

微生物学报 *Acta Microbiologica Sinica*  
54(8):876-881; 4 August 2014  
ISSN 0001-6209; CN 11-1995/Q  
http://journals.im.ac.cn/actamicrocn  
doi: 10.13343/j.cnki.wsxb.2014.08.004

## 黑曲霉 h408 阿魏酸酯酶基因的克隆及在毕赤酵母中的高效表达

周燕燕, 刘新利, 陈静, 胡泓宇, 侯运华\*

齐鲁工业大学食品与生物工程学院, 山东 济南 250353

**摘要:**【目的】实现在巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 中高效表达黑曲霉 (*Aspergillus niger*) h408 阿魏酸酯酶 A 基因 (*AnfaeA*), 并对重组酶特性进行表征。【方法】采用重叠延伸 PCR 扩增黑曲霉 h408 的阿魏酸酯酶 A 基因。将 *AnfaeA* 基因和毕赤酵母表达载体 pPIC9K 连接, 成功构建重组质粒 pPIC9K-*Anfae*, 经线性化后电转化 *P. pastoris* GS115, 透明圈法筛选活性高的转化子后进行诱导表达。利用紫外吸收法测定温度及 pH 对重组阿魏酸酯酶活性的影响。【结果】成功从 *A. niger* h408 中克隆得到阿魏酸酯酶 A 的 cDNA 基因 (GenBank: KF911349), 并实现了其在 *P. pastoris* GS115 中的高效表达。该基因长度为 783bp, 含有 1 个开放阅读框架 (ORF), 编码 260 个氨基酸, Blast 分析显示该基因和 GenBank 中黑曲霉阿魏酸酯酶序列同源性为 99%。翻译的氨基酸序列含有脂酶典型的活性盖子和催化三联体结构。从转化板上获得 1 株编号为 pPIC9K-*Anfae5* 的转化子阿魏酸酯酶活性最高, 酶活达 24.72 U/mL, 比活力为 40.84 U/mg, 比黑曲霉出发菌株 (22.1 mU/mL) 提高了 1100 倍左右。重组阿魏酸酯酶的最适 pH 为 5.0, 且在 pH 4.0-9.0 稳定性较好; 最适反应温度 50℃, 在 40-60℃ 时较稳定。【结论】阿魏酸酯酶在毕赤酵母中的高效分泌表达为其在饲料工业和造纸工业等工业化应用提供了前提, 也为后续改进酶学特性的定向进化奠定实验基础。

**关键词:**阿魏酸酯酶, 克隆, 表达, 黑曲霉

**中图分类号:**Q814 **文章编号:**0001-6209(2014)08-0876-06

阿魏酸酯酶 (feruloyl esterase, FAE, EC 3.1.1.73) 又名肉桂酸酯酶, 属羧酸酯水解酶的亚类之一, 能够水解低聚糖阿魏酸酯、阿魏酸甲酯及多聚糖阿魏酸酯中的酯键, 释放出强抗氧化性的阿魏酸<sup>[1-2]</sup>。FAE 可以和半纤维素酶 (如木聚糖酶) 协同作用, 促进纤维素彻底降解<sup>[2]</sup>, 因此 FAE 成为生物质资源降解的关键酶, 在饲料、食品和医药工业等领域具有广泛的应用前景<sup>[3]</sup>。

自然生境中产阿魏酸酯酶的微生物种类很广泛, 已报道乳酸杆菌 (*Lactobacillus* sp.)、链霉菌

(*Streptomyces* sp.)、嗜热纤维梭菌 (*Clostridium thermocellum*)、粗糙脉孢菌 (*Neurospora crassa*)、构巢曲霉 (*Aspergillus nidulans*)、黑曲霉 (*Aspergillus niger*)、黄曲霉 (*Aspergillus flavus*) 及宇佐美曲霉 (*Aspergillus usami*) 等均能产生阿魏酸酯酶<sup>[4-7]</sup>。由于多数野生菌株的产酶能力很低<sup>[4-7]</sup>, 这就限制了该酶的产业化应用。目前最主要的外源基因表达系统包括大肠杆菌 (*Escherichia coli*)、丝状真菌和酵母系统, 其中在生产非淀粉糖水解酶以毕赤酵母表达系统最为广泛<sup>[8]</sup>。基于此, 本文克隆了 *A. niger*

