

耐热 β -甘露聚糖酶基因的克隆与表达及酶学性质

赵 梅¹, 魏喜换¹, 王春娟¹, 董运海¹, 李剑芳^{*1}, 邬敏辰²

(1. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 无锡医学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 基于生物信息学和基因组学分析的结果, 采用 RT-PCR 技术从宇佐美曲霉 (*Aspergillus usamii*) E001 中克隆出一种糖苷水解酶 (GH) 26 家族 β -甘露聚糖酶 (AuMan26A) 成熟肽编码基因 (*Auman26A*), 成功实现其在毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 中的异源表达。重组 β -甘露聚糖酶 (reAuMan26A) 的发酵上清液对角豆胶的酶活性为 281.9 U/mL, 纯化后比酶活为 2281.7 U/mg。其最适反应温度 T_{opt} 为 40 °C; 在 80 °C 处理 60 min 后残留酶活性为 60%; 90 °C 时的半衰期 $t_{1/2}^{90}$ 为 10 min, 处理 60 min 后残留酶活性仍为 33%; 其最适 pH 为 5.5, 在 pH 5.0~7.0 的范围内较稳定; Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对其有明显的抑制作用, 其它所测金属离子和 EDTA 对其没有明显的影响; 所测酶的最适底物为角豆胶, 其次是魔芋粉和瓜尔豆胶, 其对角豆胶的 K_m 和 V_{max} 值分别为 15.25 mg/mL 和 7 841.9 U/mg。reAuMan26A 良好的热稳定性使其在食品、饲料和纺织等工业具有广阔的应用前景。

关键词: β -甘露聚糖酶; 耐热性; 基因克隆和表达; 酶学性质

中图分类号: TS 201.25 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2014)06—0590—07

Gene Cloning and Expression of a Thermostable β -Mannanase and Its Enzymatic Properties

ZHAO Mei¹, WEI Xihuan¹, WANG Chunjuan¹, DONG Yunhai¹, LI Jianfang^{*1}, WU Minchen²

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

Abstract: Based on the bioinformatics and genomics analysis, a glycoside hydrolase (GH) family 26 gene, *Auman26A*, which encodes β -mannanase mature peptide was cloned from *Aspergillus usamii* E001 by RT-PCR. Then, it was successfully expressed in *Pichia pastoris* GS115. The recombinant enzyme (reAuMan26A) activity of the fermentation supernatant towards locust bean gum was 281.9 U/mL. The specific activity of the purified enzyme was 2281.7 U/mg. The optimal temperature of reAuMan26A was 40 °C. After incubating at 80 °C and 90 °C for 60 min, the residual activities were 60% and 33%, respectively. The half-life ($t_{1/2}^{90}$) of reAuMan26A at 90 °C was 10 min. The optimal pH of reAuMan26A was 5.5, and it was stable over a range of pH 5.0~7.0. Its activity was not significantly affected by metal ions and EDTA, but inhibited by Fe^{2+} and Fe^{3+} . Its most favorable

收稿日期: 2013-11-11

基金项目: 国家自然科学基金项目(31271811)。

* 通信作者: 李剑芳(1965—), 女, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事食品生物技术研究。

E-mail: lijf@163.com

substrate was locust bean gum, followed by konjac flour and guar gum. The K_m and V_{max} of reAuMan26A towards locust bean gum were 15.25 mg/mL and 7 841.9 U/mg, respectively. The superior properties of reAuMan26A, especially the excellent thermostability, make it have the broad application prospects in food, paper making and textile industry.

Keywords: β -mannanase, thermostability, gene cloning and expression, enzymatic properties

