

## (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2023年9月14日 (14.09.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/169176 A1**

(51) 国际专利分类号:

*C12N 9/06* (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)  
*C12N 15/70* (2006.01) *C12P 13/02* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2023/076669

(22) 国际申请日: 2023年2月17日 (17.02.2023)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

202210214588.5 2022年3月7日 (07.03.2022) CN

(71) 申请人: 中国科学院微生物研究所 (INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。

(72) 发明人: 刘树文 (LIU, Shuwen); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。 温廷益 (WEN, Tingyi); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。 孙佳慧 (SUN, Jiahui); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。 李忠财 (LI, Zhongcai); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。 张芸 (ZHANG, Yun); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。 邓爱华 (DENG, Aihua); 中国北京市朝阳区北辰西路1号院, Beijing 100101 (CN)。

(74) 代理人: 北京大田律师事务所 (BEIJING DATIAN LAW FIRM); 中国北京市石景山区石景山路23号, Beijing 100040 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI,

GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

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

本国际公布:

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

(54) **Title:** ENGINEERING BACTERIUM FOR EXPRESSING ASPARTATE DEHYDROGENASE AND METHOD FOR PRODUCING VITAMIN B5 BY FERMENTATION

(54) 发明名称: 表达天冬氨酸脱氢酶的工程菌及发酵生产维生素B5的方法

(57) **Abstract:** Escherichia coli for expressing aspartate dehydrogenase gene (aspDH) and a method for using same for fermentation production of vitamin B5 (VB5). By comparing the fermentation yield of VB5, it is found that overexpressing the aspDH gene has the best effect. Compared with a high-pollution chemical method for producing vitamin B5, the biological method for producing the vitamin B5 has the advantages such as regenerable raw materials and easy treatment and recyclability of waste residues, wastewater and waste gas, and therefore can be used for industrial production of vitamin B5 in practice and has important application value.

(57) 摘要: 一种表达天冬氨酸脱氢酶基因aspDH的大肠杆菌, 及其用于发酵生产维生素B5 (VB5) 的方法。通过比较VB5的发酵产量, 过表达aspDH基因的效果最好。与高污染的化学法生产维生素B5相比, 生物法生产维生素B5, 具有原料可再生, 废渣、废水和废气易于处理和资源化利用等优点, 从而在实践上可用于维生素B5的工业化生产, 具有重要的应用价值。



WO 2023/169176 A1

## 表达天冬氨酸脱氢酶的工程菌及发酵生产维生素 B5 的方法

### 技术领域

本发明涉及微生物领域，特别涉及表达天冬氨酸脱氢酶的工程菌及发酵生产维生素 B5 的方法。

### 背景技术

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

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

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

微生物发酵法生产 VB5，不仅以可再生的葡萄糖为原料，而且生产过程中形成的废渣、废水和废气易于处理和资源化利用，可有效解决 VB5 产业的高污染问题。微生物利用葡萄糖合成 VB5 的代谢途径的调控机制复杂，发酵产量极低。 $\beta$ -丙氨酸作为 C3 底物与 D-泛解酸合成 VB5。为了提高 VB5 的发酵产量，需要在发酵培养基中外源补加大量的  $\beta$ -丙氨酸 (Sahm, H., et al., (1999) Appl Environ Microb, 65, 1973-1979; Dusch, N., et al., (1999) Appl Environ Microb, 65, 1530-1539; Zhang, B., et al., (2019) Food Chemistry, 294, 267-275.)。  $\beta$ -丙氨酸

可以通过L-天冬氨酸脱羧产生，因此，增强天冬氨酸的生物合成有望提高发酵法生产VB5的产量。

## 发明内容

有鉴于此，本发明通过在发酵法生产VB5的大肠杆菌中分别过表达上述三个酶，发现AspDH比AspC和AspA更有利于提高VB5的发酵产量。

为了实现上述发明目的，本发明提供以下技术方案：

第一方面，本发明提供了增强天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 的表达在生产维生素 B5 中的应用；

作为优选，所述天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 来源于戴尔福特菌 Csl-4 (*Delftia sp.* Csl-4)。

在本发明的一些具体实施方案中，所述天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 具有：

- (I)、如 SEQ ID No.55 所示的核苷酸序列；或
- (II)、如 (I) 所示的核苷酸序列经取代、缺失或添加一个或多个碱基获得的核苷酸序列，且与 (I) 所示的核苷酸序列功能相同或相似的核苷酸序列；或
- (III)、与 (I) 或 (II) 所示的核苷酸序列至少有 80%同源性的核苷酸序列。

在本发明的一些具体实施方案中，还包括：

(1)、在 *cadA* 基因中插入强启动子和/或强 RBS，其中强启动子为 P<sub>gapA</sub>，强 RBS 为 BCD2；

作为优选，所述 BCD2 具有：

- (A)、如 SEQ ID No.2 所示的核苷酸序列；或
- (B)、如 (A) 所示的核苷酸序列经取代、缺失或添加一个或多个碱基获得的核苷酸序列，且与 (A) 所示的核苷酸序列功能相同或相似的核苷酸序列；或
- (C)、与 (A) 或 (B) 所示的核苷酸序列至少有 80%同源性的核苷酸序列；

和/或

(2)、表达了来源于大肠杆菌 BL21 的 *ilvGM* 基因；和/或

(3)、表达了来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD*; 和/或

作为优选, 所述来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD* 具有:

(a)、如 SEQ ID No.1 所示的核苷酸序列; 或

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

(c)、与 (a) 或 (b) 所示的核苷酸序列至少有 80%同源性的核苷酸序列; 和/或

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

第二方面, 本发明还提供了表达载体, 包含天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH*; 作为优选, 所述天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 来源于戴尔福特菌 Csl-4 (*Delftia sp.* Csl-4);

作为优选, 所述天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 具有:

(I)、如 SEQ ID No.56 所示的核苷酸序列; 或

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

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

在本发明的一些具体实施方案中, 所述表达载体还包括:

(i)、强启动子和/或强 RBS;

其中强启动子为 PgapA, 强 RBS 为 BCD2;

作为优选, 所述 BCD2 具有:

(A)、如 SEQ ID No.2 所示的核苷酸序列; 或

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

(C)、与 (A) 或 (B) 所示的核苷酸序列至少有 80%同源性的核苷酸序列;

和/或

(ii)、来源于大肠杆菌 BL21 的 *ilvGM* 基因; 和/或

(iii)、来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD*; 和/或

作为优选, 所述来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD* 具有:

(a)、如 SEQ ID No.1 所示的核苷酸序列; 或

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

(c)、与 (a) 或 (b) 所示的核苷酸序列至少有 80%同源性的核苷酸序列; 和/或

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

第三方面, 本发明还提供了宿主, 表达了天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH*;

作为优选, 所述天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 来源于戴尔福特菌 Csl-4 (*Delftia sp.* Csl-4);

作为优选, 所述天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 具有:

(I)、如 SEQ ID No.56 所示的核苷酸序列; 或

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

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

在本发明的一些具体实施方案中, 所述宿主还包括:

(i)、强启动子和/或强 RBS;

其中强启动子为 PgapA, 强 RBS 为 BCD2;

作为优选, 所述 BCD2 具有:

(A)、如 SEQ ID No.2 所示的核苷酸序列; 或

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

(C)、与(A)或(B)所示的核苷酸序列至少有80%同源性的核苷酸序列;

和/或

(ii)、来源于大肠杆菌 BL21 的 *ilvGM* 基因; 和/或

(iii)、来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD*; 和/或

作为优选,所述来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD* 具有:

(a)、如 SEQ ID No.1 所示的核苷酸序列; 或

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

(c)、与(a)或(b)所示的核苷酸序列至少有80%同源性的核苷酸序列; 和/或

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

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

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

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

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

本发明公开了一种表达天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 的大肠杆菌,及其用于发酵生产维生素 B5 (VB5) 的方法。本发明在 VB5 工程菌中分别增强了三种合成 L-天冬氨酸的途径,分别为 *aspC* 基因编码的天冬氨酸氨基转移酶,将谷氨酸的氨基转移到草酰乙酸产生 L-天冬氨酸和酮戊二酸; *aspA* 基因编码的

天冬氨酸氨裂解酶，催化铵和延胡索酸产生天冬氨酸；*aspDH* 基因编码的天冬氨酸脱氢酶，催化草酰乙酸和铵合成天冬氨酸。通过比较 VB5 的发酵产量，过表达 *aspDH* 基因的效果最好。与高污染的化学法生产维生素 B5 相比，本发明生物法生产维生素 B5，具有原料可再生，废渣、废水和废气易于处理和资源化利用等优点，从而在实践上可用于维生素 B5 的工业化生产，具有重要的应用价值。

## 具体实施方式

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

大肠杆菌有两条产生天冬氨酸的途径，一条可以通过 *aspC* 基因编码的天冬氨酸氨基转移酶，将谷氨酸的氨基转移到草酰乙酸产生 L-天冬氨酸和酮戊二酸；另一条通过 *aspA* 基因编码的天冬氨酸氨裂解酶，催化铵和延胡索酸产生天冬氨酸。此外，在一些古菌中还发现了催化草酰乙酸和铵合成天冬氨酸的天冬氨酸脱氢酶 (Aspartate dehydrogenase, AspDH)。本发明通过在发酵法生产 VB5 的大肠杆菌中分别过表达上述三个酶，发现 AspDH 比 AspC 和 AspA 更有利于提高 VB5 的发酵产量。

为了突破高效合成维生素 B5 的代谢瓶颈，发明人比较了 3 种提高天冬氨酸合成的途径，发现异源的天冬氨酸脱氢 (*aspDH* 基因编码) 途径更适合自身的天冬氨酸转氨途径 (*aspC* 基因编码) 和天冬氨酸氨裂解途径 (*aspA* 基因编码)。

