



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118591633 A

(43) 申请公布日 2024. 09. 03

(21) 申请号 202280089679.9

(22) 申请日 2022.12.15

(30) 优先权数据

21216448.7 2021.12.21 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.07.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/086137 2022.12.15

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/117685 EN 2023.06.29

(83) 生物保藏信息

CBS 146708 2020.05.25

(71) 申请人 康齐尔庄园有限公司

地址 德国博德曼路德维希港

(72) 发明人 阿斯特丽德·马赫·艾格纳

罗伯特·马赫 奥德利·马斯

劳拉·瓦内萨·达萨·塞尔纳

安东·弗里德尔 格奥尔格·塔克

(74) 专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

专利代理师 赵晓琳

(51) Int. Cl.

C12P 7/18 (2006.01)

权利要求书1页 说明书20页

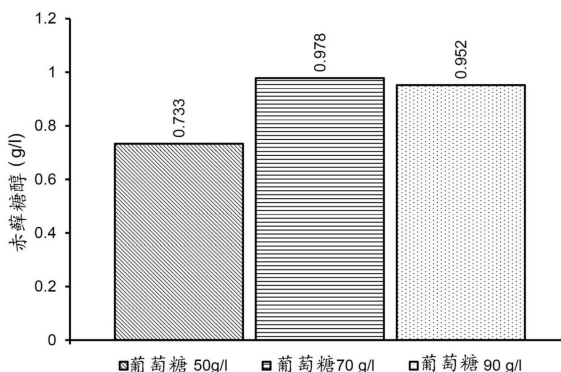
序列表(电子公布) 附图6页

(54) 发明名称

赤藓糖醇的生物技术生产方法

(57) 摘要

本发明涉及一种生物技术生产赤藓糖醇的方法,特别是一种通过在包含氮源和高浓度碳源培养基中培养至少一种腐生生物的赤藓糖醇生物技术生产方法。



1. 一种生产赤藓糖醇的方法,包括以下步骤:
 - a) 在包含浓度为至少40g/L的碳源和氮源的培养基中培养至少一种腐生生物,以在培养基中获得赤藓糖醇,
 - b) 从培养基中回收赤藓糖醇。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述培养基包含浓度为40至200g/L、优选70至90g/L的碳源。
3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述培养基包含浓度为至少50mM、优选为至少60mM、优选至少70mM的氮源。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述培养基包含含有木质纤维素的水解产物。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述碳源是葡萄糖或木糖。
6. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中所述碳源包括通过水热处理包含纤维素、半纤维素和/或淀粉的原料而获得的水解产物。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述氮源是尿素。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述至少一种腐生生物是来自肉座菌属、木霉属、赤霉属、镰刀菌属、曲霉菌属或青霉菌属的丝状真菌。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述腐生生物选自红褐肉座菌(里氏木霉)、玉米赤霉、禾谷镰刀菌、黑曲霉、构巢曲霉、米曲霉和产黄青霉。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述腐生生物是红褐肉座菌(里氏木霉)。
11. 根据前述权利要求中任何一项所述的方法,其中在步骤a)中,在所述培养基中培养所述至少一种腐生生物,直到所述培养基中含有浓度为至少250mg/L、优选至少500mg/L、优选为至少1g/L的赤藓糖醇。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在步骤a)中,所述至少一种腐生生物在pH为2至7、优选3至5.5的培养基中培养。
13. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中在步骤b)中通过结晶回收赤藓糖醇。
14. 根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中步骤b)中赤藓糖醇的回收包括以下步骤:
 - i) 优选通过离心和膜过滤去除生物质,
 - ii) 对培养基进行脱色,优选用活性炭对培养基脱色,
 - iii) 对培养基脱盐、优选通过电渗析对培养基进行脱盐和脱色,
 - iv) 制备色谱法,优选使用离子排斥和尺寸排斥机制的反相色谱法,和
 - v) 对所述赤藓糖醇进行浓缩和结晶。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中在步骤i)之前、期间或之后进行热变性步骤。

赤藓糖醇的生物技术生产方法

[0001] 本发明涉及一种生物技术生产赤藓糖醇的方法,特别是一种通过在包含氮源和高浓度碳源培养基中培养至少一种腐生生物的赤藓糖醇生物技术生产方法。

[0002] 近年来,人们的生活方式以及对高糖食品的消费不断增加导致血糖相关疾病和病症(如2型糖尿病(DMT2))的急剧增加。如今,低血糖营养和避免血糖水平的过度峰值被认为可以降低患某些慢性疾病的风险,并有利于维持和改善健康以及治疗和/或预防大量血糖相关疾病和病症。

[0003] 赤藓糖醇是一种天然存在的四碳糖醇,由于其独特的性质和广泛的应用领域,在食品工业中越来越重要。它可以在几种水果(如梨、葡萄和甜瓜)、蘑菇、酒精饮料(啤酒、葡萄酒、清酒)和发酵食品(如酱油和味噌豆瓣酱)中发现,但也自然存在于人类和动物的生物流体中,如晶状体组织、血清、血浆、胎液和尿液。由于其分子量小,赤藓糖醇很容易在上肠中被吸收,因此与食品工业中使用的其他糖醇相比,它引起的消化困难更小。大多数摄入的赤藓糖醇不会在人体内代谢,而是在不改变血糖和胰岛素水平的情况下未经修饰地排泄到尿液中(Regnat等人,Erythritol as sweetener—wherefrom and whereto?,2018, Applied Microbiology and Biotechnology, Vol.102)。此外,赤藓糖醇不致龋,热稳定,结晶良好,吸湿性低于蔗糖。由于溶解焓为负,赤藓糖醇的消耗会在口腔中引起凉爽感。赤藓糖醇的10% (w/v) 溶液在相同浓度下具有蔗糖的60-80%的甜度。

[0004] 然而,与其他糖醇(如山梨醇、木糖醇、甘露醇、乳糖醇和麦芽糖醇,这些糖醇多年来一直被公认为糖的替代品)相比,到目前为止,赤藓糖醇还不能以有商业价值的方式进行化学生产。在高温下使用镍催化剂从二醛淀粉生产赤藓糖醇导致不令人满意的低产率(Moon等人,Biotechnological production of erythritol and its applications, 2010, Appl. Microbiol. Biotechnol., Vol.86)。

[0005] 在酵母和真菌中,赤藓糖醇是通过所谓的磷酸戊糖途径产生的。它是由D-赤藓糖-4-磷酸通过去磷酸化和随后的赤藓糖还原合成的。基于此,渗透性酵母,如短梗霉属(*Aureobasidium* sp.)、丝孢酵母属(*Trichosporoides* sp.)和木兰假丝酵母(*Candida magnoliae*),对于赤藓糖醇的生物技术生产的适用性已经在几项研究中进行了研究(Ishizuka等人,Breeding of amutant of *Aureobasidium* sp.with high erythritol production,1989,J.Ferm.Bioeng.,Vol.68(5);US4939091A;US5962287 A;Oh等人,Increased erythritol production in fedbatch cultures of *Torula* sp.by controlling glucose concentration,2001,JIM&B,Vol.26;Koh等人,Scale-up of erythritol production by an osmophilic mutant of *Candida magnoliae*,2003,Biotechnol.Lett.,Vol.25;Ryu等人,Optimization of erythritol production by *Candida magnoliae* in fed-batch culture,2000,JIM&B,Vol.25)。最近的研究考察了丝状真菌产生赤藓糖醇的潜力(Jovanovic等人,2013)。然而,从不同菌株获得的赤藓糖醇的产率对于工业规模生产来说是令人不满意的。

[0006] 因此,需要一种生物技术方法来生产产量增加的赤藓糖醇。本发明通过独立权利要求的主题,特别是通过根据本发明的赤藓糖醇的生产方法,克服了现有技术中方法的缺

点。

[0007] 本发明特别涉及一种生产赤藓糖醇的方法,包括以下步骤:

[0008] a) 在包含浓度为至少40g/L的碳源和氮源的培养基中培养至少一种腐生生物,以在培养基中获得赤藓糖醇,

[0009] b) 从培养基中回收赤藓糖醇。

[0010] 在本发明的优选实施方案中,培养基包含浓度为至少50g/L,优选至少60g/L,优选至少70g/L的碳源。

[0011] 在本发明的另一个优选实施方案中,培养基包含浓度为最多150g/L、优选最多125g/L、优选最多100g/L、优选最多95g/L、优选最多90g/L的碳源。

[0012] 根据本发明的优选实施方案,培养基包含浓度为40至200g/L、优选45至175g/L、优选50至150g/L、优选55至125g/L、优选60至100g/L、优选65至95g/L、优选70至90g/L的碳源。

[0013] 优选地,培养基包含浓度为40至160g/L、优选40至150g/L、优选40g/L至140g/L、优选45至130g/L、优选45g/L至120g/L、优选45至110g/L、优选50至100g/L、优选50至95g/L、优选50g/L至90g/L、优选60至90g/L、优选65g/L至90g/L、优选70至90g/L的碳源。

[0014] 在本发明的另一个优选实施方案中,培养基包含浓度为至少50mM、优选至少55mM、优选至少60mM、优选至少65mM、优选至少70mM的氮源。

[0015] 优选地,培养基包含浓度为最多150mM、优选最多140mM、优选最多130mM、更优选最多120mM、优选最110mM、最优选最多100mM的氮源。

[0016] 特别优选地,培养基包含浓度为50至140mM、优选55至130mM、优选60至120mM、优选65至110mM、优选70至100mM的氮源。

[0017] 根据本发明的优选实施方案,培养基是合成培养基。优选地,所述培养基不是合成培养基。

[0018] 在本发明的另一个优选实施方案中,培养基包含通过水热处理包含纤维素、半纤维素和/或淀粉的原料而获得的水解产物。

[0019] 特别优选地,所述培养基包含含有木质纤维素的水解产物。

[0020] 在本发明的另一个优选实施方案中,水解产物,优选通过水热处理含纤维素、半纤维素和/或淀粉的原料,特别是含木质纤维素的水解产物而获得的水解产物,来源于农业工业残留物。

