

研究报告

嗜热棉毛菌木糖苷酶 Xyl43 基因优化及其在毕赤酵母中高效表达

张云博^{1,2} 白仁惠^{1,2} 王春迪¹ 张斐洋³ 岳春⁴ 张震宇¹ 孙付保^{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)

(4. 南阳理工学院生物与化学工程学院 河南 南阳 473004)

摘要:【目的】通过外源表达手段构建重组毕赤酵母实现木糖苷酶的高效表达。【方法】基于毕赤酵母密码子偏好性优化嗜热棉毛菌 β -木糖苷酶(Xyl43)基因密码子,将其导入毕赤酵母 GS115 中实现分泌表达,并对重组木糖苷酶酶学性质进行分析。通过单因素实验优化高产菌株的摇瓶发酵条件,并在 5 L 发酵罐中进行扩大培养。【结果】Xyl43 基因优化后的序列中 222 个碱基发生改变, G+C 含量由 52.8%降低到 44.6%, 序列一致性为 78.17%; 将构建的表达载体 pPIC9K-OptXyl43 电击转入毕赤酵母中,利用平板初筛和摇瓶复筛获得一株高效表达重组菌(命名为 *P. pastoris* GS115-Xyl43); 其所产重组木糖苷酶大小为 51.5 kD, 动力学参数 K_m 为 2.93 mmol/L、 V_{max} 为 157.9 μ mol/(min·mg), 最适反应温度 55 $^{\circ}$ C, 最适 pH 7.0, 在 pH 6.0–9.5 条件下具有良好的稳定性; 摇瓶优化结果表明: 培养基初始 pH 6.0、甲醇补加浓度 1.0%、培养温度 28 $^{\circ}$ C、摇床转速 250 r/min 为最佳产酶条件,在此条件下发酵 144 h 胞外酶活达到 42 U/mL (蛋白含量 0.54 g/L); 5 L 发酵罐放大培养,发酵 156 h (甲醇诱导 96 h), 木糖苷酶酶活为 222.2 U/mL, 蛋白含量 2.36 g/L, 较摇瓶提高了 4.3 倍。【结论】木糖苷酶在毕赤酵母中实现了高效表达, 具有较好的工业化应用前景。

关键词: 嗜热棉毛菌, β -木糖苷酶, 密码子优化, 发酵优化, 毕赤酵母

Foundation item: 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 Laboratory of Biomass-based Green Fuels and Chemicals (No. JSBGFC14006); Henan Provincial Sci-Tech open cooperation project (No. 162106000007)

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

Received: January 24, 2016; **Accepted:** March 28, 2016; **Published online** (www.cnki.net): May 04, 2016

基金项目: 国家自然科学基金项目(No. 21176106); 车用生物燃料技术国家重点实验室开放基金项目(No. KFKT2013010); 中国博士后科学基金项目(No. 2015M571666); 江苏省生物质绿色燃料与化学品重点实验室资助项目(No. JSBGFC14006); 河南省科技开放合作项目(No. 162106000007)

***通讯作者:** Tel/Fax: 86-510-85327026; E-mail: fubaosun@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-24; **接受日期:** 2016-03-28; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-05-04

Codon optimization of *Thermomyces lanuginosus* β -xylosidase Xyl43 and its overexpression in *Pichia pastoris*

ZHANG Yun-Bo^{1,2} BAI Ren-Hui^{1,2} WANG Chun-Di¹ ZHANG Fei-Yang³
YUE Chun⁴ ZHANG Zhen-Yu¹ SUN Fu-Bao^{1*}

(1. Laboratory of Industrial Biotechnology of Department of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. Jiangsu Key Laboratory of Biomass-based Green Fuels and Chemicals, College of Chemical Engineering, Nanjing Forestry University, Nanjing, Jiangsu 210037, China)

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

(4. Department of Biological and Chemical Engineering, Nanyang institute of Technology, Nanyang, Henan 473004, China)

Abstract: [Objective] We overexpressed β -xylosidase with heterologous expression by constructing a recombinant *Pichia pastoris*. [Methods] According to the codon usage frequency of highly expressed genes in *P. pastoris*, the *Thermomyces lanuginosus* β -xylosidase (Xyl43) gene was optimized and expressed in *P. pastoris* GS115, followed by characterization of Xyl43. Then, single factor experiments were used to optimize the fermentation conditions, in a 5-L fermenter. [Results] The optimized Xyl43 gene changed greatly with 78.17% of the sequence homology, and the GC content reduced from 52.8% to 44.6% with 222 bases substituted. The optimized gene was transplanted with an expression vector pPIC9K-OptXyl43 into *P. pastoris* GS115 to produce transformants. Then, a high xylosidase activity secreting recombinant *P. pastoris* GS115-Xyl43 was selected from the transformants on G-418 resistant plates, followed by shake flask cultivation. Basic enzyme properties of the recombinant xylosidase was analyzed as below: the protein molecular weight 51.5 kD, the optimal reaction temperature 55 °C, the optimum pH 7.0, and kinetic parameters $K_m=2.93$ mmol/L and $V_{max}=157.9$ μ mol/(min·mg). β -xylosidase fermentation was optimized in shake flask as follows: methanol supply 1% (each 24 h), shaking speed 250 r/min, incubation time 144 h, incubation temperature 28 °C and initial pH 6.0. Under the optimal condition, the extracellular enzyme activity reached 42 U/mL with a protein content of 0.54 g/L. Further, in a 5-L fermenter, *P. pastoris* GS115-Xyl43 achieved 222.2 U/mL of xylosidase at 156 h (methanol induction for 96 h), with protein concentration at 2.36 g/L, which was 4.3 fold more than that in the shake-flask fermentation. [Conclusion] β -xylosidase can be expressed in *P. pastoris* GS115 with high level production and can be used as a candidate in various industrial applications.

