



双孢蘑菇酪氨酸酶基因在酿酒酵母中的异源表达及其酶学特性

吴玉珍¹, 洪亚天^{1,3}, 刘全力¹, 徐海津¹, 白艳玲¹, 张秀明¹, 乔明强^{1,2*}

¹南开大学生命科学学院, 天津 300071

²南开大学分子微生物学与技术教育部重点实验室, 天津 300071

³济南市中心医院, 山东 济南 250013

摘要:【目的】在酿酒酵母中异源表达双孢蘑菇来源的酪氨酸酶基因 *PPO2*, 并研究酪氨酸酶在酿酒酵母胞内及胞外的酶学特性。【方法】提取双孢蘑菇总 RNA, 通过 RT-PCR 克隆酪氨酸酶基因 *PPO2*, 构建表达载体 pSP-G1-*PPO2*, 并转化至酿酒酵母进行表达, 采用镍亲和层析纯化蛋白并研究其酶学性质。【结果】在酿酒酵母中正确表达了大小为 65 kDa 的酪氨酸酶蛋白。重组酶能催化底物酪氨酸产生黑色素。体外活性测定表明, 酪氨酸酶催化最适温度为 45 °C, 以酪氨酸和多巴为底物时最适 pH 分别为 7.0 和 8.0。在酿酒酵母中测得底物酪氨酸浓度低于 2.5 mg/mL 时, 黑色素的产量与底物浓度呈现正相关性。【结论】来源于双孢蘑菇的酪氨酸酶基因 *PPO2* 在酿酒酵母中成功表达, 重组酶具有良好的酶学特性。利用酪氨酸酶产物黑色素的产量与底物浓度呈现正相关性这一特性, 可将其作为细胞酪氨酸产量的传感器, 为高通量筛选酪氨酸高产菌株提供了思路。

关键词: 酪氨酸酶, 异源表达, 双孢蘑菇, 酿酒酵母, 酶学特性

酪氨酸酶是普遍存在于微生物、植物、无脊椎动物及哺乳动物中的一种多酚氧化酶^[1]。在氧气的参与下, 酪氨酸酶能将单酚类化合物(如酪氨酸)氧化为多酚类化合物(如 L-多巴)及醌类化合物进而形成肉眼可见的黑色素^[2]。酪氨酸酶属于三型铜蛋白, 其酶活性中心含有一个双核的铜原子位点^[3-4], 铜原子与分子氧形成侧面桥连, 从而发挥催化活性。因此酪氨酸酶发挥催化活性需要铜离

子的参与。

目前来源于假单胞菌^[5]、曲霉菌^[6]、木霉菌^[7]、漏斗棱孔菌^[8]等微生物的酪氨酸酶基因均已被分离鉴定。其中双孢蘑菇来源的酪氨酸酶是真菌中最早被研究的^[9]。酪氨酸酶在食品药品生产、医学、美容、生物传感器^[10]及废水处理等多个领域中都发挥着重要作用。来源于双孢蘑菇的酪氨酸酶是目前唯一商品化的酪氨酸酶, 但由于提取纯化的

基金项目: 天津市应用基础与前沿技术重点项目(17JCZDJC32200)

*通信作者。Tel: +86-22-23503340; E-mail: qiaomq@nankai.edu.cn

收稿日期: 2017-04-23; 修回日期: 2017-06-10; 网络出版日期: 2017-08-04

技术限制，商品化酪氨酸酶的价格昂贵且纯度不高。已有文献报道，商品酪氨酸酶中含有杂蛋白、碳水化合物、酚类化合物及漆酶等可能会干扰酪氨酸酶活性鉴定的杂质^[11]，因此对于获得低成本、高纯度、相对安全的异源酪氨酸酶的研究具有重要的意义。

酿酒酵母作为真核模式生物，且为非致病菌，用于表达双孢蘑菇来源的酪氨酸酶具有天然的优势，是进行微生物发酵生产黑色素的合适宿主。除此之外，针对酿酒酵母中酪氨酸产量测定方法的缺陷，酪氨酸酶在酿酒酵母中的表达亦可作为酪氨酸产量的生物传感器，为高通量筛选高产酪氨酸菌株提供了可能^[12-13]。

本文在酿酒酵母中异源表达了双孢蘑菇来源的酪氨酸酶基因 *PPO2*，对酪氨酸酶蛋白进行了分离纯化和鉴定，并对其在体外的催化条件进行了探索，特别对酪氨酸酶在酿酒酵母胞内的酶学特性进行了探究，为其在酿酒酵母中作为酪氨酸产量的生物传感器提供了实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒：本研究中用到的菌株和质粒

