

(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
2020 年 3 月 26 日 (26.03.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/057308 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 9/02 (2006.01) *C12P 13/08* (2006.01)
C12N 9/06 (2006.01) *C12P 13/00* (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01) *A23K 20/189* (2016.01)
C12N 15/63 (2006.01) *A23K 10/18* (2016.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/101521

(22) 国际申请日: 2019 年 8 月 20 日 (20.08.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201811089319.0 2018年9月18日 (18.09.2018) CN

(71) 申请人: 清华大学(TSINGHUA UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国北京市海淀区清华园 1 号, Beijing 100084 (CN)。

(72) 发明人: 陈振(CHEN, Zhen); 中国北京市海淀区清华大学英士楼300房间, Beijing 100084 (CN)。刘德华(LIU, Dehua); 中国北京市海淀区清华大学英士楼300房间, Beijing 100084 (CN)。

(74) 代理人: 北京永新同创知识产权代理有限公司(NTD UNIVATION INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD); 中国北京市东城区北三环东路 36 号北京环球贸易中心 C 座 10 层, Beijing 100013 (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, 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))。

(54) **Title:** NADH-DEPENDENT AMINO ACID DEHYDROGENASE AND APPLICATION THEREOF IN INCREASING LYSINE YIELD

(54) 发明名称: NADH依赖性的氨基酸脱氢酶及其在提高赖氨酸产量中的应用

(57) **Abstract:** Disclosed is an NADH-dependent amino acid dehydrogenase and an application thereof in increasing lysine yield. The amino acid dehydrogenases are aspartate dehydrogenase derived from *Pseudomonas aeruginosa*, aspartate semialdehyde dehydrogenase derived from *Tistrella mobilis*, dihydropyridine dicarboxylic acid reductase derived from *Mycobacterium tuberculosis*, and diaminopimelate dehydrogenase derived from *Tepidanaerobacter acetatoydans*. The amino acid sequences thereof are as shown in SEQ ID NO.1, 3, 5, and 7, respectively. NADH or both NADH and NADPH can be used as co-factors of the amino acid dehydrogenase to synthesize lysine, thereby reducing the demand for NADPH in the cell, and significantly increasing the production of lysine or pentanediamine.

(57) 摘要: NADH依赖性的氨基酸脱氢酶在提高赖氨酸产量中的应用, 氨基酸脱氢酶分别为来源于*Pseudomonas aeruginosa*的天冬氨酸脱氢酶, 来源于*Tistrella mobilis*的天冬氨酸半醛脱氢酶, 来源于*Mycobacterium tuberculosis*的二氢吡啶二羧酸还原酶, 来源于*Tepidanaerobacter acetatoydans*的二氨基庚二酸脱氢酶, 其氨基酸序列分别如SEQ ID NO.1、3、5、7所示。氨基酸脱氢酶能利用NADH或同时利用NADH和NADPH作为辅因子合成赖氨酸从而减少细胞对NADPH的需求, 进而显著地提高赖氨酸或者戊二胺的产量。

WO 2020/057308 A1

NADH依赖性的氨基酸脱氢酶及其在提高赖氨酸产量中的应用

技术领域

本发明属于基因工程和生物发酵技术领域，具体地说，涉及一种NADH依赖性的氨基酸脱氢酶及其应用。

背景技术

赖氨酸是一种极其重要的氨基酸，广泛应用于饲料添加剂、保健及医药领域。目前，赖氨酸的工业生产主要通过微生物发酵法进行，工业常用的菌种包括谷氨酸棒杆菌和大肠杆菌。在赖氨酸的生物合成过程中，有四步酶促反应过程需要消耗NADPH用于合成赖氨酸。因此，传统的方法都是通过强化NADPH的供应，例如提高戊糖磷酸循环途径的代谢通量，或者表达NADPH依赖型的甘油醛3-磷酸脱氢酶，用于平衡赖氨酸合成过程中的辅酶需求，从而提高赖氨酸的产量。在戊二胺的生产过程中同样存在高度依赖NADPH的问题，戊二胺是通过在赖氨酸生产菌株中表达赖氨酸脱羧酶而获得。在微生物细胞内，NADH的浓度一般远大于NADPH，且NADH的稳定性比NADPH更高，价格更加便宜，因此直接利用胞内的NADH合成赖氨酸或戊二胺具有极大的应用潜力。

发明内容

本发明的目的是提供一种NADH依赖性的氨基酸脱氢酶及其应用。

赖氨酸和戊二胺合成途径中有四步反应消耗NADPH：（1）草酰乙酸的氨基化生成天冬氨酸；（2）磷酸天冬氨酸还原生成天冬氨酸半醛；（3）二氢吡啶二羧酸还原生成吡啶二羧酸；（4）吡啶二羧酸还原生成二氨基庚二酸。目前大部分微生物体内发现的催化上述步骤的酶都是严格依赖于NADPH。本发明通过大量的生物信息学分析和反复对比实验，在大肠杆菌中表达不同来源的氨基酸脱氢酶的基因，检测其催化活性，及对辅酶NADH、NADPH的特异性进行检测发现，来源于*Pseudomonas aeruginosa*的天冬氨酸脱氢酶（其氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示），来源于*Tistrella mobilis*的天冬氨酸半醛脱氢酶（其氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示），来源于*Mycobacterium tuberculosis*的二氢吡啶二羧酸还原酶（其氨基酸序列如SEQ ID NO.5所示），来源于*Tepidanaerobacter acetatoydans*的二氨基庚二酸脱氢酶（其氨基酸序列如SEQ ID NO.7所示）可以利用NADH催化上述四步反应。

因此，本发明提供了NADH依赖性的氨基酸脱氢酶，所述氨基酸脱氢酶为：

来源于 *Pseudomonas aeruginos* 的天冬氨酸脱氢酶；

来源于 *Tistrella mobilis* 的天冬氨酸半醛脱氢酶；

来源于 *Mycobacterium tuberculosis* 的二氢吡啶二羧酸还原酶；和/或来源于 *Tepidanaerobacter acetatoxydans* 的二氨基庚二酸脱氢酶；

5 其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.1、3、5、7 所示或如 SEQ ID No.1、3、5、7 所示氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或几个氨基酸而不影响其生物活性的氨基酸序列。

经过密码子优化，本发明提供了编码上述 NADH 依赖性的氨基酸脱氢酶的基因，其核苷酸序列分别含有如 SEQ ID NO.2、4、6、8 所示的核苷酸序列或 SEQ ID
10 No.2、4、6、8 所示核苷酸序列经取代、缺失和/或增加一个或几个碱基的具有 90% 以上同源性的、编码相同功能氨基酸脱氢酶的核苷酸序列。

