



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103667085 B

(45) 授权公告日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201310653617. 9

审查员 赵鹏

(22) 申请日 2013. 12. 04

(73) 专利权人 青岛蔚蓝生物集团有限公司

地址 266061 山东省青岛市崂山区苗岭路
29 号山东高速大厦 12A07

(72) 发明人 李佩佩 许丽红 王华明 黄亦钧

(51) Int. Cl.

C12N 1/15(2006. 01)

C12N 9/42(2006. 01)

C12N 15/56(2006. 01)

C12R 1/685(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1436243 A, 2003. 08. 13, 权利要求书.

CN 1182451 A, 1998. 05. 20, 全文.

CN 101173263 A, 2008. 05. 07, 权利要求书.

CN 101173263 A, 2008. 05. 07, 权利要求书.

CN 1436243 A, 2003. 08. 13, 权利要求书.

Liu, Y. T. and Hu, Z. . endoglucanase

I [Penicillium decumbens]. 《GenBank:

ACJ15337. 1》. 2008, 全文.

权利要求书1页 说明书3页

序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

一种内切葡聚糖酶生产菌株

(57) 摘要

本发明构建了一种黑曲霉工程菌,能高效表达来源于草酸青霉的内切葡聚糖酶基因,摇瓶发酵酶活可达 900U/mL;本发明获得的重组内切葡聚糖酶的最适作用 pH 为 4. 0,最适温度为 45℃,在 pH5. 0-7. 0 范围内酶活损失不高于 5%,可广泛应用于纺织加工技术领域。

1. 一种黑曲霉,其携带有能表达内切葡聚糖酶的质粒,其特征在于,所述的内切葡聚糖酶的氨基酸序列为 SEQ ID NO:1。
2. 如权利要求 1 所述的黑曲霉,其特征在于,所述的内切葡聚糖酶的编码核苷酸序列为 SEQ ID NO:2。
3. 权利要求 1 所述的黑曲霉在生产内切葡聚糖酶中的应用。

一种内切葡聚糖酶生产菌株

技术领域

[0001] 本发明属于微生物工程技术领域,具体涉及一种内切葡聚糖酶生产菌株。

背景技术

[0002] 纤维素酶是一类能够降解纤维素,使之生成纤维二糖、葡萄糖等一系列酶的总称,按各酶功能的不同可以分为内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和 β -葡萄糖苷酶。纤维素被它降解后可转化为人类急需的能源、食物、化工原料,对于人类社会解决食物短缺和能源危机具有重大的现实意义。

[0003] 纤维素广泛存在于自然界的生物体中,细菌、真菌、动物体内等都能产生纤维素酶。一般用于生产的纤维素酶来自于真菌,比较典型的是木霉属、曲霉属和青霉属。

[0004] 纤维素酶成本高以及酶活力低已经成为制约纤维素酶广泛应用的两大瓶颈,因此构建高效表达的基因工程菌是降低纤维素酶成本、提高产量的有效手段。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种内切葡聚糖酶生产菌株。本发明通过将草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)的内切葡聚糖酶基因转化入黑曲霉中,获得高效生产内切葡聚糖酶的黑曲霉工程菌株,从而弥补现有技术的不足。

[0006] 本发明一方面涉及一种黑曲霉工程菌,其携带有能表达内切葡聚糖酶的重组质粒。

[0007] 所述重组质粒含有草酸青霉的内切葡聚糖酶基因。

[0008] 所述内切葡聚糖酶的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1。

[0009] 所述内切葡聚糖酶的编码核苷酸序列为 SEQ ID NO: 2。

[0010] 本发明的另一方面涉及上述黑曲霉工程菌在生产内切葡聚糖酶中的应用。

[0011] 本发明构建的黑曲霉工程菌能高效表达来源于草酸青霉的内切葡聚糖酶基因,摇瓶发酵酶活可达 900U/mL;本发明获得的重组内切葡聚糖酶的最适作用 pH 为 4.0,最适温度为 45℃,在 pH5.0-7.0 范围内酶活损失不高于 5%,可广泛应用于纺织加工技术领域,具有除毛干净,对织物强力损失小的特点,有利于推广应用。

附图说明

[0012] 图 1 为黑曲霉 EG-1 发酵上清液 SDS-PAGE 电泳检测分析图,其中泳道 1 为对照组,泳道 2 为黑曲霉 EG-1 发酵上清液,箭头所指处即为重组表达的内切葡聚糖酶。

