

(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
2018年6月21日 (21.06.2018)



(10) 国际公布号
WO 2018/107880 A1

(51) 国际专利分类号:
C12P 19/02 (2006.01) *C12P 19/32* (2006.01)
C12P 9/00 (2006.01) *C12P 7/04* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2017/105664

(22) 国际申请日: 2017年10月11日 (11.10.2017)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201611167145.6 2016年12月16日 (16.12.2016) CN

(71) 申请人: 中国科学院天津工业生物技术研究所 (TIANJIN INSTITUTE OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国天津市空港经济区西七道32号, Tianjin 300308 (CN)。

(72) 发明人: 马红武 (MA, Hongwu); 中国天津市空港经济区西七道32号, Tianjin 300308 (CN)。杨雪 (YANG, Xue); 中国天津市空港经济区西七道32号, Tianjin 300308 (CN)。袁倩倩 (YUAN, Qianqian); 中国天津市空港经济区西七道32号, Tianjin 300308 (CN)。江会锋

(JIANG, Huifeng); 中国天津市空港经济区西七道32号, Tianjin 300308 (CN)。

(74) 代理人: 北京布瑞知识产权代理有限公司 (BEIJING BRIGHT IP AGENCY CO., LTD.); 中国北京市朝阳区广顺北大街5号院内32号B228, Beijing 100102 (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,

(54) Title: NEW APPROACH FOR SYNTHESIZING ACETYL COENZYME A AND DERIVATIVE PRODUCT THEREOF USING GLYCOLALDEHYDE

(54) 发明名称: 利用乙醇醛合成乙酰辅酶A及其衍生产品的新途径

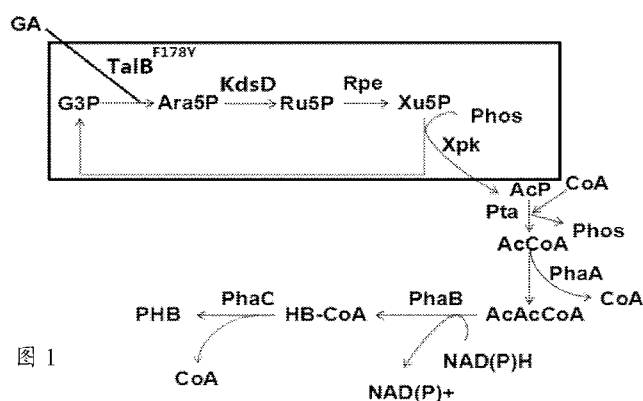


图 1

(57) Abstract: Disclosed is a new approach for synthesizing an acetyl coenzyme A and a derivative product thereof (5-phosphoarabinose, acetyl phosphoric acid, acetyl phosphate, and an acetyl coenzyme A derivative compound) using glycolaldehyde. The approach comprises a reaction of glycolaldehyde and 3-phosphoglyceraldehyde under the catalysis of an enzyme to generate 5-phosphoarabinose, wherein the enzyme is selected from an aldolase, a transaldolase, an isoenzyme and a mutant enzyme thereof.

(57) 摘要: 一种利用乙醇醛合成乙酰辅酶A及其衍生产品(5-磷酸阿拉伯糖、乙酰磷酸、乙酰磷酸盐、乙酰辅酶A衍生化合物)的新方法, 所述方法包括在酶催化下乙醇醛和3-磷酸甘油醛反应生成5-磷酸阿拉伯糖的反应, 所述的酶选自醛缩酶、转醛醇酶、及其同工酶、突变酶。



WO 2018/107880 A1

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))。

利用乙醇醛合成乙酰辅酶 A 及其衍生产品的新途径

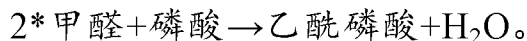
技术领域

本发明涉及生物医药技术领域，具体涉及一种利用乙醇醛合成乙酰辅酶 A 及其衍生产品的方法。

背景技术

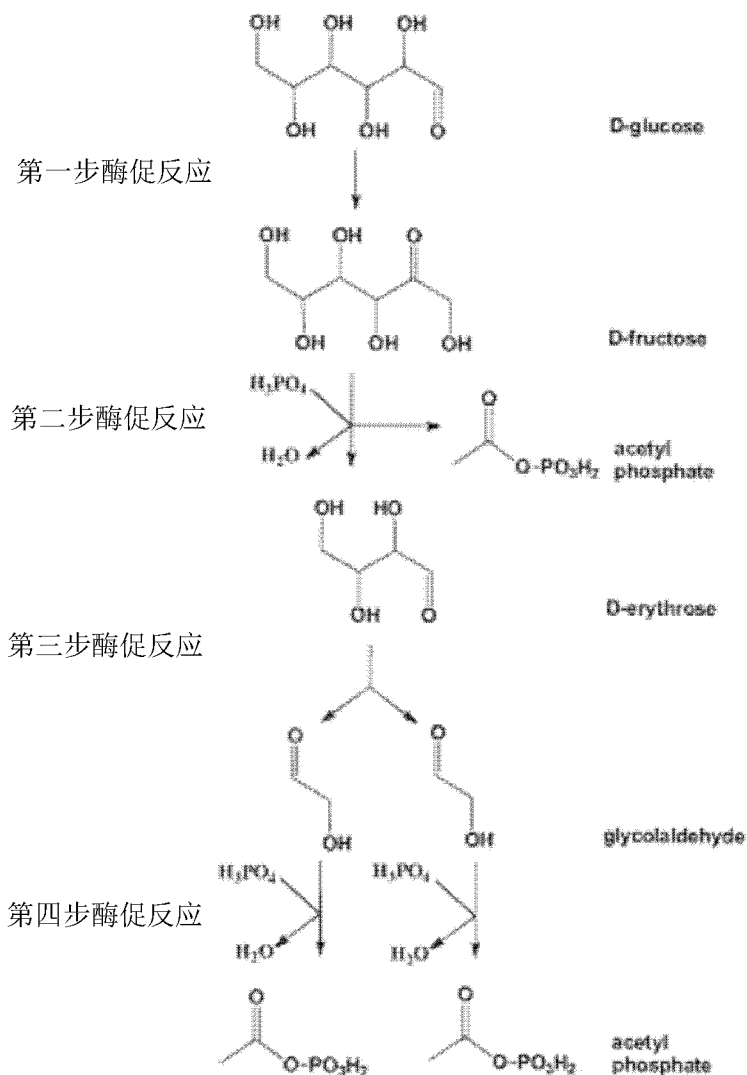
乙酰辅酶 A (AcCoA) 是合成必要的生物化合物的关键中间体，该必要生物化合物包括聚酮化合物、脂肪酸、类异戊二烯、生物碱、维生素和氨基酸等。来源于 AcCoA 的代谢产物为初级和次级代谢物，其包括工业效用的化合物。AcCoA 可以由乙酰磷酸 (AcP) 生成(如可通过磷酸乙酰转移酶 Pta (EC 2.3.1.8) 催化得到)，继而生成一系列以 AcCoA 为平台的生物产品，广泛应用于生物催化等领域。AcP 的合成方法有：

