

里氏木霉内切- β -甘露聚糖酶基因在毕赤酵母中的表达

Expression of Endo- β -mannanase Gene from *Trichoderma reesei* in *Pichia pastoris*

韦跃华, 毛爱军, 何永志, 乔 宇, 董志扬*

WEI Yue-Hua, MAO Ai-Jun, HE Yong-Zhi, QIAO Yu and DONG Zhi-Yang*

中国科学院微生物研究所微生物资源国家重点实验室 北京 100080

State Key Laboratory of Microbial Resources of Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

摘 要 采用 PCR 方法从里氏木霉(*Trichoderma reesei*)基因组中获得含有两个内含子的内切- β -甘露聚糖酶全长基因,末端重叠延伸 PCR 去除内含子后,将其插入到巴斯德毕赤酵母(*Picher pastoris*)表达载体 pPIC9K 中,位于 α -因子信号肽序列的下游,并与其同框,获得重组质粒 pM242。重组质粒线性化后用电击法转化毕赤酵母菌株 GS115。经大量筛选,获得高效分泌表达内切甘露聚糖酶的毕赤酵母工程菌株 Gpm125。摇瓶发酵结果表明,培养基中甘露聚糖酶的活力可达 12.5IU/mL。重组酶最适 pH 和最适反应温度分别为 5.0 和 80℃,在 pH5.0~6.0 时酶活稳定,在 pH5.4 时 70℃保温 30min 酶活维持 50% 以上。

关键词 内切甘露聚糖酶,分泌表达,酶学性质

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)06-0878-06

Abstract A complete mannanase gene with two introns was cloned from *Trichoderma reesei* by PCR. The two introns were then removed by overlap extension PCR. The gene encoding the mature mannanase protein was inserted into the expression vector pPIC9K, downstream of a α -factor signal peptide sequence. The resultant recombinant vector was named pM242. After linearized with *Sac* I, pM242 was transformed to *Pichia pastoris* GS115 by electroporation. After screening, the recombinant strain Gpm125 that expresses the secretory protein at high level was obtained. The activity of the recombinant mannanase reached 12.5IU/mL. Optimum pH and temperature for the recombinant enzyme were 5.0 and 80℃, respectively. The enzyme was stable at pH5.0~6.0 and maintained over 50% of original activity after incubation at 70℃ for 30min.

Key words Endo-1,4-mannanase, secretory expression, enzymatic properties

β -D-1,4-甘露聚糖酶(β -D-1,4-mannanase; EC 3.2.1.78)是一类能够水解含有 β -D-1,4-糖苷键的甘露寡糖、甘露多糖的内切水解酶。它属于半纤维素酶类。该酶广泛存在于动物、植物和微生物中,在造纸工业、食品工业和农业中有广泛的应用^[1-2]。到目前为止,细菌来源的甘露聚糖酶以芽孢杆菌研究最多,真菌来源的甘露聚糖酶报道较少,酶活普遍较

低,例如黑曲霉的甘露聚糖活性仅为 6.5IU/mL^[3],而 Ratto 等报道里氏木霉的甘露聚糖活性仅为 1.4IU/mL^[4]。

里氏木霉 RutC30 所产生的甘露聚糖酶蛋白有 5 种,其中活性最高的两种酶已经获得纯化^[5]。后来又发现,这两种甘露聚糖酶同属于基因 *man1* 的产物^[6]。该酶具有纤维素结合域,属于糖苷水解酶第五家族。其晶体结构以及水解机制已经得到深入的

研究^[7-11]。

目前国内外有关甘露聚糖酶基因的克隆表达研究较少。近来细菌来源的甘露聚糖酶陆续得到克隆并在 *E. coli* 中表达 ,发酵酶活从 8×10^{-3} IU/mL^[12] 到 10.0 IU/mL^[13] ;真菌来源的甘露聚糖酶报道的还不多 ,只有里氏木霉和刺突曲霉 (*Aspergillus aculeatus*) 的甘露聚糖酶基因在酿酒酵母中得到表达^[7,14] ,但酶活力非常低 ,如酿酒酵母表达里氏木霉 man1 活力仅为 0.22nkat^[7] (相当于 1.3×10^{-2} IU/mL)。国内在这方面研究仍为空白。本文在国内外首次报道利用毕赤酵母成功表达木霉甘露聚糖酶基因 man1 ,获得了较高分泌表达的甘露聚糖酶的毕赤酵母基因工程菌株 Gpmf25 ,发酵 120h 重组甘露聚糖酶活力可达 12.5IU/mL ,比酿酒酵母表达的里氏木霉甘露聚糖酶的活力高出近 1000 倍。

