

## 短小芽孢杆菌木聚糖酶基因在毕赤酵母中的分泌表达及酶学性质研究

江正兵<sup>1</sup> 宋慧婷<sup>2</sup> 马立新<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(湖北大学生命科学学院 分子微生物与基因工程研究室 武汉 430062)

<sup>2</sup>(湖北大学化学与材料科学学院 武汉 430062)

**摘 要** 将短小芽孢杆菌 HB030 的内切-1,4-木聚糖酶基因克隆到毕赤酵母表达载体 pPIC9k 上,得到重组质粒 pHBM220,将 pHBM220 经酶切后分别转化三株毕赤酵母 KM71、GS115、SMD1168,该木聚糖酶基因在三株毕赤酵母中均实现了分泌表达。将重组毕赤酵母 KM71(pHBM220)、GS115(pHBM220)、SMD1168(pHBM220)分别诱导产酶,对重组酶进行相关的酶学性质分析表明,三者的最适反应 pH 值约为 5.5,最适反应温度约为 60℃。在其最适反应条件下测得三者粗酶液酶活分别为 10.80IU/mL、11.63IU/mL、9.68IU/mL。重组毕赤酵母 KM71(pHBM220)所产酶的热稳定性较好,而在 pH 稳定性方面三者没有太大的差异。

**关键词** 内切-1,4-木聚糖酶基因,毕赤酵母,分泌表达,酶学性质

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0050-06

木聚糖是半纤维素的主要组分之一,作为一种可再生资源越来越受到人们的重视。内切-1,4-木聚糖酶(EC3.2.1.8)是主要催化水解木聚糖的内切木聚糖酶,在造纸、食品、饲料等行业中有极大的应用前景<sup>[1-3]</sup>。源于短小芽孢杆菌的木聚糖酶基因已有在酿酒酵母中表达的相关报道<sup>[4-8]</sup>,但目前还未见有在毕赤酵母中表达的报道。本研究将本实验室克隆得到的短小芽孢杆菌 HB030 的内切-1,4-木聚糖酶基因分别在 3 株毕赤酵母 KM71、GS115、SMD1168 中实现了分泌表达,并对表达产物进行相关酶学性质分析。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材 料

**1.1.1 酶和试剂:**限制酶、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、TaqDNA 聚合酶、溶菌酶等分别购自华美、Promega、TaKaRa 公司;4 种 dNTP 购自 TaKaRa 公司,燕麦木聚糖、RBB-Xylan (Remazol Brilliant Blue-Xylan) 购自 Sigma 公司,其它常规试剂采用进口分装或

国产分析纯。

**1.1.2 培养基:**LB 培养基见文献[9],YEPD、MM、MD、BMGY、BMMY 培养基见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

**1.1.3 菌株与质粒:**见表 1。

#### 1.2 方 法

**1.2.1 DNA 的酶切,片段回收,补平,连接和转化:**DNA 片段用 Clontech 公司的 Advantage™ PCR-pure Kit 或 Gel-extract Kit 回收,质粒 DNA 的酶切,补平,连接,转化按文献[9]进行。

**1.2.2 PCR 扩增:**按文献[9]用 PE2400 型扩增仪扩增。

扩增引物:Primer4:5'-GGCCAGGCCTCACAC CT-GTCGTTTGG-3'

Primer5:5'-GTCATAGCCCATGCCGAGAACCATTA CG-3'

扩增条件:95℃ 5min;95℃ 1min;58℃ 1min;72℃ 1.5min 35 个循环;72℃ 7min

**1.2.3 毕赤酵母感受态细胞的制备、转化:**参照 In-

收稿日期 2002-07-16,修回日期 2002-08-29。

基金项目 国家自然科学基金(No. 39900003)湖北省科技厅重点攻关项目(No. 992P0320)和武汉市科技局科技攻关项目(No. 992002054G)资助。

\* 通讯作者。 Tel 86-27-88666020; Fax 86-27-88665585; E-mail malixin9@hotmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