[0021] 根据本发明的优选实施方案,培养基包括稻草的水解物,特别是小麦秸秆的水解物。在另一优选的实施方案中,培养基包括麦麸的水解产物。优选地,所述培养基包括土豆泥的水解物。

[0022] 在本发明的优选实施方案中,碳源是单体或低聚C-5和/或C-6糖或其混合物。优选地,碳源是选自阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖和果糖的单体或低聚C-5和/或C-6糖。根据进一步优选的实施方案,碳源是单体和低聚C-5和/或C-6糖的混合物,优选选自阿拉伯糖、木糖、葡萄糖、半乳糖、甘露糖和果糖的单体和低聚C-5和/或C-6的糖的混合物。

[0023] 在进一步优选的实施方案中,碳源是葡萄糖或木糖。特别优选地,碳源是葡萄糖。优选地,所述碳源是木糖。

[0024] 根据优选实施方案,培养基中的C-5糖含量为至少5%、优选至少10%、优选至少15%、优选至少20%、优选至少25%、优选至少30%、优选至少40%、优选至少50%、优选至

少60%、优选至少70%、优选至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95% (基于培养基中总碳水化合物)。

[0025] 优选地,培养基中的C-6糖含量为至少10%、优选至少15%、优选至少20%、优选至少25%、优选至少30%、优选至少40%、优选至少50%、优选至少60%、优选至少70%、优选至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95% (基于培养基中总碳水化合物)。

[0026] 在本发明的优选实施方案中,培养基中的葡萄糖含量为至少10%、优选至少15%、优选至少20%、优选至少25%、优选至少30%、优选至少40%、优选至少50%、优选至少60%、优选至少70%、优选至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95% (基于培养基中总碳水化合物)。

[0027] 在另一个优选实施方案中,培养基中的木糖含量为至少10%、优选至少15%、优选至少20%、优选至少25%、优选至少30%、优选至少40%、优选至少50%、优选至少60%、优选至少70%、优选至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95% (基于培养基中总碳水化合物)。

[0028] 优选地,培养基中单体C-5和C-6糖的含量为至少1%、优选至少2%、优选至少3%、优选4%、优选至少5%、优选至少6%、优选至少7%、优选至少8%、优选至少9%、优选至少10%、优选至少15%、优选至少20%、优选至少30%、优选至少40%、优选至少50%、优选至少60%、优选至少70%、优选至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99% (基于培养基中的总碳水化合物)。

[0029] 根据本发明的优选实施方案,培养基中低聚C-5和C-6糖的含量为至少10%、优选至少20%、优选至少30%、优选至少40%、优选至少50%、优选至少60%、优选至少70%、优选至少75%、优选至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99% (基于培养基中的总碳水化合物)。

[0030] 根据本发明的优选实施方案,氮源选自铵盐、硝酸盐、酵母提取物和尿素。特别优选的是,所述氮源是铵盐或尿素。优选地,铵盐选自硫酸铵、硝酸铵、柠檬酸铵、琥珀酸铵、碳酸铵、草酸铵和苹果酸铵。

[0031] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,所述氮源是尿素。

[0032] 优选地,培养基包含浓度为至少8mM、优选至少10mM、优选至少15mM、优选至少20mM、优选至少25mM、优选至少30mM、优选至少35mM、优选至少40mM、优选至少45mM、优选至少50mM、优选至少55mM、优选至少60mM、优选至少65mM、优选至少70mM、优选至少80mM的尿素。

[0033] 根据本发明的优选实施方案,培养基包含浓度为最多160mM、优选最多150mM、优选最多140mM、优选最多130mM、更优选最多120mM、优选最多110mM、优选最多100mM、优选最多90mM的尿素。

[0034] 在优选实施方案中,培养基包含浓度为8至160mM、优选10至150mM、优选20至140mM、优选30至130mM、优选40至120mM、优选50至110mM、优选60至100mM、优选65至100mM、优选70至100mM、最优选70至90mM的尿素。

[0035] 根据本发明的另一个优选实施方案,所述至少一种腐生生物是丝状真菌。优选地,丝状真菌选自肉座菌属(Hypocrea)、木霉属(Trichoderma)、赤霉属(Gibberella)、镰刀菌属(Fusarium)、曲霉菌属(Aspergillus)和青霉属(Penicillium)。

[0036] 在一个优选的实施方案中,腐生生物选自红褐肉座菌(*Hypocrea jecorina*) (里氏木霉(*Trichoderma reesei*))、玉米赤霉(*Gibberella zeae*)、禾谷镰刀菌(*Fusarium graminearum*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和产黄青霉(*Penicillium chrysogenum*)组成。特别优选的是,腐生生物是红褐肉座菌(里氏木霉)。

[0037] 根据本发明的优选实施方案,所述至少一种腐生生物是天然存在的腐生生物,特别是不是遗传修饰腐生生物。

[0038] 在本发明的另一个优选实施方案中,对所述至少一种腐生生物进行遗传修饰。

[0039] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,遗传修饰腐生生物是红褐肉座菌(里氏木霉)。优选地,遗传修饰腐生生物是基于里氏木霉菌株QM6a Δ tmus53。

[0040] 优选地,至少一种遗传修饰腐生生物包含至少一个编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因、至少一个编码至少一种赤藓糖还原酶的基因和至少一个编码甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的失活基因。

[0041] 在本发明的另一个优选实施方案中,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因是fps1,特别是密码子优化的fps1。优选地,至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因是来自酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的fps1,特别是来自酿酒酵母的密码子优化的fps1。

[0042] 在进一步优选的实施方案中,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因包含SEQ ID No.1的核苷酸序列,特别是由SEQ ID No.2的核苷酸序列组成。

[0043] 在本发明的优选实施方案中,至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因包含与SEQ ID No.1具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。优选地,至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因由与SEQ ID No.1具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0044] 优选地,所述遗传修饰腐生生物膜结合糖醇转运蛋白包含SEQ ID No.2的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.2中的氨基酸序列组成。

[0045] 优选地,所述遗传修饰腐生生物膜结合糖醇转运蛋白包含与SEQ ID No.2具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。在进一步优选的实施方案中,遗传修饰腐生生物膜结合糖醇转运蛋白由与SEQ ID No.2具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0046] 在本发明的另一个优选实施方案中,所述遗传修饰腐生生物膜结合糖醇转运蛋白包含SEQ ID No.2中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。在一个特别优选的实施方案中,遗传修饰腐生生物膜结合糖醇转运蛋白包含SEQ ID No.2中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六

个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选至少两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。

[0047] 在本发明的一个优选实施方案中,至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种赤藓糖还原酶的基因是err1,特别是密码子优化的err1。优选地,至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种赤藓糖还原酶的基因是来自里氏木霉、黑曲霉或禾谷镰刀菌的err1,特别是密码子优化的err1。

[0048] 在一个优选的实施方案中,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种赤藓糖还原酶的基因包含SEQ ID No.3的核苷酸序列,特别是由SEQ ID No.3的核苷酸序列组成。

[0049] 优选地,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种赤藓糖还原酶的基因包含与SEQ ID No.3具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。在本发明的另一个优选实施方案中,至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种赤藓糖还原酶的基因由与SEQ ID No.3具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0050] 优选地,遗传修饰腐生生物赤藓糖还原酶包含SEQ ID No.4的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.4的氨基酸序列组成。

[0051] 在一个优选的实施方案中,所述遗传修饰腐生生物赤藓糖还原酶包含与SEQ ID No.4具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选的是,遗传修饰腐生生物赤藓糖还原酶由与SEQ ID No.4具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0052] 优选地,遗传修饰腐生生物赤藓糖还原酶包含SEQ ID No.4中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸与其他天然存在的氨基酸交换。在本发明的优选实施方案中,遗传修饰腐生生物赤藓糖还原酶包含SEQ ID No.4中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选至少两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。

[0053] 在本发明的优选实施方案中,至少一个编码遗传修饰腐生生物甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的死基因是mpdh。

[0054] 优选地,至少一个编码遗传修饰腐生生物甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的基因在失活之前包含SEQ ID No.9的核苷酸序列,特别是在失活之前由SEQ ID No.9的核苷酸序列组成。

[0055] 优选地,至少一个编码遗传修饰腐生生物甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的基因在失活前包含与SEQ ID No.9具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。在另一个优选实施方案中,至少一个编码遗传修饰腐生生物甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的基因在失活前由与SEQ ID No.9具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0056] 优选地,由SEQ ID No.9的核苷酸序列编码的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶在失活之前

包含SEQ ID No.10的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.10的氨基酸序列组成。

[0057] 在优选实施方案中,由SEQ ID No.9的核苷酸序列编码的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶在失活之前包含与SEQ ID No.10具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选的是,由SEQ ID No.9的核苷酸序列编码的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶在失活之前由与SEQ ID No.10具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0058] 优选地,由SEQ ID No.9的核苷酸序列编码的甘露醇1-磷酸5-脱氢酶在失活之前包含SEQ ID No.10中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。在本发明的优选实施方案中,由SEQ ID No.9的核苷酸序列编码的甘露糖醇1-磷酸5-脱氢酶在失活之前包含SEQ ID No.10中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选至少两个、优选最多一个的氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。

[0059] 在本发明的另一个优选实施方案中,至少一个编码遗传修饰腐生生物甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的失活基因被删除。

[0060] 在本发明的一个优选实施方案中,至少一个编码遗传修饰腐生生物甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的失活基因是非功能性的。

[0061] 在一个特别优选的实施方案中,通过基因敲除,特别是基因置换,使至少一个编码遗传修饰腐生生物甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的失活基因失活。优选地,通过使用缺失盒(deletion cassette)的基因替换使至少一个编码遗传修饰腐生生物甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的失活基因失活。