1 材料与方法

1.1 材料

里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) QM9414 购自中国科学院微生物研究所菌种保藏中心 ,毕赤酵母 (*Pichia Pastoris*) GS115 和 pPIC9K 表达载体及 G418 购自 Invitrogen 公司 ,质粒 pGEM-T Vector 购自 Promega 公司 ,限制酶、T4 DNA 连接酶、La Taq DNA 聚合酶等购自 TaKaRa 公司 ,Locust bean gum 购自 Sigma 公司 ,DNA 纯化试剂盒购自上海申能博彩生物技术有限公司 ,蛋白质分子量标准购自上海生物化学研究所 ,PCR 引物合成及序列测定由上海基康公司完成。

1.2 方法

1.2.1 里氏木霉 QM9414 菌株基因组 DNA 的提取 :参照文献^[15] 方法从里氏木霉 QM9414 中提取基因组 DNA。

1.2.2 里氏木霉 man1 成熟蛋白编码序列的克隆 :

表 1 PCR 扩增所用的引物及序列
Table 1 Primers used for PCR

Primer	Primer sequence
MF	5'-TCCGAATTCGCTTCGAGCTTTGTAACCAT-3'
MR	5'-TTGCGGCCGAAGCTACCGACATCCTATAT-3'
din1	5'-TGTTCCCCAAGAGTCCGGATAGAGGTGG-3'
din2	5'-GGACTCTTGGGAACAACTACACTTGG-3'
din3	5'-TGCGCCGTATTCTTCAAAACACGCAAGGT-3'
din4	5'-TGAAGAATACGGCGCACAGCAAAACCCC-3'

首先根据文献报道的序列^[6] ,设计引物 MF、MR 扩增 man1 全长序列 :PCR 反应体系 50μL ,其中含 50ng 里氏木霉 QM9414 菌株基因组 DNA 0.2mmol/L

dNTP 25 pmol 每种引物 1 μmol PCR 反应缓冲液 2.5 u La Taq DNA 聚合酶。反应条件为 :94℃ 预变性 5min 后 94℃ 变性 1min 57℃ 退火 1min 72℃ 延伸 2min 30 个循环 ,再 72℃ 延伸 5min。回收 PCR 产物并连接 pGEM-T Vector ,转化大肠杆菌 DH5α ,获得重组质粒 TMC ,测序鉴定。

man1 上的外显子和内含子如图 1 所示 ,采用引物末端重叠延伸方法 ,设计 PCR 扩增引物 (表 1) ,以去除 man1 基因的信号肽序列和内含子 ,获得 man1 成熟蛋白编码序列 (图 1)。各 PCR 反应的模板和引物如图 1 所示。除 PCR1、PCR2、PCR4、PCR5 延伸时间为 1min ,其他条件全同上述。将 PCR6 的产物连接 pGEM-T Vector ,转化大肠杆菌 DH5α ,重组质粒命名为 TM24 ,并测序鉴定。

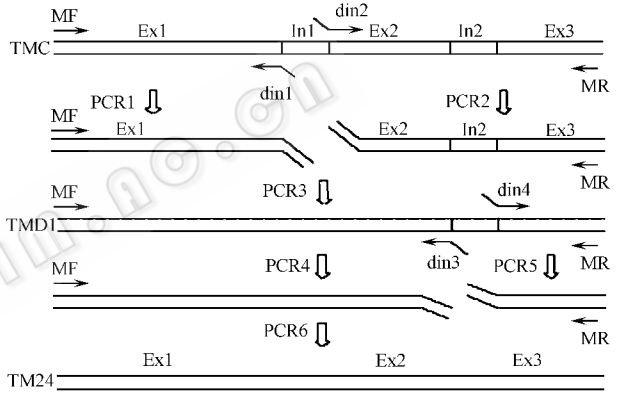


图 1 重叠延伸 PCR 去除 man1 内含子 In1、In2 示意图
Fig. 1 Deletion of In1 and In2 from man1 by Overlap Extension PCR

