



(21) 申请号 202311344960.5

(22) 申请日 2019.11.13

(62) 分案原申请数据

201911104793.0 2019.11.13

(71) 申请人 青岛蔚蓝生物集团有限公司

地址 266100 山东省青岛市崂山区九水东
路596-1号

(72) 发明人 刘艳萍 吴秀秀 黄亦钧

(51) Int. Cl.

C12N 9/42 (2006.01)

C12N 15/56 (2006.01)

C12N 15/80 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12R 1/885 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

耐低温纤维素酶突变体

(57) 摘要

本发明涉及基因工程与蛋白质改造技术领域,具体涉及一种耐低温纤维素酶突变体及其应用。本发明提供的突变体在选自下组中的至少一个位置上包含氨基酸的取代:120,130,179。所述突变体在40℃低温条件下的相对酶活均得到显著提高,从而有利于纤维素酶在纺织领域中的广泛应用。

1. 一种纤维素酶突变体,其特征在于,所述突变体是氨基酸序列为SEQ ID NO:1的纤维素酶包含第130位氨基酸的取代:V130F或V130L。
2. 如权利要求1所述的突变体,其特征在于,所述突变体包含的取代或取代的组合选自下述取代和取代的组合:
 - V130F;
 - V130L;
 - H120Q/V130F;
 - H120Q/V130L;
 - V130F/D179S;
 - V130F/D179S;
 - H120Q/V130F/D179S;
 - H120Q/V130L/D179S。
3. 编码权利要求1或2所述纤维素酶突变体的DNA分子。
4. 具有权利要求3所述DNA分子的载体。
5. 一种宿主细胞,包含权利要求4所述的载体。
6. 如权利要求5所述的宿主细胞,其特征在于,所述的宿主细胞为里氏木霉(*Trichoderma reesei*)。
7. 权利要求1或2所述纤维素酶突变体在纺织领域中的应用。

耐低温纤维素酶突变体

技术领域

[0001] 本发明涉及基因工程与蛋白质改造技术领域,具体涉及一种耐低温纤维素酶突变体及其应用。

背景技术

[0002] 纤维素酶是催化降解纤维素水解而生成葡萄糖和低聚合度纤维的一组酶的总称,包括葡聚糖内切酶、葡聚糖外切酶和纤维二糖酶3个主要组分。纤维素酶不是单一种酶,而是起协同作用的多组分酶系。纤维素酶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。一般用于工业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。纤维素酶是在工业中应用最广泛的酶之一,可广泛应用于纺织、去污剂、纸浆和造纸、饲料和食品等工业领域,在采油、医药等方面也有巨大的潜在市场。

[0003] 纤维素酶可以按照其一级序列分类成各种糖基水解酶家族,例如,糖基水解酶家族5、7、12和45含有内切葡聚糖酶。大多数纺织用酸性纤维素酶属于家族5,而大多数纺织用中性纤维素酶属于家族12或45。

[0004] 目前,在纺织行业,普遍利用纤维素酶对纤维素织物进行生物整理即酶降解整理,整理后的织物蓬松、丰满、柔软、清爽、布面清晰、悬垂性好、吸湿性强,并具有一定的“丝光”效果。中性纤维素酶对织物的剥蚀作用温和,织物强力损失小,沾色少,处理后可获得更加丰满的手感,而且纤维素酶的用量在0.5%~3%时,即可达到满意的整理效果,具有环保、节能和高效的优点。但是大部分工业用纤维素酶通常在高于50°C的条件下才具有较高的催化效率,而在纺织领域,为了节省加热或冷却费用,更为了提高织物色彩的牢固性以及减轻衣物的收缩,普遍采用30°C-40°C的低温条件进行处理。因此,现在急需开发在低温度水平下仍具有较高酶活水平的纤维素酶。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种低温纤维素酶突变体及其应用。本发明通过对纤维素酶进行蛋白质工程改造,获得了突变体蛋白。与野生型相比,所述突变体在低温条件下能保持更高的酶活力,从而保证除毛和水洗效果,更适合在低温条件下对纺织品进行处理。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

