

(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
2022 年 5 月 5 日 (05.05.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/088263 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 1/21 (2006.01) *C12N 15/60* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12P 7/46* (2006.01)
C12N 15/54 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)
C12N 15/53 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/128254

(22) 国际申请日: 2020 年 11 月 12 日 (12.11.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202011185169.0 2020 年 10 月 29 日 (29.10.2020) 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, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 刘立明(LIU, Liming); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 唐文秀(TANG, Wenxiu); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 沈忱(SHEN, Chen); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 罗秋玲(LUO, Qiuling); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 陈修来(CHEN, Xiulai); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 刘佳(LIU, Jia); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 高聪(GAO, Cong); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 宋伟(SONG, Wei); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 苏州市中南伟业知识产权代理有限公司 (普通合伙) (CENTRAL SOUTH WELL

(54) Title: RECOMBINANT ESCHERICHIA COLI FOR EFFICIENT PRODUCTION OF SUCCINIC ACID AND CONSTRUCTION METHOD FOR RECOMBINANT ESCHERICHIA COLI

(54) 发明名称: 一种高效生产琥珀酸的重组大肠杆菌及其构建方法

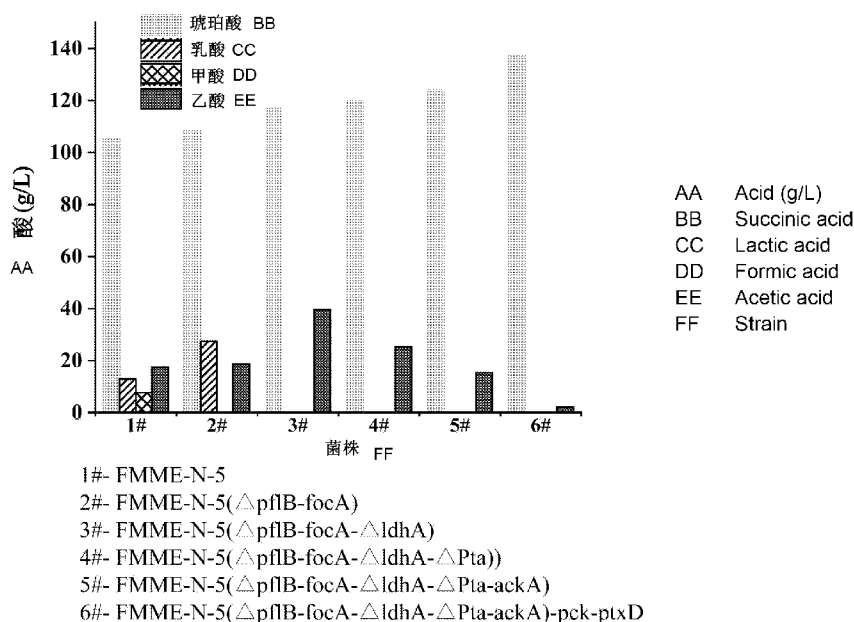


图 5

(57) Abstract: Disclosed are recombinant Escherichia coli for efficient production of succinic acid and a construction method for the recombinant Escherichia coli. The method comprises: knocking out a by-product encoding gene of a succinic acid producing strain E.coli FMME-N-5 to obtain a strain E.coli FMME-N-5(Δ focA-pflB- Δ ldhA- Δ pta-ackA); and introducing a plasmid pTrcHisA-pck-ptxD into the strain, overexpressing actinobacillus succinogenes phosphoenolpyruvate carboxykinase pck and bacillus stutzeri phosphite

INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE); 中国江苏省苏州市吴中区石湖西路188号吴中万达广场A座苏州大学科技园2303, Jiangsu 215000 (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, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二. 4(d) (i) 和 48. 2(a) (viii))。
- 包括说明书序列列表部分(细则5. 2(a))。

dehydrogenase ptxD, and screening to obtain an engineering bacterium E.coli FMME-N-5(Δ focA-pflB- Δ ldhA- Δ pta-ackA)-pck-ptxD for efficient production of succinic acid, the engineering strain using a two-stage fermentation strategy on a 7.5 L fermentation tank for fermentation for 96 h, the succinic acid yield reaching 137 g/L, the yield of succinic acid reaching 1 g/g glucose, the production strength being 1.43 g/L/h, by-products lactic acid and formic acid being not accumulated, and acetic acid being 1-2 g/L.

(57) 摘要: 公开了一种高效生产琥珀酸的重组大肠杆菌及其构建方法, 敲除E.coli 产琥珀酸菌株FMME-N-5的副产物编码基因得到菌株E.coli FMME-N-5(Δ focA-pflB- Δ ldhA- Δ pta-ackA); 将质粒pTrcHisA-pck-ptxD导入该菌株中过表达产琥珀酸放线杆菌磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶pck和施式芽孢杆菌亚磷酸酯脱氢酶ptxD, 筛选获得高效生产琥珀酸的工程菌E.coli FMME-N-5(Δ focA-pflB- Δ ldhA- Δ pta-ackA)-pck-ptxD; 该工程菌株在7.5L发酵罐上采用两阶段发酵策略, 发酵96h, 琥珀酸产量达到了137g/L, 琥珀酸得率达到1g/g葡萄糖、生产强度为1.43g/L/h, 副产物乳酸、甲酸不积累, 乙酸1-2g/L。

一种高效生产琥珀酸的重组大肠杆菌及其构建方法

技术领域

本发明涉及一种高效生产琥珀酸的重组大肠杆菌及其构建方法，属于生物工程技术领域。

背景技术

琥珀酸，学名丁二酸，是一种重要的 C4 平台化合物。作为合成通用化学品的起始原料，琥珀酸在食品、化学、医药以及其他领域有广泛的应用，琥珀酸被美国能源部列为 12 种最有潜力大宗生物基化学品中的首位。

琥珀酸的传统生产方法是化学合成法，主要有石蜡氧化法、氯乙酸甲酯氰化水解法和五氧化二钒催化加氢法等，但由于石油资源的减少和环境污染日益严重等问题，化学合成方法的弊端日益显现。而通过发酵法生产琥珀酸，能够摆脱对不可再生的战略资源石油的依赖，利用可再生资源，固定二氧化碳减轻温室效应，展现出良好的发展前景。目前研究较多的产琥珀酸的菌种有：产琥珀酸放线杆菌、产琥珀酸厌氧螺菌和大肠杆菌。产琥珀酸放线杆菌通常是从自然界中筛选，进行定向改造，能够耐受高浓度的琥珀酸盐，Guettler M 等人利用突变株产琥珀酸放线杆菌 FZ53 生产琥珀酸产量最高，以葡萄糖为碳源，发酵 48h 产量可以达到最高产量 110g/L，关于产琥珀酸放线杆菌菌种的研究较少，需要进一步的对其生理特性、发酵性能和遗传背景进行研究。产琥珀酸厌氧螺菌可以利用的发酵底物比较广泛，例如葡萄糖、乳糖、甘油等，Samuelov 等人的研究结果表明，在最适条件下，产琥珀酸厌氧螺菌琥珀酸的产率可以达到

