(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111836900 A
(43)申请公布日 2020.10.27

(21)申请号 201980018506.6
(22)申请日 2019.03.08
(30)优先权数据
10-2018-0028510 2018.03.12 KR
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.09.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2019/002706 2019.03.08
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/177311 KO 2019.09.19
(71)申请人 高丽大学校产学协力团
地址 韩国首尔市城北区安岩路145(邮递区号:02841)
(72)发明人 金京宪 金东玄
(74)专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205
代理人 杨贝贝 臧建明
(51)Int.Cl.
C12P 19/02(2006.01)
C12P 19/04(2006.01)
C12P 19/14(2006.01)
C12P 19/18(2006.01)
C12N 9/42(2006.01)

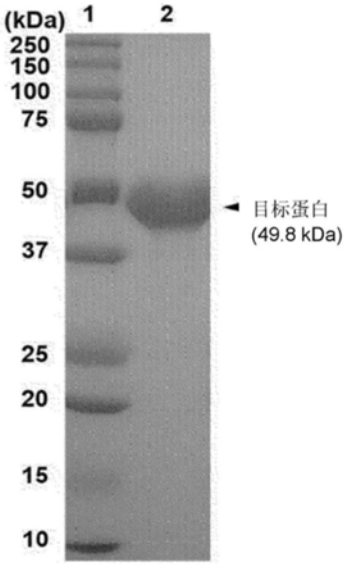
权利要求书1页 说明书7页
序列表3页 附图7页

(54)发明名称

从海藻生产葡萄糖及昆布多糖寡糖的新型β-葡萄糖苷酶

(57)摘要

本发明涉及一种用于从海藻生产葡萄糖及昆布多糖寡糖的新型β-葡萄糖苷酶。更具体来说,本发明可从表现出转糖苷酶活性同时表现出针对β-葡聚糖的外切型葡聚糖酶活性的β-葡萄糖苷酶生产葡萄糖,且通过在不同的反应条件下表现出针对昆布多糖的转糖苷酶活性来生产昆布多糖寡糖。



CN 111836900 A

1.一种用于生产葡萄糖或昆布寡糖的组合物,所述组合物包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的β-葡萄糖苷酶,其中所述β-葡萄糖苷酶具有外切型葡聚糖酶活性及转糖苷酶活性。

2.根据权利要求1所述的用于生产葡萄糖或昆布寡糖的组合物,其中所述β-葡萄糖苷酶来源于变形菌株2-40^{T}。

3.根据权利要求1所述的用于生产葡萄糖或昆布寡糖的组合物,其中所述β-葡萄糖苷酶是从用重组载体转化的宿主细胞或所述宿主细胞的培养物获得,所述重组载体包含编码所述β-葡萄糖苷酶进行的基因。

4.根据权利要求3所述的组合物,其中所述基因具有SEQ ID NO:2的核苷酸序列。

5.根据权利要求1所述的用于生产葡萄糖或昆布寡糖的组合物,其中所述β-葡萄糖苷酶使用选自由昆布多糖、昆布二糖、纤维二糖、龙胆二糖、乳糖及琼脂二糖组成的群组中的任一种基质。

6.根据权利要求1所述的用于生产葡萄糖或昆布寡糖的组合物,其中所述昆布寡糖是聚合度为2到10的昆布寡糖中的任一种。

7.一种生产葡萄糖或昆布寡糖的方法,所述方法包括使具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的β-葡萄糖苷酶与昆布多糖或昆布二糖反应,从而生产葡萄糖或昆布寡糖。

8.根据权利要求7所述的生产葡萄糖或昆布寡糖的方法,其中所述葡萄糖是通过在25℃到40℃的条件下使0.1U到3U的β-葡萄糖苷酶与作为基质的所述昆布多糖(mg)反应2小时到48小时来生产的。

9.根据权利要求7所述的生产葡萄糖或昆布寡糖的方法,其中所述昆布多糖是通过在2℃到40℃的条件下使0.005U到0.05U的β-葡萄糖苷酶与作为基质的所述昆布多糖(mg)反应,或者使0.0001U到0.005U的β-葡萄糖苷酶与作为基质的所述昆布二糖(mg)反应2小时到72小时来生产的。

10.根据权利要求7所述的生产葡萄糖或昆布寡糖的方法,其中所述昆布寡糖是聚合度为2到10的昆布寡糖中的任一种。

从海藻生产葡萄糖及昆布多糖寡糖的新型β-葡萄糖苷酶

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于从海藻生产葡萄糖及昆布寡糖的新型β-葡萄糖苷酶。

背景技术

[0002] 随着人们对全球变暖的关注，人们对用于可持续发展的可再生生物质的兴趣不断增加。木质纤维素生物质由于丰富的资源及低廉的成本，长期以来被认为是用于生产可发酵糖(例如葡萄糖)的可再生生物质。然而，其具有高含量的木质素及非常复杂的结构，且因此需要高强度的预处理及酶促糖基化，从而使其难以使用。近来，海藻作为替代木质纤维素生物质的生物质受到广泛关注，且在高碳水化合物含量、不需要耕地以及由于几乎没有木质素含量而具有简单结构方面是有利的。

[0003] 在海洋藻类中，全世界每年收获约70百万吨褐藻，褐藻的主要碳水化合物成分是海藻酸及葡聚糖，且葡聚糖主要是昆布多糖。昆布多糖在其骨架中具有β-1,3键，且在其分支中具有β-1,6键。在褐藻中，昆布属(Laminarina)、海带属(Saccharina)及岩藻属(Fucus spp.)具有30％到80％干重的高昆布多糖含量。由于昆布多糖是由葡萄糖组成的多糖，因此昆布多糖是用于生产可发酵糖的非常理想的生物质。此外，已知从昆布多糖生产的昆布寡糖具有多种生理活性，且因此可用作功能材料。

[0004] 为使用木质纤维素生物质生产可发酵糖，需要高强度的预处理，且其需要至少三种酶的组合，例如内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶及β-糖苷酶。这种预处理工艺使用高热量，且因此需要大量能量，并且在酶促糖基化工艺中使用的酶的成本占整个生物工艺的很大一部分。

[0005] 因此，需要一种通过使用最少数量的酶以降低的生产成本高效地水解昆布多糖来生产作为发酵糖的葡萄糖及作为功能材料的昆布寡糖的工艺。

发明内容

[0006] 技术挑战

[0007] 本发明的目的是提供用于从褐藻生产葡萄糖及昆布寡糖的新型β-葡萄糖苷酶的用途。

[0008] 技术解决方案

[0009] 根据本公开的方面，提供一种用于生产葡萄糖或昆布寡糖的组合物，所述组合物包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的β-葡萄糖苷酶(β-glucosidase)，其中所述β-葡萄糖苷酶具有外切型葡聚糖酶活性及转糖苷酶活性。

[0010] 本发明还提供一种生产葡萄糖或昆布寡糖的方法，所述方法包括使具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的β-葡萄糖苷酶(β-glucosidase)与昆布多糖或昆布二糖反应，从而生产葡萄糖或昆布寡糖。

