

研究报告

黑曲霉阿魏酸酯酶基因密码子优化及在毕赤酵母中的
高效表达

李兵 蔡国林 朱德伟 陆健*

(江南大学 工业生物技术教育部重点实验室 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室
生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】对黑曲霉(*Aspergillus niger*)阿魏酸酯酶基因进行克隆和密码子优化,使其在毕赤酵母(*Pichia pastoris* X-33)中高效表达。【方法】以黑曲霉基因组为模板,经重叠延伸 PCR 扩增得到阿魏酸酯酶基因(*AnfaeA*),并对 *AnfaeA* 基因进行毕赤酵母密码子偏好性“随机优化”和“一对一优化”,全基因合成后分别与表达载体 pPICZαA 连接,构建表达载体 pPICZαA-*AnfaeA*、pPICZαA-op*AnfaeA* I 和 pPICZαA-op*AnfaeA* II。经 *Sac* I 线性化后电转化至 *P. pastoris* X-33 中,筛选阳性转化子。摇瓶发酵 4.5 d 后,测定并比较重组阿魏酸酯酶(re*AnfaeA*)酶活。【结果】密码子优化前阿魏酸酯酶酶活为 6.8 ± 0.1 U/mL,基因“一对一优化”和“随机优化”后的重组酶酶活分别为 5.2 ± 0.1 U/mL 和 39.9 ± 0.1 U/mL,“随机优化”后酶活比优化前提高了近 6 倍,而“一对一优化”后酶活仅为优化前酶活的 76.5%。重组阿魏酸酯酶的最适 pH 为 5.5,且在 pH 4.5–7.0 稳定性较好;最适反应温度 50 °C,在 45–50 °C 较稳定。【结论】阿魏酸酯酶基因经密码子“随机优化”后进行重组表达,酶活显著提高,对研究阿魏酸酯酶在毕赤酵母及其它宿主中的高效表达具有一定的借鉴意义,也为大规模工业化应用奠定了基础。

关键词: 黑曲霉, 毕赤酵母, 阿魏酸酯酶, 密码子优化

Codon optimization of feruloyl esterase gene of *Aspergillus niger*
and its high expression in *Pichia pastoris*

LI Bing CAI Guo-Lin ZHU De-Wei LU Jian*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] Gene cloning and codon optimization of the feruloyl esterase from *Aspergillus niger* (*AnfaeA*) for its inducible expression in *Pichia pastoris* X-33. [Methods] The *AnfaeA* gene was

Foundation item: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2013AA102109); Project Funded by the Priority Academic Program Development of Jiangsu Higher Education Institutions

*Corresponding author: Tel/Fax: 86-510-85918191; E-mail: jlu@jiangnan.edu.cn

Received: August 02, 2016; **Accepted:** November 01, 2016; **Published online** (www.cnki.net): December 05, 2016

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(No. 2013AA102109); 江苏高校优势学科建设工程资助项目

*通讯作者: Tel/Fax: 86-510-85918191; E-mail: jlu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-08-02; **接受日期:** 2016-11-01; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-12-05

amplified by overlap extension PCR using the genome of *A. niger* as template. At the same time, the *AnfaeA* gene was optimized by ‘one amino acid one codon’ and ‘codon randomization’ and then synthesized. The three kinds of ferulic acid esterase gene were cloned into the expression vector pPICZαA, respectively, obtaining the recombinant expression vectors pPICZαA-AnfaeA, pPICZαA-opAnfaeA I and pPICZαA-opAnfFaeA II. The plasmids were then linearized by *Sac* I, and transformed into *P. pastoris* X-33. The positive transformants of each gene type were identified by PCR, and further screened by determination of feruloyl esterase activity in fermentations using high performance liquid chromatography (HPLC). **[Results]** The feruloyl esterase activity of FaeA-ori, FaeA-opt I and FaeA-opt II were 6.8 ± 0.1 U/mL, 5.2 ± 0.1 U/mL, and 39.9 ± 0.1 U/mL, respectively. By ‘codon randomization’ optimization, the activity of recombinant enzyme was 6 times higher than that coded by original *AnfaeA* gene. However, the feruloyl esterase coded by ‘one amino acid one codon’ optimized gene was only 76.5% of the original enzyme. The optimal temperature and pH for recombinant AnfaeA (reAnfaeA) was 50 °C and 5.5, respectively. In addition, reAnfaeA showed stability when incubated in 45–50 °C and pH 4.5–7.0. **[Conclusions]** By ‘codon randomization’ optimization, the resultant recombinant feruloyl esterase expressed in *P. pastoris* X-33 was 6 times higher than that coded by original *AnfaeA*, reaching the highest activity among existed recombinant feruloyl esterase until now. The results provided large-scale application potential of feruloyl esterase in industrial, and laid the experimental foundation for the further improvement the enzyme activity.

Keywords: *Aspergillus niger*, *Pichia pastoris*, Feruloyl esterase, Codon optimization

阿魏酸酯酶(E.C.3.1.1.73, Feruloyl esterase, FAE)又称为肉桂酸酯酶,属羧酸酯水解酶的亚类之一,是指能够水解植物细胞壁中多糖与阿魏酸连接的酯键,释放出游离的单体阿魏酸或阿魏酸二聚体^[1-2]。1991年, Faulds等^[3]首次从橄榄色链霉菌(*Streptomyces olivochromogenes*)中分离得到阿魏酸酯酶,目前已有超过30种阿魏酸酯酶被分离和纯化^[4]。阿魏酸酯酶来源广泛,普遍存在于真菌、细菌、植物中,绝大多数阿魏酸酯酶是从真菌,尤其是曲霉菌属(*Aspergillus* sp.)中分离得到,如黑曲霉(*A. niger*)、米曲霉(*A. oryzae*)、泡盛曲霉(*A. awamori*)和构巢曲霉(*A. nidulans*)等^[5-8]。然而,由于大多数野生菌株产阿魏酸酯酶能力很低,如黑曲霉发酵后酶活仅在0.010–0.096 U/mL之间^[9],这就限制了该酶的产业化应用。

