β-甘露聚糖酶 AuMan5A$^{loop/H321G}$ 在乳酸克鲁维酵母中的高效表达

唐诗涵[1]，李雪晴[1]，袁风娇[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：为制备食品级 β-甘露聚糖酶，将来源于宇佐美曲霉（*Aspergillus usamii*）的糖苷水解酶 5 家族 β-甘露聚糖酶突变体基因（*Auman5A*$_{loop/H321G}$）克隆至表达质粒 pKLAC1 信号肽 α-MF 下游，构建重组表达质粒 pKLAC1-*Auman5A*$^{loop/H321G}$，并电转化乳酸克鲁维酵母（*Kluyveromyces lactis*）GG799。采用半乳糖诱导表达和酶活性分析获得了高水平表达的重组 β-甘露聚糖酶突变酶（reAuMan5A$^{loop/H321G}$）的转化子 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321}$G，其产酶活力为 54.9 U/mL。SDS-PAGE 分析显示，reAuMan5A$^{loop/H321G}$ 的表观相对分子质量约为 55 000。经 YPG 培养基初始 pH、摇瓶装液量以及诱导剂的种类、初始质量浓度和添加方式的初步优化，GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 所产酶活力较工艺优化前提高了 254.6%，从而实现了 reAuMan5A$^{loop/H321G}$ 在乳酸克鲁维酵母中的高效表达。

关键词：β-甘露聚糖酶；乳酸克鲁维酵母；表达；诱导剂；发酵工艺
中图分类号：Q 786　**文章编号**：1673-1689(2019)07-0026-08　**DOI**：10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.07.004

High-Level Expression of A β-Mannanase AuMan5A$^{loop/H321G}$ in *Kluyveromyces lactis* GG799

TANG Shihan[1]，*LI Xueqing*[1]，*YUAN Fengjiao*[1]，*LI Jianfang*[1]，*WU Minchen*[*2]
（1. School of Food Science and Technology，Jiangnan University，Wuxi 214122，China；2. Wuxi Medical School，Jiangnan University，Wuxi 214122，China）

Abstract：To prepare the food-grade β-mannanase，a β-mannanase mutant gene *Auman5A*$^{loop/H321G}$ was expressed in *Kluyveromyces lactis* GG799. *Auman5A*$^{loop/H321G}$，gene constructed based on a glycoside hydrolase family 5 β-mannanase gene（*Auman5A*）from *Aspergillus usamii*，was inserted into the signal peptide α-MF downstream of the expression plasmid pKLAC1，forming a recombinant plasmid pKLAC1-*Auman5A*$^{loop/H321G}$. Then，pKLAC1-*Auman5A*$^{loop/H321}$G was electroporated into *Kluyveromyces lacti* GG799. After induction by galactose and enzyme activity analysis，a transformant GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ expressing the highest recombinant β-mannanase（reAuMan5A$^{loop/H321G}$）activity of 54.9 U/mL was selected for subsequent studies. The apparent

收稿日期：2016-12-28
基金项目：国家自然科学基金项目(31271811)；江苏省普通高校研究生科研创新计划项目(SJLX16-0472)。
* **通信作者**：邬敏辰(1962—)，男，博士，教授，博士研究生导师，主要从事酶工程与基因工程方面的研究。E-mail：bioch@163.com
引用本文：唐诗涵，李雪晴，袁风娇，等. β-甘露聚糖酶 AuMan5A$^{loop/H321G}$ 在乳酸克鲁维酵母中的高效表达 [J]. 食品与生物技术学报，2019，38(07)：26-33.

molecular weight of reAuMan5A$^{loop/H321G}$ was estimated to be about 55 000 by SDS-PAGE analysis. Furthermore, the β-mannanase activity produced by GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ was increased by 254.6% after primary optimization of the initial pH and loading volume of YPG medium as well as the species, initial concentration and supplementary mode of inducer. As a result, the high-level expression of reAuMan5A$^{loop/H321G}$ in *K. lactis* was actualized at the optimized fermentation process.

Keywords: β-mannanase, *Kluyveromyces lactis*, expression, inducer, fermentation process

内切型 β-1,4-D-甘露聚糖酶（endo-β-1,4-D-mannanase, EC 3.2.1.78）简称 β-甘露聚糖酶，能特异性催化甘露聚糖分子主链 β-1,4-D-糖苷键的水解，其产物为不同聚合度的甘露寡糖和少量单糖分子[1]。研究表明，甘露寡糖能有效促进人与动物肠道内双歧杆菌和乳酸杆菌等有益菌群的增殖，同时能抑制有害菌群的生长，从而增强机体的非特异性免疫力[2]。β-甘露聚糖酶广泛存在于各种生物体尤其是微生物和植物中，在食品、饲料、医药、生物能源和纸浆漂白等工业领域具有潜在的应用价值[3]。

