 酮酸脱羧酶 (BCKA)。已显示这类酶作用于链长 3 至 6 个碳的多种化合物 (Oku 等人, J Biol Chem. 263:18386-18396(1988); Smit 等人, Appl Environ Microbiol 71:303-311(2005))。乳酸乳球菌中的酶已在多种支链和直链底物包括 2- 氧代丁酸、2- 氧代己酸、2- 氧代戊酸、3- 甲基-2- 氧代丁酸、4- 甲基-2- 氧代丁酸和异己酸上进行了表征 (Smit 等人, Appl Environ Microbiol 71:303-311(2005))。该酶在结构上进行了表征 (Berg 等人, Science. 318:1782-1786(2007))。乳酸乳球菌酶和运动发酵单胞菌的丙酮酸脱羧酶之间的序列比对表明催化和底物识别残基几乎完全相同 (Siegert 等人, Protein Eng Des Sel 18:345-357(2005)), 所以这种酶将是定向工程改造的有前景的候选者。酿酒酵母的几种酮酸脱羧酶催化支链底物包括 ARO10、PDC6、PDC5、PDC1 和 THI3 的脱羧 (Dickenson 等人, J Biol Chem 275:10937-42(2000))。又一个 BCKAD 酶由结核分枝杆菌的 rv0853c 编码 (Werther 等人, J Biol Chem 283:5344-54(2008))。这种酶通过 α - 酮酸底物经历变构活化。在枯草芽孢杆菌中检测到 α - 酮戊二酸通过 BCKA 脱羧; 然而, 这种活性相对于对其它支链底物的活性较低 (5%) (Oku 和 Kaneda, J Biol Chem. 263:18386-18396(1988)) 并且编码这种酶的基因迄今尚未鉴定。另外的 BCKA 基因候选者可通过与乳酸乳球菌蛋白质序列的同源性鉴别。针对这种酶的高打分 (high-scoring) BLASTp 命中 (hits) 中有许多注解为吡啶丙酮酸脱羧酶 (EC 4.1.1.74)。吡啶丙酮酸脱羧酶 (IPDA) 是在植物和植物细菌中催化吡啶丙酮酸脱羧生成吡啶乙醛的一种酶。来自智人和牛的衍生自线粒体支链酮酸脱氢酶复合体的 E1 亚基的重组支链 α - 酮酸脱羧酶已在大肠杆菌中进行了克隆

和功能性表达 (Davie 等人, J. Biol. Chem. 267:16601-16606 (1992); Wynn 等人, J. Biol. Chem. 267:12400-12403 (1992); Wynn 等人, J. Biol. Chem. 267:1881-1887 (1992))。在这些研究中, 作者发现伴侣蛋白 GroEL 和 GroES 的共表达使脱羧酶的比活性增大了 500 倍 (Wynn 等人, J. Biol. Chem. 267:12400-12403 (1992))。这些酶由两个 α 和两个 β 亚基组成。

[0514]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
kdcA	AAS49166.1	44921617	乳酸乳球菌
PDC6	NP_010366.1	6320286	酿酒酵母
PDC5	NP_013235.1	6323163	酿酒酵母
PDC1	P06169	30923172	酿酒酵母
ARO10	NP_010668.1	6320588	酿酒酵母
THI3	NP_010203.1	6320123	酿酒酵母
rv0853c	053865.1	81343167	结核分枝杆菌
BCKDHB	NP_898871.1	34101272	智人
BCKDHA	NP_000700.1	11386135	智人
BCKDHB	P21839	115502434	牛
BCKDHA	P11178	129030	牛

[0515] 3- 磷酸丙酮酸脱羧酶 (EC 4.1.1.82) 催化 3- 磷酸丙酮酸脱羧生成 2- 磷酸乙醛。示例性的磷酸丙酮酸脱羧酶由苍黄链霉菌 (*Streptomyces luridus*) 的 dhpF、绿紫链霉菌 (*Streptomyces viridochromogenes*) 的 ppd、威德摩尔链霉菌 (*Streptomyces wedmorensis*) 的 fom2 和吸水链霉菌 (*Streptomyces hygroscopticus*) 的 bcpC 编码 (Circello 等人, Chem Biol 17:402-11 (2010); Blodgett 等人, FEMS Microbiol Lett 163:149-57 (2005); Hidaka 等人, Mol Gen Genet 249:274-80 (1995); Nakashita 等人, Biochim Biophys Acta 1490:159-62 (2000))。由 aepY 编码的脆弱拟杆菌 (*Bacteroides fragilis*) 酶也使丙酮酸和磺基丙酮酸脱羧 (Zhang 等人, J Biol Chem 278:41302-8 (2003))。

[0516]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
dhpF	ACZ13457.1	268628095	苍黄链霉菌
Ppd	CAJ14045.1	68697716	绿紫链霉菌

Fom2	BAA32496.1	1061008	威德摩尔链霉菌
aepY	AAG26466.1	11023509	脆弱拟杆菌

[0517] 许多草酰乙酸脱羧酶 (EC 4.1.1.3) (例如大肠杆菌中的 *eda* 基因产物) 作用于草酰乙酸的末端酸以形成丙酮酸。因为 3-酮酸位置上的脱羧与 2-酮-酸位置上形成丙二酸半醛的脱羧竞争,所以在具有丙二酸半醛中间体之前的途径的宿主菌株中可以将这种酶活性敲除。

[0518] 丙二酰-CoA 脱羧酶 (EC 4.1.1.9) 催化丙二酰-CoA 脱羧生成乙酰-CoA。该酶已在豌豆根瘤菌和醋酸钙不动杆菌中进行了表征 (An 等人, *Eur J Biochem* 257:395-402(1998); Koo 等人, *Eur J Biochem* 266:683-90(1999))。相似的酶已在红霉素链霉菌 (*Streptomyces erythreus*) 中进行了表征 (Hunaiti 等人, *Arch Biochem Biophys* 229:426-39(1984))。重组人丙二酰-CoA 脱羧酶在大肠杆菌中过量表达 (Zhou 等人, *Prot Expr Pur* 34:261-9(2004))。将丙二酰-CoA 脱羧的甲基丙二酰-CoA 脱羧酶也是合适的候选者。例如,小韦荣氏球菌酶接受丙二酰-CoA 作为底物 (Hilpert 等人, *Nature* 296:584-5(1982))。大肠杆菌酶由 *ygfG* 编码 (Benning 等人, *Biochemistry*. 39:4630-4639(2000); Haller 等人, *Biochemistry*. 39:4622-4629(2000))。大肠杆菌酶的立体特异性尚未报道,但是中度产丙酸菌 (Bott 等人, *Eur. J. Biochem.* 250:590-599(1997)) 和小韦荣氏球菌 (Huder 等人, *J. Biol. Chem.* 268:24564-24571(1993)) 中的酶催化甲基丙二酰-CoA 的 (S)-立体异构体的脱羧 (Hoffmann 等人, *FEBS. Lett.* 220:121-125(1987))。来自中度产丙酸菌 (*P. modestum*) 和小韦荣氏球菌 (*V. parvula*) 的酶由多个亚基组成,不仅使 (S)-甲基丙二酰-CoA 脱羧,而且产生跨细胞膜转运钠离子的泵作为产生能量的一种方式。

[0519]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
YgfG	NP_417394	90111512	大肠杆菌
matA	Q9ZIP6	75424899	豌豆根瘤菌
mdcD	AAB97628.1	2804622	醋酸钙不动杆菌
mdcE	AAF20287.1	6642782	醋酸钙不动杆菌
mdcA	AAB97627.1	2804621	醋酸钙不动杆菌
mdcC	AAB97630.1	2804624	醋酸钙不动杆菌
gcd	NP_036345.2	110349750	智人
mmdA	CAA05137	2706398	中度产丙酸菌

mmdD	CAA05138	2706399	中度产丙酸菌
mmdC	CAA05139	2706400	中度产丙酸菌
mmdB	CAA05140	2706401	中度产丙酸菌
mmdA	CAA80872	415915	小韦荣氏球菌
mmdC	CAA80873	415916	小韦荣氏球菌
mmdE	CAA80874	415917	小韦荣氏球菌
mmdD	CAA80875	415918	小韦荣氏球菌
mmdB	CAA80876	415919	小韦荣氏球菌

[0520] 6.2.1.a CoA 合成酶

[0521] 丙二酸活化成丙二酰-CoA 由 EC 6.2.1.a 类中的 CoA 合成酶催化。催化这个反应的 CoA 合成酶迄今为止在文献中未有描述。以上描述的几种 CoA 合成酶也可以适用于催化图 10 的步骤 K。这些酶包括乙酰-CoA 合成酶（表 16、表 25）和 ADP 形成 CoA 合成酶（表 17）。

[0522] 6.4.1.a 羧化酶

[0523] 丙酮酸羧化酶 (EC 6.4.1.1) 在消耗一个 ATP 的情况下将丙酮酸转变成草酰乙酸（步骤 H）。示例性的丙酮酸羧化酶由酿酒酵母中的 PYC1 (Walker 等人, Biochem. Biophys. Res. Commun. 176:1210-1217(1991) 和 PYC2 (Walker 等人, 同上) 和耻垢分枝杆菌中的 pyc (Mukhopadhyay 和 Purwantini, Biochim. Biophys. Acta 1475:191-206(2000)) 编码。

[0524]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
PYC1	NP_011453	6321376	酿酒酵母
PYC2	NP_009777	6319695	酿酒酵母
Pyc	YP_890857.1	118470447	耻垢分枝杆菌

[0525] 实施例 IV

[0526] 自线粒体乙酰-CoA 生产细胞溶质乙酰-CoA 的途径

[0527] 将来自线粒体的乙酰-CoA 转运至细胞溶质中的机制可促进采用来源于乙酰-CoA 的细胞溶质脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸生产途径。用于输出乙酰-CoA 的示例性机制包括图 4 和图 5 中描绘的那些, 其可在线粒体中自乙酰-CoA 和草酰乙酸形成柠檬酸, 将来自线粒体的柠檬酸输出到细胞溶质中并将柠檬酸转变成草酰乙酸, 和乙酸或乙酰-CoA。在某些实施方案中, 本文提供的是用于工程改造真核生物以通过引入能够实现图 4 和图 5 中的任何一个所描绘的转化的酶增加其细胞溶质乙酰-CoA 的可利用性的方法。本文也公开了能够实

现所需要转化的示例性酶。

[0528] 自线粒体乙酰 -CoA 生产细胞溶质乙酰 -CoA 可以通过多种途径（例如，在三个至五个酶促步骤中）完成。在一个示例性的途径中，将线粒体乙酰 -CoA 和草酰乙酸通过柠檬酸合酶组合成柠檬酸，然后通过柠檬酸或柠檬酸 / 草酰乙酸转运体将柠檬酸输出到线粒体外部。柠檬酸在细胞溶质中的酶促转变导致产生细胞溶质乙酰 -CoA 和草酰乙酸。细胞溶质草酰乙酸然后可以任选地通过草酰乙酸转运体和 / 或柠檬酸 / 草酰乙酸转运体反向转运进入线粒体中。在另一示例性的途径中，细胞溶质草酰乙酸首先在细胞溶质中经酶促转变成苹果酸，然后通过苹果酸转运体和 / 或苹果酸 / 柠檬酸转运体任选地转移到线粒体中。线粒体苹果酸可随后使用线粒体苹果酸脱氢酶转变成草酰乙酸。

[0529] 在又一个示例性的途径中，线粒体乙酰 -CoA 可以通过柠檬酸中间体转变成细胞溶质乙酰 -CoA。例如，线粒体乙酰 -CoA 和丙酮酸通过柠檬酸合酶转变成柠檬酸。柠檬酸然后通过柠檬酸或二羧酸转运体转运到细胞溶质中。细胞溶质乙酰 -CoA 和丙酮酸然后由柠檬酸直接或间接再生，丙酮酸可以再进入线粒体中

[0530] 沿着这些线路，用于自线粒体乙酰 -CoA 生产细胞溶质乙酰 -CoA 的几种示例性乙酰 -CoA 途径如图 4 和图 5 所示。在一个实施方案中，将线粒体草酰乙酸与线粒体乙酰 -CoA 组合以通过柠檬酸合酶形成柠檬酸。柠檬酸通过柠檬酸转运体、柠檬酸 / 草酰乙酸转运体或柠檬酸 / 苹果酸转运体转运到线粒体外部。细胞溶质柠檬酸通过 ATP 柠檬酸裂合酶转变成细胞溶质乙酰 -CoA 和草酰乙酸。在另一种途径中，细胞溶质柠檬酸通过柠檬酸裂合酶转变成乙酸和草酰乙酸。乙酸然后通过乙酰 -CoA 合成酶或转移酶转变成细胞溶质乙酰 -CoA。或者，乙酸可以通过乙酸激酶转变成乙酰磷酸，乙酰磷酸可以通过磷酸转乙酰酶转变成细胞溶质乙酰 -CoA。下文描述了用于乙酰 -CoA 途径酶的示例性候选酶。

[0531] 草酰乙酸和线粒体乙酰 -CoA 的转变由柠檬酸合酶催化（图 4 和图 5，步骤 A）。在某些实施方案中，所述柠檬酸合酶在本文提供的非天然存在的真核生物的线粒体中表达。

[0532]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
CIT1	NP_014398.1	6324328	酿酒酵母 S288c
CIT2	NP_009931.1	6319850	酿酒酵母 S288c
CIT3	NP_015325.1	6325257	酿酒酵母 S288c
YAL10E02684p	XP_503469.1	50551989	解脂耶氏酵母
YAL10E00638p	XP_503380.1	50551811	解脂耶氏酵母
ANI_1_876084	XP_001393983.1	145242820	黑曲霉 CBS 513.88
ANI_1_1474074	XP_001393195.2	317030721	黑曲霉 CBS 513.88
ANI_1_2950014	XP_001389414.2	317026339	黑曲霉 CBS 513.88

ANI_1_1226134	XP_001396731.1	145250435	黑曲霉 CBS 513.88
gltA	NP_415248.1	16128695	大肠杆菌 K-12 MG1655

[0533] 柠檬酸自线粒体转运到细胞溶质可以通过几种转运蛋白来实现。这样的蛋白质或将柠檬酸直接（即，柠檬酸转运体，图 4 和图 5，步骤 B）输出到细胞溶质中，或者在将来自细胞溶质的分子例如苹果酸（即，柠檬酸 / 苹果酸转运体，图 4，步骤 C）或草酰乙酸（即，柠檬酸 / 草酰乙酸转运体，图 5，步骤 C）同时转运到线粒体的同时将柠檬酸输出到细胞溶质中，如图 4 和图 5 所示。在下表中提供了实现这些转化的示例性转运酶。

[0534]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
CTP1	NP_009850.1	6319768	酿酒酵母 S288c
YAL10F26323p	XP_505902.1	50556988	解脂耶氏酵母
AATEG_09970	EAU29419.1	114187719	土曲霉 NIH2624
KLLA0E18723g	XP_454797.1	50309571	乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140
CTRG_02320	XP_002548023.1	255726194	热带假丝酵母 MYA-3404
ANI_1_1474094	XP_001395080.1	145245625	黑曲霉 CBS 513.88
YHM2	NP_013968.1	6323897	酿酒酵母 S288c
DTC	CAC84549.1	19913113	拟南芥
DTC1	CAC84545.1	19913105	烟草
DTC2	CAC84546.1	19913107	烟草
DTC3	CAC84547.1	19913109	烟草
DTC4	CAC84548.1	19913111	烟草
DTC	AAR06239.1	37964368	香橙

[0535] ATP 柠檬酸裂合酶 (ACL, EC 2.3.3.8, 图 4 和图 5, 步骤 D), 也称为 ATP 柠檬酸合酶, 催化柠檬酸 ATP- 依赖性裂解生成草酰乙酸和乙酰-CoA。在某些实施方案中, ATP 柠檬酸裂合酶在真核生物的细胞溶质中表达。ACL 是已在绿色硫细菌泥生绿菌 (*Chlorobium limicola*) 和微温绿菌 (*Chlorobium tepidum*) 中研究的 RTCA 循环的酶。来自泥生绿菌的 α (4) β (4) 杂聚体的酶在大肠杆菌中进行了克隆和表征 (Kanao 等人, *Eur. J. Biochem.* 269:3409-3416(2002))。由 *aclAB* 编码的泥生绿菌 (*C. limicola*) 酶是不可逆的并且该酶的活性通过 ADP/ATP 比率调节。在阐明 α 和 β 亚基在催化机制中的作

用的研究中,来自微温绿菌的重组 ACL 也在大肠杆菌中表达,且全酶在体外复原 (Kim 和 Tabita, J. Bacteriol. 188:6544-6552(2006))。ACL 酶也在无机营养产水菌 (*Balnearium lithotrophicum*)、地下硫氢菌 (*Sulfurihydrogenibium subterraneum*) 和细菌门产水菌门 (Aquificae) 的其它成员中鉴定 (Hugler 等人, Environ. Microbiol. 9:81-92(2007))。这种活性也在一些真菌中有报道。示例性的生物体包括大孢粪壳 (Nowrousian 等人, Curr. Genet. 37:189-93(2000))、构巢曲霉和解脂耶氏酵母 (Hynes 和 Murray, Eukaryotic Cell, July:1039-1048, (2010) 和 黑曲霉 (Meijer 等人, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 36:1275-1280(2009))。其它候选者可以基于序列同源性发现。与这些酶相关的信息列表如下。

[0536]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
ac1A	BAB21376.1	12407237	泥生绿菌
ac1B	BAB21375.1	12407235	泥生绿菌
ac1A	AAM72321.1	21647054	微温绿菌
ac1B	AAM72322.1	21647055	微温绿菌
ac1B	ABI50084.1	114055039	地下硫氢菌
ac1A	AAX76834.1	62199504	脱氮硫单胞菌
ac1B	AAX76835.1	62199506	脱氮硫单胞菌
ac11	XP_504787.1	50554757	解脂耶氏酵母
ac12	XP_503231.1	50551515	解脂耶氏酵母
SPBC1703.07	NP_596202.1	19112994	粟酒裂殖酵母
SPAC22A12.16	NP_593246.1	19114158	粟酒裂殖酵母
ac11	CAB76165.1	7160185	大孢粪壳
ac12	CAB76164.1	7160184	大孢粪壳
ac1A	CBF86850.1	259487849	构巢曲霉
ac1B	CBF86848	259487848	构巢曲霉

[0537] 在一些生物体中,将柠檬酸转变成草酰乙酸和乙酰 -CoA 通过柠檬酰 -CoA 中间体进行并且由两种独立的酶即柠檬酰 -CoA 合成酶 (EC 6.2.1.18) 和柠檬酰 -CoA 裂合酶 (EC 4.1.3.34) 催化 (Aoshima, M., Appl. Microbiol. Biotechnol. 75:249-255(2007))。柠

柠檬酰-CoA 合成酶催化柠檬酸活化成柠檬酰-CoA。嗜热氢杆菌酶由分别由 *ccsA* 和 *ccsB* 编码的大亚基和小亚基组成 (Aoshima 等人, *Mol. Microbiol.* 52:751-761 (2004))。风产液菌的柠檬酰-CoA 合成酶由由 *sucC1* 和 *sucD1* 编码的 α 和 β 亚基组成 (Hugler 等人, *Environ. Microbiol.* 9:81-92 (2007))。柠檬酰-CoA 裂合酶将柠檬酰-CoA 裂解成草酰乙酸和乙酰-CoA。这种酶是由嗜热氢杆菌中的 *ccl* (Aoshima 等人, *Mol. Microbiol.* 52:763-770 (2004)) 和风产液菌中的 *aq_150* (Hugler 等人, 同上 (2007)) 编码的同三聚体。最近也在微温绿菌中报道了用于将柠檬酸转变成草酰乙酸和柠檬酰-CoA 的该机制的基因 (Eisen 等人, *PNAS* 99(14):9509-14 (2002))。

[0538]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
<i>ccsA</i>	BAD17844.1	46849514	嗜热氢杆菌
<i>ccsB</i>	BAD17846.1	46849517	嗜热氢杆菌
<i>sucC1</i>	AAC07285	2983723	风产液菌
<i>sucD1</i>	AAC07686	2984152	风产液菌
<i>ccl</i>	BAD17841.1	46849510	嗜热氢杆菌
<i>aq_150</i>	AAC06486	2982866	风产液菌
CT0380	NP_661284	21673219	微温绿菌
CT0269	NP_661173.1	21673108	微温绿菌
CT1834	AAM73055.1	21647851	微温绿菌

[0539] 柠檬酸裂合酶 (EC 4.1.3.6, 图 4 和图 5, 步骤 E) 催化一系列反应, 导致柠檬酸裂解成乙酸和草酰乙酸。在某些实施方案中, 柠檬酸裂合酶在真核生物的细胞溶质中表达。该酶在厌氧条件下有活性并且由酰基-载体蛋白 (ACP, γ)、ACP 转移酶 (α) 和酰基裂合酶 (β) 三种亚基组成。酶活化使用不常用辅基 2'-(5"-磷酸核糖基)-3'-脱磷酸-CoA (在结构上其与乙酰-CoA 相似) 的共价结合和乙酰化。酰基化由 CitC (一种柠檬酸裂合酶合成酶) 催化。使用两种另外的蛋白质 CitG 和 CitX 将 apo 酶转变成活性全酶 (Schneider 等人, *Biochemistry* 39:9438-9450 (2000))。野生型大肠杆菌不具有柠檬酸裂合酶活性; 然而, 钼辅因子合成中有缺陷的突变体具有活性柠檬酸裂合酶 (Clark, *FEMS Microbiol. Lett.* 55:245-249 (1990))。大肠杆菌酶由 *citEFD* 编码, 柠檬酸裂合酶合成酶由 *citC* 编码 (Nilekani 和 SivaRaman, *Biochemistry* 22:4657-4663 (1983))。肠系膜样明串珠菌柠檬酸裂合酶已在大肠杆菌中克隆、表征和表达 (Bekal 等人, *J. Bacteriol.* 180:647-654 (1998))。柠檬酸裂合酶也已在利用柠檬酸作为碳源和能量来源的肠细菌 (包括鼠伤寒沙门氏菌和肺炎克雷伯氏菌) 中鉴定出来 (Bott, *Arch. Microbiol.* 167:78-88 (1997); Bott 和 Dimroth, *Mol. Microbiol.* 14:347-356 (1994))。以上