[0011] 本发明的效果

[0012] 本发明的β-葡萄糖苷酶对作为多糖的昆布多糖表现出外切型葡聚糖酶活性，且因

此仅生产葡萄糖，并且还通过改变反应条件表现出对昆布多糖或昆布二糖的转糖苷酶活性，且因此具有生产葡萄糖和/或昆布寡糖的效果。

附图说明

[0013] 图1是确认本发明的β-葡萄糖苷酶的表达的凝胶图像。

[0014] 图2示出确认本发明的β-葡萄糖苷酶的最佳活性pH的结果。

[0015] 图3示出确认本发明的β-葡萄糖苷酶的最佳温度的结果。

[0016] 图4示出确认本发明的β-葡萄糖苷酶的热稳定性的结果。

[0017] 图5示出通过使用各种二糖作为基质筛选β-葡萄糖苷酶的基质特异性而获得的薄层色谱(TLC)分析结果，其中(a)示出陆地来源的二糖，且(b)示出海洋来源的二糖。

[0018] 图6a示出通过水解昆布多糖生产的作为主要产物的葡萄糖的产率，且图6b示出主要产物的高效液相色谱(HPLC)分析结果。

[0019] 图7a示出通过针对昆布多糖的转糖苷酶活性生产的昆布寡糖的HPLC分析结果，且图7b示出昆布寡糖的TLC分析结果。

[0020] 图8a示出通过针对昆布二糖的转糖苷酶活性生产的昆布三糖及葡萄糖的HPLC分析结果，图8b示出昆布三糖及葡萄糖的TLC分析结果，且图8c示出Bgl1B的核苷酸序列(SEQ ID NO:2)。

具体实施方式

[0021] 本发明的发明人检查了Bgl1B蛋白的昆布多糖降解活性，所述Bgl1B蛋白假设具有β-葡萄糖苷酶活性。结果，通过使用作为由β-1,3连接的骨架及β-1,6-连接的分支构成的葡萄糖多糖的昆布多糖作为基质，确认了Bgl1B蛋白通过外切型葡聚糖酶活性将昆布多糖的β-1,3-或β-1,6-糖苷键裂开，从而仅生产葡萄糖。还确认了Bgl1B蛋白具有转糖苷酶活性，且因此通过控制酶的浓度及反应时间，从昆布多糖或昆布二糖生产具有高聚合度的寡糖。

[0022] 因此，本发明提供一种用于生产葡萄糖或昆布寡糖的组合物，所述组合物包含具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的β-葡萄糖苷酶，其中所述β-葡萄糖苷酶具有外切型葡聚糖酶活性及转糖苷酶活性。

[0023] 本发明还提供一种生产葡萄糖或昆布寡糖的方法，所述方法包括使具有氨基酸序列SEQ ID NO:1的β-葡萄糖苷酶与昆布多糖或昆布二糖反应，从而生产葡萄糖或昆布寡糖。

[0024] β-葡萄糖苷酶不仅表现出能使昆布多糖的β-1,3-或β-1,6-糖苷键裂开的外切型葡聚糖酶活性，而且还针对昆布多糖或昆布二糖表现出转糖苷酶活性。

[0025] 此外，缓冲液中的β-葡萄糖苷酶的最佳pH可根据缓冲液的类型而变化，但β-葡萄糖苷酶在约pH 5到约pH 7.5时表现出80％或大于80％的酶活性，且特别是在pH为6时表现出最高活性。此外，β-葡萄糖苷酶在pH为6及10℃到40℃下表现出80％或大于80％的酶活性。然而，在50℃或高于50℃下，酶活性急剧降低，且因此，由于β-葡萄糖苷酶即使在室温下也可引起充分的酶促反应，因此存在的优点是生产工艺可经济地执行，而不需要升高温度的能量消耗。此外，与现有的酶不同，即使在相对低的温度下进行热处理，酶也可能失活。

[0026] 此外，作为检查金属离子对β-葡萄糖苷酶的酶活性的影响的结果，Mg^{2+}、Ni^{2+}及Co^{2+}对酶活性没有很大影响，而Mn^{2+}抑制酶活性约50％，且Cu^{2+}及Fe^{2+}强烈抑制酶活性约10％或

小于10％。

[0027] β-葡萄糖苷酶可来源于变形菌株2-40^T(Saccharophagus degradans2-40T)，但本发明不特别受限于此。

[0028] 此外，β-葡萄糖苷酶可从与多肽生产相关联的DNA片段(即编码基因)转录及转译，所述多肽不仅包括酶编码区的上游及下游的区，而且还包括各个编码片段之间的内含子。举例来说，β-葡萄糖苷酶可从以SEQ ID NO:2阐述的序列来转录及转译，但本发明不受特别限制。此外，具有葡萄糖或昆布寡糖水解活性的蛋白，作为来源于具有一个或多个取代、缺失、易位、添加等的酶的突变蛋白，也落在本发明的酶的范围内，且所述蛋白优选地包括与以SEQ ID NO:1阐述的氨基酸序列具有至少80％的同源性、至少85％的同源性、至少90％的同源性、至少93％的同源性、至少94％的同源性、至少95％的同源性、至少96％的同源性、至少97％的同源性、至少98％的同源性及至少99％的同源性的氨基酸序列。

[0029] β-葡萄糖苷酶可从变形菌株2-40^{T}培养物的上清液中分离及纯化，或者可通过使用除变形菌株2-40^{T}以外的菌株，通过基因工程重组技术，或通过人工化学合成方法等来生产及分离。

[0030] 当使用重组技术时，可使用用于促进传统重组蛋白表达的因子，例如抗生素抗性基因及可用于亲和性柱色谱法中的报告蛋白或肽，且此种技术落在本发明所属领域的一般技术人员可容易实施的范围内。例如，β-葡萄糖苷酶可从用包含对β-葡萄糖苷酶进行编码的基因，即以SEQ ID NO:2阐述的核苷酸序列的重组载体转化的宿主细胞或其培养物获得。宿主细胞可为大肠杆菌，但本发明不限于此。

[0031] β-葡萄糖苷酶可使用昆布多糖、昆布二糖、纤维二糖、龙胆二糖、乳糖、琼脂二糖等作为基质。

[0032] β-葡萄糖苷酶可仅生产葡萄糖，或者通过控制反应条件来生产葡萄糖及昆布寡糖。

[0033] 反应条件可为β-葡萄糖苷酶的浓度、反应时间等。

[0034] 例如，葡萄糖可通过在25℃到40℃以及2小时到48小时的条件下使0.1U到3U的β-葡萄糖苷酶与作为基质的昆布多糖(mg)反应来生产。

[0035] 昆布寡糖可通过在2℃到40℃及2小时到72小时的条件下使0.005U到0.05U的β-葡萄糖苷酶与作为基质的昆布多糖(mg)反应，或者使0.0001U到0.005U的β-葡萄糖苷酶与作为基质的昆布二糖(mg)反应来生产。

[0036] 可使用昆布多糖或昆布二糖生产的昆布寡糖可为聚合度(degrees of polymerization，DP)为2或大于2、更具体来说为2到10的昆布寡糖中的任一种。更具体来说，昆布寡糖可为昆布二糖(DP2)、昆布三糖(DP3)、昆布四糖(DP4)、昆布五糖(DP5)、昆布六糖(DP6)等。