Keywords: *Thermomyces lanuginosus*, β -xylosidase, Codon optimization, Fermentation optimization, *Pichia pastoris*

β -木糖苷酶(β -D-xylosidase, EC3.2.1.37)是半纤维素降解酶系的关键组分之一,主要作用于低聚木糖末端,催化水解 β -木糖苷键,将木寡糖水解为木糖^[1]。据 Wongwisansri 报道^[2],木糖苷酶和木聚糖酶在木聚糖的水解过程中具有良好的协同水解作用,并已将其成功应用于乙醇的同步发酵过程。可见,木糖苷酶在天然木质纤维素原料高效水解中具有重要的地位。

木糖苷酶主要由细菌、丝状真菌和高等植物产

生。近年来,国内外报道了许多能分泌木糖苷酶的真菌,如嗜热拟青霉(*Paecilomyces thermophila*)、构巢曲霉(*Aspergillus nidulans*)、篮状嗜热链球菌(*Talaromyces thermophilus*)、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)等,其中以曲霉属(*Aspergillus*)和青霉属(*Penicillium*)较多^[3-5]。天然菌株分泌的木糖苷酶酶活通常较低,Lenartovicz等^[6]优化 *Aspergillus fumigatus* 产酶条件后,木糖苷酶酶活为 45 U/mL,是目前天然菌株产木糖苷酶的

最高水平。天然菌株分泌的酶成分复杂,增加了后续酶分离纯化的难度,从而限制了木糖苷酶的大规模生产与应用。于是,国内外研究者尝试外源表达来解决上述问题,已在原核(如大肠杆菌)和真核表达系统(如毕赤酵母)中实现了真菌木糖苷酶的表达^[7-9]。然而大肠杆菌所表达重组酶多为胞内酶且含量通常偏低,而且异源蛋白经大肠杆菌表达后收集过程繁琐^[10]。毕赤酵母作为表达宿主,具有表达量高、杂蛋白少和外源蛋白修饰等优点,有利于蛋白的正确折叠^[11-12]。此外,重组毕赤酵母菌产生的目的蛋白多为胞外蛋白且杂蛋白少,大大简化了粗酶液的分离纯化^[13]。可见,作为真核表达系统的毕赤酵母在酶蛋白外源表达方面具有明显优势。

嗜热棉毛菌(*Thermomyces lanuginosus*)木糖苷酶 Xyl43 具有较高木糖耐受性,在木聚糖水解过程中具有较大的应用前景^[7]。本文以该菌木糖苷酶 Xyl43 为研究对象,根据毕赤酵母密码子偏好性,优化了 β -木糖苷酶(Xyl43)基因,并构建毕赤酵母表达载体在 *P. pastoris* GS115 中实现分泌表达,分析重组木糖苷酶酶学性质并对重组毕赤酵母菌株摇瓶发酵条件进行了优化。另外,为获得高产量的木糖苷酶,在 5 L 发酵罐对重组毕赤酵母进行放大培养,为木糖苷酶的工业化生产和应用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

P. pastoris GS115、*E. coli* DH5 α 、pUCm-T、pPIC9K 均由本实验室保存。限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA Ladder Marker、蛋白 Marker 均购于大连 TaKaRa 公司;YNB、酵母提取物、蛋白胨、遗传霉素 G418 购自上海生工公司;对-硝基苯基- β -D-木糖苷(pNPX)和对-硝基苯酚(pNP)购于 Sigma 公司;LB、YPD、MD、BMMY 和 BSM 培养基(含 PTM1)按 Invitrogen 编著的 Multi-Copy Pichia Expression Kit 操作手册配制。

1.2 主要仪器

核酸电泳仪、PCR 仪,美国 Bio-Rad 公司;DYY-10C 型蛋白电泳仪,北京市六一仪器厂;蛋白

纯化仪 AKTATM Avant, GE Healthcare 公司;SW-CJ-ID 型单人超净工作台,苏州净化设备有限公司;HH-W600 数显素用恒温水箱,江苏金坛荣华仪器制造有限公司;UV-1100 紫外分光光度计,上海精密仪器仪表有限公司;HYG-A 全温摇瓶柜,江苏太仓市实验设备厂;5 L 发酵罐,上海万木春有限公司。

1.3 目的基因优化

木糖苷酶基因 Xyl43 (GenBank 登录号 HM123759.1)优化步骤如下:(1) 根据毕赤酵母密码子使用频率表,利用软件 Gene Designer 2.0 将木糖苷酶基因中低使用频率的密码子调整为高使用频率的密码子;(2) 调整基因中富含 AT 和 GC 的区域,使 GC 含量介于 40%–60%;(3) 检查其中的密码子和隐藏的酶切位点,适当使用次优密码子和消除一些不利的酶切位点;(4) 利用 RNAstructure 分析调整后的全长基因的二级结构和自由能,直到起始密码子端呈开环结构。优化后的木糖苷酶基因 5'端和 3'端分别加入 *EcoR* I、*Not* I 酶切位点,命名为 *OptXyl43*。将 *OptXyl43* 序列送往上海生工公司合成。合成的基因连到 pUCm-T 载体,即 pUCm-T-*OptXyl43*。

1.4 重组表达载体的构建

将质粒 pUCm-T-*OptXyl43* 与表达载体 pPIC9K 分别用 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切,用 0.8%的琼脂糖凝胶回收酶切后的目的基因 *OptXyl43* 和载体片段 pPIC9K,基因 *OptXyl43* 和载体 pPIC9K 连接后,经酶切鉴定(*Sac* I 单酶切、*EcoR* I 和 *Not* I 双酶切)获得表达质粒 pPIC9K-*OptXyl43*。

1.5 高产菌株的筛选及验证

(1) 菌株筛选:经 *Sac* I 线性化的 pPIC9K-*OptXyl43* 电击转化 *P. pastoris* GS115 感受态细胞(转化方法参考 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册),转化液涂布 MD 培养基平板,将板上阳性转化子点种在含不同浓度遗传霉素 G418 (1.0、2.0、4.0、6.0 g/L)的 YPD 培养基上,筛选出高拷贝转化子。将高拷贝转化子接于摇瓶中 30 °C、220 r/min 培养并测定发酵上清液中酶活,获得一株高产木糖苷酶的重组毕赤酵母菌株。

(2) 菌落 PCR 验证 :菌落 PCR 鉴定阳性转化子时,模板为高温裂解的菌液,引物为 AOX1 的通用引物(F :5'-CAACGTGAAAAAATTATTATTCGC-3'; R :5'-GCAAATGGCATTCTGACATCC-3'),反应条件 : 95 °C 10 min ; 95 °C 30 s ; 55 °C 30 s ; 72 °C 90 s , 共 30 个循环 ; 72 °C 10 min。所得产物利用 0.8%琼脂糖凝胶进行电泳分析。

1.6 木糖苷酶的诱导表达

将重组菌单菌落接入 30 mL YPD 培养基(250 mL 摇瓶)中,于 30 °C、220 r/min 振荡培养至菌体 $OD_{600}=5.0$,按 2% (体积比)接种量转接至装有 50 mL BMMY 培养基(500 mL 摇瓶)中,30 °C、220 r/min 继续振荡培养,每隔 24 h 加入纯甲醇进行诱导,其终浓度为 0.5% (体积比)。

