

(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
2016 年 10 月 27 日 (27.10.2016)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2016/169306 A1

- (51) 国际专利分类号:
C12N 9/20 (2006.01) C12R 1/845 (2006.01)
C12N 15/81 (2006.01) C12R 1/84 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/070236
- (22) 国际申请日: 2016 年 1 月 6 日 (06.01.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510195799.9 2015 年 4 月 22 日 (22.04.2015) CN
- (71) 申请人: 江南大学 (JIANGNAN UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国江苏省无锡市蠡湖大道 1800 号, Ji-
angsu 214122 (CN)。
- (72) 发明人: 喻晓蔚 (YU, Xiao Wei); 中国江苏省无锡市
蠡湖大道 1800 号, Jiangsu 214122 (CN)。 徐岩 (XU,
Yan); 中国江苏省无锡市蠡湖大道 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 PROP-
ERTY AGENCY CO.,LTD.); 中国黑龙江省哈尔滨市
松北区科技一街 99 号 18 栋 E501 耿晓岳, Heilongji-
ang 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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB,
GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS,
JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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, SM, ST,
SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, 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, 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))。
- 包括说明书序列表部分(细则 5.2(a))。

(54) Title: METHOD FOR IMPROVING EXPRESSION OF LIPASE BY GLYCOSYLATION MODIFICATION, MUTANT EN-
ZYMES AND APPLICATION OF MUTANT ENZYMES

(54) 发明名称: 糖基化改造提高脂肪酶表达的方法、突变酶及其应用

(57) Abstract: Provided are a method for improving the expression of lipase by glycosylation modification, mutant enzymes and an application of the mutant enzymes, specifically comprising: performing N-glycosylation mutation on a propeptide sequence of rhizo-
pus oryzaelipase, and respectively modifying SAS and/or NT amino acids into N-glycosylation loci NGT and/or NLT; compared
with the extracellular protein concentration of proROL which is not subjected to glycosylation, extracellular protein concentrations of
obtained mutant enzymes proROLA, proROLB and proROLAB are separately improved by 211 percent, 188 percent and 233 per-
cent; and when a fermentation tank is adopted for culturing, enzyme activities separately reach 8210U·mL⁻¹, 8457U·mL⁻¹ and
9366U·mL⁻¹, and the extracellular enzyme activity of unmutated proROL is almost zero.

(57) 摘要: 提供了糖基化改造提高脂肪酶表达的方法、突变酶及其应用。具体是将米根霉脂肪酶的前导肽序列
进行 N-糖基化突变, 将 SAS 和/或 NT 氨基酸分别改造为 N-糖基化位点 NGT 和/或 NLT, 得到的突变体酶 pro-
ROLA、proROLB、proROLAB 的胞外蛋白浓度分别比未进行糖基化的 proROL 提高了 211%、188%、233%, 发酵
罐培养时酶活分别达到 8210U·mL⁻¹、8457U·mL⁻¹ 和 9366U·mL⁻¹, 而未突变的 proROL 的胞外酶活几乎为零。



WO 2016/169306 A1

说明书

糖基化改造提高脂肪酶表达的方法、突变酶及其应用

技术领域

本发明涉及糖基化改造提高脂肪酶表达的方法、突变酶及其应用，属于酶工程领域。

背景技术

米根霉脂肪酶具有良好的1,3-位置特异性，优先催化中长链脂肪酸，在食品、化工及生物能源等方面都有很重要的应用。利用酶的水解、合成及转酯等活性，米根霉脂肪酶有不同的应用。

目前，米根霉脂肪酶的全基因序列已经在 NCBI 上公布。该酶包括 26 个氨基酸信号序列(presequence)、97 个氨基酸前导肽序列(prosequence)和 269 个氨基酸成熟肽序列(mROL)所组成。已有研究表明前导肽对米根霉脂肪酶的分泌和折叠起着十分重要的作用：酶的分泌必需有前序列的 20 号到 37 号残基，而经折叠形成活性脂肪酶必需有 38 号到 57 号残基。米根霉脂肪酶在大肠杆菌中有很好的表达，但这些脂肪酶只能以无活性的形式表达。

P. pastoris 是应用广泛、最高效的外源蛋白表达工具之一，基因的特性、内质网中的蛋白质折叠、蛋白从内质网到高尔基体的转运以及蛋白的翻译等许多因素都能影响 *P. pastoris* 表达蛋白的水平。*P. pastoris* 表达蛋白产生 N-糖基化是一种常见情况，糖基化能够稳定蛋白质的成熟构象，影响蛋白的活性及热稳定性，以及对蛋白质的正确折叠、运输、定位也起着重要作用。其中 N-糖基化在许多蛋白质研究报道中都有着至关重要的作用，对蛋白的分泌等作用是不可缺少的，人们对其研究也相对深入。通常，蛋白质的功能发生改变往往是由于蛋白的结构发生了变化，而蛋白质上增加一个大的糖链能极大的改变蛋白质的结构。

据研究报道 N-糖基化对 *P. pastoris* 表达蛋白的分泌水平与活性等具有重要影响。Kohno 等构建表达 Kex2 位点突变脂肪酶的 *P. pastoris* 基因工程菌，发现前导肽未被处理的 RNL 的热稳定性更高，且结合到脂肪酶上的糖链长度大小对 RNL 的热稳定性无影响。Ito 等研究卵清蛋白的 N-糖基化对蛋白分泌量的影响，证明 292 位 N-糖基化对该蛋白的分泌折叠是必须的。Boivin 等研究 N-糖基化对 *P. pastoris* 表达的溶栓剂 DSPA α 1 分泌水平和活性的影响，结果发现该蛋白的两个位点的 N-糖链(N117 和 N362)对蛋白的分泌和酶活性具有重要作用。此外，根毛霉脂肪酶的 N-糖基化研究也证明其对酶的分泌有关键作用，但 N-糖基化对其酶活的获得却有消极作用。

