(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 119391663 A
(43)申请公布日 2025.02.07

(21)申请号 202411298449.0
(22)申请日 2024.09.18
(71)申请人 南京大学
地址 210093 江苏省南京市鼓楼区汉口路22号
(72)发明人 任鑫坤 王子妍 曹家南 潘文进 董佳敏 甘忠文 袁紫燕
(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所(普通合伙) 32204
专利代理师 柏尚春
(51)Int.Cl.
C12N 9/04(2006.01)
C12N 15/53(2006.01)
C12N 15/70(2006.01)
C12N 1/21(2006.01)
C12P 7/26(2006.01)
C12R 1/19(2006.01)

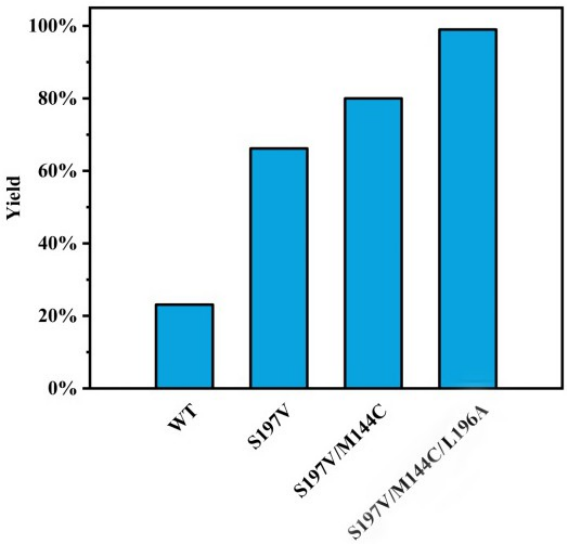
权利要求书1页 说明书7页
序列表（电子公布） 附图4页

(54)发明名称

高产诺卡酮的醇脱氢酶突变体及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种高产诺卡酮的醇脱氢酶突变体及其制备方法，对来源于益智(*Alpinia oxyphylla*)的醇脱氢酶进行定点突变，所述突变为S197V、M144C、L196A中的至少一种。本发明提供的醇脱氢酶突变体具有高催化活性，突变体M144C/L196A/S197V催化诺卡醇制备诺卡酮的产率可达99%，是原始酶的4.32倍；所述醇脱氢酶突变体催化合成诺卡酮所需的生产工艺简单、反应条件温和、生产过程环保，有利于诺卡酮的工业化生产，应用前景广阔。



CN 119391663 A

1.一种高产诺卡酮的醇脱氢酶突变体,其特征在于,所述醇脱氢酶突变体的氨基酸序列由如SEQ ID NO.1所示序列经突变得到,所述突变为S197V、M144C、L196A中的至少一种。

2.一种核酸分子,其特征在于,所述核酸分子编码权利要求1所述的醇脱氢酶突变体。

3.根据权利要求2所述的核酸分子,其特征在于,所述核酸分子的核苷酸序列由如SEQ ID NO.2所示序列经碱基突变得到。

4.一种载体,其特征在于,包含权利要求3所述的核苷酸序列。

5.根据权利要求4所述的载体,其特征在于,所述载体包括克隆载体或表达载体。

6.一种重组细胞,其特征在于,所述重组细胞包含权利要求4所述的载体。

7.根据权利要求1所述醇脱氢酶突变体的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)以带有醇脱氢酶基因的质粒为模板,用点突变引物进行PCR反应,经纯化得到突变基因片段和线性化质粒;

(2)将突变基因片段与线性化质粒连接构建表达载体,将表达载体转入宿主菌后进行诱导表达;

(3)收集表达醇脱氢酶突变体的宿主菌,重悬菌体后破碎细胞,离心取上清即得含有醇脱氢酶突变体的粗酶液。

8.一种产品,其特征在于,所述产品包含权利要求1所述的醇脱氢酶突变体或权利要求2~3任一项所述的核酸分子或权利要求4所述的载体或权利要求6所述的重组细胞。

9.一种权利要求8所述产品在催化制备诺卡酮中的应用。

10.根据权利要求9所述的应用,其特征在于,所述催化的底物为诺卡醇。

高产诺卡酮的醇脱氢酶突变体及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种醇脱氢酶,尤其涉及一种催化诺卡酮的醇脱氢酶,属于酶工程和基因工程技术领域。

背景技术

[0002] 诺卡酮((+)-Nootkatone)又名圆柚酮,存在于葡萄柚、阿拉斯加黄杉树、香根草和益智等植物中。诺卡酮具有独特的柑橘香气,是一种重要的天然香料,广泛应用于食品、饮料、化妆品和香水等领域。诺卡酮还具有驱虫、抗菌和抗炎等多种生物活性,因而在农业和医药领域也具有重要的应用价值。然而植物中的诺卡酮含量低,直接分离提取的效率低、成本高,不能满足工业应用的需求。

