

来源于嗜碱芽孢杆菌 N16-5 甘露聚糖利用基因簇的乙酰酯酶 AesA 的克隆及性质分析*

马翠萍 刘朵朵 潘炳菊 申会涛 宋亚团**

(天津科技大学生物工程学院 工业发酵微生物教育部重点实验室暨天津市工业微生物重点实验室 天津 300457)

摘要 天然来源的多糖底物上常存在乙酰基取代,特异性的乙酰酯酶能够切割这些底物上的乙酰基,从而有利于聚糖底物的进一步降解。对 *Bacillus* sp. N16-5 甘露聚糖利用基因簇上编码的乙酰酯酶 AesA 进行了基因克隆和异源表达,并对其酶学性质进行了研究。*aesA* 基因长 957bp,编码 318 个氨基酸,属于碳水化合物酯酶第 7 家族。AesA 对 4-甲基伞形酮乙酸酯(4-methylumbelliferyl-acetate)表现出较好的催化活性,金属离子 Fe^{3+} 、 Fe^{2+} 、 Mn^{2+} 及 Cu^{2+} 对 AesA 活性均有不同程度的促进作用。AesA 与甘露聚糖酶 ManA 对乙酰化的甘露聚糖底物具有显著的协同作用。此项研究有助于理解嗜碱芽孢杆菌 *Bacillus* sp. N16-5 对甘露聚糖的水解机制,并且在甘露聚糖降解中具有潜在的应用前景。

关键词 嗜碱芽孢杆菌 N16-5 乙酰酯酶 酶学性质 甘露聚糖

中图分类号 Q946.5

乙酰酯酶(acetylesterase, EC 3.1.1.6)是一类催化乙酰酯键水解生成乙酸和醇的酶。以乙酰化碳水化合物为底物的乙酰酯酶也被称为乙酰碳水化合物酯酶,是碳水化合物酯酶(carbohydrate esterases, CEs)的一种。CEs 占据了碳水化合物活性酶数据库(CAZy, <http://www.cazy.org/>)中编译序列的大约 5%,分为 16 个家族,迄今为止,只有 0.55% 已被生物化学表征,其中乙酰木聚糖酯酶占主要部分^[1]。乙酰木聚糖酯酶可切割木聚糖主链上木糖残基 C-2 或 C-3 位置的取代乙酰基,乙酰基的去除可加速木聚糖酶对主链的水解,提高水解效率^[2-3]。

甘露聚糖是仅次于木聚糖的第二大半纤维素,是木质纤维素的重要组成成分,也可以作为储能碳水化合物存在于各种植物的组织中。与木聚糖类似,天然甘露聚糖主链上的甘露糖残基有时会在 C-2 或 C-3 处被乙酰化^[4-6],作用于乙酰化甘露聚糖的乙酰酯酶可以切割这些乙酰基以降低乙酰化甘露聚糖的黏度从而促

进其水解,因此这类酶在天然的乙酰化甘露聚糖的总水解中是必需的。然而目前与乙酰木聚糖酯酶相比对这类酶的研究较少^[7]。

嗜碱芽孢杆菌 N16-5 是一株分离自内蒙古乌杜淖碱湖的革兰氏阳性的专性嗜碱菌。它具有广泛的底物谱,并且表现出利用木聚糖、甘露聚糖和果胶等多糖的优异能力^[8]。目前在其甘露聚糖利用基因簇上已发现了 7 个与甘露聚糖水解释相关的酶,其中 *manA* 编码一个甘露聚糖酶,ManA 已经被研究表征为具有高活性的胞外 β -甘露聚糖酶,具有耐高温、嗜碱的性质。经预测其中的 *aesA* (GenBank: KU644713.1) 基因编码一个乙酰酯酶,很有可能参与该菌对天然甘露聚糖的水解^[9]。本文对该酶进行了基因克隆、表达、纯化及性质表征,本研究对于研究嗜碱芽孢杆菌 N16-5 甘露聚糖利用机制以及丰富我们对于碳水化合物酯酶的认识具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和表达载体 大肠杆菌(*Escherichia coli*)

