



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113337450 A

(43) 申请公布日 2021.09.03

(21) 申请号 202110447769.8

C12R 1/19 (2006.01)

(22) 申请日 2021.04.25

(71) 申请人 华东理工大学

地址 200237 上海市徐汇区梅陇路130号

(72) 发明人 林金萍 魏东芝 张宝琪

(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

31002

代理人 余永莉

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

C12P 7/24 (2006.01)

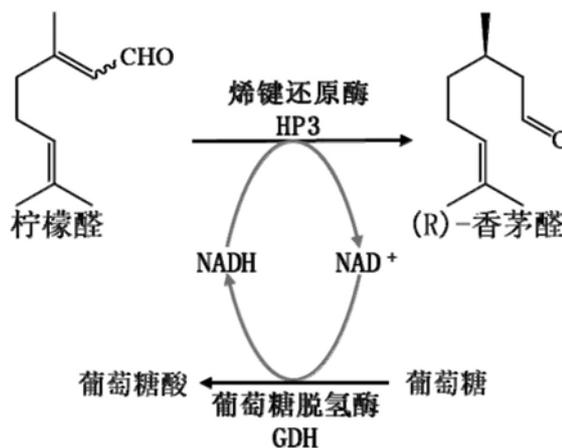
权利要求书2页 说明书7页  
序列表5页 附图2页

(54) 发明名称

一种大肠杆菌基因工程菌、构建方法以及全细胞催化生产(R)-香茅醛的方法

(57) 摘要

本发明提供一种大肠杆菌基因工程菌、构建方法以及全细胞催化生产(R)-香茅醛的方法。该大肠杆菌基因工程菌是以大肠杆菌E.coli BL21 (DE3) 为出发菌株,对其基因组上的醇脱氢酶基因adhE进行敲除,还通过质粒pET28a整合来源于枯草芽孢杆菌的葡萄糖脱氢酶GDH,以及通过质粒pET21a整合来源于假丝酵母的烯键还原酶HP3,获得一种可用于催化生产(R)-香茅醛的大肠杆菌基因工程菌,adhE、GDH、HP3的核苷酸序列依次如SEQ ID NO.1~3所示。根据本发明提供的方法,使用全细胞催化高浓度柠檬醛生产(R)-香茅醛,柠檬醛的转化率在99%以上,(R)-香茅醛的ee值在95%以上。



1. 一种可用于催化生产(R)-香茅醛的大肠杆菌基因工程菌,其特征在于,所述大肠杆菌基因工程菌是以大肠杆菌E.coliBL21(DE3)为出发菌株,对其基因组上的醇脱氢酶基因adhE进行敲除,同时还通过质粒pET28a整合来源于枯草芽孢杆菌的葡萄糖脱氢酶GDH,以及通过质粒pET21a整合来源于假丝酵母的烯键还原酶HP3,获得一种可用于催化生产(R)-香茅醛的大肠杆菌基因工程菌,其中,所述醇脱氢酶基因adhE的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述葡萄糖脱氢酶GDH的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述烯键还原酶HP3的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

2. 一种如权利要求1所述的可用于催化生产(R)-香茅醛的大肠杆菌基因工程菌的构建方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1:以大肠杆菌E.coli BL21(DE3)为出发菌株,利用CRISPR/Cas9基因编辑系统,实现其基因组上的醇脱氢酶基因adhE的敲除,获得大肠杆菌BL21(DE3)  $\Delta$  adhE;

S2:以枯草芽孢杆菌168基因组DNA为模板,PCR获得葡萄糖脱氢酶GDH基因片段,使用限制性内切酶双酶切葡萄糖脱氢酶GDH基因的DNA片段和pET28a质粒,连接,获得葡萄糖脱氢酶GDH表达载体;

S3:以热带假丝酵母ATCC 20615基因组DNA为模板,PCR获得烯键还原酶HP3基因片段,使用限制性内切酶双酶切烯键还原酶HP3基因的DNA片段和pET21a质粒,连接,获得烯键还原酶HP3表达载体;

S4:将步骤S2获得的葡萄糖脱氢酶GDH表达载体及步骤S3获得的烯键还原酶HP3表达载体共同转入步骤S1获得的敲除adhE基因的大肠杆菌BL21(DE3)  $\Delta$  adhE,得到大肠杆菌基因工程菌BL21(DE3)  $\Delta$  adhE/pET21a-HP3/pET28a-GDH。

3. 根据权利要求2所述的构建方法,其特征在于,步骤S1包括:

S11:以携带有醇脱氢酶adhE的大肠杆菌BL21(DE3)基因组DNA为模板,并设计醇脱氢酶编码基因adhE上下游同源臂的引物,进行聚合酶链式反应,得到adhE线性同源重组片段,其核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示,胶回收纯化;

S12:选择醇脱氢酶编码基因adhE上一段长度为20bp的序列设计SgRNA-adhE的引物,以SgRNA表达质粒为模板,进行PCR,得到SgRNA-adhE线性化质粒片段,胶回收纯化线性化质粒片段,经DNA连接酶连接后得到连接反应产物,将连接产物转入E.coli DH5 $\alpha$ 感受态细胞,通过平板筛选得到重组质粒SgRNA-adhE;

S13:将表达Cas9蛋白的载体质粒pCas9转入原始菌中,筛选出带有pCas9质粒的重组菌,培养重组菌,经L-阿拉伯糖诱导后制备成电转感受态细胞;

S14:将步骤S11得到的所述adhE线性同源重组片段及步骤S12得到的所述重组质粒SgRNA-adhE一起电转化进入步骤S13中的电转感受态细胞中,进行基因编辑,得到突变的大肠杆菌;

S15:去除步骤S14得到的突变的大肠杆菌中的载体质粒,得到E.coli BL21(DE3)  $\Delta$  adhE。

4. 根据权利要求2所述的构建方法,其特征在于,步骤S11中使用的引物adhE-Up-F、adhE-Up-R、adhE-Up-Down-F和adhE-Down-R的序列如SEQ ID NO.5~8所示。