β -甘露聚糖酶 (EC 3.2.1.78) 是内切 β -1,4-甘露聚糖甘露糖苷水解酶的简称,能够随机催化甘露聚糖分子主链中 β -1,4-D-甘露糖苷键的水解,是甘露聚糖降解酶系中最重要的组分,属于半纤维素酶类^[1-2]。它广泛存在于多种生物体内,在食品、医药、饲料、纺织、纸浆漂白及能源开发等众多领域具有重要的应用价值^[2]。基于一级结构同源性比对和疏水簇分析,绝大多数 β -甘露聚糖酶归属糖苷水解酶 (GH) 第 5 或 26 家族^[3-4]。目前,已有许多关于 GH5 家族 β -甘露聚糖酶的报道,但其对极端环境耐受性差和催化活性低等缺点极大地限制了其在各领域的应用^[5-6],因此有关新型酶基因的开发和酶的分子改造^[7-8]方面的研究逐年增多。随着 GH5 家族 β -甘露聚糖酶研究的成熟以及 GH26 家族 β -甘露聚糖酶基因序列的公布,研究人员逐渐转向对 GH26 家族 β -甘露聚糖酶的研究。研究发现两个糖苷水解酶家族的活性位点作用模式不尽相同^[9],许多报道也显示 GH26 家族 β -甘露聚糖酶具有不同于 GH5 家族的优良特性^[10-11],这为 GH26 家族 β -甘露聚糖酶的深入研究提供了有效的参考。

作者所在课题组在前期的研究中从 *Aspergillus usamii* E001 发酵产物中分离到了电泳纯的 β -甘露聚糖酶,之后克隆出了 *A. usamii* E001 GH5 家族 β -甘露聚糖酶 (AuMan5A) 的编码基因,并在毕赤酵母 GS115 中实现了表达^[8]。结果显示,来源于 *A. usamii* E001 发酵产物的 β -甘露聚糖酶的催化活性明显高于重组酶的活性,推测电泳纯的 *A. usamii* 的 β -甘露聚糖酶可能由两种或两种以上表观相对分子质量相似的酶组成。对 *Aspergillus niger* CBS 513.88 的基因组序列分析^[12]发现, *A. niger* 中存在两种 β -甘露聚糖酶,分别属于 GH5 家族和 GH26 家族,且两种酶的氨基酸残基数相近。另外,在前期的研究中作者发现, *A. usamii* 和 *A. niger* 的 GH5 家族 β -甘露聚糖酶序列具有高度的相似^[1-8]。本研究基于 NCBI 上 *A. niger* CBS 513.88 菌株的基因组序列,参

照推测出的黑曲霉 GH26 家族 β -甘露聚糖酶序列,借助 RT-PCR 技术从 *A. usamii* E001 中克隆出 AuMan26A 的编码基因,并在毕赤酵母 GS115 中实现了异源表达。同时,对重组酶 reAuMan26A 的酶学性质进行了初步研究,其极好的热稳定性表明该酶具有较大的应用潜力。

1 材料与方法

1.1 菌株和质粒

宇佐美曲霉 *A. usamii* E001, 大肠杆菌 *Escherichia coli* JM109 和 DH5 α , 便于实现蛋白质天然 N 端表达的质粒 pPIC9K^M, 由作者所在实验室构建和保藏; 克隆质粒 pUCm-T, 购自上海 Sangon 公司; 表达宿主菌毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115, 购自 Invitrogen 公司。

1.2 主要试剂和培养基

各种限制性内切酶, *rTaq* DNA 聚合酶, T₄ DNA 连接酶, 250 bp DNA Ladder Marker, 低相对分子质量蛋白质 Marker 和 RNA PCR Kit (AMV) Ver.3.0, 购自大连 TaKaRa 公司; 胰蛋白酶, 酵母提取物, Trizol, YNB, SDS, G418, UNIQ -10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒和聚丙烯酰胺, 购自上海 Sangon 公司; 标准甘露糖和角豆胶, Sigma 公司产品; 其他试剂均为国产或进口分析纯。

种子活化培养基 (mg/mL): 玉米粉 20, 豆饼粉 30, KH₂PO₄ 30, CaCl₂ 10, MgSO₄ 10; 诱导培养基 (mg/mL): NaNO₃ 9, KH₂PO₄ 0.5, MgSO₄ 0.5, 酵母提取物 4, 魔芋粉 5; LB, YPD, MD, BMGY 和 BMMY 培养基的配制, 参照 Multi-Copy *Pichia* Expression Kit (Invitrogen 公司) 操作手册。

1.3 引物的设计与合成

基于宇佐美曲霉与黑曲霉基因序列的相似性, 参照 NCBI 上公布的 *A. niger* CBS 513.88 菌株基因组中推测的 Man26A 的基因序列 (登录号:

XM_001397260.1), 结合生物信息学分析手段, 设计出一对扩增编码 AuMan26A 成熟肽 cDNA 的特异性上下游引物:

上游引物 (AuMan26A-F): 5'-CTCGAGAAAAG AGCTTCCAACCAGACTCTGTCC-3', 含 *Xho* I 位点;

下游引物 (AuMan26A-R): 5'-GAATTCTTAAG CCCCTCCCAGTTCAG-3', 含 *Eco*R I 位点。

1.4 AuMan26A 成熟肽编码基因的克隆

将 *A. usamii* E001 接种至种子活化培养基中, 于 30 °C、220 r/min 条件下振荡培养 24 h, 以体积分数 3% 的接种量转至诱导培养基中, 于上述条件下振荡培养 24 h 后收集菌体, 用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒提取 *A. usamii* 的总 RNA。以提取的 *A. usamii* 总 RNA 为模板, Oligo dT-Adaptor 为引物, 逆转录合成 cDNA 的第一条链。以所合成的链为模板, AuMan26A-F 和 M13 primer M4 为引物, 按如下条件进行第一轮 PCR 扩增: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 充分延伸 10 min。以第一轮 PCR 产物为模板, AuMan26A-F 和 AuMan26A-R 为引物, 按如下条件进行第二轮 PCR 扩增 AuMan26A 成熟肽的编码基因: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 57 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 90 s, 30 个循环; 72 °C 充分延伸 10 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测、割胶回收, 与 pUCm-T 连接, 转化 *E. coli* JM109, 蓝白斑筛选阳性转化子, 送上海 Sangon 公司测序。测序正确的重组质粒 pUCm-T-Auman26A 经 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切, 将目的基因克隆至能够实现天然 N 端表达的质粒 pPIC9K^M, 转化 *E. coli* DH5 α , 筛选重组表达质粒 pPIC9K^M-Auman26A 并进行测序鉴定。

1.5 Auman26A 基因在毕赤酵母中的表达

测序正确的 pPIC9K^M-Auman26A 质粒经 *Sal* I 线性化, 电转化 *P. pastoris* GS115 感受态细胞。电转化及多拷贝转化子筛选方法参见 Multi-Copy Pichia Expression Kit (Invitrogen 公司) 操作手册。重组毕赤酵母的鉴定及诱导表达参见文献 [1], 整合有 pPIC9K^M 质粒的 GS115/9K^M 做阴性对照。将获得的重组 *P. pastoris* GS115 在 YPD 平板上划线传代培养 6 次, 每次挑选 3 个单菌落按标准流程进行诱导培养, 然后测定发酵上清液中的 β -甘露聚糖酶活性, 研究重组 *P. pastoris* GS115 的遗传稳定性。

1.6 重组酶 reAuMan26A 的分离纯化

将摇瓶发酵液 8 000 r/min 离心 10 min, 除去菌体即得粗酶液。取 40 mL 粗酶液, 向其中加入硫酸铵至 50% 饱和度, 4 °C 过夜放置后离心去除部分杂蛋白质和色素。在上清液中继续加入硫酸铵至 80% 饱和度, 4 °C 过夜放置, 离心收集沉淀。将所得沉淀溶于 40 mL 的柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液 (20 mmol/L、pH 5.5), 经透析, 超滤浓缩 (截留相对分子质量为 10 kDa) 至 3 mL。上样到预先用上述缓冲液平衡好的 Sephadex G-75 凝胶层析柱 (Φ 1.6 cm $\times$ 100 cm), 然后同一缓冲液淋洗 (洗脱体积流量 0.3 mL/min), 收集有酶活力的组分。

1.7 β -甘露聚糖酶活性的测定

采用改良的 DNS 法测定 β -甘露聚糖酶活性^[1]。取 2.4 mL 5 mg/mL 角豆胶溶液 (pH 5.5 的柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液配制), 于 40 °C 预热 5 min 后加入 0.1 mL 适当稀释的酶液, 40 °C 下准确反应 10 min, 加入 2.5 mL DNS 试剂, 沸水浴中显色 7 min, 加入 5 mL 去离子水混匀后测定 OD₅₄₀。在上述反应条件下, 每分钟产生 1 μ mol 还原糖 (以甘露糖计) 所需的酶量定义为 1 个酶活性单位 (U)。

