

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
52(7):850-856; 4 July 2012  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
<http://journals.im.ac.cn/actamicrocn>

## 糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 漆酶 POXA1 在里氏木霉中的高效表达及酶学性质

董欣睿<sup>1</sup>, 秦丽娜<sup>2</sup>, 陶勇<sup>2</sup>, 黄建忠<sup>1\*</sup>, 董志扬<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> 福建师范大学生命科学学院, 工业微生物教育部工程研究中心, 福州 350108

<sup>2</sup> 中国科学院微生物研究所, 北京 100101

**摘要:** 【目的】将优化后的糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 漆酶基因 *pox1*, 在里氏木霉中进行高效表达并对重组表达的漆酶进行酶学性质测定。【方法】根据里氏木霉的密码子偏好性, 对漆酶 POXA1 密码子进行优化并合成。以质粒 pBluescript II SK (+) 为骨架, 利用里氏木霉纤维二糖水解酶基因 (*cbh1*) 的启动子和终止子序列构建里氏木霉外源蛋白表达载体 pSKLDT。PEG 介导的原生质体转化方法转化里氏木霉菌株 Tu6, 筛选获得漆酶表达工程菌; 通过木霉工程菌摇瓶发酵培养后对发酵液上清中的漆酶进行纯化, 并对异源表达的漆酶酶学性质进行研究。【结果】经尿嘧啶缺陷培养基筛选获得木霉阳性转化子, 通过 PCR 分析及漆酶酶活性筛选获得漆酶高效表达重组菌 LC-7, 该重组菌经摇瓶发酵 144h 后粗酶液酶活达 237.134IU/mL, 酶活较其出发菌 *Pleurotus ostreatus* 提高了 28.6 倍。酶学性质研究表明, 纯酶的比活为 9852IU/mg, 最适温度为 50°C, 最适 pH 为 3.0, 最适底物为 ABTS, 该漆酶催化 ABTS 的  $K_m$  和  $V_{max}$  分别为  $7.58 \times 10^{-2}$  mmol/L 及  $9.752 \times 10^{-3}$  mmol/L/min, 金属离子  $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$ 、 $Fe^{3+}$ 、 $Mn^{2+}$ 、 $Ba^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  等对漆酶有不同程度的抑制作用, 但  $Fe^{2+}$  能明显的抑制漆酶的催化活性。【结论】外源漆酶基因能在里氏木霉中实现高效分泌表达。

**关键词:** 漆酶, 里氏木霉, *cbh1* 启动子, 异源表达, 糙皮侧耳

中图分类号: Q814 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209 (2012) 07-0850-07

漆酶 (Laccase, EC 1.10.3.2) 是一种含铜的多酚氧化酶, 最早是由日本学者吉田在 1883 年于日本紫胶树的渗出液中发现的, 1894 年 Bertrand 又从柬埔寨漆树的汁液中发现, 并发现它对生漆的自然氧化干燥成膜具有催化作用, 定为 “Laccase”, 其能催化多种有机及无机化合物, 如联苯酚、多酚类、二胺类、芳胺类等。漆酶是自然界中普遍存在的酶, 尤其在植物及真菌中。真菌漆酶在植物形态发生、色素

生成及木质纤维素的降解等方面扮演了很重要的角色<sup>[1-2]</sup>。在环境微生物学中, 微生物表达漆酶的能力及漆酶降解污染物的能力是现在研究者所感兴趣的内容<sup>[3]</sup>。漆酶具有潜在的应用价值, 可用作纺织染料的漂白、造纸工业中的漂白、流出物的脱毒、生物传感器等方面<sup>[1,4]</sup>。但是, 由于野生菌的漆酶表达量较低, 导致其无法用于工业生产, 为了解决这个问题, 提高漆酶产量的一个可行性办法就是进行漆

基金项目: 福建省发改委产业化关键技术项目 (闽发改投资 [2009] 958 号); 国家自然科学基金 (30970073); 国家 “973 项目” (2011CB707402); 中国科学院重大专项 (KSCX1-YW-41B3)

\* 通信作者。董志扬, Tel: +86-10-64807337, E-mail: dongzy@im.ac.cn; 黄建忠, Tel: +86-591-22868212, E-mail: hjz@fjnu.edu.cn

