

## 携多拷贝 *glaA* 的重组黑曲霉过量合成糖化酶的研究

# Overproduction of Glucoamylase by Recombinant *Aspergillus niger* Harboring Multiple Copies of *glaA*

姚婷婷<sup>1</sup>, 王衍敏<sup>2</sup>, 顾建龙<sup>2</sup>, 王正祥<sup>1\*</sup>

YAO Ting-Ting<sup>1</sup>, WANG Yan-Min<sup>2</sup>, GU Jian-Long<sup>2</sup> and WANG Zheng-Xiang<sup>\*</sup>

1 江南大学生物工程学院工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214036

2 江阴市百圣龙生物工程公司, 江阴 214406

1 The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education and School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China

2 Jiangyin Baishenglong Biotechnology Company, Jiangyin 214406, China

**摘 要** 以工业生产菌株黑曲霉 CICIM F0410 基因组 DNA 为模板, 扩增出糖化酶 *glaA* 基因, 测序并进行表达研究。*GlaA* 基因的核苷酸序列长为 2167 bp, 包含 4 个内含子。氨基酸序列比对表明此黑曲霉糖化酶与其他曲霉属来源的糖化酶有很高的同源性。将 *glaA* 基因克隆到 pBC-Hygro 载体中, 构建重组质粒 pBC-Hygro-*glaA* 并转化 *A. niger* F0410。携多拷贝 *glaA* 的转化子用 150 μg/mL 潮霉素抗性筛选并通过荧光实时定量 PCR 鉴定。结果表明, 在染色体整合 2~3 倍糖化酶基因对糖化酶的过量合成是适宜的, 有助于提高糖化酶活力。对转化子进行摇瓶发酵研究, 发酵终止时转化子 GB0506 的糖化酶活力比出发菌株 F0410 提高了 17.5%。因此, 增加黑曲霉染色体糖化酶基因的拷贝数可以显著提高糖化酶活力。

**关键词** 黑曲霉, 糖化酶, 基因克隆, 染色体整合, 摇瓶发酵

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)04-0567-05

**Abstract** The glucoamylase gene (*glaA*) of *Aspergillus niger* CICIM F0410 was cloned, sequenced and expressed. The integrated plasmid pBC-Hygro-*glaA* carrying the *glaA* was constructed and transformed into *A. niger* F0410. Transformants with multiple copies of *glaA* integrated in the chromosome were selected by 150 μg/mL hygromycin B and identified by real-time PCR. Two to three multiples of *glaA* in the chromosome were found to be optimal for higher expression of glucoamylase. Shake-flask fermentation under optimal conditions showed that glucoamylase secreted by the transformant GB0506 was 17.5% higher than parental strain F0410 at the end of fermentation. In conclusion, increasing copy number of *glaA* by chromosomal integration significantly improves the yield of glucoamylase in the industrial strain of *A. niger*.

**Key words** *Aspergillus niger*, glucoamylase, gene cloning, chromosomal integration, shake-flask fermentation

糖化酶, 系统名为淀粉 1,4- $\alpha$ -D-葡聚糖葡萄糖水解酶 (EC. 3.2.1.3) 是淀粉水解过程中的重要酶, 其功能在于从淀粉、糊精或糖原等碳水化合物的非还原性末端释放  $\beta$ -D-葡萄糖<sup>[1]</sup>。各种不同来源的糖

化酶组成糖苷水解酶的第 15 族。到目前为止已经克隆和表达了来源于丝状真菌、酵母和细菌的约 16 种糖化酶, 其中曲霉属来源的糖化酶商业价值最高。传统的单孢子分离、诱变技术和过程优化已经

Received: January 10, 2006; Accepted: April 7, 2006.

This work was granted by the Program of New Century Excellent Talents in Universities, Ministry of Education, China (NCET-04-0497) to Z-X Wang.

\* Corresponding author. Tel: 86-510-85879781; E-mail: zxwang@sytu.edu.cn.

