(19)中华人民共和国国家知识产权局

# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101899458 B
(45)授权公告日 2011.12.21

(21)申请号 200910264850.1

(22)申请日 2009.12.24

(83)生物保藏信息
CGMCC No.3520 2009.12.17

(73)专利权人 江南大学
地址 214122 江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号

(72)发明人 李崎 李永仙 郑飞云 刘春凤 顾国贤 秦久福

(51)Int.Cl.
*C12N 15/56*(2006.01)
*C12N 1/19*(2006.01)
*C12N 15/81*(2006.01)
*C12R 1/84*(2006.01)
*C12R 1/07*(2006.01)

(56)对比文件
CN 101463330 A,2009.06.24,
CN 101307295 A,2008.11.19,
EU623974.1.Bacillus amyloliquefaciens strain BS5582 beta-1,3-1,4-glucanase (bgl) gene,.《NCBI》.2008,

审查员 孙彦珂

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 1 页

(54)发明名称

一株高产耐温性 β - 葡聚糖酶毕赤酵母及其构建

(57)摘要

本发明公开了基因工程领域中的一种巴斯德毕赤酵母重组菌及其应用。本研究室通过体外分子进化技术，对淀粉液化芽孢杆菌 β-1,3-1,4- 葡聚糖酶基因进行了热稳定性提高定向进化，获得多株热稳定性提高突变体。本发明首次在巴斯德毕赤酵母系统中表达了其中一株热稳定提高最明显 β-1,3-1,4- 葡聚糖酶基因 bgl。将该基因克隆到毕赤酵母表达载体 pPICZαA 上，构建到 AOX Ⅰ甲醇诱导型启动子下游，得到重组质粒 pPICZαA-$his_6$-bgl，将其经 Pme Ⅰ线性化后转化毕赤酵母 GS115，bgl 基因通过同源重组被整合到毕赤酵母染色体上，并处于酵母 α 因子的下游，实现了异源分泌表达。通过重组菌株培养条件的优化，β-1,3-1,4- 葡聚糖酶的最佳表达条件为：pH7.0，$OD_{600}$为 2.5，甲醇的日诱导添加量为 1%，甲醇诱导后菌体的培养时间为 2.5-3 天。在此条件下 β - 葡聚糖酶分泌到培养基中的蛋白表达量为 190mg/L，比酶活达到 4312U/mg 蛋白。SDS-PAGE 结果显示表达蛋白的大小为 27KDa 左右，与理论分子量大小吻合。

CN 101899458 B

1. 一株高产耐温性 β－葡聚糖酶毕赤酵母，其含有基因序列 1，分类命名为：巴斯德毕赤酵母 (Pichia pastoris)GS115-pPICZαA-bgl，已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为：CGMCC No.3520。

2. 权利要求 1 所述高产耐温性 β－葡聚糖酶毕赤酵母的构建方法，其特征在于包括如下步骤：

A. 如序列 1 所示的基因 bgl 及质粒 pPICZαA 经 Not Ⅰ和 Xba Ⅰ双酶切回收后，再经 T4DNA 连接酶连接，转化 Trans5α，在 Zeisin LLB 平板上筛选阳性转化子；

B. 将阳性转化子进行质粒抽提，用 Not Ⅰ和 Xba Ⅰ双酶切进行鉴定和 PCR 检测，发现重组质粒经酶切后释放一条 720bp 左右的片段，该片段与 PCR 产物大小一致，初步表明重组质粒 pPICZαA-bgl 构建成功；经测序证明，bgl 基因序列嵌入到 pPICZαA 的 5'AOX 1 和 AOX 1TT 之间，并保持了 AOX 1 控制下的正确阅读框，bgl 基因插入位点如附图 1 所示；

