



(10) 授权公告号 CN 115838705 B

(45) 授权公告日 2024.11.12

(21) 申请号 202210958005.X

C12R 1/885 (2006.01)

(22) 申请日 2022.08.11

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 102978182 A, 2013.03.20

申请公布号 CN 115838705 A

CN 103773746 A, 2014.05.07

(43) 申请公布日 2023.03.24

审查员 李紫嘉

(73) 专利权人 中国海洋大学

地址 266101 山东省青岛市崂山区松岭路
238号

专利权人 青岛蔚蓝生物集团有限公司

(72) 发明人 刘士成 张玉忠 陈刚

(51) Int. Cl.

C12N 9/20 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 15/80 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

一种脂肪酶突变体

(57) 摘要

本发明涉及基因工程和蛋白质工程技术领域,具体涉及一种新型脂肪酶突变体及其应用。所述突变体的氨基酸序列为SEQ ID NO:4,包含T63A、N103R、A176S三个突变位点。与野生型脂肪酶相比,所述突变体在里氏木霉中的表达酶活提高了40%,摇瓶发酵酶活为683 U/ml,取得了意料不到的技术效果,有利于降低该酶的生产成本,促进其在食品、饲料、医药等工业领域中的广泛应用。

1. 一种脂肪酶突变体,其特征在于,所述突变体是氨基酸序列为SEQ ID NO:1的脂肪酶的第63位氨基酸由Thr变为Ala,第103位氨基酸由Asn变为Arg,第176位氨基酸由Ala变为Ser。

2. 编码权利要求1所述脂肪酶突变体的基因。

3. 如权利要求2所述的基因,其特征在于,所述基因的核苷酸序列为SEQ ID NO:3。

4. 一种重组质粒,其特征在于,所述重组质粒携带有权利要求3所述的脂肪酶突变体基因。

5. 一种宿主细胞,其特征在于,所述宿主细胞携带有权利要求4所述的重组质粒,所述的宿主细胞为里氏木霉(*Trichoderma reesei*)。

一种脂肪酶突变体

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程和蛋白质工程技术领域,具体涉及一种脂肪酶突变体及其应用。

背景技术

[0002] 脂肪酶(Lipase, EC 3.1.1.3)是一种常见的生物大分子物质,广泛存在于动植物界,以及在真菌和细菌中,脂肪酶的作用是水解甘油三酯生成游离脂肪酸、二酸甘油酯、单甘酯以及甘油,是一种具有高催化活性并且在生物技术领域用途十分广泛的生物催化剂。脂肪酶是一种天然的水溶性生物大分子,但其催化底物是难溶于水的化合物,据报道,脂肪酶在油-水界面上会被激活,从而水解水不溶性甘油酯的酯键,这种现象可以归因于这类酶独特的结构特征。

[0003] 脂肪酶因其在酯水解、酯交换、醇解、酯化和氨解等方面的诸多应用而成为最重要的工业酶制剂之一,由于其具备的多种特性通常用于不同的方面,如洗涤剂、食品、生物能源、香料、药品以及精细化学品和农用化学品等多个领域。脂肪酶虽然不如淀粉酶和蛋白酶的应用广泛,但却具有不可估量的开发潜力,从现在各行业对各种酶的需求程度上不难看出,脂肪酶已经成为现代工业生产中不可缺少的一部分。脂肪酶因具有较好的位置专一性、立体选择性而广泛应用于选择性生物催化。

[0004] 脂肪酶广泛存在于动、植物界,以及真菌和细菌中,具有较广的生物来源。通过查阅文献可知,到目前为止已被发现的动物脂肪酶主要产生于动物的胰脏组织中,胰脂肪酶和胃脂肪酶的活性分别于1834年和1854年相继被发现并报道。经过研究人员十几年的摸索研究,1871年又有研究者发现并报道了植物种子中的脂肪酶活性,油料作物的种子是植物中脂肪酶的主要聚集场所,相比其他器官和组织其脂肪酶含量具有明显优势,如油菜籽。相比于动植物脂肪酶的研究,微生物脂肪酶活性被发现的时间相对较晚,1967年,中国科学院微生物研究所的研究人员经过大量的筛选工作筛选到一株脂肪酶产量较高的解脂假丝酵母菌株,又经过两年的研究工作后将其所产脂肪酶制成商品化酶制剂投放于市场中,经过多年的研究与发展,脂肪酶的用途也越来越广泛。

