(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118891274 A
(43)申请公布日 2024.11.01

(21)申请号 202380026523.0

(22)申请日 2023.03.09

(30)优先权数据
10202202395T 2022.03.09 SG

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.09.09

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/SG2023/050150 2023.03.09

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/172201 EN 2023.09.14

(71)申请人 菲克斯44实验室私人有限公司
地址 印度卡纳塔克

(72)发明人 皮尤什·塞西亚
巴拉特·巴卡拉朱
瓦尼塔·乌帕达
贾耶什·苏曼·瓦拉瓦德卡
乔察那·帕特尔
桑巴吉·巴尔克鲁什纳·查万

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任公司 11240
专利代理师 李小爽

(51)Int.Cl.
C07K 14/47(2006.01)
C07K 14/415(2006.01)
C07K 14/76(2006.01)

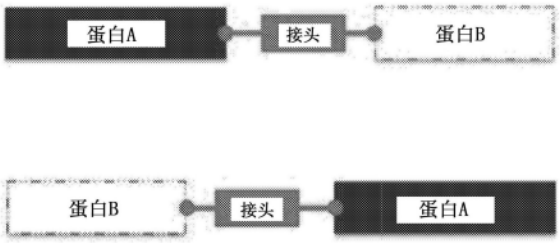
权利要求书2页 说明书22页
序列表（电子公布） 附图4页

(54)发明名称

一种新蛋白组合物及其在配制乳制品中的用途

(57)摘要

本发明公开了一种含牛奶蛋白的组合物,包含:至少一种牛奶蛋白;至少一种第一蛋白;至少一种第二蛋白;以及至少一种接头,包含由与选自由以下组成的组的序列具有至少80％相似性的核苷酸序列编码的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21。



CN 118891274 A

1.一种重组融合蛋白,包含:

a)至少一种第一蛋白;

b)至少一种第二蛋白;和

c)至少一种接头,所述至少一种接头包含由与选自由以下组成的组的序列具有至少80%相似性的核苷酸序列编码的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21。

2.一种重组融合蛋白,包含:

a.第一蛋白,所述第一蛋白包含与由选自SEQ ID NO:1、SEQID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7的核苷酸序列编码的多肽具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

b.第二蛋白,所述第二蛋白包含与由选自由SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13组成的组的核苷酸序列编码的多肽具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;

c.接头,所述接头包含由与选自由SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21组成的组的序列具有至少80%相似性的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

3.根据权利要求1所述的重组融合蛋白,其中所述第一蛋白选自包括以下的组:牛奶蛋白,非牛奶牛蛋白,以及微生物、动物和植物来源的非牛蛋白。

4.根据权利要求3所述的重组融合蛋白,其中所述牛奶蛋白是选自包括以下的组的重组表达的蛋白:α-乳白蛋白、β-乳球蛋白、κ-酪蛋白、α-酪蛋白、β-酪蛋白、乳铁蛋白等。

5.根据权利要求3所述的重组融合蛋白,其中所述牛奶蛋白是重组β-乳球蛋白。

6.根据权利要求1所述的重组融合蛋白,其中所述第二蛋白选自包括以下的组:低热量非碳水化合物甜味剂,或非牛奶牛蛋白,或微生物、动物或植物来源的非牛蛋白。

7.根据权利要求6所述的重组融合蛋白,其中所述低热量非碳水化合物甜味剂选自由以下组成的组:布拉齐因、索马甜、莫内林、仙茅甜蛋白、马槟榔甜蛋白、神秘果蛋白、Neoculin、培它丁以及它们的组合。

8.根据权利要求7所述的重组融合蛋白,其中所述低热量非碳水化合物甜味剂是布拉齐因。

9.根据权利要求1所述的重组融合蛋白,其中所述第一蛋白使用惰性肽接头与所述第二蛋白融合,所述惰性肽接头包含由与选自由以下组成的组的序列具有至少80%相似性的核苷酸序列编码的氨基酸:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21。

10.根据权利要求1所述的重组融合蛋白,其中第一蛋白和第二蛋白的方向是可互换的。

11.一种表达载体,包含编码权利要求1-10中任一项所述的重组融合蛋白的核酸分子。

12.一种组合物,包含:

a)至少一种重组融合蛋白;

b)至少一种非融合蛋白;和

c)至少一种添加剂,

其中所述至少一种重组融合蛋白包含第一蛋白、第二蛋白和接头,所述接头具有由与选自由以下组成的组的序列具有至少80%相似性的核苷酸序列编码的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21。

13.根据权利要求12所述的组合物,其中

a)所述至少一种重组融合蛋白在0.1%至8%的范围内;

b)所述至少一种非融合蛋白在1%至10%的范围内;并且

c)所述至少一种添加剂在0.1%至5%的范围内。

14.根据权利要求12所述的组合物,其中所述至少一种非融合蛋白选自由微生物、动物、植物来源的蛋白或重组表达的蛋白组成的组。

15.根据权利要求12所述的组合物,其中所述重组融合蛋白的所述第一蛋白选自由牛奶蛋白、非牛奶牛蛋白和非牛蛋白组成的组。

16.根据权利要求15所述的组合物,其中所述重组融合蛋白的牛奶蛋白选自由以下组成的组:α-乳白蛋白、β-乳球蛋白、κ-酪蛋白、α-酪蛋白、β-酪蛋白、乳铁蛋白等。

17.根据权利要求12所述的组合物,其中所述第二蛋白选自包括以下的组:低热量非碳水化合物甜蛋白,或非牛奶牛蛋白,或微生物、动物、植物来源的非牛蛋白,或重组表达的蛋白。

18.根据权利要求17所述的组合物,其中所述低热量非碳水化合物甜蛋白选自由以下组成的组:布拉齐因、索马甜、莫内林、仙茅甜蛋白、马槟榔甜蛋白、神秘果蛋白、Neoculin、培它丁以及它们的组合。

19.根据权利要求12所述的组合物,其中所述至少一种添加剂选自由以下组成的组:脂质、脂肪、灰分、微量营养素、维生素、水等。

20.根据前述权利要求中任一项所述的重组蛋白或组合物,其中所述重组融合蛋白或所述组合物用于配制乳制品和相关产品。

一种新蛋白组合物及其在配制乳制品中的用途

技术领域

[0001] 本文描述的本发明一般地涉及一种可用于配制乳制品的新蛋白组合物。特别地，本发明涉及一种重组融合蛋白和一种生产此类重组蛋白的方法，该重组蛋白具有甜味、适口并且可用作无动物成分的乳制品替代品。

[0002] 序列表的引用

[0003] 本申请与电子格式的序列表一起提交。提交的序列表名为Sequence.ST25.txt，创建于2023年3月9日且大小为12,288字节。序列表的电子格式的信息通过引用整体并入本文。

背景技术

[0004] 牛奶被认为是一种丰富的营养来源，并且通常希望在许多牛奶类饮料和其它食品中与糖一起食用。据估计，到2050年世界人口将超过90亿(United nations,2013)，因此营养需求也将增加，而乳制品构成是其中的主要组成部分。

[0005] 由于对乳制品的需求增加，乳制品行业(以及其它动物蛋白生产行业)对环境产生了不利影响。在大多数情况下，以纯素植物蛋白为基础的乳制品替代品不能满足类似程度的蛋白需求(Alcorta et al,2021)。

[0006] 同样，通常会向牛奶、牛奶类饮料或其它食品中添加糖以赋予甜味和所需的香气。虽然牛奶被认为是一种丰富的营养来源，但世界范围内关于共同消费碳水化合物糖的担忧日益增加，担心会导致肥胖、糖尿病、龋齿和/或高脂血症。天然乳制品中的一些天然存在的糖(例如乳糖)是导致诸如乳糖不耐症等不耐症的原因。

[0007] 在过去十年中，已普遍发现使用如糖精、阿斯巴甜、甜蜜素、三氯蔗糖、纽甜、乙酰磺胺酸钾等人工低热量甜味剂作为替代品的趋势日益增加。然而，即使是这些人工甜味剂也被证明会对健康产生某些不利影响，例如头晕、头痛、心理问题、胃肠道问题和情绪变化。这导致了对天然识别和获取的甜味蛋白的巨大需求。

[0008] 舌头上的味觉感受器可以识别具有特定结构的完全匹配分子(该特定结构对于碳水化合物糖、人工低热量甜味剂和甜味蛋白很常见)，并向大脑发送信号，指示大脑将其识别为“甜”味化合物。

[0009] 按照标准惯例，食用糖蔗糖的甜度感知等级为1，并且其它甜味物质相对于此进行评级。在甜味蛋白中，最受关注的是索马甜(Thaumatin)、莫内林(Monellin)和布拉齐因(Brazzein)，它们的等级为蔗糖的3000倍、3000倍和2000倍高(Ming and Hellekant,1994)。这些蛋白或类似结构蛋白或具有类似特性的蛋白的强大甜味能力也强调了它们在适当使用时的潜在影响。

[0010] 这些问题推动了替代牛奶蛋白和碳水化合物的融合蛋白的开发，并带来了营养和临床益处。

[0011] 因此，设想通过在微生物系统中重组表达所需的基因序列来表达融合蛋白，其中一种或多种蛋白与一种或多种甜味蛋白使用一个或多个接头以链式或串式融合。融合蛋白

不仅可以作为丰富的蛋白来源,还可以作为克服了其它相关的健康问题的低热量非碳水化合物甜味剂。

发明内容

[0012] 尽管本主题涉及一种由融合蛋白组成的蛋白组合物,但应当理解的是,本申请不限于所描述的特定组合物,因为可能存在本公开中未明确说明的多种可能的实施方式。还应当理解的是,描述中使用的术语仅用于描述实现方式或版本或实施方式的目的,并不旨在限制本主题的范围。

[0013] 本发明内容旨在介绍与由融合蛋白组成的蛋白组合物相关的方面。本发明内容并非旨在识别所要求保护的主题的必要特征,也不旨在用于确定或限制本主题的范围。

[0014] 本发明基于这样的发现:用编码牛奶中存在的一种或多种蛋白以及天然来源于植物的一种或多种甜味蛋白的组分构建融合基因,将产生融合蛋白分子,该融合蛋白分子不仅可以作为丰富的蛋白来源,还可以作为低热量甜味蛋白,从而克服目前使用的替代甜味剂所带来的其它相关健康问题。由此产生的组合物不仅保留了目标乳制品类饮料和食品的原有营养特性,而且还赋予了所需的味道和/或香气、稳定性和溶解度,同时确保避免目前世界范围内普遍存在的可能的健康问题。所得融合蛋白的牛奶蛋白部分将提供与动物源性牛奶蛋白相同的营养和功能特性,并且也可替代其所有应用和由其衍生的产品。此外,所得融合蛋白的甜味蛋白部分将用于替代/减少乳制品应用及由其衍生的产品中的乳糖或其它糖,同时增加此类产品的整体蛋白含量。

[0015] 在一个实施方式中,本发明提供了一种重组融合蛋白,其包含:a)至少一种第一蛋白;b)至少一种第二蛋白;和c)至少一种接头,所述接头包含由与选自由以下组成的组的序列具有80%相似性的核苷酸序列编码的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9以及SEQ ID NO:10。

[0016] 在一个实施方式中,本发明提供了一种重组融合蛋白,其包含:至少一种第一蛋白,所述至少一种第一蛋白包含与由选自由SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7组成的组中的核苷酸序列编码的多肽具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;至少一种第二蛋白,所述至少一种第二蛋白包含与由选自由SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13组成的组中的核苷酸序列编码的多肽具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;以及至少一种接头,所述至少一种接头包含由与选自由SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21组成的组中的序列具有80%相似性的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