如表 1 所示。

1.1.2 培养基和生长条件：YPD 培养基(g/L)：葡萄糖 20，蛋白胨 20，酵母粉 10。营养缺陷培养基 SC-ura (g/L)：葡萄糖 20，硫酸铵 5，无氨基酵母氮源 1.7，无尿嘧啶氨基酸混合物 1.3。LB 培养基 (g/L)：胰蛋白胨 10，酵母粉 5，氯化钠 10。氨苄青霉素的使用浓度为 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。固体培养基加入 20 g/L 琼脂粉。BY4741 的培养条件为 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min；大肠杆菌培养条件为 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min。

1.1.3 主要试剂：实验所用 PCR 相关试剂、限制性内切酶、RNAiso Plus 试剂盒、PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒购于大连宝生物工程技术有限公司；Super-Bradford Protein Assay Kit 试剂盒、大肠杆菌感受态 DH5 α 购自康为世纪生物科技有限公司；质粒快速小提试剂盒购于天根生物科技有限公司。

1.1.4 主要仪器设备：PCR 热循环仪、DNA 凝胶电泳仪、冷冻离心机、蛋白质半干转膜仪、752 紫外可见分光光度计、凝胶成像仪、915 型 Accumet pH 计。

1.2 酪氨酸酶基因表达载体的构建

按照 TaKaRa 公司的 RNAiso Plus 及 PrimeScript 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书提取双孢蘑菇的总 RNA 并合成第一链 cDNA，利用引

表 1. 本研究中使用菌株和质粒

Table 1. Strains and plasmids used in this study

Strains or plasmids	Characteristics	Source
BY4741	<i>MATa</i> , <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i> , <i>met15Δ0</i>	EUROSCARF
SC-pSP-G1	BY4741 containing pSP-G1 plasmid	This study
SC-PPO2	BY4741 containing pSP-G1-PPO2	This study
pSP-G1	Shuttle vector, Amp ^r , <i>URA3</i>	EUROSCARF
pSP-G1-PPO2	PPO2 expression vector	This study
DH5 α	Host strain to amplify plasmid DNA and the <i>mazF</i> source	Laboratory stock
pGEM-T Easy	Cloning vector for the PCR products, Amp ^r	Promega

物对 PPO2-F (ATAACTAGTATGTCGCTGATTGCTACTGT)和 PPO2-R (ATAAGATCTTCAATGGTGATGGTGATGATGACCACCGTTAATAACATGCACCGCGA)进行 PCR 扩增克隆得到 PPO2 基因,并连接至 pGEM-T Easy 载体,转化大肠杆菌 DH5 α 。测序验证序列正确的质粒与表达载体 pSP-G1 均通过 *Bgl* II、*Spe* I 双酶切后回收并连接,转化大肠杆菌,通过酶切验证后命名为 pSP-G1-PPO2 并保存菌种。

1.3 酪氨酸酶在酿酒酵母中的表达及纯化

将质粒 pSP-G1-PPO2 转化至酿酒酵母 BY4741 中,利用营养缺陷标记 *URA3* 进行筛选,涂布至 SC-ura 培养基平板。通过菌落 PCR 验证正确的转化子命名为 SC-PPO2。分别接种 SC-PPO2 与对照 SC-pSP-G1 菌株至 5 mL SC-ura 液体培养基中,培养至 OD_{600} 为 1.5–1.7 时收集菌体,加入 100 μ L 裂解液和 50 mg 玻璃珠振荡破碎 10 min, 4 $^{\circ}$ C 离心收集上清。取 100 μ L 上清液,加入 25 μ L 上样缓冲液,加热变性 10 min 后,进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,银染显色及 Western blot 蛋白杂交。当凝胶电泳蛋白条带与预期一致后进行扩大培养,按照上述方法,同样进行细胞破碎,收集上清液,进行 Ni-NTA 柱纯化蛋白并脱盐处理。根据康为世纪 Super-Bradford Protein Assay Kit 试剂盒说明绘制 BSA 标准曲线,计算纯化样品中的蛋白浓度,纯化后的蛋白于 -80° C 保存。

1.4 酪氨酸酶活力的测定

酪氨酸酶活力的测定参照文献[14]中的方法,以 L-酪氨酸和 L-多巴为底物,在酶促作用下生成产物黑色素,利用黑色素最大光吸收波长为 475 nm,通过分光光度计测定黑色素光吸收值来测定酪氨酸酶的活力。

1.5 酪氨酸酶的体外酶学特性

1.5.1 底物浓度与酪氨酸酶活力的关系: L-酪氨酸浓度设置为 0.1、0.2、0.5、1.0、2.0 mmol/L; L-多巴浓度设置为 1、2、5、10、15、30 mmol/L。取 100 μ L 酶液与 2.9 mL 分别含有底物 L-酪氨酸或 L-多巴的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)充分混匀后测定反应体系的起始 OD_{475} ,分别于常温条件下反应 60 min 与 15 min,反应结束后测定终止 OD_{475} 。