[0005] 脂肪酶被称为是天然的生物催化剂,具有高效的催化作用,现在已经工业化使用的大多数脂肪酶是由微生物发酵生产得来的。文献报道,自然界中约有2%(65个属)的微生物可以产生脂肪酶,主要为细菌、真菌以及放线菌,其中真菌最多(33个属),细菌次之(28个属),放线菌最少(4个属)。众多研究人员从不同来源的脂肪酶生产及其应用方面做了大量的研究工作,在物理化学性质和催化性能等方面也进行了多方面的研究。

[0006] 微生物发酵生产脂肪酶是目前获取脂肪酶的主要途径,因其具备来源丰富,酶活收率高,催化反应种类多,操作简便、生产周期短等特点而比产生于植物和动物的脂肪酶用途更广泛。此外,微生物脂肪酶的生产不受季节波动的限制,可在廉价的培养基上有规律的生长,因此与动植物脂肪酶相比其生产过程更稳定,生产成本也更低。但由于天然产生的脂肪酶表达量低,不利于现代的工业化生产,而通过生物技术手段可以有效地提高脂肪酶的

产量和改善酶学性质,是本领域的研究重点。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种新型脂肪酶突变体。与野生型相比,所述突变体的酶活水平得到显著提高,有利于降低脂肪酶的生产成本。

[0008] 本发明一方面涉及一种脂肪酶,其氨基酸序列为SEQ ID NO:1。

[0009] 本发明一方面涉及一种脂肪酶突变体,是氨基酸序列为SEQ ID NO:1的脂肪酶的第63位氨基酸由Thr变为Ala,第103位氨基酸由Asn变为Arg,第176位氨基酸由Ala变为Ser。

[0010] 上述脂肪酶突变体的氨基酸序列为SEQ ID NO:4。

[0011] 本发明还涉及编码上述脂肪酶突变体的基因。

[0012] 所述基因的核苷酸序列为SEQ ID NO:3。

[0013] 本发明还涉及携带有上述脂肪酶突变体编码基因的重组质粒。

[0014] 本发明还涉及携带有上述重组质粒的宿主细胞。

[0015] 所述宿主细胞为里氏木霉(*Trichoderma reesei*)。

[0016] 本发明提供的脂肪酶突变体包含T63A、N103R、A176S三个突变位点,其在里氏木霉中的表达酶活得到显著提高。本发明构建的重组表达所述脂肪酶突变体的里氏木霉工程菌,其摇瓶发酵酶活达到683 U/ml,比重组表达野生型脂肪酶的工程菌提高了40%,取得了意料不到的技术效果,从而有利于降低该酶的生产成本,促进其在食品、饲料、医药等工业领域中的广泛应用。

具体实施方式

[0017] 本发明用到了遗传工程和分子生物学领域使用的常规技术和方法,例如MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3rd Ed. (Sambrook, 2001)和CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel, 2003)中所记载的方法。这些一般性参考文献提供了本领域技术人员已知的定义和方法。但是,本领域的技术人员可以在本发明所记载的技术方案的基础上,采用本领域其它常规的方法、实验方案和试剂,而限于本发明具体实施例的限定。

[0018] 酶与试剂盒:DNA聚合酶购买自NEB公司,T4连接酶、限制性内切酶购自Fermentas公司,质粒提取试剂盒及胶纯化回收试剂盒购自Omega公司,GeneMorph II随机诱变试剂盒购自北京博迈斯生物科技有限公司。

[0019] 本发明实施例中所述脂肪酶酶活的检测方法如下:

[0020] 1、酶活定义

[0021] 在pH为 7.5,40°C条件下,每分钟产生1 μmol 可滴定脂肪酸所需的酶量为 1个酶活力单位(IU)。

[0022] 该法主要以橄榄油乳化液作为底物溶液,聚乙烯醇作为乳化剂,其测定原理为脂肪酶催化橄榄油产生脂肪酸,利用氢氧化钠滴定使酚酞变红,根据氢氧化钠的消耗量反应脂肪酸含量。

[0023] 2、底物配置:

[0024] (1)称取聚乙烯醇(PVA)40g(精确至0.1g),加水800ml,在沸水浴中加热,搅拌,直

至全部溶解,冷却后定容至1000ml,用干净的双层纱布过滤,取滤液备用。

[0025] (2)量取上述滤液150ml,加橄榄油50ml,用高速匀浆机处理6min(分两次处理,间隔5min,每次处理3min)即得乳白色PVA乳化液,该溶液现用现配。

