



蓝状菌(*Talaromyces leycettanus* JCM12802)高温果胶甲酯酶 PmeT 在毕赤酵母中的高效表达及酶学性质

华婷¹, 李雅楠², 王凯凯¹, 涂涛¹, 黄火清^{1*}, 罗会颖¹, 姚斌¹

¹ 中国农业科学院饲料研究所, 北京 100081

² 广州医科大学-中国科学院广州生物医药与健康研究联合生命科学学院, 广东 广州 510006

摘要:【目的】在毕赤酵母中高水平表达蓝状菌(*Talaromyces leycettanus* JCM12802)来源的高温果胶甲酯酶, 并对其进行酶学性质研究, 具有高催化效率的高温果胶甲酯酶有望能广泛应用于低甲氧基果胶的生产, 优化生产工艺, 提高转化率, 降低生产成本。【方法】利用 RT-PCR 的方法, 以蓝状菌(*T. leycettanus* JCM12802)总 RNA 为模板, 克隆得到果胶甲酯酶基因(*PmeT*)的 cDNA。将其插入表达载体 pPIC9K, 并转化毕赤酵母(*Pichia pastoris*)菌株 GS115, 高活性的阳性转化子进行高密度发酵研究。【结果】重组酵母的果胶甲酯酶表达水平达到 428 U/mL, 并进一步鉴定了重组果胶甲酯酶的酶学性质。该酶的最适反应温度为 75 °C, 且在 85 °C 以下具有较好的热稳定性。最适反应 pH 为 4.0, 在 pH 2.0–7.0 之间有良好的稳定性。【结论】用重组毕赤酵母可高效表达蓝状菌来源的高温果胶甲酯酶, 为其今后在工业上的应用奠定了基础。

关键词: 果胶, 果胶甲酯酶, 高温真菌, 毕赤酵母

果胶是由不同酯化程度的多聚半乳糖醛酸以 α -1,4-糖苷键聚合而成的带负电荷的复杂高分子多糖, 其侧链还连有鼠李糖、阿拉伯糖、半乳糖等多种碳水化合物, 其分子量通常为 50000–300000^[1]。作为自然界中目前唯一报道的酸性带负电荷的多糖类物质, 果胶具有良好的增稠、胶凝、乳化等作用, 已被广泛应用于药品、食品、印刷、日用

化妆品等各个领域。

目前果胶的生产主要从柑橘皮、甜菜渣等植物中提取^[2], 通常从自然界中直接获得的果胶主要为高甲氧基果胶, 而相比于高甲氧基果胶, 低甲氧基果胶具有凝胶条件简单、容易调节操作、成胶几乎不需要蔗糖等优点, 使其具有重要的应用前景。我国生产低甲氧基果胶的技术主要是化学

基金项目: 国家高技术研究发展计划(2014AA021301)

*通信作者。E-mail: huanghuoqing@caas.cn

收稿日期: 2017-02-09; 修回日期: 2017-03-16; 网络出版日期: 2017-04-11

方法, 此法会造成环境极大污染。与传统化学法相比, 酶法是利用果胶甲酯酶将高甲氧基果胶脱脂转化生产低甲氧基果胶, 具有环保、条件温和、产品质量高和低成本等优点^[3]。但该技术尚处于起步阶段, 主要由于: 一方面目前已报道的果胶甲酯酶热稳定性差, 催化效率低不能满足生产工艺的需求; 另一方面, 果胶甲酯酶表达量低, 价格高昂也严重限制了它在低甲氧基果胶生产中的应用。

果胶甲酯酶(Pectin methylesterase, PME, EC 3.1.1.11)属于碳水化合物酯酶第 8 家族的羧酸酯酶, 对甲酯化程度较高的果胶有最高酶活, 能高效催化果胶的甲氧酯水解, 生成甲醇和果胶酸^[4]。PME 在生物界中的分布很广泛, 细菌、真菌、植物, 甚至昆虫中都有发现^[5]。大多数果胶甲酯酶的分子量为 35–50 kDa, 最适 pH 为 4.0–8.0 之间, 最适温度为 40–50 °C^[6]。通常情况下, 真菌来源的 PME 对底物的特异性有着更广的适应范围, 以一种随机的方式降解果胶甲基。而植物的 PME 属于多基因家族, 能够线性作用于半乳糖醛酸链以产生游离的羧基^[4]。工业上, 果胶甲酯酶除了用于低甲氧基果胶的生产, 还可以应用于食品、化妆品和制药行业等^[7]。

