

## (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  
2023年9月14日 (14.09.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/169168 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
*C12N 15/60* (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)  
*C12N 9/88* (2006.01) *C12P 13/02* (2006.01)  
*C12N 15/70* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/076309
- (22) 国际申请日: 2023年2月16日 (16.02.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
202210214711.3 2022年3月7日 (07.03.2022) CN
- (71) 申请人: 中国科学院微生物研究所 (INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。
- (72) 发明人: 温廷益 (WEN, Tingyi); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。 刘树文 (LIU, Shuwen); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。 李忠财 (LI, Zhongcai); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。 孙佳慧 (SUN, Jiahui); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。 邓爱华 (DENG, Aihua); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。 张芸 (ZHANG, Yun); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。
- (74) 代理人: 北京大田律师事务所等 (BEIJING DATIAN LAW FIRM et al.); 中国北京市石景山区石景山路23号, Beijing 100040 (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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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: USE OF ASPARTATE DECARBOXYLASE IN FERMENTATION PRODUCTION OF VITAMIN B5

(54) 发明名称: 天冬氨酸脱羧酶在发酵生产维生素B5中的应用

(57) Abstract: The present invention relates to the field of microorganisms, in particular to a method for producing vitamin B5 by means of high-activity aspartate decarboxylase. L-aspartate  $\alpha$ -decarboxylase (PanD) derived from *Bacillus licheniformis* is screened, and the activity of producing  $\beta$ -alanine by means of catalysis is obviously higher than that of PanD derived from others. The engineering bacteria for producing vitamin B5 by means of fermentation are constructed by using PanD derived from *B.licheniformis*, and a  $\beta$ -alanine metabolism bottleneck of biosynthesizing vitamin B5 is relieved. Compared with a high-pollution chemical method for producing vitamin B5, the biological method for producing vitamin B5 has advantages such as renewable raw materials, easy disposal and resource utilization of waste slag, waste water and waste gas, thus can be used for industrial production of vitamin B5 in practice, and has important use value.

(57) 摘要: 涉及微生物领域, 具体涉及高活性的天冬氨酸脱羧酶用于生产维生素B5的方法。筛选到了源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的L-天冬氨酸 $\alpha$ -脱羧酶, 催化生产 $\beta$ -丙氨酸的活性明显高于其它来源的PanD。应用*B.licheniformis*来源的PanD构建了发酵生产维生素B5的工程菌, 解除了生物合成维生素B5的 $\beta$ -丙氨酸代谢瓶颈。与高污染的化学法生产维生素B5相比, 生物法生产维生素B5, 具有原料可再生, 废渣、废水和废气易于处理和资源化利用等优点, 从而在实践上可用于维生素B5的工业化生产, 具有重要的应用价值。



WO 2023/169168 A1

## 天冬氨酸脱羧酶在发酵生产维生素 B5 中的应用

### 技术领域

本发明涉及微生物领域，特别涉及天冬氨酸脱羧酶在发酵生产维生素 B5 中的应用。

### 背景技术

维生素 B5 (Vitamin B5, VB5) 又称 D-泛酸 (D-Pantothenic acid)，是一种水溶性维生素，是辅酶 A 及酰基载体蛋白的组成部分，作为 70 多种酶的辅助因子参与糖、脂肪、蛋白质和能量代谢，具有重要的生理代谢调控作用。VB5 主要用于动物饲料添加剂、食品添加剂和医药原料药，随着 VB5 新功能的发现和应用领域的拓展，其市场需求仍将呈现稳定增长的趋势。

中国是 VB5 生产和出口的第一大国，工业生产 VB5 方法为化学合成法，企业基本采用异丁醛-甲醛-氢氰酸法合成 DL-泛解酸内酯，DL-泛解酸内酯进一步通过化学或酶法拆分获得 L-泛解酸内酯，最后 L-泛解酸内酯与以丙烯腈为原料生产的  $\beta$ -丙氨酸合成 VB5。化学合成 VB5 的主要原料易燃、易爆、剧毒，生产过程中会产生含氰废水，处理难度大，导致 VB5 成为重污染产业。

近几年我国经济发展进入绿色环保新常态，环保对 VB5 产业的影响已经逐步显现。在大规模高强度的环保治理下，高污染的 VB5 企业限产甚至停产，市场供应短缺，价格暴涨，限制了下游饲料、食品和医药行业的健康发展。在高污染的 VB5 生产技术没有重大改进之前，这样的供需局面仍会长期持续，因此，VB5 绿色制造技术的创新迫在眉睫！

微生物发酵法生产 VB5，不仅以可再生的葡萄糖为原料，而且生产过程中形成的废渣、废水和废气易于处理和资源化利用，可有效解决 VB5 产业的高污染问题。微生物利用葡萄糖合成 VB5 的代谢途径的调控机制复杂，发酵产量极低。 $\beta$ -丙氨酸作为 C3 底物与 D-泛解酸合成 VB5。 $\beta$ -丙氨酸由 *panD* 基因编码的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶催化天冬氨酸产生。最初翻译合成的 PanD 是没有催化活性的酶原，酶原在 Gly-Ser 键上自发剪切产生两个亚基，其中含有丙酮酰基的 N 端亚基具有催化作用。成熟的 PanD 丙酮酰基与底物形成过

渡中间态，容易发生的氨基转移，导致不可逆的酶活性丧失。此外， $\beta$ -丙氨酸的积累量还受 VB5 下游代谢产物辅酶 A 浓度的调控，辅酶 A 与 PanD/PanZ 形成的蛋白复合物，反馈负调控 PanD 的表达。PanD 不仅翻译后修饰的成熟过程缓慢，还存在催化性失活和反馈抑制的问题，导致 VB5 的 C3 前体  $\beta$ -丙氨酸的合成效率非常低，限制了 VB5 高效合成。为了提高 VB5 的发酵产量，需要在发酵培养基中外源补加大量的  $\beta$ -丙氨酸 (Sahm, H., et al., (1999) Appl Environ Microb, 65, 1973-1979; Dusch, N., et al., (1999) Appl Environ Microb, 65, 1530-1539; Zhang, B., et al., (2019) Food Chemistry, 294, 267-275.)。因此， $\beta$ -丙氨酸的生物合成是发酵法生产 VB5 的代谢瓶颈。

## 发明内容

有鉴于此，为了突破高效合成  $\beta$ -丙氨酸的代谢瓶颈，发明人筛选了 16 种不同菌属来源且进化差异较大的关键酶 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶。L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶由 *panD* 基因编码，催化 L-天冬氨酸脱羧产生  $\beta$ -丙氨酸。

为了实现上述发明目的，本发明提供以下技术方案：

第一方面，本发明提供了增强 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD* 的表达在生产维生素 B5 中的应用；

所述 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。

在本发明的一些具体实施方案中，所述 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD* 具有：

- (I)、如 SEQ ID No.3 所示的核苷酸序列；或
- (II)、如 (I) 所示的核苷酸序列经取代、缺失或添加一个或多个碱基获得的核苷酸序列，且与 (I) 所示的核苷酸序列功能相同或相似的核苷酸序列；或
- (III)、与 (I) 或 (II) 所示的核苷酸序列至少有 80%同源性的核苷酸序列。

在本发明的一些具体实施方案中，还包括：

- (1)、在 *avtA* 基因中插入强启动子和/或强 RBS，其中强启动子为 PPL，强 RBS 为 BCD2；和/或
- (2)、表达了来源于大肠杆菌 BL21 的 *ilvGM* 基因；和/或

(3)、增加了 *panB*、*panC* 和/或 *panE* 基因的拷贝数。

第二方面，本发明还提供了表达载体，包含 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD*；

所述 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。

在本发明的一些具体实施方案中，所述表达载体还包括：

- (i)、强启动子和/或强 RBS；和/或
- (ii)、来源于大肠杆菌 BL21 的 *ilvGM* 基因；和/或
- (iii)、增加了拷贝数的 *panB*、*panC* 和/或 *panE* 基因。

第三方面，本发明还提供了宿主，表达了来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD*。

在本发明的一些具体实施方案中，所述宿主还包括：

- (i)、强启动子和/或强 RBS；和/或
- (ii)、来源于大肠杆菌 BL21 的 *ilvGM* 基因；和/或
- (iii)、增加了拷贝数的 *panB*、*panC* 和/或 *panE* 基因。

在本发明的一些具体实施方案中，所述宿主转染或转化如权利要求 4 或 5 所述的表达载体；

作为优选，所述宿主源自大肠杆菌，优选为大肠杆菌 K12，更优选为大肠杆菌 K12 MG1655 株。

第四方面，本发明还提供了所述表达载体、所述宿主在生产维生素 B5 中的应用。

第五方面，本发明还提供了生产维生素 B5 的方法，以所述宿主为发酵菌株，无需添加  $\beta$ -丙氨酸，发酵，收集发酵液，离心取上清液，获得维生素 B5。

本发明公开了一种高活性的天冬氨酸脱羧酶，及其用于生产维生素 B5 的方法。本发明筛选到了源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶，催化生产  $\beta$ -丙氨酸的活性明显高于其它来源的 PanD。应用 *B. licheniformis* 来源的 PanD 构建了发酵生产维生素 B5 的工程菌，解除了生物合成维生素 B5 的  $\beta$ -丙氨酸代谢瓶颈。与高污染的化学法生产维生素 B5 相比，本发明生物法生产维生素 B5，具有原料可再生，废渣、废水和废气

易于处理和资源化利用等优点，从而在实践上可用于维生素 B5 的工业化生产，具有重要的应用价值。

### 具体实施方式

本发明公开了天冬氨酸脱羧酶在发酵生产维生素 B5 中的应用。本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

本发明的 panD 基因分别来源于解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)、暗棕绿菌 (*Chlorobium phaeobacteroides*)、有效棒杆菌 (*Corynebacterium efficiens*)、谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、海洋棒杆菌 (*Corynebacterium marinum*)、大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、嗜盐古细菌甲烷暖球菌属 (*Haloquadratum walsbyi*)、海底火山口宏基因组 (Hydrothermal vent metagenome)、甲烷暖球菌 (*Methanocaldococcus jannaschii*)、趋磁细菌 (*Magnetospirillum magneticum*)、绿僵菌 (*Metarhizium robertsii*)、矿山排水宏基因组 (Mine drainage metagenome)、波罗的海红小梨形菌 (*Rhodopirellula baltica*) 和海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*)。

在筛选高效的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶方面，本发明使用了相同的双顺反子设计元件 BCD2 (Nature Methods, 2013, 10(4):354-360) 调控上述 16 种不同来源的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶的翻译起始水平。BCD 元件在外源结构基因前引入一段前导顺反子序列，核糖体顺利通过该顺反子，占据下一个顺反子 RBS 序列时，可避免与基因前端编码序列形成茎环结构，从而避免部分 panD 基因的翻译阻遏。BCD 的翻译强度与 RBS 核心序列与核糖体亚基的亲合力高度相关，与基因编码序列相关性小，从而避免 16 种不同的 panD 基因序列对于同一种翻译起始元件的干扰。

在筛选高效的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶方面，本发明将上述 16 种 BCD2-panD 序列连接到质粒上，构建 16 个重组质粒 pET28a-BCD2-panD，使用相

同的启动子调控转录。本发明所使用的质粒载体可以是 pET 系列载体，如 pET28a, pET32a, pET3 等；也可以是 pQE 系列载体或其它大肠杆菌表达载体。本发明的启动子可以是 T7 启动子等。

本发明将上述重组质粒转化至大肠杆菌 B 的衍生株，包括 BL21, BL21-Codonplus (RIL), BL21(DE3)、BL21 Star, C41(DE3), BL21(DE3)pLys S/E, BL21-CodonPlus (DE3) 株、Origami(DE3) 株、Rosetta-gammi(DE3) 株等，从而获得全细胞催化工程菌。通常将获得的目的基因和载体通过限制内切酶酶切和 T4 连接酶连接的方式构建重组载体。重组载体可以通过分子生物学实验中常规的氯化钙化学转化或电穿孔转化的方法转化至宿主细胞中，获得可用于全细胞催化的工程菌。

本发明使用全细胞催化的方法筛选高效的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶。在本发明全细胞催化过程中，首先在液体培养基中培养菌体细胞，并在恰当的时间诱导 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶表达。用于工程菌生长的培养基可以是丰富培养基，也可以是无机盐培养基。培养基包含碳源、氮源、无机离子、抗生素和营养因子。作为碳源，可以使用葡萄糖、乳糖、半乳糖等糖类；也可以是甘油、甘露醇等醇类；也可以使用葡萄糖酸、柠檬酸、丁二酸等有机酸类。作为氮源，可以使用氨水、硫酸铵、磷酸铵、氯化铵等无机氮源；也可以使用玉米浆、豆粕水解液、毛发粉、酵母提取物、蛋白胨等有机氮源。无机离子包含铁、钙、镁、锰、钼、钴、铜、钾等离子中的一种或多种。其它营养因子还包括维生素 B1、吡哆醛、生物素等维生素。