一种天冬氨酸脱氢酶 (AspDH)，催化草酰乙酸与铵根以及 NAD(P)H 反应生成天冬氨酸与水以及 NAD(P)<sup>+</sup> 的可逆反应，由以下微生物中的一种或几种产生：绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*)、克雷伯氏肺炎菌 (*Klebsiella pneumoniae*)、变形斑沙雷氏菌 (*Serratia proteamaculans*)、极端嗜热菌海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*)、需盐色盐杆菌

(*Chromohalobacter salexigens*)、鲍氏不动杆菌(*Acinetobacter baumannii*)、戴尔福特菌 Csl-4 (*Delftia sp. Csl-4*)、人苍白杆菌(*Ochrobactrum anthropi*)、柄杆菌(*Caulobacter sp.*)、马氏甲烷嗜盐菌(*Methanohalophilus mahii*)、柴氏海洋玫瑰杆菌(*Dinoroseobacter shibae*)、嗜酸产甲烷菌(*Methanosphaerula palustris*)、瘤胃甲烷短杆菌(*Methanobrevibacter ruminantium*)等。

在表达的天冬氨酸脱氢酶方面, 本发明使用强启动子调控 *aspDH* 基因的表达。所述启动子可以是强启动子可以是以下启动子或其突变体: L 启动子、trc 启动子、T5 启动子、lac 启动子、tac 启动子、T7 启动子或 *gapA* 启动子。此外, 本发明使用了活性较强 RBS 序列调控 *aspDH* 基因的翻译起始。

本发明将上述高强度的翻译起始和转录起始调控的 *aspDH* 基因整合到发酵法生产 VB5 的大肠杆菌染色体上, 实现外源基因的表达。整合位点为 *cadA* 基因, 该基因编码赖氨酸脱羧酶, 理论上对 VB5 的生物合成没有影响。

在发酵法生产 VB5 的大肠杆菌染色体上相同的 *cadA* 基因位点, 分别整合 *aspA* 和 *aspC* 基因, 并使用相同的启动子调控转录, 比较过表达 *aspA*、*aspC* 和 *aspDH* 基因的 VB5 合成的影响。

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

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

在工程菌 *avtA* 基因上还整合了源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 *panD* 基因。使用相同的强启动子 PPL 和 BCD2 分别调控转录和翻译起始。

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

下述实施例中的实验方法, 如无特殊说明, 均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料, 如无特殊说明, 均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验, 均设置三次重复实验, 结果取平均值。下述实施例中如未特别指明, 实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段和市售的常用仪器、试剂, 可参见《分子克隆实验指南(第3版)》(科学出版社)、《微生物学实验(第4版)》(高等教育出版社) 以及相应仪器和试剂的厂商说明书等参考。

若说明书中记载的序列与序列表中不一致, 则以说明书中记载的序列为准。

大肠杆菌 K12 MG1655: ATCC 编号为 700926。pACYC184 质粒: NEB 公司, 产品目录号 E4152S。质粒 pcas9 购自 Addgene 公司, 货号 62225; 质粒 pTargetF 购自 Addgene 公司, 货号 62226。

下面结合实施例, 进一步阐述本发明:

### 实施例 1 检测方法

使用 HPLC 法定量测定发酵液 VB5 的产量, 具体方法如下。取发酵液上清, 加入纯净水稀释到适当浓度, 用 0.22 $\mu$ m 滤膜过滤。使用色谱柱为 Agilent ZORBAX SB-Aq, 4.6 x250mm, 柱温为 30 $^{\circ}$ C, 检测波长为 210 nm, 流动相流速为 1 mL/min。流动相为 3.12g/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 使用磷酸调节 pH 至 2.2。以从 sigma 公司购买的泛酸钙 (VB5) 为标准品, 测定 0.1-0.5g/L 泛酸钙的浓度与光吸收值的标准曲线。

### 实施例 2 发酵生产 VB5 的工程菌的构建

以 P1 和 P2 为引物, 以野生型大肠杆菌 K12 MG1655 菌株的基因组 DNA 为模板, 使用高保真聚合酶 KAPA HiFi™ HotStar, PCR 扩增的核苷酸序列如 SEQ ID No.3 所示, 其中 10nt-45nt 为启动子 *trc*, 74nt-868nt 为 *panB* 基因的编

码序列, 880nt-1731nt 为 *panC* 基因的编码序列。引物 P1 上设计引入强启动子 *trc*, P1 和 P2 引物 5'端分别设计 BamHI 和 SphI 限制性核酸内切酶位点。PCR 程序为: 98°C 变性 30 秒, 65°C 退火 15 秒, 72 °C 延伸 90 秒, 26 个循环, 获得约 1800bp 的 *P<sub>trc</sub>-panBC* 基因片段。

P1: 5'- CGCGGATCC

CAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGAGCACAACATCAATTTATCA  
GGA

(如 SEQ ID No.10 所示, 下划线所示序列为 BamHI 酶切识别位点, 斜体为启动子 *trc* 的序列)

P2: 5'- ACATGCATGC CCTGTGTTAT GACAGATGAC -3'

(如 SEQ ID No.11 所示, 下划线所示序列为 SphI 酶切识别位点)

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

以大肠杆菌 K12 MG1655 的基因组为模板, 以 P3 和 P4 为引物, PCR 扩增得到的序列如 SEQ ID No.4 所示, 其中 11nt-45nt 为 PJ23119 启动子, 66nt-977nt 为 *panE* 基因的编码序列, 988nt-1731nt 为终止子序列。扩增引物 P3 上设计启动子 PJ23119, 引物 P4 上设计终止子 L3S2P56 序列, P3 和 P4 引物 5'端分别设计 SphI 和 BsaBI 限制性核酸内切酶位点。使用上述的 PCR 反应条件, 扩增得到的 PJ23119-panE 产物, 凝胶电泳鉴定回收后, 使用 SphI 和 BsaBI 双酶切, 同时双酶切 pACYC184-P<sub>trc</sub>-panBC 质粒。凝胶电泳回收双酶切的 PJ23119-panE 和 pACYC184-panBC 质粒, 使用 T4 连接酶连接后, 连接产物化学转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 复苏 1 小时后涂布氯霉素平板。涂布后的平板置于 37°C 培养箱 12 小时, 挑取单菌落传代, 提取重组质粒后进

行测序, 获得正确的重组质粒 pACYC184-panBCE, 从而获得了过表达维生素 B5 终端合成途径基因的重组质粒。

P3: 5'- ACATGCATGC

*ttgacagctagctcagtcctaggtataatgctage*GTTGCGGGTGAGGAGGAACA

(如 SEQ ID No.12 所示, 下划线所示序列为 SphI 酶切识别位点, 斜体为启动子 J23119 的序列)

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

(如 SEQ ID No.13 所示, 下划线所示序列为 BsaBI 酶切识别位点, 斜体为 L3S2P56 终止子序列)

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

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

P5: TGGGTCTACCG TTTTAGAGCT AGAAATAGC (如 SEQ ID NO.14 所示) ;

P6: GCTTGGAAG GACTAGTATT ATACCTAGG (如 SEQ ID NO.15 所示) ;

P7:CG GACTGGAAGA AGATCTG (如 SEQ ID NO.16 所示) ;

P8:TTTCTTAGAC GTCGGAATTG AGACTCATGC ACAGCACGA (如 SEQ ID NO.17 所示) ;

P9:TCGTGCTGT GCATGAGTCTCAATTCCGACGTCTAAGAAAC (如 SEQ ID NO.18 所示) ;

P10:GATCTCCTTT TTAAGTGAAC TTGGGGTTCAG TGCCTCCTGC TGAT (如 SEQ ID NO.19 所示) ;

P11:ATCAGCAGGACGCCTGACCCCAAGTTCCTTAAAAAGGAGATC (如SEQ ID NO.20所示) ;

P12:TGCCGTTTCAT ATTGGTGATG CAAAAACCC CTCAAGACC (如SEQ ID NO.21 所示) ;

P13:GGTCTTGAGGGGTTTTTGCATC ACCAATATGAACGGCA (如SEQ ID NO.22 所示) ;

P14:GCTGATAGAG CTGCTTGGT (如 SEQ ID NO.23 所示) ;

P15: GGAGCTACTC AACTGCTTG (如 SEQ ID NO.24 所示) ;

P16: CGCATAATT GATGCGTATG (如 SEQ ID NO.25 所示) 。

在基因合成公司合成了来源于地衣芽孢杆菌 *Bacillus licheniformis* 天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD* (如 SEQ ID No.1 所示) , 在定制合成上述 *panD* 基因序列时, 通过同义密码子替换去除 XbaI 和 HindIII 限制性内切酶序列。在定制合成上述 *panD* 基因序列时, 在每个 *panD* 序列前同时合成了相同的 BCD2 序列 (如 SEQ ID No.2 所示) , 同时在 BCD2-*panD* 序列的两端加入 XbaI 和 HindIII 限制性酶切位点。合成后的序列连接到载体上。使用限制性内切酶 XbaI 和 HindIII 双酶切上述合成 BCD2-*panD* 的载体和 pET28a (+) 质粒, 凝胶电泳回收得到酶切后的 BCD2-*panD* 的基因片段和线性化载体段, 进一步使用 T4 连接酶连接这两个片段, 连接产物转化至大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞, 在含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上筛选, 获得含有重组质粒的转化子。转化子扩培后提取质粒并将其送测序, 验证获得正确的质粒 pET28a-BCD2-*panDBI*。

