

米曲霉谷氨酰胺酶在黑曲霉中的重组表达与酶学特性

陈颖, 王斌, 潘力*

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

摘要: 该研究将米曲霉 RIB40 (*Aspergillus oryzae* RIB40) 来源的谷氨酰胺酶 (GahB) 在黑曲霉 (*Aspergillus niger*) 宿主中分泌表达。基于该研究所建立表型鉴定板与孔板培养的通量鉴定筛选方法成功得到重组表达谷氨酰胺酶的转化子 H-GahB, 最高酶活力达到 1.35 U/mL。为了增加目的基因在宿主中的拷贝数, 采用 CRISPR/Cas9 基因组编辑技术重新构建高拷贝的谷氨酰胺酶表达菌株 C-GahB, 其酶活力提高到 3.56 U/mL, 约为 H-GahB 的 2.64 倍。进一步采用 ARTP 诱变技术对 C-GahB 进行传统诱变育种, 获得了谷氨酰胺酶工程菌株 A-GahB, 其酶活力提升到 4.16 U/mL, 比出发菌株 C-GahB 的酶活力提高了 0.17 倍。纯化后的重组 GahB 的比酶活达到 40.63 U/mg, 最适温度为 37 °C, 最适 pH 值为 7.0, 其在 20~40 °C 及 pH 值 5.5~8.0 之间稳定性较好。K⁺对 GahB 的酶活力具有激活作用, Zn²⁺和 Mn²⁺则对 GahB 的酶活力有较为强烈的抑制作用。当盐质量分数为 18%时, GahB 表现出 35.38%的相对酶活力。该研究第一次在黑曲霉中实现了来源于米曲霉 RIB40 的谷氨酰胺酶 GahB 的重组分泌表达, 为此后对米曲霉谷氨酰胺酶的研究提供了基础。

关键词: 谷氨酰胺酶; 曲霉; 重组表达; CRISPR/Cas9

文章编号: 1673-9078(2022)09-126-134

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2022.9.0652

Recombinant Expression of Glutaminase from *Aspergillus oryzae* in *Aspergillus niger* and Its Enzymatic Properties

CHEN Ying, WANG Bin, PAN Li*

(School of Biology and Biological Engineering, Guangdong Provincial Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In this study, glutaminase (Gahb) from *Aspergillus oryzae* RIB40 was recombinantly expressed in *Aspergillus niger*. Based on the high-throughput screening method (phenotypic identification plate and pore plate culture) established in this study, the transformant of the recombinant glutaminase H-GahB was successfully obtained, and its highest enzyme activity was 1.35 U/mL. In order to increase the copy number of the target gene in the host, was reconstructed a high-copy glutaminase expressing strain C-GahB using the CRISPR/cas9 genome editing technology, and its enzyme activity increased to 3.56 U/mL (about 2.64 times that of H-GahB). Furthermore, C-GahB was subjected to traditional mutagenesis and breeding using ARTP mutagenesis technology, and an engineering strain of glutaminase, A-GahB, was obtained, with its enzyme activity upto 4.16 U/mL (0.17 times higher than that of the starting strain C-GahB). The specific enzyme activity of the purified recombinant GahB reached 40.63 U/mg, with the optimum temperature being 37 °C and the optimum pH being 7.0. The purified enzyme showed good stability from 20 °C to 40 °C and from pH 5.5 to 8.0. K⁺ could activate the enzyme activity of GahB, while Zn²⁺ and Mn²⁺ could strongly inhibit the enzyme activity of GahB. When the salt concentration was 18%, GahB showed a relative enzyme activity of 35.38%. In this study, glutaminase GahB from *A. oryzae* RIB40 was recombinantly expressed in *A. niger* for the first time, which provides a basis for subsequent investigations on the glutaminase from *A. oryzae*.

Key words: glutaminase; *Aspergillus*; recombinant expression; CRISPR/Cas9

引文格式:

陈颖,王斌,潘力.米曲霉谷氨酰胺酶在黑曲霉中的重组表达与酶学特性[J].现代食品科技,2022,38(9):126-134

CHEN Ying, WANG Bin, PAN Li. Recombinant expression of glutaminase from *Aspergillus oryzae* in *Aspergillus niger* and its enzymatic properties [J]. Modern Food Science and Technology, 2022, 38(9): 126-134

收稿日期: 2021-06-21

基金项目: 佛山市核心技术公关项目 (1920001000824)

作者简介: 陈颖 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 蛋白表达与纯化, E-mail: 2449132902@qq.com

通讯作者: 潘力 (1967-), 男, 博士, 教授, 研究方向: 发酵工程与酶工程, E-mail: btlip@scut.edu.cn

谷氨酰胺酶(L-谷氨酰胺水解酶, EC 3.5.1.2)可以催化谷氨酰胺脱氨生成谷氨酸,属于丝氨酸依赖性 β -内酰胺酶和青霉素结合蛋白的超家族^[1]。谷氨酰胺酶广泛分布在细菌^[2]、放线菌^[3]、真菌^[4]以及动物^[5]中。由于L-谷氨酰胺酶可以水解谷氨酰胺增加风味氨基酸谷氨酸的含量,L-谷氨酰胺酶已被广泛用于增强发酵食品的风味^[6]。Wakayama等^[7]将来自嗜麦芽窄食单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)的耐盐谷氨酰胺酶添加到酱油发酵模拟体系中,证明了该谷氨酰胺酶可用于酱油发酵过程以提升风味。真菌是L-谷氨酰胺酶的重要来源^[6]。真菌谷氨酰胺酶主要由曲霉属、木霉属及酵母生产^[8-10],部分真菌谷氨酰胺酶也已通过了生物安全性评估^[11,12],但有关真菌来源的谷氨酰胺酶表达与性能的报道仍然很少^[13]。

