

# 阿魏酸酯酶 O42807 在毕赤酵母 GS115 中的表达

陈云华, 李慧, 张光亚, 葛慧华, 李夏兰

(华侨大学 化工学院, 福建 厦门 361021)

**摘要:** 研究阿魏酸酯酶 O42807 基因(*fae*)在巴斯德毕赤酵母 GS115 中的表达及重组阿魏酸酯酶的酶学特性. 化学合成 *fae* 基因序列, 构建分泌型重组质粒 pPIC9K-*fae*, 经线性化后电转化至毕赤酵母 GS115, 对筛选出的高活性转化子进行诱导表达. SDS-PAGE 分析显示: 发酵上清液为单一条带, 表观相对分子质量为 42 ku, 酶活为  $78.49 \text{ nkat} \cdot \text{mL}^{-1}$ , 比活力为  $524.38 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 最适反应温度为  $50^\circ\text{C}$ , 在  $40\sim 45^\circ\text{C}$  温度范围内较稳定, 最适反应 pH 值为  $5.0\sim 5.5$ , 且在 pH 值为 6.0 时, 稳定性较好; 金属离子  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  对其活性有促进作用,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  有一定的抑制作用, 而  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  对其有明显的抑制作用.

**关键词:** 阿魏酸酯酶; 表达; 毕赤酵母; 酶学性质

**中图分类号:** Q 78; Q 556<sup>+</sup>.1

**文献标志码:** A

植物细胞壁中, 酚酸类物质(如阿魏酸、咖啡酸、对香豆酸等)通过酯键与多糖(如阿拉伯木聚糖、果糖)的阿拉伯糖基或半乳糖基相连, 或者通过醚键与木质素相连, 形成致密的网状结构<sup>[1]</sup>. 阿魏酸酯酶(feruloyl esterase, FAE, EC 3.1.1.73)又名肉桂酸酯酶, 能水解阿魏酸酯、低聚糖阿魏酸酯和多糖阿魏酸酯中的酯键, 释放出阿魏酸等功能性物质. FAE 可以协同木聚糖酶、木质素酶破坏木质纤维的致密网状结构, 使细胞壁结构变得疏松, 从而促进木质纤维素完全降解<sup>[1-2]</sup>. FAE 对木质纤维废弃物利用有着重要意义<sup>[3]</sup>. 至今, 已经从细菌和真菌中分离得到 40 多种 FAE, 但目前报道的 FAE 的酶活及表达量都达不到工业需要<sup>[4-6]</sup>. 毕赤酵母(*Pichia pastoris*)可高密度地发酵培养, 其菌体量可达  $130 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  干细胞重, 在生产单细胞蛋白动物饲料方面发挥重要作用<sup>[7-8]</sup>. 毕赤酵母表达系统比大肠杆菌(*Escherichia coli*)体系有更完备的基因表达调控机制及对表达产物的加工修饰能力, 并具有原核细胞系统生长速度快、便于基因操作和可工业化大规模培养等优点<sup>[9]</sup>. 本文对阿魏酸酯酶 O42807 基因(*fae*)在巴斯德毕赤酵母 GS115 中的表达及重组阿魏酸酯酶的酶学特性进行研究.

## 1 材料和方法

### 1.1 主要材料

1.1.1 菌株和质粒 *E. coli* DH5 $\alpha$  为本实验室保存; 毕赤酵母 GS115, 载体 pAO815, pPIC9K 均购自美国 Invitrogen 公司.

1.1.2 主要试剂和培养基 限制性内切酶(*EcoR* I, *Hind* III, *Sna*B I, *Not* I, *Bgl* II), T4 DNA 连接酶(立陶宛 Fermentas 公司); 质粒抽提试剂盒、胶回收试剂盒(上海 Sangon 公司); 标准蛋白质 marker (14.4~116.0 ku), SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒(上海碧云天生物技术研究所); 阿魏酸甲酯(美国 Sigma 公司); 其他试剂均为国产或进口分析纯产品. MD 培养基、YPD 种子培养基、BMGY 种子培养基、BMMY 诱导培养基按《毕赤酵母操作表达手册》(美国 Invitrogen 公司)配制.