本发明通过对米根霉脂肪酶的前导肽进行 N-糖基化突变，获得了酶活和表达量提高的脂肪酶突变体。

发明内容

说明书

为了克服现有米根霉脂肪酶表达量和酶活较低的缺陷，本发明提供一种基于 N-糖基化改造提高脂肪酶表达的方法，以及表达提高的脂肪酶及其应用。

本发明的第一个目的是提供一种表达提高脂肪酶突变体。

所述突变体，是在米根霉脂肪酶的基础上，将其前导肽的 SAS 和/或 NT 氨基酸位点突变为 N-糖基化位点。

所述突变体，在本发明的一种实施方式中，是将前导肽序列中的 SAS 氨基酸位点突变成 N-糖基化位点 NGT，命名为 proROLA，突变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示。

所述突变体，在本发明的一种实施方式中，是将前导肽序列中的 NT 氨基酸位点突变成 N-糖基化位点 NLT，命名为 proROLB，突变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示。

所述突变体，在本发明的一种实施方式中，是将前导肽序列中的 SAS、NT 氨基酸位点分别突变成 N-糖基化位点 NGT、NLT，命名为 proROLAB，突变体的氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示。

所述突变体，还可以是在严格条件下 ($T_m - 10 \sim 15^\circ\text{C}$) 与 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2 或 SEQ ID NO.3 所示氨基酸序列杂交且编码具有脂肪酶活性的蛋白质分子。

所述米根霉脂肪酶，在本发明的一种实施方式中，发生 N-糖基化突变前的氨基酸序列如 SEQ ID NO.4 所示，由于不同米根霉菌株来源的脂肪酶氨基酸序列仅有个别氨基酸的差异，因此，该方法不仅适用于 SEQ ID NO.4 序列，而且对氨基酸序列相似性达到 80% 以上的脂肪酶序列均适用于本专利。

所述米根霉脂肪酶，在本发明的一种实施方式中，发生 N-糖基化突变前的核苷酸序列如 SEQ ID NO.9 所示。

本发明的第二个目的是提供含有所述脂肪酶突变体的表达载体。

所述表达载体为分泌型载体。

所述表达载体，在本发明的一种实施方式中，可以是以下任意一种：pGAPZ α 、pPIC9、pPIC3K、pPIC9K、PAO815 或 pPICZ α 。

本发明的第三个目的是提供含有所述脂肪酶突变体的基因工程菌。

所述基因工程菌，在本发明的一种实施方式中，是以毕赤酵母为宿主构建的。

所述基因工程菌，在本发明的一种实施方式中，其构建方法是：将编码所述脂肪酶突变体的核苷酸序列克隆到表达质粒 pGAPZ α 上，然后线性化质粒，并电转入毕赤酵母 GS115 的感受态细胞中。

本发明的第四个目的是一种提高米曲霉脂肪酶表达的方法，是将米曲霉脂肪酶的前导肽的 SAS 和/或 NT 氨基酸位点进行 N-糖基化突变。

说明书

所述方法,在本发明的一种实施方式中,突变后的脂肪酶的氨基酸序列如 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2 或 SEQ ID NO.3 所示。

所述方法,在本发明的一种实施方式中,是将突变后的脂肪酶以 pGAPZ α 为载体,在毕赤酵母中进行表达。

本发明还要求保护所述脂肪酶突变体在食品、化工或生物能源等领域的应用,以及所述基因工程菌在酶制剂生产中的应用。

本发明的有益效果:

本发明的经过 N-糖基化突变的米曲霉脂肪酶,在工程菌中进步表达时,不仅不会影响菌株的生长,而且具有显著提高的酶活和分泌量。摇瓶培养 96h 后, proROLA、proROLB、proROLAB 的胞外蛋白浓度分别比未进行糖基化的 proROL 提高了 211%、188%、233%; 突变体 proROLA、proROLB 以及 proROLAB 的摇瓶发酵酶活分别达到 150 U·mL⁻¹、175 U·mL⁻¹ 和 200 U·mL⁻¹, 30L 发酵罐发酵酶活分别达到 8210 U·mL⁻¹、8457 U·mL⁻¹ 和 9366 U·mL⁻¹, 而未突变的 proROL 的胞外酶活几乎为零。

附图说明

图 1: 前导肽突变示意图;

图 2: 表达突变前后脂肪酶的基因工程菌的生长曲线;

图 3: 基因工程菌株的蛋白分泌情况;

图 4: 不同时间下基因工程菌表达脂肪酶的 SDS-PAGE; 其中, M 为蛋白 marker, 泳道 1-5 分别代表培养 24h、48h、72h、84h 和 96h;

图 5: 不同发酵时间下的突变体酶活。

具体实施方式

实施例 1: 引入 N-糖基化的突变酶及基因工程的构建

本发明在米根霉脂肪酶 ROL 的前导肽中设计 3 种 N-糖基化位点突变体,即将 SAS 和 NT 氨基酸分别改造为 N-糖基化位点 NGT 和 NLT, 突变酶分别命名为 proROLA (氨基酸序列如 SEQ ID NO.1 所示) 和 proROLB (氨基酸序列如 SEQ ID NO.2 所示); 将 SAS 和 NT 两个位点同时改造为 N-糖基化位点的突变酶命名为 proROLAB (氨基酸序列如 SEQ ID NO.3 所示)。前导肽具体突变方式如图 1 所示。