黑曲霉(*Aspergillus niger*)属于丝状真菌,具有强大的蛋白分泌表达能力以及成熟的蛋白翻译后修饰系统,并被认为是GRAS(Generally Regarded as Safe)安全菌株,在工业上已被应用于食品级酶制剂的生产宿主^[14-16]。并且近年来,黑曲霉的基因组编辑技术已成功建立^[17-21],促进了在黑曲霉中利用基因编辑技术进行遗传操作。其次,将工程菌表达与传统育种方法如常压室温等离子体诱变技术(ARTP诱变技术)结合,可进一步提高工程菌的蛋白产量^[22-24]。

米曲霉RIB40是应用于传统酿造的模式菌株,对米曲霉谷氨酰胺酶基因 $gahB$ 的重组表达,有助于进一步研究其酶学性质,并为将 $gahB$ 应用于酱油酿造及增加酱油的风味物质成分奠定基础。本研究以低蛋白背景的无孢黑曲霉HL-1为宿主,表达米曲霉RIB40(*Aspergillus oryzae*RIB40)来源的谷氨酰胺酶基因 $gahB$,建立了谷氨酰胺酶重组表达菌株通量鉴定筛选方法,利用CRISPR/Cas9基因编辑技术及ARTP诱变技术进一步提高谷氨酰胺酶的表达量并研究了重组酶 $gahB$ 的酶学性质。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌(*E. coli*) Match1T1感受态购自美国Invitrogen公司;米曲霉RIB40(*Aspergillus oryzae*RIB40, *A. oryzae*RIB40)菌株由本实验室保藏;黑曲霉(*Aspergillus niger*, *A. niger*)菌株HL-1($\Delta kusA$ 、 $\Delta pyrG$ 、 $\Delta glaA$ 、 ΔTEG 、 $\Delta aamaA$)、通用质粒UEV、质粒pFC332-amyA由本实验室构建与保藏。

1.1.2 工具酶、试剂盒和试剂

快速限制性内切酶 *Apa* I、*EcoRV*、DreamTaq Green PCR Master Mix, 美国 ThermoFisher Scientific 公司; PCR 反应预混酶 Prime STAR HS (premix), 日本 TaKaRa 公司; HiFi DNA Assembly Cloning Kit, 美国 NEB 公司; 谷氨酸(Glu)含量检测试剂盒, 北京索莱宝科技有限公司; 质粒少量提取试剂盒、质粒大量提取试剂盒, 广州捷倍斯生物科技有限公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯试剂。

1.1.3 培养基

LB 培养基(质量分数): 1%胰蛋白胨、1%氯化钠、0.5%酵母提取物(固体含2%琼脂,液体含0.05%琼脂); CD 培养基(质量分数): 2%葡萄糖、0.3% NaNO₃、0.2% KCl、0.05% MgSO₄·7H₂O、0.1% KH₂PO₄、0.001% FeSO₄·7H₂O, pH 值 5.5(固体含2%琼脂,液体含0.05%琼脂); 表型鉴定培养基(质量分数): 2%葡萄糖、1%谷氨酰胺、0.3% NaNO₃、0.2% KCl、0.1% KH₂PO₄、0.05% MgSO₄·7H₂O、0.0015%酚红、0.001% FeSO₄·7H₂O、2%琼脂, pH 值 5.5; 蔗糖高渗培养基(质量分数): 40%蔗糖、0.3% NaNO₃、0.2% KCl、0.05% MgSO₄·7H₂O、0.1% KH₂PO₄、0.001% FeSO₄·7H₂O, pH 值 5.5; 发酵培养基(质量分数): 5%玉米淀粉(需沸水浴加淀粉酶液化)、3%玉米浆、2%豆粕粉。

1.1.4 引物

实验中所使用的引物如表1所示。

1.2 仪器

Veriti 96-Well Thermal Cycler PCR 仪, 美国 Applied Biosystems 公司; 浸入式水平电泳系统, 美国 Bio-Rad 公司; M200 多功能酶标仪, 德国 TECAN 公司; 蛋白质纯化系统 AKTA purifier 与 His TrapTM HP 层析柱, 美国 GE Healthcare(通用电气)公司; ARTP-M 诱变育种仪, 无锡源清天木生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 谷氨酰胺酶重组表达载体的构建

在基因表达框前加上黑曲霉糖化酶基因 *glaA* 的信号肽,并在 N 端加上 6×His-Tag 标签序列。以引物对 PnaII-F 和 PnaII-R 扩增得到杂合启动子片段;以 *A. oryzae* RIB40 基因组为模板,引物对 $gahB$ -F 和 $gahB$ -R 扩增得到基因 $gahB$ 。利用 *EcoRV* 将通用质粒 UEV 进行线性化。利用 NEBuilder HiFi DNA 连接酶对线性化质粒 UEV、杂合启动子 PnaII 片段和米曲霉谷氨酰胺酶基因

用谷氨酸含量检测试剂盒检测其谷氨酸的含量。对照组为将实验组中三氯乙酸溶液与谷氨酰胺溶液加入顺序调换,其余不变。谷氨酰胺酶的酶活定义为:在 37 °C, pH 值为 7.0 的条件下,每分钟催化 L-谷氨酰胺生成 1 μmol/L L-谷氨酸所需的酶量为一个酶活力单位,以 U/mL 表示。

