

(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
2016 年 5 月 6 日 (06.05.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/065709 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12P 7/46 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2014/094215
- (22) 国际申请日: 2014 年 12 月 18 日 (18.12.2014)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201410599042.1 2014 年 10 月 30 日 (30.10.2014) CN
- (71) 申请人: 华东理工大学 (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。
- (72) 发明人: 李志敏 (LI, Zhimin); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。李运杰 (LI, Yunjie); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。吴辉 (WU, Hui); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。叶勤 (YE, Qin); 中国上海市徐汇区梅陇路 130 号, Shanghai 200237 (CN)。
- (74) 代理人: 上海翼胜专利商标事务所 (普通合伙) (SHANGHAI ESSEN PATENT&TRADEMARK AGENCY); 中国上海市普陀区中山北路 1958 号 2718 室, Shanghai 200063 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, 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)。

根据细则 4.17 的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则 4.17(ii))
- 关于申请人有权要求在先申请的优先权(细则 4.17(iii))
- 发明人资格(细则 4.17(iv))

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))。

(54) Title: CONSTRUCTION METHOD AND USE OF METABOLICALLY ENGINEERED E. COLI STRAINS FOR PRODUCING SUCCINIC ACID BY USING ACETIC ACID

(54) 发明名称: 利用乙酸生产丁二酸的代谢工程大肠杆菌菌株构建方法和应用

(57) Abstract: Disclosed are the construction method and application of metabolically engineered E. coli strains for producing succinic acid by using acetic acid, wherein succinic acid is produced from the metabolically engineered modified E. coli by fermentation using acetic acid as a raw material, and the transformation pathway is blocking the TCA cycle, and/or blocking the succinic acid utilization pathway, and/or enhancing the acetic acid uptake and oxaloacetate supply, strengthening the glyoxylate cycle, and/or deleting the by-product formation pathway, and/or reducing the ineffective circulation caused by the producing acetic acid from pyruvic acid through decarboxylation, and/or dredging the acetyl CoA node metabolic flux. Through analysis of the metabolic pathways and regulation thereof, E. coli strains are modified by using genetic engineering pathways, and the obtained strains are able to produce succinic acid in a culture medium using acetic acid as the carbon source, with no by-product produced.

(57) 摘要: 一种利用乙酸生产丁二酸的代谢工程大肠杆菌菌株的构建方法和应用, 代谢工程改造的大肠杆菌使用乙酸为原料发酵生产丁二酸, 其改造途径为阻断 TCA 循环, 并和/或阻断丁二酸利用途径, 并和/或增强乙酸摄取和草酰乙酸供给, 强化乙醛酸循环, 和/或缺失副产物生成途径, 和/或减少从丙酮酸脱羧生产乙酸引起的无效循环, 和/或疏导乙酰 CoA 节点代谢流。通过对代谢途径和调控的分析, 利用基因工程手段对大肠杆菌进行了改造, 获得的菌株在以乙酸为碳源的培养基中, 能够产生丁二酸, 且没有副产物产生。



WO 2016/065709 A1

利用乙酸生产丁二酸的代谢工程大肠杆菌菌株构建方法和应用

技术领域

本发明属于生物工程技术领域，更具体地讲，涉及构建利用乙酸生产丁二酸的重组大肠杆菌菌株，以及通过乙酸为主要原料利用该代谢工程大肠杆菌发酵合成丁二酸。

背景技术

丁二酸，又名琥珀酸，是一种四碳二羧酸，广泛应用于农业、食品及医药行业。丁二酸是许多重要工业化学品的前体，包括己二酸，1,4-丁二醇，四氢呋喃，N-甲基吡咯烷酮，2-吡咯烷酮，丁二酸盐及 γ -丁内酯。还可用于合成可生物降解的聚合物聚丁二酸丁二醇酯（PBS）及聚酰胺聚合物（Nylon®x,4）。目前，商业用丁二酸已经由液化石油气或矿物油经化学合成生产，转变为生物发酵生产（Catal. Today (2014), <http://dx.doi.org/10.1016/j.cattod.2014.05.035>），利用可再生资源通过生物发酵法生产丁二酸比石油炼制更具经济和社会效益，因此受到广泛关注（Enzyme and microbial technology, 2006, 39(3): 352-361）。

丁二酸生产菌株主要为产丁二酸厌氧螺菌 *Anaerobiospirillum succiniciproducens*，产丁二酸放线杆菌 *Actinobacillus succinogenes*，曼海姆产丁二酸菌 *Mannheimia succiniciproducens*，重组大肠杆菌 *Escherichia coli*，酿酒酵母 *Saccharomyce scerevisiae*（Metab Eng, 2010, 12(6): 518-525），谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum*（PLoS One, 2013, 8(4): e60659）等。其中大肠杆菌由于基因遗传背景清楚，基因操作简单，同时发酵底物多为可再生资源，如葡萄糖，木糖，甘油，麦草、玉米秸秆等木质纤维素，木薯、菊芋等淀粉类物质，而更具有工业价值。

利用重组大肠杆菌发酵丁二酸的生产，大量工作针对葡萄糖的代谢途径改造，包括在好氧和厌氧条件下葡萄糖到丁二酸的代谢流引导。San等（Biotechnol Bioeng, 2005, 90(6): 775-779）构建的大肠杆菌HL27658k(pKK313)，阻断TCA循环，切除副产物形成途径，解除乙醛酸支路阻遏，实现葡萄糖好氧转化积累丁二酸58.3g/L，得率为 $0.94 \pm 0.07 \text{ mol/mol}$ 葡萄糖，生产强度为 $1.08 \pm 0.06 \text{ g/(L·h)}$ 。Zhao等（Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(12): 1461-1475）

构建的大肠杆菌E2- Δ *sdh-ppc-sucAB*，阻断TCA循环和过表达磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶、琥珀酰辅酶A合成酶的改造下，在甘油基本盐培养基中，丁二酸的最大体积生产速率和平均体积生产速率分别为19.2和6.55mM h⁻¹。

