

(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
2021 年 6 月 24 日 (24.06.2021)



(10) 国际公布号
WO 2021/120237 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 1/20 (2006.01) *C12P 7/46* (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/127756

(22) 国际申请日: 2019 年 12 月 24 日 (24.12.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201911317890.8 2019年12月19日 (19.12.2019) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 刘立明(LIU, Liming); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 胡贵鹏(HU, Guipeng); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

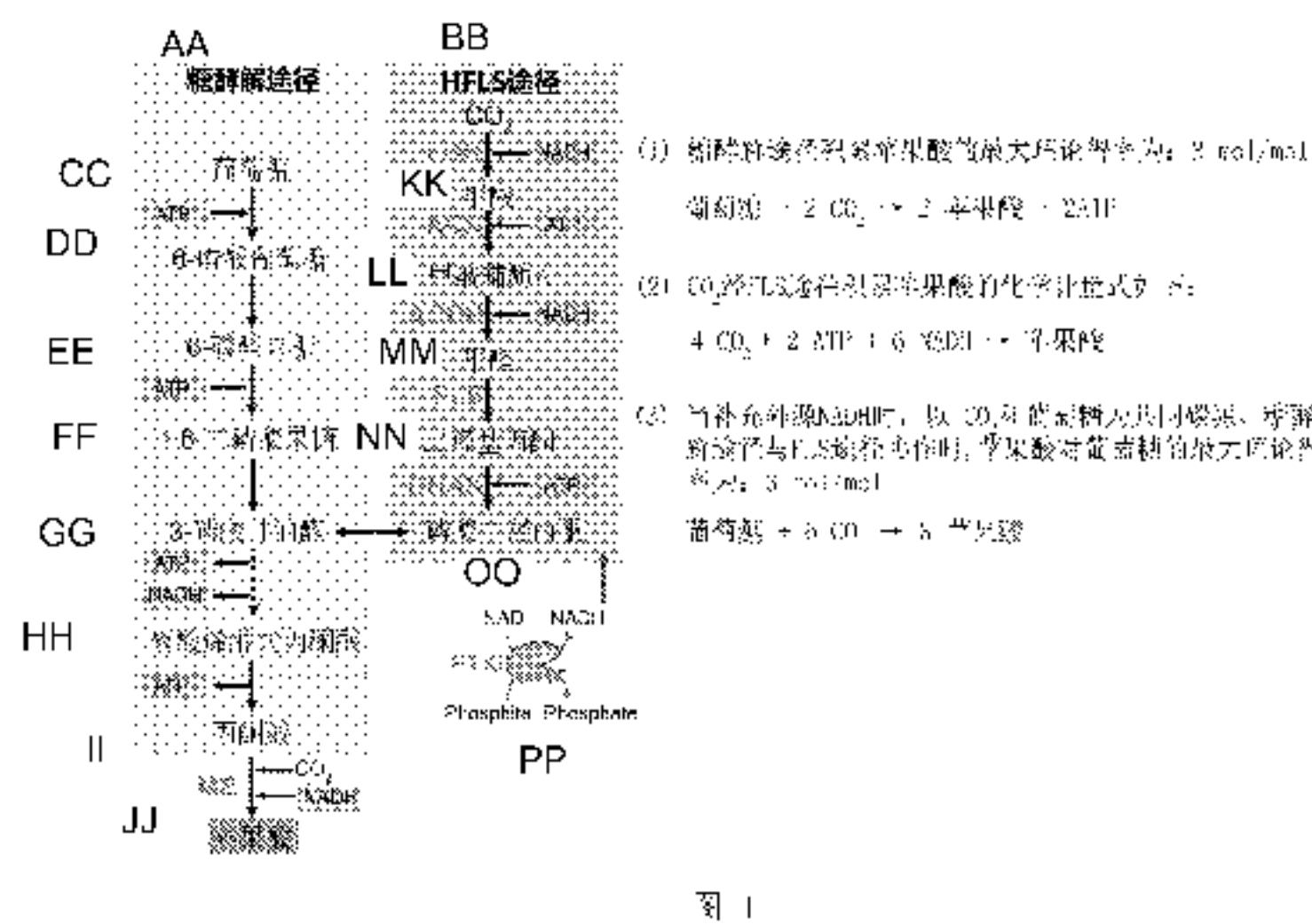
(CN)。 陈修来(CHEN, Xiulai); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 马丹蕾(MA, Danlei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 刘佳(LIU, Jia); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。 罗秋玲(LUO, Qiuling); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E区501张勇, Heilongjiang 150028 (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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,

(54) Title: CONSTRUCTION METHOD FOR AND APPLICATION OF ENGINEERED ESCHERICHIA COLI STRAIN FIXING CO₂ AND PRODUCING MALIC ACID

(54) 发明名称: 一株固定CO₂产苹果酸的大肠杆菌工程菌的构建及应用



- (1) The maximum theoretical yield of malic acid accumulated in the glycolytic pathway is: 2 mol/mol, Glucose + 2 CO₂ → 2 Malic acid + 2 ATP
- (2) The stoichiometric formula for CO₂ accumulating malic acid by means of an FLS pathway is as follows: 4 CO₂ + 2 ATP + 6 NADH → Malic acid
- (3) When supplementing exogenous NADH, CO₂ and glucose are used as co-carbon sources; and when the glycolytic pathway and the FLS pathway cooperate, the maximum theoretical yield of malic acid with respect to glucose is: 3 mol/mol, Glucose + 6 CO₂ → 3 Malic acid
- AA Glycolytic pathway
BB HFLS pathway
CC Glucose
DD 6-Glucose phosphate
EE 6-Fructose phosphate
FF 1,6-Fructose diphosphate
GG 3-Glycerate phosphate
HH Phosphoenolpyruvate
II Pyruvate
JJ Malic acid
KK Formic acid
LL Formyl-CoA
MM Formaldehyde
NN Dihydroxyacetone
OO Dihydroxyacetone phosphate
PP Phosphite Phosphate

(57) Abstract: Provided are a construction method for and an application of an engineered strain of Escherichia coli that fixes CO₂ and produces malic acid, which belong to the field of fermentation. The engineered bacteria is bacteria obtained by performing genetic engineering modification on Escherichia coli MG1655. Said genetic engineering modification comprises knocking out a fumaric acid reductase gene, a fumarase gene, a lactate dehydrogenase gene and an alcohol dehydrogenase gene, and overexpressing formate dehydrogenase, acetyl-CoA synthase, acylated acetaldehyde dehydrogenase, formaldehyde lyase, dihydroxyacetone kinase, malic enzyme and phosphorous oxidoreductase so as to obtain a strain GH0407. The described strain is used for the fermentation production of malic acid. By using CO₂ and glucose as co-substrates, anaerobic fermentation is carried out for 72 hours. The output of malic acid can reach 39g/L, and the yield is 1.53 mol/mol, whereas the original starting strain does not accumulate malic acid.

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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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)。

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(57) 摘要：提供了一株固定CO₂产苹果酸的大肠杆菌工程菌的构建及应用，属于发酵领域。所述工程菌是对大肠杆菌Escherichia coli MG1655进行基因工程改造获得的菌；所述基因工程改造为敲除富马酸还原酶基因、富马酸酶基因、乳酸脱氢酶基因和乙醇脱氢酶基因，并过量表达甲酸脱氢酶、乙酰辅酶A合成酶、酰化乙醛脱氢酶、甲醛裂合酶、二羟基丙酮激酶、苹果酸酶和亚磷酸氧化还原酶，获得菌株GH0407。上述菌株用于发酵生产苹果酸，以CO₂和葡萄糖作为共底物厌氧发酵72h，苹果酸产量达到39g/L，得率为1.53mol/mol，原始出发菌株不积累苹果酸。

一株固定 CO₂ 产苹果酸的大肠杆菌工程菌的构建及应用

技术领域

本发明涉及一株固定 CO₂ 产苹果酸的大肠杆菌工程菌的构建及应用，属于发酵工程领域。

背景技术

大气 CO₂ 浓度的不断提升影响了全球气候变化，因此迫切需要发展有效的 CO₂ 封存技术，以增强 CO₂ 的捕获或者减少 CO₂ 的释放。传统的基于物理和化学方法的二氧化碳封存技术，包括二氧化碳捕获(如后燃烧和氧燃料燃烧)、二氧化碳分离(如吸附和膜分离)和二氧化碳储存(如盐碱含水层、近海地质构造)，对于减缓二氧化碳具有重要意义。然而，这些方法存在一些明显的不足，如能耗大，运行成本高，或产生对人体健康和环境都有害的降解产物。相比之下，微生物 CO₂ 封存是缓解温室效应的一种绿色环保途径，还可以同时生产高附加值化学品。

异养微生物固定 CO₂ 可分为三个层次：(i) 直接增强异养微生物中的内源性羧化反应；(ii) 在异养微生物中构建人工合成的 CO₂ 固定支路并连接到中心碳代谢；(iii) 改造异养微生物使其能够以 CO₂ 作为唯一碳源生长。第一层次的显著缺陷是只能生产少数特殊的化合物，对于合成途径没有羧化反应的产物来说无法固定 CO₂，而第三层次目前还没有完全实现，目前最好的研究进展是获得了一株半自养型大肠杆菌。因此，为了更好的利用异养微生物固定 CO₂ 生产化学品，需要人工构建新的 CO₂ 固定途径，并且连接到糖酵解上游，从而达到 CO₂ 固定效率高，产物谱广的目的。

L-苹果酸是一种重要的四碳平台化合物，已被美国能源部列为基础化合物之一，其应用领域涉及食品、医药、化工等行业。在食品领域，L-苹果酸已成为继柠檬酸、乳酸之后，用量排第三位的食品酸味剂；在医药行业中，L-苹果酸直接参与人体新陈代谢，具有抗疲劳保护肝肾心脏的作用以及降低抗癌药物的毒副作用等；在化工领域，L-苹果酸被用于日用化妆品的生产，金属的清洗和修整，织物整理，化学镀层等。L-苹果酸是三羧酸循环中的重要中间代谢物，野生型大肠杆菌的发酵液中不能检测到苹果酸（低于 HPLC 检测限）。

