

一株产植酸酶青霉的分类鉴定及其植酸酶基因克隆 和在毕赤酵母中的表达

包佳源¹, 马忠友^{1,2*}, 戚明玲², 黄勃¹, 樊美珍^{1*}

(1. 安徽农业大学安徽省微生物防治重点实验室, 合肥 230036; 2. 安徽科技学院生命科学学院, 蚌埠 233100)

摘要: 植酸酶是催化植酸盐水解成磷酸盐的一类酶的总称, 添加到猪和家禽动物的饲料中可以提高植酸磷的利用率和促进对矿质元素的吸收利用。根据形态特征和 ITS 分子序列, 作者对该实验室筛选得到的高产植酸酶菌株青霉 RCEF4908 进行了鉴定, 确定该菌株在系统分类上属于草酸青霉 *Penicillium oxalicum* Currie & Thom。利用特异性引物扩增出植酸酶成熟肽基因片段, 蛋白质序列含有保守区域 RHGXRXRP 和 HD, 属于组氨酸酸性磷酸酶家族。通过基因操作成功实现了植酸酶在 *Pichia pastoris* GS115 的表达。转化子 P49 在诱导培养 144 h 后酶活性可以达到约 8 000 U·mL⁻¹。重组植酸酶在 pH 2.5~7.0 之间都有活性, 在 pH 5.5 时酶活性最高; 在 90 °C 水浴处理 10、20 和 30 min 后酶活性仍分别保留 53.8%、52.5% 和 45.2%, 具有较高的耐热性, 适宜于作为饲料添加剂, 有进一步开发的价值。

关键词: ITS 序列; 草酸青霉; 耐热植酸酶; 诱导表达

中图分类号: Q78; Q936

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X(2012)05-0788-05

Identification of a *Penicillium* isolate, gene cloning of phytase and its expression in *Pichia pastoris*

BAO Jia-yuan¹, MA Zhong-you^{1,2}, Qi Ming-ling², HUANG Bo¹, FAN Mei-zhen¹

(1. Anhui Provincial Key Laboratory of Microbial Pest Control, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. School of Life Sciences, Anhui Science and Technology University, Bengbu 233100)

Abstract: Phytases are a group of enzymes capable of releasing phosphate from phytate, and have been applied mainly to animal (swine and poultry) diets in order to improve phytate P digestibility and mineral bioavailability. RCEF4908, a strain with high phytase yield, was screened from a lot of phytase-produced fungal isolates. According to morphological characters and internal transcribed spacer sequences of rDNA, and it was identified as *Penicillium oxalicum* Currie & Thom. The fragment of the mature phytase was cloned directly from DNA of *P. oxalicum* RCEF4908 with the special primers designed from phytase gene in GenBank No. AY071824. The deduced amino acid sequence of this phytase with the conserved motifs RHGXRXRP and HD belongs to a typical histidine acid phosphatases. The phytase was overexpressed in the recombinant P49, and its specific activity could reach 8 000 U·mL⁻¹ after induced 144h at optimum pH 5.5, and showed high activity with phytic acid sodium salt at a pH range of 2.5 to 7.0. This recombinant phytase studied here can retain 53.8%, 52.5% and 45.2% of its activity after denaturation at 90 °C for 10, 20 and 30 min, respectively. The broad pH optima and high thermostability of the phytase makes it a better candidate for feed-pelleting applications.

Key words: internal transcribed spacer; *Penicillium oxalicum*; thermostable phytase; induced expression

植酸酶 (EC 3.1.3.8) 可以降解植物性饲料的植酸盐类, 释放出无机磷酸, 解除植酸对一些矿质元素的抗营养效应。在饲料中添加植酸酶可以提高饲料中磷的利用率, 减轻畜禽高磷排泄物对环境的污

