



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106957878 B

(45) 授权公告日 2020.10.30

(21) 申请号 201710256900.6

(22) 申请日 2017.04.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 106957878 A

(43) 申请公布日 2017.07.18

(73) 专利权人 波顿(上海)生物技术有限公司
地址 201201 上海市浦东新区瑞庆路528号
12栋

(72) 发明人 陈建 刘旭 李斌 彭春睿

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 赵青朵

(51) Int. Cl.

C12P 7/22 (2006.01)

C12R 1/19 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106011184 A, 2016.10.12

CN 102851253 A, 2013.01.02

CN 103196897 A, 2013.07.10

徐晓红. 微生物源苯丙氨酸脱氢酶的研究进展.《科技通报》.2009,第40卷(第1期),276-282.

审查员 谭小飞

权利要求书2页 说明书14页

序列表5页 附图3页

(54) 发明名称

一种生物催化生产2-苯乙醇的方法

(57) 摘要

本发明涉及生物工程与技术领域,公开了一种生物催化生产2-苯乙醇的方法。本发明所述方法将经过诱导表达的E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH的湿菌体加入到以L-苯丙氨酸为底物的生物催化体系中进行催化反应,反应完毕后离心,上清液经过萃取获得2-苯乙醇。本发明以L-苯丙氨酸为底物,在反应体系中通过添加转化有苯丙氨酸脱氢酶基因、2-酮酸脱羧酶基因和醇脱氢酶基因的重组大肠杆菌,进行生物脱氨、脱羧、还原三步催化反应,生成产物苯乙醇,一次添加辅酶NAD即可再循环利用,且无需额外添加多余酮酸和氢源,无多余副产物,达到较高的底物转化率,显著提高了苯乙醇的产量。

1. 一种生物催化生产2-苯乙醇的方法,其特征在于,将经过诱导表达的E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH的湿菌体加入到以L-苯丙氨酸为底物的生物催化体系中进行催化反应,反应完毕后离心,上清液经过萃取获得2-苯乙醇;

其中,所述E.coli/Pdh为E.coli/PdhBb或E.coli/PdhTi,E.coli/PdhBb为转化有包含来源于Bacillus badius IAM 11059苯丙氨酸脱氢酶编码基因的质粒的大肠杆菌,E.coli/PdhTi为转化有包含来源于Thermoactinomyces intermedius IF0 14230苯丙氨酸脱氢酶编码基因的质粒的大肠杆菌;所述E.coli/Kdc为E.coli/KdcA,所述E.coli/KdcA为转化有包含来源于Lactococcus lactis 2-酮酸脱羧酶编码基因的质粒的大肠杆菌;所述E.coli/ADH为E.coli/YahK,所述E.coli/YahK为转化有包含来源于Escherichia coli BW25113醇脱氢酶YahK编码基因的质粒的大肠杆菌。

2. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述大肠杆菌为E.coli BL21 (DE3)。

3. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述质粒为pET28a载体质粒。

4. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH三者湿菌体在生物催化体系中的浓度均为10-30g/L。

5. 根据权利要求4所述方法,其特征在于,所述E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH三者湿菌体在生物催化体系中的浓度依次为30g/L、20g/L、10g/L。

6. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH三者湿菌体的质量比为(1-3.2):(1-3.2):(1-3.2)。

7. 根据权利要求6所述方法,其特征在于,所述E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH三者湿菌体的质量比为3:2:1或3.2:2:1.2。

8. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述来源于Bacillus badius IAM 11059的苯丙氨酸脱氢酶编码基因和来源于Thermoactinomyces intermedius IF0 14230的苯丙氨酸脱氢酶编码基因均根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化。

9. 根据权利要求8所述方法,其特征在于,所述来源于Bacillus badius IAM 11059的苯丙氨酸脱氢酶编码基因根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化后的序列如SEQ ID NO:1所示。

10. 根据权利要求8所述方法,其特征在于,所述来源于Thermoactinomyces intermedius IF0 14230的苯丙氨酸脱氢酶编码基因根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化后的序列如SEQ ID NO:4所示。

11. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述来源于Lactococcus lactis的2-酮酸脱羧酶编码基因根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化。

12. 根据权利要求11所述方法,其特征在于,所述来源于Lactococcus lactis的2-酮酸脱羧酶编码基因根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化后的序列如SEQ ID NO:2所示。

13. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述来源于Escherichia coli BW25113的醇脱氢酶YahK编码基因根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化。

14. 根据权利要求13所述方法,其特征在于,所述来源于Escherichia coli BW25113的醇脱氢酶YahK编码基因根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化后的序列如SEQ ID NO:3所示。

15. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述生物催化体系包括L-苯丙氨酸、NAD、TPP和pH值6.0-10.5的缓冲溶液。

16. 根据权利要求15所述方法,其特征在于,所述生物催化体系包括L-苯丙氨酸、1-10mM的NAD、1-10mM的TPP和4-120mM pH值6.0-10.5的缓冲溶液。

17. 根据权利要求16所述方法,其特征在于,所述生物催化体系包括5-50g/L的L-苯丙氨酸、3-8mM的NAD、2-5mM的TPP和4-120mM pH值6.0-10.5的缓冲溶液。

18. 根据权利要求15所述方法,其特征在于,所述pH值为7.4-8.5。

19. 根据权利要求15-18任意一项所述方法,其特征在于,还包括金属离子化合物。

20. 根据权利要求19所述方法,其特征在于,所述金属离子化合物浓度以金属离子计为0.1-1mM。

21. 根据权利要求20所述方法,其特征在于,所述金属离子化合物为 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 或 Zn^{2+} 化合物。

22. 根据权利要求21所述方法,其特征在于,所述 Mg^{2+} 化合物浓度以 Mg^{2+} 计为0.4mM。

23. 根据权利要求21或22所述方法,其特征在于,所述 Mg^{2+} 化合物为 $MgSO_4$ 。

24. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述催化反应在25-40℃、150-250r/min下进行2-24h。

25. 根据权利要求24所述方法,其特征在于,所述温度为30℃或35℃。

26. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,所述萃取为通过乙酸乙酯萃取。

27. 根据权利要求1所述方法,其特征在于,还包括在催化反应过程中添加酸,维持催化反应体系pH值为7-8。

28. 权利要求1所述E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH在生物催化L-苯丙氨酸生成2-苯乙醇中的应用;

所述E.coli/Pdh为E.coli/PdhBb或E.coli/PdhTi,E.coli/PdhBb为转化有包含来源于Bacillus badius IAM 11059苯丙氨酸脱氢酶编码基因的质粒的大肠杆菌,E.coli/PdhTi为转化有包含来源于Thermoactinomyces intermedius IF014230苯丙氨酸脱氢酶编码基因的质粒的大肠杆菌;所述E.coli/Kdc为E.coli/KdcA,所述E.coli/KdcA为转化有包含来源于Lactococcus lactis 2-酮酸脱羧酶编码基因的质粒的大肠杆菌;所述E.coli/ADH为E.coli/YahK,所述E.coli/YahK为转化有包含来源于Escherichia coli BW25113醇脱氢酶YahK编码基因的质粒的大肠杆菌。

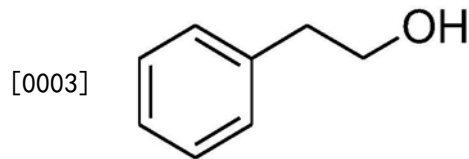
一种生物催化生产2-苯乙醇的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物工程与技术领域,更具体的说是涉及一种生物催化生产2-苯乙醇的方法。

背景技术

[0002] 2-苯乙醇(2-Penylenthanol, 2-PE) 又称β-苯乙醇(β-Penylenthanol), 化学名2-苯基乙醇(2-Penylenthyll alcohol, 2-PEA), 分子式为 $C_8H_{10}O$, 分子量122.16, 结构式如下:



[0004] 2-苯乙醇是一种具有清甜的玫瑰样花香的芳香醇, 无色粘稠液体, 沸点 $219^{\circ}C$, 相对密度1.0230, 折光率 $1.5310\sim 1.5340$, 溶于乙醇、乙醚、甘油, 略溶于水, 微溶于矿物油。2-苯乙醇天然存在于许多花和植物的精油中, 如玫瑰、风信子、茉莉、水仙、百合等, 同时也是些发酵食品如茶叶、咖啡、面包、白酒、果酒、干酪和酱油的自然风味物质。2-苯乙醇香气轻柔甜和, 不仅是所有玫瑰香型香气的基本组分, 还具有协合及增效作用, 是多种香型配方所需的组分, 作为香料添加剂, 其使用量仅次于香兰素, 是第二大香料成分, 广泛应用于食品、日化用品、化妆品和烟草行业。

[0005] 目前, 全球2-苯乙醇的年产量超过万吨, 主要通过化学合成生产, 仅有很少一部分是从玫瑰花或玫瑰精油中提取得来的。若从玫瑰花中提取天然2-苯乙醇, 每5吨玫瑰鲜花仅能萃取玫瑰精油1kg, 生产成本极其昂贵, 产量远远满足不了市场的需求。化学合成2-苯乙醇基本上是采用廉价的化工原料苯、或苯乙烯, 通过化学合成方法生产, 其工艺过程存在诸如原料毒性高、产品纯度低、合成过程污染大等弊端。产品中常残留有副产物, 如联二苯、β-氯代乙苯、氯乙醇等, 产生不良气味, 影响2-苯乙醇产品的品质。

