

(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
2016 年 9 月 9 日 (09.09.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/138712 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12P 7/04 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C12P 7/64 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/084020
- (22) 国际申请日: 2015 年 7 月 15 日 (15.07.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510093004.3 2015 年 3 月 2 日 (02.03.2015) CN
- (71) 申请人: 苏州安捷生物科技有限公司 (EN-GIZYME, INC) [CN/CN]; 中国江苏省苏州张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。 苏州汉酶生物科技有限公司 (ENZYMWORKS, INC) [CN/CN]; 中国江苏省苏州张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。
- (72) 发明人: 谢新开 (XIE, Xinkai); 中国江苏省苏州张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。 胡志浩 (HU, Zhihao); 中国江苏省苏州张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。 江君君 (JIANG, Junjun); 中国江苏省苏州张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。 田峰 (TIAN, Feng); 中国江苏省苏州张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。 李晓辉 (LI, Xiaohui); 中国江苏省苏州张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。 杜好勉 (DU, Haomian); 中国江苏省苏州张家港国泰北路 1 号 F 栋 2 楼, Jiangsu 215600 (CN)。

(74) 代理人: 苏州创元专利商标事务所有限公司 (SU-ZHOU CREATOR PATENT & TRADEMARK AGENCY LTD.); 中国江苏省苏州市干将西路 93 号, Jiangsu 215002 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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)。

根据细则 4.17 的声明:

— 发明人资格(细则 4.17(iv))

本国际公布:

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

(54) Title: METHOD FOR PREPARING FATTY ALCOHOL BY UTILIZING BIOLOGICAL METHOD

(54) 发明名称: 一种生物法制备脂肪醇的方法

(57) Abstract: Provided in the present application is a method for generating a fatty alcohol by utilizing a fatty acid or fatty acid ester. The method applies to preparation of a saturated fatty alcohol and unsaturated fatty alcohol.

(57) 摘要: 本申请提供了一种利用脂肪酸或脂肪酸酯生成脂肪醇的方法, 该方法适用于饱和脂肪醇及不饱和脂肪醇的制备。



WO 2016/138712 A1

一种生物法制备脂肪醇的方法

技术领域

本发明属于生物化工领域，更具体地，本发明涉及一种生物法制备脂肪醇的方法。

背景技术

脂肪醇是具有 8 至 22 个碳原子链的脂肪族的醇类，有些脂肪醇为饱和脂肪醇。脂肪醇在自然界中并不大量存在，因此，需要利用人工方法进行合成，以满足其工业应用所需。

目前，饱和脂肪醇是通过化学法来合成的，由于 C=C 饱和双键的存在，利用化学法来还原羧酸到醇需要用到一些贵重的金属催化剂，而且选择性并不是很好。因此，本领域还需要发掘一些新的制备饱和脂肪醇的方法，以降低成本，提高制备效率。

现有技术中，用生物法来选择性还原饱和脂肪酸的相关方法目前还没有报导。

发明内容

本发明的目的在于提供一种生物法制备脂肪醇的方法。

在本发明的第一方面，提供一种制备脂肪醇的方法，所述方法包括：以脂肪酸为底物，利用羧酸还原酶将脂肪酸转化为脂肪醛；利用醛还原酶将脂肪醛转化为脂肪醇。

在一个优选例中，所述的脂肪酸如下获得：以脂肪酸酯为底物，利用酯水解酶将脂肪酸酯转化为脂肪酸。

在另一优选例中，所述的脂肪酸酯包括(但不限于)：脂肪酸甲酯，脂肪酸乙酯，脂肪酸丙酯，脂肪酸丁酯等；较佳地为脂肪酸甲酯。

在另一优选例中，所述的羧酸还原酶包括：MsCAR，MmCAR (Mycobacterium marinum, UniProt accession number B2HN69)，NsCAR (Nocardia sp. NRRL 5646)；

所述的醛还原酶包括：AlrA 或 YjgB (E. coli, AAC77226)

所述的酯水解酶包括：CALB, HDE, Lc α E7, BioH, YbaC 或 TesA。

在另一优选例中，所述的羧酸还原酶、醛还原酶、酯水解酶是重组表达的酶。

在另一优选例中，所述的方法还包括：利用 EntD 或 Sfp (phosphopantetheine transferase, 磷酸泛酰巯基乙胺转移酶；其中，EntD 基因来自于大肠杆菌 *Escherichia coli*, sfp 基因来自于枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis*) 促进羧酸还原酶的活性。

在另一优选例中，所述的 MsCAR 具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；和/或

所述的 AlrA 具有 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列；和/或

所述的 Lc α E7 具有 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 6 中第 33-570 位所示的氨基酸序列；优选地是氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 中第 33-570 位所示的截短体；和/或

所述的 EntD 具有 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，羧酸还原酶的表达盒、醛还原酶的表达盒被串联于一个表达质粒中；较佳地，该表达质粒中还串联有酯水解酶的表达盒；更佳地，该表达质粒中还串联有 EntD 的表达盒。

在另一优选例中，所述的脂肪酸为不饱和脂肪酸，所述的脂肪醇为不饱和脂肪醇，所述的脂肪醛为不饱和脂肪醛，所述的脂肪酸酯为不饱和脂肪酸酯；或

所述的脂肪酸为饱和脂肪酸，所述的脂肪醇为饱和脂肪醇，所述的脂肪醛为饱和脂肪醛，所述的脂肪酸酯为饱和脂肪酸酯。

在本发明的另一方面，提供一种重组的表达构建物，所述的表达构建物中包括：羧酸还原酶的表达盒，醛还原酶的表达盒；较佳地，该表达质粒中还包括：酯水解酶的表达盒；更佳地，该表达质粒中还包括：EntD 的表达盒。

