



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 118325879 B

(45) 授权公告日 2024.08.13

(21) 申请号 202410756047.4

(22) 申请日 2024.06.13

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 118325879 A

(43) 申请公布日 2024.07.12

(73) 专利权人 深圳润康生态环境股份有限公司
地址 518100 广东省深圳市宝安区西乡街道铁岗社区水库路113号诺普信大楼1楼105室

(72) 发明人 王建荣 祝木金 陈微 王平
钟斌 高美芳 曹革

(74) 专利代理机构 广州科沃园专利代理有限公司 44416
专利代理师 袁秀芳

(51) Int.Cl.

C12N 9/88 (2006.01)

C12N 15/60 (2006.01)

C12N 15/81 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12P 19/00 (2006.01)

C12R 1/84 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 101423854 A, 2009.05.06

CN 109852601 A, 2019.06.07

审查员 申延昊

权利要求书1页 说明书13页

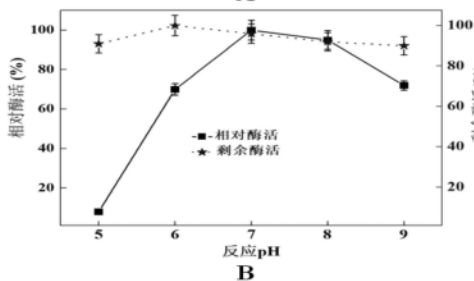
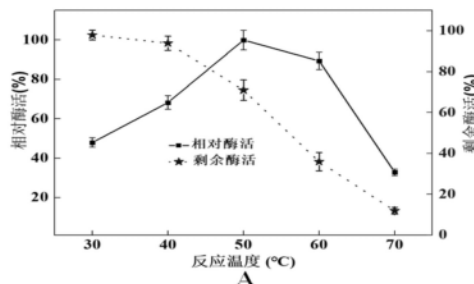
序列表(电子公布) 附图3页

(54) 发明名称

一种褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM及其应用

(57) 摘要

本发明属于分子生物学及蛋白质工程技术领域,具体设计一种褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM及其应用。本发明通过密码子优化获得褐藻胶裂解酶基因序列PL31Pt,其核苷酸序列信息如SEQ ID NO.1所示,并将该序列用于重组褐藻胶裂解酶PL31Pt工程菌的构建过程,进一步以重组PL31Pt为模板,通过蛋白理性设计获得热稳定性提升的突变体PL31PtM,其核苷酸序列如SEQ ID NO.3所示,氨基酸序列如SEQ ID NO.4所示;通过高密度发酵实现突变体PL31PtM高效制备。本发明获得的突变体PL31PtM可用于褐藻胶寡糖的制备过程,应用范围广泛。



1. 一种褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM,其特征在于,所述褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。
2. 如权利要求1所述的褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM,其特征在于,编码所述氨基酸序列的为多聚核苷酸序列,所述多聚核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。
3. 一种重组表达载体,其特征在于,包括权利要求2所述的褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM的核苷酸序列。
4. 一种重组工程菌,其特征在于,包括权利要求3所述的重组表达载体。
5. 如权利要求4所述的重组工程菌,其特征在于,以毕赤酵母工程菌为宿主。
6. 如权利要求5所述的重组工程菌,其特征在于,所述毕赤酵母工程菌包括毕赤酵母X33。
7. 一种如权利要求1所述的褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM在制备褐藻胶寡糖中的应用。
8. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,所述褐藻胶寡糖通过采用褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM水解褐藻胶制备获得。
9. 一种如权利要求4-6任一项所述的重组工程菌在制备高酶比活性突变体PL31PtM中的应用。

一种褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于分子生物学及蛋白质工程技术领域,具体设计一种褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM及其应用。

背景技术

[0002] 褐藻胶作为一种多糖主要来源于海带、昆布、马尾藻等褐藻,其由 β -D-甘露糖醛酸和 α -L-古洛糖醛酸通过 α/β -1,4糖苷键随机排列而成。褐藻胶进一步降解可形成不同聚合度褐藻胶寡糖。相比于褐藻胶,褐藻胶寡糖具有良好的水溶性,生物活性和生物利用率,因此其具有更好的应用价值。研究表明,褐藻胶寡糖具有抗氧化、抑菌、免疫调节等活性,可应用于食品医药领域。此外有研究发现在农业种植领域,褐藻胶寡糖可作为生物刺激素促进植物生长,提升果蔬品质等功效。迄今,褐藻胶寡糖的制备方式主要由化学法和酶法构成,其中化学法由于快速、成本低,成为主流方式。相比于化学法,酶法工艺具有反应条件温和、绿色环保、加工过程可控、产物结构完好等优势。但是酶法加工成本高,限制其大规模应用。褐藻胶裂解酶在酶法工艺中扮演重要角色,同时也是导致酶法工艺成本高的主要因素。因此研制高效低廉的褐藻胶裂解酶具有重要意义。

[0003] 褐藻胶裂解酶通过 β -消除的方式将褐藻胶降解为褐藻胶寡糖。褐藻胶裂解酶来源广泛,根据氨基酸相似性,可分为多个家族。目前关于褐藻胶裂解酶的研究主要集中在PL7和PL17家族,其它家族来源的褐藻胶裂解酶报道较少。因此,进一步开发其他家族来源的褐藻胶裂解酶并扩大其展开一系列的研究,对于扩大褐藻胶裂解酶的应用范围至关重要。

发明内容

[0004] 针对上述问题,本发明以来源于PL31家族的一类芽孢杆菌褐藻胶裂解酶PL31Pt为研究对象,提供了一种褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM及其应用,有效提高了酶活力及稳定性,为下一步产业化应用奠定了坚实基础。

[0005] 为了达到上述目的,本发明采用的具体技术方案如下:

[0006] 一种褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM,所述褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM的氨基酸序列如SEQ ID NO.3所示。

[0007] ASVTCSTASCLTNALQAAPGDVITLAAGVTFNGKFVAAAANGTPTGKITLQSASSSNKAELNGGGTGS
GYTLHVTGDHWVIKDLKITNAKKGIMLDPANYTLIDGAEVYQIGEEGVHYRDGFSYNTIRNSYFHDIGTVNPAFGE
AIYVGSCKGKWGTFNAATNHNTIANNTIGPNVAAEHIDIKEGSTGLVENNTFDGTGMSGANAADSFIDVKGNNV
IRGNIGYRNGNSNIKDAFQVHQRAAGWGQNAIFTNNTVYLPNTTAYVVNAASGTTASASGNTRYPAGNMYTGSVTG
GAKTGHSSASSMP (SEQ ID NO.3);

