



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108048494 B

(45) 授权公告日 2021.08.10

(21) 申请号 201711470812.2

(22) 申请日 2017.12.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 108048494 A

(43) 申请公布日 2018.05.18

(73) 专利权人 中国科学院天津工业生物技术研
究所
地址 300308 天津市东丽区空港经济区西
七道32号

(72) 发明人 江会锋 杨一群 刘玉万 卢丽娜
马延和

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245
代理人 关畅 张立娜

(51) Int.Cl.

C12P 7/18 (2006.01)

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 9/04 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 15/53 (2006.01)

(56) 对比文件

冯真泰. 生物法生产1,3-丙二醇技术综述.
《维纶通讯》. 2016, 全文.

审查员 杨光

权利要求书2页 说明书7页
序列表4页 附图2页

(54) 发明名称

一种利用生物酶合成1,3-丙二醇的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用生物酶合成1,3-丙二醇的方法。本发明提供了DERA蛋白或所述DERA蛋白相关生物材料在合成1,3-丙二醇中的应用, 以及利用DERA蛋白和yqhD蛋白生物合成1,3-丙二醇的具体方法。本发明构建并实现了1,3-丙二醇的新途径, 此途径不需要辅酶B12的参与, 有潜力成为1,3-丙二醇工业生产的新方法。

1. DERA蛋白或所述DERA蛋白相关生物材料在合成1,3-丙二醇中的应用；
所述DERA蛋白为如下任一所示蛋白质：
 - (A1) 氨基酸序列为SEQ ID No.2的蛋白质；
 - (A2) 在(A1)所限定的蛋白质的N端和/或C端连接标签后得到的融合蛋白；所述DERA蛋白相关生物材料为能够表达所述DERA蛋白的核酸分子,或含有所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系。
2. (1)和(2)在合成1,3-丙二醇中的应用；
 - (1) DERA蛋白或所述DERA蛋白相关生物材料；
 - (2) yqhD蛋白或所述yqhD蛋白相关生物材料；所述DERA蛋白为如下任一所示蛋白质：
 - (A1) 氨基酸序列为SEQ ID No.2的蛋白质；
 - (A2) 在(A1)所限定的蛋白质的N端和/或C端连接标签后得到的融合蛋白；所述DERA蛋白相关生物材料为能够表达所述DERA蛋白的核酸分子,或含有所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系；
所述yqhD蛋白为如下任一所示蛋白质：
 - (B1) 氨基酸序列为SEQ ID No.5的蛋白质；
 - (B2) 在(B1)所限定的蛋白质的N端和/或C端连接标签后得到的融合蛋白；所述yqhD蛋白相关生物材料为能够表达所述yqhD蛋白的核酸分子,或含有所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系。
3. 一种合成的1,3-丙二醇方法,包括如下步骤：
 - (a1) 以甲醛和乙醛作为底物,经DERA蛋白催化反应生成3-羟基丙醛；
 - (a2) 以3-羟基丙醛作为底物,经yqhD蛋白催化反应生成1,3-丙二醇；所述DERA蛋白为如下任一所示蛋白质：
 - (A1) 氨基酸序列为SEQ ID No.2的蛋白质；
 - (A2) 在(A1)所限定的蛋白质的N端和/或C端连接标签后得到的融合蛋白；所述yqhD蛋白为如下任一所示蛋白质：
 - (B1) 氨基酸序列为SEQ ID No.5的蛋白质；
 - (B2) 在(B1)所限定的蛋白质的N端和/或C端连接标签后得到的融合蛋白。
4. 一种合成的1,3-丙二醇方法,包括如下步骤：
 - (b1) 以乙醇为底物经yqhD蛋白催化反应生成乙醛；
 - (b2) 以乙醛和甲醛作为底物,经DERA蛋白催化反应生成3-羟基丙醛；
 - (b3) 以3-羟基丙醛作为底物,经yqhD蛋白催化反应生成1,3-丙二醇；所述DERA蛋白为如下任一所示蛋白质：
 - (A1) 氨基酸序列为SEQ ID No.2的蛋白质；
 - (A3) 在(A1)所限定的蛋白质的N端和/或C端连接标签后得到的融合蛋白；所述yqhD蛋白为如下任一所示蛋白质：
 - (B1) 氨基酸序列为SEQ ID No.5的蛋白质；
 - (B2) 在(B1)所限定的蛋白质的N端和/或C端连接标签后得到的融合蛋白。
5. 根据权利要求3或4所述的方法,其特征在于:在所述方法中,所述DERA蛋白和所述

yqhD蛋白均是以粗酶液、粗酶液冻干粉、纯酶或全细胞的形式发生催化作用的。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:所述粗酶液、粗酶液冻干粉和纯酶均按照包括如下步骤的方法制备得到:在宿主细胞中表达所述DERA蛋白和/或所述yqhD蛋白,得到重组细胞;裂解所述重组细胞获得所述粗酶液、粗酶液冻干粉或纯酶。

7. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于:所述全细胞均按照包括如下步骤的方法制备得到:在宿主细胞中表达所述DERA蛋白和/或所述yqhD蛋白,得到的重组细胞即为所述全细胞。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述重组细胞是按照包括如下步骤的方法制备获得的:向所述宿主细胞导入能够表达所述DERA蛋白和/或所述yqhD蛋白的核酸分子,经诱导培养后获得表达所述DERA蛋白和/或所述yqhD蛋白的所述重组细胞。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:所述“能够表达所述DERA蛋白和/或所述yqhD蛋白的核酸分子”是通过重组载体的形式导入到所述宿主细胞中的;所述重组载体为携带有所述DERA蛋白和/或所述yqhD蛋白的编码基因的细菌质粒、噬菌体、酵母质粒或逆转录病毒包装质粒。

10. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述宿主细胞为原核细胞或低等真核细胞。

11. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于:所述原核细胞为细菌;所述低等真核细胞为酵母细胞。

12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于:所述细菌为大肠杆菌。

13. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于:所述方法包括如下步骤:配制含有甲醛、乙醛、所述DERA蛋白和所述yqhD蛋白的反应体系,将所述反应体系于20-37℃反应0.5h以上,然后从反应产物中获得1,3-丙二醇。

