



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103525744 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 22

(21) 申请号 201310284366. 1

C12R 1/19 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 07. 07

C12R 1/01 (2006. 01)

(83) 生物保藏信息

CCTCC No. M2013301 2013. 06. 28

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800 号

(72) 发明人 常明 余榛榛 刘睿杰 金青哲

王兴国 刘元法

(74) 专利代理机构 无锡互维知识产权代理有限

公司 32236

代理人 王爱伟

(51) Int. Cl.

C12N 1/21 (2006. 01)

C12N 15/70 (2006. 01)

C12N 9/16 (2006. 01)

C11B 3/00 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书8页

序列表2页

(54) 发明名称

一种重组大肠杆菌及制备磷脂酶 C 的方法和
应用

(57) 摘要

本发明公开了一种重组大肠杆菌及制备磷脂酶 C 的方法和应用,其利用的目的基因来源于单核细胞增多性李斯特菌(*L. monocytogenes*)的重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L. m-PLC 作为发酵菌株进行液体发酵来制备磷脂酶 C,制酶工艺简单,生产周期短,成本低。并利用该重组磷脂酶 C 可特异性水解甘油磷脂 C3 位上甘油磷酸酯键生产 DAG,用其对植物毛油(大豆油、菜籽油、米糠油等)进行脱胶。

1. 一种重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L.m-PLC, 保藏编号为 CCTCC No. M2013301。
2. 根据权利要求 1 所述重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L.m-PLC, CCTCC No. M2013301, 其特征在于: 由下述方法制得:
 - (1) 以保藏编号为 CICC No. 21540 的单核细胞增多性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 的基因组为模板, 克隆得到磷脂酶 C 基因, 其碱基序列如 SEQ ID NO:1 所示;
 - (2) 将步骤(1)所得磷脂酶 C 基因克隆到表达载体 pET-28a (+) 上, 得到重组载体;
 - (3) 将步骤(2)所得重组载体转化大肠杆菌感受态细胞, 构建得到重组大肠杆菌。
3. 用权利要求 1 或 2 所述重组大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET-lm-plc, CCTCC No. M2013301 制备磷脂酶 C 的方法, 其特征在于: 以该重组大肠杆菌为发酵菌株进行液体发酵, 制备磷脂酶 C。
 4. 根据权利要求 3 所述制备磷脂酶 C 的方法, 其特征在于: 包括,
 - (1) 种子培养: 将所述重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L.m-PLC, CCTCC No. M2013301 接种于种子培养基中, 于 28°C ~ 37°C 振荡培养 6h ~ 14h, 摇床转速 150 ~ 220r/min;
 - (2) 液体发酵培养: 将经过步骤(1) 培养所得活化种子液按体积百分比 1 ~ 10% 的接种量接种至发酵培养基, 于 28 ~ 37°C 振荡培养 4h ~ 6h 小时, 摇床转速 150 ~ 220r/min; 再添加乳糖, 于 18°C ~ 32°C 振荡诱导培养 10 ~ 25h, 摇床转速 150 ~ 220r/min; 最后添加甘氨酸, 于相同条件下继续振荡诱导培养 20 ~ 40h, 发酵完毕, 得到发酵液;
 - (3) 粗酶液的提取: 将步骤(2)所得发酵液离心; 收集上清液, 即为胞外粗酶液; 收集菌体细胞沉淀用 Tris-HCl 重悬后超声破碎, 将所得超声破碎液离心, 收集上清, 即为胞内粗酶液。
 5. 根据权利要求 4 所述制备磷脂酶 C 的方法, 其特征在于: 步骤(1)所述种子培养基成分按克 / 升计为: 蛋白胨 8 ~ 12g, 酵母粉 3 ~ 10g, NaCl 8 ~ 12g, 其余成分为水, pH7.2 ~ 7.6。
 6. 根据权利要求 4 所述制备磷脂酶 C 的方法, 其特征在于: 步骤(2)所述发酵培养基成分按克 / 升计为: 蛋白胨 8 ~ 12g, 酵母粉 5 ~ 25g, 甘油 0 ~ 6g, 其余成分为 0.25mol/L Tris-HCl (pH7.2)。
 7. 根据权利要求 4 所述制备磷脂酶 C 的方法, 其特征在于: 步骤(2)所述乳糖的添加量为每升所述发酵培养基 1 ~ 10g。
 8. 根据权利要求 4 所述制备磷脂酶 C 的方法, 其特征在于: 步骤(2)所述甘氨酸的添加量为每升所述发酵培养基 0 ~ 5g。
 9. 一种植物毛油脱胶的方法, 其特征在于: 包括,
 - 植物毛油的预热和酸预处理;
 - 加入如权利要求 3 所述的磷脂酶 C 进行反应;
 - 灭酶, 离心分离完成脱胶。
 10. 根据权利要求 9 所述植物毛油脱胶的方法, 其特征在于: 具体步骤如下:
 - (1) 将植物毛油于具塞三角烧瓶中水浴加热到 60 ~ 80°C, 加入质量为总毛油质量 0.5% 的质量浓度为 25% ~ 50% 柠檬酸溶液, 在 300 ~ 500r/min 搅拌条件下进行 15 ~ 25min 的酸预处理。
 - (2) 将经过酸预处理的油样冷却到 40 ~ 60°C, 加入一定量的 4%NaOH 溶液混合均匀来