[0008] 优选地,编码所述氨基酸序列的为多聚核苷酸序列,所述多聚核苷酸序列如SEQ ID NO.4所示。

[0009] GCTTCTGTTACTTGTCTACTGCTTCTTGTGGTACTAAGCTTTGGCTCAAGCTGCTCCTGGTGACGT
TATTACTTTGGCTGCTGGTGTACTTTTAATGGTAAATTTGTTGCTGCTGCTAATGGTACTCCAAGTGGTAAAATT

ACTTTGCAATCTGCTTCTTCTTAATAAGGCTGAATTGAACGGTGGTGGTACTGGTTCTGGTTATACTTTGCATG
TTACTGGTGACCATTGGGTTATTAAGGATTTGAAAATTACCAACGCTAAGAAGGGTATTATGTTGGATCCTGCTAA
CTATACTTTGATTGATGGTGCTGAAGTTTACCAAATTGGTGAAGAAGGTGTTTCATTACAGAGATGGTTTTTCTTAT
AATACTATCAGAACTCTTACTTCCACGATATTGGTACTGTAAACCCAGCTTTTGGTGAAGCTATCTATGTTGGTT
CTGATAAGGGTAAATGGGGTACTTTTAATGCTGCTACTAACCATAATACTATCGCTAACAACTATCGGTCCAAA
TGTTGCTGCTGAACATATTGATATTAAGGAAGGTTCTACTGGTACTTTGGTTGAAAACAATACTTTTGATGGTACT
GGTATGTCTGGTGCTAACGCTGCTGATTCTTTTATTGATGTTAAGGGTAACAACGATGTTATTAGAGGTAACATTG
GTTACAGAAACGGTAATTCTAACATTAAGGATGCTTTTCAAGTCCATCAAAGAGCTGCTGGTTGGGGTCAAAACGC
TATTTTCACTAATAACTGTCTACTTGCCCAATACTACTGCTTACGTTGTTAACGCTGCTTCTGGTACTACTGCT
TCTGCTTCTGGTAACACTAGATACCCTGCTGGTAATATGTACACTGGTTCTGTTACTGGTGGTGTAAAGACTGGTC
ATTCTTCTGCTTCTTCCATGCCA (SEQ ID NO.4);

[0010] 本发明还提供了一种重组表达载体,包括所述的褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM的核苷酸序列。

[0011] 本发明还提供了一种重组工程菌,包括所述的重组表达载体。

[0012] 优选地,所述重组工程菌以毕赤酵母工程菌为宿主。

[0013] 优选地,所述毕赤酵母工程菌包括毕赤酵母X33。

[0014] 本发明还提供了一种所述的褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM在制备褐藻胶寡糖中的应用。

[0015] 优选地,所述褐藻胶寡糖通过采用褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM水解褐藻胶制备获得。

[0016] 本发明还提供了一种所述的重组工程菌在制备高酶比活性突变体PL31PtM中的应用。

[0017] 本发明以来源于PL31家族的类芽孢杆菌褐藻胶裂解酶PL31Pt为研究对象。首先重组表达来源于类芽孢杆菌褐藻胶裂解酶PL31Pt,其次通过理性设计获得热稳定性提升的突变体PL31PtM,最后高效制备突变体PL31PtM并优化酶法工艺制备褐藻胶寡糖。

[0018] 本发明主要是通过以下技术实现的:(1)根据毕赤酵母密码子偏好性,合成褐藻胶裂解酶基因序列PL31Pt;(2)重组褐藻胶裂解酶PL31Pt工程菌构建及筛选;(3)分析测定重组褐藻胶裂解酶PL31Pt酶学特性;(4)以重组PL31Pt为模板,通过蛋白理性设计获得热稳定性提升的突变体PL31PtM;(5)通过高密度发酵实现突变体PL31PtM高效制备;(6)突变体PL31PtM酶法制备褐藻胶寡糖。

[0019] 与现有技术相比,本发明提供的褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM具有如下优势:本发明提供了一种褐藻胶裂解酶突变体PL31PtM,有效提升了其热稳定性,可以将突变体PL31PtM应用于酶法制备褐藻胶寡糖,有效扩大了褐藻胶的应用范围,并为下一步产业化应用奠定基础。

附图说明

[0020] 图1为重组褐藻胶裂解酶PL31Pt的pH和温度特性图;

[0021] 图2为褐藻胶裂解酶PL31Pt三维构象及结构评估图;

[0022] 图3为突变体PL31PtM最适反应温度和热稳定性图;

- [0023] 图4为突变体PL31PtM高密度发酵曲线和蛋白电泳图；
[0024] 图5为突变体PL31PtM酶法制备褐藻胶寡糖工艺优化图。

具体实施方式

[0025] 下面结合实施例对本发明作进一步详细的描述,但本发明的实施方式不限于此。以下实施例中未作具体说明的分子生物学实验方法,均参照《分子克隆实验指南》(第三版)J. 萨姆布鲁克一书中所列的具体方法进行,或者按照试剂盒和产品说明书进行;所述试剂和生物材料,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0026] 本发明中涉及到的实验材料和试剂如下:

[0027] 1、菌株与载体:

[0028] 大肠杆菌菌株Top10为实验室常规保存、毕赤酵母X33(货号: C18000)购自Invitrogen公司。

[0029] 2、酶与试剂盒

[0030] Q5高保真Taq酶MIX(货号: M0492S)购自NEB公司;质粒提取,胶纯化试剂盒(货号: DP209-02)购自天根生化科技(北京)有限公司;限制性内切酶购自宝日医生物技术(北京)有限公司;Zeocin购自Invitrogen公司。

[0031] 3、培养基

[0032] 大肠杆菌培养基为LB液体培养基:(1% (w/v) 蛋白胨,0.5% (w/v) 酵母提取物,1% (w/v) NaCl, pH7.0),其余为水。LBZ为LB培养基加25 μ g/mL Zeocin(博莱霉素)。

[0033] 酵母培养基为YPD培养基:(1% (w/v) 酵母提取物,2% (w/v) 蛋白胨,2% (w/v) 葡萄糖),其余为水。酵母筛选培养基为YPDZ(YPD +100mg/L zeocin)。