乙酸主要由甲醇的羰基化制备，即甲醇和一氧化碳制备，是一种大量而廉价的碳源，同时也是木质纤维素材料酸水解中形成的主要副产物之一。乙酸是许多微生物厌氧代谢的终产物和有氧代谢的不完全氧化产物，大肠杆菌可以好氧代谢乙酸进行生长，并且以乙酸为唯一碳源好氧生长时，乙醛酸支路和糖异生途径的关键酶活性会得到显著提高，有利于随后进行葡萄糖到丁二酸的厌氧转化（Applied and Environmental Microbiology, 2007, 73(24): 7837-7843.）。但是目前为止尚未有采用乙酸作为碳源直接生物合成丁二酸的研究报道。本发明从增强底物摄取、阻断下游分解代谢和疏导代谢流等多方面对大肠杆菌进行改造，使其能够直接利用乙酸为碳源生产丁二酸。

发明内容

本发明的第一个目的在于提供一种利用乙酸生产丁二酸的代谢工程大肠杆菌菌株的构建方法。

本发明的第二个目的在于提供一种代谢工程大肠杆菌菌株。

本发明的第三个目的在于提供一种代谢工程大肠杆菌菌株在生产丁二酸中的应用。

本发明的第四个目的在于提供一种利用代谢工程大肠杆菌菌株生产丁二酸的方法。

为实现以上目的，本发明公开以下技术方案：一种利用乙酸生产丁二酸的代谢工程大肠杆菌菌株的构建方法，其特征在于，代谢工程改造的大肠杆菌使用乙酸为原料发酵生产丁二酸，其改造途径为缺失丁二酸脱氢酶复合物基因以阻断 TCA 循环，并和/或缺失琥珀酰 CoA 生成途径关键基因以阻断丁二酸利用途径，并和/或过表达乙酸摄取基因、和/或缺失乙醛酸循环和 TCA 循环的调节基因、和/或过表达乙醛酸循环和 TCA 循环关键酶基因以增强乙酸摄取和草酰乙酸供给，强化乙醛酸循环，和/或减少苹果酸的脱羧反应以缺失副产物生成途径，和/或减少从丙酮酸脱羧生产乙酸引起的无效循环，和/或缺失乳酸和乙

醇生产途径中关键基因以疏导乙酰 CoA 节点代谢流。

作为一个优选方案，其改造途径为：至少包括

(1) 缺失 *sdhAB*

以及以下途径中的一种或几种：

(2) 缺失 *sucABCD* 和/或 *fumC*；

(3) 过表达 *acs* 和/或 *ackA*；

(4) 缺失 *iclR*、*fadR* 和/或 *arcA*；

(5) 过表达 *gltA* 和/或 *aceA* 和/或 *acnB*；

(6) 缺失 *sfcA* 和/或 *maeB*；

(7) 缺失 *poxB*；

(8) 缺失 *adhE* 和/或 *ldhA*。

作为一个优选方案，其改造途径为：缺失 *sdhAB*，缺失 *iclR* 和过表达 *gltA*。

作为一个优选方案，其改造途径为：缺失 *sdhAB*，缺失 *iclR*，缺失 *maeB*，过表达 *gltA*。

作为一个优选方案，其改造途径为：缺失 *sdhAB*，缺失 *iclR*，缺失 *maeB*，过表达 *aceA* 和过表达 *gltA*。

作为一个优选方案，其改造途径为：缺失 *sdhAB*，缺失 *iclR*，缺失 *maeB*，过表达 *acs* 和过表达 *gltA*。

作为一个优选方案，其改造途径为：缺失 *sdhAB*，缺失 *iclR*，缺失 *maeB*，过表达 *aceA*，过表达 *acs* 和过表达 *gltA*。

为实现本发明第二个目的，本发明公开以下技术方案：利用上述构建方法得到的代谢工程大肠杆菌菌株。

为实现本发明第三个目的，本发明公开以下技术方案：利用上述构建方法得到的代谢工程大肠杆菌菌株在生产丁二酸中的应用。

为实现本发明第四个目的，本发明公开以下技术方案：一种利用上述代谢工程大肠杆菌菌株生产丁二酸的方法，其特征在于，利用以乙酸为主要碳源的大肠杆菌常用培养基，发酵代谢工程大肠杆菌，得到丁二酸。

本发明构建高效利用乙酸生产丁二酸的代谢工程大肠杆菌，即根据已有信

息对大肠杆菌途径进行分析,利用基因工程手段对大肠杆菌基因进行改造,并对其代谢情况进行分析,获得好氧条件下能够以乙酸作为碳源生产丁二酸的代谢工程大肠杆菌,并利用改造后的代谢工程菌株以乙酸为原料生产丁二酸。

本发明的方法:(1)采用分子生物学手段,对乙酸摄取途径和乙醛酸循环进行加强,分别使用载体 pTrc99a 和 pBAD33 表达乙醛酸循环关键酶基因 *gltA*、*aceA*、*acnB* 和乙酸摄取基因 *acs* 和 *ackA*; (2)利用 red 基因重组技术获得基因 *sdhAB*、*iclR*、*arcA*、*ldhA*、*sfcA*、*maeB*、*sucABCD*、*poxB*、*adhE*、*fadR* 和 *fumC* 等单缺失或组合缺失的宿主大肠杆菌;组合(1)和(2)构建丁二酸生产大肠杆菌。

本发明是以野生型大肠杆菌或已有其他改造的菌株为出发菌株(实施例用的是野生型菌株为出发菌株),一方面缺失丁二酸脱氢酶复合物基因 *sdhAB*,阻断 TCA 循环以达到积累丁二酸的目的。乙酸进入细胞后被转化为乙酰辅酶 A,乙酰辅酶 A 通过 TCA 循环和乙醛酸循环两种途径被代谢。故而可以选择进一步缺失乙醛酸循环和 TCA 循环的调节基因 *iclR*、*arcA*,和或过表达 *aceA*、*gltA*、*acnB*。缺失 *sfcA* 和 *maeB* 可以减少苹果酸的脱羧反应,维持草酰乙酸的供给。缺失 *poxB* 来减少从丙酮酸脱羧生产乙酸引起的无效循环。同时,缺失乳酸和乙醇的副产物产生途径。本发明的另一方面是增强乙酸利用途径的通量。乙酸通过乙酰辅酶 A 合成酶和 *ack-pta* 两种途径被利用,研究过表达 *acs* 和 *ackA* 对大肠杆菌代谢乙酸的影响。

本发明的优点在于:本发明通过对代谢途径和调控的分析,利用基因工程手段对大肠杆菌进行了改造,获得的菌株在以乙酸为碳源的培养基中,能够产生丁二酸,且没有副产物产生。

具体实施方式

下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如 J.萨姆布鲁克(Joseph Sambrook)等编写的《分子克隆实验指南》