[0017] 在一个实施方式中,本发明提供了一种重组融合蛋白,其包含:至少一种第一蛋白,所述至少一种第一蛋白包含与由SEQ ID NO:1中所示的核苷酸序列编码的多肽具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;至少一种第二蛋白,所述至少一种第二蛋白包含与由SEQ ID NO:2中所示的核苷酸序列编码的多肽具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;以及至少一种接头,所述至少一种接头包含由与选自由SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21组成的组中的序列具有80%相似性的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

[0018] 在至少一个实施方式中,所述接头是惰性肽接头。

[0019] 在一个实施方式中,本发明提供了一种重组融合蛋白,其包含:第一蛋白,所述第一蛋白包含与由SEQ ID NO:1中所示的核苷酸序列编码的多肽具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;第二蛋白,所述第二蛋白包含与由SEQ ID NO:2中所示的核苷酸序列编码的多肽具有至少90%序列同一性的氨基酸序列;以及接头,所述接头包含由与选自由SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21组成的组中的序列具有至少80%相似性的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

[0020] 在一个实施方式中,本发明提供了一种重组融合蛋白,其包含:第一蛋白,所述第一蛋白包含与由SEQ ID NO:1中所示的核苷酸序列编码的多肽具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;第二蛋白,所述第二蛋白包含与由SEQ ID NO:2中所示的核苷酸序列编码的多肽具有至少95%序列同一性的氨基酸序列;以及接头,所述接头包含由与选自由SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21组成的组中的序列具有至少80%相似性的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

[0021] 在一个实施方式中,所述接头是惰性肽接头并且由重复的氨基酸序列组成。

[0022] 在一个实施方式中,所述第一蛋白选自由牛奶蛋白、非牛奶牛蛋白和非牛蛋白组成的组。

[0023] 在一个实施方式中,所述牛奶蛋白是重组表达的蛋白,其选自由α-乳白蛋白、β-乳球蛋白、κ-酪蛋白、α-酪蛋白、β-酪蛋白、乳铁蛋白等组成的组。

[0024] 在示例性实施方式中,所述牛奶蛋白是重组β-乳球蛋白。

[0025] 在一个实施方式中,所述第二蛋白选自由低热量非碳水化合物甜味剂或非牛奶牛蛋白或微生物、动物、植物或重组来源的非牛蛋白组成的组。

[0026] 在一个实施方式中,所述低热量非碳水化合物甜味剂选自由布拉齐因、索马甜、莫内林、仙茅甜蛋白、马槟榔甜蛋白、神秘果蛋白、Neoculin、培它丁及其组合组成的组。

[0027] 在一个示例性实施方式中,低热量甜味剂是布拉齐因。

[0028] 在一个实施方式中,所述牛奶蛋白和低热量非碳水化合物甜味剂是在微生物系统中产生的。

[0029] 在一个实施方式中,所述重组融合蛋白包含使用一个或多个接头的所列的一种或多种第一蛋白和来自任何来源的一种或多种第二蛋白的任何组合。

[0030] 在一个实施方式中,所述融合蛋白包含使用一个或多个接头在两个方向上的所列出的一种或多种第一蛋白和来自任何来源的一种或多种第二蛋白的任何组合。

[0031] 在一个实施方式中,所述融合蛋白包含至少一种牛奶蛋白;至少一种低热量甜味蛋白;和至少一种惰性肽接头。

[0032] 在另一个实施方式中,使用惰性肽接头将至少一种牛奶蛋白与低热量非碳水化合物甜味蛋白融合。

[0033] 在另一个实施方式中,所述融合蛋白包含至少一种非牛奶牛蛋白;至少一种低热量甜味蛋白;和至少一种惰性肽接头。

[0034] 在另一个实施方式中,使用惰性肽接头将至少一种非牛奶牛蛋白与低热量非碳水

化合物甜味剂融合。

[0035] 在另一个实施方式中,所述融合蛋白包含至少一种非牛奶非牛蛋白;至少一种低热量甜味蛋白;和至少一种惰性肽接头。

[0036] 在另一个实施方式中,使用惰性肽接头将至少一种非牛奶非牛蛋白与低热量非碳水化合物甜味剂融合。

[0037] 在示例性实施方式中,融合蛋白包括使用柔性12氨基酸链惰性连接肽将牛奶蛋白β-乳球蛋白与布拉齐因融合的融合蛋白。

[0038] 在另一个实施方式中,所述惰性肽接头选自柔性接头或刚性接头或它们的组合。

[0039] 在另一个实施方式中,所述柔性肽接头具有$(SGG)_nSAG$形式,其中n=1-10。

[0040] 在另一个实施方式中,所述柔性肽接头具有$(G)_n$形式,其中n=3-10。

[0041] 在另一个实施方式中,所述柔性肽接头具有$(GGGGS)_n$形式,其中n=1-10。

[0042] 在另一个实施方式中,所述刚性肽接头具有$A(EAAAK)_nA$形式,其中n=1-10。

[0043] 在另一个实施方式中,所述接头是上述一种或多种柔性和刚性惰性接头肽链的组合。

[0044] 在另一个实施方式中,所述肽接头具有$(SGG)_nSAG-A(EAAAK)_nA-(GGGGS)_n$形式,其中n=1-10。

[0045] 在另一个实施方式中,所述第一蛋白和第二蛋白通过惰性接头以相反的方向连接。

[0046] 在示例性实施方式中,融合蛋白包括使用刚性17氨基酸链惰性肽接头将牛奶蛋白β-乳球蛋白与布拉齐因融合的融合蛋白。

[0047] 在一个实施方式中,提供了一种重组融合蛋白,其包含至少一种第一蛋白;至少一种第二蛋白;和至少一个惰性肽接头,其中使用惰性肽接头将所述至少一种第一蛋白与所述第二蛋白融合。

[0048] 在另一个方面,本文提供了一种编码本文所述的重组融合蛋白的核酸分子。

[0049] 在另一个方面,本文提供了一种表达载体,其包含编码本文所述的重组融合蛋白的核酸序列。

[0050] 在一些实施方式中,所述牛奶蛋白和甜味蛋白是在微生物系统中产生的。

[0051] 在另一个实施方式中,牛乳蛋白或非牛蛋白通过惰性接头与甜味蛋白缀合。

[0052] 在另一个方面,本文提供了一种组合物,其包含:

[0053] a)在0.1%至8%范围内的至少一种重组融合蛋白;

[0054] b)在1%至10%范围内的至少一种非融合蛋白;和

[0055] c)在0.1%至5%范围内的至少一种添加剂,

[0056] 其中,至少一种重组融合蛋白包含第一蛋白、第二蛋白和接头,所述接头具有由与选自由以下组成的组的序列具有80%相似性的核苷酸序列编码的氨基酸序列:SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21。

[0057] 在一个实施方式中,所述至少一种非融合蛋白选自由微生物、动物、植物来源的或重组表达的蛋白组成的组。

[0058] 在一个实施方式中,将所述重组蛋白与选自由碳水化合物、脂质、脂肪、灰分、微量

营养素、维生素等组成的组中的至少一种添加剂混合;以获得具有类似口感的乳制品替代产品。

[0059] 在一个实施方式中,脂肪是植物来源的、微生物来源的、发酵来源的等。

[0060] 在一个实施方式中,植物来源的油选自由葵花籽油、玉米油、大豆油、棕榈果油、棕榈仁油、红花油、亚麻籽油、米糠油、棉籽油、橄榄油、菜籽油、亚麻籽油、椰子油、藻油和微生物产生的脂肪组成的组。

[0061] 在一个实施方式中,脂肪来源于使用微生物发酵植物来源的油底物。

[0062] 在一个实施方式中,所述重组组合物包含其中用两个接头连接三种蛋白的融合蛋白。

[0063] 在一个实施方式中,所述重组融合蛋白或组合物用于配制乳制品和相关产品。

[0064] 在一个实施方式中,将所述重组融合蛋白与植物类脂肪、灰分和水混合以获得具有适口口感的乳制品替代饮料。

[0065] 在一个实施方式中,所述重组融合蛋白可用于其它乳制品,例如冰淇淋、冷冻甜点、蛋糕、咖啡奶精。

[0066] 在一个实施方式中,所述重组融合蛋白可用于但不限于纯素蛋白补充剂。

[0067] 在一个方面,本文提供了一种生产重组融合蛋白的方法,包含发酵能够生产所述重组融合蛋白的重组宿主细胞。

[0068] 从说明性实施方式的详细描述,本发明的其它方面、优点、特征和目的将变得显而易见。应当理解的是,本发明的特征可以以各种组合进行组合,而不会脱离如下述详细描述所定义的本发明的范围。

附图说明

[0069] 为了帮助理解本发明的实施方式,请参考附图,所述附图不一定按比例绘制,并且其中的参考数字指的是本发明示例性实施方式的组分。结合附图,在考虑了以下详细描述后,当前要求保护的发明的上述和其它特征、其性质和各种优点将变得更加明显:

[0070] 图1A和1B示出了根据本发明的一个实施方式,使用代表性肽键C融合的代表性蛋白A和蛋白B;

[0071] 图2是根据本发明的代表性实施方式,用于生产本文提供的融合蛋白的整合载体的载体图;

[0072] 图3A-3D是根据本发明的代表性实施方式的各种基因盒表示的示例;

[0073] 图4为重组融合蛋白β乳球蛋白-L1-布拉齐因、布拉齐因-L1-β乳球蛋白、β乳球蛋白-L2-布拉齐因、布拉齐因-L2-β乳球蛋白的表达的凝胶图像;和

[0074] 图5为重组融合蛋白β乳球蛋白-L3-布拉齐因、β乳球蛋白-L4-布拉齐因的表达的凝胶图像。

具体实施方式

[0075] 现在将参考所附实施方式来描述本发明,但这些实施方式并不限制本发明的范围和界限。所提供的描述仅作为示例和说明。

[0076] 参考以下描述中的非限制性实施方式解释了本文的实施方式及其各种特征和有

利细节。省略了对众所周知的组分和处理技术的描述,以免不必要地模糊本文中的实施方式。本文中使用的示例仅仅是为了便于理解可以实践本文中实施方式的方式,并进一步使本领域技术人员能够实践本文中的实施方式。因此,所述示例不应被解释为限制本文实施方式的范围。

[0077] 上述对具体实施方式的描述将如此充分地揭示本文实施方式的一般性质,以至于其他人能够通过应用现有知识,在不背离一般构思的情况下,容易地修改和/或调整此类具体实施方式以用于各种应用,并且因此,此类调整和修改应当且旨在被理解在所公开实施方式的等效物的含义和范围内。应当理解的是,本文采用的措辞或术语是为了描述目的,而不是为了限制。因此,尽管本文的实施方式已以优选实施方式进行了描述,但本领域技术人员将认识到,可以在本文所述实施方式的精神和范围内通过修改来实践本文的实施方式。

[0078] 现在将详细讨论本发明的一些实施方式,示出其所有特征。词语“包含”、“具有”、“含有”和“包括”及其其它形式旨在含义相同且是开放式的,因为跟在这些词语中任何一个后面的项目或多个项目并不意味着是此类项目或多个项目的详尽列表,也不意味着仅限于所列出的项目或多个项目。

[0079] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语均具有与本公开所属领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。尽管在本公开的实践或测试中可以使用任何与本文所述方法和材料类似或等效的方法和材料,但现在描述优选的方法和材料。