收稿日期:2019-08-01 修回日期:2019-09-18

* 国家重点研发计划(2017YFD0400304)资助项目

**通讯作者,电子信箱:songyajian@tust.edu.cn

DH5 α 与 BL21 (DE3) 菌株购自索莱宝科技有限公司(北京),质粒 pET28a(+) 购自上海酶研生物科技有限公司。

1.1.2 主要试剂及分析软件 DNA 切胶回收试剂盒购自北京康为世纪生物科技有限公司、质粒小提试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司(北京)、Bradford 蛋白浓度定量试剂盒购自美国伯乐生命医学产品有限公司;其他试剂均为分析纯。Fast Pfu DNA 聚合酶、dNTPs 均购自康为世纪生物科技公司(北京)、T4 连接酶、限制性内切酶 *Nde*I 和 *Xho*I 购自 Thermo Scientific 公司(USA)、PCR 引物的合成以及序列的测订均在金唯智生物科技有限公司(苏州)完成。

1.2 方法

1.2.1 序列分析 使用已收入 CAZy 数据库中部分碳水化合物酯酶蛋白质序列和 AesA 蛋白序列构建系统发生树。使用 MEGA 6.0 系统进化软件,在分析进化树

的方法中选取邻接法(Neighbour-Joining),同时将 Bootstrap 的验证复数设置为 1 000。使用 SignalP4. 1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) 进行信号肽预测,判断该酶是胞内酶还是胞外酶。

1.2.2 重组菌株的构建 以 *Bacillus* sp. N16-5 中提取的基因组为模板,根据 DNA 序列信息,设计上下游引物,引物序列如表 1 所示,通过 PCR 技术进行目的基因的扩增。将扩增得到的目的基因与载体 pET28a(+) 通过切胶回收进行纯化后,用限制性内切酶 *Nde*I 和 *Xho*I 进行双酶切,通过琼脂糖凝胶电泳验证酶切结果,并纯化回收。将回收的双酶切后的目的基因与载体 pET28a(+) 用 T₄-DNA 连接酶进行连接,并转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,选取阳性克隆,提取 pET28a-aesA 重组质粒,通过测序验证是否正确。将测序正确的重组质粒转入大肠杆菌 BL21 感受态细胞中,挑取阳性克隆进行培养和保藏。

表 1 引物

Table 1 Primers used in this work

引物名称	序列	克隆基因
aesA -f	5'-CCGCTCGAGTTATGAACGTAAATATTGCATGATTATATCG-3'	aesA
aesA -r	5'-CGCCATATGGTGCCGACAATTGACTTACCT-3'	

1.2.3 目的蛋白的诱导表达及纯化 37℃ 条件下,对带有目的基因 *aesA* 的重组大肠杆菌菌株在含卡那霉素的发酵培养基中培养 2~3h (OD_{600nm} = 0.6~0.8),加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG 诱导剂,于 30℃、200r/min 培养 6h。诱导结束后,在 4℃、7 000~8 000r/min 条件下离心,10min 收集菌体。用缓冲液重悬菌体,让样品处于冰水混合物中进行超声破碎,超声条件为:300W 功率,超声破碎 3s,暂停 4s 为一个循环,时间 15min,在 4℃、10 000~12 000r/min 条件下离心 10min 收集上清。通过 SDS-PAGE 对诱导后超声破碎液离心后的上清进行蛋白质表达检测。上清液经镍凝胶柱纯化,10K 透析袋透析,取透析后的蛋白液经 SDS-PAGE 蛋白纯度检测。

1.2.4 AesA 酶活及动力学常数的测定 对乙酸- α -萘酯(α -naphthyl acetate)、乙酸对硝基苯酯(*p*NP-acetate)和 4-甲基伞形酮乙酸酯(4-methylumbelliferyl-acetate)的活力测定参考 Mai-Gisondi 和 Master^[10]总结的方法。30℃ 下,将 10 μ l 酶液与 390 μ l 用缓冲液稀释后的底物混合均匀,反应 20min,加入 600 μ l 50mmol/L 柠檬酸终止反应,然后用 0.22 μ mol/L 过滤器过滤反应液,过滤