教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-04-0497)

被广泛的用于提高糖化酶产量<sup>[2]</sup>。随着基因工程技术的发展,用分子生物学手段改造糖化酶基因也得到大量的研究。黑曲霉糖化酶基因于1984年第一次被克隆和鉴定<sup>[3]</sup>,此后多次被克隆并成功在酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)<sup>[4]</sup>、镰孢霉(*Fusarium venenatum*)<sup>[5]</sup>和毕赤酵母(*Pichia pastoris*)<sup>[6]</sup>中得到表达。90年代的研究成果表明黑曲霉糖化酶基因的表达很大程度上受转录水平的调控<sup>[7]</sup>。

尽管有报道指出基因重组存在不稳定性,这种技术仍被广泛应用于提高基因表达水平<sup>[8]</sup>。目前,通过基因重组提高糖化酶工业生产菌株的生产能力国内还未见报道。在本研究中,我们克隆了一株糖化酶工业生产菌株的糖化酶基因,并通过筛选获得了携多拷贝糖化酶基因的重组黑曲霉,有效地提高了糖化酶的生产能力。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒** 黑曲霉 CICIM F0410(*Aspergillus niger* CICIM F0410),由江南大学中国高校工业微生物资源和信息中心保藏,是经过多次物理和化学诱变获得的一株糖化酶生产菌株;质粒 pBC-Hygro 由法国 P. Silar 教授惠赠,携带潮霉素 B 抗性基因(*hph*),用作克隆和表达载体;大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109 用作克隆宿主菌。

**1.1.2 培养基和培养方法** 黑曲霉 F0410 的培养采用淀粉(TZ)培养基(每升含有 3g 牛肉膏、10g 蛋白胨、2g 酵母抽提物、2g NaCl、20g 淀粉、17g 琼脂, pH 5.8),在 34℃ 培养 72~120h,在 3~5d 内始终观察菌落形态,标准形态灰白色,凹型状。

摇瓶发酵培养基:每升含有 30g 玉米浆、30g 硝酸铵、100g 葡萄糖, pH 5.5。

大肠杆菌 JM109 培养采用 LB 培养基<sup>[9]</sup>,必要时补加终浓度为 35μg/mL 氯霉素,培养在 37℃ 进行。

**1.1.3 主要试剂** T4 DNA 连接酶、*Pfu* DNA 聚合酶、DNA 限制性内切酶 *Eco*R I、*Sma* I 和 *Hind* III 均为上海生工生物工程技术有限公司产品;SYBR-Green I 为上海闪晶分子生物科技有限公司产品;PCR 产物(小量)纯化试剂盒为上海博太克生物工程有限公司产品;抗生素 hygromycin B 为 InvivoGen 公司产品。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因的克隆** 根据 NCBI 公布的黑曲霉糖化酶基因设计一对引物:AN-GA-1(5'-TACC

TGGCGACCTATGACTATGGCAC-3')和 AN-GA-2(5'-GGTTCGATTACAATCACATGACTTG GC-3')。以黑曲霉 F0410 染色体 DNA 为模板扩增糖化酶基因,PCR 采用 *Pfu* DNA 聚合酶,在 95℃ 变性 5min 后,进行 35 个循环,每个循环的条件为 94℃ 变性 30s, 54℃ 退火 1min, 68℃ 延伸 4min,最后在 68℃ 延伸 10min。将扩增的 PCR 产物连接到质粒 pBC-Hygro 的 *Sma* I 位点,构建重组质粒 pBC-Hygro-*glaA* 用于序列测定和转化。

**1.2.2 PCR 产物的序列测定** DNA 测序采用双脱氧核苷酸链终止法,由 ABI PRISM 3200 序列测定系统(Applied Biosystems Co., Foster City, USA)完成。序列比对和同源性分析采用 DNAMAN 软件(Version 5.2.2, Lynon BioSoft)和 BLAST 网络资源(National Center for Biotechnology Information, USA)进行分析。

**1.2.3 原生质体转化** 重组质粒 pBC-Hygro-*glaA* 转化黑曲霉 F0410 采用 PEG-原生质体法<sup>[10]</sup>:收集培养 4d 的菌丝体,加入 1mol/L 山梨醇配置 1% 蜗牛酶, 1% 纤维素酶, 0.1% 裂解酶的混合酶,在 30℃ 裂解 2.5~3h 制备原生质体。200μL 新鲜制备的原生质体( $8.5 \times 10^5$  个)和 10μg pBC-Hygro-*glaA* 在转化缓冲液(1mol/L 山梨醇, 10mmol/L CaCl<sub>2</sub>, 10mmol/L Tris-HCl; pH 7.5)和 25% PEG8000 存在的条件下进行转化,添加 1mol/L 山梨醇和 150μg/mL 潮霉素的 TZ 平板用于筛选转化子。