调节 pH 至 4 ~ 7。

(3) 再加入油重 1% ~ 3% 的蒸馏水, 和 400 ~ 2000U/Kg 的所述磷脂酶 C, 均匀混合, 在 40°C ~ 75°C 下 300r/min ~ 500r/min 搅拌 1 ~ 2h, 进行酶反应。

(4) 将反应体系升温至 90°C 以上进行灭酶 10min, 在 8000 ~ 10000r/min 进行 10min 离心分离, 即完成所述磷脂酶 C 对植物毛油的催化脱胶。

一种重组大肠杆菌及制备磷脂酶 C 的方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种来源于单核细胞增多性李斯特菌的磷脂酶 C 的生产方法及其在油脂脱胶工业方面的应用,属于酶基因工程和酶工程领域。

背景技术

[0002] 单核细胞增多性李斯特菌 (*L. monocytogenes*), 是一种重要的食源性致病菌, 生长温度范围为 -1.5°C -45°C , 最适温度为 30°C -37°C 。单增李斯特氏菌为典型的耐冷性细菌能在普通冰箱的冷藏室生长繁殖, -20°C 低温仍可部分存活, 且含有单增李斯特菌的食品冷藏时间越长, 其危险性越大; 且具较强耐热能力, 牛奶巴氏消毒温度不能将其杀死。兼性厌氧, 常在含有 CO_2 的微需氧环境中生长; 对营养要求不高, 能在物体表面形成生物膜对抗菌物质有抵抗作用, 还可耐酸, 可抵抗反复冻溶, 抗干燥, 具有耐盐性。单增李斯特氏菌可以在野生动物、家畜、鸟类、昆虫、污水、土壤和植物中生长, 因此, 常能在牛、羊、家禽中检测到单增李斯特氏菌, 乳制品、水果、蔬菜、熟肉制品、海产品中也常有不同程度的污染。临床显示, 感染李斯特氏菌病包括流产、败血症、脑膜炎等, 症状类似流感, 并且常伴有发热肠胃炎综合征。

[0003] 单增李斯特氏菌可产生两种磷脂酶 C (PLC): 磷脂酰肌醇磷脂酶 (phosphatidylinositol phospholipase C, PI-PLC) 和磷脂酰胆碱磷脂酶 C (phosphatidylcholin phospholipase C, PC-PLC)。前者由 *plcA* 基因编码, 后者由 *plcB* 基因编码。*plcA* 基因和 *plcB* 基因均是单增李斯特氏菌胞内寄生生命周期有关的毒力岛 1 (LIPI-1) 的重要基因成分。

[0004] PLC 主要作用于甘油磷脂 C3 位上甘油磷酸酯键, 水解产物为甘油二酯 (DAG) 及磷脂酸化合物 (磷酸胆碱、磷酸乙醇胺、磷酸丝氨酸以及磷酸肌醇等), 在医药行业一直具有重要应用。而目前因水解产物 DAG 可与甘油三酯 (TAG) 共同成为油的一个成分不需被除去, 而引起油脂行业的关注, 被越来越多的作为一种新兴的酶法脱胶用磷脂酶在油脂脱胶工艺中使用。PLC 酶法脱胶具有适用性广, 反应条件温和, 生产中节省酸碱化学品的消耗, 几乎不产生皂脚和废水等, 经济效益明显增长等一般酶法脱胶的共同优点, 但相较于其他的酶法脱胶, 如磷脂酶 A (PLA) 酶法脱胶, PLC 酶法脱胶不仅能大大缩短脱胶时间, 还能够有效提高毛油得率, 降低毛油损耗, 通常每 500ppm 磷就可以提高约 1% 的油产量, 这一特点在粮食价格持续上涨的今天显得尤为重要。