1.5.2 温度与酪氨酸酶活力的关系: L-酪氨酸浓度 2 mmol/L, L-多巴浓度 15 mmol/L,同样取 100 μ L 酶液与 2.9 mL 含有底物的磷酸盐缓冲液(pH 7.0)混匀后测定初始 OD_{475} ,分别置于 20、30、37、45、55、65、75 $^{\circ}$ C 充分反应, L-酪氨酸与 L-多巴反应体系分别于 60 min 和 15 min 后测定终止 OD_{475} 。

1.5.3 pH 与酪氨酸酶活力的关系: 分别配置含 2 mmol/L L-酪氨酸, 15 mmol/L L-多巴的磷酸盐缓冲液,分别将 pH 调节至 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0。同样取 100 μ L 酶液与 2.9 mL 含有底物的磷酸盐缓冲液混匀后测定初始 OD_{475} ,分别于常温条件下反应 60 min 与 15 min,反应结束后测定终止 OD_{475} 。

1.6 酪氨酸酶在酿酒酵母中的酶学特性测定

1.6.1 pH 与酪氨酸酶活力的关系: 挑取酿酒酵母 SC-PPO2 单菌落于 5 mL SC-ura 液体培养基, 30 $^{\circ}$ C、220 r/min 过夜培养,取 250 μ L 培养物转接至 5 mL SC-ura 培养基,培养至 OD_{600} 为 3.5–4.0,补加酪氨酸至其终浓度为 5 mg/mL,加入 CuSO_4 至终浓度为 1 mmol/L。加入 NaOH 分别调节 pH 至 5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、10.0。30 $^{\circ}$ C 继续培养 24 h 后,观察颜色变化,取出 1 mL 培养物,离心取上清测定 OD_{475} 。

1.6.2 底物浓度与酪氨酸酶活力的关系: 同 1.6.1 所述培养菌体至 OD_{600} 3.5–4.0, 加入 NaOH 调节 pH 至 9.0, 加入 $CuSO_4$ 至终浓度为 1 mmol/L。补加 L-酪氨酸至终浓度分别为 0、0.1、0.5、1.0、2.5、5.0 mg/mL, 30 °C 继续培养 24 h 后, 观察颜色变化, 取出 1 mL 培养物, 离心取上清测定 OD_{475} 。

1.6.3 铜离子浓度与酪氨酸酶活力的关系: 同 1.6.1 所述培养菌体至 OD_{600} 为 3.5–4.0, 补加酪氨酸至其终浓度为 2.5 mg/mL, 加入 NaOH 调节 pH 至 9.0, 分别加入 $CuSO_4$ 至终浓度为 0、0.1、0.2、0.5、1.0 mmol/L。30 °C 继续培养 24 h 后, 观察颜色变化, 取出 1 mL 培养物, 离心取上清测定 OD_{475} 。

2 结果和分析

2.1 酪氨酸酶基因表达载体的构建

处理新鲜双孢蘑菇提取总 RNA, 结果如图 1-A 所示。利用引物对 PPO2-F/R 克隆基因 PPO2, 其中下游引物引入 his-TAG。反转录克隆到的基因 PPO2 如图 1-B 所示。条带大小为 1.7 kb, 符合预期。连接 pGEM-T Easy 载体后验证正确的质粒与表达载体 pSP-G1 双酶切后纯化并连接。质粒通过 *Bgl* II、*Spe* I 双酶切, 如图 1-C 所示, 得到 7.3 kb 与 1.7 kb 两条条带, 符合预期, 并进行测序将序列正确的转化子用于下一步实验。

2.2 酪氨酸酶在酿酒酵母中的表达及纯化

菌株 SC-PPO2 与对照 SC-pSP-G1 过夜培养, 添加外源酪氨酸继续培养 24 h, 肉眼可见菌株 SC-PPO2 培养物变黑, 如图 2-A 中 2 号试管所示。1 号试管为空白对照, 无黑色素产生。表明 PPO2

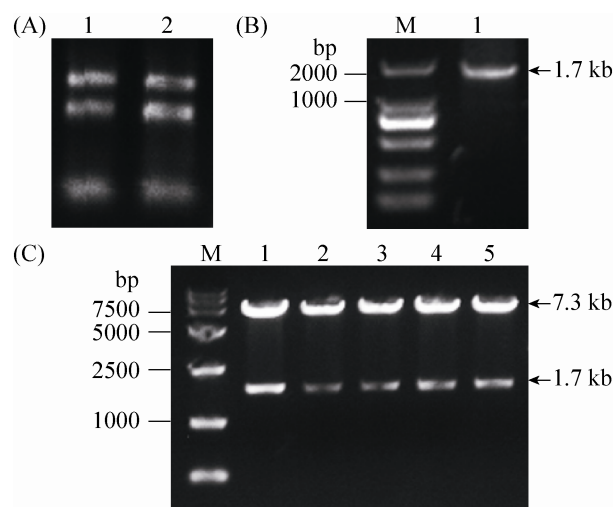


图 1. 酪氨酸酶基因表达载体的构建

Figure 1. Construction of expression vector of tyrosinase-coding gene PPO2. A: total RNA of *Agaricus bisporus*. B: clone of tyrosinase-coding gene PPO2 by RT-PCR. C: enzyme digestion analysis using *Spe* I and *Bgl* II. M: marker.