专利申请 WO2015/144447A1 公开了一种利用磷酸转酮酶 (EC 4.1.2.9、果糖-6-磷酸磷酸转酮酶 EC4.1.2.22) 或磺基乙醛乙酰转移酶 (EC 2.3.3.15) 催化甲醛生产乙酰磷酸的方法，反应方程如下：



上述制备反应使用的磷酸转酮酶，与甲醛的亲合力差，催化效率不及转化其最适底物 5-磷酸木酮糖时的百分之一，并且微生物细胞对于甲醛的耐受能力普遍较差，可应用拓展的空间较小。

专利申请 WO2015/181074A1 公开了利用磷酸转酮酶 (EC 4.1.2.9、果糖-6-磷酸磷酸转酮酶 EC4.1.2.22) 催化 D-果糖生产 D-赤藓糖和乙酰磷酸的方法，该方法还包括将 D-赤藓糖转化为乙醇醛，然后再进一步转化为乙酰磷酸，反应过程如下：



上述乙酰磷酸的制备方法的反应速率较低，磷酸转酮酶对于果糖的转化数 k_{cat} 仅为 0.1/s，效率很低，并且反应时间较长（18 h）会对酶和产物的稳定性提出考验。另外，第三步 D-erythrose 裂解为乙醇醛的反应是可逆过程，其反应速率受到裂解后的乙醇醛浓度的影响，使体系中很难积累高浓度的乙醇醛，这会导致乙酰磷酸的生成速率难以保证。第二步酶促反应生成的乙酰磷酸很可能会由于产物抑制而影响最后一步酶促反应的收率，如果第二步酶促反应生成乙酰磷酸后即时除去，会使整个制备工艺操作复杂化。

发明内容

10 为克服现有技术的不足，本发明一方面提供一种 5-磷酸阿拉伯糖

(Ara5P) 的制备方法, 所述方法包括在酶催化下乙醇醛和 3-磷酸甘油醛反应生成 Ara5P, 所述的酶选自: 醛缩酶、转醛醇酶、及其同工酶、突变酶。

优选的, 所述的制备的反应是通过微生物来进行的。

优选的, 所述的醛缩酶为果糖二磷酸醛缩酶 (EC 4.1.2.13)。

5 优选的, 所述的转醛醇酶为大肠杆菌 *Escherichia coli* 来源的转醛醇酶 (EC 2.2.1.2) 的突变酶 TalB^{F178Y}。

本发明另一方面还提供一种用于制备 Ara5P 的组合物, 包括:

(1) 乙醇醛,

(2) 3-磷酸甘油醛,

10 (3) 醛缩酶、转醛醇酶、或其同工酶、突变酶;

或,

(1) 乙醇醛,

(2) 3-磷酸甘油醛,

(3) 表达醛缩酶、转醛醇酶、或其同工酶、突变酶的微生物;

15 优选的, 所述的醛缩酶为果糖二磷酸醛缩酶 (EC 4.1.2.13)。

优选的, 所述的转醛醇酶为大肠杆菌 *Escherichia coli* 来源的转醛醇酶 (EC 2.2.1.2) 的突变酶 TalB^{F178Y}。

本发明另一方面提供一种乙酰磷酸 (AcP) 的制备方法, 所述方法包括上述 Ara5P 的制备方法步骤; 优选的, 所述的 AcP 的制备方法还包括 Ara5P
20 转化为 5-磷酸木酮糖 (Xu5P) 再进一步转化为 AcP 的步骤。

优选的, 所述的 Ara5P 转化为 Xu5P 的步骤包括 Ara5P 转化为 5-磷酸核酮糖 (Ru5P) 再进一步转化为 Xu5P 的步骤。

优选的, 所述的 Xu5P 转化为 AcP 的反应包括 Xu5P 和磷酸在磷酸转酮酶催化下生成 AcP 的步骤。

25 更优选的, 所述的磷酸转酮酶为磷酸转酮酶 (EC 4.1.2.9) 或果糖-6-磷酸转酮酶 (EC 4.1.2.22)。

所述的磷酸转酮酶可来自各种种属的微生物表达、人工合成及纯化过程，特别是来源于微生物如优选来源于 *Pseudomonas stutzeri*（如施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* A1501）和 *Bifidobacterium adolescentis* 菌株的磷酸转酮酶在上述反应中均可发挥良好的催化作用。

5 优选的，Xu5P 转化为 AcP 的反应体系中还包括磷酸转酮酶的辅酶，如焦磷酸硫胺素(ThDP)。

优选的，所述的制备的反应是通过微生物来进行的。

本发明另一方面提供一种用于制备 AcP 的组合物，包括上述用于制备 Ara5P 的组合物。

10 优选的，上述用于制备 AcP 的组合物还包括磷酸、磷酸转酮酶。

更优选的，上述用于制备 AcP 的组合物还包括磷酸转酮酶辅酶。

优选的，上述用于制备 AcP 的组合物还包括可催化 Ara5P 生成 Xu5P 的酶，该酶可为一种酶，也可两种以上的酶的组合，优选为核糖-5-磷酸异构酶和核酮糖-磷酸 3-异构酶的组合，或，阿拉伯糖-5-磷酸异构酶和核酮糖-15 磷酸 3-异构酶的组合。

在本发明的一个优选实施例中，上述用于制备 AcP 的组合物包括：

- (1) 乙醇醛，
- (2) 3-磷酸甘油醛，
- (3) 醛缩酶、转醛醇酶、或其同工酶、突变酶，
- 20 (4) 核糖-5-磷酸异构酶或阿拉伯糖-5-磷酸异构酶，
- (5) 核酮糖-磷酸 3-异构酶，
- (6) 磷酸、磷酸转酮酶、辅酶。