在另一优选例中，所述的表达构建物是重组表达载体。

在另一优选例中，所述的表达载体是 pEZ07 或 pEZ01 载体。

在本发明的另一方面，提供一种重组的细胞，所述的细胞中包括所述的表达构建物。

在另一优选例中，所述的细胞是原核细胞。

在另一优选例中，所述的原核细胞是大肠杆菌细胞。

在本发明的另一方面，提供一种发酵法制备脂肪醇的方法，所述方法包括：培养所述的重组的细胞，并在培养体系中添加脂肪酸或脂肪酸酯作为反应底物，从而获得脂肪醇。

在另一优选例中，所述发酵法制备脂肪醇的方法中，细胞的培养条件是 $33 \pm 4^\circ\text{C}$ (较佳地为 $33 \pm 2^\circ\text{C}$)， $\text{pH} 6.8 \pm 0.2$ ，溶氧 $30\% \pm 20\%$ ，通风量 4 ± 2 vvm。

在另一优选例中，所述发酵法制备脂肪醇的方法中，细胞是大肠杆菌，以 IPTG 诱导细胞表达。

在本发明的另一方面，提供一种用于制备脂肪醇的试剂盒，所述的试剂盒中包括：

包含有羧酸还原酶的表达盒、醛还原酶的表达盒、酯水解酶的表达盒的表达构建物或细胞；较佳地，所述的表达构建物或细胞还包含酯水解酶的表达盒；更佳地，所述的表达构建物或细胞还包含 EntD 的表达盒。

在一个优选例中，所述的试剂盒中还包括反应底物：脂肪酸(包括：饱和或不饱和脂肪酸)或脂肪酸酯(包括：饱和或不饱和脂肪酸)。

本发明的其它方面由于本文的公开内容，对本领域的技术人员而言是显而易见的。

附图说明

图 1、pEZ07-MsCAR-AlrA-LcaE7-EntD 质粒构建图。

图 2、3L 发酵罐中生物催化过程图(实施例 3)。

图 3、发酵液的后处理过程图(实施例 4)。

具体实施方式

本发明人经过深入的研究,首次揭示了一种用生物法来催化脂肪酸或脂肪酸甲酯生成脂肪醇的方法。本发明的方法适用于饱和脂肪醇及不饱和脂肪醇的制备,且特别有利于降低不饱和脂肪酸的生产成本。

术语

如本文所用,如本文所用,所述的“表达盒”或“基因表达盒”是指包含有表达目的多肽(本发明中为羧酸还原酶、醛还原酶、酯水解酶或 EntD)所需的所有必要元件的基因表达系统,通常其包括以下元件:启动子、编码多肽的基因序列,终止子;此外还可选择性包括信号肽编码序列等;这些元件是操作性相连的。

如本文所用,所述的“构建物”或“表达构建物”是指重组 DNA 分子,它包含预期的核酸编码序列,其可以包含一个或多个基因表达盒。所述的“构建物”通常被包含在表达载体中;这个 DNA 分子还包含转录在体外或体内可操作的连接编码序列所必需的或预期的适合的调控元件。“调控元件”在这里指的是可一定程度上控制核酸序列表达的核苷酸序列。可作为典范的调控元件包括增强子,内核糖体进入位点(IRES),复制起点,多腺苷酸化信号,启动子,转录终止序列,以及上游调节区,这些调控元件有助于核酸的复制、转录、转录后修饰等。

如本文所用,所述的“可操作地连接”或“操作性连接”是指两个或多个核酸区域或核酸序列的功能性的空间排列。例如:启动子区被置于相对于目的基因核酸序列的特定位置,使得核酸序列的转录受到该启动子区域的引导,从而,启动子区域被“可操作地连接”到该核酸序列上。

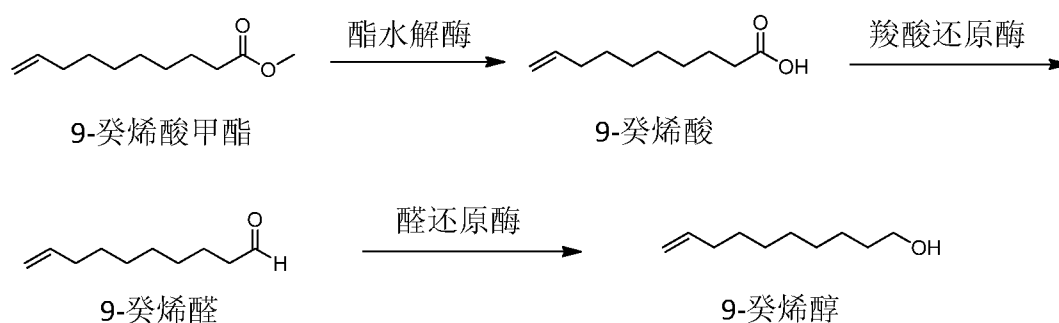
如本文所用，所述的“脂肪醇”包括“饱和脂肪醇”以及“不饱和脂肪醇”；较佳地为“不饱和脂肪醇”。

反应原理

一种方案是：以脂肪酸为底物，利用羧酸还原酶将脂肪酸转化为脂肪醛；之后，利用醛还原酶将脂肪醛转化为脂肪醇。

另一种方案是：以脂肪酸酯为底物，利用酯水解酶将脂肪酸酯转化为脂肪酸，再以脂肪酸为底物，利用羧酸还原酶将脂肪酸转化为脂肪醛；之后，利用醛还原酶将脂肪醛转化为脂肪醇。

以生产 9-癸烯醇为例，反应方法如下：



。

酶或多肽及其编码核酸

本发明首次实现了利用羧酸还原酶、醛还原酶，以及可选的酯水解酶或 EntD 进行脂肪醇的生产制备。

所述的羧酸还原酶包括(但不限于)：MsCAR，MmCAR，NsCAR；所述的醛还原酶包括(但不限于)：AlrA，YjgB；所述的酯水解酶包括(但不限于)：CALB，HDE，LcαE7，BioH，YbaC 或 TesA。作为本发明的优选方式，还利用利用 EntD 或 sfp 促进羧酸还原酶的活性。