[0006] 2-苯乙醇的另一个重要的生产途径是采用微生物发酵或者生物转化, 该途径原料和合成过程绿色环保、反应条件温和、产物安全、生产周期短、可大规模生产, 该途径制备的2-苯乙醇能满足人们对“绿色、天然”的时尚追求。国际上以微生物转化L-苯丙氨酸法生产天然2-苯乙醇, 主要集中在法国、德国、日本等发达国家, 其当前的生产量远不能满足消费需求。该方法具有条件温和、环境友好、产品绿色天然等优点。

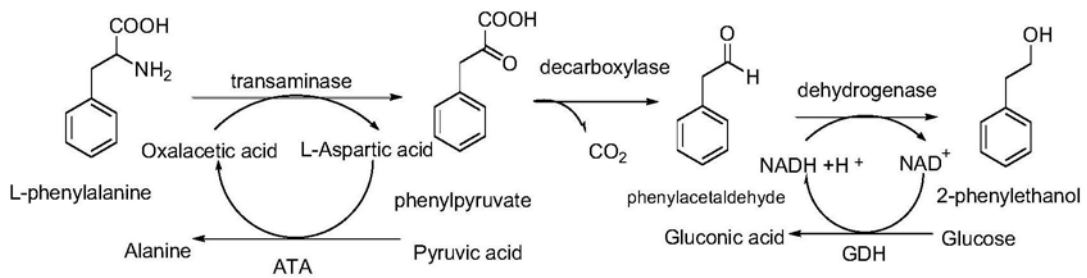
[0007] 目前, 已报道的微生物或酶生物转化L-苯丙氨酸生产2-苯乙醇主要有三条途径:

[0008] 第一条途径是从头合成的苯丙酮酸途径, 该途径从葡萄糖出发, 通过合成芳香族氨基酸的莽草酸途径形成分支酸后, 在分支酸变位酶作用下, 转变成预苯酸, 经过脱水、脱羧后形成苯丙酮酸, 相继形成苯乙醛, 并还原为2-苯乙醇, 该代谢途径长、支路多、存在多种抑制, 2-苯乙醇产量不高。如中国专利CN102851253A公开了一种产2-苯乙醇的大肠杆菌工程菌株及其应用, 其将毕赤酵母的苯丙酮酸脱羧酶以及酿酒酵母的乙醇脱氢酶两个编码基因通过基因工程技术, 转化到大肠杆菌中, 从而获得产2-苯乙醇的重组大肠杆菌, 以葡萄糖

为原料,从头合成2-苯乙醇。但是,该重组大肠杆菌的最高产量仅为130mg/L,依然处于较低的水平。

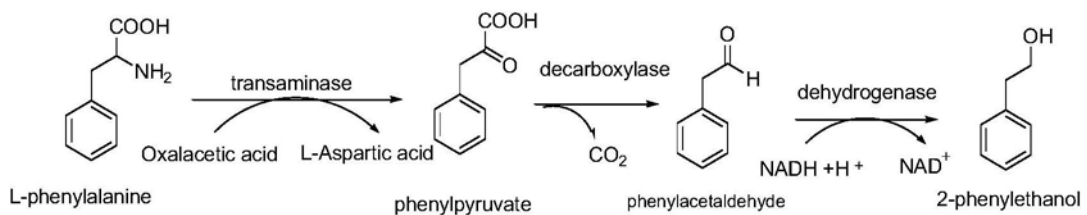
[0009] 第二条途径是从L-苯丙氨酸出发,经过脱羧酶作用下,脱羧生成苯乙胺,再经过胺氧化酶作用下形成苯乙醛,进而还原生成2-苯乙醇,此途径较少发生。

[0010] 第三条途径是从L-苯丙氨酸出发,经过转移氨基作用生成苯丙酮酸、再脱羧形成苯乙醛、最后还原生成2-苯乙醇,依次涉及芳香氨基转氨酶、苯丙酮酸脱羧酶和醇脱氢酶3种。该路线中(见路线1),芳香氨基转氨酶催化L-苯丙氨酸转移氨基作用生成苯丙酮酸,需要提供额外的酮酸如草酰乙酸原料作为L-苯丙氨酸转移氨基的受体,增加了成本,同时还额外产生L-天冬氨酸,增加后处理的产物分离难度和成本,同时增加废水处理的环保成本。如要维持草酰乙酸和L-天冬氨酸的循环,可以采用添加另外一种酮酸如丙酮酸及另外一种转氨酶(ATA),同样额外产生L-丙氨酸,增加后处理的产物分离难度和成本,同时增加废水处理的环保成本。此外,该路线(见路线1)中,醇脱氢酶催化苯乙醛还原生成2-苯乙醇必须持续加入足量价格昂贵的辅酶NADH,反应才能保证反应的顺利进行,如果采用辅酶再循环,需要提供额外的氢源如葡萄糖及葡萄糖脱氢酶,这样又增加了原料成本,同时还额外产生了葡萄糖酸,再一次增加后处理的产物分离难度和成本,同时增加废水处理的环保成本。如中国专利CN201610464256.7公开了一种2-苯乙醇的非细胞合成生物学制备方法及应用,见路线2,其实质是和路线1相同的:



路线1

[0011]



路线2

[0012] 该专利将重组转氨酶AR08、苯丙酮酸脱羧酶AR010、醇脱氢酶ADH组成的共同催化体系催化转化L-苯丙氨酸和草酰乙酸,在辅酶NADH参与下,合成2-苯乙醇及L-天冬氨酸。该专利除了存在前面所说的一些缺陷外,其多酶催化体系存在中间体性质不稳定所至产率不高的难题,而选用固定化方法,制备固定化酶进一步增大了酶制备的成本。

发明内容

[0013] 本发明的目的在于提供一种生物催化生产2-苯乙醇的方法,使得所述方法避免持

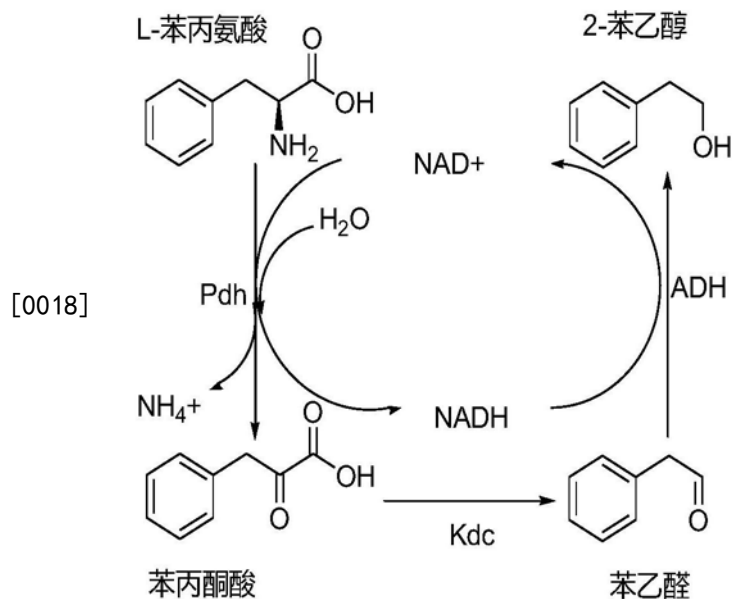
续加入辅酶NADH,通过特异性生物催化剂的选择、组合,原位实现一次添加辅酶NAD即可再循环利用,并无额外酮酸添加及额外氨基酸副产物产生,而以L-苯丙氨酸为底物催化制备2-苯乙醇,提高底物转化率,最高达到99%,且苯乙醇产量得到显著提高。

[0014] 为实现上述发明目的,本发明提供如下技术方案:

[0015] 一种生物催化生产2-苯乙醇的方法,将经过诱导表达的E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH的湿菌体加入到以L-苯丙氨酸为底物的生物催化体系中进行催化反应,反应完毕后离心,上清液经过萃取获得2-苯乙醇。

[0016] 其中,所述E.coli/Pdh为转化有包含苯丙氨酸脱氢酶编码基因的质粒的大肠杆菌;所述E.coli/Kdc为转化有包含2-酮酸脱羧酶编码基因的质粒的大肠杆菌;所述E.coli/ADH为转化有包含醇脱氢酶编码基因的质粒的大肠杆菌。

[0017] 本发明针对利用大肠杆菌生物催化L-苯丙氨酸制备2-苯乙醇产量较低的问题,通过选择特定组合的特异性生物催化剂进行一系列反应,实现了较高的L-苯丙氨酸转化率和2-苯乙醇产量;所述特异性生物催化剂为E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH三者产生的苯丙氨酸脱氢酶(简称为Pdh,能够催化苯丙氨酸脱氨的酶)、2-酮酸脱羧酶(简称为Kdc,能够催化苯丙酮酸脱羧的酶,在本发明中具体为2-酮酸脱羧酶)、醇脱氢酶(简称为ADH,能够催化苯乙醛还原的酶),催化反应路线如下:



[0019] 其中,作为优选,所述E.coli/Pdh为E.coli/PdhBb或E.coli/PdhTi;E.coli/PdhBb为转化有包含来源于Bacillus badius IAM 11059苯丙氨酸脱氢酶编码基因(在NCBI数据库中核酸序列登录号为D45211)的质粒的大肠杆菌,E.coli/PdhTi为转化有包含来源于Thermoactinomyces intermedius IF0 14230苯丙氨酸脱氢酶编码基因(在NCBI数据库中核酸序列登录号为D00631)的质粒的大肠杆菌。进一步优选地,所述来源于Bacillus badius IAM11059的苯丙氨酸脱氢酶编码基因和来源于Thermoactinomyces intermedius IF0 14230的苯丙氨酸脱氢酶编码基因均根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化。

[0020] 在本发明具体实施方式中,所述来源于Bacillus badius IAM11059的苯丙氨酸脱氢酶编码基因根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化后的序列如SEQ ID NO:1所示;所述来源于Thermoactinomyces intermedius IF0 14230的苯丙氨酸脱氢酶编码基因根据

大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化后的序列如SEQ ID NO:4所示。

[0021] 作为优选,所述E.coli/Kdc为E.coli/KdcA或E.coli/KdcPsy;E.coli/KdcA为转化有包含来源于Lactococcus lactis 2-酮酸脱羧酶编码基因(在NCBI数据库中核酸序列登录号为AY548760)的质粒的大肠杆菌,E.coli/KdcPsy为转化有包含来源于Psychrobacter cryohalolentis K5 2-酮酸脱羧酶编码基因(在NCBI数据库中核酸序列登录号为YP_580229)的质粒的大肠杆菌。进一步优选地,所述来源于Lactococcus lactis的2-酮酸脱羧酶编码基因和来源于Psychrobacter cryohalolentis K5的2-酮酸脱羧酶编码基因均根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化。

[0022] 在本发明具体实施方式中,所述来源于Lactococcus lactis的2-酮酸脱羧酶编码基因根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化后的序列如SEQ ID NO:2所示;所述来源于Psychrobacter cryohalolentis K5的2-酮酸脱羧酶编码基因根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化后的序列如SEQ ID NO:5所示。

[0023] 作为优选,所述E.coli/ADH为E.coli/YahK或E.coli/Sfa1;E.coli/YahK为转化有包含来源于Escherichia coli BW25113醇脱氢酶YahK编码基因(在NCBI数据库中核酸序列登录号为944975)的质粒的大肠杆菌,E.coli/Sfa1为转化有包含来源于Saccharomyces cerevisiae S288c醇脱氢酶Sfa1编码基因(在NCBI数据库中核酸序列登录号为NM_001180228)的质粒的大肠杆菌。进一步优选地,所述来源于Escherichia coli BW25113的醇脱氢酶YahK编码基因和来源于Saccharomyces cerevisiae S288c的醇脱氢酶Sfa1编码基因均根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化。

[0024] 在本发明具体实施方式中,所述来源于Escherichia coli BW25113的醇脱氢酶YahK编码基因根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化后的序列如SEQ ID NO:3所示;所述来源于Saccharomyces cerevisiae S288c的醇脱氢酶Sfa1编码基因根据大肠杆菌密码子偏好性进行密码子优化后的序列如SEQ ID NO:6所示。

[0025] 所述E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH三者湿菌体在生物催化体系中的浓度均为10-30g/L;在本发明具体实施过程中,所述E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH三者湿菌体在生物催化体系中的浓度依次为30g/L、20g/L、10g/L。

[0026] 同时,所述E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH三者湿菌体的质量比为(1-3.2):(1-3.2):(1-3.2);在本发明具体实施方式中,所述E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH三者湿菌体的质量比为3:2:1或3.2:2:1.2(浓度为30g/L、20g/L、10g/L或32g/L、20g/L、12g/L,本发明中其他类似配比均可以转化成g/L)。

[0027] 本发明所述E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH均为转化有重组质粒的大肠杆菌,所述质粒和大肠杆菌根据本发明所需要嵌入的三个外源基因,可选择本领域常用的质粒和大肠杆菌,在本发明具体实施方式中所述大肠杆菌选择为E.coli BL21(DE3),而质粒为商品化质粒pET28a载体质粒。

[0028] 本发明所述生物催化体系一般为包括L-苯丙氨酸底物的反应体系,在本发明中包括L-苯丙氨酸、NAD和TPP,pH 6.0-10.5的缓冲溶液;具体地,包括L-苯丙氨酸、1-10mM的NAD和1-10mM的TPP,4-120mM pH6.0-10.5的缓冲溶液;更具体地,包括5-50g/L的L-苯丙氨酸、3-8mM的NAD、2-5mM的TPP和4-120mM pH值6.0-10.5的缓冲溶液,所述pH值进一步优选为7.4-8.5。

[0029] 其中,所述缓冲溶液为PBS缓冲溶液、Tris-HCl缓冲溶液、Glycine-NaOH缓冲液中的一种或两种以上。在实际的制备过程中,本发明所述湿菌体可直接独立选用所述缓冲溶液重悬后加入到生物催化体系。更具体地,可选择pH为7.4的PBS缓冲溶液分别重悬三种湿菌体加入到生物催化反应体系,终浓度为24-120mM(包括24、60、120mM),或选择pH为8.0的Tris-HCl缓冲溶液分别重悬三种湿菌体加入到生物催化反应体系,终浓度为24-120mM(包括24、60、120mM);也可以将E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH湿菌体依次分别采用pH10.5Glycine-NaOH(终浓度12、30或60mM)、pH6.0PBS(终浓度8、20或40mM)、pH[7.0PBS(终浓度4、10或20mM)重悬,然后加入到生物催化体系中。

[0030] 在具体实施过程中,所述生物催化体系包括:

[0031] (1) 5-50g/L的L-苯丙氨酸、3mM的NAD、2mM的TPP和pH 6.0-10.5的缓冲溶液;

[0032] (2) 5-50g/L的L-苯丙氨酸、6mM的NAD、4.4mM的TPP和pH6.0-10.5的缓冲溶液;

[0033] (3) 5g/L的L-苯丙氨酸、8mM的NAD和4.4mM的TPP,pH6.0-10.5的缓冲溶液;或

[0034] (4) 5-50g/L的L-苯丙氨酸、3mM的NAD、2.2mM的TPP和pH 6.0-10.5的缓冲溶液;

[0035] 此外,上述生物催化体系可以包括所记载的组分,也可仅由所记载的组分组成。

[0036] 在本发明所述生物催化体系基础上可进一步包括金属离子化合物,浓度可选择为0.1-1mM,所述金属离子化合物为 Mg^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Ca^{2+} 或 Zn^{2+} 化合物,在具体实施过程中本发明选择0.4mM的 Mg^{2+} 化合物,可通过加入 $MgSO_4$ 来添加 Mg^{2+} 化合物。

[0037] 所述催化反应在25-40℃/25-38℃/30-38℃、150-250r/min下进行2-24h,其中温度可具体选择为30℃或35℃。本发明催化反应在需要终止时可加入乙酸乙酯,同时乙酸乙酯也可用来萃取目标产物。更为优选地,本发明方法还包括在催化反应过程中添加酸,维持催化反应体系pH值为7-8。其中所述酸可选自稀硫酸、盐酸、醋酸、草酸、柠檬酸等。

[0038] 采用本发明所述方法对L-苯丙氨酸进行生物催化制备2-苯乙醇,结果显示,不同配比不同反应时间下的2-苯乙醇产量介于0.15-3.42g/L,其中,在E.coli/PdhBb、E.coli/KdcA和E.coli/YahK质量比为3:2:1条件下,5g/L L-Phe在反应24h能够生成3.28g/L苯乙醇,且HPLC测定结果显示底物L-Phe消耗完毕,底物L-Phe的转化率达到99%,苯乙醇的摩尔产率约89%。而不同的湿菌体组合也表现出不同的较高产量。

[0039] 同时,通过增加NAD浓度、底物浓度、反应温度以及控制反应pH和改变缓冲溶液,均可以在上述高产量的基础上大幅度增加苯乙醇的产量,在本发明较佳的反应体系中,苯乙醇的产量可高达15g/L以上。通过调整本发明采用的三种湿菌体配比,可在最低辅酶浓度下实现最高的苯乙醇产量,达到效益的最大化。

[0040] 此外,在添加有金属离子化合物的情况下,其对催化反应有一定促进作用,可进一步提高底物转化率和产物产量。

[0041] 基于上述的试验结果,本发明提出了所述E.coli/Pdh、E.coli/Kdc和E.coli/ADH在生物催化L-苯丙氨酸生成2-苯乙醇中的应用,以及所述苯丙氨酸脱氢酶编码基因、2-酮酸脱羧酶编码基因和醇脱氢酶编码基因在生物催化L-苯丙氨酸生成2-苯乙醇中的应用。

[0042] 由以上技术方案可知,本发明以L-苯丙氨酸为底物,在反应体系中通过添加转化有苯丙氨酸脱氢酶基因、2-酮酸脱羧酶基因和醇脱氢酶基因的重组大肠杆菌,进行生物脱氨、脱羧、还原三步催化反应,生成产物苯乙醇,一次添加辅酶NAD即可再循环利用,且无需额外添加多余酮酸和氢源,无多余副产物,达到较高的底物转化率,显著提高了苯乙醇的产