本发明提供了含有上述基因的生物材料，所述生物材料为载体、重组菌、细胞系或表达盒。

优选地，所述重组菌为可以发酵生产赖氨酸或戊二胺的菌株中含有或过表达本
15 发明所述的 NADH 依赖性的氨基酸脱氢酶。

所述可以发酵生产赖氨酸或戊二胺的菌株为谷氨酸棒杆菌或大肠杆菌。

更优选地，所述重组菌为可以发酵生产赖氨酸或戊二胺的菌株中含有或过表达来源于 *Pseudomonas aeruginos* 的天冬氨酸脱氢酶和来源于 *Tistrella mobilis* 的天冬氨酸半醛脱氢酶；或

20 含有来源于 *Pseudomonas aeruginos* 的天冬氨酸脱氢酶、来源于 *Tistrella mobilis* 的天冬氨酸半醛脱氢酶和来源于 *Mycobacterium tuberculosis* 的二氢吡啶二羧酸还原酶；或

含有来源于 *Pseudomonas aeruginos* 的天冬氨酸脱氢酶、来源于 *Tistrella mobilis* 的天冬氨酸半醛脱氢酶、来源于 *Mycobacterium tuberculosis* 的二氢吡啶二羧酸还原酶和来源于 *Tepidanaerobacter acetatoxydans* 的二氨基庚二酸脱氢酶。
25

最优选地，所述重组菌为可以发酵生产赖氨酸或戊二胺的菌株中 NADPH-依赖性的氨基酸脱氢酶被本发明所述的 NADH 依赖性的氨基酸脱氢酶所替代。

在本发明的一个实施例中，重组菌 AM3 为谷氨酸棒杆菌 ATCC21543 内源的天冬氨酸转氨酶被替换成 NADH 依赖性的天冬氨酸脱氢酶（氨基酸序列 SEQ ID
30 NO.1）、内源的 NADPH-依赖型的天冬氨酸半醛转氨酶被替换成 NADH-依赖型的天冬氨酸半醛脱氢酶（氨基酸序列 SEQ ID NO.3），以及内源的 NADPH-依赖型的二

氢吡啶二羧酸还原酶被替换成 NADH-依赖型的二氢吡啶二羧酸还原酶（氨基酸序列 SEQ ID NO.5），该重组菌发酵培养基能够显著提高赖氨酸的产量，达到 27.7 g/L。

另外，本发明实施例中的重组菌 AM2 和 AM4 也取得优异的提高赖氨酸产量的效果，分别达到 25.8 g/L 和 25.6 g/L。所述重组菌 AM2 是谷氨酸棒杆菌 ATCC21543 内源的天冬氨酸转氨酶被替换成 NADH 依赖性的天冬氨酸脱氢酶（氨基酸序列 SEQ ID NO.1）、内源的 NADPH-依赖型的天冬氨酸半醛转氨酶被替换成 NADH-依赖型的天冬氨酸半醛脱氢酶（氨基酸序列 SEQ ID NO.3）。

所述重组菌 AM4 是谷氨酸棒杆菌 ATCC21543 内源的天冬氨酸转氨酶被替换成 NADH 依赖性的天冬氨酸脱氢酶（氨基酸序列 SEQ ID NO.1）、内源的 NADPH-依赖型的天冬氨酸半醛转氨酶被替换成 NADH-依赖型的天冬氨酸半醛脱氢酶（氨基酸序列 SEQ ID NO.3），内源的 NADPH-依赖型的二氢吡啶二羧酸还原酶被替换成 NADH-依赖型的二氢吡啶二羧酸还原酶（氨基酸序列 SEQ ID NO.5），以及内源的 NADPH-依赖型的二氨基庚二酸脱氢酶被替换成 NADH-依赖型的二氨基庚二酸脱氢酶。

所述发酵培养基(g/L)为：葡萄糖 80g，玉米浆 10g，尿素 4.5g，硫酸铵 45g，磷酸二氢钾 0.5g，七水硫酸镁 0.5g，七水硫酸亚铁 10mg，四水硫酸锰 10mg，β-丙氨酸 5mg，烟酸 5mg，硫胺素-盐酸 5mg，生物素 0.3mg，碳酸钙 30g，苏氨酸 0.2g，亮氨酸 0.2g，加水至 1L。

进一步地，本发明提供了上述 NADH 依赖性的氨基酸脱氢酶或其编码基因或上述含有其编码基因的生物材料在制备赖氨酸或戊二胺中的应用。

本发明提供了上述 NADH 依赖性的氨基酸脱氢酶或其编码基因或上述含有其编码基因的生物材料在提高赖氨酸产量或提高戊二胺产量中的应用。

在发酵生产戊二胺时，发酵菌株中内源的 lysE 基因被大肠杆菌的赖氨酸脱羧酶基因 cadA 所替换，可以显著提高戊二胺的产量。

本发明提供了上述 NADH 依赖性的氨基酸脱氢酶或其编码基因或上述含有其编码基因的生物材料在制备饲料添加剂中的应用。

本发明提供了上述 NADH 依赖性的氨基酸脱氢酶或其编码基因或上述含有其编码基因的生物材料在制备药物中的应用。

本发明提供的 NADH-依赖性的氨基酸脱氢酶可以用于取代谷氨酸棒杆菌自身的 NADPH-依赖性的氨基酸脱氢酶，本发明所筛选的这类特殊的氨基酸脱氢酶能直

接利用 NADH 作为辅因子或者同时利用 NADH 和 NADPH, 在赖氨酸或者戊二胺生产菌株中直接表达这类 NADH-依赖性的氨基酸脱氢酶或者用 NADH-依赖性的氨基酸脱氢酶替代对应的 NADPH-依赖性的氨基酸脱氢酶可以使细胞利用胞内丰富的 NADH 作为辅因子合成赖氨酸从而减少细胞对 NADPH 的需求, 进而显著的提高赖氨酸或者戊二胺的产量。

具体实施方式

以下实施例用于说明本发明, 但不用来限制本发明的范围。在不背离本发明精神和实质的情况下, 对本发明方法、步骤或条件所作的修改或替换, 均属于本发明的范围。

若未特别指明, 实施例中所用的化学试剂均为常规市售试剂, 实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

实施例 1 NADH-依赖型的氨基酸脱氢酶的表达及其催化性能验证

本发明通过大量的生物信息学分析和反复对比实验, 在大肠杆菌中表达不同来源的氨基酸脱氢酶的基因, 检测其催化活性, 及对辅酶 NADH、NADPH 的特异性进行检测发现, 来源于 *Pseudomonas aeruginos* 的天冬氨酸脱氢酶 (其氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示), 来源于 *Tistrella mobilis* 的天冬氨酸半醛脱氢酶 (其氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示), 来源于 *Mycobacterium tuberculosis* 的二氢吡啶二羧酸还原酶 (其氨基酸序列如 SEQ ID NO.5 所示), 来源于 *Tepidanaerobacter acetatoxydans* 的二氨基庚二酸脱氢酶 (其氨基酸序列如 SEQ ID NO.7 所示) 可以催化上述四步反应。