在本发明中，上述的酶或多肽可以是天然存在的，比如其可被分离或纯化自动植物或微生物。此外，所述的酶或多肽也可以是人工制备的，比如可以根据常规的基因工程重组技术来生产重组酶或多肽。

多种适合的酶或多肽可被应用于本发明。所述的酶或多肽包括全

长的酶或多肽或其生物活性片段(或称为活性片段)。经过一个或多个氨基酸残基的取代、缺失或添加而形成的酶或多肽的氨基酸序列也包括在本发明中。酶或多肽的生物活性片段的含义是指作为一种多肽,其仍然能保持全长的酶或多肽的全部或部分功能。通常情况下,所述的生物活性片段至少保持 50% 的全长酶或多肽的活性。在更优选的条件下,所述活性片段能够保持全长酶或多肽的 55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%、或 100% 的活性。酶或多肽或其生物活性片段包括一部分保守氨基酸的替代序列,所述经氨基酸替换的序列并不影响其活性或保留了其部分的活性。适当替换氨基酸是本领域公知的技术,所述技术可以很容易地被实施,并且确保不改变所得分子的生物活性。这些技术使本领域人员认识到,一般来说,在一种多肽的非必要区域改变单个氨基酸基本上不会改变生物活性。见 Watson 等 *Molecular Biology of The Gene*, 第四版, 1987, The Benjamin/Cummings Pub. Co. P224。

本发明也可采用经修饰或改良的酶或多肽,比如,可采用为了促进其半衰期、有效性、代谢和/或多肽的效力而加以修饰或改良的酶或多肽。所述经过修饰或改良的酶或多肽可以是与天然存在的酶或多肽具有较小的共同点,但也能发挥与野生型相同或基本相同的功能,且不会带来其它不良影响。也就是说,任何不影响酶或多肽的生物活性的变化形式都可应用于本发明中。

本发明还包括了编码所述的酶或多肽的生物活性片段的分离的核酸,也可以是其互补链。作为本发明的优选方式,可对各酶或多肽的编码序列进行密码子优化,以提高表达效率。编码酶或多肽的生物活性片段的 DNA 序列,可以全序列人工合成,也可用 PCR 扩增的方法获得。在获得了编码所述的酶或多肽的生物活性片段的 DNA 序列之后,将其连入合适的表达构建物(如表达载体)中,再转入合适的宿主细胞。最后通过培养转化后的宿主细胞,得到所要的多肽。

表达构建物及宿主

本发明还包括了包含编码所述酶或多肽的生物活性片段的核酸分子的表达构建物。所述的表达构建物可包括一个或多个编码所述酶或多肽的基因表达盒，还可包含与所述核酸分子的序列操作性相连的表达调控序列，以便于多肽的表达。所述的表达调控序列的设计是本领域公知的。表达调控序列中，根据不同的需要，可以应用诱导型或组成型的启动子。例如，诱导型的启动子可实现更可控的多肽表达以及化合物生产，有利于工业化应用。

作为本发明的优选方式，提供了一种表达构建物，其包括以下酶的基因表达盒：羧酸还原酶的表达盒，醛还原酶的表达盒；较佳地，还包括：酯水解酶的表达盒；更佳地，该表达质粒中还包括：EntD的表达盒。

表达构建物的建立目前已经是本领域技术人员熟悉的技术。因此，在得知了所需选择的酶或多肽之后，本领域技术人员易于进行表达构建物的建立。编码酶或多肽的基因序列可以被插入到不同的表达构建物(如表达载体)中，也可以被插入到同一表达构建物中，只要在转入到细胞后酶或多肽能够被有效地表达即可。

此外，含有编码所述酶或多肽的生物活性片段核酸序列的重组细胞也包括在本发明中。该“细胞”包括原核细胞和真核细胞。常用的原核细胞包括大肠杆菌、枯草杆菌等；常用的真核细胞包括酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。作为本发明的优选方式，所述的细胞是原核细胞，更佳地是大肠杆菌细胞；例如，所述大肠杆菌是 W3110。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用例如 CaCl_2 或 MgCl_2 等方法处理，所用的步骤在本领域众所周知。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的酶或多肽。根据所用的宿主细胞，在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。在培养的适当阶段加入底物，来实现脂肪醇的生产。

生产方法

本发明提供了一种制备脂肪醇的方法，包括：以脂肪酸为底物，利用羧酸还原酶将脂肪酸转化为脂肪醛；利用醛还原酶将脂肪醛转化为脂肪醇。较佳地，所述的脂肪酸如下获得：以脂肪酸酯为底物，利用酯水解酶将脂肪酸酯转化为脂肪酸。

作为本发明的优选方式，提供了一种发酵法制备脂肪醇的方法，所述方法包括：培养所述的重组的细胞，使之产生羧酸还原酶、醛还原酶，以及可选的酯水解酶或 EntD，并在培养体系中添加脂肪酸或脂肪酸酯作为反应底物，从而获得脂肪醇。作为本发明的优选方式，采用大肠杆菌进行重组表达所述的酶或多肽，重组细胞的培养条件是 $33 \pm 2^\circ\text{C}$ ， $\text{pH}6.8 \pm 0.2$ ，溶氧 $30\% \pm 20\%$ ，通风量 4 ± 2 vvm。当应用大肠杆菌作为表达宿主时，采用 IPTG 进行诱导酶或多肽的表达。

在获得反应产物后，可以采用本领域已知的方法将脂肪醇从反应液(发酵液)中分离出来。一种较为优选的方法如图 3 所示。

在本发明的较佳实施例中，列举了生物催化 9-癸烯酸甲酯生成 9-癸烯醇的方法，通过酯水解酶将底物水解为 9-癸烯酸(9-DA)，然后通过羧酸还原酶直接将 9-癸烯酸还原为 9-癸烯醛，最后通过醛还原酶还原 9-癸烯醛为 9-癸烯醇。在这个过程中，不饱和 C=C 双键始终没有变化，不受到这些酶的影响而保留。

