

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022 年 3 月 3 日 (03.03.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/041397 A1

(51) 国际专利分类号:
C12N 9/18 (2006.01) *C12P 7/42* (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01) *A23K 10/18* (2016.01)
C12N 15/75 (2006.01) *D21C 5/00* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) *C12R 1/07* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/119269

(22) 国际申请日: 2020 年 9 月 30 日 (30.09.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202010900348.1 2020年8月31日 (31.08.2020) CN
202010898408.0 2020年8月31日 (31.08.2020) CN
202011048393.5 2020年9月29日 (29.09.2020) CN

(71) 申请人: 江南大学(JIANGNAN UNIVERSITY) [CN/
CN]; 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖大道
1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(72) 发明人: 张涛(ZHANG, Tao); 中国江苏省无锡市
滨湖区蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。
江波(JIANG, Bo); 中国江苏省无锡市滨湖区
蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。 段晓
莉(DUAN, Xiaoli); 中国江苏省无锡市滨湖区
蠡湖大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。 缪铭

(MIAO, Ming); 中国江苏省无锡市滨湖区蠡湖
大道1800号, Jiangsu 214122 (CN)。

(74) 代理人: 哈尔滨市阳光惠远知识产权代
理有限公司(HARBIN SHINEIP INTELLECTUAL
PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国黑龙江省
哈尔滨市松北区科技一街99号18栋E区501
张勇, Heilongjiang 150028 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU,
CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT,
JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK,
LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,
MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL,
PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL,
ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US,
UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区
保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,
NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM,
AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG,
CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,
IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT,

(54) Title: FERULOYL ESTERASE AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种阿魏酸酯酶及其应用

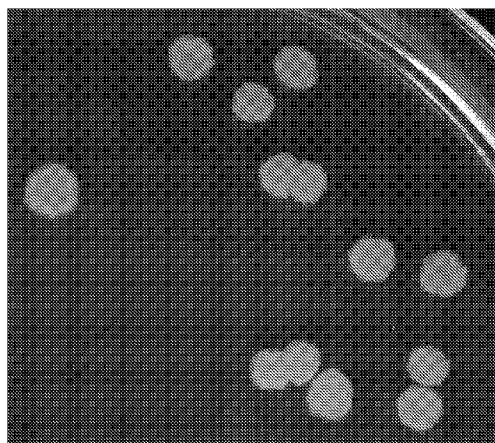


图 1

(57) Abstract: Feruloyl esterase and an application thereof. The feruloyl esterase has an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO. 2, and the feruloyl esterase represents a specific enzyme activity of up to 519 U/g. A recombinant *Bacillus subtilis* takes *Bacillus subtilis* as a host to express a gene encoding the feruloyl esterase having an amino acid sequence as shown in SEQ ID NO. 2. The recombinant *Bacillus subtilis* is inoculated into a fermentation medium for fermentation for 14 h, so that the feruloyl esterase in a cell disruption supernatant has an enzyme activity of up to 82.53 U/mL.

(57) 摘要: 一种阿魏酸酯酶及其应用, 该阿魏酸酯酶的氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示, 此阿魏酸酯酶的比酶活高达519U/g。一株重组枯草芽孢杆菌, 以枯草芽孢杆菌为宿主, 表达编码氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示的阿魏酸酯酶的基因, 将此重组枯草芽孢杆菌接种至发酵培养基中进行发酵, 发酵14h, 细胞破碎上清液中阿魏酸酯酶的酶活高达82.53U/mL。

RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布：

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二.4(d)(i)和48.2(a)(viii))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

一种阿魏酸酯酶及其应用

技术领域

本发明涉及一种阿魏酸酯酶及其应用，属于微生物技术领域。

背景技术

阿魏酸（Ferulic acid, FA）广泛存在于植物细胞壁中，与多糖、纤维素、木质素通过酯键或醚键的形式连接构成细胞壁中复杂的网状骨架结构，以维持细胞壁的完整性，同时降低生物分解率。

阿魏酸是世界上公认的安全抗氧化剂，在日本、美国等国家被列入食品添加剂中。此外，阿魏酸还具有紫外吸收、抗菌消炎、防癌降血脂等作用，在医药、化妆品、造纸等领域均有广泛的应用前景。

目前，生产阿魏酸的方法主要有植物提取法、化学合成法以及生物酶法。其中，植物提取法主要是通过酸碱水解的方式从当归、黄连、米糠、麦麸等植物中提取分离天然阿魏酸，但是，由于酸碱水解法会引起细胞壁中其他化学成分的改变，因此，使用此方法生产阿魏酸会破坏植物内其他高价值化学成分，同时，由于酸碱水解法生产阿魏酸的副产物多，产物分离困难，并且，使用此方法生产阿魏酸能耗大、污染环境。化学合成法主要是以香草醛为原料通过一系列有机反应生产阿魏酸，但是，由于产物中掺杂顺式阿魏酸，使用此方法生产阿魏酸会使分离成本增加，并且，使用此方法生产得到的阿魏酸无法直接作为医药原料使用，另外，使用此方法生产阿魏酸还具有反应时间长、对环境污染严重等缺陷。

生物酶法主要是通过将阿魏酸酯酶（Feruloyl esterase, Ferulic acid esterase, FAE, E.C.3.1.1.73）添加至含有阿魏酸酯类化合物的反应体系中进行反应以生产阿魏酸，与生物提取法、酸碱水解法以及化学合成法相比，使用生物酶法生产阿魏酸具有反应条件温和、专一性高、对环境友好等优点，这些优点使得生物酶法成为生产阿魏酸的研究热点。但是，由于现有的阿魏酸酯酶比酶活较低，例如，文献“曹艳, 夏其乐, 陈剑兵, 等. 1 株阿魏酸酯酶产生菌的筛选鉴定及发酵条件优化[J]. 微生物学杂志, 2019, (5): 8-15.”中，来源于溜曲霉的阿魏酸酯酶的比酶活仅有 231.34 U/g，这大大限制了使用生物酶法生产阿魏酸的工业化进程。

因此，急需找到一种比酶活高的阿魏酸酯酶。

发明内容

[技术问题]

本发明要解决的技术问题是提供一种比酶活高的阿魏酸酯酶（Feruloyl esterase, Ferulic

acid esterase, FAE, E.C.3.1.1.73)。

[技术方案]

为解决上述问题，本发明提供了一种阿魏酸酯酶，所述阿魏酸酯酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

本发明还提供了一种基因，所述基因编码上述阿魏酸酯酶。

在本发明的一种实施方式中，所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

本发明还提供了一种重组质粒，所述重组质粒携带上述基因。

在本发明的一种实施方式中，所述重组质粒的表达载体为 pMA5 质粒或 pUB 质粒。

本发明还提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞携带上述基因或上述重组质粒。

在本发明的一种实施方式中，所述宿主细胞为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 或枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。

在本发明的一种实施方式中，所述枯草芽孢杆菌为枯草芽孢杆菌 168、枯草芽孢杆菌 WB800、枯草芽孢杆菌 WB600 或枯草芽孢杆菌 1A751。

本发明还提供了一种生产阿魏酸酯酶的方法，所述方法为先将上述宿主细胞接种至发酵培养基中进行发酵，得到发酵液，然后从发酵液中分离得到阿魏酸酯酶。

本发明还提供了上述宿主细胞或上述生产阿魏酸酯酶的方法在生产阿魏酸酯酶中的应用。

本发明还提供了一种生产阿魏酸的方法，所述方法为先将上述阿魏酸酯酶添加至含有阿魏酸酯类化合物的反应体系中进行反应，得到反应液，然后从反应液中分离得到阿魏酸；

或者，所述方法为先将上述宿主细胞接种至发酵培养基中进行发酵，得到发酵液，然后从发酵液中分离得到阿魏酸酯酶，再将阿魏酸酯酶添加至含有阿魏酸酯类化合物的反应体系中进行反应，得到反应液，最后从反应液中分离得到阿魏酸；

或者，所述方法为先将上述宿主细胞接种至发酵培养基中进行发酵，得到发酵液，然后将发酵液添加至含有阿魏酸酯类化合物的反应体系中进行反应，得到反应液，最后从反应液中分离得到阿魏酸。