具体实施方式

[0013] 本发明用到了遗传工程和分子生物学领域使用的常规技术和方法,例如 MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3rd Ed. (Sambrook, 2001) 和 CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel, 2003) 中所记载的方法。这些一般性参考文

献提供了本领域技术人员已知的定义和方法。但是,这并不意味着将本发明限定于所述的任何具体方法、实验方案和试剂,因为它们可以改变。

[0014] 除非在本文中另作限定,本文所用的全部技术术语和科学术语具有本发明所属领域的普通计数人员通常所理解的含义。DICTIONARY OF MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY, 3rd Ed. (Singleton et al., 2006) 和 COLLINS DICTIONARY BIOLOGY (Hale et al., 2003) 为技术人员提供了本发明中所使用的许多术语的一般性解释。

[0015] 下面结合具体实施例对本发明进行详细的描述。

[0016] 实施例 1 内切葡聚糖酶基因的克隆

[0017] 1.1 草酸青霉总 DNA 的提取

[0018] 将草酸青霉(*Penicillium oxalicum*)过夜培养,取适量菌体置于离心管中,13000 rpm 离心 5 min,弃上清;加入 400 μ l 抽提缓冲液(100 mM Tris-HCl, 100 mM EDTA, 250 mM NaCl, 1%SDS);然后加 100mg 石英砂或玻璃珠,在珠打仪剧烈振荡 2min 左右;65℃水浴 20min 后,加入 200 μ l 10M NH_4AC ,冰浴 10min;13000rpm 离心 10min,取上清;加入 2 倍体积的无水乙醇,-20℃放置 30min;13000 rpm 离心 10min,弃上清;用 70%乙醇洗涤 2 次;晾干,加入水溶解,于-20℃保存。利用 OMEGA 公司的 E. Z. N. A. Fungal RNA Kit 制备草酸青霉的 mRNA,其制备过程参照试剂盒的操作手册。

[0019] 基因克隆

[0020] 以 1.1 中提取的草酸青霉菌基因组总 DNA 为模板,设计引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为 95℃ 4min;94℃ 30S;55℃ 40S,72℃ 1min 30 个循环;72℃,7min。利用凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物。

[0021] 将回收的扩增产物分别连接到 pMD18-T 载体,获得克隆载体 pMD-EG2,送至北京华大基因研究中心进行测序分析,获得的核苷酸序列为 SEQ ID NO:2,用 blast 分析表明扩增片段为草酸青霉的内切葡聚糖酶基因,其编码氨基酸序列为 SEQ ID NO:1,为一新的等位基因。

[0022] 实施例 2 黑曲霉工程菌的构建

[0023] 2.1 表达载体构建

[0024] 将 1.2 中得到的 PCR 产物进行 Xba I 单酶切。同样,对黑曲霉表达质粒 pGAMD 也进行 Xba I 单酶切。利用 PCR 纯化试剂盒回收酶切产物。用 T4 连接酶把酶切产物即克隆基因和表达载体 22℃连接过夜。最后,把连接产物导入大肠杆菌 DH5 α ;然后通过 PCR 验证连接正确与否,最后将相应的阳性克隆表达质粒命名为 pGAMD-EG1。

[0025] 原生质体制备

[0026] 接种黑曲霉菌丝于 PDA 平板上生长 4 天;切取直径约 3cm 的菌落置于约 100mL CMA (2% 麦芽提取物、2% 葡萄糖,0.1% 细菌蛋白胨)的液体培养基中,30℃,200 rpm 振荡培养过夜;多层纱布过滤收集菌丝;将菌丝置于盛有 20 mL 裂解酶液(Sigma L1412)酶解 2-3 小时;取出酶解液,加入 0.8M MgSO_4 溶液,轻轻摇晃,倒于三层灭菌擦镜纸过滤,收集滤液,3000 rpm,离心 10 min;弃上清,加 10 mL 1.2M 山梨醇悬浮,然后 3000 rpm,离心 10 min;加适量山梨醇悬浮分装(200 μ l/管, 10^8 个/mL)。

[0027] 转化与验证

[0028] 取 10 μ g pGAMD-EG1 DNA 加入到 200 μ L 原生质体中,接着加入 50 μ L 25%PEG 轻轻

混匀,室温静置 20 min;然后加 2mL 25%PEG,轻轻混匀,室温静置 5min,把原生质体加到 50 mL 左右融化后冷却至 45-55℃的上层半固体培养基(0.059% 乙酰胺,0.152%KH₂PO₄, 0.34%CsCl,0.052%KCl,1% 葡萄糖, 21.85% 山梨醇, 0.35% 琼脂糖),轻轻混匀后倒入下层基础培养基平板(0.059% 乙酰胺, 0.152%KH₂PO₄,0.34%CsCl,0.052%KCl,1% 葡萄糖,1% 琼脂粉),30℃ 黑暗培养数天至转化子长出。验证阳性转化子。将获得的一株工程菌命名为黑曲霉 EG-1 (*Aspergillus niger* EG-1)。