使用引物 P7 和 P8 扩增 *avtA* 基因上游序列, 使用引物 P9 和 P10 扩增 PL 启动子, 使用引物 P11 和 P12, 以 pET28a-BCD2-*panDBI* 为模板扩增获得 BCD2-*panDBI*-Ter 基因片段, 使用引物 P13 和 P14 扩增 *avtA* 基因下游游序列。通过重叠 PCR 连接上述 4 个片段, 获得 4 个 DNA 片段的组合体 DonorBI (如 SEQ ID No.5 所示) , 作为基因编辑的模板。其中 SEQ ID No.5 的 1nt-312nt 为靶基因 *avtA* 基因上游序列, 313nt-474nt 为 PL 启动子, 475nt-560nt 为 BCD2 序列, 560nt-943nt 为 *panDBI* 序列, 944nt-995nt 为终止子序列, 996-1261nt 为 *avtA* 基因下游游序列。

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

工程菌 *E. coli* MG1655 *avtA:panDBI/pCas* 接入无抗性的 LB 液体培养基, 37°C 培养 12 小时, 稀释涂布 LB 平板, 分别获得消除 pCas 质粒的工程菌 *E. coli* MG1655 *avtA:panDBI*。基因 *panD* 插入染色体 *avtA* 基因的编码序列, 导致 *AvtA* 失活, 弱化了缬氨酸竞争代谢途径。

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

P17: ACGGTCCACAG TTTTAGAGCT AGAAATAGC (如 SEQ ID NO.26 所示) ;

P18: CGTAGTTACA GACTAGTATT ATACCTAGG (如 SEQ ID NO.27 所示) ;

P19: GGCAGAAAAT CAGCCAGTTC (如 SEQ ID NO.28 所示) ;

P20: TCCACACATT ATACGAGCCG GATGATTAAT TGTC AAGAAC TCTGTAGCAA GGAAGG (如 SEQ ID NO.29 所示) ;

P21:TTGA CAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGA  
CAAGATT CAGGACGGGG AAC (如 SEQ ID NO.30 所示) ;

P22:CGAAAAAAGA CGCTCTAAAA GCGTCTCTTT TCTGGTATAT  
TCCTTTTGCG CTCAG (如 SEQ ID NO.31 所示) ;

P23:CAGAAAAGAGACGCTTTTAGAGCGTCTTTTTTCGTTTTGGAGC  
TACTC AACTGCTTG (如 SEQ ID NO.32 所示) ;

P24:GCCAATATGC AGATGCTCATGAGCATCTGCATATTGG C (如  
SEQ ID NO.33 所示) ;

P25:CACGTTTCGGA TATGAACTG (如 SEQ ID NO.34 所示) ;

P26:CGTCAAGCTT CAGCAACTC (如 SEQ ID NO.35 所示) 。

使用引物 P19 和 P20 扩增 *avtA* 基因上游序列, 使用引物 P21 和 P22 扩增 *E. coli* BL21 的 *ilvG<sup>+</sup>M* 序列, 使用引物 P23 和 P24 扩增 *avtA* 基因下游序列。通过引物 P20 和 P21 引入 *trc* 启动子 TTGA CAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGA, 通过引物 P22 和 P23 引入终止子序列 CCAGAAAAGAGACGCTTTTAGAGCGTCTTTTTTCGTTTT。使用重叠 PCR 连接上述 3 个片段, 获得组合体 DonorilvGM (如 SEQ ID No.6 所示), 作为基因编辑的模板。SEQ ID No.6 的 1-305nt 为靶基因 *avtA* 基因上游序列, 306nt-341nt 为 *trc* 启动子, 367nt-2013nt 为源于 *E.coli* BL21 的 *ilvG<sup>+</sup>* 基因的编码序列, 2010nt-2273nt 为 *ilvM* 基因的编码序列, 2274-2328 为终止子序列, 2329-2629 为 *avtA* 基因下游游序列。

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

使用上述 Q5® 突变试剂盒和引物 P27 和 P28 突变 pTargetF 载体的 N20 序列, 突变后 pTargetF 命名为 pTargetFcadA。

P27: TCATATCTCCG TTTTAGAGCT AGAAATAGC (如 SEQ ID NO.36 所示) ;

P28: CTATGAACGT GACTAGTATT ATACCTAGG (如 SEQ ID NO.37 所示) ;

P29: GTTGCGT GTTCTGCTTC ATC (如 SEQ ID NO.38 所示) ;

P30: CCAGTTGGTG TTAATGTTTT GCTCCCAACA CATGGGACA (如 SEQ ID NO.39 所示) ;

P31: TGTCC CATGTGTTGG GAGCA AAACATTAACACCAACTGG (如 SEQ ID NO.40 所示) ;

P32: CTCCTTAGCA TGATTAAGAT GGTGAATAAA AGGTTGCCTG T (如 SEQ ID NO.41 所示) ;

P33: ACAGGCAACCTT TTATTCACCATCTTAATCATGCTAAGGAG (如 SEQ ID NO.42 所示) ;

P34: GCTAATTTCT TCGCACAGCT GGACCAAAC GAAAAAAGAC G (如 SEQ ID NO.43 所示) ;

P35: CGTCTTTTTTCGTTTTGGTCCAGCTGTG CGAAGAAATT AGC (如 SEQ ID NO.44 所示) ;

P36: TCGTCAGTGG TCTGCTTGA (如 SEQ ID NO.45 所示) ;

P37: CTAC TCTTGCGTTG ACCTGA (如 SEQ ID NO.46 所示) ;

P38:GTGACCAGGA GTACAGAAAG (如 SEQ ID NO.47 所示) 。

以大肠杆菌 MG1655 基因组为模板, 使用引物 P29 和 P30 扩增 *cadA* 基因上游序列, 使用引物 P31 和 P32 扩增 *gapA* 启动子, 使用引物 P35 和 P36 扩增 *cadA* 基因下游序列。从基因合成公司合成了含 RBS 和终止子的 *aspDH* 基因, 使用引物 P33 和 P34 扩增 RBS-*aspDH*-Ter 序列。通过重叠 PCR 连接上述 4 个片段, 获得组合体 DonoraspDH (如 SEQ ID No.7 所示), 作为基因编辑的模板。SEQ ID No.7 的 1-210nt 为靶基因 *cadA* 基因上游序列, 211nt-480nt 为 *gapA* 启动子, 481nt-509nt 为 RBS 序列, 510nt-1307nt 源于戴尔福特菌 Csl-4 的 *aspDH* 基因的编码序列 (如 SEQ ID No.56 所示), 1308nt-1360nt 为终止子序列, 1361-1535 为 *cadA* 基因下游序列。

取 2 微升 pTargetFcadA 质粒和 10 微升 DonoraspDH 模板 DNA, 电转化至 *E. coli* MG1655 *avtA:panDBI-ilvG<sup>+</sup>M/pCas* 感受态细胞, 涂布含有 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 壮观霉素的双抗性平板, 30°C 培养。使用引物 P37 和 P38 鉴定在 *cadA* 基因上整合 PgapA-aspDH-Ter 的单菌落, 测序验证大小正确的 PCR 产物。挑选测序正确的单菌落, 加入 0.2mM 的 IPTG 培养, 消除 pTargetFcadA 质粒。进一步接入无抗性的 LB 液体培养基, 37°C 培养 12 小时, 稀释涂布 LB 平板, 获得消除 pCas 质粒的工程菌 *E. coli* MG1655 *avtA:panDBI-ilvG<sup>+</sup>M-aspDH*。

以大肠杆菌 MG1655 基因组为模板, 使用引物 P29 和 P30 扩增 *cadA* 基因上游序列, 使用引物 P31 和 P39 扩增 *gapA* 启动子, 使用引物 P40 和 P41 扩增 *aspC* 基因, 使用引物 P42 和 P36 扩增 *cadA* 基因下游序列。通过重叠 PCR 连接上述 4 个片段, 获得组合体 DonoraspC (如 SEQ ID No.8 所示), 作为基因编辑的模板。SEQ ID No.8 的 1-210nt 为靶基因 *cadA* 基因上游序列, 211nt-480nt 为 *gapA* 启动子, 611nt-1801nt 为 *aspC* 基因的编码序列, 1992-2166 为 *cadA* 基因下游序列。

取 2 微升 pTargetFcadA 质粒和 10 微升 DonoraspC 模板 DNA, 电转化至 *E. coli* MG1655 *avtA:panDBI-ilvG<sup>+</sup>M/pCas* 感受态细胞, 涂布含有 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 壮观霉素的双抗性平板, 30°C 培养。使用引物 P37 和 P38 鉴定在 *cadA* 基因上整合 PgapA-aspC 的单菌落, 测序验证大小正确的 PCR 产物。挑选测序正确的单菌落, 加入 0.2mM 的 IPTG 培养, 消除 pTargetFcadA 质粒。进一步接入无抗性的 LB 液体培养基, 37°C 培养 12 小时, 稀释涂布 LB 平板, 获得消除 pCas 质粒的工程菌 *E. coli* MG1655 *avtA:panDBI-ilvG<sup>+</sup>M-aspC*。

P39: GAGATTGCTC TGGAAGGTAT AGTGAATAAA AGGTTGCCTG  
T (如 SEQ ID NO.48 所示) ;

P40: ACAGGCAACCTT TTATTCACTATACCTTCC AGAGCAATCT C  
(如 SEQ ID NO.49 所示) ;

P41: GCTAATTCT TCGCACAGCT CCTGGATTTC TGGCAAAGTG  
(如 SEQ ID NO.50 所示) ;

P42: CACTTTGCC AGAAATCCAG GAGCTGTG CGAAGAAATT AGC  
(如 SEQ ID NO.51 所示) 。

以大肠杆菌 MG1655 基因组为模板, 使用引物 P29 和 P30 扩增 *cadA* 基因上游序列, 使用引物 P31 和 P43 扩增 *gapA* 启动子, 使用引物 P44 和 P45 扩增 *aspA* 基因, 使用引物 P46 和 P36 扩增 *cadA* 基因下游序列。通过重叠 PCR 连接上述 4 个片段, 获得组合体 DonoraspA (如 SEQ ID No.9 所示), 作为基因编辑的模板。SEQ ID No.9 的 1-210nt 为靶基因 *cadA* 基因上游序列, 211nt-480nt 为 *gapA* 启动子, 504nt-1940nt 为 *aspA* 基因的编码序列, 2004-2178 为 *cadA* 基因下游序列。

