

• 生物育种与工艺优化 •

碱性果胶酶高产菌株的构建和高密度发酵

望潇文, 向腊, 徐婷, 卢争辉, 张桂敏

湖北大学生命科学学院 生物资源绿色转化湖北省协同创新中心, 湖北 武汉 430062

望潇文, 向腊, 徐婷, 等. 碱性果胶酶高产菌株的构建和高密度发酵. 生物工程学报, 2017, 33(12): 2017–2027.

Wang XW, Xiang L, Xu T, et al. Construction and high-density fermentation of alkaline pectate lyase high-yield yeast. Chin J Biotech, 2017, 33(12): 2017–2027.

摘要: 碱性果胶酶可用于苧麻脱胶和棉织物前处理的精练工艺, 与传统的高温碱煮相比, 具有保护纤维、降低能耗和化学污染的优势, 因此获得高表达的碱性果胶酶基因工程菌, 低成本生产碱性果胶酶对于纺织工业节能减排具有重要的意义。前期研究工作已经将来源于枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 168 的碱性果胶酶基因 *pel* 经过密码子优化后在毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 中成功表达。本研究为了提高其表达量, 首先利用启动子和信号肽都优化的载体 pHBM905BDM 进行表达, 摇瓶酶活从 68 U/mL 增加到 100 U/mL, qPCR 检测转录水平提高了 27%。再利用果胶底物平板筛选水解圈大的转化子进行摇瓶发酵获得菌株 GS115-pHBM905BDM-*pels4*, 摇瓶酶活为 536 U/mL。随后构建重组质粒 pPIC9K-*pels*, 电转化菌株 GS115-pHBM905BDM-*pels4*, 利用抗生素 G418 平板进行筛选, 在含 4 mg/mL 的 G418 抗性平板上得到菌株 GS115-pHBM905BDM-pPIC9K-*pels1*, 摇瓶酶活为 770 U/mL, qPCR 测定含 7 个拷贝目的基因。最后将该菌株在 5 L 的发酵罐中进行高密度发酵, 果胶酶酶活提高至 2 271 U/mL。该碱性果胶酶酶活已达到目前酵母表达的最高水平, 说明其具有很好的应用于纺织工业的潜力。

关键词: 碱性果胶酶, 毕赤酵母, G418 抗性标记, 组氨酸脱氢酶基因 (HIS4) 选择标记, 高密度发酵

Construction and high-density fermentation of alkaline pectate lyase high-yield yeast

Xiaowen Wang, La Xiang, Ting Xu, Zhenghui Lu, and Guimin Zhang

Bioresources Green Transformation Collaborative Innovation Center of Hubei Province, College of Life Sciences, Hubei University, Wuhan 430062, Hubei, China

Abstract: Pectate lyase is widely applied in ramie degumming and fabric bioscouring in the textile industry. Compared to

Received: March 5, 2017; **Accepted:** April 19, 2017

Supported by: National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2014AA021303-04), Technical Innovation Special Fund of Hubei Province (No. 2017ACA171).

Corresponding author: Guimin Zhang. Tel: +86-27-88663882; E-mail: zhangguimin6@hotmail.com

国家高技术研究发展计划 (863 计划) (No. 2014AA021303-04), 湖北省技术创新专项重大项目 (No. 2017ACA171) 资助。

网络出版时间: 2017-05-03

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20170503.1456.002.html>

conventional processes that involve high alkaline and high temperature treatment, enzyme based treatments have significant advantages in fibers protectiveness, improved efficiency of refining, reduced energy consumption and pollution. Hence, it would be highly desirable to construct high-yield alkaline pectate lyase engineered strains and reduce the pectate lyase production cost. In the previous study, pectate lyase gene *pel* from *Bacillus subtilis*168 was expressed in *Pichia pastoris* GS115 after codon usage optimization based on the vector pHBM905A. To improve the expression level, the vector pHBM905BDM with optimized promoter and signal peptide was used to express the optimized gene *pels* in GS115. The transformant had increased activity from 68 U/mL to 100 U/mL with the improvement in the transcription level by 27% measured by qPCR. The transformants were further screened on pectin plates, where higher halo forming strains were picked for shake-flask fermentation and strain GS115-pHBM905BDM-*pels*4 showed the highest activity of 536 U/mL. Then plasmid pPIC9K-*pels* was constructed and electroporated into the GS115-pHBM905BDM-*pels*4 cells. Subsequently, high-copy transformant was screened by using the medium containing antibiotics G418, strain GS115-pHBM905BDM-pPIC9K-*pels*1 was identified with increased activity of 770 U/mL and the copy number of *pels* was 7 confirmed by qPCR. Finally, the activity of pectate lyase produced by GS115-pHBM905BDM-pPIC9K-*pels*1 reached to 2 271 U/mL in a 5-L fermentor. The activity of pectate lyase in our study reached the highest level of expression in *P. pastoris*, showing good application potential in the textile industry.

