

黑曲霉 SH-2 基因组中注释的 7 个 α -葡萄糖苷酶基因的鉴定与表达分析

杨海燕, 潘力, 王斌

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 已公布的黑曲霉 CBS513.88 基因组中注释了 7 个 α -葡萄糖苷酶基因信息, 但其中主要高活性基因一直未报道。本文通过同源重组构建了黑曲霉 SH-2 菌株 7 个 α -葡萄糖苷酶基因的系列多重敲除株。 α -葡萄糖苷酶活性测定结果显示仅 *agdB* 敲除株的酶活相较于野生株 SH-2 降低 36%, 而其余多重敲除菌株酶活影响较小。以敲除糖化酶、淀粉酶背景的黑曲霉 SH-2-3 菌株为宿主, 分别敲除和过量表达基因 *agdB* 及与已报道的黑曲霉 α -葡萄糖苷酶基因序列相似度最高的基因 *agdA*, 结果显示 *agdB* 敲除株生长速度在不含葡萄糖的培养条件下最慢, 并随着葡萄糖添加量增加; *agdB* 过量表达株酶活提高到野生型的 10 倍。本研究结果说明目前黑曲霉 SH-2 基因组中所注释的 7 个 α -葡萄糖苷酶基因中仅 *agdB* 为主要高活性 α -葡萄糖苷酶基因 (占总体酶活 36%), 黑曲霉 SH-2 中 α -葡萄糖苷酶基因仍需进一步探索。

关键词: 黑曲霉; α -葡萄糖苷酶; 基因敲除; 基因表达

文章编号: 1673-9078(2017)6-80-86

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.012

Identification and Expression Analysis of the Seven Predicted α -glucosidase Genes in *Aspergillus niger* SH-2 Genome

YANG Hai-yan, PAN Li, WANG Bin

(College of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: Seven α -glucosidase genes have been annotated in the genome of *Aspergillus niger* CBS513.88, but the gene with predominant α -glucosidase activity has not been reported. A set of seven α -glucosidase-gene-knockout mutant strains of *A. niger* SH-2 were constructed by homologous recombination, with deletion of α -glucosidase genes B, A, E, G, C, D, and F. Measurement of α -glucosidase activity showed that in the *agdB* disruption mutant strain (Δ *agdB*) activity was decreased by 36% compared with that of the control strain, but there was no significant decrease with the other deletion mutants. Using the *A. niger* SH-2-3 strain with glucoamylase and amylase gene deletions as the host, and the *agdA* gene, that shows the highest identity with the reported α -glucosidase gene sequence from *A. niger*, and *agdB* were knocked out and overexpressed, respectively. The results showed that the growth rate of *agdB* disruption mutant strains was the slowest in culture medium without glucose, and increased with increasing glucose concentrations. The α -glucosidase activity in the *agdB* overexpressing strain (3-*agdB*) was ten times as much as that of the SH-2 wild-type strain. Therefore, the results of this study suggest that *agdB* is the gene with predominant α -glucosidase activity (36% of all α -glucosidase activity) among the seven predicted α -glucosidase genes in the *A. niger* SH-2 genome, but further investigation is required.

Key words: *Aspergillus niger*; α -glucosidase; gene knock-out; gene expression

α -葡萄糖苷酶^[1,2] (EC 3.2.1.20), 广泛分布于自然界中, 来源于黑曲霉的 α -葡萄糖苷酶能够从低聚糖类

收稿日期: 2016-10-17

基金项目: 广东省科技计划项目 (2016A050503016、S2012030006235、2016A010105004); 华南理工大学中央高校基本科研业务费资助项目 (2015ZP032、2015ZZ040)

作者简介: 杨海燕 (1991-), 女, 硕士, 研究方向: 黑曲霉基因工程改造
通讯作者: 王斌 (1981-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 工业生物技术和丝状真菌遗传生理

底物的非还原性末端切开 α -1,4 糖苷键释放出葡萄糖, 或者将游离出的葡萄糖残基转移至另一糖类底物形成 α -1,6 糖苷键, 生成非发酵性的低聚糖, 如异麦芽糖、潘糖和糖肽等^[3], 是工业化生产低聚异麦芽糖 (IMOs)^[4]的关键酶制剂。

α -葡萄糖苷酶主要来源于真菌, 而国内外学者都对丝状真菌来源的 α -葡萄糖苷酶进行了研究。Minetoki 等^[5]测序分析并表达了米曲霉来源的 α -葡萄糖苷酶编码基因 *agdA*, 发现米曲霉和黑曲霉的 α -葡

葡萄糖苷酶氨基酸序列同源性为 78%，且研究发现表达的 *agdA* 基因具有葡萄糖苷酶活性；于岚等^[6]在大肠杆菌中克隆并表达黑曲霉 M-1 的 α -葡萄糖苷酶 cDNA，初步研究发现重组蛋白具有葡萄糖苷酶活性，最适 pH 为 6.0，最适温度为 45 °C，金属离子 Cu^{2+} 和 Mn^{2+} 对酶活力有明显的促进作用；周敏等^[7]也克隆分析了黑曲霉 CICIM F0410 中的 α -葡萄糖苷酶基因 (*agIU*) 序列，经序列比对发现与 NCBI 上公布的黑曲霉 CBS513.88 基因 *agdA* 序列在 2272 及 3098 位点上的两个碱基的区别，导致了两个氨基酸残基的变化。