2001年,Juge等在毕赤酵母中实现了黑曲霉阿魏酸酯酶基因的异源高效表达,重组阿魏酸酯酶表达量为300 mg/L^[10]。在国内,张帅兵等将黑曲霉阿魏酸酯酶基因导入毕赤酵母GS115中,分泌表达的重组阿魏酸酯酶酶活达16.6 U/mL^[11]。但因外源基

因的密码子并非都是毕赤酵母本身所偏好的密码子,而毕赤酵母密码子使用的偏好性尤其明显,当外源基因中含有毕赤酵母非偏好性密码子时,将严重阻碍其在毕赤酵母中的表达^[12]。近年来,宿主基因密码子的偏好性优化被作为提高外源基因表达量的重要手段,主要有密码子“随机优化”和“一对一优化”^[13]。

本研究在不改变重组蛋白氨基酸序列的前提下,分别对阿魏酸酯酶基因进行两种方式的密码子优化,构建表达载体pPICZαA-AnfaeA并电转化至毕赤酵母中进行诱导表达,以期提高重组阿魏酸酯酶的表达量及酶活,为后续进一步提高该酶的酶活及大规模应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 黑曲霉(*Aspergillus niger*) CBS 513.88、大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109和毕赤酵母X-33均为本实验室保藏;表达载体pPICZαA和pMD19-T Simple Vector均购自TaKaRa生物工程有限公司。

1.1.2 主要试剂、仪器及培养基: PCR 引物由上海 Sangon 公司合成; PCR 产物纯化试剂盒、DNA Marker、标准蛋白质 Marker、博来霉素(Zeocin)、质粒提取试剂盒和胶回收试剂盒均购自 TaKaRa 公司; 阿魏酸乙酯和阿魏酸甲酯购自 Sigma 公司; 其他化学试剂均为国产或进口分析纯。AKTA avant25 蛋白纯化仪、HisTrapTM excel (1 mL)色谱柱, 美国 GE Healthcare 公司; Agilent 1260 高效液相色谱仪, 美国安捷伦公司; Mastercycler pro PCR 仪, 德国 Eppendorf 公司。YPD、BMGY、BMMY 培养基均按 Invitrogen 公司的毕赤酵母菌实验操作手册配制。筛选平板: 2%琼脂灭菌后, 立即加入 300 μ L 10% (质量体积比)阿魏酸乙酯的二甲基甲酰胺溶液, 摇匀至呈现云雾状。

1.2 方法

1.2.1 黑曲霉阿魏酸酯酶基因的克隆及基因优化合成: 根据黑曲霉阿魏酸酯酶的基因序列 (GenBank 登录号: Y09330.2), 使用软件 Signal P3.0 预测序列信号肽并设计重叠延伸 PCR 引物(表 1)。采用 CTAB 法^[14]提取黑曲霉染色体基因组 DNA, 并以此为模板, 用表 1 中的引物组合(F1/R1, F2/R2)分别扩增外显子 1 和外显子 2。PCR 反应条件: 95 $^{\circ}$ C 4 min; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 52 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。胶回收 PCR 产物外显子 1 和外显子 2。以外显子 1 和 2 的胶回收产物的混合物(1:1,

体积比)为模板, 以 F1 和 R2 为上、下游引物进行重叠延伸 PCR, 反应条件除了延伸时间改成 60 s 外, 其余条件均和外显子 1 扩增的条件相同。将纯化的重叠延伸 PCR 产物与 pMD19-T 载体连接, 转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞, 获得重组质粒 pMD19-AnfaeA, 由上海生工生物工程有限公司进行测序。

根据基因测序结果, 在不改变阿魏酸酯酶氨基酸序列的前提下, 综合考虑毕赤酵母密码子偏好性、G+C%含量、CAI-密码子适应指数、基因序列重叠区的去除等因素, 对目的基因进行在线密码子“随机优化”(http://www.jcat.de/), 同时根据毕赤酵母偏好性密码子进行“一对一优化”, 即根据表 2 所示的毕赤酵母偏好性密码子, 将黑曲霉阿魏酸酯酶基因序列中的所有非偏好性密码子进行替换^[15]。将两种优化后的基因序列送至上海生工生物工程有限公司合成并与 pMD19-T 载体连接, 获得质粒 pMD19-opAnfaeA I 和 pMD19-opAnfaeA II。

1.2.2 阿魏酸酯酶的活性测定: 参考 Zhang 等^[16]的方法, 以阿魏酸甲酯为底物, 配置标准酶活反应体系: 取 900 μ L 阿魏酸甲酯(1 mmol/L, pH 6.0 的磷酸盐缓冲液配制)于 1.5 mL EP 管中, 50 $^{\circ}$ C 保温 5 min, 加入 100 μ L 适当稀释的酶液, 准确反应 10 min 后加入 400 μ L 冰乙酸终止反应, 过膜(水系, 0.22 μ m), 用高效液相色谱法测定经重组酶水解

表 1 实验所用的引物、序列及酶切位点

Table 1 Primers used in this study

引物 Primer	序列 Sequence (5'→3')	酶切位点 Restriction site
F1	CGGAATT <u>CGCCTCC</u> ACGCAAGGCATCTC	EcoR I
R1	CTATGGCCTGTACCGTAAGC	None
F2	CGCTTACCGTGACAGGCCATAGTCTGGGAGCGTCGATGGC	None
R2	ATAAGAATGCGGCCGCTTACCAAGTACAAGCTCCGC	Not I
Opt I-F	CGGAATT <u>CGCCTCA</u> ACACAAGGTATCAG	EcoR I
Opt I-R	ATAAGAATGCGGCCG <u>CCCA</u> AGTACAAGCGCCACTTG	Not I
Opt II-F	CGGAATT <u>CGCTTCT</u> ACTCAAGGTATTCTG	EcoR I
Opt II-R	ATAAGAATGCGGCCG <u>CCCA</u> AGTACAAGCACCACTAG	Not I

注: 下划线部分为限制性酶切位点。

Note: The underlined are restriction enzyme cutting sites.

