



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103614349 B

(45) 授权公告日 2015. 05. 27

(21) 申请号 201310578047. 1

C12R 1/01(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 11. 18

(56) 对比文件

(73) 专利权人 浙江工业大学

GENBANK. 登录号:

地址 310014 浙江省杭州市下城区潮王路  
18 号

WP\_012134312. 1. 《GENBANK》. 2013, 第 1 页.

(72) 发明人 应向贤 汪钊 王一芳 郑建永  
章银军

李晓莹等. 肝醇脱氢酶催化乙醇氧化生成乙  
醛反应机理的理论研究. 《催化学报》. 2010, 第  
31 卷(第 9 期), 第 1167-1171 页.

(74) 专利代理机构 杭州天正专利事务有限公  
司 33201

Stefano Ferri 等. Review of Glucose  
Oxidases and Glucose Dehydrogenases: A  
Bird's Eye View of Glucose Sensing  
Enzymes. 《Journal of Diabetes Science and  
Technology》. 2011, 第 5 卷(第 5 期), 第  
1068-1076 页.

代理人 黄美娟 冷红梅

(51) Int. Cl.

胡建国. 转化橙花醛产物酵母突变株筛选方  
法的研究. 《安徽农学通报》. 2012, 第 18 卷(第  
8 期), 第 23-24 页.

C12N 9/04(2006. 01)

C12N 15/53(2006. 01)

C12N 15/70(2006. 01)

C12N 1/21(2006. 01)

C12P 7/24(2006. 01)

C12P 7/22(2006. 01)

C12P 7/04(2006. 01)

审查员 刘苗

权利要求书1页 说明书8页  
序列表4页 附图1页

(54) 发明名称

一种烯醇脱氢酶、编码基因、载体、工程菌及  
其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种烯醇脱氢酶及其编码基  
因, 含有该编码基因的载体、工程菌及其应用。所  
述烯醇脱氢酶的氨基酸序列如 SEQ ID No. 1 所  
示, 其编码基因如 SEQ ID No. 2 所示。本发明提  
供了一种来源于约克氏菌 WZY002 (Yokenella  
sp. WZY002) 的烯醇脱氢酶基因核苷酸序列; 该烯  
醇脱氢酶基因可与表达载体连接构建得到含该基  
因的胞内表达重组质粒, 再转化至大肠杆菌菌株  
中, 获得重组大肠杆菌; 该重组大肠杆菌经细胞  
破碎, 分离纯化获得重组烯醇脱氢酶; 该重组烯  
醇脱氢酶具有还原烯醛、烯酮、芳香醛和芳香酮等  
底物生成对应的醇的能力; 利用重组大肠杆菌或  
重组烯醇脱氢酶为生物催化剂同时催化醇的氧化  
和醛的还原, 可以生成巴豆醛、苯甲醇、橙花醇和  
香叶醇。

CN 103614349 B

1. 一种烯醇脱氢酶,其氨基酸序列如 SEQ ID No. 1 所示。
2. 权利要求 1 所述烯醇脱氢酶的编码基因。
3. 权利要求 2 所述的编码基因,其特征在于所述编码基因的核苷酸序列如 SEQ ID No. 2 所示。
4. 含有权利要求 2 或 3 所示编码基因的重组载体。
5. 一种用权利要求 4 所述重组载体转化得到的重组基因工程菌。
6. 权利要求 2 或 3 所述基因在制备重组烯醇脱氢酶中的应用。
7. 权利要求 1 所述的烯醇脱氢酶在催化还原醛或酮制备相应的醇中的应用;所述的醛为下列之一:巴豆醛、反式 2-己烯醛、2-甲基-2-戊烯醛、反式 2-辛烯醛、反式 2-癸烯醛、香叶醛、橙花醛或苯甲醛;所述的酮为下列之一:4-甲基-3-戊烯-2-酮、3-辛烯-2-酮、2-溴苯乙酮。
8. 如权利要求 7 所述的应用,其特征在于所述催化还原在 pH5.5 ~ 9.5、20 ~ 70°C 条件下进行。
9. 权利要求 1 所述的烯醇脱氢酶在催化氧化巴豆醇制备巴豆醛中的应用。
10. 如权利要求 9 所述的应用,其特征在于所述催化氧化在 pH6.1 ~ 10.0、20 ~ 70°C 条件下进行。

## 一种烯醇脱氢酶、编码基因、载体、工程菌及其应用

### (一) 技术领域

[0001] 本发明涉及一种烯醇脱氢酶及其编码基因,含有该编码基因的载体、工程菌及其应用。

### (二) 背景技术

[0002]  $\alpha$ ,  $\beta$ - 不饱和化合物如烯醇、烯醛和烯酮等在化学工业的许多领域中具有重要应用,常用于生产精细化学品、药物和香精香料等。目前, $\alpha$ ,  $\beta$ - 不饱和烯醇通常是利用化学催化剂对烯醛或烯酮进行选择性的加氢而制备。化学法还原  $\alpha$ ,  $\beta$ - 不饱和烯醛或烯酮制备烯醇往往选择性较低,并且伴随着副产物饱和醇的生成。作为化学法的替代,生物催化法制备  $\alpha$ ,  $\beta$ - 不饱和烯醇具有高效、经济、选择性高、条件温和等优点,已越来越受研究者所重视。与化学催化剂只能催化还原反应不同,生物催化剂既可以用于  $\alpha$ ,  $\beta$ - 不饱和烯醛或烯酮的选择性加氢,也可以用于  $\alpha$ ,  $\beta$ - 不饱和烯醇的选择性氧化制备烯醛或烯酮。

