

## 扩展青霉碱性脂肪酶基因在毕赤酵母中的高效表达

袁 彩 林 琳\* 施巧琴 吴松刚

(福建师范大学生物工程学院,福州 350007)

**摘 要** 将编码扩展青霉碱性脂肪酶(PEL)的 cDNA 克隆到酵母整合型质粒 pPIC3.5K,电转化 His4 缺陷型巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris* GS115)通过橄榄油-MM 平板及 PCR 方法筛选和鉴定重组子。重组子发酵液经 SDS-PAGE 分析、橄榄油检验板鉴定,表明扩展青霉碱性脂肪酶基因在巴斯德毕赤酵母中获得了高效表达。表达蛋白分泌至培养基中,分子量约 28kD,与扩展青霉碱性脂肪酶大小一致,占分泌蛋白的 95%。橄榄油检验板检验表明该表达蛋白可分解橄榄油,通过优化该表达菌的发酵条件,以橄榄油为底物进行酶活测定,其发酵液酶活可达 260 u/mL。

**关键词** 扩展青霉碱性脂肪酶,巴斯德毕赤酵母,基因表达

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)02-0231-05

扩展青霉 PF898 是由出发菌株<sup>[1]</sup>经多代诱变育种而获得的碱性脂肪酶高产菌株,脂肪酶酶活由原来的 25 u/mL 提高至 1100 u/mL,该菌株产生的脂肪酶分子量约 28kD<sup>[2]</sup>,最适温度 34℃,最适 pH 9.5,可在碱性条件下分解三酰甘油,产生脂肪酸和甘油。国外对多种脂肪酶的结构、作用机理、动力学、基因序列、表达等做了比较深入的研究,但对扩展青霉碱性脂肪酶分子水平上的研究尚未见报道,而国内对脂肪酶的研究主要集中在菌种选育、酶学特性、发酵特性,分子生物学水平上的研究比较少。近年,我国在国内外首次对扩展青霉碱性脂肪酶基因进行克隆和序列分析<sup>[3,4]</sup>,并进行了类产碱假单胞菌耐热碱性脂肪酶基因<sup>[5]</sup>克隆和在大肠杆菌里表达的研究工作。本文是在克隆扩展青霉碱性脂肪酶 cDNA、DNA 序列基础上,首次在巴斯德毕赤酵母中进行了该基因的高效表达,并进行发酵条件优化的研究。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌种和质粒** *Pichia pastoris* GS115、*E. coli* TG1、pBlue-script II SK、pPIC3.5K 由上海生化所吴祥甫研究员、袁中一研究员等提供,质粒 pSK-PEL 由福建师范大学生物工程学院林琳博士提供。

**1.1.2 酶与试剂** 限制酶、T4 DNA ligase、低熔点琼脂糖购于 TaKaRa 公司。PCR 所用试剂购于上海生工生物工程技术有限公司。引物合成由上海生工生物工程技术有限公司完成。其它化学试剂均为国产或进口分析纯。

**1.1.3 培养基** LB、YPD、MD、MM、BMGY、BMMY 均按“Invitrogen 公司操作手册”推荐方法配制。橄榄油-MM 平板为含橄榄油乳化液的 MM 平板。

#### 1.2 方法

**1.2.1 基因操作** 质粒抽提、酶切反应、DNA 片段回收、连接反应、细菌转化、SDS-PAGE 等技术均参照“分子克隆”第二版略加修改。

**1.2.2 酵母细胞的转化及阳性转化子的筛选** 重组酵母表达载体经 *Sal* I 线性化后,电穿孔法转化宿主菌巴斯德毕赤酵母 GS115,转化物涂布于 MD 平板上,30℃培养 2 ~ 3d,将在 MD 平板上生长的 GS-pPIC3.5K-PEL 转化子分别点至橄榄油-MM 平板和 MD 平板。30℃培养 3 ~ 4d,每隔 24h 添加甲醇诱导<sup>[6]</sup>。挑取透明圈大的单菌落,用 5μL 1% 蜗牛酶/SCE 溶液 37℃摇 1h,酶解破壁,99℃加热 15min 后稀释至 20μL,取 2μL 作模板,以目的基因两端序列为引物进行 PCR 反应。总反应体积为 20μL, Taq 酶量为 2u,取 10μL 进行 1% 琼脂糖电泳鉴定。