1.2mol/1.0mol 葡萄糖, 最高产量为 65.0g/L, 但是该菌株发酵需要严格的厌氧环境, 工业化应用中很难实现。大肠杆菌作为模式菌株, 遗传背景清晰, 易操作, 能够采用各种分子生物学的技术对菌种进行改造, 所以采用大肠杆菌发酵琥珀酸已经成为一个热点, 研究也取得了众多进展, Vemuri 等利用重组大肠杆菌 AFP111 进行两阶段法发酵 76h, 琥珀酸的最终浓度可达到 99.2 g/L, 得率达到 1.1 g/g 葡萄糖, 生产强度达到 1.3 g/L/h; 张学礼等人运用基因工程及适应性进化策略构建得到重组大肠杆菌 HX024, 采用一步厌氧法发酵 96h, 最终琥珀酸产量达到 95.9 g/L, 得率达到 1 g/g 葡萄糖, 朱丽雯等人组合优化表达 *ppc* 和 *pck* 基因, 强化 CO₂ 固定路径, 重组大肠杆菌 AFP111 菌株发酵 96h, 琥珀酸产量达到 90.7 g/L; 张建国等人通过优化葡萄糖吸收代谢路径, 同时敲除副产物乙酸编码基因, 发酵 65h, 最终琥珀酸产量达到 98.92 g/L;

目前大肠杆菌发酵的生产效率较低, 发酵液中通常有乳酸、甲酸、乙酸、乙醇等副产物, 发酵过程辅因子代谢不平衡、不能耐受高浓度的产物浓度以及底物葡萄糖浓度、高浓度渗透压和葡萄糖吸收利用速度过快导致代谢失衡、产品得率及生产强度低等问题; 为了获得高性能的生产菌株, 通常需要利用传统选育手段、各种组学分析与分子生物学改造相结合的方法。

发明内容

为解决上述问题, 本发明提供一种高效生产琥珀酸的重组大肠杆菌, 采用 Red 同源重组技术对宿主菌 FMME-N-5 敲除大肠杆菌中编码丙酮酸甲酸裂解酶基因 *pflB-focA* 基因、乳酸脱氢酶基因 *ldhA* 基因、磷酸转乙酰基酶基因 *pta* 基因、并过表达琥珀酸合成路径中的关键酶磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 *pck* 和亚磷酸酯脱氢酶 *ptxD*。

本发明的第一个目的是提供一种高效生产琥珀酸的重组大肠杆菌, 所述重组大肠杆菌敲除了大肠杆菌中丙酮酸甲酸裂解酶编码基因 *pflB-focA*、乳酸脱氢酶编码基因 *ldhA*、磷酸转乙酰基酶编码基因 *pta* 中的一种或多种, 并过量表达

了磷酸烯醇式丙酮酸所激酶 Pck 和亚磷酸酯脱氢酶 PtxD。

进一步地，编码所述的磷酸烯醇式丙酮酸激酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，编码所述的亚磷酸酯脱氢酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

进一步地，所述磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 *pck* 和亚磷酸酯脱氢酶 *ptxD* 是通过质粒 pTrcHisA 进行表达。

进一步地，所述丙酮酸甲酸裂解酶编码基因 *pflB-focA* 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示；乳酸脱氢酶编码基因 *ldhA* 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.4 所示；磷酸转乙酰基酶编码基因 *pta* 的核苷酸序列如 SEQ ID NO.5 所示。

进一步地，所述重组大肠杆菌的宿主为大肠杆菌 FMME-N-5，于 2020 年 8 月 27 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏地址为中国武汉武汉大学，保藏编号为 CCTCC NO:M 2020454。

本发明的第二个目的是提供一种所述重组大肠杆菌的构建方法，所述构建方法的步骤为：

(1) 构建 *pflB-focA*、*ldhA*、*pta* 基因敲除框片段；依次将基因敲除框片段转入带有 pKD46 质粒的宿主菌，筛选获得敲除目标基因的菌株；

(2) 扩增获得磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 *pck* 和亚磷酸酯脱氢酶 *ptxD* 基因片段；将基因片段连接到表达载体上，然后将连接有基因片段的表达载体转入步骤 (1) 的菌株中，得到所述的重组大肠杆菌。

本发明的第三个目的是提供所述大肠杆菌在生产琥珀酸的应用，所述的应用是采用所述的重组大肠杆菌在发酵培养基中进行有氧-厌氧两阶段发酵，得到含有琥珀酸的发酵液。

进一步地，所述的发酵培养基的配方为：葡萄糖 30-50 g/L，玉米浆 15-25 g/L， $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2-4 g/L， K_2HPO_4 1.2-2.0 g/L， KH_2PO_4 0.5-1.0 g/L， $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2-0.5 g/L，NaCl 1-2 g/L。

进一步地，所述的有氧-厌氧两阶段发酵是在菌体 $OD_{600}=52-60$ 时，将有氧阶段转为厌氧阶段。

进一步地，将有氧阶段转为厌氧阶段是通过通入 CO_2 气体或者添加 10-20 g/L 碳酸氢盐的方式进行。

进一步地，在厌氧阶段，控制葡萄糖浓度为 5-15 g/L。

进一步地，所述的有氧-厌氧两阶段发酵的接种量，按体积百分比计，为 6-12%；发酵温度为 35-38℃。

进一步地，所述的有氧-厌氧两阶段发酵的发酵时间为 50-96 h。

进一步地，在厌氧阶段，添加 pH 中和剂，所述 pH 中和剂为 Na_2CO_3 、 K_2CO_3 、 $NaOH$ 、 KOH 、 $CaCO_3$ 、碱式碳酸镁一种或几种混合。

进一步地，在有氧-厌氧两阶段发酵 48h 后，添加渗透压保护剂，所述渗透压保护剂为脯氨酸、甲硫氨酸、半胱氨酸、甜菜碱中的一种或几种混合。

在本发明中，亚磷酸酯脱氢酶（ptxD）可以催化盐磷酸盐生成一分子磷酸盐，同时消耗一分子 NAD^+ 生成一分子 $NADH$ ，该反应产生的磷酸盐对细胞生长和 ptxD 活性不会产生抑制，且 ptxD 催化的反应不会直接竞争细胞代谢物，因此表达 ptxD 增加 $NADH$ 供应的同时，不会对琥珀酸生成的主要代谢路径产生影响。

本发明的有益效果：

本发明采用 Red 同源重组策略敲除影响琥珀酸生成的副产物编码的相关酶，包括丙酮酸甲酸裂解酶、乳酸脱氢酶、磷酸转乙酰基酶；在不影响菌体生长速度的同时会减少副产物的积累，同时有利于琥珀酸的积累；同时过量表达路径酶磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶和过量表达亚磷酸酯脱氢酶，有效提高了琥珀酸的产量，最终得到的工程菌株 *E.coli* FMME-N-5 ($\Delta focA$ - $pflB$ - $\Delta ldhA$ - Δpta)- pck -ptxD，发酵 96h 琥珀酸产量达到了 137 g/L，琥珀酸得率达到 1 g/g 葡萄糖、生产强度为 1.43 g/L/h，副产物乳酸、甲酸不积累，乙酸低于 10 g/L；本发明构