量。

附图说明

[0043] 图1所示为重组大肠杆菌异源表达苯丙氨酸脱氢酶 (*E. coli*/PdhBb) 的SDS-PAGE图;其中,泳道“未”表示未添加IPTG诱导剂时的全细胞蛋白,泳道“沉”表示添加IPTG诱导后,菌体全细胞经过超声破碎后的沉淀蛋白,泳道“上”表示添加IPTG诱导后,菌体全细胞经过超声破碎后的可溶蛋白;箭头所指为目标蛋白条带。

[0044] 图2所示为重组大肠杆菌异源表达2-酮酸脱羧酶 (*E. coli*/KdcA) 的SDS-PAGE图;其中,泳道“未”表示未添加IPTG诱导剂时的全细胞蛋白,泳道“沉”表示添加IPTG诱导后,菌体全细胞经过超声破碎后的沉淀蛋白,泳道“上”表示添加IPTG诱导后,菌体全细胞经过超声破碎后的可溶蛋白,箭头所指为目标蛋白条带。

[0045] 图3所示重组大肠杆菌异源表达醇脱氢酶基因 (*E. coli*/YahK) 的SDS-PAGE图;其中,泳道“未”表示未添加IPTG诱导剂时的全细胞蛋白,泳道“沉”表示添加IPTG诱导后,菌体全细胞经过超声破碎后的沉淀蛋白,泳道“上”表示添加IPTG诱导后,菌体全细胞经过超声破碎后的可溶蛋白,箭头所指为目标蛋白条带。

[0046] 图4所示为重组大肠杆菌异源表达苯丙氨酸脱氢酶 (*E. coli*/PdhTi) 的SDS-PAGE图;其中,泳道“未”表示未添加IPTG诱导剂时的全细胞蛋白,泳道“沉”表示添加IPTG诱导后,菌体全细胞经过超声破碎后的沉淀蛋白,泳道“上”表示添加IPTG诱导后,菌体全细胞经过超声破碎后的可溶蛋白;箭头所指为目标蛋白条带。

[0047] 图5所示为重组大肠杆菌异源表达2-酮酸脱羧酶 (*E. coli*/KdcPsy) 的SDS-PAGE图;其中,泳道“未”表示未添加IPTG诱导剂时的全细胞蛋白,泳道“沉”表示添加IPTG诱导后,菌体全细胞经过超声破碎后的沉淀蛋白,泳道“上”表示添加IPTG诱导后,菌体全细胞经过超声破碎后的可溶蛋白,箭头所指为目标蛋白条带。

[0048] 图6所示重组大肠杆菌异源表达醇脱氢酶基因 (*E. coli*/Sfa1) 的SDS-PAGE图;其中,泳道“未”表示未添加IPTG诱导剂时的全细胞蛋白,泳道“沉”表示添加IPTG诱导后,菌体全细胞经过超声破碎后的沉淀蛋白,泳道“上”表示添加IPTG诱导后,菌体全细胞经过超声破碎后的可溶蛋白,箭头所指为目标蛋白条带。

具体实施方式

[0049] 本发明公开了一种生物催化生产2-苯乙醇的方法,本领域技术人员可以借鉴本文内容,适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是,所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的,它们都被视为包括在本发明。本发明所述方法、基因、载体、重组菌株和相关应用已经通过较佳实施例进行了描述,相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的各技术方案进行改动或适当变更与组合,来实现和应用本发明技术。

[0050] 在本发明方法实施过程中,所述*E. coli*/PdhBb、*E. coli*/PdhTi、*E. coli*/KdcA、*E. coli*/KdcPsy、*E. coli*/YahK和*E. coli*/Sfa1的湿菌体加入前,可通过LB培养基培养至OD₆₀₀为0.8-1.0之间时,在培养液中添加IPTG诱导表达,添加量为0.1-1.0mM,诱导温度20-38度。LB培养基成分为:10g/L胰蛋白胨,5g/L酵母提取物,10g/L氯化钠,培养温度为36-38℃

[0051] 下面结合实施例,进一步阐述本发明。

[0052] 实施例1:E.coli/PdhBb菌株的构建

[0053] 1、PdhBb基因序列合成及表达载体构建

[0054] 本实施例中涉及的PdhBb基因,其序列长度为1143bp,NCBI数据库中的登录号为D45211,来源于Bacillus badius IAM 11059,该序列由苏州金唯智生物科技有限公司全基因序列合成。全合成PdhBb基因5'端添加核酸限制性内切酶EcoRI识别位点(5'-GAATTC-3'),3'端添加核酸限制性内切酶NotI识别位点(5'-GCGGCCGC-3'),并克隆到载体pUC57上得到载体pUC57-PdhBb。

[0055] PdhBb基因目标片段产物回收:质粒pUC57-PdhBb用限制性内切酶EcoRI和NotI酶切处理2h,经过1%琼脂糖凝胶电泳后,切下目标条带,用TIANGEN普通琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒回收。

[0056] PdhBb基因目标片段连接:限制性内切酶EcoRI和NotI酶切处理后PdhBb基因目标片段,回收后连接至同样酶处理的pET28a载体。限制性内切酶、DNA连接酶购自Thermo Fisher。

[0057] 连接产物转化:采用CaCl₂法制备感受态细胞。42℃热击法转化连接产物至E.coli DH5α感受态细胞。挑取单克隆,培养后抽提质粒,测序验证正确的质粒热击转化至E.coli BL21 (DE3)中。再次挑取单克隆,抽取质粒验证阳性克隆,E.coli/PdhBb菌株保存在终浓度20%-25%的甘油中,-80℃冰箱保存。

[0058] 2、PdhBb基因在大肠杆菌中的诱导表达

[0059] 将含有重组质粒的E.coli/PdhBb菌液以1%接种量接入含50μg/ml硫酸卡那霉素(Kan)的LB液体培养基(0.5%酵母提取物,1%胰蛋白胨,1%NaCl,pH7.0,121℃灭菌20min),36-38℃,250rpm培养至OD₆₀₀为0.8~1.0,加入不同浓度的IPTG,在20~38℃不同温度条件下进行诱导表达。采用SDS-PAGE检测目的蛋白表达量。

[0060] 3、PdhBb蛋白表达的检测

[0061] 本发明中SDS-PAGE采用12%凝胶的电泳方案,具体操作步骤参照标准实验方法进行。考马斯亮蓝染色、脱色实验按照标准实验方法进行,结果见图1,图1结果说明重组的苯丙氨酸脱氢酶PdhBb在大肠杆菌中以可溶的形式成功表达,不可溶的部分应为细胞破碎不完全所致,不影响本发明中所述实验。

[0062] 实施例2:E.coli/KdcA菌株的构建

[0063] 本实施例中涉及的KdcA基因,其序列长度为1644bp,NCBI数据库中的登录号为AY548760,来源于Lactococcus lactis,该序列由苏州金唯智生物科技有限公司全基因序列合成。全合成KdcA基因5'端添加核酸限制性内切酶EcoRI识别位点(5'-GAATTC-3'),3'端添加核酸限制性内切酶NotI识别位点(5'-GCGGCCGC-3'),并克隆到载体pUC57上得到载体pUC57-KdcA。

[0064] KdcA基因表达载体构建:KdcA目标基因酶切处理、产物回收、连接转化等参照实施例1。

[0065] IPTG诱导表达,SDS-PAGE蛋白表达鉴定,实验操作参照实施例1,结果见图2。图2结果说明重组的2-酮酸脱羧酶KdcA在大肠杆菌中以可溶的形式成功表达,不可溶的部分应为细胞破碎不完全所致,不影响本发明中所述实验。

[0066] 实施例3:E.coli/YahK菌株的构建

[0067] 本实施例中涉及的YahK基因,其序列长度为1638bp,NCBI数据库中的登录号为944975,来源于*Escherichia coli* BW25113,该序列由苏州金唯智生物科技有限公司全基因序列合成。全合成YahK基因5'端添加核酸限制性内切酶EcoRI识别位点(5'-GAATTC-3'),3'端添加核酸限制性内切酶NotI识别位点(5'-GCGGCCGC-3'),并克隆到载体pUC57上得到载体pUC57-YahK。

[0068] YahK基因表达载体构建:YahK目标基因酶切处理、产物回收、连接转化等参照实施例1。

[0069] IPTG诱导表达,SDS-PAGE蛋白表达鉴定,实验操作参照实施例1,结果见图3。图3结果说明重组的醇脱氢酶YahK大肠杆菌中以可溶的形式成功表达,不可溶的部分应为细胞破碎不完全所致,不影响本发明中所述实验。

[0070] 实施例4:E.coli/PdhTi菌株的构建

[0071] 本实施例中涉及的PdhTi基因,其序列长度为1101bp,NCBI数据库中的登录号为D00631,来源于*Thermoactinomyces intermedius* IFO 14230,该序列由苏州金唯智生物科技有限公司全基因序列合成。全合成PdhTi基因5'端添加核酸限制性内切酶EcoRI识别位点(5'-GAATTC-3'),3'端添加核酸限制性内切酶NotI识别位点(5'-GCGGCCGC-3'),并克隆到载体pUC57上得到载体pUC57-PdhTi。

