

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(10) 国际公布号
WO 2023/197968 A1

(43) 国际公布日
2023 年 10 月 19 日 (19.10.2023)

(51) 国际专利分类号:
C12P 13/00 (2006.01) *C12N 15/53* (2006.01)
C12N 15/70 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/087079

(22) 国际申请日: 2023 年 4 月 7 日 (07.04.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210371284.X 2022年4月11日 (11.04.2022) CN

(71) 申请人: 元素驱动 (杭州) 生物科技有限公司 (MINT BIOTECHNOLOGIES CO., LTD.) [CN/CN]; 中国浙江省杭州市西湖区三墩镇西园七路1号绿方科创303室, Zhejiang 310012 (CN)。

(72) 发明人: 曹晨凯(CAO, Chenkai); 中国浙江省杭州市西湖区墩余路600号, Zhejiang 310012 (CN)。
张科春(ZHANG, Kechun); 中国浙江省杭州市西湖区墩余路600号, Zhejiang 310012 (CN)。

(74) 代理人: 北京知元同创知识产权代理事务所 (普通合伙) (BEIJING ORIGINTELLIGENCE IP LAW FIRM); 中国北京市海淀区上地东路35号院1号楼4层3-509, Beijing 100085 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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

(54) Title: METHOD FOR PREPARING ISOPROPANOLAMINE

(54) 发明名称: 一种异丙醇胺的制备方法

(57) Abstract: The present invention relates to the technical field of genetic engineering and fermentation engineering, and particularly, to a method for preparing isopropanolamine. The method is characterized in that threonine is converted into L-2-amino-3-oxobutyric acid under the action of an oxidase, L-2-amino-3-oxobutyric acid is decarboxylated spontaneously to give aminoacetone, and the aminoacetone is converted into isopropanolamine under the action of a reductase, the isopropanolamine including 1-amino-(R)-2-propanol or 1-amino-(S)-2-propanol.

(57) 摘要: 本发明涉及基因工程及发酵工程技术领域, 具体公开了一种异丙醇胺的制备方法, 其特征在于, 苏氨酸在氧化酶的作用下转化为L-2-氨基-3-氧代丁酸, L-2-氨基-3-氧代丁酸自发脱羧得到氨基丙酮, 氨基丙酮在还原酶的作用下转化为异丙醇胺, 异丙醇胺包括1-氨基-(R)-2-丙醇或1-氨基-(S)-2-丙醇。



WO 2023/197968 A1

一种异丙醇胺的制备方法

本申请要求于2022年4月11日提交中国专利局、申请号为202210371284.X、发明名称为“一种异丙醇胺的制备方法”的中国专利申请的优先权，其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明涉及基因工程及发酵工程技术领域，具体涉及一种异丙醇胺的制备方法。

背景技术

异丙醇胺是重要的基础性化工原料，广泛应用于金属保护剂、酸性气体吸收剂、水泥助磨剂等领域，还可以用作纤维工业精炼剂、抗静电剂、染色剂、纤维湿润剂，还可合成洗涤剂，及用于化妆品润滑油，切削油的抗氧化剂、增塑剂、乳化剂和溶剂的制备等。

目前生产异丙醇胺的方法有环氧丙烷法、氰氨化钙法和超临界流体法。环氧丙烷法是将环氧丙烷与氨混合后，经预热进行开环反应，生成混合物，然后经脱氨、脱水、减压蒸馏、精馏而得到异丙醇胺，在此过程中，根据环氧丙烷和氨的投料比，还可生成二异丙醇胺和三异丙醇胺。氰氨化钙法是利用环氧丙烷与氰氨化钙作用，生成2-氨基-3-(2-羟丙基)-5-甲基-1,3-二噁唑烷和碳酸钙；噁唑烷在氢氧化钾或碳酸钾存在下生成二异丙醇胺。超临界流体法是以氨和环氧丙烷为原料，水为催化剂，在超临界状态下经过闪蒸、吸收、脱氨和减压连续精馏、降膜蒸发等工艺，连续生成异丙醇胺。

以上合成方法面临着步骤复杂，原料及中间产物不环保，涉及到剧毒氰化物的使用，且反应条件苛刻，副产物复杂，转化率低下、产量不高等问题，亟待改进。

发明内容

本发明所解决的技术问题在于提供一种更适合工业化生产且更环保，产量更高的异丙醇胺的制备方法。

本发明提供一种异丙醇胺的制备方法，其特征在于，苏氨酸在氧化酶、还原酶的作用下转化为异丙醇胺，异丙醇胺选自1-氨基-(R)-2-丙醇和/或1-氨基-(S)-2-丙醇；异丙醇胺优选为1-氨基-(S)-2-丙醇。

本发明还提供一种异丙醇胺的制备方法，其特征在于，苏氨酸在氧化酶的作用下转化为L-2-氨基-3-氧代丁酸，L-2-氨基-3-氧代丁酸自发脱羧得到氨基丙酮，氨基丙酮在还原酶的作用