[0037] β-葡萄糖苷酶的降解产物可依序进行作为吸附色谱的硅胶色谱及作为凝胶渗透色谱的生物凝胶P2色谱，以对约95％的高纯度的葡萄糖或昆布寡糖进行分离及纯化。

[0038] 本文使用的“蛋白”及“多肽”可互换使用。

[0039] 在本发明中，“多肽与另一个序列具有特定百分比(例如，80％、85％、90％、95％或99％)的序列同一性”的表达意味着，当两个序列被比对及比较时，氨基酸残基的特定百分比是相同的。可使用本领域中已知的任何合适的软件程序、例如在文献[分子生物学实验指

南(CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY)(F.M.奥苏拜耳(F.M.Ausubel)等人,(版)1987增补30节7.7.18)]中公开的那些程序来确定比对以及百分比同源性或同一性。优选的程序包括GCG堆积程序(GCG Pileup program)、FASTA(皮尔森(Pearson)等人,1988年美国科学学院院报(Proc.Natl Acad.Sci USA)85:2444-2448)以及基本局部比对搜索工具(Basic Local Alignment Search Tool,BLAST)(BLAST手册,阿尔丘尔(Altschul)等人,国家生物技术信息中心(Natl.Cent.Biotechnol.Inf.),国家图书馆医学(NCIB NLM NIH),马里兰州贝塞斯达(Bethesda,Md.),以及阿尔丘尔等人,1997年NAR25:3389-3402)。另一个优选的比对程序是优选地使用基本参数的比对+(ALIGN Plus)(科教软件(Scientific and Education Software),PA)。另一可得序列软件程序是可在序列软件包版本6.0(遗传学计算机集团(Genetics Computer Group),威斯康星大学(University of Wisconsin),麦迪逊分校(Madison WI))中得到的TFASTA数据搜索程序。

[0040] 本文使用的用语“重组”意指关于细胞、核酸、蛋白或载体使用时,细胞、核酸、蛋白或载体已经通过引入异源核酸或蛋白或者天然核酸或蛋白的改变而被修饰,或者所述细胞来源于以这种方式修饰的细胞。换句话说,例如,重组细胞表达未以细胞的天然(非重组)形式发现的基因,或作为另一选择,表达异常表达或从未表达的天然基因。

[0041] 本文所使用的“核酸”囊括单链或双链的脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)及其化学修饰形式。本文使用的“核酸”及“多核苷酸”可互换使用。由于遗传密码的简并性,可使用一个或多个密码子来对特定的氨基酸进行编码,且本发明囊括对特定氨基酸序列进行编码的多核苷酸。

[0042] 本文中用于阐述将核酸序列插入细胞的用语“引入”是指“转染(transfection)”、“转化”或“转导(transduction)”,且包括对将核酸序列并入到真核或原核细胞中的阐述。此时,核酸序列被并入到细胞的基因组中(例如,染色体、质粒、质体或线粒体DNA),且因此被转换为自主复制子,或被瞬时表达。

[0043] 在下文中,将参考以下实例进一步详细地阐述本发明,但这些实例不旨在限制本发明的范围。

[0044] 实施本发明的方式

[0045] <实例1>Bgl1B的过度表达及纯化

[0046] 为获得变形菌株2-40^{T}的基因组DNA(ATCC43961),将变形菌株2-40^{T}在每1L含有2.3g速溶海盐、20mM Tris-HCl、2g葡萄糖、1g酵母提取物及0.5g氯化铵的基本培养基中在30℃下培养了12小时。基因组DNA是使用商业DNA分离试剂盒(凯杰(Qiagen),美国加利福尼亚州巴伦西亚市(Valencia,CA,USA))提取的。通过聚合酶链反应(polymerase chain reaction,PCR)从基因组DAN扩增目标基因bgl1B。本文所用的引物是5'-ATACATATGAATAGACTTACACTACCGCCTTCTTCTCGT-3'(正向:SEQ ID NO:3)及5'-ATAGCGGCCGCGCTCCTACTCGAGACAAACTCAGCAAATGC-3'(反向:SEQ ID NO:4)。为通过亲和色谱对蛋白进行纯化,添加了在C末端处对6个组氨酸残基进行编码的基因的核苷酸序列。将PCR产物及pET21α载体分别用NdeI及NotI进行了酶切,并被接合以构建pET21α-Bgl1B质粒。将质粒转化到大肠杆菌DH5α中。

[0047] 为过度表达所获得的基因,将所述基因转化到蛋白表达宿主大肠杆菌B121(DE3)中。将细胞在含有50mg/L氨苄青霉素的鲁利亚-贝尔塔尼(Luria-Bertani,LB)肉汤中在37℃进行了培养,直到在600nm下的吸收率达到0.5。为了诱导蛋白表达,添加了0.1mM IPTG,

且将诱导温度设定为16℃,并且使蛋白以水溶性形式过度表达了16小时。培养后,执行离心分离以回收细胞,使用20mM Tris-HCl缓冲液(pH 7.4)来释放细胞,且然后通过超声处理进行破坏并再次进行离心分离以获得上清液。使用海思特拉普(HisTrap column)柱(通用电气医疗保健公司(GE Healthcare),美国皮斯卡塔韦(Piscataway,USA))对重组蛋白进行了纯化。使用阿米康超离心过滤器(Amicon Ultra Centrifugal filter)(30,000截留分子量;密理博公司(Millipore),美国马萨诸塞州比勒里卡(Billerica,MA,USA))对纯化的蛋白进行了浓缩,且使用二喹啉甲酸(bicinchoninic acid,BCA)蛋白测定试剂盒(赛默飞世尔科技(Thermo Fisher Scientific),美国加利福尼亚州圣霍兹市(San Hose,CA,USA))测量了蛋白浓度。

[0048] 使用8%的SDS-PAGE测得所表达的Bgl1B的分子量为49.8kDa(图1)。

[0049] <实例2>Bgl1B蛋白的最佳pH及活化温度的确认

[0050] 为探究Bgl1B蛋白的最佳活性的pH,使20mM乙酸钠(pH 4.0到pH 6.0)、20mM磷酸钠(pH 6.0到pH 7.0)及2 0mM Tris-HCl-NaCl(pH 7.0到pH 9.0)缓冲液(含有0.1%(w/v)的纤维二糖)在40℃下与Bgl1B蛋白反应了15分钟。

[0051] 图2示出在介于4.0到9.0范围内的pH时Bgl1B的相对活性。Bgl1B在pH为6时活性最高。在pH为4及pH为8或更高时,活性降低到30%或低于30%。

[0052] 图3示出在介于2℃到60℃范围内的温度下Bgl1B的相对活性。在pH为6时,Bgl1B在40℃下表现出最高的酶活性。在20℃下,保持约83%的酶活性。此外,在非常低的温度(即2℃到10℃)下,表现出58%或高于58%的酶活性。然而,在50℃或高于50℃下,酶活性急剧降低。这表明即使在室温下也可充分执行酶促反应,且因此可在不施加升高温度的能量的情况下执行经济的工艺。此外,仅通过简单的热处理便可使酶失活。

