

# (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 5 月 7 日 (07.05.2020)



(10) 国际公布号  
**WO 2020/087626 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
*C12N 9/04* (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)  
*C12N 15/53* (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2018/118368
- (22) 国际申请日: 2018 年 11 月 30 日 (30.11.2018)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201811277370.4 2018年10月30日 (30.10.2018) CN
- (71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 倪晔(NI, Ye); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。朱诚(ZHU, Cheng); 中国江苏省无锡市蠡湖大道

1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。许国超(XU, Guochao); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。周婕妤(ZHOU, Jieyu); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街 99 号 18 栋 E501 张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

(54) Title: ALCOHOL DEHYDROGENASE MUTANT AND APPLICATION THEREOF IN COENZYME REGENERATION

(54) 发明名称: 一种醇脱氢酶突变体及其在辅酶再生中的应用

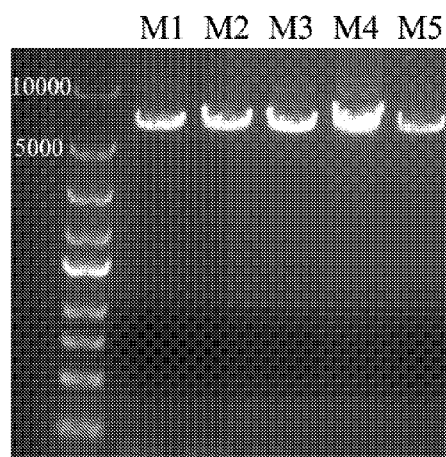


图 1

(57) Abstract: Provided is an alcohol dehydrogenase mutant and application thereof in coenzyme regeneration, belonging to the technical fields of enzyme engineering and biological engineering. The alcohol dehydrogenase mutant is obtained by means of mutating the starting amino-acid sequence of 84 valine and/or 127 tyrosine of the alcohol dehydrogenase shown in SEQ ID No. 1; the alcohol dehydrogenase mutant has high activity on various alcohol co-substrates, and can catalyze such alcohol co-substrates to regenerate the coenzyme NADPH; in comparison with the wild-type alcohol dehydrogenase KpADH, the activity and catalytic efficiency of the present invention are higher; the  $k_{cat}$  value for the co-substrate 1,4-butanediol may be up to  $75.9 \text{ min}^{-1}$ , the value of  $k_{cat}/K_m$  may be up to  $2009 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ , and the  $K_m$  value may be as low as  $11.3 \text{ mM}$ ; the alcohol dehydrogenase mutant has higher value for industrial applications.

MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,  
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,  
SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG,  
US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区  
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,  
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,  
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,  
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,  
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,  
RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI,  
CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

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

(57) 摘要: 一种醇脱氢酶突变体及其在辅酶再生中的应用, 属于酶工程以及生物工程技术领域。醇脱氢酶突变体是通过将出发氨基酸序列如SEQ ID No.1所示的醇脱氢酶的第84位缬氨酸和/或第127位酪氨酸进行突变得到的; 此醇脱氢酶突变体对多种醇类辅底物均具有较高的活力, 可以催化这些醇类辅底物进行辅酶NADPH再生; 且与野生型醇脱氢酶KpADH相比, 其活性、催化效率更高, 对辅底物1,4-丁二醇的 $k_{cat}$ 值最高可达 $75.9\text{min}^{-1}$ ,  $k_{cat}/K_m$ 值可达 $2009\text{min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ,  $K_m$ 值最低可为11.3mM, 此醇脱氢酶突变体具有更高的工业应用价值。

## 一种醇脱氢酶突变体及其在辅酶再生中的应用

### 技术领域

本发明提供了一种醇脱氢酶突变体及其在辅酶再生中的应用，属于酶工程以及生物工程技术领域。

### 背景技术

依赖辅酶 NAD(P)H 的生物不对称还原反应具有选择性高、条件温和、环境友好等众多优点，是最具应用开发潜力的手性化合物制备方法。但是，其所使用的辅酶 NAD(P)H 价格十分昂贵，为了生物不对称还原反应的可持续性和高效性，也为了降低生物不对称还原反应的成本，需要进行辅酶再生。

现在，已经有的辅酶再生方法有酶法再生、电化学法再生和光化学法再生等，其中，酶法再生因为反应速度快、选择性高、再生体系与合成体系兼容性好及过程容易控制等优点，具有较大的工业应用潜力。

而酶法辅酶再生中，异丙醇和乙醇具有良好的氧化还原潜力 ( $\Delta G' -7.4 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ) 且价格低廉，因此，利用醇脱氢酶 (ADH) 催化氧化异丙醇和乙醇进行辅酶再生的方法具有价格低廉、原子利用率高等优点。

但是，此方法中，乙醇被醇脱氢酶催化氧化生成的辅产物乙醛具有毒性，进一步催化氧化生成的醋酸会降低反应体系的 pH 值，不利于反应的进行；异丙醇被醇脱氢酶催化氧化生成的辅产物丙酮则不稳定且具有毒性，且由于异丙醇被醇脱氢酶催化氧化生成丙酮的过程是可逆反应，使得利用醇脱氢酶 (ADH) 催化氧化异丙醇进行辅酶再生的过程通常需要加入过量的异丙醇才能维持整个反应过程朝向目标产物合成的方向进行。因此，急需找到一种新的辅酶再生方法以克服上述技术的缺陷。

目前，已经有部分针对新型辅酶再生方法的研究取得了一定的进展。例如，2008 年，Lavandera I 和 Kroutil W 等利用以 *Sphingobium yanoikuyae* 来源的醇脱氢酶 SyADH 催化带有吸电子基团（如氯、氟、甲氧基等）丙酮的仲醇氧化进行辅酶再生。由于这类辅底物带有吸电子基团，可与辅产物中的羟基形成氢键作用而将辅产物稳定 ( $\Delta G' -11.1 \text{ kcal/mol}$ )，使得反应趋于不可逆，称为准不可逆反应 (Quasi-irreversible reaction)，因此，利用该体系，在仅 1.5 倍底物当量 1-氯丙酮协助下，反应 24 h 可将 30 g/L 2-辛醇完全氧化 (Lavandera I., et al., *Org Lett.*, 2018, 10, 2155-2158)。

Hollmann 等人则发现：1,4-丁二醇可作为智能辅底物，在醇脱氢酶的作用下催化氧化过程中先被还原生成 4-羟基丁醛，再自发转化为 2-羟基四氢呋喃，最后进一步不可逆地被还原生成最终辅产物  $\gamma$ -丁内酯 (GBL)，整个过程的  $\Delta G'$  为  $-8.2 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ ，并释放出两分子的辅酶 NADH，因此，1,4-丁二醇可以作为一种智能辅底物 (smart cosubstrate) 用于辅酶再生，且后期在针对此过程的进一步研究中还发现，此过程产生的辅产物  $\gamma$ -丁内酯具有动力学和热力学稳定的特点，能够改变 Meerwein-Ponndorf-Verley 反应的化学平衡从而减少辅底物的过量添加 (Kara S., et al., *Green Chem.* 2013, 15, 330-335)。

不过，上述研究依旧存在酶的催化效率低、底物对酶催化有明显的抑制作用等缺陷，因此，针对新的辅酶再生方法的研究仍需进一步展开。

### 发明内容

为解决上述问题，本发明提供了一种醇脱氢酶突变体及其在辅酶再生中的应用。此醇脱氢酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示的醇脱氢酶的第 84 位缬氨酸和/或第 127 位酪氨酸进行突变得到的；此醇脱氢酶突变体对多种醇类辅底物（如 1,4-丁二醇、1,5-戊二醇、1,6-己二醇）均具有较高的催化活力，可以催化这些醇类辅底物进行辅酶 NADPH 再生；与野生型醇脱氢酶 KpADH 相比，此醇脱氢酶突变体的活性、催化效率更高，其对辅底物 1,4-丁二醇的  $k_{\text{cat}}$  值最高可达  $75.9 \text{ min}^{-1}$ ，是野生型 KpADH 的 7.3 倍， $k_{\text{cat}}/K_m$  值可达  $2009 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ，是野生型 KpADH 的 14.7 倍， $K_m$  值最低可为 11.3 mM，较野生型醇脱氢酶 KpADH

有了显著的降低,因此,此醇脱氢酶突变体具有更高的工业应用价值。

本发明的技术方案如下:

本发明提供了一种醇脱氢酶的突变体,所述突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示的醇脱氢酶的第 84 位缬氨酸和/或第 127 位酪氨酸进行突变得到的。

在本发明的一种实施方式中,所述突变体为 M1、M2、M3、M4 或 M5;

所述 M1 是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示醇脱氢酶的第 84 位缬氨酸突变为异亮氨酸得到的;

所述 M2 是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示醇脱氢酶的第 127 位酪氨酸突变为半胱氨酸得到的;

所述 M3 是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示醇脱氢酶的第 127 位酪氨酸突变为甲硫氨酸得到的;

所述 M4 是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示醇脱氢酶的第 84 位缬氨酸突变为异亮氨酸以及第 127 位酪氨酸突变为半胱氨酸得到的;

所述 M5 是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示醇脱氢酶的第 84 位缬氨酸突变为异亮氨酸以及第 127 位酪氨酸突变为甲硫氨酸得到的。

在本发明的一种实施方式中,所述突变体的氨基酸序列为 SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4、SEQ ID No.5 或 SEQ ID No.6。

本发明提供了编码上述突变体的基因。

本发明提供了携带上述基因的重组质粒。

在本发明的一种实施方式中,所述重组质粒载体为 pET 载体。

在本发明的一种实施方式中,所述重组质粒载体为 pET28a (+)。

本发明提供了携带上述基因或上述重组质粒的宿主细胞。

在本发明的一种实施方式中,所述宿主细胞为大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

在本发明的一种实施方式中,所述宿主细胞为大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3)。

本发明提供了上述突变体或上述基因或上述重组质粒或上述宿主细胞在辅酶再生方面的应用。

本发明提供了一种生产醇脱氢酶突变体的方法,所述方法为先将上述宿主细胞接种至 LB 培养基中,于 30~40 °C、100~200 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养至培养液中吸光度 OD<sub>600</sub> 达到 0.5~1.0,然后在培养液中加入异丙基-β-D-六代呋喃半乳糖苷 (IPTG) 于 16~30 °C 下进行诱导 5~10 h,得到醇脱氢酶突变体。