建菌株有利于琥珀酸的工业化生产。

生物材料保藏

大肠杆菌(*Escherichia coli*) FMME-N-5, 所述大肠杆菌已于 2020 年 8 月 27 日保藏于中国典型培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC NO:M 2020454, 保藏地址为中国武汉, 武汉大学。

附图说明

图 1 为敲除丙酮酸甲酸裂解酶胶验证图;

图 2 为敲除乳酸脱氢酶胶验证图;

图 3 为敲除磷酸转乙酰基胶验证图;

图 4 为表达磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶和亚磷酸酯脱氢酶重组载体结构图;

图 5 为构建工程菌株发酵 96 h *E.coli* FMME-N-5 (Δ focA-pflB- Δ ldhA- Δ pta)-pck-ptxD 发酵罐补料分批发酵结果。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明作进一步说明, 以使本领域的技术人员可以更好地理解本发明并能予以实施, 但所举实施例不作为对本发明的限定。

序列表中未相关核苷酸序列信息:

(1) SEQ ID NO.1 序列信息为产琥珀酸放线杆菌来源的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 *pck* 核苷酸序列;

(2) SEQ ID NO.2 序列信息为施氏假单胞菌的亚磷酸酯脱氢酶 *ptxD* 核苷酸序列;

(3) SEQ ID NO.3 序列信息为丙酮酸甲酸裂解酶编码基因 *pflB-focA* 的核苷酸序列;

(4) SEQ ID NO.4 序列信息为乳酸脱氢酶编码基因 *ldhA* 的核苷酸序列;

(5) SEQ ID NO.5 序列信息为磷酸转乙酰基酶编码基因 *pta* 的核苷酸序列;

菌体浓度的测定：

取适量发酵液用 2 mol/L 的盐酸中和后，菌体密度以分光光度计 600 nm 波长下检测的吸光值来表示。

葡萄糖的测定：

发酵液预处理：取发酵液 12000 r/min 离心 5min 取上清。稀释至适宜倍数，用 M-100 生物传感分析仪检测发酵液葡萄糖浓度。

有机酸的测定：

高效液相色谱法：发酵液预处理：取发酵液 12000 r/min 离心 5min 取上清。稀释适宜倍数后，利用高效液相色谱仪（HPLC）检测琥珀酸、乳酸、甲酸、乙酸的产量。仪器为 Waters e2695 反相高效液相色谱仪，色谱柱采用 Bio-Rad HPX 87H；流动相为 5 mmol/L H_2SO_4 ；流速设定为 0.6 mL/min；检测器为紫外检测器，检测波长为 210 nm，柱温为 35℃。

实施例 1：敲除丙酮酸甲酸裂解酶编码基因

(1) 为了实现编码丙酮酸甲酸裂解酶的基因的敲除以减少副产物加酸的量，借助 Red 同源重组技术构建基因组编辑片段。基因编辑片段包括上下游同源臂区域、抗性筛选盒。以质粒 pKD4 为模板，设计序列如 SEQ ID NO.6/SEQ ID NO.7 引物对 pflB-focA-S/pflB-focA-A 扩增抗性筛选基因 Kan 获得 pflB-focA 敲除框片段。

(2) 将 pKD46 质粒转化进入表达宿主 *E.coli* FMME-N-5 感受态细胞中，通过菌落 PCR 筛选得到重组菌株 *E.coli* FMME-N-5-pKD46，然后将得到的 pflB-focA 敲除框片段采用电转的方法转入重组菌株 *E.coli* FMME-N-5-pKD46 感受态细胞中，采用 50 $\mu\text{g/mL}$ 的 Kan 抗性平板筛选得到阳性转化子。最后借助温敏型质粒 pCP20 热诱导 FLP 重组酶表达消除 Kan 抗性基因，42℃培养转接 3 次，消除温敏型质粒 pKD46 和 pCP20；成功得到了敲除丙酮酸甲酸裂解酶的 *E.coli* FMME-N-5 ($\Delta\text{focA-pflB}$)。

引物序列信息：5'→3'方向

pflB-focA-S: TTACTCCGTATTTGCATAAAAACCATGCGAGTTACGGGCC
TATAAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

pflB-focA-A: ATAGATTGAGTGAAGGTACGAGTAATAACGTCCTGCTGC
TGTTCTCATATGAATATCCTCCTTAG

实施例 2：敲除乳酸脱氢酶表达基因

(1) *E.coli* FMME-N-5 (Δ focA-pflB) 的构建同实施例 1

(2) 为了进一步减少副产物乳酸的量以对编码乳酸脱氢酶的基因进行敲除，借助 Red 同源重组技术构建基因组编辑片段。基因编辑片段包括上下游同源臂区域、抗性筛选盒。以质粒 pKD4 为模板，设计序列如 SEQ ID NO.8/SEQ ID NO.9 引物对 *ldhA*-S/*ldhA* -A 扩增抗性筛选基因 Kan 获得 *ldhA* 敲除框片段。

(3) 将 pKD46 质粒转化进入表达宿主 *E.coli* FMME-N-5- Δ focA-pflB 感受态细胞中，通过菌落 PCR 筛选得到重组菌株 *E.coli* FMME-N-5- Δ focA-pflB-pKD46，然后将得到的 *ldhA* 敲除框片段采用电转的方法转入重组菌株 *E.coli* FMME-N-5- Δ focA-pflB-pKD46 感受态细胞中，采用 50 μ g/mL 的 Kan 抗性平板筛选得到阳性转化子。最后借助温敏型质粒 pCP20 热诱导 FLP 重组酶表达消除 Kan 抗性基因，42℃培养转接 3 次，消除温敏型质粒 pKD46 和 pCP20；成功得到了敲除乳酸脱氢酶的 *E.coli* FMME-N-5 (Δ focA-pflB- Δ ldhA)。

引物序列信息：5'→3'方向

ldhA-S: ATGAACTCGCCGTTTTATAGCACAAAACAGTACGACAAGAAG
TACGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

ldhA-A: TTAAACCAGTTCGTTTCGGGCAGGTTTCGCCTTTTTCCAGATTG
CTCATATGAATATCCTCCTTAG

实施例 3：敲除磷酸转乙酰基酶表达基因

(1) *E.coli* FMME-N-5 (Δ focA-pflB- Δ ldhA) 的构建同实施例 2

(2) 为了进一步减少副产物乙酸的量又保证细胞生长, 以对编码磷酸专乙酰基的基因进行敲除, 借助 Red 同源重组技术构建基因组编辑片段。基因编辑片段包括上下游同源臂区域、抗性筛选盒。以质粒 pKD4 为模板, 设计序列如 SEQ ID NO.10/SEQ ID NO.11 引物对 pta-S/pta -A 扩增抗性筛选基因 Kan 获得 pta 敲除框片段。