在本发明的一种实施方式中，所述阿魏酸酯类化合物为阿魏酸甲酯或阿魏酸乙酯。

在本发明的一种实施方式中，所述反应的温度为 30~90°C、时间为 10~30 min。

本发明还提供了上述阿魏酸酯酶或上述基因或上述重组质粒或上述宿主细胞或上述方法在生产阿魏酸、水解木质纤维素、制备饲料以及造纸中的应用。

有益效果：

(1) 本发明提供了一种氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示的阿魏酸酯酶, 此阿魏酸酯酶的比酶活高达 519 U/g, 因此, 此阿魏酸酯酶在生产阿魏酸中具有巨大的应用前景。

(2) 本发明提供了一株重组枯草芽孢杆菌, 此重组枯草芽孢杆菌以枯草芽孢杆菌为宿主, 表达编码氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示的阿魏酸酯酶的基因, 此重组枯草芽孢杆菌可高产阿魏酸酯酶, 具体体现在: 将此重组枯草芽孢杆菌接种至发酵培养基中进行发酵, 发酵 14 h, 即可使细胞破碎上清液中阿魏酸酯酶的酶活高达 82.53 U/mL, 因此, 此重组枯草芽孢杆菌在生产阿魏酸酯酶以及阿魏酸中具有巨大的应用前景。

生物材料保藏

一株短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) SK52.001, 分类学命名为 *Bacillus pumilus*, 已于 2020 年 8 月 14 日保藏于中国典藏培养物保藏中心, 保藏编号为 CCTCC NO: M 2020421, 保藏地址为中国武汉, 武汉大学。

附图说明

图 1: 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) SK52.001 的菌落形态。

图 2: 短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) SK52.001 的菌体形态。

图 3: 阿魏酸标准品的高效液相色谱图。

图 4: 阿魏酸甲酯标准品的高效液相色谱图。

图 5: 反应液的高效液相色谱图。

图 6: 反应液的 LC-MS 图。

图 7: 蛋白浓度标准曲线。

图 8: 反应液中阿魏酸的产量。

具体实施方式

下述实施例中涉及的阿魏酸标准品购自北京百灵威科技有限公司; 下述实施例中涉及的阿魏酸甲酯购自阿法埃莎(中国)化学有限公司; 下述实施例中涉及的牛白蛋白和考马斯亮蓝 G-250 购自上海国药集团化学试剂有限公司; 下述实施例中涉及的 pMA5 质粒购自优宝生物; 下述实施例中涉及的大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 购自通用生物技术有限公司; 下述实施例中涉及的枯草芽孢杆菌 WB800 购自 NTCC 典型培养物保藏中心; 下述实施例中涉及的溶菌酶购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 下述实施例中涉及的三(羟甲基)氨基甲烷 (Tris) 和乙二胺四乙酸二钠二水合物购自上海麦克林生化科技有限公司

下述实施例中涉及的培养基如下:

菌株分离培养基: 马铃薯 200 g/L、蔗糖 20 g/L、琼脂 15 g/L, pH 自然。

筛选固体培养基：使用 0.22 μm 的滤膜过滤含有 100 mg/L 阿魏酸乙酯的 N,N-二甲基甲酰胺溶液，得到阿魏酸乙酯溶液；将经灭菌的基础培养基冷却至 60°C 后，向基础培养基中添加 10% (v/v) 的阿魏酸乙酯溶液，摇匀至呈均匀的乳白色溶液；

其中，基础培养基：NaNO₃ 2 g/L、K₂HPO₄·3H₂O 1 g/L、KCl 0.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L、琼脂 15 g/L，pH 自然。

种子培养基：马铃薯 200 g/L、蔗糖 20 g/L，pH 自然。

基础发酵培养基：麦麸 20 g/L、NaNO₃ 2 g/L、K₂HPO₄·3H₂O 1 g/L、KCl 0.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L，pH 自然。

LB 液体培养基：胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L，pH 自然。

LB 固体培养基：胰蛋白胨 10 g/L、酵母提取物 5 g/L、氯化钠 10 g/L、琼脂粉 15 g/L。

Super Rich 培养基：胰蛋白胨 25 g/L、酵母提取物 20 g/L、磷酸氢二钾 3.0 g/L、葡萄糖 30 g/L，pH 自然。

下述实施例中涉及的溶液如下：

裂解液：Tris 6.057 g/L，NaCl 5.844 g/L，盐酸调 pH 8.0，定容至 1 L。

透析液：Tris 6.057 g/L，盐酸调 pH 8.0，定容至 1 L。

实施例 1：短小芽孢杆菌 SK52.001 的获取

具体步骤如下：

1、短小芽孢杆菌 SK52.001 的分离纯化

以来源于江苏省无锡市贡湖湾湿地地区的土壤为样本，取 1.0 g 样本放入 10 mL 装入玻璃珠的无菌水中，于 30°C，200 r/min 摇床振荡 30 min，使菌体充分分离，得到混合菌液；吸取 0.5 mL 混合菌液在无菌环境下加入装有 4.5 mL 生理盐水的 10 mL 离心管中，得到 10⁻¹ 稀释液，重复上述稀释步骤，依次得到 10⁻²、10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释液；分别吸取 100 μL 稀释梯度为 10⁻³、10⁻⁴、10⁻⁵、10⁻⁶ 稀释液涂布于菌株分离培养基上，于 30°C 恒温培养箱中倒置培养 24~48 h，得到稀释涂布平板；挑取稀释涂布平板上的单菌落在筛选固体培养基上划线，于 30°C 恒温培养箱中倒置培养 24 h，得到单菌落；观察单菌落周围是否有透明圈出现，筛选周围有透明圈的单菌落；此次共筛得一个单菌落，将与此单菌落对应的菌株命名为 SK52.001。

2、短小芽孢杆菌 SK52.001 的鉴定

提取菌株 SK52.001 的基因组，将菌株 SK52.001 的 16S rDNA 进行扩增和测序（由天一辉远生物科技有限公司完成），将测序分析得到的菌株 SK52.001 的 16S rDNA 序列（SK52.001 的 16S rDNA 序列如 SEQ ID NO.1 所示）在 GenBank 中进行比对，结果显示此菌株确为短小

芽孢杆菌，命名为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) SK52.001。

3、短小芽孢杆菌 SK52.001 的观察

蘸取短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) SK52.001 的菌液在 LB 固体培养基上划线，于 30°C 恒温培养箱倒置培养 12 h，得到单菌落；挑取单菌落接种至 LB 液体培养基中于 30°C、200 r/min 的摇床上培养 12 h，得到菌液；将菌液用无菌水稀释 100 倍后涂布于 LB 固体培养基上，于 30°C 培养箱中培养 18 h 后观察到菌落形态（菌落形态见图 1）；将菌液用无菌水稀释 20 倍后在光学显微镜下观察到菌体形态（菌体形态见图 2）。

由图 1 可知，短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) SK52.001 的菌落形态为：圆形，较薄，中间呈浅黄色，边缘微白，表面黏稠湿润，边缘凹凸不整齐。

由图 2 可知，短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) SK52.001 的菌体形态为：短杆状，两端钝圆，具有典型的芽孢杆菌的形态特征，属于革兰氏阳性菌。

实施例 2：阿魏酸酯酶的生产

具体步骤如下：

挑取实施例 1 获得的短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) SK52.001 的单菌落接种至种子培养基中，于 30°C、200 r/min 的摇床中培养 18 h，得到种子液；将种子液按照 5% (v/v) 的接种量接种至基础发酵培养基中，于 30°C、200 r/min 的摇床中发酵 26 h，得到发酵液。

将发酵液于 4°C、10000 rpm 下离心 10 min，获得粗酶液；测定粗酶液中阿魏酸酯酶的酶活，测定方法如下：

将 250 μ L 粗酶液添加至 750 μ L 浓度为 0.003 mol/L 的阿魏酸甲酯溶液（阿魏酸甲酯溶液是通过将阿魏酸甲酯溶于 pH 为 8.0、浓度为 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中获得的），得到酶反应体系；将酶反应体系于 50°C 水浴锅中反应 30 min 后，先用沸水灭酶 10 min，然后经 0.22 μ m 膜过滤，得到反应液；以灭酶后的粗酶液为空白对照，采用 HPLC 法（高效液相色谱法）测定反应液中阿魏酸浓度；将阿魏酸浓度代入阿魏酸酯酶活力计算公式中，得到粗酶液中阿魏酸酯酶的酶活；