[0005] 国外对脱胶用磷脂酶 C 的研究起步较早。1988 年, Graillie 等提出用 PLC 处理油脂, 将磷脂转化成 DAG, 不仅不会将 TAG 成分带走, 还能产生部分“油”, 减少油脂在精炼过程中的损失。Graillie 等还进一步研究利用蜡状芽孢杆菌制备 PLC 酶制剂, 但由于当时制备成本的限制, 忽视了 PLC 潜在的商业价值。2005 年, S. 格拉马蒂科瓦用 Mut⁺ 表型的毕赤酵母菌株表达异源 PLC, 用于处理油脂, 可将毛油中的磷脂残留量降低至 10ppm 以下。但鉴于大多数 PLC 属于磷脂酰胆碱专一性磷脂酶 C (PC-PLC), 对磷脂酶胆碱 (PC) 和磷脂酰乙醇胺 (PE) 具有较高的特异性, 而对磷脂酰肌醇 (PI) 活性较低, 只用 PC-PLC 脱胶不能完全

除去毛油中的磷,因此 Gramatikova 在 2005 年首次提出将 PLC 和 PLA 联合使用进行油脂脱胶。2006 年,长崎咏子等利用溜曲霉 IAM13907 株和米曲霉 NBRC4190 株纯化得到一种新型 PLC,相对分子量约为 87kDa,在 0-80℃ 范围内较稳定,被广泛用于食品和化妆品行业。2007 年,Verenium 公司在 AOCS 年会上推出了 Purifine® (PLC),已经成为目前工艺最成熟的脱胶用 PLC 产品。PLC (BD16449) 是 Vince Ciofalo 利用毕赤酵母 SMD1168 重组表达的一种分子量约为 34kDa 的糖基化蛋白酶,安全性高,被应用于植物油脱胶。2008 年,C. L. g. 戴顿等在 Gramatikova 的研究基础上,综合考虑 PLA 和 PLC 的优缺点,发明了 PC-PLC/PI-PLC 与 PLA1/PLA2 的混合制剂,用以去除植物油中的磷脂。研究表明,复合制剂的酶促反应速度明显优于单独使用,可以将残磷含量降至 3ppm 以下,从而避免了其他辅助脱胶工序,节省了大量的化学试剂和水。Danisco 也通过 LysoMax® (LAT)和 PLC 的复合制剂对胶质进行处理,显著减少了毛油的炼耗率。

[0006] 国内油脂脱胶用 PLC 的研究尚处于起步阶段。武汉病毒研究所陈涛团队一直致力于微生物 PLC 的研究,李彩凤和詹逸舒分别筛选了产 PLC 的哈维氏弧菌和蜡状芽孢杆菌,刘菲菲利用大肠杆菌和毕赤酵母重组表达了蜡状芽孢杆菌 PLC,赵金星利用大肠杆菌重组表达了铜绿假单胞菌 PLC,但其所制备的 PLC 均未应用于油脂脱胶。2003 年,孙春来从粘质沙雷氏菌发酵上清液中分离纯化得到一种 PLC。2006 年,孟庆飞利用该酶对大豆油进行脱胶,使得毛油中磷脂的水解率达到 85.7%,精炼率提高了 3.08%。杨娇使用 PLC 用于大豆毛油脱胶,将残磷量降低到 17.8ppm。2012 年,于殿宇等利用海藻酸钠和壳聚糖固定 PLC 进行大豆毛油脱胶,将磷含量降至 3.8ppm。2013 年,刘露等利用 PLC 进行菜籽毛油脱胶,将磷含量降至 4.3ppm。

[0007] 虽然 PLC 酶法脱胶技术在油脂行业的应用起步相对较晚,但近年来发展十分迅速。因此研制出具有我国自主知识产权,低价、优质、通用性强的酶法脱胶用 PLC 具有非常重要的现实意义。

发明内容

[0008] 鉴于上述和 / 或现有酶基因工程和酶工程领域中存在的问题,提出了本发明。

[0009] 因此,本发明其中一个目的是提供一种重组大肠杆菌。

[0010] 为解决上述技术问题,根据本发明的一个方面,本发明提供了如下技术方案:一种重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L. m-PLC,保藏编号为 CCTCC No. M2013301。

[0011] 作为本发明所述重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L. m-PLC 的一种构建方案,其中:由下述方法制得:

[0012] (1) 以保藏编号为 CICC No. 21540 的单核细胞增多性李斯特菌 (*L. monocytogenes*) 的基因组为模板,克隆得到磷脂酶 C 基因,其碱基序列如 SEQ ID NO:1 所示;

[0013] (2) 将步骤(1)所得磷脂酶 C 基因克隆到表达载体 pET-28a (+) 上,得到重组载体;