14. 根据权利要求13所述的方法,其特征在于:所述反应体系中还含有能够为反应外加还原力的物质以及NADPH。

15. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于:所述方法包括如下步骤:配制含有乙醇、甲醛、所述DERA蛋白和所述yqhD蛋白的反应体系,将所述反应体系于20-37℃反应0.5h以上,然后从反应产物中获得1,3-丙二醇。

16. 根据权利要求15所述的方法,其特征在于:所述反应体系中还含有NADPH。

17. 根据权利要求3或4所述的方法,其特征在于:所述能够表达DERA蛋白的核酸分子为所述DERA蛋白的编码基因,为如下任一:

(C1) SEQ ID No.3所示的DNA分子;

(C2) SEQ ID No.1所示的DNA分子;

所述能够表达yqhD蛋白的核酸分子为所述yqhD蛋白的编码基因,为SEQ ID No.4所示的DNA分子。

一种利用生物酶合成1,3-丙二醇的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物酶合成领域,具体涉及一种利用生物酶合成1,3-丙二醇的方法。

背景技术

[0002] 1,3-丙二醇是一种重要的化学中间体,可以参与聚合反应生产聚醚、聚氨酯和聚酯。与1,2-丙二醇、丁醇和乙二醇为前体合成的聚合物相比,以1,3-丙二醇为前体合成的聚合物具有更好的性能和稳定性,因此被广泛应用于纺织业、塑剂、冷却剂等。如1,3-丙二醇和对苯二甲酸发生聚合反应形成的聚对苯二甲酸丙二醇酯(PTT),主要用于制造地毯、纺织纤维,用这种聚合物制成的纺织品具有良好的拉伸弹性、复苏性、防沾污性;在发动机冷却配方中加1,3-丙二醇,可以增强热稳定性并且减少腐蚀性,而且比用乙二醇作冷却剂毒性小。近来还发现1,3-丙二醇还可以用于热塑性塑料、涂料和胶片的制造,如用1,3-丙二醇合成的热塑性聚氨酯(TPU),改善了热水解性和热稳定性。

[0003] 1,3-丙二醇合成方法主要分为化学合成法和微生物合成法,化学法主要有环氧乙烷羰基化法和丙烯醛水合氢化法。目前通用的微生物法生产1,3-丙二醇主要是利用微生物将甘油转化为1,3-丙二醇。生物柴油生产过程中会生成一部分副产物甘油,以此为发酵底物生产1,3-丙二醇,可大大降低生产成本,但是该方法需要使用甘油脱水酶和辅酶B12。而甘油脱水酶(glycerol dehydratase)是甘油代谢还原途径中的限速酶,它是由dhaB1、dhaB2、dhaB3三个基因编码合成的三个亚基组成,并且在辅酶B12的参与下,催化甘油脱去一分子水形成3-羟基丙醛。辅酶B12易与甘油相互作用,使得C-Co键发生断裂,形成了5'-脱氧腺苷和烷基氰钴胺素类似物,烷基氰钴胺素类似物可以与甘油脱水酶紧密结合使之失去催化活性,甘油脱水反应停止。甘油脱水酶的这种现象严重影响甘油的转化。除了上述情况外,甘油脱水酶在氧存在的情况下也会失活,研究表明氧的存在对甘油脱水酶的酶活有强烈的影响,与无氧情况下的甘油脱水酶相比,暴露在氧中的甘油脱水酶在5min内酶活下降80%,并且在60min后酶活彻底丧失。同样甘油浓度对甘油脱水酶也有抑制作用,浓度越高抑制作用越大。

发明内容

[0004] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种利用生物酶DERA催化合成1,3-丙二醇的方法,该方法不需要辅酶B12的参与。

[0005] 第一,本发明要求保护DERA蛋白或所述DERA蛋白相关生物材料在合成1,3-丙二醇中的应用。

[0006] 其中,所述DERA蛋白具体可为如下任一所示蛋白质:

[0007] (A1) 氨基酸序列为SEQ ID No.2的蛋白质;

[0008] (A2) 将SEQ ID No.2所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同功能的蛋白质;

[0009] (A3) 与(A1)或(A2)所限定的氨基酸序列具有99%以上、95%以上、90%以上、85%

以上或者80%以上同源性且具有相同功能的蛋白质；

[0010] (A4) 在(A1) - (A3) 中任一所限定的蛋白质的N端和/或C端连接标签后得到的融合蛋白。

[0011] 所述DERA蛋白相关生物材料为能够表达所述DERA蛋白的核酸分子,或含有所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系。

[0012] 进一步地,所述应用为所述“DERA蛋白或所述DERA蛋白相关生物材料”和“yqhD蛋白或所述yqhD蛋白相关生物材料”在合成1,3-丙二醇中的应用。

[0013] 其中,所述yqhD蛋白为如下任一所示蛋白质:

[0014] (B1) 氨基酸序列为SEQ ID No.5的蛋白质;

[0015] (B2) 将SEQ ID No.5所示的氨基酸序列经过一个或几个氨基酸残基的取代和/或缺失和/或添加且具有相同功能的蛋白质;

[0016] (B3) 与(B1) 或(B2) 所限定的氨基酸序列具有99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者80%以上同源性且具有相同功能的蛋白质;

[0017] (B4) 在(B1) - (B3) 中任一所限定的蛋白质的N端和/或C端连接标签后得到的融合蛋白。

[0018] 所述yqhD蛋白相关生物材料为能够表达所述yqhD蛋白的核酸分子,或含有所述核酸分子的表达盒、重组载体、重组菌或转基因细胞系。

[0019] 进一步地,所述核酸分子可以是DNA,如cDNA、基因组DNA或重组DNA;所述核酸分子也可以是RNA,如mRNA等。所述重组载体可为重组表达载体,也可为重组克隆载体。所述表达盒可由能够启动所述核酸分子转录的启动子,所述核酸分子,以及转录终止序列组成。

[0020] 第二,本发明要求保护一种合成的1,3-丙二醇方法。

[0021] 本发明所提供的合成的1,3-丙二醇方法,可为如下方法I或方法II。

[0022] 方法I:一种合成的1,3-丙二醇方法,包括如下步骤:

[0023] (a1) 以甲醛和乙醛作为底物,经DERA蛋白催化反应生成3-羟基丙醛;

[0024] (a2) 以3-羟基丙醛作为底物,经yqhD蛋白催化反应生成1,3-丙二醇。

[0025] 所述DERA蛋白为前文(A1) - (A4) 任一所示蛋白;所述yqhD蛋白为前文(B1) - (B4) 任一所示蛋白。

[0026] 方法II:一种合成的1,3-丙二醇方法,包括如下步骤:

[0027] (b1) 以乙醇为底物经yqhD蛋白催化反应生成乙醛;

[0028] (b2) 以乙醛和甲醛作为底物,经DERA蛋白催化反应生成3-羟基丙醛;

[0029] (b3) 以3-羟基丙醛作为底物,经yqhD蛋白催化反应生成1,3-丙二醇;

[0030] 所述DERA蛋白为前文(A1) - (A4) 任一所示蛋白;所述yqhD蛋白为前文(B1) - (B4) 任一所示蛋白。

[0031] 在所述方法中,所述DERA蛋白和所述yqhD蛋白均可以粗酶液、粗酶液冻干粉、纯酶或全细胞的形式发生催化作用。

[0032] 进一步,所述粗酶液、粗酶液冻干粉和纯酶均可按照包括如下步骤的方法制备得到:在宿主细胞中表达所述DERA蛋白和/或所述yqhD蛋白,得到重组细胞;裂解所述重组细胞获得所述粗酶液、粗酶液冻干粉或纯酶。所述全细胞均按照包括如下步骤的方法制备得到:在宿主细胞中表达所述DERA蛋白和/或所述yqhD蛋白,得到的重组细胞即为所述全细

胞。

[0033] 再进一步,所述重组细胞具体可按照包括如下步骤的方法制备获得:向所述宿主细胞导入能够表达所述DERA蛋白和/或所述yqhD蛋白的核酸分子,经诱导培养后获得表达所述DERA蛋白和/或所述yqhD蛋白的所述重组细胞。

[0034] 更进一步,所述“能够表达所述DERA蛋白和/或所述yqhD蛋白的核酸分子”是通过重组载体的形式导入到所述宿主细胞中的。其中,所述重组载体可为携带有所述DERA蛋白和/或所述yqhD蛋白的编码基因的细菌质粒(如在细菌中表达的基于T7启动子的表达载体,具体如pET-28a等)、噬菌体、酵母质粒(如YEp系列载体等)或逆转录病毒包装质粒。

[0035] 进一步地,所述宿主细胞可为原核细胞或低等真核细胞。

[0036] 更进一步地,所述原核细胞具体可为细菌;所述低等真核细胞具体可为酵母细胞。

[0037] 在本发明的一个实施例中,所述宿主细胞具体为大肠杆菌,更加具体的为E. coli BL21 (DE3)。相应的,所述诱导培养为向培养体系中加IPTG至终浓度0.1-2mM(具体如0.5mmol/L),10℃-37℃(具体如16℃)诱导培养2-24小时(具体如16小时)。

[0038] 在本发明中,所述方法I具体包括如下步骤:配制含有甲醛、乙醛、所述DERA蛋白和所述yqhD蛋白的反应体系,将所述反应体系于20℃-37℃(具体如37℃)反应0.5小时以上(具体如4h),然后从反应产物中获得1,3-丙二醇。

[0039] 其中,将所述反应体系于20℃-37℃(具体如37℃)反应0.5小时以上(具体如4h),还包括60-100℃(具体如70℃)加热2min以上(具体如3min)使蛋白沉淀,后离心(如12000rpm离心25min)除去蛋白沉淀的步骤。

[0040] 另外,所述方法I的反应体系中还可含有能够为反应外加还原力的物质以及NADPH。

[0041] 在本发明中,所述能够为反应外加还原力的物质具体为葡萄糖-6-磷酸和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。反应过程中,葡萄糖-6-磷酸脱氢酶将葡萄糖-6-磷酸脱氢的过程会为所述yqhD蛋白催化3-羟基丙醛生成1,3-丙二醇的步骤提供还原力。

[0042] 在所述方法中,所述反应可在pH为7-9的缓冲液中进行。

[0043] 在本发明中,所述反应具体是在pH为8.0的50mM磷酸缓冲液中进行。

[0044] 更加具体地,所述反应体系组成如下:终浓度为1mg/ml的所述DERA蛋白;终浓度为0.5mg/mL的所述yqhD蛋白;终浓度为50mM的甲醛;终浓度为20mM的乙醛;终浓度为25mM的葡萄糖-6-磷酸,终浓度为1mM的NADPH;含量为5U的葡萄糖-6-磷酸脱氢酶;余量为pH为7-9的缓冲液(具体如pH为8.0的50mM磷酸缓冲液)。

[0045] 在本发明中,所述方法II具体包括如下步骤:配制含有乙醇、甲醛、所述DERA蛋白和所述yqhD蛋白的反应体系,将所述反应体系于20℃-37℃(具体如37℃)反应0.5小时以上(具体如4h),然后从反应产物中获得1,3-丙二醇。

[0046] 其中,将所述反应体系于20℃-37℃(具体如37℃)反应0.5小时以上(具体如4h),还包括60-100℃(具体如70℃)加热2min以上(具体如3min)使蛋白沉淀,后离心(如12000rpm离心25min)除去蛋白沉淀的步骤。

[0047] 另外,所述方法II的反应体系中还可含有NADPH。

[0048] 在所述方法中,所述反应可在pH为7-9的缓冲液中进行。

[0049] 在本发明中,所述反应具体是在pH为8.0的50mM磷酸缓冲液中进行。

[0050] 更加具体地,所述反应体系组成如下:终浓度为1mg/ml的所述DERA蛋白;终浓度为0.5mg/mL的所述yqhD蛋白;终浓度为90mM的乙醇;终浓度为20mM的甲醛;终浓度为5mM的NADPH;余量为pH为7-9的缓冲液(具体如pH为8.0的50mM磷酸缓冲液)。