Keywords: alkaline pectate lyase, *Pichia pastoris*, G418 marker, HIS4 selection marker, high-density fermentation

苧麻纤维不仅是纤维中最长、最坚韧和最丝滑的,还具有润湿性好、不易缩水、易印染和可以抵抗霉菌、细菌及昆虫等优良的特性^[1],因此被普遍应用于纺织和造纸行业中。然而,苧麻纤维中含有20%–30%由果胶和半纤维素组成的胶质,当其应用于工业生产时,这些胶质必须被去除^[2]。在传统的化学脱胶中,由于大量碱的使用和能量的消耗,引起了严重的环境污染,需要使用大量的人力物力来处理废水、废气^[3]。因此,利用微生物或其酶类来进行生物脱胶成为一种研究趋势^[4]。另外,棉织物前处理中的煮练是去除棉织物表面大部分天然杂质如果胶质、蜡质和残留的浆料,从而改进织物的外观,提高润湿性,以利于印染等后加工。传统工艺是在高温强碱条件下去除纤维素共生物,除了对环境污染严重外,对纤维的损伤大,失重大。碱性果胶酶作为一种天然蛋白质易于生物降解,不会污染环境与纺织品,具有保护纤维、提高精炼效率、降低能耗和污染等优势^[5]。

果胶酶可以催化水解果胶分子中的 α -1,4糖苷键,将其分解为半乳糖醛酸等物质^[6]。果胶酶可以从多种微生物中分离得到,比如芽孢杆

菌^[7]、链霉菌^[8]和放线菌^[9]等。碱性果胶酶主要是由芽孢杆菌产生,然而芽孢杆菌会分泌出对纤维有害的内源性纤维素酶,因此在工业生产中芽孢杆菌并不是一个非常适合分泌表达碱性果胶酶的宿主。而毕赤酵母 *Pichia pastoris* 作为外源蛋白表达系统一直被广泛应用^[10],它不产生内源纤维素酶,具有醇氧化酶(AOX1)强启动子,可以严格调控外源蛋白的表达,且表达的蛋白还可以被糖基化从而提高蛋白的热稳定性,以甲醇作为诱导物,生产成本较低,非常适合工业化大规模生产。以最典型的分泌型表达载体 pPIC9K 为例,它具有醇氧化酶基因 5'AOX1 启动子、3'AOX1 终止子,能胞外分泌表达的信号肽序列 MF α ,并以 HIS4 基因重组互补作为选择标记^[11]。

本研究前期将来源于枯草芽孢杆菌 *Bacillus subtilis* 中的碱性果胶酶基因 *pel168* 首先在大肠杆菌里表达^[12],测定了其所产碱性果胶酶 PEL168E 最适温度为 55 °C,最适 pH 为 9.5,比酶活为 353 U/mg,然后将 *pel168* 进行密码优化后,利用载体 pHBM905A 在毕赤酵母 GS115 中进行表达得到 PEL168P,其最适反应条件和比酶活与

PEL168E 保持一致,但是发生了糖基化,在 60 °C 的热稳定性显著高于 PEL168E,说明糖基化可以提高该酶的热稳定性。pHBM905A 是在 pPIC9K 的基础上把卡那霉素 Kan 抗性基因表达盒插入到多克隆位点并在其上下游加上限制酶 *Cpo* I 和 *Not* I 识别位点,并且将元件“*Amp*^r+*Ori*”插入到 *HIS4* 基因序列中得到^[13]。将该碱性果胶酶用于苧麻脱胶,发现其可以有效地去除苧麻纤维表面的果胶,但是构建的工程菌所表达的酶活仅为 54 U/mL,导致应用成本过高。

本研究中用的表达载体 pHBM905BDM 是在 pHBM905A 的基础上将 5'AOX1 启动子替换成 d1+2×201AOX1,信号肽由 MF α 替换成 MF4I-SS^[14]。三种载体 pPIC9K、pHBM905BDM 和 pHBM905A 都是穿梭质粒,所不同的是,pPIC9K 含有组氨酸脱氢酶基因 (*HIS4*) 筛选标记和 G418 抗性筛选标记;另外两个只含有 *HIS4* 筛选标记。本研究先构建了重组质粒 pHBM905A-*pels* 和 pHBM905BDM-*pels*,检测载体上启动子和信号肽的不同对蛋白表达量的影响;然后利用 pHBM905BDM 上的 *HIS4* 筛选标记,将 pHBM905BDM-*pels* 电转化 GS115 酵母感受态,得到的转化子通过果胶底物平板功能筛选获得碱性果胶酶多拷贝菌株。同时构建重组质粒 pPIC9K-*pels*,电转化通过功能筛选得到的酵母多拷贝菌株,并利用 G418 筛选重组子,以期得到表达量更高的菌株,从而进一步降低碱性果胶酶的生产成本。最后将得到的高产菌株进行高密度发酵,检测其在小型发酵罐中的产酶水平。

1 材料与方法

1.1 材料与配方

菌株:大肠杆菌 *Escherichia coli* XL10-Gold

克隆菌株、大肠杆菌 *Rosset Blue* (DE3) 表达菌株购自 Transgene 公司,毕赤酵母 GS115 购自 Invitrogen 公司。

质粒:pPIC9K 购自 Invitrogen 公司,pHBM905A^[13]、pHBM905BDM^[14]均为本实验室改造。

培养基:

YPD: 1%酵母提取物,2%蛋白胨,2%葡萄糖,1.5%琼脂(固体)。

LB: 0.5%酵母提取物,1%蛋白胨,0.5% NaCl,1.5%琼脂(固体)。

BMGY: 1%酵母提取物,2%蛋白胨,0.34% YNB,1% (NH₄)₂SO₄,100 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH 6.0),1%甘油。