*Invitrogen* 公司毕赤酵母操作手册进行。

**1.2.4 重组毕赤酵母的表型鉴定、诱导表达** :参照 *Invitrogen* 公司毕赤酵母操作手册进行。

**1.2.5 SDS-PAGE** :参照 BIO-RAD 实验手册进行。

**1.2.6 木聚糖酶酶活力测定及酶活力单位定义** :用

重组毕赤酵母诱导所产的粗酶液经硫酸铵 (45% 饱和度) 初步纯化后,水解燕麦木聚糖,用 DNS 法测定反应液中的还原糖(以木糖作为标准)含量。酶活力单位定义:在最适反应条件下,以每 1min 生成 1 $\mu$ mol 还原糖所需的酶量作为一个酶活力单位(IU)。

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

Strain/Plasmid	Characteristics	Source
<i>B. pumilus</i> HB030		Stored in this lab
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>SupE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> , <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gryA966</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Stored in this lab
<i>Pichia pastoris</i> GS115	<i>his4</i>	Purchased from <i>Invitrogen</i>
<i>Pichia pastoris</i> KM71	<i>his4</i> , <i>aox1::ARG4</i> , <i>arg4</i>	Purchased from <i>Invitrogen</i>
<i>Pichia pastoris</i> SMD1168	<i>his4</i> , <i>pep4</i>	Purchased from <i>Invitrogen</i>
GS115( pHBM220 )		This work
KM71( pHBM220 )		This work
SMD1168( pHBM220 )		This work
pPIC9K	<i>Amp<sup>r</sup></i> , <i>Kan<sup>r</sup></i> , <i>pucc ori</i> , <i>HIS4</i> , <i>P<sub>AOX1</sub></i> , <i>T<sub>AOX1</sub></i> $\alpha$ -Factor SS, MCS	Purchased from <i>Invitrogen</i>
pHBM219	<i>xy1</i> cloned in pHBM316A2	Stored in this lab
pHBM220	<i>xy1</i> cloned in pPIC9K	This work

## 2 结果

### 2.1 表达载体的构建

将质粒 pHBM219 用 *Xba*I 完全酶切,用 T4 DNA Polymerase 处理,使其末端平头化,再用 *Bam*HI 完全酶切,回收 ~1.0kb 的片段。此片段与经 *Bam*HI + *Sna*BI 双酶切的 pPIC9K 载体连接,可得到 pHBM220, 如图 1。

因 pPIC9K 中只在 7110bp 处有一个 *Nde*I 限制性酶切位点,而在木聚糖酶基因中,只在距起始密码 ~400bp 处有一个 *Nde*I 限制性酶切位点,故该质粒用 *Nde*I 酶切后,可出现 ~3.9kb 和 ~6.3kb 两片段,如图 2。由此可判断 pHBM220 为重组质粒。

### 2.2 重组毕赤酵母的筛选

将质粒 pHBM220 用 *Sal*I 完全酶切,分别转化毕赤酵母 KM71、GS115、SMD1168 三株宿主菌。根据各转化平板上转化子数目的多少,分别挑取 30~60 个转化子点接至 BMGY 培养基上,28 $^{\circ}$ C 培养 1~2d 后,转接至含有 RBB-Xylan 的 BMMY 培养基平板上,甲醇诱导(每 24h 补加一次甲醇)48h 后,有部分菌落周围有明显水解圈出现,如图 3。挑取有水解圈的转化子,经 YEPD 液体培养基 28 $^{\circ}$ C 摇床培养后,抽提

