

嗜热脂肪芽孢杆菌羧酸酯酶的异源表达及酶学性质研究

孙锦霞 刘钟滨*

(同济大学医学院病原生物学与免疫学系, 病原生物学教研室, 上海 200092)

摘要 运用生物信息学技术从嗜热脂肪芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*) CICC 20156 中克隆获得羧酸酯酶基因, 构建黑曲霉和毕氏酵母表达质粒, 将重组质粒分别转化毕氏酵母 GS115 和黑曲霉 *pyrG* 基因缺陷株 M54. SDS-PAGE 和 Western blot 检测显示: 携带 His 标记的外源蛋白在转化真菌宿主中均获得了高效分泌性表达, 毕氏酵母和黑曲霉表达的外源蛋白分子质量均约为 29 ku, 蛋白质浓度分别为 30.7 mg/L 和 15.3 mg/L. 生物学活性测定表明, 毕氏酵母与黑曲霉表达的羧酸酯酶单位蛋白酶活分别为 22 671 U/mg 和 21 438 U/mg. 酶学性质研究显示, 两种表达系统表达的重组羧酸酯酶的酶学特性基本一致, 它们在 40~70℃ 范围内均显示较好的酶活性, 最适反应温度为 60℃. 70℃ 处理 30 min, 毕氏酵母和黑曲霉表达重组羧酸酯酶残余酶活分别为 76.7%和 67.6%, 显示出良好的热稳定性. 在 pH 6.5~8.5 的范围内显示较高酶活性, 最适 pH 为 8.0. 上述研究首次实现了具有良好热稳定性的嗜热脂肪芽孢杆菌羧酸酯酶在黑曲霉和毕氏酵母中高效异源分泌性表达, 其中毕氏酵母羧酸酯酶的产量要高于黑曲霉的酶产量, 但考虑到重组黑曲霉表达外源性蛋白无需使用任何诱导剂, 黑曲霉菌表达热稳定性羧酸酯酶可能具有更好的应用前景.

关键词 羧酸酯酶, 嗜热脂肪芽孢杆菌, 黑曲霉, 毕氏酵母, 异源表达, 酶学性质

学科分类号 Q782

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00134

羧酸酯酶(carboxylesterases, CarEs, EC 3.1.1.1)是一类能水解羧酸酯生成羧酸和醇的重要酶. 除了参与脂质的分解反应, 在特定的非水相系统中, 它们还催化分解反应的逆反应: 酯化合成和转酯反应. 羧酸酯酶广泛应用于各种生物化学和制药工业, 近年来其对环境毒物如农药马拉硫磷、对硫磷等的生物降解作用也引起了人们很大关注^[1-2].

随着羧酸酯酶的应用越来越广泛, 对该酶的热稳定性也提出了更高要求. 嗜热脂肪芽孢杆菌(*Geobacillus stearothermophilus*)是具有嗜热性的革兰氏阳性菌, 其表达的酶具有较好的热稳定性, 适合于工业化生产及多方面实际应用的需要. 本研究从嗜热脂肪芽孢杆菌 CICC 20156 中克隆获得羧酸酯酶基因, 构建重组真核质粒 pYG1.2-CarE 和 pPIC9K-CarE, 将它们分别转化黑曲霉菌 M54 和毕氏酵母 GS115, 首次实现了热稳定性羧酸酯酶在黑曲霉和毕氏酵母中的高效分泌性表达, 同时我们对该酶的酶学性质也作了初步研究.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒. 真核表达质粒 pYG1.2 和黑曲霉菌 *pyrG* 缺陷株 M54 由本室构建保存^[3-4]; 质粒 pPIC9K、pPIC9(Invitrogen 公司)和毕氏酵母 GS115 由同济大学疫苗研究所提供; 嗜热脂肪芽孢杆菌 CICC 20156 购自上海市工业微生物研究所; 大肠杆菌 DH5 α 由本室保存.

1.1.2 主要试剂. 融壁酶 Lywallzyme 购自广东工业微生物研究所; 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购自 Fermentas 公司; his 抗体购自生义科技有限公司; 羊抗鼠 IgG 购自上海神航生物科技有限公司; 尿嘧啶核苷购自 Sigma 公司; α -萘酚、 α -醋酸萘

* 通讯联系人.

Tel: 021-65986238, 18916008683, E-mail: lzbjh@126.com

收稿日期: 2010-03-20, 接受日期: 2010-06-08

酯、固蓝 B 盐购自国药集团；低分子质量蛋白质标准购自 TaKaRa 公司；质粒提取试剂盒和核酸回收试剂盒购自 Tiangen 公司；G418 购自上海基峰生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 嗜热脂肪芽孢杆菌羧酸酯酶基因的获取。

a. 引物设计. 运用生物信息学技术根据 GenBank 公布的嗜热脂肪芽孢杆菌羧酸酯酶基因序列设计以下核酸扩增引物. 其中 P1 和 P2 是用于黑曲霉表达系统的 PCR 扩增引物. P3、P4、P5 和 P6 是用于酵母表达系统的引物, 由于酵母表达质粒 pPIC9K 和羧酸酯酶基因序列中均含同样的 *Xho*I 酶切位点 CTCGAG, 故设计了两对扩增引物以对该酶切位点进行定点同义突变, 拟将该位点改变为 CTCGAA.