将 pKD46 质粒转化进入表达宿主 *E.coli* FMME-N-5- Δ focA-pflB- Δ ldhA 感受态细胞中, 通过菌落 PCR 筛选得到重组菌株 *E.coli* FMME-N-5- Δ focA-pflB- Δ ldhA-pKD46, 然后将得到的 pta 敲除框片段采用电转的方法转入重组菌株 *E.coli* FMME-N-5- Δ focA-pflB- Δ ldhA-pKD46 感受态细胞中, 采用 50 μ g/mL 的 Kan 抗性平板筛选得到阳性转化子。最后借助温敏型质粒 pCP20 热诱导 FLP 重组酶表达消除 Kan 抗性基因, 42 $^{\circ}$ C 培养转接 3 次, 消除温敏型质粒 pKD46 和 pCP20; 成功得到了敲除磷酸转乙酰基酶的 *E.coli* FMME-N-5 (Δ focA-pflB- Δ ldhA- Δ pta)。

引物序列信息: 5'→3'方向

pta-S: GTGTCCCGTATTATTATGCTGATCCCTACCGGAACCAGCGTCGG
TCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

pta-A: TACACCATCGCGCTGACTGCGATTCAGTCTGCACAGCAGCAGC
AGTAACATATGAATATCCTCCTTAG

实施例 4: 敲除磷酸转乙酰基-乙酸激酶表达基因

(1) *E.coli* FMME-N-5 (Δ focA-pflB- Δ ldhA- Δ pta) 的构建同实施例 3

(2) 为了进一步减少副产物乙酸的量, 借助 Red 同源重组技术构建基因组编辑片段。基因编辑片段包括上下游同源臂区域、抗性筛选盒。以质粒 pKD4 为模板, 设计序列如 SEQ ID NO.12/SEQ ID NO.13 引物对 pta-ackA-S/pta-ackA-A 扩增抗性筛选基因 Kan 获得 pta-ackA 敲除框片段。

将 pKD46 质粒转化进入表达宿主 *E.coli* FMME-N-5- Δ focA-pflB- Δ ldhA- Δ pta

感受态细胞中，通过菌落 PCR 筛选得到重组菌株 *E.coli* FMME-N-5- Δ focA-pflB- Δ ldhA-pKD46，然后将得到的 *pta* 敲除框片段采用电转的方法转入重组菌株 *E.coli* FMME-N-5- Δ focA-pflB- Δ ldhA -pKD46 感受态细胞中，采用 50 μ g/mL 的 Kan 抗性平板筛选得到阳性转化子。最后借助温敏型质粒 pCP20 热诱导 FLP 重组酶表达消除 Kan 抗性基因，42℃培养转接 3 次，消除温敏型质粒 pKD46 和 pCP20；成功得到了敲除磷酸转乙酰基-乙酸激酶的 *E.coli* FMME-N-5 (Δ focA-pflB- Δ ldhA- Δ pta-ackA)。

引物序列信息：5'→3'方向

pta-ackA-S: ATGTCGAGTAAGTTAGTACTGGTTCTGAACTGCGGTAGTT
CTTCAGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

pta-ackA-A: TCAGGCAGTCAGGCGGCTCGCGTCTTGCGCGATAACCAG
TTCTTCCATATGAATATCCTCCTTAG

实施例 5：表达载体 pTrcHisA-pck 的构建

本发明所用的磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 *pck* 来源于产琥珀酸放线杆菌，提取产琥珀酸放线杆菌的基因组 DNA；

根据已公布的基因组信息序列，分别设计序列如 SEQ ID NO.14/SEQ ID NO.15 引物对 *pck*-S/*pck*-A，以提取的产琥珀酸放线杆菌基因组 DNA 为模板，采用标准的 PCR 扩增体系和程序，扩增获取 *pck* 基因。

pck-S: **GGGATCC**ATGACTGACTTAAACAAACTCGTT

pck-A: **CCGCTCGAGA**ATACGAAAACCTGGCCGCGGTT

PCR 扩增获取的 *pck*，采用琼脂糖凝胶核酸电泳切胶回收，回收产物与表达载体 pTrcHisA 分别利用限制性内切酶 BamH I 和 XhoI 进行双酶切 3 h，酶切产物采用琼脂糖核酸电泳凝胶回收，DNA 和线性化质粒大小分别为 1617、4405 bp，然后采用 T4 DNA 连接酶 16℃过夜连接，转化至 JM109 感受态细胞中，挑取单菌落 PCR 验证，阳性转化子进行测序，比对正确，证明表达载体构建成

功，质粒命名为 pTrcHisA-pck。

实施例 6：表达载体 pTrcHisA-pck-ptxD 的构建

本发明所用的亚磷酸酯脱氢酶 *ptxD* 来源于施氏假单胞菌，提取铜绿假单胞菌的基因组 DNA；

根据已公布的基因组信息序列，分别设计序列如 SEQ ID NO.16/SEQ ID NO.17 引物对 *ptxD*-S/*ptxD*-A，以提取的施氏假单胞菌的基因组 DNA 为模板，采用标准的 PCR 扩增体系和程序，扩增获取 *ptxD* 基因。

引物序列信息：5'→3'方向：

ptxD-S: **ACTCGAGATGCTGCCGAACTGGTGATCACG**

ptxD-A: **AAGCTTAATCGTGCGGCGACCAAGCCGAAA**

PCR 扩增获取的 *ptxD*，采用琼脂糖凝胶核酸电泳切胶回收，回收产物与表达载体 pTrcHisA-pck 分别利用限制性内切酶 XhoI 和 Hind III 进行双酶切 3 h，酶切产物采用琼脂糖核酸电泳凝胶回收，DNA 和线性化质粒大小分别为 1011、4370 bp，然后采用 T4 DNA 连接酶 16°C 过夜连接，转化至 JM109 感受态细胞中，挑取单菌落 PCR 验证，阳性转化子进行测序，比对正确，证明表达载体构建成功，质粒命名为 pTrcHisA-pck-ptxD。将重组质粒电转入表达宿主菌 *E.coli* FMME-N-5 (Δ focA-pflB- Δ ldhA- Δ pta-ackA)，得到重组菌株 *E.coli* FMME-N-5 (Δ focA-pflB- Δ ldhA- Δ pta-ackA) - pck-ptxD。

实施例 7：重组菌株 *E.coli* FMME-N-5 (Δ focA-pflB- Δ ldhA- Δ pta-ackA) - pck-ptxD 发酵罐补料分批发酵

发酵罐上发酵培养基如下：发酵培养基为：发酵培养基为葡萄糖 35 g/L，玉米浆 20g/L，(NH₄)₂SO₄ 3 g/L，K₂HPO₄ 1.4 g/L，KH₂PO₄ 0.6 g/L，MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L，NaCl 2 g/L；补料培养基：葡萄糖 800 g/L；

