



## 葡萄穗霉中 $\beta$ -甘露聚糖酶基因在黑曲霉中的表达及酶学性质

杨家兴<sup>1,2</sup>, 王华明<sup>2\*</sup>, 路福平<sup>1</sup>

<sup>1</sup> 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457

<sup>2</sup> 中国科学院天津工业生物技术研究所, 天津 300308

**摘要:** 【目的】以黑曲霉(*Aspergillus niger*)为宿主菌来表达葡萄穗霉(*Stachybotrys chartarum*)中的 $\beta$ -甘露聚糖酶( $\beta$ -mannanase)基因。【方法】通过对葡萄穗霉全基因组进行比对分析, 获得编码 $\beta$ -甘露聚糖酶基因s16942和s331的序列信息, 通过设计引物, PCR扩增得到基因s16942和s331, 连接到载体pGm上, 并转化到黑曲霉中, 获得的转化子经过amdS二筛平板复筛, 测序验证, 得到高效表达此基因的工程菌株G1-pGm-s16942和G1-pGm-s331。【结果】SDS-PAGE检测结果显示, G1-pGm-s16942和G1-pGm-s331表达的蛋白分子量大小分别约为48 kDa和60 kDa, 且阴性对照中没有此条带。粗酶液的酶学性质表明, G1-pGm-s16942表达的 $\beta$ -甘露聚糖酶的最适反应温度为60 °C, 最适反应pH为7, 粗酶液的酶活最高达521 U/mL; G1-pGm-s331表达的 $\beta$ -甘露聚糖酶的最适反应温度为50 °C, 最适反应pH为7, 粗酶液的酶活最高达84 U/mL。【结论】本研究首次将葡萄穗霉的 $\beta$ -甘露聚糖酶基因转化到黑曲霉中并成功表达, 并且具有较高的活性。

**关键词:**  $\beta$ -甘露聚糖酶, 葡萄穗霉, 黑曲霉, 遗传转化, 重组蛋白表达

$\beta$ -甘露聚糖酶( $\beta$ -mannanase EC 3.2.1.78)是一类能够水解含有甘露糖苷键的甘露聚糖(包括葡甘露聚糖和半乳甘露聚糖等异甘露聚糖)的半纤维素内切水解酶, 以内切方式降解 $\beta$ -D-1,4-吡喃甘露糖苷键, 降解产物的非还原末端为甘露糖<sup>[1]</sup>, 其主要水解产物为单糖、二糖、三糖、四糖等低聚糖<sup>[2]</sup>。甘露聚糖酶水解甘露聚糖, 获得的甘露寡糖具有很好的生物调节功能<sup>[3]</sup>, 如: 改善动物肠

道微生物生态<sup>[4]</sup>、促进营养物质吸收、提高饲料利用率以及提高动物生产性能等<sup>[5-6]</sup>。目前已在动物生产、饲料、食品、医药、石油开采以及生物技术等多方面得到广泛应用<sup>[7-8]</sup>。因此人们对 $\beta$ -甘露聚糖酶的深入研究越来越重视。

$\beta$ -甘露聚糖酶的来源非常广泛, 包括植物、细菌、真菌、放线菌甚至软体动物<sup>[9-10]</sup>。其中 $\beta$ -甘露聚糖酶的微生物源种类最为丰富, 不仅具有活

基金项目: 天津市科技计划项目(14ZCZDSY00065)

\*通信作者。E-mail: wang\_hm@tib.cas.cn

收稿日期: 2015-10-21; 修回日期: 2015-12-09; 网络出版日期: 2015-12-16

性高、成本低和提取方便等优点, 还有耐受pH值、温度范围广和底物专一性等特点, 已在工业生产和理论研究中得到了广泛应用。国内外对于甘露聚糖酶及其生产菌的研究开始于20世纪70年代末, 初步统计已发现100余种产酶微生物, 包括细菌、真菌和放线菌等。其中研究较多的是细菌中的弧菌(*Vibrio*)<sup>[11]</sup>、假单胞菌(*Pseudomonas*)和芽孢杆菌(*Bacillus*)<sup>[12]</sup>, 真菌中的酵母菌(*Saccharomyces*)、青霉菌(*Penicillium*)、曲霉菌(*Aspergillus*)<sup>[13]</sup>和木霉菌(*Trichoderma*)<sup>[14]</sup>, 以及放线菌中的链霉菌(*Streptomyces*)<sup>[15]</sup>等。目前还没有关于葡萄穗霉(*Stachybotrys chartarum*)来源 $\beta$ -甘露聚糖酶的研究报道。

葡萄穗霉是1种丝状真菌, 广泛存在于环境中, 其生长条件中对湿度的要求较高, 属于腐生菌, 常见于植物残留和土壤中, 具有嗜纤维性。但目前对于其自身产酶及其产酶基因克隆的研究比较少。杜宗军等<sup>[16]</sup>测定筛选到的1株葡萄穗霉中的纤维素酶活力为2.12 U/mL; Saibi等<sup>[17]</sup>测定了葡萄穗霉中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶活力为78 U/mg; 王红霞等<sup>[18]</sup>把葡萄穗霉中的木聚糖酶基因转化到黑曲霉中并得到表达, 摇瓶发酵上清液最高酶活力达69.43 U/mL(中国专利: 201210156461.9); 于海玲等<sup>[19]</sup>把葡萄穗霉中的 $\beta$ -葡萄糖苷酶基因转化到黑曲霉(*Aspergillus niger*)中并得到表达, 摇瓶发酵粗酶液的酶活力最高达5313.82 U/mL(中国专利: 201210281712.6)。于海玲等<sup>[20]</sup>把葡萄穗霉中的 $\beta$ -木糖苷酶基因转化到黑曲霉中并得到表达, 摇瓶发酵粗酶液的最高酶活力达24.78 U/mL(中国专利: 201210281598.7)。

根据葡萄穗霉在生长过程中具有嗜纤维性的特点, 并且对其在生长过程中自身产酶及其基因异源表达产酶的研究发现, 这些酶大都属于纤维素酶或半纤维素酶, 且性质较好, 所以推测, 其基因组库即为一个优良的糖苷水解酶基因库, 从中肯定可以筛选到性质较好的此类基因。鉴于纤维素酶及半纤维素酶的应用越来越广泛, 对其基

因组的开发研究就非常有意义。到目前为止, 还没有葡萄穗霉中 $\beta$ -甘露聚糖酶基因在黑曲霉(*Aspergillus niger*)宿主中表达的研究报道。本研究通过对葡萄穗霉进行全基因组比对分析, 将获得的 $\beta$ -甘露聚糖酶基因导入到黑曲霉中并得到高效表达, 再以酶活力高低和酶学性质为指标筛选重组工程菌株, 旨在获得1种酶活力高, pH和温度耐受性好, 生产成本低, 有重要应用价值的新型 $\beta$ -甘露聚糖酶。此研究可以为黑曲霉表达系统及 $\beta$ -甘露聚糖酶基因的研究提供参考素材, 也为进一步研究和开发新型 $\beta$ -甘露聚糖酶, 及解析其结构与功能的关系奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** 葡萄穗霉购自中国微生物菌种保管委员会普通微生物中心, CGMCC 3.5365; 大肠杆菌(DH5 $\alpha$ )购自天根生化科技(北京)有限公司; 黑曲霉G1和穿梭载体pGm为本实验室保藏。

穿梭载体pGm图谱如图1所示。总长度为8982 bp, 其上包含有来源于黑曲霉的糖化酶强启动子PglA, 及来源于塔宾曲霉(*Aspergillus tubingensis*)的终止子TglA, 此外还包含有氨苄青霉素和乙酰胺2种选择性标记位点, 以及常用的4个酶切位点Xho I、Afl II、Pac I和Xba I。