迄今为止，已有众多 β-甘露聚糖酶基因被克隆分析，并在多种表达体系中实现了异源表达，如毕赤酵母（*Pichia pastoris*）[4]、植物乳杆菌（*Lactobacillus plantarum*）[5]、大肠杆菌（*Escherichia coli*）[6]、里氏木霉（*Trichoderma reesei*）[7] 和枯草芽胞杆菌（*Bacillus subtilis*）[8]等体系。与毕赤酵母类似，乳酸克鲁维酵母（*Kluyveromyces lactis*）具有生长快、操作简便、分泌表达以及翻译后加工准确等特点。但毕赤酵母表达外源蛋白质需要甲醇诱导，因此其表达的蛋白质/酶存在一定的安全隐患；而乳酸克鲁维酵母是被美国 FDA 认证为“一般认为安全”（generally recognized as safe, GRAS）的菌种，其所用诱导剂为食品级原料（如半乳糖等），因此借助其表达的蛋白质/酶可直接用于食品、饲料和医药等领域[9]。目前已有多种糖苷水解酶如 α-淀粉酶、β-半乳糖苷酶和木聚糖酶等在乳酸克鲁维酵母中进行了表达[10]，但未见有 β-甘露聚糖酶在乳酸克鲁维酵母中表达的文献报道。

作者所在实验室前期将 β-甘露聚糖酶基因 *Auman5A* 和突变基因 *Auman5A*$^{loop/H321G}$ 分别在毕赤酵母 GS115 中成功实施了表达。酶学性质分析表明，突变酶 AuMan5A$^{loop/H321G}$ 的温度特性（T_{opt} 和 $t_{1/2}^{70}$）及其催化效率（k_{cat}/K_m）较原酶 AuMan5A 均有显著改善，分别达到 75 ℃、300 min 和 3 194 mL/(mg·s)，具有较高的工业应用价值。而经毕赤酵母表达的 AuMan5A$^{loop/H321G}$ 可能存在应用领域受限等问题，因此，本研究拟借助 pKLAC1 将 *Auman5A*$^{loop/H321G}$ 在乳酸克鲁维酵母 GG799 中表达，并对转化子的发酵产酶工艺进行初步优化，为食品级 β-甘露聚糖酶的工业化生产及应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和培养基

乳酸克鲁维酵母 GG799 和表达质粒 pKLAC1：购自美国 New England BioLabs 公司；克隆质粒 pUCm-T：购自上海 Sangon 公司；大肠杆菌 JM109 和 DH5α：购自 Novagen 公司；重组表达质粒 pPICZαA-*Auman5A*$^{loop/H321G}$：作者所在实验室构建和保存。

LB、YCB、YPD 和 YPG 培养基的配制：参照 K. lactis Protein Expression Kit（New England BioLabs 公司，2005 版）操作手册。

1.2 工具酶和试剂

ExTaq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、250 bp DNA Ladder Marker 和低相对分子质量蛋白质 Marker：均购自大连 TaKaRa 公司；EZ-10 柱式 DNA 胶回收试剂盒：购自上海 Sangon 公司；标准 D-甘露糖和角豆胶：Sigma 公司产品；其它试剂均为国产或进口分析纯。

1.3 PCR 引物设计及合成

根据表达质粒 pKLAC1 多克隆位点和 Kex 酶切位点以及 *Auman5A*$^{loop/H321G}$ 或 *Auman5A* 核苷酸序列（GenBank 登录号：HQ839639），设计一对 PCR 引物 Xho-F 和 Not-R，用于目的基因的扩增；PCR 引物 IntPri-1、IntPri-2 和 IntPri-3，用于重组乳酸克鲁维酵母的分析。所有引物由上海 Sangon 公司合成，见表 1。

表 1 目的基因扩增和鉴定的 PCR 引物

Table 1 PCR primers for the amplification and identification of Auman5Aloop/H321G

引物名称	引物序列 (5′→3′)	酶切位点
Xho-F	CTCGAGAAAAGATCCTTCGCCAGCACCTC	*Xho* Ⅰ
Not-R	GCGGCCGCTTAGGCACTATCAATAGCAG	*Not* Ⅰ
IntPri-1	TACCGACGTATATCAAGCCCA	-
IntPri-2	ATCATCCTTGTCAGCGAAAGC	-
IntPri-3	CAGTGATTACATGCATATTGT	-