基于上述酶的氨基酸序列, 本发明设计并基因合成了相应的密码子优化的基因序列, 如序列 SEQ ID NO.2、4、6、8 所示。将合成后的基因片段直接插入到 pET-28a 的 EcoRI 和 SalI 双酶切位点, 所获得的质粒分别命名为 pET-adh, pET-asd, pET-dapB, pET-ddh。将上述质粒利用化学转化法转入到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中, 在含 50mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选获得重组菌, 分别命名为 BL21/ pET-adh, BL21/pET-asd, BL21/pET-dapB, BL21/pET-ddh。

将上述 BL21 菌株在含 50mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基中培养至 OD600 达到 0.6 (37°C, 150rpm), 添加 0.1mM 的 IPTG 并继续培养 12h 以诱导蛋白的表达 (20°C, 150rpm)。将菌体离心分离, 并用 100ml 100mM 的 PBS 缓冲液 (pH7.0) 洗涤两次, 最后将菌体重悬于 5ml 的 100mM 的 PBS 缓冲液 (pH7.0) 中。将所述重悬液利用超声进行破碎, 并离心获得上清液 (12000rpm, 30 分钟)。利用蛋白纯

化试剂盒 HisTrap (GE) 分离纯化酶, 用于酶活检测。

天冬氨酸脱氢酶的活性检测体系包括: 100mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH8.2), 0.2mM 的辅酶 NADH 或者 NADPH, 4mM 的草酰乙酸, 100mM 的氯化铵, 和适量的酶。反应在 37 °C 进行, 测定其在 340nm 下的吸光值变化。酶活定义为每分钟消耗 1 μ M 的 NAD (P) H 所需要的酶量 (U)。实验结果如表 1 所示。

天冬氨酸半醛脱氢酶的活性检测体系包括: 200mM 的 CHES 缓冲液 (pH9.0), 50mM 的 KPi, 0.5mM 的辅酶 NAD 或者 NADP, 2mM 的天冬氨酸半醛, 和适量的酶。反应在 25 °C 进行, 测定其在 340nm 下的吸光值变化。酶活定义为每分钟产生 1 μ M 的 NAD (P) H 所需要的酶量 (U)。实验结果如表 1 所示。

二氢吡啶二羧酸还原酶的活性检测体系包括: 100mM 的 HEPES 缓冲液 (pH7.5), 0.2mM 的辅酶 NADH 或者 NADPH, 4mM 的草酰乙酸, 1mM 的丙酮酸, 0.1mM 的天冬氨酸半醛, 25ug/ml 的二氢吡啶二羧酸合成酶, 和适量的酶。反应在 25 °C 进行, 测定其在 340nm 下的吸光值变化。酶活定义为每分钟消耗 1 μ M 的 NAD (P) H 所需要的酶量 (U)。实验结果如表 1 所示。

二氨基庚二酸脱氢酶的活性检测体系包括: 100mM 的甘氨酸-KOH 缓冲液 (pH10.0), 0.5mM 的辅酶 NAD 或者 NADP, 5mM 的二氨基庚二酸, 和适量的酶。反应在 30 °C 进行, 测定其在 340nm 下的吸光值变化。酶活定义为每分钟产生 1 μ M 的 NAD (P) H 所需要的酶量 (U)。实验结果如表 1 所示。

表 1. 不同来源的氨基酸脱氢酶的酶活 (单位 U/mg)

	天冬氨酸 脱氢酶	天冬氨酸半 醛脱氢酶	二氢吡啶二 羧酸还原酶	二氨基庚二 酸脱氢酶
来源	<i>Pseudomonas aeruginos</i>	<i>Tistrella mobilis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	<i>Tepidanaerobacter acetatoxydans</i>
以 NADH 为底物	34.5	6.7	5.6	12.6
以 NADPH 为底物	37.2	7.7	1.8	1.1

由表 1 可以看出, 本发明所筛选获得的四种酶都可以高效的利用 NADH 作为辅因子来催化目标反应, 而来自谷氨酸棒杆菌的酶基本不能利用 NADH。

实施例 2、过表达 NADH-依赖型的氨基酸脱氢酶提高谷氨酸棒杆菌赖氨酸的产量

本实施例在一株谷氨酸棒杆菌 LC298 (Applied and environmental microbiology, 2011, 02912-10) 中分别表达本发明所筛选的 NADH-依赖性的氨基酸脱氢酶, 同时也表达谷氨酸棒杆菌自身所对应的 NADPH-依赖型的氨基酸脱氢酶作为对照, 比较不同辅酶特异性的酶对于促进赖氨酸合成的影响。

以 pET-adh 为模板以分别以 acagctatgacatgattacgaaggagatatacatatgctgaacattgtgatgcgg 和

tgcctgcctgcaggtcgacttttagtgaaatggcatgggca 为引物克隆 NADH-依赖型的天冬氨酸脱氢酶基因片段, 利用 Gibson 组装试剂盒将该片段连接到质粒 pEC-K18mob2 (从

Addgene 购买) 的 EcoRI 和 XbaI 位点内, 所获得的质粒命名为 pEC-adh_pa。将 pEC-adh_pa 电转化到谷氨酸棒杆菌 LC298 中(电转条件为电压 2.5KV, 200Ω, 2mm 电转杯), 含 50mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选获得重组菌, 分别命名为 LC/pEC-adh_pa。同时以谷氨酸棒杆菌 LC298 为模板, 以

acagctatgacatgattacgaaggagatatacatatgagttcagttcgctgcagga 和

tgcctgcctgcaggtcgacttttagtcgtaatgctccgctgc 为引物克隆谷氨酸棒杆菌自身的天冬氨酸氨基转移酶基因片段, 利用 Gibson 组装试剂盒将该片段连接到质粒 pEC-K18mob2 (从 Addgene 购买) 的 EcoRI 和 XbaI 位点内, 所获得的质粒命名为 pEC-aspC_cg。

将 pEC-aspC_cg 电转化到谷氨酸棒杆菌 LC298 中(电转条件为电压 2.5KV, 200Ω, 2mm 电转杯), 含 50mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选获得重组菌, 分别命名为 LC/pEC-aspC_cg。

以 pET-asd 为模板以分别以 acagctatgacatgattacgaaggagatatacatatgcgtatcgggattgttga 和

tgcctgcctgcaggtcgactttacaccagtaactctgcgatttgc 为引物克隆 NADH-依赖型的天冬氨酸半醛脱氢酶基因片段, 利用 Gibson 组装试剂盒将该片段连接到质粒 pEC-K18mob2

(从 Addgene 购买) 的 EcoRI 和 XbaI 位点内, 所获得的质粒命名为 pEC-asd_tm。

将 pEC-asd_tm 电转化到谷氨酸棒杆菌 LC298 中(电转条件为电压 2.5KV, 200Ω, 2mm 电转杯), 含 50mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选获得重组菌, 分别命名为 LC/pEC-asd_tm。同时以谷氨酸棒杆菌 LC298 为模板, 以

acagctatgacatgattacgaaggagatatacatatgaccaccatcgagttgtt 和

tgcctgcctgcaggtcgactttacttaaccagcagctcag 为引物克隆谷氨酸棒杆菌自身的天冬氨酸半醛脱氢酶基因片段, 利用 Gibson 组装试剂盒将该片段连接到质粒 pEC-K18mob2