1.8 reAuMan26A 酶学性质的分析

1.8.1 温度对酶活性的影响 在不同温度 (30~60 °C) 下, 按 1.7 的方法测定 reAuMan26A 的活性。最适温度 T_{opt} 定义为最高酶活性 (以相对活性 100% 计) 所对应的温度。将酶液置于不同温度保温 0~60 min, 按 1.7 中的方法测定残余酶活性, 未处理酶液 (0 min) 的酶活性以 100% 计。酶的半衰期 $t_{1/2}$ 定义为残余酶活性为 50% 时的保温时间。

1.8.2 pH 对酶活性的影响 用不同 pH 值 (pH 2.5~8.0) 的 100 mmol/L 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液配制 5 mg/mL 角豆胶溶液, 按 1.7 中的方法测定 reAuMan26A 的活性。最适 pH 定义为最高酶活性所对应的 pH 值。将酶液在不同 pH 值 (pH 2.5~8.0 柠檬酸-Na₂HPO₄ 缓冲液)、40 °C 保温 60 min, 按 1.7 中的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。

1.8.3 金属离子和 EDTA 对酶活性的影响 将酶液与不同金属离子或 EDTA 溶液 (终浓度 2.0 mmol/L) 混匀后于 40 °C 保温 1 h, 按 1.7 中的方法测定残余酶活性。以未加金属离子和 EDTA 的酶活性计为 100%。

1.8.4 reAuMan26A 的底物谱及动力学参数的测定
用 100 mmol/L、pH 5.5 柠檬酸- Na_2HPO_4 缓冲液分别配制质量浓度为 5 mg/mL 的角豆胶、瓜尔豆胶、魔芋粉、桦木木聚糖、羧甲基纤维素钠(CMC - Na)和可溶性淀粉溶液,按照 1.7 中的方法测定 reAuMan26A 对不同底物的活性。以不同质量浓度(1~10 mg/mL)的角豆胶溶液为底物,按照 1.7 的方法测定 reAuMan26A 的活性,采用 Origin 8.0 软件进行非线性拟合,计算出 reAuMan26A 的 K_m 和 $V_{\max}$ 值。

2 结果与讨论

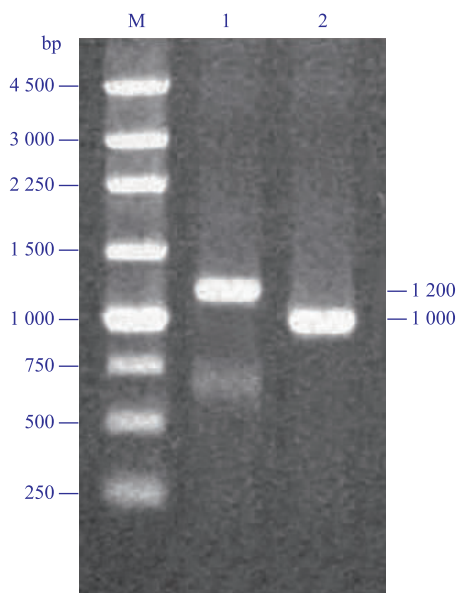
2.1 Auman26A 基因的克隆

按 1.4 的方法进行 PCR 反应,经质量分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检测第一轮 PCR 产物,在 1 200 bp 处有一条明显的条带(图 1 泳道 1),将目的产物割胶回收纯化。以第一轮 PCR 产物为模板,进行第二轮 PCR 扩增。结果显示 PCR 产物在 1 000 bp 处有一条特异性的条带(图 1 泳道 2),PCR 产物长度与预期相符,割胶回收产物连接至 pUCm-T,获得重组质粒 pUCm-T-Auman26A,经蓝白斑筛选和菌液 PCR 检测后进行测序。测序结果显示获得的基因片段为 954 bp,编码 317 个氨基酸,Blast 分析表明该基因序列与 *A. niger* CBS 513.88(XM_00139760.1)、*Aspergillus flavus* NRRL3357 (XM_002377295.1)和 *Aspergillus oryzae* RIB40(XM_001825696.2)序列同源性分别为 98%、84% 和 83%。将 pUCm-T-Auman26A 和 pPIC9K^M 经 *Xho* I 和 *Eco*R I 双酶切及回收纯化后,相互连接得到重组表达质粒 pPIC9KM-Auman26A 并进行测序鉴定。测序结果表明目的基因没有发生突变,且读码框完全正确。