[0003] 对诺卡酮合成技术的研究多有报道,以化学和生物合成方法为主。中国专利申请CN 1830936A公开了一种诺卡酮的合成方法及其应用,采用化学合成法,先通过超临界技术萃取缬草油得到巴伦亚烯,再加入次氯酸钠/叔丁基过氧化氢混合溶液,经过混合反应与分离纯化,产生诺卡酮结晶。中国专利申请CN 108430464A以β-蒎烯为原料,利用臭氧氧化分解,实现高收率生产诺卡酮。然而,化学合成的诺卡酮为外消旋体,纯度和质量不稳定,限制了其在高附加值产品中的应用。此外,化学合成法还存在操作步骤繁琐、反应条件苛刻、需要使用大量有机溶剂和催化剂等缺点,导致生产成本高昂且环境污染严重。

[0004] 生物合成法通过酶能够催化前体物质如柠檬烯、诺卡醇等转化为诺卡酮。中国专利申请CN 115976118 A公开了一种生物合成诺卡酮的方法及载体,利用基因工程技术,将益智中参与诺卡酮合成的全套酶引入表达细胞,构建出能够由法尼基焦磷酸合成诺卡酮的重组菌。刘天罡教授及其团队通过碳源的选择与优化、微生物菌株的改造以及发酵条件的优化等方法,将碳源合成诺卡醇的产量显著提高至10～15g/L,并在酵母中合成了圆柚酮。但在常规反应条件下,催化诺卡醇生成诺卡酮的醇脱氢酶的活性偏低,已成为限制生物合成法生产诺卡酮的重要因素。

发明内容

[0005] 发明目的:本发明的目的是提供一种可以高产诺卡酮的醇脱氢酶突变体,并提供编码所述突变体的核酸分子、包含所述突变体的载体或重组细胞或产品,以及所述突变体的制备方法与应用。

[0006] 技术方案:本发明的第一方面提供一种高产诺卡酮的醇脱氢酶突变体,所述醇脱氢酶突变体的氨基酸序列由如SEQ ID NO.1所示序列经突变得到,所述突变为S197V、M144C、L196A中的至少一种。

[0007] 本发明使用的野生型醇脱氢酶来源于益智(Alpinia oxyphylla),能够以诺卡醇为底物,以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶(LpNOX)为辅酶,催化合成诺卡酮。本发明通过对野生型醇脱氢酶的活性中心的氨基酸进行定点突变,实现蛋白结构和功能的改变。经筛选,发现S197V、M144C或L196A的单突变或组合突变能够得到具有高活性的醇脱氢酶突变体,所

述突变体催化诺卡醇制备诺卡酮的产量较野生型醇脱氢酶有显著增加。

[0008] 本发明使用氨基酸的标准单字母代码与标准的取代记法,例如:S197V意指N端处第197位的丝氨酸(S)突变为缬氨酸(V);S197V/M144C意指N端处第197位的丝氨酸(S)突变为缬氨酸(V),并且N端处第144位的蛋氨酸(M)突变为半胱氨酸(C)。

[0009] 第二方面,本发明提供一种核酸分子,所述核酸分子编码第一方面所述的醇脱氢酶突变体。所述核酸分子能够表达所述高产诺卡酮的醇脱氢酶突变体。

[0010] 进一步的,所述核酸分子的核苷酸序列由如SEQ ID NO.2所示序列经碱基突变得到。

[0011] 第三方面,本发明提供一种载体,包含第二方面所述的核苷酸序列。所述载体为重组载体,可以在原核和/或真核细胞等各种宿主细胞中保持其复制或自主复制的能力,从而扩增或表达所述核苷酸序列。所述载体可为本领域常规的各种载体,如各种质粒、噬菌体或病毒载体等。

[0012] 进一步的,所述载体包括克隆载体或表达载体。所述表达载体可以为PET系列表达载体,优选以pET22b(+)质粒为表达载体。

[0013] 第四方面,本发明提供一种重组细胞,所述重组细胞包含第三方面所述的载体。优选以大肠杆菌为重组细胞,如大肠杆菌C43或大肠杆菌BL21。

[0014] 进一步的,所述重组细胞的构建方法包括如下步骤:(1)构建表达载体:将如第二方面所述的核酸分子与质粒连接,得到如第三方面所述的表达载体;(2)构建重组细胞:将表达载体转入感受态细胞中,培养并筛选得到所述重组细胞。

[0015] 第五方面,本发明提供一种第一方面所述醇脱氢酶突变体的制备方法,包括如下步骤:

[0016] (1)以带有醇脱氢酶基因的质粒为模板,用点突变引物进行PCR反应,经纯化得到突变基因片段和线性化质粒;