培养过程以在有氧条件下实施 5-48 小时左右培养为宜，培养温度通常控制在 25~45°C，pH 通常控制在 5~8。培养 3~40 小时开始加入选自 IPTG、乳糖、别乳糖中的至少一种诱导剂，诱导剂的加入方式可以是一次性、间歇或连续补加，诱导剂的补加量为 0.01~1mmol。

在加入诱导剂 0.5~30 小时后，一次性加入的底物 L-天冬氨酸，通常优选为 L-天冬氨酸、L-天冬氨酸钠盐、L-天冬氨酸钾盐、L-天冬氨酸铵盐等。

在 L-天冬氨酸脱羧反应生产  $\beta$ -丙氨酸的过程中，催化液的 pH 值持续升高，需要加入酸使 pH 维持在利于全细胞催化的范围，通常为 4.0 以上、优选为 5.0 以上、更优选为 5.5 以上，通常为 8.0 以下，优选为 7.5 以下，更优选为 6.8 以下。此处所使用的酸为 L-天冬氨酸。可以采用固体粉末、悬浊液或

溶液的形式补加；可以间歇或连续补加维持 pH 在上述范围，也可以通过发酵罐 pH 电极信号反馈补加使 pH 维持在恒定值。

催化反应的温度通常介于 25°C 和 60°C 之间，优选为 30°C 和 45°C 之间。催化过程中的温度可是设为上述范围中的固定值，也可以是由低到高变化值。

本发明进一步应用筛选到的高效的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶，构建发酵法生产维生素 B5 的工程菌，解除了生物合成维生素 B5 的  $\beta$ -丙氨酸代谢瓶颈。

本发明所述的发酵法生产 VB5 的大肠杆菌，表达了 VB5 终端合成途径上的 *panB*、*panC* 和 *panE* 基因。大肠杆菌的 *panB* 基因编码酮泛解酸羟甲基转移酶，催化底物  $\alpha$ -酮异戊酸增加一个甲基形成酮泛解酸。酮泛解酸由 *panE* 基因编码的酮泛解酸还原酶还原为泛解酸。由 *panC* 基因编码的泛酸合成酶进一步催化泛解酸和  $\beta$ -丙氨酸缩合形成 VB5。

以大肠杆菌 K12 MG1655 的基因组为模板，PCR 扩增 *panBC* 基因。扩增引物上设计引入强启动子 *P<sub>trc</sub>*，引物两端同时设计 *Bam*HI 和 *Sph*I 限制性核酸内切酶位点。PCR 扩增得到的 *P<sub>trc</sub>-panBC* 产物，凝胶电泳鉴定回收后，使用 *Bam*HI 和 *Sph*I 双酶切，同时双酶切 *pACYC184* 质粒。凝胶电泳回收双酶切的 *P<sub>trc</sub>-panBC* 和 *pACYC184* 质粒，使用 T4 连接酶连接后，连接产物化学转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞，复苏 1 小时后涂布氯霉素平板。涂布后的平板置于 37°C 培养箱 12 小时，挑取单菌落传代，提取重组质粒后进行测序，获得正确的重组质粒 *pACYC184-P<sub>trc</sub>-panBC*。

以大肠杆菌 K12 MG1655 的基因组为模板，PCR 扩增 *panE* 基因。扩增引物上设计引入强启动子 *PJ23119*，引物两端同时设计 *Sph*I 和 *Bsa*BI 限制性核酸内切酶位点。PCR 扩增得到的 *PJ23119-panE* 产物，凝胶电泳鉴定回收后，使用 *Bam*HI 和 *Sph*I 双酶切，同时双酶切 *pACYC184-P<sub>trc</sub>-panBC* 质粒。凝胶电泳回收双酶切的 *PJ23119-panE* 和 *pACYC184-P<sub>trc</sub>-panBC* 质粒，使用 T4 连接酶连接后，连接产物化学转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞，复苏 1 小时后涂布氯霉素平板。涂布后的平板置于 37°C 培养箱 12 小时，挑取单菌落传代，提取重组质粒后进行测序，获得正确的重组质粒 *pACYC184-P<sub>trc</sub>-panBC-PJ23119-panE*，从而获得了过表达维生素 B5 终端合成途径基因的重组质粒。

大肠杆菌 K12 MG1655 的 *ilvG* 基因突变失活，本发明引入了大肠杆菌 BL21 的具有活性的 *ilvG* 基因，提高了 VB5 的前体合成供应。本发明在大肠杆菌 K12 MG1655 的染色体上插入了来源于大肠杆菌 BL21 的 *ilvG<sup>+</sup>M* 基因，且使用 *trc* 强启动子调控 *ilvG<sup>+</sup>M* 的转录起始，使用终止子 *Ter* 调控 *ilvG<sup>+</sup>M* 的转录终止。*ilvG<sup>+</sup>M* 基因在染色体的插入位点为 *avtA* 基因的编码序列，导致 *AvtA* 失活，弱化了缬氨酸的合成，从而弱化了 VB5 的竞争途径，有利于 VB5 的生物合成。构建了工程菌 *E. coli* MG1655 *avtA:ilvG<sup>+</sup>M*，提高了 VB5 前体乙酰乳酸的合成途径，弱化了缬氨酸竞争途径。

在大肠杆菌 K12 MG1655 的 *avtA* 基因上整合了上述筛选到的 3 个活性较高的 *panD* 基因，分别源于枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 和谷氨酸棒杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)。这 3 个基因使用相同的强启动子 PPL 和相同的 BCD2 分别调控转录和翻译起始。

将上述构建的重组质粒 pACYC184-P<sub>trc</sub>-panBC-PJ23119-panE 转化到工程菌 *E. coli* MG1655 *avtA: panDBs-ilvG<sup>+</sup>M*，工程菌 *E. coli* MG1655 *avtA: panDBl-ilvG<sup>+</sup>M* 和工程菌 *E. coli* MG1655 *avtA: panDCg-ilvG<sup>+</sup>M* 中，得到发酵法生产 VB5 的工程菌。通过摇瓶发酵比较工程菌的 VB5 产量，验证最优的 PanD。

发酵生产 VB5 的方法，培养基包含碳源、氮源、无机离子、抗生素和它的营养因子。作为碳源，可以使用葡萄糖、乳糖、半乳糖等糖类。作为无机氮源，可以使用氨水、硫酸铵、磷酸铵、氯化铵等无机氮源；作为有机氮源可以使用玉米浆、豆粕水解液、毛发粉、酵母提取物、蛋白胨等有机氮源。无机离子包含铁、钙、镁、锰、钼、钴、铜、钾等离子中的一种或多种。

通过催化生产 β-丙氨酸和发酵生产 VB5 两步验证，从 16 种序列差异较大的不同来源的候选酶中筛选到了活性最高的 L-天冬氨酸 α-脱羧酶，在不添加 β-丙氨酸时可高效发酵生产 VB5，解除了生物合成瓶颈，降低了生产成本。

下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到的。

以下实施例中的定量试验，均设置三次重复实验，结果取平均值。下述实施例中如未特别指明，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和市售的常用仪器、试剂，可参见《分子克隆实验指南(第3版)》(科学出版社)、《微生物学实验(第4版)》(高等教育出版社)以及相应仪器和试剂的厂商说明书等参考。

若说明书中记载的序列与序列表中不一致，则以说明书中记载的序列为准。

下面结合实施例，进一步阐述本发明：

### 实施例 1 检测方法

采用 HPLC 法定量测定发酵液  $\beta$ -丙氨酸的积累量，具体方法如下。取发酵液上清，加入纯净水稀释到适当浓度，用  $0.22\mu\text{m}$  滤膜过滤。采用邻苯二甲醛 (OPA) 在线柱前衍生法测定  $\beta$ -丙氨酸浓度，所用色谱柱为 Agilent AdvanceBio AAA C18,  $4.6 \times 100\text{mm}$ ,  $2.7\mu\text{m}$ ，柱温为  $40^\circ\text{C}$ ，检测波长为  $338\text{nm}$ ，流动相流速为  $1\text{mL}/\text{min}$ 。流动相 A 为  $10\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$  和  $10\text{mM Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ ，调节 pH 至 8.2，流动相 B 为乙腈：甲醇：水=45：45：10。以从 sigma 公司购买的  $\beta$ -丙氨酸为标准品，测定该色谱条件下丙氨酸的浓度与光吸收值的标准曲线。

采用 HPLC 法定量测定发酵液 VB5 的产量，具体方法如下。取发酵液上清，加入纯净水稀释到适当浓度，用  $0.22\mu\text{m}$  滤膜过滤。使用色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-Aq,  $4.6 \times 250\text{mm}$ ，柱温为  $30^\circ\text{C}$ ，检测波长为  $210\text{nm}$ ，流动相流速为  $1\text{mL}/\text{min}$ 。流动相为  $3.12\text{g}/\text{L NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ，使用磷酸调节 pH 至 2.2，。以从 sigma 公司购买的泛酸钙为标准品，测定  $0.1\text{-}0.5\text{g}/\text{L}$  泛酸钙的浓度与光吸收值的标准曲线。

### 实施例 2 过表达 L-天冬氨酸 $\alpha$ -脱羧酶的载体与全细胞催化产 $\beta$ -丙氨酸工程菌的构建

在基因合成公司合成了 16 个 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD*，分别来源于解淀粉芽孢杆菌 *Bacillus amyloliquefaciens* (如 SEQ ID No.1 所示)、枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* (如 SEQ ID No.2 所示)、地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* (如 SEQ ID No.3 所示)、暗棕绿菌 *Chlorobium phaeobacteroides* (如 SEQ ID No.4 所示)、有效棒杆菌 *Corynebacterium*

*efficiens* (如 SEQ ID No.5 所示)、谷氨酸棒杆菌 *Corynebacterium glutamicum* (如 SEQ ID No.6 所示)、海洋棒杆菌 *Corynebacterium marinum* (如 SEQ ID No.7 所示)、大肠杆菌 *Escherichia coli* (如 SEQ ID No.8 所示)、嗜盐古细菌甲烷暖球菌属 *Haloquadratum walsbyi* (如 SEQ ID No.9 所示)、海底火山口宏基因组 Hydrothermal vent metagenome (如 SEQ ID No.10 所示)、甲烷暖球菌 *Methanocaldococcus jannaschii* (如 SEQ ID No.11 所示)、趋磁细菌 *Magnetospirillum magneticum* (如 SEQ ID No.12 所示)、绿僵菌 *Metarhizium robertsii* (如 SEQ ID No.13 所示)、矿山排水宏基因组 Mine drainage metagenome (如 SEQ ID No.14 所示)、波罗的海红小梨形菌 *Rhodopirellula baltica* (如 SEQ ID No.15 所示) 和海栖热袍菌 *Thermotoga maritima* (如 SEQ ID No.16 所示)。在定制合成上述 *panD* 基因序列时, 通过同义密码子替换去除 XbaI 和 HindIII 限制性内切酶序列。

本发明将上述 16 种 BCD2-*panD* 序列连接到质粒上, 构建 16 个重组质粒 pET28a-BCD2-*panD*。在定制合成上述 *panD* 基因序列时, 在每个 *panD* 序列前同时合成了相同的 BCD2 序列 (如 SEQ ID No.17 所示), 同时在 BCD2-*panD* 序列的两端加入 XbaI 和 HindIII 限制性酶切位点。合成后的序列连接到载体上。使用限制性内切酶 XbaI 和 HindIII 双酶切上述合成 BCD2-*panD* 的载体和 pET28a (+) 质粒, 凝胶电泳回收得到酶切后的 BCD2-*panD* 的基因片段和线性化载体段, 进一步使用 T4 连接酶连接这两个片段, 连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上筛选, 获得含有重组质粒的转化子。转化子扩培后提取质粒并将其送测序, 验证获得 16 个正确的质粒 pET28a-BCD2-*panDBa*、pET28a-BCD2-*panDBs*、pET28a-BCD2-*panDBl*、pET28a-BCD2-*panDCp*、pET28a-BCD2-*panDCe*、pET28a-BCD2-*panDCg*、pET28a-BCD2-*panDCm*、pET28a-BCD2-*panDEc*、pET28a-BCD2-*panDHw*、pET28a-BCD2-*panDHv*、pET28a-BCD2-*panDMj*、pET28a-BCD2-*panDMm*、pET28a-BCD2-*panDMr*、pET28a-BCD2-*panDMd*、pET28a-BCD2-*panDRb*、pET28a-BCD2-*panDTm*。在这 16 个重组载体中, 16 个不同来源的 *panD* 基因使用相同的启动子 (T7) 调控转录起始, 使用相同的 BCD2 序列调控翻译起始。

将上述提取的 16 个表达不同来源 *panD* 基因的 pET28a-BCD2-*panD* 质粒转化到 *E. coli* BL21(DE3) 的感受态细胞, 在含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上筛选, 获得 16 株工程菌 *E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDBa*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDBs*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDBl*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDCp*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDCe*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDCg*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDCm*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDEc*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDHw*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDHv*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDMj*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDMm*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDMr*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDMd*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDRb*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDTm*, 用于  $\beta$ -丙氨酸全细胞催化。