后反应液测定吸光度值。酶活力定义为在一定反应条件下,每分钟分解底物生成 1 μ mol/L 产物所需的酶量。测定 AesA 对底物的动力学常数。配制不同浓度梯度底物进行反应,以单位时间内产物的生成量作为酶促反应的初速度,采用 Lineweaver-Burk 双倒数法作图,得到回归曲线,求解 K_m 和 V_{max} 值等。

1.2.5 AesA 酶学性质分析 在 PH7、20~70℃ 温度的条件下测定酶活,得出其最适反应温度;在最适温度条件下,pH3~11 的底物中测定 AesA 的酶活,得出其最适 pH。为测定金属离子等对酶活性的影响,在反应体系中加入不同金属离子和化学试剂(终浓度为 5mmol/L): Li⁺、K⁺、Ni²⁺、Cu²⁺、Mg²⁺、Ca²⁺、Fe²⁺、Zn²⁺、Co²⁺、Mn²⁺、Fe³⁺、SDS、EDTA-Na₂、乙醇和 β -巯基乙醇,以不添加金属离子和化学试剂的反应体系作对照,在最适反应条件下测定其酶活。

1.2.6 AesA 与 β -甘露聚糖酶对乙酰化甘露聚糖底物协同作用的测定 60℃ 条件下,按 9:1 的质量比分别将甘露聚糖底物(魔芋甘露聚糖或槐豆胶)与乙酸酐混合均匀,将一定量的吡啶作为催化剂,反应 4h 后,用无水乙醇对样品进行沉淀及清洗,以去除其中未完全反

应的物质。30℃ 条件下烘干直至重量不再发生变化, 获得乙酰化甘露聚糖底物^[11-12]。配制 0.5% 乙酰化甘露聚糖(乙酰化魔芋甘露聚糖和乙酰化刺槐豆胶)底物。分别取 400μl 的底物, 样品 1 加入 90μl 的 AesA 及 10μl 缓冲液, 样品 2 加入 90μl 的缓冲液及 10μl ManA, 样品 3 加入 90μl 的 AesA 及 10μl ManA, DNS 法测定还原糖的产量, 从而计算出两种酶的协同率。协同率定义为共同作用于底物时产生的总还原糖与单个酶单独作用于同一底物时产生的还原糖的总量之比, 计算公式如下:

$$S = \frac{N_{12}}{N_1 + N_2}$$

式中, S 为协同率; N₁ 为 AesA 单独作用时的还原糖产量 (mmol); N₂ 为 ManA 单独作用时的还原糖产量 (mmol); N₁₂ 为两种酶同时作用时的还原糖产量 (mmol)。

2 结果与分析

2.1 序列分析

基因 *aesA* 长 957bp, 编码 318 个氨基酸, 由该基因编码的成熟蛋白质理论分子量为 35.7kDa。经 SignalP4.1 预测, AesA 缺乏信号肽和半胱氨酸残基, 为细胞内蛋白质。使用 blast 在 NCBI 数据 (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 对 *aesA* 基因序列进行分析。发现其与乙酰木聚糖酯酶序列具有很高的相似性, 未发现与其相似性较高的乙酰甘露聚糖酯酶。将所有已收入 CAZy (<http://www.cazy.org/>) 数据库中的碳水化合物酯酶序列与 AesA 蛋白序列进行比对, 构建其系统进化树。构建结果如图 1 所示。从进化树图可知, AesA 与来自 CE7 家族的乙酰木聚糖酯酶 6fkx 距离较近。对两者蛋白质序列进行比对发现其一致性为 51%。



图 1 AesA 蛋白序列系统进化树分析

Fig. 1 The phylogenetic tree analysis of AesA

2.2 异源表达及纯化

以提取的 *Bacillus* sp. N16-5 基因组为模板,扩增目的基因 *aesA*,进行琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 2a 所示,与理论长度一致。重组质粒 pET28a-*aesA* 双酶切验证结果如图 2b 所示,重组质粒经过双酶切后产生了与 pET28a 载体和目的基因相同大小的两条带,且测序结果未发生基因突变,说明成功获得了阳性重组质粒。

