

米曲霉(*Aspergillus oryzae*)果胶酸内切水解酶(PGA)在原核系统中重组表达

Expression of Endopolygalacturonase A of *Aspergillus oryzae* in *Escherichia coli*

张宇玲[§], 赵庆新[§], 朱 泓, 孙 静, 韩丰敏, 袁 生*

ZHANG Yu-Ling[§], ZHAO Qing-Xin[§], ZHU Hong, SUN Jing, HAN Feng-Min and YUAN Sheng*

江苏省生物多样性和生物技术重点实验室, 南京师范大学生命科学学院微生物工程重点实验室, 南京 210097

Jiangsu Key Laboratory for Biodiversity and Biotechnology, Key Laboratory for Microbial Technology in the College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China

摘 要 果胶酶具有广阔的商业用途, 在食品工业上主要用于果汁和酒类的澄清、提高植物油的提取率、提高水果的硬度和植物纤维脱胶。米曲霉(*Aspergillus oryzae*)一直用于传统发酵食品的生产, 自然条件下其果胶酶的产量较低。文献报道的果胶酶的重组表达成功的例子较少, 且活性较低。通过 RT-PCR 的方法, 获得不含信号肽的果胶酸内切水解酶 A (polygalacturonase A, PGA) 的 cDNA, PGA cDNA 连入 pET-28a(+) 载体, 构建 pET-28a(+)pga 质粒。pET-28a(+)pga 转化 *Turner*(DE3)plac I 细胞, 得到转化子 pET-28a(+)pga-*Turner*(DE3)plac I, 首次实现了米曲霉 PGA 在大肠杆菌系统中过表达, 进一步对 PGA 在大肠杆菌系统中表达的条件进行了研究。在 37°C、220 r/min 条件培养 pET-28a(+)pga-*Turner*(DE3)plac I 细胞, OD_{600} 至 0.8 左右时, 用 500 μ mol/L isopropyl β -D-thiogalactopyranoside (IPTG) 进行诱导表达, 在 15°C 和 170 r/min 条件下继续培养 24 h, 表达效果最好, 相对于每毫升培养基而言, 产酶可达到 70 u/mL, 是米曲霉自然条件产酶量的 87.5 倍, 远优于文献报道的重组表达的 PGA 酶活。

关键词 米曲霉, 果胶酸水解酶, 大肠杆菌, 原核表达

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2007)01-0101-05

Abstract Pectinases are mainly used in the food industry to clarify fruit juices and wine, improve oil extraction, remove the peel from the citrus fruit, increase the firmness of some fruits and degum fibres. The filamentous fungus *Aspergillus oryzae*, used for the production of traditional fermented foods, only could produce less pectinases under general conditions. So far only a few of PGs expressed in yeast or *E. coli* were reported but they did not show higher activity. The cDNA of mature PGA (without signal peptide) was synthesized with specific primers from total RNA of *Aspergillus oryzae* by RT-PCR. PGA cDNA was ligated into pET-28a(+) expression vector, creating plasmid pET-28a(+)pga. The plasmid pET-28a(+)pga was transformed into *E. coli* *Turner*(DE3)plac I cells to express PGA heterogeneously. For improving the efficiency of PGA expression in *E. coli*, the conditions for expression of the PGA in *E. coli* were optimized. *E. coli* *Turner*(DE3)plac I cells with pET-28a(+)pga

Received: July 26, 2006; Accepted: September 19, 2006.

This work was supported by the grants from the National Natural Science Funds of China (No. 30170005) and the Jiangsu Province National Natural Science Funds (No. BK2005136).

[§] Both ZHANG Yu-Ling and ZHAO Qing-Xin are first authors.

* Corresponding author. Tel: +86-25-83598790; Fax: +86-25-83706565; E-mail: shengyuan@email.njnu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30170005)和江苏省自然科学基金(No. BK2005136)

[§] 为共同第一作者。

was first cultivated at 37°C, 220r/min until OD_{600nm} reached about 0.8. Then, cultivation broth was added with 0.5 mmol/L IPTG and incubated at 15°C, 170r/min for other 24 h for induced-expression of PGA. Our data showed that the activity of recombinant expressed PGA could reach to 70u/mL medium, which is 87.5-fold of the activity of PGA produced in culture of *A. oryzae* and superior than known recombinant expression amount of PGA reported by other researchers.