[0017] (2)将突变基因片段与线性化质粒连接构建表达载体,将表达载体转入宿主菌后进行诱导表达;

[0018] (3)收集表达醇脱氢酶突变体的宿主菌,重悬菌体后破碎细胞,离心取上清即得含有醇脱氢酶突变体的粗酶液。

[0019] 进一步的,在所述制备方法的基础上,第(3)步中,可省略重悬菌体及后续操作,直接将收集的湿菌体作为全细胞催化剂使用。

[0020] 所述制备方法得到的含醇脱氢酶突变体的粗酶液或菌体均具有高催化活性,可高产诺卡酮。

[0021] 优选地,第(1)步中,所述点突变引物如表1:

[0022] 表1点突变引物

[0023]

引物名称	序列(5’-3’)
S197V_F	gacccgcctgGTTatgccgcatc
S197V_R	gatgcggcatAACcaggcgggtc
M144C_F	ctatcgtgagcTGTgctagcgtgag
M144C_R	ctcacgctagcACAgctcacgatag
L196A_F	ccgacccgcGCTgttatgccgcatc

L196A_R	gatgcggcataacAGCgcgggtcgg

[0024] 引物中使用大写字母的为突变位点,“F”代表上游引物,“R”代表下游引物。

[0025] 优选地,第(1)步中,所述PCR反应的体系如表2:

[0026] 表2PCR反应体系

[0027]

组成成分	体积
10×BufferforKOD-Plus-	2.5μL
2mMdNTP	2.5μL
25mM$MgSO_4$	1.5μL
DMSO	1μL
10pmol/μLForwardPrimer	0.75μL
10pmol/μLReversePrimer	0.75μL
DNA模板	<100ng
KOD-Plus-	1μL
ddH_2O	upto25μL

[0028] 优选地,第(1)步中,所述PCR反应的条件如表3:

[0029] 表3PCR反应条件

[0030]

反应温度	时间	
95 ℃	3 min	
95 ℃	15 s	循环 32 次
57 ℃	10 s	
72 ℃	120 s	
72 ℃	10 min	

[0031] 第六方面,本发明提供一种产品,所述产品包含第一方面所述的醇脱氢酶突变体,或第二方面所述的核酸分子,或第三方面所述的载体,或第四方面所述的重组细胞。所述产品包括催化剂。

[0032] 第七方面,本发明提供一种第六方面所述产品在催化制备诺卡酮中的应用。

[0033] 进一步的,所述催化的底物为诺卡醇。所述催化可在磷酸钾缓冲溶液中进行。所述催化的反应条件包括在温度为20~30℃、pH为7.0~9.0的条件下反应8~16h。优选的,所述温度为25℃,pH为7.5,反应时间为12h。

[0034] 有益效果:与现有技术相比,本发明具有如下显著优点:1、本发明提供的醇脱氢酶突变体具有对诺卡醇的高催化活性,突变体M144C/L196A/S197V催化诺卡醇制备诺卡酮的产率可达99%,是原始酶的4.32倍;2、本发明提供的醇脱氢酶突变体催化诺卡醇合成诺卡酮的生产工艺简单、反应条件温和、生产过程环保,有利于诺卡酮的工业化生产,应用前景广阔。

附图说明

[0035] 图1为醇脱氢酶催化诺卡醇合成诺卡酮的反应示意图;

[0036] 图2为野生型醇脱氢酶与其突变体的催化产率图;

[0037] 图3为不同温度下醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V的催化产率图;

[0038] 图4为不同pH下醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V的催化产率图;

[0039] 图5为不同反应时间下醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V的催化产率图。

具体实施方式

[0040] 下面结合附图对本发明的技术方案作进一步说明。

[0041] 本发明中的野生型醇脱氢酶及其突变体均能够以诺卡醇(trans-nootkatol)为底物、以烟酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化酶(LpNOX)为辅酶,催化合成诺卡酮((+)-nootkatone),反应过程如图1所示。

[0042] 实施例所用材料的获取途径:

[0043] 1、菌株和质粒

[0044] 质粒pET-22b(+)、E.coli BL21(DE3)、E.coli DH5α均由申请人保藏,均来源于商业途径。野生型醇脱氢酶为来自益智(Alpinia oxyphylla)的醇脱氢酶AoSDR1ADH,LpNOX来自戊糖乳植物杆菌(Lactobacilluspentosus),两种酶的编码基因均由金唯智(苏州)公司合成。该酶的定点突变序列通过PCR方法获得,由申请人构建。

[0045] 2、试剂和培养基

[0046] DNA胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒均来自生工生物工程(上海)股份有限公司。