作者简介: 董欣睿 (1987-), 女, 黑龙江省哈尔滨人, 硕士研究生, 主要从事分子生物学研究。E-mail: xinrui403@126.com

收稿日期: 2012-02-20; 修回日期: 2012-03-30

酶基因的异源表达,但迄今为止漆酶基因异源表达仍然非常不理想,常用的大肠杆菌,酿酒酵母、毕赤酵母都不能很好表达漆酶基因。

丝状真菌里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 是纤维素酶、半纤维素酶的主要工业生产菌株<sup>[5]</sup>,该菌无毒无害,具有强大的蛋白分泌能力,某些突变株的外分泌蛋白量可达 100 g/L,并且具有与高等哺乳动物相似的糖基化系统。因此里氏木霉是一种非常理想的重组蛋白表达宿主<sup>[5]</sup>,得到国际著名酶制剂公司(如 Genencor、Novozymes 等)高度重视,并成功应用于多种酶制剂表达和生产。本文将来源于糙皮侧耳 (*Pleurotus ostreatus*) 的漆酶基因 *pox1*<sup>[6]</sup>,根据里氏木霉密码子偏好性进行人工合成并在其 C 端引入组

氨酸标签序列。以质粒 pBluscript II SK (+) 为骨架,依次连入 *cbh1* 启动子,漆酶基因以及 *cbh1* 终止子序列构建了异源表达盒 pSKLDT,利用 *cbh1* 启动子及其信号肽序列在里氏木霉中成功实现了异源漆酶基因的高效表达,漆酶在木霉胞外分泌表达活力达到 237.11 IU/mL,是目前国内外文献报道最高的。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:**本研究所使用的菌株和质粒见表 1。

表 1 本研究所使用的菌种和质粒  
Table1 Strains and plasmids used in the study

Strain/plasmid	Description	Origin
<i>Trichoderma reesei</i> Tu6	Uracil auxotrophs strain	Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$		Laboratory store
<i>Escherichia coli</i> XL-10Gold		Laboratory store
pSKCST	<i>Cbh1</i> promoter, <i>Cbh1</i> signal peptide, <i>Cbh1</i> terminator, Amp resistance	Laboratory store
pLacT	Laccase gene, laccase signal peptide, Amp resistance	Synthetic plasmid
pLacdT	Laccase gene, Amp resistance	In this study
pSKpyr	Pyr4 gene, Amp resistance	In this study
pSKLDT	1552bp laccase gene in pSKCST plasmid	In this study

**1.1.2 主要试剂和仪器:**实验中所用的限制性内切酶, pMD18-T simple vector 购自 TaKaRa 公司;质粒提取和胶回收试剂盒购自天根生物有限公司;蛋白质 Marker, TransStart FastPfu DNA Polymerase 购自全式金公司,其他试剂均为国产分析纯。离心机购自 Backman 公司, DU800 spectrophotometer 购自于 Backman 公司, PCR 仪购自 ABI 公司。实验中所用的引物均由上海生工合成。

**1.1.3 培养基和菌株生长条件:**LB 培养基用于大肠杆菌的培养,马铃薯葡萄糖琼脂(PDA)用于 *T. reesei* 的培养, *T. reesei* Tu6 的培养需添加 5 mmol/L 尿苷。原生质体制备前用培养基为基本培养基(MM):含葡萄糖 2%, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5%, MgSO<sub>4</sub> 0.06%, CaCl<sub>2</sub> 0.06%, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.0005%, MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0.00016%, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.00014%, CoCl<sub>2</sub> 0.0002%。转化子筛选培养基:将基本培养基中 2% 葡萄糖换为 2% 乳糖,再添加

ABTS 0.0274%。液体发酵的种子培养基:在 250 mL 的三角瓶中,加入土豆汁 30 mL,葡萄糖 0.6 g, 55 KPa 高压蒸汽灭菌 20 min。发酵培养基:在 250 mL 的三角瓶中,装玉米芯 1.5 g, 麦麸 0.9 g, 1% 的玉米浆溶液(自来水配置) 30 mL, 起始 pH 4.8, 100 KPa 高压蒸汽灭菌 30 min。培养温度均为 28℃。

### 1.2 *Pleurotus ostreatus* 漆酶 POXA1 基因异源表达重组质粒的构建

质粒抽提、限制酶酶切、DNA 片段回收及连接按试剂说明书进行。根据 *P. ostreatus* 漆酶 *pox1* 基因序列,运用 codon W 软件对里氏木霉中分泌量较高的蛋白质 Cel7A、Cel7B、Cel6A、Cel5A、CIP1、XYN1、Cel12A 的基因序列进行分析,得出里氏木霉的密码子偏好性,通过 DNA 2 软件根据分析出的密码子偏好性对漆酶 *pox1* 基因序列进行优化(与原基因的同源性达到 76.42%)并体外人工合成,为了方