基因在酿酒酵母中正确表达且具生物活性, 能够将底物酪氨酸催化为黑色素。蛋白杂交检测结果如图 2-B 所示, SC-PPO2 菌株正确表达 65 kDa 大小的酪氨酸酶, 泳道 1 空白对照中无此条带。

酶液经过镍柱纯化且进行脱盐处理后, 通过 SDS-PAGE 检测蛋白纯化结果。如图 2-C 所示, 纯化后条带单一, 大小正确, 表明纯化结果较好, 可用于酪氨酸酶的活性检测。蛋白质定量采用牛血清蛋白 BSA 作为标准品, 由标准曲线计算蛋白含量约为 0.604 mg/mL。

2.3 重组酪氨酸酶的体外酶学特性

2.3.1 底物浓度与酪氨酸酶活力的关系: 酪氨酸酶同时具有单酚氧化酶与多酚氧化酶的活性^[15], 因此我们选用 L-酪氨酸与 L-多巴分别作为底物表征酪氨酸酶的两种酶活性。酪氨酸酶活力与 L-酪氨酸浓度的关系如图 3-A 所示, 可见当酪氨酸浓

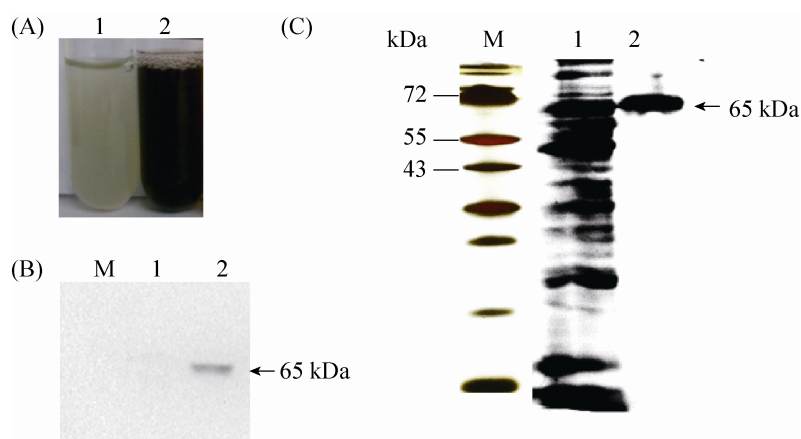


图 2. 酪氨酸酶蛋白的表达、Western blot 检测及纯化分析

Figure 2. The enzyme activity analysis, Western blot analysis and purification of recombinant tyrosinase. A: enzyme activity analysis of tyrosinase in *Saccharomyces cerevisiae*. Lane 1: control SC-pSP-G1; lane 2: recombinant SC-PPO2. B: Western blot analysis of recombinant tyrosinase. M: protein marker; lane 1: control SC-pSP-G1; lane 2: recombinant SC-PPO2. C: SDS-PAGE analysis of purified tyrosinase. M: protein marker; lane 1: recombinant strain SC-PPO2; lane 2: purified protein tyrosinase.

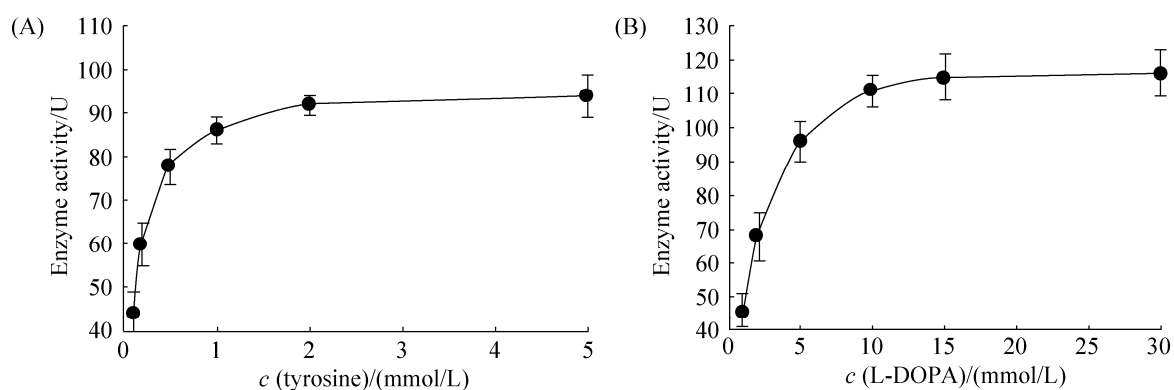


图 3. 底物浓度对酪氨酸酶活性的影响

Figure 3. Effect of substrate concentration on tyrosinase activity. Values represent results of three independent operations. The average and standard error were calculated.

