



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119876216 A

(43) 申请公布日 2025. 04. 25

(21) 申请号 202510095224.3

(22) 申请日 2025.01.21

(71) 申请人 中国科学院上海高等研究院
地址 201210 上海市浦东新区海科路99号

(72) 发明人 孙俊松 范梦慧 刘宇飞 乐菲

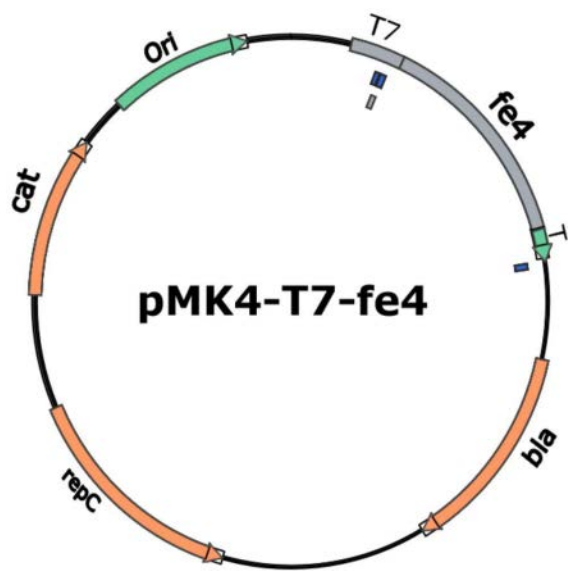
(74) 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司
31002
专利代理师 余永莉

(51) Int. Cl.
C12N 15/75 (2006.01)
C12N 15/55 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 9/18 (2006.01)
C12R 1/125 (2006.01)

权利要求书1页 说明书4页
序列表（电子公布） 附图2页

(54) 发明名称
一种用于发酵生产阿魏酸酯酶的枯草芽孢杆菌表达系统及其应用

(57) 摘要
本发明公开了一种用于发酵生产阿魏酸酯酶的枯草芽孢杆菌表达系统及其应用。该枯草芽孢杆菌表达系统的构建方法包括以下步骤：1) 合成序列如SEQ ID NO:1所示阿魏酸酯酶的编码基因；2) 将所述阿魏酸酯酶的编码基因构建到一种穿梭表达质粒中，得到阿魏酸酯酶表达质粒；3) 将所述阿魏酸酯酶表达质粒转入枯草芽孢杆菌底盘菌株中，即可得到一种用于发酵生产阿魏酸酯酶的枯草芽孢杆菌表达系统。本发明通过将一种经密码子优化的革兰氏阳性菌来源的阿魏酸酯酶基因构建至枯草芽孢杆菌的T7表达系统，只需补加木糖或廉价的麸皮，即可高效分泌表达阿魏酸酯酶。该酶可用于饲料或食品原料的加工以及阿魏酸的生产等领域，具有广阔的应用前景。



1. 一种用于发酵生产阿魏酸酯酶的枯草芽孢杆菌表达系统的构建方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 合成序列如SEQ ID NO:1所示阿魏酸酯酶的编码基因;

2) 将所述阿魏酸酯酶的编码基因构建到一种穿梭表达质粒中,得到阿魏酸酯酶表达质粒;

3) 将所述阿魏酸酯酶表达质粒转入枯草芽孢杆菌底盘菌株中,即可得到一种用于发酵生产阿魏酸酯酶的枯草芽孢杆菌表达系统。

2. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述枯草芽孢杆菌表达系统通过T7 RNA聚合酶及其组成型启动子pT7转录阿魏酸酯酶的编码基因。

3. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述穿梭表达质粒为pMK4-T7。

4. 根据权利要求1所述的构建方法,其特征在于,所述枯草芽孢杆菌底盘菌株为枯草芽孢杆菌164T7P。

5. 一种根据权利要求1-4中任意一项所述的构建方法得来的用于发酵生产阿魏酸酯酶的枯草芽孢杆菌表达系统。

6. 一种如权利要求5所述的枯草芽孢杆菌表达系统在发酵生产阿魏酸酯酶中的应用。

7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,将所述枯草芽孢杆菌表达系统在LB培养基中,以及木糖或麸皮的诱导下,进行阿魏酸酯酶的发酵生产。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,在LB培养基中加入0.1-1w/V%木糖或1.0-3.0w/V%麸皮,用于高效地诱导阿魏酸酯酶的表达和宿主细胞株的生长。

9. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,所述枯草芽孢杆菌表达系统可用于饲料或食品原料的微生物生物转化。

一种用于发酵生产阿魏酸酯酶的枯草芽孢杆菌表达系统及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于枯草芽孢杆菌工程菌构建技术领域,具体涉及一种用于发酵生产阿魏酸酯酶的枯草芽孢杆菌表达系统及其应用。

背景技术

[0002] 作为GRAS (Generally Recognised As Safe) 菌种,枯草芽孢杆菌底盘株被广泛应用于生物工程中,尤其是用于医药食品加工领域的工业酶类。尽管如此,枯草芽孢杆菌的分子遗传工具,例如启动子元件等,相比大肠杆菌仍然有限,应用最广泛的启动子是P43。近年来陆续报道了几种新型启动子,但它们的效率仍比不上T7表达系统中的T7启动子。T7启动子最早被用于大肠杆菌中,在T7 RNA聚合酶的作用下,能够非常高效地起始转录其下游的DNA序列。近年来有文献报道T7表达系统可以在芽孢杆菌中发挥作用,但在枯草芽孢杆菌ATCC 6051a中还未见报道。枯草芽孢杆菌ATCC 6051a又称A164菌株,与实验室研究使用的枯草芽孢杆菌模式菌168及其衍生菌种相比,其分泌表达异源蛋白的效果更好,在含有蛋白胨的培养基中生长更快,具有更好的工业应用的潜力。

[0003] 阿魏酸酯酶(EC 3.1.1.73; Ferulic acid esterase)是一种羧酸酯水解酶,该酶可以水解植物细胞壁中阿魏酸与木聚糖、阿拉伯糖形成的酯键,释放出游离的阿魏酸。同时,可以使纤维素酶和纤维素充分的接触,提高植物细胞壁中纤维素的降解。此外,阿魏酸酯酶在医药、食品、饲料、造纸、纺织等工业领域中有着广泛的应用。因此越来越多的研究者致力于对阿魏酸酯酶的研究。根据FAE的蛋白质一级结构以及对四种合成底物(香豆酸甲酯,阿魏酸甲酯,芥子酸甲酯和咖啡酸甲酯)的作用特点,将FAE分为A、B、C、D四类。

[0004] A类FAE可以专一作用于和FA结构类似的苯环中含有CH₃O-的酚类酯,能催化水解芥子酸甲酯、对香豆酸甲酯以及阿魏酸甲酯,但却对咖啡酸甲酯没有催化作用。A类FAE能够专一性切割FA和阿拉伯糖连接的1,5-酯键,其氨基酸序列与脂肪酶的序列相近。黑曲霉来源的FAE属于A类。B类FAE除了对芥子酸甲酯没有催化效果,其他三种底物都可以催化,它对以1,6-酯键结合在半乳糖残基上以及以1,2-酯键结合在阿拉伯糖残基上的FA有催化作用,其蛋白质一级结构与乙酰基木聚糖酯酶类似。C类和D类FAE能水解所有4种羟基肉桂酸甲酯底物,其中C类FAE不能水解FA二聚体,其蛋白质一级结构与绿原酸酯酶、鞣酸酶相似,而D类FAE与木聚糖酶相比显示出较高的蛋白质一级结构相似性,可释放阿魏酸二聚体。目前细菌型阿魏酸酯酶的表达量很低,通常是利用大肠杆菌进行胞内表达,利用昂贵的IPTG进行诱导表达,并且需要对宿主细胞进行破壁处理,导致酶的纯化成本太高,没有商业化应用前景。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种用于发酵生产阿魏酸酯酶的枯草芽孢杆菌表达系统及其应用,从而解决现有技术中阿魏酸酯酶的产量较低,无法实现商业化生产的问题。

[0006] 为了解决上述问题,本发明采用的技术方案如下:

