

(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
2019 年 10 月 24 日 (24.10.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/200874 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 1/21 (2006.01) *C12P 13/06* (2006.01)
C12P 7/42 (2006.01) *C12R 1/19* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/111895

(22) 国际申请日: 2018 年 10 月 25 日 (25.10.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810352695.8 2018 年 4 月 19 日 (19.04.2018) CN
201810352649.8 2018 年 4 月 19 日 (19.04.2018) CN
201810352693.9 2018 年 4 月 19 日 (19.04.2018) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 蔡宇杰(CAI, Yujie); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。熊天真(XIONG, Tianzhen); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。刘金彬(LIU, Jinbin); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。丁彦蕊(DING, Yanrui); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。白亚军(BAI, Yajun); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。郑晓晖(ZHENG, Xiaohui); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

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

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,

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

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

本国际公布:

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

(54) Title: ENGINEERING BACTERIA AND USE THEREOF IN PRODUCTION OF DANSHENSU

(54) 发明名称: 一种工程菌及其在丹参素生产中的应用

(57) Abstract: Provided are a recombinant E. coli and the use thereof in the production of danshensu. The recombinant E. coli simultaneously expresses α -hydroxycarboxylic acid dehydrogenase, L- α -amino acid aminotransferase, and any one of glucose dehydrogenase, L-lactic dehydrogenase and L-glutamate dehydrogenase, and genes thereof involved in the decomposition of phenolic compounds are knocked out on the basis of host E. coli.

(57) 摘要: 提供了一种重组大肠杆菌及其在丹参素生产中的应用, 所述重组大肠杆菌同时表达 α -羟基羧酸脱氢酶和 L- α -氨基酸转氨酶, 以及葡萄糖脱氢酶、L-乳酸脱氢酶和 L-谷氨酸脱氢酶中的任意一种, 并在宿主大肠杆菌的基础上敲除了酚类化合物分解相关的基因。



WO 2019/200874 A1

一种工程菌及其在丹参素生产中的应用

技术领域

本发明涉及一种工程菌及其在丹参素生产中的应用，属于生物工程技术领域。

背景技术

提取自丹参的丹参素，学名 R-(+)-3-(3, 4-二羟基苯基)-2-羟基丙酸、D-(+)-β-(3, 4-二羟基苯基)乳酸，英文名为：Danshensu、D-DSS、R-DSS、(R)-(+)-3-(3, 4-Dihydroxyphenyl)-lactic acid、(R)-(+)-3-(3, 4-Dihydroxyphenyl)-2-hydroxypropanoic acid，是一种右旋酚酸类化合物。目前不存在天然的左旋丹参素。

丹参素是丹参水提液中的重要有效成份，国内于 1980 年从丹参水提液中得到并鉴定了结构(丹参水溶性有效成分的研究，II.D(+)-β(3, 4-二羟基苯基)乳酸的结构，上海第一医学院学报，1980，05(7)，384-385)，各种研究表明丹参素具有重要的药理药效作用，在心脑血管疾病的治疗等方面具有独特治疗作用。

当前丹参素主要从丹参中提取得到(专利 CN200810038853.9)。丹参素在丹参中的含量较低，并且丹参种植成本高且产量有限，因此当前丹参素不仅价格高而且远远无法满足市场的需求。专利 CN201310559498.0 提出了一种构建大肠杆菌基因工程菌利用葡萄糖发酵产丹参素的方法，由于合成代谢途径涉及利用羟基化酶，该酶很容易使代谢过程产物氧化而影响丹参素的产率，同时由于大肠杆菌发酵是高耗氧过程，也会氧化丹参素，因此当前该方法产率较低，成本将会高于植物提取过程。专利 CN201210190171.6 提出了水解丹酚酸 B 生产丹参素的方法，丹酚酸 B 需从丹参提取，并且化学水解过程有大量副反应，同样不适用于规模化生产。手性合成丹参素(专利 CN201210420488.4)的催化剂极为昂贵，当前也仅停留在实验室水平。

早在 1988 年 Roth 等人提出了先以化学法处理左旋多巴得到对应的 3,4-二羟基苯丙酮酸，再酶法合成 S-(+)-3-(3,4-二羟基苯基)-2-羟基丙酸(S-DSS, L-DSS)的方法(Enzymatic Synthesis of (S)-(-)-3-(3,4-Dihydroxyphenyl)lactic Acid, Arch. Pharm. (Weinheim) 321, 179-180 (1988))。Z. Findrik, 等人采用蛇毒氨基酸氧化酶将左旋多巴转化成 3,4-二羟基苯丙酮酸，然后再用 D-乳酸脱氢酶还原生成 D-(3,4-二羟基苯基)乳酸(Modelling and Optimization of the(R)-(+)-3,4-dihydroxyphenyllactic Acid Production Catalyzed with D-lactate Dehydrogenase from Lactobacillus leishmannii Using Genetic Algorithm, Chem. Biochem. Eng. Q. 19 (4) 351-358 (2005))。这两种方法制备 3,4-二羟基苯丙酮酸中间体的成本较高，且操作复杂。

发明内容

基于目前各种方法的缺陷，本发明提供了一种基于转氨酶的光学纯的丹参素生产方法，并构建了多酶共表达的工程菌，实现了丹参素的高效生产。本发明所要解决的技术问题是提供一种能低成本生产丹参素的重组菌。同时本发明要解决该菌株的构建和应用的技术问题。

本发明的第一个目的是提供能低成本生产光学纯丹参素的重组菌；所述重组菌同时表达了α-羟基羧酸脱氢酶和 L-α-氨基酸转氨酶，以及以下任意一种：葡萄糖脱氢酶、L-乳酸脱氢酶、L-谷氨酸脱氢酶，并在宿主大肠杆菌的基础上敲除了酚类化合物分解相关的基因。

在一种实施方式中，所述α-羟基羧酸脱氢酶为 D 型α-羟基羧酸脱氢酶，来自 Lactobacillus plantarum ATCC 14917、Enterococcus faecalis ATCC 35038 或者 Lactobacillus fermentum ATCC 14931。

在一种实施方式中，所述α-羟基羧酸脱氢酶为 L 型α-羟基羧酸脱氢酶，来自 Bacillus coagulans DSM 1、Weissella confusa strain DSM 20196 或者 Lactobacillus fermentum ATCC 14931。

在一种实施方式中,所述 α -羟基羧酸脱氢酶为 D- α -羟基羧酸脱氢酶,其氨基酸序列是 NCBI 上 accession NO. 为 WP_003643296.1、WP_002335374.1、或 EEI22188.1 的序列; α -羟基羧酸脱氢酶为 L- α -羟基羧酸脱氢酶,其氨基酸序列是 NCBI 上 accession NO 为 WP_013858488.1、WP_003607654.1 或 WP_035430779.1 的序列。

在一种实施方式中,D- α -羟基羧酸脱氢酶的核苷酸序列是 NCBI 上 accession NO. 为 NZ_GL379761 REGION: COMPLEMENT(533562..534560)、NZ_KB944641 REGION: 161892..162830、ACGI01000078 REGION: 20793..21791 的序列;L- α -羟基羧酸脱氢酶的核苷酸序列是 NCBI 上 accession NO. 为 NZ_ATUM01000014 REGION: 39316..40254、NZ_JQAY01000006 REGION: 69708..70640、NZ_GG669901 REGION: 45517..46470 的序列。

在一种实施方式中,所述 L- α -氨基酸转氨酶来自 *Escherichia coli* BL21、*Lactobacillus plantarum* ATCC 14917、*Lactobacillus paracasei* ATCC 334。

在一种实施方式中,L- α -氨基酸转氨酶的氨基酸序列是 NCBI 上 accession NO 为 WP_000462687.1、WP_000486988.1、WP_003643296.1、YP_806114.1 的序列。

在一种实施方式中,L- α -氨基酸转氨酶的核苷酸序列是 NCBI 上 accession NO 为: NC_012892 REGION: COMPLEMENT(989603..990793)、NC_012892 REGION: 4174517..4175710、NZ_GL379768 REGION: complement(121900..123087)、NC_008526 REGION: complement(840419..841594)的序列。

在一种实施方式中,所述葡萄糖脱氢酶来自 *Bacillus subtilis* ATCC 13952。

在一种实施方式中,所述葡萄糖脱氢酶的氨基酸序列是 NCBI 上 accession NO 为 WP_013351020.1 序列。

在一种实施方式中,所述葡萄糖脱氢酶的核苷酸序列是 NCBI 上 accession NO 为: NZ_CP009748 REGION: 386154..38693。