**1.2.3 酵母菌的诱导表达** 将筛选到的酵母阳性转化子,接种至 BMGY 培养基中,30℃振荡培养 16 ~ 20h 至  $OD_{600}$  为 2 ~ 6,离心收集菌体,用 BMMY 培养基稀释至  $OD_{600}$  为 1,每隔 24h 添加 0.5% 的甲醇诱导表达。

**1.2.4 表达产物的鉴定** 取发酵液用橄榄油检验板检测活性,SDS-PAGE 检测目的蛋白表达水平和分子量。以橄榄油为底物,用 NaOH 滴定法测定酶活<sup>[7]</sup>。酶活单位定义为:在反应条件下,每分钟催化脂肪水解产生 1μmol 脂肪酸的酶量

收稿日期 2002-09-24,修回日期 2002-12-25。

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30270033)和福建省自然科学基金重点项目(No. B0120001)资助。

\* 通讯作者。Tel 86-591-3531613;E-mail:linlin@fjnu.edu.cn,benbo\_00@yahoo.com

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

为一个脂肪酶国际单位(u)。

1.2.5 表达条件优化 :用不同的培养基、pH 及不同的甘油、甲醇浓度诱导表达 ,测定上清的脂肪酶酶活。每组实验重复 3 次 ,并设相应对照。

## 2 结果

### 2.1 表达质粒 pPIC3.5K-PEL 的构建及转化

pSK-PEL 经 *EcoR* I / *SnaB* I 双酶切 ,低熔点胶回收的片段与 *EcoR* I / *SnaB* I 双酶切的穿梭质粒 pPIC3.5K 相连 ,构建表达质粒 pPIC3.5K-PEL(图 1) ,经 *Sal* I 酶切线性化后 ,电转化巴斯德毕赤酵母。

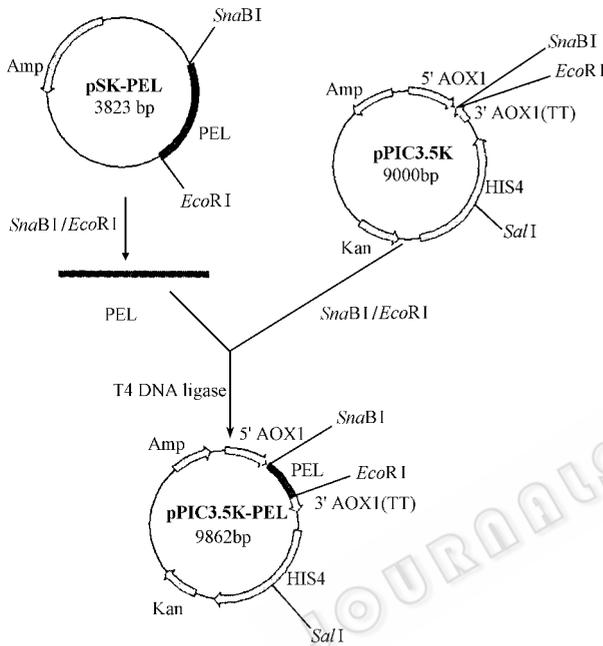


图 1 穿梭表达质粒 pPIC3.5K-PEL 的构建

Fig.1 Construction of shuttle expression vector pPIC3.5K-PEL

### 2.2 重组酵母菌 GS-pPIC3.5K-PEL 筛选

利用脂肪酶可水解橄榄油 ,在橄榄油检验板上产生透明圈的特性 ,MD 平板筛选后 ,将长出的菌落分别点至橄榄油-MM 平板和 MD 平板上 ,以筛选产酶活高的转化子。根据在 MM 平板上能否形成透明圈 ,计算外源基因整合率为 90% ~ 95%。挑取透明圈大的菌落 ,以其基因组 DNA 为模板 ,目的基因两端序列为引物<sup>[3]</sup> ,进行 PCR 扩增 ,扩增出一条约 880bp 的条带(图 2) ,大小与目的基因片段一致 ,而对照未扩增出任何条带 ,说明 PEL 基因已整合入重组酵母转化子的基因组中。