取 2 微升 pTargetFcadA 质粒和 10 微升 DonoraspA 模板 DNA, 电转化至 *E. coli* MG1655 *avtA:panDBI-ilvG<sup>+</sup>M/pCas* 感受态细胞, 涂布含有 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 壮观霉素的双抗性平板, 30°C 培养。使用引物 P37 和 P38 鉴定在 *cadA* 基因上整合 P<sub>gapA</sub>-*aspA* 的单菌落, 测序验证大小正确的 PCR 产物。挑选测序正确的单菌落, 加入 0.2mM 的 IPTG 培养, 消除 pTargetFcadA 质粒。进一步接入无抗性的 LB 液体培养基, 37°C 培养 12 小时, 稀释涂布 LB 平板, 获得消除 pCas 质粒的工程菌 *E. coli* MG1655 *avtA:panDBI-ilvG<sup>+</sup>M-aspA*。

P43: GAACCTTCTT TTTCAAGCTG CGTGAATAAA AGGTTGCCTG T  
(如 SEQ ID NO.52 所示) ;

P44: ACAGGCAACCTT TTATTCACGCAGCTTGAAAAA GAAGGTTC  
(如 SEQ ID NO.53 所示) ;

P45: GCTAATTTCT TCGCACAGCT CTGCTCACAA GAAAAAAGGC  
(如 SEQ ID NO.54 所示) ;

P46: GCCTTTTTTC TTGTGAGCAGAGCTGTG CGAAGAAATT AGC (如 SEQ ID NO.55 所示) 。

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

**SEQ ID No.1**

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

**SEQ ID No.2**

CCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCGTACT  
GAAACATCTTAATCATGCTAAGGAGGTTTTCTAATG

**SEQ ID No.3**

CGCGGATCC TTGA CAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGA\_  
GCACAACA  
TCAATTTATCAGGATACGTTATGAAACCGACCACCATCTCCTTACTGCA  
GAAGTACAAAC  
AGGAAAAAAAAACGTTTCGCGACCATCACCGCTTATGACTATAGCTTCG  
CCAAACTCTTTG  
CTGATGAAGGGCTTAACGTCATGCTGGTGGGCGATTGCTGGGCATGA  
CGGTTTCAGGGGC  
ACGACTCCACCCTGCCAGTTACCGTTGCCGATATCGCCTACCACACTGC  
CGCCGTACGTC  
GCGGCGCACCAAACCTGCCTGCTGCTGGCTGACCTGCCGTTTATGGCGTA  
TGCCACGCCGG

AACAAGCCTTCGAAAACGCCGCAACGGTTATGCGTGCCGGTGCTAACA  
TGGTCAA AATTG  
AAGGCGGTGAGTGGCTGGTAGAAACCGTACAAATGCTGACCGAACGTG  
CCGTTCTGTAT  
GTGGTCACTTAGGTTTAACACCACAGTCAGTGAATATTTTCGGTGGCTA  
CAAAGTTCAGG  
GGCGCGGCGATGAAGCGGGCGATCAACTGCTCAGCGATGCATTAGCCT  
TAGAAGCTGCTG  
GGCACAGCTGCTGGTGCTGGAATGCGTGCCGGTTGAACTGGCAAAC  
GTATTACCGAAG  
CACTGGCGATCCCGGTTATTGGCATTGGCGCAGGCAACGTCACTGACG  
GGCAGATCCTCG  
TGATGCACGACGCCTTTGGTATTACCGGCGGTCACATTCCTAAATTTCG  
TAAAAATTTCC  
TCGCCGAAACGGGCGACATCCGCGCGGCTGTGCGGCAGTATATGGCTG  
AAGTGGAGTCCG  
GCGTTTATCCGGGCGAAGAACACAGTTTCCATTAAGGAGTCACGTTGTG  
TTAATTA  
TCGAAACCCTGCCGCTGCTGCGTCAGCAAATTCGCCGCCTGCGTATGGA  
AGGCAAGCGCG  
TGGCGCTGGTGCCTACCATGGGTAACCTGCACGATGGCCATATGAAGC  
TGGTCGACGAAG  
CCAAAGCCCGCGCCGATGTGGTCGTCGTCAGTATTTTCGTAAACCCGAT  
GCAGTTCGACC  
GCCCGGAAGATCTGGCTCGTTATCCACGGACCTTGCAGGAGGACTGCG  
AGAAGCTAAACA  
AACGTAAAGTGGATTTAGTTTTCGCCCCCTTCGGTAAAAGAGATCTACCC  
GAACGGTACTG  
AAACCCACACTTACGTTGACGTTCTGGCCTTTCGACCATGCTGGAAGG  
TGCCAGCCGTC

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

**SEQ ID No.4**

ACATGCATGC ttgacagctagctcagtcctaggtataatgctagc  
GTTGCGGGTGAGGAGGAACAATGAAAATTACCGTATTGGGATGCGGTG  
CCTTAGGGCAAT  
TATGGCTTACAGCACTTTGCAAACAGGGTCATGAAGTTCAGGGCTGGCT  
GCGCGTACCGC  
AACCTTATTGTAGCGTGAATCTGGTTGAGACAGATGGTTCGATATTTAA  
CGAATCGCTGA  
CCGCCAACGATCCCGATTTTCTCGCCACCAGCGATCTGCTCCTGGTGAC  
GCTGAAAGCAT

GGCAGGTTTCCGATGCCGTCAAAAGCCTCGCGTCCACACTGCCTGTAAC  
TACGCCAATAC  
TGTTAATTCACAACGGCATGGGCACCATCGAAGAGTTGCAAAACATTC  
AGCAGCCATTAC  
TGATGGGCACCACCACCCATGCAGCCCGCCGCGACGGCAATGTCATTA  
TTCATGTGGCAA  
ACGGTATCACGCATATTGGCCCGGCACGGCAACAGGACGGGGATTACA  
GTTATCTGGCGG  
ATATTTTGCAAACCGTGTTGCCTGACGTTGCCTGGCATAACAATATTCG  
CGCCGAGCTGT  
GGCGCAAGCTGGCAGTCAACTGCGTGATTAATCCACTGACTGCCATCTG  
GAATTGCCCGA  
ACGGTGAATTACGTCATCATCCGCAAGAAATTATGCAGATATGCGAAG  
AAGTCGCGGGCGG  
TGATCGAACGCGAAGGGCATCATACTTCAGCAGAAGATTTGCGTGATT  
ACGTGATGCAGG  
TGATTGATGCCACAGCGGAAAATATCTCGTCGATGTTGCAGGATATCCG  
CGCGCTGCGCC  
ACACTGAAATCGACTATATCAATGGTTTTCTCTTACGCCGCGCCCGCGC  
GCATGGGATTG  
CCGTACCGGAAAACACCCGCCTGTTTGAAATGGTAAAAGAAAGGAGA  
GTGAATATGAGC  
GCATCGGCACTGGTTTTGCCTCGCCCCTGGTAGTGAAGAGACTAATTTTC  
GAAAAAAGACGCTGAAAAGCGTCTTTTTTCGTTTTGGGATCTAAATCGA  
G

**SEQ ID No.5**

CG GACTGGAAGA AGATCTGTTT GTCTCTGCGE  
GTCCGAATAT TGAAGTCTG CCGGAAGGCC AGTTTAAATA  
CCACGTCGAT TTTGAGCATC

TGCATATTGG CGAAGAAACC GGGATGATTT GCGTCTCCCG  
GCCGACGAAT CCAACAGGCA  
ATGTGATTAC TGACGAAGAG TTGCTGAAGC TTGACGCGCT  
GGCGAATCAA CACGGCATT  
CGCTGGTGAT TGATAACGCT TATGGCGTCC CGTTCCCGGG  
TATCATCTTC AGTGAAGCGC  
GCCCGCTATG GAATCCGAAT ATCGTGCTGT GCATGAGTCT  
CAATTCCGACGTCTAAGAAACCATT  
ATTATCATGACATTAACCTATAAAA  
TAGGCGTATCACGAGGCCCTTTCGTC  
TTCACCTCGAGTCCCTATCAGTGATA  
GAGATTGACATCCCTATCAGTGATAG  
AGATACTGAGCACATCAGCAGGACG  
CACTGACC  
GGGCCCAAGTTCACTTAAAAAGGAGATCAACAATGAAAGCAATTTTCG  
TACTGAAACATCTTAATCATGCTAAGGAGGTTTTCTA  
ATGTACCGTA CGTTAATGAG CGCAAACTT CACAGAGCGA  
GAGTGACGGA AGCCAATTTG  
AACTACGTCG GCAGCGTGAC AATTGATGAA GATTTGCTGG  
ATGCTGTCCG AATGATGGCA  
AATGAAAAAG TGCAAATTGT GAATAATAAT AACGGGGCCC  
GGCTGGAAAC GTACATTATT  
CCCGGTGAAA GGGGCAGCGG CGTCGTTTGT TTAAACGGAG  
CTGCCGCCCC CCTTGTCCAG  
GTTGGAGATG TCGTCATCAT CGTGTCTTAT GCGATGATGT  
CTGAAGAGGA AGCAAAGACC  
CATAAGCCGA AGGTTGCCGT TTTGAACGAG AGAAACGAAA  
TCGAGGAAAT GCTGGGTCAG  
GAGCCAGCCC GTACCATTCT GTAA