[0003] 用于生物法制备  $\alpha$ ,  $\beta$ - 不饱和烯醇的生物催化剂既可以是整细胞,也可以是酶。因为细胞内含有多种酶,整细胞催化往往会遇到副反应的问题,副反应的存在会降低目标反应产物的得率。对于像烯醛还原生成烯醇这种一步反应来说,酶法催化更具优势,既可以彻底避免副反应的问题,也可以克服细胞膜阻碍底物和产物跨膜传递的问题。因而,通过基因工程技术高产烯醇脱氢酶,将为其在生物法制备  $\alpha$ ,  $\beta$ - 不饱和化合物中的应用奠定良好的基础。

[0004] 烯醇脱氢酶能够催化烯醛或烯酮的还原生成烯醇,也能够催化烯醇的氧化生成烯醛或烯酮。烯醇脱氢酶属于含锌中链醇脱氢酶家族,以 NAD (P)H 为辅酶,一般来说都具有苜蓿醇脱氢酶的活力。目前,已从微生物中发现多种烯醇脱氢酶,如醋酸钙不动杆菌 (*Acinetobacter calcoaceticus*)、贝氏不动杆菌 (*Acinetobacter baylyi*)、恶臭假单胞菌 (*Pseudomonas putida*) 和酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*)。这些野生菌中烯醇脱氢酶含量极低,利用其作为生物催化剂进行大规模的工业化生产存在一定的难度,因而构建烯醇脱氢酶基因工程菌从而大量生产重组烯醇脱氢酶具有重要意义。

### (三) 发明内容

[0005] 本发明目的是提供一种烯醇脱氢酶基因、含有该基因的重组载体、该重组载体转化得到的重组基因工程菌,及其在生物法制备  $\alpha$ ,  $\beta$ - 不饱和醇 / 醛中的应用。

[0006] 本发明采用的技术方案是:

[0007] 一种烯醇脱氢酶,其氨基酸序列如 SEQ ID No. 1 所示。

[0008] SEQ ID No. 1:

[0009] MSIIKSYAAK EAGSELELYE YDAGELRPED VEVQVDYCGI

[0010] CHSDLSMIDN EWGFSQYPLV AGHEVIGRVA ALGSAAQEKG

[0011] VKVGQRVGVG WTARSCGHCD ACISGNQINC LEGAVATILN

[0012] RGGFAEKLRA DWQWVIPLPE SIDIESAGPL LCGGITVFKP

[0013] LLMHHITATS RVGVIGIGGL GHIAIKLLHA MGCEVTAFSS  
 [0014] NPSKEQEVLA MGADKVVNSR DPDALNALAG QFDLIINTVN  
 [0015] VDLDWQPYFE ALAYGGHFHT VGAVMKPLPV PAFTLIAGDR  
 [0016] SISGSATGTP YELRKLKFA GRSKVSPTE LFPMSQINEA  
 [0017] IQHVRDGKAR YRVVLQADF。

[0018] 由于氨基酸序列的特殊性,任何含有 SEQ ID NO. 1 所示氨基酸序列的多肽的片段或其变体,如其保守性变体、生物活性片段或衍生物,只要该多肽的片段或多肽变体与前述氨基酸序列同源性在 90% 以上、且具有相同的酶活性,均属于本发明保护范围之列。具体的,所述改变可包括氨基酸序列中氨基酸的缺失、插入或替换;其中,对于变体的保守性改变,所替换的氨基酸具有与原氨基酸相似的结构或化学性质,如用亮氨酸替换异亮氨酸,变体也可具有非保守性改变,如用色氨酸替换甘氨酸。

[0019] 本发明所述蛋白的片段、衍生物或类似物是指基本上保持本发明所述的蛋白酶相同的生物学功能或活性的蛋白,可以是下列情形:(I) 一个或多个氨基酸残基被保守或非保守氨基酸残基(优选的是保守氨基酸残基)取代,并且取代的氨基酸可以是也可以不是由遗传密码子编码的;(II) 一个或多个氨基酸残基上的某个基团被其它基团取代;(III) 成熟蛋白与另一种化合物(比如延长蛋白半衰期的化合物,例如聚乙二醇)融合;(IV) 附加的氨基酸序列融合进成熟的蛋白而形成的蛋白序列(如用来纯化此蛋白的序列或蛋白原序列)。

[0020] 所述蛋白可以是重组蛋白、天然蛋白或合成蛋白,可以是纯天然纯化的产物,或是化学合成的产物,或使用重组技术从原核或真核宿主(例如:细菌、酵母、高等植物、昆虫和哺乳动物细胞)中产生。根据重组生产方案所用的宿主,本发明的蛋白可以是糖基化的。本发明的蛋白还可以包括或不包括起始的甲硫氨酸残基。

[0021] 本发明还涉及所述烯醇脱氢酶的编码基因。

[0022] 具体的,所述编码基因的核苷酸序列如 SEQ ID No. 2 所示:

[0023] ATGTCTATTA TAAAAAGCTA TGCCGCAAAA GAGGCGGGCA GCGAACTCGA

[0024] ACTTTACGAA TATGATGCCG GTGAACTCAG GCCGGAAGAT GTCGAGGTGC

[0025] AGGTCGACTA CTGCGGTATC TGCCATTCCG ATCTTTCCAT GATCGACAAC

[0026] GAATGGGGAT TCTCTCAGTA TCCGCTGGTT GCCGGGCATG AAGTGATTGG

[0027] CCGCGTGGCG GCGCTCGGCA GTGCGGCGCA GGAAAAAGGG GTGAAAAGTTG

[0028] GTCAGCGCGT GGGCGTAGGC TGGACGGCGC GCAGCTGTGG GCATTGCGAT

[0029] GCATGTATCA GCGGTAATCA GATTAAGTGC CTGGAAGGCG CCGTAGCCAC

[0030] CATTCTCAAC CGTGGCGGTT TTGCCGAGAA ACTGCGGGCA GACTGGCAGT

[0031] GGGTGATCCC GCTTCCGGAG AGCATCGATA TTGAGTCGGC AGGTCCTCTG

[0032] TTATGCGGCG GTATTACGGT TTTTAAACCT CTGCTGATGC ACCACATCAC

[0033] CGCGACCAGT CGCGTGGGGG TGATCGGCAT CGGCGGTCTT GGGCACATTG

[0034] CCATTAAGT GTTGCACGCA ATGGGCTGTG AAGTGACCGC ATTCAGCTCG

[0035] AATCCGTCGA AAGAACAGGA AGTGCTGGCA ATGGGGGCGG ATAAAGTCGT

[0036] GAACAGTCGC GATCCAGACG CGTTAAATGC GCTGGCAGGC CAGTTTGATC

[0037] TCATTATCAA CACCGTTAAT GTCGACCTCG ACTGGCAGCC CTACTTTGAA

[0038] GCGCTGGCCT ATGGCGGCCA TTTCCACACC GTCGGCGCAG TGATGAAGCC

[0039] GCTGCCGGTT CCGGCGTTTA CATTGATTGC TGGCGATCGC AGCATCTCCG  
[0040] GCTCAGCAAC CGGTACGCCC TATGAGCTGC GCAAATTGAT GAAGTTTGGC  
[0041] GGGCGCAGCA AGGTCTCGCC GACGACAGAG CTGTTCCCAA TGTCGCAAA  
[0042] CAACGAAGCC ATCCAGCACG TTCGCGACGG CAAAGCGCGT TACCGCGTGG  
[0043] TACTGCAAGC CGACTTT。

[0044] 该烯醇脱氢酶基因由如下方法得到：从野生菌约克氏菌 WZY002 (*Yokenella* sp. WZY002) 中分离纯化得到该烯醇脱氢酶，N 端测序结果经比对获得相似度最高的同源基因序列，设计引物 1-1 (5'-ATGTCTATTATAAAAAGCTATGCC-3')、引物 1-2 (5'-AGCTATGCCGCAAAAGAG-3')、引物 2 (5'-AAAGTCGGCTTGCAGTACC-3')。利用 PCR 技术，以来源于约克氏菌 WZY002 的基因组 DNA 为模板克隆出烯醇脱氢酶基因片段。将该片段连接到 pEASY-E2 载体上获得克隆载体 pEASY-E2-YsADH 并将其转化于大肠杆菌 Trans1-T1 中。对重组质粒测序，并利用软件对测序结果进行分析，该序列含有一个长为 1017bp 的开放阅读框 (SEQ ID NO. 2)，利用软件对该基因序列进行分析，推知所述烯醇脱氢酶基因编码的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

[0045] 所述烯醇脱氢酶基因源自约克氏菌 WZY002 (*Yokenella* sp. WZY002)。该约克氏菌保藏于中国典型培养物保藏中心，地址：中国武汉，武汉大学，430072，保藏编号：CCTCC No:M2013099，保藏日期：2013 年 3 月 22 日，已在先前申请专利(申请号：201310188883.9)中提交了相关菌种保藏信息并披露了其遗传资源来源。

[0046] 由于核苷酸序列的特殊性，任何 SEQ ID NO. 2 所示多核苷酸的变体，只要其与该多核苷酸具有 70% 以上同源性、且具有相同的功能，均属于本发明保护范围之列。所述多核苷酸的变体是指一种具有一个或多个核苷酸改变的多核苷酸序列。此多核苷酸的变体可以是天然发生的等位变异体或非天然发生的变异体，包括取代变异体、缺失变异体和插入变异体。如本领域所知的，等位变异体是一个多核苷酸的替换形式，它可能是一个或多个核苷酸的取代、缺失或插入，但不会从实质上改变其编码的氨基酸的功能。

[0047] 另外，可与 SEQ ID NO :2 所示多核苷酸序列杂交的多核苷酸(至少具有 50% 同源性，优选具有 70% 同源性)，也在本发明保护范围之列，特别是在严格条件下可与本发明所述核苷酸序列杂交的多核苷酸。所述“严格条件”是指：(1) 在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如 0.2SSC, 0.1%SDS, 60°C ;或(2) 杂交时加用变性剂，如 50% (v/v) 甲酰胺，0.1% 小牛血清，0.1%Ficoll, 42°C ;或(3) 仅在两条序列之间的同源性至少在 95% 以上，更好是 97% 以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的蛋白与 SEQ ID NO :1 所示的蛋白有相同的生物学功能和活性。