其中，阿魏酸酯酶酶活的定义为：在 50°C 下，每分钟分解阿魏酸甲酯生成 1 μ mol 阿魏酸所需要的酶量为 1 个酶活力单位 (1 U)；

阿魏酸酯酶活力计算公式如下：

$$\text{阿魏酸酯酶活力} = \frac{\text{稀释倍数} \times \text{阿魏酸浓度} \times \text{反应体系体积}}{\text{反应时间} \times \text{阿魏酸相对分子质量} \times \text{加酶液体积}};$$

阿魏酸标准品的高效液相色谱图见图 3，阿魏酸甲酯标准品的高效液相色谱图见图 4，反

应液的高效液相色谱图见图 5，阿魏酸浓度根据高效液相色谱图中的峰面积 Y 与阿魏酸浓度 X 之间的线性关系 $Y=52514X-80.417$ ($R^2=0.9996$) 计算而得；

HPLC 法采用 Agilent 1 200 型高效液相色谱仪；色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent, 4.6 mm×150 mm, 3.5 μm)；紫外检测器；流动相 A: 1% (v/v) 的乙酸溶液，流动相 B: 甲醇；流速 1 mL/min；柱温 30℃；检测波长 320 nm，梯度洗脱程序如表 1 所示。

检测结果为：粗酶液中阿魏酸酯酶的酶活为 195 U/L。

为进一步证明短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) SK52.001 可产阿魏酸酯酶，将反应液 LC-MS 分析（分析结果见图 6）。

由图 6 可知，产物峰相对丰度最高的碎片 $m/z=193$ ，而目标产物的相对分子质量为 194，与阿魏酸单体的相对分子量一致。

表 1 洗脱程序

时间/min	A 相/%	B 相/%
0	90	10
0.23	70	30
1.66	50	50
4.97	0	100
5.57	85	15
7.52	90	10
7.60	90	10

实施例 3：阿魏酸酯酶的生产

具体步骤如下：

在实施例 1 的基础上，将基础发酵培养基分别替换为发酵培养基 A~E，得到发酵液 A~E；其中，发酵培养基 A: 小麦麸皮 45 g/L、胰蛋白胨 5 g/L、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0 g/L、KCl 0.5 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L，pH 6.0；

发酵培养基 B: 去淀粉小麦麸皮 10 g/L、 $NaNO_3$ 2 g/L、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0 g/L、KCl 0.5 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L，pH 自然；去淀粉小麦麸皮的处理方法为：用浓度为 0.3% (w/w) 的醋酸钾溶液浸泡小麦麸皮，得到混合物；将混合物在 95℃水浴 1 h 并不断搅拌后，使用去离子水反复冲洗至淀粉完全去除，于 105℃下烘干至恒重备用；

发酵培养液 C: 小麦麸皮 10 g/L、 $NaNO_3$ 2 g/L、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0 g/L、KCl 0.5 g/L、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L、 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L，pH 自然；

发酵培养液 D: 小麦麸皮 45 g/L、 $NaNO_3$ 2 g/L、 $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 1.0 g/L、KCl 0.5 g/L、

MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L，pH 自然。

发酵培养液 E：小麦麸皮 45 g/L、酵母提取物 5 g/L、K₂HPO₄·3H₂O 1.0 g/L、KCl 0.5 g/L、MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L、FeSO₄·7H₂O 0.01 g/L，pH 自然。

将发酵液 A~E 分别于 4°C、10000 rpm 下离心 10 min，获得粗酶液 A~E；测定粗酶液 A~E 中阿魏酸酯酶的酶活，测定结果为：粗酶液 A~E 中阿魏酸酯酶的酶活分别为 421 U/L、73 U/L、102 U/L、241 U/L、344 U/L。可见，使用发酵培养基 A 时，短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) SK52.001 产阿魏酸酯酶的产量最高。

实施例 4：阿魏酸酯酶的性能

具体步骤如下：

测定粗酶液 A 中阿魏酸酯酶的比酶活，测定方法如下：

称取 100 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 50 mL 90% (v/v) 乙醇中后，加入 100 mL 85% (v/v) 磷酸，并用蒸馏水定容至 1 L，得到考马斯亮蓝 G-250 染液；称取 100 mg 牛白蛋白溶解，并用蒸馏水定容至 100 mL，得到标准蛋白溶液；分别吸取 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mL 标准蛋白溶液分别加入 1.0、0.98、0.96、0.94、0.92、0.90 mL 蒸馏水中后，分别加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 染液混合均匀，得到混合液；将混合液于 25°C 下反应 2 min，得到反应液；将反应液于 595 nm 波长下测定吸光度，并绘制蛋白浓度标准曲线（标准曲线见图 7）。

取 100 μL 实施例 2 获得的粗酶液 A，用蒸馏水定容至 1 mL，得到稀释液；在稀释液中加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 染液混合均匀，得到混合液；将混合液于 25°C 下反应 2 min，得到反应液；将反应液于 595 nm 波长下测定吸光度；根据测得的吸光度和蛋白浓度标准曲线，计算得到粗酶液 A 中的蛋白浓度，并根据粗酶液 A 中的蛋白浓度，计算得到粗酶液 A 中阿魏酸酯酶的比酶活；

其中，阿魏酸酯酶的比酶活的计算公式如下：

$$\text{比酶活} = \frac{\text{粗酶液酶活力}}{\text{蛋白浓度}}。$$

检测结果为：粗酶液 A 中的蛋白浓度为 0.81 mg/mL、粗酶液 A 中阿魏酸酯酶的比酶活 519 U/g。

通过 PCR 从短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) SK52.001 基因组中扩增出阿魏酸酯酶的基因并进行测序，测序结果为：粗酶液 A 中的阿魏酸酯酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示，编码粗酶液 A 中的阿魏酸酯酶的基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

实施例 5：阿魏酸的生产

具体步骤如下：

挑取实施例 1 获得的短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) SK52.001 的单菌落接种至种子培养基中，于 30°C、200 r/min 的摇床中培养 18 h，得到种子液；将种子液按照 5% (v/v) 的接种量接种至基础发酵培养基中，于 30°C、200 r/min 的摇床中发酵 40 h，得到发酵液；发酵过程中，不断对发酵液取样；将取样的发酵液于 4°C、10000 rpm 下离心 10 min，获得粗酶液；将 250 μ L 粗酶液添加至 750 μ L 浓度为 0.003 mol/L 的阿魏酸甲酯溶液（阿魏酸甲酯溶液是通过将阿魏酸甲酯溶于 pH 为 8.0、浓度为 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中获得的），得到酶反应体系；将酶反应体系于 50°C 水浴锅中反应 30 min，得到反应液。

测定反应液中阿魏酸的产量（检测结果见图 8）；

其中，反应液中阿魏酸的产量的检测方法为：

将反应液先用沸水灭酶 10 min，然后经 0.22 μ m 膜过滤，最后以灭酶后的粗酶液为空白对照，采用 HPLC 法（高效液相色谱法）测定反应液中阿魏酸浓度；

HPLC 法采用 Agilent 1200 型高效液相色谱仪；色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C18（Agilent，4.6 mm $\times$ 150 mm，3.5 μ m）；紫外检测器；流动相 A：1% (v/v) 的乙酸溶液，流动相 B：甲醇；流速 1 mL/min；柱温 30°C；检测波长 320 nm，梯度洗脱程序如表 1 所示。

如图 8 所示，发酵 26h 粗酶液，反应 30min 后，阿魏酸常量为 280 mg/L。

实施例 6：重组枯草芽孢杆菌的构建

具体步骤如下：

以实施例 1 获得的短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) SK52.001 的基因组为模板，以 *fae-F/fae-R* 为引物，通过 PCR 扩增获得编码阿魏酸酯酶的基因（SEQ ID NO.3）；将编码阿魏酸酯酶的基因和 pMA5 质粒用同源重组酶 Exnase II 连接，得到连接产物；将连接产物转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中；将转化后的大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞涂布 LB 固体培养基（含有 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 氨苄霉素），37°C 倒置培养 24 h；挑取阳性转化子，提取质粒，测序验证，验证正确即获得重组质粒 PMA5-*fae*；将获得的重组质粒 PMA5-*fae* 转化枯草芽孢杆菌 WB800，得到转化产物；将转化产物涂布在 LB 固体培养基（含有 100 μ g $\cdot$ mL⁻¹ 卡那霉素）上，于 37°C 恒温培养箱中倒置培养 8~12 h，得到转化子；将转化子进行 PCR 验证，验证正确即获得重组枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800/ PMA5-*fae*；