BMMY: 同 BMGY,无甘油。

MD: 0.34% YNB,1% (NH₄)₂SO₄,2%葡萄糖,1.5%琼脂(固体)。

果胶底物培养基: 1%果胶,1.5%琼脂,其余同 BMMY,pH 7.0。

甘油分批发酵培养基: 甘油 40 g/L, K₂SO₄ 18 g/L, KOH 4.13 g/L, MgSO₄·7H₂O 14.9 g/L, 85% H₃PO₄ 27 mL/L, CaSO₄ 0.93 g/L, 微量元素溶液(PTM1) 4 mL/L^[15]。

生长补料培养基: 含 12 mL/L PTM1 的 50% (V/V) 的甘油溶液。

诱导补料培养基: 含 12 mL/L PTM1 的 100% 的甲醇溶液(分析纯)。

1.2 毕赤酵母表达载体的构建

将来源于 *Bacillus subtilis* 168 的碱性果胶酶基因 *pel* 根据毕赤酵母密码子偏爱性进行优化后得到基因 *pels*,以引物 F-P1 和 R-P1(表 1) 得到目的基因 PCR 产物,经琼脂糖凝胶回收后用 T₄ DNA 聚合酶和 dTTP 在 12 °C 处理 20 min,得

到两端分别是 *Cpo* I 和 *Not* I 的粘性末端, 处理好的基因片段 *pels* 分别与经双酶切的载体 pHBM905A 和 pHBM905BDM 连接, 连接产物转化大肠杆菌 XL10-Gold 得到的正确重组质粒分别命名为 pHBM905A-*pels* 和 pHBM905BDM-*pels*。由引物 F-P2 和 R-P2 (表 1) 得到的目的基因和表达载体 pPIC9K 同时用限制性内切酶 *Eco*R I 和 *Not* I 进行酶切, 处理好的基因片段与载体酶连, 连接产物转化大肠杆菌 XL10-Gold 得到的正确重组质粒命名为 pPIC9K-*pels*。

1.3 毕赤酵母的电转化

将线性化的重组质粒电转化毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 电转条件为: 电压 1.5 kV, 电击时间 4 ms。电击后, 立即加入 1 mL 冰预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液, 用移液器轻柔吸打混匀后, 涂布于 MD 平板上, 28 °C 培养直至转化子出现。

1.4 平板筛选高拷贝菌株

1.4.1 果胶底物平板

当插入到毕赤酵母基因组上的异源基因拷

贝数越多, 则表达量应该越高, 因此对应的碱性果胶酶的酶活越高。将 MD 平板上的转化子接种于果胶底物平板上 28 °C 培养, 每隔 12 h 加适量的甲醇于平板盖上进行诱导。2-3 d 后, 在平板表面覆盖一层 1% 的十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 溶液并静置 10 min 左右观察水解圈的形成, 水解圈越大代表对应菌株产酶能力越强。

1.4.2 G418 抗生素平板

将电转后的产物涂布于含 0.5 mg/mL G418 的 MD 平板上, 待转化子长出后将其逐步接种于含 1、2、3 和 4 mg/mL G418 的 YPD 平板上, 观察酵母菌株的生长状态, 理论上生长越快越好的菌株含有目的基因拷贝数越高, 从而产酶量越高。

1.5 碱性果胶酶在毕赤酵母里的诱导表达和酶活测定

测定方法参考文献[12]。

1.6 qPCR 测定转录水平对蛋白表达的影响

RNA 提取的方法参照 TRIzol[®] Reagent kit, 根据 $RNA (mg/mL) = 40 \times OD_{260} \times \text{稀释倍数}$ 来计

表 1 文中所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'-3')
F-P1	GTCAGCCGACTTGGGACATCAGACACTTG
R-P1	GGCCATTAGTTAAGTTTACCTGCTCCTGCTTG
F-P2	<u>CGGAATTC</u> GCCGACTTGGGACATCAG
R-P2	ATAAGAAT <u>GCGGCCGCT</u> TAGTTAAGTTTACCTGCTCC
F-P3	ATGGCTATCACTGTCGGTATTAACGG
R-P3	TTAAGCCTTAGCAACGTGTTGCAAC
F-P4	GGTATTAACGGTTTTCGGACGTATTG
R-P4	GTAAGCCTTGTGGGTAGAGTCGTAC
F-P5	CGATATGAACGTTGATGACAATTTG
R-P5	CTAGCTCTAGCCTCTTCTTGAGTTC

Underline represent the restriction sites.

