



构巢曲霉内切甘露聚糖酶在毕赤酵母中的表达及重组蛋白质的表征

张鹏飞¹, 李小连², 王自强², 袁向华¹, 李建军^{2,3*}, 杜昱光^{2,3*}

¹四川师范大学生命科学学院, 四川 成都 610101

²中国科学院过程工程研究所, 生化工程国家重点实验室, 国家生化工程技术研究中心(北京), 北京 100090

³中国科学院过程工程研究所, 全军生物药制造与剂型工程重点实验室, 北京 100090

摘要:【目的】内切甘露聚糖酶是一类重要的半纤维素酶, 能够有效水解半纤维素的第二大组分甘露聚糖, 已广泛应用于工业生物技术领域。【方法】本文对来源于腐生真菌构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的一个内切甘露聚糖酶在毕赤酵母中进行过表达及详细的酶学性质研究。【结果】该甘露聚糖酶在摇瓶和发酵罐条件下都成功获得表达, 发酵罐条件下的蛋白质表达量高达 3.9 mg/mL; 该酶的最适 pH 和温度分别为 4.0 和 60 °C, 在 pH 5.0–9.0 之间表现出了很好的稳定性; 在温度 ≤40 °C 时, 该酶非常稳定, 当温度 ≥60 °C, 该酶的稳定性大大降低; Co²⁺和 Zn²⁺促进了该酶的活性, 而 Pb²⁺、Cu²⁺、Mn²⁺等金属离子表现出了一定的抑制作用。【结论】该构巢曲霉来源的内切甘露聚糖酶能在毕赤酵母中高效表达, 表现出了一定的耐酸、耐碱及耐热等性能, 具有开发为商品酶的潜力, 为深入开发构巢曲霉来源的其他糖苷酶奠定了基础。

关键词: 构巢曲霉, β-1,4-甘露聚糖酶, 酶学性质, 二价金属离子, 发酵

甘露聚糖类物质作为半纤维素的第二大组分, 在自然界里广泛存在^[1-2]。甘露聚糖的主链主要是以 1,4-β-D-吡喃甘露糖苷键连接而成的线性结构, 在线性多糖的侧链上有葡萄糖基、半乳糖基等取代基, 形成甘露聚糖、葡甘露聚糖、半乳甘露聚糖等。β-1,4-甘露聚糖酶(β-1,4-mannanase,

EC.3.2.1.78)是一类能够水解甘露聚糖、葡甘露聚糖、半乳甘露聚糖等以 β-1,4-D-甘露吡喃糖为主链的甘露聚糖的内切水解酶, 属于半纤维素酶类^[1-6]。按照最适 pH 值的不同, β-1,4-甘露聚糖酶可分为酸性、中性、碱性等^[3-4]。根据氨基酸序列及蛋白质的结构特点(即按照糖活性酶数据库: CAZy

基金项目: 国家“863 计划”(2014AA093511)

*通信作者。李建军, Tel/Fax: +86-10-82545039, E-mail: jjli@ipe.ac.cn; 杜昱光, Tel: +86-10-82545070, Fax: +86-10-82545039, E-mail: ygdu@ipe.ac.cn

收稿日期: 2017-04-14; 修回日期: 2017-06-07; 网络出版日期: 2017-07-21

Database, Carbohydrate-Active enZymes Database), β -1,4-甘露聚糖酶被划分为糖苷水解酶家族 5、9、26、44、113 等^[7]。 β -1,4-甘露聚糖酶的应用非常广泛,已被用于食品、饲料、医药、造纸、纺织印染、石油开采、生物能源、生物基化学品等诸多领域,具有很大的应用价值^[1-6]。

β -1,4-甘露聚糖酶来源广泛,主要存在于细菌、真菌、植物以及无脊椎动物中^[1-6,8-12]。微生物是 β -1,4-甘露聚糖酶的重要来源,具有活力高、成本低、来源稳定、提取方便等优点。但天然微生物所产的 β -1,4-甘露聚糖酶产量低,不能满足工业化生产的需要。随着分子生物学的发展,许多 β -1,4-甘露聚糖酶基因已被成功克隆并进行了异源表达(大肠杆菌、芽孢杆菌、酿酒酵母、毕赤酵母、克鲁维酵母等表达系统)、表征^[8-9,13-16]。

腐生真菌构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)能降解多种多糖,和基因组测序的结果一致:该真菌编码多种降解多糖的基因^[17-18]。来源于构巢曲霉的 72 个糖苷酶已被 Bauer 等克隆并成功在毕赤酵母中表达,但是 Bauer 等仅对部分糖苷酶进行了简单表征^[18]。

由于 β -1,4-甘露聚糖酶的广泛应用,寻找新型、高效、稳定的 β -1,4-甘露聚糖酶一直是工业酶制剂的热点之一。构巢曲霉一共编码了 4 个 β -1,4-甘露聚糖酶,其中 β -1,4-甘露聚糖酶 C6 (GenBank accession number AN3358.2)对刺槐豆胶(locust bean gum)和瓜尔豆树胶(gum guar)表现出了最高酶活^[18]。本文对该 β -1,4-甘露聚糖酶进行了表达(摇瓶与发酵罐)与详细表征(最优 pH 与温度, pH 与热稳定性,二价金属离子对酶活的影响)。另外,虽然构巢曲霉编码了 72 个糖苷酶基因,但是对构巢曲霉来源糖苷酶研究的报道还比较少。因此,本文对 β -1,4-甘露聚糖酶 C6 的酶学性质研究将为