具体构建方法如下:

(1) 以含有 SEQ ID NO.4 所示氨基酸序列的米曲霉脂肪酶基因 *proROL* 的载体 pPIC9K-*proROL*、pGAPZ α 为模板, 同时用限制性内切酶 *EcoR* I、*Not* I 双酶切, 胶回收目的基因 *proROL* 和 pGAPZ α 载体片段, 用 T4 DNA 连接酶连接目的基因和载体, 构建重组质粒

说明书

pGAPZα-proROL。

(2) 以重组质粒 pGAPZα-proROL 为模板，设计引物 NGT-A F/NGT-A R 和 NLT-BF/NLT-BR 分别进行全质粒 PCR，构建分别将 ROL 基因中 SAS、LT 氨基酸突变成 NGT、NLT 的重组质粒，命名为 pGAPZα-proROLA 和 pGAPZα-proROLB。构建完成后，再以质粒 pGAPZα-proROLA 为模板，用引物 NLT-BF/NLT-BR 全质粒 PCR 构建重组质粒 pGAPZα-proROLAB。所用引物如表 1 所示。

表1 引物

引物名称	序列 (5'-3')	编号
NGT-A F	GATTCTCCACTACCGCCGTCAACGGAACCGACAA TTCTGCCCTCCC	SEQ ID NO.5
NGT-A R	GGGAGGAATTGTCGGTTCCGTTGACGGCGGTAGT GGAAGATC	SEQ ID NO.6
NLT-BF	CTACATGCAAAAGAATCTTACAGAATGGTATGA	SEQ ID NO.7
NLT-BR	TCATACCAATTCTGTAAAGATTCTTTTGCATGTAG	SEQ ID NO.8

(3) 将上述构建的重组表达质粒 pGAPZα-proROL、pGAPZα-proROLA、pGAPZα-proROLB 及 pGAPZα-proROLAB 分别用限制性内切酶 *AvrII* 酶切线性化，胶回收目的片段，电转入酵母感受态 GS115 细胞，设计引物进行基因组 PCR 验证阳性菌株，即得到基因工程菌 GS115/pGAPZα-proROL、GS115/pGAPZα-proROLA、GS115/pGAPZα-proROLB、GS115/pGAPZα-proROLAB。经测定，proROL、proROLA、proROLB、proROLAB 基因在酵母基因组中均为单拷贝。

实施例 2：表达突变酶与野生酶的基因工程菌的生长比较

以 GS115/pGAPZα-proROL 为对照，比较了表达米根霉脂肪酶突变体的基因工程菌的生长情况。

摇瓶发酵条件：将阳性转化子划线 YPD-G418 平板 (w/v)：酵母膏 1%，葡萄糖 2%，琼脂粉 2%，胰蛋白胨 2%，G418 0.025%)，30℃ 培养 3 d，挑单克隆接种至 100 mL YPD 液体培养基 (w/v)：酵母膏 1%，葡萄糖 2%，胰蛋白胨 2%) 中，30℃ 200 rpm·min⁻¹ 摇瓶培养，每隔 12 h 或 24 h 取样。

菌株生长曲线如图 2 所示。结果表明，各突变菌株与对照生长情况相似，48h 以内菌株生长迅速，72h 后各菌株生长变得缓慢，趋于平稳。说明在米根霉脂肪酶基因中引入糖基化位点后不会影响各菌株的生长。

实施例 3：N-糖基化对米根霉脂肪酶分泌水平的影响

本发明比较了表达突变酶和野生酶的基因工程菌的脂肪酶分泌情况。

说明书

将各基因工程菌进行发酵培养,具体培养条件:将阳性转化子划线 YPD-G418 平板, 30°C 培养 3 d, 挑单克隆接种至 100 mL YPD 液体培养基中, 30°C 200 rpm·min⁻¹ 摇瓶培养, 每隔 12 h 或 24 h 取样。

结果如图 3 所示, 未引入糖基化位点的米根霉脂肪酶 proROL 的蛋白浓度最低, 而引入两个糖基化位点的米根霉脂肪酶 proROLAB 的胞外蛋白浓度略高于只引入一个糖基化位点的脂肪酶 proROLA 和 proROLB, 初步判断引入的糖基化位点发生了糖基化, 且影响了米根霉脂肪酶的分泌水平。结果显示, 发酵培养 96h 后, proROLA、proROLB、proROLAB 的胞外蛋白浓度分别比未进行糖基化的 proROL 提高了 211%、188%、233%。

如图 4 为不同取样时间的 SDS-PAGE 图。由于分泌的米根霉脂肪酶前导肽被部分切割(图 1 中 KR 位点为切除信号肽的特异性酶切位点), 保留 28 个前导肽氨基酸, 引入糖基化位点的前导肽片段也被切除了, 因此分泌表达的米根霉脂肪酶分子量均一致。未引入糖基化位点脂肪酶 proROL 从 24 h-96 h 都几乎未分泌, 其余引入糖基化位点脂肪酶的分泌量都随着时间延长而增加, 84 h 达到最大, 且突变酶 proROLA 和 proROLAB 的分泌量在相同时间段都略高于脂肪酶 proROLB。

实施例 4: 摇瓶条件下 N-糖基化对米根霉脂肪酶胞外酶活的影响

将构建的基因工程菌进行摇瓶发酵培养产酶, 同时测定不同发酵时间的脂肪酶酶活。

具体条件: 将阳性转化子划线 YPD-G418 平板, 30°C 培养 3 d, 挑单克隆接种至 100 mL YPD 液体培养基中, 30°C 200 rpm·min⁻¹ 摇瓶培养, 每隔 12 h 或 24 h 取样。

