

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(10) 国际公布号

WO 2020/238339 A1

(43) 国际公布日
2020 年 12 月 3 日 (03.12.2020)

(51) 国际专利分类号:

C12N 9/20 (2006.01)

C11D 7/42 (2006.01)

C12N 15/55 (2006.01)

C11D 11/00 (2006.01)

C11D 3/386 (2006.01)

NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/079438

(22) 国际申请日: 2020 年 3 月 16 日 (16.03.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:

201910468809.X 2019年5月31日 (31.05.2019) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 王睿 (WANG, Rui); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道 1800 号张勇, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代理有限公司 (HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市松北区科技一街 99 号 18 栋 E 区 501 张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: LIPASE MUTANT AND USE THEREOF IN STAIN REMOVAL

(54) 发明名称: 一种脂肪酶突变体及其在去污方面的应用

(57) Abstract: Provided are multiple lipase mutants with a good thermal stability, a good pH stability and a good washing performance. The lipase mutants can be used in aspects such as stain removal, oil processing, dairy processing, pasta processing, meat processing, drug synthesis, diesel synthesis, polymer synthesis, chiral compound synthesis, leather production, detergent preparation and paper making, wherein same falls within the technical field of enzyme engineering.

(57) 摘要: 提供了多种热稳定性好、pH 稳定性好、洗涤性能好的脂肪酶突变体, 可用于去污、油脂加工、乳品加工、面食加工、肉类加工、药物合成、柴油合成、高分子合成、手性化合物合成、皮革生产、制备洗涤剂 and 造纸等方面, 属于酶工程技术领域。



WO 2020/238339 A1

一种脂肪酶突变体及其在去污方面的应用

技术领域

本发明涉及一种脂肪酶突变体及其在去污方面的应用，属于酶工程技术领域。

背景技术

脂肪酶（Lipase，EC 3.1.1.3，甘油酯水解酶）是水解脂肪的一类酶的总称。在有些反应系统中，脂肪酶可以催化水解、醇解、转酯、氢解、间接氧化还原转酯化作用，此外，脂肪酶还具有水解外消旋混合物以及酯合成和合成肽键的能力，因此，脂肪酶在很多领域均具有重要的应用，例如：

1、脂肪酶可在油脂加工中应用，油脂的脂肪酶水解可在常温常压下进行，因此，不会使得油脂中的高度不饱和脂肪酸和生育酚等生物物质变性；

2、脂肪酶可在乳品加工中应用，应用脂肪酶在乳品中进行乳脂水解，可增强干酪、奶粉、奶油的风味，促进干酪的成熟，改善乳制品的品质；

3、脂肪酶可在面食加工中应用，在面食中加入脂肪酶，可使产品的弹性得到不同程度的提高，面皮薄而透明但不易破裂，改善食感，另外，在面食中加入脂肪酶，可释放出单酸甘油酯，延缓腐败，提高面食的保鲜能力；

4、脂肪酶可在肉类加工中应用，在肉类中加入脂肪酶，可有效降解肉类中的脂类，制作无脂肪肉；

5、脂肪酶可在药物合成中应用，微生物脂肪酶被用来从动物和植物中富集多不饱和脂肪酸，游离的多不饱和脂肪酸和它们的单双甘酯被用来生产各种药物，如硫氮草酮、萘普生、卡托普利等药物的合成中都要用到脂肪酶；

6、脂肪酶可在柴油合成中应用，酶法合成柴油就是利用脂肪酶催化动植物油脂与低碳醇间的酯交换反应生成相应的脂肪酸酯，和传统化学催化合成柴油相比，该法具有提纯工艺简单、投资设备少、耗能低、污染小、对油脂原料要求低等优点，已日益引起人们的普遍关注；

7、脂肪酶可在高分子合成中应用，当前，人工合成的高分子材料造成了严重的环境污染，因此，应用酶催化法合成可以被微生物降解的该分子材料越来越受到人们的重视；

8、脂肪酶可在手性化合物合成中应用，脂肪酶可以在非水解质中起作用，其在非水解质中的酶催化反应可合成具有光学活性的醇、脂肪酸、内酯等医药农药中间体。

9、脂肪酶可在皮革生产中应用，在皮革的加工过程中，一个重要的步骤是脱除与皮革或皮毛紧密相连的残余脂肪和蛋白质，其中，皮内脂肪由于受到脂肪膜的保护，很难被石灰处

理等化学处理方法去除，利用脂肪酶的分解作用或与蛋白酶混合使用，能够轻易进入脂肪内部将其乳化出来，明显提高了皮革质量；

10、脂肪酶可在制备洗涤剂中应用，应用遗传工程开发出洗涤剂用脂肪酶是现代生物技术大规模工业化最成功的应用之一；

11、脂肪酶可在造纸合成中应用，“洽脂”是木材中所有疏水性成分的总称，包括三甘酯和蜡脂，它会在干燥柱上沉积而影响纸的质量和生产能力，脂肪酶可除去纸浆中的“洽脂”，改善纸的质量。

然而，脂肪酶的大多数应用都对脂肪酶的稳定性有一定的要求，例如，药物合成的过程中，常需使用较高的温度，这对脂肪酶的热稳定性有了更高的要求；皮革加工和造纸过程中需使用强碱，这对脂肪酶在碱性条件下的 pH 稳定性有了更高的要求，而现有的大多数脂肪酶稳定性都比较差，例如，来源于少根根霉（*Rhizopus arrhizus*）的脂肪酶 RAL，其最适温度仅有 35℃，在 50℃下热处理 10 min 后，只能残余 40%的酶活，处理到 40 min 后，酶活会完全丧失，其在 pH 大于 9.5 的条件下，会损失 70%以上活性，这无疑大大限制了脂肪酶在上述应用中的进一步发展。

因此，急需提供一种稳定性，尤其是热稳定性和在碱性条件下 pH 稳定性强的脂肪酶。

发明内容

[技术问题]

本发明要解决的技术问题是提供一种稳定性，尤其是热稳定性和在碱性条件下 pH 稳定性强的脂肪酶（Lipase，EC 3.1.1.3）。

[技术方案]

为解决上述问题，本发明提供了一种脂肪酶突变体，所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 151 位、第 235 位、第 171 位、第 343 位、第 275 位、第 332 位、第 310 位或第 180 位氨基酸进行突变得到的；

或者，所述酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 316 位以及第 340 位氨基酸同时进行突变得到的；

或者，所述酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 178 位以及第 238 位氨基酸同时进行突变得到的；

或者，所述酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 316 位、第 340 位、第 178 位以及第 238 位氨基酸同时进行突变得到的；

或者,所述酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 235 位、第 343 位、第 332 位以及第 310 位氨基酸同时进行突变得到的;

或者,所述酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 151 位、第 171 位、第 275 位以及第 180 位氨基酸同时进行突变得到的;

或者,所述酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 235 位、第 343 位、第 332 位、第 310 位、第 151 位、第 171 位、第 275 位以及第 180 位氨基酸同时进行突变得到的;

或者,所述酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 235 位、第 343 位、第 332 位、第 310 位、第 151 位、第 171 位、第 275 位、第 180 位、第 316 位、第 340 位、第 178 位以及第 238 位氨基酸同时进行突变得到的。

