

漆酶工程菌株的构建及其培养条件的研究

刘卫晓 钞亚鹏 钱世钧*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要 提取产漆酶白腐菌(*Fome lignosus*)的总 RNA,利用 RT-PCR 的方法克隆到漆酶的 cDNA,并将其克隆到表达载体 pPIC9k,重组质粒经线性化、电激转化 *Pichia pastoris* GS115、通过底物显色反应筛选到漆酶生产工程菌株。其中 2[#] 工程菌株产酶活力较高。培养基、培养温度、诱导用甲醇浓度及培养基中铜离子浓度对该菌产酶活力均有一定的影响。在最适条件下(用含 200 μ mol/L Cu²⁺ 的 BMMY 培养基,于 20 $^{\circ}$ C,250r/min;用 0.5% 甲醇诱导)培养至第 6 天时,该菌株产酶活力达到最高(1510U/L)。

关键词 漆酶 工程菌 培养条件

中图分类号 3939.9 文献标识码:A 文章编号 1001-6209(2004)05-0596-04

漆酶(EC1.10.3.2)是一种含铜离子的多酚氧化酶,广泛分布于高等植物(如漆树)和许多真菌中^[1]。漆酶多为分泌型糖蛋白,且一般为单体酶。该酶具有广泛的底物作用范围,可以氧化多种酚类化合物及其衍生物,在助剂(如 ABTS[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiaoline-6-sufonic acid)],2,2'-偶氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸))存在的情况下,还可以氧化降解一些不含酚羟基的酚类类似物。因此,它在许多方面都有着重要的应用价值,如在造纸工业中用于生物漂白及漂白废水的处理,食品工业中防治果汁产生沉淀,制漆工业中用于改善油漆的性能。漆酶制造的生物传感在医药检测、环境污染物监测中的应用等^{2-4]}。要实现上述诸多的实际应用,就必须有廉价的漆酶酶源,但真菌培养时极易被污染,产酶活力不稳定同时其产酶活力相对都较低,这就导致漆酶的工业化生产很难实现。因此在本文中,我们从产生漆酶的原始菌株出发克隆了漆酶的 cDNA,构建了漆酶工程菌株并优化了其培养条件。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌种 表达载体选用 pPIC9k (Invitrogen) 宿主菌:毕赤酵母(*Pichia pastoris* GS115)和大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109;原始菌株:木层孔菌(*Fome lignosus*)由本实验室筛选保存^[5,6]。

1.1.2 培养基:LB,YPD,RDB 琼脂培养基,MD 和

MM 琼脂培养基(含有 25 μ g/mL G418,0.2mmol/L ABTS 和 0.1 mmol/L CuSO₄),BMGY 及 BMM(100mmol/L, pH6.0 的磷酸钾缓冲溶液,1.34% YNB,4 \times 10⁻⁵ 生物素,0.5% 甲醇),BMMY(BMM 中加入 1% yeast extract,2% peptone)培养基(均含有不同浓度的 CuSO₄)。培养基详细配方见文献[9]。

1.1.3 主要试剂和仪器:ABTS[2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiaoline-6-sufonic acid)](Sigma),G418 抗生素(Invitrogen),TRIzol kit (Invitrogen),oligo(dT)₅(Sangon),DEPC(二乙基焦碳酸盐)(Sigma),Super-script reverse transcriptase (Invitrogen),Platinum Taq DNA Polymerase High Fidelity (Invitrogen),EcoR I,Not I,Sac I 和 Bgl II (Promega),PCR 仪(Stratagene),电泳仪(北京六一仪器厂),恒温摇床(New Brunswick Scientific 公司),721 分光光度计和 756MC 紫外分光光度计(上海第三分析仪器厂)。

1.2 工程菌构建

1.2.1 引物设计:根据白腐菌(*Fome lignosus*)中漆酶的 cDNA 序列(由本实验室克隆并注册到 GenBank,the accession number,AY365228)设计下列引物:P_N:5'-GCTAGAAATTCAAAAGAGCTATTGGCCCTGT-3';P_C:5'-TAGCGGCCGCTCACTGCTCAGAAG-3'。

