

里氏木霉 Cel5A 基因优化及其在毕赤酵母中的高效表达

白仁惠^{1,2}, 张云博¹, 王春迪¹, 张斐洋³, 张喆³, 孙付保¹, 张震宇¹

1 江南大学 生物工程学院 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122

2 南京林业大学 江苏省生物质绿色燃料与化学品重点实验室, 江苏 南京 210037

3 河南天冠企业集团有限公司 车用生物燃料技术国家重点实验室, 河南 南阳 473000

白仁惠, 张云博, 王春迪, 等. 里氏木霉 Cel5A 基因优化及其在毕赤酵母中的高效表达. 生物工程学报, 2016, 32(10): 1381-1394.

Bai RH, Zhang YB, Wang CD, et al. Gene optimization and efficient expression of *Trichoderma reesei* Cel5A in *Pichia pastoris*. Chin J Biotech, 2016, 32(10): 1381-1394.

摘要: 内切纤维素酶 Cel5A 缺乏是限制纤维素酶制剂高效酶解天然纤维素的关键因素。本文尝试构建高效表达里氏木霉 Cel5A 的毕赤酵母重组菌株以弥补目前 Cel5A 的天然分泌不足, 通过基因密码子偏好性优化里氏木霉 Cel5A 基因和构建表达载体 pPIC9K-eg2, 并将其电转入毕赤酵母 GS115 以构建重组子, 利用浓度梯度平板和摇瓶发酵筛选获得一株高产毕赤酵母 *Pichia pastoris* 菌株 GS115-EG II。重组酶的酶学性质分析显示, 该酶分子量 50 kDa、最适 pH (pH 4.5) 略有降低及最适反应温度为 60 °C, 专一性地作用于非结晶纤维素, 与天然里氏木霉 Cel5A 并无明显区别。通过摇瓶发酵的初步优化, 该菌摇瓶培养条件: 培养温度 28 °C、起始 pH 5.0、接种量 2%、每 24 h 添加甲醇 1.5% (V/V)、每 24 h 添加山梨醇 4 g/L 及吐温 80 添加 4 g/L, 发酵 192 h 重组酶酶活达到 24.0 U/mL。进一步上罐 (5 L) 发酵 180 h, 该重组酶 Cel5A 酶活高达 270.9 U/mL, 蛋白含量达到 4.16 g/L。重组毕赤酵母 *P. pastoris* GS115-EG II 是一株适合于外源表达 Cel5A 的工程菌, 该重组酶可替代天然分泌 Cel5A 适用于当前酶基生物炼制模式下木质纤维素基质高效水解中。

关键词: 毕赤酵母 GS115-EG II, 里氏木霉 Cel5A 基因, AOX1 启动子, 密码子偏好性, 发酵优化, CMC 酶活

Received: January 9, 2016; **Accepted:** March 4, 2016

Supported by: National Natural Science Foundation of China (No. 21176106), State Key Laboratory of Motor Vehicle Biofuel Technology (No. KFKT2013010), China Postdoctoral Science Foundation (No. 2015M571666), Jiangsu Key Lab of Biomass-based Green Fuels and Chemicals (No. JSBGFC14006).

Corresponding author: Fubao Sun. Tel/Fax: +86-510-85327026; E-mail: fubaosun@jiangnan.edu.cn

国家自然科学基金 (No. 21176106), 车用生物燃料技术国家重点实验室开放基金 (No. KFKT2013010), 中国博士后科学基金 (No. 2015M571666), 江苏省生物质绿色燃料与化学品重点实验室课题 (No. JSBGFC14006) 资助。

Gene optimization and efficient expression of *Trichoderma reesei* Cel5A in *Pichia pastoris*

Renhui Bai^{1,2}, Yunbo Zhang¹, Chundi Wang¹, Feiyang Zhang³, Zhe Zhang³, Fubao Sun¹, and Zhenyu Zhang¹

¹ Laboratory of Industrial Biotechnology of Department of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

² Jiangsu Key Laboratory of Biomass-based Green Fuels and Chemicals, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China

³ State Key Laboratory of Motor Vehicle Biofuel Technology, Henan Tianguan Group Co., Ltd, Nanyang 473000, Henan, China

Abstract: Deficient activity of endo-1,4-beta-glucanase II (Cel5A) secreted by *Trichoderma reesei* is one of the challenges involved in effective cellulase saccharification of cellulosic substrates. Therefore, we expressed Cel5A in *Pichia pastoris* by constructing a recombinant strain. With the gene optimization based on codon bias, and the construction of expression vector pPIC9K-eg2, the optimized gene was electro-transformed into *P. pastoris* GS115 to form transformants. Then, a high Cel5A activity producing recombinant, namely *P. pastoris* GS115-EG II, was selected on G-418 resistant plates, followed by shake-flask cultivation. Enzyme characterization showed that the recombinant Cel5A reacted optimally at pH 4.5 and 60 °C, with 50 kDa of molecular weight, preferentially degrading amorphous cellulose. Recombinant Cel5A was not significantly different from the native *T. reesei* Cel5A. Moreover, a shake-flask fermentation of the recombinant strain was optimized as below: incubation temperature 28 °C, initial pH 5.0, inoculum volume 2%, methanol addition (per 24 h) 1.5% (V/V), sorbitol addition (per 24 h) 4 g/L and Tween 80 4 g/L. Under above optimized condition, the recombinant produced 24.0 U/mL of the Cel5A after 192 h fermentation. When incubated in a 5 L fermentation, Cel5A enzyme activity reached 270.9 U/mL at 180 h, with 4.16 g/L of the total protein. The study indicates that the recombinant strain *P. pastoris* GS115-EG II is extremely suitable for heterologous expression of *T. reesei* cellulase Cel5A. And the recombinant Cel5A can be used as an alternative to the native *T. reesei* Cel5A in development of a commercially relevant enzyme based biorefinery process.

Keywords: *Pichia pastoris* GS115-EG II, *Trichoderma reesei* Cel5A gene, AOX1 promoters, codon bias, fermentation optimization, CMC enzyme activity

微生物酶法生物炼制工艺的关键步骤之一是如何经济高效地水解纤维素/半纤维素组分为可发酵性糖, 纤维素酶成本过高仍然是阻碍该生物炼制商业化推进的关键因素^[1]。目前商业纤维素酶主要来源于真菌里氏木霉及其变种, 酶蛋白种类多达 80 余种^[2], 其中除了存在大量的不起作用的杂蛋白外, 纤维素酶蛋白种类和比例相对较单一, 难以满足不同来源(种属和预处理)基质特异性需求, 酶蛋白间协同能力相对较低, 从而导致酶载量增加, 酶解效率降低^[3]。针