本研究选用毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统, 克隆表达了一株来自于耐热菌蓝状菌 *T. leycettanus* JCM12802 的 *PmeT* 基因。重组表达的果胶甲酯酶(r-PmeT)最适反应温度为 75 °C, 且在 85 °C 以下具有较好的热稳定性; 最适反应 pH 为 4.0, pH 2.0–7.0 时有较好的稳定性; 发酵液表达效价高达 428 U/mL, 是用于酶法生产低甲氧基果胶的最好候选者之一, 为 PME 的产业化奠定了基础。其优越的性质也为扩充 PME 的应用范围和工业前景提供了可能。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒: 蓝状菌 *T. leycettanus* JCM12802 菌株购自日本微生物保藏中心(JCM RIKEN BRC)。用于基因克隆的大肠杆菌 *Escherichia coli* Trans-T1 和质粒 pEASY-T3 均购自北京全式金生物公司。*P. pastoris* GS115 菌株和 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 主要试剂和仪器: 实验所用的限制性内切酶购自 TaKaRa 公司; 真菌 DNA 提取试剂盒, 质粒提取和胶回收试剂盒购自 Omega 生物公司; SV 总 RNA 纯化系统和 cDNA 合成试剂盒购自 TOYOBO (Tokyo, Japan); 蛋白质 Marker, FastPfu DNA Polymerase 购自全式金公司; 其他试剂均为国产分析纯。PCR 仪购自伯乐公司(BioRad), 离心机购自日立(HITACHI)公司, 小型发酵罐购自瑞士比欧(Bioengineering AG)。

1.1.3 培养基和培养条件: 大肠杆菌培养基 LB、酵母生长培养基 YPD、转化培养基 MD 以及诱导表达培养基 BMGY、BMMY、发酵培养基 10×Basal Salts、微量盐溶液 PTM1 均根据 Invitrogen 公司操作手册配制。

1.2 果胶甲酯酶基因 *PmeT* 的克隆

耐热真菌蓝状菌 *T. leycettanus* JCM12802 已由上海美吉公司完成基因组的草图测序, 经注释分析其中含有一个典型的果胶甲酯酶基因 *PmeT*。采用 GENSCAN 软件 (<http://genes.mit.edu/GENSCAN.html>)和 SignalP 4.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)分别预测分析了 *PmeT* 基因的内含子、外显子, 以及其蛋白的信号肽序列, 根据分析结果设计了用于扩增 *PmeT* 基因成熟蛋白编码区的一对扩增引物 PmeT-12802-F: 5'-GCGCGAATTCGCAAG

TCGAATAACTGCCCCAGCTG-3'; PmeT-12802-R: 5'-GCAGGCGGCGCCTAAGAGAGATAGCTCG TATCGACC-3' (下划线显示的酶切位点 *EcoR* I 和 *Not* I)。

为了获得 *PmeT* 基因的 cDNA 序列, 将 *T. leycettanus* JCM12802 菌株在黄豆粉培养基中 45 °C 培养 3–5 d, 收集菌丝并在液氮中研磨成细粉, 用 SV 总 RNA 纯化系统提取总 RNA, 并用 TOYOBO 反转录试剂盒合成 cDNA 第一条链。以此为模板, 用引物 PmeT-12802-F 和 PmeT-12802-R 进行 PCR 扩增, 产物经纯化回收连接到载体 pEASY-T3 上, 并转化至 *E. coli* Trans-T1 菌株中测序。

1.3 果胶甲酯酶基因 *PmeT* 的序列分析

基因的序列特征分析主要通过 Vector NTI Advance 10 软件(Invitrogen)进行, 一致性及新颖性分析通过 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast/>)进行比对。酶蛋白的特征修饰如信号肽、糖基化位点、定位信号等均采用在线分析(<http://www.cbs.dtu.dk/services/>)完成。蛋白的多序列比对通过 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalW/>)软件实现。