收稿日期: 2011-12-13

基金项目: 安徽省教育厅优秀青年基金 (2005JQ1199) 和安徽省自然科学基金优秀青年基金 (08040106902) 共同资助。

作者简介: 包佳源, 男, 硕士研究生。E-mail: baoguoshi1204@163.com

* 通讯作者: 马忠友, 男, 博士。E-mail: mzyou899@sohu.com

樊美珍, 女, 教授。E-mail: mzfanzan44@163.com

染以及促进单胃动物对饲料中矿物质的吸收利用, 达到节磷减排的目的, 因此对植酸酶的开发利用受到了众多研究人员的重视^[1-6]。研究人员从各种样品中不断地分离筛选出新的产植酸酶微生物, 高产植酸酶菌株简青霉 *Penicillium simplicissimum* W46 是从 83 个土壤样品中分离出的^[2], 沙雷氏菌 *Serratia plymuthica* IC1270 被从植物根际分离出来^[4], 从印度农村传统的牲畜发酵饲料中也分离出一些新的产植酸酶微生物类群^[3]。采用基因工程方法从大肠杆菌克隆的植酸酶基因 *AppA* 被重组到巴斯德毕赤酵母 MR33, 在谷氨酸钠废水中发酵产植酸酶活性达到 $3\ 380\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 酵母细胞干重 $136\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 单细胞蛋白含量达到细胞干重的 46.66%, 适宜于作为动物饲料添加剂^[5]。

来源于黑曲霉和无花果曲霉的植酸酶已经作为饲料添加剂应用到, 然而它们不能够承受饲料造粒时的短暂高温; 来源于烟曲霉的植酸酶虽然能够耐受这种高温, 但是在 37°C 下的酶活性很低, 不适合作为饲料添加剂使用, 因此需要开发出新的植酸酶资源^[7-8]。为此, 作者对实验室筛选出的可产生耐热植酸酶的青霉 RCEF4908 进行了分类鉴定, 克隆到耐热植酸酶基因 (*phyA*) 成熟肽片断, 并转化到巴斯德毕赤酵母中进行了表达, 为植酸酶的应用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 供试菌株和质粒

供试菌株 *Penicillium* sp. RCEF4908、*Pichia pastoris* GS115 (His⁻)、*Escherichia coli* DH5 α 和表达质粒 pPIC9K 由本实验室保存。

1.2 试剂

植酸钠 (P3168, Sigma 公司), 酵母氮源基础培养基 Yeast Nitrogen Base (YNB, Sigma 公司), *EcoR* I、*Not* I、*Bgl* II、碱性磷酸酶和 T4 连接酶 (Fermentation 公司), DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒 (上海华舜生物工程公司), 质粒抽提试剂盒 (道普生物科技 (北京) 有限公司), Taq 聚合酶 (大连宝生物科技有限公司), 其它药品均为国产分析纯试剂。

1.3 试验方法

1.3.1 菌株 RCEF4908 的形态学鉴定 将菌株接种到查氏酵母膏琼脂平板培养基 (CYA), 查氏琼脂平板培养基 (CA) 上, 并放在温度为 28°C 的培养箱中进行培养, 定时观察^[9]。

1.3.2 菌株 *ITS1+5.8S+ITS2 rDNA* 区域的扩增 采

用氯化苄法提取基因组 DNA^[10], ITS 序列扩增采用真菌鉴定通用引物

ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')

ITS5 (5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3')

引物由上海 Invitrogen 生物工程有限公司合成。扩增程序: 94°C 变性 5 min, (94°C 变性 1 min, 52°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min) $\times 30$, 72°C 延伸 10 min, 4°C 保温。PCR 产物由上海 Invitrogen 生物技术有限公司测序。

1.3.3 植酸酶成熟肽基因片段的扩增 根据 GenBank 核酸序列数据库中已知植酸酶基因序列 (No. AY071824) 设计特异性引物 PhyFor (5'-AGCGAATTCATGTCACATCGTGTTCGGACCTG-3', *EcoR* I) 和 PhyRev (5'-AAAGCGGCCGCTCACTTTGAAGAAACGCCACATTTTCGCC-3', *Not* I)。扩增程序: 94°C 变性 5 min, (94°C 变性 1 min, 52°C 退火 1 min, 72°C 延伸 1 min) $\times 30$, 72°C 延伸 10 min, 4°C 保温。

1.3.4 植酸酶基因表达载体的构建与转化 将植酸酶基因 PCR 扩增产物采用 DNA 琼脂糖凝胶回收试剂盒进行纯化, 纯化产物和表达质粒 pPIC9K 分别用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切并用 T4 连接酶连接, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 利用质粒引物 (α -Factor: TACTATTGCCAGCATTGCTGC 和 3-AOX: GCAAATGGCATTCTGACATCC) 进行菌落 PCR 扩增法筛选阳性克隆并交由上海 Invitrogen 生物技术有限公司测序。将测序正确的阳性克隆子培养并提取质粒, 按照毕赤酵母表达手册电击转化到 *P. pastoris* GS115 (His⁻), 用 MD 培养基筛选 His⁺ 转化子。将重组酵母 His⁺ 转化子接种在含有 $3.0\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ Geneticin 的新鲜 YPD-Geneticin 培养基上筛选多拷贝转化子。

