

特异腐质霉内切葡聚糖酶 II 基因在毕赤酵母中的表达及酶学性质

郑海英 黄平 蔡少丽 柯崇榕 林国滢 黄建忠*

(福建师范大学 工业微生物教育部工程研究中心 生命科学学院 福建省现代
发酵技术工程研究中心 福建 福州 350108)

摘要: 【目的】在毕赤酵母中表达特异腐质霉 *Humicola insolens* 的中性内切葡聚糖酶 II, 并对其性质加以研究。【方法】利用 RT-PCR 的方法, 以特异腐质霉(*Humicola insolens*) NC3 总 RNA 为模板, 克隆到中性内切葡聚糖酶 II 基因(*eg II*)的 cDNA。将其插入表达载体 pPIC9K, 重组质粒经线性化后电击转化毕赤酵母(*Pichia pastoris*)菌株 GS115。【结果】SDS-PAGE 和酶活的检测结果均表明: *eg II* 基因在毕赤酵母中成功表达。重组酶的部分酶学性质研究表明, 该酶的最适反应温度为 70 °C, 且在 65 °C 以下具有较好的热稳定性。最适反应 pH 为 6.5, 在 pH 6.0–7.0 之间有较好的稳定性。【结论】用重组毕赤酵母可高效表达外源中性内切葡聚糖酶, 为其今后在工业应用奠定了基础。

关键词: 中性内切葡聚糖酶 II, 特异腐质霉, 毕赤酵母

Expression of *Humicola insolens* (NC3) endo- β -glucanase II gene in *Pichia pastoris* and anylysis of enzymic properties

ZHENG Hai-Ying HUANG Ping CAI Shao-Li KE Chong-Rong
LIN Guo-Yan HUANG Jian-Zhong*

(Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Ministry of Education, Fujian Normal University,
Fuzhou, Fujian 350108, China)

Abstract: [Objective] The purpose was to clone and express endo-1,4- β -glucanase gene of *Humicola insolens* in *Pichia pastoris* expression system. [Methods] An endo-1,4- β -gluca-

基金项目: 基金福建省发改委产业化关键技术项目(闽发改投资[2009]958 号)

*通讯作者: Tel: 86-591-22868212; 信箱: hjz@fjnu.edu.cn

收稿日期: 2011-07-12; 接受日期: 2011-12-06

nase II (*eg II*) cDNA gene was isolated from the fungus *Humicola insolens* NC3 by RT-PCR. Subsequently, we cloned the *eg II* gene into expression vector pPIC9K, and then transformed into *Pichia pastoris* GS115. **[Results]** SDS-PAGE and CMC enzyme activity analysis demonstrated that recombinant EG II protein was successfully expressed after induction in shake flasks. The endo-1,4- β -glucanase exhibited maximum activity at 70 °C and pH 6.5, and was stable between pH 6.0 and 7.0 and below 65 °C. **[Conclusion]** *P. pastoris* expression system is an efficient way of production of endo-1,4- β -glucanase. The recombinant endo-1,4- β -glucanase could be a candidate for industrial applications.

Keywords: Neutral endo-1,4- β -glucanase II, *Humicola insolens*, *Pichia pastoris*

纤维素酶是指能水解纤维素 β -1,4 葡萄糖苷键, 将纤维素降解成纤维二糖和葡萄糖的一组酶的总称。它不是单一酶, 而是起协同作用的多组分酶系。主要包含内切葡聚糖酶 (Endo-1,4- β -glucanase, EC3.2.1.4, 简称 EG)、外切葡聚糖酶 (Exo-1,4- β -glucanase, EC3.2.1.91, 简称 CBH) 和 β -葡萄糖苷酶 (β -glucosidase, EC3.2.1.21, 简称 BG)^[1]。其中内切葡聚糖酶主要作用于纤维素分子内部的非结晶区, 随机水解 β -1,4 糖苷键, 将长链纤维素分子截短, 产生大量带非还原性末端的小分子纤维素^[2]。

纤维素酶按其催化反应的最适 pH 可分为酸性纤维素酶 (最适 pH 为 3–5)、中性纤维素酶 (最适 pH 为 6–8) 和碱性纤维素酶 (最适 pH 为 8–11)。在纺织领域, 由于难以控制酸性外切 β -葡聚糖酶对结晶区纤维素的影响, 致使织物的使用寿命和性能下降, 强度降低^[3]。而中性纤维素酶的主要成分是内切 β -葡聚糖酶, 对结晶区纤维素水解活力很低, 而对非结晶区纤维素水解活力较高, 所以不会造成织物强度的下降且可防沾色, 从而达到良好的洗涤效果和抛光效果。因此, 中性纤维素酶在棉织品的水洗整理工业中得到广泛的应用^[4]。高成本、低酶活严重影响纤维素酶的大规模工业化生产。通过基因工程技术提高产酶量已经成为纤维素酶研究领域的重要方法, 纤维素酶基因的克隆表达为构建高效纤维素分解菌开辟了新的途径。近年来, 已经从数种真菌中克隆到了内切葡聚糖