构巢曲霉来源其他糖苷酶的深入研究与应用开发奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试剂

无氨基酸酵母氮源(Yeast Nitrogen Base W/O Amino acid, YNB)来自 Difco 公司;刺槐豆胶(locust bean gum, LBG)购自 Sigma 公司;其余试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 菌株与质粒

过表达来源于构巢曲霉的内切- β -1,4-甘露聚糖酶 C6 (GenBank accession number AN3358.2)的毕赤酵母来自美国真菌遗传保藏中心(Fungal Genetics Stock Center, FGSC)。

1.3 培养基

1.3.1 YPD 活化培养基(g/L): 葡萄糖 20, 蛋白胨 20, 酵母膏 10; YPD 平板, 琼脂 15。

1.3.2 BMGY 生长培养基(g/L): YNB 13.4, 甘油 10, 生物素 0.0004, 磷酸钾缓冲溶液 0.1 mol/L, pH 6.0。

1.3.3 BMMY 诱导培养基(g/L): YNB 13.4, 甲醇 0.5% (V/V), 生物素 0.0004, 磷酸钾缓冲溶液 0.1 mol/L, pH 6.0。

1.3.4 发酵罐发酵培养基: (采用无机盐培养基, g/L)^[19], H₃PO₄ 26.70, CaSO₄ 0.93, K₂SO₄ 18.20, MgSO₄·7H₂O 14.90, KOH 4.13, 甘油 40 mL, PTM1 4.35 mL, pH 5.0, 1.0×10⁴ Pa 灭菌 30 min。

1.3.5 PTM1 微量元素溶液(g/L): CuSO₄·5H₂O 6.00, KI 0.08, MnSO₄·H₂O 0.50, NaMoO₄·2H₂O 0.20, H₃BO₃ 0.02, CoCl₂ 0.50, ZnCl₂ 20.00, FeSO₄·7H₂O 65.00, Biotin 0.20, H₂SO₄ 5.00, 混匀过滤除菌, 4 °C 避光保存。

1.3.6 甘油补料培养基:甘油 50% (*V/V*), PTM1 4.35 mL/L。

1.3.7 甲醇补料培养基:甲醇 100% (*V/V*), PTM1 4.35 mL/L。

1.4 蛋白质的摇瓶表达

1.4.1 平板培养:从甘油管中接菌并在 YPD 平板上划线, 30 °C 培养 3–4 d。

1.4.2 种子培养:从 YPD 平板上挑单菌落并接种到 BMGY 中, 250 mL 三角瓶装 50 mL 培养基, 30 °C、200 r/min 回转式摇床培养过夜。

1.4.3 诱导产酶:当 OD_{600} 达到 3–4 左右时, 离心收集全部菌体, 转入 BMMY 中, 使 OD_{600} 在 1.0 左右, 250 mL 挡板三角瓶(baffled flasks)装 50 mL 培养基, 30 °C、200 r/min 培养, 每 24 h 补加 0.5 % (*V/V*)甲醇, 诱导 120 h。

1.5 蛋白质的发酵罐表达

1.5.1 种子培养:从 YPD 平板上挑单菌落并接种到 YPD 培养基中, 30 °C、250 r/min 振荡培养 20 h, 得到一级种子, 再将一级种子 10%接种到 1 L 的 YPD 培养基中, 30 °C、250 r/min 振荡培养 10 h, 得到二级种子。

1.5.2 C6 的发酵罐发酵培养:将二级种子按 10% 的接种量接种至 10 L 发酵罐中, 初始培养参数为: 转速 200 r/min, 培养温度 30 °C, pH 5.0。随着菌体的生长, DO (Dissolved oxygen, 溶氧量)逐渐下降, 通过调节搅拌转速、通气量和罐压, 使 DO 维持在 20%–30%, 发酵过程中采用氨水自动控制 pH 值在 5.0。当 DO 回升时, 按照 20–36 mL/min 的速度流加甘油, 使菌体继续生长至湿重 200 g/L 左右, 停止流加甘油。当 DO 回升至 100%时, 继续饥饿培养 30 min, 然后流加甲醇进行诱导, 流加速度为: 0–4 h, 3.5 mL/(L·h); 5–24 h, 逐渐提

高流加速度到 10 mL/(L·h), 并一直维持该速度至发酵结束。发酵过程中, 每隔一定时间取样检测, 测定发酵液的光密度 OD_{600} 及菌体湿重, 并留上清用于蛋白质的 SDS-PAGE 及活性分析和观察。

1.6 OD_{600} 及细胞湿重的测定

发酵液稀释后于波长 600 nm 处进行比色测定, $OD_{600} = OD_{600}$ 读数 × 稀释倍数; 取 4 mL 发酵液在 10000 r/min 离心 10 min, 吸尽上清液后, 称得的细胞重量换算为每升的克数即细胞湿重。