提及的蛋白质列表如下。

[0540]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
citF	AAC73716.1	1786832	大肠杆菌
citE	AAC73717.2	87081764	大肠杆菌
citD	AAC73718.1	1786834	大肠杆菌
citC	AAC73719.2	87081765	大肠杆菌
citG	AAC73714.1	1786830	大肠杆菌
citX	AAC73715.1	1786831	大肠杆菌
citF	CAA71633.1	2842397	肠系膜样明串珠菌
citE	CAA71632.1	2842396	肠系膜样明串珠菌
citD	CAA71635.1	2842395	肠系膜样明串珠菌
citC	CAA71636.1	3413797	肠系膜样明串珠菌
citG	CAA71634.1	2842398	肠系膜样明串珠菌
citX	CAA71634.1	2842398	肠系膜样明串珠菌
citF	NP_459613.1	16763998	鼠伤寒沙门氏菌
citE	AAL19573.1	16419133	鼠伤寒沙门氏菌
citD	NP_459064.1	16763449	鼠伤寒沙门氏菌
citC	NP_459616.1	16764001	鼠伤寒沙门氏菌
citG	NP_459611.1	16763996	鼠伤寒沙门氏菌
citX	NP_459612.1	16763997	鼠伤寒沙门氏菌
citF	CAA56217.1	565619	肺炎克雷伯氏菌
citE	CAA56216.1	565618	肺炎克雷伯氏菌
citD	CAA56215.1	565617	肺炎克雷伯氏菌
citC	BAH66541.1	238774045	肺炎克雷伯氏菌

citG	CAA56218.1	565620	肺炎克雷伯氏菌
citX	AAL60463.1	18140907	肺炎克雷伯氏菌

[0541] 乙酸酰基化生成乙酰 -CoA 由具有乙酰 -CoA 合成酶活性的酶催化 (图 4 和图 5, 步骤 F)。在某些实施方案中,乙酰 -CoA 合成酶在真核生物的细胞溶质中表达。催化这个反应的两种酶是 AMP 形成乙酰 -CoA 合成酶 (EC 6.2.1.1) 和 ADP 形成乙酰 -CoA 合成酶 (EC 6.2.1.13)。AMP 形成乙酰 -CoA 合成酶 (ACS) 是用于将乙酸活化成乙酰 -CoA 的主要酶。示例性的 ACS 酶在大肠杆菌 (Brown 等人, *J. Gen. Microbiol.* 102:327-336(1977))、富养罗尔斯通氏菌 (Priefert 和 Steinbuchel, *J. Bacteriol.* 174:6590-6599(1992))、热自养甲烷热杆菌 (Ingram-Smith 和 Smith, *Archaea* 2:95-107(2007))、肠道沙门氏菌 (Gulick 等人, *Biochemistry* 42:2866-2873(2003)) 和酿酒酵母 (Jogl 和 Tong, *Biochemistry* 43:1425-1431(2004)) 中被发现。

[0542]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
acs	AAC77039.1	1790505	大肠杆菌
acoE	AAA21945.1	141890	富养罗尔斯通氏菌
acs1	ABC87079.1	86169671	热自养甲烷热杆菌
acs1	AAL23099.1	16422835	肠道沙门氏菌
ACS1	Q01574.2	257050994	酿酒酵母

[0543] ADP 形成乙酰 -CoA 合成酶 (ACD, EC 6.2.1.13) 是将酰基 -CoA 酯转变成它们的相应酸与同时合成 ATP 相偶联的另一候选酶。在文献中描述了具有宽底物特异性的几种酶。来自闪烁古生球菌的由 AF1211 编码的 ACD I 显示作用于多种直链和支链底物,包括乙酰 -CoA、丙酰 -CoA、丁酰 -CoA、乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、异戊酸、琥珀酸、延胡索酸、苯乙酸、吡啶乙酸 (Musfeldt 等人, *J. Bacteriol.* 184:636-644(2002))。来自死海盐盒菌的酶 (注解为琥珀酰 -CoA 合成酶) 接受丙酸、丁酸和支链酸 (异戊酸和异丁酸) 作为底物并且显示在正方向和反方向上操作 (Brasen 等人, *Arch. Microbiol.* 182:277-287(2004))。来自超嗜热泉古生菌 (hyperthermophilic crenarchaeon) 需氧热棒菌 (*Pyrobaculum aerophilum*) 的由 PAE3250 编码的 ACD 显示所有经表征的 ACD 的最宽底物范围,与乙酰 -CoA、异丁酰 -CoA (优选的底物) 和苯基乙酰 -CoA 反应 (Brasen 等人, 同上 (2004))。来自闪烁古生球菌、死海盐盒菌和需氧热棒菌的酶已在大肠杆菌中克隆、功能性表达和表征 (Musfeldt 等人, 同上; Brasen 等人, 同上 (2004))。另外的候选者包括由大肠杆菌中的 *sucCD* 编码的琥珀酰 -CoA 合成酶 (Buck 等人, *Biochemistry* 24:6245-6252(1985)) 和来自恶臭假单胞菌的酰基 -CoA 连接酶 (Fernandez-Valverde 等人, *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1149-1154(1993))。与这些蛋白质和基因相关的信息如下所示。

[0544]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
AF1211	NP_070039.1	11498810	闪烁古生球菌 DSM 4304
AF1983	NP_070807.1	11499565	闪烁古生球菌 DSM 4304
scs	YP_135572.1	55377722	死海盐盒菌 ATCC 43049
PAE3250	NP_560604.1	18313937	好氧火棒菌菌株 IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	大肠杆菌
sucD	AAC73823.1	1786949	大肠杆菌
paaF	AAC24333.2	22711873	恶臭假单胞菌

[0545] 将 CoA 部分添加到乙酸上的一种替代方法是应用一对酶,例如转磷酸的酰基转移酶和乙酸激酶(图4和图5,步骤F)。这种活性使得在同时消耗一个ATP时净生成乙酰-CoA。在某些实施方案中,磷酸转乙酰酶在真核生物的细胞溶质中表达。示例性的转磷酸的酰基转移酶是由 pta 编码的磷酸转乙酰酶。来自大肠杆菌的 pta 基因编码可将乙酰-CoA 转变成乙酰-磷酸的酶,反之亦然(Suzuki, T. *Biochim. Biophys. Acta* 191:559-569(1969))。这种酶在该过程中也可以利用丙酰-CoA 替代形成丙酸的乙酰-CoA(Hesslinger 等人, *Mol. Microbiol* 27:477-492(1998))。同源物存在于包括肠道沙门氏菌和莱茵衣藻在内的若干其它生物体中。

[0546]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
Pta	NP_416800.1	16130232	大肠杆菌
Pta	NP_461280.1	16765665	肠道沙门氏菌肠道亚种血清型变种鼠伤寒菌株 LT2
PAT2	XP_001694504.1	159472743	莱茵衣藻
PAT1	XP_001691787.1	159467202	莱茵衣藻

[0547] 示例性的乙酸激酶是由 ackA 编码的大肠杆菌乙酸激酶(Skarstedt 和 Silverstein *J. Biol. Chem.* 251:6775-6783(1976))。同源物存在于包括肠道沙门氏菌和莱茵衣藻在内的若干其它生物体中。与这些蛋白质和基因相关的信息如下所示:

[0548]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
AckA	NP_416799.1	16130231	大肠杆菌
AckA	NP_461279.1	16765664	肠道沙门氏菌肠道亚种血清型变种鼠伤寒菌株 LT2
ACK1	XP_001694505.1	159472745	莱茵衣藻
ACK2	XP_001691682.1	159466992	莱茵衣藻

[0549] 在有些实施方案中,细胞溶质草酰乙酸通过草酰乙酸转运体转运回到线粒体中。转运回到线粒体中的草酰乙酸然后可以用于本文描述的乙酰-CoA 途径中。草酰乙酸自细胞溶质转运到线粒体中可以通过几种转运蛋白质实现。这样的蛋白质或者直接(即,草酰乙酸转运体)将草酰乙酸输入到线粒体中或者在将来自线粒体的分子例如柠檬酸(即,柠檬酸/草酰乙酸转运体)同时转运到细胞溶质中的同时将草酰乙酸输入到细胞溶质中,如图5所示。实现这些转化的示例性转运酶在下表中提供。

[0550]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
OAC1	NP_012802.1	6322729	酿酒酵母 S288c
KLLA0B12826g	XP_452102.1	50304305	乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140

[0551]

YALIOE04048g	XP_503525.1	50552101	解脂耶氏酵母
CTRG_02239	XP_002547942.1	255726032	热带假丝酵母 MYA-3404
DIC1	NP_013452.1	6323381	酿酒酵母 S288c
YALIOB03344g	XP_500457.1	50545838	解脂耶氏酵母
CTRG_02122	XP_002547815.1	255725772	热带假丝酵母 MYA-3404
PAS_chr4_0877	XP_002494326.1	254574434	巴斯德毕赤酵母 GS115
DTC	CAC84549.1	19913113	拟南芥
DTC1	CAC84545.1	19913105	烟草
DTC2	CAC84546.1	19913107	烟草
DTC3	CAC84547.1	19913109	烟草
DTC4	CAC84548.1	19913111	烟草
DTC	AAR06239.1	37964368	香橙

[0552] 在有些实施方案中,细胞溶质草酰乙酸首先通过细胞溶质苹果酸脱氢酶转变成苹果酸(图4,步骤H)。细胞溶质苹果酸通过苹果酸转运体或柠檬酸/苹果酸转运体转运到线粒体中(图4,步骤I)。线粒体苹果酸然后通过线粒体苹果酸脱氢酶转变成草酰乙酸(图4,步骤J)。线粒体草酰乙酸然后可以用于本文描述的乙酰-CoA 途径。这些酶中的每一个的示例性实例在下文提供。

[0553] 草酰乙酸通过苹果酸脱氢酶转变成苹果酸(EC 1.1.1.37,图4,步骤H)。当苹果酸是自细胞溶质转运到线粒体中的二羧酸时,可以使用细胞溶质和线粒体两种形式的

苹果酸脱氢酶的表达,例如,如图3中所示。酿酒酵母具有苹果酸脱氢酶的三个拷贝:MDH1(McAlister-Henn 和 Thompson, J. Bacteriol. 169:5157-5166(1987)、MDH2(Minard 和 McAlister-Henn, Mol. Cell. Biol. 11:370-380(1991);Gibson 和 McAlister-Henn, J. Biol. Chem. 278:25628-25636(2003)) 和 MDH3(Steffan 和 McAlister-Henn, J. Biol. Chem. 267:24708-24715(1992)),它们分别定位于线粒体、细胞溶质和过氧化物酶体。来自酿酒酵母的与细胞溶质苹果酸脱氢酶 MDH2 密切相关的同源物在包括乳酸克鲁维酵母和热带假丝酵母在内的一些生物体中被发现。已知大肠杆菌也具有由 mdh 编码的活性苹果酸脱氢酶。

[0554]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
MDH1	NP_012838	6322765	酿酒酵母
MDH2	NP_014515	116006499	酿酒酵母
MDH3	NP_010205	6320125	酿酒酵母
Mdh	NP_417703.1	16131126	大肠杆菌
KLLA0E07525p	XP_454288.1	50308571	乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140

[0555]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
YALI0D16753g	XP_502909.1	50550873	解脂耶氏酵母
CTRG_01021	XP_002546239.1	255722609	热带假丝酵母 MYA-3404

[0556] 苹果酸自细胞溶质转运到线粒体可以通过几种转运蛋白质来实现。这样的蛋白质或者直接(即,苹果酸转运体)将苹果酸输入到线粒体中或者在将来自线粒体的分子例如柠檬酸(即,柠檬酸/苹果酸转运体)同时转运到细胞溶质中的同时将苹果酸输入到细胞溶质中,如图4中所示。实现这些转化的示例性转运酶在下表中提供。

[0557]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
OAC1	NP_012802.1	6322729	酿酒酵母 S288c
KLLA0B12826g	XP_452102.1	50304305	乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140
YAL10E04048g	XP_503525.1	50552101	解脂耶氏酵母
CTRG_02239	XP_002547942.1	255726032	热带假丝酵母 MYA-3404
DIC1	NP_013452.1	6323381	酿酒酵母 S288c

YALIOB03344g	XP_500457.1	50545838	解脂耶氏酵母
CTRG_02122	XP_002547815.1	255725772	热带假丝酵母 MYA-3404
PAS_chr4_0877	XP_002494326.1	254574434	巴斯德毕赤酵母 GS115
DTC	CAC84549.1	19913113	拟南芥
DTC1	CAC84545.1	19913105	烟草
DTC2	CAC84546.1	19913107	烟草
DTC3	CAC84547.1	19913109	烟草
DTC4	CAC84548.1	19913111	烟草
DTC	AAR06239.1	37964368	香橙

[0558] 苹果酸可以通过苹果酸脱氢酶转变成草酰乙酸 (EC 1.1.1.37, 图4, 步骤J)。当苹果酸是自细胞溶质转运到线粒体中的二羧酸时, 在某些实施方案中, 表达细胞溶质和线粒体两种形式的苹果酸脱氢酶, 如图3和图4中所示。酿酒酵母具有苹果酸脱氢酶的三个拷贝: MDH1 (McAlister-Henn 和 Thompson, *J. Bacteriol.* 169:5157-5166 (1987)、MDH2 (Minard 和 McAlister-Henn, *Mol. Cell. Biol.* 11:370-380 (1991); Gibson 和 McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 278:25628-25636 (2003)) 和 MDH3 (Steffan 和 McAlister-Henn, *J. Biol. Chem.* 267:24708-24715 (1992)), 它们分别定位于线粒体、细胞溶质和过氧化物酶体。与来自酿酒酵母的线粒体苹果酸脱氢酶 MDH1 密切相关的同源物在包括乳酸克鲁维酵母、解脂耶氏酵母、热带假丝酵母在内的一些生物体中被发现。已知大肠杆菌也具有由 *mdh* 编码的活性苹果酸脱氢酶。

[0559]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
MDH1	NP_012838	6322765	酿酒酵母
MDH2	NP_014515	116006499	酿酒酵母
MDH3	NP_010205	6320125	酿酒酵母
Mdh	NP_417703.1	16131126	大肠杆菌
KLLAOF25960g	XP_456236.1	50312405	乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140
YALIOD16753g	XP_502909.1	50550873	解脂耶氏酵母
CTRG_00226	XP_002545445.1	255721021	热带假丝酵母 MYA-3404

[0560] 实施例 V

[0561] 利用对 NADH 具有优先性的途径酶

[0562] 自葡萄糖产生乙酰-CoA 最多可产生呈 NADH 形式的四个还原当量。使还原当量的产率最大化的直接和能量有效方式是利用 Embden-Meyerhof-Parnas 糖酵解途径 (EMP 途径)。在许多利用碳水化合物的生物体中,各甘油醛-3-磷酸分子通过甘油醛-3-磷酸脱氢酶的每一次氧化产生一个 NADH 分子。假定通过 EMP 途径代谢的每个葡萄糖分子产生两个甘油醛-3-磷酸分子,可由葡萄糖转变成丙酮酸获得两个 NADH 分子。

[0563] 假定通过 EMP 途径代谢的每个葡萄糖分子产生两个丙酮酸分子,可由丙酮酸转变成乙酰-CoA 获得两个额外 NADH 分子。这可通过采用将丙酮酸转变成乙酰-CoA 的以下酶或酶组中的任何一个来进行:

[0564] I. NAD- 依赖性丙酮酸脱氢酶;

[0565] II. 丙酮酸甲酸裂合酶和 NAD- 依赖性甲酸脱氢酶;

[0566] III. 丙酮酸:铁氧还蛋白氧化还原酶和 NADH:铁氧还蛋白氧化还原酶;

[0567] IV. 丙酮酸脱羧酶和 NAD- 依赖性酰基化乙酰基醛脱氢酶;

[0568] V. 丙酮酸脱羧酶、NAD- 依赖性酰基化乙醛脱氢酶、乙酸激酶和磷酸转乙酰酶;和

[0569] VI. 丙酮酸脱羧酶、NAD- 依赖性酰基化乙醛脱氢酶和乙酰-CoA 合成酶。

[0570] 总的来说,每个代谢的葡萄糖分子可获得四个 NADH 分子。在一个方面,脂肪醇途径需要来自乙酰-CoA 的三个还原步骤。因此,很可能这三个还原步骤中的每一个都将利用 NADPH 或 NADH 作为还原剂,进而将这些分子分别转变成 NADP 或 NAD。因此,在有些方面,可能理想的是所有还原步骤都是 NADH- 依赖性的以便将脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸的产率最大化。脂肪醇、脂肪醛和脂肪酸的高产率可以通过以下方式来完成:

[0571] 鉴别和实施对 NADH 比对其它还原当量(例如 NADPH) 优先性更强的内源或外源脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径酶,

[0572] I. 衰减有助于 NADPH- 依赖性还原活性的一种或多种内源脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径酶,

[0573] II. 改变内源或外源脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径酶的辅因子特异性,致使其对 NADH 比对其天然形式具有更强的优先性,或

[0574] III. 改变内源或外源脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸途径酶的辅因子特异性,致使其对 NADPH 比对其天然形式具有更弱的优先性。

[0575] 来自内源或外源 DNA 序列的个别酶或蛋白质活性可使用本领域众所周知的方法进行测定。例如,可使基因在大肠杆菌中表达,并且可使用细胞提取物测量其所编码蛋白质的活性。或者,酶可使用本领域众所周知的标准程序进行纯化并测定活性。基于分光光度的测定特别有效。

[0576] 改变酶的辅因子特异性的若干实例和方法是本领域已知的。例如,Houry 等人 (Protein Sci. 2009 年 10 月;18(10):2125-2138) 创建了对 NADH 具有增加的亲和力且对 NADPH 具有减少的亲和力的几种木糖还原酶。Ehsani 等人 (Biotechnology and Bioengineering, 第 104 卷, 第 2 期, 第 381-389 页, 2009 年 10 月 1 日) 急剧地减少了 2,3-丁二醇脱氢酶对 NADH 的活性,同时增加了对 NADPH 的活性。Machielsen 等人 (Engineering in Life Sciences, 第 9 卷, 第 1 期, 第 38-44 页, 2009 年 2 月) 急剧地

增加了醇脱氢酶对 NADH 的活性。Khoury 等人 (Protein Sci. 2009 年 10 月 ;18(10):2125 - 2138) 在表 I 中列出了成功改变超过 25 种其它酶的辅因子优先性的几个在先实例。另外的描述可以在以下文献中找到 :Lutz 等人, Protein Engineering Handbook, 第 1 卷和第 2 卷, 2009, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, 特别是第 31 章 :Altering Enzyme Substrate and Cofactor Specificity via Protein Engineering(通过蛋白质工程改变酶底物和辅因子特异性)。

[0577] 实施例 VI

[0578] 测定途径酶的辅因子优先性

[0579] 本实施例描述了用于测定酶的辅因子优先性的实验方法。

[0580] 酶对各途径步骤的辅因子优先性可以通过克隆质粒上位于组成性或诱导性启动子之后的个体基因并转化到宿主生物(例如大肠杆菌)中进行测定。例如,编码来自以下的催化途径步骤的酶的基因可如下所述组装在基于 pZ 的表达载体上:1) 乙酰乙酰-CoA 至 3-羟基丁酰-CoA, 2) 3-羟基丁酰-CoA 至 3-羟基丁醛, 3) 3-羟基丁醛至 1,3-丁二醇(其中 R₁为 C₁;R₃为 OH)。

[0581] 基于 pZ 的表达载体中的填充片段的置换。载体骨架得自 Expressys (<http://www.expressys.de/>) 的 Rolf Lutz 博士。载体和菌株基于由 Lutz 和 Bujard 开发的 pZ 表达系统 (Nucleic Acids Res 25, 1203-1210(1997))。pZE13luc、pZA33luc、pZS*13luc 和 pZE22luc 含有萤光素酶基因作为填充片段。为了用侧接适当限制酶位点的 lacZ- α 片段置换萤光素酶填充片段, 萤光素酶填充片段通过用 EcoRI 和 XbaI 消化而从各载体中去除。用以下引物, lacZ- α 片段从 pUC19 进行 PCR 扩增:

[0582] lacZ α -RI

[0583] 5' GACGAATTCGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGTCCAATTCCTGGCCGTCGTTTTAC3' (SEQ ID NO:)

[0584] lacZ α 3' BB

[0585] 5' -GACCCTAGGAAGCTTTCTAGAGTCGACCTATGCGGCATCAGAGCAGA-3' (SEQ ID NO:)

[0586] 这产生具有 EcoRI 位点、NheI 位点、核糖体结合位点、SalI 位点和起始密码子的 5' 末端的片段。在片段的 3' 末端上是终止密码子、XbaI、HindIII 和 AvrII 位点。PCR 产物用 EcoRI 和 AvrII 消化并连接到用 EcoRI 和 XbaI 消化的基础载体中(XbaI 和 AvrII 具有相容的末端并生非位点)。因为 NheI 和 XbaI 限制酶位点产生可连接在一起的相容末端(但产生在连接之后不被任一酶消化的位点), 所以克隆到载体中的基因可“生物砖化(Biobricked)”在一起 (http://openwetware.org/wiki/Synthetic_Biology:BioBricks)。简而言之, 这种方法使用相同的 2 个限制位点使得有限数目的基因连接到载体中(只要位点不出现在基因内部), 这是因为基因之间的位点在每次添加后受到破坏。这些载体可以随后使用 Phusion® 位点-定向诱变试剂盒 (NEB, Ipswich, MA, USA) 进行修饰以在 EcoRI 和 NheI 位点之间插入间隔序列 AATTAA。这消除结合 RBS 和起始密码子的 RNA 中的推定茎环结构。

[0587] 所有载体具有 pZ 命名, 后面为字母及编号, 表示复制起点、抗生素抗性标记和启动子/调节单元。复制起点为第二个字母并且对于 ColE1 用 E 表示、对于 p15A 用 A 表示和对于基于 pSC101 的来源用 S 表示(以及较低拷贝数形式的 pSC101 命名为 S*)。第一个编

号代表抗生素抗性标记(1代表氨苄西林,2代表卡那霉素,3代表氯霉素)。最后一个编号定义调节所关注基因的启动子(1代表 PLtet0-1,2代表 PLlac0-1 和 3 代表 PA1lac0-1)。对于本文讨论的工作,我们采用了三种基础载体 pZS*13S、pZA33S 和 pZE13S,经修饰用于如上讨论的生物砖 (biobricks) 插入。

[0588] 含有编码途径酶的基因的质粒然后可以转化到含有 lacIQ 的宿主菌株中,其允许通过添加异丙基 β -D-1-硫代吡喃型半乳糖苷 (IPTG) 可诱导表达。在体外测定 (in vitro assays) 中,使用菌株大肠杆菌 MG1655lacIQ 作为含有途径基因的质粒构建体的宿主,对异源酶的活性进行了测试。让细胞在含有各构建体的适当抗生素的 LB 培养基 (Difco) 中在好氧条件下生长,且在光密度 (OD600) 达到大约 0.5 时,通过添加 1mM 的 IPTG 诱导。可在 6 小时之后收获细胞,且如下文所论述进行酶测定。