1.3.5 转化子的诱导表达 将多拷贝重组酵母的单菌落接种于装有 50 mL BMGY 培养基的 250 mL 三角烧瓶中, 于 30°C , $200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 培养 20 h, 然后 $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min, 将菌体重悬于装有 10 mL BMMY^[11] 培养基的 100 mL 三角烧瓶中, 在 30°C , $200\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 摇床上继续培养, 每隔 24 h 分别取菌液样品 1.3 mL, 置于 1.5 mL Eppendorf 管中, $12\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 收集菌体和上清液, 同时向培养基中添加 100% 甲醇至终浓度 1%。

1.3.6 植酸酶的活性测定 采用钒钼酸铵法^[2] 并略做改动, 向每支干净的试管中加入 1 mL 经适当稀释的发酵液, 再加入 2 mL 植酸钠溶液 (对照加入 2 mL 钒钼终止液), 将试管放入 37°C 的恒温水浴锅

中, 温育 60 min。向每支试管中加入 2 mL 钒钼终止液 (对照加入 2 mL 植酸钠溶液), 静置 10 min, 在波长 415 nm 下进行比色测定, 测定时用标准空白调零。

酶活性单位 (U) 定义: 在 37°C、pH5.50 条件下, 每分钟从 5.0 mmol·L⁻¹ 的植酸钠溶液中释放 1 μmol 无机磷, 即为一个植酸酶活性单位, 以 U 表示。

重组植酸酶在不同 pH 条件下的酶活性测定参照^[11] 重组植酸酶的耐热性测定参照^[8,12]。

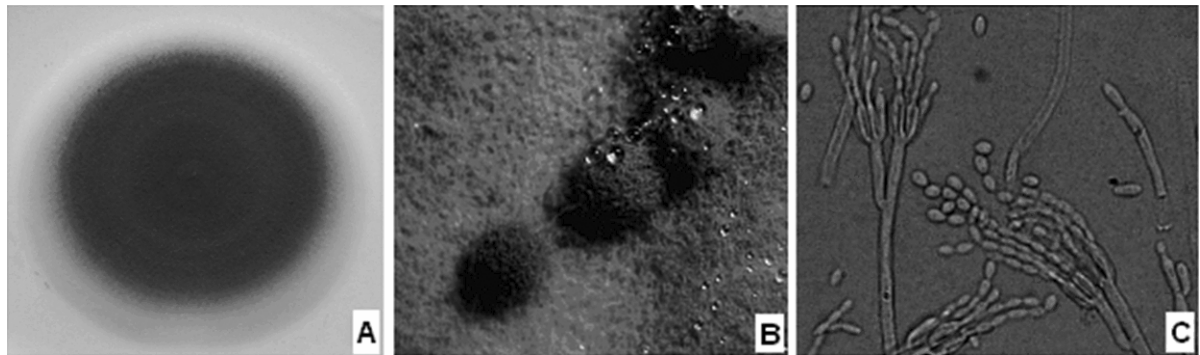
1.3.7 重组植酸酶的 SDS-PAGE 电泳检测 毕赤酵母转化子经甲醇诱导培养 144 h, 12 000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 取上清粗酶液 1.0 mL 置于 1.5 mL Eppendorf 管中, 加热浓缩至 0.1 mL, 加入等体积上样缓冲液, 采用 4% 的浓缩胶和 12% 的分离胶进行电泳检测,

考马斯亮蓝 R-250 染色观察。

2 结果与分析

2.1 青霉 RCEF4908 菌株的分类鉴定

该菌株在 CYA 培养基上菌落呈绒状, 正面豆绿色, 反面黄色, 致密, 生长局限, 边缘厚密; 在 CA 培养基上菌落呈绒状, 正面绿色, 反面黄色, 边缘整齐透明, 菌落 7 天直径 2.8~2.9 cm。培养时间延长, 菌落表面孢子堆积成壳状, 有渗出液出现。显微观察结果显示该菌株有青霉属典型的帚状枝, 分生孢子梗双轮或单轮, 100~200 μm × 3.5~4.5 μm。瓶梗 6~10 个平行排列, 9.0~14.0 μm × 3.0~4.0 μm。孢子形态圆柱形、椭圆形、光滑, 孢子大小 4.5~6.5 × 2.9~4.0 μm (图 1)。这些形态特征与草酸青霉的描述性状相符合。



A: 早期的菌落; B: 菌落表面的壳状突起和渗出液; C: 二轮生不对称的帚状枝 (400×)