**1.1.2 酶和试剂:** 限制性内切酶、T4 DNA连接酶及DNA聚合酶等购自Thermo Fisher Scientific; 胶回收试剂盒和质粒小提试剂盒购自Fermentas; SDS-PAGE预制凝胶购自Invitrogen; 基因组提取试剂盒Fungal DNA Kit购自OMEGA bio-tek; 裂解酶、甘露糖和甘露聚糖(G-0753)购自Sigma公司; 其他试剂为国产分析纯。PCR引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司合成; 序列测序由英潍捷基(上海)贸易有限公司测定; 蛋白质谱鉴定由中国科学院天津工业生物技术研究所技术支撑中心完成。

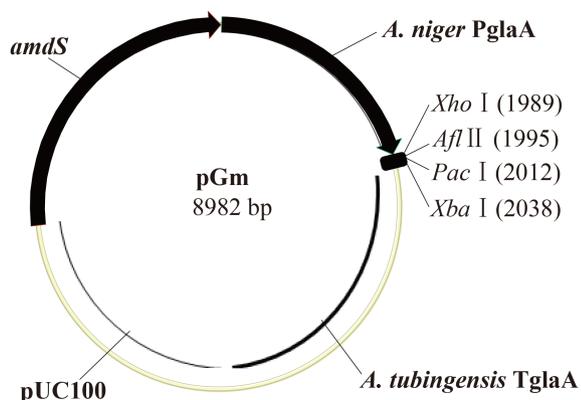


图 1. 穿梭载体pGm图谱

Figure 1. Atlas of shuttle vector pGm. *A. niger* PglaA is a diastase strong promoter from *Aspergillus niger*; *Xho* I, *Afl* II, *Pac* I and *Xba* I represent four frequently-used cleavage sites, the numbers in the parentheses represent their sites in the vector pGm; *A. tubingensis* TglaA is a terminator from *Aspergillus tubingensis*; *Amd* is an acetamide selective marker gene; PUC100 is an original vector for reconstructing pGm, and ampicillin selective marker gene is a part of fragment pUC100.

**1.1.3 培养基和溶液:** 培养基: LB、CMA、amdS 乙酰胺选择培养基<sup>[21]</sup>及TSB发酵产酶培养基等; 溶液: Solution A、Solution B和Solution C (转化用) 及乙酸-乙酸钠缓冲液(稀释粗酶液用)等。

## 1.2 β-甘露聚糖酶基因的筛选及分析

通过对葡萄穗霉全基因组(该基因组已由编号为11ZCZDSY08300的天津市工业微生物基因组解析项目完成测序)进行研究分析, 挑选出了可能编码β-甘露聚糖酶的基因s16942和s331, 对这2个基因所编码蛋白的理论分子量大小, 有无信号肽, 糖基化情况, 同源性及其系统进化树进行分析预测。

## 1.3 葡萄穗霉基因组DNA的提取

在CMA液体培养基中接种葡萄穗霉, 30 °C、200 r/min条件培养48 h, 用9层无菌纱布过滤得菌丝体, 将菌丝体在液氮中研磨成粉末, 提取基因组DNA。详细的基因组DNA提取方法参考Fungal DNA Kit说明书。

## 1.4 s16942和s331基因序列的克隆

根据从葡萄穗霉基因组DNA中得到的β-甘露聚糖酶基因的序列信息设计引物。s16942引物信息: 上游引物F: 5'-ACATCTTAAGAAGATGTTCGCCGACGCGCTGTCTGT-3', 下游引物R: 5'-TGCTCTAGACTAATCGCTCTCGTTCAGAGCGTTG-3'; s331引物信息: 上游引物F: 5'-ATATCTTAAGAAGATGCGTCACGCCCTCGCCGCCTCTCT-3', 下游引物R: 5'-TGCTCTAGATTACAGGCACTGGTAGTACCAGTCATTC-3'。其中上游引物加*Afl* II 酶切位点, 下游引物加*Xba* I 酶切位点, 如下划线所示。PCR反应体系为50 μL, 包括phusion DNA聚合酶0.5 μL, 基因组DNA模板1.0 μL, 上下游引物各2.5 μL, dNTPs 5.0 μL, phusion buffer 10 μL, 超纯水28.5 μL。s16942的PCR反应条件为: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 72 °C 35 s, 进行30个循环; 72 °C 10min; 4 °C。S331的PCR反应条件为: 98 °C 30 s; 98 °C 10 s, 72 °C 38 s, 进行30个循环; 72 °C 10 min; 4 °C保温。1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物。

## 1.5 黑曲霉重组表达载体的构建

将s16942和s331基因的PCR产物和pGm质粒分别用*Afl* II 和*Xba* I 双酶切, 经过琼脂糖凝胶电泳分离及胶回收试剂盒回收, 再用T4 DNA连接酶将酶切后的s16942和s331分别与pGm质粒在22 °C连接2 h, 得到重组质粒; 再转化大肠杆菌DH5α感受态, 并涂布到含氨苄青霉素的LB平板培养12–16 h, 分别挑取转化子做菌落PCR验证及测序验证; 选取测序正确的菌株提取质粒, 即为构建好的含有β-甘露聚糖酶基因(s16942和s331)的重组质粒pGm-s16942和pGm-s331。

## 1.6 黑曲霉G1原生质体转化

将黑曲霉G1的孢子接种到CMA液体培养基中, 在30 °C、200 r/min 条件下培养12–16 h; 用

8层无菌纱布过滤收集菌丝,并用Solution A冲洗,将冲洗后的菌丝放入加有0.6 g裂解酶和40 mL Solution B的无菌三角瓶中,在30 °C、200 r/min条件下裂解1.5 h;裂解液用无菌神奇滤布过滤,收集滤液,平均分装到50 mL无菌离心管中,加入相同体积的Solution B,混匀,4000 r/min离心5 min,弃上清,加20 mL Solution B,混匀,4000 r/min离心5 min,弃上清,再加20 mL Solution B,混匀,4000 r/min离心5 min,弃上清;加Solution B至100  $\mu$ L,混匀,加入提取的重组质粒10  $\mu$ L,再加入Solution C 12.5  $\mu$ L,混匀,冰上静置20 min;加1 mL Solution C和2 mL Solution B,混匀后分别加入到3支8 mL amdS上层培养基中,再倒入3个amdS下层培养基平板中,置于30 °C恒温箱培养7-10 d,观察有无转化子长出<sup>[22]</sup>。

### 1.7 重组黑曲霉工程菌株的平板复筛、表达及单孢分离

将长出的转化子用无菌竹签转接到amdS复筛培养基平板上,30 °C培养3-5 d,在复筛培养基平板上可以正常生长的即为阳性转化子菌株,将这些阳性转化子菌株转接到TSB发酵产酶培养基,30 °C、200 r/min条件培养5 d,取发酵液上清进行SDS-PAGE电泳分析,检查目的蛋白表达情况,如有目的蛋白表达,则从中筛选出表达量最大的菌株,再对其进行单孢分离,在选取的单孢菌株中筛选表达量最大的菌株。

### 1.8 克隆目的基因测序验证

将筛选出的表达量最大的单孢菌株转接到CMA液体培养基,30 °C培养12-16 h,过滤收集菌丝,提取基因组DNA(方法参照 Fungal DNA Kit 试剂盒说明书),以其为模板克隆出目的基因,进行测序验证。

### 1.9 重组表达产物的SDS-PAGE分析

SDS-PAGE凝胶使用Invitrogen公司预制胶,浓度10%。发酵液上清加4 $\times$ 上样缓冲液,沸水煮5 min后上样10  $\mu$ L,进行电泳。

### 1.10 重组酶的 $\beta$ -甘露聚糖酶活力测定

以甘露聚糖为底物测定 $\beta$ -甘露聚糖酶活性,以每分钟从浓度为3 mg/mL的甘露聚糖溶液中降解释放1  $\mu$ mol还原糖所需要的酶量为1个酶活力单位U。反应体系为:在2.0 mL经过适当稀释的酶液中加入2.0 mL甘露聚糖溶液,电磁振荡3 s,37 °C精确保温30 min。加入5.0 mL DNS试剂,电磁振荡3 s。沸水浴加热5 min,迅速冷却至室温,加水定容至25 mL,电磁振荡3 s,用分光光度计在540 nm处测定吸光度<sup>[23]</sup>。