表 2 毕赤酵母高表达偏好性密码子
Table 2 The optimal codon list in *P. pastoris*

氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	偏好密码子 Optimal codon	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	偏好密码子 Optimal codon	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	偏好密码子 Optimal codon	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	偏好密码子 Optimal codon
Phe	TTT	*	Ser	TCT	*	Tyr	TAT		Cys	TGT	*
	TTC			TCC			TAC	*		TGC	
Leu	TTA			TCA		His	CAT		Arg	CGT	
	TTG	*		TCG			CAC	*		CGC	
	CTT			AGT		Gln	CAA	*		CGA	
	CTC			AGC			CAG			CGG	
	CTA		Pro	CCT		Asn	AAT			AGA	*
	CTG			CCC			AAC	*		AGG	
Ile	ATT	*		CCA	*	Lys	AAA		Gly	GGT	*
	ATC			CCG			AAG	*		GGC	
	ATA		Thr	ACT	*	Asp	GAT			GGA	
Val	GTT	*		ACC			GAC	*		GGG	
	GTC			ACA		Glu	GAA	*	Ala	GCT	*
	GTA			ACG			GAG			GCC	
	GTG									GCA	
										GCG	

注：*：高表达偏好性密码子。

Note: *: Optimal codon.

所产生的阿魏酸的含量^[17]。以预先在酶溶液中加入 400 μ L 冰乙酸再加底物溶液的反应物为对照。将反应条件下，每分钟降解阿魏酸甲酯生成 1 μ mol 阿魏酸所需的阿魏酸酯酶的酶量定义为 1 个酶活力单位 U。

1.2.3 毕赤酵母重组表达载体的构建及阳性转化子的筛选：分别将重组质粒 pMD19-AnfaeA、pMD19-opAnfaeA I 和 pMD19-opAnfaeA II 用 *Eco*R I 和 *Not* I 双酶切后，与经相同酶双酶切的 pPICZ α A 质粒连接，转化至大肠杆菌 JM109 中，挑选阳性转化子，经 PCR 验证，获得重组表达载体 pPICZ α A-AnfaeA、基因“随机优化”后重组表达载体 pPICZ α A-opAnfaeA I 和“一对一优化”后重组质粒 pPICZ α A-opAnfaeA II。将 3 种重组质粒经 *Sac* I 酶切线性化，电转入毕赤酵母 X-33 中，涂布于 Zeocin 抗性 YPD 平板 30 $^{\circ}$ C 培养 3–5 d，挑取单克隆进行 PCR 验证(引物为 Opt I-F/R，Opt II-F/R，

PCR 扩增条件与 1.2.1 中重叠延伸时反应条件相同)，阳性转化子经发酵及甲醇诱导，将发酵液离心后加到阿魏酸乙酯筛选平板上 30 $^{\circ}$ C 孵育 1 h，根据透明圈大小初步筛选高酶活转化子，进一步用高效液相色谱法测定高酶活转化子所对应的发酵液上清中重组阿魏酸酯酶酶活，筛选酶活最高的阳性转化子。

1.2.4 重组阿魏酸酯酶的纯化：阿魏酸酯酶在毕赤酵母 X-33 中的表达属于分泌型表达，载体 pPICZ α A 中含有 His 标签，因此选择亲和色谱柱镍 (Ni) 柱进行重组蛋白的分离纯化。主要步骤：将发酵上清过膜(水系，0.22 μ m)，经过 HisTrapTM excel 色谱柱，操作方法按照该色谱柱的说明书进行，上样量为 10 mL，按峰收集流出液，并经 SDS-PAGE 电泳检验分离效果。

1.2.5 重组阿魏酸酯酶特性研究：最适 pH 和 pH 稳定性的测定均在 1.2.2 所示的标准酶反应体系中

进行。采用不同 pH (pH 3.0–7.0) 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(50 mmol/L), 分别测定重组阿魏酸酯酶的活性, 确定其最适 pH。将纯化的重组酶液用不同 pH (pH 3.0–7.5) 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(50 mmol/L)稀释至 100 μ L, 35 $^{\circ}$ C 保温 1 h, 测定残余酶活, 确定其稳定的 pH 范围。

最适温度及温度稳定性: 采用 1.2.2 所示的标准酶反应体系, 分别在不同温度下(30–75 $^{\circ}$ C)保温 5 min, 测定阿魏酸生成量, 确定不同温度下重组阿魏酸酯酶的活性及其最适反应温度。将纯化后酶液分别于 40、50、60 $^{\circ}$ C 保温 10–60 min 后, 测定残余酶活, 确定其稳定的温度范围。

金属离子和 EDTA 对重组阿魏酸酯酶活性的影响: 将纯化后酶液分别与不同金属离子(Na^{+} 、 K^{+} 、 Ca^{2+} 、 Fe^{2+} 、 Mg^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Zn^{2+})及 EDTA (终浓度均为 2.0 mmol/L)混匀, 35 $^{\circ}$ C 保温 1 h, 在标准酶反应体系中 50 $^{\circ}$ C 保温 5 min, 测定残余酶活, 以不加金属离子或 EDTA 并经过 35 $^{\circ}$ C 保温 1 h 的酶液为对照(相对酶活 100%), 确定金属离子和 EDTA 对重组阿魏酸酯酶活性的影响。

