

平菇漆酶基因在毕赤酵母中的分泌表达及酶学性质研究

张银波^{1,2} 江木兰² 胡小加² 张桂敏¹ 马立新^{1*}

(¹湖北大学分子微生物学与基因工程研究室 武汉 430062)

(²中国农业科学院油料作物研究所 农业部油料作物遗传改良重点开放实验室 武汉 430062)

摘 要 采用 RT-PCR 技术克隆到一个平菇(*Pleurotus ostreatus*)漆酶基因的全长 cDNA,命名为 *lccPo1*,其序列提交 GenBank,登录号为 AY450404。将其 ORF 克隆到毕赤酵母表达载体 pHBM906,转化 3 株毕赤酵母 GS115、KM71 和 SMD1168,该漆酶基因在 3 种毕赤酵母菌株中均实现了分泌表达。3 种摇瓶培养条件:①25℃,1.0%(V/V)甲醇;②20℃,1.0%(V/V)甲醇;③20℃,0.5%(V/V)甲醇,进行比较研究后发现适当提高甲醇浓度有利于漆酶在低温条件下表达,而降低培养温度到 20℃则可以提高漆酶的产量 2~6 倍。3 株重组毕赤酵母在其最适反应条件下测得三者粗酶液最高漆酶酶活分别为 3.19U/mL[GS115(pHBM565)]、2.56U/mL[KM71(pHBM565)]和 2.49U/mL[SMD1168(pHBM565)]。对重组酶进行相关的酶学性质分析表明,三者的最适反应 pH 值约为 4.2,最适反应温度约为 60℃。重组毕赤酵母 GS115(pHBM565)所产酶的热稳定性稍好,在 pH 稳定性方面三者没有太大差异。

关键词 RT-PCR,漆酶基因,毕赤酵母,分泌表达

中图分类号 Q939 文献标识码 A 文章编号 1001-6209(2005)04-0625-05

绿色植物占地球陆地生物量的 95% 以上,其化学物质组成主要是木质素、纤维素和半纤维素,它们占植物干重的比例分别为 15%~20%、45% 和 20%。木质素与半纤维素以共价键形式结合,将纤维素分子包埋在其中,形成一种天然屏障,使相关酶类不易与纤维素分子接触,因此,要彻底降解纤维素,必须首先解决木质素的降解问题,而漆酶则在木质素的降解及其他方面有重要的应用价值。

漆酶(Laccase,EC1.10.3.2)是一种含铜的多酚氧化酶,广泛地存在于各种植物和真菌中^[1]。自从 1883 年首次被发现以来,漆酶一直是生物学、化学和环境科学等领域十分活跃的研究热点,在很多方面有较大的应用价值,比如木质素的降解和纸浆的生物漂白^[2-5]、新型传感器的研制和生物检测^[6,7]、环境污染物的降解^[8-10]、生物燃料电池的阴极反应^[11]、食品饮料中酚类物质的去除^[12]及其他潜在的应用。我国具有十分丰富的漆酶资源,但是我国对漆酶的研究与一些发达国家相比还十分落后,对于漆酶基因的克隆与异源表达研究尤显不足。本文报道了运用 RT-PCR 技术克隆到一个平菇漆酶基因的全长 cDNA,通过测序和 BLAST 比对对其进行了分析鉴定,并探索了其在毕赤酵母中实现高效表达的条件及所产漆酶的酶学性质,为今后其实现工业化生产和实际应用奠定了一定的基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 试剂:限制性内切酶、T4 DNA 聚合酶、T4 DNA 连接

酶、*Ex-Taq* DNA 聚合酶、4 种 dNTP 和 One Step RT-PCR Kit 等均购自 TaKaRa 公司,TRIzol 试剂购自 Invitrogen 公司,DNA 纯化试剂盒购自杭州维特洁公司,ABTS 购自上海 Sangon 公司,其他常规试剂采用进口分装或国产分析纯。

1.1.2 培养基:LB、YEPD、MD、BMGY、BMMY 等培养基见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