1.7 菌体含量、酶活及蛋白含量测定

(1) 菌体密度(OD_{600})值测定 :将菌液稀释适当倍数后于分光光度计 600 nm 处以去离子水为空白测定吸光值。

(2) 酶活测定 :反应体系为 200 μ L,内含 10 μ L 20 mmol/L 对-硝基苯基- β -D-木糖苷(pNPX),185 μ L 50 mmol/L pH 6.5 磷酸盐缓冲液和 5 μ L 适当稀释的酶液,对照样中用 5 μ L 去离子水代替 5 μ L 酶液,于 50 °C 反应 10 min 后,加入 600 μ L 1 mol/L Na_2CO_3 溶液终止反应。分光光度计 410 nm 处以对照样为空白测定吸光度值,以对-硝基苯酚(pNP)作标准曲线计算酶活力。酶活力单位的定义 :在上述条件下,每分钟生成 1 μ mol pNP 所需要的酶量为 1 个酶活单位(U)。

(3) 蛋白含量测定 :用 Bradford 法^[14]测定蛋白质浓度,以牛血清蛋白作为标准蛋白绘制标准曲线。0.4 mL NaCl 溶液(0.15 mol/L)与 0.1 mL 适当稀释的酶液混合,加入 2.5 mL 考马斯亮蓝试剂后混匀,对照为 0.5 mL NaCl 溶液(0.15 mol/L)与 2.5 mL 考马斯亮蓝混合物,以对照样为空白在 595 nm 处测定样品吸光值,计算蛋白含量。

1.8 单因素摇瓶优化及上罐发酵

基于上述毕赤酵母培养方法,保持其它条件不变,种子液按 6%的接种量接种到发酵培养基 BMMY

中,每隔 24 h 向 BMMY 培养基中补加纯甲醇。通过单因素实验,分别对 BMMY 培养基初始 pH (4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)、甲醇补加量(0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%)、温度(24、26、28、30 °C)、摇床转速(100、190、220、250 r/min)进行优化,测定木糖苷酶活性,确定最佳诱导条件。

发酵罐(5 L)培养 :在摇瓶发酵条件基础上利用 5 L 发酵罐对重组菌进行放大培养。按 6%的接种量将培养 24 h 的种子培养液接种到 1.5 L 初始培养基中。菌体生长阶段温度为 30 °C, pH 6.0,通气量维持在 25%以上,待初始培养基中甘油耗尽,即 DO 值迅速升高时,以 12 mL/(h·L)的速度补加 50%甘油(含 12 mL/L PTM1),菌体 OD_{600} 达到一定量时停止补加甘油,饥饿处理 2 h 后补加甲醇诱导产酶。甲醇诱导阶段温度为 28 °C, pH 6.0,转速与溶氧关联,溶氧 DO 值维持 25%左右,甲醇(含 12 mL/L PTM1)流加速度 6 mL/(h·L)。开始甲醇诱导后每隔 12 h 取样并分析表达产物。

1.9 木糖苷酶的纯化和 SDS-PAGE 分析

高产菌在上述诱导条件下培养 144 h,发酵液在 6 000 r/min 离心 5 min 后,取上清液 100 mL,在 0 °C 条件下加入硫酸铵(饱和度 60%)。将沉淀的蛋白用 pH 6.5 的磷酸盐缓冲液复溶,上样凝胶色谱 Sephadex G-75 分离蛋白,以峰收集方式收集洗脱组分,每管收集 1 mL。根据 A_{280} 值将处于同一吸收峰的样品合并,并测定合并样品的酶活。具体方法见文献[15],纯化后的蛋白用 12% SDS-PAGE 电泳分析。

1.10 酶学性质分析

酶的最适作用温度和 pH 以及热稳定性和 pH 稳定性测定参照文献[16]。

底物特异性测定 :以榉木木聚糖(Beechwood xylan)、微晶纤维素(Avicel)、羧甲基纤维素(CMC)和水杨苷(D-salicin)为底物分别测定木糖苷酶的比酶活,方法参照文献[17],所用的缓冲液均为 pH 6.5 的磷酸盐缓冲液。比酶活(U/mg)=酶活/蛋白含量。

1.11 木糖苷酶动力学参数的测定

在酶促反应的最适条件下,以浓度分别为 1–8 mmol/L 的 pNPX 为底物,55 °C 反应时间 10 min,

测定酶活，计算出相应的反应速度，利用软件 GraphPad Prism 5 拟合分析，确定 K_m 和 V_{max} 值。

2 结果与分析

2.1 木糖苷酶基因的优化

为了使目的基因在毕赤酵母中更好地表达，常需要对目的基因密码子进行优化^[18]。对比木糖苷酶基因密码子和毕赤酵母密码子使用频率表(表 1)，发现密码子 GCG (Ala)、GTC (Leu)、CCG (Pro)、CGC

(Arg)、TCG (Ser)和 ACG (Thr)在毕赤酵母中使用频率低于 11%，而在天然的 *Xyl43* 基因中，这些密码子频率有的高达 40%，可能导致木糖苷酶在毕赤酵母中难以表达。于是，在保持氨基酸序列不发生改变的前提下，通过优化密码偏好性、调整 mRNA 二级结构及降低 GC 含量完成对目的基因优化。木糖苷酶基因全长 1 017 bp，编码 339 个氨基酸，优化后的基因序列中 222 个碱基发生改变，序列同源性为 78.17%。

表 1 Xyl43 基因优化前后密码子使用频率表									
Table 1 Codon usage of native and optimized Xyl43 gene in <i>P. pastoris</i>									
氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	毕赤酵母 <i>Pichia Kazusa</i> (%)	天然基因 Nat. <i>Xyl43</i> (%)	优化的基因 Opt. <i>Xyl43</i> (%)	氨基酸 Amino acid	密码子 Codon	毕赤酵母 <i>Pichia Kazusa</i> (%)	天然基因 Nat. <i>Xyl43</i> (%)	优化的基因 Opt. <i>Xyl43</i> (%)
Ala	GCA	23.4	26.1	0	Pro	CCA	41.6	26.7	90.0
	GCT	44.8	26.1	78.3		CCT	34.8	20.0	10.0
	GCG	6.1	17.4	0		CCG	8.6	36.6	0
	GCC	25.7	30.4	21.7		CCC	15.0	16.7	0
Cys	TGT	82.0	0	100	Gln	CAA	60.9	41.7	91.7
	TGC	18.0	100	0		CAG	39.1	58.3	8.3
Asp	GAT	58.0	53.3	53.3	Arg	AGA	48.0	21.4	85.7
	GAC	42.0	46.7	46.7		AGG	15.8	14.3	0
Glu	GAA	56.3	47.1	76.5	CGA	CGA	10.0	7.1	0
	GAG	43.7	52.9	23.5		CGT	16.5	7.1	14.3
Phe	TTT	53.9	42.9	14.3		CGG	4.5	7.1	0
	TTC	46.1	57.1	85.7		CGC	5.3	43.0	0
Gly	GGA	32.7	32.1	3.6	Ser	AGT	15.0	9.5	0
	GGT	43.6	32.1	96.4		AGC	9.1	23.8	0
	GGG	9.9	7.1	0		TCA	18.2	0	0
	GGC	13.9	28.6	0		TCT	29.2	4.8	85.7
His	CAT	56.5	73.3	53.3	Thr	TCG	8.9	38.1	0
	CAC	43.5	26.7	46.7		TCC	19.7	23.8	14.3
Ile	ATA	18.0	0	0		ACA	24.3	25.0	0
	ATT	50.5	58.8	88.2		ACT	39.5	8.4	66.7
	ATC	31.5	41.2	11.8	Val	ACG	10.6	33.3	0
Lys	AAA	46.9	37.5	0		ACC	25.6	33.3	33.3
	AAG	53.1	62.5	100		GTA	15.5	5.0	0
Leu	TTA	16.2	0	0		GTT	42.0	20.0	80.0
	TTG	32.7	18.2	95.5	Tyr	GTG	19.2	50.0	0
	CTA	11.1	0	0		GTC	23.3	25.0	20.0
	CTT	16.5	40.9	4.5		TAT	46.9	31.8	0
	CTG	15.5	18.2	0	Stop	TAC	53.1	68.2	100
Trp	CTC	7.9	22.7	0		TAA	50.0	0	100
	TGG	100	100	100		TAG	31.2	100	0
Met	ATG	100	100	100	TGA	TGA	18.8	0	0
	AAT	48.5	33.3	0					
Asn	AAC	51.5	66.7	100					