其中，引物如下：

fae-F：aaaaggagcgatttacatgATGAACTTACAAGAGCAAATCAAATCGCTGC（SEQ ID NO.4）；

fae-R: gagctcgactctagaggatccTTAATGGTGATGGTGATGATGTTCAAATGCCTTT (SEQ ID NO.5)。

实施例 7：阿魏酸酯酶的生产

具体步骤如下：

将实施例 1 获得的重组枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800/ PMA5-*fae* 的转化子在 LB 固体培养基（含有 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素）上划线，于 30°C 恒温培养箱中倒置培养 12 h，得到单菌落；挑取单菌落接种至 LB 液体培养基（含有 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素），于 37°C、200 r/min 培养 12 h，得到种子液；将种子液以 3% (v/v) 的接种量转接至 Super Rich 培养基中，于 37°C、200 r/min 培养 60 h，得到发酵液。

发酵过程中，每隔一段时间对发酵液进行取样，取样量 1 mL；将发酵液于 4°C、10000 rpm 下离心 15 min，获得发酵上清液和沉淀；在沉淀中加入 1 mL 裂解液将菌体重悬，得到重悬液（全细胞）。

检测发酵不同时间获得的发酵上清液和重悬液中阿魏酸酯酶的酶活（检测结果见表 2），测定方法如下：

将 10 μL 发酵上清液或重悬液添加至 990 μL 浓度为 0.003 mol/L 的阿魏酸甲酯溶液（阿魏酸甲酯溶液是通过将阿魏酸甲酯溶于 pH 为 8.0、浓度为 0.05 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液中获得的），得到酶反应体系；将酶反应体系于 50°C 水浴锅中反应 10 min 后，先用沸水灭酶 10 min，然后经 0.22 μm 膜过滤，得到反应液；以灭酶后的粗酶液为空白对照，采用 HPLC 法（高效液相色谱法）测定反应液中阿魏酸浓度；将阿魏酸浓度代入阿魏酸酯酶活力计算公式中，得到粗酶液中阿魏酸酯酶的酶活；

其中，阿魏酸酯酶酶活的定义为：在 50°C 下，每分钟分解阿魏酸甲酯生成 1 μmol 阿魏酸所需要的酶量为 1 个酶活力单位（1 U）；

阿魏酸酯酶活力计算公式如下：

$$\text{阿魏酸酯酶活力} = \frac{\text{稀释倍数} \times \text{阿魏酸浓度} \times \text{反应体系体积}}{\text{反应时间} \times \text{阿魏酸相对分子质量} \times \text{加酶液体积}};$$

阿魏酸标准品的高效液相色谱图见图 3，阿魏酸甲酯标准品的高效液相色谱图见图 4，反应液的高效液相色谱图见图 5，阿魏酸浓度根据高效液相色谱图中的峰面积 Y 与阿魏酸浓度 X 之间的线性关系 $Y=52514X-80.417$ ($R^2=0.9996$) 计算而得；

HPLC 法采用 Agilent 1200 型高效液相色谱仪；色谱柱为 ZORBAX Eclipse Plus C18 (Agilent, 4.6 mm×150 mm, 3.5 μm)；紫外检测器；流动相 A：1% (v/v) 的乙酸溶液，流

动相 B: 甲醇; 流速 1 mL/min; 柱温 30°C; 检测波长 320 nm, 梯度洗脱程序如表 1 所示。

由表 2 可知, 当发酵进行到 14 h 时, 重组枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800/ PMA5-*fae* 发酵获得的重悬液中阿魏酸酯酶的酶活达到 3.20 U/mL; 当发酵进行到 60 h 时, 重组枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800/ PMA5-*fae* 发酵获得的发酵上清液中阿魏酸酯酶的酶活达 20.80 U/mL; 在发酵到 14 h 之后, 重组枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800/ PMA5-*fae* 发酵获得的重悬液中阿魏酸酯酶的酶活先降低后升高, 这是由于菌体达到稳定期后不断死亡使菌体数量减少, 胞内酶活力下降, 菌体死亡自溶后营养物质增多, 使菌体数量缓慢上升, 进而阿魏酸酯酶活力缓慢增加; 在发酵到 40 h 之后, 重组枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800/ PMA5-*fae* 发酵获得的发酵上清液中阿魏酸酯酶的酶活持续不断增长, 这可能是由于菌体不断死亡自溶破碎后, 胞内的阿魏酸酯酶释放出来。

表 2 发酵不同时间获得的发酵上清液和重悬液中阿魏酸酯酶的酶活

组别	发酵上清液 (U/mL)	重悬液 (U/mL)
发酵 6 h	0.20	0.17
发酵 14 h	2.13	3.20
发酵 20 h	1.24	1.01
发酵 25 h	10.01	1.51
发酵 37 h	17.92	1.94
发酵 42 h	15.10	2.27
发酵 48 h	16.15	1.86
发酵 54 h	18.81	1.45
发酵 60 h	20.80	1.60

实施例 8: 阿魏酸酯酶的生产

具体步骤如下:

以枯草芽孢杆菌 WB800 为对照, 将实施例 7 获得的重组枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800/ PMA5-*fae* 的转化子在 LB 固体培养基 (含有 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素) 上划线, 于 30°C 恒温培养箱中倒置培养 12 h, 得到单菌落; 挑取单菌落接种至 LB 液体培养基 (含有 100 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 卡那霉素), 于 37°C、200 r/min 培养 12 h, 得到种子液; 将种子液以 3% (v/v) 的接种量转接至 Super Rich 培养基中, 于 37°C、200 r/min 培养 14 h, 得到发酵液。

发酵结束后, 取 5 mL 发酵液, 将发酵液于 4°C、8000 rpm 下离心 15 min, 获得发酵上清液和沉淀; 在沉淀中加入 5 mL 裂解液将菌体重悬, 得到重悬液 (全细胞); 将重悬液超声破

碎 15 min，得到细胞破碎液；将细胞破碎液于 4°C、8000 rpm 下离心 15 min，得到细胞破碎上清液。

检测枯草芽孢杆菌 WB800 和重组枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800/ PMA5-*fae* 发酵获得的发酵上清液和细胞破碎上清液中阿魏酸酯酶的酶活（检测结果见表 3）。

由表 3 可知，当发酵进行到 14 h 时，重组枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800/ PMA5-*fae* 发酵获得的胞内阿魏酸酯酶的酶活为 82.53 U/mL，比发酵进行到 60 h 的胞外阿魏酸酯酶活力 20.80 U/mL 高 4 倍；同时，重组枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800/ pMA5-*fae* 的胞内阿魏酸酯酶活力明显高于枯草芽孢杆菌 WB800 的胞内阿魏酸酯酶活力。因此，选用发酵 14 h 的胞内阿魏酸酯酶作为后续酶纯化的基础。

表 3 不同枯草芽孢杆菌发酵获得的发酵上清液和细胞破碎上清液中阿魏酸酯酶的酶活

枯草芽孢杆菌 WB800		重组枯草芽孢杆菌 <i>Bacillus subtilis</i> WB800/ PMA5- <i>fae</i>	
发酵上清液	细胞破碎上清液	发酵上清液	细胞破碎上清液
0.85 U/mL	2.08 U/mL	2.13 U/mL	82.53 U/mL

实施例 9：阿魏酸酯酶的性能

具体步骤如下：

将实施例 3 获得的重组枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* WB800/ PMA5-*fae* 发酵获得的细胞破碎上清液用镍柱纯化后，先使用含有 0.01 mol/L EDTA 的透析液透析三次，再使用不含 EDTA 的透析液透析三次，得到纯酶；将纯酶放置在 4°C 冰箱中备用。