在一种实施方式中,所述 L-乳酸脱氢酶来自 *Lactococcus lactis* ATCC 19257。

在一种实施方式中,所述 L-乳酸脱氢酶的氨基酸序列是 NCBI 上 accession NO 为 WP_003131075.1 序列。

在一种实施方式中,所述 L-乳酸脱氢酶的核苷酸序列是 NCBI 上 accession NO 为: NZ_JXJZ01000017 REGION: 18532..19509 的序列。

在一种实施方式中,所述 L-谷氨酸脱氢酶来自 *Escherichia coli* BL21、*Rhodobacter sphaeroides* ATCC BAA-808、*Clostridium symbiosum* ATCC 14940、*Bacillus subtilis* 168。

在一种实施方式中,L-谷氨酸脱氢酶的氨基酸序列是 NCBI 上 accession NO 为 WP_000373021.1、WP_011338202.1、WP_003497202.1、WP_010886557.1 序列。

在一种实施方式中,L-谷氨酸脱氢酶的核苷酸序列是 NCBI 上 accession NO 为: NC_012892 REGION: 1786741..1788084、NC_007493 REGION: complement(2129131..2130558)、NZ_KE992901 REGION: complement(17603..18955)、NC_000964 REGION: complement(2402067..2403350)的序列。

在一种实施方式中,所述重组菌,是将编码 L- α -氨基酸转氨酶、 α -羟基羧酸脱氢酶和以下任意一种:葡萄糖脱氢酶、L-乳酸脱氢酶、L-谷氨酸脱氢酶的基因,都连接到质粒上,构建得到三基因共表达重组质粒,然后将重组质粒转化相应菌株,得到重组工程菌。

在一种实施方式中,所述重组菌是以 *Escherichia coli* BL21(DE3)为宿主构建得到的。

在一种实施方式中,所述酚类化合物分解相关的基因为 hpaD、mhpB 中的任意一种或者两种组合。

在一种实施方式中,所述酚类物质分解基因的核苷酸序列是 NCBI 上,NCBI 上 accession NO 为: NC_012892 REGION: complement(4505585..4506436) 和 NC_012892 REGION: 339806..340750。

在一种实施方式中,所述重组菌还强化表达了丙酮酸转运基因、L-乳酸转运基因、谷氨酸转运基因、NAD 合成基因、磷酸吡哆醛合成基因一种或者多种;其中,丙酮酸转运基因、L-乳酸转运基因、谷氨酸转运基因不同时表达。

在一种实施方式中,所述强化表达是通过将 *Escherichia coli* BL21(DE3)基因组上所要强化表达的基因前增加组成型启动子。

在一种实施方式中,所述强化表达的基因为丙酮酸转运相关的基因、lldP(乳酸转运基因)、gltS(谷氨酸转运基因)、nadA(NAD 合成基因)、pdxJ(磷酸吡多醛合成基因)中的任意一种或多种;其中,所述丙酮酸转运相关的基因包括 btsT 和 ybdD(丙酮酸向胞内转运基因)。

在一种实施方式中,所述 btsT 和 ybdD 在 NCBI 上 accession NO 为:; nadA 为 NC_012892 REGION: 740487..741530; pdxJ 为 NC_012892 REGION: complement (2567591..2568322)。

在一种实施方式中,所述 lldP 在 NCBI 上 accession NO 为: NC_012892 REGION: 3646638..3648293; nadA 为 NC_012892 REGION: 740487..741530; pdxJ 为 NC_012892 REGION: complement (2567591..2568322)。

在一种实施方式中,所述 gltS 在 NCBI 上 accession NO 为: NC_012892 REGION: complement(3694931..3696136); nadA 为 NC_012892 REGION: 740487..741530; pdxJ 为 NC_012892 REGION: complement (2567591..2568322)。

本发明的第二个目的是提供一种生产丹参素的方法,所述方法是利用本发明的重组菌。

在一种实施方式中,所述生产丹参素,是进行全细胞转化生产。

在一种实施方式中,所述全细胞转化生产的体系中,包括细胞湿重为 1-200g/L 和左旋多巴浓度为 1-200g/L;

当所述重组菌同时表达 α -羟基羧酸脱氢酶、L- α -氨基酸转氨酶和葡萄糖脱氢酶时,所述全细胞转化生产的体系中还包 括: 丙酮酸浓度为 1-200g/L 和葡萄糖浓度为 1-200g/L;

当所述重组菌同时表达 α -羟基羧酸脱氢酶、L- α -氨基酸转氨酶和 L-乳酸脱氢酶时,所述全细胞转化生产的体系中还包 括: L-乳酸 1-200g/L;

当所述重组菌同时表达 α -羟基羧酸脱氢酶、L- α -氨基酸转氨酶和 L-谷氨酸脱氢酶时,所述全细胞转化生产的体系中还包 括: L-谷氨酸 1-200g/L;

所述全细胞转化生产的体系 pH 6.0-9.0; 于 15-40℃反应,时间 1-48 小时。

本发明的有益效果:

本发明构建了一种新型的多酶共表达基因工程菌,实现了丹参素的低成本生产,进一步地,通过敲除或强化表达大肠杆菌基因组上的相 关基因促进底物的转运及减少产物的分解。本发明选择的(D/L)- α -羟基羧酸脱氢酶均具有底物专一性差,光学专一性强的特点,可生产光学纯的 D-丹参素和 L-丹参素。该生产过程简单且原料易得,具有良好的工业化应用前景。

具体实施方案

本发明的工程菌的功能核心在于可以同时表达 3 种酶,分别为 L- α -氨基酸转氨酶、 α -羟基羧酸脱氢酶和以下任意一种: 葡萄糖脱氢酶、L-乳酸脱氢酶、L-谷氨酸脱氢酶。其原理为: 在工程菌全细胞内,葡萄糖脱氢酶或 L-乳酸脱氢酶或 L-谷氨酸脱氢酶以菌体内的 NAD 为辅酶将对应的葡萄糖脱氢或 L-乳酸脱氢酶或 L-谷氨酸脱氢酶生成 NADH 和对应的葡萄糖酸或丙酮酸或 α -酮戊二酸; 左旋多巴被 L- α -氨基酸转氨酶脱氨生成 3,4-二羟基苯丙酮酸,丙酮酸获得氨转化成丙氨酸; α -羟基羧酸脱氢酶利用葡萄糖脱氢过程生成的 NADH 将 3,4-二羟基苯丙酮酸还原成丹参素、同时实现了辅酶 NAD 的再生。进一步地,同时敲除或强化表达大肠杆菌基因组上的相 关基因促进底物的转运及减少产物的分解。

为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案如下:

1. 本发明所涉及的菌株及质粒

购自美国菌种保藏中心 ATCC 的 *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917、*Enterococcus faecalis* ATCC 35038、*Lactobacillus fermentum* ATCC 14931、*Lactobacillus paracasei* ATCC 334、

Bacillus subtilis ATCC 13952、Escherichia coli BL21 (DE3)、Lactococcus lactis ATCC 19257。购自德国微生物菌种保藏中心 DSMZ 的 Bacillus coagulans DSM 1、Weissella confusa strain DSM 20196。购自 Novagen 公司的 pETDuet-1、pACYCDuet-1、pCOLADuet-1、pRSFDuet-1 质粒和 Escherichia coli BL21(DE3)。

2. 大肠杆菌中相关基因的敲除及组成型强化表达

(1) 大肠杆菌酚类化合物分解相关的基因的敲除

本发明中的酚类物质都极易被大肠杆菌中的酶分解, 根据文献(Biodegradation of Aromatic Compounds by Escherichia coli, Microbiol Mol Biol Rev. 2001, 65(4): 523–569.), 将相关基因敲除, 避免产物和底物的分解。选择的基因是 hpaD 和 mhpB, NCBI 上 accession NO 为: NC_012892 REGION: complement(4505585..4506436)和 NC_012892 REGION: 339806..340750。

(2) 大肠杆菌丙酮酸转运基因的组成型强化表达

在全细胞转化过程中, 需把底物转运至细胞内才能进行, 增强丙酮酸转运蛋白有助于快速并长时间维持胞内底物的高浓度, 有利于反应的进行。选择丙酮酸转运相关的基因是 btsT 和 ybdD, NCBI 上 accession NO 为: NC_012892 REGION: complement(4496239..4498389)和 NC_012892 REGION: 592652..592849。多巴与芳香族氨基酸类似, 细胞培养过程中需要吸收氨基酸等, 因此菌体本身会表达大量的氨基酸转运蛋白, 无须再强化表达。