在本发明的一种实施方式中,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 151 位丝氨酸突变为天冬酰胺得到的 (S151N), 命名为 L1;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 235 位丝氨酸突变为丙氨酸得到的 (S235A), 命名为 L2;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 171 位赖氨酸突变为精氨酸得到的 (K171R), 命名为 L3;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 343 位丝氨酸突变为酪氨酸得到的 (S343Y), 命名为 L4;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 275 位甘氨酸突变为丙氨酸得到的 (G275A), 命名为 L5;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 332 位谷氨酰胺突变为苯丙氨酸得到的 (Q332F), 命名为 L6;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 310 位天冬氨酸突变为缬氨酸得到的 (D310V), 命名为 L7;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 180 位亮氨酸突变为组氨酸得到的 (L180H), 命名为 L8;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 316 位苯丙氨酸突变为半胱氨酸以及第 340 位甘氨酸突变为半胱氨酸得到的 (F316C\G340C), 命名为 L9;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 178 位丝氨酸突变为半胱氨酸以及第 238 位谷氨酰胺突变为半胱氨酸得到的 (S178C\Q238C), 命名为 L10;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 316 位苯丙氨酸突变为半胱氨酸、第 340 位甘氨酸突变为半胱氨酸、第 178 位丝氨酸突变为半胱氨酸以及第 238 位谷氨酰胺突变为半胱氨酸得到的 (F316C\G340C\S178C\Q238C), 命名为 L11;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 235 位丝氨酸突变为丙氨酸、第 343 位丝氨酸突变为酪氨酸、第 332 位谷氨酰胺突变为苯丙氨酸以及第 310 位天冬氨酸突变为缬氨酸得到的 (S235A\S343Y\Q332F\D310V), 命名为 L12;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 151 位丝氨酸突变为天冬酰胺、第 171 位赖氨酸突变为精氨酸、第 275 位甘氨酸突变为丙氨酸以及第 180 位亮氨酸突变为组氨酸得到的 (S151N\K171R\G275A\L180H), 命名为 L13;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 235 位丝氨酸突变为丙氨酸、第 343 位丝氨酸突变为酪氨酸、第 332 位谷氨酰胺突变为苯丙氨酸、第 310 位天冬氨酸突变为缬氨酸、第 151 位丝氨酸突变为天冬酰胺、第 171 位赖氨酸突变为精氨酸、第 275 位甘氨酸突变为丙氨酸以及第 180 位亮氨酸突变为组氨酸得到的 (S235A\S343Y\Q332F\D310V\S151N\K171R\G275A\L180H), 命名为 L14;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 235 位丝氨酸突变为丙氨酸、第 343 位丝氨酸突变为酪氨酸、第 332 位谷氨酰胺突变为苯丙氨酸、第 310 位天冬氨酸突变为缬氨酸、第 151 位丝氨酸突变为天冬酰胺、第 171 位赖氨酸突变为精氨酸、第 275 位甘氨酸突变为丙氨酸、第 180 位亮氨酸突变为组氨酸、第 316 位苯丙氨酸突变为半胱氨酸、第 340 位甘氨酸突变为半胱氨酸、第 178 位丝氨酸突变为半胱氨酸以及第 238 位谷氨酰胺突变为半胱氨酸得到的

(S235A\S343Y\Q332F\D310V\S151N\K171R\G275A\L180H\F316C\G340C\S178C\Q238C), 命名为 L15。

本发明还提供了一种基因, 所述基因编码上述脂肪酶突变体。

本发明还提供了一种重组质粒, 所述重组质粒携带上述基因。

在本发明的一种实施方式中, 所述重组质粒的表达载体为 pPIC9K 载体、pPIC3.5K 载体、pPICZ α 载体或 pPICZ 载体。

本发明还提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞携带上述基因或上述重组质粒。

在本发明的一种实施方式中，所述宿主细胞为真菌或细菌。

在本发明的一种实施方式中，所述宿主细胞为毕赤酵母。

本发明还提供了一种洗涤剂，所述洗涤剂含有上述脂肪酶突变体。

在本发明的一种实施方式中，其特征在于，所述洗涤剂含有上述脂肪酶突变体、表面活性剂以及缓冲液。

在本发明的一种实施方式中，所述表面活性剂可为十二烷基硫酸钠（SDS）、乙氧基化烷基硫酸钠（AES）、脂肪醇聚氧乙烯醚（AEO-9）和/或月桂基磺化琥珀酸单酯二钠（DLS）。

在本发明的一种实施方式中，所述缓冲液可为磷酸缓冲液、Tris 缓冲液、柠檬酸盐缓冲液或碳酸钠盐缓冲液。

在本发明的一种实施方式中，所述洗涤剂中上述脂肪酶突变体的浓度为 10~400 U/L。

本发明还提供了一种去污方法，所述方法为在需去污物品中添加上述脂肪酶突变体；或者，所述方法为在需去污物品中添加上述洗涤剂。

本发明还提供了上述脂肪酶突变体或上述基因或上述重组质粒或上述宿主细胞在油脂加工、乳品加工、面食加工、肉类加工、药物合成、柴油合成、高分子合成、手性化合物合成、皮革生产、制备洗涤剂或造纸方面的应用。

本发明还提供了上述脂肪酶突变体或上述洗涤剂或上述去污方法在去污方面的应用。

[有益效果]

（1）本发明脂肪酶突变体的热稳定性较野生型有了明显的改善，其中，L11 的最适温度可达 45°C，较野生型提高了 5°C，L11 的 T_m 值可达 49.2°C，较野生型提高 4.2°C，L11 的在 65°C 的半衰期为 3.9 min，是野生型的 4.59 倍；L12 的最适温度为 45°C，较野生型提高了 5°C， T_m 值可达 50.3°C，较野生型提高 5.3°C，L12 的在 65°C 的半衰期为 4.9 min，是野生型的 5.76 倍；L13 的最适温度为 43°C，较野生型提高了 3°C， T_m 值可达 53.8°C，较野生型提高 8.8°C，L13 的在 65°C 的半衰期为 7.6 min，是野生型的 8.94 倍；L14 的最适温度为 48°C，较野生型提高了 8°C， T_m 值可达 60.8°C，较野生型提高 15.8°C，L14 的在 65°C 的半衰期为 19.8 min，是野生型的 23.29 倍；L15 的最适温度可达 50°C，较野生型提高了 10°C， T_m 值可达 68.8°C，较野生型提高 23.8°C，L15 的在 65°C 的半衰期为 56.2 min，是野生型的 66.11 倍；L1~L10 的热稳定性也相比于野生型有了一定的改善；

（2）本发明脂肪酶突变体的 pH 稳定性较野生型有了明显的改善，其中，L9 的最适 pH 由野生型的 8.0 提升至 8.5；L11 的最适 pH 由野生型的 8.0 提升至 9.0，L11 在 pH 为 10 的条

件下的酶活可达最适 pH 条件下的酶活的 80.5%，较野生型提高了 10.73 倍，L11 在 pH 为 10 的条件下处理 30 min 后的残余酶活可达 90.8%，较野生型提高了 2.20 倍；L15 的最适 pH 由野生型的 8.0 提升至 9.0；L15 在 pH 为 10 的条件下的酶活可达最适 pH 条件下的酶活的 75.2%，较野生型提高了 10.02 倍，L15 在 pH 为 10 的条件下处理 30 min 后的残余酶活可达 100%，较野生型提高了 2.43 倍；

(3) 本发明脂肪酶突变体的洗涤性能好，其中，使用 L9 洗涤油污布的去油率可达 92.8%；使用 L11 洗涤油污布的去油率可达 93.5%；使用 L15 洗涤油污布的去油率可达 93.6%；

(4) 本发明脂肪酶突变体的热稳定性好、pH 稳定性好、洗涤性能好，因此，本发明的脂肪酶突变体在去污、油脂加工、乳品加工、面食加工、肉类加工、药物合成、柴油合成、高分子合成、手性化合物合成、皮革生产、制备洗涤剂 and 造纸等方面均有很重要的应用。

附图说明

图 1：含有编码不同突变体基因的重组质粒的全质粒 PCR 扩增电泳图；

其中，M 为 DL10000 DNA 分子量标准，1 为含有编码突变体 S151N 的基因的重组质粒的全质粒 PCR 扩增电泳结果，2 为含有编码突变体 S235A 的基因的重组质粒的全质粒 PCR 扩增电泳结果，3 为含有编码突变 K171R 的基因的重组质粒的全质粒 PCR 扩增电泳结果。