中所述的条件，或按照制造厂商所推荐的条件进行实验。

本发明通过代谢途径分析，为了加强乙酸的利用，需要对乙酸摄取途径进行改造。采用 pBAD33 作为载体过表达 *acs* 及 *ackA*，使用酶切位点进行连接。

由于乙酸主要通过乙醛酸循环进行代谢，需要加强流向乙醛酸循环的代谢通量。一方面，需要敲除乙醛酸循环及 TCA 循环的调节基因，解除调节基因对代谢流的抑制，即敲除 *iclR*、*fadR*、*arcA*。另一方面，过表达乙醛酸循环及 TCA 循环的关键基因，即过表达 *gltA*、*aceA* 和 *acnB*，采用 pTrc99a 作为载体，使用酶切位点进行连接。

琥珀酸的高效积累，需要阻断 TCA 循环，即敲除基因 *sdhAB*、*fumC*。另外，还需阻断琥珀酸的有氧降解途径，即琥珀酰 CoA 生成途径，故敲除 *sucABCD*。

为减少苹果酸的脱羧反应，维持草酰乙酸的供给，缺失 *sfcA* 和 *maeB*。

避免由丙酮酸脱羧生成乙酸，形成无效循环，缺失 *poxB*。

敲除可能的代谢副产物途径，使代谢流流向目标产物，同时避免代谢副产物的生成，节约下游分离成本，故而敲除乳酸和乙醇产生途径中的关键基因 *ldhA* 和 *adhE*。

上述 1-8 项中每一项均作为改造的方向，但每一项中不是全部进行改造。多种组合仅是为了提高生产效率和产量。

采用 Red 基因重组的方法构建基因缺失重组大肠杆菌（Folia Microbiologica, 2011, 56(3): 253-263）。使用带有目的基因 50bp 同源臂的引物，以 pKD4 或相应基因的单缺失菌为模板扩增两侧带有 FRT 位点的 *kan* 抗性基因片段。宿主菌中转入辅助质粒 pKD46，30℃ 下以 L-阿拉伯糖诱导表达协助同源重组的 *exo*、*bet*、*gam* 基因，42℃ 下培养一段时间质粒丢失。电转化促使基因发生同源重组，将目的基因替换为 *kan* 抗性基因。最后转入高温诱导表达翻转酶重组酶(FLP)的质粒 pCP20，消除染色体上同源重组的抗性基因，该质粒是温度敏感型氨苄青霉素和氯霉素抗性质粒，42℃ 时诱导 FLP 酶的产生，同时质粒丢失。

实施例 1. 敲除基因以获得丁二酸生产菌株

采用 red 重组技术敲除基因 *sdhAB*、*iclR*、*arcA*、*ldhA*、*sfcA*、*maeB*、*sucABCD*、*poxB*、*adhE*、*fumC*、*fadR*。具体操作如下：

对于基因 *sdhAB* 的敲除，首先用序列为 SEQ ID NO:1 的引物 1 (F-*sdhAB*) 和序列为 SEQ ID NO:2 的引物 2 (R-*sdhAB*)，以 pKD4 为模板 PCR 克隆约 1700bp 的 DNA 片段。宿主菌中钙转化导入质粒 pKD46，以氨苄青霉素筛选重组子。导入 pKD46 的重组菌 30°C 培养至 OD₆₀₀ 约为 0.3 时，加入 L-阿拉伯糖诱导 1 小时，然后使用 10% 的甘油制备电转感受态。电转化采用细菌模式 1 (1.8KV, 5ms) 进行。使用卡那霉素筛选发生同源重组的转化子。随后使用序列为 SEQ ID NO:3 的引物 3 (F-*sdhAB-check*) 和序列为 SEQ ID NO:4 的引物 4 (R-*sdhAB-check*) 进行菌落 PCR，敲除成功的转化子与野生菌 PCR 得到的目的片段大小有差异，能够初步判定是否重组成功。PCR 产物送测序，野生菌 PCR 基因条带与 *sdhAB* 基因序列相同，而重组菌 PCR 基因条带中间部分与 *kan* 基因序列相同，则证明基因确实敲除成功。

sdhAB 敲除成功的重组菌，37°C 培养 5-6 小时后，转入 42°C 培养过夜，分离单菌落，然后验证抗性。只有卡那霉素抗性无氨苄青霉素抗性的为 pKD46 已消除的菌落。然后在该菌中转入质粒 pCP20，30°C 培养一段时间后，转入 42°C 培养过夜，分离单菌落，然后验证抗性。挑取只在无抗性平板上生长，而卡那霉素抗性平板和氨苄青霉素抗性平板上均不生长的菌落进行鉴定。使用序列为 SEQ ID NO:3 的引物 3 (F-*sdhAB-check*) 和序列为 SEQ ID NO:4 的引物 4 (R-*sdhAB-check*) 进行菌落 PCR，抗性消除成功的转化子与野生菌 PCR 得到的目的片段大小有明显差异，能够判定抗性基因是否消除重组成功。

对于 *iclR*、*arcA* 基因，按照上述方法依次敲除，所用引物见表 3。基因敲除后获得的菌株见表 1。

对于基因 *maeB* 的敲除，从 CGSC (<http://cgsc.biology.yale.edu/index.php>) 菌种库中查找相的单基因缺失菌，得到菌株 JW2447-5。然后使用序列为 SEQ ID NO:13 的引物 13 (F-*maeB-check*) 和序列为 SEQ ID NO:14 的引物 14 (F-*maeB-check*)，以 JW2447-5 全基因组为模板，PCR 克隆卡那霉素抗性基因。其他感受态制备、电转化及菌株筛选方法同基因 *sdhAB* 敲除方法。

基因 *ldhA*、*adhE*、*fumC*、*fadR*、*sfcA*、*sucABCD*、*poxB* 的敲除，与基因 *maeB* 的敲除方法相同，所用引物见表 3。基因敲除后获得的菌株见表 1。