### 1.2 pAO815-*fae* 表达载体的构建

根据阿魏酸酯酶 O42807 的氨基酸序列, 以毕赤酵母标准密码子优化设计阿魏酸酯酶的基因序列,

收稿日期: 2014-10-31

通信作者: 李夏兰(1965-), 女, 教授, 博士, 主要从事生物化工的研究. E-mail: xialan@hqu.edu.cn.

基金项目: 福建省厦门市科技计划项目(2014S006); 福建省发改委投资基金资助项目(2013-886)

在基因序列的两端引入 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切位点, 化学合成基因序列 *fae*. 用 *Hind* III, *Eco*R I 分别双酶切合成的基因序列和质粒 pAO815, 胶回收双酶切片段后用 T4 DNA 连接酶连接并转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞. 筛选出的阳性克隆子由 Sangon 测序, 测序正确的重组质粒命名为 pAO815-*fae*.

1.3 pPIC9K-*fae* 表达载体的构建

以质粒 pAO815-*fae* 为模板, 采用上游引物 5'-TACGTAGCCTCTACTCAGGGGATCAGT-3' 和下游引物 5'-AATATGCGGCCGCTTACCAAGTACAAGCCCCG-3' 扩增成熟阿魏酸酯酶编码序列. 聚合酶链反应(PCR)反应条件如下: 94 ℃ 变性 30 s, 55 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 反应 30 个循环, 最后, 72 ℃ 延伸 10 min. PCR 产物经胶回收用 *Sna*B I 和 *Not* I 进行双酶切, 然后, 连接到经同样双酶切的 pPIC9K 上并转化至 *E. coli* DH5 $\alpha$ . 筛选出的阳性克隆子由 Sangon 测序, 测序正确的重组质粒命名为 pPIC9K-*fae*.

1.4 *fae* 在毕赤酵母中的表达

pPIC9K-*fae* 用 *Bgl* II 线性化, 电转化毕赤酵母 GS115, 涂布于 MD 平板上筛选重组子, 取 MD 平板上生长良好的菌落用牙签点种至含 G418 的 YPD 摇瓶中, 筛选抗 G418 的重组子, 命名为 GS115/pPIC9K-*fae*. 提取 GS115/pPIC9K-*fae* 及以质粒 pPIC9K 转化菌株(GS115/pPIC9K)基因组 DNA, 利用通用引物 5'AOX, 3'AOX 进行 PCR 鉴定. 重组酵母 GS115/pPIC9K-*fae* 诱导表达参见《毕赤酵母操作表达手册》. 用 Bradford 法测定蛋白质量浓度, SDS-PAGE 分析发酵上清液.

1.5 重组阿魏酸酯酶酶活测定

取 250  $\mu$ L 酶液, 加入 250  $\mu$ L 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液(pH=5.0)配制的阿魏酸甲酯溶液, 50 ℃ 反应 10 min, 加入 500  $\mu$ L 冰乙酸(体积分数为 10%), 4 ℃, 10 000 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 高效液相色谱法(HPLC)测定阿魏酸的质量浓度<sup>[10]</sup>. 空白对照为煮沸失活的酶液. 在 50 ℃, pH 值为 5.0 条件下, 每分钟水解阿魏酸甲酯.

1.6 重组阿魏酸酯酶粗酶酶学性质的研究

1.6.1 最适反应温度的测定 取 250  $\mu$ L 酶液保温 5 min 后, 加入 250  $\mu$ L 阿魏酸甲酯溶液(由 pH 值为 5.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液配置), 在 40~65 ℃ 中反应 10 min, 测定重组阿魏酸酯酶的酶活. 以所测的最高酶活为 100%, 计算相对酶活( $A_r$ ).