图 2：含有编码不同突变体基因的毕赤酵母工程菌的发酵上清液的蛋白纯化 SDS-PAGE 电泳图；

其中，M 为 DL10000 DNA 分子量标准，1 为含有编码突变体 S151N 的基因的毕赤酵母工程菌的发酵上清液的蛋白纯化 SDS-PAGE 电泳结果，2 为含有编码突变体 S235A 的基因的毕赤酵母工程菌的发酵上清液的蛋白纯化 SDS-PAGE 电泳结果，3 为含有编码突变 K171R 的基因的毕赤酵母工程菌的发酵上清液的蛋白纯化 SDS-PAGE 电泳结果。

图 3：野生型、L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10 在不同温度下的相对酶活。

图 4：野生型、L11、L12、L13、L14、L15、L16 以及 L17 在不同温度下的相对酶活。

图 5：野生型、L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10 在不同 pH 下的相对酶活。

图 6：野生型、L11、L12、L13、L14、L15、L16 以及 L17 在不同 pH 下的相对酶活。

具体实施方式

下面结合具体实施例对本发明进行进一步的阐述。

下述实施例中涉及的大肠杆菌 JM109 购自生工生物工程（上海）有限公司；下述实施例中涉及的毕赤酵母 GS115 购自 Invitrogen 公司；下述实施例中涉及的 pPIC9K 载体购自 Invitrogen 公司。

下述实施例中涉及的检测方法如下：

脂肪酶酶活的检测方法：

pNPP 法，具体参考文献：Pencreach G et al. Enzyme and Microbial Technol. 1996, 18: 417-422.。

其中，脂肪酶酶活的定义为：在 pH 8.0，40°C 的条件下反应，每分钟产生 1 μmol 对硝基苯酚的酶量为一个酶活力单位（1U）。

下述实施例中涉及的培养基如下：

LB 液体培养基（m/m）：蛋白胨 1%、酵母提取物 0.5%、NaCl 1%，pH7.0。

YPD 液体培养基（m/m）：酵母提取物 1%、胰蛋白胨 2%、葡萄糖 2%，121°C 高压灭菌 20 min。

YPD 平板（m/m）：酵母提取物 1%、胰蛋白胨 2%、葡萄糖 2%、琼脂 2%，121°C 高压灭菌 20 min。

MD 平板（m/m）：无氨基酵母氮源 1.34%、生物素 4×10^{-5} %、葡萄糖 2%、琼脂 2%。

MM 平板（m/m）：无氨基酵母氮源 1.34%、生物素 4×10^{-5} %、甲醇 0.5%、琼脂 2%。

BMGY 培养基（m/m）：酵母提取物 1%、胰蛋白胨 2%。

实施例 1：野生型脂肪酶的表达

具体步骤如下：

从华根霉（*Rhizopus chinensis*）中扩增得到编码氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的基因；将获得的基因 *proRCL* 通过 *Not* I 和 *Eco* R I 双酶切与 pPIC9K 载体连接，得到重组质粒 pPIC9K-*proRCL*；将重组质粒 pPIC9K-*proRCL* 转化至大肠杆菌 JM109 中，得到大肠杆菌工程菌 *E.coli* JM109/pPIC9K-*proRCL*；将 *E.coli* JM109/pPIC9K-*proRCL* 涂布于 LB 平板（含 100 mg/L 卡那霉素）上，于 37°C 培养 10 h 后，筛选阳性克隆并测序确认，得到验证正确的重组质粒 pPIC9K-*proRCL*；将重组质粒 pPIC9K-*proRCL* 用 *Sal* I 线性化后，电转化入毕赤酵母 GS115 中，得到毕赤酵母工程菌 *Pichia* GS115/pPIC9K-*proRCL*；将毕赤酵母工程菌 *Pichia* GS115/pPIC9K-*proRCL* 涂布于 MD 平板（含 100 mg/L 卡那霉素）上，于 37°C 培养 10 h 后，提取基因组、PCR 鉴定确定阳性克隆，得到阳性转化子；将阳性转化子接种于含 25 mL BMGY 培养基的 250 mL 摇瓶中，30°C、250 r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 4.0，得到菌液；将菌液于 8 000 r/min 离心 5 min 后收集菌体，用 100 mL 的 BMMY 培养基重悬菌体至 OD₆₀₀ 为 1.0，得到重悬液；将重悬液于 30°C、250 r/min 继续培养，每 24 h 补加 0.5%（体积比）甲醇诱导表达，96 h 后收集菌液，将菌液于 8 000 r/min 离心 5 min，得到含有野生型酶的上清液；将上清液利用镍

柱进行亲和层析，在 250 mmol/L 咪唑浓度时洗脱目的蛋白，得到纯化后的野生型酶，命名为野生型；

其中，扩增引物如下：

Fm : 5'- TCAAGATCCCTAGGGTTCCTGTTGCTGGTCATAAAGGTTC -3' (SEQ ID NO.2) ;

Rm : 5'- AATTCAGTGCGGCCGCTTAATGATGATGATGATGATGAGAAGAACCCAAACAGCTTCC TTCGTTAATACC -3' (SEQ ID NO.3) 。

实施例 2：脂肪酶突变体的制备及表达

具体步骤如下：

利用全质粒 PCR 技术，以实施例 1 获得的重组质粒 pPIC9K-*proRCL* 为模板进行定点突变，获得突变体 S151N、S235A、K171R、S343Y、G275A、Q332F、D310V、L180H、F316C\G340C、S178C\Q238C 、 F316C\G340C\S178C\Q238C 、 S235A\S343Y\Q332F\D310V 、 S151N\K171R\G275A\L180H 、 S235A\S343Y\Q332F\D310V\S151N\K171R\G275A\L180H 、 S235A\S343Y\Q332F\D310V\S151N\K171R\G275A\L180H\F316C\G340C\S178C\Q238C 、 D159R 以及 T319V；

其中，突变引物为：

S151N：

S151N-Fm: 5'- CTGCTTACTGTCGTAACGTTCCTCAGGTACC- 3' (SEQ ID NO.4) ;

S151N-Rm: 5'- GGTACCTGGAACGACGTTACGACAGTAAGCAG -3' (SEQ ID NO.5) ;

S235A：

S235A-Fm: 5'- GTTTCCTTTCCGCATACAACCAAGTTGTCAAAG -3' (SEQ ID NO.6) ;

S235A-Rm: 5'- CTTTGACAACCTTGTTGTATGCGGAAAGGAAAC -3' (SEQ ID NO.7) ;

K171R：

K171R-Fm: 5'- GTCTCAAGTATGTTCTGATGGTAGGCTTATCAAGAC -3' (SEQ ID NO.8) ;

K171R-Rm: 5'- GTCTTGATAAGCCTACCATCAGGAACATACTTGAGAC -3' (SEQ ID NO.9) ;

S343Y：

S343Y-Fm: 5'- CCCGGTGTCGAATATTTGGATCAAGGAAGAC -3' (SEQ ID NO.10) ;

S343Y-Rm: 5'-GGGGTGAAGATAACCGGCGGCTTGAGGAGG-3' (SEQ ID NO.11) ;

G275A:

G275A-Fm : 5'-GCCTTGCTCGCTGCCATGGATCTCTACCAACGTG-3' (SEQ ID NO.12) ;

G275A-Rm : 5'-CACGTTGGTAGAGATCCATGGCAGCGAGCAAGGC-3' (SEQ ID NO.13) ;

Q332F:

Q332F-Fm: 5'-CCCTCATGTTCTCTCTTTCGCCTTCGGTTATCTTC-3' (SEQ ID NO.14);

Q332F-Rm : 5'-GAAGATAACCGAAGGCGAAAGGAGGAACATGAGGG-3' (SEQ ID NO.15) ;

D310V:

D310V-Fm : 5'-CATTCGCTTACTACGTCGTCAGCACCGGAATTCCC-3' (SEQ ID NO.16) ;

D310V-Rm : 5'-GGGAATCCGGTGCTGACGACGTAGTAAGCGAATG-3' (SEQ ID NO.17) ;

L180H:

L180H-Fm: 5'-GACCTTCACTTCTCTTCACACTGATACCAATGGC-3' (SEQ ID NO.18);