Key words *Aspergillus oryzae*, polygalacturonase, *Escherichia coli*, expression

果胶酶可分为果胶酯酶和果胶降解酶两类。果胶酯酶可脱去果胶上的甲氧基团,使果胶去酯化,果胶降解酶可分为水解酶和裂解酶两类。果胶酸内切水解酶(E. C. 3.2.1.15)可水解两个未甲基化的半乳糖醛酸残基间的 α -1,4-D-糖苷键,果胶酸外切水解酶(E. C. 3.2.1.67)可水解果胶酸还原端的末端残基^[1]。果胶酶具有广阔的商业用途,在食品工业上主要用于果汁和酒类的澄清、提高植物油的提取率、去除柑橘囊衣、提高水果的硬度和植物纤维脱胶^[2-5]。商品果胶酶通常是通过真菌发酵生产的,常用的发酵菌种是黑曲霉。许多真菌产果胶酶过程中,需要以果胶、半乳糖醛酸或多聚半乳糖醛酸等为底物进行诱导^[6],且受其他碳源物质如葡萄糖的抑制作用^[7]。

丝状真菌米曲霉(*A. oryzae*)一直用于传统发酵食品的生产,米曲霉用于酱油生产时,产生的PGA产量较低。*A. oryzae*的PGA酶为内切型的果胶酸水解酶^[8],前人已经克隆了*A. oryzae* KBN616的PGA基因(*pgaA*)^[8],为了改善PGA的同源表达,前人构建了PGA在*A. oryzae*中表达的同源重组表达系统,但PGA产量仅达 $0.084\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ^[9]。为此,我们尝试采用大肠杆菌原核表达系统重组表达*A. oryzae* PGA,得到了可溶性的并具有较高生物学活性的PGA,酶活可达70u/mL,结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 菌株与质粒

A. oryzae 3.762(野生型)来自中国普通微生物菌种保藏管理中心,用50mL含1%果胶酸的基本培养基,150r/min,30°C避光条件下培养 $2d$ ^[8]。大肠杆菌DH5 α 作为基因克隆的宿主菌。*Escherichia coli* Turner plac I(DE3)(Novagen),用作*pgaA*基因表达的宿主菌。pMD 18-T Vector(TaKaRa)作为克隆载体,pET-28a(+)(Novagen)用作表达载体。

1.2 *pgaA*基因的克隆与表达

参照 Logemann 等的方法从米曲霉的菌丝体中提取总RNA^[10]。然后用 oligo(dT)12-18 primer,通过逆转录得到PGA的cDNA;PCR引物设计是根据

参考文献8和NCBI核酸数据库中米曲霉内切型的果胶酸水解酶*pgaA*基因序列(NCBI accession number: D14282),正义引物(5'-CATATGGACTCCTGTACTTTCACCTCG-3')包含Nde I限制性酶切位点和PGA基因序列正义链第307-327碱基序列,反义引物(5'-GAATTCACAATAGATATCACAATGGCCGGCTGAAGT-3')包含EcoR I限制性酶切位点和与PGA基因序列正义链第1490-1520碱基互补的反义链序列;使用高保真的PfuUltra™ DNA聚合酶(Stratagene)和上述特异引物通过扩增得到不含信号肽的PGA cDNA,然后将PGA cDNA序列连接到pMD 18-T Vector(TaKaRa),构建pMD 18-T-pgA质粒转化DH5 α ,得到pMD 18-T-pgA-DH5 α 阳性转化子;用限制性内切酶Nde I和EcoR I将不含信号肽的PGA cDNA片段从pMD 18-T-pgA上切下,连接到pET-28a(+)(Novagen)表达载体上,转化*E. coli* Turner plac I(DE3)细胞(Novagen),得到pET-28a(+)-pgA-Turner plac I(DE3)阳性转化子。

pET-28a(+)-pgA-Turner plac I(DE3)转化子在LB中培养,LB中分别加入葡萄糖、卡那霉素和氯霉素至终浓度为1%(W/V)、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。在37°C,220r/min条件下培养,当 OD_{600} 达到0.8左右时,加入不同浓度的IPTG,在结果中所指示的实验温度下诱导表达不同时间。诱导表达结束后,在5000g,4°C条件下离心10min,收集菌体,用5mL 10mmol/L Tris-HCl, pH 7.0溶液洗涤菌体,重复1次,然后将菌体在-80°C条件下冻存6h以上,然后用25mL含100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ lysozyme和1mmol/L PMSF的10mmol/L Tris-HCl(pH7.5)溶液重新悬浮细胞,在0°C条件下,超声破碎细胞,离心得上清,上清进一步用Ni²⁺-nitrilotriacetate-agarose柱进行亲和层析,包涵体用含1% Triton的Tris-HCl, pH7.0清洗5次。