1.2.2 漆酶 cDNA 的克隆:提取 *F. lignosus* 菌丝体总 RNA(TRIzol kit,Invitrogen),以 oligo(dT)₅ 反转录合成 cDNA,RT-PCR 扩增得到漆酶的 cDNA。PCR 反

基金项目 院创新项目(KSCXZ-SW-102-05),传感技术联合国家实验室项目

* 通讯作者。Tel/Fax:86-10-62651598;E-mail:Qiansj@sun.im.ac.cn

作者简介 刘卫晓(1976-),女,河北邯郸人,博士研究生,研究方向为生物化学与分子生物学。E-mail:wxl76@hotmail.com

收稿日期 2004-02-04;修回日期 2004-04-23

应体系和反应条件参见文献 [7]。

1.2.3 构建重组表达载体 将 cDNA 克隆到表达载体 pPIC9k, 重组质粒 pPIC9k-lcc 构建如图 1 所示。

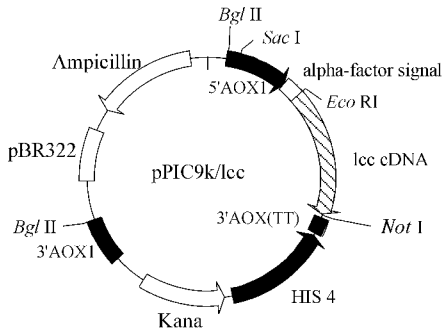


图 1 重组质粒 pPIC9k-lcc 构建图

Fig.1 Construction of the recombinant vector pPIC9k-lcc

1.2.4 工程菌获得 重组表达载体分别经 *Sac* I 和 *Bgl* II 酶切后, 电激转化毕赤酵母 GS115, 筛选阳性转化子。pPIC9k 空质粒分别经酶切后, 电激转化毕赤酵母 GS115, 筛选阳性转化子(只有 G418 抗性, 不产漆酶)作为对照菌株。

1.3 漆酶的表达

用牙签挑取阳性转化子单菌落接种到 BMGY 液体培养基中, 30℃, 250r/min 培养至 OD_{600} 到 2~6; 6000r/min 5min 离心收集菌体, 用 BMM 或 BMMY 悬浮菌体至 OD_{600} 为 1.0, 分别于 20℃ 或 30℃ 培养, 每天补加一定量的甲醇进行诱导, 或于 30℃, 250r/min 培养至 OD_{600} 到 2~6; 6000r/min 5min 离心收集菌体, 用 1/10 体积的 BMMY 培养基悬浮菌体, 于 30℃ 培养, 每天补加一定量的甲醇进行诱导。

1.4 漆酶活性测定

按参考文献 [7] 所述方法。一个酶活单位(U)是指合适条件下, 反应体系中每分钟催化 $1\mu\text{mol/L}$ ABTS 氧化所需的酶量。

1.5 蛋白含量的测定

参考文献 [6] 测定蛋白含量。

2 结果

2.1 工程菌构建和培养

经 RT-PCR 克隆到漆酶的 cDNA(约 1.5kb), *Eco*RI 和 *Not*I 双酶切后, 克隆到表达载体 pPIC9k。重组表达载体分别经 *Sac*I 和 *Bgl*II 酶切线性化、纯化回收后, 电激转化毕赤酵母 GS115。阳性转化子在筛选平板上菌落周围产生蓝绿色菌圈。从这些阳性转化子中, 挑单菌落分别点种在 MM 和 MD 培养基上, 其中转化子 1# 能在两种培养基上生长, 而转

化子 2# 在 MM 培养基上生长状态良好, 而在 MD 培养基上几乎不能生长。分别将两转化子转接至液体培养基于 30℃ 培养, 离心收集菌体转接至 BMMY, 每天用 0.5% 甲醇诱导。两转化子产酶活力如图 2 所示 2# 转化子产酶活力远远高于 1# 转化子。其在第 6 天产酶活力达到最高, 之后产酶活力缓慢下降。对照菌株发酵液中没有检测到漆酶活力, 工程菌表达漆酶的电泳图见图 3。

