(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2022 年 4 月 7 日 (07.04.2022)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2022/068026 A1

(51) 国际专利分类号:
*C12N 1/21* (2006.01) *C12P 7/18* (2006.01)
*C12N 1/20* (2006.01) *C12R 1/225* (2006.01)
*C12P 39/00* (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)
*C12P 7/42* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/131691

(22) 国际申请日: 2020 年 11 月 26 日 (26.11.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202011046932.1 2020年9月29日 (29.09.2020) CN

(71) 申请人: 江苏大学 (JIANGSU UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省镇江市京口区学府路301号, Jiangsu 212013 (CN)。

(72) 发明人: 齐向辉 (QI, Xianghui); 中国江苏省镇江市京口区学府路301号, Jiangsu 212013 (CN)。 张宇飞 (ZHANG, Yufei); 中国江苏省镇江市京口区学府路301号, Jiangsu 212013 (CN)。 员君华 (YUAN, Junhua); 中国江苏省镇江市京口区学府路301号, Jiangsu 212013 (CN)。 张国艳 (ZHANG, Guoyan); 中国江苏省镇江市京口区学府路301号, Jiangsu 212013 (CN)。 袁娇 (YUAN, Jiao); 中国江苏省镇江市京口区学府路301号, Jiangsu 212013 (CN)。

王洋 (WANG, Yang); 中国江苏省镇江市京口区学府路301号, Jiangsu 212013 (CN)。

(74) 代理人: 南京智造力知识产权代理有限公司 (NANJING IPZHI INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国江苏省南京市江宁区芝兰路18号4幢1202室, Jiangsu 211100 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(54) **Title:** MULTI-BACTERIAL HYBRID CONVERSION SYSTEM FOR EFFICIENT CO-PRODUCTION OF 3-HYDROXYPROPIONIC ACID AND 1,3-PROPANEDIOL AND METHOD FOR ESTABLISHING SAME

(54) 发明名称: 一种高效联产3-羟基丙酸和1,3-丙二醇的多菌混合转化体系及建立方法

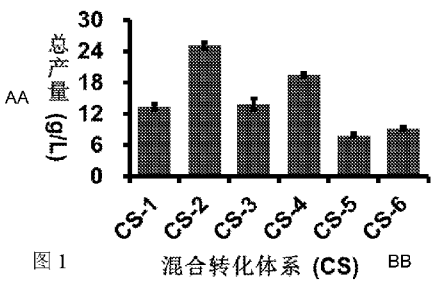



图 1

AA Total yield
BB Hybrid conversion system

(57) **Abstract:** Provided are a multi-bacterial hybrid conversion system for efficient co-production of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol and a method for establishing same, relating to the technical field of bioengineering; the multi-bacterial hybrid conversion system is used for metabolising glycerol, and the system is optimised so that, by means of introducing genetically engineered bacteria that efficiently metabolise 3-hydroxypropionaldehyde, the toxic intermediate metabolite 3-hydroxypropionaldehyde generated by Lactobacillus reuteri is rapidly metabolised, and the glycerol is converted to the maximum extent to the final products 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol.

(57) 摘要: 提供了一种高效联产3-羟基丙酸和1,3丙二醇的多菌混合转化体系及建立方法, 属于生物工程技术领域; 其中, 采用多菌混合转化体系来代谢甘油, 并对该体系进行优化, 通过引入高效代谢3-羟基丙醛的基因工程菌, 快速代谢罗伊氏乳杆菌生成的毒性中间代谢产物3-羟基丙醛, 从而最大限度地将甘油转化成最终产物3-羟基丙酸和1,3-丙二醇。

WO 2022/068026 A1

[见续页]

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

# 一种高效联产 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇的多菌混合转化体系及建立方法

## 技术领域

本发明属于生物工程技术领域，具体涉及一种高效联产 3-羟基丙酸和 1,3 丙二醇的多菌混合转化体系及建立方法。

## 背景技术

3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇是工业上两种重要的平台化合物，作为生物可降解性聚合物的前体物质和食品添加剂广泛使用。3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇的生产有化学合成法和生物法两种。化学法多以不可再生资源作为原料，其生产过程能耗大，产物副产物多难以分离纯化，生产过程产生不可估量的环境污染。生物法合成 3-羟基丙酸和/或 1,3-丙二醇多以葡萄糖和甘油作为底物，其中以甘油作为底物生产 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇步骤简单，研究充分，原料廉价，且能解决甘油过剩的问题。

目前，由于生物合成 3-羟基丙酸的过程需要消耗辅酶 $NAD^+$产生 NADH，1,3-丙二醇的生产恰恰相反，将 NADH 转变为 $NAD^+$，只能将 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇的生产分开进行，否则会造成微生物体内辅酶的不平衡，影响反应持续进行，导致最终产量低。

罗伊氏乳杆菌具有强大的甘油代谢潜力，但其代谢甘油生产 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇的过程中会产生具有细胞和酶毒性的 3-羟基丙醛，且 3-羟基丙醛的产生速率远大于 1,3-丙二醇。3-羟基丙醛的快速积累对细胞和酶系造成毒害，反应也随之停止。只有解除罗伊氏乳杆菌转化甘油过程中间代谢物 3-羟基丙醛抑制问题，才能提升 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇最终产量。因此，亟需设计出一种多菌混合转化体系来提升 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇的产量。

## 发明内容

针对现有技术中存在不足，本发明提供了一种高效联产 3-羟基丙酸和 1,3 丙二醇的多菌混合转化体系及建立方法。本发明中，采用多菌混合转化体系来代谢甘油，并对该体系进行优化，通过引入高效代谢 3-羟基丙醛的基因工程菌，快速代谢罗伊氏乳杆菌生成的毒性中间代谢产物 3-羟基丙醛。运用此策略成功解除毒性中间代谢产物 3-羟基丙醛的积累，使得反应持续进行，最大限度地将甘油转化成最终产物 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇。

本发明是通过以下技术手段实现上述技术目的的。

本发明首先提供了一种高效联产 3-羟基丙酸和 1,3 丙二醇的多菌混合转化体系，该体系中包括罗伊氏乳杆菌和基因工程大肠杆菌；以质量分数计，所述体系中，罗伊氏乳杆菌 25%-75%，基因工程大肠杆菌 25%-75%。