[0014] (3) 将步骤(2)所得重组载体转化大肠杆菌感受态细胞,构建得到重组大肠杆菌。

[0015] 本发明所提供的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) BL21 (DE3)-pET28a-L. m-PLC,已于 2013 年 6 月 28 日保藏于中国典型培养物保藏中心 (CCTCC),保藏编号: CCTCC

No. M2013301, 地址:中国,武汉,武汉大学。该菌株以下简称:大肠杆菌(*Escherichia coli*) BL21 (DE3)-pET28a-L. m-PLC。

[0016] 本发明的另一个目的是提供一种利用重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L. m-PLC 作为发酵菌株进行液体发酵来制备磷脂酶 C 的方法,其制酶工艺简单,生产周期短,成本低,在植物毛油脱胶方面具有一定的应用前景。

[0017] 作为本发明所述制备磷脂酶 C 的方法的一种优选方案,其中:包括,

[0018] (1)种子培养:将所述重组大肠杆菌 BL21(DE3)/pET-lm-plc, CCTCC No. M2013301 接种于种子培养基中,于 28℃~37℃ 振荡培养 6h~14h,摇床转速 150r/min~220r/min;

[0019] (2)液体发酵培养:将经过步骤(1)培养所得活化种子液按体积百分比 1~10% 的接种量接种至发酵培养基,于 28~37℃ 振荡培养 4h~6h 小时,摇床转速 150~220r/min;再添加乳糖,于 18℃~32℃ 振荡诱导培养 10~25h,摇床转速 150~220r/min;最后添加甘氨酸,于相同条件下继续振荡诱导培养 20~40h,发酵完毕,得到发酵液;

[0020] (3)粗酶液的提取:将步骤(2)所得发酵液离心;收集上清液,即为胞外粗酶液;收集菌体细胞沉淀用 Tris-HCl 重悬后超声破碎,将所得超声破碎液离心,收集上清,即为胞内粗酶液。

[0021] 作为本发明所述制备磷脂酶 C 的方法的一种优选方案,其中:步骤(1)所述种子培养基成分按克/升计为:蛋白胨 8~12g,酵母粉 3~10g, NaCl 8~12g,其余成分为水, pH7.2~7.6。

[0022] 作为本发明所述制备磷脂酶 C 的方法的一种优选方案,其中:步骤(2)所述发酵培养基成分按克/升计为:蛋白胨 8~12g,酵母粉 5~25g,甘油 0~6g,其余成分为 0.25mol/L Tris-HCl (pH7.2)。

[0023] 作为本发明所述制备磷脂酶 C 的方法的一种优选方案,其中:步骤(2)所述乳糖的添加量为每升所述发酵培养基 1~10g。

[0024] 作为本发明所述制备磷脂酶 C 的方法的一种优选方案,其中:步骤(2)所述甘氨酸的添加量为每升所述发酵培养基 0~5g。

[0025] 与现有产磷脂酶 C 的野生分离菌株以及基因工程菌株相比,本发明构建了一株目的基因来源于单核细胞增多性李斯特菌(*L. monocytogenes*),可高产磷脂酶 C 的基因工程重组大肠杆菌 BL21 (DE3)/pET-lm-plc CCTCC No. M2013301,利用该菌株通过液体发酵来生产磷脂酶 C,产酶量高,其酶活性最高可达 779.358U/ml,且安全性好;该制酶方法生产工艺简单,生产周期短,成本低,在植物毛油脱胶方面具有一定的应用前景。

[0026] 重组磷脂酶 C 酶活的测定方法如下:

[0027] p-NPPC 法定量测定酶活。p-NPPC 是卵磷脂的一种底物结构类似物,PLC 可水解 p-NPPC 生成对硝基苯酚,对硝基苯酚是一种黄色物质,在 410nm 处有最大吸收峰,利用分光光度法测定发酵液在 410nm 处的吸光值,可反映 PLC 水解 p-NPPC 产生对硝基苯酚的量,根据对硝基苯酚标准曲线可定量计算出相应酶活力大小;酶反应体系组成如下:50mM/L Tris-HCl (pH7.2),10mmol/L NPPC。1mL 反应体系中加入 100 μ L 的发酵液,于 37℃ 反应 30min;酶活力单位定义如下:在 pH7.2,温度为 37℃ 的条件下,每分钟水解 p-NPPC 产生 1nmol 对硝基苯酚所需的酶的量为 1 个酶活力单位(U)。

[0028] 本发明的再一个目的是提供对植物毛油,如大豆油、菜籽油、米糠油等进行脱胶处

理的方法,该方法不仅可有效降低毛油中的磷含量,还可提高成品油中甘油二酯的含量,提高了中性油的得率,节约了成本。

[0029] 根据本发明的再一个方面,本发明提供一种植物毛油脱胶的方法,包括,植物毛油的预热和酸预处理;加入如权利要求3所述的磷脂酶C进行反应;灭酶,离心分离完成脱胶。