[0589] 体外酶测定。为了获得用于活性测定的粗提取物,通过在 4,500rpm (Beckman-Coulter, Allegera X-15R) 下离心 10min 收获细胞。将沉淀重悬浮于 0.3mL 含有核酸酶 (benzonase) 和溶菌酶的 BugBuster (Novagen) 试剂中,并在室温下在轻轻振荡下裂解进行约 15 分钟。通过在 14,000rpm (Eppendorf 离心机 5402) 下于 4°C 离心 30min,获得无细胞裂解物。使用 Bradford 等人,Anal. Biochem. 72:248-254 (1976) 的方法测定样品中的细胞蛋白质,如下所述进行特异性酶测定。活性报告为单位 /mg 蛋白质,其中活性单位定义为在室温下在 1 分钟内转变 1 微摩尔底物所需要的酶量。

[0590] 可使用自若干文献来源 (Durre 等人, FEMS Microbiol. Rev. 17:251-262 (1995); Palosaari 和 Rogers, Bacteriol. 170:2971-2976 (1988) 和 Welch 等人, Arch. Biochem. Biophys. 273:309-318 (1989) 改编的程序,在还原方向上测定途径步骤。NADH 或 NADPH 的氧化可以在室温下持续总共 240 秒每隔四秒读取 340nm 下的吸光度。可在 100mM MOPS (用 KOH 调整到 pH 7.5)、0.4mM NADH 或 0.4mM NADPH 和 1 至 50 μ mol 的细胞提取物中进行还原测定。对于羧酸还原酶样酶,也可以在饱和浓度下加入 ATP。可加入以下试剂使反应开始: 100 μ mol 的 100mM 乙酰乙酰-CoA、3-羟基丁酰-CoA、3-羟基丁酸或 3-羟基丁醛。使分光光度计快速空白,且随后开始动力学读数。可使用 340nm 下的吸光度每分钟降低所得的斜率以及 NAD(P)H 在 340nm 下的摩尔消光系数 (6000) 及提取物的蛋白质浓度来测定比活性。

[0591] 实施例 VII

[0592] 增加 NADPH 可利用性的方法

[0593] 在本发明的有些方面,可能有利的是使用 NADPH 作为还原剂,使用具有活性的途径酶。例如,NADPH-依赖性途径酶对于 MI-FAE 循环、MD-FAE 循环和 / 或终止途径中间体可具有高度特异性并且使用 NADPH 作为底物可具有有利的动力学特性。如果一种或多种途径步骤是 NADPH 依赖性的,那么可使用增加 NADPH 可利用性的几种替代方法。这些包括:

[0594] 1) 通过戊糖磷酸途径包含葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸内酯酶和 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶 (脱羧) 的氧化分支,相对于野生型增加通量。这将每个代谢的葡萄糖-6-磷酸产生 2 个 NADPH 分子。然而,脱羧步骤将降低 1,3-丁二醇的最大理论产率。

[0595] 2) 通过包含葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、6-磷酸葡萄糖酸内酯酶、磷酸葡萄糖酸脱水酶和 2-酮基-3-脱氧葡萄糖酸 6-磷酸醛缩酶的 Entner Doudoroff 途径,相对于野生型增加通量。

[0596] 3) 引入可溶性转氢酶将 NADH 转变成 NADPH。

[0597] 4) 引入膜结合的转氢酶将 NADH 转变成 NADPH。

- [0598] 5) 采用 NADP- 依赖性甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶。
- [0599] 6) 采用下列酶或酶组中的任何一个将丙酮酸转变成乙酰 -CoA
- [0600] a) NADP- 依赖性丙酮酸脱氢酶；
- [0601] b) 丙酮酸甲酸裂合酶和 NADP- 依赖性甲酸脱氢酶；
- [0602] c) 丙酮酸：铁氧还蛋白氧化还原酶和 NADPH：铁氧还蛋白氧化还原酶；
- [0603] d) 丙酮酸脱羧酶和 NADP- 依赖性酰基化乙酰基醛脱氢酶；
- [0604] e) 丙酮酸脱羧酶、NADP- 依赖性乙醛脱氢酶、乙酸激酶和磷酸转乙酰酶；和
- [0605] f) 丙酮酸脱羧酶、NADP- 依赖性乙醛脱氢酶和乙酰 -CoA 合成酶；和任选地使这些酶的 NAD- 依赖性形式衰减。
- [0606] 7) 改变天然甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶、甲酸脱氢酶或酰基化乙酰基醛脱氢酶的辅因子特异性以使对 NADPH 比对其天然形式具有更强的优先性。
- [0607] 8) 改变天然甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶、丙酮酸脱氢酶、甲酸脱氢酶或酰基化乙酰基醛脱氢酶的辅因子特异性以使对 NADH 比对其天然形式具有更弱的优先性。
- [0608] 来自内源或外源 DNA 序列的个体酶或蛋白质活性可以使用本领域众所周知的方法进行测定。例如，基因可以在大肠杆菌中表达并且如先前实施例中描述的方法，可使用细胞提取物测量其所编码蛋白质的活性。或者，可使用本领域众所周知的标准程序将酶纯化并且测定活性。基于分光光度的测定特别有效。
- [0609] 改变酶的辅因子特异性的若干实例和方法是本领域已知的。例如，Khoury 等人 (Protein Sci. 2009 年 10 月 ;18(10):2125 - 2138) 创建了对 NADH 具有增加的亲和力且对 NADPH 具有减少的亲力的几种木糖还原酶。Ehsani 等人 (Biotechnology and Bioengineering, 第 104 卷, 第 2 期, 第 381 - 389 页, 110 月 2009) 急剧地减少 2, 3- 丁二醇脱氢酶对 NADH 的活性, 同时增加对 NADPH 的活性。Machielsen 等人 (Engineering in Life Sciences, 第 9 卷, 第 1 期, 第 38 - 44 页, 2009 年 2 月) 急剧地增加醇脱氢酶对 NADH 的活性。Khoury 等人 (Protein Sci. 2009 年 10 月 ;18(10):2125 - 2138) 在表 I 中列出了成功改变超过 25 种其它酶的辅因子优先性的几个在先实例。另外的描述可以在以下文献中找到 :Lutz 等人, Protein Engineering Handbook, 第 1 卷和第 2 卷, 2009, Wiley-VCH Verlag GmbH&Co. KGaA, 特别是第 31 章 :Altering Enzyme Substrate and Cofactor Specificity via Protein Engineering (通过蛋白质工程改变酶底物和辅因子特异性)。
- [0610] 下文提供了用于这些步骤的候选酶。
- [0611] 葡萄糖 -6- 磷酸脱氢酶
- [0612]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
ZWF1	NP_014158.1	6324088	酿酒酵母 S288c
ZWF1	XP_504275.1	50553728	解脂耶氏酵母
Zwf	XP_002548953.1	255728055	热带假丝酵母 MYA-3404
Zwf	XP_001400342.1	145233939	黑曲霉 CBS 513.88

KLLA0D19855g	XP_453944.1	50307901	乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140
--------------	-------------	----------	---------------------

[0613] 6-磷酸葡萄糖酸内酯酶

[0614]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
SOL3	NP_012033.2	82795254	酿酒酵母 S288c
SOL4	NP_011764.1	6321687	酿酒酵母 S288c
YALIOE11671g	XP_503830.1	50552840	解脂耶氏酵母
YALIOC19085g	XP_501998.1	50549055	解脂耶氏酵母
ANI_1_656014	XP_001388941.1	145229265	黑曲霉 CBS 513.88
CTRG_00665	XP_002545884.1	255721899	热带假丝酵母 MYA-3404
CTRG_02095	XP_002547788.1	255725718	热带假丝酵母 MYA-3404
KLLA0A05390g	XP_451238.1	50302605	乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140
KLLA0C08415g	XP_452574.1	50305231	乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140

[0615] 6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶（脱羧）

[0616]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
GND1	NP_012053.1	6321977	酿酒酵母 S288c
GND2	NP_011772.1	6321695	酿酒酵母 S288c
ANI_1_282094	XP_001394208.2	317032184	黑曲霉 CBS 513.88
ANI_1_2126094	XP_001394596.2	317032939	黑曲霉 CBS 513.88
YALIOB15598g	XP_500938.1	50546937	解脂耶氏酵母
CTRG_03660	XP_002549363.1	255728875	热带假丝酵母 MYA-3404

[0617]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
KLLA0A09339g	XP_451408.1	50302941	乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140

[0618] 磷酸葡萄糖酸脱水酶

[0619]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
Edd	AAC74921.1	1788157	大肠杆菌 K-12 MG1655
Edd	AAG29866.1	11095426	运动发酵单胞菌运动亚种 ZM4
Edd	YP_350103.1	77460596	荧光假单胞菌 Pf0-1
ANI_1_2126094	XP_001394596.2	317032939	黑曲霉 CBS 513.88
YALIOB15598g	XP_500938.1	50546937	解脂耶氏酵母
CTRG_03660	XP_002549363.1	255728875	热带假丝酵母 MYA-3404
KLLAOA09339g	XP_451408.1	50302941	乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140

[0620] 2-酮基-3-脱氧葡萄糖酸 6-磷酸醛缩酶

[0621]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
Eda	NP_416364.1	16129803	大肠杆菌 K-12 MG1655
Eda	Q00384.2	59802878	运动发酵单胞菌运动亚种 ZM4
Eda	ABA76098.1	77384585	荧光假单胞菌 Pf0-1

[0622] 可溶性转氨酶

[0623]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
SthA	NP_418397.2	90111670	大肠杆菌 K-12 MG1655
SthA	YP_002798658.1	226943585	棕色固氮菌 DJ
SthA	O05139.3	11135075	荧光假单胞菌

[0624] 膜结合的转氨酶

[0625]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
ANI_1_29100	XP_001400109.2	317027842	黑曲霉 CBS 513.88
Pc21g18800	XP_002568871.1	226943585	255956237 威斯康辛产黄青霉菌 54-1255
SthA	O05139.3	11135075	荧光假单胞菌
NCU01140	XP_961047.2	164426165	粗糙脉孢霉 OR74A

[0626] NADP- 依赖性甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶

[0627]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
gapN	AAA91091.1	642667	突变链球菌
NP-GAPDH	AEC07555.1	330252461	拟南芥
GAPN	AAM77679.2	82469904	小麦
gapN	CAI56300.1	87298962	丙酮丁醇梭菌
NADP-GAPDH	2D2I_A	112490271	细长聚球藻 PCC 7942

[0628]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
NADP-GAPDH	CAA62619.1	4741714	细长聚球藻 PCC 7942
GDP1	XP_455496.1	50310947	乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140
HP1346	NP_208138.1	15645959	幽门螺杆菌 26695

[0629] NAD- 依赖性甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶

[0630]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
TDH1	NP_012483.1	6322409	酿酒酵母 s288c
TDH2	NP_012542.1	6322468	酿酒酵母 s288c
TDH3	NP_011708.1	632163	酿酒酵母 s288c
KLLA0A11858g	XP_451516.1	50303157	乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140
KLLA0F20988g	XP_456022.1	50311981	乳酸克鲁维酵母 NRRL Y-1140
ANI_1_256144	XP_001397496.1	145251966	黑曲霉 CBS 513.88
YALIO06369g	XP_501515.1	50548091	解脂耶氏酵母
CTRG_05666	XP_002551368.1	255732890	热带假丝酵母 MYA-3404

[0631] 来自大肠杆菌 K-12 MG1655 的突变型 LpdA, 描述于 Biochemistry, 1993, 32(11), 第 2737 - 2740 页:

[0632] MSTEIKTQVVVLGAGPAGYSAAFRCADLGLTVIVERYNTLGGVCLNVGCIPSKALLHVAKVIEEAKAL

AEHGIVFGPKTDIDKIRTWKEKVINQLTGGLAGMAKGRKVKVNVNGLGKFTGANTLEVEGENGKTVINFDNAIIAAG
SRPIQLPFIPHEDPRIWDSTDALELKEVPERLLVMGGGIIIGLEMGTVYHALGSQIDVVVRKHQVIRAADKDIVKVFT
KRISKKNLMLLETKVTAVEAKEDGIYVTMEGKKAPAEPQRYDAVLVAIGRVPNGKNLDAGKAGVEVDDRGFIRVVKQ
LRTNVPHIFAIGDIVGQPM LAHKGVHEGHVAAEVIAGKKHYFDPKVIPSIAYTEPEVAWVGLTEKEAKEKGISYETA
TFPWAASGRATASDCADGMTKLIFDKESHVIGGAI VGTNGGELLGEIGLAIEMGCAEDIALTIHAHPTLHESVGL
AAEVFECSITDLPNPKAKKK (SEQ ID NO:)

[0633] 来自大肠杆菌 K-12 MG1655 的突变型 LpdA, 描述于 *Biochemistry*, 1993, 32(11), 第 2737 - 2740 页:

[0634] MSTEIKTQVVVLGAGPAGYSAAFRCADLGLLETIVIVERYNTLGGVCLNVGCIPSKALLHVAKVIEEAKAL
AEHGIVFGPKTDIDKIRTWKEKVINQLTGGLAGMAKGRKVKVNVNGLGKFTGANTLEVEGENGKTVINFDNAIIAAG
SRPIQLPFIPHEDPRIWDSTDALELKEVPERLLVMGGGIIIALEMATVYHALGSQIDVVVRKHQVIRAADKDIVKVFT
KRISKKNLMLLETKVTAVEAKEDGIYVTMEGKKAPAEPQRYDAVLVAIGRVPNGKNLDAGKAGVEVDDRGFIRVVKQ
LRTNVPHIFAIGDIVGQPM LAHKGVHEGHVAAEVIAGKKHYFDPKVIPSIAYTEPEVAWVGLTEKEAKEKGISYETA
TFPWAASGRATASDCADGMTKLIFDKESHVIGGAI VGTNGGELLGEIGLAIEMGCAEDIALTIHAHPTLHESVGL
AAEVFECSITDLPNPKAKKK (SEQ ID NO:)

[0635] NADP- 依赖性甲酸脱氢酶

[0636]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
fdh	ACF35003.	194220249	稳定伯克霍尔德氏菌
fdh	ABC20599.2	146386149	热醋穆尔氏菌 ATCC 39073

[0637] 突变体博伊丁假丝酵母酶, 描述于 *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 第 61 卷, 第 3-4 期, 2009 年 12 月, 第 157-161 页:

[0638] MKIVLVLYDAGKHAADDEEKLYGCTENKLGIANWLKDGHELIITSDKEGETSELDKHIPDADIIITTPF
HPAYITKERLDKAKNLKLVVAVGSDHIDLIDYINQTKKKISVLEVTGSNVVVAEHVMTMLVLRNFVPAHEQII
NHDWEVAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVLRLPFNPKELLYYQRQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQAD
IVTVNAPLHAGTKGLINKELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESQQLRGYGGDVWFPQPAPKDHPWRMRN
KYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGKFDYRPQDIILLNGEYVTKAYGKHDKK (SEQ ID NO:)

[0639] 突变体博伊丁假丝酵母酶, 描述于 *Journal of Molecular Catalysis B:Enzymatic*, 第 61 卷, 第 3-4 期, 2009 年 12 月, 第 157-161 页:

[0640] MKIVLVLYDAGKHAADDEEKLYGCTENKLGIANWLKDGHELIITSDKEGETSELDKHIPDADIIITTPF
HPAYITKERLDKAKNLKLVVAVGSDHIDLIDYINQTKKKISVLEVTGSNVVVAEHVMTMLVLRNFVPAHEQII
NHDWEVAIAKDAYDIEGKTIATIGAGRIGYRVLRLPFNPKELLYYSPQALPKEAEEKVGARRVENIEELVAQAD
IVTVNAPLHAGTKGLINKELLSKFKKGAWLVNTARGAICVAEDVAAALESQQLRGYGGDVWFPQPAPKDHPWRMRN
KYGAGNAMTPHYSGTTLDAQTRYAEGTKNILESFFTGKFDYRPQDIILLNGEYVTKAYGKHDKK (SEQ ID NO:)

[0641] 突变体酿酒酵母酶, 描述于 *Biochem J.* 2002 年 11 月, 1:367 (Pt. 3):841-847:

[0642] MSKGKVVLLVYEGGKHAEEQEKLKLCIENELGIRNFIEEQGYELVTTIDKDPEPTSTVDRELKDAEIVI
TTPFFPAYISRNRIAEAPNLKLCVTAGVGSVDHVDLEAANERKIVTEVTGSNVVVAEHVMATILVLRNNGGHQQ

AINGEWDIAGVAKNEYDLEDKIIISTVGAGRIGYRVLERLVAFNPKKLLYYARQELPAEAINRLNEASKLFNGRGDIV
 QRVEKLEDMVAQSDVVTINCLPHKDSRGLFNKKLISHMKDGAYLVNTARGAICVAEDVAEAVKSGKLAGYGGDVWDK
 QPAPKDHPWRTMDNKDHVGNAMTVHISGTSLDAQKRYAQGVKNILNSYFSKKFDYRPQDIIVQNGSYATRAYGQKK (SEQ ID NO:)

[0643] NADPH: 铁氧还蛋白氧化还原酶

[0644]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
peth	YP_171276.1	56750575	细长聚球藻 PCC 6301
fpr	NP_457968.1	16762351	肠道沙门氏菌
fnr1	XP_001697352.1	159478523	莱茵衣藻
rfnr1	NP_567293.1	18412939	拟南芥
aceF	NP_414657.1	6128108	大肠杆菌 K-12 MG1655

[0645] NADP- 依赖性酰基化乙酰基醛脱氢酶

[0646]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
adhB	AAB06720.1	1513071	嗜热厌氧假乙醇杆菌 ATCC 33223
TheetDRAFT_0840	ZP_08211603.	326390041	嗜热厌氧乙醇杆菌 JW 200
Cbei_3832	YP_001310903.1	150018649	拜氏梭菌 NCIMB 8052
Cbei_4054	YP_001311120.1	150018866	拜氏梭菌 NCIMB 8052

[0647]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
Cbei_4045	YP_001311111.1	150018857	拜氏梭菌 NCIMB 8052

[0648] 编码丙酮酸脱氢酶、丙酮酸：铁氧还蛋白氧化还原酶、丙酮酸甲酸裂合酶、丙酮酸脱羧酶、乙酸激酶、磷酸转乙酰酶和乙酰-CoA 合成酶的示例性基因以上在实施例 II 中予以描述。

[0649] 实施例 VIII

[0650] 用于化学生产的工程酿酒酵母

[0651] 真核宿主相对于原核系统具有几个优点。它们能够支持翻译后修饰和宿主膜锚定及细胞器特异性酶。真核生物中的基因典型地具有内含子,其可影响基因表达的定时和蛋白质结构。

[0652] 良好适用于工业化学品生产的示例性真核生物是酿酒酵母 (*Saccharomyces*)

cerevisiae)。这种生物体经充分表征、遗传上易控制且工业上稳固。基因可使用本领域已知的方法容易地插入、缺失、置换、过量表达或表达不足。一些方法是基于质粒的,而另一些方法修饰染色体 (Guthrie 和 Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology*, 第 B 部分, 第 350 卷, Academic Press(2002); Guthrie 和 Fink, *Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology*, 第 C 部分, 第 351 卷, Academic Press(2002))。

[0653] 质粒介导的基因表达通过酵母附加型质粒 (YEps) 实现。YEps 允许高水平的表达;然而,它们非常不稳定并且它们需要在选择培养基中进行培养。它们也使宿主代谢具有高维护成本。可以使用使用营养缺陷型 (例如, URA3、TRP1、HIS3、LEU2) 或抗生素选择标记 (例如, Zeo^R或 Kan^R) 的高拷贝数质粒,通常具有强组成性启动子 (例如 PGK1 或 ACT1) 和转录终止子-聚腺苷酸区 (例如来自 CYC1 或 AOX 的那些)。许多实例对精通此项技术的技术人员来说是可获得的。这些包括 pVV214 (具有 URA3 选择标记的 2 微米质粒) 和 pVV200 (具有 TRP1 选择标记的 2 微米质粒) (Van 等人, *Yeast* 20:739-746 (2003))。或者,可以使用低拷贝质粒,例如着丝粒质粒或 CEN 质粒。再者,许多实例对精通此项技术的技术人员来说是可获得的。这些包括 pRS313 和 pRS315 (Sikorski 和 Hieter, *Genetics* 122:19-27 (1989)), 它们两者都需要添加启动子 (例如, PGK1 或 ACT1) 和终止子 (例如, CYC1、AOX)。

[0654] 对于工业应用,基因的染色体过量表达对质粒介导的过量表达来说更佳。Mikkelsen 及合作者鉴定了染色体 X、XI 和 XII 上酿酒酵母基因组的高度表达区域的 11 个整合位点 (Mikkelsen 等人, *Met Eng* 14:104-11 (2012))。这些位点被必需基因分隔开,使位点之间的重组可能性减到最小。

[0655] 用于将基因插入到真核生物 (例如酿酒酵母) 中的工具是本领域已知的。特别有用的工具包括酵母整合质粒 (YIps)、酵母人工染色体 (YACS) 和基因打靶/同源重组。注意,这些工具也可以用于插入、缺失、置换、表达不足或以其他方式改变宿主的基因组。

[0656] 酵母整合质粒 (YIps) 利用天然酵母同源重组系统将 DNA 有效地整合到染色体中。这些质粒不含有复制起点并因此可仅在染色体整合后维持。示例性的构建体包括启动子、所关注基因、终止子和具有启动子、侧接 FRT 位点、loxP 位点的选择标记,或使得抗性标记能够移除及再循环的定向重复序列。该方法需要用合适的引物合成和扩增所关注基因,然后该基因在独特限制位点 (例如由 EcoRI 和 XhoI 酶产生的限制位点) 上进行消化 (Vellanki 等人, *Biotechnol Lett.* 29:313-318 (2007))。将所关注基因在 EcoRI 和 XhoI 位点插入启动子下游的合适表达载体中。基因插入通过 PCR 和 DNA 序列分析验证。然后使用适当的转化方法将重组质粒线性化并且在所需位点整合到酿酒酵母的染色体 DNA 中。将细胞平板接种在具有适当选择标记的 YPD 培养基上并孵育 2-3 天。通过集落 PCR (colony PCR) 分析转化体的必要基因插入物。为了去除来自侧接 loxP 位点的构建体的抗生素标记,引入含有 Cre 重组酶的质粒。Cre 重组酶促进侧接 loxP 位点的序列的切除 (Guedener 等人, *Nucleic Acids Res* 30:e23 (2002))。通过在不存在任何抗生素的培养基上成功培养使所得菌株不含 Cre 质粒。或者,Cre 重组酶质粒具有 URA 选择标记,并且通过细胞在充当 URA 的反选择的 5-FOA 上生长而有效地去除质粒。这种方法也可以用于无痕整合而不使用 loxP。本领域技术人员可使用 URA 作为标记进行整合,通过无 URA 板上生长而对整合进行选择,然后通过无 5-FOA 板上生长对 URA 突变体进行选择。5-FOA 通过 URA 基因产物转变成

