

米曲霉果胶酸酯裂解酶(pectin lyase 1)在原核系统中重组表达 Expression of Pectin Lyase 1 from *Aspergillus oryzae* in *Escherichia coli*

赵庆新^{1 2} 袁 生^{1*} 张宇玲¹

ZHAO Qing-Xin^{1 2}, YUAN Sheng^{1*} and ZHANG Yu-Ling¹

1 江苏省生物多样性和生物技术重点实验室,南京师范大学生命科学学院微生物工程重点实验室,南京 210046

2 盐城师范学院生命科学与技术学院,盐城 224002

1 Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, Key Laboratory for Microbial Technology in the College of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China

2 College of Life Science and Biotechnology, Yancheng Teachers College, Yancheng 224002, China

摘 要 来自米曲霉(*Aspergillus oryzae*)和黑曲霉(*Aspergillus niger*)的果胶酸酯裂解酶(pectin lyase)一直被用于传统发酵食品的生产,但自然条件下 *A. oryzae* 和 *A. niger* 的果胶酸酯裂解酶产量较低。通过 RT-PCR 的方法,获得不含信号肽的 *A. oryzae* Pel 1 cDNA,将 Pel 1 cDNA 连入 pET-28a(+)载体,构建 pET-28a(+)-pel1 质粒。pET-28a(+)-pel1 转化 Turner(DE3)plac I 细胞,得到转化子 pET-28a(+)-pel1-Turner(DE3)plac I,表达与 6 个组氨酸融合的 Pel1。进一步对 Pel1 在 *E. coli* 系统中表达的条件进行了研究,在 37℃ 220 r/min 条件下,培养 pET-28a(+)-pel1-Turner(DE3)plac I 细胞,当 OD_{600} 至 0.8 左右时,用 500 μ mol/L isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)进行诱导表达,在 15℃ 和 170 r/min 条件下,继续培养 60 h 后,表达效果最好,产酶可达到 400 u/mL,是 *A. oryzae* 自然条件下产酶量的 4000 倍,也高于已报道的真菌果胶酸酯裂解酶在真菌体系中重组表达的效果。

关键词 米曲霉,果胶酸酯裂解酶 1,大肠杆菌,表达

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)05-0873-05

Abstract Pectin lyases from *Aspergillus oryzae* and *Aspergillus niger* are usually used for the production of traditional fermented foods, but these fungi produce less pectinases under natural conditions. The cDNA coding mature Pel1 (without signal peptide) was amplified from *Aspergillus oryzae* by RT-PCR. Pel1 cDNA was cloned into pET-28a(+) expression vector, then was transformed into *E. coli* Turner(DE3)plac I cells to express Pel1 with 6-His tag. For improving the efficiency of Pel1 expression in *E. coli*, the conditions of expressing the Pel1 in *E. coli* were optimized. *E. coli* Turner(DE3)plac I cells with pET-28a(+)-pel1 was first cultivated at 37℃, 220 r/min until OD_{600} reached about 0.8. Then, cultivation broth was added with 0.05 ~ 0.1 mmol/L IPTG and continuously incubated at 15℃, at 170 r/min for 60 h for expressing of Pel1. The recombinant expressed Pel1 activity could reach 400 u/mL medium, which is 4000-fold of Pel1 produced naturally by *A. oryzae* and superior than known recombinant amount of pectin lyases expressed in different fungi expression systems.

Key words *Aspergillus oryzae*, pectin lyase 1, *Escherichia coli*, expression

Received: January 16, 2007; Accepted: April 11, 2007.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Foundation of China (No.30170005), Jiangsu Province National Natural Science Funds (No. BK2005136) and Jiangsu Province Education Office University Direction National Natural Science Funds (No.07KJD1180237).