基金项目: 山东省高等学校科技计划项目 (J10LC08, J12LD06)

\* 通信作者。Tel: +86-531-89631192; Fax: +86-531-89631191; E-mail: houyinhua@qlu.edu.cn

作者简介: 周燕燕, (1987-), 女, 山东菏泽人, 硕士研究生, 从事丝状真菌发酵和分子生物学研究。E-mail: zhouyanflp@163.com

收稿日期: 2013-12-12; 修回日期: 2014-01-18

h408 的阿魏酸酯酶 A 编码基因, 并将该基因插入至表达载体 pPIC9K 中, 构建了毕赤酵母基因工程菌, 并对重组酶特性进行了初步研究。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株和质粒:** *A. niger* h408 和 *E. coli* DH5 $\alpha$  为本实验室保存, 毕赤酵母 GS115 和载体 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。质粒 pUCm-T 为 Biotek 公司的产品。

**1.1.2 主要试剂及培养基:** 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, *Taq* DNA 聚合酶、*pfu* DNA 聚合酶为 Biotek 公司的产品, DNA 凝胶回收试剂盒、低分子量蛋白 Marker 购自 Sangon 公司;

对硝基苯酚、阿魏酸乙酯购自 Sigma 公司; 阿魏酸对硝基苯酚酯根据文献一步法合成<sup>[9]</sup>; 其它常规试剂为国产分析纯。MD 培养基、YEPD、BMGY 种子培养基、BMMY 诱导培养基和 BSM 发酵培养基按 Invitrogen 公司毕赤酵母操作表达手册配制。

### 1.2 黑曲霉基因组 DNA 的提取

将 PDA 斜面保藏的 *A. niger* h408 菌株活化后, 接种于 100mL PDA 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C, 180 r/min 摇床培养 1-2 d。采用液氮研磨法<sup>[10]</sup> 提取其染色体。

### 1.3 重叠延伸 PCR 克隆黑曲霉阿魏酸酯酶 cDNA 序列

根据 GenBank 中检索到的阿魏酸酯酶 A 的基因序列, 利用引物设计软件 Primer5.0 设计外显子 1 和外显子 2 的扩增引物, 引物序列如表 1 所示。

表 1. 试验所用的引物及序列  
Table 1. Primers used in this study

| primer   | sequence (5'→3')                         | size/bp | underline      | employment                |
|----------|--|---------|----------------|---------------------------|
| P1       | gcGAATTCGCCTCTACACAGGGCATCTCCG           | 30      | <i>Eco</i> RI  | to amplify the exon1      |
| P2       | CTGTGGCCCGTCACAGTCAGC                    | 21      | none           |                           |
| P3       | CGCTGACTGTGACGGGCCACAGTCTCGGAGCGTCCCTGGC | 40      | overlap region | to amplify the exon2      |
| P4       | cgCCTAGGTTACCAAGTACAAGCTCCGCTCGT         | 32      | <i>Avr</i> II  |                           |
| factor-F | GCTGCTCCAGTCAACTACAACA                   | 24      | none           | to identify transformants |
| AOX3R    | ATGGCATTCTGACATCCTCTTGA                  | 23      | none           | to identify transformants |

首先以提取的 *A. niger* h408 染色体 DNA 为模板, 采用两对合成的引物组合 (P1 + P2, P3 + P4) 分别扩增外显子 1 和 2。PCR 反应条件如下: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 62 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。PCR 产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 然后分别胶回收外显子 1 和外显子 2。以外显子 1 和 2 回收产物的混合物 (1:1) 为模板, 以 P1 和 P4 为上下游引物, 进行重叠延伸 PCR。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。胶回收重叠延伸 PCR 产物, 并连接 pUCm-T 载体, CaCl<sub>2</sub> 法转化 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 获得重组质粒 pUCm-Anfae, 然后交由济南力戈生物技术公司测定序列。

### 1.4 毕赤酵母重组表达质粒的构建及表达

将拼接 PCR 回收产物用 *Eco*RI 和 *Avr*II 进行双酶切, 切胶回收目的基因, 与经同样双酶切的 pPIC9K 质粒连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 挑选阳性克隆子, 经 PCR 验证筛选获得重组表达载体 pPIC9K-Anfae, 并测序验证。重组表达质粒 pPIC9K-