AAGC

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

**SEQ ID No.6**

GGCAGAAAAT CAGCCAGTTC CGCGCCCGCC ATCCCGCAAT  
TGGCGCGGGC AAACAAACGA  
CACTTTTGCT GAAGCAGGGC TACGGCTTTG TTCGTGAGCA  
TGGCGACGAT AAAGTGCTGG  
TCGTCTGGGC AGGGCAACAG TAACTTTTCC GGCTTCCCGT  
TCGTCAGTAC CTCGGGAAGC  
CGCCAACCAG GATAAAATGT CAGCCCTAAT CAGCGTTGCA  
GGATAAAGCA CCGCTCACTC  
TTCAACAGAC CGATTTGCAC CCCAGCAAAT GTAGCGTTAT  
TGTTACCTTC CTTGCTACAG  
AGTTCTTGA CAATTAATCATCCGGCTCGTATAATGTGTGGA  
CAAGATT CAGGACGGGG AACTAACTAT G  
AATGGCGCACAGTGGGTGGTACATGCGTTGCGGGCACAGGGTGTGAAC  
ACCGTTTTTCGGTTATCCGGGTGGCGCAATTATGCCGGTTTACGATGCAT  
TGTATGACGGCGGCGTGGAGCACTTGCTATGCCGACATGAGCAGGGTG  
CGGCAATGGCGGCTATCGGTTATGCTCGTGCTACCGGCAAACTGGCG  
TATGTATCGCCACGTCTGGTCCGGGCGCAACCAACCTGATAACCGGGCT

TGCGGACGCACTGTTAGATTCCATCCCTGTTGTTGCCATCACCGGTCAA  
GTGTCCGCACCGTTTATCGGCACTGACGCATTTTCAGGAAGTGGATGTCC  
TGGGATTGTCGTTAGCCTGTACCAAGCACAGCTTTCTGGTGCAGTCGCT  
GGAAGAGTTGCCGCGCATCATGGCTGAAGCATTTCGACGTTGCCTGCTC  
AGGTCGTCCTGGTCCGGTTCTGGTCGATATCCCAAAGATATCCAGTTA  
GCCAGCGGTGACCTGGAACCGTGGTTCACCACCGTTGAAAACGAAGTG  
ACTTTCCACATGCCGAAGTTGAGCAAGCGCGCCAGATGCTGGCAAAA  
GCGCAAAAACCGATGCTGTACGTTGGCGGTGGCGTGGGTATGGCGCAG  
GCAGTTCCGGCTTTGCGTGAATTTCTCGCTGCCACAAAATGCCTGCCA  
CCTGTACGCTGAAAGGGCTGGGCGCAGTAGAAGCAGATTATCCGTA  
ATCTGGGCATGCTGGGAATGCATGGCACCAAAGCGGGCGAACTTCGCGG  
TGCAGGAGTGCGACTTGCTGATCGCCGTGGGTGCACGTTTTGATGACCG  
GGTGACCGGCAAACCTGAACACCTTCGCACCACACGCCAGTGTTATCCA  
TATGGATATCGACCCGGCAGAAATGAACAAGCTGCGTCAGGCACATGT  
GGCATTACAAGGTGATTTAAATGCTCTGTTACCAGCATTACAGCAGCCG  
TTAAATAFCAATGACTGGCAGCTACACTGCGCGCAGCTGCGTGATGAA  
CATGCCTGGCGTTACGACCATCCCGGTGACGCTATCTACGCGCCGTTGT  
TGTTAAAACAACTGTCAGATCGTAAACCTGCGGATTGCGTCGTGACCAC  
AGATGTGGGGCAGCACCAGATGTGGGCTGCGCAGCACATCGCCCACAC  
TCGCCCGGAAAATTTTCATCACCTCCAGCGGCTTAGGCACCATGGGTTTT  
GGTTACCGGCGGCGGTTGGCGCGCAAGTCGCGCGACCAAACGATAACC  
GTCGTCTGTATCTCCGGTGACGGCTCTTTCATGATGAATGTGCAAGAGC  
TGGGCACCGTAAAACGCAAGCAGTTACCGTTGAAAATCGTCTTACTCG  
ATAACCAACGGTTAGGGATGGTTCGACAATGGCAGCAACTGTTTTTCCA  
GGAACGATATAGCGAAACCACCCTTACCGATAACCCCGATTTCTCATG  
TTAGCCAGCGCCTTCGGCATCCCTGGCCAACACATCACCCGTAAAGACC  
AGGTTGAAGCGGCACTCGACACCATGCTGAACAGTGATGGGCCATAACC  
TGCTTCATGTCTCAATCGACGAACTTGAGAACGTCTGGCCGCTGGTGCC  
GCCTGGTGCCAGTAATTCAGAAATGTTGGAGAAATTATCATGATGCAA  
CATCAGGTCAATGTATCGGCTCGCTTCAATCCAGAAACCTTAGAACGTG

TTTTACGCGTGGTGCGTCATCGTGGTTTCCACGTCTGCTCAATGAATAT  
 GGCCGCCGCCAGCGATGCACAAAATATAAATATCGAATTGACCGTTGC  
 CAGCCCACGGTCGGTCGACTTACTGTTTAGTCAGTTAAATAAACTGGTG  
 GACGTCGCACACGTTGCCATCTGCCAGAGCACAACCACATCACAACAA  
 ATCCGCGCCTGAGCG

CAAAAGGAATATACCAGAAAAGAGACGCTTTTAGAGCGTCTTTTTTCGT  
 TTT

GGAGCTACTC AACTGCTTG CCGGAATGCT GCGCGAGAAG  
 TTGGGTTGGG

ATATCGAACC ACAGAATATT GCACTAACAA ACGGCAGCCA  
 GAGCGCGTTT TTCTACTTAT

TTAACCTGTT TGCCGGACGC CGTGCCGATG GTCGGGTCAA  
 AAAAGTGCTG TTCCCGCTTG

CACCGGAATA CATTGGCTAT GCTGACGCCG GACTGGAAGA  
 AGATCTGTTT GTCTCTGCGE

GTCCGAATAT TGAAGTCTG CCGGAAGGCC AGTTTAAATA  
CCACGTCGAT TTTGAGCATC

TGCATATTGG C

**SEQ ID No.7** RBS-aspDH-ter L3S2P56

GTTGCGT GTTCTGCTTC ATCGCGCTGA TGGGCGCAAG

CTCCTTCGAG CTGGCAGGTA CCTTCATCGT CAGCCTGATT

ATCCTGATGT TCTACGCTCG

CAAAATGCAC GAGCGCCAGA GCCACTCAAT GGATAACCAC

ACCGCGTCTA ACGCACATTA

ATTAAAAGTA TTTTCCGAGG CTCCTCCTTT CATTGTTGCC

CATGTGTTGG GAG

CA AAACATTAAC

ACCAACTGGC AAAATTTTGT CCTAAACTTG ATCTCGACGA

AATGGCTGCA CCTAAATCGT

GATGAAAATC ACATTTTTAT CGTAATTGCC CTTTAAAATT  
CGGGGCGCCG ACCCCATGTG  
GTCTCAAGCC CAAAGGAAGA GTGAGGCGAG TCAGTCGCGT  
AATGCTTAGG CACAGGATTG  
ATTTGTCGCA ATGATTGACA CGATTCCGCT TGACGCTGCG  
TAAGGTTTTT GTAATTTTAC  
AGGCAACCTT TTATTCAC  
CATCTTAATCATGCTAAGGAGGTTTTCTAATGAATATTGCTGTGATTGG  
CTGCGGTGCGATTGGCGCCA  
GCGTGCTCGAACTGCTCAAGGGCCATGCCGCGGTGCAGGTGGGCTGGG  
TGCTTGTGCCCCG  
AAGTGACGGACGCCGTGCGCGCCACCCTGGCCCGGCATGCGCCCCAGG  
CGCGCGCACTGC  
CTGCGCTGACGACTGAAGACCGGCCCGACCTTATCGTCGAATGCGCAG  
GCCATAACGCCA  
TCGAAGAGCATGTGCTGCCCCGCCCTGCGGGCGCGGCATTCCTGCCGTCGT  
GGCCTCCATCG  
GCGCACTCAGCGCCCCCGGCATGGCCGAGGCCGTTTCAGGCCGCGGCCG  
AGGCCGGAGGCA  
CCCAGGTGCAATTGCTGTCTGGGCGCCATCGGCGGCGTGGATGCGCTGG  
CCGCAGCCCCGCA  
TCGGCGGCCTGGACGAAGTGGTCTACACCGGCCGCAAGCCGCCCTGG  
CCTGGACCGGCA  
CGCCCGCAGAACAGCGCTGCGACCTCGCCAGCCTCAAGGAAGCCTTCT  
GCATCTTCGAAG  
GCAGCGCACGCGAGGCCGCCAGCTCTACCCCAAGAACGCCAACGTGG  
CCGCCACCCTGT  
CGCTGGCCGGCATGGGCCTGGACCGCACACGGTGCGCCTGTACGCCG  
ACCCGGCCGTGG

ACGAAAACGTGCACCATGTGGCCGCGCGCGGGCGCCTTCGGTTCCATGG  
AATTGACCATGC  
GCGGCAAGCCGCTGGAGGCCAACCCCAAGACCTCGGGCCCTCACCGTCT  
ACAGCGTGGTGC  
GCGCCGTGCTCAACCAGGCCACGGCCATCGCCATCTAAGCCGCACCTTT  
TCGAAAAAAGACGCTGAAAAGCGTCTTTTTTCGTTTTGGTCC  
AGCTGTG CGAAGAAATT AGCAAAATGA  
ACGAGAACCT GCCGTTGTAC GCGTTCGCTA ATACGTATTC  
CACTCTCGAT GTAAGCCTGA  
ATGACCTGCG TTTACAGATT AGCTTCTTTG AATATGCGCT  
GGGTGCTGCT GAAGATATTG  
CTAATAAGAT CAAGCAGACC ACTGACGA