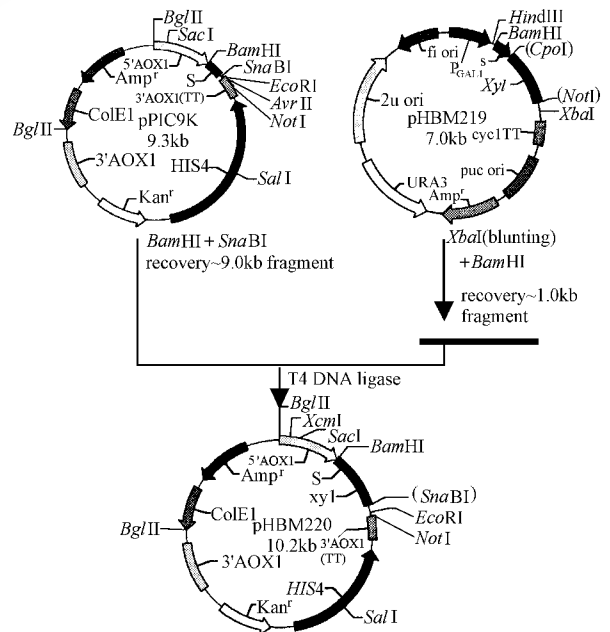


图 1 pHBM220 构建过程图

Fig. 1 Construction of plasmid pHBM220

总 DNA 作为模板,用 Primer4、Primer5 进行 PCR 扩增,得到与正对照(以短小芽孢杆菌 HB030 的总 DNA 为模板进行 PCR 扩增)相同的条带,如图 4。将 3 株整合了内切-1,4-木聚糖酶基因且有明显分

泌表达的毕赤酵母转化子在含有 RBB-Xylan 的 BM-MY 培养基的平板上进行筛选,分别挑取一株水解圈较大的重组毕赤酵母命名为 KM71( pHBM220 )、SMD1168( pHBM220 )和 GS115( pHBM220 )。

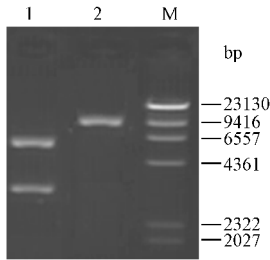


图 2 毕赤酵母表达质粒酶切鉴定

Fig.2 Identification of expression plasmids for *P. pastoris* by digestion

1. pHBM220/ *Nde* I ; 2. pPIC9k/ *Nde* I ; M.  $\lambda$ DNA/ *Hind* III

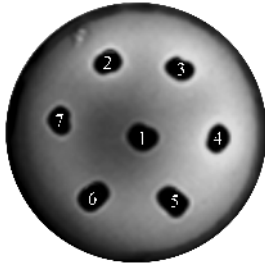


图 3 重组毕赤酵母 RBB-xylan 检测

Fig.3 Test of recombinant *P. pastoris* by RBB-Xylan

1. Control( - ): KM71( pPIC9k ); 2. 3. SMD1168( pHBM220 )  
4. 5. KM71( pHBM220 ); 6. 7. GS115( pHBM220 )

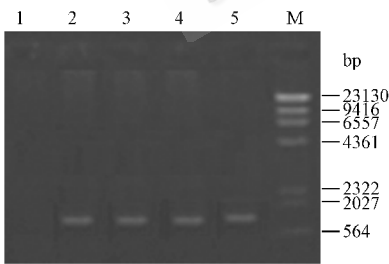


图 4 重组毕赤酵母 PCR 鉴定

Fig.4 Identification of recombinant *P. pastoris* by PCR

1. Control( - ) *P. pastoris* total DNA + pPIC9k/template ;  
2. Control( + ) HBM030 total DNA/template ;  
3. SMD1168( pHBM220 ) total DNA/template ;  
4. KM71( pHBM220 ) total DNA/template ;  
5. GS115( pHBM220 ) total DNA/template ;  
M.  $\lambda$ DNA/ *Hind* III .

### 2.3 重组毕赤酵母的诱导表达

重组毕赤酵母 KM71( pHBM220 ) Mut<sup>-</sup> 表型为 Mut<sup>S</sup>, SMD1168( pHBM220 )和 GS115( pHBM220 )经 Mut<sup>S</sup> 表型鉴定为 Mut<sup>+</sup>。将 KM71( pHBM220 )按 Mut<sup>S</sup>

