

(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



(10) 国际公布号

WO 2022/217705 A1

(43) 国际公布日

2022 年 10 月 20 日 (20.10.2022)

(51) 国际专利分类号:

C12N 9/16 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12P 17/04 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(21) 国际申请号:

PCT/CN2021/096674

(22) 国际申请日:

2021 年 5 月 28 日 (28.05.2021)

(25) 申请语言:

中文

(26) 公布语言:

中文

(30) 优先权:

202110388771.2 2021年4月12日 (12.04.2021) 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, 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, Jiangsu 214122 (CN)。

徐歆(XU, Xin); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖

大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

宋伟(SONG, Wei); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号,

Jiangsu 214122 (CN)。

陈修来(CHEN, Xiulai); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu

214122 (CN)。

刘佳(LIU, Jia); 中国江苏省无锡市

滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

高聪(GAO, Cong); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡

湖大道1800号, 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)。

(54) Title: MODIFIED ACID PHOSPHATASE AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种改造的酸性磷酸酶及其应用

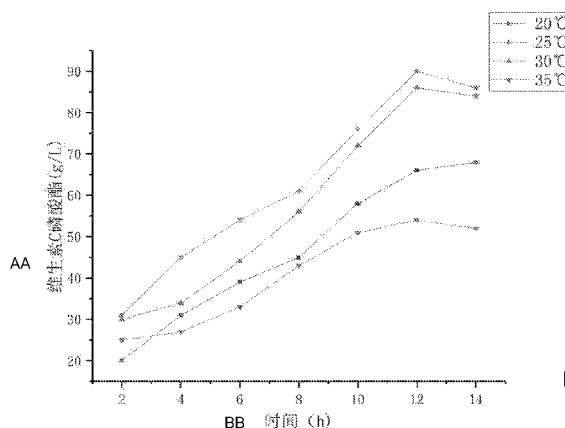


图 5

AA Vitamin C phosphate (g/L)
BB Time (h)

(57) Abstract: Provided are a modified acid phosphatase and an application thereof. According to the mutant modified acid phosphatase PaAPase_{mu3}, vitamin C is converted into vitamin C phosphate by expressing the modified acid phosphatase PaAPase_{mu3} in Escherichia coli by means of whole-cell conversion. A catalytic system of the modified acid phosphatase PaAPase_{mu3} is optimized from the pH and temperature of the reaction, such that the yield of the vitamin C phosphate can reach 90.1 g/L, and the molar yield can reach 75.1%.

(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)。

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: 提供了一种改造的酸性磷酸酶及其应用。该突变改造的酸性磷酸酶 PaAPase_{mu3}, 通过在大肠杆菌中表达所述改造的酸性磷酸酶 PaAPase_{mu3}, 利用全细胞转化法, 将维生素C转化为维生素C磷酸酯。并从反应的pH、温度方面对改造的酸性磷酸酶 PaAPase_{mu3}的催化体系进行优化, 可使得维生素C磷酸酯产量达到90.1g/L, 摩尔产率达75.1%。

一种改造的酸性磷酸酶及其应用

技术领域

本发明涉及一种改造的酸性磷酸酶及其应用，属于生物工程技术领域。

背景技术

维生素 C 磷酸酯作为一个维生素 C 的衍生物，其化学式为 $C_6H_6O_9P$ 。它是由维生素 C 的碳骨架在 2 位桥连一个磷酸基。

目前，维生素 C 磷酸酯的主要生产方法为化学合成法，主要为基团保护法合成，但是这种方法虽然得率高，能耗却较大，同时会对环境产生毒害作用，不符合绿色生产、安全生产和可持续发展的要求。通过生物法制备维生素 C 磷酸酯具有产品质量稳定安全、工艺条件温和、高效、环保等特点，可以减轻环境和资源压力，因此迫切需要一种有效的生物法高效制备维生素 C 磷酸酯。

目前，微生物法生产维生素 C 磷酸酯涉及到一个关键的酶酸性磷酸酶，它具有广泛的底物谱，可以催化维生素 C，使其 C2 位磷酸化，形成维生素 C 磷酸酯。而微生物法制备维生素 C 磷酸酯主要为酶转化法。目前，由于酶转化法具备环境友好、反应条件温和及操作简便等优点而更具备工业应用价值。但是，天然筛选的酸性磷酸酶本身存在水解能力，会水解产物，导致维生素 C 磷酸酯的产率低下，限制了酶转化法大规模生产制备，提高酶酸性磷酸酶的磷酸化能力，减弱水解能力是目前研究的重点问题。

发明内容

在目前的研究中，酸性磷酸酶都会对产物进行水解，导致产量低。因而，为实现磷酸化反应，酶改造的酸性磷酸酶往往需要对特定的关键残基进行突变改造的，以期来提高酶的实用性能。

