

一种 GDSL 脂肪酶、基因工程菌及其应用

技术领域

本发明涉及基因工程及蛋白质工程领域,涉及到一种新型 GDSL 脂肪酶的基因克隆及表达的方法以及酶法生产维生素 A 棕榈酸酯的应用,属于工业微生物领域技术。

背景技术

脂肪酶, 又称酰基甘油水解酶, 是一类能将天然油脂降解为甘油和游离脂肪酸的酶, 其广泛存在于动植物及微生物中。微生物是脂肪酶的重要来源, 主要包括根霉、曲霉及假丝酵母等等。根据对不同脂肪酶的氨基酸序列及其基本生物学性质分析, 可将脂肪酶分为 8 个家族, 其中第 2 家族, 又称 GDSL 家族。GDSL 型脂肪酶 (lipase, EC 3.1.1.3) 是一类水解酶, 能水解硫酯、芳基酯、磷脂和氨基酸等多种底物。由于 GDSL 脂肪酶是一种新型脂肪酶, 目前人们对其表达及功能都研究较少。由于 GDSL 脂肪酶具有酯类水解活性, 人们对其研究越来越深入。

维生素 A 棕榈酸酯能帮助维持正常视觉功能并参与各种代谢活动维持生物机体健康, 是目前最常用的维生素 A 衍生物, 广泛应用于食品、化妆品、医药等行业。目前合成维生素 A 棕榈酸酯主要有化学法和酶法。化学方法合成维生素 A 棕榈酸酯存在环境污染、成本等问题, 而酶法则污染少, 时空产率高, 成本低。而生产维生素 A 棕榈酸酯的酶就是具有酯类水解活性的脂肪酶。

发明内容

本发明的目的在于提供一种 GDSL 脂肪酶、工程菌及其应用, 该脂肪酶活性高, 可应用于维生素 A 棕榈酸酯的生产。

为实现上述技术目的, 本发明采用如下技术方案:

一种 GDSL 脂肪酶, 其氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

本发明还提供了编码上述 GDSL 脂肪酶的基因。

具体地, 所述的编码 GDSL 脂肪酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

上述 GDSL 脂肪酶来源于淀粉酶链霉菌(*Streptomyces diastaticus*) CS1801, 该菌株已在申请人的在先申请 CN109337843A 中公开。

本发明还提供了一种重组载体, 其包含编码 GDSL 脂肪酶的基因和表达载体, 所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。所述表达载体为 pET-32a (+)。上述基因在表达载体 pET-32a (+) 的多克隆位点间插入。

本发明还提供了一种包含上述的重组载体的基因工程菌

进一步地，所述工程菌的宿主细胞为 E.coli BL21(DE3)。

本发明还提供了上述的工程菌在酶法生产维生素 A 棕榈酸酯中的应用，包括：

- (1) 将工程菌接入 LB 培养基中进行种子培养；
- (2) 种子液转入发酵培养基中进行发酵培养，之后加入诱导剂诱导酶类的表达；
- (3) 对发酵液进行离心，获取上清液，通过硫酸铵沉淀、冷冻干燥获得酶粉；
- (4) 将酶粉添加至含有维生素 A 和棕榈酸的有机相体系，生产维生素 A 棕榈酸酯。

具体地，所述方法包括：将在 37℃，200r 条件下于 LB 培养基中培养 8~12h 的工程菌以 5%的接种量接入发酵培养基。发酵 8~12h 后添加 IPTG 至终浓度 0.4~1mmol/L，在 37℃、200r 条件下发酵培养 18~24h。4000r，10min，离心取发酵液的上清液。用 50%的硫酸铵溶液沉淀酶蛋白，冷冻干燥 48h 后获得酶粉。将酶粉按 5%加入有机相体系（维生素 A：棕榈酸=10g：10g 溶于 1L 正己烷）转化一定时间后测定维生素 A 棕榈酸酯的含量，并计算转化率。

进一步的，所述的发酵培养基成分为：

胰蛋白胨 10g/L，酵母粉 5g/L，NaCl 10g/L，MgSO₄·7H₂O 1g/L，KH₂PO₄ 0.5g/L，K₂HPO₄ 0.5g/L，橄榄油乳化液 12mL/L。