1.4 重组表达质粒的构建、转化与筛选

将测序正确的 *PmeT* 基因和质粒 pPIC9K 同时用 *EcoR* I 和 *Not* I 进行双酶切, 分别胶回收基因和载体片段, 然后过夜连接, 转化 *E. coli* Trans1 感受态细胞, 涂布于 LB 氨苄抗性平板培养过夜, 挑取单菌落进行菌落 PCR 验证, 验证正确的克隆于 25 mL 氨苄抗性的 LB 液体培养基中培养 12 h 左右, 抽提质粒测序验证, 得到正确的重组表达载体并命名为 pPIC9K-PmeT。

采用 *Bgl* II 酶切表达载体 pPIC9K-PmeT 对其

线性化, 电转化至毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 用 1 mol/L 的山梨醇重悬并涂布于 MD 平板, 30 °C 培养 3 d 至长出单菌落。随机挑取大量转化子直接转移到高浓度 G418 (600 µg/mL) 的 YPD 平板, 30 °C 培养 1 d。

挑选 10 个能在高浓度 G418 平板上生长迅速的单菌落接种于 3 mL BGMYP 培养基中 30 °C 生长 2 d, 离心收集细胞, 换入 1 mL BMMYP 培养基 30 °C 诱导培养 2 d。对诱导上清液进行的果胶甲酯酶的酶活, 从中筛选出果胶甲酯酶活性高的转化子。

果胶甲酯酶活性测定方法为 NaOH 滴定法^[8]。反应体系包括 1 mL 恰当稀释的酶液和 25 mL 0.1% (W/V) 橘皮果胶(pH 5.0), 底物中加入 NaCl 至终浓度为 117 mmol/L, 40 °C 反应 10 min。反应体系通过 20 mmol/L NaOH 溶液自动滴定, 保持一定的 pH。单位酶活(U)的定义如下: 上述标准条件下, 每分钟释放 1 µmol 酸所消耗的酶量。

1.5 发酵罐水平果胶甲酯酶的表达及活性测定

选取摇床水平果胶甲酯酶活性高的转化子, 对其在发酵罐条件下进行果胶甲酯酶的表达。重组酵母的发酵为高细胞密度补料发酵, 发酵过程分为菌株培养阶段、碳源饲喂阶段和诱导表达阶段, 具体方法见 Invitrogen 操作手册。发酵过程分为 4 个阶段。(1) 菌株培养阶段: 发酵培养基 10×Basal Salts 接种前首先加入氨水使培养基的 pH 达到 5.0 (氨水同时也作为菌株生长的氮源), 再按每升培养基加 4.37 mL 的量加入 PTM1。5%–10% 接种种子液, 通气搅拌培养 18–24 h; (2) 碳源添加阶段: 流加 25% 葡萄糖(每升中含 12 mL PTM1), 流加量为 36 mL/(h·L), 培养 4 h。(3) 碳源-甲醇混合添加阶段: 流加 25% 葡萄糖: 甲醇(8:1) 培养 4 h,

流加量为 9 mL/(h·L)。(4) 诱导表达阶段: 加入诱导剂甲醇(每升中含 12 mL PTM1), 使甲醇终浓度维持在 0.3%。在诱导过程中每隔 24 h 取样 1 次测定表达的果胶甲酯酶的活性, 并同时进行 SDS-PAGE, 监测表达量的累积情况。

1.6 重组果胶甲酯酶 r-PmeT 的纯化

下罐的发酵培养液首先经过 4 °C、8000 r/min 离心 15 min, 然后通过 0.2 μm 孔径的中空纤维膜组件(天津膜天膜公司)进行除菌处理, 得到无菌无溶杂质的发酵液。其次利用 6 kDa 的 Vivaflow 超滤膜包(Vivascience, Hannover, Germany)对发酵液进行浓缩, 浓缩液用 30%–80%的硫酸铵分级沉淀, 室温下 12000 r/min 离心 20 min, 沉淀物用 20 mmol/L 柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(pH 6.5)重悬。

粗酶液用 5 mL HiTrapTM 脱盐柱进行脱盐处理, 进一步用预先经缓冲液平衡的 HiTrap Q Sepharose XL 5 mL FPLC 柱子(GE Healthcare, Uppsala, Sweden)进行纯化, 洗脱液使用同种缓冲液, NaCl 浓度从 0–1.0 mol/L 呈线性梯度递增, 流速控制在 1.0 mL/min。有果胶甲酯酶活性的洗脱液通过 12% SDS-PAGE 验证。蛋白浓度以牛血清白蛋白为底物利用蛋白定量试剂盒(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)测定。