1.1.3 菌株和质粒:本实验所用菌株和质粒见表 1。

1.2 平菇菌丝体的培养、诱导及预处理

用接种环挑 1 环平菇试管种接入盛有 25mL PDA 液体培养基的 250mL 三角瓶,置恒温摇床中,28℃、240r/min 振荡培养约 4d,菌丝体足量后加入 250μL 100mmol/L 的 2,5-二甲苯胺诱导漆酶基因的表达,24h 内收集菌体,用 DEPC 处理的 ddH₂O 配制的 PBS 缓冲液清洗 3 次,滤干后迅速置于液氮中冻存 10min,准备抽提总 RNA。

1.3 总 RNA 的抽提和 RT-PCR 扩增

总 RNA 的抽提参照 TRIzol 试剂的操作手册进行。根据已发表的平菇漆酶基因(Z34848.1)设计扩增引物^[13]: primerG: 5'-GTCATGTTTCCAGGCGCACGG-3'; primerH: 5'-GGCCAGGCCTTAGGACGGAACGATG-3'。扩增条件参照 One Step RT-PCR Kit 操作手册,用 PE2400 PCR 仪进行扩增。

1.4 DNA 操作

DNA 的回收、消化、连接和转化参照相应的试剂盒操作手册和文献[14]进行。

基金项目:国家 863 计划(2001AA214161,2002AA227011)

* 通讯作者。Tel/Fax: 86-27-88666349; E-mail: malixin9@hotmail.com

作者简介:张银波(1974-)男,湖北应城人,助理研究员,硕士,从事微生物基因工程方面的研究。E-mail: ybzhang04@yahoo.com

收稿日期:2004-11-02,修回日期:2005-03-18

表 1 供试菌株和质粒

Table 1 Strains and plasmids used in this work

Strains and plasmids	Characteristics	Source
<i>Escherichia coli</i> XL10-Gold	<i>Tet^r</i> , <i>Sup</i> E44 , <i>hsd</i> R17 , <i>rec</i> A1 , <i>end</i> A1 , <i>gry</i> A966 , <i>thi</i> - 1 , <i>rel</i> A1	Purchased from Stratagene
<i>Pichia pastoris</i> GS115	<i>his</i> 4	Purchased from Invitrogen
<i>Pichia pastoris</i> KM71	<i>his</i> 4 , <i>aox</i> 1 : : <i>ARG</i> 4 , <i>arg</i> 4	Purchased from Invitrogen
<i>Pichia pastoris</i> SMD1168	<i>his</i> 4 , <i>pep</i> 4	Purchased from Invitrogen
GS115 (pHBM565)		This work
KM71(pHBM565)		This work
SMD1168(pHBM565)		This work
pMD18-T	<i>Amp^r</i> , <i>puc</i> ori	Purchased from Takara
pHBM505	<i>lccPo</i> 1 cloned in pMD18-T	This work
pHBM906	<i>Amp^r</i> , <i>Kan^r</i> , <i>puc</i> ori , <i>HIS</i> 4 , <i>P_{AOX1}</i> , <i>T_{AOX1}</i>	Stored in this lab
pHBM565	<i>lccPo</i> 1 cloned in pHBM906	This work

1.5 重组毕赤酵母表达载体 pHBM565 的构建和鉴定

回收 RT-PCR 扩增约 1.6kb 的产物 经 T4 DNA 聚合酶处理后与用 *Cpo* I 和 *Not* I 消化好的毕赤酵母表达载体 pHBM906连接 ,转化大肠杆菌 XL10-Gold ,得重组质粒 pHBM565 ,用酶切和 PCR 方法鉴定重组子。

1.6 重组毕赤酵母在底物平板上的诱导表达

毕赤酵母感受态细胞的制备、转化参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册进行。将 MD 平板上生长的 3 株毕赤酵母转化子分别转接适量到 BMGY 平板上 ,28℃培养 2d ,再分别转接适量菌落到 MM 添加 0.2mmol/L ABTS 和 0.1mmol/L CuSO₄ 的底物平板上 ,每 12h 添加适量甲醇进行诱导 ,25℃培养 ,观察其表达情况。

1.7 外源基因在毕赤酵母中的高密度诱导表达^[15]