5. 根据权利要求2所述的构建方法,其特征在于,步骤S12中使用的引物Sg-F和adhE-Sg-R的序列如SEQ ID NO.9~10所示。

6. 根据权利要求2所述的构建方法,其特征在于,步骤S3中使用的引物GDH-F和GDH-R的序列如SEQ ID NO.11~12所示,步骤S4中使用的引物HP3-F和HP3-R的序列如SEQ ID NO.13~14所示。

7. 一种全细胞催化生产(R)-香茅醛的方法,其特征在于,以权利要求1所述的可用于催化生产(R)-香茅醛的大肠杆菌基因工程菌的全细胞为生物催化剂,在反应体系中加入冻干的所述大肠杆菌基因工程菌的全细胞,并加入底物柠檬醛,实现细胞内催化反应制备(R)-香茅醛。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,所述反应体系中大肠杆菌基因工程菌的细胞干重为10~80g/L,温度控制在20~40℃,pH控制在7.0~8.5,底物柠檬醛的初始转化浓度为200~700mmol/L,同时加入220~770mmol/L的葡萄糖。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,葡萄糖的加入量是底物柠檬醛摩尔浓度的1.1倍。

10. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于,反应进行过程中,根据pH变化,通过加入 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液调节其pH至8.0。

## 一种大肠杆菌基因工程菌、构建方法以及全细胞催化生产(R)-香茅醛的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及酶工程和手性医药中间体制备技术领域,更具体地涉及一种大肠杆菌基因工程菌、构建方法以及全细胞催化生产(R)-香茅醛的方法。

### 背景技术

[0002] 光学纯(R)-香茅醛是一种重要的香料及医药中间体,其可用于饮料、食品、香水等的调香,还可作为合成L-薄荷醇的原料。工业上主要由天然精油分离获得,也可由柠檬醛经金属催化剂催化加氢制得。

[0003] 目前工业上催化柠檬醛生产(R)-香茅醛主要是通过金属催化剂催化柠檬醛加氢,相关利用生物催化法制备(R)-香茅醛存在底物浓度低、醛过度还原等问题。2010年,Stewart等人在大肠杆菌中表达*Pichia stipitis*的烯键还原酶,利用纯化后的烯键还原酶与葡萄糖脱氢酶进行催化反应,在反应5.75h后催化150mM E-柠檬醛的转化率达到95%(*Chemical Communications*, 2010, 46(45):8558-8560.);该研究使用的是纯酶作为催化剂,并没有使用全细胞催化系统,且底物E-柠檬醛需由E/Z-柠檬醛分离获得,虽然产物(R)-香茅醛的光学纯度达到98%。但产量还是偏低。2016年,中国专利申请CN106086089A公开了利用氨基酸催化的柠檬醛顺反异构反应,通过在催化柠檬醛的反应中偶联此反应生产(R)-香茅醛。该发明可以以柠檬醛为底物生产(R)-香茅醛,但产物ee值还是偏低,仅为65.4%。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一种大肠杆菌基因工程菌、构建方法以及全细胞催化生产(R)-香茅醛的方法,从而解决现有技术中(R)-香茅醛的制备存在底物浓度低、醛过度还原、产物ee值偏低的问题。

[0005] 为了解决上述技术问题,本发明采用以下技术方案:

[0006] 根据本发明的第一方面,提供一种可用于催化生产(R)-香茅醛的大肠杆菌基因工程菌,所述大肠杆菌基因工程菌是以大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3)为出发菌株,对其基因组上的醇脱氢酶基因*adhE*进行敲除,同时还通过质粒pET28a整合来源于枯草芽孢杆菌的葡萄糖脱氢酶GDH,以及通过质粒pET21a整合来源于假丝酵母的烯键还原酶HP3,获得一种可用于催化生产(R)-香茅醛的大肠杆菌基因工程菌,其中,所述醇脱氢酶基因*adhE*的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示,所述葡萄糖脱氢酶GDH的核苷酸序列如SEQ ID NO.2所示,所述烯键还原酶HP3的核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0007] 本发明所述的可用于催化生产(R)-香茅醛的大肠杆菌基因工程菌,是通过Crispr-Cas9介导的基因敲除方法实现大肠杆菌醇脱氢酶基因的缺失,从而得到醇脱氢酶缺失的大肠杆菌,并在所得的菌株中表达烯键还原酶及葡萄糖脱氢酶基因得到。

[0008] 其中,葡萄糖脱氢酶GDH来源于枯草芽孢杆菌168 (*Bacillus subtilis* 168,参见“枯草芽孢杆菌168产生的一种新磷脂类抗生素bacilysocin[J];国外医药,抗生素分册;

2002年04期), 烯键还原酶HP3来源于热带假丝酵母(*Candida tropicalis*, ATCC 20615)。

[0009] 根据本发明的第二方面, 提供一种如上所述的可用于催化生产(R)-香茅醛的大肠杆菌基因工程菌的构建方法, 包括以下步骤:S1: 以大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3) 为出发菌株, 利用CRISPR/Cas9基因编辑系统, 实现其基因组上的醇脱氢酶基因adhE的敲除, 获得大肠杆菌BL21 (DE3)  $\Delta$  adhE; S2: 以枯草芽孢杆菌168基因组DNA为模板, PCR获得葡萄糖脱氢酶GDH基因片段, 使用限制性内切酶双酶切葡萄糖脱氢酶GDH基因的DNA片段和pET28a质粒, 连接, 获得葡萄糖脱氢酶GDH表达载体; S3: 以热带假丝酵母ATCC 20615基因组DNA为模板, PCR获得烯键还原酶HP3基因片段, 使用限制性内切酶双酶切烯键还原酶HP3基因的DNA片段和pET21a质粒, 连接, 获得烯键还原酶HP3表达载体; S4: 将步骤S2获得的葡萄糖脱氢酶GDH表达载体及步骤S3获得的烯键还原酶HP3表达载体共同转入步骤S1获得的敲除adhE基因的大肠杆菌BL21 (DE3)  $\Delta$  adhE, 得到大肠杆菌基因工程菌BL21 (DE3)  $\Delta$  adhE/pET21a-HP3/pET28a-GDH。