1.2.3 毕赤酵母重组表达载体的构建 :将质粒 TM24 上 man1 的 cDNA 序列经 *EcoR* I、*Not* I 双酶切后插入毕赤酵母表达载体 pPIC9K 的多克隆位点 ,使其位于 α-因子信号肽序列的下游 ,并与之同框。转化 DH5α 得到重组质粒 pM242 ,并进行限制性酶切及测序鉴定。

1.2.4 毕赤酵母的电转化 :质粒 pM242 经 *Sac* I 线性化后 ,电转化酵母感受态细胞 GS115。电转化参数为 :1500V ,25μF ,200Ω。化转之后的酵母细胞在 RDB 平板上培养 3 ~ 5d ,直至长出菌落。

1.2.5 重组毕赤酵母的平板筛选 :用灭菌牙签挑取转化子分别点种到筛选培养基 MM 和 MD 平板上 ,30℃ 培养 2d ,在 MD 上生长正常而在 MM 上生长缓慢或不生长的转化子为阳性转化子。挑取阳性转化子 ,分别点种于含 250μg/mL、500μg/mL、750μg/mL、1000μg/mL G418 的 YPD 培养基平板上 ,进一步筛选阳性转化子。

1.2.6 重组毕赤酵母工程菌株的诱导表达 :将阳性转化子接种于含 50mL BMGY 培养基中的 250mL 的摇瓶中 ,30℃ 下 220r/min 摇床培养 48h。离心收集菌体 ,将菌体转移至 25mL BMMY 诱导培养基中 ,30℃ 下 220r/min 继续培养 ,每 24h 补加甲醇使其浓度为 0.5%。每 24h 取样 ,4℃ 下 6000r/min 离心 5min ,收集上清 ,即为粗酶液。

1.2.7 刚果红平板检测酶活 :取甲醇诱导 48h 不同菌株的粗酶液各 20μL ,加入到含 0.5% Locust bean gum 的琼脂平板的孔穴中 ,50℃ 培养过夜 ,用 0.1% 的刚果红染色 1h ,再用 1mol/L NaCl 脱色 40min^[16]。酶解圈的大小可大致反映菌株产重组甘露聚糖酶活力的高低。

1.2.8 重组甘露聚糖酶的活力测定 :采用 DNS 定糖法测定内切甘露聚糖酶的活性 ,底物的制备和酶活测定参照文献^[6]。定义每分钟催化产生 1μmol 甘露糖所需酶量为一个酶活力单位 (IU)。

1.2.9 重组毕赤酵母表达产物的 SDS-PAGE 电泳 :分别取诱导发酵 24、48、72、96h 的粗酶液 20μL ,进行 10% SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 ,分析重组蛋白的表达情况。

1.2.10 重组甘露聚糖酶最适 pH 及 pH 稳定性 :用不同 pH 的柠檬酸缓冲液制备反应底物^[6] ,测定重组内切甘露聚糖酶的活力 ;将重组甘露聚糖酶在不同 pH 值的缓冲液中 (pH3.0~6.0 :50mmol/L 柠檬酸钠缓冲液 ,pH7.0~8.0 :50mmol/L 磷酸缓冲液) 30℃ 保温 24h ,检测剩余的酶活力。经 3 次取样统计分析 ,计算相对酶活力。

1.2.11 重组内切甘露聚糖酶最适温度及温度稳定性 :在不同温度条件下测定重组甘露聚糖酶的活力 ;将重组甘露聚糖酶在不同温度下保温 120min ,检测剩余的酶活力。经 3 次取样统计分析 ,计算相对酶活力。

2 结果

2.1 里氏木霉 *man1* 基因成熟蛋白编码序列的克隆

以里氏木霉 QM9414 为模板 ,以 MF 和 MR 为引物 PCR 得到大约 1.4kb 的片段 (如图 2) ,将该片段克隆到 pGEM-T Vector 中 ,得到质粒 TMC ,序列测定结果表明 ,该片段与文献报道的 *man1* 序列同源性为 100%^[7]。以 TMC 为模板 ,分别扩增 Ex1 和 Ex2-In2-Ex3 片段。扩增获得的 Ex1 片段大小约为 700bp ,Ex2-In2-Ex3 片段大小约为 500bp ,与理论值 739bp 和