1.7 重组果胶甲酯酶 r-PmeT 酶学性质的测定

分别配制 pH 3–7 的不同 pH 的底物, 并用不同 pH 的缓冲液稀释 r-PmeT, 在 40 °C 的条件下反应 10 min, 测定纯化的 r-PmeT 在不同 pH 条件下的果胶甲酯酶活力, 并绘制 pH 对重组果胶甲酯酶 r-PmeT 的影响曲线。最适 pH 条件反应 10 min, 分别测定 20–90 °C 不同温度下的酶活力, 绘制温度对重组果胶甲酯酶 r-PmeT 的影响曲线; 将 r-PmeT 在 65、75、85 °C 下保温不同时间(2、5、

10、20、30、60 min)测定剩余相对酶活力, 绘制温度稳定性曲线。在酶促反应体系中加入不同的金属离子和化学试剂, 终浓度为 1 mmol/L, 在最适反应条件下测定果胶甲酯酶相对酶活力。

分别配制 0.1%、0.2%、0.4%、0.5%、0.6%、0.8%、1.0%浓度的底物, 在酶反应最适条件下反应 1 min, 根据反应曲线, 记录 30 s (一级反应时间)时的 NaOH 消耗体积, 计算相应的反应速率。利用 Michaelis-Menten 为模型计算出 K_m 和 V_{max} 。

酶的比活单位指的是每毫克酶蛋白所表现出的酶活性单位(U)。通过 Bradford 法, 测定纯化的果胶甲酯酶蛋白含量, 同时在最适 pH 4.0 和 40 °C 条件下, 测定果胶甲酯酶 r-PmeT 活性, 由此得到酶的比活(U/mg 酶蛋白)。

2 结果和分析

2.1 果胶甲酯酶基因 *pmeT* 的克隆和序列分析

根据 *T. leycettanus* JCM12802 基因组草图中果胶甲酯酶基因 *PmeT* 序列, 发现 *pmeT* 基因全长为 1422 bp, 含有 6 个内含子(121–189、327–404、485–555、700–773、835–894、1090–1163 bp, cDNA 全长为 996 bp, 推导编码 332 个氨基酸和一个终止密码子, 前 18 个氨基酸为信号肽序列。本实验先提取了在黄豆粉培养基生长的 *T. leycettanus* JCM12802 菌株的总 RNA, 反转录得到 cDNA, 并以此为模板, 直接扩增获得果胶甲酯酶基因 *PmeT* 的成熟基因, 并连接到 pEASY-T3 上, 测序结果表明与理论预测的序列一致。*PmeT* 基因完整的序列已经提交至 GenBank 数据库, 序列号为 KY070588。

推导的 *PmeT* 氨基酸序列与来源于 *T. stipitatus* ATCC 10500 的假定的果胶甲酯酶基因

(XP_002484603.1)的一致性为 76%，与 *Aspergillus luchuensis* 来源的果胶甲酯酶(GAT29911.1)一致性为 62%。经预测，成熟蛋白的分子量为 35.1 kDa，等电点为 4.6，含有一个可能的 N-糖基化位点 N₂₂₆N₂₂₇S₂₂₈。多序列比对结果显示果胶甲酯酶可能的催化残基 D₁₅₉、D₁₈₀ 和 R₂₄₆ 位点，在 *PmeT* 序列中也完全保守^[9]。

2.2 重组毕赤酵母的构建及筛选

分别用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切测序正确的重组质粒 pEASY-T3-*PmeT* 和表达质粒 pPIC9k，回收片段和载体，并连接转化 *E. coli* Trans-T1，构建表达载体 pPIC9k-*PmeT*。用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 进行酶切验证，得到大小 950 bp 和 9 kb 的片段，酶切结果正确。表达载体 pPIC9K-*PmeT* 经 *gl* II 线性化后通过电击转化导入 *P. pastoris* GS115 感受态细胞，其转化液涂布于 MD 平板上，30 °C 培养 3 d。获得的转化子中，挑取 300 个转化子直接转接到高浓度的 G418 (600 μg/mL) 平板上，继续培养 1 d，挑选出 10 个明显比其他克隆生长快速的菌株。对以上 10 个克隆，通过甲醇诱导 72 h 取样，按照方法 1.4 所述对诱导液上清进行果胶甲酯酶活力的测定，结果表明 5[#]号转化子酶活性最高，达到了 1.6 U/mL。