[0080] 在本发明的一个方面,为了克服现有技术中的问题并且提供后续章节中详述的各种优点,公开了一种用于配制乳制品和相关产品的包含融合蛋白的蛋白组合物。

[0081] 如在说明书和权利要求书中所使用的,单数形式“一”、“一种”和“该/所述”包括复数引用,除非上下文另有明确规定。例如,术语“一种制品”可以包括多个制品,除非上下文另有明确规定。本领域普通技术人员将理解,图中的要素只是为了简单和清楚而示出的,并且不一定按比例绘制。例如,为了提高对本发明的理解,图中一些要素的尺寸可能相对于其它要素被夸大。可以存在前述应用中所描述的但未在所描述的附图之一中示出的附加组分。如果描述了此类组分但未在图中示出,则不存在此类图不应被视为在说明书中省略了此类设计。

[0082] 根据需要,本文公开了本发明的详细实施方式;然而,应当理解的是,所公开的实施方式仅仅是本发明的示例,其可以以各种形式体现。因此,本文公开的具体结构和功能细节不应被解释为限制,而仅作为权利要求的基础和用于教导本领域技术人员以几乎任何适当的详细结构来多方面地采用本发明的代表性基础。此外,本文使用的术语和短语并非旨在限制,而是提供本发明的可理解的描述。

[0083] 本发明致力于利用选定的蛋白和/或低热量甜味蛋白,通过使用惰性肽接头来创建融合蛋白,以获得具有甜味、稳定性和溶解性的所得蛋白,同时确保避免目前世界范围内普遍存在的可能的健康问题。舌头上的味觉感受器能够识别具有特定结构(碳水化合物糖、人工低热量甜味剂和甜味蛋白中常见的)的完全匹配分子,并向大脑发送信号,表明它的味道是甜的。甜味蛋白的长度通常为约50至200个氨基酸,分子量为约6.5至30Kda(Zhao et al,2021)。

[0084] 因此,本文提供了一种重组融合蛋白,其包含至少一种第一蛋白;至少一种第二蛋白;和至少一种惰性肽接头,其中使用惰性肽接头将所述至少一种第一蛋白与所述第二蛋

白融合。本公开还提供了生产所述重组融合蛋白的方法及包含该重组融合蛋白的组合物。

[0085] 牛奶由两大类蛋白组成-酪蛋白(αS1-酪蛋白、αS2-酪蛋白、β-酪蛋白和κ-酪蛋白)和乳清蛋白(β-乳球蛋白和α-乳白蛋白)。已知酪蛋白会相互作用产生亚胶束和胶束,它们在牛奶的稳定性和营养特性方面起着至关重要的作用。虽然αS1-酪蛋白、αS2-酪蛋白和β-酪蛋白分子仍然嵌入其中,但κ-酪蛋白则部分突出于胶束结构。乳清蛋白保持悬浮并且不参与胶束的形成。

[0086] 如本文所使用的,“牛奶蛋白(乳蛋白,milk protein)”是通常在一种或多种哺乳动物奶汁中发现的任何蛋白或其片段或变体。在一些实施方式中,本文描述的牛奶蛋白是酪蛋白,例如κ酪蛋白、副κ酪蛋白、β酪蛋白、α-S1-酪蛋白和α-S2-酪蛋白。

[0087] 在本发明的一个方面,为了克服现有技术中的问题并提供后续章节中详述的各种优点,公开了一种用于配制乳制品和相关产品的包含融合蛋白的蛋白组合物。

[0088] 因此,一个实施方式中,本发明致力于使用选定的蛋白和/或低热量甜味蛋白通过使用惰性肽接头来创建融合蛋白,以实现所得蛋白的一个或多个目标,例如甜味、稳定性和溶解性。

[0089] 使用编码牛奶中存在的一种或多种蛋白以及天然来源于植物的一种或多种甜味蛋白的组分一起构建融合基因,可以产生融合蛋白分子,其不仅可以作为丰富的蛋白来源,还可以作为低热量甜味蛋白,从而克服了目前使用的替代甜味剂所带来的其它相关健康问题。

[0090] 因此,该组合物不仅保留了目标牛奶类饮料和食品物品的原有营养特性,而且还赋予了所需的味道和/或香气、稳定性和溶解性,同时确保避免目前世界范围内普遍存在的可能的健康问题。

[0091] 所得融合蛋白的牛奶蛋白部分将具有与动物源性牛奶蛋白相同的营养和功能特性,并且可以作为其所有应用和由其衍生的产品的适当替代品。此外,所得融合蛋白的甜味蛋白部分可用于替代/减少乳糖或其它糖,同时增加此类产品的整体蛋白含量。

[0092] 在下面的描述中,为了解释的目的,阐述了具体的细节以便于理解本发明。然而,对于本领域技术人员来说显而易见的是,本发明可以在没有这些细节的情况下实施。本领域技术人员将认识到,本发明的实施方式(其中一些实施方式如下描述)可以并入到许多系统中。

[0093] 鉴于上述情况,本发明公开了一种蛋白组合物,其包含其中使用一种接头连接两种蛋白的融合蛋白。

[0094] 所述组合物包含其中用一种接头连接两种蛋白的融合蛋白。或者,所述组合物包含其中用两种接头连接三种蛋白的融合蛋白。或者,所述融合蛋白包含使用一种或多种接头的所列的一种或多种第一蛋白与来自任何来源的一种或多种第二蛋白的任何组合。

[0095] 使用编码牛奶中存在的一种或多种蛋白与天然来源于植物的一种或多种甜味蛋白的组分一起构建融合基因,产生了融合蛋白分子。它涉及使用惰性肽接头,该惰性肽接头具有翻译过程中所需的柔性和稳定性,并且还可作为连接合成为融合蛋白的两种产生蛋白的桥梁。通常,所述惰性肽接头包含至少四个氨基酸,其赋予一种或多种以下特性:A)柔性,或B)刚性,或C)提高溶解度,或D)增加融合蛋白的稳定性。

[0096] 因此,所述组合物不仅保留了目标牛奶类饮料和食品物品的原有营养特性,而且

还赋予了所需的味道和/或香气、稳定性和溶解性,同时确保避免目前世界范围内普遍存在的可能的健康问题。所得融合蛋白的牛奶蛋白部分将具有与动物源性牛奶蛋白相同的营养和功能特性,并且可以作为其所有应用和由其衍生的产品的适当替代品。此外,所得融合蛋白的甜味蛋白部分可用于替代/减少乳糖或其它糖,同时增加此类产品的整体蛋白含量。

[0097] 在本发明的一个示例性实施方式中,提供了一种组合物,其包含融合蛋白,该融合蛋白包含使用柔性12氨基酸链惰性肽接头与布拉齐因融合的牛奶蛋白β-乳球蛋白。

[0098] 所附的图1A和图1B示出了根据本发明的一个实施方式,使用代表性惰性肽键融合代表性蛋白A和蛋白B。蛋白A可以是牛奶蛋白或非牛奶牛蛋白或微生物、动物、植物来源的非牛蛋白或重组蛋白。蛋白B是低热量非碳水化合物甜味剂或牛奶蛋白或非牛奶牛蛋白或微生物、动物、植物来源的非牛蛋白或重组蛋白。

[0099] 所附的图2示出了用于驱动表达的载体的示例。根据本实施方式,将基因克隆到含有毕赤酵母酒精氧化酶启动子、酒精氧化酶终止子、吉欧霉素抗性基因的整合载体pPICZA中。整合载体含有甲醇诱导型启动子(AOX1、FLD1、MOX1、DAS1等)、α交配信号因子、吉欧霉素抗性盒、终止子(如图2所示)。本文使用的载体的进一步示例是含有组成型启动子、α交配信号因子、吉欧霉素抗性盒、终止子的整合载体。与上述类似,其中吉欧霉素被替换为卡那霉素抗性。类似地,α交配因子被任何驱动表达到细胞外部分的信号因子所替代。

[0100] 表达生物体:上述实施方式中的重组分子可在用于重组分子的微生物系统中表达,例如细菌-大肠杆菌(Escherichia coli)、枯草芽孢杆菌(Bacillus subtilis)、蓝藻细菌(Cyanobacteria)等。一些真菌表达宿主的示例-黑曲霉(Aspergillus niger)、构巢曲霉(Aspergillus nidulans)、里氏木霉(Trichoderma reesei)、青霉菌属(Pencillum sps)。一些酵母的示例:酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)、白色念珠菌(Candida albicans)、乳酸克鲁维酵母(Kluyveromyces lactis)、马克斯克鲁维酵母(Kluyveromyces marxianus)、耶氏酵母属(Yarrowia sps)等,以及甲基营养型酵母:毕赤酵母(Pichia pastoris)、多形汉逊酵母(Hansenula polymorpha)、博伊丁假丝酵母(Candida boidini)。

[0101] 转化:可以使用转化规程,例如使用乙酸锂和LiCl的化学转化、转染、电穿孔、PEG介导、农杆菌介导的转化等。

[0102] 目的蛋白:

[0103] 牛奶蛋白:-本发明中使用的牛奶蛋白的一些示例包括κ酪蛋白、α-S1-酪蛋白、α-S2-酪蛋白、β-酪蛋白、β-乳球蛋白、α乳清蛋白、转铁蛋白。

[0104] 其它动物蛋白-本发明中的其它蛋白的一些示例包括卵清蛋白、卵转铁蛋白、卵类粘蛋白。

[0105] β乳球蛋白

[0106] 牛β乳球蛋白是牛乳汁的主要乳清蛋白,是本发明几个实施方式的一部分。该基因的序列如下所示。

CTGATTGTTACCCAGACCATGAAGGGTCTGGACATTCAAAAAGTTG
CGGGCACCTGGTACAGCCTGGCGATGGCGGCGAGCGACATCAGCCT
GCTGGATGCGCAGAGCGCGCCGCTGCGTGTGTATGTTGAGGAACTG
AAGCCGACCCCGGAGGGCGACCTGGAAATTCTGCTGCAGAAATGGG
AGAACGATGAATGCGCGCAGAAGAAGATCATTGCGGAGAAAACCA

[0107] AGATCCCGGCGGTGTTCAAGATTGACGCGCTGAACGAAAACAAAGT
GCTGGTTCTGGACACCGATTACAAAAAGTATCTGCTGTTTTGCATGG
AGAACAGCGCGGAGCCGGAACAGAGCCTGGTGTGCCAATGCCTGGT
TCGTACCCCGGAAGTGGACGATGAGGCGCTGGAAAAATTCGATAAG
GCGCTGAAAGCGCTGCCGATGCACATCCGTCTGAGCTTTAACCCGA
CCCAGCTGGAGGAACAATGCCACATT [SEQ ID NO:1]

[0108] α乳白蛋白

[0109] α乳白蛋白是牛乳汁的乳清蛋白,是本发明的几个实施方式的一部分。

[0110] 该基因的序列如下所示。

GAACAATTGACTAAGTGTGAAGTTTTTAGAGAGTTGAAGGATTTGA
AAGGTTACGGTGGTGTTTCTTTGCCAGAGTGGGTTTGTACTACTTTC
CATACTTCTGGTTACGATACTCAAGCTATCGTTCAAAACAACGATTC
TACTGAATACGGTTTGTTCCAAATTAACAATAAGATTTGGTGTAAAG

[0111] ATGATCAAAACCCTCACTCTTCTAACATTTGTAACATCTCTTGTGAT
AAGTTCTTGGATGATGATTTGACTGATGATATTATGTGTGTTAAGAA
AATTTTGGATAAGGTTGGTATTAATTACTGGTTGGCTCATAAGGCTT
TGTGTTCTGAAAAATTGGATCAATGGTTGTGTGAGAAATTGTAA
[SEQ ID NO:2]