优选的，所述的醛缩酶为果糖二磷酸醛缩酶（EC 4.1.2.13）或脱氧核糖磷酸醛缩酶（4.1.2.4）。

25 优选的，所述的转醛醇酶为大肠杆菌 *Escherichia coli* 来源的转醛醇酶（EC 2.2.1.2）的突变酶 TalB^{F178Y}。

优选的，所述的磷酸转酮酶为磷酸转酮酶（EC 4.1.2.9）或果糖-6-磷酸磷酸转酮酶（EC 4.1.2.22）。

优选的，所述的磷酸转酮酶辅酶为焦磷酸硫胺素。

在本发明的一个更优选实施例中，上述用于制备 AcP 的组合物包括：

- 5 (1) 乙醇醛，
- (2) 3-磷酸甘油醛，
- (3) 果糖二磷酸醛缩酶（EC 4.1.2.13）或脱氧核糖磷酸醛缩酶（EC 4.1.2.4）或大肠杆菌 *Escherichia coli* 来源的转醛醇酶（TalB）的突变酶 TalB^{F178Y}，
- 10 (4) 核糖-5-磷酸异构酶（EC 5.3.1.6）或阿拉伯糖-5-磷酸异构酶（EC 5.3.1.13），
- (5) 核酮糖-磷酸 3-异构酶（EC 5.1.3.1），
- (6) 磷酸、磷酸转酮酶（EC 4.1.2.9）或果糖-6-磷酸磷酸转酮酶（EC 4.1.2.22）及焦磷酸硫胺素。

15 AcP 的稳定性较差，在实际应用中常做成乙酰磷酸盐的形式，本发明另一方面提供一种乙酰磷酸盐的制备方法，所述方法包括上述 Ara5P 的制备方法步骤。

优选的，所述的乙酰磷酸盐的制备方法包括上述 AcP 的制备方法步骤。

20 优选的，所述的乙酰磷酸盐包括：乙酰磷酸二锂盐、乙酰磷酸二钠盐和乙酰磷酸二铵盐。

本发明另一方面提供一种乙酰辅酶 A（AcCoA）的制备方法，所述方法包括上述 Ara5P 的制备方法步骤。

优选的，所述的 AcCoA 的制备方法包括上述 AcP 的制备方法步骤。

25 优选的，所述的 AcCoA 的制备方法还包括在乙酰磷酸转移酶（Pta）作用下 AcP 转化为 AcCoA 的步骤。

优选的，所述的制备的反应是通过微生物来进行的。

本发明另一方面提供一种 AcCoA 衍生化合物的制备方法，所述方法包括上述 Ara5P 的制备方法步骤，优选的，所述方法包括上述 AcP 的制备方法步骤，更优选的，所述方法包括上述 AcCoA 的制备方法步骤；在本发明的一个优选实施例中，所述的 AcCoA 衍生化合物选自：丙酮、异丙醇、乙酸、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-脯氨酸、L-精氨酸、L-亮氨酸、L-半胱氨酸、琥珀酸酯和聚羟基脂肪酸酯。

在本发明的另一个优选实施例中，所述的 AcCoA 衍生化合物为聚 3-羟基丁酸酯（PHB）。

优选的，所述的制备的反应是通过微生物来进行的。

上述 Ara5P、AcP、乙酰磷酸盐、AcCoA、AcCoA 衍生化合物的制备方法中所述的 3-磷酸甘油醛可采用商购，也可采用现有技术中已知的方法制备得到，如利用葡萄糖、甘油、磷酸二羟基丙酮等制备得到，例如磷酸二羟基丙酮可以在丙糖磷酸异构酶作用下转化为 3-磷酸甘油醛；也可在上述制备方法的反应体系中加入 3-磷酸甘油醛的制备反应物，实现在线制备；3-磷酸甘油醛的来源并不会限制本发明的保护范围。

上述 Ara5P、AcP、乙酰磷酸盐、AcCoA、AcCoA 衍生化合物的制备方法中所述的乙醇醛可由现有技术中已知的方法制备得到，如，乙醛的卤代反应、糖类的裂解反应等，其中，利用甲醛制备乙醇醛的成本较低，优选的，上述乙醇醛是利用甲醛按照现有技术优选如“甲醛合成乙醇醛研究及其应用进展”中记载的乙醇醛的制备方法和工艺（辛坤，李青松，贾冰，等. 甲醛合成乙醇醛研究及其应用进展. 天然气化工·C1 化学与化工，2016（41）：88-94）制备得到。

本发明另一方面提供一种上述醛缩酶、转醛醇酶或其同工酶、突变酶在制备 Ara5P、AcP、乙酰磷酸盐、AcCoA 和 AcCoA 衍生化合物中的应用。

本发明另一方面还提供一种表达上述醛缩酶、转醛醇酶或其同工酶、突变酶的微生物在制备 Ara5P、AcP、乙酰磷酸盐、AcCoA 和 AcCoA 衍生化

合物中的应用。

本发明涉及的酶可来自各种微生物来源及人工改造获得的同工酶、突变酶。

上述制备的反应通过微生物来进行，如反应中涉及的反应物中的一种或两种以上，和/或，酶的一种或两种以上可由微生物在线生产。

本发明提供的 Ara5P 的制备方法中醛缩酶或转醛醇酶不依赖于辅酶，催化效率较高（比酶活大于 50U/mg），且醛缩酶及转醛醇酶的种类繁多，可优化空间很大。本发明中磷酸转酮酶的催化底物为 5-磷酸木酮糖，是其最适底物，亲和力和比酶活很高（ K_m 约为 10-45mM，比酶活为 90-800 U/mg），并且作为最后一步反应，该催化过程不可逆，使体系不受反应平衡的限制，既可以拉动醛缩酶和转醛醇酶的速率，又可以最大限度地提高乙酰磷酸的收率及促进 3-磷酸甘油醛的回补。提供的 AcP 的制备方法，催化速率较高，反应路线的碳理论得率为 100%，没有碳损失，G3P 和酶均可循环使用，反应效率较高，成本有所降低，另外，辅助酶 RpiA（或 KdsD）及 Rpe，与底物亲和力强、稳定性好、催化活性高。上述制备方法的该方法在补料发酵、连续发酵等可控制底物水平的生产过程中会发挥更为明显的优势。

附图说明

图 1 所示为本发明实施例 1 提供的生物合成途径示意图。

图 2 所示为本发明实施例 6 提供的 GC-MS 检测结果。

图 3 所示为本发明实施例 7 提供的 GC-MS 检测结果。

具体实施方式

下面将结合本发明实施例中的附图，对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述，显然，所描述的实施例仅是本发明一部分实施例，而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例，本领域普通技术人员在没有作出