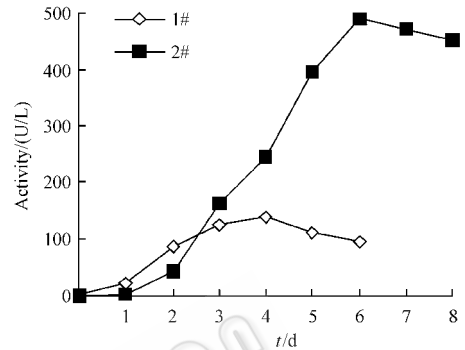


图 2 两转化子 1# 和 2# 产酶活力

Fig.2 Laccase activities (U/L) produced by two laccase-secreting engineered strains

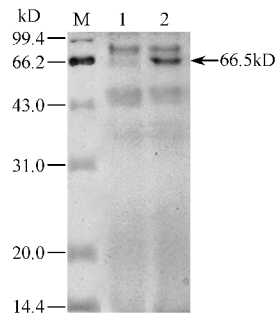


图 3 工程菌表达漆酶的 SDS-PAGE

Fig.3 SDS-PAGE of laccase produced by engineered strain
M. Marker; 1. Protein produced by *P. pastoris* GS115 (pPIC9k); 2. Protein produced by laccase-secreting engineered strain.

2.2 培养基对工程菌(2# 转化子)产酶活力、生物量及培养液 pH 的影响

将工程菌接种至两种不同的液体培养基 BMM 和 BMMY, 用 0.5% 甲醇诱导。该工程菌在两种培养基中产酶活力、生物量(OD_{600})及培养液 pH 变化如图 4 所示。BMMY 培养基中, 工程菌的生物量和产酶活力均显著高于用 BMM 培养。这可能由于 BMM 培养基营养成分相对于 BMMY 较贫乏。图 4 还显示, BMM 中培养液的 pH 随培养时间延长迅速下降, 第 8 天时, 已降至 3.2; 而 BMMY 中培养液的 pH 在整个培养过程中没有明显变化。由于生物量相对较低及培养液 pH 的显著降低使得 BMM 中工程菌产

酶活力较低。

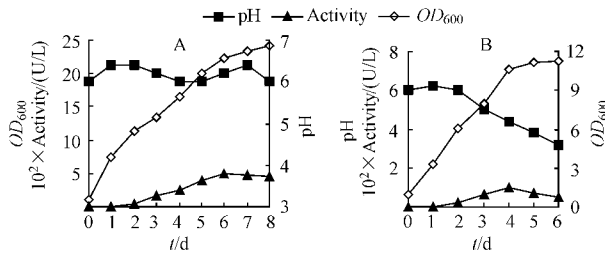


图4 培养基对工程菌产酶活力、生物量及培养液 pH 的影响

Fig.4 The effect of media on the laccase activity, biomass and pH
A: BMMY; B: BMM.

2.3 甲醇浓度对工程菌产酶活力的影响

在培养过程中,用不同浓度的甲醇诱导,工程菌产酶活力如图5所示。在一定的甲醇浓度范围内,随甲醇浓度的增加酶活增加。0.5%的甲醇浓度是最佳的诱导浓度,当其浓度高于0.5%时,随甲醇浓度升高酶活反而降低,当用1.0%甲醇诱导时,该菌产酶活力仅为0.5%诱导时的68.7%。

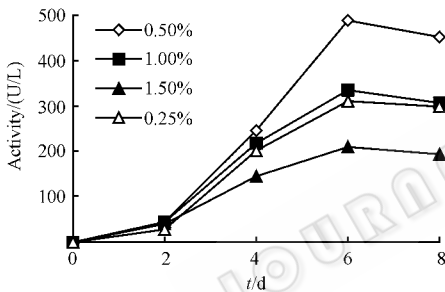


图5 甲醇浓度对工程菌产酶活力的影响

Fig.5 The effect of methanol concentration on the laccase activity produced by laccase-secreting engineered strain