挑取 *E.coli* FMME-N-5- Δ focA-pflB- Δ ldhA- Δ pta-pck-ptxD 重组菌株进行

7.5L 发酵罐两阶段发酵。单克隆接种于 25 mL (50 mL 摇瓶) 的 LB 培养基作为一级种子液, 置于 38 °C 200 rpm 的条件下培养 8.5h。取一级种子液 200 μ l 接种至 50mL/500mL 的种子培养基中; 38°C、200rpm 培养 7.5h 得到二级种子液。发酵罐的初始装液量为 4L, 种子接种量为 10%, 有氧阶段发酵条件为: 培养温度为 38°C, 通气量为 1vvm, 初始搅拌转速为 600 r/min, 氨水控制 pH 为 7.0, 整个有氧阶段溶氧控制在 20% 的水平, 当菌体浓度生长至 OD₆₀₀=55-60 时, 转为厌氧发酵阶段; 厌氧阶段: 停止通气, 搅拌转速为 200 r/min, 补加 800 g/L 葡萄糖并控制补料速率控制发酵液的 pH<10 g/L, 厌氧阶段使用碱式碳酸镁控制 pH=6.5, 发酵周期为总共 96h;

根据琥珀酸的产量测定, 结果如图 5 所示, 发酵 96h, 重组菌株 *E.coli* FMME-N-5- Δ focA-pflB- Δ ldhA- Δ pta-pck-ptxD 生产琥珀酸产量达到了 137 g/L, 琥珀酸得率达到 1 g/g 葡萄糖、生产强度为 1.43 g/L/h, 副产物乳酸、甲酸不积累, 乙酸仅有 1-2 g/L;

以上结果说明, 本发明技术采用基因工程技术, 敲除相关副产物编码基因: 丙酮酸甲酸裂解酶 *focA-pflB*、乳酸脱氢酶 *ldhA*、磷酸转乙酰基酶 *pta*、过量表达途径酶磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 *pck* 和亚磷酸酯脱氢酶 *ptxD* 平衡辅因子代谢能够有效提高琥珀酸的产量。

以上所述实施例仅是为充分说明本发明而所举的较佳的实施例, 本发明的保护范围不限于此。本技术领域的技术人员在本发明基础上所作的等同替代或变换, 均在本发明的保护范围之内。本发明的保护范围以权利要求书为准。

权 利 要 求 书

1、一种高效生产琥珀酸的重组大肠杆菌，其特征在于，所述重组大肠杆菌敲除了大肠杆菌中丙酮酸甲酸裂解酶编码基因 *pflB-focA*、乳酸脱氢酶编码基因 *ldhA*、磷酸转乙酰基酶编码基因 *pta* 中的一种或多种，并过量表达了磷酸烯醇式丙酮酸所激酶 Pck 和亚磷酸酯脱氢酶 PtxD。

2、根据权利要求 1 所述的重组大肠杆菌，其特征在于，编码所述的磷酸烯醇式丙酮酸激酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示，编码所述的亚磷酸酯脱氢酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

3、根据权利要求 1 所述的重组大肠杆菌，其特征在于，所述磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 *pck* 和亚磷酸酯脱氢酶 *ptxD* 是通过质粒 pTrcHisA 进行表达。

4、根据权利要求 1 所述的重组大肠杆菌，其特征在于，所述重组大肠杆菌的宿主为大肠杆菌 FMME-N-5，于 2020 年 8 月 27 日保藏于中国典型培养物保藏中心，保藏地址为中国武汉武汉大学，保藏编号为 CCTCC NO:M 2020454。

5、一种权利要求 1-4 任一项所述重组大肠杆菌的构建方法，其特征在于，所述构建方法的步骤为：

(1) 构建 *pflB-focA*、*ldhA*、*pta* 基因敲除框片段；依次将基因敲除框片段转入带有 pKD46 质粒的宿主菌，筛选获得敲除目标基因的菌株；

(2) 扩增获得磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶 *pck* 和亚磷酸酯脱氢酶 *ptxD* 基因片段；将基因片段连接到表达载体上，然后将连接有基因片段的表达载体转入步骤 (1) 的菌株中，得到所述的重组大肠杆菌。

6、权利要求 1-4 任一项所述的大肠杆菌在生产琥珀酸的应用，其特征在于，所述的应用是采用所述的重组大肠杆菌在发酵培养基中进行有氧-厌氧两阶段发酵，得到含有琥珀酸的发酵液。