L180H-Rm : 5'-GCCATTGGTATCAGTGTGAAGGCAAGTGAAGGTC-3' (SEQ ID NO.19) ;

F316C\G340C:

F316C-Fm: 5'-CACCGGAATTCCCTGCCACCGTACCGTTCAC-3' (SEQ ID NO.20) ;

F316C-Rm: 5'-GTGAACGGTACGGTGGCAGGGAATTCCGGTG-3' (SEQ ID NO.21) ;

G340C-Fm: 5'-GTTATCTTCACCCCTTGCGTCGAATCTTGGATC-3' (SEQ ID NO.22) ;

G340C-Rm: 5'-GATCCAAGATTCGACGCAGGGGTGAAGATAAC-3' (SEQ ID NO.23) ;

S178C\Q238C:

S178C-Fm: 5'-GACCTTCACTTTGCCTTCTCACTGATACCAATG-3' (SEQ ID NO.24) ;

S178C-Rm: 5'-CATTGGTATCAGTGAGAAGGCAAGTGAAGGTC-3' (SEQ ID NO.25) ;

Q238C-Fm: 5'-CCTTTCCTCATACAACTGCGTGTCAAAGACTACTTCCCCG-3' (SEQ ID NO.26) ;

Q238C-Rm : 5'-CGGGGAAGTAGTCTTTGACAACGCAGTTGTATGAGGAAAGG-3'

(SEQ ID NO.27) ;

F316C\G340C\S178C\Q238C、S235A\S343Y\Q332F\D310V、S151N\K171R\G275A\L180H、
S235A\S343Y\Q332F\D310V\S151N\K171R\G275A\L180H 以 及
S235A\S343Y\Q332F\D310V\S151N\K171R\G275A\L180H\F316C\G340C\S178C\Q238C: 同上;
D159R;

D159R-Fm: 5'-GGTACCAAGTGGCGATGTAAGCAATGTCTC-3' (SEQ ID NO.28) ;

D159R-Rm: 5'-GAGACATTGCTTACATCGCCACTTGGTACC-3' (SEQ ID NO.29) ;

T319V:

T319V-Fm: 5'-CCCTTCCACCGTGTCGTTTACAAGCGTG-3' (SEQ ID NO.30) ;

T319V-Rm: 5'-CACGCTTGTGAACGACACGGTGGGAAGGG-3' (SEQ ID NO.31) ;

PCR 体系为: 10 μ M 正向引物和反向引物各 1 μ L, dNTPMix 2 μ L, 5 $\times$ PS Buffer 2.5 μ L,
PrimeStar GXL polymerase 0.5 μ L, 模板 0.5 μ L, 加双蒸水补齐 25 μ L;

PCR 条件为: 95°C 2 min; 95°C 20 s, 55~63°C 1 min, 68°C 11 min, 共 18 个循环; 68°C
5 min。

PCR 产物用 1%琼脂糖凝胶电泳进行检测, 将检测后正确的 PCR 产物用 *Dpn* I 进行消化,
后转化至大肠杆菌 JM109 中, 得到含有编码突变体的基因的大肠杆菌工程菌; 将大肠杆菌工
程菌涂布于 LB 平板 (含 100 mg/L 卡那霉素) 上, 于 37°C 培养 10 h 后, 筛选阳性克隆并测
序确认, 得到验证正确的重组质粒 (含有编码突变体 S151N、S235A、K171R 的基因的重组
质粒的全质粒 PCR 扩增电泳图见图 1) ; 将重组质粒用 *Sal* I 线性化后, 电转化入毕赤酵母
GS115 中, 得到含有编码突变体的基因的毕赤酵母工程菌; 将毕赤酵母工程菌涂布于 MD 平
板 (含 100 mg/L 卡那霉素) 上, 于 37°C 培养 10 h 后, 提取基因组、PCR 鉴定确定阳性克隆,
得到阳性转化子; 将阳性转化子接种于含 25 mL BMGY 培养基的 250 mL 摇瓶中, 30°C、250
r/min 培养至 OD₆₀₀ 为 4.0, 得到菌液; 将菌液于 8 000 r/min 离心 5 min 后收集菌体, 用 100 mL
的 BMMY 培养基重悬菌体至 OD₆₀₀ 为 1.0, 得到重悬液; 将重悬液于 30°C、250 r/min 继续培
养, 每 24 h 补加 0.5% (体积比) 甲醇诱导表达, 96 h 后收集菌液, 将菌液于 8 000 r/min 离
心 5 min, 得到分别含有不同突变体的上清液 (含有编码突变体 S151N、S235A、K171R 的基
因的毕赤酵母工程菌的发酵上清液的蛋白纯化 SDS-PAGE 电泳图见图 2) ; 将上清液利用镍
柱进行亲和层析, 在 250 mmol/L 咪唑浓度时洗脱目的蛋白, 得到纯化后的突变体 S151N、
S235A、K171R、S343Y、G275A、Q332F、D310V、L180H、F316C\G340C、S178C\Q238C、
F316C\G340C\S178C\Q238C、S235A\S343Y\Q332F\D310V、S151N\K171R\G275A\L180H、

S235A\S343Y\Q332F\D310V\S151N\K171R\G275A\L180H
 S235A\S343Y\Q332F\D310V\S151N\K171R\G275A\L180H\F316C\G340C\S178C\Q238C
 D159R 或 T319V, 分别命名为 L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11、L12、
 L13、L14、L15、L16 以及 L17。

实施例 3: 不同脂肪酶的酶学性质研究

具体步骤如下:

1、最适温度 (T_{opt})

分别在 30°C、35°C、40°C、45°C、50°C、55°C、60°C、65°C 的条件下测定实施例 1 获得的野生型和实施例 2 获得的 L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11、L12、L13、L14、L15、L16 以及 L17 的脂肪酶酶活, 以酶活最高的为 100%, 其余酶活与之相比计算相对酶活, 以考察酶的最适作用温度 (检测结果见图 3-4)。

由图 3-4 可知, 野生型的最适温度均为 40°C; L1、L2、L3、L4、L5、L6、L8、L9、L10、L16 和 L17 的最适温度也均为 40°C, 与野生型相比没有提升; 而 L7 的最适温度提升至 45°C; L13 的最适温度提升至 43°C; L11 和 L12 的最适温度提升至 45°C; L14 的最适温度提升至 48°C; L15 的最适温度提升最多, 为 50°C, 较野生型提升了 10°C。

2、变性温度 (T_m)

将实施例 1 获得的野生型和实施例 2 获得的 L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11、L12、L13、L14、L15、L16 以及 L17 先分别于 40°C~70°C 的恒温水浴中处理 30 min, 然后分别冰浴 20 min, 最后于 40°C 下测定脂肪酶酶活, 当酶活为初始酶活的 50% 时, 该热处理温度即为酶的变性温度 (检测结果见表 1)。

由表 2 可知, 与野生型相比, L1~L15 的变性温度均有不同程度的提升, 其中, 提高程度较大的为 L11~L15, 变性温度分别为 49.2°C、50.3°C、53.8°C、60.8°C 和 68.8°C, 分别比野生型提高了 4.2°C、5.3°C、8.8°C、15.8°C 和 23.8°C; 而 L16 的变性温度为 40.1°C, L17 的变性温度为 38.5°C, 分别较野生型降低了 4.9°C 和 6.5°C。

表 1 不同脂肪酶的变性温度 (T_m)

编号	变性温度 (T_m)
野生型	45.0°C
L1	47.8°C
L2	46.9°C
L3	45.7°C
L4	48.1°C

L5	47.2°C
L6	46.3°C
L7	46.9°C
L8	47.3°C
L9	48.1°C
L10	46.2°C
L11	49.2°C
L12	50.3°C
L13	53.8°C
L14	60.8°C
L15	68.8°C
L16	40.1°C
L17	38.5°C

3、半衰期 ($t_{1/2}$)