P1: 5' CGTCTAGAAAGAGAATGATGAAAA-TTGTTCCGCCG 3' (下划直线为 *Xba*I 酶切位点, 虚线为赖氨酸和精氨酸构成的 KEX2 位点), P2: 5' CGGTAACTCAATGGTGATGGTGATGGTGC-CAATCTA ACGATTCAA 3' (下划直线为 *Hpa*I 酶切位点, 虚线为 6 个组氨酸密码子组成的 His-tag). P3: 5' CGCTCGAGAAAAGA GAGGCTG AAGCT-ATGATGAAAATTGTTCCG 3' (下划直线为 *Xho*I 酶切位点, 虚线为 KEX2 位点, 波浪线为 KEX1 位点), P4: 5' CGCGCGCATATTCGAGGACGCC-TTCGTAC 3', P5: 5' CGTCCTCGAATATGCGC-GCGAGTATAAAA 3', P6: 5' CGGAATTCTTA-ATGGTGATGGTGATGGTGCCAATCTAACGATT-CAAG 3' (下划直线为 *Eco*R I 酶切位点, 虚线为 6 个组氨酸密码子组成的 His-tag).

b. PCR 扩增羧酸酯酶基因. 取 2.5 mmol/L dNTP 4 μ l, 正、反向引物各 10 pmol, 10 $\times$ 缓冲液 5 μ l, 模板 DNA(菌液)1 μ l, 加水至总体积 49 μ l, 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 冰浴 3 min, 加 PfuDNA 聚合酶 1 μ l, 短暂离心混匀后执行 PCR 循环程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 循环 30 次, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min.

1.2.2 重组质粒构建与基因转化试验. 将 PCR 产物按试剂盒操作程序进行纯化, 用限制性内切酶 *Xba*I 和 *Hpa*I 消化, 与经相同酶消化的黑曲霉表达质粒 pYG1.2 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选获得重组质粒 pYG1.2-CarE-his. 由于酵母表达质

粒 pPIC9K 含有 2 个 *Xho*I 的酶切位点, 故实验中用了 pPIC9 作为过渡质粒. 将 PCR 产物按试剂盒操作程序进行纯化, 经纯化的片段首先用限制性内切酶 *Xho*I / *Eco*R I 消化, 然后与经相同酶消化的过渡载体质粒 pPIC9 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选获得重组质粒 pPIC9-CarE-his, 经测序确认后从该重组质粒中用限制性内切酶 *Bam*H I / *Eco*R I 切下含羧酸酯酶基因的片段, 并与相同酶消化的质粒载体 pPIC9K 连接, 转化大肠杆菌 DH5 α , 筛选获得重组表达质粒 pPIC9K-CarE-his. 有关感受态大肠杆菌的制备、大肠杆菌的转化反应、克隆筛选、质粒的抽提和扩增按相关试剂盒说明进行. 重组质粒经酶切鉴定后送交上海联合基因公司进行测序. 重组质粒 pPIC9K-CarE-his 转化毕氏酵母 GS115 采用电转化方法^[3], 并用 G418 筛选高拷贝克隆. 重组质粒 pYG1.2-CaE-his 转化黑曲霉菌 *pyrG* 基因缺陷株采用原生质体 / 聚乙二醇转化方法^[6].

1.2.3 重组羧酸酯酶的表达. 将 PDA 斜面培养基上长出的重组黑曲霉菌孢子 5×10^7 接种于 100 ml ACMS/N/P 培养基^[7], 于 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 摇动发酵. 不同时间取发酵液上清, 无菌玻璃丝过滤. 另将重组质粒转化的毕氏酵母菌接种于 MGY 培养基 (1.34% YNB, 1% 甘油, $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素) 中, 于 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 摇动培养至 $A_{600}=5$; 然后在 BMMY 培养基 (1% 酵母提取物, 2% 蛋白胨, 100 mmol/L 磷酸钾缓冲液 pH6.0, 1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}\%$ 生物素, 0.5% 甲醇) 中诱导表达, 不同时间取发酵液上清. 目标蛋白检测采用 SDS-PAGE 和 Western blot 进行, SDS-PAGE 结果采用考马斯亮蓝染液显色检测, 重组菌表达蛋白经 SDS-PAGE 初步鉴定后, 将蛋白质转移到 PVDF 膜上, 先用抗 his IgG 抗体与之结合, 然后用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 与之反应, ECL 显色曝光观察结果.