注: *Pichia Kazusa* 表示来源于网站 <http://www.kazusa.or.jp/codon> 的毕赤酵母密码子偏好性表。

Note: *Pichia Kazusa*: The codon usage frequency of *P. pastoris*, from <http://www.kazusa.or.jp/codon>.

基因序列 G+C 含量直接影响 PCR 退火温度, 也影响 mRNA 热力学稳定性及 mRNA 二级结构^[19]。木糖苷酶基因优化后二级结构的起始密码子端序列有 13 个碱基呈开环结构(图略), 据报道^[20]这种结构利于基因在毕赤酵母中转录和翻译。另外, 优化后基因序列中不含隐藏的酶切位点(*EcoR* I、*Not* I、*Sac* I 和 *Sal* I 等), G+C 含量由 52.8%降低到 44.6%, 与毕赤酵母表达手册要求的外源基因 G+C 含量(40%–50%)相一致, 为目的基因在毕赤酵母中成功表达提供了保障。

2.2 表达载体 pPIC9K-OptXyl43 的构建

连接目的基因 *OptXyl43* 和载体片段 pPIC9K, 连接后的 pPIC9K-OptXyl43 用 *Sac* I 单酶切, *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切验证, 凝胶电泳如图 1 所示。原质粒 pPIC9K 大小约 9 300 bp, 构建的载体为 13 000 bp 左右, 明显大于原质粒, 表明木糖苷酶基因已成功连接到质粒 pPIC9K 上, 基因测序也进一步验证了其正确性。

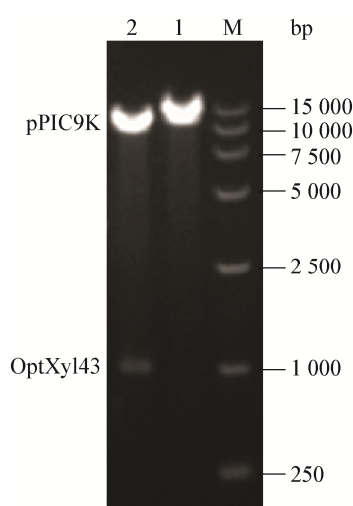


图 1 重组质粒 pPIC9K-OptXyl43 的酶切验证

Figure 1 Analysis of pPIC9K-OptXyl43 digested by *Sac* I and *EcoR* I/*Not* I

注: M: DL15000 marker; 1: *Sac* I 单酶切 pPIC9K-OptXyl43; 2: *EcoR* I/*Not* I 双酶切 pPIC9K-OptXyl43.

Note: M: DL15000 marker; 1: Digestion of pPIC9K-OptXyl43 by *Sac* I; 2: Digestion of pPIC9K-OptXyl43 by *EcoR* I and *Not* I.

2.3 重组毕赤酵母的构建及筛选

表达载体 pPIC9K-OptXyl43 经 *Sac* I 线性化后通过电击转化导入 *P. pastoris* GS115 感受态细胞, 其转化液涂布在 30 °C 的 MD 培养基上培养 72 h, 共获得 83 株转化子。转化子点到 6 g/L 的 G418 抗性 YPD 平板上培养 72 h 左右, 挑取菌落, 最终获得 19 株能生长的转化子。以 *P. pastoris* GS115 为对照, 对 19 株转化子进行菌落 PCR, 用 AOX1 的通用引物扩增, 结果如图 2 所示。对照菌扩增产物中只有一条约 2 200 bp 条带(野生型 AOX1 基因); 挑选出的 19 株转化子的扩增产物中均有两条带, 其中一条带和宿主菌(*P. pastoris* GS115)扩增产物一致, 另一条带约 1 500 bp, 即目的基因(1 017 bp)和 AOX1 部分序列(Flanking Aox1, 492 bp)之和。该结果表明线性化质粒 pPIC9K-OptXyl43 已成功整合到 *P. pastoris* GS115 基因组上。

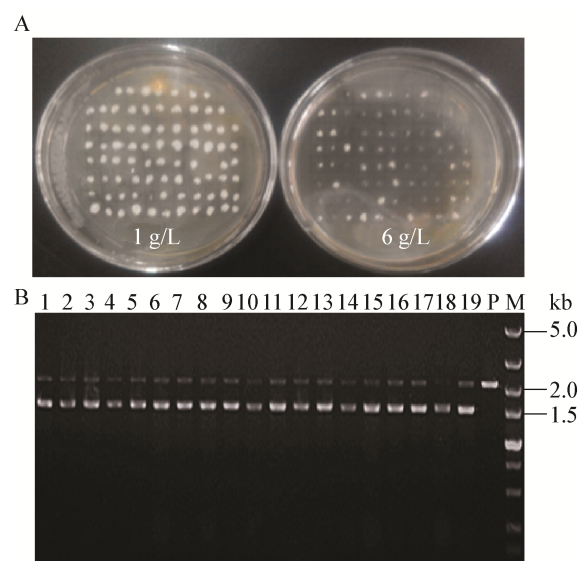


图 2 高产 Xyl43 菌株的 PCR 验证

Figure 2 PCR amplification analysis of high-yield Xyl43 transformants

注: M: DL5000 marker; P: 毕赤酵母 GS115; 1–19: 19 株 pPIC9K-OptXyl43 转化子。

Note: M: DL5000 marker; P: *P. pastoris* GS115; 1–19: Nineteen pPIC9K-OptXyl43 transformants.