2.3 重组酵母菌发酵罐水平果胶甲酯酶的表达

选择摇床水平对表达量高的毕赤酵母重组菌株 5[#]号进行 3.7 L 发酵罐(Bioengineering AG)发酵研究，发酵过程具体的操作方法见 Invitrogen 操作手册。在甲醇诱导表达阶段，每 24 h 取样检测果胶甲酯酶的酶活性，并进行 SDS-PAGE 分析。随着甲醇的诱导，上清中果胶甲酯酶活力显著增加，分泌的酶蛋白不断积累(图 1)。经甲醇诱导 120 h 后，重组表达的果胶甲酯酶 r-*PmeT* 的活力

达到最高，发酵效价为 428 U/mL。经 Bradford 法测得发酵液总蛋白浓度为 3.2 mg/mL，BioRad 的 Gel Doc™ XR+软件扫描显示目的蛋白为 2.98 mg/mL，占发酵总蛋白的 93.1%。

2.4 重组表达果胶甲酯酶 r-*PmeT* 的纯化

取诱导 5 d 的发酵液，经离心、硫酸铵沉淀和离子交换层析之后得到电泳纯，在 SDS-PAGE 显示单一的条带(图 2)，重组酶表观分子为 37 kDa，比理论分子量 35.1 kDa 稍大，推测可能因为存在糖基化修饰。

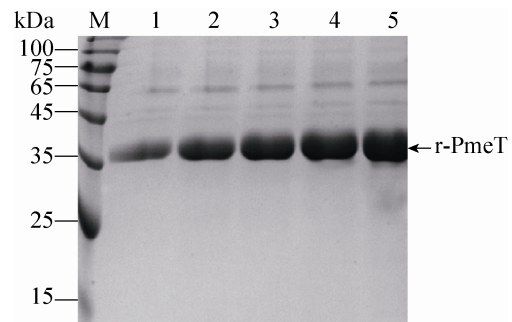


图 1. 3.7 L 发酵罐表达果胶甲酯酶不同时间取样的 SDS-PAGE

Figure 1. SDS-PAGE of expressed pectin esterase in the 3.7 L fermentor with different induction time. M: standard protein molecular weight; lanes 1–5: the expression of r-*PmeT* after induced 24, 48, 72, 96, 120 h by methanol, respectively.

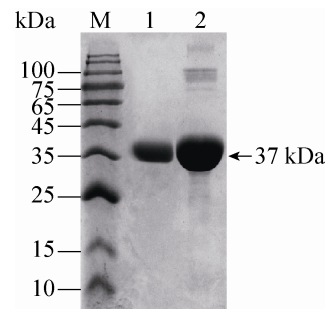


图 2. 重组酶 r-*PmeT* 纯化的 SDS-PAGE

Figure 2. SDS-PAGE analysis of purified r-*PmeT*. M: standard protein molecular weight; lane 1: the purified r-*PmeT*; lane 2: precipitate of the culture supernatant after addition of ammonium sulfate.

2.5 表达产物果胶甲酯酶 r-PmeT 的酶学性质测定

2.5.1 pH 和温度对果胶甲酯酶 r-PmeT 的影响:

纯化后的 r-PmeT 在 40 °C 下测定的最适 pH 为 4.0 (图 3-A), pH 3.0–5.0 均具有较高的酶活力, 保持最大酶活力的 60%以上, 当 pH ≥ 5.0 时, 酶活迅速降低, 在 pH 7.0 时几乎检测不到酶活性。pH 4.0 时 r-PmeT 的最适温度为 75 °C (图 3-B), r-PmeT 具有非常宽的温度作用范围, 酶活在 45–80 °C 时仍能保持最大活力的 60%。即使在 20–40 °C 较低的温度时, 仍然具有相对高的活性, 大于 40%, 甚至在 85 °C 时, 仍能检测到最高的酶活力的 30%。热稳定性分析表明 r-PmeT 在 65 °C 下处理 1 h, 相对酶活力能保持在 90%左右(图 4), 75 °C

热处理时, 前 20 min 内酶活持续下降, 酶活降至 70%之后酶活变化不大, 保持 70%左右, 85 °C 处理 5 min 时, 酶活迅速下降至 50%, 之后酶活缓慢下降, 30 min 后酶活保持在 20%左右。