本发明提供了一种酸性磷酸酶突变体，所述突变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示。

本发明提供了酸性磷酸酶突变体，以来源于 *Pseudomonas aeruginosa* 的酸性磷酸酶为亲本酶，所述酸性磷酸酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，将亲本酶的第 57 位、第 58 位、第 94 位和第 135 位中的至少一个位点突变。

在一种实施方式中，所述突变体为(a)-(f)所示任一：

(a)第 58 位突变为 F；

(b)第 94 位突变为 F；

(c)第 135 位突变为 R；

(d)第 94 位突变为 F、第 135 位突变为 R；

(e)第 58 位突变为 P、第 135 位突变为 R;

(f)第 57 位突变为 H、第 58 位突变为 P、第 135 位突变为 R。

本发明提供了编码所述突变体的基因。

本发明提供了携带所述基因的重组质粒。

本发明提供了表达所述突变体,或携带所述重组质粒的微生物细胞。

本发明提供了一种合成维生素 C 磷酸酯的方法,利用所述微生物细胞以维生素 C 为底物,转化生产维生素 C 磷酸酯。

在一种实施方式中,将权利要求 5 所述微生物细胞加入含有维生素 C 和焦磷酸钠的反应体系,反应体系中的 pH 为 3.8-4.3。

在一种实施方式中,反应体系中的 pH 为 4.0-4.2。

在一种实施方式中,在 25-37°C 下反应不少于 8 小时。

在一种实施方式中,在 25-30°C 下反应不少于 10 小时。

在一种实施方式中,所述微生物细胞在反应体系中的浓度为 20-40g/L,维生素 C 的浓度为 70-100g/L,焦磷酸钠的浓度为 180-240 g/L。

在一种实施方式中,所述微生物细胞在反应体系中的浓度为 30 g/L,维生素 C 的浓度为 88 g/L,焦磷酸钠的浓度为 223 g/L。

在一种实施方式中,所述微生物细胞在反应体系中的浓度为 25-35g/L,维生素 C 的浓度为 70-90g/L,焦磷酸钠的浓度为 200-240 g/L。

本发明提供了所述突变体,或所述微生物细胞在制备维生素 C 磷酸酯、含有维生素 C 磷酸酯的产品和维生素 C 磷酸酯衍生物中的应用。

本发明提供了所述微生物细胞在制备维生素 C 磷酸酯、含有维生素 C 磷酸酯的产品和维生素 C 磷酸酯衍生物中的应用。

本发明的有益效果: 本发明提供了一种改造的酸性磷酸酶 *PaAPase_{mu3}*,用于催化生产维生素 C 磷酸酯。该改造的酸性磷酸酶不仅大大提高了改造的酸性磷酸酶的催化效率,同时对产物水解能力很低,有效降低了生产成本。本发明提供的改造的酸性磷酸酶以维生素 C 为底物时维生素 C 磷酸酯的产量可达 90.1 g/L,摩尔产率可达 75.1%,加快了酶转化法生产维生素 C 磷酸酯的工业化进程。

附图说明

图 1 为改造的酸性磷酸酶 *PaAPase_{mu3}* 的 SDS-PAGE 图。

图 2 为改造的酸性磷酸酶在不同 pH 下的酶活图。

图 3 为改造的酸性磷酸酶在不同温度下的酶活图。

图 4 为转化体系缓冲液 pH 和维生素 C 磷酸酯生产量的关系图。

图 5 为转化温度和维生素 C 磷酸酯生产量的关系图。

具体实施方式

(1) 液相色谱分析方法:

样品分析采用液相色谱仪 Waters ACQUITY UPLCTM;

流动相成分: 用超纯水配制 1 L 0.1 mol·L⁻¹ KH₂PO₄ 溶液, 再加入 500 mL 乙腈混合在一起, 用磷酸调混合溶液 pH 至 3.0; 流动相通过 0.22 μm 的有机滤膜真空抽滤后, 超声脱气 20 min。

进样程序: 每 8 分钟进一个样品, 每个样品的取样量为 12 μL。

洗脱程序: 流动相流速恒定为 1 mL·min⁻¹。

色谱柱: APS-2 HYPERSIL column (150 mm × 4.6 mm, 5 μm), 柱温为 35°C。

检测器: 紫外吸收波长为 254 nm。

(2) 蛋白纯化

用超声破碎仪对含有目的质粒的细胞进行超声处理, 功率为 36%, 工作 2 s, 间歇 3 s, 直至破碎完全, 得到全细胞破碎液; 将细胞破碎液在冷冻离心机中设置离心温度 4°C, 转速 12000 rpm 离心 30 min, 离心后将上清液通过 0.22 μm 水系滤膜过滤后收集滤液; 将滤液利用 AKTExpress 系统的纯化仪纯化, 纯化柱使用 5mL 规格的 HisTrap HP 纯化柱; 洗脱时用含 1M 咪唑的缓冲液 (20mM Tris-HCl, 150mM NaCl), 以 2-3 mL·min⁻¹ 的流速进行洗脱; 然后, 用 10%(w/v) 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 验证纯化的组分, 并将最纯的组分用 PD-10 脱盐柱进行脱盐, 脱盐时使用低盐缓冲液 (10mM Tris-HCl, 0.1M NaCl; pH 6.0), 收集得到纯化脱盐的蛋白。