有毒的 5- 氟尿嘧啶。或者,FLP-FRT 系统可用于将基因整合到染色体中。该系统包括通过衍生自酵母酿酒酵母的 2 μ 质粒的 Flipase 重组酶 (FLP) 用在短 Flipase 识别靶 (FRT) 位点之间的序列重组 (Sadowski, P. D., Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol. 51:53-91 (1995); Zhu 和 Sadowski, J. Biol. Chem. 270:23044-23054 (1995))。类似地,基因缺失方法如以下文献中所述进行 :Baudin 等人, Nucleic. Acids Res. 21:3329-3330 (1993); Brachmann 等人, Yeast 14:115-132 (1998); Giaever 等人, Nature 418:387-391 (2002); Longtine 等人, Yeast 14:953-961 (1998) Winzeler 等人, Science 285:901-906 (1999)。

[0657] 用于操作酵母染色体的另一种方法是基因打靶。这种方法利用酵母中的双链 DNA 断裂通过同源重组修复的事实。侧接靶向序列的线性 DNA 片段可因此使用天然同源重组机器有效地整合到酵母基因组中。除了插入基因的应用以外,基因打靶方法还可用于基因组 DNA 操作,例如缺失基因、在基因、其启动子或其它调节元件中引入突变或在基因中添加标签。

[0658] 酵母人工染色体 (YACs) 是可用于途径构建和装配的人工染色体。YACs 能够表达含有多个基因的 DNA (100-3000kb) 的大序列。YACs 的应用最近应用于工程改造酵母中的类黄酮 (flavenoid) 生物合成 (Naesby 等人, Microb Cell Fact 8:49-56 (2009))。在这种方法中, YACs 用于快速测试随机装配的途径基因以找到最佳组合。

[0659] 基因的表达水平可以通过改变基因和 / 或其调节区的序列来调节。这样的基因调节区包括例如启动子、增强子、内含子和终止子。负调节元件 (例如阻遏元件和 / 或沉默元件) 的功能破坏也可以用于增强基因表达。基于 RNA 的工具也可以用于调节基因表达。这样的工具包括 RNA 适体、核糖开关 (riboswitch)、反义 RNA、核酶和核糖开关。

[0660] 为了通过其启动子改变基因的表达,不同强度的组成性和诱导性启动子的文库是可获得的。强组成性启动子包括 pTEF1、pADH1 和衍生自糖酵解途径基因的启动子。pGAL 启动子是经充分研究的被半乳糖活化且被葡萄糖阻遏的诱导性启动子。另一个常用的诱导性启动子是铜诱导性启动子 pCUP1 (Farhi 等人, Met Eng 13:474-81 (2011))。启动子强度的进一步变异可通过诱变或改组方法引入。例如,易错 PCR 可以应用于产生合成启动子文库,如 Alper 和 colleagues 所示 (Alper 等人, PNAS 102:12678-83 (2005))。启动子强度可以通过报道蛋白 (例如 β -半乳糖苷酶、荧光蛋白和萤光素酶) 表征。

[0661] 基因组中所插入基因的位置可以改变其表达水平。例如,所整合基因的过量表达可通过将基因整合到重复 DNA 元件 (例如核糖体 DNA 或长末端重复序列) 中而实现。

[0662] 对于酵母或其它真核细胞中的外源表达,基因可以在细胞溶质中表达而无需添加前导序列,或者可以靶向线粒体或其它细胞器,或者通过添加合适的靶向序列例如适合于宿主细胞的线粒体靶向或分泌信号而靶向分泌。因此,应当理解,对核酸序列进行适当修饰以去除或包括靶向序列可以掺入到外源核酸序列中以赋予所需特性。也可以进行遗传修饰以增强多肽合成。例如,通过用最佳或共有序列取代核糖体结合位点和 / 或改变基因序列以添加或去除二级结构来提高翻译效率。也可以通过用另一个编码序列取代一个编码序列以更好匹配宿主的密码子优先性来增加翻译速率。

[0663] 实施例 IX

[0664] 用于制备脂肪醇、脂肪醛和脂肪酸的终止途径

[0665] 本实施例描述了将 MI-FAE 循环或 MD-FAE 循环的中间体转变成所关注产物 (例如

脂肪醇、脂肪醛和脂肪酸)的酶。途径示于图 1 和图 7。在实施例 I 中公开了用于催化步骤 A-G 的酶。本实施例描述了适合于催化步骤 H-N 的酶。

[0666] 酶包括 :A. 硫解酶, B. 3- 酮酰基 -CoA 还原酶, C. β - 羟基 1-ACP 脱水酶, D. 烯酰 -CoA 还原酶, E. 酰基 -CoA 还原酶 (醛形成), F. 醇脱氢酶, G. 酰基 -CoA 还原酶 (醇形成), H. 酰基 -CoA 水解酶、转移酶或合成酶, J. 酰基 -ACP 还原酶, K. 酰基 -CoA:ACP 酰基转移酶, L. 硫酯酶, N. 醛脱氢酶 (酸形成) 或羧酸还原酶。

[0667] 用于将 MI-FAE 循环中间体转变成脂肪醇、脂肪醛或脂肪酸产物的途径见下表。这些途径在本文中也称为“终止途径”。

[0668]

产物	来自图 1 的终止途径酶
酸	H
	K/L
	E/N
	K/J/N
醛	E
	K/J
	H/N
	K/L/N
醇	E/F
	K/J/F
	H/N/F
	K/L/N/F
	G

[0669] 产物特异性可以使用图 1 和图 6 中所示的一种或多种酶进行精细调节。通过延长途径的一种或多种酶并结合如上所述的终止途径的一种或多种酶来控制链长。产物的结构通过终止途径的一种或多种酶来控制。与各种途径中间体反应的所选终止途径酶实例见下表。本文描述了另外的实例。

[0670]

酶	底物	实例
酰基-CoA 还原酶	酰基-CoA	贝氏不动杆菌(<i>A. bayliyi</i>)的 Acr1 (GenBank AAC45217)
	3-羟基酰基-CoA	罗伊氏乳杆菌的 PduP (GenBank CCC03595.1)
	3-氧代酰基-CoA	托氏硫化叶菌(<i>S. tokodaii</i>)的 Mer (GenBank NP_378167)

[0671]

酰基-CoA 水解酶、转移酶或合成酶	酰基-CoA	大肠杆菌的 <i>tesB</i> (GenBank NP_414986)
	3-羟基酰基-CoA	褐家鼠的 <i>hibch</i> (GenBank Q5XIE6.2)
	3-氧代酰基-CoA	番茄(<i>S. lycopersicum</i>)的 <i>MKS2</i> (GenBank ACG69783)
	烯酰-CoA	发酵氨基酸球菌的 <i>gctAB</i> (GenBank CAA57199, CAA57200)
酰基-ACP 酰基转移酶	酰基-CoA	大肠杆菌的 <i>fabH</i> (GenBank AAC74175.1)

[0672] 步骤 H. 酰基-CoA 水解酶、转移酶或合酶

[0673] 酰基-CoA 水解酶、转移酶和合酶将酰基-CoA 部分转变成它们的相应酸。这样的酶可以用于例如将脂肪酰-CoA 转变成脂肪酸、将 3-羟基酰基-CoA 转变成 3-羟基酸、将 3-氧代酰基-CoA 转变成 3-氧代酸或将烯酰-CoA 转变成烯酸。

[0674] 3.1.2 家族中的 CoA 水解酶或硫酯酶将酰基-CoA 分子水解成它们的相应酸。具有不同底物范围的几种 CoA 水解酶适合于将酰基-CoA、3-羟基酰基-CoA、3-氧代酰基-CoA 和烯酰-CoA 底物水解成它们的相应酸。例如,来自褐家鼠脑的由 *acot12* 编码的酶 (Robinson 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71:959-965(1976)) 可与丁酰-CoA、己酰-CoA 和丙二酰-CoA 反应。由 *acot8* 编码的人类二羧酸硫酯酶表现出对戊二酰-CoA、己二酰-CoA、庚二酰-CoA、癸二酰-CoA 和十二烷二酰-CoA 有活性 (Westin 等人, *J. Biol. Chem.* 280:38125-38132(2005))。与这种酶最接近的大肠杆菌同源物 *tesB* 也可以水解一系列 CoA 硫酯 (Naggert 等人, *J Biol Chem* 266:11044-11050(1991))。相似的酶也在大鼠肝脏中进行了表征 (Deana R., *Biochem Int* 26:767-773(1992))。大肠杆菌中具有水解酶活性的另外的酶包括 *ybgC*、*paaI* 和 *ybdB* (Kuznetsova 等人, *FEMS Microbiol Rev*, 2005, 29(2):263-279; Song 等人, *J Biol Chem*, 2006, 281(16):11028-38)。尽管其序列尚未报道,但是来自豌豆叶线粒体的酶具有宽的底物特异性,已证明对乙酰-CoA、丙酰-CoA、丁酰-CoA、棕榈酰-CoA、油酰-CoA、琥珀酰-CoA 和巴豆酰-CoA 有活性 (Zeihner 等人, *Plant. Physiol.* 94:20-27(1990))。来自酿酒酵母的乙酰-CoA 水解酶 *ACH1* 代表另一种候选水解酶 (Buu 等人, *J. Biol. Chem.* 278:17203-17209(2003))。另外的具有芳基-CoA 水解酶活性的酶包括结核分枝杆菌的棕榈酰-CoA 水解酶 (Wang 等人, *Chem. Biol.* 14:543-551(2007)) 和大肠杆菌中由 *entH* 编码的酰基-CoA 水解酶 (Guo 等人, *Biochemistry* 48:1712-1722(2009))。另外的 CoA 水解酶如上所述。

[0675]

基因名称	GenBank 登录 #	GI#	生物体
------	--------------	-----	-----

[0676]

acot12	NP_570103.1	18543355	褐家鼠
tesB	NP_414986	16128437	大肠杆菌
acot8	CAA15502	3191970	智人
acot8	NP_570112	51036669	褐家鼠
tesA	NP_415027	16128478	大肠杆菌
ybgC	NP_415264	16128711	大肠杆菌
paaI	NP_415914	16129357	大肠杆菌
ybdB	NP_415129	16128580	大肠杆菌
ACH1	NP_009538	6319456	酿酒酵母
Rv0098	NP_214612.1	15607240	结核分枝杆菌
entH	AAC73698.1	1786813	大肠杆菌

[0677] 对 3-羟基酰基-CoA、3-氧代酰基-CoA 和烯酰-CoA 中间体有活性的 CoA 水解酶也是本领域众所周知的。例如,用于将烯酰-CoA 底物转变成它们的相应酸的酶是来自发酵氨基酸球菌的戊烯二酸 CoA-转移酶。这种酶通过位点-定向诱变转化成对戊二酰-CoA、乙酰-CoA 和 3-丁烯酰-CoA 有活性的酰基-CoA 水解酶 (Mack 等人, FEBS. Lett. 405:209-212(1997))。另一种合适的酶是大肠杆菌的 fadM 硫酯酶 III。这种酶参与油酸 β -氧化且优选的底物是 3,5-十四碳二烯酰-CoA (Nie 等人, Biochem 47:7744-51(2008))。

[0678]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
gctA	CAA57199.1	559392	发酵氨基酸球菌
gctB	CAA57200.1	559393	发酵氨基酸球菌
gctA	ACJ24333.1	212292816	共生梭菌
gctB	ACJ24326.1	212292808	共生梭菌
gctA	NP_603109.1	19703547	具核梭杆菌

gctB	NP_603110.1	19703548	具核梭杆菌
fadM	NP_414977.1	16128428	大肠杆菌

[0679] 3-羟基异丁酰-CoA 水解酶对 3-羟基酰基-CoA 底物有活性 (Shimomura 等人, J Biol Chem. 269:14248-14253(1994))。编码这种酶的基因包括褐家鼠 (Shimomura 等人, Methods Enzymol. 324:229-240(2000)) 和智人 (Shimomura 等人, 同上) 的 hibch。相似的候选基因也可以通过序列同源性鉴定, 包括酿酒酵母的 hibch 和蜡样芽孢杆菌的 BC_2292。示例性的 3-氧代酰基-CoA 水解酶是番茄的 MKS2 (Yu 等人, Plant Physiol 154:67-77(2010))。这种酶的天然底物是 3-氧代-肉豆蔻酰-CoA, 其产生 C14 链长产物。

[0680]

基因名称	GenBank 登录 #	GI#	生物体
------	--------------	-----	-----

[0681]

fadM	NP_414977.1	16128428	大肠杆菌
hibch	Q5XIE6.2	146324906	褐家鼠
hibch	Q6NVY1.2	146324905	智人
hibch	P28817.2	2506374	酿酒酵母
BC_2292	AP09256	29895975	蜡样芽孢杆菌
MKS2	ACG69783.1	196122243	番茄

[0682] CoA 转移酶催化 CoA 部分从一个分子可逆转移到另一个分子上。若干转化需要 CoA 转移酶将羧酸活化成它们的相应酰基-CoA 衍生物。CoA 转移酶已在公开文献中有描述并且代表这些步骤的合适候选者。下文描述了这些酶。

[0683] 已显示克鲁维氏梭菌的 cat1、cat2 和 cat3 的基因产物分别表现出琥珀酰-CoA、4-羟基丁酰-CoA 和丁酰-CoA 转移酶活性 (Seedorf 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 105:2128-2133(2008); Sohling 等人, J Bacteriol. 178:871-880(1996))。相似的 CoA 转移酶活性也存在于阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、氨基丁酸梭菌 (*Clostridium aminobutyricum*) 和牙龈卟啉单胞菌 (*Porphyromonas gingivalis*) 中 (Riviere 等人, J. Biol. Chem. 279:45337-45346(2004); van Grinsven 等人, J. Biol. Chem. 283:1411-1418(2008))。

[0684]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
cat1	P38946.1	729048	克鲁维氏梭菌
cat2	P38942.2	172046066	克鲁维氏梭菌

cat3	EDK35586.1	146349050	克鲁维氏梭菌
TVAG_395550	XP_001330176	123975034	阴道毛滴虫 G3
Tb11.02.0290	XP_828352	71754875	布氏锥虫
cat2	CAB60036.1	6249316	氨基丁酸梭菌
cat2	NP_906037.1	34541558	牙龈卟啉单胞菌 W83

[0685] 利用乙酰 -CoA 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 等人, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 58:2116-2121(2002); Vanderwinkel 等人, 33:902-908(1968))。这种酶对链长 C3-C6 的底物具有宽的底物范围 (Sramek 等人, *Arch Biochem Biophys* 171:14-26(1975)) 并且已显示将 CoA 部分自多种支链和直链 3- 氧代和酰基 -CoA 底物转移至乙酸, 该底物包括异丁酸 (Matthies 等人, *Appl Environ. Microbiol* 58:1435-1439(1992))、戊酸 (Vanderwinkel 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33:902-908(1968)) 和丁酸 (Vanderwinkel 等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 33:902-908(1968))。这种酶在转录水平上被乙酰乙酸诱导, 所以调节控制的修饰对于工程改造这种酶至途径中可能是必需的 (Pauli 等人, *Eur. J Biochem.* 29:553-562(1972))。相似的酶存在于谷氨酸棒杆菌 ATCC 13032 (Duncan 等人, 68:5186-5190(2002))、丙酮丁醇梭菌 (Cary 等人, *Appl Environ Microbiol* 56:1576-1583(1990); Wiesenborn 等人, *Appl Environ Microbiol* 55:323-329(1989)) 和糖乙酸多丁醇梭菌 (Kosaka 等人, *Biosci. Biotechnol Biochem.* 71:58-68(2007)) 中。

[0686]

基因	GI#	登录号	生物体
atoA	2492994	P76459.1	大肠杆菌
atoD	2492990	P76458.1	大肠杆菌
actA	62391407	YP_226809.1	谷氨酸棒杆菌
cg0592	62389399	YP_224801.1	谷氨酸棒杆菌
ctfA	15004866	NP_149326.1	丙酮丁醇梭菌
ctfB	15004867	NP_149327.1	丙酮丁醇梭菌
ctfA	31075384	AAP42564.1	糖乙酸多丁醇梭菌
ctfB	31075385	AAP42565.1	糖乙酸多丁醇梭菌

[0687] β - 酮己二酰 -CoA 转移酶, 也称为琥珀酰 -CoA:3- 氧代酸 -CoA 转移酶, 对 3- 氧

代酰基 -CoA 底物有活性。这种酶由恶臭假单胞菌中的 *pcaI* 和 *pcaJ* 编码 (Kaschabek 等人, *J Bacteriol.* 184:207-215(2002))。相似的酶在不动杆菌 ADP1 (Kowalchuk 等人, *Gene* 146:23-30(1994))、天蓝色链霉菌和克氏假单胞菌 (旧称 sp. B13) (Gobel 等人, *J Bacteriol.* 184:216-223(2002); Kaschabek 等人, *J Bacteriol.* 184:207-215(2002)) 中被发现。另外的示例性琥珀酰 -CoA:3-氧代酸 -CoA 转移酶已在幽门螺杆菌 (Corthesy-Theulaz 等人, *J Biol. Chem.* 272:25659-25667(1997))、枯草芽孢杆菌 (Stols 等人, *Protein Expr. Purif.* 53:396-403(2007)) 和智人 (Fukao, T. 等人, *Genomics* 68:144-151(2000); Tanaka, H. 等人, *Mol Hum Reprod* 8:16-23(2002)) 中进行了表征。与这些基因相关的 Genbank 信息概述如下。

[0688]

基因	GI#	登录号	生物体
<i>pcaI</i>	24985644	AAN69545.1	恶臭假单胞菌
<i>pcaJ</i>	26990657	NP_746082.1	恶臭假单胞菌
<i>pcaI</i>	50084858	YP_046368.1	不动杆菌 ADP1
<i>pcaJ</i>	141776	AAC37147.1	不动杆菌 ADP1
<i>pcaI</i>	21224997	NP_630776.1	天蓝色链霉菌
<i>pcaJ</i>	21224996	NP_630775.1	天蓝色链霉菌
<i>catI</i>	75404583	Q8VVP3	克氏假单胞菌

[0689]

<i>catJ</i>	75404582	Q8VVP2	克氏假单胞菌
HPAG1_0676	108563101	YP_627417	幽门螺杆菌
HPAG1_0677	108563102	YP_627418	幽门螺杆菌
<i>ScoA</i>	16080950	NP_391778	枯草芽孢杆菌
<i>ScoB</i>	16080949	NP_391777	枯草芽孢杆菌
OXCT1	NP_000427	4557817	智人
OXCT2	NP_071403	11545841	智人

[0690] 将酰基 -CoA 底物转变成它们的酸产物可以由酶的 6.2.1 家族中的 CoA 酸 - 硫醇连接酶或 CoA 合成酶催化。将 ATP 转变成 ADP (ADP 形成) 的 CoA 合酶是可逆的并且在酸形成方向上反应。而形成 AMP 的酶仅催化酸活化成酰基 -CoA。对于脂肪酸形成, 形成 AMP 的酶的缺失或衰减将减少回通量。形成 ADP 的乙酰 -CoA 合成酶 (ACD, EC 6.2.1.13)

是将酰基 -CoA 酯转变成它们的相应酸与伴随合成 ATP 相偶联的酶。来自闪烁古生球菌的由 AF1211 编码的 ACD I 显示作用于多种直链和支链底物 (包括异丁酸、异戊酸和延胡索酸) (Musfeldt 等人, J Bacteriol. 184:636-644(2002))。闪烁古生球菌中由 AF1983 编码的第二种可逆性 ACD 也显示具有宽的底物范围 (Musfeldt 和 Schonheit, J Bacteriol. 184:636-644(2002))。来自死海盐盒菌的酶 (注解为琥珀酰 -CoA 合成酶) 接受丙酸、丁酸和支链酸 (异戊酸和异丁酸) 作为底物并且显示以正和反方向起作用 (Brasen 等人, Arch Microbiol 182:277-287(2004))。来自超嗜热泉古生菌需氧热棒菌的由 PAE3250 编码的 ACD 显示所有表征的 ACD 的最宽底物范围, 与乙酰 -CoA、异丁酰 -CoA (优选的底物) 和苯基乙酰 -CoA 反应 (Brasen 等人, 同上)。定向进化或工程改造可用于修饰这种酶以在宿主生物的生理温度下操作。来自闪烁古生球菌、死海盐盒菌和需氧热棒菌的酶全都在大肠杆菌中进行了克隆、功能性表达和表征 (Brasen 和 Schonheit, 同上; Musfeldt 和 Schonheit, J Bacteriol. 184:636-644(2002))。另外一种候选者是由大肠杆菌的 sucCD 以及酿酒酵母的 LSC1 和 LSC2 基因编码的琥珀酰 -CoA 合成酶。这些酶在体内可逆的反应中催化在伴随消耗一个 ATP 时自琥珀酸形成琥珀酰 -CoA (Buck 等人, Biochemistry 24:6245-6252(1985))。已证明来自恶臭假单胞菌的酰基 CoA 连接酶作用于若干脂族底物包括乙酸、丙酸、丁酸、戊酸、己酸、庚酸和辛酸并且作用于芳香族化合物例如苯基乙酸和苯氧基乙酸 (Fernandez-Valverde 等人, Appl. Environ. Microbiol. 59:1149-1154(1993))。来自豌豆根瘤菌的相关酶—丙二酰 CoA 合成酶 (6.3.4.9) 可将若干二酸 (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) 转变成它们的相应单硫酯 (Pohl 等人, J. Am. Chem. Soc. 123:5822-5823(2001))。

[0691]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
AF1211	NP_070039.1	11498810	闪烁古生球菌
AF1983	NP_070807.1	11499565	闪烁古生球菌
scs	YP_135572.1	55377722	死海盐盒菌
PAE3250	NP_560604.1	18313937	好氧火棒菌菌株 IM2
sucC	NP_415256.1	16128703	大肠杆菌
sucD	AAC73823.1	1786949	大肠杆菌
LSC1	NP_014785	6324716	酿酒酵母
LSC2	NP_011760	6321683	酿酒酵母
paaF	AAC24333.2	22711873	恶臭假单胞菌
matB	AAC83455.1	3982573	豌豆根瘤菌

