

定点突变改善 β -甘露聚糖酶 AuMan5A 的酶学性质

董运海¹, 胡蝶², 邬敏辰^{*3}, 唐诗涵¹, 王春娟¹, 李剑芳¹

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 基于糖苷水解酶 5 家族 (GHF5) β -甘露聚糖酶一级、三维结构的比对和分析, 对宇佐美曲霉 GHF5 β -甘露聚糖酶 AuMan5A 的关键位点氨基酸实施定点突变以获得酶学性质优良的突变酶 AuMan5A^{G320D}。采用大引物 PCR 技术将 AuMan5A 基因 (*Auman5A*) 中编码 Gly³²⁰ 的密码子 GGT 突变为 Asp³²⁰ 的 GAC, 构建出突变酶基因 *Auman5A*^{G320D}。分别将 *Auman5A* 和 *Auman5A*^{G320D} 在毕赤酵母 GS115 中进行了表达, 分析了表达产物 AuMan5A 和 AuMan5A^{G320D} 的酶学性质。结果表明: AuMan5A^{G320D} 的最适温度 T_{opt} 由突变前的 65 °C 提升至 70 °C, 在 70 °C 的半衰期 $t_{1/2}^{70}$ 由原酶的 10 min 延长至 25 min; AuMan5A^{G320D} 的比活性由突变前的 351.2 U/mg 提高到 1 729.1 U/mg, 其催化效率 (k_{cat}/K_m) 是原酶的 9.3 倍。将 Gly³²⁰ 突变为 Asp³²⁰ 不仅改善了 AuMan5A 的温度特性, 而且显著提高了该酶的比活性和催化效率。

关键词: β -甘露聚糖酶; 定点突变; 温度特性; 比活性; 催化效率

中图分类号: TS 201.25 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2017)08—0819—07

Improvement in the Enzymatic Properties of β -Mannanase (AuMan5A) by Site-Directed Mutagenesis

DONG Yunhai¹, HU Die², WU Minchen^{*3}, TANG Shiha¹, WANG Chunjuan¹, LI Jianfang¹

(1. School of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: Based on comparison and analysis of primary and three-dimensional (3-D) structures of glycoside hydrolase family 5 (GHF5) β -mannanases, an amino acid at the key site of *Aspergillus oryzae* GHF5 β -mannanase (AuMan5A) was subjected to site-directed mutagenesis to obtain a mutant enzyme AuMan5A^{G320D} with superior enzymatic properties. Using the megaprimer PCR method, the AuMan5A^{G320D}-encoding gene, *Auman5A*^{G320D}, was constructed by mutating the Gly³²⁰-encoding codon GGT of *Auman5A* into Asp³²⁰-encoding GAC. Then, two genes, *Auman5A* and *Auman5A*^{G320D}, were extracellularly expressed in *Pichia pastoris* GS115 and the enzymatic properties of expressed products were analyzed. Results indicated that the optimal temperature of

收稿日期: 2015-04-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31271811)。

* 通信作者: 邬敏辰 (1962—), 男, 江苏无锡人, 理学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事酶工程与基因工程研究。

E-mail: bioch@163.com

引用本文: 董运海, 胡蝶, 邬敏辰, 等. 定点突变改善 β -甘露聚糖酶 AuMan5A 的酶学性质[J]. 食品与生物技术学报, 2017, 36(08): 819-825.

AuMan5A^{G320D} was 70 °C and its half-life at 70 °C ($t_{1/2}^{70}$) was 25 min. The specific activity of AuMan5A^{G320D} was increased from 351.2 U/mg to 1 729.1 U/mg and its catalytic efficiency (k_{cat}/K_m) was 9.3 times higher than that of AuMna5A. Through mutating Gly³²⁰ into Asp³²⁰, this work not only improved the temperature characteristics of AuMan5A, but also significantly enhanced its specific activity and catalytic efficiency.