[0112] κ酪蛋白

[0113] κ酪蛋白是牛的牛奶蛋白的主要酪蛋白,参与牛奶胶束的稳定。其是本发明的一些实施方式的一部分。

[0114] CAAGAACAAAACCAAGAGCAACCAATCAGATGTGAAAAGGATGAG AGATTTTTCTCTGATAAGATCGCTAAGTACATCCCAATCCAATATGT TTTGTCTAGATACCCTTCTTACGGTTTGAATTACTACCAACAAAAGC CTGTTGCTTTGATTAACAACCAATTCTTGCCATACCCTTACTATGCTA AACCAGCTGCTGTTAGATCCCCTGCTCAAATTTTGCAATGGCAAGTT TTGTCTAACACTGTTCCAGCAAAGTCTTGTCAAGCTCAACCTACTAC TATGGCTAGACATCCACACCCTCATTTGTCTTTCATGGCTATTCCAC CTAAGAAAAACCAAGATAAGACTGAAATCCCAACTATTAATACTAT TGCTTCTGGAGAGCCAACTTCTACTCCTACTATTGAAGCTGTTGAGT CTACTGTTGCTACTTTGGAGGCTTCTCCTGAAGTTATTGAGTCTCCA CCTGAGATTAATACTGTTCAAGTTACTTCTACTGCTGTTTAA [SEQ ID NO:3]

[0115] αS1酪蛋白

[0116] αS1酪蛋白是另一种主要的酪蛋白并且是牛乳汁的主要组分。其为本发明的一些实施方式的一部分。

[0117] AGACCAAAACATCCAATTAAACATCAAGGTTTGCCACAAGAAGTTT TGAACGAAAATTTGTTGAGATTTTTCGTTGCTCCATTTCCAGAAGTT TTCGGTAAAGAAAAGGTTAACGAATTGTCAAAAGATATTGGTTCAG AATCTACTGAAGATCAAGCTATGGAAGATATCAAGCAAATGGAAGC AGAATCAATTTCTTCATCTGAAGAAATCGTTCCAAATTCTGTTGAAC AAAAGCATATCCAAAAGGAAGATGTTCCATCTGAAAGATATTTGGG TTACTTAGAACAATTGTTGAGATTGAAGAAATACAAGGTTCCACAA TTGGAAATCGTTCCAAATTCAGCTGAAGAAAGATTGCATTCTATGA AAGAAGGTATTCATGCACAACAAAAAGAACCAATGATCGGTGTTAA CCAAGAATTGGCATACTTCTACCCAGAATTGTTTAGACAATTTTATC

[0118] AATTGGATGCTTACCCATCTGGTGCATGGTATTACGTTCCATTAGGT ACACAATACACTGATGCTCCATCATTTTCTGATATCCCAAACCCAAT CGGTTCAGAAAATTCTGAAAAGACTACTATGCCATTGTGGTAA [SEQ ID NO:4]

[0119] αS2酪蛋白

[0120] αS2酪蛋白是一种酪蛋白并且是牛乳汁的组分。其为本发明的一些实施方式的一部分。

[0121] AAGAACACTATGGAACATGTTTCTTCTTCTGAAGAGTCTATCATCTC
TCAAGAAACTTACAAGCAAGAGAAAAACATGGCTATTAATCCATCT
AAGGAAAATTTGTGTTCTACTTTCTGTAAGGAGGTTGTTAGAAACGC
TAATGAAGAGGAATACTCTATTGGTTCTTCTTCTGAGGAATCTGCTG
AAGTTGCTACTGAGGAAGTTAAGATTACTGTTGATGATAAGCACTA
TCAAAAGGCTTTGAACGAGATTAATCAATTCTACCAAAAGTTCCCTC
AATATTTGCAATACTTGTATCAAGGTCCAATTGTTTTGAACCCTTGG
GATCAAGTTAAGAGAAACGCTGTTCCAATCACTCCTACTTTGAACA
GAGAACAATTGTCTACTTCTGAGGAAAATTCTAAGAAAACTGTTGA
TATGGAATCTACTGAGGTTTTCACTAAGAAAACTAAGTTGACTGAG
GAAGAGAAAAACAGATTGAACTTTTTGAAGAAGATTTCTCAAAGAT
ACCAAAAGTTCGCTTTGCCACAATACTTGAAGACTGTTTACCAACAT
CAAAAGGCTATGAAACCTTGGATTCAACCTAAGACTAAAGTTATTC
CTTACGTTAGATATTTGTAA [SEQ ID NO:5]

[0122] β酪蛋白

[0123] β酪蛋白是一种主要的酪蛋白并且是牛乳汁的组分。其为本发明的一些实施方式的一部分。

[0124] AGAGAATTGGAAGAGTTGAACGTTCCAGGTGAAATTGTTGAATCTT
TGTCTTCTTCTGAAGAGTCTATCACTAGAATTAATAAGAAAATTGAG
AAGTTTCAATCTGAAGAGCAACAACAAACTGAAGATGAGTTGCAAG
ATAAGATCCATCCATTCGCTCAAACTCAATCTTTGGTTTACCCATTC
CCTGGTCCAATTCCTAACTCTTTGCCTCAAAATATTCCACCTTTGACT
CAAACTCCAGTTGTTGTTCCACCTTTCTTGCAACCTGAAGTTATGGG
TGTTTCTAAGGTTAAAGAAGCTATGGCTCCAAAGCATAAAGAGATG

[0125] CCATTTCCTAAGTATCCAGTTGAACCTTTCACTGAGTCTCAATCTTTG
ACTTTGACTGATGTTGAGAACTTGCACTTGCCATTGCCTTTGTTGCA
ATCTTGGATGCATCAACCACACCAACCTTTGCCACCTACTGTTATGT
TTCCACCTCAATCTGTTTTGTCTTTGTCTCAATCTAAGGTTTTGCCAG
TTCCTCAAAAAGCTGTTCCATACCCTCAAAGAGATATGCCAATTCAA
GCCTTTTTGTTGTATCAAGAACCAGTTTTGGGTCCTGTTAGAGGTCC
ATTCCCTATTATTGTTTAA [SEQ ID NO:6]

[0126] 卵清蛋白

[0127] 卵清蛋白是在蛋清中发现的主要蛋白,占总蛋白的约55%。其为本发明的一些实施方式的一部分。

[0128] ATGGGTTCAATTGGAGCTGCATCTATGGAGTTCTGCTTCGACGTCTT
CAAGGAGTTGAAAGTACACCATGCCAACGAAAATATCTTCTATTGC
CCCATTGCTATTATGTCTGCCTAGCTATGGTATATTTAGGCGCAAAG
GATCTACAAGAACGCAAATTAATAAAGTTGTTAGGTTTGATAAGTT
ACCAGGTTTCGGCGACTCCATTGAGGCCCAGTGCGGTACTTCAGTTA
ATGTCCATTCATCATTAAGGGACATCTTGAACCAGATTACTAAACCT
AATGACGTGTATTCTTTCTCTTTAGCAAGTAGGCTGTACGCCGAGGA
GAGGTATCCTATCTTACCCGAATATTTACAATGTGTAAAGGAGTTGT
ACCGTGGAGGTCTGGAACCCATAAATTTTCAGACGGCAGCCGATCA
GGCTAGAGAGCTAATTAATTCCTGGGTAGAATCACAAACGAATGGT
ATAATTAGGAATGTTCTTCAACCATCTAGTGTTGACTCCCAAACGGC
CATGGTTCTTGTCAATGCAATAGTTTTCAAGGGATTGTGGGAGAAG
GCATTTAAGGACGAGGATACGCAGGCCATGCCCTTCAGGGTTACTG
AGCAGGAATCCAAGCCAGTGCAAATGATGTACCAGATAGGTCTATT
TCGTGTCGCCTCTATGGCTTCCGAGAAAATGAAGATTCTTGAGTTAC
CCTTCGCCTCCGGCACTATGTCAATGCTTGTACTGCTACCCGATGAG
GTATCCGGCTTAGAACAGCTAGAATCAATTATCAATTTTGAGAAGCT
AACAGAGTGGACATCCTCAAACGTTATGGAGGAAAGGAAAATCAA
AGTTTACTTGCCTAGGATGAAGATGGAAGAAAAGTATAATCTGACT
TCCGTCCTAATGGCTATGGGCATAACCGATGTTTTCAGTTCCTCCGC
TAATTTGTCCGGAATATCCTCCGCAGAATCCCTGAAAATCTCTCAAG
CCGTCCATGCCGCACACGCAGAAATCAACGAAGCCGGACGTGAGGT
CGTAGGTAGTGCCGAGGCTGGTGTCGATGCAGCTAGTGTATCCGAG
GAATTTAGGGCAGATCACCCCTTCCTTTTCTGCATAAAGCACATAGC
AACCAATGCAGTACTGTTCTTCGGAAGATGTGTATCCCCC [SEQ ID NO:7]

[0129] 甜味蛋白:低热量非碳水化合物甜味剂的示例包括布拉齐因、索马甜、莫内林、马槟榔甜蛋白、神秘果蛋白、仙茅甜蛋白、Neoculin和培它丁等。本文使用布拉齐因作为低热量非碳水化合物甜味剂。布拉齐因是一种来自植物物种伯拉氏瘤药树(Pentadiplandra brazzeana)的甜味蛋白,以摩尔计其为蔗糖的约2000倍甜。它在自然界中以两种形式存在。

主要形式以焦谷氨酸残基开始且长为54个氨基酸,次要形式以下一个氨基酸天冬氨酸开始并且长为53个氨基酸。据报道,次要形式具有更好的甜味能力,因此从uniprot ID P56552(序列如下所示)中选择了次要形式,针对毕赤酵母进行了密码子优化和合成。

[0130] 布拉齐因

[0131] 布拉齐因是一种甜味蛋白,存在于植物伯拉氏瘤药树的提取物中。按摩尔计,它的味道为蔗糖的2000倍甜。它是本发明的一些实施方式的一部分。

[0132]
GATAAGTGCAAGAAAGTCTATGAAAACTACCCAGTATCCAAATGTC
AACTGGCTAACCAGTGCAATTATGACTGCAAGCTTGACAAGCACGC
GAGGAGTGGGGAGTGTTTTTACGACGAGAAACGCAATCTACAGTGT
ATTTGCGATTACTGTGAATAT [SEQ ID NO:8]

[0133] 索马甜

[0134] 索马甜是在非洲竹芋(Thaumatococcus daniellii)的果实中发现的一种甜味蛋白。按摩尔计,它为蔗糖的100000倍甜。它是本发明的一些实施方式的一部分。

[0135]
ATGGCCGCCACCACTTGCTTCTTCTTCCTCTTCCCCTTCCTCCTCCTC
CTCACGCTCTCCCGCGCTGCCACCTTCGAGATCGTCAACCGCTGCTC
CTACACCGTGTGGGCGGCCGCCTCCAAAGGCGACGCCGCCCTGGAC
GCCGGCGGCCGCCAGCTCAACTCGGGAGAGTCCTGGACCATCAACG
TAGAACCCGGCACCAACGGTGGCAAAATCTGGGCCCGCACCGACTG
CTATTTCGACGACAGCGGCAGCGGCATCTGCAAGACCGGCGACTGC
GGCGGCCTCCTCCGGTGCAAGCGCTTCGGCCGGCCGCCCACCACGC
TGGCGGAGTTCTCGCTCAACCAGTACGGCAAGGACTACATCGACAT
CTCCAACATCAAAGGCTTCAACGTGCCGATGGACTTCAGCCCGACC
ACGCGCGGCTGCCGCGGGGTGCGGTGCGCCGCCGACATCGTGGGGC
AGTGCCCGGCGAAGCTGAAGGCGCCGGGGGGTGGTTGCAACGATGC
GTGCACCGTGTTCCAGACGAGCGAGTACTGCTGCACCACGGGGAAG
TGCGGGCCGACGGAGTACTCGCGCTTCTTCAAGAGGCTTTGCCCGG
ACGCGTTCAGTTATGTCCTGGACAAGCCAACCACCGTCACCTGCCCC
GGCAGCTCCAACTACAGGGTCACTTTCTGCCCTACTGCCCTTGAACT
TGAAGACGAGTAA [SEQ ID NO:9]