实施例 2. 过表达乙醛酸循环关键酶基因 *gltA*、*aceA* 和 *acnB*。

大肠杆菌来源的柠檬酸合成酶基因 *gltA* 使用质粒 pTrc99a 过量表达。首先使用序列为 SEQ ID NO:29 的引物 35 (pTrc99a-*gltA*-F (BamH1)) 和序列为 SEQ ID NO:30 的引物 36 (pTrc99a-*gltA*-R-Hind3)，以大肠杆菌 MG1655 为模板 PCR 克隆带有酶切位点的 *gltA* 基因。然后使用 BamH I 和 HindIII 对 pTrc99a 和 PCR 回收的目的片段双酶切，酶切产物回收后，使用 T4 连接酶 16°C 连接。然后钙转化进入目的菌株中。使用氨苄青霉素抗性筛选构建成功的重组菌。蛋白电泳确定蛋白是否表达。表达正确的菌株抽质粒，送测序，记为 pTrc99a-*gltA*。

aceA 及 *acnB* 的过量表达同样使用质粒 pTrc99a。方法同上，分别记为 pTrc99a-*aceA*、pTrc99a-*acnB*。

gltA 分别与 *aceA*、*acnB* 串联表达时，以酶切位点进行连接，得到的质粒分别记为 pTrc99a-*aceA-gltA*、pTrc99a-*acnB-gltA*。

过表达 *acs* 及 *ackA* 采用载体 pBAD33，该质粒能与 pTrc99a 同时存在于大肠杆菌中。重组质粒的构建方法同上。构建成功的质粒见表 2。

表 1 菌种

菌种编号	基因型
MG1655	wild type
MG01	MG1655 Δ <i>sdhAB</i> :: <i>Km^R</i>
MG02	MG1655 Δ <i>sdhABAiclR</i> :: <i>Km^R</i>
MG022	MG1655 Δ <i>sdhABAfadR</i> :: <i>Km^R</i>
MG023	MG1655 Δ <i>sdhABAarcA</i> :: <i>Km^R</i>
MG024	MG1655 Δ <i>sdhABAfumC</i> :: <i>Km^R</i>
MG03	MG1655 Δ <i>sdhABAiclR</i> Δ <i>arcA</i> :: <i>Km^R</i>
MG032	MG1655 Δ <i>sdhABAiclR</i> Δ <i>maeB</i> :: <i>Km^R</i>
MG033	MG1655 Δ <i>sdhABAiclR</i> Δ <i>sfcA</i> :: <i>Km^R</i>
MG04	MG1655 Δ <i>sdhABAiclR</i> Δ <i>maeB</i> Δ <i>arcA</i> :: <i>Km^R</i>
MG042	MG1655 Δ <i>sdhABAiclR</i> Δ <i>maeB</i> Δ <i>poxB</i> :: <i>Km^R</i>

MG043	MG1655 <i>AsdhABAiclRΔmaeBΔadhE::Km^R</i>
MG044	MG1655 <i>AsdhABAiclRΔmaeBΔldhA::Km^R</i>
MG05	MG1655 <i>AsdhABAiclRΔmaeBΔpoxBΔarcA::Km^R</i>
MG06	MG1655 <i>AsdhABAiclRΔmaeBΔpoxBΔldhAΔadhE::Km^R</i>

表 2 质粒

质粒	基因型
pTrc99a	Cloning vector, Ap ^R
pBAD33	Cloning vector, Cm ^R
pTrc99a- <i>gltA</i>	<i>E. coli gltA</i> in pTrc99a, Ap ^R
pTrc99a- <i>aceA</i>	<i>E. coli aceA</i> in pTrc99a, Ap ^R
pTrc99a- <i>acnB</i>	<i>E. coli acnB</i> in pTrc99a, Ap ^R
pTrc99a- <i>aceA-gltA</i>	<i>E. coli gltA</i> and <i>aceA</i> in pTrc99a, Ap ^R
pTrc99a- <i>acnB-gltA</i>	<i>E. coli gltA</i> and <i>acnB</i> in pTrc99a, Ap ^R
pBAD- <i>acs</i>	<i>E. coli acs</i> in pBAD33, Cm ^R
pBAD- <i>ackA</i>	<i>E. coli ackA</i> in pBAD33, Cm ^R
pBAD- <i>acs-ackA</i>	<i>E. coli acs</i> and <i>ackA</i> in pBAD33, Cm ^R

表 3 引物列表

引物名称	序列 (from 5' to 3')	序列标号
F- <i>sdhAB</i>	ATGAAATTGCCAGTCAGAGAATTTGATGC	SEQ ID NO:1
	AGTTGTGATTGGTGCCGGTGCGCTCTTGAG	
	CGATTGTGTAG	
R- <i>sdhAB</i>	TTACGCATTACGTTGCAACAACATCGACTT	SEQ ID NO:2
	GATATGGCCGATGGCGCGCGGATGTAACG	
	CACTGAGAAGC	
F- <i>sdhAB</i> -check	GCATGTGGCAGGTGTTGA	SEQ ID NO:3
R- <i>sdhAB</i> -check	TACGGGTAATGACTTGTAGGC	SEQ ID NO:4
F- <i>iclR</i>	GAAAACCCGCCGTTGCCACCGCACCAGCG	SEQ ID NO:5
	ACTGGACAGGTTTCAGTCTTTACGTCTTGAG	
	CGATTGTGTAG	
R- <i>iclR</i>	CAGCGCATTCCACCGTACGCCAGCGTCACT	SEQ ID NO:6
	TCCTTCGCCGCTTTAATCACGATGTAACGC	