### 实施例 3 全细胞催化筛选最优的 *panD* 基因

刮取上述 16 个工程菌 *E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panD* 菌苔, 接入含有 3 mL LB (含 50 mg/L 卡那霉素) 培养基的 50 mL 无菌透气盖试管中, 置于 37 °C 摇床中 220 rpm 培养 12 h, 得到种子液, OD<sub>600</sub> 为 4-5; 培养所得的种子液按 2% 的接种量接入含有 30 mL LB (含 50 mg/L 卡那霉素) 培养基的 500 mL 挡板摇瓶中, 置于 37 °C 摇床中 220 rpm 培养 2 h, 加入 0.3mM 诱导剂 IPTG, 继续按照相同的条件诱导 4h。诱导后的三角瓶中加入 30mL 天冬氨酸溶液 (使用氢氧化钠调节 pH 至 6.0), 置于 37 °C 摇床中 220 rpm 培养 30 分钟。离心后取上清液检测  $\beta$ -丙氨酸的产量, 每个工程菌设置三个平行实验, 取平均值。过表达不同来源 *panD* 基因的工程菌的  $\beta$ -丙氨酸产量如表 1 所示, 过表达来源于枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* (SEQ ID No.2 所示)、地衣芽孢杆菌 *B. licheniformis* (如 SEQ ID No.3 所示)、谷氨酸棒杆菌 *C. glutamicum* 和趋磁细菌 *M. magneticum* 的 *panD* 基因的工程菌的  $\beta$ -丙氨酸的产量比其它工程菌高十倍左右, 其中来源于地衣芽孢杆菌的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶的催化效率最高。

表 1

工程菌	$\beta$ -丙氨酸 (g/L)
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDBa</i>	0.22±0.02

<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDBs</i>	3.45±0.44
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDBl</i>	4.12±0.35
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDCp</i>	0.05±0.01
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDCe</i>	0.35±0.05
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDCg</i>	2.98±0.42
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDCm</i>	0.44±0.02
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDEc</i>	0.55±0.11
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDHw</i>	0.35±0.02
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDHv</i>	0.05±0.01
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDMj</i>	0.58±0.06
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDMm</i>	1.21±0.11
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDMr</i>	0.61±0.03
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDMd</i>	0.02±0.01
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2- <i>panDRb</i>	0.21±0.02
<i>E. coli</i> BL21 /pET28a-BCD2-	0.74±0.10

<i>panDTm</i>	
---------------	--

进一步使用 5L 发酵罐验证工程菌 *E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDBI* 的催化性能。刮取工程菌 *E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDBI* 菌苔接入含有 50 mL 的 LB (含 50 mg/L 卡那霉素 (5~200 mg/L 均可) 培养基的 500 mL 三角瓶中, 在 37 °C 220 rpm 摇床中培养 4 h, 得到种子液, OD<sub>600</sub> 为 4-5; 培养所得的种子液按 2% 的接种量接入含有 2 L 无机盐培养基的 5 L 发酵罐中, 培养温度为 37 °C, DO 控制在 30% 以上, 罐压控制在 0.02~0.10MPa。反馈补加氨水控制 pH 维持在 6.9, 通过流加补料液使培养液中葡萄糖的浓度维持在 5 g/L 以下。当培养液中菌体 OD<sub>600</sub> 达到 30 时加入 0.1mM 诱导剂 IPTG, 4h 后菌体培养液 OD<sub>600</sub> 达到 80 左右。补加 10g/L 的 L-天冬氨酸作为底物, 催化过程中不调控 pH, 当 pH 不再上升时再加入 10g/L 的 L-天冬氨酸。间歇补加 25 次固体天冬氨酸, 催化 36h, β-丙氨酸的产量达到 140.5g/L。

其中无机盐培养基成分和补料液成分如下: 无机盐培养基: 2 g/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.85 g/L Citric acid (柠檬酸), 0.7 g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 10 mg/L FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 2.25 mg/L ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2 mg/L CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.5 mg/L MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.23 mg/L NaB<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O, 2.0 mg/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.1 mg/L NH<sub>4</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>, 0.15 mg/L CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 余量为水。补料液包含 700 g/L 葡萄糖和 20g/L MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 余量为水。

#### 实施例 4 发酵生产 VB5 的工程菌的构建。

以 P1 和 P2 为引物, 以野生型大肠杆菌 K12 MG1655 菌株的基因组 DNA 为模板, 使用高保真聚合酶 KAPA HiFi™ HotStar, PCR 扩增的核苷酸序列如 SEQ ID No.18 所示, 其中 10nt-45nt 为启动子 *trc*, 74nt-868nt 为 *panB* 基因的编码序列, 880nt-1731nt 为 *panC* 基因的编码序列。引物 P1 上设计引入强启动子 *trc*, P1 和 P2 引物 5'端分别设计 BamHI 和 SphI 限制性核酸内切酶位点。PCR 程序为: 98°C 变性 30 秒, 65°C 退火 15 秒, 72 °C 延伸 90 秒, 26 个循环, 获得约 1800bp 的 *P<sub>trc</sub>-panBC* 基因片段。

P1: 5'- CGCGGATCC

*CAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAGCACAAACATCAATTTATCA*  
GGA

(如 SEQ ID No.24 所示; 下划线所示序列为 BamHI 酶切识别位点, 斜体为启动子 *trc* 的序列)

P2: 5'- ACATGCATGC CCTGTGTTAT GACAGATGAC -3'

(如 SEQ ID No.25 所示; 下划线所示序列为 SphI 酶切识别位点)

PCR 扩增得到的 *P<sub>trc</sub>-panBC* 产物, 凝胶电泳鉴定回收后, 使用 BamHI 和 SphI 双酶切, 同时双酶切 pACYC184 质粒。切胶回收上述 PCR 电泳条带, 使用限制性内切酶 BamHI 和 SphI 双酶切上述扩增的 *P<sub>trc</sub>-panBC* 基因的 DNA 片段和 pACYC184 质粒。凝胶电泳回收双酶切的 *P<sub>trc</sub>-panBC* 和 pACYC184 质粒, 使用 T4 连接酶连接后, 连接产物化学转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 复苏 1 小时后涂布氯霉素平板。涂布后的平板置于 37°C 培养箱 12 小时, 挑取单菌落传代, 提取重组质粒后进行测序, 获得正确的重组质粒 pACYC184-panBC。

以大肠杆菌 K12 MG1655 的基因组为模板, 以 P3 和 P4 为引物, PCR 扩增得到的序列如 SEQ ID No.19 所示, 其中 11nt-45nt 为 PJ23119 启动子, 66nt-977nt 为 *panE* 基因的编码序列, 988nt-1731nt 为终止子序列。扩增引物 P3 上设计启动子 PJ23119, 引物 P4 上设计终止子 L3S2P56 序列, P3 和 P4 引物 5' 端分别设计 SphI 和 BsaBI 限制性核酸内切酶位点。使用上述的 PCR 反应条件, 扩增得到的 PJ23119-panE 产物, 凝胶电泳鉴定回收后, 使用 SphI 和 BsaBI 双酶切, 同时双酶切 pACYC184-*P<sub>trc</sub>-panBC* 质粒。凝胶电泳回收双酶切的 PJ23119-panE 和 pACYC184-panBC 质粒, 使用 T4 连接酶连接后, 连接产物化学转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 复苏 1 小时后涂布氯霉素平板。涂布后的平板置于 37°C 培养箱 12 小时, 挑取单菌落传代, 提取重组质粒后进行测序, 获得正确的重组质粒 pACYC184-panBCE, 从而获得了过表达维生素 B5 终端合成途径基因的重组质粒。

P3: 5'- ACATGCATGC

*ttgacagctagctcagtcctaggtataatgctagc*GTTGCGGGTGAGGAGGAACA

(如 SEQ ID No.26 所示; 下划线所示序列为 SphI 酶切识别位点, 斜体为启动子 J23119 的序列)

P4: 5'- CTCGATTTAGATCCCAAACGAA AAAAGACGCGCTTTTCAGC  
GTCTTTTTTC GAAAATTAGT CTCTTCACTA CCAGGGATGA CTATCGAG

(如 SEQ ID No.27 所示; 下划线所示序列为 BsaBI 酶切识别位点, 斜体为 L3S2P56 终止子序列)

应用已报道的包含 pCas9 和 pTargetF 载体的 CRISPR-Cas9 基因编辑系统 (Jiang, Y., Chen, B., Duan, C. L., Sun, B. B., Yang, J. J., and Yang, S. (2015) Multigene Editing in the *Escherichia coli* Genome via the CRISPR-Cas9 System, *Appl Environ Microb* 81, 2506-2514.) 。

使用 NEB 公司的基因突变试剂盒 (Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit, 货号 E0552S) , 按照试剂盒说明书设计引物 P5 和 P6 突变 pTargetF 载体。突变后的 N20 序列为 CTTTCCAAGC TGGGTCTACC, 靶向 avtA 基因。突变后的 pTargetF 命名为 pTargetFavtA。

P5: TGGGTCTACCG TTTTAGAGCT AGAAATAGC (如 SEQ ID No.28 所示) ;

P6: GCTTGGAAG GACTAGTATT ATACCTAGG (如 SEQ ID No.29 所示) ;

P7:CG GACTGGAAGA AGATCTG (如 SEQ ID No.30 所示) ;

P8:TTTCTTAGAC GTCGGAATTG AGACTCATGC ACAGCACGA (如 SEQ ID No.31 所示) ;

P9:**TCGTGCTGT GCATGAGTCTCAATTCCGACGTCTAAGAAAC** (如 SEQ ID No.32 所示) ;

P10:GATCTCCTTT TTAAGTGAAC TTGGGGTCAG TGCCTCCTGC TGAT (如 SEQ ID No.33 所示) ;

P11:ATCAGCAGGACGCACTGACCCCAAGTTCCTTAAAAAGGAGATC (如SEQ ID No.34所示) ;

P12:TGCCGTTTCAT ATTGGTGATG CAAAAACCC CTCAAGACC (如 SEQ ID No.35 所示) ;

P13:GGTCTTGAGGGGTTTTTTGCATC ACCAATATGAACGGCA (如 SEQ ID No.36 所示) ;

P14:GCTGATAGAG CTGCTTGGT (如 SEQ ID No.37 所示) ;

P15: **GGAGCTACTC AACTGCTTG** (如 SEQ ID No.38 所示) ;

P16: CGCATAATT GATGCGTATG (如 SEQ ID No.39 所示) ;

使用引物 P7 和 P8 扩增 *avtA* 基因上游序列, 使用引物 P9 和 P10 扩增 PL 启动子, 使用引物 P11 和 P12 分别以 pET28a-BCD2-*panDBs*、pET28a-BCD2-*panDBI*、*E. coli* BL21 /pET28a-BCD2-*panDCg* 为模板扩增获得 BCD2-*panDBs*-Ter、BCD2-*panDBI*-Ter、BCD2-*panDCg*-Ter 基因片段, 使用引物 P13 和 P14 扩增 *avtA* 基因下游游序列。通过重叠 PCR 连接上述 4 个片段, 获得 4 个 DNA 片段的组合体 DonorBs (如 SEQ ID No.20 所示)、DonorBI (如 SEQ ID No.21 所示) 和 DonorCg (如 SEQ ID No.22 所示), 作为基因编辑的模板。其中 SEQ ID No.20、21 和 22 的 1nt-312nt 为靶基因 *avtA* 基因上游序列, 313nt-474nt 为 PL 启动子, 475nt-560nt 为 BCD2 序列。SEQ ID No.20 的 560nt-943nt 为 *panDBs* 序列, 944nt-995nt 为终止子序列, 996-1261nt 为 *avtA* 基因下游游序列。SEQ ID No.21 的 560nt-943nt 为 *panDBI* 序列, 944nt-995nt 为终止子序列, 996-1261nt 为 *avtA* 基因下游游序列。SEQ ID No.22 的 560nt-970nt 为 *panDCg* 序列, 971nt-1022nt 为终止子序列, 1023-1288nt 为 *avtA* 基因下游游序列。

将 pCas9 质粒转化入 MG1655 涂布含有 50 mg/L 卡那霉素抗性平板, 30°C 培养, 获得菌株 MG655/pCas9。挑取 MG1655/pCas9 菌苔于 50mL 含卡那霉素的 LB 的 500mL 摇瓶中, 30°C, 220rpm 培养, 当培养基 OD600 为 0.2 时加入终浓度为 10mM 的阿拉伯糖进行诱导, OD600 为 0.45 时制备感受态细胞。取 2 微升 pTargetFavtA 质粒和 10 微升 DonorBs 模板 DNA, 电转化至 MG655/pCas9 感受态细胞, 涂布含有 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 壮观霉素的双抗性平板, 30°C 培养。使用引物 P15 和 P16 鉴定在 *avtA* 基因上整合 PPL-BCD2-*panD*-Ter 的单菌落, 测序验证大小正确的 PCR 产物。挑选测序正确的单菌落, 加入 0.2mM 的 IPTG 培养, 消除 pTargetFavtA 质粒, 分别获得工程菌 *E. coli* MG1655 *avtA:panDBs/pCas*, *E. coli* MG1655 *avtA:panDBI/pCas*, *E. coli* MG1655 *avtA:panDCg/pCas*, 仍按照上述方法制备感受态备用。