1.3 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳检测

为了检测重组菌表达的PGA重组蛋白产物,采用SDS-PAGE凝胶电泳检测,浓缩胶浓度为3.5%,分离胶浓度为11.0%,用考马斯亮蓝R-250染色。

1.4 蛋白浓度的测定

参照 Bradford 的方法采用考马斯亮蓝 G-250 法进行可溶性蛋白含量测定^[11]。以牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白,配制标准溶液,制作标准曲线。

1.5 PGA 酶活的检测

PGA 酶活测定的样品制备 50mL 菌液表达结束后,收集细胞,用 25mL 含 100 μ g/mL lysozyme 和 1mmol/L PMSF 的 10mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 溶液重新悬浮细胞,0 $^{\circ}$ C 条件下超声破碎细胞,14000r/min 条件下离心 20min,收集上清,测定上清中可溶性重组表达的 PGA 酶活。

PGA 酶活性检测的反应体系为:0.5 mL 反应液,内含 50mmol/L sodium acetate (pH 5.0),0.1% 果胶酸和适量的 PGA,在 50 $^{\circ}$ C 反应 10min。为了检测反应体系中产生的还原糖的量,加 0.5mL dinitrosalicylic acid (DNS) 试剂终止反应,然后检测在 520nm 处的吸收值^[12],再根据标准曲线回归方程,换算得到还原糖浓度,然后计算裂解细胞上清的每毫升体积所含的总酶活,再计算相对于每毫升菌体培养液体积的总酶活。一个酶活单位定义为每分钟释

放的还原糖等同 1 μ mol 半乳糖醛酸(galacturonic acid)的酶量。

2 结果

2.1 PGA cDNA 的克隆和序列分析

A. oryzae 3.762 在 50 mL 含 1% 果胶酸的基本培养基中,170r/min,30 $^{\circ}$ C 避光条件下培养 2d,菌液上清中测得最高 PGA 酶活可达 0.8u/mL。收集菌体提取总 RNA,经 RT-PCR,得到了不含信号肽的 PGA cDNA,全长 1008bp,编码一条 336 个氨基酸的肽链。通过基因序列比对发现,从 *A. oryzae* 3.762 来源的 PGA 酶核苷酸序列与文献报道的 *A. oryzae* KBN616 的 PGA 酶核苷酸有 5 个核苷酸碱基发生改变:1010-1014 位的 GACT \rightarrow ACTG,1072 位 T \rightarrow C (Fig. 1),最终导致 *A. oryzae* 3.762 的 PGA 与来自 *A. oryzae* KBN616 的 PGA 的氨基酸序列相比发生了 3 个氨基酸替换,即 337 位 Gly \rightarrow Asp,338 位 Leu \rightarrow Trp,358 位 Ser \rightarrow Pro (Fig. 2)。3 次重复得到的 *A. oryzae* 3.762 来源的 PGA 酶核苷酸序列完全一致,所以这种差异可能是由于两株菌株本身的差异造成的,而不是 RT-PCR 过程产生的突变。

```

A.oryzae KBN816 919      ...GTC TCTGATATCA CCTTCGACAAGGTTACCGGTACCGTTGAGAGCGACGCTACTGA
A.oryzae 3.762 919      ...GTC TCTGATATCA CCTTCGACAAGGTTACCGGTACCGTTGAGAGCGACGCTACTGA
A.oryzae KBN616 975      CATCTACATTCTCTGTGGATCTGGCAGCTGCAC TGGACTGGACCTGGTCCGGTGTTCOCAT
A.oryzae 3.762 975      CATCTACATTCTCTGTGGATCTGGCAGCTGCAC TGGACTGGACCTGGTCCGGTGTTCOCAT
A.oryzae KBN616 1035     CACTGGTGGTAAAGACTAGCTCCAAGTGGGAGAACGTTCTACTGGTGC TTCCTTGTTAA
A.oryzae 3.762 1035     CACTGGTGGTAAAGACTAGCTCCAAGTGGGAGAACGTTCTACTGGTGC TTCCTTGTTAA
  