	ACTGAGAAGC	
F- <i>iclR</i> -check	CTCATCGGATCAGTTCAGTA	SEQ ID NO:7
R- <i>iclR</i> -check	TAATGCTTTGTGTACTGCCC	SEQ ID NO:8
	ATGCAGACCCCGCACATTCTTATCGTTGAA	
F- <i>arcA</i>	GACGAGTTGGTAACACGCAACGTCTTGAG	SEQ ID NO:9
	CGATTGTGTAG	
	TTAATCTTCCAGATCACCGCAGAAGCGAT	
R- <i>arcA</i>	AACCTTCACCGTGAATGGTGGGATGTAAC	SEQ ID NO:10
	GCACTGAGAAGC	
F- <i>arcA</i> -check	GATTTAGTTGGCAATTTAGG	SEQ ID NO:11
R- <i>arcA</i> -check	AGTTACAACGGACGATGAG	SEQ ID NO:12
F- <i>maeB</i> -check	CAGGCATGGTATTGCTGGAT	SEQ ID NO:13
R- <i>maeB</i> -check	TTCGCTGTGGTGCATAAACT	SEQ ID NO:14
F- <i>fumC</i> -check	ATAAACAGAGCCGCCCTTCG	SEQ ID NO:15
R- <i>fumC</i> -check	ACACGCCTGCCCTACACCAC	SEQ ID NO:16
F- <i>ldhA</i> -check	GGCATGTTTAACCGTTCAGT	SEQ ID NO:17
R- <i>ldhA</i> -check	AACGCGGCTACTTTCTTCAT	SEQ ID NO:18
F- <i>adhE</i> -check	CCTGGAAGTGACGCATTAGA	SEQ ID NO:19
R- <i>adhE</i> -check	GCAGATCATTGAGAAGTGGC	SEQ ID NO:20
F- <i>fadR</i> -check	AGGCAGGAGTGAGGCAAGT	SEQ ID NO:21
R- <i>fadR</i> -check	AGACGGCAGCATCGAGTT	SEQ ID NO:22
F- <i>sfcA</i> -check	CCTCAATGACGATTAAACAC	SEQ ID NO:23
R- <i>sfcA</i> -check	CCTTCATAGTTCCTCCTTTT	SEQ ID NO:24
F- <i>poxB</i> -check	TGGTTCTCGCATAATCGC	SEQ ID NO:25
R- <i>poxB</i> -check	CTCCGTAAACGTCGTCCC	SEQ ID NO:26
F- <i>sucA</i> -check	CGCATCAGGCGTAACAAA	SEQ ID NO:27
R- <i>sucA</i> -check	CTTCCAGAACCGCATCCA	SEQ ID NO:28
F- <i>sucB</i> -check	TGAAGTGATTCCGTTTGGG	SEQ ID NO:29
R- <i>sucB</i> -check	ATCAGGCATCGCTTGTCG	SEQ ID NO:30
F- <i>sucC</i> -check	CACCAATGTAGGTCGGATAA	SEQ ID NO:31
R- <i>sucC</i> -check	CGTAGATAACAGAAGCGGTAG	SEQ ID NO:32
F- <i>sucD</i> -check	GGTAGCAGAAGTGGGTGTT	SEQ ID NO:33

R- <i>sucD</i> -check	GTTGATGGTCGGGTGTTT	SEQ ID NO:34
pTrc99a- <i>gltA</i> -F (<i>Bam</i> H1)	TTAGGATCCAAGGAGATATAATGGCTGAT ACAAAAGCAAA	SEQ ID NO:35
pTrc99a- <i>gltA</i> -R (<i>Hind</i> 3)	CGCAAGCTTTTAACGCTTGATATCGCTTTT A	SEQ ID NO:36
pTrc99a- <i>aceA</i> -F(<i>Eco</i> R1)	TTAGAATTCAAGGAGATATACCATGAAAA CCCGTACACAACA	SEQ ID NO:37
pTrc99a- <i>aceA</i> -R(<i>Bam</i> H1)	CGCGGATCCTTAGAACTGCGATTCTTCAG	SEQ ID NO:38
pTrc99a- <i>acnB</i> -F(<i>Nco</i> I)	GGGCCATGGAAGGAGATATAGTGCTAGAA GAATACCGTAAGCA	SEQ ID NO:39
pTrc99a- <i>acnB</i> -R(<i>Bam</i> H1)	CCCGGATCCTTAAACCGCAGTCTGGAAAA TCAC	SEQ ID NO:40
pBAD33- <i>acs</i> -F(<i>Sac</i> I)	TAAGAGCTCAAGGAGATATACCATGAGCC AAATTCACAAACA	SEQ ID NO:41
pBAD33- <i>acs</i> -R(<i>Sal</i> I)	CCCGTCGACTTACGATGGCATCGCGATAG	SEQ ID NO:42
pBAD33- <i>ackA</i> -F(<i>Sal</i> I)	CCCGTCGACAAGGAGATATACCATGTCTGA GTAAGTTAGTACT	SEQ ID NO:43
pBAD33- <i>ackA</i> -R(<i>Hind</i> 3)	CTTAAGCTTTCAGGCAGTCAGGCGGCTCG	SEQ ID NO:44

实施例 3.产丁二酸菌株复合培养基摇瓶发酵

以大肠杆菌 MG1655 为出发菌株，敲除基因 *sdhAB*，阻断 TCA 循环，得到产琥珀酸基础菌株 MG01。

在单缺失菌 MG01 的基础上，分别敲除基因 *iclR*、*fadR*、*arcA* 和 *fumC*，获得菌株 MG02、MG022、MG023、MG024。经比较发现，MG02 效果最优，故接下来以 MG02 为出发菌株。

在双缺失菌 MG02 的基础上，验证阻断补给途径和激活 TCA 循环对发酵产琥珀酸的影响，故又分别敲除基因 *arcA*、*maeB*、*sfcA*，获得菌株 MG03、MG032、MG033。发酵结果表明，MG032 效果最优，故以 MG032 为基础进行后续改造。

为了解缺失副产物生成途径对琥珀酸发酵的影响，又进一步敲除了基因 *poxB*、*adhE*、*ldhA*，获得菌株 MG042、MG043、MG044。由于基因 *arcA* 显著影响琥珀酸对乙酸的得率，故在菌株 MG032 中敲除了 *arcA*，构建了菌株 MG04。

在 MG042 的基础上敲除基因 *arcA*，得到菌株 MG05，敲除基因 *adhE* 和 *ldhA*

得到菌株 MG06。

上述菌株构建完成后，保存于甘油中（25% v/v）。并应用构建完成的各种质粒转化各缺失菌株，获得过表达各基因的重组菌。摇瓶发酵验证各菌株的发酵性能。

使用添加 10 g/l 乙酸钠的 LB 培养基于 250 ml 摇瓶中培养以评价重组菌的性能。培养温度 37 °C，转速 200 rpm。装液量 50 ml。根据需要加入卡那霉素或者氨苄青霉素。带有重组质粒的菌株，培养 2 小时（OD₆₀₀ 约为 0.4-0.6）后，加入 1mM IPTG 诱导。

培养结束后取样，12000 rpm 离心 10 分钟分离菌体和上清。发酵液上清适当稀释后，经 0.22 μ m 微孔膜过滤，采用日本岛津高效液相色谱仪监测发酵液上清中的有机酸。色谱柱为 BioRadAminex HPX-87 离子色谱柱（300 mm*7.8mm），配有 UV 检测器和示差折光检测器。流动相为 5mM 的 H₂SO₄，流速 0.6 ml/min，柱温 65 °C。