[0053] 图4示出酶相对于温度的稳定性。在40℃下反应1小时后,保持80%的酶活性,而在50℃或高于50℃下反应1小时后,几乎没有表现出活性。

[0054] <实例3>金属离子对Bgl1B的影响

[0055] 为检查金属离子对Bgl1B蛋白的活性的影响,将10mM Mg^{2+}、Ca^{2+}、Mn^{2+}、Ni^{2+}、Cu^{2+}、Fe^{2+}及Co^{2+}添加到0.1%(w/v)纤维二糖中,且将这些情况的相对活性与未添加金属离子的情况进行了比较。

[0056] 如表1所示,Mg^{2+}、Ni^{2+}及Co^{2+}对酶活性没有很大影响,但Mn^{2+}表现出56.2%的酶活性。此外,Cu^{2+}及Fe^{2+}表现出非常低的酶活性,即10%,这表明非常强的抑制效果。

[0057] [表1]

[0058]

金属离子	相对酶活性(%)
对照组	100.0±2.8
Mg^{2+}	98.9±2.3
Ca^{2+}	82.0±1.5
Mn^{2+}	52.6±2.1
Ni^{2+}	90.3±2.7
Cu^{2+}	0.0±0.0
Fe^{2+}	8.2±0.3
Co^{2+}	95.7±1.6

[0059] <实例4>Bgl1B的基质特异性的确认

[0060] 为确认Bgl1B蛋白的基质特异性，使0.2％(w/v)的多种二糖中的每一者在20mM磷酸钠缓冲液(pH 6)中与0.6U的Bgl1B反应了1小时。作为所使用的基质，使用了两组：第一组，包括陆地来源的二糖、纤维二糖(β-1,4键)、乳糖(β-1,4键)、龙胆二糖(β-1,6键)、蔗糖(α-1,2键)、麦芽糖(α-1,4键)及蜜二糖(α-1,6键)；以及第二组海洋来源的基质，包括昆布二糖(β-1,3键)、琼脂二糖(β-1,4键)、新琼脂二糖及作为三糖(α-1,4键)的琼脂三糖(β-1,6键及α-1,4键)。

[0061] 如图5所示，Bgl1B能够水解所有具有β-键的二糖。相反，Bgl1B不能水解任何具有α-键的二糖。Bgl1B也不能水解琼脂三糖。因此，确认了Bgl1B具有宽范围的酶活性，其能够水解具有β-键的二糖。

[0062] <实例5>Bgl1B对各种基质的酶促反应速率的确认

[0063] 为确认Bgl1B蛋白对各种基质的酶促反应速率，使Bgl1B蛋白在pH 6及40℃下以0.1％到0.4％(w/v)的各种浓度与每一基质进行了反应。通过莱恩威弗-伯克(Lineweaver-Burk)图确定了作为与酶促反应速率相关的参数的V_{max}、K_m及k_{cat}。

[0064] [表2]

[0065]

酶	基质	糖苷键	V_{max} (U/mg蛋白)	K_m (mM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($mM^{-1}s^{-1}$)
Bgl1B	昆布二糖	β-1,3	$1.1x10^{2}$	$9.9x10^{-1}$	$9.1x10^{1}$	$9.2x10^{1}$
	纤维二糖	β-1,4	$1.6x10^{1}$	$2.0x10^{1}$	$1.3x10^{1}$	$6.5x10^{-1}$
	龙胆二糖	β-1,6	$1.1x10^{0}$	$1.3x10^{1}$	$8.8x10^{-1}$	$6.6x10^{-2}$
	乳糖	β-1,4	$1.0x10^{0}$	$2.0x10^{1}$	$8.3x10^{-1}$	$4.1x10^{-2}$
	琼脂二糖	β-1,4	$3.1x10^{-1}$	$6.9x10^{1}$	$2.6x10^{-1}$	$3.7x10^{-3}$
诺维信（Novozyme）188	昆布二糖	β-1,3	$4.2x10^{-1}$	$2.5x10^{0}$	$8.5x10^{-1}$	$3.4x10^{-1}$
	纤维二糖	β-1,4	$3.9x10^{0}$	$3.4x10^{0}$	$7.8x10^{0}$	$2.3x10^{0}$

[0066] 如表2的结果所示，在参数的总体视图中，Bgl1B表现出对昆布二糖的最高基质特异性。与商业化酶诺维信188相比，Bgl1B表现出259倍的更大V_{max}、2.5倍的更低K_m及108倍的更大k_{cat}，从而显示出108倍的更大催化效率。在昆布二糖之后，Bgl1B具有高基质特异性，其顺序为纤维二糖、龙胆二糖、乳糖及琼脂二糖。

[0067] <实例6>使用HPLC及TLC确认Bgl1B蛋白的酶促反应特性

[0068] 使用高效液相色谱(High Performance Liquid Chromatography，HPLC)及薄层色谱(Thin Layer Chromatography，TLC)分析了使用为多糖的昆布多糖作为基质的Bgl1B蛋白的酶促反应特性。使用配备有凝胶渗透及配体交换柱(KS-802；昭和电工公司(Shodex))的安捷伦(Agilent)1100HPLC及折射率检测器(refractive index detector)执行了HPLC分析，且分析条件是流速为0.5毫升/分钟，柱温为80℃，且无菌水为流动相。对于TLC分析，将1μl反应产物装载到硅胶60板(默克公司(Merck))上，且然后使用正丁醇:乙酸:水(体积比为3:2:2)的混合溶剂进行了显影，并用10％(v/v)的硫酸进行了处理以实现可视化。

[0069] 作为在40℃下使3U的Bgl1B与0.2％(w/v)的昆布多糖反应24小时的结果，如图6(a)所示，从昆布多糖生产葡萄糖的产率非常高，即75％，且如图6(b)所示，通过HPLC分析确认了昆布多糖被Bgl1B降解，且因此，仅生产葡萄糖而不生产寡糖。

[0070] 此外，作为通过改变反应条件，使0.03U的极低浓度的Bgl1B与0.2％(w/v)的昆布

多糖反应的结果，如图7a-7b所示，从昆布多糖生产葡萄糖长达24小时，此后葡萄糖的量不再增加，且生产了具有低聚合度的寡糖，例如DP2、DP3及DP4。这些结果在昆布多糖的情况下也得到确认。

[0071] 作为0.002U的Bgl1B与0.3％(w/v)的昆布多糖反应的结果，如图8(a、b)所示，确认了DP3的生产。

[0072] 从这些结果中，确认了在期望的条件下，单独的Bgl1B可从昆布多糖生产作为主要产物的葡萄糖，即可发酵糖，且还确认了通过转糖苷酶活性从昆布多糖及昆布二糖生产作为功能材料的寡聚糖。

[0073] 工业适用性

[0074] 本发明可应用于通过酶促反应生产葡萄糖及昆布寡糖的领域。

<110> 高丽大学校产学协力团
<120> 从海藻生产葡萄糖及昆布多糖寡糖的新型β-葡萄糖苷酶
<130> X18U13C0303
<150> KR 10-2018-0028510
<151> 2018-03-12
<160> 4
<170> KopatentIn 2.0
<210> 1
<211> 444
<212> PRT
<213> 变形菌 2-40(Saccharophagus degradans 2-40)
<400> 1