表 1 突变过程中使用的引物

名称	引物(5'-3')
D56-F	GCGCATNNKCAGTGGGAAGAT
D56-R	CCACTGMNNATGCGCGCGCAC
W58-F	GATCAGNNKGAAGATAACGTG
W58-R	ATCTTCMNNCTGATCATGCGC
V94-F	CAAGAAAACCTGNNKGAAGTG
V94-R	CATCAGCACTTCMNNCAGGTT
D135-F	GGCCATACCATGNNKAGCTAT
D135-R	TTTAAAATAGCTMNNCATGGT
W58P/D135R/Q57L-F	CGCGCGCATGATAAACCAGAA
W58P/D135R/Q57L-R	GTTATCTTCTGGTTTATCATG
W58P/D135R/Q57R-F	CGCGCGCATGATAGGCCAGAA
W58P/D135R/Q57R-R	GTTATCTTCTGGCCTATCATG

W58P/D135R/Q57H -F	CGCGCGCATGATCACCCAGAA
W58P/D135R/Q57H-R	GTTATCTTCTGGGTGATCATG

实施例 1: *PaAPase* 酶突变体的构建和筛选

以氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示的 *PaAPase* 酶为亲本（其编码基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示），对其第 56 位、58 位、135 位、194 位进行饱和突变（引物如表 1 所示），筛选有益突变体：

将 PCR 获得的片段与 pET-28a(+)载体连接（BamH I 和 Hind III 酶），利用表 1 中相应的引物进行全质粒 PCR，获得含有突变体的重组质粒。将重组质粒转入大肠杆菌，构建得到重组菌，将重组菌涂布于含卡那霉素抗性的 LB 平板，37°C 培养至长出单克隆。

将无菌的 96 孔深孔板（一级板）在超净台中打开，用排枪在每一个孔中加入 400 μ L LB 培养基（含 0.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的卡那霉素），再用牙签挑取平板上饱和突变的大肠杆菌转化子接种到 96 孔深孔板中，其中第十二列的板孔中加入起始菌株作为对照，37°C，600 rpm 在高通量摇床中过夜培养。用排枪取 50 μ L 的一级板中的种子液接种至每孔含有 800 μ L 乳糖自诱导培养基（含 0.1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的卡那霉素）的 96 孔深孔板（二级板）中 37°C，600 rpm 培养 3~4 h（OD₆₀₀ 约为 1），将高通量摇床的温度调整为 25°C，诱导 12 h。然后在 3000 $\times$ g 下离心 5 min，倒掉 96 孔深孔板（二级板）中的上清液，收集细胞并保存在 -80°C 备用。将 -80°C 冷冻的含有突变体细胞的 96 孔深孔板取出，在室温下放置 30 min 解冻，然后用排枪在每孔中加入底物溶液（4 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ L-抗坏血酸，30 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 焦磷酸，pH 4.0）200 μ L，用排枪反复吹吸使细胞悬浮于底物溶液中，然后将细胞悬浮液置于 25°C 保温 16 h。3000 $\times$ g 下离心 20 min 分离沉淀，将深孔板中的上清取出，稀释 5 倍数后使用 HPLC 进行测定，并计算摩尔转化率。

根据 HPLC 结果并测序，筛选出 3 个有益突变体：W58F、V94F 和 D135R，摩尔转化率分别为 37.6%、41.3%、45.3%。

在得到了 3 个有益突变体的基础上，按照上述步骤，将 W58F、V94F 和 D135R 进行组合突变（在单突突变体的基础上利用相应的引物进行突变，构建得到双突突变体），并按照步骤 2，测定转化效率。

结果显示组合突变体 W58F/D135R，W58F/V94F 和 V94F/D135R 转化率分别为 19.7%、17.9%、40.9%，转化率均不如 D135R。因此，选择以 *PaAPase*_{Mu1}(D135R)为模板，对 Trp58 和 Val94 进行位点饱和突变。

结果显示，在双突变体中，*PaAPase*_{Mu2} (W58P/D135R)转化率增加了 1.56 倍。以 *PaAPase*_{Mu2} (W58P/D135R)为模板，将 Gln57 突变为阳性氨基酸(Lys、Arg 和 His)，其中 *PaAPase*_{Mu3} (Q57H/W58P/D135R)，比野生型的转化率提高了 1.9 倍。