进一步的，所述基因工程大肠杆菌为琥珀酸半醛脱氢酶工程大肠杆菌 E. coli BL21/pANY-GabD4（简称 E.coli GabD4）、1,3-丙二醇氧化还原酶工程大肠杆菌 E. coli BL21/pANY-PduQ（简称 E. coli PduQ）以及联合表达琥珀酸半醛脱氢酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶的工程大肠杆菌 E. coli BL21/pANY-GabD4-PduQ（简称 E. coli GabD4-PduQ）中的一种或多种。

进一步的，所述体系中菌体总浓度为 10-30 g/L 细胞干重。

进一步的，以质量分数计，所述体系为 50%罗伊氏乳杆菌和 50%联合表达琥珀酸半醛脱氢酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶的工程大肠杆菌，其中菌体总浓度为 20 g/L 细胞干重。

本发明还提供了上述高效联产 3-羟基丙酸和 1,3 丙二醇的多菌混合转化体系的构建方法，具体包括如下步骤：

（1）静息细胞的制备：

将罗伊氏乳杆菌 FXZ014（Lactobacillus reuteri FXZ014）在含 40 mM 甘油的 MRS 培养基中生长 12 h，然后在 8000 rpm、4 ℃、5 min 离心收集菌体，经 0.1 M 磷酸钾缓冲液（pH 7.0）洗涤 2 次后，得到罗伊氏乳杆菌静息细胞，备用；

将基因工程大肠杆菌分别在 37 ℃、220 rpm 摇床培养至 OD600 为 0.4-0.6 之间时加入终浓度为 0.5 mM 的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷（IPTG），25℃、120rpm 过夜诱导目标蛋白表达，然后经 8000 rpm、4 ℃、5 min 离心分别收集菌体，经 0.1 M 磷酸钾缓冲液（pH 7.0）洗涤 2 次后，得到基因工程大肠杆菌静息细胞；备用。

其中，罗伊氏乳杆菌 FXZ014 参照文献 ZABED H M, ZHANG Y, GUO Q, et al. Co-biosynthesis of 3-hydroxypropionic acid and 1,3-propanediol by a newly isolated Lactobacillus reuteri strain during whole cell biotransformation of glycerol [J]. Journal of Cleaner Production, 2019, 226(432-42. 中所述方法进行筛选。

（2）高效联产 3-羟基丙酸和 1,3 丙二醇的多菌混合转化体系的建立：

将上述制备的罗伊氏乳杆菌静息细胞分别与基因工程大肠杆菌混合，即得多菌混合转化体系。

在体系中，以质量分数计，罗伊氏乳杆菌 25%-75%，基因工程大肠杆菌 25%-75%。

本发明还提供了上述多菌混合转化体系的应用，所述应用为代谢甘油高效联产 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇。

**与现有技术相比，本发明的有益效果在于：**

本发明采用多菌混合转化策略，解决了罗伊氏乳杆菌单菌转化过程中毒性中间代谢物 3-羟基丙醛抑制问题。通过整合能高效转化 3-羟基丙醛为 3-羟基丙酸或\和 1,3-丙二醇的基因工

程菌，建立 6 个双菌和三菌混合转化体系，缓解了中间代谢物抑制问题。

本发明对最优混合转化体系中联合表达琥珀酸半醛脱氢酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶的基因工程大肠杆菌进行 UTR 工程修饰，使得其中琥珀酸半醛脱氢酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶高效平衡表达，解决了 3-羟基丙醛转化为 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇过程中的辅酶 $NAD^+$和 NADH 供应问题，使得基因工程大肠杆菌自身能够实现辅酶 $NAD^+$和 NADH 的循环再生。

本发明还开发出适配上述最优转化体系的两步法以及分批补料生物转化技术，进一步解决了目前技术存在的中间产物抑制和辅酶 $NAD^+$和 NADH 供应问题，使得反应持续高效进行，最终 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇的总产量达到 214.39 g/L，为迄今为止最高水平，具有广阔的应用前景与实际意义。

## 附图说明

图 1 为本发明所述不同混合转化体系（CS）生产能力对比结果。

图 2 为双菌混合转化体系 CS-2 的转化条件优化结果。

图 3 为不同 UTR 修饰的双菌混合转化体系 CS-2 的比较结果。

图 4 为最优双菌混合转化体系 CS-2-V3 在不同甘油负载下的生产能力。

图 5 为使用一步法以及两步法转化技术在不同甘油浓度下的产量。

图 6 为采用两种分批补料生物转化技术进行生产的结果。

图 7 为单菌、双菌以及三菌转化体系的生产能力对比。

## 具体实施方式

下面结合附图以及具体实施例对本发明作进一步的说明，但本发明的保护范围并不限于此。

**实施例 1：基因工程大肠杆菌的构建：**

（1）琥珀酸半醛脱氢酶工程大肠杆菌 E. coli BL21/pANY-GabD4（简称 E.coli GabD4）：

根据钩虫贪铜菌编码琥珀酸半醛脱氢酶的基因 *GabD4* 序列和载体 pANY1 上基因元件特征，利用 Oligo7.0 软件设计引物：PANY-F: 5’-atgtatatctccttcttaaagt-3’、PANY-R: 5’-cctccatgggagctcctg-3’、GabD4-F1：5’-taactttaagaaggagatatacatatgtaccaagatctggcactgt-3’和 GabD4-R1：5’-tgcaggagctcccatggaggttacgcttgggtgatgaact-3’。

使用 PANY-F 和 PANY-R 引物对扩增 pANY1 载体骨架（不包含 6×His tag 和 ccdB 表达盒），PCR 反应参数：预变性，98 ℃1min；变性，98 ℃10s；退火，55 ℃10s；延伸，72 ℃30s；终止延伸，72 ℃5min；32 个循环后得到 pANY1 载体骨架。

使用 GabD4-F1 和 GabD4-R1 引物对扩增含有同源臂的 *GabD4* 基因片段，PCR 反应参数：预变性，98 ℃1min；变性，98 ℃10s；退火，55 ℃10s；延伸，72 ℃30s；终止延伸，