Met Asn Arg Leu Thr Leu Pro Pro Ser Ser Arg Leu Arg Ser Lys Glu
1 5 10 15
Phe Thr Phe Gly Val Ala Thr Ser Ser Tyr Gln Ile Glu Gly Gly Ile
20 25 30
Asp Ser Arg Leu Pro Cys Asn Trp Asp Thr Phe Cys Glu Gln Pro Asn
35 40 45
Thr Ile Ile Asp Asn Thr Asn Gly Ala Ile Ala Cys Asp His Ile Asn
50 55 60
Arg Trp Gln Asp Asp Ile Glu Leu Ile Ala Asn Leu Gly Val Asp Ala
65 70 75 80
Tyr Arg Phe Ser Ile Ala Trp Gly Arg Val Ile Asn Leu Asp Gly Ser
85 90 95
Leu Asn Asn Glu Gly Val Thr Phe Tyr Lys Asn Ile Leu Thr Lys Leu
100 105 110
Arg Glu Lys Asn Leu Lys Ala Tyr Ile Thr Leu Tyr His Trp Asp Leu
115 120 125
Pro Gln His Leu Glu Asp Ala Gly Gly Trp Leu Asn Arg Asp Thr Ala
130 135 140
Tyr Lys Phe Arg Asp Tyr Val Asn Leu Ile Thr Gln Ala Leu Asp Asp
145 150 155 160
Asp Val Phe Cys Tyr Thr Thr Leu Asn Glu Pro Phe Cys Ser Ala Tyr
165 170 175
Leu Gly Tyr Glu Ile Gly Val His Ala Pro Gly Ile Lys Asp Leu Ala
180 185 190
Ser Gly Arg Lys Ala Ala His His Leu Leu Leu Ala His Gly Leu Ala
195 200 205

Met Gln Val Leu Arg Lys Asn Cys Pro Asn Ser Leu Ser Gly Ile Val
210 215 220
Leu Asn Met Ser Pro Cys Tyr Ala Gly Ser Asn Ala Gln Ala Asp Ile
225 230 235 240
Asp Ala Ala Lys Arg Ala Asp Asp Leu Leu Phe Gln Trp Tyr Ala Gln
245 250 255
Pro Leu Leu Thr Gly Cys Tyr Pro Asp Ala Ile Asn Ser Leu Pro Asp
260 265 270
Asn Ala Lys Pro Pro Ile Cys Glu Gly Asp Met Ala Leu Ile Ser Gln
275 280 285
Pro Leu Asp Tyr Leu Gly Leu Asn Tyr Tyr Thr Arg Ala Val Phe Phe
290 295 300
Ala Asp Gly Asn Gly Gly Phe Thr Glu Gln Val Pro Glu Gly Val Glu
305 310 315 320
Leu Thr Asp Met Gly Trp Glu Val Tyr Pro Gln Gly Leu Thr Asp Leu
325 330 335
Leu Ile Asp Leu Asn Gln Arg Tyr Thr Leu Pro Pro Leu Leu Ile Thr
340 345 350
Glu Asn Gly Ala Ala Met Val Asp Glu Leu Val Asn Gly Glu Val Asn
355 360 365
Asp Ile Ala Arg Ile Asn Tyr Phe Gln Thr His Leu Gln Ala Val His
370 375 380
Asn Ala Ile Glu Gln Gly Val Asp Val Arg Gly Tyr Phe Ala Trp Ser
385 390 395 400
Leu Met Asp Asn Phe Glu Trp Ala Leu Gly Tyr Ser Lys Arg Phe Gly
405 410 415
Ile Thr Tyr Val Asp Tyr Gln Thr Gln Lys Arg Thr Leu Lys Ala Ser
420 425 430
Gly His Ala Phe Ala Glu Phe Val Ser Ser Arg Ser
435 440

<210> 2
<211> 1335
<212> DNA
<213> 变形菌 2-40(Saccharophagus degradans 2-40)
<400> 2
atgaatagac ttacactacc gccttcttct cgtttgcgca gcaaagagtt tacctttggt 60
gttgcaacgt cgtcttacca aattgaaggc ggcatagatt ctcgcctgcc ctgtaattgg 120
gatacgttct gtgagcagcc caataccatt attgataaca ccaacggcgc cattgcttgc 180
gaccacataa atagatggca agacgatata gaacttattg ccaacctagg ggtagatgcc 240

taccgctttt ctattgcgtg gggccgtgtt attaatttag acggcagcct caataatgaa 300
ggcgttacat tttacaaaaa tattttaact aagcttcgcg aaaagaattt aaaagcttat 360
ataacgctat accactggga cttgccacaa catttagaag atgctggcgg ctggcttaac 420
cgcgataccg cctacaagtt tcgcgactat gtaaacctta taacccaagc gcttgatgac 480
gatgtatttt gctacacaac gttaaacgag ccctttgca gtgcctacct tggctatgaa 540
attggtgtac acgcaccggg tataaaagac ttagccagtg ggcgcaaagc cgcacaccat 600
ttattacttg cccatggctt agctatgcaa gtgctgcgaa aaaactgccc caatagttta 660
agcggcatag tgttaaacat gagcccttgt tacgccggca gcaacgcaca agcagatata 720
gatgcagcaa aacgcgcgga cgatttatta tttcagtggt atgcacaacc gctacttact 780
ggctgctacc ctgatgcaat aaacagcctg ccagacaatg ccaaaccacc tatttgtgaa 840
ggcgacatgg cgttaataag ccaaccttta gattatttag gccttaacta ctatacccgc 900
gcagtatttt ttgccgacgg taatggcggt tttaccgaac aagtacctga gggtgtagag 960
ctaaccgata tgggctggga agtttacccg caaggcttaa ccgatttact aatagaccta 1020
aaccaacgct ataccctacc cccgttactt attaccgaaa acggcgcagc aatggtggac 1080
gaacttgtta acggcgaagt taacgatatt gcccgaataa attattttca aacccattta 1140
caagcggtac acaacgccat tgaacaaggt gttgatgtac gcggttattt tgcttggagc 1200
ctaatggata attttgagtg ggcactgggt tacagcaaac gattcggtat tacctatgta 1260
gattaccaaa cacaaaagcg aacgctaaaa gccagcggcc acgcatttgc tgagtttgtc 1320
tcgagtagga gctaa 1335

<210> 3
<211> 39
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 用于扩增bgl1B的正向引物
<400> 3
atacatatga atagacttac actaccgcct tcttctcgt 39

<210> 4
<211> 41
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 用于扩增bgl1B的反向引物
<400> 4
atagcggccg cgctcctact cgagacaaac tcagcaaatg c 41

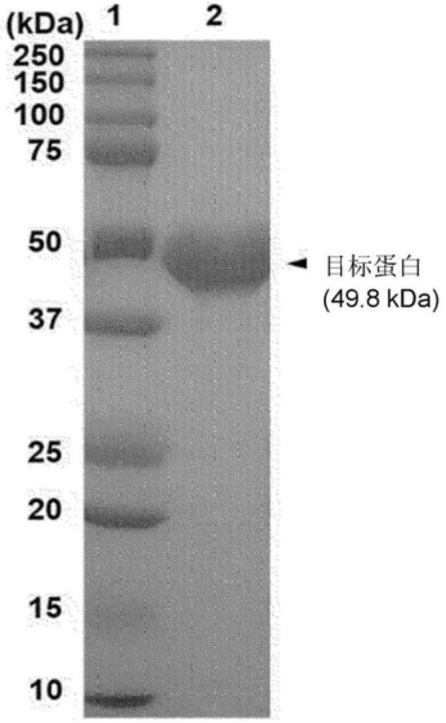

(kDa)
1
2
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
目标蛋白
(49.8 kDa)