[0010] 根据本发明的一个优选方案, 步骤S1包括:S11: 以携带有醇脱氢酶adhE的大肠杆菌BL21 (DE3) 基因组DNA为模板, 并设计醇脱氢酶编码基因adhE上下游同源臂的引物, 进行PCR, 得到adhE线性同源重组片段, 其核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示, 胶回收纯化; S12: 选择醇脱氢酶编码基因adhE上一段长度为20bp的序列设计SgRNA-adhE的引物, 以SgRNA表达质粒为模板, 进行聚合酶链式反应, 得到SgRNA-adhE线性化质粒片段, 胶回收纯化线性化质粒片段, 经DNA连接酶连接后得到连接反应产物, 将连接产物转入*E. coli* DH5 $\alpha$ 感受态细胞, 通过平板筛选得到重组质粒SgRNA-adhE; S13: 将表达Cas9蛋白的载体质粒pCas9转入原始菌中, 筛选出带有pCas9质粒的重组菌, 培养重组菌, 经L-阿拉伯糖诱导后制备成电转感受态细胞; S14: 将步骤S11得到的所述adhE线性同源重组片段及步骤S12得到的所述重组质粒SgRNA-adhE一起电转化进入步骤S13中的电转感受态细胞中, 进行基因编辑, 得到突变的大肠杆菌; S15: 去除步骤S14得到的突变的大肠杆菌中的载体质粒, 得到大肠杆菌BL21 (DE3)  $\Delta$  adhE。

[0011] 优选地, 步骤S11中使用的引物adhE-Up-F、adhE-Up-R、adhE-Up-Down-F和adhE-Down-R的序列如SEQ ID NO.5~8所示。

[0012] 优选地, 步骤S12中使用的引物Sg-F和adhE-Sg-R的序列如SEQ ID NO.9~10所示。

[0013] 优选地, 步骤S3中使用的引物GDH-F和GDH-R的序列如SEQ ID NO.11~12所示, 步骤S4中使用的引物HP3-F和HP3-R的序列如SEQ ID NO.13~14所示。

[0014] 进一步优选地, 在步骤S12中, SgRNA表达质粒为pTarget。

[0015] 进一步优选地, 在步骤S13中, 阿拉伯糖的终浓度为10mmol/L。

[0016] 进一步优选地, 步骤S14还包括用引物adhE-Up-F和adhE-Down-R进行菌落PCR验证并对PCR产物进行测序, 以确定得到突变的大肠杆菌。

[0017] 进一步的, 步骤S15中, 采用37℃培养及抗生素抗性负筛去除载体质粒。

[0018] 进一步的, 步骤S2中, 烯键还原酶表达载体为pET21a-HP3。

[0019] 进一步的, 在步骤S3中, 葡萄糖脱氢酶表达载体为pET28a-GDH。

[0020] 根据本发明的第三方面, 提供一种全细胞催化生产(R)-香茅醛的方法, 以上面所述的可用于催化生产(R)-香茅醛的大肠杆菌基因工程菌的全细胞为生物催化剂, 在反应体系中加入冻干重组菌株全细胞, 并加入底物柠檬醛, 通过发酵实现细胞内催化反应制备

(R)-香茅醛。

[0021] 所述反应体系中大肠杆菌基因工程菌的细胞干重为10~80g/L,温度控制在20~40℃,pH控制在7.0~8.5,底物柠檬醛的初始转化浓度为200~700mmol/L,同时加入220~770mmol/L的葡萄糖。

[0022] 优选地,葡萄糖的加入量是底物柠檬醛摩尔浓度的1.1倍。

[0023] 反应进行过程中,根据pH变化,通过加入 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液调节其pH至8.0。

[0024] 根据本发明的一个特别优选方案,提供一种全细胞催化生产(R)-香茅醛的方法,以重组菌株全细胞为生物催化剂,在反应体系中加入冻干重组菌株全细胞,并加入底物柠檬醛,同时加入底物柠檬醛摩尔浓度1.1倍的葡萄糖,在30℃、pH 8.0、200rpm条件下实现细胞内催化反应制备(R)-香茅醛,具体包括以下步骤:

[0025] 1) 平板培养:将重组大肠杆菌划线到含有筛选抗生素的LB固体平板培养基上,37℃过夜培养;

[0026] 2) 种子培养:在超净台挑取步骤(1)所得平板上的单菌落,接种到含有筛选抗生素的LB液体培养基中,37℃培养8h;

[0027] 3) 诱导培养:在超净台将步骤(2)所得种子培养液接种到含有筛选抗生素的LB液体培养基中,37℃培养,待菌液 $\text{OD}_{600}$ 数值达到0.6,加入终浓度为0.2mM的IPTG,20℃诱导培养12h。

[0028] 4) 收集菌体:将步骤(3)所得的诱导培养所得菌液于转速为8000rpm的条件下离心10min,分离得到菌体沉淀;将所得菌体用生理盐水洗涤2次,然后置于-80℃冷冻2h,再置于真空冷冻干燥机中干燥,得到重组大肠杆菌全细胞生物催化剂。

[0029] 5) 生物催化反应制备(R)-香茅醛:取步骤(4)所得的细胞干重浓度为75g/L的重组大肠杆菌全细胞生物催化剂,在30℃、pH 8.0、200rpm条件下对底物进行催化转化:所述底物为柠檬醛,起初始底物浓度为700mM,同时加入770mM的葡萄糖为共底物,反应进行中,根据pH变化,通过加入 $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 溶液调节其pH至8.0。

[0030] 进一步的,在步骤1)-3)中LB培养基配方为:酵母提取物5g/L,蛋白胨10g/L,NaCl 10g/L,pH 7.0,LB固体培养基包含琼脂15g/L,其余为水,121℃条件下灭菌20min,使用前加入相应抗生素。

[0031] 本发明的工作原理为:通过对大肠杆菌中醇脱氢酶adhE的敲除,降低了反应中醇类副产物的生成,同时在大肠杆菌中进行了烯键还原酶和葡萄糖脱氢酶的共表达,当以此重组大肠杆菌静止细胞为全细胞生物催化剂,柠檬醛为底物,葡萄糖为共底物时,通过烯键还原酶加氢即可制得香茅醛,从而实现高效低成本的生产手性(R)-香茅醛。反应过程示意图如图1所示。