(3) 大肠杆菌辅酶合成相关重要基因的组成型强化表达

在 α -羟基羧酸脱氢酶还原过程中需要以 NADH 为辅酶, 强化表达大肠杆菌 NAD 合成途径的关键酶, 可以提高菌体内的 NAD 水平, 从而有利于丹参素的生成。选择的基因有 nadA。NCBI 上 accession NO 为: NC_012892 REGION: 740487..741530。

磷酸吡多醛(胺)是 L- α -氨基酸转氨酶的辅酶, 过表达该辅酶途径中的核心基因 pdxJ, 有利于左旋多巴的合成。NCBI 上 accession NO 为: NC_012892 REGION: complement(2567591..2568322)。

3. 酶的选择

(1) L- α -氨基酸转氨酶的选择

L- α -氨基酸转氨酶广泛存在于细菌、真菌、哺乳动物细胞中。通常活力最高的是以 α -酮戊二酸或草酰乙酸为受氨体的转氨酶, 在这过程中 α -酮戊二酸或草酰乙酸价格昂贵, 而对应生成的谷氨酸或天冬氨酸价值均远低于对应的前体, 综合考查 20 种天然 L-氨基酸对应的 α -酮酸发现, 丙酮酸与丙氨酸的价格相当, 因此本申请选择以丙酮酸为氨的受体, 从而实现丙氨酸与丹参素的联产。从 Lactobacillus plantarum ATCC 14917、Lactobacillus paracasei ATCC 334 中分别克隆得到 L- α -氨基酸转氨酶基因 lpt、lct, 其氨基酸序列是 NCBI 上 accession NO. 为 WP_003643296.1、YP_806114.1 的序列。从 Escherichia coli BL1 (DE3) 中克隆得到两个 L- α -氨基酸转氨酶基因 ect1、ect2, 其氨基酸序列是 NCBI 上 accession NO 为 WP_000462687.1、WP_000486988.1。

(2) α -羟基羧酸脱氢酶的选择

根据最适底物的情况, α -羟基羧酸脱氢酶包含有乳酸脱氢酶、 α -羟酸异己酸脱氢酶、扁桃酸脱氢酶、乙醛酸还原酶等, 这些酶能广泛作用于多种底物生成 α -羟基羧酸, 通常根据其最适作用的底物来命名。本发明从中选择光学性强且对 3, 4-二羟基苯丙酮酸具有较强活性的酶, 用于 D 或 L 丹参素的生产。从 Lactobacillus plantarum ATCC 14917、Enterococcus faecalis ATCC 35038、Lactobacillus fermentum ATCC 14931 中分别克隆得到 D 型 α -羟基羧酸脱氢酶基因 lpldhd、efmdhd、lflhdhd, 其氨基酸序列是 NCBI 上 accession NO. 为 WP_003643296.1、WP_002335374.1、EEI22188.1 的序列。从 Bacillus coagulans DSM 1、Weissella confusa strain DSM 20196、Lactobacillus fermentum ATCC 14931 中分别克隆得到 L 型 α -羟基羧酸脱氢酶基因 bclhdh、wclhdh、lflhdh, 其氨基酸序列是 NCBI 上 accession NO 为 WP_013858488.1、WP_003607654.1、WP_035430779.1 的序列。

(3) 葡萄糖脱氢酶的选择

在生物转化反应中， α -羟基羧酸脱氢酶需要以 NADH 和/或 NADPH 为辅酶，采常有甲酸脱氢酶、葡萄糖脱氢酶、亚磷酸酸脱氢酶等，葡萄糖脱氢酶相对于其它来酶来说活力最高，因此本发明从 *Bacillus subtilis* ATCC 13952 得到葡萄糖脱氢酶基因 *bsgdh*(氨基酸序列是 WP_013351020.1)。

(4)L-乳酸脱氢酶的选择

L-乳酸是最为廉价的有机酸，脱氢后成的丙酮酸再转氨生成的丙氨酸具有较高的附加值。L-乳酸脱氢酶广泛存在于多种微生物中，以 L-乳酸为底物将 L-乳酸上生成的氢传递给辅酶 NAD 或 NADP，从而生成 NADH 或 NADPH。NADH 或者 NADPH 可以作为前述的 α -羟基羧酸脱氢酶的供氢体。通常来讲以 NAD(NADP)为辅酶的乳酸脱氢酶更趋向于以丙酮酸为底物合成乳酸，但当乳酸过量等情况下乳酸脱氢酶会脱掉乳酸的氢生成丙酮酸。本发明从 *Lactococcus lactis* ATCC 19257 中得到 L-乳酸脱氢酶基因 *lldh*(氨基酸序列是 WP_003131075.1)。

(5)L-谷氨酸脱氢酶的选择

L-谷氨酸是最为廉价的一种氨基酸，脱氢后生成的 α -酮戊二酸可作为左旋多巴转氨脱氨的受氨体。L-谷氨酸脱氢酶广泛存在于几乎所有生物中，以 L-谷氨酸为底物将 L-谷氨酸上生成的氢传递给辅酶 NAD 或 NADP，从而生成 NADH 或 NADPH。NADH 或者 NADPH 可以作为前述的羟基羧酸脱氢酶的供氢体。本发明从 *Escherichia coli* BL21、*Rhodobacter sphaeroides* ATCC BAA-808、*Clostridium symbiosum* ATCC 14940、*Bacillus subtilis* 168 中分别得到 L-谷氨酸基因 *ecgdh*(氨基酸序列是 WP_000373021.1)、*rsgdh*(氨基酸序列是 WP_011338202.1)、*csgdh*(氨基酸序列是 WP_003497202.1)、*bsgdh*(氨基酸序列是 WP_010886557.1)。

4. 三酶共表达体系的构建及细胞的培养

目前大肠杆菌多基因共表达有多种方法(大肠杆菌多基因共表达策略，中国生物工程杂志，2012，32(4):117-122)，本发明采用刘向磊(合成生物学技术改造大肠杆菌生产莽草酸及白藜芦醇，2016，上海医药工业研究院，博士论文)所述方法构建，每个基因前均包含 T7 启动子和 RBS 结合点，每个基因后有一个 T7 终止子。理论上讲因为每个基因前都有 T7 和 RBS，因此基因的表达强度受排列次序的影响不大。每个质粒上包含三个基因(L- α -氨基酸转氨酶、(D/L)- α -羟基羧酸脱氢酶、葡萄糖脱氢酶或 L-乳酸脱氢酶或 L-谷氨酸脱氢酶对应的基因)，将构建好的质粒热转导入大肠杆菌感受态细胞中，并涂布于抗生素固体平板上，筛选得到阳性转化子，即得到重组大肠杆菌。细胞的培养：根据经典的重组大肠杆菌培养及诱导表达方案，将重组大肠杆菌按体积比为 2% 的量转接到 LB 发酵培养基(蛋白胨 10g/L、酵母粉 5g/L、NaCl 10g/L)中，当细胞 OD₆₀₀ 达到 0.6-0.8 后，加入终浓度为 0.4mM 的 IPTG，在 20℃ 诱导表达培养 8h。诱导表达结束后，20℃、8000rpm、20 分钟离心收集细胞。

5. 全细胞转化生产纯丹参素

细胞转化生产的体系为：细胞湿重为 1-200g/L，左旋多巴浓度为 1-200g/L；

当所述重组菌同时表达 α -羟基羧酸脱氢酶、L- α -氨基酸转氨酶和葡萄糖脱氢酶时，所述全细胞转化生产的体系中还包：丙酮酸浓度为 1-200g/L 和葡萄糖浓度为 1-200g/L；

当所述重组菌同时表达 α -羟基羧酸脱氢酶、L- α -氨基酸转氨酶和 L-乳酸脱氢酶时，所述全细胞转化生产的体系中还包：L-乳酸 1-200g/L；

当所述重组菌同时表达 α -羟基羧酸脱氢酶、L- α -氨基酸转氨酶和 L-谷氨酸脱氢酶时，所述全细胞转化生产的体系中还包：L-谷氨酸 1-200g/L；

所述全细胞转化生产的体系 pH 6.0-9.0，于 15-40℃ 反应，时间 1-48 小时。

转化结束后液相色谱测定丹参素产量及构型。左旋多巴溶解度较低，高浓度情况下是含有不溶物的混悬液。

6. 样品的检测分析

丹参素定量分析：转化液采用 PerkinElmer Series 200 高效液相色谱仪检测分析，配示差折光检测器。色谱条件为：流动相是甲醇-0.1%甲酸水(40:60)、采用汉邦 Megres C18 色谱柱(4.6×250mm，5 μ m)，流速 1ml/min、柱温 30℃、进样量 20 μ l。