```

图 1 *A. oryzae* KBN616 和 *A. oryzae* 3.762 的 PGAs 酶核苷酸序列比对

Fig. 1 Alignment of nucleotide sequences of PGAs from *A. oryzae* KBN616 and *A. oryzae* 3.762

```

A.oryzae KBN816 188      ...STYINIDGATVYNQDDCLAINSGSHITFTNGYCDGGHGLSIGSVGGRSDNTVEDVT
A.oryzae 3.762 181      ...STYINIDGATVYNQDDCLAINSGSHITFTNGYCDGGHGLSIGSVGGRSDNTVEDVT
A.oryzae KBN616 244      ISNSKVVNSQNGVRIKTVYDATGTVSNVKFEDITLSGITKYGLIVEQDYENGSPGTPTN
A.oryzae 3.762 244      ISNSKVVNSQNGVRIKTVYDATGTVSNVKFEDITLSGITKYGLIVEQDYENGSPGTPTN
A.oryzae KBN616 304      GIKVSDITFDKVTGTVESDATDIYIILCGSGSCTGLTWSGVSITGGKTSKCEVPTGASC
A.oryzae 3.762 304      GIKVSDITFDKVTGTVESDATDIYIILCGSGSCTDW TWSGVSITGGKTSKCEVPTGASC
  
```

图 2 *A. oryzae* KBN616 和 *A. oryzae* 3.762 的 PGAs 酶氨基酸序列比对

Fig. 2 Alignment of amino acids sequences of PGAs from *A. oryzae* KBN616 and *A. oryzae* 3.762

2.2 PGA 在 *E. coli* 中的表达

在 IPTG 诱导下,构建的重组菌 pET-28a(+)-pgaA-Turner plac I(DE3)能够表达与 6 His-tag 融合的 *A. oryzae* 3.762 PGA 重组蛋白,该重组蛋白是不含信号肽的成熟蛋白。PGA 重组蛋白的表达形式包含有活性的可溶性蛋白和无活性的包涵体蛋白。所收集的包涵体检测不到活性,包涵体经过复性处理,仍未检测出活性(具体复性过程和方法略)。

为了提高重组活性 PGA 蛋白的表达效果,对其表达条件进行进一步研究。在菌体培养液培养到 OD_{600nm} 约为 0.8 时,加入 $500\mu\text{mol/L}$ IPTG 进行诱导,在不同温度下,170r/min 条件下连续表达 24h(Fig. 3) 结果表明 15 °C 条件下产酶活性最高。高温表达可能加快蛋白合成速度,但可能只有少部分蛋白能进行正确折叠,所以高温表达效果差。在 OD_{600nm} 约为 0.8 时,加入不同浓度的 IPTG 进行诱导,重组菌在 15 °C,170r/min 连续表达 24h(Fig. 4),最适 IPTG 诱导浓度为 $500\mu\text{mol/L}$ 。在 OD_{600nm} 约为 0.8 时,加入 $500\mu\text{mol/L}$ IPTG 进行诱导,重组菌在 15 °C,170r/min 下连续表达时间为 6 ~ 72h(Fig. 5),最佳表达时间为 24h。重组表达 PGA 蛋白多数以包涵体形式存在,可溶性重组表达 PGA 经 Ni^{2+} -nitrilotriacetate-agarose 部分纯化,可去除大多数杂蛋白。在优化的诱导表达条件下, $500\mu\text{mol/L}$ IPTG,15 °C,170r/min,表达 24h,由 50mL 菌体培养液中获得的菌体,可制备获得 25mL 细胞裂解上清液,经检测每毫升上清液作用 10min 可释放还原糖量为 1.4mmol,即每毫升裂解上清液酶活为 140u 相对于菌体培养液 50mL 体积而言,每毫升菌体培养液重组蛋白酶活可达 70u。

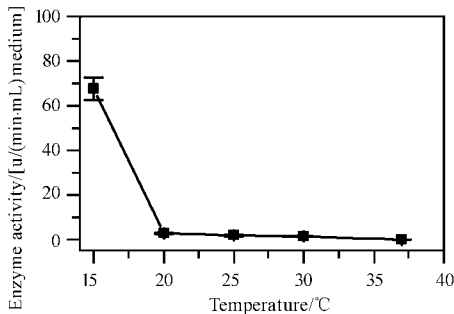


图3 温度对 PGA 表达的影响

Fig.3 Effect of temperature on PGA expression

Cell of pET-28a(+)-pgaA-Turner plac I(DE3) was incubated at 37°C at 200r/min to the cell density with OD_{600} about 0.8. The expressions were induced by adding IPTG to $500\mu\text{mol/L}$ concentration and cell was continuously incubated at different temperatures at 170r/min for 24h.