1.6.2 温度稳定性的测定 将 FAE 酶液置于 40~65 ℃ 下, 保温 12 h, 每隔 3 h 取样测定残留酶活, 以 0 h 酶活为 100%, 计算相对酶活.

1.6.3 最适反应 pH 值的测定 取 250  $\mu$ L 酶液 50 ℃ 保温 5 min 后, 加入 250  $\mu$ L 的阿魏酸甲酯溶液(0.2 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液调节 pH 值在 4.0~7.0 之间), 50 ℃ 下反应 10 min, 测定重组阿魏酸酯酶的酶活. 以所测的最高酶活为 100%, 计算相对酶活.

1.6.4 pH 值稳定性的测定 将酶液置于 0.2 mol $\cdot$ L<sup>-1</sup>, pH 值为 4.0~7.0 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液中, 50 ℃ 保温 2 h, 测定残留酶活, 以各 pH 值的 0 h 酶活为 100%, 计算相对酶活.

1.6.5 金属离子对重组阿魏酸酯酶酶活的影响 将 FAE 酶液与含有 10 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的各种金属离子(Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>) 的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲溶液(pH=5.0)混合, 于 50 ℃ 保温 2 h, 测定残留酶活, 以不添加抑制剂的酶活为 100%, 计算相对酶活.

2 结果与分析

2.1 pAO815-*fae* 和 pPIC9K-*fae* 表达载体的构建

构建的表达载体, 如图 1 所示. 由图 1 可知: 测序结果显示 *fae* 基因序列正确, 重组表达载体 pAO815-*fae* 构建成功. 以质粒 pAO815-*fae* 为模板, PCR 产物在约 800 bp 处出现一条特异性条带, 其大小与预期的相符. 将目的产物用 *Sna*B I 和 *Not* I 双酶切切胶回收后, 与经同样双酶切后回收的质粒 pPIC9K 连接, 转化 *E. coli* DH5 $\alpha$  筛选获得重组质粒. 表达载体 pPIC9K-*fae* 双酶切结果和示意图, 如图 2 所示. 图 2(a)中: 泳道 1 为重组质粒双酶切片段; 泳道 2 为 DNA mark. 由图 2(a)可知: 酶切条带相对分子质量与载体基因大小吻合, 两条条带分别为 9.3 kbp 和 800 bp.

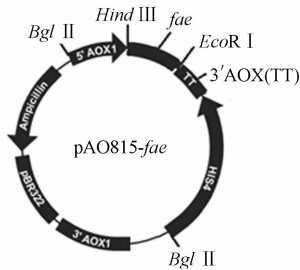
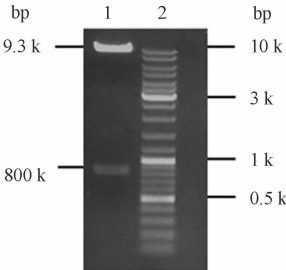
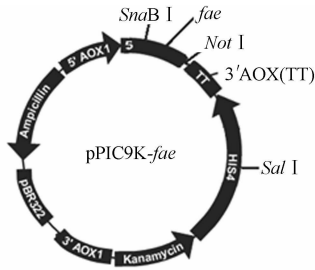


图 1 表达载体 pAO815-*fae* 示意图  
Fig. 1 Schematic representation of the expression vector pAO815-*fae*



(a) 双酶切结果



(b) 示意图

图 2 表达载体 pPIC9K-*fae* 双酶切结果及示意图  
Fig. 2 Cleavage map and schematic representation of the expression vector pPIC9K-*fae*