Yuan 等^[8]研究发现，黑曲霉中与 α -葡萄糖苷酶有关的基因分别为糖苷水解酶 (GH) 31 家族的 *agdA*、*agdB*、*agdE*、*agdG* 和 *agdF*，以及糖苷水解酶 (GH) 13 家族的 *agdC* 和 *agdD*。黑曲霉 (*Aspergillus niger*) SH-2 是工业上常用的高产糖化酶菌株，其基因组序列已于 2014 年公布^[9]，根据 ASPGD 数据库黑曲霉 CBS513.88 中注释的 7 个 α -葡萄糖苷酶基因比对到黑曲霉 SH-2 基因组中，发现黑曲霉 SH-2 中编码 α -葡萄糖苷酶的基因 *agdA* 与黑曲霉 CBS513.88 中基因 *agdA* (D45356) 的碱基序列存在一个碱基的区别，基因 *agdB*、*agdE*、*agdG*、*agdC*、*agdD* 和 *agdF* 的碱基序列则与黑曲霉 CBS513.88 完全相同。

研究已公开的黑曲霉基因组中所注释的 7 个 α -葡萄糖苷酶基因中的主要高活性 α -葡萄糖苷酶基因，不仅有利于提高黑曲霉 α -葡萄糖苷酶生产低聚异麦芽糖的工业应用，也有利于提高黑曲霉糖化酶工业生产葡萄糖的纯度和产率，降低糖化酶工业生产应用的成本^[10]。本实验主要通过同源重组技术连续敲除黑曲霉 SH-2 中编码 α -葡萄糖苷酶的基因 *agdB*、*agdA*、*agdE*、*agdG*、*agdC*、*agdD* 和 *agdF*，构建系列 α -葡萄糖苷酶基因多重敲除株，探索其中主要的高活性 α -葡萄糖苷酶基因。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒

菌株 (表 1) 为本实验室构建和保藏，*Escherichia coli* Match1T1 购自 Invitrogen 公司，T-vector pMDTM20 载体购自 TaKaRa 公司。其中，菌株 SH-2-3 来源于黑曲霉 SH-2，为利用同源重组技术成功敲除了基因 *kusA*、*pyrG*、*glaA*、*aamA* 和 *amyA* 的黑曲霉 SH-2 突变株。巢巢曲霉乳清酸核苷酸脱羧酶基因 (*ANpyrG*) 为筛选标记基因。

表 1 菌株

Table 1 Strains

Strains	Genetic markers and instructions	Source
SH-2		Laboratory stock
$\Delta agdB$	$\Delta kusA$; $\Delta pyrG$; $\Delta agdB::ANpyrG$	This study
$\Delta agdBA$	$\Delta kusA$; $\Delta pyrG$; $\Delta agdB$; $\Delta agdA::ANpyrG$	This study
$\Delta agdBAE$	$\Delta kusA$; $\Delta pyrG$; $\Delta agdB$; $\Delta agdA$; $\Delta agdE::ANpyrG$	This study
$\Delta agdBAEG$	$\Delta kusA$; $\Delta pyrG$; $\Delta agdB$; $\Delta agdA$; $\Delta agdE$; $\Delta agdG::ANpyrG$	This study
$\Delta agdBAEGF$	$\Delta kusA$; $\Delta pyrG$; $\Delta agdB$; $\Delta agdA$; $\Delta agdE$; $\Delta agdG$; $\Delta agdF::ANpyrG$	This study
$\Delta agdBAEGC$	$\Delta kusA$; $\Delta pyrG$; $\Delta agdB$; $\Delta agdA$; $\Delta agdE$; $\Delta agdG$; $\Delta agdC::ANpyrG$	This study
$\Delta agdBAEGD$	$\Delta kusA$; $\Delta pyrG$; $\Delta agdB$; $\Delta agdA$; $\Delta agdE$; $\Delta agdG$; $\Delta agdD::ANpyrG$	This study
$\Delta agdA$	$\Delta kusA$; $\Delta pyrG$; $\Delta agdA::ANpyrG$	This study
SH-2-3	$\Delta kusA$; $\Delta pyrG$; $\Delta glaA$; $\Delta aamA$; $\Delta amyA$	Laboratory stock
3- $\Delta agdB$	$\Delta kusA$; $\Delta pyrG$; $\Delta glaA$; $\Delta aamA$; $\Delta amyA$; $\Delta agdB::ANpyrG$	This study
3- $\Delta agdA$	$\Delta kusA$; $\Delta pyrG$; $\Delta glaA$; $\Delta aamA$; $\Delta amyA$; $\Delta agdA::ANpyrG$	This study
3- <i>agdB</i>	$\Delta kusA$; $\Delta pyrG$; $\Delta glaA$; $\Delta aamA$; $\Delta amyA$; <i>agdB</i> ; <i>ANpyrG</i>	This study
3- <i>agdA</i>	$\Delta kusA$; $\Delta pyrG$; $\Delta glaA$; $\Delta aamA$; $\Delta amyA$; <i>agdA</i> ; <i>ANpyrG</i>	This study

1.1.2 酶和化学试剂

FastDigestTM 快速限制性内切酶和预混酶 DreamTaq Green MM 购自美国 Thermo scientific 公司；PCR 反应预混酶 Prime STAR HS(premix) 购自 TaKaRa 公司；抗生素 *Amp* 购自北京普博欣生物科技有限公司；质粒小量提取试剂盒和质粒大量提取试剂盒购自