诱导方式诱导产酶, GS115( pHBM220 )和 SMD1168( pHBM220 )按 Mut<sup>+</sup> 诱导方式诱导产酶, 同时将 SMD1168( pHBM220 )按 Mut<sup>S</sup> 诱导方式诱导产酶以比较不同诱导方式对产酶的影响, 并将转入 pPIC9k 质粒的毕赤酵母 KM71、SMD1168、GS115 三株宿主菌同步诱导作为产酶的本底对照, 与对应的重组菌株同时取样分析, 作为本底对照菌株的酶活分别为 0.0038IU/mL、0.046IU/mL、0.016IU/mL, 而且, 其随诱导时间的延长并无明显变化。三者中的最大值(0.046IU/mL)远小于重组菌株诱导产酶第一次取样的最小值(3.92IU/mL)。鉴于此, 为便于计算忽略宿主菌产酶的本底影响。KM71( pHBM220 )-Mut<sup>S</sup> 在诱导培养的第 96 小时产酶达最高值, SMD1168( pHBM220 )-Mut<sup>S</sup> 在诱导培养的第 72 小时产酶达最高值, 如图 5; GS115( pHBM220 )-Mut<sup>+</sup> 在诱导培养的第 64 小时产酶达最高值, SMD1168( pHBM220 )-Mut<sup>+</sup> 在诱导培养的第 64 小时产酶达最高值, 如图 6。将诱导所产酶的粗酶液经 SDS-PAGE 分析表明有明显的表达蛋白带(该木聚糖酶基因表达产物的计算分子量为 26.8kD)如图 7。

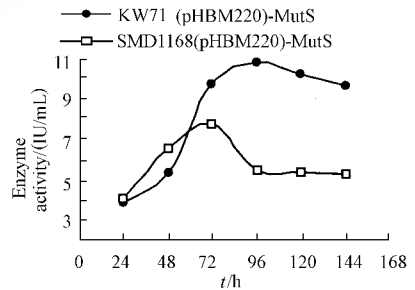


图 5 KM71( pHBM220 ) SMD1168( pHBM220 )诱导( Mut<sup>S</sup> )产酶曲线

Fig.5 Curve of enzyme production by KM71( pHBM220 ) SMD1168( pHBM220 )-Mut<sup>S</sup>

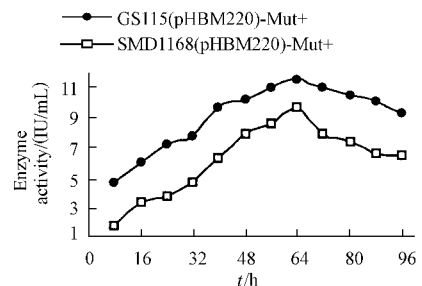


图 6 GS115( pHBM220 ) SMD1168( pHBM220 )诱导( Mut<sup>+</sup> )产酶曲线

Fig.6 Curve of enzyme production by GS115( pHBM220 ) SMD1168( pHBM220 )-Mut<sup>+</sup>

## 2.4 重组毕赤酵母酶学性质分析

分别用 pH4.5、pH5.0、pH5.5、pH6.0、pH6.5、pH7.0、pH7.5、pH8.0、pH8.5 的磷酸缓冲液配制木聚糖底物,在 50℃ 反应温度下,测定 3 株重组毕赤酵母诱导所产酶粗酶液经硫酸铵(45% 饱和度)初步纯化后的酶活力,测得其最适反应 pH 值均约为 5.5,如图 8;用 pH7.0 的磷酸缓冲液配制木聚糖底物,分别在 35℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、65℃、70℃、75℃、80℃、85℃ 测定酶活力,测得其最适反应温度均约为 60℃,如图 9。

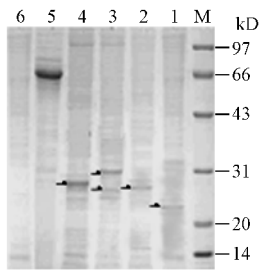


图 7 重组毕赤酵母 SDS-PAGE 检测

Fig. 7 Test of recombinant *P. pastoris* by SDS-PAGE

M. Protein molecular weight marker ;

1. SMD1168(pHBM220)-Mut<sup>S</sup> ;
2. SMD1168(pHBM220)-Mut<sup>+</sup> ;
3. KM71(pHBM220)-Mut<sup>S</sup> ;
4. GS115(pHBM220)-Mut<sup>+</sup> ;
5. Control(+) :GS115/His<sup>+</sup> Mut<sup>+</sup> Albumin ;
6. Control(-) :KM71(pPIC9k)-Mut<sup>S</sup>

- ▲— KM71-pHBM220(MutS)
- ◆— GS115-pHBM220(Mut+)
- SMD1168-pHBM220(MutS)
- SMD1168-pHBM220(Mut+)