2.2 Auman26A 基因在毕赤酵母中的表达

提取 pPIC9K^M-Auman26A 质粒,经 *Sal* I 线性化后,电转 *P. pastoris* GS115 感受态细胞,经 MD 平板和含不同浓度 G418 的 YPD 平板筛选后获得高拷贝的 GS115/Auman26A。随机挑选几个高拷贝的 GS115/Auman26A 重组子用引物 5'-AOX 和 3'-AOX 进行菌液 PCR 检测,结果如图 2 所示。可见,以 GS115/Auman26A 为模板的 PCR 反应能扩增出长度约为 2 100 bp 和 1 500 bp 的产物,2 100 bp 的产物为 *P. pastoris* GS115 本身的 AOX1 基因,1 500 bp 的产物包括约为 1 000 bp 的目的基因和 500 bp pPIC9K^M 质粒上 5'-AOX 和 3'-AOX 引物序列之间

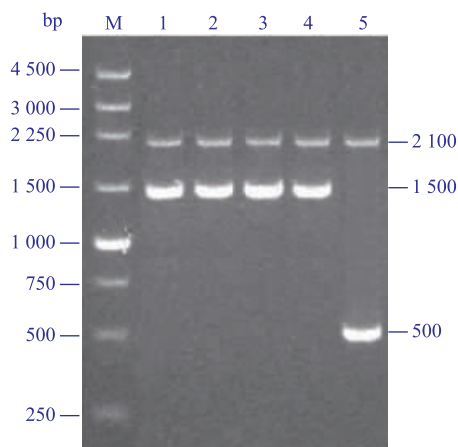
的片段。结果表明,Auman26A 基因已成功整合入 *P. pastoris* GS115 基因组中。



M:250 bp DNA Ladder Marker; 1:以 AuMan26A-F、M13M4 为引物第一轮 PCR 产物; 2:以 AuMan26A-F、AuMan26A-R 为引物第二轮 PCR 产物

图 1 Auman26A 的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplifications for Auman26A



M:250 bp DNA Ladder Marker;
1—4:GS115/Auman26A; 5:GS115/9K^M

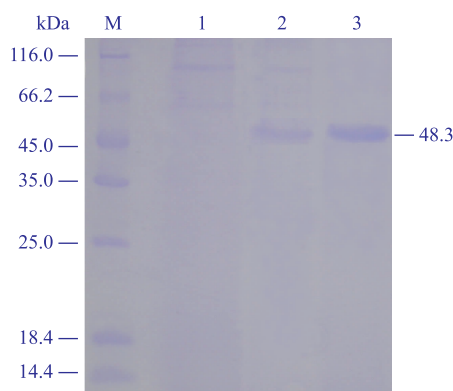
图 2 重组毕赤酵母 GS115/Auman26A 的 PCR 检测

Fig. 2 PCR detections of recombinant *P. pastoris* GS115/Auman26A

挑取几个高拷贝的重组子按照 Multi-Copy Pichia Expression Kit 手册中的方法诱导表达,筛选到一个产酶活性最高的 GS115/Auman26A 重组子,其发酵上清液的酶活为 281.9 U/mL,而 GS115/9K^M

的发酵上清液中未检测到 β -甘露聚糖酶的活性。SDS-PAGE 的结果显示, reAuMan26A 的表观相对分子质量约为 48.3 kDa(图 3); 而 GS115/9K^M 的发酵上清液在 48.3 kDa 处无特异性条带, 与酶活性测定结果一致。遗传稳定性研究试验表明, *P. pastoris* GS115/Auman26A 具有良好的遗传稳定性, 经 6 次传代后表达水平无明显改变。

将 *A. usamii* 菌株诱导表达上清液分别经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析、透析、超滤和 Sephadex G-75 凝胶进行分离纯化。SDS-PAGE 电泳分析显示, 纯化后的酶呈现单一条带(图 3), 测得比酶活为 2281.7 U/mg。



M: 低相对分子质量蛋白质 Marker;

1: GS115/9K^M; 2: GS115/Auman26A; 3: 纯化酶

图 3 重组毕赤酵母表达上清液的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expressed supernatant of the recombinant *P. Pastoris*

