



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118291410 A

(43) 申请公布日 2024.07.05

(21) 申请号 202410527994.6

(22) 申请日 2024.04.29

(71) 申请人 邦泰生物工程(深圳)有限公司

地址 518000 广东省深圳市光明区凤凰街
道塘尾社区恒泰裕大厦3栋3B-130

申请人 中山市邦泰合盛生物科技有限公司
安徽邦泰生物工程有限公司

(72) 发明人 梁超群 周志刚 王国红 张琦

温泰贤 舒尚科

(51) Int. Cl.

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

C12P 17/06 (2006.01)

C12P 41/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表(电子公布) 附图4页

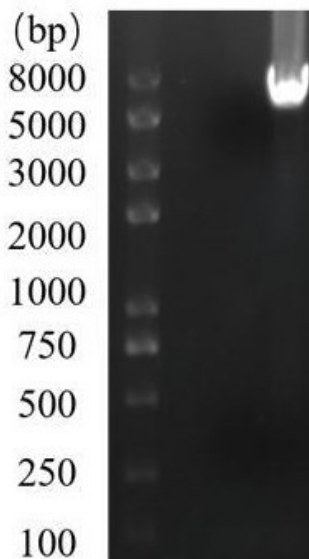
(54) 发明名称

一种醇脱氢酶突变体及其在制备高浓度(S)-玻色因中的应用

(57) 摘要

本发明将来源于*Kluyveromyces polyspora*的醇脱氢酶(KpADH)进行点突变得得到KpADH的突变体KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N},将KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}突变载体热击转化到*E. coli* BL21 (DE3) 感受态细胞中,得到醇脱氢酶突变体KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}重组工程菌。重组工程菌发酵得到KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}粗酶液,醇脱氢酶突变体KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}的酶活力为5.07 U/mg。在β-丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、NADPH、醇脱氢酶突变体粗酶液、BsGDH,制备高浓度(S)-玻色因。KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}反应条件的优化,最佳反应条件为:在β-丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、0.6 mM NADPH、3 g/L KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}粗酶液、3 g/L BsGDH粗酶液,温度35°C, pH 7.5。

CN 118291410 A



1. 一种醇脱氢酶突变体,其特征在于:所述醇脱氢酶突变体的氨基酸序列是由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列发生突变得到的氨基酸序列,所述醇脱氢酶突变体为Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N。

2. 根据权利要求1所述的醇脱氢酶突变体,其特征在于:所述醇脱氢酶突变体在制备(S)-玻色因中的应用。

3. 根据权利要求1所述的醇脱氢酶突变体制备(S)-玻色因的方法,其特征在于:在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、NADPH、醇脱氢酶突变体、BsGDH,制备(S)-玻色因。

4. 根据权利要求3所述醇脱氢酶突变体制备(S)-玻色因的方法,其特征在于:在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、NADPH、醇脱氢酶突变体、BsGDH,温度25-45 °C,制备(S)-玻色因。

5. 根据权利要求3所述醇脱氢酶突变体制备(S)-玻色因的方法,其特征在于:在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、NADPH、醇脱氢酶突变体、BsGDH,pH 6.5-8.5,制备(S)-玻色因。

6. 根据权利要求3所述的醇脱氢酶突变体制备(S)-玻色因的方法,其特征在于:在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、0.4-1.2 mM NADPH、醇脱氢酶突变体、BsGDH,制备(S)-玻色因。

7. 根据权利要求3所述的醇脱氢酶突变体制备(S)-玻色因的方法,其特征在于:在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、NADPH、1-5 g/L KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}粗酶液、BsGDH,制备(S)-玻色因。

8. 根据权利要求3所述的醇脱氢酶突变体制备(S)-玻色因的方法,其特征在于:在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、NADPH、醇脱氢酶突变体、1-5 g/L BsGDH粗酶液,制备(S)-玻色因。

9. 根据权利要求3所述的醇脱氢酶突变体制备(S)-玻色因的方法,其特征在于:在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、0.6 mM NADPH、3 g/L KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}粗酶液、3 g/L BsGDH粗酶液,温度35 °C,pH 7.5,制备(S)-玻色因。