[0072] PdhTi基因表达载体构建:PdhTi目标基因酶切处理、产物回收、连接转化等参照实施例1。

[0073] IPTG诱导表达,SDS-PAGE蛋白表达鉴定,实验操作参照实施例1,结果见图4。图4结果说明重组的醇脱氢酶PdhTi大肠杆菌中以可溶的形式成功表达,不可溶的部分应为细胞破碎不完全所致,不影响本发明中所述实验。

[0074] 实施例5:E.coli/KdcPsy菌株的构建

[0075] 本实施例中涉及的KdcPsy基因,其序列长度为1671bp,NCBI数据库中的登录号为YP_580229,来源于*Escherichia coli* BW25113,该序列由苏州金唯智生物科技有限公司全基因序列合成。全合成KdcPsy基因5'端添加核酸限制性内切酶EcoRI识别位点(5'-GAATTC-3'),3'端添加核酸限制性内切酶NotI识别位点(5'-GCGGCCGC-3'),并克隆到载体pUC57上得到载体pUC57-KdcPsy。

[0076] KdcPsy基因表达载体构建:KdcPsy目标基因酶切处理、产物回收、连接转化等参照实施例1。

[0077] IPTG诱导表达,SDS-PAGE蛋白表达鉴定,实验操作参照实施例1,结果见图5。图5结果说明重组的醇脱氢酶KdcPsy大肠杆菌中以可溶的形式成功表达,不可溶的部分应为细胞破碎不完全所致,不影响本发明中所述实验。

[0078] 实施例6:E.coli/SfaI菌株的构建

[0079] 本实施例中涉及的SfaI基因,其序列长度为1161bp,NCBI数据库中的登录号为NM_001180228,来源于*Saccharomyces cerevisiae* S288c,该序列由苏州金唯智生物科技有限公司全基因序列合成。全合成SfaI基因5'端添加核酸限制性内切酶EcoRI识别位点(5'-GAATTC-3'),3'端添加核酸限制性内切酶NotI识别位点(5'-GCGGCCGC-3'),并克隆到载体pUC57上得到载体pUC57-SfaI。

[0080] Sfa1基因表达载体构建:Sfa1目标基因酶切处理、产物回收、连接转化等参照实施例1。

[0081] IPTG诱导表达, SDS-PAGE蛋白表达鉴定, 实验操作参照实施例1, 结果见图6。图6结果说明重组的醇脱氢酶Sfa1大肠杆菌中以可溶的形式成功表达, 不可溶的部分应为细胞破碎不完全所致, 不影响本发明中所述实验。

[0082] 实施例7: 本发明所述方法摇瓶试验

[0083] 将重组大肠杆菌*E. coli*/PdhBb、*E. coli*/PdhTi、*E. coli*/KdcA、*E. coli*/KdcPsy、*E. coli*/YahK、*E. coli*/Sfa1经过IPTG诱导表达、离心收集的菌沉备用; 底物L-Phe现用现配; NAD (配置30mM母液, 现用现配); TPP (配置20mM母液, 现用现配); Glycine-NaOH 100mM pH 10.5, 磷酸盐缓冲液100mM pH6.0和pH 7.0。

[0084] 操作过程如下:

[0085] (1) 收集重组大肠杆菌, 按下表按照100g/L菌体浓度添加适量的缓

[0086] 冲液;

[0087] 表3

[0088]

重组大肠杆菌	重悬所用缓冲液
<i>E. coli</i> /PdhBb、 <i>E. coli</i> /PdhTi	100mM Glycine-NaOH pH 10.5
<i>E. coli</i> /KdcA、 <i>E. coli</i> /KdcPsy	100mM pH 6.0磷酸盐缓冲液
<i>E. coli</i> /YahK、 <i>E. coli</i> /Sfa1	100mM pH 7.0磷酸盐缓冲液

[0089] (2) 反应体系配置

[0090] 配置不同体积的反应体系, 各组分的终浓度如下表所示, 10ml、25ml、

[0091] 50ml的反应体系配置方法如下表所示。

[0092] 表4

[0093]

成分	终浓度	10ml 反应 体系配置	25ml 反应 体系配置	50ml 反应 体系配置
L-Phe	5 g/L	2	5	10
NAD	3 mM	1	2.5	5
TPP	2 mM	1	2.5	5
<i>E. coli</i> /PdhBb 或 <i>E. coli</i> /PdhTi	30 g/L	3	7.5	15
<i>E. coli</i> /KdcA 或 <i>E. coli</i> /KdcPsy	20 g/L	2	5	10
<i>E. coli</i> /YahK 或 <i>E. coli</i> /Sfa1	10 g/L	1	2.5	5

[0094] (3) 反应体系混匀后, 25-38℃, 100-250rpm, 摇床反应, 反应过程不控pH, 反应结束后检测反应液pH值为8~9。

[0095] (4) 反应的检测与监控

[0096] 反应液10000g离心5min, HPLC液相检测苯乙醇含量。

[0097] 反应两个小时后苯乙醇的产量及摩尔产率如下表所示：

[0098] 表5

不同湿菌体催化剂组合	苯乙醇产量 g/L(摩尔产率)		
	10 mL	25 mL	50 mL
PdhBb-KdcA-YahK	2.21(59.76%)	2.26(61.12%)	1.75(47.32%)
PdhBb-KdcA-SfaI	0.25(6.76%)	0.27(7.30%)	0.18(4.87%)
PdhBb-KdcPsy-YahK	1.52(41.10%)	1.58(42.73%)	1.28(34.61%)
PdhBb-KdcPsy-SfaI	0.21(5.68%)	0.25(6.76%)	0.17(4.60%)
PdhTi-KdcA-YahK	2.01(54.36%)	2.09(56.52%)	1.65(44.62%)
PdhTi-KdcA-SfaI	0.23(6.22%)	0.24(6.49%)	0.16(4.33%)
PdhTi-KdcPsy-YahK	1.41(38.13%)	1.49(40.29%)	1.18(31.91%)
PdhTi-KdcPsy-SfaI	0.19 (5.14%)	0.21(5.68%)	0.15(4.06%)

[0100] 实施例8：*E. coli*/PdhBb、*E. coli*/KdcA、*E. coli*/YahK不同配比催化制备苯乙醇

[0101] 生物催化反应体系配置过程参照实施例7中25ml催化反应体系。

[0102] 因*E. coli*/PdhBb、*E. coli*/KdcA、*E. coli*/YahK各自的催化剂PdhBb、KdcA和YahK的催化效率不一致，因此设计了不同菌体细胞投入量的多个配比。选择3个取样点，分别是2h、19h和24h，HPLC测定苯乙醇含量如下表所示。

[0103] 表6

反应时间 催化剂配比	苯乙醇 g/L		
	2h	19h	24h
1/1/1	1.90	2.97	2.97
1/2/1	1.62	2.30	2.40
1/2/2	1.72	1.97	2.08
1/3/1	1.26	1.97	2.17
1/3/2	1.35	2.06	2.14
1/3/3	1.60	1.85	1.95
2/1/1	2.32	2.51	2.66
2/1/2	2.43	2.15	2.33
2/2/1	1.98	2.58	2.58
3/2/1	2.26	3.42	3.28
3/1/2	2.28	2.43	2.39

[0105] 根据表6结果可知，按照本发明方法进行催化反应，所制备的苯乙醇产量较高；其中在*E. coli*/PdhBb、*E. coli*/KdcA、*E. coli*/YahK质量比为3:2:1条件下，5g/L L-Phe在反应24h能够生成3.28g/L苯乙醇，HPLC鉴定结果显示L-Phe已消耗完毕，底物的转化率达到99%，苯乙醇的摩尔产率约89%。

[0106] 实施例9：*E. coli*/PdhBb、*E. coli*/KdcA、*E. coli*/YahK的比例及辅酶NAD的用量苯乙醇产量的影响

[0107] 25mL反应体系，缓冲液配置同实例7，三种酶采用不同缓冲液，缓冲液用量同实例7的25mL体系，苯丙氨酸用量30g/L。反应温度30℃，反应过程不控pH，反应结束后检测反应液

pH值为8~9。反应中控数据见下表。

[0108] 表7

	PdhBb-KdcA-YahK 配比	辅酶 NAD	辅酶 TPP	苯乙醇产量 (g/L)			
				2h	4h	6h	17h
[0109]	3.2:2:1.2	6mM	4.4mM	2.9	5.3	6.8	7.0
	3.2:2:1.2	8mM	4.4mM	3.5	5.9	7.6	8.4
	3.2:2:1.2	10mM	4.4mM	3.0	5.5	6.9	7.1

[0110] 根据表7结果可知,按照本发明方法进行催化反应,通过增加E.coli/PdhBb、E.coli/YahK的比例及辅酶NAD的用量,所制备的苯乙醇产量提高到7.0~8.4g/L;

[0111] 实施例10:改变不同底物量进行酶催化制备苯乙醇。

[0112] 10mL反应体系,缓冲液配置同实例7,三种湿菌体(E.coli/PdhBb、E.coli/KdcA、E.coli/YahK)采用不同缓冲液,缓冲液用量同实例7的10mL体系,反应温度30℃,反应过程不控pH,反应结束后检测反应液pH值为8~9。反应中控数据见下表。