在本发明的一种实施方式中,所述 LB 培养基为含有 0-100 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 培养基。

在本发明的一种实施方式中,所述异丙基-β-D-六代呋喃半乳糖苷 (IPTG) 在培养液中的添加量为 0.05~1.0 mmol/L。

本发明提供了一种生产 D-苯丙氨酸钠的方法,所述方法为以苯丙酮酸钠和氨基酸脱氢酶 DAADH<sub>D94A</sub> 和 NADP<sup>+</sup>以及 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 或 NH<sub>4</sub>Cl 或 CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 中的一种作为反应体系,以上述醇脱氢酶突变体以及 1,4-丁二醇或 1,5-戊二醇或 1,6-己二醇或异丙醇或 2,3-丁二醇中的一种作为辅酶循环系统,以缓冲液作为缓冲体系,于 30~35 °C、pH 7~9 的条件下不对称还原反应 1~24 h,得到 D-苯丙氨酸钠。

在本发明的一种实施方式中,所述苯丙酮酸钠在反应体系中的添加量为 10-200 mmol/L。

在本发明的一种实施方式中,所述氨基酸脱氢酶 DAADH<sub>D94A</sub> 在反应体系中的添加量为 0.5~5 kU/L。

在本发明的一种实施方式中,所述 NADP<sup>+</sup>在反应体系中的添加量为 0.1~1.0 mmol/L。

在本发明的一种实施方式中,所述 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 在反应体系中的添加量为 20~200 mmol/L。

在本发明的一种实施方式中,所述 1,4-丁二醇在反应体系中的添加量为 5~100 mmol/L。

在本发明的一种实施方式中,所述醇脱氢酶突变体在反应体系中的添加量为 0.3~3 kU/L。

在本发明的一种实施方式中,所述缓冲液为磷酸盐缓冲液、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液或 Tris-HCl 缓冲液。

在本发明的一种实施方式中,所述缓冲液为磷酸盐缓冲液。

在本发明的一种实施方式中,所述磷酸盐缓冲液的浓度为 10~200 mmol/L。

有益效果:

(1) 本发明的醇脱氢酶突变体对多种醇类辅底物(如 1,4-丁二醇、1,5-戊二醇、1,6-己二醇)均具有较高的活力,可以催化这些醇类辅底物进行辅酶 NADPH 再生;

(2) 与野生型醇脱氢酶 *KpADH* 相比,本发明的醇脱氢酶突变体的活性、催化效率更高,其对辅底物 1,4-丁二醇的  $k_{cat}$  值最高可达  $75.9 \text{ min}^{-1}$ ,是野生型 *KpADH* 的 7.3 倍,  $k_{cat}/K_m$  值可达  $2009 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ ,是野生型 *KpADH* 的 14.7 倍,  $K_m$  值最低可为 11.3 mM,较野生型醇脱氢酶 *KpADH* 有了显著的降低,因此,本发明的醇脱氢酶突变体具有更高的潜在工业应用价值;

(3) 利用本发明的醇脱氢酶突变体偶联氨基酸脱氢酶 *DAADH*<sub>D94A</sub> 催化苯丙酮酸钠生成 D-苯丙氨酸钠,产物生成率 >99%, *ee* 值 >99.9%,因此,本发明的醇脱氢酶突变体具有高效的辅酶再生能力,且能够在氨基酸脱氢酶反应中得到应用,具有很高的工业推广价值。

### 附图说明

图 1: 野生型和醇脱氢酶突变体 M1~M5 的全质粒 PCR 核酸电泳图;

图 2: 醇脱氢酶突变体 M1~M3 梯度洗脱蛋白电泳图;

图 3: 醇脱氢酶突变体 M4~M5 梯度洗脱蛋白电泳图;

图 4: 酶偶联型辅因子再生体系反应示意图;

图 5: 酶偶联型辅因子再生反应催化苯丙酮酸钠生成 D-苯丙氨酸产物手性色谱图;

图 6: 酶偶联型辅因子再生反应中  $\gamma$ -丁内酯辅产物气相色谱图。

### 具体实施方式

下面结合具体实施例,对本发明进行进一步的阐述,下述实施例中所涉及的引物、载体以及宿主细胞均只用于对本发明进行解释说明,不对本发明有任何限定作用。

**下述实施例中涉及的检测方法如下:**

**醇脱氢酶酶活检测方法:**

总反应体系为 200  $\mu\text{L}$ ,包括: 1.0 mM  $\text{NADP}^+$ 、200 mM 底物 1,4-丁二醇、甘氨酸氢氧化钠缓冲液 (Gly-NaOH、100 mM、pH 9.5),充分混匀,30  $^{\circ}\text{C}$  保温 2 min,加入适量的酶液,检测 340 nm 下光吸收值的变化。

用下式计算得到酶活力:

$$\text{酶活力(U)} = \text{EW} \times V \times 10^3 / (6220 \times l)$$

式中,EW 为 1 分钟内 340 nm 处吸光度的变化;V 为反应液的体积,单位为 mL;6220 为  $\text{NAD(P)H}$  的摩尔消光系数,单位为  $\text{L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ ;  $l$  为光程距离,单位为 cm。

1 个活力单位(U)对应于上述条件下每分钟催化氧化 1  $\mu\text{mol}$   $\text{NADP}^+$  所需的酶量。

**$k_{cat}$  值、 $K_m$  值、 $k_{cat}/K_m$  值的检测方法:**

动力学测定按照酶活测定的方法,10  $\mu\text{L}$  不同浓度的醇类底物,1 mM  $\text{NADP}^+$ ,10  $\mu\text{L}$  适当浓度酶,170  $\mu\text{L}$  pH 9.5 的甘氨酸-氢氧化钠缓冲液,每个样品做三个平行,测定在 30 $^{\circ}\text{C}$  下  $\text{OD}_{340}$  的变化,计算不同浓度下的比活力,进一步计算得米氏常数 ( $K_m$ ) 和最大反应速率 ( $V_{\max}$ ) 及催化速率 ( $k_{cat}$ ),计算公式如下所示:

$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\max}} \times \frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{\max}}$$

由双倒数曲线与 X 轴和 Y 轴的截距可以计算出  $V_{\max}$  和  $K_m$  值;

$$k_{\text{cat}} = \frac{V_{\text{max}}}{[E]}$$

根据公式进一步可以计算得到  $k_{\text{cat}}$  值。

#### 产物 D-苯丙氨酸钠的生成率检测方法：

反应处理后的样品过膜后待检测，液相检测使用 Astec CHIROBIOTIC™ T 手型柱 (150 mm × 4.6 mm × 5 μm, Sigma Technologies Co. Ltd)，流动相为甲醇：超纯水=70：30，流速为 0.5 mL·min<sup>-1</sup>，柱温箱设定为 30℃，紫外吸收波长为 210 nm，产物 D-苯丙氨酸钠的保留时间为 8.49 min，液相图谱如图 5 所示。

#### 产物 D-苯丙氨酸钠的光学纯度检测方法：

光学纯度  $ee$  的测定方法：

$$ee = \frac{A_S - A_R}{A_S + A_R} \times 100\%$$

式中， $A_S$  为液相色谱获得的 D-苯丙氨酸钠的摩尔浓度； $A_R$  为液相色谱获得的 L-苯丙氨酸钠的摩尔浓度。

#### 辅产物 $\gamma$ -丁内酯的生成率检测方法：

辅产物  $\gamma$ -丁内酯由气相检测，使用气相柱为 CP-Chirasil-Dex CB (25 m × 0.25 mm × 0.25 μm, Agilent Technologies Co. Ltd)，柱温于 70℃ 保持 5 min，然后以 20℃/min 的速率升温至 200℃ 并保持 5 min，汽化室和检测器的温度都设定温 250℃， $\gamma$ -丁内酯的保留时间为 7.92 min，气相图谱如图 6 所示。

#### 实施例 1：含有编码醇脱氢酶突变体 M1~M5 基因的重载载体及重组菌的构建

具体步骤如下：

以实验室保藏的 pET28a-*KpADH* 重组质粒为模板（记载于公开号为 CN105936909A 的专利申请中），采用全质粒 PCR 方法对氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示的醇脱氢酶的第 84 位、127 位氨基酸残基进行定点饱和突变得得到含有 M1、M2、M3 的重组载体，然后进一步以 M1 重组质粒为模板，采用全质粒 PCR 方法对 M1 的第 127 位进行定点饱和突变得得到含有 M4、M5 的重组载体；

涉及的引物如下（均按 5'-3' 方向描述，下划线代表突变位点）：

M1：

氨基酸序列如 SEQ ID No.7 所示的 V84-F：GCTTCACCAAnnkAACTTCGGC

氨基酸序列如 SEQ ID No.8 所示的 V84-R：GCCGAAGTTmnnTGGTGAAGC

M2、M3：

氨基酸序列如 SEQ ID No.9 所示的 Y127-F：ACTGCTTCTTnnkGCTTCAATT

氨基酸序列如 SEQ ID No.10 所示的 Y127-R：AATTGAAGCmnnAGAAGCAGT

M4：

氨基酸序列如 SEQ ID No.11 所示的 V84I/Y127C-F：ACTGCTTCTtgtGCTTCAATT

氨基酸序列如 SEQ ID No.12 所示的 V84I/Y127C-R：AATTGAAGCacaAGAAGCAGT

M5：

氨基酸序列如 SEQ ID No.13 所示的 V84I/Y127M-F：ACTGCTTCTTatgGCTTCAATT

氨基酸序列如 SEQ ID No.14 所示的 V84I/Y127M-R：AATTGAAGCcatAGAAGCAGT

其中，PCR 反应体系（50 μL）为：KOD 酶（2.5 U/mL）1.0 μL、模板（5-50 ng）1.0 μL、dNTP 4.0 μL、10×reaction buffer 5.0 μL、上下游引物各 1.0 μL，ddH<sub>2</sub>O 补足至 50 μL；