[0026] 3、具体测定方法为:

[0027] 取2个100 mL锥形瓶,分别为空白对照(A)和待测样品(B),两瓶分别加入4 mL底物溶液和5 mL NaHPO₄-KH₂P0₄ 缓冲液(pH=7.5),再向对照瓶中加入少量高体积分数乙醇,在40°C水浴条件下预热5 min后将1 mL待测酶液加至两锥形瓶中,立即混匀计时,反应15 min后向样品瓶中立刻补加等量乙醇终止反应,摇匀后取出。分别向2个锥形瓶中滴入少量酚酞溶液,用0.05 mol/L NaOH标准溶液滴定,将出现微红色并保持30 s不褪色作为滴定终点,记录消耗 NaOH标准溶液的体积。

[0028] $X = [(V1 - V2) \times c \times 50 \times n] / (0.05 \times 15)$ 。

[0029] X --为样品酶活力,IU;

[0030] V1--为 NaOH 标准溶液滴定样品时消耗量,mL;

[0031] V2--为NaOH 标准溶液滴定空白时消耗量,mL;

[0032] c --为NaOH 标准溶液浓度,mol/L;

[0033] 50--0.05mol/L的氢氧化钠溶液1ml相当于脂肪酸50 μ mol;

[0034] n--为样品的稀释倍数;

[0035] 0.05--氢氧化钠标准溶液换算系数;

[0036] 15为反应时间15 min,时间换算系数。

[0037] 下面结合具体实施方式,对本发明做进一步阐述。

[0038] 实施例1基因克隆

[0039] 申请人将来源于皱褶莫氏黑粉菌(*Moesziomyces rugulosus*)的野生型脂肪酶基因命名ZFCB,其氨基酸序列为SEQ ID NO:1。根据里氏木霉的密码子偏好性,对其进行密码子优化,送华大基因进行基因合成。所述野生型脂肪酶ZFCB基因的核苷酸序列为SEQ ID NO:2。

[0040] 设计上下游引物和反应条件,运用PCR技术克隆脂肪酶ZFCB基因片段。引物序列和反应条件具体如下:

[0041] 上游引物1(F):GTACGGTACCACGCCCTCGTCAAGCGCCTGCC(下划线为KpnI酶切位点);

[0042] 下游引物1(R):CTGATCTAGATTAGGGCGTGACGATGCCGCTGCACG(下划线为XbaI酶切位点)。

[0043] PCR条件为:98°C变性1min;98°C 变性10s,56°C 复性15s,72°C 延伸1min,30个循环,72°C保温5min。野生型脂肪酶ZFCB基因全长972bp。

[0044] 实施例2 脂肪酶突变体的筛选与里氏木霉工程菌的构建

[0045] 申请人为了进一步提高野生型脂肪酶ZFCB的表达酶活,通过定向进化技术对该酶的基因进行了大量突变的筛选。

[0046] 以优化后的脂肪酶基因为模板,利用引物上游引物1(F)和下游引物1(R),用GeneMorph II随机突变PCR试剂盒(Stratagene)进行PCR扩增;胶回收PCR产物。所述PCR产物即为随机突变得到的脂肪酶突变体基因片段。

[0047] 2.1表达质粒的构建

[0048] 将野生型脂肪酶ZFCB基因片段和上述获得的PCR产物用限制性内切酶Kpn I和Xba I进行双酶切,同样对木霉表达载体pKL用限制性内切酶Kpn I和Xba I进行双酶切。然后用T4连接酶把双酶切产物即克隆基因和表达载体22°C连接过夜。最后,把连接产物导入大肠杆菌DH5a,涂布于LB+Amp平板,37°C倒置培养。待转化子出现后,用牙签逐个挑至多个96孔板,然后提取质粒用于里氏木霉转化。

[0049] 2.2里氏木霉原生质体制备

[0050] 接种里氏木霉菌丝于PDA平板上生长7天;切取直径约3cm的菌落置于约60ml YEG (0.5%酵母粉、1%葡萄糖)的液体培养基中,30°C,200 rpm振荡培养过夜;多层纱布过滤收集菌丝;将菌丝置于盛有20 ml裂解酶液(0.2g/10ml,0.7 M NaCl溶解,Sigma L1412)酶解2h;取出酶解液,轻轻摇晃,倒于三层灭菌擦镜纸过滤,收集滤液,3000 rpm,离心10 min;弃上清,加5 ml 溶液2悬浮,然后3000 rpm,离心10 min;加适量溶液2悬浮分装(200 μ l/管, 10^8 个/ml)。