便纯化,人工合成的漆酶 C 端设计了组氨酸标签。以 pLacT 为模板设计引物 (LacdsF: 5'-GGAATTCGCAATTGGCCCTACGGGCGAC-3'; LacdsR: 5'-ACTAGTCTAATGGTGGTGATGGTGGTGG-3') 扩增得到不含漆酶信号肽的漆酶基因片段,连入 pMD18-T simple vector 后得到载体 pLacdT 并进行测序鉴定正确后,用 *EcoR* I 和 *Spe* I 双酶切 pLacdT 得到不含信号肽的漆酶基因片段,将酶切片段连入同样用 *EcoR* I 和 *Spe* I 双酶切的载体 pSKCST,得到表达载体 pSKLDT。

### 1.3 里氏木霉的原生质体转化及阳性转化子筛选

*T. reesei* 原生质体的制备和转化参照 M. Penttila 的方法<sup>[7]</sup>:表达载体 pSKLDT 用限制性内切酶 *Sal* I 和 *Not* I 线性化后乙醇沉淀,然后分别与经乙醇沉淀的含筛选标记 *pyr4* 基因的载体 pSKpyr 混合,转化里氏木霉菌株 Tu6。将适量转化液和 4 mL 转化培养基混匀,立即铺于转化底层培养基上,28℃ 培养 3-4 d。转化子长出后,提取转化子基因组 DNA,PCR 鉴定转化子外源基因整合情况。

### 1.4 木霉转化子的摇瓶发酵及漆酶活力测定

将筛选获得的转化子接于 PDA 斜面,孢子形成后,用 2 mL 无菌水洗涤孢子,孢子悬液接种于含 30 mL 的种子培养基的 250 mL 三角瓶中,28℃,200 r/min 培养 48 h。四层纱布过滤菌体,称取湿重 0.9 g 菌体接于 30 mL 的发酵培养基中,28℃,200 r/min 培养 6-7 d,4℃,17210 × g 离心 10 min 得到的上清液即为粗酶液。

漆酶酶活测定方法采用分光光度计法:(1) 2,2-二氯-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸) (ABTS) 为底物,以 pH3.0 的柠檬酸盐为缓冲液,在 420 nm 下测定吸光度值的增加<sup>[8]</sup>。(2) 愈创木酚为底物,以 pH6.0 的磷酸钠为缓冲液,在 465 nm 下测定吸光值的变化<sup>[9]</sup>。(3) 邻联甲苯胺为底物,以 pH4.6 的醋酸钠为缓冲液,在 600 nm 下测定吸光值的改变<sup>[10]</sup>。漆酶活力单位 (IU) 定义为在 25℃ 下,每毫升酶液每分钟催化 1 μmol ABTS 氧化所需的酶量,即为一个漆酶活力单位 (IU)。

平板检测酶活<sup>[11]</sup>:取 20 μL 粗酶液,加到含有 0.5 mmol/L 的 ABTS 琼脂平板空穴中,室温放置 1 h,观察是否产生蓝绿色圈。

### 1.5 木霉重组表达漆酶的分离纯化

重组菌摇瓶发酵 144 h 后,17210 × g 离心 15

min 收集漆酶粗酶液,用 80% 饱和度硫酸铵在 4℃ 下进行沉淀,17210 × g 离心 30 min 收集沉淀;沉淀用 20 mmol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲液溶解;在 AKTA FPLC 经脱盐柱脱盐处理后,用 HisTrap FF crude 柱进行亲和层析,收集峰值洗脱液,测定漆酶活力并进行 SDS-PAGE 检测。

## 1.6 重组漆酶酶学性质研究

**1.6.1 温度对重组漆酶的影响:**最适温度:取一定量纯化漆酶,以 ABTS 为底物,在 pH3.0 的柠檬酸缓冲液体系中,分别在 20℃-80℃ 范围内测定漆酶活力,分析其最适反应温度;热稳定性:将漆酶酶液分别在 40、50、60 和 70℃ 孵育 30、60、120、240 min,在 50℃、pH 3.0 的柠檬酸缓冲液体系中分别测定漆酶活力,分析其热稳定性。