**1.2.4 转化子的筛选和稳定性研究** 挑取转化子至潮霉素浓度为 225~300μg/mL 的 TZ 平板,34℃ 培养 3d,始终观察菌落形态和透明圈大小。挑单菌落接入 CD 培养基<sup>[11]</sup>,34℃ 培养 4~6d 制备种子液。在发酵培养基中接入 8% 种子液,34℃,220r/min 摇床发酵 120~144h,三角瓶装液量为 50mL/250mL 三角瓶,每 24h 取样测定酶活力。

为了考察转化子的稳定性,将其在不加抗性的 TZ 培养基传代 5 次,每传一代都进行潮霉素抗性稳定性研究,同时进行摇瓶发酵测定酶活力。

**1.2.5 酶活力测定方法** 糖化酶酶活测定按文献[12]方法略有改动:反应管加入 2% 的可溶性淀粉 1mL 和 50mmol/L 的乙酸钠缓冲液 0.2mL,在 40℃ 保温 5min 后,加入 80μL 稀释适当倍数的酶液在 40℃ 准确反应 2min,用 200g/L NaOH 终止反应,释放的葡萄糖用葡萄糖酶电极测定<sup>[13]</sup>。于 40℃、pH 4.6 的条件下,1h 分解可溶性淀粉产生 1mg 葡萄糖所需要的糖化酶定义为一个酶活力单位。

**1.2.6 定量 PCR 转化子在染色体整合的糖化酶基**

因拷贝数通过相对定量 PCR 来检测<sup>[14]</sup>。根据黑曲霉 F0410 糖化酶基因的测序结果设计引物扩增一段大小为 600bp 的片段: DL-1 (5'-CAGCATCATTACACCTCAGCA-3') 和 (DL-2 5'-AGAACATACAAGCAGCCACTG-3')。采用 SYBR Green I 作荧光染料, 稀释染色体 DNA 至相同浓度 (5ng) 作模板, 由 MJ Research PTC-200 型定量 PCR 仪 (MJ, USA) 完成, 每个样做 3 个平行反应。

## 2 结果

### 2.1 重组质粒 pBC-Hygro-*glaA* 的构建

以黑曲霉 F0410 的染色体为模板进行 PCR 扩增, 获得了约 3.3kb 的 DNA 片段, 纯化该扩增产物并进行测序和比对分析。扩增产物为 3327 bp, 其中糖化酶编码基因为 2167 bp, 推衍得到的氨基酸序列有 640 个氨基酸残基, 含有一个由 18 个氨基酸残基组成的信号肽序列。该糖化酶与曲霉属来源的其它糖化酶有很高的同源性, 与 NCBI 上公布的黑曲霉 X00712 糖化酶氨基酸序列相比有一个氨基酸位点的改变: 264(R→S), 测序结果表明这个位点的差异不是在基因操作过程产生的, 而是本来就存在的。

PCR 扩增出的 *glaA* 基因片段经试剂盒纯化后克隆到载体 pBC-Hygro 的 *Sma*I 位点, 构建重组质粒 pBC-Hygro-*glaA* (图 1), 并进行酶切和测序验证。