A: colony at first stage; B: colony surface with crusts and exudate droplets; C: asymmetrically biverticillate penicilli conidiophores (400×)

图 1 青霉 RCEF4908 菌株的形态特征

Figure 1 The morphological characteristics of *Penicillium* sp RCEF4908

从青霉 RCEF4908 的 DNA PCR 中扩增出的 ITS1+5.8S+ITS2 序列共计 502 bp, 其中 ITS1 为 176 bp、5.8S 为 157 bp、ITS2 为 169 bp (GenBank No. HM053477)。将测得的 RCEF4908 ITS 序列与 GenBank 数据库比对, 和 RCEF4908 ITS 序列相似率达到 99% 的菌株均为草酸青霉 *Penicillium oxalicum* Currie & Thom。在 GenBank 核酸序列数据库中下载相关菌株的 ITS 区域序列与供试菌株的序列放在一起, 用 BioEdit 软件进行匹配排列。使用 MEGA4.1 软件, 并采用 Bootstrap analysis 方法进行 1000 次重复抽样分析和 Neighbor-Joining 构建分支发育系统树, RCEF4908 和草酸青霉聚在一组, 自举支持率 100% (图 2), 和其他青霉菌株相距甚远。综合比较该菌株的形态特征和 ITS1+5.8S +ITS2 序列结果, 将 RCEF4908 菌株鉴定为草酸青霉 *P.oxalicum*。

2.2 植酸酶基因的扩增与表达载体构建

通过特异性引物 PhyFor 和 PhyRev 可以直接从 *P. oxalicum* 基因组 DNA 扩增出植酸酶成熟肽基因片段, PCR 产物经双酶切连接到表达质粒 pPIC9K, 转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞, 涂布在含有氨苄青霉素抗性的 LB 平板上, 37°C 下培养 18 h。随意挑取 4 个菌落采用 PCR 扩增法筛选阳性克隆, 结果如图 3, 扩增出的片段长度大约为 1 600 bp。测序结果表明该片段全长 1 344 bp (GenBank No. HM053476)。PCR 产物序列和 EF197827、AY071824 的 BLAST 比对相似性均为 99%, 说明扩增结果正确, 表达载体 pPIC9K-*phyA* 构建成功。推导出的蛋白质序列含有保守区域 RHGX RXP 和 HD, 属于组氨酸酸性磷酸酶家族。

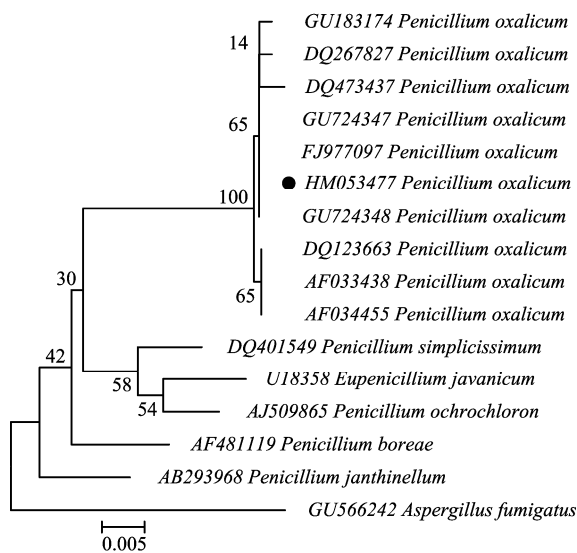


图 2 青霉属部分菌株的 ITS 区域分支系统树

Figure 2 Neighbour-joining tree based on ITS region sequence data of some strains from *Penicillium* spp

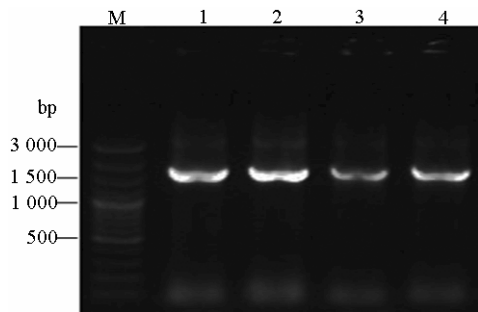


图 3 菌落 PCR 扩增法筛选阳性克隆

Figure 3 Screening of the positive recombinants by clone PCR method

2.3 植酸酶基因工程酵母的构建与诱导表达

提取表达质粒 pPIC9K-*phyA*, 酶切、线性化后电击转化到 *P. pastoris* GS115, 筛选 His⁺转化子。将重组酵母 His⁺转化子接种在含有 3.0 mg·mL⁻¹ Geneticin 的新鲜 YPD 培养基上筛选多拷贝转化子, 发现有四个酵母转化子菌落生长良好, 菌株编号分别为 P47、P49、P51 和 P57, 经甲醇诱导培养后能够分泌表达重组植酸酶, 定时取样测定酶活性。从图 4 可以看出转化子 P49 分泌表达的重组植酸酶活性最高, 144 h 后的酶活性可以达到约 8 000 U·mL⁻¹。