2.5.2 金属离子和化学试剂对果胶甲酯酶 r-PmeT 的影响:

通过对测定数据(表 1)分析可知, 在 1 mmol /L 的浓度情况下, 化学试剂(EDTA、SDS、β-Mercaptoethanol)和大多数的金属离子(Na⁺、K⁺、Mn²⁺、Ag⁺、Mg²⁺、Ca²⁺)对该酶都没有明显影响, 而 Co²⁺、Cr³⁺、Cu²⁺、Ni⁺、Fe³⁺、Zn²⁺ 离子对纯化 r-PmeT 有增强作用, 酶活力的增强幅度 10%–20%不等。表明该果胶甲酯酶对金属离子和化学试剂均具有较好的抵抗能力, 适合在工业环境条件下应用。

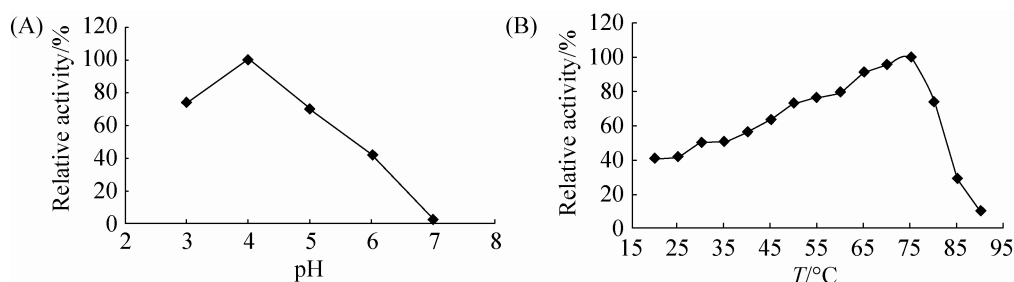


图 3. pH 和温度对重组酶 r-PmeT 活力的影响

Figure 3. Effect of pH and temperature on recombinant enzyme activity. A: effect of pH activity; B: effect of temperature on activity.

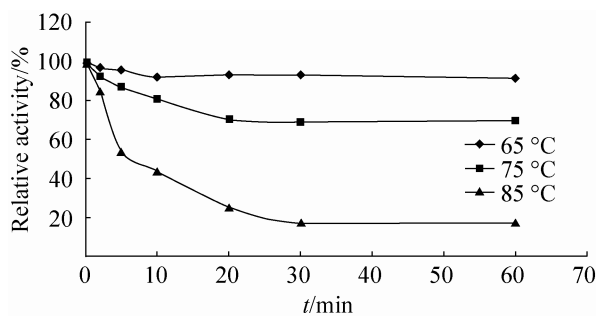


图 4. 热稳定性曲线

Figure 4. Thermostability of r-PmeT at 65, 75, 85 °C.

表 1. 1 mmol/L 浓度的金属离子及相关化学试剂对 r-PmeT 的影响

Table 1. Effects of metal ions and chemicals at 1 mmol/L on the activity of r-PmeT

Reagent	Relativity activity/%	Reagent	Relativity activity/%
None	100.0	Mg ²⁺	105.1
Na ⁺	91.9	Fe ³⁺	118.1
K ⁺	104.5	Zn ²⁺	112.8
Ca ²⁺	105.1	Mn ²⁺	96.3
Co ²⁺	116.1	Cu ²⁺	114.8
Cr ³⁺	119.7	EDTA	95.8
Ag ⁺	108.2	SDS	91.6
Ni ⁺	119.3	β-mercaptoethanol	90.9

2.5.3 果胶甲酯酶 r-PmeT 的 K_m 和 V_{max} 测定: 标准条件下, 通过对不同浓度底物反应的测定, 经 Michaelis-Menten 模型计算出 K_m 和 V_{max} 的数值分别为 2.4 mmol/L 和 31.07 mmol/(min·mg), 比活性为 140 U/mg。