72 ℃5min；32 个循环后得到 GabD4 基因。

将上述两个基因片段按无缝克隆试剂盒说明方法进行重组连接，将 pANY1 载体骨架与 GabD4 基因按 1:3（mol/mol）混合，加入一倍体积的 2×MultiF Seamless Assembly Mix，50 ℃连接 30 min；通过热激转化法将重组载体转化 *E.coli* BL21 感受态细胞中，将连接产物加入感受态细胞并混匀，冰上放置 30 min，42 ℃热激 60 s，冰上冷却 2 min 后加入 900 μL LB 培养基，37 ℃孵育 1 h 后涂布含 50 μg/mL 的卡那霉素平板；使用质粒小提试剂盒提取质粒验证其大小是否正确；最终将质粒送苏州金唯智生物公司进行基因测序；结果成功筛选获得重组工程菌株，命名为 *E.coli* BL21/ pANY-GabD4，简称 E .coli GabD4。

（2）1,3-丙二醇氧化还原酶工程大肠杆菌 E. coli BL21/pANY-PduQ（简称 E. coli PduQ）：

利用罗伊氏乳杆菌编码 1,3-丙二醇氧化还原酶的基因 PduQ 序列和载体 pANY1 构建 1,3-丙二醇氧化还原酶工程大肠杆菌 E. coli BL21/pANY-PduQ，其方法与步骤（1）基本相同，仅有如下区别：

引物： PduQ-F1：5’- taactttaagaaggagatatacatatggaaaaatttagtatgccaac-3’和 PduQ-R1：5’- tgcaggagctcccatggaggttaacgaattattgcttcgtaaat-3’。

（3）联合表达琥珀酸半醛脱氢酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶的工程大肠杆菌 E. coli BL21/pANY-GabD4-PduQ（简称 E. coli GabD4-PduQ）：

利用步骤（1）和（2）中得到的载体 pANY-GabD4 和 pANY-PduQ 设计引物：GabD4-F2：5’- cctccatgggagctcctg-3’、GabD4-R2：5’- ttacgcttgggtgatgaactt-3’、 PduQ-F2：5’- agttcatcacccaagcgtaatggccttttgctgg-3’和 PduQ-R2：5’- tgcaggagctcccatggaggttaacgaattattgcttc-3’。

其他步骤与步骤（1）中基本相同，得到联合表达琥珀酸半醛脱氢酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶的工程大肠杆菌 E. coli BL21/pANY-GabD4-PduQ。

**实施例 2：**

（1）静息细胞的制备：

将罗伊氏乳杆菌 FXZ014 在 MRS 培养基（10 g/L 胰蛋白胨、10 g/L 牛肉浸膏、5 g/L 酵母粉、2 g/L 磷酸氢二钾、5 g/L 乙酸钠、2 g/L 柠檬酸氢二铵、0.1 g/L 硫酸镁、0.15 g/L 硫酸锰、1 g/L 吐温 80 和 20 g/L 葡萄糖）中 37 ℃静置过夜活化，接着在含 40 mM 甘油的 MRS 培养基中 37 ℃厌氧条件下扩大培养 12 h；然后经 8000 rpm、4 ℃冷冻离心菌液 5 min，收集细胞，弃上清；最后用 0.1 M 磷酸钾缓冲液（pH 7.0）洗涤，离心，得到罗伊氏乳杆菌 FXZ014 静息细胞，备用。

将 E.coli GabD4、E.coli PduQ 以及 E. coli GabD4-PduQ 三种菌株分别经过夜活化于 LB 培养基（10 g/L 胰蛋白胨、10 g/L 氯化钠和 5 g/L 酵母粉）中，然后以 1%（v/v）接种量在 37 ℃、

220 rpm 条件下扩大体积培养，当 OD600 为 0.4-0.6 时 IPTG，使得 IPTG 的终浓度为 0.5 mM，接着 25℃、150 rpm 下过夜诱导蛋白表达；然后经 8000 rpm、4 ℃冷冻离心菌液 5 min，收集细胞，弃上清；最后用 0.1 M 磷酸钾缓冲液（pH 7.0）洗涤，离心，分别得到 E.coli GabD4 静息细胞、E.coli PduQ 静息细胞以及 E. coli GabD4-PduQ 静息细胞，备用。

（2）静息细胞干重的测量与换算：

将过夜活化的菌种，分别以 1%接种量接种于 5 瓶含 50 mL 对于培养基的锥形瓶中，在适宜条件下进行培养；每隔 3 小时测量其中一瓶培养物的 OD600，记录后，离心收集菌体，并使用 0.1 M 磷酸钾缓冲液（pH 7.0）洗涤细胞两次，弃上清后于烘箱烘干水分，至细胞重量不变为止；最终得到 5 个不同 OD600 值以及对应的细胞干重（CDW），通过线性拟合工具，得到 OD600 与 CDW 的近似关系：1 OD600≈0.34 g/L CDW。

**实施例 3：多菌混合转化体系的建立及筛选**

本实施例中考察了添加了不同菌后的多菌混合转化体系代谢甘油联产 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇的产量，以此来筛选出最优的多菌混合转化体系。将不同种类和含量的菌混合，获得多菌混合转化体系，试验组 1~6 中分别添加了不同种类、含量的菌，具体配方如表 1 所示。

表 1. 多菌混合转化体系的配方

| 编号 | 配方 |
|---|---|
| 1 | 50%罗伊氏乳杆菌 FXZ014 + 25% E.coli GabD4 + 25%E.coli PduQ |
| 2 | 50% 罗伊氏乳杆菌 FXZ014 + 50% E. coli GabD4-PduQ |
| 3 | 75% 罗伊氏乳杆菌 FXZ014 + 12.5% E. coli GabD4 + 12.5%E. coli PduQ |
| 4 | 75%罗伊氏乳杆菌 FXZ014+ 25% E. coli GabD4-PduQ |
| 5 | 25%罗伊氏乳杆菌 FXZ014 + 37.5% E. coli GabD4 + 37.5%E. coli PduQ |
| 6 | 25%罗伊氏乳杆菌 FXZ014 + 75% E. coli GabD4-PduQ |

将试验组 1~6 中不同配方的多菌混合转化体系（细胞干重为 15 g/L）分别转化 30 g/L 的甘油溶液，4 h 后分别取样采用高效液相色谱法测定其中 3-HP 和 1,3-PD 浓度，其测定条件为：Aminex HPX-87H (300 × 7.8 mm) 色谱柱，示差折光检测器，流速 0.6 mL/min，柱温 65 ℃。图 1 为测定结果，从图 1 中可以看出双菌混合转化体系（CS-2、CS-4、CS-6）中 3-HP 和 1,3-PD 总产量显著高于相同条件下的三菌混合转化体系（CS-1、CS-3、CS-5），其中以混合转化系 CS-2 的 3-HP 和 1,3-PD 产量最高，分别达到 14.73 g/L 和 10.38 g/L。