1.3.7 重组谷氨酰胺酶纯化

在构建谷氨酰胺酶基因重组表达载体时,将 6×His-tag 的组氨酸标签序列加在了目的基因表达框的 C 端。根据组氨酸标签的对镍离子的特异亲和性,使用镍柱亲和层析的方法对谷氨酰胺酶进行纯化。将谷氨酰胺酶重组表达菌株接入发酵培养基培养 4 d 取发酵上清液,过滤后使用 HisTrap™ HP 层析柱进行纯化。上样体积为 15 mL,上样流量为 1 mL/min。采用梯度洗脱法(洗脱液咪唑浓度为 0~0.5 mol/L)收集洗脱峰纯化液,记录各个纯化液样品的体积,并进行后续的 SDS-PAGE 蛋白电泳检测、蛋白含量测定以及酶学性质研究。

1.3.8 谷氨酰胺酶酶学性质研究

1.3.8.1 温度对纯化 *gahB* 酶活力的影响

最适温度的测定:在 pH 值为 7.0 的条件下,将纯化得到的蛋白酶液分别在 20、30、37、40、50、60、70、80 °C 条件下反应 30 min,测定不同温度条件下谷氨酰胺酶酶活力的变化,以最适温度下得到的酶活力为 100%。温度稳定性的测定:将纯化酶液在上述温度下保温处理 2 h,测定剩余的酶活力,以未经处理组的酶活力为 100%。

1.3.8.2 pH 对纯化 *gahB* 酶活力的影响

最适 pH 的测定:配制不同 pH 值(4.0、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0) 0.1 mol/L 的磷酸盐缓冲液,在最适温度下,测定不同 pH 值条件的谷氨酰胺酶酶活力的变化,以最适 pH 值条件下测定的酶活力为 100%。pH 稳定性的测定:将纯化酶液在上述 pH 的缓冲液中保温处理 2 h,测定酶液剩余的酶活力,以未经处理组的酶活力为 100%。

1.3.8.3 金属离子对纯化 *gahB* 酶活力的影响

金属离子稳定性的测定:在标准的酶反应体系下,加入不同的金属离子(Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 、 K^{+} 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^{+} 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+}),在反应体系中每种离子的终浓度为 5.0 mmol/L,测定酶活力,以未经处理组的酶活力为 100%。

1.3.8.4 盐浓度对纯化 *gahB* 酶活力的影响

耐盐性的测定:在标准的酶反应体系下,加入不同质量的 NaCl 使得反应体系中 NaCl 的终浓度为 0%、5%、10%、15%、18%,测定酶活力,以未经处理组

的酶活力为 100%。

1.3.9 数据统计及图表绘制

每组实验数据为三个平行重复,取平均值,采用标准差的方式进行误差分析;使用软件 Origin 绘制数据图。

2 结果与讨论

2.1 谷氨酰胺酶重组表达菌株的构建与通量

鉴定筛选方法的建立

为构建谷氨酰胺酶重组表达载体,以相应的引物对扩增得到杂合启动子片段及基因 *gahB* 片段(图 1a)。利用连接酶对线性化质粒 UEV、杂合启动子片段和基因 *gahB* 片段进行连接(图 1b),并转化进大肠杆菌中。经测序最终得到序列正确的谷氨酰胺酶重组表达载体 UEV-*gahB*。

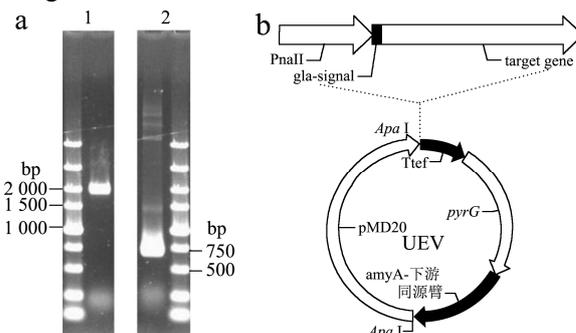


图 1 谷氨酰胺酶重组表达载体的构建

Fig.1 Construction of recombinant vector UEV-*gahB*

注: a: 谷氨酰胺酶基因片段及杂合启动子 PnaII 片段电泳图(泳道 1 为 *gahB* 基因片段;泳道 2 为杂合启动子 PnaII 片段); b: 谷氨酰胺酶重组表达载体构建图谱。

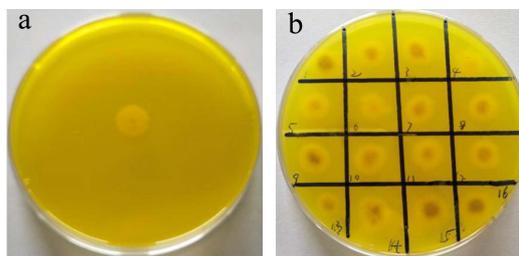


图 2 谷氨酰胺酶基因重组表达的转化子的表型板鉴定

Fig.2 The screening plate identification of transformants for glutaminase gene recombinant expression

注: a: 宿主黑曲霉 *A. niger* HL-1; b: 转化株 H-*gahB*。

为获得谷氨酰胺酶重组表达菌株,将表达载体 UEV-*gahB* 转化至无孢黑曲霉 *A. niger* HL-1 中。将 PCR 鉴定成功的转化子挑取至表型鉴定板并进行孔板发酵(图 2)。图 2a 为宿主 *A. niger* HL-1, 其由于其没有分泌谷氨酰胺酶而没有在培养基上形成变色圈;图 2b