Anfae 经 *Sac*I 线性化后, 采用电转化法<sup>[11]</sup> 导入毕赤酵母 GS115。将转化液涂布于 MD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 2 d。随机挑取重组子单菌落于试管中诱导培养, 将诱导上清加在含阿魏酸乙酯的平板上 30 $^{\circ}$ C 孵育 1 h, 观察菌落周围是否有透明圈, 有透明圈的为阳性转化子。按 Invitrogen 公司毕赤酵母操作表达手册提取酵母阳性转化子的染色体, 利用载体引物 (Factor-F + AOX3R, 反应程序参见 Invitrogen 公司毕赤酵母操作表达手册)、Factor-F + P4、P1 + AOX3R 和 *Anfae*A 自身引物 P1 + P4 组合分别进行 PCR 扩增, 同时以 pPIC9K 转化菌株的染色体 DNA 扩增为阴性对照。

### 1.5 重组阿魏酸酯酶工程菌发酵液的 SDS-PAGE 分析及活性测定

取 1 mL 转化子发酵液, 离心收集上清, 发酵液上清加入等体积 15% 三氯乙酸沉淀, 丙酮洗涤并干燥后, 采用 SDS-PAGE (聚丙烯酰胺凝胶电泳) 对表达产物进行分析。并采用 UV 法<sup>[12]</sup> 对发酵液上清进行酶活测定, 将反应条件下, 每分钟降解阿魏酸对

硝基苯酚酯生成 1  $\mu\text{mol}$  对硝基苯酚所需的酶量定义为一个酶活力单位 U。以牛血清蛋白做标准曲线,采用 Bradford 法<sup>[13]</sup>进行发酵液总蛋白浓度的测定。用 BandScan5.0 软件扫描蛋白电泳图来对目的蛋白进行定量。

## 1.6 重组阿魏酸酯酶特性研究

**1.6.1 最适 pH:** 最适 pH 值实验:采用 HPLC 法<sup>[12]</sup>。分别在不同 pH (pH 3.0 - 8.0) 条件下测定重组阿魏酸酯酶的活性。以某 pH 下的最高酶活为 100%, 计算其它 pH 下的相对酶活。绘制相对酶活随 pH 变化的曲线。

**1.6.2 pH 稳定性:** 将粗酶液用不同 pH 值缓冲液 (pH = 3.0 - 8.0 的 0.1 mol/L 磷酸钠缓冲液) 稀释, 于 35°C 下保温 1 h, 测定残余酶活。以其中酶活性最高者为 100%, 其它 pH 值下与该酶活的比值为该 pH 值下的相对酶活。绘制相对酶活-pH 曲线。

**1.6.3 重组酶最适温度及温度稳定性:** 分别在不同温度下 (30 - 80°C) 测定阿魏酸酯酶的酶活。同理绘制温度-相对酶活曲线。将粗酶液分别置于 40°C、50°C、60°C 保温 10 - 60 min, 测定残余酶活性, 绘制不同温度下相对酶活-温育时间曲线。

## 2 结果和分析

### 2.1 黑曲霉阿魏酸酯酶 A cDNA 的克隆及序列分析

以提取的 *A. niger* 染色体为模板, 按方法 1.3 所述采用重叠延伸 PCR 成功克隆获得黑曲霉阿魏酸酯酶 A 的 cDNA 序列, 电泳结果 (省略) 显示在 400 bp 左右获得外显子 1 和外显子 2 的条带, 条带长度与预期设计的大小吻合 (外显子 1 去信号肽后 398 bp; 外显子 2 为 385 bp)。经重叠延伸 PCR 扩增后在 750 bp 左右得到一条明亮的条带, 大小与预期连接后的产物一致, 初步说明外显子 1 和 2 已经连接。测序 (结果省略) 显示 PCR 产物长度为 783 bp, 含有 1 个开放阅读框架, 编码 260 个氨基酸。翻译后的氨基酸序列中含有典型的脂肪酶的盖子和催化三联体结构。

该基因序列已经提交 NCBI GenBank, 编号为 KF911349。Blast 分析显示该序列与已发布的阿魏酸酯酶 A 序列 (HM123720.1) 的同源性为 99%。采用 DNAMAN 软件对翻译的蛋白序列进行分析, 理论蛋白分子量为 28233.8Da, 带负电的氨基酸 (Asp +