2.2 *fae* 在毕赤酵母中的表达

以 GS115/pPIC9K-*fae* 的基因组为模板,用 5' AOX1 和 3' AOX1 引物进行 PCR 验证,PCR 产物用质量分数为 1% 的凝胶电泳检测,结果如图 3 所示.图 3 中:1 是以 pPIC9K-*fae* 质粒为模板;2 是以无菌水为对照;3 是 DNA marker;4~8 是以 GS115/pPIC9K-*fae* 转化子为模板;9 是以 GS115/pPIC9K 基因组为模板.电泳结果显示:以 GS115/pPIC9K 基因组为模板进行 PCR,得到约 2 200 bp 的 PCR 产物片段,即 AOX 基因;而以 GS115/pPIC9K-*fae* 转化子基因组为模板的 PCR 产物,除了 AOX 基因,还有一条 800 bp 左右的 *fae* 片段,显示目的基因 *fae* 已经成功整合到这些转化子基因组中.

挑取上述阳性转化子,按照节 1.3 进行培养和诱导表达.甲醇诱导每隔 12 h 或 24 h 取样,测定其表达量,筛选到一个产酶活性最高的 GS115/pPIC9K-*fae* 重组子.取其发酵上清液进行 SDS-PAGE 分析,如图 4 所示.图 4 中:1 为 GS115/pPIC9K 发酵上清液;2 为蛋白 marker;3~10 为 GS115/pPIC9K-*fae* 诱导培养 0,12,24,48,72,96,120,144 h 的发酵上清液.由图 4 可知:在 42 ku 得到一条清晰条带,而且几乎没有杂条带,初步说明 *fae* 得到成功表达.SDS-PAGE 结果显示的表观相对分子质量( $M_r$ )明显大于其理论值 28.48 ku,这主要有以下 2 个原因:1) FAE 的理论等电点(pI)为 3.3,这可能降低了 FAE 与 SDS 的结合,以及在 SDS-PAGE 凝胶中的迁移;2) FAE 蛋白序列的 N 端有一个糖基化位点,而毕赤酵母表达外源蛋白时,会对其进行糖基化修饰,从而使相对分子质量增大<sup>[9]</sup>.

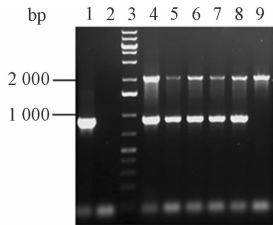


图 3 GS115/pPIC9K-*fae* 转化子 PCR 电泳图  
Fig. 3 Cleavage map of the PCR analysis of GS115/pPIC9K-*fae* transformants

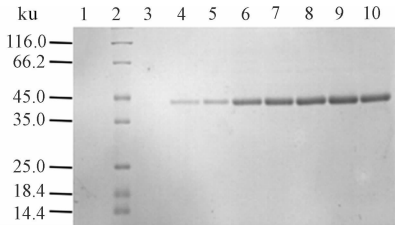


图 4 SDS-PAGE 分析产物的表达  
Fig. 4 Products expression analyzed by SDS-PAGE

GS115/pPIC9K-*fae* 表达量的测定结果,如图 5 所示.图 5 中:培养液上清中阿魏酸酯酶酶活力( $\alpha$ )在诱导培养 96 h 后达最高,为 78.49 nkat  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>,比活( $u$ )为 524.38 nkat  $\cdot$  mg<sup>-1</sup>,之后酶活逐渐降低.菌体浓度( $D$ )在培养 24 h 后基本稳定,但发酵液中的蛋白量( $\rho_p$ )一直持增长趋势,这可能是由于发酵后期由于营养物质缺乏,造成部分菌体自溶使蛋白量增加.

2.3 重组阿魏酸酯酶粗酶的酶学性质

通过研究在 40~65  $^{\circ}$ C 时酶活的变化,探究酶反应的最适温度( $\theta$ ),如图 6 所示.由图 6 可知:50  $^{\circ}$ C 之前,重组阿魏酸酯酶的酶活较高,相对酶活( $A_r$ )都在 80% 以上.FAE 的最适作用温度为 50  $^{\circ}$ C,超过 50  $^{\circ}$ C 后,FAE 的酶活下降较快,可能是随着温度的升高,酶出现失活现象.