1.4 重组表达质粒的构建

以 pPICZαA-*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 为模板、Xho-F 和 Not-R 为引物,PCR 扩增目的基因 *Auman5A*$^{loop/H321G}$:94 ℃预变性 4 min;30 个循环 (94 ℃ 30 s、55 ℃ 30 s 和 72 ℃ 70 s);72 ℃延长 10 min。将目的 PCR 产物与 pUCm-T 连接,转化大肠杆菌 JM109,进行蓝白斑筛选、双酶切鉴定和 DNA 测序。将测序正确的 pUCm-T-*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 经 *Xho* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 双酶切,割胶回收目的条带,与经同样双酶切的 pKLAC1 连接,获重组表达质粒 pKLAC1-*Auman5A*$^{loop/H321G}$,转化大肠杆菌 DH5α,DNA 测序验证。

1.5 乳酸克鲁维酵母转化子的筛选和表达

pKLAC1 和 pKLAC1-*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 经 *Sac* Ⅰ 线性化,分别电转化乳酸克鲁维酵母 GG799 感受态细胞,涂布于含 5 mmol/L 乙酰胺的 YCB 平板,30 ℃静置培养 3 d。随机挑取生长良好的单菌落,接种于 YPD 液体培养基中,30 ℃、220 r/min 培养至菌液 OD_{600} 达 1.3~1.5 时,提取菌体基因组 DNA。参照 K. lactis Protein Expression Kit 操作手册,以基因组 DNA 为模板,IntPri-1 或 IntPri-3 和 IntPri-2 为上下游引物,PCR 分析重组乳酸克鲁维酵母,筛选出若干整合有多拷贝目的基因 *Auman5A*$^{loop/H321G}$ 的转化子;不含目的基因的转化子命名为 GG799/pKLAC1(空白对照)。将多拷贝转化子和 GG799/pKLAC1 分别接种于 YPD 培养基中,于 30 ℃、220 r/min 培养 24 h,以 2%接种体积分数转接于 30 mL YPG 培养基中,在相同条件下诱导表达 48 h,收集上清液测定 β-甘露聚糖酶活性。选取成功表达 reAuMan5A$^{loop/H321G}$ 且活性最高的乳酸克鲁维酵母转化子,命名为 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$。

1.6 重组表达产物的分析

采用改良 DNS 法测定 β-甘露聚糖酶活性。取 2.4 mL、5 mg/mL 角豆胶溶液(用 pH 3.6、50 mmol/L 柠檬酸-Na_2HPO_4 缓冲液配制),65 ℃预热 10 min,加入 0.1 mL 适当稀释的酶液,65 ℃准确反应 15 min,加入 2.5 mL DNS 试剂,沸水浴显色 7 min,测定 OD_{540}。在上述反应条件下,每分钟释放 1 μmol 还原糖(以 D-甘露糖计)所需酶量定义为 1 个酶活性单位(U)。采用 SDS-PAGE 分析重组表达产物组成。以牛血清蛋白为标准,采用 Bradford 法分析重组表达产物浓度。

1.7 发酵产酶工艺的初步优化

1.7.1 诱导剂种类对产酶的影响 分别用 20 mg/mL 乳糖、葡萄糖、麦芽糖和蔗糖替代 YPG 培养基中的半乳糖作为碳源和诱导剂,于 30 ℃、220 r/min 诱导表达 96 h,取上清液测定 β-甘露聚糖酶活性。

1.7.2 摇瓶装液量对产酶的影响 在最适诱导剂条件下,将摇瓶的 YPG 装液量分别调整为 20、30、40、50、60、70 mL/250 mL,其它条件同 1.7.1。

1.7.3 培养基初始 pH 对产酶的影响 在最适诱导剂和装液量条件下,将 YPG 培养基的初始 pH 分别调整为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5,其它条件同 1.7.1。

1.7.4 诱导剂初始质量浓度对产酶的影响 在以上各种最适条件下,调整发酵培养基中诱导剂的初始质量浓度为 20、40、80 mg/mL,每 24 小时取上清液测定 β-甘露聚糖酶酶活性,其它条件同 1.7.1。

1.7.5 诱导剂添加方式对菌体生长和产酶的影响 在以上各种最适条件下,设计 4 种诱导剂添加方式:(A) 诱导剂初始质量浓度为 40 mg/mL,后续发酵过程中不补加诱导剂;(B) 诱导剂初始质量浓度为 20 mg/mL,后续发酵过程中不补加诱导剂;(C) 诱导剂初始质量浓度为 40 mg/mL,每 48 小时补加诱导剂 40 mg/mL;(D) 诱导剂初始质量浓度为 20 mg/mL,每 24 小时补加诱导剂 20 mg/mL。其中补加的诱导剂母液质量浓度为 400 mg/mL,在发酵过程中,每 24 小时取样监测酶活性、菌体生长量和诱导剂质量浓度变化。

