

突变的溶血磷脂酶

技术领域

本发明涉及突变的溶血磷脂酶。还涉及编码所述酶的基因，以及包含所述基因
5 的载体以及宿主细胞。此外，还涉及所述酶的用途。

背景技术

在黑曲霉中已报道了有两种脂肪酶，称为lipaseA和lipaseB，或者称为lipase1和
lipase2。其中lipaseB的性质比较特殊，Zhu Shu-sen从黑曲霉A733中克隆表达了lipaseB，
发现lipaseB的最适温度为15℃，最适pH在3.5-4.0，不能耐受超过40℃以上的温度。该
10 酶能够水解pNPC4-pNPC18链长的底物，其中pNPC12为最适底物。但lipB的比酶活极
低，经过纯化后的lipB比酶活仅为6.8U/mg。

Jiangke Yang等人从黑曲霉CICC 4009中克隆表达了lipas2，虽然这个lipase2和
Zhu Shu-sen克隆的lipaseB高度同源，仅有两个氨基酸的差别，但是性质有一定程度
的差异，最适底物为pNPC8和pNPC10，最适pH小于6.5，最适温度为50℃，不能耐受
15 超过40℃以上的温度。

综上所述，黑曲霉来源的liapse2或者lipaseB的实用性不强，首先比酶活极低，
温度耐受性不高，适用的最适底物短链脂肪酸的甘油三脂。该酶不如用途较为广泛的
脂肪酶TL和RML，其比酶活能够达到12000或8000U/mg。TL能够耐受60℃的温度保
持20小时不失活，RML能水解各种长链脂肪酸的甘油三脂。

20 在之前的专利申请CN202110707919.4中，发明人从黑曲霉GIM 3.24（AN02）中
利用CBS513.88的lipaseB的基因序列设计引物克隆了上述黑曲霉菌株的LPL（溶血磷
脂酶）基因AN02-LPL，并发现AN02-LPL具有非常高的磷脂酶A1活力和溶血磷脂酶
活力，可以用于油脂脱胶，在不添加碱的条件下，可以将毛油的含磷量降低至5ppm，
可以用于酶法脱胶，并且由于不需要加碱可以减少脱胶时皂的形成。另外由于AN02-
25 LPL具有极高的溶血磷脂酶活力，所以，可以与磷脂酶A2合用，利用大豆磷脂为原料
制备甘油磷脂酰胆碱（GPC），具有健脑防衰老的作用用于医药及保健品中。但是该
基因应用在预脱胶豆油和稻米中，脱胶效果不能达到要求。

本领域仍然期望得到比酶活和稳定性更高的溶血磷脂酶。

发明内容

30 本发明人基于前期工作，在发明CN202110707919.4中开发的突变溶血磷脂酶基
础上，开发了新的突变体。

具体地，发明人通过将将在定点突变野生型溶血磷脂酶的94位天冬氨酸的方法得

到了AN02-LPL的1个突变体D94N，其在4℃贮藏2周后的酶活损失相比于AN02-LPL减少了77%。

另外，发明人通过在将第84位和85位氨基酸分别突变为精氨酸和苏氨酸之后，提高了对磷脂酸的比酶活，在预脱胶豆油脱胶中的应用效果优于野生型基因AN02-LPL，能够将含磷量降至更低的水平，符合进行物理精炼的要求。

发明人还在AN02-LPL的基础上将第111位赖氨酸突变为组氨酸，第147位酪氨酸突变为亮氨酸，第84位丝氨酸突变为精氨酸，第85位天冬氨酸突变为苏氨酸后，新突变体HLRT针对磷脂酸的比酶活在pH4.3时由AN02-LPL的347U/mg提高至835U/mg；在pH4.8时由AN02-LPL的863U/mg提高至2903U/mg；在pH5.5时由AN02-LPL的0U/mg提高至2527U/mg。

发明人还在AN02-LPL的突变多肽M1(突变位点以成熟肽计为L86I，G187D，E209K，A254D)的基础上，将第84位丝氨酸突变为精氨酸，第85位天冬氨酸突变为苏氨酸后，新突变体M1RT针对磷脂酸的比酶活在pH4.3时由AN02-LPL的347U/mg提高至1252U/mg；在pH4.8时由AN02-LPL的863U/mg提高至2956U/mg；在pH5.5时由AN02-LPL的0U/mg提高至2972U/mg。

发明人还在AN02-LPL基因的基础上将第84位丝氨酸突变为精氨酸，第85位天冬氨酸突变为苏氨酸后，新突变体WTRT针对磷脂酸的比酶活在pH4.3时由AN02-LPL的347U/mg提高至984U/mg；在pH4.8时由AN02-LPL的863U/mg提高至2003U/mg；在pH5.5时由AN02-LPL的0U/mg提高至1342U/mg。

发明人在上述WTRT的基础上，再将第94位天冬氨酸突变为酪氨酸得到新突变体WTRT-Y。新突变体WTRT-Y仍然可以保持针对磷脂酸的高比酶活，在pH4.3时由AN02-LPL的347U/mg提高至961U/mg；在pH4.8时由AN02-LPL的863U/mg提高至1803U/mg；在pH5.5时由AN02-LPL的0U/mg提高至1212U/mg。与突变体WTRT的酶活相比基本持平(在pH4.3时984U/mg、在pH4.8时2003U/mg和在pH5.5时1342U/mg)。

突变体WTRT在4度贮藏2周后的酶活从29921U/ml下降至20076U/ml，而突变体WTRT-Y的蛋白稳定性得到了提高，其在4度贮藏2周后的酶活仅从28765U/ml下降至25984U/ml。损失相比于WTRT减少了68%。

突变体WTRT的表达菌株在传代2次后，酶活只有未传代菌株的37.5%，而突变体WTRT-Y的表达菌株传代2次后，酶活与未传代菌株酶活一致，无不稳定现象。

具体地，本发明涉及以下方面：

一方面，本发明涉及突变的溶血磷脂酶，其氨基酸序列相对于野生型溶血磷脂

酶具有一个或多个突变，并且具有增加的比活性或增加的稳定性。

本领域技术人员可以理解，作为本发明的突变的溶血磷脂酶的基础序列的野生型溶血磷脂酶不限于SEQ ID NO:1，还可以包括现有技术已知的其它溶血磷脂酶。具体地，本发明的溶血磷脂酶相对于现有技术已知的溶血磷脂酶，可以在与SEQ ID NO:1的第84和85位对应的氨基酸位置上具有突变。

