

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200510018574.2

[51] Int. Cl.

*C12N 1/19 (2006.01)*

*C12R 1/84 (2006.01)*

*C12N 15/56 (2006.01)*

*C12N 9/24 (2006.01)*

*C12P 19/00 (2006.01)*

[45] 授权公告日 2007年6月20日

[11] 授权公告号 CN 1322110C

[22] 申请日 2005.4.19

[21] 申请号 200510018574.2

[73] 专利权人 湖北大学

地址 430062 湖北省武汉市武昌区宝集安

[72] 发明人 屠俊 陈亚兰

[56] 参考文献

US5534429A 1996.7.9

CN1544640A 2004.11.10

Construction of a *Pichia pastoris* yeast strain that carries amutant hepatitis B surface antigen gene. Muzio. V, et al, *Biotechnol. Apl.*, Vol. 2 No. 12 1995

Construction of a *Pichia pastoris* yeast strain that carries amutant hepatitis B surface antigen gene. Muzio. V, et al, *Biotechnol. Apl.*, Vol. Vol. 12 No. No. 2 1995

审查员 魏聪

[74] 专利代理机构 武汉金堂专利事务所

代理人 丁齐旭

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称

一种酵母基因工程菌及耐热耐碱木聚糖酶制剂和应用方法

[57] 摘要

本发明是通过基因工程的手段构建能高效表达耐热耐碱木聚糖酶的酵母基因工程菌，并从其中培养分离纯化制取耐热耐碱木聚糖酶，从而能高效、经济的转化制备木寡糖。利用本发明的酵母基因工程菌 GS115/HB705 制备的耐热耐碱木聚糖酶酶活性可达 426IU/ml，耐热性可达 80℃，耐碱性可达 pH10.6。利用该耐热耐碱木聚糖酶生产木寡糖纯度高，效益好。

1、一种毕赤酵母工程菌 (*Pichia pastoris*) GS115/HB705, 其保藏号为 CCTCC No:M205033。

2、按权利要求 1 所述的酵母基因工程菌制备的耐热耐碱木聚糖酶, 其特征在于将权利要求 1 所述的表达耐热耐碱木聚糖酶的酵母基因工程菌, 在以甲醇为碳源的培养基中, 温度 24°C—28°C, 经 24—360 小时诱导培养, 每隔一定时间测酶活, 酶活性达 36—426IU/ml 时停止诱导培养, 将完成诱导培养的酵母基因工程菌经高速离心除去菌体, 收集上清液, 即粗酶液, 经过滤浓缩即得耐热耐碱木聚糖酶产品, 该木聚糖酶的最适反应 pH 为 8.5, 最适反应温度为 70°C, 在 30°C—85°C 范围内仍具 60%以上酶活性, 在 50°C—80°C 范围内, 仍具 80%以上酶活性; 其在 70°C、pH8.5 时的半衰期为 30min, 在 pH 4.0—10.6 范围内仍具 80%以上酶活性。

3、按权利要求 2 所述的耐热耐碱木聚糖酶水解制备木寡糖的方法, 其特征在于:

- 1)、将抽提于玉米芯的木聚糖配制成浓度为 10—20% 木聚糖的溶液;
- 2)、按每 50—100g 木聚糖对应 1ml 的权利要求 2 所述的耐热耐碱木聚糖酶粗酶液的比例加权利要求 2 所述的耐热耐碱木聚糖酶;
- 3)、上述混合液在 60°C—80°C、时间 4—12 小时进行水解反应;
- 4)、将水解物进行离心去残渣, 取上清液, 再经微滤、超滤、真空干燥即为木寡糖成品。