将重组阿魏酸酯酶在 40~65  $^{\circ}$ C 保温 0,3,6,9,12 h 后,测定其残余酶活,结果如图 7 所示.重组阿魏酸酯酶在 40~65  $^{\circ}$ C 温度下,随着保温时间( $t$ )的延长,FAE 的酶活( $A_r$ )逐渐下降.40~45  $^{\circ}$ C 保温 12 h 后,酶活为初始酶的 50% 左右;50  $^{\circ}$ C 以后,酶活下降较快,保温 12 h 后,剩余酶活不足 10%.

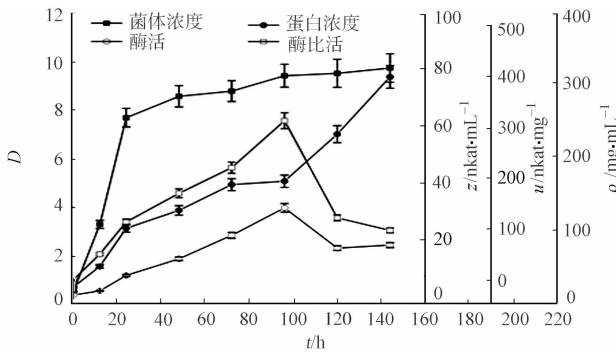


图 5 GS115/pPIC9K-fae 表达量的测定

Fig. 5 Determination of the products expression in GS115/pPIC9K-fae

2.3.1 最适反应 pH 值和 pH 值稳定性的测定 pH 值为 4.0~7.0 时,酶的最适反应 pH 值,如图 8 所示.由图 8 可知:pH 值为 5.0~5.5,重组阿魏酸酯酶的酶活最大. pH 值稳定性结果,如图 9 所示.由图 9 可知:pH 值为 4.0~6.0 时,随着 pH 值的增大,重组酶的稳定性随之增大;pH 值为 6.0 时,稳定性相对较高,为 63%;pH 值大于 6.0 时,酶活稳定性逐渐下降.重组酶对 pH 值比较敏感,这可能是因为 pH 值过低或过高会改变酶的空间结构<sup>[11]</sup>.

2.3.2 金属离子重组阿魏酸酯酶酶活性的影响 无金属离子, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 的相对酶活分别为 100%, 106%, 109%, 101%, 98%, 66%, 41%, 60%, 55%. 由此可知: K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup> 对 FAE 有促进作用; Fe<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> 对其有一定的抑制作用; Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 对其有显著抑制作用.