1.7 SDS-PAGE(聚丙烯酰胺凝胶电泳)检测

为了检测内切- β -1,4-甘露聚糖酶 C6 的表达情况, 采用 SDS-PAGE 检测, 浓缩胶浓度为 5%, 分离胶浓度为 12%, 用考马斯亮蓝 G-250 染色。

1.8 蛋白质浓度测定

参照 Bradford 的方法采用考马斯亮蓝 G-250 法进行可溶性蛋白质含量测定。以牛血清白蛋白 (BSA)作为标准蛋白质, 配制标准溶液, 制作标准曲线^[20]。

1.9 酶活分析

参考饲料行业对甘露聚糖酶的酶活分析方法, 对甘露聚糖酶 C6 进行酶活分析。使用 0.3% (*W/V*)的 LBG (locust bean gum, 刺槐豆胶) (Sigma G0753)作为底物, 加入一定量、稀释过的酶, 反应体积为 1 mL (0.5 mL LBG, 0.1 mL 稀释酶液, 0.4 mL pH 5.5 醋酸钠缓冲溶液), 在 37 °C、pH 5.5 (0.1 mmol/L 醋酸钠)的条件下反应 15 min, 加入 1.5 mL DNS (3,5-二硝基水杨酸)试剂终止反应, 沸水浴加热 5 min, 用自来水冷却至室温, 然后加入 2.5 mL 蒸馏水, 以标准空白样为空白对照, 在 540 nm 处测定吸光度。根据甘露糖的标准曲线计算还原糖的含量, 并计算甘露聚糖酶的比酶活。1

个酶活单位 U 定义为每分钟释放的还原糖等同 1 μmol 甘露糖所需要的酶量。所有的酶活测定都进行了 3 次平行试验。

1.10 最适反应 pH 与 pH 稳定性

使用 0.3% (*W/V*) 的 LBG 作为底物, 在 50 mmol/L、pH 2.0–12.0 的 B&R (Britton and Robinson) 缓冲溶液中测定 C6 的最优反应 pH。不同 pH 条件下的酶活测定都在 37 °C 反应 15 min, 分别计算比酶活。

C6 的 pH 稳定性按照下面的过程测定: 首先把 C6 在 4 °C、不同 pH 值(pH 2.0–11.0) 的缓冲溶液中分别孵育 1、5、24、120 h, 然后立即在标准条件下(最优 pH 4.0、37 °C, 反应 15 min) 进行酶活分析。把 C6 在最优 pH 4.0 时的初始比酶活作为 100%, 在不同 pH、时间点的残余比酶活和 pH 4.0 时的初始酶活进行比较, 即得到不同 pH、时间点的残余酶活的百分比。

1.11 最适反应温度与热稳定性

使用 0.3% (*W/V*) 的 LBG 作为底物, 在 50 mmol/L、最优 pH 4.0 的 B&R 缓冲溶液中测定 C6 的最优反应温度。不同温度下的酶活分析都进行 15 min, 分别计算比酶活。

C6 的热稳定性按照下面的过程测定: 首先把 C6 在不同温度(40、50、60、70 °C 等)、一定 pH (C6 最稳定) 的缓冲溶液中分别孵育 15 min、30 min、1 h 及 2 h, 然后立即在标准条件下(最优 pH 4.0、37 °C, 反应 15 min) 进行酶活分析。如果 C6 在某一温度失活速度太快, 将在该温度孵育 5、10 min 等。把 C6 在在标准条件下的初始比酶活作为 100%, 在不同温度、时间点的残余比酶活和标准条件时的初始酶活进行比较, 即得到不同温度、时间点残余酶活的百分比。

1.12 二价金属离子对酶活的影响

二价金属离子对 C6 酶活影响的分析过程: 在上述标准酶活分析体系中, 分别加入 1 mmol/L 的二价金属离子 [$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, NiSO_4 , MnSO_4 , CuSO_4 , BaCl_2 , ZnSO_4 , CoCl_2 , CaCl_2 , MgCl_2 , FeSO_4], 在标准条件下(最优 pH 4.0、37 °C, 反应 15 min) 进行酶活分析。把 C6 在标准条件下的初始比酶活作为 100%, 在添加不同金属离子时的比酶活和标准条件时的初始酶活进行比较, 即得到添加不同金属离子时比酶活的百分比。

2 结果和分析

2.1 蛋白质的摇瓶表达

首先在摇瓶中培养过表达甘露聚糖酶 C6 (GenBank accession number AN3358.2) 的毕赤酵母, 用 0.5% (*V/V*) 的甲醇连续诱导 120 h, 进行 SDS-PAGE 分析(图 1)。结果表明, 在 75 kDa 左右出现明显条带。基于该蛋白质的氨基酸序列预测的分子量为 41.8 kDa, 75 kDa 左右条带的分子量远高于预测分子量, 可能是由于在毕赤酵母中表达