[0030] 作为本发明所述植物毛油脱胶的方法的一种优选方案,其中:具体步骤如下:

[0031] (1)将植物毛油于具塞三角烧瓶中水浴加热到60~80℃,加入质量为总毛油质量0.5%的质量浓度为25%~50%柠檬酸溶液,在300~500r/min搅拌条件下进行15~25min的酸预处理。

[0032] (2)将经过酸预处理的油样冷却到40~60℃,加入一定量的4%NaOH溶液混合均匀来调节pH至4~7。

[0033] 油相pH的测定:用50mL离心管取油水混合物40g,在5000r/min条件下离心10min,弃去上层油相,再往沉淀中加入5mL的蒸馏水,充分搅拌混合后再次在5000r/min条件下离心10min,取离心管中水相用pH计测定pH值,经校正后采用。油相pH为5.0左右时的经验校正公式:pH实际=pH测定-0.3。

[0034] (3)再加入油重1%~3%的蒸馏水,和400~2000U/Kg的所述磷脂酶C,均匀混合,在40℃~75℃下300r/min~500r/min搅拌1~2h,进行酶反应。

[0035] (4)将反应体系升温至90℃以上进行灭酶10min,在8000~10000r/min进行10min离心分离,即完成所述磷脂酶C对植物毛油的催化脱胶。

[0036] 利用该重组磷脂酶C对植物毛油,如大豆油、菜籽油、米糠油等进行脱胶处理,不仅可有效降低毛油中的磷含量,还可提高成品油中甘油二酯的含量,提高毛油得率,节约成本,给油脂企业带来了巨大的利益。

具体实施方式

[0037] 在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明,但是本发明还可以采用其他不同于在此描述的其它方式来实施,本领域技术人员可以在不违背本发明内涵的情况下做类似推广,因此本发明不受下面公开的具体实施例的限制。

[0038] 下述实施例中所使用实验材料如下:表达载体pET-28a(+)和大肠杆菌JM109、BL21(DE3)由本实验室保存;单核细胞增多性李斯特菌(*L. monocytogenes*)中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC),保藏编号为:21540,pMD18T-simple Vector、T4DNA连接酶和10×T4连接酶Buffer购自宝生物工程(大连)有限公司;限制性内切酶Not I和EcoR I购自BioLabs。

[0039] 实施例1 磷脂酶C基因的克隆

[0040] 根据NCBI上提供的*L. monocytogenes*的plc基因(YP005964174.1)的序列设计引物,其中,上游引物为:

[0041] 5'-CGGAATTCATGTGTTGTGATGAATACTTACAAA-3' (下划线标示部分表示EcoR I酶切位点);

[0042] 下游引物为:

[0043] 5'-ATGCGGCCGCTTATTCATTTGTTTTTTT-3' (下划线标示部分表示NotI酶切位点)。

[0044] 以保藏编号为 CICC No. 21540 的单核细胞增多性李斯特菌(*L. monocytogenes*) 的基因组 DNA 为模板,运用 PCR 的方法克隆得到溶血性磷脂酶 C 基因,并与载体 pMD18T-simple 连接构建克隆载体 pMD18T-simple-lm-plc,将该克隆载体转化大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* JM109,挑选阳性克隆,测序验证,其碱基序列如 SEQ ID NO:1 所示,结果表明磷脂酶 C 基因克隆成功。

[0045] 实施例 2 重组质粒 pET-L. m-plc 的构建

[0046] 用 EcoR I 和 Not I 对重组载体 pMD18T-simple-lm-plc 和表达载体 pET-28a(+) 进行双酶切,酶切反应体系为 20 μ L:质粒 10 μ L、Buffer32 μ L、Not I 0.5 μ L、EcoR I 0.5 μ L、100**Bsa*0.2 μ L、H206.8 μ L。回收目的基因和载体 DNA,并用 T4DNA 连接酶进行连接,连接反应体系 10 μ L:目的基因 6 μ L、载体 DNA1.2 μ L、10 \times T4 连接酶 Buffer1 μ L、T4DNA 连接酶 1 μ L、H200.8 μ L,于 16 $^{\circ}$ C 反应 12h。

[0047] 将连接产物转化大肠杆菌感受态细胞 *E. coli* JM109,转化方法如下:

[0048] (1) 向已分装的 *E. coli* JM109 感受态细胞(100u1/管)中加入 10u1 上述连接产物并轻轻混匀,冰浴 30min;