[0007] 根据本发明的第一方面,提供一种用于发酵生产阿魏酸酯酶的枯草芽孢杆菌表达系统的构建方法,包括以下步骤:1)合成序列如SEQ ID NO:1所示阿魏酸酯酶的编码基因;2)将所述阿魏酸酯酶的编码基因构建到一种穿梭表达质粒中,得到阿魏酸酯酶表达质粒;3)将所述阿魏酸酯酶表达质粒转入枯草芽孢杆菌底盘菌株中,即可得到一种用于发酵生产阿魏酸酯酶的枯草芽孢杆菌表达系统。

[0008] 根据本发明,所述枯草芽孢杆菌表达系统通过T7 RNA聚合酶及其组成型启动子pT7转录阿魏酸酯酶的编码基因。

[0009] 优选的,所述穿梭表达质粒为pMK4-T7。但是应当理解的是,本发明并不仅限于pMK4-T7表达质粒,还可以是其他穿梭表达质粒。

[0010] 优选的,所述枯草芽孢杆菌底盘菌株为枯草芽孢杆菌164T7P。

[0011] 根据本发明的一个优选实施例,采用的枯草芽孢杆菌底盘菌株为一株可高水平表达外源蛋白的枯草芽孢杆菌164T7P(参见中国发明专利申请CN112226451A),该菌株通过在枯草芽孢杆菌基因组的aprE位点插入木糖诱导的T7 RNA聚合酶表达系统,对外源蛋白进行高水平转录表达;此外,该菌株在nprE位点整合一份comk基因表达框,提高了其遗传操作效率。但是应当理解的是,该枯草芽孢杆菌164T7P为本发明的最优选实施例,本发明方法并不仅限于该枯草芽孢杆菌164T7P,可采用任何枯草芽孢杆菌。

[0012] 根据本发明的一个优选方案,提供一种枯草芽孢杆菌表达系统的构建方法,包括如下步骤:1)通过基因序列优化后的合成序列如SEQ ID NO:1所示的阿魏酸酯酶的编码基因;2)将SEQ ID NO:1所示的阿魏酸酯酶的编码基因构建到一种穿梭表达质粒中,得到如SEQ ID NO:2所示的表达质粒pMK4-T7-fe4;3)将pMK4-T7-fe4转入枯草芽孢杆菌164T7P中得到164T7P-pMK4-T7-fe4表达株。

[0013] 根据本发明的第二方面,提供一种根据上述构建方法得来的用于发酵生产阿魏酸酯酶的枯草芽孢杆菌表达系统。

[0014] 根据本发明的第三方面,提供一种枯草芽孢杆菌表达系统在发酵生产阿魏酸酯酶中的应用。

[0015] 将所述枯草芽孢杆菌表达系统在LB培养基中,以及木糖或麸皮的诱导下,进行阿魏酸酯酶的发酵生产。

[0016] 优选的,在LB培养基中加入0.1-1w/V%木糖或1.0-3.0w/V%麸皮,用于高效地诱导阿魏酸酯酶的表达和宿主细胞株的生长。

[0017] 根据本发明,所述枯草芽孢杆菌表达系统既可用于阿魏酸酯酶的生产,也可用于饲料或食品原料的微生物生物转化。

[0018] 应当理解的是,本发明中所采用的如SEQ ID NO:1所示的阿魏酸酯酶,为发明人经过一系列突变,经密码子优化过的革兰氏阳性菌来源的阿魏酸酯酶基因。进一步的,本发明将该阿魏酸酯酶基因通过枯草芽孢杆菌表达后实现分泌,这在当前是相当罕见的,更令人惊喜的是,还实现了阿魏酸酯酶的高效分泌表达。发明人在此之前筛选了多种酶,只有这一种阿魏酸酯酶的表达效果最为出色。酶与表达质粒以及宿主细胞之间的选择性在此之前都是未知的,而本发明通过阿魏酸酯酶基因、表达质粒以及宿主细胞的选择,首次构建一种枯草芽孢杆菌表达系统,成功实现了阿魏酸酯酶的高效分泌表达。