542bp 相符。再以 Ex1、E2-In2-Ex3 片段混合作为模板 ,MF、MR 为引物进行 PCR 扩增 ,得到去除 In1 的基因的全编码序列 ,长度约为 1.2kb ,并与理论值 1238bp 相符。以同样的方法去除第二个内含子 In2 ,最后得到 Ex1-Ex2-Ex3 ,即 *man1* 成熟蛋白编码序列 (图 3) 。测序结果表明 ,两个内含子都正确除去。

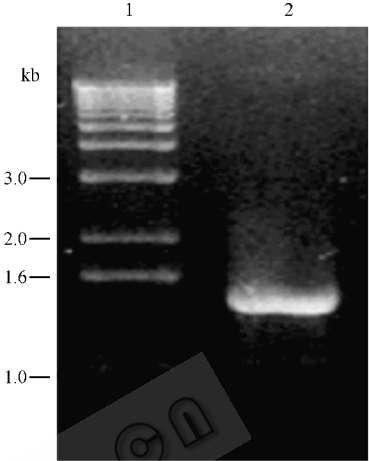


图 2 从里氏木霉 QM9414 中扩增 *man1* 全长序列
Fig. 2 PCR product of the whole length *man1* from *Trichoderma reesei* QM9414
1 : 1kb DNA Ladder ; 2 : *man1* gene with two introns .

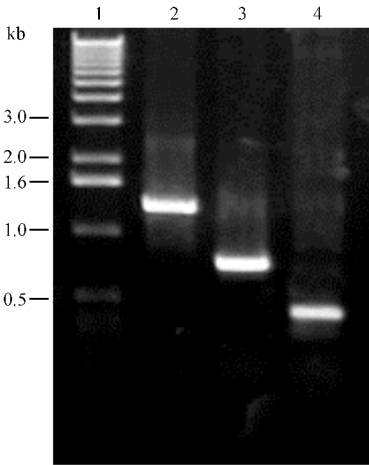


图 3 末端重叠延伸 PCR 去除第二个内含子 In2
Fig. 3 Deletion of In2 by overlap extension PCR
1 : 1kb ladder ; 2 : *man1* without introns obtained by overlap extension of 3 and 4 ; 3 : fragment Ex1-Ex2 ; 4 : fragment Ex3 .

2.2 毕赤酵母表达载体的构建

将 *man1* 的成熟蛋白编码序列进行 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后插入到毕赤酵母表达载体 pPIC9K 中 ,并插入 α-因子信号肽序列下游的阅读框 ,获得重组质粒 pM242。进行如下酶切鉴定 :*EcoR* I 和 *Not* I 双酶 (1313bp) , *Sac* I (2371bp) , *Sal* I (2083bp) , *Pst* I (1242bp、1827bp、2555bp、4357bp) , *Bgl* II (1431bp、2403bp、6666bp) ,括号内表示理论上切出的片段长

度。电泳结果与理论值相符(图4)。测序结果表明插入片段在 pPIC9K 中有正确的阅读框。

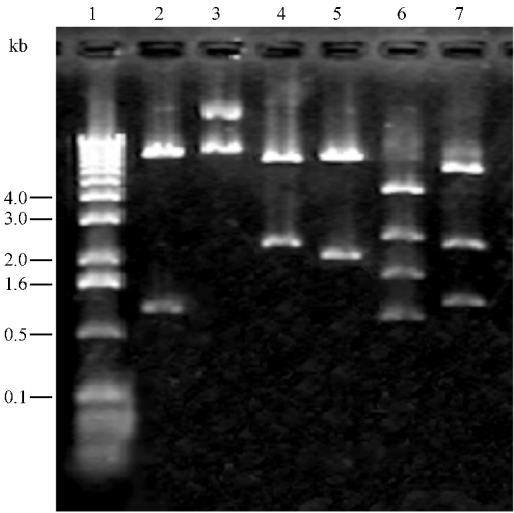


图4 重组质粒 pM242 的酶切分析

Fig. 4 Restriction analysis of the recombinant plasmid pM242
1:1kb DNA ladder; 2:pM242 digested with *EcoR* I and *Not* I; 3:pM242 without digestion; 4:pM242 digested with *Sca* I; 5:pM242 digested with *Sal* I; 6:pM242 digested with *Pst* I; 7:pM242 digested with *Bgl* II.