[0048] 本发明还涉及含有所述编码基因的重组载体，以及利用所述重组载体转化得到的重组基因工程菌。

[0049] 本发明还涉及所述基因在制备重组烯醇脱氢酶中的应用。

[0050] 具体的，所述的应用为：构建含有所述烯醇脱氢酶基因的重组载体 pEASY-E2-YsADH，将所述重组载体转化至大肠杆菌 TransB (DE3) 中，获得的重组大肠杆菌 TransB (DE3) /pEASY-E2-YsADH。重组大肠杆菌经诱导培养，培养液经离心分离得到含有烯醇脱氢酶的菌体细胞。菌体细胞在超声波破碎后，离心去除细胞碎片，所得的上清液通过 Ni-NTA 金属螯合亲和层析分离纯化得到重组烯醇脱氢酶。

[0051] 本发明烯醇脱氢酶还原醛或酮的活力测定方法为：在 2.5mL MES 缓冲液(50mM, pH6.5)中,分别加入 10mM 底物和 0.3mM NADPH,最后加入 3 $\mu$ g 重组烯醇脱氢酶启动酶反应,反应温度为 65 $^{\circ}$ C。通过测量 340nm 下辅酶 NADPH 吸光值的降低从而计算其酶活力。酶活力单位定义为在 pH6.5 和 65 $^{\circ}$ C 下,1min 氧化 1 $\mu$ mol 辅酶 NADPH 所需的酶量。

[0052] 本发明还涉及所述的烯醇脱氢酶在催化还原醛或酮制备相应的醇中的应用；所述的醛为下列之一：巴豆醛、反式 2-己烯醛、2-甲基-2-戊烯醛、反式 2-辛烯醛、反式 2-癸烯醛、香叶醛、橙花醛或苯甲醛；所述的酮为下列之一：4-甲基-3-戊烯-2-酮、3-辛烯-2-酮、2-溴苯乙酮。

[0053] 具体的,所述催化还原在 pH5.5~9.5、20~70 $^{\circ}$ C(酶活检测时优选 pH6.5 和 65 $^{\circ}$ C,而酶法或整细胞法催化还原反应时优选 pH6.5~8.0 和 20~40 $^{\circ}$ C)条件下进行。

[0054] 本发明还涉及所述的烯醇脱氢酶在催化氧化巴豆醇制备巴豆醛中的应用。

[0055] 具体的,所述催化氧化可在 pH6.1~10.0、20~70 $^{\circ}$ C(酶活检测时优选 pH8.0 和 55 $^{\circ}$ C、而酶法或整细胞法催化氧化反应时优选 pH7.5~9.0 和 20~40 $^{\circ}$ C)条件下进行。

[0056] 所述重组烯醇脱氢酶可同时催化苯甲醛的还原和巴豆醇的氧化,生成苯甲醇和巴豆醛。具体过程如下：底物巴豆醇和苯甲醛的比例为 1:0.5~1:2,以含有所述烯醇脱氢酶的重组大肠杆菌湿菌体为催化剂,在 pH7.5~9.5 的缓冲液中,于 20~40 $^{\circ}$ C 下反应 6~24 小时。反应结束后反应液经乙酸乙酯萃取,离心得到有机相,无水硫酸钠干燥后,对底物及其转化产物进行气相色谱分析,结果表明,重组大肠杆菌能在同一反应体系中催化巴豆醇的氧化生成巴豆醛,同时催化苯甲醛的还原生成苯甲醇。

[0057] 所述重组烯醇脱氢酶可也可同时催化橙花醛/香叶醛的还原和巴豆醇的氧化,生成橙花醇、香叶醇和巴豆醛。具体过程：底物醛和巴豆醇的比例为 1:1~1:7,其中醛为等摩尔比的橙花醛和香叶醛。以重组烯醇脱氢酶为催化剂,在 pH6.5~8.5 的缓冲液中,于 20~40 $^{\circ}$ C 下反应 2~10 小时。反应结束后反应液经乙酸乙酯萃取,离心得到有机相,无水硫酸钠干燥后,对底物及其转化产物进行气相色谱分析,结果表明,重组烯醇脱氢酶能催化巴豆醇氧化生成巴豆醛,同时催化橙花醛/香叶醛还原生成橙花醇/香叶醇。

[0058] 本发明的有益效果主要体现在：提供了一种来源于约克氏菌 *Yokenella* sp. WZY002)的烯醇脱氢酶基因核苷酸序列；该烯醇脱氢酶基因可与表达载体连接构建得到含该基因的胞内表达重组质粒,再转化至大肠杆菌菌株中,获得重组大肠杆菌；该重组大肠杆菌经细胞破碎,分离纯化获得重组烯醇脱氢酶；该重组烯醇脱氢酶具有还原烯醛、烯酮、芳香醛和芳香酮等底物生成对应的醇的能力；利用重组大肠杆菌或重组烯醇脱氢酶为生物催化剂同时催化醇的氧化和醛的还原,可以生成巴豆醛、苯甲醇、橙花醇和香叶醇。

#### (四) 附图说明

[0059] 图 1 为 PCR 扩增烯醇脱氢酶基因的琼脂糖凝胶电泳图；其中,1 为利用引物 1-1 和引物 2 扩增得到的烯醇脱氢酶基因片段；M 为 100bp DNA Ladder Marker；