2 结果与分析

2.1 黑曲霉阿魏酸酯酶基因的克隆和基因优化后合成

以提取的黑曲霉基因组 DNA 为模板, 经重叠延伸 PCR 获得阿魏酸酯酶基因(不含信号肽, 内含子及终止子)琼脂糖凝胶电泳显示在 750 bp 处有一条明显条带(图 1), 测序后基因大小为 780 bp, 与 NCBI 中报道序列(GenBank 登录号: Y09330.2)进行 BLAST 比对, 相似性达 99.64%, 表明获得阿魏酸酯酶基因。

密码子使用频率在线分析(<http://www.kazusa.or.jp/codon>)表明原基因序列中含有毕赤酵母的稀有密码子(使用率均小于 15%), 如 CCG(Pro)、GCG(Ala)、CTC(Leu)、TCG/AGC(Ser)、ACG(Thr)和 CGG/C(Arg)等。然而上述稀有密码子近半数存在于 2–6 个连续密码子簇中, 这势必对目的基因在毕赤酵母中的高效表达造成影响。因此, 对该目的基因

进行偏好密码子优化可能会促进目的蛋白的高效表达。*AnfaeA* 基因 G+C%含量占碱基总量的 54.4%, “随机优化”(AnfaeA-opt I)和“一对一优化”(AnfaeA-opt II)后 G+C%含量分别降到 45.1%和 40.9%, 而 CAI-密码子适应指数由 0.51 升到 0.91, 基本符合毕赤酵母 G+C%含量和 CAI-密码子适应指数(CAI 在 0.8–1.0 内被认为是毕赤酵母高表达范围)特征^[15]。将 3 种目的基因(图 2)合成后连接 pMD19-T 载体保存到大肠杆菌 JM109 中。

2.2 重组表达载体的构建及阳性转化子的筛选

将 3 种带 *EcoR* I 和 *Not* I 酶切位点的目的基因插入表达载体 pPICZ α A 中, 构建了诱导型启动子 AOX1 的重组表达载体 pPICZ α A-AnfaeA (图 3A)、pPICZ α A-opAnfaeA I 和 pPICZ α A-opAnfaeA II。重组质粒经内切酶 *Sac* I 线性化后电转化到毕赤酵母 X-33 中, 将抗性平板上长出的转化子提取酵母基因组进行 PCR 验证, 扩增出正确条带的阳性转化子经过甲醇诱导发酵 3 d 后, 取上清进行阿魏酸乙酯平板的复筛(图 3B), 透明圈的出现表明阿魏酸酯酶表达, 根据透明圈的大小筛选出基因优化前后高酶活菌株各 5 株, 并利用高效液相色谱法测定发酵液中酶活, 得到酶活最高的菌株各一株, 分别命名为 FaeA-ori、FaeA-opt I 和 FaeA-opt II。

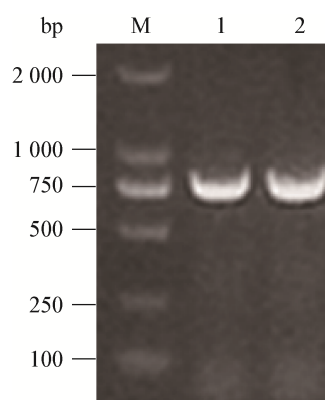


图 1 *AnfaeA* 基因的琼脂糖电泳检测

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of *AnfaeA*

注: M: 标准 DNA marker; 1–2: PCR 扩增阿魏酸酯酶基因。

Note: M: DNA marker; 1–2: PCR products of *AnfaeA*.