酶基因并在酵母中得到了表达^[5–9], 由于表达水平低, 目前还没有在工业上应用的报道。

本文采用基因操作技术, 对 *Humicola insolens* NC3 中性内切葡聚糖酶基因 *eg II* 进行克隆并在毕赤酵母中表达; 同时对重组酶进行了部分酶学性质研究, 为该酶的大规模制备及工业应用提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 特异腐质霉 (*Humicola insolens*) NC3 菌株、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 菌株、质粒 pUC18 和 pPIC9K、毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115 均为本实验室保存。

1.1.2 培养基和培养条件: LB 培养基参见分子克隆^[10]; YPD、MD、MGY、MMY 等培养基配方和毕赤酵母 GS115 培养条件见 Invitrogen 公司提供的毕赤酵母操作手册。

1.1.3 工具酶和试剂: 限制性内切酶、T4 连接酶、*Taq* 酶、聚合酶、胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 蛋白质分子量标准购自上海生物工程公司; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na) 购自 Sigma 公司; 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 PCR 扩增 *eg II* 基因: 采用 Trizol 试剂一步法提取总 RNA, 以总 RNA 为模板反转录合成

cDNA。根据特异腐质霉内切葡聚糖酶基因序列和 pPIC9K 载体自身含有分泌表达信号肽特点,设计引物扩增去除信号肽的内切葡聚糖酶基因表达片段。上游引物和下游引物(划线序列分别为 *Not* I 和 *Eco*R I 酶切位点,引物由上海生物工程有限公司合成)分别为:

5'-GGAATTCCAGGGCGGTGCATGGCAGCAG-3';

5'-GGCGGCCGCCTATGGCACGTATTTCTTGAG-3'。

PCR 反应体积为 15 μ L, 扩增条件: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 35 s, 62.5 $^{\circ}$ C 35 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。取 5 μ L PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 重组质粒的构建: 从凝胶上回收大小约为 1 100 bp 的目的片段。纯化的 DNA 和 pPIC9K 质粒分别用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切后进行连接、转化, 然后进行 PCR 和双酶切鉴定, 将鉴定为阳性重组质粒的克隆送到上海生工公司进行测序, 测序正确的阳性重组质粒命名为 pPIC9K-eg II。

1.2.3 毕赤酵母的转化、筛选和表型鉴定: 重组载体 pPIC9K-eg II 质粒用 *Sal* I 酶切, 电转毕赤酵母 GS115。毕赤酵母感受态制备、电转均参照毕赤酵母操作手册。转化后涂布 MD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养至转化子出现。用灭过菌的牙签挑取转化子分别点种 MD 平板上, 确定其甲醇利用表型, 在 MD 平板上能正常生长的转化子为阳性转化子。经过表型鉴定的阳性转化子分别点种到含有 0.25、0.5、1.0、1.5、2.0 g/L 抗生素 G418 的 YPD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 2 d, 筛选、检测获得酶活力最高的菌株, 命名为 GS115-pPIC9K-eg II。

1.2.4 酵母阳性重组菌株的诱导表达: 挑取单菌落接种于 3 mL YPD 液体培养基中, 培养 24 h 后取 30–50 μ L 接种到 MGY 培养基中, 28 $^{\circ}$ C、230 r/min 振荡培养, 当菌体 OD_{600} 达到 2.0–6.0 时, 取菌液适量, 离心(4 $^{\circ}$ C、5 000 r/min、5 min), 弃

去上清液, 收集菌体, 转入 30 mL MMY 液体培养基中使 OD_{600} 为 1 左右。于 28 $^{\circ}$ C 振荡(230 r/min)培养 216 h, 每隔 24 h 取样同时补加甲醇至总体积的 1.5%, 所取样品离心分别收集细胞和上清液, 进行菌体浓度分析和酶活力检测。

1.2.5 刚果红平板定性检测酶活: 1% CMC-Na、0.5% 琼脂、0.1 mol/L pH 6.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液配置刚果红平板, 室温凝固后, 打孔。然后取 100 μ L 粗酶液滴入空穴中, 以相同培养条件获得的等量 GS115 发酵液为阴性对照, 50 $^{\circ}$ C 保温 1 h, 用 1 g/L 的刚果红溶液染色 20 min, 弃染液后用 0.1 mol/L 的 NaCl 溶液脱色 1 h。观察产生的透明圈, 透明圈的大小大致反应菌株产重组 eg II 酶活力的高低。