2.4 培养温度对产酶活力的影响

对工程菌的培养温度进行了研究(图6),不同温度培养下的工程菌产酶活力达到最高所需时间也不同。于15℃下培养时,工程菌产酶活力随培养时间的延长逐渐增加,于第8天达到最高。而其他3

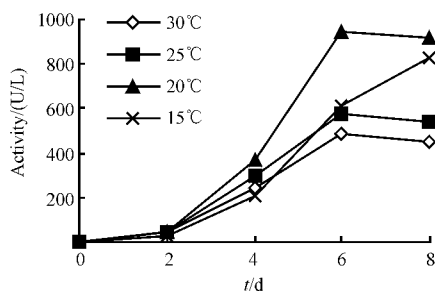


图6 培养温度对酶活力的影响

Fig.6 The effect of temperature on the laccase activity produced by laccase-secreting engineered strain

个温度下,工程菌产酶活力均于第6天达到最高,且20℃培养的工程菌产酶活力显著高于在25℃和30℃培养。

2.5 Cu^{2+} 浓度对产酶活力的影响

将工程菌接种至含不同浓度 Cu^{2+} 的 BMMY 中,于20℃ 250r/min 培养,用0.5%的甲醇诱导,第6天取样研究培养液中铜离子的浓度对酶活力的影响,研究结果如图7所示。当溶液中不加 Cu^{2+} 时,培养液中酶活力非常低,随加入的 Cu^{2+} 浓度增加,酶活力也有所增加。当培养基中加入 $200\mu\text{mol/L}$ 时,培养液中漆酶活力达到最高(1510U/L),测定含不同铜离子浓度发酵液中蛋白含量,计算酶的比活力。图7说明,铜离子的加入并没有改变酶蛋白的含量,而是提高了培养基中酶的活力。漆酶是含铜的多酚氧化酶,铜离子处于酶的活性中心,在漆酶催化底物发生氧化时起着传递电子的作用^[8]。所以,培养基中铜离子浓度对酶活力有很大的影响。

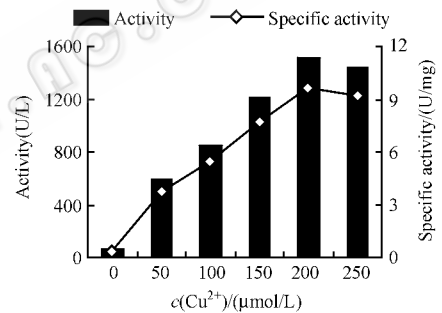


图7 Cu^{2+} 浓度对酶活力和比活力的影响

Fig.7 The effect of copper concentration on the laccase activity and specific activity produced by laccase-secreting engineered strain

3 讨论

构建列的漆酶生产工程菌株,液态发酵实验研究表明,2#工程菌产酶活力远远高于1#工程菌。2#工程菌是经 *Sac I* 酶切表达载体转化酵母得到,其在 MM 培养基上生长状况良好,而在 MD 培养基上几乎不能生长,其甲醇利用表型可能是 $\text{His}^+ \text{Mut}^+$ 型。1#工程菌是经 *Bgl II* 酶切表达载体转化酵母得到,其在 MM 和 MD 两种培养基上均生长良好,可能是 $\text{His}^+ \text{Mut}^s$ 。 $\text{His}^+ \text{Mut}^+$ 型工程菌是线性化的重组质粒,特异性插入到酵母染色体醇氧化酶基因位点上,而 $\text{His}^+ \text{Mut}^s$ 型工程菌是线性化的质粒与酵母染色体发生同源交换重组。由于位点特异性交换比在两个独立位点发生双交换更易于引起多拷贝基因插入,同时适当提高基因剂量在一定程度上,有助于实现外源蛋白的高表达。所以,本研究中得到