7、根据权利要求 6 所述的应用，其特征在于，所述的有氧-厌氧两阶段发

酵是在菌体 $OD_{600}=52-60$ 时, 将有氧阶段转为厌氧阶段。

8、根据权利要求 6 所述的应用, 其特征在于, 将有氧阶段转为厌氧阶段是通过通入 CO_2 气体或者添加 10-20 g/L 碳酸氢盐的方式进行。

9、根据权利要求 6 所述的应用, 其特征在于, 在厌氧阶段, 控制葡萄糖浓度 5 度为 5-15 g/L。

10、根据权利要求 6 所述的应用, 其特征在于, 所述的有氧-厌氧两阶段发酵的接种量, 按体积百分比计, 为 6-12%; 发酵温度为 35-38°C。

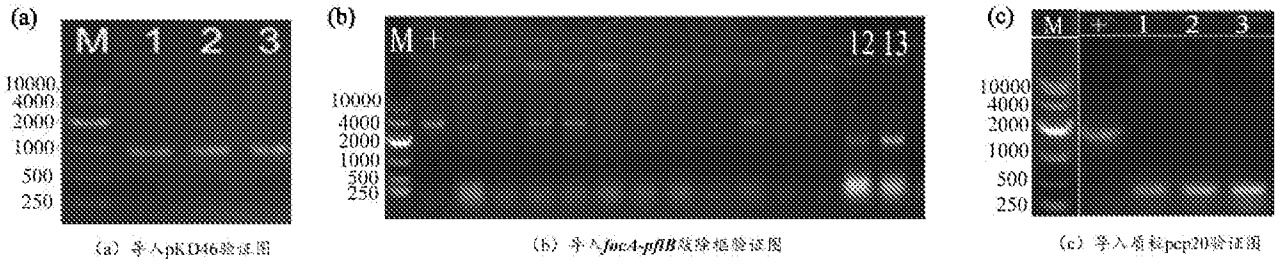


图 1

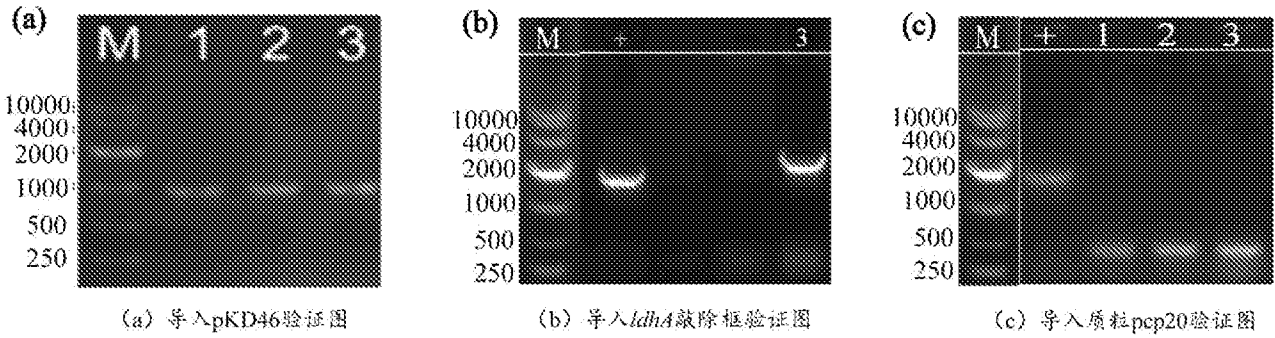


图 2

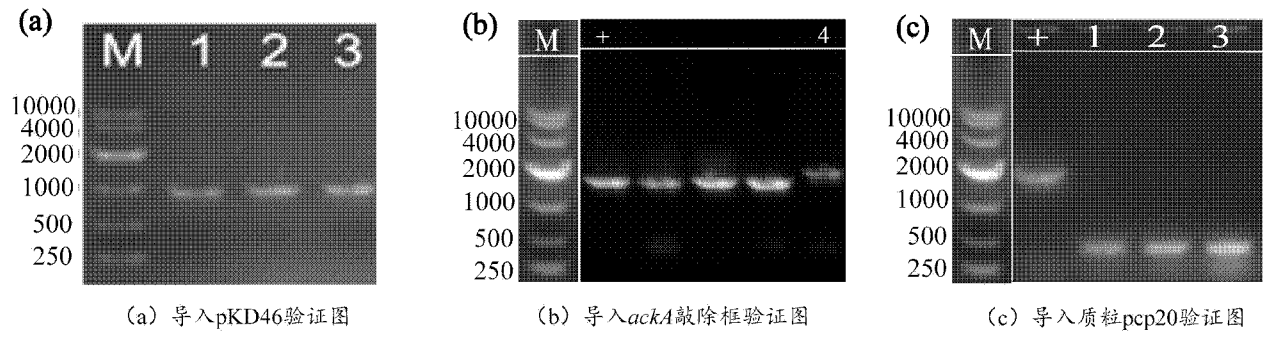


图 3

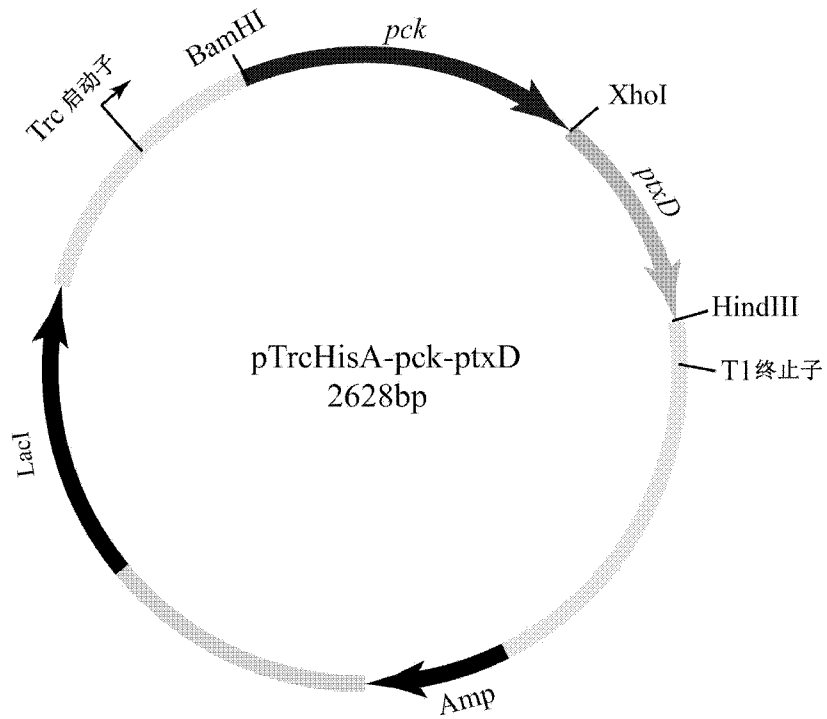


图 4

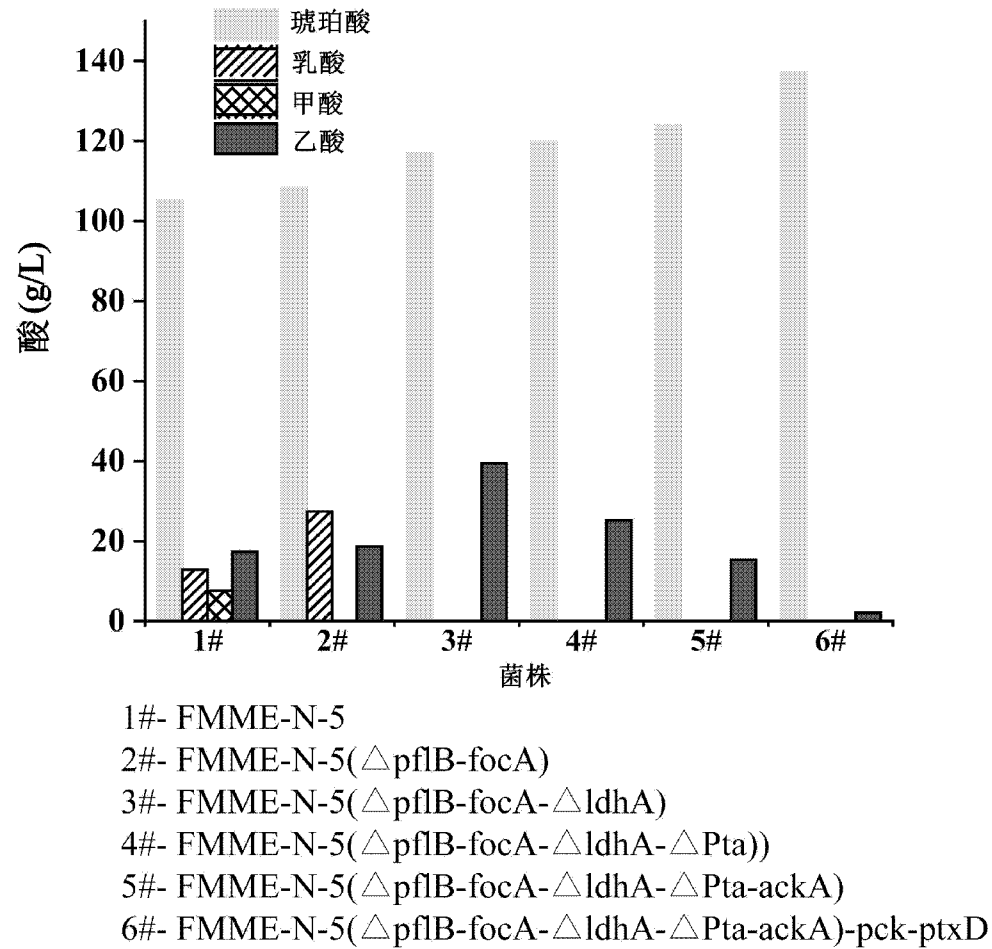


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/128254

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/60(2006.01)i;
C12P 7/46(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)n