为转化株 H-gahB, 从图中可以看出部分转化子形成了较为明显的变色圈, 部分转化子形成了较小的变色圈。挑取变红的转化子进行孔板发酵, 根据孔板发酵酶活成功筛选得到酶活最高的谷氨酰胺酶重组表达菌株 H-gahB-20, 酶活力达到 1.34 U/mL。

将孔板发酵筛选得到的酶活力最高的转化株 H-gahB-20 转接到液体 CD 培养基中进行扩大培养, 30 °C 静置培养 5~6 d 后接入盛有 100 mL 发酵培养基的 500 mL 摇瓶中进行发酵, 发酵条件为 5% (V/V) 接种量, 250 r/min, 30 °C。共培养 7 d, 每 24 h 取一次样, 用于谷氨酰胺酶酶活力测定与蛋白电泳分析。

谷氨酰胺酶基因重组表达株 H-gahB-20 发酵 24 h 到 168 h 的酶活力测定结果如图 3a 所示。由图可知, H-gahB 从 24 h 时酶活力开始上升, 至第 96 h 时酶活力达到最大值, 最高酶活力为 1.35 U/mL, 随后酶活力开始下降。表达株 H-gahB-20 发酵 24 h 到 168 h 的蛋白电泳分析如图 3b 所示。泳道 C 为宿主发酵第 96 h 上清蛋白条带, 与宿主对照可知 H-gahB-20 表达的蛋白位于红框内所在位置, 大小与目的蛋白预测大小 72.93 ku 一致, 96 h 的目的蛋白条带最为明显这与酶活力测定结果一致。

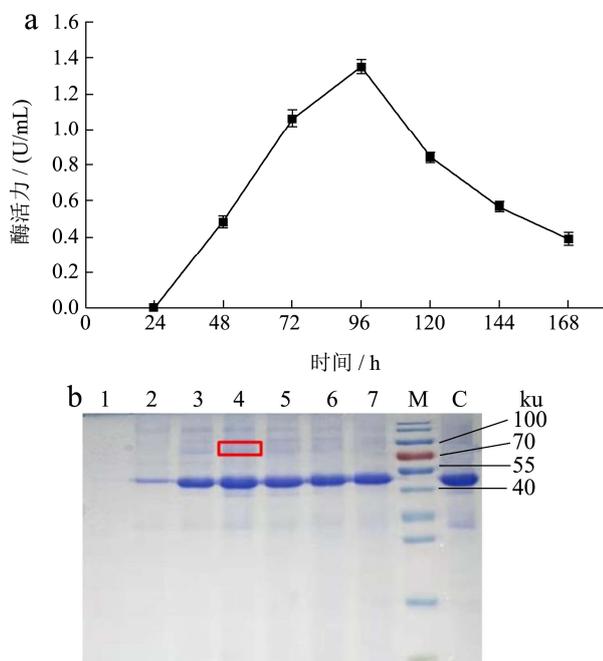


图 3 H-gahB-20 不同发酵时间的酶活力测定和 SDS-PAGE 分析
Fig.3 Enzyme activity and SDS-PAGE analysis of H-gahB-20 at different fermentation times

注: a: H-gahB-20 发酵第 24~168 h 酶活力测定曲线; b: H-gahB-20 发酵第 24~168 h (泳道 1~7) 上清蛋白条带, 泳道 C 为宿主发酵第 96 h 上清蛋白条带, M 为#26616 蛋白 Marker, 红框内为目的蛋白所在位置。

2.2 利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术优化谷氨酰胺酶的重组表达

CRISPR/Cas9 作为基因编辑技术, 可将目的基因表达框定点整合到基因组的靶基因位置来提高目的基因的拷贝数, 从而可能提高基因的表达量。因此选择利用 CRISPR/Cas9 基因编辑技术来进一步提高谷氨酰胺酶表达量。将质粒 UEV-gahB 与质粒 pFC332-amyA 共同转化至作为宿主的 *A. niger* HL-1 中, 将目的片段整合到基因组中具有双拷贝的基因 *amyA* 上。转化结果显示利用 CRISPR/Cas9 技术的重组表达基因 *gahB* 转化株在转化板上成功长出。而后利用先前建立的通量鉴定筛选方法进行转化子的筛选, 先挑取转化株 C-gahB 至表型鉴定培养基上进行表型鉴定, 之后将表型板上变红的转化子进行孔板发酵筛选。酶活测定结果显示, 筛选酶活力最高的一株为 C-gahB-17, 其酶活力为 3.11 U/mL, 为孔板发酵的 H-gahB-20 的酶活力的 2.32 倍。结果表明利用 CRISPR/Cas9 技术构建的米曲霉谷氨酰胺酶基因 *gahB* 表达株具有较高的重组表达水平。

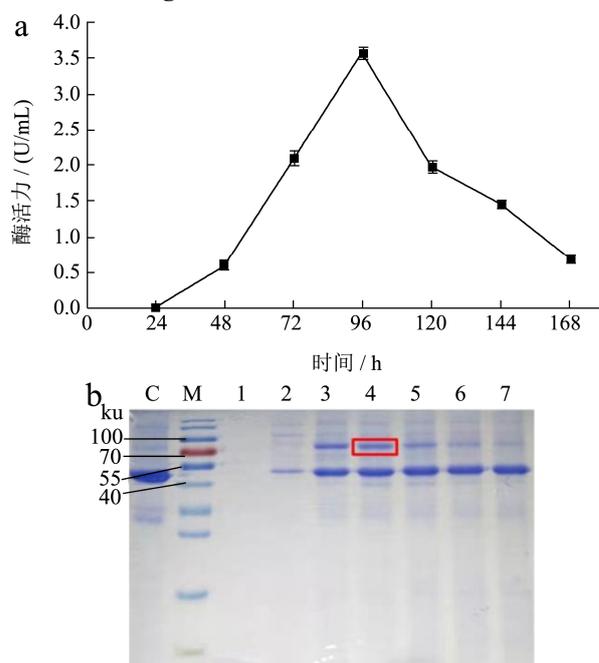


图 4 利用 CRISPR/Cas9 的转化子 (C-gahB-17) 不同发酵时间的酶活力测定和 SDS-PAGE 分析

Fig.4 Enzyme activity and SDS-PAGE analysis of CRISPR/Cas9-transformant (C-gahB-17) at different fermentation times