* Corresponding author. Tel: +86-25-85891067; Fax: +86-25-83706565; E-mail: yuansheng@njnu.edu.cn

国家自然科学基金(No.30170005),江苏省自然科学基金(No. BK2005136)和江苏省教育厅高校自然科学基金(No.07KJD1180237)资助。

果胶是一类富含半乳糖醛酸的多糖,其主链的半乳糖醛酸残基之间以 α -d-1,4-糖苷键相连,主要存在于高等植物初生细胞壁和中胶层。果胶多糖有三种不同结构域:均一型聚半乳糖醛酸(homogalacturonan, HG)、聚鼠李糖半乳糖醛酸(rhamnogalacturonan-I, RG I)和替代聚半乳糖醛酸(substituted galacturonans, RG II),该三种结构域多糖已经分别从细胞壁中被分离纯化和加以研究^[1,2]。HG是线形的 α -d-1,4-糖苷键相连的多聚半乳糖醛酸,其部分半乳糖醛酸残基的羧基被甲酯化。果胶的降解需要各种果胶酶的作用,如果胶酸酯裂解酶(pectin lyase)、果胶酸裂解酶(pectate lyase)、果胶酸水解酶(polygalacturonase)、果胶酸甲酯酶(pectin methylesterase)、聚鼠李糖半乳糖醛酸水解酶(rhamnogalacturonase)。在上述果胶酶中,只有果胶酸酯裂解酶能够降解高度甲酯化的果胶,因此在果胶降解过程中,果胶酸酯裂解酶起着重要的作用。果胶酸酯裂解酶以 β -消旋机制裂解果胶,其产物的非还原端残基的 C4-C5 之间会形成不饱和双键^[3,4]。

来自 *A. niger*^[5], *A. oryzae*^[3,6], *Penicillium italicum*^[4], *Colletotrichum gloeosporioides*^[7] 和 *Glomerella cingulata*^[8] 的许多真菌果胶酸酯裂解酶基因已经被克隆和研究,*A. niger* 和 *G. Glomerella cingulata* 基因组中存在果胶酸酯裂解酶基因家族。果胶酶在饮料、酒类^[9]、食品、制药、饲料^[10]、造纸和纺织品^[11]等行业中有广泛的应用。

一些果胶酸酯裂解酶的生产和性质已经在许多文献和综述有所报道^[12,13]。*A. oryzae* 和 *A. niger* 是工业化生产果胶酸酯裂解酶的常用菌种。在中国和日本的传统发酵食品酱和酱油的生产中,*A. oryzae* 是常用的菌种。

在自然条件下,真菌需要在果胶酸或果胶酸酯等底物的诱导下,才能产生果胶酸酯裂解酶和其他果胶酶;在其他碳源如葡萄糖或蔗糖存在的条件下,果胶酶的表达会受到抑制^[14]。固体发酵和基因重组技术是解决葡萄糖或蔗糖等碳源抑制真菌果胶酶自然表达的有效方法。*A. oryzae*^[3,9], *A. niger*^[13] 的一些果胶酸酯裂解酶已经通过基因重组技术,替换启动子,实现同源重组表达;来自 *Glomerella cingulata*^[9] 和 *A. nidulans*^[15] 的果胶酸酯裂解酶,已经实现了在酵母体内的异源重组表达。然而,真菌果胶酸酯裂解酶在真菌中重组表达的效果比较差,产酶量约 40u/mL medium 左右^[3,7,9,13,15]。相对于真菌表达系统而言,大肠杆菌表达系统是常用的、更为

方便的表达系统,能够获得较多的重组蛋白,我们已经在原核系统中,成功的表达了来自 *A. nidulans* 的果胶酸裂解酶(Ac pectate lyase A)和来自 *A. oryzae* 的果胶酸内切水解酶(Ac endo-polygalacturonase A),本研究成功实现了 *A. oryzae* 的果胶酸酯裂解酶 I(pectin lyase I, Pel1)在 *E. coli* Turner(DE3)plac I 细胞中的过表达,酶活可达 400u/mL medium,具体报道如下。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

A. oryzae 3.762(野生型)来自中国普通微生物菌种保藏管理中心(China General Microbiological Culture Collection Center, CGMCC),用 50mL 含 1% 甲酯化果胶酸(P9561, Sigma)的基本培养基,150r/min, 30℃避光条件下培养 8d^[7]。大肠杆菌 DH5 α 作为基因克隆的宿主菌。*E. coli* Turner plac I(DE3)(Novagen)用作 *pel1* 基因表达的宿主菌。pMD 18-T Vector(TaKaRa)作为克隆载体,pET-28a(+)(Novagen)用作表达载体。