(从 Addgene 购买) 的 EcoRI 和 XbaI 位点内, 所获得的质粒命名为 pEC-asd_cg。将 pEC-asd_cg 电转化到谷氨酸棒杆菌 LC298 中 (电转条件为电压 2.5KV, 200Ω, 2mm 电转杯), 含 50mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选获得重组菌, 分别命名为 LC/pEC-asd_cg。

5 以 pET-dapB 为模板以分别以 acagctatgacatgattacgaaggagatatacatatgcggtaggcgtccttgg 和 tgcattgcctgcaggtcgactttacaaatttcagtgcagatcgagtagggg 为引物克隆 NADH-依赖型的二氢吡啶二羧酸还原酶基因片段, 利用 Gibson 组装试剂盒将该片段连接到质粒 pEC-K18mob2 (从 Addgene 购买) 的 EcoRI 和 XbaI 位点内, 所获得的质粒命名为 pEC-dapB_mt。将 pEC-dapB_mt 电转化到谷氨酸棒杆菌 LC298 中
10 (电转条件为电压 2.5KV, 200Ω, 2mm 电转杯), 含 50mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选获得重组菌, 分别命名为 LC/pEC-dapB_mt。同时以谷氨酸棒杆菌 LC298 为模板, 以 acagctatgacatgattacgaaggagatatacatatgggaatcaagggttggcgt 和 tgcattgcctgcaggtcgactttacaggcctaggaatgtctca 为引物克隆谷氨酸棒杆菌自身的二氢吡啶二羧酸还原酶基因片段, 利用 Gibson 组装试剂盒将该片段连接到质粒
15 pEC-K18mob2 (从 Addgene 购买) 的 EcoRI 和 XbaI 位点内, 所获得的质粒命名为 pEC-pEC-dapB_cg。将 pEC-dapB_cg 电转化到谷氨酸棒杆菌 LC298 中 (电转条件为电压 2.5KV, 200Ω, 2mm 电转杯), 含 50mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选获得重组菌, 分别命名为 LC/pEC-dapB_cg。

以 pET-ddh 为模板以分别以
20 acagctatgacatgattacgaaggagatatacatatgccaaagaccaaagtgc 和 tgcattgcctgcaggtcgactttagaccagacgacaaattaattgttctaagtgc 为引物克隆 NADH-依赖型的二氨基庚二酸脱氢酶基因片段, 利用 Gibson 组装试剂盒将该片段连接到质粒 pEC-K18mob2 (从 Addgene 购买) 的 EcoRI 和 XbaI 位点内, 所获得的质粒命名为 pEC-ddh_ta。将 pEC-ddh_ta 电转化到谷氨酸棒杆菌 LC298 中 (电转条件为电压
25 2.5KV, 200Ω, 2mm 电转杯), 含 50mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选获得重组菌, 分别命名为 LC/pEC-ddh_ta。同时以谷氨酸棒杆菌 LC298 为模板, 以 acagctatgacatgattacgaaggagatatacatatgaccaacatccgcgtagcta 和 tgcattgcctgcaggtcgactttagacgtcgctgcgatca 为引物克隆谷氨酸棒杆菌自身的二氨基庚二酸脱氢酶基因片段, 利用 Gibson 组装试剂盒将该片段连接到质粒 pEC-K18mob2
30 (从 Addgene 购买) 的 EcoRI 和 XbaI 位点内, 所获得的质粒命名为 pEC-ddh_cg。将 pEC-ddh_cg 电转化到谷氨酸棒杆菌 LC298 中 (电转条件为电压 2.5KV, 200Ω,

2mm 电转杯), 含 50mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选获得重组菌, 分别命名为 LC/pEC-ddh_cg。

将空质粒 pEC-K18mob2 电转化到谷氨酸棒杆菌 LC298 中 (电转条件为电压 2.5KV, 200Ω, 2mm 电转杯), 含 50mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选获得重组菌, 分别命名为 LC/pEC-K18 作为对照菌株。

将上述所获得的谷氨酸棒杆菌 LC298 的衍生菌株分别在发酵培养基中培养 72h (30°C, 200rpm), 检测赖氨酸的产量。发酵培养基的成分为 (g/L): 葡萄糖 80g, 玉米浆 10g, 尿素 4.5g, 硫酸铵 45g, 磷酸二氢钾 0.5g, 七水硫酸镁 0.5g, 七水硫酸亚铁 10mg, 四水硫酸锰 10mg, β-丙氨酸 5mg, 烟酸 5mg, 硫胺素-盐酸 5mg, 生物素 0.3mg, 碳酸钙 30g, 卡那霉素 25mg。

其中对照菌株 LC/pEC-K18 赖氨酸的产量为 14.01 g/L, 其他菌株的发酵结果如表 2 所示, 说明过表达 NADH-依赖型的氨基酸脱氢酶可以显著提高赖氨酸的产量, 并且效果优于来源于谷氨酸棒杆菌自身的 NADPH-依赖型氨基酸脱氢酶。

表 2. 表达不同辅酶特异性的氨基酸脱氢酶菌株的赖氨酸产量 (单位 g/L)

天冬氨酸脱氢酶		天冬氨酸半醛脱氢酶	
LC/pEC-adh_pa	LC/pEC-aspC_cg	LC/pEC-asp_tm	LC/pEC-asp_cg
18.31	14.28	18.55	14.35
二氢吡啶二羧酸还原酶		二氨基庚二酸脱氢酶	
LC/pEC-dapB_mt	LC/pEC-dapB_cg	LC/pEC-ddh_ta	LC/pEC-ddh_cg
17.32	14.15	19.98	18.75

实施例 3 利用 NADH-依赖型的氨基酸脱氢酶替换 NADPH-依赖型的氨基酸脱氢酶提高赖氨酸的产量

除了可以直接过表达 NADH-依赖型的氨基酸脱氢酶提高赖氨酸产量以外, 还可以直接用 NADH-依赖型的氨基酸脱氢酶替换谷氨酸棒杆菌中对应的 NADPH-依赖型的氨基酸脱氢酶以提高赖氨酸的产量。本实施例在一株谷氨酸棒杆菌 ATCC 21543 中利用同源重组的方法分别将细胞自身 NADPH-依赖型的氨基酸脱氢酶逐一替换为表达本发明所筛选的 NADH-依赖性的氨基酸脱氢酶, 考察其对于促进赖氨酸合成的影响。

以 pET-adh 为模板以分别以 gtacgcagttatgctgaacattgtgatgatcgatg 和 gctgtattcacttttagattgaaatggcatgggcatgattt 为引物克隆 NADH-依赖型的天冬氨酸脱氢酶基因片段 adh, 以 ATCC 21543 的基因组为模板分别以 acagctatgacatgattacggagttcttcttcagcgctgcg 和 tggtcagcataactgcgtacctccgcatgtg 为引物克