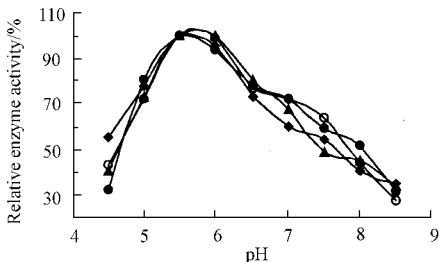


图 8 pH 值对重组毕赤酵母所产酶活的影响

Fig. 8 Effect of pH on activity of the enzyme produced by recombinant *P. pastoris*

取 3 株重组毕赤酵母诱导所产粗酶液,经硫酸铵(45% 饱和度)初步纯化后分成若干等份,并分别调节 pH 值为 2.0、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、11.0,同时取自然 pH 值的酶液作参照,在 4℃ 保存 24h 后调节其 pH 值与自然 pH 值相同,在其最

适反应条件下分别测定酶活,测得在 pH5.0 ~ 10.0 的范围内 KM71 (pHBM220)-Mut<sup>S</sup>、SMD1168 (pHBM220)-Mut<sup>S</sup> 所产酶的稳定性较好,而 GS115 (pHBM220)-Mut<sup>+</sup>、SMD1168 (pHBM220)-Mut<sup>+</sup> 产的酶,在中性偏酸的情况下较稳定,如图 10。

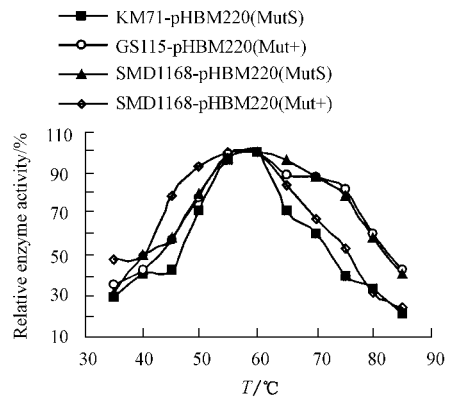


图 9 温度对重组毕赤酵母所产酶活的影响

Fig. 9 Effect of temperature on activity of the enzyme produced by recombinant *P. pastoris*

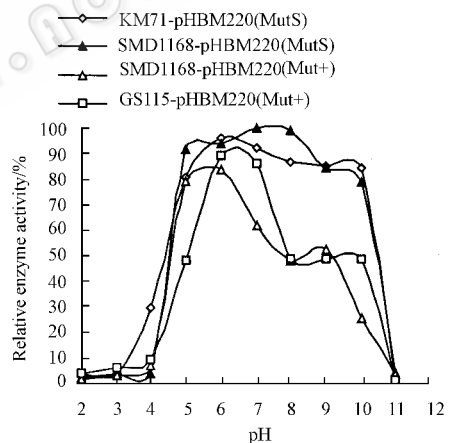


图 10 重组毕赤酵母所产酶的 pH 值稳定性

10 pH stability of the enzyme produced by recombinant *P. pastoris*

将 3 株重组毕赤酵母诱导所产粗酶液经硫酸铵(45% 饱和度)初步纯化后,在其最适反应温度 60℃ 保温,每隔 1.5h 取样,在其最适反应条件下测定其酶活,测得 KM71(pHBM220)-Mut<sup>S</sup> 所产酶的热稳定性较好,在其最适反应温度 60℃ 保温 6h 还可保持 50% 以上的酶活,SMD1168(pHBM220)-Mut<sup>S</sup> 所产酶热稳定性较差,在其最适反应温度 60℃ 保温 6h 后,其酶活降到 20% 以下,而 GS115(pHBM220)-Mut<sup>+</sup> 在其最适反应温度 60℃ 保温 1.5h 可保持 50% 以上的活性,3h 以后活性急剧下降,如图 11。