发明内容

本发明的第一个目的是提供一种能够固定 CO₂ 生产苹果酸的大肠杆菌工程菌株，所述大肠杆菌工程菌株被敲除富马酸还原酶基因（*frdBC*）、富马酸酶基因（*fumB*）、乳酸脱氢酶基因（*ldhA*）和乙醇脱氢酶基因（*adhE*），并过量表达甲酸脱氢酶（FDH）、乙酰辅酶 A 合成酶（ACS）、酰化乙醛脱氢酶（ACDH）、甲醛裂合酶（FLS）、二羟基丙酮激酶（DHAP）、苹果酸酶（ME）和亚磷酸氧化还原酶（PTXD）。

在本发明的一种实施方式中，所述富马酸还原酶基因的核苷酸序列与 NCBI 上 accession number: NP_418577.1 或 NP_418576.1 的基因一致。

在本发明的一种实施方式中，所述富马酸酶基因的核苷酸序列与 NCBI 上 accession number:

NP_418546.1 的基因一致。

在本发明的一种实施方式中，所述乳酸脱氢酶基因的核苷酸序列与 NCBI 上 accession number: NP_415898.1 的基因一致。

在本发明的一种实施方式中，所述乙醇脱氢酶基因的核苷酸序列与 NCBI 上 accession number: NP_415757.1 的基因一致。

在本发明的一种实施方式中，所述大肠杆菌工程菌是以 *Escherichia coli* MG1655 为宿主得到的；所述 *Escherichia coli* MG1655(ATCC® 700926™)是 ATCC 上购买的野生型大肠杆菌。

在本发明的一种实施方式中，所述甲酸脱氢酶基因的核苷酸序列与 NCBI 上 accession number: CP001666.1 的基因一致。

在本发明的一种实施方式中，所述乙酰辅酶 A 合成酶基因的核苷酸序列与 NCBI 上 accession number: NP_418493.1 的基因一致。

在本发明的一种实施方式中，所述酰化乙醛脱氢酶的基因序列如 SEQ ID NO.1 所示。

在本发明的一种实施方式中，甲醛裂合酶的基因序列如 SEQ ID NO.2 所示。

在本发明的一种实施方式中，二羟基丙酮酸激酶的基因序列如 SEQ ID NO.3 所示。

在本发明的一种实施方式中，所述苹果酸酶基因的核苷酸序列与 NCBI 上 accession number: NP_418493.1 的基因一致。

在本发明的一种实施方式中，所述亚磷酸氧化还原酶基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

在本发明的一种实施方式中，所述甲酸脱氢酶、乙酰辅酶 A 合成酶、酰化乙醛脱氢酶、甲醛裂合酶和二羟基丙酮酸激酶是由同尾酶组装的方式逐步连接到载体 pER 上进行过量表达，最终质粒命名为 pER-CF5A。所述苹果酸酶基因和亚磷酸氧化还原酶基因是由同尾酶组装的方式连接到载体 pCDR 上进行过量表达，最终质粒命名为 pCDR-ME-PTXD。

本发明的第二个目的是提供所述大肠杆菌工程菌在发酵生产苹果酸方面的应用。在本发明的一种实施方式中，所述应用是将大肠杆菌工程菌活化后，于温度 30-37℃、转速 700-800 rpm、氧气通气量 0.8-1.2 vvm、pH = 6.5-7.0 条件下进行好氧培养 12-18 h；然后，将氧气通气量调至 0 vvm，转速调整至 180-200 rpm，并通入氮气 10-20 min (1 vvm)，厌氧条件下发酵时间 60-80 h，维持 pH 中性。可选地，所述应用是将大肠杆菌工程菌活化后，于温度 37℃、转速 800 rpm、氧气通气量 1 vvm、pH = 6.5-7.0 条件下进行好氧培养；其次，将氧气通气量调至 0 vvm，转速调整至 200 rpm，并通入氮气 10-20 min (1 vvm)，厌氧条件下发酵时间 72 h，采用 250 g/L KHCO₃ 作为酸碱中和剂以维持 pH = 7。

所述发酵使用的发酵培养基含有葡萄糖 40-50 g/L，Na₂HPO₃·5H₂O 20-50 mM，KHCO₃ 30-50 mM，Na₂HPO₄·12H₂O 15.11g/L、KH₂PO₄ 3 g/L NH₄Cl 1 g/L、NaCl 0.5g/L，每 L 培养基含有 1mL 微量元素液；微量元素液：FeCl₃·6H₂O 2.4 g/L、CoCl₂·6H₂O 0.3 g/L、CuCl₂ 0.15 g/L、ZnCl₂·4H₂O 0.3 g/L、NaMnO₄ 0.3 g/L、

H₃BO₃ 0.075 g/L 、MnCl₂·4H₂O 0.495 g/L，溶于 0.1M HCl 中配制。

本发明通过敲除富马酸还原酶基因和富马酸酶基因构建了一株可以少了积累苹果酸的工程菌株。以阻断丙酮酸为节点合成苹果酸是目前发现的最短路径之一，构建该路径时，需要将丙酮酸节点的主要副产物合成途径进行阻断。本发明通过敲除乳酸脱氢酶基因和乙醇脱氢酶基因，以达到增加前体丙酮酸积累的目的。

本发明以 *Escherichia coli* MG1655 为出发菌株，利用代谢工程手段，通过构建 CO₂ 固定途径、苹果酸合成途径、阻断苹果酸代谢去路以及和阻断丙酮酸支路，从而得到生产苹果酸的大肠杆菌基因工程菌。在发酵 72 h 后苹果酸的产量达到 39 g/L，苹果酸对葡萄糖得率为 1.53 mol/mol。该发酵过程为厌氧发酵，产品得率高、产量大，目前未见本发明中 CO₂ 固定途径生产苹果酸的报道。

本发明将 CO₂ 固定与苹果酸生产相结合，不仅能够对有效缓解温室效应提供新的方案，而且可以同时为苹果酸的生产提供新的思路，将废弃物质变成有用物质。

附图说明

图 1 大肠杆菌工程菌中构建 CO₂ 合成苹果酸的路径。

图 2 frdBC 基因敲除验证电泳图【1-18 号泳道均表示成功敲除 frdBC 基因的转化子，19 号泳道（标注“+”）表示野生型大肠杆菌的菌落 PCR 结果，19 号泳道（标注“-”）为空白对照组】。

图 3 fumB 基因敲除验证电泳图【1-11、13-14 号泳道均表示成功敲除 fumB 基因的转化子，12、15-16 号泳道是未成功敲除 fumB 基因的转化子，17 号泳道（标注“+”）表示野生型大肠杆菌的菌落 PCR 结果，18 号泳道（标注“-”）为空白对照组】。

图 4 ldhA 基因敲除验证电泳图【3 号泳道是未成功敲除 fumB 基因的转化子，8-10 号泳道表示成功敲除 ldhA 基因的转化子】。

图 5 adhE 基因敲除验证电泳图【1-4、6-14、16 号泳道均表示成功敲除 adhE 基因的转化子，17 号泳道（标注“+”）表示野生型大肠杆菌的菌落 PCR 结果，18 号泳道（标注“-”）为空白对照组】。

图 6 重组质粒 pER-CF5A 的图谱。

图 7 重组质粒 pCDR-ME-PTXD 的图谱。

图 8 大肠杆菌发酵生产苹果酸产量-时间曲线。

图 9 大肠杆菌发酵生产苹果酸得率。

具体实施方式

苹果酸检测方法（高效液相色谱条件）：色谱柱：Aminex HPX-87H (7.8×300 mm)，流动相：5mM H₂SO₄，柱温：35℃，检测波长：210 nm，进样量：10 μl，流速：0.6 ml/min。

商业化质粒产品的购买来源：pKD4、pKD46 以及 pCP20 质粒购自 BioVector NTCC。pER 质粒是 pETM6（购自 addgene，#49795）改造启动子区域后获得的质粒，pCDR 质粒是 pCDM4（购自 addgene，#49796）

改造启动子区域后获得的质粒。

CO₂ 固定速率的检测及计算方法：(1) 检测方法：首先，使用 LB 培养基将大肠杆菌培养至对数生长期（OD₆₀₀ = 0.4-0.8）；其次，收集对数中期细胞，并使用 20 mL M9 培养基（含 5-10 g/L 葡萄糖和 20-50 mM NaHCO₃）重悬至 OD₆₀₀ = 3-5；再次，将 20 mL 的细胞悬液转移至 25 mL 的血清瓶中培养 2 h；最后，注入浓盐酸释放细胞悬液中的总无机碳，用气相色谱仪测定血清瓶顶空气体中 CO₂ 的浓度。气相色谱柱：RTX-QBOND (30 m; 0.32 mm 内径，膜厚度 10 mm (美国宾夕法尼亚州贝尔方特 RESTEK 公司)。载气为氦气，色谱柱恒温 80℃，流速 15 mL/min，进样口压力 68.8 kPa。

(2) 计算方法：CO₂ 固定速率 = (B-A) mg/mL × 5 mL / (C mg × 2 h)

注：A 和 B 分别为血清瓶中培养前后血清瓶顶空的 CO₂ 浓度，顶空体积为 5 mL，血清瓶中细胞干重为 C mg，培养时间为 2 h。

实施例 1：构建能够固定 CO₂ 生产苹果酸的大肠杆菌工程菌株

(1) *E. coli* MG1655 富马酸还原酶基因 frdBC 的敲除

根据 NCBI 数据库中 *Escherichia coli* MG1655 的 frdBC 基因序列设计敲除引物 QCfrdBC-S 和 QCfrdBC-A（表 1），以 pKD4 质粒为模板扩增 frdBC 的敲除框并进行胶回收。备注：pKD4 质粒包含两个 FRT 位点（在翻转酶作用下可以折叠从而消除 FRT 位点之间的 DNA 序列），两个 FRT 位点之间是卡那霉素（kan，作为基因敲除的筛选压力）的编码基因，即 FRT-kan-FRT。在敲除基因时，设计引物扩增出 FRT-kan-FRT 的 DNA 片段。需要指出的是，设计的两条扩增引物分别包含靶基因的上下游 39-49 bp，即我们最终获得的 DNA 片段是“靶基因上游 39-49 bp-FRT-kan-FRT-靶基因上游 39-49 bp”，这个 DNA 片段称为靶基因的敲除框。将 frdBC 的敲除框通过电转化的形式导入含有 pKD46 质粒的 *E. coli* MG1655 感受态细胞中（电转化电压和时间分别为 1800 V 和 5 ms）。将电转的感受态细胞涂布于含卡那霉素（50 g/mL）的 LB 固体培养基平板上，倒置培养 12-24h。待平板长出单菌落后，使用验证引物 YZfrdBC-S 和 YZfrdBC-A（表 1）筛选阳性转化子。