C. 将含有 pPICZαA-bgl 的 Trans5α 重组菌大量培养，经质粒提取后，采用 PmeI 线性化并纯化后用于毕赤酵母转导；

D. 重组表达载体 pPICZαA-bgl 经 PmeI 完全酶切线性化后，电转化巴斯德毕赤酵母 GS115 并涂布 Zeocin YPDS 平板，30℃倒置培养 2～4 天直至菌落出现；挑选阳性转化子，接种含有 Zeocin YPD 液体培养基；对转化子进行 Mut 表型鉴定，得到 Mut+ 菌株，进一步经诱导培养和酶活测定，筛选得到高产毕赤酵母工程菌 Pichia pastoris GS115-pPICZαA-bgl；

E. 将 Pichia pastoris GS115-pPICZαA-bgl 按 Mut+ 诱导方式诱导产酶，通过重组菌株培养条件的优化，β-1,3-1,4- 葡聚糖酶的最佳表达条件为：pH 7.0，$OD_{600}$ 为 2.5，甲醇的日诱导添加量为 1%，甲醇诱导后菌体的培养时间为 2.5-3 天。

# 一株高产耐温性 β-葡聚糖酶毕赤酵母及其构建

## 技术领域

[0001] 一株高产耐温性 β-葡聚糖酶毕赤酵母及其构建，属于基因工程领域。

## 背景技术

[0002] 在啤酒工业中，啤酒厂在糖化过程中使用 β-葡聚糖酶已经比较普遍，国外许多公司如 NOVO、诺维信、DMS 等早已有商品化的酶制剂出售。在糖化过程中，大麦胚乳细胞壁中的 β-葡聚糖虽然在制麦阶段大部分被降解，但因植物 β-葡聚糖酶耐温性差，在糖化时其剩余活力会被完全破坏，残留的 β-葡聚糖仍有可能会导致麦汁粘度过大，致使过滤困难，延长糖化醪过滤时间，降低浸出物含量。在发酵过程中，过量的 β-葡聚糖会导致酵母早期沉降，降低发酵度。在成品啤酒中，β-葡聚糖会与蛋白质结合，导致雾状混浊和凝胶沉淀，降低啤酒的非生物稳定性。啤酒生产中添加 β-葡聚糖酶可将 β-葡聚糖降解为低聚糖和葡萄糖，降低麦汁粘度，从而大大提高过滤速度，增加生产效率。大麦一般不用做人类食物的直接来源，价格低廉，但若直接作为动物饲料使用时其中含有的 β-葡聚糖会造成单胃哺乳动物（如猪）和禽类消化道液体粘稠，影响营养成分的吸收，故 β-葡聚糖被称为抗营养因子。在大麦为主要原料的饲料中添加 β-1,3-1,4-葡聚糖酶，降解 β-葡聚糖，降低消化道内液体的粘度，改善禽畜肠胃道环境，提高营养的吸收效率，消除抗营养因子的作用。这对帮助饲料工业开辟一条具有高经济价值的道路具有实际意义。Cantwell 于 1983 年首次克隆和表达了来自 β-1,3-1,4-葡聚糖酶，此后不断有芽孢杆菌属和非芽孢杆菌属的该基因得到克隆和表达。

[0003] 巴斯德毕赤酵母 (Pichia pastoris) 是一种能高效表达重组蛋白的酵母品种，一方面由于其是属于真核生物，因此表达出来的蛋白可以进行糖基化修饰，另一方面毕赤酵母生长速度快，可以将表达的蛋白分泌到培养基中，方便蛋白纯化。毕赤酵母表达载体 pPICZ 在多克隆位点 (MCR)3′ 端带有 his-tag 和 c-myc epitopes，这些 tag 有利于常规检测和纯化，而且在 MCR5′ 端引入了 alpha factor(α-factor) 用以增加表达，并且在表达后 α-factor 可以自动被切除。在进行克隆的时候，如果你选择的是 EcoRI，那么只需在目标蛋白中增加两个氨基酸序列即可完成。另外 pPICZ 系列选用的是 Zeocin 抗生素作为筛选标记，而诱导表达的载体需要甲醇（甲醇比一般用于大肠杆菌表达诱导使用的 IPTG 便宜）。