一种醇脱氢酶突变体及其在制备高浓度(S)-玻色因中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于酶工程技术领域,具体涉及一种醇脱氢酶突变体及其应用,开发高浓度(S)-玻色因的制备方法。

背景技术

[0002] 玻色因(Pro-Xylane),化学名称为羟丙基四氢吡喃三醇,是一种木糖衍生物,具有抗皮肤衰老、脱水,促进胶原蛋白合成等作用,被广泛应用于食品、医药、化妆品、医药等领域。玻色因有多种立体构型,不同的异构体特征对生物活性具有不同影响,有关研究报道S构型玻色因生物活性最佳。

[0003] 目前,(S)-玻色因的合成方法分为化学法和生物法。化学法具有使用大量有机试剂、使用昂贵的金属催化剂、步骤繁琐、反应条件苛刻、存在污染等缺点。相比起化学法,生物酶法具有操作简单、立体选择性高、反应条件温和、环境友好、无金属残留等优点。

[0004] 醇脱氢酶可用于合成玻色因,以廉价、常见物质木糖和葡萄糖作为底物,以筛选得到的脱氢酶作为催化剂,直接制备出高价值的化妆品原料玻色因,最近报道的用于合成(S)-玻色因的醇脱氢酶催化活性普遍较低,因此有必要对酶分子进行改造。

发明内容

[0005] 为解决上述技术问题,本发明提供一种醇脱氢酶突变体,醇脱氢酶突变体的氨基酸序列是由SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列发生突变得到的氨基酸序列,醇脱氢酶突变体为Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N。

[0006] 作为优选的技术方案,醇脱氢酶突变体在制备(S)-玻色因中的应用。

[0007] 作为优选的技术方案,在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、NADPH、醇脱氢酶突变体、BsGDH,制备(S)-玻色因。

[0008] 作为优选的技术方案,在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、NADPH、醇脱氢酶突变体、BsGDH,温度25-45 °C,制备(S)-玻色因。最佳温度为30°C。

[0009] 作为优选的技术方案,在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、NADPH、醇脱氢酶突变体、BsGDH,pH 6.5-8.5,制备(S)-玻色因。最适pH为7.5。

[0010] 作为优选的技术方案,在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、NADPH、醇脱氢酶突变体、BsGDH,制备(S)-玻色因。葡萄糖与 β -丙酮木糖苷摩尔浓度比值在1:1-5:1之间,最佳葡萄糖与 β -丙酮木糖苷摩尔浓度比为1.5:1。

[0011] 作为优选的技术方案,在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、0.4-1.2 mM NADPH、醇脱氢酶突变体、BsGDH,制备(S)-玻色因。NADPH的最佳浓度是0.6 mM。

[0012] 作为优选的技术方案,在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、NADPH、1-5 g/L KpADH^{136N}/F161V/S237N/A269G/A318N粗酶液、BsGDH,制备(S)-玻色因。KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}粗酶液的最佳浓度是3 g/L。

[0013] 作为优选的技术方案,在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、NADPH、醇脱氢酶突变体、

1-5 g/L BsGDH粗酶液,制备 (S)-玻色因。BsGDH粗酶液的最佳浓度是3 g/L。

[0014] 作为优选的技术方案,在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、0.6 mM NADPH、3 g/L KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}粗酶液、3 g/L BsGDH粗酶液,温度30 °C,pH 6.5-8.5,制备 (S)-玻色因。

[0015] 本发明还提供一种重组工程菌,其特征在于:将权利要求1所述的醇脱氢酶突变体的氨基酸序列转化到E.coli BL21 (DE3) 感受态细胞中,得到醇脱氢酶突变体KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}重组工程菌。

有益效果

[0016] 1、本发明将来源于*Kluyveromyces polyspora*的醇脱氢酶(KpADH)进行点突变得得到KpADH的突变体KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N},该突变体具有较高的酶活性。

[0017] 2、应用KpADH的突变体KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}制备高浓度(S)-玻色因。