[0692] 步骤 J. 酰基 -ACP 还原酶

[0693] 酰基 -ACP 还原成它的相应醛由酰基 -ACP 还原酶 (AAR) 催化。这样的转化描绘于图 1 和图 7 的步骤 J。合适的候选酶包括细长聚球藻 (*Synechococcus elongatus*) PCC7942 的 orf1594 基因产物及其同源物 (Schirmer 等人, *Science*, 329:559-62(2010))。细长聚球藻 (*S. elongates*) PCC7942 酰基 -ACP 还原酶与似乎在大多数蓝细菌生物体中保守的操纵子中的醛脱羧基酶共表达。这种酶与醛脱羧基酶一起在大肠杆菌中表达赋予产生烷烃的能力。将海洋原绿球藻 (*P. marinus*) AAR 也克隆到大肠杆菌中, 与脱羧基酶一起证明产生烷烃 (美国申请 2011/0207203)。

[0694]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
orf1594	YP_400611.1	81300403	细长聚球藻 PCC7942
PMT9312_0533	YP_397030.1	78778918	海洋原绿球藻 MIT 9312
syc0051_d	YP_170761.1	56750060	细长聚球藻 PCC 6301
Ava_2534	YP_323044.1	75908748	多变鱼腥藻 ATCC 29413
alr5284	NP_489324.1	17232776	念珠藻 PCC 7120
Aazo_3370	YP_003722151.1	298491974	厚壁孢子念珠藻
Cyan7425_0399	YP_002481152.1	220905841	蓝丝菌 PCC 7425
N9414_21225	ZP_01628095.1	119508943	泡沫节球藻 CCY9414
L8106_07064	ZP_01619574.1	119485189	鞘丝藻 PCC 8106

[0695] 步骤 K. 酰基 -CoA:ACP 酰基转移酶

[0696] 酰基 -CoA 转移至酰基 -ACP 由 EC 2.3.1 类中的酰基转移酶催化。具有这种活性的酶如上所述。

[0697] 步骤 L. 硫酯酶

[0698] 酰基 -ACP 硫酯酶将酰基 -ACP 转变成它的相应酸。图 1 的步骤 L 中需要这样的转化。示例性的酶包括拟南芥的 FatA 和 FatB 同等型 (isoform) (Salas 等人, *Arch Biochem Biophys* 403:25-34(2002))。这两种蛋白质的活性随碳链长度而变化, 其中 FatA 优选油基 -ACP (oleyl-ACP), FatB 优选棕榈酰 -ACP。多种具有不同链长特异性的硫酯酶列于 WO 2008/113041 中并且包括在下表中。例如, 先前已显示中链植物硫酯酶 (如来自加州月桂 (*Umbellularia californica*) 的 FatB) 在大肠杆菌中的表达导致高水平的中链脂肪酸、主要是月桂酸 (C12:0) 的累积。类似地, 湿地萼距花 (*Cuphea palustris*) FatB1 硫酯酶在大肠杆菌中的表达导致 C8-10:0 产物的累积 (Dehesh 等人, *Plant Physiol* 110:203-10(1996))。类似地, 大肠杆菌中表达的红花 (*Carthamus tinctorius*) 硫酯酶导致在 C18:1 链终止和释放为游离脂肪酸方面有 >50 倍提升 (Knutzon 等人, *Plant Physiol*

100:1751-58(1992))。用于改变硫酯酶底物特异性的方法也是本领域已知的(例如, EP1605048)。

[0699]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
fatA	AEE76980.1	332643459	拟南芥
fatB	AEE28300.1	332190179	拟南芥
fatB2	AAC49269.1	1292906	萼距花
fatB3	AAC72881.1	3859828	萼距花
fatB1	AAC49179.1	1215718	湿地萼距花
M96568.1:94..1251	AAA33019.1	404026	红花
fatB1	Q41635.1	8469218	加州月桂
tesA	AAC73596.1	1786702	大肠杆菌

[0700] 步骤 N. 醛脱氢酶(酸形成)或羧酸还原酶

[0701] 醛转变成酸由形成酸的醛脱氢酶催化。若干酿酒酵母酶催化醛氧化成酸,包括 ALD1(ALD6)、ALD2 和 ALD3(Navarro-Avino 等人, *Yeast* 15:829-42(1999); Quash 等人, *Biochem Pharmacol* 64:1279-92(2002))。线粒体蛋白质 ALD4 和 ALD5 催化类似的转化(Wang 等人, *J Bacteriol* 180:822-30(1998); Boubekour 等人, *Eur J Biochem* 268:5057-65(2001))。HFD1 编码十六醛脱氢酶。示例性的形成酸的醛脱氢酶列于下表。

[0702]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
ALD2	NP_013893.1	6323822	酿酒酵母 s288c
ALD3	NP_013892.1	6323821	酿酒酵母 s288c
ALD4	NP_015019.1	6324950	酿酒酵母 s288c
ALD5	NP_010996.2	330443526	酿酒酵母 s288c

[0703]

ALD6	NP_015264.1	6325196	酿酒酵母 s288c
HFD1	NP_013828.1	6323757	酿酒酵母 s288c
Ca019.8361	XP_710976.1	68490403	白色假丝酵母

CaO19.742	XP_710989.1	68490378	白色假丝酵母
YALIO03025	CAG81682.1	49647250	解脂耶氏酵母
ANI_1_1334164	XP_001398871.1	145255133	黑曲霉
ANI_1_2234074	XP_001392964.2	317031176	黑曲霉
ANI_1_226174	XP_001402476.1	145256256	黑曲霉
ALDH	P41751.1	1169291	黑曲霉
KLLA0D09999	CAH00602.1	49642640	乳酸克鲁维酵母

[0704] 酸转变成醛在热力学上是不利的并且典型地需要富含能量的辅因子和多个酶促步骤。例如,在丁醇生物合成中,丁酸转变成丁醛通过 CoA 转移酶或连接酶将丁酸活化成它的相应酰基-CoA,然后通过 CoA- 依赖性醛脱氢酶还原成丁醛来催化。或者,酸可以活化为酰基-磷酸并随后通过磷酸还原酶还原。通过单一酶将酸直接转变成醛由 1.2.1 家族中的双功能羧酸还原酶催化。催化这些转化的示例性酶包括羧酸还原酶、 α -氨基己二酸还原酶和视黄酸还原酶。

[0705] 艾奥瓦诺卡氏菌 (*Nocardia iowensis*) 中发现的羧酸还原酶 (CAR) 催化羧酸至它们的相应醛的镁、ATP 和 NADPH 依赖性还原 (Venkitasubramanian 等人, *J Biol. Chem.* 282:478-485 (2007))。这种酶的天然底物是苯甲酸并且该酶表现出芳香族和脂族底物 (包括长度 C12-C18 的脂肪酸) 的宽接受性 (Venkitasubramanian 等人, *Biocatalysis in Pharmaceutical and Biotechnology Industries*. CRC press (2006); WO 2010/135624)。CAR 需要通过磷酸泛酰巯基乙胺转移酶 (PPTase) 将无活性脱辅基酶转变成有活性全酶进行翻译后活化 (Hansen 等人, *Appl. Environ. Microbiol* 75:2765-2774 (2009))。诺卡氏菌属 (*Nocardia*) CAR 酶在大肠杆菌中进行了克隆和功能性表达 (Venkitasubramanian 等人, *J Biol. Chem.* 282:478-485 (2007))。编码特异性 PPTase 的 *npt* 基因的共表达改进该酶的活性。来自分枝杆菌菌株 JLS 的相关酶催化长度 C12-C16 的脂肪酸的还原。WO 2010/135624 中描述了这种酶中对脂肪酸具有增强的活性的变体。 α -氨基己二酸还原酶 (AAR, EC1.2.1.31) 参与一些真菌菌种中的赖氨酸生物合成途径。这种酶将 α -氨基己二酸天然地还原成 α -氨基己二酸半醛。羧基基团首先通过腺苷酸的 ATP- 依赖性形成活化,然后通过 NAD(P)H 还原得到醛和 AMP。同 CAR 一样,这种酶利用镁并且需要通过 PPTase 活化。AAR 的候选酶及其相应 PPTase 在酿酒酵母 (Morris 等人, *Gene* 98:141-145 (1991))、白色假丝酵母 (Guo 等人, *Mol. Genet. Genomics* 269:271-279 (2003)) 和粟酒裂殖酵母 (Ford 等人, *Curr. Genet.* 28:131-137 (1995)) 中被发现。来自粟酒裂殖酵母的 AAR 当在大肠杆菌中表达时表现出显著活性 (Guo 等人, *Yeast* 21:1279-1288 (2004))。来自产黄青霉的 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 等人, *J Biol. Chem.* 278:8250-8256 (2003))。编码产黄青霉 (*P. chrysogenum*) PPTase 的基因迄今尚未鉴定并且高置信度命中通过序列比较同源性检索尚未鉴定。

[0706]

蛋白质	GenBank ID	GI 编号	生物体
car	AAR91681.1	40796035	艾奥瓦诺卡氏菌
npt	ABI83656.1	114848891	艾奥瓦诺卡氏菌
car	YP_001070587.1	126434896	分枝杆菌菌株 JLS
npt	YP_001070355.1	126434664	分枝杆菌菌株 JLS
LYS2	AAA34747.1	171867	酿酒酵母
LYS5	P50113.1	1708896	酿酒酵母
LYS2	AAC02241.1	2853226	白色假丝酵母
LYS5	AA026020.1	28136195	白色假丝酵母
Lys1p	P40976.3	13124791	粟酒裂殖酵母
Lys7p	Q10474.1	1723561	粟酒裂殖酵母
Lys2	CAA74300.1	3282044	产黄青霉

[0707] 另外的 car 和 npt 基因可基于序列同源性进行标识。

[0708]

基因名称	GI 编号	GenBank 登录号	生物体
fadD9	121638475	YP_978699.1	牛分枝杆菌 <i>BCG</i>
BCG_2812c	121638674	YP_978898.1	牛分枝杆菌 <i>BCG</i>
nfa20150	54023983	YP_118225.1	皮疽诺卡氏菌 <i>IFM 10152</i>
nfa40540	54026024	YP_120266.1	皮疽诺卡氏菌 <i>IFM 10152</i>
SGR_6790	YP_001828302.1	182440583	灰色链霉菌灰色亚种 <i>NBRC 13350</i>
SGR_665	YP_001822177.1	182434458	灰色链霉菌灰色亚种 <i>NBRC 13350</i>
MSMEG_2956	YP_887275.1	118473501	耻垢分枝杆菌 <i>MC2 155</i>
MSMEG_5739	YP_889972.1	118469671	耻垢分枝杆菌 <i>MC2 155</i>
MSMEG_2648	YP_886985.1	118471293	耻垢分枝杆菌 <i>MC2 155</i>
MAP1040c	NP_959974.1	41407138	鸟分枝杆菌副结核亚种 <i>K-10</i>
MAP2899c	NP_961833.1	41408997	鸟分枝杆菌副结核亚种 <i>K-10</i>

[0709]

MMAR_2117	YP_001850422.1	183982131	海分枝杆菌 <i>M</i>
MMAR_2936	YP_001851230.1	183982939	海分枝杆菌 <i>M</i>
MMAR_1916	YP_001850220.1	183981929	海分枝杆菌 <i>M</i>
Tpau_1373	YP_003646340.1	296139097	微变束村氏菌 <i>DSM 20162</i>
Tpau_1726	YP_003646683.1	296139440	微变束村氏菌 <i>DSM 20162</i>
CPC7001_1320	ZP_05045132.1	254431429	蓝菌属 <i>PCC7001</i>
DDBDRAFT_0187729	XP_636931.1	66806417	盘基网柄菌 <i>AX4</i>

[0710] 在灰色链霉菌 (*Streptomyces griseus*) 中发现的另外一种候选酶由 griC 和 griD 基因编码。相信这种酶因为缺失 griC 或 griD 而将 3-氨基-4-羟基苯甲酸转变成 3-氨基-4-羟基苯甲醛导致细胞外 3-乙酰基氨基-4-羟基苯甲酸 (一种 3-氨基-4-羟基苯甲酸代谢的支路 (shunt) 产物) 的累积 (Suzuki 等人, *J. Antibiot.* 60(6):380-387(2007))。griC 和 griD 与 SGR_665 (一种在序列上类似于艾奥瓦诺卡氏菌 npt 的酶) 的共表达可以是有益的。

[0711]

基因名称	GI 编号	GenBank 登录号	生物体
griC	YP_001825755.1	182438036	灰色链霉菌灰色亚种 NBRC 13350
griD	YP_001825756.1	182438037	灰色链霉菌灰色亚种 NBRC 13350

[0712] 实施例 X

[0713] 在酿酒酵母中自葡萄糖产生 1,3-丁二醇

[0714] 本实施例说明了在酿酒酵母中自葡萄糖产生 1,3-BDO 的构建和生物合成生产。

[0715] 用于 1,3-BDO 产生的途径包含两个 MI-FAE 循环酶 (硫解酶和 3-氧代酰基-CoA 还原酶), 以及终止途径酶 (酰基-CoA 还原酶 (醛形成) 和醇脱氢酶)。经工程改造到酿酒酵母中的 1,3-BDO 途径由将乙酰-CoA 转化成 1,3-BDO 的四个酶促步骤组成。第一步骤需要两个乙酰-CoA 分子通过乙酰乙酰-CoA 硫解酶 (THL) 缩合成乙酰乙酰-CoA。在第二步骤中, 乙酰乙酰-CoA 通过乙酰乙酰-CoA 还原酶 (也称为 3-羟基丁酰-CoA 脱氢酶 (HBD)) 还原成 3-羟基丁酰-CoA。3-羟基丁酰-CoA 还原酶 (ALD) 催化自酰基-CoA 形成醛。3-羟基丁醛进一步还原成 1,3-BDO 由 1,3-BDO 脱氢酶 (ADH) 催化。

[0716] 为了能够在细胞溶质中产生 1,3-BDO, 将形成两个乙酰-CoA 的途径经工程改造到酿酒酵母中。第一途径需要通过丙酮酸脱羧酶 (图 2E)、乙醛脱氢酶 (图 2F) 和乙酰-CoA 合成酶 (图 2B) 将丙酮酸转变成乙酰-CoA。第二途径是丙酮酸甲酸裂合酶 (图 2H)。

[0717] 对于 1,3-BDO 途径的各酶促步骤, 将一系列可应用基因装配以供确证。在该项研究中所克隆和评估的基因连同适当的参考文献及关于多肽序列的 URL 引用如下呈现于表 1 中。

[0718] 表 1

[0719]

乙酰乙酰-CoA 硫解酶(THL)					
示例性步骤	ID	基因	NCBI 登录#	GI	来源生物体
图 1A	1502	<i>thiI</i>	P45359.1	1174677	丙酮丁醇梭菌 <i>ATCC 824</i>
图 1A	1491	<i>atoB</i>	NP_416728	16130161	大肠杆菌菌株 <i>K-12</i> 亚菌株 <i>MG1655</i>
图 1A	560	<i>thiA</i>	NP_349476.1	15896127	丙酮丁醇梭菌 <i>ATCC 824</i>
图 1A	1512	<i>phbA</i>	P07097.4	135759	生枝动胶菌
图 1A	1501	<i>phbA</i>	P14611.1	135754	富养罗尔斯通氏菌 <i>H16</i>
3-羟基丁酰-CoA 脱氢酶(HBD)					
图 1B	1495	<i>hbd</i>	AAM14586.1	20162442	拜氏梭菌 <i>NCIMB 8052</i>
3-羟基丁酰-CoA 还原酶(ALD)					
图 1E	707	<i>Lvis_1603</i>	YP_795711.1	116334184	短乳杆菌 <i>ATCC 367</i>
3-羟基丁醛还原酶(ADH)					
图 1F	28	<i>bdh</i>	BAF45463.1	124221917	糖乙酸多丁醇梭菌
丙酮酸甲酸裂合酶(PflAB)					
图 2H	1799	<i>pflA</i>	NP_415422.1	16128869	大肠杆菌 <i>MG1655</i>
图 2H	500	<i>pflB</i>	NP_415423	16128870	大肠杆菌 <i>MG1655</i>
PDH 旁路(醛脱氢酶、乙酰-CoA 合酶)					
图 2F	1849	<i>ALD6</i>	NP_015264.1	6325196	酿酒酵母 <i>S288c</i>
图 2B	1845	<i>Acs</i>	AAL23099.1	16422835	肠道沙门氏菌 <i>LT2</i>
图 2B	1845A	<i>Acsm</i>	AAL23099.1	16422835	肠道沙门氏菌 <i>LT2</i>

[0720] 通过 PCR 自天然或野生型生物体的基因组 DNA 克隆基因。用于扩增途径基因的引物是 (从 5' 到 3'; 加下划线序列是基因特异性的):

[0721] Th1 1502:

[0722] FP: TCTAATCTAAGTTTTCTAGAACTAGTAAAGATGAGAGATGTAGTAATAGTAAGTGCTGTA (SEQ ID NO:)

[0723] RP: GATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCTTAGTCTCTTTCAACTACGAGAGCTGTT (SEQ ID NO:)

[0724] Th1 1491:

[0725] FP: TCTAATCTAAGTTTTCTAGAACTAGTAAAGATGAAAAATTGTGTCATCGTCAGTG (SEQ ID NO:11)

[0726] RP: GATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCTTAATTCAACCGTTCAATCACCATCGCAAT (SEQ ID NO:)

[0727] Th1 560:

[0728] FP: AATCTAAGTTTTCTAGAACTAGTAAAGATGAAAGAAGTTGTAATAGCTAGTGCAGTAA (SEQ ID NO:)

[0729] RP: TATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCTAATGGTGATGGTGATGATGGCACTTTTCTA (SEQ ID NO:)

[0730] Th1 1512:

[0731] FP:TCTAATCTAAGTTTTCTAGAACTAGTAAAGATGAGCACCCCGTCCATCGTCA (SEQ ID NO:)

[0732] PR:GATATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCCTAAAGGCTCTCGATGCACATCGCC (SEQ ID NO:)

[0733] Th1 1501:

[0734] FP:TAAGCTAGCAAGAGGAGAAGTCGACATGACTGACGTTGTTCATCGTATCCGC (SEQ ID NO:)

[0735] RP:GCCTCTAGGAAGCTTTCTAGATTATTATTTGCGCTCGACTGCCAGC (SEQ ID NO:)

[0736] Hbd 1495:

[0737] FP:AAGCATACAATCAACTATCTCATATACAATGAAAAAGATTTTTGTACTTGGAGCA (SEQ ID NO:)

[0738] RP:AAAAATCATAAATCATAAGAAATTCGCTTATTTAGAGTAATCATAGAATCCTTTTCCTGA (SEQ ID NO:)

[0739] Ald 707:

[0740] FP:AATCTAAGTTTTCTAGAACTAGTAAAGATGAACACAGAAAACATTGAACAAGCCAT (SEQ ID NO:)

[0741] RP:TATCGAATTCCTGCAGCCCGGGGATCCCTAAGCCTCCCAAGTCCGTAATGAGAACCCTT (SEQ ID NO:)

[0742] Adh 28:

[0743] FP:CCAAGCATACAATCAACTATCTCATATACAATGGAGAATTTTAGATTTAATGCATATACA (SEQ ID NO:)

[0744] RP:AATAAAAATCATAAATCATAAGAAATTCGCTTAAAGGGACATTTCTAAAATTTTATATAC (SEQ ID NO:)

[0745] 1845A 是野生型 (1845) 酶的序列变异体。该变异是由 Starai 及合作者描述的残基 Leu-641 (L641P) 中的点突变 (Starai 等人, J Biol Chem 280:26200-5 (2005))。突变的功能例如是为了防止通过乙酰化的翻译后调节并将 Acs 酶以其活性状态维持。

[0746] 构建表 2 中所示的穿梭质粒用于酿酒酵母中异源基因的表达。质粒 d9、d10 和 d11 是分别具有 Ura、His 和 Leu 选择标记的空质粒对照。质粒 d12 或 d13 含有具有 URA3 选择标记的单一 ALD 或 ADH 基因。质粒 d14、d16 和 d17 含有具有 HIS3 选择标记的 hbd 和 thi1 基因。

[0747] 表 2

[0748]

质粒	选择标记	基因
pESC-L	URA3	NA
pESC-H	HIS3	NA
pESC-U	LEU2	NA
pY3Hd1	URA3	1799 (pf1A) -500 (pf1B)

pY3Hd2	HIS3	1799 (pf1A)–500 (pf1B)
pY3Hd3	LEU2	1799 (pf1A)–500 (pf1B)
pY3Hd4	URA3	1849 (ALD6)–1845 (Acs)
pY3Hd5	URA3	1849 (ALD6)–1845A (Acsm)
pY3Hd6	URA3	1495 (Hbd)–1491 (Th1)
pY3Hd7	URA3	1495 (Hbd)–560 (Th1)
pY3Hd8	LEU2	28 (ADH)–707 (ALD)
pY3Hd9	URA3	NA
pY3Hd10	HIS3	NA
pY3Hd11	LEU2	NA
pY3Hd12	URA3	707 (ALD)
pY3Hd13	URA3	28 (ADH)
pY3Hd14	HIS3	1495 (Hbd)–1502 (Th1)
pY3Hd15	HIS3	1495 (Hbd)–1512 (Th1)
pY3Hd16	HIS3	1495 (Hbd)–1491 (Th1)
pY3Hd17	HIS3	1495 (Hbd)–560 (Th1)

[0749] 选择酵母宿主BY4741 [MATa his3 Δ 0 leu2 Δ 0 met15 Δ 0 ura3 Δ 0] 作为宿主菌株用于本工作, 作为具有适当营养缺陷型标记的野生型实验室菌株以寄主途径质粒。BY4741 用含有 1, 3-BDO 途径基因的质粒单独地或连同含有 PDH 旁路基因或 pf1AB 基因的质粒一起转化。本实施例中使用的载体骨架包括 p427TEF 酵母表达载体、pY3H 桥载体 (Sunrise Science) 和 pESC 酵母表位标记 (epitope tagging) 载体 (Agilent Technologies)。用来自酿酒酵母的含有 TEF1 启动子、CYC 终止子和 URA3 选择标记的 pY3H 载体构建具有不同选择标记的双启动子质粒。将来自酿酒酵母的 ADH1 启动子和终止子序列插入到 TEF1 启动子的上游, 所以两个转录单元是处于背对背方向。SV40 核定位信号序列在克隆过程期间被去除。将所得质粒命名为 pY3Hd9。为了构建具有不同选择标记的质粒, pY3Hd9 中的 URA3 基因用来自酿酒酵母的 HIS3 或 LEU2 基因置换, 分别产生 pY3Hd10 和 pY3Hd11。将四个 1, 3-BDO 途径基因中的两个—Hbd 和 Th1 (关于基因编号参见表 103)—克隆到具有 HIS3 标记的双启动子质粒中以使得 ADH1 启动子控制 Hbd 基因的表达, 同时 TEF1 启动子控制 Th1 基因的表达 (pY3Hd14 ~ 17)。将 Ald 和 Adh 基因克隆到具有 LEU2 选择标记的双启动子质粒中以