1.2.6 重组 eg II 酶活性检测: 采用 DNS 定糖法测定内切葡聚糖酶的活力。取 0.2 mL 适当稀释的粗酶液, 加入 1.8 mL 1.5% CMC-Na (0.1 mol/L pH 6.0 的醋酸-醋酸钠缓冲液配置), 50 $^{\circ}$ C 反应 30 min, 加入 3 mL DNS 试剂, 煮沸 10 min, 用蒸馏水定容到 15 mL, 在 540 nm 波长下测定光吸收值。每分钟水解 CMC-Na 产生 1 μ g 还原糖(以葡萄糖计)所需酶量定义为 1 个酶活力单位(U)。酶活力计算公式: 酶活力 [μ g/mL(g)·min] = $(S \times D \times 1\ 000) / (0.2 \times 30) \div 1.5$ 。式中: S : 测得光吸收在标准曲线上对应的葡萄糖量, mg 数; D : 酶液稀释倍数; 1 000: mg 和 μ g 之间的换算系数; 0.2: 测定所取酶液量, mL 数; 30: 反应时间, min 数; 1.5: 方法换算系数。国际酶活单位的定义: 在测定条件下, 每分钟水解 CMC-Na 产生 1 μ mol 还原糖(以葡萄糖计)所需酶量定义为 1 个酶活力单位(IU)。U 与国际单位 IU 的换算关系: 1 U \div 180 = 1 IU [μ mol/mL(g)·min]。180: 葡萄糖的分子量。

1.2.7 蛋白质浓度的测定: 参照《蛋白质技术手册》测定蛋白质含量^[11]。

1.2.8 酶学性质分析: 按酶活力测定的反应条件测定该酶的最适反应温度和最适反应 pH, 并检

测该酶的热稳定性和 pH 稳定性。

2 结果

2.1 *eg II* 基因的克隆及表达载体的构建

RNA 模板经逆转录及 PCR 扩增后获得目的片段。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离, 胶回收纯化后, 上下游酶切位点双酶切, 并用同样的酶处理 pPIC9K 载体, 连接, 转化大肠杆菌 *E. coli* DH5 α , 小量抽提质粒后进行 PCR 验证 (图 1) 和测序。测序结果表明插入片段在 pPIC9K 有正确的阅读框, 载体 pPIC9K-*eg II* 构建成功。

进一步测序表明序列和读码框都正确。目的片段测序结果见图 2。将 *eg II* 基因 cDNA 序列在 NCBI 上进行 BLASTn 分析, 目的片段测序结果与 GenBank No. D84470.1 的序列比对, 相似性高达 99%, 与 No. X76046.1 相似性达到 97%。