[0060] 图 2 为构建的重组质粒 pEASY-E2-YsADH；

[0061] 图 3 为 PCR 扩增鉴定阳性重组子的琼脂糖凝胶电泳图；M 为 DNA 分子量标准；泳道 1 至 8 为 PCR 扩增的目的 DNA 片段。

### (五) 具体实施方式

[0062] 下面结合具体实施例对本发明进行进一步描述,但本发明的保护范围并不仅限于此:

[0063] 实施例 1:

[0064] 用核酸提取试剂盒提取约克氏菌 WZY002 (*Yokenella* sp. WZY002) 的基因组 DNA, 以该基因组 DNA 为模板, 在引物 1-1 (5' -ATGTCTATTATAAAAAGCTATGCC-3') 或引物 1-2 (5' -AGCTATGCCGCAAAAGAG-3')、引物 2 (5' -AAAGTCGGCTTGCAGTACC-3') 的作用下进行 PCR 扩增。

[0065] PCR 反应体系各组分加入量(总体积 50  $\mu$ L):

[0066] 10 $\times$ TransStart rTaq Buffer (含  $Mg^{2+}$ ) 5  $\mu$ L, 10mM dNTP mixture (dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 各 2.5mM) 12.5  $\mu$ L, 浓度为 50pM 的引物 1 (1-1 或 1-2) 和引物 2 各 1  $\mu$ L, 基因组 DNA 1  $\mu$ L, TransTaq DNA 聚合酶 1  $\mu$ L, 加水补至 50  $\mu$ L。

[0067] PCR 反应条件为: 预变性 94 $^{\circ}$ C, 4min, 然后进入温度循环 94 $^{\circ}$ C, 30s; 55 $^{\circ}$ C, 30s; 72 $^{\circ}$ C, 1min; 共 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 终止温度为 4 $^{\circ}$ C。

[0068] 取 6  $\mu$ L PCR 反应液用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳结果表明为单一条带, 扩增片段大小约为 1kb, 如图 1 所示。用 DNA 液体快速回收试剂盒纯化, 利用 Taq DNA 聚合酶向片段 5' 端引入碱基 A。将该片段同 T 载体 (pEASY-E2, 该载体购自北京全式金生物技术有限公司) 进行连接, 得到重组质粒 pEASY-E2-YsADH, 构建示意图如图 2 所示。将该重组质粒化学法转化至大肠杆菌 T1 感受态中, 涂布于含 50  $\mu$ g/ml 氨苄青霉素的 LB 平板上, 挑取单菌落进行菌落 PCR 鉴定, 鉴定结果见图 3。由图可知, 在 1kb 左右的位置具有单一条带, 表明所挑选的菌株均为阳性重组子。获得的阳性重组子经培养后, 提取质粒, 送样测序, 利用软件分析测序结果, 结果表明: 经引物 1-1 和引物 2 扩增到的核苷酸序列长度为 1017bp (其核苷酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示), 该序列编码一个完整的开放阅读框。

[0069] 实施例 2:

[0070] 根据实施例 1 获得的重组质粒用化学法转化至大肠杆菌 Trans B (DE3) (该感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司) 中, 获得含有胞内表达重组质粒 pEASY-E2-YsADH 的重组大肠杆菌 Trans B (DE3) /pEASY-E2-YsADH。该重组大肠杆菌用含有氨苄青霉素 (50  $\mu$ g/ml) 和卡那霉素 (50  $\mu$ g/ml) 的 LB 液体培养基 37 $^{\circ}$ C 下培养 16h, 再以 1% 接种量 (v/v) 接种到新鲜的含有氨苄青霉素 (50  $\mu$ g/ml) 和卡那霉素 (50  $\mu$ g/ml) 的 LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}$ C 下培养至菌体浓度 OD600 约 0.6 左右, 再向 LB 液体培养基加入终浓度为 0.2mM 的 IPTG, 22 $^{\circ}$ C 下诱导培养 6~8h, 然后在 4 $^{\circ}$ C 下 10000rpm 离心 10min, 收集含有重组烯醇脱氢酶的菌体细胞。所得的重组基因工程菌经超声波破碎后, 离心去除细胞碎片, 所得的上清液即为粗酶液。

[0071] 该粗酶液基于巴豆醇的氧化反应, 测得其氧化巴豆醇生成巴豆醛的活力为 1.91U/mg, 而宿主菌大肠杆菌 Trans B (DE3) 按照相同方法检测其氧化巴豆醇活力仅为 0.066U/mg。该粗酶液基于巴豆醛的还原反应, 测得其还原巴豆醛生成巴豆醇的活力为 9.65U/mg, 而宿主菌大肠杆菌 Trans B (DE3) 按照相同方法检测其还原巴豆醛活力仅为 0.37U/mg。重组基因工程菌的烯醇脱氢酶氧化和还原活力分别是阴性对照的 29 和 26 倍, 表明该烯醇脱氢酶基因在大肠杆菌 Trans B (DE3) 中成功实现过量表达。

[0072] 烯醇脱氢酶氧化巴豆醇的活力测定方法为：在 2.5mL Tris-HCl 缓冲液(50mM, pH8.0)中,分别加入 20mM 底物巴豆醇和 1mM NADP<sup>+</sup>,最后加入适量的酶启动酶反应,反应温度为 55℃。通过测量 340nm 下辅酶 NADPH 吸光值的增加从而计算其酶活力。酶活力单位定义为在 pH8.0 和 55℃下,1min 生成 1 μmol 辅酶 NADPH 所需的酶量。