对该问题, 国内外研究者们开展了外加酶蛋白(复合酶)和纤维素酶制剂重新定制的探索, 取得了显著进展^[4]。

纤维素酶核心酶组分 Cel5A 主要产自真菌里氏木霉 *Trichoderma reesei*, 其含量占纤维素酶总蛋白比例不足 10%^[5]。Cel5A 对纤维素长链内部 β -1,4 糖苷键进行有效水解从而促进纤维素糖化, 所以可用于羊毛和棉织物等纤维素材料的表面处理, 使其更为柔顺, 用于牛仔布料能产生良好的脱色与石磨效应^[6-8]。可见, 如何获

得充足的纤维素酶蛋白 Cel5A 具有重要的应用价值。国内外研究者在微生物技术层面上进行了广泛研究,其中,异源表达效果引起了人们广泛关注。就细菌方面而言,Nakazawa 等将里氏木霉 Cel5A 基因成功在大肠杆菌中实现了异源表达,摇瓶培养后得到胞内 CMC 比酶活 $3.7 \text{ U/mg}^{[9]}$ 。但由于大肠杆菌所产蛋白为胞内蛋白,后续提纯工作繁杂,且 Cel5A 基因来源于真菌,许多研究者将其置于真菌表达系统中进行异源表达。Boonvitthya 等将 Cel5A 基因成功在解脂耶氏酵母 *Yarrowia lipolytica* 中实现异源表达,摇瓶培养后酶活为 $6 \text{ U/mL}^{[10]}$ 。du Plessis 等将 Cel5A 基因成功在酿酒酵母中实现异源表达,并利用培养基成分优化以及分别与 Cel7A、Cel7B 基因共表达用以提高 Cel5A 酶活,摇瓶培养后得到最终酶活 $22.3 \text{ U/mL}^{[11]}$ 。然而,尽管研究人员在这些真菌中实现了异源表达,但由于宿主过度的翻译后修饰作用(如糖基化)导致异源表达酶活处于较低水平。于是,研究者们尝试以毕赤酵母作为宿主进行 Cel5A 表达。乔宇等将天然 Cel5A 基因导入毕赤酵母,摇瓶诱导培养后 CMC 酶活为 $8.7 \text{ U/mL}^{[12]}$ 。郑海英等对含天然 Cel5A 基因的重组毕赤酵母进行摇瓶优化后 CMC 酶活达到 $23.1 \text{ U/mL}^{[13]}$ 。Boonvitthya 等进一步将天然 Cel5A 基因导入毕赤酵母,摇瓶诱导培养后 CMC 酶活最高可达 $70 \text{ U/mL}^{[10]}$ 。Samanta 等将天然 Cel5A 基因在毕赤酵母中进行表达,摇瓶初步优化后 CMC 酶活可达 $130 \text{ U/mL}^{[14]}$ 。这些研究表明,毕赤酵母是异源表达 Cel5A 的合适宿主,但目前这些研究大多是将 Cel5A 天然基因导入毕赤酵母中在摇瓶水平上开展工作,总体产酶水平仍不高,尤其国内这方面工作还很有限。

基于此,本文首先对里氏木霉内切葡聚糖酶 Cel5A 基因实现基因优化处理(密码子偏好性优化,GC 含量调整以及 mRNA 二级结构优化),然后将优化后的基因在 AOX1 启动子调控下在毕赤酵母中实现异源表达,通过多拷贝筛选获得目的菌株。检验其酶学性质后对其主要培养条件进行摇瓶优化以获得较高酶活,最后对重组菌株实现上罐发酵。

1 材料与方法

1.1 材料

毕赤酵母 GS115 (*his 4*)、大肠杆菌 DH5 α 和大肠杆菌 JM109 等菌株为本实验室保存。质粒 pPIC9K 购自 Invitrogen 公司。限制性内切酶、连接酶和聚合酶购自 TaKaRa-宝生物工程(大连)有限公司。细菌/真菌培养基成分与遗传霉素 G-418 等抗生素购自生工生物工程上海(股份)有限公司。

1.2 菌株培养

大肠杆菌培养基为 LB,配制平板时加入 1.8%琼脂。毕赤酵母采用 YPD 培养,其重组菌筛选采用 MD 平板,摇瓶发酵采用 BMMY (www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/easysel ecte man.pdf)。大肠杆菌平板培养时于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 恒温培养箱中进行,摇瓶培养于旋转式摇床 ($37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 220 r/min)上进行。

大肠杆菌培养:将大肠杆菌接入 LB 培养基中于 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 220 r/min 培养过夜,用于质粒提取。

毕赤酵母培养:将重组菌单菌落接入 30 mL 体积 YPD 中于 $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 250 r/min 培养过夜至 $OD_{600}=5$,然后以 1% (V/V) 接种量转接至 50 mL (500 mL 三角瓶) BMMY 中发酵产酶,每 24 h 添加甲醇至终浓度为 1.5% (V/V) 以诱导产酶。

1.3 目的基因优化

利用软件 Gene Designer (DNA2.0, Menlo Park, CA, USA) 对来源于里氏木霉内切葡聚糖酶 II (Cel5A) 基因 (GenBank Accession No. DQ178347.1) 进行密码子优化。然后用软件 RNAstructure 预测经密码子优化后目的基因二级结构, 通过少数密码子同义替换将起始密码子端碱基呈现开环结构, 并调整目的基因 GC 含量在 40%–50%。最后在优化的目的基因 5'端添加 *EcoR* I 酶切位点, 在 3'端添加 *Not* I 酶切位点, 送至上海旭冠生物科技发展有限公司进行全基因合成。

1.4 表达载体构建及其电转化

将合成的目的基因通过 *EcoR* I 与 *Not* I 酶切位点克隆在穿梭质粒 pPIC9K 上, 以 *Sac* I 作为线性化位点酶切后进行浓缩, 用大约 2 μ g 线性化质粒与毕赤酵母感受态细胞混合, 在 2 mm 电击杯中冰浴 15 min, 电击参数设置为 2.5 kV 与 5 ms。电击后将 1 mL 冰浴后的 1 mol/L 山梨醇加入电击杯混匀, 涂 MD 平板筛选转化子。

1.5 高产菌株筛选

首先利用抗性浓度梯度筛选转化子, 将含有重组质粒 pPIC9K-*eg2* 转化子点在遗传霉素 G-418 抗性浓度分别为 0、2 和 4 mg/mL 的 YPD 平板上实现筛选。然后将能在高浓度抗性平板上正常生长转化子接入发酵培养基中实现产酶, 用以进行高产菌株筛选。其中摇瓶培养做 3 个平行, 标准差在图中以误差线标示。

1.6 分析测定

实验中按照先前报道方法对重组蛋白进行 SDS-PAGE 分析^[15]。以羧甲基纤维素作为底物测定 Cel5A 酶活, 方法如下: 测定样为 200 μ L 1%