Keywords: β -mannanase, site-directed mutagenesis, temperature characteristics, specific activity, catalytic efficiency

β -甘露聚糖酶 (endo- β -1,4-D-mannanases, EC 3.2.1.78) 广泛存在于各种生物体尤其是微生物中, 从甘露聚糖分子主链的内部随机切割 β -1,4-D-甘露糖苷键产生不同聚合度的甘露寡糖, 是甘露聚糖降解酶系中最关键的组分^[1]。基于一级结构同源性比对和疏水簇分析, β -甘露聚糖酶属于糖苷水解酶家族 (GHF) 5、26 和 113, 具有相似的 (β/α)₈-TIM 桶状折叠^[2]。随着甘露寡糖生理功能的发现、绿色饲料的兴起以及半纤维素资源的开发, β -甘露聚糖酶在诸多工业领域的应用潜力日益凸显^[3-4]。然而, 野生型 β -甘露聚糖酶在酶学性质上或多或少存在缺陷, 难以满足工业化应用的要求^[5-6]。采用基因工程技术定向改造酶蛋白分子, 已有较多成功的实例, 但有关 β -甘露聚糖酶分子改造的报道较少^[7]。Li 等^[8]基于三维结构分析, 对酶蛋白分子进行定向改造, 提高了假蜜环菌 β -甘露聚糖酶的蛋白酶耐受性。Xu 等^[9]通过对酶分子表面结构的优化设计并结合定点突变, 提高了枯草芽孢杆菌 β -甘露聚糖酶的耐酸性。

迄今为止, 已有许多丝状真菌的 GHF5 β -甘露聚糖酶编码基因被克隆和表达, 并分析了它们的酶学性质^[10]。作者所在实验室克隆了 *Aspergillus niger* GHF5 β -甘露聚糖酶基因 *Auman5A*, 并对该基因及其编码的氨基酸序列进行了生物信息学分析^[6]; 其后, 本实验室魏喜换等^[11]基于理性设计并结合定点突变, 显著提高了 AuMan5A 对底物瓜尔豆胶的亲和力。为进一步改善 AuMan5A 的酶学性质, 本研究中通过对 GHF5 β -甘露聚糖酶一级、三维结构的比对和分析, 推测 AuMan5A 的底物结合凹槽侧壁上 320 位点处的氨基酸残基对其酶学性质有较大的影响。据此, 借助定点突变构建突变酶基因 *Auman5A*^{G320D}, 将该基因在毕赤酵母 GS115 中表达, 分析 AuMan5A 突变前后的温度特性、比活性

和催化效率。

1 材料与方法

1.1 菌株、质粒和培养基

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109 和 DH5 α 菌株, 毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 菌株和表达质粒 pPICZ α A, 由作者所在实验室保藏; 克隆质粒 pUCm-T, 购自上海 Sangon 公司; 重组质粒 pUCm-T-*Auman5A*, 由本实验室构建和保藏; LB, LLB, YPD, YPDS-Zeocin, BMGY 和 BMMY 培养基的配制, 参照 EasySelectTM *Pichia* Expression Kit (Invitrogen 公司) 操作手册。

1.2 主要试剂

各种限制性内切酶, *rTaq* DNA 聚合酶, T₄ DNA 连接酶, 250 bp DNA Ladder Marker 和低相对分子质量蛋白质 Marker, 均购自大连 TaKaRa 公司; Zeocin 和 EZ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒, 购自上海 Sangon 公司; 角豆胶和标准甘露糖, 为 Sigma 公司产品; DEAE Sepharose Fast Flow 和 Sephadex G-75, 均为 Amersham Pharmacia Biotech 公司产品; 其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 β -甘露聚糖酶一级、三维结构的分析

以 GHF5 AuMan5A 一级结构 (GenBank: ADZ99027) 为模板, 运用 BLAST 服务器在 GenBank 数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) 中搜寻丝状真菌来源的、分别与 AuMan5A 序列同源性 > 60% 的若干 GHF5 β -甘露聚糖酶序列; 运用 ClustalW2 程序 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) 和 DNAMAN 6.0 软件对这些酶进行多序列同源性比对, 重点分析这些酶 C 末端一级结构的主要差异, 以确定拟突变的位点及在其上的氨基酸残基。

在 PDB 数据库 (<http://www.rcsb.org/>) 寻找一种

与 AuMan5A 序列同源性高的 GHF5 β -甘露聚糖酶晶体结构,用作 AuMan5A 及其突变体同源建模的模板;运用 MODELLER 9.11 程序(<http://salilab.org/modeller/>)进行三维结构同源建模。针对酶蛋白分子的三维结构,使用 PyMol 软件(<http://pymol.org>)分析各位点氨基酸残基之间的距离($\text{\AA}$)。