例如，作为突变的基础序列的已知溶血磷脂酶（诺维信公司生产）的序列可以是：

MHRPLQLWALAALTSLVTAAPAPVLRRDVSSSVLSELDLFAQYSAAAYCSSN
IGSPGTKLTCSVGNCPRVEAADTETLIEFNESSEFGDVTGYIAVDRTNSLLVLAFRGS
10 STVSNWEADLDFPLTDASSLCSGCEIHSFGWAAWQTVQASITSTLESAIASYPGYTL
VFTGHSYGAALAAIAATTLRNAGYTIQLYDYGQPRLGNLALAQYITAQTQGANYR
VTHTDDIVPKLPPELFGYHHFSPEYWITSGDNVTVTTSQVQVVTGIDSTAGNDGTL
LDSTSAHDWYIVYIDGCD (SEQ ID NO:8)。

由于SEQ ID NO:8比SEQ ID NO:1在N末端多27个氨基酸，本领域技术人员可以理解，与SEQ ID NO:1的第84和85位对应的氨基酸位置是指该序列的第111和112位。因此，本发明也涉及在SEQ ID NO:8的第111和112位具有突变的溶血磷脂酶。

作为另一个实例，突变的基础序列的已知溶血磷脂酶是CN2019800303753中的SEQ ID NO:1。

一方面，本发明涉及溶血磷脂酶，其氨基酸序列在对应于SEQ ID NO:1的选自第84、85和94位的一个或多个位置具有突变。

在一个实施方案中，其氨基酸序列相对于SEQ ID NO:1在第94位具有突变。在一个实施方案中，所述突变是天冬氨酸突变为天冬酰胺。

一方面，本发明涉及溶血磷脂酶，其氨基酸序列相对于SEQ ID NO:1在第84和85位具有突变。在一个实施方案中，所述突变是第84位的丝氨酸突变为精氨酸和第85位的天冬氨酸突变为苏氨酸。在一个实施方案中，所述溶血磷脂酶还包含在选自第111、147、86、187、209和254的一个或多个位置上的另外的突变。在一个实施方案中，所述另外的突变是第111和147位的突变。在一个实施方案中，所述另外的突变是第86、187、209和254位的突变。在一个实施方案中，所述另外的突变所述是第111位的赖氨酸突变为组氨酸和第147位的酪氨酸突变为亮氨酸。在一个实施方案中，所述另外的突变是第86位的亮氨酸突变为异亮氨酸、第187位的甘氨酸突变为天冬氨酸、第209位的谷氨酸突变为赖氨酸和第254位的丙氨酸突变为天冬氨酸。

在一个实施方案中，本发明的溶血磷脂酶的氨基酸序列在对应于SEQ ID NO:1

的第84、85和94位的位置上具有突变。在一个实施方案中，所述突变是第84位的丝氨酸突变为精氨酸，第85位的天冬氨酸突变为苏氨酸，并且第94位的天冬氨酸突变为酪氨酸。

5 在一个实施方案中，所述溶血磷脂酶的氨基酸序列如SEQ ID NO:2、3、5、6或7所示。

另一方面，本发明涉及核酸分子，其选自：(a)编码上述溶血磷脂酶的核苷酸序列；和(b)与(a)所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列，互补可以是部分或完全互补。

技术人员将会认为，由于遗传密码的简并性，多种不同的核苷酸序列可以编码同样的酶。另外，可以认识到，技术人员能够使用常规技术进行不影响本发明的核苷酸序列所编码的酶活性的核苷酸取代，这样可以反映表达本发明的酶所用的任何特

10 定的宿主生物体的密码子偏好性。

本发明还提供了包含所述核酸分子的载体，以及包含所述核酸分子或所述载体的宿主细胞。

“载体”是指通常携带有不属于细胞中心代谢的部分的基因的染色体外元件，并且常常是环状双链DNA分子的形式。此类元件可为得自任何来源的自主复制序列、基因组整合序列、噬菌体或核苷酸序列、线性或环状的单链或双链DNA或RNA，其中许多核苷酸序列已经被接合或重组到特定构建体中，该构建体能够将所选基因产

15 物的启动子片段和DNA序列连同合适的3'非翻译序列一起导入细胞。

编码本发明的溶血磷脂酶的基因和基因产物可在异源宿主细胞，例如细菌细胞、真菌细胞，例如酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞和植物细胞中表达。用于表达本

20 发明的核酸分子的异源宿主细胞可以是存在于真菌或细菌家族中并在宽温度、pH值和溶剂耐受性范围内生长的微生物宿主。例如，预期任何细菌、酵母和丝状真菌可为表达本发明核酸分子的合适宿主。宿主菌株的实例包括但不限于细菌、真菌或酵母物种例如毕赤酵母属(Pichia)、曲霉属(Aspergillus)、木霉属(Trichoderma)、糖酵

25 母属(Saccharomyces)、发夫酵母属(Phaffia)、克鲁维酵母属(Kluyveromyces)、耶氏酵母属(Yarrowia)、假丝酵母属(Candida)、汉逊酵母属(Hansenula)、沙门氏菌属(Salmonella)、芽孢杆菌属(Bacillus)、不动杆菌属(Acinetobacter)、发酵单胞菌属(Zymomonas)、土壤杆菌属(Agrobacterium)、赤细菌属(Erythrobacter)、绿菌属(Chlorobium)、着色菌属(Chromatium)、黄杆菌属(Flavobacterium)、噬

30 纤维菌属(Cytophaga)、红细菌属(Rhodobacter)、红球菌属(Rhodococcus)、链霉菌属(Streptomyces)、短杆菌属(Brevibacterium)、棒状杆菌属(Corynebacteria)、分支杆菌属(Mycobacterium)、异常球菌属(Deinococcus)、埃希氏菌属(Escherichia)、

欧文氏菌属 (*Erwinia*)、泛菌属 (*Pantoea*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、鞘氨醇单胞菌属 (*Sphingomonas*)、甲基单胞菌属 (*Methylomonas*)、甲基细菌属 (*Methylobacter*)、甲基球菌属 (*Methylococcus*)、甲基弯菌属 (*Methylosinus*)、甲基微菌属 (*Methylomicrobium*)、甲基孢囊菌属 (*Methylocystis*)、产碱菌属 (*Alcaligenes*)、集胞蓝细菌属 (*Synechocystis*)、聚球蓝细菌属 (*Synechococcus*)、鱼腥蓝细菌属 (*Anabaena*)、硫杆菌属 (*Thiobacillus*)、甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*)、克雷伯氏菌属 (*Klebsiella*) 和粘球菌属 (*Myxococcus*) 物种。在一个实施方案中，所述宿主细胞是真菌细胞。在一个实施方案中，所述宿主细胞是毕赤酵母或黑曲霉细胞。