(*W/V*) CMC 底物 (pH 4.8) 与 100 μ L 发酵液上清混合, 空白对照为 200 μ L 柠檬酸缓冲液 (50 mmol/L, pH 4.8) 与 100 μ L 发酵液上清混合。混合液在 50 $^{\circ}$ C 反应 30 min 后加入 300 μ L 3,5-二硝基水杨酸溶液沸水浴 5 min, 加入 3.9 mL H₂O, 混合均匀后在 540 nm 测定吸光值。酶活单位 (U) 定义: 1 个酶活力单位是指在 50 $^{\circ}$ C 与 pH 4.8 的条件下, 每分钟产生 1 微摩尔葡萄糖所对应的酶量。以微晶纤维素和水杨苷分别作为底物测定 Cel5A 相应酶活时, 分别以微晶纤维素和水杨苷替代 CMC, 用上述相同步骤进行测定, 其中微晶纤维素水解反应时间为 1 h。以滤纸 (Whatman Filter Paper No. 1) 作底物测定 Cel5A 酶活时, 将 50 mg 滤纸条置于 200 μ L 柠檬酸缓冲液 (50 mmol/L, pH 4.8) 作为反应底物, 除混合物反应时间为 1 h 外其他测定方法与 CMC 酶活测定方法相同。

蛋白含量测定方法采用考马斯亮蓝法 (Bradford), 测定管为 0.8 mL NaCl 溶液 (0.15 mol/L) 与 0.2 mL 酶液混合, 混匀后加入 5 mL 考马斯亮蓝试剂, 对照为 1 mL NaCl 溶液 (0.15 mol/L) 与 5 mL 考马斯亮蓝混合物, 测定混合液 OD_{595} 值。

1.7 酶学性质分析

外源表达 Cel5A 最适反应 pH: 测定不同 pH (pH 3.0–8.0) 柠檬酸缓冲液 (50 $^{\circ}$ C、反应 30 min) 对应 CMC 酶活。考察最适反应温度: 测定不同反应温度 40–80 $^{\circ}$ C 下柠檬酸缓冲液 (pH 4.8、反应 30 min) 对应 CMC 酶活。酶蛋白热稳定性: 不同温度 (40–80 $^{\circ}$ C) 时每隔 10 min 取样测定 CMC 酶活。重组蛋白底物特异性: 按 CMC 酶活测定方法, 以不同底物 (Avicel, D-(-)-Salicin 与 Filter paper) 替代 CMC 测定相

对应酶活。测定重组蛋白反应动力学时底物浓度为 0.1%–2.5% (W/V), 反应动力学参数 K_m 和 V_{max} 利用软件 GraphPad Prism 5 进行计算。所有实验数值均做 3 个平行, 标准差在图中以误差线标示。

1.8 单因素摇瓶优化

基于上述毕赤酵母培养方法, 保持其他条件不变, 优化接种量时考察接种量为 1%、2%、3%和 4%时重组菌产酶能力; 优化培养基 pH 时考察培养基 pH 4、pH 5、pH 6 和 pH 7 时重组菌产酶能力; 优化培养温度时考察温度为 24 °C、26 °C、28 °C和 30 °C时重组菌产酶能力; 优化甲醇添加量时考察每 24 h 添加甲醇至终浓度 0.5%、1%、1.5%、2%和 2.5%时重组菌产酶能力, 它们分别培养 144 h 后对其菌浓度与酶活进行测定; 优化碳源时, 在每 24 h 添加甲醇至终浓度为 1.5%时考察每 24 h 添加碳源 (山梨醇、甘露醇、葡萄糖及甘油) 至终浓度 4 g/L, 培养 72 h, 测定其酶活与生物量; 考察非离子表面活性剂时, 在发酵培养基中分别添加 4 g/L 吐温 20、4 g/L 吐温 80、0.5 g/L Triton X-100、2 g/L PEG2000、2 g/L PEG4000、2 g/L PEG6000、2 g/L PEG10000 和 2 g/L PEG20000, 培养 192 h, 测定酶活。所有优化均采用单因素优化, 均在 500 mL 三角瓶内完成, 装液量为 50 mL。所有实验数值均做 3 个平行, 标准差在图中以误差线标示。

1.9 上罐发酵

该培养在 5 L 发酵罐 (上海万木春生物工程有限公司, 型号 WMC-9005A/T) 里进行, 采用无机盐培养基 (工作体积 1.5 L), 配方参考 (http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/pichiaferm_prot.pdf)。YPD 培养基上种子培养 24 h 后, 按 7.5%接种量接入发酵罐。在生长阶

段, 控制发酵罐温度为 30 °C和转速 180 r/min 培养 16 h (OD_{600} =30 左右), 补加 400 mL 50%甘油溶液 (含有 12% PTM1) 作为碳源。继续培养 (大约在 36 h) 至 OD_{600} =300 时流加甲醇 (含 12% PTM1) 进入诱导阶段, 此时转速提升至 500 r/min, 温度降为 28 °C, 此时起流速与 DO 相关联, 维持 DO 在 25%左右诱导培养 144 h。期间每 12 h 取样测定 OD_{600} 、发酵上清液酶活及蛋白含量。

2 结果与分析

2.1 目的基因优化

本实验以毕赤酵母作为宿主菌株进行研究, 由于存在外源基因密码子偏好性, 导致外源基因天然密码子在宿主细胞中转录和翻译效率常受到不利影响, 所以目的基因异源表达前常要进行外源目的基因的优化处理^[16]。本文通过优化密码子偏好性、优化 mRNA 二级结构及调整 GC 含量等对里氏木霉葡聚糖内切酶 II 基因进行优化处理, 以使目的基因更适合在毕赤酵母中异源表达。

在优化密码子偏好性时, 利用软件 Gene Designer 对里氏木霉内切葡聚糖酶 II (Cel5A) 基因 *eg2* 进行密码子优化。其中, 目的基因含有自身信号肽, 同样也实现了密码子偏好性优化, 并在优化后基因 5'端添加 *EcoR* I 酶切位点, 在 3'端添加 *Not* I 酶切位点。优化后基因密码子与未优化的相比较, 结果如表 1 所示。针对毕赤酵母偏好性表, 天然 Cel5A 基因序列中使用频率低于 20%的密码子均进行同义替换, 以提高其异源表达效率。优化后目的基因密码子得到大幅度调整, 其中 284 个碱基发生变化。