手性分析: PerkinElmer Series 200 高效液相色谱仪检测分析, 配示紫外检测器, Chiralcel OD-H 手性柱(4.6×250mm), 流动相体积比为正己烷:异丙醇:三氟乙酸=80:20:0.1, 流速为 0.5 mL/min, 柱温 25℃, 进样量 20μL, 检测波长 280nm。

丹参素溶解度较低, 转化过程如有结晶析出, 则稀释后测定。

丹参素的光学纯度通过对映体过量值(%e.e)来评价。

当生产 R-丹参素时,

$$\text{对映体过量值 \%e.e} = [(S_R - S_S) / (S_R + S_S) \times 100\%]$$

当生产 S-丹参素时,

$$\text{对映体过量值 \%e.e} = [(S_S - S_R) / (S_R + S_S) \times 100\%]$$

式中 S_S 为转化液中 S-丹参素的峰面积, S_R 为转化液中 R-丹参素的液相色谱峰面积。

为了使本发明所要解决的技术问题、技术方案及有益效果更加清楚明白, 以下结合实施例, 对本发明进行详细的说明。应当说明的是, 此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明, 并不用于限定本发明。

实施例 1

根据文献 Large scale validation of an efficient CRISPR/Cas-based multi gene editing protocol in *Escherichia coli*. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1):68 所述的方法将 *Escherichia coli* BL21(DE3) 上的 hpaD 和 mhpB 进行单或双敲除。其中, 本发明所用基因敲除的质粒为 pCasRed 与 pCRISPR-gDNA(hpaD sgRNA) 与同源臂(hpaD donor)一起导入 *Escherichia coli* BL21(DE3) 上, Cas9/sgRNA 诱发宿主在 hpaD 基因位点发生双链断裂, 重组酶 Red 将 hpaD donor 整合到 hpaD 基因上, 实现基因的敲除, 并测序验证。hpaD sgRNA、hpaD donor、mhpB sgRNA、mhpB donor 分别如序列 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12 所示。mhpB 以同样的方式敲除。

配置 pH 为 7 的溶液, 左旋多巴或 D-丹参素 4g/L, 湿菌体量 200g/L, 35℃ 放置 10 小时后测定浓度, 表 1 中显示了反应体系中, 左旋多巴和 D-丹参素的剩余量。

表 1 不同菌株对底物和产物分解后的剩余浓度

	左旋多巴 g/L	D-丹参素 g/L
<i>Escherichia coli</i> BL21(DE3)	1.6	1.4
<i>Escherichia coli</i> BL21(Δ hpaD Δ mhpB, DE3)	3.7	3.5
<i>Escherichia coli</i> BL21(Δ hpaD, DE3)	2.0	2.8
<i>Escherichia coli</i> BL21(Δ mhpB, DE3)	1.7	1.5

很显然 *Escherichia coli* BL21(Δ hpaD Δ mhpB, DE3) 效果最好, 将之命名为 *Escherichia coli* HM。

实施例 2

L- α -氨基酸转氨酶的筛选, 分别从大肠杆菌和乳杆菌中克隆多种 L- α -氨基酸转氨酶基因, 并在 *Escherichia coli* BL21(DE3) 中得到表达, 破胞测定粗酶液活性, 以丙酮酸为受体时比较各种酶的活性, 根据文献 (转氨酶催化不对称合成芳香族 L-氨基酸. 生物工程学报, 2012, 28(11):1346-1358.) 所述的方法测定 L- α -氨基酸转氨酶的活性, 结果如表 2 所示。因此选择来源于大肠杆菌的 L- α -氨基酸转氨酶 ect1 用于左旋多巴的转氨脱氨是最佳的。

以 α -酮戊二酸为受体时比较各种酶的活性, 根据文献 (转氨酶催化不对称合成芳香族 L-氨基酸. 生物工程学报, 2012, 28(11):1346-1358.) 所述的方法测定 L- α -氨基酸转氨酶的活性, 结果如表 3 所示。因此选择来源于 *Lactobacillus paracasei* ATCC 334 的 L- α -氨基酸转氨酶 lct 用于左旋多巴的转氨脱氨是最佳的。

诱导表达方法:将重组大肠杆菌按体积比为 2% 的量转接到 LB 发酵培养基(蛋白胨 10g/L、酵母粉 5g/L、NaCl 10g/L)中,当细胞 OD600 达到 0.6-0.8 后,加入终浓度为 0.4mM 的 IPTG,在 20℃ 诱导表达培养 8h。诱导表达结束后,20℃、8000rpm、20 分钟离心收集细胞。

表 2 不同 L- α -氨基酸转氨酶的活性比较

重组菌	活性 U/ml
Escherichia coli BL21(DE3)/pETDuet-1-ect1	2
Escherichia coli BL21(DE3)/pETDuet-1-ect2	0.01
Escherichia coli BL21(DE3)/pETDuet-1-lpt	1.2
Escherichia coli BL21(DE3)/pETDuet-1-lct	0.6

表 3 不同 L- α -氨基酸转氨酶的活性比较

重组菌	活性 U/ml
Escherichia coli BL21/pETDuet-1-ect1	2.1
Escherichia coli BL21/pETDuet-1-ect2	0.9
Escherichia coli BL21/pETDuet-1-lpt	2.4
Escherichia coli BL21/pETDuet-1-lct	3.1

实施例 3

α -羟基羧酸脱氢酶酶学性质的比较。通常这种酶类也可能具有还原丙酮酸生成乳酸的能力,因此不能还原或极微弱还原丙酮酸的酶是比较好的。以丙酮酸为底物,比较了不同酶的还原能力,根据文献(粘质沙雷氏菌 H3010 发酵型 D-乳酸脱氢酶基因的克隆表达、纯化及酶学性质研究.工业微生物,2012,42(04):30-37.)所述的方法测定以 NAD 为辅酶还原丙酮酸的活性,实验结果如表 4 所示。

表 4 各种 α -羟基羧酸脱氢酶还原丙酮酸活性比较

重组菌	活性 U/ml
Escherichia coli HM/pETDuet-1-lpldhd	6.6
Escherichia coli HM/pETDuet-1-efmdhd	0
Escherichia coli HM/pETDuet-1-lfldhd	0.7
Escherichia coli HM/pETDuet-1-bcldhl	5.2
Escherichia coli HM/pETDuet-1-wcldhl	0.2
Escherichia coli HM/pETDuet-1-lfldhl	6.3

实施例 4

同时表达 α -羟基羧酸脱氢酶、L- α -氨基酸转氨酶和葡萄糖脱氢酶的重组大肠杆菌构建:首先将编码 L- α -氨基酸转氨酶、 α -羟基羧酸脱氢酶和葡萄糖脱氢酶的基因,连接到质粒上。得到三基因共表达重组质粒,将质粒转化大肠杆菌 Escherichia coli HM,利用抗生素平板筛选得到阳性转化子,即得到重组大肠杆菌。

将重组大肠杆菌诱导表达完成后收集菌体,于 100ml 反应体积中,细胞湿重 40g/L,左旋多巴 40g/L,丙酮酸 30g/L,葡萄糖 30g/L, pH 8.0,于 35℃ 反应,时间 12 小时。转化结束后液相色谱测定丹参素产量及构型,结果如表 5 所示。

表 5 各种重组菌的比较

重组菌	丹参素			丙氨酸 g/L
	浓度 g/L	构型	c.e%	

Escherichia coli HM/pETDuet-1-wcldhl-ect1-bsgdh	18.3	S	>99.9	9.3
Escherichia coli HM/pETDuet-1-bcldhl-ect1-bsgdh	18.1	S	>99.9	10.0
Escherichia coli HM/pETDuet-1-lfldhl-ect1-bsgdh	17.9	S	>99.9	9.6
Escherichia coli HM/pETDuet-1-efmdhd-ect1-bsgdh	20.6	R	>99.9	10.7
Escherichia coli HM/pETDuet-1-lpldhd-ect1-1-bsgdh	15.8	R	>99.9	9.8
Escherichia coli HM/pETDuet-1-lfldhd-ect1-bsgdh	22.6	R	>99.9	11.6

实施例 5

同时表达 α -羟基羧酸脱氢酶、L- α -氨基酸转氨酶和 L-乳酸脱氢酶的重组大肠杆菌构建：首先将编码 L-乳酸脱氢酶、L- α -氨基酸转氨酶、 α -羟基羧酸脱氢酶的基因，连接到质粒上。得到三基因共表达重组质粒，将质粒转化大肠杆菌 *Escherichia coli* HM，利用抗生素平板筛选得到阳性转化子，即得到重组大肠杆菌。