[0113] 表8

	苯丙氨酸 用量	PdhBb-KdcA-YahK 配比	辅酶 NAD	辅酶 TPP	苯乙醇产量 (g/L)	
					4h	17h
[0114]	5g/L	3.2:2:1.2	6mM	4.4mM	1.8	2.4
	10g/L	3.2:2:1.2	6mM	4.4mM	2.5	4.1
[0115]	30 g/L	3.2:2:1.2	6mM	4.4mM	5.3	7.0
	50 g/L	3.2:2:1.2	6mM	4.4mM	4.8	6.5

[0116] 根据表8结果可知,按照本发明方法进行催化反应,通过增加底物苯丙氨酸用量,可提高苯乙醇产量,达到7g/L。

[0117] 实施例11:通过改变缓冲液的不同种类进行酶催化制备苯乙醇

[0118] 采用实施例7的10mL反应体系,苯丙氨酸用量30g/L。反应温度30℃,反应过程不控pH,反应结束后检测反应液pH值为8~9,缓冲液终浓度与实施例7中10mL反应体系相同。反应中控数据见下表。

[0119] 表8

[0120]	缓冲液	PdhBb-KdcA-YahK 配比	辅酶 NAD	辅酶 TPP	苯乙醇产量 (g/L)	
					18h	25h
	pH=7.4 PBS	3.2:2:1.2	3mM	2.2mM	8.2	8.6
	pH=8.0 Tris-HCl	3.2:2:1.2	3mM	2.2mM	5.8	7.0
	实施例 7 的 三种混合缓 冲液	3.2:2:1.2	3mM	2.2mM	3.7	6.1

[0121] 根据表8结果可知,按照本发明方法进行催化反应,通过改变反应体系缓冲溶液,选用单一的PBS缓冲溶液或Tris-HCl缓冲溶液重悬湿菌体加入到反应体系,苯乙醇产量有适当提高,达到7.0-8.6g/L;

[0122] 实施例12:通过改变酶催化过程中pH值制备苯乙醇

[0123] 10mL反应体系,缓冲液配置同实施例7,三种酶采用不同缓冲液,缓冲液用量同实施例7的10mL体系,苯丙氨酸用量30g/L。反应温度30℃,反应过程通过补加酸调节pH至7~8,本实施例采用10%柠檬酸,但不限制其它种类酸:稀硫酸、盐酸、醋酸、草酸等。反应中控数据见下表。

[0124] 表9

[0125]	PdhBb-KdcA-YahK 配比	辅酶 NAD	辅酶 TPP	苯乙醇产量 (g/L)			
				2h	4h	17h	22h
	2:2:1.2	6mM	4.4mM	2.7	5.1	12.2	11.1
[0126]	2:2:1.2	3mM	2.2mM	2.6	4.4	9.0	9.6
	3.2:2:1.2	3mM	2.2mM	2.4	4.9	10.0	10.9

[0127] 根据表9结果可知,按照本发明方法进行催化反应,通过调节催化过程中pH值至7~8,所制备的苯乙醇产量提高到9.6-11.1g/L;按照本实施例方法采用其他酸来控制pH值为7-8,结果苯乙醇产量同样得到大幅度提升。

[0128] 实施例13:通过改变酶催化过程中的温度制备苯乙醇

[0129] 10mL反应体系,缓冲液配置同实例7,三种湿菌体(E.coli/PdhBb、E.coli/KdcA、E.coli/YahK)采用不同缓冲液,缓冲液用量同实例7的10mL体系,苯丙氨酸用量30g/L。改变不同反应温度,反应过程通过补加10%柠檬酸酸调节pH至7~8。反应中控数据见下表。

[0130] 表10

温度	PdhBb-KdcA-YahK 配比	辅酶 NAD	辅酶 TPP	苯乙醇产量 (g/L)		
				4h	17h	24h
25°C	2:2:1.2	6mM	4.4mM	3.5	6.5	7.0
30°C	2:2:1.2	6mM	4.4mM	5.1	12.2	11.0
35°C	2:2:1.2	6mM	4.4mM	7.0	14.1	15.5
40°C	2:2:1.2	6mM	4.4mM	4.3	6.2	7.1

[0131] 根据表10结果可知,按照本发明方法进行催化反应,提高反应温度至35°C,补加柠檬酸来调节酶催化过程中pH值至7~8,所制备的苯乙醇产量提高到15.5g/L。

[0132] 实施例14:添加金属离子Mg²⁺对催化反应的影响

[0133] 生物催化反应体系配置过程参照实施例7中25ml催化反应体系,在E.coli/PdhBb、E.coli/KdcA、E.coli/YahK比例3:2:1反应条件下,添加不同浓度的MgSO₄,考察对反应的影响,结果如下表:

[0134] 表11

MgSO ₄ 浓度 mM	反应时间				
	0	0.2	0.4	0.6	0.8
2h	2.21	2.35	2.48	2.25	2.11
7.5h	1.87	2.12	2.33	2.24	1.84

[0135] 由表11可知,添加0.4mM的MgSO₄对本发明中的生物催化反应有一定的促进作用。

[0136] 实施例15:添加氨吸附剂对催化反应的影响

[0137] 生物催化反应体系配置过程参照实施例7中25ml催化反应体系,在反应体系中添加0.3g沸石,补加柠檬酸来调节酶催化过程中pH值至7~8。反应中控数据见下表。

[0138] 表12

投酶比	辅酶 NAD	辅酶 TPP	苯乙醇产量 (g/L)
			24h
3.2:2:1.2	6mM	4.4mM	4.8

[0139] 由表12可知,添加添加0.3g的沸石对本发明中的生物催化反应未见明显促进作用,可能原因是反应体系小,产生的氨已挥发,剩余的氨不足以影响酶催化过程,对于更大的反应体系有待进一步研究。

[0140] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应

视为本发明的保护范围。

[0001] SEQUENCE LISTING
 [0002] <110> 波顿(上海)生物技术有限公司
 [0003] <120> 一种生物催化生产2-苯乙醇的方法
 [0004] <130> MP1622949
 [0005] <160> 6
 [0006] <170> PatentIn version 3.3
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 1143
 [0009] <212> DNA
 [0010] <213> 人工序列
 [0011] <400> 1
 [0012] atgagcttag tagaaaaaac atccatcata aaagatttca ctctttttga aaaaatgtct 60
 [0013] gaacatgaac aagttgtttt ttgcaacgat cggcgacag gactaagggc cattatcgct 120
 [0014] attcatgaca ccacactcgg acctgcgctc ggcggctgcc gcatgcagcc ttataacagt 180
 [0015] gtggaagaag cattggaaga tgctcttcgc ctttccaaag gaatgactta caaatgcgcg 240
 [0016] gcgtccgatg tcgactttgg cggcggaaaa gcagtcatta tcggtgatcc gcagaaagat 300
 [0017] aaatctccag aactgttccg cgcgtttggc caatttgttg attcgcttgg cggccgtttc 360
 [0018] tatacaggta ctgatatggg aacgaatag gaagatttca ttcacgcat gaaagaaca 420
 [0019] aactgcattg ttgggggtgcc ggaagcttac ggcggcgcg gagattcctc tattccaact 480
 [0020] gccatgggtg tctgtacgg cattaagca accaacaanaa tgttgtttgg caaggacgat 540
 [0021] cttggcggcg tcaattatgc cattcaagga cttggcaaag taggctacaa agtagcggaa 600
 [0022] gggctgctcg aagaaggtgc tcatttattt gtaacggata ttaacgagca aacgttggag 660
 [0023] gctatccagg aaaaagcaaa aacaacatcc gtttctgtca cggtagtagc gagcgatgaa 720
 [0024] atttattccc aggaagccga tgtgttcggt ccgtgtgcat ttggcggcgt tgtaaatgat 780
 [0025] gaaacgatga agcagttcaa ggtgaaagca atcgcgggtt cagccaacaa tcagctgctt 840
 [0026] acggaggatc acggcagaca cttgcagac aaaggcattc tgtatgctcc ggattatatt 900
 [0027] gttaactctg gcggtctgat ccaagtagcc gacgaattgt atgaggtgaa caaagaacgc 960
 [0028] gtgcttgcca agacgaagca tatttacgac gcaattcttg aagtgtacca gcaagcggaa 1020
 [0029] ttagatcaaa tcaccacaat ggaagcagcc aacagaatgt gtgagcaaag aatggcggca 1080
 [0030] agaggccgac gcaacagctt ctttacttct tctgttaagc caaatggga tattcgcaac 1140
 [0031] taa 1143
 [0032] <210> 2
 [0033] <211> 1644
 [0034] <212> DNA
 [0035] <213> 人工序列
 [0036] <400> 2
 [0037] atgtatacag taggagatta cctgtagac cgattacacg agttgggaat tgaagaatt 60
 [0038] tttggagttc ctggtgacta taacttaca ttttagatc aaattattc acgcgaagat 120
 [0039] atgaaatgga ttgaaatgc taatgaatta aatgcttctt atatggctga tggttatgct 180
 [0040] cgtactaaaa aagctgccgc atttctcacc acatttggag tcggcgaatt gagtgcgatc 240
 [0041] aatggactgg caggaagtta tgccgaaaat ttaccagtag tagaaattgt tggttacca 300