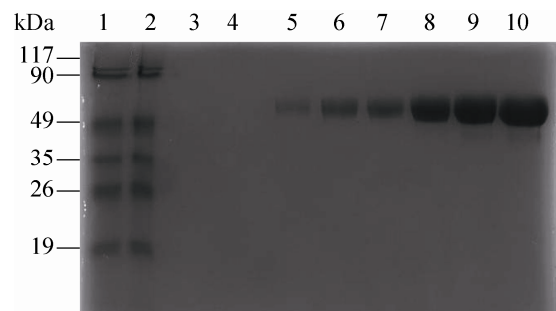


图 1. 摇瓶表达 C6 的 SDS-PAGE 分析

Figure 1. SDS-PAGE analysis of overexpressed C6 in flasks. Lane 1, 2: protein marker; lane 3: induced with methanol for 0 h; lane 4: induced for 6 h; lane 5: induced for 24 h; lane 6: induced for 36 h; lane 7: induced for 48 h; lane 8: induced for 72 h; lane 9: induced for 96 h; lane 10: induced for 120 h.

蛋白质时的糖基化所致^[21]。随着诱导时间的延长, 目的蛋白质的表达量也逐渐增加。并通过酶活分析进一步验证。

2.2 蛋白质的发酵罐表达

我们用 10 L 发酵罐(5 L 发酵液)对甘露聚糖酶 C6 进行了大量表达。菌体的生长曲线如图所示。过表达甘露聚糖酶 C6 毕赤酵母工程菌株的生长曲线如图 2 所示, 菌体湿重和 OD_{600} 的结果一致, 随着发酵时间的延长, 两者都呈现逐渐递增的趋势。当菌体湿重达到 211 g/L 即第 41 h 时开始用甲醇诱导, 连续诱导 76 h。从蛋白质的浓度变化来看(图 3), 随着诱导时间的延长, 蛋白质的表达量呈现逐渐递增的趋势, 117 h 时发酵产量达到 3.9 mg/mL。并进行了酶活分析。

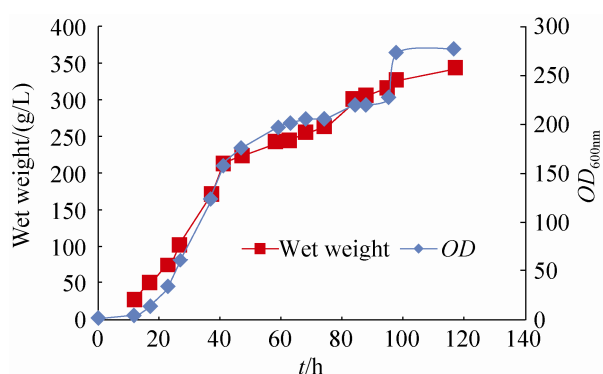


图 2. 过表达 C6 工程菌体的生长曲线

Figure 2. Growth curve of engineered microorganisms overexpressing C6.

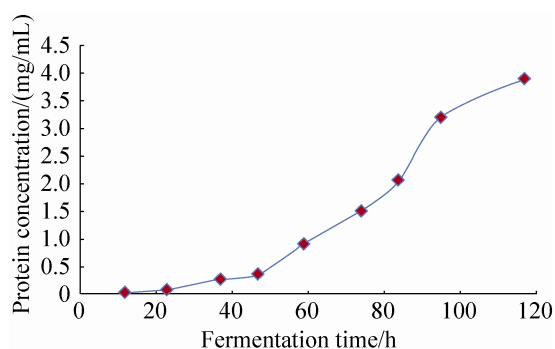


图 3. 蛋白质表达量随时间的变化

Figure 3. Changes of protein concentrations over time.

2.3 蛋白质的酶学性质分析

2.3.1 最适反应 pH 与 pH 稳定性: pH-活性曲线

的结果表明(图 4), pH 4.0 时 C6 表现出了最高酶活, pH 3.0–8.0 时酶活为最高酶活的 50% 以上, pH 2.0 时酶活为最高酶活的 31%, 而当 $pH \geq 9.0$ 时酶活大大降低, pH 11.0 及 pH 12.0 时几乎测不到酶活。因此 pH 对 C6 的活性有非常大的影响, 该酶为一酸性甘露聚糖酶。

pH 稳定性研究发现(图 5), C6 在 pH 3.0–10.0 时表现出了比较高的稳定性; pH 5.0–9.0 时孵育 5 d 后, 酶活仅失去 20% 左右; pH 3.0 和 pH 10.0 时孵育 5 d 后, 酶活丢失 40% 左右; pH 2.0 时孵育 1 h 后, 几乎完全失活; pH 11.0 和 pH 12.0 时的温稳定性也非常差, 孵育 1 h 后, 酶活就失去 60% 以上, 孵育 5 d 后, 只保留 10% 左右的活性。

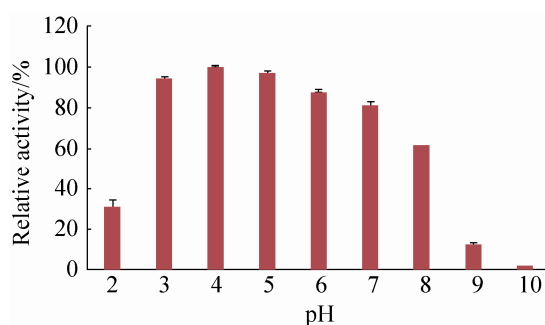


图 4. pH 对酶活的影响

Figure 4. Effects of pH on enzyme activity.