**实施例 4：双菌混合转化体系 CS-2 的条件优化**

本实施例中分别考察了不同细胞干重（20、25 和 30 g/L）、底物浓度（40、50 和 60 g/L）以及转化时间（3、4 和 5 h）对混合转化体系 CS-2 的影响，进一步优化实施例 3 中所得的混

合转化体系 CS-2。

图 2 为试验结果，结果表明，在 4 h 之前，所有条件下 3-HP 和 1,3-PD 产量都明显提升，4 h 之后几乎不再变化；当细胞干重为 20 g/L 和甘油浓度为 60 g/L 时，混合转化体系产量达到最大值 45.15 g/L，其中 3-HP 和 1,3-PD 浓度分别为 26.33 和 18.82 g/L。

**实施例 5：UTR 工程优化双菌混合转化体系**

（1）UTR 修饰的双菌混合体系建立与筛选：

本实施例中分别采用 5 种具有不同 GabD4 表达量的 UTR 工程菌代替 E. coli GabD4-PduQ 来进一步优化实施例 3 中筛选得到的双菌混合转化体系 CS-2，5 种 UTR 工程菌分别为 E. coli V1、E. coli V2、E. coli V3、E. coli V4 和 E. coli V5，通过 UTR 工程和基因工程手段得到，其 GabD4 表达量由弱到强。

静息细胞制备参照实施例 2，将 L .reuteri FXZ014 静息细胞分别和 E. coli V1、E. coli V2、E. coli V3、E. coli V4 以及 E. coli V5 静息细胞按 1:1 的比例混合，进而得到如下体系 CS-2-V1、CS-2-V2、CS-2-V3、CS-2-V4 和 CS-2-V5。试验按实施例 4 中的最优条件进行：细胞干重为 20 g/L，甘油浓度 60 g/L，pH 8.5，转化时间 4 h。

试验结果如图 3 所示，相较双菌体系 CS-2，所有经 UTR 修饰的双菌体系均表现出更高的产量（图 3a），其中由 E. coli V3 组成的双菌体系 CS-2-V3 表现最佳，其几乎消耗完 60 g/L 甘油（图 3c），且产生的中间代谢物 3-HPA 也最少（图 3b），终产物 3-HP 和 1,3-PD 产量高达 32.37 和 22.64 g/L。

（2）高底物负载下的产量对比：

本步骤中考察了步骤（1）中的得到的最优双菌体系 CS-2-V3 在更高甘油负载时的表现，比较了在高甘油负载时一步法和两步法转化甘油联产 3-羟基丙酸和 1，3-丙二醇的能力。一般来说，高的底物浓度是高产的先决条件，且上述最优双菌体系 CS-2-V3 几乎可以完全消耗 60 g/L 甘油，因此对于双菌体系 CS-2-V3 进行高浓度底物转化试验，使用更高浓度甘油（70、85、100 和 120 g/L）在 pH 8.5，细胞干重 20 g/L，30 ℃条件下进行转化试验。

试验结果如图 4，更高的甘油负载下 3-HP 和 1,3-丙二醇产量更高（图 4a），但随之也导致更多的甘油残余（图 4c）；在高浓度甘油负载下中间代谢物 3-HPA 积累较多，但差异不显著（图 4b）；有趣的是，通过对 pH 的测定，发现随着反应的进行，pH 逐渐降低，单 pH 降低至 6 时，反应几乎停止（图 4d）。

**实施例 6：一步法和两步法生物转化**

一步法：将双菌混合体系 CS-2-V3 运用于高的底物甘油浓度（120、140 和 160 g/L），细胞干重 20 g/L，pH 8.5，30 ℃，180 rpm 下转化 4 h 后测定各组分浓度。

两步法：收集一步法转化反应液，调节 pH 至 8.5，再次添加 20 g/L 新鲜静息细胞（50% L. reuteri FXZ014 + 50% E. coli V3）,再次反应 4 h 后测定各组分浓度。

试验结果如图 5 所示，双菌混合体系 CS-2-V3 一步法转化不能完全利用 120 g/L 以及更高浓度的甘油，且随着底物浓度增大，底物抑制效应和中间代谢物抑制效应越大；在一步法基础上进行的二步法转化可以完全利用 120 g/L 的甘油，最终产生 69.36 和 47.58 g/L 的 3-HP 和 1,3-PD，未检测到中间产物 3-HPA。使用两步法转化 140 g/L 甘油时，虽然产量较 120 g/L 甘油有所提升，但仍然有 12.56 g/L 甘油未能转化。使用更高浓度的甘油 160 g/L 时，由于底物和中间产物抑制作用，产量甚至低于使用 140 g/L 底物的产量。

**实施例 7：连续分批补料生物转化**

本实施例为了完全解除底物和中间产物抑制作用，针对双菌混合体系 CS-2-V3 开发了 2 种分批补料生物转化技术，极大提升了其联产 3-HP 和 1,3-PD 的能力。

（1）连续补加甘油

初始条件为细胞干重 20 g/L，甘油 20 g/L，pH 8.5, 30 ℃180 rpm。转化 2 h 后，收集样品分析其组分，补加 20 g/L 的甘油，然后调节 pH 至 8.5；每 2 小时重复以上步骤，直至最终产量不再变化为止。试验结果如图 6a 所示，采用分批补加低浓度底物的策略，反应持续进行直至 18 h 停止，共生成 3-HP 94.56 g/L 和 1,3-PD 64.13 g/L。

（2）连续补加甘油和静息细胞

初始条件为细胞干重 10 g/L，甘油 20 g/L，pH 8.5, 30 ℃180 rpm。转化 2 h 后，收集样品分析其组分，补加 20 g/L 的甘油以及细胞干重为 3 g/L 的静息细胞，然后调节 pH 至 8.5；每 2 小时重复以上步骤，直至最终产量不再变化为止。