**1.6.2 pH 对重组漆酶的影响:**(1) 最适 pH: 取一定量纯化后的酶液,以 ABTS 为底物,分别于不同 pH 的缓冲液 2.0-8.0 中,室温测定酶活力,并计算其比活,分析其最适作用 pH。其中 pH2.0-pH2.5 为 0.1 mol/L 甘氨酸-盐酸缓冲液,pH3.0-pH5.0 为 0.1 mol/L 柠檬酸缓冲液,pH6.0-pH8.0 为 0.1 mol/L 磷酸缓冲液。(2) pH 稳定性:取适量纯化后的酶液,以 ABTS 为底物,在 4℃ 下分别于不同 pH 的缓冲液中孵育 24 h;然后,50℃ 下,于 pH3.0 的柠檬酸盐缓冲液中测定酶活力,并计算其比活。

**1.6.3 金属离子对酶活力的影响:**将一定量纯化后的酶液,与 pH3.0、0.1 mol/L 的柠檬酸盐缓冲液混合后,以 ABTS 为底物,分别加入终浓度为 10 mmol/L 的  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{2+}$  及 2 mmol/L 的  $\text{Ba}^{2+}$ ,在 50℃ 下测定其酶活力,并计算其比活。

**1.6.4 漆酶底物催化分析:**以 0.1-5 mmol/L 的 ABTS、0.4-1.0 mmol/L 的愈创木酚、0.1-0.4 mmol/L 的邻联甲苯胺为底物,在 25℃ 下,0.1 mol/L, pH3.0 的柠檬酸钠缓冲液中测定酶反应的速率,根据 Line Weaver-Burk 作图法,求取米氏常数  $K_m$  和最大反应速率  $V_{max}$ 。

## 2 结果

### 2.1 *Pleurotus ostreatus* 漆酶 POXA1 异源表达重组质粒的构建

采用 PCR 方法扩增获得不含信号肽的漆酶基因,将漆酶基因片段连入 pMD18-T simple vector 后

得到载体 pLacdT 并进行测序鉴定正确后,按照 1.2 所述方法构建质粒 pSKLDT。

## 2.2 转化子的筛选、诱导表达及漆酶酶活测定

随机挑取板上的多株转化子,提取基因组 DNA,利用引物 Lacds-F 及 Lacds-R 进行 PCR 鉴定,得到多株基因组中含有漆酶目的片段的转化子,阳性转化子经多次传代后仍能在 MM 培养基上正常生长。

用发酵培养基(见 1.1.3)对重组木霉转化子进行发酵,该重组菌产漆酶的活力在 144 h 达到高峰(图 1)。取培养 144h 的发酵液上清利用分光光度计法,在 420 nm 下测漆酶酶活(见 1.4)发现以 pSKLDT 为表达载体的阳性转化子 LC-7 的酶活最高,其酶活为 237.134 IU/mL。平板检测漆酶酶活结果如图 2。

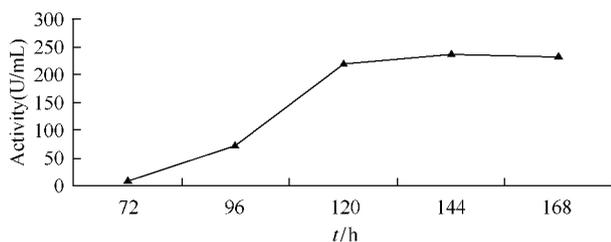


图 1 LC-7 菌株产酶曲线

Fig. 1 Laccase production curve of LC-7.



图 2 平板检测漆酶酶活

Fig. 2 Plate assay for demonstration of laccase activity in extracellular fluid. LC-7: the strain with the highest laccase activity; CK: the parental strain Tu6 with no laccase activity.