广州捷倍斯生物科技有限公司；胶回收试剂盒购自美国 Omega 公司；对硝基苯- α -D-半乳糖吡喃糖苷 (pNPG) 和 L 型谷胱甘肽 (GSH) 购自 Sigma 公司；其他试剂均为分析纯试剂。

1.1.3 培养基

CD 培养基 (g/L)：葡萄糖 20， NaNO_3 3，KCl 2，

MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 0.01, pH 5.5 (固体含 1.7% 琼脂, 液体含 0.05% 琼脂)。

蔗糖高渗培养基 (g/L): 蔗糖 400, NaNO₃ 3, KCl 2, MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 0.01, pH 5.5 (琼脂含 0.5% 琼脂, 固体含 1.7% 琼脂)。

淀粉发酵培养基 (g/L): 玉米淀粉 50, 玉米浆 30, 豆粕粉 20。

去除筛选标记 *ANpyrG* 基因所用 5-氟乳清酸 (5-FOA) 培养基 (g/L): 葡萄糖 20, NaNO₃ 3, KCl 2, MgSO₄·7H₂O 0.5, KH₂PO₄ 0.01, 琼脂 17, pH 5.5, 高温灭菌后加入 0.22 μm 过滤除菌的 5-氟乳清酸 1 (g/L) 和尿嘧啶核苷 2.442 (g/L)。

淀粉培养基 (g/L): 牛肉膏 3, 蛋白胨 10, 酵母粉 2, NaCl 2, 可溶性淀粉 5, pH 5.5 (按 0%、0.5%、1%、1.5% 和 2% 的量添加葡萄糖)。

1.2 方法

1.2.1 α-葡萄糖苷酶基因敲除载体的构建

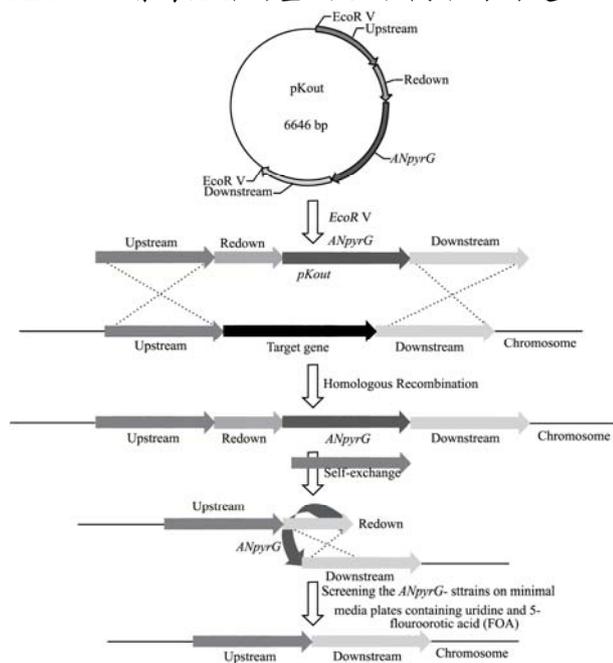


图1 无标记基因敲除载体 pKout 及敲除策略

Fig.1 Vector pKout and strategy of markerless gene knockout

以构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*) 的基因组为模板, 扩增得到作为筛选标记基因的构巢曲霉乳清酸核苷酸脱羧酶基因 (*ANpyrG*) 片段, 以黑曲霉 SH-2 基因组为模板, 扩增待敲除基因的上游同源臂 Upstream、下游同源臂 Downstream 以及 500 bp 下游同源臂 5' 端同向重复序列 Redown, 重叠 PCR 连接片段 Upstream-Redown-*ANpyrG*-Downstream, 胶回收后连接 T-vector pMDTM20, 连接产物用热激法转入大肠杆菌中, 重组质粒经 PCR 和测序验证正确后进行质粒

大量提取。大量提取获得的质粒用 *EcoR* V 或 *Apa* I 等限制性内切酶酶切得到线性化敲除载体 pKout, 该载体如图 1 所示。按照该构建方法, 构建 α-葡萄糖苷酶基因 *agdB*、*agdA*、*agdE*、*agdG*、*agdC*、*agdD* 和 *agdF* 的敲除载体 pKout-*agdB*、pKout-*agdA*、pKout-*agdE*、pKout-*agdG*、pKout-*agdC*、pKout-*agdD* 和 pKout-*agdF*。

1.2.2 α-葡萄糖苷酶基因多重敲除突变株构建及筛选标记基因 *ANpyrG* 的循环利用

原生质体的制备及转化详见参考文献^[1], 同时准备阳性对照和阴性对照组, 其中阳性对照不加质粒, 但加入 2.442 g/L 尿嘧啶核苷; 而阴性对照既不加质粒也不加入尿嘧啶核苷。转化平板在 30 °C 培养箱中培养 4~6 d 后在上层培养基长出的转化子即为发生同源重组交换的阳性转化子, 该敲除策略见图 1。

α-葡萄糖苷酶基因敲除株的鉴定: 将转化子转移至淀粉固体培养基, 30 °C 培养 4 d 后提基因组^[12]进行 PCR 扩增验证。

ANpyrG 筛选标记基因的去留: 通过设计 500 bp 左右的同向重复片段, 利用生物体自身存在的自交换机制, 通过在含有 5-氟乳清酸和尿嘧啶核苷的 CD 固体培养基中培养, 利用 5-氟乳清酸能抑制含有 *pyrG* 基因的菌株生长的特性, 筛选出不含 *ANpyrG* 筛选标记的菌株, 将该菌株用作下一步敲除的宿主菌。