创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例，都属于本发明保护的范围。

本发明的具体实施方式中涉及的利用乙醇醛生物合成乙酰磷酸的途径如图 1 所示，反应过程中涉及的反应物、中间体及酶的信息详见表 1 和 2。

表 1 本发明中涉及的代谢物信息表

化合物名称	英文全称	缩写
乙醇醛	Glycolaldehyde	GA
3-磷酸甘油醛	Glyceraldehyde-3-phosphate	G3P
磷酸二羟基丙酮	Dihydroxyacetone phosphate	DHAP
5-磷酸阿拉伯糖	Arabinose 5-phosphate	Ara5P
5-磷酸核糖	Ribose 5-phosphate	R5P
5-磷酸核酮糖	Ribulose 5-phosphate	Ru5P
5-磷酸木酮糖	Xylulose-5-phosphate	Xu5P
乙酰基磷酸	Acetyl phosphate	AcP
硫胺素焦磷酸	Thiamine pyrophosphate	ThDP
辅酶 A	Coenzyme A	CoA
乙酰辅酶 A	Acetyl-coenzyme A	AcCoA
磷酸根离子	Phosphate	Phos

5

表 2 本发明中涉及的酶信息表

缩写	酶名称	英文全称	EC 编号
Fsa	醛缩酶	Aldolase	4.1.2.13
TalB	转醛醇酶	Transaldolase	2.2.1.2
KdsD	阿拉伯糖-5-磷酸异构酶	Arabinose-5-phosphate isomerase	5.3.1.13
RpiA	核糖-5-磷酸异构酶	Ribose-5-phosphate isomerase	5.3.1.6
Rpe	核酮糖-磷酸 3-异构酶	Ribulose-phosphate 3-epimerase	5.1.3.1

TpiA	丙糖磷酸异构酶	Triose-phosphate isomerase	5.3.3.1
Fpk	果糖-6-磷酸磷酸转酮酶	Fructose-6-phosphate phosphoketolase	4.1.2.22
Xpk	磷酸转酮酶	Phosphoketolase	4.1.2.9
Pta	磷酸乙酰转移酶	Phosphate acetyltransferase	2.3.1.8

实施例 1

乙醇醛为 15 mM 的初始浓度下，在大肠杆菌 *Escherichia coli* 来源的 Transaldolase TalB 的突变酶 TalB^{F178Y}（在野生酶基础上第 178 位氨基酸残基由 F 突变为 Y）作用下，添加 5 mM G3P，进行 Ara5P 的制备反应，反应 1h 后，将反应液冻干、衍生处理后，通过 GC-MS 定量检测到的 Ara5P 含量为 2.5 mM，Ara5P 的平均合成速率为 52.1 $\mu\text{mol}(\text{Ara5P})/\text{min}/\text{mg}$ （酶蛋白）。

实施例 2

乙醇醛在 15mM 的初始浓度下，ThDP 浓度为 1mM， PO_4^{3+} 浓度为 2mM，加入 *Bifidobacterium adolescentis* 来源的 Fpk（EC 4.1.2.22）、大肠杆菌来源的 aldolase（Fsa，EC 4.1.2.13）、2 mM G3P 和微量的 RpiA、Rpe，进行 AcP 的制备反应。经过检测，乙醇醛的转化速率为 16.3 μmol （乙醇醛）/min/mg（酶蛋白）。

以上数据为反应体系进行 3 h 的平均速率。

实施例 3

乙醇醛在 15 mM 的初始浓度下，ThDP 浓度为 1 mM， PO_4^{3+} 浓度为 2 mM，加入施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* A1501 来源的 Xpk（EC 4.1.2.9）、大肠杆菌 *Escherichia coli* 来源的 Transaldolase (TalB, EC 2.2.1.2)的突变酶 TalB^{F178Y}、2 mM G3P 和微量的 RpiA、Rpe，进行 AcP 的制备反应。经过检测，乙醇醛的转化速率为 19.7 μmol （乙醇醛）/min/mg（酶蛋白）。

以上数据为反应体系进行 3 h 的平均速率。

实施例 4

乙醇醛在 20 mM 的初始浓度下，ThDP 浓度为 1 mM， PO_4^{3+} 浓度为 2 mM，加入施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* A1501 来源的 Xpk、大肠杆菌 *Escherichia coli* 来源的 Transaldolase (talB, EC 2.2.1.2) 的突变酶 TalB^{F178Y}、4 mM DHAP 和微量的 RpiA、Rpe、TpiA，进行 AcP 的制备反应。经过检测，乙醇醛的转化速率为 26.5 μmol (乙醇醛) /min/mg (酶蛋白)。

以上数据为反应体系进行 3 h 的平均速率。

实施例 5

将合成磷酸转酮酶的基因整合到大肠杆菌 *Escherichia coli* K-12 MG1655 的基因组中，然后将含有用于合成聚 3-羟基丁酸酯 (PHB) 的基因 (PhaA、PhaB 和 PhaC) 以及 TalB^{F178Y} 的基因的质粒转入到上述菌株中，上述质粒选择 IPTG 诱导型启动子 (其余需要的酶，在大肠杆菌中均已存在)。将上述菌株在 LB 培养基中进行培养，培养 2.5 h 后，菌体 OD_{600} 值达到 0.8-1.0 时，添加 IPTG 至终浓度 0.5 mM，诱导 (22 °C, 6 h) 表达上述质粒上的目标酶蛋白。离心 (4 °C、8000 r/min、5 min) 收集菌体后，用不添加碳源和氮源的 M9 培养基悬浮菌体后，重新离心收集菌体，此悬浮、离心过程重复三次，用于除去菌体中残留的碳源。将最终收集的菌体以上述 M9 培养基重新悬浮后，均分 3 份，分别添加 0.02 g、0.45 g、0.9 g 乙醇醛 (菌体中含有中间代谢物 G3P，不需做额外添加)，以上述 M9 培养基统一定容至 30 mL，发酵 20 h，观察发酵过程中细胞生长情况，发酵结束后收集菌体并检测发酵液中 PHB 含量。

PHB 的检测：将发酵液离心获得菌体后，冻干称重。利用体积比 1:1 的氯仿及酯化液 (主要成分为甲醇) 混合液 4 mL 在 100 °C 下对菌体冻干粉衍生 4 h，然后添加 2 mL 超纯水，静置分层后，除去甲醇及细胞碎片等，取下层的 3-羟基丁酸甲酯氯仿溶液，利用气质联用仪 GC-MS 对氯仿中的 3-羟基丁酸甲酯进行定量检测。

实验结果：在上述发酵过程中，菌体可以进行正常的生长、繁殖；发酵结束后，相应的菌体干重分别为 0.025 g、0.076 g、0.131 g；经与标准品比对，测

得样品中 3-羟基丁酸的总含量分别为 0.005 g、0.066 g、0.089 g，碳源转化率在 10%-20%之间。结果表明，菌体可以利用乙醇醛和自身含有的 G3P、酶进行乙酰磷酸、乙酰辅酶 A 的合成，并继续生成乙酰辅酶 A 的衍生物 PHB 用于自身的碳源储备，乙醇醛在发酵过程中未表现出明显的细胞毒性，并可维持菌体正
5 常的代谢消耗。