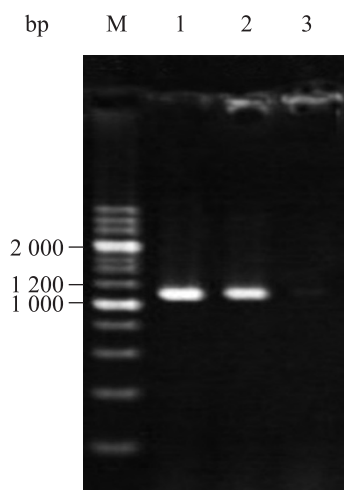


图 1 内切葡聚糖酶 *eg II* 基因 PCR 产物电泳图谱

Fig. 1 Agrose electrophoresis image of PCR product of the *eg II* gene

注: M: Marker; 1-2: pPIC9K-*eg II* 的 PCR 产物; 3: 空载体 pPIC9K 的 PCR 产物。

Note: M: Marker; 1-2: PCR product of pPIC9K-*eg II*; 3: PCR product of pPIC9K.

```

1   TGT GGT GGC GTT GGC TTC TCG GGC TCT ACG TCC TGT GTG TCT GGT   45
46  TAC ACG TGC GTG TAC CTG AAC GAC TGG TAC AGC CAA TGC CAG CCG   90
91  CAG CCG ACG ACG TTA CGG ACG ACA ACA ACG CCA GGG GCA ACA TCG  135
136 ACA ACA AGG TCA GCC CCG GCT GCC ACT TCA ACC ACT CCG GCC AAG  180
181 GGC AAG TTC AAG TGG TTT GGC ATC AAC CAG TCC TGC GCC GAG TTC  225
226 GGC AAG GGA GAG TAT CCT GGG CTC TGG GGC AAG CAC TTT ACC TTC  270
271 CCC TCG ACG TCG TCG ATT CAG ACG CAC ATC AAT GAC GGC TTC AAC  315
316 ATG TTC CGT GTG GCC TTC TCA ATG GAG CGG TTG GCA CCC AAC CAG  360
361 CTG ACT GCT GCG TTC GAT GCC AAC TAC CTC CGA AAC CTG ACT GAG  405
406 ACT GTC AAC TTC ATC ACA GGC AAG GGC AAG TAT GCG ATG CTT GAC  450
451 CCC CAC AAC TTC GGC CGC TAT TAT GAG AGA ATC ATC ACG GAC AAG  495
496 GCT GCC TTC GCC AGC TTC TTC ACC AAG CTG GCC GCG CAC TTC GCG  540
541 TCG AAC CCT CTT GTC ATC TTT GAC ACC AAC AAC GAG TAC CAC GAC  585
586 ATG GAC CAG CAG CTC GTC TTC GAC CTG AAC CAG GCC GCC ATC GAC  630
631 GCC ATC CGC GCT GCA GGC GCT ACA TCG CAG TAC ATC ATG GTG GAG  675
676 GGC AAC TCG TGG ACC GGG GCG TGG ACG TGG AAC GTG ACC AAC ACC  720
721 AAC TTG GCG GCG CTA CGC GAC CCG GAG AAC AAG CTG GTG TAC CAG  765
766 ATG CAT CAG TAC CTC GAC TCG GAC GGG TCC GGC ACG AGC ACG GCC  810
811 TGC GTC AGC ACC CAG GTC GGC GTT CAG CGC GTC ATT GGC GCG ACC  855
856 AAC TGG CTC AGG CAG AAC GGC AAG GTT GGA CTG CTC GGC GAG TTC  900
901 GCC GGC GGC GCC AAC TCG GTT TGC CAG CAG GCC ATT GAG GGC ATG  945
946 CTC AAC CAC CTC CAG GAG AAT AGC GAT GTC TGG ACA GGT GCG CTC  990
991 TGG TGG GCG GGT GGC CCG TGG TGG GGT GAC TAT ATC TAC TCG TTT 1035
1036 GAA CCT CCT TCG GGT ATT GGC TAC ACC TAC TAC AAC TCC CTT   1077
  
```

图 2 内切葡聚糖酶 *eg II* 基因测序结果

Fig. 2 Sequence of *eg II* gene

2.2 重组质粒在毕赤酵母的表达

重组质粒 pPIC9K-eg II 经 *Sal* I 线性化, 电击转化至毕赤酵母 GS115 中, 涂布 MD 平板, 28 °C 培养。因为受体菌酵母 GS115 是组氨酸缺陷型 (His⁻), pPIC9K 载体携带 His4 基因, 所以只有线性化 pPIC9K-eg II 片段整合到酵母基因组中才能在 MD 平板上生长。挑取转化子接种于 3 mL YPD 液体培养基中, 于 28 °C 振荡培养 24 h。抽提酵母基因组 DNA 进行 PCR 验证(图 3), 结果表明该目的片段已经整合到酵母基因组中。

2.3 重组毕赤酵母的诱导表达

挑取阳性菌株, 1.5% 甲醇诱导培养。每 24 h 取样检测酶活力和菌体浓度。酶活力在诱导培养 168 h 最高(图 4), 达到 5 191.2 U/mL, 菌体浓度 144 h 达到最高。

2.4 表达产物的分析

2.4.1 SDS-PAGE 分析: 工程菌诱导表达 168 h 后的 SDS-PAGE 结果如图 5 所示, 结果表明: 毕赤酵母工程菌能够成功表达 eg II, 分子质量约为 50 kD, 与预测的 48 kD 略大, 可能是表达产物在翻译后修饰时发生了部分糖基化。

2.4.2 重组酶的酶活分析: 重组菌株诱导培养 168 h 后, 取其发酵液进行定性和定量分析。发酵液的刚果红平板定性检测结果如图 6 所示: 刚果红平板上均可以看到清晰的水解圈, GS115-pPIC9K-eg II 发酵液产生的水解圈与 GS115 发酵液

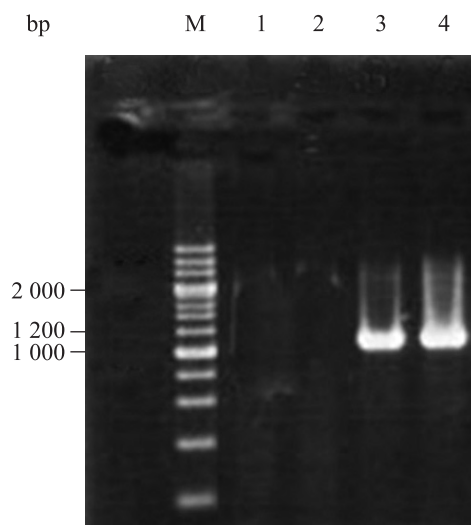


图 3 重组毕赤酵母菌株的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of recombinant *P. pastoris* by PCR
注: M: Marker; 1-2: 宿主菌 GS115 的 PCR 产物; 3-4: 目的片段 *eg II* 的 PCR 产物。

Note: M: Marker; 1-2: PCR product of GS115; 3-4: PCR product of *eg II*.