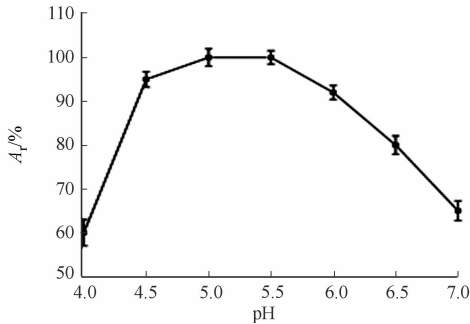


图 8 pH 对重组阿魏酸酯酶酶活性的影响

Fig. 8 Effect of pH on the activity of recombinant FAE

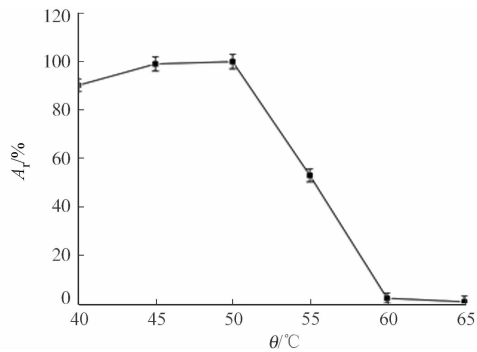


图 6 温度对重组阿魏酸酯酶活性的影响

Fig. 6 Effect of temperature on the activity of recombinant FAE

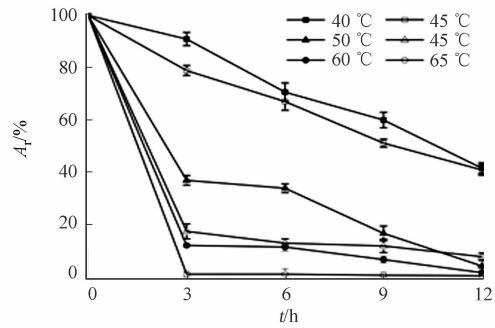


图 7 温度对重组阿魏酸酯酶稳定性的影响

Fig. 7 Effect of temperature on the stability of recombinant FAE

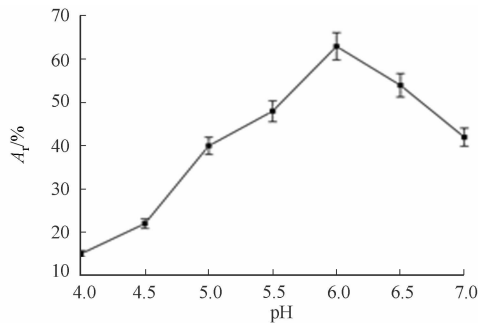


图 9 pH 对重组阿魏酸酯酶稳定性的影响

Fig. 9 Effect of pH on the stability of recombinant FAE

### 3 讨论

为了提高阿魏酸酯酶的表达量,已对多个阿魏酸酯酶编码基因进行了外源表达.国内外学者主要采用大肠杆菌、毕赤酵母表达系统对阿魏酸酯酶进行重组表达,如表 1 所示.文中研究的产 FAE 工程菌目标是应用于饲料中,所以选择已增补至《饲料添加剂品种目录(2013)》中的黑曲霉的 FAE 序列. FAE 的氨基酸序列来源于 UniProt 数据库中的 O42807. 该 FAE 是 DE Vries 等<sup>[1]</sup>从黑曲霉(*Aspergillus niger*) CBS120.49 中分离得到的,当 *A. niger* CBS120.49 在含质量分数为 0.1% 葡萄糖和 1% 燕麦木聚糖的混合植物细胞壁中培养 4 d 后,酶比活(*u*)为 20.875 nkat · mg<sup>-1</sup>(以阿魏酸甲酯为底物),其最适温度(*θ*)为 55~60 °C,最适 pH 值为 5.0,属于胞外酶. 此 FAE 含有 281 个氨基酸(1~21 位为信号肽序

列,21 位为信号肽序列,22~281 为成熟肽链),其中,含有 30 个酸性氨基酸残基(Asp,Glu)和 10 个碱性氨基酸残基(Lys,Arg),含有 7 个 Cys 和 1 个糖基化位点,pI 为 3.3,理论相对分子质量为 28.48 ku.

表 1 阿魏酸酯酶基因工程菌的研究进展

Tab.1 Research progress of the engineering bacteria of FAE

基因来源	表达载体	表达宿主	Mr/ku	$z/\text{nkat} \cdot \text{mL}^{-1}$	$u/\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$	酶学性质		参考文献
						$\theta/^{\circ}\text{C}$	最适 pH	
<i>A. niger</i>	—	—	—	—	20.87	55~60	5.0	[1]
人工合成	pPIC9K	<i>P. pastoris</i>	42	78.49	524.38	50	5.0	文中
<i>A. niger</i>	pHIL-D2	<i>P. pastoris</i>	30	—	718.10	—	5.2	[9]
<i>F. oxysporum</i>	pPICZα C	<i>P. pastoris</i>	62	13.86	—	65	6.0	[12]
<i>A. niger</i>	pPIC9K	<i>P. pastoris</i>	28	277.22	—	40	—	[13]
<i>A. niger</i>	pPIC9K	<i>P. pastoris</i>	33	412.82	815.63	50	5.5	[4]
<i>A. oryzae</i>	pPIC9K	<i>P. pastoris</i>	39	35.24	974.44	—	—	[14]
<i>A. oryzae</i>	pPICZαA	<i>P. pastoris</i>	61	—	511.02	—	6.0	[6]
			75	—	238.81			
<i>A. awamori</i>	pTZ57R/T	<i>E. coli</i>	35	—	30.89	55	5.5	[15]
rumen microbial metagenome	pET29b	<i>E. coli</i>	29	—	172.01	50	7.0	[5]