PCR 扩增程序为：（1）94℃变性 3 min，（2）94℃变性 30 sec，（3）54℃退火 30 sec，（4）72℃延伸 150 sec，重复步骤（2）~（4）进行 10-15 个循环，最后 72℃延伸 10 min，4℃

保存 PCR 扩增产物。

PCR 结束后, 添加 *DpnI* 限制性内切酶于反应混合物中并置于 37°C 孵育 1 h, 用  $\text{CaCl}_2$  热转化法将 10  $\mu\text{L}$  消化后 PCR 反应液转入 50  $\mu\text{L}$  *E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞, 并均匀涂布于含有 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  硫酸卡那霉素的 LB 琼脂平板, 37°C 倒置培养 12 h, 得到含有重组载体的重组菌。

### 实施例 2: 含有重组载体的重组菌的筛选

具体步骤如下:

根据实施例 1 得到引入了醇脱氢酶突变体 M1~M3 的重组菌, 并将重组菌平板倒置培养, 得到菌落;

在 96 深孔板内每孔加入 300  $\mu\text{L}$  含卡那霉素 (Kan) 的 LB 液体培养基, 再把实施例 1 中平板上的单菌落用牙签逐一挑出到深孔板, 预留两个孔放母本作为对照, 留两个孔不接种做空白对照, 放置到摇床 37°C, 120  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  过夜培养;

第 2 天将培养得到的重组菌转接到另一块加了 600  $\mu\text{L}$  已加 kan 的液体培养基的 96 深孔板内, 原板每孔加入 70  $\mu\text{L}$  浓度为 30% 的甘油, -80°C 保菌, 转接后的深孔板放入摇床, 37°C, 120  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  震荡培养 2 h 后加入诱导剂 IPTG (终浓度为 0.2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ), 温度设为 30°C 震荡培养 5 h, 然后 4°C, 4000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min, 倒掉上清液, -80°C 冷冻 1 h 以上, 然后每孔加入 200  $\mu\text{L}$  破碎缓冲液 (pH 7.5, 10  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl、750  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的溶菌酶、10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 DNase) 摇床 37°C, 120  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  震荡 1 h。

离心取上清测定重组菌表达得到的醇脱氢酶突变体对 1,4-丁二醇的比活力, 挑选出比活力提高的醇脱氢酶突变体, 并对得到其进行测序验证, 得到成功过表达了醇脱氢酶突变体 M1~M3 的含有重组载体的重组菌 (M1~M3 的全质粒 PCR 核酸电泳结果如图 1)。

M4、M5 可通过直接以含有 M1 的重组质粒为模板, 采用全质粒 PCR 方法对 M1 的第 127 位进行定点突变得得到 (M4、M5 的全质粒 PCR 核酸电泳结果如图 1)。

### 实施例 3: 醇脱氢酶突变体 M1~M5 的表达及纯化

#### 1、表达

具体步骤如下:

将实施例 1 得到的含有重组载体的重组菌按 2% 的转接量接种至含有硫酸卡那霉素 (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 的 LB 培养基中, 37°C, 200  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  摇床培养, 培养液的吸光度  $\text{OD}_{600}$  达到 0.8 时, 加入 0.2 mM 的异丙基- $\beta$ -D-六代呋喃半乳糖苷 (IPTG) 进行诱导, 诱导温度为 25°C, 诱导 8 h 后, 8000  $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 10 min 获得了分别表达醇脱氢酶突变体 M1~M5 的重组菌菌体, 将收集的菌体悬浮于磷酸钾缓冲液 (100 mM, pH 7.0) 中, 超声破碎, 得到醇脱氢酶突变体 M1~M5。

#### 2、纯化

纯化所使用的柱子为镍亲和柱 HisTrap FF crude, 利用重组蛋白上的组氨酸标签进行亲和层析来完成, 具体步骤如下:

首先使用 A 液将镍柱平衡, 粗酶液上样, 继续使用 A 液将穿透峰洗脱下来, 待平衡后用 B 液 (20 mM 磷酸钠、500 mM NaCl、500 mM 咪唑, pH 7.4) 进行梯度洗脱, 将结合到镍柱上的重组蛋白洗脱下来, 获得纯化后的醇脱氢酶突变体 M1~M5, 纯化后使用 10 kDa 的超滤管将醇脱氢酶蛋白浓缩并置换到 PBS (100 mM, pH 7.0) 缓冲液中, 备用。

对纯化后的醇脱氢酶突变体 M1~M5 进行活力测定以及 SDS-PAGE 分析。

检测结果为: 如图 2 和图 3 所示, 经 SDS-PAGE 分析, 镍柱纯化后, 醇脱氢酶突变体 M1~M5 在 40 kDa 左右显示单条带, 且杂蛋白较少, 说明柱纯化效果较好。

### 实施例 4: 醇脱氢酶突变体 M1~M5 对智能辅底物 1,4-丁二醇的动力学分析

测定 *KpADH* 在不同底物浓度和辅酶浓度情况下的活力, 并根据活力和底物浓度的倒数做出双倒数曲线, 计算动力学参数, 检测结果如表 1。

由表 1 可知, 突变体 M1 对于 1,4-丁二醇的氧化起着重要的作用, 其  $k_{\text{cat}}$  值为 75.9  $\text{min}^{-1}$ , 是野生型 *KpADH* 的 7.3 倍,  $k_{\text{cat}}/K_m$  值为 620  $\text{min}^{-1}\cdot\text{M}^{-1}$ , 是野生型 *KpADH* 的 4.53 倍; M2 和

M3 对 1,4-丁二醇的  $K_m$  值分别为 38.1 mM 和 12.1 mM, 催化速率  $k_{cat}$  分别为 27.8 mM 和 16.8 mM, 可以看出由于 Y127 位点显著地降低了  $K_m$  值, 其对底物 1,4-丁二醇的结合起着积极的作用; 突变体 M5 有最高的  $k_{cat}/K_m$  值为  $2009 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ , 是 WT 的 14.7 倍。

表 1 醇脱氢酶突变体对 1,4-丁二醇的动力学参数

| Variant      | HO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH |                            |                                                    |
|--------------|---------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------|
|              | $K_M[\text{mM}]$                                                          | $k_{cat}[\text{min}^{-1}]$ | $k_{cat}/K_M[\text{min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}]$ |
| <i>KpADH</i> | 75.6±0.4                                                                  | 10.4±0.4                   | 137                                                |
| M1           | 122±2.1                                                                   | 75.9±1.3                   | 620                                                |
| M2           | 38.1±1.9                                                                  | 27.8±0.5                   | 729                                                |
| M3           | 12.1±0.9                                                                  | 16.8±1.1                   | 1390                                               |
| M4           | 30.4±1.3                                                                  | 39.1±0.4                   | 1286                                               |
| M5           | 11.3±0.8                                                                  | 22.7±1.1                   | 2009                                               |

#### 实施例 5: 醇脱氢酶突变体 M1~M5 对智能辅底物 1,5-戊二醇和 1,6-己二醇的动力学分析

测定 *KpADH* 在不同底物浓度和辅酶浓度情况下的活力, 并根据活力和底物浓度的倒数做出双倒数曲线, 计算动力学参数, 检测结果如表 2。

由表 2 可知, 这两种碳链更长的二醇底物拥有比 1,4-丁二醇更优秀的催化效率, 其中, 突变体 M1 对 1,5-戊二醇和 1,6-己二醇的  $K_m$  值分别为 42.5 mM 和 12.3 mM,  $k_{cat}$  值分别为  $51.1 \text{ min}^{-1}$  和  $64.7 \text{ min}^{-1}$ , 表明了 M1 与这两个二醇底物的结合能力和催化速率方面都有所提高;

突变体 M3 对 1,5-戊二醇的  $K_m$  值相比于野生型 *KpADH* 从 74.4 mM 降低到 14.3 mM, 对 1,6-己二醇的  $K_m$  值相比于野生型 *KpADH* 从 18.5 mM 降低到 6.48 mM, 这主要是由于底物亲和力和力方面的改善;

M3 对 1,5-戊二醇和 1,6-己二醇的催化效率  $k_{cat}/K_m$  分别是野生型 *KpADH* 的 4.36 和 2.69 倍;

双突变 M5 对 1,5-戊二醇和 1,6-己二醇的  $K_m$  值为 8.21 mM 和 6.52 mM, 远低于相比于野生型 *KpADH* 的  $K_m$  值(74.4 mM 和 18.5 mM), 催化效率  $k_{cat}/K_m$  分别是  $2353 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$  和  $12032 \text{ min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}$ , 是野生型 *KpADH* 的 3.14 和 5.3 倍, 可以看出, 双突变体 M5 是一种催化氧化二醇底物再生 NADPH 很有前景的突变体。

表 2 醇脱氢酶突变体对 1,5-戊二醇和 1,6-己二醇的动力学参数

| Variant      | HO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH |                            |                                                    | HO-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -OH |                            |                                                    |
|--------------|--------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|----------------------------------------------------|
|              | $K_M[\text{mM}]$                                                                           | $k_{cat}[\text{min}^{-1}]$ | $k_{cat}/K_M[\text{min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}]$ | $K_M[\text{mM}]$                                                                                            | $k_{cat}[\text{min}^{-1}]$ | $k_{cat}/K_M[\text{min}^{-1} \cdot \text{M}^{-1}]$ |
| <i>KpADH</i> | 74.4±2.2                                                                                   | 55.7±1.0                   | 749                                                | 18.5±1.5                                                                                                    | 41.9±0.9                   | 2269                                               |
| M1           | 42.5±1.5                                                                                   | 51.1±0.8                   | 1202                                               | 12.3±0.7                                                                                                    | 64.7±1.7                   | 5252                                               |
| M2           | 63.5±0.1                                                                                   | 25.1±0.9                   | 396                                                | 31.8±1.7                                                                                                    | 36.2±2.2                   | 1138                                               |
| M3           | 14.3±0.9                                                                                   | 46.6±1.7                   | 3269                                               | 6.48±0.45                                                                                                   | 39.5±1.9                   | 6093                                               |
| M4           | 16.3±0.8                                                                                   | 24.8±1.1                   | 1521                                               | 12.9±1.3                                                                                                    | 98.3±2.5                   | 7630                                               |
| M5           | 8.21±0.22                                                                                  | 19.3±0.9                   | 2353                                               | 6.52±1.0                                                                                                    | 75.2±2.1                   | 12032                                              |