### 2.2 糖化酶高产菌株的筛选

以黑曲霉 F0410 为出发菌株制备原生质体, 用

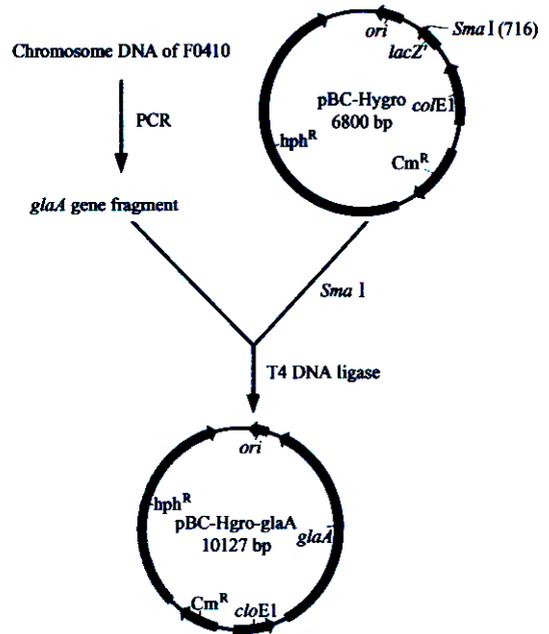


图 1. 重组质粒 pBC-Hygro-*glaA* 的构建

Fig. 1 Construction of pBC-Hygro-*glaA* for chromosomal integration

*hph*<sup>R</sup>: hygromycin B resistance gene; *Cm*<sup>R</sup>: chloramphenicol resistance gene.

重组质粒 pBC-Hygro-*glaA* 进行 PEG-原生质体转化, 添加 1mol/L 山梨醇和 150 $\mu$ g/mL 潮霉素的 TZ 平板用于筛选转化子。经多次转化共获得 123 株转化子。所有转化子通过在添加 150 $\mu$ g/mL 潮霉素的淀粉琼脂平板 (TZ) 上形成的透明圈进行初筛, 然后通过摇瓶发酵测定酶活力进行筛选。新菌株出现 4 种不同

表 1 典型转化菌株与黑曲霉 F0410 的比较

Table 1 Comparison between *A. niger* F0410 and its derived typical transformants

Parameters	F0410	Transformants			
		DH	GB	MH	X B
Colonial morphology					
Colony diameter /mm	2.0	13.0	2.0	2.0	0.5
Halo diameter /mm	11.0	25.0	12.5	10.0	3.0
Growth <sup>a</sup>	No growth	Growth	Rapid growth	Slow growth	Always small
Glucosylase activity <sup>b</sup>	100.0%	114.5%~117.3%	115.2%~118.7%	81.9%~99.0%	79.0%

a: 在 34 $^{\circ}$ C 的培养箱中, 菌株在添加 300 $\mu$ g/mL hygromycin B 的 TZ 培养基上培养 96 h。

b: 以黑曲霉 F0410 144h 的发酵过滤液测得的糖化酶活力计为 100%。

的菌落形态,与出发菌株 F0410 比较如表 1 所示。

菌落形态为 DH 和 GB 的转化子在初筛时表现出优势,糖化酶活力与出发菌株相比有明显的提高,但 DH 在传代后会恢复到出发菌株的形态,糖化酶活力也表现不稳定,因此选择 6 株 GB 型转化子进行摇瓶发酵,并通过相对定量 PCR 考察它们染色体上整合的 *glaA* 基因拷贝数。结果如表 2 所示,在相同的培养条件下,转化子发酵产生的糖化酶活力与出发菌株相比有了明显的提高,在染色体整合 2~3 倍的糖化酶基因对糖化酶的过量合成是适宜的,糖化酶的活力比出发菌株提高了 12.7%~23%,当在染色体整合的糖化酶基因拷贝数达到出发菌株的 8 倍时,糖化酶的活力仅提高了 6%。

表 2 黑曲霉及其转化子糖化酶活力与基因拷贝数之间的关系

Table 2 The relationship of glucoamylase activities and *glaA* copies in *A. niger* and its derived transformants

Strains	Relative activities, %	Ct <sup>a</sup>	2 <sup>-ΔCt</sup>
F0410	100.0	24.04	1.00
GB0501	119.2	22.46	2.98
GB0502	104.7	23.64	1.32
GB0503	114.8	22.92	2.17
GB0504	112.7	22.62	2.68
GB0505	106.1	20.99	8.28
GB0506	123.0	22.89	2.20

a: Ct 值的含义是:每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数。每个模板的 Ct 值与该模板的起始拷贝数的对数存在线性关系,低 Ct 值意味着高浓度的起始模板量,2<sup>-ΔCt</sup> 方法进行相对定量分析<sup>[14]</sup>。

为了考察转化菌株的稳定性,转化子 GB0506 在不加抗性的 TZ 培养基传代 5 次,每传一代都随机挑取 30 个单菌落至添加 150μg/mL 潮霉素的 TZ 选择性培养基上进行潮霉素抗性稳定性研究,同时进行摇瓶发酵测定酶活力。所挑选的单菌落都能够在抗性培养基上生长,糖化酶活力也表现出良好的稳定性(表 3)。