## 3 讨论

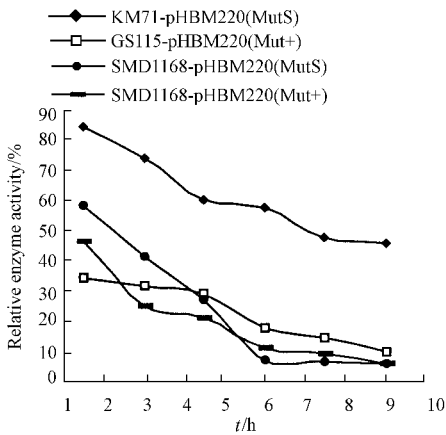


图 11 重组毕赤酵母所产酶的热稳定性

Fig. 11 Heat stability of the enzyme produced by recombinant *P. pastoris*

因在毕赤酵母 *KM71*、*GS115*、*SMD1168* 中均实现了分泌表达,其酶活力分别达到  $10.80\text{IU/mL}$ 、 $11.63\text{IU/mL}$ 、 $9.68\text{IU/mL}$  与 *Filip Nuyens* 等<sup>[8]</sup>在 2001 年报道在酿酒酵母中的最高表达量  $8.5\text{nkcat/mL}$  ( $\text{nkcat/mL}$  与本文定义的  $\text{IU/mL}$  相当)高  $1.18 \sim 3.13\text{IU/mL}$ 。本研究中的重组毕赤酵母未经 G418 进行高拷贝筛选,若经 G418 进行筛选可能得到高拷贝的重组毕赤酵母,也可能得到该木聚糖酶更高的表达量,这方面的工作本室正在进行。本研究的木聚糖酶基因分别用三株毕赤酵母作为宿主表达得到的重组酶最适反应 pH 和最适反应温度几乎一致,均分别约为 pH5.5、 $60^\circ\text{C}$ ,用毕赤酵母 *GS115* 作为宿主的表达量略高,用毕赤酵母 *KM71* 作为宿主表达的木聚糖酶的热稳定性和 pH 稳定性较好,而蛋白酶缺陷型毕赤酵母 *SMD1168* 作为宿主并没有表现出明显的优越性。

本研究中,重组毕赤酵母的甲醇诱导方式对诱导产酶有一定的影响。如 *SMD1168*(pHBM220) Mut 表型鉴定为 Mut<sup>+</sup>,按 Mut<sup>S</sup> 诱导方式诱导,在诱导的第 3 天,即第 72h 产酶达最高值,而 72h 后酶活急剧下降,*KM71*(pHBM220) Mut<sup>S</sup> 和 *GS115*(pHBM220) Mut<sup>+</sup> 在诱导产酶达最高值后表现为缓慢下降趋势,如图 5、图 6 所示。将 *SMD1168*(pHBM220)按 Mut<sup>+</sup> 诱导方式诱导,在诱导的第 64h 达到最高值后亦表现为缓慢下降趋势,如图 6 所示。*SMD1168*(pHBM220) Mut<sup>S</sup> 在诱导产酶达最高值后表现为急剧下降,可能是因为诱导时间过长,而导致一些内源蛋白水解酶系对目标蛋白降解所造成。

