

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510112638.5

[51] Int. Cl.

C12N 9/20 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C12N 1/16 (2006.01)
C12N 11/00 (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 10 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 100424170C

[22] 申请日 2005. 10. 11

[21] 申请号 200510112638.5

[73] 专利权人 北京化工大学

地址 100029 北京市北三环东路 15 号

[72] 发明人 谭天伟 于明锐 陈必强 王 芳
邓 列 聂开立 何耀强

[56] 参考文献

CN1621528A 2005. 6. 1

CN1456674A 2003. 11. 19

Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. Georges Pignede et al. Journal of Bacteriology, Vol. 182 No. 10. 2000

Characterization of an extracellular lipase encoded by LIP2 in *Yarrowia lipolytica*. Georges Pignede et al. Journal of Bacteriology, Vol. 182 No. 10. 2000

Overproduction of lipase by *Yarrowia lipolytica* mutants. P. Fickers et al. Appl Microbiol Biotechnol, Vol. 63. 2003

固定化假丝酵母脂肪酶合成棕榈酸异辛酯. 陈必强等. 化工学报, 第 55 卷第 3 期. 2004

审查员 唐 莉

[74] 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

代理人 顾晋伟 刘继富

权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 3 页

[54] 发明名称

脂肪酶、其基因、产生该酶的亚罗解脂酵母及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种用于制备一种脂肪酶, 具体是氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1 或其保守突变序列的脂肪酶, 还涉及编码该脂肪酶的基因、产生该脂肪酶的亚罗解脂酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 以及利用该脂肪酶合成酯的方法。

1. 一种产生氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 的脂肪酶的亚罗解脂酵母 (*Yarrowia lipolytica*), 其保藏编号为 CGMCC No. 1470。
2. 一种利用脂肪酶合成酯的方法, 其包括:
 - (a) 使用权利要求 1 所述的亚罗解脂酵母提取脂肪酶;
 - (b) 使用步骤 (a) 中所得脂肪酶合成酯。
3. 根据权利要求 2 的方法, 其中步骤 (b) 中通过固定化脂肪酶合成酯。
4. 根据权利要求 3 的方法, 其中所述的固定化脂肪酶包含氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 的脂肪酶、载体和共固定剂, 其中, 载体与共固定剂的质量体积比为 1:1~1:3, 脂肪酶与载体的比例为 1000-30000 单位/克载体。
5. 根据权利要求 4 的方法, 其中所述载体为固体颗粒和膜状纺织品。
6. 根据权利要求 5 的方法, 其中所述固体颗粒为硅胶、硅藻土, 所述膜状纺织品为天然纤维织物和化学纤维织物。
7. 根据权利要求 6 的方法, 其中所述天然纤维织物为棉布, 所述化学纤维织物为涤纶。
8. 根据权利要求 4 的方法, 其中所述共固定剂选自高分子化合物、表面活性剂、蛋白质、无机盐中的至少一种。
9. 根据权利要求 8 的方法, 其中所述共固定剂选自 PEG6000、椰子油、吐温 80、明胶、卵磷脂和硫酸镁中的至少一种。
10. 根据权利要求 2 的方法, 其中步骤 (b) 中所述酯的合成通过脂肪酸和醇的酯化反应进行。
11. 根据权利要求 10 的方法, 其中脂肪酸和醇以 3:1~1:5 的摩尔比加入, 再和脂肪酶混合, 于 20-50℃反应 9-50 小时。
12. 根据权利要求 11 的方法, 其中所述的脂肪酸选自 C8~C18 一元脂肪酸和二元酸的至少一种, 醇选自 C1~C18 的伯醇、C3~C5 的仲醇以及甘油、维生素 C 中的至少一种。
13. 根据权利要求 12 的方法, 其中所述的脂肪酸选自辛酸、癸酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、己二酸、壬二酸、癸二酸中的至少一种; 所述醇选自甲醇、丙醇、丁醇、己醇、异辛醇、异丙醇、异丁醇、癸醇、十二醇、十八醇、甘油、维生

素 C 中的至少一种。

14. 根据权利要求 2 的方法, 其中步骤 (b) 中酯的合成通过底物醇或者酸和酯的转酯化反应进行。

15. 根据权利要求 14 的方法, 其特征在于底物醇或者酸和底物酯以摩尔比 3:1~1:7 加入, 再与固定化脂肪酶混合, 于 20-50℃反应 9-50 小时。

16. 根据权利要求 15 的方法, 其中所述底物酸选自棕榈酸、油酸中的至少一种; 底物醇选自甲醇、乙醇中的至少一种; 底物酯选自维生素 A 醋酸酯、豆油、红花油、亚麻油、玉米油、棕榈油、色拉油中的至少一种。

17. 根据权利要求 10-16 中任一项的方法, 其中所述反应使用有机溶剂或不用溶剂, 所述有机溶剂选自丙酮、正己烷、环己烷、石油醚、正庚烷或正辛烷中的至少一种。

脂肪酶、其基因、产生该酶的亚罗解脂酵母及其应用

技术领域

本发明涉及一种用于制备一种脂肪酶、编码该脂肪酶的基因、产生该脂肪酶的亚罗解脂酵母 (*Yarrowia lipolytica*) 以及利用该脂肪酶合成酯类的方法。

背景技术

酯类物质是食品、饮料、医药、生物能源等许多工业领域常用的化学物质,但长期以来,工业上脂肪酸酯均是通过化学法来生产。即用无机催化剂如浓硫酸、苯磺酸等在高温高压下催化酸醇的酯化反应来完成。虽然产率较高,但也存在许多难以克服的缺点。如:高温高压反应能耗高、副反应多,产物色泽深、分离和精制困难等,而且酸对设备腐蚀严重,不利于生产。随着生物技术的发展,特别是酶工程的研究,为生物催化剂合成脂肪酸酯提供了新的方法。与传统的化学法相比,酶法合成具有反应条件温和,特异性强,副反应少,产物品质高等特点。特别是非水相中脂肪酶促反应,拓宽了酶的应用范围和领域,成为近年来酶学研究的热点。