对构建好的菌株 pET28a-*aesA* 进行诱导培养和收集,细胞破碎液上清 SDS-PAGE 检测结果如图 2c 所示。发现一条明显的表达条带,与预期 *aesA* 编码的蛋白质大小 35.7kDa 一致,说明重组蛋白在大肠杆菌中成功异源表达。经镍柱亲和层析,纯化出的目的蛋白无杂带,条带单一。

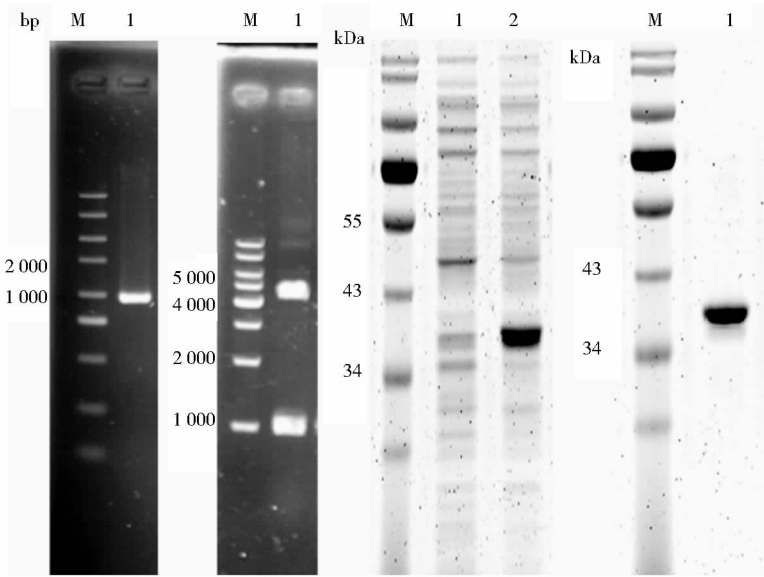


图 2 AesA 的异源表达及蛋白质纯化

Fig. 2 SDS-PAGE detection of protein purified by His trap TM HP column

(a) Amplified *aesA* electrophoresis maps (b) Plasmid pET28a-*aesA* double enzyme electrophoresis (c) Detection of recombinant plasmid expression by SDS-PAGE Lane1: The broken supernatant of BL21 pET28a recombinant strain; Lane2: The broken supernatant of pET28a-*aesA* recombinant strain (d) SDS-PAGE detection of protein purified by His Trap TM HP column

2.3 AesA 的酶活及动力学参数测定

对不同乙酰化底物进行酶活性和动力学参数测定,结果如表 2 所示。重组 AesA 对乙酸- α -萘酯未显示出活性,对乙酸对硝基苯酯和 4-甲基伞形酮乙酸酯均表现出明显活性,酶活力分别为 1.531U/mg 和 1.679U/mg。对这

两种底物进行动力学参数测定,计算 K_m 分别为 3.36mmol/L、3.27mmol/L, V_{max} 分别为 0.036mmol/min、0.044mmol/min, k_{cat}/K_m 分别 228.88ms⁻¹、289.71ms⁻¹。

表 2 AesA 底物特异性及动力学分析

Table 2 The substrate specificity and kinetics analysis of AesA

底物	V_{max} (mmol/min)	k_{cat} (s ⁻¹)	K_m (mmol/L)	k_{cat}/K_m (ms ⁻¹)	比酶活 (U/mg)
乙酸- α -萘酯	N	N	N	N	N
乙酸对硝基苯酯	0.036	0.77	3.36	228.88	1.53
4-甲基伞形酮乙酸酯	0.044	0.95	3.27	289.71	1.68

2.4 AesA 的酶学性质分析

以 4-甲基伞形酮乙酸酯为底物,对重组 AesA 的最适温度及最适 pH 进行测定,如图 3 所示,重组 AesA 的

最适温度为 30℃、最适 pH 为 8.0。不同金属离子、化学试剂对 AesA 活性的影响如表 3 所示。大部分金属离子、化学试剂对 AesA 的活性都会产生不同程度的抑