1.4 重组表达质粒的构建

基于 GHF5 β -甘露聚糖酶一级、三维结构的比对和分析,拟将 AuMan5A 一级结构中的 Gly³²⁰突变为 Asp³²⁰。根据 *Auman5A* 核苷酸序列(GenBank: HQ839639)设计 PCR 引物,由上海 Sangon 公司合成。

G320D-F:5'—GGGAAGTCGCCGGATGACGGG AATACTATCTAC—3',加框部分为突变密码子;

Man5A -F:5'—GAATTCTCCTTCGCCAGCACC TC—3',下划线部分为 *EcoR* I 酶切位点;

Man5A -R:5'—GCGGCCGCTTAGGCACTATCA ATAGCAG—3',下划线部分为 *Not* I 酶切位点。

以 pUCm-T-*Auman5A* 为模板、G320D-F 和 Man5A-R 为引物,PCR 扩增基因片段 *GM*;再利用同一模板、Man5A-F 和 *GM* 为引物,采用大引物 PCR 技术^[12]扩增突变酶基因 *Auman5A*^{G320D}。将目的 PCR 产物与 pUCm-T 连接,获重组质粒 pUCm-T-*Auman5A*^{G320D},转化 *E. coli* JM109,阳性转化子的测序结果与预期一致。将 pUCm-T-*Auman5A* 和 pUCm-T-*Auman5A*^{G320D} 分别经 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,回收目的条带,与经同样双酶切的 pPICZ α A 连接,获重组表达质粒 pPICZ α A-*Auman5A* 和 pPICZ α A-*Auman5A*^{G320D},转化 *E. coli* DH5 α ,DNA 测序验证。

1.5 β -甘露聚糖酶的表达和纯化

将测序正确的 pPICZ α A-*Auman5A* 和 pPICZ α A-*Auman5A*^{G320D} 分别用 *Sac* I 线性化,电转化 *P. pastoris* GS115,具体操作参照基因脉冲仪(Bio-Rad 公司)说明书。重组毕赤酵母的鉴定、多拷贝筛选和诱导表达等参照 EasySelect™ *Pichia* Expression Kit 操作手册。诱导表达上清液用 80%饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析,离心收集沉淀,溶于适量 20 mmol/L NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液(pH 7.0);粗酶液经透析、超滤浓缩(膜截留相对分子质量为 10 000,Millipore 公司),上样 DEAE Sepharose Fast Flow 阴离子交换层析柱(2.0 cm $\times$ 20 cm),用含 0.1~1.0 mol/L NaCl 的上述磷

酸缓冲液进行梯度洗脱,分步收集洗脱液;合并具有 β -甘露聚糖酶活性的洗脱液,超滤浓缩至 1 mL,上样 Sephadex G-75 凝胶层析柱(1.6 cm $\times$ 80 cm)进行纯化。

1.6 β -甘露聚糖酶活性和蛋白的分析

β -甘露聚糖酶活性测定参见文献[13],并略作修改。在 2.4 mL 5 mg/mL 角豆胶溶液(pH 3.6、50 mmol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液配制)中加入 0.1 mL 适当稀释的酶液,65 $^{\circ}\text{C}$ 准确反应 10 min,加入 2.5 mL DNS 试剂,在沸水浴中显色 7 min,测定 OD₅₄₀ 值。在上述反应条件下,每分钟产生 1 μmol 还原糖(以甘露糖计)所需的酶量定义为 1 个 β -甘露聚糖酶活性单位(U)。采用 SDS-PAGE 分析重组表达产物;Bradford 法测定蛋白质含量。

1.7 pH 和温度对 β -甘露聚糖酶活性的影响

用不同 pH 值(pH 2.5~7.0)的柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液配制角豆胶溶液,按 1.6 方法测定酶活性。最适 pH 定义为最高酶活性(以相对酶活性 100%计)所对应的 pH 值。将酶液在不同 pH 值(pH 2.0~10.0 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液)、40 $^{\circ}\text{C}$ 保温 60 min,按 1.6 方法测定残余酶活性。酶的 pH 稳定性定义为残余酶活性在 85%以上的 pH 范围。

在不同温度(50~75 $^{\circ}\text{C}$)下,按 1.6 方法测定酶活性。最适温度 T_{opt} 定义为最高酶活性(以相对酶活性 100%计)所对应的温度。将酶液置于 70 $^{\circ}\text{C}$ 下处理 0~80 min,按 1.6 方法测定残余酶活性,未经处理酶液的酶活性以 100%计。酶的半衰期 $t_{1/2}$ ^[7] 定义为经 70 $^{\circ}\text{C}$ 处理残余酶活性为 50%时所对应的时间。