[0073] 烯醇脱氢酶还原巴豆醛的活力测定方法为：在 2.5mL Tris-HCl 缓冲液(50mM, pH6.5)中,分别加入 10mM 巴豆醛和 0.3mM NADPH,最后加入适量的酶启动酶反应,反应温度为 65℃。通过测量 340nm 下辅酶 NADPH 吸光值的降低从而计算其酶活力。酶活力单位定义为在 pH6.5 和 65℃下,1min 氧化 1 μmol 辅酶 NADPH 所需的酶量。

[0074] 实施例 3：

[0075] 实施例 2 中获得重组大肠杆菌 Trans B (DE3)/pEASY-E2-YsADH 湿菌体,用 50mM 的 pH8.0 的 Tris-HCl 缓冲液重悬菌体,然后进行超声破碎(超声 2s,间隔 6s,有效超声时间 5min),破碎悬浮液在 4℃下 10000rpm 离心 10min,尽量弃尽细胞碎片得蛋白粗酶液。按照 Ni-NTA 金属螯合亲和层析使用说明,取蛋白粗酶液上样至预平衡 Ni<sup>2+</sup>柱中,再依次用 10mM 咪唑、40mM 咪唑、100mM 咪唑、250mM 咪唑洗脱杂蛋白和目的蛋白。用 100mM 咪唑洗脱重组烯醇脱氢酶后,所得的酶液经超滤膜脱盐浓缩,然后于 -20℃低温保藏。

[0076] 实施例 4：

[0077] 以实施例 2 中获得含有重组烯醇脱氢酶的大肠杆菌 Trans B (DE3)/pEASY-E2-YsADH 湿菌体为生物催化剂,同时催化巴豆醇的氧化和苯甲醛的还原,从而制备巴豆醛和苯甲醇。在 2mL 反应体系中,分别含有 50mM 的缓冲液(Tris, pH8.5 或者 CAPSO, pH9.5),0.8g 湿菌体,以及一定配比的巴豆醇和苯甲醛。于 30℃和 200rpm 下催化反应 12h。该反应不添加辅酶 NAD(P)<sup>+</sup>或 NAD(P)H。

[0078] 反应结束后,向反应液中加入 2mL 的乙酸乙酯,放入摇床在 30℃和 200rpm 下萃取 3h。萃取液在 10000rpm 离心 10min,取有机相 400 ~ 1000 μL,加入过量无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 干燥,对底物及其转化产物进行气相色谱分析。色谱柱为 VARION CHIRASIL-DEX CB (30m×0.25mm×0.39mm)。分析条件包括：载气, N<sub>2</sub>;流速,0.6mL/min;分流比 1:49;进样室和 FID 检测器温度均为 250℃。升温程序包括：60℃保温 2min,10℃/min 升温至 140℃,然后保温 10min。结果见表 1。

[0079] 表 1 结果表明,重组大肠杆菌能在同一反应体系中催化巴豆醇的氧化生成巴豆醛,同时催化苯甲醛的还原生成苯甲醇。在 pH8.5 和巴豆醇/苯甲醛比例为 2:1 时,苯甲醇的得率高达 92.1%;而当 pH9.5 和巴豆醇/苯甲醛比例为 1:2 时,反应更有利于巴豆醇的氧化生成巴豆醛,其得率为 75.0%。

[0080] 表 1:整细胞催化巴豆醇的氧化和苯甲醛的还原

[0081]



反应 pH	底物	产物	得率 (%)
8.5	巴豆醇 (200 mM)	巴豆醛	31.8%
	苯甲醛 (100 mM)	苯甲醇	92.1%
9.5	巴豆醇 (100 mM)	巴豆醛	75.0%

[0082]

	苯甲醛 (200 mM)	苯甲醇	51.8%
--	--------------	-----	-------

[0083] 实施例 5 :

[0084] 对实施例 3 中获得的重组烯醇脱氢酶,以烯醛、烯酮、芳香醛或芳香酮为底物,通过测量 340nm 下辅酶 NADPH 吸光值的降低从而计算其酶活力。在 2.5mL 反应体系中,分别含有 10mM 底物,0.3mM NADPH 以及 50mM MES 缓冲液 (pH6.5)。加入 3  $\mu$ g 重组烯醇脱氢酶启动酶反应,反应温度为 65 $^{\circ}$ C。酶活力单位定义为在 pH6.5 和 65 $^{\circ}$ C 下,1min 氧化 1  $\mu$ mol 辅酶 NADPH 所需的酶量。结果见表 2。在表 2 中,100% 相对比活力对应的绝对酶活力值为 399.2U/mg。

[0085] 表 2 结果表明,重组烯醇脱氢酶能还原巴豆醛、反式 2-己烯醛、2-甲基-2-戊烯醛、反式 2-辛烯醛、反式 2-癸烯醛、香叶醛、橙花醛及苯甲醛等醛类底物生成相应的初级醇。在还原醛类底物时,酶活力以苯甲醛为底物时最高。此外,重组烯醇脱氢酶也能还原 4-甲基-3-戊烯-2-酮、3-辛烯-2-酮、2-溴苯乙酮和对溴苯乙酮等酮类底物生成对应的次级醇。

