



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102876704 A

(43) 申请公布日 2013.01.16

(21) 申请号 201210360555.8

(22) 申请日 2012.09.20

(71) 申请人 江南大学

地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800  
号江南大学生物工程学院

(72) 发明人 饶志明 李静静 张显 徐美娟  
杨套伟

(51) Int. Cl.

C12N 15/75(2006.01)

C12N 1/21(2006.01)

C12N 9/88(2006.01)

C12R 1/125(2006.01)

C12R 1/445(2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 4 页

序列表 1 页 附图 1 页

(54) 发明名称

利用重组枯草芽孢杆菌高效表达  
Staphylococcus aureus  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶

(57) 摘要

本发明涉及一种利用重组枯草芽孢杆菌高效表达 Staphylococcus aureus  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶,以金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)基因组 DNA 为模板,扩增得到编码  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶(ALDC)的基因 saald,将其克隆到穿梭表达载体 pMA5 上,以 B. subtilis WB600 为表达宿主,构建  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因工程菌 pMA5-saald/B. subtilis WB600,实现 ALDC 的高效表达。该工程菌在 LB 培养基中的发酵酶活较出发菌 S. aureus 提高了约 1200 倍,较宿主菌 B. subtilis WB600 提高约 10588 倍,达到 36000U/L。该重组菌在发酵培养基中发酵培养 48h, ALDC 酶活达 66500U/L。

1. 一种重组质粒 pMA5-saald,其特征是以 *Staphylococcus aureus* 基因组 DNA 为模板,扩增得到编码  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶 (ALDC) 的基因,将其克隆到枯草芽孢杆菌表达载体 pMA5 上,获得重组质粒 pMA5-saald。

2. 权利要求 1 所述的基因 saald 的扩增方法,其特征是基因的克隆根据 saald 基因的特异性设计引物, P1 :5' -ATCGGATCCATGACGAATGTCTTGATC-3' (BamH I), P2 :5' -TGACTACGCGTCTATTTCAGCTTCTCTAATTT-3' (Mlu I); 扩增条件 :94℃ 预变性, 5min, 一个循环 ;94℃ 变性, 1min, 56℃ 退火, 1min, 72℃ 延伸, 1min30s, 30 个循环 ;72℃, 10min, 一个循环 ;15℃, 10min, 一个循环。PCR 扩增体系 :金黄色葡萄球菌染色体 DNA 2  $\mu$  L, 上下游引物各 0.5  $\mu$  L, dNTP Mix 4  $\mu$  L, 10 $\times$ Ex Taq Buffer 5  $\mu$  L, 灭菌的双蒸水 37  $\mu$  L, Ex Taq DNA 聚合酶 1  $\mu$  L, 扩增 saald 基因, 大小为 705bp。

3. 一种高效表达 *S. aureus*  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的重组菌 pMA5-saald/*B. subtilis* WB600,其特征是构建方法如下 :

(1) 将含 saald 基因的重组质粒 pMA5-saald 通过转化化学转化法转入 *B. subtilis* WB600 中,在含氨苄青霉素的抗性平板上挑取抗性转化子,提取质粒酶切验证,得到重组菌 pMA5-saald/*B. subtilis* WB600 ;

(2) 对上述重组菌进行诱导表达,超声波破碎后测定 ALDC 的酶活力,并与对照菌株进行比较,重组菌 pMA5-saald/*B. subtilis* WB600 的酶活力相对较高,重组菌 pMA5-saald/*B. Subtilis* WB600 的总酶活为 36000U/L,其胞外、胞内比酶活分别为 26500U/L、9500U/L。。重组菌的 ALDC 酶活力比出发菌 *S. aureus* 提高了约 1200 倍,比宿主菌 *B. subtilis* WB600 提高了约 10588 倍。

4. 重组菌 pMA5-saald/*B. subtilis* WB600 的发酵培养,其特征是经种子活化转接发酵培养基 (大豆蛋白胨 10g/L, 玉米浆 15g/L, 尿素 3g/L, 葡萄糖 50g/L,  $k_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  1.7g/L,  $kH_2PO_4$  2.3g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.75g/L, NaCl 5g/L, pH 6.8), 37℃ 摇床 160r/min 培养 48h, 结束发酵,其胞外、胞内比酶活分别为 28300U/L、38200U/L,总酶活达 66500U/L。

## 利用重组枯草芽孢杆菌高效表达 *Staphylococcus aureus* $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶

### 技术领域

[0001] 利用重组枯草芽孢杆菌高效表达 *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶属于基因工程和酶工程领域。