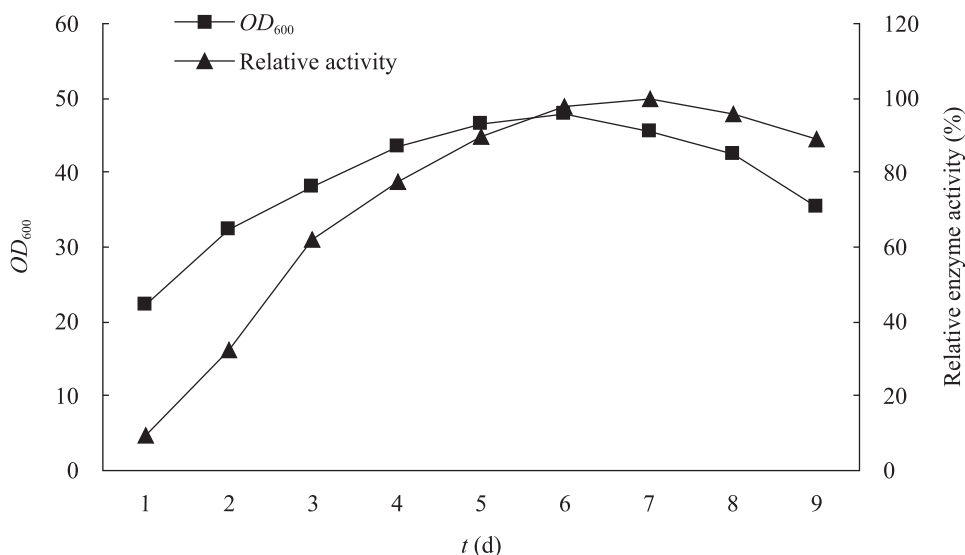


图 4 重组毕赤酵母产 eg II 的酶活曲线

Fig. 4 Curve of *eg II* production by recombinant *P. pastoris*

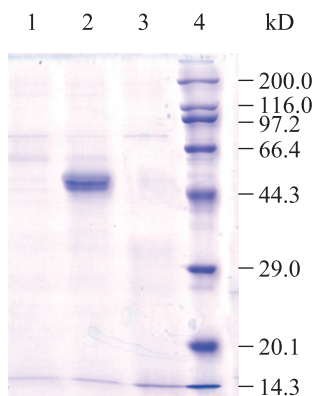


图5 重组质粒蛋白表达产物的 SDS-PAGE 鉴定

Fig. 5 SDS-PAGE analysis of expressed product

注: 1: pPIC9K 重组毕赤酵母发酵产物; 2: pPIC9K-eg II 重组毕赤酵母发酵产物; 3: 宿主菌 GS115 发酵产物; 4: 蛋白 Marker.

Note: 1: pPIC9K; 2: eg II production by recombinant *P. pastoris*; 3: GS115; 4: Protein marker.

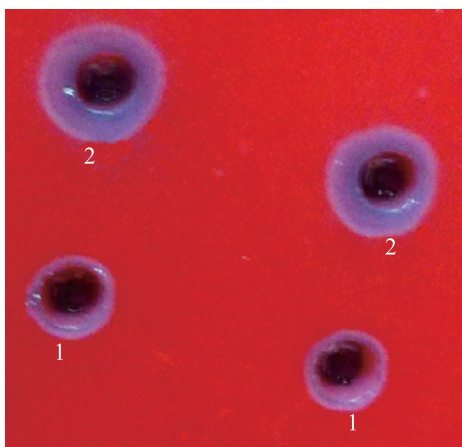


图6 重组内切葡聚糖酶 II 的刚果红平板定性检测

Fig. 6 Qualitative detection of recombinant eg II on agar medium

注: 1: GS115 发酵液; 2: pPIC9K-eg II-GS115 发酵液.

Note: 1: Control; 2: Supernatant of pPIC9K-eg II-GS115.

产生的水解圈相比, 前者明显大于后者, 且前者十分透亮。采用 DNS 法进行定量分析, 结果表明宿主菌 GS115 的发酵液的酶活力仅为 40.5 U/mL, 而该重组酶活力高达 5 191.2 U/mL。对照组的发酵液也能检测到酶活力可能是菌株自身分泌微量多糖水解酶造成的^[12], 也可能是发酵培养基的残糖成分引起的。

2.4.3 重组酶的蛋白浓度测定: 采用 Bradford 法测定重组酶的蛋白含量。以牛血清白蛋白为标准, 以 OD_{595} 值为纵坐标, 对应的蛋白质浓度为横坐标, 做出标准曲线。根据待测样品的 A_{595} 值和标准曲线, 得出重组酶的蛋白质含量为 301.50 mg/L。

2.5 重组酶最适反应温度及温度稳定性

在不同温度条件下测定重组酶的活力, 结果表明该酶最适反应温度为 70 °C (图 7), 说明该酶具有较好的耐热性。将重组酶分别在不同温度下保温 30 min, 检测剩余酶活力, 结果表明该酶在 65 °C 的条件下仍保持 80% 的酶活力(图 8), 说明该酶具有较好的热稳定性。