[0018] 3、醇脱氢酶突变体KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}在制备高浓度(S)-玻色因的酶活力是KpADH野生型100多倍。

[0019] 4、进一步优化KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}在制备高浓度(S)-玻色因的反应条件,最佳反应条件为在 β -丙酮木糖苷中,加入葡萄糖、0.6 mM NADPH、3 g/L KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}粗酶液、3 g/L BsGDH粗酶液,温度35 °C,pH 7.5,制备 (S)-玻色因。

附图说明

[0020] 图1 pET-28a(+)-KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}的琼脂糖凝胶电泳图

图2温度对(S)-玻色因的合成的影响

图3 pH对(S)-玻色因的合成的影响

图4葡萄糖与 β -丙酮木糖苷摩尔浓度比值对(S)-玻色因的合成的影响

图5 NADPH浓度对(S)-玻色因的合成的影响

图6 KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}粗酶液浓度对(S)-玻色因的合成的影响

图7 BsGDH粗酶液浓度对(S)-玻色因的合成的影响

具体实施方式

[0021] 为了使本发明容易理解,下面将结合具体实施例,详细说明本发明。但在详细描述本发明前,应当理解本发明不限于描述的具体实施方式。还应当理解,本文中使用的术语仅为了描述具体实施方式,而并不表示限制性的。

[0022] 除非另有定义,本文中使用的所有术语与本发明所属领域的普通技术人员的通常理解具有相同的意义。虽然与本文中描述的方法和材料类似或等同的任何方法和材料也可以在本发明的实施中使用,但是现在描述了优选的方法和材料。

[0023] LB液体培养基组成:10 g/L氯化钠,10 g/L蛋白胨,5 g/L酵母浸出物,溶剂为去离子水,pH自然。

[0024] LB固体培养基组成:10 g/L氯化钠,10 g/L蛋白胨,5 g/L酵母浸出物,15 g/L琼脂粉,溶剂为去离子水,pH自然。

[0025] 实施例1:玻色因中间体(β -丙酮木糖苷)的制备

向20 L反应釜中依次加入D-木糖1000 g、水3700 mL、甲醇3700 mL、乙酰丙酮800

g,充分溶解后升温至45 °C搅拌。向其中逐滴加入氢氧化钠溶液(360 g氢氧化钠溶于2000 mL水中),保持温度50 °C ± 10 °C。滴加完毕,50 °C ± 10 °C搅拌3小时至TLC检测反应完毕。将反应液降温至25 °C,滴加5 M盐酸调pH至7-8。减压蒸馏除去甲醇,加入100 g活性炭,50 °C搅拌3 h,热过滤,用1000 mL水淋洗,得第二步酶反应所需用到的玻色因中间体(β -丙酮木糖苷),浓度为300 g/L。

[0026] 实施例2:野生型醇脱氢酶*E. coli* BL21 (DE3) -KpADH的构建

将来源于*Kluyveromyces polyspora*的醇脱氢酶(KpADH)的碱基序列(GenBank: KP872638.1),针对大肠杆菌密码子偏好性优化,由通用生物(安徽)股份有限公司合成长度为1029 bp的重组基因KpADH序列(碱基序列如SEQ ID NO.1)。将重组基因KpADH插入载体pET-28a(+),选择NdeI酶切位点和XhoI酶切位点,构建pET-28a(+)-KpADH重组质粒。将该表达质粒转化到大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3)中,涂布于含有50 mg/L卡那霉素抗性的固体LB培养皿上,37 °C培养16 h,挑取阳性克隆,即为野生型*E. coli* BL21 (DE3) -KpADH,用以表达重组KpADH。

[0027] 实施例3 醇脱氢酶突变体的基因构建

根据实施例2中KpADH的基因序列,对Q136、F161、S237、A269、A318进行突变,分别设计突变的引物,进行PCR克隆,对野生型KpADH进行定点突变,得到KpADH的突变体KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}(氨基酸序列如SEQ ID NO.4)。引物如下:

Q136N-F:5' -ccgcatcgtataatgatccgaccctgaccctg-3'