### 2.3 表达产物的鉴定

选取 4 株阳性克隆和空白对照菌株(空载体 pPIC3.5K 转化的 GS115)进行摇瓶发酵 ,每隔 24h 添加甲醇诱导 ,每隔 24h 取 1mL 发酵液 ,离心 ,取上清点至橄榄油检验板 ,可观察到明显的透明圈(图 3) 。发酵上清进行 15% SDS-PAGE ,考马斯亮蓝 R250 染色(图 4) ,扫描图片分析表明 ,目的蛋白占分泌蛋白的 95% ,分子量约为 28kD ,与扩展青霉碱性脂肪酶一

致 ,而阴性对照无此条带 ,说明 PEL 基因在 *Pichia pastoris* GS115 中得到正确表达和修饰。

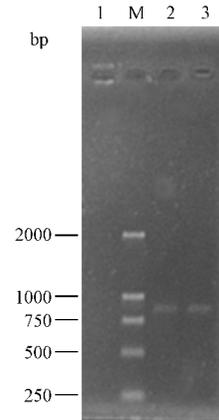


图 2 重组子的 PCR 鉴定

Fig. 2 Detection of GS115 transformed with pPIC3.5K-PEL by PCR  
1. GS-pPIC3.5K( Negative control );  
M. DNA marker 2, 3. GS-pPIC3.5K-PEL

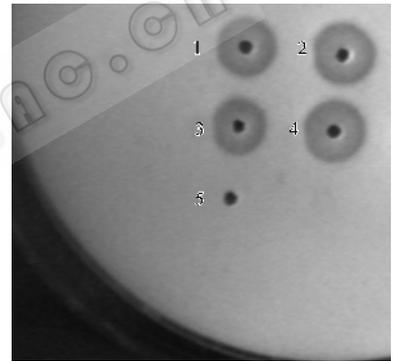


图 3 重组酵母菌胞外脂肪酶活性检测

Fig.3 Assay of extracellular lipase activity in recombinant *Pichia* strains  
1 ~ 4. GS-pPIC3.5K-PEL 5. GS-pPIC3.5K( Negative Control )

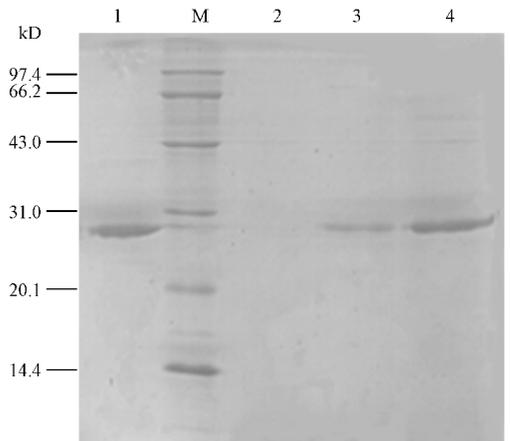


图 4 重组酵母菌上清的 SDS-PAGE

Fig.4 SDS-PAGE of the supernatant of recombinant *Pichia* strains  
1. Purified PEL ; M. Low molecular weight protein mark ;  
2. GS-pPIC3.5K( Negative control ) 3 ~ 4. GS-pPIC3.5K-PEL

## 2.4 发酵条件优化

**2.4.1 不同培养基及 pH 对 PEL 表达的影响** 将重组酵母菌 GS-pPIC3.5K-PEL 接入 A、B、C 三种培养基(表 1)中,在 100mL 的三角瓶中,装培养液 15mL,转速 250r/min,温度 30℃ 进行培