1.2.4 重组羧酸酯酶活性测定. 采用 α -萘酚法^[8]测定羧酸酯酶活性. 以 0.01 mol/L 的 α -萘酚为原液, 稀释成不同浓度, 以 α -萘酚浓度为横坐标, 以 A 值为纵坐标绘制标准曲线. 酶活计算公式为: 酶活 / (U $\cdot$ ml $^{-1}$) = 根据 A 值计算的 α -萘酚量 $\times$ 稀释倍数 / (保温时间 $\times$ 酶液体积). 羧酸酯酶活力单位定义: 在 37 $^{\circ}$ C, pH 7.0 的条件下, 1 min 内从 0.03 mol/L 的 α -醋酸萘酯溶液中释放 1 μ mol 的 α -萘酚所需的酶量为一个酶活单位.

2 结 果

2.1 嗜热脂肪芽孢杆菌羧酸酯酶基因的克隆和序列分析

将 PCR 扩增获得的 DNA 片段分别插入质粒 pYG1.2 和 pPIC9 中, 获得重组质粒 pYG1.2-CarE-his

和 pPIC9-CarE-his, 对质粒 DNA 进行序列测定和分析的结果显示(图 1), 两种重组质粒中插入片段序列全长均为 780 bp, 其中包括 744 bp 嗜热脂肪芽孢杆菌羧酸酯酶基因成熟肽编码序列以及引入的限制性内切酶酶切位点、KEX 位点和 His-tag.

```
tctagaagagaATGATGAAAATTGTTCCGCCGAAGCCGTTTTCTTTGAAGCCGGGAGCGGGCGGTGCTGC
TTTTGCATGGGTTTACCGCAATTCCGCCGACGTTTCGGATGCTTGGGCGATTCTTGGAATCGAAAGGGT
ATACGTGCCACGCTCCGATTTACAAAGGGCATGGCGTGCCGCCGGAAGAGCTCGTCCACACCGGACCG
GATGATTGGTGGCAAGACGTCATGAACGGCTATCAGTTTTTGAAAAACAAAGGCTACGAAAAAATTGC
CGTGGCTGGATTGTCGCTTGGAGGCGTATTTCTCTCAAATTAGGCTACACTGTACCTACACAAGGCATT
GTGACGATGTGCGCGCCGATGTACATCAAAAGCGAAGAAACGATGTACGAAGGTGTGCTCGAGTATGC
GCGCGAGTATAAAAAGCGGGAAGGGAAATCAGAGGAACAAATCGAACAGGAAATGGAACGGTTCAA
ACAAACGCCGATGAAGACGTTGAAAGCCTTGCAAGAACTCATTGCCGATGTGCGCGCCACCTTGATT
TGGTTTATGCACCGACGTTTCGTCGTCCAAGCGGCCATGATGAGATGATCAATCCAGACAGCGCGAACA
TCATTATAACGAAATTGAATCGCCGGTCAAACAAATCAAATGGTATGAGCAATCAGCCATGTGATTAC
GCTTGATCAAGAAAAAGATCAGCTGCATGAAGATATTTATGCATTTCTTGAATCGTTAGATTGgaccatcac
catcacca tTGAgttaac
```

Fig. 1 The sequence of the carboxylesterase gene of *Geobacillus stearothermophilus* CICC 20156 in the recombined plasmids pYG1.2-CarE-his

The sequence of carboxylesterase gene is highlighted in capital letters, the *Xba* I and *Hpa* I sites are underlined, the dotted line indicates the KEX2 site, the start codon and stop codon are in bold italics, and wave line indicated the His-tag composed of six histidine.

2.2 重组羧酸酯酶蛋白表达的检测

2.2.1 SDS-PAGE 检测重组羧酸酯酶表达. SDS-PAGE 检测转化宿主菌发酵液上清中表达蛋白, 结果显示在分子质量 29 ku 处出现一条较明显的条带, 而对照组 pYG1.2 转化的黑曲霉菌 M54 和

pPIC9K 转化的毕氏酵母 GS115 发酵液上清均未见此条带(图 2). 表达产物的分子质量与文献报道的 *Geobacillus kaustophilus* 羧酸酯酶分子质量十分接近^[9].

