

研究报告

黑曲霉阿魏酸酯酶在毕赤酵母中的组成型表达

黄雪月^{1,2} 张梁^{1,2*} 李赢^{1,2} 李由然^{1,2} 顾正华^{1,2} 丁重阳^{1,2} 石贵阳^{1,2}

(1. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室 江苏 无锡 214122)

(2. 江南大学生物工程学院 江苏 无锡 214122)

摘要:【目的】实现黑曲霉来源的阿魏酸酯酶在毕赤酵母(*Pichia pastoris* GS115)中的组成型表达。【方法】以黑曲霉(*Aspergillus niger*)基因组为模板,经重叠延伸 PCR 扩增得到阿魏酸酯酶基因(*AnfaeA*),将其与载体 pGAP9K 相连,构建重组表达载体 pGAP9K*AnfaeA*,经 *Sal* I 线性化后电转入毕赤酵母 GS115 中,得到重组菌株。高效液相色谱法测定发酵液中阿魏酸酯酶活力,并对重组菌进行了发酵优化。【结果】克隆得到 783 bp 的阿魏酸酯酶编码基因并实现了其在毕赤酵母中的组成型表达。重组菌发酵 84 h 后,上清液中酶活达 5.72 ± 0.10 U/mL。重组酶(re*AnfaeA*)经分离纯化后比酶活为 59.75 U/mg,大小约为 40 kD。发酵优化结果为:葡萄糖 40.0 g/L,蛋白胨 10.0 g/L,酵母膏 30.0 g/L, CaCO_3 0.2 g/L,种龄 28 h,接种量 3% (体积比),装液量 50 mL/250 mL。在此条件下发酵培养,酶活达 15.60 ± 0.23 U/mL。【结论】阿魏酸酯酶在毕赤酵母中的组成型表达,对研究毕赤酵母组成型表达系统和阿魏酸酯酶的发酵生产具有一定的借鉴意义。

关键词: 黑曲霉, 阿魏酸酯酶, GAP 启动子, 组成型表达, 发酵优化

Constitutive expression of feruloyl esterase from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris*

HUANG Xue-Yue^{1,2} ZHANG Liang^{1,2*} LI Ying^{1,2} LI You-Ran^{1,2} GU Zheng-Hua^{1,2}
DING Zhong-Yang^{1,2} SHI Gui-Yang^{1,2}

(1. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

(2. College of Biological Engineering, Jiangnan University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] This study is aimed to constitutively express feruloyl esterase gene (*AnfaeA*) from *Aspergillus niger* in *Pichia pastoris* GS115. [Methods] The *AnfaeA* gene was amplified from *A. niger* by overlap extension PCR and cloned into the expression vector pGAP9K. The recombinant expression vector (pGAP9K*AnfaeA*) was linearized by *Sal* I, then transformed into *P. pastoris* GS115. Feruloyl esterase activity of the recombinant strain was determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) and we optimized the fermentation conditions. [Results] We cloned

Foundation item: National High-Tech Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2011AA100905)

***Corresponding author:** Tel: 86-510-85918235; E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn

Received: January 08, 2016; **Accepted:** March 30, 2016; **Published online** (www.cnki.net): April 18, 2016

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(863 计划) (No. 2011AA100905)

***通讯作者:** Tel: 86-510-85918235; E-mail: zhangl@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2016-01-08; **接受日期:** 2016-03-30; **优先数字出版日期**(www.cnki.net): 2016-04-18

AnfaeA gene (783 bp) and constitutively expressed *AnfaeA* gene in *P. pastoris* GS115. Feruloyl esterase activity reached its peak (5.72 ± 0.10 U/mL) after 84 h fermentation, its specific activity was 59.75 U/mg, and the molecular weight of reAnfaeA was about 40 kD. The optimal fermentation conditions were as follows: glucose 40.0 g/L, tryptone 10.0 g/L, yeast extract 30.0 g/L, CaCO_3 0.2 g/L, inoculum age 28 hours, inoculation level 3% (*V/V*), medium volume 50 mL in 250 mL flask. Under these conditions, feruloyl esterase activity in fermentation supernatant was 15.60 ± 0.23 U/mL. **[Conclusion]** We constitutively expressed feruloyl esterase in *P. pastoris* GS115. It was helpful to study the constitutive expression system in *P. pastoris* and improve the fermentation production of feruloyl esterase.

Keywords: *Aspergillus niger*, Feruloyl esterase, GAP promoter, Constitutive expression, Fermentation optimization

阿魏酸酯酶(E.C 3.1.1.73, 又称为肉桂酸酯酶、肉桂酰酯酶)是羧酸酯水解酶(E.C 3.1.1.1)的一个亚类,能够断开植物细胞壁中多糖与多糖、多糖与木质素之间的交联,产生游离的阿魏酸和其他肉桂酸^[1]。生物质的降解需要阿魏酸酯酶、纤维素酶、木聚糖酶、果胶酶等多种酶的协同作用,阿魏酸酯酶能断开糖残基与酚类物质间的酯键,可以促进水解酶水解细胞壁聚合体的骨架,因而又被称为木质纤维素降解酶的辅助酶,在工业造纸、动物饲料、利用木质纤维素再生产乙醇等方面都有广泛的应用前景^[2]。

