

黑曲霉木聚糖酶基因 *xynB* 的克隆及在酿酒酵母中的表达*

Cloning of *xynB* Gene Encoding Xylanase B from *Aspergillus niger* and Expression in *Sacharomyces cerevisiae*

张水龙¹, 陈 东², 曹树威¹, 吴仁智², 黄日波^{1,2**}

ZHANG Shui-long¹, CHEN Dong², CAO Shu-wei¹, WU Ren-zhi², HUANG Ri-bo^{1,2**}

(1. 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530004; 2. 广西科学院非粮生物质酶解国家重点实验室, 国家非粮生物质能源工程技术研究中心, 广西生物炼制重点实验室, 广西南宁 530007)

(1. Life Science and Technology College, Guangxi University, Nanning, Guangxi, 530004, China; 2. State Key Laboratory of Non-Food Biomass and Enzyme Technology, National Engineering Research Center for Non-Food Biorefinery, Guangxi Academy of Science, Guangxi Key Laboratory of Biorefinery, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:从黑曲霉(*Aspergillus niger*)克隆木聚糖酶基因 *xynB*, 利用重叠延伸 PCR 法去除其中的内含子。将该基因与质粒 pYES2 连接, 构建真核表达载体, 用醋酸锂转化法导入酿酒酵母 (*Sacharomyces cerevisiae*) INVSC1 菌株表达。利用 α 信号肽替换基因原信号肽, 以考察信号肽对表达蛋白分泌的影响。结果获得 2 株重组菌株, 分别为 *xynB* 连接原信号肽的 pYES2-*xynB* 菌株和 *xynB* 连接 α 信号肽的 pYES2-*xynB*- α 菌株。木聚糖酶 B 成功表达, SDS-PAGE 检测到约 24kDa 目的蛋白质条带。木聚糖酶 B 最适催化温度为 50℃, 最适催化 pH 值为 5.0, Mn^{2+} 对酶活具有强烈的抑制作用。将 α 信号肽取代原信号肽使酶活达到最高的诱导时间由 72h 缩短为 48h, 但是置换信号肽使最高酶活由 7.59U 降低为 3.97U。

关键词:木聚糖酶 黑曲霉 酿酒酵母

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2013)02-0148-04

Abstract: The xylanase *xynB* gene from *Aspergillus niger* was cloned and its introns were trimmed off by overlap extension PCR. An expression vector was successfully constructed by ligating the *xynB* with vector pYES2 and transformed into *Saccharomyces cerevisiae* INVSC1 using Lithium Acetate method. The signal peptide of xylanase B was replaced with α signal peptide to identify the effect of signal peptide on the secretion of expressed protein, recombinant *S. cerevisiae* pYES2-*xynB* with xylanase B original signal peptide and pYES2-*xynB*- α with α -signal peptide were obtained. The result showed that the xylanase B was expressed successfully. A target protein band of approximately 24kDa was identified on SDS-PAGE gel map. The optimal action temperature of expressed xylanase B was 50℃ and the optimal action pH value was 5.0, Mn^{2+} inhibited the activity of xylanase B strongly. The induction time of maximum activi-

收稿日期: 2013-03-06

修回日期: 2013-03-28

作者简介: 张水龙 (1984-), 男, 硕士研究生, 主要从事生物技术研究。

* 国家 973 项目 (2010CB736209, 2012CB723605), 国家 863 项目 (2012AA022106, 2012AA023406, 2012AA022302, 2013AA050701), 国家国际合作项目 (2010DFB63590, 2011DFA61910), 广西科学研究与技术开发计划项目 (桂科合 10100019-21, 桂科攻 1099071, 桂科合 1140010-15), 广西科技创新能力与条件建设计划项目 (桂科能 12237022), 广西自然科学基金项目 (2012GXNSFAA053062), 广西科学院基本科研业务费项目 (10YJ25SW15, 12YJ25SW04), 八桂学者建设工程专项经费项目资助。

** 通讯作者。

ty of xylanase B decreased from 72h to 48h by replacing the xylanase B original signal peptide with α -signal peptide. However, the replacement of signal peptide caused the decrease of the maximum activity of xylanase B from 7.59U to 3.97U.