1.8 β -甘露聚糖酶动力学常数的测定

以不同浓度(1.0~10.0 mg/mL)的角豆胶溶液(用 pH 3.6、50 mmol/L 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液配制)为底物,在酶各自的最适温度下按 1.6 方法测定其活性,采用 Origin 8.0 软件进行非线性拟合,计算 β -甘露聚糖酶的 K_m 和 k_{cat} 值。

2 结果与分析

2.1 AuMan5A 关键氨基酸位点的确定

将 AuMan5A 序列(ADZ99027)分别与其它 GHF5 β -甘露聚糖酶序列进行同源性比对,发现 AuMan5A 与 硫色曲霉 (*Aspergillus sulphureus*, AsMan5A, ABC59553)、棘孢曲霉 (*A. aculeatus*, AaMan5A, AAA67426)、构巢曲霉 (*A. nidulans*,

AnMan5A, AGG69666) 和嗜松青霉 (*Penicillium-pinophilum*, PpMan5A, AEV41143) β -甘露聚糖酶的同源性较高, 分别为 94%、74%、67% 和 63%。再运用 ClustalW2 程序对这 5 种酶进行多序列同源性比对, 其中 C 末端的比对结果如图 1 所示。由图 1 可见, AuMan5A 320 位点处为 Gly(G), 而其它 4 种 β -甘露聚糖酶与之对应的均为 Asp(D, 用红框表示)。

AuMan5A	LFWQYGDLLSTGKSPFGNTIYYGTSDYQCLVTDHVAIDSA.	345
AsMan5A	LFWQYGDLLSTGESPDGNTIYYGTSDYECLVTDHVAIDSA.	407
AaMan5A	LYWQYGTTFSWGQSPNIGNTIYYNTSDFTCLVTDHVAIDNAQS	376
AnMan5A	LFWQWGDLLSTGQTHNDGNTIYYGSDEYTCMVTDHMERIAAR.	441
PpMan5A	MFWQYGDLLSTGQSPNIGNTIYYGTDTFTCLVTDHIAAI....	406

图 1 5 种不同来源的 GHF5 β -甘露聚糖酶 C 末端的多序列同源性比对

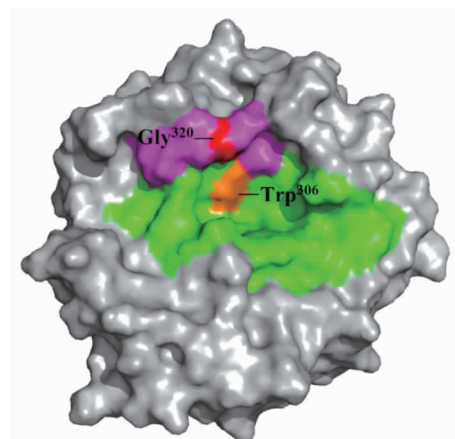
Fig. 1 Multiple sequence alignment of C-termini among five GHF5 β -mannanases from different organisms

通过在 PDB 数据库中搜寻, 选定与 AuMan5A 同源性最高的黑曲霉 (*A.niger*) β -甘露聚糖酶晶体结构 (PDB:3WH9) 为模板, 对 AuMan5A 进行三维结构同源建模。基于三维结构的比对和分析, 发现 AuMan5A 320 位点处的 Gly 位于其一个 loop 结构 ($^{306}W \sim G^{327}$) 内, 该 loop 结构的部分序列 ($^{317}SPDGGN^{322}$) 在三维结构上参与构成了底物结合凹槽的侧壁(图 2)。Dilokpimol 等^[14]分析认为该位点氨基酸 (通常为 Asp) 参与构成了底物结合位点 (subsite)-2。同时, 该位点邻近于在 GHF5 β -甘露聚糖酶中绝对保守的 Trp 位点(如 AuMan5A 306 位点处的 Trp), 该保守位点是 subsite-1 处结合糖环的疏水平台^[15]。Huang 等^[10]构建了 AnMan5A 的两个突变体 W306G 和 W306Y, 它们的酶活性分别仅为野生型酶的 6% 和 11%。上述对 GHF5 β -甘露聚糖酶一级、三维结构的分析结果表明, AuMan5A 320 位点处的氨基酸残基可能对其酶学性质有较大影响。据此, 借助定点突变将 Gly³²⁰ 突变为其它酶与之对应的 Asp³²⁰。