1.2.3 摇瓶发酵及 α-葡萄糖苷酶活性测定

分别挑取野生型和各个验证正确的敲除株单菌落于 100 mL CD 液体培养基中, 30 °C 培养 7 d 后取 4 mL 转接至装有 100 mL 淀粉发酵培养基的 500 mL 三角瓶中, 于 30 °C、250 r/min 条件下培养 6 d。培养结束后, 离心取发酵上清液, 采用 pNPG 法测定 α-葡萄糖苷酶活性, 具体操作见文献^[2]。

1.2.4 菌株生长情况测定

按照 4% 接种量将在 CD 液体培养基中培养 10 d 的 SH-2、Δ*agdB*、SH-2-3、3-Δ*agdB* 菌株转接至 100 mL 分别含有 0%、0.5%、1%、1.5% 和 2% 葡萄糖的淀粉培养基中, 其中加入 5 个 4~5 mm 的研磨珠, 每隔 12 h 取样测定 OD₆₀₀。每组做三个平行, 取平均值。

2 结果与讨论

2.1 黑曲霉 α-葡萄糖苷酶基因多重敲除株的构建

通过同源重组连续敲除黑曲霉 (*Aspergillus niger*) SH-2 菌株中 α-葡萄糖苷酶基因 *agdB*、*agdA*、*agdE*、

agdG、*agdC*、*agdD* 和 *agdF*，构建一系列黑曲霉 α -葡萄糖苷酶基因多重敲除株（表 1）。以构建 α -葡萄糖苷酶基因 *agdB* 敲除株 ($\Delta agdB$) 为例，PCR 验证结果见图 2B。根据图 2A 所示敲除鉴定示意图设计引物，以敲除株为模板，PCR 扩增得到的片段 1 和片段 2 大小与理论上设计的片段大小一致，并且未扩增出片段 3 和片段 4，说明基因 *agdB* 已成功敲除。筛选能在含有 5-氟乳清酸和尿嘧啶核苷的 CD 平板上生长，而无法在普通 CD 平板上生长的敲除株 $\Delta agdB$ ，为 *pyrG* 缺陷株，重新循环利用筛选标记基因 *ANpyrG*。按照上述方法继再上一轮 *pyrG* 缺陷的敲除株如 $\Delta agdB$ 为宿主菌，连续敲除 *agdA*、*agdE* 和 *agdG* 获得一系列多重敲除株 $\Delta agdBA$ 、 $\Delta agdBAE$ 和 $\Delta agdBAEG$ (表 1)。并进一步以 *pyrG* 缺陷的敲除株如 $\Delta agdBAEG$ 为宿主菌，分别进行基因 *agdC*、*agdD* 和 *agdF* 的敲除，得到多重敲除株 $\Delta agdBAEGC$ 、 $\Delta agdBAEGD$ 和 $\Delta agdBAEGF$ (表 1)。

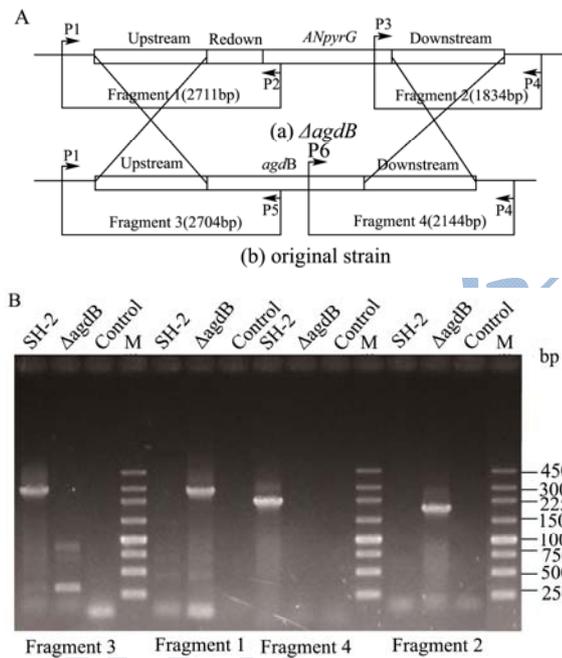


图 2 基因 *agdB* 敲除突变株 PCR 验证

Fig.2 PCR analysis of the *agdB* gene disruption mutant strain

2.2 系列 α -葡萄糖苷酶基因多重敲除株的 α -葡萄糖苷酶活性比较分析

系列 α -葡萄糖苷酶基因多重敲除株 $\Delta agdB$ 、 $\Delta agdBA$ 、 $\Delta agdBAE$ 、 $\Delta agdBAEG$ 、 $\Delta agdBAEGC$ 、 $\Delta agdBAEGD$ 和 $\Delta agdBAEGF$ 的 PCR 扩增验证如图 3A。按照 1.2.3 的方法，分别测定系列多重敲除株的 α -葡萄糖苷酶相对酶活 (图 3B)。结果显示，系列多重敲除株中仅 *agdB* 敲除株酶活相较于野生株 SH-2 (酶

活为 42 U/L) 降低 36%，敲除株 $\Delta agdBAE$ 酶活相较于 $\Delta agdBA$ 酶活降低 7%左右，其余 α -葡萄糖苷酶基因的多重敲除均对降低菌株 α -葡萄糖苷酶活性的影响较小。