工程菌 *E. coli* MG1655 *avtA:panDBs/pCas*, *E. coli* MG1655 *avtA:panDBI/pCas* 和 *E. coli* MG1655 *avtA:panDCg/pCas* 接入无抗性的 LB 液体培养基, 37°C 培养 12 小时, 稀释涂布 LB 平板, 分别获得消除 pCas 质粒的工程菌 *E. coli* MG1655 *avtA:panDBs*, *E. coli* MG1655 *avtA:panDBI* 和 *E. coli*

MG1655 *avtA:panDCg*。基因 *panD* 插入染色体 *avtA* 基因的编码序列，导致 *AvtA* 失活，弱化了缬氨酸竞争代谢途径。

野生型大肠杆菌 K12 MG1655 的 *ilvG* 基因突变，其编码的乙酰乳酸合成酶没有活性。本发明在大肠杆菌 MG1655 的染色体上引入了大肠杆菌 BL21 的具有活性的 *ilvG* 基因，提高了 VB5 的前体乙酰乳酸的合成。本发明在大肠杆菌 K12 MG1655 的染色体上插入了来源于大肠杆菌 BL21 的 *ilvG<sup>+M</sup>* 基因，且使用 *trc* 强启动子调控 *ilvG<sup>+M</sup>* 的转录起始，使用终止子 *Ter* 调控 *ilvG<sup>+M</sup>* 的转录终止。*ilvG<sup>+M</sup>* 基因整合到 *avtA* 基因的另外一个 N20 靶序列。使用上述 Q5® 突变试剂盒和引物 P17 和 P18 突变 pTargetF 载体，突变后 pTargetF 命名为 pTargetFavtA1。

P17: ACGGTCCACAG TTTTAGAGCT AGAAATAGC (如 SEQ ID No.40 所示) ;

P18: CGTAGTTACA GACTAGTATT ATACCTAGG (如 SEQ ID No.41 所示) ;

P19: GGCAGAAAAT CAGCCAGTTC (如 SEQ ID No.42 所示) ;

P20: TCCACACATT ATACGAGCCG GATGATTAAT TGTC AAGAAC TCTGTAGCAA GGAAGG (如 SEQ ID No.43 所示) ;

P21: TTGA CAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGA CAAGATT CAGGACGGGG AAC (如 SEQ ID No.44 所示) ;

P22: CGAAAAAAGA CGCTCTAAA GCGTCTCTTT TCTGGTATAT TCCTTTTGCG CTCAG (如 SEQ ID No.45 所示) ;

P23: CAGAAAAGAGACGCTTTTAGAGCGTCTTTTTTCGTTTTGGAGC TACTC AACTGCTTG (如 SEQ ID No.46 所示) ;

P24: GCCAATATGC AGATGCTCATGAGCATCTGCATATTGG C (如 SEQ ID No.47 所示) ;

P25: CACGTTTCGGA TATGAACTG (如 SEQ ID No.48 所示) ;

P26: CGTCAAGCTT CAGCAACTC (如 SEQ ID No.49 所示) 。

使用引物 P19 和 P20 扩增 *avtA* 基因上游序列，使用引物 P21 和 P22 扩增 *E.coli* BL21 的 *ilvG<sup>+M</sup>* 序列，使用引物 P23 和 P24 扩增 *avtA* 基因下游序列。通过引物 P20 和 P21 引入 *trc* 启动子 TTGA

CAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGA, 通过引物 P22 和 P23 引入终止子序列 CCAGAAAAGAGACGCTTTTAGAGCGTCTTTTTTCGTTTT. 使用重叠 PCR 连接上述 3 个片段, 获得组合体 DonorilvGM (如 SEQ ID No.23 所示), 作为基因编辑的模板。SEQ ID No.23 的 1-305nt 为靶基因 *avtA* 基因上游序列, 306nt-341nt 为 *trc* 启动子, 367nt-2013nt 为源于 *E.coli* BL21 的 *ilvG<sup>+</sup>* 基因的编码序列, 2010nt-2273nt 为 *ilvM* 基因的编码序列, 2274-2328 为终止子序列, 2329-2629 为 *avtA* 基因下游游序列。

取 2 微升 pTargetFavtA1 质粒和 10 微升 DonorilvGM 模板 DNA, 分别电转化至 *E.coli* MG1655 *avtA:panDBs/pCas*, *E.coli* MG1655 *avtA:panDBI/pCas*, *E.coli* MG1655 *avtA:panDCg/pCas* 感受态细胞, 涂布含有 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 壮观霉素的双抗性平板, 30°C 培养。使用引物 P25 和 P26 鉴定在 *avtA* 基因上整合 P*trc*-*ilvG<sup>+</sup>*-M-Ter 的单菌落, 测序验证大小正确的 PCR 产物。挑选测序正确的单菌落, 加入 0.2mM 的 IPTG 培养, 消除 pTargetFavtA1 质粒。进一步接入无抗性的 LB 液体培养基, 37°C 培养 12 小时, 稀释涂布 LB 平板, 分别获得消除 pCas 质粒的工程菌 *E.coli* MG1655 *avtA:panDBs-ilvG<sup>+</sup>M*, *E.coli* MG1655 *avtA:panDBI-ilvG<sup>+</sup>M* 和 *E.coli* MG1655 *avtA:panDCg-ilvG<sup>+</sup>M*。通过在染色体上整合有活性的 *ilvG<sup>+</sup>M*, 提高了 VB5 前体乙酰乳酸的合成。

将上述构建的载体 pACYC184-panBCE 转化至上述工程菌 *E.coli* MG1655 *avtA:panDBs-ilvG<sup>+</sup>M*, *E.coli* MG1655 *avtA:panDBI-ilvG<sup>+</sup>M* 和 *E.coli* MG1655 *avtA:panDCg-ilvG<sup>+</sup>M* 中, 分别获得工程菌 *E.coli* MG1655 *avtA:panDBs-ilvG<sup>+</sup>M/pACYC184-panBCE*, *E.coli* MG1655 *avtA:panDBI-ilvG<sup>+</sup>M/pACYC184-panBCE* 和 *E.coli* MG1655 *avtA:panDCg-ilvG<sup>+</sup>M/pACYC184-panBCE*, 用于发酵生产 VB5。

其中:

**SEQ ID No.1:**

ATGATGGCCGGAAAACACTGCACCGCGCTACCGTGACGGAAGCCAATTTA  
AACTATGTCGGC  
AGCATAACGATTGATGAAGATCTTTTAGATGCCGTCGGAATGCTCGCTA  
ATGAAAAAGTT

CAGATTGTGAATAATAATAACGGAGCGAGACTTGAAACGTATATTATT  
CCCGGTAAGCGG  
GGGAGCGGCGTCATCTGTTTAAATGGAGCTGCCGCCCGTCTCGTCCAAG  
AAGGAGATAAA  
GTCATTATTATTTCTTATCAAATGATGTCTGATCAGGAAGCAAAAAGCC  
ATCAGCCGAAG  
GTGGCCGTTCTGGATGATCAGAATAAAAATCGAGCAGATGCTGGGCCAG  
GAGCCGGCACAC  
ACGATTTTGTA

**SEQ ID No.2:**

ATGTATCGAA CAATGATGAG CGGCAAACCTT CACAGGGCAA  
CTGTTACGGA AGCAAACCTG  
AACTATGTGG GAAGCATTAC AATTGATGAA GATCTCATTG  
ATGCTGTGGG AATGCTTCCT  
AATGAAAAAG TACAAATTGT GAATAATAAT AATGGAGCAC  
GTCTTGAAAC GTATATTATT  
CCTGGTAAAC GGGGAAGCGG CGTCATATGC TTAAACGGTG  
CAGCCGCACG CCTTGTGCAG  
GAAGGAGATA AGGTCATTAT TATTTCTAC AAAATGATGT  
CTGATCAAGA AGCGGCAAGC  
CATGAGCCGA AAGTGGCTGT TCTGAATGAT CAAAACAAAA  
TTGAACAAAT GCTGGGGAAC  
GAACCAGCCC GTACAATTTT GTAA

**SEQ ID No.3:**

ATGTACCGTA CGTTAATGAG CGCAAACCTT CACAGAGCGA  
GAGTGACGGA AGCCAATTTG  
AACTACGTCG GCAGCGTGAC AATTGATGAA GATTTGCTGG  
ATGCTGTTCGG AATGATGGCA  
AATGAAAAAG TGCAAATTGT GAATAATAAT AACGGGGCCC  
GGCTGGAAAC GTACATTATT

CCCGGTGAAA GGGGCAGCGG CGTCGTTTGT TTAAACGGAG  
CTGCCGCCCG CCTTGTCCAG  
GTTGGAGATG TCGTCATCAT CGTGTCTTAT GCGATGATGT  
CTGAAGAGGA AGCAAAGACC  
CATAAGCCGA AGGTTGCCGT TTTGAACGAG AGAAACGAAA  
TCGAGGAAAT GCTGGGTCAG  
GAGCCAGCCC GTACCATTCT GTAA

**SEQ ID No.4:**

ATGAAGCTGCACCTGCTGAAGAGCAAAATTCACAACGCGCGTGTTACC  
AGCGGTGACCTGGAGTACGAAGGCAGCATTACCATCGATCAGGAGCTG  
CTGCTGCTGGCGGAGATGATCCCGAACGAAAAAGTTCTGGTGGTGAAC  
ACAACAACGGCGAGCGTTTCGAAACCTATATCATTACGGTGAACCG  
GGCAGCCGTGTTATTCAGCTGAACGGTGCGGCGGCGCGTTGCGCGCTG  
CCGGGCGACGAGATCATTATCATGACCTTCGCGGTGATGGATGAAAAG  
AAAGCGCGTACCTTTCAACCGATGGTGCTGATCGTTGACCACCTGAACA  
ACCCGAAGCGTCGTCACCGTATTGGCCAGGAAGACGAACAACCTGAGCA  
GCAGCATCTAA

**SEQ ID No.5:**

ATGCTGCGCACCATCCTCGGTAGCAAGATTCACCGCGCCACCGTCACCC  
AGGCCGACCTT  
GACTATGTCGGCTCCATCACCATCGACGCCGACCTGGTCAATGCCGCCG  
GCCTCATCGAG  
GGCGAGAAGGTCGCCGTCGTGGACATCACCAACGGCGCCCGCATTGAG  
ACCTATGTGATC  
ACCGGCGATGCCGGAACCGGCAGCATCTGCATCAATGGTGCCGCCGCC  
CATCTGATCAAC  
CCGGGTGATCTGGTCATCATCATGAGCTATCTGCAGGCCACCGATGCCG  
AGGCCCGCGCC  
TACCAGCCCAATATCGTCCACGTGGATGCCGACAACCGGATCGTCGCC  
CTGGGCAACGAC

GCCGGCGAGCCCATCCCGGGTTCCAGCTTGCTGTCCTCGCGCTCCCTCT  
AA

**SEQ ID No.6:**

ATGCTGCGCA CCATCCTCGG  
AAGTAAGATT CACCGAGCCA CTGTCACTCA AGCTGATCTA  
GATTATGTTG GCTCTGTAAC  
CATCGACGCC GACCTGGTTC ACGCCGCCGG ATTGATCGAA  
GGCGAAAAAG TTGCCATCGT  
AGACATCACC AACGGCGCTC GTCTGGAAAC TTATGTCATT  
GTGGGCGACG CCGGAACGGG  
CAATATTTGC ATCAATGGTG CCGCTGCACA CTTATTAAT  
CCTGGCGATC TTGTGATCAT  
CATGAGCTAC CTTCAGGCAA CTGATGCGGA AGCCAAGGCG  
TATGAGCCAA AGATTGTGCA  
CGTGGACGCC GACAACCGCA TCGTTGCGCT CGGCAACGAT  
CTTGCGGAAG CACTACCTGG  
ATCCGGGCTT TTGACGTCGA GAAGCATTAA

**SEQ ID No.7:**

ATGCTCAGAACCATCCTCGGCAGCAAAATCCACCGCGCCACGGTCACC  
CAGGCAGACCTC  
AACTACGTGGGGTCCGTCACGGTTCGACGCCGACCTGCTCGCGGCCGCC  
GGCCTCATCGAG  
GGCGAAAAGGTGGCCATCGTCGACGTCACCAACGGTGCCAGGCTGGAG  
ACCTACGTCATC  
ACCGGTCGCCCCGGGCACCGGCGAGATCTGCATCAACGGTGCGGCGGCG  
CACCTGATCCAC  
CCGGGCGACATCGTCATCCTCATCTCCTACCTGCAGGCCACCCTGGACG  
AGGCCCTCGAA  
TACGAGCCGCGCATCGTCCACGTCGACGAGAACAACCGCATCGTCGCC  
CTGGGCAATGAC