### 1.11 重组酶的最适pH及pH稳定性测定

在37 °C,不同pH条件下测定重组 $\beta$ -甘露聚糖酶的酶活,得出其最适pH;在常温条件下把粗酶液在不同pH值(4、5、6、7、8)的缓冲液中保存一定时间(1、2、3、5、8、15、30、50和400 h),测剩余酶活。

### 1.12 重组酶的最适温度及温度稳定性测定

在最适pH,不同温度条件下,测定重组 $\beta$ -甘露聚糖酶的酶活,得出其最适温度;在最适pH条件下把粗酶液在不同温度(40、50、60、70 °C)下保温一定时间(20、40、60、80、100、120、140、160、180 min),测剩余酶活。

## 2 结果和分析

### 2.1 $\beta$ -甘露聚糖酶基因的筛选及分析

通过对葡萄穗霉全基因组进行研究分析,筛选出了编码具有 $\beta$ -甘露聚糖酶活性蛋白的基因s16942和s331。s16942基因长度为1349 bp,cDNA长度为1221 bp,编码1种含406个氨基酸的蛋白质P16942,用DNASar软件分析预测该蛋白质的理论分子量大小为45.25 kDa;s331基因长度为1508 bp,cDNA长度为1296 bp,编码1种含431个氨基酸的蛋白质P331,用DNASar软件分析预测该蛋白质的理论分子量大小为47.05 kDa。

## 2.2 β-甘露聚糖酶基因所编码蛋白的分析

### 2.2.1 β-甘露聚糖酶基因所编码蛋白的信号肽预测

用SignalP 4.1 Server分析预测发现P16942和P331这2种蛋白都含有信号肽序列。P16942的前21个氨基酸为信号肽，信号肽切割位点在第21和22个氨基酸之间；P331的前19个氨基酸为信号肽，信号肽切割位点在第19和20个氨基酸之间。所以推测这2种蛋白都能分泌到胞外，即都为胞外蛋白。

### 2.2.2 β-甘露聚糖酶基因所编码蛋白的糖基化位点预测

Server分析预测发现P16942有1个潜在的N-糖基化位点和1个潜在的O-糖基化位点，P331有1个潜在的N-糖基化位点和18个潜在的O-糖基化位点。所以推测P331的糖基化修饰相对于P16942可能会比较多或者比较复杂。

### 2.2.3 β-甘露聚糖酶基因所编码蛋白与木霉来源β-甘露聚糖酶的同源性比对

把P16942和P331的氨基酸序列与1种目前已经商业化的来源于木霉的β-甘露聚糖酶氨基酸序列进行同源性比对(图2)。分析发现这3种氨基酸序列的相似度不高，序列覆盖率达70.7%，但相同氨基酸的比例仅为19.3%，

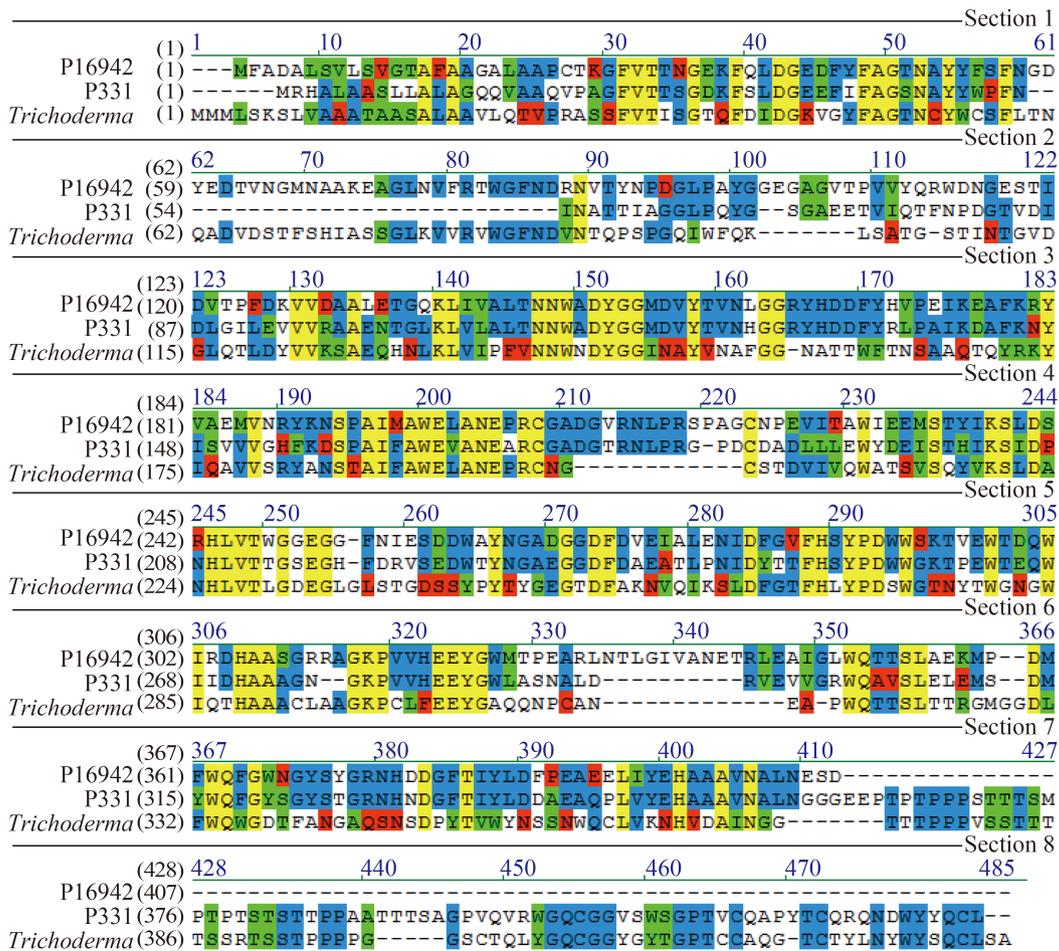


图 2. P16942、P331和木霉来源的β-甘露聚糖酶氨基酸序列同源性比对分析

Figure 2. Sequence homology comparative analysis of P16942,P331 and β-mannanase from *Trichoderma*. No background: non-similar residues; blue background: conservative residues; green background: block of similar residues; yellow background: identical residues; red background: weakly similar residues.

因此可以判断, 本研究筛选到的是2个新的β-甘露聚糖酶基因。从比对结果可以看出, P16942和P331的相似度较高, 相同及相似的氨基酸更多, 其中相同氨基酸的比例达44.4%。

**2.2.4 β-甘露聚糖酶基因所编码蛋白的系统进化树及分析:** 把P16942和P331的氨基酸序列及NCBI

中BLAST得到的其它来源甘露聚糖酶序列共同构建一个系统进化树图谱(图3)。从进化树图谱可以看出, 这些蛋白在进化方面主要分为2个较大的分支, 而P16942和P331虽然属于同一个大的分支, 但在这个分支中, 它们却分别属于不同的二级分支, 说明P16942和P331在进化方面的差异是比较