用下转化为异丙醇胺，异丙醇胺包括 1-氨基-（R）-2-丙醇或 1-氨基-（S）-2-丙醇。

在一些实施方案中，转化在细菌或真菌体内完成。

在一些实施方案中，以苏氨酸为底物，加入含有氧化酶编码基因及还原酶编码基因的重组微生物进行发酵培养，发酵过程中，重组微生物过表达产生所述氧化酶及还原酶。

在一些实施方案中，氧化酶编码基因包括 *tdh*、*yiaY*、*adhB* 中的任一种或几种，优选为 *tdh*；更优选地，*tdh* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

在一些实施方案中，所述还原酶编码基因包括 *gre2p*、*egsA*、*SU7*、*VIN7* 中的任一种或几种，优选为 *gre2p*；更优选地，*gre2p* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

在一些实施方案中，所述制备方法还包括通过基因工程方法构建所述重组微生物，基因工程方法优选地包括质粒表达或基因组整合。

在一些实施方案中，重组微生物通过质粒表达的方法进行构建，构建方法为：通过 PCR 扩增获得氧化酶编码基因及还原酶编码基因，将获得的基因共同连接至质粒载体（例如含有 IPTG 诱导型启动子的质粒载体，优选为含有 IPTG 诱导型启动子的 pZElac 载体）上、并转化至感受态细胞（例如大肠杆菌 *E.coli* dh5a 感受态细胞）中，测序后获得重组载体；将重组载体转化至微生物中，即得到重组微生物。

在一些实施方案中，重组载体为 pZE-*tdh*-*gre2p*；优选地，pZE-*tdh*-*gre2p* 构建方法为：通过 PCR 扩增得 *tdh* 基因和 *gre2p* 基因，将 *tdh* 基因和 *gre2p* 基因共同连接至含有 IPTG 诱导型启动子的 pZElac 载体上并转化至感受态细胞中，测序后得到质粒 pZE-*tdh*-*gre2p*；pZE-*tdh*-*gre2p* 构建方法示例性为：以大肠杆菌 MG1655 及酿酒酵母 S288C 的基因组为模板分别通过 PCR 扩增得 *tdh* 基因和 *gre2p* 基因，将 *tdh* 基因和 *gre2p* 基因共同连接至含有 IPTG 诱导型启动子的 pZElac 载体上并转化至大肠杆菌 *E.coli* dh5a 感受态细胞中，测序后得到质粒 pZE-*tdh*-*gre2p*。

在一些实施方案中，微生物选自大肠杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌、酵母或链霉菌中的一种或几种。

在一些实施方案中，微生物选自大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、产脲假丝酵母 (*Candida utilis*) 或毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中的一种或几种。

在一些实施方案中，发酵过程中，发酵温度为 20~90°C。

在一些实施方案中，发酵过程中，采用的培养基包括如下比例的原料：M9 盐 11~13g/L，硫酸镁 1~5 g/L，氯化钙 0.1 ~0.5 g/L、硫胺素 0.01~0.05 g/L、辅料 10~100 g/L、酵母粉 3~8 g/L、IPTG 1 ~3mM/L、氨基霉素 30~60μg/mL。

在一些实施方案中，辅料为 D-葡萄糖。

本发明还提供制备异丙醇胺的重组微生物，所述重组微生物含有氧化酶编码基因和还原酶编码基因；

优选地，氧化酶编码基因包括 *tdh*、*yiaY*、*adhB* 中的任一种或几种，优选为 *tdh*；更优选地，*tdh* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示；

和/或，所述还原酶编码基因包括 *gre2p*、*egsA*、*SU7*、*VIN7* 中的任一种或几种，优选为 *gre2p*；更优选地，*gre2p* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示；

优选地，微生物选自大肠杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌、酵母或链霉菌中的一种或几种；更优选地，微生物选自大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 或毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中的一种或几种。

本发明还提供用于制备异丙醇胺的重组 DNA 或生物材料，所述重组微生物或生物材料含有氧化酶编码基因和还原酶编码基因；

优选地，氧化酶编码基因包括 *tdh*、*yiaY*、*adhB* 中的任一种或几种，优选为 *tdh*；更优选地，*tdh* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示；

和/或，所述还原酶编码基因包括 *gre2p*、*egsA*、*SU7*、*VIN7* 中的任一种或几种，优选为 *gre2p*；更优选地，*gre2p* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示；

优选地，所述生物材料为表达盒、转座子、质粒载体、噬菌体载体或病毒载体。

本发明还提供上述重组微生物、上述重组 DNA 或生物材料在制备异丙醇胺中的应用。

有益效果：本发明所述的一种异丙醇胺的制备方法，其利用酶将苏氨酸氧化为 L-2-氨基-3-氧代丁酸，得到的 L-2-氨基-3 氧代丁酸自发脱羧得到氨基丙酮，然后利用还原酶将氨基丙酮还原为异丙醇胺。本发明采用成本低廉的原料，制备工序简单，操作手段温和，能避免剧毒氧化物的使用，过程环保，转化率及产率高，适合工业化加工生产。