## 2.3 重组漆酶的纯化

将酶活最高的阳性转化子 LC-7 按照 1.4 的方法进行诱导表达,对重组漆酶进行纯化,纯化结果见图 3。SDS-PAGE 电泳结果表明,表达产物分子量在 60-70 kDa 之间,约为 61 kDa,与野生型 POXA1 的大小一致<sup>[12]</sup>。

## 2.4 重组漆酶学性质分析

**2.4.1 重组漆酶的最适温度及热稳定性:**在不同温度条件下测定重组漆酶的活力,发现该酶最适反应温度为 50℃(图 4-A)。将纯化后的酶液分别在不同温度下孵育 30, 60, 120, 240 min,检测剩余活力。结果表明漆酶在 40℃ 保持基本稳定,50℃ 孵育

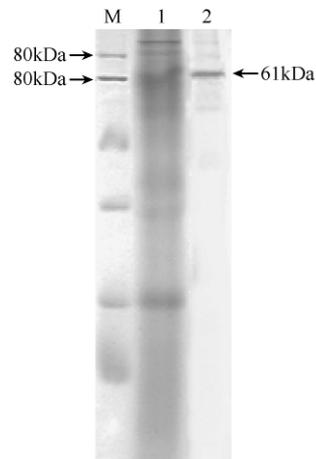


图 3 纯化后的漆酶

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified laccase. M. Marker; 1. fermentation broth; 2. purified laccase.

30min,酶活力降为原来的 53%(图 4-B)。

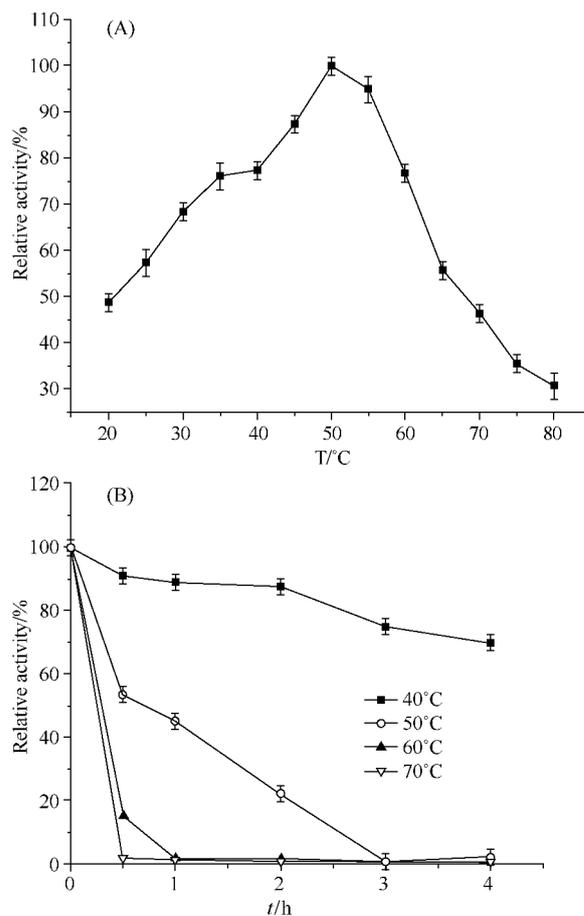


图 4 温度对重组漆酶的影响

Fig. 4 The effect of temperature on the activity of recombinant laccase. A: optimum temperature for recombinant laccase; B: temperature stability for recombinant laccase.

**2.4.2 重组漆酶的最适 pH 及 pH 稳定性:**在不同 pH 条件下分析重组漆酶的酶活力发现,该酶在 pH3.0 时表现出最大活力,与原始酶的性质一致<sup>[12]</sup>,其最适 pH 为 3.0(图 5-A)。在不同 pH 的缓冲液中 4℃ 孵育 24h,重组漆酶在 pH6.0-8.0 的缓冲液中的酶活力基本保持不变,在 pH 小于 4.0 时,剩余酶活低于 30%(图 5-B)。