[0019] 其次,本发明还提供一种利用枯草芽孢杆菌表达系统实现阿魏酸酯酶的发酵生产方法。该方法仅需使用木糖或廉价的麸皮等作为表达诱导物,即可实现高表达量,且易于实现工业化生产。

[0020] 与现有技术相比,根据本发明提供的一种用于发酵生产阿魏酸酯酶的枯草芽孢杆菌表达系统及其应用具有以下有益效果:

[0021] 1) 本发明构建的阿魏酸酯酶表达菌株可以以木糖或廉价的麸皮为诱导物实现阿魏酸酯酶的发酵生产;

[0022] 2) 本发明构建的阿魏酸酯酶表达菌株生长快速,酶蛋白表达量及比酶活高,可自主分泌表达,纯化和应用成本低廉,具有良好的工业应用前景。

[0023] 综上所述,本发明通过将一种经密码子优化的革兰氏阳性菌来源的阿魏酸酯酶基因构建至枯草芽孢杆菌的T7表达系统,只需补加木糖或廉价的麸皮,即可高效分泌表达阿魏酸酯酶。该酶可用于饲料或食品原料的加工以及阿魏酸的生产等领域,具有广阔的应用前景。

附图说明

[0024] 图1为阿魏酸酯酶表达质粒pMK4-T7-fe4的示意图;

[0025] 图2为枯草芽孢杆菌表达系统分泌表达阿魏酸酯酶后SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳照片(SDS-PAGE);

[0026] 图3为阿魏酸酯酶的酶活测定结果。

具体实施方式

[0027] 下面结合实施例对本发明的技术方案进行详细说明。实施例中未注明具体条件的操作,按照常规条件或制造商建议的条件进行。以下采用的试剂和生物材料如未特别说明,均为商业化产品。

[0028] 实施例1:阿魏酸酯酶表达质粒的构建

[0029] 图1为阿魏酸酯酶表达质粒pMK4-T7-fe4的示意图。其构建基于质粒pMK4-T7,首先以该质粒为模板,扩增其线性DNA,扩增线性的pMK4-T7质粒片断。使用引物对VecF (SEQ ID NO:3)/VecR (SEQ ID NO:4),PCR反应后,利用来自诺唯赞公司的FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit产物纯化试剂盒进行DNA的清洁回收;再以化学合成的编码阿魏酸酯酶的DNA为模板,扩增fe4基因片断,引物对为fe4-F (SEQ ID NO:5)/fe4-R (SEQ ID NO:6),扩增后的PCR产物通过限制内切酶Dpn I去除模板,再利用诺唯赞公司的FastPure Gel DNA Extraction Mini Kit产物纯化试剂盒进行DNA的清洁回收;然后通过融合PCR完成pMK4-T7-fe4的构建,融合PCR操作如下:PCR反应体系:fe4片段1 μ L,线性化质粒pMK4-T7 1 μ L,2 $\times$ Phanta Master Mix 25 μ L,添加ddH₂O至反应体系为50 μ L。PCR反应条件为预变性95 $^{\circ}$ C5min,然后变性95 $^{\circ}$ C15s,退火55 $^{\circ}$ C15s,延伸72 $^{\circ}$ C2min,循环数30。取10 μ L PCR反应产物转化枯草芽孢杆菌164T7P,孵育后均匀涂布于含有10 μ g/mL氯霉素的抗性平板,放置于37 $^{\circ}$ C恒温箱过夜培养,对于所长出的单菌落,通过菌落PCR鉴定,阳性转化子即为转化成功的菌种,随机挑取单克隆提取质粒,交由上海杰李生物技术有限公司测序,鉴定完全正确的质粒即为质粒pMK4-T7-fe4,所对应的重组菌命名为枯草芽孢杆菌164T7P-pMK4-T7-fe4。