实施例中，尽管主要以生产 9-癸烯醇作为举例，但是应理解，其它饱和或不饱和的脂肪酸酯或脂肪酸为底物来生产相应的脂肪醇也是可以的。例如用 9, 12-二烯十三酸甲酯生成 9, 12-二烯十三酸、9, 12-二烯十三醛、9, 12-二烯十三醇。

本发明采用生物法生产脂肪醇，其优势是选择性还原，可以在不影响 C=C 双键的情况下选择性的还原羧酸基团，具有 100% 的选择性。与化学法相比，生物催化反应条件更加温和，不使用重金属以及有机溶剂，是绿色环保的新方法，具有无可比拟的优势。

本发明的方法，通过提供一种新的绿色环保的生物方法来合成不饱和脂肪醇，同时降低不饱和脂肪醇的制造成本以获得工业上的应用。

试剂盒

基于本发明的方法改进，还提供了一种用于制备脂肪醇的试剂盒，所述的试剂盒中包括：包含有羧酸还原酶的表达盒、醛还原酶的表达盒、酯水解酶的表达盒的表达构建物或细胞；较佳地，所述的表达构建物或细胞还包含酯水解酶的表达盒；更佳地，所述的表达构建物或细胞还包含 EntD 的表达盒。各表达盒可被串联于一个表达构建物(如表达载体)上，也可分别位于不同的表达构建物(如表达载体)上。各表达盒可存在于一个表达宿主(细胞)中，也可存在于不同的表达宿主(细胞)中。

此外，所述的试剂盒中还可包括使用说明书，以说明各材料的使用方法、反应顺序，便于本领域技术人员使用。

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 J.萨姆布鲁克等编著，分子克隆实验指南，第三版，科学出版社，2002 中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

实施例 1、构建质粒 pEZ07-MsCAR-AlrA-LcαE7-EntD

根据 SEQ ID NO: 1、3、5，合成 MsCAR 基因片段(SEQ ID NO: 1)、AlrA 基因片段(SEQ ID NO: 3)和 LcαE7 基因片段(SEQ ID NO: 5 中第 97-1713 位)，分别连入 pUC57 载体(苏州金唯智生物技术有限公司)，分别获得质粒 pUC57-MsCAR、pUC57-AlrA 和 pUC57-LcαE7。

利用 PCR 方法分别从质粒 pUC57-MsCAR 和 pUC57-AlrA 上扩增基因 MsCAR 和 AlrA，引物见表 1。两基因扩增产物分别带酶切位点 NcoI/XhoI 和 XhoI/BamHI，将两基因扩增产物分别进行酶切，回收后的片段与 NcoI/BamHI 双酶切的质粒 pEZ07(通过转移 pTrc99A 的 LacIq 基因和 pTrc 启动子片段到 pCL1920 质粒的 LacZα 基因前获得 pEZ07，克隆 pTrc99A 的引物为 GGCATCCGCTTACAGACA 和 TTGTCGGTGAACGCTCTCCTGA。pTrc99A 和 pCL1920 都获自 Biovector 中国质粒载体菌株细胞基因保藏中心)

一起通过 T4 DNA 连接酶进行连接，并转化大肠杆菌 DH5 α 完成重组质粒 pEZ07-MsCAR-AlrA 的构建。

然后，利用 PCR 方法从质粒 pUC57-Lc α E7 上扩增基因 Lc α E7，其两端均分别带有限制性酶切位点 EcoRI/HindIII，将两基因分别进行酶切，回收后的片段与 EcoRI/HindIII 双酶切的质粒 pEZ07-MsCAR-AlrA 一起通过 T4 DNA 连接酶进行连接，并转化大肠杆菌 DH5 α ，完成重组质粒 pEZ07-MsCAR-AlrA-Lc α E7 的构建。

以大肠杆菌 W3110 基因组为模板，扩增基因 EntD(SEQ ID NO: 7)，扩增引物为 EntD-BamHI-F 和 EntD-EcoRI-R，将扩增得到的 EntD 片段与质粒 pEZ07-MsCAR-AlrA-Lc α E7 分别用相同的限制性内切酶 BamHI、EcoRI 进行酶切，回收后通过 T4 DNA 连接酶进行连接，完成 pEZ07-MsCAR-AlrA-Lc α E7-EntD 的构建，如图 1。启动子为 Trc，每个基因前都设置 rbs 位点(序列为 AAGGAG)用于蛋白转录。获得的质粒 pEZ07-MsCAR-AlrA-Lc α E7-EntD 转化大肠杆菌，获得重组菌株 pEZ07-MsCAR-AlrA-Lc α E7-EntD/W3110。

表 1、重组菌株构建引物表

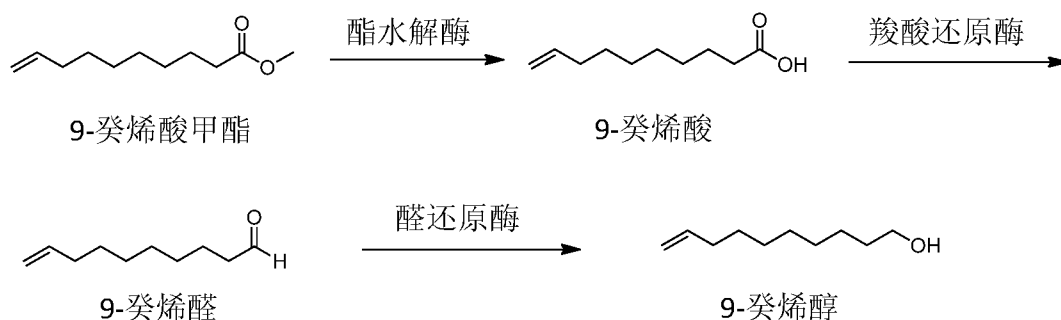
引物名称	引物序列(5'-3')
MsCAR-NcoI-F	5'-CATGCCATGGGCACGAGCGATG-3' (SEQ ID NO: 9)
MsCAR-XhoI-R	5'-CCAACCGCTCGAGCTAAATCAGACCGAACTCGCGCAG-3' (SEQ ID NO: 10)
Alra-XhoI-F	5'-CCACTCGAGAAGGAGATATACTTATGACAACTAATGTG-3' (SEQ ID NO: 11)
Alra-EcoRI-R	5'-CAGCCGGAATTCGGATCCTTAAAAATCGGCTTTAAGTAC-3' (SEQ ID NO: 12)
Lc α E7-32-EcoRI-F	5'-CCGGAATTCAAGGAGATATACTTATGGCAACAATAAT-3' (SEQ ID NO: 13)
Lc α E7-R-HindIII	5'-GTCCAGCCCAAGCTTCTAAAATAAATCTCTATG-3' (SEQ ID NO: 14)