将 pCP20 质粒转化至阳性转化子以消除卡那霉素抗性基因，再使用 YZfrdBC-S 和 YZfrdBC-A 引物进行验证，成功敲除的转化子电泳条带大小为 529 bp，没有敲除的对照组电泳条带大小为 1917 bp（图 2）。在 MG1655 体内成功敲除 frdBC 基因的菌株命名为 GH0101。

(2) *E. coli* GH0101 富马酸酶基因 fumB 的敲除

根据 NCBI 数据库中 *Escherichia coli* MG1655 的 fumB 基因序列设计敲除引物 QCfumB-S 和 QCfumB-A（表 1），以 pKD4 质粒为模板扩增 fumB 的敲除框并进行胶回收。将 fumB 的敲除框通过电转化的形式导入含有 pKD46 质粒的 *E. coli* GH0101 感受态细胞中（电转化电压和时间分别为 1800 V 和 5 ms）。将电转的感受态细胞涂布于含卡那霉素（50 g/mL）的 LB 固体培养基平板上，倒置培养 12-24 h。待平板长出单菌落后，使用验证引物 YZfumB-S 和 YZfumB-A（表 1）筛选阳性转化子。

将 pCP20 质粒转化至阳性转化子以消除卡那霉素抗性基因,再使用 YZfumB-S 和 YZfumB-A 引物进行验证,成功敲除的转化子电泳条带大小为 506 bp,没有敲除的对照组电泳条带大小为 1940 bp(图 3)。在 GH0101 体内成功敲除 fumB 基因的菌株命名为 GH0201。

(3) *E. coli* GH0201 乳酸脱氢酶基因 ldhA 的敲除

根据 NCBI 数据库中 *Escherichia coli* MG1655 的 ldhA 基因序列设计敲除引物 QCldhA-S 和 QCldhA-A(表 1),以 pKD4 质粒为模板扩增 ldhA 的敲除框并进行胶回收。将 ldhA 的敲除框通过电转化的形式导入含有 pKD46 质粒的 *E. coli* GH0201 感受态细胞中(电转化电压和时间分别为 1800 V 和 5 ms)。将电转的感受态细胞涂布于含卡那霉素(50 g/mL)的 LB 固体培养基平板上,倒置培养 12-24h。待平板长出单菌落后,使用验证引物 YZldhA-S 和 YZldhA-A(表 1)筛选阳性转化子。

将 pCP20 质粒转化至阳性转化子以消除卡那霉素抗性基因,再使用 YZldhA-S 和 YZldhA-A 引物进行验证,成功敲除的转化子电泳条带大小为 744 bp,没有敲除的对照组电泳条带大小为 2132 bp(图 4)。在 GH0201 体内成功敲除 ldhA 基因的菌株命名为 GH0301。

(4) *E. coli* GH0301 乙醇脱氢酶基因 adhE 的敲除

根据 NCBI 数据库中 *Escherichia coli* MG1655 的 adhE 基因序列设计敲除引物 QCadhE-S 和 QCadhE-A(表 1),以 pKD4 质粒为模板扩增 adhE 的敲除框并进行胶回收。将 adhE 的敲除框通过电转化的形式导入含有 pKD46 质粒的 *E. coli* GH0301 感受态细胞中(电转化电压和时间分别为 1800 V 和 5 ms)。将电转的感受态细胞涂布于含卡那霉素(50 g/mL)的 LB 固体培养基平板上,倒置培养 12-24h。待平板长出单菌落后,使用验证引物 YZadhE-S 和 YZadhE-A(表 1)筛选阳性转化子。

将 pCP20 质粒转化至阳性转化子以消除卡那霉素抗性基因,再使用 YZadhE-S 和 YZadhE-A 引物进行验证,成功敲除的转化子电泳条带大小为 352 bp,没有敲除的对照组电泳条带大小为 2676 bp(图 5)。在 GH0301 体内成功敲除 adhE 基因的菌株命名为 GH0401。

(5) FDH、ACS、ACDH、FLS 和 DHAK 蛋白的过表达

根据 NCBI 数据库中提供的永达尔梭菌甲酸脱氢酶基因序列设计扩增引物 FDH-S 与 FDH-A(表 1),以永达尔梭菌基因组为模板,扩增出 FDH 蛋白的基因序列,胶回收后采用一步同源重组的方式连接到质粒 pER(*Bgl*II 和 *Xho*I)上得到重组质粒 pER-FDH; pER 质粒的基因序列如 SEQ ID NO.5 所示。根据 NCBI 数据库中提供的大肠杆菌 MG1655 乙酰 CoA 合成酶基因序列设计扩增引物 ACS-S 与 ACS-A(表 1),以大肠杆菌 MG1655 的基因组为模板,扩增 ACS 蛋白的编码基因序列,胶回收后采用一步同源重组的方式连接到质粒 pER(*Bgl*II 和 *Xho*I)上得到重组质粒 pER-ACS。

根据文献提供的 ACDH、FLS 和 DHAK 基因序列,采用基因合成的方式,分别得到 ACDH、FLS 和 DHAK 编码基因的片段,然后以酶切连接的方式连接到质粒 pER 上(*Bgl*II 和 *Xho*I),分别得到重组质粒 pER-ACDH、pER-FLS 和 pER-DHAK;采用同尾酶组装技术【*ACS Synth Biol* 1, 256-266 (2012)】,分别将

上述五个质粒(pER-FDH、pER-ACS、pER-ACDH、pER-FLS和pER-DHAK)逐步组装成一个质粒pER-CF5A。采用的同尾酶为 *BlnI* 和 *SpeI*，酶切位点的位置见图 6。

(6) ME 和 PTXD 蛋白的过表达

根据 NCBI 数据库中提供的丙酮丁醇梭菌苹果酸酶基因序列设计扩增引物 ME-S 与 ME-A (表 1)，以丙酮丁醇梭菌的基因组为模板，扩增出编码苹果酸酶的基因片段，并采用一步同源重组的方式连接到质粒 pCDR (*BglII* 和 *XhoI*) 上得到重组质粒 pCDR-ME；pCDR 质粒的基因序列如 SEQ ID NO.6 所示。采用基因合成的方式，得到 PTXD 编码基因的片段，然后以酶切连接的方式连接到质粒 pCDR (*BglII* 和 *XhoI*) 上，得到重组质粒 pCDR-PTXD；采用同尾酶组装技术，将上述两个质粒 (pCDR-ME 和 pCDR-PTXD) 组装成一个质粒 pCDR-ME-PTXD。采用的同尾酶为 *BlnI* 和 *SpeI*，酶切位点的位置见图 7。

将上述得到的两个质粒 pER-CF5A 和 pCDR-ME-PTXD 转化至 *E. coli* GH0401 感受态细胞中，涂布于含有壮观霉素和氨苄青霉素的双抗性平板上，获得的转化子即为本发明所述的大肠杆菌基因工程菌，命名为 GH0407。此外，将 pER 空质粒与 pCDR-ME-PTXD 转化至 *E. coli* GH0401 感受态细胞获得工程菌株 GH0402 作为对照菌株，以验证异源 CO₂ 固定途径 (HFLS，图 1) 对苹果酸合成的影响。

实施例 2：利用工程大肠杆菌 GH0402 和 GH0407 发酵生产苹果酸

平板活化培养基及活化培养条件：平板活化培养基是 LB 培养基，活化条件：37℃ 培养箱倒置 12 h。发酵使用的发酵培养基含有：葡萄糖 50 g/L、Na₂HPO₃·5H₂O 20 mM、KHCO₃ 50 mM、Na₂HPO₄·12H₂O 15.11g/L、KH₂PO₄ 3 g/L NH₄Cl 1 g/L、NaCl 0.5g/L、微量元素液 1mL/L；微量元素液：FeCl₃·6H₂O 2.4 g/L、CoCl₂·6H₂O 0.3 g/L、CuCl₂ 0.15 g/L、ZnCl₂·4H₂O 0.3 g/L、NaMnO₄ 0.3 g/L、H₃BO₃ 0.075 g/L、MnCl₂·4H₂O 0.495 g/L，以 0.1M HCl 为溶剂。将工程大肠杆菌 GH0402 和 GH0407 于平板活化后，挑取单菌落于液体 LB 种子培养基中，37℃、200 rpm 培养 12 h (OD₆₀₀ = 3-4)。种子培养完成后，按 2% (v/v) 的接种量接种至发酵培养基中，于温度 37℃、转速 800 rpm、氧气通气量 1 vvm、pH = 7.0 条件下培养 16h 后关闭氧气通量，并通入氮气 10-20 min (氮气通量：1 vvm) 除去残留氧气，厌氧条件下继续发酵时间 72 h。整个过程采用 250 g/L KHCO₃ 作为酸碱中和剂以维持 pH = 7。

采用高效液相色谱 (HPLC) 测得 GH0407 发酵液上清中最终的苹果酸产量为 39 g/L (图 8)，苹果酸对葡萄糖得率达到 1.53 mol/mol (为目前报道最高) (图 9)，工程菌株 GH0407 的 CO₂ 固定速率为 41 mg gDCW⁻¹ h⁻¹，比多数自养蓝藻的 CO₂ 固定速率 (6-25 mg gDCW⁻¹ h⁻¹) 更高 (表 2)。发酵液中的 HCO₃⁻ 与 CO₂ 之间会发生快速的可逆反应，同时 HCO₃⁻ 还可以作为酸碱中和剂控制发酵液的 pH，因此，通过向培养基中添加 KHCO₃ 可以创造 CO₂ 环境。