可用于转化上述宿主细胞的载体是本领域熟知的。通常，载体包含指导相关基因转录和翻译的序列、可选标记和允许自主复制或染色体整合的序列。合适的载体包含含有转录起始控制的基因5'区域和控制转录终止的DNA片段3'区域。

一方面，本发明还涉及生产溶血磷脂酶的方法，包括在宿主细胞中表达编码本发明的溶血磷脂酶的核酸分子，并且回收得到的多肽。

可应用多种培养方法以制备本发明的酶。例如，从重组微生物宿主中大规模生产特定基因产物可通过分批、分批补料和连续培养方法进行。

分批和补料分批培养方法在本领域内是常用的且众所周知，并且实例可见于如下文献：Thomas D. Brock in *Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology*，第二版，Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA (1989)，以及Deshpande, Mukund V., (*Appl. Biochem. Biotechnol.*, 36:227-234 (1992))。

本发明的酶的商业生产也可通过连续培养进行。连续培养是一种开放式系统，其中将设定好的培养基连续加入生物反应器中，并同时移出等量条件培养基用于加工。连续培养一般使细胞维持在其中细胞主要处于对数生长期的恒定高液相密度。或者，连续培养可以用固定化细胞来进行，其中连续添加碳和营养素，且连续从细胞团块中取出有价值的产物、副产物或废弃物。细胞固定可使用范围广泛的固体载体进行，所述固体载体由天然材料和/或合成材料组成。

从分批发酵、分批补料发酵、或连续培养中回收期望的酶可通过本领域技术人员已知的任何方法完成。例如，当在细胞内生产酶时，通过离心或膜过滤从培养基中分离细胞浆液，任选地用水或期望 pH 的含水缓冲液洗涤，然后将期望 pH 的含水缓冲液中的细胞浆液悬浮使其匀化，生产出包含需要的酶的细胞提取物。

本发明还涉及组合物，其包含本发明的溶血磷脂酶或本发明的宿主细胞的发酵液、发酵上清和/或发酵浓缩液。本发明的酶组合物可为任何适于使用的形式，例如，去除或未去除细胞的粗发酵液，含或不含细胞碎片的细胞裂解物，半纯化或纯化的酶

组合物，或宿主细胞作为酶的来源。所述酶组合物可为干粉或颗粒、无粉尘的颗粒、液体、稳定化液体或稳定化受保护的酶。液体酶组合物可根据确立的工艺，例如通过添加稳定剂如糖、糖醇或其他多元醇，和/或乳酸或其他有机酸来稳定化。

本发明另外涉及本发明的宿主细胞的发酵液、发酵上清或发酵浓缩液。

5 本发明还涉及本发明的溶血磷脂酶在油脂脱胶中的用途。将本发明的溶血磷脂酶用于油脂脱胶时，相对于现有技术的溶血磷脂酶，比酶活有显著提高，降低了生产成本。

附图说明

图1显示pAOP-WTRT和pAOP-WTRT-Y菌株在PDA固体培养基平板上进行2次
10 传代培养后突变体WTRT和WTRT-Y的酶活变化。

具体实施方式

实验材料

1. 实验菌株和质粒

菌株：毕赤酵母GS115购自Invitrogen, C18100；黑曲霉AN19，购自中国工业微
15 生物菌种保藏管理中心，编号：黑曲霉CICC2243。

SphI 和 HindIII 限制性内切酶购自 NEB。

卵磷脂(纯度 98%)购自阿拉丁。

NEFA 试剂盒购自日本和光纯药工业株式会社。

Bradford试剂盒购自生工(上海)生物工程有限公司。质粒: pAOP-Eno质粒由本实
20 验室构建，具体见下文。pAO815购自Invitrogen, K1750-01。

pAOP-Eno 载体由发明人参考《分子克隆实验指南》(第三版，纽约，冷泉港实验室出版社，New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)的方法构建，具体过程如下：

用SphI和HindIII酶切位点将从生工生物工程(上海)股份有限公司全基因合成获
25 得的RML基因（NCBI登录号：A34959），带米曲霉 α -淀粉酶信号肽（NCBI序列号：XM_001821384.2, 1-63bp序列）插入到以米曲霉烯醇化酶启动子（NCBI序列号：D63941.1, 215-734bp；含12拷贝增强子序列）和黑曲霉糖化酶终止子（NCBI序列号：AF214480.1，其中终止子序列部分）的表达框中，将整个表达框以BglII和XhoI插入到克隆载体pSP72的多克隆位点，最后将米曲霉来源的PyrG表达基因（NCBI序列号：
30 AB017705.1）以XhoI酶切位点插入到载体上，从而构建好RML基因表达载体pAOP-Eno。

2. 培养基和溶液

黑曲霉筛选平板：1.34% 酵母氮源碱（YNB）含硫酸铵不含氨基酸，2% 麦芽糖，2% 卵磷脂乳化液，0.1M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 pH4.0，2%琼脂糖，10mM CaCl₂。

PDA固体培养基：购自BD 公司，货号BD 213400。

YPD液体培养基：1% 酵母提取物，2% 蛋白胨，2% 葡萄糖。

- 5 MGYS固体培养基：1.34% 酵母氮源碱（YNB）含硫酸铵不含氨基酸，1%甘油，1M 山梨醇，4×10⁻⁵%D-生物素，2%琼脂。

BMM-大豆磷脂筛选培养基：1.34% 酵母氮源碱（YNB）含硫酸铵不含氨基酸，4×10⁻⁵%D-生物素，0.5% 甲醇(灭菌后加入)，2% 大豆磷脂乳化液，0.1M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 pH6.6，2%琼脂，添加10uM的ZnSO₄·7H₂O。

- 10 -- 2%大豆磷脂乳化液：2g大豆磷脂，100ml H₂O，用高速匀浆机 8000rpm 匀浆 1min。

BMGY液体培养基：1% 酵母提取物，2% 蛋白胨，1.34% 酵母氮源碱（YNB）含硫酸铵不含氨基酸，1%甘油，4×10⁻⁵%D-生物素，0.1M 磷酸二氢钾-磷酸氢二钾缓冲液 pH6.0。

- 15 BMMY液体培养基：1% 酵母提取物，2% 蛋白胨，1.34% 酵母氮源碱（YNB）含硫酸铵不含氨基酸，0.3% ZnSO₄·7H₂O，0.5%甲醇(灭菌后加入)，4×10⁻⁵% D-生物素(灭菌后加入)，0.1M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 pH6.6。