EntD-BamHI-F 5'-GTCGGATCCAAGGAGATATACTTATGGTCGATATG-3' (SEQ ID NO: 15)

EntD-EcoRI-R 5'-GTCATCCGGAATTCTTAATCGTGTGGCA-3' (SEQ ID NO: 16)

实施例 2、通过重组菌株 pEZ07-MsCAR-AlrA-LcαE7-EntD/W3110 将 9-癸烯酸甲酯转化为 9-癸烯醇

通过在生产宿主中外源性表达酯水解酶、羧酸还原酶和醛还原酶将底物脂肪酸甲酯(具体为 9-癸烯酸甲酯)转化为脂肪醇(具体为 9-癸烯醇), 反应式如下:



具体来说, 将质粒 pEZ07-MsCAR-AlrA-LcαE7-EntD 转化入大肠杆菌 W3110, 在添加 100mg/L 壮观霉素的 LB 板中挑选相应的转化子。将 pEZ07-MsCAR-AlrA-LcαE7-EntD/W3110 的转化子接种于 3mL 添加 100mg/L 壮观霉素的 LB+1%甘油的培养基中, 然后在培养箱内 33℃培养过夜。从过夜的培养基中取 100uL 转移到 50mL(2%接种量)同样培养基的 250mL 烧瓶中, 然后在培养箱内 33℃培养至 OD600 达到 0.5~0.6, 添加终浓度为 1mM 的 IPTG, 同时添加 400uL 纯的 9-癸烯酸甲酯(终浓度为 7g/L), 在诱导后 3 小时, 18 小时时分别取发酵液 400uL 于 2mL 离心管中, 加入 800uL 的 4-甲基-2-戊酮, 将离心管置于涡旋振荡器上剧烈震荡, 从发酵液中萃取出反应剩余的 9-癸烯酸甲酯, 中间产物 9-癸烯酸, 9-癸烯醛和产物 9-癸烯醇, 震荡 30 分钟后将离心管在 12000rpm 离心 1 分钟, 取上层 4-甲基-2-戊酮萃取层, 转移到 2mL 新离心管中, 加入无水硫酸钠干燥, 然后继续在 12000rpm

离心 1 分钟，取上清 4-甲基-2 戊酮溶液进行 GC 检测。GC 检测方法具体为：进样口 280℃，分流比 10:1，流速 3ml 每分钟，柱温起始 100℃，25℃每分钟升至 246℃，30℃每分钟升至 290℃并保留 2 分钟，检测器 300℃。本菌株在上述培养条件下 9-癸烯醇在 3h 时转化率为 19.0%，18h 时转化率为 94.9%。

$$\text{转化率} = \frac{\text{产物峰面积}}{\text{总峰面积}} \times 100 \%$$

经测定，反应过程中，不饱和 C=C 双键始终没有变化，并不受到所表达的酶或表达体系的影响。

实施例 3、在 3L 发酵罐中转化 9-癸烯酸甲酯为 9-癸烯醇
所用培养基如表 2 所示。

表 2、以 9-癸烯酸甲酯为底物的发酵培养基成分

	NaCl	酵母粉	蛋白胨	甘油	MgSO ₄	(NH ₄) ₂ SO ₄
种子培养基 (g/L)	10	5	10	0	0	0
发酵培养基 (g/L)	10	5	10	0	0	0
补料培养基 (g/L)	0	0	0	600	4	75

挑取活化的单菌落(重组菌株 pEZ07-MsCAR-AlrA-LcaE7-EntD/W3110)接入种子培养基中，200 rpm，30℃培养过夜；按 5%的接种量接种到含有 0.95L 发酵培养基的 3L 发酵罐中，发酵参数控制为：温度 33℃，pH6.8，溶氧 30%，通风量 4 vvm，搅拌转速与溶氧偶联，通过流加补料培养基控制发酵液中甘油浓度为 4-8 g/L；发酵 2 h 后加入 IPTG(终浓度为 1 mM)诱导，诱导 1 h 开始流加 9-癸烯酸甲酯，流加周期为每 7~8 min 流加 1 s(流速为 10 mL/min)，发酵过程如图 2。发酵 68 h，共添加底物 100g，转化率 95%。

实施例 4、9-癸烯醇的分离和提纯

将发酵罐中发酵液转移到 5L 四口瓶中于 80℃ 加热 2 小时，然后用浓盐酸调节至 pH=2.0，加入等体积的乙酸乙酯，搅拌器充分搅拌萃取后 7000rpm 离心 10 分钟，倒出乙酸乙酯和水相，分液漏斗分离水相和乙酸乙酯相，离心沉淀用乙酸乙酯重悬再搅拌萃取，7000rpm 离心 10 分钟后倒出乙酸乙酯层，加入新的乙酸乙酯重复上述步骤 2 次，然后合并乙酸乙酯萃取液，旋蒸浓缩得到粗产品 80g，再将粗产品进行油浴减压精馏，外温 105℃，得到纯度大于 99% 的 9-癸烯醇 65g。