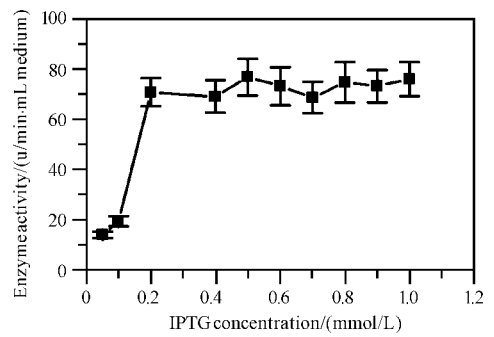


图4 IPTG 浓度对 PGA 表达的影响

Fig.4 Effect of various concentrations of IPTG on PGA expression

Cell of pET-28a(+)-pgaA-Turner plac I(DE3) was incubated at 37°C at 200r/min to the cell density with OD_{600} about 0.8. The expressions were induced at different concentrations of IPTG and cell was continuously incubated at 15°C at 170r/min for 24h.

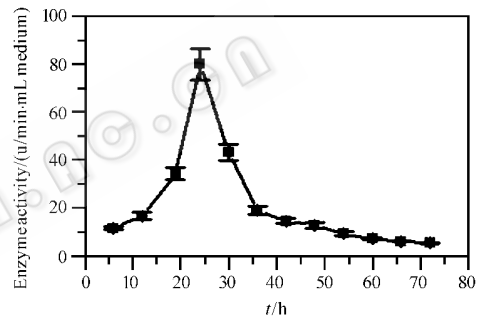


图5 表达时间对 PGA 活性的影响

Fig.5 Shows the time-course of PGA expression

Cell of pET-28a(+)-pgaA-Turner plac I(DE3) was incubated at 37°C at 200r/min to the cell density with OD_{600} about 0.8. The expressions were induced at 0.5mmol/L IPTG and cell was continuously incubated at 15°C at 170r/min for different times.

3 讨论

以上实验结果表明,*A. oryzae* 的 PGA 酶在大肠杆菌系统中表达是行之有效的。PGA 在 *A. oryzae* 3.762 中是糖基化蛋白^[8],PGA 在 *E. coli* 中的成功表达表明 PGA 的糖基化对该蛋白酶的水解果胶酸的活性是非必需的。重组蛋白 PGA 在 *E. coli* 中表达的酶活可达 70u/mL,比 PGA 在 *A. oryzae*(0.8 u/mL)中自然表达水平高要 87.5 倍,也比其他 PGs (polygalacturonases)在自然条件下的表达优越,*A. niger* 通过液体发酵产生的酶,以果胶作为唯一碳源并在培养基中不断补充不同浓度的葡萄糖,果胶酶活力仅能达到 0.120u/mL^[13]。

此外,本文报道的 *A. oryzae* PGA 在原核重组表达体系中的表达效果比以往报道的其它 PG 酶的异

源表达效果更好,是病原真菌 *Stereum purpureum* 来源的 PGA 在 *E. coli* 中表达酶活的 20 倍左右,后者表达酶活力仅达 $3.4\text{u/mL}^{[14]}$ 。虽然 *Stereum purpureum* 来源的 PGA 在 *E. coli* 中表达也采取 20°C 低温表达,但可能 IPTG 浓度和表达的时间未能进一步优化,影响了表达的效果。另外 *A. oryzae* 3.762 的 PGA 与文献相比发生了 3 个氨基酸替换,也可能是 *A. oryzae* 3.762 的 PGA 在 *E. coli* 中表达效果较好的原因,在以后的研究中我们将进一步确认 *A. oryzae* 3.762 的 PGA 的三处氨基酸改变对酶活和表达的影响。Blanco *et al* 报道将酿酒酵母 *Saccharomyces cerevisiae* (PGU1)的 *pg* 基因在 *Pichia pastoris* 中表达,但表达的 PG 酶活力也仅有 $6\text{u/mL}^{[15]}$ 约为 *A. oryzae* PGA 在 *E. coli* 中表达酶活的 1/12。*A. oryzae* PGA 和 *Stereum purpureum* 的 PGA 在 *E. coli* 中都能正常表达,说明糖基化修饰对 *A. oryzae* PGA 和 *Stereum purpureum* 的 PGA 的催化功能没有直接的影响,*Saccharomyces cerevisiae* (PGU1)的 PG 酶的糖基化位点突变后,其酶活也未受到影响^[15] 因此原核表达对其它待于研究的真菌 PGs 可能是一种很好的选择。