Q136N-R:5' -cggatcattattacgatgcggggtcataatgct-3'

F161V-F:5' -cgaaaatggttaccgcctattgtgcaagcaa-3'

F161V-R:5' -atagcgcgtaacaacattttcgtatgcattttc-3'

S237N-F:5' -cccatttcaatcagttcattgatgttcgcgatg-3'

S237N-R:5' -gaactgattgaaatgggttttttcaactttggt-3'

A269G-F:5' -tgcaatggtggattttcacagcaggatattgtg-3'

A269G-R:5' -ctgtgaaaatccaccattgcacagcagcagacg-3'

A318N-F:5' -agttactgaacttcgagtttactccgtttcata-3'

A318N-R:5' -ctcgaagttcagtaactttttggtttttcattatc-3'

其中,PCR扩增醇脱氢酶突变体基因,PCR体系为:21 μ L ddH₂O、10 μ L Q5-reaction Buffer、10 μ L Q5 high GC Enhancer、2 μ L上游引物(10 μ M)、2 μ L下游引物(10 μ M)、2 μ L dNTPs、2 μ L DNA模板(pET-28a(+)-KpADH)、1 μ L Q5酶,共50 μ L。PCR程序为:98 °C预变性3 min;按如下参数循环35次:98 °C变性8 s,65 °C退火25 s,72 °C延伸1.5 min;最后72 °C延伸10 min。

[0028] 实施例4 重组工程菌构建

PCR反应结束后,PCR产物pET-28a(+)-KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}的核苷酸序列经过1%的琼脂糖凝胶电泳检测分析为阳性后,取10 μ L PCR反应液,加入1.2 μ L Cutsmart Buffer及1 μ L Dpn I酶,于37 °C、220 rpm摇床中消化3 h进行去除模板质粒DNA,得到KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}突变载体。然后将KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}突变载体热击转化到*E. coli* BL21 (DE3)感受态细胞中,在37 °C、220 rpm摇床复苏1 h后涂布于含50 mg/L卡那霉素抗性的固体LB培养皿培养16 h,挑取单菌落培养于含终浓度50 mg/L卡那霉素抗

性的液体LB培养基中培养过夜,提取质粒测序,得到醇脱氢酶突变体KpADH^{Q136N}/F161V/S237N/A269G/A318N重组工程菌。

[0029] 实施例5醇脱氢酶突变体的表达

对于实施例2中构建的野生型醇脱氢酶*E. coli* BL21 (DE3) -KpADH、实施例4中得到的醇脱氢酶突变体KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}重组工程菌,分别接种于含终浓度50 mg/L卡那霉素抗性的液体LB培养基中,37 °C、220 rpm培养12 h,再以1%(v/v)接种量接种至新鲜的含终浓度50 mg/L卡那霉素抗性的液体LB培养基中,于37 °C、220 rpm下培养至OD₆₀₀=0.8,加入终浓度为0.5 mM的异丙基-β-D-硫代半乳糖苷(IPTG),25 °C、150 rpm下诱导培养16 h。然后在4 °C、12000 rpm下离心10 min,弃去上清,收集沉淀,获得湿菌体。分别将收集得到的湿菌体按照100 g/L的量,用50 mM磷酸钾缓冲溶液(pH 7.5)重悬菌体,在冰水混合物上超声破碎,破碎功率为400 W,每工作2 s,间歇2 s,总工作时间10 min,收集细胞破碎液,在4 °C、12000 rpm下离心20 min,取上清,即为野生型醇脱氢酶KpADH粗酶液和醇脱氢酶突变体KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}粗酶液。

[0030] 实施例6葡萄糖脱氢酶*E. coli* BL21 (DE3) -BsGDH的构建及表达

根据来源于*Bacillus subtilis* 168的葡萄糖脱氢酶(BsGDH)的碱基序列(碱基序列如SEQ ID NO.5),由通用生物(安徽)股份有限公司合成长度为786 bp的重组基因BsGDH序列。将重组基因BsGDH插入载体pET-28a(+),选择NdeI酶切位点和XhoI酶切位点,构建pET-28a(+)-BsGDH重组质粒。将该表达质粒转化到大肠杆菌*E. coli* BL21 (DE3)中,涂布于含有50 mg/L卡那霉素抗性的固体LB培养皿上,37 °C培养16 h,挑取阳性克隆,即为野生型*E. coli* BL21 (DE3) -BsGDH,用以表达重组BsGDH。与实施例5中相同条件制备BsGDH粗酶液。