从本研究的实验数据来看,重组毕赤酵母所表达木聚糖酶的 pH 值稳定性和热稳定性与甲醇的诱导方式有关。从 pH 值稳定性方面来看,*KM71*(pH-

*BM220*) Mut<sup>S</sup>、*SMD1168*(pHBM220) Mut<sup>S</sup> 所产酶的 pH 值稳定性曲线很相似,在 pH5.0 ~ 10.0 范围内稳定性较好;*GS115*(pHBM220) Mut<sup>+</sup> 和 *SMD1168*(pHBM220) Mut<sup>+</sup> 所产酶的 pH 值稳定性曲线也极为相似,而重组毕赤酵母 *SMD1168*(pHBM220)经两种不同的诱导方式诱导所产的木聚糖酶表现出截然不同的 pH 值稳定性,如图 10 所示。在热稳定性方面,也与甲醇的诱导方式有一定的联系,在酶的最适反应温度保温 1.5h,*KM71*(pHBM220) Mut<sup>S</sup> 和 *SMD1168*(pHBM220) Mut<sup>S</sup> 所产酶均可保持 50% 以上的酶活性;而 *GS115*(pHBM220) Mut<sup>+</sup> 和 *SMD1168*(pHBM220) Mut<sup>+</sup> 所产酶均在 50% 以下。Mut<sup>S</sup>(甲醇利用慢)、Mut<sup>+</sup>(甲醇利用快)的甲醇诱导方式对所产酶的 pH 值稳定性和热稳定性的影响,可能是因为 Mut<sup>S</sup> 诱导方式诱导时间长,更有利于毕赤酵母本身的修饰系统对表达产物的后期加工修饰作用,如糖基化等,这对酶的稳定性是有利的<sup>[10-11]</sup>。当然,这只是通过本研究的实验得出的结论,是否具有-般性,还需要更进一步的实验来证实。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Monfort A, Blasco A, Prieto JA *et al.* Combined expression of *Aspergillus nidulans* endoxylanase X24 and *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase in industrial baker's yeast and their use in bread making. *Appl Environ Microbiol*, 1996 **62**: 3712 - 3715
- [2] Linko YY, Javanainen P, Linko S. Biotechnology of bread baking. *Trends Food Sci Technol*, 1997 **8**: 339 - 344
- [3] Courtin CM, Roelants A, Delcour JA. Fractionation-reconstitution experiments provide insight into the role of endoxylanase in bread-making. *J Agric Food Chem*, 1999 **47**: 1870 - 1877
- [4] Li XL, Ljungdahl LG. Expression of *Aureobasidium pullulans xynA* in, and secretion of the xylanase from, *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 1996 **62**: 209 - 213
- [5] La Grange DC, Pretorius IS, Van Zyl WH. Expression of a *Trichoderma reesei*  $\beta$ -xylanase gene (*XYN2*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, 1996 **62**: 1036 - 1044
- [6] La Grange DC, Pretorius IS, Van Zyl WH. Cloning of the *Bacillus pumilus*  $\beta$ -xylosidase gene (*xynB*) and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997 **47**: 262 - 266
- [7] La Grange DC, Claeysens M, Pretorius IS *et al.* Coexpression of the *Bacillus pumilus*  $\beta$ -xylosidase (*xynB*) gene with the *Trichoderma reesei*  $\beta$ -xylanase (*xyn2*) gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000 **54**: 195 - 200
- [8] Filip Nuyens, Willem H, Van Zyl *et al.* Heterologous expression of the *Bacillus pumilus* endo- $\beta$ -xylosidase (*xynA*) gene in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2001 **56**: 431 -

- [ 9 ] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. Molecular Cloning : A Laboratory Manual. 2nd ed. New York : Cold Spring harbor Laboratory , 1989.
- [ 10 ] LI Y Y ( 李育阳 ): *Gene Expression Technology*( 基因表达技术 ). Beijing Science Press 2001.2
- [ 11 ] Kjeldsen T, BRAANDT J, Andersen AS *et al.* A removable spacer peptide in an  $\alpha$ -factor-leader/insulin precursor fusion proteolytic degradation of secreted recombinant human albumin. *Yeast* ,1998 ,**14** :161 - 169

## Secreted Expression of *Bacillus pumilus* Xylanase Gene in *Pichia pastoris* and Study on Enzymatic Properties

JIANG Zheng-Bing<sup>1</sup> SONG Hui-Ting<sup>2</sup> MA Li-Xin<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>( College of Life science , Hubei University , Wuhan 430062 ,China )

<sup>2</sup>( College of Chemistry and Material science , Hubei University , Wuhan 430062 ,China )

**Abstract** The endo-1 *A*-xylanase gene from *Bacillus pumilus* HB030 was cloned into the *Pichia pastoris* expression vector , pPIC9k , the recombinant plasmid was named pHBM220. The digested recombinant plasmid pHBM220 was transformed into *Pichia pastoris* KM71、GS115、SMD1168 , respectively. The recombinant *Pichia pastoris* KM71 ( pHBM220 ) , GS115 ( pHBM220 ) , SMD1168 ( pHBM220 ) secreted functional endo-1 *A*-xylanase , and the enzymatic activities reached 10.80IU/mL , 11.63IU/mL , 9.68IU/mL , respectively. The temperature and pH optimum for the recombinant xylanase were 60°C and pH5.5 , respectively.

**Key words** Endo-1 *A*-xylanase gene , *Pichia pastoris* , expression , enzymatic properties

Received : 07-16-2002

This work was supported by Grant from Chinese National Natural Science Fund ( No. 39900003 ).

\* Corresponding author. Tel 86-27-88666020 ; Fax 86-27-88665585 ; E-mail: malixin9@hotmail.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>