将纯酶稀释 0~50 倍后，参照实施例 5 中的方法检测纯酶的阿魏酸酯酶酶活，检测结果见表 4。

由表 4 可知，选择 20 倍的稀释倍数最佳，测定稀释 20 倍的纯酶的阿魏酸酯酶酶活，测定方法如下：

称取 100 mg 考马斯亮蓝 G-250 溶于 50 mL 90% (v/v) 乙醇中后，加入 100 mL 85% (v/v) 磷酸，并用蒸馏水定容至 1 L，得到考马斯亮蓝 G-250 染液；称取 100 mg 牛白蛋白溶解，并用蒸馏水定容至 100 mL，得到标准蛋白溶液；分别吸取 0、0.02、0.04、0.06、0.08、0.10 mL 标准蛋白溶液分别加入 1.0、0.98、0.96、0.94、0.92、0.90 mL 蒸馏水中后，分别加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 染液混合均匀，得到混合液；将混合液于室温（25°C）下反应 5 min，得到反应液；将反应液于 560 nm 波长下测定吸光度，并绘制蛋白浓度标准曲线（标准曲线见图 7）。

取 500 μ L 纯酶，在纯酶中加入 500 μ L 蒸馏水后，再加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 染液混合均匀，得到混合液；将混合液于室温（25°C）下反应 5 min，得到反应液；将反应液于 595

nm 波长下测定吸光度；根据测得的吸光度和蛋白浓度标准曲线，计算得到纯酶的蛋白浓度，并根据稀释 20 倍的纯酶中阿魏酸酯酶活力，计算得到阿魏酸酯酶比酶活；

其中，阿魏酸酯酶比酶活的计算公式如下：

$$\text{比酶活} = \frac{\text{粗酶液酶活力}}{\text{蛋白浓度}}。$$

检测结果为：稀释 20 倍的纯酶的蛋白浓度为 0.15 mg/mL、稀释 20 倍的纯酶的阿魏酸酯酶比酶活为 2230 U/mg。

表 4 稀释不同倍数的纯酶的阿魏酸酯酶酶活

纯酶稀释倍数	加酶体积（稀释后）/μL	酶活力（U/mL）	备注
0	10	47.85	底物完全反应
2	10	60.53	底物几乎反应完全
5	10	142.25	底物几乎反应完全
20	10	334.50	峰高度比为 4：3
50	10	210.89	峰高度比为 1：4

虽然本发明已以较佳实施例公开如上，但其并非用以限定本发明，任何熟悉此技术的人，在不脱离本发明的精神和范围内，都可做各种的改动与修饰，因此本发明的保护范围应该以权利要求书所界定的为准。

权 利 要 求 书

- 1.一种阿魏酸酯酶，其特征在于，所述阿魏酸酯酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。
- 2.一种基因，其特征在于，所述基因编码权利要求 1 所述的阿魏酸酯酶。
- 3.如权利要求 2 所述的一种基因，其特征在于，所述基因的核苷酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。
- 4.一种重组质粒，其特征在于，所述重组质粒携带权利要求 2 或 3 所述的基因。
- 5.如权利要求 4 所述的一种重组质粒，其特征在于，所述重组质粒的表达载体为 pMA5 质粒或 pUB 质粒。
- 6.一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞携带权利要求 2 或 3 所述的基因或权利要求 4 或 5 所述的重组质粒。
- 7.如权利要求 6 所述的一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞为短小芽孢杆菌 (*Bacillus pumilus*) 或枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*)。
- 8.如权利要求 7 所述的一种宿主细胞，其特征在于，所述枯草芽孢杆菌为枯草芽孢杆菌 168、枯草芽孢杆菌 WB800、枯草芽孢杆菌 WB600 或枯草芽孢杆菌 1A751。
- 9.一种生产阿魏酸酯酶的方法，其特征在于，所述方法为先将权利要求 6-8 任一项所述的宿主细胞接种至发酵培养基中进行发酵，得到发酵液，然后从发酵液中分离得到阿魏酸酯酶。
- 10.权利要求 6-8 任一项所述的宿主细胞或权利要求 9 所述的生产阿魏酸酯酶的方法在生产阿魏酸酯酶中的应用。
- 11.一种生产阿魏酸的方法，其特征在于，所述方法为先将权利要求 1 所述的阿魏酸酯酶添加至含有阿魏酸酯类化合物的反应体系中进行反应，得到反应液，然后从反应液中分离得到阿魏酸；
或者，所述方法为先将权利要求 6-8 任一项所述的宿主细胞接种至发酵培养基中进行发酵，得到发酵液，然后从发酵液中分离得到阿魏酸酯酶，再将阿魏酸酯酶添加至含有阿魏酸酯类化合物的反应体系中进行反应，得到反应液，最后从反应液中分离得到阿魏酸；
或者，所述方法为先将权利要求 6-8 任一项所述的宿主细胞接种至发酵培养基中进行发酵，得到发酵液，然后将发酵液添加至含有阿魏酸酯类化合物的反应体系中进行反应，得到反应液，最后从反应液中分离得到阿魏酸。
- 12.如权利要求 11 所述的一种生产阿魏酸的方法，其特征在于，所述阿魏酸酯类化合物为阿魏酸甲酯或阿魏酸乙酯。
- 13.如权利要求 11 或 12 所述的一种生产阿魏酸的方法，其特征在于，所述反应的温度为 30~90°C、时间为 10~30 min。
- 14.权利要求 1 所述的阿魏酸酯酶或权利要求 2 或 3 所述的基因或权利要求 4 或 5 所述的

重组质粒或权利要求 6-8 任一项所述的宿主细胞或权利要求 9 所述的生产阿魏酸酯酶的方法或权利要求 11-13 任一项所述的生产阿魏酸的方法在生产阿魏酸、水解木质纤维素、制备饲料以及造纸中的应用。