图1

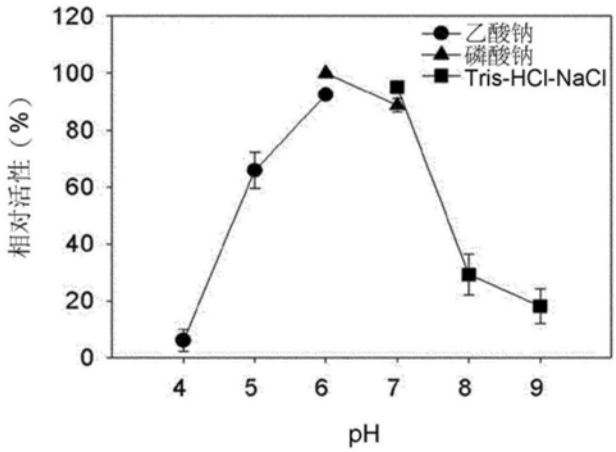

120
100
80
60
40
20
0
相对活性（%）
4
5
6
7
8
9
pH
乙酸钠
磷酸钠
Tris-HCl-NaCl

图2

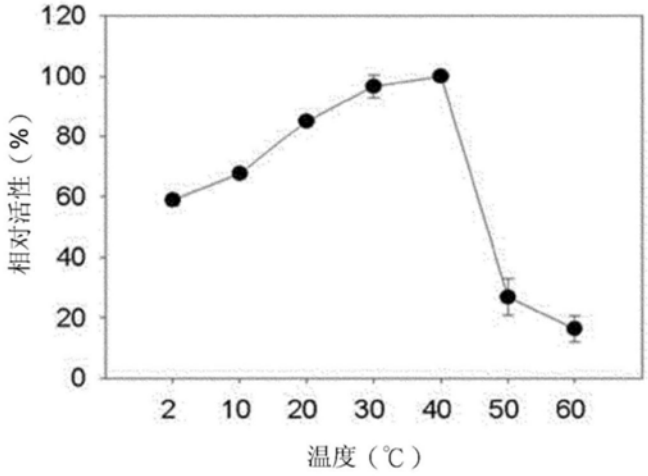

120
100
80
60
40
20
0
相对活性（%）
2
10
20
30
40
50
60
温度（℃）

图3

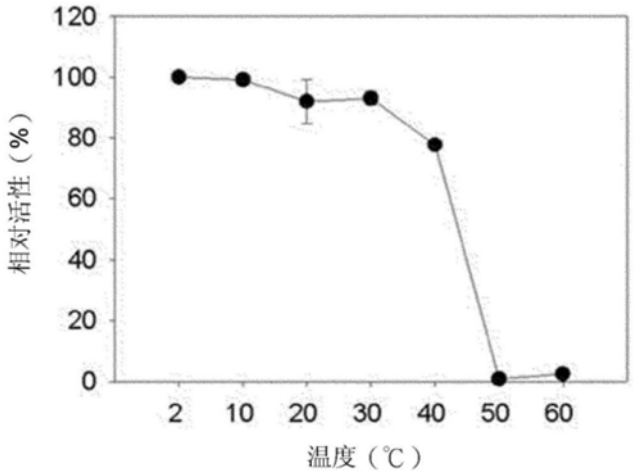

120
100
80
60
40
20
0
相对活性（%）
2
10
20
30
40
50
60
温度（℃）

图4

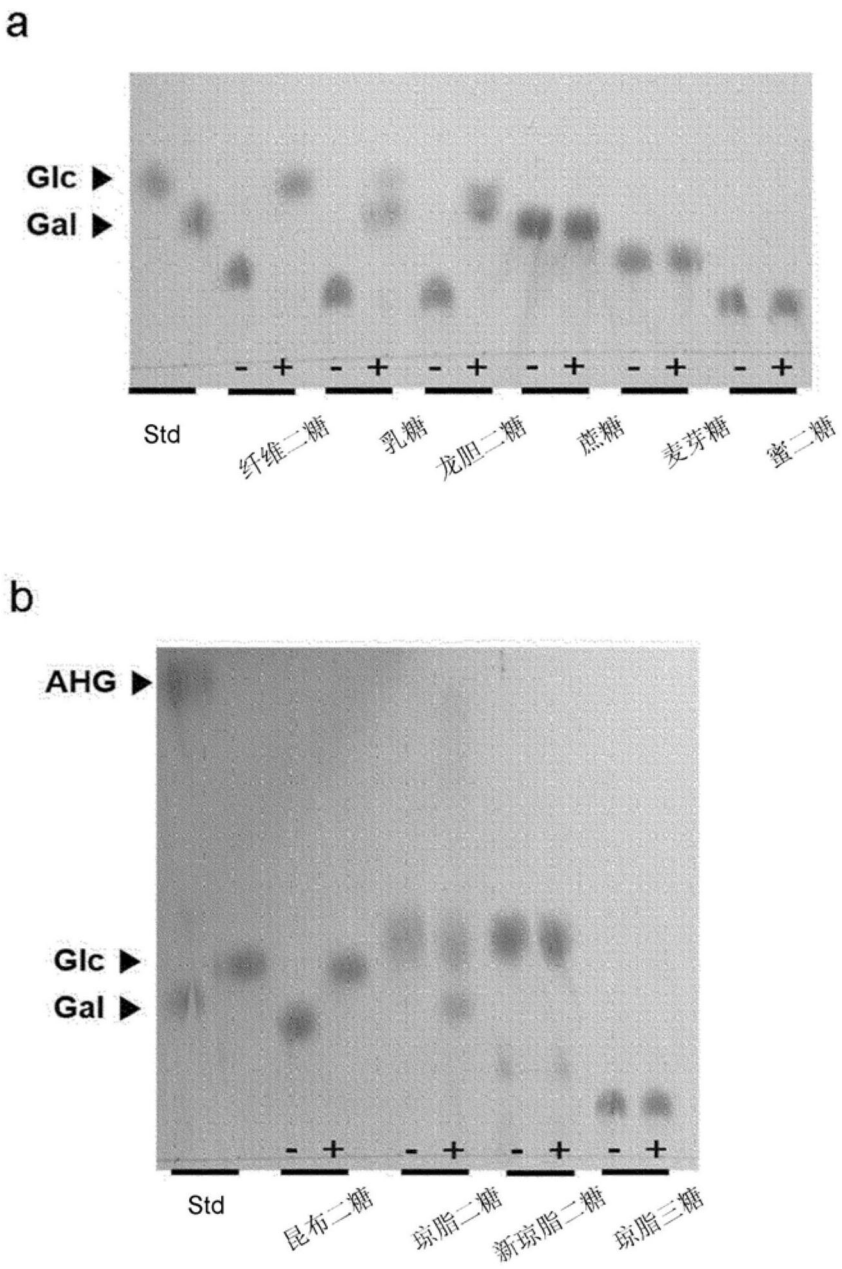

a
Glc
Gal
- + - + - + - + - + - +
Std
纤维二糖
乳糖
龙胆二糖
蔗糖
麦芽糖
蜜二糖
b
AHG
Glc
Gal
- + - + - + - +
Std
昆布二糖
琼脂二糖
新琼脂二糖
琼脂三糖

