

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 11 月 12 日 (12.11.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/224232 A1

(51) 国际专利分类号:

C12N 1/20 (2006.01)

C12P 7/40 (2006.01)

C12N 9/18 (2006.01)

C12P 7/62 (2006.01)

C12N 9/00 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/120238

(22) 国际申请日: 2019 年 11 月 22 日 (22.11.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201910380623.9 2019年5月8日 (08.05.2019) 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: 倪晔(NI, Ye); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 窦哲(DOU, Zhe); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 许国超(XU, Guochao); 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事务所(普通合伙)(CENTRAL SOUTH WELL INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE); 中国江苏

省苏州市工业园区金芳路 18 号 B3 幢 2 层 214 室, 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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

(54) Title: ACINETOBACTER AND USE THEREOF IN PRODUCTION OF CHIRAL 3-CYCLOHEXENE-1-FORMIC ACID

(54) 发明名称: 一株不动杆菌及其在生产手性3-环己烯-1-甲酸中的应用

(57) Abstract: Provided are an Acinetobacter and the use thereof in the production of chiral 3-cyclohexene-1-formic acid. The taxonomic name of the Acinetobacter is Acinetobacter sp., and the Acinetobacter was deposited in the China General Microbiological Culture Collection Center (CGMCC) on January 21, 2019, with the deposition address being No.3, Courtyard 1, Beichen West Road, Chaoyang District, Beijing, and the deposition number being CGMCC No. 17220. By using the Acinetobacter to produce chiral methyl 3-cyclohexene-1-formate, the optical purity of the obtained product methyl (S)-3-cyclohexene-1-formate is at least 99%, and a catalyst has good stability, can tolerate substrates and products with higher concentration, and has mild reaction conditions. A resolution process can be used for simply and efficiently obtaining (S)-3-cyclohexene-1-formic acid with high optical purity and high concentration. Furthermore, the method is energy saving and environmentally friendly, the high-concentration products are conducive to the recovery of products, and the method is an efficient method for producing the (S)-3-cyclohexene-1-formic acid, and has good industrial application prospects.

(57) 摘要: 提供一株不动杆菌及其在生产手性3-环己烯-1-甲酸中的应用。该不动杆菌的分类学命名为不动杆菌 Acinetobacter sp., 于2019年01月21日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心, 保藏地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号, 保藏编号CGMCC No.17220。采用该不动杆菌生产手性3-环己烯-1-甲酸甲酯, 所得产物(S)-3-环己烯-1-甲酸甲酯的光学纯度在99%以上, 而且催化剂的稳定性好, 能耐受较高浓度的底物和产物, 反应条件温和。使用该拆分工艺能简单、高效地获得高光学纯度和高浓度的(S)-3-环己烯-1-甲酸, 且该法节能、环保, 高浓度的产物有利于产物的回收, 是一种高效的(S)-3-环己烯-1-甲酸的生产方法, 具有很好的工业应用前景。

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))。

一株不动杆菌及其在生产手性 3-环己烯-1-甲酸中的应用

技术领域

本发明涉及一株不动杆菌及其在生产手性 3-环己烯-1-甲酸中的应用，属于微生物技术领域。

背景技术

3-环己烯-1-甲酸作为手性化合物是一种重要的化学试剂和有机中间体，广泛应用于医药、化工等多个领域。*(S)*-3-环己烯-1-甲酸是凝血因子 Xa 的抑制剂——依度沙班中间体 3,4-二氨基环己烷羧酸衍生物的重要起始原料。而*(R)*-3-环己烯-1-甲酸也可以用于合成多种药物中间体，如抗肿瘤药物(+)-Phyllanthocin 的中间体、FK 506（普乐可复）的 C24-C34 片段、磷酸奥司他韦（特敏福）的初始原料。