### 背景技术

[0002]  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶 ( $\alpha$ -acetolactate decarboxylase, 简称为 ALDC) 能催化双乙酰的前体物  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧形成乙偶姻, 避免双乙酰的生成, 它可以缩短啤酒熟化周期, 提高生产效率, 对啤酒工业来说极有经济价值。

[0003]  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶主要应用于啤酒酿造工业。在啤酒酵母代谢过程中,  $\alpha$ -乙酰乳酸是亮氨酸-缬氨酸生物合成过程的中间产物。大部分  $\alpha$ -乙酰乳酸在酵母细胞内代谢形成缬氨酸和亮氨酸, 小部分渗漏到细胞外, 进入发酵液中, 在胞外经非酶氧化生成双乙酰。在啤酒酿造过程中, 双乙酰是影响啤酒质量的关键因素, 也是决定啤酒成熟与否的重要指标, 虽然双乙酰赋予了啤酒特殊的风味, 但是其口味阈值比较低 (0.02 ~ 0.10mg/L), 当含量超过 0.15mg/L 时就会给啤酒带来不愉快的馊饭味, 因此在整个发酵过程中严格控制双乙酰的产生量是至关重要的。 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶能将啤酒生产过程中双乙酰的前驱物质  $\alpha$ -乙酰乳酸迅速分解为乙偶姻, 从而快速地降低啤酒中双乙酰的含量。

[0004] 酿酒酵母不含 ALDC, 很多细菌中含有该酶。Godtfredsen 等测试的 34 个属 79 个种 (325 株) 细菌中, 有 ALDC 活性的占 20 个属 40 个种。 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶首次于 1952 年从产气肠杆菌中分离得到, 之后有关该酶在生物界中的分布及菌种选育得到了广泛研究。 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶 (ALDC) 存在于多种细菌中, 它参与  $\alpha$ -乙酰乳酸代谢, 将  $\alpha$ -乙酰乳酸转化为乙偶姻。目前还未在真菌、海藻和原生动物等真核生物中发现该酶的存在。

[0005] 细菌中天然存在的 ALDC 产量很低, 要想将该酶应用于啤酒工业, 研究 ALDC 的分子结构以及 ALDC 基因, 进行基因的克隆和表达, 提高酶的产量, 是一种必然的选择。随着对 ALDC 分子水平研究的深入,  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因已经从多种细菌中克隆得到, 并在大肠杆菌、枯草杆菌和酵母中获得了不同程度的表达。

### 发明内容

[0006] 本发明的主要研究内容: 本发明利用分子技术克隆了来自金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*, 缩写为 *S. aureus*) 的  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因在本发明中简称 saald, 构建重组表达载体 pMA5-saald, 并将其转化 *Bacillus subtilis* WB600, 成功构建了基因工程菌 pMA5-saald/*B. subtilis* WB600 将发酵获得的  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶运用在啤酒发酵中, 初步探讨了其降低双乙酰含量的能力。

[0007] 本发明的技术方案:

[0008] 1.  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶引物设计

[0009] 根据 NCBI 金黄色葡萄球菌的全基因组核酸序列中 saald 基因序列, 设计  $\alpha$ -乙酰

乳酸脱羧酶的 PCR 引物 P1 和 P2。

[0010] P1 :5' -ATCGGATCCATGACGAATGTCTTGTATC-3' BamH I

[0011] P2 :5' -TGACTACGCGTCTATTTCAGCTTCTCTAATTT-3' Mlu I

## [0012] 2. 重组菌的构建

[0013] 从金黄色葡萄球菌中抽提染色体 DNA 作为模板,根据预先设计好的引物、PCR 扩增条件和扩增体系进行 PCR。采用凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化和回收,电泳检验回收产物的浓度。采用下共同的限制性内切酶对载体 pMA5 和纯化的 PCR 产物进行双酶切,电泳检验酶切产物,并用凝胶回收试剂盒对酶切产物进行纯化和回收。将载体和 PCR 产物用 T4DNA 连接酶过夜连接。取连接产物转入 E. coli JM109 的感受态细胞进行转化,挑取阳性转化子于 10mL 的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养过夜,提取质粒,酶切验证正确后,将菌液加入甘油于 -40℃ 冰箱保存。将经验证构建成功的重组质粒 pMA5-saalD 用化学转化法转化至 B. subtilisWB600 中表达。转化方法为采用改进的 Spizizen 法。经筛选验证获得阳性转化子,即为重组枯草芽孢杆菌 pMA5-saalD/B. subtilis WB600。