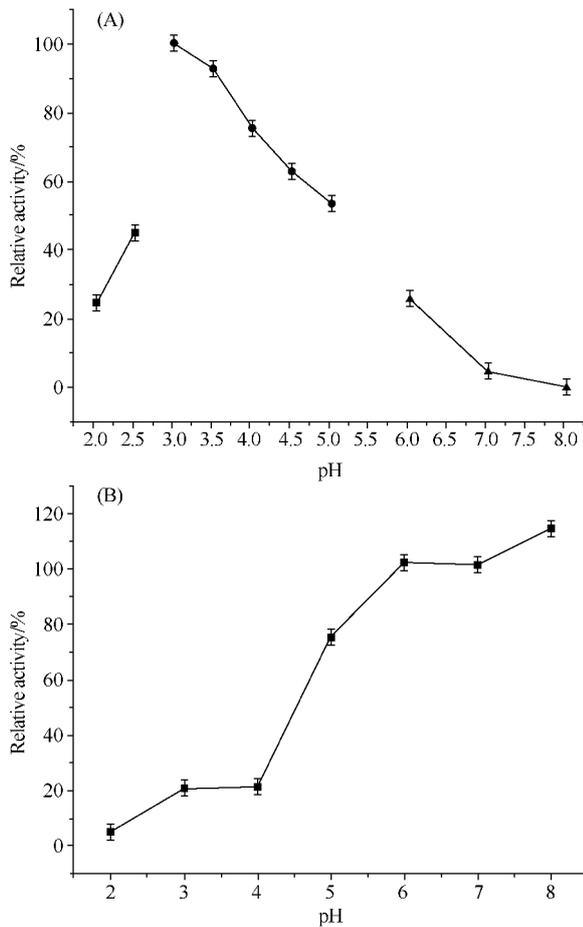


图 5 pH 对重组漆酶的影响

Fig.5 The effect of pH on the activity of recombinant laccase.  
A: optimum pH value for recombinant laccase; B: pH stability for recombinant laccase.

**2.4.3 金属离子对漆酶活力的影响:**图 6 所示,多种金属离子对漆酶活力都有一定影响,其中  $\text{Fe}^{2+}$  对漆酶的催化活性显示出很强的抑制作用,其他金属离子  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Fe}^{3+}$ 、 $\text{Mn}^{2+}$ 、 $\text{Ba}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  对酶活有不同程度的抑制作用,没有金属离子对该漆酶具有激活作用。

**2.4.4 漆酶底物催化分析:**按照 1.6.4 的方法,选取漆酶常用 3 个底物对该酶催化性质进行了初步分

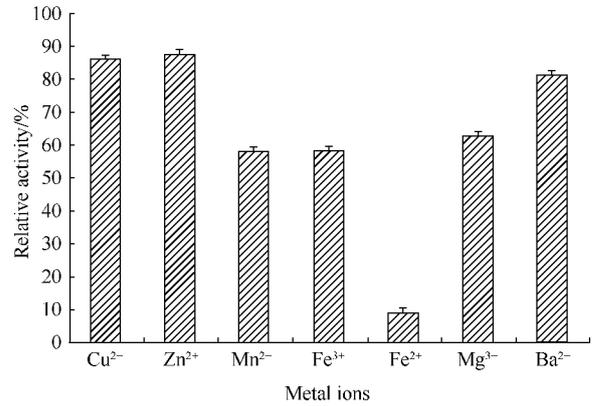


图 6 金属离子对漆酶的影响

Fig.6 Effect of metal ions on purified laccase enzyme.

析,结果表明该酶对 ABTS 的  $K_m$  为 0.0758 mmol/L,  $V_{max}$  为 9.752  $\mu\text{mol/L}/\text{min}$ 。以邻联甲苯胺为底物时,  $K_m$  为 0.3683 mmol/L,  $V_{max}$  为 0.949  $\mu\text{mol/L}/\text{min}$ 。实验发现该漆酶不能催化底物愈创木酚。

### 3 讨论

国际上首次报道的漆酶基因异源表达是在 1990 年<sup>[1]</sup>,此后国内外围绕漆酶基因异源表达开展了许多工作,但迄今为止漆酶基因在常用的大肠杆菌、酿酒酵母、毕赤酵母等宿主中都没能很好表达,表达活力非常低<sup>[13-14]</sup>,因此选用新的、具有工业化生产前景的里氏木霉表达系统对漆酶进行高效表达研究,对漆酶的进一步应用开发具有重要意义。

丝状真菌里氏木霉是工业上重要的纤维素酶生产菌株,具有很强的分泌蛋白能力,并能对合成的真核蛋白正确地进行各种翻译后加工,如肽链的剪切和糖基化等。此外,里氏木霉本身对人没有毒性,在产酶条件下也不会产生真菌毒素和抗生素,因此里氏木霉常被开发为基因工程宿主菌用于生产重组蛋白。里氏木霉中纤维二糖水解酶 CBH1 由单拷贝基因编码,其分泌量占外分泌蛋白的 64% - 80%,因此, CBH1 的启动子通常被用作强启动子表达异源蛋白<sup>[15]</sup>。本文利用 *cbh1* 强启动子成功异源表达了来源于糙皮侧耳的漆酶基因,并进行了酶学性质分析。结果表明通过摇瓶发酵得到的粗酶液的酶活为 237.134 IU/mL,发酵周期为 144 h,酶活较其出发菌 *P. ostreatus* 提高了近 30 倍<sup>[12]</sup>,且远高于真菌漆酶在黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、构巢曲霉 (*Aspergillus*

nidulans)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)中异源表达的最高表达量<sup>[16]</sup>。