[0051] 在本发明中,所述能够表达DERA蛋白的核酸分子为所述DERA蛋白的编码基因,具体可为如下任一:

[0052] (C1) SEQ ID No.3所示的DNA分子;

[0053] (C2) SEQ ID No.1所示的DNA分子;

[0054] (C3) 在严格条件下与(C1)或(C2)限定的DNA分子杂交且编码所述DERA蛋白的DNA分子;

[0055] (C4) 与(C1)-(C3)中任一限定的DNA序列具有99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者80%以上同源性且编码所述DERA蛋白的DNA分子。

[0056] 所述能够表达yqhD蛋白的核酸分子为所述yqhD蛋白的编码基因,具体可为如下任一:

[0057] (D1) SEQ ID No.4所示的DNA分子;

[0058] (D2) 在严格条件下与(D1)限定的DNA分子杂交且编码所述yqhD蛋白的DNA分子;

[0059] (D3) 与(D1)或(D2)限定的DNA序列具有99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者80%以上同源性且编码所述yqhD蛋白的DNA分子。

[0060] 本发明构建并实现了1,3-丙二醇的新途径,此途径不需要辅酶B12的参与,有潜力成为1,3-丙二醇工业生产的新方法。

附图说明

[0061] 图1为pET-28a-Dera的质粒图谱。

[0062] 图2为体外纯酶反应GC-MS检测结果。

具体实施方式

[0063] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0064] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0065] pET-28a由苏州鸿讯公司提供。

[0066] E.coli BL21 (DE3) 菌株为全式金公式产品,货号为CD601-03。

[0067] 实施例1、DERA蛋白和yqhD蛋白的获得

[0068] 一、DERA蛋白的获得

[0069] 1、Dera基因获得

[0070] 2-deoxyribose-5-phosphate aldolase简称DERA酶,在多种物种中存在,在短乳杆菌中发现Dera基因,其核苷酸序列为SEQ ID No.1,该基因可编码DERA蛋白,其氨基酸序列为SEQ ID No.2,在不改变DERA氨基酸序列的前提下,将上述野生型Dera基因的密码子替换为大肠杆菌偏好(高频使用)的密码子,经密码子优化后,得到优化后Dera基因序列,具有大肠杆菌偏爱密码子,其基因序列为SEQ ID No.3。

[0071] 2、表达载体的构建

[0072] 将SEQ ID No.3所示的优化后Dera基因克隆到pET-28a载体(Novagen, Kan⁺)酶切

位点NdeI和XhoI之间的DNA片段,得到重组质粒,命名为pET-28a-Dera(图1)。

[0073] pET-28a-Dera的结构描述:将pET-28a载体酶切位点NdeI和XhoI之间的小片段替换为SEQ ID No.3所示DNA片段后得到的重组质粒。

[0074] 3、基因的表达

[0075] 为了体外检测DERA酶活性,在大肠杆菌中对该酶进行外源表达及纯化。

[0076] (1) 将大肠杆菌表达型重组质粒pET-28a-Dera转入E.coli BL21 (DE3) 中,获得重组菌。采用卡那霉素抗性平板进行阳性克隆筛选(Kan⁺,100mg/mL),37℃过夜培养;

[0077] (2) 挑取单克隆至5mL LB液体培养基中(Kan⁺,100mg/mL),37℃、220r/min培养至OD₆₀₀为0.6-0.8。将5mL LB培养基中菌液转接至800mL 2YT培养基中(Kan⁺,100mg/mL),37℃、220rpm培养至OD₆₀₀为0.6-0.8时,降温至16℃,加IPTG至终浓度0.5mM,诱导表达16h;

[0078] (3) 将上述培养菌液收集到收菌瓶中,5500r/min离心10min;

[0079] (4) 弃上清,用35mL蛋白缓冲液(pH为8.0的50mM磷酸缓冲液)将所得菌体沉淀悬起,倒入50mL离心管中,-80℃冰箱保存。

[0080] 4、蛋白纯化

[0081] (1) 破菌:采用高压低温破碎仪,在压力1200bar,4℃条件下对于上述步骤3得到的菌体沉淀破菌2次。4℃、10000r/min离心45min,取离心后的沉淀、上清,制样。

[0082] (2) 纯化:上清液经0.45μm微孔滤膜抽滤,进行镍亲和层析纯化,具体步骤如下:

[0083] a:柱平衡:挂上清前,先用ddH₂O洗2个柱体积,再用蛋白缓冲液(配方同上)平衡Ni亲和层析柱1个柱体积。

[0084] b:上样:将上清按0.5mL/min流速缓慢经过Ni亲和层析柱,再重复一次。

[0085] c:洗脱杂蛋白:采用蛋白缓冲液(配方同上)冲洗1个柱体积,再用50mL含50mM咪唑的蛋白缓冲液(配方同上)去洗脱结合较强的杂蛋白,取前几滴流穿样品,制样。

[0086] d:洗脱目的蛋白:分别用20mL含100mM,200mM,300mM咪唑的蛋白缓冲液(配方同上)将目的蛋白洗脱下来,取前几滴流穿样品,制样,12%SDS-PAGE检测。

[0087] (3) 浓缩换液:将收集到的目的蛋白用50mL Amicon超滤管(10kDa,Millipore公司)离心浓缩(4℃、3500r/min),浓缩至1mL。加15mL蛋白缓冲液,浓缩至1mL,重复该过程1次,得到纯化的蛋白DERA。

[0088] (4) 用BCA蛋白浓度检测试剂盒检测浓缩后蛋白浓度,为20mg/mL。即得到纯化浓缩的DERA蛋白,其氨基酸序列为SEQ ID No.2。

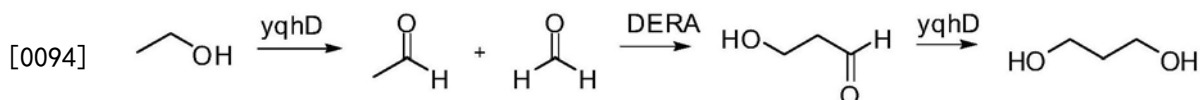
[0089] 二、yqhD蛋白的获得

[0090] 本发明实验中用到的1,3-丙二醇氧化还原酶基因yqhD来源于大肠杆菌。采用PCR技术以Escherichia coli str.K-12substr.MG1655菌株基因组为模板扩增得到yqhD基因,其核苷酸序列为SEQ ID No.4,将该基因克隆到pET-28a载体上,该基因编码的蛋白为yqhD蛋白,其氨基酸序列为SEQ ID No.5,其表达载体构建及基因表达和蛋白纯化均同步骤一。此处不再赘述。