## 一种酵母基因工程菌及耐热耐碱木聚糖酶制剂和应用方法

### 技术领域

本发明涉及的是酵母基因工程菌，特别是一种高效表达耐热耐碱木聚糖酶的酵母基因工程菌及耐热耐碱木聚糖酶制剂和耐热耐碱木聚糖酶水解制备木寡糖的方法。

### 背景技术

植物是自然界中主要的可再生有机资源，其主要成分是纤维素，半纤维素和木质素。其中半纤维素约占植物干重的35%，是除纤维素外，自然界中最为丰富的多糖，而半纤维素主要由木聚糖等多糖组成。作为木聚糖降解的主要作用酶， $\beta$ -1,4-内切木聚糖酶使木聚糖降解为木聚寡糖或者木糖。

现在，木聚糖酶已被用于纸浆制造、生物漂白、禽畜饲料品质改进等生产实践上。在造纸工业，利用木聚糖酶作为纸浆漂白助剂不仅可以提高纸张的白度和强度，还可以减少氯的用量，从而减轻对环境的污染(Wong K K Y, CRC Crit, Rev et al. Biotechnol. 1992, 12:413~435)。在食品工业，用木聚糖酶水解木聚糖的方法来生产功能性低聚木糖已成为现实(尤新. 食品工业科技. 2001, 6:1~4)。在饲料行业，利用木聚糖酶可以改善饲料的营养价值，从而提高饲料的利用率。我国农业部制定的《允许使用的饲料和饲料添加剂品种目录》上，将木聚糖酶列入饲料级酶制剂。然而木聚糖酶在饲料行业的应用面临产量低、成本高、耐热性酶难以获得等问题。

由于木聚糖在碱性条件下的可溶性最高，故碱性木聚糖酶尤其倍受关注。同时，木聚糖酶在应用中所进行的预处理过程通常需高温条件，因此，热稳定性高的耐高温木聚糖酶尤显重要。而且，现有木聚糖酶发酵产量较低、分离、纯化工艺较复杂已成为目前木聚糖酶规模化应用的关键限制因子。因此，寻找或产生高温、耐碱木聚糖酶，并显著提高木聚糖酶的酶活性及其在宿主中的分泌表达水平则成为当前木聚糖酶研究中的一个非常重要的方向。

目前，国内有关科研单位广泛进行了木聚糖酶及其相关内容的研究。如中科院微生物研究所刘伟丰、毛爱军、祝令香、赵云、董志扬等人对耐碱性木聚糖酶基因在短小芽孢杆菌中高效分泌表达的研究(见微生物学报, Vol.

44. August. No. 4. 2004, 487-490), 其酶活性 968.108 IU/mL, 最适反应温度为 55 °C, 在 60 °C 条件下保温 2h 酶活力下降 90 %, 该木聚糖酶不耐高温。

中国农业大学王海, 李里特, 石波等人 用玉米芯酶法制备低聚木糖的研究, (见食品科学: 2002, Vol, 23, No. 5, 81-83) 其木聚糖酶酶活性 3.6IU/ml, 发酵酶活低, 耐热或耐碱性不够好。

国外 Guptan N 等 (Cloning, Expression, and Sequence Analysis of the Gene Encoding the Alkali-Stable, Thermostable Endoxylanase from Alkalophilic, Mesophilic Bacillus sp. Strain NG-27. Appl. Environ. Microbiol, 2000, 66 (6): 2631-2635) 克隆了一个耐热耐碱的木聚糖酶基因, 但他们只在大肠杆菌中对该基因实现了表达, 在 1000ml 摇瓶中测得的酶活仅为 7IU/ml。

### 发明内容

本发明是通过基因工程的手段构建能高效表达耐热耐碱木聚糖酶的酵母基因工程菌, 并从其中培养分离纯化制取耐热耐碱木聚糖酶, 从而能高效、经济的转化制备木寡糖。

使用的微生物: 本发明涉及的酵母基因工程菌(毕赤酵母菌 *Pichia pastoris* GS115/HB705), 它具有高效表达耐热耐碱木聚糖酶的特性, 该菌株于 2005 年 4 月 15 日在中国典型培养物保藏中心保藏, 保藏号为 CCTCC No:M205033 (以下简称 GS115/HB705)