试验结果如图 6b 所示，在初始低浓度静息细胞和低浓度底物情况下，几乎解除了中间代谢物和低温抑制现象，新鲜添加的静息细胞也使得反应持续时间更长，最终经 24 h 反应，消耗 240 g/L 甘油，产生 3-HP 和 1,3-PD 共计 214.39 g/L，其中 3-HP 产量 125.93 g/L，1,3-PD 产量 88.46 g/L。生产 3-HP 和 1,3-PD 强度高达 8.93 g/L/h，为迄今为止最高水平。

**对比例 1：单菌、双菌和三菌混合转化甘油产量对比**

本实施例中分别考察单菌、双菌、三菌转化甘油产量的差异，分别设定了单一 L. reuteri FXZ014 20 g/L，双菌 L. reuteri FXZ014 10 g/L 和 E. coli BL21/pANY-GabD4-PduQ 10 g/L 以及三菌 L. reuteri FXZ014 10 g/L、E. coli BL21/pANY-GabD4 5 g/L 和 E. coli BL21/pANY-PduQ 5 g/L 转化体系。分别与 40 g/L 底物甘油在 30 ℃、180 rpm 下反应 6 h，随后测定 3-羟基丙酸、1,3-丙二醇以及甘油残余浓度。

如图 7 所示，使用单菌进行转化积累了大量中间代谢物 3-HPA，仅产生了 8.9 g/L 的 3-

羟基丙酸和 6.2 g/L 的 1,3-丙二醇,；相对单菌转化，采用多菌混合转化策略，显著缓解了中间产物的抑制作用，提高了 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇产量。其中，双菌转化的策略效果最佳，产，产生 3-羟基丙酸 15.3 g/L 和 1,3-丙二醇 11.9 g/L。

**对比例 2：一步法、两步法以及连续分批补料生物转化的产量对比**

本实施例中分别考察了双菌体系 CS-2-V3 运用不同转化技术联产 3-HP 和 1,3-PD 的差异，一步法、两步法分别按前文实施例中的方式进行，分别增加底物甘油浓度，直至产量不再增加为止，结果如图 8 所示，普通一步法转化，总产量最低，仅有 85.2 g/L；而本发明开发的两步法，使得总产量提升了 36%；此外，本发明开发的两种分批补料生物转化技术更是具有无与伦比的优势，总产量近乎是普通一步法的两倍多，达到 214.39 g/L，这也是迄今为止的最优水平。

所述实施例为本发明的优选的实施方式，但本发明并不限于上述实施方式，在不背离本发明的实质内容的情况下，本领域技术人员能够做出的任何显而易见的改进、替换或变型均属于本发明的保护范围。

# 权 利 要 求 书

1. 一种多菌混合转化体系，其特征在于，该体系中包括罗伊氏乳杆菌和基因工程大肠杆菌；以质量分数计，所述体系中，罗伊氏乳杆菌 25%-75%，基因工程大肠杆菌 25%-75%。

2. 根据权利要求 1 所述的多菌混合转化体系，其特征在于，所述基因工程大肠杆菌为琥珀酸半醛脱氢酶工程大肠杆菌 E.coli GabD4、1,3-丙二醇氧化还原酶工程大肠杆菌 E. coli PduQ、联合表达琥珀酸半醛脱氢酶和 1,3-丙二醇氧化还原酶的工程大肠杆菌 E. coli GabD4-PduQ 中的一种或多种。

3. 根据权利要求 1 所述的多菌混合转化体系，其特征在于，所述体系中菌体总浓度为 10-30 g/L 细胞干重。

4. 根据权利要求 1 所述的多菌混合转化体系，其特征在于，以质量分数计，所述体系包括 50%罗伊氏乳杆菌和 50%基因工程大肠杆菌。

5. 根据权利要求 1~4 所述的多菌混合转化体系，其特征在于，体系中，所述基因工程大肠杆菌为 E. coli GabD4-PduQ；体系中，包括 50%罗伊氏乳杆菌和 50% E. coli GabD4-PduQ，菌体的总浓度为 20 g/L 细胞干重。

6. 权利要求 1 所述的多菌混合转化体系的构建方法，其特征在于，包括：

分别制备罗伊氏乳杆菌 FXZ014、基因工程大肠杆菌的静息细胞，按比例混合得到多菌混合转化体系。

7. 根据权利要求 6 所述的多菌混合转化体系的构建方法，其特征在于，体系中，以质量分数计，罗伊氏乳杆菌 FXZ014 占比 25%-75%，基因工程大肠杆菌占比 25%-75%。

8. 权利要求 1 所述的多菌混合转化体系在联产 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇中的应用。

9. 根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于，所述基因工程菌通过代谢甘油联产 3-羟基丙酸和 1,3-丙二醇。

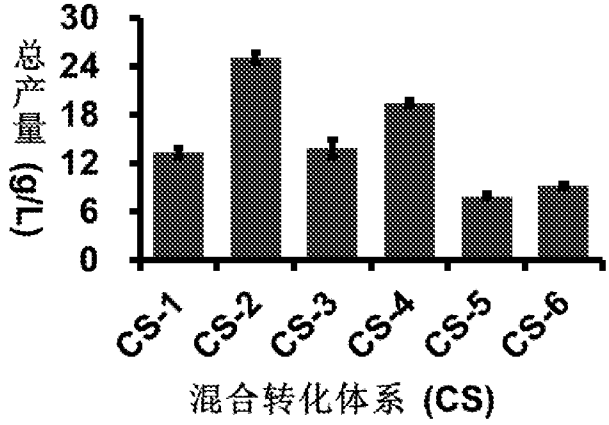

总产量 (g/L)
30
24
18
12
6
0
CS-1
CS-2
CS-3
CS-4
CS-5
CS-6
混合转化体系 (CS)