[0032] 根据本发明提供的一种全细胞催化生产(R)-香茅醛的方法,使用全细胞催化高浓度柠檬醛生产(R)-香茅醛,柠檬醛的转化率在99%以上,(R)-香茅醛的ee值在95%以上。利用生物催化法催化柠檬醛生产(R)-香茅醛与现有技术中公开使用的其他方法相比具有反应条件温和、生产工艺简单、立体选择性高等优点。

[0033] 本发明相对现有技术具有以下显著的优越性:

[0034] 1) 本发明对E.coli BL21 (DE3) 自身的醛还原酶adhE进行了敲除,降低了反应中醇类副产物的生成。

[0035] 2) 本发明催化700mM柠檬醛完全转化,且产物ee值>95%,取得了显著效果。

[0036] 3) 本发明菌株要求的培养基简单、成本低,利用全细胞作为生物催化剂进行转化,不需要破碎细胞和分离纯化酶,操作过程简单,产物分离方便,且无需复杂的手性拆分,工艺简单高效,具有较高的大规模应用潜力。

[0037] 综上所述,本发明通过对大肠杆菌细胞中的醇脱氢酶基因adhE的敲除及共表达烯键还原酶和葡萄糖脱氢酶,提供了一种可用于催化生产(R)-香茅醛的大肠杆菌基因工程菌,并且提供了该大肠杆菌基因工程菌的构建方法,还提供了一种操作过程简单,产物分离方便,转化效率高,副产物少的全细胞催化生产(R)-香茅醛的方法,有利于(R)-香茅醛的工业化生产。

## 附图说明

[0038] 图1为本发明的反应过程示意图;

[0039] 图2为BL21 (DE3)  $\Delta$  adhE菌株PCR验证电泳图;

[0040] 图3为标准品的气相图谱,其中A为(S)-香茅醛,B为(R)-香茅醛,C为顺式柠檬醛,D为反式柠檬醛;

[0041] 图4为菌株BL21 (DE3)  $\Delta$  adhE/pET21a-HP3/pET28a-GDH催化柠檬醛的反应过程曲线。

## 具体实施方式

[0042] 以下结合具体实施例,对本发明做进一步说明。应理解,以下实施例仅用于说明本发明而非用于限制本发明的范围。

[0043] 以下实施例中所述的LB培养基配方为:酵母提取物5g/L,蛋白胨10g/L,NaCl 10g/L,pH 7.0,LB固体培养基包含琼脂15g/L,其余为水,121℃条件下灭菌20min,使用前加入相应抗生素。

[0044] 所用试剂均为市售。

[0045] 实施例1

[0046] 提取大肠杆菌BL21 (DE3) 基因组DNA,并以此为模板,设计醇脱氢酶编码基因adhE上下游同源臂的引物adhE-Up-F、adhE-Up-R、adhE-Up-Down-F和adhE-Down-R进行PCR,得到醇脱氢酶编码基因adhE线性同源重组片段,其核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。引物adhE-Up-F、adhE-Up-R、adhE-Up-Down-F和adhE-Down-R的序列分别如SEQ ID NO.5~8所示。具体如下:

[0047] adhE-Up-F:AAAGCAAGCATGGTGCTGCG

[0048] adhE-Up-R:TCAGTAGCGCTGTCTGGCAA

[0049] adhE-Up-Down-F:

TTGCCAGACAGCGCTACTGAAGCCATAATGCTCTCCTGATAATG

[0050] adhE-Down-R:GGTCTGAATCACGGTTAGCTCC。

[0051] 选择醇脱氢酶编码基因adhE上一段长度为20bp的序列设计SgRNA-adhE的引物Sg-F和adhE-Sg-R,引物序列如SEQ ID NO.9~10所示。以pTarget质粒为模板,进行PCR,得到SgRNA-adhE线性化质粒片段,胶回收纯化线性化质粒片段,经DNA连接酶连接后得到连接反

应产物,将连接产物转入E.coli DH5 $\alpha$ 感受态细胞,通过壮观霉素抗性平板筛选得到转化子;将转化子转接入含有壮观霉素抗性的5mL LB培养基中37 $^{\circ}$ C过夜培养,收集菌体用于SgRNA-adhE质粒的抽提。引物Sg-F和adhE-Sg-R的序列具体如下:

[0052] adhE-Sg-R:

ATCTGAGTTCTCTGATGGTCGTTTTAGAGCTAGAAATAGCAAGTT

[0053] Sg-F:ACTAGTATTATACCTAGGACTGAG。

[0054] 以实验室保藏的大肠杆菌BL21 (DE3) 为出发菌株,将携带Cas9基因的pCas质粒转入到大肠杆菌中,在卡那霉素抗性平板培养基中筛选得到转化子;将转化子转接入含有卡那霉素抗性的5mL LB培养基中30 $^{\circ}$ C过夜培养;按1%的接种量接入到相同的LB培养基中,并加入终浓度为10mmol/L的L-阿拉伯糖为诱导剂,30 $^{\circ}$ C培养3h至OD600=0.5时收集菌体用于制备电转感受态。

[0055] 将PCR获得的adhE线性同源重组片段及SgRNA-adhE质粒一起电转入BL21 (DE3) / pCas9感受态中,经30 $^{\circ}$ C培养活化1h后,涂布于含卡那霉素和壮观霉素抗性的LB平板,置于30 $^{\circ}$ C培养36h,挑选转化子,用引物adhE-Up-F和adhE-Down-R进行菌落PCR验证并对PCR产物进行测序,验证确定目标基因已经发生正确的缺失。因为SgRNA-adhE质粒包含抗壮观霉素基因,在无壮观霉素的培养基中培养时,大肠杆菌中的SgRNA-adhE质粒丢失。而pCas9质粒是温敏型复制子,在37 $^{\circ}$ C下复制被抑制并且会在穿戴过程中丢失,结合7 $^{\circ}$ C培养及抗生素抗性负筛,将敲除adhE基因的大肠杆菌中的SgRNA-adhE质粒和pCas9质粒丢失。如图2所示,M为2K PlusII DNA Marker;1代表用验证引物adhE-Up-F和adhE-Down-R对大肠杆菌BL21 (DE3) 进行菌落PCR电泳条带;2代表用验证引物adhE-Up-F和adhE-Down-R对大肠杆菌BL21 (DE3)  $\Delta$  adhE进行菌落PCR电泳条带。由图2可知,目标基因adhE已经发生正确的缺失。