[0062] 在本发明的一个优选实施方案中,通过基因组编辑,特别是通过归巢核酸内切酶(meganuclease)、锌指核酸酶(ZFN)、转录激活子样效应核酸酶(TALEN)或通过成簇规则间隔短回文重复序列(CRISPR)系统,使至少一个编码遗传修饰腐生生物甘露醇1-磷酸5-脱氢酶的基因失活,特别是使其不具有功能。

[0063] 在一个特别优选的实施方案中,所述遗传修饰腐生生物包含至少一个、优选至少两个、优选至少三个、优选至少四个、优选至少五个遗传修饰腐生生物另外的失活基因。优选地,所述至少一个遗传修饰腐生生物另外的失活基因选自编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1(Dhps-1)的基因、编码赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因、编码赤藓酮糖激酶(EYK1)的基因和编码赤藓糖醇脱氢酶(EYD1)的基因。

[0064] 在本发明的优选实施方案中,所述至少一个遗传修饰腐生生物另外的失活基因是编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1(Dhps-1)的基因。优选地,至少一个编码遗传修饰腐生生物磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1(Dhps1)的基因在失活前包含SEQ ID No.11的核苷酸序列,特别是在失活前由SEQ ID No.11的核苷酸序列组成。

[0065] 优选地,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1(Dhps1)的基因在失活前包含与SEQ ID No.11具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。在进一步优选的实施方案中,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物磷酸-

2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1 (Dhaps1) 的基因在失活前由与SEQ ID No.11具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0066] 优选地,由SEQ ID No.11的核苷酸序列编码的磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1 (Dhaps1) 在失活之前包含SEQ ID No.12的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.12的氨基酸序列组成。

[0067] 在优选实施方案中,由SEQ ID No.11的核苷酸序列编码的磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1 (Dhaps1) 在失活之前包含与SEQ ID No.12具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选的是,由SEQ ID No.11的核苷酸序列编码的磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1 (Dhaps1) 在失活之前由与SEQ ID No.12具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0068] 优选地,SEQ ID No.11的核苷酸序列编码的磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1 (Dhaps1) 在失活之前由包括如SEQ ID No.12所定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。在本发明的优选实施方案中,由SEQ ID No.11的核苷酸序列编码的磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1 (Dhaps1) 在失活之前包括如SEQ ID No.12所定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选至少两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。

[0069] 在本发明的另一个实施方案中,所述至少一个遗传修饰腐生生物另外的失活基因是编码赤藓糖醇利用因子 (EUF) 的基因。优选地,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓糖醇利用因子 (Euf1) 的基因在失活前包含SEQ ID No.13的核苷酸序列,特别是在失活之前由SEQ ID No.13的核苷酸序列组成。

[0070] 优选地,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓糖醇利用因子 (Euf1) 的基因在失活前包含与SEQ ID No.13具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。特别优选地,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓糖醇利用因子 (Euf1) 的基因在失活前由与SEQ ID No.13具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0071] 优选地,由SEQ ID No.13的核苷酸序列编码的赤藓糖醇利用因子 (Euf1) 在失活之前包含SEQ ID No.14的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.14的氨基酸序列组成。

[0072] 在优选实施方案中,由SEQ ID No.13的核苷酸序列编码的赤藓糖醇利用因子 (Euf1) 在失活之前包含与SEQ ID No.14具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选地,由SEQ ID No.13的核苷酸序列编码的赤藓糖醇利用因子 (Euf1) 在失活之前由与SEQ ID No.14具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0073] 优选地,由SEQ ID No.13的核苷酸序列编码的赤藓糖醇利用因子(Euf1)在失活之前包含SEQ ID No.14中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。在本发明的优选实施方案中,在失活之前由SEQ ID No.13的核苷酸序列编码的赤藓糖醇利用因子(Euf1)包含SEQ ID No.14中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选至少两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。

[0074] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,至少一个遗传修饰腐生生物另外的失活基因是编码赤藓酮糖激酶(EYK1)的基因。优选地,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓酮糖激酶(Eyk1)的基因在失活前包含SEQ ID No.15的核苷酸序列,特别是在失活之前由SEQ ID No.15的核苷酸序列组成。

[0075] 根据本发明的另一个优选实施方案,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓酮糖激酶(Eyk1)的基因在失活前包含与SEQ ID No.15具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。特别优选地,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓酮糖激酶(Eyk1)的基因在失活前由与SEQ ID No.15具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0076] 优选地,在失活之前由SEQ ID No.15的核苷酸序列编码的赤藓酮糖激酶(Eyk1)包含SEQ ID No.16的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.16的氨基酸序列组成。

[0077] 在优选实施方案中,由SEQ ID No.15的核苷酸序列编码的赤藓酮糖激酶(Eyk1)在失活之前包含与SEQ ID No.16具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选的是,由SEQ ID No.15的核苷酸序列编码的赤藓酮糖激酶(Eyk1)在失活之前由与SEQ ID No.16具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0078] 优选地,由SEQ ID No.15的核苷酸序列编码的赤藓酮糖激酶(Eyk1)在失活之前包含SEQ ID No.16中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。在本发明的优选实施方案中,由SEQ ID No.15的核苷酸序列编码的赤藓酮糖激酶(Eyk1)在失活之前包含SEQ ID No.16中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选至少两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。

[0079] 在本发明的优选实施方案中,至少一个遗传修饰腐生生物另外的失活基因是编码赤藓糖醇脱氢酶(EYD1)的基因。优选地,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓糖醇脱氢酶(Eyd1)的基因在失活前包含SEQ ID No.17的核苷酸序列,特别是在失活之前由SEQ ID No.17的核苷酸序列组成。

[0080] 优选地,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓糖醇脱氢酶(Eyd1)的基因在失活前包含与SEQ ID No.17具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优

选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。在本发明的另一个优选实施方案中,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓糖醇脱氢酶(Eyd1)的基因在失活前由与SEQ ID No.17具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0081] 优选地,由SEQ ID No.17的核苷酸序列编码的赤藓糖醇脱氢酶(Eyd1)在失活之前包含SEQ ID No.18的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.18的氨基酸序列组成。

[0082] 在优选实施方案中,由SEQ ID No.17的核苷酸序列编码的赤藓糖醇脱氢酶(Eyd1)在失活之前包含与SEQ ID No.18具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选地,由SEQ ID No.17的核苷酸序列编码的赤藓糖醇脱氢酶(Eyd1)在失活之前由与SEQ ID No.18具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0083] 优选地,由SEQ ID No.17的核苷酸序列编码的赤藓糖醇脱氢酶(Eyd1)在失活之前包含SEQ ID No.18中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。在本发明的优选实施方案中,由SEQ ID No.17的核苷酸序列编码的赤藓糖醇脱氢酶(Eyd1)在失活之前包含SEQ ID No.18中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最大六个、优选最多五个、优选最低四个、优选高达三个、优选低达两个、优选高达一个的氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。

[0084] 在本发明的一个优选实施方案中,至少一个遗传修饰腐生生物另外的失活基因是编码赤藓糖醇异构酶1(EYI1)的基因。优选地,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓糖醇异构酶1(Eyi1)的基因在失活前包含SEQ ID No.19的核苷酸序列,特别是在失活之前有SEQ ID No.19的核苷酸序列组成。

[0085] 特别优选的是,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓糖醇异构酶1(Eyi1)的基因在失活前包含与SEQ ID No.19具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。在本发明的另一个优选实施方案中,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓糖醇异构酶1(Eyi1)的基因在失活前由与SEQ ID No.19具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0086] 优选地,由SEQ ID No.19的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶1(Eyi1)在失活之前包含SEQ ID No.20的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.20的氨基酸序列组成。

[0087] 在优选实施方案中,由SEQ ID No.19的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶1(Eyi1)在失活之前包含与SEQ ID No.20具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选的是,由SEQ ID No.19的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶1(Eyi1)在失活之前由与SEQ ID No.20具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0088] 优选地,由SEQ ID No.19的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶1(Eyi1)在失活之前包含SEQ ID No.20中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。在本发明的优选实施方案中,由SEQ ID No.19的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶1(Eyi1)在失活之前包含如SEQ ID No.20中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选至少两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。

[0089] 在本发明的另一个优选实施方案中,至少一个遗传修饰腐生生物另外的失活基因是编码赤藓糖醇异构酶2(EYI2)的基因。优选地,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓糖醇异构酶2(Eyi2)的基因在失活前包含SEQ ID No.21的核苷酸序列,特别是在失活之前由SEQ ID No.21的核苷酸序列组成。

[0090] 优选地,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓糖醇异构酶2(Eyi2)的基因在失活前包含与SEQ ID No.21具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。在本发明的优选实施方案中,所述至少一个编码遗传修饰腐生生物赤藓糖醇异构酶2(Eyi2)的基因在失活前由与SEQ ID No.21具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0091] 优选地,由SEQ ID No.21的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶2(Eyi2)在失活之前包含SEQ ID No.22的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.22的氨基酸序列组成。

[0092] 在优选实施方案中,由SEQ ID No.21的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶2(Eyi2)在失活之前包含与SEQ ID No.22具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选的是,由SEQ ID No.21的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶2(Eyi2)在失活之前由与SEQ ID No.22具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0093] 优选地,由SEQ ID No.21的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶2(Eyi2)在失活之前包含SEQ ID No.22中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。在本发明的优选实施方案中,由SEQ ID No.21的核苷酸序列编码的赤藓糖醇异构酶2(Eyi2)在失活之前包含SEQ ID No.22中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最多三个、优选至少两个、优选最多一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。

[0094] 在本发明的另一个优选实施方案中,所述至少一个遗传修饰腐生生物另外的失活基因被删除,所述另外的失活基因选自编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1(Dhps-1)的基因、编码赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因、编码赤藓酮糖激酶(EYK1)的基因、编码赤藓糖醇脱氢酶(EYD1)的基因、编码赤藓糖醇异构酶(EYI1)的基因和编码赤藓糖醇异构酶(EYI2)的基因。