隆基因片段 adh-up , 以 ATCC 21543 的基因组为模板分别以 attcaactctaaaagtgaatacagcggagacagc 和 tgcattgcctgcaggtcgactctcttcaacgatttcagcaaggc 为引物克隆基因片段 adh-down, 利用 Gibson 组装试剂盒将这三个片段连接到质粒 pK18-mobsacB (从 Addgene 购买) 的 EcoRI 和 XbaI 位点内, 所获得的质粒命名为 pK18-adh。将 pK18-adh 电转化到谷氨酸棒杆菌 ATCC 21543 中 (电转条件为电压 2.5KV, 200Ω, 2mm 电转杯), 通过两次筛选获得重组菌。一次重组菌在含 25mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选。该重组菌进一步在液体 LB 培养基里过夜培养, 之后在含有 100g/L 的蔗糖 LB 平板上进行二次筛选, 获得正确重组菌株命名为 AM1: aspC, 该菌株的主要特征是内源的天冬氨酸转氨酶被替换成 NADH-依赖型的天冬氨酸脱氢酶。

以 pET-asd 为模板以分别以 tagttttacaatgcgtatcgggattgttgagg 和 atggcgggtttttacaccagtaactctgcgatttgcac 为引物克隆 NADH-依赖型的天冬氨酸半醛脱氢酶基因片段 asd , 以 ATCC 21543 的基因组为模板分别以 acagctatgacatgattacgagcccaatctttcacgggc 和 cgatacgcattgtaaaactactcctttaaaacttttagcgctccg 为引物克隆基因片段 asd , 以 ATCC 21543 的基因组为模板分别以 tactggtgtaaaaacccgccattaaaaactccg 和 tgcattgcctgcaggtcgactatttgggtcattatctcggaaaaatgcg 为引物克隆基因片段 asd-down, 利用 Gibson 组装试剂盒将这三个片段连接到质粒 pK18-mobsacB (从 Addgene 购买) 的 EcoRI 和 XbaI 位点内, 所获得的质粒命名为 pK18-asd。将 pK18-asd 电转化到谷氨酸棒杆菌 ATCC 21543 中 (电转条件为电压 2.5KV, 200Ω, 2mm 电转杯), 通过两次筛选获得重组菌。一次重组菌在含 25mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选。该重组菌进一步在液体 LB 培养基里过夜培养, 之后在含有 100g/L 的蔗糖 LB 平板上进行二次筛选, 获得正确重组菌株命名为 AM1: asd, 该菌株的主要特征是内源的 NADPH-依赖型的天冬氨酸半醛转氨酶被替换成 NADH-依赖型的天冬氨酸半醛脱氢酶。

以 pET-dapB 为模板以分别以 aaggagcataatgcatgatgcaaactccgc 和 tgaaatgagcctttacaaattattgagatcaagtacatctcgcatacaaaaag 为引物克隆 NADH-依赖型的二氢吡啶二羧酸还原酶基因片段 dapB, 以 ATCC 21543 的基因组为模板分别以 acagctatgacatgattacgctagatcgggctagatcgggctaa 和 catcatgcattatgctccttcattttcgtggggc 为引物克隆基因片段 dapB-up , 以 ATCC 21543 的基因组为模板分别以 aataatttgtaaaggctcatttcagcagcgg 和 tgcattgcctgcaggtcgactttaaaagtcattgacatacgggcttgt 为引物克隆基因片段 dapB-down, 利用 Gibson 组装试剂盒将这三个片段连接到质粒

pK18-mobsacB (从 Addgene 购买) 的 EcoRI 和 XbaI 位点内, 所获得的质粒命名为 pK18-dapB。将 pK18-dapB 电转化到谷氨酸棒杆菌 ATCC 21543 中 (电转条件为电压 2.5KV, 200Ω, 2mm 电转杯), 通过两次筛选获得重组菌。一次重组菌在含 25mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选。该重组菌进一步在液体 LB 培养基里过夜培养, 之后在含有 100g/L 的蔗糖 LB 平板上进行二次筛选, 获得正确重组菌株命名为 AM1: dapB, 该菌株的主要特征是内源的 NADPH-依赖型的二氢吡啶二羧酸还原酶被替换成 NADH-依赖型的二氢吡啶二羧酸还原酶。

以 pET-ddh 为模板以分别以 ttacaagaacatgccaaagaccaaagtgtg 和 tcgagctaaattagaccagacgacaaattaattgttctaagtcg 为引物克隆 NADH-依赖型的二氨基庚二酸脱氢酶基因片段 ddh, 以 ATCC 21543 的基因组为模板分别以 acagctatgacatgattacgatcgtcaaggctgctgctg 和 tctttggcatgttcttgaatcctccaaaattgtggtgg 为引物克隆基因片段 ddh-up, 以 ATCC 21543 的基因组为模板分别以 tctggtctaatttagctcgaggggcaaggaa 和 tgcattgctgcaggtcgactcttccccgcaagacgatg 为引物克隆基因片段 ddh-down, 利用 Gibson 组装试剂盒将这三个片段连接到质粒 pK18-mobsacB (从 Addgene 购买) 的 EcoRI 和 XbaI 位点内, 所获得的质粒命名为 pK18-ddh。将 pK18-ddh 电转化到谷氨酸棒杆菌 ATCC 21543 中 (电转条件为电压 2.5KV, 200Ω, 2mm 电转杯), 通过两次筛选获得重组菌。一次重组菌在含 25mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选。该重组菌进一步在液体 LB 培养基里过夜培养, 之后在含有 100g/L 的蔗糖 LB 平板上进行二次筛选, 获得正确重组菌株命名为 AM1: ddh, 该菌株的主要特征是内源的 NADPH-依赖型的二氨基庚二酸脱氢酶被替换成 NADH-依赖型的二氨基庚二酸脱氢酶。

将 pK18-asd 电转化到谷氨酸棒杆菌 AM1: aspC 中 (电转条件为电压 2.5KV, 200Ω, 2mm 电转杯), 通过两次筛选获得重组菌。一次重组菌在含 25mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选。该重组菌进一步在液体 LB 培养基里过夜培养, 之后在含有 100g/L 的蔗糖 LB 平板上进行二次筛选, 获得正确重组菌株命名为 AM2, 该菌株的主要特征是内源的天冬氨酸转氨酶被替换成 NADH-依赖型的天冬氨酸脱氢酶, 以及内源的 NADPH-依赖型的天冬氨酸半醛转氨酶被替换成 NADH-依赖型的天冬氨酸半醛脱氢酶。

将 pK18-dapB 电转化到谷氨酸棒杆菌 AM2 中 (电转条件为电压 2.5KV, 200Ω, 2mm 电转杯), 通过两次筛选获得重组菌。一次重组菌在含 25mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选。该重组菌进一步在液体 LB 培养基里过夜培养, 之后在含有 100g/L 的