#### 实施例 6: 醇脱氢酶突变体 M1、M2、M5 偶联氨基酸脱氢酶 DAADH<sub>D94A</sub> 催化苯丙酮酸钠生成 D-苯丙氨酸钠

来源于 *Ureibacillus thermosphaericus* 的氨基酸脱氢酶 DAADH<sub>D94A</sub> 能够催化底物苯丙酮酸钠生成产物 D-苯丙氨酸钠, D-苯丙氨酸是治疗 II 型糖尿病药物那格列奈的重要手型成分, 但

是催化反应中需要昂贵的辅酶 NADPH 的加入。

下面使用实施例 3 得到的醇脱氢酶突变体 M1、M2、M5 再生 NADPH 构建酶偶联型辅因子再生反应生成 D-苯丙氨酸钠，具体步骤如下：

建立底物苯丙酮酸钠 50mM 的生物催化体系：醇脱氢酶突变体 M1、M2、M5 或野生 *KpADH* 纯酶（蛋白浓度 1.5 kU/L）或葡萄糖脱氢酶 GDH（1.5 kU/L）、DAADH<sub>D94A</sub>（5 kU/L）、底物苯丙酮酸钠（50 mM）、辅底物 1,4-丁二醇（50 mM）、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>（100 mM）；

将生物催化体系在 30℃ 和 180 r·min<sup>-1</sup> 条件下反应，按时间进程取样测定反应中 D-苯丙氨酸钠的生成率，检测结果如表 3。

由表 3 可知，反应 4 h 时野生型 *KpADH* 产物生成率仅有 46.4%，突变体 M1，M2 再生 NADPH 反应中 D-苯丙氨酸钠生成率分别提高到 88.0% 和 89.0%，突变体 M5 于 4 h 得到 D-苯丙氨酸钠生成率 99.9%，*e.e.* 值>99.9%。

表 3 酶偶联型辅因子再生反应制备 D-苯丙氨酸钠

| 反应时间 (h) | 转化率 (%) |      |      |      |      |
|----------|---------|------|------|------|------|
|          | WT      | GDH  | M1   | M2   | M5   |
| 0.5      | 5.1     | 67.0 | 36.4 | 43.5 | 88.3 |
| 1        | 11.5    | 72.1 | 71.6 | 77.6 | 96.1 |
| 1.5      | 17.9    | 72.4 | 80.8 | 78.4 | 97.9 |
| 2        | 24.8    | 74.3 | 85.4 | 82.4 | 98.2 |
| 3        | 39.3    | 74.4 | 87.0 | 88.3 | 99.7 |
| 4        | 46.4    | 74.4 | 88.0 | 89.0 | 99.9 |

#### 实施例 7：醇脱氢酶突变体 M5 偶联氨基酸脱氢酶 DAADH<sub>D94A</sub> 催化苯丙酮酸钠生成 D-苯丙氨酸钠

使用实施例 6 测得的最优醇脱氢酶突变体 M5 再生 NADPH 构建酶偶联型辅因子再生体系，并将辅底物 1,4-丁二醇的添加量减少到 0.5 倍当量，具体步骤如下（再生体系反应如图 4）：

建立底物苯丙酮酸钠 100 mM 的生物催化体系 A：醇脱氢酶突变体 M5（1.5 kU/L）、DAADH<sub>D94A</sub>（5 kU/L）、底物苯丙酮酸钠（100 mM）、辅底物 1,4-丁二醇（50 mM）、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>（200 mM）；

建立底物苯丙酮酸钠 200 mM 的生物催化体系 B：醇脱氢酶突变体 M5（蛋白浓度 10 mg/mL）、DAADH<sub>D94A</sub>（5 kU/L）、底物苯丙酮酸钠（200 mM）、辅底物 1,4-丁二醇（100 mM）、(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>（200 mM）；

将生物催化体系 A、B 均在 30℃ 和 180 r·min<sup>-1</sup> 条件下反应，按时间进程取样测定反应中 D-苯丙氨酸钠和辅产物  $\gamma$ -丁内酯的生成率，检测结果如表 4。

由表 4 可知，100 mM 底物反应中，D-苯丙氨酸钠的生成率于 2 h 达到了 99.8%，在 1 h 时  $\gamma$ -丁内酯生成率达到 90.6%；底物苯丙酮酸钠的添加量进一步提高到 200 mM，辅底物 1,4-丁二醇的添加量也为 100 mM，产物 D-苯丙氨酸钠产物生成率于 6 h 达到 99.2%，辅产物  $\gamma$ -丁内酯生成率达到 90.3%（D-苯丙氨酸钠产物手性色谱见图 5， $\gamma$ -丁内酯辅产物气相色谱见图 6）。

表 4 使用 M5 再生 NADPH 偶联反应中 D-苯丙氨酸的测定

| 反应时间(h) | D-苯丙氨酸生成率(%) |        |
|---------|--------------|--------|
|         | 100 mM       | 200 mM |
| 0       | 0            | 0      |
| 0.5     | 67.6         | 26.1   |
| 1       | 98.5         | 41.1   |
| 1.5     | 98.8         | 60.6   |
| 2       | 99.8         | 77.6   |
| 3       | 99.9         | 95.0   |
| 4       | 99.9         | 98.5   |
| 6       | 99.9         | 99.2   |

表 5 使用 M5 再生 NADPH 偶联反应中 $\gamma$ -丁内酯的测定

| 反应时间(h) | $\gamma$ -丁内酯生成率(%) |        |
|---------|---------------------|--------|
|         | 100 mM              | 200 mM |
| 0       | 0                   | 0      |
| 0.5     | 62.6                | 26.8   |
| 1       | 90.6                | 45.6   |
| 1.5     | 88.7                | 65.9   |
| 2       | 85.9                | 80.0   |
| 3       | 84.9                | 85.6   |
| 4       | 85.7                | 87.1   |
| 6       | 84.6                | 90.3   |

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

## 序列表

<110> 一种醇脱氢酶突变体及其在辅酶再生中的应用

<120> 江南大学

<160> 14

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 342

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 1

```

Met Ser Val Leu Ile Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ile Ala Lys His Ile
1           5           10           15
Val Arg Val Leu Leu Glu Gln Asn Tyr Lys Val Ile Gly Thr Val Arg
           20           25           30
Ser Gln Asp Lys Ala Asp Lys Leu Leu Lys Gln Tyr Asn Asn Pro Asn
           35           40           45
Leu Ser Tyr Glu Ile Val Pro Glu Ile Ala Asn Leu Asp Ala Phe Asp
           50           55           60
Asp Ile Phe Lys Lys His Gly Lys Glu Ile Lys Tyr Val Ile His Ala
65           70           75           80
Ala Ser Pro Val Asn Phe Gly Ala Lys Asp Leu Glu Lys Asp Leu Val
           85           90           95
Ile Pro Ala Ile Asn Gly Thr Lys Asn Met Phe Glu Ala Ile Lys Lys
           100          105          110
Tyr Ala Pro Asp Thr Val Glu Arg Val Val Met Thr Ala Ser Tyr Ala
           115          120          125
Ser Ile Met Thr Pro His Arg Gln Asn Asp Pro Thr Leu Thr Leu Asp
           130          135          140
Glu Glu Thr Trp Asn Pro Val Thr Glu Glu Asn Ala Tyr Glu Asn Val
145          150          155          160
Phe Thr Ala Tyr Cys Ala Ser Lys Thr Phe Ala Glu Lys Glu Ala Trp
           165          170          175
Lys Phe Val Lys Glu Asn Ser Asp Ala Val Lys Phe Lys Leu Thr Thr
           180          185          190
Ile His Pro Ser Phe Val Phe Gly Pro Gln Asn Phe Asp Glu Asp Val
           195          200          205
Thr Lys Lys Leu Asn Glu Thr Cys Glu Ile Ile Asn Gly Leu Leu His
           210          215          220
Ala Pro Phe Asp Thr Lys Val Glu Lys Thr His Phe Ser Gln Phe Ile
225          230          235          240

```

Asp Val Arg Asp Val Ala Lys Thr His Val Leu Gly Phe Gln Lys Asp  
 245 250 255  
 Glu Leu Ile Asn Gln Arg Leu Leu Leu Cys Asn Gly Ala Phe Ser Gln  
 260 265 270  
 Gln Asp Ile Val Asn Val Phe Asn Glu Asp Phe Pro Glu Leu Lys Gly  
 275 280 285  
 Gln Phe Pro Pro Glu Asp Lys Asp Thr Asp Leu Asn Lys Gly Val Thr  
 290 295 300  
 Gly Cys Lys Ile Asp Asn Glu Lys Thr Lys Lys Leu Leu Ala Phe Glu  
 305 310 315 320  
 Phe Thr Pro Phe His Lys Thr Ile His Asp Thr Val Tyr Gln Ile Leu  
 325 330 335  
 His Lys Glu Gly Arg Val  
 340