算 RNA 的量, 取相同量的 RNA 进行反转录为 cDNA 的第一条链。反转录的方法参照 TaKaRa PrimeScript™ 1st strand kit。相对定量 PCR 的方法参照 TaKaRa SYBR® Green I kit。进行相对基因表达分析一般采用的是操作简便的 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 内参基因选用的是 GS115 内源的 3-磷酸甘油醛脱氢酶基因 *GAP*, 但是目的基因和内参基因扩增效率都必须接近 100%, 并且相互之间的效率偏差也必须在 5% 以内。

1.7 qPCR 检测目的基因的拷贝数

1.7.1 毕赤酵母总 DNA 的抽提

总 DNA 抽提的方法参照 Easy-DNA™ kit (Invitrogen), 测定总 DNA 的浓度及纯度, 当 A_{260}/A_{280} 高于 1.8 时可用于下一步的分析。

1.7.2 绝对定量

1) 标准曲线的建立

以毕赤酵母 GS115 菌株的基因组为模板, F-P3 和 R-P3 为引物 (表 1), PCR 扩增 *GAP* 基因; 以 pHBM905A-*pels* 为模板, F-P1 和 R-P1 (表 1) 为引物, PCR 扩增 *pels* 基因。回收纯化的 *GAP* 和 *pels* 片段分别与 pMD18-T 连接, 转化大肠杆菌感受态, 得到正确的重组质粒 pMD18T-*GAP* 和 pMD18T-*pels*, 测定浓度并根据质粒的质量分数和阿伏伽德罗常数^[16-17], 利用如下公式计算出每微升质粒溶液中所含质粒的拷贝数。

$$\text{DNA(copy)} = \frac{6.02 \times 10^{23} (\text{copy/mol}) \times \text{DNA amount (g)}}{\text{DNA length (bp)} \times 660 (\text{g/mol/bp})}$$

将质粒溶液稀释成 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 个拷贝/ μL 的 DNA 溶液, 分别以 $1 \mu\text{L}$ 各浓度质粒溶液作为模板, 以引物 F-P4/R-P4 和 F-P5/R-P5 (表 1) 进行荧光定量 PCR。以实时荧光定量 PCR 仪自带软件给出的 C_t 值作为纵坐标, 模板中质粒拷贝数的对数值作为横坐标, 建立标准曲线。

PCR 的效率由标准曲线的斜率计算出, 公式为 $E=10^{-1/\text{slope}}-1$ 。

2) *pels* 基因拷贝数的测定

以含有 *pels* 基因的毕赤酵母菌株基因组 DNA 为模板, 分别用引物 F-P4/R-P4 和 F-P5/R-P5 (表 1) 进行荧光定量 PCR。将得到的 C_t 值分别代入标准曲线中, 求出 DNA 样品中 *GAP* 基因和 *pels* 基因的起始模板拷贝数。*GAP* 基因在毕赤酵母的基因组中以单拷贝的形式存在, 因此可以用 *GAP* 基因的拷贝数表征模板中基因组的起始拷贝数。*pels* 基因起始模板拷贝数与 *GAP* 基因起始模板拷贝数的比值即为 *pels* 基因在毕赤酵母基因组中的拷贝数。

$$\text{copy number}_{pels} = \frac{\text{copy quantity}_{pels}}{\text{copy quantity}_{GAP}}$$

1.8 高密度发酵

将高产菌株接种于 100 mL YPD 培养基中, 28°C 、200 r/min 摇床培养 24 h, 至 OD_{600} 为 20 左右。将种子培养液按 10% 接种量接入 5 L 发酵罐中, 初始培养条件为: 装料量 2 L, 搅拌转速为 500 r/min, 通气量为 4 vvm。生长阶段温度为 28°C , 采用流加 25% 的浓氨水控制 pH 为 5.5。当甘油耗尽时 (DO 迅速上升至 60% 以上), 采用与溶氧偶联方式使 DO 维持在 $(30 \pm 5)\%$ 并补加 50% (V/V) 的甘油。当 OD_{600} 为 300 左右时, 停止流加甘油, 待甘油再次耗尽 (DO 迅速上升至 60% 以上), 开始流加甲醇进行诱导表达, 并将培养温度降低至 25°C , 同样采用与溶氧偶联方式流加。每 12 h 取样测定碱性果胶酶酶活。

2 结果与分析

2.1 不同表达载体对果胶酶酵母表达的影响

表达载体 pHBM905BDM 具有比 pHBM905A

更好的启动子和信号肽, 因此用 pHBM905BDM 载体的菌株分泌表达产物的能力理论上应该更强。挑取了在底物平板上水解圈最小的毕赤酵母重组菌株 GS115-pHBM905A-*pels* 和 GS115-pHBM905BDM-*pels* 同时进行摇瓶诱导发酵, 每隔 24 h 取样测定酶活。结果 (图 1) 发现诱导第 3 天时, 含两种载体的菌株所产的酶活同时达到最高, 利用载体 pHBM905A 表达的碱性果胶酶酶活为 68 U/mL, 利用载体 pHBM905BDM 的酶活为 100 U/mL, 提高了 47%。

2.2 qPCR 从转录水平分析两种载体的表达

由于 pHBM905BDM 表达载体具有更强的启动子和胞外分泌的信号肽, 为了研究启动子的优化对 PEL168S 的表达影响, 通过 qPCR 来从转录水平上分析蛋白的表达。抽提两种菌株 GS115-pHBM905A-*pels* 和 GS115-pHBM905BDM-*pels* 的总 RNA, 进行反转录得到 cDNA, 再进行 qPCR, 根据相对定量 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行相对基因表达分析。结果表明 (图 2), 利用 pHBM905BDM 表达的碱性果胶酶的 mRNA 表达水平比用