本发明能在温和的环境下分别生产两种不同构型的异丙醇胺。具有很好的生产推广和应

用价值。

具体实施方式

为了使本发明实现的技术手段、创作特征、达成目的与功效易于明白了解，下面结合具体实施例进一步阐述本发明。

在本公开中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时，为了更好地理解本公开，下面提供相关术语的定义和解释。

也应理解本文使用的术语仅是为了描述具体实施方式的目的，并不意欲是限制性的。

本文中使用冠词“一”和“所述”来指代冠词的语法宾语中的一个或多个。

替代方案（例如，“或”）的使用应当被理解为意指替代方案中的一个、两个或其任何组合。术语“和/或”应当被理解为意指替代方案中的一个或两个。

如本文所用，术语“基因合成”，指利用重组 DNA 技术产生或利用本领域可用和公知的合成 DNA 或氨基酸序列技术获得。

“编码”指的是多核苷酸诸如基因、cDNA 或 mRNA 中核苷酸的特异性序列用作模板合成在生物学过程中的其他多聚体和大分子的固有性质，所述多聚体和大分子具有核苷酸（即，rRNA、tRNA 和 mRNA）的限定序列或氨基酸的限定序列中的任一个和由其产生的生物学性质。因此，如果相应于那个基因的 mRNA 的转录和翻译在细胞或其他生物学系统中产生蛋白质，则基因编码蛋白质。核苷酸序列等同 mRNA 序列并通常提供在序列表中的编码链，和用作转录基因或 cDNA 的模板的非编码链两者，都可被称为编码那个基因或 cDNA 的蛋白质或其他产物。

如本文所用，术语“内源的”指的是来自有机体、细胞、组织或系统的或在有机体、细胞、组织或系统内产生的任何物质。

如本文所用，术语“外源的”指的是任何从有机体、细胞、组织或系统引入的或在有机体、细胞、组织或系统外产生的物质。

如本文所用，术语“表达”被定义为由它的启动子驱动的特异核苷酸序列的转录和/或翻译。

除非另有规定，“编码氨基酸序列的多核苷酸序列”包括为彼此简并版本并编码相同的氨基酸序列的所有的核苷酸序列。短语编码蛋白质或 RNA 的核苷酸序列也可包括内含子，其

程度为编码该蛋白质的核苷酸序列可在某些版本中包含内含子（一个或多个）。

如本文所用的，术语“载体”为物质组合物，其包括分离的核酸，并且其可用于传递分离的核酸至细胞内部。转移的核酸通常连接到例如插入到载体核酸分子中。载体可以包含引导细胞中的自主复制的序列或可以包含足以允许整合到宿主细胞 DNA 中的序列。很多载体在本领域中是已知的，包括但不限于质粒、噬菌粒、人工染色体、细菌噬菌体以及动物病毒。因此，术语“载体”包括自主复制的质粒或病毒。

本发明实例所用的 DNA 聚合酶 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase、非连接酶依赖型单片段快速克隆试剂盒 ClonExpress®II One Step 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

LB 培养基成分：胰蛋白胨 10g/L，酵母粉 5g/L，氯化钠 10g/L，固体培养基中添加 1.5% 的琼脂粉。

抗生素浓度为：氨苄霉素 50 µg/mL。

异丙醇胺的检测方法：使用配备安捷伦色谱柱 (Agilent InfinityLab Poroshell 120 Columns) 的 HPLC-RID 定量检测异丙醇胺。

实施例 1 和实施例 2 用到的重组载体构建如下：

根据 NCBI 公布的大肠杆菌 MG1655 和酿酒酵母 S288C 的基因组序列分别设计引物：

PZE_Nhe1_F	CGCGCTAGCTCTAGAGGCATCAAATAAAACGAAAGGC
PZE_Kpn1_R	CGGGGTACCTTTCTCCTCTTTAATGAATTCTG
tdh_kpn1_F	CGGGGTACCATGAAAGCGTTATCCAAACTGAAAG
tdh_BamH1_R	CGCGGATCCTTAATCCCAGCTCAGAATAACTTTC
gre2p_BamH1_F	CGCg gatccAGGAGAAATTA ACTATGTCAGTTTTTCGTTTCAGGTGCTAACGGG
gre2p_Nhe1_R	CGCGCTAGCTTATATTCTGCCCTCAAATT
gldA_BamH1_F	CGCGGATCCAGGAGAAATTA ACTATGGACCGCATTATTCAATCACCGGGTAAA
gldA_Nhe1_R	CGCgctagcTTATTCCC ACTCTTGCAGGA