2.2 重组表达质粒的构建

将 AuMan5A 一级结构中编码 Gly³²⁰ 的密码子 GGT 突变为编码 Asp³²⁰ 的 GAC。以 pUCm-T-*Auman5A* 为模板、G320D-F 和 Man5A-R 为引物, 经第一轮 PCR 扩增获得长度约为 100 bp 的基因片段 GM(图 3 泳道 1); 再利用同一模板、Man5A-F 和 GM 为引物, 经第二轮 PCR 扩增获得长度约为 1050

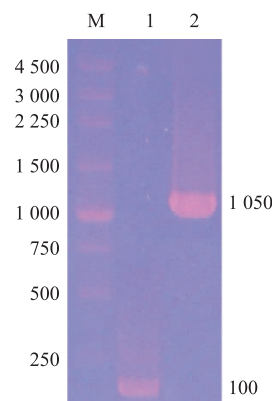
bp 的突变酶基因 *Auman5A*^{G320D}(图 3 泳道 2)。测序结果与预期一致。分别将酶基因 *Auman5A* 和 *Auman5A*^{G320D} 克隆至 pPICZ α A, 获得重组表达质粒 pPICZ α A-*Auman5A* 和 pPICZ α A-*Auman5A*^{G320D}。



彩色区域: AuMan5A 底物结合凹槽; 品红色: Gly³²⁰ 所在 loop 结构的部分序列 ($^{317}SPDGGN^{322}$)

图 2 AuMan5A 三维结构的表面构型

Fig. 2 Surface conformation of the three-dimensional structure of AuMan5A



M: DNA Marker; 1: 基因片段 GM; 2: 突变酶基因 *Auman5A*^{G320D}

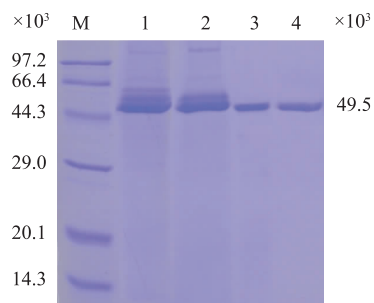
图 3 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳分析 (12 g/L)

Fig. 3 Analysis of PCR products by agarose gel electrophoresis (12 g/L)

2.3 β -甘露聚糖酶的表达和纯化

挑选若干在 YPDS-Zeocin (400 μ g/mL) 平板上生长良好的单菌落, 按照 EasySelect™ *Pichia* Expression Kit 操作手册进行诱导表达, 筛选到 2 个产 AuMan5A 和 AuMan5A^{G320D} 活性最高的转化子 GS115/*Auman5A* 和 GS115/*Auman5A*^{G320D}, 酶活性分别为 50.8 和 304.2 U/mL, 空白对照 GS115/pPICZ α A

上清液中未检测到 β -甘露聚糖酶活性。将2个转化子的表达上清液分别经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析、阴离子交换层析和凝胶层析分离纯化。SDS-PAGE分析显示,纯化的 AuMan5A 和 AuMan5A^{G320D} 均在约 49.5×10^3 (表观相对分子质量)处呈现单一条带(图4)。按1.6方法测得纯化酶的比活性分别为351.2 U/mg 和 1 729.1 U/mg。



M: 蛋白质 Marker; 1~2: 重组酵母表达上清液; 3~4: 纯化的 AuMan5A 和 AuMan5A^{G320D}

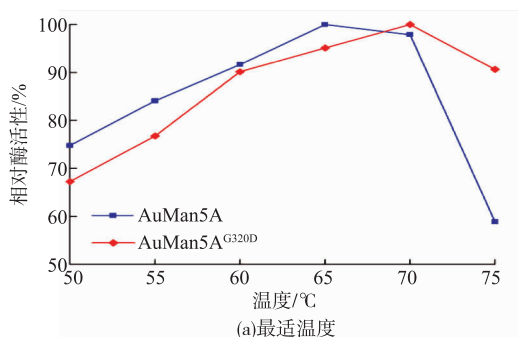
图4 诱导表达上清液和纯化酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Analysis of the expression supernatants and purified enzymes by SDS-PAGE