为获得高产菌,将上述平板筛选到的 19 株转化子接至摇瓶发酵培养基进行复筛。如图 3 所示,这 19 株菌摇瓶培养 144 h 均能产生木糖苷酶,其中 8 号菌株产酶最高(14.2 U/mL)。对 8 号菌株进一步培养发现,该菌培养至 144 h 达到最高产酶水平。因此,实验中选择 8 号重组菌株作为后续研究对象,命名为 *P. pastoris* GS115-Xyl43,该菌最适发酵时间为 144 h。

2.4 木糖苷酶分离纯化及酶学性质分析

发酵上清液中重组木糖苷酶(ReXyl43)的分离纯化主要采用硫酸铵(饱和度 60%)沉淀蛋白,通过磷酸盐缓冲液(pH 6.5)复溶蛋白并经凝胶柱 Sephadex G-75 分离,最终获得木糖苷酶。纯化后木糖苷酶的比酶活由纯化前 78 U/mg 提高到 125 U/mg,样品的 SDS-PAGE 电泳图谱如图 4 所示。纯化前后样品均在 44.3 kD 附近出现一条明显条带。Chen 等^[7]对该木糖苷酶开展了相似工作,并确认该条带对应的是木糖苷酶,其分子量大小约为 51.5 kD。SDS-PAGE 分析表明,纯化后的重组木糖苷酶可用于后续酶学性质分析。

酶学性质分析如表 2 所示。经测定(图略),该

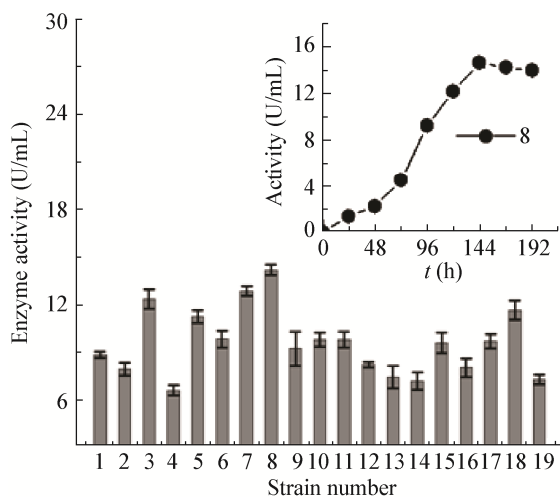


图 3 高产木糖苷酶重组毕赤酵母的摇瓶筛选

Figure 3 Screening of high-yield xylosidase recombinant *P. pastoris* at shake flask fermentation

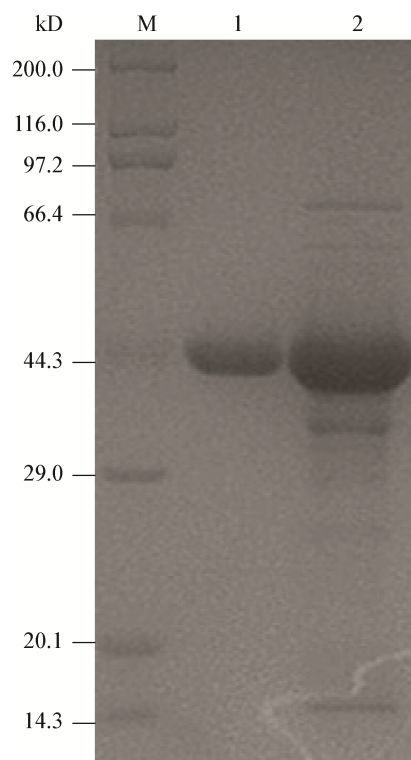


图 4 纯化前后重组木糖苷酶的 SDS-PAGE

Figure 4 SDS-PAGE analysis of the ReXyl43 enzyme before (1) and after (2) the purification.

注: M: Marker; 1: 粗酶液; 2: 纯化后木糖苷酶。

Note: M: Protein marker; 1: Crude xylosidase; 2: Purified xylosidase.

重组木糖苷酶最适作用温度为 55 °C, 重组木糖苷酶在不超过 55 °C 条件下热稳定良好, 在此温度下保温 60 min 相对酶活还能保持 95% 以上。该酶作用的最适 pH 为 7.0, 在 pH 6.0–9.5 条件下稳定性较好, 其相对酶活能保持 80% 以上, 比其天然基因在大肠杆菌中表达(pH 7.0–9.5 范围 80% 以上)具有更宽泛的 pH 适应性^[7]。底物特异性显示, 该木糖苷酶不能水解微晶纤维素、羧甲基纤维素和水杨苷等纤维素类标准底物; 对榉木木聚糖有明显水解, 比酶活达到 3.8 U/mg, 最适于水解 pNPX 木糖苷键, 比酶活可达 120 U/mg 以上。另外, 以不同浓度 pNPX 为底物在最适反应条件(55 °C, pH 7.0)下测定酶活, 并通过软件拟合得该重组酶 K_m 和 V_{max} 值分别为 2.93 mmol/L 和 157.9 μ mol/(min·mg)。

表 2 不同木糖苷酶酶学性质和表达产量比较
Table 2 Comparison of the enzyme property and production of different xylosidases

微生物 Microorganisms	表达宿主 Host	重组木糖苷酶基本酶学性质 Recombinant xylosidase basic enzyme properties					产量 Yield (U/mL)	参考文献 Reference
		Mw (kD)	Temperature (°C)	pH	K_m (mmol/L)	V_{max} ($\mu\text{mol}/(\text{min}\cdot\text{mg})$)		
<i>A. fumigatus</i>	—	—	70	—	—	—	45 ^a	Lenartovicz ^[6]
<i>P. thermophila</i>	—	—	—	—	—	—	3.2 ^a	Wang ^[5]
<i>P. thermophila</i>	<i>E. coli</i>	—	—	—	—	—	103.9 ^a /392.5 ^b	Chen ^[21]
<i>P. thermophila</i>	<i>E. coli</i>	52.3	55	7.0	4.50	90.2	98.0 ^a	Teng ^[22]
<i>C. owensensis</i>	<i>E. coli</i>	55.0	75	5.0	1.60	3 930.0	—	Mi ^[23]
<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	61.4	35	7.0	—	—	0.4 ^a	Banka ^[24]
<i>A. japonicus</i>	<i>P. pastoris</i>	113.2	70	4.0	0.31	114.0	0.3 ^a	Wakiyama ^[25]
<i>P. chrysosporium</i>	<i>P. pastoris</i>	83.0	45	5.0	—	—	26.1 ^a	Huy ^[26]
<i>H. insolens</i>	<i>P. pastoris</i>	83.2	60	6.0	2.51	37.3	8.1 ^c	Xia ^[27]
<i>A. niger</i>	<i>P. pastoris</i>	84.5	70	4.0	0.66	—	4.6 ^a	Choengpanya ^[28]
<i>T. lanuginosus</i>	<i>E. coli</i>	51.5	55	6.5	3.90	107.6	37.3 ^a	Chen ^[7]
<i>T. lanuginosus</i>	<i>P. pastoris</i>	51.5	55	7.0	2.93	157.9	42.0 ^a /222.2 ^b	This work

注：Mw：分子量；T：最适温度；pH：最适 pH。a：摇瓶水平；b：发酵罐水平；c：摇瓶纯化；—：未显示。

Note: Mw: Molecular weight; T: Optimal temperature; pH: Optimum pH. a: Shake-flask level; b: Fermenter level; c: Shake-flask broth purification level; —: Not show.