ATCGCCGAGGCCGTCCCGGGCTCCGACACCGTCTCCGCCCGGAACATCT  
AA

**SEQ ID No.8:**

ATGATTCGCA CGATGCTGCA GGGCAAACCTC CACCGCGTGA  
AAGTGA CTCA TGCGGACCTG  
CACTATGAAG GTTCTTGCGC CATTGACCAG GATTTTCTTG  
ACGCAGCCGG TATTCTCGAA  
AACGAAGCCA TTGATATCTG GAATGTCACC AACGGCAAGC  
GTTTCTCCAC TTATGCCATC  
GCGGCAGAAC GCGGTTTCGAG AATTATTTCT GTTAACGGTG  
CGGCGGCCCA CTGCGCCAGT  
GTCGGCGATA TTGTCATCAT CGCCAGCTTC GTTACCATGC  
CAGATGAAGA AGCTCGCACC  
TGGCGACCCA ACGTCGCCTA TTTTGAAGGC GACAATGAAA  
TGAAACGTAC CGCGAAAGCG  
ATTCCGGTAC AGGTTGCTTAA

**SEQ ID No.9:**

ATGCGTCGTTGGCTGCTGAAGAGCAAACCTGCACCGTGCGCGTGTGACC  
GGTACCGAGAAGGACTACGAAGGCAGCATCAGCATTGATGCGGCGCTG  
CTGAGCGAGGCGGACATTGCGGTGGGTGAACAGGTTCAAGTGGTTAAC  
GTTACCAACGGCGAGCGTTTCGAAACCTATAACCATTGAGGGTGAAAGC  
CGTCAGATGGAGCTGAACGGTGCGGCGGCGCGTCTGGCGGAAACCGGT  
GATGTGATCATTGTTATCAGCTACGGCCTGTATGTGAAAGATGAGCAAC  
CGGAACCGACCGTTCTGCTGCTGGACGAGGAAAACCGTATTAGCGAGC  
GTGAATAA

**SEQ ID No.10:**

ATGCAGCGTACCTTCCTGAAGAGCAAACCTGCACCGTCTGACCACCACC  
ATCCGTGGCAAGGAGAACAGCGGCGTGATTCTGGTTAACGGTGTGGCG  
CCGCACAAAGTTGCGGGCGACCTGCTGATCATTGCGGCGTACAGCAGC

TATAGCGAGGATGAACTGCGTAACTACCAACCGGCGCTGTGCTATGTT  
GACGAAAAGAACGTGCTGACCCGTATCAGCCGTAA

**SEQ ID No.11:**

ATGCGTAAACATGCAGGAGAAAGGCGTGAGCGAGAAGGAAATTCTGGA  
GGAAGTGAAGAAATACCGTAGCCTGGATCTGAAATATGAAGACGGCAA  
CATTTTCGGTAGCATGTGCAGCAACGTGCTGCCGATCACCCGTAAGATC  
GTTGATATTTTCCTGGAGACCAACCTGGGTGACCCGGGCCTGTTTAAAG  
GTACCAAGCTGCTGGAGGAAAAAGCGGTGGCGCTGCTGGGCAGCCTGC  
TGAACAACAAGGATGCGTACGGTCACATCGTTAGCGGTGGCACCGAAG  
CGAACCTGATGGCGCTGCGTTGCATCAAAAACATTTGGCGTGAGAAAC  
GTCGTAAGGGCCTGAGCAAAAACGAACACCCGAAGATCATTGTGCCGA  
TTACCGCGCACTTCAGCTTTGAGAAAGGTCGTGAAATGATGGATCTGG  
AGTACATCTATGCGCCGATTAAAGAGGACTACACCATCGACGAAAAAT  
TTGTGAAGGACGCGGTTGAGGACTATGATGTTGACGGTATCATTGGCAT  
TGCGGGTACCACCGAACTGGGTACCATCGATAACATTGAGGAACTGAG  
CAAAATCGCGAAGGAAAACAACATCTACATTCACGTGGACGCGGGCGTT  
CGGTGGCCTGGTTATCCCGTTTCTGGACGATAAATACAAGAAAAAGGG  
CGTGAAGTATAAGTTCGATTTTAGCCTGGGTGTTGATAGCATCACCATT  
GACCCGCACAAAATGGGTCACTGCCCGATCCCGAGCGGTGGCATTCTG  
TTCAAAGACATCGGTTACAAGCGTTATCTGGATGTGGACGCGCCGTATC  
TGACCGAGACCCGTCAGGCGACCATTCTGGGCACCCGTGTGGGTTTTGG  
TGGCGCGTGCACCTACGCGGTTCTGCGTTATCTGGGCCGTGAAGGTCAA  
CGTAAAATCGTTAACGAGTGCATGGAAAACACCCTGTACCTGTATAAA  
AAGCTGAAAGAGAACAACCTCAAGCCGGTGATCGAACCGATTCTGAAC  
ATCGTTGCGATTGAGGATGAAGACTACAAAGAGGTGTGCAAAAAGCTG  
CGTGACCGTGGTATTTATGTGAGCGTTTGCAACTGCGTTAAAGCGCTGC  
GTATCGTGGTTATGCCGCACATTAAGCGTGAGCACATCGATAACTTTAT  
CGAAATTCTGAACAGCATCAAACGTGACTAA

**SEQ ID No.12:**

ATGATGAAGATCATTTCGTGCGAAACTGCACGGCATCCGTGTGACCAAC  
GCGGATCTGAACTACCACGGCAGCATTACCCTGGACCCGGAGCAGTGC  
GAAATGGCGGGTATCTATCCGATGGAGTTCGTTGATATTTGGAACAAG  
AACAGCGCGGGCGCGTATCAGCACCTACGTGATTTTTGGTGAACCGGGC  
AGCCGTTGCTGCGTTCTGAACGGTGCGGGCGGCGCGTACCTGCCAAAAA  
GGCGACGAGCTGATCATTGCGGGCAGCGCGGATATCAGCGGTCCGGAA  
AAGCTGTACGACATCAAACCGCGTATTCTGACCTTCCTGCCGGACAACC  
ACGTGGATCAGGTTCTGTACTATGATGTGTTCCAAAGCGAGAAGCGTCC  
GTATGACTTTCGTATCGTTGACGCGGATAAACACACCATTGAAAGCTGC  
CACACCTGGCCGAACGTGGACATCACCAAGCTGCGTAGCGATCTGGCG  
GCGAAAGGTTGGAGCGAGGCGGAAATCGACAGCTTCATTGCGAGCCAC  
TTTAGCCTGTAA

**SEQ ID No.13:**

ATGCGTGACACCAAGAAAATGCTGAACCGTGCGGATGAGCTGGACGAT  
CTGTACGAAGCGGTTTCGTGCGCTGATCATTCCGCATGTGCGTGCGGGCGG  
ATGAAGCGTGCAGCCTGAAGAGCGCGGGTCAGCTGCACACCGACGATA  
CCCAGCGTCTGCAAAACGTTCTGGTGGAAACCGTACCCGCCGAAGGCGC  
TGCAGGAGCGTTTCCAATTTACCCTGCCGGACAACGAGGGTAACGGCA  
AAGATGGCCTGATGCACCTGATCCGTGATGTTCTGCGTTATAGCGTGAA  
CACCTGGGACCAAGGTTTTATGGATAAGCTGACCAGCAGCACCAACCC  
GGTTGGCGTGATCAGCGAAATTGTTCTGGGCATCCTGAACACCAACGTT  
CATGTGTACCATGTGGCGCCGGCGCTGAGCGTTATTGAGAAAGTGACC  
GGCCGTACCCTGGCGGCGTATTTTCGGTTTTAACAGCCCGAGCGCGGGTG  
GCATTAGCTGCCAGGGTGGCAGCGCGAGCAACCTGACCAGCCTGGTGG  
TTGCGCGTAACAGCCTGTACCCGGACTGCAAGCTGAACGGTGGCAGCA  
GCTATCAATTTGCGATCTTCACCAGCTGCCACGGTCACTTCAGCATGGA  
AAAAGCGGGCATTACCTGCGGTATGGGCCTGAGCAGCGTGGTTCACGT  
TCCGGTGAACGACGATGGCCGTATGAACGTTAGCGCGCTGCGTGAGCT  
GGTGATCCAGGCGAAGGCGCAAGGTAAAACCCCGCTGTATGTTAACGC  
GACCGCGGGTACCACCGTTCTGGGTGTGTTTGACCCGCTGCACGAAATC

AAGACCATTTGCGAGGAATTTGGCATGTGGTTCACGTGGATGCGAGC  
TGGGGTGGCAGCATCATTTTCAGCGCGAAGCACCGTCACAACTGACC  
GGTTGCGAGCTGGCGGACAGCCTGACCATTAGCCCGCACAAAATGCTG  
AACGTTCCGATGACCTGCAGCTTTCTGCTGACCAACAACCTGAGCAGCT  
TCTACACCGCGAACAGCCTGGACGCGGGTTACCTGTTCCACGATACCG  
AGGACGATGAAGTGTGGGACCTGGCGAACCTGACCCTGCAGTGCGGTC  
GTCGTGCGGATAGCCTGAAAATGGCGCTGGCGTGGACCTACTATGGTG  
CGGCGGGCTTTGAACGTCGTATCAACCACGCGTTCAAGATGGCGGGCGC  
ACCTGAGCAGCATCATTCAGAAAAGCCCGGACTTTGAACTGGTTAGCC  
CGAACCCGCCGCCGTGCCTGCAAGTGTGCTTCTACTATACCCCGGGTGG  
CAAGATGGCGAAAAGCGAGATGGAAACCAGCCGTCGTACCCGTGCGAT  
GGTTGAAAAGATGGTGGACCGTGGCTTCATGTTTGATTTTCGCGCCGGGT  
CCGAAAGGCGATTTCTTTCGTGTGGTTGTGAACTGCGAGACCCTGCTGG  
GTACCGTTGAAGGCCTGTTCAAGGGTCTGGAGGCGGTGGGTAAACAAG  
TTGTGTAA

**SEQ ID No.14:**

ATGCTGAACATCACCACCGGTGCGCGTTTCACCACCTACGCGATCGAA  
GCGCCGCGTGGCAGCAAAGTGATTGGTGTGAACGGTGCGGCGGCGCGT  
CTGGTGCAGAAGGGTGACAAAGTTATCGTGGTTACCTACGGCATGCTG  
CCGGAGGAAGAGGCGCGTAACTATAACCCGACCGTGGTTCTGCTGGAC  
GATGGTAACCTGATTAAACGTGCGGGCGTAA

**SEQ ID No.15:**

ATGGTGGACACCCCGTACCGTAAGATGCTGGCGGCGAAAATCCACCGT  
GCGACCGTGACCGGTGCGGATGTTAACTATGAAGGCAGCCTGACCGTG  
CCGCCGGAACCTGCTGGTTGCGGCGAAGATCCACCCGTACGAGAGCCTG  
CACGTGTGGAACGTTACCCGTGGTACCCGTCTGGAGACCTATGCGATTG  
AAGGCCTGCCGAACAGCAACGACGTGTGCGCGAACGGTGCGGCGGGCGC  
ACCTGATTCGTCCGGGTGACCATGTGATTCTGGCGGCGTATGCGATGGT  
TCCGGAGGCGGATGCGGCGACCCACAAACCGCGTCTGATCTTCGTGGA  
CGATAACAACCAGCTGAGCCACGTTGGTCCGGAAATTGCGGGTCCGAA

CCTGCGTAGCGACAGCGACGATACCCACCTGGTTCGTAGCACCGAGAT  
GACCCCGGATGGTCAACCGCTGGCGGAAGGCTGCTAA

**SEQ ID No.16:**

ATGCTGAACATCTACCTGAAGAGCAAAATCCACATGGCGACCATTACC  
CGTAAAGAGGTGTACTATGAAGGTAGCATCGAGATTGACGAGGAACTG  
ATGGGTAAAGCGGGCATTAGCGAGGGCGAACTGGTTCTGGTGGTGAAC  
GTTAACAACGCGGAACGTTTCGTGACCTACGTTATCAAGGGTAAACGT  
GGCAGCCGTGAGATTAACCTGTATGGTGCGGCGGCGCGTCTGGGCGAG  
GAAGGCGACCGTGTGATCATTATGGCGTTCACCTTTAGCGATAAGCCG  
GTGAAGGCGAAAACCATCGTTCTGAACGAGAAGAACGAAATTGTTTCAG  
GAAAAATAA