[0034] 酵母诱导培养基为BMGY培养基:(1% (w/v) 酵母提取物、2% (w/v) 蛋白胨、1.34% (w/v) YNB、0.00004% (w/v) Biotin、1% 甘油(V/V)),其余为水。注:YNB为酵母氮源基础(Yeast Nitrogen Base);Biotin为生物素。

[0035] 4. 褐藻胶裂解酶活性测定所用试剂

[0036] 采用DNS法测定褐藻胶裂解酶活性,主要的试剂包括底物海藻酸钠(浓度为0.5%, m/v)和显色剂DNS试剂(6.3‰ (w/v) 3,5-二硝基水杨酸;18.2% (w/v) 四水酒石酸钾钠;5‰ (w/v) 苯酚;5‰ (w/v) 无水亚硫酸钠,其余为水)。

[0037] 实施例1 重组褐藻胶裂解酶PL31Pt工程菌构建及筛选

[0038] 通过分析NCBI数据库获得类芽孢杆菌(*Paenibacillus tyrfis*)褐藻胶裂解酶的基因序列(基因登录号:BSDJ01000004.1),其全长为1023bp。通过生物信息学软件DNAMAN6.0翻译后,发现该序列对应的褐藻胶裂解酶PL31Pt由340个氨基酸组成。通过在线信号肽软件SignalP-5.0 Server(<https://services.healthtech.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)分析,发现褐藻胶裂解酶PL31Pt前31个氨基酸为信号肽序列。此外通过在线生物信息网站expasy中的Compute pI/MW(<https://www.expasy.org/resources/compute-pi-mw>)计算分析,发现去掉信号肽的褐藻胶裂解酶PL31Pt的理论分子量和等电点分别为31.8kDa和6.13。

[0039] 由于在本发明中,使用毕赤酵母作为重组表达宿主,因此需要根据毕赤酵母密码子的偏好性优化类芽孢杆菌(*Paenibacillus tyrfis*)褐藻胶裂解酶基因序列。此外由于在

重组表达时所用信号肽为 α 信号肽,因此在基因优化时,需要去除褐藻胶裂解酶PL31Pt的信号肽编码序列,通过密码子优化最终获得褐藻胶裂解酶基因PL31Pt,其序列如SEQ ID NO.1所示,对应的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。优化后的褐藻胶裂解酶基因PL31Pt序列由安徽通用生物有限公司合成,在合成过程中将褐藻胶裂解酶基因PL31Pt直接连接至载体pPICZ α A,从而获得表达载体pPICZ α A-PL31Pt。

[0040] 重组酵母工程菌的构建大致如下:(1)将表达载体pPICZ α A-PL31Pt用限制性内切酶SacI线性化后,参照天根生化科技(北京)有限公司胶纯化试剂盒(货号:DP209-02)进行纯化回收,并测定其浓度;(2)将毕赤酵母感受态细胞,于冰上放置30min,将纯化后的线性化表达载体pPICZ α A-PL31Pt转入毕赤酵母感受态细胞并在冰上放置20min;(3)将含有线性化表达载体pPICZ α A-PL31Pt的酵母感受态细胞,转入电转杯,通过电穿孔仪进行电击转化(转化参数为1500千伏,400欧姆);(4)将转化后的产物转入2mL离心管并加入0.5mL 1M山梨醇溶液,30°C,静置2h后,均匀涂布于YPDZ平板;(5)将涂布好的平板在30°C,静置培养3至5天,即得酵母转化子。

[0041] 对培养获得的酵母转化子进行筛选实验,实验过程大致如下:(1)将单个酵母转化子分别挑入含有5mL BMGY的50mL离心管中,30°C,200rpm培养24h后,开始进行诱导培养。诱导培养过程中每过24h按0.75%(体积比,v/v)的比例加入甲醇进行诱导培养,培养48h后进行褐藻胶裂解酶活性测定。

[0042] 褐藻胶裂解酶活性测定方法如下:(1)将海藻酸钠和稀释好的酶液在50°C分别预热5min;(2)分别取预热好的酶液50 μ L加入2mL离心管中,然后再加入350 μ L海藻酸钠溶液(浓度为0.5%,m/v),50°C反应30min;(3)将600 μ L DNS显色剂加入反应溶液后,在100°C沸水浴10min进行显色;(4)待显色后的溶液冷却至室温,20min后,离心,取上清在540nm下测定吸光值,整个测定过程以失活的酶液作为对照。褐藻胶裂解酶活性定义为:每30min生成1 μ mol葡萄糖当量的褐藻胶寡糖,所需要的酶量定义为一个活力单位。

[0043] 通过筛选50个重组转化子,最终获得一个酶活优势菌(命名为P13),其发酵酶活为12U/mL。

[0044] 实施例2 重组褐藻胶裂解酶PL31Pt酶学特性表征

[0045] 为了进一步分析重组褐藻胶裂解酶PL31Pt(简称重组PL31Pt),首先对其进行纯化。纯化过程大致如下:(1)将重组工程菌P13接入含有100mL BMGY培养基的500mL摇瓶中,诱导培养120h后,6°C,8000rpm离心10min,收集上清酶液;(2)通过10kDa超滤管超滤浓缩上清酶液,将超滤好的酶液,用上海生工生物工程有限公司的Ni-IDA蛋白纯化试剂盒(货号C600292)进行纯化;(3)测定纯化后的重组PL31Pt酶学特性,包括酶反应动力学参数、pH特性、温度特性和金属离子稳定性。

[0046] 纯化后重组PL31Pt酶反应动力学参数测定如下:(1)配置不同浓度的海藻酸钠(1-10mg/mL)作为底物备用;(2)分别测定重组PL31Pt对不同浓度海藻酸钠的水解反应速度;(3)以不同浓度海藻酸钠为横坐标,以重组PL31Pt对不同浓度底物的水解反应速度为纵坐标,通过软件Graphpad Prism 8进行拟合分析,获得重组PL31Pt的米氏常数和最大反应速度。重组PL31Pt酶比活力、米氏常数 K_m 和最大反应速度 V_{max} 分别为1152U/mg、1.23mg/mL和1906.8 μ M/min/mg。

[0047] 重组PL31Pt的pH特性测定包括最适反应pH和pH稳定性。重组PL31Pt最适反应pH测

定如下:在50℃条件下测定重组PL31Pt在pH5.0-9.0下的酶活,以测定酶活最高pH下的酶活为100%,计算其他pH下的相对酶活。

[0048] 由图1B可知,重组PL31Pt最适反应pH为7.0,在pH6.0至9.0范围内相对酶活大于70%。

[0049] 重组PL31Pt的pH稳定性测定如下:在25℃条件下,将重组PL31Pt在pH5.0至9.0条件下放置4h后进行剩余酶活测定,以没有处理的样品的酶活为100%,计算其他pH下的剩余酶活。