[0042]	acttcaaaag tacaaaatga cggaaaatth gtccatcata cactagcaga tgggtatttt	360
[0043]	aaacacttta tgaagatgca tgaacctgtt acagcagcgc ggactttact gacagcagaa	420
[0044]	aatgccacat atgaaattga cagagtaact tctcaattac taaaagaaag aaaaccagtc	480
[0045]	tatattaact taccagtcga tgttgctgca gcaaaagcag agaagcctgc attatcttta	540
[0046]	gaaaaagaaa gctctacaac aaatacaact gaacaagtga ttttgagtaa gattgaagaa	600
[0047]	agtttgaaaa atgccccaaaa accagtagtg attgcaggac acgaagtaat tagttttggt	660
[0048]	ttagaaaaaa cggtaactca gtttgtttca gaaacaaaac taccgattac gacactaaat	720
[0049]	tttggtaaaa gtgctgttga tgaatctttg ccctcatttt taggaatata taacgggaaa	780
[0050]	ctttcagaaa tcagtcttaa aaatthttgtg gagtccgcag actttatcct aatgcttgg	840
[0051]	gtgaagctta cggactcctc aacagtgca ttcacacatc atttagatga aaataaaatg	900
[0052]	atthcactaa acatagatga aggaataatt ttcaataaag tggtagaaga ttttgatttt	960
[0053]	agagcagtgg thtctctttt atcagaatta aaaggaatag aatatgaagg acaatatatt	1020
[0054]	gataagcaat atgaagaatt tattccatca agtgcctcct tatcacaaga ccgtctatgg	1080
[0055]	caggcagttg aaagthtgac tcaaagcaat gaaacaatcg ttgctgaaca aggaacctca	1140
[0056]	thttttggag ctthacaat thtctthaaa tcaaatagtc gthttattgg acaacctth	1200
[0057]	tggggttcta ttggatatac thttccagcg gctthtaggaa gccaaattgc ggataaagag	1260
[0058]	agcagacacc thttatttat tggatggt tcactthcaac thaccgtaca agaattagga	1320
[0059]	ctatcaatca gagaaaact caatthcaatt gththtatca thaaataatga tggthataca	1380
[0060]	gthgaaagag aatthcacgg acctactcaa agthataacg acatthcaat gthggaattac	1440
[0061]	tcgaaattac cagaaacatt tggagcaaca gaagatcgtg tagtatcaaa aatthgthaga	1500
[0062]	acagagaatg aatthgtgth tgcctatgaaa gaagcccaag cagatgthca thagaatgth	1560
[0063]	tggatagaac tagthttgga thaaagaagat gcgccccaaat tactgaaaaa aatgggthaa	1620
[0064]	thatttgctg agcaaaataa atag	1644
[0065]	<210>	3
[0066]	<211>	1638
[0067]	<212>	DNA
[0068]	<213>	人工序列
[0069]	<400>	3
[0070]	atgaagctgg ccgaagcctt gctgcgcgcg ctgaaggatc gcggcgcaca ggccatgttc	60
[0071]	gggattccgg gcgatttgc cttgcccttc thcaagtggt cggaggaac gcagatcctg	120
[0072]	ccgtccaca cgctgagcca cgagccggcg gtgggcttcg cggcggacgc ggccgcgcgc	180
[0073]	tacagctcca ctctaggggt ggccgcggtc acctacgggg cggcgcctt caacatggtg	240
[0074]	aatgcggtgg ccggcctca cgccgagaag tcgccggtcg tcgtcatctc cggcgcgcgc	300
[0075]	ggcacgacgg agggcaacgc cggcctgctg ctggaccacc agggccgcac gctggacacg	360
[0076]	cagthccagg thttcaagga gatcacctg gccagggcc ggctggacga cccggccaag	420
[0077]	gccccggcgg agatcggccg cgtgctgggg gccggccct ccctgtcgcg cccggtctat	480
[0078]	ctggaatcc cccgcaacat ggtcaacgcc gaggtcgagc cggthggcga cgacccccgc	540
[0079]	tggccggtgg accgcgacgc gctggccgcc tgcgcggacg aggtgctggc ggccatgcgc	600
[0080]	tcggccagct ccccggtgct gatggtctgc gtgaggtccg ccgctacggg gctggaggcc	660
[0081]	aagthggcgg acgtggcga cgggctgggc gtgccggtgg thaccacct catggggcgc	720
[0082]	ggctgctgg ccgacgcgc gaccccccg ctcggcacct acatcggcgt thccggcgc	780
[0083]	gcggagatca cccggtggt cgaggagtc gacgggctgt thctgctcgg gcctactctc	840

[0084]	agcgacacaa acttcgcggt gtcccagcgc aagatcgacc tgcgcaagac catccacgcc	900
[0085]	ttcgaccggg cggtagcgt gggctatcac acctacgccg acatcccgt ggacgggctg	960
[0086]	gtggacgcgc tgctggagcg gctgcccgcg tccgaccgca cgacgcgcgg caaggaacce	1020
[0087]	cacgcctacc cgaccggcct tcaggccgac gacggcccca tcgcaccgat ggacatgcc	1080
[0088]	cgtgccgtca acgaccgct gcgcgccggg caggagccgc tgctgatgc ggcgacatg	1140
[0089]	ggcgactgcc tttcaccgc catggacatg atcgaccgc ggctgatgg gccgggctat	1200
[0090]	tacgcgggca tgggcttcgg cgtgccggcg ggcacgggg cgcagtgcgt gtcgggcg	1260
[0091]	aagcgcacc tgacggtgt cggcgacgc gccttcaga tgaccgggt ggagcttgg	1320
[0092]	aactgccgac ggctgggcat cgacccatc gtgatcctgt tcaacaacgc cagttgggag	1380
[0093]	atcgtgcgca cttccagcc cgaatccgc ttcaatgacc tggacgactg gcggttcgc	1440
[0094]	gagatggcgg cgggcatggg cggcgacggt gtccgtgtgc gcacgcgggc ggagctgaag	1500
[0095]	gcggcgtgg acaaggcct ccccacgcgc gggcgttcc agctgatcga ggcgatgatc	1560
[0096]	ccccggcg tgctgtccga cacgtggc cgcttcgtcc aggggcagaa gcgcctgca	1620
[0097]	gccgcggc ggaataa	1638
[0098]	<210>	4
[0099]	<211>	1101
[0100]	<212>	DNA
[0101]	<213>	人工序列
[0102]	<400>	4
[0103]	atgcgtgatg ttttcgagat gatggaccgc tacggtcatg agcaggtgat cttttgccgt	60
[0104]	catcctcaaa ccggcctgaa ggccattatc gccctgcata ataccaccgc aggtccggcc	120
[0105]	ctgggtggtt gccgtatgat cccgtacgcc agcaccgacg aggcactgga agatgtgctg	180
[0106]	cgctgagca aaggtatgac ctacaaatgc agcctggccg acgtggattt tggcgggtgg	240
[0107]	aagatggtga tcacggcga cccgaagaaa gacaaaagcc cggaactgtt ccgcgttatc	300
[0108]	ggtcgttcg tgggtggtct gaacggtcgc ttctataccg gcacagatat gggcaccat	360
[0109]	ccgaggatt ttgtgcatgc ccccgcgag agcaaaagt ttgccgcct gccgaagagc	420
[0110]	tatggcggta aaggtgatac cagcattccg accgccctgg gcgtgtttca cggcatgcgt	480
[0111]	gcaaccgcc gtttctgtg ggtaccgat caactgaaag gccgtgtggt ggccatccag	540
[0112]	ggtgttgca aagtggcga acgctgctg cagctgttag tggaggttg gcctactgt	600
[0113]	aagattgcag atattgatag cgtgcgctgc gagcagctga aagagaaata cggcgacaag	660
[0114]	gtgcaactgg ttgactgaa ccgtatccac aaggagagt gcgacatct tagcccttg	720
[0115]	gcaaaagtg gcgtggttaa cgatgacacc atcgacgagt tccgctgcct ggccatcgt	780
[0116]	ggtagcga acaatcagct ggtggaagat cgtcacggtg ccctgctgca gaaacgcagc	840
[0117]	atttctatg ccccgatta tctggtgaa gcaggcgcc tgattcaggt tgccgatgaa	900
[0118]	ctggaaggct ttcacagga acgctgctg gccaaaacc aagccatcta tgacatggtg	960
[0119]	ctggacatc tccatcgcgc caagaacgag aacattacca cctgtgaggc cgccgatcgt	1020
[0120]	attgtgatg agcgcctgaa gaagctgacc gatattgcc gcattctgct ggaggacct	1080
[0121]	cgtaacagc cacgtcgta	a 1101
[0122]	<210>	5
[0123]	<211>	1671
[0124]	<212>	DNA
[0125]	<213>	人工序列