挑取待表达的重组毕赤酵母单菌落于 BMGY 液体培养基(按≤10%装瓶) ,28℃、280r/min 培养至对数期(*OD*₆₀₀ = 2 ~ 6)。转接 1mL 培养液至 100mL BMGY 液体培养基(按≤10%装瓶) ,28℃、280r/min 摇床培养至对数中期(*OD*₆₀₀ = 20 ~ 30)。室温 4000r/min 离心 5min ,收集菌体 ,去上清 ,细胞沉淀全部转移至 100mL BMMY 液体培养基中 ,采用不同的培养温度 280r/min 摇床培养。每隔 12h 补加 100% 甲醇至适当浓度。从细胞沉淀转至 BMMY 液体培养基诱导开始 ,每隔 24h 取样 1mL 粗酶液分析表达水平。

1.8 蚀刻-PAGE

参照 BIO-RAD 实验手册稍有改动 ,在浓缩胶、分离胶、上样缓冲液和电泳缓冲液中均除去 SDS ,上样缓冲液中不加 β-巯基乙醇 ,蛋白样品不煮沸变性。电泳完毕后 ,将蛋白质分子量标记切下单独用考马斯亮蓝染色 ,而蛋白胶置于含有漆酶底物 ABTS 的磷酸缓冲液中反应显色。

1.9 漆酶酶活力的测定^[16]

用 0.02mol/L ,最适反应 pH 值的磷酸缓冲液制备 0.2mmol/L 的 ABTS 溶液 ,取 490μL 加入 10μL 的粗酶液 ,在最适反应温度反应 10min 后 ,迅速转入冰水中终止反应。稀释

成 2mL ,在 420nm 的波长下快速测定其吸光值。以每 1min 氧化 1μmol ABTS 的酶量作为 1 个酶活力单位(U)。

2 结果

2.1 漆酶基因的 *lccPo*1 的克隆

总 RNA 抽提后 ,甲醛变性胶电泳检测 RNA 的质量 ,符合要求后利用引物 primerG 和 primerH 进行 RT-PCR ,扩增到约 1.6kb 的 DNA 产物 ,与预期的结果相符 ,纯化后克隆到载体 pMD18-T 上(重组质粒命名为 pHBM505) ,送上海博亚公司测序。质粒 pHBM505 所携带的漆酶基因的 cDNA 编码区序列全长为 1599bp ,编码 1 段由 23 个氨基酸残基组成的信号肽和 1 段由 510 个氨基酸残基组成的成熟肽 ,属于多铜氧化酶家族 ,BLAST 比对分析表明该序列与 Marzullo 等发表的平菇漆酶基因(Z34848.1)在氨基酸水平的一致性为 84% ,核苷酸水平的一致性为 93%。该 cDNA 命名为 *lccPo*1 ,其序列提交 GenBank ,登录号为 AY450404。

2.2 重组毕赤酵母表达载体 pHBM565 的构建

回收 RT-PCR 扩增出的目的片段 ,在 12℃、dTTP 存在的情况下用 T4 DNA 聚合酶处理 ,纯化后与经 *Cpo* I 和 *Not* I 消化的毕赤酵母表达载体 pHBM906 连接 ,转化大肠杆菌 XL10-Gold ,重组质粒命名为 pHBM565。利用限制性核酸内切酶 *Bgl* II 单切重组质粒 pHBM565 得到 1 条 9.3kb 的 DNA 条带 ,而用 *Cpo* I 和 *Not* I 双酶切原始载体 pHBM906 则得到大小分别为 7.7kb 和 1.2kb 的两条带 ,均与预期相符。另以 pHBM565 的质粒 DNA 为模板 ,利用引物 primerG 和 primerH 进行 PCR 扩增 ,得到与正对照质粒 DNA 作为模板结果一致的扩增产物 ,由此可以判断上述质粒即为我们所需的 *lccPo*1 在毕赤酵母中的表达载体。

2.3 重组毕赤酵母的筛选

将质粒 pHBM565 用 *Sal* I 部分酶切 ,分别转化毕赤酵母 GS115、KM71 和 SMD1168 3 株宿主菌。各挑取 30 ~ 60 个转化子点接至 BMGY 培养基平板上 ,28℃培养 1 ~ 2d 后 ,转接至

含有 ABTS-CuSO₄ 的 MM 培养基平板上 ,加适量甲醇诱导(每 12h 补加 1 次)48h 后 ,部分菌落周围有明显的墨绿色晕圈出现。于毕赤酵母转化平板上 ,分别从周围出现晕圈的单菌落上挑取适量菌体 ,利用引物 primerG、primerH 进行菌落 PCR ,得到与正对照(pHBM505 质粒 DNA 作为模板)一致的扩增产物 ,说明 *lccPo1* 基因已转入到受体菌。将重组菌株分别命名为 GS115 (pHBM565) KM71 (pHBM565) 和 SMD1168 (pHBM565)。