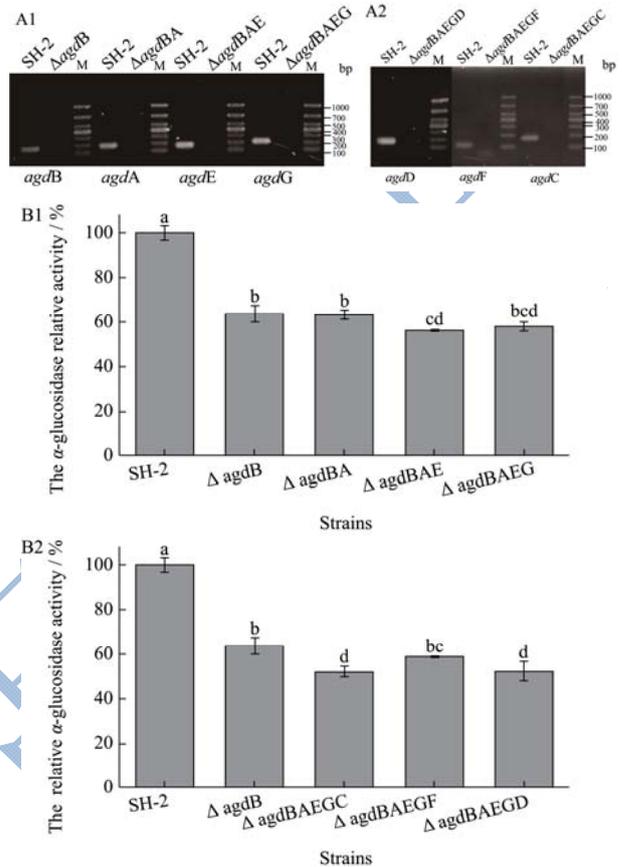


图 3 不同基因敲除突变株的 PCR 验证 (A) 及 α -葡萄糖苷酶相对酶活 (B)

Fig.3 PCR analysis and the relative α -glucosidase activity of different gene disruption mutants

注：柱形图上所标注的相同的 1 个或多个字母表示在 $\alpha=0.05$ 的显著性水平内没有差异 (Duncan 检验)。

2.3 敲除基因 *agdB* 及 *agdA* 对黑曲霉 SH-2 的 α -葡萄糖苷酶活性的影响

1997 年，Nakamura 等^[13]首次鉴定了黑曲霉 α -葡萄糖苷酶的基因序列，即 α -葡萄糖苷酶基因 *agdA* 的序列，此后基因 *agdA* 被公认为黑曲霉中主要的 α -葡萄糖苷酶基因^[14]，这与上述实验结果中仅 *agdB* 基因敲除株 α -葡萄糖苷酶活性降低不一致，而通过碱基序列比对发现黑曲霉 SH-2 中的基因 *agdA* 序列与黑曲霉 CBS513.88 的基因 *agdA* 序列在 2211 位点上有一个碱基的区别，而基因 *agdB* 序列则完全一致。因此，本研究在黑曲霉 SH-2 中分别敲除基因 *agdA* 和 *agdB*，通过比较基因 *agdA* 和 *agdB* 敲除株的 α -葡萄糖苷酶

活性以确定哪个基因的敲除对降低 α -葡萄糖苷酶活性影响较大。

由于糖化酶、淀粉酶和 α -葡萄糖苷酶都具有水解 α -糖苷键生成葡萄糖的作用，为避免糖化酶和淀粉酶的干扰，以敲除糖化酶和淀粉酶背景的黑曲霉 SH-2-3 为宿主，分别敲除基因 *agdA* 和 *agdB*。在避免糖化酶和淀粉酶背景干扰的情况下确定黑曲霉 SH-2 中基因 *agdA* 及 *agdB* 的敲除对 α -葡萄糖苷酶活性的影响。

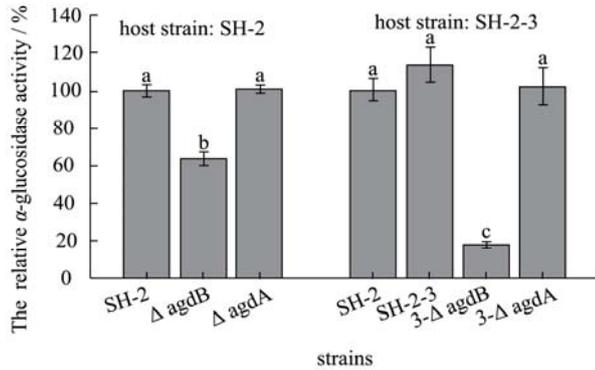


图4 不同 *agdB* 和 *agdA* 敲除株的 α -葡萄糖苷酶活性比较

Fig.4 Comparison of α -glucosidase activity in different *agdB* or *agdA* disruption mutants

注：柱形图上所标注的相同的1个或多个字母表示在 $\alpha=0.05$ 的显著性水平内没有差异（Duncan 检验）。

不同宿主菌 *agdB* 及 *agdA* 基因敲除后 α -葡萄糖苷酶相对酶活如图4所示，结果显示，背景敲除株 SH-2-3 结果与野生株研究结果一致，仅 *agdB* 敲除株 α -葡萄糖苷酶活性降低，而 *agdA* 敲除株 α -葡萄糖苷酶活性没有明显变化。表明基因 *agdB* 的敲除对菌株 α -葡萄糖苷酶活性有影响，而基因 *agdA* 的敲除则基本不影响菌株的 α -葡萄糖苷酶活性。