养,每隔 24h 添加 0.5% 甲醇诱导,每 24h 取样,进行酶活测定,结果(图 5)表明,不同的培养基对 PEL 基因表达影响较大,培养效果较好的是 Medium C,而价格昂贵的 BMMY 培养基并非产酶活最高的培养基。

表 1 培养基配方及 pH 条件

Table 1 Different fermentation medium and pH

	Medium composition	pH
Medium A	1% yeast extract, 2% peptone, 1.34% YNB, $4 \times 10^{-5}$ biotin, 0.5% methanol	6.0
Medium B	1% yeast extract, 2% peptone, 0.5% methanol	6.0
Medium C	1% yeast extract, 2% peptone, 0.5% methanol	7.0

$T = 30^\circ\text{C}$ , agitation = 250 r/min, volume = 15 mL

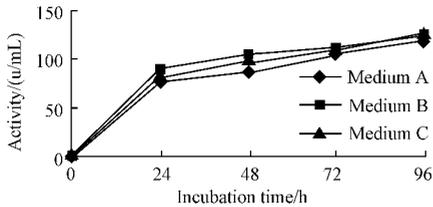


图 5 培养基配方及 pH 条件对 PEL 表达的影响

Fig.5 Effect of media and pH on PEL production

**2.4.2 补加甘油对 PEL 表达的影响** :用 Medium C 培养 GS-pPIC3.5K-PEL(培养条件同上),加甲醇诱导的同时,分别补加 0.25%、0.5%、1% 的甘油,酶活测定结果(图 7)表明,甘油对 PEL 基因表达有较大的影响,补加甘油能使酶活上升,但浓度过高不利于酶活进一步提高,添加量累积至 4% 反而导致酶活下降。

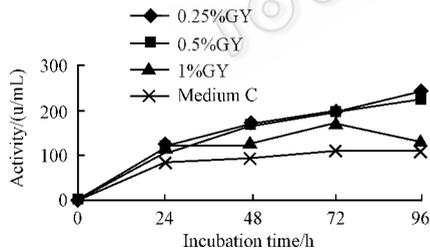


图 6 甘油对 PEL 表达的影响

Fig.6 Effect of glycerol on PEL production

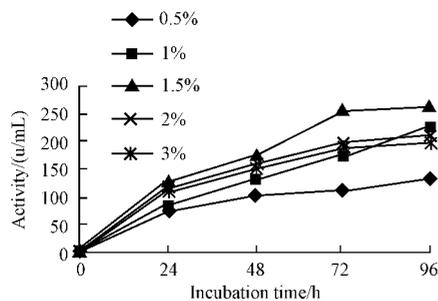


图 7 甲醇诱导浓度对 PEL 表达的影响

Fig.7 Effect of concentration of methanol induce on PEL production

**2.4.3 甲醇诱导浓度对 PEL 表达的影响** :用 Medium C 进行

培养 GS-pPIC3.5K-PEL(培养条件同上),每 24 h 分别添加 0.5%、1%、1.5%、2%、3% 的甲醇诱导表达,酶活测定结果(图 6)表明,不同的甲醇诱导浓度对 PEL 基因表达有较大的影响,用 1.5% 的甲醇诱导表达效果最好,培养 72h 酶活达到 260 u/mL。

## 3 讨论

巴斯德毕赤酵母作为一种新型外源基因表达系统,具有一套和真核生物极其相似的分泌途径,能对外源蛋白进行加工、折叠、翻译后修饰,并将其分泌到培养基中,是一种较为理想的真核蛋白表达系统。其具有受甲醇调控的 AOX1 基因强启动子,能够稳定高效表达外源蛋白。现已有多种蛋白质在该系统中得以高效表达,且其产生的自身分泌蛋白很少,使分离纯化较为简便<sup>[8-10]</sup>。目前国外对脂肪酶在 *Pichia pastoris* 中的表达也做了大量的研究,如 *Candida rugosa*, *Geotrichum candidum*, *Rhizopus oryzae* 等真菌的脂肪酶都在 *Pichia pastoris* 中得到成功表达。其中 *Candida rugosa* 脂肪酶重组菌经过 280h 的发酵培养,酶活为 150 u/mL; *Geotrichum candidum* 脂肪酶 A 和 B 重组菌诱导发酵 48h 后,酶活分别为 23 u/mL 和 50 u/mL<sup>[11]</sup>,在每 24h 补加甲醇诱导的条件下, *Rhizopus oryzae* 脂肪酶重组菌罐上发酵 98h,发酵酶活为 110 u/mL,在发酵控制系统控制下根据溶氧量的变化自动流加甲醇条件下,发酵酶活进一步提高到 500 u/mL<sup>[12]</sup>。