表 2 突变体转化效果

突变体	转化率 (%)	产量
WT	25.9	31.08
W58F	37.6	45.12
V94F	41.3	51.96
D135R	45.3	54.36
W58F/D135R	19.7	23.64
V94F/D135R	40.9	49.08
W58F/V94F	17.9	21.48
W58P/D135R	62.1	79.32
Q57H/W58P/D135R	75.1	90.10

实施例 2：突变体的酶学性质

将获得的含有 *PaAPase*_{Mu3} (Q57H/W58P/D135R) 的重组菌接入 LB 培养基，培养 12 h 后得到活化液，将活化液接种至新鲜的 TB 培养基，培养 2 h 后，加入终浓度为 0.2 mM 的 IPTG，25°C 培养 14 h，诱导表达重组目的蛋白，并收集酶液，并将酶液超声破碎，进行蛋白胶验证（图 1），图 1 中 M 为 marker，1 为粗酶液条带，2 为纯化目标蛋白条带（29KDa）；其余的突变体也采用的相同的方法进行表达和纯化。

（1）比酶活测定

采用高效液相色谱法测定 *PaAPase* 及其突变体的活性。底物溶液(500 mM L-抗坏血酸和 500 mM 焦磷酸钠)500 μ L (pH 5.0)，酶液 5 μ L，30°C 反应 30 min，加 95 μ L 42% 磷酸终止反应；活性单位的定义是在 1 分钟内产生 1 μ mol 维生素 C 磷酸酯所需的酶量（表 3）。

（2）动力学参数测定

在 30°C 下，通过测量不同浓度维生素 C 和维生素 C 磷酸酯(1–1000 mM)的初始产物生成速率其余条件与比酶活测定一致，计算了动力学参数，包括 V_{max} 、 K_m 和 k_{cat} 。所有的活性测定重复三次（表 3）。

表 3 各突变体的比酶活和动力学参数

酶	比酶活(U mg ⁻¹)	K_m (mM)	k_{cat} (s ⁻¹)	k_{cat}/K_m (min ⁻¹ ·mM ⁻¹)
WT	14.8	289	16.3	3.38
Mu1(D135R)	28.1	245	18.7	4.58
Mu2(W58P/D135R)	32.3	223	19.2	5.17

Mu3(Q57H/ W58P/D135R)	39.7	211	20.1	5.72
-----------------------	------	-----	------	------

(3) pH 对 *PaAPase*_{mu3} 活性的影响

在 pH 2.5-8.0 范围内检测 *PaAPase* 的 pH 稳定性, 由图 2 可知, *PaAPase* 在 pH 在 3.0-8.0 时 4°C 保存 12 h 的酶活损失较小, 残余酶活都在 90% 以上。但是, 当 pH 低于 2.5 时, *PaAPase* 的残余酶活仅为初始酶活的 60%。上述结果表明 *PaAPase* 在 pH 3.0-8.0 具有很好的 pH 稳定性, 在强酸性条件下, 酶活损失较大。

(4) 温度对 *PaAPase*_{mu3} 活性的影响

在 0-55°C 的范围内检测 *PaAPase* 的温度稳定性, 结果如图 3 表示, *PaAPase* 在低于 20°C 的环境中较稳定, *PaAPase* 可保留初始活性的 90% 以上, 当温度处于 20-55°C 之间, 酶活的损失逐渐增加, 在 50°C 条件下放置 1 h, 酶活损失将近 50%。上述结果表明, 温度升高有助于蛋白酶分子进行催化作用, 但随着温度的升高, 蛋白质变性失活的趋势也越来越明显, 当温度超过 50°C 时, 酶活开始急剧下降, 主要原因是此时大量蛋白变性失活, 而在 25-50°C 时, 温度升高对反应体系中酶催化活性的提高要超出由于蛋白变性而失去的活性, 所以酶活总体上呈上升趋势。

实施例 3: 重组菌 *PaAPase*_{mu3} 全细胞生产维生素 C 磷酸酯

(1) 全细胞最适反应 pH

将从甘油管中保存的菌株涂布于 LB 固体培养基上, 在 37°C 下恒温培养至长出单克隆, 挑取单克隆至新鲜的 LB 液体培养基中, 以 200 rpm、37°C 下恒温培养 12h 后得到活化液, 将活化液接种至新鲜的 TB 培养基, 培养 2 h 后, 加入终浓度为 0.2 mM 的 IPTG, 于 25°C 下诱导培养 14 h, 结束后收集细胞。

在 100 mL 锥形瓶中分别加入 3 g 诱导培养后表达 *PaAPase*_{mu3} 蛋白的全细胞分别于 pH3.0、pH3.5、pH4.0、pH4.5 和 pH5.0 的反应体系, 反应体系中有 88 g/L 维生素 C、223 g/L 焦磷酸钠、盐酸调节 pH, 25 °C 反应 12 h 后, 过 0.22 μ m 水膜, 进行液相色谱分析。