2.4 过量表达基因 *agdB* 及 *agdA* 对 α -葡萄糖苷酶活性的影响

以敲除糖化酶和淀粉酶等背景的黑曲霉突变株 SH-2-3 为宿主，糖化酶的启动子和终止子为表达元件，进行基因 *agdA* 及 *agdB* 的过量表达，构建的 *agdA* 及 *agdB* 过量表达株分别命名为 3-*agdA* 和 3-*agdB*，其 PCR 验证见图 5A 和图 5B 所示。淀粉发酵培养 6 d 后，3-*agdA* 和 3-*agdB* 的蛋白表达情况及 α -葡萄糖苷酶相对酶活如图 5C 和 5D 所示，发现 3-*agdB* 过量表达株的酶活提高到宿主菌 SH-2-3 的 8 倍以上，野生株 SH-2 的 10 倍，说明基因 *agdB* 的过量表达提高了黑曲霉 SH-2 的 α -葡萄糖苷酶活性，而基因 *agdA* 虽然表达构建过程与基因 *agdB* 完全一样，且其基因表达框已成功整合到宿主的基因组上，但基因 *agdA* 表达株

3-*agdA* 却未表现出 α -葡萄糖苷酶蛋白的表达，其蛋白表达情况及 α -葡萄糖苷酶活性与宿主菌 SH-2-3 差异不明显。

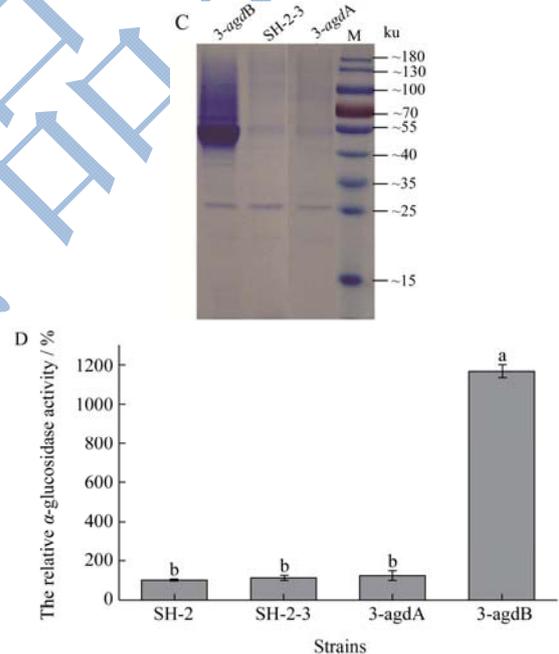
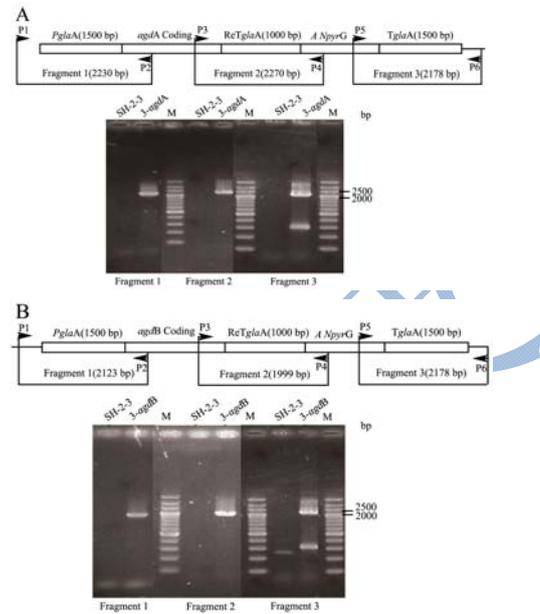


图5 *agdA* 及 *agdB* 过量表达株的 PCR 验证 (A 和 B)、SDS-PAGE 电泳图 (C) 及 α -葡萄糖苷酶相对酶活 (D)

Fig.5 PCR analysis, SDS-PAGE (C), and the relative α -glucosidase (D) activity of *agdA* (A) and *agdB* (B) overexpressing strains