实施例 6

采用不同途径制备乙酰磷酸和 AcCoA，反应 2 h，反应结束后检测 Ara5P 和 AcCoA 的含量，AcCoA 的含量也可间接表示乙酰磷酸的合成量，反应物、酶及其添加量如表 3 所示。

10 Ara5P 的检测：取 50 μ L 反应液，将反应液冻干后，利用 30 μ L 甲氧胺盐酸盐和 90 μ L 三甲基硅基三氟乙酰胺分别衍生 1 h 后，衍生温度为 37 $^{\circ}$ C，利用 GC-MS 检测 Ara5P 含量。

AcCoA 的检测：取 50 μ L 反应液，经 10%的硫酸溶液终止反应后，用 0.22 μ m 的滤膜除去杂质后，进行液相检测，流动相 A 为 0.2 M、pH=5 的磷酸二氢钠
15 溶液，流动相 B 为乙腈，AcCoA 的最大吸收峰出现在 254 nm。

产物含量检测结果如表 3 所示。

表 3 结果表明，上述反应体系中不添加醛缩酶或转醛醇酶时，没有 Ara5P 生成，AcCoA 的生成量也非常少，反应转化率非常低；上述反应体系中添加醛缩酶或转醛醇酶和 G3P 后，可生成 Ara5P，且反应转化率较高；在同时添加 RpiA
20 和 Rpe 后，生成的 Ara5P 会在 RpiA、Rpe 和 Fpk/Xpk 作用下转化为乙酰磷酸，进一步被磷酸乙酰转移酶转化为 AcCoA，且由 Ara5P 和 AcCoA 的检测结果可知，反应转化率非常高；在体系中同时添加 DHAP 和 TpiA，替代 G3P，也可获得与直接添加 G3P 相似的效果，达到较高的转化率。

表 3 体系的物质添加和代谢物生成情况表

(反应物或产物浓度单位：mM；酶用量单位： μ g)

25

体系中物质的添加情况	积累或生成情况
------------	---------

GA	Phos	G3P	DHAP	ThDP	CoA	F/Xpk	TpiA	TalB ^{F178Y}	RpiA	Rpe	Pta	Ara5P	AcCoA
15	2	0	0	2	5	2	0	0	0	0	1	0	0.02
15	2	2	0	2	5	2	0	40	0	0	1	1.20	0.22
15	2	2	0	2	5	2	0	40	1	1	1	1.63	3.65
15	2	0	3	2	5	2	1	40	1	1	1	1.06	3.47

备注：缓冲液中包含 Tris、NaCl 及 MgCl₂ 三种主要成分，pH 7.5，37 °C，反应体系均为 200 μL。

另外，在含有反应物如 GA、Phos、G3P、ThDP 等的相同反应体系中，分别：
 A: 不添加醛缩酶或转醛醇酶；B: 添加 TalB^{F178Y}；C: 添加 TalB^{F178Y} 和 F/Xpk；
 5 D: 添加 TalB^{F178Y}、F/Xpk 以及 RpiA；E: 添加 TalB^{F178Y}、F/Xpk 以及 RpiA 和 Rpe。
 GC-MS 检测 Ara5P 含量，结果如图 2 中 A-E 图所示（Ara5P 的出峰时间约为 37min）。
 由图 2 中各图及其对应的反应条件可以看出，在仅添加醛缩酶时，Ara5P 生成；
 在添加 RpiA 和 Rpe 时，生成的 Ara5P 被磷酸转酮酶较为彻底的分解。

10 实施例 7

乙醇醛在 15 mM 的初始浓度下，ThDP 浓度为 1 mM，PO₄³⁺ 浓度为 2 mM，
 加入施氏假单胞菌 *Pseudomonas stutzeri* A1501 来源的 Xpk (EC 4.1.2.9)、大肠杆菌
Escherichia coli 来源的 Transaldolase (TalB, EC 2.2.1.2) 的突变酶 TalB^{F178Y}、
 2 mM G3P 和微量的 KdsD、Rpe，进行 AcP 的制备反应。反应 2 h 后，检测到
 15 生成的 AcP 浓度为 4.5 mM。

另外，在含有反应物 GA、Phos、G3P、ThDP 等的相同反应体系中，分别：
 a: 添加 TalB^{F178Y}；b: 添加 TalB^{F178Y}、F/Xpk 以及 KdsD 和 Rpe。GC-MS 检测
 Ara5P 含量，结果如图 3 中 a-b 图所示。a 图中，出峰时间为 36.61 min, 36.89 min
 和 37.37 min 的三种物质分别为 Ara5P, R5P 和 Ru5P，对应分子离子碎片依次
 20 如图 3 中的 c-e 所示。由图 3 中各图及其对应的反应条件可以看出，在添加 KdsD

和 Rpe 时，生成的 Ara5P 被磷酸转酮酶完全分解。

以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1. 一种 5-磷酸阿拉伯糖的制备方法，所述方法包括在酶催化下乙醇醛和 3-磷酸甘油醛反应生成 5-磷酸阿拉伯糖，所述的酶选自：醛缩酶、转醛醇酶、及其同工酶、突变酶；

5 优选的，所述的制备的反应是通过微生物来进行的。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的醛缩酶为果糖二磷酸醛缩酶（EC 4.1.2.13）；和/或，

所述的转醛醇酶为大肠杆菌 *Escherichia coli* 来源的转醛醇酶（EC 2.2.1.2）的突变酶 TalB^{F178Y}。

10 3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述乙醇醛是由甲醛制备得到的。

4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，所述 3-磷酸甘油醛由磷酸二羟基丙酮制备得到。

5. 一种用于制备 5-磷酸阿拉伯糖的组合物，包括：

15 (1) 乙醇醛，

(2) 3-磷酸甘油醛，

(3) 醛缩酶、转醛醇酶、或其同工酶、突变酶；

或，

(1) 乙醇醛，

20 (2) 3-磷酸甘油醛，

(3) 表达醛缩酶、转醛醇酶、或其同工酶、突变酶的微生物；

优选的，所述的醛缩酶为果糖二磷酸醛缩酶（EC 4.1.2.13）；和/或，

所述的转醛醇酶为大肠杆菌 *Escherichia coli* 来源的转醛醇酶的突变酶 TalB^{F178Y}。

25 6. 一种乙酰磷酸的制备方法，所述方法包括如权利要求 1-4 任一项所述的 5-磷酸阿拉伯糖的制备方法；

优选的，所述的制备的反应是通过微生物来进行的。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其特征在于，所述的方法还包括 5-磷酸阿拉伯糖转化为 5-磷酸木酮糖再进一步转化为乙酰磷酸的步骤。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述的 5-磷酸阿拉伯糖转化为 5-磷酸木酮糖的步骤包括 5-磷酸阿拉伯糖转化为 5-磷酸核酮糖再进一步转化为 5-磷酸木酮糖的步骤；和/或，