图 1

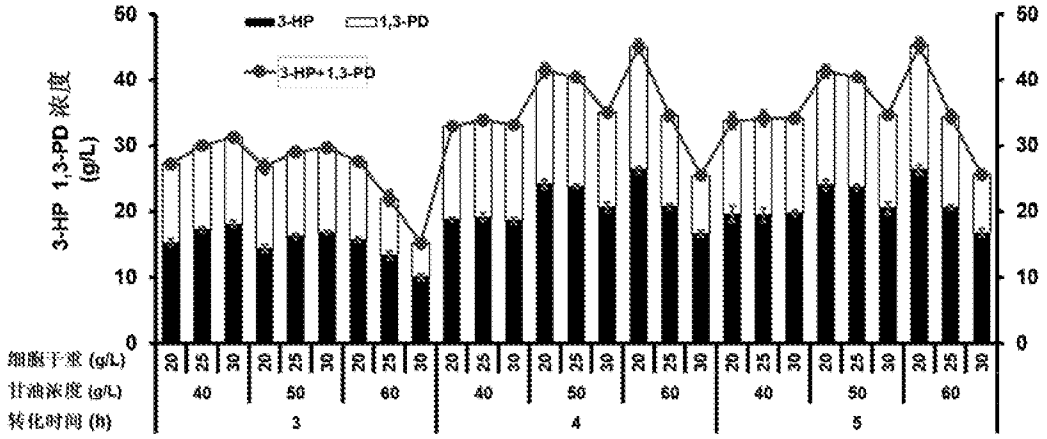

3-HP
1,3-PD
3-HP+1,3-PD
3-HP 1,3-PD 浓度 (g/L)
细胞干重 (g/L)
甘油浓度 (g/L)
转化时间 (h)

图 2

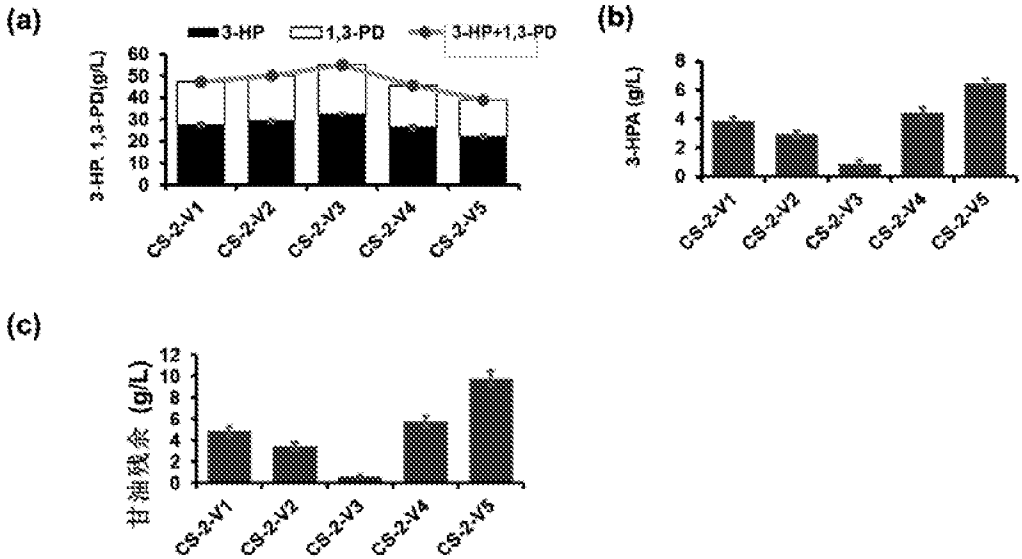

(a)
3-HP
1,3-PD
3-HP+1,3-PD
3-HP, 1,3-PD(g/L)
CS-2-V1
CS-2-V2
CS-2-V3
CS-2-V4
CS-2-V5
(b)
3-HPA (g/L)
(c)
甘油残余 (g/L)

图 3

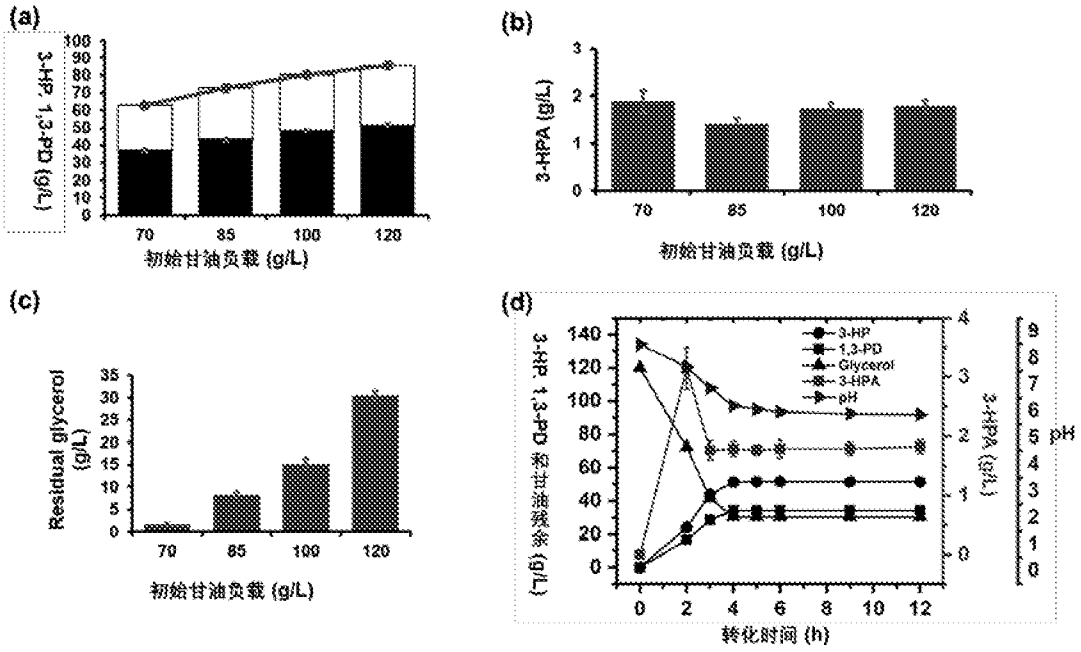

(a)
3-HP, 1,3-PD (g/L)
初始甘油负载 (g/L)
(b)
3-HPA (g/L)
初始甘油负载 (g/L)
(c)
Residual glycerol (g/L)
初始甘油负载 (g/L)
(d)
3-HP
1,3-PD
Glycerol
3-HPA
pH
转化时间 (h)