根据毕赤酵母偏好性表达对 FAE O42807 的基因序列进行改造后,人工合成该酶的基因序列 *fae*. 这段序列与表达载体 pPIC9K 相连,FAE 在 α-factor 信号肽的引导下分泌到胞外.由表 1 可知:酵母表达系统与大肠杆菌表达系统相比,其酶比活较高;该重组阿魏酸酯酶的酶比活可达 524.38 nkat · mg<sup>-1</sup>,酶活力介于文献报道之间,比原始菌株酶活大大提高;重组阿魏酸酯酶最适温度在 40~60 ℃,最适 pH 值在 5.2~7.0 之间,文中重组阿魏酸酯酶的最适温度为 50 ℃,最适 pH 值为 5.0.

先前尝试用胞内表达载体 pAO815 在毕赤酵母中表达,但不能检测到酶活.这可能是由于阿魏酸酯酶 O42807 是一种糖基化蛋白,胞内表达时未进行糖基化修饰,不能产生有活性的阿魏酸酯酶<sup>[9,16-17]</sup>.

4 结 束 语

文中报道的重组阿魏酸酯酶在 40 ℃中保温 3 h 后,保留了 80%以上的酶活;40~45 ℃保温 12 h 后,仍保留 50%左右的酶活.Fe<sup>2+</sup>,Zn<sup>2+</sup>对重组阿魏酸酯酶酶活有一定的抑制作用,而 Mn<sup>2+</sup>,Cu<sup>2+</sup>对其有明显抑制作用.这与 Donaghy 等<sup>[18]</sup>报道的阿魏酸酯酶的酶学性质一致.构建的基因工程菌在胞外表达时,发酵液中背景蛋白较少,重组蛋白纯度较高.阿魏酸酯酶在毕赤酵母中的高效分泌表达为后续定向改进酶学特性奠定了基础.

参 考 文 献:

[1] FAULDS C B,WILLIAMSON G. Purification and characterization of a ferulic acid esterase (FAE-Ⅲ) from *Aspergillus niger*: Specificity for the phenolic moiety and binding to microcrystalline cellulose[J]. Microbiology,1994,140 (4):779-787.

[2] FAULDS C B,MANDALARI G,BISIGNANO G. Arabinoxylan and mono-and dimeric ferulic acid release from brewer's grain and wheat bran by feruloyl esterases and glycosyl hydrolases from *Humicola insolens*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2004,64(5):644-650.

[3] TOPAKAS E,VAFIADI C,CHRISTAKOPOULOS P. Microbial production, characterization and applications of feruloyl esterases[J]. Process Biochemistry,2007,42(4):497-509.

[4] 周燕燕,刘新利,陈静,等. 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[J]. 微生物学报,2014 (8):876-881.

[5] WONG D W,CHAN V J,LIAO H,et al. Cloning of a novel feruloyl esterase gene from rumen microbial metagenome and enzyme characterization in synergism with endoxylanases[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology,2013,40(3/4):287-295.