[0047] LB液体培养基成分为胰蛋白胨10g/L、酵母粉5g/L、氯化钠10g/L。

[0048] LB固体培养基成分为胰蛋白胨10g/L、酵母粉5g/L、氯化钠10g/L、琼脂粉15g/L。

[0049] TB液体培养基成分为酵母粉12g/L、胰蛋白胨12g/L、甘油4ml/L、磷酸氢二钾12.5g/L、磷酸二氢钾2.3g/L。

[0050] LpNOX粉末的获得:将含LpNOX基因的pET-22b(+)质粒转化至E.coli BL21(DE3)宿主菌,并涂布于在含有100μg/mL氨苄青霉素的LB固体培养基表面,37℃培养8h。挑取单独的大肠杆菌菌落接种于3mL含有100μg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基,37℃过夜培养,作为种子液。将种子液按5%接种量,接至装有50mLTB培养基的250mL锥形瓶中,在37℃、200rpm培养。当培养到8h时,添加IPTG至终浓度为0.5mM,设置培养温度为18℃,继续培养16h。将发酵液离心,收集菌体,用pH 7.5的200mM磷酸盐缓冲液重悬。将所得粗酶液超声破碎后离心,收集上清液,冻干得LpNOX粉末。

[0051] 实施例1一种醇脱氢酶突变体S197V

[0052] 本实施例以醇脱氢酶AoSDR1ADH作为原始酶,其氨基酸序列如SEQ ID No.1所示,将其N端第197位的丝氨酸(S)突变为缬氨酸(V)即为突变体S197V的序列。原始酶的核苷酸序列如SEQ ID No.2所示。具体制备方法如下:

[0053] 1、重组质粒构建

[0054] 以带有醇脱氢酶AoSDR1ADH基因的pET-22b(+)质粒为模板,用点突变引物进行PCR反应,经纯化得到突变基因片段和线性化质粒。所述点引物见表4,PCR反应体系见表5,PCR反应条件见表6。

[0055] 表4S197V突变体基因片段引物和线性化质粒引物

[0056]

引物名称	序列(5’-3’)
S197V_F	gacccgcctgGTTatgccgcatc
S197V_R	gatgcggcatAACcaggcgggtc

[0057] 注:引物中使用大写字母的为突变位点,“F”代表上游引物,“R”代表下游引物。

[0058] 表5PCR反应体系

[0059]

组成成分	体积
10×BufferforKOD-Plus-	2.5μL
2mMdNTP	2.5μL
25mM$MgSO_4$	1.5μL
DMSO	1μL
10pmol/μLForwardPrimer	0.75μL
10pmol/μLReversePrimer	0.75μL
DNA模板	<100ng
KOD-Plus-	1μL
ddH_2O	upto25μL

[0060] 表6PCR反应条件

[0061]

反应温度	时间
95 ℃	3 min

[0062]

95 ℃	15 s	循环 32 次
57 ℃	10 s	
72 ℃	120 s	
72 ℃	10 min	

[0063] PCR产物经核酸电泳验证后,使用DNA胶回收试剂盒纯化。配制如表7所示的反应体系,其中突变基因片段为第197位丝氨酸突变为缬氨酸的基因片段,线性化质粒为包含第197位丝氨酸突变为缬氨酸的基因片段的线性化质粒。在37℃反应1h进行一步克隆,得到含突变酶基因的重组质粒。

[0064] 表7一步克隆体系

[0065]

组成成分	含量
线性化质粒	0.03pmol
突变基因片段	0.06pmol
5×CEIIBuffer	4μL
ExnaseII	2μL
ddH_2O	to20μL

[0066] 2、重组菌株构建与酶突变体表达

[0067] 将重组质粒转化至E.coli DH5α感受态细胞,涂布于在含有100μg/mL氨苄青霉素的LB固体培养基表面,37℃培养12h。将平板培养基表面生长的所有单菌落刮至于装有5mL含有100μg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基的试管中,在37℃、200rpm震荡培养12h。用质粒提取试剂盒提取质粒,重组质粒保存于-20℃冰箱。

[0068] 将重组质粒转化至E.coli BL21(DE3)宿主菌,并涂布于在含有100μg/mL氨苄青霉素的LB固体培养基表面,37℃培养8h。挑取单独的大肠杆菌菌落接种于3mL含有100μg/mL氨苄青霉素的LB液体培养基,37℃过夜培养,作为种子液。将种子液按5%接种量,接至装有50mL TB培养基的250mL锥形瓶中,在37℃、200rpm培养。当培养到8h时,添加IPTG至终浓度

为0.5mM,设置培养温度为18℃,继续培养16h。将发酵液离心,收集菌体,用pH 7.5的200mM磷酸盐缓冲液重悬,得到含醇脱氢酶突变体S197V的全细胞催化剂(即湿菌体)。