[0136] 莫内林

ATGGGAGAGTGGGAAATTATCGATATTGGTCCCTTCACCCAAAACT
TGGGAAAGTTTGCTGTTGACGAGGAAAATAAAATCGGACAGTACGG
AAGACTCACTTTCAACAAGGTCATTAGGCCTTGTATGAAGAAAACA

[0137] ATCTACGAGAACGAAGGCTTTAGAGAGATTAAGGGGTACGAATATC
AACTGTACGTGTATGCTTCCGATAAACTTTTCAGAGCCGATATCTCT
GAGGACTACAAGACTAGAGGCAGGAAATTGCTCAGGTTTAACGGAC
CTGTTCCTCCACCGTAG [SEQ ID NO:10]

[0138] 神秘果蛋白

ACAACAATGAAGGAATTAACAATGCTCTCTCTCTCGTTCTTCTTCGT
CTCTGCATTGTTGGCAGCAGCGGCCAACCCACTGCTTAGTGCAGCG
GATTCGGCACCCAATCCGGTTCTTGACATAGACGGAGAGAAACTCC
GGACGGGGACCAATTATTACATTGTGCCGGTGCTCCGCGACCATGG
CGGCGGCCTTACAGTATCCGCCACCACCCCCAACGGCACCTTCGTTT
GTCCACCCAGAGTTGTCCAAACACGAAAGGAGGTCGACCACGATCG
CCCCCTCGCTTTCTTTCCAGAGAACCCAAAGGAAGACGTTGTTCGAG
TCTCCACCGATCTCAACATCAATTTCTCGGCGTTCATGCCCTGTCGTT

[0139] GGACCAGTTCCACCGTGTGGCGGCTCGACAAATACGATGAATCCAC
GGGGCAGTACTTCGTGACCATCGGCGGTGTCAAAGGAAACCCAGGT
CCCGAAACCATTAGTAGCTGGTTTAAGATTGAGGAGTTTTGTGGTAG
TGGTTTTTACAAGCTTGTTTTCTGTCCCACCGTTTGTGGTTCCTGCAA
AGTAAAATGCGGAGATGTGGGCATTTACATTGATCAGAAGGGAAGA
AGGCGTTTGGCTCTCAGCGATAAACCATTCGCATTCGAGTTCAACAA
AACCGTATACTTCTAATTGGGTTTGGGGGTGGTTTTTCCAATCACAT
CTCATGTATGATCAGCTCCATTATCGATCTGCATAATTATAATTAAT
AAGGAAGCTTTT [SEQ ID NO:11]

[0140] 仙茅甜蛋白

ATGGCGGCCAAGTTTCTTCTCACCATTCTTGTCACCTTTGCGGCCGT
CGCTAGCCTTGGCATGGCCGACAGTGTCCTGCTCTCCGGGCAAACTC
TGTATGCGGGCCACTCCCTCACGTCGGGCAGCTATACCTTAACCATA
CAAAACAACTGCAACCTGGTGAAATACCAGCACGGGAGGCAGATCT
GGGCTAGCGACACTGACGGGCAGGGCTCCCAATGCCGCCTCACATT

[0141] GCGGAGTGACGGGAACCTCATTATCTACGACGACAACAACATGGTC
GTGTGGGGGAGCGACTGCTGGGGGAACAACGGCACGTATGCTCTTG
TTCTTCAGCAGGATGGCCTCTTTGTCATCTATGGCCCGGTTTTGTGG
CCCCTTGGCCTTAATGGGTGCCGCAGTCTTAATGGTGAAATCACAGT
TGCTAAGGATTCTACTGAACCACAACATGAGGATATTAAGATGGTG
ATTAATAATTAA [SEQ ID NO:12]

[0142] Neoculin

ATGGCGGCCAAGTTTCTTCTCACCATTCTTGTCACCTTTGCGGCCGT
CGCTAGCCTTGGCATGGCCGACAGTGTCCTGCTCTCCGGGCAAACTC
TGTATGCCGGCCACTCCCTCACGTCGGGCAGCTATACCTTAACCATA
CAAAACAACTGCAACCTGGTGAAATACCAGCACGGGAGGCAGATCT
GGGCTAGCGACACTGACGGGCAGGGCTCCCAATGCCGCCTCACATT
GCGGAGTGACGGGAACCTCATTATCTACGACGACAACAACATGGTC

[0143] GTGTGGGGGAGCGACTGCTGGGGGAACAACGGCACGTATGCTCTTG
TTCTTCAGCAGGATGGCCTCTTTGTCATCTATGGCCCGGTTTTGTGG
CCCCTTGGCCTTAATGGGTGCCGCAGTCTTAATGGTGAAATCACAGT
TGCTAAGGATTCTACTGAACCACAACATGAGGATATTAAGATGGTG
ATTAATAATTAATCAAGTGAGAGGATTGTTATGAGAATAATGAGGG
AATGGAAGACCAATCTCATGTCGGTGTGGCCTATCTCGACCTGTTTG
CAGTGCCTTTGTTAAAATAACACATTGCTTAA [SEQ ID NO:13]

[0144] 接头:接头是用于连接两个蛋白分子以提高溶解性、稳定性和/或表达的肽分子。如Enbrel®、Ontak®、Orencia®、Amevive®、Arcalyst®和Nplate®等药物含有通过接头连接的多个蛋白,并且已获得FDA批准。接头可分为柔性接头或刚性接头(Chen et al.,2013;Smith et al.2003)。

[0145] 柔性接头主要由如甘氨酸、丙氨酸和/或丝氨酸等小分子氨基酸组成,它们形成无序环,从而为折叠提供相对较高的自由度(Argos,1990)。例如,本文中使用的"L1型接头"由氨基酸$(SGG)_nSAG$组成[对应的核苷酸序列为SEQ ID NO:14]。

[0146] 柔性接头的一个显著局限性是缺乏刚性。文献中有一些示例,使用柔性接头会导致产量相对较低/生物活性降低(Amet et al.,2009;Maeda et al.,1997)。文献中已经使用了许多α螺旋形成接头来构建重组融合蛋白(Amet et al.,2009;Bai and Shen,2006)。例如,本文中使用的“L2型接头”由氨基酸A(EAAAK)$_n$A组成[对应的核苷酸序列为SEQ ID NO:15]。

[0147] 还可以使用进一步修饰的柔性和刚性接头来实现所需的产量/生物活性,如文献中所证明的(Chen et al.,2013)。例如,本文使用的“L3型接头”由氨基酸KKKR(SGG)$_n$SAGKREAEA组成[对应的核苷酸序列为SEQ IDNO:16],并且本文使用的“L4型接头”由氨基酸(KKKR)$_n$(EAEA)$_n$组成[对应的核苷酸序列为SEQ ID NO:17]。

[0148] L1型接头

[0149] SEQ ID NO:14

[0150] (TCTGGTGGG)$_n$AGCGCGGGT

[0151] 其中n=1-10

[0152] L2型接头

[0153] SEQ ID NO:15

[0154] GCT(GAAGCAGCTGCGAAA)$_n$GCA

[0155] 其中n=1-10

[0156] L3型接头

[0157] SEQ ID NO:16

[0158] AAAAAAAAAAGA(TCTGGTGGG)$_n$AGCGCGGGTAAAAGA GAGGCTGAAGCT

[0159] 其中n=1-10

[0160] L4型接头

[0161] SEQ ID NO:17

[0162] (AAAAAAAAAAGA)$_n$(GAGGCTGAAGCT)$_n$

[0163] 其中n=1-10

[0164] L5型接头

[0165] SEQ ID NO:18

[0166] (GGG)$_n$

[0167] 其中n=3-10

[0168] L6型接头

[0169] SEQ ID NO:19

[0170] (GGGGGTGGGGGTTCT)$_n$

[0171] 其中n=1-10

[0172] L7型接头

[0173] SEQ ID NO:20

[0174] GCT(GAAGCAGCTGCGAAA)$_4$GCTTTGGAAGCT(GAAGCAGCTGCGAAA)$_4$GCT

[0175] L8型接头

[0176] SEQ ID NO:21

[0177] $(CCAGCT)_nCCA$

[0178] n=3-10

[0179] 从上面提到的接头可以明显看出,它们由重复的氨基酸序列组成。该特定的重复序列可以重复“n”次,以根据需要而改变接头序列的长度和性质,其中“n”的范围可以是1到10。最佳重复次数对于维持蛋白的功能和稳定性至关重要。如果蛋白之间距离太近,可能会影响3D结构并从而影响功能。如果它们距离太远,重组分子的稳定性受到影响。布拉齐因蛋白具有四个二硫化物内桥Cys4-Cys52、Cys16-Cys37、Cys22-Cys47和Cys26-Cys49。这些二硫化物内桥使布拉齐因成为最热稳定的甜蛋白。这一特性非常重要,因为大多数人造甜味剂无法承受烘焙和其它烹饪过程中的高温。显然,其中一个二硫化物桥靠近N末端和C末端,因此仅一个或两个重复基序的非常短的接头就会引起与第一个蛋白的空间位阻,从而导致布拉齐因蛋白的正确构象被Cys4-Cys52二硫化物桥稳定。这可适用于重组分子的两个方向。因此,在我们的示例中使用了n=3,它保持适当的分离,从而不影响二硫化物桥的形成,并从而不影响布拉齐因蛋白的结构。

[0180] 载体:将基因克隆到pPICZA整合载体中,该载体含有毕赤酵母酒精氧化酶启动子、酒精氧化酶终止子、吉欧霉素抗性基因。

[0181] 信号肽:α交配信号因子-酵母α交配因子的pro区域是一种分泌信号因子,广泛用于重组蛋白在细胞外部分的表达。在少数实施方式中,使用已针对毕赤酵母中的细胞外分泌进行优化的信号因子。序列如下:

[0182] SEQ ID NO:22

[0183] ATGAGATTTCCTTCAATTTTTACTGCTGTTTTATTCGCAGCATCCTCC
GCATTAGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGAAACGGCAC
AAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTAGAAGGGGA
TTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAATAACGGGT
TATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTAAAGAAGAA
GGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT

[0184] 人类血清白蛋白信号因子

[0185] 人类血清白蛋白信号因子是毕赤酵母中用于蛋白表达的另一种常用信号肽。信号因子序列如下:

[0186] SEQ ID NO:23

[0187] ATGAAGTGGGTCACCTTCATTTCCTTGCTGTTCTTGTTCTCTTCCGCT
TACTCT

[0188] Pre-Ost1-α信号因子

[0189] 在一些实施方式中,α交配因子的pro区域与Pre-Ost1融合并用作信号肽

[0190] SEQ ID NO:24

[0191] ATGAGGCAGGTTTGGTTCTCTTGGATTGTGGGATTGTTCCTATGTTTT
TTCAACGTGTCTTCTGCTGCTCCAGTCAACACTACAACAGAAGATGA
AACGGCACAAATTCCGGCTGAAGCTGTCATCGGTTACTCAGATTTA
GAAGGGGATTTCGATGTTGCTGTTTTGCCATTTTCCAACAGCACAAA
TAACGGGTTATTGTTTATAAATACTACTATTGCCAGCATTGCTGCTA
AAGAAGAAGGGGTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCT

[0192] 图3A-3D示出了根据本发明实施方式的各种基因盒表示。

[0193] 图3A示出了基因盒表示,其中AOX1用作载体,并且α交配信号因子是用于表达重组蛋白的信号肽。β-乳球蛋白(蛋白A)通过“L1型接头”与布拉齐因(蛋白B)连接,反之亦然。同一基因盒中的“L1型接头”可以被“L2型接头”替代。

[0194] 图3B示出了基因盒表示,其中AOX1用作载体,并且α交配信号因子是用于表达重组蛋白的信号肽。β-酪蛋白(蛋白A)通过“L1型接头”与布拉齐因(蛋白B)连接,反之亦然。同一基因盒中的“L1型接头”可以被“L2型接头”替代。

[0195] 图3C示出了基因盒表示,其中AOX1用作载体,并且人类血清白蛋白信号因子(HAS-SP)是用于表达重组蛋白的信号肽。β-乳球蛋白(蛋白A)通过“L1型接头”与布拉齐因(蛋白B)连接,反之亦然。同一基因盒中的“L1型接头”可以被“L2型接头”替代。

[0196] 图3D示出了基因盒表示,其中AOX1用作载体,并且人类血清白蛋白信号因子(HAS-SP)是用于表达重组蛋白的信号肽。β-酪蛋白(蛋白A)通过“L1型接头”与布拉齐因(蛋白B)连接,反之亦然。同一个基因盒中的“L1型接头”可以被“L2型接头”替代。

[0197] 图4显示了根据本发明的一个实施方式,表达β乳球蛋白-L1-布拉齐因、布拉齐因-L1-β乳球蛋白、β乳球蛋白-L2-布拉齐因、布拉齐因-L2-β乳球蛋白的凝胶图像。在图4中,泳道1为空白,泳道2为空白,泳道3为牛奶蛋白标准品,泳道4为β-乳球蛋白-L1-布拉齐因,泳道5为布拉齐因-L1-β-乳球蛋白,泳道6为β-乳球蛋白-L2-布拉齐因,泳道7为布拉齐因-L2-β-乳球蛋白。

[0198] 图5显示了根据本发明的实施方式的β乳球蛋白-L3-布拉齐因、β乳球蛋白-L4-布拉齐因表达的凝胶图像。在图5中,泳道1为空白,泳道2为空白,泳道3为空白,泳道4为牛奶蛋白标准品,泳道5为β-乳球蛋白-L3-布拉齐因,β-乳球蛋白-L4-布拉齐因。

[0199] 本发明将根据下述示例性材料和方法作进一步描述,这些材料和方法仅用于说明目的,而不应理解为限制本发明的范围。以下实验可以扩大到工业/商业规模,并且所获得的结果可以外推到工业规模。可用于任何方法和组合物的其它材料和方法也是本领域已知的。

[0200] 组合物

[0201] 在一些实施方式中,可以使用所述重组融合蛋白分子制备以下组合物。

[0202] 组合物的非限制性示例如下:

[0203] 1.牛奶蛋白与甜蛋白连接,并与脂肪和灰分组合,其中灰分含有必需的矿物质。

[0204] 2.非牛奶蛋白与甜味蛋白连接,并与脂肪和灰分组合,其中灰分包含必需的矿物质。

[0205] 3.牛奶蛋白和非牛奶蛋白与甜味蛋白连接,并与脂肪和灰分组合,其中灰分包含

必需的矿物质。

[0206] 4.牛奶蛋白与另一种牛奶蛋白连接。

[0207] 5.牛奶蛋白与非牛奶蛋白连接。

[0208] 6.非牛奶蛋白与非牛奶蛋白连接。

[0209] 蛋白

[0210] 在一些实施方式中,本发明的蛋白组合物中使用了以下蛋白。蛋白的非限制性示例如下:

[0211] 1.牛奶蛋白κ酪蛋白、αS1酪蛋白、αS2酪蛋白、β酪蛋白、β乳球蛋白、α乳白蛋白、转铁蛋白和卵清蛋白

[0212] 2.甜味蛋白-索马甜、莫内林、马槟榔甜蛋白、神秘果蛋白、仙茅甜蛋白、Neoculin和培它丁。

[0213] 脂肪

[0214] 在一些实施方式中,本发明的组合物中使用了以下脂肪。脂肪的非限制性示例如下:

[0215] 植物类油,如葵花籽油、玉米油、大豆油、棕榈果油、棕榈仁油、红花油、亚麻籽油、米糠油、棉籽油、橄榄油、菜籽油、亚麻籽油、椰子油;藻油、微生物产生的脂肪和源自植物类油底物的微生物发酵的脂肪。

[0216] 灰分

[0217] 在一些实施方式中,本发明的组合物中使用食用灰分。

[0218] 矿物质

[0219] 矿物质的非限制性示例是钙、磷和镁。

[0220] 载体

[0221] 在实施方式中,本发明的蛋白组合物中使用了下列载体。载体的非限制性示例如下:

[0222] 1.含有甲醇诱导型启动子(AOX1、FLD1、MOX1、DAS1等)、α交配信号因子、吉欧霉素抗性盒、终止子的整合载体。

[0223] 2.含有组成型启动子、α交配信号因子、吉欧霉素抗性盒、终止子的整合载体。

[0224] 3.与上面针对1和2提到的载体相似的载体,其中吉欧霉素替换为卡那霉素抗性。

[0225] 4.与上面针对1-3提到的载体相似的载体,其中α交配因子被替换为驱动表达到细胞外部分的任何信号因子。

[0226] 表达生物体

[0227] 根据本发明的实施方式,上述实施方式中的重组分子可以在用于重组分子的微生物系统中表达,例如

[0228] 细菌-大肠杆菌、枯草芽孢杆菌、蓝藻细菌等

[0229] 真菌表达宿主-黑曲霉、构巢曲霉、里氏木霉、青霉菌属

[0230] 酵母-酿酒酵母、白色念珠菌、乳酸克鲁维酵母、马克斯克鲁维酵母、耶氏酵母属等

[0231] 甲基营养型酵母-毕赤酵母、多形汉逊酵母、博伊丁假丝酵母转化

[0232] 可以使用转化规程,例如利用乙酸锂和LiCl的化学转化、转染、电穿孔、PEG介导的转化、农杆菌介导的转化等。

[0233] 实施例

[0234] 以下实施例用于说明本公开的具体实施方式。实施例中公开的技术代表了发明人发现的在本公开的方法和过程中发挥良好作用的技术;然而,本领域技术人员根据本公开应该认识到,可以在公开的具体实施方式中进行许多改变并且仍然获得相同或相似的结果,而不会脱离本公开的精神和范围。因此,实施例中阐述或显示的所有事项应被解释为说明性的,而不是限制性的。

[0235] 重组载体

[0236] 此处简要介绍了一些示例性的重组载体pPICZA-β-乳球蛋白-L1-布拉齐因、pPICZA-布拉齐因-L1-β-乳球蛋白、pPICZA-β-乳球蛋白-L2-布拉齐因、pPICZA-布拉齐因-L2-β-乳球蛋白、pPICZA-β-乳球蛋白-L3-布拉齐因、pPICZA-布拉齐因-L3-β-乳球蛋白、pPICZA-β乳球蛋白-L4-布拉齐因、pPICZA-布拉齐因-L4-β乳球蛋白。

[0237] 目的基因与所选的信号肽一起被合成。通过重叠PCR,利用接头将两种基因融合在一起。接头的序列是在重叠PCR引物内设计的。将融合构建体克隆到pPICZA的EcoRI和NotI位点,并通过标准规程转化到大肠杆菌NEB5感受态细胞中。在25μg/ml吉欧霉素LB琼脂平板上筛选转化体。通过限制性消化和测序确认转化体。

[0238] 宿主生物体

[0239] 毕赤酵母菌株是BG16菌株的衍生物,本文将其指定并称为PX-1。

[0240] 菌株构建

[0241] 通过中量制备法大量分离选定用于毕赤酵母转化的质粒。用SacI/Pmel酶将40μg质粒DNA线性化,并且将5-10μg线性化载体用于通过电穿孔法转化上述PX-1菌株。转化规程简述如下。将20-50ul PX-1菌株接种于100ml YPD培养基中,并且生长过夜至O.D为1-1.3。收获细胞并用冷无菌milliQ水洗涤两次。下一步,用2ml 1M山梨糖醇洗涤,并且最后悬浮于200μl 1M山梨糖醇中。将细胞置于冰上并于当天用于电穿孔。将80μl感受态细胞与5-10μg线性化DNA混合,并在Biorad电穿孔仪中使用为毕赤酵母电穿孔预设的条件进行电穿孔。电穿孔后立即加入1ml 1M山梨糖醇并在30℃下温育1小时。随后将1ml YPD添加到培养物中并在30℃下进一步振荡温育2-3小时。在不同浓度(100-2000μg/ml)的YPD-吉欧霉素平板上筛选菌落。通过菌落PCR确认整合的阳性菌落。

[0242] 表达

[0243] 将单菌落接种于10ml BMGY培养基(1%酵母提取物、2%蛋白胨、100mM磷酸钾(pH 6.0)、1.34%酵母氮源基础、4×10^{-5}%生物素、1%甘油)中,培养24小时,然后转移到BMMY(1%酵母提取物、2%蛋白胨、100mM磷酸钾(pH 6.0)、1.34% YNB、4×10^{-5}%生物素、0.5%甲醇)培养基中,至最终O.D为1-2以进行诱导。每24小时后向培养物中添加0.5%的甲醇。在24、48和72小时收集样品,并在SDS page上进行可视化以查看表达。然后将阳性样品连续放大至500ml烧瓶、1ml烧瓶和8L发酵罐。

[0244] 发酵罐条件

[0245] 将菌株的甘油原液接种到250mL带挡板烧瓶中的50mL YPD肉汤中。然后使用该接种物接种100ml GYP(酵母提取物1%、蛋白胨2%和甘油2%)作为适应阶段。然后将其接种到250ml BSM(甘油4%、正磷酸2.7%、K_2SO_4 1.8%、$MgSO_4\cdot7H_2O$ 1.4%、KOH 0.413%、$CaSO_4\cdot2H_2O$ 0.116%)中。然后将培养物接种到含有BSM培养基的8L发酵罐中,生长期维持

pH为5,且诱导期维持pH为6。生长期温度维持在30,且诱导期温度维持在24。

[0246] 蛋白纯化

[0247] 培养上清液首先经过微滤处理,以去除细胞和其它颗粒物质。然后采用超滤/渗滤浓缩渗透物,再进行冷冻干燥,以获得粉末状蛋白。

[0248] 品尝测试

[0249] 进行了一项双盲研究,使用20名参与者分析了样品的甜度商数。以20C、30g/L的蔗糖溶液作为参比溶液,其甜度商数为1。参与者品尝样品并要求基于蔗糖标准为1来评定甜度商数。

[0250] 实施例1:构建重组载体用于表达重组融合蛋白

[0251] 此处简述了一些示例性的重组载体pPICZA-β-乳球蛋白-L1-布拉齐因、pPICZA-布拉齐因-L1-β-乳球蛋白、pPICZA-β-乳球蛋白-L2-布拉齐因、pPICZA-布拉齐因-L2-β-乳球蛋白、pPICZA-β-乳球蛋白-L3-布拉齐因、pPICZA-布拉齐因-L3-β-乳球蛋白、pPICZA-β乳球蛋白-L4-布拉齐因、pPICZA-布拉齐因-L4-β乳球蛋白。目的基因与所选的信号肽一起被合成。通过重叠PCR,利用接头将两个基因融合在一起。接头的序列是在重叠PCR引物内设计的。将融合构建体克隆在pPICZA的EcoRI和Not1位点,并通过标准规程转化到大肠杆菌NEB5感受态细胞中。在25μg/ml吉欧霉素LB琼脂平板上筛选转化体。通过限制性消化和测序确认转化体。