蔗糖 LB 平板上进行二次筛选，获得正确重组菌株命名为 AM3，该菌株的主要特征是内源的天冬氨酸转氨酶被替换成 NADH-依赖型的天冬氨酸脱氢酶，以及内源的 NADPH-依赖型的天冬氨酸半醛转氨酶被替换成 NADH-依赖型的天冬氨酸半醛脱氢酶，以及内源的 NADPH-依赖型的二氢吡啶二羧酸还原酶被替换成 NADH-依赖型的二氢吡啶二羧酸还原酶。

将 pK18-ddh 电转化到谷氨酸棒杆菌 AM3 中（电转条件为电压 2.5KV，200Ω，2mm 电转杯），通过两次筛选获得重组菌。一次重组菌在含 25mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选。该重组菌进一步在液体 LB 培养基里过夜培养，之后在含有 100g/L 的蔗糖 LB 平板上进行二次筛选，获得正确重组菌株命名为 AM4，该菌株的主要特征是内源的天冬氨酸转氨酶被替换成 NADH-依赖型的天冬氨酸脱氢酶，以及内源的 NADPH-依赖型的天冬氨酸半醛转氨酶被替换成 NADH-依赖型的天冬氨酸半醛脱氢酶，以及内源的 NADPH-依赖型的二氢吡啶二羧酸还原酶被替换成 NADH-依赖型的二氢吡啶二羧酸还原酶，以及内源的 NADPH-依赖型的二氨基庚二酸脱氢酶被替换成 NADH-依赖型的二氨基庚二酸脱氢酶。

将上述所获得的谷氨酸棒杆菌 ATCC 21543 的衍生菌株分别在发酵培养基中培养 72h（30°C，200rpm），检测赖氨酸的产量。发酵培养基的成分为（g/L）：葡萄糖 80g，玉米浆 10g，尿素 4.5g，硫酸铵 45g，磷酸二氢钾 0.5g，七水硫酸镁 0.5g，七水硫酸亚铁 10mg，四水硫酸锰 10mg，β-丙氨酸 5mg，烟酸 5mg，硫胺素-盐酸 5mg，生物素 0.3mg，碳酸钙 30g，苏氨酸 0.2g，亮氨酸 0.2g。各菌株的发酵结果如表 3 所示，说明利用本发明所筛选的 NADH-依赖型的氨基酸脱氢酶单独或者组合替换谷氨酸棒杆菌自身的 NADPH-依赖型的氨基酸脱氢酶可以显著提高赖氨酸的产量。

表 3. 替换氨基酸脱氢酶重组菌株的赖氨酸产量（单位 g/L）

ATCC 21543	AM1:aspC	AM1:asd	AM1:dapB	AM1:ddh	AM2	AM3	AM4
21.2	23.8	24.1	23.7	22.6	25.8	27.7	25.6

实施例 4 利用包含 NADH-依赖型的氨基酸脱氢酶的谷氨酸棒杆菌提高戊二胺的产量

在上述表达 NADH 依赖型的菌株中表达赖氨酸脱羧酶可以实现戊二胺的直接生物合成。本实施例在实施例 3 所获得的菌株的基础上，利用同源重组的方法将赖氨酸的外排基因 lysE 替换为来源于大肠杆菌的谷氨酸脱羧酶基因 cadA，实现从葡萄糖到戊二胺的直接生产，考察 NADH 依赖型的氨基酸脱氢酶对于促进戊二胺合

成的影响。

以大肠杆菌 MG1655 为模板分别以
TTCGTGGTGTGCCCCGTGGCCCGGTTGGTTGGGCAGGAGTATATTGGGATCCa
tgAACGTTATTGCAATATTGAATC 和

5 catcaacatcagttatTTTTTTGCTTTCTTCTTTCAATAC 为引物克隆赖氨酸脱羧酶基因
片段 cadA，以 ATCC 21543 的基因组为模板分别以
acagctatgacatgattacgcggcggaagaagtgaataacc 和

GCCACGGGCAACACCACGAATGCGCTACCTTAACCGAAAAGTTACTTTcgtgac
ctatggaagtacttaa 为引物克隆基因片段 cadA-up，以 ATCC 21543 的基因组为模板分
10 别以 GCAAAAAAataactgatgttgatgggttagttttcgc 和

tgcatacctgcaggtcgactttcaacgcagcgcagcatta 为引物克隆基因片段 cadA-down，利用
Gibson 组装试剂盒将这三个片段连接到质粒 pK18-mobsacB（从 Addgene 购买）的
EcoRI 和 XbaI 位点内，所获得的质粒命名为 pK18-cadA。将 pK18-cadA 分别电转

15 ddh，AM2，AM3，AM4 中（电转条件为电压 2.5KV，200Ω，2mm 电转杯），通
过两次筛选获得重组菌。一次重组菌在含 25mg/L 的卡那霉素 LB 平板上筛选。该
重组菌进一步在液体 LB 培养基里过夜培养，之后在含有 100g/L 的蔗糖 LB 平板上
进行二次筛选，获得正确重组菌株分别命名为 ATCC 21543-cadA，AM1：
aspC-cadA，AM1：asd-cadA，AM1：dapB-cadA，AM1：ddh-cadA，AM2-cadA，
20 AM3-cadA，AM4-cadA。这些菌株的特征是其内源的 lysE 基因被大肠杆菌的赖氨
酸脱羧酶基因 cadA 所替换。

将上述所获得的谷氨酸棒杆菌菌株分别在发酵培养基中培养 72h（30℃，
200rpm），检测赖氨酸的产量。发酵培养基的成分为（g/L）：葡萄糖 80g，玉米浆

10g，尿素 4.5g，硫酸铵 45g，磷酸二氢钾 0.5g，七水硫酸镁 0.5g，七水硫酸亚
25 铁 10mg，四水硫酸锰 10mg，β-丙氨酸 5mg，烟酸 5mg，硫胺素-盐酸 5mg，生物素
0.3mg，碳酸钙 30g，苏氨酸 0.2g，亮氨酸 0.2g。各菌株的发酵结果如表 4 所示，说
明利用本发明所筛选的 NADH-依赖型的氨基酸脱氢酶单独或者组合替换谷氨酸棒
杆菌自身的 NADPH-依赖型的氨基酸脱氢酶可以显著提高戊二胺的产量。

表 4. 替换氨基酸脱氢酶重组菌株的戊二胺产量（单位 g/L）

ATCC 21543-cadA	AM1:aspC-cadA	AM1:asd-cadA	AM1:dapB-cadA
17.2	18.7	19.6	18.9

AM1:ddh-cadA	AM2-cadA	AM3-cadA	AM4-cadA
18.6	20.2	22.3	19.4

虽然，上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述，但在本发明基础上，可以对之作一些修改或改进，这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此，在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进，均属于本发明