2.6 重组酶的最适反应 pH 及 pH 稳定性

在不同 pH 反应条件下分析重组酶的活力, 结果如图 9 所示。重组酶作用的 pH 范围广, 在 pH 为 5.5–8.0 范围内活性都较高, 该酶最适反应 pH 为 6.5。pH 稳定性实验结果如图 10 所示, 结果表明该酶在 pH 6.0–7.0 保温 30 min, 剩余酶活力仍高达 60%; pH 低于 5.5 和高于 7.5 剩余酶活力均低于 50%, 属于典型的中性酶。

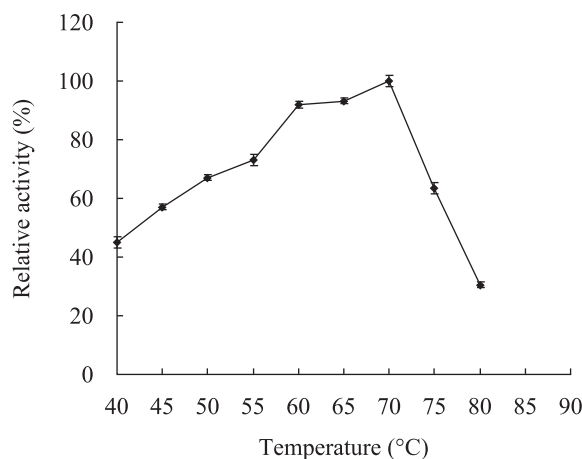


图7 重组内切葡聚糖酶 II 的最适温度

Fig. 7 The optimum temperature of eg II produced by recombinant *P. pastoris*

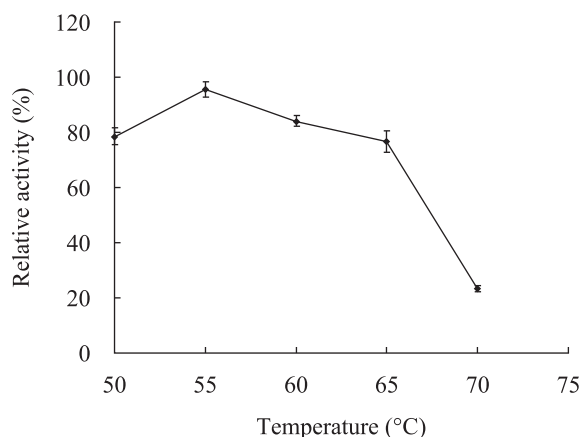


图 8 重组内切葡聚糖酶 II 的热稳定性研究

Fig. 8 The thermostability of egII produced by recombinant *P. pastoris*

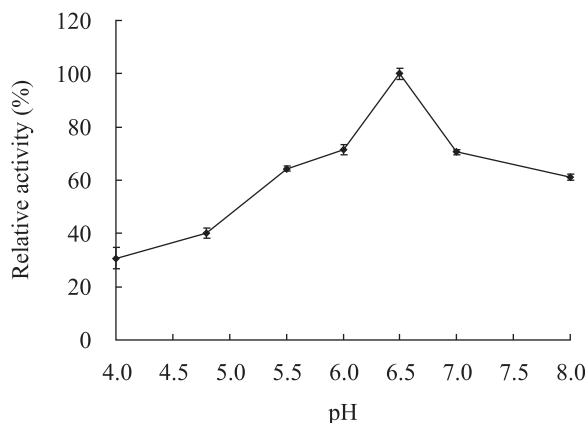


图 9 重组内切葡聚糖酶 II 的最适 pH

Fig. 9 The optimum pH of egII produced by recombinant *P. pastoris*

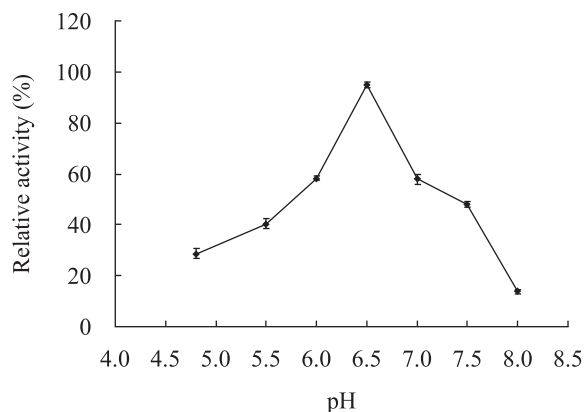


图 10 重组内切葡聚糖酶 II 的 pH 稳定性研究

Fig. 10 The pH stability of egII produced by recombinant *P. pastoris*

3 讨论

目前, 纤维素酶已被广泛应用于食品、造纸、纺织、能源、饲料等领域, 纤维素酶的研究越来越受到人们的青睐。纤维素酶广泛存在微生物中, 表达水平低, 生产纯化成本高, 价格昂贵, 一直限制着纤维素酶的工业化生产。利用基因工程的手段, 在生物反应器中高效表达纤维素酶, 可以大幅度提高生产水平, 将有望实现中性内切葡聚糖酶的商品化, 促进国产中性内切葡聚糖酶在棉织品水洗整理工艺中的应用。从高产菌株中克隆纤维素酶从而构建高效表达工程菌可解决生产水平低的实际问题, 因此克隆特异腐质霉纤维素酶基因并成功表达具有重要意义。