[0050] 由图1B可知,重组PL31Pt在pH5.0至9.0条件下放置4小时后具有很好的稳定性,所有样品的剩余酶活均大于90%。

[0051] 重组PL31Pt温度特性测定包括最适反应温度和热稳定性。其中最适反应温度测定如下:在pH7.0条件下测定重组PL31Pt在30℃-70℃不同温度下的酶活,以测定酶活最高温度下的酶活为100%,计算其他温度下的相对酶活。

[0052] 由图1A可知,重组PL31Pt最适反应为50℃,在40℃-60℃范围内相对酶活大于60%。

[0053] 重组PL31Pt热稳定性测定如下:将稀释好的酶液(1U/mL到2U/mL之间)在不同温度(30℃至70℃)下热处理30min后测定剩余酶活,以没有热处理的样品酶活设置为100%,计算不同处理温度下的剩余酶活。

[0054] 实验结果如图1A所示。重组PL31Pt在30℃至40℃范围内具有良好的热稳定性,剩余酶活均大于90%。当热处理温度大于40℃,剩余酶活急剧下降,重组褐藻胶裂解酶PL31Pt在60℃和70℃,热处理30分钟后,相对酶活及剩余酶活分别仅为36.2%和12.5%。

[0055] 不同金属离子对重组PL31Pt稳定性影响测定如下:将重组PL31Pt分别加入含有1mM和5mM不同金属离子缓冲液中,室温放置4h后进行活性测定,以没有处理的样品作为对照,计算剩余酶活。

[0056] 由表1可知,金属离子Na⁺、K⁺、Ca⁺和Mg²⁺对重组PL31Pt具有激活作用,剩余酶活均大于100%;金属离子Mn²⁺、Cu²⁺和Zn²⁺对重组PL31Pt具有抑制作用。

[0057] 表1不同金属离子对重组PL31Pt稳定性影响

金属离子	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺	Mg ²⁺	Mn ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺
[0058] 1mM	141%	134%	120%	170%	57%	33%	72%
5mM	128%	132%	106%	173%	43%	32%	44%

[0059] 实施例3 理性设计提升重组PL31Pt热稳定性

[0060] 从实施例2温度测定部分的结果我们可知,重组PL31Pt热稳定性较差,从而限制其产业化应用,因此提升其热稳定性具有重要意义。本部分通过蛋白质理性设计提升重组PL31Pt热稳定性。

[0061] 首先对PL31Pt进行三维建模,通过在线生物信息学软件SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>) 进行建模。通过预测分析,获得PL31Pt蛋白三维构象(图2A)。由图2A可知,PL31Pt主要由β折叠和无规则蜷曲构成。通过在线生物信息软件SAVES v6.0 (<https://saves.mbi.ucla.edu/>) 评估重组PL31Pt三维构象的精确性,实验结果如图2B所示。由图2B可知,拉式图结果表明,94.4%的氨基酸位于最优区域,5.6%的氨基酸位于其他允

许区域,表明获得模型构象正确。经过建模以及模型评估,最终确定重组PL31Pt目标三维构象。

[0062] 其次通过三种热稳定性预测分析线软件对重组PL31Pt三维构象进行计算分析,寻找目标氨基酸突变位点。这三种生物信息在线软件分别为PROSS (<https://pross.weizmann.ac.il/step/pross-terms/>)、Consensus Finder (<http://kazlab.umn.edu/>)和Fireprot (<https://loschmidt.chemi.muni.cz/fireprotweb/?action=calculation&job=dskrsn&>),这三种生物信息软件预测结果如表2所示。

[0063] 根据预测分析结果挑选目标突变位点,选择的依据是必须至少两个生物信息学软件预测相同的突变体。最终确定进行突变实验的位点有9个,分别为S9T、G34P、T43S、S68F、H97P、S122F、F158T、K235G和D261P。

[0064] 表2 不同生物信息学软件预测分析结果

位点	原始氨基酸	PROSS 预测突变位点	Consensus Finder 预测突变位点	Fireprot 预测突变位点
2	S	D	T	N
5	C	W	V	F
9	S	T	T	T
18	A	D	G	S
28	A	F	N	P
34	G	P	P	P
40	A	Q	S	W
43	T	A	S	S
57	N	V	Y	F
68	S	F	F	Q
88	N	D	P	S
97	H	P	P	C
112	G	C	S	Q
122	S	P	F	F
141	A	G	W	N
158	F	T	S	T
186	G	N	P	S
206	N	Q	E	A
235	K	G	W	G
244	A	S	P	H
261	D	P	S	P
292	G	H	K	L

[0066] 通过定点突变构建不同突变体 (S9T、G34P、T43S、S68F、H97P、S122F、F158T、K235G 和D261P) 所对应的表达载体。根据不同单点突变体设计相应的扩增引物。引物序列分别为 S9T-fw和S9T-rev; G34P-fw和G34P-rev; T43S-fw和T43S-rev; S68F-fw和S68F-rev; H97P-fw和H97P-rev; S122F-fw和S122F-rev; F158T-fw和F158T-rev; K235G-fw和K235G-rev; D261P-fw和D261P-rev。

[0067] 不同突变体对应的表达载体的构建以及筛选方法大致如下 (以S9T为例): (1) 以表达载体pPICZ α -PL31Pt为模板, 以引物S9T-fw和S9T-rev, 进行PCR扩增, PCR扩增体系如表3所示, 扩增条件为: 98°C, 预变性15s; 98°C变性5s, 54°C退火20s, 72°C延伸30s, 扩增30个循环; (2) 将扩增好的产物用限制性内切酶DpnI进行酶解5小时, 从而分解掉模板pPICZ α -PL31Pt (模板的存在会导致转化大肠的时候出现很多假阳性); (3) 将酶解后的产物采用热

激法转入大肠杆菌Top10; (4) 大肠转化子的筛选采用菌液PCR法, 首先将重组转化子分别以单菌落的形式挑入LB培养基, 200rpm, 37°C培养4h后, 取2 μ L菌液作为模板, 用引物(5' AOX-fw: GACTGGTTCCAATTGACAAGC和3' AOX-rev: GGCACCTGGCATTCTGACAT CC)进行PCR扩增, 扩增体系参照表3, 将扩增引物换成5' AOX-fw和3' AOX, 扩增模板换成重组转化子菌液, 扩增条件为94°C, 预变性60s; 94°C变性10s, 50°C退火30s, 72°C延伸60s, 扩增33个循环, 将验证正确的产物进行测序, 根据测序结果确定突变位点。