[0091] 实施例2、DERA蛋白和yqhD蛋白在合成1,3-丙二醇中的应用

[0092] 一、DERA参与的催化甲醛及乙醇缩合合成1,3-丙二醇

[0093] 反应方程式如下:



[0095] 二、体外DERA纯酶功能验证

[0096] 空白对照反应体系 (500 μ L) : 50mM甲醛及20mM乙醛, 25mM葡萄糖-6-磷酸, 1mM NADPH, 5U葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 和蛋白缓冲液 (50mM磷酸盐, pH=8)。

[0097] DERA反应体系 (500 μ L) : 1mg/ml实施例1制备纯化的DERA蛋白及0.5mg/mL实施例1制备纯化的yqhD蛋白, 50mM甲醛及20mM乙醛, 25mM葡萄糖-6-磷酸, 1mM NADPH, 5U葡萄糖-6-磷酸脱氢酶, 和蛋白缓冲液 (50mM磷酸盐, pH=8)。

[0098] 将上述各组反应体系混匀后于37 $^{\circ}$ C反应4h。反应结束后, 70 $^{\circ}$ C加热3min使蛋白沉淀, 后于12000rpm下离心25min除去蛋白沉淀, 取出上清进行液相检测。检测到1.3丙二醇。

[0099] 检测方法如下:

[0100] 采用Aminex HPX-87H色谱柱;

[0101] 进样量: 10 μ l;

[0102] 柱温: 40 $^{\circ}$ C;

[0103] 流动相: 5mM稀硫酸;

[0104] 流速: 0.6mL/min。

[0105] 然后将上清样品冷冻干燥除水衍生后进行GC-MS检测。结果如图2所示。图2中, A为无DERA蛋白对照气相色谱图; B为实验组气相色谱图; C为实验组二级质谱图。由图2可见, 在DERA蛋白和yqhD蛋白存在的情况下, 甲醛和乙醛能够转化为1.3-丙二醇。

[0106] 气相色谱条件:

[0107] 进样量: 1 μ L;

[0108] 进样口温度: 250 $^{\circ}$ C;

[0109] 分流比10:1;

[0110] 载气流量: 1.2mL/min;

[0111] 程序升温条件: 起始温度60 $^{\circ}$ C, 维持一分钟, 以5 $^{\circ}$ C/min升到100 $^{\circ}$ C, 以25 $^{\circ}$ C/min升到300 $^{\circ}$ C, 维持5min。

[0112] 质谱条件为:

[0113] 离子源: EI, 离子源温度: 250 $^{\circ}$ C, 发射电流: 9.6 μ A, 电离能: 70eV, 溶剂延迟: 3min, 质量范围: 50-450amu。

[0114] 三、DERA联合yqhD参与的催化甲醛及乙醇缩合合成1.3-丙二醇

[0115] 空白对照反应体系 (500 μ L) : 20mM甲醛及90mM乙醇, 5mM NADPH, 和蛋白缓冲液 (50mM磷酸盐, pH=8)。

[0116] 混合酶反应体系 (500 μ L) : 1mg/ml实施例1制备纯化的DERA蛋白及0.5mg/mL实施例1制备纯化的yqhD蛋白, 20mM甲醛及90mM乙醇, 5mM NADPH, 和蛋白缓冲液 (50mM磷酸盐, pH=8)。

[0117] 将上述各组反应体系混匀后于37 $^{\circ}$ C反应4h。反应结束后, 70 $^{\circ}$ C加热3min使蛋白沉淀, 后于12000rpm下离心25min除去蛋白沉淀, 取出上清进行液相检测, 检测到1.3丙二醇。

[0118] 检测方法如下:

- [0119] 采用Aminex HPX-87H色谱柱；
- [0120] 进样量:10 μ l；
- [0121] 柱温:40 $^{\circ}$ C；
- [0122] 流动相:5mM稀硫酸；
- [0123] 流速:0.6mL/min。

- [0001] <110> 中国科学院天津工业生物技术研究所
[0002] <120> 一种利用生物酶合成1,3-丙二醇的方法
[0003] <130> GNCLN172325
[0004] <160> 5
[0005] <170> PatentIn version 3.5
[0006] <210> 1
[0007] <211> 687
[0008] <212> DNA
[0009] <213> 短乳杆菌(Lactobacillus breris)
[0010] <400> 1
[0011] gtaaccagct ttagcatgac tgtcgtcacc cgtaagatg gctacggtg cactgacacc 60
[0012] catcegactg gcaccagcat cgatcatagc taaggcttct tcacgactgt ggataccacc 120
[0013] ggaagccttg acgcctaagc gatcgccaac tgtttcacgc atcaacttaa catcttcaac 180
[0014] cttagcacct gatggtgaga acccagtgga cgtcttaaca aagtcagcac cggctttttc 240
[0015] actcaactga caagcccgga caatttcata cttcgtaa acgcatttt ccaagataac 300
[0016] ttttagaatt ttacccttag cgtggactgc atcagctaga ccctgaatgt ctgccaaagc 360
[0017] cttctcatca ttaccgctt ttaattcacc tacgttcaag accatatega tttcttccgc 420
[0018] cccttgatcg atggctgtcg tggcttcaaa gatttcactt tccgttgcca tggcccctag 480
[0019] tggaaaacca acgacagcga ttgattaac atcagttccc ttttaattgct cagttacaaa 540
[0020] cggaaatccaa taggagtta cgcagaccga agccgtgta aatttcttag cttcgtcaca 600
[0021] agtttcttg atatctgctt cagtgcata tgcctttaa ttagtgtgat caatgtactt 660
[0022] cgctaattgt tctgtggtta atgtcat 687
[0023] <210> 2
[0024] <211> 229
[0025] <212> PRT
[0026] <213> 短乳杆菌(Lactobacillus breris)
[0027] <400> 2
[0028] Met Thr Leu Thr Thr Glu Gln Leu Ala Lys Tyr Ile Asp His Thr Asn
[0029] 1 5 10 15
[0030] Leu Lys Ala Asp Ala Thr Glu Ala Asp Ile Lys Gln Thr Cys Asp Glu
[0031] 20 25 30
[0032] Ala Lys Lys Phe Asn Thr Ala Ser Val Cys Val Asn Ser Tyr Trp Ile
[0033] 35 40 45
[0034] Pro Phe Val Thr Glu Gln Leu Lys Gly Thr Asp Val Asn Pro Ile Ala
[0035] 50 55 60
[0036] Val Val Gly Phe Pro Leu Gly Ala Met Ala Thr Glu Ser Lys Ile Phe
[0037] 65 70 75 80
[0038] Glu Ala Thr Thr Ala Ile Asp Gln Gly Ala Glu Glu Ile Asp Met Val
[0039] 85 90 95
[0040] Leu Asn Val Gly Glu Leu Lys Gly Gly Asn Asp Glu Lys Val Leu Ala
[0041] 100 105 110