将重组大肠杆菌诱导表达完成后收集菌体，于 100ml 反应体积中，细胞湿重为 40g/L，左旋多巴浓度为 40g/L，丙酮酸浓度为 30g/L，pH 8.0，于 35℃ 反应，时间 12 小时。转化结束后液相色谱测定丹参素产量及构型，结果如表 6 所示。

表 6 各种重组菌的比较

重组菌	丹参素			丙氨酸 g/L
	浓度 g/L	构型	e.e%	
Escherichia coli HM/pETDuet-1-wcldhl-ect1-llldh	16.3	S	>99.9	9.7
Escherichia coli HM/pETDuet-1-bcldhl-ect1-llldh	5.7	S	>99.9	4.6
Escherichia coli HM/pETDuet-1-lfldhl-ect1-llldh	6.3	S	>99.9	4.0
Escherichia coli HM/pETDuet-1-efmdhd-ect1-llldh	17.1	R	>99.9	8.6
Escherichia coli HM/pETDuet-1-lpldhd-ect1-1-llldh	8.9	R	>99.9	5.4
Escherichia coli HM/pETDuet-1-lfldhd-ect1-llldh	15.5	R	>99.9	8.4

实施例 6

同时表达 α -羟基羧酸脱氢酶、L- α -氨基酸转氨酶和 L-谷氨酸脱氢酶重组大肠杆菌构建：首先将编码 L- α -氨基酸转氨酶、 α -羟基羧酸脱氢酶和 L-谷氨酸脱氢酶的基因，连接到质粒上。得到三基因共表达重组质粒，将质粒转化大肠杆菌 *Escherichia coli* HM，利用抗生素平板筛选得到阳性转化子，即得到重组大肠杆菌。

将重组大肠杆菌诱导表达完成后收集菌体，于 100ml 反应体积中，细胞湿重为 40g/L，左旋多巴浓度为 40g/L，L-谷氨酸浓度为 30g/L，pH 8.0，于 35℃ 反应，时间 12 小时。转化结束后液相色谱测定丹参素产量及构型，结果如表 7 所示。

表 7 各种重组菌的比较

重组菌	丹参素		
	浓度 g/L	构型	e.e%
Escherichia coli HM/pETDuet-1-wcldhl-bsgdh-lct	19.6	S	>99.9
Escherichia coli HM/pETDuet-1-bcldhl-bsgdh-lct	19.4	S	>99.9
Escherichia coli HM/pETDuet-1-lfldhl-bsgdh-lct	14.5	S	>99.9
Escherichia coli HM/pETDuet-1-efmdhd-bsgdh-lct	21.7	R	>99.9
Escherichia coli HM/pETDuet-1-lpldhd-bsgdh-1-lct	17.1	R	>99.9

Escherichia coli HM/pETDuet-1- lfldhd-bsgdh-lct	22.5	R	>99.9
Escherichia coli HM/pETDuet-1- efmdhd-bsgdh-ect1	14.3	R	>99.9
Escherichia coli HM/pETDuet-1-efmdhd-bsgdh-ect2	21.4	R	>99.9
Escherichia coli HM/pETDuet-1-efmdhd-bsgdh-lpt	19.6	R	>99.9
Escherichia coli HM/pCOLADuet-1-lfldhd-bsgdh-lct	26.3	R	>99.9
Escherichia coli HM/pRSFDuet-1- lfldhd-bsgdh-lct	23.4	R	>99.9
Escherichia coli HM/pCOLADuet-wcldhl-bsgdh-lct	25.9	S	>99.9

实施例 7

采用文献 Large scale validation of an efficient CRISPR/Cas-based multi gene editing protocol in Escherichia coli. Microbial Cell Factories,2017,16(1):68 所述的方法,将 Escherichia coli HM 基因组上对应基因前增加大肠杆菌的 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(gpdA)前的中等表达强度组成型启动子(PG),序列如 SEQ ID NO:8 所示。

强化基因 btsT 表达时,以 Escherichia coli HM 基因组为模板,以引物 btsT-FF/btsT-FR、btsT-gpdA-F/btsT-gpdA-R、btsT-RF/btsT-RR,扩增出上游、启动子、下游序列,并以 btsT-FF 和 btsT-RR 为引物融合为含有 gpdA 启动子的表达框。然后与质粒 pCasRed、pCRISPR-gDNA(含 btsT sgRNA)一起转入 Escherichia coli HM 后,Cas9/sgRNA 诱发宿主在 btsT 基因位点发生双链断裂,重组酶 Red 将 gpdA 启动子整合到 btsT 基因之前,并测序验证。

强化基因 ybdD 表达时,以 Escherichia coli HM 基因组为模板,以引物 ybdD-FF/ybdD-FR、ybdD-gpdA-F/ybdD-gpdA-R、ybdD-RF/ybdD-RR,扩增出上游、启动子、下游序列,并以 ybdD-FF 和 ybdD-RR 为引物融合为含有 gpdA 启动子的表达框。然后与质粒 pCasRed、pCRISPR-gDNA(含 ybdD sgRNA)一起转入 Escherichia coli HM 后,Cas9/sgRNA 诱发宿主在 ybdD 基因位点发生双链断裂,重组酶 Red 将 gpdA 启动子整合到 ybdD 基因之前,并测序验证。

下表 8 为引物名称与序列序号的对应索引。

表 8 引物名称与序列序号对照

名称	序列表中编号
btsT sgRNA	SEQ ID NO:20
btsT-FF	SEQ ID NO:22
btsT-FR	SEQ ID NO:23
btsT-gpdA-F	SEQ ID NO:24
btsT-gpdA-R	SEQ ID NO:25
btsT-RF	SEQ ID NO:26
btsT-RR	SEQ ID NO:27
ybdD sgRNA	SEQ ID NO:21
ybdD-FF	SEQ ID NO:28
ybdD-FR	SEQ ID NO:29
ybdD-gpdA-F	SEQ ID NO:30
ybdD-gpdA-R	SEQ ID NO:31
ybdD-RF	SEQ ID NO:32

ybdD-RR	SEQ ID NO:33
---------	--------------

根据实施例 2 所述的诱导表达方法, 收集各类细胞进行转化分析, 结果如表 9 所示。转化体系中全细胞转化体系为: 细胞湿重 5 g/L, 丙酮酸 50g/L, 左旋多巴 20 g/L, 葡萄糖 50g/L, pH 8.0, 温度为 40℃, 摇床转速 250 转/分钟; 转化时间 12 小时。

表 9 转化结果比较

重组菌	丹参素			丙氨酸 g/L
	浓度 g/L	构型	e.e%	
Escherichia coli HM (PG-btsT)/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-bsgdh	4.3	R	>99.9	2.7
Escherichia coli HM (PG-ybdD)/pCOLADuet-wcldhl-ect1-bsgdh	4.6	S	>99.9	3.1
Escherichia coli HM (PG-btsT)/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-bsgdh	4.1	R	>99.9	3.2
Escherichia coli HM (PG-ybdD)/pCOLADuet-1-wcldhl-ect1-bsgdh	4.3	S	>99.9	2.9
Escherichia coli HM (PG-btsT, PG-ybdD)/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-bsgdh	5.8	R	>99.9	4.1
Escherichia coli HM (PG-btsT,PG- ybdD)/pCOLADuet-1-wcldhl-ect1-bsgdh	5.1	S	>99.9	3.9
Escherichia coli HM/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-bsgdh	4.5	R	>99.9	2.9
Escherichia coli HM/ pCOLADuet-1-wcldhl-ect1-bsgdh	3.9	S	>99.9	2.6

将效果最好的 Escherichia coli HM (PG-btsT, PG-ybdD)命名为 Escherichia coli HMBY。

强化基因 lldP 表达时, 以 Escherichia coli HM 基因组为模板, 扩增出上游、启动子、下游序列, 再得到含有 gpdA 启动子的表达框。然后与质粒 pCasRed、pCRISPR-gDNA(含 lldP sgRNA)一起转入 Escherichia coli HM 后, Cas9/sgRNA 诱发宿主在 lldP 基因位点发生双链断裂, 重组酶 Red 将 gpdA 启动子整合到 lldP 基因之前, 并测序验证。

根据实施例 2 所述的诱导表达方法, 收集各类细胞进行转化分析, 结果如表 10 所示。转化体系中全细胞转化体系为: 细胞湿重 5 g/L, L-乳酸 50g/L, 左旋多巴 20 g/L, pH 8.0, 温度为 40℃, 摇床转速 250 转/分钟; 转化时间 12 小时。