2.3 重组毕赤酵母的筛选和鉴定

在 MM 和 MD 筛选培养基上筛选得到 500 个阳性转化子,分别点种于含有 250μg/mL、500μg/mL、750μg/mL 和 1000μg/mL G418 的 YPD 平板上,在含有 1000μg/mL G418 的平板上获得了近 50 个阳性转化子。分别诱导表达这些阳性转化子,取诱导 24h 的培养物上清液 200μL 进行 DNS 法测酶活。筛选获得酶活较高的 Gpma43、Gpmb44、Gpmb6、Gpmb18、Gpmf16、Gpm25 共 6 个克隆。酶活最高的 Gpmf25 和次高 Gpmb44 进行刚果红平板检测,酶解圈如图 5 所示。

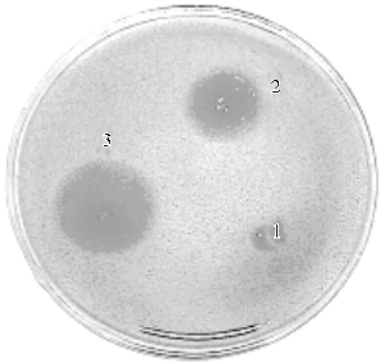


图5 分泌表达的重组内切甘露聚糖平板检测

Fig. 5 Detection of recombinant mannanase on agar medium containing LBG

1:GS115 as control; 2:transformant Gpmb44; 3:transformant Gpmf25.

2.4 重组毕赤酵母 Gpmf25 的诱导表达和 SDS-PAGE 电泳

以甲醇诱导表达重组毕赤酵母 Gpmf25,每 24h 取样,测定培养基中分泌表达的内切甘露聚糖酶活力,发现甘露聚糖酶的活力在诱导培养 120h 达到高峰,活力为 12.5IU/mL,SDS-PAGE 电泳分析结果表明(图 6)表达产物分子量约为 60kD,与文献报道的 53kD 相比,重组表达的甘露聚糖酶分子量略偏大^[6]。

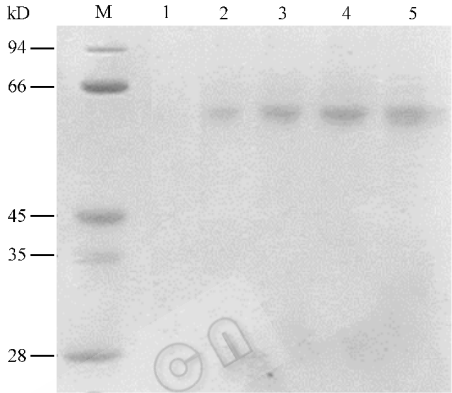


图6 重组内切甘露聚糖酶的 SDS-PAGE 分析

Fig. 6 SDS-PAGE analysis of recombinant mannanase
M: Molecular weight ladder; 1:Gpmf25 without induction; 2~5:Gpmf25 at 24h, 48h, 72h and 96h after induced by methanol.

2.5 重组内切甘露聚糖酶最适 pH 及 pH 稳定性

鉴于工程菌发酵产生的酶液将直接作为酶制剂用于生产,因对该重组甘露聚糖酶发酵液进行相关酶学性质分析。在不同 pH 反应条件下分析重组内切甘露聚糖酶发酵液的活力,表明最适 pH 为 5.0(图 7),而 Stalbrand 报道的甘露聚糖酶纯酶最适 pH4.0^[6]。将重组内切甘露聚糖酶发酵液在不同 pH 值的缓冲液中 30℃保温 24h,检测剩余酶活力,发现该酶在 pH5.0~6.0 条件下保持 90% 以上的酶活(图 8),而纯酶在 pH4.0~7.0 之间酶活稳定。