本发明涉及一种纤维素酶突变体,其包含与SEQ ID NO:1具有至少90%同一性的氨基酸序列,且与SEQ ID NO:1相比在120,130,179中至少一个位置上发生了氨基酸的取代。

[0007] 在本发明的一些实施例中,所述突变体的氨基酸序列与SEQ ID NO:1相比具有至少91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,或至少99%的同一性。

[0008] 在一些更具体的实施例中,所述突变体的氨基酸序列与SEQ ID NO:1相比具有至少99.1%,99.2%,99.3%,99.4%,99.5%,99.6%,99.7%,99.8%,或至少99.9%的同一性。

[0009] 在本发明的一些实施例中,所述突变体包含下组中至少一个氨基酸的取代: H120Q, V130F/L, D179S。

[0010] 在本发明的一些实施例中,所述突变体包含有下述取代或取代的组合:H120Q、V130F、V130L、D179S、H120Q/V130F、H120Q/V130L、H120Q/D179S、V130F/D179S、V130F/D179S、H120Q/V130F/D179S或H120Q/V130L/D179S。

[0011] 本发明还涉及编码上述纤维素酶突变体的DNA分子。

[0012] 本发明还涉及包含上述DNA分子的重组表达载体。

[0013] 本发明还涉及一种宿主细胞,包含上述重组表达载体。

[0014] 在本发明的一些实施例中,宿主细胞为里氏木霉(*Trichoderma reesei*)。

[0015] 将上述重组表达载体转入里氏木霉宿主细胞中进行重组表达,获得的纤维素酶突变体在低温条件下具有更高的酶活力。

[0016] 本发明还涉及上述纤维素酶突变体在纺织领域中的应用。

[0017] 本发明提供的纤维素酶突变体在低温条件下具有更高的耐受性和酶活力。与野生型相比,分别含H120Q、V130F、V130L、D179S单点突变的纤维素酶突变体在40℃条件下的相对酶活普遍提高了10.0%-56.7%。其中,V130L单点突变体在40℃条件下的相对酶活高达94%,取得了意料不到的技术效果。

[0018] 此外,本发明提供的包含H120Q,V130F/L,D179S中任意2个或3个突变位点组合的纤维素酶突变体,例如H120Q/V130F、H120Q/V130L、H120Q/D179S、V130F/D179S、V130F/D179S两点突变体,H120Q/V130F/D179S、H120Q/V130L/D179S三点突变体,在40℃条件下的相对酶活比野生型纤维素酶NT45普遍提高了10.0%-78.2%。因此,本发明所述纤维素酶突变体比野生型更适合应用于纺织工业领域,能大大减少纤维素酶的用量,节省工时和能源,降低生产成本。

具体实施方式

[0019] 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。但是本发明不限于所述的任何具体方法、实验方案和试剂。

[0020] 下面结合具体实施方式对本发明进行详细描述。

[0021] 实施例1 纤维素酶突变体的筛选

为了提高野生型纤维素酶NT45(氨基酸序列为SEQ ID NO: 1,编码核苷酸序列为SEQ ID NO:2)在低温条件下的酶活力,申请人通过定向进化技术对该酶活性位点附近的氨基酸进行了大量突变的筛选。

[0022] 设计PCR引物NtE-F1、NtE-R1如下:

NtE-F1:GGCGAATTCATGCGCTCCT CCACCATTC(下划线为限制性内切酶EcoRI识别位点);

NtE-R1:ATAGCGGCCGCTTAGGCGCACTGGTGGTAGTAGTC(下划线为限制性内切酶NotI识别位点)。

[0023] 以野生型纤维素酶NT45基因(SEQ ID NO: 2)为模板,以上述引物用GeneMorph II随机突变PCR试剂盒(Stratagene)进行PCR扩增,胶回收PCR产物,EcoRI、NotI进行酶切处理