注: a: C-gahB-17 发酵第 24~168 h 酶活力测定曲线; b: C-gahB-17 发酵第 24~168 h (泳道 1~7) 上清蛋白条带, 泳道 C 为宿主发酵第 96 h 上清蛋白条带, M 为#26616 蛋白 Marker, 红框内为目的蛋白所在位置。

将孔板发酵筛选得到的酶活力最高的转化株 C-gahB-17 进行摇瓶发酵, 用于谷氨酰胺酶酶活力测定与蛋白电泳分析 (图 4)。谷氨酰胺酶基因重组表达株 C-gahB-17 发酵 24 h 到 168 h 的酶活力测定结果如图 4a 所示。由图可知, C-gahB-17 从第 24 h 时酶活力开始上升, 且从第 48 h 开始急剧上升, 第 96 h 时酶活力达到最大值, 最高酶活力为 3.56 U/mL, 随后酶活力开始下降。表达株 C-gahB-17 发酵 24 h 到 168 h 的蛋白电泳分析如图 4b 所示。泳道 C 为宿主发酵第 96 h 上清蛋白条带, 与宿主对照可知 C-gahB-17 表达的蛋白位于红框内所在位置, 目的蛋白从第 72 h 开始有可目测的条带, 第 72 h 和第 96 h 条带最为明显, 第 120 h 开始条带又逐渐变淡, 这与酶活力测定结果一致。图 3 与图 4 相比, 可以明显看出利用 CRISPR/Cas9 技术进行的黑曲霉转化得到的转化株 C-gahB 比普通方法转化得到的转化株 H-gahB 具有更高的酶活力, 且 SDS-PAGE 蛋白电泳中目的蛋白条带也更为明显。

2.3 谷氨酰胺酶重组表达菌株的 ARTP 诱变筛选

由于 ARTP 诱变技术在最佳诱变条件下可以获得一定的正突变, 因此选取此前获得的谷氨酰胺酶酶活力最高的转化子 C-gahB-17 进行 ARTP 诱变, 以期获得具有更高谷氨酰胺酶活力的菌株。使用 ARTP-M 诱变育种仪进行诱变时处理样品时间分别设为 0、30、60、90、120、150、180、210、240 和 270 s。待平板上长出单菌落时计算单菌落数, 制作致死率曲线 (图 5)。随着诱变时间的增加, 黑曲霉致死率升高, 在 0~60 s 之间致死率上升较快, 60 s 时的致死率超过了 50%; 当诱变时间为 150~180 s 时, 致死率达到 90%~95% 之间, 当诱变时间为 270 s 时, 致死率接近 100%。由于当致死率在 90%~95% 之间时可能有最多的正突变, 因此确定 150 s 为最终诱变时间。诱变处理后稀释梯度涂布平板。最终, 挑取变红最快或最明显的单菌落至孔板进行发酵。酶活力测定结果显示, 突变株 A-gahB 具有谷氨酰胺酶活力, 不同突变株之间酶活力有一定差别, 其中酶活力最高的一株为 A-gahB-7, 其酶活力为 4.16 U/mL, 比出发菌株 C-gahB-17 的酶活力提高了 0.17 倍。结果表明, 利用 ARTP 诱变技术可以获得具有更高酶活力的米曲霉谷氨酰胺酶 gahB 重组表达菌株。

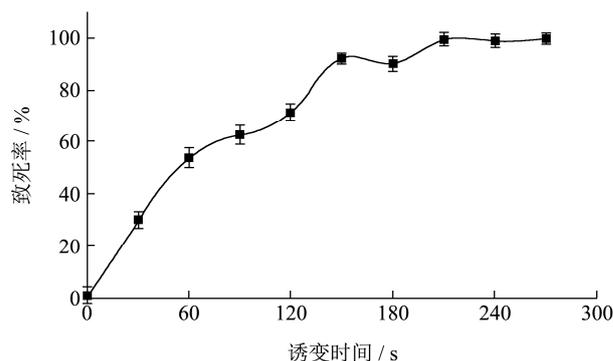


图 5 ARTP 诱变育种的致死率曲线

Fig.5 The lethality rate curve of ARTP

2.4 重组表达谷氨酰胺酶的纯化

根据组氨酸标签的对镍离子的特异亲和性使用镍柱亲和层析的方法对谷氨酰胺酶 gahB 进行纯化。将转化株 H-gahB-20 以及转化株 C-gahB-17 进行发酵, 并进行镍柱亲和层析柱纯化谷氨酰胺酶 gahB (表 2)。经过镍柱亲和层析纯化的谷氨酰胺酶 gahB 的比酶活达到了 40.63 U/mg。回收率为 31.98%。转化株 H-gahB-20 与转化株 C-gahB-17 发酵第 96 h 纯化前后的 SDS-PAGE 蛋白电泳结果见图 6。从图中可以看出, 转化株 H-gahB-20 纯化后的目的条带十分淡。而转化株 C-gahB-17 纯化前后的 SDS-PAGE 蛋白电泳目的蛋白条带均十分明显。通过对比纯化前后的蛋白条带, 可以确定通过镍柱亲和层析纯化得到了单一的目的蛋白重组 gahB。