[0042]	Asp Ile Gln Gly Leu Ala Asp Ala Val His Ala Lys Gly Lys Ile Leu	
[0043]	115	120 125
[0044]	Lys Val Ile Leu Glu Asn Ala Leu Leu Thr Lys Asp Glu Ile Val Arg	
[0045]	130	135 140
[0046]	Ala Cys Gln Leu Ser Glu Lys Ala Gly Ala Asp Phe Val Lys Thr Ser	
[0047]	145	150 155 160
[0048]	Thr Gly Phe Ser Thr Ser Gly Ala Lys Val Glu Asp Val Lys Leu Met	
[0049]	165	170 175
[0050]	Arg Glu Thr Val Gly Asp Arg Leu Gly Val Lys Ala Ser Gly Gly Ile	
[0051]	180	185 190
[0052]	His Ser Arg Glu Glu Ala Leu Ala Met Ile Asp Ala Gly Ala Ser Arg	
[0053]	195	200 205
[0054]	Met Gly Val Ser Ala Thr Val Ala Ile Leu Thr Gly Asp Asp Ser His	
[0055]	210	215 220
[0056]	Ala Lys Ala Gly Tyr	
[0057]	225	
[0058]	<210> 3	
[0059]	<211> 687	
[0060]	<212> DNA	
[0061]	<213> 人工序列	
[0062]	<220>	
[0063]	<223>	
[0064]	<400> 3	
[0065]	atgaccctga ccaccgaaca gctggctaaa tacatcgacc acaccaacct gaaagctgac	60
[0066]	gctaccgaag ctgacatcaa acagacctgc gacgaagcta aaaaattcaa caccgcttct	120
[0067]	gtttgcgta actcttactg gatcccgttc gttaccgaac agctgaaagg taccgacgtt	180
[0068]	aaccgatcg ctggtgttg tttcccgtg ggtgctatgg ctaccgaatc taaaatcttc	240
[0069]	gaagctacca ccgctatcga ccagggtgct gaagaaatcg acatggttct gaacgttgg	300
[0070]	gaactgaaag gtgtaacga cgaaaaagt ctggctgaca tccagggtct ggctgacget	360
[0071]	gttcacgcta aaggtaaat cctgaaagt atcctggaaa acgctctgct gaccaaagac	420
[0072]	gaaatcgctt gtgcttgcca gctgtctgaa aaagctggtg ctgacttctg taaaacctct	480
[0073]	accggttct ctacctctgg tgctaaagt gaagacgta aactgatgcg tgaaccgtt	540
[0074]	ggtgaccgtc tgggtgttaa agcttctggt ggtatccact ctcgtgaaga agctctggt	600
[0075]	atgatcgacg ctggtgcttc tcgtatgggt gtttctgcta ccgttgctat cctgaccggt	660
[0076]	gacgactctc acgctaaagc tggttac	687
[0077]	<210> 4	
[0078]	<211> 1164	
[0079]	<212> DNA	
[0080]	<213> 大肠杆菌(Escherichia coli)	
[0081]	<400> 4	
[0082]	atgaacaact ttaatctgca cacccaacc cgcattctgt ttggtaaagg cgcaatcgct	60
[0083]	ggtttacgcg aacaaattcc tcacgatgct cgcgtattga ttacctacgg cggcggcage	120