[0049] (2) 将上述 EP 管置于 42 $^{\circ}$ C 水浴,精确计时 90s,勿摇动 EP 管;

[0050] (3) 转移 EP 管于冰浴中,冷却 3min;

[0051] (4) 每管加入无菌 TB 培养基 890 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C 摇床,100r/min,复苏 1h;

[0052] (5) 以 8000r/min 的转速离心 2min,吸去 800 μ L 上清培养基,用移液枪轻轻吹吸剩余培养基和细胞,并转移至含终浓度 100 μ g/ml 卡那霉素的 LB 固体平板,涂匀并于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 10 ~ 18h;

[0053] (6) 挑取阳性克隆,并经 Not I 和 EcoR I 双酶切验证重组质粒 pET-L. m-plc。

[0054] (7) 取成功构建的重组质粒 pET-L. m-plc 与等体积的体积分数为 30% 的甘油混匀,于 -80 $^{\circ}$ C 保藏。

[0055] 实施例 3 重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L. m-PLC,保藏编号为 CCTCC No. M2013301 的构建

[0056] 将构建好的重组质粒 pET-L. m-plc 转化大肠杆菌 BL21 (DE3),转化方法如下:

[0057] (1) 向已分装的 *E. coli* BL21 (DE3)100 μ L 感受态细胞(100u1/管)中加入 0.5u1 上述重组质粒 pET-lm-plc 并轻轻混匀,冰浴 30min;

[0058] (2) 将上述 EP 管置于 42 $^{\circ}$ C 水浴,精确计时 90s,勿摇动 EP 管;

[0059] (3) 转移 EP 管于冰浴中,冷却 3min;

[0060] (4) 每管加入无菌 TB 培养基 890 μ L,置于 37 $^{\circ}$ C 摇床,100r/min,复苏 1h;

[0061] (5) 以 8000r/min 的转速离心 2min,吸去 800 μ L 上清培养基,用移液枪轻轻吹吸剩余培养基和细胞,并转移至含终浓度 100 μ g/ml 卡那霉素的 LB 固体平板,涂匀并于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 10 ~ 18h;

[0062] (6) 挑取阳性克隆,Not I 和 EcoR I 双酶切验证重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L. m-PLC。

[0063] (7) 取成功构建的重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L. m-PLC 与等体积的体积分数为 30% 的甘油混匀,于 -80 $^{\circ}$ C 保藏。

[0064] 实施例 4 重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L. m-PLC 制备磷脂酶 C

[0065] 用重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L. m-PLC 保藏编号为 CCTCC No. M2013301 制备磷脂酶 C。

[0066] (1) 种子培养 : 取 100 μ L 上述保藏的重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L. m-PLC, CCTCC No. M2013301 接种于种子培养基中, 在回旋式摇床上于 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 10h, 摇床转速 200r/min ; 上述种子培养基成分按克 / 升计为 : 蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, NaCl 10g, 其余成分为水, 于 1×10^5 Pa 高压下灭菌 20min。

[0067] (2) 液体发酵培养 : 将经过步骤(1) 培养所得活化种子液按体积百分比 5% 的接种量接种至发酵培养基, 发酵培养基装于 250ml 三角瓶, 装液量为 50ml, 在回旋式摇床上于 35 $^{\circ}$ C 振荡培养 4h 小时, 摇床转速 200r/min ; 添加乳糖至终浓度为 2.5g/L, 在回旋式摇床上于 30 $^{\circ}$ C 振荡诱导培养 20h, 摇床转速为 200r/min ; 发酵完毕, 得到发酵液 ; 上述发酵培养基成分按克 / 升计为 : 蛋白胨 10g, 酵母粉 5g, 甘油 2g, 其余成分为 0.25mol/L Tris-HCl (pH7.2), 于 1×10^5 Pa 高压下灭菌 20min。

[0068] (3) 粗酶液的提取 : 将步骤(2) 所得发酵液于 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 转速 10000r/min ; 收集菌体细胞沉淀, 用 25mmol/L Tris-HCl (pH7.2) 重悬菌体, 置于超声破碎仪中超声破碎 10min, 将所得超声破碎液离心, 取上清, 即为胞内粗酶液。利用 p-NPPC 法定量测得胞内粗酶液的酶活达到 376.026U/ml。

[0069] 实施例 5 重组大肠杆菌 BL21 (DE3) -pET28a-L. m-PLC 制备磷脂酶 C

[0070] (1) 种子培养 : 取 100 μ L 上述保藏的重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L. m-PLC, CCTCC No. M2013301 接种于种子培养基中, 在回旋式摇床上于 32 $^{\circ}$ C 振荡培养 14h, 摇床转速 200r/min ; 上述种子培养基成分按克 / 升计为 : 蛋白胨 10g, 酵母粉 6g, NaCl 10g, 其余成分为水, 于 1×10^5 Pa 高压下灭菌 20min。