GS115/HB705 菌株的菌学特性:

a、形态特征: 毕赤酵母的无性生殖为芽殖, 有时有假菌丝。有性生殖产生子囊内含有 1---4 枚光滑圆形、礼帽形或土星子囊孢子。

b、生理生化特征: 毕赤酵母能利用特殊的物质为原料生长, 如石油、甲醇、氨态氮、有机酸等。GS115/HB705 菌株具有毕赤酵母的生理生化特征, 同时因插入了耐热耐碱木聚糖酶基因, 具有高效表达耐热耐碱木聚糖酶基因的特性。

本发明是这样实现的。酵母基因工程菌 GS115/HB705 (*Pichia pastoris*) 是通过构建环境基因组文库, 并从中筛选出一耐热耐碱木聚糖酶基因, Blast 的结果发现, 该基因与来源于 *Bacillus* sp. NG-27 的木聚糖酶基因 AF015445 在核苷酸水平具 98% 同源性, 在氨基酸水平具 100% 同源性。根据其序列设计引物, 通过 PCR 扩增出上述耐热耐碱木聚糖酶基因, 并将此基因插入到毕赤酵母整合表达载体 pHBM905 中, 然后将得到的含耐热耐碱木聚糖酶基因的表达式载体导入到毕赤酵母中, 再从中筛选出一种高效表达耐热耐碱木聚糖酶酶的酵母基

因工程菌 GS115/HB705 菌株。我们所得到的酶的最适反应 pH 为 8.5，最适反应温度为 70℃，在 30℃-85℃ 范围内仍具 60% 以上酶活性，尤其在 50℃-80℃ 范围内，仍具 80% 以上酶活性；其在 70℃、pH8.5 时的半衰期为 30min；而且其 pH 稳定性很高，在 pH 4.0-10.6 范围内仍具 80% 以上酶活性。利用该基因工程菌产酶纯度达 90% 以上，易分离纯化。

具体做法是，根据筛选到的耐热耐碱木聚糖酶基因序列，应用 PCR 方法用从环境基因组文库中筛选到的阳性克隆的质粒 DNA 为模板，扩增出 1.2Kb 的 DNA 片段，将其插入到毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 整合表达载体中，再通过化学转化导入到毕赤酵母宿主 GS115 中，再从中筛选出高效表达耐热耐碱木聚糖酶的酵母基因工程菌。

将高效表达的耐热耐碱木聚糖酶的酵母基因工程菌 GS115/HB705，在以甲醇为碳源的培养基中，温度 24℃—28℃，经 24—360 小时诱导培养（每隔一定时间测酶活，酶活性达 426 IU/ml 时停止诱导培养），将完成诱导培养的酵母基因工程菌经高速离心除去菌体，收集上清液，即粗酶液，经过滤浓缩即得耐热耐碱木聚糖酶产品。

应用上述的耐热耐碱木聚糖酶粗酶液水解制备木寡糖的方法，其步骤为：

- 1)、将抽提于玉米芯的木聚糖制成浓度为 10%—20% 的玉米芯木聚糖溶液；
- 2)、按每 50—100g 玉米芯木聚糖对应 1ml 的粗酶液的比例加酶；
- 3)、上述混合液在 60℃—80℃、时间 4—12 小时进行水解反应；
- 4)、将水解物进行离心去残渣，取上清液，再经微滤、超滤、真空干燥即为木寡糖成品。

将水解物进行离心去残渣，取上清液，再经微滤、超滤、真空干燥后称重，计算收率为 20%—40%，进行薄层层析或质谱鉴定表明 2—7 糖的木寡糖含量占 80% 以上。

利用本发明的酵母基因工程菌 GS115/HB705 制备的耐热耐碱木聚糖酶酶活性高，耐热性可达 80℃，耐碱性可达 pH10.6。利用该耐热耐碱木聚糖酶生产木寡糖纯度高，效益好。