目前，仅有少数关于手性 3-环己烯-1-甲酸拆分制备的文献报道，例如 Cihangir Tanyeli 等（*Tetrahedron Asymmetry*, 2004, 15, 2057-2060）描述了一种利用商品化的猪肝酯酶（PLE），马肝酯酶（HLE）和猪胰脂肪酶（PPL）水解*(R,S)*-3-环己烯-1-甲酸甲酯制备手性 3-环己烯-1-甲酸，PLE 催化反应得到*(S)*-构型的羧酸转化率为 49%，*e.e.*>99%，HLE 催化底物水解后也生成*(S)*-构型的羧酸，转化率达到 48%，*e.e.*值为 97%，与此相反，PPL 产生*(R)*-构型羧酸的 *e.e.*值为 91%，转化率为 49%。徐春秀等（*现代药物与临床*, 2013, 28(2):126-128）在 2013 年报道了通过化学拆分法以手性苯乙胺为手性拆分剂，*(R,S)*-3-环己烯-1-甲酸在丙酮中形成非对映异构体，并利用它们的溶解度差别来拆分为*(R)*-(+)-3-环己烯-1-甲酸（收率 28.3%）和*(S)*-(-)-3-环己烯-1-甲酸（收率 28.7%），光学纯度均大于 99%。Sheng Wu 等人（*Applied and Environmental Microbiology*, 2016, AEM.01817-16）利用 Mhg 酯酶对 3-环己烯-1-甲酸甲酯进行水解得到手性 3-环

己烯-1-甲酸，底物的转化率为 53%，*e.e.* 值为 25%。王钊等人在专利中描述了一种商品化的蛋白酶拆分制备手性 3-环己烯-1-甲酸的方法，收率为 32.8%，*e.e.* 值为 99.5%。

然而这些研究存在一定的局限性，如：商品酶价格昂贵，且催化的水解反应底物浓度较低，利用微生物酶催化过程又存在立体选择性不高的问题，化学法的手性拆分试剂价格非常昂贵。因此，目前仍然缺乏可高立体选择性催化 3-环己烯-1-甲酸甲酯制备手性 3-环己烯-1-甲酸的微生物酶。

发明内容

为解决上述技术问题，本发明提供一株能够生产对映选择性地催化水解高浓度底物的产酯酶的不动杆菌，并提供利用该菌株或其产生的粗酶催化 (*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯对映选择性水解生产高浓度产物 (*S*)-3-环己烯-1-甲酸的方法。

本发明的第一个目的是提供一株不动杆菌，其分类学命名为不动杆菌 *Acinetobacter sp.*，已于 2019 年 01 月 21 日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心，保藏地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，保藏编号 CGMCC No.17220。

本发明的第二个目的是提供所述的不动杆菌在生产 (*S*)-3-环己烯-1-甲酸的中应用。

进一步地，应用所述的不动杆菌发酵生产的酯酶为催化剂，催化 (*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯生产 (*S*)-3-环己烯-1-甲酸。

进一步地，所述催化具体是在含有助溶剂的缓冲溶液中，催化 (*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯的对映选择性水解，然后从水解反应生成的混合物中收集 (*S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯，在碱性条件下加热水解得到 (*S*)-3-环己烯-1-甲酸。

进一步地，所述的助溶剂为与水互溶的有机溶剂。

进一步地，所述的助溶剂的添加量为反应液总体积的 5~35%。

进一步地，所述的缓冲溶液为柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液或甘氨酸-NaOH 缓冲液，所述缓冲溶液的 pH 为 5.0~9.5。

进一步地，所述的碱性条件为 0.5~1.5M 氢氧化钠溶液。

本发明的第三个目的是提供一种酯酶，由所述的不动杆菌发酵生产得到。

本发明的第四个目的是提供一种微生物菌剂，包含所述的不动杆菌。

本发明的有益效果是：

采用本发明的不动杆菌生产手性 3-环己烯-1-甲酸甲酯，具有显著的优点，所得产物(S)-3-环己烯-1-甲酸甲酯的光学纯度在 99%以上，而且催化剂的稳定性好，能耐受较高浓度的底物和产物，反应条件温和。使用本发明的拆分工艺能简单、高效地获得高光学纯度和高浓度的(S)-3-环己烯-1-甲酸，且该法节能、环保，高浓度的产物有利于产物的回收，是一种高效的(S)-3-环己烯-1-甲酸的生产方法，具有很好的工业应用前景。

生物材料保藏

不动杆菌 *Acinetobacter* sp.，已于 2019 年 01 月 21 日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心，保藏地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，保藏编号 CGMCC No.17220。

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。

本发明用到的培养基有：

富集培养基（g/L）：环己烯羧酸甲酯 1.5，(NH₄)₂SO₄ 2，KH₂PO₄，MgSO₄ 0.5，NaCl 1，DMSO 5%(v/v)，pH 7.0，121℃高温灭菌 20 min。取少量土样悬浮于装有富集培养基的试管中，30℃，180 rpm 下培养 48 h，吸取适量培养液，加入到装有第二轮富集培养基的试管中，同样的条件继续培养 48 h。