[0029] 实施例 3 发酵与酶活测定

[0030] 3.1摇瓶表达

[0031] 将黑曲霉工程菌 EG-1 接种于 50mL 黑曲霉发酵培养基 (1.2% NaNO₃,0.05% KCl, 0.15% KH₂PO₄,0.205% MgSO₄ · 7H₂O,0.35% NaH₂PO₄ · H₂O,7% 柠檬酸钠,4.5% 胰蛋白大豆肉汤,微量元素 1mL,4.1% 葡萄糖),30℃ 培养 4-5 天,离心取上清,进行 SDS-PAGE 检测分析。结果如图 1 所示,在 50kDa 处有一蛋白条带,即为重组表达的内切葡聚糖酶,重组蛋白大小与预测的一致。

[0032] 实施例 4 酶学性质分析

[0033] 4.1最适作用 pH 值

[0034] 用 pH 值分别为 2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0 的缓冲液进行稀释测定,在温度 45℃ 条件下测定酶活,以最高酶活为 100%,计算相对酶活,做 pH- 相对酶活曲线。结果显示:本发明的重组表达内切葡聚糖酶的最适作用 pH4.0。

[0035] 最适作用温度

[0036] 分别在 30℃、35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃, pH5.0 的条件下测定酶活,以最高酶活为 100%,计算相对酶活,做温度- 相对酶活曲线。结果显示:本发明的重组表达内切葡聚糖酶的最适作用温度为 45℃。

[0037] 实施例 4 内切葡聚糖酶在针织面料、梭织面料的除毛染色方面的应用

[0038] 处理原料:针织面料、梭织面料;

[0039] 酶的用量:0.1-3.0g/L;

[0040] 处理条件:35-55℃,处理时间为 30-150 分钟, pH 范围为 4.0-9.5;

[0041] 适用的浴比范围:1:5-1:30;

[0042] 设备类型:溢流染色机,卷染机,水洗机等;

[0043] 本发明获得的重组内切葡聚糖酶具有除毛干净,对织物强力损失小的特点,有利于推广应用。

SEQUENCE LISTING

<110> 青岛蔚蓝生物集团有限公司

<120> 一种内切葡聚糖酶生产菌株

<160> 2

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 477

<212> PRT

<213> endoglucanase enzyme sequence

<400> 1

```

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

```

Ala Ala Asn Ser Tyr Thr Pro His Pro Cys Ser Ser Asp Asp Cys Asp	
225	230 235 240
Lys Gly Gly Cys Gly Phe Asn Pro Tyr Ala Gln Gly Lys Thr Asn Tyr	
	245 250 255
Trp Ala Pro Gly Gly Thr Val Asp Thr Ser Lys Pro Phe Thr Ile Asn	
	260 265 270
Thr Gln Phe Ile Thr Asn Asp Gly Thr Thr Thr Gly Ile Arg Thr Glu	
	275 280 285
Ile Arg Arg Lys Tyr Ile Gln Asn Gly Asn Val Ile Ala Asn Ala Lys	
	290 295 300
Ser Ser Ala Gly Val Asp Ser Ile Lys Val Ala Trp Ser Glu Ser Val	
305	310 315 320
Glu Gly Ala Ala Ala Thr Phe Gly Gly Leu Thr Ser Met Gly Lys Ala	
	325 330 335
Pro Gly Arg Gly Ile Val Leu Ile Phe Ser Ile Arg Asn Glu Val Arg	
	340 345 350
Gly Asn Met Lys Ser Leu Asp Arg Gly Ser Asn Gly Pro Cys Ser Ser	
	355 360 365
Arg Glu Gly Asn Pro Thr Lys Ile Ile Ala Gln Asn Pro Asp Thr His	
	370 375 380
Val Val Phe Ser Lys Met Arg Trp Gly Asp Ile Gly Ser Thr Phe Asn	
385	390 395 400
Ala Pro Gly Gly Ser Gly Ser Ser Ser Cys Thr Thr Pro Ser Lys Ala	
	405 410 415
Thr Thr Thr Val Ala Thr Thr Lys Ala Thr Ser Thr Thr Thr Lys Ile	
	420 425 430
Ser Thr Thr Thr Thr Ala Gly Gly Ala Thr Gln Thr Gln Trp Gly Gln	
	435 440 445
Cys Gly Gly Gln Gly Lys Pro Gly Pro Thr Ala Cys Val Ser Gly Thr	
	450 455 460
Thr Cys Lys Ala Gln Lys Leu Tyr Tyr Ser Gln Cys Leu	
465	470 475