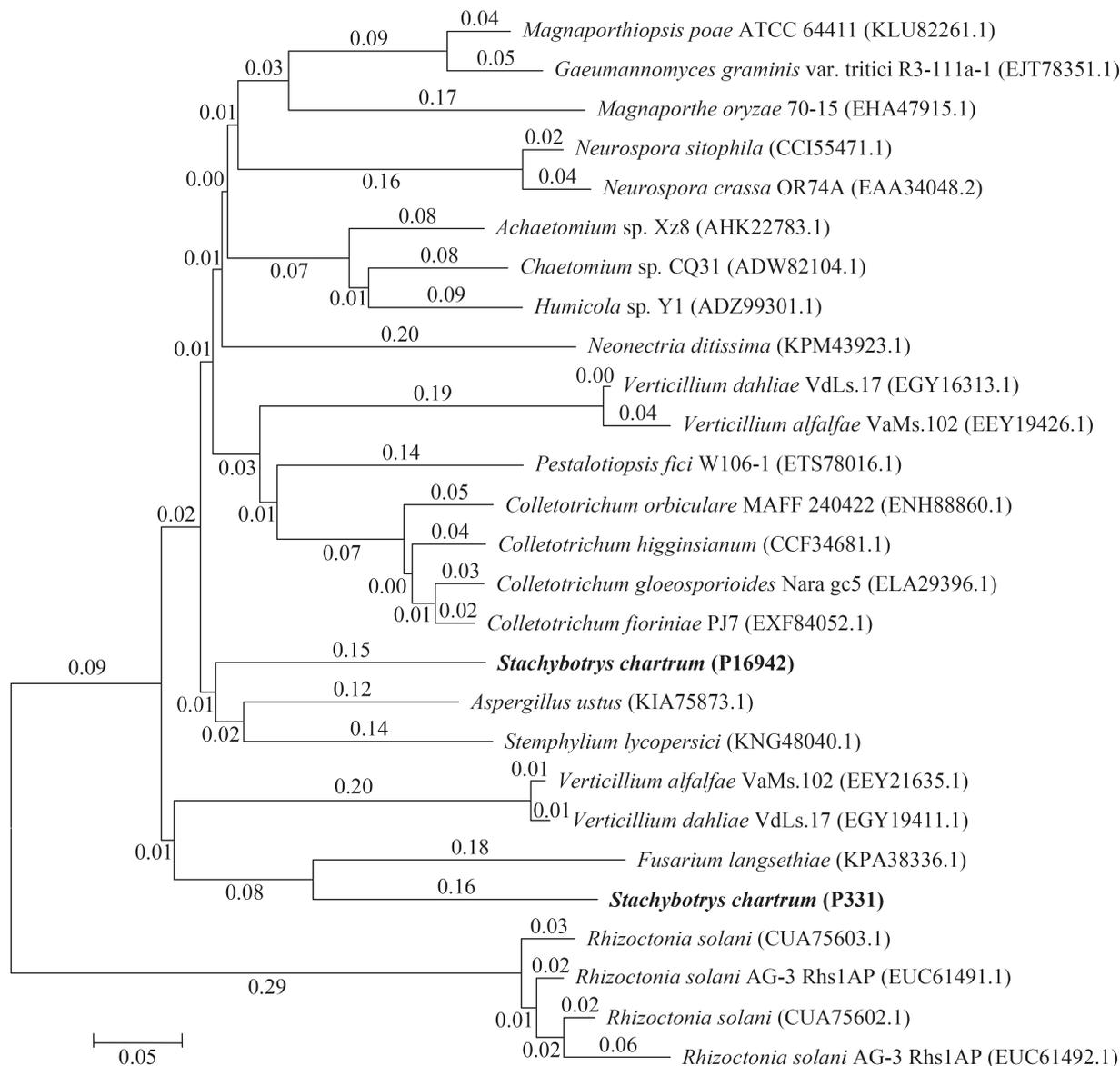


图 3. P16942和P331的系统进化树

Figure 3. Phylogenetic tree of P16942 and P331. The phylogenetic tree was constructed by using ClustalW and MEGA 6.0 with the amino acid sequences of β-mannanases from various strains, with their sequence IDs in the parentheses, which were screened by online BLASTp on NCBI with amino acid sequences from P16942 and P331; the numbers on the horizontal lines represent evolutionary distances of these mannanases.

明显的。P16942与*Aspergillus ustus* (KIA75873.1)和*Stemphylium lycopersici* (KNG48040.1)来源的 $\beta$ -甘露聚糖酶比较相近；P331与*Fusarium langsethiae* (KPA38336.1)来源的甘露聚糖酶比较相近。

### 2.3 s16942和s331基因的克隆及黑曲霉表达载体的构建

经PCR扩增得到了大小正确的s16942 (1349 bp)和s331 (1508 bp)基因(图4)。

对构建好的载体转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态获得的转化子分别进行菌落PCR验证和测序验证,结果表明插入到载体pGm中的分别为正确的s16942和s331基因,且有正确的阅读框。

### 2.4 重组黑曲霉菌株的筛选和验证

将在amdS筛选培养基上长出的转化子分别转接到二筛培养基上,结果都能正常生长,说明都是阳性转化子,再将这些转化子分别接种于TSB发酵产酶培养基中进行发酵验证,在菌体生长第5天取发酵液上清进行SDS-PAGE电泳分析,检查是否有目的蛋白表达。在有目的蛋白表达的菌株中筛选出表达量最大的菌株,对其进行单孢

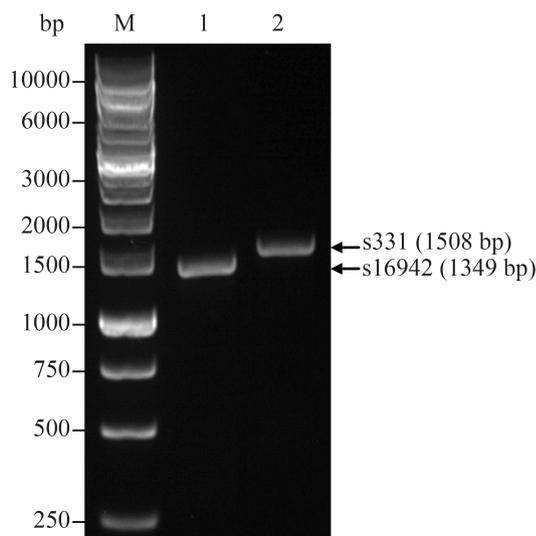


图4. PCR扩增产物的电泳分析

Figure 4. Electrophoretic analysis of PCR products. M: DNA marker; lane 1: PCR products of s16942; lane 2: PCR products of s331.

分离,从选取的单孢菌株中筛选表达量最大的再进行测序验证,验证结果正确,此即为黑曲霉重组工程菌株G1-pGm-s16942和G1-pGm-s331。

### 2.5 重组表达产物的分析

**2.5.1 重组表达产物的SDS-PAGE电泳分析:**将黑曲霉重组表达菌株G1-pGm-s16942和G1-pGm-s331分别接种于TSB发酵产酶培养基中,每24 h取1 mL发酵液进行SDS-PAGE电泳分析(图5, 6)及酶活测定(图7),发酵时间为6 d。经过SDS-PAGE电泳对比发现,重组表达菌株G1-pGm-s16942和G1-pGm-s331都有目的蛋白表达,且作为对照的原始宿主菌G1都无此条带, $\alpha$ -淀粉酶( $\alpha$ -amylase)为宿主菌黑曲霉自有条带。结果显示G1-pGm-s16942在6 d的发酵中产酶量及酶活力都是一直增大,在第6天时的蛋白表达量已经达到了大约2.3 g/L,推测其还有增大的趋势;G1-pGm-s331在第4天时产酶量就达到最大,蛋白表达量约为0.3 g/L,第5-6天有少许的下降,酶活力在第4-5天时都达到最大,第6天时有些下降。

**2.5.2 重组表达产物的糖基化情况预测分析:**SDS-PAGE电泳分析结果显示这2种目的蛋白的分子量都有偏大,并且G1-pGm-s331所表达目的蛋白的

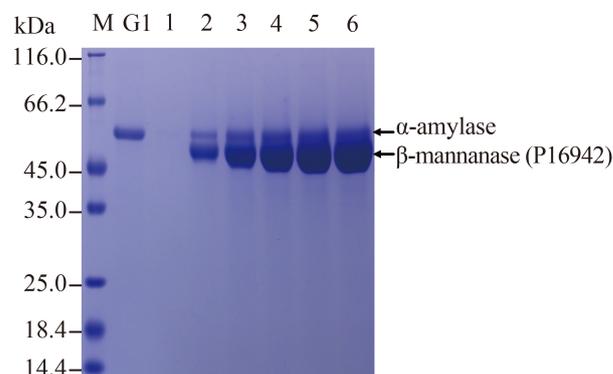


图5. 重组工程菌株G1-pGm-s16942表达产物的SDS-PAGE分析

Figure 5. SDS-PAGE analysis of expression product from recombinant strains G1-pGm-s16942. M: protein marker; G1: host strain; lane 1-6: expression situation of recombinant strains G1-pGm-s16942 in 1-6 d.