改良型Bradford法蛋白浓度测定试剂盒(购自上海生工生物工程有限公司)

PCR 酶： PrimeSTAR®HS DNA Polymerase (购自宝生物工程(大连)有限公司)

- 20 NEFA 试剂盒 (购自日本和光纯药工业株式会社)

磷脂酸购自阿拉丁试剂。

实施例 1：突变体 D94N 的构建以及酶活的测定

1、构建质粒

1.1 质粒 pAOP-Eno 的构建如上文所述。

- 25 1.2 pAOP-AN02-LPL 和 pAOP-D94N 质粒的构建

选取 AN02-LPL 的成熟肽，如下 SEQ ID NO: 1 所示：

AN02-LPL (SEQ ID NO: 1)

- 30 DISSTVLDNIDLFAQYSAAAYCSSNIESTGTTLTCDVGNCPLEAAGATTIDDEF
DDTSSYGDPTGFIAVDPTNELIVLSFRGSSDLSNWIADLDFGLTSVSSICDGCCEMHK
GFYEAWVEVIADTITSKVEAAVSSYPDYTLVFTGHSYGAALAAVAATVLRNAGYTL
DLYNFGQPRIGNLALADYITGQNMGSNYRVTHTDIVPKLPPELLGYHHFSPEYWI
TSGNDVTVTTSADVTEVVGVDSTAGNDGTLLDSTTAHRWYTIYISECS

将 AN02-LPL (SEQ ID NO: 1) 的 94 位天冬氨酸 (D) 突变为天冬酰胺 (N), 突变后的多肽命名为 D94N。

突变体 D94N 的成熟肽的氨基酸序列 (SEQ ID NO: 2)

DISSTVLDNIDLFAQYSAAAYCSSNIESTGTTLTCDVGNCPLEAAGATTIDEF
5 DDTSSYGDPTGFIAVDPTNELIVLSFRGSSDLNWIADLN~~N~~FGLTSVSSICDGCCEMHK
GFYEAWVEVIADTITSKVEAAVSSYPDYTLVFTGHSYGAALAAVAATVLRNAGYTL
DLYNFGQPRIGNLALADYITGQNMGSNYRVTHTDIVPKLPPELLGYHHFSPEYWI
TSGNDVTVTTSADVTEVVGVDSTAGNDGTLLDSTTAHRWYTIYISECS

将 AN02-LPL 和 D94N 送苏州金唯智生物科技有限公司合成基因序列, 克隆至
10 pAOP-Eno 质粒中, 得到 pAOP-AN02-LPL 质粒和 pAOP-D94N 质粒。

2、黑曲霉突变菌株的获得和酶活的测定

pAOP-AN02-LPL 质粒和 pAOP-D94N 质粒分别转化黑曲霉 AN19 菌株, 得到的菌株分别命名为 19-AN02-LPL 和 19-D94N。具体转化方法如下:

(1) 将培养在 PDA 固体培养基 (购自 BD 公司, 货号 BD 213400) 的黑曲霉
15 AN19 菌株孢子用孢子洗液洗脱, 将洗脱下来的孢子涡旋震荡 1min 后, 通过 mircloth 过滤, 制备成均一的孢子悬液。

(2) 接种 1×10^7 个孢子悬液至发酵培养基(2% 葡萄糖, 6% 麦芽糖, 7% 柠檬酸钠, 1.5% 硫酸铵, 4% 胰蛋白大豆肉汤 (Tryptic soy broth), 0.1% 磷酸二氢钠, 0.1% 硫酸镁, 0.07% Tween 80, 微量元素 (KI 0.83g/L, H_3BO_3 6.2g/L, $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ 22.3g/L, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 8.6g/L, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.25g/L, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 0.025g/L, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.025g/L 按 1/1000 比例添加; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 2.78g/L, $Na_2.EDTA$ 3.73g/L 按 1/100 比例添加))中, 28°C, 200rpm, 培养 42-48h; 用灭菌 Mircloth (购自 Millipore) 过滤收集长出的菌丝; 将收集的菌丝体用灭菌的渗透压稳定剂(0.6 mol/L $MgSO_4$)冲洗三次, 压干。
20

(3) 菌丝转移至 100mL 三角瓶中, 每 0.8 g 菌丝体重悬在 10 mL 的酶解液 (1%纤维素酶 (购自 sigma, 货号 C1184-25KU)、1%溶壁酶 (购自 sigema, 货号 L1412-25G)、0.1%蜗牛酶 (购自生工, 货号 A600870-0005)) 中, 分散; 30 °C, 60 rpm, 60-90 min(30min 后每隔 10min 观察一次); 用酶酶解的菌丝用 Mircloth 过滤, 再用 0.6 mol/L $MgSO_4$ 冲洗, 收集滤液; 4 °C, 1000g 离心 10 min, 弃上清, 得原生
30 质体沉淀; 5 mL 预冷的 1.0 mol/L 山梨醇溶液重悬原生质体沉淀, 800g, 4 °C 离心 10 min, 弃上清; 原生质体重悬于 1 mL 预冷的 1.0 mol/L 山梨醇, 冰浴待用。

(4) 取原生质体离心, 用预冷的 STC(1.0 M 山梨醇, 50 mM $CaCl_2$, 50 mM Tris-

HCl, pH=7.5)溶液调整至 1×10^7 个/mL, 获得原生质体悬液; 向 200 μ L 原生质体悬液中, 加入 5 μ g DNA(pAOP-AN02-LPL 质粒或 pAOP-D94N 质粒)和 50 μ L PTC(40%w/v PEG4000, 50mM CaCl₂, 50mM Tris-HCl, pH=7.5)溶液, 轻轻拍打混匀, 冰浴 30 min; 加 0.2 mL PTC 溶液, 混匀, 再加入 0.8 mL PTC 溶液, 混匀, 室温 30 min; 将上述混合液加入到 5ml 再生培养基(0.2%(w/v) KH₂PO₄, 0.1% (w/v) KCl, 0.05%(w/v) MgSO₄·7H₂O, 0.005% (w/v) FeSO₄·7H₂O, 1M 蔗糖, 10mM 乙酰胺, 20 mM 氯化铯, 0.6w/v%琼脂)中, 混匀; 铺于含有再生培养基(除了含有 1.5%琼脂, 其他成分同上)的再生平板上, 28 °C, 培养 3 天以上。