进一步的，橄榄油乳化剂配置方法为：橄榄油乳化剂 PVA 与橄榄油以体积比 3：1 混合，利用超声波乳化。

利用本发明的酶构建的基因工程菌进行酶法生产维生素 A 棕榈酸酯，转化所得维生素 A 棕榈酸酯含量最高为 16.35mg/L。转化效率最高为 81.75%。该脂肪酶为酶法合成维生素 A 棕榈酸酯提供新途径，具有重要应用前景。

附图说明

图 1 为 GDSL 脂肪酶 PCR 扩增的目的条带；

图 2 为大肠杆菌 SDS-PAGE 电泳图；

图 3 为 GDSL 脂肪酶生产维生素 A 棕榈酸酯的转化时间。

具体实施方式

实施例 1

本实施例说明淀粉酶链霉菌来源的 GDSL 脂肪酶基因的 PCR 扩增方法。

取试管斜面保存的淀粉酶链霉菌 CS1801 进行平板活化，将单菌落接种到 LB 液体培养基中，30℃，培养 2~3 天。取培养液，于 8000r 离心 2min，收集菌体，用细菌基因组提取试剂盒进行总的基因组提取，提取步骤参照上海生工的细菌基因组提取试剂盒的说明书。

GDSL 脂肪酶基因扩增引物设计为:

GDSL2-上: 5' -GTGGCCGGGCTCACGTCCTC-3'

GDSL2-下: 5' -TCATTCCGGCAGGCTCCG-3'

以提取的淀粉酶链霉菌基因组为模板, 采用上述引物及上海生工的高 GC 含量 PCR 扩增试剂盒进行扩增, 但不加 Taq 酶。

具体的扩增程序如下, 预变性 95℃10min, 加 Taq 酶。95℃变性 1min, 退火温度 55℃, 退火时间为 30s, 延伸温度为 72℃, 延伸时间为 1min, 此过程进行 29 个循环, 最后 72℃延伸 30min。取产物进行琼脂糖凝胶电泳, 将目的条带切胶回收后保存。凝胶回收试剂盒购自生工。

实施例 2

本实施例说明带有酶切位点的 GDSL 脂肪酶基因的 PCR 扩增方法。

带有酶切位点的 GDSL 脂肪酶基因扩增引物设计为:

GDSL2-上: 5' -CCGGAATTCGTGGCCGGGCTCACGTCCTC-3'

GDSL2-下: 5' -CCGCTCGAGTCATTCCGGCAGGCTCCG-3'

以实施例 1 中的胶回收产物为模板, 采用上述引物及上海生工的高 GC 含量 PCR 扩增试剂盒进行扩增。

具体的扩增程序如下, 预变性 95℃2 min。95℃变性 1min, 退火温度 55℃, 退火时间为 30s, 延伸温度为 72℃, 延伸时间为 1min, 此过程进行 29 个循环, 最后 72℃延伸 30min。取产物进行琼脂糖凝胶电泳, 目的条带如图 1, 将目的条带切胶回收后送生工测序得到序列 SEQ ID NO.1。

实施例 3

本实施例说明 GDSL 脂肪酶的重组克隆载体的构建方法。

将实施例 2 中的胶回收产物与 T 载体连接, 转化至 DH-5 α 后, 挑阳性克隆子验证, 提取质粒后测序验证。

实施例 4

本实施例说明 GDSL 脂肪酶的重组表达载体的构建方法。

将实施例 3 中的质粒用 XhoI 和 EcoRI 进行双酶切并回收目的条带, 同时用 XhoI 和 EcoRI 对 pET32a(+)载体双酶切, 回收载体中较大的片段, 将回收的目的基因片段与载体片段进行连接, 导入宿主细胞大肠杆菌 DH5 α , 抗性筛选后, 挑取阳性克隆子测序验证。

实施例 5

本实施例说明 GDSL 脂肪酶基因工程菌的构建方法。

提取实施例 4 中的测序正确的阳性克隆子的质粒，直接转化导入宿主细胞大肠杆菌 BL21 (DE3) 中，GDSL 脂肪酶基因工程菌构建成功，在其发酵过程需加入 IPTG 等诱导剂诱导其高效表达 GDSL 脂肪酶蛋白。通过 SDS-PAGE 验证融合蛋白表达成功。SDS-PAGE 电泳图如图 2 所示，泳道 1 为未经诱导的 *E. coli* pET32a-GDSL，泳道 2、3、4 为经过 IPTG 分别诱导 4、8、16h 的重组大肠杆菌 *E. coli* pET32a-GDSL，与其它泳道相比，在分子量为 44k Da 处有明显条带，除去质粒上融合表达的蛋白，与预测目标蛋白大小相一致，表明 GDSL 脂肪酶在重组菌中成功表达。