3 讨论

低甲氧基果胶是一种在食品、工业、医疗等行业中广泛应用的物质^[10], 但目前国内生产方法仍停留在化学酸水解, 产率低, 能源利用率低, 无法满足生产需求, 导致其价格上涨^[11]。果胶甲酯酶可以迅速对果胶分子进行去甲基化反应, 从而达到将从植物中提取的高甲氧基果胶高效转化为低甲氧基果胶的目的, 由此, 酶法生产低甲氧基果胶法亟需规模化。本文从嗜热真菌 *T. leycettanus* JCM12802 中首次分离得到了酸性耐高温的果胶甲酯酶 PmeT, 并在毕赤酵母中进行了高效表达研究。

一般来说, 天然微生物产果胶甲酯酶的同时也产多聚半乳糖醛酸酶和果胶裂解酶, 其发酵的粗酶液水解果胶酯键的同时也会在果胶主链的 α -1,4-糖苷键发生水解作用或消去作用, 缩短果胶主链。本研究从嗜热真菌 *T. leycettanus* JCM12802 中克隆出的单一的果胶甲酯酶基因, 构建毕赤酵母基因工程菌株, 该菌株能够分泌单一的果胶甲酯酶, 特异性水解果胶酯键, 克服天然微生物同时产多种果胶酶的问题, 优化了低甲氧基果胶的生产加工过程。

Jiang 等^[12]和 Pan 等^[13]分别实现了黑曲霉和产黄青霉的果胶甲酯酶 *Pme* 基因在毕赤酵母中异源高效表达, 表达量分别为 10.2 mg/L 和 1.09 U/mL。陈献忠等^[14]通过在酿酒酵母表面展示表达果胶甲

酯酶可达到 2.6 U/g 干酵母, 相比这些报道的研究结果而言, 本文重组果胶甲酯酶 r-PmeT 表达量达到 428 U/mL, 远高出此前报道中的产量。果胶甲酯酶在酵母中的高效表达为其在低甲氧基果胶生产、饲料和食品等行业的工业化大规模应用提供了前提。

目前所发现的果胶甲酯酶最适温度介于 40–50 °C^[6], 作用温度均偏低, 高于 50 °C 时稳定性非常差, 严重降低了酶法生产的效率。本文中重组果胶甲酯酶的最适作用温度为 75 °C, 并且在 75 °C 时非常稳定, 处理 1 h 仍然能保留 60% 以上的活性。该酶除了耐热性质好以外, 在低温区也能保持 40% 以上的酶活, 有着很宽的温度适应性。提高酶法生产低甲氧基果胶的作用温度, 可使高甲氧基果胶能够低成本、无污染地快速转化为低甲氧基果胶, 能够满足各个行业生产的需要。

总的来说, 本研究首次获得了一个酸性耐热的果胶甲酯酶基因, 并实现了在毕赤酵母中的高水平表达, 高温果胶甲酯酶表达量达到了 3 g/L, 在 75 °C 条件下仍然非常稳定, 比活性达到了 140 U/mg。其优良的性质拓宽了甲酯酶的应用领域, 突破了低温的限制, 为扩充果胶甲酯酶的应用范围和工业前景提供了可能, 具有很好的工业前景。在接下来的实验中, 将会深入研究该酶的耐热机理, 并进行改造提高表达量与酶活力。

参考文献

- [1] Harholt J, Suttangkakul A, Vibe Scheller H. Biosynthesis of pectin. *Plant Physiology*, 2010, 153(2): 384–395.
- [2] Tu GY, Wang ZW, Wang ZN. Preparation and application of pectin. *Food and Drug*, 2007, 9(6): 50–55. (in Chinese)