[0095] 优选地,所述至少一个遗传修饰腐生生物另外的失活基因是非功能性的,所述另

外的失活基因选自编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1 (Dhaps-1) 的基因、编码赤藓糖醇利用因子 (EUF) 的基因、编码赤藓酮糖激酶 (EYK1) 的基因、编码赤藓糖醇脱氢酶 (EYD1) 的基因、编码赤藓糖醇异构酶 (EYI1) 的基因和编码赤藓糖醇异构酶 (EYI2) 的基因。

[0096] 在一个特别优选的实施方案中,所述至少一个遗传修饰腐生生物另外的失活基因通过基因敲除,特别是基因置换失活,所述另外的失活基因选自编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1 (Dhaps-1) 的基因、编码赤藓糖醇利用因子 (EUF) 的基因、编码赤藓酮糖激酶 (EYK1) 的基因、编码赤藓糖醇脱氢酶 (EYD1) 的基因、编码赤藓糖醇异构酶 (EYI1) 的基因和编码赤藓糖醇异构酶 (EYI2) 的基因。优选地,所述至少一个遗传修饰腐生生物另外的失活基因通过使用缺失盒的基因替换失活,所述另外的失活基因选自编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1 (Dhaps-1) 的基因、编码赤藓糖醇利用因子 (EUF) 的基因、编码赤藓酮糖激酶 (EYK1) 的基因、编码赤藓糖醇脱氢酶 (EYD1) 的基因、编码赤藓糖醇异构酶 (EYI1) 的基因和编码赤藓糖醇异构酶 (EYI2) 的基因。

[0097] 在本发明的一个优选实施方案中,所述至少一个遗传修饰腐生生物另外的失活基因通过基因组编辑,特别是通过归巢核酸内切酶、锌指核酸酶 (ZFN)、转录激活子样效应核酸酶 (TALEN) 或通过成簇规则间隔短回文重复序列 (CRISPR) 系统失活,所述另外的失活基因选自编码磷酸-2-脱氢-3-脱氧庚酸醛缩酶1 (Dhaps-1) 的基因、编码赤藓糖醇利用因子 (EUF) 的基因、编码赤藓酮糖激酶 (EYK1) 的基因、编码赤藓糖醇脱氢酶 (EYD1) 的基因、编码赤藓糖醇异构酶 (EYI1) 的基因和编码赤藓糖醇异构酶 (EYI2) 的基因。

[0098] 在本发明的另一个优选实施方案中,所述遗传修饰腐生生物进一步包含至少一个编码至少一种转酮醇酶的基因。优选地,至少一个编码至少一种转酮醇酶的基因是tk11,特别是密码子优化的tk11。优选地,所述遗传修饰腐生生物进一步包含至少一个编码来自里氏木霉的tk11的基因,特别是来自里氏木霉的密码子优化tk11。在优选的实施方案中,至少一个编码至少一种转酮醇酶的基因包含SEQ ID No.5的核苷酸序列,特别是由SEQ ID No.5的核苷酸序列组成。

[0099] 在本发明的另一个优选实施方案中,至少一个编码至少一种转酮醇酶的基因包含与SEQ ID No.5具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。优选地,至少一个编码至少一种转酮醇酶的基因由与SEQ ID No.5具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0100] 优选地,所述至少一种转酮醇酶包含SEQ ID No.6的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.6的氨基酸序列组成。

[0101] 在本发明的另一个优选实施方案中,所述至少一种转酮醇酶包含与SEQ ID No.6具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。特别优选地,所述至少一种转酮醇酶由与SEQ ID No.6具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0102] 在本发明的另一个优选实施方案中,所述至少一种转酮醇酶包含SEQ ID No.6中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八

个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。在一个特别优选的实施方案中,所述至少一种转酮醇酶包含SEQ ID No.6中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最低三个、优选至少两个、优选高达一个的氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。

[0103] 在本发明的优选实施方案中,所述遗传修饰腐生生物进一步包含至少一个编码至少一种转醛醇酶的基因。优选地,至少一个编码至少一种转醛醇酶的基因是tal1,特别是密码子优化的tal1。优选地,所述遗传修饰腐生生物进一步包含至少一个编码里氏木霉tal1的基因,特别是编码来自里氏木霉的密码子优化tal1。在优选的实施方案中,至少一个编码至少一种转醛醇酶的基因包含SEQ ID No.7的核苷酸序列,特别是由SEQ ID No.7的核苷酸序列组成。

[0104] 在另一优选实施方案中,至少一个编码至少一种转醛醇酶的基因包含与SEQ ID No.7具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。优选地,至少一个编码至少一种转醛醇酶的基因由与SEQ ID No.7具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0105] 优选地,所述至少一种转醛醇酶包含SEQ ID No.8的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.8的氨基酸序列组成。

[0106] 特别优选地,所述至少一种转醛醇酶包含与SEQ ID No.8具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。优选地,所述至少一种转醛醇酶由与SEQ ID No.8具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0107] 在本发明的另一个优选实施方案中,所述至少一种转醛醇酶包含SEQ ID No.8中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。在一个特别优选的实施方案中,所述至少一种转醛醇酶包含SEQ ID No.8中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选最多四个、优选最低三个、优选至少两个、优选高达一个的氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。

[0108] 在本发明的另一个优选实施方案中,遗传修饰腐生生物进一步包含至少一个编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因。优选地,至少一个编码至少一种赤藓糖醇利用因子的基因是euf1,特别是密码子优化的euf1。优选地,所述遗传修饰腐生生物进一步包含至少一个编码来自里氏木霉的euf1基因,特别是编码来自里氏木霉的密码子优化euf1。在优选实施方案中,至少一个编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因包含SEQ ID No.13的核苷酸序列,特别是由SEQ ID No.3的核苷酸序列组成。

[0109] 在优选实施方案中,至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种赤藓糖醇利用因子的基因包含与SEQ ID No.13具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列。优选地,至少一个编码至少一种赤藓糖醇利用因子的基因由与SEQ ID No.13具有至少80%、

优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的核苷酸序列组成。

[0110] 优选地,所述至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)包含SEQ ID No.14的氨基酸序列,特别是由SEQ ID No.14的氨基酸序列组成。

[0111] 在另一优选实施方案中,所述至少一种赤藓糖醇利用因子包含与SEQ ID No.14具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列。优选地,所述至少一种赤藓糖醇利用因子由与SEQ ID No.14具有至少80%、优选至少85%、优选至少90%、优选至少95%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少98%、优选至少99%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0112] 在本发明的另一个优选实施方案中,所述至少一种赤藓糖醇利用因子包含SEQ ID No.14中定义的氨基酸序列,其中一个、优选两个、优选三个、优选五个、优选六个、优选七个、优选八个、优选九个、优选十个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。在一个特别优选的实施方案中,所述至少一种赤藓糖醇利用因子包含SEQ ID No.14中定义的氨基酸序列,其中最多十个、优选最多九个、优选最多八个、优选最多七个、优选最多六个、优选最多五个、优选高达四个、优选最低三个、优选至少两个、优选最大一个氨基酸被其他天然存在的氨基酸交换。

[0113] 在本发明的一个优选实施方案中,遗传修饰腐生生物的至少一个编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因、至少一个编码至少一种赤藓糖还原酶的基因、至少一个编码至少一种转酮醇酶的基因、至少一个编码至少一种转醛醇酶和/或编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因是外源性多核苷酸序列。

[0114] 优选地,遗传修饰腐生生物的至少一个编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因、至少一个编码至少一种赤藓糖还原酶的基因、至少一个编码转酮醇酶的基因、至少一个编码至少一种转醛醇酶的基因和/或至少一个编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因是内源性多核苷酸序列。

[0115] 在进一步优选的实施方案中,遗传修饰腐生生物包含编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的至少一种外源基因。优选地,遗传修饰腐生生物包含至少一个编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的内源性基因。

[0116] 优选地,遗传修饰腐生生物包含至少一个编码至少一种赤藓糖还原酶的外源基因。在另一个优选实施方案中,遗传修饰腐生生物包含至少一个编码至少一种赤藓糖还原酶的内源性基因。

[0117] 进一步优选的是,所述遗传修饰腐生生物包含至少一个编码至少一种转酮醇酶的外源基因。在本发明的一个优选实施方案中,遗传修饰腐生生物包含至少一个编码至少一种转酮醇酶的内源性基因。

[0118] 优选地,遗传修饰腐生生物包含至少一个编码至少一种转醛醇酶的外源基因。优选地,遗传修饰腐生生物包含至少一个编码至少一种转醛醇酶的内源性基因。

[0119] 优选地,遗传修饰腐生生物包含至少一个编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的外源基因。优选地,遗传修饰腐生生物包含至少一个编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的内源基因。

[0120] 在本发明的一个优选实施方案中,将至少一个编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白

的基因、至少一个编码至少一种赤藓糖还原酶的基因、至少一个编码至少一种转酮醇酶的基因、至少一个编码至少一种转醛醇酶的基因和/或至少一个编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因稳定地或瞬时地引入遗传修饰腐生生物基因组中。

[0121] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,至少一个编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因、编码至少一种赤藓糖还原酶的至少一种基因、编码至少一种转酮醇酶的至少一条基因、至少一个编码至少一种转醛醇酶的基因和/或至少一个编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因过表达。

[0122] 优选地,遗传修饰腐生生物的至少一个编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因,特别是至少一个编码至少一种薄膜结合糖醇转运蛋白的外源或内源性基因过表达。在进一步优选的实施方案中,遗传修饰腐生生物的至少一个编码至少一种赤藓糖还原酶的基因,特别是至少一个编码至少一种赤藓糖还原酶的外源或内源性基因过表达。优选地,遗传修饰腐生生物至少一个编码至少一种转酮醇酶的基因,特别是至少一个编码至少一种转酮醇酶的外源或内源性基因过表达。进一步优选的是,遗传修饰腐生生物的至少一个编码至少一种转醛醇酶的基因,特别是至少一个编码至少一种转醛醇酶的外源或内源性基因过表达。优选地,遗传修饰腐生生物的至少一个编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因,特别是至少一个编码至少一种赤藓糖醛利用因子(EUF)的外源或内源基因过表达。