本研究直接在 MM 平板添加底物进行筛选,克服了用 G418 筛选价格昂贵、易受菌浓度影响出现假阳性等优点,成功地在巴斯德毕赤酵母中进行了扩展青霉碱性脂肪酶基因的表达。发酵上清中目的蛋白占 95%,为进一步的纯化提供方便。

发酵条件实验研究表明,不同的培养基对酶活有较大的影响,培养基不添加价格昂贵的 YNB 及生物素,酶活反而增加,可能是因为不加 YNB 与加 YNB 的培养基相比,pH 值更高,碱性脂肪酶在此条件下相对稳定<sup>[13,14]</sup>。采用此培养基大大降低发酵成本,而且该培养基无需过滤除菌,操作更为简便。另外,在 pH 7 的条件下进行培养,酶活较高,也与碱性脂肪酶的 pH 稳定值有关。0.5% 甲醇诱导同时补加不同浓度的甘油,能增加碱性脂肪酶的表达,但甘油浓度较大时,在

培养后期酶活反而下降。这可能是与甲醇相比,甘油是更好的碳源,发酵初期使菌体大大增加,引起酶活上升,但甘油对 AOX1 具有部分的抑制作用,浓度过大反而使酶活下降<sup>[9,15]</sup>。甲醇诱导浓度对酶活也有很大的影响,1.5% 甲醇诱导效果最好,至 72h 酶活达 260u/mL,但高浓度的甲醇诱导反而导致酶活下降,这可能是与甲醇除了诱导表达,也可以作为碳源供毕赤酵母利用,而使细胞生物量增加,分泌外源蛋白增多,但甲醇同时存在毒害作用,过高反而导致酶活下降<sup>[16,17]</sup>。本项工作为进一步进行大规模发酵及利用蛋白质工程改善脂肪酶酶学性质,研究其结构与功能的相互关系奠定了基础。