[0031] 实施例7醇脱氢酶的酶活测定

对实施例5中获得的粗酶液中的野生型醇脱氢酶KpADH、醇脱氢酶突变体KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}分别进行活力测定。酶反应体系:在10 mL 50 mM磷酸钾缓冲溶液(pH 7.5)中进行活性测定实验,体系中包含终浓度500 mM β-丙酮木糖苷、800 mM 葡萄糖、0.4 mM NADPH、2 g/L醇脱氢酶粗酶液、2 g/L BsGDH粗酶液,在30 °C、400 rpm下反应5 min。反应结束后取100 μL反应液于100 μL 10 mM EDTA中终止反应,12000 rpm速度离心1 min后取上清液用超纯水稀释10倍后过膜,通过高效液相色谱(HPLC)检测(S)-玻色因的含量。HPLC检测条件:仪器Agilent 1260Infinity II(安捷伦科技有限公司,美国),色谱柱Xtimate C18 (4.6×250 mm,5 μm),检测器为示差检测器,流动相为超纯水,10 μL进样量,1 mL/min流速,柱温30 °C。同时通过参考外消旋玻色因标准品的保留时间确定(S)-玻色因的保留时间,其中(S)-玻色因在前,保留时间约为10.49 min;(R)-玻色因在后,保留时间约为12.59 min。

[0032] 酶活测定结果显示,KpADH野生型的酶活力为0.05 U/mg,醇脱氢酶突变体KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}的酶活力为5.07 U/mg。其中酶活定义:一个酶活单位定义为在上述条件下,每分钟产生1 μmol (S)-玻色因所需要的酶量(前5分钟)

实施例8 KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}反应条件的优化

条件优化的基准反应体系如下:反应体系为10 mL 50 mM磷酸钾缓冲溶液,包含终浓度500 mM β-丙酮木糖苷、800 mM 葡萄糖、0.4 mM NADPH、2 g/L KpADH^{Q136N}/F161V/S237N/A269G/A318N粗酶液、2 g/L BsGDH粗酶液,在pH 7.5、30 °C、400 rpm下反应1 h。为了

优化(S)-玻色因的酶催化合成,我们分别测试了温度(25-45 °C)和pH(6.5-8.5)的影响,以及反应体系中葡萄糖与 β -丙酮木糖苷摩尔浓度比值(1:1-5:1)、NADPH(0.4-1.2 mM)、KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}粗酶液(1-5 g/L)、BsGDH粗酶液(1-5 g/L)的浓度影响。反应结束后取100 μ L反应液于100 μ L 10 mM EDTA中终止反应,12000 rpm速度离心1 min后取上清液用超纯水稀释10倍后过膜,通过HPLC检测(S)-玻色因的含量。

[0033] 在温度25-45 °C范围内考察温度的影响,结果如图1所示,最适温度为35 °C。

[0034] 在pH 6.5-8.5范围内考察pH的影响,结果如图2所示,最适pH为7.5。

[0035] 改变葡萄糖与 β -丙酮木糖苷的浓度,考察葡萄糖与 β -丙酮木糖苷摩尔浓度比值在1:1-5:1之间对底物转化率的影响,结果如图3所示,最佳葡萄糖与 β -丙酮木糖苷摩尔浓度比为1.5:1。

[0036] 在0.4-1.2 mM范围内考察辅酶NADPH浓度的影响,结果如图4所示,NADPH的最佳浓度是0.6 mM。

[0037] 在1-5 g/L范围内考察KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}粗酶液浓度的影响,结果如图5所示,KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}粗酶液的最佳浓度是3 g/L。