以大肠杆菌 MG1655 的基因组为模板通过 PCR 扩增得 tdh 基因片段，以酿酒酵母 S288C 的基因组为模板通过 PCR 扩增得 gre2p 基因片段，并通过非连接酶依赖型单片段快速克隆试剂盒将其连接到含有 IPTG 诱导型启动子的载体 pZElac 上，然后转化至 BW25113 感受态细胞，涂布硫酸卡那霉素抗性平板过夜培养，挑阳性克隆进行测序验证，正确的重组载体命名

为 pZE-tdh-gre2p。

以大肠杆菌 MG1655 的基因组为模板通过 PCR 扩增得 tdh 基因片段及 gldA 基因片段，并通过非连接酶依赖型单片段快速克隆试剂盒将其连接到含有 IPTG 诱导型启动子的载体 pZElac 上，然后转化至 BW25113 感受态细胞，涂布硫酸卡那霉素抗性平板过夜培养，挑阳性克隆进行测序验证，正确的重组载体命名为 pZE-tdh-gldA。

其中，tdh 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示。

gre2p 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

gldA 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:3 所示。

实施例 1

将重组载体 pZE-tdh-gre2p 转入大肠杆菌 BW25113 中，得到重组菌，将上述重组菌单菌落分别接种 2 mL 含有 50 μ g/mL 氨苄霉素的 LB 液体培养基，37 $^{\circ}$ C，220rpm 过夜培养(约 14h)。按照初始 OD 为 0.05 转接装有 10 mL 发酵培养基的 100mL 三角瓶，往发酵培养基中按 8.57 g/L 的比例加入苏氨酸作为底物（该比例为苏氨酸与发酵培养基的比值），30 $^{\circ}$ C，220rpm 培养。每个发酵瓶中加入 0.5 g CaCO₃ 调节发酵液的 pH。培养 12h 及 24h 后收集发酵液，检测苏氨酸和异丙醇胺的浓度（参见表 1）。苏氨酸在 tdh 编码的氧化酶的作用下转化为 L-2-氨基-3 氧代丁酸，L-2-氨基-3 氧代丁酸自发脱羧得到氨基丙酮，氨基丙酮在 gre2p 编码的还原酶的作用下转化为异丙醇胺。

采用的发酵培养基如下：

组分	浓度
M9 盐	11.2 g/L
硫酸镁	1 g/L
氯化钙	0.1 g/L
硫胺素	0.01 g/L
D-葡萄糖	40 g/L
酵母粉	5 g/L
IPTG	1 mM/L
氨苄霉素	50 μ g/mL

实施例 2

本实施例为对照实施例。将重组载体 pZE-tdh-gldA 转入大肠杆菌 BW25113 中，得到重

组菌，将上述重组菌单菌落分别接种 2 mL 含有 50μg/mL 氨苄霉素的 LB 液体培养基，37℃，220rpm 过夜培养（约 14h）。按照初始 OD 为 0.05 转接装有 10 mL 发酵培养基的 100mL 三角瓶，往发酵培养基中按 8.57 g/L 的比例加入苏氨酸作为底物（该比例为苏氨酸与发酵培养基的比值），32℃，220rpm 培养。每个发酵瓶中加入 0.5 g CaCO₃ 调节发酵液的 pH。培养 12h 及 24h 后收集发酵液，检测苏氨酸和异丙醇胺的浓度（参见表 1）。

实施例 1 及实施例 2 的检测结果如表 1 所示。可知，实施例 1 中发酵 12h 后发酵液中异丙醇胺浓度为 0.43g/L，转化率为 22.6%，发酵 24h 后发酵液中的异丙醇胺高达 1.48g/L，转化率为 43.8%，本实施例中得到的异丙醇胺均为 S-构型的异丙醇胺，在其它的一些实施例中，可通过酶基因的选择实现对异丙醇胺产物的构型的控制。而实施例 2 在发酵过程中，由于氧化酶的存在，苏氨酸有所转化，然而 gldA 虽然也为还原酶编码基因，却并不能催化产生异丙醇胺。

表 1 检测结果表

	时间/h	苏氨酸/g L ⁻¹	异丙醇胺/g L ⁻¹
pZE-tdh-gre2p	12	5.55	0.43
	24	3.21	1.48
pZE-tdh-gldA	12	7.13	未检出
	24	6.25	未检出

以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解，本发明不受上述实施例的限制，上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理，在不脱离本发明精神和范围的前提下，本发明还会有各种变化和改进，这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