[0056] 实施例2

[0057] 本实施例说明烯键还原酶HP3和葡萄糖脱氢酶GDH表达载体的构建方法

[0058] 从实验室保藏的枯草芽孢杆菌168 (*Bacillus subtilis* 168) 中提取基因组DNA,并以此为模板,设计葡萄糖脱氢酶GDH的引物GDH-F和GDH-R,引物序列如SEQ ID NO.11~12所示。使用高保真聚合酶PrimeSTAR $^{\circ}$ Max进行聚合酶链式反应。PCR程序为:98 $^{\circ}$ C变性10秒,55 $^{\circ}$ C退火5秒,72 $^{\circ}$ C延伸8秒,30个循环。引物GDH-F和GDH-R的序列如下所示:

[0059] GDH-F:CGCGGATCCATGTATCCGGATTTAAAAGGAA

[0060] GDH-R:ACGCGTCGACTTAACCGCGCCTGCCTG。

[0061] 切胶回收上述PCR产物,使用限制性内切酶BamH I和Sal I双酶切葡萄糖脱氢酶GDH基因的DNA片段和pET28a质粒,得到酶切后的葡萄糖脱氢酶GDH基因片段和载体大片段;将酶切后的葡萄糖脱氢酶GDH基因片段和载体大片段用T4 DNA聚合酶连接,转化至大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态,在卡那霉素抗性平板培养基中筛选得到含有重组质粒的转化子;将转化子转接入含有卡那霉素抗性的5mL LB培养基中37 $^{\circ}$ C过夜培养,提取质粒并将其送测序,将结果正确的质粒命名为pET28a-GDH。

[0062] 从实验室保藏的热带假丝酵母ATCC 20615中提取基因组DNA,以此为模板,并设计烯键还原酶基因HP3的引物HP3-F和HP3-R,引物序列如SEQ ID NO.13~14所示。使用高保真聚合酶PrimeSTAR $^{\circ}$ Max进行PCR。PCR程序为:98 $^{\circ}$ C变性10秒,55 $^{\circ}$ C退火5秒,72 $^{\circ}$ C延伸10秒,30个循环。引物HP3-F和HP3-R的序列具体如下所示:

[0063] HP3-F:TCCGAGCTCATGACAATCTCTAAAGAAAC

[0064] HP3-R:CCCAAGCTTCTAAGCTAATGGCTTTCCAA。

[0065] 切胶回收上述PCR产物,使用限制性内切酶Sac I和Hind III双酶切烯键还原酶HP3基因的DNA片段和pET21a质粒,得到酶切后的烯键还原酶HP3基因片段和载体大片段;将酶切后的烯键还原酶HP3基因片段和载体大片段用T4 DNA聚合酶连接,转化至大肠杆菌BL21 (DE3)感受态,在氨苄青霉素抗性平板培养基中筛选得到含有重组质粒的转化子;将转化子转接入含有氨苄青霉素抗性的5mL LB培养基中37℃过夜培养,提取质粒并将其送测序,将结果正确的质粒命名为pET21a-HP3。

[0066] 实施例3

[0067] 本实施例说明菌株BL21 (DE3)  $\Delta$  adhE/pET21a-HP3/pET28a-GDH的构建和培养方法。

[0068] 将实施例2中构建成功的pET21a-HP3和pET28a-GDH质粒电转入实施例1中的基因敲除菌大肠杆菌BL21 (DE3)  $\Delta$  adhE中,得到大肠杆菌工程菌株BL21 (DE3)  $\Delta$  adhE/pET21a-HP3/pET28a-GDH。

[0069] 将上述大肠杆菌工程菌株在含有50 $\mu$ g/mL卡那霉素和100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB平板上划线,37℃培养过夜,挑取单菌落接种至有50 $\mu$ g/mL卡那霉素和100 $\mu$ g/mL氨苄青霉素的LB试管中,37℃培养10h,按1-2% (v/v)的接种量接入到400mL LB培养基中,37℃培养至OD600=0.8时,加入终浓度为0.2mM的IPTG,再置于20℃、180rpm下继续诱导12h。

[0070] 实施例4

[0071] 本实施例说明菌株BL21 (DE3)  $\Delta$  adhE/pET21a-HP3/pET28a-GDH全细胞催化剂的制备。

[0072] 用实施例3中诱导所得大肠杆菌工程菌经离心后收集菌体,用0.9%生理盐水重悬后,再次离心收集菌体,再重复一次,以充分去除菌体中的培养基成分。所收集的菌体经-80℃预冷后,置于真空冷冻干燥机中冻干,所得冻干菌粉即可用做催化柠檬醛合成(R)-柠檬醛的全细胞催化剂。

[0073] 实施例5

[0074] 本实施例说明菌株BL21 (DE3)  $\Delta$  adhE/pET21a-HP3/pET28a-GDH催化柠檬醛合成(R)-柠檬醛的能力。

[0075] 底物的配制:称取45.67g柠檬醛置于100mL容量瓶中,加入正己烷定容至100mL,配得3mol/L柠檬醛溶液。

[0076] 用实施例4中的冻干菌粉作为生物催化剂催化柠檬醛的转化。于100mL圆底烧瓶中加入4.67mL含有3mol/L柠檬醛的正己烷溶液、5.13mL含有3mol/L葡萄糖的水溶液和0.2mL的20mM的NAD<sup>+</sup>水溶液,再加入10mL的200mM、pH 8.0的磷酸盐缓冲液,再添加实施例3中获得的冻干菌粉1.5g,于30℃、200rpm下反应24h。反应过程中间隔一段时间取样,反应样品用等体积乙酸乙酯萃取两次,合并有机相,用气相色谱(GC)检测柠檬醛的转化率及(R)-香茅醛的产率及ee值。标准品的气相图谱如图3所示,其中A为(S)-香茅醛,B为(R)-香茅醛,C为顺式柠檬醛,D为反式柠檬醛。菌株BL21 (DE3)  $\Delta$  adhE/pET21a-HP3/pET28a-GDH催化柠檬醛的反应过程曲线如图4所示。