## [0014] 3. 重组菌 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的表达及酶活测定

[0015] 取冻管保藏的菌种接入 10mL 含卡那霉素的 LB 培养基中,37℃ 振荡培养过夜,次日按 1% 的接种量转接,37℃ 培养 24h,取发酵液于 4℃,10000r/min 离心 10min,取上清用于胞外酶活力的测定,收集菌体采用超声破破碎,破碎液上清用于胞外酶活力的测定。蛋白质含量采用 Bradford 法测定,以 BSA 为标准蛋白。经测定重组菌 ALDC 胞外酶活力为 9500U/L,胞内酶活力为 26500U/L,总酶活 36000U/L,约是出发菌的 1200 倍,宿主菌的 10588 倍。

## [0016] 4. $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶在啤酒发酵中的应用

[0017] 将发酵获得的  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶运用在啤酒发酵中,初步探讨了其降低双乙酰含量的能力。在冷麦汁中加入按照 0.05mg/L 的量添加所得的纯酶,经检测发现,发酵过程中双乙酰的峰值比不添加的情况下明显降低,且加速了双乙酰的还原,使发酵周期缩短了约 3 天。啤酒发酵结束后,其中的乙酰乳酸几乎完全生成双乙酰而得到还原,这样就有效避免了成品啤酒中双乙酰的回升现象。

[0018] 本发明的有益效果: $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶 (ALDC) 能催化双乙酰的前体物  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧形成乙偶姻,避免双乙酰的生成,它可以缩短啤酒熟化周期,提高生产效率,对啤酒工业来说极有经济价值。鉴于  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的应用价值,获得该酶的高表达和高酶活一直以来是研究的热点。因此,通过基因工程技术构建高表达载体达到  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的高效表达和比较高的酶活水平具有重要意义。以本实验室保藏的一株金黄色葡萄球菌 (S. aureus) 为出发菌株,测得较为可观的  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶活性,克隆其基因 saalD 并在枯草芽孢杆菌中得以高效表达,所构建的工程菌发酵所产生的 ALDC 酶活达到 36000U/L 较出发菌 S. aureus 提高了约 1200 倍,较宿主菌 B. subtilis WB600 提高约 10588 倍,该基因工程菌株,适用于工业化的生产和应用,具有一定的理论和应用价值。

## 附图说明

[0019] 图 1 质粒 pMA5-saalD 的酶切验证。1 :pMA5-saalD/BamH I+Mlu I ;2 :pMA5-saalD/BamH I ;3 :DNA Marker :DL 2000 ;4 :DNA Marker : $\lambda$ -HindIII

[0020] 图 2  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的表达。1 :Protein Marker (kDa) ;2 :B. subtilis WB600 ;

3 :*B. subtilis* WB600with recombinant plasmid pMA5-saald

### 具体实施方式

[0021] 下面结合实施例,对本发明进一步说明。

[0022] 实施例 1 :重组质粒 pMA5-saald 的构建及转化

[0023] [1] 从金黄色葡萄球菌抽提染色体 DNA 作为模板,抽提方法如下 :用接种环从新鲜的金黄色葡萄球菌平板上挑取单菌落悬浮于 0.5mL 的灭菌双蒸水中,沸水煮 5-10min,8000r/min 离心 10min,取上清装入一只干净的 1.5mL 离心管中,-20℃冰箱保存备用。

[0024] [2] 以金黄色葡萄球菌总 DNA 为模板,利用实施例 1 提供的引物做 PCR 扩增,扩增条件为 :94℃ 预变性,5min,一个循环 ;94℃ 变性,1min,56℃ 退火,1min,72℃ 延伸,1min30s,30 个循环 ;72℃,10min,一个循环 ;15℃,10min,一个循环。PCR 扩增体系 :模板 (金黄色葡萄球菌染色体 DNA) 2 μ L,上下游引物各 0.5 μ L, dNTP Mix 4 μ L, 10×Ex Taq Buffer 5 μ L, 灭菌的双蒸水 37 μ L, Ex Taq DNA 聚合酶 1 μ L。采用凝胶回收试剂盒对 PCR 产物进行纯化和回收,电泳检验回收产物的浓度。回收产物存放在 1.5mL 的离心管中,-20℃冰箱保存备用。