目前已从多种真菌如里氏木霉、绿色木霉等克隆到纤维素酶基因并成功构建表达内切葡聚糖酶的毕赤酵母基因工程菌。因为毕赤酵母表达外源基因具有密码子偏好性, 所以大部分外源基因不能获得高效表达, 以致异源表达的酶活力不高。国内谭慧芳等首次在毕赤酵母系统中表达特异腐质霉 *egII* 基因, 摇瓶发酵 24 h 时酶活力为 2.5 IU/mL^[6]。本研究表达的特异腐质霉内切葡聚糖酶 II 摇瓶发酵 168 h 时的酶活力为 5 191.2 U/mL (即 28.84 IU/mL), 蛋白表达量 301.50 mg/L。造成两者表达水平差异显著的因素可能有: 使用 AOX 启动子、外源基因、培养条件等, 这些对异源蛋白分泌效率有很大的影响。(1) 启动子在转录水平上调控基因的表达。以 AOX1 为启动子表达外源蛋白具有明显优势, 这可能也是目前未见以 GAP 启动子进行胞外表达报道的原因。Kim 等研究发现, 用毕赤酵母表达灰盖鬼伞过氧化物酶, AOX1 启动子表达目的蛋白的活性是 GAP 启动子的 5 倍^[13]。(2) 外源基因的转录、翻译和分泌等都受到毕赤酵母自身的遗传背景的影响, 酵母自身分泌的胞外酶、细胞结

合酶等都可能导导致外源蛋白降解,所以不同的外源基因表现出不同的表达水平和生物活性^[14]。(3) 温度、溶氧、培养时间等都会影响外源蛋白在毕赤酵母中的表达水平^[15-16]。

一般纤维素酶的最适反应温度为 40 °C–60 °C, 纤维素酶各组分最适反应温度和热稳定性也存在差异。武秀琴对绿色木霉的酶学性质进行研究, 该酶的最适反应温度在 50 °C 左右^[17]。雒军等将瑞氏木霉内切葡聚糖酶 II 基因转入大肠杆菌进行表达, 其酶最适反应温度为 60 °C 左右^[18]。陈祺等将绿色木霉内切葡聚糖酶 I 基因进行原核表达, 该酶在 60 °C 左右保温 1 h 时剩余酶活仅为 50% 左右^[19]。王瑾等将绿色木霉内切葡聚糖酶 II 基因转入毕赤酵母表达, 其酶最适反应温度为 50 °C, 活力在 60 °C 时下降到 60%^[20]。本研究表达的特异腐质霉中性内切葡聚糖酶具有较好的耐热性和热稳定性。其最适反应温度为 70 °C, 65 °C 保温 30 min 仍有 80% 剩余酶活力。这与表达时发生的糖基化程度有关。适宜的糖基化在蛋白质折叠和抗蛋白酶降解中起重要作用, 使得酶蛋白结构具有更好的稳定性, 从而提高了其热稳定性^[21]。热稳定性的提高, 有助于从根本上减少棉织品水洗整理工艺和饲料制粒过程中内切葡聚糖酶酶活的损失; 促进国产中性内切葡聚糖酶在纺织行业和洗涤剂工业中的应用。

本研究目前处于摇瓶培养阶段, 接下来我们将充分利用工业微生物教育部工程研究中心和现代发酵技术工程研究中心提供的技术平台进行发酵罐探索实验, 摸索适宜的发酵工艺, 为工业化生产高产量、热稳定性良好的中性内切葡聚糖酶奠定基础。