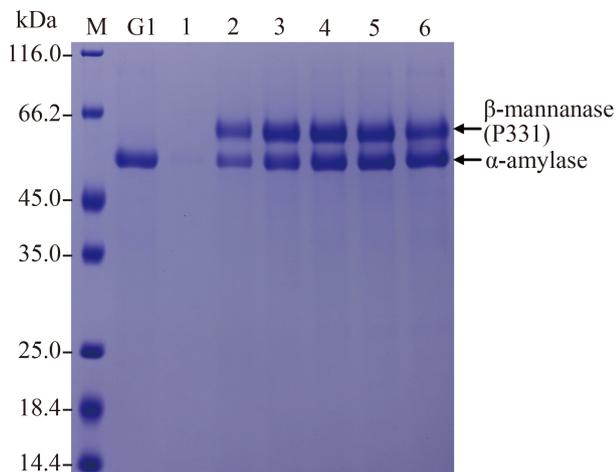


图 6. 重组工程菌株G1-pGm-s331表达产物的SDS-PAGE分析

Figure 6. SDS-PAGE analysis of expression product from recombinant strains G1-pGm-s331. M: protein marker; G1: host strain; lane 1-6: expression situation of recombinant strains G1-pGm-s331 in 1-6 d.

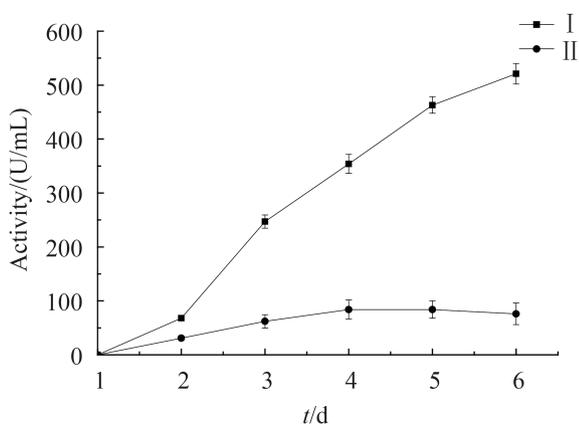


图 7. 重组β-甘露聚糖酶在1-6 d发酵中的酶活力变化曲线

Figure 7. Activity curves of recombinant β-mannanases in 1-6 d of fermentation. I: crude enzyme of recombinant strain G1-pGm-s16942; II: crude enzyme of recombinant strain G1-pGm-s331.

偏大比较明显。由于糖基化预测发现P331潜在的糖基化位点比较多, 共19个, 所以推测P331的糖基化修饰比较多或者比较复杂, 导致了其在SDS-PAGE电泳分析时分子量明显偏大, 条带位置有较大的偏差; 而P16942潜在的糖基化位点比较少, 只有2个, 所以推测P16942的糖基化修饰比较

少或者没有糖基化修饰, 使其在SDS-PAGE电泳分析时分子量偏差较小, 位置相对正确。

**2.5.3 重组表达产物的质谱鉴定:** 为了验证重组表达菌株所表达蛋白就是预测蛋白, 就进一步对目的蛋白进行了质谱鉴定。分别割取SDS-PAGE蛋白凝胶上的2个目的条带进行质谱检测, 结果发现G1-pGm-s16942检测到的肽段序列和G1-pGm-s331检测到的肽段序列分别和各自预测蛋白序列的相符度达到了83.25%和75.41%, 说明黑曲霉工程菌株G1-pGm-s16942和G1-pGm-s331所表达目的蛋白分别就是预测的蛋白P16942和P331。

## 2.6 重组表达产物的酶学特性研究

### 2.6.1 重组表达产物的最适pH及pH稳定性测定:

在不同pH条件下测定2种重组酶的β-甘露聚糖酶活, 发现这2种重组酶的最适pH都为7 (图8)。将这2种重组酶分别在不同pH缓冲液中常温条件下保存一定时间, 再分别测定剩余酶活(图9)。

从pH稳定性曲线可以看出, 这2种重组酶对于中性附近pH的耐受性都很好, 在pH 6-pH 8的缓冲液保存50 h, 酶活力都几乎没有下降, 保存

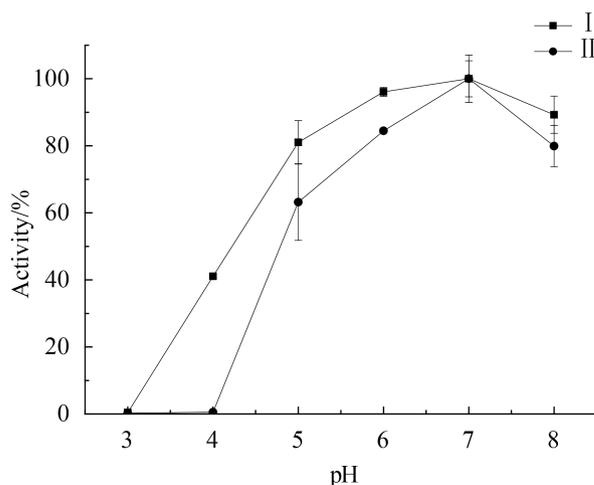


图 8. 两种重组β-甘露聚糖酶的最适pH曲线

Figure 8. Optimum pH curves of two kinds of recombinant β-mannanases. I: crude enzyme of recombinant strain G1-pGm-s16942; II: crude enzyme of recombinant strain G1-pGm-s331.

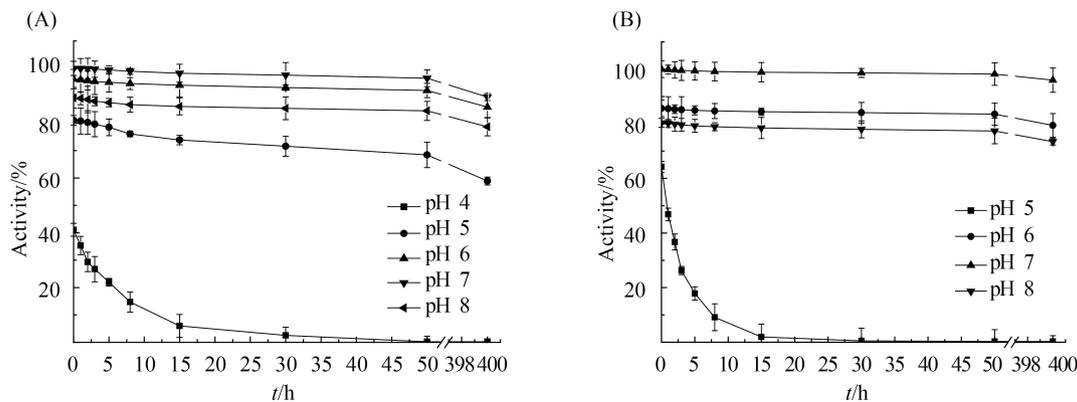


图 9. 重组酶P16942和P331 pH稳定性曲线

Figure 9. pH stability curves of recombinase P16942 and P331. A: crude enzyme of recombinase P16942; B: crude enzyme of recombinase P331.