[0025] [3] 构建重组质粒 pMD18-T-saald,导入感受态 *E. coli* JM109。连接体系 :PCR 胶回收产物 4.8 μ L, solution I 5 μ L, pMD18-T 质粒 0.5 μ L, 16℃ 过夜连接。转化方法 :将连接好的 10 μ L pMD18-T-saald 加入到 120 μ L 感受态 *E. coli* JM109 中,于冰上放置 45min, 42℃ 热击 90s,放置冰上 2min,加入 800 μ L LB 液体培养基,37℃ 摇床培养 1h,离心,倒掉大部分上清液,留 150 μ L 与沉淀混匀,涂布到氨苄青霉素平板 (Amp+LB) 上,于 37℃ 培养箱培养 9h 左右,挑去平板上的阳性菌落到 10ml 液体 LB 培养基中,37℃ 摇床过夜培养。提取质粒,经酶切验证连接成功后,将菌液加入终浓度 17% (w/v) 的甘油,-40℃ 冰箱保藏。

[0026] [4] 将 [3] 中提取的质粒和质粒 pMA5 分别用 BamH I 和 Mlu I 进行双酶切,利用凝胶回收试剂盒回收后进行连接,连接体系 :目的基因酶切产物 7.7 μ L, pET-28a 酶切产物 0.3 μ L, T4DNA 连接酶 buffer 1 μ L, T4DNA 连接酶 1 μ L, 16℃ 过夜连接。将连接好的重组质粒 pMA5-saald 转化到感受态 *E. coli* JM109,转化方法参照实施例 2[3],用卡那霉素平板 (Kana+LB) 挑取阳性菌落。37℃ 摇床过夜培养后提取质粒,酶切验证正确后加入甘油,-20℃ 冰箱保藏备用。

[0027] [5] 将经验证构建成功的重组质粒 pMA5-saald 用化学转化法转化至 *B. subtilis* 中表达。转化方法为采用改进的 Spizizen 法。挑取 *B. subtilis* WB600 接种于一支 5mL LB 液体培养基试管,37℃ 摇床培养过夜。取 100 μ L 过夜培养的菌液,接种至用 5mL SP I Medium 中,37℃ 摇床培养,5h 后开始测 OD600,当培养物生长到对数末期时,快速取 200 μ L 接种到 2mL SPII Medium 中,37℃ 100r/min 摇床培养 1.5h。加 20 μ L 100×EGTA 溶液,于 37℃ 100r/min 摇床培养 10min,用 1.5mL 离心管分装成 500 μ L 每管。向管中加入适量的质粒 pMA5-saald,轻轻混匀于 37℃ 100r/min 摇床培养 30min。将离心管转移到 250r/min 摇床,37℃ 养 1.5h。以 4000r/min 离心收集菌体,弃部分上清液,留 100 μ L 重悬菌体,涂布于卡那霉素抗性平板,37℃ 过夜培养。挑取阳性菌落,提取质粒酶切验证,得到重组菌 pMA5-saald/*B. subtilis* WB600,-20℃ 冰箱保藏备用。

[0028] 实施例 2 :α - 乙酰乳酸脱羧酶表达及酶活测定

[0029] [1] 将实施例 1[5] 构建的重组菌 pMA5-saald/B. subtilis WB600, 与出发菌 *S. aureus* 及宿主菌 *B. subtilis* WB600 分别接种于 10mL 含卡那霉素的液体 LB 培养基中, 37°C 摇床 160r/min 振荡培养过夜, 次日按 1% 的接种量转接, 37°C 培养 24h, 取所得菌液 1mL 于 1.5mL 离心管中, 8000r/min 离心 2min, 倒掉上清, 加入 100  $\mu$ L pH6.8 的 Tris-HCl 缓冲液将菌体混匀, 加入 30  $\mu$ L 蛋白酶上样缓冲液, 沸水浴 30min, 使蛋白质变性, 8000r/min 离心 10min, 取上清进行 SDS-PAGE 检测, 其中 SDS-PAGE 使用 5% 的分离胶和 15% 的浓缩胶, 采用不连续垂直电泳, 用考马斯亮蓝 R250 染色, 以含有空载质粒 pMA5 的 *B. subtilis* WB600 做空白对照。

[0030] [2] 将菌液于 8000r/min, 4°C 离心 10min, 用 pH6.0 的 MES I 缓冲液 (2- 吗啉乙磺酸 0.05mol/L, Brij-350.05%, NaCl 0.6mol/L, pH6.0) 洗涤两次, 最后用 pH6.0 的 MES I 缓冲液悬浮菌体, 超声波破碎 (300W, 工作 2S 停 5S, 工作 10min), 10000r/min 离心 30min, 上清即为粗酶液。采用 400  $\mu$ L 的酶活测定体系 (200  $\mu$ L 酶液, 200  $\mu$ L 底物), 30°C 反应 10min, 用 4.6mL 显色剂终止, 30°C 显色 30min, 于 520nm 波长下检测反应液的吸光值。一个单位酶活 (IU) 定义为: 在 30°C, pH6.0 的反应条件下, 1min 使  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧形成 1  $\mu$ mol 乙偶姻的酶量。测得出发菌 *S. aureus* 的总酶活为 300U/L, 宿主菌 *B. subtilis* WB600 的总酶活为 3.4U/L, 重组菌 pMA5-saald/B. subtilis WB600 的总酶活为 36000U/L, 其胞外、胞内比酶活分别为 26500U/L、9500U/L。重组菌的 ALDC 酶活力比出发菌 *S. aureus* 提高了约 1200 倍, 比宿主菌 *B. subtilis* WB600 提高了约 10588 倍。