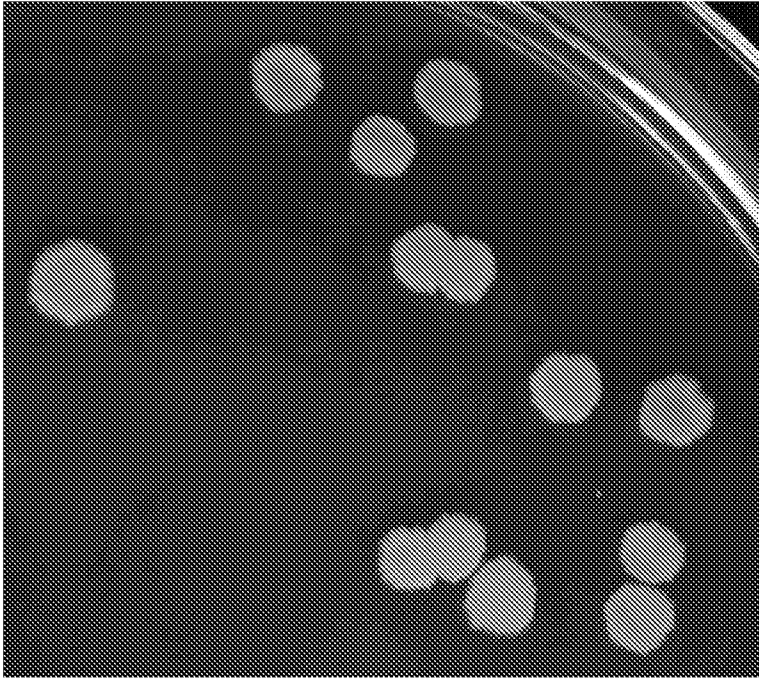


图 1

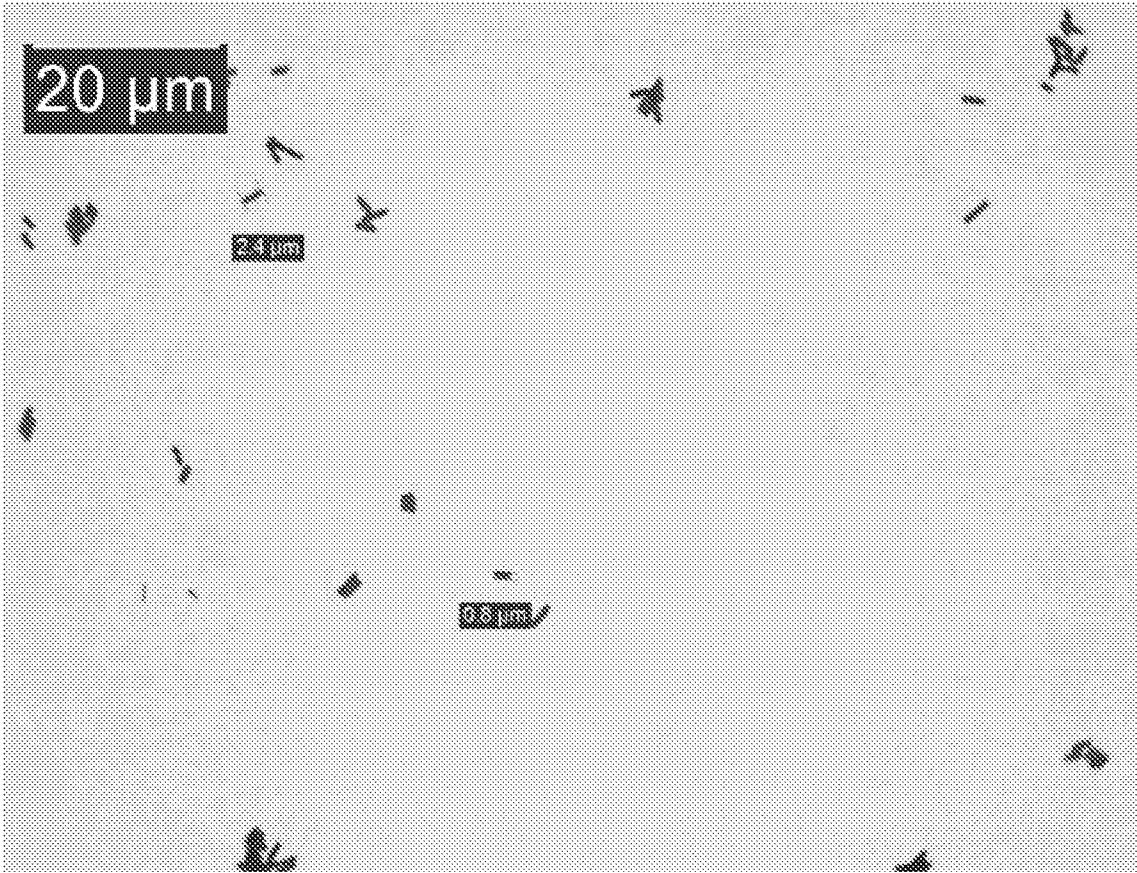


图 2

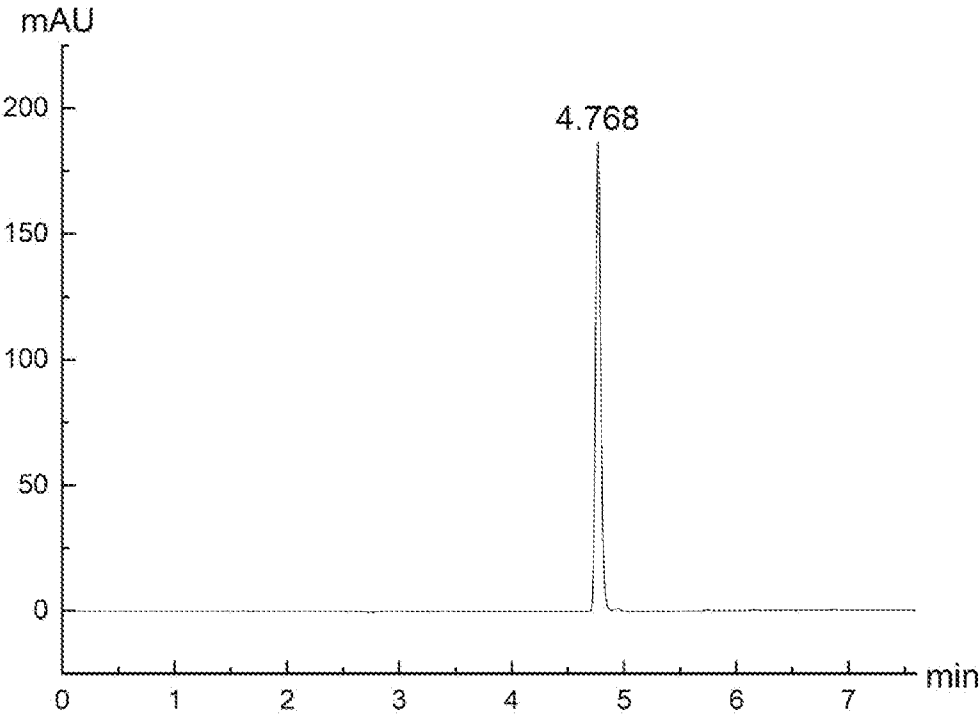


图 3

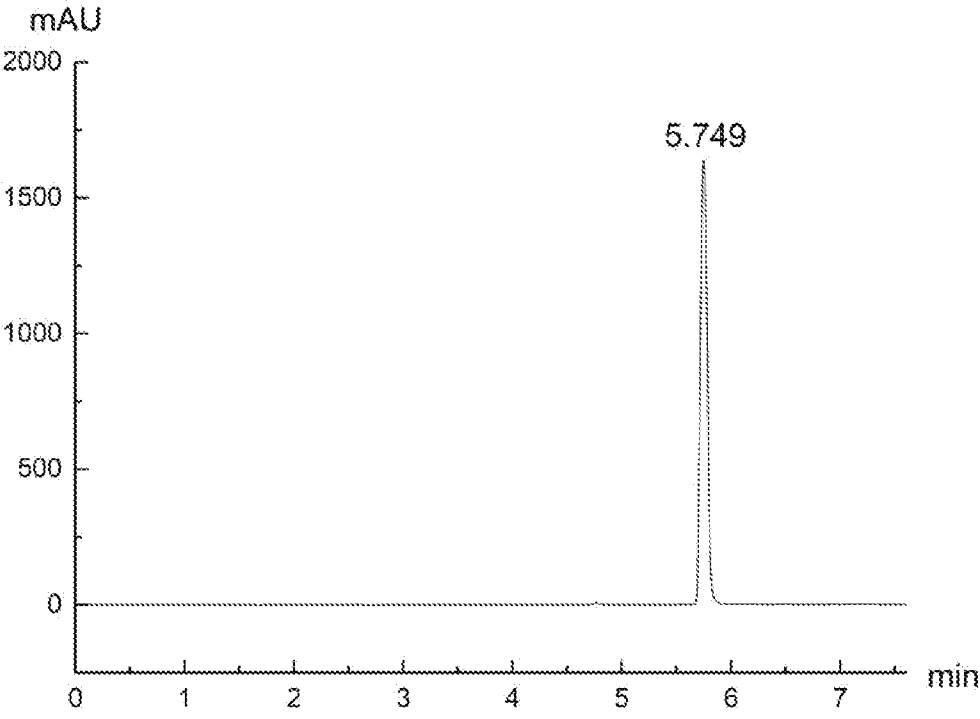


图 4

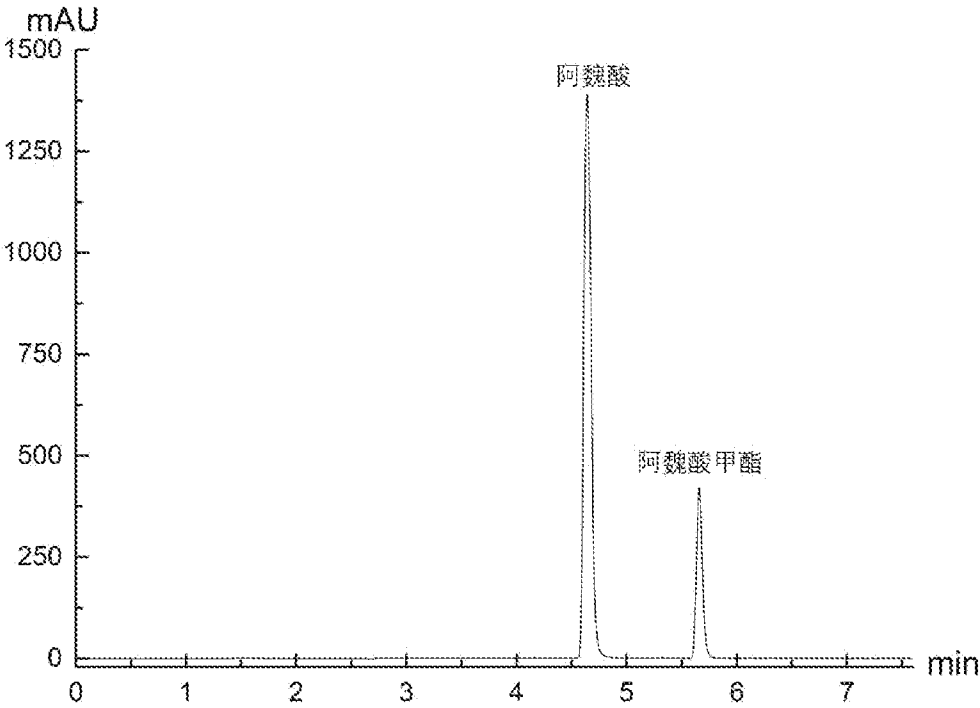


图 5

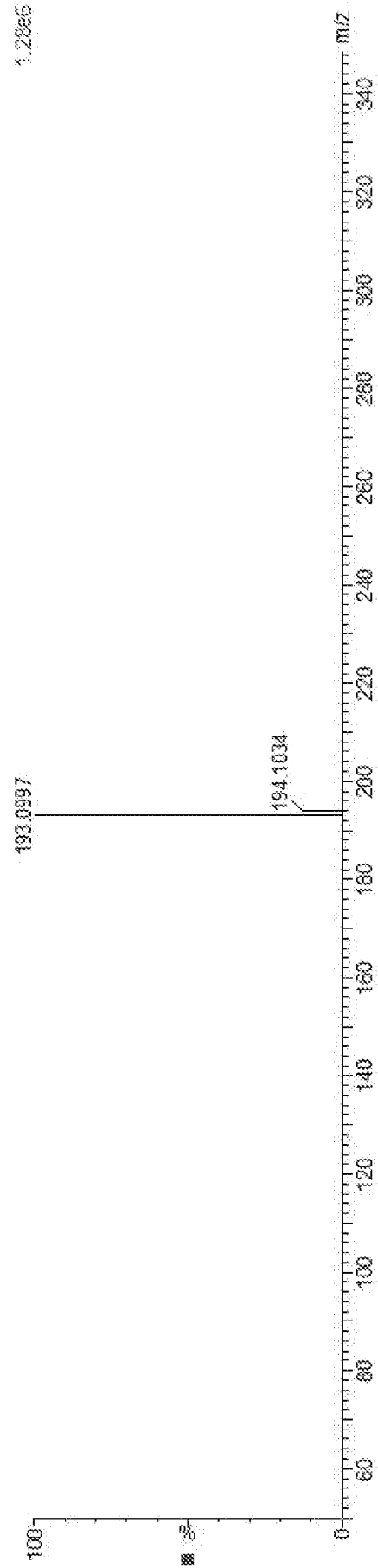


图 6

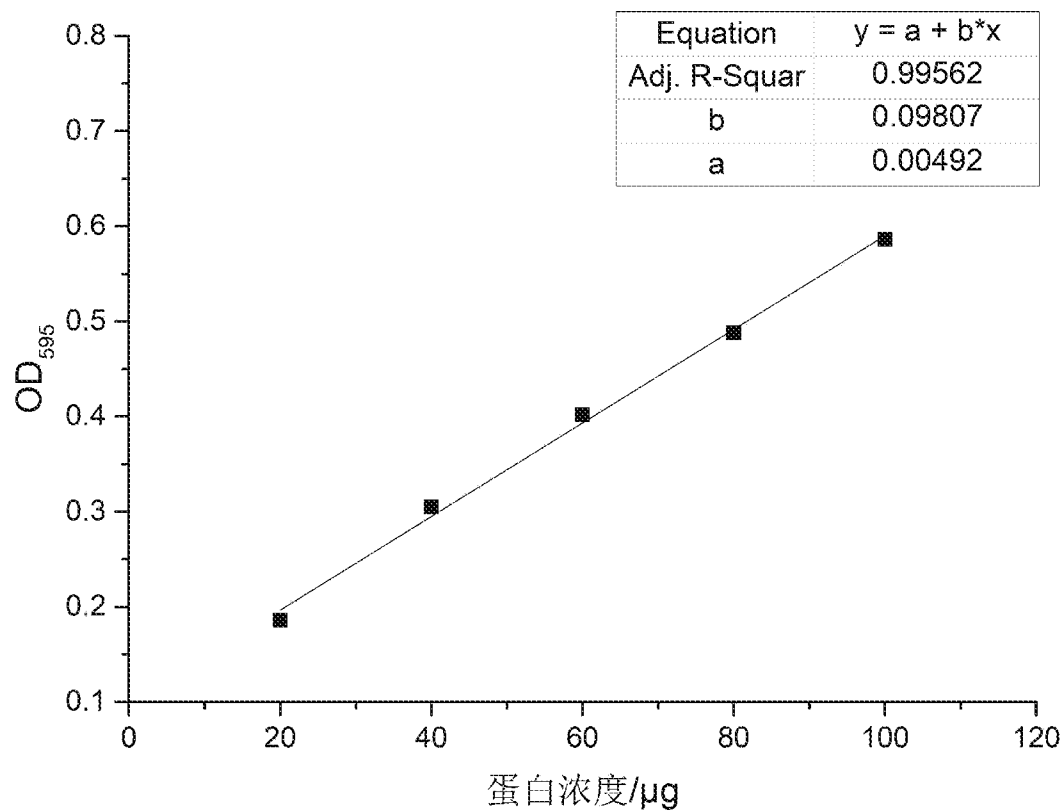


图 7