表 1 Cel5A 基因优化前后密码子使用频率表

Table 1 Codon usage of wild and optimized Cel5A gene in the *P. pastoris*

Amino acid	Codon	<i>Pichia</i> Kazusa (%)	Wd. <i>eg2</i> (%)	Opt. <i>eg2</i> (%)	Amino acid	Codon	<i>Pichia</i> Kazusa (%)	Wd. <i>eg2</i> (%)	Opt. <i>eg2</i> (%)
Ala	GCA	23.4	21.4	0.0	Pro	CCA	41.6	21.1	85.0
	GCT	44.8	39.3	100.0		CCT	34.8	36.8	15.0
	GCG	6.1	7.2	0.0		CCG	8.6	26.3	0.0
	GCC	25.7	32.1	0.0		CCC	15.0	15.8	0.0
Cys	TGT	82.0	58.3	100.0	Gln	CAA	60.9	36.0	68.0
	TGC	18.0	41.7	0.0		CAG	39.1	54.0	32.0
Asp	GAT	58.0	47.4	21.1	Arg	AGA	48.0	10.0	100
	GAC	42.0	52.6	78.9		AGG	15.8	20.0	0.0
Glu	GAA	56.3	50.0	33.3		CGA	10.0	30.0	0.0
	GAG	43.7	50.0	66.7	CGT	16.5	0.0	0.0	
Phe	TTT	53.9	46.2	15.4	CGG	4.5	10.0	0.0	
	TTC	46.1	53.8	84.6	CGC	5.3	30.0	0.0	
Gly	GGA	32.7	13.6	0.0	Ser	AGT	15.0	7.0	0.0
	GGT	43.6	29.5	100.0		AGC	9.1	16.7	0.0
	GGG	9.9	13.6	0.0		TCA	18.2	26.2	0.0
	GGC	13.9	43.3	0.0		TCT	29.2	16.7	37.2
His	CAT	56.5	0.0	0.0	TCG	8.9	16.7	0.0	
	CAC	43.5	100.0	100.0	TCC	19.7	16.7	62.8	
Ile	ATA	18.0	9.5	0.0	Thr	ACA	24.3	15.9	0.0
	ATT	50.5	33.4	31.8		ACT	39.5	27.3	88.6
	ATC	31.5	57.1	68.2		ACG	10.6	25.0	0.0
Lys	AAA	46.9	16.7	14.3	Val	ACC	25.6	31.8	11.4
	AAG	53.1	83.4	85.7		GTA	15.5	4.4	0.0
Leu	TTA	16.2	4.4	0.0	GTT	42.0	31.8	100	
	TTG	32.7	26.1	100	GTG	19.2	13.6	0.0	
	CTA	11.1	0.0	0.0	GTC	23.3	50.0	0.0	
	CTT	16.5	21.7	0.0	Tyr	TAT	46.9	64.3	0.0
	CTG	15.5	26.1	0.0		TAC	53.1	35.7	100.0
	CTC	7.9	21.7	0.0	Stop	TAA	50.0	0.0	100.0
Trp	TGG	100.0	100.0	100.0		TAG	31.3	100.0	0.0
	Met	ATG	100.0	100.0		100.0	TGA	18.8	0.0
Asn	AAT	48.5	36.7	3.2	GC%		42.0	52.9	46.2
	AAC	51.5	63.3	96.8					

Pichia Kazusa: cited online <http://www.kazusa.or.jp/> codon; Opt. *eg2*: optimized *eg2*; Wd. *eg2*: native *eg2*.

在转录与翻译过程中基因在起始密码子端二级结构若呈现环状结构, 将会对 30S 核糖体有排斥作用, 导致转录和翻译效率降低^[17]。因此, 实验接着通过 RNAstructure 对目的基因 mRNA 二级结构进行了预测和优化。通过对起

始密码子端碱基进行调整, 并严格执行密码子同义替换, 最终破坏基因起始密码子端环状结构, 使优化后基因 mRNA 起始密码子端二级结构 10 个碱基呈开环结构, 有助于提高宿主对目的基因的转录和翻译效率, 结果如图 1 所示。

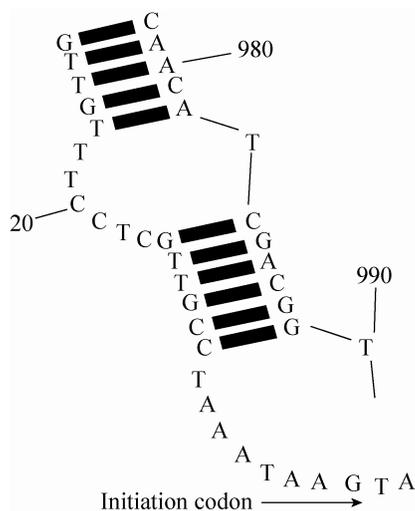


图1 Cel5A 基因 mRNA 二级结构预测

Fig. 1 Prediction of Cel5A gene mRNA secondary structure.

本实验在优化密码子偏好性的同时,通过手动调整碱基对密码子也进行了同义替换,最终使目的基因 GC 含量从 52.9% 降至 46.2%。一些研究认为,基因序列中 GC 含量同样影响基因转录和翻译,GC 含量控制在 40%–50% 有助于提高外源基因在毕赤酵母中表达效率^[16]。本实验中目的基因优化后 GC 含量为 46.2%,与相关报道一致,这为提高后面的异源表达效率提供了可能。

2.2 含目的基因表达载体的构建

本实验中选择由甲醇严格调控的 AOX1 强启动子,为实现 Cel5A 基因在毕赤酵母中的异源表达,将目的基因插入穿梭质粒 pPIC9K 上,插入位点在酿酒酵母 α -因子信号肽下游,酶切位点为 *EcoR* I 与 *Not* I,并置于 AOX1 启动子下游。将构建好的含目的基因的表达载体进行单双酶切验证,结果表明表达载体 pPIC9K-*eg2* 构建成功。

2.3 电转化与平板筛选

为了将上述表达载体 pPIC9K-*eg2* 导入毕赤酵母细胞以实现异源表达,本实验中以 *Sac* I 作为线性化位点进行酶切并浓缩,利用电转化手段导入毕赤酵母 GS115 感受态细胞,将优化后目的基因整合至毕赤酵母染色体上,以获得含目的基因 *eg2* 的转化子。最后将电击后菌液涂布在不含组氨酸的筛选平板 (MD) 上,在 30 °C 下培养 72 h 共获得 80 株转化子。

平板筛选时将上述转化子点到不同浓度的遗传霉素 G-418 抗性梯度平板上,结果如图 2 所示。所有转化子在无遗传霉素 G-418 抗性的 YPD 平板上均能生长,当浓度升至 2 mg/mL 时绝大部分转化子可以生长,当浓度升至 4 mg/mL 时,仅剩 12 株具有生长优势。因此,以这 12 株菌株作为后续摇瓶筛选实验对象。

2.4 摇瓶筛选及产酶验证

为获得高产菌株,将上述平板筛选到的 12 株转化子接至摇瓶发酵培养基上,培养 192 h 后进行酶活与生物量测定 (图 3)。这 12 株重组菌均能在发酵培养基中生长和产酶,其中 66 号菌株生长较好,发酵 192 h 时菌浓最高,达到 $OD_{600}=30$;而且发酵液中酶活相对较高,CMC 酶活近 20 U/mL。这样,本实验中选择 66 号重

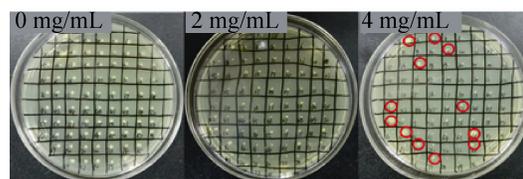


图2 高产 Cel5A 菌株的抗性平板筛选 (30 °C 培养 48 h)

Fig. 2 Selection of high Cel5A activity producing transformants on G-418 concentration gradient plate.