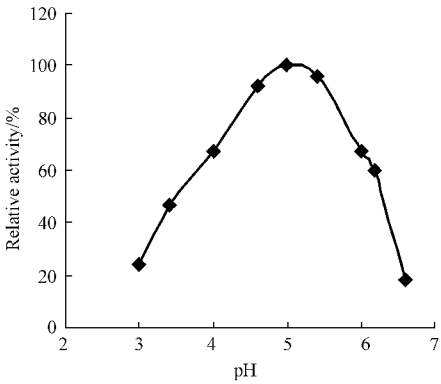


图7 重组内切甘露聚糖酶的最适 pH 值

Fig. 7 Optimum pH value for recombinant mannanase

2.6 重组内切甘露聚糖酶最适温度及温度稳定性

在不同温度条件下测定重组甘露聚糖酶发酵液

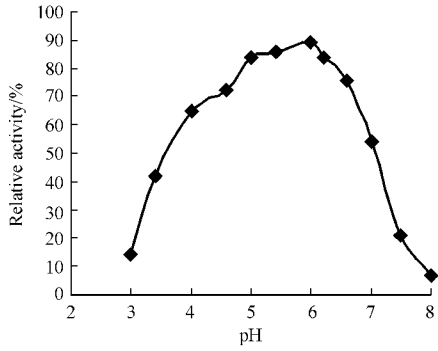


图8 重组表达内切甘露聚糖酶的 pH 值稳定性

Fig. 8 pH stability of recombinant mannanase

的活力,发现该酶最适反应温度为 80℃(图 9), Stalbrand 报道的纯酶的最适温度为 70~80℃^[6]。将重组甘露聚糖酶发酵液分别在不同温度下保温 120min 检测剩余的酶活力。结果表明重组甘露聚糖酶在 80℃ 的条件下保温 30min 后基本丧失酶活力,70℃ 条件下 30min 后保持约 50% 酶活,而在 60℃ 条件下保温 120min 酶活维持 60% 以上;40℃、50℃ 酶活稳定(图 10)。Stalbrand 报道的纯酶在 70℃、30min 酶活基本不变,而在 80℃、30min 酶活维持 80%。

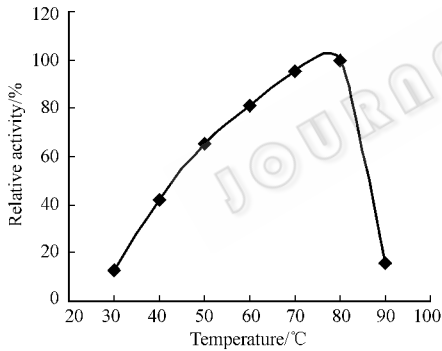


图9 重组内切甘露聚糖酶的最适反应温度

Fig. 9 Optimum temperature for recombinant mannanase

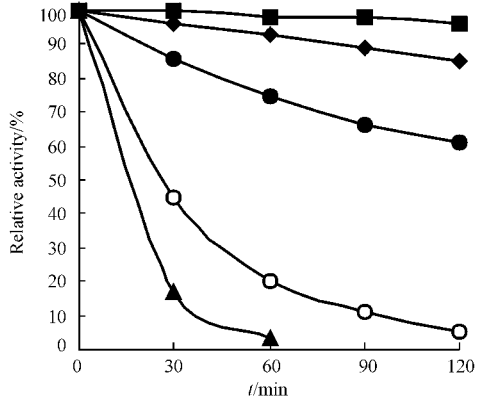


图10 重组表达内切甘露聚糖酶的温度稳定性

Fig. 10 Temperature stability of recombinant mannanase

■ 40℃ ◆ 50℃ ● 60℃ ○ 70℃ ▲ 80℃

3 讨论

甘露聚糖酶能专一水解甘露聚糖多糖链的 β -D-1,4-甘露糖苷键,其对降解半纤维素具有重要的意义。有关研究表明甘露聚糖酶作为饲料添加剂,能够明显提高饲料利用率^[17],在造纸漂白过程中甘露聚糖酶能够降低化学污染^[1]等,甘露聚糖酶还可用来分解食物中的甘露聚糖,产生功能性糖类,由此可改善人体和动物肠道中的菌群组成,促进消化系统的功能^[18],因而甘露聚糖酶研究逐渐受到广泛的关注。1989 年, Akino 首次报道从芽孢杆菌中克隆得到甘露糖酶基因^[19],到目前为止已有大约 30 个微生物来源甘露聚糖酶基因得到克隆,其中有 8 个基因属真菌来源^[20-24],但关于微生物来源的甘露聚糖酶基因异源表达研究相对较少,特别是真菌的甘露聚糖酶基因,只有刺突曲霉和里氏木霉来源的两个基因得到了表达^[7,14]。