## 发明内容

[0004] 本发明的目的是提供一株高产耐高温 β-葡聚糖酶毕赤酵母及其构建。本发明的技术方案为：

[0005] 1. 淀粉液化芽孢杆菌 β-1,3-1,4-葡聚糖酶热稳定性提高突变体基因的开放阅读框序列为序列 1。

[0006] 2. 一株高产耐温性 β-葡聚糖酶毕赤酵母，其含有基因序列 1，分类命名为：巴斯德毕赤酵母 (Pichia pastoris GS115-pPICZαA-bgl)，已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为：CGMCC No.3520

[0007] 3. 以重组质粒 pET-28a-bgl 为模板，PPICZαA-F(AAGGAAAAAAGCGGCCGCATGAAACGAGTGTTGCTAAT) 和 PPICZαA-R(GCTCTAGA CCTTTTTTTGTATAGCGCAC) 为 PCR 引物扩增，扩增的 DNA 片段与实际大小一致，约 720bp。通过 PCR 产物纯化试剂盒对扩增产物进行纯化，得到耐温性 β-葡聚糖酶基因 bgl。

[0008] 4. 基因 bgl。及质粒 pPICZαA 经 NotI 和 Xba I 双酶切回收后，再经 $T_4$DNA 连接酶连接，转化 Trans5α，在 Zeisin LLB 平板上筛选阳性转化子。

[0009] 表 1PCR 扩增产物 Not I 和 Xba I 双酶切体系 (50μl)

[0010]

| 组分 | 体积(μl) |
|---|---|
| *Not* I (12U/μl) | 1.5 |
| *Xba* I (12U/μl) | 1.5 |
| 0.1%BSA | 5 |
| 10×K Buffer | 5 |
| PCR 产物 | 37 |

[0011] 表 2pPICZαA Not I 和 Xba I 双酶切体系 (50μl)

[0012]

| 组分 | 体积(μl) |
|---|---|
| *Not* I (12U/μl) | 1.5 |
| *Xba* I (12U/μl) | 1.5 |
| 0.1%BSA | 5 |
| 10×K Buffer | 5 |
| pPICZαA | 37 |

[0013] 表 3 表达载体 pPICZαA 与目的基因的连接体系 (10μl)

[0014]

| 组分 | 体积(μl) |
|---|---|
| pPICZα-A | 4 |
| $T_4$ DNA ligase | 1 |
| 10× Buffer | 1 |
| 目的基因 | 4 |

[0015] 5. 将阳性转化子进行质粒抽提，用 Not I 和 Xba I 双酶切进行鉴定和 PCR 检测，发现重组质粒经酶切后释放一条 720bp 左右的片段，该片段与 PCR 产物大小一致，初步表明重组质粒 pPICZαA-bgl 构建成功。经测序证明，bgl 基因序列嵌入到 pPICZαA 的 5' AOX 1 和 AOX 1TT 之间，并保持了 AOX 1 控制下的正确阅读框。

[0016] 6. 将含有 pPICZαA-bgl 的 Trans5α 重组菌大量培养，经质粒提取后，采用 Pme I 线性化并纯化后用于毕赤酵母转导。

[0017] 表 4 重组质粒的线性化酶切体系 (50μl)

[0018]

| 组分 | 体积(μl) |
|---|---|
| *Pme* Ⅰ(12U/μl) | 4 |
| 10×NEB Buffer | 5 |
| 100×BSA | 0.5 |
| pPICZαA-*bgl*(1μg/μl) | 40.5 |

[0019] 7. 重组表达载体 pPICZαA-bgl 经 Pme Ⅰ完全酶切线性化后，电转化 Pichiapastoris GS115 并涂布 Zeocin YPDS 平板，30℃倒置培养 2～4 天直至菌落出现。挑选阳性转化子，接种含有 ZeocinYPD 液体培养基。对转化子进行 Mut 表型鉴定，得到 Mut+ 菌株，进一步经诱导培养和酶活测定，筛选得到高产毕赤酵母工程菌 Pichiapastoris GS115-pPICZαA-bgl。