制作用,Fe³⁺、Fe²⁺、Mn²⁺ 及 Cu²⁺ 表现出对酶活性有不同程度的促进作用,其中 Cu²⁺ 的促进作用最为显著,活

性为不加金属离子的 140.9%。

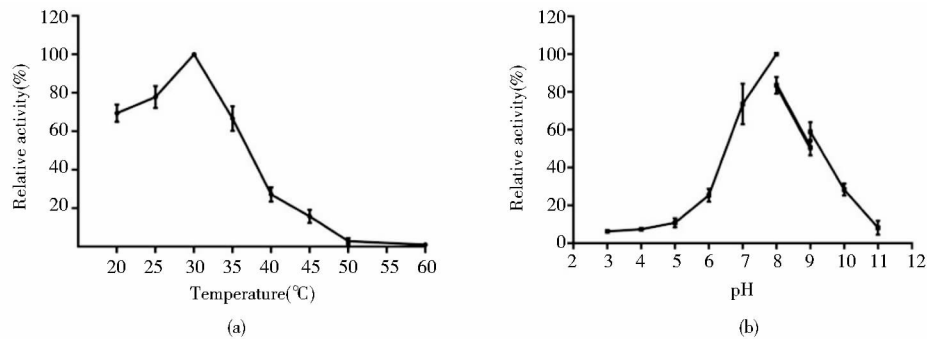


图3 重组 AesA 最适温度 (a) 及 pH (b)
Fig.3 Optimum temperature (a) and pH (b) of recombinant AesA

表3 金属离子、化学试剂对 AesA 活性的影响

Table 3 Effect of metal ions and chemical reagents on the activities of purified AesA

金属离子及化学试剂	相对活性(%)
对照	100.0
Li ⁺	73.7 ± 0.9
Fe ³⁺	139.6 ± 1.4
Fe ²⁺	134.6 ± 1.5
Zn ²⁺	67.2 ± 1.3
Mn ²⁺	116.3 ± 0.9
Ni ²⁺	73.7 ± 1.4
K ⁺	98.5 ± 1.1
Cu ²⁺	140.9 ± 0.9
Mg ²⁺	74.1 ± 0.5
Ca ²⁺	71.2 ± 0.6
乙醇	66.1 ± 0.7
SDS	89.8 ± 1.5
EDTA-Na ₂	93.6 ± 0.5
β-巯基乙醇	51.2 ± 0.8

2.5 AesA 和 β-甘露聚糖酶 ManA 对乙酰甘露聚糖底物的协同作用

由表 4 可以看出,AesA 单独作用于乙酰化甘露聚糖底物几乎没有还原糖的产生,ManA 作用于乙酰化甘露聚糖底物可以产生一定量的还原糖。同时添加 AesA 与 ManA 将大大促进 ManA 对乙酰化甘露聚糖底物的降解能力。其中对乙酰化魔芋甘露聚糖的协同率达到 1.47,而对乙酰化槐豆胶的协同率达到 1.34。以上结果表明,AesA 对甘露聚糖链上乙酰基的去除,对 β-甘露聚糖酶 ManA 对乙酰化甘露聚糖底物的水解具有显著促进作用。

3 讨 论

本研究克隆、表达并纯化了来自 *Bacillus* sp. N16-5 甘露聚糖利用基因簇的乙酰酯酶 AesA,并对其酶学性质进行了研究。根据序列同源性分析,乙酰甘露聚糖酯酶 AesA 属于碳水化合物酯酶 CE7 家族,目前该家族特征被表征的酶共有 7 个,主要为乙酰木聚糖酯酶和头孢菌素-C 脱乙酰酶。CE7 家族成员对乙酰酯的底物特异性较差,但可作用于多种醇类,如对硝基苯酚、4-甲基乙酸伞形酯、α/β-萘酚和荧光素衍生物^[13-15]。AesA 符合 CE7 家族这一特点,对对硝基苯酚酯和 4-甲基乙酸伞形酯表现出活性。然而,已发现的 CE7 家族成员均不能对乙酰甘露聚糖表现出活性,而 AesA 是该家族第一个发现的可以作用于乙酰甘露聚糖、促进 β-甘露聚糖酶对底物进行水解的酶。该酶的发现丰富了我们对该家族成员的认识,这对该家族的进一步研究具有重要的意义。