参 考 文 献

- [1] Bhat MK, Bhat S. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications[J]. Biotechnol Advanle, 1997, 15(3/4): 583–620.
- [2] Lynd LR, Weimer PJ, van Zyl WH, et al. Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology[J]. Microbiology Molecular Biology Reviews, 2002, 66(3): 506–577.
- [3] 刘森林, 邢苗, 刘刚, 等. 碱性纤维素酶革兰氏阴性菌株筛选及酶学性质研究[J]. 微生物学通报, 2005, 32(4): 91–94.
- [4] Mettinen-Oinonen A, Londesborough J, Joutsjoki V, et al. Three cellulases from *Melanocarpus albowmyces* for textile treatment at neutral pH[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 34(3–4): 332–341.
- [5] Wonganu B, Pootanakit K, Boonyapakron K, et al. Cloning, expression and characterization of a thermo-tolerant endoglucanase from *Syncephalastrum racemosum* (BCC18080) in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2008, 58(1): 78–86.
- [6] 谭慧芳, 张国青, 郑光宇, 等. 特异腐质霉中性内切葡聚糖酶 II 基因的克隆及表达[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 68–73.
- [7] 母敬郁, 王曦, 王娇, 等. 重组 *Thermomonospora fusca* 纤维素酶 Cel6A 在毕赤酵母中的表达及纯化[J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(6): 578–582.
- [8] Koseki T, Mese Y, Fushinobu S, et al. Biochemical characterization of a glycoside hydrolase family 61 endoglucanase from *Aspergillus kawachii*[J]. Applied Microbiology Biotechnology, 2008, 77(6): 1279–1285.
- [9] 张亚波, 刘连盟, 徐荣燕, 等. 嗜热子囊菌光孢变种内切葡聚糖酶 I 基因在毕赤酵母中的表达及部分酶学性质[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(3): 419–422.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 1595.
- [11] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000: 77–90.
- [12] 王玮, 文湘华. 木质素过氧化物酶 LiPH2 合成基因在毕赤酵母中的表达[J]. 环境科学学报, 2009,

- 29(9): 1793–1799.
- [13] Kim SJ, Lee JA, Kim YH, et al. Optimization of the functional expression of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris* by varying the host and promoter[J]. Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 19(9): 966–971.
- [14] 余占桥, 马青山, 赵龙妹, 等. 毕赤酵母优化表达外源蛋白策略[J]. 微生物学通报, 2010, 37(7): 1035–1042.
- [15] Haltrich D, Nidetzky B, Kulbe KD, et al. Production of fungal xylanases[J]. Bioresource Technology, 1996, 58(2): 137–161.
- [16] 占纪勋, 刘廷志, 王德培, 等. 黑曲霉 S13 液体发酵产木聚糖酶的研究[J]. 北京工商大学学报: 自然科学版, 2002, 20(4): 14–17.
- [17] 武秀琴. 绿色木霉 RW-2 纤维素酶的酶学性质研究[J]. 中国酿造, 2009(11): 68–71.
- [18] 雒军, 宫晓燕, 魏炜, 等. 瑞氏木霉内切葡聚糖酶 II 在大肠杆菌中的重组表达及重组酶性质测定[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2009, 32(3): 91–97.
- [19] 陈祺, 韦宇拓, 杜丽琴, 等. 绿色木霉葡聚糖内切酶 I 基因的定点突变及酶学性质的研究[J]. 广西农业生物科学, 2008, 27(Suppl 1): 1–7.
- [20] 王瑾, 邬敏辰, 周晨妍. 内切葡聚糖酶基因在大肠杆菌与毕赤酵母中的表达[J]. 生物技术通报, 2008(3): 110–114.
- [21] 吴振芳, 陈忠, 曾民, 等. 内切葡聚糖基因在大毕赤酵母中的高效表达研究[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(3): 529–535

征订启事

欢迎订阅《微生物学通报》

《微生物学通报》创刊于 1974 年, 是中国科学院微生物研究所和中国微生物学会主办, 国内外公开发行人, 以微生物学应用基础研究及技术创新与应用为主的综合性学术期刊。刊登内容包括: 基础微生物学研究, 农业微生物学研究, 工业微生物学研究, 医学微生物学研究, 食品微生物学研究, 环境微生物学研究, 微生物功能基因组研究, 微生物蛋白组学研究, 微生物模式菌株研究, 微生物工程与药物研究, 微生物技术成果产业化及微生物教学研究改革等。

本刊为中国生物科学类核心期刊。曾获国家级优秀科技期刊三等奖, 中国科学院优秀科技期刊三等奖, 北京优秀科技期刊奖, 被选入新闻出版总署设立的“中国期刊方阵”并被列为“双效”期刊。

自 2008 年本刊已经全新改版, 由双月刊改为月刊, 发表周期缩短, 内容更加丰富详实。欢迎广大读者到邮局订阅或直接与本刊编辑部联系购买, 2012 年每册定价 58 元, 全年 696 元, 我们将免邮费寄刊。

另, 本编辑部现存有少量过刊, 如有需要者可直接与编辑部联系。(请事先与编辑部联系, 获悉每册售价。敬请在汇款单上注明所购刊物的年代、卷、期和数量)

邮购地址: (100101)北京朝阳区北辰西路 1 号院 3 号中国科学院微生物研究所《微生物学通报》编辑部

Tel: 010-64807511; E-mail: bjb@im.ac.cn

网址: <http://journals.im.ac.cn/wswxtbcn>

国内邮发代号: 2-817; 国外发行代号: BM413