表 3 *A. niger* GB0506 的稳定性研究

Table 3 Stability research of *A. niger* transformant GB0506

Parameters	Number of generation				
	1	2	3	4	5
Resistance stability <sup>a</sup>	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%	100.0%
Glucoamylase activity <sup>b</sup>	100.0%	102.4%	100.1%	101.5%	99.8%

a: 菌株在不加抗性的 TZ 培养基传代并随机挑选 30 个单菌落至添加 150μg/mL 潮霉素的 TZ 培养基培养。

b: *A. niger* GB0506 第一代的糖化酶活力计为 100%。每个值都是 3 份平行样的平均值。

### 2.3 重组黑曲霉过量合成糖化酶

对重组菌 GB0506 进行摇瓶条件优化,考察了不同的培养基及摇瓶条件对糖化酶产量的影响。最

优的摇瓶发酵条件是 30g/L 玉米浆,30g/L 硝酸铵和 100g/L 工业葡萄糖,培养基 pH 5.5,接种量为 8%。与其它碳源相比,用葡萄糖作为唯一碳源可以获得最高的糖化酶活力(数据未列出)。在优化条件下对重组菌 GB0506 和出发菌株 F0410 进行摇瓶发酵,在整个发酵过程中,GB0506 的糖化酶活力稳定高于 F0410(图 2),在 144 h 发酵终了时,转化子 GB0506 的糖化酶活力比出发菌株 F0410 提高了 17.5%。

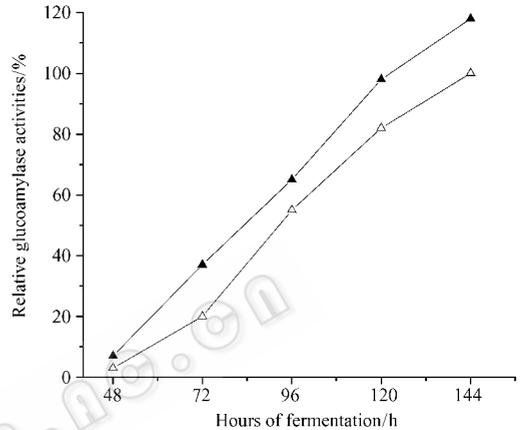


图 2 黑曲霉 F0410(△)和转化菌株 GB0506(▲) 250mL 摇瓶发酵进程曲线

Fig. 2 Time course of glucoamylase activities of *A. niger* F0410 (△) and *A. niger* transformant GB0506 (▲) in 250mL shake flask.

### 3 讨论

通过基因重组或再转化的方法在黑曲霉染色体引入多拷贝的糖化酶基因可以提高糖化酶产量。Verdoes<sup>[15]</sup>研究了糖化酶基因拷贝数与表达量的关系,结果显示在 20 个基因拷贝数之内,糖化酶的表达水平得到提高(由 50mg/mL 提高到 900mg/mL),但随着基因拷贝数的继续增加,糖化酶表达出现很大程度的下降,在一些菌株中还发现了基因不稳定现象,表现为基因拷贝的丢失,对转化子 Southern 杂交的分析表明新引入的糖化酶基因发生了重排。Swift<sup>[16]</sup>对携带有 20 个糖化酶基因拷贝的重组菌 *A. niger* BI 进行了糖化酶发酵研究,在其最大生长速率时糖化酶的产量达到 15.0mg/(g·h),Ryszka<sup>[17]</sup>对整合了多拷贝糖化酶基因的重组菌进行了糖化酶发酵研究。对于液态发酵,重组菌 *A. awamori* A.a.2/2 和 *A. niger* A.n.20 的糖化酶活力是出发菌株的 2 倍,对于固态发酵,重组菌 *A. awamori* A.a.14 的糖化酶活力比出发菌株提高了 85%。