该酶作为首个从甘露聚糖基因簇上克隆表达的碳水化合物酯酶,对于我们研究细菌对甘露聚糖的利用具有重要价值。在前期研究中,我们发现嗜碱芽孢杆菌 N16-5 的甘露聚糖利用基因簇上有大量胞内水解酶,并且发现该菌的甘露聚糖利用机制为将甘露聚糖在胞外部分降解后转运进胞内进行进一步的降解。对 AesA 的信号肽预测发现该酶同样为胞内酶,因此我们推测 AesA 参与了嗜碱芽孢杆菌 N16-5 在胞内对甘露聚糖的彻底水解,并且可能与其他甘露聚糖降解酶发生了协同作用。同时,这也解释了为何作为嗜碱微生物来源的酶,AesA 的最适 pH 只有 8.0,并且在偏中性条件下表现出较好的活性。

表 4 AesA 和 ManA 的协同作用
Table 4 Synergy degree between AesA and ManA

酶	乙酰化魔芋甘露聚糖			乙酰化刺槐豆胶		
	还原糖生成量 (mmol)	协同率	显著性	还原糖生成量 (mmol)	协同率	显著性
ManA	0.41 ± 0			0.34 ± 0.02		
AesA	0.04 ± 0.01			0.03 ± 0		
AesA 和 ManA	0.67 ± 0.03	1.47 ± 0.05	* *	0.5 ± 0.02	1.34 ± 0.12	*

* represent($P < 0.05$); **represent($P < 0.01$)

甘露聚糖降解酶之间的协同作用可以提高甘露聚糖转化为可发酵糖的效率,以及用于生物乙醇生产的可行性。同时,协同降解产生的甘露糖、甘露寡糖在食品、饲料以及保健品等行业中具有潜在的应用前景^[16]。针对天然乙酰化甘露聚糖底物的水解过程,乙酰酯酶作为辅助酶能够发挥促进作用,但是目前针对甘露聚糖底物的乙酰酯酶的研究非常少。本研究发现的 AesA 与 β -甘露聚糖酶具有显著的协同作用,可以明显促进 β -甘露聚糖酶对乙酰化甘露聚糖底物的水解,因此该酶在甘露聚糖的水解过程中具有潜在的应用价值。