[0069] 实施例2一种醇脱氢酶突变体S197V/M144C

[0070] 本实施例以实施例1中所构建的带有酶突变体S197V的质粒为模板,将其氨基酸序列N端第144位的蛋氨酸(M)突变为半胱氨酸(C)。其余制备方法与实施例1相同。点突变引物和质粒构建引物见表8。

[0071] 表8S197V/M144C突变体基因片段引物和线性化质粒引物

[0072]

引物名称	序列（5'-3'）
M144C_F	ctatcgtgagcTGTgctagcgtgag

[0073]

M144C_R	ctcacgctagcACAgctcacgatag

[0074] 实施例3一种醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V

[0075] 本实施例以实施例2中所构建的带有酶突变体S197V/M144C的质粒为模板,将其氨基酸序列N端第196位的亮氨酸(L)突变为丙氨酸(A)。其余制备方法与实施例2相同。点突变引物和质粒构建引物见表9。

[0076] 表9M144C/L196A/S197V突变体基因片段引物和线性化质粒引物

[0077]

引物名称	序列(5'-3')
L196A_F	ccgacccgcGCTgttatgccgcatc
L196A_R	gatgcggcataacAGCgcgggtcgg

[0078] 实施例4野生型醇脱氢酶及其突变体的催化产率比较

[0079] 分别将野生型醇脱氢酶AoSDR1ADH、实施例1-3制得的含有醇脱氢酶突变体的全细胞催化剂,在催化剂OD_{600}=60、底物诺卡醇浓度为100mM、LpNOX终浓度为5mg/ml、NAD+终浓度为80μM和pH=7.5的磷酸钾缓冲溶液构成的反应体系中,以400rpm在室温下(约25℃)过夜反应(约12h),反应结束后获得含诺卡酮的反应液。取500μL含诺卡酮的反应液加500μL乙酸乙酯萃取,于1,2000rpm离心1min,取300μL上清液用气相色谱检测。

[0080] 气相分析条件:安捷伦HP-5色谱柱。气相程序:进样压力23psi,流量2.5ml/min,柱温从60℃以50℃/min的速度升至240℃后保持4min,单个样品采样共7.6min。诺卡酮保留时间为5.24min。

[0081] 测试结果如图2所示。实施例1-3所得醇脱氢酶突变体的产率均高于野生型酶,实施例3中获得的含有醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V酶活性显著提高,诺卡酮催化产率达原始酶的4.32倍,有利于实现工业化生产。

[0082] 实施例5醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V在不同温度下的催化产率

[0083] 用实施例3的醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V作为催化剂,使用与实施例4相同的反应体系,以400rpm分别在15℃、20℃、25℃、30℃、35℃和40℃下过夜反应,反应结束后获得含诺卡酮的反应液。检测方法与实施例4相同。

[0084] 测试结果如图3所示。不同温度对于醇脱氢酶突变酶M144C/L196A/S197V的催化作用有显著影响,在15~30℃范围内的催化效率较好,高于30℃时,酶活性有所降低。

[0085] 实施例6醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V在不同pH下的催化产率

[0086] 用实施例3的醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V作为催化剂,在实施例4的反应

体系的基础上,调整催化剂OD_{600}=40、底物诺卡醇浓度为80mM,分别和pH=6.0、7.0、8.0、9.0和10.0的磷酸钾缓冲溶液,以400rpm在室温下过夜反应,反应结束后获得含诺卡酮的反应液。检测方法与实施例4相同。

[0087] 测试结果如图4所示。该酶在较pH=8.0~9.0范围内具有较好的催化效率。在酸性缓冲液(pH=6.0~7.0)条件下,醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V的催化活性较为有限。当缓冲液pH>9.0时,酶活力逐渐减弱。

[0088] 实施例7醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V在不同反应时间下的催化产率

[0089] 用实施例3的醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V作为催化剂,使用与实施例4相同的反应体系,以400rpm在室温下分别反应1h、2h、4h、8h和16h,反应结束后获得含诺卡酮的反应液。检测方法与实施例4相同。

[0090] 测试结果如图5所示。该酶最佳反应时间为8~12h,随反应时间增加,诺卡酮催化产率逐步提升,在12h后逐渐趋于平缓。

[0091] 实施例8醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V在不同细胞浓度与底物浓度下的催化产率

[0092] 用实施例3的醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V作为催化剂,在实施例4的反应体系的基础上,分别在催化剂OD_{600}=20、40、60,底物诺卡醇浓度为60mM、80mM、100mM下,以400rpm在室温下过夜反应,反应结束后获得含诺卡酮的反应液。检测方法与实施例4相同。

[0093] 测试结果见表10。

[0094] 表10醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V合成诺卡酮的产率

[0095]