2 结果与分析

2.1 重组表达质粒的构建

根据 pKLAC1 多克隆位点的特点,在上游引物 Xho-F 设计时引入了 *Xho* Ⅰ 位点和 *Kex* 切割信号肽 α-MF 的寡肽序列 (Lys-Arg)。当目的基因 *Auman5A*$^{loop/H321G}$ 借助 *Xho* Ⅰ 和 *Not* Ⅰ 位点克隆至

pKLAC1 的 α-MF 下游时，经诱导表达及翻译后加工,使表达产物 reAuMan5A$^{loop/H321G}$ 拥有天然 N 末端，见图 1。根据 1.4 所述方法，将 *Auman5A*$^{loop/H321G}$ 与 pKLAC1 连接,并转化大肠杆菌 DH5α,随后提取转化子的质粒 DNA,采用 *Hind*Ⅲ和 *Not* Ⅰ双酶切筛选重组质粒。结果表明,空质粒 pKLAC1 的双酶切产物有一条约 300 bp 的特异性条带；而重组质粒 pKLAC1-*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 的产物有一条约 1 400 bp 的条带,与预期相符。

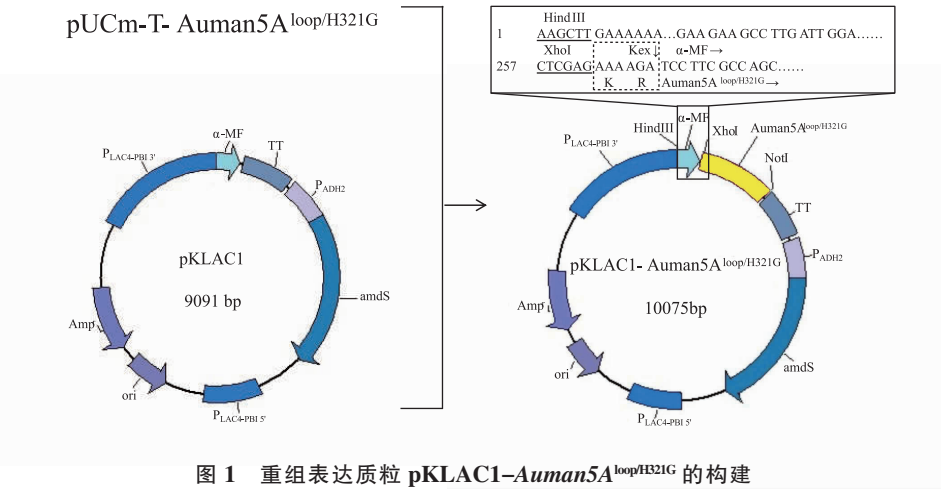


图 1　重组表达质粒 pKLAC1-*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 的构建

Fig. 1　Construction of a recombinant expression plasmid pKLAC1-*Auman5A*$^{loop/H321G}$

2.2　重组乳酸克鲁维酵母的构建及筛选

pKLAC1 和 pKLAC1-*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 经线性化后，分别电转化乳酸克鲁维酵母 GG799 感受态细胞,经含有乙酰胺的 YCB 平板筛选阳性转化子。以阳性转化子基因组 DNA 为模板，引物 IntPri-1 和 IntPri-2 进行 PCR 鉴定，扩增出 1.9 kb 的片段,表明质粒 pKLAC1 和 pKLAC1-*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 均已成功整合至乳酸克鲁维酵母 GG799 基因组；引物 IntPri-2 和 IntPri-3 进行 PCR 鉴定，扩增出 2.3 kb 的片段，表明乳酸克鲁维酵母 GG799 基因组中的 LAC4 位点处整合有多拷贝串联的表达框，未扩增出 2.3 kb 片段转化子为单拷贝子。挑取表达目的基因的多拷贝子,经半乳糖诱导表达和酶活性分析获得产 reAuMan5A$^{loop/H321G}$ 活性最高的转化子 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$,上清液酶活性为 54.9 U/mL,空白对照 GG799/pKLAC1 发酵上清液未检测出 β-甘露聚糖酶活性。结果表明,β-甘露聚糖酶基因 *Auman5A*$^{loop/H321G}$ 成功在乳酸克鲁维酵母 GG799 中表达。

2.3　发酵产酶工艺的初步优化

2.3.1　诱导剂种类对 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 产酶的影响　重组乳酸克鲁维酵母可以利用多种诱导剂表达外源基因,诱导剂种类对其生长代谢和产酶有重要影响。如图 2(a) 所示,以半乳糖为诱导剂时,GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 产 β-甘露聚糖酶活力最高。由于在缺少诱导物的情况下,启动子 LAC4 不会被完全抑制[11],当其以半乳糖外的还原糖甚至非还原糖作诱导剂,GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 也能表达外源基因。其中以乳糖作诱导剂时,达到了半乳糖作诱导剂时的 73.1%，以麦芽糖为诱导剂时仅为半乳糖的 38.7%。故选择半乳糖作为发酵培养基中的碳源和诱导剂。