2.4 重组毕赤酵母的诱导表达

将 GS115 (pHBM565) KM71 (pHBM565) 和 SMD1168 (pHBM565)按高密度摇瓶培养方式分别在 20℃ 和 25℃ 条件下利用不同补加量的甲醇诱导产酶 ,并将不携带漆酶基因的重组毕赤酵母菌株 GS115(pHBM906) KM71(pHBM906)和 SMD1168(pHBM906) 种宿主菌同步诱导作为产酶的本底对照 ,与对应的重组菌株同时取样分析 ,经 ABTS 法测定所产漆酶酶活。由于 3 株重组酵母在不同的培养条件下产酶结果相似 ,下面仅以 GS115(pHBM565)为例进行报道。

2.4.1 培养温度对诱导产酶酶活的影响 :在培养温度为 25℃、甲醇补加量为 1.0% 的条件下 GS115 (pHBM565)在诱导的第 9 天所产酶酶活达最高值 0.91U/mL ;在培养温度为 20℃、甲醇补加量为 1.0% 的条件下 ,GS115 (pHBM565)在诱导的第 10 天所产酶酶活达最高值 3.19U/mL(图 1)。将诱导所产酶的粗酶液经蚀刻-PAGE 分析表明有明显表达的具有漆酶活性的墨绿色蛋白带(图 2)。

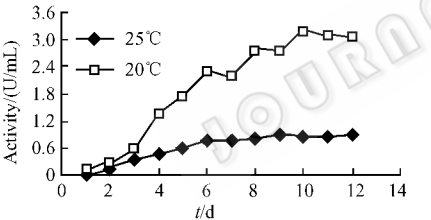


图 1 GS115(pHBM565)在不同温度下的诱导产酶曲线
Fig.1 Curve of enzyme production of GS115(pHBM565) under different temperature

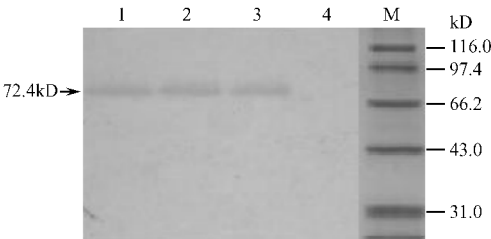


图 2 重组毕赤酵母 PAGE-ABTS 检测

Fig.2 Test of recombinant *P. pastoris* by PAGE-ABTS
1. *LCCPo1* secreted by GS115(pHBM565) 2. *LCCPo1* secreted by KM71 (pHBM565); 3. *LCCPo1* secreted by SMD1168(pHBM565); 4. No *LCCPo1* secreted by GS115(pHBM906); M. Low range protein molecular weight marker.

2.4.2 在 20℃ 培养条件下甲醇补加量对诱导产酶酶活的影响 :在甲醇补加量为 0.5% 的条件下 GS115 (pHBM565)在诱

导的第 12 天所产酶酶活达最高值 2.80U/mL ;在甲醇补加量为 1.0% 的条件下第 10 天所产酶酶活达最高值 ,为 3.19U/mL (图 3)。

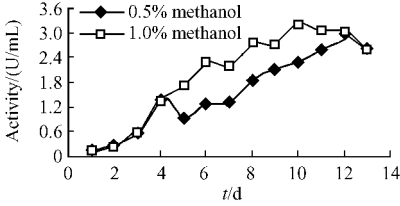


图 3 GS115(pHBM565)不同甲醇补加量的诱导产酶曲线
Fig.3 Curve of enzyme production of GS115(pHBM565) induced by methanol with different concentrations

2.4.3 在 25℃ 培养条件下不同甲醇补加量对诱导产酶酶活的影响 :在甲醇补加量为 0.5% 的条件下 GS115 (pHBM565)在诱导的第 9 天所产酶酶活达最高值 0.94U/mL ;在甲醇补加量为 1.0% 的条件下 ,第 9 天产酶达最高值 0.91U/mL(图 4)。