[0020] 本发明的有益效果为：将 Pichia pastoris GS115-pPICZαA-bgl 按 Mut+ 诱导方式诱导产酶，通过重组菌株培养条件的优化，β-1,3-1,4- 葡聚糖酶的最佳表达条件为：pH7.0，$OD_{600}$ 为 2.5，甲醇的日诱导添加量为 1％，甲醇诱导后菌体的培养时间为 2.5-3 天。在此条件下 β-葡聚糖酶分泌到培养基中的蛋白表达量为 190mg/L，比酶活达到 4312U/mg 蛋白。SDS-PAGE 结果显示表达蛋白的大小为 27KD 左右，与理论分子量大小吻合。

[0021] 生物材料样品保藏

[0022] 一株高产耐温性 β-葡聚糖酶毕赤酵母，该菌株为巴斯德毕赤酵母，命名为 Pichia pastorisGS115-pPICZαA-bgl，已保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC No.3520，2009 年 12 月 17 日。

## 附图说明

[0023] 图 1 重组载体 pPICZαA-bgl 的结构图。

[0024] 图 2 重组载体 pPICZαA-bgl Not Ⅰ和 Xba Ⅰ双酶切验证电泳图。

[0025] 图 3 重组菌 SDS-PAGE 图。

## 具体实施方式

[0026] 实例 1

[0027] 将发明得到的重组巴斯德毕赤酵母 Pichia pastoris GS115-pPICZαA-bgl 按 Mut+ 诱导方式诱导产酶，通过重组菌株培养条件的优化，β-1,3-1,4- 葡聚糖酶的最佳表达条件为：pH7.0，$OD_{600}$ 为 2.5，甲醇的日诱导添加量为 1％，甲醇诱导后菌体的培养时间为 2.5-3 天。在此条件下 β-葡聚糖酶分泌到培养基中的蛋白表达量为 190mg/L，比酶活达到 4312U/mg 蛋白。SDS-PAGE 结果显示表达蛋白的大小为 27KDa 左右，与理论分子量大小吻合。