我们设置了两个对照组：(i) 发酵液中不添加 KHCO₃，采用 NaOH 作为酸碱中和剂；(ii) 以不含 CO₂ 固定途径 (即不含 pER-CF5A 质粒) 的菌株 GH0402 作为对照组。结果表明，当使用 NaOH 替代 KHCO₃ 作为酸碱中和剂时 (即不提供 CO₂ 环境时)，工程菌株 GH0407 苹果酸的产量仅为 2.3 g/L，对葡萄糖得率

仅为 0.14 mol/mol；对照组 GH0402 发酵上清液中最终的苹果酸产量为 22 g/L，对葡萄糖得率为 1.13 mol/mol。从对照组的数据可以看出，CO₂ 确实提高了苹果酸的产量和得率。

表 1 基因敲除引物与蛋白过量表达引物序列

引物名称	引物序列
QCfrdBC-S	ATGGCTGAGATGAAAAACCTGAAAATTGAGGTGGTGCGCTATAACCCGGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
QCfrdBC-A	TTACCAGTACAGGGCAACAAACAGGATTACGATGGTGGCAACCACAGTTATGGGAATTAGCCATGGTCC
YZfrdBC-S	TGGAGTACAGCGACGTGAAG
YZfrdBC-A	GGAATACGCGACCAATGAAG
QCfumB-S	ATGTCAAACAAACCCTTTATCTACCAGGCACCTTTCCGATGGGGAAAGGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
QCfumB-A	TTACTTAGTGCAGTTCGCGCACTGTTTGTGACGATTTGCTGGAAGAAGATGGGAATTAGCCATGGTCC
YZfumB-S	TGTGAGCGTATCGTGCGTC
YZfumB-A	CGTGAAATTACAATCGCAAAC
QCldhA-S	ATGAAACTCGCCGTTTATAGCACAAAACAGTACGACAAGAAGTACCTGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
QCldhA-A	TTAAACCAGTTCGTTCTGGGCAGGTTTCGCCTTTTCCAGATTGCTTAAGATGGGAATTAGCCATGGTCC
YZldhA-S	AACCCACAGCCCGAGCGT
YZldhA-A	GGCTTACCGTTTACGCTTTCC
QCadhE-S	ATGGCTGTACTAATGTCGCTGAACTTAACGCACTCGTAGAGCGTGTAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
QCadhE-A	TTAAGCGGATTTTTTCGCTTTTTTCTCAGCTTTAGCCGGAGCAGCTTCTATGGGAATTAGCCATGGTCC
YZadhE-S	TCATCACCGCACTGACTAT
YZadhE-A	TCCTTAACTGATCGGCATT
FDH-S	agatatacatatggcagatctGATGAAAAGTATACTAACTACTTGTCTTATTGT
FDH-A	ggtttctttaccagactcgagTTAAGCGTCTTTACGCATACTCTTTT
ACS-S	agatatacatatggcagatctGATGAGCCAAATTCACAAACACACC
ACS-A	ggtttctttaccagactcgagTTACGATGGCATCGCGATAGC
ME-S	agatatacatatggcagatctGATGAATAATTTAAAAGGTTTAGAATTACTAAGAA
ME-A	ggtttctttaccagactcgagTTATCTATAGTATGGTTCCCAAATTTCA

表 2 微生物 CO₂ 固定速率的比较

菌株名称	CO ₂ 固定速率	培养条件	参考文献
<i>Botryococcus braunii</i> SAG-30.81	6.8 mg gDCW ⁻¹ h ⁻¹	11 L 发酵罐	Bioresour Technol 101, 5892-5896 (2010)
<i>Chlorella vulgaris</i>	9.3 mg gDCW ⁻¹ h ⁻¹	光反应器	Int J Greenh Gas Con 14, 169-176 (2013)
<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	23.7 mg gDCW ⁻¹ h ⁻¹	光反应器	Biotechnol Bioeng 67, 465-475 (2000)
<i>E. coli</i> JB	0.95 mg gDCW ⁻¹ h ⁻¹	3 L 发酵罐	Bioresour Technol 150, 79-88 (2013)
<i>E.coli</i>	41 mg gDCW ⁻¹ h ⁻¹	3.6 L 发酵罐	本发明

1. 一种固定 CO₂ 生产苹果酸的大肠杆菌工程菌株，其特征在于，所述大肠杆菌工程菌株被敲除富马酸还原酶基因（*frdBC*）、富马酸酶基因（*fumB*）、乳酸脱氢酶基因（*ldhA*）和乙醇脱氢酶基因（*adhE*），并过量表达甲酸脱氢酶（*FDH*）、乙酰辅酶 A 合成酶（*ACS*）、酰化乙醛脱氢酶（*ACDH*）、甲醛裂合酶（*FLS*）、二羟基丙酮激酶（*DHAP*）、苹果酸酶（*ME*）和亚磷酸氧化还原酶（*PTXD*）。

2. 根据权利要求 1 所述的一种固定 CO₂ 生产苹果酸的大肠杆菌工程菌株，其特征在于，所述大肠杆菌工程菌是以 *Escherichia coli* MG1655 为宿主。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的一种固定 CO₂ 生产苹果酸的大肠杆菌工程菌株，其特征在于，所述甲酸脱氢酶、乙酰辅酶 A 合成酶、酰化乙醛脱氢酶、甲醛裂合酶和二羟基丙酮激酶是由同尾酶组装的方式逐步连接到载体上进行过量表达。

4. 根据权利要求 3 所述的一种固定 CO₂ 生产苹果酸的大肠杆菌工程菌株，其特征在于，所述载体的核苷酸序列如 SEQ ID NO.5 所示。

5. 根据权利要求 1-4 任一所述的一种固定 CO₂ 生产苹果酸的大肠杆菌工程菌株，其特征在于，所述苹果酸酶基因和亚磷酸氧化还原酶基因是由同尾酶组装的方式连接到载体上进行过量表达。

6. 根据权利要求 5 所述的一种固定 CO₂ 生产苹果酸的大肠杆菌工程菌株，其特征在于，所述载体的核苷酸序列如 SEQ ID NO.6 所示。

7. 根据权利要求 1-6 任一所述的一种固定 CO₂ 生产苹果酸的大肠杆菌工程菌株，其特征在于，所述富马酸还原酶基因的核苷酸序列与 NCBI 上 accession number: NP_418577.1 或 NP_418576.1 的基因一致，所述富马酸酶基因的核苷酸序列与 NCBI 上 accession number: NP_418546.1 的基因一致，所述乳酸脱氢酶基因的核苷酸序列与 NCBI 上 accession number: NP_415898.1 的基因一致，所述乙醇脱氢酶基因的核苷酸序列与 NCBI 上 accession number: NP_415757.1 的基因一致，所述甲酸脱氢酶基因的核苷酸序列与 NCBI 上 accession number: CP001666.1 的基因一致，所述乙酰辅酶 A 合成酶基因的核苷酸序列与 NCBI 上 accession number: NP_418493.1 的基因一致，所述酰化乙醛脱氢酶的基因序列如 SEQ ID NO.1 所示，甲醛裂合酶的基因序列如 SEQ ID NO.2 所示，二羟基丙酮酸激酶的基因序列如 SEQ ID NO.3 所示，所述苹果酸酶基因的核苷酸序列与 NCBI 上 accession number: NP_418493.1 的基因一致，所述亚磷酸氧化还原酶基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示。

8. 权利要求 1-7 任一所述的一种固定 CO₂ 生产苹果酸的大肠杆菌工程菌株在发酵生产苹果酸方面的应用。

9. 根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于，将大肠杆菌工程菌活化后，于温度 30-37℃、转速 700-800 rpm、氧气通气量 0.8-1.2 vvm、pH = 6.5-7.0 条件下进行好氧培养 12-18 h；然后，将氧气通气量调至 0 vvm，转速调整至 180-200 rpm，并以 1 vvm 的速度通入氮气 10-20 min，厌氧条件下发酵时间 60-80 h，维持 pH 中性。

10. 根据权利要求 9 所述的应用, 其特征在于, 发酵使用的发酵培养基含有葡萄糖 40-50 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20-50 mM, KHCO_3 30-50 mM, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 15.11g/L、 KH_2PO_4 3 g/L NH_4Cl 1 g/L、 NaCl 0.5g/L, 每 L 培养基含有 1mL 微量元素液; 微量元素液: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 2.4 g/L、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L、 CuCl_2 0.15 g/L、 $\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.3 g/L、 NaMnO_4 0.3 g/L、 H_3BO_3 0.075 g/L 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.495 g/L, 溶于 0.1M HCl 中配制。