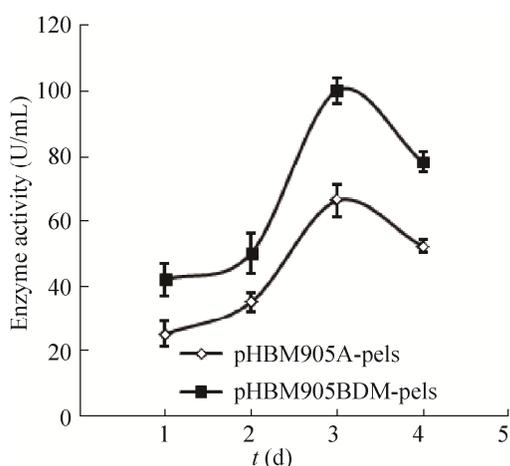


图 1 两种载体表达碱性果胶酶的摇瓶表达酶活
Fig. 1 The comparison of enzyme activities expressed by two different vectors.

pHBM905A 的提高了 27%。由于胞外表达酶活提高了 47%, 因此推测 pHBM905BDM 上的信号肽对碱性果胶酶 PEL168S 的表达促进程度比 pHBM905A 要高约 20%。

2.3 果胶底物平板筛选高拷贝菌株

由于当 *pels* 基因利用载体 pHBM905BDM 在毕赤酵母里的表达量更好, 因此选用重组质粒 pHBM905BDM-*pels* 来进行后面的工作, 该质粒经 *Sal* I 线性化后电转化毕赤酵母 GS115, 将得到的转化子点在果胶底物平板上, 如图 3 所示, 将

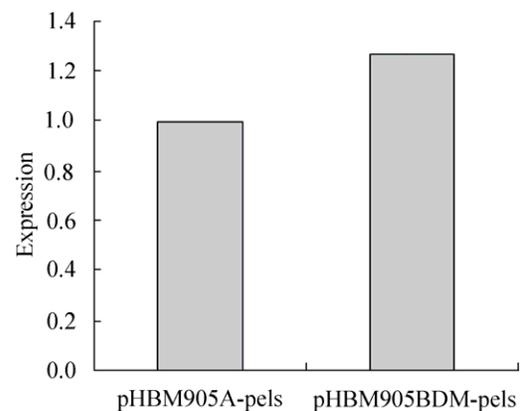


图 2 两种载体表达碱性果胶酶 mRNA 表达水平比较
Fig. 2 The comparison of the mRNA transcription levels of alkaline pectate lyase based on the vectors pHBM905A and pHBM905BDM.

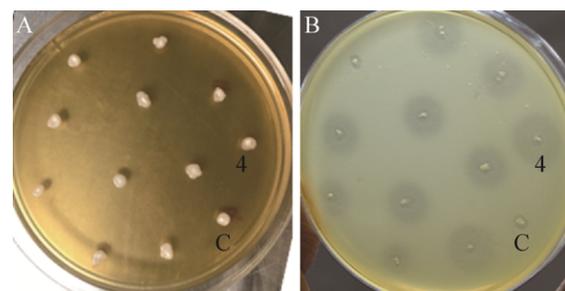


图 3 果胶底物平板筛选转化子
Fig. 3 Screening of the transformants with the activity of pectate lyase on the plate containing pectin. (A) The size of transformants as control. (B) The halo formation. C: GS115 as negative control.

筛选出的最大水解圈对应菌株命名为 GS115-pHBM905BDM-*pels4*, 经摇瓶发酵检测该菌株所产的碱性果胶酶酶活提高至 536 U/mL。

2.4 G418 抗性筛选高拷贝菌株

将 2.3 中筛选出的高拷贝菌株 GS115-pHBM905BDM-*pels4* 制作成感受态, 导入经 *Sac I* 线性化的重组质粒 pPIC9K-*pels*, 转化产物涂布于含 0.5 mg/mL G418 的 MD 平板上, 然后将长出的转化子点在 G418 浓度逐渐提高的 YPD 平板上, 于 28 °C 培养 5–8 d 并经常观察转化子的生长状况。最终当 G418 的浓度提高至 4 mg/mL, 如图 4 所示筛选得到一株生长最好的转化子, 命名为 GS115-pHBM905BDM-pPIC9K-*pels1*, 经摇瓶发酵检测, 该菌株所产碱性果胶酶酶活提高至 770 U/mL。

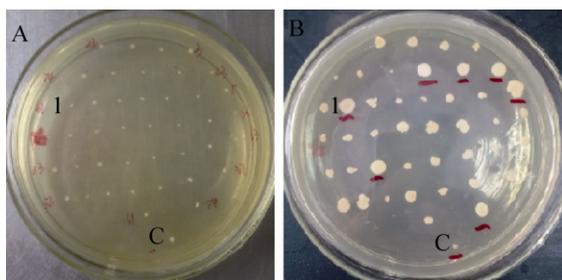


图 4 抗生素 G418 筛选转化子

Fig. 4 Screening of the transformants on the plate with the antibiotics G418. (A) The initial size of transformants as control. (B) The size of transformants after 6 days. (C): GS115-pHBM905BDM-*pels* as negative control.