多数真菌漆酶的最适温度范围是 30 - 60℃<sup>[17-19]</sup>。本研究中漆酶的最适温度为 50℃, 与在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中异源表达的漆酶 AH-28-2<sup>[20]</sup>性质一致。一般来说, 真菌生长在低 pH 环境下, 纯化后的重组漆酶 POXA1 在以 ABTS 为底物时的最适 pH 为 3.0, 与野生型的 POXA1 性质相同<sup>[12]</sup>。金属离子 Fe<sup>2+</sup> 对漆酶的抑制最强, 其原因可能是 Fe<sup>2+</sup> 通过与底物催化氧化产物 ABTS 的阳离子自由基反应来影响漆酶的活性。重组漆酶的最适底物为 ABTS, 其 K<sub>m</sub> 是 0.0758 mmol/L, V<sub>max</sub> 是 9.752 μmol/L/min。

漆酶作为一种在环境保护、食品加工、制药等领域中具有重大应用前景的新型酶制剂, 受到越来越多研究者的重视, 尤其对真菌漆酶的工业应用研究比较广泛。选择具有高分泌能力及低毒的丝状真菌为宿主, 通过环保和节约经济的方式, 对漆酶大规模的工业生产是十分重要的。本文通过对 *P. ostreatus* 漆酶 POXA1 基因的密码子优化及选择优秀的表达宿主里氏木霉, 实现了漆酶的高效表达, 为将来漆酶的生产, 提供了可靠且经济的手段。

## 参考文献

- [1] Gianfreda L, Xu F, Bollag JM. Laccases: a useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremediation Journal*, 1999, 3(1):1-26.
- [2] Thurston CF. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology-Sgm*, 1994, 140:19-26.
- [3] Baldrian P. Fungal laccases-occurrence and properties. *Fems Microbiology Reviews*, 2006, 30(2):215-242.
- [4] Xu F. Oxidation of phenols, anilines, and benzenethiols by fungal laccases: correlation between activity and redox potentials as well as halide inhibition. *Biochemistry*, 1996, 35(23):7608-7614.
- [5] Zhang GT, Hartl L, Schuster A, Polak S, Schmoll M, Wang TH, Seidl V, Seiboth B. Gene targeting in a nonhomologous end joining deficient *Hypocrea jecorina*. *Journal of Biotechnology*, 2009, 139(2):146-151.
- [6] Giardina P, Cannio R, Martirani L, Marzullo L, Palmieri G, Sannia G. Cloning and sequencing of a laccase gene from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(6):2408-2413.
- [7] Penttila M, Nevalainen H, Ratto M, Salminen E, Knowles J. A versatile transformation system for the cellulolytic filamentous fungus *Trichoderma-Reesei*. *Gene*, 1987, 61(2):155-164.
- [8] Niladevi KN, Sukumaran RK, Jacob N, Anisha GS, Prema P. Optimization of laccase production from a novel strain-*Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. *Microbiological Research*, 2009, 164(1):105-113.
- [9] Erkurt EA, Unyayar A, Kumbur H. Decolorization of synthetic dyes by white rot fungi, involving laccase enzyme in the process. *Process Biochemistry*, 2007, 42(10):1429-1435.
- [10] 王宜磊, 朱陶. 漆酶高产菌株的筛选及产酶条件研究. *生态学杂志(Chinese Journal of Ecology)*, 2002, 21(2):27-29.
- [11] Srinivasan C, Dsouza TM, Boominathan K, Reddy CA. Demonstration of Laccase in the White-Rot Basidiomycete *Phanerochaete-Chrysosporium Bkm-F1767*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1995, 61(12):4274-4277.
- [12] Palmieri G, Giardina P, Bianco C, Scaloni A, Capasso A, Sannia G. A novel white laccase from *Pleurotus ostreatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 1997, 272(50):31301-31307.
- [13] Otterbein L, Record E, Longhi S, Asther M, Moukha S. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus I-937* and expression in *Pichia pastoris*. *European Journal of Biochemistry*, 2000, 267(6):1619-1625.
- [14] Soden DM, O'Callaghan J, Dobson AD. Molecular cloning of a laccase isozyme gene from *Pleurotus sajor-caju* and expression in the heterologous *Pichia pastoris* host. *Microbiology*, 2002, 148(Pt 12):4003-4014.
- [15] Miettinen-Oinonen A, Paloheimo M, Lantto RA, Suominen P. Enhanced production of cellobiohydrolases in *Trichoderma reesei* and evaluation of the new preparations in biofinishing of cotton. *Journal of Biotechnology*, 2005, 116(3):305-317.
- [16] 刘志明, 郭丽琼. 真菌漆酶异源表达研究进展. *中国生物工程杂志(China Biotechnology)*, 2009, 29(6):135-142.
- [17] Nishizawa Y, Nakabayashi K, Shinagawa E. Purification and characterization of laccase from White-Rot fungus *Trametes Sanguinea M85-2*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1995, 80(1):91-93.
- [18] Wood DA. Production, purification and properties of