400 h, 酶活力都只下降约10%。在偏酸性pH时, P16942比P331的耐受性相对较好: P16942在pH 4缓冲液中保存5 h, 酶活力下降50%, 保存30 h后就几乎没有酶活力了, 而因P331在pH 4无酶活力, 所以没有测定其在pH 4的稳定性; 在pH 5缓冲液中, P16942保存50 h, 酶活力下降约10%, 400 h下降约20%, 而P331在保存15 h时就几乎没有酶活力了。

### 2.6.2 重组表达产物的最适温度及温度稳定性测定:

在pH为7, 不同温度下测定2种重组酶的 $\beta$ -甘露聚糖酶活, 发现G1-pGm-s16942所产粗酶液的最适温度为60 °C, G1-pGm-s331所产粗酶液的最适温度为50 °C (图10)。将这2种重组酶分别在最适pH不同温度条件下保温一定时间, 再分别测定剩余酶活(图11)。

从温度稳定性曲线可以看出, 这2种酶对较高温(60、70 °C)的耐受性都比较差, 而对较低温度(40、50 °C)的耐受性相对较好。P16942在最适温度60 °C保温20 min剩余约40%酶活力, P331在最适温度50 °C保温20 min剩余约65%酶活力, P16942和P331在60 °C和70 °C保温80 min时酶活力几乎完全损失; P16942在40 °C的耐受性较好, 保温180 min剩约85%酶活力, P331在40 °C保温180 min剩约60%酶活力。

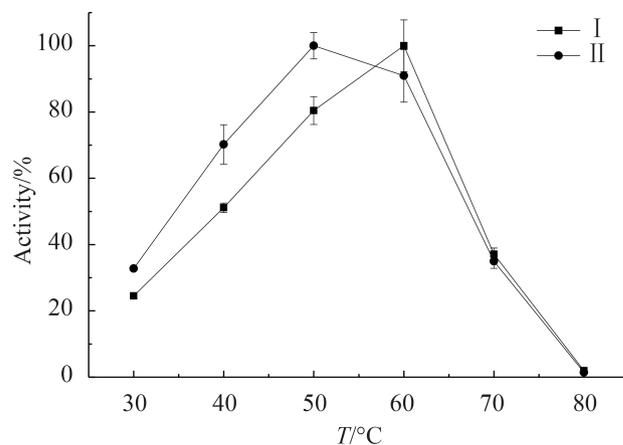


图 10. 2种重组 $\beta$ -甘露聚糖酶的最适温度曲线

Figure 10. Optimum temperature curves of two kinds of recombinase  $\beta$ -mannanases. I: crude enzyme of recombinant strain G1-pGm-s16942; II: crude enzyme of recombinant strain G1-pGm-s331.

## 3 讨论

由于近年来对半纤维素资源的开发利用和甘露寡糖益生价值的发现, 以及 $\beta$ -甘露聚糖酶在工业应用的领域越来越广泛, 极大地推动了 $\beta$ -甘露聚糖酶研究的发展, 对 $\beta$ -甘露聚糖酶的研究报道也越来越多。刘项羽等<sup>[24]</sup>将来源于*Bacillus subtilis* JNA 3-10的 $\beta$ -甘露聚糖酶基因在*Bacillus subtilis* 168菌株中进行了表达, 得到的重组菌株 BPM1002中 $\beta$ -甘露聚糖酶活力达235.94 U/mL, 用5 L发酵

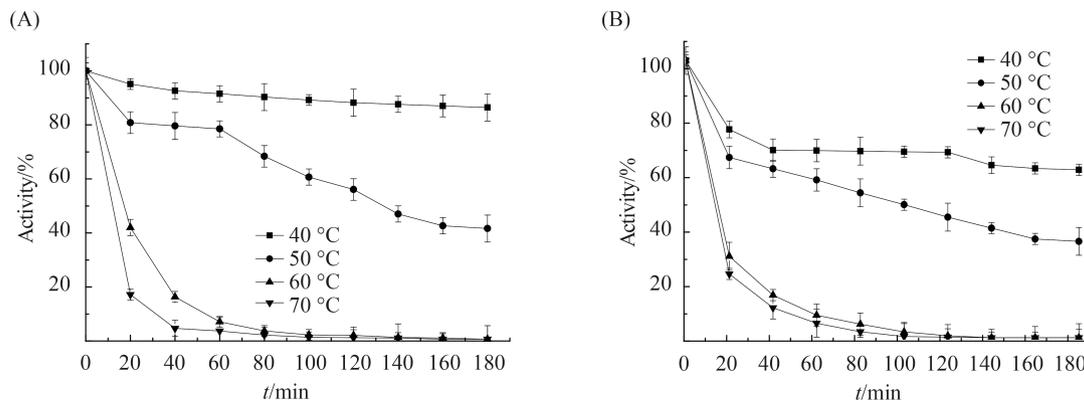


图 11. 重组酶P16942和P331热稳定性曲线

Figure 11. Thermostability curves of recombinase P16942 and P331. A: crude enzyme of recombinase P16942; B: crude enzyme of recombinase P331.

罐对重组菌株进行放大实验时发现，魔芋粉对重组菌株产 $\beta$ -甘露聚糖酶的诱导作用非常明显，酶活力最高可达2748.82 U/mL；张莹莹等<sup>[25]</sup>用黑曲霉CICC2462表达从自身菌株获得并经过改造的 $\beta$ -甘露聚糖酶基因(MAN)，静置培养8 d后其分泌表达的 $\beta$ -甘露聚糖酶酶活最高可达12467.2 U/mL；赵梅等<sup>[26]</sup>将从宇佐美曲霉(*Aspergillus usamii*) E001中克隆得到的 $\beta$ -甘露聚糖酶基因(*Auman26A*)，在毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115中成功得到异源表达，发酵液上清的 $\beta$ -甘露聚糖酶活力达到281.9 U/mL；成莉凤等<sup>[27]</sup>从原工程菌株slp-man-pET28a/JM提取重组质粒slp-man-pET28a，转化*Escherichia coli*. BL21(DE3)，新工程菌株slp-man-pET28a/BL分泌的 $\beta$ -甘露聚糖酶活性最高达645.5 U/mL。目前已商业化的甘露聚糖酶主要来自芽孢杆菌、木霉和青霉。耐酸碱方面，芽孢杆菌所产甘露聚糖酶一般属于中性或偏碱性甘露聚糖酶，木霉和青霉所产甘露聚糖酶普遍为酸性甘露聚糖酶，耐热性方面，大多数的甘露聚糖酶最适反应温度在45–65 °C左右，但是只有少数甘露聚糖酶能够在酸性或碱性环境中，或者较高温度条件下保存一段时间后还能保持较高的酶活力，而大多数工业生产都需要具有这种特性的甘露聚糖酶。

虽然目前在文献中报道或者已经商业化的 $\beta$ -甘露聚糖酶有不少的表达量及酶活力都达到了较高的水平，但是多数 $\beta$ -甘露聚糖酶在酶活力，pH和温度耐受性，及其他环境影响等综合指标方面都难以满足工业需求<sup>[28]</sup>。基因工程是解决对于目前存在的如 $\beta$ -甘露聚糖酶的生产低，酶活力低，可耐受pH及温度不适合工业生产应用等诸多问题的比较有效的途径。鉴于到目前为止，还没有来自葡萄穗霉的 $\beta$ -甘露聚糖酶表达的研究报道，本研究运用基因工程手段，把来源于葡萄穗霉的 $\beta$ -甘露聚糖酶基因s16942和s331转化到黑曲霉G1中，成功使其得到异源表达，并且获得了能够表达 $\beta$ -甘露聚糖酶重组工程菌株G1-pGm-s16942和G1-pGm-s331。对获得的重组工程菌株的研究表明，G1-pGm-s16942所表达的 $\beta$ -甘露聚糖酶在60 °C，pH 7条件下具有最高酶活力，发酵上清液酶活力最高达521 U/mL；G1-pGm-s331所表达的 $\beta$ -甘露聚糖酶在50 °C，pH 7条件下具有最高酶活力，发酵上清液酶活力最高为84 U/mL。对这2个基因的来源菌，黑葡萄穗霉的发酵上清液进行 $\beta$ -甘露聚糖酶活力测定，结果发现其酶活力最高值也不足0.1 U/mL，因此可以认为其不具有 $\beta$ -甘露聚糖酶活力。说明这2个基因在黑曲霉宿主G1中得到了很好的表达。