<210> 2  
 <211> 342  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成

<400> 2  
 Met Ser Val Leu Ile Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ile Ala Lys His Ile  
 1 5 10 15  
 Val Arg Val Leu Leu Glu Gln Asn Tyr Lys Val Ile Gly Thr Val Arg  
 20 25 30  
 Ser Gln Asp Lys Ala Asp Lys Leu Leu Lys Gln Tyr Asn Asn Pro Asn  
 35 40 45  
 Leu Ser Tyr Glu Ile Val Pro Glu Ile Ala Asn Leu Asp Ala Phe Asp  
 50 55 60  
 Asp Ile Phe Lys Lys His Gly Lys Glu Ile Lys Tyr Val Ile His Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Ser Pro Ile Asn Phe Gly Ala Lys Asp Leu Glu Lys Asp Leu Val  
 85 90 95  
 Ile Pro Ala Ile Asn Gly Thr Lys Asn Met Phe Glu Ala Ile Lys Lys  
 100 105 110  
 Tyr Ala Pro Asp Thr Val Glu Arg Val Val Met Thr Ala Ser Tyr Ala  
 115 120 125  
 Ser Ile Met Thr Pro His Arg Gln Asn Asp Pro Thr Leu Thr Leu Asp  
 130 135 140  
 Glu Glu Thr Trp Asn Pro Val Thr Glu Glu Asn Ala Tyr Glu Asn Val  
 145 150 155 160  
 Phe Thr Ala Tyr Cys Ala Ser Lys Thr Phe Ala Glu Lys Glu Ala Trp  
 165 170 175  
 Lys Phe Val Lys Glu Asn Ser Asp Ala Val Lys Phe Lys Leu Thr Thr  
 180 185 190

Ile His Pro Ser Phe Val Phe Gly Pro Gln Asn Phe Asp Glu Asp Val  
 195 200 205  
 Thr Lys Lys Leu Asn Glu Thr Cys Glu Ile Ile Asn Gly Leu Leu His  
 210 215 220  
 Ala Pro Phe Asp Thr Lys Val Glu Lys Thr His Phe Ser Gln Phe Ile  
 225 230 235 240  
 Asp Val Arg Asp Val Ala Lys Thr His Val Leu Gly Phe Gln Lys Asp  
 245 250 255  
 Glu Leu Ile Asn Gln Arg Leu Leu Leu Cys Asn Gly Ala Phe Ser Gln  
 260 265 270  
 Gln Asp Ile Val Asn Val Phe Asn Glu Asp Phe Pro Glu Leu Lys Gly  
 275 280 285  
 Gln Phe Pro Pro Glu Asp Lys Asp Thr Asp Leu Asn Lys Gly Val Thr  
 290 295 300  
 Gly Cys Lys Ile Asp Asn Glu Lys Thr Lys Lys Leu Leu Ala Phe Glu  
 305 310 315 320  
 Phe Thr Pro Phe His Lys Thr Ile His Asp Thr Val Tyr Gln Ile Leu  
 325 330 335  
 His Lys Glu Gly Arg Val  
 340

<210> 3  
 <211> 342  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成

<400> 3  
 Met Ser Val Leu Ile Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ile Ala Lys His Ile  
 1 5 10 15  
 Val Arg Val Leu Leu Glu Gln Asn Tyr Lys Val Ile Gly Thr Val Arg  
 20 25 30  
 Ser Gln Asp Lys Ala Asp Lys Leu Leu Lys Gln Tyr Asn Asn Pro Asn  
 35 40 45  
 Leu Ser Tyr Glu Ile Val Pro Glu Ile Ala Asn Leu Asp Ala Phe Asp  
 50 55 60  
 Asp Ile Phe Lys Lys His Gly Lys Glu Ile Lys Tyr Val Ile His Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Ser Pro Val Asn Phe Gly Ala Lys Asp Leu Glu Lys Asp Leu Val  
 85 90 95  
 Ile Pro Ala Ile Asn Gly Thr Lys Asn Met Phe Glu Ala Ile Lys Lys  
 100 105 110  
 Tyr Ala Pro Asp Thr Val Glu Arg Val Val Met Thr Ala Ser Cys Ala  
 115 120 125  
 Ser Ile Met Thr Pro His Arg Gln Asn Asp Pro Thr Leu Thr Leu Asp  
 130 135 140

Glu Glu Thr Trp Asn Pro Val Thr Glu Glu Asn Ala Tyr Glu Asn Val  
 145 150 155 160  
 Phe Thr Ala Tyr Cys Ala Ser Lys Thr Phe Ala Glu Lys Glu Ala Trp  
 165 170 175  
 Lys Phe Val Lys Glu Asn Ser Asp Ala Val Lys Phe Lys Leu Thr Thr  
 180 185 190  
 Ile His Pro Ser Phe Val Phe Gly Pro Gln Asn Phe Asp Glu Asp Val  
 195 200 205  
 Thr Lys Lys Leu Asn Glu Thr Cys Glu Ile Ile Asn Gly Leu Leu His  
 210 215 220  
 Ala Pro Phe Asp Thr Lys Val Glu Lys Thr His Phe Ser Gln Phe Ile  
 225 230 235 240  
 Asp Val Arg Asp Val Ala Lys Thr His Val Leu Gly Phe Gln Lys Asp  
 245 250 255  
 Glu Leu Ile Asn Gln Arg Leu Leu Leu Cys Asn Gly Ala Phe Ser Gln  
 260 265 270  
 Gln Asp Ile Val Asn Val Phe Asn Glu Asp Phe Pro Glu Leu Lys Gly  
 275 280 285  
 Gln Phe Pro Pro Glu Asp Lys Asp Thr Asp Leu Asn Lys Gly Val Thr  
 290 295 300  
 Gly Cys Lys Ile Asp Asn Glu Lys Thr Lys Lys Leu Leu Ala Phe Glu  
 305 310 315 320  
 Phe Thr Pro Phe His Lys Thr Ile His Asp Thr Val Tyr Gln Ile Leu  
 325 330 335  
 His Lys Glu Gly Arg Val  
 340

<210> 4  
 <211> 342  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成

<400> 4  
 Met Ser Val Leu Ile Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ile Ala Lys His Ile  
 1 5 10 15  
 Val Arg Val Leu Leu Glu Gln Asn Tyr Lys Val Ile Gly Thr Val Arg  
 20 25 30  
 Ser Gln Asp Lys Ala Asp Lys Leu Leu Lys Gln Tyr Asn Asn Pro Asn  
 35 40 45  
 Leu Ser Tyr Glu Ile Val Pro Glu Ile Ala Asn Leu Asp Ala Phe Asp  
 50 55 60  
 Asp Ile Phe Lys Lys His Gly Lys Glu Ile Lys Tyr Val Ile His Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Ser Pro Val Asn Phe Gly Ala Lys Asp Leu Glu Lys Asp Leu Val  
 85 90 95

Ile Pro Ala Ile Asn Gly Thr Lys Asn Met Phe Glu Ala Ile Lys Lys  
 100 105 110  
 Tyr Ala Pro Asp Thr Val Glu Arg Val Val Met Thr Ala Ser Met Ala  
 115 120 125  
 Ser Ile Met Thr Pro His Arg Gln Asn Asp Pro Thr Leu Thr Leu Asp  
 130 135 140  
 Glu Glu Thr Trp Asn Pro Val Thr Glu Glu Asn Ala Tyr Glu Asn Val  
 145 150 155 160  
 Phe Thr Ala Tyr Cys Ala Ser Lys Thr Phe Ala Glu Lys Glu Ala Trp  
 165 170 175  
 Lys Phe Val Lys Glu Asn Ser Asp Ala Val Lys Phe Lys Leu Thr Thr  
 180 185 190  
 Ile His Pro Ser Phe Val Phe Gly Pro Gln Asn Phe Asp Glu Asp Val  
 195 200 205  
 Thr Lys Lys Leu Asn Glu Thr Cys Glu Ile Ile Asn Gly Leu Leu His  
 210 215 220  
 Ala Pro Phe Asp Thr Lys Val Glu Lys Thr His Phe Ser Gln Phe Ile  
 225 230 235 240  
 Asp Val Arg Asp Val Ala Lys Thr His Val Leu Gly Phe Gln Lys Asp  
 245 250 255  
 Glu Leu Ile Asn Gln Arg Leu Leu Leu Cys Asn Gly Ala Phe Ser Gln  
 260 265 270  
 Gln Asp Ile Val Asn Val Phe Asn Glu Asp Phe Pro Glu Leu Lys Gly  
 275 280 285  
 Gln Phe Pro Pro Glu Asp Lys Asp Thr Asp Leu Asn Lys Gly Val Thr  
 290 295 300  
 Gly Cys Lys Ile Asp Asn Glu Lys Thr Lys Lys Leu Leu Ala Phe Glu  
 305 310 315 320  
 Phe Thr Pro Phe His Lys Thr Ile His Asp Thr Val Tyr Gln Ile Leu  
 325 330 335  
 His Lys Glu Gly Arg Val  
 340

<210> 5  
 <211> 342  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成

<400> 5  
 Met Ser Val Leu Ile Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ile Ala Lys His Ile  
 1 5 10 15  
 Val Arg Val Leu Leu Glu Gln Asn Tyr Lys Val Ile Gly Thr Val Arg  
 20 25 30  
 Ser Gln Asp Lys Ala Asp Lys Leu Leu Lys Gln Tyr Asn Asn Pro Asn  
 35 40 45