平板分离培养基（g/L）：三丁酸甘油酯 10，Tween-80 10，蛋白胨 16，酵母膏 10，NaCl 5，琼脂 15，KH₂PO₄ 0.5，MgSO₄ 0.2，pH 7.0，121℃高温灭菌 20 min。将培养液进行梯度稀释涂布平板培养基，产透明圈的单菌落即为目的菌落。

发酵培养基（g/L）：甘油 15，蛋白胨 5，酵母膏 5，NaCl 1，KH₂PO₄ 0.5，

pH 7.0, 121℃ 高温灭菌 20 min。灭菌后冷却、接种, 接种量 5 % (v/v), 在 30℃, 180 rpm 转速条件下进行发酵, 培养 12 h 后菌体湿重可达 20 g/L, 该酶的比活力(U)定义为: 每分钟催化 1 μmol (*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯所需要的细胞量, 测得 JNU9335 产酶可达 180 U/L, 比活力为 9 U/g 湿细胞。

对映选择性地催化水解的反应条件: 细胞浓度为 20~200 g/L, 底物浓度为 50~500 mM, 反应温度为 10~60℃, pH 5~9.5, 反应时间为 0.5~36 h。

底物的对映体过量值 (*e.e.*) 和转化率采用气相色谱分析, 分析条件如下: B-DM 手性柱(30 m $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 μm); 以氮气作为载气; 进样口温度 280℃; 空气流量 300 mL/min, 尾吹气流量 25 mL/min; 分流比 50:1, 进样量 1.0 μL 。柱箱升温程序: 初始温度 100℃ 保持 2 min, 2℃/min 升温至 150℃, 保持 2 min。FID 检测器温度: 280℃。

实施例 1: 不动杆菌的筛选

从江苏、陕西、山东、河南、江西等地区的 300 多份土壤中进行筛选, 筛选的具体步骤如下:

从不同的环境中采集土壤样品, 利用环己烯甲酸甲酯为唯一碳源进行三轮富集培养, 筛选酯酶产生菌。通过反复筛选, 分离得到 7 株具有很高的对映选择性催化活性的菌株, 进一步对 7 株候选菌的性能进行分析筛选:

7 株候选菌株对(*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯的对映选择性水解性能:

取 1.0 g 各菌株的湿细胞悬浮于 10 mL 的磷酸盐缓冲溶液(100 mM, pH 7.0)中, (*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯的浓度为 50 mM, 助溶剂 DMSO 的添加量为 5%, 反应混合物在 30℃, 180 rpm 的恒温摇床上反应, 在表 1 中所示的时间取样, 产物和底物经乙酸乙酯萃取, 无水 Na_2SO_4 干燥后, 再通过手性气相色谱分析底物的转化率和对映体过量值 (*e.e.*_s)。各菌株的催化性能如表 1 所示。

表 1 候选菌株的催化性能比较

微生物菌株	反应时间 (h)	<i>e.e.</i> _s (%)	转化率 (%)
JNU9335	12	99.5	46
JNU9308	12	96.9	41
JNU9324	12	98.0	41
JNU9210	12	91.9	39
JNU9124	12	95.5	36
JNU9105	12	99.1	28
JNU9008	12	99.9	25

表 1 说明从土壤中筛选的这 9 株菌均具有很高的对映选择性催化活性，其中 JNU9335 反应速度最快，转化率最高。

7 株候选菌株对不同浓度的(*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯的耐受能力：

取 1 g 各菌株的湿细胞悬浮于 10 mL 的磷酸盐缓冲溶液 (100 mM, pH 7.0) 中，分别加入不同浓度的(*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯，反应混合物在 30℃，180 rpm 的恒温摇床上反应 24 h。反应后取样，产物和底物经乙酸乙酯萃取，无水 Na₂SO₄ 干燥后，再通过手性气相色谱分析底物的转化率。各菌株对不同浓度底物的耐受情况如表 2 所示。

表 2 候选菌株对不同浓度的底物耐受情况的对比

微生物菌株	(<i>R,S</i>)-3-环己烯-1-甲酸甲酯浓度 (mM)		
	100 mM	200 mM	500 mM
JNU9335	46	90	197
JNU9308	42	48	60
JNU9324	42	15	12
JNU9210	34	30	30
JNU9124	32	12	20
JNU9105	20	40	40
JNU9008	20	40	39