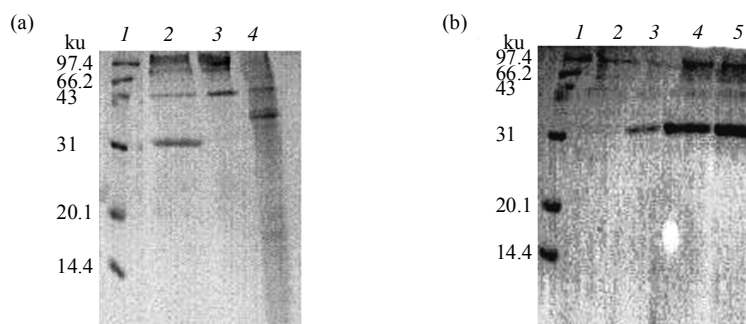


Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the recombinant carboxylesterase

(a) Recombinant carboxylesterase production in medium samples of cultures(120 h) of transformed or non-transformed *A. niger*. 1: Protein molecular mass marker. 2: pYG1.2-CarE transformed *A. niger* M54. 3: pYG1.2 transformed *A. niger* M54. 4: Non-transformed *A. niger* M54. (b) Recombinant carboxylesterase production in medium samples of cultures of transformed or non-transformed *Pichia pastoris* GS115. 1: Protein molecular mass marker. 2: 72 h cultures of pPIC9K transformed *Pichia pastoris* GS115. 3~5: 24 h, 48 h and 72 h cultures of pPIC9K-CarE transformed *Pichia pastoris* GS115.

2.2.2 Western blot 检测重组羧酸酯酶表达. 重组菌表达蛋白经 SDS-PAGE 初步鉴定后, 将蛋白质转移到 PVDF 膜上, 先用抗 his IgG 抗体与之结合, 然后用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 与之反应, ECL 显色曝光观察结果. 从图 3 可以看出, 重组黑曲霉菌和毕氏酵母菌发酵上清在 29 ku 处有和图 2 相对应的条带出现, 而空菌和空质粒转化菌均无分泌性条带出现, 表明其为重组菌分泌性表达的嗜热脂肪芽孢杆菌羧酸酯酶, 而非黑曲霉和毕氏酵母本身表达的羧酸酯酶.

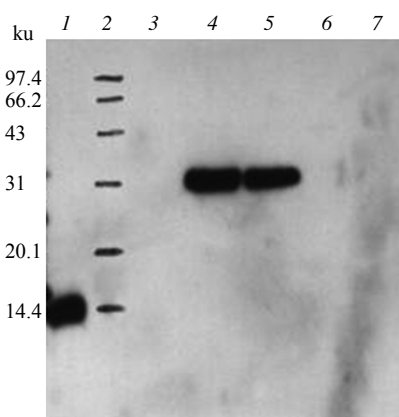


Fig. 3 Western blot analysis of the expression of recombinant carboxylesterase in medium samples of cultures of *Pichia pastoris* GS115 and *Aspergillus niger* M54

1: Positive his-tn6 control. 2: Protein molecular mass marker. 3: 96 h cultures of pPIC9K transformed *Pichia pastoris* GS115. 4: 96 h cultures of pPIC9K-CarE transformed *Pichia pastoris* GS115. 5: 120 h cultures of pYG1.2-CarE transformed *A.niger* M54. 6: 120 h cultures of non-transformed *A.niger* M54. 7: 120 h cultures of pYG1.2 transformed *A.niger* M54.

2.3 重组羧酸酯酶活性的测定

应用 α -萘酚法测定重组菌分泌性羧酸酯酶活性, 分别于不同培养时间取培养上清测定酶活, 重组毕氏酵母和黑曲霉菌的产酶曲线见图 4. 重组黑曲霉第 1 天产酶活性很低, 之后酶活性明显增强, 第 5 天(120 h)酶活性达最高峰, 最高酶活为 328 U/ml, 随后酶活下降. 毕氏酵母在培养前 2 天, 产酶量较低, 之后酶活迅速升高, 至第 4 天(96 h)达最高峰, 最高酶活为 696 U/ml, 是黑曲霉表达的 2.12 倍, 之后酶活下降.

运用天能凝胶图像处理系统分析表明, 黑曲霉

第 5 天羧酸酯酶产量为 15.3 mg/L, 单位蛋白质的酶活为 21 438 U/mg; 毕氏酵母第 4 天羧酸酯酶产量为 30.7 mg/L, 单位蛋白的酶活为 22 671 U/mg. 可见, 黑曲霉和毕氏酵母的单位酶活基本一致, 毕氏酵母表达酶活力高是由于其酶产量高所致.

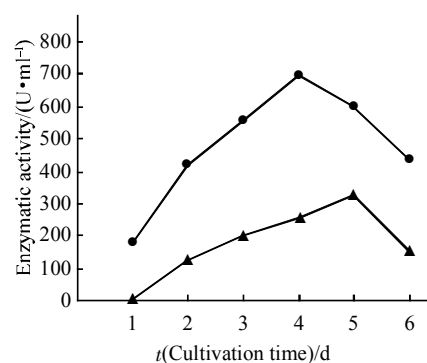


Fig. 4 Activity of carboxylesterase produced by recombinant fungi in different cultivation time

●—●: *Pichia pastoris*; ▲—▲: *Aspergillus niger*.