[0077] 经气相色谱检测,在反应20h后柠檬醛的转化率达到100%,(R)-香茅醛的产率达

到93.1%，且产物ee值达到95.4%。

[0078] 以上所述的，仅为本发明的较佳实施例，并非用以限定本发明的范围，本发明的上述实施例还可以做出各种变化。凡是依据本发明申请的权利要求书及说明书内容所作的简单、等效变化与修饰，皆落入本发明专利的权利要求保护范围。本发明未详尽描述的均为常规技术内容。

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 华东理工大学

&lt;120&gt; 一种大肠杆菌基因工程菌、构建方法以及全细胞催化生产(R)-香茅醛的方法

&lt;160&gt; 14

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2676

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Escherichia coli BL21 (DE3)

&lt;400&gt; 1

```
atggctgtta ctaatgtcgc tgaacttaac gactcgtag agcgtgtaa aaaagcccag 60
cgtgaatatg ccagtttcac tcaagagcaa gtagacaaa tcttccgcgc cgccgctctg 120
gctgctgcag atgctcgaat cccaactcgcg aaaatggccg ttgccgaatc cggcatgggt 180
atcgtcgaag ataaagtgat caaaaaccac tttgcttctg aatatatcta caacgcctat 240
aaagatgaaa aaacctgtgg tgttctgtct gaagacgaca cttttggtac catcactatc 300
gctgaaccaa tcggtattat ttgcggtatc gttccgacca ctaacccgac ttcaactgct 360
atcttcaaat cgctgatcag tctgaagacc cgtaacgcca ttatcttctc cccgcacccg 420
cgtgcaaaaag atgccaccaa caaagcggct gatatcgttc tgcaggctgc tategctgcc 480
gggtctccga aagatctgat cggctggatc gatcaacctt ctgttgaact gtctaacgca 540
ctgatgcacc acccagacat caacctgatc ctccgcactg gtggtccggg catggttaaa 600
gccgcataca gctccggtaa accagctatc ggtgtaggcg cgggcaacac tccagttggt 660
atcgatgaaa ctgctgatat caaacgtgca gttgcatctg tactgatgtc caaaccttc 720
gacaacggcg taatctgtgc ttctgaacag tctgttgttg ttgttgactc tgtttatgac 780
gctgtacgtg aacgttttgc aaccacggc ggctatctgt tgcagggtaa agagctgaaa 840
gctgttcagg atgttatcct gaaaaacggt gcgctgaacg cggctatcgt tggtcagcca 900
gcctataaaa ttgctgaact ggcaggcttc tctgtaccag aaaacaccaa gattctgatc 960
ggatgaagtga ccgttgttga tgaaagcga cggttcgac atgaaaaact gtccccgact 1020
ctggcaatgt accgcgctaa agatttcgaa gacgcggtag aaaaagcaga gaaactgggt 1080
gctatgggcg gtatcggtea tacctcttgc ctgtacactg accaggataa ccaaccggct 1140
cgcgtttctt acttcggtea gaaaatgaaa acggcgcgta tcttgattaa caccacggcg 1200
tctcagggtg gtatcggtea cctgtataac ttcaaactcg caccttcctt gactctgggt 1260
tgtggttctt ggggtggtaa ctccatctct gaaaacgttg gtccgaaaca cctgatcaac 1320
aagaaaaccg ttgctaagcg agctgaaaac atgttgtggc acaaacttc gaaatctatc 1380
tacttccgcc gtggtccct gccaatcgcg ctggatgaag tgattactga tggccacaaa 1440
cgtgcgctca tcgtgactga ccgcttctct ttcaacaatg gttatgctga tcagatcact 1500
tccgtactga aagcagcagg cgttgaaact gaagtcttct tcgaagtaga agcggacccg 1560
accctgagca tcgttcgtaa aggtgcagaa ctggcaaact cttcaaac agacgtgatt 1620
atcgcgctgg gtggtggttc cccgatggac gccgcgaaga tcatgtgggt tatgtacgaa 1680
```

catccgaaa ctcaactcga agagctggcg ctgcgcttta tggatatccg taaacgtatc 1740  
 tacaagttcc cgaaaatggg cgtgaaagcg aaaatgatcg ctgtcaccac cacttctggt 1800  
 acaggttctg aagtcactcc gtttgcggtt gtaactgacg acgctactgg tcagaaatat 1860  
 ccgctggcag actatgcgct gactccggat atggcgattg tcgacgcaa cctggttatg 1920  
 gacatgccga agtccctgtg tgctttcggg ggtctggacg cagtaactca cgccatggaa 1980  
 gcttatgttt ctgtactggc atctgagttc tctgatggtc aggctctgca ggcaactgaa 2040  
 ctgctgaaaag aatatctgcc agcgtcctac cacgaagggt ctaaaaatcc ggtagcgcgt 2100  
 gaacgtgttc acagtgcagc gactatcgcg ggtatcgcg ttgcgaacgc cttcctgggt 2160  
 gtatgtcact caatggcgca caaactgggt tcccagttcc atattccgca cggctctggca 2220  
 aacgccctgc tgatttgtaa cgttattcgc tacaatgcga acgacaacc gaccaagcag 2280  
 actgcattca gccagtatga ccgtccgcag gctcgcctc gttatgctga aattgccgac 2340  
 cacttgggtc tgagcgcacc gggcgaccgt actgctgcta agatcgagaa actgctggca 2400  
 tggtctgaaa cgctgaaagc tgaactgggt attccgaaat ctatccgtga agctggcggt 2460  
 caggaagcag acttctctggc gaacgtggat aaactgtctg aagatgcatt cgatgaccag 2520  
 tgcaccggcg ctaaccgcg ttaccgcgtg atctccgagc tgaaacagat cctgctggat 2580  
 acctactacg gtcgtgatta tgtagaaggt gaaactgcag cgaaaaaaga agccgctccg 2640  
 gctaaagctg agaaaaaagc gaaaaaatcc gcttaa 2676