[0126]	<400> 5	
[0127]	atgagtcaac aatataccat tgccgactac ctgtttgacc gcgttgcaga agccggcgca	60
[0128]	agcgaagtgt ttggcgtgcc gggcgacttc aacctgacct ttctggacaa cgtgctggca	120
[0129]	agcgacaaac tgcgctgggt gggtaataca aacgaactga acgccggtta tgcagccgat	180
[0130]	ggctatgccc gtgagcgtgg ctttgccgca atgggtgacca catttgccgt tggatgaactg	240
[0131]	agcgcaatca atgccacagc cggcagtttt gccgagtatg caccggtgct gcacatcgtt	300
[0132]	ggtgcaccga gtaccgccct gcaggatagt aagcgtcgca ttcaccacag cctgggtgac	360
[0133]	ggtgttttca atcacttcat caagatgggt gaacctgtga ccgttgcccc tgcacaaatc	420
[0134]	acaccgaaa acgcagcaag cgagatcgac cgcgtgatcc gcgttatcct gaaaaaacac	480
[0135]	cgcccgggtt acttactgct gagccccgac gtggccaaaa caccgattta tccgccgacc	540
[0136]	accaagctga tcgacagtga ggaagacatc accagccagg ccgactggc cgatttcaaa	600
[0137]	caggccctga ttgagttcct gccgaataaa accacaacc tgatggcaga tctgatgggtg	660
[0138]	caccgtctgg gcctgcagaa tcagctgaaa gactgattg ccgacacaga catcccgtat	720
[0139]	accacctga gttgggtaa gaccctgctg gacgagaata gcgaacgttg ggccggtacc	780
[0140]	tatgccgtg tggccagccg cccggtggtt aaagatatgg tggaaaattg tgaatgctta	840
[0141]	atcaaaattg gcgtgcagta tacagacacc accacagccg gtttcagcca agacatcgt	900
[0142]	gagaacgtgg ttgtgatct gcactacgaa cgtgccagca ttgccggcaa aaatttcgcc	960
[0143]	ccgatcgac tgaagatgc cctgaaaacc ctgcatgaag tgatgaccag cgatatcaac	1020
[0144]	atcgtgccga agcagttctg cgaggaagtg aaacagcacg aacaacatgg taaagacaat	1080
[0145]	gaagccatcc gccaggacga tctgtggcac atcattgcag acgccctgga tgataaaaat	1140
[0146]	ctggttttta gcgaacaggg taccgcctac ttcggcatta gcgatgttcg tctgccgaa	1200
[0147]	ggtgttacca gctatggtca gccgatgtgg ggtagcatcg gttataacct gcctgcaagc	1260
[0148]	ctgggtggcg ccattgccag ccctcaaaa cgcagcatcc tgctgatcgg tgatggtagc	1320
[0149]	gcctgctga ccatccagga gatcgccgtg atgattcaag aacgcattaa tccggtgatt	1380
[0150]	gtgctgatta acaacgacgg ctataccgtg gagegtgcaa tccacggcga aaatcagtac	1440
[0151]	tacaatgata tcccgaatg cgactggcag ctgatgccga aagcctttgg tgccaatgcc	1500
[0152]	aacaatagtc tgctgctgaa agccgaaacc gccggcgaac tgaaagacgc cctgaagcag	1560
[0153]	gccgcagccg caaaagataa actggtgatg ctggaagtga ttgccggcaa gcacgatatt	1620
[0154]	ccgccgtgc tggccgatat cagcgcagcc ctgaaaceta agaacgatta a	1671
[0155]	<210> 6	
[0156]	<211> 1161	
[0157]	<212> DNA	
[0158]	<213> 人工序列	
[0159]	<400> 6	
[0160]	atgtccgccg ctactgttgg taaacctatt aagtgcattg ctgctgttgc gtatgatgcg	60
[0161]	aagaaacat taagtgtga agaaatcacg gtagacgcc caaaagcgca cgaagtacgt	120
[0162]	atcaaaattg aatatactgc tgtatgccac actgatgcgt acactttatc aggctctgat	180
[0163]	ccagaaggac ttttccttg cgttctgggc cacgaaggag ccggtatcgt agaattctgta	240
[0164]	ggcgatgatg tcataacagt taagcctggt gatcatgta ttgctttgta cactgctgag	300
[0165]	tgtggcaaat gtaagtctg tacttccggt aaaaccaact tatgtggtgc tgtagagct	360
[0166]	actcaaggga aaggtgtaat gcctgatggg accacaagat ttcataatgc gaaaggtgaa	420
[0167]	gatataatcc atttcatggg ttgctctact ttttcgaaat atactgtggt ggcagatgct	480

[0168] tctgtggttg ccatcgatcc aaaagctccc ttggatgctg cctgtttact gggttgtggt 540
[0169] gttactactg gttttggggc ggctcttaag acagctaagtg tgcaaaaagg cgataccggt 600
[0170] gcagtatttg gctgcgggac tgtaggactc tccgttatcc aaggtgcaaa gttaaggggc 660
[0171] gcttccaaga tcattgcat tgacattaac aataagaaaa aacaatattg ttctcaattt 720
[0172] ggtgccacgg attttgtaa tccaaggaa gatttgcca aagatcaaac tatcgttgaa 780
[0173] aagttaattg aatgactga tgggggtctg gattttactt ttgactgtac tgtaataacc 840
[0174] aaaattatga gagatgcttt ggaagcctgt cataaagggt ggggtcaatc tattatcatt 900
[0175] ggtgtgctg ccgctggtga agaaatttct acaaggcctg tccagctggt cactggtaga 960
[0176] gtgtggaaag gctctgcttt tggtggcatc aaaggtagat ccgaaatgg cggtttaatt 1020
[0177] aaagactatc aaaaagggtgc cttaaagtc gaagaattta tcactcacag gagaccattc 1080
[0178] aaagaaatca atcaagcctt tgaagatttg cataacggtg attgcttaag aaccgtcttg 1140
[0179] aagtctgatg aaataaaata g 1161

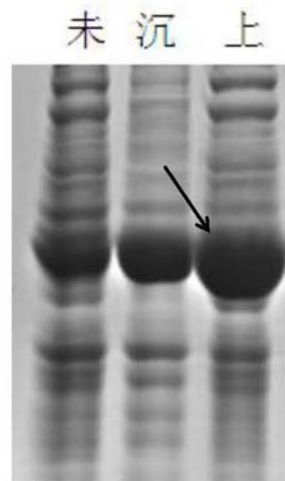


图1

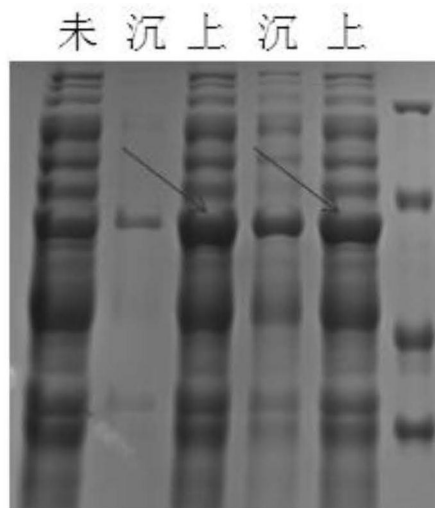


图2

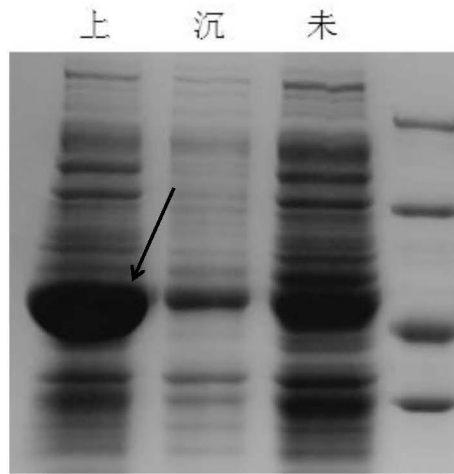


图3

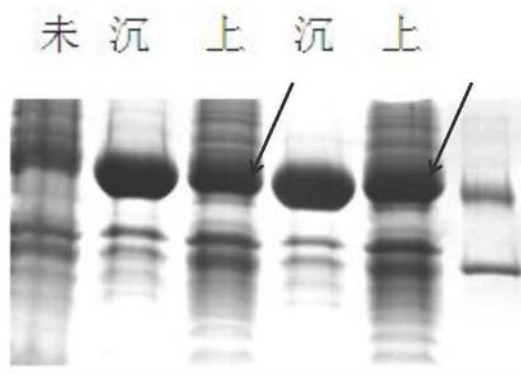


图4

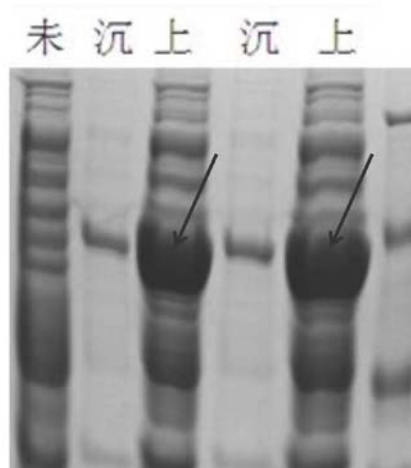


图5

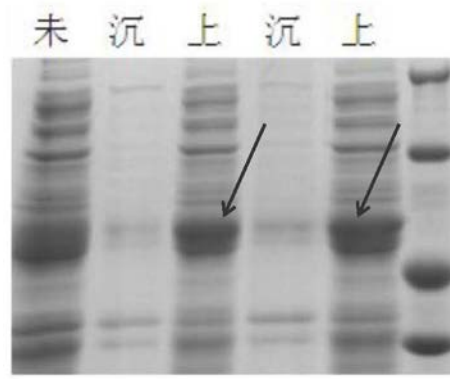


图6