[0028] 核苷酸及氨基酸序列

[0029] <110> 江南大学

[0030] <120> 专利名称

[0031] 一株高产耐温性 β-葡聚糖酶毕赤酵母及其构建

[0032] <140> 申请号 200910264850.1

[0033] <141> 申请日期 2009 年 12 月 25 日

[0034] <160>2

[0035] <210>1

[0036] <211>717

[0037] <212>DNA

[0038] <213> 人工序列

[0039] <220>

[0040] <223> 根据基因序列设计，用于高效表达。

[0041] <400>1

[0042] atgaaacgag tgttgctaat tcttgtcacc ggattgttta tgagtttgtg tgggatcact 60

[0043] tctagtgttt cggctcaaac aggcggatcg ttttttgaac cttttaacag ctataactcc 120

[0044] gggttatggc aaaaagctga tggttactca aatggagata tgtttaactg cacttggcgt 180

[0045] gcgaataacg tctctatgac gtcatcaggt gaaatgcgtt tggcgctgac aagtccgtct 240

[0046] tataacaagt ttgactgcgg ggaaaaccgc tcggttcaaa catatggcta tggactttat 300

[0047] gaagtcagaa tgaaaccggc taaaaacaca gggattgttt catcgttctt cacttataca 360

[0048] ggtccaacgg aggggactcc ttgggatgag attgatatcg aatttttggg aaaagacaca 420

[0049] acaaaggttc aatttaacta ttatacaaat ggcgcaggaa accatgagaa gttggcggat 480

[0050] ctcggatttg atgcagccaa tgcctatcat acgtatgcgt tcgattggca gccaaactct 540

[0051] attaaatggt atgtcgatgg gcaattaaaa catactgcga caacccaaat accggcagcg 600

[0052] ccggggaaaa tcatgatgaa tttgtggaat ggtacgggtg tcgatgattg gctcggttcc 660

[0053] tacaatggcg taaatccgct atacgctcat tacgactggg tgcgctatac aaaaaaa 717

[0054] <210>2

[0055] <211>30

[0056] <212>PRT

[0057] <400>2

[0058] Met Lys Arg Val Leu Leu Ile Leu Val Thr Gly Leu Phe Met Ser Leu

[0059] 1 5 10 15

[0060] Cys Gly Ile Thr Ser Ser Val Ser Ala Gln Thr Gly Gly Ser Phe Phe

[0061] 20 25 30

[0062] Glu Pro Phe Asn Ser Tyr Asn Ser Gly Leu Trp Gln Lys Ala Asp Gly

[0063] 35 40 45

[0064] Tyr Ser Asn Gly Asp Met Phe Asn Cys Thr Trp Arg Ala Asn Asn Val

[0065] 50 55 60

[0066] Ser Met Thr Ser Ser Gly Glu Met Arg Leu Ala Leu Thr Ser Pro Ser

[0067] 65 70 75 80

[0068] Tyr Asn Lys Phe Asp Cys Gly Glu Asn Arg Ser Val Gln Thr Tyr Gly

[0069] 85 90 95

[0070] Tyr Gly Leu Tyr Glu Val Arg Met Lys Pro Ala Lys Asn Thr Gly Ile

[0071] 100 105 110

[0072] Val Ser Ser Phe Phe Thr Tyr Thr Gly Pro Thr Glu Gly Thr Pro Trp

[0073] 115 120 125

[0074] Asp Glu Ile Asp Ile Glu Phe Leu Gly Lys Asp Thr Thr Lys Val Gln

[0075] 130 135 140

[0076] Phe Asn Tyr Tyr Thr Asn Gly Ala Gly Asn His Glu Lys Leu Ala Asp

[0077] 145 150 155 160

[0078] Leu Gly Phe Asp Ala Ala Asn Ala Tyr His Thr Tyr Ala Phe Asp Trp

[0079] 165 170 175

[0080] Gln Pro Asn Ser Ile Lys Trp Tyr Val Asp Gly Gln Leu Lys His Thr

[0081] 180 185 190

[0082] Ala Thr Thr Gln Ile Pro Ala Ala Pro Gly Lys Ile Met Met Asn Leu

[0083] 195 200 205

[0084] Trp Asn Gly Thr Gly Val Asp Asp Trp Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Val