“微生物脂肪酶催化酯的合成”CN 1223300A (1999) 报道了以脂肪醇、一元脂肪酸为底物,游离的脂肪酶为催化剂,在 15℃~40℃ 条件下,于有机溶剂中催化脂肪酸酯的合成。该方法所用脂肪酶是用华根霉生产,反应为分批操作,在搅拌罐中进行。10~36hr 底物转化率可达 95%。反应结束后,过滤分离脂肪酶和反应液,减压蒸馏得到产物酯。该方法采用游离脂肪酶,因此反应批次不高,不利于产物的分离纯化。

Leite 等人 (1998) 研究了固定化米黑毛霉脂肪酶催化的酯化反应。以异辛烷为溶剂通过渗透蒸发膜移走反应中生成的水。Buferend 等人 (1999) 中空纤维膜反应器,以辛烷为溶剂,通过将底物循环反应合成长链脂肪酸酯。膜反应器催化效率高,能选择性移走反应中生成的水,但膜反应器也存在造价高,操作复杂、膜易堵塞等问题。

亚罗解脂酵母 (*Y. lipolytica*) 属于非常规酵母, FDA 认证为安全级酵母 (GRAS), 该菌株被大规模用于生产柠檬酸、单细胞蛋白, 工业生产中积累了大量的经验。亚罗解脂酵母分泌几种胞外蛋白包括酸性和碱性蛋白酶、RNA 酶、酯酶、几种脂肪酶等 (Barth and Gaillardin, 1997)。1976 年, Ota 等人报道 *Y. lipolytica* 生产一个胞外脂肪

酶及两个与细胞结合 (Cell-bound) 的脂肪酶。1996 年, Ota 等人纯化出 39kDa 的胞外脂肪酶并测定了 N-端氨基酸序列。1997 年, Destain 等人报道 *Y.lipolytica* 在 500L 发酵罐中大规模生产脂肪酶, 最高酶活达到 1000U/ml 发酵液, 该方法虽然进行了大规模生产但是单位体积发酵液的酶活不高。2000 年, Fignede 等人采用基因工程的方法来提高胞外脂肪酶 Lip2 的生产, 在 15L 发酵罐中, 优化条件下, 发酵酶活达到了 10000U/ml 发酵液。该方法虽然单位发酵液的酶活比较高, 但是生产规模小, 只在 15L 的发酵罐中进行, 而且发酵的控制条件比较严格, 难于进行放大。目前, 关于 *Y. lipolytica* 胞外脂肪酶的应用报道很少, Sandoval 等人报道用 *Y.lipolytica* 脂肪酶拆分手性酸, 得到的产物的光学纯度大大提高。关于 *Y.lipolytica* 脂肪酶的其他应用未见报道。

发明内容

本发明为了克服现有技术中的不足, 提供一种新型的脂肪酶、编码该脂肪酶的基因、高产该脂肪酶的菌株和使用该脂肪酶合成酯的方法。

在一个方面中, 本发明提供了一种脂肪酶, 其氨基酸序列为 SEQ ID NO:1 或其保守突变序列。SEQ ID NO:1 由 301 个氨基酸残基组成, 其中 164-168 氨基酸(GHSLG)为脂肪酶的保守五肽序列。与 Lip2 基因 (AJ012632) 编码的氨基酸序列相比, 其中第 179 位氨基酸由甘氨酸 (G) 突变成天冬氨酸 (D)。本文中所述的术语“保守突变”指由另一生物学相似残基替代氨基酸残基。保守突变的例子包括将亲水残基如异亮氨酸、缬氨酸、亮氨酸或蛋氨酸替代为另一种, 将极性残基替代为另一种, 例如将精氨酸替代为赖氨酸、将谷氨酸替代为天冬氨酸或谷氨酰胺替代为天冬酰胺等。

在另一个方面中, 本发明提供了一种编码上述脂肪酶的基因, 更具体地提供了核苷酸序列为 SEQ ID NO:2 的编码所述脂肪酶的基因。该基因由 906 个碱基组成。与 Lip2 基因的核苷酸序列相比, 其中第 536 位核苷酸由 g 突变为 a。

可以理解的是, 由于氨基酸密码子的兼并性, 本发明中编码脂肪酶的基因除了 SEQ ID:2 所示的序列外, 还包括编码上述脂肪酶氨基酸序列的其他核酸分子。

在另一个方面中, 本发明提供了一种产生上述脂肪酶的亚罗解脂酵母 (*Yarrowia lipolytica*), 其已于 2005 年 9 月 30 日在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (地址: 北京市海淀区中关村北一条 13 号中国科学院微生物研究所, 邮编:

100080) 提交生物保藏, 保藏编号为 CGMCC No. 1470。

在又一个方面中, 本发明提供了一种利用上述脂肪酶合成酯的方法, 其包括:

- (a) 获得权利要求 1 所述的脂肪酶;
- (b) 使用步骤 (a) 中所得脂肪酶合成酯。

本发明技术人员通过阅读本说明书, 可以从上述的亚罗解脂酵母提取得到所述的脂肪酶, 也可以通过本领域中公知的基因重组技术在本领域中公知的合适基因表达系统中容易地获得, 还可以通过本领域技术人员公知的肽合成方法进行化学合成。

在本发明的一个实施方案中, 步骤 (b) 中通过固定化脂肪酶合成酯。

在一个优选的实施方案中, 其中所述的固定化脂肪酶包含上述脂肪酶、载体和共固定剂。固定化载体先用一定组成和配比的共固定剂活化。将固定化载体和共固定剂按 1:1~1:3(W:V) 比例混合, 干燥。脂肪酶用去离子水溶解, 按 1000—30000 单位/克载体的比例与活化后的固定化载体混合, 晾干待用。

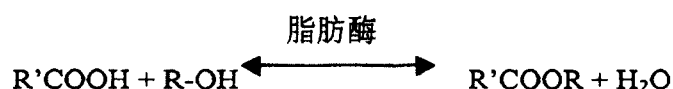
在另一个优选的实施方案中, 所述载体包括固体颗粒, 如硅胶、硅藻土; 和膜状纺织品, 包括天然纤维织物如棉布和化学纤维织物如涤纶, 尤其是膜状纺织品固定化酶, 其具有表面积大、吸附性强、价格便宜、稳定性好以及以重复利用的特点。