Key words: xylanase B, *Aspergillus niger*, *Saccharomyces cerevisiae*

半纤维素是植物性纤维材料的重要组成部分,而木聚糖是半纤维素的主要成分,在被子植物中约占干物质重的 15%~30%,在裸子植物中占 7%~12%^[1]。木聚糖酶(EC3.2.1.8)可以将木聚糖降解成小分子物质,产物以低聚木糖为主,此外还有少量的木糖、阿拉伯糖等成分。木聚糖酶广泛应用于造纸、食品、饲料等行业^[2],例如造纸业中的纸浆预处理、啤酒、果汁等饮料的澄清、饲料中抗营养因子的去除、低聚木糖的生产等等。许多微生物可以产生木聚糖酶,如黑曲霉、里氏木霉^[3]、青霉等^[4]、灰浅红链霉菌等。目前的研究主要集中在产木聚糖酶菌株筛选、发酵培养基优化、诱变育种、木聚糖酶组分分离纯化等,但对木聚糖酶基因的克隆、异源表达方面的研究较少。本研究从 1 株黑曲霉菌株中克隆木聚糖酶基因 *xynB*,并在酿酒酵母中成功进行表达。酿酒酵母被美国食品与药品管理局认定为一种安全菌^[5],用它作为表达宿主,符合食品用与饲用酶制剂的要求。发酵完成后,剩余菌体可以收获,制成高蛋白饲料,既可以避免环境污染,又可以增加经济效益。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

黑曲霉 40616 菌株购自中国工业微生物菌种保藏管理中心(CICC),大肠杆菌 DH5 α 、酿酒酵母 INVSC1(*leu - trp - his - ura -*)、大肠杆菌酿酒酵母穿梭质粒 pPYES2 均由本实验保藏。

限制性内切酶 *EcoR* I、*Xba* I、连接酶、LA Taq 酶购自宝生物工程(大连)有限公司,测序委托上海英骏公司进行。无氨基酸酵母氮源(YNB)购自 Difco, yeast extract, trptone 购自 OXOID 公司,其他试剂为国产分析纯。

培养基有 LB 培养基(1% NaCl, 1% trptone, 0.5% yeast extract)、YPD 培养基(2% 葡萄糖, 2% trptone, 1% yeast extract)、SC-U 培养基(2% 葡萄糖, 0.67% YNB, 0.115% 缺省尿嘧啶的氨基酸混合物),和诱导培养基(用半乳糖代替葡萄糖即可)。固体培养基添加 2% 琼脂。

1.2 实验方法

1.2.1 黑曲霉 *xynB* 基因克隆、内含子去除与序列分析

使用袁洪水等^[6]的方法提取黑曲霉基因组

DNA,作为扩增 *xynB* 基因的模板。参考 GenBank 上黑曲霉 *xynB* 基因核酸序列(Accession Number: EU423881)设计引物。利用引物对 *xynB*-1, *xynB*-2 扩增木聚糖酶基因 *xynB*,利用引物对 *xynB*1, *xynB*-2 扩增外显子 1,引物对 *xynB*3, *xynB*4 扩增外显子 2,然后将两个外显子进行重叠延伸 PCR(gene splicing by overlap extension PCR)^[7],得到去除内含子的木聚糖酶基因 *xynB*。用质粒 pPIC9K 作模板,利用引物对 α -1, α -2 扩增 α 信号肽,利用 α -3, α -4 扩增去除自身信号肽的 *xynB* 基因,通过重叠延伸 PCR,可得到与 α 信号肽融合的 *xynB* 基因。将黑曲霉 *xynB* 基因核酸序列提交至 GenBank(Accession Number: KC417394),选用 Blast 程序进行同源性搜索,对序列进行分析。实验所用引物序列如下:
*xynB*1: 5'-CCGGAATTCAAAAAAATGCTCACCAAGAAC-3'; *xynB*2: 5'-CTGTAGGTGATGTCCTGCGCACTTCCG-3'; *xynB*3: 5'-CGGAAGTGCGCAGGACATCACCTACAG-3'; *xynB*4: 5'-CGGCTCTAGATTAATGATGATGATGATGATGCTGAACAGTGATGGAGGAAG-3'; *xynB* - α -1: 5'-CCGGAATTCAAAAAAATGAGATTTCTTCAATT-3'; *xynB* - α -2: 5'-GTTCGTGGGGAACAGCTTCAGCCTCTC-3'; *xynB* - α -3: 5'-GAGAGGCTGAAGCTGTTCCCCACGAC-3'; *xynB* - α -4: 同 *xynB*4。下划线处表示酶切位点。