**SEQ ID No.8**

GTTGCGT GTTCTGCTTC ATCGCGCTGA TGGGCGCAAG  
CTCCTTCGAG CTGGCAGGTA CCTTCATCGT CAGCCTGATT  
ATCCTGATGT TCTACGCTCG  
CAAAATGCAC GAGCGCCAGA GCCACTCAAT GGATAACCAC  
ACCGCGTCTA ACGCACATTA  
ATTAAAAGTA TTTTCCGAGG CTCCTCCTTT CATT<sup>TT</sup>GTCC  
CATGTGTTGG GAG  
CA AAACATTAAC  
ACCAACTGGC AAAATTTTGT CCTAAACTTG ATCTCGACGA  
AATGGCTGCA CCTAAATCGT  
GATGAAAATC ACATTTTTAT CGTAATTGCC CTTTAAAATT  
CGGGGCGCCG ACCCCATGTG  
GTCTCAAGCC CAAAGGAAGA GTGAGGCGAG TCAGTCGCGT  
AATGCTTAGG CACAGGATTG  
ATTTGTCGCA ATGATTGACA CGATTCCGCT TGACGCTGCG  
TAAGGTTTTT GTAATTTTAC  
AGGCAACCTT TTATTCAC

TATACCTTCC AGAGCAATCT CACGTCTTGC AAAAACAGCC  
TGC GTTTTCA  
TCAGTAATAG TTGGAATTTT GTAAATCTCC CGTTACCCTG  
ATAGCGGACT TCCCTTCTGT  
AACCATAATG GAACCTCGTC atgTTTGAGA ACATTACCGC  
CGCTCCTGCC GACCCGATTC  
TGGGCCTGGC CGATCTGTTT CGTGCCGATG AACGTCCCGG  
CAA AATTAAC CTCGGGATTG  
GTGTCTATAA AGATGAGACG GGCAAAACCC CGGTACTGAC  
CAGCGTGAAA AAGGCTGAAC  
AGTATCTGCT CGAAAATGAA ACCACCAAAA ATTACCTCGG  
CATTGACGGC ATCCCTGAAT  
TTGGTCGCTG CACTCAGGAA CTGCTGTTTG GTAAAGGTAG  
CGCCCTGATC AATGACAAAC  
GTGCTCGCAC GGCACAGACT CCGGGGGGCA CTGGCGCACT  
ACGCGTGGCT GCCGATTTCC  
TGGCAAAAAA TACCAGCGTT AAGCGTGTGT GGGTGAGCAA  
CCCAAGCTGG CCGAACCATA  
AGAGCGTCTT TAACTCTGCA GGTCTGGAAG TTCGTGAATA  
CGCTTATTAT GATGCGGAAA  
ATCACACTCT TGA CTTCGAT GCACTGATTA ACAGCCTGAA  
TGAAGCTCAG GCTGGCGACG  
TAGTGCTGTT CCATGGCTGC TGCCATAACC CAACCGGTAT  
CGACCCTACG CTGGAACAAT  
GGCAAACACT GGCACA ACTC TCCGTTGAGA AAGGCTGGTT  
ACCGCTGTTT GACTTCGCTT  
ACCAGGGTTT TGCCCGTGGT CTGGAAGAAG ATGCTGAAGG  
ACTGCGCGCT TTCGCGGCTA  
TGCATAAAGA GCTGATTGTT GCCAGTTCCT ACTCTAAAAA  
CTTTGGCCTG TACAACGAGC

GTGTTGGCGC TTGTACTCTG GTTGCTGCCG ACAGTGAAAC  
CGTTGATCGC GCATTCAGCC  
AAATGAAAGC GGCGATTCGC GCTAACTACT CTAACCCACC  
AGCACACGGC GCTTCTGTTG  
TTGCCACCAT CCTGAGCAAC GATGCGTTAC GTGCGATTG  
GGAACAAGAG CTGACTGATA  
TGCGCCAGCG TATTCAGCGT ATGCGTCAGT TGTTTCGTCAA  
TACGCTGCAG GAAAAAGGCG  
CAAACCGCGA CTTCAGCTTT ATCATCAAAC AGAACGGCAT  
GTTCTCCTTC AGTGGCCTGA  
CAAAGAACA AGTGCTGCGT CTGCGCGAAG AGTTTGGCGT  
ATATGCGGTT GCTTCTGGTC  
GCGTAAATGT GGCCGGGATG ACACCAGATA ACATGGCTCC  
GCTGTGCGAA GCGATTGTGG  
CAGTGCTGta aGCATTAAAA ACAATGAAGC CCGCTGAAAA  
GCGGGCTGAG ACTGATGACA  
AACGCAACAT TGCCTGATGC GCTACGCTTA TCAGGCCTAC  
GCGTCCCCTG CAATATTTTG  
AATTTGCACG ATTTTGTAGG CCGGATAAGG CGCTCGTGCC  
GCATCCGGCA TAAACAAAGC  
    GCACTTTGCC AGAAATCCAG G  
AGCTGTG CGAAGAAATT AGCAAAATGA  
ACGAGAACCT GCCGTTGTAC GCGTTCGCTA ATACGTATTC  
CACTCTCGAT GTAAGCCTGA  
ATGACCTGCG TTTACAGATT AGCTTCTTTG AATATGCGCT  
GGGTGCTGCT GAAGATATTG  
CTAATAAGAT CAAGCAGACC ACTGACGA  
**SEQ ID No.9**  
GTTGCGT GTTCTGCTTC ATCGCGCTGA TGGGCGCAAG

CTCCTTCGAG CTGGCAGGTA CCTTCATCGT CAGCCTGATT  
ATCCTGATGT TCTACGCTCG  
CAAATGCAC GAGCGCCAGA GCCACTCAAT GGATAACCAC  
ACCGCGTCTA ACGCACATTA  
ATTAAAAGTA TTTTCCGAGG CTCCTCCTTT CATTTTGTCC  
CATGTGTTGG GAG  
CA AAACATTAAC  
ACCAACTGGC AAAATTTTGT CCTAAACTTG ATCTCGACGA  
AATGGCTGCA CCTAAATCGT  
GATGAAAATC ACATTTTTAT CGTAATTGCC CTTTAAAATT  
CGGGGCGCCG ACCCCATGTG  
GTCTCAAGCC CAAAGGAAGA GTGAGGCGAG TCAGTCGCGT  
AATGCTTAGG CACAGGATTG  
ATTTGTCGCA ATGATTGACA CGATTCCGCT TGACGCTGCG  
TAAGGTTTTT GTAATTTTAC  
AGGCAACCTT TTATTCAC  
GCA  
GCTTGAAAAA GAAGGTTTAC atgTCAAACA ACATTCGTAT  
CGAAGAAGAT CTGTTGGGTA  
CCAGGGAAGT TCCAGCTGAT GCCTACTATG GTGTTCACAC  
TCTGAGAGCG ATTGAAAAC  
TCTATATCAG CAACAACAAA ATCAGTGATA TTCCTGAATT  
TGTTTCGCGGT ATGGTAATGG  
TTAAAAAAGC CGCAGCTATG GCAAACAAAG AGCTGCAAAC  
CATTCCTAAA AGTGTAGCGA  
ATGCCATCAT TGCCGCATGT GATGAAGTCC TGAACAACGG  
AAAATGCATG GATCAGTTCC  
CGGTAGACGT CTACCAGGGC GGCGCAGGTA CTTCCGTAAA  
CATGAACACC AACGAAGTGC

TGGCCAATAT CGGTCTGGAA CTGATGGGTC ACCAAAAAGG  
TGAATATCAG TACCTGAACC  
CGAACGACCA TGTTAACAAA TGTCAGTCCA CTAACGACGC  
CTACCCGACC GGTTTCCGTA  
TCGCAGTTTA CTCTTCCCTG ATTAAGCTGG TAGATGCGAT  
TAACCAACTG CGTGAAGGCT  
TTGAACGTAA AGCTGTCGAA TTCCAGGACA TCCTGAAAAT  
GGGTCGTACC CAGCTGCAGG  
ACGCAGTACC GATGACCCTC GGTCAGGAAT TCCGCGCTTT  
CAGCATCCTG CTGAAAGAAG  
AAGTGAAAAA CATCCAACGT ACCGCTGAAC TGCTGCTGGA  
AGTTAACCTT GGTGCAACAG  
CAATCGGTAC TGGTCTGAAC ACGCCGAAAG AGTACTCTCC  
GCTGGCAGTG AAAAAACTGG  
CTGAAGTTAC TGGCTTCCCA TGCGTACCGG CTGAAGACCT  
GATCGAAGCG ACCTCTGACT  
GCGGCGCTTA TGTTATGGTT CACGGCGCGC TGAAACGCCT  
GGCTGTGAAG ATGTCCAAAA  
TCTGTAACGA CCTGCGCTTG CTCTCTTCAG GCCCACGTGC  
CGGCCTGAAC GAGATCAACC  
TGCCGGA ACT GCAGGCGGGC TCTTCCATCA TGCCAGCTAA  
AGTAAACCCG GTTGTTCGG  
AAGTGGTTAA CCAGGTATGC TTCAAAGTCA TCGGTAACGA  
CACC ACTGTT ACCATGGCAG  
CAGAAGCAGG TCAGCTGCAG TTGAACGTTA TGGAGCCGGT  
CATTGGCCAG GCCATGTTCG  
AATCCGTTCA CATTCTGACC AACGCTTGCT ACAACCTGCT  
GGAAAAATGC ATTAACGGCA  
TCACTGCTAA CAAAGAAGTG TGCGAAGGTT ACGTTTACAA  
CTCTATCGGT ATCGT TACTT