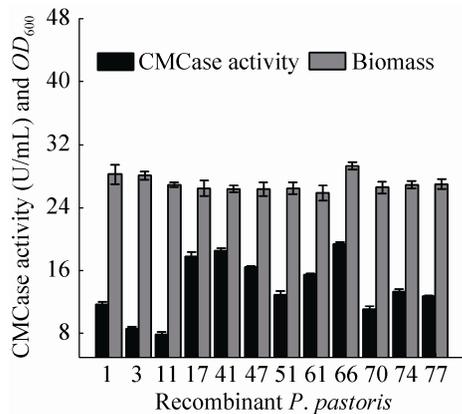


图3 转化子的摇瓶发酵筛选 (30 °C培养 192 h)

Fig. 3 Selection of high Cel5A activity producing transformants by shake flask fermentation.

组菌株作为后续研究对象, 暂命名为 *P. pastoris* GS115-EG II 表示。

为了验证重组 Cel5A 已经实现异源表达并且分泌在胞外, 实验接着利用 SDS-PAGE 对 *P. pastoris* GS115-EG II 发酵上清液进行分析, 结果表明转化子 *P. pastoris* GS115-EG II 在摇瓶培养 168 h 的不同阶段均分泌出一种蛋白, 随着发酵时间延长, 该蛋白浓度越大。该蛋白分子量约 50 kDa, 这与先前一些关于里氏木霉天然

Cel5A 蛋白的报道是一致的^[18]。另外, 一些研究的毕赤酵母中表达的重组 Cel5A 蛋白大小与本文结果一致^[10,19]。因此, 结合前面所测酶活, 我们认为该蛋白是目标酶蛋白 Cel5A。

另外, 由 SDS-PAGE 分析可知该重组菌目前分泌的重组蛋白是接近电泳纯水平的, 其发酵上清液可直接用于重组里氏木霉 Cel5A 酶酶学性质分析, 不需要繁琐的蛋白纯化手段。这与先前相关报道相一致, 毕赤酵母本身无内源性纤维素酶产生, 产酶背景简单, 可以直接获得较纯的目的蛋白酶液^[20]。

2.5 重组蛋白酶学性质分析

本实验接着以摇瓶发酵上清液中重组里氏木霉 Cel5A 酶直接进行酶学性质分析, 包括重组 Cel5A 酶水解底物的最适温度与 pH、酶蛋白热稳定性、底物特异性以及酶学动力学参数等。结果如图 4 和表 2 所示, 重组酶 Cel5A 最适反应 pH 值为 4.5, 最适反应温度为 60 °C, 耐热性分析显示温度 60 °C 时对该酶酶活无明显影响, 但温度高于 70 °C 时酶活下降非常明显。实验数据与其他天然 Cel5A 外源表达的相关报道基本

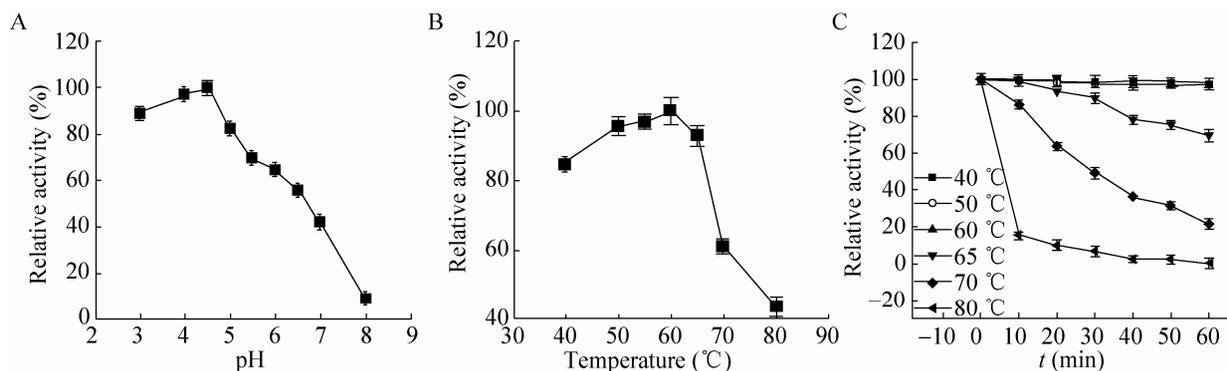


图4 重组 Cel5A 酶学性质

Fig. 4 Enzyme property of the recombinant Cel5A. (A) Optimum pH. (B) Optimal temperature. (C) Thermal tolerance.

表 2 重组 Cel5A 酶学性质分析

Table 2 Analysis of recombinant cellulase enzyme Cel5A property

Mw (kDa)	pH	T (°C)	Stability (70 °C, %)	K_m	V_{max}	Source
50.0	4.5	60	50	4.93	275.9	This study
58.0	5.0	60	50	2.10	220.6	[10]
52.8	5.0	55	50	0.17	—	[14]
48.0	5.0	55	60	—	—	[12]

Mw: molecular weight; T: optimum reaction temperature; stability (%): residual activity (%) after the incubation at 70 °C for 30 min.

一致^[10,12,14]。酶学性质表明,本实验通过对里氏木霉 Cel5A 基因优化后在毕赤酵母中表达的 Cel5A 与天然酶蛋白非常接近,可适用于当前纤维素酶基生物炼制工业的天然纤维基质酶解。

另外,对重组酶底物特异性进行分析可知重组酶对 CMC 有较强水解作用(比酶活为 58.82 U/mg),但对微晶纤维素(比酶活为 0.02 U/mg)、水杨苷(无法检测到酶活)及滤纸水解力(比酶活为 0.05 U/mg)较弱。可见,该重组酶蛋白与天然 Cel5A 相似,对无定型纤维素长链有较强的水解作用,但对纤维素短链以及纤维素结晶区作用较弱^[14]。实验进一步以 0.1%–2.5%浓度 CMC 为底物对重组 Cel5A 酶动力学关键参数进行测定,并利用曲线拟合软件 GraphPad Prism 5 进行计算,获得该重组酶的 K_m 值为 4.93 mg/mL, V_{max} 值为 275.9 $\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$ 。与先前报道相比^[10,14],本实验中所得 Cel5A 的最大反应速度 V_{max} 与相关报道基本一致,但 K_m 值明显大于相关报道的,初步推断可能是目的基因经过优化后表达的 Cel5A 酶蛋白结构发生了明显变化,具体信息有待深入研究。

2.6 重组毕赤酵母摇瓶优化

发酵条件优化是增加重组毕赤酵母菌产酶水平的重要手段^[13]。本实验对毕赤酵母 *P. pastoris* GS115-EG II 发酵的培养基(碳源、甲醇诱导物和添加剂)和培养条件(接种量、初始 pH 和培养温度)一些关键性参数进行初步考察(图 5)。如图 5A 所示,当接种量为 2%时,该菌生物量最高 ($OD_{600}=27.7$),相应的 CMC 酶活也最高,达到 19.8 U/mL。在培养基初始 pH 方面(图 5B),在 pH 5 时其生物量和酶活最高,分别为 29.1 及 18.1 U/mL。培养温度如图 5C 所示,当培养温度为 28 °C 时,其生物量 OD_{600} 与酶活最高,分别为 32.4 与 20.8 U/mL。