本研究中,我们克隆了糖化酶生产菌株黑曲霉 F0410 的糖化酶基因,并获得了携多拷贝 *glaA* 的黑曲霉转化菌株,有效地提高了糖化酶的生产能力(表 2 图 2)。经 33t 发酵罐中试实验,重组基因工程菌 GB0506 糖化酶发酵水平达 51 000 单位(数据未显示)。结果表明在工业菌株 *A. niger* F0410 染色体整合多拷贝的糖化酶基因可以提高糖化酶的活力,其中在染色体整合 2~3 倍糖化酶基因对糖化酶的过量合成是适宜的(表 2),但研究也发现,糖化酶的产量与染色体整合的 *glaA* 拷贝数不呈线性关系,这可能是由于基因的整合位点、转录调节蛋白的数量等因素也限制了糖化酶基因的分泌表达<sup>[15]</sup>。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] Bui DM, Kunze I, Forster S *et al.* Cloning and expression of an *Arxula adenivorans* glucoamylase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1996, **44**: 610 - 619
- [ 2 ] Ford C. Improving operating performance of glucoamylase by mutagenesis. *Current Opinion in Biotechnology*, 1999, **10**(4): 353 - 357
- [ 3 ] Boel E, Hansen MT, Hjort I *et al.* Two different types of intervening sequences in the glucoamylase gene from *Aspergillus niger*. *The EMBO Journal*, 1984, **3**(7): 1581 - 1585
- [ 4 ] Shibuya I, Tamura G, Shima H *et al.* Construction of an alpha-amylase/glucoamylase fusion gene and its expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1992, **56**(6): 884 - 889
- [ 5 ] Marilyn GW, Geoffrey DR, Jeff S *et al.* Evolution of a recombinant (glucoamylase-producing) strain of *Fusarium venenatum* A3/5 in chemostat culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 2001, **73**: 146 - 156
- [ 6 ] Guo D(郭德军), Liu Z(柳增善). Secretory expression of *GAI* gene of *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*. *Biotechnology(生物技术)*, 2005, **15**(3): 3 - 5
- [ 7 ] Verdoes JC, Punt PJ, Schrickx JM *et al.* Glucoamylase overexpression in *Aspergillus niger*: molecular genetic analysis of strains containing multiple copies of the *glaA* gene. *Transgenic Research*, 1993, **2**(2): 84 - 92
- [ 8 ] Fowler T, Berka RM, Ward M. Regulation of the *glaA* gene of *Aspergillus niger*. *Current Genetics*, 1990, **18**(6): 537 - 545
- [ 9 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2<sup>nd</sup> ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [ 10 ] Yao TI(姚婷婷), Wang ZX(王正祥). Preparation, regeneration and transformation of protoplasts from *Aspergillus niger*. *Journal of Food and Biotechnology(食品与生物技术学报)*, 2006, **25**: (in press)
- [ 11 ] Youssuf A, Gherbawy MH. Effect of gamma irradiation on the production of cell wall degrading enzymes by *Aspergillus niger*. *International Journal of Food Microbiology*, 1998, **40**: 127 - 131
- [ 12 ] Yamasaki Y, Suzuki Y, Ozama J. Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Penicillium oxalicum*. *Agricultural Biological and Chemistry*, 1977, **41**: 755 - 762
- [ 13 ] Shi J(史建国), Zhou FX(周风臻), Yang MH(杨明慧) *et al.* Study of glucoamylase activity assay by the glucose enzyme electrode. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 1996, **12**(Supplement): 226 - 231
- [ 14 ] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. *Methods*, 2001, **25**(4): 402 - 408
- [ 15 ] Verdoes JC, van Diepeningen AD, Punt PJ *et al.* Evaluation of molecular and genetic approaches to generate glucoamylase overproducing strains of *Aspergillus niger*. *Journal of Biotechnology*, 1994, **36**(2): 165 - 175
- [ 16 ] Swift RJ, Wiebe MG, Robson GD *et al.* Recombinant glucoamylase production by *Aspergillus niger* B1 in chemostat and pH auxostat cultures. *Fungal Genetics and Biology*, 1998, **25**(2): 100 - 109
- [ 17 ] Ryszka L, Czajak J, Sawicka-Zukowska R *et al.* Glucoamylase production using transformants of *Aspergillus* constructed by genetic engineering methods in liquid and solid medium cultures. *Prace Instytutowi Laboratoriow Badawczych Przemyslu Spozywczego*, 2002,