表 10 转化结果比较

重组菌	丹参素			丙氨酸 g/L
	浓度 g/L	构型	e.e%	
Escherichia coli HM (PG-lldP)/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-llldh	5.3	R	>99.9	3.3
Escherichia coli HM (PG-lldP)/ pCOLADuet-1-wcldhl-ect1-llldh	7.0	S	>99.9	3.8
Escherichia coli HM/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-llldh	3.8	R	>99.9	2.6
Escherichia coli HM/ pCOLADuet-1-wcldhl-ect1-llldh	5.5	S	>99.9	3.7

将效果最好的 Escherichia coli HM (PG-lldP)命名为 Escherichia coli HML。

强化基因 gltS 表达时, 以 Escherichia coli HM 基因组为模板, 扩增出上游、启动子、下游序列, 再得到含有 gpdA 启动子的表达框。然后与质粒 pCasRed、pCRISPR-gDNA(含 gltS sgRNA)一起转入 Escherichia coli HM 后, Cas9/sgRNA 诱发宿主在 gltS 基因位点发生双链断裂, 重组酶 Red 将 gpdA 启动子整合到 gltS 基因之前, 并测序验证。

根据实施例 2 所述的诱导表达方法, 收集各类细胞进行转化分析, 结果如表 11 所示。转化体系中全细胞转化体系为: 细胞湿重 5 g/L, L-谷氨酸 1g/L, 左旋多巴 20 g/L, pH 8.0, 温度为 40℃, 摇床转速 250 转/分钟; 转化时间 12 小时。

表 11 转化结果比较

重组菌	丹参素 g/L		
	浓度 g/L	构型	e.e%
Escherichia coli HM (PG-gltS)/pCOLADuet-1-lfldhd-bsgdh-lct	9.4	R	>99.9
Escherichia coli HM (PG-gltS)/ pCOLADuet-1-wcldhl-bsgdh-lct	8.2	S	>99.9
Escherichia coli HM/pCOLADuet-1-lfldhd-bsgdh-lct	6.3	R	>99.9
Escherichia coli HM/ pCOLADuet-1-wcldhl-bsgdh-lct	7.4	S	>99.9

将效果最好的 Escherichia coli HM (PG-gltS)命名为 Escherichia coli HMG。

实施例 8

根据实例 7 的方法将 Escherichia coli HMBY 中 nadA、pdxJ 基因前增加大肠杆菌的 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因(gpdA)前的中等表达强度组成型启动子(PG), 序列如 SEQ ID NO:8 所示。然后再将质粒导入。

强化基因 nadA 表达时, 以 Escherichia coli HMBY 基因组为模板, 以引物 nadA-FF/nadA-FR、nadA-gpdA-F/nadA-gpdA-R、nadA-RF/nadA-RR, 扩增出上游、启动子、下游序列, 并以 nadA-FF 和 nadA-RR 为引物融合为含有 gpdA 启动子的表达框。然后与质粒 pCasRed、pCRISPR-gDNA(含 nadA sgRNA)一起转入 Escherichia coli HMBY 后, Cas9/sgrNA 诱发宿主在 nadA 基因位点发生双链断裂, 重组酶 Red 将 gpdA 启动子整合到 nadA 基因之前, 并测序验证。

强化基因 pdxJ 表达时, 以 Escherichia coli HMBY 基因组为模板, 以引物 pdxJ-FF/pdxJ-FR、pdxJ-gpdA-F/pdxJ-gpdA-R、pdxJ-RF/pdxJ-RR, 扩增出上游、启动子、下游序列, 并以 pdxJ-FF 和 pdxJ-RR 为引物融合为含有 gpdA 启动子的表达框。然后与质粒 pCasRed、pCRISPR-gDNA(含 pdxJ sgRNA)一起转入 Escherichia coli HMBY 后, Cas9/sgrNA 诱发宿主在 pdxJ 基因位点发生双链断裂, 重组酶 Red 将 gpdA 启动子整合到 pdxJ 基因之前, 并测序验证。

下表 12 为引物名称与序列表序号的对应索引。

表 12 引物名称与序列表序号对照

名称	序列表中编号
pdxJ sgRNA	SEQ ID NO:13
nadA sgRNA	SEQ ID NO:1
pdxJ-FF	SEQ ID NO:14
pdxJ-FR	SEQ ID NO:15
pdxJ-gpdA-F	SEQ ID NO:16
pdxJ-gpdA-R	SEQ ID NO:17
pdxJ-RF	SEQ ID NO:18
pdxJ-RR	SEQ ID NO:19
nadA-FF	SEQ ID NO:2
nadA-FR	SEQ ID NO:3

nadA-gpdA-F	SEQ ID NO:4
nadA-gpdA-R	SEQ ID NO:5
nadA-RF	SEQ ID NO:6
nadA-RR	SEQ ID NO:7

基因改造完成后，将共表达质粒导入。根据实施例 2 所述的诱导表达方法，收集各类细胞进行转化分析，结果如表 13 所示。转化体系中全细胞转化体系为：细胞湿重为 20g/L，丙酮酸 100 g/L，左旋多巴 120g/L，葡萄糖 200g/L，pH 9.0，温度为 30℃，摇床转速 250 转/分钟；转化时间 24 小时。

表 13 转化结果比较

菌株	丹参素			丙酮酸 g/L
	浓度 g/L	构型	e.e%	
Escherichia coli HMBY(PG-pdxJ、PG-nadA)/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-bsgdh	91.1	R	>99.9	51.3
Escherichia coli HMBY(PG-pdxJ、PG-nadA)/pCOLADuet-1-wclldhl-ect1-bsgdh	93.0	S	>99.9	49.5
Escherichia coli HML(PG-pdxJ)/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-bsgdh	73.1	R	>99.9	42.7
Escherichia coli HMBY(PG-nadA)/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-bsgdh	82.2	R	>99.9	41.6
Escherichia coli HMBY/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-bsgdh	65.4	R	>99.9	34.6
Escherichia coli HMBY/pCOLADuet-1-wclldhl-ect1-bsgdh	68.6	S	>99.9	35.1

将最好的 Escherichia coli HMBY(PG-nadA,PG-pdxJ)命名为 Escherichia coli NP。

基因改造完成后，将共表达质粒导入。根据实施例 2 所述的诱导表达方法，收集各类细胞进行转化分析，结果如表 14 所示。转化体系中全细胞转化体系为：细胞湿重为 20g/L，L-乳酸 100 g/L，左旋多巴 120g/L，pH 9.0，温度为 30℃，摇床转速 250 转/分钟；转化时间 24 小时。

表 14 转化结果比较

菌株	丹参素			丙氨酸 g/L
	浓度 g/L	构型	e.e%	
Escherichia coli HML(PG-pdxJ、PG-nadA)/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-llldh	89.5	R	>99.9	44.9
Escherichia coli HML(PG-pdxJ、PG-nadA)/pCOLADuet-1-wclldhl-ect1-llldh	91.8	S	>99.9	48.8
Escherichia coli HML(PG-pdxJ)/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-llldh	72.7	R	>99.9	39.1
Escherichia coli HML(PG-nadA)/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-llldh	80.4	R	>99.9	40.3
Escherichia coli HML/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-llldh	63.1	R	>99.9	32.2
Escherichia coli HML/pCOLADuet-1-wclldhl-ect1-llldh	66.2	S	>99.9	33.9

将最好的 Escherichia coli HML(PG-nadA,PG-pdxJ)命名为 Escherichia coli NL。

基因改造完成后，将共表达质粒导入。根据实施例 2 所述的诱导表达方法，收集各类细胞进行转化分析，结果如表 15 所示。转化体系中全细胞转化体系为：细胞湿重为 20g/L，L-谷氨酸 200 g/L，左旋多巴 120g/L，pH 9.0，温度为 30℃，摇床转速 250 转/分钟；转化时间 24 小时。

表 15 转化结果比较

菌株	丹参素 g/L		
	浓度 g/L	构型	e.e%
Escherichia coli HMG(PG-pdxJ、PG-nadA)/pCOLADuet-1-lfldhd-bsgdh-lct	92.9	R	>99.9
Escherichia coli HMG(PG-pdxJ、PG-nadA)/pCOLADuet-1-wcldhl-bsgdh-lct	96.2	S	>99.9
Escherichia coli HMG(PG-pdxJ)/pCOLADuet-1-efmdhd-bsgdh-lct	73.4	R	>99.9
Escherichia coli HMG(PG-nadA)/pCOLADuet-1-lfldhd-bsgdh-lct	83.2	R	>99.9
Escherichia coli HMG/pCOLADuet-1-lfldhd-bsgdh-lct	67.0	R	>99.9
Escherichia coli HMG/pCOLADuet-1-lfldhl-bsgdh-lct	69.6	S	>99.9