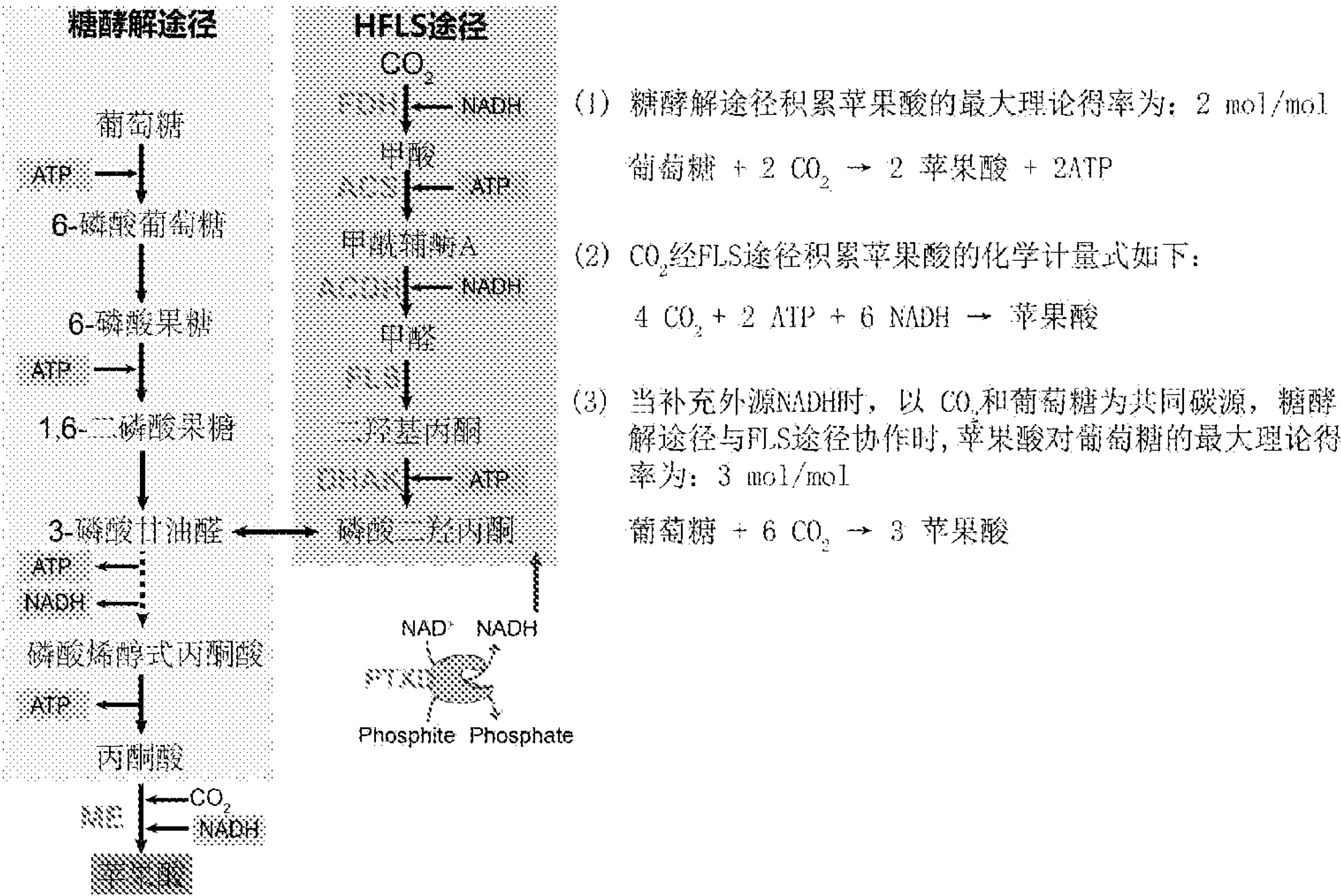


图 1

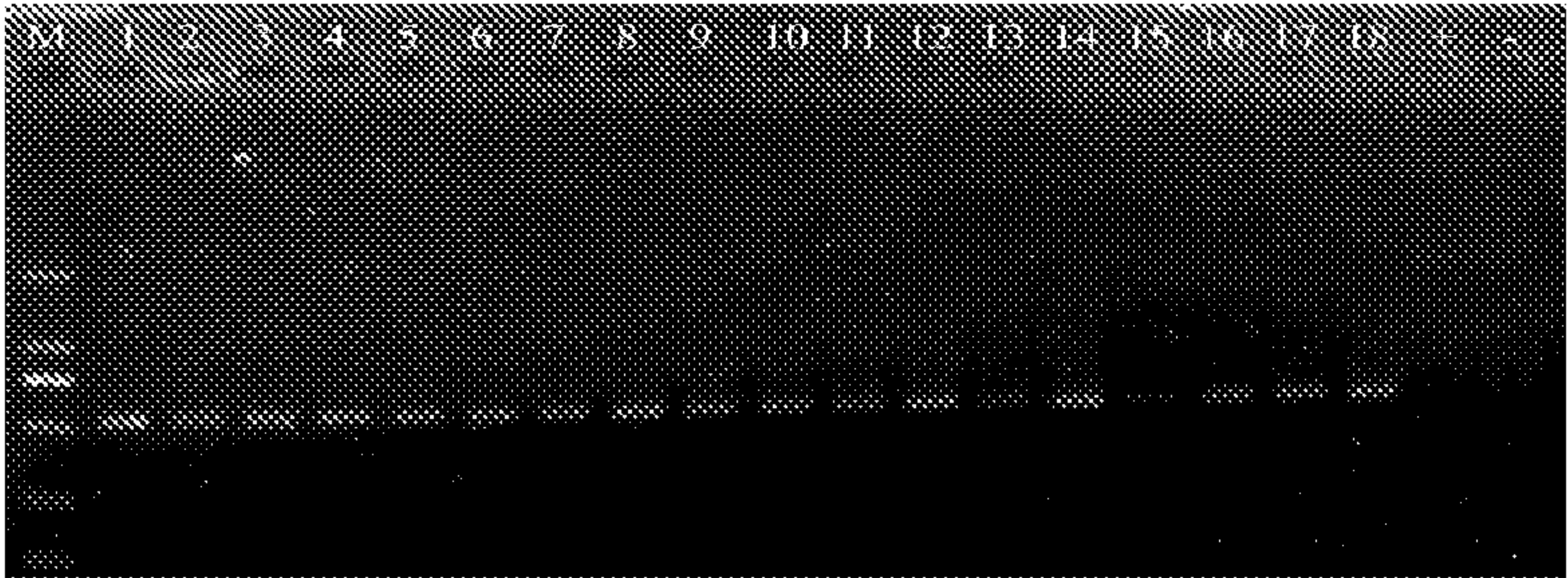


图 2

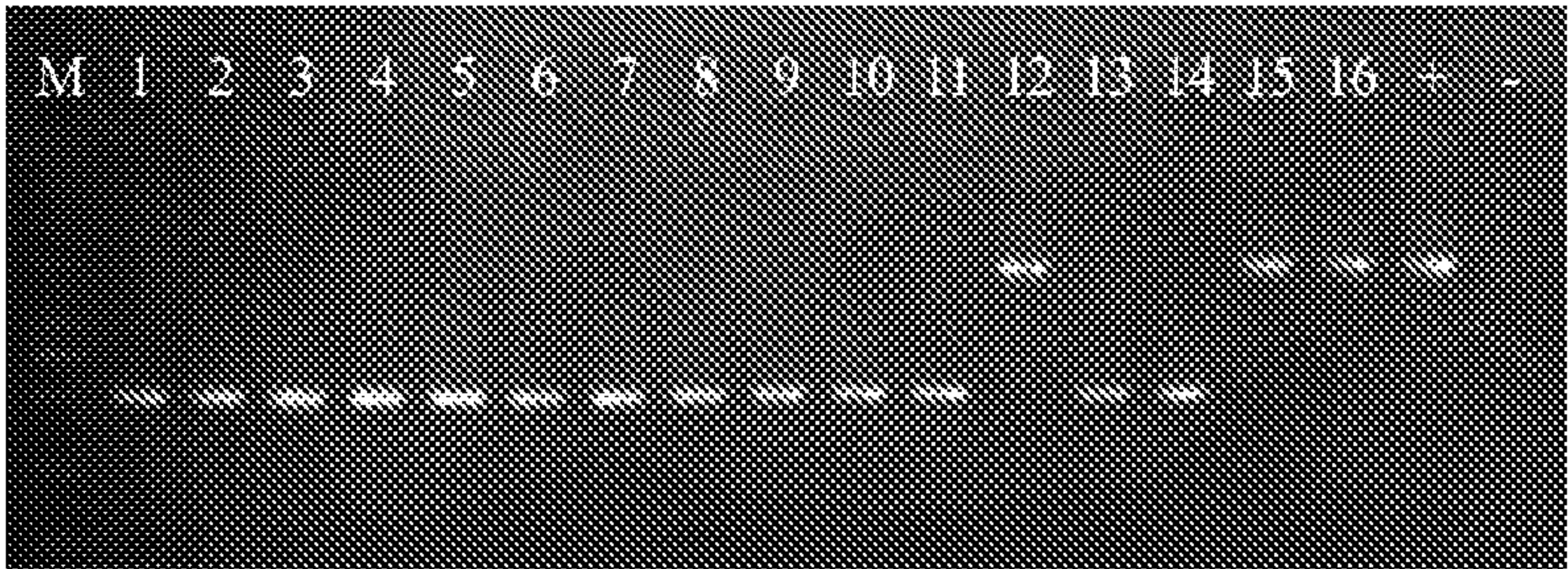


图 3

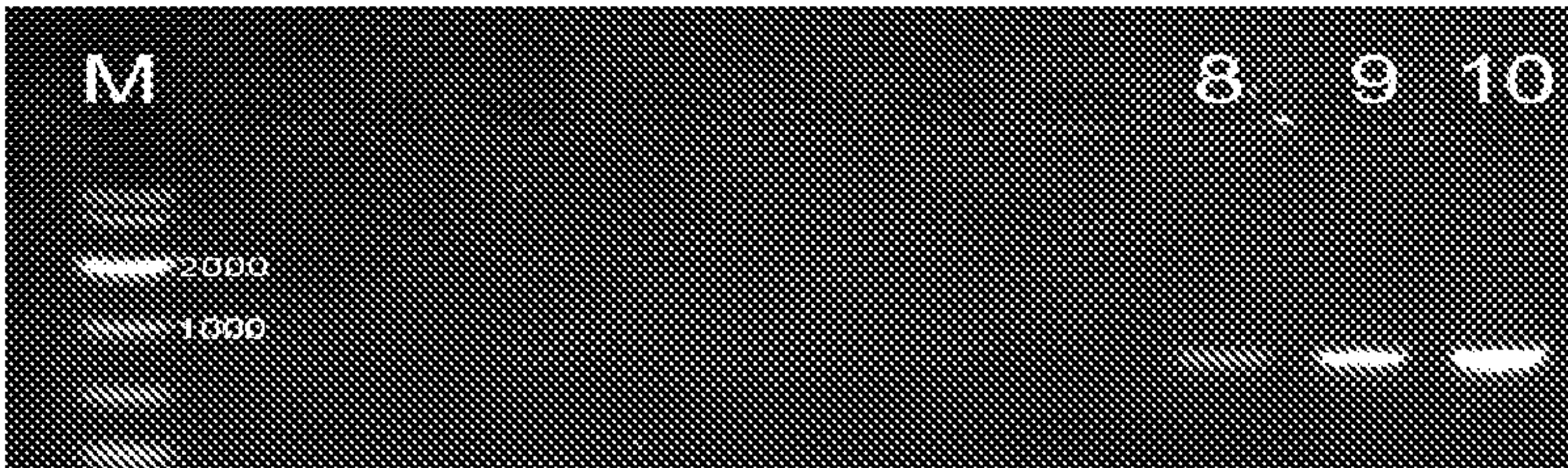


图 4

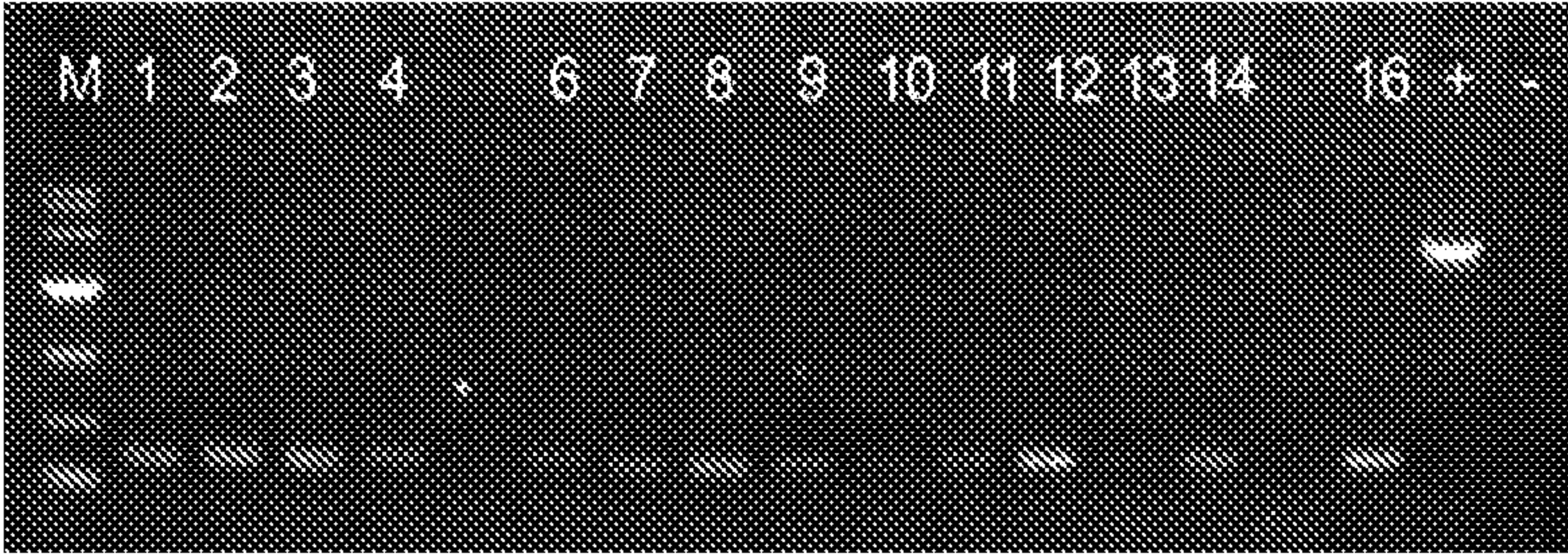


图 5

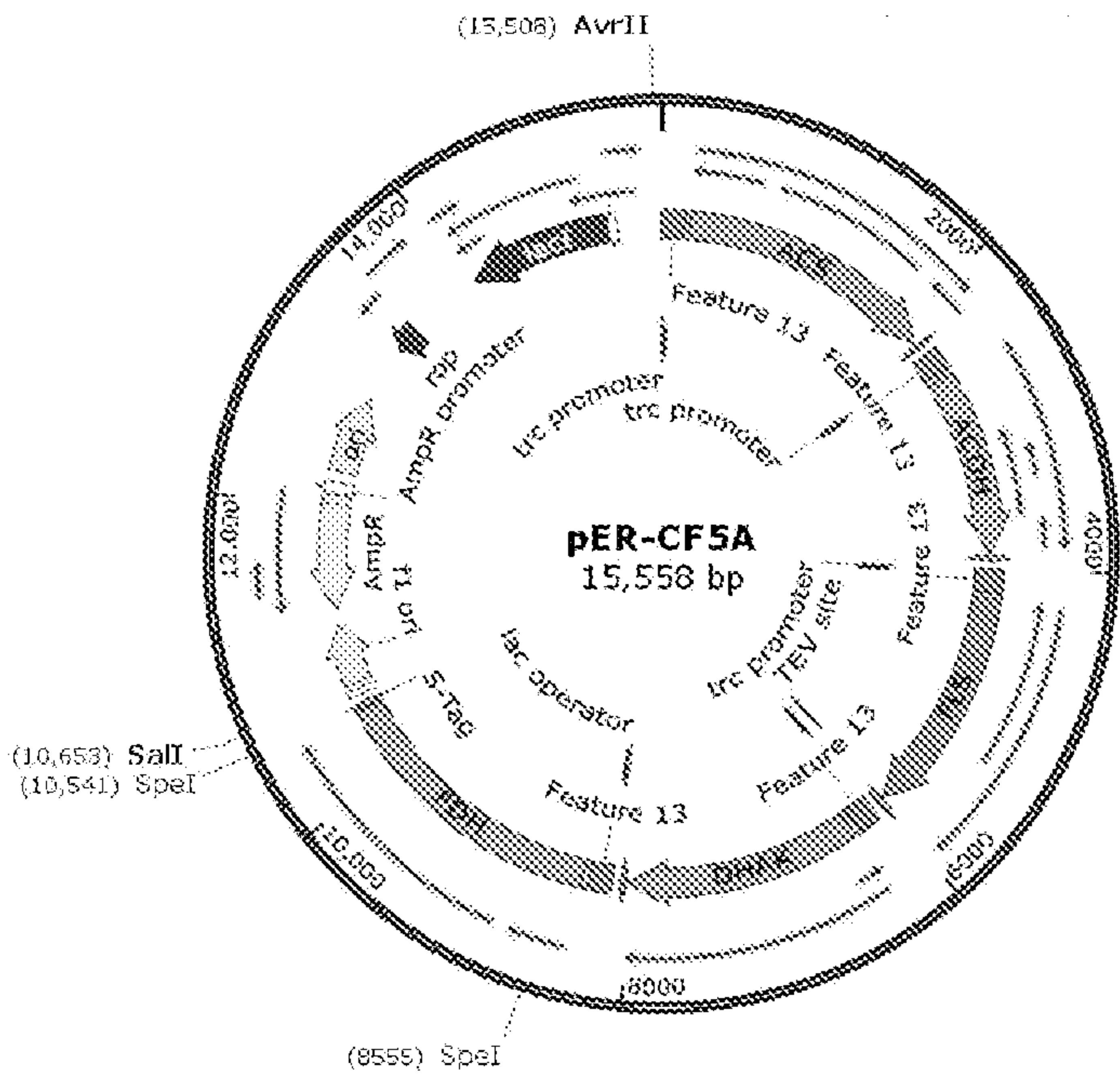


图 6

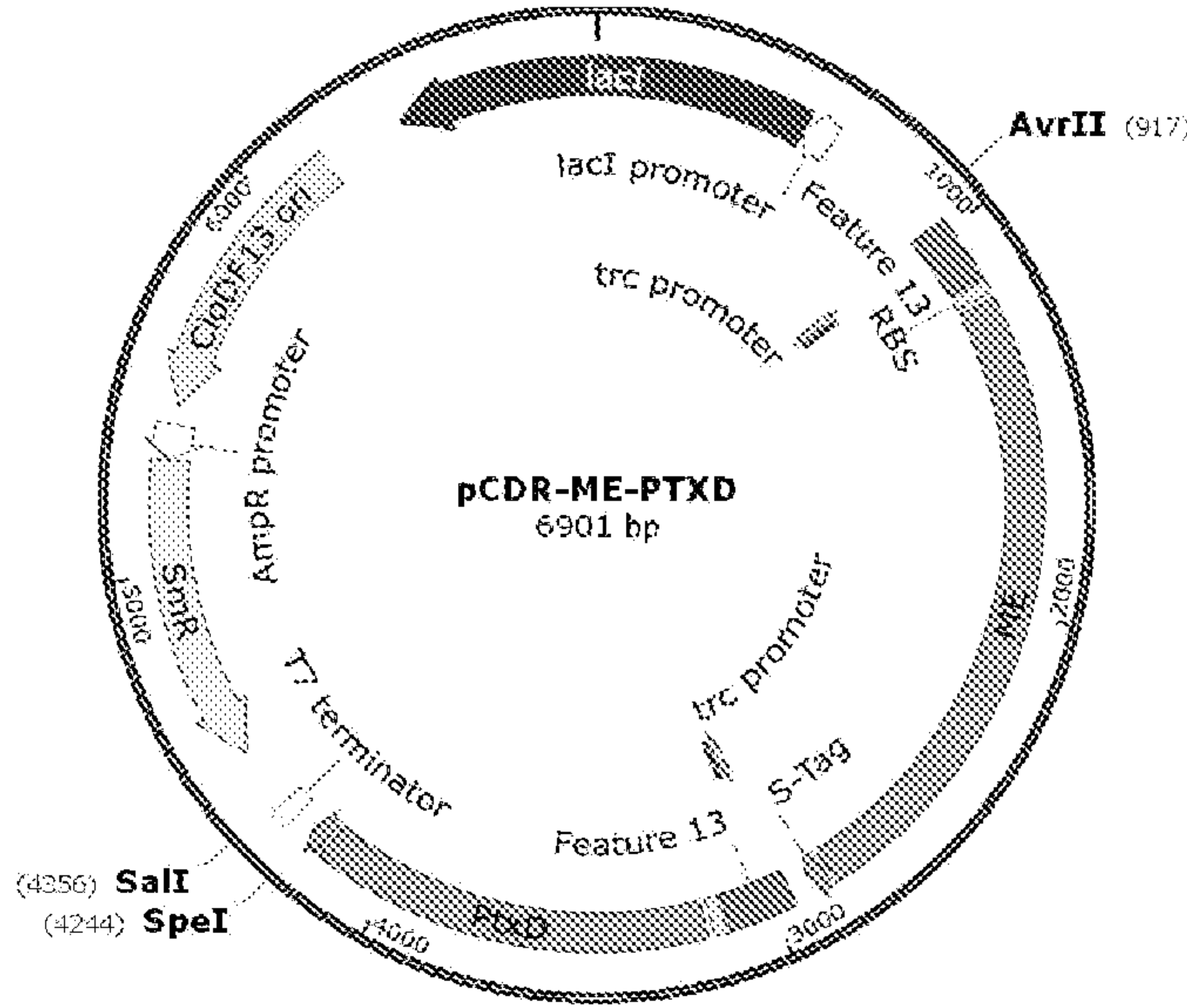


图 7

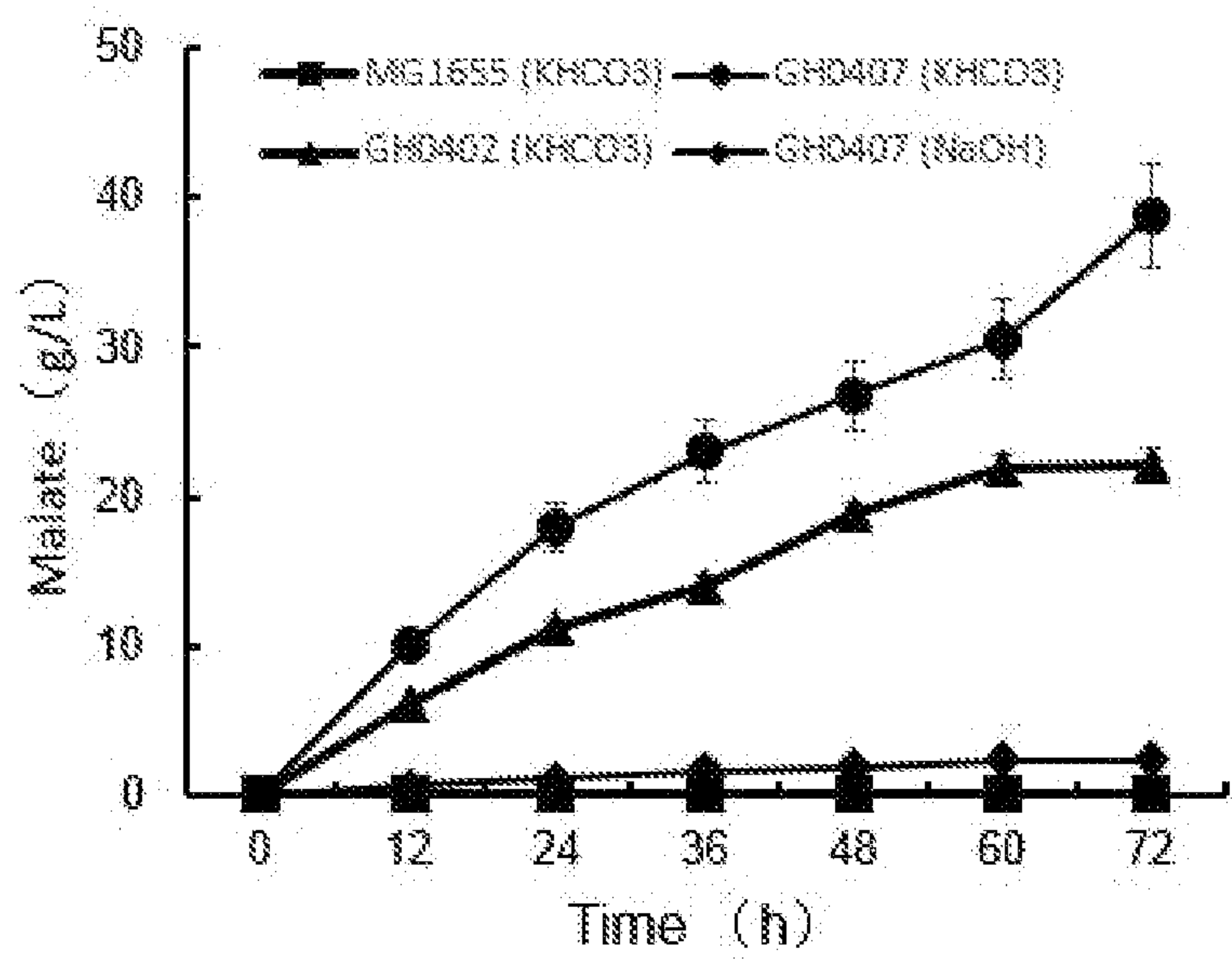


图 8

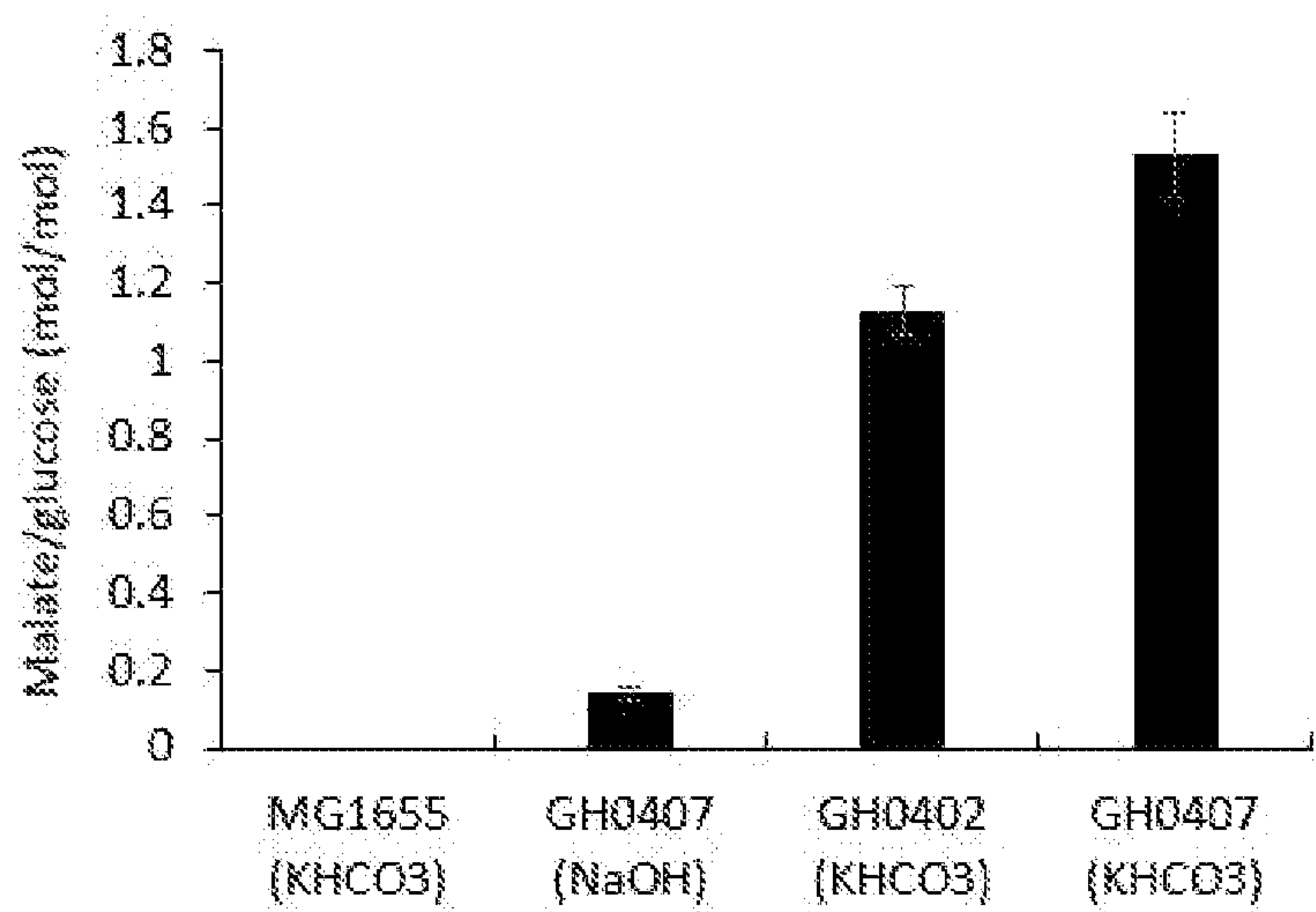


图 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/127756

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12P 7/46(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)n

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)

CNABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 百度学术, Patentics: applicant/inventor, 苹果酸, malic acid, 大肠杆菌, Escherichia coli, 富马酸还原酶, frdBC, fumarate reductase, 富马酸酶, fumB, fumarase, 乳酸脱氢酶, LDH, lactate dehydrogenase, 乙醇脱氢酶, ADH, ethanol dehydrogenase, 甲酸脱氢酶, FDH, formate dehydrogenase, 乙酰辅酶A合成酶, ACS, acyl-CoA synthetase, 酰化乙醛脱氢酶, ACDH, acyl acetaldehyde dehydrogenase, 甲醛裂合酶, FLS, formaldehyde lyase, 二羟基丙酮激酶, DHAP, dihydroxyacetone kinase, 苹果酸酶, ME, malic enzyme, 亚磷酸氧化还原酶, PTXD, phosphite oxidoreductase, sequences 1-28

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	董晓翔 (DONG, Xiaoxiang). "代谢工程改造Escherichia coli生产L-苹果酸 (Design And Construction of L-Malate Overproducing Escherichia coli Strains)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库工程科技I辑 (Chinese Master's Theses Full-text Database, Engineering Science I), No. 2017, 02, 15 February 2017 (2017-02-15), No. B018-256, pages 1-40	1-10
A	CN 104046577 A (NANJING TECH UNIVERSITY) 17 September 2014 (2014-09-17) entire document	1-10
A	吴亚斌 (WU, Yabin). "产L-苹果酸重组大肠杆菌的构建和发酵性能研究 (The Construction and Fermentation of Recombinant Escherichia Coli for L-Malic Acid Production)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库工程科技I辑 (Chinese Master's Theses Full-text Database, Engineering Science I), No. 2013, 04, 15 April 2013 (2013-04-15), No. B018-88, pages 1-41	1-10