2.4 重组羧酸酯酶的最适温度和热稳定性

重组羧酸酯酶的最适温度如图 5 所示. 在不同温度(20~80℃)条件下测定羧酸酯酶的活性, 毕氏酵母和黑曲霉表达系统表达重组酶的最适温度趋势一致. 结果显示, 随着温度上升, 重组羧酸酯酶活性升高, 至 60℃ 酶活达最高. 70℃ 时还具有较高酶活性, 酶活性为最适反应温度的 50%以上. 但随着反应温度继续上升, 酶活性显著下降, 80℃ 时几乎测不到酶活.

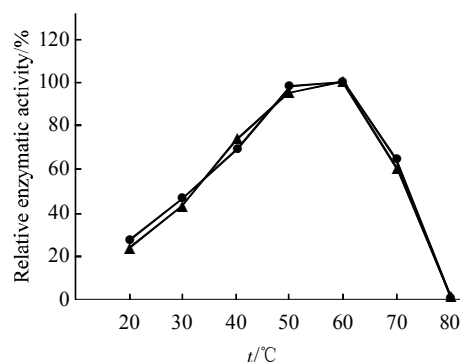


Fig. 5 The optimum temperature for recombinant carboxylesterase

●—●: *Pichia pastoris*; ▲—▲: *Aspergillus niger*.

将酶液分别在 40℃、50℃、60℃、70℃、80℃ 保温 10 min、30 min, 通过测定羧酸酯酶的残余酶活来反映酶的热稳定性, 从图 6 所示结果可见, 毕氏酵母和黑曲霉表达系统表达重组酶的热稳定性趋势一致. 该酶在 60℃ (或以下) 时相当稳定, 热处理对酶活影响较小, 在 60℃ 随热处理时间延长至 30 min, 酶活略有下降但仍为未处理组酶活的 80% 以上. 70℃ 时处理 30 min 后毕氏酵母表达羧酸酯酶残余酶活为 76.7%, 黑曲霉表达重组羧酸酯酶残余酶活为 67.6%. 随着温度进一步上升, 酶活急剧下降, 80℃ 处理 10 min 则几乎测不到酶活.

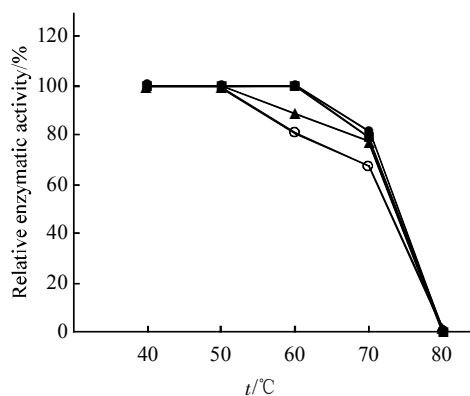


Fig. 6 The thermostability of the recombinant CaEs

●—●: *Pichia pastoris* treated for 10 min; ▲—▲: *Pichia pastoris* treated for 30 min; ■—■: *Aspergillus niger* treated for 10 min; ○—○: *Aspergillus niger* treated for 30 min.

2.5 重组羧酸酯酶最适 pH 值和 pH 稳定性

采用不同 pH 值的缓冲溶液来配制反应体系, 按羧酸酯酶的标准测定方法测定酶活. 不同 pH 值反应体系对酶活的影响如图 7 所示, 由图 7 可知, 毕氏酵母和黑曲霉产生的重组羧酸酯酶的最适反应 pH 趋势基本一致. 重组羧酸酯酶的最适反应 pH 为 8.0, 二者在 pH 7.0~8.5 的反应体系中, 重组羧酸酯酶的相对酶活较高. 当反应体系中 pH < 6.0 和 pH > 9.0 时羧酸酯酶活性急剧下降.

将酶液在不同 pH 值的缓冲液中 37℃ 保温 30 min, 然后按标准方法测定酶活, 结果如图 8 所示, 从图 8 中可看出重组羧酸酯酶在 pH 6.0~8.5 范围内比较稳定, 酶活保持在 75% 以上, 在 pH < 6.0, pH > 9.0 时酶活迅速下降.

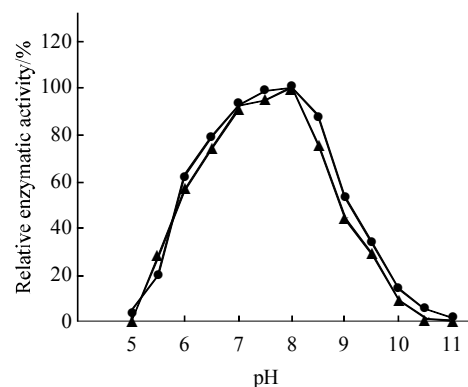


Fig. 7 Effect of the pH on activity of recombinant carboxylesterase

●—●: *Pichia pastoris*; ▲—▲: *Aspergillus niger*.