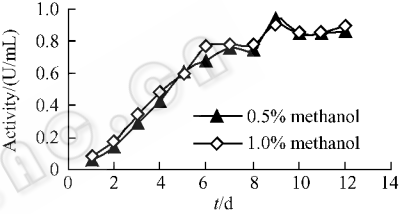


图 4 GS115(pHBM565)不同甲醇补加量的诱导产酶曲线
Fig.4 Curve of enzyme production of GS115(pHBM565) induced by methanol with different concentrations

2.5 重组漆酶酶学性质分析

分别用 pH2.2、pH3.0、pH4.0、pH5.0、pH6.0、pH7.0、pH8.0 的磷酸缓冲液配制 ABTS 漆酶底物 ,在 60℃ 反应温度下测定 3 株重组毕赤酵母诱导所产酶粗酶液经硫酸铵 (45% 饱和度) 初步纯化后的酶活 ,测得其最适反应 pH 值均约为 4.2 ;用 pH4.2 的磷酸缓冲液配制漆酶反应底物 ,分别在 30℃、40℃、50℃、60℃、70℃、80℃ 测定酶活力 ,测得其最适反应温度均约为 60℃。

取 3 株重组毕赤酵母诱导所产粗酶液 ,经硫酸铵(45% 饱和度) 初步纯化后分成若干等份 ,并分别调节 pH 值为 2.2、3.0、4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0、10.6 ,同时取自然 pH 值的酶液作参照 ,在 4℃ 保存 36h 后调节其 pH 值与自然 pH 值相同 ,在其最适反应条件下分别测定酶活 ,测得在 pH4.0 ~ 10.0 的范围内 GS115(pHBM565) KM71(pHBM565) 和 SMD1168(pHBM565) 所产酶的稳定性较好 ,酶活基本都在 80% 以上 ,其中在 pH9.0 的缓冲条件下所保存的 3 种酶液其酶活均超过自然 pH 值条件下所保存的酶液。

将 3 株重组毕赤酵母诱导所产粗酶液经硫酸铵(45% 饱和度) 初步纯化后 ,在其最适反应温度 60℃ 保温 ,每隔 30min 取样 ,在其最适反应条件下测定其酶活 ,测得 GS115 (pHBM565) 所产酶在其最适反应温度 60℃ 保温 75min 后丧失了约 50% 的活性 ,随后酶活缓慢下降。KM71(pHBM565) 和 SMD1168(pHBM565) 所产酶在其最适反应温度 60℃ 保温

40min 后丧失约 50% 的活性, 随后酶活缓慢下降。

3 讨论

本研究所克隆的平菇漆酶基因 *lccPo1* 在 3 株毕赤酵母 GS115、KM71 和 SMD1168 中均实现了分泌表达。其最高酶活分别为 3.19U/mL [GS115 (pHBM565)], 2.56U/mL [KM71 (pHBM565)], 2.49U/mL [SMD1168 (pHBM565)]。这一结果离国际上所报道的漆酶基因在毕赤酵母中摇瓶培养的最高酶活 11.5 U/mL^[17] 还有一定的差距, 但是在利用 BMMY 培养基的情况下这一结果是最高的。