实施例 6

本实施例说明 GDSL 脂肪酶基因工程菌在维生素 A 棕榈酸酯生产中的应用。

(1) 将 37℃，200r，LB 培养基中培养 8~12h 的基因工程菌以 5% 的接种量接入发酵培养基。

(2) 发酵 8~12h 后添加 IPTG 至终浓度 0.4~1mmol/L，在 37℃、200r 条件下发酵培养 18~24h。

(3) 4000r，10min，离心取发酵液的上清液。用 50% 的硫酸铵溶液沉淀酶蛋白，冷冻干燥 48h 后获得酶粉，按照国标 GB/T23535-2009 测定 GDSL 脂肪酶酶活为 1.53U/mg。

(4) 将酶粉按 5% 的添加量 (w/v) 加入有机相体系 (维生素 A: 棕榈酸=10g: 10g 溶于 1L 正己烷) 转化 2、4、6、8、10 h 后测定维生素 A 棕榈酸酯的含量，并计算转化率。如图 3 所示，转化 8h 后，维生素 A 棕榈酸酯含量最高为 16.35mg/L，转化率为 81.75%。

所述的发酵培养基成分为：

胰蛋白胨 10g/L，酵母粉 5g/L，NaCl 10g/L，MgSO₄·7H₂O 1g/L，KH₂PO₄ 0.5g/L，K₂HPO₄ 0.5g/L，橄榄油乳化液 12mL/L，蒸馏水定容至 1L。

橄榄油乳化液配制方法为：将橄榄油乳化剂 PVA 与橄榄油以体积比 3: 1 混合，利用超声波乳化。

所述的维生素 A 棕榈酸酯测定方法为：高效液相法，采用外标法定量。色谱条件为：色谱柱：Alltech C18 (250x4.6mm, 4.5μm)；流动相：100%甲醇；检测器：岛津 10A 紫外检测器；检测波长：327nm；流速：1mL/min。

转化率计算公式为：

$$\text{转化率} = \frac{\text{维生素A棕榈酸酯 (g/L)}}{(\text{维生素A (g)} + \text{棕榈酸 (g)}) / \text{正己烷 (L)}} \times 100\%$$

权 利 要 求

1. 一种 GDSL 脂肪酶，其特征在于，氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。
2. 编码权利要求 1 所述 GDSL 脂肪酶的基因。
3. 根据权利要求 2 所述的基因，其特征在于，核苷酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。
4. 一种包含权利要求 3 所述基因的重组载体。
5. 根据权利要求 4 所述的重组载体，其特征在于，表达载体为 pET 32a(+).
6. 一种包含权利要求 5 所述的重组载体的工程菌。
7. 根据权利要求 6 所述的工程菌，其特征在于，宿主细胞为大肠杆菌 *E.coli* BL21(DE3)。
8. 权利要求 6 或 7 任一项所述的工程菌在生产维生素 A 棕榈酸酯中的应用，包括：
 - (1) 将工程菌接入 LB 培养基中进行种子培养；
 - (2) 种子液转入发酵培养基中进行发酵培养，之后加入诱导剂诱导酶类的表达；
 - (3) 对发酵液进行离心，获取上清液，通过硫酸铵沉淀、冷冻干燥获得酶粉；
 - (4) 将酶粉添加至含有维生素 A 和棕榈酸的有机相体系，生产维生素 A 棕榈酸酯。
9. 根据权利要求 8 所述的应用，其特征在于，所述发酵培养基成分为：

胰蛋白胨 10g/L，酵母粉 5g/L，NaCl 10g/L，MgSO₄ · 7H₂O 1g/L，KH₂PO₄ 0.5g/L，K₂HPO₄ 0.5g/L，橄榄油乳化液 12mL/L，蒸馏水定容至 1L。
10. 根据权利要求 9 所述的应用，其特征在于，所述橄榄油乳化液配制方法为：将橄榄油乳化剂 PVA 与橄榄油以体积比 3: 1 混合，利用超声波乳化。