在另一个优选的实施方案中, 所述共固定剂选自(包括)高分子化合物、表面活性剂、蛋白质、无机盐中的至少一种。

在一个进一步的优选实施方案中, 所述共固定剂选自 PEG6000、椰子油、吐温 80、明胶、卵磷脂和硫酸镁中的至少一种, 共固定剂的总浓度为 0.5%—2%, 各组分的质量比为明胶: 卵磷脂: PEG6000: 吐温 80: 硫酸镁: 椰子油=5: 1: 1: 2: 1: 1。

在本发明的一个实施方案中, 酯的合成通过脂肪酸和醇的酯化反应进行, 优选将脂肪酸和醇以 3:1~1:5 的摩尔比和脂肪酶混合, 于 20-50℃反应 9-50 小时。具体而言, 将底物脂肪酸和醇按摩尔比 3:1~1:5 的比例加入含有有机溶剂的酶反应器中。加入固定化酶开始反应。在 20-50℃的条件下, 搅拌反应 9-50 小时, 转化率可以达到 56-97%, 在反应过程中加入分子筛或变色硅胶除去反应中生成的水, 可增加反应的转化率。反应结束后, 固定化酶可以直接分离, 用少量的有机溶剂洗涤后可再次使用。反应液过滤后在真空度 0.05-0.08MPa 条件下减压蒸馏, 蒸发出反应媒体有机溶剂, 得到产物酯。蒸发出的溶剂经过冷凝后可回收重复使用。

本发明在有机溶剂中完成的酯化反应方程式为：



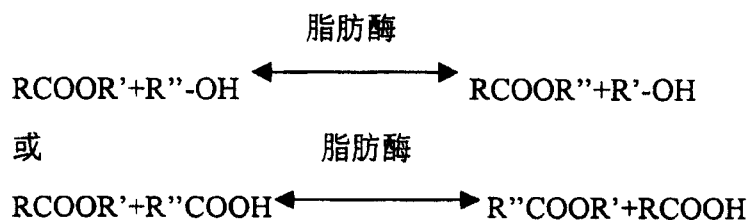
酶活的定义为：40℃条件下，pH8.0的磷酸缓冲溶液中水解橄榄油，每分钟释放出 1μmol 脂肪酸的酶量为一个酶活单位。

其中所述的脂肪酸选自 C8~C18 一元脂肪酸和二元酸的至少一种，优选为辛酸、癸酸、棕榈酸、硬脂酸、油酸、亚油酸、亚麻酸、己二酸、壬二酸、癸二酸中的至少一种；醇选自 C1~C18 的伯醇、C3~C5 的仲醇以及甘油、维生素 C 中至少一种，优选为甲醇、丙醇、丁醇、己醇、异辛醇、癸醇、十二醇、十八醇、异丙醇、异丁醇、甘油和维生素 C 中的至少一种。

反应所用的有机溶剂为丙酮、正己烷、环己烷、石油醚、正庚烷或正辛烷等，对于某些底物可直接采用无溶剂体系。

在本发明的另一个实施方案中，其中步骤（b）中酯的合成通过底物醇或者酸和酯的转酯化反应进行，优选将底物醇或者底物酸和底物酯以摩尔比 3:1~1:7 与有机溶剂和固定化脂肪酶混合，于 20-50℃反应 9-50 小时。具体而言，将底物酸或者醇和酯按摩尔比 3:1~1:7 的比例加入含有有机溶剂的酶反应器中。加入固定化酶开始反应。在 20-50℃的条件下，搅拌反应 9-50 小时，转化率可以达到 80-93%。反应结束后，固定化酶可以直接分离，用少量的有机溶剂洗涤后可再次使用。反应液通过分离纯化得到产物酯。蒸发出的溶剂经过冷凝后可回收重复使用。

本发明在有机溶剂中完成的酯化反应方程式为：



其中所述底物酸选自棕榈酸、油酸中的至少一种；底物醇选自甲醇、乙醇中的至少一种；底物酯选自维生素 A 醋酸酯、豆油、红花油、亚麻油、玉米油、棕榈油、色拉油中的至少一种。

反应所用的有机溶剂选自丙酮、正己烷、环己烷、石油醚、正庚烷中的至少一种，对于某些底物可直接采用无溶剂体系。

因此，本发明的一个优点是通过一系列的诱变方法得到一株高产脂肪酶的菌株，该菌株于 500L 发酵罐中，优化的条件下，发酵脂肪酶活力可达到 8000U/ml 发酵液，为生产提供了廉价的酶催化剂。发酵液经过离子交换和疏水层析纯化后，脂肪酶比酶活可达到 18600U/mg。

本发明的另一个优点是本发明生产的脂肪酶有广泛的底物适应性，作用的底物包括一元、二元脂肪酸，一元的伯醇，甘油，维生素 A、C 等。将酶固定在载体上，提高了酶的稳定性和使用批次，并且有利于连续化生产，大大简化了后续的分离纯化步骤，由于该发明采用生物催化剂，反应中使用的溶剂可以回收重复利用，因此不会环境造成污染，为酯类的工业化生产提供了非常有前景的绿色工艺路线。

附图说明

图 1 说明复合诱变系谱 I，其中 UV 为紫外线，n 为快中子， γ 为 γ 射线，ME 为磁场；

图 2 说明复合诱变系谱 II，其中 n 为快中子， γ 为 γ 射线，ME 为磁场；

图 3 说明不同的氮源 a、b（a 为脱脂豆粕、b 为全脂豆粕）(4%)对脂肪酶产量的影响；

图 4 说明温度对脂肪酶产量的影响；

图 5 说明 pH 对脂肪酶产量的影响；

图 6 说明 500 L 发酵罐中发酵时酶产量随时间的变化。

具体实施方式

下面通过具体的实施方案描述本发明的亚罗解脂酵母菌的获得以及利用该菌株中的脂肪酶合成酯的方法。除非特别指明，本发明中所用的实验方法均为本领域技术人员所公知的方法。此外，实施例应理解为说明性的，而不是要限制本发明的范围，本发明的实质和范围仅由权利要求书限定。对于本领域技术人员而言，在不背离本发明实质和范围的前提下，对这些实施方案中的菌种诱变条件、分离纯化条件、底物类型、反应条件进行的各种改变或改动也属于本发明的保护范围。