催化剂	催化剂类型	催化剂浓度	底物浓度(mM)	产率
M144C/L196A/S197V	全细胞	OD_{600}=20	60	78%
	全细胞	OD_{600}=20	80	75%
	全细胞	OD_{600}=20	100	73%
	全细胞	OD_{600}=40	60	55%
	全细胞	OD_{600}=40	80	89%
	全细胞	OD_{600}=40	100	71%
	全细胞	OD_{600}=60	60	94%
	全细胞	OD_{600}=60	80	98%
	全细胞	OD_{600}=60	100	99%

[0096] 实施例9醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V的动力学参数测定

[0097] 测定实施例3的醇脱氢酶突变体M144C/L196A/S197V对不同底物浓度(诺卡醇2mM、5mM、10mM、20mM)情况下的比活力,并根据比活力和底物浓度的倒数作双倒数曲线。计算动力学参数,Km为1.37×10^{-15}mM,Kcat为$11.136S^{-1}$。

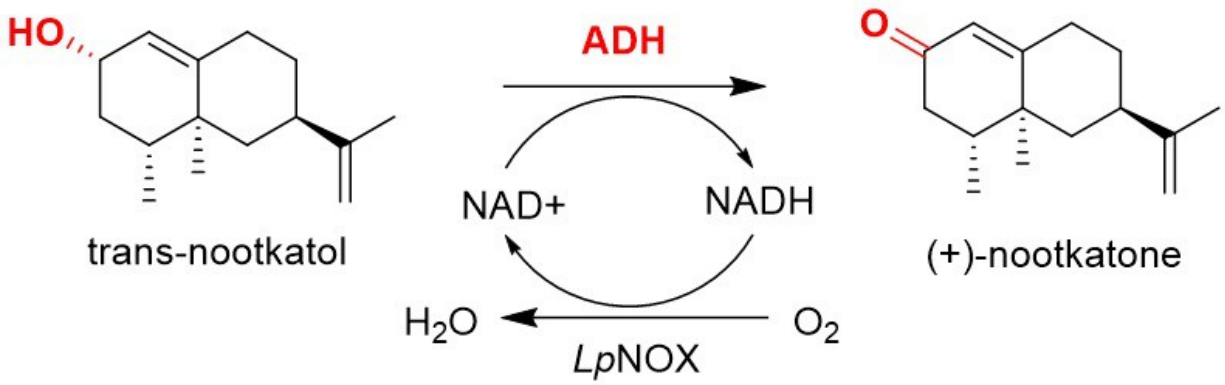

HO
ADH
O
NAD+
NADH
trans-nootkatol
(+)-nootkatone