- extracellular laccase of *Agaricus-Bisporus*. *Journal of General Microbiology*, 1980, 117 (4) :327-338.
- [19] Youn HD, Hah YC, Kang SO. Role of laccase in lignin degradation by White-Rot fungi. *Fems Microbiology Letters*, 1995, 132 (3) :183-188.
- [20] Hong YZ, Xiao YH, Zhou HM. Expression of a laccase cDNA from *Trametes* sp AH28-2 in *Pichia pastoris* and mutagenesis of transformants by nitrogen ion implantation. *Fems Microbiology Letters*, 2006, 258 (1) : 96-101.

## Overexpression and characterization of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* in *Trichoderma reesei*

Xinrui Dong<sup>1</sup>, Lina Qin<sup>2</sup>, Yong Tao<sup>2</sup>, Jianzhong Huang<sup>1\*</sup>, Zhiyang Dong<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Science, Engineering Research Center of Industrial Microbiology, Fujian Normal University, Fuzhou 350108, China

<sup>2</sup> Institute of Microbiology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101, China

**Abstract:** [Objective] Expression, purification and characterization of a laccase gene from *Pleurotus ostreatus* in *Trichoderma reesei*. [Methods] The strong promoter and terminator of cellobiohydrolase I (cbh1) gene from *T. reesei* were amplified by PCR and inserted into pBluescriptIIISK (+) to form vector pSKCST. The laccase gene from *Pleurotus ostreatus* was *de novo* synthesized according to *T. reesei* codon bias and cloned into the vector pLacdt resulting in the expression vector pSKLDT. The linearized pSKLDT was introduced into *T. reesei* strain Tu6 by protoplast-mediated transformation. The screened laccase expression transformants were grown in shake flasks on minimal medium and the recombinant laccase was purified and characterized. [Results] Transformants were isolated in selective screening medium plate and identified by PCR. The enzyme activity of laccase in transformant LC-7 was 237.134 U/mL which was 28.6-fold higher than that in *P. ostreatus*. The specific activity of the purified enzyme was 9852 IU/mg. Enzymatic assay revealed that the optimum temperature for its activity was 50°C and pH was 3.0. The optimum substrate was ABTS and the  $K_m$  and  $V_{max}$  for ABTS were  $7.58 \times 10^{-2}$  mmol/L and  $9.752 \times 10^{-3}$  mmol/L/min. Metal ions like  $Cu^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ba^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  and  $Fe^{2+}$  had different inhibitory effect on purified laccase. [Conclusions] Under the regulation of cbh1 promoter and cbh1 signal peptide, heterologous laccase was successfully overexpressed in *T. reesei*.

**Keywords:** laccase, *Trichoderma reesei*, *cbh1* promoter, heterologous protein expression, *Pleurotus ostreatus*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the Key Technique Project of Fujian Provincial Development and Reform Commission ([2009]958), by the National Natural Science Foundation of China (30970073), by the Key Project of China National Programs for Fundamental Research and Development (2011CB707402) and by the Knowledge Innovation Program from the Chinese Academy of Sciences (KSCX1-YW-41B3)

\* Corresponding authors. Tel: +86-40-64807337, E-mail: dongzy@im.ac.cn (Zhiyang Dong); Tel: +86-591-22868212, E-mail: hjz@fjnu.edu.cn (Jianzhong Huang)

Received: 20 February 2012 / Revised: 30 March 2012