2.4 重组植酸酶在不同 pH 条件下的酶活性测定

从图 5 可以看出重组植酸酶的 pH 活性范围很广, 在 pH2.5~7.0 之间都有活性, 在 pH5.5 时酶活性最高, 适宜于作为饲料添加剂, 可以进一步开发利用。

2.5 重组植酸酶的耐热性测定

把重组植酸酶在 90℃ 水浴处理, 定时取样测定

酶活性。结果显示在处理 10、20 和 30 min 后酶活性仍分别保留 53.8%、52.5%和 45.2%, 具有较高的耐热性, 能够承受饲料加工期间的短暂高温, 适宜于作为饲料添加剂开发利用。

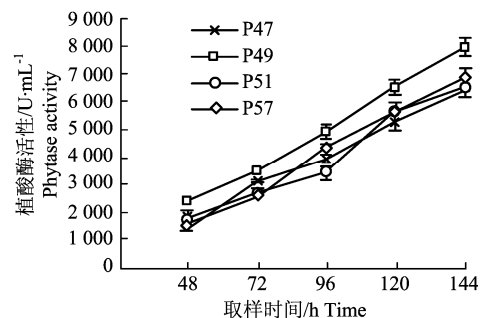


图 4 诱导表达的重组植酸酶活性

Figure 4 The activity of phytase from the recombinants induced by methanol

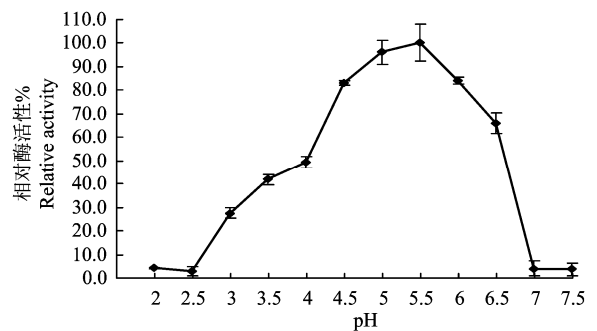
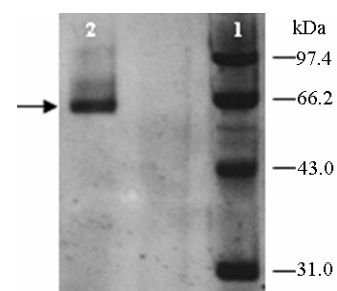


图 5 重组植酸酶在不同 pH 条件下的酶活性

Figure 5 The activity of the recombinant phytase at different pH



1: 蛋白质标准分子量; 2: 重组植酸酶; 箭头表示重组植酸酶条带的位置

Lane 1: Molecular weight standards of protein; Lane 2: The recombinant phytase from *Penicillium oxalicum* RCEF4908; The arrow indicates the position of the recombinant phytase

图 6 重组植酸酶的 SDS-PAGE 电泳图谱

Figure 6 SDS-PAGE analysis of the recombinant phytase

2.6 重组植酸酶的 SDS-PAGE 电泳

重组植酸酶蛋白共有 547 个氨基酸残基, 含有酸性氨基酸 (Asp, Glu, Asn 和 Gln) 87 个, 碱性

氨基酸 (Lys, Arg 和 His) 49 个。理论推测的蛋白质分子量为 49.09 kDa, 等电点 pI 为 6.38。从 SDS-PAGE 电泳结果 (图 6) 可以估算出重组植酸酶的分子量约为 66.0 kDa, 大于其理论预测值, 这是由于宿主 *P. pastoris* GS115 对表达蛋白进行糖基化修饰的结果。

3 讨论

为了便于更深入的研究植酸酶高产菌株青霉 RCEF4908, 对该菌株进行了分类鉴定, 采用形态分类学方法和现代分子分类技术相结合, 确定该菌株在系统分类上属于草酸青霉。在 GenBank 数据库中搜索直接获得草酸青霉植酸酶基因的已知序列, 大大方便了后续的基因工程操作, 避免了不必要的步骤, 提高了实验效率。