2.3 reAuMan26A 的酶学性质

按照 1.7 中的方法测定 reAuMan26A 的最适反应温度 T_{opt} , 结果如图 4 (a) 所示。由图可见, reAuMan26A 在 35~45 °C 范围内有较高的催化活性, 其 T_{opt} 为 40 °C。由图 4(b) 可知, reAuMan26A 具有很好的热稳定性, 80 °C 保温 60 min 可保留 60% 的酶活性; 在 90 °C 的半衰期 $t_{1/2}^{90}$ 为 10 min, 保温 60 min 仍可保留 33% 的酶活性。可见, 该重组酶在高温下可长时间保存, 恢复到 40 °C 时仍可保留较高活性。不同来源的 β -甘露聚糖酶在温度特性方面有着显著的差异, 如源自海栖热袍菌 (*Thermotoga maritima*) β -甘露聚糖酶的最适温度为 95 °C, 85 °C 处理后酶活力保留 50% 以上^[13]; Songsiriritthigul 等人^[11]所研究的地衣芽胞杆菌 (*Bacillus licheniformis*) GH26 β -甘露聚糖酶重组酶的最适反应温度为 50 °C, 50 °C 半衰期为 80 h。而本研究中的 reAuMan26A 在

温度特性上表现出不同于其它酶的特点, 其最适反应温度为 40 °C, 低于已报道过的 β -甘露聚糖酶的值, 而热稳定性却明显高于其它酶^[11-7]。据报道, 酶在一定温度范围内升温时的失活是可逆的, 温度降低后酶活性就恢复正常。大多数酶在 40 °C 以上催化活力趋于下降, 60~70 °C 呈现可逆失活, 70~80 °C 出现不可逆变性^[14]。由图 4 可知, reAuMan26A 在 50 °C 时就开始出现可逆变性, 90 °C 热处理 1 h 冷却后仍保留较高酶活性, 可推测该酶经过 90 °C 热处理恢复到 40 °C 时发生了复性。从侧面说明, reAuMan26A 的酶分子结构不同于之前报道过的其它酶, 这为进一步探讨 reAuMan26A 的分子结构特点提供了线索。

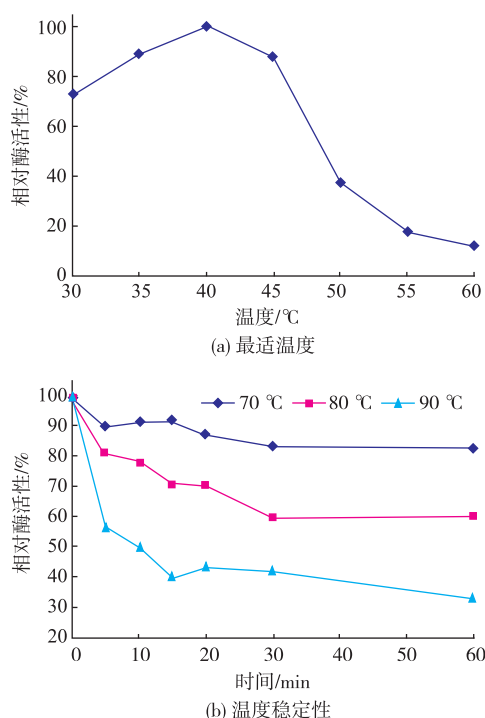


图 4 reAuMan26A 的最适温度及温度稳定性

Fig. 4 Optimal temperature (a) and thermostability (b) of reAuMan26A

reAuMan26A 的最适反应 pH 和 pH 稳定性的研究结果如图 5 所示。可知, reAuMan26A 在 pH 3.5~5.5 的范围内催化活性较高, 其中最适 pH 为 5.5; 当 pH 低于 3.5 和高于 5.5 时, reAuMan26A 的催化活性迅速下降。如图所见, reAuMan26A 在 pH 5.0~7.0 的范围内具有较高的稳定性; 当 pH 低于 4.0 时, 酶活性丧失较快。细菌来源的甘露聚糖酶最适反应 pH 多为 5.5~7.0, 真菌来源的多为 3.0~5.5^[2], 该酶的最适 pH 与已有文献报道一致。