按照上述检测方法测定维生素 C 磷酸酯的产量。结果如表 4 和图 4 所示, *PaAPase*_{mu3} 酶在 pH3.0-4.0 内转化率随着 pH 的上升而增长, 在 pH3.8-4.3 之间维生素 C 磷酸酯产量可达到 85g/L 及以上, 在 pH4.0 时可达到 90.1 g/L, 摩尔产率为 75.1%, 随后随 pH 的进一步升高而下降。

表 4 不同 pH 下维生素 C 磷酸酯产量

pH	维生素 C 磷酸酯产量 (g/L)
3	10.4

3.5	56.7
3.6	66.2
3.7	72.3
3.8	85.6
3.9	88.5
4.0	90.1
4.1	91.1
4.2	89.1
4.3	85.5
4.4	76.5
4.5	55
5	22.5

(2) 全细胞最适反应温度

按照 (1) 中的步骤，在反应体系 pH 为 4 的条件下每 2 小时测定 *PaAPase_{mu3}* 在不同温度条件下 (20、25、30、37 °C) 转化 14 h 的维生素 C 磷酸酯产量，计算摩尔产率。结果如图 5 所示，*PaAPase_{mu3}* 酶在 25-30°C 时均能有较高的维生素 C 磷酸酯的产量，在 25°C 时转化率最高，维生素 C 磷酸酯产量为 90.1 g/L，摩尔产率为 75.1%，在 30°C 维生素 C 磷酸酯产量为 84 g/L，摩尔产率为 70%。因而，在 25-30°C 的转化温度对 *PaAPase_{mu3}* 酶催化磷酸化反应更有利。

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

1. 一种酸性磷酸酶突变体,其特征在于,所述突变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示。
2. 酸性磷酸酶突变体,其特征在于,以来源于 *Pseudomonas aeruginosa* 的酸性磷酸酶为亲本酶,所述酸性磷酸酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示,将亲本酶的第 57 位、第 58 位、第 94 位和第 135 位中的至少一个位点突变。
 3. 根据权利要求 2 所述的突变体,其特征在于,所述突变体为(a)-(f)所示任一:
 - (a)第 58 位突变为苯丙氨酸;
 - (b)第 94 位突变为苯丙氨酸;
 - (c)第 135 位突变为精氨酸;
 - (d)第 94 位突变为苯丙氨酸、第 135 位突变为精氨酸;
 - (e)第 58 位突变为脯氨酸、第 135 位突变为精氨酸;
 - (f)第 57 位突变为组氨酸、第 58 位突变为脯氨酸、第 135 位突变为精氨酸。
 4. 编码权利要求 1~3 任一项所述突变体的基因。
 5. 携带权利要求 4 所述基因的重组质粒。
 6. 表达权利要求 1 或 2 所述突变体,或携带权利要求 4 所述重组质粒的微生物细胞。
 7. 一种合成维生素 C 磷酸酯的方法,其特征在于,利用权利要求 6 所述微生物细胞以维生素 C 为底物,转化生产维生素 C 磷酸酯。
 8. 根据权利要求 7 所述的方法,其特征在于,将权利要求 5 所述微生物细胞加入含有维生素 C 和焦磷酸钠的反应体系,反应体系中的 pH 为 3.8-4.3。
 9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于,在 25-37°C 下反应不少于 8 小时。
 10. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在于,所述微生物细胞在反应体系中的浓度为 20-40g/L,维生素 C 的浓度为 70-100g/L,焦磷酸钠的浓度为 180-240 g/L。
 11. 根据权利要求 10 所述的方法,其特征在于,所述微生物细胞在反应体系中的浓度为 30 g/L,维生素 C 的浓度为 88 g/L,焦磷酸钠的浓度为 223 g/L。
 12. 权利要求 1~3 任一项所述突变体在制备维生素 C 磷酸酯、含有维生素 C 磷酸酯的产品和维生素 C 磷酸酯衍生物中的应用。
 13. 权利要求 6 所述微生物细胞在制备维生素 C 磷酸酯、含有维生素 C 磷酸酯的产品和维生素 C 磷酸酯衍生物中的应用。