2.3.2　摇瓶装液量对 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 产酶的影响　乳酸克鲁维酵母在生长过程中耗氧,溶解氧浓度对其产酶有很大影响，在摇瓶发酵条件下，溶氧可以通过改变摇瓶的装液量来调节。如图 2(b) 所示,GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 产酶的产酶活力随着装液量的增加而逐渐提高，当装液量达到 70 mL/250 mL 时,产酶活力降低。由于摇瓶发酵时间长达 96 h,水蒸汽挥发影响培养基中各组分比例,装液量过小会导致 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 产酶活力较低；在摇瓶发酵后期，随着乳酸克鲁维酵母菌体的增加,耗氧量加大,当装液量的过高时溶氧量降低,从而影响 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 产酶活力。当装液量为 60 mL/250 mL 时,GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 产酶活力最高,故选取摇瓶装液量为 60 mL/250 mL。

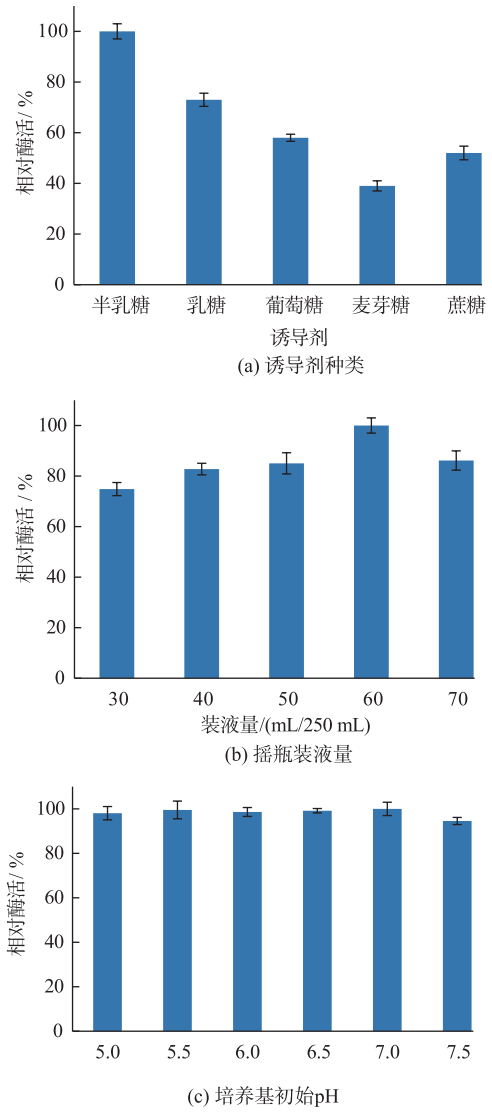


图 2 诱导剂种类、摇瓶装液量以及培养基初始 pH 对 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 产酶的影响

Fig. 2 Effects of inducers、medium volume and initial pH on the expression of GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$

2.3.3 培养基初始 pH 对 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 产酶的影响 培养基 pH 主要从酶的活性、细胞膜所带电荷的状态、某些组分的解离以及代谢过程等方面影响酵母的生长代谢和发酵产物合成[12]。由于摇瓶中培养基的 pH 不受控制，故只考虑培养基初始 pH 对重组乳酸克鲁维酵母产酶活力的影响。由图 2(c) 可知，GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 对 pH 的耐受范围较广，在所选 pH 5.0~7.5 范围内，产酶活力几乎不受影响，与王辉等[13]报道相符。培养基的自然 pH 在 7.0 左右，故选择发酵培养基初始 pH 为 7.0。

2.3.4 诱导剂初始质量浓度对 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 产酶的影响 作为重组乳酸克鲁维酵母的碳源和重组蛋白质表达的诱导剂，半乳糖的添加量对其生长代谢和产酶有重要影响。如图 3 所示，半乳糖初始质量浓度为 20 mg/mL 时，GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 产酶活力在 48 h 内迅速增加，48 h 后趋于平衡，最终产酶活力 54.9 U/mL；半乳糖初始质量浓度为 40 mg/mL 时，产酶活力在 72 h 内迅速增加，72 h 后趋于平衡，最终产酶活力为 70.2 U/mL，提高了 27.8%；半乳糖初始质量浓度为 80 mg/mL 时，产酶活力在 24 h 内迅速增加，最终产酶活力仅为 38.4 U/mL。结果表明，在发酵初期，产酶活力随着菌体的增长而迅速提高，发酵后期由于碳源等营养物质的消耗，产酶速率减缓。诱导剂初始质量浓度影响 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 的产酶活力。