Leu Ser Tyr Glu Ile Val Pro Glu Ile Ala Asn Leu Asp Ala Phe Asp  
 50 55 60  
 Asp Ile Phe Lys Lys His Gly Lys Glu Ile Lys Tyr Val Ile His Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Ser Pro Ile Asn Phe Gly Ala Lys Asp Leu Glu Lys Asp Leu Val  
 85 90 95  
 Ile Pro Ala Ile Asn Gly Thr Lys Asn Met Phe Glu Ala Ile Lys Lys  
 100 105 110  
 Tyr Ala Pro Asp Thr Val Glu Arg Val Val Met Thr Ala Ser Cys Ala  
 115 120 125  
 Ser Ile Met Thr Pro His Arg Gln Asn Asp Pro Thr Leu Thr Leu Asp  
 130 135 140  
 Glu Glu Thr Trp Asn Pro Val Thr Glu Glu Asn Ala Tyr Glu Asn Val  
 145 150 155 160  
 Phe Thr Ala Tyr Cys Ala Ser Lys Thr Phe Ala Glu Lys Glu Ala Trp  
 165 170 175  
 Lys Phe Val Lys Glu Asn Ser Asp Ala Val Lys Phe Lys Leu Thr Thr  
 180 185 190  
 Ile His Pro Ser Phe Val Phe Gly Pro Gln Asn Phe Asp Glu Asp Val  
 195 200 205  
 Thr Lys Lys Leu Asn Glu Thr Cys Glu Ile Ile Asn Gly Leu Leu His  
 210 215 220  
 Ala Pro Phe Asp Thr Lys Val Glu Lys Thr His Phe Ser Gln Phe Ile  
 225 230 235 240  
 Asp Val Arg Asp Val Ala Lys Thr His Val Leu Gly Phe Gln Lys Asp  
 245 250 255  
 Glu Leu Ile Asn Gln Arg Leu Leu Leu Cys Asn Gly Ala Phe Ser Gln  
 260 265 270  
 Gln Asp Ile Val Asn Val Phe Asn Glu Asp Phe Pro Glu Leu Lys Gly  
 275 280 285  
 Gln Phe Pro Pro Glu Asp Lys Asp Thr Asp Leu Asn Lys Gly Val Thr  
 290 295 300  
 Gly Cys Lys Ile Asp Asn Glu Lys Thr Lys Lys Leu Leu Ala Phe Glu  
 305 310 315 320  
 Phe Thr Pro Phe His Lys Thr Ile His Asp Thr Val Tyr Gln Ile Leu  
 325 330 335  
 His Lys Glu Gly Arg Val  
 340

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 342

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工合成

&lt;400&gt; 6

Met Ser Val Leu Ile Ser Gly Ala Ser Gly Tyr Ile Ala Lys His Ile  
 1 5 10 15  
 Val Arg Val Leu Leu Glu Gln Asn Tyr Lys Val Ile Gly Thr Val Arg  
 20 25 30  
 Ser Gln Asp Lys Ala Asp Lys Leu Leu Lys Gln Tyr Asn Asn Pro Asn  
 35 40 45  
 Leu Ser Tyr Glu Ile Val Pro Glu Ile Ala Asn Leu Asp Ala Phe Asp  
 50 55 60  
 Asp Ile Phe Lys Lys His Gly Lys Glu Ile Lys Tyr Val Ile His Ala  
 65 70 75 80  
 Ala Ser Pro Ile Asn Phe Gly Ala Lys Asp Leu Glu Lys Asp Leu Val  
 85 90 95  
 Ile Pro Ala Ile Asn Gly Thr Lys Asn Met Phe Glu Ala Ile Lys Lys  
 100 105 110  
 Tyr Ala Pro Asp Thr Val Glu Arg Val Val Met Thr Ala Ser Met Ala  
 115 120 125  
 Ser Ile Met Thr Pro His Arg Gln Asn Asp Pro Thr Leu Thr Leu Asp  
 130 135 140  
 Glu Glu Thr Trp Asn Pro Val Thr Glu Glu Asn Ala Tyr Glu Asn Val  
 145 150 155 160  
 Phe Thr Ala Tyr Cys Ala Ser Lys Thr Phe Ala Glu Lys Glu Ala Trp  
 165 170 175  
 Lys Phe Val Lys Glu Asn Ser Asp Ala Val Lys Phe Lys Leu Thr Thr  
 180 185 190  
 Ile His Pro Ser Phe Val Phe Gly Pro Gln Asn Phe Asp Glu Asp Val  
 195 200 205  
 Thr Lys Lys Leu Asn Glu Thr Cys Glu Ile Ile Asn Gly Leu Leu His  
 210 215 220  
 Ala Pro Phe Asp Thr Lys Val Glu Lys Thr His Phe Ser Gln Phe Ile  
 225 230 235 240  
 Asp Val Arg Asp Val Ala Lys Thr His Val Leu Gly Phe Gln Lys Asp  
 245 250 255  
 Glu Leu Ile Asn Gln Arg Leu Leu Leu Cys Asn Gly Ala Phe Ser Gln  
 260 265 270  
 Gln Asp Ile Val Asn Val Phe Asn Glu Asp Phe Pro Glu Leu Lys Gly  
 275 280 285  
 Gln Phe Pro Pro Glu Asp Lys Asp Thr Asp Leu Asn Lys Gly Val Thr  
 290 295 300  
 Gly Cys Lys Ile Asp Asn Glu Lys Thr Lys Lys Leu Leu Ala Phe Glu  
 305 310 315 320  
 Phe Thr Pro Phe His Lys Thr Ile His Asp Thr Val Tyr Gln Ile Leu  
 325 330 335  
 His Lys Glu Gly Arg Val  
 340

<210> 7  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (10)..(11)  
<223> n is a, c, g, t or u

<400> 7  
gcttcaccan nkaacttcgg c

21

<210> 8  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (11)..(12)  
<223> n is a, c, g, t or u

<400> 8  
gccgaagttm nntggtgaag c

21

<210> 9  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (10)..(11)  
<223> n is a, c, g, t or u

<400> 9  
actgcttctn nkgcttcaat t

21

<210> 10

<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (11)..(12)  
<223> n is a, c, g, t or u

<400> 10  
aattgaagcm nnagaagcag t 21

<210> 11  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<400> 11  
actgcttctt gtgcttcaat t 21

<210> 12  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<400> 12  
aattgaagca caagaagcag t 21

<210> 13  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<400> 13  
actgcttcta tggcttcaat t 21

<210> 14  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列

<400> 14

aattgaagcc atagaagcag t

21

## 权 利 要 求 书

1.一种醇脱氢酶的突变体,其特征在于,所述突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示的醇脱氢酶的第 84 位缬氨酸和/或第 127 位酪氨酸进行突变得到的;

所述突变体为 M1、M2、M3、M4 或 M5;

所述 M1 是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示醇脱氢酶的第 84 位缬氨酸突变为异亮氨酸得到的;

所述 M2 是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示醇脱氢酶的第 127 位酪氨酸突变为半胱氨酸得到的;

所述 M3 是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示醇脱氢酶的第 127 位酪氨酸突变为甲硫氨酸得到的;

所述 M4 是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示醇脱氢酶的第 84 位缬氨酸突变为异亮氨酸以及第 127 位酪氨酸突变为半胱氨酸得到的;

所述 M5 是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID No.1 所示醇脱氢酶的第 84 位缬氨酸突变为异亮氨酸以及第 127 位酪氨酸突变为甲硫氨酸得到的。

2.如权利要求 1 所述的一种醇脱氢酶的突变体,其特征在于,所述突变体的氨基酸序列为 SEQ ID No.2、SEQ ID No.3、SEQ ID No.4、SEQ ID No.5 或 SEQ ID No.6。

3.编码权利要求 1 或 2 所述突变体的基因。

4.携带权利要求 3 所述基因的重组质粒。

5.如权利要求 4 所述的重组质粒,其特征在于,所述重组质粒载体为 pET 载体。

6.如权利要求 4 或 5 所述的重组质粒,其特征在于,所述重组质粒载体为 pET28a (+)。

7.携带权利要求 3 所述基因或权利要求 4-6 任一所述重组质粒的宿主细胞。

8.如权利要求 7 所述的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞为大肠杆菌 (*Escherichia coli*)。

9.如权利要求 7 或 8 所述的宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞为大肠杆菌 *E. coli* BL21 (DE3)。

10.权利要求 1 或 2 所述的突变体或权利要求 3 所述的基因或权利要求 4-6 任一所述的重组质粒或权利要求 7-9 任一所述的宿主细胞在辅酶再生方面的应用。

11.一种生产醇脱氢酶突变体的方法,其特征在于,所述方法为先将权利要求 7-9 任一所述的宿主细胞接种至 LB 培养基中,于 30~40 °C、100~200 r·min<sup>-1</sup> 摇床培养至培养液中吸光度 OD<sub>600</sub> 达到 0.5~1.0,然后在培养液中加入异丙基-β-D-六代呋喃半乳糖苷 (IPTG) 于 16~30 °C 下进行诱导 5~10 h,得到醇脱氢酶突变体。

12.如权利要求 11 所述的方法,其特征在于,所述 LB 培养基为含有 0-100 μg/mL 硫酸卡那霉素的 LB 培养基。

13.如权利要求 11 或 12 所述的方法,其特征在于,所述异丙基-β-D-六代呋喃半乳糖苷 (IPTG) 在培养液中的添加量为 0.05~1.0 mmol/L。

14.一种生产 D-苯丙氨酸钠的方法,其特征在于,所述方法为以苯丙酮酸钠和氨基酸脱氢酶 DAADH<sub>D94A</sub> 和 NADP<sup>+</sup>以及 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 或 NH<sub>4</sub>Cl 或 CH<sub>3</sub>COONH<sub>4</sub> 中的一种作为反应体系,以权利要求 1 或 2 所述醇脱氢酶突变体以及 1,4-丁二醇或 1,5-戊二醇或 1,6-己二醇或异丙醇或 2,3-丁二醇中的一种作为辅酶循环系统,以缓冲液作为缓冲体系,于 30~35 °C、pH 7~9 的条件下不对称还原反应 1~24 h,得到 D-苯丙氨酸钠。

15.如权利要求 14 所述的方法,其特征在于,所述苯丙酮酸钠在反应体系中的添加量为 10-200 mmol/L。

16.如权利要求 14 或 15 所述的方法,其特征在于,所述氨基酸脱氢酶 DAADH<sub>D94A</sub> 在反应体系中的添加量为 0.5~5 kU/L。

17.如权利要求 14-16 任一所述的方法,其特征在于,所述 NADP<sup>+</sup>在反应体系中的添加量为 0.1~1.0 mmol/L。

18.如权利要求 14-17 任一所述的方法,其特征在于,所述 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 在反应体系中的添加