使得 ADH1 启动子驱动 adh 基因且 TEF1 启动子驱动 ald 基因 (pY3Hd8)。将 Pf1AB 基因或 PDH 旁路基因 (ALD6 和 acs) 克隆到具有 URA3 标记的双启动子质粒中,其中 pf1A 或 ALD6 处于 ADH1 启动子控制之下,pf1B 或 acs 处于 TEF1 启动子控制之下。使用 Frozen-EZ 酵母转化法进行酵母转化 (Zymo Research)。

[0750] 表 3 和表 4 显示所测试的质粒和实验条件的组合。

[0751] 表 3

[0752]

样品	质粒 1	质粒 2	质粒 3	基因 1	基因 2	基因 3	基因 4	基因 5	基因 6	通气	注释
1	pESC-L	pESC-H								厌氧	EV2
2	pESC-L	pESC-H								23G	EV2
3	d8	d16		1495	1491	28	707			厌氧	BDO
4	d8	d16		1495	1491	28	707			厌氧	BDO
5	d8	d16		1495	1491	28	707			23G	BDO
6	d8	d16		1495	1491	28	707			23G	BDO
7	d8	d17		1495	560	28	707			厌氧	BDO
8	d8	d17		1495	560	28	707			厌氧	BDO
9	d8	d17		1495	560	28	707			23G	BDO
10	d8	d17		1495	560	28	707			23G	BDO
11	pESC-H	pESC-L	pESC-U							厌氧	EV3
12	pESC-H	pESC-L	pESC-U							23G	EV3
13	d8	d16	d1	1495	1491	28	707	pflA	pflB	厌氧	BDO+pflAB
14	d8	d16	d1	1495	1491	28	707	pflA	pflB	厌氧	BDO+pflAB

15	d8	d16	d1	1495	1491	28	707	pf1A	pf1B	23G	BDO+pf1AB
16	d8	d16	d1	1495	1491	28	707	pf1A	pf1B	23G	BDO+pf1AB
17	d8	d17	d1	1495	560	28	707	pf1A	pf1B	厌氧	BDO+pf1AB
18	d8	d17	d1	1495	560	28	707	pf1A	pf1B	厌氧	BDO+pf1AB
19	d8	d17	d1	1495	560	28	707	pf1A	pf1B	23G	BDO+pf1AB
20	d8	d17	d1	1495	560	28	707	pf1A	pf1B	23G	BDO+pf1AB
21	d8	d16	d5	1495	1491	28	707	ALD6	acsm	厌氧	BDO+PDH
22	d8	d16	d5	1495	1491	28	707	ALD6	acsm	厌氧	BDO+PDH
23	d8	d16	d5	1495	1491	28	707	ALD6	acsm	23G	BDO+PDH
24	d8	d16	d5	1495	1491	28	707	A1D6	acsm	23G	BDO+PDH
25	d8	d17	d5	1495	560	28	707	ALD6	acsm	厌氧	BDO+PDH
26	d8	d17	d5	1495	560	28	707	ALD6	acsm	厌氧	BDO+PDH
27	d8	d17	d5	1495	560	28	707	ALD6	acsm	23G	BDO+PDH
28	d8	d17	d5	1495	560	28	707	ALD6	acsm	23G	BDO+PDH

[0753] 表 4

[0754]

质粒 1	质粒 2	质粒 3	基因 1	基因 2	基因 3	基因 4	基因 5	基因 6	通气	注释
------	------	------	------	------	------	------	------	------	----	----

d9	d11								好氧	EVC
d8	d17		1495	560	28	707			好氧	BDO
d8	d17	d5	1495	560	28	707	1849	1845A	好氧	BDO+PDH
d8	d14		1495	1502	28	707			好氧	BDO
d8	d14	d5	1495	1502	28	707	1849	1845A	好氧	BDO+PDH

[0755] 在表 3 中,将菌落接种到 5ml 2%葡萄糖培养基(有相应氨基酸漏失(dropout))并在 30 摄氏度下培养约 48 小时。将细胞短暂离心并重悬浮于添加了吐温-80 和麦角固醇的 2ml 新鲜 2%葡萄糖培养基。将重悬浮的培养物加入到 20ml 培养瓶中的 10ml 新鲜葡萄糖培养基中以获得起始 OD 为 0.2。对于厌氧培养,将装有培养物的培养瓶抽真空后充填氮气。对于微好氧生长,插入 23G 针。将所有培养物都在 30 摄氏度下振荡培养 24 小时。在表 4 中,在 96 孔板中进行实验,将细胞在好氧条件下在具有不同葡萄糖和乙酸浓度(5%葡萄糖、10%葡萄糖、5%葡萄糖+50mM 乙酸和 10%葡萄糖+50mM 乙酸)的 1.2ml 培养基中生长。

[0756] 使用 HPX-87H 柱(BioRad)通过 HPLC 测定培养物上清液中的葡萄糖、1,3-BDO、醇和其它有机酸副产物的浓度。

[0757] MI-FAE 循环和终止途径基因在有或无 pf1AB 或 PDH 旁路的情况下进行了测试。如图 9-11 所示,这些构建体在酵母酿酒酵母 BY4741 中产生 0.3 - 3.35mM 1,3-BDO,并且在所测试的被测样品中产生乙醇。PDH 旁路(此处,ALD6 和 acs 或 acsm 基因过量表达)改进了 1,3-BDO 的生产。

[0758] 实施例 XI

[0759] 1,3-丁二醇途径酶的酶促活性

[0760] 本实施例描述了使用体外测定检测 1,3-BDO 途径酶活性。

[0761] 在体外测定中,使用内部酵母菌株作为含有途径基因的质粒构建体的宿主,测试了异源酶的活性。将细胞在好氧条件下在含有适当氨基酸的酵母培养基中生长用于各构建体。为了获得用于活性测定的粗提取物,通过离心收获细胞。将沉淀重悬浮于含有蛋白酶抑制剂混合物(cocktail)的 0.1ml100mM Tris pH 7.0 缓冲液中。使用珠磨(bead beating)3min 的方法制备裂解物。珠磨之后,将溶液在 14,000rpm(Eppendorf 离心机 5402)下于 4℃离心 15min。使用 Bradford 等人,Anal. Biochem. 72:248-254(1976)的方法测定样品中的细胞蛋白质,并且如下所述进行特异性酶测定。

[0762] 硫解酶

[0763] 硫解酶催化两个乙酰-CoA 的缩合形成乙酰乙酰-CoA。在该反应中,释放辅酶 A(CoA)并且在与 CoA 反应时,可使用在 410nm 下吸收的 5,5'-二硫代双-2-硝基苯甲酸(DTNB)检测游离 CoA。测试了五种硫解酶(参见实施例 X,表 1)。大肠杆菌粗裂解物中的估计比活性示于图 12。

[0764] 在显示所表达蛋白质的 Th1 中,1512 和 1502 证明针对大肠杆菌粗裂解物中的乙酰-CoA 缩合活性有最高比活性。

[0765] 将 1491 和 560 均克隆到具有 1495 的双启动子酵母载体中,1495 是 3- 羟基丁酰 -CoA 脱氢酶 (参见图 13)。评估了这些硫解酶的乙酰 -CoA 缩合活性,数据示于图 13。结果表明,560 和 1491 证明有初始活性爆发,该爆发太快速以致无法测量。然而,在初始酶速率之后,560 的缩合速率大于 1491。因此,如粗裂解物中所观察到的活性硫解酶活性所指示,在酵母双启动子载体的情况下存在蛋白质表达和活性酶。

[0766] 3- 羟基丁酰 -CoA 脱氢酶 (Hbd)

[0767] 乙酰乙酰 -CoA 通过 3- 羟基丁酰 -CoA 脱氢酶代谢为 3- 羟基丁酰 -CoA。该反应需要 NADH 的氧化,其可通过 340nm 下的激发波长和 460nm 下的发射波长的荧光来监测。氧化形式 NAD⁺ 不发荧光。这个检测策略用于所有的脱氢酶步骤。1495 (来自拜氏梭菌的 Hbd) 在含有 1491 (载体 id = pY3Hd17) 或 560 (载体 id = pY3Hd16) 的双启动子酵母载体中进行了测定。有关各酶的 GenBank 标识符,参见表 1。时程数据示于图 14。

[0768] 含有 560 的 1495 的 Hbd 速率比 1491 快得多。图 15 中提供的结果显示 Hbd 对 NADH 优于对 NADPH。在粗裂解物中的四种途径酶中,Hbd 酶似乎展示最快的催化活性。Hbd 酶,即 3- 酮酰基 -CoA 还原酶,是优先与 NADH 辅因子反应的 MI-FAE 循环或 MD-FAE 循环酶的一个实例。

[0769] 醛脱氢酶 (Ald)

[0770] 醛还原酶将 3- 羟基丁酰 -CoA 转变成 3- 羟基丁醛。该反应需要 NAD(P)H 氧化,该氧化可用于监测酶活性。将来自短乳杆菌的 Ald (基因 ID 707) 克隆到含有来自糖乙酸多丁醇梭菌的醇脱氢酶 (基因 ID 28) 的双载体中。将这两种酶克隆到含有 Leu 标记的另一双启动子酵母载体中。

[0771] 粗裂解物的 Ald 活性数据示于图 16 中,其中来自大肠杆菌的 707 裂解物用作标准品。结果表明,707 显示酵母裂解物中的酶活性与来自细菌的裂解物相当。另外,707 基因产物对 NADH 优于对 NADPH 作为辅因子。707 基因产物,即酰基 -CoA 还原酶 (醛形成),是优先与 NADH 辅因子反应的终止途径酶的一个实例。

[0772] 醇脱氢酶 (Adh)

[0773] 1, 3-BDO 由醇脱氢酶 (Adh) 形成,醇脱氢酶 (Adh) 在 NAD(P)H 存在下将 3- 羟基丁醛还原。NAD(P)H 的氧化可用于监测如上所述的反应。

[0774] 具有 ALD (基因 707) 的双启动子载体中的 ADH (基因 28) 与丁醛 (3- 羟基丁醛的一种替代底物) 的评估示于图 17。数据表明,基因 28 的 Adh 活性与具有丁醛和 NADPH 的无插入对照 (EV) 相当。这很可能由于酵母中存在的可以与 28 相同能力发挥功能的内源 ADH 酶所造成。

[0775] 总之,Th1、Hbd、Ald 和 Adh 之用于产生 1, 3-BDO 的候选者显示在酵母粗裂解物中对所构建的双启动子载体有酶活性。

[0776] 在本申请全文中,引用了各种出版物。这些出版物在其实体中的公开内容,包括发表的 GenBank 和 GI 编号,特此通过引用结合到本申请中,以便更全面地描述本发明所属领域的现有状态。尽管本发明参照以上提供的实施例作了说明,但是应当理解,在不偏离本发明的精神的情况下,可以进行各种修改。