2.5 qPCR 检测毕赤酵母基因组中目的基因拷贝数

将含有 *pels* 基因的毕赤酵母基因组同样进行 real-time PCR 反应, 通过标准曲线计算出 *pels* 基因在毕赤酵母基因组中的拷贝数。毕赤酵母 *GAP* 基因 C_t 值与起始拷贝数对数值的回归方程为: $y = -3.526 2x + 42.204$, PCR 效率为 1.744, *pels* 基因 C_t 值与起始拷贝数对数值的回归方程为: $y = -3.503 9x + 42.179$, PCR 效率为 1.738, 可以看出做出标准曲线的两个 PCR 效率几乎是一致的。由表 2 里的 C_t 值经计算得菌株 GS115-pHBM905BDM-*pels4* 中 *pels* 的拷贝数为 5, 菌株 GS115-pHBM905BDM-pPIC9K-*pels1* 中 *pels* 的拷贝数为 7。

2.6 高密度发酵

由于菌株 GS115-pHBM905BDM-pPIC9K-*pels1* 的表达量最高, 将其进行高密度发酵使碱性果胶酶的表达量进一步提高。发酵诱导周期为 120 h 左右, 每 12 h 取样测菌体干重和上清酶活, 结果如图 5 所示。当诱导到 96 h 时, 酶活达到最大值 2 271 U/mL, 约为摇瓶发酵所得碱性果胶酶酶活的 3 倍, 但是未达到预期的目标。同时用 SDS-PAGE 检测诱导期间每 12 h 取得的上清液, 发现 108 h 时的样品目的条带变小了, 推测目的蛋白可能被降解。为了分析发生降解的原因, 通过网站 (<https://prosper.erc.monash.edu.au/>) 预测

表 2 qPCR 测定目的基因拷贝数的 C_t 值和拷贝数

Table 2 The C_t values and copy numbers of two strains measured through qPCR

	GS115-pHBM905BDM- <i>pels4</i>	GS115-pHBM905BDM-pPIC9K- <i>pels1</i>
<i>GAP</i>	27.140	26.999
<i>pels</i>	24.689	24.078
Copy number	5.254	7.138

分析发现该碱性果胶酶的氨基酸序列中存在毕赤酵母 GS115 的内源蛋白酶 Prb1 的酶切位点。另外由图 6 第 5、6 泳道可以看出诱导 96 h 和 108 h 的样品多出一条带,且浓度呈现增高趋势,将该蛋白带(黑框表示)进行质谱检测发现是醇氧化酶 AOX1,由于 AOX1 是胞内酶,说明在诱导过程中酵母细胞出现死亡裂解的现象,从而导致内源蛋白酶的释放降解了部分目的蛋白,酶活未达到预期目标。

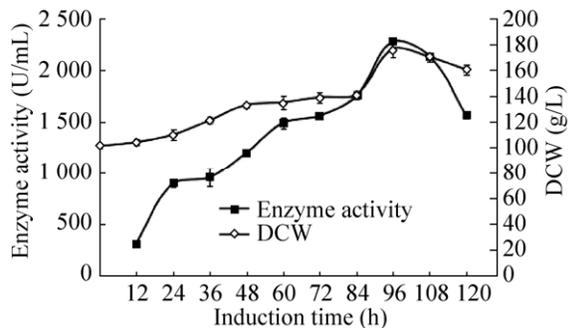


图 5 高表达果胶酶毕赤酵母的高密度发酵
Fig. 5 High-density fermentation of *P. pastoris* with high yield pectate lyase.

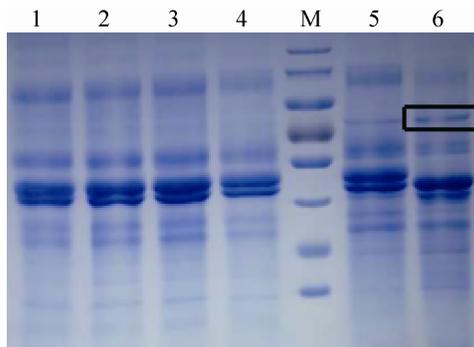


图 6 SDS-PAGE 检测发酵上清
Fig. 6 SDS-PAGE measurement of fermentation supernatant. 1: 48 h; 2: 60 h; 3: 72 h; 4: 84 h; 5: 96 h; 6: 108 h; M: marker.

3 讨论

本研究构建了重组质粒 pHBM905A-*pels* 和 pHBM905BDM-*pels*, 其中 pHBM905BDM-*pels* 具有更强的启动子与信号肽, 实验验证 pHBM905BDM 分泌表达目的蛋白的能力的确更强, 因此选用该载体表达目的基因。然后利用 HIS4 选择标记, 将 pHBM905BDM-*pels* 电转化毕赤酵母 GS115, 并通过果胶底物平板功能性筛选得到整合了多拷贝果胶酶基因 *pels* 的菌株。在此基础上, 将 pPIC9K-*pels* 电转化上述菌株制备的感受态细胞, 利用 G418 筛选和摇瓶发酵成功得到了产量进一步提高的高产菌株。本研究的结果证实了利用 HIS4 营养缺陷型和 G418 抗性的双选法筛选碱性果胶酶高产工程菌是可行的, 利用这个策略, 果胶酶的产量从 68 U/mL 提高至 770 U/mL, 提高了 10 倍多, 为定向获得多拷贝整合的酵母高产菌株提供了新的思路。