H2O
O2
LpNOX

图 1

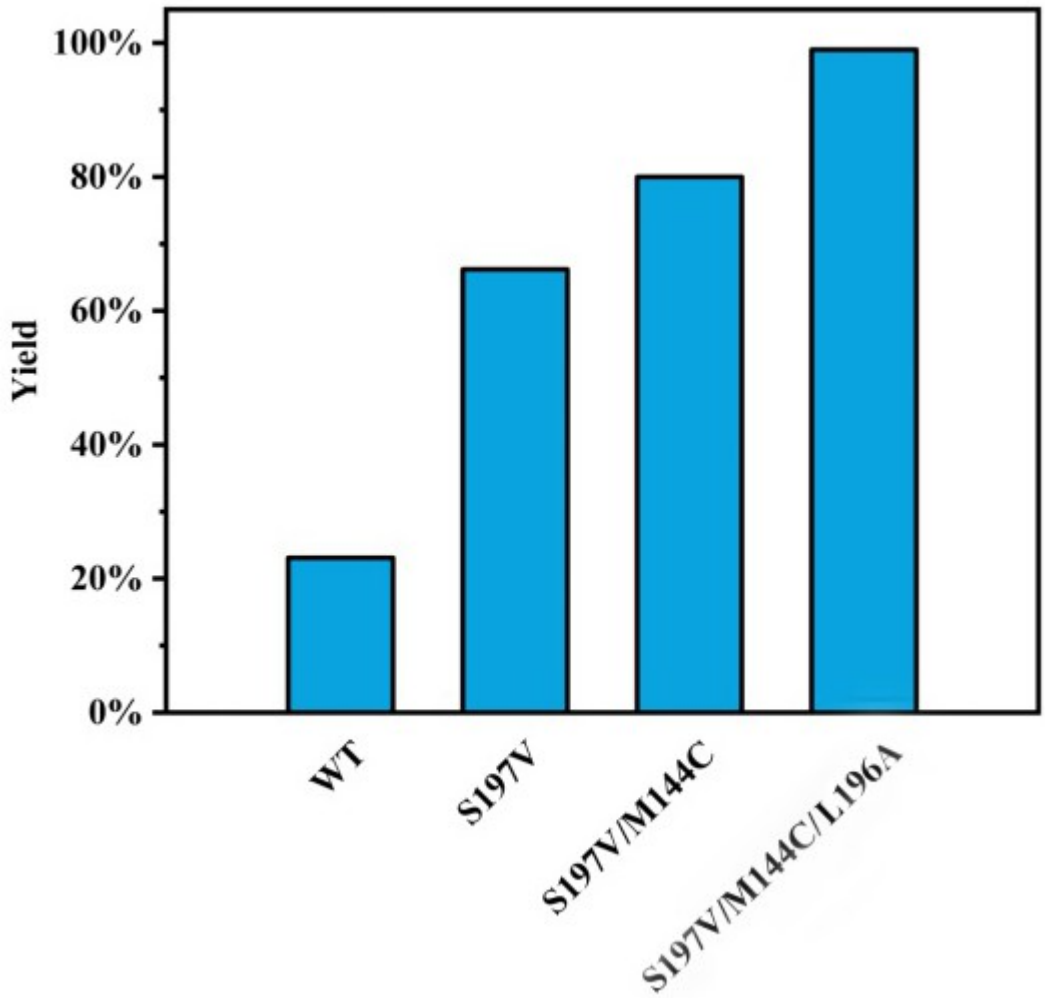

100%
80%
60%
40%
20%
0%
Yield
WT
S197V
S197V/M144C
S197V/M144C/L196A

图 2

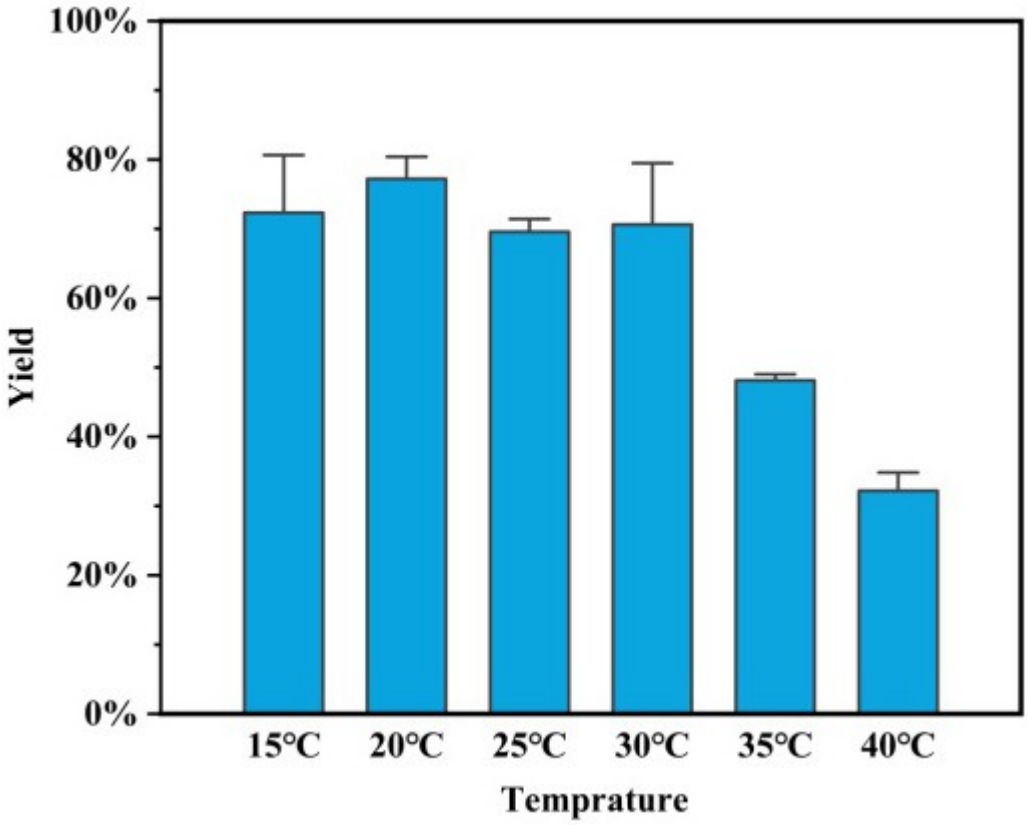


图 3

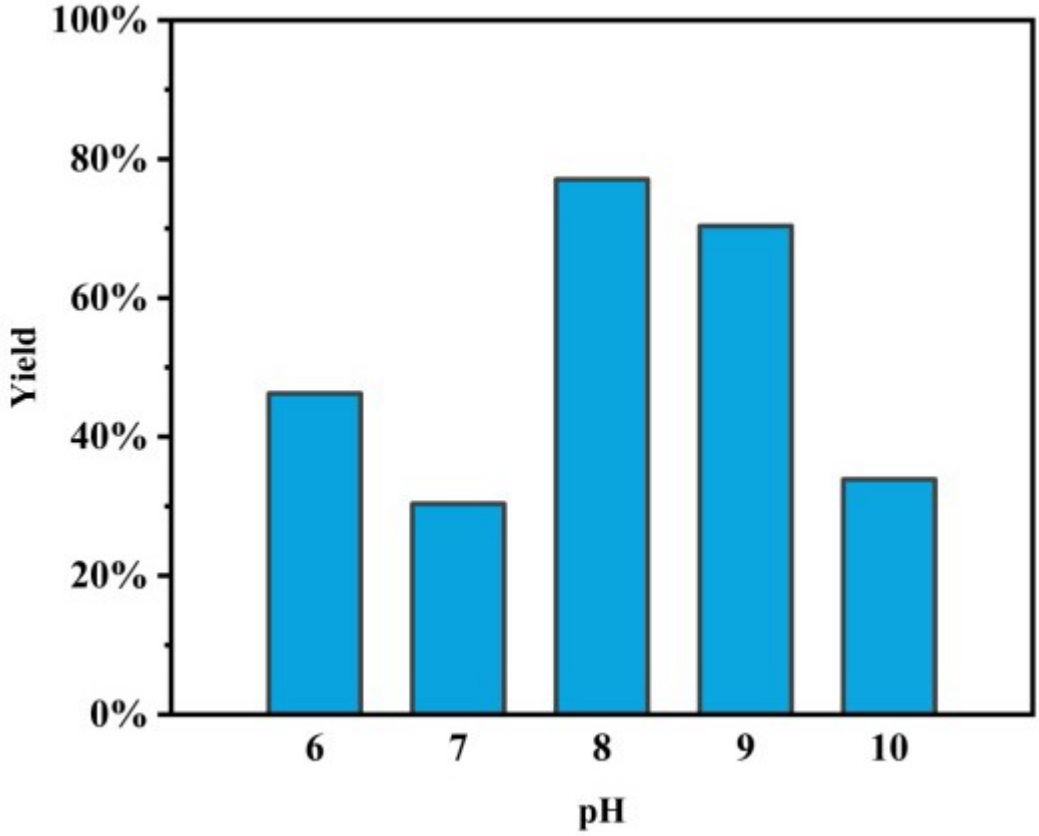


图 4

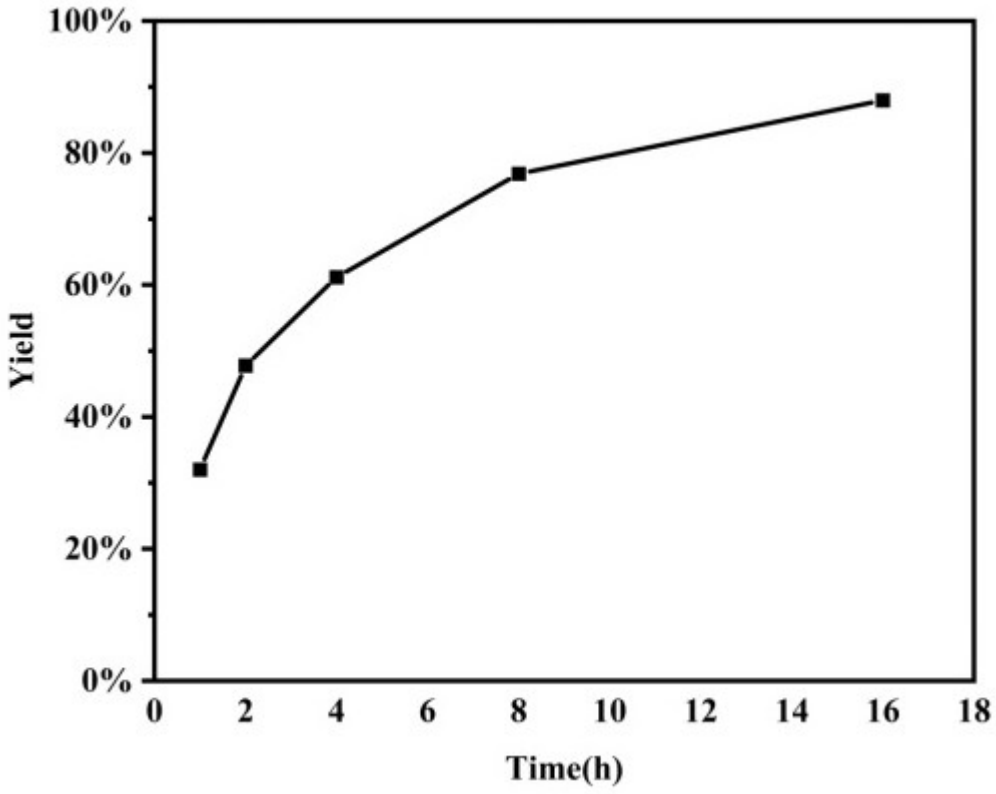


图 5