将实施例 1 获得的野生型和实施例 2 获得的 L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11、L12、L13、L14、L15、L16 以及 L17 分别置于 65°C 恒温水浴中，每隔一段时间取样一次，测其残留酶活，比较其热稳定性（检测结果见表 2）。

由表 3 可知，与野生型相比，L1~L15 在 65°C 下半衰期均有不同程度的延长，其中，延长程度较大的为 L11~L15，半衰期分别为 3.9 min、4.9 min、7.6 min、19.8 min 和 56.2 min，分别比野生型延长了 4.59 倍、5.76 倍、8.94 倍、23.29 倍和 66.11 倍；而 L16 的半衰期为 0.75 min，L17 的半衰期为 0.5 min，分别较野生型降低了 11.76%和 41.18%。

表 2 不同脂肪酶在 65°C 下处理后的半衰期

编号	半衰期
野生型	0.85 min
L1	2.8 min
L2	2.1 min
L3	1.2 min
L4	3.2 min
L5	2.5 min
L6	1.9 min
L7	2.0 min
L8	2.6 min

L9	3.3 min
L10	1.9 min
L11	3.9 min
L12	4.9 min
L13	7.6 min
L14	19.8 min
L15	56.2 min
L16	0.75 min
L17	0.5 min

4、最适 pH

分别配置浓度为 0.05 mol/L 的柠檬酸缓冲液 (pH 6)、浓度为 0.05 mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH 6~8)、浓度为 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8~9) 以及浓度为 0.05 mol/L 的碳酸盐缓冲 (pH 9~10) 代替脂肪酶活力测定方法中的缓冲液, 在 40°C 下测定实施例 1 获得的野生型和实施例 2 获得的 L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11、L12、L13、L14、L15、L16 以及 L17 的脂肪酶酶活, 以酶活最高的为 100%, 其余酶活与之相比计算相对酶活, 以考察酶的最适作用 pH (检测结果见图 5-6)。

由图 5-6 可知, 野生型的最适 pH 为 8.0; L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L10、L12、L13、L14、L16 和 L17 的最适 pH 也为 8.0, 与野生型相比没有变化; L9 的最适 pH 均上升为 8.5, 较野生型提升了 0.5; L11 和 L15 的最适 pH 均上升为 9.0, 较野生型提升了 1, 更加偏好碱性条件。

5、耐碱能力

根据 4 中的结果, 计算实施例 1 获得的野生型和实施例 2 获得的 L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11、L12、L13、L14、L15、L16 以及 L17 在 pH 为 10 的条件下的酶活占最适 pH 条件下酶活的比例, 计算结果见表 3。

由表 3 可知, L9、L11 和 L15 在 pH 为 10 的条件下的酶活占最适 pH 条件下酶活的 90.6%、80.5% 和 75.2%, 分别较野生型分别提高了 12.1 倍、10.7 倍和 10.0 倍; L16 和 L17 在 pH 为 10 的条件下的酶活占最适 pH 条件下酶活的 7.2% 和 6.9%, 与野生型相比略有降低; 其余突变体在 pH 为 10 的条件下的酶活占最适 pH 条件下酶活的比例与野生型相差不大或略有上升。

表 3 不同脂肪酶在 pH 为 10 的条件下的酶活占最适 pH 条件下酶活的比例

编号	比例
野生型	7.5%

L1	8.5%
L2	16.5%
L3	17.6%
L4	21.0%
L5	24.5%
L6	9.9%
L7	17.8%
L8	15.6%
L9	90.6%
L10	13.4%
L11	80.5%
L12	5.7%
L13	30.3%
L14	25.6%
L15	75.2%
L16	7.2%
L17	6.9%

6、pH 稳定性

配置浓度为 0.05 mol/L、pH 为 10 的碳酸盐缓冲代替脂肪酶活力测定方法中的缓冲液，将实施例 1 获得的野生型和实施例 2 获得的 L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11、L12、L13、L14、L15、L16 以及 L17 分别在上述缓冲体系下于 25°C 保存 30 min 后，在 40°C 下测定脂肪酶活力，以初始酶活为 100%，保存后酶活与之相比计算残留酶活，以考察其 pH 稳定性（检测结果见表 4）。

由表 4 可知，L5 在 pH 为 10 的条件下处理 30 min 后的残余酶活为 65.0%，较野生型提高了 57.3%；L7 在 pH 为 10 的条件下处理 30 min 后的残余酶活为 55.3%，较野生型提高了 34.2%；L9 在 pH 为 10 的条件下处理 30 min 后的残余酶活为 87.4%，较野生型提高了 112%；L11 在 pH 为 10 的条件下处理 30 min 后的残余酶活为 98.8%，较野生型提高了 139.8%；L12 在 pH 为 10 的条件下处理 30 min 后的残余酶活为 55.8%，较野生型提高了 35.4%；L13 和 L14 在 pH 为 10 的条件下处理 30 min 后的残余酶活为 65.2%和 65.8%，分别较野生型提高了 58.3%和 59.7%；L15 在 pH 为 10 的条件下处理 30 min 后的酶活无损失，仍保持 100%，较野生型提高了 142.7%；而 L16 和 L17 在 pH 为 10 的条件下处理 30 min 后的残余酶活为 39.4%和 38.5%，比野生型略有降低；其余突变体在 pH 为 10 的条件下处理 30 min 后的残余酶活与野生型相差

不大或略有上升。

表 4 不同脂肪酶在 pH 为 10 的条件下处理 30 min 后的残余酶活

编号	残余酶活
野生型	41.2%
L1	40.6%
L2	48.3%
L3	44.4%
L4	47.2%
L5	65.0%
L6	37.8%
L7	55.3%
L8	42.1%
L9	87.4%
L10	40.5%
L11	90.8%
L12	55.8%
L13	65.2%
L14	65.8%
L15	100%
L16	39.4%
L17	38.5%

实施例 3：不同脂肪酶的洗涤性能评估

具体步骤如下：

1、油污布的制作

将棉布裁剪成 6×6 cm 大小的方形棉布块，在沸腾的三氯甲烷中煮沸脱脂 4 h，得到脱脂棉布；将橄榄油加入到甲苯中，得到浓度为 200 mg/mL 的油污水；将油污水以每次 0.1 mL 的量分两次滴加到脱脂棉布的两侧，得到滴加了油污水的脱脂棉布；将滴加了油污水的脱脂棉布先在通风橱里晾干，然后放置在 60℃的烘箱中烘干 1 h，得到油污布。

2、洗涤剂的制作

配置浓度为 0.1 mol/L 的磷酸缓冲液 (pH 9.0)，浓度为 0.1 mol/L 的 Tris 缓冲液 (pH 10.0、10.5、11.0) 以及浓度为 0.5% (m/m) 的 SDS 溶液与实施例 1 获得的野生型和实施例 2 获得的 L9、L11、L15、L16 以及 L17 配制成洗涤液，洗衣液最终体积均为 100 mL，配方如下：

洗涤剂 1: 缓冲液 50 mL, 去离子水 50 mL;

洗涤剂 2~7: 缓冲液 50 mL, 实施例 1 获得的野生型和实施例 2 获得的 L9、L11、L15、L16 或 L17 100 U, 添加去离子水至总体积 100 mL;

洗涤剂 8: 缓冲液 50 mL, SDS 溶液 25 mL, 添加去离子水至总体积 100 mL;

洗涤剂 9~14: 缓冲液 50 mL, 实施例 1 获得的野生型和实施例 2 获得的 L9、L11、L15、L16 或 L17 100 U, SDS 溶液 25 mL, 添加去离子水至总体积 100 mL。

3、油污布的洗涤

经油污布分别放入洗衣液 1~14 中, 在 50°C、200 rpm 的条件下洗涤 30 min, 洗涤完成后, 将油污布取出, 分别用 100 mL 的纯净水在 40°C、200 rpm 的条件下洗涤 3 次, 每次 2 min, 晾干后, 将油污布放置 60°C 烘箱中继续烘干 1 h。

4、洗涤性能的评估

用精密天平称取洗前和洗后油污布的质量, 去油率以洗前和洗后的油重量为衡量标准:

去油率 (%) = [(洗前油重 - 洗后油重) / 洗前油重] × 100;

每个条件下做 15 块重复油污布, 不同脂肪酶对油污布的洗涤效果如表 5。

由表 5 可知, 在 pH 为 9.0 和 10.0、10.5 和 11.0 的四个条件下加入野生型后, 去油率与未添加相比没有提升, 还略有降低, 说明野生型并无洗涤性能;

在 pH 为 9.0 和 10.0、10.5 和 11.0 的四个条件下加入 L9 后, 去油率比仅用缓冲液洗涤时提升近一倍, 当洗涤剂中含有 SDS 时, 再加入 L9, 去油率可以由 79.9%、78.6%、75.8% 和 76.1% 分别上升至 88.1%、90.5%、92.8% 和 85.5%, 提升幅度为 10.3%、15.3%、22.4% 和 12.4%; 在 pH 为 9.0 和 10.0、10.5 和 11.0 的四个条件下加入 L11 后, 去油率比仅用缓冲液洗涤时提升一倍, 当洗涤剂中含有 SDS 时, 再加入 L11, 去油率可以由 79.9%、78.6%、75.8% 和 76.1% 分别上升至 87.5%、90.4%、93.5% 和 86.3%, 提升幅度为 9.9%、15.0%、23.4% 和 13.4%; 在 pH 为 9.0 和 10.0、10.5 和 11.0 的四个条件下加入 L15 后, 去油率比仅用缓冲液洗涤时提升一倍, 当洗涤剂中含有 SDS 时, 再加入 L15, 去油率可以由 79.9%、78.6%、75.8% 和 76.1% 分别上升至 87.1%、89.1%、93.6% 和 86.5%, 提升幅度为 9.0%、13.4%、23.4% 和 13.7%, 说明 L9、L11、L15 具有非常良好的洗涤效果, 应用前景广泛;

在 pH 为 9.0 和 10.0、10.5 和 11.0 的四个条件下加入 L16 或 L17 后, 去油率与未添加相比没有提升, 说明 L16 和 L17 也并无洗涤性能。

表 5 含有不同脂肪酶的洗涤剂在不同 pH 下的洗涤性能

组别	洗净率 (%)
----	---------

	pH 9	pH 10	pH 10.5	pH 11
洗涤剂 1	16.4	19.3	17.4	16.8
洗涤剂 2	14.8	15.9	22.2	23.4
洗涤剂 3	37.1	38.3	33.8	33.0
洗涤剂 4	38.1	38.9	33.1	32.9
洗涤剂 5	37.7	39.4	32.2	31.5
洗涤剂 6	15.1	15.5	16.6	16.4
洗涤剂 7	12.9	14.7	16.5	15.6
洗涤剂 8	79.9	78.6	75.8	76.1
洗涤剂 9	76.9	75.5	75.5	76.3
洗涤剂 10	88.1	90.5	92.8	85.5
洗涤剂 11	87.5	90.4	93.5	86.3
洗涤剂 12	87.1	89.1	93.6	86.5
洗涤剂 13	75.7	76.3	74.2	73.4
洗涤剂 14	73.3	75.7	74.4	73.8

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

1.一种脂肪酶突变体,其特征在于,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 151 位、第 235 位、第 171 位、第 343 位、第 275 位、第 332 位、第 310 位或第 180 位氨基酸进行突变得到的;

或者,所述酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 316 位以及第 340 位氨基酸同时进行突变得到的;

或者,所述酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 178 位以及第 238 位氨基酸同时进行突变得到的;

或者,所述酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 316 位、第 340 位、第 178 位以及第 238 位氨基酸同时进行突变得到的;

或者,所述酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 235 位、第 343 位、第 332 位以及第 310 位氨基酸同时进行突变得到的;

或者,所述酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 151 位、第 171 位、第 275 位以及第 180 位氨基酸同时进行突变得到的;

或者,所述酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 235 位、第 343 位、第 332 位、第 310 位、第 151 位、第 171 位、第 275 位以及第 180 位氨基酸同时进行突变得到的;

或者,所述酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 235 位、第 343 位、第 332 位、第 310 位、第 151 位、第 171 位、第 275 位、第 180 位、第 316 位、第 340 位、第 178 位以及第 238 位氨基酸同时进行突变得到的。

2.如权利要求 1 所述的一种脂肪酶突变体,其特征在于,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 151 位丝氨酸突变为天冬酰胺得到的;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 235 位丝氨酸突变为丙氨酸得到的;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 171 位赖氨酸突变为精氨酸得到的;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 343 位丝氨酸突变为酪氨酸得到的;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 275 位甘氨酸突变为丙氨酸得到的;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 332 位谷氨酰胺突变为苯丙氨酸得到的;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 310 位天冬氨酸突变为缬氨酸得到的;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 180 位亮氨酸突变为组氨酸得到的;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 316 位苯丙氨酸突变为半胱氨酸以及第 340 位甘氨酸突变为半胱氨酸得到的;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 178 位丝氨酸突变为半胱氨酸以及第 238 位谷氨酰胺突变为半胱氨酸得到的;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 316 位苯丙氨酸突变为半胱氨酸、第 340 位甘氨酸突变为半胱氨酸、第 178 位丝氨酸突变为半胱氨酸以及第 238 位谷氨酰胺突变为半胱氨酸得到的;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 235 位丝氨酸突变为丙氨酸、第 343 位丝氨酸突变为酪氨酸、第 332 位谷氨酰胺突变为苯丙氨酸以及第 310 位天冬氨酸突变为缬氨酸得到的;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 151 位丝氨酸突变为天冬酰胺、第 171 位赖氨酸突变为精氨酸、第 275 位甘氨酸突变为丙氨酸以及第 180 位亮氨酸突变为组氨酸得到的;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 235 位丝氨酸突变为丙氨酸、第 343 位丝氨酸突变为酪氨酸、第 332 位谷氨酰胺突变为苯丙氨酸、第 310 位天冬氨酸突变为缬氨酸、第 151 位丝氨酸突变为天冬酰胺、第 171 位赖氨酸突变为精氨酸、第 275 位甘氨酸突变为丙氨酸以及第 180 位亮氨酸突变为组氨酸得到的;

或者,所述脂肪酶突变体是通过将出发氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示的脂肪酶的第 235 位丝氨酸突变为丙氨酸、第 343 位丝氨酸突变为酪氨酸、第 332 位谷氨酰胺突变为苯丙氨酸、第 310 位天冬氨酸突变为缬氨酸、第 151 位丝氨酸突变为天冬酰胺、第 171 位赖氨酸突变为精氨酸、第 275 位甘氨酸突变为丙氨酸、第 180 位亮氨酸突变为组氨酸、第 316 位苯丙氨酸突变为半胱氨酸、第 340 位甘氨酸突变为半胱氨酸、第 178 位丝氨酸突变为半胱氨酸以及第 238 位谷氨酰胺突变为半胱氨酸得到的。

3.一种基因,其特征在于,所述基因编码权利要求 1 或 2 所述的脂肪酶突变体。

4.一种重组质粒,其特征在于,所述重组质粒携带权利要求 3 所述的基因。

5.如权利要求 4 所述的一种重组质粒,其特征在于,所述重组质粒的表达载体为 pPIC9K 载体、pPIC3.5K 载体、pPICZ α 载体或 pPICZ 载体。