[0085] 210 215 220

[0086] Asn Pro Leu Tyr Ala His Tyr Asp Trp Val Arg Tyr Thr Lys Lys

[0087] 225 230 235

[0088] 核苷酸及氨基酸序列表

[0089] <110> 江南大学

[0090] <120> 专利名称

[0091] 一株高产耐温性 β-葡聚糖酶毕赤酵母及其构建

[0092] <140> 申请号 200910264850.1

[0093] <141> 申请日期 2009 年 12 月 25 日

[0094] <160>2

[0095] <210>1

[0096] <211>717

[0097] <212>DNA

[0098] <213> 人工序列

[0099] <220>

[0100] <223> 根据基因序列设计，用于高效表达。

[0101] <400>1

[0102] atgaaacgag tgttgctaat tcttgtcacc ggattgttta tgagtttgtg tgggatcact 60

[0103] tctagtgttt cggctcaaac aggcggatcg ttttttgaac cttttaacag ctataactcc 120

[0104] gggttatggc aaaaagctga tggttactca aatggagata tgtttaactg cacttggcgt 180

[0105] gcgaataacg tctctatgac gtcatcaggt gaaatgcgtt tggcgctgac aagtccgtct 240

[0106] tataacaagt ttgactgcgg ggaaaaccgc tcggttcaaa catatggcta tggactttat 300

[0107] gaagtcagaa tgaaaccggc taaaaacaca gggattgttt catcgttctt cacttataca 360

[0108] ggtccaacgg aggggactcc ttgggatgag attgatatcg aatttttggg aaaagacaca 420

[0109] acaaaggttc aatttaacta ttatacaaat ggcgcaggaa accatgagaa gttggcggat 480

[0110] ctcggatttg atgcagccaa tgcctatcat acgtatgcgt tcgattggca gccaaactct 540

[0111] attaaatggt atgtcgatgg gcaattaaaa catactgcga caacccaaat accggcagcg 600

[0112] ccggggaaaa tcatgatgaa tttgtggaat ggtacgggtg tcgatgattg gctcggttcc 660

[0113] tacaatggcg taaatccgct atacgctcat tacgactggg tgcgctatac aaaaaaa 717

[0114] <210>2

[0115] <211>30

[0116] <212>PRT

[0117] <400>2

[0118] Met Lys Arg Val Leu Leu Ile Leu Val Thr Gly Leu Phe Met Ser Leu

[0119] 1 5 10 15

[0120] Cys Gly Ile Thr Ser Ser Val Ser Ala Gln Thr Gly Gly Ser Phe Phe

[0121] 20 25 30