[6] KOSEKI T,HORI A,SEKI S,et al. Characterization of two distinct feruloyl esterases, AoFaeB and AoFaeC, from

- Aspergillus oryzae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2009,83(4):689-696.
- [7] FELBER M,PICHLER H,RUTH C. Strains and molecular tools for recombinant protein production in *Pichia pastoris*[M]. New York:Springer,2014:87-111.
- [8] WEGNER G H. Emerging applications of the methylotrophic yeasts. [J]. FEMS Microbiology Letters,1990,7(3/4):279-283.
- [9] JUGE N,WILLIAMSON G,PUIGSERVER A,et al. High-level production of recombinant *Aspergillus niger* cinnamoyl esterase (FAEA) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. FEMS Yeast Research,2001,1(2):127-132.
- [10] 李夏兰,范韵敏,方柏山. 来自桔青霉的阿魏酸酯酶的分离纯化、理化性质[J]. 微生物学报,2010,50(8):1058-1064.
- [11] 方园,欧仕益,张宁. 阿魏酸酯酶的制备及其酶学性质[J]. 暨南大学学报(自然科学与医学版),2012,33(5):481-485.
- [12] MOUKOULI M,TOPAKAS E,CHRISTAKOPOULOS P. Cloning, characterization and functional expression of an alkali-tolerant type C feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology,2008,79(2):245-254.
- [13] 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[J]. 应用与环境生物学报,2009,15(2):276-279.
- [14] 曾妍,龚海燕,邬敏辰,等. 阿魏酸酯酶 A 的基因克隆与表达及其水解产物的纯化[J]. 生物工程学报,2014,30(3):425-434.
- [15] FAZARY A E,HAMAD H A,LEE J C,et al. Expression of feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* in *Escherichia coli*: Characterization and crystal studies of the recombinant enzyme[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2010,46(4):440-444.
- [16] CEREGHINO J L,CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. FEMS Microbiology Reviews,2000,24(1):45-66.
- [17] MIZUNO T,SHIONO Y,KOSEKI T. Biochemical characterization of *Aspergillus oryzae* native tannase and the recombinant enzyme expressed in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering,2014,118(4):392-395.
- [18] DONAGHY J A,BRONNENMEIER K,SOTO-KELLY P F,et al. Purification and characterization of an extracellular feruloyl esterase from the thermophilic anaerobe *Clostridium stercorarium*[J]. Journal of Applied Microbiology,2000,88(3):458-466.

## Expression of Feruloyl Esterase O42807 in *Pichia pastoris* GS115

CHEN Yunhua, LI Hui, ZHANG Guangya, GE Huihua, LI Xialan

(College of Chemical Engineering, Huaqiao University, Xiamen 361021, China)

**Abstract:** This paper studied the expression of the feruloyl esterase O42807 in *Pichia pastoris* GS115 and the enzymatic properties of the recombinant feruloyl esterase. Based on the amino acids of feruloyl esterase O42807, the gene (*fae*) of feruloyl esterase was synthesized chemically. The secreted expression vector pPIC9K-*fae* was constructed by the ligation of the *fae* gene into the shuttle vector pPIC9K. The plasmid pPIC9K-*fae* was linearized and then electrotransformed into *Pichia pastoris* GS115. Afterwards, the recombinant strain with high level of feruloyl esterase activity was obtained through activity screening. The SDS-PAGE result showed a single band in the fermentation supernatant. The molecular weight of the recombinant feruloyl esterase was about 42 ku and the enzyme activity was  $78.49 \text{ nkat} \cdot \text{mL}^{-1}$ . The specific activity of the recombinant feruloyl esterase was  $524.38 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ . The results also showed that the optimal reaction temperature was  $50^\circ\text{C}$ , and stable from  $40^\circ\text{C}$  to  $45^\circ\text{C}$ . And the optimal pH was from 5.0 to 5.5, stable at pH 6.0. Furthermore, the enzymatic activity was slightly enhanced by  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ , whereas it was slightly inhibited by  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ , and strongly inhibited by  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ .

**Keywords:** feruloyl esterase; expression; *Pichia pastoris*; enzymatic properties