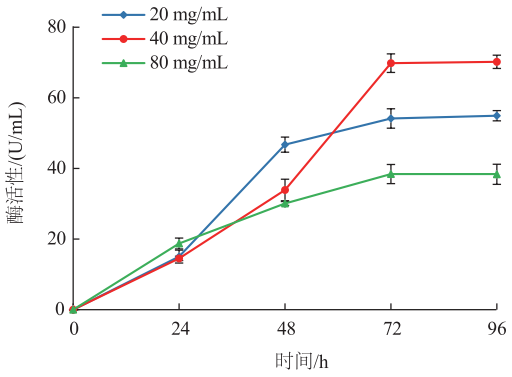
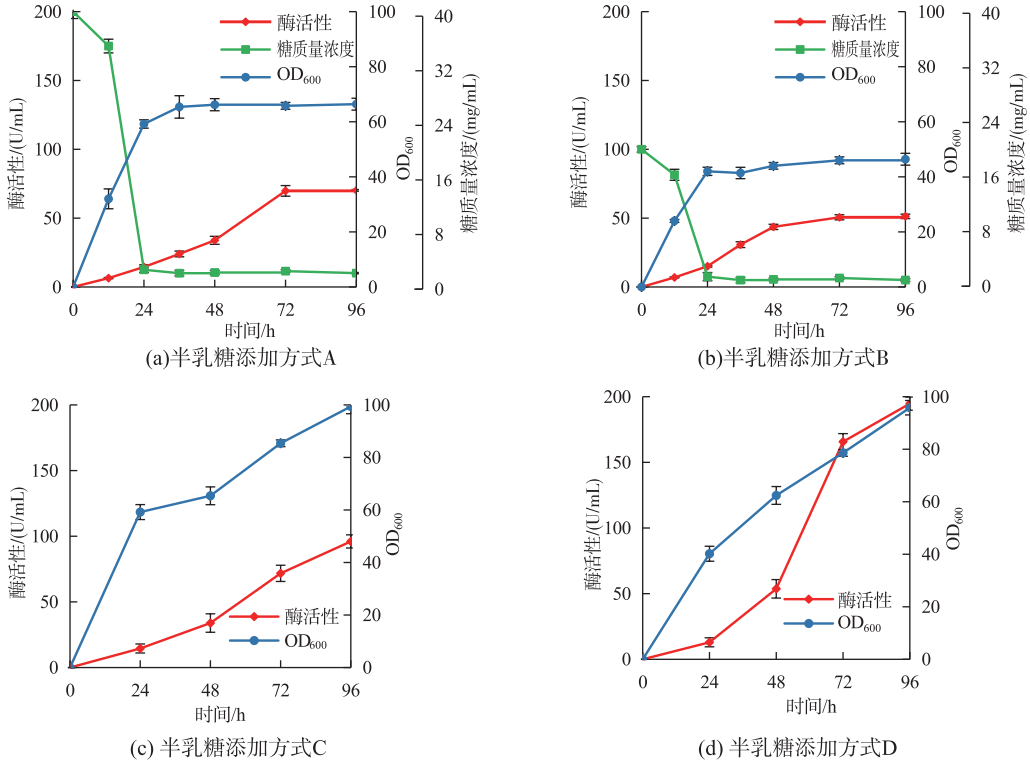


图 3 半乳糖初始质量浓度对 GG799/*Auman5A*^{loopH321G} 产酶的影响

Fig. 3 Effect of initial concentration of galactose on the expression of GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$

2.3.5 诱导剂添加方式对 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 菌体生长和产酶的影响 为进一步优化重组乳酸克鲁维酵母摇瓶发酵工艺，按 1.7.5 方法设计 4 种诱导剂添加方式进行实验。如图 4(a,b)所示，在未补加半乳糖的发酵过程中，发酵液半乳糖质量浓度在 24 h 内分别从 40 mg/mL 和 20 mg/mL 迅速降低至 2 mg/mL 和 1 mg/mL；其后，半乳糖维持在低质量浓度水平，菌体浓度也趋于平衡，OD_{600} 最终为 69.1(方式 A) > 48.2(方式 B)。如图 4(c) 所示，当每 48 小时补加 40 mg/mL 半乳糖时，重组乳酸克鲁维酵母细胞在24 h 内迅速增殖，48 h 补加半乳糖后细胞继续增殖，96 h 后 OD_{600} 达 99.6，GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 产酶活力平稳上升，96 h 后达到了 96.1 U/mL，比未补加半乳糖方案 A 的 70.2 U/mL 提高了