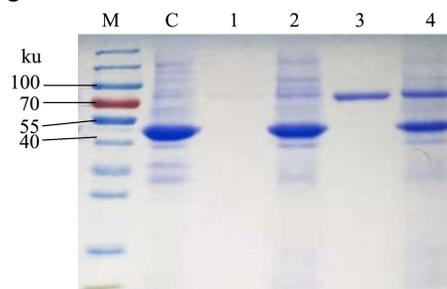


图 6 谷氨酰胺酶 gahB 的纯化

Fig.6 The purification of glutaminase gahB

注: C: 宿主发酵 96 h 上清液; 1: 转化株 H-gahB-20 发酵 96 h 上清液的纯化样品; 2: 转化株 H-gahB-20 发酵 96 h 上清液; 3: 转化株 C-gahB-17 发酵 96 h 上清液的纯化样品; 4: 转化株 C-gahB-17 发酵 96 h 上清液; M: 蛋白 Marker。

表 2 谷氨酰胺酶 gahB 发酵上清液的纯化

Table 2 Purification of gahB from culture supernatant

纯化步骤	总酶活力/U	总蛋白质量/mg	比酶活/(U/mg)	回收率/%	纯化倍数
粗酶液	71.13±0.75	187.09±0.26	0.38	100	1
镍柱亲和层析	22.75±0.60	0.56±0.08	40.63	31.98	106.92

2.5 重组谷氨酰胺酶的酶学性质研究

2.5.1 温度对 gahB 酶活力的影响

随着温度的升高, 重组 gahB 的酶活力先升高, 直至最适温度 37 °C 时达到最高, 随后重组 gahB 的酶活力便随着温度的升高而下降(图 7a)。重组 gahB 在 20 °C 至 60 °C 区间内相对酶活力在 60% 以上, 而在 70 °C 时相对酶活迅速下降至 30% 以下。说明重组 gahB 对高温敏感。随后将纯化谷氨酰胺酶 gahB 在上述温度下保温处理 2 h 后测定剩余酶活力, 得到重组 gahB 的温度稳定性曲线(图 7b)。由图可以看出重组 gahB 在 20 °C 至 40 °C 的温度区间内稳定性较好, 保存 2 h 后可以保持 80% 以上的相对酶活。而当温度升至 50 °C 时相对酶活迅速下降至 0, 说明重组 gahB 对高温十分敏感。

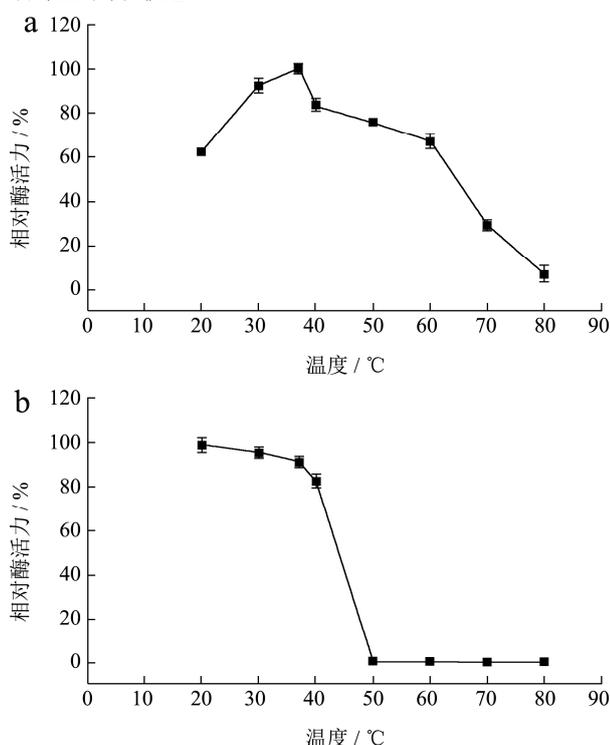


图 7 温度对 gahB 酶活力的影响

Fig.7 Effects of temperature on the activity of gahB

注: a: 最适温度的测定; b: 温度稳定性的测定。

2.5.2 pH 对 gahB 酶活力的影响

随着 pH 的升高, 重组 gahB 的酶活力先升高, 直至最适 pH 值 7.0 时达到最高, 随后重组 gahB 的酶活力便随着 pH 的升高而下降(图 8)。重组 gahB 在 pH 值 5.0 至 pH 值 9.0 区间内相对酶活力在 60% 以上, 说明重组谷氨酰胺酶 gahB 为中性酶, 在中性条件下酶活力表现最好。由图可以看出重组 gahB 在 pH 值 5.5~8.0 之间稳定性较好, 保存 2 h 后可以保持 70% 以