[0252] 宿主生物体

[0253] 毕赤酵母菌株--一种BG16的衍生菌株,采购自Atum Biosciences。

[0254] 菌株构建-通过中量制备规程大量分离选定用于毕赤酵母转化的质粒。用SacI/PmeI酶线性化40μg质粒DNA,并使用5-10μg线性化载体通过电穿孔转化上述PPS-9016菌株。转化规程简述如下。用20-50ul PX-1菌株接种100ml YPD培养基中,并且生长过夜至O.D为1-1.3。收获细胞并用冷无菌milliQ水洗涤两次。下一步,用2ml 1M山梨糖醇洗涤,最后悬浮于200μl 1M山梨糖醇中。将细胞置于冰上并于当天用于电穿孔。将80μl感受态细胞与5-10μg线性化DNA混合,并在Biorad电穿孔仪中使用用于毕赤酵母电穿孔的本发明条件进行电穿孔。电穿孔后立即加入1ml1M山梨糖醇并在30℃下温育一小时。随后将1ml YPD添加到培养物中并在30℃下进一步振荡温育2-3小时。在不同浓度(100-2000μg/ml)的YPD-吉欧霉素平板上筛选菌落。通过菌落PCR确认了整合的阳性菌落。

[0255] 实施例2:重组融合蛋白的表达

[0256] 将单个菌落接种于10ml BMGY培养基(1%酵母提取物、2%蛋白胨、100mM磷酸钾(pH 6.0)、1.34%酵母氮源基础、4×10^{-5}%生物素、1%甘油)中,并且培养24小时,然后转移至BMMY培养基(1%酵母提取物、2%蛋白胨、100mM磷酸钾(pH 6.0)、1.34%YNB、4×10^{-5}%生物素、0.5%甲醇)中,至最终O.D为1-2以进行诱导。每24小时后,向培养物中添加0.5%甲醇。在24、48和72小时收集样本,并在SDS page上进行可视化以查看表达。然后将阳性样品连续放大至500ml烧瓶、1ml烧瓶和8L发酵罐。

[0257] 发酵罐条件:将菌株的甘油原液接种到250mL带挡板烧瓶中的50mL YPD肉汤中。然后使用该接种物接种100ml GYP(酵母提取物1%、蛋白胨2%和甘油2%)作为适应阶段。然后将其接种到250ml BSM(甘油4%、正磷酸2.7%、K_2SO_4 1.8%、$MgSO_4\cdot7H_2O$ 1.4%、KOH 0.413%、$CaSO_4\cdot2H_2O$0.116%)中。然后将培养物接种到含有BSM培养基的8L发酵罐中,生长

期维持pH为5,且诱导期维持pH为6。生长期温度保持在30℃,且诱导期温度保持在24℃。

[0258] 实施例3:融合蛋白的分离和纯化

[0259] 培养上清液首先经过微滤处理,以去除细胞和其它颗粒物质。然后采用超滤/渗滤浓缩渗透物并冷冻干燥以获得蛋白粉。

[0260] 实施例4:重组融合蛋白适口性的确定

[0261] 品尝测试-进行了一项双盲研究,使用20名参与者以分析样品的甜度商数。以20C、30g/L的蔗糖溶液作为参比溶液,其甜度商数为1。参与者品尝样品并要求基于蔗糖标准为1评定甜度商数。

[0262] 以上所述仅为本发明的优选实施方式,并非用于限制本发明。凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

[0263] 在整个本说明书中,词语“包含”或其变型如“包括”或“含有”应理解为暗示包含所述要素、整体或步骤,或要素、整数或步骤组,但不排除任何其它要素、整数或步骤,或要素、整数或步骤组。

[0264] 表述“至少”或“至少一种”的使用表明使用一个或多个要素或组分或数量,因为该使用可以在本公开的实施方式中以实现一个或多个期望的目的或结果。

[0265] 针对各种物理参数、尺寸或数量所提及的数值仅为近似值,并且可以设想,高于/低于分配给所述参数、尺寸或数量的数值的值都落入本公开的范围内,除非说明书中有明确相反的声明。

[0266] 尽管本文重点强调了本公开的特定特征,但应当理解的是,可以在不脱离本公开的原理的情况下进行各种修改,并且可以对优选实施方式进行许多改变。根据本文的公开,本领域技术人员将清楚本公开的性质或优选实施方式的这些和其它修改,因此应清楚地理解,前述描述性内容应仅解释为对本公开的说明,而非限制。

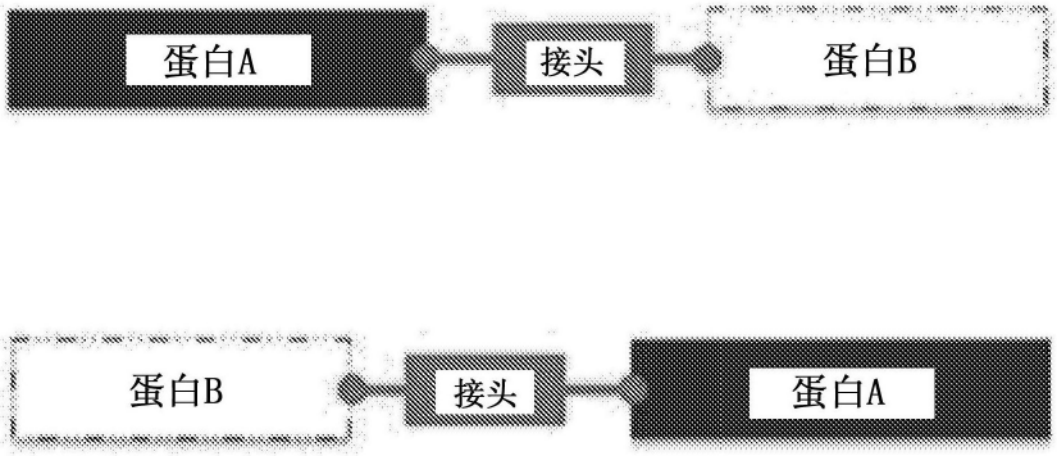

蛋白A
接头
蛋白B
蛋白B
接头
蛋白A

图1

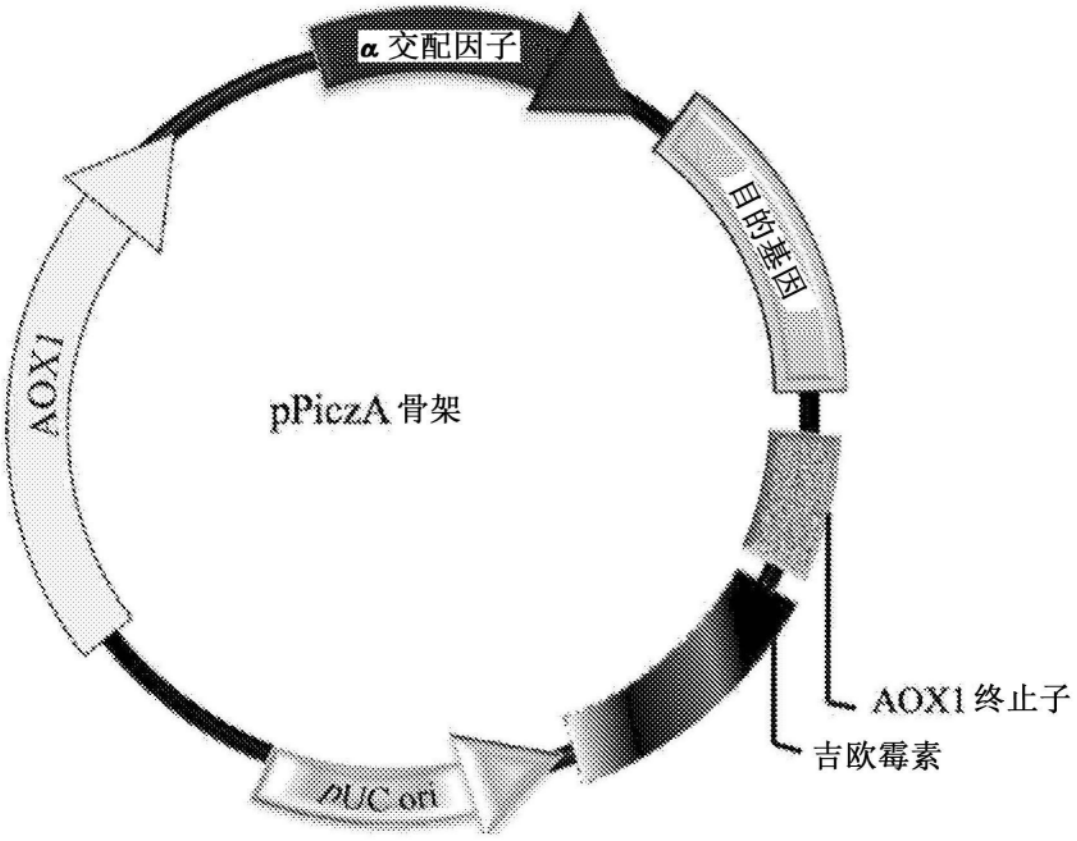

α 交配因子
目的基因
AOX1 终止子
吉欧霉素
pUC ori
AOX1
pPiczA 骨架

图2

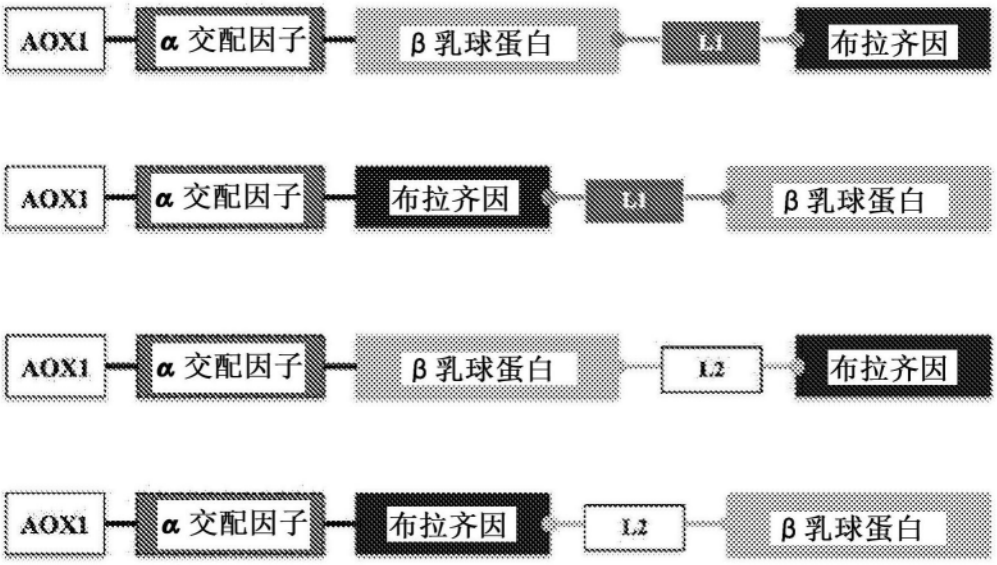

AOX1
α 交配因子
β 乳球蛋白
L1
布拉齐因
AOX1
α 交配因子
布拉齐因
L1
β 乳球蛋白
AOX1
α 交配因子
β 乳球蛋白
L2
布拉齐因
AOX1
α 交配因子
布拉齐因
L2
β 乳球蛋白