酶活力的定义为: 每分钟在标准反应条件下产生 1 μmol pNP 所用的酶量为一个脂肪酶水解酶活国际单位。酶活力的测定方法用 pNPP 法。

结果如图 5 所示。发酵过程中 proROL 的胞外酶活几乎为零, 而其他三种引入 N-糖基化位点的脂肪酶突变体的胞外酶活随着发酵时间的延长酶活不断增加, 84h 酶活达到最大值。突变体 proROLA、proROLB 以及 proROLAB 的酶活最高值分别达到 150 U·mL⁻¹、175 U·mL⁻¹ 和 200 U·mL⁻¹。

实施例 5: 发酵罐条件下 N-糖基化对米根霉脂肪酶胞外酶活的影响

将构建的基因工程菌进行 30L 发酵罐发酵培养产酶, 同时测定 84h 发酵时间的脂肪酶酶活。

具体条件: 将阳性转化子划线 YPD-G418 平板, 30°C 培养 3 d, 挑单克隆接种至 200 mL YPD 液体培养基中, OD 值达到 2-6 时, 接种于 30L 发酵罐中进行发酵培养, 发酵过程中流加葡萄糖溶液, 控制浓度为 2% 左右, 流加氨水控制 pH5.5, 温度 28°C, 发酵 84 h 之后测定脂肪酶酶活力。

酶活力的定义为: 每分钟在标准反应条件下产生 1 μmol pNP 所用的酶量为一个脂肪酶水

说明书

解酶活国际单位。酶活力的测定方法用 pNPP 法。

发酵结果显示，proROL 的胞外酶活几乎为零，而其他三种引入 N-糖基化位点的脂肪酶突变体 proROLA、proROLB 以及 proROLAB 的胞外酶活在 84h 酶活分别达到 $8210 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 、 $8457 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $9366 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

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。

核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

序列表

<110> 江南大学

<120> 糖基化改造提高脂肪酶表达的方法、突变酶及其应用

<160> 9

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 366

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<400> 1

Val Pro Val Ser Gly Lys Ser Gly Ser Ser Thr Thr Ala Val Asn Gly

1 5 10 15

Thr Asp Asn Ser Ala Leu Pro Pro Leu Ile Ser Ser Arg Cys Ala Pro

20 25 30

Pro Ser Asn Lys Gly Ser Lys Ser Asp Leu Gln Ala Glu Pro Tyr Tyr

35 40 45

Met Gln Lys Asn Thr Glu Trp Tyr Glu Ser His Gly Gly Asn Leu Thr

50 55 60

Ser Ile Gly Lys Arg Asp Asp Asn Leu Val Gly Gly Met Thr Leu Asp

65 70 75 80

Leu Pro Ser Asp Ala Pro Pro Ile Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Ser

85 90 95

Ala Ser Asp Gly Gly Lys Val Val Ala Ala Thr Thr Ala Gln Ile Gln

100 105 110

Glu Phe Thr Lys Tyr Ala Gly Ile Ala Ala Thr Ala Tyr Cys Arg Ser

115 120 125

核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

Val Val Pro Gly Asn Lys Trp Asp Cys Val Gln Cys Gln Lys Trp Val			
130	135	140	
Pro Asp Gly Lys Ile Ile Thr Thr Phe Thr Ser Leu Leu Ser Asp Thr			
145	150	155	160
Asn Gly Pro Val Leu Arg Ser Asp Lys Gln Lys Thr Ile Tyr Leu Val			
165	170	175	
Phe Arg Gly Thr Asn Ser Phe Arg Ser Ala Ile Thr Asp Ile Val Phe			
180	185	190	
Asn Phe Ser Asp Tyr Lys Pro Val Lys Gly Ala Lys Val His Ala Gly			
195	200	205	
Phe Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Val Val Asn Asp Tyr Phe Pro Val Val			
210	215	220	
Gln Glu Gln Leu Thr Ala Asn Pro Thr Tyr Lys Val Ile Val Thr Gly			
225	230	235	240
His Ser Leu Gly Gly Ala Gln Ala Leu Leu Ala Gly Met Asp Leu Tyr			
245	250	255	
Gln Arg Glu Pro Arg Leu Ser Pro Lys Asn Leu Ser Ile Phe Thr Val			
260	265	270	
Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Pro Thr Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ser			
275	280	285	
Thr Gly Ile Pro Phe Gln Arg Thr Val His Lys Arg Asp Ile Val Pro			
290	295	300	
His Val Pro Pro Gln Ser Phe Gly Phe Leu His Pro Gly Val Glu Ser			
305	310	315	320
Trp Ile Lys Ser Gly Thr Ser Asn Val Gln Ile Cys Thr Ser Glu Ile			
325	330	335	
Glu Thr Lys Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Leu Leu			
340	345	350	
Asp His Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Asn Glu Gly Ser Cys Leu			
355	360	365	

核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

<210> 2

<211> 367

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<400> 2

Val Pro Val Ser Gly Lys Ser Gly Ser Ser Thr Thr Ala Val Ser Ala

1 5 10 15

Ser Asp Asn Ser Ala Leu Pro Pro Leu Ile Ser Ser Arg Cys Ala Pro

20 25 30

Pro Ser Asn Lys Gly Ser Lys Ser Asp Leu Gln Ala Glu Pro Tyr Tyr

35 40 45

Met Gln Lys Asn Leu Thr Glu Trp Tyr Glu Ser His Gly Gly Asn Leu

50 55 60

Thr Ser Ile Gly Lys Arg Asp Asp Asn Leu Val Gly Gly Met Thr Leu

65 70 75 80

Asp Leu Pro Ser Asp Ala Pro Pro Ile Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn

85 90 95

Ser Ala Ser Asp Gly Gly Lys Val Val Ala Ala Thr Thr Ala Gln Ile

100 105 110

Gln Glu Phe Thr Lys Tyr Ala Gly Ile Ala Ala Thr Ala Tyr Cys Arg

115 120 125

Ser Val Val Pro Gly Asn Lys Trp Asp Cys Val Gln Cys Gln Lys Trp

130 135 140

Val Pro Asp Gly Lys Ile Ile Thr Thr Phe Thr Ser Leu Leu Ser Asp

145 150 155 160

Thr Asn Gly Pro Val Leu Arg Ser Asp Lys Gln Lys Thr Ile Tyr Leu

165 170 175

Val Phe Arg Gly Thr Asn Ser Phe Arg Ser Ala Ile Thr Asp Ile Val

180 185 190

核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

Phe Asn Phe Ser Asp Tyr Lys Pro Val Lys Gly Ala Lys Val His Ala
 195 200 205
 Gly Phe Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Val Val Asn Asp Tyr Phe Pro Val
 210 215 220
 Val Gln Glu Gln Leu Thr Ala Asn Pro Thr Tyr Lys Val Ile Val Thr
 225 230 235 240
 Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Gln Ala Leu Leu Ala Gly Met Asp Leu
 245 250 255
 Tyr Gln Arg Glu Pro Arg Leu Ser Pro Lys Asn Leu Ser Ile Phe Thr
 260 265 270
 Val Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Pro Thr Phe Ala Tyr Tyr Val Glu
 275 280 285
 Ser Thr Gly Ile Pro Phe Gln Arg Thr Val His Lys Arg Asp Ile Val
 290 295 300
 Pro His Val Pro Pro Gln Ser Phe Gly Phe Leu His Pro Gly Val Glu
 305 310 315 320
 Ser Trp Ile Lys Ser Gly Thr Ser Asn Val Gln Ile Cys Thr Ser Glu
 325 330 335
 Ile Glu Thr Lys Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Leu
 340 345 350
 Leu Asp His Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Asn Glu Gly Ser Cys Leu
 355 360 365

<210> 3

<211> 367

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<400> 3

Val Pro Val Ser Gly Lys Ser Gly Ser Ser Thr Thr Ala Val Asn Gly

核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

1	5	10	15
Thr Asp Asn Ser Ala Leu Pro Pro Leu Ile Ser Ser Arg Cys Ala Pro			
	20	25	30
Pro Ser Asn Lys Gly Ser Lys Ser Asp Leu Gln Ala Glu Pro Tyr Tyr			
	35	40	45
Met Gln Lys Asn Leu Thr Glu Trp Tyr Glu Ser His Gly Gly Asn Leu			
	50	55	60
Thr Ser Ile Gly Lys Arg Asp Asp Asn Leu Val Gly Gly Met Thr Leu			
65	70	75	80
Asp Leu Pro Ser Asp Ala Pro Pro Ile Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn			
	85	90	95
Ser Ala Ser Asp Gly Gly Lys Val Val Ala Ala Thr Thr Ala Gln Ile			
	100	105	110
Gln Glu Phe Thr Lys Tyr Ala Gly Ile Ala Ala Thr Ala Tyr Cys Arg			
	115	120	125
Ser Val Val Pro Gly Asn Lys Trp Asp Cys Val Gln Cys Gln Lys Trp			
	130	135	140
Val Pro Asp Gly Lys Ile Ile Thr Thr Phe Thr Ser Leu Leu Ser Asp			
145	150	155	160
Thr Asn Gly Pro Val Leu Arg Ser Asp Lys Gln Lys Thr Ile Tyr Leu			
	165	170	175
Val Phe Arg Gly Thr Asn Ser Phe Arg Ser Ala Ile Thr Asp Ile Val			
	180	185	190
Phe Asn Phe Ser Asp Tyr Lys Pro Val Lys Gly Ala Lys Val His Ala			
	195	200	205
Gly Phe Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Val Val Asn Asp Tyr Phe Pro Val			
	210	215	220
Val Gln Glu Gln Leu Thr Ala Asn Pro Thr Tyr Lys Val Ile Val Thr			
225	230	235	240
Gly His Ser Leu Gly Gly Ala Gln Ala Leu Leu Ala Gly Met Asp Leu			
	245	250	255

核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

Tyr Gln Arg Glu Pro Arg Leu Ser Pro Lys Asn Leu Ser Ile Phe Thr
 260 265 270
 Val Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Pro Thr Phe Ala Tyr Tyr Val Glu
 275 280 285
 Ser Thr Gly Ile Pro Phe Gln Arg Thr Val His Lys Arg Asp Ile Val
 290 295 300
 Pro His Val Pro Pro Gln Ser Phe Gly Phe Leu His Pro Gly Val Glu
 305 310 315 320
 Ser Trp Ile Lys Ser Gly Thr Ser Asn Val Gln Ile Cys Thr Ser Glu
 325 330 335
 Ile Glu Thr Lys Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Leu
 340 345 350
 Leu Asp His Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Asn Glu Gly Ser Cys Leu
 355 360 365

<210> 4

<211> 366

<212> PRT

<213> 人工合成序列

<400> 4

Val Pro Val Ser Gly Lys Ser Gly Ser Ser Thr Thr Ala Val Ser Ala
 1 5 10 15
 Ser Asp Asn Ser Ala Leu Pro Pro Leu Ile Ser Ser Arg Cys Ala Pro
 20 25 30
 Pro Ser Asn Lys Gly Ser Lys Ser Asp Leu Gln Ala Glu Pro Tyr Tyr
 35 40 45
 Met Gln Lys Asn Thr Glu Trp Tyr Glu Ser His Gly Gly Asn Leu Thr
 50 55 60
 Ser Ile Gly Lys Arg Asp Asp Asn Leu Val Gly Gly Met Thr Leu Asp