实施例 1：亚罗解脂酵母菌种的获得

本菌种是经过进行紫外线、亚硝基胍诱变后再进行快中子、 γ 射线和磁场复合处理相结合得到的脂肪酶高产育种。简言之，紫外诱变时间分别为 1 分钟、1.5 分钟、2 分钟，快中子诱变剂量分别为 5 千拉特、10 千拉特、15 千拉特， γ 射线诱变剂量分别为 5 万伦琴、10 万伦琴、15 万伦琴，如图 1 和 2 所示。图 1 说明复合诱变系谱 I，其中 UV 为紫外线，n 为快中子， γ 为 γ 射线，ME 为磁场；图 2 说明复合诱变系谱 II，其中 n 为快中子， γ 为 γ 射线，ME 为磁场。经过上述一系列诱变过程，最终得到了酶活为 2246U/mL 的高产脂肪酶菌株。

麦芽汁斜面培养基（麦芽汁 0.3%，酵母粉 0.3%，牛肉蛋白胨 0.5%，葡萄糖 1%，琼脂 2%）上、26℃下培养 48hr 后出现白色菌落，72hr 后菌落长大，呈淡黄色，较肥厚，边缘整齐，略带油脂光泽，96hr 后菌落匍匐展开，变得单薄，并且表面出现皱褶。

实施例 2：发酵条件的优化

比较了不同的氮源 a、b（a 为脱脂豆粕、b 为全脂豆粕）(4%)对脂肪酶产量的影响，结果见图 3。从图 3 的曲线可以看出，以 b 作为氮源的培养基脂肪酶产量很低，远小于以 a 作为氮源。

选择有利于产脂肪酶的油脂 c、d、e（c 为豆油、d 为菜籽油、e 为橄榄油）作为碳源(2.5%)进行研究，结果比较见下表 1：

表 1

培养时间(HR)	24	48	72	96
c	440	960	1520	1760
d	360	720	1340	1480
e	320	640	880	1080

从表中可见，在比较的三种碳源中，c 的脂肪酶产量最高。

在恒温摇床中，不同温度下培养 96 小时，结果见图 4。从图 4 可知，产脂肪酶的温度较窄，以 28℃~30℃最适，超过 30℃，脂肪酶产量明显减少，34℃基本不产脂肪酶。

培养基在接种前用 1N NaOH 和 1N HCl 将 pH 调节到一定值，28℃振荡培养 96

小时, 结果见下表 2。从表 2 可见, 发酵初始 pH6~7 最利于生产脂肪酶, 而发酵液的自然 pH 在 5.7 左右。

初始 pH	4	5	6	7	8	9	自然
终 pH	4	4.8	5.6	6.4	6.7	7.2	5.7
酶活(U/mL)	400	1460	1680	1600	1040	700	1620

在获得较好的培养基配方(4%脱脂豆粕、2.5%豆油、0.1% K_2HPO_4 、0.1%司盘(SPAN) 60)后, 我们在 30L 发酵罐中进行了初步的实验以研究其发酵过程(发酵温度为 26℃, 搅拌转速为 350rpm, pH5.7, 通气量为 0.5vvm)的变化规律和脂肪酶的产量, 结果见图 5。从图 5 可以看出, 两批有代表性的发酵的脂肪酶活力增长和 pH 变化趋势基本一致, 发酵 40 小时左右开始产酶, 80 小时左右进入产酶旺盛期, 130 小时左右脂肪酶活力达到最高峰, 之后开始下降; 发酵过程中 pH 保持在 4~5 之间, 波动不大, 在酶活达到最高峰后回升到 5.4。综上所述, 发酵时间应当为 130 小时左右, 脂肪酶产量可达 5300U/mL。

实施例 3: 发酵和脂肪酶的提取

随后在 500L 发酵罐中进行了中试放大实验, 培养基组分为 4%豆粕、2.5%豆油、0.1% K_2HPO_4 、0.1%司盘(SPAN)60、0.3%泡敌; 发酵温度为 26℃, 搅拌转速为 200rpm, pH5.7, 通气量为 0.35vvm。发酵酶活达到了 8000U/mL, 结果如图 6。

脂肪酶的提取通过本领域技术人员公知的方法进行。简言之, 将发酵液 4000rpm 离心 10min, 取上清液, 加入 4%聚乙二醇 6000 絮凝浓缩, 自然沉降分层, 取下层液。向下层液中加入 3 倍体积的丙酮, 得到沉淀, 干燥后得到粗酶产品。经上述操作后得到的粗酶产品酶活为 5×10^4 u/g, 收率为 65%, 外观为灰黄色粉末。

实施例 4 酯化脂肪酶基因的克隆

亚罗解脂酵母发酵液经过离心分离得到上清, 上清液用 3 倍体积的冷丙酮沉淀, 得到的沉淀物冷丙酮洗涤 3 次, 室温干燥得到粗酶粉。此酶粉用 25mM 的磷酸缓冲液(pH7.5)溶解, 离心得到上清液。此上清液经过 Q-sepharose FF 层析柱后收集脂

肪酶组分,该组分加入硫酸铵至终浓度为 0.8M,然后经过 Butyl sepharose FF 层析柱,收集脂肪酶组分,得到纯化的脂肪酶。此脂肪酶组分在 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳上得到单一条带,此条带转印到 PVDF 膜上进行蛋白质 N 端测序,得到氨基酸序列为 VYTSTETSHIDQESY。

此序列同亚罗解脂酵母基因组的蛋白序列比较,结果发现此序列与 Lip2 基因 (AJ012632) 编码的氨基酸序列匹配。分析发现此序列含有保守的五肽序列 GHSLG (第 194-198 氨基酸), N-端 1-30 氨基酸为该脂肪酶的信号肽序列。根据 lip2 脂肪酶的基因序列 (SEQ NO.1) 设计如下引物:

引物 1: 5'-ACGAGAATTCGTGTACACCTCTACCGAGACC-3'

引物 2: 5'-AATAAAGCTTGATACCACAGACACCCTCGGT-3'

根据该引物,以亚罗解脂酵母基因组为模板,PCR 扩增得到 DNA 序列,经过测序得到 SEQ ID NO:2 的基因序列,该序列与 Lip2 基因同源,编码该脂肪酶的成熟肽,只是第 536 位核苷酸由 g 突变为 a,导致所编码的氨基酸序列中第 179 位氨基酸由甘氨酸 (G) 突变成天冬氨酸 (D)。

实施例 5 脂肪酶的固定化

将棉布和共固定剂按质量体积比为 1:1 的比例混合,室温晾干得到活化载体。共固定剂为 PEG6000、椰子油、吐温 80、明胶、卵磷脂和硫酸镁混合物,其质量比为明胶:卵磷脂:PEG6000:吐温 80:硫酸镁:椰子油=5:1:1:2:1:1。亚罗解脂酵母脂肪酶水溶液按 8000U/克活化载体的比例与活化载体混合,浸泡,室温晾干得到固定化脂肪酶。

实施例 6

将硅藻土和共固定剂按质量体积比为 1:1.5 的比例混合,室温晾干得到活化载体。共固定剂为 PEG6000、椰子油、吐温 80、明胶、卵磷脂和硫酸镁混合物,其质量比为明胶:卵磷脂:PEG6000:吐温 80:硫酸镁:椰子油=5:1:1:2:1:1。亚罗解脂酵母脂肪酶水溶液按 8000IU/克活化载体的比例与活化载体混合,浸泡,室温晾干得到固定化脂肪酶。

实施例 7

将涤纶和共固定剂按质量体积比为 1: 3 的比例混合, 室温晾干得到活化载体。
共固定剂为 PEG6000、椰子油、吐温 80、明胶、卵磷脂和硫酸镁混合物, 其质量比为明胶: 卵磷脂: PEG6000: 吐温 80: 硫酸镁: 椰子油=5: 1: 1: 2: 1: 1。亚罗解脂酵母脂肪酶水溶液按 8000IU/克活化载体的比例与活化载体混合, 浸泡, 室温晾干得到固定化脂肪酶。

实施例 8

0.085g 实施例 5 中制备的固定化脂肪酶(16000u/g,)加入含有 0.85mol/L 浓度油和甲醇的 5ml 正己烷中, 40℃条件下, 反应 16hr 后, 反应的转化率达 95%。经过在-0.05Mpa 压力下减压蒸馏得到产物油酸甲酯。

实施例 9

0.12g 实施例 5 中制备的固定化酶 (9000U/g) 加入到含 1g 棕榈酸 (0.54mol/L) 和 0.67g 2—乙基己醇(0.7mol/L)的 5mL 石油醚中。40℃条件下, 振荡反应(190r/min), 22hr 反应转化率达 96.7%。半衰期达 150hr。

实施例 10

0.05g 实施例 5 中制备的脂肪酶(16000u/g)加入含有 0.7mol/L 浓度硬脂酸和丁醇的 5ml 的环己烷中, 40℃条件下, 反应 24hr 后, 反应的转化率达 97%。经过在-0.05Mpa 压力下减压蒸馏得到产物硬脂酸丁酯。

实施例 11

0.12g 实施例 5 中制备的固定化酶 (9000U/g) 加入到含 1g 硬脂酸和 0.62g 2—乙基己醇 (0.65mol/L) 的 5mL 正庚烷中。45℃条件下, 振荡反应 (190r/min), 50hr 反应转化率达 95%。

实施例 12

20g 实施例 5 中制备的固定化酶 (9000U/g) 加入含 138g 棕榈酸 (0.54mol) 和

92g 异辛醇 (0.706mol) 的 690mL 的石油醚中, 40℃条件下搅拌反应。固定化酶固定在不锈钢丝网上置于反应器内, 反应 24hr 转化率可达 95%。反应液经碱液洗涤、过滤后在 0.05~0.08 的 Mpa 真空度下蒸发出有机溶剂, 得到产品棕榈酸异辛酯。产品色泽浅, 酸值为 0.205mgKOH/g。

实施例 13

0.2g 实施例 5 中制备的固定化酶 (9000U/g) 加入含 0.2g 癸酸和 0.147g 异丁醇的 20ml 正己烷中, 50℃条件下, 振荡反应 (190r/min), 24hr 反应转化率达 91%。

实施例 14

0.2g 实施例 6 中制备的固定化酶 (9000U/g) 加入含 0.2g 辛酸和 0.135g 异丙醇的 20ml 正己烷中, 35℃条件下, 振荡反应 (190r/min), 20hr 反应转化率达 93%。

实施例 15

0.3g 实施例 5 中制备的固定化酶加入含 0.2g 癸二酸和 0.147g 异丁醇的 10ml 正己烷中, 40℃条件下, 振荡反应, 9hr 反应转化率达 91%。

实施例 16

0.12g 实施例 5 中制备的固定化酶加入含 0.2g 癸二酸和 0.535g 十八醇的 20ml 石油醚中, 30℃条件下, 振荡反应, 12hr 反应转化率达 89%。

实施例 17

0.3g 实施例 7 中制备的固定化酶加入含 0.2g 癸二酸和 0.2575g 辛醇的 10ml 正己烷中, 50℃条件下, 振荡反应, 18hr 反应转化率达 88%。

实施例 18

0.25g 实施例 6 中制备的固定化酶加入含 0.2g 己二酸和 0.3886g 十二醇的 20ml 正辛烷中, 20℃条件下, 振荡反应, 48hr 反应转化率达 89%。