表 2 说明随着底物浓度的增加，多数菌株的活性受到较高底物浓度的抑制，水解产物增加很少，而只有菌株 JNU9335 在较高的底物浓度下 (500 mM)，

仍能维持较高的转化率，得到较高浓度的产物，说明该菌株具有优异的底物和产物耐受性，所以该菌株被筛选作为最优菌株用于以后的工作。

通过上述筛选得到一株产酶稳定的高活力和高选择性的酯酶产生菌 JNU9335，该菌株已于 2019 年 01 月 21 日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心，保藏编号 CGMCC No.17220。

实施例 2：不动杆菌 *Acinetobacter sp.* JNU9335 的形态及生理学鉴定

菌株 JNU9335 具有如下的微生物学特征：

1.形态大小

杆状，染色均匀， $0.5\sim 0.9\times 1.5\sim 3\ \mu\text{m}$ ，不产芽孢，无鞭毛，革兰氏染色阴性。

2.适宜生长环境

适宜的生长温度为 $20\sim 35^{\circ}\text{C}$ ，可以在 pH 5~9 环境中生存。

3.平板培养菌落特性

在 30°C 平板上培养 24 h 可形成小的菌落，36 h 形成粘稠、湿润的白色菌落，边缘光滑，中间突出。随着时间的延长，在三丁酸甘油酯平板上形成透明圈。

实施例 3：不动杆菌 *Acinetobacter sp.* JNU9335 的分子生物学鉴定

提取菌株 JNU9335 的染色体 DNA，使用引物（27F:5'-AGAGTTTGATCCT GGCTCAG-3'; 1492R:5'-TACCTTGTTACGACTT-3'）酶促扩增 16S 核糖体 DNA(16S rDNA)，热循环仪 PCR 程序为：在 95°C 变性 5min，在 95°C 40s，在 55°C 下 1min 在 72°C 下 2min 的 30 个循环，最后一步在 72°C 下 10min。16S rDNA 测序结果分析，鉴定为不动杆菌 *Acinetobacter sp.*。

实施例 4：不动杆菌 *Acinetobacter sp.* JNU9335 的发酵培养

发酵培养基（g/L）：甘油 15，蛋白胨 5，酵母膏 5，NaCl 1， KH_2PO_4 0.5，pH 7.0。 121°C 高温灭菌 20 min。灭菌后冷却、接种，接种量 5 % (v/v)，在 30°C ，180 rpm 转速条件下进行发酵，培养 12 h，在 8000 rpm，10 min 条件下收集菌体，弃尽上层培养基，用生理盐水洗涤一次，在真空冷冻干燥机(SCIENTZ-10N)中干燥 24 h，收集酶粉于 -20°C 保存。该酶的比活力(U)定义为：每分钟催化 $1\ \mu\text{mol}$

(*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯所需要的细胞量，测得酶粉的比活力为 96 U/g。

实施例 5：温度对环己烯甲酸甲酯的酶促水解的影响

将 70 mg 的(*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯，0.5 mL 二甲基亚砷、25 mg 冻干的粗酶粉加入到 10 mL 磷酸盐缓冲液（100 mM，pH 7.0）中，混合均匀后分别置于 20，30，40 和 50℃，180 rpm 的恒温摇床上反应振荡 6 h。反应后取样，产物和底物经乙酸乙酯萃取，无水 Na₂SO₄ 干燥后，再通过手性气相色谱分析底物的转化率和对映体过量值（*e.e.*_s）。如表 3 所示，温度在 20~40℃时，该酯酶具有很高的转化率和稳定的 *e.e.*_s，说明该温度范围内，该酯酶是比较稳定的，活性没有受到很大的损失。温度超过 50℃时，该酯酶的转化能力大大下降，这可能是高温导致该酯酶空间构型发生变化，从而导致酶的活性下降。

表 3 温度对不动杆菌酯酶催化(*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯的酶促水解的影响

温度 (°C)	<i>e.e.</i> _s (%)	转化率 (%)
20	99.5	32
30	99.4	46
40	99.3	40
50	99.5	25

实施例 6：不动杆菌酯酶对不同浓度(*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯的酶促水解

将浓度为 100，200 和 500 mM 的(*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯和 0.5 mL 二甲基亚砷加入到 10 mL 磷酸盐缓冲液（100 mM，pH 7.0）中，再分别加入相应量的酶，反应混合物置于 30℃，180 rpm 的恒温摇床上振荡反应。反应后取样，产物和底物经乙酸乙酯萃取，无水 Na₂SO₄ 干燥后，再通过手性气相色谱分析底物的转化率和对映体过量值（*e.e.*_s）。结果如表 4 所示。