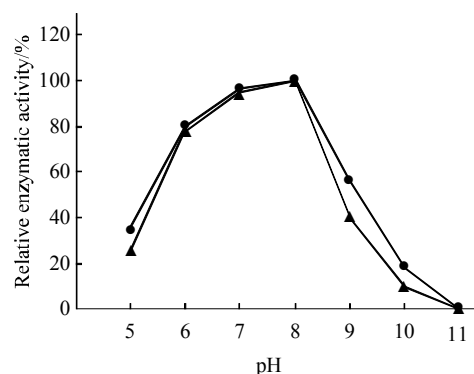


Fig. 8 pH stability of recombinant carboxylesterase

●—●: *Pichia pastoris*; ▲—▲: *Aspergillus niger*.

3 讨 论

羧酸酯酶在生物化学、制药工业以及农药的生物降解 and 环境保护等方面发挥重要作用, 随着对羧酸酯酶研究的进一步深入, 其应用前景将更加广泛. 但羧酸酯酶不易获取和热稳定性差, 限制了其应用. 本文首次报道运用毕氏酵母和黑曲霉菌两种真菌表达系统, 成功高效分泌性表达具有热稳定性的嗜热脂肪芽孢杆菌羧酸酯酶.

甲醇酵母表达系统是应用最广泛的酵母表达系统. 此类酵母易于操作培养, 具有强有力的受甲醇严格诱导调控的启动子 AOX1, 表达菌株稳定, 发酵水平高, 分泌能力强. 本实验采用的分泌型表达载体 pPIC9K 一个重要特点是其携带的外源基因的表达可抑制毕氏酵母自身蛋白的表达. SDS-PAGE

结果也可以证实这一点, 基因重组毕氏酵母发酵上清中外源蛋白的表达非常高, 占培养基中总蛋白的绝大部分, 为进一步纯化外源蛋白提供了很大方便.

黑曲霉菌是一种不产生黄曲霉毒素的安全真菌, 它除了在生产各种真菌代谢物及酶类的发酵工业上被广泛应用外, 在应用于基因工程生产外源蛋白质产物方面也受到很大重视. 在本文研究中我们应用了先前构建的黑曲霉菌表达系统^[9]. 该系统中的基因工程宿主菌是通过紫外线照射突变法获得的乳清酸核苷-5'-磷酸脱羧酶(*pyrG*)基因缺陷株黑曲霉 M54. 该系统中的表达性质粒 pYG1.2 是一穿梭质粒, 它既可以在大肠杆菌中复制, 又可以整合到曲霉菌染色体上, 该质粒又是一种融合蛋白基因表达载体, 它包含黑曲霉葡萄糖淀粉酶(*glaA*)基因的启动子和编码 *glaA* 前 498 个氨基酸的基因片段, 而 *glaA* 基因启动子是丝状真菌表达载体中常用的一种强启动子, 我们将嗜热脂肪芽孢杆菌羧酸酯酶基因插入截短型 *glaA* 基因后面, 这将有利于外源基因的表达.

鉴于上述两种不同表达系统各自有其特点, 本课题通过基因工程手段将嗜热脂肪芽孢杆菌羧酸酯酶基因分别转入毕氏酵母 GS115 和黑曲霉 M54 进行表达. 实验结果证实, 羧酸酯酶在黑曲霉和毕氏酵母中均获得高效分泌性表达. 黑曲霉第 5 天酶活最高, 为 328 U/ml. 毕氏酵母第 4 天酶活最高, 为 696 U/ml, 大约是黑曲霉表达酶活性的 2.12 倍. 经测定和计算, 本实验中重组黑曲霉羧酸酯酶单位酶含量为 15.3 mg/L, 单位蛋白的酶活为 21 438 U/mg; 重组酵母羧酸酯酶产量为 30.7 mg/L, 单位蛋白的酶活为 22 671 U/mg. 虽然重组酵母菌酶产量明显高于黑曲霉的产量, 但两者的每毫克蛋白质的酶活性却无明显差异. 由此看来所测得的毕氏酵母羧酸酯酶酶活较高的原因主要是由于其产量较高所致.

Delroisse 等^[10]曾将昆虫赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)的酯酶基因在毕氏酵母中表达, 表达量为 7 mg/L. Pesaresi 等^[11]在大肠杆菌中表达了铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*) PAO1 的羧酸酯酶基因, 单位蛋白酶活为 18 900 U/mg. Soliman 等^[12]从沙漠土壤中分离得到高温烷烃芽孢杆菌(*Geobacillus thermoleovorans*) YN, 将其羧酸酯酶基因在大肠杆菌表达, 单位蛋白酶活为 902 U/mg. Maqbool 等^[13]将枯草杆菌羧酸酯酶基因在大肠杆菌

表达, 单位蛋白酶活为 1 735 U/mg. 可见, 本实验中重组表达的羧酸酯酶产量和酶活均是较高的.