图5

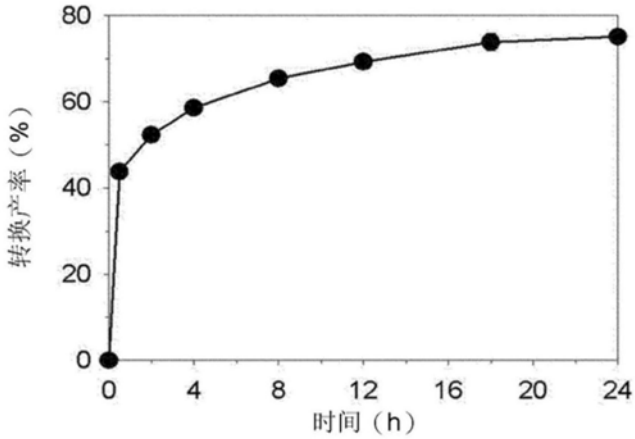

80
60
40
20
0
转换产率（%）
0
4
8
12
16
20
24
时间（h）

图6a

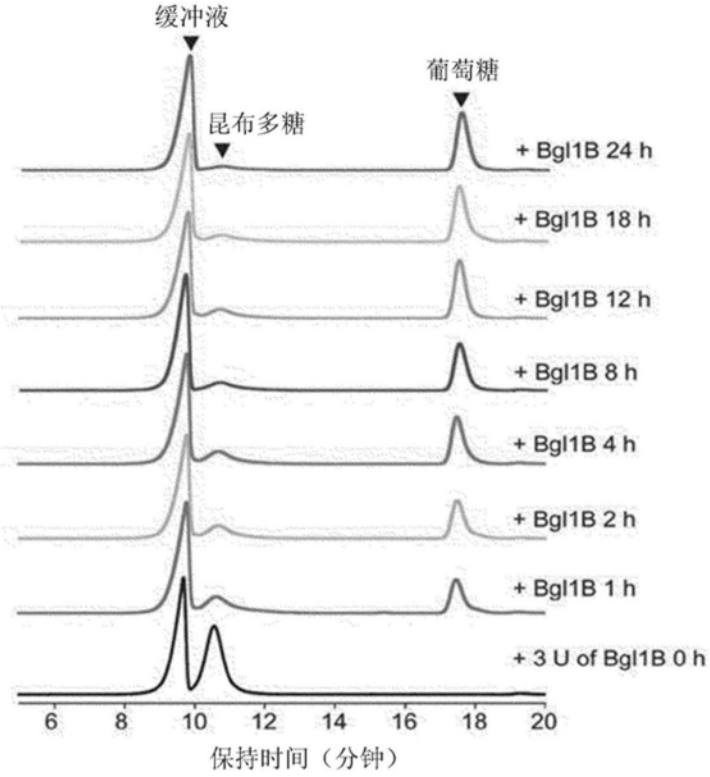

缓冲液
葡萄糖
昆布多糖
+ Bgl1B 24 h
+ Bgl1B 18 h
+ Bgl1B 12 h
+ Bgl1B 8 h
+ Bgl1B 4 h
+ Bgl1B 2 h
+ Bgl1B 1 h
+ 3 U of Bgl1B 0 h
6
8
10
12
14
16
18
20
保持时间（分钟）

图6b

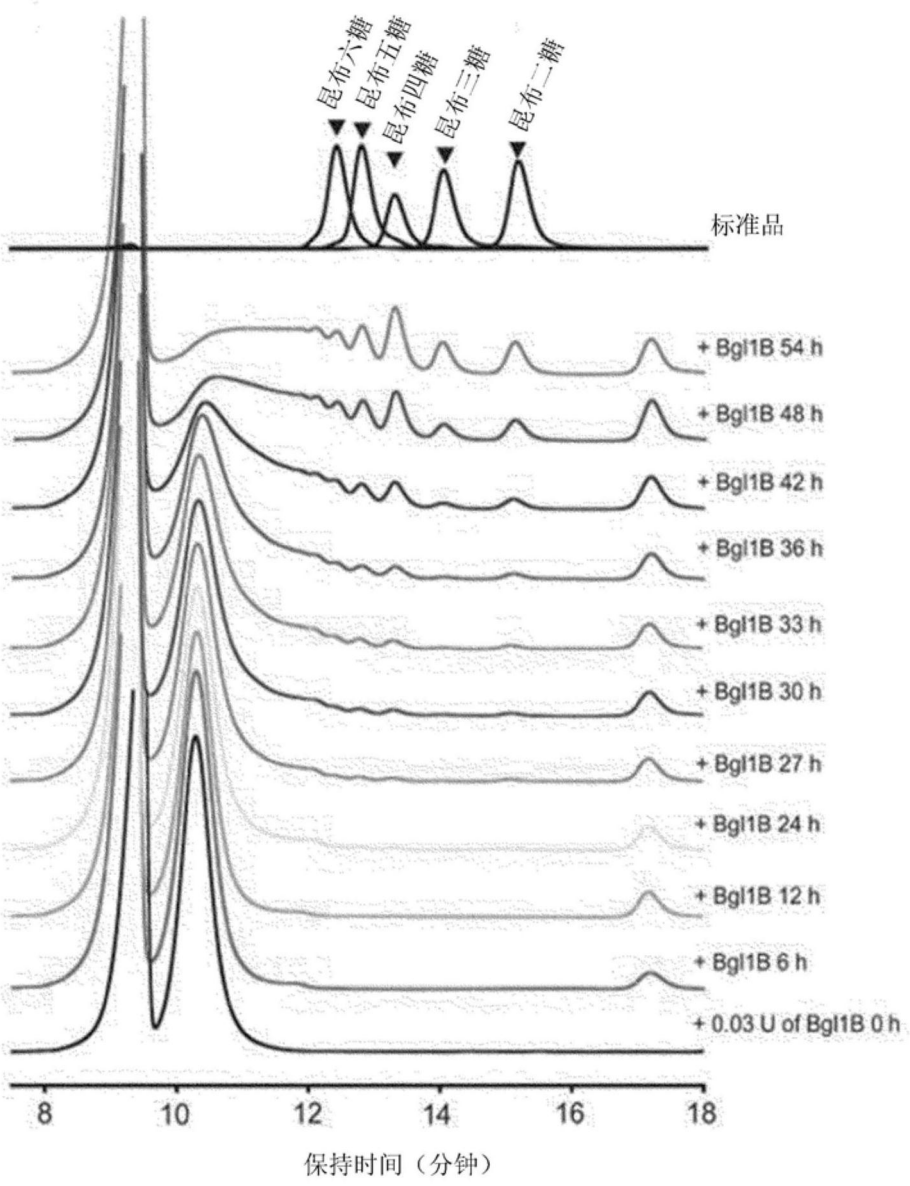

昆布六糖
昆布五糖
昆布四糖
昆布三糖
昆布二糖
标准品
+ Bgl1B 54 h
+ Bgl1B 48 h
+ Bgl1B 42 h
+ Bgl1B 36 h
+ Bgl1B 33 h
+ Bgl1B 30 h
+ Bgl1B 27 h
+ Bgl1B 24 h
+ Bgl1B 12 h
+ Bgl1B 6 h
+ 0.03 U of Bgl1B 0 h
8
10
12
14
16
18
保持时间（分钟）