[0038] 在1-5 g/L范围内考察BsGDH粗酶液浓度的影响,结果如图6所示,BsGDH粗酶液的最佳浓度是3 g/L。

[0039] 实施例9双酶一锅反应催化制备(S)-玻色因的放大及产物鉴定

优化后的反应体系如下:扩大反应体系至500 mL, β -丙酮木糖苷终浓度分别为1000 mM、1100 mM、1200 mM,葡萄糖终浓度分别为1500 mM、1650 mM、1800 mM,辅酶NADPH终浓度为0.6 mM,KpADH^{Q136N/F161V/S237N/A269G/A318N}粗酶液与BsGDH粗酶液终浓度均为3 g/L,加入pH 7.5的50 mM磷酸钾缓冲溶液,在pH 7.5、35 °C、400 rpm搅拌下反应8-10 h。反应结束后,取100 μ L反应液于100 μ L 10 mM EDTA中终止反应,12000 rpm速度离心1 min后取上清液用超纯水稀释10倍后过膜,通过HPLC检测(S)-玻色因的含量。

[0040] 结果表明,1000 mM β -丙酮木糖反应8 h后,产物浓度为998 mM,转化率为99.8%;1100 mM β -丙酮木糖反应9 h后,产物浓度为1092 mM,转化率为99.3%;1200 mM β -丙酮木糖反应10 h后,转化率达到98.4%,此时产物浓度为1181 mM即227 g/L。

[0041] 将500 mL(产物浓度为227 g/L)反应液离心取上清液后加入活性炭脱色,纳滤除盐,减压蒸馏除水,纯化得到产物111 g,纯度为99.6%,产率97.8%。利用核磁共振对得到的(S)-玻色因进行分析,得到结果¹H NMR (400 MHz, DMSO-d₆) δ 4.87 (dt, J = 9.7, 5.0 Hz, 3H), 4.26 (d, J = 4.4 Hz, 1H), 3.78 (dq, J = 17.3, 5.9 Hz, 1H), 3.66 (dd, J = 10.9, 5.3 Hz, 1H), 3.23 (dq, J = 15.6, 5.2 Hz, 1H), 3.07 - 2.88 (m, 3H), 2.82 (td, J = 9.0, 5.4 Hz, 1H), 1.72 (ddd, J = 13.9, 8.0, 2.7 Hz, 1H), 1.45 (ddd, J = 14.1, 9.2, 5.2 Hz, 1H), 1.02 (d, J = 6.2 Hz, 3H)。