度低于 2 mmol/L 时, 酶催化速率随底物浓度增加而升高, 高于 2 mmol/L 时反应速率没有明显变化, 表明此时底物已饱和; 酪氨酸酶活力与 L-多巴浓度的关系如图 3-B 所示, 当 L-多巴浓度低于 10 mmol/L 时, 酶催化速率也随底物浓度增加而升高, 高于 10 mmol/L 后酶催化速率保持不变。根据 Lineweaver-Burk 方程 $1/V = (K_m/V_{max}) \times 1/[S] + 1/V_{max}$, 计算可得以酪氨酸为底物时 $K_m = 0.12$ mmol/L,

$V_{max} = 97$ U/min; 以 L-多巴为底物时, $K_m = 1.86$ mmol/L, $V_{max} = 132$ U/min。其中 K_m 是酶催化反应的重要常数, 表征酶与底物的亲和力, K_m 越小, 酶与底物之间的亲和力越高。

2.3.2 温度与酪氨酸酶活力的关系: 图 4 显示的是酪氨酸酶活性受温度的影响, 可见在 45 °C 时酶活力达到最高, 30–65 °C 酪氨酸酶均表现出较高的酶活力。

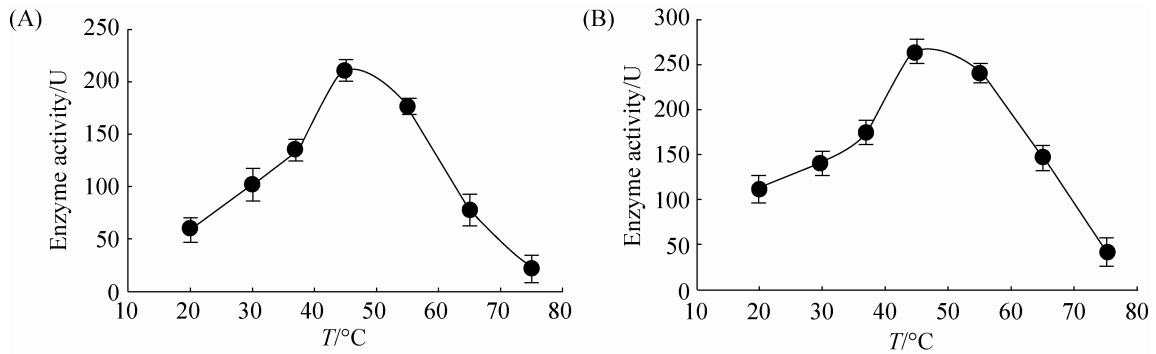


图 4. 温度对酪氨酸酶活性的影响

Figure 4. Effect of temperature on tyrosinase activity. A: L-tyrosine as substrate; B: L-DOPA as substrate. Values represent results of three independent operations. The average and standard error were calculated.

2.3.3 pH 与酪氨酸酶活力的关系: 酪氨酸酶活力与 pH 关系如图 5 所示, 以 L-酪氨酸为底物时最适 pH 约为 7.0, 以 L-多巴为底物时最适 pH 约为 8.0, 表明酪氨酸酶发挥单酚氧化酶与多酚氧化酶的最适 pH 有所差别, 但总体相近。

2.4 酪氨酸酶在酿酒酵母中的酶学特性

2.4.1 pH 与酪氨酸酶活力的关系: 将生长至稳定期的 SC-PPO2 培养体系分别调节 pH 至 5.0–10.0,

继续培养 24 h 后, 培养体系的颜色变化如图 6 所示。测得上清 OD_{475} 的结果见表 2, 与肉眼观察结果较为一致。将生长至稳定期的培养体系 pH 调为 9.0 时, 培养 24 h 后, 培养液中的 pH 值降为 7.7, 黑色素积累量最高。

2.4.2 底物浓度与酪氨酸酶活力的关系: 通过在培养体系中外源添加不同浓度的酪氨酸, 颜色变化如图 7 所示, 上清 OD_{475} 结果如表 3, 可见酪氨