5 要求保护的范围。

权 利 要 求 书

1、NADH 依赖性的氨基酸脱氢酶，所述氨基酸脱氢酶为：

来源于 *Pseudomonas aeruginos* 的天冬氨酸脱氢酶；

来源于 *Tistrella mobilis* 的天冬氨酸半醛脱氢酶；

来源于 *Mycobacterium tuberculosis* 的二氢吡啶二羧酸还原酶；和/或

来源于 *Tepidanaerobacter acetatoxydans* 的二氨基庚二酸脱氢酶；

其氨基酸序列分别如 SEQ ID NO.1、3、5、7 所示或如 SEQ ID No.1、3、5、7 所示氨基酸序列经取代、缺失和/或增加一个或几个氨基酸而不影响其生物活性的氨基酸序列。

2、编码权利要求 1 所述 NADH 依赖性的氨基酸脱氢酶的基因，其特征在于，其核苷酸序列分别含有如 SEQ ID NO.2、4、6、8 所示的核苷酸序列或 SEQ ID No.2、4、6、8 所示核苷酸序列经取代、缺失和/或增加一个或几个碱基的具有 90%以上同源性的、编码相同功能氨基酸脱氢酶的核苷酸序列。

3、含有权利要求 2 所述基因的生物材料，其特征在于，所述生物材料为载体、重组菌、细胞系或表达盒。

4、如权利要求 3 所述的生物材料，其特征在于，所述重组菌为可以发酵生产赖氨酸或戊二胺的菌株中含有或过表达权利要求 1 所述的 NADH 依赖性的氨基酸脱氢酶。

5、如权利要求 4 所述的生物材料，其特征在于，所述重组菌为可以发酵生产赖氨酸或戊二胺的菌株中含有或过表达来源于 *Pseudomonas aeruginos* 的天冬氨酸脱氢酶和来源于 *Tistrella mobilis* 的天冬氨酸半醛脱氢酶；或

含有或过表达来源于 *Pseudomonas aeruginos* 的天冬氨酸脱氢酶、来源于 *Tistrella mobilis* 的天冬氨酸半醛脱氢酶和来源于 *Mycobacterium tuberculosis* 的二氢吡啶二羧酸还原酶；或

含有或过表达来源于 *Pseudomonas aeruginos* 的天冬氨酸脱氢酶、来源于 *Tistrella mobilis* 的天冬氨酸半醛脱氢酶、来源于 *Mycobacterium tuberculosis* 的二氢吡啶二羧酸还原酶和来源于 *Tepidanaerobacter acetatoxydans* 的二氨基庚二酸脱氢酶。

6、如权利要求 3-5 任一所述的生物材料，其特征在于，所述重组菌为可以发酵生产赖氨酸或戊二胺的菌株中 NADPH-依赖性的氨基酸脱氢酶被权利要求 1 所述的 NADH 依赖性的氨基酸脱氢酶所替代。

7、权利要求 1 所述的 NADH 依赖性的氨基酸脱氢酶或其编码基因或权利要求 3-6 任一所述的生物材料在制备赖氨酸或戊二胺中的应用。

8、权利要求 1 所述的 NADH 依赖性的氨基酸脱氢酶或其编码基因或权利要求 3-6 任一所述的生物材料在提高赖氨酸产量或提高戊二胺产量中的应用。

9、如权利要求 7 或 8 所述的应用，其特征在于，发酵生产戊二胺时，发酵菌株中内源的 *lysE* 基因被大肠杆菌的赖氨酸脱羧酶基因 *cadA* 所替换。

10、权利要求 1 所述的 NADH 依赖性的氨基酸脱氢酶或其编码基因或权利要求 3-6 任一所述的生物材料在制备药物或饲料添加剂中的应用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/101521

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/02(2006.01)i; C12N 9/06(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 13/08(2006.01)i;
C12P 13/00(2006.01)i; A23K 20/189(2016.01)i; A23K 10/18(2016.01)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 A23K

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, SIPOABS, DWPI, CNKI, google, baidu, patentics, NCBI genbank, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 清华大学, 陈振, 刘德华, NADH依赖性的氨基酸脱氢酶, 赖氨酸, 天冬氨酸脱氢酶, 天冬氨酸半醛脱氢酶, 二氢吡啶二羧酸还原酶, 二氨基庚二酸脱氢酶, 赖氨酸脱羧酶, 氨基酸脱氢酶, 辅因子, 合成赖氨酸, 提高赖氨酸, 戊二胺, 饲料, SEQ ID NOs.1-8, Pseudomonas aeruginos, aspC, Tistrella mobilis, asd, Mycobacterium tuberculosis, dapB, Tepidanaerobacter acetatodydans, lysA, lysE, cadA, Ddh, NADH, NADPH, feed

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NCBI GenBank. "MULTISPECIES: L-Aspartate Dehydrogenase [Pseudomonas], NCBI Reference Sequence: WP_003112905.1, 267aa Linear." NCBI GenBank., 21 July 2015 (2015-07-21), page 1	1-6
Y	NCBI GenBank. "MULTISPECIES: L-Aspartate Dehydrogenase [Pseudomonas], NCBI Reference Sequence: WP_003112905.1, 267aa Linear." NCBI GenBank., 21 July 2015 (2015-07-21), page 1	7-10
X	NCBI GenBank. "Aspartate-Semialdehyde Dehydrogenase [Tistrella mobilis], NCBI Reference Sequence: WP_014746527.1, 330aa linear." NCBI GenBank., 19 May 2013 (2013-05-19), page 1	1-6



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
 "D" document cited by the applicant in the international application
 "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