上的相对酶活力。在 pH 值 4.0~9.0 之间可以保持 50% 以上的相对酶活力, 说明重组 gahB 的 pH 稳定性较好。

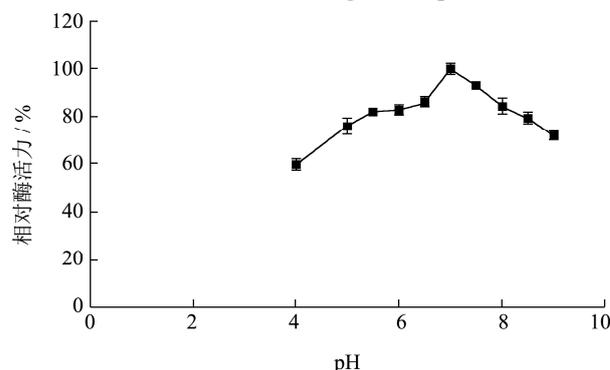


图 8 pH 对 gahB 酶活力的影响

Fig.8 Effects of pH on the activity of gahB

2.5.3 金属离子对 gahB 酶活力的影响

在标准的酶反应体系下, 加入 5.0 mmol/L 不同的金属离子 (Ba^{2+} 、 Mn^{2+} 、 K^+ 、 Mg^{2+} 、 Ni^{2+} 、 Co^{2+} 、 Ca^{2+} 、 Na^+ 、 Zn^{2+} 、 Cu^{2+}), 测定金属离子稳定性(表 3)。结果表明, K^+ 对 gahB 的酶活力表现具有激活作用, 能提升约 20% 的相对酶活力。其余金属离子对 gahB 的酶活力均有不同强度的抑制作用, 其中 Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 的抑制作用最为显著。

表 3 金属离子对纯化 gahB 酶活力的影响

Table 3 Effect of metal ions on the activity of purified gahB

金属离子	浓度/(mmol/L)	相对酶活力/%
对照	-	100±1.06
K^+	5	122.01±3.91
Na^+	5	97.87±3.77
Ni^{2+}	5	93.25±3.02
Co^{2+}	5	87.82±1.58
Cu^{2+}	5	80.09±1.30
Ba^{2+}	5	78.17±1.03
Mg^{2+}	5	75.93±1.55
Ca^{2+}	5	70.82±0.96
Mn^{2+}	5	51.32±2.11
Zn^{2+}	5	40.01±2.61

2.5.3 盐浓度对 gahB 酶活力的影响

在标准的酶反应体系下, 加入不同质量分数的 NaCl 使得反应体系中 NaCl 的最终质量分数为 0%、5%、10%、15%、18%, 测定纯化 gahB 的耐盐性(图 9)。结果表明, 随着盐质量分数的上升, gahB 的酶活力逐渐下降, 当盐质量分数为 10% 时 gahB 仍有 80% 以上的相对酶活力, 当盐质量分数上升至 15% 时, 相对酶活力降至 50% 左右, 而当盐质量分数到达 18% 时, gahB 仅剩有 35.38% 的相对酶活力。

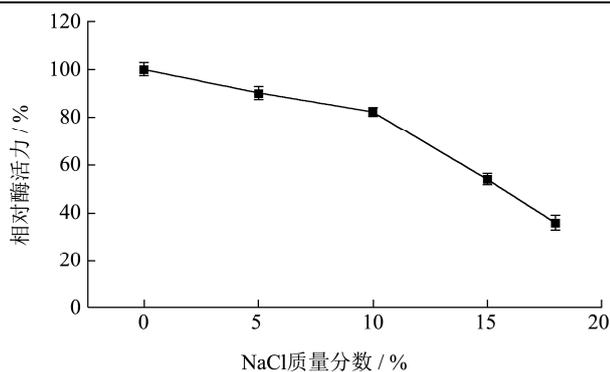


图9 gahB 的耐盐性

Fig.9 Salt tolerance of gahB

3 结论

黑曲霉作为良好的蛋白表达宿主,具有强大的蛋白分泌表达能力以及成熟的蛋白翻译后修饰系统,已被应用于多种酶制剂的生产。黑曲霉菌株 HL-1 ($\Delta kusA$ 、 $\Delta pyrG$ 、 $\Delta glaA$ 、 ΔTEG 、 $\Delta aamA$) 是本实验室自主构建的高效表达菌株,由于敲除了多个表达量高的内源蛋白如糖化酶 $glaA$ 、淀粉酶 $aamA$,使得该菌株在表达外源基因的能力有显著提高。利用该宿主,本研究实现了谷氨酰胺酶基因 $gahB$ 在 *A. niger* HL-1 中的重组表达,所得转化子 H-gahB 的最高酶活力达到 1.35 U/mL,并通过表型鉴定板以及孔板发酵建立了通量鉴定筛选方法。通过 CRISPR/Cas9 优化谷氨酰胺酶的重组表达,其酶活力达到 3.56 U/mL,约为 H-gahB 的 2.64 倍。利用 ARTP 诱变技术对重组菌株进行诱变筛选得到谷氨酰胺酶重组菌株的突变株 A-gahB,其发酵酶活力达到 4.16 U/mL,比出发菌株 C-gahB 的酶活力提高了 0.17 倍。纯化后的重组 $gahB$ 的比酶活达到 40.63 U/mg。重组 $gahB$ 的最适温度为 37 °C,最适 pH 值为 7.0,其在 20~40 °C 及 pH 值 5.5~8.0 之间稳定性较好。当酶反应体系中金属离子浓度为 5 mmol/L 时, K^+ 对 $gahB$ 的酶活力表现具有激活作用, Zn^{2+} 和 Mn^{2+} 则对 $gahB$ 的酶活力表现有较为强烈的抑制作用。当盐质量分数为 18% 时, $gahB$ 仍有 35.38% 的相对酶活力。综上所述,本研究第一次在黑曲霉中实现了来源于米曲霉 RIB40 的谷氨酰胺酶 $gahB$ 的分泌表达,为此后对米曲霉谷氨酰胺酶的研究提供了基础。

参考文献

[1] Brown G, Singer A, Proudfoot M, et al. Functional and structural characterization of four glutaminases from *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* [J]. *Biochemistry*, 2008, 47(21): 5724-5735