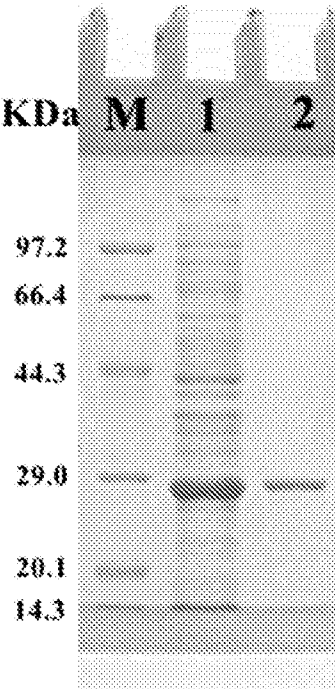


图 1

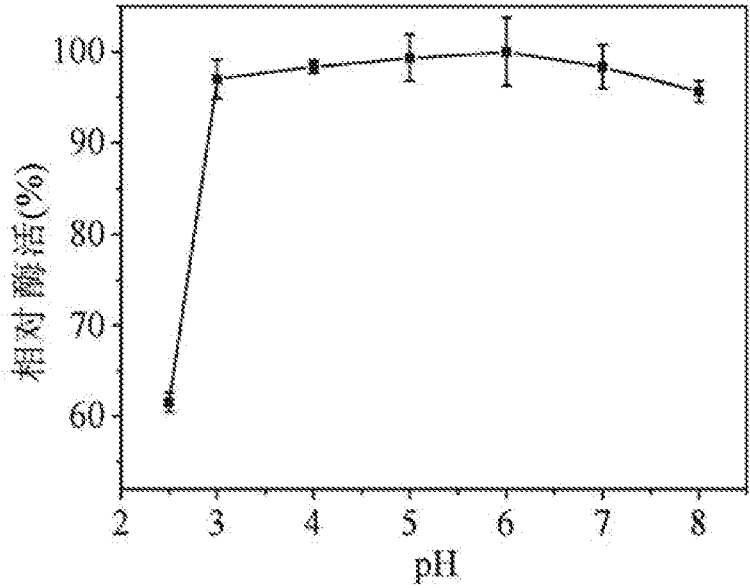


图 2

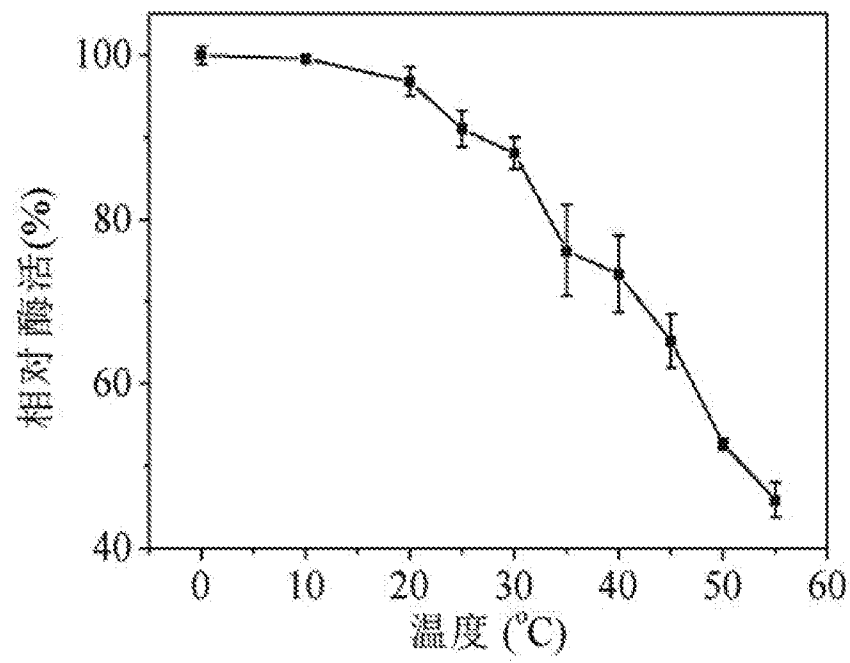


图 3

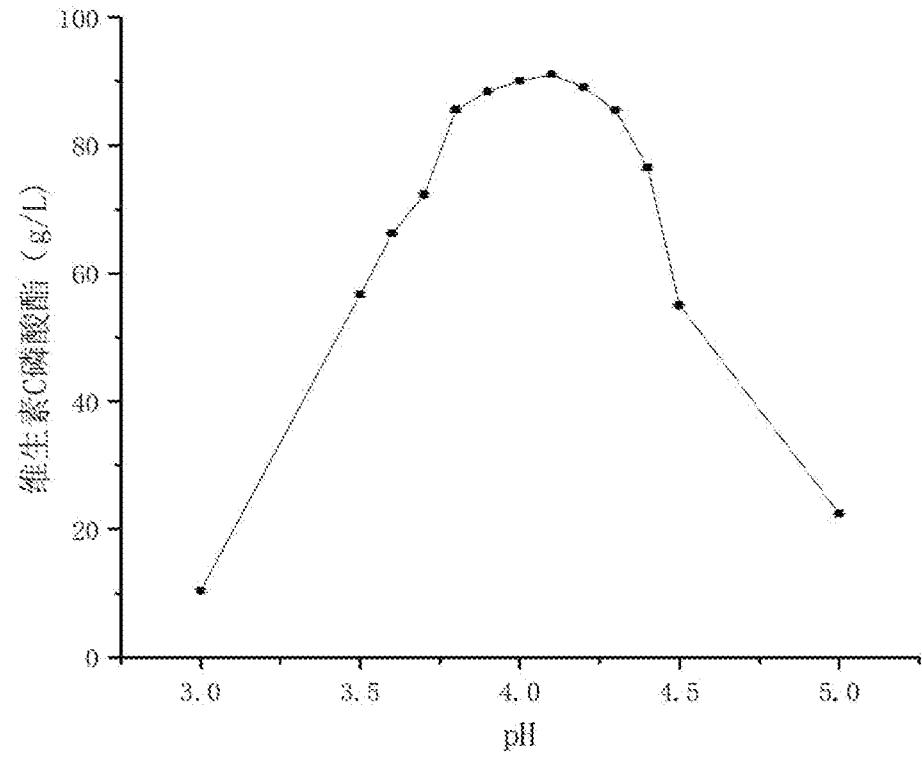


图 4

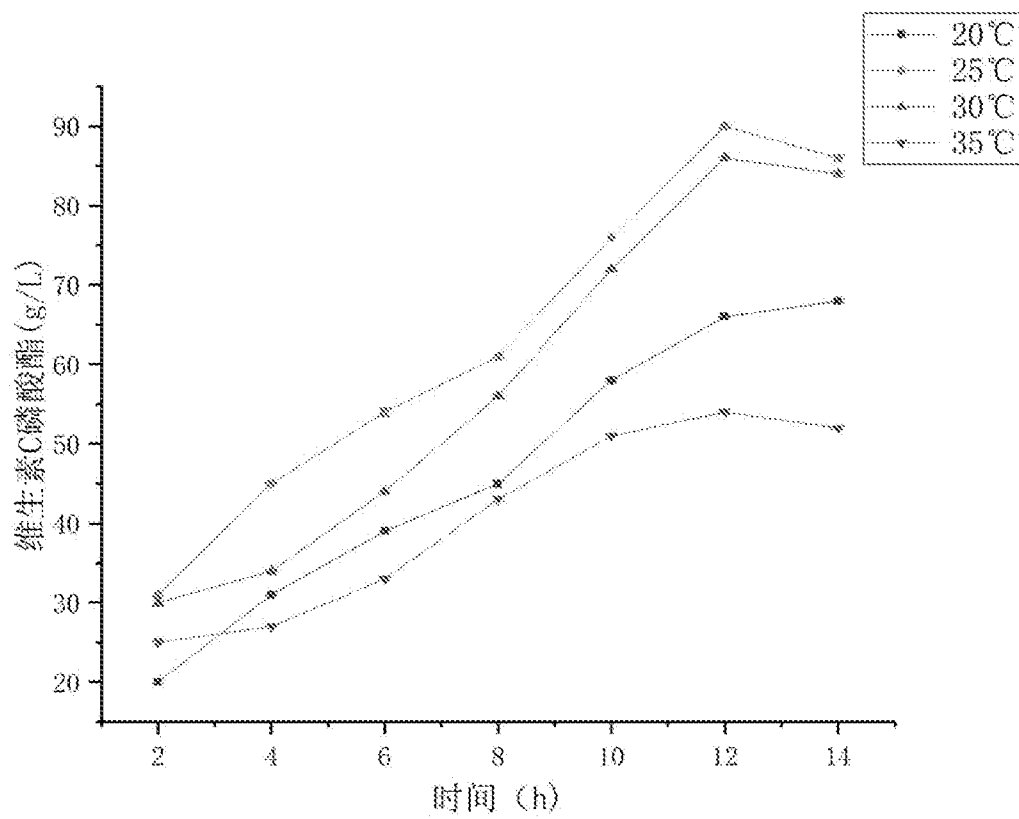


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/096674

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C12N 9/16(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 17/04(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, VEN(DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI WEB of Science; GenBank+EMBL+DDBJ, 中国专利生物序列检索系统, China Patent Biological Sequence Retrieval System: 对SEQ ID NOs: 1, 3的检索, search for SEQ ID NOs: 1, 3, Pseudomonas aeruginosa, 铜绿假单胞菌, acid phosphatase, 酸性磷酸酶, phosphorycholine phosphatase, 突变, mutant																	
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 106282081 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 04 January 2017 (2017-01-04) see entire document</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>ZHENG, K. et al. "Enzymatic Production of Ascorbic Acid-2-phosphate by Recombinant Acid Phosphatase" <i>J Agric Food Chem</i>, Vol. 65, No. 20, 24 May 2017 (2017-05-24), see abstract</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>PRAMANIK, K. et al. "An in Silico Structural, Functional and Phylogenetic Analysis with Three Dimensional Protein Modeling of Alkaline Phosphatase Enzyme of Pseudomonas Aeruginosa" <i>J Genet Eng Biotechnol</i>, Vol. 15, No. 2, 12 June 2017 (2017-06-12), see abstract</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>DOMENECH, C. E. et al. "Pseudomonas Aeruginosa Acid Phosphatase Activation by Divalent Cations and Inhibition by Aluminium Ion" <i>FEBS Letters</i>, Vol. vol. 299, No. 1, 02 March 1992 (1992-03-02), see abstract</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	A	CN 106282081 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 04 January 2017 (2017-01-04) see entire document	1-13	A	ZHENG, K. et al. "Enzymatic Production of Ascorbic Acid-2-phosphate