序列信息：

SEQ ID: 1

长度：1026

类型：DNA

物种：大肠杆菌 MG1655

atgaaagcgt tatccaaact gaaagcggaa gagggcatct ggatgaccga cgttctgta 60

ccggaactcg ggcataacga tctgctgatt aaaatccgta aaacagccat ctgcgggact 120

gacgttcaca tctataactg ggatgagtg tgcacaaaaa ccatcccggt gccgatggc	180
gtgggccatg aatatgtcgg tgaagtggta ggtattggc aggaagtga aggcttcaag	240
atcgcgatc gcgtttctgg cgaaggccat atcacctgtg gtcattgccg caactgtcgt	300
ggtggctgta cccatttggt cgcgaacacg ataggcggtg gtgttaacg cccgggctgc	360
tttgccgaat atctggtgat cccggcattc aacgccttca aaatccccga caatatttc	420
gatgacttag ccgcaatttt tgatcccttc ggtaacgccg tgcataccgc gctgtcgtt	480
gatctggtgg gcgaagatgt gctggttct ggtgcaggcc cgattggtat tatggcagcg	540
gcggtggcga aacacgttgg tgcacgcaat gtggtgatca ctgatgttaa cgaataccgc	600
cttgagctgg cgcgtaaaat gggatcacc cgtgcgggta acgtcgccaa agaaaatctc	660
aatgacgtga tggcggagtt aggcattgacc gaaggttttg atgtcggtct ggaaatgtcc	720
ggtgcgccgc cagcgtttcg taccatgctt gacacatga atcacggcgg ccgtattgcg	780
atgctgggta ttccgccgtc tgatatgtct atcgactgga ccaaagtgt ctftaaaggc	840
ttgttcatta aaggatttta cggctgtgag atgtttgaaa cctggtacaa gatggcggcg	900
ctgattcagt ctggcctcga tcttcgccg atcattacc atcgtttctc tategatgat	960
ttccagaagg gctttgacgc tatgcgttcg ggccagtcgg ggaaagtgt tctgagctgg	1020
gattaa	1026

SEQ ID: 2

长度: 1029

类型: DNA

物种: 酿酒酵母 S288C

atgtcagttt tcgttcagg tgctaacggg ttcatgccc aacacattgt cgatctctg	60
ttgaaggaag actataaggt catcggttct gccagaagtc aagaaaaggc cgagaattta	120
acggaggcct ttgtaacaa cccaaaatc tccatggaag ttgtccaga catatctaag	180

ctggacgcat ttgacatgt ttccaaaag cacggcaagg atatcaagat agttctacat	240
acggcctctc cattctgctt tgatacact gacagtgaac gcgatttatt aattcctget	300
gtgaacgggtg ttaaggggaat tetccactca attaaaaaat acgccgctga ttctgtagaa	360
cgtgtagtgc tcacctcttc ttatgcagct gtgttcgata tggcaaaaga aaacgataag	420
tctttaacat ttaacgaaga atcctggaac ccagctacct gggagagttg ccaaagtgc	480
ccagttaacg cctactgtgg ttctaagaag ttgctgaaa aagcagcttg ggaatttcta	540
gaggagaata gagactctgt aaaattcgaa ttaactgccg ttaaccaggt ttacgtttt	600
gggccgcaaa tgtttgacaa agatgtgaaa aaacacttga acacatcttg cgaactcgtc	660
aacagcttga tgcatttacc accagaggac aagataccgg aactatttgg tggatacatt	720
gatgttcgtg atgttgcaaa ggctcattta gtgtccttcc aaaagaggga aacaattggt	780
caaagactaa tcgtatcgga ggccagattt actatgcagg atgttctcga taccctaac	840
gaagacttcc ctgttctaaa aggcaatatt ccagtgggga aaccagggtc tgggtctacc	900
cataacaccc ttggtgctac tcttgataat aaaaagagta agaaattgtt aggtttcaag	960
ttcaggaaact tgaaagagac cattgacgac actgcctccc aaattttaa atttgagggc	1020
agaatataa	1029

SEQ ID: 3

长度: 1104

类型: DNA

物种: 大肠杆菌 MG1655

atggaccgca ttattcaatc accgggtaaa tacatccagg gcgctgatgt gattaatcgt	60
ctgggcgaat acctgaagcc gctggcagaa cgctggtagg tggtaggtga caaattgtt	120
ttaggttttg ctcaatccac tgtcgagaaa agctttaaag atgctggact ggtagtagaa	180
attgcgccgt ttggcgggtga atgttcgcaa aatgagatcg accgtctcgc tggcatcgcg	240