36.9%。如图 4(d) 所示，在每 24 小时补加 20 mg/mL 半乳糖时，重组乳酸克鲁维酵母菌体质量浓度在 96 h 内几乎为线性增殖至 OD_{600} 为 91.5，与添加方式 C 相当，GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 产酶活力在 48 h 后大幅度上升，96 h 后高达 194.7 U/mL，比未优化前提高 254.6%，表明诱导剂少量多次的补料方式，可有效调节半乳糖作为碳源和诱导剂的作用方式 [14]，从而调节重组乳酸克鲁维酵母的生长代谢和外源蛋白质的表达，实现 β-甘露聚糖酶 reAuMan5A$^{loop/H321G}$ 在乳酸克鲁维酵母的高效表达。



(a)半乳糖添加方式A　(b)半乳糖添加方式B

(c) 半乳糖添加方式C　(d) 半乳糖添加方式D

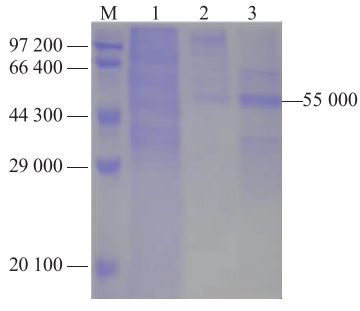
图 4　半乳糖添加方式对 GG799/Auman5A$^{loop/H321G}$ 菌体生长和产酶的影响

Fig. 4　Effects of fed strategy of galactose on the growth and expression of GG799/Auman5A$^{loop/H321G}$

2.4　重组表达产物的分析

利用 SDS-PAGE 分析重组乳酸克鲁维酵母的发酵上清液，GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 的上清液在约 55 000 左右呈现一条特异性条带，而 GG799/pKLAC1 无此蛋白质条带，进一步说明 β-甘露聚糖酶基因 *Auman5A*$^{loop/H321G}$ 通过乳酸克鲁维酵母分泌表达。另外，优化后的 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 的表达水平较之前有明显提升，见图 5。

优化摇瓶发酵工艺后，GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 发酵液中 β-甘露聚糖酶 reAuMan5A$^{loop/H321G}$ 表达量为 327.2 mg/L，为优化前(87.4 mg/L) 的 3.75 倍，也高于表 2 中所报道重组乳酸克鲁维酵母外源蛋白质表达量。



M：蛋白质标志物；1：GG799/pKLAC1 表达产物；2：GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 表达产物；3：优化工艺后 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 表达产物

图 5　重组 β-甘露聚糖酶表达的 SDS-PAGE 分析

Fig. 5　SDS-PAGE analysis of recombinant β-mannanases

表 2 重组乳酸克鲁维酵母外源蛋白质表达量

Table 2 Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*

基因产物	表达质粒	启动子	摇瓶表达水平/(mg/L)	蛋白质含量测定方法	参考文献
β-甘露聚糖酶	pKLAC1	LAC4-PBI	327.2	Bradford 法	本文
人血清白蛋白	pKLAC1	LAC4-PBI	81	Western blot 半定量法	[15]
人干扰素 β	pKLAC1	LAC4-PBI	1	Bradford 法	[16]
抗 HER2 人源化单克隆抗体	pYES2-ochI/pPICZAA-ura3	LAC4	120±20	ELISA 法	[17]
α-半乳糖苷酶	rDNA integration	Sc GAL7	250	Bradford 法	[18]
木聚糖酶	pKD1	Kl LAC4	120	Bradford 法	[19]

3 结 语

将 β-甘露聚糖酶突变体基因(*Auman5A*$^{loop/H321G}$)克隆至 pKLAC1,并整合进入乳酸克鲁维酵母 GG799,实现了其在乳酸克鲁维酵母中的表达。构建得到的重组菌株 GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 的产 β-甘露聚糖酶 reAuMan5A$^{loop/H321G}$ 活力为 54.9 U/mL。以半乳糖为最优碳源和诱导剂,装液量为 60 mL/250 mL,初始 pH 为 7.0,初始半乳糖质量浓度为 20 mg/mL,每 24 小时补加半乳糖至 20 mg/mL 的条件下,GG799/*Auman5A*$^{loop/H321G}$ 产酶活力达到 194.7 U/mL,较优化前提高了 254.6%,蛋白质表达量为 327.2 mg/L,为优化前的 3.75 倍。本研究成功实现了 *Auman5A*$^{loop/H321G}$ 在乳酸克鲁维酵母 GG799 中的高效异源表达,为制备食品、医药和饲料等加工领域的食品级 β-甘露聚糖酶奠定了基础。

参考文献:

[1] DHAWAN S,KAUR J. Microbial mannanases:an overview of production and applications[J]. **Critical Reviews in Biotechnology**,2007,27(4):197-216.

[2] YAMABHAI M,SAK-UBOL S,SRILA W,et al. Mannan biotechnology:from biofuels to health[J]. **Critical Reviews in Biotechnology**,2016,36(1):32-42.