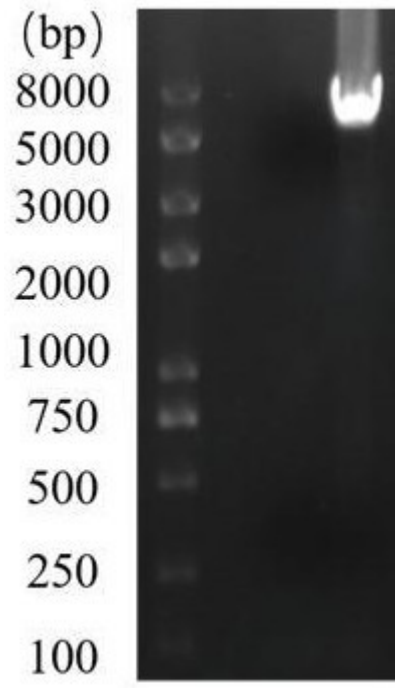


图 1

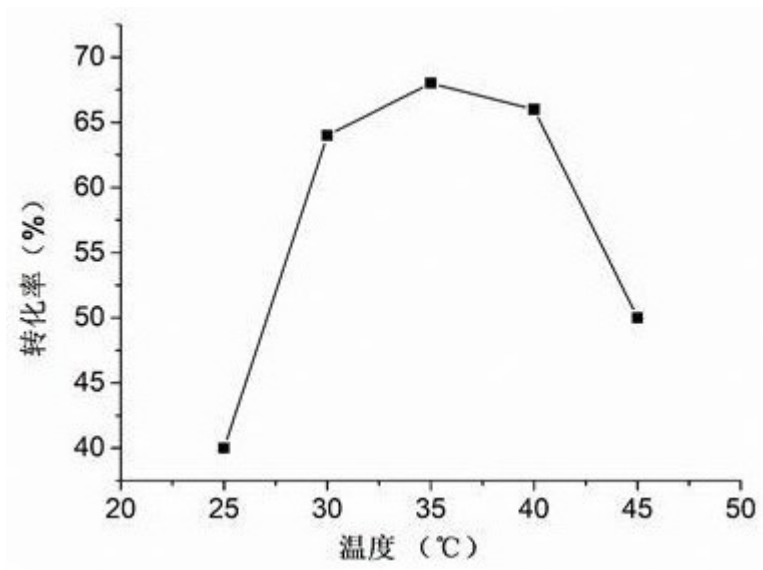


图 2

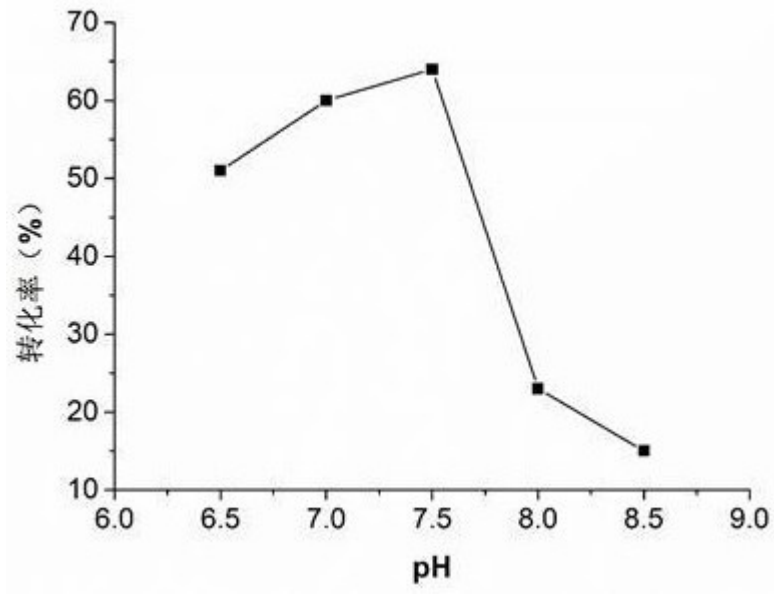


图 3

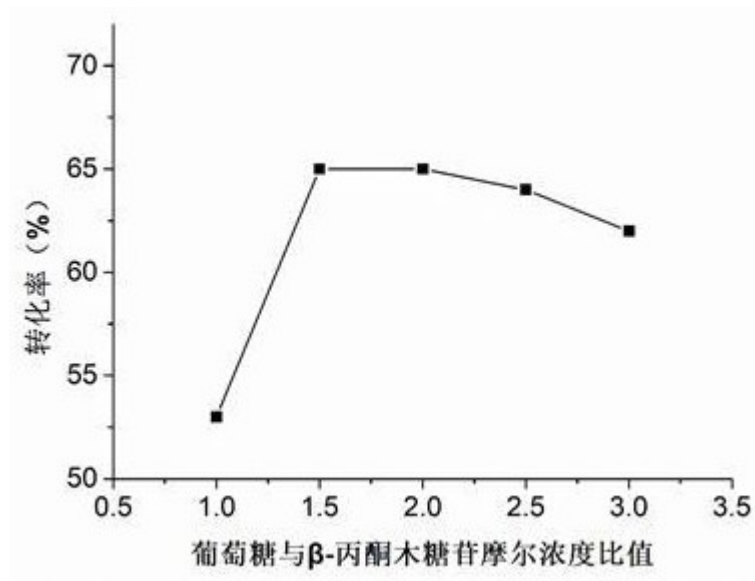