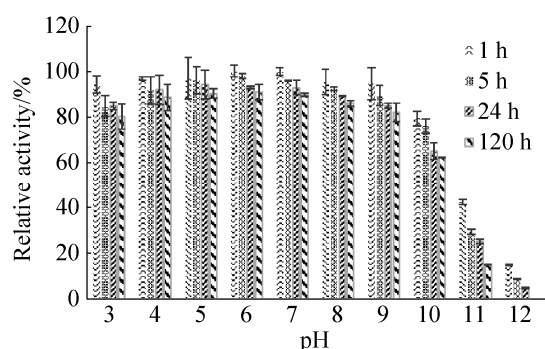


图 5. C6 的 pH 稳定性

Figure 5. Effects of pH on stability of C6.

2.3.2 最适反应温度与热稳定性: 温度对 C6 酶活的影响见图 6。结果发现, 60 °C 时 C6 表现出了最高活性; 40–70 °C 时酶活为最高酶活的 50% 以上; 25–35 °C 时活性为最高酶活的 40% 左右; 在较高温度如 75 °C 和 80 °C 时, 活性迅速降低, 仅为最高活性的 20% 左右。

同时也考察了 C6 的热稳定性(图 7)。C6 在 40 °C 时非常稳定, 孵育 2 h 后, 几乎没有丢失活性; 在 50 °C 时也比较稳定, 孵育 2 h 后, 丢失 20% 左右的活性; 在 60 °C 时, C6 孵育 15 min 后, 失去 40% 左右的初始活性, 而孵育 2 h 后, C6 几乎完全失活; 在 70 °C 时, C6 的失活速度加快, 孵育 15 min 后, 几乎完全失活。

2.3.3 金属离子对酶活的影响: 研究了二价金属离子对 C6 活性的影响(图 8)。结果发现, Co^{2+} 和

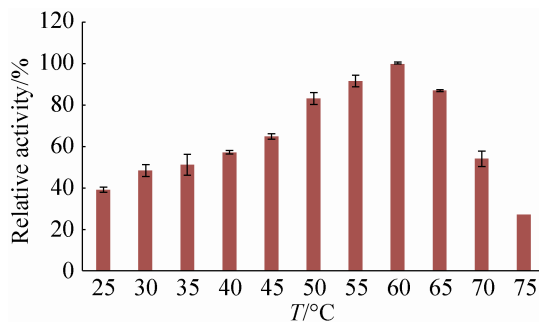


图 6. 温度对酶活的影响

Figure 6. Effects of temperature on enzyme activity.

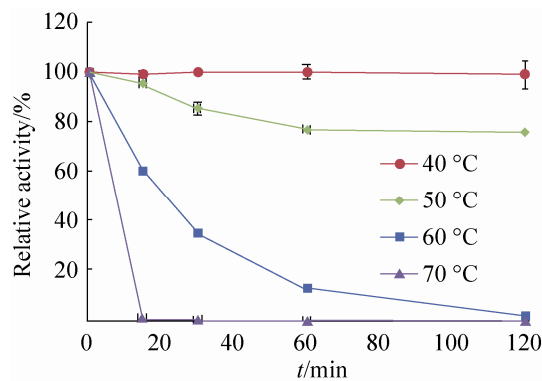


图 7. C6 的热稳定性

Figure 7. Thermal stability of C6.

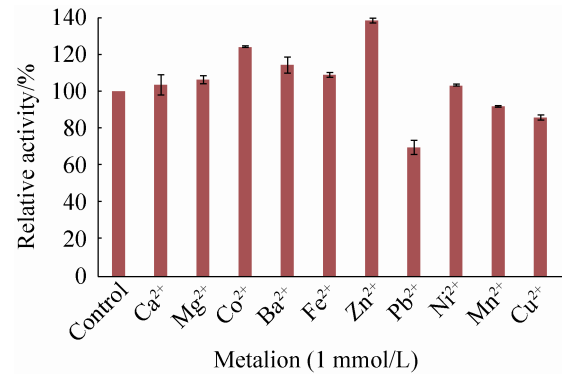


图 8. 金属离子对酶活的影响

Figure 8. Effects of metal ions on enzyme activity.