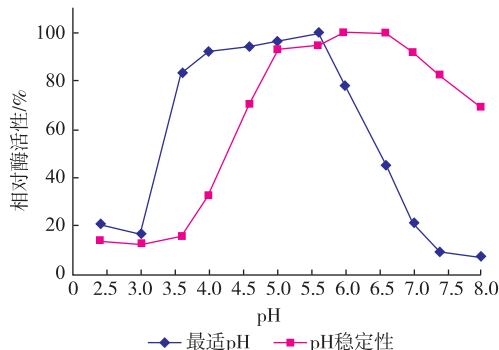


图5 reAuMan26A 的最适 pH 及 pH 稳定性

Fig. 5 Optimal pH and stability of reAuMan26A

金属离子和 EDTA 对 reAuMan26A 酶活性的影响如图 6 所示。可见,不同的金属离子和 EDTA 对酶活性影响不明显,只有 EDTA 对 reAuMan26A 酶活性有轻微激活作用;而其他金属离子对 reAuMan26A 酶活性有一定的抑制作用,其中 Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 的抑制作用比较明显。

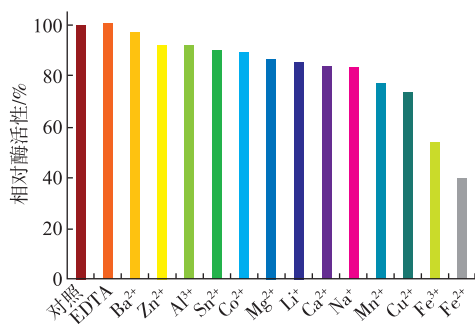


图6 金属离子和 EDTA 对 reAuMan26A 酶活性的影响

Fig. 6 Effects of metal ions and EDTA on the activity of reAuMan26A

reAuMan26A 底物谱分析的结果显示, reAuMan26A 对角豆胶的催化活性最高,将其对角豆胶的催化活性定为 100%;而对魔芋粉和瓜尔豆胶的催化活性较低,相对酶活性分别为 56.4% 和 28.5%。另外, reAuMan26A 对可溶性淀粉、桦木木聚糖和羧甲基纤维素钠没有催化活性。由以上数据可知,该酶仅识别并催化水解含有甘露糖结构的多聚糖,更加表明其倾向于专一性水解主链中的 β -

1,4-糖苷键,侧链较多的瓜尔豆胶不易被催化水解。reAuMan26A 对于角豆胶的 K_m 和 V_{max} 值分别为 15.25 mg/mL 和 7 841.9 U/mg。

3 结 语

近年来,关于 β -甘露聚糖酶的研究报道逐年增多。相对于 GH5 家族 β -甘露聚糖酶,有关 GH26 家族 β -甘露聚糖酶的研究较少。在少数的关于 GH26 家族 β -甘露聚糖酶研究的报道中,均显示出其优良的酶学特性^[10-11]。作者在前期研究的基础上,根据 *A. usamii* 与 *A. niger* 基因序列的相似性,通过生物信息学和基因组学分析,成功实现了 AuMan26A 编码基因的克隆表达。传统的通过基因或 cDNA 文库开发新基因的方法工作量较大,而且不易操作^[15]。随着生物信息学技术的发展,挖掘新基因的手段也越来越多^[16]。自然界微生物中具有丰富的酶资源,利用生物信息学和基因组学相结合的方法从微生物中挖掘具有优良性状的新型酶是一条获取优良酶的有效途径。

本研究中采用 RT-PCR 技术成功克隆了 AuMan26A 的编码基因并在毕赤酵母 GS115 中实现了异源表达,重组 β -甘露聚糖酶 (reAuMan26A) 的发酵上清液对角豆胶的酶活性为 281.9 U/mL,表达水平明显高于 GH5 家族的 *A. usamii* 和 *A. niger* LW-1 β -甘露聚糖酶 AnMan5A^[1]和 AuMan5A^[17]。初步的酶学性质研究表明,该酶的最适反应温度 T_{opt} 为 40 $^{\circ}\text{C}$;在 80 $^{\circ}\text{C}$ 处理 60 min 后残留酶活性为 60%;90 $^{\circ}\text{C}$ 时的半衰期 $t_{1/2}^{90}$ 为 10 min,处理 60 min 后残留酶活性为 33%;其最适 pH 为 5.5,在 pH 5.0~7.0 的范围内较稳定; Fe^{2+} 和 Fe^{3+} 对其有明显的抑制作用,其它所测金属离子和 EDTA 对其没有明显的影响;所测酶的最适底物为角豆胶,其对角豆胶的 K_m 和 V_{max} 值分别为 15.25 mg/mL 和 7 841.9 U/mg。本研究成果为 GH26 家族 β -甘露聚糖酶的深入研究奠定了理论基础,也为其它新酶基因的开发和进一步应用提供了新的思路和策略。