FaeA-ori	GCCTCCACGCAAGGCTCTCGGAAGACCTCTACAAATCGCTTGGTAGAGATGGCCACTATCTCCCAAGCGGCTACGGCGGA	80
FaeA-opt-I	GCCTCAACCAAGGTATCAGTGAAGACCTTTACAAACCGATTGGTGGAAATGGCAACTATCAGTCAGGCGAGCATACGGCGGA	80
FaeA-opt-II	GCTTCTACTCAAGGTATTTCTGAAGATCTGTACAAACCGTCTGGTTGAAATGGCCACTATTTCTCAAGCTGCTTACGGTGA	80
FaeA-ori	CCATATGCAATATTCCATCGACTATTATCAAGGAGAGGAAATTTACAACGCTCAAACTGATATCAACGGATGGATCCTCC	160
FaeA-opt-I	TCITTTGTAAACATCCCAAGTACGATTATCAAGGGAGAGAGATATACAACGCTCAGACGGACATTAACGGATGGATATTGA	160
FaeA-opt-II	TTTGTGTAAACATTCATCTACTATTATTAAAGGTGAAAGATTITACAACGCTCAAACTGATATTAACGGTTGGATTTTGA	160
FaeA-ori	GGGACGACACAGCAGCAAGAAATTATACCGTCTTCCGTGGCACTGGCAGTGACAGAAACCTACAGCTCGATACTAACTAC	240
FaeA-opt-I	GGGACGACACATCCAAAGAGATTATTACCGTCTTCCGTGGTACGGGATCTGACACTAACCTGCACTAGACACAAACTAC	240
FaeA-opt-II	GAGATGATAGTAGTAAGGAATTATTACTGTTTTTCCGTGGTACTGGTAGTGATAGTAACCTTCBACTTGATAGTAACACTAC	240
FaeA-ori	ACGCTCACGCCATTGACACTCTACCTCAATGCAACGATTGCGAGGTACACGGTGGATACTATATTGGATGGATCTCAGT	320
FaeA-opt-I	ACCGTGACTCCATTGATAGTACTCTACCAATGTAACGATTGCGAAGTGCACTGGTGGATAGTACATTGGATGGATTTCGGT	320
FaeA-opt-II	ACTCTTACTCCATTGATAGTACTCTTCCCAATGTAACGATTGCGAAGTTACCGGTGGATACTACATTGGTGGATTTCGT	320
FaeA-ori	CCAAAGACCAAGTTCGAGTCGGCTTGTCAAAACACAGGCTAGCCAGTATCCGGACTATCCGGCTTACCGTCAAGGCCATAGTC	400
FaeA-opt-I	ACAGGATCAGGTAGATCCCTGGTTAAACAGCAAGCTTCCCAATATCCGTGATTATGCTCTTACTGTCAACCGGTCAGTCCCT	400
FaeA-opt-II	TCAAAGACCAAGTTGAATCTCTGGTTAAGCAACCAAGCTAGCCAAATACCGAGATTACGCTCTGACTGTTACTGGTCACAGTC	400
FaeA-ori	TGGGAGCGTCGATGGCAGCACTCACTGCCGCCAGCTGCTCCGGCAGCATACGACAAACGTCCTCTGTACACATTCGGCGAA	480
FaeA-opt-I	TGGGAGCTTCAATGGCTGCAATTAACGTCAAGCTCAATTTGTCTGCTACTTATGATATTTGTGAGATTATACACCTTCGGTGAG	480
FaeA-opt-II	TGGCTGCTTCTATGGCTGCTCTGACTGCTGCTCAACTCTCTGCTACTTACGATTAACGTTGCTCTGTACACTTTTGGTGAA	480
FaeA-ori	CCGGGCAGCGGCAACCAAGGCTTCCGGTTCGTACATGAACGATGGGTTCCAGGTCTCGAGCCCGGAGACGACCCAGTACTT	560
FaeA-opt-I	CCTAGATCTGGTAATCAGGCCTTTTGCTTCATACATGAATGACGCCTTTCAGTCTGATCTCCCGAGACCCAGCCAAATACTT	560
FaeA-opt-II	CCACGTAGTGGTAACCAAGCTTTTGCTTCTTACATGAACGATGCTTTTCAAGTTTCTAGTCCAGAACTACTCAATACTT	560
FaeA-ori	CCGGGTCTCTCATTTCAACGACGGGCATCCCAAACTTGCCCGCGGAGCAGGGTTACGGCCATGGTGGTGTGAGTACT	640
FaeA-opt-I	TACAGTCAACCCATTCAAAATGATGGTATTCCAAATTTGCTCCCGCCGACCAAGGTTATGCCCATGGAGGTGTTGAATATT	640
FaeA-opt-II	TCGTGTTACTCACTGTAAAGATGGTATTCCAAACTTGCCACCGCTGAACAAGGTTACGCTACCGGTGGTGTGAATACT	640
FaeA-ori	GGAGCGTTGATCCATTACAGCGCCCAACACCTTTGTCTGTACTGGGGATGAAGTACAGTCTGTGAGGCCACAGGGCGGA	720
FaeA-opt-I	GGICTGTGATCCATTATCTGCTCAGAAATAGTTTGTGCTGCTGAGGGATGAGGTTCAATGTTGTGAAGCCCAAGGCGGT	720
FaeA-opt-II	GGAGTGTGATCCATTACAGTGTCAAAACACTTTTGTGTTGTACTGGTGTGAAGTCAATGTTGTGAAGCTCAAGGTGGT	720
FaeA-ori	CACGGGGTGAATGATGCGCATACTACTTATTTGGGATGACGAGCGGAGCTTGTACTTG	779
FaeA-opt-I	CAGGGGGTTAATGATGCTCAGACTACATATTTGGGATGACAACTGGCGCTTGTACTTG	779
FaeA-opt-II	CAGGGTGTAAAGATGCTCAGACTACTTACTTTGGTATGACTAGTGGTGTGTTGTACTTG	779

图 2 基因优化前后 *AnfaeA* 基因的核苷酸序列Figure 2 Alignment of nucleotide of the optimized and original *AnfaeA* genes

注：阴影部分为相同的核苷酸。

Note: Characters with shadow are the same nucleotides, and others are different ones.

2.3 重组阿魏酸酯酶在毕赤酵母中的表达

用浓度为 1% 的甲醇分别诱导重组毕赤酵母菌株 FaeA-ori、FaeA-opt I 和 FaeA-opt II，每隔 12 h 取样，离心并测定发酵液上清的酶活。如图 4 所示，在发酵 4.5 d 时比酶活最高，FaeA-ori 为 6.8 U/mL，“一对一优化”菌株 FaeA-opt II 酶活为 5.2 U/mL，仅为优化前酶活的 76.5%，但“随机优化”菌株 FaeA-opt I 酶活达到 39.9 U/mL，酶活提高了将近 6 倍。

2.4 重组阿魏酸酯酶的纯化及 SDS-PAGE 分析

经 HisTrapTM excel 色谱柱纯化后，SDS-PAGE 电泳显示约 33 kD 处有明显的单一蛋白条带(图 5)，略高于理论分子量(28 kD)，而阴性对照 pPICZαA/X-33 诱导上清中几乎没有相应的蛋白条带。根据 pPICZαA 载体说明书，目的基因下游酶切位点和 pPICZαA 载体终止子之间含有 His 标签、c-myc 抗体标签和其他酶切位点，蛋白表达后大小将增加