**SEQ ID No.17:**

CCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTACT  
GAAACATCTTAATCATGCTAAGGAGGTTTTCTAATG

**SEQ ID No.18:**

CGCGGATCC TTGA CAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGA  
GCACAACA  
TCAATTTATCAGGATACGTTATGAAACCGACCACCATCTCCTTACTGCA  
GAAGTACAAAC  
AGGAAAAAAAAACGTTTCGCGACCATCACCGCTTATGACTATAGCTTCG  
CCAAACTCTTTG  
CTGATGAAGGGCTTAACGTCATGCTGGTGGGCGATTGCTGGGCATGA  
CGGTTACAGGGGC  
ACGACTCCACCCTGCCAGTTACCGTTGCCGATATCGCCTACCACACTGC  
CGCCGTACGTC  
GCGGCGCACCAAACCTGCCTGCTGCTGGCTGACCTGCCGTTTATGGCGTA  
TGCCACGCCGG  
ACAAGCCTTCGAAAACGCCGCAACGGTTATGCGTGCCGGTGCTAACA  
TGGTCAAATTG

AAGGCGGTGAGTGGCTGGTAGAAACCGTACAAATGCTGACCGAACGTG  
CCGTTCTGTAT  
GTGGTCACTTAGGTTTAAACACCACAGTCAGTGAATATTTTCGGTGGCTA  
CAAAGTTCAGG  
GGCGCGGCGATGAAGCGGGCGATCAACTGCTCAGCGATGCATTAGCCT  
TAGAAGCTGCTG  
GGGCACAGCTGCTGGTGGTGGGAATGCGTGCCGGTTGAACTGGCAAAC  
GTATTACCGAAG  
CACTGGCGATCCCGGTTATTGGCATTGGCGCAGGCAACGTCACTGACG  
GGCAGATCCTCG  
TGATGCACGACGCCTTTGGTATTACCGGCGGTCACATTCCTAAATTTCGC  
TAAAAATTTCC  
TCGCCGAAACGGGCGACATCCGCGCGGCTGTGCGGCAGTATATGGCTG  
AAGTGGAGTCCG  
GCGTTTATCCGGGCGAAGAACACAGTTTCCATTAAGGAGTCACGTTGTG  
TTAATTA  
TCGAAACCCTGCCGCTGCTGCGTCAGCAAATTCGCCGCCTGCGTATGGA  
AGGCAAGCGCG  
TGGCGCTGGTGCCTACCATGGGTAACTGCACGATGGCCATATGAAGC  
TGGTCGACGAAG  
CCAAAGCCCGCGCCGATGTGGTCGTCGTCAGTATTTTCGTTAACCCGAT  
GCAGTTCGACC  
GCCCGGAAGATCTGGCTCGTTATCCACGGACCTTGCAGGAGGACTGCG  
AGAAGCTAAACA  
AACGTAAAGTGGATTTAGTTTTTCGCCCTTCGGTAAAAGAGATCTACCC  
GAACGGTACTG  
AAACCCACACTTACGTTGACGTTCTGGCCTTTCGACCATGCTGGAAGG  
TGCCAGCCGTC  
CGGGACATTTTCGCGGCGTTTTCGACTATTGTCAGCAAGCTGTTCAACCT  
GGTCCAGCCGG

ACATCGCCTGCTTCGGTGAAAAAGATTTTCAGCAACTGGCGCTGATCCG  
 CAAAATGGTTG  
 CCGATATGGGCTTCGATATTGAGATTGTCGGTGTGCCAATTATGCGCGC  
 CAAAGACGGTC  
 TGGCGCTAAGTTCCCGTAACGGTTATCTGACGGCGGAACAACGCAAAA  
 TTGCGCCTGGTC  
 TGTACAAAGTTTTAAGTTCGATTGCTGACAAATTGCAGGCTGGGGAAC  
 GGGATCTCGATG  
 AAATTATTACCATTGCGGGGCAAGAAGTGAATGAAAAAGGCTTCCGCG  
 CCGATGATATTC  
 AGATTCGCGATGCCGACACATTGCTGGAAGTTTCTGAAACCAGCAAAC  
 GGGCAGTAATTC  
 TGGTAGCCGCCTGGCTTGGCGATGCTCGCCTGATCGACAACAAAATGG  
 TCGAGCTGGCGT  
 AATACTTAACTGGCGCTACGGCTGATGGCGCCAGTTATTAATTTACCCC  
 ACGTCATCTGT  
CATAACACAGG

**SEQ ID No.19:**

ACATGCATGC ttgacagctagctcagtcctaggtataatgctagc  
GTTGCGGGTGAGGAGGAACAATGAAAATTACCGTATTGGGATGCGGTG  
 CCTTAGGGCAAT  
 TATGGCTTACAGCACTTTGCAAACAGGGTCATGAAGTTCAGGGCTGGCT  
 GCGCGTACCGC  
 AACCTTATTGTAGCGTGAATCTGGTTGAGACAGATGGTTCGATATTTAA  
 CGAATCGCTGA  
 CCGCCAACGATCCCGATTTTCTCGCCACCAGCGATCTGCTCCTGGTGAC  
 GCTGAAAGCAT  
 GGCAGGTTTCCGATGCCGTCAAAGCCTCGCGTCCACACTGCCTGTAAC  
 TACGCCAATAC

TGTTAATTCACAACGGCATGGGCACCATCGAAGAGTTGCAAAACATTC  
 AGCAGCCATTAC  
 TGATGGGCACCACCACCCATGCAGCCCGCCGCGACGGCAATGTCATTA  
 TTCATGTGGCAA  
 ACGGTATCACGCATATTGGCCCGGCACGGCAACAGGACGGGGATTACA  
 GTTATCTGGCGG  
 ATATTTTGCAAACCGTGTTGCCTGACGTTGCCTGGCATAACAATATTCG  
 CGCCGAGCTGT  
 GCGCAAGCTGGCAGTCAACTGCGTGATTAATCCACTGACTGCCATCTG  
 GAATTGCCCGA  
 ACGGTGAATTACGTCATCATCCGCAAGAAATTATGCAGATATGCGAAG  
 AAGTCGCGGCGG  
 TGATCGAACGCGAAGGGCATCATACTTCAGCAGAAGATTTGCGTGATT  
 ACGTGATGCAGG  
 TGATTGATGCCACAGCGGAAAATATCTCGTCGATGTTGCAGGATATCCG  
 CGCGCTGCGCC  
 AACTGAAATCGACTATATCAATGGTTTTCTCTTACGCCGCGCCCGCGC  
 GCATGGGATTG  
 CCGTACCGGAAAACACCCGCCTGTTTGAAATGGTAAAAAGAAAGGAGA  
 GTGAATATGAGC  
 GCATCGGCACTGGTTTGCCTCGCCCCTGGTAGTGAAGAGACTAATTTTC  
 GAAAAAAGACGCTGAAAAGCGTCTTTTTTCGTTTTGGGATCTAAATCGA  
G

**SEQ ID No.20:**

CG GACTGGAAGA AGATCTGTTT GTCTCTGCGG  
 GTCCGAATAT TGA ACTGCTG CCGGAAGGCC AGTTTAAATA  
CCACGTCGAT TTTGAGCATC  
**TGCATATTGG** CGAAGAAACC GGGATGATTT GCGTCTCCCG  
 GCCGACGAAT CCAACAGGCA

**ATGTGATTAC TGACGAAGAG TTGCTGAAGC TTGACGCGCT**  
GGCGAATCAA CACGGCATT  
CGCTGGTGAT TGATAACGCT TATGGCGTCC CGTTCCCGGG  
TATCATCTTC AGTGAAGCGC  
GCCCCGCTATG GAATCCGAAT ATCGTGCTGT **GCATGAGTCT**  
CAATTCC**GACGTCT**AAGAAACCATT  
ATTATCATGACATTAACCTATAAAAA  
TAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC  
TTCACCTCGAGTCCCTATCAGTGATA  
GAGATTGACATCCCTATCAGTGATAG  
AGATACTGAGCACATCAGCAGGACG  
CACTGACC  
GGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCG  
TACTGAAACATCTTAATCATGCTAAGGAGGTTTTCTA  
ATGTATCGAA CAATGATGAG CGGCAAACCTT CACAGGGCAA  
CTGTTACGGA AGCAAACCTG  
AACTATGTGG GAAGCATTAC AATTGATGAA GATCTCATTG  
ATGCTGTGGG AATGCTTCCT  
AATGAAAAAG TACAAATTGT GAATAATAAT AATGGAGCAC  
GTCTTGAAAC GTATATTATT  
CCTGGTAAAC GGGGAAGCGG CGTCATATGC TTAAACGGTG  
CAGCCGCACG CCTTGTGCAG  
GAAGGAGATA AGGTCATTAT TATTTCCCTAC AAAATGATGT  
CTGATCAAGA AGCGGCAAGC  
CATGAGCCGA AAGTGGCTGT TCTGAATGAT CAAAACAAAA  
TTGAACAAAT GCTGGGGAAC  
GAACCAGCCC GTACAATTTT GTAA  
AAGC  
CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG  
**CATC ACCAATATGAACGGCA**

TTAT CAGCCTGGCA CCTGGCGGTA TTGGTCCGGC GATGATGTGT  
GAAATGATTA

AGCGTAACGA TCTGCTGCGC CTGTCTGAAA CAGTCATCAA  
ACCGTTTTAC TACCAGCGTG

TTCAGGAAAC TATCGCCATC ATTCGCCGCT ATTTACCGGA  
**AAATCGCTGC CTGATTCATA**

AACCGGAAGG AGCCATTTTC CTCTGGCTAT GGTTTAAGGA  
TTTGCCCAT TACGACCAAGC

**AGCTCTATCA GC**

**SEQ ID No.21:**

CG GACTGGAAGA AGATCTGTTT GTCTCTGCGC

GTCCGAATAT TGAAC TGCTG CCGGAAGGCC AGTTTAAATA  
CCACGTCGAT TTTGAGCATC

**TGCATATTGG** CGAAGAAACC GGGATGATTT GCGTCTCCCG  
GCCGACGAAT CCAACAGGCA

**ATGTGATTAC** TGACGAAGAG TTGCTGAAGC TTGACGCGCT  
GGCGAATCAA CACGGCATT

CGCTGGTGAT TGATAACGCT TATGGCGTCC CGTTCCCGGG  
TATCATCTTC AGTGAAGCGC

GCCCGCTATG GAATCCGAAT **ATCGTGCTGT GCATGAGTCT**  
CAATTCC**GACGTCT**AAGAAACCATT

ATTATCATGACATTAACCTATAAAA  
TAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC

TTCACCTCGAGTCCCTATCAGTGATA  
GAGATTGACATCCCTATCAGTGATAG

AGATACTGAGCACATCAGCAGGACG  
CACTGACC

GGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCG  
TACTGAAACATCTTAATCATGCTAAGGAGGTTTTCTA

ATGTACCGTA CGTTAATGAG CGCAAACTT CACAGAGCGA  
 GAGTGACGGA AGCCAATTTG  
 AACTACGTCG GCAGCGTGAC AATTGATGAA GATTTGCTGG  
 ATGCTGTTCGG AATGATGGCA  
 AATGAAAAAG TGCAAATTGT GAATAATAAT AACGGGGCCC  
 GGCTGGAAAC GTACATTATT  
 CCCGGTGAAA GGGGCAGCGG CGTCGTTTGT TTAAACGGAG  
 CTGCCGCCC CCTTGTCCAG  
 GTTGGAGATG TCGTCATCAT CGTGTCTTAT GCGATGATGT  
 CTGAAGAGGA AGCAAAGACC  
 CATAAGCCGA AGGTTGCCGT TTTGAACGAG AGAAACGAAA  
 TCGAGGAAAT GCTGGGTCAG  
 GAGCCAGCCC GTACCATTCT GTAA

AAGC

CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG  
**CATC ACCAATATGAACGGCA**  
 TTAT CAGCCTGGCA CCTGGCGGTA TTGGTCCGGC GATGATGTGT  
 GAAATGATTA  
 AGCGTAACGA TCTGCTGCGC CTGTCTGAAA CAGTCATCAA  
 ACCGTTTTAC TACCAGCGTG  
 TTCAGGAAAC TATCGCCATC ATTCGCCGCT ATTTACCGGA  
**AAATCGCTGC CTGATTCATA**  
 AACCGGAAGG AGCCATTTTC CTCTGGCTAT GGTTTAAGGA  
 TTTGCCCAT TACGACCAAGC  
**AGCTCTATCA GC**