07 November 2019

Date of mailing of the international search report

18 November 2019

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/CN2019/101521

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NCBI GenBank. "Aspartate-Semialdehyde Dehydrogenase [Tistrella mobilis], NCBI Reference Sequence: WP_014746527.1, 330aa linear." <i>NCBI GenBank.</i> , 19 May 2013 (2013-05-19), page 1	7-10
X	CHRUSZCZ, M. "Chain A, 4-Hydroxy-Tetrahydrodipicolinate Reductase, PDB: 5TEK_A, 250aa Linear." <i>NCBI GenBank.</i> , 26 October 2017 (2017-10-26), pages 1 and 2	1-6
Y	CHRUSZCZ, M. "Chain A, 4-Hydroxy-Tetrahydrodipicolinate Reductase, PDB: 5TEK_A, 250aa Linear." <i>NCBI GenBank.</i> , 26 October 2017 (2017-10-26), pages 1 and 2	7-10
X	NCBI GenBank. "Diaminopimelate Dehydrogenase [Tepidanaerobacter Acetatoxydans], NCBI Reference Sequence: WP_013779049.1, 301aa linear." <i>NCBI GenBank.</i> , 08 February 2016 (2016-02-08), page 1	1-6
Y	NCBI GenBank. "Diaminopimelate Dehydrogenase [Tepidanaerobacter Acetatoxydans], NCBI Reference Sequence: WP_013779049.1, 301aa linear." <i>NCBI GenBank.</i> , 08 February 2016 (2016-02-08), page 1	7-10
X	PAVELKA, M. S. et al. "Mycobacterium Tuberculosis Dihydrodipicolinate Reductase (dapB) Gene, Complete cds, GenBank: U66101.1, 1150bp DNA linear." <i>NCBI GenBank.</i> , 16 April 1997 (1997-04-16), page 1	2-6
Y	PAVELKA, M. S. et al. "Mycobacterium Tuberculosis Dihydrodipicolinate Reductase (dapB) Gene, Complete cds, GenBank: U66101.1, 1150bp DNA linear." <i>NCBI GenBank.</i> , 16 April 1997 (1997-04-16), page 1	7-10
Y	李东霞等 (LI, Dongxia et al.). "生物法合成戊二胺研究进展 (Progress in Biosynthesis of Diaminopentane)" <i>生物工程学报 (Chinese Journal of Biotechnology)</i> , Vol. 30, No. 2, 25 February 2014 (2014-02-25), pages 161-174	7-10
X	NCBI GenBank. "L-Aspartate Dehydrogenase [Pseudomonas Aeruginosa], NCBI Reference Sequence: WP_003453564.1, 267aa linear." <i>NCBI GenBank.</i> , 12 May 2013 (2013-05-12), page 1	1-6
X	TULLY, B. J. et al. "Aspartate-Semialdehyde Dehydrogenase [Tistrella sp.], GenBank: MAM72981.1, 330aa linear." <i>NCBI GenBank.</i> , 13 July 2018 (2018-07-13), pages 1 and 2	1-6
X	ZHANG, Y. et al. "Dihydrodipicolinate Reductase [Mycobacterium Tuberculosis CCDC5079], GenBank: AEJ47734.1, 248aa linear." <i>NCBI GenBank.</i> , 30 January 2014 (2014-01-30), page 1	1-6
PX	CN 109182283 A (TSINGHUA UNIVERSITY) 11 January 2019 (2019-01-11) claims 1-10	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/101521

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/CN2019/101521

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	109182283	A	11 January 2019	None	

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/101521

A. 主题的分类

C12N 9/02(2006.01)i; C12N 9/06(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12P 13/08(2006.01)i; C12P 13/00(2006.01)i; A23K 20/189(2016.01)i; A23K 10/18(2016.01)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 A23K

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, SIPOABS, DWPI, CNKI, google, baidu, patentics, NCBI genbank, 中国专利生物序列检索系统, 清华大学, 陈振, 刘德华, NADH依赖性的氨基酸脱氢酶, 赖氨酸, 天冬氨酸脱氢酶, 天冬氨酸半醛脱氢酶, 二氢吡啶二羧酸还原酶, 二氨基庚二酸脱氢酶, 赖氨酸脱羧酶, 氨基酸脱氢酶, 辅因子, 合成赖氨酸, 提高赖氨酸, 戊二胺, 饲料, SEQ ID Nos. 1-8, Pseudomonas aeruginos, aspC, Tistrella mobilis, asd, Mycobacterium tuberculosis, dapB, Tepidanaerobacter acetatoxydans, lysA, lysE, cadA, Ddh, NADH, NADPH, feed.

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
X	NCBI genbank. "MULTISPECIES: L-aspartate dehydrogenase [Pseudomonas], NCBI Reference Sequence: WP_003112905.1, 267aa linear." NCBI genbank., 2015年 7月 21日 (2015 - 07 - 21), 第1页	1-6
Y	NCBI genbank. "MULTISPECIES: L-aspartate dehydrogenase [Pseudomonas], NCBI Reference Sequence: WP_003112905.1, 267aa linear." NCBI genbank., 2015年 7月 21日 (2015 - 07 - 21), 第1页	7-10
X	NCBI genbank. "aspartate-semialdehyde dehydrogenase [Tistrella mobilis], NCBI Reference Sequence: WP_014746527.1, 330aa linear." NCBI genbank., 2013年 5月 19日 (2013 - 05 - 19), 第1页	1-6

☒ 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

2019年 11月 7日

国际检索报告邮寄日期

2019年 11月 18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

朱宁

电话号码 86-(10)-53961956

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	NCBI genbank. "aspartate-semialdehyde dehydrogenase [Tistrella mobilis], NCBI Reference Sequence: WP_014746527.1, 330aa linear." NCBI genbank., 2013年 5月 19日 (2013 - 05 - 19), 第1页	7-10
X	CHRUSZCZ, M. "Chain A, 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate Reductase, PDB: 5TEK_A, 250aa linear." NCBI genbank., 2017年 10月 26日 (2017 - 10 - 26), 第1-2页	1-6
Y	CHRUSZCZ, M. "Chain A, 4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate Reductase, PDB: 5TEK_A, 250aa linear." NCBI genbank., 2017年 10月 26日 (2017 - 10 - 26), 第1-2页	7-10
X	NCBI genbank. "diaminopimelate dehydrogenase [Tepidanaerobacter acetatoxydans], NCBI Reference Sequence: WP_013779049.1, 301aa linear." NCBI genbank., 2016年 2月 8日 (2016 - 02 - 08), 第1页	1-6
Y	NCBI genbank. "diaminopimelate dehydrogenase [Tepidanaerobacter acetatoxydans], NCBI Reference Sequence: WP_013779049.1, 301aa linear." NCBI genbank., 2016年 2月 8日 (2016 - 02 - 08), 第1页	7-10
X	PAVELKA, M.S. 等. "Mycobacterium tuberculosis dihydrodipicolinate reductase (dapB) gene, complete cds, GenBank: U66101.1, 1150bp DNA linear." NCBI genbank., 1997年 4月 16日 (1997 - 04 - 16), 第1页	2-6
Y	PAVELKA, M.S. 等. "Mycobacterium tuberculosis dihydrodipicolinate reductase (dapB) gene, complete cds, GenBank: U66101.1, 1150bp DNA linear." NCBI genbank., 1997年 4月 16日 (1997 - 04 - 16), 第1页	7-10
Y	李东霞等. "生物法合成戊二胺研究进展." 生物工程学报., 第30卷, 第2期, 2014年 2月 25日 (2014 - 02 - 25), 第161-174页	7-10
X	NCBI genbank. "L-aspartate dehydrogenase [Pseudomonas aeruginosa], NCBI Reference Sequence: WP_003453564.1, 267aa linear." NCBI genbank., 2013年 5月 12日 (2013 - 05 - 12), 第1页	1-6
X	TULLY, B.J. 等. "aspartate-semialdehyde dehydrogenase [Tistrella sp.], GenBank: MAM72981.1, 330aa linear." NCBI genbank., 2018年 7月 13日 (2018 - 07 - 13), 第1-2页	1-6
X	ZHANG, Y. 等. "dihydrodipicolinate reductase [Mycobacterium tuberculosis CCDC5079], GenBank: AEJ47734.1, 248aa linear." NCBI genbank., 2014年 1月 30日 (2014 - 01 - 30), 第1页	1-6
PX	CN 109182283 A (清华大学) 2019年 1月 11日 (2019 - 01 - 11) 权利要求第1-10项	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/CN2019/101521

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 109182283 A	2019年 1月 11日	无	