近十几年来, 来源于欧文氏菌 *Erwinia*^[18]、放线菌 *Actinomycetes*^[9] 和芽孢杆菌 *Bacillus*^[19] 等的碱性果胶酶基因已通过基因工程技术得到了表达, 这些表达主要以 *E. coli* 为表达宿主, IPTG 作为诱导剂, 表达产量较低且大多属于内分泌型, 考虑到 IPTG 和破菌的成本, 限制了其在工业上的应用。本研究采用的是真核表达系统——巴斯德毕赤酵母, 除了具有细胞生长快、易于培养、遗传操作简单等特点外, 还可以对表达的蛋白质进行正确加工、修饰和分泌等。毕赤酵母已基本成为较完善的外源基因表达系统, 其优势有: 含有特有的醇氧化酶启动子, 用甲醇可严格地调控外源基因的表达; 易于高密度发酵, 以更廉价的甲醇代替 IPTG 作为诱导物, 生产成本较

低,细胞干重可以很快达到很高的浓度(120 g/L以上),利于工业化生产;外源基因通过整合型质粒整合于毕赤酵母染色体基因组上,结构稳定;能使产物有效分泌并适当糖基化,自身分泌的蛋白质非常少,便于产物纯化^[20]。毕赤酵母已广泛作为宿主菌株成功表达了很多外源重组蛋白,例如应用于工业上的木聚糖酶(178 mg/L)^[21]、纤维素酶(65 mg/L)^[22]、脂肪酶(630 mg/L)^[23]和植酸酶(63 mg/L)^[24]等;用毕赤酵母生产用于生物医药上的蛋白时,所产的蛋白效价高且没有细菌内毒素或潜在的病毒污染,例如可用于生产胰岛素前体(1.5 g/L)^[25]、人血清白蛋白(6 g/L)^[26]和肿瘤坏死因子(10 g/L)^[27]等,通过不断优化表达载体上的信号肽和启动子,外源蛋白的表达量可进一步提高^[28]。

然而,在毕赤酵母里表达的碱性果胶酶并不多,且表达量也较低。最早表达的是来源于真核生物腐皮镰孢霉 *Fusarium solani* f. sp. *pisi*^[29]中的 *peIB* 和 *peIC*,近几年研究较多的是来源于 *Bacillus subtilis* WSHB04-02 的碱性果胶酶在 GS115 中的表达^[30],并经过一系列发酵优化策略,例如调节甲醇和菌体浓度比率^[31]、表达阶段采用低温^[32]、在菌体生长阶段采用甘油指数流加、在诱导阶段采用甲醇分阶段流加和山梨醇与甲醇混合添加诱导^[15]等方法,使得 PGL 的产量最高为 1 593 U/mL。本研究中筛选得到的碱性果胶酶高产菌株在 5 L 发酵罐中的表达水平达到了 2 271 U/mL,虽然未达到预期目标,但已经是目前文献报道的最高表达水平。*P. pastoris* 在以甲醇作为唯一碳源和能源表达外源目的蛋白时,细胞生长与蛋白表达一直存在着激烈的竞争,共同争夺碳源和能源,也导致外源蛋白表达效率降

低。虽然有报道碱性果胶酶 PL 在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中分泌表达^[33],用 IPTG 诱导的发酵上清酶活可达到 4 507 U/mL。但考虑到毕赤酵母表达所用诱导剂的成本远远低于 IPTG,且相比于大肠杆菌其自身分泌蛋白更少,产物方便纯化,通过一系列发酵策略的优化^[34],有望进一步提高该菌株的发酵产量,使其更加具有应用于纺织行业的潜力。

REFERENCES

- [1] Wang B, Peng DX, Liu LJ, et al. An efficient adventitious shoot regeneration system for ramie (*Boehmeria nivea* Gaud) using thidiazuron. *Bot Stud*, 2007, 48(2): 173–180.
- [2] Brühlmann F, Leupin M, Erismann KH, et al. Enzymatic degumming of ramie bast fibers. *J Biotechnol*, 2000, 76(1): 43–50.
- [3] Zou MY, Guo FF, Li XZ, et al. Enhancing production of alkaline polygalacturonate lyase from *Bacillus subtilis* by fed-batch fermentation. *PLoS ONE*, 2014, 9(3): e90392.
- [4] Zheng LS, Du YM, Zhang JY. Degumming of ramie fibers by alkalophilic bacteria and their polysaccharide-degrading enzymes. *Bioresour Technol*, 2001, 78(1): 89–94.
- [5] Hoondal GS, Tiwari RP, Tewari R, et al. Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, 59(4/5): 409–418.
- [6] Kohli P, Gupta R. Alkaline pectinases: a review. *Biocatal Agric Biotechnol*, 2015, 4(3): 279–285.
- [7] Kashyap DR, Chandra S, Kaul A, et al. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. *World J Microbiol Biotechnol*, 2000, 16(3): 277–282.
- [8] Beg QK, Bhushan B, Kapoor M, et al. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from *Streptomyces* sp. QG-11-3. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2000, 24(6): 396–402.