与其天然基因的大肠杆菌表达结果^[7]相比,该重组木糖苷酶(ReXyl43)的最适反应 pH、米氏常数和最大反应速度分别发生改变(表 2),推测原因可能是因为毕赤酵母的后修饰作用使木糖苷酶结构发生变化,最终影响了其酶学性质。该木糖苷酶经毕赤酵母表达后,其米氏常数明显变小,表明 ReXyl43 的底物亲和力增强,更易于结合底物;最大反应速度略有提升,有助于酶反应效率的提高,因此该酶在未来木聚糖类基质高效水解方面具有潜在的应用价值。

2.5 摇瓶发酵产木糖苷酶的条件优化

为提高木糖苷酶的表达水平,对重组菌的主要发酵条件(发酵培养基初始 pH 值、甲醇补加量、培养温度和培养转速)进行优化,结果如图 5 所示。当发酵培养基 BMMY 初始 pH 值较低时(图 5A),随着初始 pH 值增加,重组菌生物量和木糖苷酶活性均明显提高,在初始 pH 6.0 时二者均达到最高水平,此后进一步增加 pH 值,菌体生物量和木糖苷酶表达量均显著下降。

诱导型表达载体含有 AOX1 启动子,添加适量甲醇能有效促进重组菌产酶能力^[29]。在培养基初始 pH 6.0 时考察甲醇补加量对重组菌生长和产

酶的影响(图 5B)。结果显示,随着甲醇添加量提高,重组菌生物量呈现先增加再降低趋势,在 1.5% 甲醇添加量时生物量达到最高水平;而重组菌在 1.0% 甲醇诱导量时达到较高产酶水平。过多甲醇用量(如甲醇补加量为 2.5% 时)可能对菌体产生一定的毒害作用,不利于木糖苷酶表达^[30]。

在上述最佳条件下,优化 *P. pastoris* GS115-Xyl43 的培养温度(图 5C)。结果发现,培养温度对重组菌生物量影响较小,但对木糖苷酶表达量影响显著,木糖苷酶酶活在 28 °C 时达到最高水平(38.05 U/mL)。

增加溶氧可以明显提高重组毕赤酵母的生物量和产酶能力^[30]。通过调节发酵摇床转速来控制溶氧(图 5D),摇床转速从 100 r/min 增加到 250 r/min 时重组毕赤酵母生物量和木糖苷酶表达量都明显增加,分别从 100 r/min 时 OD_{600} 为 12.78 和 14.46 U/mL 增加到 OD_{600} 为 29.59 和 42 U/mL。因此, *P. pastoris* GS115-Xyl43 在摇瓶中发酵 144 h 时的最佳产酶条件为: BMMY 培养基初始 pH 6.0、甲醇补加量 1.0%、温度 28 °C 和摇床转速 250 r/min。该条件下,木糖苷酶的酶活达到 42 U/mL,蛋白含量为 0.54 g/L。

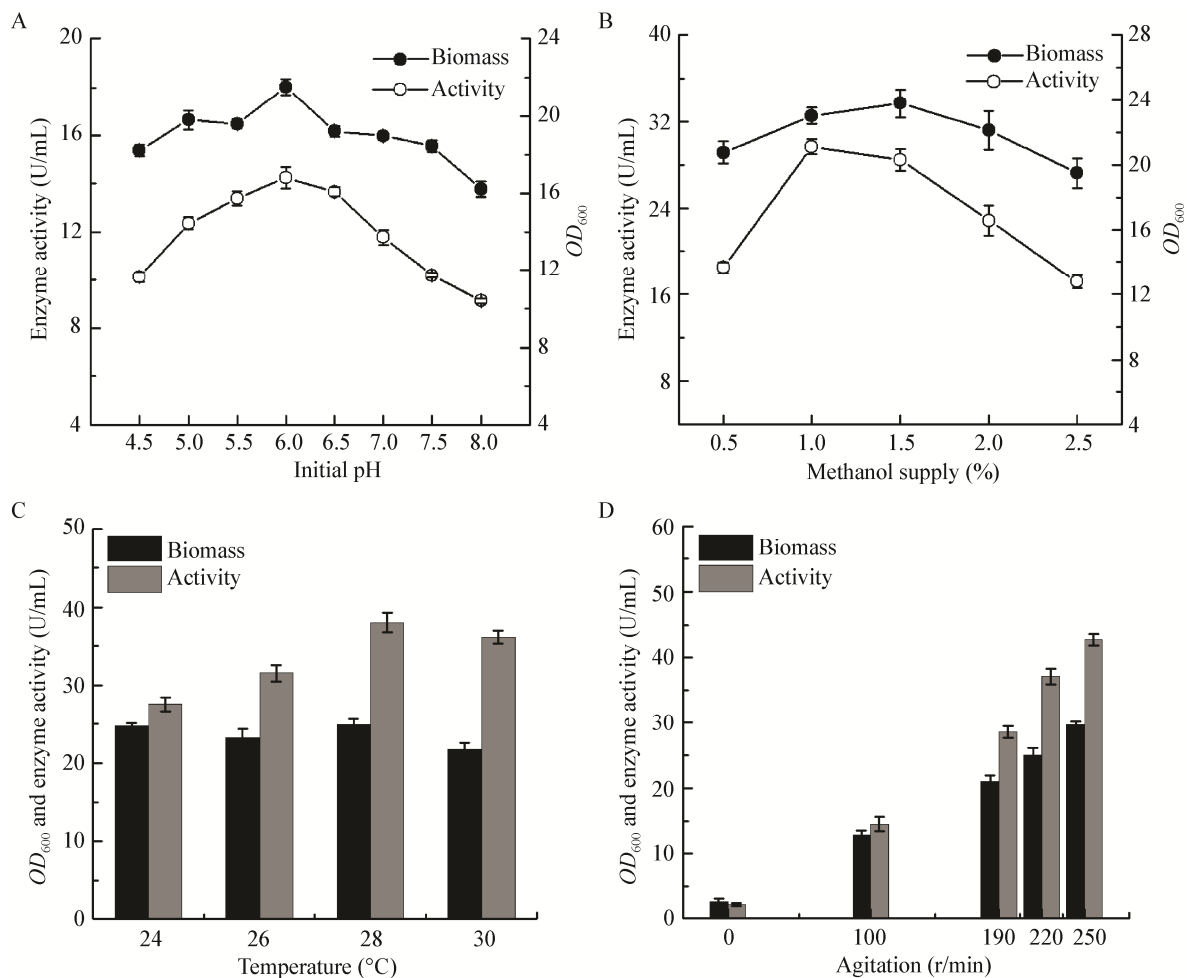
图 5 重组菌 *P. pastoris* GS115-Xyl43 发酵(144 h)关键参数的选择

Figure 5 Selection of some key variables for the xylosidase fermentation (144 h) at BMMY medium

注：培养基初始 pH (A)、甲醇补加量(B)、培养温度(C)和培养转速(D).