参考文献

- [1] Topakas E, Paul C. Microbial xylanolytic carbohydrate esterases. Springer Netherlands: Industrial Enzymes, 2007: 20-21.
- [2] Hu X, Zhang P, Miao M, et al. Development of a recombinant d-mannose isomerase and its characterizations for d-mannose synthesis. International Journal of Biological Macromolecules, 2016, 89(8): 328-335.
- [3] Koutaniemi S, van Gool M P, Juvonen M, et al. Distinct roles of carbohydrate esterase family CE16 acetyl esterases and polymer-acting acetyl xylan esterases in xylan deacetylation. Journal of Biotechnology, 2013, 168(4): 684-692.
- [4] 吴红丽, 薛勇, 刘健, 等. 乙酰木聚糖酯酶研究进展. 中国生物工程杂志, 2016, 36(3): 102-110.
Wu H L, Xue Y, Liu J, et al. Research progress of acetylxylanesterase. China Biotechnology, 2016, 36(3): 102-110.
- [5] Saumya S, Gursharan S, Kumar A S. Mannans: An overview of properties and application in food products. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 119(11): 79-95.
- [6] 张云程, 张艳, 张洋, 等. 甘露消毒丹的临床运用. 陕西中医, 2002, 23(2): 33-33.
Zhang Y C, Zhang Y, Zhang Y, et al. Clinical application of manna disinfectant. Shanxi Traditional Chinese Medicine, 2002, 23(2): 33-33.
- [7] Tenkanen M, Thornton J, Viikari L. An acetylglucosaminidase of *Aspergillus oryzae*; purification, characterization and role in the hydrolysis of O-acetyl-galactoglucomannan. Journal of Biotechnology, 1995, 42(3): 197-206.
- [8] Ma Y H, Xue Y F, Dou Y, et al. Characterization and gene cloning of a novel β -mannanase from alkaliphilic *Bacillus* sp. N16-5. Extremophiles, 2004, 8(6): 447-454.
- [9] Song Y J, Xue Y F, Ma Y H. Global microarray analysis of carbohydrate use in alkaliphilic hemicellulolytic bacterium *Bacillus* sp. N16-5. PLoS One, 2013, 8(1): e54090.
- [10] Mai-Gisondi G, Master E R. Colorimetric detection of acetyl xylan esterase activities. Methods in Molecular Biology, 2017, 1588(4): 45-57.
- [11] Gao S, Nishinari K. Effect of degree of acetylation on gelation of konjac glucomannan. Biomacromolecules, 2004, 5(5): 175-185.
- [12] 光善仪, 宫晓梅, 高晓燕, 等. 乙酸酐对魔芋葡甘聚糖的改性. 精细化工, 2004, 21(7): 529-531.
Guang S Y, Gong X M, Gao X Y, et al. Modification of konjac glucomannan by acetic anhydride. Fine Chemical Engineering, 2004, 21(7): 529-531.
- [13] Levisson M, Han G W, Deller M C, et al. Functional and structural characterization of a thermostable acetyl esterase from *Thermotoga maritima*. Proteins-structure Function & Bioinformatics, 2012, 80(6): 1545-1559.
- [14] Lorenz W W, Wiegel J. Isolation, analysis, and expression of two genes from *Thermoanaerobacterium* sp. strain JW/SL YS485: a beta-xylosidase and a novel acetyl xylan esterase with cephalosporin C deacetylase activity. Journal of Bacteriology, 1997, 179(17): 5436.
- [15] Florence V, Charnock S J, Verschueren K H G, et al. Multifunctional xylooligosaccharide/cephalosporin C deacetylase revealed by the hexameric structure of the *Bacillus subtilis* enzyme at 1.9 Å resolution. Journal of Molecular Biology, 2003, 330(3): 593-606.
- [16] 王瑶, 王睿琪, 那金, 等. 甘露聚糖酶协同水解甘露聚糖研究进展. 中国农学通报, 2017, 33(21): 21-26.

Wang Y, Wang R Q, Na J, et al. Research progress of manganese synergistic hydrolysis of mannose. Chinese Agricultural Science

Bulletin, 2017, 33(21): 21-26.

Cloning and Characterization of Acetylesterase AesA Derived from Mannan Utilization Gene Cluster of *Bacillus* sp. N16-5

MA Cui-ping LIU Duo-duo PAN Bing-ju SHEN Hui-tao SONG Ya-jian

(Key Lab of Industrial Fermentation Microbiology of the Ministry of Education, Tianjin Key Lab of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract The residues of natural polysaccharide substrates were often substituted by acetyl groups, and acetyl esterase can cut acetyl groups on these substrates, which is conducive to the further degradation. The gene *aesA* which encoding an acetyl esterase was cloned from mannan utilization gene cluster of *Bacillus* sp. N16-5 and heterologously expressed in prokaryotic host. The gene *aesA* is 957bp long and encodes 318 amino acids, belonging to the carbohydrate esterase family 7 (CE7). AesA showed good catalytic activity for 4-methylumbelliferyl-acetate and *p*NP-acetate, however, there was no active effect on alpha-naphthyl acetate. The enzyme activity for 4-methylumbelliferyl-acetate is 1.68U/mg, and the kinetic parameters K_m , V_{max} and k_{cat}/K_m , were measured by 3.27mmol/L, 0.044mmol/min and 289.71ms⁻¹, respectively. Metal ions Fe³⁺, Fe²⁺, Mn²⁺ and Cu²⁺ all promoted the activity of AesA, and Cu²⁺ exhibited the most significant promoting effect. AesA has a significant synergistic effect with β -mannanase ManA on degrading acetylated mannan substrates, and the synergy degree reached 1.47 when using acetylated locust bean gum as substrate. It is helpful to understand the mannan utilization mechanism of *Bacillus* sp. N16-5, and has potential application prospects in mannan degradation.

Key words *Bacillus* sp. N16-5 Acetylesterase Enzymological properties Mannan