<210> 2

<211> 1434

<212> DNA

<213> endoglucanase gene sequence

<400> 2

atgtctttca caaggagacc gtttcccgag gcggcattgg ccctcttgcc tctcgcccag 60

gcccagcagc aagtggttgc gaaacttgaa aaccgcgtccc cgaaaacata caagtgtctc 120

aagtccggag gctgtgttgt tcaggacacg tcggttgtgt tcgaatggaa atccctctgg	180
attcacaccg ccaacggcta cgactcgtgc accacctcgt ttgaagtgga cccaaccttg	240
tgccctgatg ttacgacgtg gtccaagaac tgtgtcattg aacctgctaa ctacacctct	300
tttgagagg ccaccagtgg tgactcgctc actttgcacc agtacgtgaa aaccgacgga	360
acctacaaca atgcgtctcc ccgtgtctac ctctcggtc ccgacggcga ctacgtcctc	420
atgaaactgc tgggccagga gtcaccttt gatgtcgacc ttccaccct gccgtgtggt	480
gagaacggtg cactctatct atccgagatg agtgggagcg gtggacgcaa tgccaacaac	540
aagggcggtg ccgcgtacgg ttcaggatac tgtgacgtta agtgccccct cgaaacctgg	600
aaaaatggca cccttgtgcc cgggtggccag gcttactgct gtaacgaaat ggatatcctg	660
gagggttaact ccgcagccaa ctcttacaca cctcaccctt gcagctccga tgactgtgac	720
aaggttgat gcggcttcaa cccctatgcg cagggttaaga ccaactactg ggcgccggc	780
ggtaccgtgg acacctcaa gcccttcacc atcaacactc agttcatcac caacgatggt	840
acaaccaccg gtattcgac cgagatccgc cggaaataca tccagaatgg caatgttatt	900
gccaacgcca agtcttccgc gggagttagac tccatcaagg tggcgtggtc cgaaagcgtg	960
gaaggcgccg ccgccacttt cgggtggactg acctccatgg gcaaggctcc cggcccggt	1020
attgtgctga tcttcagtat caggaacgaa gttaggggca acatgaaatc cttggacagg	1080
ggtagcaacg gtccttgac cagcaggag ggcaacccta ccaaaatcat tgctcagaac	1140
cccgacactc acgttgtctt ctctaaaatg cgctggggtg acatttggtc cactttcaac	1200
gccccggtg gctctggatc gagctcgtgt accaccccca gcaaggccac caccaccgtc	1260
gctacgacca aggcgacctc caccaccacc aagatttcca ccaccaccac cgccggtggc	1320
gcgactcaga cccaatgggg ccagtgtgga ggccagggca agcccggacc tacagcctgc	1380
gtgtccggaa ctacctgaa ggcgcagaag ctttactact ctacgtgcct gtga	1434

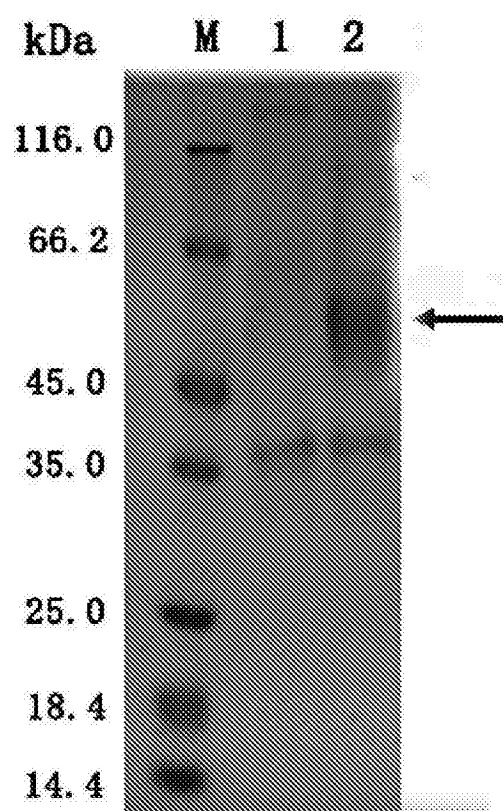


图 1