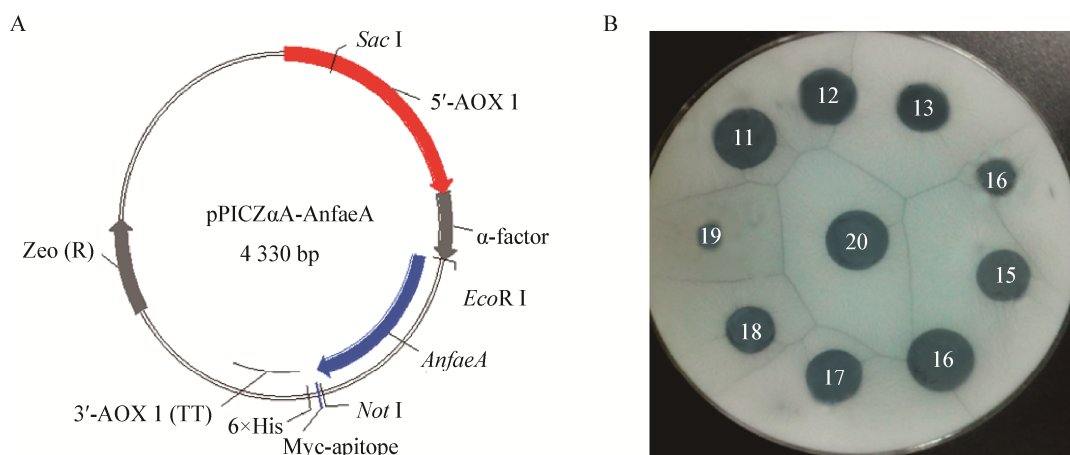


图3 重组载体 pPICZαA-AnfaeA 构建图谱(A)和阿魏酸乙酯平板法检测酶活(B)

Figure 3 pPICZαA-AnfaeA plasmid map (A) and the feruloyl esterase assay of *P. pastoris* transformants (B)

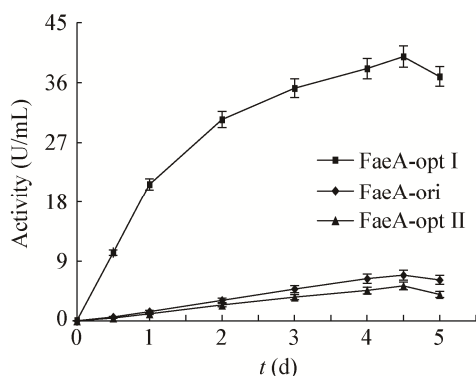


图4 3株重组菌诱导发酵生产阿魏酸酯酶

Figure 4 Fermentation and secretion curve of recombinant AnfaeA from yeast

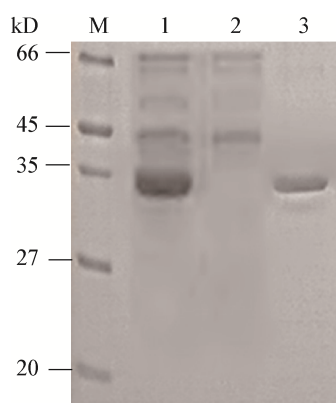


图5 reAnfaeA 分离纯化的 SDS-PAGE 图谱

Figure 5 SDS-PAGE analysis of reAnfaeA

注: M: 标准蛋白 Marker; 1: 重组菌发酵液上清; 2: 空载对照(菌株 pPICZαA/X-33); 3: 纯化后的重组蛋白。

Note: M: Standard protein marker; 1: Fermentation supernatant of recombinant strain; 2: pPICZαA/X-33; 3: Purification of reAnfaeA.

约 2.5 kD。利用在线软件 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)对重组蛋白潜在糖基化位点进行预测,结果表明在氨基酸序列 79–82 位(Asn-Tyr-Thr-Leu)有一个潜在的 N-糖基化位点,重组蛋白在表达分泌过程中可能被糖基化,蛋白质分子量会因 N-糖基化增大 2 kD 左右,从而使其实际分子量较其理论分子量增大约 5 kD。

2.5 重组阿魏酸酯酶的酶学特性研究

如图 6 所示,反应温度在 45–60 °C 范围时,重组阿魏酸酯酶具有较高的酶活,最适温度为 50 °C,高于扩展青霉(37 °C)^[18]和宇佐美曲霉(45 °C)^[19]来源的最适作用温度,当反应温度高于 60 °C 时,酶活较低。重组阿魏酸酯酶在 45–50 °C 范围内较稳定,50 °C 保温 2 h 后,酶活仍保留 50%。当温度高于 55 °C 时,该酶稳定性较差,保温 1 h 后残余酶活不到 20%。

如图 7 所示,重组阿魏酸酯酶在 pH 4.0–6.0 之间有较高的活性,其最适反应 pH 为 5.5,与来自宇佐美曲霉^[19]、泡盛曲霉^[20]的阿魏酸酯酶最适 pH 相似。在 pH 4.5–7.0 范围内,该酶具有较好的稳定性,在酸性范围(pH 3.0–3.5)时稳定性较差,35 °C 保温 1 h,酶活大部分丢失。

通过不同金属离子和 EDTA 的添加考察了其对重组阿魏酸酯酶活性的影响,结果如图 8 所示,金属离子及 EDTA 对重组酶活性影响较小,酶活均能维持在 85%以上,其中 Na⁺、K⁺、Ca²⁺、Mg²⁺、Zn²⁺