表 4 不动杆菌酯酶对不同浓度的(*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯的酶促水解

底物浓度 (mM)	反应时间 (h)	产物浓度 (mM)	<i>e.e.</i> _s (%)
100	3	48	99.5
200	6	94	99.4
500	12	215	99.1

表 4 显示, 该酯酶催化不同浓度的(*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯时, 产物浓度随着底物浓度的增加而增加, 最高可达 215 mM, 且仍保留较高的产物光学纯度, 说明较高浓度的底物和产物对该不动杆菌酯酶的活性没有造成显著的影响, 该酯酶可以耐受高浓度的底物和产物。这是至今报道的生物催化法生产手性环己烯甲酸的方法中, 生成产物浓度最高的例子, 也是唯一一篇微生物酶法转化的报道。本发明的方法具有很广阔的实际工业应用前景。

实施例 7: (*S*)-环己烯-1-甲酸的克级制备

将 3.50 g (*R,S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯与 2.5 mL 二甲基亚砷和 47.5 mL 磷酸盐缓冲液 (200 mM, pH 7.0) 混合均匀后, 加入 1 g 酶粉。反应在恒温 30 °C 的 250 mL 圆底烧瓶中进行, 400 rpm 下机械搅拌。通过手性气相色谱监测底物的转化率和产物的对映体过量值。12 h 后停止反应, 过滤除酶后, 调节 pH 至 9, 加入乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机相后旋转蒸发至无液体流出, 获得(*S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯, 然后将(*S*)-3-环己烯-1-甲酸甲酯加入 1 M NaOH 水溶液 50 °C 加热回流搅拌反应 6 h, 再加入 1 M HCl 水溶液调节 pH 至 5, 加入等体积乙酸乙酯萃取 3 次, 合并有机层, 用无水 Na₂SO₄ 干燥, 过滤, 旋转蒸发得到(*S*)-3-环己烯-1-甲酸, 所得产物为具有特殊气味的液体, 分离后总得率为 40 %, 光学纯度为 99 % *e.e.*。

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。

打印件(原件为电子形式)

0-1	PCT/RO/134表(SAFE)有关保藏的微生物或其他生物材料的说明(PCT细则第13条之二)	
0-1-1	软件版本	CEPCT 版本 1.00.00 MT/FOP 20140331/0.20.5.21
0-2	国际申请号	PCT/CN2019/120238
0-3	申请人或代理人的档案号	PCT1910091

1	下面的说明与本申请说明书中此处提到的保藏的微生物或其他生物材料相关:	
1-1	页码	
1-2	行号:	
1-3	保藏事项	
1-3-1	保藏单位名称	中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心
1-3-2	保藏单位地址	中国微生物菌种保藏委员会, 中国北京市2714信箱, 邮政编码:100080, Beijing (CN)。
1-3-3	保藏日期	2019年 1月 21日 (21.01.2019)
1-3-4	保藏号	CGMCC 17220
1-4	补充说明	
1-5	本说明是对下列指定国	所有指定国
1-6	单独提交的说明 这些说明将随后提交给国际局	

由受理局填写

0-4	本表格与国际申请一起收到: (是或否)	
0-4-1	授权官员	

由国际局填写

0-5	国际局收到本表格日期:	
0-5-1	授权官员	

权 利 要 求 书

1、一株不动杆菌，其特征在于，其分类学命名为不动杆菌 *Acinetobacter sp.*，已于 2019 年 01 月 21 日保藏于中国普通微生物菌种保藏管理中心，保藏地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，保藏编号 CGMCC No.17220。

5 2、权利要求 1 所述的不动杆菌在生产(S)-3-环己烯-1-甲酸的中应用。

3、根据权利要求 2 所述的应用，其特征在于，应用所述的不动杆菌发酵生产的酯酶为催化剂，催化(R,S)-3-环己烯-1-甲酸甲酯生产(S)-3-环己烯-1-甲酸。

4、根据权利要求 3 所述的应用，其特征在于，所述催化具体是在含有助溶剂的缓冲溶液中，催化(R,S)-3-环己烯-1-甲酸甲酯的对映选择性水解，然后从水
10 解反应生成的混合物中收集(S)-3-环己烯-1-甲酸甲酯，在碱性条件下加热水解得到(S)-3-环己烯-1-甲酸。