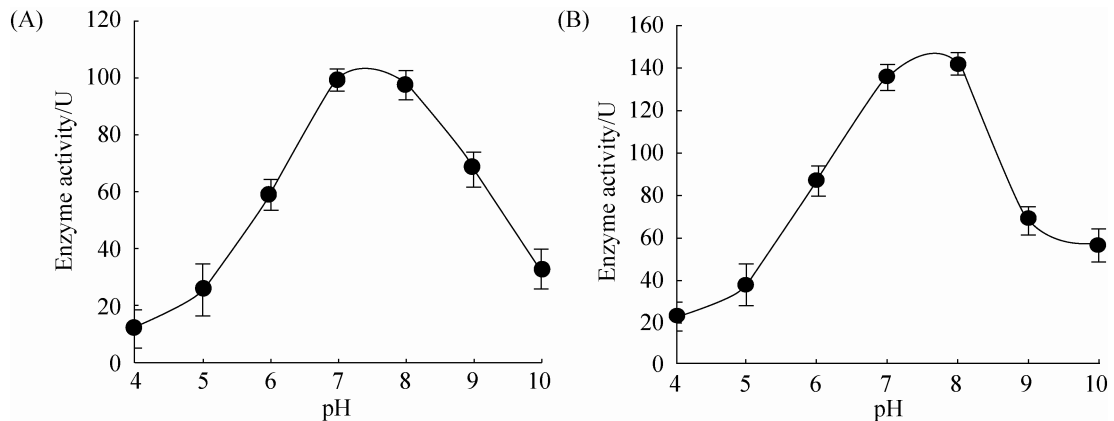


图 5. pH 对酪氨酸酶活性的影响

Figure 5. Effect of pH on tyrosinase activity. A: L-tyrosine as substrate; B: L-DOPA as substrate. Values represent results of three independent operations. The average and standard error were calculated.

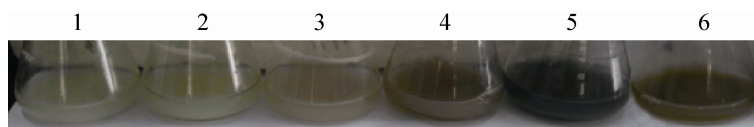


图 6. pH 对酿酒酵母胞内酪氨酸酶活性的影响

Figure 6. Effect of pH on tyrosinase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. 1–6: pH: 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 and 10.0.

表 2. 不同 pH 下的紫外吸收测定结果

Table 2. Effect of pH on intracellular tyrosinase activity

pH	OD_{475}
5.0	0.443
6.0	0.596
7.0	1.395
8.0	2.081
9.0	3.249
10.0	2.794

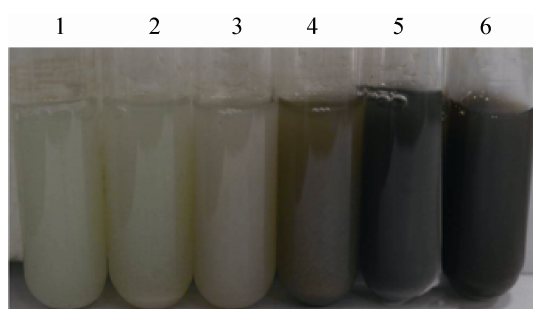


图 7. 底物浓度对酿酒酵母胞内酪氨酸酶活性的影响
Figure 7. Effect of substrate concentration on tyrosinase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. 1–6: tyrosine concentration: 0, 0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0 mg/mL.

表 3. 不同酪氨酸浓度下的紫外吸收测定结果

Table 3. Effect of substrate concentration on tyrosinase activity

c (Tyrosine)/(mg/mL)	OD_{475}
0	0.147
0.1	0.415
0.5	1.296
1.0	2.285
2.5	3.445
5.0	3.549

酸浓度低于 2.5 mg/mL 时, 黑色素随底物浓度增加而积累, 高于 2.5 mg/mL 时, 黑色素积累量保持稳定, 底物达到饱和。

2.4.3 铜离子浓度与酪氨酸酶活力的关系: Cu^{2+} 对酪氨酸酶发挥酶活性起着重要作用, 添加不同浓度的 $CuSO_4$ 对酪氨酸酶活性的影响如图 8 所示, 上清 OD_{475} 结果如表 4, 可见 Cu^{2+} 浓度不低于 0.2 mmol/L 时, 酪氨酸酶可以发挥较高的催化活性。

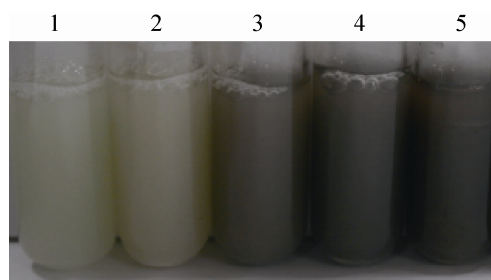


图 8. Cu^{2+} 浓度对酿酒酵母胞内酪氨酸酶活性的影响
Figure 8. Effect of $CuSO_4$ concentration on tyrosinase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. 1–5: $CuSO_4$ concentration: 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 mmol/L.