[0068] 表3 基因扩增反应体系

试剂	体积 (μ L)
Q5 高保真 Taq 酶 MIX	25
引物 S9T-fw	0.5
引物 S9T-rev	0.5
pPICZ α A-PL31Pt	2
灭菌水	22
总计	50

[0070] 通过实验最终获得不同单点突变体表达载体, 分别为: pPICZ α A-1 (对应S9T)、pPICZ α A-2 (对应G34P)、pPICZ α A-3 (对应T43S)、pPICZ α A-4 (对应S68F)、pPICZ α A-5 (对应H97P)、pPICZ α A-6 (对应S122F)、pPICZ α A-7 (对应F158T)、pPICZ α A-8 (对应K235G)和pPICZ α A-9 (对应D261P)。

[0071] 将构建好的突变体表达载体转入毕赤酵母X33, 重组毕赤酵母的培养过程和实施例1一致。将不同突变体的发酵酶液进行热稳定性测定, 从而判断是否是有效突变体。热稳定性测试方法如下: 将稀释好的酶液在60°C水浴保温30min后进行残留酶活测定, 以没有热处理的样品作为对照。

[0072] 不同单点突变体热稳定性结果如表4所示, 由表4可知, 突变体G34P、H97P、S122F和D261P能够提升热稳定性, 在60°C水浴保温30min后, 剩余酶活分别为45.6%、51.3%、48.3%和62.1%, 分别是出发模板PL31Pt的1.25倍、1.40倍、1.33倍和1.71倍。

[0073] 表4 单点突变热稳定性

[0074]

样品	剩余酶活 (%)
PL31Pt	36.3
S9T	37.6
G34P	45.6
T43S	38.1
S68F	32.6
H97P	51.3
S122F	48.3
F158T	34.8
K235G	30.6
D261P	62.1

[0075] 实施例4 组合突变进一步提升热稳定性

[0076] 以实施例3获得的4个有效突变体G34P、H97P、S122F和D261P为基础,进行组合突变进一步提升热稳定性。由于在实施例3中突变体D261P提升效果最明显,因此以其为模板构建双突变体D261P-G34P、D261P-H97P和D261P-S122F。双突变体的构建过程和实施例3中单点突变体一致。双突变体D261P-G34P的构建过程如下:以突变体D261P对应的表达载体pPICZ α -9为模板,通过G34P-fw和G34P-rev进行扩增,扩增好的产物用DpnI进行酶解,酶解后的产物转入大肠杆菌Top10,通过菌液PCR以及测序确定双突变体D261P-G34P所对应的表达载体是否构建成功。通过实验最终获得不同双突变体所对应的表达载体pPICZ α -9-2(对应突变体D261P-G34P)、pPICZ α -9-5(对应突变体D261P-H97P)和pPICZ α -9-6(对应突变体D261P-S122F)。

[0077] 将构建好的双突变体表达载体分别转入毕赤酵母X33,重组毕赤酵母的培养过程和实施例1一致。将不同双突变体的发酵酶液进行热稳定性测定,从而判断是否是有效突变体。热稳定性测试方法如下:将稀释好的酶液在60°C水浴保温30分钟后进行残留酶活测定,以没有热处理的样品作为对照。

[0078] 不同双突变体热稳定性结果如表5所示,由表5可知,双突变体D261P-G34P热稳定性提升不明显。其他两个双突变体D261P-H97P和D261P-S122F,在60°C水浴保温30分钟后,剩余酶活分别为80.2%和73.6%,分别是出发模板D261P的1.29倍和1.18倍。

[0079] 表5 单点突变热稳定性

[0080]

样品	剩余酶活 (%)
PL31Pt	36.4
D261P	62.2
D261P-G34P	63.1
D261P-H97P	80.2
D261P-S122F	73.6

[0081] 在双突变的基础上,进行多点组合突变,多组合突变体包括D261P-H97P- G34P、D261P-H97P-S122F和D261P-H97P-G34P-S122F。多点组合突变的构建过程和实施例3中单点突变体一致。通过实验最终获得不同多组合突变体所对应的表达载体pPICZ α A-9-5-2(对应D261P-H97P-G34P)、pPICZ α A-9-5-6(对应D261P-H97P-S122F)和pPICZ α A-9-5-2-6(对应D261P-H97P-G34P-S122F)。

[0082] 将构建好的多组合突变体表达载体分别转入毕赤酵母X33,重组毕赤酵母的培养过程和实施例1一致。将不同多组合突变体的发酵酶液进行热稳定性测定,热稳定性测试方法如下:将稀释好的酶液在60°C水浴保温30min后进行残留酶活测定,以没有热处理的样品作为对照。

[0083] 不同组合突变体热稳定性结果如表6所示,由表6可知,组合突变体D261P-H97P-S122F提升效果最好,在60°C水浴保温30分钟后,剩余酶活为91.2%,分别是PL31Pt、D261P和D261P-H97P的2.51倍、1.47倍和1.14倍。为了便于书写将组合突变体D261P-H97P-S122F命名为PL31PtM,其对应的表达载体pPICZ α A-9-5-6命名为pPICZ α A-PL31PtM。

[0084] 表6 单点突变热稳定性

[0085]

样品	剩余酶活 (%)
PL31Pt	36.4
D261P	62.2
D261P-H97P	80.2
D261P-H97P-G34P	82.1
D261P-H97P-S122F	91.2
D261P-H97P-G34P-S122F	86.5

[0086] 实施例5、突变体PL31PtM分离纯化及特性测定

[0087] 突变体PL31PtM分离纯化参照实施例2提供的方法进行。通过实验获得纯化后重组PL31PtM。对重组PL31PtM进行酶学特性测定(包括酶反应动力学参数、温度特性、pH特性和金属离子稳定性),整个实验过程以PL31Pt作为对照。

[0088] 参照实施例2相同的实验方法测定突变体PL31PtM酶反应动力学参数,测定结果如表7所示。相比于出发模板PL31Pt,突变体PL31PtM酶反应动力学参数均得到一定的提升,使