后与经同样酶切后的pET21a载体连接,转化至大肠杆菌BL21 (DE3) 中,涂布于LB+Amp平板,37°C倒置培养,待转化子出现后,用牙签逐个挑至96孔板,每个孔中加入150 μ L含有0.1 mM IPTG的LB+Amp培养基,37°C 220rpm培养6 h左右,离心弃上清,菌体用缓冲液重悬,反复冻融破壁,获得含有纤维素酶的大肠杆菌细胞裂解液。

[0024] 分别取出50 μ L裂解液至两块新的96孔板,分别在40°C和50°C条件下测定其纤维素酶酶活,并以50°C条件下的酶活计100%,计算40°C条件下的相对酶活。结果发现,与野生型纤维素酶NT45相比,有些突变体在40°C条件下的相对酶活没有变化,有些突变体的相对酶活甚至降低了,另外还有些突变,虽然在40°C条件下的相对酶活得到提高,但突变后纤维素酶的酶学性质发生了显著的变化,均不符合要求。最终,申请人获得了既能显著提高纤维素酶在40°C条件下的相对酶活,又不会影响原有酶学性质的突变位点:H120Q,V130F,V130L,D179S。

[0025] 在纤维素酶NT45的基础上,本发明提供了分别含H120Q、V130F、V130L、D179S单点突变的纤维素酶突变体,还提供了包含H120Q、V130F/L、D179S中任意2个或3个突变位点组合的纤维素酶突变体,例如H120Q/V130F、H120Q/V130L、H120Q/D179S、V130F/D179S、V130F/D179S两点突变体,H120Q/V130F/D179S、H120Q/V130L/D179S三点突变体,

实施例2 纤维素酶突变体在里氏木霉中的表达

2.1基因合成与质粒构建

申请人依照里氏木霉的密码子偏爱性分别对野生型纤维素酶的编码核苷酸序列 SEQ ID NO:2和实施例1记载的突变体的编码核苷酸序列进行优化合成,并且在合成序列的5'和3'两端分别加上KpnI和XbaI两个酶切位点。上述基因合成工作由上海生工生物工程股份有限公司完成。

[0026] 合成后的质粒分别用限制性内切酶KpnI (Fermentas)和XbaI进行酶切;同时用限制性内切酶KpnI (Fermentas)和XbaI对质粒pTGII进行酶切;使用凝胶纯化试剂盒将酶切产物纯化,并用T4 DNA连接酶(Fermentas)将上述两个酶切产物连接;将连接产物转化进Trans5 α 大肠杆菌(Transgen),用氨苄青霉素进行选择,为确保准确,对若干克隆进行测序(Invitrogen)。测序结果显示,多个克隆测序结果均一致。

[0027] 使用质粒中量制备试剂盒(Axygen)从测序结果正确的大肠杆菌克隆中纯化质粒。

[0028] 2.2原生质体制备

取纤维素酶基因缺陷型的宿主菌里氏木霉U4孢子悬液,接种于PDA平板上,30°C培养

6天;待其产孢丰富后,切取约1cm \times 1cm的菌落置于含120mL YEG+U(0.5%酵母粉、1%葡萄糖、0.1%尿苷)的液体培养基中,30°C,220rpm振荡培养14~16h;用无菌纱布过滤收集菌丝体,并用无菌水清洗一次;将菌丝体置于含有20mL 10mg/mL裂解酶液(Sigma L1412)的三角瓶中,30°C,90rpm作用1-2 h;用显微镜观察检测原生质体转化进展。

[0029] 将预冷的20mL 1.2M山梨醇(1.2M山梨醇,50mM Tris-Cl,50mM CaCl₂)加入上述三角瓶中,轻轻摇匀,用无菌Miracloth滤布过滤收集滤液,3000rpm,4°C离心10min;弃上清,加入预冷的5mL 1.2M山梨醇溶液悬浮菌体,3000 rpm,4°C离心10min;弃上清,加入适量预冷的1.2M山梨醇悬浮分装(200 μ L/管,原生质体浓度为10⁸个/mL)。