Glu) 28 个, 带正电的氨基酸 (Lys + Arg) 11 个。理论等电点 pI 为 4.12。

### 2.2 黑曲霉阿魏酸酯酶 A 基因在毕赤酵母 GS115 中的表达

按照 1.4 中所述方法, 进行阿魏酸酯酶 A 表达载体的构建及转化。测序证明表达载体 pPIC9K-Anfae 构建无误, 序列插入的相位正确, 无移码突变。表达载体线性化后, 电转化 GS115 菌株共获得 331 株转化子。对转化子诱导培养后的发酵上清进行平板活性检测, 结果得到 5 株活性较强的转化子, 如图 1 所示。从图中可以看出 5 号转化子透明圈直径最大, 将其编号为 pPIC9K-Anfae5。采用 UV 法测定诱导 3d 后其上清液酶活为 24.72U/mL。

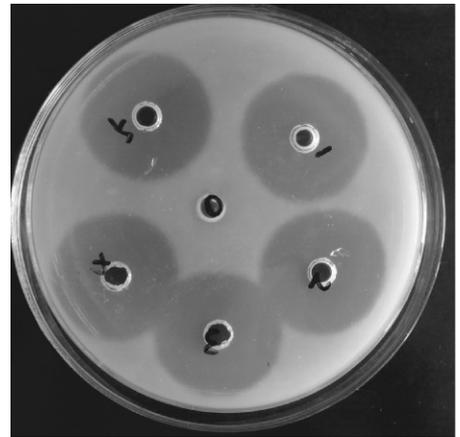


图 1. 阿魏酸乙酯平板法检测酶活

Figure 1. The feruloyl esterase activity of *P. pastoris* transformants.

0: BMMY; 1 - 5: pPIC9K-Anfae/GS115 1 - 5.

以 pPIC9K-Anfae5 转化子的染色体 DNA 为模板, 进行 PCR 验证, 转化子均在预期位置处获得明亮的 PCR 条带 (结果省略), 而阴性对照除了载体引物组合得到 300 bp 左右的条带之外, 其余引物组合均无条带, PCR 结果证实 *AnfaeA* 基因成功整合到毕赤酵母的染色体中。

### 2.3 重组酵母发酵液上清 SDS-PAGE 分析及阿魏酸酯酶活性测定

以甲醇诱导表达重组毕赤酵母, 每 12 h 取样, 测定发酵上清中的阿魏酸酯酶活力, 发现酶活力在诱导培养 3d 达到高峰, 按照方法 1.5 所述对 5 号转化子发酵液上清进行蛋白沉淀, 然后溶解后进行 SDS-PAGE 分析, 结果见图 2, 在约 33 kDa 处有 1 条明显的特异性蛋白条带, 而阴性对照 pPIC9K/GS115 诱导上清中几乎没有明显蛋白条带, 这初步表明目的基因得

到成功表达。发酵上清中杂蛋白很少, Bradford 法测得发酵液总蛋白浓度为 0.676 mg/mL, BandsScan 软件扫描显示目的蛋白浓度为 0.605 mg/mL, 占发酵总蛋白的 89.6%。重组酶的比活力为 40.84 U/mg。由于毕赤酵母中存在糖基化修饰的原因, 致使重组酶的分子量高于理论分子量(28.23 kDa)。

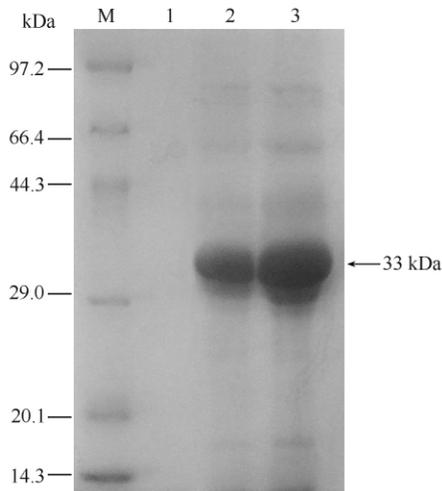


图 2. 阿魏酸酯酶发酵液 SDS-PAGE 分析

Figure 2. SDS-PAGE analysis of fermentation supernatants. M, Low molecular weight protein marker; lane1, Fermentation supernatants from pPIC9K/GS115; lane 2 and 3, Fermentation supernatants from pPIC9K-Anfae/GS115 (sampling amount 10 $\mu$ L and 20 $\mu$ L, respectively).