[0071] (2) 液体发酵培养 : 将经过步骤(1) 培养所得活化种子液按体积百分比 5% 的接种量接种至发酵培养基, 发酵培养基装于 250ml 三角瓶, 装液量为 50ml, 在回旋式摇床上于 30 $^{\circ}$ C 振荡培养 8h 小时, 摇床转速 150r/min ; 添加乳糖至终浓度为 5g/L, 在回旋式摇床上于 28 $^{\circ}$ C 振荡诱导培养 14h, 摇床转速为 220r/min ; 再添加甘氨酸至终浓度为 1g/L, 于相同条件下继续振荡诱导培养 10h ; 发酵完毕, 得到发酵液 ; 上述发酵培养基成分按克 / 升计为 : 蛋白胨 9g, 酵母粉 12g, 甘油 3g, 其余成分为 0.25mol/L Tris-HCl (pH7.2), 于 1×10^5 Pa 高压下灭菌 20min。

[0072] (3) 粗酶液的提取 : 将步骤(2) 所得发酵液于 4 $^{\circ}$ C 离心 10min, 转速 10000r/min, 收集上清液, 即为胞外粗酶液 ; 收集菌体细胞沉淀, 用 25mmol/L Tris-HCl (pH7.2) 重悬菌体, 置于超声破碎仪中超声破碎 10min, 将所得超声破碎液离心, 取上清, 即为胞内粗酶液 ; 利用 p-NPPC 法定量测得胞内和胞外粗酶液的总酶活达到 503.821U/ml。

[0073] 实施例 6

[0074] (1) 种子培养 : 取 50 μ L 上述保藏的重组大肠杆菌 BL21 (DE3)-pET28a-L. m-PLC, CCTCC M2013301 接种于种子培养基中, 在回旋式摇床上于 35 $^{\circ}$ C 振荡培养 12h, 摇床转速 180r/min ; 上述种子培养基成分按克 / 升计为 : 蛋白胨 11g, 酵母粉 6g, NaCl 11g, 其余成分为水, 于 1×10^5 Pa 高压下灭菌 20min。

[0075] (2) 液体发酵培养 : 将经过步骤(1) 培养所得活化种子液按体积百分比 5% 的接种量接种至发酵培养基, 发酵培养基装于 250ml 三角瓶, 装液量为 50ml, 在回旋式摇床上于

37℃振荡培养 6h 小时,摇床转速 180r/min;添加乳糖至终浓度为 1g/L,在回旋式摇床上于 25℃振荡诱导培养 20h,摇床转速为 200r/min;再添加甘氨酸至终浓度为 3g/L,于相同条件下继续振荡诱导培养 18h;发酵完毕,得到发酵液;上述发酵培养基成分按克/升计为:蛋白胨 12g,酵母粉 22g,甘油 4g,其余成分为 0.25mol/L Tris-HCl (pH7.2),于 1×10^5 Pa 高压下灭菌 20min。

[0076] (3)粗酶液的提取:同实施例 5

[0077] 利用 p-NPPC 法定量测得胞内和胞外粗酶液的总酶活达到 779.358U/ml。

[0078] 实施例 7 重组 PLC 的菜籽毛油脱胶

[0079] 将菜籽毛油加热到 80℃,加入质量浓度 45%、质量为菜籽毛油 0.5% 的柠檬酸溶液,在 500r/min 搅拌条件下进行 20min 的酸预处理。将经过酸预处理的油样冷却至 47℃,加入一定量的 4%NaOH 溶液,混合均匀来调节 pH 至 5.2。加入油重 1% 的蒸馏水和 500U/kg 重组磷脂酶 C,均匀混合,在 62℃下 300r/min 搅拌 1h 进行酶反应。反应结束后将反应体系升温至 90℃进行灭酶 10min,在 8000r/min 进行 10min 离心分离,即完成重组磷脂酶 C 对菜籽毛油的催化脱胶。