注：柱形图上所标注的相同的1个或多个字母表示在 $\alpha=0.05$ 的显著性水平内没有差异（Duncan 检验）。

2.5 α -葡萄糖苷酶基因 *agdB* 敲除对黑曲霉生长的影响

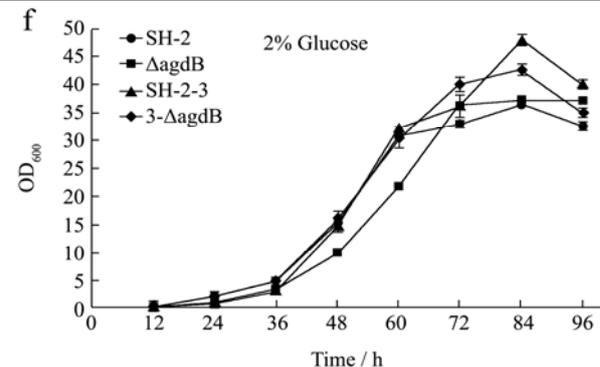
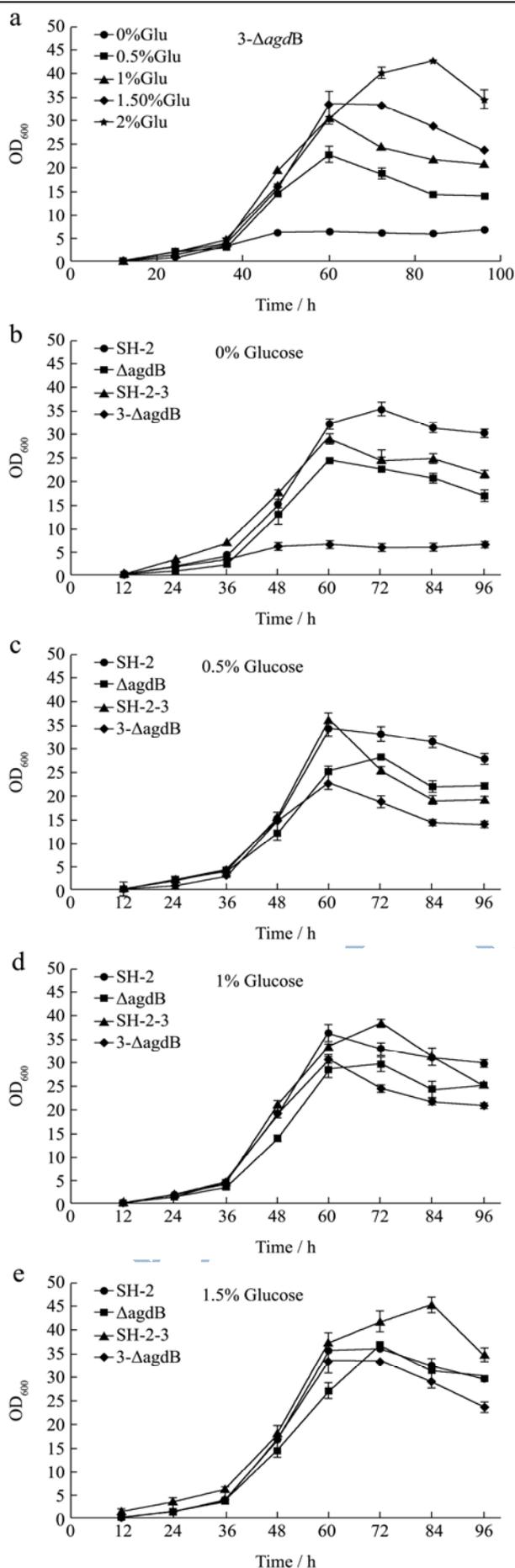


图6 敲除株3- $\Delta agdB$ 、SH-2-3、敲除株 $\Delta agdB$ 和SH-2在不同葡萄糖浓度条件下生长速度变化情况

Fig.6 Growth rates of strains 3- $\Delta agdB$, SH-2-3, $\Delta agdB$, and SH-2 with different glucose concentrations

α -葡萄糖苷酶主要作用是水解葡萄糖苷键释放出葡萄糖，是为生物生长过程提供能量的重要酶类。以敲除糖化酶和淀粉酶等背景的黑曲霉突变株 SH-2-3 为宿主构建的 $agdB$ 敲除株 (3- $\Delta agdB$) 在无葡萄糖以及 0.5%~2% 的一系列葡萄糖浓度的培养条件下测定其生长速度 (图 6a)，结果显示在只有淀粉为碳源的情况下生长极为缓慢，随着葡萄糖浓度从 0.5% 升高到 2%，其生长速度得到改善，并达到接近对照菌 SH-2-3 的生长速度 (图 6c-f)。同样以野生型为宿主构建的 $\Delta agdB$ 敲除株的生长也同样受葡萄糖浓度的影响，随着一系列葡萄糖浓度升高，其菌体生长速度接近对照野生株 SH-2 的生长速度 (图 6)。研究结果显示黑曲霉 SH-2 中 $agdB$ 基因的缺失，直接影响黑曲霉 SH-2 菌株分解葡萄糖苷键释放出葡萄糖，在无外源添加葡萄糖的培养条件下菌株生长受到严重影响，外源添加葡萄糖能改善甚至完全恢复菌株的生长速度，这也进一步验证 $agdB$ 基因是黑曲霉 SH-2 的 7 个 α -葡萄糖苷酶基因中最重要的 α -葡萄糖苷酶功能基因。

3 结论

3.1 据调查研究发现黑曲霉 SH-2 中与 α -葡萄糖苷酶相关的基因分别为糖苷水解酶 (GH) 31 家族的 $agdA$ 、 $agdB$ 、 $agdE$ 、 $agdF$ 和 $agdG$ ，以及糖苷水解酶 (GH) 13 家族的 $agdC$ 和 $agdD$ 。 α -葡萄糖苷酶基因 $agdB$ 的敲除降低了黑曲霉 SH-2 的 α -葡萄糖苷酶活性，而其他 α -葡萄糖苷酶基因的敲除对黑曲霉 SH-2 的 α -葡萄糖苷酶活性影响较小；基因 $agdB$ 过量表达株 3- $agdB$ 的 α -葡萄糖苷酶活性提高到野生株 SH-2 的 10 倍；基因 $agdB$ 的敲除影响了菌株 3- $\Delta agdB$ 在淀粉培养基中的生长速度。而被公认为黑曲霉主要的 α -葡萄糖苷酶基因 $agdA$ 的敲除株与过量表达株的 α -葡萄糖苷酶活性均没有明显变化。本研究结果显示黑曲霉 SH-2 基