Note: Initial pH (A), methanol supply (B), culture temperature (C) and agitation (D).

2.6 重组木糖苷酶的上罐发酵

重组菌 *P. pastoris* GS115-Xyl43 在 5 L 发酵罐的放大培养,结果如图 6 所示。在菌体生长阶段(如图 6A),当溶氧 DO 值在 20 h 迅速上升(培养基甘油耗尽)时以恒速补加甘油,使菌体生长至 OD_{600} 为 280 左右,此时停止补加甘油,饥饿培养 2 h 后开始甲醇诱导。在甲醇诱导阶段,通过控制 DO 值来流加甲醇以高效诱导重组毕赤酵母产酶,同时可避免过高的甲醇对菌体产生毒害作用,甲醇流加 [6 mL/(h·L)]与 DO 偶联,即 DO 值高于 25%时补加甲醇,维持 DO 在 25%左右。

发酵结果如图 6B 所示,在 5 L 发酵罐中重组

菌在甘油补料阶段生长速度很快,在甘油耗尽时(60 h)生物量 OD_{600} 已近 280;此时添加甲醇进行诱导,细胞生长繁殖放缓,但菌体量仍持续增加,直至发酵后期时生物量 OD_{600} 接近 400。随着甲醇添加,木糖苷酶酶活不断提升,156 h (甲醇诱导 96 h)时酶活达到 222.2 U/mL。同时发酵上清液蛋白总量达到 2.36 g/L。此外,对不同时间点的发酵上清液进行 SDS-PAGE 电泳分析(图 6B),结果显示各上清液在 SDS-PAGE 图中有一条清晰条带,该条带随发酵时间增加而变得浓重清晰,表明发酵上清液中木糖苷酶含量随着发酵时间增加而显著提高,与酶活增长趋势保持一致。

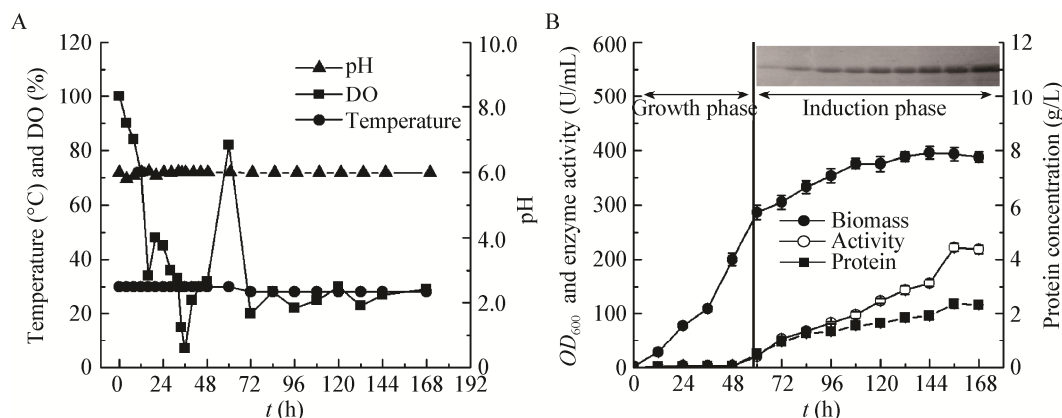


图6 上罐发酵实验

Figure 6 ReXyl43 fermentation in a 5 L bioreactor

注：A：5 L 发酵罐过程控制；B：上罐发酵结果(含 60–156 h 上清液酶蛋白 SDS-PAGE)。

Note: A: Process control of the bioreactor (5 L); B: Results of the ReXyl43 fermentation, containing SDS-PAGE of the ReXyl43 protein at fermentation (60–156 h) supernatant.

近年来国内外研究者开展了不少关于木糖苷酶发酵的工作(表 2)。其中, Lenartovicz 等^[6]进行天然烟曲霉发酵 72 h 时木糖苷酶活达到 45 U/mL, 是截止目前天然菌株发酵产木糖苷酶的最高水平。江正强课题组在国内较早开展了木糖苷酶研究, 对 *P. thermophila* J18 发酵培养 120 h 酶活仅为 3.2 U/mL; 将该菌木糖苷酶在大肠杆菌中表达, 摇瓶发酵 48 h 酶活达到 104 U/mL, 进一步上罐发酵酶活近 400 U/mL, 达到目前报道的较高水平^[5,21]。另外, 该课题组也尝试了天然 *T. lanuginosus* 木糖苷酶 Xyl43 在大肠杆菌中克隆表达, 发酵 60 h 胞外酶活达到 37 U/mL^[7]。与这些报道相比, 本文在毕赤酵母中实现了木糖苷酶高分泌表达 (220 U/mL)。

3 结论

本研究利用毕赤酵母表达系统实现了嗜热棉毛菌 β -木糖苷酶(Xyl43)的分泌表达, 通过分析影响表达量的关键因素, 对这些因素进行了优化, 如 β -木糖苷酶基因密码子和摇瓶发酵条件等, 在最佳培养条件下木糖苷酶酶活在摇瓶水平达到 42 U/mL。进一步在 5 L 发酵罐中对重组毕赤酵母放大培养, 木糖苷酶酶活高达 220 U/mL, 相应蛋