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C12P; C12R

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

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

CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, PUBMED, ISI WEB OF SCIENCE: 大肠杆菌, 琥珀酸, 丁二酸, 丙酮酸甲裂解酶, 乳酸脱氢酶, 磷酸转乙酰基酶, 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶, 亚磷酸酯脱氢酶, 亚磷酸氧化还原酶, e.coli, succinic acid, succinate, pyruvate formic acid lyase, phosphoenolpyruvate carboxylase, pf1b, ldh, pta, pck, phosphite dehydrogenase, phosphite oxidoreductase, ptxD; EBI+GenBank+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID NOs.1-2进行检索.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105779513 A (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 20 July 2016 (2016-07-20) see claim 1	1-10
A	CN 105658801 A (NOVOGY, INC.) 08 June 2016 (2016-06-08) see claims 1-5 and 10-12	1-10
A	CN 104974946 A (TIANJIN INSTITUTE OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 14 October 2015 (2015-10-14) see entire document	1-10
A	CN 104694449 A (UNIVERSITY OF FLORIDA RESEARCH FOUNDATION, INC.) 10 June 2015 (2015-06-10) see entire document	1-10
A	CN 102282156 A (国家政治研究所高级研究中心高级研究中心) 14 December 2011 (2011-12-14) see entire document	1-10



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 June 2021

Date of mailing of the international search report

14 July 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088, China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/128254

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2011063157 A2 (MYRIANT TECHNOLOGIES LLC et al.) 26 May 2011 (2011-05-26) see entire document	1-10
A	岳方方 等 (YUE, Fangfang et al.). "产琥珀酸大肠杆菌工程菌株的构建 (Construction of Engineered Escherichia Coli for Succinate Production)" <i>中国酿造 (China Brewing)</i> , No. 2, 15 February 2010 (2010-02-15), ISSN: 0254-5071, pages 25-29, see abstract	1-10
A	YONG Y et al. "Construction of an energy-conserving glycerol utilization pathways for improving anaerobic succinate production in Escherichia coli" <i>Metabolic Engineering</i> , Vol. 56, 31 December 2019 (2019-12-31), ISSN: 1096-7176, pp. 181-189, see entire document	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/128254

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/128254

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105779513	A	20 July 2016	CN	105779513	B	06 December 2019
CN	105658801	A	08 June 2016	US	2016215274	A1	28 July 2016
				AU	2014311318	A1	18 February 2016
				BR	112016003256	A2	12 December 2017
				WO	2015031441	A3	23 April 2015
				EP	3039149	A2	06 July 2016
				CA	2920028	A1	05 March 2015
				US	2019233800	A1	01 August 2019
				WO	2015031441	A2	05 March 2015
				EP	3039149	A4	10 May 2017
				AU	2014311318	B2	02 November 2017
				US	10174296	B2	08 January 2019
				CA	3103529	A1	05 March 2015
				EP	3039149	B1	10 June 2020
CN	104974946	A	14 October 2015	CN	104974946	B	11 January 2019
CN	104694449	A	10 June 2015	BR	PI0809400	A2	09 September 2014
				EP	2121915	A4	05 May 2010
				JP	2010531635	A	30 September 2010
				WO	2008115958	A2	25 September 2008
				ES	2389582	T3	29 October 2012
				AU	2008228948	B2	24 April 2014
				CA	2688938	C	16 January 2018
				JP	5836342	B2	24 December 2015
				KR	20100015743	A	12 February 2010
				WO	2008115958	A3	19 February 2009
				EP	2570481	B1	26 November 2014
				EP	2121915	A2	25 November 2009
				WO	2008115958	A4	09 April 2009
				JP	2014050387	A	20 March 2014
				US	2010184171	A1	22 July 2010
				ES	2527402	T3	23 January 2015
				HK	1137485	A1	30 July 2010
				HK	1211318	A1	20 May 2016
				JP	5546871	B2	09 July 2014
				BR	PI0809400	B1	04 December 2018
				MY	160694	A	15 March 2017
				AU	2008228948	A1	25 September 2008
				CN	104694449	B	22 May 2018
				CA	2688938	A1	25 September 2008
				EP	2121915	B1	08 August 2012
				EP	2570481	A1	20 March 2013
				MX	2009010154	A	12 October 2009
				CN	101688196	A	31 March 2010
				KR	101631719	B1	24 June 2016
				US	8691539	B2	08 April 2014
				CN	101688196	B	07 January 2015
CN	102282156	A	14 December 2011	AU	2018202957	A1	17 May 2018
				ES	2391351	A1	23 November 2012
				US	2011231958	A1	22 September 2011
				US	10851386	B2	01 December 2020

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/128254

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
				AU	2016204749	A1	28 July 2016
				US	2013067975	A1	21 March 2013
				US	2012285210	A1	15 November 2012
				US	2016017345	A1	21 January 2016
				ES	2391351	B1	06 November 2013
				CA	2781461	A1	27 May 2010
				MX	2011005282	A	06 September 2011
				US	2012295303	A1	22 November 2012
				WO	2010058298	A2	27 May 2010
				CN	102282156	B	15 March 2017
				NZ	593539	A	25 January 2013
				WO	2010058298	A3	02 September 2010
				CN	107058115	A	18 August 2017
				BR	PI0921949	A2	18 July 2017
				AR	074376	A1	12 January 2011
				AU	2009318903	A1	14 July 2011
WO	2011063157	A2	26 May 2011	US	8778656	B2	15 July 2014
				WO	2011063157	A3	03 November 2011
				US	2012225461	A1	06 September 2012