gagactgcgc agtgtggcgc aattctcggt atcggtggcg gaaaaaccct cgatactgcc	300
aaagcactgg cacatttcat ggggtgttcg gtagcgatcg caccgactat cgcctctacc	360
gatgcaccgt gcagcgcatt gtctgttata tacaccgatg aggggtgagtt tgaccgctat	420
ctgctgttgc caaataaacc gaatatggtc attgtcgaca ccaaaatcgt cgctggcgca	480
cctgcacgtc tgtagcggc gggatatggc gatgcgctgg caacctgggt tgaagcgcgt	540
gcctgctctc gtagcggcgc gaccacatg gcgggcggca agtgcacca ggctgcgctg	600
gcactggctg aactgtgcta caacaccctg ctggaagaag gcgaaaaagc gatgcttgct	660
gccgaacagc atgtagtac tccggcgctg gagcgcgtga ttgaagcgaa cacctatttg	720
agcgggttg gtttgaaag tgggtgtctg gctgcggcgc acgcagtga taacggcctg	780
accgctatcc cggacgcga tcaactattat cacggtgaaa aagtggcatt cggtacgctg	840
acgcagctgg ttctggaaaa tgcgccggtg gaggaatcg aaaccgtacg tgcccttagc	900
catgcggtag gtttgccaat aactctcgct caactggata ttaaagaaga tgccccggcg	960
aaaatgcgaa ttgtggcaga agcggcatgt gcagaagggtg aaaccattca caacatgcct	1020
ggcggcgca cgccagatca ggtttacgcc gctctgctgg tagccgacca gtacggtcag	1080
cgtttctgc aagagtggga ataa	1104

权 利 要 求 书

1、一种异丙醇胺的制备方法，其特征在于，苏氨酸在氧化酶、还原酶的作用下转化为异丙醇胺，异丙醇胺选自 1-氨基-（R）-2-丙醇和/或 1-氨基-（S）-2-丙醇；异丙醇胺优选为 1-氨基-（S）-2-丙醇。

2、一种异丙醇胺的制备方法，其特征在于，苏氨酸在氧化酶的作用下转化为 L-2-氨基-3 氧代丁酸，L-2-氨基-3 氧代丁酸自发脱羧得到氨基丙酮，氨基丙酮在还原酶的作用下转化为异丙醇胺，异丙醇胺包括 1-氨基-（R）-2-丙醇或 1-氨基-（S）-2-丙醇。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的异丙醇胺的制备方法，其特征在于，转化在细菌或真菌体内完成。

4、根据权利要求 1-3 任一项所述的异丙醇胺的制备方法，其特征在于，以苏氨酸为底物，加入含有氧化酶编码基因及还原酶编码基因的重组微生物进行发酵培养，发酵过程中，重组微生物过表达产生所述氧化酶及还原酶。

5、根据权利要求 1-4 任一项所述的异丙醇胺的制备方法，其特征在于，氧化酶编码基因包括 *tdh*、*yiaY*、*adhB* 中的任一种或几种，优选为 *tdh*；更优选地，*tdh* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示；

和/或，所述还原酶编码基因包括 *gre2p*、*egsA*、*SU7*、*VIN7* 中的任一种或几种，优选为 *gre2p*；更优选地，*gre2p* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

6、根据权利要求 4 或 5 所述的异丙醇胺的制备方法，其特征在于，所述制备方法还包括通过基因工程方法构建所述重组微生物，基因工程方法优选地包括质粒表达或基因组整合。

7、根据权利要求 6 所述的异丙醇胺的制备方法，其特征在于，重组微生物通过质粒表达的方法进行构建，构建方法为：通过 PCR 扩增获得氧化酶编码基因及还原酶编码基因，将获得的基因共同连接至质粒载体（例如含有 IPTG 诱导型启动子的质粒载体，优选为含有 IPTG 诱导型启动子的 pZElac 载体）上、并转化至感受态细胞（例如大肠杆菌 *E.coli* dh5a 感受态细胞）中，测序后获得重组载体；将重组载体转化至微生物中，即得到重组微生物。

8、根据权利要求 7 所述的异丙醇胺的制备方法，其特征在于，重组载体为 pZE-*tdh*-*gre2p*；优选地，pZE-*tdh*-*gre2p* 构建方法为：通过 PCR 扩增得 *tdh* 基因和 *gre2p* 基因，将 *tdh* 基因和 *gre2p* 基因共同连接至含有 IPTG 诱导型启动子的 pZElac 载体上并转化至感受态细胞中，测序后得到质粒 pZE-*tdh*-*gre2p*；pZE-*tdh*-*gre2p* 构建方法示例性为：以大肠杆菌 MG1655 及酿酒酵母

母 S288C 的基因组为模板分别通过 PCR 扩增得 *tdh* 基因和 *gre2p* 基因，将 *tdh* 基因和 *gre2p* 基因共同连接至含有 IPTG 诱导型启动子的 pZElac 载体上并转化至大肠杆菌 *E.coli* dh5a 感受态细胞中，测序后得到质粒 pZE-*tdh*-*gre2p*。

9、根据权利要求 7 所述的异丙醇胺的制备方法，其特征在于，微生物选自大肠杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌、酵母或链霉菌中的一种或几种。

10、根据权利要求 7 所述的异丙醇胺的制备方法，其特征在于，微生物选自大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 或毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中的一种或几种。