<210> 2

<211> 786

<212> DNA

<213> *Bacillus subtilis*

<400> 2

atgtatccgg atttaaaagg aaaagtcgtc gctattacag gagctgcttc agggctcggg 60  
 aaggcgatgg ccattcgctt cggcaaggag caggcaaaag tggttatcaa ctattatagt 120  
 aataaacaag atccgaacga ggtaaaagaa gaggtcatca aggcgggagg tgaagctggt 180  
 gtcgtccaag gagatgtcac gaaagaggaa gatgtaaaaa atatcgtgca aacggcaatt 240  
 aaggagtctg gcacactcga tattatgatt aataatgccg gtcttgaaaa tcctgtgcca 300  
 tctcacgaaa tgccgctcaa ggattgggat aaagtcctcg gcacgaactt aacgggtgcc 360  
 tttttaggaa gccgtgaagc gattaaatat ttcgtagaaa acgatatcaa gggaaatgtc 420  
 attaacatgt ccagtgtgca cgaagtgatt ctttgccgt tatttgtcca ctatgcggca 480  
 agtaaaggcg ggataaagct gatgacagaa acattagcgt tggaatacgc gccgaagggc 540  
 attcgcgtca ataataattg gccaggtgcg atcaacacgc caatcaatgc tgaaaaattc 600  
 gctgacccta aacagaaaagc tgatgtagaa agcatgattc caatgggata tatcgcgcaa 660  
 ccggaggaga tcgccgcagt agcagcctgg cttgcttcga aggaagccag ctacgtcaca 720  
 ggcatcacgt tattcgcgga cggcggtatg acacaatct cttcattcca ggcaggccgc 780  
 ggttaa 786

<210> 3

<211> 1209

<212> DNA

<213> *Candida tropicalis*

<400> 3

```

atgacaatct ctaaagaaac agtcccaatt actccattag gtaatacatt actttttgaa 60
ccaatcaaag taggtgcca cactttacca caaagaattg cttttgctcc ttcaactcgt 120
tgccgtgcca cagctgataa tataccaaca gatttacaat tgcaatatta tgatgaaaga 180
tccaaatatc cagg tacttt aattatcact gaagctactt atttatctga acaaggtggt 240
ttaaaccac atgtaccggg tatattcaat aaaagacaag ttgaaggatg gaagaaaatc 300
aacgatgcta ttcattgctaa caatagtttc agttctattc aattatggta tttgggacgt 360
gtagctaatg cacaacactt gaaaaacaaa ggattacctt acattgcacc atctggagtt 420
tattggaatg aagaaactga agccattgct gaacaagctg gaaaccatt acgtgcttta 480
actattgaag aaattgatca tattgttgat gttgaatttc ctaacgccgc aagaaattcc 540
cttgaagctg gttttgatta tgttgaagtt cactcagcac atggatactt attggatcaa 600
tttttgaaata ctgcttcaaa taagagaact gatgaatag gtggtagtat tgaaaaccgt 660
gctcgtttgt tgttacgtat tattgataaa ttgattccaa ttgttggagc tgatagatta 720
gctgtcagat tatcaccatg ggctaaattc caaacgctg atactgaagg tgaagaaatc 780
catagttata ttttgaacga attacaaaa agagctgatg aaggaaatca attagcttat 840
atttcattag ttgaaccaag agttcaagca agttgggata tcgaagagga taaacaagtt 900
ggatccaatg attttactta caaacattgg aaaggtaact ttattagagc tggctacttat 960
gctcatgaat tagataaaat tgatcaagat attgataatg gaagaacatt acttgctttt 1020
tctagatttt tcctttccaa tcctgatttg attgaaaagt taaaggacgg aattccttta 1080
actcaatatg aaagacctac tttttatact caagacaatt ttggttataa tacctggcca 1140
agaaatggag aactgatctc atttgatgaa gaaacagaaa aggcaagagt tggaaagcca 1200
ttagcttag 1209

```

<210> 4

<211> 878

<212> DNA

<213> *E.coli* BL21 (DE3) Strain

<400> 4

```

aaagcaagca tgggtctgcg tcttgatcaa gcaggcagac cttataacga aggtgagcag 60
gtggttattg gtgtaatga acgatacgtt tctgtatgcc gtaaacta taaagaggcg 120
ttacaagtcg gctcattaac ggctattcag gaaaggcatc gccacgatta ataagaattt 180
ctttactgac agggtgagca gggcgctttt atctgtcag ttcgttttac tcaacttctc 240
cgggctatac acccttctcg gcagttttt aacgccgcta tacgcctcac aggacgctta 300
agcaccgacg ttgacttgtg acctgtaaag tacaatatec ctgtgttttag gcgttataca 360
tcgtcgcaaa tatgatgaag gctaatgctg tcggtttatg gaaaagttgc tttgggtaaa 420
caaaaaaacg gccccagaag gggccgttta tattgccaga cagcgtact gaagccataa 480
tgctctcctg ataagttaa acttttttag taaatcatct gctcgaatac gagagtatag 540
tcagtgcggt gatgatttgc ttaacctatg aaaatcaaaa gcttactcgc gctcacactc 600
actgtgattt actaaaagag tttaaacatt agagttatta tctctaatgc gtcacttcca 660

```

ggtggcgtaa gcaagattac tcacttctgg gtactgatta cgtgatccaa atcaaatttt 720  
tgcaaagctg acacctttca gcatcgcttt tcgccattat agctaacagt taataaattg 780  
tagtatgatt tgggtggctac attagcatgt tttgcacaac tagataacaa taacgaatga 840  
tagcaatttt aagtagttag gaggtgaaaa atgctgtc 878