白含量为 2.36 g/L, 为木糖苷酶的工业化生产和应用奠定了良好的基础。

参考文献

- [1] Rasmussen LE, Sørensen HR, Vind J, et al. Mode of action and properties of the β -xylosidases from *Talaromyces emersonii* and *Trichoderma reesei*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2006, 94(5): 869-876
- [2] Wongwisansri S, Promdonkoy P, Matetaviparee P, et al. High-level production of thermotolerant β -xylosidase of *Aspergillus* sp. BCC125 in *Pichia pastoris*: characterization and its application in ethanol production[J]. Bioresource Technology, 2013, 132: 410-413
- [3] Fan YY, Li XT, Teng C. Research progress on β -xylosidases from microorganism[J]. Food Research and Development, 2013, 34(12): 116-121 (in Chinese)
- [4] 范园园, 李秀婷, 滕超. 微生物产 β -木糖苷酶的研究进展[J]. 食品研究与开发, 2013, 34(12): 116-121
- [5] Lagaert S, Pollet A, Courtin CM, et al. β -xylosidases and α -L-arabinofuranosidases: accessory enzymes for arabinoxylan degradation[J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(2): 316-332
- [6] Wang L, Jiang ZQ, Yang SQ. Optimization of β -xylosidase Production by *Paecilomyces thermophila* J18 in Liquid State Fermentation[J]. Microbiology China, 2007, 34(3): 519-523 (in Chinese)
- [7] 王岚, 江正强, 杨绍青. 嗜热拟青霉产胞外木糖苷酶发酵条件的优化[J]. 微生物学通报, 2007, 34(3): 519-523
- [8] Lenartovicz V, de Souza CGM, Moreira FG, et al. Temperature and carbon source affect the production and secretion of a thermostable β -xylosidase by *Aspergillus fumigatus*[J]. Process Biochemistry, 2003, 38(12): 1775-1780
- [9] Chen Z, Jia H, Yang Y, et al. Secretory expression of a β -xylosidase gene from *Thermomyces lanuginosus* in *Escherichia coli* and characterization of its recombinant enzyme[J]. Letters in Applied Microbiology, 2012, 55(5): 330-337
- [10] Juturu V, Wu JC. Heterologous expression of β -xylosidase gene from *Paecilomyces thermophila* in *Pichia pastoris*[J]. World

- Journal of Microbiology & Biotechnology, 2013, 29(2): 249-255
- [9] Kirikyali N, Wood J, Connerton IF. Characterisation of a recombinant β -xylosidase (xylA) from *Aspergillus oryzae* expressed in *Pichia pastoris*[J]. AMB Express, 2014, 4: 68
- [10] Zelena K, Eisele N, Berger RG. *Escherichia coli* as a production host for novel enzymes from basidiomycota[J]. Biotechnology Advances, 2014, 32(8): 1382-1395
- [11] Potvin G, Ahmad A, Zhang ZS. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: A review[J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 64: 91-105
- [12] Cereghino GPL, Cregg JM. Applications of yeast in biotechnology: protein production and genetic analysis[J]. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10(5): 422-427
- [13] Chiruvolu V, Cregg JM, Meagher MM. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fedbatch fermentations[J]. Enzyme and Microbial Technology, 1997, 21(4): 277-283
- [14] Kruger NJ. The bradford method for protein quantitation[A] // Walker JM. Basic Protein and Peptide Protocols[M]. New York: Humana Press, 1994, 32: 9-15
- [15] Zhang HM, Wang JQ, Wu MC, et al. Optimized expression, purification and characterization of a family 11 xylanase (AuXyn11A) from *Aspergillus usamii* E001 in *Pichia pastoris*[J]. Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014, 94(4): 699-706
- [16] Gruninger RJ, Gong X, Forster RJ, et al. Biochemical and kinetic characterization of the multifunctional β -glucosidase/ β -xylosidase/ α -arabinosidase, Bgxa1[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(7): 3003-3012
- [17] Kumar AK, Parikh BS. Cellulose-degrading enzymes from *Aspergillus terreus* D34 and enzymatic saccharification of mild-alkali and dilute-acid pretreated lignocellulosic biomass residues[J]. Bioresources and Bioprocessing, 2015, 2(1): 1-13
- [18] Mellitzer A, Weis R, Glieder A, et al. Expression of lignocellulolytic enzymes in *Pichia pastoris*[J]. Microbial Cell Factories, 2012, 11(1): 1-11
- [19] Knight RD, Freeland SJ, Landweber LF. A simple model based on mutation and selection explains trends in codon and amino-acid usage and GC composition within and across genomes[J]. Genome Biology, 2001, 2(4): 1-13
- [20] Hasegawa M, Yasunaga T, Miyata T. Secondary structure of MS2 phage RNA and bias in code word usage[J]. Nucleic Acids Research, 1979, 7(7): 2073-2079
- [21] Chen Z, Jia HY, Yan QJ, et al. Optimization of fermentation conditions of recombinant β -xylosidase extracellularly expressed in *E. coli*[J]. Microbiology China, 2013, 40(2): 212-219 (in Chinese)
- 陈洲, 贾会勇, 闫巧娟, 等. 重组大肠杆菌高效分泌表达 β -木糖苷酶发酵条件的优化[J]. 微生物学通报, 2013, 40(2): 212-219
- [22] Teng C, Jia HY, Yan QJ, et al. High-level expression of extracellular secretion of a β -xylosidase gene from *Paecilomyces thermophila* in *Escherichia coli*[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 1822-1830
- [23] Mi SF, Jia XJ, Wang JZ, et al. Biochemical characterization of two thermostable xylanolytic enzymes encoded by a gene cluster of *Caldicellulosiruptor owensensis*[J]. PLoS One, 2014, 9(8): e105264
- [24] Banka AL, Guralp SA, Gulari E. Secretory expression and characterization of two hemicellulases, xylanase, and β -xylosidase, isolated from *Bacillus subtilis* M015[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 174(8): 2702-2710
- [25] Wakiyama M, Yoshihara K, Hayashi S, et al. Purification and properties of an extracellular β -xylosidase from *Aspergillus japonicus* and sequence analysis of the encoding gene[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2008, 106(4): 398-404
- [26] Huy ND, Thayumanavan P, Kwon TH, et al. Characterization of a recombinant bifunctional xylosidase/arabinofuranosidase from *Phanerochaete chrysosporium*[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2013, 116(2): 152-159
- [27] Xia W, Shi PJ, Xu XX, et al. High level expression of a novel family 3 neutral β -xylosidase from *Humicola insolens* Y1 with high tolerance to D-xylose[J]. PLoS One, 2015, 10(2): e0117578
- [28] Choengpanya K, Arthornthurasuk S, Wattana-amorn P, et al. Cloning, expression and characterization of β -xylosidase from *Aspergillus niger* ASKU28[J]. Protein Expression and Purification, 2015, 115: 132-140
- [29] Katakura Y, Zhang WH, Zhuang GQ, et al. Effect of methanol concentration on the production of human β_2 -glycoprotein / domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor Gas Sensor[J]. Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 86(5): 482-487
- [30] Moukoulis M, Topakas E, Christakopoulos P. Cloning and optimized expression of a GH-11 xylanase from *Fusarium oxysporum* in *Pichia pastoris*[J]. New Biotechnology, 2011, 28(4): 369-374