(5) 将上述步骤(4)再生平板上长出的克隆挑至筛选平板上, 每种菌株筛选出 100 个转化子, 从中挑选出 10 个在筛选平板上形成较大的白色沉淀圈的转化子进行摇瓶发酵, 比较酶活大小, 具体过程如下:

(6) 将筛选到的 10 个阳性克隆涂布于 3% (w/v) 的 PDA 固体培养基(购自 BD 公司, 货号 BD 213400)上, 28 °C培养 3 天左右带有大量孢子形成, 将洗脱下来的孢子涡旋震荡 1 min 后, 通过 mircloth 过滤, 制备成均一的孢子悬液; 接种 1 $\times$ 10⁷ 个孢子悬液至发酵培养基(2% (w/v) 葡萄糖, 10% (w/v) 麦芽糖, 7% (w/v) 柠檬酸钠, 1.5% (w/v) 硫酸铵, 4% Tryptic soy broth, 0.1% (w/v) 磷酸二氢钠, 0.1% (w/v) 硫酸镁, 0.07% (w/v) Tween 80, 微量元素)中, 28°C, 200 rpm, 培养 8 天, 进行酶活测定, 选择酶活最高的转化子进行酶活比较。

(7) 19-AN02-LPL 和 19-D94N 菌株发酵液贮藏前的酶活测定

取 19-AN02-LPL 和 19-D94N 菌株的发酵液, 以大豆卵磷脂作为底物, 测定酶活, 方法如下: 取上述发酵液 10ul 加入到 90ul 底物溶液中, 50°C反应 10min, 95°C5min 灭活, 7000 rpm 离心 5min, 取 1ul 上清加 NEFA 试剂盒中的试剂 A 80ul, 37°C反应 10min, 加试剂 B 160ul 反应 10min。测定 550nm 吸光值, 从而计算酶活。

其中, 所述底物溶液组成(9 mL)为: 由 5 ml 4%w/v 大豆卵磷脂、1 mL 20% (v/v) Triton X-100, 2.5 mL 0.1M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH=4.3)和 0.5 mL 水组成。

结果显示, 19-AN02-LPL 菌株和 19-D94N 菌株的发酵液的酶活分别为 47688 U/ml 和 45457 U/ml。

(8) 19-AN02-LPL 和 19-D94N 菌株发酵液贮藏后的酶活测定

将 19-AN02-LPL 和 19-D94N 菌株的发酵液在 4°C条件下贮藏 2 周, 以上述步骤(7)相同的方法测定酶活。

结果表明, 贮藏 2 周后, 19-AN02-LPL 菌株发酵液的酶活从 47688U/ml 下降至

37261U/ml; 而 19-D94N 菌株发酵液的酶活仅从 45457U/ml 下降至 43442U/ml。因此 D94N 相比于 AN02-LPL, 酶活损失减少了 77%。这有利于该酶的稳定贮藏, 延长该酶的使用周期。

实施例 2: 突变体 HLRT 的构建及针对磷脂酸的比酶活

5 选取 AN02-LPL 的成熟肽, 如 SEQ ID NO:1 所示。

将第 111 位赖氨酸突变为组氨酸, 第 147 位酪氨酸突变为亮氨酸, 第 84 位丝氨酸突变为精氨酸, 第 85 位天冬氨酸突变为苏氨酸。

得到新突变体 HLRT 氨基酸序列如下:

DISSTVLDNIDLFAQYSAAAYCSSNIESTGTTLTCDVGNCPLEAAGATTIDEF
10 DDTSSYGDPTGFIAVDPTNELIVLSFRGSRTLSNWIADLDFGLTSVSSICDGCCEMHH
GFYEAWVEVIADTITSKVEAAVSSYPDYTLVFTGHS LGAALAAVAATVLRNAGYTL
DLYNFGQPRIGNLALADYITGQNMGSNYRVTHTDIVPKLPPELLGYHHFSPEYWI
TSGNDVTVTTSADVTEVVGVDSTAGNDGTLLDSTTAHRWYTIYISECS (SEQ ID NO:3)

将 AN02-LPL 和 HLRT 氨基酸序列送金唯智生物工程有限公司合成基因序列,
15 克隆至 pAO815 载体中, 得到 P-AN02-LPL 和 P-HLRT 质粒。用 BglII 线性化后, 用电转化法将载体转化至毕赤酵母 GS115 菌株的感受态细胞中。将转化物接种于 MGYS 固体培养基平板上, 30°C 培养 3 天, 得到 pic-AN02-LPL 和 pic-HLRT 的毕赤酵母转化子。挑取平板上的单克隆, 至 BMM-大豆磷脂筛选培养基平板上, 选取白色沉淀圈大的克隆, 命名为 pic-AN02-LPL 和 pic-HLRT。

20 取 pic-AN02-LPL 和 pic-HLRT, 先在 YPD 液体培养基中活化, 然后接种于 BMGY 液体培养基中, 在 30°C 下, 220 rpm 振荡培养过夜。将培养物转至 BMMY 液体培养基中, 初始 OD600 为 6。

首先, 用 2% 甲醇进行诱导, 在 24 h 和 32 h 后各补加 1% 甲醇, 48 h 和 56 h 后各补加 1% 甲醇, 72 h 取样。

25 将获得的发酵液用截留分子量为 10 kDa 的超滤管进行超滤脱盐浓缩 40 倍。将处理后的样品加入缓冲液(20mM 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH5.5))中。得到的酶液称为 AN02-LPL 和 HLRT。

以磷脂酸作为底物, 测定酶活, 方法如下:

9ml 底物: 5ml 1% 磷脂酸, 1ml 20% Triton X-100, 2.5ml 0.1M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH=4.3; 4.8; 5.5), 0.5ml 水。
30

10ul 稀释的酶液+90ul 底物 50°C 反应 10min, 95°C 5min 灭活, 7000rpm 离心 5min, 取 1ul 上清加 NEFA 试剂盒中的试剂 A 80ul, 37°C 反应 10min, 加试剂 B 160ul

反应 10min。测定 550nm 吸光值，从而计算酶活。

使用改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒测定发酵液的蛋白浓度，从而计算得到 AN02-LPL 和 HLRT 在不同 pH 条件下针对磷脂酸的比酶活。

新突变体 HLRT 针对磷脂酸的比酶活在 pH4.3 时由 AN02-LPL 的 347U/mg 提高至 835U/mg；在 pH4.8 时由 AN02-LPL 的 863U/mg 提高至 2903U/mg；在 pH5.5 时由 AN02-LPL 的 0U/mg 提高至 2527U/mg。