实施例 5、通过重组菌株 pEZ07-MsCAR-AlrA-LcαE7-EntD/W3110 将 9-癸烯酸转化为 9-癸烯醇

将 pEZ07-MsCAR-AlrA-LcαE7-EntD/W3110(该发酵不需要 LcαE7，但该基因的存在没有影响)的转化子接种于 3mL 添加 100mg/L 壮观霉素的 LB+1%甘油的培养基中，然后在培养箱内 33℃ 和 250rpm 培养过夜。从过夜的培养基中取 100uL 转移到 50mL(2%接种量)同样培养基的 250mL 烧瓶中，然后在培养箱内 33℃ 和 250rpm 培养至 OD600 达到 0.5~0.6，添加终浓度为 1mM 的 IPTG，同时添加 100uL 纯的 9-癸烯酸(终浓度为 1.8g/L)，在诱导后 3 小时，18 小时时分别取发酵液 400uL 于 2mL 离心管中，加入 800uL 的 4-甲基-2-戊酮，将离心管置于涡旋振荡器上剧烈震荡从发酵液中萃取出反应剩余的 9-癸烯酸，中间体 9-癸烯醛，和产物 9-癸烯醇，震荡 30 分钟后在 12000rpm 离心 1 分钟，取上层 4-甲基-2-戊酮有机层，转移到 2mL 新离心管中，加入无水硫酸钠干燥，12000rpm，1 分钟离心，取上清 4-甲基-2-戊酮有机溶液进行 GC 检测。GC 检测方法具体为：进样口 280℃，分流比 10:1，流速 3ml 每分钟，柱温起始 100℃，25℃ 每分钟升至 246℃，30℃ 每分钟升至 290℃ 并保留 2 分钟，检测器 300℃。本菌株在上述培养条件下 9-癸烯醇在 3h 时转化率为 18.2%，18h 时转化率为 93.6%。

实施例 6、在 3L 发酵罐中转化 9-癸烯酸为 9-癸烯醇

所用培养基如表 3 所示。

表 3、以 9-癸烯酸为底物的发酵培养基成分

	甘油	酵母粉	蛋白胨	K ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄
种子培养基 (g/L)	5	24	12	16	2.3
发酵培养基 (g/L)	5	24	12	16	2.3
补料培养基 (g/L)	80	24	12	16	2.3

挑 取 活 化 的 单 菌 落 (重 组 菌 株 pEZ07-MsCAR-AlrA-LcαE7-EntD/W3110, 该发酵不需要 LcαE7, 但该基因的存在没有影响)接入种子培养基中, 200 rpm, 30℃培养过夜; 按 5%的接种量接种到 0.95L 发酵培养基的 3L 发酵罐, 发酵参数控制为: 温度 33℃, pH 6.8, 溶氧 30%, 通风量 2 vvm, 搅拌转速与溶氧偶联, 通过流加补料培养基控制发酵液中甘油浓度为 4-8 g/L; 在发酵罐中生长至 OD600 达到 0.5~0.6, 添加终浓度为 1mM 的 IPTG, 同时开始流加 9-癸烯酸, 流加周期为每 7~8 min 流加 1 s(流速为 10 mL/min), 发酵 24 h, 共添加底物 20g, 转化率 98%。

实施例 7、通过重组菌株 pEZ07-MsCAR-AlrA-LcαE7-EntD/W3110 将 9, 12-二烯十三酸甲酯转化为 9, 12-二烯十三碳-1-醇

将 pEZ07-MsCAR-AlrA-LcαE7-EntD/W3110 的转化子接种于 3mL 添加 100mg/L 壮观霉素的 TB 培养基中, 然后在培养箱内 33℃和 250rpm 培养过夜。从过夜的培养基中取 100uL 转移到 50mL(2%接种量)同样培养基的 250mL 烧瓶中, 然后在培养箱内 33℃和 250rpm 培养至 OD600 达到 0.5~0.6, 添加终浓度为 1mM 的 IPTG, 同时添加 200uL 纯的 9, 12-二烯十三酸甲酯(终浓度为 4g/L), 在诱导后 3 小时, 18 小时时分别取发酵液 400uL 于 2mL 离心管中, 加入 800uL 的 4-甲基-2-戊酮, 将离心管置于涡旋振荡器上剧烈震荡 30 分钟, 然后在 12000rpm 离心 1 分钟, 取上层 4-甲基-2-戊酮萃取层,

转移到 2mL 新离心管中，加入无水硫酸钠干燥，12000rpm，1 分钟离心，取上清 4-甲基-2 戊酮溶液用进行 GC 检测。GC 检测方法具体为：进样口 280℃，分流比 10:1，流速 3ml 每分钟，柱温起始 100℃，25℃每分钟升至 246℃，30℃每分钟升至 290℃并保留 2 分钟，检测器 300℃。

结果，本菌株在 18h 时转化率为 90%。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权利要求：

1. 一种制备脂肪醇的方法，其特征在于，所述方法包括：

以脂肪酸为底物，利用羧酸还原酶将脂肪酸转化为脂肪醛；利用醛还原酶将脂肪醛转化为脂肪醇。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的脂肪酸如下获得：

以脂肪酸酯为底物，利用酯水解酶将脂肪酸酯转化为脂肪酸。

3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，

所述的羧酸还原酶包括：MsCAR，MmCAR 或 NsCAR；

所述的醛还原酶包括：AlrA 或 YjgB；

所述的酯水解酶包括：CALB，HDE，LcαE7，BioH，YbaC 或 TesA。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，还包括：利用 EntD 或 Sfp 促进羧酸还原酶的活性。

5. 如权利要求 1 或 4 所述的方法，其特征在于，所述的 MsCAR 具有 SEQ ID NO: 2 所示的氨基酸序列；和/或

所述的 AlrA 具有 SEQ ID NO: 4 所示的氨基酸序列；和/或

所述的 LcαE7 具有 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或 SEQ ID NO: 6 中第 33-570 位所示的氨基酸序列；优选地是氨基酸序列如 SEQ ID NO: 6 中第 33-570 位所示的截短体；和/或