核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

65	70	75	80
Leu Pro Ser Asp Ala Pro Pro Ile Ser Leu Ser Gly Ser Thr Asn Ser			
	85	90	95
Ala Ser Asp Gly Gly Lys Val Val Ala Ala Thr Thr Ala Gln Ile Gln			
	100	105	110
Glu Phe Thr Lys Tyr Ala Gly Ile Ala Ala Thr Ala Tyr Cys Arg Ser			
	115	120	125
Val Val Pro Gly Asn Lys Trp Asp Cys Val Gln Cys Gln Lys Trp Val			
	130	135	140
Pro Asp Gly Lys Ile Ile Thr Thr Phe Thr Ser Leu Leu Ser Asp Thr			
145	150	155	160
Asn Gly Pro Val Leu Arg Ser Asp Lys Gln Lys Thr Ile Tyr Leu Val			
	165	170	175
Phe Arg Gly Thr Asn Ser Phe Arg Ser Ala Ile Thr Asp Ile Val Phe			
	180	185	190
Asn Phe Ser Asp Tyr Lys Pro Val Lys Gly Ala Lys Val His Ala Gly			
	195	200	205
Phe Leu Ser Ser Tyr Glu Gln Val Val Asn Asp Tyr Phe Pro Val Val			
	210	215	220
Gln Glu Gln Leu Thr Ala Asn Pro Thr Tyr Lys Val Ile Val Thr Gly			
225	230	235	240
His Ser Leu Gly Gly Ala Gln Ala Leu Leu Ala Gly Met Asp Leu Tyr			
	245	250	255
Gln Arg Glu Pro Arg Leu Ser Pro Lys Asn Leu Ser Ile Phe Thr Val			
	260	265	270
Gly Gly Pro Arg Val Gly Asn Pro Thr Phe Ala Tyr Tyr Val Glu Ser			
	275	280	285
Thr Gly Ile Pro Phe Gln Arg Thr Val His Lys Arg Asp Ile Val Pro			
	290	295	300
His Val Pro Pro Gln Ser Phe Gly Phe Leu His Pro Gly Val Glu Ser			
305	310	315	320

核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

Trp Ile Lys Ser Gly Thr Ser Asn Val Gln Ile Cys Thr Ser Glu Ile

325

330

335

Glu Thr Lys Asp Cys Ser Asn Ser Ile Val Pro Phe Thr Ser Leu Leu

340

345

350

Asp His Leu Ser Tyr Phe Asp Ile Asn Glu Gly Ser Cys Leu

355

360

365

<210> 5

<211> 46

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<400> 5

gattctccac taccgccgtc aacggaaccg acaattctgc cctccc

46

<210> 6

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<400> 6

gggaggaatt gtcggttccg ttgacggcgg tagtgaaga tc

42

<210> 7

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工合成

核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

<400> 7

ctacatgcaa aagaatctta cagaatggta tga

33

<210> 8

<211> 33

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<400> 8

tcataccatt ctgtaagatt cttttgcatg tag

33

<210> 9

<211> 1101

<212> DNA

<213> 人工合成序列

<400> 9

gttcctgttt ctggtaaate tggatcttcc actaccgccg tctctgcate tgacaattct	60
gccctccctc ctctcatttc cagccgttgt gctcctcctt ctaacaaggg aagtaaaagc	120
gatcttcaag ctgaacctta ctacatgcaa aagaatacag aatgggatga gtcccatggt	180
ggcaacctga catccatcgg aaagcgagat gacaatttgg ttggtggcat gactttggat	240
ttacctagcg atgctcctcc tctcagcctc tctggatcta ccaacagcgc ctctgatggt	300
ggtaagggttg ttgctgctac tactgctcaa attcaagagt tcaccaagta tgctggatc	360
gctgccactg cctactgtcg ttctgttgtc cctggtaaca agtgggactg tgtccaatgt	420
caaaagtggg ttctgatgg caagatcacc actaccttta cctccttgct ttccgacaca	480
aatggttacg tcttgagaag tgataaaca aagaccattt atcttgtttt ccgtggtacc	540
aactccttca gaagtgccat cactgatatt gtcttcaact ttccgacta caagcctgtc	600
aagggcgcca aggttcatgc tggtttcctt tcctcttatg agcaagttgt caatgactat	660
ttccctgtcg tccaagaaca actgaccgcc aaccctactt acaaggatcat cgtcaccggt	720

核 苷 酸 和 / 或 氨 基 酸 序 列 表

cactcactcg gtggtgcaca agctttgctt gccggtatgg atctctacca acgtgaacca	780
agactgtctc ccaagaattt gagcatcttc actgttgggtg gtcctcgtgt tggtaacccc	840
acctttgctt actatgttga atctaccggt attcctttcc aacgtaccgt tcacaagaga	900
gatatcgttc ctacggttcc tcctcaatcc ttcggtattcc ttcattcccgg tgttgaatct	960
tggattaagt ctggtacctc caacgttcaa atctgtactt ctgaaattga aaccaaggat	1020
tgcagtaact ctatcggtcc ttccacctct ctcccttgatc acttgagtta ctttgatata	1080
aacgaaggaa gctgtttgta a	1101