1.2.2 重组表达质粒构建和酿酒酵母感受态制备与转化

扩增的基因含有 *EcoR* I, *Xba* I 酶切位点,双酶切以后,通过 T4 连接酶与同样经过双酶切处理的质粒 pYES2 相连,转化大肠杆菌 DH5 α ,菌落 PCR 筛选阳性转化子,提取质粒送交测序公司测序。重组质粒按照信号肽不同分别命名为 pYES2-*xynB*(含自身信号肽)和 pYES2-*xynB*- α (含 α 信号肽)。按照 invitrogen 公司实验方法进行酿酒酵母化学感受态制备(醋酸锂法)及重组质粒转化,重组酿酒酵母根据转入质粒的不同,分别命名为酿酒酵母 pYES2、酿酒酵母 pYES2-*xynB*、酿酒酵母 pYES2-*xynB*- α 。

1.2.3 重组酿酒酵母诱导表达和重组木聚糖酶纯化

重组酿酒酵母用 SC-U 培养基培养 24h,测定 OD_{600} ,计算使 50ml 诱导培养基 OD_{600} 达到 0.4 所需的菌液,收集菌液,离心,菌体转入 50ml 的诱导培养

基进行诱导,培养温度 30℃,转速 180r/min。每隔 12h 取样,4℃,8000r/min 离心 10min,上清即为粗酶液。酿酒酵母经诱导培养后,收集培养液,4℃,8000r/min 离心,收集上清,用 80%饱和度的(NH₄)₂SO₄沉淀,沉淀用 pH 值 5.0 的缓冲液溶解,超滤(millipore,MWCO = 3kDa),SDS-PAGE 检测重组蛋白。

1.2.4 木聚糖酶酶活和酶学性质测定

适当稀释的 50μl 木聚糖酶 B,加入 1.95ml 的 1%木聚糖(磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制,pH 值 5.0,50℃下反应 30min,加入 2mlDNS 溶液灭活,沸水浴 10min,冰浴冷却,定容到 25ml,测量 OD₅₂₀。1 个酶活单位(U)定义为在上述反应条件下,每分钟释放 1μmol 木糖的酶量^[8]。

木聚糖酶酶学性质测定在其他测定条件不变的情况下,测量不同温度下酶活力(30~80℃),考察温度对酶催化活力的影响。在最适温度下,使反应在不同 pH 值的缓冲液(pH 值 3~8)中进行,考察 pH 值对酶活力的影响。木聚糖酶在不同温度中保持 30min(20~80℃),然后在最适温度,最适 pH 值反应条件下测定残余的酶活,以 4℃保温处理的木聚糖酶酶活计为 100%,考察酶的热稳定性。酶在不同 pH 值缓冲液中孵育 3h 后,测定残余酶活,未经过处理的木聚糖酶酶活计为 100%,考察木聚糖酶 B 的 pH 值稳定性。反应底物中加入终浓度 1mM 的不同金属离子,测定酶活,以未加金属离子时测得的酶活计为 100%,考察金属离子对木聚糖酶酶活的影响。