<210> 5

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

aaagcaagca tgggtgctgcg 20

<210> 6

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

tcagtagcgc tgtctggcaa 20

<210> 7

<211> 44

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

ttgccagaca gcgctactga agccataatg ctctctgat aatg 44

<210> 8

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

ggtctgaatc acggttagct cc 22

<210> 9

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

atctgagttc tctgatggtc gttttagagc tagaaatagc aagtt 45

<210> 10

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

actagtatta tacctaggac tgag 24  
<210> 11  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 11  
cgcggatcca tgtatccgga tttaaaagga a 31  
<210> 12  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 12  
acgcgtcgac ttaaccgagg cctgctg 28  
<210> 13  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 13  
tccgagctca tgacaatctc taaagaaac 29  
<210> 14  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 14  
cccaagcttc taagctaatg gctttccaa 29

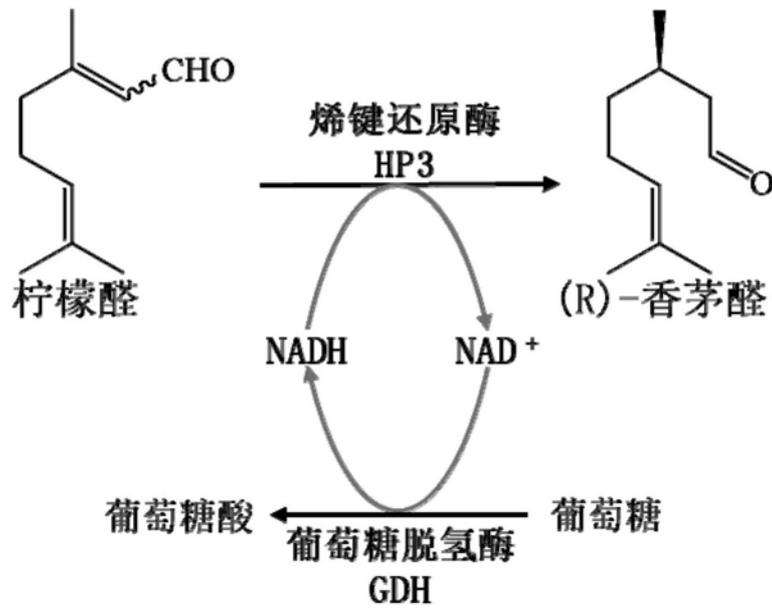


图1

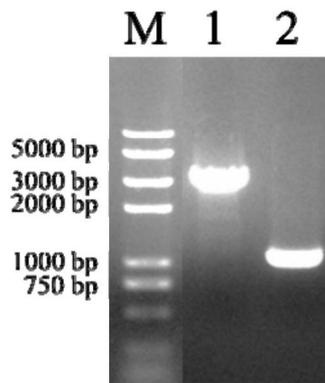


图2

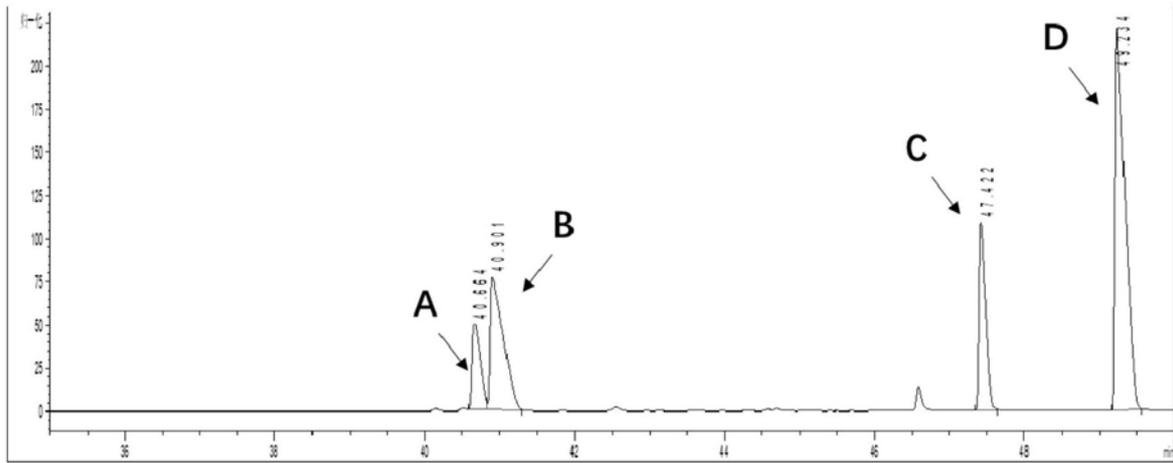


图3

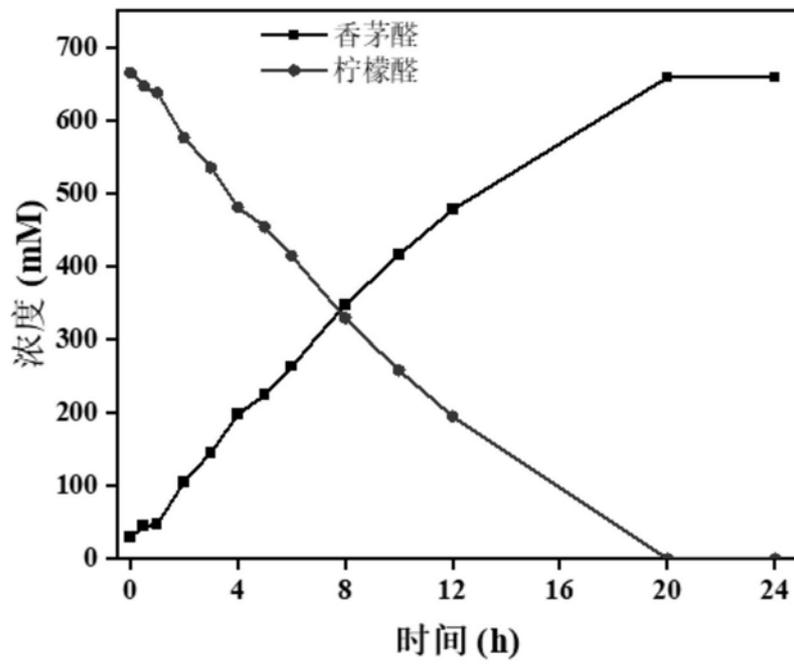


图4