图 4

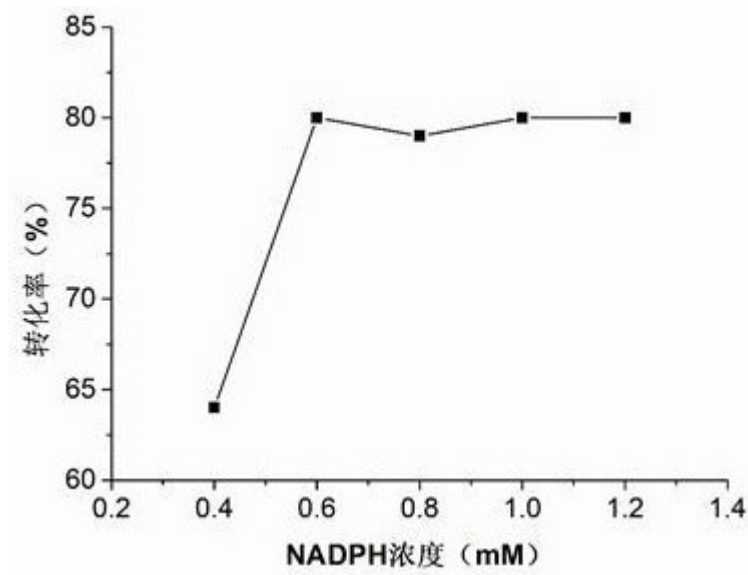


图 5

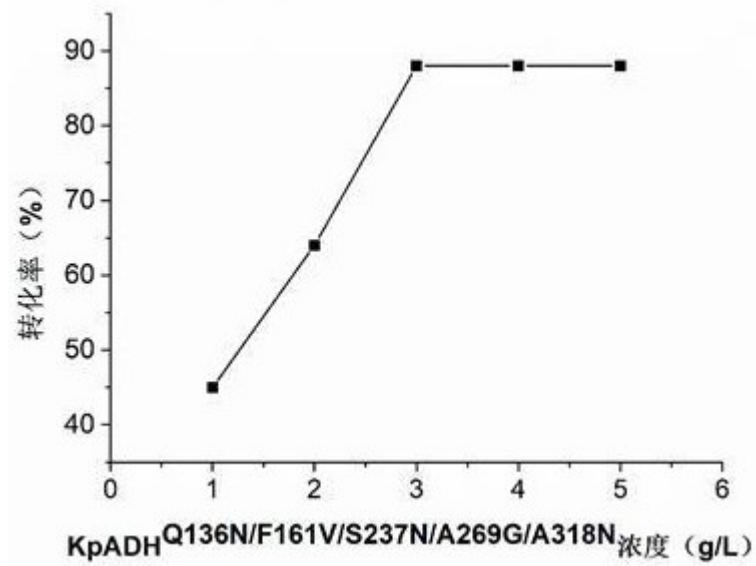


图 6

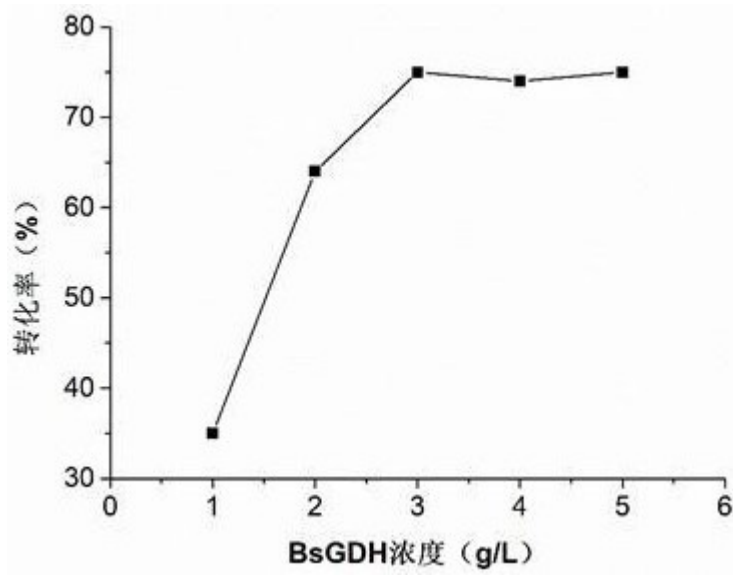


图 7