的 His⁺ Mut⁺ 型工程菌(即 2[#] 工程菌)产酶活力较高,很可能是因为漆酶基因以多拷贝插入。

研究还探讨了工程菌产酶过程特征和一些影响因素,包括培养基类型、培养温度、诱导用甲醇浓度及培养基中铜离子浓度。在最适条件下,工程菌产酶活力最高达 1.51U/mL,其产酶活力低于原始菌株产酶活力,但工程菌的最适产酶时间。但原始菌株发酵过程中极易污染,而且产酶活力不稳定,工程菌则产酶活力稳定,而且发酵条件易于控制。本文作者还构建了另一组成型表达的漆酶产生工程菌,产酶活力最高为 9.03U/mL^[7]。国外研究者^[9]构建的工程菌产酶活力高低不等(0.6~140U/mL),多数情况下发酵罐培养工程菌产酶活力要远远高于摇瓶试验。所以,为进一步提高漆酶的活力,则需摸索发酵条件或寻找更合适的表达系统提高漆酶的表达活力。

参 考 文 献

[1] Dittmer T K, Patel N J, Dhawale S W, et al. Production of laccase isoform by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol Letters*, 1997, **149**: 65 - 70.

[2] Abadulla E, Tzanov T, Costa S, et al. Decolorization and detoxification of textile dyes with a laccase from *Trametes hirsute*. *Appl Environ Microbiol* 2000, **66**: 3357 - 3362.

[3] Lante A, Crapisi A, Pasini G, et al. Immobilized laccase for must and wine processing. In: Clark D S, Estell D A. eds. *Enzyme Engineering*. New York: The New York Academy of Sciences, 1992, 558 - 562.

[4] Bergbauer M, Eggert C, Kraepelin G. Degradation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the white-rot fungus *Trametes versicolor*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1991, **35**: 105 - 109.

[5] 钞亚鹏, 叶军, 钱世钧. 担子菌组成型漆酶产生特性的研究. *微生物学报* 2000 **40**(6): 628 - 632.

[6] 刘淑珍, 钱世钧. 担子菌漆酶的分离纯化及其性质研究. *微生物学报* 2003 **43**(1): 73 - 78.

[7] Liu W, Chao Y, Liu S, et al. Molecular cloning and characterization of a laccase gene from the Basidiomycete *Fome lignosus* and expression in *Pichia pastoris*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, **63**(2): 174 - 181.

[8] Ducros V, Brzozowski A M, Wilson K S, et al. Crystal structure of the type - 2 Cu depleted laccase from *Coprinus cinnereus* at 2.2 resolution. *Nat Struct Biol*, 1998, **5**: 310 - 315.

[9] Hong F, Meinander N Q, Jansson L J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002 **79**(4): 438 - 449.

Construction and Culture Conditions of Laccase-secreting Engineered Strain

LIU Wei-Xiao CHAO Ya-Peng QIAN Shi-Jun*

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: A cDNA encoding for a laccase was isolated from the white-rot fungus *Fome lignosus* by RT-PCR. It was cloned into the expression vector pPIC9k, and expressed in the *Pichia pastoris* GS115. Laccase-secreting transformants were selected by their ability to oxidize the substrate ABTS [2'-2-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)]. The laccase activity produced by 2[#] engineered strain was higher than the other strain. The type of media, culture temperature, and the concentrations of methanol and copper had significant effects on the laccase-secreting ability of the engineered strain. Under the optimal culture conditions, the highest activity value reached 1510U/L in BMMY medium with 200μmol/L added initially and 0.5% methanol supplemented daily, and the optimal secreting time was the 6th day at 20°C.

Key words: Laccase, Engineered strain, Culture conditions

Foundation item: Chinese Academy of Sciences Especially Fund(KSCXZ-SW-102-05)

* Corresponding author. Tel/Fax: 86-10-62651598; E-mail: Qiansj@sun.im.ac.cn

Received date: 02-04-2004