生物量的测定采用分光光度计法测定 600nm 下的吸光值。

该培养条件下野生菌 MG1655 消耗 7.11g/l 乙酸，没有琥珀酸产生。

该培养条件下菌株 MG1655 pTrc99a-*gltA*，没有琥珀酸产生。

该培养条件下菌株 MG02 消耗 0.76 g/l 乙酸，生成 0.01 g/l 丁二酸，得率为 0.01 mol/mol 乙酸。

而该培养条件下菌株 MG02/pTrc99a-*gltA* 消耗 3.31 g/l 乙酸，生成 0.85 g/l 丁二酸，得率为 0.131 mol/mol 乙酸。

表 4 不同菌种复合培养基摇瓶发酵结果

菌种	发酵周期	发酵结束	乙酸消耗	丁二酸	得率
	h	OD ₆₀₀	g/l	g/l	mol/mol
MG1655	36.0	6.33±0.20	7.11±0.10	ND	0.000±0.000
MG1655 pTrc99a- <i>gltA</i>	36.0	7.68±0.06	6.92±0.89	ND	0.000±0.000
MG02	47.5	4.57±0.10	0.76±0.19	0.01±0.00	0.007±0.001
MG02 pTrc99a- <i>gltA</i>	47.5	5.59±0.07	3.31±0.26	0.85±0.05	0.131±0.020

ND：未检测到产物。

实施例 4. 乙酸生物转化生产丁二酸

为了提高琥珀酸的生产速率，采用生物转化法摇瓶培养验证各菌株发酵性

能。具体操作如下：

保存在甘油管中的种子接种与装有 3ml LB 的试管中培养过夜，然后转接到装有 50ml LB 培养基的锥形瓶中，接种量 2%，含有质粒的菌株培养约 2 小时加入 1mM IPTG 诱导（或转接于含 10 g/l 葡萄糖的 M9 培养基中，接种量 4%，培养 5 小时后加入 1mM IPTG 诱导）。诱导 5 小时后，8000 rpm 离心 10 min 收集菌体。基本盐培养基洗涤一次。菌体重悬于不含氮源的 M9 培养基（即培养基中不添加氯化铵）中，碳源为 5-10 g/l 的乙酸钠。培养基中根据需要加入适当的抗生素和 IPTG。培养条件均为 37 °C，220 rpm。

M9培养基组成为（每升）： $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 15.12 g， KH_2PO_4 3 g，NaCl 0.5 g， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g， CaCl_2 0.011 g，氯化铵 1 g，1%维生素B₁ 0.2 mL以及微量元素(TE)混合液0.2 mL。微量元素(TE)混合液组成为（每升）： $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.0g， $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 80g， $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 10g， $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.0g， CoCl_2 4.0g， $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0g， H_3BO_3 0.5g， $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10g。

有机酸的测定方法及生物量的测定同实施例 3。

摇瓶发酵结果如表 5、6 所示。

由表 5 可见，以 LB 培养菌体进行转化实验时，野生型大肠杆菌 MG1655 只产生 0.024g/l 琥珀酸，得率仅为 0.003mol/mol 乙酸。

经过改造，单敲除基因 *sdhAB* 得到的菌株 MG01，琥珀酸产量上升至 0.16g/l，得率上升至 0.047 mol/mol 乙酸。敲除基因 *sdhAB* 和 *iclR* 得到的双缺失菌株 MG02，琥珀酸的产量有轻微上升，为 0.19g/l，得率没有明显改变。

而三缺失菌株 MG032，即在 MG02 基础上进一步敲除基因 *maeB* 获得的菌株，消耗 1.98 g/l 乙酸，生成 0.75 g/l 琥珀酸，产量提高 30 倍，得率达到 0.194 mol/mol 乙酸。

在 MG032 的基础上，进一步敲除基因 *poxB* 得到菌株 MG042，相比野生菌 MG1655，琥珀酸的产量和得率均有明显上升，分别为 0.67g/l 和 0.169mol/mol，但是并没有优于菌株 MG032。

五缺失菌株 MG05 的生长受到明显的抑制，琥珀酸的产量为 0.42g/l，而得率明显上升，为 0.421mol/mol 乙酸，接近理论得率 0.5mol/mol。

在菌株 MG02 的基础上, 表达柠檬酸合成酶基因 *gltA*, 获得菌株 MG02 pTrc99a-*gltA* (见表 6), 该菌株消耗 1.9 g/l 乙酸, 生成 0.80 g/l 琥珀酸, 相对于野生菌 MG1655, 产量提高了 33.3 倍, 得率进一步提高到 0.214 mol/mol 乙酸。

优化组合 MG032 pTrc99a-*gltA*, 消耗 2.7 g/l 乙酸, 生成 1.50g/l 琥珀酸, 得率为 0.283 mol/mol 乙酸。

优化组合 MG032 pTrc99a-*aceA-gltA*, 消耗 3.5 g/l 乙酸, 生成 2.2g/l 琥珀酸, 得率为 0.320 mol/mol 乙酸。

优化组合 MG032 pTrc99a-*aceA-gltA* pBAD-*acs*, 消耗 3.6 g/l 乙酸, 生成 2.6g/l 琥珀酸, 得率为 0.367 mol/mol 乙酸。

其他菌株发酵结果见表 5、6。

除了使用 LB 为培养基培养菌体外, 还可使用以葡萄糖为碳源的基本盐培养基培养菌体。发酵结果如表 7 所示。

此培养条件下, 菌株 MG02 pTrc99a-*gltA* 消耗乙酸 2.34g/l, 产生琥珀酸 0.84g/l, 得率为 0.184mol/mol。菌株 MG02 pTrc99a-*gltA* 消耗乙酸 1.53g/l, 产生琥珀酸 0.97g/l, 得率为 0.322mol/mol。