近年来 Stalbrand 对里氏木霉甘露聚糖酶进行了较为深入的研究,纯化并分析了其性质,并在酿酒酵母中进行表达^[6-7],酶的结构和功能也获得了系统的研究^[8-12]。然而,在酿酒酵母中表达里氏木霉甘露聚糖酶基因所产甘露聚糖酶的活力很低,使其应用受到限制,而甘露聚糖酶高表达的尝试却未见报道。

本文首次将里氏木霉 β -D-甘露聚糖酶基因在巴斯德毕赤酵母表达,并筛选获得高表达,表达活力较在酿酒酵母中表达的高出近 1000 倍。表达的重组甘露聚糖酶得到正确折叠并分泌到细胞外。经对发酵粗酶液初步鉴定,酶液拥有良好的 pH 和温度稳定性,具有很大的应用潜力。粗酶液较 Stalbrand 报道的纯酶最适 pH 稍高,温度稳定性较低,可能是由于发酵液中的多种杂质影响,在具体的应用中仍须对其性质作进一步评估。基因序列分析发现,该基因 GC 含量是 56%,而毕赤自身高表达的基因 GC 含量约 40%~42%^[25],同时在毕赤中很少使用的密码子如 Arg(CGC, AGG)占了 6 个 Arg 密码子的 4 个,而 Gly 非常用密码子 GGC、GGG 占了 45 个中的 29 个。通过 SDS 电泳分析发现毕赤表达的木霉甘露聚糖酶基因表达产物的分子量为 60kD,大于根据其氨基酸序列推导出的分子量,也大于已报道的里氏木霉原始菌株所产甘露聚糖酶分子量^[6],这可能是由于毕赤酵母糖基化程度不同造成的^[26],在酿酒酵母中表达糖基化更高,达到 70kD^[7]。本研究还发现里氏木霉甘露聚糖酶在毕赤酵母中表达较慢,在甲醇诱导发酵 120h 才达到最高活性,这可能由于毕赤密码子