所述的 EntD 具有 SEQ ID NO: 8 所示的氨基酸序列。

6. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，羧酸还原酶的表达盒、醛还原酶的表达盒被串联于一个表达质粒中；较佳地，该表达质粒中还串联有酯水解酶的表达盒；更佳地，该表达质粒中还串联有 EntD 的表达盒。

7. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述的脂肪酸为不饱和脂肪酸，所述的脂肪醇为不饱和脂肪醇，所述的脂肪醛为不饱和脂肪醛，

所述的脂肪酸酯为不饱和脂肪酸酯；或

所述的脂肪酸为饱和脂肪酸，所述的脂肪醇为饱和脂肪醇，所述的脂肪醛为饱和脂肪醛，所述的脂肪酸酯为饱和脂肪酸酯。

8. 一种重组的表达构建物，其特征在于，所述的表达构建物中包括：羧酸还原酶的表达盒，醛还原酶的表达盒；较佳地，该表达质粒中还包括：酯水解酶的表达盒；更佳地，该表达质粒中还包括：EntD 的表达盒。

9. 一种重组的细胞，其特征在于，所述的细胞中包括权利要求 8 所述的表达构建物。

10. 一种发酵法制备脂肪醇的方法，其特征在于，所述方法包括：培养权利要求 9 所述的重组的细胞，并在培养体系中添加脂肪酸或脂肪酸酯作为反应底物，从而获得脂肪醇。

11. 一种用于制备脂肪醇的试剂盒，其特征在于，所述的试剂盒中包括：

包含有羧酸还原酶的表达盒、醛还原酶的表达盒、酯水解酶的表达盒的表达构建物或细胞；较佳地，所述的表达构建物或细胞还包含酯水解酶的表达盒；更佳地，所述的表达构建物或细胞还包含 EntD 的表达盒。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/084020

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 7/04 (2006.01) i; C12P 7/64 (2006.01) i; C12N 15/63 (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)

C12P; C12N; C07K

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; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED and Keywords: MsCAR, MmCAR, NsCAR, AlrA, YjgB, CALB, HDE, LcaE7, BioH, YbaC, TesA, EntD, Sfp, fatty acid, aliphatic ester, ester of fatty acid, aliphatic alcohol, fatty alcohol, carboxylate reductase, aldehyde reductase, AR, aldehyde dehydrogenase, ester hydrolase 等; GENBANK, EMBL, NATIONAL BIO-SEQUENCE DATABASE OF CHINESE PATENT and search sequences: SEQ ID NOs: 1-16.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2013152052 A2 (LS9, INC.), 10 October 2013 (10.10.2013), description, paragraphs [0057, 0065, 0085, 0094, 0100, 0133 and 0146], and claims 51 and 53	1-2, 4, 6-1
Y	WO 2013152052 A2 (LS9, INC.), 10 October 2013 (10.10.2013), description, paragraphs [0057, 0065, 0085, 0094, 0100, 0133 and 0146], and claims 51 and 53	3, 5
Y	CN 102656273 A (LS9, INC.), 05 September 2012 (05.09.2012), description, paragraph [0394], and SEQ ID NO: 54-97 and 98-147	3, 5
A	CN 102264910 A (LS9, INC.), 30 November 2011 (30.11.2011), the whole document	1-11
A	WO 2013184602 A2 (GENOMATICA, INC.), 12 December 2013 (12.12.2013), the whole document	1-11
A	WO 2013152051 A2 (LS9, INC.), 10 October 2013 (10.10.2013), the whole document	1-11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 25 November 2015 (25.11.2015)	Date of mailing of the international search report 08 December 2015 (08.12.2015)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Ying Telephone No.: (86-10) 62089434

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/084020

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2013152052 A2	10 October 2013	CA 2883064 A1 EP 2834350 A2 MX 2014011903 A US 2015064757 A1 JP 2015512645 A AU 2013243602 A1 CN 104704113 A KR 20150032660 A WO 2013152052 A3 CO 7170148 A2	10 October 2013 11 February 2015 12 May 2015 05 March 2015 30 April 2015 13 November 2014 10 June 2015 27 March 2015 13 March 2014 28 January 2015
CN 102656273 A	05 September 2012	EP 2480680 A1 EP 2910630 A1 EP 2480680 A4 CA 2774975 A1 WO 2011038132 A1 WO 2011038134 A1 EP 2480680 B1 US 9133406 B2 US 2011162259 A1 MX 2012003472 A US 2011072714 A1 ES 2536240 T3	01 August 2012 26 August 2015 06 November 2013 31 March 2011 31 March 2011 31 March 2011 11 February 2015 15 September 2015 07 July 2011 22 May 2012 31 March 2011 21 May 2015
CN 102264910 A	30 November 2011	AP 201105673 D0 EP 2367947 A2 JP 2012506715 A AU 2009320224 A1 ES 2505115 T3 WO 2010062480 A2 WO 2010062480 A3 US 2010105963 A1 MX 2011004286 A EP 2796559 A1 CA 2740037 A1 EP 2367947 B1 US 9068201 B2 US 8999686 B2 US 2013115665 A1 KR 20110090964 A EP 2367947 A4 CN 102264910 B	30 April 2011 28 September 2011 22 March 2012 03 June 2010 09 October 2014 03 June 2010 29 July 2010 29 April 2010 01 June 2011 29 October 2014 03 June 2010 16 July 2014 30 June 2015 07 April 2015 09 May 2013 10 August 2011 24 October 2012 26 August 2015
WO 2013184602 A2	12 December 2013	CN 104685058 A US 2015148513 A1 TW 201410865 A EP 2855687 A2 US 2014030779 A1 WO 2013184602 A3	03 June 2015 28 May 2015 16 March 2014 08 April 2015 30 January 2014 30 January 2014
WO 2013152051 A2	10 October 2013	CA 2883968 A1 EP 2834352 A2 MX 2014011905 A WO 2013152051 A3	10 October 2013 11 February 2015 08 May 2015 12 December 2013