另外,诱导型系统中表达载体含有 AOX1 启动子,添加合适甲醇浓度能有效促进重组菌产酶能力^[21]。实验接着对培养基关键成分进行考察。如图 5D 所示,重组毕赤酵母生物量与酶活随着甲醇浓度增加而增加,当甲醇添加量为 1.5% (V/V) 时,生物量与酶活达到最高水平,分别为 28 和 20 U/mL。对碳源考察如图 5E 所示,每 24 h 添加碳源均能促进菌株生长繁殖,其中葡萄糖效果最好,但添加葡萄糖未能提高酶活,而添加山梨醇和甘油在促进菌体生长繁殖同时也显著增加了重组毕赤酵母菌产酶能力,且山梨醇相对于甘油在促进酶活方面更有优势。该结果与早先的报道相符,Thorpe 等^[22]在比较混合碳源甘油/甲醇和山梨醇/甲醇对毕赤酵母外源表达重组蛋白影响时发现:相对于甘油,添加山梨醇导致毕赤酵母生物量稍低些,但其重组蛋白的产率提高明显。于是,本实验接着对山梨醇添加量进行考察,发现当山梨醇添加量为 4 g/L 时酶活提升最为明显,达到 11.4 U/mL,比对照提高了 28%。

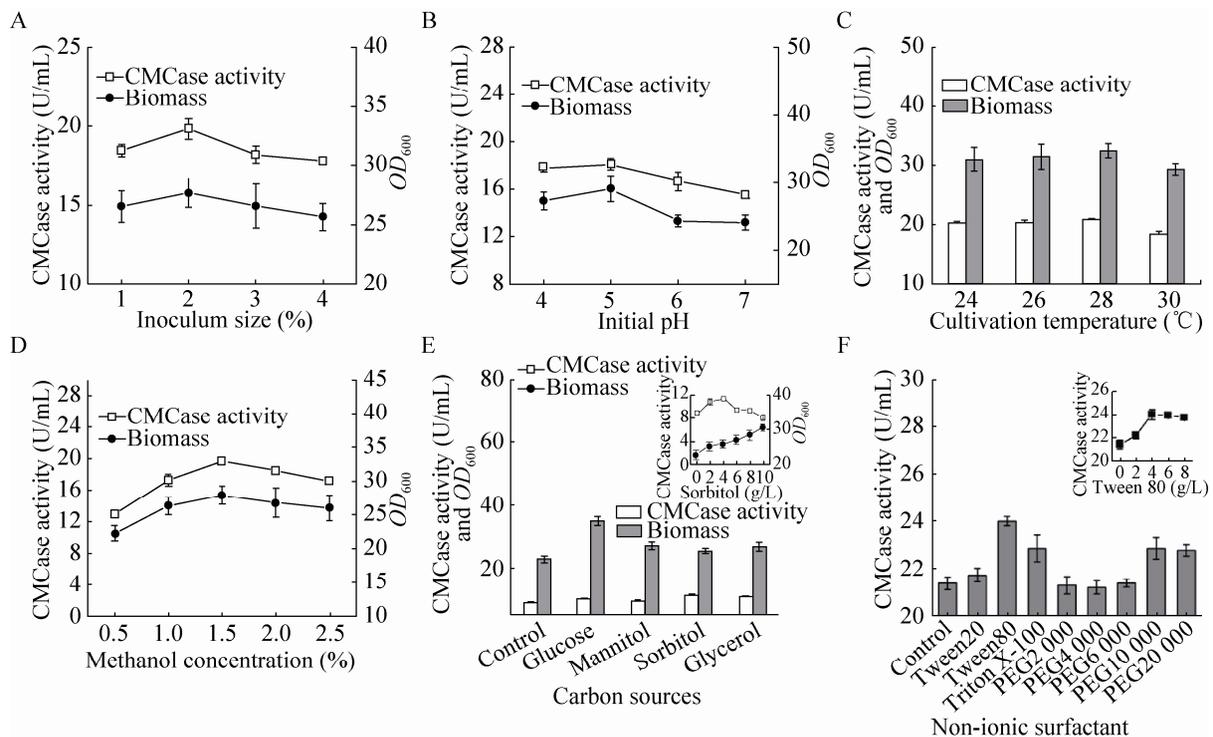


图5 重组毕赤酵母发酵产酶水平的初步摇瓶优化

Fig. 5 Preliminary shake flask optimization of the recombinant *P. pastoris* producing Cel5A. (A) Inoculation volume. (B) Initial fermentation pH. (C) Culture temperature. (D) Methanol addition each 24 h. (E) Carbon source. (F) Non-ionic surfactant addition.

此外,非离子表面活性剂能够提高真菌细胞壁渗透性,从而提高目的蛋白的表达量^[23]。实验也考察非离子表面活性剂对菌株 *P. pastoris* GS115-EG II 产重组酶的影响,如图 5F 所示。不同种类表面活性剂均对菌株发酵产酶有积极作用,其中吐温 80 作用效果最为明显,使所表达酶活增加 10% 以上。进一步对吐温 80 添加量进行选择,发现在吐温 80 添加量为 4 g/L 时重组菌株 *P. pastoris* GS115-EG II 表达酶活最高,高达 24.0 U/mL。

总之,本实验通过摇瓶优化,明显提高了重组菌 *P. pastoris* GS115-EG II 产酶能力,使酶活提高 10% 以上,达到 24.0 U/mL。然而,目前

摇瓶发酵获得的 CMC 酶活不高。Samanta 等将在毕赤酵母 GS115 中进行表达和诱导培养 48 h 时达到最高酶活 (75 U/mL); 进一步在 BMMH 中诱导培养 72 h 的 CMC 酶活可达 130 U/mL^[14]。最近, Akbarzadeh 等优化 Cel5A 基因并在毕赤酵母 GS115 进行表达,以 1% 甲醇诱导培养 72 h,其重组 Cel5A 蛋白 CMC 酶活高达 2 358.8 U/mL,这是迄今为止公开报道的最高酶活^[24]。

2.7 上罐发酵

鉴于摇瓶发酵时溶氧局限性,实验接着尝试在发酵罐水平通过加强溶氧来提高重组菌 *P. pastoris* GS115-EG II 的 Cel5A 表达水平,控

制条件如图 6A 所示。在上罐发酵过程中溶氧 (DO) 反映甲醇消耗量, 当甲醇流加速率过高时 DO 值会过低, 而甲醇添加速率过低时 DO 值会偏高^[25]。本实验通过控制 DO 值来准确地控制甲醇添加量以高效诱导重组毕赤酵母产酶, 同时又不至于对菌体产生毒害作用。本文在诱导过程中维持 DO 值在 25% 上下, 发酵 pH 值与温度维持基本恒定。