- 涂国云, 王正武, 王仲妮. 果胶的制备与应用. 食品与药品, 2007, 9(6): 50–55.
- [3] Ren JH, Xu YQ. Study on application of low methoxyl pectin. *Food Engineering*, 2006, (2): 19–20, 26. (in Chinese)
任建辉, 徐雅琴. 低甲氧基果胶的研究概况. 食品工程, 2006, (2): 19–20, 26.
- [4] Micheli F. Pectin methylesterases: cell wall enzymes with important roles in plant physiology. *Trends in Plant Science*, 2001, 6(9): 414–419.
- [5] Pelloux J, Rustérucci C, Mellerowicz EJ. New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends in Plant Science*, 2007, 12(6): 267–277.
- [6] Sakai T, Sakamoto T, Hallaert J, Vandamme EJ. Pectin, pectinase, and protopectinase: production, properties, and applications. *Advances in Applied Microbiology*, 1993, 39: 213–294.
- [7] Kashyap DR, Vohra PK, Chopra S, Tewari R. Applications of pectinases in the commercial sector: a review. *Bioresource Technology*, 2001, 77(3): 215–227.
- [8] Fries M, Ihrig J, Brocklehurst K, Shevchik VE, Pickersgill RW. Molecular basis of the activity of the phytopathogen pectin methylesterase. *The EMBO Journal*, 2007, 26(17): 3879–3887.
- [9] Jenkins J, Mayans O, Smith D, Worboys K, Pickersgill RW. Three-dimensional structure of *Erwinia chrysanthemi* pectin methylesterase reveals a novel esterase active site. *Journal of Molecular Biology*, 2001, 305(4): 951–960.
- [10] Li C, Shan Y, Li GY. Optimization on enzymatic preparation of low-methoxy pectin. *Food & Machinery*, 2010, (2): 110–114. (in Chinese)
李川, 单杨, 李高阳. 酶法制备低甲氧基果胶的工艺优化研究. 食品与机械, 2010, (2): 110–114.
- [11] Liu YD, Zhang L, Chen GG. The present situation of low methoxyl pectin producing technology and its prospect. *Academic Periodical of Farm Products Processing*, 2008, (1): 57–58, 85. (in Chinese)
刘忆冬, 张磊, 陈国刚. 低甲氧基果胶生产工艺现状及其发展前景. 农产品加工, 2008, (1): 57–58, 85.
- [12] Jiang XP, Chen P, Yin ML, Yang Q. Constitutive expression, purification and characterisation of pectin methylesterase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* for potential application in the fruit juice industry. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2013, 93(2): 375–381.
- [13] Pan X, Tu T, Wang LW, Luo HY, Ma R, Shi PJ, Meng K, Yao B. A novel low-temperature-active pectin methylesterase from *Penicillium chrysogenum* F46 with high efficiency in fruit firming. *Food Chemistry*, 2014, 162: 229–234.
- [14] Chen XZ, Xiao Y, Shen W, Fan Y. Surface display of pectinesterase on *Saccharomyces cerevisiae* for efficient bioethanol production from sweet potato starch. *Acta Microbiologica Sinica*, 2016, 56(6): 922–931. (in chinese)
陈献忠, 肖艳, 沈微, 樊游. 表面展示表达果胶酯酶的重组酿酒酵母构建及乙醇发酵. 微生物学报, 2016, 56(6): 922–931.

High-level expression and characterization of pectin methylesterase *PmeT* from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 in *Pichia pastoris*

Ting Hua¹, Yanan Li², Kaikai Wang¹, Tao Tu¹, Huoqing Huang^{1*}, Huiying Luo¹, Bin Yao¹

¹ Institute of Feed Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

² College of Life Science, Guangzhou Institutes of Biomedicine and Health, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou Medical University, Guangzhou 510006, Guangdong Province, China

Abstract: [Objective] We highly expressed the high temperature resistant pectin methylesterase from *Talaromyces leycettanus* JCM12802 in *Pichia pastoris* and studied its enzymatic properties. Pectin methylesterase with high catalytic efficiency at high temperature was expected to be widely used in the production of low-methoxyl pectin, for an optimal production process and conversion rate with reduced production cost. [Methods] We cloned the cDNA of pectin methylesterase gene (*PmeT*) from the total RNA of *T. leycettanus* JCM12802 as template by RT-PCR, which was inserted into the expression vector pPIC9K and transformed into *P. pastoris* GS115. We cultivated the high activated positive transformant for high-density fermentation. [Results] The recombinant pectin methylesterase (r-PmeT) expression level reached 428 U/mL. We have identified the enzymatic properties of r-PmeT. The optimum reaction temperature of r-PmeT was 75 °C, and its thermostability was below 85 °C. The optimum pH was 4.0, and it was stable between pH 2.0 and 7.0. [Conclusion] The recombinant *Pichia pastoris* could express high level pectin methylesterase from *T. leycettanus* JCM12802, which shows excellent application potential in its future industrial.

Keywords: pectin, pectin methylesterase, high temperature fungi, *Pichia pastoris*

(本文责编: 张晓丽)

Supported by the National High-tech R&D Program (2014AA021301)

*Corresponding author. E-mail: huanghuoqing@caas.cn

Received: 9 February 2017; Revised: 16 March 2017; Published online: 11 April 2017