[0123] 在本发明的另一个优选实施方案中,遗传修饰腐生生物的至少一个编码至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因、至少一个编码至少一种赤藓糖还原酶的基因、至少一个编码至少一种转酮醇酶的基因、至少一个编码至少一种转醛醇酶的基因和/或至少一个编码至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因在组成型或诱导型启动子的控制下。在优选的实施方案中,组成型或诱导型启动子是天然存在的启动子。在进一步优选的实施方案中,组成型或诱导型启动子是合成启动子。优选地,组成型启动子选自pki、tef、gpd。诱导型启动子优选选自bga1、bx11、cbh1、cbh2、xyn1、xyn2。优选地,至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因在选自pki、tef、gpd的启动子的控制下,优选地在pki启动子的调控下。优选地,至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种赤藓糖还原酶的基因在选自pki、tef、gpd的启动子的控制下,优选地在tef启动子的控制下。优选地,至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种转酮醇酶的基因在选自pki、tef、gpd的启动子的控制下,优选地在tef启动子的控制下。优选地,至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种转醛醇酶的基因在选自pki、tef、gpd的启动子的控制下,优选地在tef启动子的控制下。优选地,至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因在选自pki、tef、gpd的启动子的控制下,优选地在tef启动子的调控下。

[0124] 在本发明的另一个优选实施方案中,至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因、至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种赤藓糖还原酶的基因、至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种转酮醇酶的基因、至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种转醛醇酶的基因和/或至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因存在于质粒上。优选地,至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种膜结合糖醇转运蛋白的基因、至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种赤藓糖还原酶的基因、至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种代谢产物的基因、至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种转酮醇酶的基因、至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种转醛醇酶的基

因和/或至少一个编码遗传修饰腐生生物至少一种赤藓糖醇利用因子(EUF)的基因中的每一个都存在于单独的质粒上。

[0125] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,遗传修饰腐生生物是以CBS编号146708保藏在Westerdijk真菌生物多样性研究所的里氏木霉菌株。

[0126] 根据本发明的一个优选实施方案,在步骤a)中以至少5L、优选至少10L、优选至少25L、优选地至少50L、优选至少100L、优选至少250L、优选至少500L、优选至少1,000L、优选至少2,500L、优选至少7,500L、优选至少10,000L、优选至少25,000L、优选地至少50,000L、优选至少75,000L、优选至少100,000L的体积培养所述至少一种腐生生物。

[0127] 在本发明的另一个优选实施方案中,在步骤a)中在培养基中培养所述至少一种腐生生物,直到所述培养基含有浓度为至少250mg/L、优选至少300mg/L、优选至少350mg/L、优选至少400mg/L、优选至少450mg/L、优选至少500mg/L、优选至少600mg/L、优选至少700mg/L、优选至少800mg/L、优选至少900mg/L、优选至少1g/L、优选至少2g/L、优选至少3g/L、优选至少4g/L、优选至少5g/L、优选至少6g/L、优选至少7g/L、优选至少8g/L、优选至少9g/L、优选至少10g/L、优选至少15g/L、优选至少20g/L、优选至少25g/L、优选至少30g/L、优选至少35g/L、优选至少40g/L的赤藓糖醇。

[0128] 特别优选地,在培养基中培养所述至少一种腐生生物,直到所述培养基含有浓度为250mg/L至40g/L、优选500mg/L至40mg/L、优选750mg/L至40g/L,优选1g/L至40g/L的赤藓糖醇。

[0129] 在进一步优选的实施方案中,在培养基中培养所述至少一种腐生生物,直到培养基含有浓度为5g/L至40g/L、优选10g/L至40g/L,优选15g/L至40g/L、优选20g/L至40g/L、优选25g/L至40mg/L、优选30g/L至40g/m/L的赤藓糖醇。

[0130] 根据本发明的优选实施方案,赤藓糖醇的产率为至少3mg/g、优选至少4mg/g、优选至少5mg/g、优选至少6mg/g、优选至少7mg/g、优化至少8mg/g、优选至少9mg/g、优选至少10mg/g、优选至少11mg/g、优选至少12mg/g、优选至少13mg/g、优选至少14mg/g、优选至少15mg/g、优选至少17.5mg/g、优选至少20mg/g、优选至少25mg/g、优选至少30mg/g、优选至少40mg/g、优选至少50mg/g、优选至少75mg/g、优选至少100mg/g(分别基于消耗的mg赤藓糖醇/g碳源,特别是消耗的mg赤藓糖醇/g-葡萄糖)。

[0131] 在一个优选的实施方案中,赤藓糖醇的产率为3至100mg/g,优选4至100mg/g、优选5至100mg/g、优选6至100mg/g、优选7至75mg/g、优选8至75mg/g、优选9至75mg/g、优选10至75mg/g、优选15至50mg/g(分别基于消耗的mg赤藓糖醇/g碳源,特别是消耗的mg赤藓糖醇/g-葡萄糖)。

[0132] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,在步骤a)中,在pH为2至7、优选2.5至6.5、优选2.5到6、优选3至5.5的培养基中培养所述至少一种腐生生物。特别优选地,所述至少一种腐生生物在培养基中在最高7、优选最高6.5、优选最高6、优选最高5.5、优选最高5的pH下培养。

[0133] 根据本发明的优选实施方案,在步骤a)中,在培养基中在25至35°C、优选26至34°C、优选27至33°C,优选28至32°C,优选29至31°C、优选30°C的温度下培养所述至少一种腐生生物。

[0134] 在本发明的优选实施方案中,在步骤a)中,在培养基中在至少15°C、优选至少20

°C、优选至少25°C、优选至少26°C、优选至少27°C、优选至少28°C的温度下培养所述至少一种腐生生物。

[0135] 在进一步优选的实施方案中,在步骤a)中,在培养基中在最高35°C、优选最高34°C、优选最高33°C、优选最高32°C、优选最高31°C的温度下培养所述至少一种腐生生物。

[0136] 优选地,在步骤a)中在培养基中培养至少一种腐生生物至少24小时、优选至少36小时、优选至少48小时、优选至少60小时、优选至少72小时、优选至少84小时、优选至少96小时、优选至少108小时、优选至少120小时、优选至少132小时、优选至少144小时、优选至少156小时、优选168小时。

[0137] 在本发明的另一个优选实施方案中,在步骤a)中,在培养基中培养至少一种腐生生物最多240小时、优选最多216小时、优选最多192小时、优选最多180小时、优选最多168小时、优选最多156小时、优选最多144小时、优选最多132小时、优选最多120小时、优选最多108小时、优选96最多小时、优选最多84小时、优选最多72小时。

[0138] 根据本发明的优选实施方案,步骤a)中的至少一种腐生生物的培养在培养期间不添加有效渗透剂,特别是在培养期间没有添加至少一种盐的情况下进行。特别优选的是,步骤a)中的至少一种腐生生物的培养在培养期间不添加氯化钠(NaCl)的情况下进行。

[0139] 在本发明的优选实施方案中,步骤a)中的至少一种腐生生物的培养以分批模式进行。优选地,步骤a)中的至少一种腐生生物的培养以补料分批模式进行。在另一个优选实施方案中,步骤a)中的至少一种腐生生物的培养以连续模式进行。

[0140] 在本发明的另一个优选实施方案中,赤藓糖醇在步骤c)中通过结晶回收。

[0141] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,步骤b)中赤藓糖醇的回收包括以下步骤:

[0142] i) 优选通过离心和膜过滤去除生物质,

[0143] ii) 对培养基进行脱色,优选用活性炭对培养基脱色,

[0144] iii) 对培养基脱盐,优选通过电渗析对培养基进行脱盐和脱色,

[0145] iv) 制备色谱法,优选使用离子排斥和尺寸排斥机制的反相色谱法,和v) 赤藓糖醇浓缩和结晶。

[0146] 根据本发明的优选实施方案,在步骤i)之前、期间或之后进行热变性步骤。优选地,在步骤i)之前进行热变性步骤。在另一优选实施方案中,在步骤i)期间进行热变性步骤。优选地,在步骤i)之后进行热变性步骤。

[0147] 特别优选的是,热变性步骤包括将培养基加热到至少45°C、优选至少50°C、优选至少55°C、优选至少60°C、优选至少65°C、优选至少70°C,优选75°C、优选至少80°C、优选至少85°C、优选至少90°C、优选至少95°C的温度。

[0148] 在本发明的优选实施方案中,对培养基进行热变性至少10秒、优选至少20秒、优选至少30秒、优选至少40秒、优选至少50秒、优选至少1分钟、优选至少2分钟、优选至少3分钟、优选至少4分钟、优选至少5分钟、优选至少6分钟、优选至少7分钟、优选至少8分钟、优选至少9分钟、优选至少10分钟。

[0149] 热变性步骤主要用于在进行进一步的回收步骤之前使培养基中的蛋白质和酶失活。

[0150] 在本发明的一个特别优选的实施方案中,在步骤b)中回收的赤藓糖醇,特别是在

步骤v)中获得的赤藓糖醇,具有至少90%、优选至少92%、优选至少94%、优选至少96%、优选至少97%、优选至少97.5%、优选至少98%、优选至少98.5%、优选至少99%、优选至少99.5%的纯度。

[0151] 本文使用的术语“遗传修饰”及其语法等价物是指核酸的一种或多种改变,所述核酸例如生物体基因组内的核酸,特别是腐生生物基因组内的核苷酸。“遗传修饰”腐生生物可以指具有添加、删除和/或改变,特别是失活基因的腐生生物。

[0152] 在本发明的上下文中,术语“赤藓糖还原酶”涉及可逆催化醛糖还原为糖醇的任何酶,其中所述酶具有将赤藓糖还原为赤藓糖醇的主要比活性。因此,本发明的“赤藓糖还原酶”对底物赤藓糖表现出高特异性和亲和力。特别是,“赤藓糖还原酶”对赤藓糖的特异性比任何其他底物(如甘油)都高。