如图 6B 所示, 在 5 L 发酵罐中重组菌在甘油补料阶段 (0–36 h) 生长速度最快, 当甘油耗尽时 (36 h) 生物量已达 $OD_{600}=300$; 此时添加甲醇进行诱导培养, 细胞生长繁殖放缓, 但菌体量仍持续增加, 直至发酵将近结束时生物量达到最高水平 (OD_{600} 接近 700)。随着甲醇添加量增加, CMC 酶活不断提升, 180 h 时酶活达到 270.9 U/mL。同时, 发酵上清液蛋白总量也在增加, 在 180 h 达到 4.16 g/L。另外, 不同时间点的发酵上清液也进行了 SDS-PAGE 电泳

(图 6B), 各上清液在大约 50 kDa 处均有一条清晰条带, 该条带随发酵进行更加浓重清晰。这也表明, 在发酵过程中目的蛋白表达量的确随着发酵时间增加而显著提高, 与酶活增长趋势相一致。总之, 本实验通过对发酵罐参数的精确控制获得了较高的菌体浓度及良好的菌体活性, 从而为重组 Cel5A 蛋白的高效表达提供了可能。

3 讨论

本文鉴于基因密码子偏向性, 通过密码子偏向性优化、二级结构优化与 GC 含量调整等手段实现目的基因优化以期里氏木霉 Cel5A 在毕赤酵母中高效表达。既然国内外研究人员已开展了原始 Cel5A 基因直接在毕赤酵母里外源表达的研究, 本文就将密码子优化基因在毕赤酵母里表达后与已报到结果进行比较。相对于天然基因直接表达, 目的基因优化后外源表达存

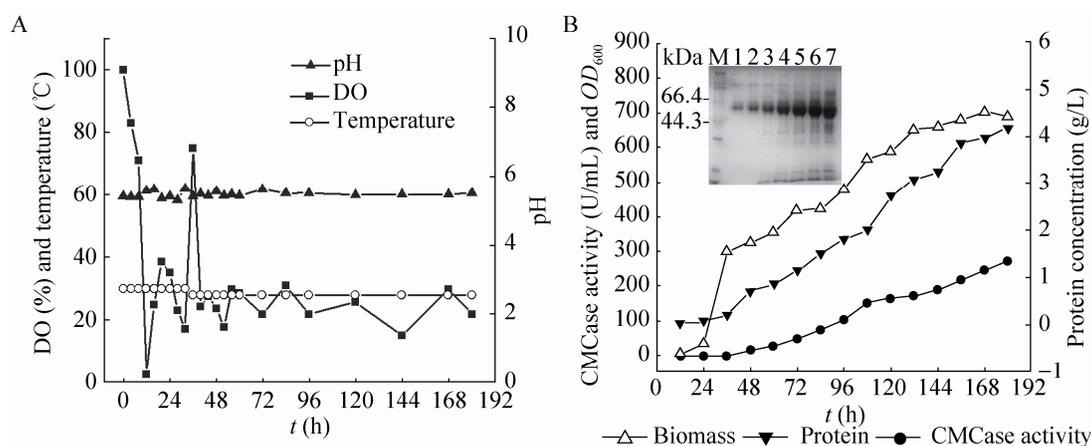


图 6 毕赤酵母 GS115-EG II 上罐发酵实验

Fig. 6 *P. pastoris* GS115-EG II fermentation in a 5 L bioreactor. (A) Fermentation process control of the recombinant Cel5A at DO, pH and temperature in a 5 L bioreactor. (B) Recombinant Cel5A fermentation, in the SDS-PAGE of fermentation supernatant at different time, loading at 10 μ L. (M) Protein marker. (1–7) The supernatant at 60, 72, 96, 120, 144, 168, 180 h fermentation, respectively.

在着高效表达潜力；从本文结果和已报道文献看，目的基因优化后表达比天然基因直接表达的酶活相对高一些^[12-13]。因此，目的基因序列的合理优化和转化子的有效筛选是获得高效表达重组菌的关键。

毕赤酵母具有特殊的整合方式，通过电转化合成大量转化子的目的基因拷贝数是不同的，能在高浓度抗性平板上正常生长的转化子所含目的基因拷贝数通常较高^[14]。文献[26]表明，重组毕赤酵母菌株中所含目的基因拷贝数能够影响其产酶能力，目的基因拷贝数增多时表达量能显著提升，但过多的拷贝数也无助于酶蛋白高效表达。本文中以 *Sac I* 作为线性化位点使线性化质粒载体中的 *AOX1* 基因与毕赤酵母染色体上 *AOX1* 基因进行替换与整合，有可能获得多拷贝转化子，进一步通过高浓度抗性平板筛选获得高产转化子可能性较大。本文在 4 mg/mL 抗性平板上完成重组毕赤酵母 *P. pastoris* GS115-EG II 筛选，该菌株有可能是高拷贝重组菌。

重组毕赤酵母 *P. pastoris* GS115-EG II 分泌表达的重组酶与天然里氏木霉分泌 Cel5A 酶蛋白在酶学性质上没有明显差异，表明重组毕赤酵母 *P. pastoris* GS115-EG II 是适合外源表达 Cel5A 的工程菌，该重组酶适用于弥补里氏木霉菌株天然分泌 Cel5A 不足，可用于当前酶基生物炼制模式下的木质纤维素基质高效水解中。

重组毕赤酵母 *P. pastoris* GS115-EG II 摇瓶发酵优化后 Cel5A 酶表达量增加并不理想 (< 15%)，通过上罐发酵实现了重组毕赤酵母菌株 *P. pastoris* GS115-EG II 高效分泌，其 CMC 酶活达到 270.9 U/mL，蛋白含量达到 4.16 g/L。与天然里氏木霉发酵液相比，其酶活分别是

Culbertson 等^[27]与 Ahamed 等^[28]报道里氏木霉发酵液 CMC 酶活的 150 倍和 64.5 倍，表明毕赤酵母是异源表达里氏木霉内切酶基因 Cel5A 的合适宿主。李红等^[29]在 5 L 罐水平里进行过含原始 Cel5A 基因重组毕赤酵母的外源表达，甲醇诱导 48 h 后 CMC 酶活为 15.6 U/mL，远低于本文所获得的结果。然而国外新近报道 (Akbarzadeh 等^[24]) Cel5A 基因优化后导入毕赤酵母 GS115 构建的重组菌，以 1% 甲醇诱导培养 72 h，其重组 Cel5A 蛋白 CMC 酶活高达 2 358.8 U/mL，这是迄今为止公开报道的最高酶活。如若属实，将使毕赤酵母外源表达 Cel5A 商业化成为可能。