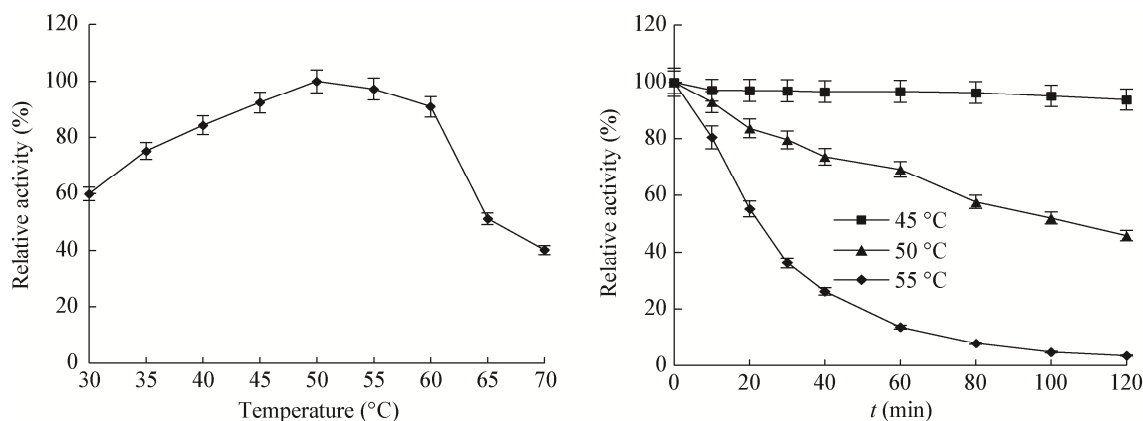


图6 温度对重组阿魏酸酯酶活力的影响及重组阿魏酸酯酶的温度稳定性

Figure 6 Effects of temperature on the activity of recombinant feruloyl esterase and the stability of recombinant feruloyl esterase

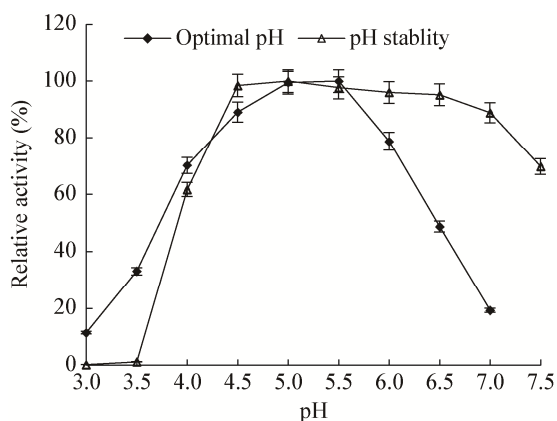


图7 pH对重组阿魏酸酯酶活力及其稳定性的影响

Figure 7 Effects of pH on the activity and stability of recombinant feruloyl esterase

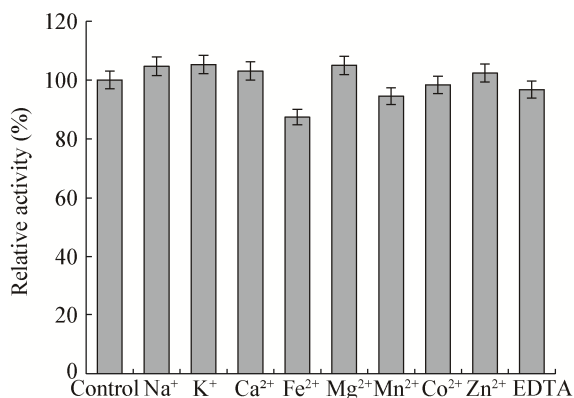


图8 金属离子和EDTA对reAnfaeA酶活力的影响

Figure 8 Effects of various metal ions and EDTA on the activity of the reAnfaeA

对重组酶活性有促进作用,而 Fe^{2+} 、 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 和EDTA对酶活有抑制作用。

3 讨论

阿魏酸酯酶能切断植物细胞壁中酚类物质与多糖之间的共价交联结构,使木质纤维素原料变得疏松,在生物质降解过程有着重要的作用,在食品、造纸、化妆品等行业有广泛的应用前景^[21],但野生菌产量低限制了其在工业生产上的应用,通过基因工程手段实现阿魏酸酯酶的异源表达是解决原始菌发酵产量低的有效途径。毕赤酵母表达系统在密码子使用上的偏好性影响外源基因的表达,尤其是稀有密码子密集区往往成为制约蛋白质翻译速率及表达水平的因素,根据表达宿主的密码子偏好性对外源基因的密码子进行优化是提高其表达量的一种有效方法。

前期报道中,来源于米曲霉和宇佐美曲霉的阿魏酸酯酶未经密码子优化在毕赤酵母中重组表达,重组酶活分别为 2.11 U/mL ^[22]和 10.76 U/mL ^[19],本研究中经密码子“随机优化”的重组阿魏酸酯酶酶活高达 39.9 U/mL ,显著高于前期研究,说明密码子优化对重组蛋白表达的必要性。本研究分别将黑曲霉阿魏酸酯酶基因中毕赤酵母非偏好性密码子进行“随机”或“一对一”替换为偏好性密码子,并将其克隆至表达载体在毕赤酵母中分泌表达,结果显

示, 密码子“随机优化”后的重组酶酶活比未经密码子优化的重组酶酶活提高了近 6 倍, 而“一对一优化”后的重组酶酶活仅为优化前酶活的 76.5%, 表明密码子“随机优化”对黑曲霉阿魏酸酯酶在毕赤酵母中的重组表达更有促进作用。其主要原因在于, 在“随机优化”方法中除了偏好性密码子, G+C%含量、CAI-密码子适应指数、基因序列重叠区的去除等因素均被考虑进去, 而“一对一优化”方法仅以密码子偏好性这一单一因素为标准, 使重组阿魏酸酯酶表达量反而有所降低, 这也为其他来源的基因在毕赤酵母中的密码子优化及重组表达策略提供了借鉴。此外, 本研究中的重组阿魏酸酯酶具有较好的温度和 pH 稳定性, 除 Fe^{2+} 对其有轻微的抑制作用外, 不受金属离子的影响, 说明其可适应工业化生产及应用中的极端环境, 为在饲料和造纸行业等大规模工业化应用奠定了基础。