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/128254

A. 主题的分类 C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 15/54(2006.01)i; C12N 15/53(2006.01)i; C12N 15/60(2006.01)i; C12P 7/46(2006.01)i; C12R 1/19(2006.01)n 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																							
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N; C12P; C12R 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, PUBMED, ISI WEB OF SCIENCE: 大肠杆菌, 琥珀酸, 丁二酸, 丙酮酸甲裂解酶, 乳酸脱氢酶, 磷酸转乙酰基酶, 磷酸烯醇式丙酮酸羧激酶, 亚磷酸酯脱氢酶, 亚磷酸氧化还原酶, e.coli, succinic acid, succinate, pyruvate formic acid lyase, phosphoenolpyruvate carboxylase, pf1b, ldh, pta, pck, phosphite dehydrogenase, phosphite oxidoreductase, ptxD; EBI+GenBank+中国专利生物序列检索系统: 对SEQ ID N0s. 1-2进行检索。																							
C. 相关文件 <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>A</td> <td>CN 105779513 A (华东理工大学) 2016年 7月 20日 (2016 - 07 - 20) 参见权利要求1</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 105658801 A (诺沃吉公司) 2016年 6月 8日 (2016 - 06 - 08) 参见权利要求1-5和10-12</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104974946 A (中国科学院天津工业生物技术研究所) 2015年 10月 14日 (2015 - 10 - 14) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104694449 A (佛罗里达大学研究基金公司) 2015年 6月 10日 (2015 - 06 - 10) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 102282156 A (国家政治研究所高级研究中心高级研究中心) 2011年 12月 14日 (2011 - 12 - 14) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2011063157 A2 (MYRIANT TECHNOLOGIES LLC等) 2011年 5月 26日 (2011 - 05 - 26) 参见全文</td> <td>1-10</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	A	CN 105779513 A (华东理工大学) 2016年 7月 20日 (2016 - 07 - 20) 参见权利要求1	1-10	A	CN 105658801 A (诺沃吉公司) 2016年 6月 8日 (2016 - 06 - 08) 参见权利要求1-5和10-12	1-10	A	CN 104974946 A (中国科学院天津工业生物技术研究所) 2015年 10月 14日 (2015 - 10 - 14) 参见全文	1-10	A	CN 104694449 A (佛罗里达大学研究基金公司) 2015年 6月 10日 (2015 - 06 - 10) 参见全文	1-10	A	CN 102282156 A (国家政治研究所高级研究中心高级研究中心) 2011年 12月 14日 (2011 - 12 - 14) 参见全文	1-10	A	WO 2011063157 A2 (MYRIANT TECHNOLOGIES LLC等) 2011年 5月 26日 (2011 - 05 - 26) 参见全文	1-10
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
A	CN 105779513 A (华东理工大学) 2016年 7月 20日 (2016 - 07 - 20) 参见权利要求1	1-10																					
A	CN 105658801 A (诺沃吉公司) 2016年 6月 8日 (2016 - 06 - 08) 参见权利要求1-5和10-12	1-10																					
A	CN 104974946 A (中国科学院天津工业生物技术研究所) 2015年 10月 14日 (2015 - 10 - 14) 参见全文	1-10																					
A	CN 104694449 A (佛罗里达大学研究基金公司) 2015年 6月 10日 (2015 - 06 - 10) 参见全文	1-10																					
A	CN 102282156 A (国家政治研究所高级研究中心高级研究中心) 2011年 12月 14日 (2011 - 12 - 14) 参见全文	1-10																					
A	WO 2011063157 A2 (MYRIANT TECHNOLOGIES LLC等) 2011年 5月 26日 (2011 - 05 - 26) 参见全文	1-10																					
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																							
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件																							
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期																					
2021年 6月 18日		2021年 7月 14日																					
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员																					
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		张丹丹 电话号码 62411308																					

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	岳方方等. “产琥珀酸大肠杆菌工程菌株的构建” 中国酿造, 第2期, 2010年 2月 15日 (2010 - 02 - 15), ISSN: 0254-5071, 第25-29页, 参见摘要	1-10
A	YONG Y等. “Construction of an energy-conserving glycerol utilization pathways for improving anaerobic succinate production in Escherichia coli” Metabolic Engineering, 第56卷, 2019年 12月 31日 (2019 - 12 - 31), ISSN: 1096-7176, 第181-189页, 参见全文	1-10

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/128254

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	105779513	A	2016年 7月 20日	CN	105779513	B	2019年 12月 6日
CN	105658801	A	2016年 6月 8日	US	2016215274	A1	2016年 7月 28日
				AU	2014311318	A1	2016年 2月 18日
				BR	112016003256	A2	2017年 12月 12日
				WO	2015031441	A3	2015年 4月 23日
				EP	3039149	A2	2016年 7月 6日
				CA	2920028	A1	2015年 3月 5日
				US	2019233800	A1	2019年 8月 1日
				WO	2015031441	A2	2015年 3月 5日
				EP	3039149	A4	2017年 5月 10日
				AU	2014311318	B2	2017年 11月 2日
				US	10174296	B2	2019年 1月 8日
				CA	3103529	A1	2015年 3月 5日
				EP	3039149	B1	2020年 6月 10日
CN	104974946	A	2015年 10月 14日	CN	104974946	B	2019年 1月 11日
CN	104694449	A	2015年 6月 10日	BR	PI0809400	A2	2014年 9月 9日
				EP	2121915	A4	2010年 5月 5日
				JP	2010531635	A	2010年 9月 30日
				WO	2008115958	A2	2008年 9月 25日
				ES	2389582	T3	2012年 10月 29日
				AU	2008228948	B2	2014年 4月 24日
				CA	2688938	C	2018年 1月 16日
				JP	5836342	B2	2015年 12月 24日
				KR	20100015743	A	2010年 2月 12日
				WO	2008115958	A3	2009年 2月 19日
				EP	2570481	B1	2014年 11月 26日
				EP	2121915	A2	2009年 11月 25日
				WO	2008115958	A4	2009年 4月 9日
				JP	2014050387	A	2014年 3月 20日
				US	2010184171	A1	2010年 7月 22日
				ES	2527402	T3	2015年 1月 23日
				HK	1137485	A1	2010年 7月 30日
				HK	1211318	A1	2016年 5月 20日
				JP	5546871	B2	2014年 7月 9日
				BR	PI0809400	B1	2018年 12月 4日
				MY	160694	A	2017年 3月 15日
				AU	2008228948	A1	2008年 9月 25日
				CN	104694449	B	2018年 5月 22日
				CA	2688938	A1	2008年 9月 25日
				EP	2121915	B1	2012年 8月 8日
				EP	2570481	A1	2013年 3月 20日
				MX	2009010154	A	2009年 10月 12日
				CN	101688196	A	2010年 3月 31日
				KR	101631719	B1	2016年 6月 24日
				US	8691539	B2	2014年 4月 8日
				CN	101688196	B	2015年 1月 7日
CN	102282156	A	2011年 12月 14日	AU	2018202957	A1	2018年 5月 17日
				ES	2391351	A1	2012年 11月 23日
				US	2011231958	A1	2011年 9月 22日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/128254

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)
				US	10851386	B2	2020年 12月 1日
				AU	2016204749	A1	2016年 7月 28日
				US	2013067975	A1	2013年 3月 21日
				US	2012285210	A1	2012年 11月 15日
				US	2016017345	A1	2016年 1月 21日
				ES	2391351	B1	2013年 11月 6日
				CA	2781461	A1	2010年 5月 27日
				MX	2011005282	A	2011年 9月 6日
				US	2012295303	A1	2012年 11月 22日
				WO	2010058298	A2	2010年 5月 27日
				CN	102282156	B	2017年 3月 15日
				NZ	593539	A	2013年 1月 25日
				WO	2010058298	A3	2010年 9月 2日
				CN	107058115	A	2017年 8月 18日
				BR	PI0921949	A2	2017年 7月 18日
				AR	074376	A1	2011年 1月 12日
				AU	2009318903	A1	2011年 7月 14日
WO	2011063157	A2	2011年 5月 26日	US	8778656	B2	2014年 7月 15日
				WO	2011063157	A3	2011年 11月 3日
				US	2012225461	A1	2012年 9月 6日