量为 20~200 mmol/L。

19.如权利要求 14-18 任一所述的方法，其特征在于，所述 1,4-丁二醇在反应体系中的添加量为 5~100 mmol/L。

20.如权利要求 14-19 任一所述的方法，其特征在于，所述醇脱氢酶突变体在反应体系中的添加量为 0.3~3 kU/L。

21.如权利要求 14-20 任一所述的方法，其特征在于，所述缓冲液为磷酸盐缓冲液、甘氨酸-氢氧化钠缓冲液或 Tris-HCl 缓冲液。

22.如权利要求 14-21 任一所述的方法，其特征在于，所述缓冲液为磷酸盐缓冲液。

23.如权利要求 14-22 任一所述的方法，其特征在于，所述磷酸盐缓冲液的浓度为 10~200 mmol/L。

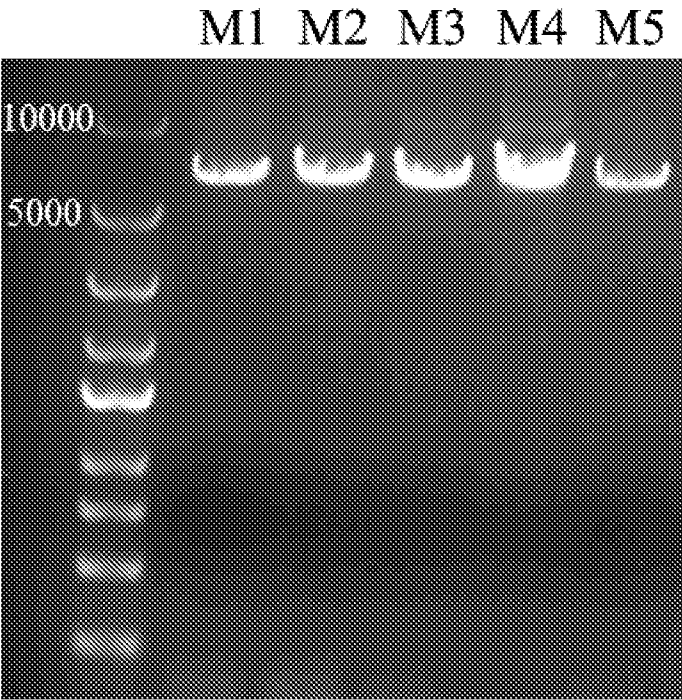


图 1

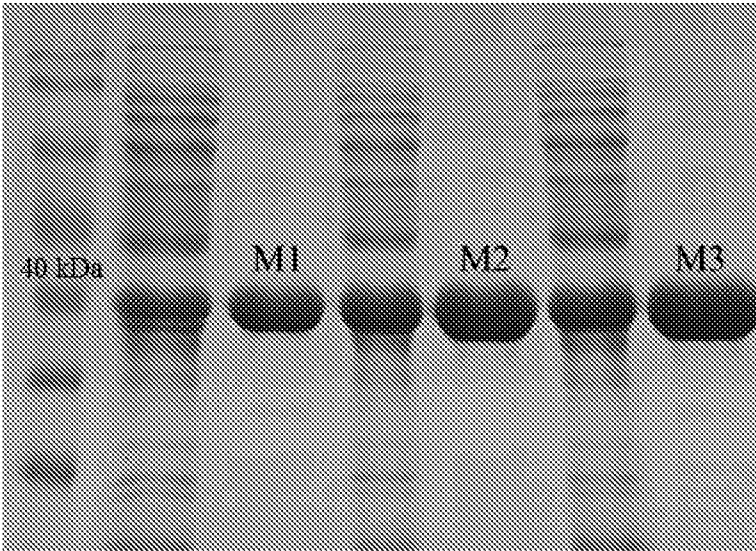


图 2

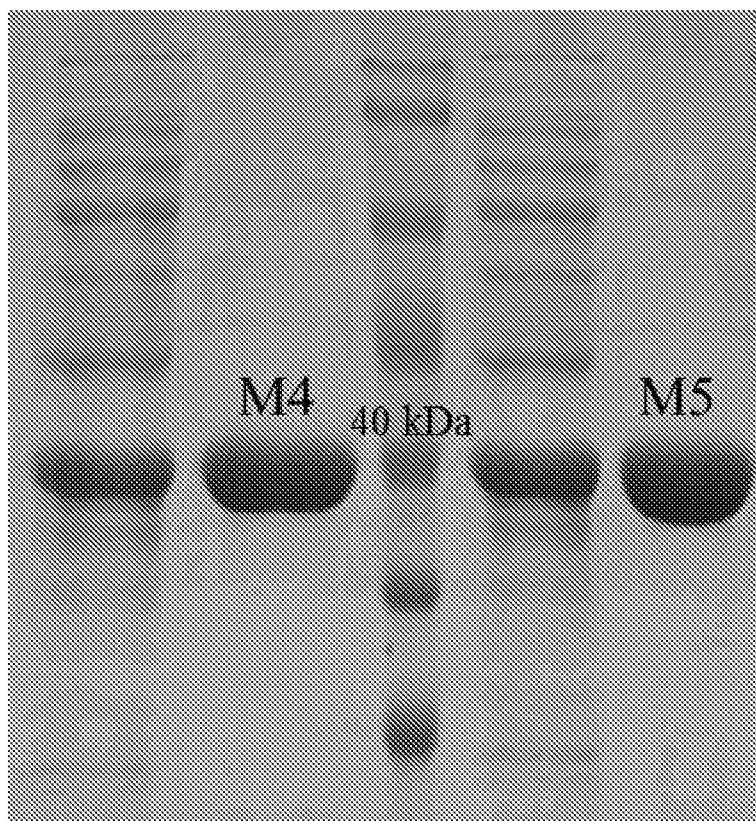


图 3

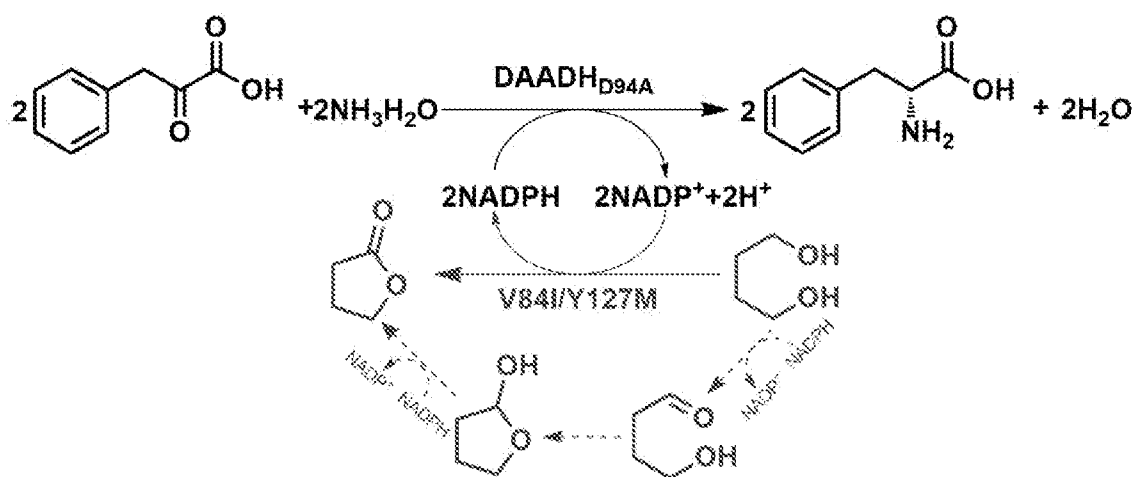


图 4

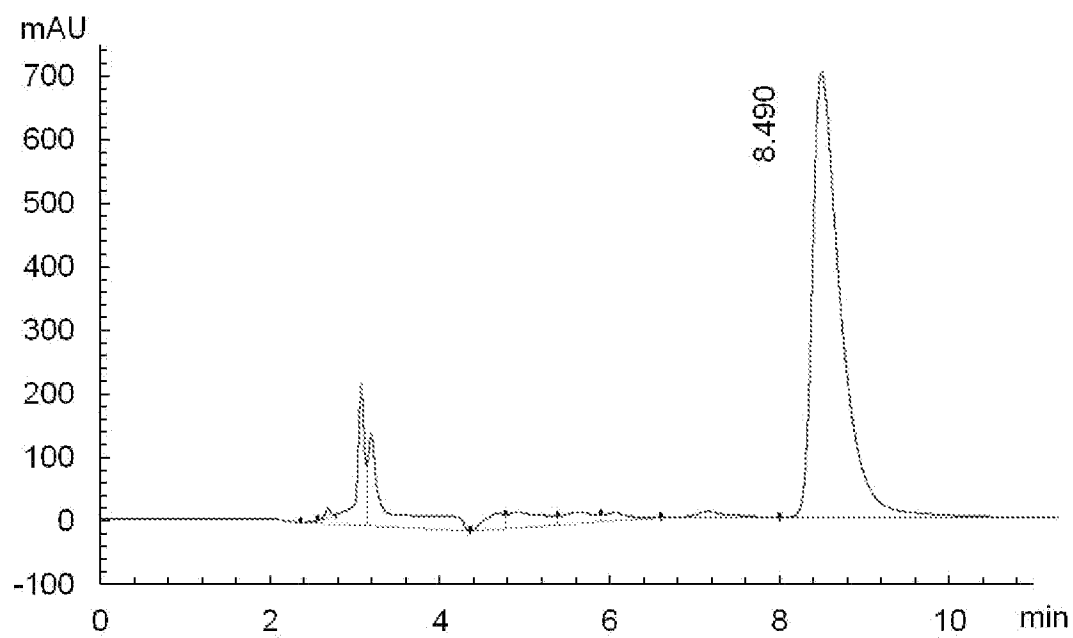


图 5

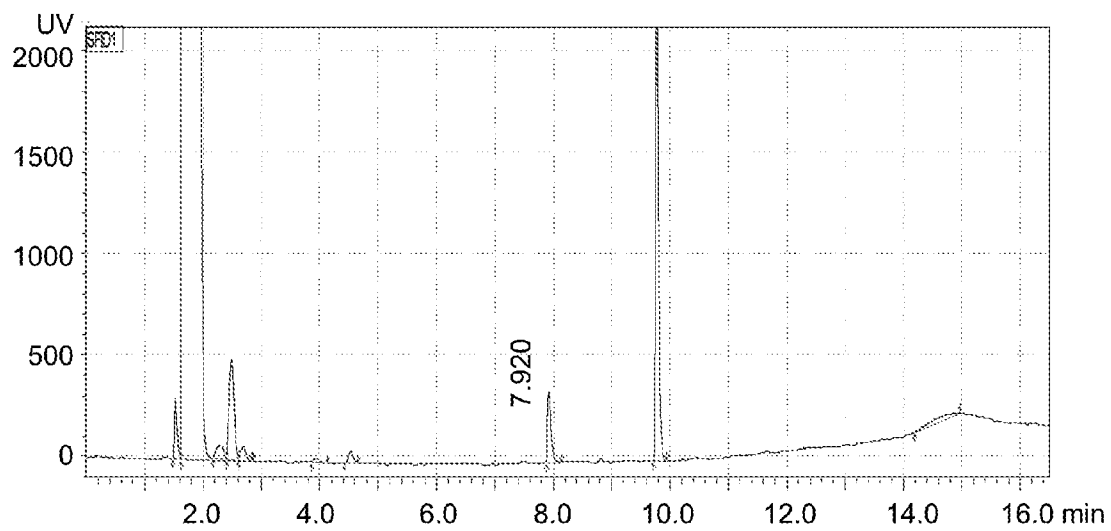


图 6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/118368

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C12N 9/04(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