**SEQ ID No.22:**

CG GACTGGAAGA AGATCTGTTT GTCTCTGCG €  
 GTCCGAATAT TGAACGCTG CCGGAAGGCC AGTTTAAATA  
CCACGTCGAT TTTGAGCATC

TGCATATTGG CGAAGAAACC GGGATGATTT GCGTCTCCCG  
GCCGACGAAT CCAACAGGCA  
ATGTGATTAC TGACGAAGAG TTGCTGAAGC TTGACGCGCT  
GGCGAATCAA CACGGCATT  
CGCTGGTGAT TGATAACGCT TATGGCGTCC CGTTCCCGGG  
TATCATCTTC AGTGAAGCGC  
GCCCGCTATG GAATCCGAAT ATCGTGCTGT GCATGAGTCT  
CAATTCCGACGTCTAAGAAACCATT  
ATTATCATGACATTAACCTATAAAA  
TAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC  
TTCACCTCGAGTCCCTATCAGTGATA  
GAGATTGACATCCCTATCAGTGATAG  
AGATACTGAGCACATCAGCAGGACG  
CACTGACC  
GGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCG  
TACTGAAACATCTTAATCATGCTAAGGAGGTTTTCTA  
ATGCTGCGCA CCATCCTCGG  
AAGTAAGATT CACCGAGCCA CTGTCACTCA AGCTGATCTA  
GATTATGTTG GCTCTGTAAC  
CATCGACGCC GACCTGGTTC ACGCCGCCGG ATTGATCGAA  
GGCGAAAAG TTGCCATCGT  
AGACATCACC AACGGCGCTC GTCTGGAAAC TTATGTCATT  
GTGGGCGACG CCGGAACGGG  
CAATATTTGC ATCAATGGTG CCGCTGCACA CCTTATTAAT  
CCTGGCGATC TTGTGATCAT  
CATGAGCTAC CTTACAGGCAA CTGATGCGGA AGCCAAGGCG  
TATGAGCCAA AGATTGTGCA  
CGTGGACGCC GACAACCGCA TCGTTGCGCT CGGCAACGAT  
CTTGCGGAAG CACTACCTGG  
ATCCGGGCTT TTGACGTCGA GAAGCATTAA

AAGC

CTAGCATAACCCCTTGGGGCCTCTAAACGGGTCTTGAGGGGTTTTTTG

**CATC ACCAATATGAACGGCA**

TTAT CAGCCTGGCA CCTGGCGGTA TTGGTCCGGC GATGATGTGT

GAAATGATTA

AGCGTAACGA TCTGCTGCGC CTGTCTGAAA CAGTCATCAA

ACCGTTTTAC TACCAGCGTG

TTCAGGAAAC TATCGCCATC ATTCGCCGCT ATTTACCGGA

**AAATCGCTGC CTGATTCATA**

AACCGGAAGG AGCCATTTTC CTCTGGCTAT GGTTTAAGGA

TTTGCCCAT TACGACCAAGC

**AGCTCTATCA GC****SEQ ID No.23:**

GGCAGAAAAT CAGCCAGTTC CGCGCCCGCC ATCCCGCAAT

TGGCGCGGGC AAACAAACGA

CACTTTTGCT GAAGCAGGGC TACGGCTTTG TTCGTGAGCA

TGGCGACGAT AAAGTGCTGG

TCGTCTGGGC AGGGCAACAG TAACTTTTCC GGCTTCCCGT

TCGTCAGTAC CTCGGGAAGC

CGCCAACCAG GATAAAATGT CAGCCCTAAT CAGCGTTGCA

GGATAAAGCA CCGCTCACTC

TTCAACAGAC CGATTTGCAC CCCAGCAAAT GTAGCGTTAT

TGTTACCTTC CTTGCTACAG

AGTTCTTGA CAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGA

**CAAGATT CAGGACGGGG AACTAACTAT G**

AATGGCGCACAGTGGGTGGTACATGCGTTGCGGGCACAGGGTGTGAAC

ACCGTTTTTCGGTTATCCGGGTGGCGCAATTATGCCGGTTTACGATGCAT

TGTATGACGGCGGCGTGGAGCACTTGCTATGCCGACATGAGCAGGGTG

CGGCAATGGCGGCTATCGGTTATGCTCGTGCTACCGGCAAACTGGCG

TATGTATCGCCACGTCTGGTCCGGGCGCAACCAACCTGATAACCGGGCT

TGCGGACGCACTGTTAGATTCCATCCCTGTTGTTGCCATCACCGGTCAA  
GTGTCCGCACCGTTTATCGGCACTGACGCATTTTCAGGAAGTGGATGTCC  
TGGGATTGTCGTTAGCCTGTACCAAGCACAGCTTTCTGGTGCAGTCGCT  
GGAAGAGTTGCCGCGCATCATGGCTGAAGCATTTCGACGTTGCCTGCTC  
AGGTCGTCCTGGTCCGGTTCTGGTCGATATCCCAAAGATATCCAGTTA  
GCCAGCGGTGACCTGGAACCGTGGTTCACCACCGTTGAAAACGAAGTG  
ACTTTCCACATGCCGAAGTTGAGCAAGCGCGCCAGATGCTGGCAAAA  
GCGCAAAAACCGATGCTGTACGTTGGCGGTGGCGTGGGTATGGCGCAG  
GCAGTTCCGGCTTTGCGTGAATTTCTCGCTGCCACAAAATGCCTGCCA  
CCTGTACGCTGAAAGGGCTGGGCGCAGTAGAAGCAGATTATCCGTA  
ATCTGGGCATGCTGGGAATGCATGGCACCAAAGCGGCGAACTTCGCGG  
TGCAGGAGTGCGACTTGCTGATCGCCGTGGGTGCACGTTTTGATGACCG  
GGTGACCGGCAAACCTGAACACCTTCGCACCACACGCCAGTGTTATCCA  
TATGGATATCGACCCGGCAGAAATGAACAAGCTGCGTCAGGCACATGT  
GGCATTACAAGGTGATTTAAATGCTCTGTTACCAGCATTACAGCAGCCG  
TTAAATAFCAATGACTGGCAGCTACACTGCGCGCAGCTGCGTGATGAA  
CATGCCTGGCGTTACGACCATCCCGGTGACGCTATCTACGCGCCGTTGT  
TGTTAAAACAACTGTCAGATCGTAAACCTGCGGATTGCGTCGTGACCAC  
AGATGTGGGGCAGCACCAGATGTGGGCTGCGCAGCACATCGCCCACAC  
TCGCCCGGAAAATTTTCATCACCTCCAGCGGCTTAGGCACCATGGGTTTT  
GGTTTACCGGCGGCGGTTGGCGCGCAAGTCGCGCGACCAAACGATAACC  
GTCGTCTGTATCTCCGGTGACGGCTCTTTCATGATGAATGTGCAAGAGC  
TGGGCACCGTAAAACGCAAGCAGTTACCGTTGAAAATCGTCTTACTCG  
ATAACCAACGGTTAGGGATGGTTCGACAATGGCAGCAACTGTTTTTCCA  
GGAACGATATAGCGAAACCACCCTTACCGATAACCCCGATTTCTCATG  
TTAGCCAGCGCCTTCGGCATCCCTGGCCAACACATCACCCGTAAAGACC  
AGGTTGAAGCGGCACTCGACACCATGCTGAACAGTGATGGGCCATAACC  
TGCTTCATGTCTCAATCGACGAACTTGAGAACGTCTGGCCGCTGGTGC  
CGCCTGGTGCCAGTAATTCAGAAATGTTGGAGAAATTATCATGATGCA  
ACATCAGGTCAATGTATCGGCTCGCTTCAATCCAGAAACCTTAGAACGT

GTTTTACGCGTGGTGCATCGTGGTTTCCACGTCTGCTCAATGAATA  
 TGGCCGCCGCCAGCGATGCACAAAATATAAATATCGAATTGACCGTTG  
 CCAGCCCACGGTCGGTCGACTTACTGTTTAGTCAGTTAAATAAACTGGT  
 GGACGTCGCACACGTTGCCATCTGCCAGAGCACAACCACATCACAACA  
 AATCCGCGCCTGAGCG  
CAAAAGGAATATAACCAGAAAAGAGACGCTTTTAGAGCGTCTTTTTTCGT  
 TTT  
**GGAGCTACTC AACTGCTTG CCGGAATGCT GCGCGAGAAG**  
 TTGGGTTGGG  
 ATATCGAACC ACAGAATATT GCACTAACAA ACGGCAGCCA  
 GAGCGCGTTT TTCTACTTAT  
 TTAACCTGTT TGCCGGACGC CGTGCCGATG GTCGGGTCAA  
 AAAAGTGCTG TTCCCGCTTG  
 CACCGGAATA CATTGGCTAT GCTGACGCCG GACTGGAAGA  
 AGATCTGTTT GTCTCTGCGE  
 GTCCGAATAT TGAAGTCTG CCGGAAGGCC AGTTTAAATA  
CCACGTCGAT TTTGAGCATC  
**TGCATATTGG C**

### 实施例 5 VB5 工程菌的发酵试验

取试验菌株 *E.coli* MG1655 *avtA:panDBs-ilvG<sup>+</sup>M/pACYC184-panBCE*, *E.coli* MG1655 *avtA:panDBI-ilvG<sup>+</sup>M/pACYC184-panBCE* 和 *E.coli* MG1655 *avtA:panDCg-ilvG<sup>+</sup>M/pACYC184-panBCE*, 划线接种于含 34 mg/L 氯霉素的固体 LB 培养基平板, 37°C 静置培养 12 小时。挑取平板上的菌苔, 接种至 LB 培养基斜面中, 37°C 静置培养 10-12 h。挑取平板上的菌苔, 接种至液体 LB 培养基中, 37°C、220rpm 振荡培养 12h, 得到种子液。将种子液按照 3% 的接种量接种至发酵培养基中, 37°C、220rpm 震荡培养。

发酵培养基: MOPS 80 g/L, 葡萄糖 20.0g/L、硫酸铵 10.0g/L、磷酸二氢钾 2.0 g/L、七水硫酸镁 2.0 g/L、酵母粉 5.0g/L、微量元素混合液 5mL/L, 余量为水。微量元素混合液: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10g/L、CaCl<sub>2</sub> 1.35g/L、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.25g/L、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.5g/L、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1g/L、

(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.106g/L、Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 0.23g/L、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.48g/L、35% HCl 10mL/L，余量为水。

培养过程中，用氨水调节反应体系的 pH 值使其维持在 6.8-7.0。培养过程中，每隔 4h 取样一次，使用生物传感分析仪 SBA-40D 检测葡萄糖含量，当体系中的葡萄糖含量低于 5g/L 时，补加葡萄糖并使体系中的葡萄糖浓度达到 20g/L。培养 24h 后取样，12000g 离心 2 分钟，取上清液，检测 VB5 含量（表 2）。

表 2

工程菌	维生素 B5 (g/L)
<i>E.coli</i> MG1655 <i>avtA:panDBs-ilvG<sup>+</sup>M/pACYC184-panBCE</i>	2.12±0.13
<i>E.coli</i> MG1655 <i>avtA:panDBI-ilvG<sup>+</sup>M/pACYC184-panBCE</i>	3.36±0.25
<i>E.coli</i> MG1655 <i>avtA:panDCg-ilvG<sup>+</sup>M/pACYC184-panBCE</i>	1.77±0.15

本发明通过 β-丙氨酸全细胞催化和 VB5 发酵两个方面，验证了本发明筛选到的来源于地衣芽孢杆菌的 PanD 活性最高，可显著提高 VB5 的发酵产量。

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来说，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、增强 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD* 的表达在生产维生素 B5 中的应用;

所述 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。

2、如权利要求 1 所述的应用,其特征在於,所述 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD* 具有:

(I)、如 SEQ ID No.3 所示的核苷酸序列;或

(II)、如 (I) 所示的核苷酸序列经取代、缺失或添加一个或多个碱基获得的核苷酸序列,且与 (I) 所示的核苷酸序列功能相同或相似的核苷酸序列;或

(III)、与 (I) 或 (II) 所示的核苷酸序列至少有 80%同源性的核苷酸序列。

3、如权利要求 1 或 2 所述的应用,其特征在於,还包括:

(1)、在 *avtA* 基因中插入强启动子和/或强 RBS,其中强启动子为 PPL,强 RBS 为 BCD2;和/或

(2)、表达了来源于大肠杆菌 BL21 的 *ilvGM* 基因;和/或

(3)、增加了 *panB*、*panC* 和/或 *panE* 基因的拷贝数。

4、表达载体,其特征在於,包含 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD*;

所述 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*)。

5、如权利要求 4 所述的表达载体,其特征在於,还包括:

(i)、强启动子和/或强 RBS;和/或

(ii)、来源于大肠杆菌 BL21 的 *ilvGM* 基因;和/或

(iii)、增加了拷贝数的 *panB*、*panC* 和/或 *panE* 基因。

6、宿主,其特征在於,表达了来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD*。

7、如权利要求 6 所述的宿主,其特征在於,还包括:

(i)、强启动子和/或强 RBS;和/或

(ii)、来源于大肠杆菌 BL21 的 *ilvGM* 基因；和/或

(iii)、增加了拷贝数的 *panB*、*panC* 和/或 *panE* 基因。

8、如权利要求 6 或 7 所述的宿主，其特征在于，转染或转化如权利要求 4 或 5 所述的表达载体；

作为优选，所述宿主源自大肠杆菌，优选为大肠杆菌 K12，更优选为大肠杆菌 K12 MG1655 株。

9、如权利要求 4 或 5 所述的表达载体、如权利要求 6 至 8 任一项所述的宿主在生产维生素 B5 中的应用。

10、生产维生素 B5 的方法，其特征在于，以权利要求 6 至 8 任一项所述的宿主为发酵菌株，无需添加  $\beta$ -丙氨酸，发酵，收集发酵液，离心取上清液，获得维生素 B5。