11、根据权利要求 4-10 任一项所述的异丙醇胺的制备方法，其特征在于，发酵过程中，发酵温度为 20~90°C。

12、根据权利要求 4-10 任一项所述的异丙醇胺的制备方法，其特征在于，发酵过程中，采用的培养基包括如下比例的原料：M9 盐 11~13g/L，硫酸镁 1~5 g/L，氯化钙 0.1 ~0.5 g/L、硫胺素 0.01~0.05 g/L、辅料 10~100 g/L、酵母粉 3~8 g/L、IPTG 1 ~3mM/L、氯霉素 30~60μg/mL。

13、制备异丙醇胺的重组微生物，所述重组微生物含有氧化酶编码基因和还原酶编码基因；

优选地，氧化酶编码基因包括 *tdh*、*yiaY*、*adhB* 中的任一种或几种，优选为 *tdh*；更优选地，*tdh* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示；

和/或，所述还原酶编码基因包括 *gre2p*、*egsA*、*SU7*、*VIN7* 中的任一种或几种，优选为 *gre2p*；更优选地，*gre2p* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示；

优选地，微生物选自大肠杆菌、芽孢杆菌、棒状杆菌、酵母或链霉菌中的一种或几种；更优选地，微生物选自大肠埃希氏菌 (*Escherichia coli*)、枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)、巨大芽孢杆菌 (*Bacillus megaterium*)、解淀粉芽孢杆菌 (*Bacillus amyloliquefaciens*)、谷氨酸棒状杆菌 (*Corynebacterium glutamicum*)、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)、产朊假丝酵母 (*Candida utilis*) 或毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中的一种或几种。

14、用于制备异丙醇胺的重组 DNA 或生物材料，其特征在于，所述重组微生物或生物材料含有氧化酶编码基因和还原酶编码基因；

优选地，氧化酶编码基因包括 *tdh*、*yiaY*、*adhB* 中的任一种或几种，优选为 *tdh*；更优选地，*tdh* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:1 所示；

和/或，所述还原酶编码基因包括 *gre2p*、*egsA*、*SU7*、*VIN7* 中的任一种或几种，优选为 *gre2p*；更优选地，*gre2p* 基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO:2 所示；

优选地，所述生物材料为表达盒、转座子、质粒载体、噬菌体载体或病毒载体。

15、权利要求 13 所述重组微生物、权利要求 14 所述的重组 DNA 或生物材料在制备异丙醇胺中的应用。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/087079

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 13/00(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/53(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)

IPC: C12P; 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)

CNABS; CNTXT; DWPI; VEN; SIPOABS; WPABSC; ENTXTC; CNKI; 万方数据资源系统, WANFANG Data Resource System; PubMed; ISI Web of Science; Elsevier Science: 元素驱动, 苏氨酸, Thr, Threonine, 2-amino-3-hydroxybutyric acid, 异丙醇胺, 1-氨基-2-丙醇, 1-amino-2-propanol, 1-amino-2-hydroxypropane, aminoisopropanol, MIPA, iso-propanol amino, 2-氨基-3-氧代-丁酸, 2-amino-3-oxobutanoic acid, butanoic acid, 2-amino-3-oxo-, 氨基丙酮, aminoacetone, 1-amino-2-propanone, 制备, preparation, 酶, enzyme, 氧化, 还原, oxidation, oxidase, reduction, reductase, oxidoreductase, 脱氢酶, dehydrogenase, tdh, yiaY, adhB, gre2p, egsA, SU7, VIN7等; 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System; Genbank; EMBL; STN和检索的序列: SEQ ID NOs: 1-2, 72-19-5, 6531-42-6, 65116-81-6, 298-08-8, 78-96-6, 2799-16-8, 2799-17-9等, STN and searched sequences: SEQ ID NOs: 1-2, 72-19-5, 6531-42-6, 65116-81-6, 298-08-8, 78-96-6, 2799-16-8 and 2799-17-9, etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CAMPBELL, R. L. et al. "Formation of D-1-amino-2-propanol from L-threonine by enzymes from Escherichia coli K12" <i>Biochemical and Biophysical Research Communications</i> , Vol. 53, No. 2, 17 July 1973 (1973-07-17), pp. 432-438 see abstract, and p. 435, lines 12-24, and p. 437, lines 1-25	1-15
A	TURNER, J. M. "Microbial metabolism of amino ketones. Aminoacetone formation from 1-aminopropan-2-ol by a dehydrogenase in Escherichia coli" <i>Biochem J.</i> , Vol. 99, No. 2, 31 May 1966 (1966-05-31), pp. 427-433 see abstract	1-15

☒ 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

04 July 2023

Date of mailing of the international search report

16 July 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/087079**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2005222430 A1 (YAEGASHI KEISUKE et al.) 06 October 2005 (2005-10-06) see embodiment 2	1-15
A	CN 107162920 A (SHENYANG GOLD JYOUKI TECHNOLOGY CO., LTD.) 15 September 2017 (2017-09-15) see abstract	1-15
A	CN 1610745 A (DAIICHI PRECISION CHEMICAL CO., LTD.) 27 April 2005 (2005-04-27) see description, p. 7, lines 16-27	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/087079