偏好与木霉有所差异,导致外源基因转录表达较慢^[27]。若通过定点突变的方法改变外源基因糖基化位点和优化同义密码子有可能使该基因在毕赤酵母中得到更高的表达,有关研究我们将作进一步报道。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Buchert J, Salminen J, Siika-aho M *et al.* The role of *Trichoderma reesei* xylanase and mannanase in the treatment of softwood kraft pulp prior to bleaching. *Holzforschung*, 1993, **47**: 473–478
- [2] Viikari L, Kantelinen A, Siika-Aho M *et al.* Application of *Trichoderma reesei* in pulp and paper industry. *Proceedings of the Second Tricel Symposium on Trichoderma Cellulases and Other Hydrolases*, 1993, **8**: 255–262
- [3] McCleary BV. β -D-mannanases. *Methods in Enzymology: Biomass Part A Cellulose and Hemicellulose*. Academic Press Inc, 1988, **160**: 596–610
- [4] Ratto M, Pautamen K. Production of mannan-degrading enzymes. *Biotechnol Lett*, 1988, **10**(9): 661–664
- [5] Stalbrand H, Siika-aho M, Tenkanen M *et al.* Purification and characterization of two β -mannanases from *Trichoderma reesei*. *Journal of Biotechnology*, 1993, **29**: 229–242
- [6] Stalbrand H, Saloheimo A, Vehmaanpera J *et al.* Cloning and expression in *Saccharomyces cerevisiae* of a *Trichoderma reesei* b-mannanase gene containing a cellulose binding domain. *Appl Environ Microbiol*, 1995, **61**: 1090–1097
- [7] Aparicio R, Fischer H, Scott DJ *et al.* Structural insights into the beta-mannosidase from *T. reesei* obtained by synchrotron small-angle X-ray solution scattering enhanced by X-ray crystallography. *Biochemistry*, 2002, **41**(30): 9370–9375
- [8] Hagglund P, Sabini E, Boisset C *et al.* Degradation of mannan I and II crystals by fungal endo-beta-1,4-mannanases and a beta-1,4-mannosidase studied with transmission electron microscopy. *Biomacromolecules*, 2001, **2**(3): 694–699
- [9] Hagglund P, Eriksson T, Collen A *et al.* A cellulose-binding module of the *Trichoderma reesei* beta-mannanase Man5A increases the mannan-hydrolysis of complex substrates. *J Biotechnol*, 2003, **101**(1): 37–48
- [10] Sabini E, Schubert H, Murshudov G *et al.* The three-dimensional structure of a *Trichoderma reesei* β -mannanase from glycoside hydrolase family 5. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 2000, **56**(1): 3–13
- [11] Sabini E, Wilson KS, Siika-aho M *et al.* Digestion of single crystals of mannan I by an endo-mannanase from *Trichoderma reesei*. *Eur J Biochem*, 2000, **267**(8): 2340–2344
- [12] Mingardon F, Perret S, Belaich A *et al.* Heterologous production, assembly, and secretion of a minicellulosome by *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *Appl Environ Microbiol*, 2005, **71**(3): 1215–1222
- [13] Mai V, Wiegel J. Advances in development of a genetic system for *Thermoanaerobacterium spp.*: expression of genes encoding hydrolytic enzymes, development of a second shuttle vector, and integration of genes into the chromosome. *Appl Environ Microbiol*, 2000, **66**(11): 4817–4821
- [14] Setati ME, Ademark P, van Zyl WH *et al.* Expression of the *Aspergillus aculeatus* endo-beta-1,4-mannanase encoding gene (man1) in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the recombinant enzyme. *Protein Expr Purif*, 2001, **21**(1): 105–114
- [15] Zhu H (朱衡), Qu F (瞿峰), Zhu LH (朱立煌). Isolation of genomic DNAs from fungi using benzyl chloride. *Acta Mycologica Sinica* (真菌学报), 1994, **13**(1): 34–40
- [16] Teacher RM, Wood PJ *et al.* Use of congo red-polysaccharide interactions in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Appl Environ Microbiol*, 1982, **43**: 777–780
- [17] Qi JR (齐军茹), Liao JS (廖劲松), Peng ZY (彭志英). Preparation and application of β -mannanase. *Chinese Food Additives* (中国食品添加剂), 2002, **6**: 12–15
- [18] Yang BW (杨文博), Dong SM (董树敏), Shen X (沈庆) *et al.* β -mannanase from NK-27 strain degrade plant gum and products promote growth of *Bifidoacterium*. *Microbiology* (微生物学通报), 1995, **22**(4): 204–207
- [19] Akino T, Kato C, Horikoshi K. Two *Bacillus b*-mannanases having different COOH termini are produced in *Escherichia coli* carrying pMAH5. *Appl Environ Microbiol*, 1989, **55**(12): 3178–3183
- [20] Ali BR, Zhou L, Graves FM, Freedman RB *et al.* Cellulases and hemicellulases of the anaerobic fungus *Piromyces* constitute a multiprotein cellulose-binding complex and are encoded by multigene families. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, **125**(1): 15–21
- [21] Fanutti C, Ponyi T, Black GW *et al.* The conserved noncatalytic 40-residue sequence in cellulases and hemicellulases from anaerobic fungi functions as a protein docking domain. *J Biol Chem*, 1995, **270**(49): 29314–29322
- [22] Millward-Sadler SJ, Hall J, Black GW *et al.* Evidence that the *Piromyces* gene family encoding endo-1,4-mannanases arose through gene duplication. *FEMS Microbiol Lett*, 1996, **141**: 183–188
- [23] Steenbakkers PJ, Li XL, Ximenes EA *et al.* Noncatalytic docking domains of cellulosomes of anaerobic fungi. *J Bacteriol*, 2001, **183**(18): 5325–5333
- [24] Sugino H, Furuichi S, Murao S *et al.* Molecular characterization of a *Rhodotorula*-lytic enzyme from *Paecilomyces lilacinus* having beta-1,3-mannanase activity. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2004, **68**: 757–760
- [25] Zhao X (赵翔), Huo KK (霍克克), Li YY (李育阳). Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, **16**(3): 308–311
- [26] Wang P, Zhang J, Sun Z *et al.* Glycosylation of prourokinase produced by *Pichia pastoris* impairs enzymatic activity but not secretion. *Protein Expr Purif*, 2000, **20**(2): 179–185
- [27] Sinclair G, Choy FY. Synonymous codon usage bias and the expression of human glucocerebrosidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2002, **26**(1): 96–105