[0086] 表 2 :重组烯醇脱氢酶的底物谱及其相应的酶比活力

底物	产物	酶相对比活力 (%)
巴豆醛	巴豆醇	100
反式 2-己烯醛	反式 2-己烯醇	41.7
2-甲基-2-戊烯醛	2-甲基-2-戊烯醇	41.5
反式 2-辛烯醛	反式 2-辛烯醇	30.2
反式 2-癸烯醛	反式 2-癸烯醇	16.7
香叶醛	香叶醇	37.4

[0088]

橙花醛	橙花醇	37.3
苯甲醛	苯甲醇	107
4-甲基-3-戊烯-2-酮	4-甲基-3-戊烯-2-醇	3.0
3-辛烯-2-酮	3-辛烯-2-醇	7.9
2-溴苯乙酮	2-溴苯乙醇	27.4
对溴苯乙酮	对溴苯乙醇	1.1

[0089] 实施例 6:

[0090] 以实施例 3 中获得的重组烯醇脱氢酶生物催化剂,同时催化巴豆醇的氧化和橙花醛 / 香叶醛的还原,分别生成巴豆醛和橙花醇 / 香叶醇。橙花醛和香叶醛是顺反异构体,而相对应的橙花醇和香叶醇也是顺反异构体。在 2mL 反应体系中,分别含有 100mM 的 PIPES 缓冲液 (pH7.0), 1.5mg 重组烯醇脱氢酶, 178mM 巴豆醇, 25mM 橙花醛, 25mM 香叶醛, 0.4mM NADP<sup>+</sup>。于 30℃ 和 100rpm 下催化反应 4h。

[0091] 反应结束后,向反应液中加入 2mL 的乙酸乙酯,放入摇床在 30℃ 和 200rpm 下萃取 3 小时。萃取液在 10000rpm 离心 10min,取有机相 400 ~ 1000 μL,加入过量无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>干燥,对底物及其转化产物进行气相色谱分析。气相色谱升温程序为:60℃ 保温 3min, 15℃ / min 升温至 180℃,然后保温 3min,其它色谱条件与实施例 4 相同。结果见表 3。

[0092] 表 3 结果表明,重组烯醇脱氢酶能催化巴豆醇氧化生成巴豆醛(得率为 12.7%),同时催化橙花醛 / 香叶醛还原生成橙花醇 / 香叶醇,其对应的得率分别为 48.5% 和 48.6%。

[0093] 表 3:酶法同时催化巴豆醇的氧化和橙花醛 / 香叶醛的还原

底物	产物	得率 (%)
巴豆醇 (178 mM)	巴豆醛	12.7%
橙花醛 (25 mM)	橙花醇	48.5%
香叶醛 (25 mM)	香叶醇	48.6%

[0001]

## SEQUENCE LISTING

<110> 浙江工业大学

<120> 一种烯醇脱氢酶、编码基因、载体、工程菌及其应用

<130>

<160> 5

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 339

<212> PRT

<213> Yokenella sp.

<400> 1

Met Ser Ile Ile Lys Ser Tyr Ala Ala Lys Glu Ala Gly Ser Glu Leu 15  
 1 5 10

Glu Leu Tyr Glu Tyr Asp Ala Gly Glu Leu Arg Pro Glu Asp Val Glu 30  
 20 25 30

Val Gln Val Asp Tyr Cys Gly Ile Cys His Ser Asp Leu Ser Met Ile 45  
 35 40 45

Asp Asn Glu Trp Gly Phe Ser Gln Tyr Pro Leu Val Ala Gly His Glu 60  
 50 55 60

Val Ile Gly Arg Val Ala Ala Leu Gly Ser Ala Ala Gln Glu Lys Gly 80  
 65 70 75

Val Lys Val Gly Gln Arg Val Gly Val Gly Trp Thr Ala Arg Ser Cys 95  
 85 90

Gly His Cys Asp Ala Cys Ile Ser Gly Asn Gln Ile Asn Cys Leu Glu 110  
 100 105 110

Gly Ala Val Ala Thr Ile Leu Asn Arg Gly Gly Phe Ala Glu Lys Leu 125  
 115 120 125

Arg Ala Asp Trp Gln Trp Val Ile Pro Leu Pro Glu Ser Ile Asp Ile 140  
 130 135 140

Glu Ser Ala Gly Pro Leu Leu Cys Gly Gly Ile Thr Val Phe Lys Pro 160  
 145 150 155

[0002]

Leu Leu Met His His Ile Thr Ala Thr Ser Arg Val Gly Val Ile Gly	165	170	175	
Ile Gly Gly Leu Gly His Ile Ala Ile Lys Leu Leu His Ala Met Gly	180	185	190	
Cys Glu Val Thr Ala Phe Ser Ser Asn Pro Ser Lys Glu Gln Glu Val	195	200	205	
Leu Ala Met Gly Ala Asp Lys Val Val Asn Ser Arg Asp Pro Asp Ala	210	215	220	
Leu Asn Ala Leu Ala Gly Gln Phe Asp Leu Ile Ile Asn Thr Val Asn	225	230	235	240
Val Asp Leu Asp Trp Gln Pro Tyr Phe Glu Ala Leu Ala Tyr Gly Gly	245	250	255	
His Phe His Thr Val Gly Ala Val Met Lys Pro Leu Pro Val Pro Ala	260	265	270	
Phe Thr Leu Ile Ala Gly Asp Arg Ser Ile Ser Gly Ser Ala Thr Gly	275	280	285	
Thr Pro Tyr Glu Leu Arg Lys Leu Met Lys Phe Ala Gly Arg Ser Lys	290	295	300	
Val Ser Pro Thr Thr Glu Leu Phe Pro Met Ser Gln Ile Asn Glu Ala	305	310	315	320
Ile Gln His Val Arg Asp Gly Lys Ala Arg Tyr Arg Val Val Leu Gln	325	330	335	
Ala Asp Phe				
<210>	2			
<211>	1017			
<212>	DNA			
<213>	Yokenella sp.			
<400>	2			
atgtctatta taaaaagcta tgccgcaaaa gaggcgggca gcgaactcga actttacgaa			60	
tatgatgccg gtgaactcag gccggaagat gtcgaggtgc aggtcgacta ctgcggtatc			120	