2 结果与分析

2.1 木聚糖酶 *xynB* 基因的克隆与内含子的去除

琼脂糖凝胶电泳出现 1 条约 750bp 的 *xynB* 基因条带,通过重叠延伸 PCR,得到去除内含子的 *xynB* 基因(图 1)。测序结果与黑曲霉 *xynB* 基因(Accession Number: AY126481)同源性最高,为 98%,而两者编码的蛋白质序列则完全相同,这是由于突变主要发生在内含子区的缘故。

2.2 信号肽对重组木聚糖酶诱导表达的影响

电泳分析和测序证实带 *xynB* 基因的 pYES2 质粒已经成功导入酿酒酵母 INVSC1 菌株后,按照方法 1.2.5 进行木聚糖酶 B 的诱导表达(图 2)。含空质粒 pYES2 的酿酒酵母 pYES2 未检测到木聚糖酶酶活,而酿酒酵母 pYES2-*xynB*-α 与酿酒酵母 pYES2-*xynB* 均检测到木聚糖酶酶活。酿酒酵母 pYES2-*xynB* 在诱导 72h 后酶活最高,为 5.56U,而酿酒酵母 pYES2-*xynB*-α 则在诱导 48 后酶活最高,为 3.98。

酿酒酵母 pYES2-*xynB* 最高酶活为酿酒酵母 pYES2-*xynB*-α 最高酶活的 1.9 倍,表明对于木聚糖酶 B 而言,信号肽种类对分泌具有显著的影响,自身信号肽引导分泌的能力要比 α 信号肽要强。

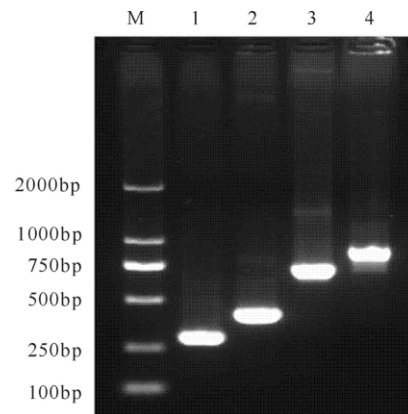


图 1 *xynB* 基因的克隆与内含子的去除

Fig. 1 Cloning of gene *xynB* and removal of intron
M: marker; 1. 外显子 1; 2: 外显子 2; 3: 不含内含子的 *xynB*; 4: 含内含子 *xynB*

M: marker, 1. exon1, 2: exon2, 3: *xynB* gene without intron, 4: *xynB* gene with intron

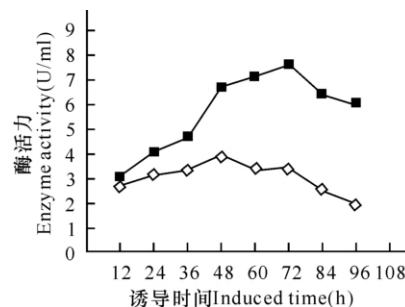


图 2 诱导时间与酶活的关系

Fig. 2 Effect of induction time on xylanase B activity

○: pYES2-*xynB*-α; ■: pYES2-*xynB*.

2.3 重组木聚糖酶表达验证

通过 SDS-PAGE 检测,酿酒酵母 pYES2-*xynB* 出现 1 条约 24 kDa 的目的蛋白质条带,而酿酒酵母 pYES2 未有此条带出现,说明此条带的确为木聚糖酶 B(图 3),表明 *xynB* 基因在 pYES2-*xynB* 菌株得到表达。

2.4 重组木聚糖酶 B 的酶学性质

2.4.1 木聚糖酶 B 的最适催化温度与 pH 值

测定不同温度下木聚糖酶酶活,结果如图 4 所示。从图 4 中可以看出,木聚糖酶 B 在 45~55℃ 的温度范围催化活力最高,超过 55℃ 酶活急剧降低,这可能是高温导致酶的不可逆变性所致。测定不同 pH 值条件下木聚糖酶 B 的酶活,结果如图 5 所示。从中可以看出,木聚糖酶 B 在酸性条件下催化活力