[0084]	gtgaaaaaa ccggcgttct cgatcaagtt ctggatgccc tgaaaggcat ggacgtgctg	180
[0085]	gaatttggcg gtattgagcc aaacccgct tatgaaacgc tgatgaacgc cgtgaaactg	240
[0086]	gttcgcgaac agaaagtac tttctgctg gcggttggcg gcggttctgt actggacggc	300
[0087]	accaaattta tcgccgcagc ggctaactat ccgaaaaata tcgatccgtg gcacattctg	360
[0088]	caaacgggcg gtaaagagat taaaagcgc atccccgatgg gctgtgtgct gacgctgcca	420
[0089]	gcaaccggtt cagaatccaa cgcaggcgcg gtgatctccc gtaaaaccac aggcgacaag	480
[0090]	caggcgttcc attctgccca tgttcagccg gtatttgcg tgctcgatcc ggtttatacc	540
[0091]	tacaccctgc cgcgcgctca ggtggctaac ggcgtagtgg acgcctttgt acacaccgtg	600
[0092]	gaacagtatg ttaccaaacc gtttgatgcc aaaattcagg accgtttcgc agaaggcatt	660
[0093]	ttgctgacgc taatcgaaga tggctcgaaa gccctgaaag agccagaaaa ctacgatgtg	720
[0094]	cgcgccaacg tcatgtgggc ggcgactcag gcgctgaacg gtttgattgg cgctggcgta	780
[0095]	ccgcaggact gggcaacgca tatgctgggc cacgaactga ctgcatgca cggctctggat	840
[0096]	cacgcgcaaa cactggctat cgtcctgcct gcaactgtga atgaaaaacg cgataccaag	900
[0097]	cgcgctaagc tgctgcaata tgctgaacgc gtctggaaca tcaactgaagg ttccgatgat	960
[0098]	gagcgatttg acgcccgat tgccgcaacc cgcaatttct ttgagcaatt aggcgtagcc	1020
[0099]	acccacctct ccgactacgg tctggacggc agctccatcc cggctttget gaaaaaactg	1080
[0100]	gaagagcacg gcatgacca actgggcgaa aatcatgaca ttacgttga tgtcagccgc	1140
[0101]	cgtatatacg aagccgccg ctaa	1164
[0102]	<210>	5
[0103]	<211>	387
[0104]	<212>	PRT
[0105]	<213>	大肠杆菌(Escherichia coli)
[0106]	<400>	5
[0107]	Met Asn Asn Phe Asn Leu His Thr Pro Thr Arg Ile Leu Phe Gly Lys	
[0108]	1 5 10 15	
[0109]	Gly Ala Ile Ala Gly Leu Arg Glu Gln Ile Pro His Asp Ala Arg Val	
[0110]	20 25 30	
[0111]	Leu Ile Thr Tyr Gly Gly Gly Ser Val Lys Lys Thr Gly Val Leu Asp	
[0112]	35 40 45	
[0113]	Gln Val Leu Asp Ala Leu Lys Gly Met Asp Val Leu Glu Phe Gly Gly	
[0114]	50 55 60	
[0115]	Ile Glu Pro Asn Pro Ala Tyr Glu Thr Leu Met Asn Ala Val Lys Leu	
[0116]	65 70 75 80	
[0117]	Val Arg Glu Gln Lys Val Thr Phe Leu Leu Ala Val Gly Gly Gly Ser	
[0118]	85 90 95	
[0119]	Val Leu Asp Gly Thr Lys Phe Ile Ala Ala Ala Ala Asn Tyr Pro Glu	
[0120]	100 105 110	
[0121]	Asn Ile Asp Pro Trp His Ile Leu Gln Thr Gly Gly Lys Glu Ile Lys	
[0122]	115 120 125	
[0123]	Ser Ala Ile Pro Met Gly Cys Val Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gly Ser	
[0124]	130 135 140	
[0125]	Glu Ser Asn Ala Gly Ala Val Ile Ser Arg Lys Thr Thr Gly Asp Lys	

[0126]	145	150	155	160
[0127]	Gln Ala Phe His Ser Ala His Val Gln Pro Val Phe Ala Val Leu Asp			
[0128]		165	170	175
[0129]	Pro Val Tyr Thr Tyr Thr Leu Pro Pro Arg Gln Val Ala Asn Gly Val			
[0130]		180	185	190
[0131]	Val Asp Ala Phe Val His Thr Val Glu Gln Tyr Val Thr Lys Pro Val			
[0132]		195	200	205
[0133]	Asp Ala Lys Ile Gln Asp Arg Phe Ala Glu Gly Ile Leu Leu Thr Leu			
[0134]		210	215	220
[0135]	Ile Glu Asp Gly Pro Lys Ala Leu Lys Glu Pro Glu Asn Tyr Asp Val			
[0136]		225	230	235
[0137]	Arg Ala Asn Val Met Trp Ala Ala Thr Gln Ala Leu Asn Gly Leu Ile			
[0138]		245	250	255
[0139]	Gly Ala Gly Val Pro Gln Asp Trp Ala Thr His Met Leu Gly His Glu			
[0140]		260	265	270
[0141]	Leu Thr Ala Met His Gly Leu Asp His Ala Gln Thr Leu Ala Ile Val			
[0142]		275	280	285
[0143]	Leu Pro Ala Leu Trp Asn Glu Lys Arg Asp Thr Lys Arg Ala Lys Leu			
[0144]		290	295	300
[0145]	Leu Gln Tyr Ala Glu Arg Val Trp Asn Ile Thr Glu Gly Ser Asp Asp			
[0146]		305	310	315
[0147]	Glu Arg Ile Asp Ala Ala Ile Ala Ala Thr Arg Asn Phe Phe Glu Gln			
[0148]		325	330	335
[0149]	Leu Gly Val Pro Thr His Leu Ser Asp Tyr Gly Leu Asp Gly Ser Ser			
[0150]		340	345	350
[0151]	Ile Pro Ala Leu Leu Lys Lys Leu Glu Glu His Gly Met Thr Gln Leu			
[0152]		355	360	365
[0153]	Gly Glu Asn His Asp Ile Thr Leu Asp Val Ser Arg Arg Ile Tyr Glu			
[0154]		370	375	380
[0155]	Ala Ala Arg			
[0156]	385			