[0153] 本文所用的术语“膜结合的糖醇转运蛋白”指的是适合于将糖醇可逆地转运过外膜,特别是将细胞内产生的糖醇转运到培养基的膜蛋白。根据本发明,“膜结合糖醇转运蛋白”适合于将细胞内产生的赤藓糖醇通过膜转运到培养基中。

[0154] 在本发明的上下文中,术语“转酮醇酶”是指戊糖磷酸途径的酶,其催化C-2单元从酮糖供体到受体醛缩戊糖的硫胺依赖性可逆转移。特别是,“转酮醇酶”催化C-2单元从5-磷酸木酮糖转移到5-磷酸核糖,形成7-磷酸景天庚酮糖和3-磷酸甘油醛。

[0155] 术语“转醛醇酶”指的是磷酸戊糖途径非氧化分支的一种酶,催化C-3单元从酮糖供体向受体醛糖的可逆转移。特别是,“转酮醇酶”催化C-3单元从7-磷酸景天庚酮糖转移到3-磷酸甘油醛,形成4-磷酸赤藓糖和6-磷酸果糖。

[0156] 在本发明的上下文中,“失活”基因是可以暂时或永久不被转录或可以被转录但转录物不能用于基因翻译的基因。根据本发明,基因的失活包括但不限于通过部分或完全基因缺失、部分或完全的基因替换、基因抑制、基因插入和基因突变的失活。在本发明的上下文中,“失活”进一步包括任何转录后基因调控,特别是通过RNAi或siRNA,导致转录物翻译成基因产物的抑制。

[0157] 在本发明的上下文中,“非功能性”基因是存在于生物体的基因组或生物体的质粒中的基因,该基因未被转录或被转录但转录物未翻译成基因产物。

[0158] 在本发明的上下文中,“缺失”基因是先前存在于生物体的基因组或生物体中的质粒中,但已从生物体的基因组或者生物体中的质体中完全去除的基因。

[0159] 在本发明的上下文中,动词“过表达”是指基因数量增加的人工表达。这包括可使用诱导型启动子调节的基因的诱导型过表达和使用组成型启动子的基因的持续过表达。

[0160] 术语“低聚糖”或“低聚C-5和C-6糖”在本文中用于由至少两种单体组成的二聚糖、低聚糖和多糖,优选由至少两个选自C-5和C-6糖的单体组成。

[0161] 在本发明的上下文中,术语“一个(a)”意指包括“一个”或“一个或多个”的含义。

[0162] 在本发明的上下文中,术语“包括(comprising)”优选地具有“包含(containing)”或“包括(including)”的含义,意思是包括特定识别的元素而不排除其他元素的存在。然而,在一个优选实施方案中,术语“包括(comprising)”也被理解为具有“基本上由…组成”的含义,并且在另一个优选的实施方案中具有“由…组成”的意思。

[0163] 术语“和/或”在本文中用于表示在列表中连接的单个元素的任何组合的公开。仅出于说明目的,表达式“A、B和/或C”可以指A单独、B单独、C单独、(A和B)、(B和C)、(A与C)和

(A、B与C)。

[0164] 本发明的进一步优选实施方案是子权利要求的主题。

[0165] 通过以下示例和附图来进一步描述本发明。

[0166] 图1显示了在含有50g/L、70g/L或90g/L葡萄糖作为碳源和80mM尿素作为氮源的培养基中培养168小时后,培养基中碳源浓度对里氏木霉赤藓糖醇生产的影响。

[0167] 图2显示了在包含70g/L葡萄糖作为碳源和20mM、60mM或80mM尿素作为氮源的培养基中培养168小时后,培养基中氮源浓度对里氏木霉赤藓糖醇生产的影响。

[0168] 图3说明了在包含10g/L、50g/L或100g/L葡萄糖作为碳源和20mM硫酸铵作为氮源的培养基中培养24、48、72、96和120小时后,初始碳源浓度对遗传修饰菌株QM6a Δ tmus53 fps1 (Reas11) err1 (Repyr4) Δ mpdh (“Mod. 菌株”)和相应亲本菌株QM6a Δ tmus53 (“PS”)生产赤藓糖醇的影响。

[0169] 图4显示了在含有50g/L葡萄糖作为碳源的培养基中培养96小时后,浓度为20mM或80mM的不同氮源对里氏木霉 (QM6a Δ tmus53) 赤藓糖醇产生的影响。

[0170] 图5显示了氮源对里氏木霉 (QM6a Δ tmus53) 在含有50g/L葡萄糖作为碳源和20mM或80mM相应氮源的培养基中培养96小时后生物量生成(干重)的影响。

[0171] 图6说明了在含有70g/L葡萄糖和60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM或120mM尿素的培养基或含有50g/L葡萄糖和80mM尿素(右栏)的培养基中培养168小时后,尿素浓度对里氏木霉 (QM6a Δ tmus53) 赤藓糖醇生产的影响。

实施例

[0172] 1. 赤藓糖醇的生物技术生产

[0173] 1.1 碳源浓度对赤藓糖醇生产的影响

[0174] 里氏木霉在250mL烧瓶中培养,每个烧瓶包含100mL培养基,该培养基含有50g/L、70g/L或90g/L葡萄糖作为碳源和80mM尿素作为氮源。

[0175] 培养168小时后,测量样品的培养基中的赤藓糖醇浓度。样品中赤藓糖醇的平均浓度为0.733g/L (50g/L葡萄糖)、0.978g/L (70g/L葡萄糖) 和0.952g/L (90g/L葡萄糖) (见图1)。

[0176] 1.2 氮源浓度对赤藓糖醇生产的影响

[0177] 在类似的实验中,里氏木霉在250mL烧瓶中培养,每个烧瓶包含100mL培养基,该培养基含有70g/L葡萄糖作为碳源和20mM、60mM或80mM尿素作为氮源。

[0178] 培养168小时后,测量样品的培养基中的赤藓糖醇浓度。样品中赤藓糖醇的平均浓度为0.051g/L (20mM尿素)、0.55g/L (60mM尿素) 和0.978g/L (80mM尿素) (见图2)。

[0179] 1.3 初始葡萄糖浓度对遗传修饰菌株和相应亲本生产赤藓糖醇的影响

[0180] 里氏木霉菌株QM6a Δ tmus53 fps1 (Reas11) err1 (Repyr4) Δ mpdh (“Mod. 菌株”)和相应亲本菌株QM6a Δ tmus53 (“PS”)在250mL烧瓶中培养,每个烧瓶包含100mL培养基,该培养基含有10g/L、50g/L或100g/L葡萄糖作为碳源和20mM硫酸铵作为氮源。

[0181] 培养24、48、72、96和120小时后,测量样品培养基中的赤藓糖醇浓度(见表1和图3)。在仅含10g/L葡萄糖的培养基中未检测到赤藓糖醇。

[0182] 表1: 赤藓糖醇浓度

	孵育时间	赤藓糖醇浓度[g/L]					
		Mod. 菌株 10 g/L	亲 本 菌 株 (PS) 10 g/L	Mod. 菌株 50 g/L	亲 本 菌 株 (PS) 50 g/L	Mod. 菌株 100 g/L	亲 本 菌 株 (PS) 100 g/L
[0183]	24 h	0	0	0	0	0	0
	48 h	0	0	0.0045	0.0025	0.0075	0.002
	72 h	0	0	0.014	0.011	0.016	0.01
	96 h	0	0	0.0255	0.0.023	0.018	0.012
[0184]	120 h	0	0	0.0305	0.026	0.0225	0.016

[0185] 1.4不同氮源对里氏木霉生产赤藓糖醇的影响

[0186] 为了研究不同氮源对里氏木霉赤藓糖醇生产的影响,在250mL烧瓶中培养菌株QM6a Δ tmus53,该烧瓶包含100mL培养基,该培养基以50g/L葡萄糖作为碳源,20mM或80mM硫酸铵、硝酸钠或尿素作为氮源。

[0187] 培养96小时后,测量样品的培养基中的赤藓糖醇浓度。样品中赤藓糖醇的平均浓度为0.018g/L (50g/L葡萄糖,20mM NH_4^+)、0.028g/L (50g/L葡萄糖,80mM NH_4^+)、0.03g/L (50mg/L葡萄糖,20m M尿素)、0.301g/L (50/L葡萄糖,80m M尿素)。在使用20或80mM NO_3^- 作为氮源的情况下,96小时后在培养基中未检测到赤藓糖醇(见图4)。

[0188] 1.5不同氮源对里氏木霉生长的影响

[0189] 里氏木霉(QM6a Δ tmus53)在250mL烧瓶中培养,每个烧瓶包含100mL培养基,该培养基含有50g/L葡萄糖作为碳源和20mM或80mM硫酸铵、硝酸钠或尿素作为氮源。

[0190] 培养96小时后,测量不同样品中里氏木霉的干重。平均重量为0.384g (50g/L葡萄糖,20mM NH_4^+)、0.417g/L (50g/L葡萄糖,80mM NH_3^+)、0.107g (50mg/L葡萄糖,20mmM NO_3^-)、0.117g (50g/L葡萄糖,80mmM NO_3^-)、0.557g (50mg/L葡萄糖,20mM尿素)和1.007g (50%葡萄糖,80mM尿素)(见图5)。

[0191] 1.6培养基中尿素浓度对赤藓糖醇产量的影响

[0192] 以里氏木霉(QM6a Δ tmus53)在培养过程中消耗的葡萄糖量为参考,研究了培养基中尿素浓度对赤藓糖醇产量的影响。为此,在250mL烧瓶中培养里氏木霉,所述烧瓶包含100mL以70g/L葡萄糖作为碳源,60mM、70mM、80mM、90mM、100mM、110mM或120mM尿素作为氮源的培养基。在含有50g/L葡萄糖作为碳源和80mM尿素作为氮源的100mL培养基存在下,还测量了用于里氏木霉培养的赤藓糖醇的产率。