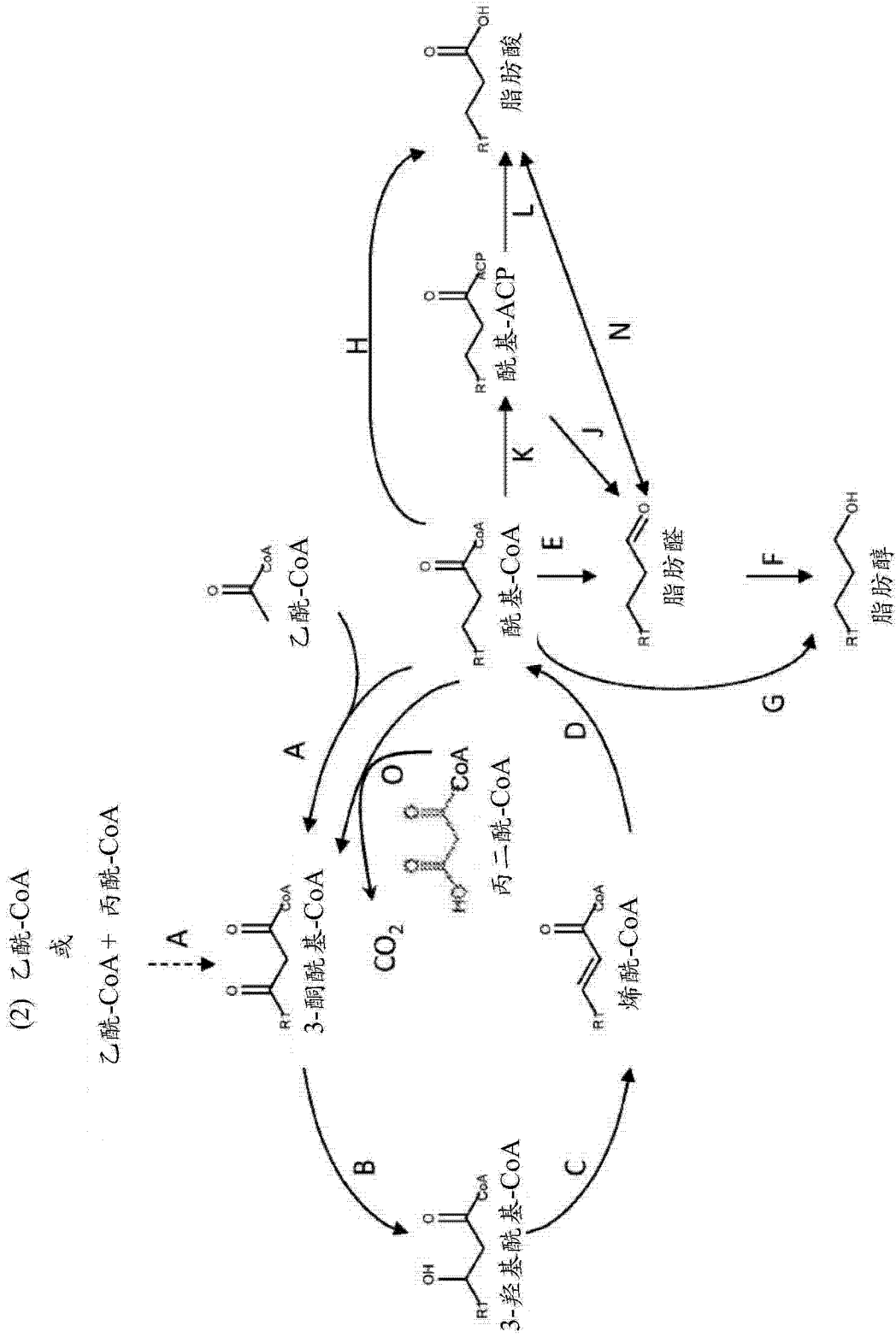


图 1

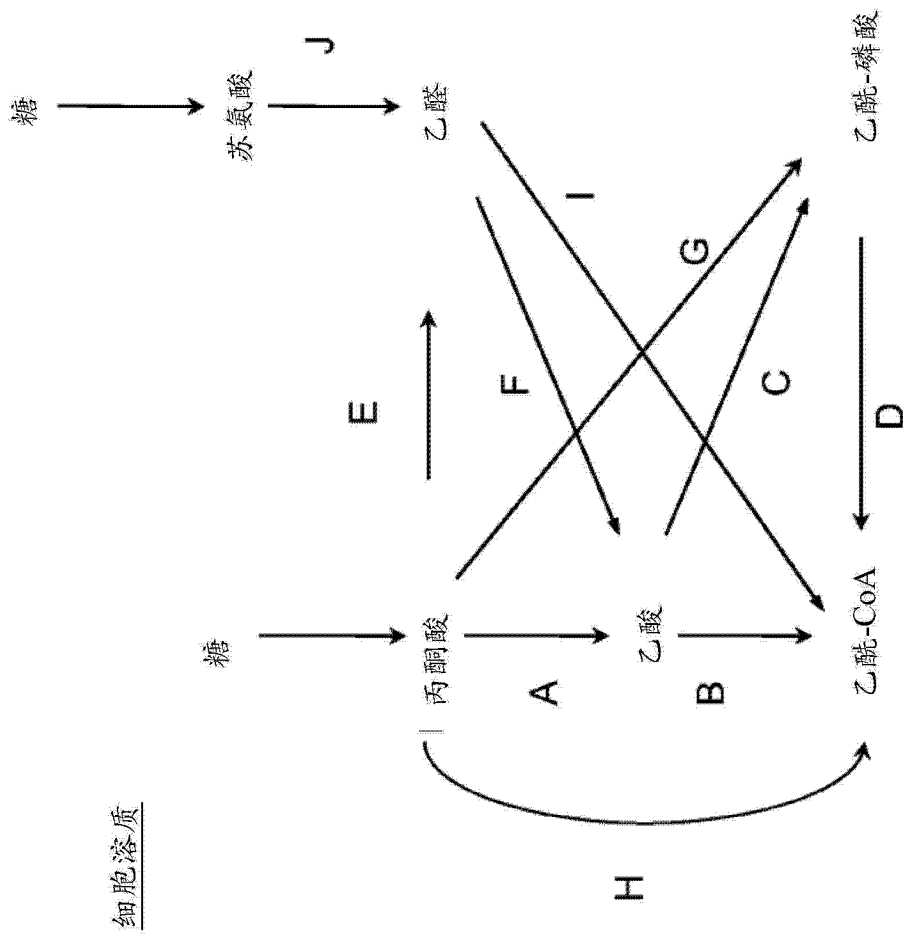


图 2

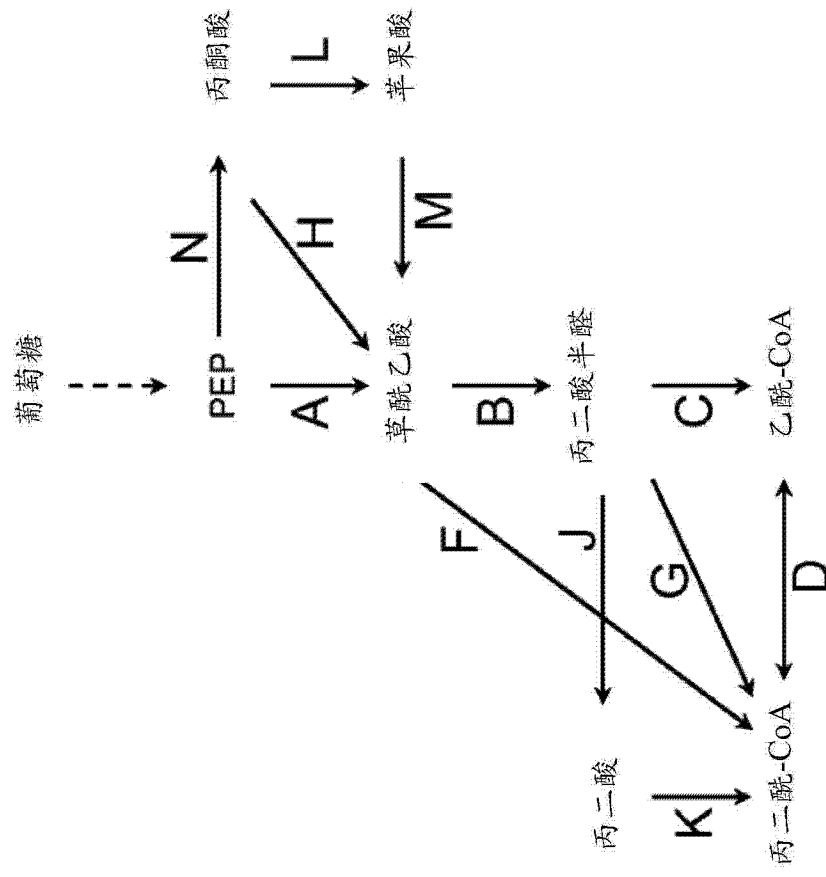


图 3

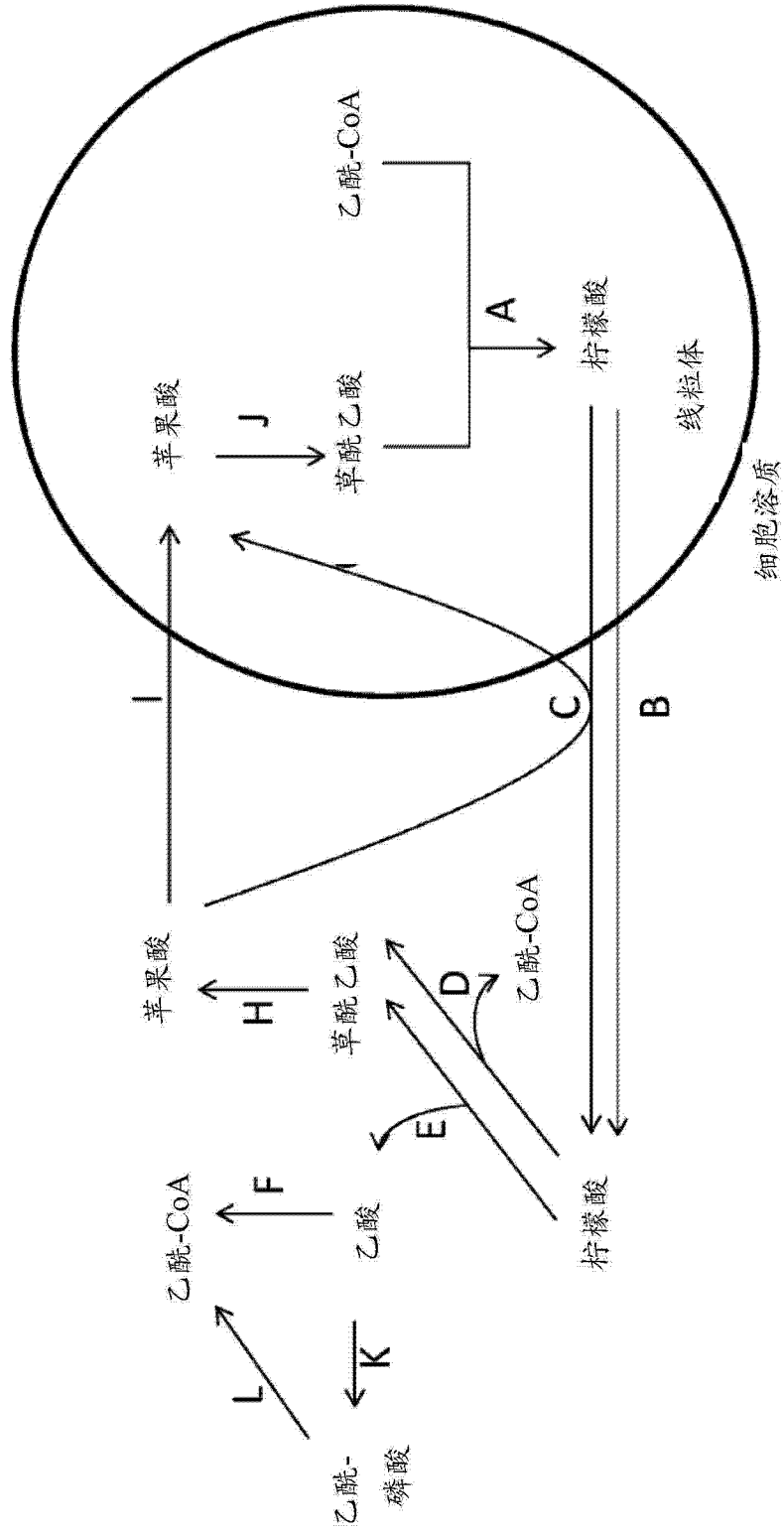


图 4

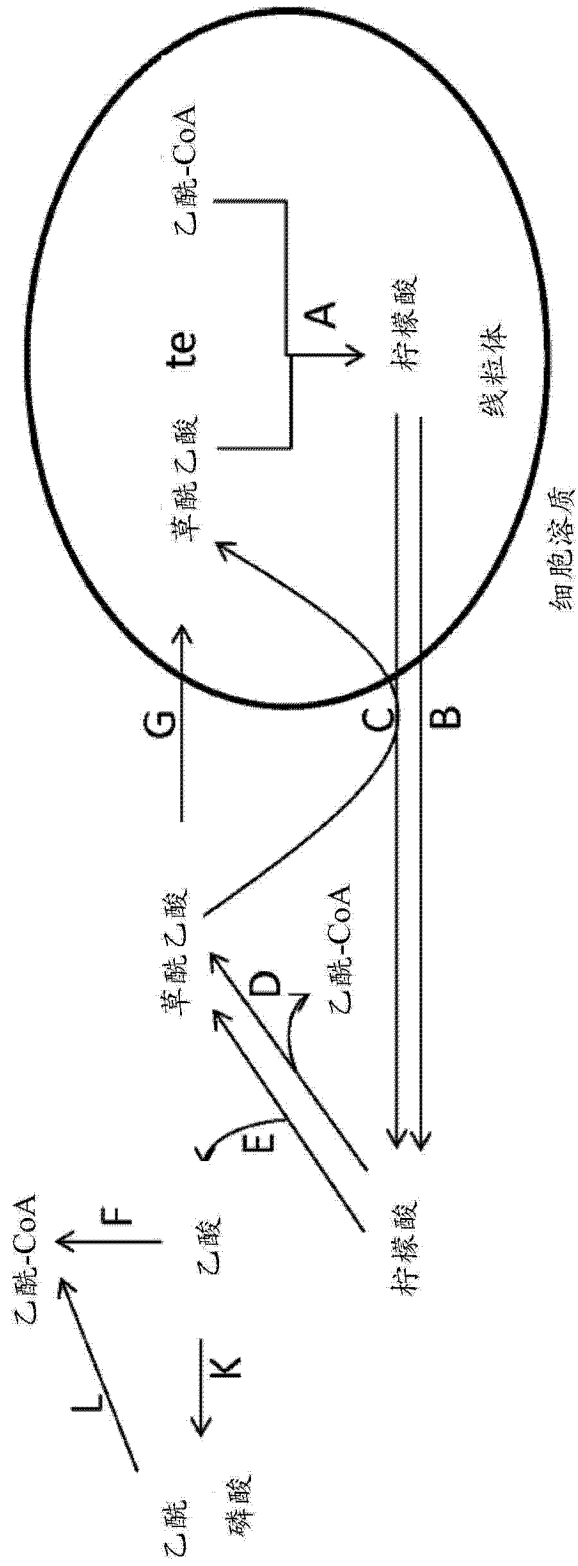


图 5

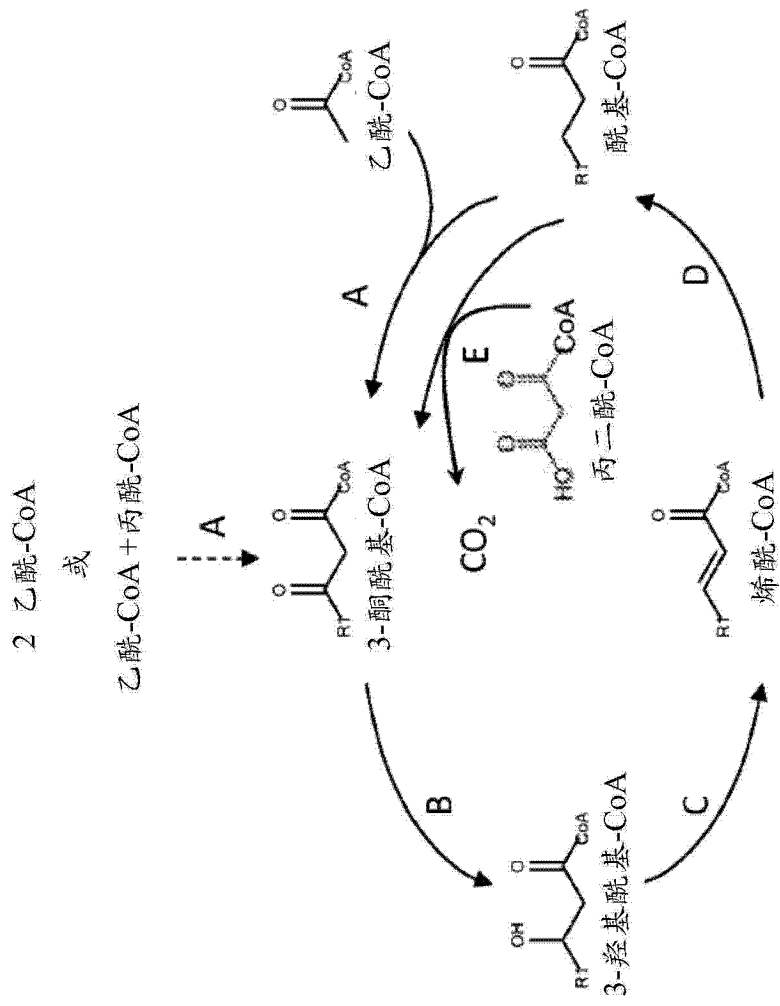


图 6

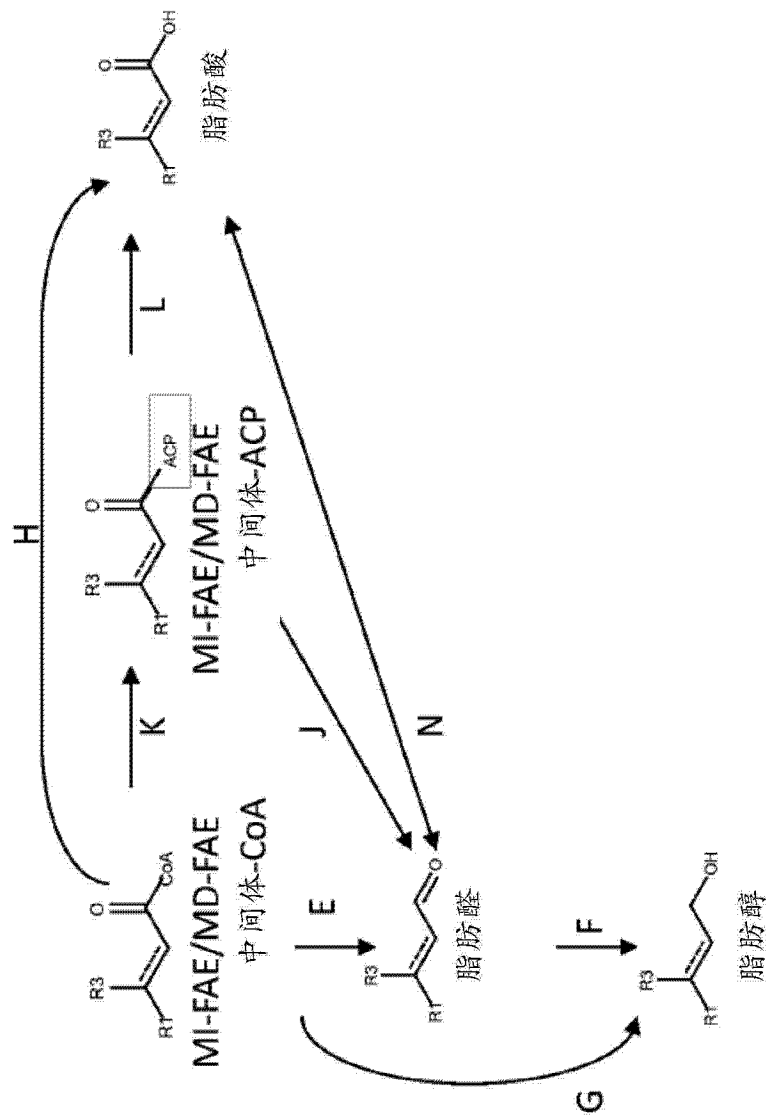


图 7

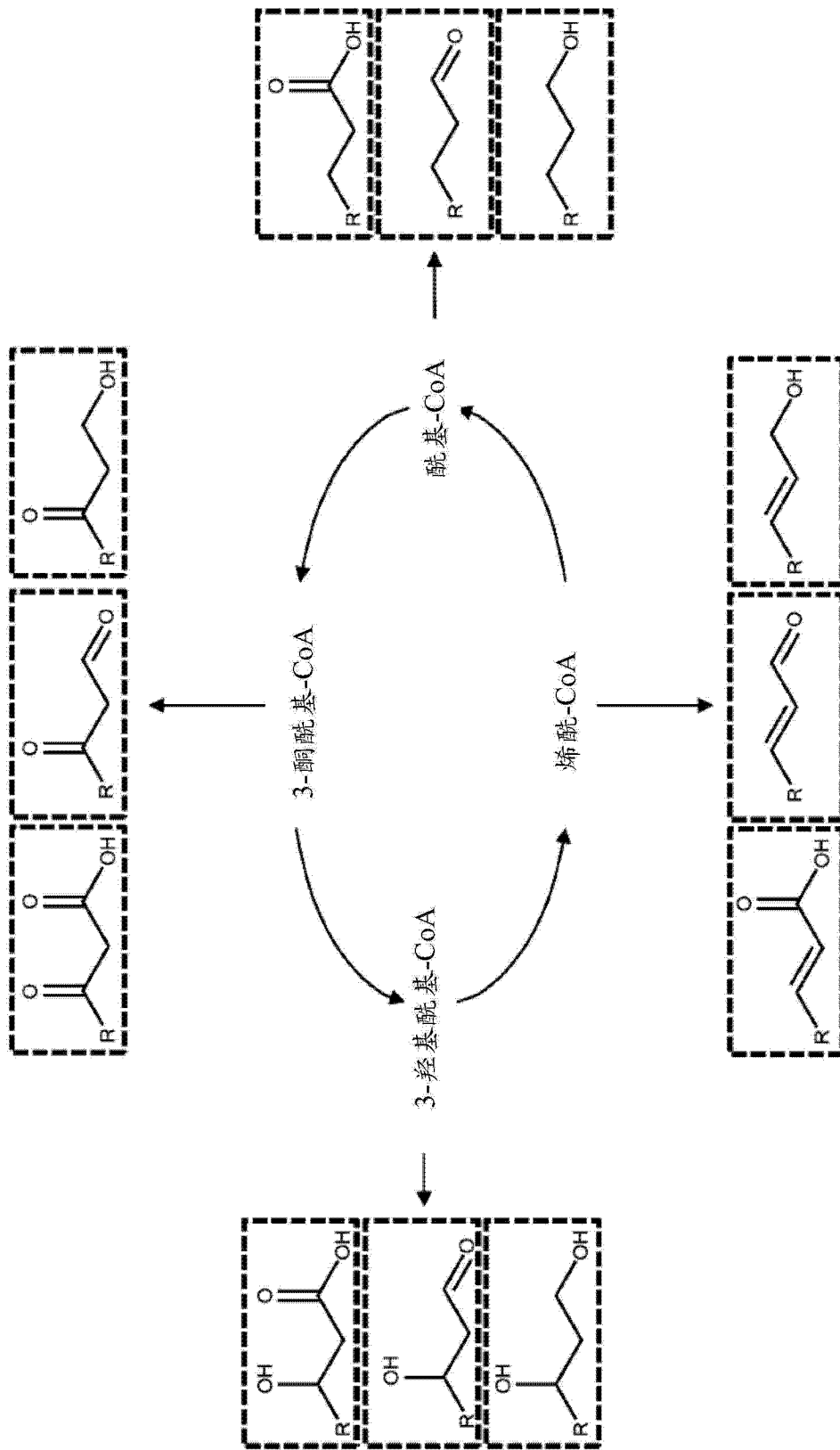


图 8

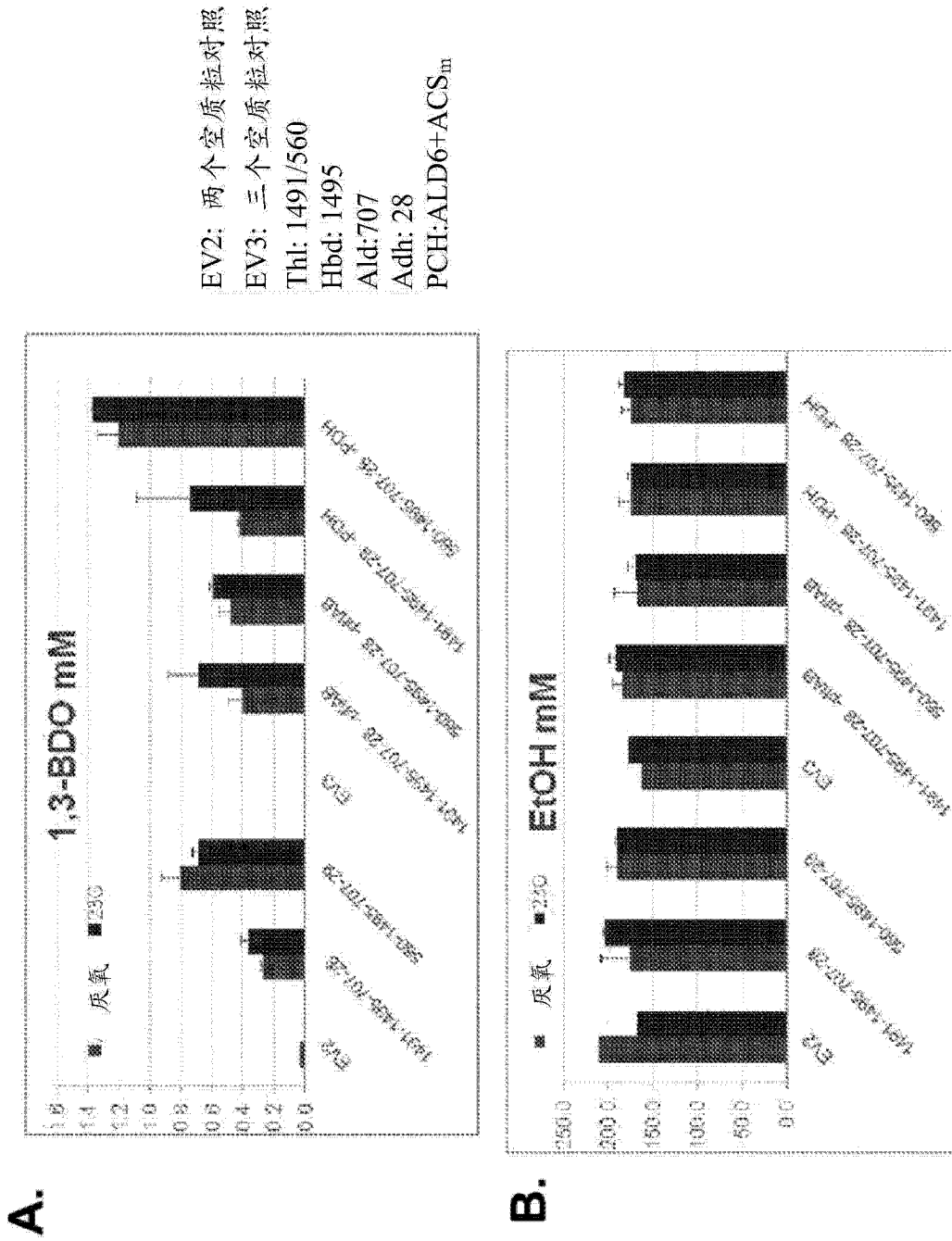