实施例 19

0.3g 固定化酶加入含 0.2g 己二酸和 0.203g 庚醇的 20ml 正己烷中, 37℃条件下, 振荡反应, 24hr 反应转化率达 92%。

实施例 20

0.2g 实施例 5 中制备的固定化酶加入 0.2g 癸二酸和 2g 己醇, 无溶剂条件下, 40℃下反应 20h, 转化率达 94%。

实施例 21

0.16g 实施例 5 中制备的固定化酶加入 0.2g 己二酸和 2g 辛醇, 无溶剂条件下, 35℃下反应 50h, 转化率达 90%。

实施例 22

0.50g 实施例 5 中制备的固定化酶加入 0.0956g 维生素 C 和 1.051g 棕榈酸的 10mL 丙酮溶剂, 40℃, 反应 72 小时, 转化率为 65.3%。

实施例 23

0.60g 实施例 7 中制备的固定化酶加入 0.0956g 维生素 C 和 0.956g 月桂酸的 10mL 丙酮溶剂, 37℃, 反应 72 小时, 转化率为 56.5%。

实施例 24

0.40g 固定化酶加入 0.0956g 维生素 C 和 1.203g 豆蔻酸的 10mL 丙酮溶剂, 40℃, 反应 72 小时, 转化率为 58.2%。

实施例 25

0.50g 实施例 5 中制备的固定化酶加入 0.0956g 维生素 C 和 1.000g 亚油酸的 10mL 丙酮溶剂, 35℃, 反应 72 小时, 转化率为 61.6%。

实施例 26

0.65g 实施例 5 中制备的固定化酶加入 0.0956g 维生素 C 和 1.203g 亚麻酸的 10mL 丙酮溶剂, 40℃, 反应 72 小时, 转化率为 63.6%。

实施例 27

0.3g 实施例 5 中制备的固定化酶加入含 0.100g (0.3mmol) 维生素 A 醋酸酯和 0.234g (0.9mmol) 棕榈酸的 10ml 正己烷中, 35℃下反应 24h 转化率达 84%。

实施例 28

0.4g 实施例 5 中制备的固定化酶加入含 0.100g (0.3mmol) 维生素 A 醋酸酯和 0.254g (0.9mmol) 油酸的 20ml 正己烷中, 40℃下反应 24h 转化率达 80%。

实施例 29

0.3g 实施例 5 中制备的固定化酶加入含 2.00g 色拉油和 0.25g 甲醇的 10ml 石油醚中, 40℃下反应 30h 转化率达 93%。

实施例 30

0.3g 实施例 5 中制备的固定化酶加入含 2.00g 豆油和 0.27g 甲醇的 10ml 正庚烷中, 35℃下反应 40h 转化率达 92%。

实施例 31

0.4g 实施例 5 中制备的固定化酶加入含 2.00g 红花油和 0.30g 甲醇的 10ml 石油醚中, 40℃下反应 50h 转化率达 93%。

实施例 32

0.35g 实施例 5 中制备的固定化酶加入含 2.00g 亚麻油和 0.28g 甲醇的 10ml 正己烷中, 30℃下反应 50h 转化率达 90%。

实施例 33

0.3g 实施例 5 中制备的固定化酶加入含 2.00g 玉米油和 0.26g 甲醇的 10ml 石油醚

中，40℃下反应 30h 转化率达 92%。

实施例 34

0.3g 实施例 6 中制备的固定化酶加入含 2.00g 棕榈油和 0.29g 甲醇的 10ml 环己烷中，30℃下反应 40h 转化率达 89%。

实施例 35

0.3g 实施例 5 中制备的固定化酶加入含 2.00g 色拉油和 0.36g 乙醇的 10ml 石油醚中，40℃下反应 30h 转化率达 91%。

实施例 36

0.4g 实施例 5 中制备的固定化酶加入含 0.110g 甘油和 0.190g 癸酸的 20ml 正己烷中，37℃下反应 24h 转化率达到 96%。

实施例 37

0.4g 实施例 5 中制备的固定化酶加入含 0.110g 甘油和 0.178g 辛酸的 20ml 正己烷中，40℃下反应 24h 转化率达到 92%。

序 列 表

<110> 北京化工大学

<120> 脂肪酶、其基因、产生该酶的亚罗解脂酵母及其应用

<160> 2

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 301

<212> PRT

<213> 亚罗解脂酵母

<220>

<221> misc_特征

<222> (179)

<223> 突变位点

<400> 1

Val	Tyr	Thr	Ser	Thr	Glu	Thr	Ser	His	Ile	Asp	Gln	Glu	Ser	Tyr	Asn
1				5					10					15	

Phe	Phe	Glu	Lys	Tyr	Ala	Arg	Leu	Ala	Asn	Ile	Gly	Tyr	Cys	Val	Gly
			20					25					30		

Pro	Gly	Thr	Lys	Ile	Phe	Lys	Pro	Phe	Asn	Cys	Gly	Leu	Gln	Cys	Ala
		35					40					45			

His	Phe	Pro	Asn	Val	Glu	Leu	Ile	Glu	Glu	Phe	His	Asp	Pro	Arg	Leu
50						55					60				

Ile	Phe	Asp	Val	Ser	Gly	Tyr	Leu	Ala	Val	Asp	His	Ala	Ser	Lys	Gln
65					70				75					80	

Ile	Tyr	Leu	Val	Ile	Arg	Gly	Thr	His	Ser	Leu	Glu	Asp	Val	Ile	Thr
				85				90						95	

Asp	Ile	Arg	Ile	Met	Gln	Ala	Pro	Leu	Thr	Asn	Phe	Asp	Leu	Ala	Ala
			100				105						110		

Asn	Ile	Ser	Ser	Thr	Ala	Thr	Cys	Asp	Asp	Cys	Leu	Val	His	Asn	Gly
		115				120					125				

Phe	Ile	Gln	Ser	Tyr	Asn	Asn	Thr	Tyr	Asn	Gln	Ile	Gly	Pro	Lys	Leu
130						135					140				