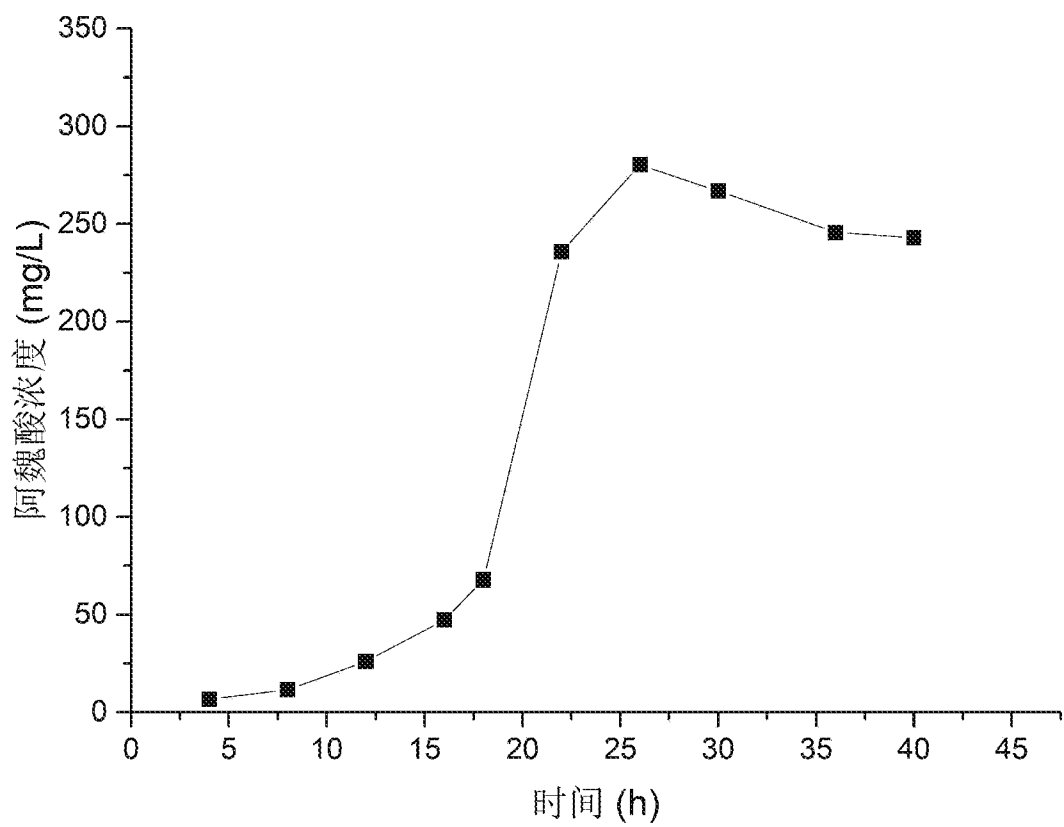


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/119269

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/18(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; C12N 15/75(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 7/42(2006.01)i;
A23K 10/18(2016.01)i; D21C 5/00(2006.01)i; C12R 1/07(2006.01)n