将最好的 Escherichia coli HMG(PG-nadA,PG-pdxJ)命名为 Escherichia coli HNP。

实施例 9

根据实施例 2 所述诱导表达方法, 将 Escherichia coli NP/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-bsgdh 诱导表达完成后收集菌体, 于 100ml 反应体系中, 细胞湿重 1g/L, 丙酮酸 1g/L, 左旋多巴 1g/L, 葡萄糖 1g/L, pH 6.0, 温度为 15℃, 摇床转速 250 转/分钟; 转化时间 1 小时。测定结果, R-丹参素浓度为 77 mg/L, e.e%>99.9。

根据实施例 2 所述诱导表达方法, 将 Escherichia coli NL/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-lldh 诱导表达完成后收集菌体, 于 100ml 反应体系中, 细胞湿重 1g/L, L-乳酸 1 g/L, 左旋多巴 1g/L, pH 6.0, 温度为 15℃, 摇床转速 250 转/分钟; 转化时间 1 小时。测定结果, R-丹参素浓度为 77 mg/L, e.e%>99.9。

根据实施例 2 所述诱导表达方法, 将 Escherichia coli HNP/pCOLADuet-1-efmdhd-bsgdh-lct 诱导表达完成后收集菌体, 于 100ml 反应体系中, 细胞湿重 1g/L, L-谷氨酸 1 g/L, 左旋多巴 1g/L, pH 6.0, 温度为 15℃, 摇床转速 250 转/分钟; 转化时间 1 小时。测定结果, S-丹参素浓度为 93 mg/L, e.e%>99.9。

实施例 10

根据实施例 2 所述诱导表达方法, 将表 16 中菌株诱导表达完成后收集菌体, 于 100ml 反应体系中, 细胞湿重 200g/L, 丙酮酸 200g/L, 左旋多巴 200g/L, 葡萄糖 200g/L, pH 8.5, 温度为 40℃, 摇床转速 250 转/分钟; 转化时间 48 小时。将沉淀全部稀释溶解后测定结果。

表 16 转化结果比较

菌株	丹参素			丙氨酸 g/L
	产量 g/L	构型	e.e%	
Escherichia coli NP/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-bsgdh	182	R	>99.9	91
Escherichia coli NP/pCOLADuet-1-wcldhl-ect1-bsgdh	179	S	>99.9	97
Escherichia coli NP/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-pmaao	142	R	>99.9	80
Escherichia coli NP/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-praao	176	R	>99.9	95
Escherichia coli NP/pCOLADuet-1-wcldhl-ect1-mmaao	154	S	>99.9	80
Escherichia coli NP/pCOLADuet-1-wcldhl-ect1-praao	162	S	>99.9	88

根据实施例 2 所述诱导表达方法, 将表 17 中菌株诱导表达完成后收集菌体, 于 100ml 反应体系中, 细胞湿重 200g/L, L-乳酸 200g/L, 左旋多巴 200g/L, pH 8.5, 温度为 40℃, 摇床转速 250 转/分钟; 转化时间 48 小时。将沉淀全部稀释溶解后测定结果。

表 17 转化结果比较

菌株	丹参素	丙氨酸
----	-----	-----

	浓度 g/L	构型	e.e%	g/L
Escherichia coli NL/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-llldh	180	R	>99.9	87
Escherichia coli NL/pCOLADuet-1-wcldhl-ect1-llldh	179	S	>99.9	86
Escherichia coli NL/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-pmaao	130	R	>99.9	64
Escherichia coli NL/pCOLADuet-1-lfldhd-ect1-praao	153	R	>99.9	75
Escherichia coli NL/pCOLADuet-1-wcldhl-ect1-mmaao	139	S	>99.9	67
Escherichia coli NL/pCOLADuet-1-wcldhl-ect1-praao	142	S	>99.9	61

根据实施例 1 所述诱导表达方法，将表 18 中菌株诱导表达完成后收集菌体，于 100ml 反应体系中，细胞湿重 200g/L，L-谷氨酸 20g/L，左旋多巴 200g/L，pH 8.5，温度为 40℃，摇床转速 250 转/分钟；转化时间 48 小时。将沉淀全部稀释溶解后测定结果。

表 18 转化结果比较

菌株	丹参素		
	产量 g/L	构型	e.e%
Escherichia coli HNP/pCOLADuet-1-lfldhd-bsgdh-lct	184.6	R	>99.9
Escherichia coli HNP/pCOLADuet-1-wcldhl-bsgdh-lct	186.2	S	>99.9
Escherichia coli NPP/pCOLADuet-1-lfldhd-bsgdh-ect1	131.2	R	>99.9
Escherichia coli HNP/pCOLADuet-1-lfldhd-rsgdh-ect2	161.9	R	>99.9
Escherichia coli HNP/pCOLADuet-1-wcldhl-csgdh-lpt	140.7	S	>99.9

以上所述的酶及其共表达基因工程菌的改造和构建、菌体的培养基组成及培养方法和全细胞生物转化仅为本发明的较佳实施例而已，并不用于限制本发明，理论上讲其它的细菌、丝状真菌、放线菌、动物细胞均可进行基因组的改造，并用于多基因共表达的全细胞催化。凡在本发明的原则和精神之内所作的任何修改、等同替换。

SEQUENCE LISTING

<110> 江南大学

<120> 一种工程菌及其在丹参素生产中的应用

<160> 33

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

ttaacggcgt cggcttcggg

20

<210> 2

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

tcgaatcctg cacgaccac cacta

25

<210> 3

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

tcggccactc atcaacatga ttcacgaca ttagcgtaat attcgctgtt

50

<210> 4

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

aacagcgaat attacgctaa tgcgatgaa tcatgtgat gaggccga

50

<210> 5
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 5
tgtctggatc aaacattacg ctcatgggtt tctcctgtca ggaacgttcg 50

<210> 6
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 6
cgaacgttcc tgacaggaga aaacatgag cgtaatgttt gatccagaca 50

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 7
catccacgga caatgcgcgc agctg 25

<210> 8
<211> 1100
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 8
atgaatcatg ttgatgagtg gccgatcgt acgtgggaag aaaccacgaa actccattgc 60
gcaatacgtc gcgataacca gtaaaaagac cagccagtga atgctgattt gtaaccttga 120
atattatttt tccataacat ttctgcttt aacataattt tccgttaaca taacgggctt 180
tttcaaaat ttcattaaat attgttcacc cgtttcagg taatgactcc aactattga 240
tagtgtttta tggtcagata atgcccgatg actttgtcat gcagctccac cgattttgag 300
aacgacagcg acttccgtcc cagccgtgcc aggtgctgcc tcagattcag gttatgccgc 360
tcaattcgtc gcgtatatcg ctgctgatt acgtgcagct ttcccttcag gcgggattca 420

tacagcggcc agccatccgt catccatc accacgtcaa agggtgacag caggctcata	480
agacgcccc gctcgccat agtgcggtca ccgaatacgt gcgcaacaac cgtcttcgg	540
agcctgtcat acgcgtaaaa cagccagcgc tggcgcgatt tagccccgac atagccccac	600
tggtcgtcca ttccgcgca gacgatgacg tctactgccc gctgtatgcg cgaggttacc	660
gactgcggcc tgagttttt aagtgcgta aaatcgtgtt gaggccaacg ccataatgc	720
gggcagtgc ccggcatcca acgcatcca tggccatc aatgatttc tggtcgtac	780
cgggttgaga agcgggtgaa gtgaactgca gttgccatgt ttacggcag tgagagcaga	840
gatagcgtg atgtccggcg gtgctttgc cgttacgcac caccctgca gtagctgaac	900
aggagggaca gctgatagaa acagaagcca ctggagcacc taaaaaac catcatacac	960
taaatcagta agttggcagc atcacccgt ttcagtacg ttacgttca ctgtgagaat	1020
ggagattgcc catccgcga tctggtcta agcctggaaa ggatcaattt tcatccgaac	1080
gttctgaca ggagaaaacc	1100
<210> 9	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 9	
tatgcccgtc gatcgcgccc	20
<210> 10	
<211> 120	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<400> 10	
ccaagatcac gcacgtaccg tcgatgtatc tctctgaact gccagggaaa aaccacggtt	60
agatcagcaa gcgttgccgg gaaatgggcg tcgataccat tatcgtttc gacaccact	120