☒ 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

03 September 2020

Date of mailing of the international search report

24 September 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/127756

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106434772 A (BEIJING UNIVERSITY OF CHEMICAL TECHNOLOGY) 22 February 2017 (2017-02-22) entire document	1-10
A	CN 104694449 A (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 10 June 2015 (2015-06-10) entire document	1-10
A	CN 101255405 A (NANJING TECH UNIVERSITY) 03 September 2008 (2008-09-03) entire document	1-10
A	CN 1246155 A (LOCKHEED MARTIN ENERGY RESEARCH CORP. et al.) 01 March 2000 (2000-03-01) entire document	1-10
A	WO 2012031079 A2 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 08 March 2012 (2012-03-08) entire document	1-10
A	ZHANG, Xian et al. "L-Malate Production by Metabolically Engineered Escherichia coli." <i>APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY</i> , Vol. 77, No. 2, 19 November 2010 (2010-11-19), pp. 427-434	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/127756

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed:
- ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- ☐ on paper or in the form of an image file.
- b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13^{ter}.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
- ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13^{ter}.1(a)).
- ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13^{ter}.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/127756

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104046577	A	17 September 2014	None			
CN	106434772	A	22 February 2017	CN	106434772	B	21 May 2019
CN	104694449	A	10 June 2015	BR	PI0809400	A2	09 September 2014
				EP	2121915	A4	05 May 2010
				JP	2010531635	A	30 September 2010
				WO	2008115958	A2	25 September 2008
				ES	2389582	T3	29 October 2012
				CA	2688938	C	16 January 2018
				JP	5836342	B2	24 December 2015
				KR	20100015743	A	12 February 2010
				WO	2008115958	A3	19 February 2009
				EP	2570481	B1	26 November 2014
				EP	2121915	A2	25 November 2009
				AU	2008228948	B2	24 April 2014
				WO	2008115958	A4	09 April 2009
				JP	2014050387	A	20 March 2014
				US	2010184171	A1	22 July 2010
				ES	2527402	T3	23 January 2015
				HK	1211318	A1	20 May 2016
				JP	5546871	B2	09 July 2014
				HK	1137485	A1	23 November 2012
				BR	PI0809400	B1	04 December 2018
				MY	160694	A	15 March 2017
				AU	2008228948	A1	25 September 2008
				CN	104694449	B	22 May 2018
				CA	2688938	A1	25 September 2008
				EP	2121915	B1	08 August 2012
				EP	2570481	A1	20 March 2013
				MX	2009010154	A	12 October 2009
				CN	101688196	A	31 March 2010
				KR	101631719	B1	24 June 2016
				US	8691539	B2	08 April 2014
				CN	101688196	B	07 January 2015
CN	101255405	A	03 September 2008	CN	101255405	B	08 June 2011
CN	1246155	A	01 March 2000	CN	1121500	C	17 September 2003
				EP	1012323	A4	16 January 2002
				HU	0001997	A3	28 January 2002
				AU	6052398	A	25 August 1998
				HU	0001997	A2	28 October 2000
				EP	1012323	A1	28 June 2000
				ES	2285757	T3	16 November 2007
				CA	2278892	C	24 February 2009
				PT	1012323	E	31 May 2007
				HU	227509	B1	28 July 2011
				DE	69837607	D1	31 May 2007
				AT	360084	T	15 May 2007
				AU	724274	B2	14 September 2000
				CA	2278892	A1	06 August 1998
				BR	9806822	A	09 May 2000
				EP	1012323	B1	18 April 2007

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/127756

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				DK	1012323	T3		18 June 2007	
				WO	9833930	A1		06 August 1998	
				BR	9806822	B1		05 May 2009	
				JP	2000515389	A		21 November 2000	
				JP	3681404	B2		10 August 2005	
				DE	69837607	T2		27 December 2007	
				US	5869301	A		09 February 1999	
WO	2012031079	A2	08 March 2012	US	9187772	B2		17 November 2015	
				US	2013157330	A1		20 June 2013	
				WO	2012031079	A3		16 August 2012	

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2019/127756
A. 主题的分类 C12N 1/20(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12P 7/46(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)n 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)) CNABS, DWPI, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, Web of Science, 百度学术, Patentics: 申请人/发明人, 苹果酸, malic acid, 大肠杆菌, Escherichia coli, 富马酸还原酶, frdBC, fumarate reductase, 富马酸酶, fumB, fumarase, 乳酸脱氢酶, LDH, lactate dehydrogenase, 乙醇脱氢酶, ADH, ethanol dehydrogenase, 甲酸脱氢酶, FDH, formate dehydrogenase, 乙酰辅酶A合成酶, ACS, acyl-CoA synthetase, 酰化乙醛脱氢酶, ACDH, acyl acetaldehyde dehydrogenase, 甲醛裂合酶, FLS, formaldehyde lyase, 二羟基丙酮激酶, DHAP, dihydroxyacetone kinase, 苹果酸酶, ME, malic enzyme, 亚磷酸氧化还原酶, PTXD, phosphite oxidoreductase, 序列1-28		
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	董晓翔. "代谢工程改造Escherichia coli生产L-苹果酸." 中国优秀硕士学位论文全文数据库工程科技 I 辑., 第2017年02期, 2017年 2月 15日 (2017 - 02 - 15), B018-256号, 1-40页	1-10
A	CN 104046577 A (南京工业大学) 2014年 9月 17日 (2014 - 09 - 17) 全文	1-10
A	吴亚斌. "产L-苹果酸重组大肠杆菌的构建和发酵性能研究." 中国优秀硕士学位论文全文数据库工程科技 I 辑., 第2013年04期, 2013年 4月 15日 (2013 - 04 - 15), B018-88号, 1-41页	1-10
A	CN 106434772 A (北京化工大学) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 全文	1-10
☒ 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 2020年 9月 3日		国际检索报告邮寄日期 2020年 9月 24日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		授权官员 冯晓亮 电话号码 86-(10)-53961927

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	CN 104694449 A (佛罗里达大学研究基金公司) 2015年 6月 10日 (2015 - 06 - 10) 全文	1-10
A	CN 101255405 A (南京工业大学) 2008年 9月 3日 (2008 - 09 - 03) 全文	1-10
A	CN 1246155 A (洛克系德 马丁能量研究有限公司 等) 2000年 3月 1日 (2000 - 03 - 01) 全文	1-10
A	W0 2012031079 A2 (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 2012年 3月 8日 (2012 - 03 - 08) 全文	1-10
A	ZHANG, X. 等. "L-Malate Production by Metabolically Engineered Escherichia coli." APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY., 第77卷, 第2期, 2010年 11月 19日 (2010 - 11 - 19), 427-434页	1-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:
- a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式
- b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式 (细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式 (细则13之三. 1(b) 和行政规程第713段)
2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围 (如适用) 的所需声明。
3. 补充意见:

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2019/127756			
检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104046577	A	2014年 9月 17日	无			
CN	106434772	A	2017年 2月 22日	CN	106434772	B	2019年 5月 21日
CN	104694449	A	2015年 6月 10日	BR	PI0809400	A2	2014年 9月 9日
				EP	2121915	A4	2010年 5月 5日
				JP	2010531635	A	2010年 9月 30日
				WO	2008115958	A2	2008年 9月 25日
				ES	2389582	T3	2012年 10月 29日
				CA	2688938	C	2018年 1月 16日
				JP	5836342	B2	2015年 12月 24日
				KR	20100015743	A	2010年 2月 12日
				WO	2008115958	A3	2009年 2月 19日
				EP	2570481	B1	2014年 11月 26日
				EP	2121915	A2	2009年 11月 25日
				AU	2008228948	B2	2014年 4月 24日
				WO	2008115958	A4	2009年 4月 9日
				JP	2014050387	A	2014年 3月 20日
				US	2010184171	A1	2010年 7月 22日
				ES	2527402	T3	2015年 1月 23日
				HK	1211318	A1	2016年 5月 20日
				JP	5546871	B2	2014年 7月 9日
				HK	1137485	A1	2012年 11月 23日
				BR	PI0809400	B1	2018年 12月 4日
				MY	160694	A	2017年 3月 15日
				AU	2008228948	A1	2008年 9月 25日
				CN	104694449	B	2018年 5月 22日
				CA	2688938	A1	2008年 9月 25日
				EP	2121915	B1	2012年 8月 8日
				EP	2570481	A1	2013年 3月 20日
				MX	2009010154	A	2009年 10月 12日
				CN	101688196	A	2010年 3月 31日
				KR	101631719	B1	2016年 6月 24日
				US	8691539	B2	2014年 4月 8日
				CN	101688196	B	2015年 1月 7日
CN	101255405	A	2008年 9月 3日	CN	101255405	B	2011年 6月 8日
CN	1246155	A	2000年 3月 1日	CN	1121500	C	2003年 9月 17日
				EP	1012323	A4	2002年 1月 16日
				HU	0001997	A3	2002年 1月 28日
				AU	6052398	A	1998年 8月 25日
				HU	0001997	A2	2000年 10月 28日
				EP	1012323	A1	2000年 6月 28日
				ES	2285757	T3	2007年 11月 16日
				CA	2278892	C	2009年 2月 24日
				PT	1012323	E	2007年 5月 31日
				HU	227509	B1	2011年 7月 28日
				DE	69837607	D1	2007年 5月 31日
				AT	360084	T	2007年 5月 15日
				AU	724274	B2	2000年 9月 14日
				CA	2278892	A1	1998年 8月 6日
				BR	9806822	A	2000年 5月 9日

国际检索报告 关于同族专利的信息				国际申请号 PCT/CN2019/127756			
检索报告引用的专利文件				公布日 (年/月/日)		同族专利	
				EP	1012323	B1	2007年 4月 18日
				DK	1012323	T3	2007年 6月 18日
				WO	9833930	A1	1998年 8月 6日
				BR	9806822	B1	2009年 5月 5日
				JP	2000515389	A	2000年 11月 21日
				JP	3681404	B2	2005年 8月 10日
				DE	69837607	T2	2007年 12月 27日
				US	5869301	A	1999年 2月 9日
WO	2012031079	A2	2012年 3月 8日	US	9187772	B2	2015年 11月 17日
				US	2013157330	A1	2013年 6月 20日
				WO	2012031079	A3	2012年 8月 16日