虽然G1-pGm-s16942发酵上清的最高酶活力明显高于G1-pGm-s331,但是根据各自表达的蛋白量及酶活力最高值推算比酶活, G1-pGm-s331的发酵上清的比酶活(280 U/mg)要高于G1-pGm-s16942 (226.5 U/mg),且G1-pGm-s331还可以通过菌株诱变,优化培养基及培养条件等措施提高表达量,进一步提高酶活力,并且其在第4天的蛋白表达量及酶活力就达到最高,发酵时间相对较短,如果在工业生产上就可以节省大量的时间及人力物力;而G1-pGm-s16942的优势在于其所表达的重组酶的温度和pH稳定性相对好于G1-pGm-s331,且原始表达量比较大,还可以在后期对所表达的酶进行改造优化等措施使其酶活力提高。对这2种重组酶的氨基酸序列进行比对分析时发现,它们各有一段氨基酸序列无法互相覆盖,即各自独有,所以推测它们各自的优势可能和这两段各自独有的氨基酸序列相关,而其真实功能还有待于进一步研究。

此研究可以为 $\beta$ -甘露聚糖酶这类酶的特性研究及纯化和体外定向改造提供一定的理论基础,可以用于降解甘露聚糖及异甘露聚糖和生产甘露低聚糖的应用研究,也为 $\beta$ -甘露聚糖酶的研究提供了一种新的出发菌株。筛选和开发新型的比酶活高,温度和pH稳定性好的 $\beta$ -甘露聚糖酶,不仅可以提升 $\beta$ -甘露聚糖酶相关的工业生产技术水平,还可以打破国际专利对于传统 $\beta$ -甘露聚糖酶的技术垄断,为我国的半纤维素原料降解产业提供理论及实际应用的支持。本研究还为DNA序列数据库提供了新的基因资源,为更广泛更深入的研究 $\beta$ -甘露聚糖酶提供了良好的参考素材。

本研究中使用的宿主菌表达系统为黑曲霉表达系统。黑曲霉是1种重要的工业用生产菌株,酶系丰富,代谢产物复杂,因此广泛用于多种酶制剂及有机酸等工业用品的生产<sup>[29]</sup>。在酶制剂生产中,黑曲霉作为表达宿主具有以下几个优点:(1)黑曲霉已被美国FDA (Food and drug administration)

批准为GRAS (Generally regarded as safe)菌株,已被认定是食品药品安全菌株,所以黑曲霉工程菌株菌体本身,或者其所表达的酶制剂产物,都可以广泛的应用在食品药品生产领域;(2)黑曲霉具有大量产生自身酶类的能力(如糖化酶和淀粉酶),这说明黑曲霉具有很强的表达蛋白的能力;(3)黑曲霉与大多数曲霉类微生物一样,具有有效的翻译后修饰功能和良好的分泌表达系统,可以使它们产生并输送异源蛋白至胞外基质中,并且所产蛋白都趋向于向胞外分泌<sup>[30]</sup>。而其它表达菌株如大肠杆菌在高表达外源蛋白时容易形成包涵体,其所产包涵体不仅后期分离纯化比较困难,而且缺乏真核细胞的翻译后修饰,使其表达产物没有生物活性;酿酒酵母分泌蛋白的能力相对较弱,且经常会过度糖基化。目前有报道的使用黑曲霉作为工业生产菌株的产品包括柠檬酸、葡糖酸和没食子酸等有机酸,以及淀粉酶、酸性蛋白酶、纤维素酶、果胶酶和糖化酶等酶制剂。

## 4 结论

本研究将从葡萄穗霉中筛选获得的 $\beta$ -甘露聚糖酶基因s16942和s331转化到黑曲霉G1中,并获得较好的异源表达。G1-pGm-s16942所产粗酶液的最高酶活力为521 U/mL,最适pH为7,最适温度为60 °C; G1-pGm-s331所产粗酶液的最高酶活力为84 U/mL,最适pH为7,最适温度为50 °C。这2种重组酶对较高温度的耐受性较差,较低温度时相对较好,尤其是G1-pGm-s16942所产粗酶液在40 °C保温180 min时还剩约85%酶活力;这2种重组酶的pH稳定性较好,在pH 6-8缓冲液中保存400 h酶活力都还剩余约90%。

## 参考文献

- [1] Chauhan PS, Puri N, Sharma P, Gupta N. Mannanases: microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications. *Applied Microbiology and*

- Biotechnology*, 2012, 93(5): 1817–1830.
- [ 2 ] Akino T, Nakamura N, Horikoshi K. Production of  $\beta$ -mannosidase and  $\beta$ -mannanase by an alkaliphilic *Bacillus* sp.. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1987, 26(4): 323–327.
- [ 3 ] Yuan DL, Song CY. The biological function of mannan oligosaccharides and its application in animal husbandry production. *Feed Review*, 2013, (2): 28–31. (in Chinese)  
远德龙, 宋春阳. 甘露寡糖的生物学功能及其在动物生产中的应用. *饲料博览*, 2013, (2): 28–31.
- [ 4 ] Chen XC. The function of mannan oligosaccharide for the health of poultry enteric canal. *Feed Research*, 2014, (3): 17–21. (in Chinese)  
陈晓春. 甘露寡糖对家禽肠道健康的作用. *饲料研究*, 2014, (3): 17–21.
- [ 5 ] Liang Y, Li B, Dai JJ. The application progress of mannan oligosaccharide in feed industry. *Feed Research*, 2013, (1): 32–33, 36. (in Chinese)  
梁永, 李彪, 戴晋军. 甘露寡糖在饲料工业上的应用进展. *饲料研究*, 2013, (1): 32–33, 36.
- [ 6 ] Zhang PH, Wang ZW. The application of  $\beta$ -mannanases in livestock and poultry. *Feed and Husbandry: New Feed*, 2015, (2): 52–53. (in Chinese)  
章飘海, 王珍韡.  $\beta$ -甘露聚糖酶在畜禽中的应用. *饲料与畜牧: 新饲料*, 2015, (2): 52–53.
- [ 7 ] Van Zyl WH, Rose SH, Trollope K, Görgens JF. Fungal  $\beta$ -mannanases: mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications. *Process Biochemistry*, 2010, 45(8): 1203–1213.
- [ 8 ] Wang MF, You SP, Zhang SS, Qi W, Liu ZH, Wu WN, Su RX, He ZM. Purification, characterization, and production of  $\beta$ -mannanase from *Bacillus subtilis* TJ-102 and its application in gluco-mannooligosaccharides preparation. *European Food Research and Technology*, 2013, 237(3): 399–408.
- [ 9 ] Xu BZ, Sellos D, Janson JC. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel (*Mytilus edulis*)  $\beta$ -mannanase gene. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(6): 1753–1760.
- [10] Sabini E, Wilson KS, Siika-aho M, Boisset C, Chanzy H. Digestion of single crystals of mannan I by an endo-mannanase from *Trichoderma reesei*. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(8): 2340–2344.
- [11] Tamaru Y, Aarki T, Amagoi H, Mori H, Morishita T. Purification and characterization of an extracellular  $\beta$ -1,4-mannanase from a marine bacterium, *Vibrio* sp. strain MA-138. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(12): 4454–4458.
- [12] Ma YH, Xue YF, Dou YT, Xu ZH, Tao WY, Zhou PJ. Characterization and gene cloning of a novel  $\beta$ -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16–5. *Extremophiles*, 2004, 8(6): 447–454.
- [13] Kurakake M, Komaki T. Production of  $\beta$ -mannanase and  $\beta$ -mannosidase from *Aspergillus awamori* K<sub>4</sub> and their properties. *Current Microbiology*, 2001, 42(6): 377–380.
- [14] Hägglund P, Eriksson T, Collén A, Nerinckx W, Claeysens M, Stålbrand H. A cellulose-binding module of the *Trichoderma reesei*  $\beta$ -mannanase Man5A increases the mannan-hydrolysis of complex substrates. *Journal of Biotechnology*, 2003, 101(1): 37–48.
- [15] Qiu ZH, Shi PJ, Liu SC, Yao B. Gene cloning and characterization of a protease-resistant  $\beta$ -mannanase rooted in *Streptomyces fradiae* var. k11. *Journal of Agricultural Science and Technology*, 2010, 12(4): 114–120. (in Chinese)  
邱振华, 石鹏君, 刘素纯, 姚斌. 来源于链霉菌 *Streptomyces fradiae* var. k11 的抗蛋白酶甘露聚糖酶的基因克隆与鉴定. *中国农业科技导报*, 2010, 12(4): 114–120.
- [16] Du ZJ, Ji MJ, Chen GJ, Gao PJ. Culture conditions and production of alkaline-endurable cellulases from cellulolytic fungus *Stachybotrys atra* S607. *Industrial Microbiology*, 2001, 31(4): 22–25, 30. (in Chinese)  
杜宗军, 季明杰, 陈冠军, 高培基. 黑色葡萄状穗霉 S607 耐碱性纤维素酶发酵条件的研究. *工业微生物*, 2001, 31(4): 22–25, 30.
- [17] Saibi W, Amouri B, Gargouri A. Purification and biochemical characterization of a transglucosylating  $\beta$ -glucosidase of *Stachybotrys* strain. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 77(2): 293–300.
- [18] 天津工业生物技术研究所. 一种木聚糖酶及其应用: 中国 201210156461. 2012–10–17.
- [19] 天津工业生物技术研究所. 一种 $\beta$ -葡糖苷酶及其应用: 中国 201210281712. 6. 2012–12–19.
- [20] 天津工业生物技术研究所. 一种 $\beta$ -木糖苷酶及其应用: 中国 201210281598. 7. 2012–12–19.