[3] CHAUHAN P S,PURI N,SHARMA P,et al. Mannanases:microbial sources,production,properties and potential biotechnological applications[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2012,93(5):1817-1830.

[4] ZHAO Mei,WEI Xihuan,WANG Chunjuan,et al. Gene cloning and expression of a thermostable β- mannanase and its enzymatic properties[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2014,33(6):590-596.(in Chinese)

[5] SAK-UBOL S,NAMVIJITR P,PECHSRICHUANG P,et al. Secretory production of a β-mannanase and a chitosanase using a *Lactobacillus plantarum* expression system[J]. **Microbial Cell Factories**,2016,15:81.

[6] ZHOU J,ZHANG R,GAO Y,et al. Novel low-temperature-active,salt-tolerant and proteases-resistant endo-1,4-β-mannanase from a new *Sphingomonas strain*[J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**,2012,113(5):568-574.

[7] WANG J,ZENG D,LIU G,et al. Truncation of a mannanase from *Trichoderma harzianum* improves its enzymatic properties and expression efficiency in *Trichoderma reesei*[J]. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**,2014,41(1):125-133.

[8] GUO S,TANG J,WEI D,et al. Construction of a shuttle vector for protein secretory expression in *Bacillus subtilis* and the application of the mannanase functional heterologous expression[J]. **Journal of Microbiology and Biotechnology**,2014,24(4):431-439.

[9] CELIK E,CALIK P. Production of recombinant proteins by yeast cells[J]. **Biotechnology Advances**,2012,30(5):1108-1118.

[10] ZHAN F X,WANG Q H,JIANG S J,et al. Developing a xylanase XYNZG from *Plectosphaerella cucumerina* for baking by heterologously expressed in *Kluyveromyces lactis*[J]. **BMC Biotechnology**,2014,14:107.

[11] VAN OOYEN A J J,DEKKER P,HUANG M,et al. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*[J]. **FEMS Yeast Research**,2006,6(3):381-392.

[12] WU Q,XU H,YING H J,et al. Kinetic analysis and pH-shift control strategy for poly (γ-glutamic acid) production with *Bacillus subtilis* CGMCC 0833[J]. **Biochemical Engineering Journal**,2010,50(1-2):24-28.

[13] WANG Hui,ZHANG Liang,LI Youran,et al. Optimization of fermentation conditions for the production of phospholipase A2 by

recombinant *Kluyveromyces lactis*[J]. **Food Science**, 2015(21): 111-116.(in Chinese)

[14] WU Shihua, LIAO Lan, HUANG Cuiji, et al. Study on shaking-flask and fed-batch fermentation of L-leueine[J]. **Science and Technology of Food Industry**, 2006(9): 130-132.(in Chinese)

[15] FU Lili, GUAN Bo, LEI Jianyong, et al. Expression of human serum albumin in *Kluyveromyces lactis*[J]. **Bioprocess Engineering**, 2012, (5): 55-60.(in Chinese)

[16] MADHAVAN A, SUKUMARAN R K. Secreted expression of an active human interferon-β (HuIFN β) in *Kluyveromyces lactis* [J]. **Engineering in Life Sciences**, 2016, 16(4): 379-385.

[17] WANG Lina, LIU Bo, GONG Xin, et al. Expression and analysis of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in *Kluyveromyces lactis*[J]. **China Biotechnology**, 2009(5): 44-49.(in Chinese)

[18] BERGKAMP R J M, KOOL I M, GEERSE R H, et al. Multiple-copy integration of the alpha-galactosidase gene from *Cyamopsis tetragonoloba* into the ribosomal DNA of *Kluyveromyces lactis*[J]. **Current Genetics**, 1992, 21(4-5): 365-370.

[19] WALSH D J, GIBBS M D, BERQUIST P L. Expression and secretion of a xylanase from the extreme thermophile, *Thermotoga strain* FjSS3B.1, in *Kluyveromyces lactis*[J]. **Extremophiles**, 1998, 2(1): 9-14.

科　技　信　息

澳新拟批准一种长链糖脂作为非酒精饮料的防腐剂

2019 年 6 月 13 日，澳新食品标准局（FSANZ）发布 83-19 号通告，拟批准来自食用菌匙盖假花（Dacryopinaxspathularia）的长链糖脂（long-chain glycolipids）作为非酒精饮料的防腐剂。据了解，此次申请是由 Lanxess Deutschland GmbH 和 Brooke-Taylor & Co Pty Ltd 提交，申请要求的最大使用水平在 20-100ppm 之间，使用量取决于饮料基质。

［信息来源］中华人民共和国海关总署. 澳新拟批准一种长链糖脂作为非酒精饮料的防腐剂 [EB/OL]. (2019-6-14). http://www.customs.gov.cn/customs/