从漆酶基因在毕赤酵母中的表达情况看来 (1) 诱导时的培养温度对重组毕赤酵母的产酶酶活有重要影响。培养温度对于漆酶基因在酵母中的表达是一个十分重要的参数, Cassland 等^[18] 曾报道漆酶基因在啤酒酵母中异源表达时通过将培养温度降低至 19℃ 使漆酶酶活提高了约 5 倍, 同时也显示在毕赤酵母中表达漆酶基因培养温度为 16~19℃ 时比 28℃ 时产酶量要高得多。本研究中诱导摇瓶培养时在甲醇补加量同为 1.0% 的情况下, 培养温度为 20℃ 时诱导所产酶的最高酶活比 25℃ 时高 2~6 倍, 而且摇瓶培养周期也相对缩短 2~3d (图 1、3)。可能的解释有以下几种: ① 漆酶是一个热稳定性不高的酶, 降低培养温度有利于提高其在摇瓶培养过程中的稳定性; ② 降低培养温度一方面可以减弱毕赤酵母内源蛋白酶的分泌, 减少死细胞蛋白酶的释放, 另一方面也可以降低蛋白酶的反应活性, 从而减少蛋白酶对漆酶蛋白的降解; ③ 可能与重组漆酶肽链的正确折叠有关, 由于低温培养时细胞的生长速率减慢, 蛋白质的合成速率减慢, 使得系统具有足够的时间进行翻译后加工修饰和漆酶肽链的正确折叠^[9]。本实验室在进行植酸酶和木聚糖酶的工程毕赤酵母菌株摇瓶培养时, 将培养温度从 30℃ 降低至 25℃ 同样也提高了产酶酶活, 因此适当的降低培养温度对提高外源基因在毕赤酵母中的表达量是有益的。(2) 诱导时的甲醇补加量也对重组毕赤酵母的产酶酶活有重要影响。1.0% 的甲醇补加量诱导产酶最高酶活比 0.5% 稍高, 且摇瓶培养周期缩短, 同时发现甲醇补加量对诱导产酶的影响与培养温度有很大的关系。在 20℃ 诱导时 1.0% 的甲醇补加量诱导产酶酶活比同期的 0.5% 的甲醇补加量普遍增高, 摇瓶培养周期缩短。但在 25℃ 诱导时上述两种甲醇补加量条件下的产酶则没有显著的差别, 其同步性非常好。可能原因是相对于培养温度而言甲醇补加量 ($\leq 3.0\%$ 的情况下) 对酵母生长速率的影响要小得多, Feng 等^[17] 的研究结果表明在培养温度为 30℃ 时, 甲醇补加量在 0.5%~2.0% 的范围内毕赤酵母的生长速率基本相同, 而在培养温度为 20℃ 时甲醇补加量为 1.0% 时毕赤酵母的生长速率则是甲醇补加量为 0.5% 时的 2 倍, 可能是毕赤酵母的生长速率制约了其生物量, 进而影响了漆酶的产量。

从工程酶的酶学性质来看, 3 株重组毕赤酵母所产重组漆酶的最适反应 pH 值均为 pH4.2, 最适反应温度均为 60℃, 表现出很好的一致性。在 pH 值的稳定性方面, 在 pH4.0~

10.0 范围内 3 种重组毕赤酵母所产酶均保持了 80% 以上的活性, 而在热稳定性方面则重组毕赤酵母 GS115 (pHBM565) 所产酶要明显优于另外两种, 前者在最适反应温度 60℃ 下经过 80min 还能保持 50% 以上的活性, 而后两者则经过 40min 后即丧失了 50% 的活性。可能是由于 Mut⁺ 型重组毕赤酵母 KM71 (pHBM565) 和 SMD1168 (pHBM565) 在高密度摇瓶培养条件下对重组漆酶的翻译后加工修饰不完全或者是影响了其空间构象的正确折叠造成的, 而对于 Mut⁺ 型重组毕赤酵母 GS115 (pHBM565) 来说则影响要小得多。

本实验的研究结果表明与传统的毕赤酵母摇瓶培养策略 (培养温度为 30℃, 甲醇补加量为 0.5%) 相比, 适当的降低培养温度和提高甲醇补加量可以大幅度地提高漆酶在毕赤酵母中的表达量, 同时本实验室所进行的植酸酶和木聚糖酶在毕赤酵母中的表达情况也与上述结论相符, 但是, 此结论能否外推尚需进一步验证。

参考文献

- [1] Reinhammar B. Kinetic studies on Polyporus and tree laccases. In: Messerschmidt A. ed. Multi-copper oxidase. Singapore: World Scientific, 1997, 167-200.
- [2] Nurdan K P, Merih S, Azmi T. Laccase: production by *Trametes versicolor* and application to denim washing. *Process Biochemistry*, 2005, 40(5): 1673-1678.
- [3] Cécile S, Susana C, Teresa V, et al. Comparison of different fungal enzymes for bleaching high-quality paper pulps. *Journal of Biotechnology*, 2005, 115(4): 333-343.
- [4] Sigoillot C, Record E, Belle V, et al. Natural and recombinant fungal laccases for paper pulp bleaching. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2004, 64(3): 346-352.
- [5] Record E, Asther M, Sigoillot C, et al. Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, 62(4): 349-355.
- [6] Gomes S A S S, Nogueira J M F, Rebelo M J F. An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 20(6): 1211-1216.
- [7] Fabio V, Antonio C, Santa R, et al. A high sensitivity amperometric biosensor using a monomolecular layer of laccase as biorecognition element. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 20(2): 315-321.
- [8] Olivier P, Etienne V, Catherine R. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by *Cladosporium sphaerospermum* isolated from an aged PAH contaminated soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 2004, 51(1): 71-78.
- [9] Atef J, Francisco G, Michel J P, et al. Role of *Pycnoporus coccineus* laccase in the degradation of aromatic compounds in olive oil mill wastewater. *Enzyme and Microbial Technology*, 2005, 36(4): 478-486.
- [10] Rigas F, Dritsa V, Marchant R, et al. Biodegradation of lindane by *Pleurotus ostreatus* via central composite design. *Environment International*, 2005, 31(2): 191-196.