- 6.一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞携带权利要求3所述的基因或权利要求4或5所述的重组质粒。
- 7.如权利要求6所述的一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞为真菌或细菌。
- 8.如权利要求6或7所述的一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞为毕赤酵母。
- 9.一种洗涤剂，其特征在于，所述洗涤剂含有权利要求1或2所述的脂肪酶突变体。
- 10.如权利要求9所述的一种洗涤剂，其特征在于，所述洗涤剂含有权利要求1或2所述的脂肪酶突变体、表面活性剂以及缓冲液。
- 11.如权利要求10所述的一种洗涤剂，其特征在于，所述表面活性剂可为十二烷基硫酸钠（SDS）、乙氧基化烷基硫酸钠（AES）、脂肪醇聚氧乙烯醚（AEO-9）和/或月桂基磺化琥珀酸单酯二钠（DLS）。
- 12.如权利要求10或11所述的一种洗涤剂，其特征在于，所述缓冲液可为磷酸缓冲液、Tris 缓冲液、柠檬酸盐缓冲液或碳酸钠盐缓冲液。
- 13.如权利要求9-12任一所述的一种洗涤剂，其特征在于，所述洗涤剂中权利要求1或2所述脂肪酶突变体的浓度为10~400 U/L。
- 14.一种去污方法，其特征在于，所述方法为在需去污物品中添加权利要求1或2所述的脂肪酶突变体；或者，所述方法为在需去污物品中添加权利要求9-13任一所述的洗涤剂。
- 15.权利要求1或2所述的脂肪酶突变体或权利要求3所述的基因或权利要求4或5所述的重组质粒或权利要求6-8任一所述的宿主细胞在油脂加工、乳品加工、面食加工、肉类加工、药物合成、柴油合成、高分子合成、手性化合物合成、皮革生产、制备洗涤剂或造纸方面的应用。
- 16.权利要求1或2所述的脂肪酶突变体或权利要求9-13任一所述的洗涤剂或权利要求14所述的去污方法在去污方面的应用。