[0030] 2.3表达载体转化与菌株验证

以下操作均在冰上进行,取10 μ g重组质粒加入到含有200 μ L原生质体溶液的无菌7mL离心管中,然后加入50 μ L 25%PEG (25%PEG,50mM Tris-Cl,50mM CaCl₂),轻弹管底混匀,冰上放置20min;加入2mL 25%PEG,混匀后室温放置5min;加入4mL 1.2M山梨醇,轻轻混匀后倒入融化并保持在55 $^{\circ}$ C的上层培养基中(0.1%MgSO₄,1%KH₂PO₄,0.6%(NH₄)₂SO₄,1%葡萄糖,18.3%山梨醇,0.35%琼脂糖);轻轻混匀后铺在制备好的下层培养基平板上(2%葡萄糖,0.5%(NH₄)₂SO₄,1.5%KH₂PO₄,0.06%MgSO₄,0.06%CaCl₂,1.5%琼脂),30 $^{\circ}$ C培养5~7d至有转化子长出。挑取转化子至下层培养基平板,30 $^{\circ}$ C培养2d;取适量菌丝体置于2mL离心管中,加入100mg无菌石英砂和400 μ L抽提缓冲液(100mM Tris-HCl,100mM EDTA,250mM NaCl,1%SDS);用珠打仪剧烈振荡2min;65 $^{\circ}$ C水浴20min后,加入200 μ L 10M NH₄AC,冰浴10min;13000rpm离心10min;取上清,加入2倍体积的无水乙醇,-20 $^{\circ}$ C放置30min;13000rpm离心10min,弃上清;用70%乙醇洗涤2次;晾干,加水溶解,于-20 $^{\circ}$ C保存。

[0031] 以上述提取的转化子基因组 DNA 为模板,利用引物M6-F和M6-R进行PCR扩增验证。

[0032] M6-F:ATGCGCTCCT CCACCATTC;
M6-R:TTAGGCGCACTGGTGGTAGTAGTC。

[0033] PCR扩增条件为94 $^{\circ}$ C 4min;94 $^{\circ}$ C 40s;58 $^{\circ}$ C 40s,72 $^{\circ}$ C 1min,30个循环;72 $^{\circ}$ C 7min,16 $^{\circ}$ C;利用凝胶回收试剂盒回收 PCR 扩增产物并进行测序分析,构建得到了含纤维素酶基因的里氏木霉工程菌。

[0034] 2.4 发酵验证

将上述里氏木霉工程菌分别接种于PDA平板,30 $^{\circ}$ C培养6d,待孢子丰富后,取两块直径1cm的菌丝块接种于含有50 mL发酵培养基的250 mL三角瓶中(1.5%葡萄糖,1.7%乳糖,2.5%玉米浆,0.44%(NH₄)₂SO₄,0.09% MgSO₄,2% KH₂PO₄,0.04% CaCl₂,0.018% 吐温-80,0.018% 微量元素),30 $^{\circ}$ C培养48小时,然后25 $^{\circ}$ C培养48小时,取发酵液进行酶活测定和酶学性质检测。

[0035] 实施例3 酶活测定和酶学性质分析

3.1纤维素酶酶活测定方法

在50 $^{\circ}$ C、pH值为6.0的条件下,每分钟从浓度为5 mg/ml的羟甲基纤维素钠溶液中降解释放1 μ mol还原糖所需要的酶量为一个酶活力单位U,还原糖以葡萄糖等量。

[0036] 取三支试管各加入0.5 mL CMC底物,与待测酶液一起50 $^{\circ}$ C水浴预热5 min。在第一、二试管中各加入0.5 mL待测液,并计时,50 $^{\circ}$ C水浴中反应15 min。反应完后在三支试管中各加入1.5 mL DNS试剂,并在第三支试管总补加0.5 mL的待测酶液。取出并摇匀三支试管后,在沸水浴中反应5 min。迅速冷却至室温,用水定到5.0 mL。以第三支试管试液为对照在540 nm波长条件下测第一、二试管试液的吸光度,吸光度在0.25-0.35之间为宜。待测酶液反应液的吸光度与水平控制酶液反应液吸光度之差的绝对值不超过0.015。