[0193] 培养168小时后,在不同样品中测量培养基中的赤藓糖醇浓度和葡萄糖浓度的降低。赤藓糖醇的平均产量(以消耗的葡萄糖mg计)为3.03mg/g (70g/L葡萄糖,60mM尿素)、18.59mg/g (70mg/L葡萄糖,70mM尿素)、15.2mg/g (70g/L葡萄糖,80mM尿素)和14.3mg/g (70g/L葡萄糖,90mM脲)、9.92mg/g (70g/L葡萄糖,100mM尿素)、8.47mg/g (50g/L葡萄糖,110mM尿素)、5.23mg/g (70g/L葡萄糖,120mM尿素)和15.43mg/g (50g/L葡萄糖,80mM尿素)

(见图6)。

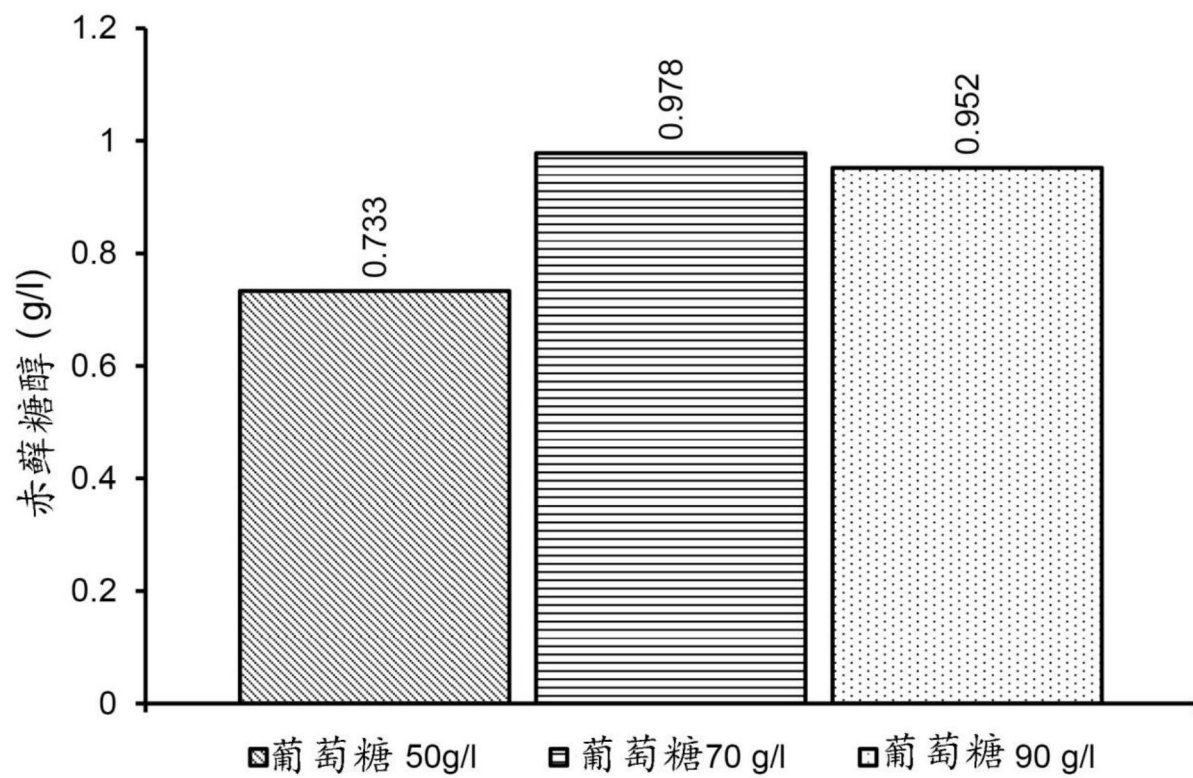


图1

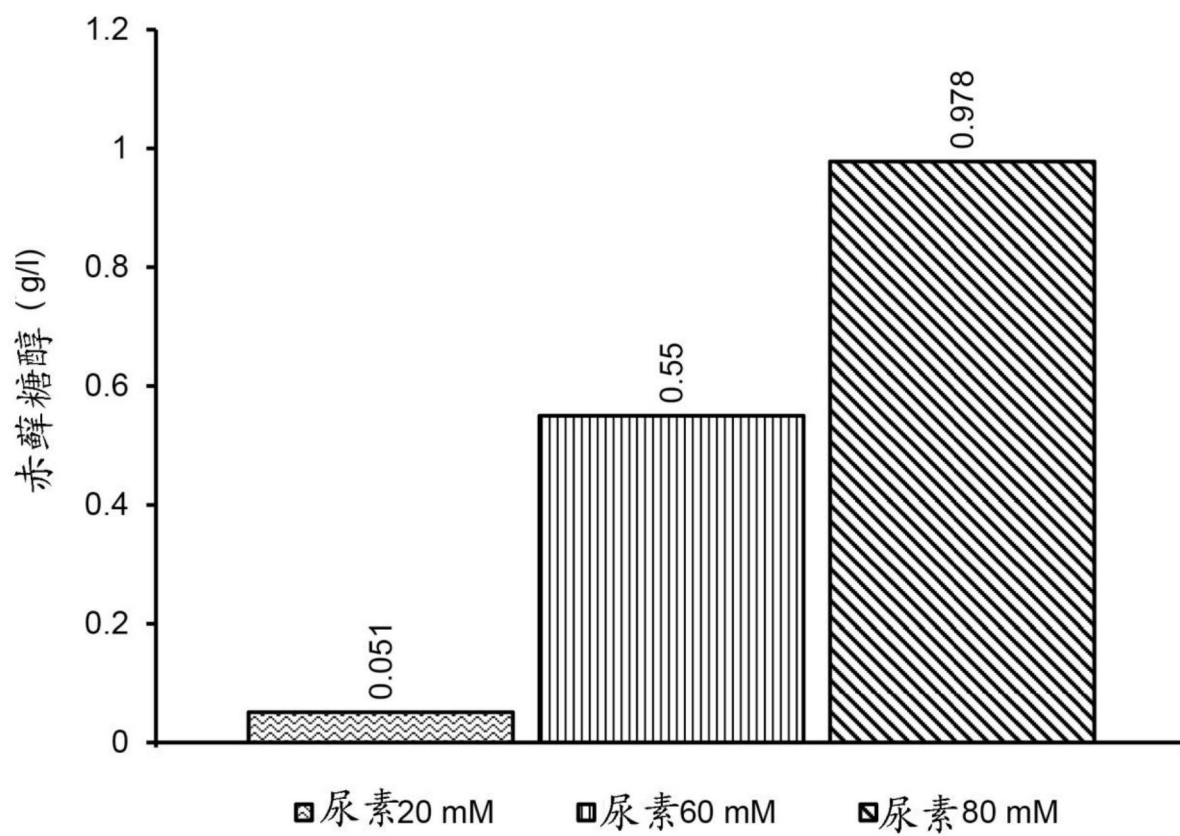


图2

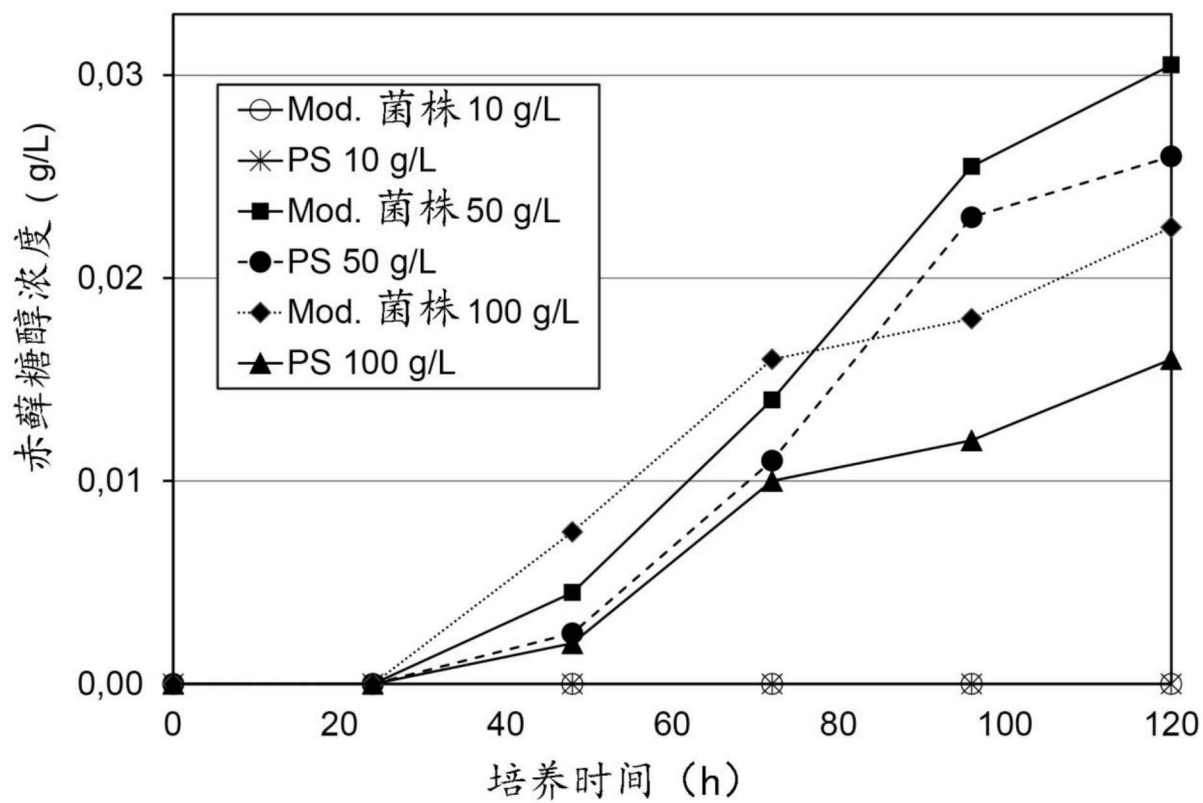


图3

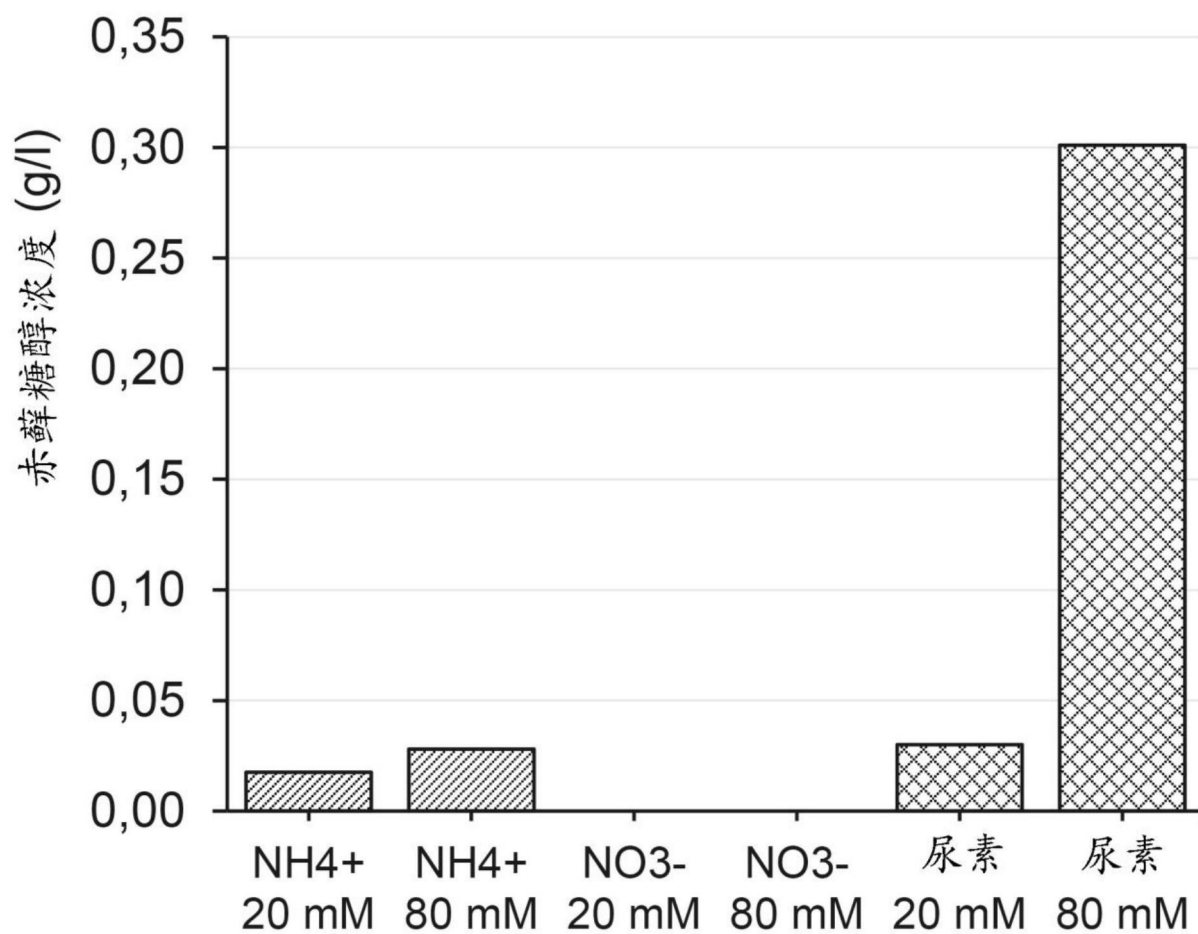


图4

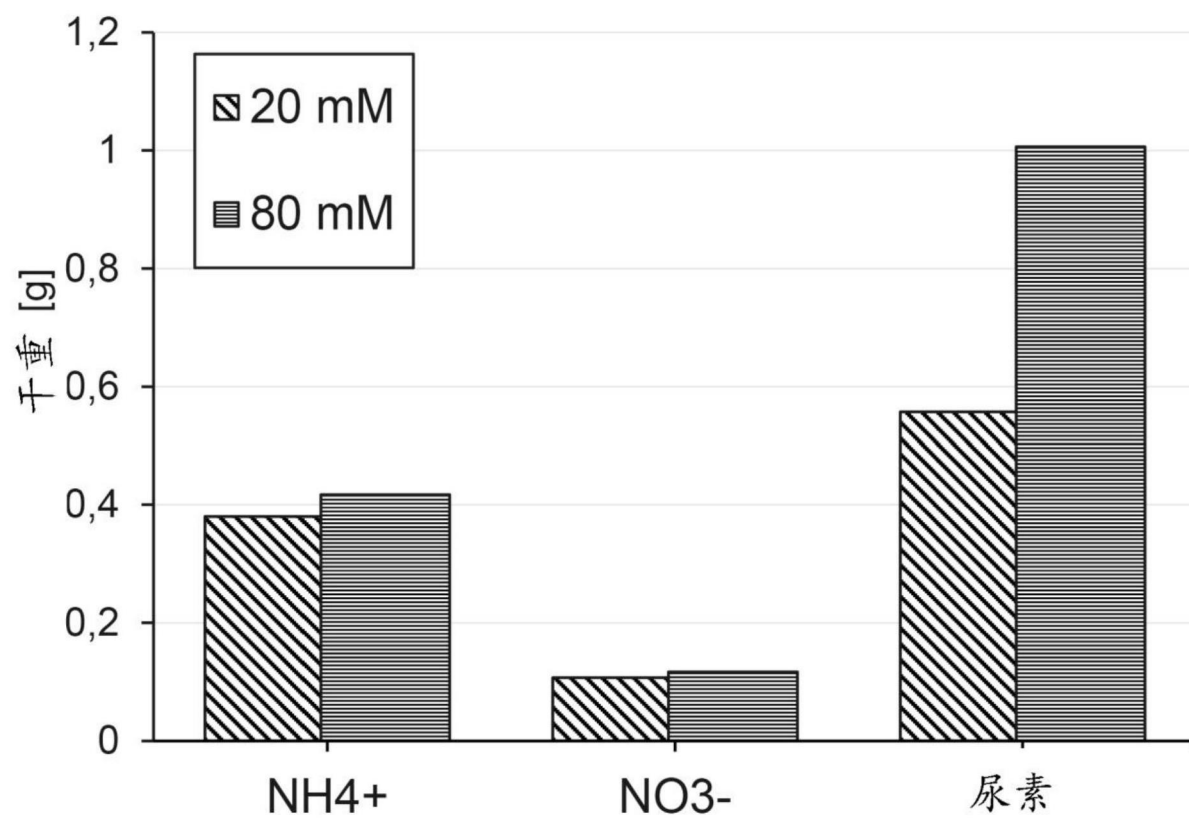


图5

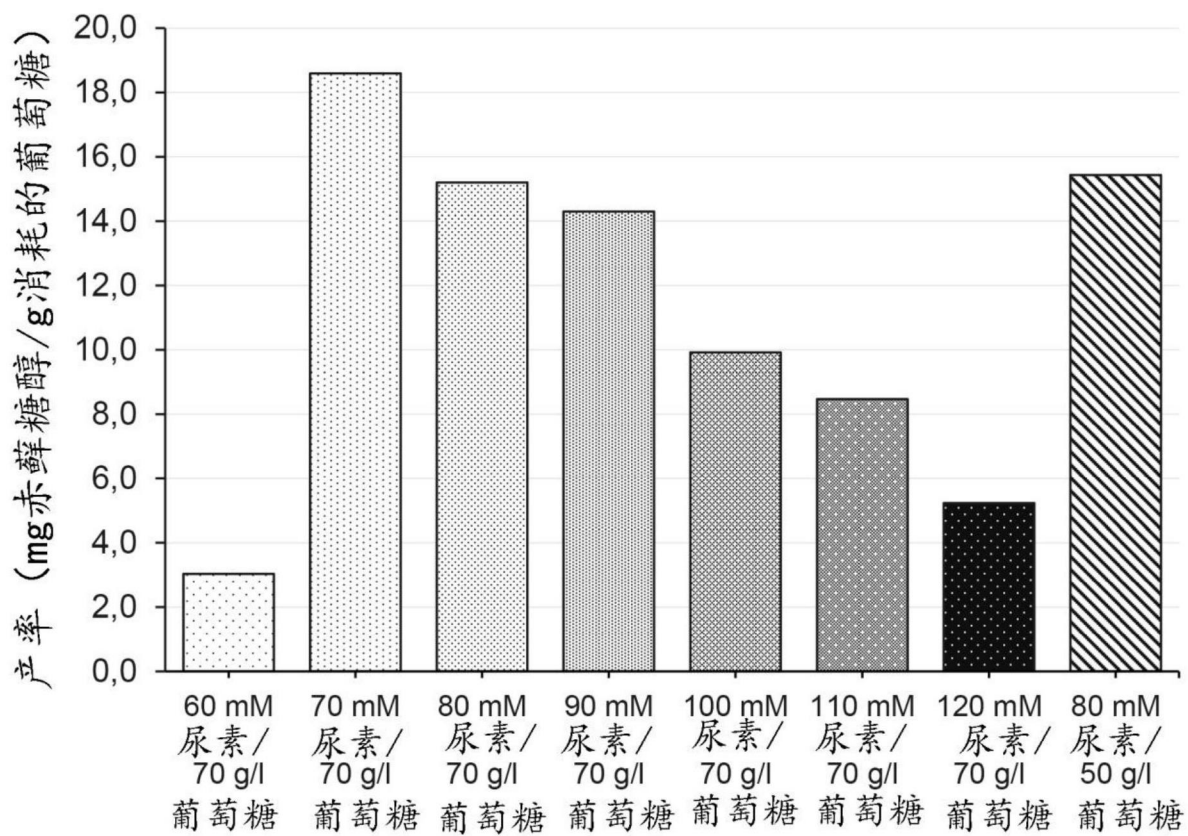


图6