## 2.4 重组阿魏酸酯酶特性研究

按照 1.6.1 中的方法测定重组阿魏酸酯酶 A 的最适 pH 及 pH 稳定性, 结果见图 3, 该酶的最适 pH 为 5.0 左右, 在 pH 为 4 - 7 范围内催化活性较高, 当低于 3.0 或高于 9.0 时, 几乎没有活性。由图 3 可以看出, 重组阿魏酸酯酶在 pH 4.0 - 9.0 范围内较稳定, 该特性有助于该酶在造纸制浆中的应用。当 pH 为 3.0 时于 35 $^{\circ}$ C 保温 1 h, 几乎丧失活性; 当 pH 为 9.5 时 35 $^{\circ}$ C 孵育 1 h 残余酶活为 42.89%。

对重组阿魏酸酯酶的最适反应温度及温度稳定性也进行了测定。结果如图 4 所示, 其最适温度为 50 $^{\circ}$ C, 在 40 - 60 $^{\circ}$ C 之间有较高催化活性, 当温度达 70 $^{\circ}$ C 时, 催化活性下降, 酶反应速率是正常的 29.8%。由图 5 可以看出, 重组酶在 40 - 50 $^{\circ}$ C 时较稳定, 50 $^{\circ}$ C 处理 1 h 后, 仍保留 71.89% 的酶活。当温度高于 60 $^{\circ}$ C 时, 则稳定性较差, 处理 10min 后, 残余酶活仅为 2.92%。因此要促进其应用范围需要提高该酶的热稳定性。

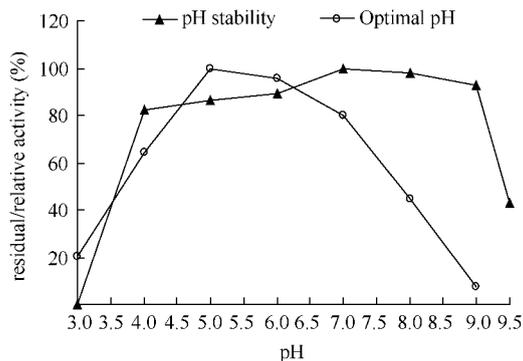


图 3. pH 对重组阿魏酸酯酶活力及其稳定性的影响

Figure 3. Effects of pH on the activity and stability of recombinant feruloyl esterase.

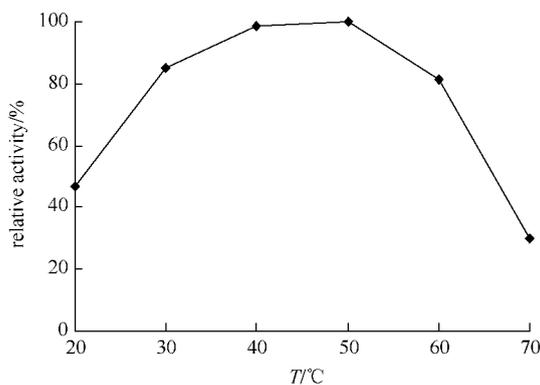


图 4. 温度对重组阿魏酸酯酶活力的影响

Figure 4. Effects of temperature on the activity of recombinant feruloyl esterase.

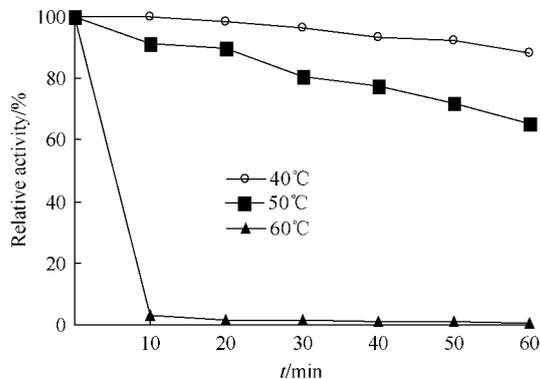


图 5. 重组阿魏酸酯酶的温度稳定性

Figure 5. Effects of temperature on the stability of recombinant feruloyl esterase.