图 4

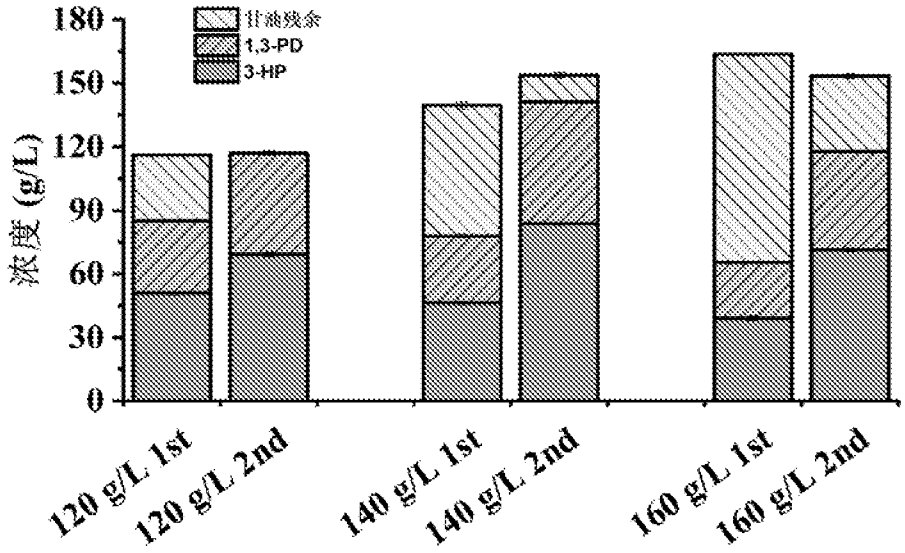

甘油残余
1,3-PD
3-HP
浓度 (g/L)
120 g/L 1st
120 g/L 2nd
140 g/L 1st
140 g/L 2nd
160 g/L 1st
160 g/L 2nd

图 5

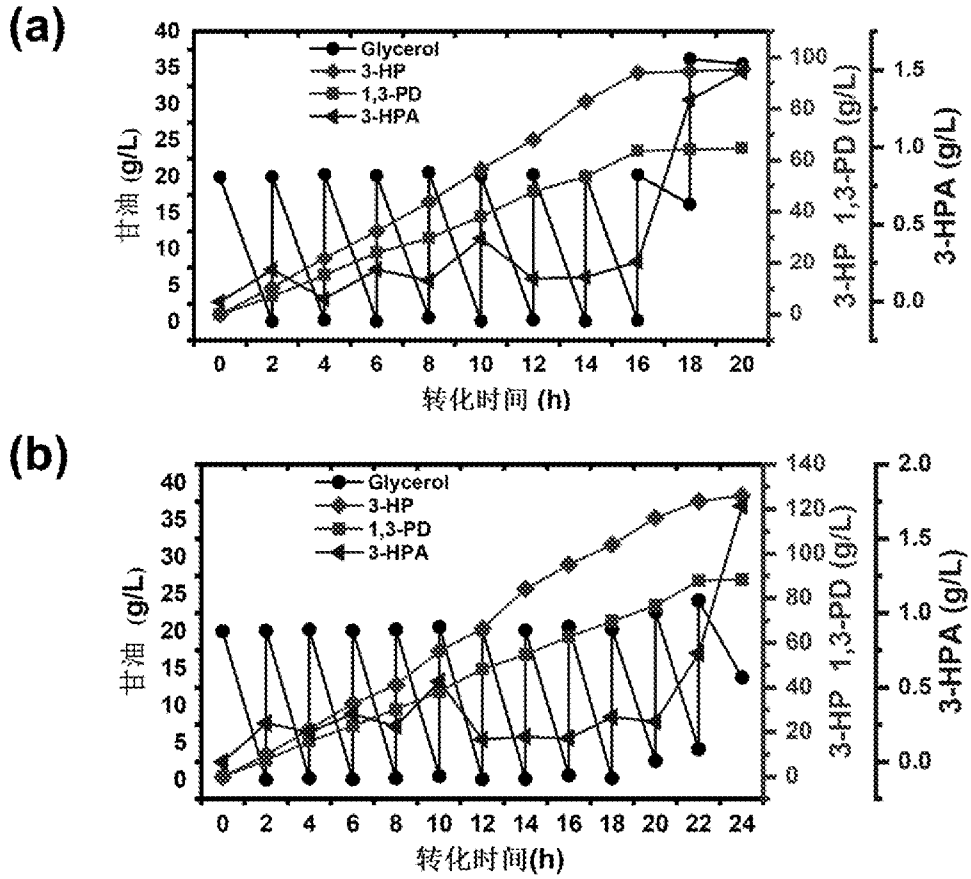

(a)
Glycerol
3-HP
1,3-PD
3-HPA
甘油 (g/L)
3-HP 1,3-PD (g/L)
3-HPA (g/L)
转化时间 (h)
(b)
Glycerol
3-HP
1,3-PD
3-HPA
甘油 (g/L)
3-HP 1,3-PD (g/L)
3-HPA (g/L)
转化时间(h)