[2] Ramli A N M, Johari N D, Azhar M A, et al. A new l-glutaminase from *Kosakonia* sp.: extracellular production, gene identification and structural analysis [J]. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 2020, 15(1): 862-875

[3] Tork S E, Aly M M, Elsemin O. A new l-glutaminase from *Streptomyces pratensis* NRC 10: gene identification, enzyme purification, and characterization [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2018, 113: 550-557

[4] Awad M F, El-Shenawy F S, El-Gendy M, et al. Purification, characterization, and anticancer and antioxidant activities of L-glutaminase from *Aspergillus versicolor* Faesay4 [J]. *International Microbiology : the Official Journal of the Spanish Society for Microbiology*, 2021, 24(2): 169-181

[5] Maharem T M, Emam M A, Said Y A. Purification and characterization of L-glutaminase enzyme from camel liver: Enzymatic anticancer property [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2020, 150: 1213-1222

[6] Binod P, Sindhu R, Madhavan A, et al. Recent developments in l-glutaminase production and applications - an overview [J]. *Bioresource Technology*, 2017, 245(Pt B): 1766-1774

[7] Wakayama M, Yamagata T, Kamemura A, et al. Characterization of salt-tolerant glutaminase from *Stenotrophomonas maltophilia* NYW-81 and its application in Japanese soy sauce fermentation [J]. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2005, 32(9): 383-390

[8] Bazaraa W, Alian A, El-Shimi N, et al. Purification and characterization of extracellular glutaminase from *Aspergillus oryzae* NRRL 32567 [J]. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2016, 6: 76-81

[9] El-Sayed A S A. L-glutaminase production by *Trichoderma koningii* under solid-state fermentation [J]. *Indian Journal of Microbiology*, 2009, 49(3): 243-250

[10] Iyer P V, Singhal R S. Glutaminase production using *Zygosaccharomyces rouxii* NRRL-Y 2547: effect of aeration, agitation regimes and feeding strategies [J]. *Chemical Engineering & Technology*, 2010, 33(1): 52-62

[11] Ohshita K, Nakajima Y, Yamakoshi J, et al. Safety evaluation of yeast glutaminase [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2000, 38(8): 661-670

[12] Vo T D, Sulaiman C, Tafazoli S, et al. Safety assessment of glutaminase from *Aspergillus niger* [J]. *Food Science & Nutrition*, 2020, 8(3): 1433-1450

[13] Amobonye A, Singh S, Pillai S. Recent advances in microbial glutaminase production and applications-a concise review [J]. *Critical Reviews in Biotechnology*, 2019, 39(7): 944-963

- [14] Cairns T C, Nai C, Meyer V. How a fungus shapes biotechnology: 100 years of *Aspergillus niger* research [J]. Fungal Biology and Biotechnology, 2018, 5(Suppl): 271-283
- [15] Frisvad J C, Larsen T O, Thrane U, et al. Fumonisin and ochratoxin production in industrial *Aspergillus niger* strains [J]. PloS One, 2011, 6(8): e23496
- [16] Yu B, Zhang X, Sun W, et al. Continuous citric acid production in repeated-fed batch fermentation by *Aspergillus niger* immobilized on a new porous foam [J]. Journal of Biotechnology, 2018, 276-277: 1-9
- [17] Leynaud-Kieffer L M C, Curran S C, Kim I, et al. A new approach to Cas9-based genome editing in *Aspergillus niger* that is precise, efficient and selectable [J]. PloS One, 2019, 14(1): e0210243
- [18] Li X, Huang L, Pan L, et al. CRISPR/dCas9-mediated epigenetic modification reveals differential regulation of histone acetylation on *Aspergillus niger* secondary metabolite [J]. Microbiological Research, 2021, 245: 126694
- [19] Van Leeuwe T M, Arentshorst M, Ernst T, et al. Efficient marker free CRISPR/Cas9 genome editing for functional analysis of gene families in filamentous fungi [J]. Fungal Biology and Biotechnology, 2019, 6(2): 14882-14889
- [20] Li C, Brant E, Budak H, et al. CRISPR/Cas: a Nobel prize award-winning precise genome editing technology for gene therapy and crop improvement [J]. Journal of Zhejiang University Science B, 2021, 22(4): 253-284
- [21] 林锦莹,赵兰,欧阳松应. CRISPR/Cas9: 基因编辑的新时代 [J]. 中国细胞生物学报, 2021, 43(3): 647-654
- LIN Jinying, ZHAO Lan, OUYANG Songying. CRISPR/Cas9: a new era of gene editing [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2021, 43(3): 647-654
- [22] Nyabako B A, Fang H, Cui F, et al. Enhanced acid tolerance in *Lactobacillus acidophilus* by atmospheric and room temperature plasma (ARTP) coupled with adaptive laboratory evolution (ALE) [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2020, 191(4): 1499-1514
- [23] Ottenheim C, Nawrath M, Wu J C. Microbial mutagenesis by atmospheric and room-temperature plasma (ARTP): the latest development [J]. Bioresources and Bioprocessing, 2018, 5(1): 1-14
- [24] Zhang K, Mohsin A, Dai Y, et al. Combinatorial effect of ARTP mutagenesis and ribosome engineering on an industrial strain of *Streptomyces albus* S12 for enhanced biosynthesis of salinomycin [J]. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 2019, 7: 212
- [25] 董良波. 高活力海藻糖酶基因的挖掘及其在黑曲霉中的高效表达研究[D]. 广州: 华南理工大学, 2020
- DONG Liangbo. Screening of highly active trehalase genes and its high level expression in *Aspergillus niger* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2020