综上所述, 获得的重组大肠杆菌能够以乙酸为碳源生产丁二酸。

表 5 以 LB 培养菌体进行转化实验摇瓶结果 1

菌种	发酵周期 h	发酵结束 OD600	乙酸消耗 g/l	丁二酸 g/l	得率 mol/mol
MG1655	24	6.32±0.15	3.87±0.00	0.024±0.00	0.003±0.000
MG01	24	5.15±0.10	1.76±0.04	0.16±0.00	0.047±0.002
MG02	24	5.66±0.06	2.07±0.05	0.19±0.01	0.047±0.002
MG022	24	4.22±0.02	1.8±0.03	0.11±0.00	0.031±0.002
MG023	24	4.00±0.02	1.51±0.02	0.13±0.00	0.044±0.006
MG024	24	4.23±0.02	1.77±0.01	0.14±0.00	0.040±0.001
MG03	40	3.01±0.02	1.59±0.09	0.31±0.00	0.098±0.007
MG032	24	5.25±0.01	1.98±0.01	0.75±0.01	0.194±0.003
MG033	24	4.70±0.02	2.00±0.00	0.44±0.00	0.112±0.002
MG04	24	4.30±0.03	1.50±0.03	0.30±0.01	0.102±0.005
MG042	24	4.70±0.03	2.03±0.01	0.67±0.01	0.169±0.002
MG043	24	4.59±0.02	2.01±0.02	0.50±0.01	0.126±0.001
MG044	24	4.61±0.03	2.00±0.03	0.45±0.01	0.114±0.002
MG05	24	2.69±0.01	0.499±0.00	0.42±0.00	0.421±0.000
MG06	24	4.60±0.03	2.05±0.03	0.60±0.03	0.149±0.002

表 6 以 LB 培养菌体进行转化实验摇瓶结果 2

菌种	发酵周期 h	发酵结束 OD ₆₀₀	乙酸消耗 g/l	丁二酸 g/l	得率 mol/mol
MG02 pTrc99a-gltA	40.5	3.17±0.06	1.90±0.05	0.80±0.07	0.214±0.029
MG02 pTrc99a-aceA	40.5	3.00±0.01	2.00±0.05	0.30±0.03	0.076±0.001
MG02 pTrc99a-acnB	40.5	3.20±0.03	1.80±0.04	0.35±0.04	0.099±0.027
MG02 pTrc99a-aceA-gltA	40.5	3.00±0.02	2.30±0.05	0.81±0.01	0.179±0.001
MG02 pTrc99a-acnB-gltA	40.5	2.89±0.01	2.30±0.02	0.79±0.10	0.175±0.005
MG02 pBAD-acs	40.5	2.30±0.01	0.70±0.01	0.20±0.01	0.145±0.001
MG02 pBAD-ackA	40.5	2.10±0.06	0.62±0.05	0.21±0.02	0.172±0.004
MG02 pBAD-acs-ackA	40.5	1.80±0.04	0.50±0.04	0.23±0.02	0.234±0.001

表 7 以葡萄糖培养菌体进行转化实验摇瓶结果

菌种	发酵周期 h	发酵结束 OD ₆₀₀	乙酸消耗 g/l	丁二酸 g/l	得率 mol/mol
MG02	61	4.24±0.11	3.88±0.01	0.22±0.01	0.029±0.001
MG02 pTrc99a-gltA	36	5.2±0.03	2.34±0.06	0.84±0.06	0.184±0.017
MG03	61	3.3±0.13	3.96±0.00	0.13±0.01	0.016±0.001
MG03 pTrc99a-gltA	61	1.97±0.04	1.53±0.11	0.97±0.02	0.322±0.018

实施例 5. 产丁二酸菌株在补料分批发酵罐中的发酵

使用补料分批培养的方式，在 3L 发酵罐中培养以评价上述产丁二酸菌的发酵性能。

发酵培养基为：10g/l 蛋白胨、5g/l 酵母浸提物、10g/l 氯化钠、10g/l 乙酸钠。

菌株预培养时，使用装有 3ml LB 培养基的小试管，37° C 培养 9 小时左右，所得培养物作为一级种子。然后将一级种子转接于装有 30ml LB 的三角瓶中，接种量 2%，培养 2 小时左右加入 1mM IPTG 诱导 7 小时作为二级种子。二级种子接入 3L 发酵罐中开始发酵。发酵温度 37° C，接种量 2%，调节搅拌和通气以保持溶解氧高于 30%饱和氧浓度。使用 4M 氢氧化钠及 2M 硫酸调节 pH 为 7.0。发酵初始，根据需要添加适当抗生素。培养物培养至 OD₆₀₀ 为 2 左右时，加入 1mM IPTG 诱导。发酵过程中补加乙酸，控制残乙酸浓度不高于 5g/l。

菌株 MG032 pTrc99a-gltA 发酵 56 小时，菌体生长至 OD₆₀₀ 为 10.2，产生琥珀酸 5g/l。

以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

权 利 要 求 书

1. 一种利用乙酸生产丁二酸的代谢工程大肠杆菌菌株的构建方法，其特征在于，代谢工程改造的大肠杆菌使用乙酸为原料发酵生产丁二酸，其改造途径为缺失丁二酸脱氢酶复合物基因以阻断 TCA 循环，并和/或缺失琥珀酰 CoA 生成途径关键基因以阻断丁二酸利用途径，并和/或过表达乙酸摄取基因、和/或缺失乙醛酸循环和 TCA 循环的调节基因、和/或过表达乙醛酸循环和 TCA 循环关键酶基因以增强乙酸摄取和草酰乙酸供给，强化乙醛酸循环，和/或减少苹果酸的脱羧反应以缺失副产物生成途径，和/或减少从丙酮酸脱羧生产乙酸引起的无效循环，和/或缺失乳酸和乙醇生产途径中关键基因以疏导乙酰 CoA 节点代谢流。

2. 根据权利要求 1 所述的一种利用乙酸生产丁二酸的代谢工程大肠杆菌菌株的构建方法，其特征在于，其改造途径为：至少包括

(1) 缺失 *sdhAB*

以及以下途径中的一种或几种：

(2) 缺失 *sucABCD* 和/或 *fumC*；

(3) 过表达 *acs* 和/或 *ackA*；

(4) 缺失 *iclR*、*fadR* 和/或 *arcA*；

(5) 过表达 *gltA* 和/或 *aceA* 和/或 *acnB*；

(6) 缺失 *sfcA* 和/或 *maeB*；

(7) 缺失 *poxB*；

(8) 缺失 *adhE* 和/或 *ldhA*。

3. 根据权利要求 2 所述的一种利用乙酸生产丁二酸的代谢工程大肠杆菌菌株的构建方法，其特征在于，其改造途径为：

缺失 *sdhAB*，缺失 *iclR* 和过表达 *gltA*。

4. 根据权利要求 2 所述的一种利用乙酸生产丁二酸的代谢工程大肠杆菌菌株的构建方法，其特征在于，其改造途径为：

缺失 *sdhAB*，缺失 *iclR*，缺失 *maeB* 和过表达 *gltA*。

5. 根据权利要求 2 所述的一种利用乙酸生产丁二酸的代谢工程大肠杆菌菌株的构建方法，其特征在于，其改造途径为：

缺失 *sdhAB*, 缺失 *iclR*, 缺失 *maeB*, 过表达 *aceA* 和过表达 *gltA*。

6. 根据权利要求 2 所述的一种利用乙酸生产丁二酸的代谢工程大肠杆菌菌株的构建方法, 其特征在于, 其改造途径为:

缺失 *sdhAB*, 缺失 *iclR*, 缺失 *maeB*, 过表达 *acs* 和过表达 *gltA*。

7. 根据权利要求 2 所述的一种利用乙酸生产丁二酸的代谢工程大肠杆菌菌株的构建方法, 其特征在于, 其改造途径为:

缺失 *sdhAB*, 缺失 *iclR*, 缺失 *maeB*, 过表达 *aceA*, 过表达 *acs* 和过表达 *gltA*。

8. 利用权利要求 1 或 2 所述的构建方法得到的代谢工程大肠杆菌菌株。

9. 利用权利要求 1 或 2 所述的构建方法得到的代谢工程大肠杆菌菌株在生产丁二酸中的应用。

10. 一种利用权利要求 8 所述代谢工程大肠杆菌菌株生产丁二酸的方法, 其特征在于, 利用以乙酸为主要碳源的大肠杆菌常用培养基, 发酵权利要求 8 所述代谢工程大肠杆菌, 得到丁二酸。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2014/094215

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 7/46 (2006.01) i; C12N 1/21 (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)

C12P; C12N

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)

WPI, EPODOC, CNKI, CPRS, SpringerLink, ISI Web of Knowledge, Elsevier Science Direct: sdh, sdhab, succinate, acetate, succinic acid, acetic acid, suc. fumc, acs, acka, iclr, fadr, acra, glta, acea, acnb, sfca, maeb, poxb, adhe, ldha escherichia coli

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 101363032 A (SHANDONG UNIVERSITY), 11 February 2009 (11.02.2009), description, page 2, paragraph 6, and abstract	1-10
Y	WANG, Yi'na et al., "Effects of Carbon Sources on Succinate Production by Dual-phase Fermentations of Recombinant Escherichia Coli", CHINA BIOTECHNOLOGY, no. 3, vol. 29, 31 March 2009 (31.03.2009), pages 57-62	1-10
A	CN 102174455 A (TIANJIN INSTITUTE OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY), 07 September 2011 (07.09.2011), the whole document	1-10
A	CN 101792778 A (NANJING UNIVERSITY OF TECHNOLOGY), 04 August 2010 (04.08.2010), the whole document	1-10
A	WO 2006031424 A2 (RICE UNIVERSITY), 23 March 2006 (23.03.2006), the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search
11 June 2015 (11.06.2015)

Date of mailing of the international search report
23 June 2015 (23.06.2015)

Name and mailing address of the ISA/CN:
State Intellectual Property Office of the P. R. China
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao
Haidian District, Beijing 100088, China
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer

YAO, Jinxiao

Telephone No.: (86-10) **62414292**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2014/094215

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101363032 A	11 February 2009	CN 101363032 B	30 March 2011
CN 102174455 A	07 September 2011	CN 102174455 B	21 November 2012
CN 101792778 A	04 August 2010	CN 101792778 B	19 June 2013
WO 2006031424 A2	23 March 2006	US 7223567 B2	29 May 2007
		KR 101245428 B1	19 March 2013
		US 2006046288 A1	02 March 2006
		WO 2006031424 A3	30 November 2006
		EP 1781797 A2	09 May 2007
		EP 1781797 A4	05 October 2011
		BR PI0514734 A	24 June 2008
		CN 101044245 A	26 September 2007
		KR 20070053716 A	25 May 2007
		JP 4771437 B2	14 September 2011
		US 7790416 B2	07 September 2010
		CN 101044245 B	02 May 2012
		JP 2008516585 A	22 May 2008
		US 2007184539 A1	09 August 2007

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2014/094215

A. 主题的分类

C12P 7/46(2006.01)i; C12N 1/21(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)

C12P, ; C12N

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))

WPI, EPODOC, CNKI, CPRS, SpringerLink, ISI Web of Knowledge, Elsevier Science Direct:sdh, sdhab, succinate, acetate, succinic acid, acetic acid, suc, fumc, acs, acka, iclr, fadr, acra, glta, acea, acnb, sfca, maeb, poxb, adhe, ldha丁二酸, 琥珀酸, 乙酸, 大肠杆菌

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
Y	CN 101363032 A (山东大学) 2009年 2月 11日 (2009 - 02 - 11) 说明书第2页第6段、摘要	1-10
Y	王益娜等. “碳源对重组大肠杆菌两阶段发酵产丁二酸的影响” 中国生物工程杂志, 第3期卷, 第29卷期, 2009年 3月 31日 (2009 - 03 - 31), 第57-62页	1-10
A	CN 102174455 A (天津工业生物技术研究所) 2011年 9月 7日 (2011 - 09 - 07) 全文	1-10
A	CN 101792778 A (南京工业大学) 2010年 8月 4日 (2010 - 08 - 04) 全文	1-10
A	WO 2006031424 A2 (RICE UNIVERSITY) 2006年 3月 23日 (2006 - 03 - 23) 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

2015年 6月 11日

国际检索报告邮寄日期

2015年 6月 23日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

受权官员

姚进孝

电话号码 (86-10)62414292

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2014/094215

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	101363032	A	2009年 2月 11日	CN	101363032	B	2011年 3月 30日
CN	102174455	A	2011年 9月 7日	CN	102174455	B	2012年 11月 21日
CN	101792778	A	2010年 8月 4日	CN	101792778	B	2013年 6月 19日
WO	2006031424	A2	2006年 3月 23日	US	7223567	B2	2007年 5月 29日
				KR	101245428	B1	2013年 3月 19日
				US	2006046288	A1	2006年 3月 2日
				WO	2006031424	A3	2006年 11月 30日
				EP	1781797	A2	2007年 5月 9日
				EP	1781797	A4	2011年 10月 5日
				BR	PI0514734	A	2008年 6月 24日
				CN	101044245	A	2007年 9月 26日
				KR	20070053716	A	2007年 5月 25日
				JP	4771437	B2	2011年 9月 14日
				US	7790416	B2	2010年 9月 7日
				CN	101044245	B	2012年 5月 2日
				JP	2008516585	A	2008年 5月 22日
				US	2007184539	A1	2007年 8月 9日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)