Zn^{2+} 促进了 C6 的酶活, 尤其 Zn^{2+} , 使酶活提高了 40% 左右; Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 表现出了一定的抑制作用, 尤其 Pb^{2+} , 使酶活降低了 40% 左右; 其他金属离子对酶活没有太大影响。

3 讨论

内切甘露聚糖酶作为一种重要的半纤维素酶, 由于在工业生物技术领域的重要性, 得到普遍重视和深入研究。从产酶菌种的筛选、诱变、诱导表达、纯化等, 到利用基因工程和蛋白质工程技术, 在基因克隆、蛋白质表达、酶学性质及蛋白质工程等方面进行了广泛的研究^[1–6]。

文献对来源于棘孢曲霉(*Aspergillus aculeatus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、硫色曲霉(*Aspergillus sulphureus*)、齐整小核菌(*Sclerotium rolfii*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、费氏新萨托菌(*Neosartorya fischeri*)、双孢叶腹菌(*Bispora*)等真菌内切甘露聚糖酶的研究已经非常多^[10,14–15,22–26]。相比而言, 对来源于构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)的甘露聚糖酶及其他糖苷酶的研究还比较少。构巢曲霉也是一种重要的丝状真菌, 能够降解多种多糖, 按照基因组序列, 至少编码了 72 种糖苷酶

基因。虽然研究者们已经克隆、表达、纯化了一些来自构巢曲霉的糖苷酶,但是针对这些糖苷酶的酶学性质研究(包括最优 pH 与温度, pH 与热稳定性,金属离子对酶活的影响,等等)还比较少^[18,27-29]。本文比较系统研究了构巢曲霉来源的内切- β -1,4-甘露聚糖酶 C6 (GenBank accession number AN3358.2)的酶学性质。

不同微生物来源的内切甘露聚糖酶表现出了不同的酶学性质。构巢曲霉来源内切- β -1,4 甘露聚糖酶 C6 的最适 pH 为 4.0,属于酸性内切甘露聚糖酶,而文献报道的最适 pH 为 5.5^[18];该酶的最适反应温度为 60 °C,和文献报道的最优温度 52 °C 比较接近^[18];该酶在 pH 5.0-9.0 时表现出了非常高的稳定性,孵育 5 d 后,酶活仅失去 20% 左右;而在强酸和强碱条件下,尤其强碱条件下,稳定性大大降低;该酶在 40 °C 时表现出了非常高的稳定性,但是在 ≥ 60 °C 时该酶的耐热性大大降低。来自嗜酸双孢叶腹菌 MEY-1 的内切甘露聚糖酶的最适 pH 及温度分别为 1.0-1.5 和 65 °C,表现出了很强的嗜酸性,在很宽的 pH 范围(pH 1.0-12.0)及温度 ≤ 60 °C 时非常稳定^[15];来源于嗜热费氏新萨托菌 P1 的内切甘露聚糖酶在 pH 4.0 和 80 °C 表现出了最高活性,在 pH 2.0-12.0 及温度 ≤ 60 °C 时表现出了很高的稳定性^[10];纤维微杆菌属 HY-13 来源的内切甘露聚糖酶在 50 °C 和 pH 6.0 时酶活最高,在 pH 5.5-9.0 时比较稳定,但是在 50 °C 的热稳定性较差^[9]。地衣芽孢杆菌 DSM13 来源的内切甘露聚糖酶的最优反应 pH 及温度分别为 pH 6.0-7.0 和 50-60 °C,在 pH 6.0-9.0 及温度 ≤ 50 °C 时比较稳定^[8]。可以看出,内切甘露聚糖酶的最优 pH 和温度以及 pH 和热稳定性等性能和微生物的来源环境紧密相关,将为内切甘露聚糖酶应用于不同生物技术领域提供指导。

众所周知,金属离子作为一种辅酶因子或抑制因子对酶的水解有很大的影响。本研究发现: Co^{2+} 和 Zn^{2+} 促进了 C6 的酶活,尤其 Zn^{2+} ,使酶活提高了 40% 左右;而 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Mn^{2+} 等金属离子对 C6 有一定的抑制作用, Pb^{2+} 使酶活降低了 40% 左右。同样有研究报道 Co^{2+} 促进了来源于嗜酸真菌双孢叶腹菌 MEY-1 及纤维微杆菌属 HY-13 的内切甘露聚糖酶的活性,但是对来自嗜热真菌费氏新萨托菌 P1 的内切甘露聚糖酶有抑制作用,而对环状芽孢杆菌 CGMCC1554 来源的内切甘露聚糖酶活性没有影响^[15,9-10,29]; Zn^{2+} 促进了嗜酸双孢叶腹菌 MEY-1 来源内切甘露聚糖酶的酶活,而抑制了来自嗜热费氏新萨托菌 P1、环状芽孢杆菌 CGMCC1554 及纤维微杆菌属 HY-13 的内切甘露聚糖酶的活性^[9-10,15,30]; Pb^{2+} 在较高浓度(10 mmol/L)时对嗜酸双孢叶腹菌 MEY-1 来源的内切甘露聚糖酶有一定的抑制作用^[15]; Cu^{2+} 抑制了来自嗜热真菌费氏新萨托菌 P1、环状芽孢杆菌 CGMCC1554、纤维微杆菌属 HY-13 的内切甘露聚糖酶的活性,促进了嗜酸真菌双孢叶腹菌 MEY-1 来源的内切甘露聚糖酶的酶活^[9-10,15,30]; Mn^{2+} 促进来自嗜热费氏新萨托菌 P1、嗜酸双孢叶腹菌 MEY-1、纤维微杆菌属 HY-13 的内切甘露聚糖酶的活性^[9-10,15]。因此,综合上述结果表明,不同金属离子对内切甘露聚糖酶活性有不同程度的影响,同一种金属离子对不同微生物来源的内切甘露聚糖酶有不同程度的影响。但是,关于金属离子影响内切甘露聚糖酶活性的确切机制仍然不清楚^[31]。