[0030] 实施例2阿魏酸酯酶的分泌表达及活性检测

[0031] 除非特殊说明,以下培养基中均含有10 μ g/mL氯霉素。使用枯草芽孢杆菌164T7P-pMK4-T7-fe4做摇瓶发酵实验:首先挑取单克隆到装有3mL LB培养基(配方为10g/L蛋白胨,10g/L NaCl,5g/L酵母粉)的试管中,200rpm,37 $^{\circ}$ C在恒温摇床过夜培养;然后取500 μ L的培养物转接到装有50mL LB培养基的500mL摇瓶中,200rpm,37 $^{\circ}$ C在恒温摇床培养;待生长 $\sim$ 4h或OD₆₀₀到1左右,向培养基中添加终浓度为0.1-1.0% (w/V) 的木糖诱导;每隔24h取一次样,使用酶标仪测定OD₆₀₀。

[0032] 各种木质纤维素等含量丰富的农作物废弃物(麦麸、玉米麸、甜菜渣和啤酒糟等)中含有大量的阿魏酸。FAEs作为辅助酶,可协助木质素降解酶或果胶酶等进入植物细胞壁的作用位点,促进植物中生物质的转化,释放出具有生物活性的阿魏酸或其他酚酸化合物。麸皮为小麦加工的副产物,富含阿拉伯木聚糖。本部分与上述以木糖为诱导物的发酵方法基本相同,区别仅在于把诱导物木糖替换成廉价的麸皮,其他方法步骤均相同:首先挑取单克隆到装有3mL LB培养基的试管中,200rpm,37 $^{\circ}$ C在恒温摇床过夜培养;然后取500 μ L的培养物转接到装有50mL LB+1.0-3.0% 麸皮 (w/V,小麦麸皮或玉米麸皮) 培养基的500mL摇瓶中,200rpm,37 $^{\circ}$ C在恒温摇床培养每隔24h取一次样,图2显示了利用枯草芽孢杆菌分泌表达阿魏酸酯酶后SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后染色的图,可看出阿魏酸酯酶可在木糖或木糖/小麦麸皮的诱导下高水平表达。

[0033] 阿魏酸酯酶活检测原理为阿魏酸甲酯在340nm下具有最大光吸收,阿魏酸酯酶可以降解阿魏酸甲酯中的酯键使吸光度下降,通过测定340nm下的吸光度差值(ΔA_{340})来计算不同样品的酶活。具体操作如下:称取阿魏酸甲酯100mg,用无水乙醇定容至100mL;从中依次取0.02、0.04、0.06、0.08和0.1mL阿魏酸甲酯溶液,并分别用无水乙醇定容至10mL,获得浓度分别为9.6、19.2、28.8、38.4和48 μ mol/L的阿魏酸甲酯标准溶液。分别取稀释后的0.6mL粗酶液加至2mL离心管中,于30-70 $^{\circ}$ C水浴锅中预热15min,再依次加入0.2mL的pH分别为3.0-8.0的阿魏酸甲酯溶液,在不同温度的恒温水浴锅中反应30min;以煮沸失活的酶溶液为对照,用酶标仪检测反应体系在340nm的反应终止时刻的吸光度。定义每min水解1 μ mol阿魏酸甲酯为一个酶活单位,得到的酶活计算公式:酶活性=[x(失活)-x(正常)] $\times$ V样总 $\times$ N/(1000 $\times$ T $\times$ V样)。其中x为样品 ΔA_{340} 的吸光值代入标准曲线后计算得到的值;V样总为提取液总体积,0.5mL;N为稀释倍数;V样为加入反应体系的样本体积;T为反应时间,30min。得到的阿魏酸酯酶的酶活数据如图3所示,可看出pH=7,温度为40 $^{\circ}$ C时,阿魏酸酯酶的酶活最高,为228.56U/L。

[0034] 以上所述的,仅为本发明的较佳实施例,并非用以限定本发明的范围,本发明的上述实施例还可以做出各种变化。凡是依据本发明申请的权利要求书及说明书内容所作的简单、等效变化与修饰,皆落入本发明专利的权利要求保护范围。本发明未详尽描述的均为常规技术内容。