在饮料生产和酒类产品的澄清工艺中,需用果胶酶清除果胶,*A. oryzae* PGA 的最佳 pH 为 5.0,适用于酸性饮料的澄清^[8,9]。目前 *A. oryzae* PGA 的工业生产仍然使用真菌发酵工艺,酶的产量有待提高,并且存在分离纯化困难等问题。*A. oryzae* PGA 在原核系统中的成功表达为 *A. oryzae* PGA 的细菌发酵生产工艺提供了理论和技术基础。

REFERENCES(参考文献)

[1] Fogarty WM, Kelly CT. Pectic enzymes. In: Microbial Enzymes and Biotechnology (Fogarty WM, Ed.). London: Applied Science Publishers, 1983, pp. 131 - 182.

[2] Uhlig H. Processing of fruit, vegetables, and wine. In: Enzymes in Industry: Production and Applications. (New York: Gerhartz W ed) VCH, 1990, pp. 126 - 128.

[3] Tanner RD, Prokop A, Bajpai RK. Removal of fibre from vines by solid-state fermentation/enzymic degradation: a comparison of flax and kutzu retting. *Biotechnol Adv*, 1993, **11**: 635 - 643.

[4] Chang TS, Siddiq M, Sinha NK, Cash JN. Plum juice quality affected by enzyme treatment and fining. *J Food Sci*, 1994, **59**: 1065 - 1069.

[5] Baker RA, Wicker L. Current and potential applications of enzyme infusion in the food industry. *Trends Food Sci Technol*, 1996, **7**: 279 - 284.

[6] Maldonado MC, Strasser de Saad AM, Callieri DAS. Regulatory aspects of the synthesis of polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger* sp. *Sci des Aliments*, 1989a, **9**: 101 - 110.

[7] Maldonado MC, Strasser de Saad AM, Callieri DAS. Catabolite repression of the synthesis of inducible polygalacturonase and pectinesterase by *Aspergillus niger* sp. *Curr Microbiol*, 1989b, **18**: 303 - 306.

[8] Kitamoto N, Kimura T, Kito Y, Ohmiya K, Tsukagoshi N. Structural features of a polygalacturonase gene cloned from *Aspergillus oryzae* KBN616. *FEMS Microb Lett*, 1993, **111**: 37 - 42.

[9] Kitamoto N, Matsui J, Kawai Y, Kato A, Yoshino S, Ohmiya K, Tsukagoshi N. Utilization of the TEF1- α gene (TEF1) promoter for expression of polygalacturonase genes, *pgaA* and *pgaB*, in *Aspergillus oryzae*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, **50**: 85 - 92.

[10] Logemann J, Schell J, Willmitzer L. Improved method for the isolation of RNA from plant-tissues. *Anal Biochem*, 1987, **163**: 16 - 20.

[11] Bradford MA. Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1970, **72**: 248 - 254.

[12] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem*, 1959, **31**: 426 - 428.

[13] Maldonado MC, Strasser de Saad AM. Production of pectinesterase and polygalacturonase by *Aspergillus niger* in submerged and solid state systems. *J Industrial Microbiol Biotechnol*, 1998, **20**: 34 - 38.

[14] Shimizu T, Shibata H, Araya T, Nakatsu T, Miyairi K, Okuno T, Kato H. Expression, purification, and crystallization of endopolygalacturonase from a pathogenic fungus, *Stereum purpureum*, in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification*, 2005, **44**: 130 - 135.

[15] Blanco P, Thow G, Simpson CG, Villa TG, Williamson B. Mutagenesis of key amino acids alters activity of a *Saccharomyces cerevisiae* endo-polygalacturonase expressed in *Pichia pastoris*. *FEMS Microbio Lett*, 2002, **210**: 187 - 191.