VEN, CNABS, PubMed, ISI Web of Knowledge, NCBI Genbank, EMBL-EBI, CNKI: 申请人/发明人, 序列1-6, 醇脱氢酶, V84, V84I, Y127, Y127C, Y127M, KpADH, 突变, alcohol dehydrogenase, mutant, Kluyveromyces polysporus

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                                             | Relevant to claim No. |
|-----------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| PX        | CN 109402076 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 01 March 2019 (2019-03-01)<br>claims 1-10, and description, paragraphs 28-39                                                                                                                                              | 1-23                  |
| X         | XU, G.C. et al. "Hydroclassified Combinatorial Saturation Mutagenesis: Reshaping Substrate Binding Pockets of KpADH for Enantioselective Reduction of Bulky-Bulky Ketones"<br><i>ACS Catalysis</i> , Vol. no. 8, 13 August 2018 (2018-08-13),<br>pp. 8336-8345 | 1-23                  |
| A         | CN 105936895 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 14 September 2016 (2016-09-14)<br>entire document                                                                                                                                                                         | 1-23                  |
| A         | CN 108504641 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 07 September 2018 (2018-09-07)<br>entire document                                                                                                                                                                         | 1-23                  |
| A         | CN 108359649 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 03 August 2018 (2018-08-03)<br>entire document                                                                                                                                                                            | 1-23                  |
| A         | CN 105200068 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 30 December 2015 (2015-12-30)<br>entire document                                                                                                                                                                          | 1-23                  |



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

03 June 2019

Date of mailing of the international search report

08 July 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

State Intellectual Property Office of the P. R. China  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing  
100088  
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/118368

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages                                                                                                                                                              | Relevant to claim No. |
|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|
| A         | CN 108384765 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 10 August 2018 (2018-08-10)<br>entire document                                                                                                                                                             | 1-23                  |
| A         | CN 105936909 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 14 September 2016 (2016-09-14)<br>entire document                                                                                                                                                          | 1-23                  |
| A         | CN 104531628 A (ASYMCHEM LABORATORIES (TIANJIN) CO., LTD. et al.) 22 April 2015 (2015-04-22)<br>entire document                                                                                                                                 | 1-23                  |
| A         | CN 103642765 A (NANJING UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 19 March 2014 (2014-03-19)<br>entire document                                                                                                                                                 | 1-23                  |
| A         | ZHOU, J.Y. et al. "Carbonyl Group-Dependent High-Throughput Screening and Enzymatic Characterization of Diaromatic Ketone Reductase"<br><i>Catalysis Science &amp; Technology</i> , Vol. no. 6, 31 December 2016 (2016-12-31),<br>pp. 6320-6327 | 1-23                  |

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

International application No.

**PCT/CN2018/118368**

| Patent document<br>cited in search report |           |   | Publication date<br>(day/month/year) | Patent family member(s) |           |   | Publication date<br>(day/month/year) |
|-------------------------------------------|-----------|---|--------------------------------------|-------------------------|-----------|---|--------------------------------------|
| CN                                        | 109402076 | A | 01 March 2019                        | None                    |           |   |                                      |
| CN                                        | 105936895 | A | 14 September 2016                    | None                    |           |   |                                      |
| CN                                        | 108504641 | A | 07 September 2018                    | None                    |           |   |                                      |
| CN                                        | 108359649 | A | 03 August 2018                       | None                    |           |   |                                      |
| CN                                        | 105200068 | A | 30 December 2015                     | None                    |           |   |                                      |
| CN                                        | 108384765 | A | 10 August 2018                       | None                    |           |   |                                      |
| CN                                        | 105936909 | A | 14 September 2016                    | None                    |           |   |                                      |
| CN                                        | 104531628 | A | 22 April 2015                        | CN                      | 104531628 | B | 30 October 2018                      |
| CN                                        | 103642765 | A | 19 March 2014                        | CN                      | 103642765 | B | 18 November 2015                     |

## 国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/118368

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                             |                                             |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|
| <b>A. 主题的分类</b><br>C12N 9/04(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i<br><br>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>B. 检索领域</b><br>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)<br>C12N<br><br>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献<br><br>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))<br>VEN, CNABS, PubMed, ISI Web of Knowledge, NCBI Genbank, EMBL-EBI, CNKI; 申请人/发明人, 序列1-6, 醇脱氢酶, V84, V84I, Y127, Y127C, Y127M, KpADH, 突变, alcohol dehydrogenase, mutant, Kluyveromyces polysporus                                                                    |                                                                                                                                                                                                                                             |                                             |
| <b>C. 相关文件</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                             |                                             |
| 类 型*                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                                                                                                                                                           | 相关的权利要求                                     |
| PX                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | CN 109402076 A (江南大学) 2019年 3月 1日 (2019 - 03 - 01)<br>权利要求1-10, 说明书第28-39段                                                                                                                                                                  | 1-23                                        |
| X                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | XU, G.C. 等. "Hydroclassified Combinatorial Saturation Mutagenesis: Reshaping Substrate Binding Pockets of KpADH for Enantioselective Reduction of Bulky-Bulky Ketones"<br>ACS CATALYSIS, 第8卷, 2018年 8月 13日 (2018 - 08 - 13),<br>第8336-8345页 | 1-23                                        |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | CN 105936895 A (江南大学) 2016年 9月 14日 (2016 - 09 - 14)<br>全文                                                                                                                                                                                   | 1-23                                        |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | CN 108504641 A (江南大学) 2018年 9月 7日 (2018 - 09 - 07)<br>全文                                                                                                                                                                                    | 1-23                                        |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | CN 108359649 A (江南大学) 2018年 8月 3日 (2018 - 08 - 03)<br>全文                                                                                                                                                                                    | 1-23                                        |
| A                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | CN 105200068 A (江南大学) 2015年 12月 30日 (2015 - 12 - 30)<br>全文                                                                                                                                                                                  | 1-23                                        |
| <input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |                                                                                                                                                                                                                                             |                                             |
| * 引用文件的具体类型:<br>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件<br>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利<br>"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)<br>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件<br>"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<br>"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<br>"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<br>"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<br>"&" 同族专利的文件 |                                                                                                                                                                                                                                             |                                             |
| 国际检索实际完成的日期<br><br>2019年 6月 3日                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |                                                                                                                                                                                                                                             | 国际检索报告邮寄日期<br><br>2019年 7月 8日               |
| ISA/CN的名称和邮寄地址<br>中国国家知识产权局(ISA/CN)<br>中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088<br>传真号 (86-10)62019451                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                                                                                                                                                                                                                                             | 受权官员<br><br>奚静<br><br>电话号码 86-(10)-53961974 |

| C. 相关文件 |                                                                                                                                                                                                                         |         |
|---------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|
| 类 型*    | 引用文件, 必要时, 指明相关段落                                                                                                                                                                                                       | 相关的权利要求 |
| A       | CN 108384765 A (江南大学) 2018年 8月 10日 (2018 - 08 - 10)<br>全文                                                                                                                                                               | 1-23    |
| A       | CN 105936909 A (江南大学) 2016年 9月 14日 (2016 - 09 - 14)<br>全文                                                                                                                                                               | 1-23    |
| A       | CN 104531628 A (凯莱英医药集团天津股份有限公司等) 2015年 4月 22日 (2015 - 04 - 22)<br>全文                                                                                                                                                   | 1-23    |
| A       | CN 103642765 A (南京工业大学) 2014年 3月 19日 (2014 - 03 - 19)<br>全文                                                                                                                                                             | 1-23    |
| A       | ZHOU, J.Y. 等. "Carbonyl group-dependent high-throughput screening and enzymatic characterization of diaromatic ketone reductase"<br>CATALYSIS SCIENCE & TECHNOLOGY, 第6卷, 2016年 12月 31日 (2016 - 12 - 31),<br>第6320-6327页 | 1-23    |

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/118368

| 检索报告引用的专利文件 |           |   | 公布日<br>(年/月/日) | 同族专利 | 公布日<br>(年/月/日)            |
|-------------|-----------|---|----------------|------|---------------------------|
| CN          | 109402076 | A | 2019年 3月 1日    | 无    |                           |
| CN          | 105936895 | A | 2016年 9月 14日   | 无    |                           |
| CN          | 108504641 | A | 2018年 9月 7日    | 无    |                           |
| CN          | 108359649 | A | 2018年 8月 3日    | 无    |                           |
| CN          | 105200068 | A | 2015年 12月 30日  | 无    |                           |
| CN          | 108384765 | A | 2018年 8月 10日   | 无    |                           |
| CN          | 105936909 | A | 2016年 9月 14日   | 无    |                           |
| CN          | 104531628 | A | 2015年 4月 22日   | CN   | 104531628 B 2018年 10月 30日 |
| CN          | 103642765 | A | 2014年 3月 19日   | CN   | 103642765 B 2015年 11月 18日 |