较强,pH 值为 5 时活力最高,pH 值超过 6 时,酶活急剧下降。

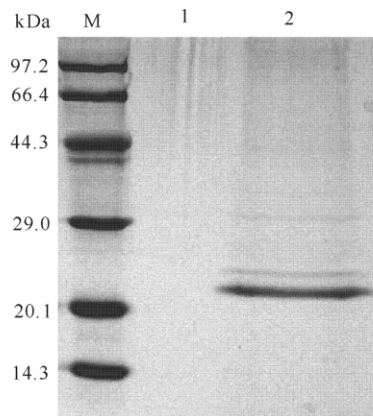


图 3 木聚糖酶 B 的 SDS-PAGE 检测

Fig. 3 Detection of xylanase B by SDS-PAGE

M: 蛋白质分子量标准; 1: 酿酒酵母 pYES2; 2: 酿酒酵母 pYES2-xynB

M: protein molecular weight standard, 1: *S. cerevisiae* pYES2, 2: *S. cerevisiae* pYES2-xynB

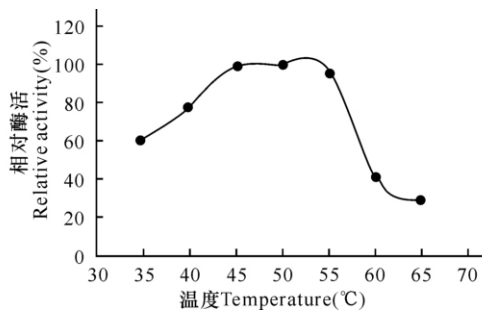


图 4 温度对木聚糖酶活力的影响

Fig. 4 Effect of temperature on xylanase B activity

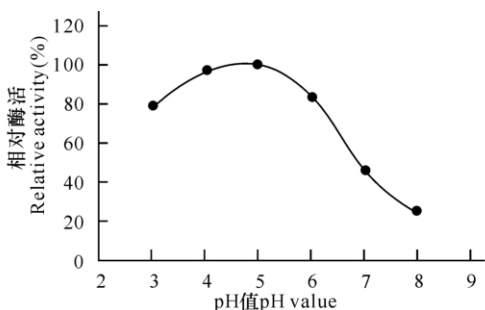


图 5 pH 值对木聚糖酶活力的影响

Fig. 5 Effect of pH value on xylanase B activity

2.4.2 木聚糖酶 B 的温度及 pH 值稳定性

从图 6 中可以看出,木聚糖酶 B 在 50°C 以下较稳定,保温 30min,酶活几乎没有损失,50°C 保温 30min 后,酶活几乎损失一半,而 50°C 以上,酶非常不稳定,保温 30min 后,未能检测到酶活。从图 7 中可以看出,木聚糖酶 B 的 pH 稳定性很强,在 pH 值为 3~11 的缓冲液中,酶活几乎没有损失。

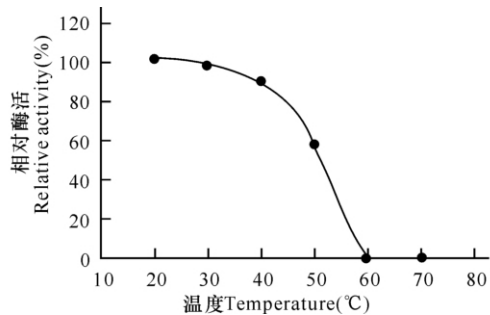


图 6 温度对木聚糖酶 B 稳定性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on stability of xylanase B