尽管已有较多对植酸酶的研究, 也有植酸酶产品已经应用于饲料行业, 但是还有一些问题没有解决, 如植酸酶在饲料加工中的耐热性问题、更高活性的新类型植酸酶开发等。目前关于植酸酶的耐热性研究主要集中在烟曲霉植酸酶^[7-8], 该酶虽然具有耐热性, 但是酶活性不高, 没有应用价值。而 Chen 等将大肠杆菌的植酸酶基因 *appA* 融合 *AOX1* 启动子, 在巴斯德毕赤酵母中进行了高效表达, 高密度培养时, 胞外植酸酶的产量达到 $5\ 000\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, 但没有报道耐热性^[13]。

青霉 RCEF4908 菌株是从大量的产植酸酶丝状真菌中筛选得到的高产植酸酶菌株, 通过基因工程操作成功实现了植酸酶在 *P. pastoris* GS115 的表达。重组植酸酶在 pH2.5~7.0 之间都有活性, 在 pH5.5 时酶活性最高, 培养 144 h 后的酶活性可以达到约 $8\ 000\ \text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。在 90℃ 水浴处理 20 min 后酶活性仍保留 52.5%, 具有很强的耐热性^[12,14-15], 能够承受饲料加工期间的短暂高温, 可以通过 DNA 定向进化技术进一步提高酶活性和耐热性, 可以作为饲料添加剂开发利用。

参考文献:

- [1] Han Y, Wilson D B, Lei X G. Expression of an *Aspergillus niger* Phytase gene (*phyA*) in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Applied Environment Microbiology, 1999, 65(5): 1915-1918.
- [2] Tseng Y, Fang T, Tseng S. Isolation and characterization of a novel phytase from *Penicillium simplicissimum*[J]. Folia Microbiologica, 2000, 45 (2): 121-127.
- [3] Mukesh P, Suma S, Singaracharya M A, et al. Isolation of phytate-hydrolysing microbial strains from traditional waste water of rice fermentation and liquid cattle feeds[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2004, 20(5): 531-534.
- [4] Shedova E, Lipasova V, Velikodvorskaya G, et al. Phytase activity and its regulation in a rhizospheric strain of *Serratia plymuthica*[J]. Folia Microbiologica, 2008, 53(2): 110-114.
- [5] Bai Y, Yang P, Wang, Y, et al. Phytase production by fermentation of recombinant *Pichia pastoris* in monosodium glutamate wastewater[J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 2009, 25(9): 1643-1649.
- [6] WEN Y N, WANG XY, XIA R X, et al. Cloning of a *phyA* from *Aspergillus niger* and its over expression in *Escherichia coli*[J]. Journal of Shenyang Agricultural University, 2009, 40(3): 335-338.
- [7] Wyss M, Pasamontes L, Remy R, et al. Comparison of the thermostability properties of three acid phosphatases from molds: *Aspergillus fumigatus* phytase, *A. niger* phytase, and *A. niger* pH2.5 acid phosphatase[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1998, 64 (11): 4446-4451.
- [8] Pasamontes L, Haiker M, Wyss M, et al. Gene cloning, purification, and characterization of a heat-stable phytase from the fungus *Aspergillus fumigatus*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(5): 1696-1700.
- [9] 孔华忠. 中国真菌志, 第三十五卷: 青霉属及其相关有性型属[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [10] 朱衡, 瞿峰, 朱立煌. 利用氯化苄提取适于分子生物学分析的真菌 DNA[J]. 真菌学报, 1994, 13(1): 34-40.
- [11] Fu D, Huang H, Luo H, et al. A highly pH-stable phytase from *Yersinia kristeensenii*: Cloning, expression, and characterization[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2008, 42(6): 499-505.
- [12] Xiong A S, Yao Q H, Peng R H, et al. High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(5): 1039-1047.
- [13] Chen C C, Wu P H, Huang C T, et al. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2004, 35 (4): 315-320.
- [14] Lassen S F, Breinholt J, Ostergaard P R, et al. Expression, gene cloning, and characterization of five novel phytases from four Basidiomycete fungi: *Peniophora lycii*, *Agrocybe pediades*, a *Ceriporia* sp., and *Trametes pubescens*[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2001, 67(10): 4701-4707.
- [15] Ullah A H J, Sethumadhavan K. *PhyA* gene product of *Aspergillus ficuum* and *Peniophora lycii* produces dissimilar phytases[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2003, 303(2): 463-468.