[0037] 酶活X=(葡萄糖等量值/180/15/0.5) \times n

其中:X——酶活力单位,IU/g (mL);

180——葡萄糖从微克换算成微摩尔;

15——待测液与底物的反应时间;

0.5——加入反应的待测酶液量;

n——稀释倍数。

[0038] 3.2酶活测定

按照上述方法进行酶活检测,结果显示:本发明实施例2构建得到的重组表达野生型纤维素酶NT45及其突变体的里氏木霉发酵上清液的酶活为50-200 U/mL。

[0039] 3.3 耐低温效果分析

分别在40℃、50℃,pH6.0条件下测定上述重组表达野生型纤维素酶NT45及其突变体的里氏木霉发酵上清液的酶活,并以50℃条件下的酶活计100%,分别计算野生型纤维素酶NT45及其突变体各自在40℃条件下的相对酶活,结果见表1。

[0040] 相对酶活= 40℃条件下的酶活/50℃条件下的酶活×100%。

[0041] 表1 纤维素酶在40℃条件下的相对酶活

纤维素酶	在40℃条件下的相对酶活
野生型NT45	60%
H120Q单点突变体	66%
V130F单点突变体	88%
V130L单点突变体	94%
D179S单点突变体	67%

从表1的数据可以看出,与野生型纤维素酶NT45相比,本发明提供的单点突变体在40℃条件下的相对酶活普遍提高了10.0%-56.7%,从而说明本发明提供的单点突变体在40℃低温条件下的酶活水平得到显著提高。其中,V130L单点突变体在40℃条件下的相对酶活高达94%,取得了意料不到的技术效果。

[0042] 此外,本发明提供的包含H120Q,V130F/L,D179S中任意2个或3个突变位点组合的纤维素酶突变体,例如H120Q/V130F、H120Q/V130L、H120Q/D179S、V130F/D179S、V130F/D179S两点突变体,H120Q/V130F/D179S、H120Q/V130L/D179S三点突变体,在40℃条件下的相对酶活比野生型纤维素酶NT45普遍提高了10.0%-78.2%,取得了意料不到的技术效果。

[0043] 综上所述,与本发明提供的纤维素酶突变体在低温条件下具有更高的酶活,更适合其在纺织工业中的应用,前景广阔。

[0044] 实施例4 纤维素酶突变体在纺织领域中的应用

4.1针织面料、梭织面料的除毛染色—浴工艺

应用温度为 35-55℃;

处理时间为 30-150 min;

pH 范围为 4.0-8.5;

上述工艺条件特别适用于染色同浴的情况;适用的浴比范围为1:5-1:30,使用的设备类型为溢流染色机,卷染机,水洗机等,纤维素酶突变体的用量为300-900U/L。

[0045] 本发明提供的纤维素酶突变体除毛干净,对织物强力损失小,可实现染色和除毛工艺一体同浴。

[0046] 4.2 牛仔面料的起花及除毛应用

应用温度为 35-55℃ ;

处理时间为 10-60 min ;

pH 范围为 4.0-8.5 ;

上述工艺条件可应用于退浆及单独石磨洗条件下的除毛、起花工艺；适用的浴比范围为1:5-1:30,使用的设备类型为工业水洗机等,纤维素酶突变体的用量为300-900U/L。

[0047] 本发明提供的纤维素酶突变体除毛干净,起花均匀,花点较小,对织物强力损失小。

[0048] 上述实验结果表明,本发明的低温纤维素酶突变体可广泛应用于纺织加工领域,在35-55℃低温条件下,及pH4.0-8.5 范围内应用,无需调酸可直接使用,且效果良好;除毛干净,对织物强力损失小;牛仔水洗,起花小,花点较小,批差稳定;耐盐性好,直接使用可用于中和除氧后的抛光、染色一浴工艺,能大大节省工时,减少生产成本。

[0049] 而且,与野生型纤维素酶NT45相比,达到相同处理效果所需纤维素酶突变体的用量减少了18.5-43.4%,从而显著降低了加工过程中的用酶成本,有利于进一步提高降低生产成本。