## 3 讨论

阿魏酸酯酶是半纤维素酶系中关键的脱支酶之一, 在降解生物质资源方面发挥关键的作用。基于

阿魏酸酯酶广泛的应用前景及目前仍未有工业化生产的现状,本文对 *A. niger* 阿魏酸酯酶 A 基因进行了克隆和在毕赤酵母中的高效表达的研究。

最早报道黑曲霉产生阿魏酸酯酶的研究是在 1993 年<sup>[14]</sup>。黑曲霉野生菌株和其他丝状真菌一样产生阿魏酸酯酶的活性较低,通过优化黑曲霉培养基组成和发酵条件后,目的蛋白产量提高为 1 mg/mL,酶活为 20.6 nkat/mL<sup>[15]</sup>。后来 de Vries 等通过提高基因拷贝数实现了在黑曲霉和卡宾曲霉中的表达,但是表达量都很低,原因是丝状真菌胞内高活性酸性蛋白酶对其进行降解<sup>[16]</sup>。2001 Juge 等<sup>[17]</sup>在毕赤酵母中实现了黑曲霉的 *faeA* 基因异源高效表达,表达量达 300 mg/L。相比这些报道的研究结果而言,本文重组蛋白表达量(605 mg/mL)远远超出这些报道。阿魏酸酯酶在酵母中的高效表达为其在饲料工业和造纸工业等工业化大规模应用提供了前提。

一般情况下,真菌来源的阿魏酸酯酶的最适温度为 30 - 60℃。本文中重组阿魏酸酯酶的温度为 50℃,在 40 - 60℃ 时较稳定,温度高于 60℃ 时,则稳定性较差,这就无法满足一些高温过程,例如动物饲料制粒、纸浆漂白和溶解浆制备等过程。因此利用定点突变、DNA shuffling 和定向进化等策略对黑曲霉 *faeA* 基因进行改造的研究就十分必要。通过改造以期获得酶学性质更优良,比活力更高的基因工程菌,为实现阿魏酸酯酶的工业化应用奠定坚实的基础。

## 参考文献

- [1] Zeng W, Chen H. Synergistic effect of feruloyl esterase and cellulase in hydrolyzation of steam-exploded rice straw. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2009, 25 (1) : 49-54. (in Chinese)  
曾薇, 陈洪章. 阿魏酸酯酶和纤维素酶在水解汽爆稻草中的协同作用. *生物工程学报*, 2009, 25 (1) : 49-54.
- [2] Benoit I, Danchin EG, Bleichrodt RJ, de Vries RP. Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity. *Biotechnology Letters*, 2008, 30 (3) : 387-396. .
- [3] Wong DW. Feruloyl esterase: a key enzyme in biomass degradation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2006, 133 (2) : 87-112.
- [4] Crepin VF, Faulds CB, Connerton IF. A non-modular type B feruloyl esterase from *Neurospora crassa* exhibits concentration-dependent substrate inhibition. *The Biochemical Journal*, 2003, 370 (Pt 2) : 417-427.
- [5] Zhang S, Pei X, Wu Z. Cloning and Expression of feruloyl esterase A from *Aspergillus niger*, and establishment of fast activity detection methods. *Chinese Journal of Applied and 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. *应用与环境生物学报*, 2009, 15 (2) :276-279.
- [6] Zhang SB, Zhai HC, Wang L, Yu GH. Expression, purification and characterization of a feruloyl esterase A from *Aspergillus flavus*. *Protein Expression and Purification*, 2013, 92 (1) : 36-40.
- [7] Gong Y, Yin X, Wu M, Zeng Y. Cloning, expression and enzymatic characterization of feruloyl esterase A from *Aspergillus usamii*. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2013, 32 (7) :706-712. (in Chinese)  
龚燕燕, 殷欣, 郭敏辰, 曾妍. 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. *食品与生物技术学报*, 2013, 32 (7) :706-712.
- [8] Cereghino JL, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24 (1) : 45-66.
- [9] Hegde S, Srinivas P, Muralikrishna G. Single-step synthesis of 4-nitrophenyl ferulate for spectrophotometric assay of feruloyl esterases. *Analytical Biochemistry*, 2009, 387 (1) : 128-129.
- [10] Al-Samarrai TH, Schmid J. A simple method for extraction of fungal genomic DNA. *Letters in Applied Microbiology*, 2000, 30 (1) : 53-56.
- [11] Wu S, Letchworth GJ. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol. *BioTechniques*, 2004, 36 (1) : 152-154.
- [12] Liu Y, Xu Z. Study on the determination of ferulic acid esterase enzyme activity with spectrophotometer method and its impact factors. *Science and Technology of Food Industry*, 2013, 13 (34) : 284-288. (in Chinese)  
刘元元, 徐泽平. 阿魏酸酯酶活性的分光光度法测定及影响因素研究. *食品工业科技*, 2013, 13 (34) : 284-288.
- [13] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248-254.
- [14] Faulds CB, Williamson G. Ferulic acid esterase from *Aspergillus niger*: purification and partial characterization of two forms from a commercial source of pectinase.