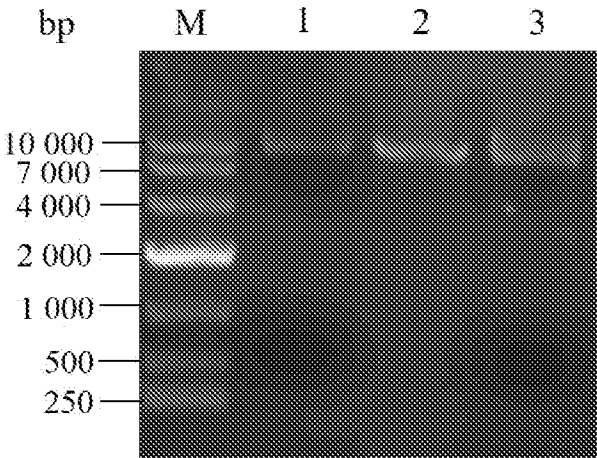


图 1

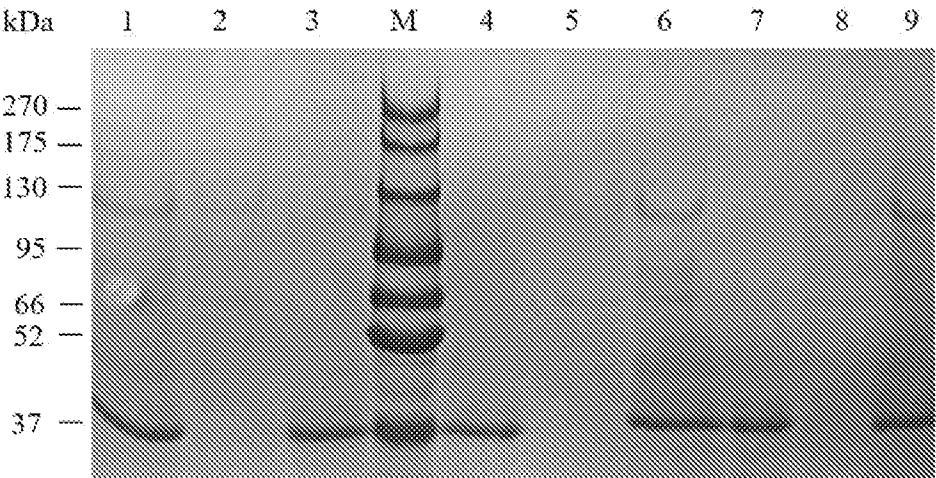


图 2

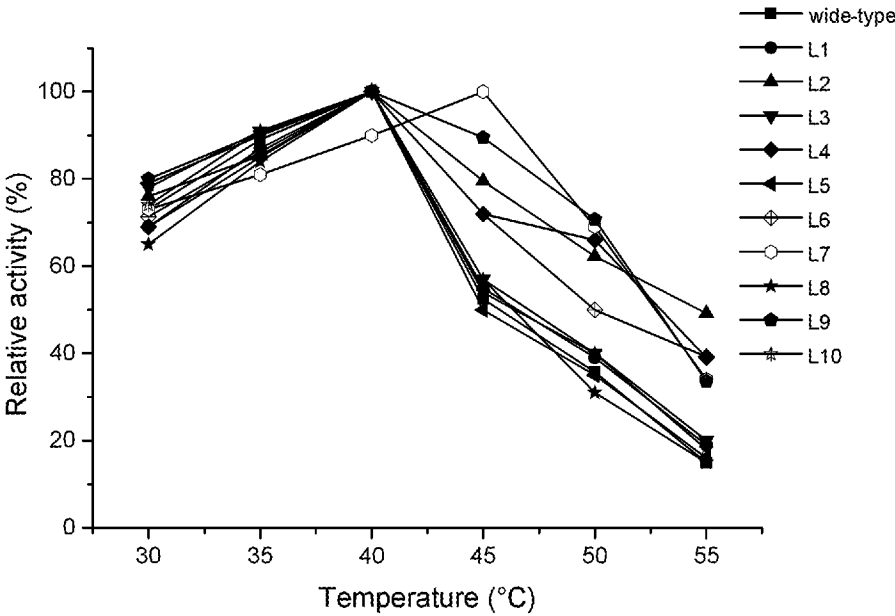


图 3

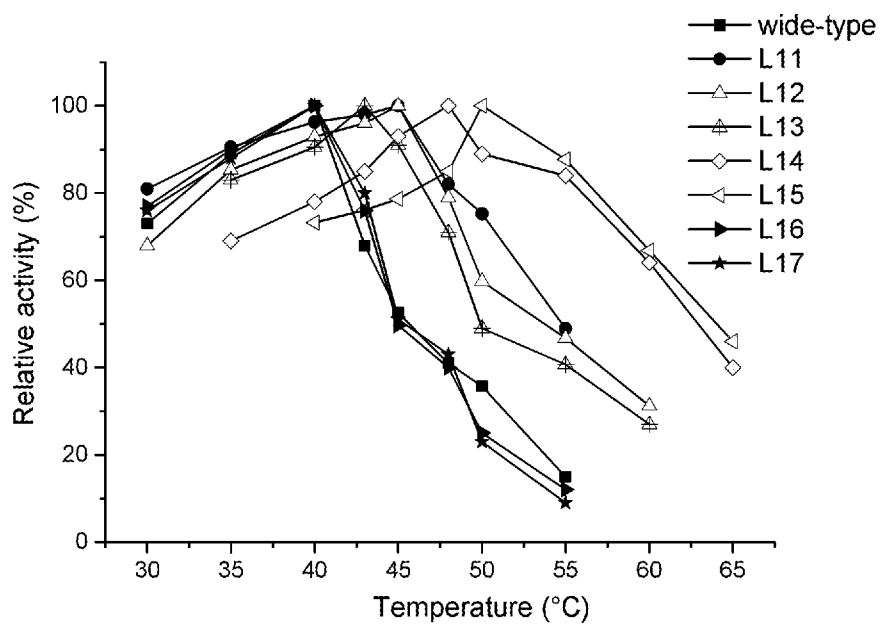


图 4

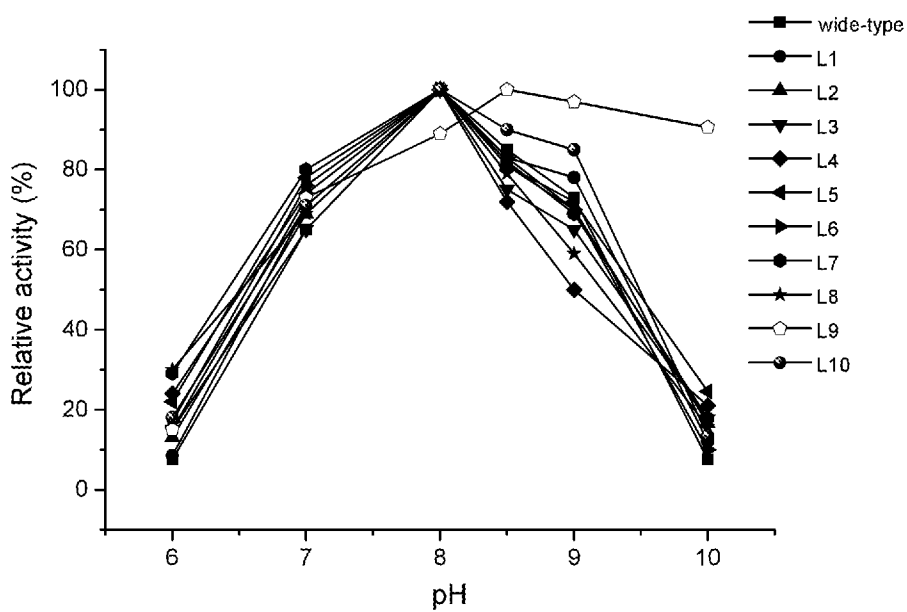


图 5

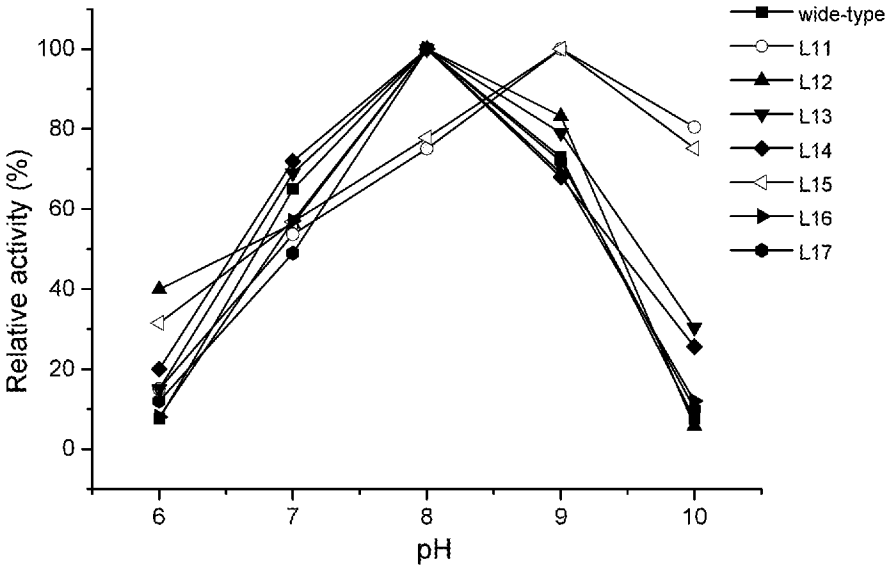


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/079438

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/20(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; C11D 3/386(2006.01)i; C11D 7/42(2006.01)i; C11D 11/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C11D

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

Databases: CNMED; CNABS; CPEA; TWMED; DWPI; SIPOABS; EPOQUE; CNKI; ISI; ELSEVEER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; 万方; WANFANG; 中国专利生物序列检索系统数据库; CHINA PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE SEARCH SYSTEM search terms: 脂肪酶, 热稳定, 变体, 华根霉, 江南大学, lipase, mutant, variant, rhizopus, SEQ ID NO: 1

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 110172455 A (YUNNAN UNIVERSITY) 27 August 2019 (2019-08-27) see description, paragraphs 0017-0060, and claims	1-16
X	CN 101974499 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 16 February 2011 (2011-02-16) see abstract, description, paragraphs 0011-0022, and claims	1-8
Y	CN 101974499 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 16 February 2011 (2011-02-16) see abstract, description, paragraphs 0011-0022, and claims	9-16
X	CN 102994471 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 27 March 2013 (2013-03-27) see abstract, description, paragraphs 0011-0023, and claims	1-8
Y	CN 102994471 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 27 March 2013 (2013-03-27) see abstract, description, paragraphs 0011-0023, and claims	9-16
Y	CN 107034205 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 11 August 2017 (2017-08-11) see abstract, description, paragraphs 0011-0024, and claims	9-16
A	CN 102839164 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 26 December 2012 (2012-12-26) see entire document	1-16



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date
 “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 “&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 May 2020

Date of mailing of the international search report

20 May 2020

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
 No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
 100088
 China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/079438

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/079438

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	110172455	A	27 August 2019	CN	110172455	B	17 March 2020
				CN	110904074	A	24 March 2020
				CN	110904073	A	24 March 2020
CN	101974499	A	16 February 2011	CN	101974499	B	11 July 2012
CN	102994471	A	27 March 2013	CN	102994471	B	03 December 2014
CN	107034205	A	11 August 2017	WO	2018223664	A1	13 December 2018
				US	2019185829	A1	20 June 2019
CN	102839164	A	26 December 2012	CN	102839164	B	16 October 2013

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/079438

A. 主题的分类

C12N 9/20(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; C11D 3/386(2006.01)i; C11D 7/42(2006.01)i; C11D 11/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12N; C11D

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

数据库: CNMED; CNABS; CPEA; TWMED; DWPI; SIPOABS; EPOQUE; CNKI; ISI; ELSEVEER; NCBI; PUBMED; GOOGLE; GenBank; EMBL; 万方; 中国专利生物序列检索系统数据库 检索词: 脂肪酶, 热稳定, 变体, 华根霉, 江南大学, lipase, mutant, variant, rhizopus, SEQ ID NO:1

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
PX	CN 110172455 A (云南大学) 2019年 8月 27日 (2019 - 08 - 27) 参见说明书第0017-0060段, 权利要求书	1-16
X	CN 101974499 A (江南大学) 2011年 2月 16日 (2011 - 02 - 16) 参见摘要, 说明书第0011-0022, 权利要求书	1-8
Y	CN 101974499 A (江南大学) 2011年 2月 16日 (2011 - 02 - 16) 参见摘要, 说明书第0011-0022, 权利要求书	9-16
X	CN 102994471 A (江南大学) 2013年 3月 27日 (2013 - 03 - 27) 参见说明书第0011-0023段, 权利要求书	1-8
Y	CN 102994471 A (江南大学) 2013年 3月 27日 (2013 - 03 - 27) 参见说明书第0011-0023段, 权利要求书	9-16
Y	CN 107034205 A (江南大学) 2017年 8月 11日 (2017 - 08 - 11) 参见说明书第0005-0041段, 权利要求书	9-16
A	CN 102839164 A (江南大学) 2012年 12月 26日 (2012 - 12 - 26) 参见全文	1-16

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2020年 5月 8日

国际检索报告邮寄日期

2020年 5月 20日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

马岚

电话号码 86-(10)-62412181

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

第IV栏 摘要正文(续第1页第5项)

提供了多种热稳定性好、pH稳定性好、洗涤性能好的脂肪酶突变体，可用于去污、油脂加工、乳品加工、面食加工、肉类加工、药物合成、柴油合成、高分子合成、手性化合物合成、皮革生产、制备洗涤剂 and 造纸等方面，属于酶工程技术领域。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/079438

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	110172455	A	2019年 8月 27日	CN	110172455	B	2020年 3月 17日
				CN	110904074	A	2020年 3月 24日
				CN	110904073	A	2020年 3月 24日
CN	101974499	A	2011年 2月 16日	CN	101974499	B	2012年 7月 11日
CN	102994471	A	2013年 3月 27日	CN	102994471	B	2014年 12月 3日
CN	107034205	A	2017年 8月 11日	WO	2018223664	A1	2018年 12月 13日
				US	2019185829	A1	2019年 6月 20日
CN	102839164	A	2012年 12月 26日	CN	102839164	B	2013年 10月 16日