图 6

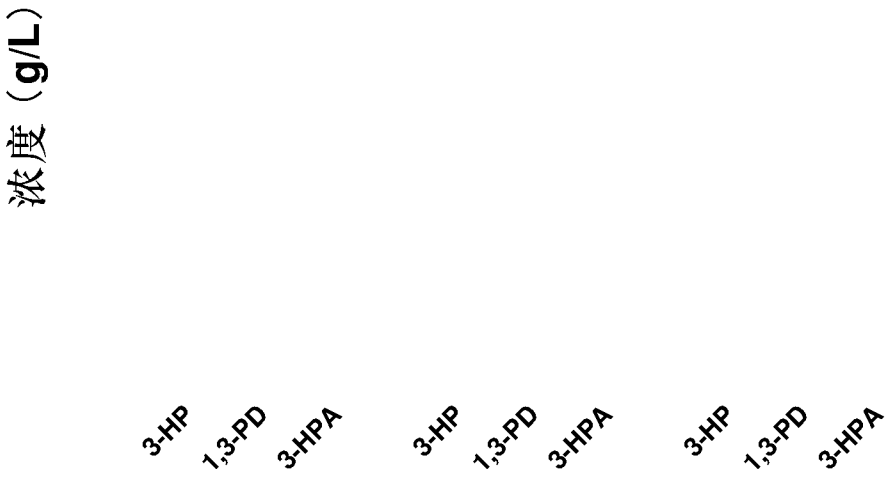

浓度（g/L）
3-HP
1,3-PD
3-HPA
3-HP
1,3-PD
3-HPA
3-HP
1,3-PD
3-HPA

图 7

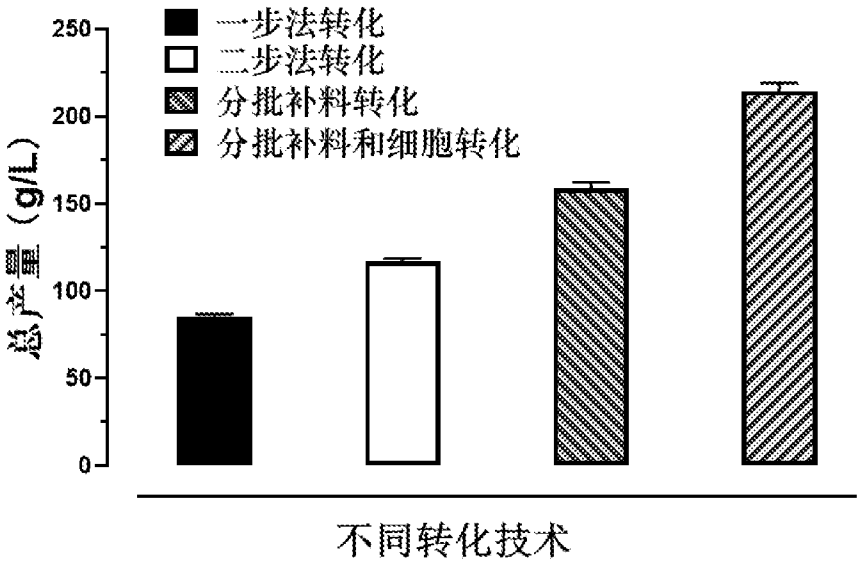

一步法转化
二步法转化
分批补料转化
分批补料和细胞转化
总产量（g/L）
250
200
150
100
50
0
不同转化技术

图 8

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
**PCT/CN2020/131691**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; C12P 39/00(2006.01)i; C12P 7/42(2006.01)i; C12P 7/18(2006.01)i; C12R 1/225(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N C12P C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT WPI EPODOC CNKI 万方: 3-羟基丙酸, 1, 3-丙二醇, 罗伊氏乳杆菌, 基因工程大肠杆菌, hydroxypropionic acid, propanediol, Lactobacillus reuteri, engineered Escherichia coli

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|---|---|---|
| A | US 2007148749 A1 (YASUDA SHINZO et al.) 28 June 2007 (2007-06-28)<br>claims 1-10 | 1-9 |
| A | CN 108060203 A (JIANGSU UNIVERSITY) 22 May 2018 (2018-05-22)<br>claims 1-10 | 1-9 |
| A | CN 103789248 A (JIANGSU UNIVERSITY) 14 May 2014 (2014-05-14)<br>claims 1-9 | 1-9 |
| A | 李清 等 (LI, Qing et al.). "重组肺炎克雷伯菌发酵联产3-羟基丙酸和1，3-丙二醇 (Co-Production of 3-Hydroxypropionie Acid and 1,3-Propanediol by a Recombinant Strain of Klebsiella pneumoniae)"<br>*《过程工程学报》("The Chinese Journal of Process Engineering")*,<br>Vol. 14, No. 1, 28 February 2014 (2014-02-28),<br>pp. 133-138 | 1-9 |

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

| Date of the actual completion of the international search | Date of mailing of the international search report |
|---|---|
| **16 June 2021** | **29 June 2021** |
| Name and mailing address of the ISA/CN<br>**China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)**<br>**No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088**<br>**China**<br>Facsimile No. **(86-10)62019451** | Authorized officer<br><br>Telephone No. |

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**
**Information on patent family members**

International application No.
**PCT/CN2020/131691**

| Patent document cited in search report | Publication date (day/month/year) | Patent family member(s) | Publication date (day/month/year) |
|---|---|---|---|
| US 2007148749 A1 | 28 June 2007 | WO 2005093060 A1 | 06 October 2005 |
| | | EP 1731604 A1 | 13 December 2006 |
| | | EP 1731604 A4 | 04 April 2007 |
| CN 108060203 A | 22 May 2018 | CN 108060203 B | 31 March 2020 |
| CN 103789248 A | 14 May 2014 | CN 103789248 B | 02 March 2016 |

# 国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/131691

A. 主题的分类

C12N 1/21(2006.01)i; C12N 1/20(2006.01)i; C12P 39/00(2006.01)i; C12P 7/42(2006.01)i; C12P 7/18(2006.01)i; C12R 1/225(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N C12P C12R

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

CNPAT WPI EPODOC CNKI 万方：3-羟基丙酸，1，3-丙二醇，罗伊氏乳杆菌，基因工程大肠杆菌，hydroxypropionic acid, propanediol, Lactobacillus reuteri, engineered Escherichia coli

C. 相关文件

| 类 型* | 引用文件，必要时，指明相关段落 | 相关的权利要求 |
|---|---|---|
| A | US 2007148749 A1 (YASUDA SHINZO等) 2007年 6月 28日 (2007-06-28)<br>权利要求1-10 | 1-9 |
| A | CN 108060203 A (江苏大学) 2018年 5月 22日 (2018-05-22)<br>权利要求1-10 | 1-9 |
| A | CN 103789248 A (江苏大学) 2014年 5月 14日 (2014-05-14)<br>权利要求1-9 | 1-9 |
| A | 李清等. "重组肺炎克雷伯菌发酵联产3-羟基丙酸和1，3-丙二醇"<br>《过程工程学报》, 第14卷，第1期，2014年 2月 28日 (2014-02-28)，<br>第133-138页 | 1-9 |

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件
“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件
“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性
“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性
“&” 同族专利的文件

| 国际检索实际完成的日期 | 国际检索报告邮寄日期 |
|---|---|
| 2021年 6月 16日 | 2021年 6月 29日 |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br>中国国家知识产权局(ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088<br>传真号 (86-10)62019451 | 受权官员<br>张英姝<br>电话号码 86-(10)-53962163 |

# 国际检索报告
## 关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/131691

| 检索报告引用的专利文件 | | | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 | | | 公布日<br>(年/月/日) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| US | 2007148749 | A1 | 2007年 6月 28日 | WO | 2005093060 | A1 | 2005年 10月 6日 |
| | | | | EP | 1731604 | A1 | 2006年 12月 13日 |
| | | | | EP | 1731604 | A4 | 2007年 4月 4日 |
| CN | 108060203 | A | 2018年 5月 22日 | CN | 108060203 | B | 2020年 3月 31日 |
| CN | 103789248 | A | 2014年 5月 14日 | CN | 103789248 | B | 2016年 3月 2日 |