ACCTGAACCC GTTCATCGGT CACCACAACG GTGACATCGT  
GGGTAAAATC TGTGCCGAAA  
CCGGTAAGAG TGTACGTGAA GTCGTTCTGG AACGCGGTCT  
GTTGACTGAA GCGGAACTTG  
ACGATATTTT CTCCGTACAG AATCTGATGC ACCCGGCTTA  
CAAAGCAAAA CGCTATACTG  
ATGAAAGCGA ACAG<sup>taa</sup>TCG TACAGGGTAG TACAAATAAA  
AAAGGCACGT CAGATGACGT  
GCCTTTTTTC TTGTGAGCAG AGCTGTG CGAAGAAATT AGCAAAATGA  
ACGAGAACCT GCCGTTGTAC GCGTTCGCTA ATACGTATTC  
CACTCTCGAT GTAAGCCTGA  
ATGACCTGCG TTTACAGATT AGCTTCTTTG AATATGCGCT  
GGGTGCTGCT GAAGATATTG  
CTAATAAGAT CAAGCAGACC ACTGACGA

**SEQ ID No.56**

ATGAATATTGCTGTGATTGGCTGCGGTGCGATTGGCGCCA  
GCGTGCTCGAACTGCTCAAGGGCCATGCCGCGGTGCAGGTGGGCTGGG  
TGCTTGTGCCCCG  
AAGTGACGGACGCCGTGCGCGCCACCCTGGCCCCGGCATGCGCCCCAGG  
CGCGCGCACTGC  
CTGCGCTGACGACTGAAGACCGGCCCGACCTTATCGTCGAATGCGCAG  
GCCATACCGCCA  
TCGAAGAGCATGTGCTGCCCCGCCCTGCGGCGCGGCATTCCTGCCGTCGT  
GGCCTCCATCG  
GCGCACTCAGCGCCCCCGGCATGGCCGAGGCCGTTTCAGGCCGCGGCCG  
AGGCCGGAGGCA  
CCCAGGTGCAATTGCTGTCTGGGCGCCATCGGCGGCGTGGATGCGCTGG  
CCGCAGCCCCGCA  
TCGGCGGCCTGGACGAAGTGGTCTACACCGGCCGCAAGCCGCCCTGG  
CCTGGACCGGCA

CGCCCGCAGAACAGCGCTGCGACCTCGCCAGCCTCAAGGAAGCCTTCT  
GCATCTTCGAAG  
GCAGCGCACGCGAGGCCGCCAGCTCTACCCCAAGAACGCCAACGTGG  
CCGCCACCCTGT  
CGCTGGCCGGCATGGGCCTGGACCGCACCACGGTGCGCCTGTACGCCG  
ACCCGGCCGTGG  
ACGAAAACGTGCACCATGTGGCCGCGCGCGGGCGCCTTCGGTTCCATGG  
AATTGACCATGC  
GCGGCAAGCCGCTGGAGGCCAACCCCAAGACCTCGGCCCTCACCGTCT  
ACAGCGTGGTGC  
GCGCCGTGCTCAACCAGGCCACGGCCATCGCCATCTAA

### 实施例 3 VB5 工程菌的发酵试验

取试验菌株工程菌 *E. coli* MG1655

*avtA:panDBI-ilvG<sup>+</sup>M-aspDH/pACYC184-panBCE*, *E. coli* MG1655

*avtA:panDBI-ilvG<sup>+</sup>M-aspC/pACYC184-panBCE* 和 *E. coli* MG1655

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

发酵培养基: MOPS 80 g/L, 葡萄糖 20.0g/L、硫酸铵 10.0g/L、磷酸二氢钾 2.0 g/L、七水硫酸镁 2.0 g/L、酵母粉 5.0g/L、微量元素混合液 5mL/L, 余量为水。微量元素混合液: FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 10g/L、CaCl<sub>2</sub> 1.35g/L、ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.25g/L、MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.5g/L、CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1g/L、(NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.106g/L、Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O 0.23g/L、CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.48g/L、35% HCl 10mL/L, 余量为水。

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

表 1

工程菌	维生素 B5 (g/L)
<i>E. coli</i> MG1655 <i>avtA:panDBl-ilvG<sup>+</sup>M-aspDH/pACYC184-panBCE</i>	4.86±0.13
<i>E. coli</i> MG1655 <i>avtA:panDBl-ilvG<sup>+</sup>M-aspC/pACYC184-panBCE</i>	3.55±0.25
<i>E. coli</i> MG1655 <i>avtA:panDBl-ilvG<sup>+</sup>M-aspA/pACYC184-panBCE</i>	3.97±0.15

本发明通过在发酵法生产VB5的大肠杆菌中增强三条不同的产生天冬氨酸的途径，发现过表达*aspDH*基因的工程菌，比过表达*aspC*和*aspA*更有利于提高VB5的发酵产量。

以上所述仅是本发明的优选实施方式，应当指出，对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明原理的前提下，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

## 权 利 要 求 书

1、增强天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 的表达在生产维生素 B5 中的应用；  
作为优选，所述天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 来源于戴尔福特菌 Csl-4 (*Delftia sp.* Csl-4)。

2、如权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 具有：

(I)、如 SEQ ID No.56 所示的核苷酸序列；或

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

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

3、如权利要求 1 或 2 所述的应用，其特征在于，还包括：

(1)、在 *cadA* 基因中插入强启动子和/或强 RBS，其中强启动子为 P<sub>gapA</sub>，强 RBS 为 BCD2；

作为优选，所述 BCD2 具有：

(A)、如 SEQ ID No.2 所示的核苷酸序列；或

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

(C)、与 (A) 或 (B) 所示的核苷酸序列至少有 80%同源性的核苷酸序列；

和/或

(2)、表达了来源于大肠杆菌 BL21 的 *ilvGM* 基因；和/或

(3)、表达了来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD*；和/或

作为优选，所述来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD* 具有：

(a)、如 SEQ ID No.1 所示的核苷酸序列；或

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

(c)、与(a)或(b)所示的核苷酸序列至少有80%同源性的核苷酸序列;和/或

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

4、表达载体,其特征在于,包含天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH*;

作为优选,所述天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 来源于戴尔福特菌 Csl-4 (*Delftia sp.* Csl-4);

作为优选,所述天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 具有:

(I)、如 SEQ ID No.56 所示的核苷酸序列;或

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

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

5、如权利要求4所述的表达载体,其特征在于,还包括:

(i)、强启动子和/或强 RBS;

其中强启动子为 *PgapA*, 强 RBS 为 *BCD2*;

作为优选,所述 *BCD2* 具有:

(A)、如 SEQ ID No.2 所示的核苷酸序列;或

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

(C)、与(A)或(B)所示的核苷酸序列至少有80%同源性的核苷酸序列;

和/或

(ii)、来源于大肠杆菌 BL21 的 *ilvGM* 基因;和/或

(iii)、来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD*;和/或

作为优选, 所述来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD* 具有:

(a)、如 SEQ ID No.1 所示的核苷酸序列; 或

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

(c)、与 (a) 或 (b) 所示的核苷酸序列至少有 80%同源性的核苷酸序列; 和/或

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

6、宿主, 其特征在于, 表达了天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH*;

作为优选, 所述天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 来源于戴尔福特菌 Csl-4 (*Delftia sp.* Csl-4);

作为优选, 所述天冬氨酸脱氢酶基因 *aspDH* 具有:

(I)、如 SEQ ID No.56 所示的核苷酸序列; 或

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

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

7、如权利要求 6 所述的宿主, 其特征在于, 还包括:

(i)、强启动子和/或强 RBS;

其中强启动子为 PgapA, 强 RBS 为 BCD2;

作为优选, 所述 BCD2 具有:

(A)、如 SEQ ID No.2 所示的核苷酸序列; 或

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

(C)、与 (A) 或 (B) 所示的核苷酸序列至少有 80%同源性的核苷酸序列;

和/或

(ii)、来源于大肠杆菌 BL21 的 *ilvGM* 基因；和/或

(iii)、来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD*；和/或

作为优选，所述来源于地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 的 L-天冬氨酸  $\alpha$ -脱羧酶基因 *panD* 具有：

(a)、如 SEQ ID No.1 所示的核苷酸序列；或

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

(c)、与 (a) 或 (b) 所示的核苷酸序列至少有 80%同源性的核苷酸序列；和/或

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

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

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

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

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/076669

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C12N9/06(2006.01)i; C12N15/70(2006.01)i; C12N1/21(2006.01)i; C12P13/02(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C12N; C12P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) VEN, CNTXT, VCN, PubMed, ISI Web of Science, CNKI, 万方, WANFANG, 百度学术, BAIDU SCHOLAR, 读秀, DUXIU, STN, GenBank, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 天冬氨酸脱氢酶, 戴尔福特菌Csl-4, 维生素B5, D-泛酸, aspDH, Delfta sp., papA, BCD2, cadA, panD, ilvGM, panB, PanC, PanE, VB5, SEQ ID NOs: 1-2, 56.		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 115595328 A (INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 13 January 2023 (2023-01-13) entire document	1-10
PX	CN 115595314 A (INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 13 January 2023 (2023-01-13) entire document	1-10
Y	CN 109306343 A (INSTITUTE OF MICROBIOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 05 February 2019 (2019-02-05) claims 1-10	1-2, 4, 6, 8-10
Y	CN 112625985 A (ZHEJIANG UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 09 April 2021 (2021-04-09) description, paragraph 0005	1-2, 4, 6, 8-10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>31 May 2023</b>		Date of mailing of the international search report <b>12 June 2023</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088</b>		Authorized officer  Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Chen, S. et al. "Delftia sp. Cs1-4, complete genome, Genbank: CP002735.1" <i>NCBI</i> , 13 September 2021 (2021-09-13), pages 1-2	2, 4, 6, 8-10
Y	XU, Jian et al. "Novel Mode Engineering for $\beta$ -Alanine Production in <i>Escherichia coli</i> with the Guide of Adaptive Laboratory Evolution" <i>Microorganisms</i> , Vol. 9, 15 March 2021 (2021-03-15), abstract	1-2, 4, 6, 8-10
A	孙志浩 等 (SUN, Zhihao et al.). "生物方法制备D-泛酸研究进展 (Advances of Several Studies on Producing D-Pantothenic Acid by Bio-technology)" <i>药物生物技术 (Chinese Journal of Pharmaceutical Biotechnology)</i> , Vol. 9, No. 3, 31 December 2002 (2002-12-31), pages 178-182	1-10
A	CN 1201491 A (TAKEDA PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 09 December 1998 (1998-12-09) entire document	1-10
A	WANG, Leilei et al. "Advances in biotechnological production of $\beta$ -alanine" <i>World Journal of Microbiology and Biotechnology</i> , Vol. 37, 05 April 2021 (2021-04-05), article no. 79, pages 1-11	1-10
A	CN 1259576 A (DEGUSSA-HUELS AG) 12 July 2000 (2000-07-12) entire document	1-10
A	CN 1420931 A (BASF AG) 28 May 2003 (2003-05-28) entire document	1-10
A	CN 1788089 A (BASF AG) 14 June 2006 (2006-06-14) entire document	1-10

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

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

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

International application No.