构巢曲霉来源的内切甘露聚糖酶 C6 在毕赤酵母中高效表达,酶活也比较高,并且表现出了一定的耐酸、耐碱及耐热等性能,因此具有开发为商品酶潜力。同时,本研究也将拓宽人们对构

巢曲霉来源糖苷酶的认识,将为构巢曲霉来源其他糖苷酶的深入研究以及应用开发提供指导。

参 考 文 献

- [1] Moreira LRS, Filho EXF. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2008, 79(2): 165–178.
- [2] Gübitz GM, Sachslehner A, Haltrich D. Microbial mannanases: substrates, production, and applications//Himmel ME, Baker JO, Saddler JN. *Glycosyl Hydrolases for Biomass Conversion*. Washington, DC: American Chemical Society, 2001, 769: 239–262.
- [3] 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.
- [4] Dhawan S, Kaur J. Microbial mannanases: an overview of production and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2007, 27(4): 197–216.
- [5] Stålbrand H. Enzymology of endo- β -1,4-mannanases//Whitaker JR, Voragen AJG, Wong DWS. *Handbook of Food Enzymology*. New York: Marcel Dekker, 2003: 961–969.
- [6] Zhao YJ, Xue YF, Ma YH. Recent advances and prospect on structural biology of β -mannanase—a review. *Acta Microbiologica Sinica*, 2009, 49(9): 1131–1137. (in Chinese) 赵月菊, 薛燕芬, 马延和. β -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.
- [7] Henrissat B, Davies G. Structural and sequence-based classification of glycoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology*, 1997, 7(5): 637–644.
- [8] Songsiriritthigul C, Buranabanyat B, Haltrich D, Yamabhai M. Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9: 20.
- [9] Kim DY, Ham SJ, Lee HJ, Cho HY, Kim JH, Kim YJ, Shin DH, Rhee YH, Son KH, Park HY. Cloning and characterization of a modular GH5 β -1,4-mannanase with high specific activity from the fibrolytic bacterium *Cellulosimicrobium* sp. strain HY-13. *Bioresource Technology*, 2011, 102(19): 9185–9192.
- [10] Yang H, Shi PJ, Lu HQ, Wang HM, Luo HY, Huang HQ, Yang PL, Yao B. A thermophilic β -mannanase from *Neosartorya fischeri* P1 with broad pH stability and significant hydrolysis ability of various mannan polymers. *Food Chemistry*, 2015, 173: 283–289.
- [11] Filichkin SA, Leonard JM, Monteros A, Liu PP, Nonogaki H. A novel endo- β -mannanase gene in tomato LeMAN5 is associated with anther and pollen development. *Plant Physiology*, 2004, 134(3): 1080–1087.
- [12] Xu BZ, Sellos D, Janson JC. Cloning and expression in *Pichia pastoris* of a blue mussel (*Mytilus edulis*) β -mannanase gene. *European Journal of Biochemistry*, 2002, 269(6): 1753–1760.
- [13] Sumppunn P, Chaijan S, Isarangkul D, Wiyakrutta S, Meevootisom V. Characterization, gene cloning, and heterologous expression of β -mannanase from a thermophilic *Bacillus subtilis*. *The Journal of Microbiology*, 2011, 49(1): 86–93.
- [14] Setati ME, Ademark P, van Zyl WH, Hahn-Hägerdal B, Stålbrand H. Expression of the *Aspergillus aculeatus* endo- β -1,4-mannanase encoding gene (*man1*) in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expression and Purification*, 2001, 21(1): 105–114.
- [15] Luo HY, Wang YR, Wang H, Yang J, Yang YH, Huang HQ, Yang PL, Bai YG, Shi PJ, Fan YL, Yao B. A novel highly acidic β -mannanase from the acidophilic fungus *Bispora* sp. MEY-1: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2009, 82(3): 453–461.
- [16] Pan X, Zhou JG, Tian A, Le KY, Yuan HY, Xue YF, Ma YH, Lu H. High level expression of a truncated β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5 in *Kluyveromyces cicerisporus*. *Biotechnology Letters*, 2011, 33(3): 565–570.
- [17] Galagan JE, Calvo SE, Cuomo C, Ma LJ, Wortman JR, Batzoglou S, Lee SI, Bastürkmen M, Spevak CC, Clutterbuck J, Kapitonov V, Jurka J, Scaccocchio C, Farman M, Butler J, Purcell S, Harris S, Braus GH, Draht O, Busch S, D'Enfert C, Bouchier C, Goldman GH, Bell-Pedersen D, Griffiths-Jones S, Doonan JH, Yu J, Vienken K, Pain A, Freitag M, Selker EU, Archer DB, Peñalva MÁ, Oakley BR, Momany M, Tanaka T, Kumagai T, Asai K, Machida M, Nierman WC, Denning DW, Caddick M, Hynes M, Paoletti M, Fischer R, Miller B, Dyer P, Sachs MS, Osmani SA, Birren BW. Sequencing of *Aspergillus nidulans* and comparative analysis with *A. fumigatus* and *A. oryzae*. *Nature*, 2005, 438(7071): 1105–1115.