[0031] 实施例 3: 重组菌 pMA5-saald/B. subtilis WB600 的发酵

[0032] 将实施例 1[5] 构建的重组菌 pMA5-saald/B. subtilisWB600 经 LB 培养基活化培养后, 按照 4% 的接种量接种发酵培养基 (大豆蛋白胨 10g/L, 玉米浆 15g/L, 尿素 3g/L, 葡萄糖 50g/L,  $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$  1.7g/L,  $KH_2PO_4$  2.3g/L,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.75g/L, NaCl 5g/L, pH 6.8), 37°C 摇床 160r/min 培养 48h, 结束发酵, 然后按照实施例 2[2] 所述的方法进行酶活的测定, 其胞外、胞内酶活分别为 28300U/L、38200U/L, 总酶活达 66500U/L。

[0001]

## 序 列 表

- <110> 江南大学
- <120> 利用重组枯草芽孢杆菌高效表达 *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶
- <160> 1
- <211> 705bp
- <212> DNA
- <213> *Staphylococcus aureus*
- <222> (1)..(705)
- <223>  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶
- <400> 1

```
1   atgacgaatg tcttgatca acatggtaca ttaggtacgt taatggctgg cttactagaa
61  ggaacagcta caattaatga atgttagaa catgggaatt tagggattgc aacgtaaca
121 gggctctgatg gcgaagtaat attttagac gggaaggcat atcatgctaa cgagcataaa
181 gaatttatag aattaaagg cgatgagaaa gtaccgtatg catcgattac taattttaa
241 gcgagtaaga cattccatt gcaacaatta tcacaagatg atgtattcgc acaaattaa
301 aatgaaatgt taagtgagaa tttatttcg gctgttaaaa tttatggcac atttaaacad
361 atgcatgtac gaatgatgcc tgctcagcaa ccgcatata cacgtttgat tgattcagca
421 cgcagacaac ctgaggaaaa aagacaagat atctgtggcg ccattgttgg atttttaca
481 ccagaattat tcatggcgt agggctctgct ggtttcata tacattttgc ggatgatgaa
541 agagcttatg gtggacatgt tcttgacttt gaagtggatg acgttgcgt tgagatacaa
601 aacttgaaa cattccaaca acattcccg gtaaataacg agacgtttgt taaagcgaaa
661 atagactata aagatgtggc agaagaatt agagaagctg aatag
```

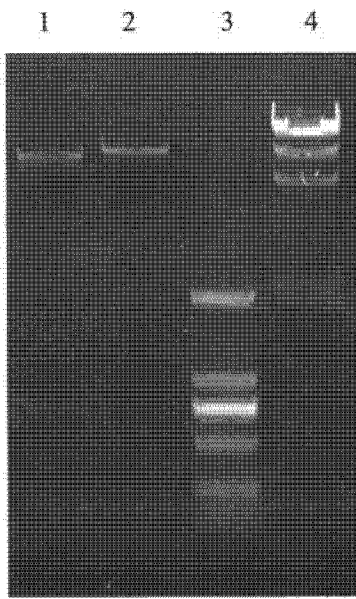


图 1

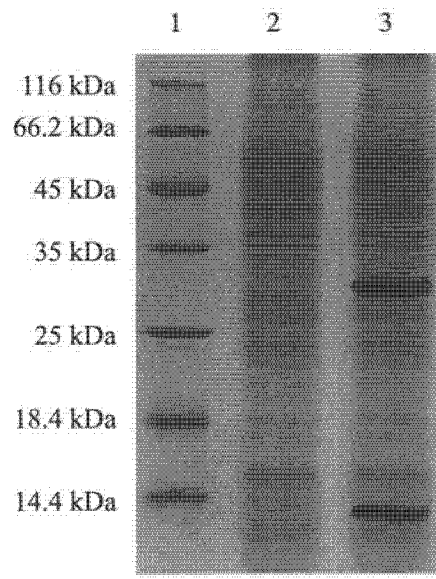


图 2