*Biotechnology and Applied Biochemistry*, 1993, 17 (Pt 3): 349-359.

[15] Record E, Asther M, Sigoillot C, Pages S, Punt PJ, Delattre M, Haon M, van den Hondel CA, Sigoillot JC, Lesage-Meessen L, Asther M. Overproduction of the *Aspergillus niger* feruloyl esterase for pulp bleaching application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 62 (4): 349-355.

[16] de Vries RP, Michelsen B, Poulsen CH, Kroon PA, van den Heuvel RH, Faulds CB, Williamson G, van den

Hombergh JP, Visser J. The *faeA* genes from *Aspergillus niger* and *Aspergillus tubingensis* encode ferulic acid esterases involved in degradation of complex cell wall polysaccharides. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997, 63 (12): 4638-4644.

[17] Juge N, Williamson G, Puigserver A, Cummings NJ, Connerton IF, Faulds CB. High-level production of recombinant *Aspergillus niger* cinnamoyl esterase (FAEA) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Yeast Research*, 2001, 1 (2): 127-132.

## Cloning of feruloyl esterase gene from *Aspergillus niger* h408 and high-efficient expression in *Pichia pastoris*

Yanyan Zhou, Xinli Liu, Jing Chen, Hongyu Hu, Yunhua Hou\*

College of Food and Bioengineering, Qilu University of Technology, Jinan 250353, Shandong Province, China

**Abstract:** [Objective] To achieve the high-efficiency expression of feruloyl esterase gene (*AnfaeA*) from *Aspergillus niger* h408 in *Pichia pastoris* and characterize the recombinant feruloyl esterase (FAE). [Methods] Using gene splicing by overlap extension (SOE), we cloned *AnfaeA* gene from *A. niger* h408 and subcloned into T vector for sequencing analysis. The expression vector pPIC9K-*Anfae* was constructed by the ligation of the *AnfaeA* gene into the shuttle vector pPIC9K. The plasmid pPIC9K-*Anfae* was linearized and then electrotransformed into *P. pastoris* GS115. The recombinant strain with high level of FAE activity was obtained through plate screening. Effects of pH and temperature on recombinant FAE were determined by ultraviolet (UV) methods. [Results] We have successfully cloned and high-efficiently expressed the *AnfaeA* gene (GenBank: KF911349) from *A. niger* h408 in *P. pastoris* GS115. The sequencing result showed that the length of *AnfaeA* was 783bp. The gene contained an Open Reading Frame encoding 260 amino acids and was similar to feruloyl esterase A from *A. niger* by homology analysis. The deduced amino acids contained a typical active lid and catalytic triad of lipase. The SDS-PAGE result indicated that molecular weight of the recombinant FAE was about 30 kDa and the activity of the recombinant enzyme was 24.72 U/mL. The specific activity of the recombinant FAE was 40.84 U/mg. Compared with *A. niger* h408, the recombinant enzyme activity increased about to 1100 times. The optimal temperature and pH for recombinant FAE was 50°C and 5.0, respectively. Recombinant FAE showed nearly 80% of its maximal activity at 60°C and was active in the pH range 4.0-9.0. [Conclusions] The high-efficient expression of *AnfaeA* gene in *P. pastoris* provided a prerequisite for achieving industrial application in feed and paper-making industry. In addition, the results established the experimental basis for further improvement of recombinant feruloyl esterase by directed evolution.

**Keywords:** feruloyl esterase, cloning, expression, *Aspergillus niger*

(本文责编:王晋芳)

Supported by the S&T Plan Projects of Shandong Provincial Education Department (J10LC08, J12LD06)

\* Corresponding author. Tel: +86-531-89631192; Fax: +86-531-89631191; E-mail: houyunhua@qlu.edu.cn

Received: 12 December 2013 / Revised: 18 January 2014