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/076309

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C12N15/60(2006.01)i; C12N9/88(2006.01)i; C12N15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P13/02(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N, C12P		
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, CNTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, KRTXT, VEN, CNKI, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, pubmed, ISI web of science, STN, 中国生物序列检索系统, China Biological Sequence Search System: 中国科学院微生物研究所, 温廷益, 刘树文, 李忠财, 孙佳慧, 邓爱华, 张芸, L-天冬氨酸 $\alpha$ -脱羧酶, panD, aspartate 1-decarboxylase, aspartate a-decarboxylase, 9024-58-2, 地衣芽孢杆菌, Bacillus licheniformis, 维生素b5, 泛酸, 79-83-4, D-pantothenic acid, 启动子, PPL, RBS, BCD2, ILVGM, SEQ ID NO.3		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1420931 A (BASF AG) 28 May 2003 (2003-05-28) description, pages 4-6, 11, 16, 18, 24, 32, 41-42, and 55, and sequences 27-28	1, 3-10
Y	CN 1420931 A (BASF AG) 28 May 2003 (2003-05-28) description, pages 4-6, 11, 16, 18, 24, 32, 41-42, and 55, and sequences 27-28	2-3
X	CN 1788089 A (BASF AG) 14 June 2006 (2006-06-14) description, pages 5, 7, 17-18, 25, 28-29, and 32, and table 1	1, 3-10
X	CN 1639349 A (BASF AG) 13 July 2005 (2005-07-13) description, pages 4-5, 7, 17, 24, 27-28, and 32, and table 1	1, 3-10
Y	NCBL "MULTISPECIES: aspartate 1-decarboxylase [Bacillus], WP_003182918.1" NCBI REFERENCE SEQUENCE, 30 May 2019 (2019-05-30), amino acid sequence	2-3
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 <b>06 June 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>12 June 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/ CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088</b>		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/076309

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	RACHINGER, M et al. "aspartate 1-decarboxylase PanD [Bacillus paralicheniformis ATCC 9945a],AGN36811.1" <i>GENBANK</i> , 16 November 2015 (2015-11-16), amino acid sequence	2-3
PX	CN 115595328 A (INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 13 January 2023 (2023-01-13) claims 1-10	1-10
PX	CN 115595314 A (INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 13 January 2023 (2023-01-13) claims 1-10	1-10

**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.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),  
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

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

International application No.

**PCT/CN2023/076309**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	1420931	A	28 May 2003	WO	0121772	A2	29 March 2001
				WO	0121772	A3	07 March 2002
				WO	0121772	A9	05 December 2002
				KR	20020092912	A	12 December 2002
				PL	356566	A1	28 June 2004
				SK	5222002	A3	04 March 2003
				EP	2163629	A2	17 March 2010
				EP	2163629	A3	02 June 2010
				EP	2163629	B1	08 March 2017
				HU	0202705	A2	28 December 2002
				HU	0202705	A3	28 February 2011
				HU	230509	B1	28 September 2016
				MXPA	02003017	A	06 September 2004
				BR	0014115	A	21 May 2002
				BRPI	0014115	B1	05 May 2015
				BRPI	0014115	B8	25 May 2021
				EP	1214420	A2	19 June 2002
				EP	1214420	B1	23 March 2016
				TR	200200751	T2	23 August 2004
				CZ	20021013	A3	11 December 2002
				AU	7708700	A	24 April 2001
				CA	2385497	A1	29 March 2001
				JP	2003527828	A	24 September 2003
				JP	5392957	B2	22 January 2014
				IL	148786	A0	12 September 2002
				NO	20021382	D0	20 March 2002
NO	20021382	L	16 May 2002				
CN	1788089	A	14 June 2006	CA	2491145	A1	15 January 2004
				AU	2003251792	A1	23 January 2004
				MXPA	04012812	A	24 February 2005
				EP	1660667	A2	31 May 2006
				EP	1660667	A4	05 January 2011
				JP	2006504408	A	09 February 2006
				IN	3053	CH2004A	17 February 2006
				US	2004146996	A1	29 July 2004
				US	7291489	B2	06 November 2007
				WO	2004005525	A2	15 January 2004
				WO	2004005525	A3	02 February 2006
				ZA	200500948	B	27 December 2006
				US	2006141585	A1	29 June 2006
				US	7989187	B2	02 August 2011
				IN	3051	CH2004A	17 February 2006
				CN	1639349	A	13 July 2005
AU	2002316575	A1	23 January 2004				
CA	2491137	A1	15 January 2004				
AT	530639	T	15 November 2011				
WO	2004005527	A1	15 January 2004				
JP	2005531326	A	20 October 2005				
HU	0500383	A2	29 August 2005				
DK	1520030	T3	27 February 2012				

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

International application No. <b>PCT/CN2023/076309</b>
---

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		EP 1520030 A1	06 April 2005
		EP 1520030 A4	17 March 2010
		EP 1520030 B1	26 October 2011
		MXPA 04012807 A	24 February 2005
		US 2006099692 A1	11 May 2006
.....	.....	.....	.....
CN 115595328 A	13 January 2023	None	
.....	.....	.....	.....
CN 115595314 A	13 January 2023	None	
.....	.....	.....	.....

<p><b>A. 主题的分类</b></p> <p>C12N15/60(2006.01)i; C12N9/88(2006.01)i; C12N15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P13/02(2006.01)i</p> <p>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</p>																				
<p><b>B. 检索领域</b></p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12N, C12P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>CNABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, KRTXT, VEN, CNKI, 百度学术, pubmed, ISI web of science, STN, 中国生物序列检索系统: 中国科学院微生物研究所, 温廷益, 刘树文, 李忠财, 孙佳慧, 邓爱华, 张芸, L-天冬氨酸<math>\alpha</math>-脱羧酶, panD, aspartate 1-decarboxylase, aspartate a-decarboxylase, 9024-58-2, 地衣芽孢杆菌, Bacillus licheniformis, 维生素b5, 泛酸, 79-83-4, D-pantothenic acid, 启动子, PPL, RBS, BCD2, ILVGM, SEQ ID NO.3</p>																				
<p><b>C. 相关文件</b></p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 1420931 A (BASF公司) 2003年5月28日 (2003 - 05 - 28) 说明书第4-6、11、16、18、24、32、41-42、55页及序列27-28</td> <td>1, 3-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 1420931 A (BASF公司) 2003年5月28日 (2003 - 05 - 28) 说明书第4-6、11、16、18、24、32、41-42、55页及序列27-28</td> <td>2-3</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 1788089 A (巴斯福股份公司) 2006年6月14日 (2006 - 06 - 14) 说明书5、7、17-18、25、28-29、32页及表1</td> <td>1, 3-10</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>CN 1639349 A (巴斯福股份公司) 2005年7月13日 (2005 - 07 - 13) 说明书4-5、7、17、24、27-28、32页及表1</td> <td>1, 3-10</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>NCBI. "MULTISPECIES: aspartate 1-decarboxylase [Bacillus], WP_003182918.1" NCBI REFERENCE SEQUENCE, 2019年5月30日 (2019 - 05 - 30), 氨基酸序列</td> <td>2-3</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 1420931 A (BASF公司) 2003年5月28日 (2003 - 05 - 28) 说明书第4-6、11、16、18、24、32、41-42、55页及序列27-28	1, 3-10	Y	CN 1420931 A (BASF公司) 2003年5月28日 (2003 - 05 - 28) 说明书第4-6、11、16、18、24、32、41-42、55页及序列27-28	2-3	X	CN 1788089 A (巴斯福股份公司) 2006年6月14日 (2006 - 06 - 14) 说明书5、7、17-18、25、28-29、32页及表1	1, 3-10	X	CN 1639349 A (巴斯福股份公司) 2005年7月13日 (2005 - 07 - 13) 说明书4-5、7、17、24、27-28、32页及表1	1, 3-10	Y	NCBI. "MULTISPECIES: aspartate 1-decarboxylase [Bacillus], WP_003182918.1" NCBI REFERENCE SEQUENCE, 2019年5月30日 (2019 - 05 - 30), 氨基酸序列	2-3
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
X	CN 1420931 A (BASF公司) 2003年5月28日 (2003 - 05 - 28) 说明书第4-6、11、16、18、24、32、41-42、55页及序列27-28	1, 3-10																		
Y	CN 1420931 A (BASF公司) 2003年5月28日 (2003 - 05 - 28) 说明书第4-6、11、16、18、24、32、41-42、55页及序列27-28	2-3																		
X	CN 1788089 A (巴斯福股份公司) 2006年6月14日 (2006 - 06 - 14) 说明书5、7、17-18、25、28-29、32页及表1	1, 3-10																		
X	CN 1639349 A (巴斯福股份公司) 2005年7月13日 (2005 - 07 - 13) 说明书4-5、7、17、24、27-28、32页及表1	1, 3-10																		
Y	NCBI. "MULTISPECIES: aspartate 1-decarboxylase [Bacillus], WP_003182918.1" NCBI REFERENCE SEQUENCE, 2019年5月30日 (2019 - 05 - 30), 氨基酸序列	2-3																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"D" 申请人在国际申请中引证的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"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)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2023年6月6日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2023年6月12日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p>		<p>授权官员</p> <p>孙谦</p> <p>电话号码 (+86) 010-53962101</p>																		

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	RACHINGER, M 等. "aspartate 1-decarboxylase PanD [Bacillus paralicheniformis ATCC 9945a], AGN36811.1" GENBANK, 2015年11月16日 (2015 - 11 - 16), 氨基酸序列	2-3
PX	CN 115595328 A (中国科学院微生物研究所) 2023年1月13日 (2023 - 01 - 13) 权利要求1-10	1-10
PX	CN 115595314 A (中国科学院微生物研究所) 2023年1月13日 (2023 - 01 - 13) 权利要求1-10	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列表进行的:
  - a.  作为国际申请的一部分提交的;
  - b.  为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),  
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2.  本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。
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/CN2023/076309

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	1420931	A	2003年5月28日	WO	0121772	A2	2001年3月29日
				WO	0121772	A3	2002年3月7日
				WO	0121772	A9	2002年12月5日
				KR	20020092912	A	2002年12月12日
				PL	356566	A1	2004年6月28日
				SK	5222002	A3	2003年3月4日
				EP	2163629	A2	2010年3月17日
				EP	2163629	A3	2010年6月2日
				EP	2163629	B1	2017年3月8日
				HU	0202705	A2	2002年12月28日
				HU	0202705	A3	2011年2月28日
				HU	230509	B1	2016年9月28日
				MXPA	02003017	A	2004年9月6日
				BR	0014115	A	2002年5月21日
				BR- PI	0014115	B1	2015年5月5日
				BR- PI	0014115	B8	2021年5月25日
				EP	1214420	A2	2002年6月19日
				EP	1214420	B1	2016年3月23日
				TR	200200751	T2	2004年8月23日
				CZ	20021013	A3	2002年12月11日
AU	7708700	A	2001年4月24日				
CA	2385497	A1	2001年3月29日				
JP	2003527828	A	2003年9月24日				
JP	5392957	B2	2014年1月22日				
IL	148786	A0	2002年9月12日				
NO	20021382	D0	2002年3月20日				
NO	20021382	L	2002年5月16日				
CN	1788089	A	2006年6月14日	CA	2491145	A1	2004年1月15日
				AU	2003251792	A1	2004年1月23日
				MXPA	04012812	A	2005年2月24日
				EP	1660667	A2	2006年5月31日
				EP	1660667	A4	2011年1月5日
				JP	2006504408	A	2006年2月9日
				IN	3053	CH20 04A	2006年2月17日
				US	2004146996	A1	2004年7月29日
				US	7291489	B2	2007年11月6日
				WO	2004005525	A2	2004年1月15日
				WO	2004005525	A3	2006年2月2日
				ZA	200500948	B	2006年12月27日
				US	2006141585	A1	2006年6月29日
				US	7989187	B2	2011年8月2日
IN	3051	CH20 04A	2006年2月17日				
CN	1639349	A	2005年7月13日	ZA	200500949	B	2006年12月27日
				AU	2002316575	A1	2004年1月23日
				CA	2491137	A1	2004年1月15日
				AT	530639	T	2011年11月15日
				WO	2004005527	A1	2004年1月15日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/076309

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)
				JP 2005531326 A	2005年10月20日
				HU 0500383 A2	2005年8月29日
				DK 1520030 T3	2012年2月27日
				EP 1520030 A1	2005年4月6日
				EP 1520030 A4	2010年3月17日
				EP 1520030 B1	2011年10月26日
				MXPA 04012807 A	2005年2月24日
				US 2006099692 A1	2006年5月11日
<hr/>					
CN	115595328	A	2023年1月13日	无	
<hr/>					
CN	115595314	A	2023年1月13日	无	
<hr/>					