by Recombinant Acid Phosphatase" <i>J Agric Food Chem</i> , Vol. 65, No. 20, 24 May 2017 (2017-05-24), see abstract	1-13	A	PRAMANIK, K. et al. "An in Silico Structural, Functional and Phylogenetic Analysis with Three Dimensional Protein Modeling of Alkaline Phosphatase Enzyme of Pseudomonas Aeruginosa" <i>J Genet Eng Biotechnol</i> , Vol. 15, No. 2, 12 June 2017 (2017-06-12), see abstract	1-13	A	DOMENECH, C. E. et al. "Pseudomonas Aeruginosa Acid Phosphatase Activation by Divalent Cations and Inhibition by Aluminium Ion" <i>FEBS Letters</i> , Vol. vol. 299, No. 1, 02 March 1992 (1992-03-02), see abstract	1-13
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.															
A	CN 106282081 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 04 January 2017 (2017-01-04) see entire document	1-13															
A	ZHENG, K. et al. "Enzymatic Production of Ascorbic Acid-2-phosphate by Recombinant Acid Phosphatase" <i>J Agric Food Chem</i> , Vol. 65, No. 20, 24 May 2017 (2017-05-24), see abstract	1-13															
A	PRAMANIK, K. et al. "An in Silico Structural, Functional and Phylogenetic Analysis with Three Dimensional Protein Modeling of Alkaline Phosphatase Enzyme of Pseudomonas Aeruginosa" <i>J Genet Eng Biotechnol</i> , Vol. 15, No. 2, 12 June 2017 (2017-06-12), see abstract	1-13															
A	DOMENECH, C. E. et al. "Pseudomonas Aeruginosa Acid Phosphatase Activation by Divalent Cations and Inhibition by Aluminium Ion" <i>FEBS Letters</i> , Vol. vol. 299, No. 1, 02 March 1992 (1992-03-02), see abstract	1-13															
☒ 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 31 December 2021		Date of mailing of the international search report 21 January 2022															
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/CN2021/096674

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	"Sequence 2 from patent US 10308919" <i>GenBank: QFN31972.1</i> , 10 October 2019 (2019-10-10), see amino acid sequence and related information	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/096674**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/CN2021/096674