其具有更好的催化效率,从而在下游应用领域具有更强的竞争力。

[0089] 表7 突变体PL31PtM酶反应动力学参数

酶动力学参数	PL31PtM	PL31Pt
酶比活 (U/mg)	1321	1152
米氏常数 K_m (mg/mL)	1.03	1.23
最大反应速度 V_{max} ($\mu\text{M}/\text{min}/\text{mg}$)	2106	1906.8

[0091] 突变体PL31PtM温度特性测定包括最适反应温度和热稳定性,参照实施例2相同的实验方法测定突变体PL31PtM最适反应温度,整个实验过程以PL31Pt为对照。实验结果如图3A所示。突变体PL31PtM最适反应温度为60°C,相比于PL31Pt,最适反应温度提升10°C,此外突变体PL31PtM在高温条件下具有更好的酶活性。

[0092] 突变体PL31PtM热稳定性测定如下:分别将突变体PL31PtM在40°C-70°C不同温度下水浴处理30min,测定剩余酶活,将没有处理样品的酶活设置为100%,整个实验过程以PL31Pt为对照,实验结果如图3B所示。相比于出发模板PL31Pt,突变体PL31PtM热稳定性得到有效提升,在60°C和70°C条件下水浴处理60min后,突变体PL31PtM剩余酶活分别为91.2%和65.3%,分别是出发模板PL31Pt的2.53倍和5.41倍。

[0093] 突变体PL31PtM最适反应pH测定参照实施例2相同的实验方法进行,整个实验过程以PL31Pt为对照。通过实验测定,突变体PL31PtM最适反应pH和出发模板PL31Pt相似,最适反应pH均为7.0,在pH6.0至9.0范围内具有良好的水解活性。pH特性测定结果表明,突变体PL31PtM温度提升并没有改变其pH特性。

[0094] 参照实施例2相同的实验方法测定突变体PL31PtM的pH稳定性,整个实验过程以PL31Pt为对照。通过实验测定,突变体PL31PtM在pH5.0至9.0放置4小时后具有很好的稳定性,所有样品的剩余酶活均大于90%。

[0095] 参照实施例2相同的实验方法测定不同金属离子(1 mM)对突变体PL31PtM稳定性影响,整个实验过程以PL31Pt为对照,实验结果如表8所示。由表8可知,金属离子 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^+ 和 Mg^{2+} 对突变体PL31PtM具有激活作用,剩余酶活均大于100%;金属离子 Mn^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对突变体PL31PtM具有抑制作用。

[0096] 表8不同金属离子对重组PL31PtM稳定性影响

金属离子	Na^+	K^+	Ca^+	Mg^{2+}	Mn^{2+}	Cu^{2+}	Zn^{2+}
PL31Pt	140%	135%	121%	172%	58%	34%	71%
PL31PtM	146%	133%	127%	168%	65%	32%	69%

[0098] 实施例6 突变体PL31PtM高效制备

[0099] 本部分以毕赤酵母为宿主,通过构建高拷贝重组工程菌以及高密度发酵实现突变体PL31PtM的高效制备。前期报道的许多文献表明,目标基因的拷贝数和固体平板zeocin浓度呈正相关。因此本部分通过提高YPDZ固体平板zeocin的浓度筛选高拷贝重组工程菌。参照实施例1相同的实验方法构建重组毕赤酵母工程菌,将转化子涂布于zeocin浓度为400

mg/L固体平板。通过筛选,获得一个酶活优势菌,命名为X33-PtM。

[0100] 以筛选到的酶活优势菌X33-PtM为研究对象,在7 L发酵罐中进行高密度发酵。实验过程大致如下:将单菌落工程菌接入含有50 mL YPG培养基的250mL的三角瓶中,30°C,200rpm振荡过夜培养。再将过夜培养的重组酵母工程菌按1%(v/v)的接种量接入含有100mL YPG培养基的500 mL 三角瓶中,30°C,200rpm振荡过夜培养,至OD₆₀₀大于10。将二次过夜培养的重组酵母工程菌按10%(v/v)的接种量接入含有3L BSM培养基的7L发酵罐。重组酵母工程菌在7L发酵罐的培养条件为:温度为30 °C、pH值5.0、搅拌速度为500rpm、空气流量为40L/min。培养初期,以甘油作为碳源供菌体生长。当菌体湿重达到一定的量(180 g/L左右),停止流加甘油,待甘油被菌体吸收完后(溶氧迅速上升)开始用甲醇诱导。甲醇的添加量根据溶氧进行调整(发酵过程中溶解氧不低于10%)。培养过程中,每24h取样测定酶活。

[0101] 重组工程菌X33-PtM高密度发酵结果如图4所示。由图4A可知,随着发酵时间的增加,褐藻胶裂解酶活性逐渐增加,当诱导培养至168小时,X33-PtM发酵酶活达到1725 U/mL。此外由图4B蛋白电泳分析结果可知,上清发酵液蛋白条带单一,表明上清液中基本为突变体PL31PtM,此外蛋白电泳显示突变体PL31PtM的分子量约为47kDa,大于实施例1中预测的理论分子量,表明突变体PL31PtM在毕赤酵母重组表达过程中,存在着糖基化修饰。

[0102] 实施例7突变体PL31PtM酶法制备褐藻胶寡糖

[0103] 以海藻酸钠为底物,通过突变体PL31PtM酶法制备褐藻胶寡糖。首先进行工艺优化,包括底物浓度(1%至3%,m/v)、反应时间(1小时至4小时)和酶添加量(2U/mL、4 U/mL和6 U/mL)。实验过程大致如下:(1)总反应体系是50mL,根据实验需求加入不同浓度的海藻酸钠和酶液,反应条件为60°C、pH7.0,转速150rpm,根据实验需求分别在不同时间进行水解实验;(2)将水解后的反应液10°C离心30min,取上清;(3)将获得上清通过0.22微米滤膜过滤,将过滤后的液体,冷冻干燥,最终获得褐藻胶寡糖样品。

[0104] 水解率计算公式如下:水解率=(褐藻胶寡糖样品/初始海藻酸钠重量)100%

[0105] 不同底物浓度优化过程如下:海藻酸钠含量分别设置为1%、2%和3%,酶添加量为4U/mL,反应温度为60°C,反应pH为7.0,150rpm,反应时间为2小时。实验结果如图5A所示,由图5A可知,底物含量越高,水解率越低,1%、2%和3%底物含量所对应的水解率分别为75.2%、65.8%和42.6%。综合考虑分析,最终选择底物含量为2%进行下一步的实验。