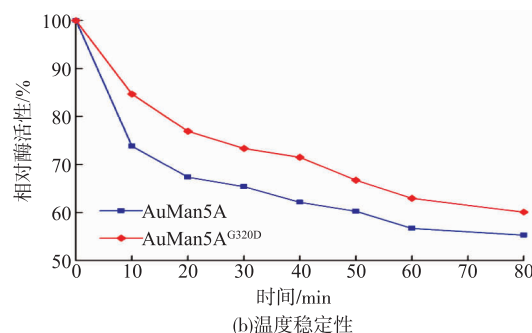
2.4 β -甘露聚糖酶 pH 和温度特性的分析

按1.7方法分析了 pH 对 AuMan5A 和 AuMan5A^{G320D} 活性的影响,结果显示 AuMan5A 和 AuMan5A^{G320D} 均在 pH 值为 3.5 时具有最大的催化活性,且在 pH 3.0~8.0 范围内稳定。单点突变并未影响 AuMan5A 的 pH 特性。

按1.7方法分析了温度对 AuMan5A 和 AuMan5A^{G320D} 活性的影响,结果如图5所示。由图5(a)可见, AuMan5A^{G320D} 的最适温度 T_{opt} 为 70 °C,较 AuMan5A 的 65 °C 略有提升。由图5(b)可见, AuMan5A^{G320D} 在 70 °C 的半衰期 $t_{1/2}^{70}$ 为 25 min,是 AuMan5A ($t_{1/2}^{70}=10$ min) 的 2.5 倍。分析结果显示,将 Gly³²⁰ 突变为 Asp³²⁰ 改善了 AuMan5A 的温度特性。



(a) 最适温度

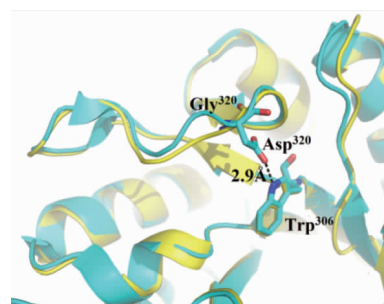


(b) 温度稳定性

图5 AuMan5A 和 AuMan5A^{G320D} 温度特性的分析

Fig. 5 Temperature characteristics of AuMan5A and AuMan5A^{G320D}

按1.3方法模拟了 AuMan5A^{G320D} 的三维结构。在酶蛋白分子三维结构上,利用 PyMol 软件测得在 AuMan5A^{G320D} 中 Asp³²⁰ 与 Trp³⁰⁶ 之间的距离为 2.9 Å,处于氢键成键距离之内^[16],而在 AuMan5A 中 Gly³²⁰ 与 Trp³⁰⁶ 的距离超出了形成氢键的范围(图6)。由此推测,Asp³²⁰ 与 Trp³⁰⁶ 所形成的氢键可使参与底物结合凹槽侧壁构成的部分 loop 结构^(317SPDGGN322) 更加稳固,增加了酶蛋白分子的刚性^[17]。



黄色: AuMan5A; 蓝色: AnMan5A^{G320D}

图6 AuMan5A 和 AnMan5A^{G320D} 局部结构的比对和分析
Fig. 6 Comparison of the local structures between AuMan5A and AnMan5A^{G320D}

2.5 酶动力学常数的测定

在 AuMan5A 和 AuMan5A^{G320D} 各自的最适温度 ($T_{\text{opt}}=65$ °C 和 70 °C) 下,按1.8方法测得 AuMan5A 和 AuMan5A^{G320D} 对角豆胶的 K_m 值分别为 1.75 和 0.99 mg/mL, k_{cat} 值分别为 584.2 和 3 058.6 s⁻¹; AuMan5A^{G320D} 的催化效率 (k_{cat}/K_m) 是 AuMan5A 的 9.3 倍。测定结果显示,将 Gly³²⁰ 突变为 Asp³²⁰ 显著提高了 AuMan5A 的催化效率。

3 结 语

基于理性设计对关键位点上的氨基酸残基进

行单点突变,可使酶的比活性或催化效率大幅度提高。如 Srikrishnan 等^[18]基于内切葡聚糖酶一级、三维结构的比对和分析,所获 *Thermoascus aurantiacus* 内切葡聚糖酶 Eg1 单点突变子 Y95F 的催化效率较野生型酶提高了 4.4 倍;Cheng 等^[19]通过晶体结构解析,并结合单点突变(Y61G),将 *Thermotogamaritima* 纤维素酶 Cel12A 的比活性提高了 70%。