1.2 *pel1* 基因的克隆与表达

参照 Logemann 等的方法从 *A. oryzae* 的菌丝体中提取总 RNA^[16],然后用 oligo(dT)12~18 primer,通过逆转录得 cDNA。根据 NCBI 核酸数据库中 *A. oryzae* Pel1 基因全长 cDNA 序列(NCBI accession number: AB029322)设计特异引物,正义链为 5'-CATATGGGCGTTTCTGGTTC-3'(为 *Pel1* cDNA 正义链的 61~77 碱基序列,5'端加上 *Nde* I 切点),反义链为 5'-GGATCCTTAGAGCTTGC-3'(为 *Pel1* cDNA 正义链的 1137~1146 碱基序列的反向互补链,5'端加上 *Bam*H I 切点)。使用高保真的 PfuUltra™ DNA 聚合酶(Stratagene)和上述特异引物通过扩增得到不含信号肽的 *Pel1* cDNA,然后将 *Pel1* cDNA 序列连接到 pMD 18-T Vector(TaKaRa),构建 pMD 18-T-*pel1* 质粒转化 DH5 α ,得到 pMD 18-T-*pel1*-DH5 α 阳性转化子;用限制性内切酶 *Nde* I 和 *Bam*H I 将不含信号肽的 *Pel1* cDNA 片段从 pMD 18-T-*pel1* 上切下,连接到 pET-28a(+)(Novagen)表达载体上,转化 *E. coli* Turner plac I(DE3)细胞(Novagen),得到 pET-28a(+)-*pel1*-Turner plac I(DE3)阳性转化子。

pET-28a(+)-*pel1*-Turner plac I(DE3)转化子在 LB 中培养,LB 中分别加入葡萄糖、卡那霉素和氯霉素,分别至终浓度为 1%(W/V)、50 μ g/mL 和 34 μ g/mL。在 37℃、220r/min 条件下培养,当 OD₆₀₀ 达到

0.8 左右时,加入 0.5mmol/L,在 170r/min,15℃ 条件下表达 60h。诱导表达结束后,在 5000g 4℃ 条件下离心 10min,收集菌体,用 5mL 10mmol/L Tris-HCl, pH7.0 溶液洗涤菌体重复一次,然后将菌体在 -80℃ 条件下冻存 6h 以上,然后用 25mL 含 100 μg/mL lysozyme 和 1mmol/L PMSF 的 10mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 溶液重新悬浮细胞,在 0℃ 条件下,超声破碎细胞,离心得上清,上清进一步用 Ni²⁺-nitrilotriacetate-agarose 柱进行亲和层析,包涵体用含 1% triton 的 Tris/HCl pH 7.0 清洗。

1.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

为了检测重组菌表达的 Pel1 重组蛋白产物,采用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测,浓缩胶浓度为 3.5%,分离胶浓度为 11.0%,用考马斯亮蓝 R-250 染色。

1.4 蛋白浓度的测定

参照 Bradford 的方法采用考马斯亮蓝 G-250 法进行可溶性蛋白含量测定^[17]。以牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白,配制标准溶液,制作标准曲线。

1.5 Pel1 酶活的检测

Pel1 酶活测定的样品制备 50mL 菌液表达结束后,收集细胞,用 25mL 含 100μg/mL 溶菌酶和 1mmol/L PMSF 的 10mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 溶液重新悬浮细胞,0℃ 条件下超声破碎细胞,14 000r/min 条件下离心 20min,收集上清,测定上清中可溶性重组表达的 Pel1 酶活。

Pel1 酶活性检测的反应体系为 0.5mL 反应液,内含 50mmol/L sodium acetate (pH 5.0),0.1% 果胶酸酯和适量的 Pel1,在 40℃ 反应 10min^[7]。反应结束后,加 1mL 0.02mol HCl 终止反应,然后在 235nm 检测光吸收值的变化。一个酶活单位定义为每 min 释放的 1μmol 不饱和半乳糖醛酸(unsaturated galacturonic acid)的酶量。在 235nm,不饱和半乳糖醛酸光吸收系数为 5200M⁻¹cm⁻¹^[18]。