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/084020

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		CN 104395464 A	04 March 2015
		AU 2013243601 A1	30 October 2014
		US 2015064782 A1	05 March 2015
		CO 7170149 A2	28 January 2015
		JP 2015512644 A	30 April 2015
		KR 20150032930 A	31 March 2015

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/084020

A. 主题的分类

C12P 7/04(2006.01)i; C12P 7/64(2006.01)i; C12N 15/63(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)

C12P; C12N; C07K

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; CPRSABS; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; WOTXT; USTXT; JPTXT; CNKI; PUBMED 和关键词: 脂肪酸, 脂肪酸酯, 脂肪醇, 羧酸还原酶, 醛还原酶, 醛脱氢酶, 酯水解酶, MscAR, MmCAR, NsCAR, AlrA, YjgB, CALB, HDE, LcaE7, BioH, YbaC, TesA, EntD, Sfp, fatty acid, aliphatic ester, ester of fatty acid, aliphatic alcohol, fatty alcohol, carboxylate reductase, aldehyde reductase, AR, aldehyde dehydrogenase, ester hydrolase 等; GENBANK, EMBL, 中国专利生物序列检索系统和检索的序列: SEQ ID NO:1-16。

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2013152052 A2 (LS9公司) 2013年 10月 10日 (2013 - 10 - 10) 说明书第[0057、0065、0085、0094、0100、0133、0146]段, 权利要求51、53	1-2、4、6-11
Y	WO 2013152052 A2 (LS9公司) 2013年 10月 10日 (2013 - 10 - 10) 说明书第[0057、0065、0085、0094、0100、0133、0146]段, 权利要求51、53	3、5
Y	CN 102656273 A (LS9公司) 2012年 9月 5日 (2012 - 09 - 05) 说明书第[0394]段, SEQ ID NO: 54-97、98-147	3、5
A	CN 102264910 A (LS9公司) 2011年 11月 30日 (2011 - 11 - 30) 全文	1-11
A	WO 2013184602 A2 (GENOMATICA公司) 2013年 12月 12日 (2013 - 12 - 12) 全文	1-11
A	WO 2013152051 A2 (LS9公司) 2013年 10月 10日 (2013 - 10 - 10) 全文	1-11

☐ 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

2015年 11月 25日

国际检索报告邮寄日期

2015年 12月 8日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
北京市海淀区蓟门桥西土城路6号
100088 中国

传真号 (86-10)62019451

授权官员

王颖

电话号码 (86-10)62089434

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/084020

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)
WO	2013152052	A2	2013年 10月 10日	CA	2883064	A1	2013年 10月 10日
				EP	2834350	A2	2015年 2月 11日
				MX	2014011903	A	2015年 5月 12日
				US	2015064757	A1	2015年 3月 5日
				JP	2015512645	A	2015年 4月 30日
				AU	2013243602	A1	2014年 11月 13日
				CN	104704113	A	2015年 6月 10日
				KR	20150032660	A	2015年 3月 27日
				WO	2013152052	A3	2014年 3月 13日
				CO	7170148	A2	2015年 1月 28日
CN	102656273	A	2012年 9月 5日	EP	2480680	A1	2012年 8月 1日
				EP	2910630	A1	2015年 8月 26日
				EP	2480680	A4	2013年 11月 6日
				CA	2774975	A1	2011年 3月 31日
				WO	2011038132	A1	2011年 3月 31日
				WO	2011038134	A1	2011年 3月 31日
				EP	2480680	B1	2015年 2月 11日
				US	9133406	B2	2015年 9月 15日
				US	2011162259	A1	2011年 7月 7日
				MX	2012003472	A	2012年 5月 22日
				US	2011072714	A1	2011年 3月 31日
				ES	2536240	T3	2015年 5月 21日
CN	102264910	A	2011年 11月 30日	AP	201105673	D0	2011年 4月 30日
				EP	2367947	A2	2011年 9月 28日
				JP	2012506715	A	2012年 3月 22日
				AU	2009320224	A1	2010年 6月 3日
				ES	2505115	T3	2014年 10月 9日
				WO	2010062480	A2	2010年 6月 3日
				WO	2010062480	A3	2010年 7月 29日
				US	2010105963	A1	2010年 4月 29日
				MX	2011004286	A	2011年 6月 1日
				EP	2796559	A1	2014年 10月 29日
				CA	2740037	A1	2010年 6月 3日
				EP	2367947	B1	2014年 7月 16日
				US	9068201	B2	2015年 6月 30日
				US	8999686	B2	2015年 4月 7日
				US	2013115665	A1	2013年 5月 9日
				KR	20110090964	A	2011年 8月 10日
				EP	2367947	A4	2012年 10月 24日
				CN	102264910	B	2015年 8月 26日
WO	2013184602	A2	2013年 12月 12日	CN	104685058	A	2015年 6月 3日
				US	2015148513	A1	2015年 5月 28日
				TW	201410865	A	2014年 3月 16日
				EP	2855687	A2	2015年 4月 8日
				US	2014030779	A1	2014年 1月 30日
				WO	2013184602	A3	2014年 1月 30日
WO	2013152051	A2	2013年 10月 10日	CA	2883968	A1	2013年 10月 10日
				EP	2834352	A2	2015年 2月 11日
				MX	2014011905	A	2015年 5月 8日
				WO	2013152051	A3	2013年 12月 12日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/084020

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 104395464 A	2015年 3月 4日
		AU 2013243601 A1	2014年 10月 30日
		US 2015064782 A1	2015年 3月 5日
		CO 7170149 A2	2015年 1月 28日
		JP 2015512644 A	2015年 4月 30日
		KR 20150032930 A	2015年 3月 31日