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106282081	A	04 January 2017	US	2018057802	A1	01 March 2018
				US	10308919	B2	04 June 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/096674

A. 主题的分类

C12N 9/16(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 17/04(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))

数据库: CNABS, VEN(DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, PubMed, Elsevier Science, ISI WEB of Science; GenBank+EMBL+DDBJ, 中国专利生物序列检索系统 检索词: 对SEQ ID NOs: 1、3的检索, *Pseudomonas aeruginosa*, 铜绿假单胞菌, acid phosphatase, 酸性磷酸酶, phosphorycholine phosphatase, 突变, mutant

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 106282081 A (江南大学) 2017年1月4日 (2017 - 01 - 04) 参见全文	1-13
A	Kai Zheng等. "Enzymatic Production of Ascorbic Acid-2-phosphate by Recombinant Acid Phosphatase" J Agric Food Chem, 第65卷, 第20期, 2017年5月24日 (2017 - 05 - 24), 参见摘要	1-13
A	Krishnendu Pramanik等. "An in silico structural, functional and phylogenetic analysis with three dimensional protein modeling of alkaline phosphatase enzyme of <i>Pseudomonas aeruginosa</i> " J Genet Eng Biotechnol, 第15卷, 第2期, 2017年6月12日 (2017 - 06 - 12), 参见摘要	1-13
A	Carlos E.Domenech等. "Pseudomonas aeruginosa acid phosphatase Activation by divalent cations and inhibition by aluminium ion" FEBS Letters, 第299卷, 第1期, 1992年3月2日 (1992 - 03 - 02), 参见摘要	1-13

☒ 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

2021年12月31日

国际检索报告邮寄日期

2022年1月21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

受权官员

邵旭倩

电话号码 010-62411298

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/096674

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	"Sequence 2 from patent US 10308919" GenBank: QFN31972.1, 2019年10月10日 (2019 - 10 - 10), 参见氨基酸序列及相关信息	1-13

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:

国际申请号
PCT/CN2021/096674

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	106282081	A	2017年1月4日	US	2018057802	A1	2018年3月1日
				US	10308919	B2	2019年6月4日