- [18] Bauer S, Vasu P, Persson S, Mort AJ, Somerville CR. Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States America*, 2006, 103(30): 11417–11422.
- [19] http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pichiaferm_prot.pdf.
- [20] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [21] Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular Recognition*, 2005, 18(2): 119–138.
- [22] Christgau S, Kauppinen S, Vind J, Kofod LV, Dalbøge H. Expression cloning, purification and characterization of a β -1,4-mannanase from *Aspergillus aculeatus*. *Biochemistry and Molecular Biology International*, 1994, 33(5): 917–925.
- [23] Regalado C, García-Almendárez BE, Venegas-Barrera LM, Téllez-Jurado A, Rodríguez-Serrano G, Huerta-Ochoa S, Whitaker JR. Production, partial purification and properties of β -mannanases obtained by solid substrate fermentation of spent soluble coffee wastes and copra paste using *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2000, 80(9): 1343–1350.
- [24] Chen XL, Cao YH, Ding YH, Lu WQ, Li DF. Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* β -mannanase in *Pichia pastoris*. *Journal of Biotechnology*, 2007, 128(3): 452–461.
- [25] Gübitz GM, Hayn M, Urbanz G, Steiner W. Purification and properties of an acidic α -mannanase from *Sclerotium rolfsii*. *Journal of Biotechnology*, 1996, 45(2): 165–172.
- [26] Stålbrand H, Saloheimo A, Vehmaanperä J, Henrissat B, Penttilä M. Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei* β -mannanase gene containing a cellulose binding domain. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(3): 1090–1097.
- [27] Bauer S, Vasu P, Mort AJ, Somerville CR. Cloning, expression, and characterization of an oligoxyloglucan reducing end-specific xyloglucanobiohydrolase from *Aspergillus nidulans*. *Carbohydrate Research*, 2005, 340(17): 2590–2597.
- [28] Pérez-González JA, van Peij NNME, Bezoen A, MacCabe AP, Ramón D, de Graaff LH. Molecular cloning and transcriptional regulation of the *Aspergillus nidulans xlnD* gene encoding a β -xylosidase. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998, 64(4): 1412–1419.
- [29] Pérez-González JA, de Graaff LH, Visser J, Ramón D. Molecular cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of two *Aspergillus nidulans* xylanase genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 1996, 62(6): 2179–2182.
- [30] Yang PL, Li YN, Wang YR, Meng K, Luo HY, Yuan TZ, Bai YG, Zhan ZC, Yao B. A novel β -mannanase with high specific activity from *Bacillus circulans* CGMCC1554: gene cloning, expression and enzymatic characterization. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2009, 159(1): 85–94.
- [31] Srivastava PK, Kapoor M. Production, properties, and applications of *endo*- β -mannanases. *Biotechnology Advances*, 2017, 35(1): 1–19.

Overexpression and characterization of endo- β -1,4-mannanase from *Aspergillus nidulans* in *Pichia pastoris*

Pengfei Zhang¹, Xiaolian Li², Ziqiang Wang², Xianghua Yuan¹, Jian-Jun Li^{2,3*}, Yuguang Du^{2,3*}

¹ College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, Sichuan Province, China

² National Key Laboratory of Biochemical Engineering, National Engineering Research Center for Biotechnology (Beijing), Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100090, China

³ Key Laboratory of Biopharmaceutical Production & Formulation Engineering, PLA, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100090, China

Abstract: [Objective] Endo β -1,4-mannanases play important roles in hydrolysis of the β -1,4 glycosidic linkages in mannans and heteromannans, the second most abundant hemicellulosic polysaccharides in nature. [Methods] In this study, we overexpressed and characterized an endo β -1,4-mannanase from *Aspergillus nidulans* in *Pichia pastoris*. [Results] A β -1,4-mannanase was successfully overexpressed in flasks and fermentor, and the yield of overexpressed protein in fermentor reached 3.90 mg/mL. The optimal pH and temperature of the enzyme were 4.0 and 60 °C respectively, and it was very stable over the pH ranges from 5.0 to 9.0. It was thermally stable below 40 °C, whereas it was inactivated very quickly above 60 °C. Its enzyme activities could be enhanced by Co^{2+} and Zn^{2+} , whereas it was inhibited by Pb^{2+} , Mn^{2+} and Cu^{2+} . [Conclusion] This endo- β -1,4-mannanase could be well produced by *Pichia pastoris*, and has a potential as commercial enzymes for application.

Keywords: *Aspergillus nidulans*, β -1,4-mannanase, enzymological properties, divalent metal ion, fermentation

(本文责编: 李磊)

Supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (2014AA093511)

*Corresponding authors. Jianjun Li, Tel/Fax: +86-10-82545039, E-mail: jjli@ipe.ac.cn; Yuguang Du, Tel: +86-10-82545070, Fax: +86-10-82545039, E-mail: ygdu@ipe.ac.cn

Received: 14 April 2017; Revised: 7 June 2017; Published online: 21 July 2017