<210> 11
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 11
tcacgagta cctcttgcgc 20

<210> 12
<211> 120
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 12
tagcctgata tgcacgctta tcttactgt ctttccact cgccgctggt gggatatgtc 60
aatggcgtga ttgccagcgc ccgcgagcgt attgcggctt tctcccctga actggtggtg 120

<210> 13
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 13
cgtcgcggtc agtaatgtga 20

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 14
gcagaagaag atggtcattg gcaac 25

<210> 15
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 15
tcggccactc atcaacatga ttattcgct taggcataaa ttgccggaac 50

<210> 16
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 16
gttccggcaa ttatgccta agcgaatgaa tcatgttgat gaggggccga 50

<210> 17
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 17
tgacgcctaa cagtaattca gccatggttt tctcctgtca ggaacgttcg 50

<210> 18
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 18
cgaacgttcc tgacaggaga aaacatggc tgaattactg ttaggcgtca 50

<210> 19
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 19
tcacagcaaa acgcttcgcc agaaa 25

<210> 20
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 20
gcggtagttg cattacgtcg 20

<210> 21
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 21
cggaaaatat ttaggtcagg 20

<210> 22
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 22
gcaggagggtt aagatgcaat tagat 25

<210> 23
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 23
tcggccactc atcaacatga ttcatacctg taagccaaaa gacgacgagt 50

<210> 24
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 24
actcgtcgtc ttttggtta caggtatgaa tcatgttgat gaggggccga 50

<210> 25
<211> 50
<212> DNA
<213> 人工序列

<400> 25
gcttgaatag tttttcgta tccatgggtt tctcctgtca ggaacgttcg 50

<210> 26

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 26

cgaacgttcc tgacaggaga aaaccatgga tacgaaaaaa ctattcaagc

50

<210> 27

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 27

gatacccagc gccaggccga cgata

25

<210> 28

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 28

ggtggggatg gcttacatcc tgcac

25

<210> 29

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 29

tcggccactc atcaacatga ttcacggat gcggcgtgaa cgctttatcc

50

<210> 30

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 30

ggataaagcg ttcacgccgc atccgatgaa tcatgttgat gaggggccga

50

<210> 31

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 31

cggcttttgc cagtgaatca aacatggttt tctcctgtca ggaacgttcg

50

<210> 32

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 32

cgaacgttcc tgacaggaga aaaccatggt tgattcactg gcaaaagccg

50

<210> 33

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 33

tataacgatg ccggacaggc gctgc

25

23
权 利 要 求 书

1、一种重组大肠杆菌，其特征在于，所述重组大肠杆菌同时表达了 α -羟基羧酸脱氢酶和L- α -氨基酸转氨酶，以及以下任意一种：葡萄糖脱氢酶、L-乳酸脱氢酶、L-谷氨酸脱氢酶，并在宿主大肠杆菌的基础上敲除了酚类化合物分解相关的基因。

2、根据权利要求1所述的重组大肠杆菌，其特征在于，所述酚类分解基因为 hpaD、mhpB 中的任意一种或者两种组合。

3、根据权利要求1所述的重组大肠杆菌，其特征在于，所述重组大肠杆菌还强化表达了丙酮酸转运基因、L-乳酸转运基因、谷氨酸转运基因、NAD 合成基因、磷酸吡哆醛合成基因一种或者多种；其中，丙酮酸转运基因、L-乳酸转运基因、谷氨酸转运基因不同时表达。

4、根据权利要求3所述的重组大肠杆菌，其特征在于，所述强化表达的基因为丙酮酸转运相关的基因、lldP、gltS、nadA、pdxJ 中的任意一种或多种，其中，所述丙酮酸转运相关的基因包括 btsT 和 ybdD。

5、根据权利要求4所述的重组大肠杆菌，其特征在于，所述强化表达是通过将宿主大肠杆菌基因组上所要强化表达的基因前增加组成型启动子。

6、根据权利要求1所述的重组大肠杆菌，其特征在于，所述葡萄糖脱氢酶、L-乳酸脱氢酶、L-谷氨酸脱氢酶中的任意一种和 α -羟基羧酸脱氢酶、L- α -氨基酸转氨酶是通过 pCOLADuet 共表达的。

7、根据权利要求1所述的重组大肠杆菌，其特征在于，所述宿主菌为 Escherichia coli BL21。

8、一种生产丹参素的方法，其特征在于，所述方法是利用权利要求1-7任一所述的重组菌。

9、根据权利要求8所述的方法，其特征在于，所述方法是进行全细胞转化生产。

10、根据权利要求9所述的方法，其特征在于，所述全细胞转化生产的体系中，包括细胞湿重为 1-200g/L 和左旋多巴浓度为 1-200g/L；

当所述重组菌同时表达 α -羟基羧酸脱氢酶、L- α -氨基酸转氨酶和葡萄糖脱氢酶时，所述全细胞转化生产的体系中还包括：丙酮酸浓度为 1-200g/L 和葡萄糖浓度为 1-200g/L；

当所述重组菌同时表达 α -羟基羧酸脱氢酶、L- α -氨基酸转氨酶和 L-乳酸脱氢酶时，所述全细胞转化生产的体系中还包括：L-乳酸 1-200g/L；

当所述重组菌同时表达 α -羟基羧酸脱氢酶、L- α -氨基酸转氨酶和 L-谷氨酸脱氢酶时，所述全细胞转化生产的体系中还包括：L-谷氨酸 1-200g/L；

所述全细胞转化生产的体系 pH 6.0-9.0；于 15-40℃ 反应，时间 1-48 小时。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/111895

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 1/21(2006.01)i; C12P 7/42(2006.01)i; C12P 13/06(2006.01)i; C12R 1/19(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; C12R

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

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

CNABS, VEN(DWPI+SIPOABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 百度学术, BAIDU, ISI-WEB OF SCIENCE:
 丹参素, 大肠杆菌, 脱氢酶, 转氨酶, 酚, 表达, 敲除, danshensu, salvianic acid A, Escherichia coli, E.coli, dehydrogenase,
 transaminase, phenol, express+, knockout

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103667371 A (TIANJIN UNIVERSITY) 26 March 2014 (2014-03-26) see abstract, and description, paragraphs [0003]-[0018]	1-10
A	白晨龙 (BAI, Chenlong). "大肠杆菌组成型合成丹参素及其分离 (Constitutive Production of Salvianic Acid A in Escherichia Coli and Separation)" 中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑 (Medicine and Health Sciences, China Master's Theses Full-Text Database), No. 2017, no. 03, 15 March 2017 (2017-03-15), ISSN: 1674-0246, see E057-93, the main body of thesis, and pp. 12-34	1-10
A	ZHOU, L. et al. "Chromosome engineering of Escherichia coli for constitutive production of salvianic acid A" MICROBIAL CELL FACTORIES, Vol. 16, No. 84, 16 May 2017 (2017-05-16), ISSN: 1475-2859, see pp. 1-9	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

08 January 2019

Date of mailing of the international search report

24 January 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

International application No.
PCT/CN2018/111895

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/111895

A. 主题的分类 C12N 1/21(2006.01)i; C12P 7/42(2006.01)i; C12P 13/06(2006.01)i; C12R 1/19(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; C12R 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, VEN(DWPI+SIP0ABS), CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, CNKI, 百度学术, ISI-WEB OF SCIENCE:丹参素, 大肠杆菌, 脱氢酶, 转氨酶, 酚, 表达, 敲除, danshensu, salvianic acid A, Escherichia coli, E. coli, dehydrogenase, transaminase, phenol, express+, knockout		
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 103667371 A (天津大学) 2014年 3月 26日 (2014 - 03 - 26) 参见说明书摘要、说明书第[0003]-[0018]段	1-10
A	白晨龙. "大肠杆菌组成型合成丹参素及其分离" 中国优秀硕士学位论文全文数据库医药卫生科技辑, 第2017年第03期, 2017年 3月 15日 (2017 - 03 - 15), ISSN: 1674-0246, 参见E057-93的论文正文第12-34页	1-10
A	Zhou, L等. "Chromosome engineering of Escherichia coli for constitutive production of salvianic acid A" MICROBIAL CELL FACTORIES, 第16卷, 第84期, 2017年 5月 16日 (2017 - 05 - 16), ISSN: 1475-2859, 参见第1-9页	1-10
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2019年 1月 8日		2019年 1月 24日
ISA/CN的名称和邮寄地址		受权官员
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		徐益君 电话号码 86-(010)-62411083

国际申请号 PCT/CN2018/111895

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 103667371 A	2014年 3月 26日	CN 103667371 B	2016年 3月 16日