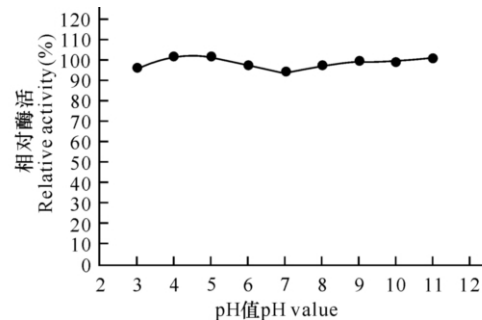


图 7 pH 值对木聚糖酶 B 稳定性的影响

Fig. 7 Effect of pH value on stability of xylanase B

2.4.3 金属离子对木聚糖酶酶活影响

由图 8 可知,Ca²⁺、Mn²⁺、Zn²⁺ 对木聚糖酶 B 具有抑制作用,其中 Mn²⁺ 的抑制作用最强,可使酶活降低约 30%,Cu²⁺ 则具有一定的激活作用,可使酶活增加 7.9%,Fe²⁺、Ni²⁺、Co²⁺、Mg²⁺ 对酶活没有显著的作用。

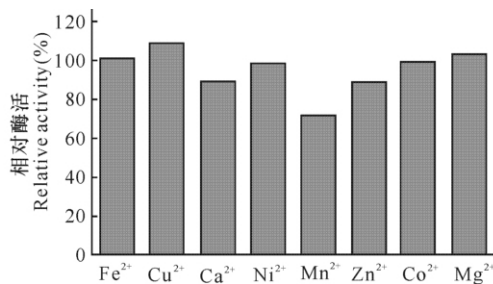


图 8 金属离子对木聚糖酶 B 酶活的影响

Fig. 8 Effect of metal ion on xylanase activity

3 讨论

通过优化产酶培养基与产酶条件,使黑曲霉液体发酵生产木聚糖酶的产量提高了数倍。为进一步提高木聚糖酶的产量,采用基因工程的方法,克隆了黑曲霉木聚糖酶基因 *xynB* 并在酿酒酵母中进行表达。实验结果显示,木聚糖酶基因 *xynB* 在酿酒酵母中成功表达。利用酿酒酵母的 α 信号肽引导木聚糖酶 B 的胞外分泌,酶活为 3.98U,用木聚糖酶 B 自身信号肽引导木聚糖酶 B 的胞外分泌,酶活为 7.56U,是 α

(下转第 157 页 Continue on page 157)

利用鼠李糖乳杆菌发酵木薯淀粉产 L-乳酸的最高发酵浓度为 175.4g/L,糖酸转化率为 78.83%,所用菌株为 CASL^[13]。与之相比,本文报道的 SCT-10-10-60 发酵木薯淀粉产 L-乳酸的最大浓度为 203.33g/L,糖酸转化率为 78.85%,指标略高于 CASL 菌株。SCT-10-10-60 菌株具有较高的潜在工业利用价值。

参考文献:

[1] 欧提库尔,穆斯塔帕,张志东,等. L-乳酸的研究进展及其应用前景[J]. 新疆化工,2005(3):5-18.
 [2] 于雷. 基因组重组技术对鼠李糖乳杆菌的分子育种及其 L-乳酸的发酵[D]. 长春:吉林大学博士论文,2007.
 [3] 王玉华. 酪乳杆菌的分子育种及 L-乳酸发酵工艺研究[D]. 长春:吉林大学博士毕业论文,2006.
 [4] Narayanan N,Roychoudhury P K,Srivastava A. L-lactic acid fermentation and its product polymerization[J]. Electronic Journal of Biotechnology,2004,7(2):167-179.
 [5] 王博彦,金其荣. 发酵有机酸生产与应用手册[M]. 北京:中国轻工业出版社,2000:337-389.
 [7] Socol C R,Stonoga V I,Reimbault M. Production of L-

lactic acid by *Rhizopus species* [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology,1994(1):433-435.