- [21] Zhao Y, Ba ZH, Zhang CY. Spontaneous mutation of the bi-directional selection marker *amdS* gene and screening *amdS*-strains in *A. niger*. *Journal of Jining Medical College*, 2008, 31(4): 283–285. (in Chinese)  
赵颖, 巴再华, 张春艳. 双向选择标记 $amdS$ 在黑曲霉中自发突变及 $amdS$ -检测. *济宁医学院学报*, 2008, 31(4): 283–285.
- [22] Yao TT, Wang ZX. Preparation, regeneration and transformation of *Aspergillus niger* protoplasts. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2006, 25(4): 116–120. (in Chinese)  
姚婷婷, 王正祥. 黑曲霉原生质体的制备、再生及转化条件. *食品与生物技术学报*, 2006, 25(4): 116–120.
- [23] Fan ZH. The research on enzymatic property of mannase. *Feed Industry*, 2008, 29(16): 19–21. (in Chinese)  
范志恒. 甘露聚糖酶的酶学性质研究. *饲料工业*, 2008, 29(16): 19–21.
- [24] Liu XY, Xu MJ, Yang TW, Zhang X, Rao ZM. Cloning and expression of  $\beta$ -mannanase gene in *Bacillus subtilis*. *Chinese Journal of Applied and Environmental Biology*, 2012, 18(4): 672–677. (in Chinese)  
刘项羽, 徐美娟, 杨套伟, 张显, 饶志明.  $\beta$ -甘露聚糖酶基因在枯草芽孢杆菌中的克隆及表达. *应用与环境生物学报*, 2012, 18(4): 672–677.
- [25] Zhang YY, Zhang H, Li J. Construction of  $\beta$ -mannanase engineering strain of *Aspergillus niger*. *Biotechnology*, 2013, 23(3): 31–36. (in Chinese)  
张莹莹, 张会, 李杰. 构建 $\beta$ -甘露聚糖酶的黑曲霉工程菌. *生物技术*, 2013, 23(3): 31–36.
- [26] Zhao M, Wei XH, Wang CJ, Dong YH, Li JF, Wu MC. Gene cloning and expression of a thermostable  $\beta$ -mannanase and its enzymatic properties. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2014, 33(6): 590–596. (in Chinese)  
赵梅, 魏喜换, 王春娟, 董运海, 李剑芳, 邬敏辰. 耐热 $\beta$ -甘露聚糖酶基因的克隆与表达及酶学性质. *食品与生物技术学报*, 2014, 33(6): 590–596.
- [27] Cheng LF, Feng XY, Duan SW, Zheng K, Liu ZC. Construction of high efficient expression system of the  $\beta$ -mannanase gene from *Erwinia carotovora* CXJZ95–198. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2015, 31(10): 240–245. (in Chinese)  
成莉凤, 冯湘沅, 段盛文, 郑科, 刘正初. 来源于欧文氏杆菌CXJZ95–198的 $\beta$ -甘露聚糖酶基因高效表达体系构建. *中国农学通报*, 2015, 31(10): 240–245.
- [28] Zhao YJ, Xue YF, Ma YH. Recent advances and prospect on structural biology of  $\beta$ -mannanase-A review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(9): 1131–1137. (in Chinese)  
赵月菊, 薛燕芬, 马延和.  $\beta$ -甘露聚糖酶的结构生物学研究现状和展望. *微生物学报*, 2009, 49(9): 1131–1137.
- [29] Van Den Hombergh JPTW, Van De Vondervoort PJI, Fraissinet-Tachet L, Visser J. *Aspergillus* as a host for heterologous protein production: the problem of proteases. *Trends in Biotechnology*, 1997, 15(7): 256–263.
- [30] Storms R, Zheng Y, Li HS, Sillaots S, Martinez-Perez A, Tsang A. Plasmid vectors for protein production, gene expression and molecular manipulations in *Aspergillus niger*. *Plasmid*, 2005, 53(3): 191–204.

# Expression in *Aspergillus niger* and characterization of $\beta$ -mannanases from *Stachybotrys chartarum*

Jiaxing Yang<sup>1,2</sup>, Huaming Wang<sup>2\*</sup>, Fuping Lu<sup>1</sup>

<sup>1</sup> College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China

<sup>2</sup> Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

**Abstract [Objective]** Using *Aspergillus niger* as host to express  $\beta$ -mannanases from *Stachybotrys chartarum*. **[Methods]** Through sequence analysis of *Stachybotrys chartarum* genome, two  $\beta$ -mannanase genes (s16942 and s331) were identified. The primers were designed based on the DNA sequence and the  $\beta$ -mannanase genes (s16942 and s331) were obtained, and then inserted to the vector pGm. The expression plasmids were transferred into *Aspergillus niger*.  $\beta$ -mannanase producing strains (G1-pGm-s16942 and G1-pGm-s331) were isolated after screening several transformants using amdS selection plates and confirmed by PCR fragment sequencing. **[Results]** The molecular weight of the enzymes from G1-pGm-s16942 and G1-pGm-s331 were about 48 kDa and 60 kDa respectively by SDS-PAGE gel analysis, and the recombinant proteins did not present in the negative control. Assays of enzymatic property using the crude enzyme preparations indicated that the enzyme from G1-pGm-s16942 exhibited maximum activity (521 U/mL) under the optimum conditions (pH 7 and 60 °C); the enzyme from G1-pGm-s331 exhibited maximum activity (84 U/mL) under the optimum conditions (pH 7 and 50 °C). **[Conclusion]** This was the first study of the heterologous expression of the  $\beta$ -mannanase genes from *Stachybotrys chartarum* in *Aspergillus niger* host and the  $\beta$ -mannanase genes could be expressed successfully with high activities and protein titers.

**Keywords:**  $\beta$ -mannanase, *Stachybotrys chartarum*, *Aspergillus niger*, genetic transformation, recombinant protein expression

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the Tianjin Science and Technology Planning Projects (14ZCZDSY00065)

\*Corresponding author. E-mail: wang\_hm@tib.cas.cn

Received : 21 October 2015; Revised: 9 December 2015; Published online: 16 December 2015