图3A

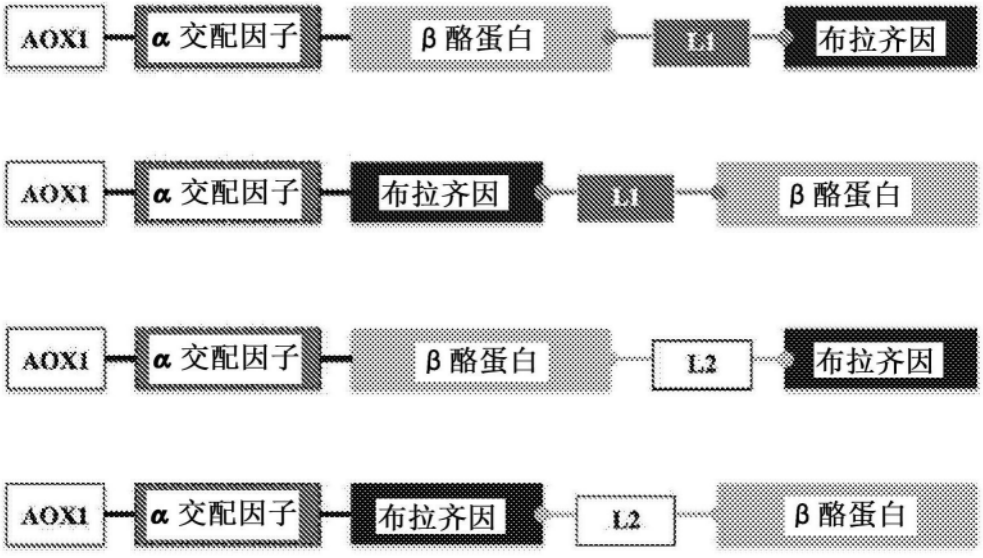

AOX1
α 交配因子
β 酪蛋白
L1
布拉齐因
AOX1
α 交配因子
布拉齐因
L1
β 酪蛋白
AOX1
α 交配因子
β 酪蛋白
L2
布拉齐因
AOX1
α 交配因子
布拉齐因
L2
β 酪蛋白

图3B

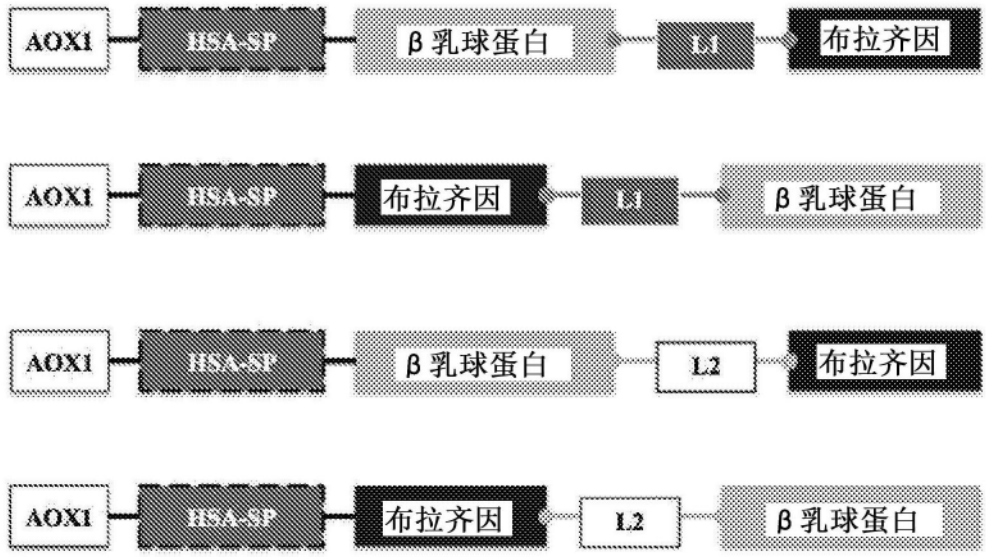

AOX1
HSA-SP
β乳球蛋白
L1
布拉齐因
AOX1
HSA-SP
布拉齐因
L1
β乳球蛋白
AOX1
HSA-SP
β乳球蛋白
L2
布拉齐因
AOX1
HSA-SP
布拉齐因
L2
β乳球蛋白

图3C

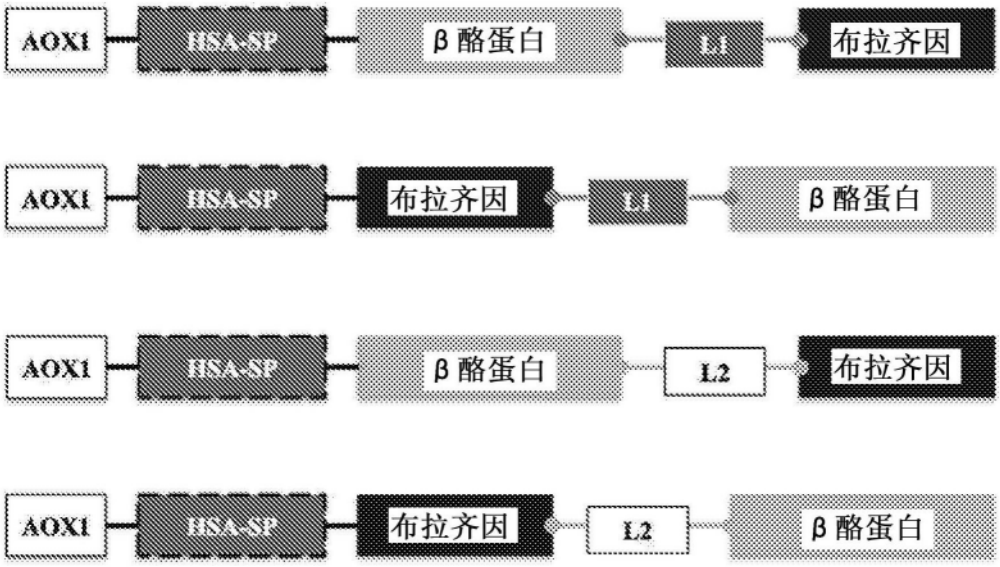

AOX1
HSA-SP
β酪蛋白
L1
布拉齐因
AOX1
HSA-SP
布拉齐因
L1
β酪蛋白
AOX1
HSA-SP
β酪蛋白
L2
布拉齐因
AOX1
HSA-SP
布拉齐因
L2
β酪蛋白

图3D

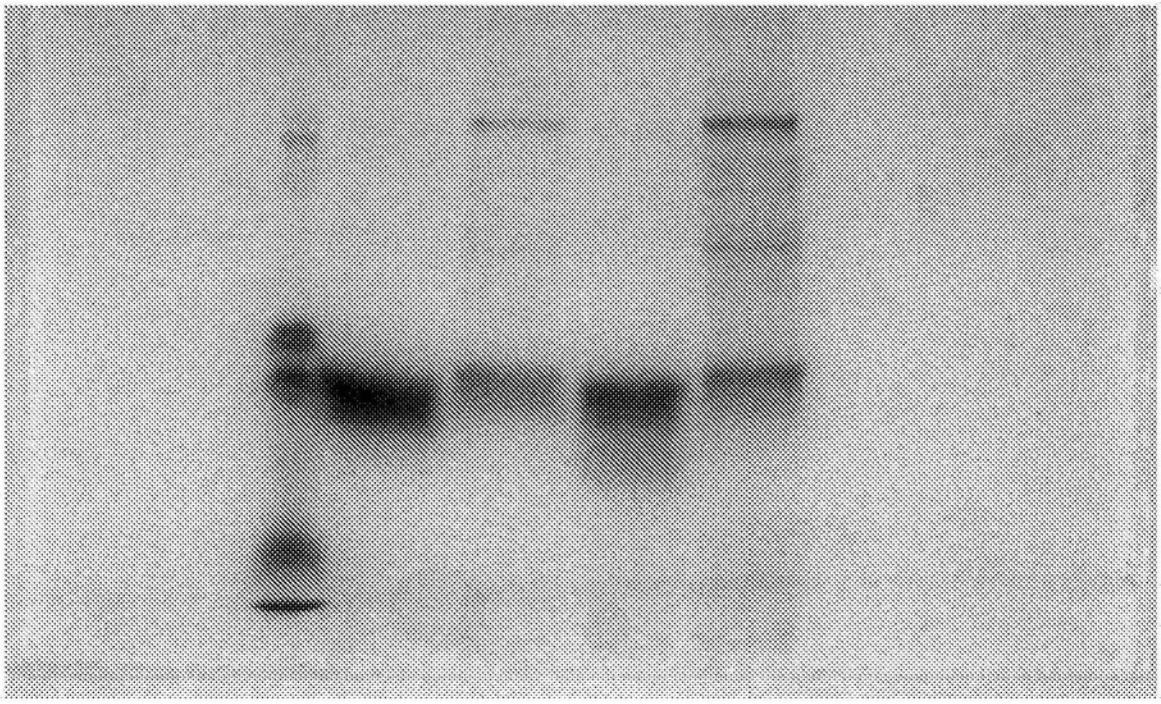


图4

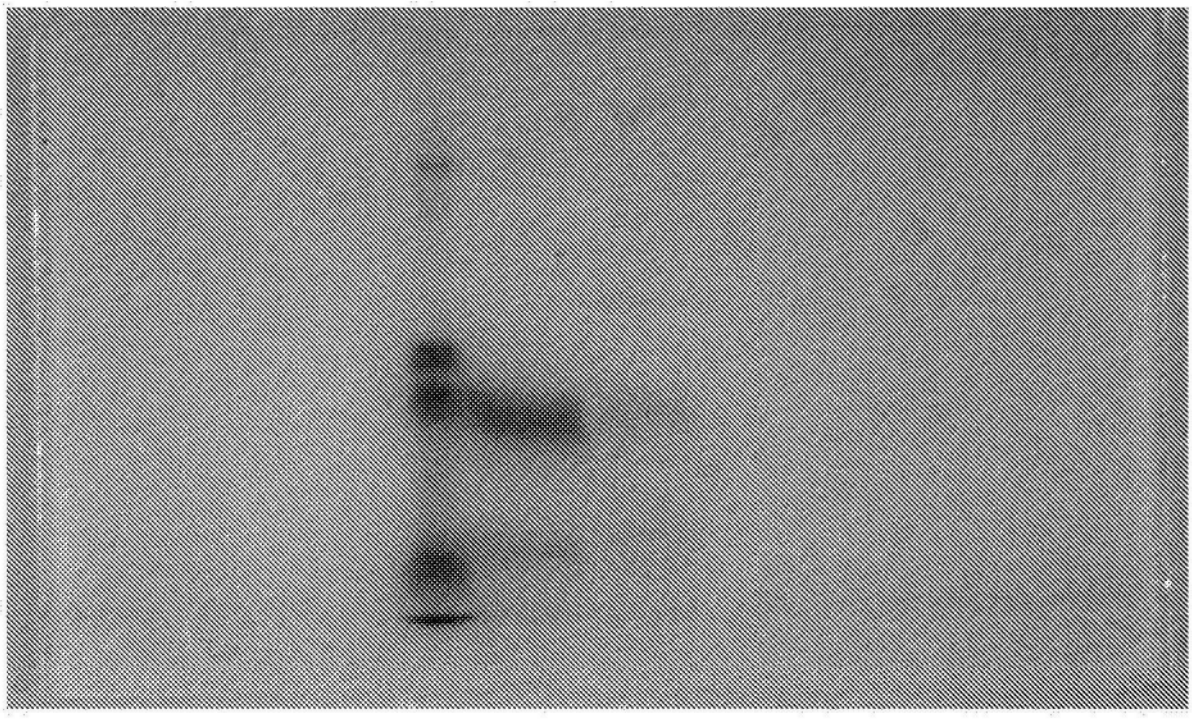


图5