表 4. 不同 Cu^{2+} 下的紫外吸收测定结果Table 4. Effect of $CuSO_4$ concentration on tyrosinase activity

c ($CuSO_4$)/(mmol/L)	OD_{475}
0	0.003
0.1	0.576
0.2	2.879
0.5	2.993
1.0	3.012

3 讨论

酪氨酸酶在微生物及动植物中普遍存在, 并发挥着重要的生理功能。近年来, 由于酪氨酸酶在食品、药品及环境领域有潜在用途, 酪氨酸酶受到广泛的关注。但是从生物体中直接分离纯化酪氨酸酶的工艺复杂、产量较低^[16], 致使商品化酪氨酸酶的价格昂贵且纯度不高, 制约了酪氨酸酶在各领域的应用, 因此酪氨酸酶的异源表达成为了研究热点。Wichers 等在大肠杆菌中成功克隆了酪氨酸酶基因 *PPO2* 的 cDNA^[17], 但是表达出的蛋白并没有表现出酪氨酸酶活性。酿酒酵母作为真核模式生物, 在表达双孢蘑菇来源的酪氨酸酶上具有天然的优势。

本研究在酿酒酵母中异源表达了双孢蘑菇的酪氨酸酶, 并鉴定了其相关酶学特性。在体

外实验中发现,酪氨酸酶发挥催化作用的最适温度为 45 °C,以酪氨酸为底物时酪氨酸酶 $K_m=0.12$ mmol/L,最适 pH 为 7.0; L-多巴作为底物时, $K_m=1.86$ mmol/L,最适 pH 为 8.0,表明相较于 L-多巴,酪氨酸酶对酪氨酸的亲合力更高。当酪氨酸浓度低于 2 mmol/L 时,酶催化速率随底物浓度增加而升高,高于 2 mmol/L 时底物饱和;底物 L-多巴浓度高于 10 mmol/L 后酶催化速率保持不变,底物达到饱和。同时,在酿酒酵母中测定了酪氨酸酶在胞内的相关特性,在适合酿酒酵母生长的 30 °C 条件下,酪氨酸酶发挥催化活性需要不低于 0.2 mmol/L 的 Cu^{2+} 。培养物生长至稳定期后将 pH 调节为 9.0 时,24 h 后黑色素积累量最高。该培养条件偏碱性,推测与酿酒酵母胞内产酸相关。在底物酪氨酸浓度低于 2.5 mg/mL 时,黑色素的产量与底物酪氨酸的浓度呈正相关性。

酪氨酸酶通过催化酪氨酸生成肉眼可见的黑色素,且在一定范围内黑色素的产量与酪氨酸浓度呈正相关性,可将酪氨酸酶作为酿酒酵母细胞酪氨酸产量的传感器,为高通量筛选酪氨酸高产菌株提供了思路。但是酿酒酵母的培养条件偏酸性,需要人工调节培养体系的 pH,这可能成为影响最终结果的因素,是下一步工作需要解决的问题。

参 考 文 献

- [1] Cabrera-Valladares N, Martínez A, Piñero S, Lagunas-Muñoz VH, Tinoco R, de Anda R, Vázquez-Duhalt R, Bolívar F, Gosset G. Expression of the *mela* gene from *Rhizobium etli* CFN42 in *Escherichia coli* and characterization of the encoded tyrosinase. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006, 38(6): 772–779.
- [2] Jang JH, Moon KD. Inhibition of polyphenol oxidase and peroxidase activities on fresh-cut apple by simultaneous treatment of ultrasound and ascorbic acid. *Food Chemistry*, 2011, 124(2): 444–449.
- [3] Gerdemann C, Eicken C, Krebs B. The crystal structure of catechol oxidase: new insight into the function of type-3 copper proteins. *Accounts of Chemical Research*, 2002, 35(3): 183–191.
- [4] Inlow JK. Homology models of four *Agaricus bisporus* tyrosinases. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2012, 50(1): 283–293.
- [5] McMahon AM, Doyle EM, Brooks S, O'Connor KE. Biochemical characterisation of the coexisting tyrosinase and laccase in the soil bacterium *Pseudomonas putida* F6. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(5): 1435–1441.
- [6] Abdel-Raheem A, Shearer CA. Extracellular enzyme production by freshwater ascomycetes. *Fungal Diversity*, 2002, 11: 1–19.
- [7] Selinheimo E, Saloheimo M, Ahola E, Westerholm-Parvinen A, Kalkkinen N, Buchert J, Kruus K. Production and characterization of a secreted, C-terminally processed tyrosinase from the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. *The FEBS Journal*, 2006, 273(18): 4322–4335.
- [8] Marková E, Kotik M, Křenková A, Man P, Haudecoeur R, Boumendjel A, Hardré R, Mekmouche Y, Courvoisier-Dezord E, Réglie M, Martínková L. Recombinant tyrosinase from *Polyporus arcularius*: overproduction in *Escherichia coli*, characterization, and use in a study of aurones as tyrosinase effectors. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2016, 64(14): 2925–2931.
- [9] Lezzi C, Bleve G, Spagnolo S, Perrotta C, Grieco F. Production of recombinant *Agaricus bisporus* tyrosinase in *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 2012, 39(12): 1875–1880.
- [10] DeLoache WC, Russ ZN, Narcross L, Gonzales AM, Martin VJJ, Dueber JE. An enzyme-coupled biosensor enables (*S*)-reticuline production in yeast from glucose. *Nature Chemical Biology*, 2015, 11(7): 465–471.
- [11] Flurkey A, Cooksey J, Reddy A, Spoonmore K, Rescigno A, Inlow J, Flurkey HW. Enzyme, protein, carbohydrate, and phenolic contaminants in commercial tyrosinase preparations: potential problems affecting tyrosinase activity and inhibition studies. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2008, 56(12): 4760–4768.
- [12] Mustafi N, Grünberger A, Kohlheyer D, Bott M, Frunzke J. The development and application of a single-cell biosensor for the detection of L-methionine and branched-chain amino acids. *Metabolic Engineering*, 2012, 14(4): 449–457.
- [13] Santos CNS, Stephanopoulos G. Melanin-based high-throughput screen for L-tyrosine production in

- Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2008, 74(4): 1190–1197.
- [14] Jiang MM, Tian CR, Wang XJ. Characteristics of *Agaricus bisporus* tyrosinase. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 2008, 24(2): 194–198. (in Chinese)
蒋萌蒙, 田呈瑞, 王向军. 双孢蘑菇中酪氨酸酶的特性. *江苏农业学报*, 2008, 24(2): 194–198.
- [15] Faccio G, Kruus K, Saloheimo M, Thöny-Meyer L. Bacterial tyrosinases and their applications. *Process Biochemistry*, 2012, 47(12): 1749–1760.
- [16] Liao HJ, Li RJ, Tao M, Bai YJ, Tang J, Tang YM. Isolation, purification and partial characterization of tyrosinase from Yunnan-grown lettuce tip. *Food Science*, 2017, 38(8): 30–36. (in Chinese)
廖海君, 李蕊伽, 陶敏, 白亚娟, 唐菁, 唐云明. 云南莴笋尖酪氨酸酶分离纯化及酶学性质. *食品科学*, 2017, 38(8): 30–36.
- [17] Wichers HJ, Recourt K, Hendriks M, Ebbelaar CEM, Biancone G, Hoeberichts FA, Mooibroek H, Soler-Rivas C. Cloning, expression and characterisation of two tyrosinase cDNAs from *Agaricus bisporus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2003, 61(4): 336–341.

Expression and characterization of tyrosinase from *Agaricus bisporus* in *Saccharomyces cerevisiae*

Yuzhen Wu¹, Yatian Hong^{1,3}, Quanli Liu¹, Haijin Xu¹, Yanling Bai¹, Xiuming Zhang¹, Mingqiang Qiao^{1,2*}

¹ College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

² Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Ministry of Education, Nankai University, Tianjin 300071, China

³ Jinan Central Hospital, Jinan 250013, Shandong Province, China

Abstract: [Objective] The aim of this research was to express the tyrosinase-coding *PPO2* gene from *Agaricus bisporus* in *Saccharomyces cerevisiae* and to investigate the characteristics of tyrosinase *in vitro* and *in vivo*. [Methods] We cloned *PPO2* gene by RT-PCR using the total RNA extracted from *Agaricus bisporus*. The expression vector pSP-G1-*PPO2* was constructed and transformed into yeast. The recombinant protein was purified with Ni-NTA and the tyrosinase enzyme properties were evaluated. [Results] The optimum temperature of tyrosinase *in vitro* was 45 °C. And the optimum pH was 7.0 and 8.0 using tyrosine and L-3,4-dihydroxyphenylalanine (L-DOPA) as substrate, respectively. In *Saccharomyces cerevisiae*, the yield of melanin increased with the rise in substrate concentration within 2.5 mg/mL. [Conclusion] We achieved heterologous expression of tyrosinase-coding gene *PPO2* from *Agaricus bisporus* in *Saccharomyces cerevisiae* and characterized the enzyme properties. The melanin production positively correlates with the concentration of substrate tyrosine which indicates that tyrosinase could be a biosensor to report the content of tyrosine in yeast and could be used for the high throughput screening of high-yield tyrosine strains.

Keywords: tyrosinase, heterologous expression, *Agaricus bisporus*, *Saccharomyces cerevisiae*, enzyme properties

(本文责编: 李磊)

Supported by the Tianjin Key Research Program of Application Foundation and Advanced Technology, China (17JCZDJC32200)

*Corresponding author. Tel: +86-22-23503340; E-mail: qiaomq@nankai.edu.cn

Received: 23 April 2017; Revised: 10 June 2017; Published online: 4 August 2017