参 考 文 献

- [1] Kroon PA, Garcia-Conesa MT, Fillingham IJ, et al. Release of ferulic acid dehydrodimers from plant cell walls by feruloyl esterases[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 1999, 79(3): 428-434
- [2] Hu XS, Li XL. Review on cloning, expression, regulation and applications of feruloyl esterase genes[J]. Biotechnology Bulletin, 2009(12): 11-16 (in Chinese)
胡雪松, 李夏兰. 阿魏酸酯酶基因克隆表达调控及其应用进展[J]. 生物技术通报, 2009(12): 11-16
- [3] Faulds CB, Williamson GJ. The purification and characterization of 4-hydroxy-3-methoxycinnamic (ferulic) acid esterase from *Streptomyces olivochromogenes*[J]. Journal of General Microbiology, 1991, 137(10): 2339-2345
- [4] Topakas E, Vafiadi C, Christakopoulos P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases[J]. Process Biochemistry, 2007, 42(4): 497-509
- [5] Zhang SB, Wu ZL. Identification of amino acid residues responsible for increased thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger* using the PoPMuSiC algorithm[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 2093-2096
- [6] Koseki T, Hori A, Seki S, et al. Characterization of two distinct feruloyl esterases, AoFaeB and AoFaeC, from *Aspergillus oryzae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(4): 689-696
- [7] Fazary AE, Hamad HA, Lee JC, et al. Expression of feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* in *Escherichia coli*: characterization and crystal studies of the recombinant enzyme[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(4): 440-444
- [8] Debeire P, Khoun P, Jeltsch JM, et al. Product patterns of a feruloyl esterase from *Aspergillus nidulans* on large feruloyl-arabino-xylo-oligosaccharides from wheat bran[J]. Bioresource Technology, 2012, 119: 425-428
- [9] Fazary AE, Ju YH. Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007, 39(11): 811-828
- [10] Juge N, Williamson G, Puigserver A, et al. High-level production of recombinant *Aspergillus niger* cinnamoyl esterase (FaeA) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. FEMS Yeast Research, 2001, 1(2): 127-132
- [11] Zhang SB, Pei XQ, Wu ZL. Cloning and expression of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger*, and establishment of fast activity detection methods[J]. Chinese Journal of Applied & Environmental Biology, 2009, 15(2): 276-279 (in Chinese)
张帅兵, 裴小琼, 吴中柳. 黑曲霉阿魏酸酯酶 A 的克隆、表达及快速酶活检测体系的建立[J]. 应用与环境生物学报, 2009, 15(2): 276-279
- [12] Huang GR, Tian LC, Huang SP, et al. High expression of codon optimized phytase-encoding gene appA-P in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Hubei University (Natural Science), 2007, 29(3): 290-293 (in Chinese)
黄光瑞, 田丽春, 黄生平, 等. 密码子优化的植酸酶基因 appA-P 在毕赤酵母中的高效表达[J]. 湖北大学学报: 自然科学版, 2007, 29(3): 290-293
- [13] Menzella HG. Comparison of two codon optimization strategies to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*[J]. Microbial Cell Factories, 2011, 10(1): 92-94
- [14] Zhang XL, Lü XL, Shen YN, et al. Four methods of DNA extraction for *Aspergillus niger*[J]. Chinese Journal of Mycology, 2011, 6(3): 145-148 (in Chinese)
张晓利, 吕雪莲, 沈永年, 等. 4 种黑曲霉基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 中国真菌学杂志, 2011, 6(3): 145-148
- [15] Zhao X, Huo KK, Li YY. Synonymous codon usage in *Pichia pastoris*[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2000, 16(3): 308-311
- [16] Zhang SB, Pei XQ, Wu ZL. Multiple amino acid substitutions significantly improve the thermostability of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger*[J]. Bioresource Technology, 2012, 117: 140-147
- [17] Chen YH, Yang JT, Chau KH. Determination of the helix and β form of proteins in aqueous solution by circular dichroism[J]. Biochemistry, 1974, 13(16): 3350-3359
- [18] Donaghy J, McKay AM. Purification and characterisation of a feruloyl esterase from the fungus *Penicillium expansum*[J]. Journal of Applied Microbiology, 1997, 83(6): 718-726
- [19] Gong YY, Yin X, Wu MC, et al. Cloning, expression and enzymatic characterization of feruloyl esterase A from *Aspergillus usami*[J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2013, 32(7): 706-712 (in Chinese)
龚燕燕, 殷欣, 邬敏辰, 等. 宇佐美曲霉阿魏酸酯酶 A 基因的克隆表达及酶学性质研究[J]. 食品与生物技术学报, 2013, 32(7): 706-712
- [20] Koseki T, Takahashi K, Fushinobu S, et al. Mutational analysis of a feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* involved in substrate discrimination and pH dependence[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2005, 1722(2): 200-208
- [21] Huang XY, Zhang L, Li Y, et al. Constitutive expression of feruloyl esterase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*[J]. Microbiology China, 2017, 44(1): 68-78 (in Chinese)
黄雪月, 张梁, 李赢, 等. 黑曲霉阿魏酸酯酶在毕赤酵母中的组成型表达[J]. 微生物学通报, 2017, 44(1): 68-78
- [22] Zeng Y, Gong YY, Wu MC, et al. Gene cloning, expression of a feruloyl esterase and purification of its hydrolysis products[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(3): 425-434 (in Chinese)
曾妍, 龚燕燕, 邬敏辰, 等. 阿魏酸酯酶 A 的基因克隆与表达及其水解产物的纯化[J]. 生物工程学报, 2014, 30(3): 425-434