[0122] Glu Pro Phe Asn Ser Tyr Asn Ser Gly Leu Trp Gln Lys Ala Asp Gly

[0123] 35 40 45

[0124] Tyr Ser Asn Gly Asp Met Phe Asn Cys Thr Trp Arg Ala Asn Asn Val

[0125] 50 55 60

[0126] Ser Met Thr Ser Ser Gly Glu Met Arg Leu Ala Leu Thr Ser Pro Ser

[0127] 65 70 75 80

[0128] Tyr Asn Lys Phe Asp Cys Gly Glu Asn Arg Ser Val Gln Thr Tyr Gly

[0129] 85 90 95

[0130] Tyr Gly Leu Tyr Glu Val Arg Met Lys Pro Ala Lys Asn Thr Gly Ile

[0131] 100 105 110

[0132] Val Ser Ser Phe Phe Thr Tyr Thr Gly Pro Thr Glu Gly Thr Pro Trp

[0133] 115 120 125

[0134] Asp Glu Ile Asp Ile Glu Phe Leu Gly Lys Asp Thr Thr Lys Val Gln

[0135] 130 135 140

[0136] Phe Asn Tyr Tyr Thr Asn Gly Ala Gly Asn His Glu Lys Leu Ala Asp

[0137] 145 150 155 160

[0138] Leu Gly Phe Asp Ala Ala Asn Ala Tyr His Thr Tyr Ala Phe Asp Trp

[0139] 165 170 175

[0140] Gln Pro Asn Ser Ile Lys Trp Tyr Val Asp Gly Gln Leu Lys His Thr

[0141] 180 185 190

[0142] Ala Thr Thr Gln Ile Pro Ala Ala Pro Gly Lys Ile Met Met Asn Leu

[0143] 195 200 205

[0144] Trp Asn Gly Thr Gly Val Asp Asp Trp Leu Gly Ser Tyr Asn Gly Val

[0145] 210 215 220

[0146] Asn Pro Leu Tyr Ala His Tyr Asp Trp Val Arg Tyr Thr Lys Lys

[0147] 225 230 235

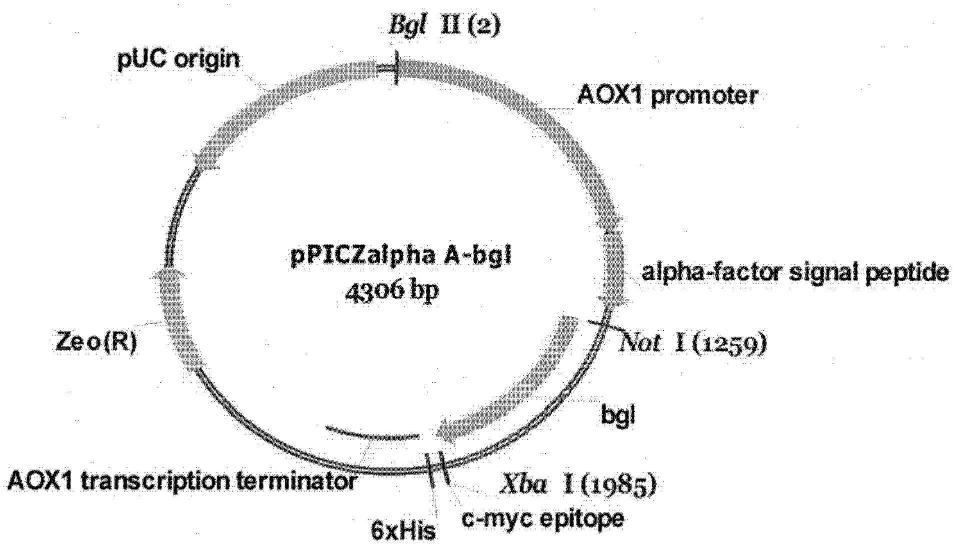
Bgl II (2)
pUC origin
AOX1 promoter
pPICZalpha A-bgl
4306 bp
alpha-factor signal peptide
Zeo(R)
Not I (1259)
bgl
AOX1 transcription terminator
Xba I (1985)
6xHis
c-myc epitope

图 1

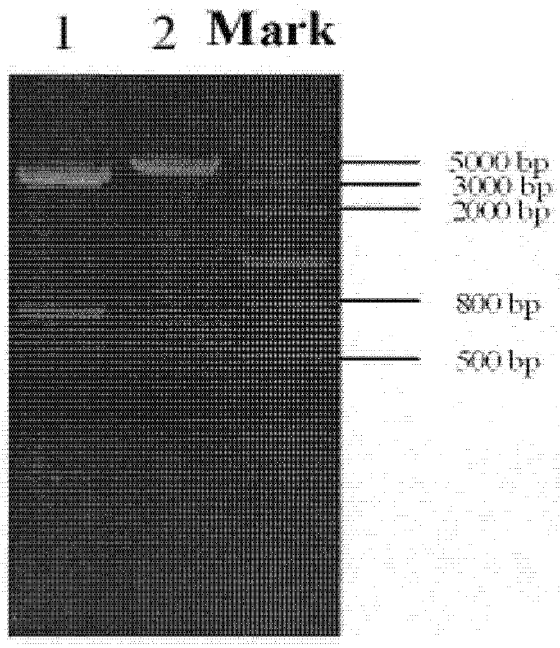
1
2
Mark
5000 bp
3000 bp
2000 bp
800 bp
500 bp

图 2

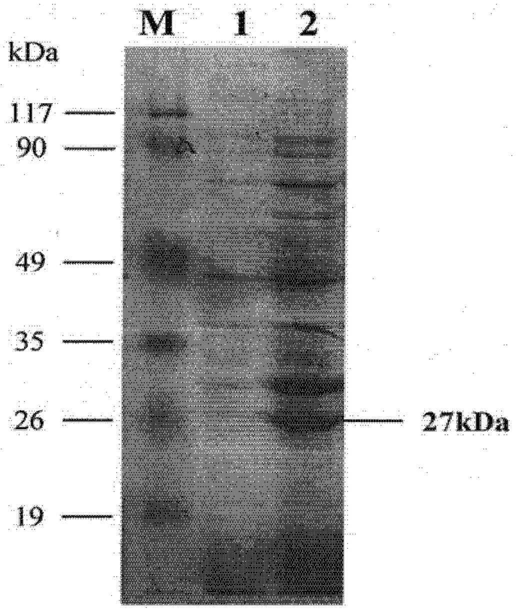
M
1
2
kDa
117
90
49
35
26
19
27kDa

图 3