[0080] 经本实施方式对菜籽毛油进行脱胶处理后,脱胶菜籽油的磷含量为 4.503mg/kg,磷含量比脱胶前降低了 97.55% 左右。

[0081] 实施例 8 重组 PLC 的米糠毛油脱胶

[0082] 将米糠毛油加热到 80℃,加入质量浓度 50%、质量为米糠毛油 0.45% 的柠檬酸溶液,在 500r/min 搅拌条件下进行 20min 的酸预处理。将经过酸预处理的油样冷却至 47℃,加入一定量的 4%NaOH 溶液,混合均匀来调节 pH 至 5.0。加入油重 1% 的蒸馏水和 1000U/kg 的重组磷脂酶 C,均匀混合,在 60℃下 300r/min 搅拌 1h 进行酶反应。反应结束后将反应体系升温至 90℃进行灭酶 10min,在 10000r/min 进行 10min 离心分离,即完成重组磷脂酶 C 对米糠毛油的催化脱胶。

[0083] 经本实施方式对米糠毛油进行脱胶处理后,脱胶米糠油的磷含量为 50.191mg/kg,磷含量比脱胶前降低了 83.63% 左右。

[0084] 实施例 9 重组 PLC 的大豆毛油脱胶

[0085] 将大豆毛油加热到 80℃,加入质量浓度 45%、质量为大豆毛油 0.5% 的柠檬酸溶液,在 500r/min 搅拌条件下进行 20min 的酸预处理。将经过酸预处理的油样冷却至 47℃,加入一定量的 4%NaOH 溶液,混合均匀来调节 pH 至 5.2。加入油重 1% 的蒸馏水和 500U/kg 重组磷脂酶 C,均匀混合,在 62℃下 300r/min 搅拌 1.2h 进行酶反应。反应结束后将反应体系升温至 90℃进行灭酶 10min,在 10000r/min 进行 10min 离心分离,即完成重组磷脂酶 C 对大豆毛油的催化脱胶。

[0086] 经本实施方式对大豆毛油进行脱胶处理后,脱胶大豆油的磷含量为 3.945mg/kg,磷含量比脱胶前降低了 98.29% 左右。

[0087] 实施例 10 重组 PLC 的大豆毛油脱胶

[0088] 将大豆毛油加热到 80℃,加入质量浓度 45%、质量为大豆毛油 0.5% 的柠檬酸溶液,在 500r/min 搅拌条件下进行 20min 的酸预处理。将经过酸预处理的油样冷却至 47℃,加入一定量的 4%NaOH 溶液,混合均匀来调节 pH 至 4.5。加入油重 1% 的蒸馏水和 600U/kg 重组磷脂酶 C,均匀混合,在 67℃下 300r/min 搅拌 1h 进行酶反应。反应结束后将反应体系升温

至 90℃进行灭酶 10min,在 10000r/min 进行 10min 离心分离,即完成重组磷脂酶 C 对大豆毛油的催化脱胶。

[0089] 经本实施方式对大豆毛油进行脱胶处理后,脱胶大豆油的磷含量为 3.705mg/kg,磷含量比脱胶前降低了 98.40% 左右,大豆油中甘油二酯含量比脱胶前增加约 0.8%。

[0090] 应说明的是,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

[0001]

序 列 表

<110> 江南大学

<120> 一种重组大肠杆菌及制备磷脂酶 C 的方法和应用

<130> 20130628

<160> 1

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 889

<212> DNA

<213> BL21(DE3)-pET28a-L. m-PLC

<400> 1

```

atggaattcg tgaagttcaa aaaagtgggt ctaggtatgt gcttgaccgc aagtgttcta    60
gtctttccgg taacgataaa agcaaatgcc tgttgtgatg aataacttaca aacacccega    120
gctccgcattg atattgacag caaattacca cataaactta gttggtcgcg ggataaccgcg    180
acaaatactg acgtaaatac gcactattgg ctttttaaac aagcggaaaa aatactagct    240
aaagaigtaa atcatatgcg agctaattta atgaatgaac ttaaaaaatt cgataaacia    300
atagctcaag gaatatatga tgcggatcat aaaaatecat attatgatac tagtacattt    360
ttatctcatt tttataatec tgatagagat aatacttatt tgccgggttt tgctaatgcg    420
aaaataacag gagcaaagta tttcaatcaa tcggtgactg attaccgaga agggaaatit    480
gacacagcgt tttataaatt aggcctagca atccattatt atacggatat tagtcaacct    540
atgcaagcca ataattttac cgcaatatca taccctccag gctaccactg tgcatatgaa    600
aattacgtag ataccattaa acacaattat caagcaacgg aagacatggt agcaaaaaga    660
ttttgctcag atgacgtgaa agactggctc tatgaaaatg cgaaaagggc gaaagcggac    720
taccgaaaa tagtcaatgc gaaaactaaa aatcatatt tagtaggaaa ttccgaatgg    780
aaaaaggata cagtggaacc tactggagct agactaagag attcacagca aactttggca    840

```

[0002]

ggttttttag aattttggtc taaaaaaca aatgaataag cggccgcat

889