1.6 组织离析实验

用 1% 次氯酸钠对土豆块茎进行消毒,再用无菌的生理盐水清洗 20g 土豆,在室温条件下晾干。将土豆块茎切成 2mm × 2mm × 2mm 小块。2g 土豆块茎小块用 1mL 反应溶液(50mmol/L NaAc/HAc, 2u Pel1, pH 5.0)40℃ 下处理 0.5h。

2 结果

2.1 Pel1 cDNA 的克隆和序列分析

我们成功地从 A. oryzae 3.762 克隆了不含信号肽的 A. oryzae Pel1 基因。A. oryzae 3.762 在添加

1% pectin(90% methyl-esterified pectin)的 Czapek-Dox medium 中,在 150r/min 30℃ 条件下培养 8d,培养基上清中酶活可达到 0.1u/mL。经过 RT-PCR,得到了含 1086bp 但不含信号肽的 A. oryzae Pel1 cDNA 编码 361 氨基酸的多肽链。通过序列比对分析,发现在 A. oryzae KBN616 Pel1 cDNA 和 A. oryzae Pel1 DNA 之间,有三处核苷酸差异。从 A. oryzae KBN616 Pel1 cDNA 到 A. oryzae Pel1 cDNA,分别是 No. 876 C→T, No. 921 C→T 和 No. 1121 T→C (图 1)。876 C→T 和 921 C→T 二处的核苷酸差异对 Pel1 蛋白的氨基酸序列未有影响,但突变 1121 T→C 导致了 Pel1 蛋白 No. 374 氨基酸 V 变为氨基酸 A (图 2)。三次重复实验的结果一致,说明 A. oryzae 3.762 Pel1 cDNA 和 A. oryzae KBN616 Pel1 cDNA 之间的差异可能是由于菌株之间的差异导致的,而不是 RT-PCR 过程产生的突变。

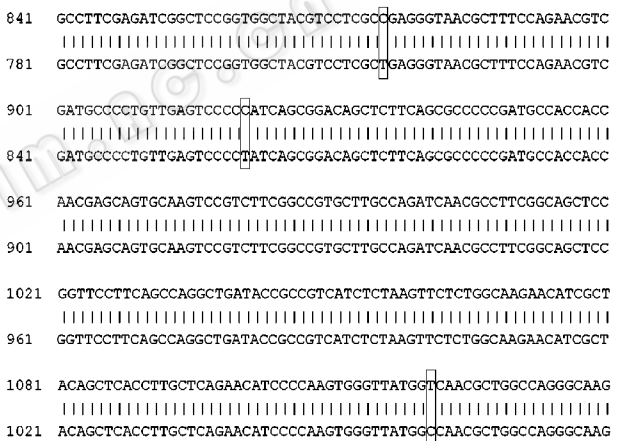


图 1 A. oryzae KBN616 和 A. oryzae 3.762 的 Pel1 酶核苷酸序列比对

Fig. 1 Alignment of Pel1 cDNA from A. oryzae KBN616 (upper line) and Pel1 cDNA from A. oryzae 3.762 (lower line)

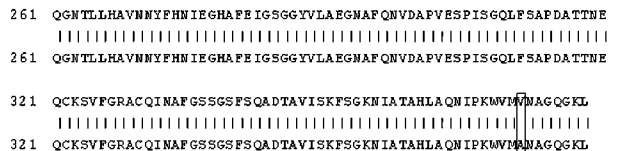


图 2 A. oryzae KBN616 和 A. oryzae 3.762 的 Pel1 酶氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of Pel1 protein from A. oryzae KBN616 (upper line) and Pel1 protein from A. oryzae 3.762 (lower line)

2.2 Pel1 在 E. coli 中的表达

本研究首次实现了 A. oryzae pel1 基因在原核系统中的表达,也是丝状真菌 pectin lyase 基因首次在原核系统中表达。在 IPTG 诱导下,构建的重组菌 pET-28a (+)-pel1-Turner plac I (DE3)能够表达与 6 His-tag 融合的 A. oryzae 3.762 Pel1 重组蛋白,该重