- [11] Katz E , Filanovsky B , Willner I . A biofuel cell based on two immiscible solvents and glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-functionized electrodes . *New J Chem* , 1999 , **23** :481 – 487 .
- [12] Servili M , De Stefano G , Piacquadio P , *et al.* A novel method for removing phenols from grape must . *Am J Enol Viticulture* , 2000 , **51** :357 – 361 .
- [13] Giardina P , Aurilia V , Cannio R , *et al.* The gene , protein and glycan structures of laccase from *Pleurotus ostreatus* . *Eur J Biochem* , 1996 , **235** (3) :508 – 515 .
- [14] Sambrook J , Russell D W . Molecular Cloning : A Laboratory Manual . 3rd ed . Cold Spring Harbor Laboratory Press 2001 .
- [15] Li A , Crimmins D L , Luo Q , *et al.* Expression of a novel regenerating gene product , Reg IV , by high density fermentation in *Pichia pastoris* : production , purification , and characterization . *Protein Expr Purif* , 2003 , **31** (2) :197 – 206 .
- [16] Brian S W , Robin L W . Radical-cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions : pulse radiolysis studies of 2 ,2 '-Axinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) . *J Chem Soc Perkin Trans II* , 1982 , 805 – 812 .
- [17] Feng H , Nina Q M , Leif J J . Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris* . *Biotechnology and Bioengineering* , 2002 , **79** (4) :438 – 449 .
- [18] Cassland P , Jönsson L J . Characterization of a gene encoding *Trametes versicolor* laccase A and improved heterologous expression in *Saccharomyces cerevisiae* by decreased cultivation temperature . *Appl Microbiol Biotechnol* , 1999 , **52** :393 – 400 .

Expression of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme

ZHANG Yin-bo^{1,2} JIANG Mu-lan² HU Xiao-jia² ZHANG Gui-min¹ MA Li-xin^{1*}

(¹ Molecular Microbiology Lab Hubei University , Wuhan 430062 , China)

(² Oil Crops Research Institute , Chinese Academy of Agricultural Sciences , Wuhan 430062 , China)

Abstract : A *Pleurotus ostreatus* laccase gene was cloned by RT-PCR and designated as lccPo1. Its sequence was submitted to GenBank with the accession number AY450404 obtained. The open reading frame was transformed into three *Pichia pastoris* strains GS115 , KM71 and SMD1168 , respectively , under control of the *AOX1* promoter by using the vector pHBM906. *LCCPo1* can be expressed by all three *P. pastoris* recombinant strains. Three different strategies for shake-flask cultures were compared : ① (25℃ , 1.0% methanol) , ② (20℃ , 1.0% methanol) , ③ (20℃ , 0.5% methanol). The laccase activity could be improved by increasing the methanol concentration befittingly. The results showed that the cultivation temperature had a marked effect on the production of active heterologous laccase. 2 ~ 6 folds higher laccase activities were obtained when the cultivation temperature was kept at 20℃ instead of 25℃ . The highest activities , 3.19U/mL [GS115 (pHBM565)] , 2.56U/mL [KM71 (pHBM565)] , and 2.49U/mL [SMD1168 (pHBM565)] , were gotten when the induction were performed at 20℃ with 1.0% (V/V) methanol supplied. The temperature and pH optimum for the recombinant laccase produced by three strains were 60℃ and pH4.2 , respectively .

Key words : Laccase gene , RT-PCR , *Pichia pastoris*