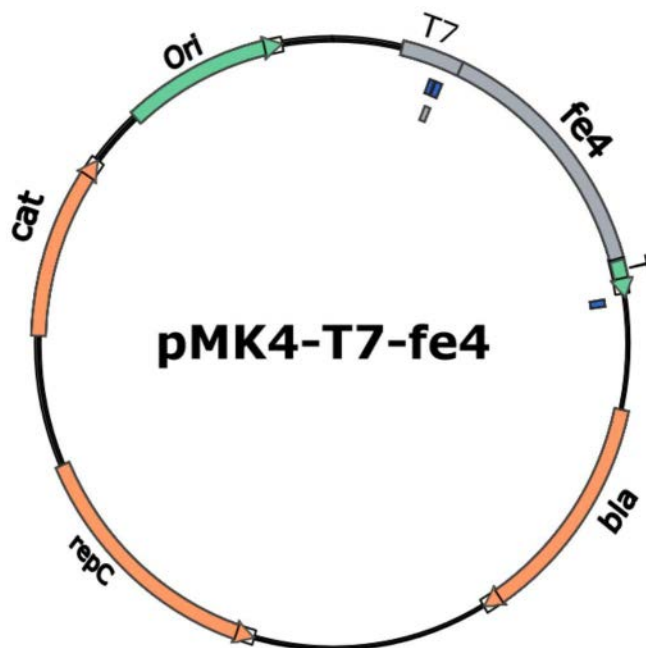


图1

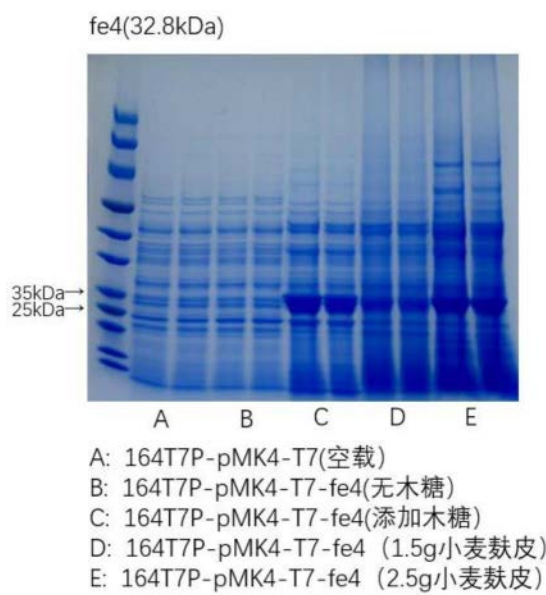


图2

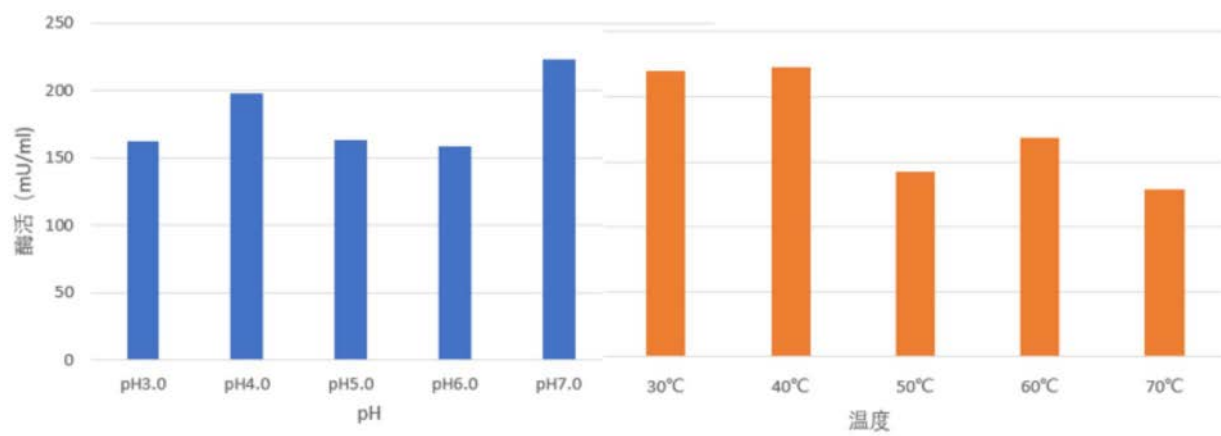


图3