所述的 5-磷酸木酮糖转化为乙酰磷酸的反应包括 5-磷酸木酮糖和磷酸在磷酸转酮酶催化下生成乙酰磷酸的步骤。

9. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述的磷酸转酮酶为磷酸转酮酶（EC 4.1.2.9）或果糖-6-磷酸磷酸转酮酶（EC 4.1.2.22）。

10. 一种用于制备乙酰磷酸的组合物，包括如权利要求 5 所述的用于制备 5-磷酸阿拉伯糖的组合物。

11. 如权利要求 10 所述的组合物，其特征在于，所述组合物还包括磷酸、磷酸转酮酶，优选的，所述组合物还包括磷酸转酮酶辅酶；和/或，所述组合物还包括可催化 5-磷酸阿拉伯糖生成 5-磷酸木酮糖的酶。

12. 如权利要求 11 所述的组合物，其特征在于，所述组合物包括：

(1) 乙醇醛，

(2) 3-磷酸甘油醛，

(3) 醛缩酶、转醛醇酶、或其同工酶、突变酶，

(4) 核糖-5-磷酸异构酶或阿拉伯糖-5-磷酸异构酶，

(5) 核酮糖-磷酸 3-异构酶，

(6) 磷酸、磷酸转酮酶、辅酶；

优选的，所述的醛缩酶为果糖二磷酸醛缩酶（EC 4.1.2.13）；和/或，

所述的转醛醇酶为大肠杆菌 *Escherichia coli* 来源的转醛醇酶的突变酶 TalB^{F178Y}；和/或，

所述的磷酸转酮酶为磷酸转酮酶（EC 4.1.2.9）或果糖-6-磷酸磷酸转酮

酶 (EC 4.1.2.22)。

13. 一种乙酰磷酸盐的制备方法, 所述方法包括如权利要求 1-4 任一项所述的 5-磷酸阿拉伯糖的制备方法或如权利要求 6-9 任一项所述的乙酰磷酸的制备方法, 优选的, 所述的乙酰磷酸盐包括: 乙酰磷酸二锂盐、乙酰磷酸二钠盐和乙酰磷酸二铵盐。

14. 一种乙酰辅酶 A 的制备方法, 所述方法包括如权利要求 1-4 任一项所述的 5-磷酸阿拉伯糖的制备方法或如权利要求 6-9 任一项所述的乙酰磷酸的制备方法;

优选的, 所述的制备的反应是通过微生物来进行的。

15. 一种乙酰辅酶 A 衍生化合物的制备方法, 所述方法包括如权利要求 1-4 任一项所述的 5-磷酸阿拉伯糖的制备方法或如权利要求 6-9 任一项所述的乙酰磷酸的制备方法或如权利要求 14 所述的乙酰辅酶 A 的制备方法,

优选的, 所述的乙酰辅酶 A 衍生化合物选自: 丙酮、异丙醇、乙酸、L-谷氨酸、L-谷氨酰胺、L-脯氨酸、L-精氨酸、L-亮氨酸、L-半胱氨酸、琥珀酸酯和聚羟基脂肪酸酯;

更优选的, 所述的乙酰辅酶 A 衍生化合物为聚 3-羟基丁酸酯;

优选的, 所述的制备的反应是通过微生物来进行的。

16. 一种醛缩酶、转醛醇酶或其同工酶、突变酶, 或, 表达醛缩酶、转醛醇酶或其同工酶、突变酶的微生物在制备 5-磷酸阿拉伯糖、乙酰磷酸、乙酰磷酸盐、乙酰辅酶 A 或乙酰辅酶 A 衍生化合物中的应用。