Asp Ser Val Ile Glu Gln Tyr Pro Asp Tyr Gln Ile Ala Val Thr Gly
145 150 155 160

His Ser Leu Gly Gly Ala Ala Ala Leu Leu Phe Gly Ile Asn Leu Lys
165 170 175

Val Asn Asp His Asp Pro Leu Val Val Thr Leu Gly Gln Pro Ile Val
180 185 190

Gly Asn Ala Gly Phe Ala Asn Trp Val Asp Lys Leu Phe Phe Gly Gln
195 200 205

Glu Asn Pro Asp Val Ser Lys Val Ser Lys Asp Arg Lys Leu Tyr Arg
210 215 220

Ile Thr His Arg Gly Asp Ile Val Pro Gln Val Pro Phe Trp Asp Gly
225 230 235 240

Tyr Gln His Cys Ser Gly Glu Val Phe Ile Asp Trp Pro Leu Ile His
245 250 255

Pro Pro Leu Ser Asn Val Val Met Cys Gln Gly Gln Ser Asn Lys Gln
260 265 270

Cys Ser Ala Gly Asn Thr Leu Leu Gln Gln Val Asn Val Ile Gly Asn
275 280 285

His Leu Gln Tyr Phe Val Thr Glu Gly Val Cys Gly Ile
290 295 300

<210> 2
<211> 903
<212> DNA
<213> 亚罗解脂酵母

<220>
<221> misc_特征
<222> (536)
<223> 突变位点

<400> 2
gtgtacacct ctaccgagac ctctcacatt gaccaggagi cctacaactt ctttgagaag 60
tacgcccgcac tcgcaaacat tggatattgt gttgggtcccg gcactaagat cticaagccc 120
ttcaactgtg gcctgcaatg tgcccacttc cccaacgttg agctcatcga ggagttccac 180

gacccccgc	lcattttga	tglllclggt	tacctcgctg	ttgalcatgc	ciccaagcag	240
atctaccttg	llattcgagg	aaccacict	ctggaggacg	tcataaccga	catccgaatc	300
atgcaggcgc	ctcigacgaa	cittigatct	gtgctaaca	tcctttctac	tgtacttgt	360
gatgacigtc	llgiccacaa	tggttcacac	cagtcctaca	acaacaccta	caatcagatc	420
ggccccaage	tcgactctgt	gallgagcag	tatcccgact	accagattgc	tgtaaccggt	480
cactctctcg	gaggagctgc	agcccttcctg	ttcggaatca	accicaaggt	laacgaccac	540
gatccccctg	ttgttacct	tggtcagccc	attgtcggta	acgtcggcct	tgtaactgg	600
gicgataaac	cttctttlgg	ccaggagaac	cccgatgtct	ccaaggtgic	caaagaccga	660
aagctctacc	gaatcaccca	ccgaggagat	atcgccctc	aagtgcctt	ctgggacggt	720
taccagcact	gtcttggtga	ggctcttatt	gactggcccc	tgatccacc	tcctctctcc	780
aacgttgtca	tgtgccaggg	ccagagcaat	aaacagtgt	ctgccggtaa	cactctgtc	840
cagcaggtca	atgigattgg	aaaccatctg	cagtaactcg	tcaccgaggg	tgtctgtggt	900
atc						903