[0003]

tgccattccg atctttccat gatcgacaac gaatggggat tctctcagta tccgctggtt 180  
 gccgggcatg aagtgattgg ccgctggcgc gcgctcggca gtgcggcgca ggaaaaagg 240  
 gtgaaagtfg gtcagcgcgt gggcgtaggc tggacggcgc gcagctgtgg gcattgcgat 300  
 gcatgtatca gcgtaataca gattaactgc ctggaaggcg ccgtagccac catttcaac 360  
 cgtggcggtt ttgccgagaa actgcgggca gactggcagt gggatgatccc gttccggag 420  
 agcatcgata ttgagtccgc aggtcctctg ttatgcggcg gtattacggt tttaaact 480  
 ctgctgatgc accacatcac cgcgaccagt cgcgtggggg tgatcggcat cggcgggttt 540  
 gggcacattg ccattaaact gttgcacgca atgggctgtg aagtgaccgc attcagctcg 600  
 aatccgctga aagaacagga agtgctggca atggggcggg ataaagtcgt gaacagtgcg 660  
 gatccagacg cgtaaatagc gctggcaggc cagtttgatc tcattataa caccgtaat 720  
 gtcgacctcg actggcagcc ctactttgaa gcgctggcct atggcggcca ttccacacc 780  
 gtcggcgcag tgatgaagcc gctgccggtt ccggcgttta cattgattgc tgccgatcgc 840  
 agcatctccg gctcagcaac ccgtacgccc tatgagctgc gcaaattgat gaagtttgcc 900  
 gggcgcagca aggtctcgcc gacgacagag ctgttcccaa tgcgcaaat caacgaagcc 960  
 atccagcacg ttcgcgacgg caaagcgcgt taccgctgg tactgcaagc cgacttt 1017

<210> 3  
 <211> 24  
 <212> DNA  
 <213> Unknown

<220>  
 <223> 人工序列

<400> 3  
 atgtctatta taaaagcta tgcc 24

<210> 4  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Unknown

<220>  
 <223> 人工序列

<400> 4  
 agctatgccg caaaagag 18

<210> 5  
 <211> 19

[0004]

<212> DNA

<213> Unknown

<220>

<223> 人工序列

<400> 5

aaagtcggct tgcagtacc

19

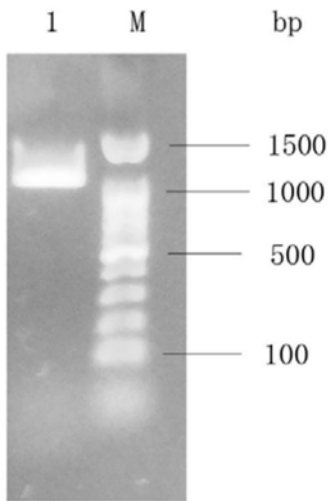


图 1

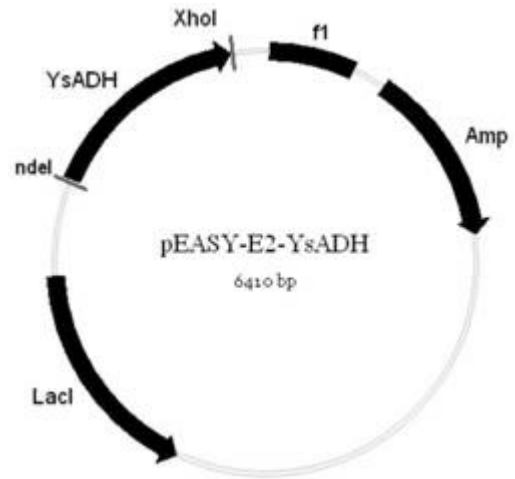


图 2

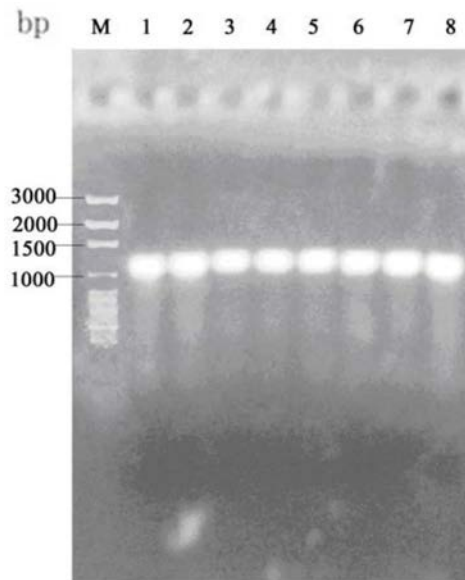


图 3