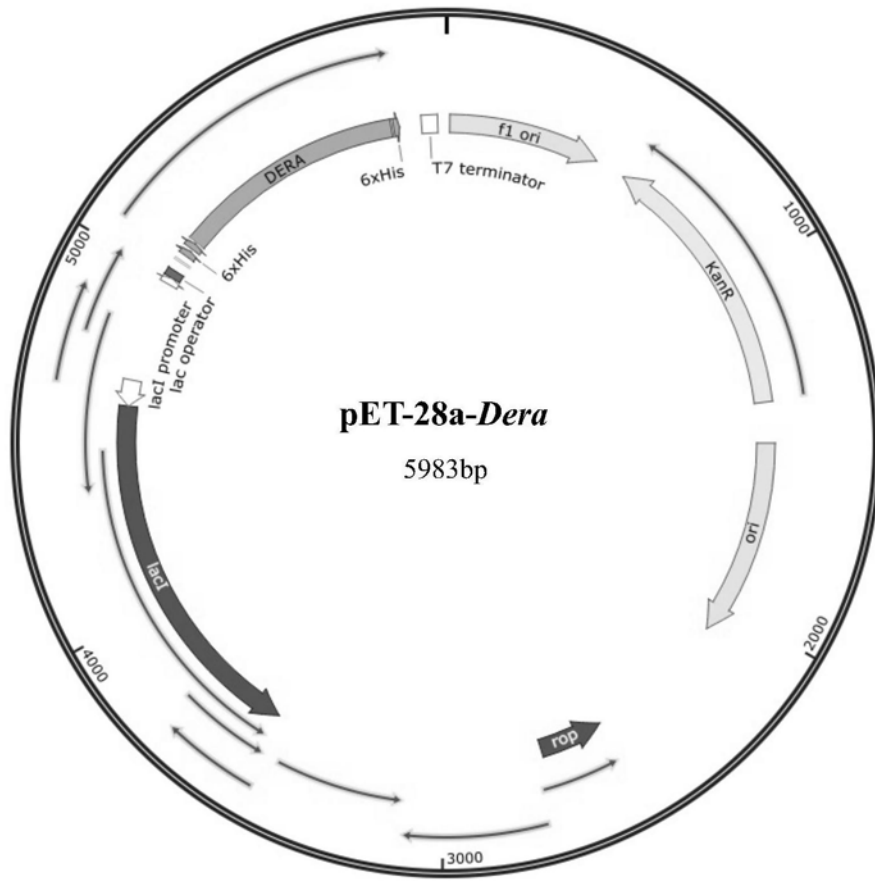
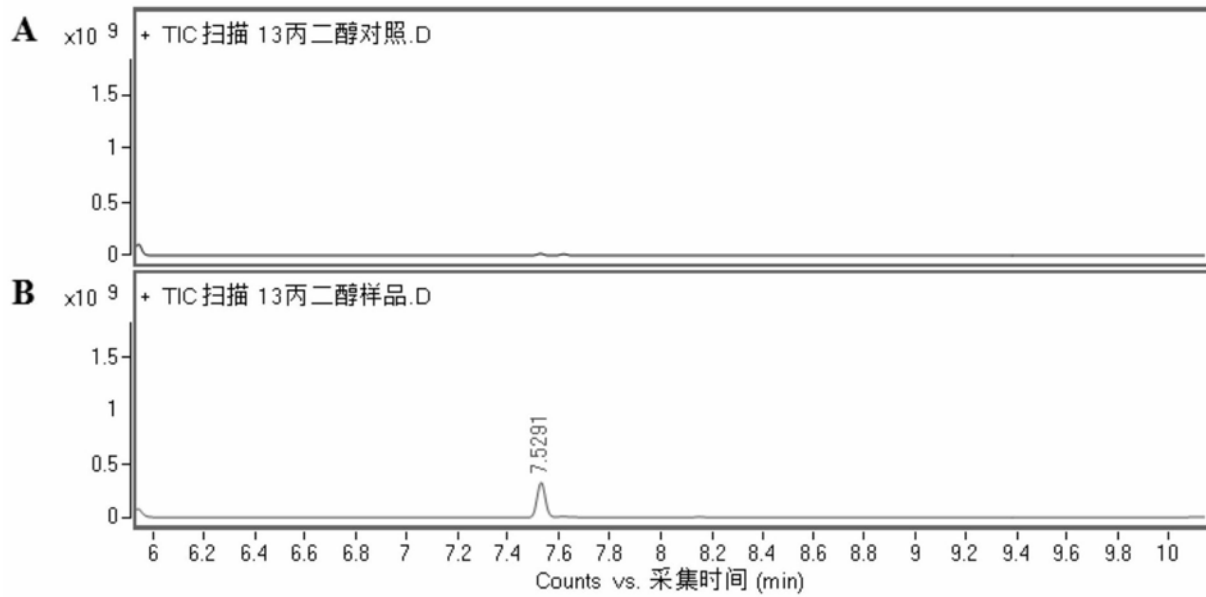


图1



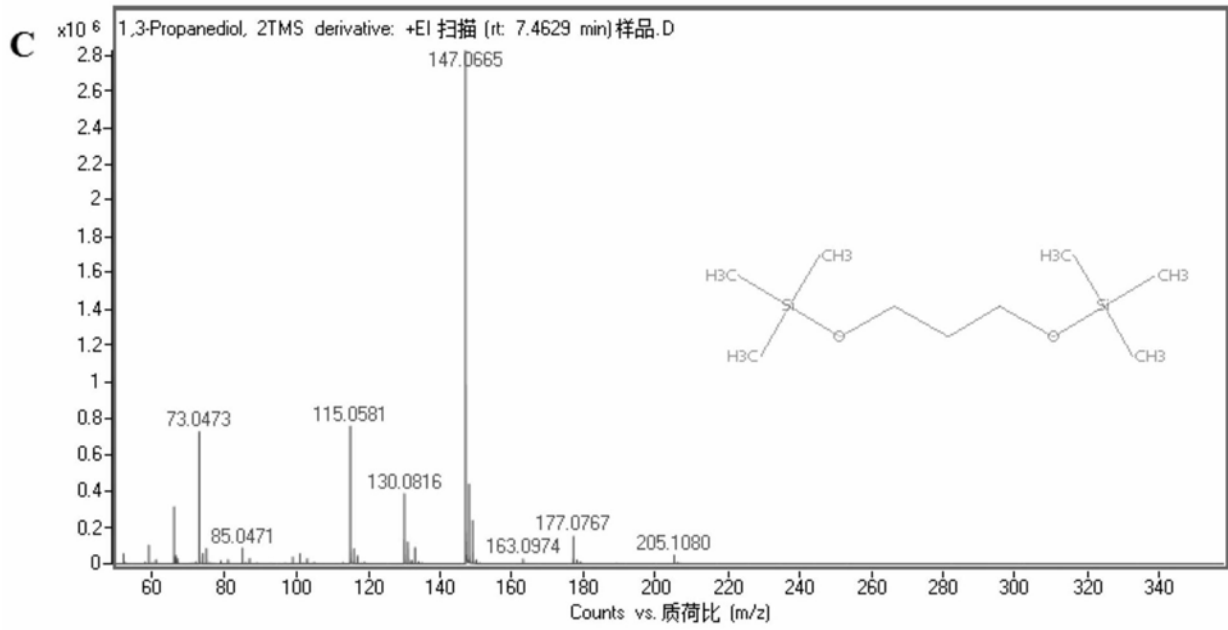


图2