图 9

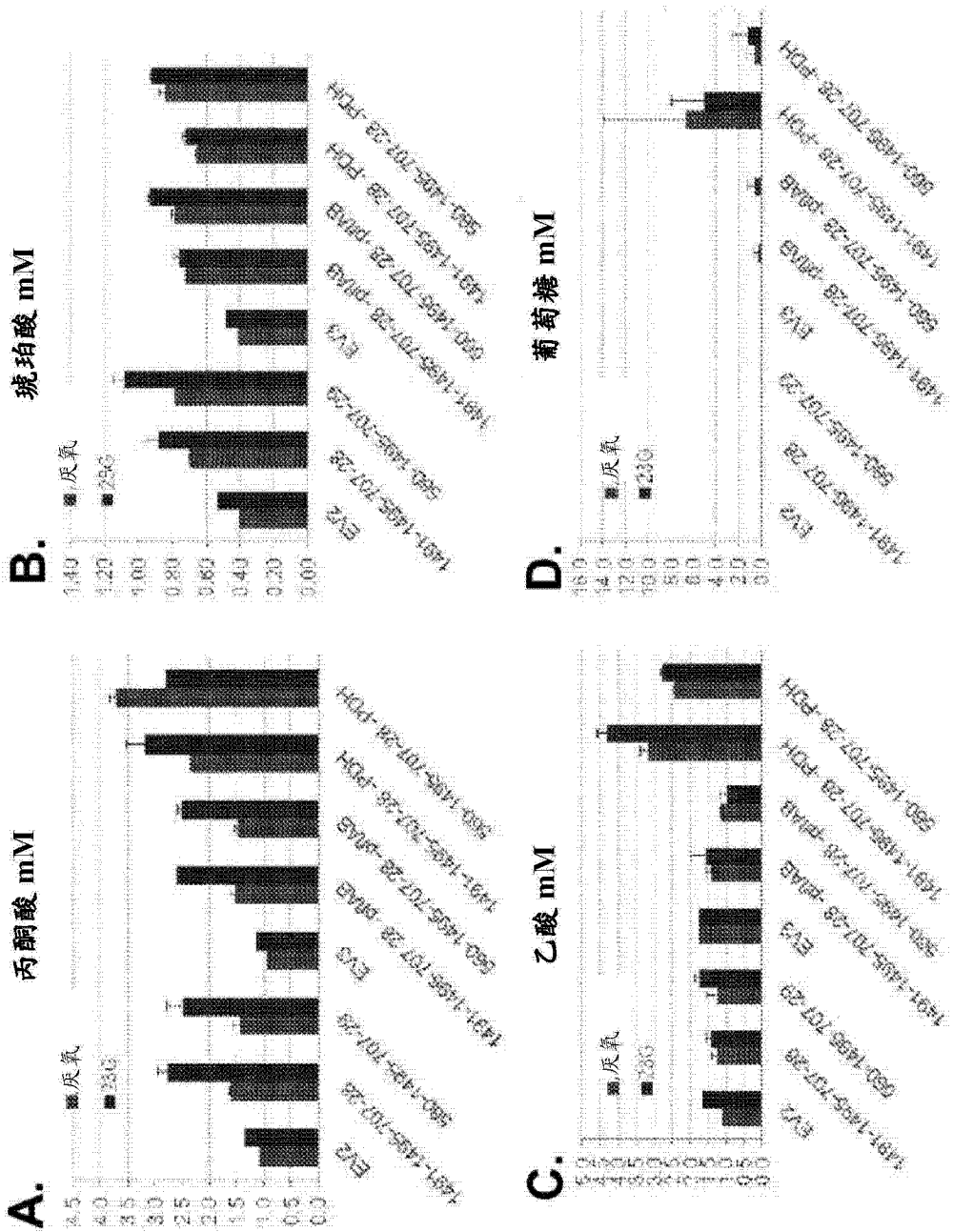


图 10

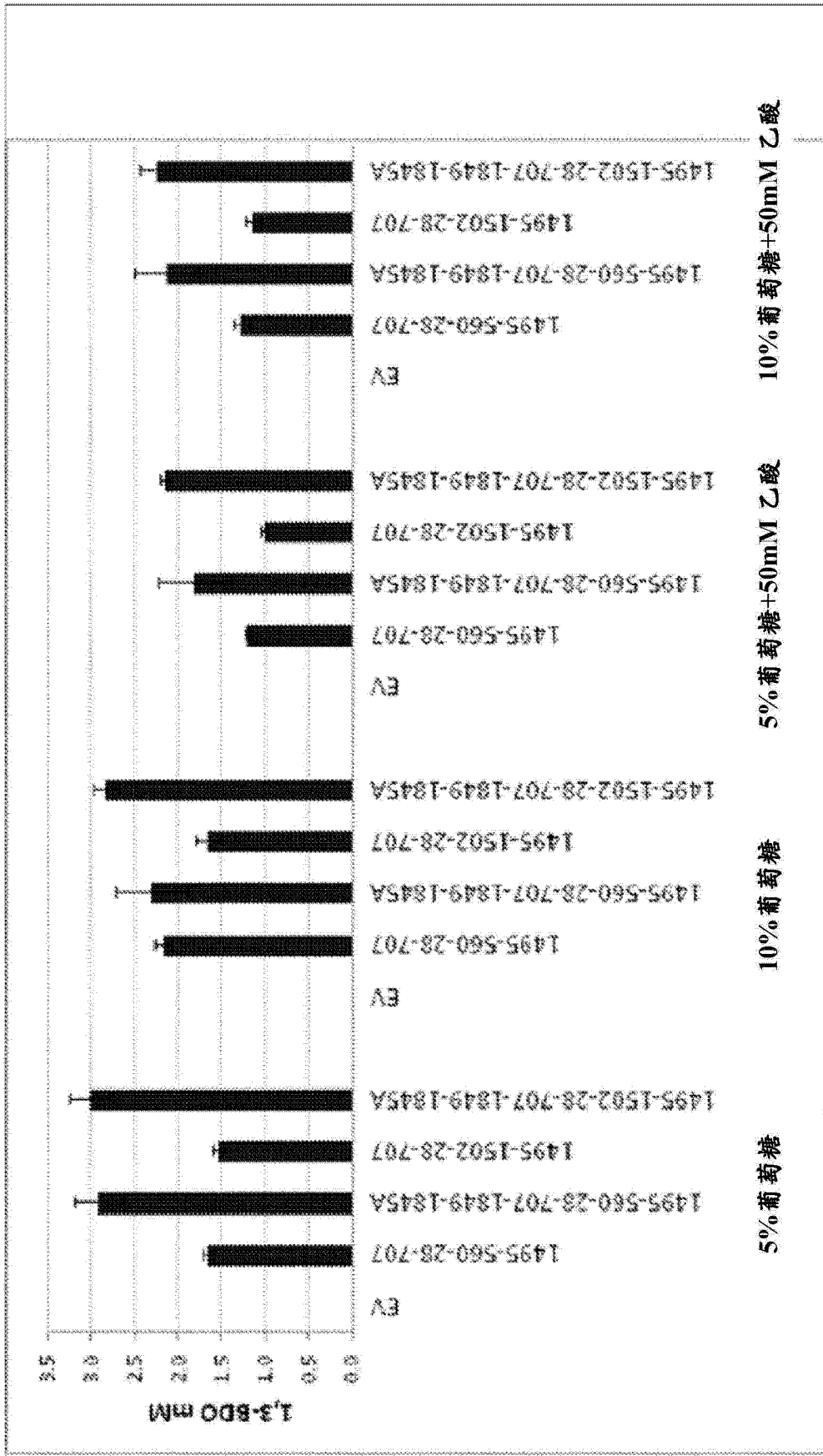


图 11

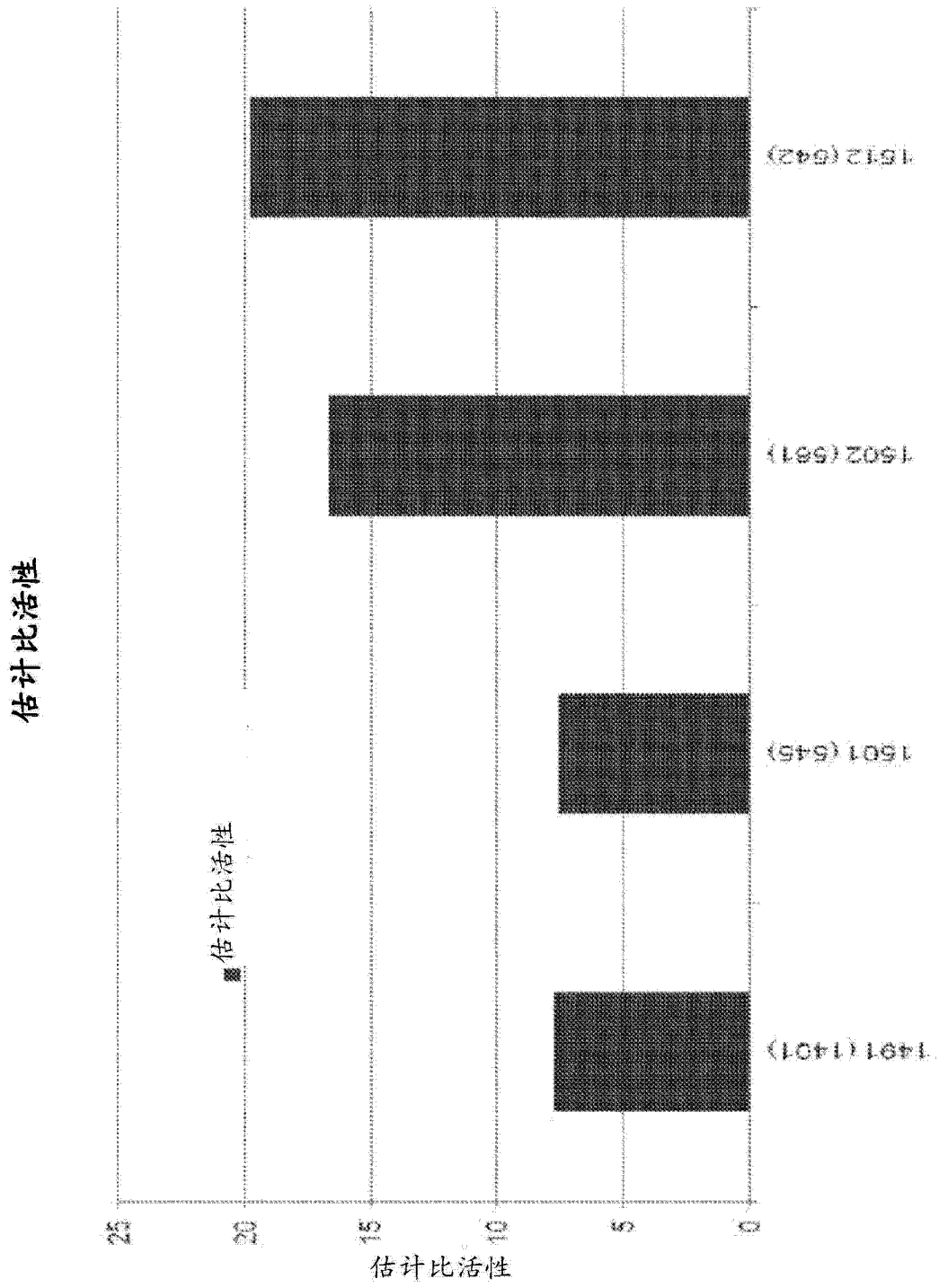


图 12

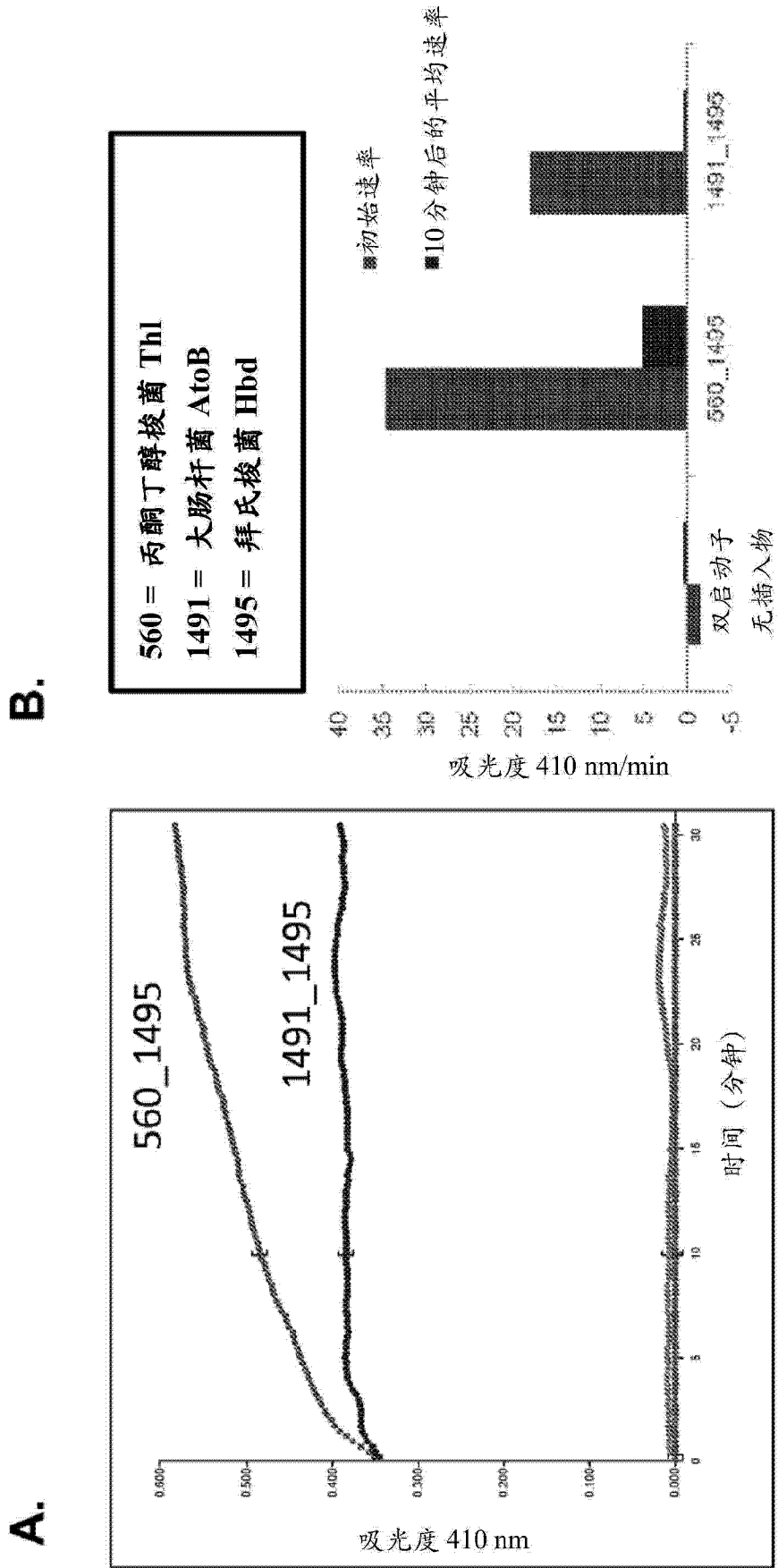


图 13

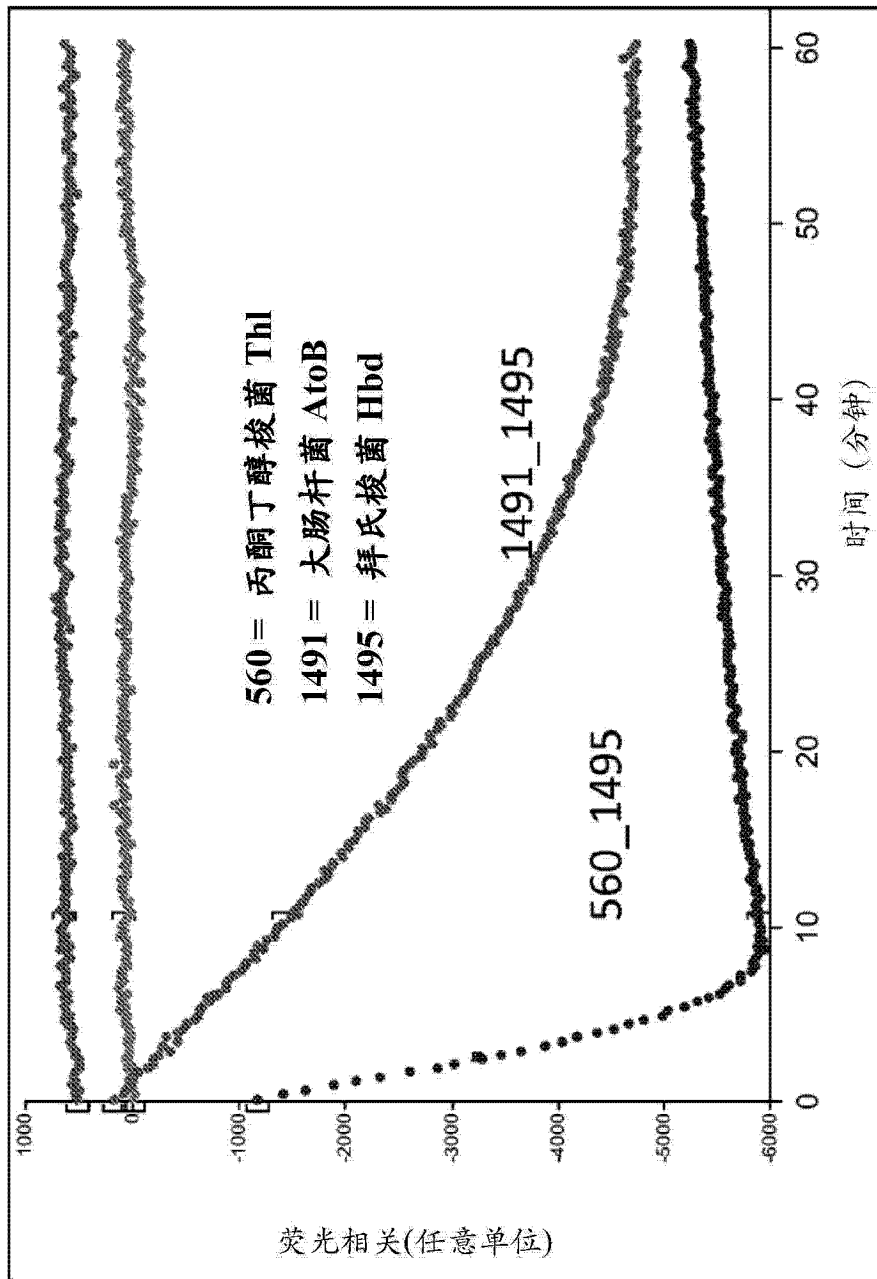


图 14

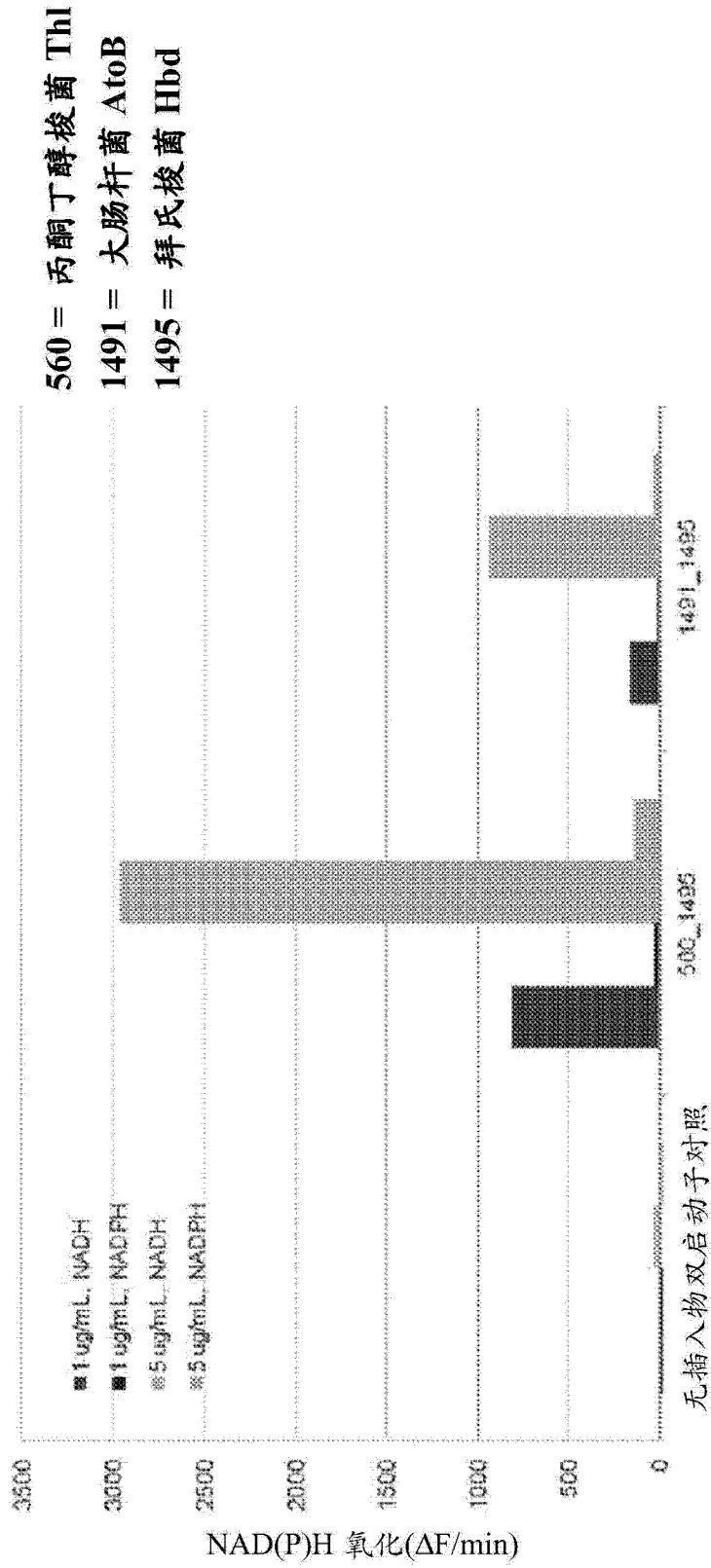


图 15

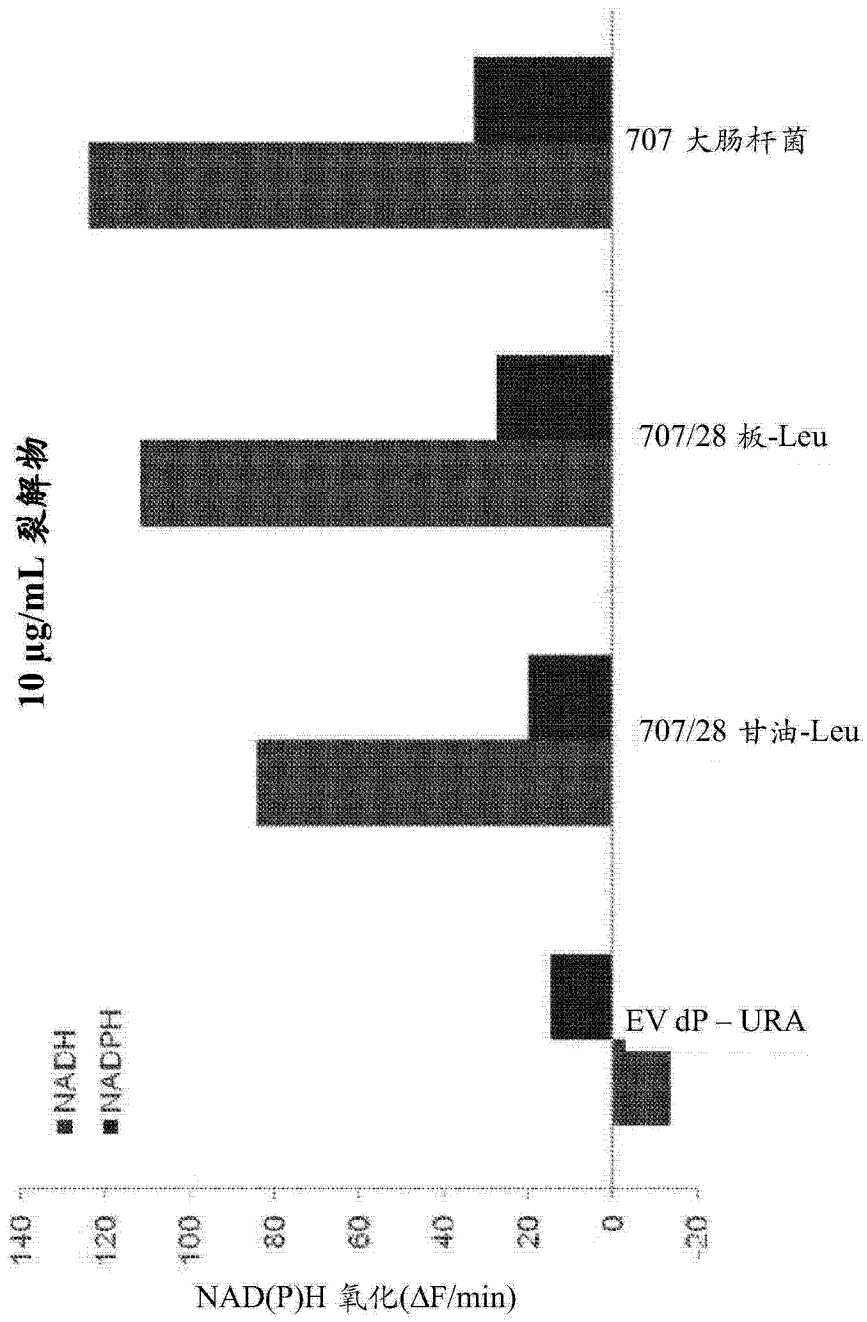


图 16

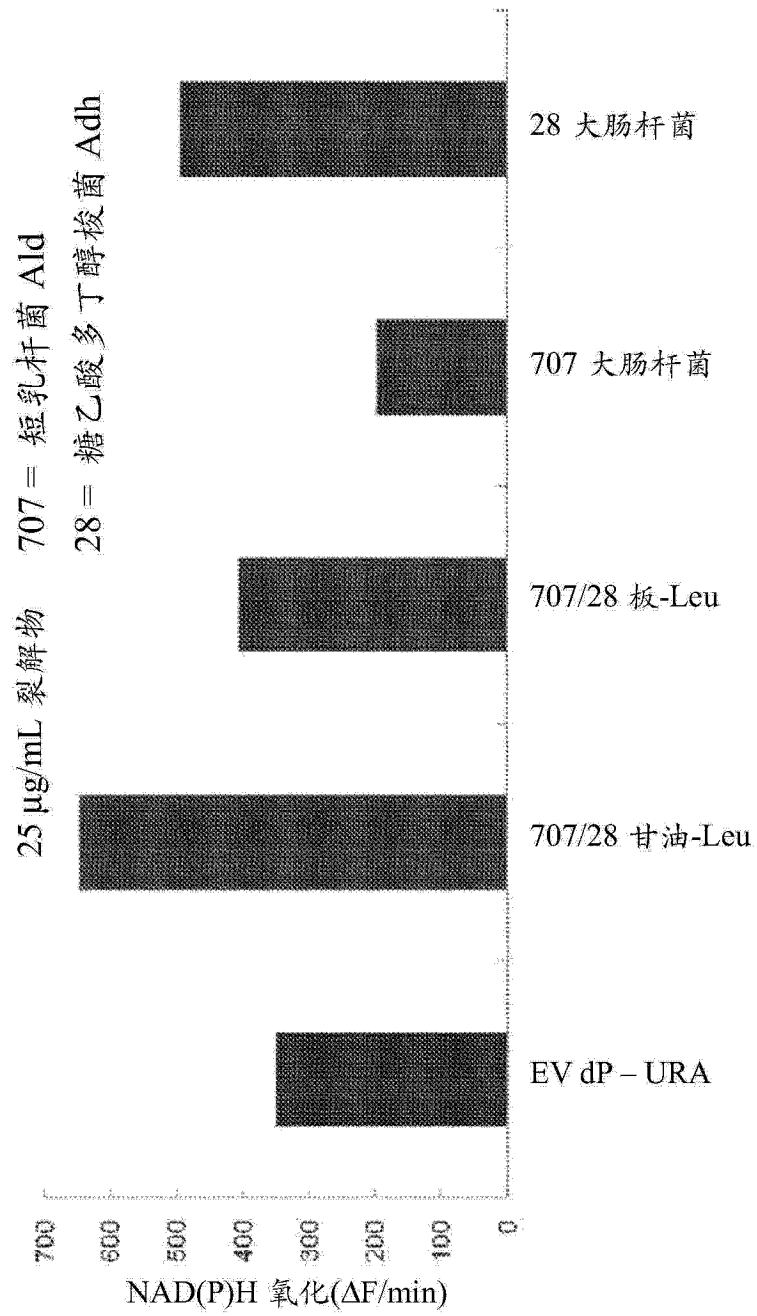


图 17