组蛋白是不含信号肽的成熟蛋白。在 1mmol/L IPTG 诱导下,37℃和 200r/min 条件下,表达 6 h,表达的 Pel1 酶活很低,大部分是包涵体形式。为了提高 Pel1 重组蛋白的表达效果,进一步对表达条件进行了优化,在 170r/min 和 15℃(图 3a),0.05~0.1mmol/L IPTG(图 3b)诱导下,经过 60h(图 3c)表达后,表达效果较好,酶活可 400u/mL medium。

Pel1 重组蛋白的表达形式包含有活性的可溶性蛋白和无活性的包涵体蛋白,所收集的包涵体检测不到活性,包涵体经过复性处理,仍未检测出活性(具体复性过程和方法略)。

Pel1 重组蛋白的 N-terminus 被加上 6-His tag,重组表达的 Pel1 蛋白可以用 Ni²⁺-NTA-agarose column 进行纯化,重组表达的 Pel1 约是 39kD(图略)。

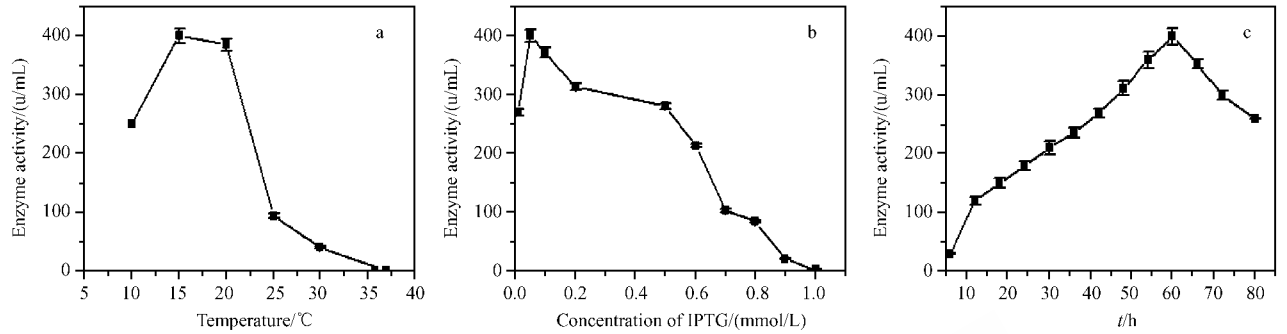


图 3 温度、IPTG 浓度和时间对 Pel1 表达的影响

Fig. 3 Optimization of the expression of *A. oryzae* Pel1 in *E. coli*

Cells of pET-28a(+)pel1-Turner plac I(DE3) were incubated at 37℃ at 200r/min to the cell density with OD₆₀₀ about 0.8, then placed under different conditions for expression of Pel1:(a) at different temperatures (15~37℃), expressions were performed under the induction of 0.5mmol/L IPTG at 170r/min for 60 h;(b) expressions were induced by different concentrations of IPTG (0.01~1.0mmol/L) at 15℃ and 170r/min for 60 h;(c) expressions were performed at 15℃ at 170r/min under the induction of 0.5mmol/L IPTG for different lengths of time.