5、根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述的助溶剂为与水互溶的有机溶剂。

6、根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述的助溶剂的添加量为反
15 应液总体积的 5~35%。

7、根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述的缓冲溶液为柠檬酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液或甘氨酸-NaOH 缓冲液，所述缓冲溶液的 pH 为 5.0~9.5 的。

8、根据权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述的碱性条件为 0.5~1.5
20 M 氢氧化钠溶液。

9、一种酯酶，其特征在于，由权利要求 1 所述的不动杆菌发酵生产得到。

10、一种微生物菌剂，其特征在于，包含权利要求 1 所述的不动杆菌。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/120238

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/20(2006.01)i; C12N 9/18(2006.01)i; C12N 9/00(2006.01)i; C12P 7/40(2006.01)i; C12P 7/62(2006.01)i; C12P 41/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N, 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)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, NCBI, EMBL, STN: 不动杆菌, Acinetobacter sp., JNU9335, CGMCC No.17220, 酯酶, esterase, lipolytic enzyme, phosphoric triester hydrolase, sulfuric ester hydrolase, 3-环己烯-1-甲酸, cyclohexene -3-ene-1- carboxylic acid, (S)-3-环己烯-1-甲酸, (S)-3-cyclohexene carboxylic acid, (S)- cyclohexene -3-ene-1- carboxylic acid, (R, S)-3-环己烯-1-甲酸甲酯, (R, S)-3-cyclohexene methyl formate, (R, S)- cyclohexene -3-ene-1-carboxylic acid, 手性拆分, chiral resolution, 光学拆分, optical resolution, 外消旋体拆分, 对映选择性水解

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 1408848 A (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY et al.) 09 April 2003 (2003-04-09) entire document	1-10
PX	CN 110272839 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 24 September 2019 (2019-09-24) claims 1-10	1-10
A	US 2004138429 A1 (COUNCIL SCIENT IND RES) 15 July 2004 (2004-07-15) entire document	1-10
A	US 2009238811 A1 (MCDANIEL C STEVEN et al.) 24 September 2009 (2009-09-24) entire document	1-10
A	CN 106119303 A (ZHEJIANG UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 16 November 2016 (2016-11-16) 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 February 2020

Date of mailing of the international search report

26 February 2020

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/CN2019/120238

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104845922 A (OCEAN UNIVERSITY OF CHINA et al.) 19 August 2015 (2015-08-19) entire document	1-10
A	KIM, H.E. et al. "Gene Cloning, Sequencing, and Expression of an Esterase from <i>Acinetobacter lwoffii</i> I6C-1" <i>CURRENT MICROBIOLOGY</i> , Vol. 46, 31 December 2003 (2003-12-31), pp. 291-295	1-10
A	MA, B.D. et al. "Increased Catalyst Productivity in α -Hydroxy Acids Resolution by Esterase Mutation and Substrate Modification" <i>ACS Catal.</i> , Vol. 4, 17 February 2014 (2014-02-17), pp. 1026-1031	1-10
A	赵玉巧 等 (ZHAO, Yuqiao et al.). "高选择性手性酯酶产生菌的筛选及应用 (Isolation and application of acinetobacter SP. YQ231 highly producing enantioselective esterases)" <i>应用与环境生物学报 (Chinese Journal of Applied and Environmental Biology)</i> , Vol. 8, No. 6, 31 December 2002 (2002-12-31), pp. 640-643	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/120238

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	1408848	A	09 April 2003	CN	1168822	C	29 September 2004
CN	110272839	A	24 September 2019	None			
US	2004138429	A1	15 July 2004	US	2005163739	A1	28 July 2005
US	2009238811	A1	24 September 2009	US	2014193889	A1	10 July 2014
CN	106119303	A	16 November 2016	None			
CN	104845922	A	19 August 2015	CN	104845922	B	17 February 2016