REFERENCES

- [1] Fang X, Qin YQ, Li XZ, et al. Progress on cellulase and enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass. *Chin J Biotech*, 2010, 26(7): 864–869 (in Chinese).
方诩, 秦玉琪, 李雪芝, 等. 纤维素酶与木质纤维素生物降解转化的研究进展. *生物工程学报*, 2010, 26(7): 864–869.
- [2] Nagendran S, Hallen-Adams HE, Paper JM, et al. Reduced genomic potential for secreted plant cell-wall-degrading enzymes in the ectomycorrhizal fungus *Amanita bisporigera*, based on the secretome of *Trichoderma reesei*. *Fungal Genet Biol*, 2009, 46(5): 427–435.
- [3] Meyer AS, Rosgaard L, Sørensen HR. The minimal enzyme cocktail concept for biomass processing. *J Cereal Sci*, 2009, 50(3): 337–344.
- [4] Bussamra BC, Freitas S, da Costa AC. Improvement on sugar cane bagasse hydrolysis using enzymatic mixture designed cocktail. *Bioresour Technol*, 2015, 187: 173–181.
- [5] Rosgaard L, Pedersen S, Langston J, et al. Evaluation of minimal *Trichoderma reesei*

- cellulase mixtures on differently pretreated barley straw substrates. *Biotechnol Progr*, 2007, 23(6): 1270–1276.
- [6] Heikinheimo L, Buchert J, Miettinen-Oinonen A, et al. Treating denim fabrics with *Trichoderma reesei* cellulases. *Text Res J*, 2000, 70(11): 969–973.
- [7] Miettinen-Oinonen A, Heikinheimo L, Buchert J, et al. The Role of *Trichoderma reesei* cellulases in cotton finishing. *Aatcc Rev*, 2001, 51(9): 7–12.
- [8] Suominen PL, Mäntylä AL, Karhunen T, et al. High frequency one-step gene replacement in *Trichoderma reesei*. II. Effects of deletions of individual cellulase genes. *Mol Gen Genet*, 1993, 241(5/6): 523–530.
- [9] Nakazawa H, Okada K, Kobayashi R, et al. Characterization of the catalytic domains of *Trichoderma reesei* endoglucanase I, II, and III, expressed in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2008, 81(4): 681–689.
- [10] Boonvitthya N, Bozonnet S, Burapatana V, et al. Comparison of the heterologous expression of *Trichoderma reesei* endoglucanase II and cellobiohydrolase II in the yeasts *Pichia pastoris* and *Yarrowia lipolytica*. *Mol Biotechnol*, 2013, 54(2): 158–169.
- [11] du Plessis L, Rose SH, van Zyl WH. Exploring improved endoglucanase expression in *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2010, 86(5): 1503–1511.
- [12] Qiao Y, Mao AJ, He YZ, et al. Secreted expression of *Trichoderma reesei* endo- β -glucanase II gene in *Pichia pastoris* and analysis of enzymic properties. *Mycosystema*, 2004, 23(3): 388–396 (in Chinese).
- 乔宇, 毛爱军, 何永志, 等. 里氏木霉内切- β -葡聚糖酶 II 基因在毕赤酵母中的表达及酶学性质研究. *菌物学报*, 2004, 23(3): 388–396.
- [13] Zheng HY, Cai SL, Huang P, et al. Optimization of fermentation conditions for neutral endoglucanase EG II. *J Microbiol*, 2012, 32(1): 12–16 (in Chinese).
- 郑海英, 蔡少丽, 黄平, 等. 内切中性纤维素酶 EG II 的发酵条件优化. *微生物学杂志*, 2012, 32(1): 12–16.
- [14] Samanta S, Basu A, Halder UC, et al. Characterization of *Trichoderma reesei* endoglucanase II expressed heterologously in *Pichia pastoris* for better biofinishing and biostoning. *J Microbiol*, 2012, 50(3): 518–525.
- [15] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227(5259): 680–685.
- [16] Akcapinar GB, Gul O, Sezerman U. Effect of codon optimization on the expression of *Trichoderma reesei* endoglucanase I in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Progr*, 2011, 27(5): 1257–1263.
- [17] Cruz-Vera LR, Magos-Castro MA, Zamora-Romo E, et al. Ribosome stalling and peptidyl-tRNA drop-off during translational delay at AGA codons. *Nucl Acids Res*, 2004, 32(15): 4462–4468.
- [18] Miettinen-Oinonen A, Suominen P. Enhanced production of *Trichoderma reesei* endoglucanases and use of the new cellulase preparations in producing the stonewashed effect on denim fabric. *Appl Environ Microbiol*, 2002, 68(8): 3956–3964.
- [19] Miettinen-Oinonen A, Paloheimo M, Lantto R, et al. Enhanced production of cellobiohydrolases in *Trichoderma reesei* and evaluation of the new preparations in biofinishing of cotton. *J Biotechnol*, 2005, 116(3): 305–317.
- [20] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*, 1993, 11(8): 905–910.
- [21] Katakura Y, Zhang WH, Zhuang GQ, et al. Effect of methanol concentration on the production of human β_2 -glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor. *J Ferment Bioeng*, 1998, 86(5): 482–487.
- [22] Thorpe ED, d'Anjou MC, Daugulis AJ. Sorbitol as a non-repressing carbon source for fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris*.

- Biotechnol Lett, 1999, 21(8): 669–672.
- [23] Liu YT, Xuan SX, Long CN, et al. Screening, identifying of cellulose-decomposing strain L-06 and its enzyme-producing conditions. Chin J Biotech, 2008, 24(6): 1112–1116 (in Chinese).
刘韞滔, 禰淑霞, 龙传南, 等. 纤维素降解菌 L-06 的筛选、鉴定及其产酶条件的分析. 生物工程学报, 2008, 24(6): 1112–1116.
- [24] Akbarzadeh A, Siadat SOR, Motallebi M, et al. Characterization and high level expression of acidic endoglucanase in *Pichia pastoris*. Appl Biochem Biotechnol, 2014, 172(4): 2253–2265.
- [25] Potvin G, Ahmad A, Zhang ZS. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review. Biochem Eng J, 2012, 64: 91–105.
- [26] Mellitzer A, Weis R, Glieder A, et al. Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*. Microb Cell Fact, 2012, 11: 61.
- [27] Culbertson A, Jin MJ, Sousa LDC, et al. In-house cellulase production from AFEX™ pretreated corn stover using *Trichoderma reesei* RUT C-30. RSC Adv, 2013, 3(48): 25960–25969.
- [28] Ahamed A, Vermette P. Culture-based strategies to enhance cellulase enzyme production from *Trichoderma reesei* RUT-C30 in bioreactor culture conditions. Biochem Eng J, 2008, 40(3): 399–407.
- [29] Li H. Gene clone and high-cell-density expression of endoglucanase II in *Pichia pastoris*. Sun Yatsen Univ Forum, 2007, 27(11): 370–373 (in Chinese).
李红. 内切纤维素酶 EG II 基因克隆及其在毕赤酵母中高密度发酵表达. 中山大学学报论丛, 2007, 27(11): 370–373.

(本文责编 陈宏宇)