实施例 3：HLRT 的脱胶测试

取预脱胶豆毛油摇匀搅拌加热，温度稳定在 55℃；加入 50% 柠檬酸至终浓度为 650ppm。20000rpm 剪切 1.5min；55℃搅拌反应 1h；分别将 30 ppm HLRT、30 ppm AN02-LPL、60ppm AN02-LPL 与 1.8ml 水混合后一同加入，200000 rpm 剪切 1.5min；加入酶水混合液后 升温至 55℃开始计时，反应 4h 反应结束后，升温至 85℃将酶灭活，至少保持>8min，离心得到脱胶油后取样进行磷含量测试。含磷量小于 10ppm 即符合标准。

	磷含量 (ppm)
HLRT 30ppm	7.8
AN02-LPL 30ppm	21.9
AN02-LPL 60ppm	8.1

15

实施例 4：突变体 M1RT 的构建及针对磷脂酸的比酶活

制备 AN02-LPL 的突变多肽 M1(突变位点以成熟肽计为 L86I, G187D, E209K, A254D)。M1 序列如下所示：

DISSTVLDNIDLFAQYSAAAYCSSNIESTGTTLTCDVGNCP LVEAAGATTIDEF
20 DDTSSYGDPTGFIAVDPTNELIVLSFRGSSDISNWIADLDFGLTSVSSICDGCEMHKG
FYEAWEVIADTITSKVEAAVSSYPDYTLVFTGHSYGAALAAVAATVLRNAGYTL D
LYNFGQPRIGNLALADYITDQNMGSNYRVTHTD DIVPKLPPKLLGYHHFSPEYWIT
SGNDVTVTTS DVT EVVGVDSTDGNDGTL LDSTTAHRWYTIYISECS (SEQ ID NO:4)
将 M1 的第 84 位丝氨酸突变为精氨酸，第 85 位天冬氨酸突变为苏氨酸

得到新突变体 M1RT 氨基酸序列如下:

DISSTVLDNIDLFAQYSAAAYCSSNIESTGTTLTCDVGNCPLVEAAGATTIDEF
DDTSSYGDPTGFIAVDPTNELIVLSFRGSRTISNWIADLDFGLTSVSSICDGCCEMHKG
FYEAWVEVIADTITSKVEAAVSSYPDYTLVFTGHSYGAALAAVAATVLRNAGYTL
5 LYNFGQPRIGNLALADYITDQNMGSNYRVTHTDIVPKLPPKLLGYHHFSPEYWIT
SGNDVTVTTSADVTEVVGVDSTDGNDGTLLDSTTAHRWYTIYISECS (SEQ ID NO:5)

将 M1RT 氨基酸序列送金唯智生物工程有限公司合成基因序列,克隆至 pAO815 载体中,得到 P-M1RT 质粒。用 BglII 线性化后,用电转化法将载体转化至毕赤酵母 GS115 菌株的感受态细胞中。将转化物接种于 MGYS 固体培养基平板上,30°C 培养 10 3 天,得到 pic-M1RT 的毕赤酵母转化子。挑取平板上的单克隆,至 BMM-大豆磷脂筛选培养基平板上,选取白色沉淀圈大的克隆,命名为 pic-M1RT。

取 pic-M1RT,先在 YPD 液体培养基中活化,然后接种于 BMGY 液体培养基中,在 30°C 下,220 rpm 振荡培养过夜。将培养物转至 BMMY 液体培养基中,初始 OD600 为 6。

15 首先,用 2%甲醇进行诱导,在 24 h 和 32 h 后各补加 1%甲醇,48 h 和 56 h 后各补加 1%甲醇,72 h 取样。

将获得的发酵液用截留分子量为 10 kDa 的超滤管进行超滤脱盐浓缩 40 倍。将处理后的样品加入缓冲液中(20mM 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH5.5))。得到的酶液称为 M1RT,以磷脂酸作为底物,测定酶活,方法如下:

20 9ml 底物: 5ml 1%磷脂酸, 1ml 20% Triton X-100, 2.5ml 0.1M 柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液(pH=4.3; 4.8; 5.5)。

10ul 稀释的酶液+90ul 底物 50°C 反应 10min, 95°C 5min 灭活, 7000rpm 离心 5min, 取 1ul 上清加 NEFA 试剂盒中的试剂 A 80ul, 37°C 反应 10min, 加试剂 B 160ul 反应 10min。测定 550nm 吸光值,从而计算酶活。

25 使用改良型 Bradford 法蛋白浓度测定试剂盒测定发酵液的蛋白浓度,从而计算得到 M1RT 在不同 pH 条件下针对磷脂酸的比酶活。

新突变体 M1RT 针对磷脂酸的比酶活在 pH4.3 时由 AN02-LPL 的 347U/mg 提高至 1252U/mg; 在 pH4.8 时由 AN02-LPL 的 863U/mg 提高至 2956U/mg; 在 pH5.5 时由 AN02-LPL 的 0U/mg 提高至 2972U/mg。

30 实施例 5: 突变体 WTRT 的构建及针对磷脂酸的比酶活

选取 AN02-LPL 的成熟肽,如 SEQ ID NO:1 所示。

将其第 84 位丝氨酸突变为精氨酸,第 85 位天冬氨酸突变为苏氨酸,得到新突

变体 WTRT 氨基酸序列如下:

DISSTVLDNIDLFAQYSAAYCSSNIESTGTTLTCDVGNCPLVEAAGATTIDDEF
DDTSSYGDPTGFIAVDPTNELIVLSFRGSRTLSNWIADLDFGLTSVSSICDGCCEMHK
GFYEAWVEVIADTITSKVEAAVSSYPDYTLVFTGHSYGAALAAVAATVLRNAGYTL
5 DLYNFGQPRI GN LALADYITGQNMGSNYRVTH TDDIVPKLPPELLGYHHFSPEYWI
TSGNDVTVTTS DVT EVVGVDSTAGNDGTLLDSTTAHRWYTIYISECS (SEQ ID NO:6)

将 WTRT 氨基酸序列送金唯智生物工程有限公司合成基因序列,克隆至 pAOP-Eno 载体中,得到 pAOP-WTRT 质粒,转化黑曲霉 AN19 菌株。

转化方法如下:

10 将培养在 PDA 固体培养基的黑曲霉菌株孢子用孢子洗液洗脱,将洗脱下来的孢子涡旋震荡 1min 后,通过 mircloth 过滤,制备成均一的孢子悬液;接种 1×10^7 个孢子悬液至发酵培养基(2% 葡萄糖,6% 麦芽糖,7% 柠檬酸钠,1.5% 硫酸铵,4% Tryptic soy broth,0.1% 磷酸二氢钠,0.1% 硫酸镁,0.07% Tween 80,微量元素)中,28℃,200rpm,培养 42-48h;用灭菌 Mircloth 过滤收集长出的菌丝;将收集的
15 菌丝体用灭菌的渗透压稳定剂(0.6 mol/L $MgSO_4$)冲洗三次,压干;菌丝转移至 100mL 三角瓶中,每 0.8 g 菌丝体重悬在 10 mL 的酶解液中,分散;30 ℃,60 rpm,60-90 min(30min 后每隔 10min 观察一次);原生质体混合液用 Mircloth 过滤,再用 0.6 mol/L $MgSO_4$ 冲洗,收集滤液;4 ℃,1000g 离心 10 min,弃上清;5 mL 预冷 1.0 mol/L 山梨醇溶液重悬原生质体沉淀,800g,4 ℃ 离心 10 min,弃上清;原生质
20 体重悬于 1 mL 预冷 1.0 mol/L 山梨醇,冰浴待用。取原生质体离心,用预冷的 STC(1.0 M Sorbitol,50mM $CaCl_2$,50mM Tris-HCl,pH=7.5) 溶液调整至 1×10^7 个/mL;向 200 μ L 原生质体悬液中,加入 5 μ g DNA 和 50 μ L PTC(40% PEG4000,50mM $CaCl_2$,50mM Tris-HCl,pH=7.5) 溶液,轻轻拍打混匀,冰浴 30 min;加 0.2 mL PTC 溶液,混匀,再加入 0.8 mL PTC 溶液,混匀,室温 30 min;将上述混合
25 液加入到 5ml 再生培养基(0.2% KH_2PO_4 ,0.1% KCl,0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$,0.005% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$,1M 蔗糖,10mM 乙酰胺,20 mM 氯化铯,0.6% 琼脂)中,混匀;铺于再生培养基(成分同上,1.5%琼脂)上,28 ℃,培养 3 天以上。

将再生培养基上长出的阳性克隆涂布于 PDA 固体培养基上,28℃培养 3 天左右待有大量孢子形成,将洗脱下来的孢子涡旋震荡 1min 后,通过 mircloth 过滤,制
30 备成均一的孢子悬液;接种 1×10^7 个孢子悬液至发酵培养基(2% 葡萄糖,10% 麦芽糖,7% 柠檬酸钠,1.5% 硫酸铵,4% Tryptic soy broth,0.1% 磷酸二氢钠,0.1% 硫酸镁,0.07% Tween 80,微量元素)中,28℃,200rpm,培养 8 天,进行酶活测定。

以磷脂酸作为底物，测定酶活，方法同实施例 4。新突变体 WTRT 针对磷脂酸的比酶活在 pH4.3 时由 AN02-LPL 的 347U/mg 提高至 984U/mg；在 pH4.8 时由 AN02-LPL 的 863U/mg 提高至 2003U/mg；在 pH5.5 时由 AN02-LPL 的 0U/mg 提高至 1342U/mg。

5 实施例 6：突变体 WTRT-Y 的构建

选取 AN02-LPL 的成熟肽，如 SEQ ID NO:1 所示。

将第 84 位丝氨酸突变为精氨酸，第 85 位天冬氨酸突变为苏氨酸，再将第 94 位天冬氨酸突变为酪氨酸。得到新突变体 WTRT-Y 氨基酸序列如下：

DISSTVLDNIDLFAQYSAAAYCSSNIESTGTTLTCDVGNCPLEAAGATTIDEF
10 DDTSSYGDPTGFIAVDPTNELIVLSFRGSRTLSNWIADLYFGLTSVSSICDGCCEMHK
GFYEAWVEVIADTITSKVEAAVSSYPDYTLVFTGHSYGAALAAVAATVLRNAGYTL
DLYNFGQPRIGNLALADYITGQNMGSNYRVTHTDIVPKLPPELLGYHHFSPEYWI
TSGNDVTVTTSADVTEVVGVDSTAGNDGTLLDSTTAHRWYTIYISECS (SEQ ID
NO:7)。

15 将 WTRT-Y 氨基酸序列送金唯智生物工程有限公司合成基因序列，克隆至 pAOP-Eno 载体中，得到 pAOP-WTRT-Y 质粒。

实施例 7：突变体 WTRT-Y 与 AN02-LPL 和突变体 WTRT 的酶活比较

将表达载体 pAOP-AN02-LPL（构建方法见实施例 1）、pAOP-WTRT（构建方法见实施例 5）和 pAOP-WTRT-Y 转化入黑曲霉 AN19E（见专利申请 CN202111598184.2）
20 中。转化方法如下：

用孢子洗液洗脱新鲜的黑曲霉 AN19E 孢子，通过 Miracloth 过滤制备成孢子悬液，并调整至 1×10^7 个/mL。接种 1mL 孢子悬液至菌丝培养基（2%胰蛋白胨，1%酵母抽提物，2%葡萄糖，0.3%尿嘧啶）中，于 28°C，180rpm，培养 40 小时，用灭菌 Miracloth 过滤收集长出的菌丝。

25 收集的菌丝用灭菌的渗透压稳定剂（0.6 M $MgSO_4$ ，10mM NaH_2PO_4 ，pH=5.8）冲洗三次，压干。菌丝转移至 100mL 三角瓶中，每 0.8g 菌丝重悬在 20mL 的酶解液（用渗透压稳定剂配制 1%裂解酶，1%纤维素酶，0.1%蜗牛酶的酶解液，用 0.22 μm 的微孔滤膜过滤除菌）中，于 30°C，90 rpm，酶解 60-90min。酶解好的原生质体混合液用 Miracloth 过滤，收集滤液，4°C，1000g 离心 10min，用 5mL 预冷的
30 1.0mol/L 山梨醇溶液重悬原生质体沉淀，于 800g，4°C 离心 10min，弃上清。再用预冷的 STC 溶液（1.0 M 山梨醇，50mM $CaCl_2$ ，50mM Tris-HCl，pH=7.5）将原生质体调整至 1×10^7 个/mL，冰浴待用。

向 200μL 原生质体悬液中,加入 10μL 浓度为 1μg/μL 的表达载体,再添加 50μL PTC 溶液 (40% PEG4000, 50mM CaCl₂, 50mM Tris-HCl, pH=7.5), 混匀后冰浴 30min。加入 0.2mL PTC 溶液, 混匀后再加入 0.8mL PTC 溶液, 混匀, 室温保持 30min。