图7a

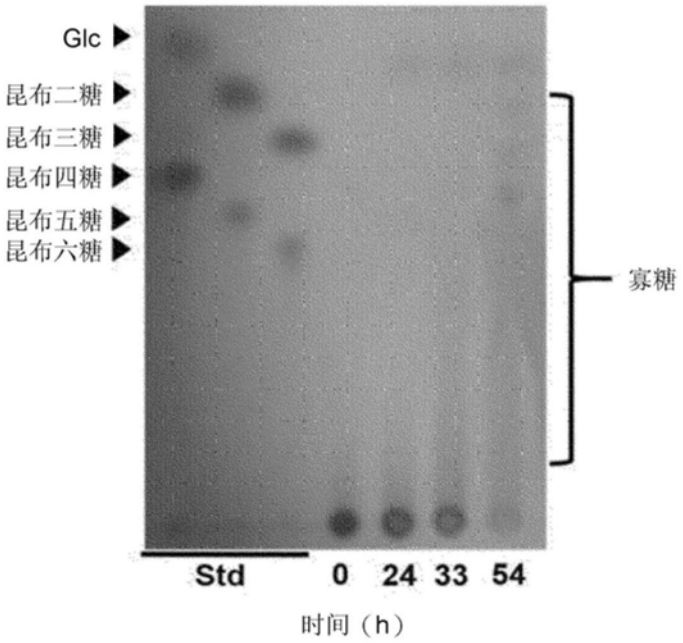

Glc
昆布二糖
昆布三糖
昆布四糖
昆布五糖
昆布六糖
寡糖
Std
0
24
33
54
时间（h）

图7b

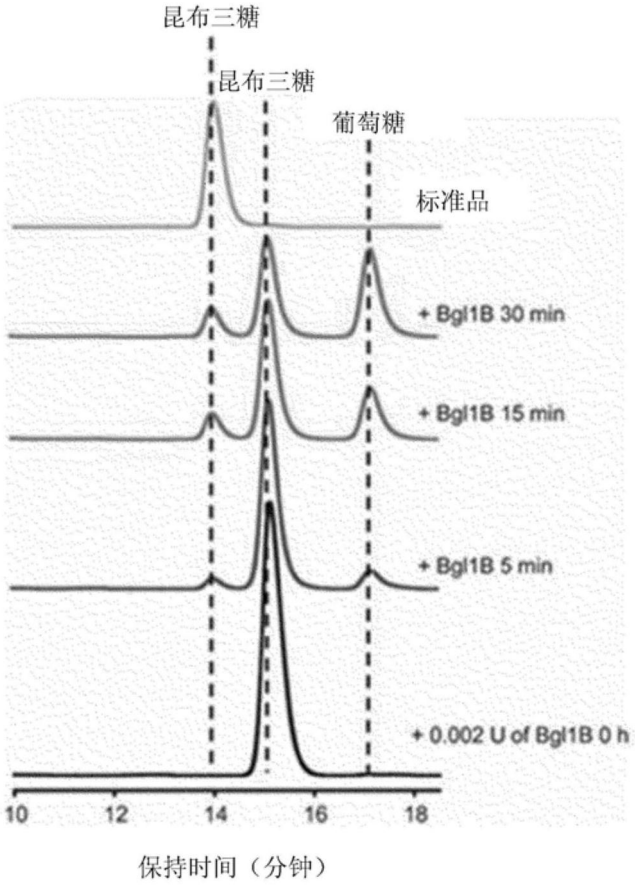

昆布三糖
昆布三糖
葡萄糖
标准品
+ Bgl1B 30 min
+ Bgl1B 15 min
+ Bgl1B 5 min
+ 0.002 U of Bgl1B 0 h
10
12
14
16
18
保持时间（分钟）

图8a

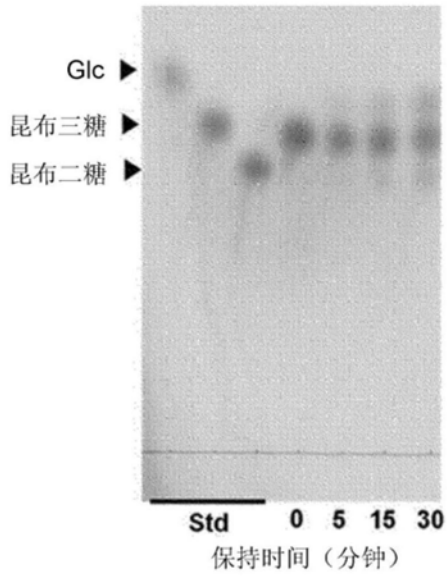


图8b

Bgl1B的核苷酸序列

Atgaatagacttacactaccgccttcttctcgtttgcgcagcaaagagtttacctttggtgttgcaacgtcgtcttaccaaattgaaggcggcatag
attctcGcctgccctgtaattgggatacgttctgtgagcagcccaataccattattgataacaccaacggcgccattgcttgcgaccacataaatag
atggcaagaCgatatagaacttattgccaacctaggggtagatgcctaccgcttttctattgcgtggggccgtgttattaatttagacggcagcct
caataatgaaggcgTtacattttacaaaaatattttaactaagcttcgcgaaaagaatttaaaagcttatataacgctataccactgggacttgcca
caacatttagaagatgctggCggctggcttaaccgcgataccgcctacaagtttcgcgactatgtaaaccttataacccaagcgcttgatgacga
tgtattttgctacacaacgttaaacgaGccctttgcagtgcctaccttggctatgaaattggtgtacacgcaccgggtataaaagacttagccagt
gggcgcaaagccgcacaccatttattacttgCccatggcttagctatgcaagtgctgcgaaaaaactgccccaatagtttaagcggcatagtgtt
aaacatgagcccttgttacgccggcagcaacgcacaAgcagatatagatgcagcaaaacgcgcggacgatttattatttcagtggtatgcacaa
ccgctacttactggctgctaccctgatgcaataaacagcctgcCagacaatgccaaaccacctatttgtgaaggcgacatggcgttaataagcca
acctttagattatttaggccttaactactatacccgcgcagtatttttgccGacggtaatggcggttttaccgaacaagtacctgagggtgtagag
ctaaccgatatgggctgggaagtttacccgcaaggcttaaccgatttactaatagAcctaaaccaacgctataccctacccccgttacttattaccg
aaaacggcgcagcaatggtggacgaacttgttaacggcgaagttaacgatattgcccgaAtaaattattttcaaacccatttacaagcggtacac
aacgccattgaacaaggtgttgatgtacgcggttattttgcttggagcctaatggataattttgagtgGgcactgggttacagcaaacgattcgg
tattacctatgtagattaccaaacacaaaagcgaacgctaaaagccagcggccacgcatttgctgagtttgtctcgagtaggagctaa

图8c