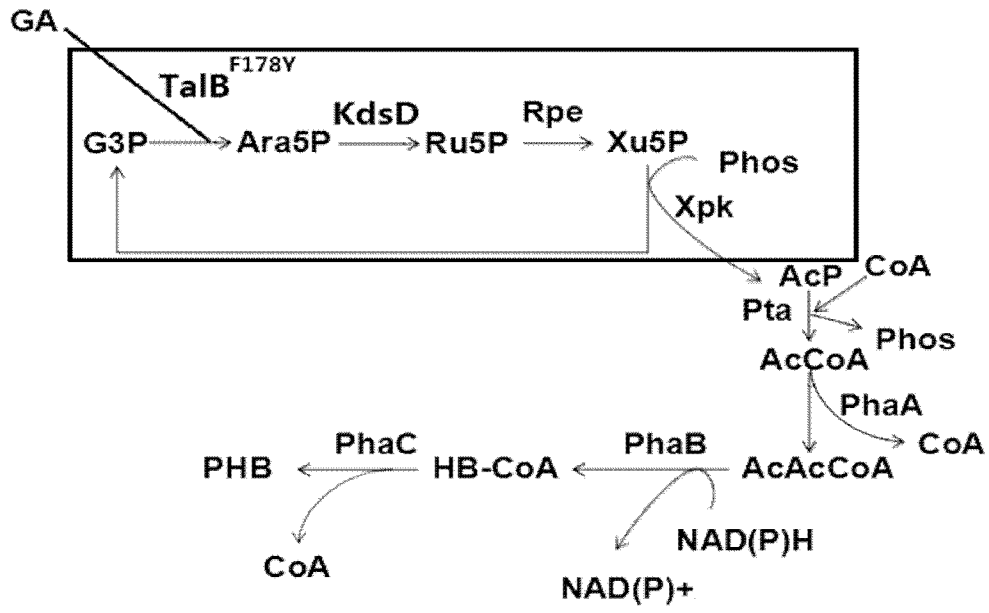


图 1

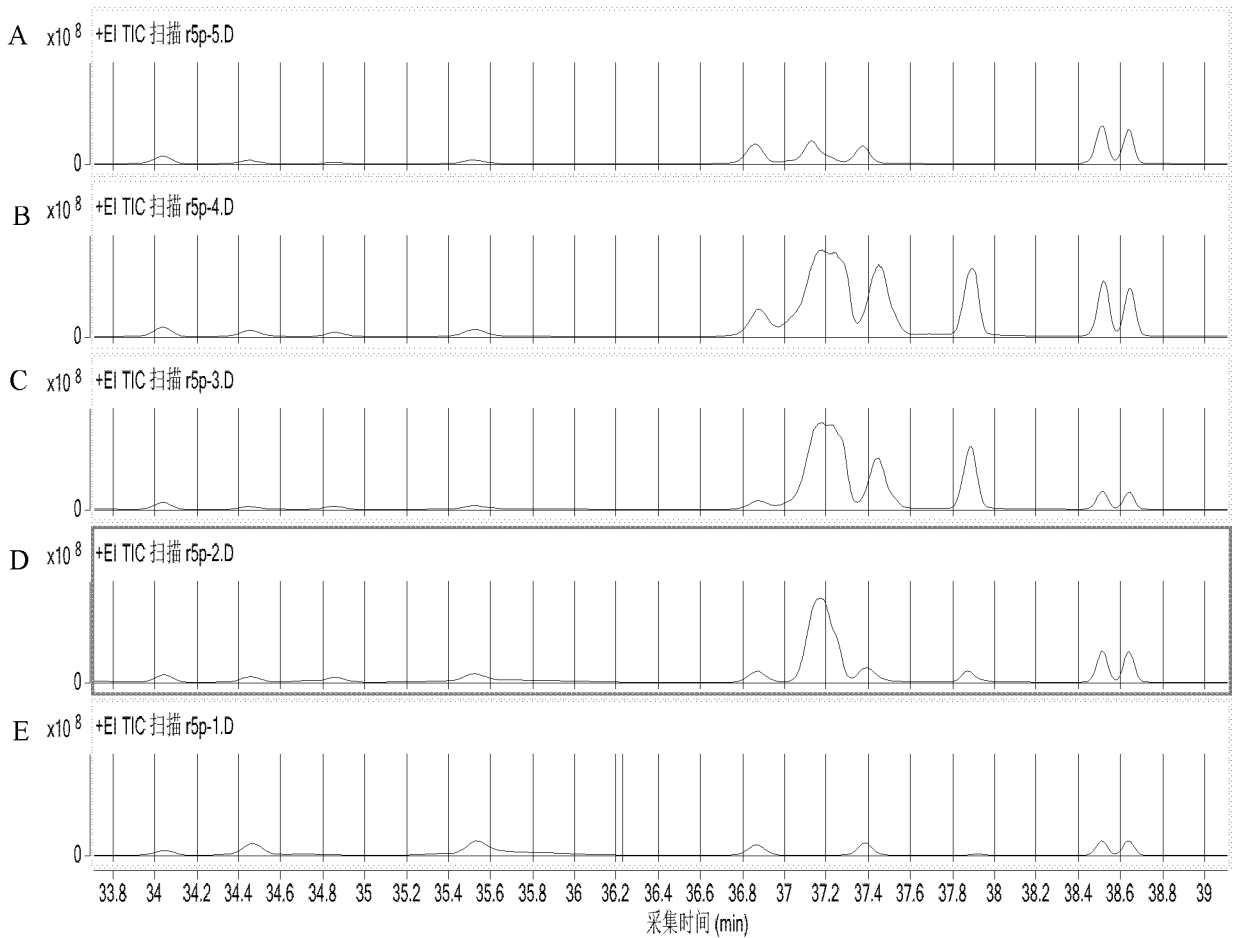


图 2

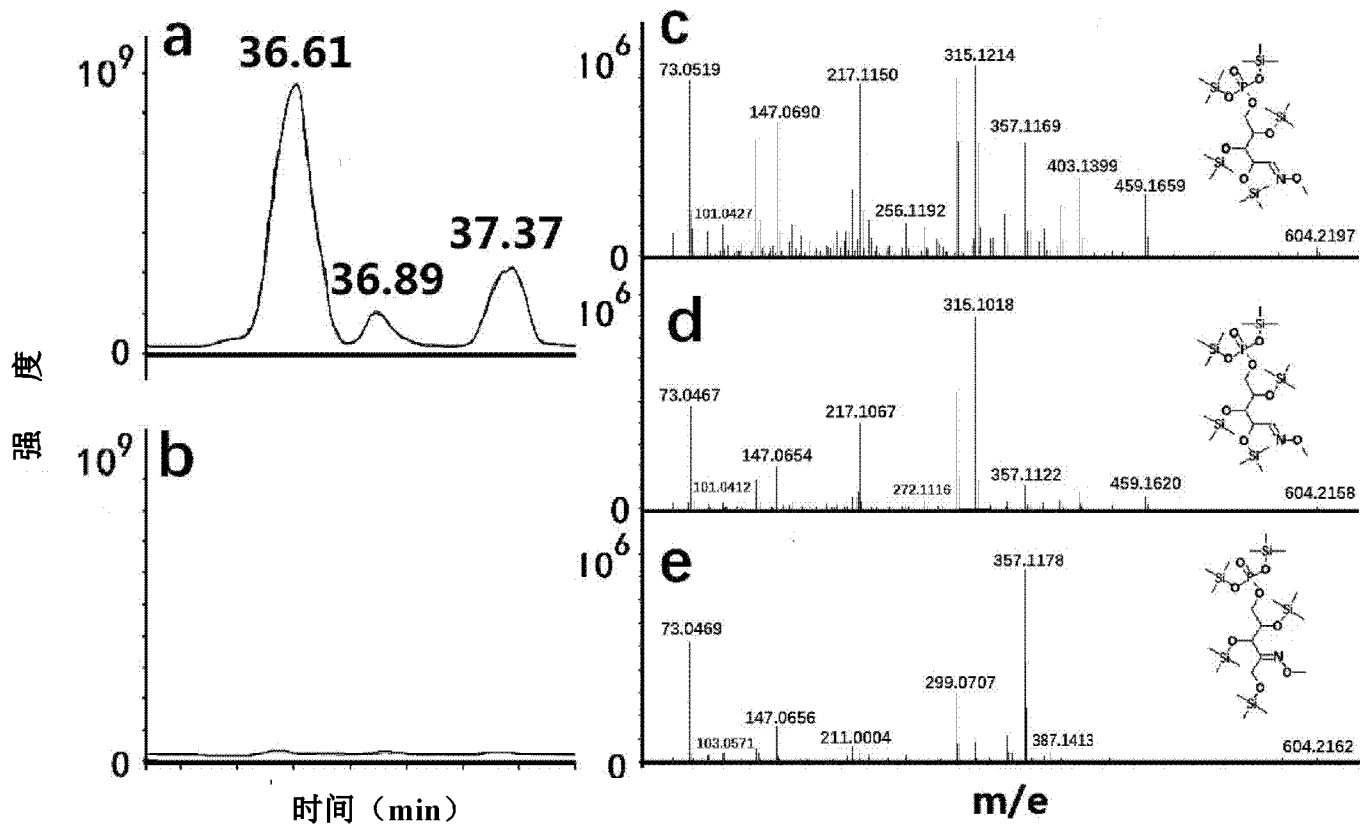


图 3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/105664

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 19/02 (2006.01) i; C12P 9/00 (2006.01) i; C12P 19/32 (2006.01) i; C12P 7/04 (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