本研究中以宇佐美曲霉 AuMan5A 为对象,基于丝状真菌的 GH5 β -甘露聚糖酶一级、三维结构的比对和分析,推测 AuMan5A 底物结合凹槽侧壁上 320 位点处的氨基酸残基对其酶学性质有较大

的影响。在此分析基础上,采用大引物 PCR 技术将 *Auman5A* 中编码 Gly³²⁰ 的密码子 GGT 突变为 Asp³²⁰ 的 GAC,构建出突变酶基因 *Auman5A*^{G320D}。分别将 *Auman5A* 和 *Auman5A*^{G320D} 在毕赤酵母 GS115 中进行了表达,分析了重组表达产物 AuMan5A 和 AuMan5A^{G320D} 的酶学性质。结果表明,将 Gly³²⁰ 突变为 Asp³²⁰ 不仅改善了 AuMan5A 的温度特性,而且显著提高了该酶的比活性和催化效率。产 AuMan5A^{G320D} 的重组酵母菌株有望用于 β -甘露聚糖酶的工业化生产。

参考文献:

- [1] VAN Z W H, ROSE S H, TROLLOPE K, et al. Fungal β -mannanases; mannan hydrolysis, heterologous production and biotechnological applications[J]. **Process Biochemistry**, 2010, 45(8): 1203-1213.
- [2] ZHANG Y, JU J, PENG H, et al. Biochemical and structural characterization of the intracellular mannanase AaManA of *Alicyclobacillus acidocaldarius* reveals a novel glycoside hydrolase family belonging to clan GH-A [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2008, 283(46): 31551-31558.
- [3] CHAUHAN P S, PURI N, SHARMA P, et al. Mannanases; microbial sources, production, properties and potential biotechnological applications[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2012, 93(5): 1817-1830.
- [4] DHAWAN S, KAUR J. Microbial mannanases; an overview of production and applications [J]. **Critical Reviews in Biotechnology**, 2007, 27(4): 197-216.
- [5] CHEN X, CAO Y, DING Y, et al. Cloning, functional expression and characterization of *Aspergillus sulphureus* β -mannanase in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Biotechnology**, 2007, 128(3): 452-461.
- [6] TANG C, GUO J, WU M, et al. Cloning and bioinformatics analysis of a novel acidophilic β -mannanase gene, *Auman5A*, from *Aspergillus usamii* YL-01-78[J]. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, 2011, 27(12): 2921-2929.
- [7] COUTURIER M, FELIU J, BOZONNET S, et al. Molecular engineering of fungal GH5 and GH26 beta-(1,4)-mannanases toward improvement of enzyme activity[J]. **PLoS ONE**, 2013, 8(11): e79800.
- [8] LI Y, HU F, WANG X, et al. A rational design for trypsin-resistant improvement of *Armillariella tabescens* β -mannanase MAN47 based on molecular structure evaluation[J]. **Journal of Biotechnology**, 2013, 163(4): 401-407.
- [9] XU M, ZHANG R, LIU X, et al. Improving the acidic stability of a β -mannanase from *Bacillus subtilis* by site-directed mutagenesis[J]. **Process Biochemistry**, 2013, 48(8): 1166-1173.
- [10] HUANG J W, CHEN C C, HUANG C H, et al. Improving the specific activity of β -mannanase from *Aspergillus niger* BK01 by structure-based rational design[J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2014, 1844(3): 663-669.
- [11] WEI Xihuan, WANG Chunjuan, ZHAO Mei, et al. Directed modification of β -mannanase substrate affinity based on rational design[J]. **Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.)**, 2014, 40(1): 58-64. (in Chinese)
- [12] XIE Z H, SHI X J. Fast and almost 100% efficiency site-directed mutagenesis by the megaprimer PCR method [J]. **Progress in Biochemistry and Biophysics**, 2009, 36(11): 1490-1494.
- [13] ZHAO Mei, WEI Xihuan, WANG Chunjuan, et al. Gene cloning and expression of a thermostable β -mannanase and its enzymatic properties[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014, 33(6): 590-596. (in Chinese)
- [14] DILOKPIMOL A, NAKAI H, GOTFREDSSEN C H, et al. Recombinant production and characterisation of two related GH5 endo- β -1,4-mannanases from *Aspergillus nidulans* FGSC A4 showing distinctly different transglycosylation capacity [J]. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2011, 1814(12): 1720-1729.
- [15] SABINI E, SCHUBERT H, MURSHUDOV G, et al. The three-dimensional structure of a *Trichoderma reesei* β -mannanase from