决定酶使用效率的重要因素之一是酶的稳定性, 特别是工业用酶对酶的热稳定性提出了更高的要求. Maqbool 等^[13]在大肠杆菌中表达枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)羧酸酯酶, 在 pH7.0 条件下, 于 10~40℃ 较稳定, 但 45℃ 时酶活迅速下降, 50℃ 30 min 完全失去活性. Mnisi 等^[14]将凝结芽孢杆菌(*Bacillus coagulans*)羧酸酯酶基因在大肠杆菌表达, 其最适温度为 50℃, 65℃ 以上酶活几乎消失. 但也有些嗜高温的细菌能产生热稳定性较高的羧酸酯酶, 如 Park 等^[15]报道大肠杆菌表达的硫叶菌属 *Sulfolobus solfataricus* P1 羧酸酯酶最适温度为 85℃, 80℃ 孵育 5 天残余酶活为 41%. Soliman 等^[12]用大肠杆菌表达的高温烷烃芽孢杆菌羧酸酯酶在 60~65℃ 具有最大酶活性, 在 70℃ 作用 1 h 酶活未受明显影响, 但随温度进一步提高酶活迅速下降. 本实验表达的两种重组羧酸酯酶的最适温度为 60℃, 70℃ 时仍具有较高酶活性. 该酶在 60℃ 时相当稳定, 热处理对酶活影响很小, 70℃ 处理 30 min 后毕氏酵母表达羧酸酯酶残余酶活为 76.7%, 黑曲霉表达重组羧酸酯酶残余酶活为 67.6%. 这些性质使其具备了良好的应用特性.

本文研究完成后我们看到了不久前 Montoro-García 等^[9]发表的一篇论文, 该文报道对 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 的羧酸酯酶基因进行了克隆并成功在大肠杆菌中进行了表达, 随后又对该酶性质作了探讨. 基因序列比对发现, 本研究表达的重组羧酸酯酶与该报道羧酸酯酶之间存在高度同源性, 仅在第 326 位有 1 个碱基的差异(C→T), 并由此造成编码氨基酸由前者的苏氨酸变为后者的异亮氨酸. 此外, 两者的酶学性质包括热稳定性、pH 特性等方面同样存在高度的相似性. 该结果提示, *Geobacillus stearothermophilus* CICC 20156 与 *Geobacillus kaustophilus* HTA426 可能存在高度关联性, 同时也说明无论应用大肠杆菌、黑曲霉或酵母表达高度同源的相同基因, 只要蛋白质的结构未受破坏, 该蛋白质的性质就不会因宿主不同而发生改变.

本研究应用两种表达系统表达的重组羧酸酯酶的酶学特性基本一致. 而从酶活性看, 重组毕氏酵母表达羧酸酯酶的产量要高于重组黑曲霉菌的酶产量. 但考虑到毕氏酵母表达外源性蛋白需要甲醇诱

导,而甲醇具有一定的毒性,反之黑曲霉菌表达外源性蛋白却无须应用任何诱导剂,因此黑曲霉菌表达系统似乎显示出更好的应用前景.

我们在针对两种表达系统的引物设计中,均在嗜热脂肪芽孢杆菌耐热羧酸酯酶的C端加入连续6个组氨酸密码子(His-tag)作为标记物,这一方面是出于表达蛋白检测的需要,另一方面也为羧酸酯酶的进一步纯化(如需要)提供了方便的条件.