## REFERENCES(参考文献)

- [ 1 ] SHI Q Q(施巧琴). Studies on alkaline lipase I. Screening and purification of the microorganisms. *Microbiology(微生物学通报)*, 1981, **3**(3):109-110
- [ 2 ] LIN L(林琳), SHI Q Q(施巧琴), GUO X L(郭小玲). Purification and N-terminal sequencing of alkaline lipase from *Penicillium expansum*. *Journal of Xiamen University(厦门大学学报)*, 2002, **41**(5):600-604
- [ 3 ] LIN L(林琳), XIE B F(谢必锋), YANG G Z(杨冠珍) et al. Cloning and sequence analysis of cDNA encoding alkaline lipase from *Penicillium expansum* PF898. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology(中国生物化学与分子生物学学报)*, 2002, **18**(1):32-37
- [ 4 ] LIN L(林琳), XIE B F(谢必锋), YANG G Z(杨冠珍) et al. Cloning and sequence analysis of genomic DNA encoding alkaline lipase from *Penicillium expansum* PF898. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology(中国生物化学与分子生物学学报)* 2003, **19**(1)
- [ 5 ] WENG L X(翁丽星), HU Z H(胡志浩) et al. Clone and expression in *Escherichia coli* of an alkaline and thermostable exolipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *Acta Microbiologica Sinica(微生物学报)*, 1997, **37**(6):434-437
- [ 6 ] Brocca S, Schmidt-Dannert C, Lotti M et al. Design, total synthesis, and functional overexpression of the *Candida rugosa* lip1 gene coding for a major industrial lipase. *Protein Science*, 1998, **7**(6):1415-1422
- [ 7 ] Beisson F, Tiss A, Rivière C et al. Methods for lipase detection and assay: a critical review. *Eur J Lipid Technol*, 2002, **2**:133-153
- [ 8 ] Hong F, Meinander N Q, Jonsson L J. Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and Bioengineering*, 2002, **79**(4):438-449
- [ 9 ] Sreekrishna K, Brankamp R G, Kropp K E et al. Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Gene*, 1997, **190**(1):55-62
- [ 10 ] Romanos M. Advances in the use of *Pichia pastoris* for high-level gene expression. *Current Opinion in Biotechnology*, 1995, **6**(5):527-533
- [ 11 ] Schmidt-Dannert C, Pleiss J, Schmid R D. A toolbox of recombinant lipases for industrial applications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998, 864:14-22
- [ 12 ] Minning S, Schmidt-Dannert C, Schmid R D. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties. *Journal of biotechnology*, 1998, **66**(2-3):147-156
- [ 13 ] ZHENG Y(郑毅), HUANG J X(黄建忠), SHI Q Q(施巧琴) et al. Studies on alkaline-mesophile lipase III. Purification and some properties of alkaline lipase from *Penicillium expansum* PF898. *Industrial Microbiology(工业微生物)*, 1996, **26**(3):15-19
- [ 14 ] Inan M, Chiruvolu V, Eskridge K M et al. Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. *Enzyme and Microbial Technology*, 1999, **24**(7):438-445
- [ 15 ] Inan M, Meagher M M. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2001, **92**(6):585-589
- [ 16 ] Katakura Y, Zhang W, Zhuang G et al. Effect of methanol concentration on the production of human [beta]2-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1998, **86**(5):482-487
- [ 17 ] Stratton J, Chiruvolu V, Meagher M. High cell-density fermentation. *Methods in Molecular Biology*, 1998, **103**:107-120

## Overexpression of *Penicillium expansum* Lipase Gene in *Pichia pastoris*

YUAN Cai LIN Lin\* SHI Qiao-Qin WU Song-Gang

(Bioengineering college, Fujian normal university, Fuzhou 350007, China)

**Abstract** The alkaline lipase gene of *Penicillium expansum* (PEL) was cloned into the yeast integrative plasmid pPIC3.5K, which was then transformed into His4 mutant yeast GS115. Recombinant *Pichia* strains were obtained by minimal olive oil-me-

Received: 09-24-2002

This work was supported by Grant from National Natural Science Foundation of China (No. 30270033) and Natural Sciences Foundation of Fujian (Key Program, No. B0120001).

\* Corresponding author. Tel 86-591-3531613 E-mail linlin@fjnu.edu.cn © 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

thanol plates screening and confirmed by PCR. The expression product of PEL gene was analyzed by SDS-PAGE and olive oil plate, the result indicated that PEL gene was functionally overexpressed in *Pichia pastoris* and up to 95% of the secreted protein. Recombinant lipase had a molecular mass of 28kD, showing a range similar to that of PEL, could hydrolyze olive oil and formed clear halos in the olive oil plates. Four different strategies (different media, pH, glycerol and methanol concentration) were applied to optimize the cultivation conditions, the activity of lipase was up to 260 u/mL under the optimal cultivation conditions. It is pointed out that the absence of the expensive biotin and yeast nitrogen base in the medium increased the lipase production. The possible reason of this result is absence of yeast nitrogen base increased the medium pH during cultivation, and PEL shows a higher stability at this condition. The lipase activity of the supernatant from the culture grown at pH 7 was higher than the one from the culture in the same medium at pH 6.0 is due to the pH stability of PEL too. The results also showed that the methanol and glycerol concentration had a marked effect on the production of lipase.

**Key words** *Penicillium expansum* lipase, *Pichia pastoris*, expression