因组中研究发现的 7 个 α -葡萄糖苷酶基因中仅 *agdB* 为主要高活性 α -葡萄糖苷酶基因 (占总体酶活 36%), 而黑曲霉 SH-2 中被公认为黑曲霉主要的 α -葡萄糖苷酶基因 *agdA* 反而对于黑曲霉 SH-2 的 α -葡萄糖苷酶活性影响不大。

3.2 基于基因 *agdB*、*agdA*、*agdE*、*agdG* 和 *agdF* (或 *agdC/D*) 敲除后仍存在酶活, 说明仍需进一步探索黑曲霉 SH-2 中的 α -葡萄糖苷酶基因。后续实验希望能够找出其他影响黑曲霉 SH-2 的 α -葡萄糖苷酶活性的基因, 通过将其敲除, 从而构建一株低 α -葡萄糖苷酶背景的高产糖化酶的黑曲霉工业生产菌株, 进一步扩大该黑曲霉及其发酵生产的糖化酶的应用, 简化生产工艺, 提高工业成本。

参考文献

- [1] Xu Y, Liao C H, Yao L L, et al. GlnR and PhoP directly regulate the transcription of genes encoding starch-degrading, amylolytic enzymes in *Saccharopolyspora erythraea* [J]. Appl. Environ. Microbiol., 2016
- [2] Liu X, Wu D, Wu J, et al. Optimization of the production of *Aspergillus niger* alpha-glucosidase expressed in *Pichia pastoris* [J]. World J. Microbiol, Biotechnol., 2013, 29(3): 533-540
- [3] Shimba N, Shinagawa M, Hoshino W, et al. Monitoring the hydrolysis and transglycosylation activity of alpha-glucosidase from *Aspergillus niger* by nuclear magnetic resonance spectroscopy and mass spectrometry [J]. Anal. Biochem., 2009, 393(1): 23-28
- [4] 林亲录,符琼,周丽君.低聚异麦芽糖制备的研究进展[J].食品工业科技,2011,32(2):398-400
LIN Qin-lu, FU Qiong, ZHOU Li-jun. Research progress in the isomaltooligosaccharides production [J]. Science and Technology of Food Industry, 2011, 32(2): 398-400
- [5] Minetoki T, Gomi K, Kitamoto K, et al. Nucleotide sequence and expression of alpha-glucosidase-encoding gene (*agdA*) from *Aspergillus oryzae* [J]. Biosci. Biotechnol. Biochem., 1995, 59(8): 1516-1521
- [6] 于岚,张云开,苏艳,等.黑曲霉 α -葡萄糖苷酶 cDNA 的克隆及表达[J].生物技术,2006,16(2):5-8
YU Lan, ZHANG Yun-kai, SU Yan, et al. Cloning and expression of an α -glucosidase cDNA from *Aspergillus niger* in *E.coli* [J]. Biotechnology, 2006, 16(2): 5-8
- [7] 周敏,王正祥.黑曲霉 CICIM F0410 中 α -葡萄糖苷酶的酶学性质研究[J].生物技术通报,2009,1:130-133
ZHOU Min, WANG Zheng-xiang. Studies on enzymatic properties of alpha-glucosidase in *Aspergillus niger* CICIM F0410 [J]. Biotechnology Bulletin, 2009, 1: 130-133
- [8] Yuan X L, van der Kaaij R M, van den Hondel C A, et al. *Aspergillus niger* genome-wide analysis reveals a large number of novel alpha-glucan acting enzymes with unexpected expression profiles [J]. Mol. Genet Genomics, 2008, 279(6): 545-561
- [9] Yin C, Wang B, He P, et al. Genomic analysis of the aconidial and high-performance protein producer, industrially relevant *Aspergillus niger* SH2 strain [J]. Gene, 2014, 541(2): 107-114
- [10] 吕洋,康清浦,贾新成.糖化酶中葡萄糖苷转移酶去除方法[J].河南科学,2005,23(2):207-208
LV Yang, KANG Qing-pu, JIA Xin-cheng. The method of removing glucosyltransferase from glucoamylase [J]. Henan Science, 2005, 23(2): 207-208
- [11] 张晓立,郑小梅,满云,等.黑曲霉柠檬酸工业菌株原生质体制备与转化[J].生物技术通报,2015,31(3):171-177
ZHANG Xiao-li, ZHENG Xiao-mei, MAN Yun, et al. Preparation of protoplast for efficient DNA transformation of citric acid hyper-producing *Aspergillus niger* industrial strain [J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(3): 171-177
- [12] 吴琦,王红宁,刘世贵.三种黑曲霉细胞基因组 DNA 提取方法的比较[J].生物技术,2003,13(6):30-31
WU Qi, WANG Hong-ning, LIU Shi-gui. Comparison of three methods of genomic DNA extraction from *Aspergillus niger* [J]. Biotechnology, 2003, 13(6): 30-31
- [13] Nakamura A, Nishimura I, Yokoyama A, et al. Cloning and sequencing of an alpha-glucosidase gene from *Aspergillus niger* and its expression in *A. nidulans* [J]. J. Biotechnol., 1997, 53(1): 75-84
- [14] Wang L, Cao Z, Hou L, et al. The opposite roles of *agdA* and *glaA* on citric acid production in *Aspergillus niger* [J]. Appl. Microbiol. Biotechnol., 2016, 100(13): 5791-5803