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N; C12P; A23K; D21C; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, TWABS, HKABS, MOABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED, 万方数据库: 阿魏酸酯酶, 肉桂酸酯酶, 短小芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌, feruloyl esterase, ferulic acid esterase, FAE, Bacillus pumilus, Bacillus subtilis GENBANK+EMBL+China Patents Biological Sequence Search System: sequence search for SEQ ID NOs: 2-3

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	None. "alpha/beta hydrolase [Bacillus pumilus]" <i>NCBI Reference Sequence: WP_106036153.1</i> , 16 March 2018 (2018-03-16), See sequence and related information	1-14
A	None. "Bacillus pumilus strain NCTC10337 genome assembly, chromosome: 1" <i>GenBank: LT906438.1</i> , 15 August 2017 (2017-08-15), see sequence position 560830-561723 and related information	1-14
A	Weiyue Liang et al. "A novel feruloyl esterase with high rosmarinic acid hydrolysis activity from Bacillus pumilus W3" <i>International Journal of Biological Macromolecules</i> , Vol. 161, 09 June 2020 (2020-06-09), ISSN: 0141-8130, pages 525-530, see Abstract and Results	1-14
A	CN 106434598 A (JIANGNAN UNIVERSITY) 22 February 2017 (2017-02-22) see entire document	1-14
A	EP 3186373 A1 (RENESCIENCE AS) 05 July 2017 (2017-07-05) see entire document	1-14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

18 March 2021

Date of mailing of the international search report

26 May 2021

Name and mailing address of the ISA/CN

**China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing
100088
China**

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/119269

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	王锐丽 (WANG, Ruili). "短小芽孢杆菌阿魏酸酯酶的分离纯化及性质研究 (Production and Property of Ferulic Acid Esterase from <i>Bacillus pumilus</i>)" <i>湖北农业科学 (Hubei Agricultural Sciences)</i> , Vol. 55, No. 10, 31 May 2016 (2016-05-31), ISSN: 0439-8114, pp. 2611-2614, see entire document	1-14
A	孙晓明 等 (SUN, Xiaoming et al.). "微生物发酵产阿魏酸酯酶及释放阿魏酸研究概述 (Summary on the Conditions of Ferulic Acid Esterase and Ferulic Acid Production by Microorganism Fermentation)" <i>食品研究与开发 (Food Research and Development)</i> , Vol. 40, No. 1, 31 January 2019 (2019-01-31), ISSN: 1005-6521, pp. 201-206, see entire document	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2020/119269

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed:
 - ☒ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - ☐ on paper or in the form of an image file.
 - b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
 - ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2020/119269

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106434598	A	22 February 2017	CN	106434598	B	06 December 2019
EP	3186373	A1	05 July 2017	EP	3186373	B1	16 December 2020
				IN	201717007963	A	14 July 2017
				US	2017240875	A1	24 August 2017
				WO	2016030480	A1	03 March 2016
				CA	2958034	A1	03 March 2016
				BR	112017003847	A2	27 February 2018

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/119269

A. 主题的分类 C12N 9/18(2006.01)i; C12N 15/55(2006.01)i; C12N 15/75(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12P 7/42(2006.01)i; A23K 10/18(2016.01)i; D21C 5/00(2006.01)i; C12R 1/07(2006.01)n 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类																	
B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C12N; C12P; A23K; D21C; C12R 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, TWABS, HKABS, MOABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, TWTXT, WOTXT, USTXT, EPTXT, JPTXT, CNKI, WEB OF SCIENCE, PUBMED, 万方数据库: 阿魏酸酯酶, 肉桂酸酯酶, 短小芽孢杆菌, 枯草芽孢杆菌, feruloyl esterase, ferulic acid esterase, FAE, Bacillus pumilus, Bacillus subtilis GENBANK+EMBL+中国专利生物序列检索系统: 对 SEQ ID Nos:2-3的序列检索																	
C. 相关文件 <table border="1"> <thead> <tr> <th>类 型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>无. "alpha/beta hydrolase [Bacillus pumilus]" NCBI Reference Sequence: WP_106036153.1, 2018年 3月 16日 (2018 - 03 - 16), 参见序列及相关信息</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>无. "Bacillus pumilus strain NCTC10337 genome assembly, chromosome: 1" GenBank: LT906438.1, 2017年 8月 15日 (2017 - 08 - 15), 参见序列第560830-561723位及相关信息</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Weiyue Liang等. "A novel feruloyl esterase with high rosmarinic acid hydrolysis activity from Bacillus pumilus W3" International Journal of Biological Macromolecules, 第161卷, 2020年 6月 9日 (2020 - 06 - 09), ISSN: 0141-8130, 第525-530页, 参见Abstract和Results</td> <td>1-14</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106434598 A (江南大学) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 参见全文</td> <td>1-14</td> </tr> </tbody> </table>			类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	无. "alpha/beta hydrolase [Bacillus pumilus]" NCBI Reference Sequence: WP_106036153.1, 2018年 3月 16日 (2018 - 03 - 16), 参见序列及相关信息	1-14	A	无. "Bacillus pumilus strain NCTC10337 genome assembly, chromosome: 1" GenBank: LT906438.1, 2017年 8月 15日 (2017 - 08 - 15), 参见序列第560830-561723位及相关信息	1-14	A	Weiyue Liang等. "A novel feruloyl esterase with high rosmarinic acid hydrolysis activity from Bacillus pumilus W3" International Journal of Biological Macromolecules, 第161卷, 2020年 6月 9日 (2020 - 06 - 09), ISSN: 0141-8130, 第525-530页, 参见Abstract和Results	1-14	A	CN 106434598 A (江南大学) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 参见全文	1-14
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	无. "alpha/beta hydrolase [Bacillus pumilus]" NCBI Reference Sequence: WP_106036153.1, 2018年 3月 16日 (2018 - 03 - 16), 参见序列及相关信息	1-14															
A	无. "Bacillus pumilus strain NCTC10337 genome assembly, chromosome: 1" GenBank: LT906438.1, 2017年 8月 15日 (2017 - 08 - 15), 参见序列第560830-561723位及相关信息	1-14															
A	Weiyue Liang等. "A novel feruloyl esterase with high rosmarinic acid hydrolysis activity from Bacillus pumilus W3" International Journal of Biological Macromolecules, 第161卷, 2020年 6月 9日 (2020 - 06 - 09), ISSN: 0141-8130, 第525-530页, 参见Abstract和Results	1-14															
A	CN 106434598 A (江南大学) 2017年 2月 22日 (2017 - 02 - 22) 参见全文	1-14															
☒ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。																	
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件																	
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期															
2021年 3月 18日		2021年 5月 26日															
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员															
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451		于娜 电话号码 86-10-62089160															

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	EP 3186373 A1 (RENESCIENCE AS) 2017年 7月 5日 (2017 - 07 - 05) 参见全文	1-14
A	王锐丽. “短小芽孢杆菌阿魏酸酯酶的分离纯化及性质研究” 湖北农业科学, 第55卷, 第10期, 2016年 5月 31日 (2016 - 05 - 31), ISSN: 0439-8114, 第2611-2614页, 参见全文	1-14
A	孙晓明等. “微生物发酵产阿魏酸酯酶及释放阿魏酸研究概述” 食品研究与开发, 第40卷, 第1期, 2019年 1月 31日 (2019 - 01 - 31), ISSN: 1005-6521, 第201-206页, 参见全文	1-14

第I栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列表进行的:

a. ☒ 作为国际申请的一部分提交的:

☒ 附件C/ST. 25文本文件形式

☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:

☐ 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))

☐ 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)

2. ☐ 另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2020/119269

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	106434598	A	2017年 2月 22日	CN	106434598	B	2019年 12月 6日
EP	3186373	A1	2017年 7月 5日	EP	3186373	B1	2020年 12月 16日
				IN	201717007963	A	2017年 7月 14日
				US	2017240875	A1	2017年 8月 24日
				WO	2016030480	A1	2016年 3月 3日
				CA	2958034	A1	2016年 3月 3日
				BR	112017003847	A2	2018年 2月 27日