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)

DWPI, CNABS, CNTXT, CNKI, DUXIU 甲醛, 乙醇醛, 甘油醛, 酶, 催化, 阿拉伯糖, 乙酰磷酸, 醛缩酶, 同工酶, 突变酶, 乙酰辅酶, A 5-phosphate arabinose, glycolaldehyde, enzyme, catalysis, 3-phosphate glyceraldehyde, transaldolase, aldolase, microorganisms, GA, G3P, Ara5P, AcCoA, AcP, FsA, TalB

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106755172 A (TIANJIN INSTITUTE OF INDUSTRIAL BIOTECHNOLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 31 May 2017 (31.05.2017), claims 1-16	1-16
X	WO 2015181074 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA et al.), 03 December 2015 (03.12.2015), claim 5	16
Y	WO 2015181074 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA et al.), 03 December 2015 (03.12.2015), claims 1-15	2, 5, 10-12
Y	WO 2015144447 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA et al.), 01 October 2015 (01.10.2015), claims 1-11	2, 5, 10-12
X	WO 2015144447 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA et al.), 01 October 2015 (01.10.2015), claims 1-11	1, 3-4, 6-9, 13-15

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search
19 December 2017

Date of mailing of the international search report
23 January 2018

Name and mailing address of the ISA
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, Jianbin
Telephone No. (86-10) 62411184

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/105664

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	殷馨等, “乙酰磷酸二锂盐的制备及含量测定”, 中国生化药物杂志, 30 September 2003 (30.09.2003), 24(9), pages 198-199, (YIN, Xin et al., Preparation of Acetylphosphate Dilithium and its Assay, Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics)	1-16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/105664

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 106755172 A	31 May 2017	None	
WO 2015181074 A1	03 December 2015	JP 2017516475 A	22 June 2017
		US 2017191095 A1	06 July 2017
		CN 106536742 A	22 March 2017
		EP 3149180 A1	05 April 2017
WO 2015144447 A1	01 October 2015	CN 106255759 A	21 December 2016
		US 2017107546 A1	20 April 2017
		JP 2017508473 A1	30 March 2017
		EP 3122886 A1	01 February 2017

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12P 19/02(2006.01)i; C12P 9/00(2006.01)i; C12P 19/32(2006.01)i; C12P 7/04(2006.01)i</p> <p>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</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>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))</p> <p>DWPI, CNABS, CNTXT, CNKI, 读秀 甲醛, 乙醇醛, 甘油醛, 酶, 催化, 阿拉伯糖, 乙酰磷酸, 醛缩酶, 同工酶, 突变酶, 乙酰辅酶A 5-phosphate arabinose, glycolaldehyde, enzyme, catalysis, 3-phosphate glyceraldehyde, transaldolase, aldolase, microorganisms, GA, G3P, Ara5P, AcCoA, AcP, FsA, TalB</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <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>PX</td> <td>CN 106755172 A (中国科学院天津工业生物技术研究所) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 权利要求1-16</td> <td>1-16</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2015181074 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA ET, AL) 2015年 12月 3日 (2015 - 12 - 03) 权利要求5</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2015181074 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA ET, AL) 2015年 12月 3日 (2015 - 12 - 03) 权利要求1-15</td> <td>2、5、10-12</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2015144447 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA ET, AL) 2015年 10月 1日 (2015 - 10 - 01) 权利要求1-11</td> <td>2、5、10-12</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2015144447 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA ET, AL) 2015年 10月 1日 (2015 - 10 - 01) 权利要求1-11</td> <td>1、3-4、6-9、13-15</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	PX	CN 106755172 A (中国科学院天津工业生物技术研究所) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 权利要求1-16	1-16	X	WO 2015181074 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA ET, AL) 2015年 12月 3日 (2015 - 12 - 03) 权利要求5	16	Y	WO 2015181074 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA ET, AL) 2015年 12月 3日 (2015 - 12 - 03) 权利要求1-15	2、5、10-12	Y	WO 2015144447 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA ET, AL) 2015年 10月 1日 (2015 - 10 - 01) 权利要求1-11	2、5、10-12	X	WO 2015144447 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA ET, AL) 2015年 10月 1日 (2015 - 10 - 01) 权利要求1-11	1、3-4、6-9、13-15
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
PX	CN 106755172 A (中国科学院天津工业生物技术研究所) 2017年 5月 31日 (2017 - 05 - 31) 权利要求1-16	1-16																		
X	WO 2015181074 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA ET, AL) 2015年 12月 3日 (2015 - 12 - 03) 权利要求5	16																		
Y	WO 2015181074 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA ET, AL) 2015年 12月 3日 (2015 - 12 - 03) 权利要求1-15	2、5、10-12																		
Y	WO 2015144447 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA ET, AL) 2015年 10月 1日 (2015 - 10 - 01) 权利要求1-11	2、5、10-12																		
X	WO 2015144447 A1 (SCIENTIST OF FORTUNE SA ET, AL) 2015年 10月 1日 (2015 - 10 - 01) 权利要求1-11	1、3-4、6-9、13-15																		
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																				
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																				
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2017年 12月 19日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2018年 1月 23日</p>																		
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>汪建斌</p> <p>电话号码 (86-10)62411184</p>																		

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	殷馨 等. “乙酰磷酸二锂盐的制备及含量测定” 中国生化药物杂志, 第24卷卷, 第9期, 2003年 9月 30日 (2003 - 09 - 30), 第198-199页	1-16

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/105664

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	106755172	A	2017年 5月 31日	无			
WO	2015181074	A1	2015年 12月 3日	JP	2017516475	A	2017年 6月 22日
				US	2017191095	A1	2017年 7月 6日
				CN	106536742	A	2017年 3月 22日
				EP	3149180	A1	2017年 4月 5日
WO	2015144447	A1	2015年 10月 1日	CN	106255759	A	2016年 12月 21日
				US	2017107546	A1	2017年 4月 20日
				JP	2017508473	A1	2017年 3月 30日
				EP	3122886	A1	2017年 2月 1日