[0106] 在底物含量实验结果基础上进行酶添加量的优化,酶添加量分别设置为2U/mL、4 U/mL和6 U/mL。底物含量2%,反应温度为60°C,反应pH为7.0,150rpm,反应时间为2小时,实验结果如图5B所示。由图5B可知,随着酶添加量的增加,水解率逐渐增加,酶添加量2U/mL、4 U/mL和6 U/mL的水解率分别为55.6%、65.9%和78.6%。最终选择酶添加量为6U/mL进行下一步实验。

[0107] 在底物含量和用酶量的基础上进行反应时间优化,反应时间设置为1小时、2小时、3小时和4小时。底物含量2%,酶添加量6U/mL,反应pH7.0,反应温度为60°C,150rpm,实验结果如图5C所示。由图5C可知,反应4小时效果最好,水解率为90.1%,其次为3小时,水解率为87.2%。综合考虑最终水解时间设定为3小时。

[0108] 通过反应底物浓度、酶添加量以及反应时间的优化,最终确定酶解最佳工艺条件为:底物浓度2%、酶添加量6U/mL、反应时间3小时、反应温度为60°C,反应pH为7.0,转速

150rpm。

[0109] 在最佳工艺的条件下,将水解反应体系扩大至5升,反应在7升反应罐进行,过程如下:(1)称取100g海藻酸钠置于7升反应罐,加入5升0.1mol/L的pH7.0磷酸缓冲液,将转速设置为150rpm,温度为60°C,搅拌至海藻酸钠溶解成胶体状;(2)加入18mL酶液(总酶活约为30000U)至7升反应罐进行反应;(3)当反应时间达到3小时,将反应温度提升至90°C,将突变体PL31PtM失活,停止反应,并将水解液转移至5升烧杯;(4)参照工艺优化过程的方法,将水解液离心,过滤、冻干。

[0110] 通过实验以及分析,在最佳工艺条件下,5L反应体系的水解率达到89.1%。

[0111] 最后,需要说明的是,上述实施例仅例示性说明本发明的原理、性能及功效,而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下,对上述实施例进行修饰或改变。因此,举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变,仍应由本发明的权利要求所涵盖。