2.3 组织离析

组织离析实验表明,重组表达的 *Aspergillus oryzae* Pel1 能够有效地离析土豆组织块,从组织块

中释放出单细胞(图 4A),未经 *Aspergillus oryzae* Pel1 处理的组织块细胞仍然紧密地连接在一起(图 4B)。

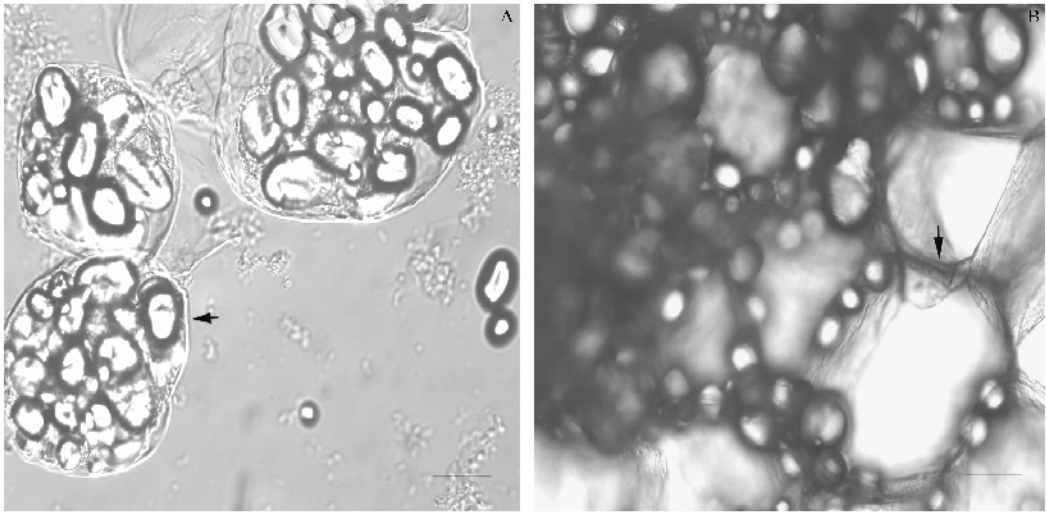


图 4 重组表达的 *Aspergillus oryzae* Pel1 离析土豆组织块的实验

Fig. 4 Assay for potato tissue maceration caused by recombinant *Aspergillus oryzae* Pel1

2g of potato tubers (about 2mm × 2mm × 2mm) were treated with 2u Pel1 in 1mL reaction solution containing 50mmol/L NaAc-HAc, pH5, at 40℃ for 0.5 h. Controls were treated with the same reaction solution as above except for the lack of enzymes. A: test of potato tubers; B: control of potato tubers. Arrow in A with shaft shows single cells macerated from tissue by Pel1; Arrow in B indicates tissue cells joined closely; Bar = 250μm.

3 讨论

A. oryzae Pel1 在 *E. coli* 中的表达效果可达 400u/mL medium,表明 *A. oryzae* Pel1 在 *E. coli* 中的

表达是成功的。前人报道 *A. oryzae* Pel1 是一种糖基化蛋白^[7],Pel1 在 *E. coli* 中成功表达说明 Pel1 糖基化对其酶活而言,不是必需的。*A. oryzae* Pel1 在 *E. coli* 中的表达效果与 *A. oryzae* (0.1u/mL) 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

medium, no shown)自然表达的效果相比,高达4000倍。

前人曾经通过生物重组技术,用 *A. oryzae* *TEF1* 基因的启动子调控 *pel1* 和 *pel2* 的表达,实现 *A. oryzae* KBN616 *pel1* 和 *pel2* 基因在 *A. oryzae* 中的原位重组表达,表达水平约 30~60 u/mL^[3,7], *A. oryzae* *Pel1* 在 *E. coli* 中的表达效果是其 6~11 倍。*A. niger* N400 Pectin lyase A gene^[12], 在 *A. niger* pyruvate kinase 启动子调控下重组表达的酶活约是 30 u/mL medium^[19],也低于 *A. oryzae* *Pel1* 在 *E. coli* 中的表达效果。*Glomerella cingulata*^[9] 和 *A. nidulans*^[15] Pectin lyase 基因在 *Pichia pastoris* 实现了异源重组表达,但文献未对表达效果作详细报道。

A. oryzae *Pel1* 在 *E. coli* 中的成功表达,使得用 *E. coli* 工业化发酵生产 *A. oryzae* *Pel1* 成为可能。本实验构建的工程菌 pET-28a(+)-*pel1*-Turner plac I(DE3)最佳表达条件为 0.05 mmol/L IPTG、15℃ 和 60 h,对工业发酵来说还不是比较适宜,但我们将对表达载体构建的有关元件作出改进,得到改良的表达工程菌,使得之适合工业化发酵。我们的实验结果表明 6His-tag 不影响酶活,而且有利于目的蛋白的纯化。一般情况下当细胞中目的蛋白表达量较低时,使用镍柱纯化,难以得到单一条带;但当目的蛋白表达效果改进后,表达量较大时,6His-tag 将更有利于目的蛋白的分离和纯化。

通过对纯化的重组表达的 *A. oryzae* *Pel1* 的酶活初步研究,发现在 pH5.0~5.5 和 40~50℃ 左右活性较高,和前人通过真菌同源重组表达的 *A. oryzae* *Pel1* 类似^[7]。植物组织离析实验表明,重组的 *A. oryzae* *Pel1* 酶也能够有效的解离土豆块茎等植物组织细胞(Fig. 4),重组表达的 *A. oryzae* *Pel1* 在酸性饮料和啤酒的澄清、有关食品行业加工和植物来源的有效药物成分的提取等方面可能会有较好应用前景。

REFERENCES (参考文献)

[1] O'Neill MA, Albersheim P, Darvill A. The pectic polysaccharides of primary cell walls. In: Dey PM Ed. Methods in Plant Biochemistry, vol. 2. London: Academic Press, 1990, pp. 415-441.