参考文献:

- [1] Li J F, Zhao S G, Tang C D, et al. Cloning and functional expression of an acidophilic β -mannanase gene (*Anman5A*) from *Aspergillus niger* LW-1 in *Pichia pastoris*[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2012, 60(3): 765-773.
- [2] Moreira L R S, Filho E X F. An overview of mannan structure and mannan-degrading enzyme systems[J]. *Applied Microbiology*

- Biotechnology**, 2008, 79(2):165–178.
- [3] Cantarel B L, Coutinho P M, Rancurel C, et al. The Carbohydrate-Active EnZymes database (CAZy): an expert resource for Glycogenomics[J]. **Nucleic Acids Research**, 2009, 37(Database):233–238.
- [4] Henrissat B, Bairoch A. New families in the classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities[J]. **The Biochemical Journal**, 1993, 293(3):781–788.
- [5] Chen X L, Cao Y H, Ding Y H, 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 D, Guo J, Wu M C, 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] Luo H Y, Wang Y R, Wang H, et al. A novel highly acidic β -mannanase from the acidophilic fungus *Bispora sp.* MEY-1: gene cloning and overexpression in *Pichia pastoris*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2009, 82(3):453–461.
- [8] Hekmat O, Leggio L L, Rosengren A, et al. Rational engineering of mannosyl binding in the distal glycone subsites of *Cellulomonas fimi* endo- β -1,4-mannanase: mannosyl binding promoted at subsite -2 and demoted at subsite -3 [J]. **Biochemistry**, 2010, 49(23):4884–4896.
- [9] Couturier M, Roussel A, Rosengren A, et al. Structural and biochemical analyses of glycoside hydrolase families 5 and 26 beta-(1,4)-mannanases from *Podospira anserina* reveal differences upon manno-oligosaccharide catalysis [J]. **The Journal of Biological Chemistry**, 2013, 288(20):14624–14635.
- [10] Politz O, Krah M, Thomsen K K, et al. A highly thermostable endo-(1,4)- β -mannanase from the marine bacterium *Rhodothermus marinus*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2000, 53(6):715–721.
- [11] Songsiririthigul C, Buranabanyat B, Haltrich D, et al. Efficient recombinant expression and secretion of a thermostable GH26 mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Bacillus licheniformis* in *Escherichia coli*[J]. **Microbial Cell Factories**, 2010, 9(1):20–34.
- [12] Pel H J, de Winde J H, Archer D B, et al. Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory *Aspergillus niger* CBS 513.88[J]. **Nature Biotechnology**, 2007, 25(2):221–231.
- [13] 张敏, 江正强, 李里特. 重组海栖热袍菌极耐热甘露聚糖酶的纯化和性质研究[J]. 微生物学通报, 2008, 35(10):1565–1571. ZHANG Min, JIANG Zhengqiang, Li Lite. Purification and characterization of a recombinant thermostable β -mannanase from *Thermotoga maritima*[J]. **Microbiology**, 2008, 35(10):1565–1571. (in Chinese)
- [14] 陈清西. 酶学及其研究技术[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 2010:138.
- [15] Wang J Q, Zhang H M, Wu M C, et al. Cloning and sequence analysis of a novel xylanase gene, *Auxyn10A*, from *Aspergillus usamii*[J]. **Biotechnology Letters**, 2011, 33(5):1029–1038.
- [16] Shi H L, Yin X, Wu M C, et al. Cloning and bioinformatics analysis of an endoglucanase gene (*Aucel12A*) from *Aspergillus usamii* and its functional expression in *Pichia pastoris* [J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, 2012, 39(2):347–357.
- [17] Tang C D, Li J F, Wei X H, et al. Fusing a carbohydrate-binding module into the *Aspergillus usamii* β -mannanase to improve its thermostability and cellulose-binding capacity by *in silico* design[J]. **Plos One**, 2013, 8(5):e64766.