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/087079

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2005222430	A1	06 October 2005	EP	1586553	A1	19 October 2005
				EP	1586553	B1	22 April 2009
				DE	602005014035	D1	04 June 2009
				US	7223873	B2	29 May 2007
CN	107162920	A	15 September 2017	None			
CN	1610745	A	27 April 2005	US	2004247583	A1	09 December 2004
				US	7166452	B2	23 January 2007
				AU	2002234942	B2	24 March 2005
				DE	60237584	D1	21 October 2010
				CZ	20032343	A3	18 February 2004
				JPWO	2002070714	A1	02 July 2004
				JP	4136663	B2	20 August 2008
				EP	1371731	A1	17 December 2003
				EP	1371731	A4	14 December 2005
				EP	1371731	B1	08 September 2010
				KR	20030096268	A	24 December 2003
				KR	100629642	B1	29 September 2006
				AT	480627	T	15 September 2010
				WO	02070714	A1	12 September 2002
				CA	2440025	A1	12 September 2002
				CA	2440025	C	12 February 2008

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2023/087079

A. 主题的分类

C12P 13/00(2006.01)i; C12N 15/70(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 15/53(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)

IPC: C12P; C12N

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; CNTXT; DWPI; VEN; SIPOABS; WPABSC; ENTXTC; CNKI; 万方数据资源系统; PubMed; ISI Web of Science; Elsevier Science和关键词: 元素驱动, 苏氨酸, Thr, Threonine, 2-amino-3-hydroxybutyric acid, 异丙醇胺, 1-氨基-2-丙醇, 1-amino-2-propanol, 1-amino-2-hydroxypropane, aminoisopropanol, MIPA, iso-propanol amino, 2-氨基-3-氧代-丁酸, 2-amino-3-oxobutanoic acid, butanoic acid, 2-amino-3-oxo-, 氨基丙酮, aminoacetone, 1-amino-2-propanone, 制备, preparation, 酶, enzyme, 氧化, 还原, oxidation, oxidase, reduction, reductase, oxidoreductase, 脱氢酶, dehydrogenase, tdh, yiaY, adhB, gre2p, egsA, SU7, VIN7等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL; STN和检索的序列: SEQ ID NOs: 1-2, 72-19-5, 6531-42-6, 65116-81-6, 298-08-8, 78-96-6, 2799-16-8, 2799-17-9等

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	R. L. Campbell等. "Formation of D-1-amino-2-propanol from L-threonine by enzymes from Escherichia coli K12" Biochemical and Biophysical Research Communications, 第53卷, 第2期, 1973年7月17日 (1973 - 07 - 17), 第432-438页 参见摘要, 第435页第12-24行, 第437页第1-25行	1-15
A	J. M. Turner. "Microbial metabolism of amino ketones. Aminoacetone formation from 1-aminopropan-2-ol by a dehydrogenase in Escherichia coli" Biochem J., 第99卷, 第2期, 1966年5月31日 (1966 - 05 - 31), 第427-433页 参见摘要	1-15
A	US 2005222430 A1 (YAEGASHI KEISUKE等) 2005年10月6日 (2005 - 10 - 06) 参见实施例2	1-15

☒ 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

"D" 申请人在国际申请中引证的文件

"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

2023年7月4日

国际检索报告邮寄日期

2023年7月16日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

何睿

电话号码 (+86) 010-62411106

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 107162920 A（沈阳金久奇科技有限公司）2017年9月15日（2017 - 09 - 15） 参见摘要	1-15
A	CN 1610745 A（第一精密化学股份有限公司）2005年4月27日（2005 - 04 - 27） 参见说明书第7页第16-27行	1-15

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:

b. ☐ 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三. 1(a)),

☐ 附有说明序列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. ☐ 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/087079

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	2005222430	A1	2005年10月6日	EP	1586553	A1	2005年10月19日
				EP	1586553	B1	2009年4月22日
				DE	602005014035	D1	2009年6月4日
				US	7223873	B2	2007年5月29日
CN	107162920	A	2017年9月15日	无			
CN	1610745	A	2005年4月27日	US	2004247583	A1	2004年12月9日
				US	7166452	B2	2007年1月23日
				AU	2002234942	B2	2005年3月24日
				DE	60237584	D1	2010年10月21日
				CZ	20032343	A3	2004年2月18日
				JPWO	2002070714	A1	2004年7月2日
				JP	4136663	B2	2008年8月20日
				EP	1371731	A1	2003年12月17日
				EP	1371731	A4	2005年12月14日
				EP	1371731	B1	2010年9月8日
				KR	20030096268	A	2003年12月24日
				KR	100629642	B1	2006年9月29日
				AT	480627	T	2010年9月15日
				WO	02070714	A1	2002年9月12日
				CA	2440025	A1	2002年9月12日
				CA	2440025	C	2008年2月12日