[2] Uhlig H. Processing of fruit, vegetables, and wine. In: Gerhartz W (ed) Enzymes in industry: production and applications. New York: VCH, 1990, pp. 126-128.

[3] Kitamoto N, Yoshino-Yasuda S, Ohmiya K, et al. A second pectin lyase gene (*pel2*) from *Aspergillus oryzae* KBN616: Its sequence

analysis and overexpression, and characterization of the gene products. *J Biosci Bioeng*, 2001, **91**: 378-381.

- [4] Alana A, Alkorta I, Dominguez JB, et al. Pectin lyase activity in a *Penicillium italicum* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1990, **56**: 3755-3759.
- [5] Gysler C, Harmsen JAM, Kester HCM, et al. Isolation and structure of the pectin lyase encoding gene from *Aspergillus niger*. *Gene*, 1990, **89**: 101-108.
- [6] Kitamoto N, Yoshino-Yasuda S, Ohmiya K, et al. Sequence analysis and overexpression of a pectin lyase gene (*pel1*) from *Aspergillus oryzae* KBN616. *Biosci Biotech Biochem*, 2001, **65**: 209-212.
- [7] Wei YD, Shi J, Li J, et al. Two pectin lyase genes, *pnl-1* and *pnl-2*, from *Colletotrichum gloeosporioides* f. sp. *Malvae* differ in a cellulose-binding domain and in their expression during infection of *Malva pusilla*. *Microbiology*, 2002, **148**: 2149-2157.
- [8] Templeton MD, Sharrock KR, Bowen JK, et al. The pectin lyase-encoding gene (*pnl*) family from *Glomerella cingulata*: characterization of *pnlA* and its expression in yeast. *Gene*, 1994, **142**: 141-146.
- [9] Brawman JW. Application of enzymes in fruit juice technology. In: Birch GG, Blakerough N, Barker JK eds, Enzymes and Food Processing. London: Applied Science, 1981, pp. 247-261.
- [10] Pilnik W, Rombouts FM. Polysaccharides and food processing. *Carbohydr Res*, 1985, **142**: 93-105.
- [11] Hoondal GS, Tiwari RP, Tewari R, et al. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *App Microbiol Biotech*, 2002, **59**: 409-418.
- [12] Sanchez-Torres P, Visser J, Benen JAE. Identification of amino acid residues critical for catalysis and stability in *Aspergillus niger* family I pectin lyase A. *Biochem J*, 2003, **370**: 331-337.
- [13] Semenova MV, Grishutin SG, Gusakov AV, et al. Isolation and properties of pectinases from the fungus *Aspergillus japonicus*. *Biochemistry*, 2003, **68**: 559-569.
- [14] Dean RA, Timberlake WE. Regulation of *Aspergillus nidulans* pectate lyase gene (*pelA*). *Plant Cell*, 1989, **1**: 275-284.
- [15] Bauer S, Vasu P, Persson S, et al. Development and application of a suite of polysaccharide-degrading enzymes for analyzing plant cell walls. *PNAS*, 2006, **103**: 11417-11422.
- [16] Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant-tissues. *Anal Biochem*, 1987, **163**: 16-20.
- [17] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**: 248-254.
- [18] Papi M, Kyriakidis D. Overexpression of the pectin lyase gene of *Pseudomonas marginalis* in *Escherichia coli* and purification of the active enzyme. *Biotech App Biochem*, 2003, **37**: 187-194.
- [19] Harmsen JAM, Kusters-van Someren, MA, et al. Cloning and expression of a second *Aspergillus niger* pectin lyase gene (*pelA*): indications of a pectin lyase gene family in *A. niger*. *Curr Genet*,