### 具体实施方式

通过构建环境基因组文库，筛选出内切  $\beta$ -木聚糖酶基因，经过 DNA 测序分析证实筛选出的基因与来源于 *Bacillus* sp. NG-27 的木聚糖酶基因 AF015445 在核苷酸水平具 98% 同源性，在氨基酸水平具 100% 同源性。通过 PCR 方法将上述基因插入到毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达载体上，再通过化学转化导入

到毕赤酵母宿主 GS115 中，并对得到的若干转化子进行 PCR 鉴定。

实施例 1：鉴定确证导入了耐热耐碱木聚糖酶基因的 GS115 转化子若干（如 8—10 个），经摇瓶培养，使细胞密度对应的 OD600 达到 2.0—6.0；转接到以甲醇作为唯一碳源的诱导培养基中于 24°C—28°C 诱导培养。

诱导培养 48 小时后，每隔 24 小时取样，对所取样进行 SDS—PAGE 进行电泳分析。

选择、诱导、培养高效表达耐热耐碱木聚糖酶效果的菌株 GS115/HB705（GS115+耐热耐碱木聚糖酶基因），重复上述过程进行较大规模（100—1000ml 的装瓶量）的诱导培养，其间取样进行 SDS—PAGE 分析，当产酶水平达 36IU/ml 以上时，停止诱导，离心分离菌体，收集含耐热耐碱木聚糖酶的上清液，即为粗酶液，粗酶液进行酶活测定，酶活性为 36IU/ml。

实施例 2：鉴定确证导入了耐热耐碱木聚糖酶基因的 GS115 转化子若干（如 8—10 个），经摇瓶培养，使细胞密度对应的 OD600 达到 2.0—6.0；转接到以甲醇作为唯一碳源的诱导培养基中于 24°C—28°C 诱导培养。

诱导培养 192 小时，其间前 48 小时，每隔 12 小时取样，48 小时后，每隔 24 小时取样，对所取样进行 SDS—PAGE 进行电泳分析。

选择、诱导、培养高效表达耐热耐碱木聚糖酶效果的菌株 GS115/HB705（GS115+耐热耐碱木聚糖酶基因），重复上述过程进行较大规模（100—1000ml 的装瓶量）的诱导培养，其间取样进行 SDS—PAGE 分析，当产酶水平达 179 IU/ml 以上时，停止诱导，离心分离菌体，收集含耐热耐碱木聚糖酶的上清液，即为粗酶液，粗酶液进行酶活测定，酶活性为 179IU/ml。

实施例 3：鉴定确证导入了耐热耐碱木聚糖酶基因的 GS115 转化子若干（如 8—10 个），经摇瓶培养，使细胞密度对应的 OD600 达到 2.0—6.0；转接到以甲醇作为唯一碳源的诱导培养基中于 24°C—28°C 诱导培养。

诱导培养 360 小时，其间前 48 小时，每隔 12 小时取样，48 小时后，每隔 24 小时取样，对所取样进行 SDS—PAGE 进行电泳分析。

选择、诱导、培养高效表达耐热耐碱木聚糖酶效果的菌株 GS115/HB705（GS115+耐热耐碱木聚糖酶基因），重复上述过程进行较大规模（100—1000ml 的装瓶量）的诱导培养，其间取样进行 SDS—PAGE 分析，当产酶水平达 426IU/ml 以上时，停止诱导，离心分离菌体，收集含耐热耐碱木聚糖酶的上清液，即为粗酶液，粗酶液进行酶活测定，酶活性为 426IU/ml。

粗酶液水解时间：将 100—1000g 抽提于玉米芯的木聚糖配制成 10%—20% 的玉米芯木聚糖溶液，再按 50—100g 玉米芯木聚糖对应 1ml 粗液的比例加

酶，于 60°C---80°C 进行 4---12 小时的水解反应。

将上述水解物进行离心去残渣，将上清液依次微滤、超滤、真空干燥后称重，计算收率为 20---40%，取部分干燥物重新按一定比例溶于蒸馏水中，进行薄层层析或质谱鉴定表明 2---7 糖的低聚糖含量大于 80%。