- glycoside hydrolase family 5[J]. *Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography*, 2000, 56: 3-13.
- [16] NAZARI R M, KHAJEH K, Aminian M, et al. Enhancement of thermal stability of chondroitinase ABC I by site-directed mutagenesis: An insight from Ramachandran plot[J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1834(2): 479-486.
- [17] FEI B, XU H, CAO Y, et al. A multi-factors rational design strategy for enhancing the thermostability of *Escherichia coli* AppA phytase[J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2013, 40(5): 457-464.
- [18] SRIKRISHNAN S, RANDALL A, BALDI P, et al. Rationally selected single-site mutants of the *thermoascus aurantiacus* endoglucanase increase hydrolytic activity on cellulosic substrates [J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, 109(6): 1595-1599.
- [19] CHENG Y S, KO T P, HUANG J W, et al. Enhanced activity of *Thermotoga maritima* cellulase 12A by mutating a unique surface loop[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(3): 661-669.

会 议 消 息

会议名称(中文): 第五届食用昆虫与微生物转化废弃物及资源化利用研讨会

所属学科: 动植物微生物学, 细胞生物学, 植物营养学, 农林植物保护学

开始日期: 2017-09-22

结束日期: 2017-09-25

所在城市: 湖北省 武汉市

主办单位: 中国微生物学会农业微生物专业委员会、环境微生物专业委员会和微生物资源专业委员会、中国昆虫学会昆虫微生物组专业委员会

承办单位: 湖北省暨武汉微生物学会、华中农业大学农业微生物学国家重点实验室、华中师范大学生命科学学院

摘要截稿日期: 2017-09-10

联系人: 郑龙玉 博士

E-MAIL: ly.zheng@mail.hzau.edu.cn

会议网站: <http://csm.im.ac.cn/templates/team/introduction.aspx?nodeid=9&page=ContentPage&contentid=4835>

会议背景介绍: 昆虫在自然界有一百多万种, 占地球上生物种类的一半以上。除有害种类外, 有益种类在食用(饲用、食用、药用)、环境治理、工业资源、观赏、土壤改良等方面发挥着极其重要的作用, 它还蕴藏着丰富的昆虫微生物资源。昆虫与微生物密不可分, 在食用昆虫与微生物联合转化废弃物变废为宝的过程中, 微生物在提高废弃物转化效率、拮抗病原微生物、降解抗生素、引诱成虫交配产卵等方面发挥着极其重要作用, 已成为国内外研究的热点。我国每年产生畜禽粪便 38 亿吨, 餐厨剩余物上亿吨, 严重污染了环境, 并可能传播疾病、威胁人类安全。随着人口大幅增长和养殖业快速发展, 饲料与人类竞争蛋白质等营养物质的问题日益凸显, 食用昆虫与微生物转化废弃物, 能提供虫体蛋白等营养物质和功能微生物肥料, 完全做到零排放, 可以创造显著的经济效益。在《国家中长期科技发展纲要(2006-2020)》中, 已将“综合治污与废弃物循环利用”列为农业重点领域和优先主题。为此, 由中国微生物学会农业微生物专业委员会、环境微生物专业委员会和微生物资源专业委员会、中国昆虫学会昆虫微生物组专业委员会联合主办, 湖北省暨武汉微生物学会、华中农业大学农业微生物学国家重点实验室、华中师范大学生命科学学院共同承办的【第五届食用昆虫与微生物转化废弃物及资源化利用研讨会】暨【第二届昆虫肠道微生物与环境治理学术研讨会】, 定于 2017 年 9 月 22-25 日在武汉召开。

研讨会内容:

(1)食用昆虫与微生物联合转化畜禽粪便工艺及机制;(2)食用昆虫的基因组学与基因工程;(3)昆虫肠道微生物多样性及研究新技术;(4)昆虫肠道微生物资源挖掘及应用;(5)昆虫肠道微生物功能及其与宿主互作;(6)昆虫抗菌物质的研究与应用;(7)昆虫与微生物高效降解木质纤维素系统;(8)食用昆虫与微生物无害化处理餐厨剩余物工艺及应用;(9)食用昆虫作为饲料添加剂在养殖业中的应用(10)食用昆虫与微生物转化有机废弃物开发功能肥料及应用。