权 利 要 求 书

- 1、一种脂肪酶突变体，其特征在于，所述突变体是在米根霉脂肪酶的基础上，将其前导肽的 SAS 和/或 NT 氨基酸位点突变为 N-糖基化位点；所述突变体是以下任意一种：
 - (1) 氨基酸序列是 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2 或 SEQ ID NO.3 所示的序列；
 - (2) 在严格条件下与 (1) 限定的氨基酸序列杂交且编码具有脂肪酶活性的蛋白质分子。
- 2、根据权利要求 1 所述的脂肪酶突变体，其特征在于，所述米根霉脂肪酶突变前的氨基酸序列是 SEQ ID NO.4 所示的序列。
- 3、含有权利要求 1-2 任一所述脂肪酶突变体的表达载体。
- 4、根据权利要求 3 所述的表达载体，其特征在于，所述表达载体为分泌型载体。
- 5、根据权利要求 3 所述的表达载体，其特征在于，所述表达载体为以下任意一种：pGAPZ α ，pPIC9，pPIC3K，pPIC9K，PAO815 和 pPICZ α 。
- 6、含有权利要求 1-2 任一所述脂肪酶突变体的基因工程菌。
- 7、一种权利要求 6 所述基因工程菌的构建方法，其特征在于，所述方法是将编码权利要求 2 所述脂肪酶突变体的核苷酸序列克隆到表达质粒 pGAPZ α 上，然后线性化质粒，并电转入毕赤酵母 GS115 的感受态细胞中。
- 8、一种提高米曲霉脂肪酶表达的方法，其特征在于，所述方法是将米曲霉脂肪酶的前导肽进行 N-糖基化突变，突变后脂肪酶的氨基酸序列是 SEQ ID NO.1、SEQ ID NO.2 或 SEQ ID NO.3 所示的序列。
- 9、权利要求 1 所述脂肪酶突变体在食品、化工或生物能源方面的应用。
- 10、权利要求 6 所述基因工程菌在酶制剂生产中的应用。

前导肽突变后:

ROL:VPVSGKSGSSTTAVNGTDNSALPPLISSRCAPPSNKGSKSDLQAEPYMQKNLTEWYESHGGNLTSIGKRDDNLVGGMTLDLPDAPPISLSGSTNSA

前导肽突变前:

ROL:VPVSGKSGSSTTAVSASDNSALPPLISSRCAPPSNKGSKSDLQAEPYMQKNLTEWYESHGGNLTSIGKRDDNLVGGMTLDLPDAPPISLSGSTNSA

图 1

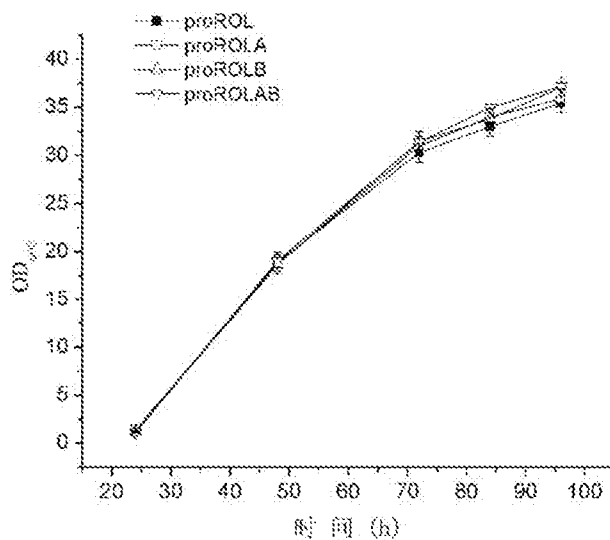


图 2

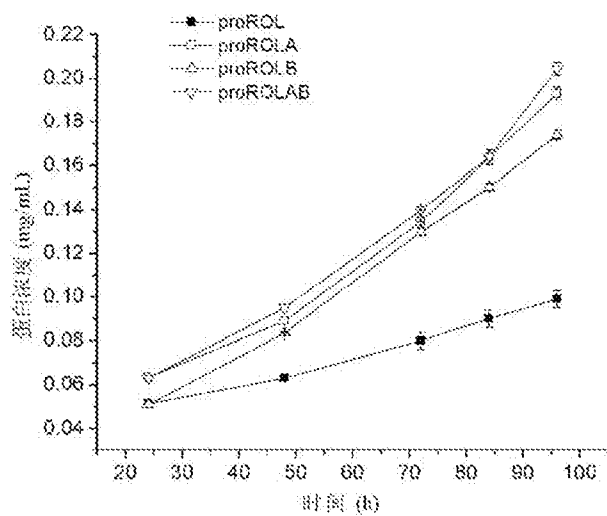


图 3

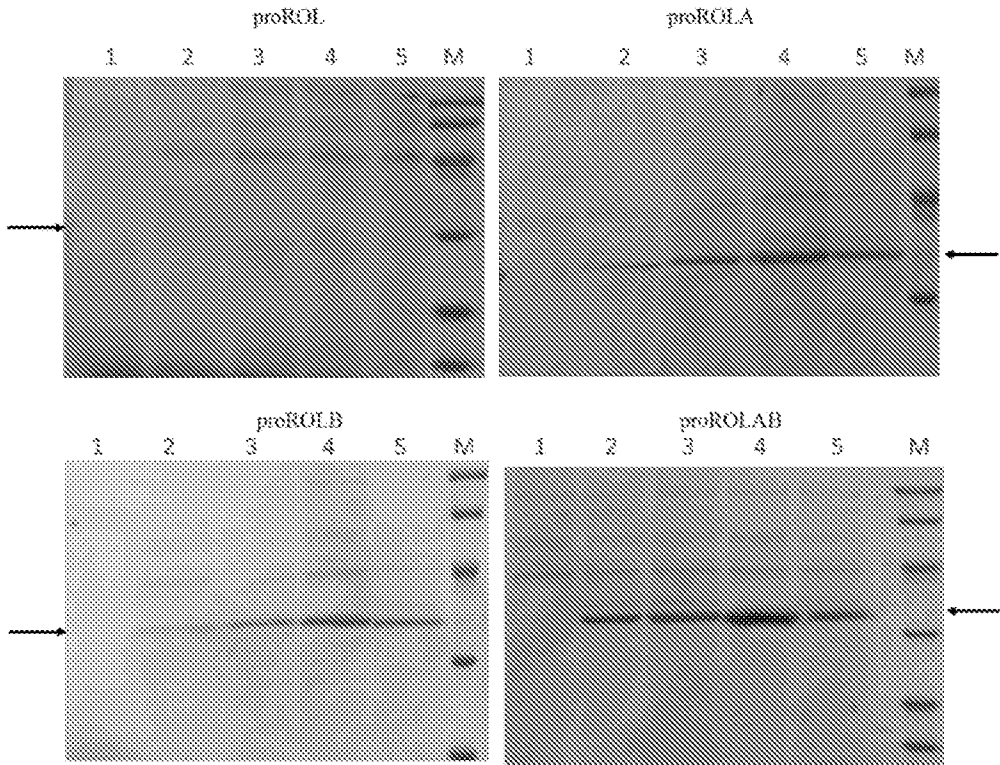


图 4

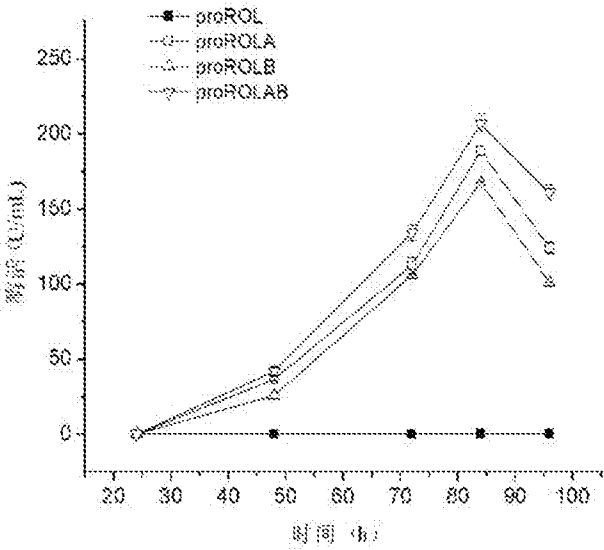


图 5

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/070236

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 9/20 (2006.01) i; C12N 15/81 (2006.01) i; C12N 1/19 (2006.01) i; C12R 1/845 (2006.01) n; C12R 1/84 (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; 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)

Database: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED;

Search words: LIPASE, MUTANT+, GLYCOSYLAT+;

GenBank, EMBL, DDBJ: sequence search on SEQ ID NOS: 1-4

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 104762277 A (JIANGNAN UNIVERSITY), 08 July 2015 (08.07.2015), see the whole document	1-10
X	"AAF32408.1" GenBank, 12 February 2004 (12.02.2004), see the sequence	1-7, 10
Y	"AAF32408.1" GenBank, 12 February 2004 (12.02.2004), see the sequence	9
Y	CN 101857856 A (WUHAN INSTITUTE OF VIROLOGY, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES), 13 October 2010 (13.10.2010), see description, paragraph [0034]	9
A	CN 102363786 A (YELLOW SEA FISHERIES RESEARCH INSTITUTE, CHINESE ACADEMY OF FISHERY SCIENCES), 29 February 2012 (29.02.2012), see the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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
"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)	"&" document member of the same patent family
"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	

Date of the actual completion of the international search 29 March 2016 (29.03.2016)	Date of mailing of the international search report 12 April 2016 (12.04.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WU, Tingchen Telephone No.: (86-10) 62089319

International application No.
PCT/CN2016/070236

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2009)

A. 主题的分类		
C12N 9/20(2006.01)i; C12N 15/81(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12R 1/845(2006.01)n; C12R 1/84(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; 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))		
数据库: CPRSABS, CNABS, CJFD, CSCD, SIPONPL, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI WEB OF KNOWLEDGE, CA, BA, MEDLINE, PUBMED; 检索词: 脂肪酶, 突变, 糖基化, LIPASE, MUTANT+, GLYCOSYLAT+; GenBank, EMBL, DDBJ: SEQ ID NOS: 1-4的序列检索		
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
PX	CN 104762277 A (江南大学) 2015年 7月 8日 (2015 - 07 - 08) 参见全文	1-10
X	"AAF32408.1" GenBank, 2004年 2月 12日 (2004 - 02 - 12), 参见序列	1-7, 10
Y	"AAF32408.1" GenBank, 2004年 2月 12日 (2004 - 02 - 12), 参见序列	9
Y	CN 101857856 A (中国科学院武汉病毒研究所) 2010年 10月 13日 (2010 - 10 - 13) 参见说明书第34段	9
A	CN 102363786 A (中国水产科学研究院黄海水产研究所) 2012年 2月 29日 (2012 - 02 - 29) 参见全文	1-10
☐ 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
2016年 3月 29日		2016年 4月 12日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088		吴汀晨
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62089319

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/070236

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	104762277	A	2015年 7月 8日	无	
CN	101857856	A	2010年 10月 13日	CN	101857856 B 2012年 2月 1日
CN	102363786	A	2012年 2月 29日	CN	102363786 B 2013年 12月 11日