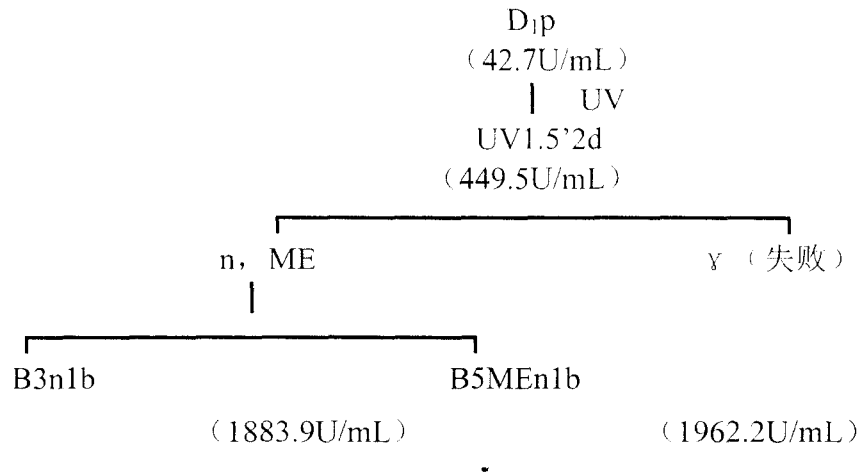


图 1

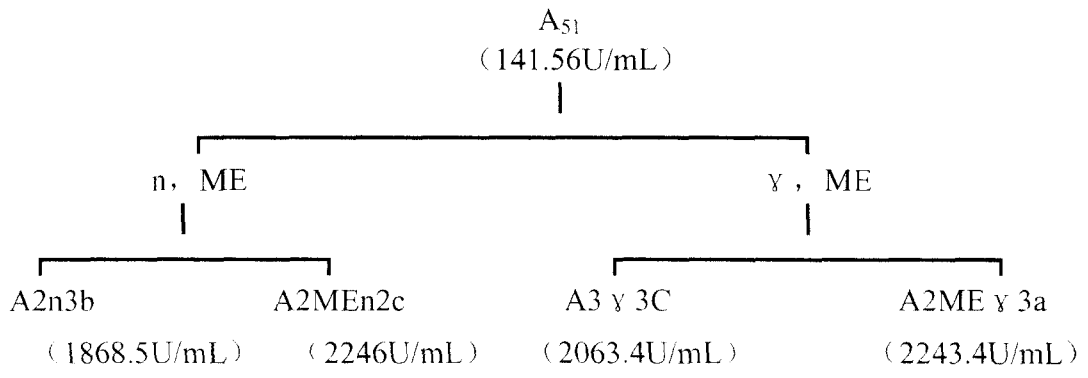


图 2

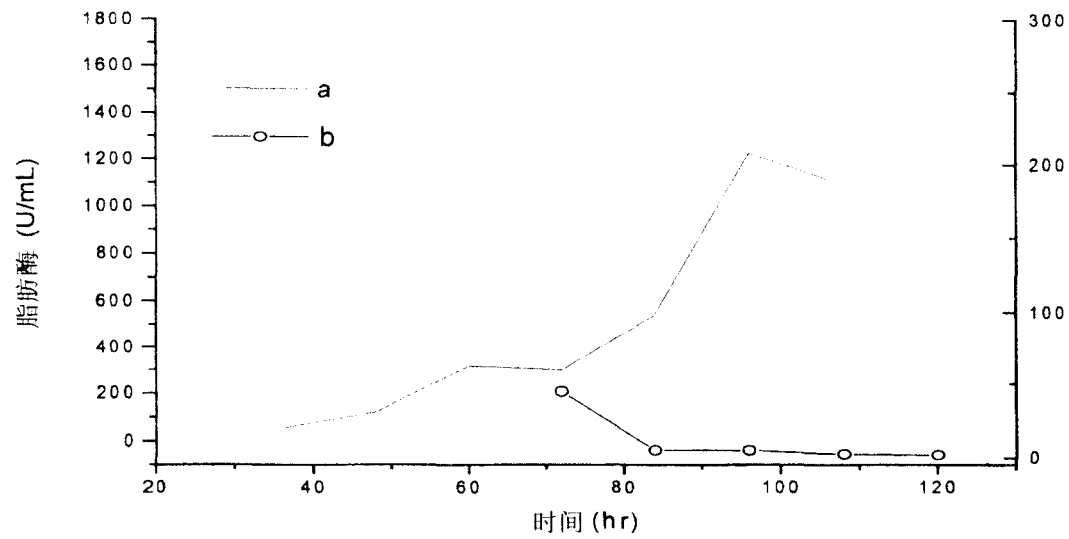


图 3

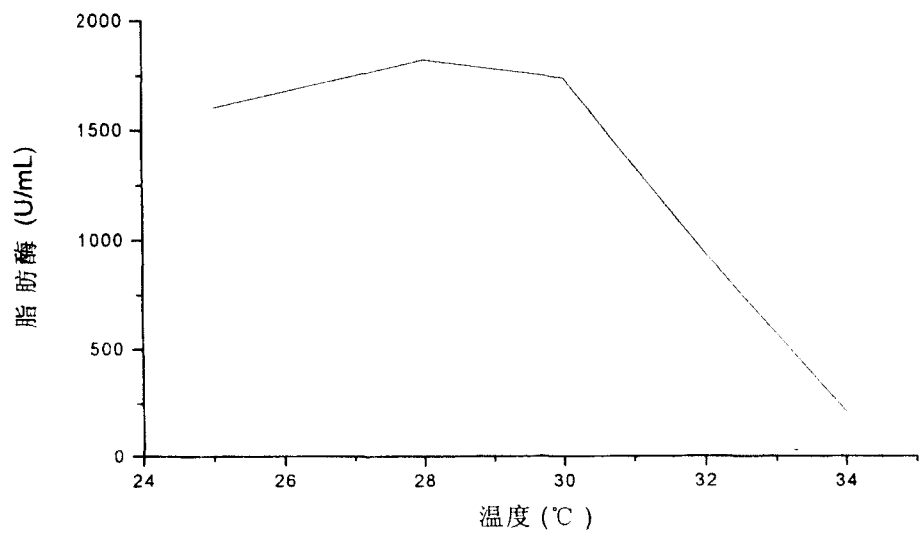


图 4

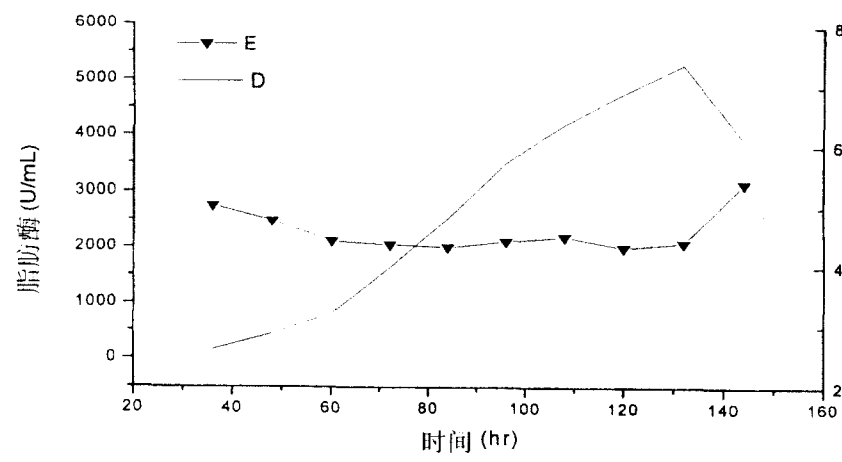


图 5

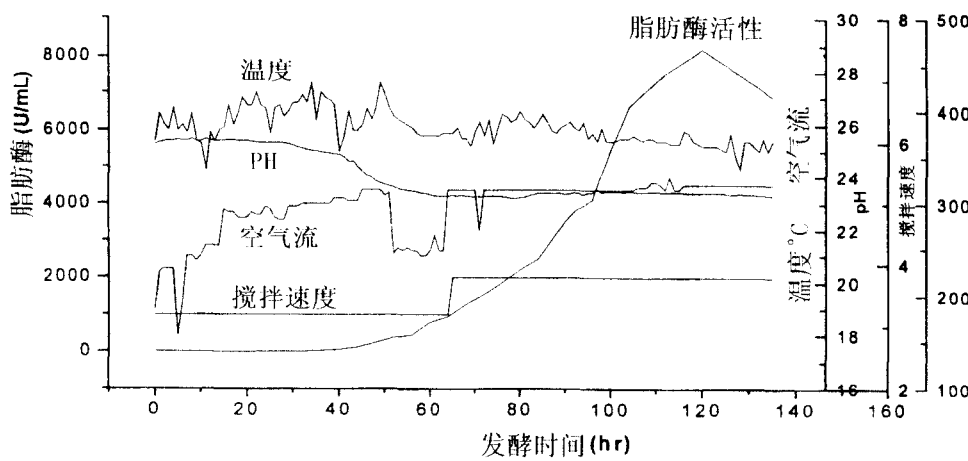


图 6