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/120238

A. 主题的分类 C12N 1/20(2006.01)i; C12N 9/18(2006.01)i; C12N 9/00(2006.01)i; C12P 7/40(2006.01)i; C12P 7/62(2006.01)i; C12P 41/00(2006.01)i 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 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)) CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, NCBI, EMBL, STN; 不动杆菌, Acinetobacter sp., JNU9335, CGMCC No.17220, 酯酶, esterase, lipolytic enzyme, phosphoric triester hydrolase, sulfuric ester hydrolase, 3-环己烯-1-甲酸, cyclohexene -3-ene-1-carboxylic acid, (S)-3-环己烯-1-甲酸, (S)-3-cyclohexene carboxylic acid, (S)-cyclohexene -3-ene-1-carboxylic acid, (R,S)-3-环己烯-1-甲酸甲酯, (R,S)-3-cyclohexene methyl formate, (R,S)-cyclohexene -3-ene-1-carboxylic acid, 手性拆分, chiral resolution, 光学拆分, optical resolution, 外消旋体拆分, 对映选择性水解																							
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 1408848 A (华东理工大学等) 2003年 4月 9日 (2003 - 04 - 09) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>PX</td> <td>CN 110272839 A (江南大学) 2019年 9月 24日 (2019 - 09 - 24) 权利要求1-10</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2004138429 A1 (COUNCIL SCIENT IND RES) 2004年 7月 15日 (2004 - 07 - 15) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2009238811 A1 (MCDANIEL C STEVEN等) 2009年 9月 24日 (2009 - 09 - 24) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106119303 A (浙江工业大学) 2016年 11月 16日 (2016 - 11 - 16) 全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104845922 A (中国海洋大学等) 2015年 8月 19日 (2015 - 08 - 19) 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 1408848 A (华东理工大学等) 2003年 4月 9日 (2003 - 04 - 09) 全文	1-10	PX	CN 110272839 A (江南大学) 2019年 9月 24日 (2019 - 09 - 24) 权利要求1-10	1-10	A	US 2004138429 A1 (COUNCIL SCIENT IND RES) 2004年 7月 15日 (2004 - 07 - 15) 全文	1-10	A	US 2009238811 A1 (MCDANIEL C STEVEN等) 2009年 9月 24日 (2009 - 09 - 24) 全文	1-10	A	CN 106119303 A (浙江工业大学) 2016年 11月 16日 (2016 - 11 - 16) 全文	1-10	A	CN 104845922 A (中国海洋大学等) 2015年 8月 19日 (2015 - 08 - 19) 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 1408848 A (华东理工大学等) 2003年 4月 9日 (2003 - 04 - 09) 全文	1-10																					
PX	CN 110272839 A (江南大学) 2019年 9月 24日 (2019 - 09 - 24) 权利要求1-10	1-10																					
A	US 2004138429 A1 (COUNCIL SCIENT IND RES) 2004年 7月 15日 (2004 - 07 - 15) 全文	1-10																					
A	US 2009238811 A1 (MCDANIEL C STEVEN等) 2009年 9月 24日 (2009 - 09 - 24) 全文	1-10																					
A	CN 106119303 A (浙江工业大学) 2016年 11月 16日 (2016 - 11 - 16) 全文	1-10																					
A	CN 104845922 A (中国海洋大学等) 2015年 8月 19日 (2015 - 08 - 19) 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 2020年 2月 18日		国际检索报告邮寄日期 2020年 2月 26日																					
ISA/CN的名称和邮寄地址 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		授权官员 张蕾 电话号码 86-(10)-53962037																					

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	KIM, H.E. 等. "Gene Cloning, Sequencing, and Expression of an Esterase from <i>Acinetobacter lwoffii</i> I6C-1" CURRENT MICROBIOLOGY, 第46卷, 2003年 12月 31日 (2003 - 12 - 31), 第291-295页	1-10
A	MA, B.D. 等. "Increased Catalyst Productivity in α -Hydroxy Acids Resolution by Esterase Mutation and Substrate Modification" ACS Catal., 第4卷, 2014年 2月 17日 (2014 - 02 - 17), 第1026-1031页	1-10
A	赵玉巧等. "高选择性手性酯酶产生菌的筛选及应用" 应用与环境生物学报, 第8卷, 第6期, 2002年 12月 31日 (2002 - 12 - 31), 第640-643页	1-10

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/120238

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	1408848	A	2003年 4月 9日	CN 1168822 C	2004年 9月 29日
CN	110272839	A	2019年 9月 24日	无	
US	2004138429	A1	2004年 7月 15日	US 2005163739 A1	2005年 7月 28日
US	2009238811	A1	2009年 9月 24日	US 2014193889 A1	2014年 7月 10日
CN	106119303	A	2016年 11月 16日	无	
CN	104845922	A	2015年 8月 19日	CN 104845922 B	2016年 2月 17日