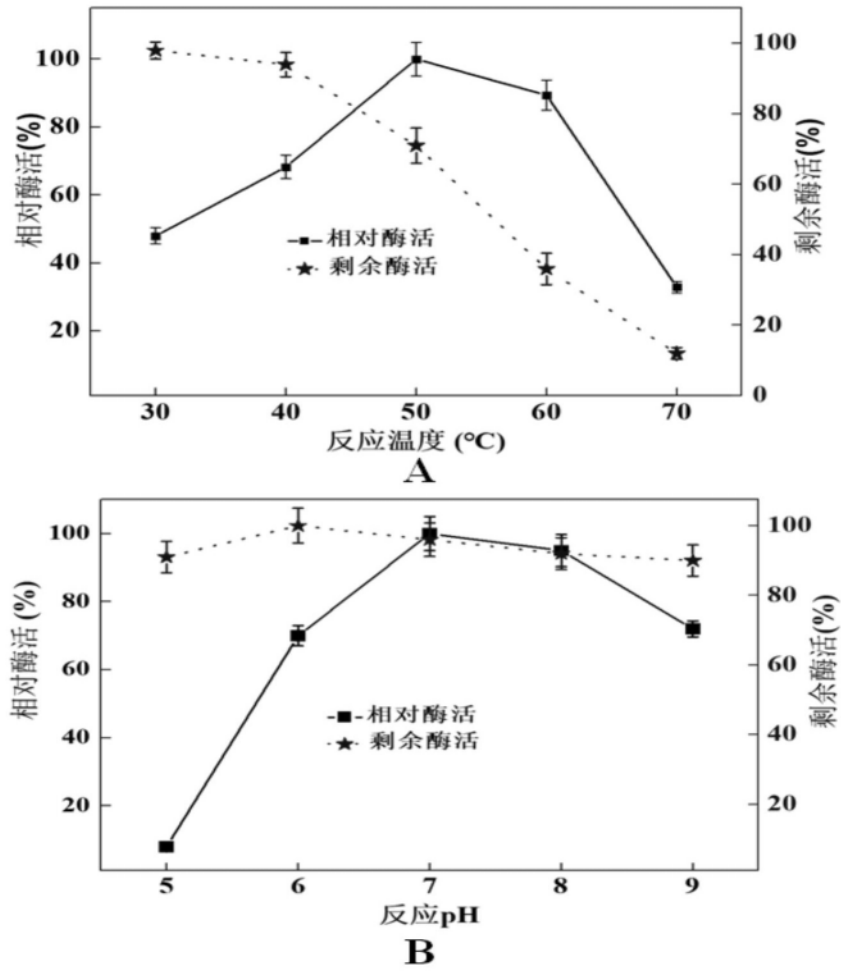


图1

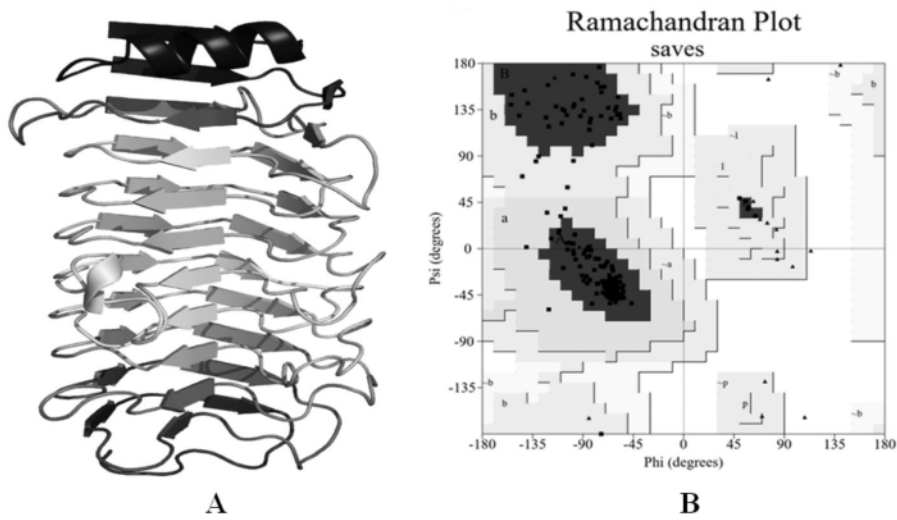


图2

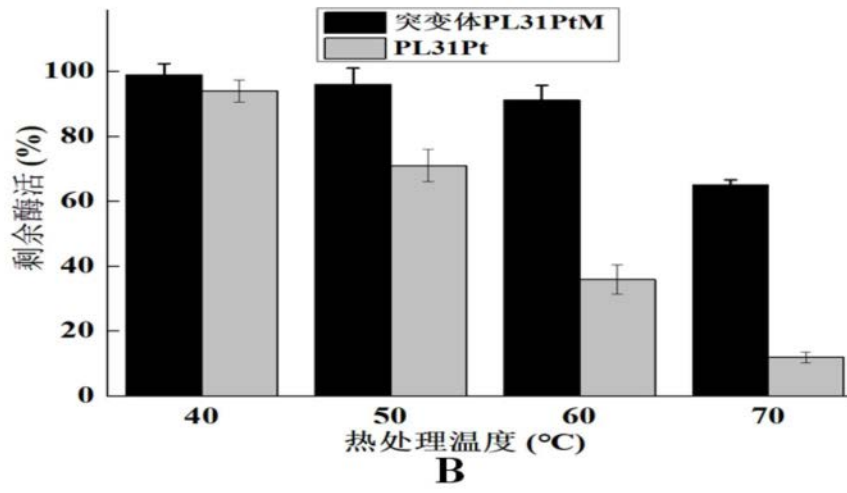
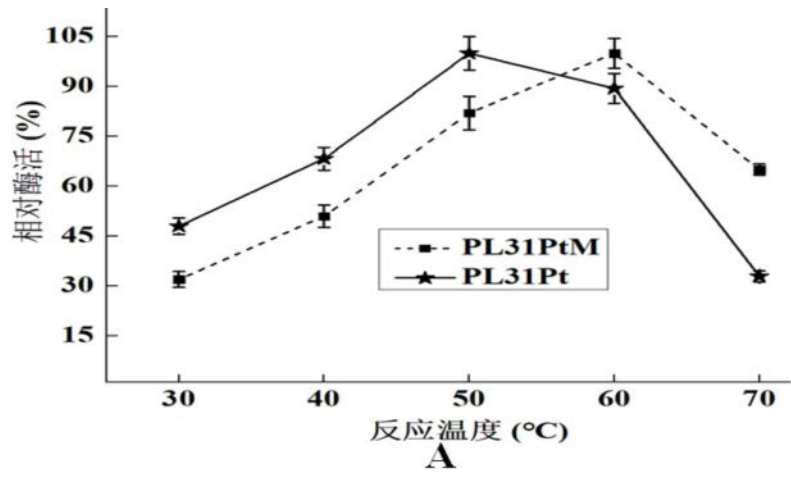


图3

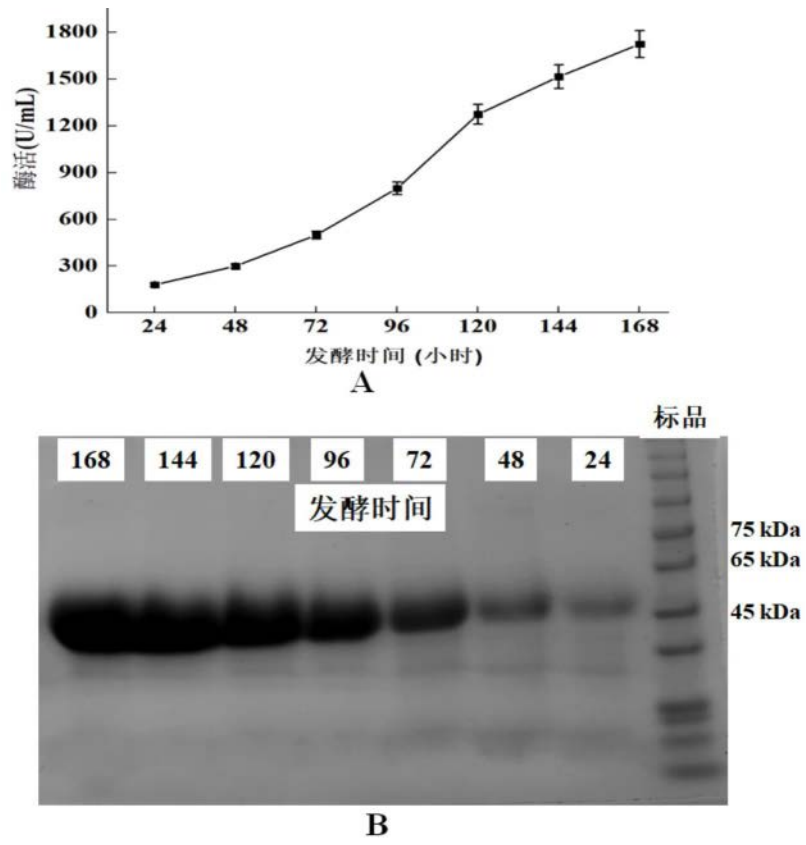


图4

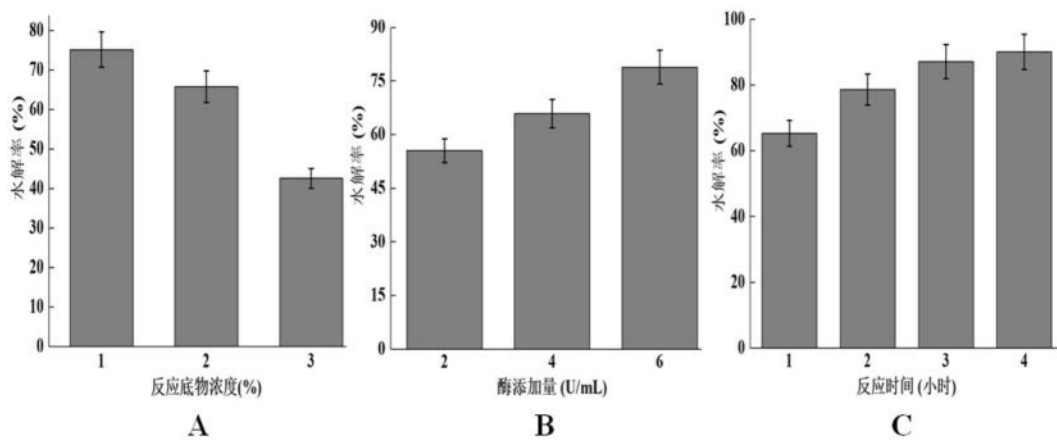


图5