5 将上述混合液铺于再生培养基 (1%葡萄糖, 0.6%NaNO₃, 0.15% KH₂PO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄, 0.001% FeSO₄, 1M 蔗糖, 2%琼脂粉) 上, 28℃, 培养 7 天, 待菌落长出。

将在平板上长出的菌落, 转接至黑曲霉筛选平板上, 28℃, 培养 3 天, 从而获得 LPL 的黑曲霉表达菌株 pAOP-AN02-LPL、pAOP-WTRT 和 pAOP-WTRT-Y。

10 对上述菌株进行摇瓶发酵。发酵培养基 (2% 葡萄糖, 15% 麦芽糖, 7% 柠檬酸钠, 1.5% 硫酸铵, 4% TSB, 0.1% 磷酸二氢钠, 0.1% 硫酸镁, 0.07% Tween 80, 微量元素) 于 115℃, 高压灭菌 15min。发酵条件为 28℃, 220rpm, 10d, 接种量 1×10⁷ 个孢子/50mL。

摇瓶发酵结束后进行酶活测定。将 pAOP-AN02-LPL、pAOP-WTRT 和 pAOP-
15 WTRT-Y 的发酵液稀释至合适的蛋白浓度, 以磷脂酸作为底物, 测定酶活, 方法同实施例 4。

结果显示, 新突变体 WTRT-Y 仍然可以保持针对磷脂酸的高比酶活, 在 pH4.3 时由 AN02-LPL 的 347U/mg 提高至 961U/mg; 在 pH4.8 时由 AN02-LPL 的 863U/mg 提高至 1803U/mg; 在 pH5.5 时由 AN02-LPL 的 0U/mg 提高至 1212U/mg。与突变体
20 WTRT 的酶活相比基本持平 (在 pH4.3 时 984U/mg、在 pH4.8 时 2003U/mg 和在 pH5.5 时 1342U/mg)。

实施例 8: 突变体 WTRT 和 WTRT-Y 的抗降解稳定性评估

将 pAOP-WTRT 和 pAOP-WTRT-Y 发酵酶液上清微滤后, 分别在 4℃ 和 -20℃ 贮藏 2 周后, 考察残余脂肪酶酶活变化, 从而评估突变基因的抗降解稳定性。

25 酶活测定方法同实施例 4。

结果显示, 突变体 WTRT 在 4 度贮藏 2 周后的酶活从 29921U/ml 下降至 20076U/ml, 而突变体 WTRT-Y 的蛋白稳定性得到了提高, 其在 4 度贮藏 2 周后的酶活仅从 28765U/ml 下降至 25984U/ml。损失相比于 WTRT 减少了 68%。

实施例 9: 突变体 WTRT 和 WTRT-Y 的菌株稳定性评估

30 将 pAOP-WTRT 和 pAOP-WTRT-Y 菌株在 PDA 固体培养基平板上进行 2 次传代培养, 并进行摇瓶发酵考察传代后的酶活变化。

结果见图 1。如图 1 所示, 突变体 WTRT 传代 2 次后, 酶活是未传代菌株的

37.5%，而新突变体 WTRT-Y 的表达菌株传代 2 次后，酶活与未传代菌株酶活一致，无不稳定现象。

权 利 要 求

1. 突变的溶血磷脂酶，其氨基酸序列相对于野生型溶血磷脂酶具有一个或多个突变，并且具有增加的比活性或增加的稳定性。
- 5 2. 权利要求 1 的溶血磷脂酶，其氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:1 的选自第 84、85 和 94 位的一个或多个位置具有突变。
3. 权利要求 2 的溶血磷脂酶，其氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:1 的第 94 位的位置上具有突变，优选地，所述突变是天冬氨酸突变为天冬酰胺。
4. 权利要求 2 的溶血磷脂酶，其氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:1 的第 84 和
10 85 位的位置上具有突变，优选地，所述突变是第 84 位的丝氨酸突变为精氨酸，并且第 85 位的天冬氨酸突变为苏氨酸。
5. 权利要求 4 的溶血磷脂酶，其还包含在对应于 SEQ ID NO:1 的选自第 111、147、86、187、209 和 254 的一个或多个位置上的另外的突变，优选地，所述另外的突变是第 111 和 147 位的突变，或是第 86、187、209 和 254 位的突变，更优选地，
15 所述另外的突变是第 111 位的赖氨酸突变为组氨酸和第 147 位的酪氨酸突变为亮氨酸；或第 86 位的亮氨酸突变为异亮氨酸、第 187 位的甘氨酸突变为天冬氨酸、第 209 位的谷氨酸突变为赖氨酸和第 254 位的丙氨酸突变为天冬氨酸。
6. 权利要求 2 的溶血磷脂酶，其氨基酸序列在对应于 SEQ ID NO:1 的第 84、85 和 94 位的位置上具有突变；优选地，所述突变是第 84 位的丝氨酸突变为精氨酸，
20 第 85 位的天冬氨酸突变为苏氨酸，并且第 94 位的天冬氨酸突变为酪氨酸。
7. 权利要求 1 的溶血磷脂酶，其包含如 SEQ ID NO:2、3、5、6 或 7 所示的氨基酸序列。
8. 核酸分子，选自：
 (a)编码权利要求 1-7 的任一项所述的溶血磷脂酶的核苷酸序列；和
25 (b)与(a)所述的核苷酸序列互补的核苷酸序列。
9. 载体，其包含权利要求 8 的核酸分子。
10. 宿主细胞，其包含权利要求 8 的核酸分子，或权利要求 9 的载体；优选地，所述宿主细胞选自细菌细胞、真菌细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞和植物细胞，更优选地，所述宿主细胞是真菌细胞，更优选毕赤酵母细胞或黑曲霉细胞。
- 30 11. 生产溶血磷脂酶的方法，包括在宿主细胞中表达编码权利要求 1-7 的任一项的溶血磷脂酶的核酸分子，并且回收得到的多肽。
12. 组合物，其包含权利要求 1-7 的任一项所述的溶血磷脂酶或权利要求 10 的

宿主细胞的发酵液、发酵上清和/或发酵浓缩液。

13. 权利要求 10 所述的宿主细胞的发酵液、发酵上清或发酵浓缩液。

14. 权利要求 1-7 的任一项所述的溶血磷脂酶或权利要求 12 所述的组合物或权利要求 13 所述的发酵液、发酵上清和/或发酵浓缩液在油脂脱胶中的用途。

5