参 考 文 献

- [1] Gershtater M, Sharples K, Edwards R, *et al.* Carboxylesterase activities toward pesticide esters in crops and weeds. *Phytochemistry*, 2006, **67**(23): 2561–2567
- [2] 郑玉芝, 郭成君, 张建亮, 等. 双表达解毒酶基因工程菌的酶活性分析及其应用. *食品科学*, 2006, **27**(12): 33–37
Zhen Y Z, Guo C J, Zhang J L, *et al.* *Food Science*, 2006, **27**(12): 33–37
- [3] 刘钟滨, David J J, David B A. 黑曲霉菌为宿主菌的重组表达性质粒的构建. *同济大学学报*, 2001, **22**(3): 1–4
Liu Z B, David J J, David B A. *J Tongji University*, 2001, **22**(3): 1–4
- [4] 刘钟滨, David J J, David B A. 黑曲霉菌 pyrG 缺陷株的建立. *微生物学杂志*, 2001, **21**(3): 15–17
Liu Z B, David J J, David B A. *J Microbiol*, 2001, **21**(3): 15–17
- [5] 唐雪明, 邵蔚蓝, 王正祥, 等. 地衣芽孢杆菌感受态细胞的诱导形成及其高效电转化方法. *无锡轻工大学学报*, 2002, **21**(5): 460–463
Tang X M, Shao W L, Wang Z X, *et al.* *J Wuxi University of Light Industry*, 2002, **21**(5): 460–463
- [6] Hartingsveldt W V, Mattern I E, Zeijl C V, *et al.* Development of a homologous transformation system for *Aspergillus niger* based on the pyrG gene. *Mol General Genetics*, 1987, **206**(1): 71–75
- [7] MacKenzie D A, Spencer J A, Gal-Coëffet M F, *et al.* Efficient production from *Aspergillus niger* of a heterologous protein and an individual protein domain, heavy isotope-labelled, for structure-function analysis. *J Biotechnology*, 1996, **46**(2): 85–93
- [8] Asperen K V. A study of housefly esterases by means of a sensitive colorimetric method. *J Insect Physiology*, 1962, **8**(4): 401–406
- [9] Montoro-García S, Martínez-Martínez I, Navarro-Fernández J, *et al.* Characterization of a novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426 shows the existence of a new carboxylesterase family. *J Bacteriology*, 2009, **191**(9): 3076–3085
- [10] Delroisse J M, Dannau M, Gilsoul J J, *et al.* Expression of a synthetic gene encoding a *Tribolium castaneum* carboxylesterase in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification*, 2005, **42**(2): 286–294
- [11] Pesaresi A, Devescovi G, Lamba D, *et al.* Isolation, characterization, and heterologous expression of a carboxylesterase of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Current Microbiology*, 2005, **50**(2): 102–109
- [12] Soliman N A, Knoll M, Abdel-Fattah Y R, *et al.* Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt. *Process Biochemistry*, 2007, **42**(7): 1090–1100
- [13] Maqbool Q A, Johri S, Rasool S, *et al.* Molecular cloning of carboxylesterase gene and biochemical characterization of encoded protein from *Bacillus subtilis* (RRL BB1). *J Biotechnology*, 2006, **125**(1): 1–10
- [14] Mnisi S M, Louw M E, Theron J, *et al.* Cloning and characterization of a carboxylesterase from *Bacillus coagulans* 81-11. *Current Microbiology*. 2005, **50**(4): 196–201
- [15] Park Y J, Choi S Y, Lee H B. A carboxylesterase from the thermoacidophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus* P1: purification, characterization, and expression. *Biochim Biophys Acta*, 2006, **1760**(5): 820–828

Heterologous Expression and Characterization of The Carboxylesterase From *Geobacillus stearothermophilus*

SUN Jin-Xia, LIU Zhong-Bin*

(Department of Pathogen Biology, Medical School, Tongji University Shanghai 200092, China)

Abstract The carboxylesterase gene of *Geobacillus stearothermophilus* CICC 20156 was cloned by bioinformatics technology and then was inserted into the expression vectors pPIC9K and pYG1.2. The recombinant plasmids were transformed into yeast *Pichia pastoris* GS115 and *Aspergillus niger* M54 respectively. It was revealed by SDS-PAGE and Western blot that the exogenous protein of about 29 ku with a His-tag each were secreted by the transformed hosts into the external mediums. The concentration of recombinant carboxylesterase in medium excreted by *Pichia pastoris* and *Aspergillus niger* was 30.7 mg/L and 15.3 mg/L respectively. Bioactivity assay indicated that the carboxylesterase activity was 22 671 U/mg for the enzyme expressed by *Pichia pastoris* and 21 438 U/mg for that expressed by *Aspergillus niger*. The research results also showed that both enzymes expressed by the two kinds of hosts possess similar characteristic. The recombinant enzyme exhibited thermostability with optimum temperature at 60°C and remained 76.7%~67.6% activity even after incubation at 70°C for 30 min. The enzyme also showed a broader pH tolerance and the optimum pH for the enzyme activity was at 8.0. This is the first report that the thermostable carboxylesterase of *Geobacillus stearothermophilus* was highly secretively expressed in *Aspergillus niger* and *Pichia pastoris*. Though the amount of carboxylesterase excreted by recombinant *Aspergillus niger* was lower than that excreted by recombinant *Pichia. pastoris*, the engineering *Aspergillus niger* may still show a better perspective for potential applications in biotechnological industries, for no inducer is needed to get crude carboxylesterases in the culture supernatants of it.

Key words carboxylesterases, *Geobacillus stearothermophilus*, *A. niger*, *P. pastoris*, heterogeneous expression, enzymic properties

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00134

*Corresponding author.

Tel: 86-21-65986238, 18916008683, E-mail: lzbjh@126.com

Received: March 20, 2010 Accepted: June 8, 2010