[0051] 2.3转化

[0052] 每个质粒 DNA取10 μ l 加入到200 μ l原生质体中,接着加入50 μ l 25%PEG溶液轻轻混匀,冰浴20min;然后加入2 ml 25%PEG,轻轻混匀,室温静置5min,把原生质体加到50 ml左右融化后冷却至45-55°C的上层半固体培养基(0.1%MgSO₄,1%KH₂PO₄,0.6%(NH₄)₂SO₄,1%葡萄糖,18.3%山梨醇,0.35%琼脂糖),轻轻混匀后倒入含100 μ g/ml潮霉素下层基础培养基平板(2%葡萄糖,0.5%(NH₄)₂SO₄,1.5%KH₂PO₄,0.06%MgSO₄,0.06%CaCl₂,1.5%琼脂),30°C黑暗培养数天至转化子长出。

[0053] 上述获得的阳性转化子即为重组表达野生型脂肪酶ZFCB及其突变体的里氏木霉工程菌株。

[0054] 2.4摇瓶发酵验证

[0055] 将上述构建得到的阳性转化子分别接种于MM发酵培养基(1.5%葡萄糖,1.7%乳糖,2.5%玉米浆,0.44%(NH₄)₂SO₄,0.09%MgSO₄,2%KH₂PO₄,0.04%CaCl₂,0.018%吐温-80,0.018%微量元素,0.018%聚丙二醇-2000),30°C培养48h,然后25°C乳糖诱导培养72h。离心取发酵上清液,进行脂肪酶酶活测定分析。

[0056] 结果显示,与重组表达野生型脂肪酶ZFCB的工程菌相比,本发明构建的重组表达脂肪酶突变体的工程菌中,绝大多数菌株的发酵酶活没有明显变化,有8株菌的发酵酶活显著下降,仅有2株菌的酶活明显提高。申请人将酶活最高的工程菌命名为里氏木霉ZFCB-768 (*Trichoderma reesei* ZFCB-768)。该菌株摇瓶发酵上清液中脂肪酶酶活高达683 U/ml,与重组表达野生型脂肪酶ZFCB的工程菌提高40%,取得了意料不到的技术效果。

[0057] 实施例4 脂肪酶突变体序列的确定

[0058] 4.1 总DNA的提取

[0059] 将上述构建得到的酶活水平最高的里氏木霉ZFCB-768过夜培养,取适量菌体置于离心管中,13000 rpm离心5 min,弃上清;加入400 μ l抽提缓冲液(100 mM Tris-HCl,100 mM EDTA,250 mM NaCl,1%SDS);然后加100mg石英砂或玻璃珠,在珠打仪剧烈振荡2min左右;65°C水浴20min后,加入200 μ l 10M NH₄AC,冰浴10min;13000rpm离心10min,取上清;加入2倍体积的无水乙醇,-20°C放置30min;13000 rpm离心10min,弃上清;用70%乙醇洗涤2次;晾干,加入水溶解,于-20°C保存。

[0060] 4.2 测序分析

[0061] 利用实施例1中所述上下游引物进行PCR,扩增目的基因。PCR扩增条件为:94°C 3min;94°C 30S;56°C 30S,72°C 60S 30个循环;72°C 5min。利用凝胶回收试剂盒回收PCR扩增产物。PCR回收产物做TA克隆,挑取阳性转化子送上海生工生物工程有限公司测序分析。

[0062] 测序结果显示,从里氏木霉ZFCB-768中扩增得到的脂肪酶突变体基因的核苷酸序列为SEQ ID NO:3,其编码的氨基酸序列为SEQ ID NO:4。

[0063] 将野生型脂肪酶ZFCB与上述脂肪酶突变体的氨基酸序列进行比对发现,所述脂肪酶突变体中包含四个突变位点,分别为T63A、N103R、A176S。

[0064] 本发明提供的脂肪酶突变体能显著提高其在里氏木霉中的表达量,有利于降低该酶的生产成本,促进其在食品、饲料、医药等工业领域的广泛应用。