**PCT/CN2023/076669**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN	115595328	A	13 January 2023	None	
CN	115595314	A	13 January 2023	None	
CN	109306343	A	05 February 2019	None	
CN	112625985	A	09 April 2021	None	
CN	1201491	A	09 December 1998	SK 30598	A3 11 January 1999
				AU 6943696	A 01 April 1997
				KR 19990044609	A 25 June 1999
				KR 100421088	B1 04 June 2004
				WO 9710340	A1 20 March 1997
				EP 0859848	A1 26 August 1998
				EP 0859848	B1 14 April 2004
				DK 0859848	T3 09 August 2004
				US 5932457	A 03 August 1999
				DE 69632199	D1 19 May 2004
				DE 69632199	T2 21 April 2005
				AT 264392	T 15 April 2004
CN	1259576	A	12 July 2000	ZA 9907405	B 08 June 2000
				KR 20000047840	A 25 July 2000
				ID 25769	A 02 November 2000
				EP 1006193	A2 07 June 2000
				EP 1006193	A3 17 September 2003
				ZA 997405	B 08 June 2000
				DE 19855314	A1 08 June 2000
				HU 9904446	D0 28 January 2000
				HU 9904446	A2 28 November 2000
				JP 2000166578	A 20 June 2000
				SK 163999	A3 11 July 2000
				US 6184006	B1 06 February 2001
				IL 133215	A0 19 March 2001
				BR 9905785	A 24 April 2001
				YU 61899	A 28 February 2003
CN	1420931	A	28 May 2003	WO 0121772	A2 29 March 2001
				WO 0121772	A3 07 March 2002
				WO 0121772	A9 05 December 2002
				KR 20020092912	A 12 December 2002
				PL 356566	A1 28 June 2004
				SK 5222002	A3 04 March 2003
				EP 2163629	A2 17 March 2010
				EP 2163629	A3 02 June 2010
				EP 2163629	B1 08 March 2017
				HU 0202705	A2 28 December 2002
				HU 0202705	A3 28 February 2011
				HU 230509	B1 28 September 2016
				MXPA 02003017	A 06 September 2004
				BR 0014115	A 21 May 2002
				BRPI 0014115	B1 05 May 2015
				BRPI 0014115	B8 25 May 2021
				EP 1214420	A2 19 June 2002
				EP 1214420	B1 23 March 2016

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

International application No.

**PCT/CN2023/076669**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
				TR 200200751 T2	23 August 2004
				CZ 20021013 A3	11 December 2002
				AU 7708700 A	24 April 2001
				CA 2385497 A1	29 March 2001
				JP 2003527828 A	24 September 2003
				JP 5392957 B2	22 January 2014
				IL 148786 A0	12 September 2002
				NO 20021382 D0	20 March 2002
				NO 20021382 L	16 May 2002
<hr/>					
CN	1788089	A	14 June 2006	CA 2491145 A1	15 January 2004
				AU 2003251792 A1	23 January 2004
				MXPA 04012812 A	24 February 2005
				EP 1660667 A2	31 May 2006
				EP 1660667 A4	05 January 2011
				JP 2006504408 A	09 February 2006
				IN 3053 CH2004A	17 February 2006
				US 2004146996 A1	29 July 2004
				US 7291489 B2	06 November 2007
				WO 2004005525 A2	15 January 2004
				WO 2004005525 A3	02 February 2006
				ZA 200500948 B	27 December 2006
				US 2006141585 A1	29 June 2006
				US 7989187 B2	02 August 2011
				IN 3051 CH2004A	17 February 2006
<hr/>					



C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	Xu, J. 等. "Novel Mode Engineering for $\beta$ -Alanine Production in Escherichia coli with the Guide of Adaptive Laboratory Evolution" Microorganisms, 第9卷, 2021年3月15日 (2021 - 03 - 15), 摘要	1-2, 4, 6, 8-10
A	孙志浩 等. "生物方法制备D-泛酸研究进展" 药物生物技术, 第9卷, 第3期, 2002年12月31日 (2002 - 12 - 31), 第178-182页	1-10
A	CN 1201491 A (武田药品工业株式会社) 1998年12月9日 (1998 - 12 - 09) 全文	1-10
A	Wang, L.L. 等. "Advances in biotechnological production of $\beta$ -alanine" World Journal of Microbiology and Biotechnology, 第37卷, 2021年4月5日 (2021 - 04 - 05), 文章号第79, 第1-11页	1-10
A	CN 1259576 A (底古萨-胡尔斯股份公司) 2000年7月12日 (2000 - 07 - 12) 全文	1-10
A	CN 1420931 A (BASF公司) 2003年5月28日 (2003 - 05 - 28) 全文	1-10
A	CN 1788089 A (巴斯福股份公司) 2006年6月14日 (2006 - 06 - 14) 全文	1-10

第1栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a.  作为国际申请的一部分提交的;
- b.  为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),  
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。
2.  本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。
3. 补充意见:

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/076669

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	115595328	A	2023年1月13日	无			
CN	115595314	A	2023年1月13日	无			
CN	109306343	A	2019年2月5日	无			
CN	112625985	A	2021年4月9日	无			
CN	1201491	A	1998年12月9日	SK	30598	A3	1999年1月11日
				AU	6943696	A	1997年4月1日
				KR	19990044609	A	1999年6月25日
				KR	100421088	B1	2004年6月4日
				WO	9710340	A1	1997年3月20日
				EP	0859848	A1	1998年8月26日
				EP	0859848	B1	2004年4月14日
				DK	0859848	T3	2004年8月9日
				US	5932457	A	1999年8月3日
				DE	69632199	D1	2004年5月19日
				DE	69632199	T2	2005年4月21日
				AT	264392	T	2004年4月15日
CN	1259576	A	2000年7月12日	ZA	9907405	B	2000年6月8日
				KR	20000047840	A	2000年7月25日
				ID	25769	A	2000年11月2日
				EP	1006193	A2	2000年6月7日
				EP	1006193	A3	2003年9月17日
				ZA	997405	B	2000年6月8日
				DE	19855314	A1	2000年6月8日
				HU	9904446	D0	2000年1月28日
				HU	9904446	A2	2000年11月28日
				JP	2000166578	A	2000年6月20日
				SK	163999	A3	2000年7月11日
				US	6184006	B1	2001年2月6日
				IL	133215	A0	2001年3月19日
				BR	9905785	A	2001年4月24日
				YU	61899	A	2003年2月28日
CN	1420931	A	2003年5月28日	WO	0121772	A2	2001年3月29日
				WO	0121772	A3	2002年3月7日
				WO	0121772	A9	2002年12月5日
				KR	20020092912	A	2002年12月12日
				PL	356566	A1	2004年6月28日
				SK	5222002	A3	2003年3月4日
				EP	2163629	A2	2010年3月17日
				EP	2163629	A3	2010年6月2日
				EP	2163629	B1	2017年3月8日
				HU	0202705	A2	2002年12月28日
				HU	0202705	A3	2011年2月28日
				HU	230509	B1	2016年9月28日
				MXPA	02003017	A	2004年9月6日
				BR	0014115	A	2002年5月21日
				BR- PI	0014115	B1	2015年5月5日
				BR- PI	0014115	B8	2021年5月25日
				EP	1214420	A2	2002年6月19日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/076669

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)	
				EP	1214420	B1	2016年3月23日
				TR	200200751	T2	2004年8月23日
				CZ	20021013	A3	2002年12月11日
				AU	7708700	A	2001年4月24日
				CA	2385497	A1	2001年3月29日
				JP	2003527828	A	2003年9月24日
				JP	5392957	B2	2014年1月22日
				IL	148786	A0	2002年9月12日
				NO	20021382	D0	2002年3月20日
				NO	20021382	L	2002年5月16日
CN	1788089	A	2006年6月14日	CA	2491145	A1	2004年1月15日
				AU	2003251792	A1	2004年1月23日
				MXPA	04012812	A	2005年2月24日
				EP	1660667	A2	2006年5月31日
				EP	1660667	A4	2011年1月5日
				JP	2006504408	A	2006年2月9日
				IN	3053	CH20 04A	2006年2月17日
				US	2004146996	A1	2004年7月29日
				US	7291489	B2	2007年11月6日
				WO	2004005525	A2	2004年1月15日
				WO	2004005525	A3	2006年2月2日
				ZA	200500948	B	2006年12月27日
				US	2006141585	A1	2006年6月29日
				US	7989187	B2	2011年8月2日
				IN	3051	CH20 04A	2006年2月17日