- [9] Brühlmann F, Kim KS, Zimmerman W, et al. Pectinolytic enzymes from actinomycetes for the degumming of ramie bast fibers. *Appl Environ Microbiol*, 1994, 60(6): 2107–2112.
- [10] Li PZ, Anumanthan A, Gao XG, et al. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*. *Appl Biochem Biotechnol*, 2007, 142(2): 105–124.
- [11] Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*, 2005, 18(2): 119–138.
- [12] Zhang CJ, Yao J, Zhou C, et al. The alkaline pectate lyase PEL168 of *Bacillus subtilis* heterologously expressed in *Pichia pastoris* is more stable and efficient for degumming ramie fiber. *BMC Biotechnol*, 2013, 13(1): 26.
- [13] Zhang GM, Huang J, Huang GR, et al. Molecular cloning and heterologous expression of a new xylanase gene from *Plectosphaerella cucumerina*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2007, 74(2): 339–346.
- [14] Xiang L, Wang QH, Zhou YL, et al. High-level expression of a ZEN-detoxifying gene by codon optimization and biobrick in *Pichia pastoris*. *Microbiol Res*, 2016, 193: 48–56.
- [15] Wang ZH, Wang Y, Zhang DX, et al. Enhancement of cell viability and alkaline polygalacturonate lyase production by sorbitol co-feeding with methanol in *Pichia pastoris* fermentation. *Bioresour Technol*, 2010, 101(4): 1318–1323.
- [16] Abad S, Kitz K, Hörmann A, et al. Real-time PCR-based determination of gene copy numbers in *Pichia pastoris*. *Biotechnol J*, 2010, 5(4): 413–420.
- [17] Lee C, Kim J, Shin SG, et al. Absolute and relative QPCR quantification of plasmid copy number in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*, 2006, 123(3): 273–280.
- [18] Tardy F, Nasser W, Robert-Baudouy J, et al. Comparative analysis of the five major *Erwinia chrysanthemi* pectate lyases: enzyme characteristics and potential inhibitors. *J Bacteriol*, 1997, 179(8): 2503–2511.
- [19] Sukhumsirchart W, Kawanishi S, Deesukon W, et al. Purification, characterization, and overexpression of thermophilic pectate lyase of *Bacillus* sp. RN1 isolated from a hot spring in Thailand. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2009, 73(2): 268–273.
- [20] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*, 2005, 22(4): 249–270.
- [21] Tanaka H, Okuno T, Moriyama S, et al. Acidophilic xylanase from *Aureobasidium pullulans*: efficient expression and secretion in *Pichia pastoris* and mutational analysis. *J Biosci Bioeng*, 2004, 98(5): 338–343.
- [22] Thongekkaew J, Ikeda H, Masaki K, et al. An acidic and thermostable carboxymethyl cellulase from the yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization and improvement of its recombinant enzyme production by high cell-density fermentation of *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 2008, 60(2): 140–146.
- [23] Jia B, Liu WS, Yang JK, et al. *Burkholderia cepacia* lipase gene modification and its constitutive and inducible expression in *Pichia pastoris*. *Acta Microbiol Sin*, 2010, 50(9): 1194–1201 (in Chinese).
贾彬, 刘文山, 杨江科, 等. 洋葱伯克霍尔德菌脂肪酶的基因改造及其在毕赤酵母中组成型和诱导型的表达. *微生物学报*, 2010, 50(9): 1194–1201.
- [24] Xiong AS, Yao QH, Peng RH, et al. High level expression of a synthetic gene encoding *Peniophora lycii* phytase in methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, 72(5): 1039–1047.
- [25] Wang Y, Liang ZH, Zhang YS, et al. Human insulin from a precursor overexpressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* and a simple procedure for purifying the expression product. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 73(1): 74–79.
- [26] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Nat Biotechnol*, 1993, 11(8): 905–910.

- [27] Sreekrishna K, Nelles L, Potenz R, et al. High-level expression, purification, and characterization of recombinant human tumor necrosis factor synthesized in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Biochemistry*, 1989, 28(9): 4117–4125.
- [28] Patrick F. *Pichia pastoris*: a workhorse for recombinant protein production. *Curr Res Microbiol Biotechnol*, 2014, 2: 354–363.
- [29] Guo W, González-Candelas L, Kolattukudy PE. Cloning of a new pectate lyase gene *pelC* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, Mating Type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*. *Arch Biochem Biophys*, 1995, 323(2): 352–360.
- [30] Zhuge B, Du GC, Shen W, et al. Expression of a *Bacillus subtilis* pectate lyase gene in *Pichia pastoris*. *Biochem Eng J*, 2008, 40(1): 92–98.
- [31] Wang Y, Wang ZH, Du GC, et al. Enhancement of alkaline polygalacturonate lyase production in recombinant *Pichia pastoris* according to the ratio of methanol to cell concentration. *Bioresour Technol*, 2009, 100(3): 1343–1349.
- [32] Wang Y, Wang ZH, Xu QL, et al. Lowering induction temperature for enhanced production of polygalacturonate lyase in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem*, 2009, 44(9): 949–954.
- [33] Wang HL, Li XM, Ma YH, et al. Process optimization of high-level extracellular production of alkaline pectate lyase in recombinant *Escherichia coli* BL21 (DE3). *Biochem Eng J*, 2015, 93: 38–46.
- [34] Looser V, Bruhlmann B, Bumbak F, et al. Cultivation strategies to enhance productivity of *Pichia pastoris*: a review. *Biotechnol Adv*, 2015, 33(6): 1177–1193.

(本文责编 陈宏宇)