[8] 杨洁彬. 乳酸菌-生物学基础及应用[M]. 北京:中国轻工业出版社,1996:98-216.
 [9] 钱志良,劳含章,王健,等. 工业乳酸发酵的近期进展[J]. 生物加工过程,2005,1(1):23-27.
 [10] Linko Y Y,Javanainen P. Simultaneous liquefaction, saccharification,and lactic acid fermentation on barley starch[J]. Enzyme Microb Technol,1996,19:118-123.
 [11] Gao C,Ma C Q,Xu P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass[J]. Biotechnol Advances,2011,29:930-939.
 [12] 孙靓,孙菲菲,黄艳燕,等. 木薯淀粉发酵生产 L-乳酸的培养条件优化[J]. 中国酿造,2009(7):33-37.
 [13] Wang L M,Zhao B,Liu B,et al. Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus* [J]. Bioresource Technology,2010,101:7895-7901.

(责任编辑:邓大玉)

(上接第 151 页 Continue from page 151)

信号肽分泌效率的 1.9 倍,说明信号肽的种类对木聚糖酶 B 表达量具有显著的影响。与黑曲霉菌株液体发酵相比,重组酿酒酵母的木聚糖酶产量有相当程度的下降,分析原因可能是酿酒酵母分泌蛋白质能力较差,导致木聚糖酶 B 产量降低;酶活降低也可能与菌株的性质有关,Gorgens 等发现异源木聚糖酶在营养缺陷的酿酒酵母菌株中分泌严重降低,虽然可以通过在培养基中添加相应的氨基酸来克服,但是酿酒酵母的生长速度仍然缓慢。分析原因可能是细胞既要合成氨基酸,又要分泌蛋白,导致细胞的负担加重^[9]。

为解决木聚糖酶 B 在酿酒酵母中表达产量比黑曲霉菌株液体发酵产量要低的问题,下一步的研究可从以下两方面着手:一是克隆黑曲霉中其他木聚糖酶基因,在酿酒酵母中表达。由于黑曲霉中具有多种木聚糖酶基因,木聚糖酶 B 可能不是复合酶系中发挥主要作用的成分。如果克隆黑曲霉中其他木聚糖酶基因,然后进行异源表达,可能会得到较好的结果;二是更换表达宿主,如乳酸克鲁维酵母、粟酒裂殖酵母等。乳酸克鲁维酵母已经成功表达多种外源蛋白质,具有分泌能力超强、安全、大规模发酵特征优良、整合表达能力等优点。

参考文献:

[1] 曹云鹤,陈小玲,贺平丽,等. 硫色曲霉木聚糖酶基因

xynA 的克隆、表达及酶学性质分析[J]. 生物技术通讯,2006,17(6):878-881.

[2] 彭林才,陈元彩,付时雨,等. 黑曲霉液体发酵产木聚糖酶条件的研究[J]. 造纸科学与技术,2008,27(3):18-21.
 [3] Hartrich D,Nidetzky B,Kulbe K D,et al. Production of fungal xylanase [J]. Bioresource Technology,1996,58(2):137-161.
 [4] Li Y,Cui F J,Liu Z Q,et al. Improvement of xylanase production by *Penicillium oxalicum* ZH-30 using response surface methodology[J]. Enzyme and Microbial Technology,2007,40(5):1381-1388.
 [5] Nevoigt E. Progress in Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiol Mol Biol Rev,2008,72(3):379-412.
 [6] 袁洪水,李术娜,张爱莲,等. 石英砂研磨法快速提取顶头孢霉染色体 DNA[J]. 河北农业大学学报,2007,30(5):8-11.
 [7] Horton R M,Hunt H D,Ho S N,et al. Engineering hybrid gene without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension PCR[J]. Gene,1989,77(1):61-68.
 [8] 吕世锋,任建伟,张满,等. 黑曲霉液体发酵产木聚糖酶的研究[J]. 山东化工,2011,40(9):8-12,19.
 [9] Gorgens J F,Planas J,Zyl W H,et al. Comparison of three expression systems for heterologous xylanase production by *S. cerevisiae* in defined medium[J]. Microbiol Revs,2004,21(14):1205-1217.

(责任编辑:邓大玉)