阿魏酸酯酶来源菌广泛,现有报道的微生物来源的阿魏酸酯酶都是胞外酶^[3],其中霉菌来源的报道最多。产阿魏酸酯酶的主要霉菌包括:黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[4]、米曲霉(*A. oryzae*)^[5]、泡盛曲霉(*A. awamori*)^[6]、构巢曲霉(*A. nidulans*)^[7]、黄曲霉(*A. flavus*)^[8]等。然而,不论是采用固态发酵或是液体深层发酵,野生菌的阿魏酸酯酶产量很低,黑曲霉发酵酶活仅在 10–96 U/L^[9]之间。丝状真菌生长条件的特殊性也制约了其在发酵上的大规模应用。选用发酵优势菌株进行异源表达是解决上述问题的一种有效途径。自 2001 年^[1]阿魏酸酯酶首次在毕赤酵母中表达成功后,在毕赤酵母中表达阿魏酸酯酶的研究越来越多,但都局限于甲醇诱导型表达载体,毕赤酵母以甲醇为碳源时,利用醇氧化酶的 AOX1 启动子介导外源基因在毕赤酵母中表达。虽然 AOX1 启动子是高效启动子,但发酵诱导过程中

甲醇的加入给高密度发酵及发酵产物带来安全性问题。毕赤酵母三磷酸甘油醛脱氢酶 GAP 启动子是另一种强启动子,且已成功用于外源蛋白的表达^[10]。GAP 启动子作为无需甲醇诱导的组成型启动子,克服了甲醇诱导的安全性问题,简化了发酵操作,在特定产品的发酵生产方面具有极大优势。

本研究利用 GAP 启动子介导黑曲霉来源的阿魏酸酯酶在毕赤酵母中组成型表达,进一步对重组酶实现了分离纯化并对重组菌进行了发酵优化,为研究毕赤酵母组成型表达系统的建立及阿魏酸酯酶的发酵生产打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒: 本文所用菌株和质粒见表 1 所示。

1.1.2 主要试剂、培养基和仪器: 2×PCR *Taq* Master mix 购自杭州宝赛生物科技有限公司; Page Ruler prestained protein ladder 购自 Fermentas 公司; T4 DNA 连接酶、DNA marker 购自 TaKaRa 公司; 氨苄青霉素(Amp), 遗传霉素(G418)购自 Sigma 公司; 阿魏酸甲酯(MFA)购自上海维塔化学试剂有限公司; 反式阿魏酸购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 牛血清白蛋白购自国药集团化学试剂公司。LB、YEPD 和 MD 培养基按 Invitrogen 公司多克隆毕赤酵母表达手册配制; 重组菌发酵培养基基础成分同 YEPD, 具体成分文中优化。

表 1 本文中所用菌株和质粒
Table 1 The strains and plasmids used in this paper

菌株和质粒 Strains and plasmids	相关特性/用途 Characters/Application	来源 Sources
<i>Escherichia coli</i> JM109	Cloning <i>AnfaeA</i> gene	Laboratory preservation
<i>Aspergillus niger</i>	Original strain	Laboratory preservation
<i>Pichia pastoris</i> GS115	Expression host	Laboratory preservation
pGAP9K/GS115	Recombinant <i>P. pastoris</i> GS115 strains, carrying vector pGAP9K	This study
ReGS115	Recombinant <i>P. pastoris</i> GS115 strains, carrying vector pGAP9K <i>AnfaeA</i>	This study
pMD19-T simple vector	Cloning vector, Amp ^r	TaKaRa
pGAP9K	Constitutive expression vector, GAP promoter, Amp ^r	Laboratory preservation
pGAP9K <i>AnfaeA</i>	Constitutive expression vector, carrying <i>AnfaeA</i> gene	This study

1.2 阿魏酸酯酶基因 *AnfaeA* 的克隆及重组载体的构建

根据 NCBI (GenBank : Y09330.2)中报道 *A. niger* 编码阿魏酸酯酶的基因序列以及软件 Singal P 3.0 预测序列信号肽的结果,设计重叠延伸 PCR 引物见表 2。用改良的 CTAB 法^[11]提 *A. niger* 染色体基因组,并以此为模板,用表 2 中的引物分别进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(50 μ L) 2 \times PCR Taq Master mix 25 μ L,上下游引物(10 μ mol/L)各 1 μ L,模板 1 μ L,灭菌蒸馏水 22 μ L。以 *A. niger* 染色体基因组为模板, P1、P3 为引物扩增得到内含子上游片段 S₁ (PCR 扩增条件 1 : 94 $^{\circ}$ C 2 min ; 94 $^{\circ}$ C 30 s , 60 $^{\circ}$ C 30 s , 72 $^{\circ}$ C 30 s , 30 个循环 ; 72 $^{\circ}$ C 10 min), 以 P2、P4 为引物扩增得到内含子下游片段 S₂ (PCR 扩增条件 1), 以纯化后的片段 S₁ 和 S₂ 为模板, P1 和 P4 为引物, 通过 PCR 将片段 S₁ 和 S₂ 重叠拼接, 得到不含信号肽与内含子的阿魏酸酯酶基因 *AnfaeA* (PCR 扩增条件 2 : 94 $^{\circ}$ C 2 min ; 94 $^{\circ}$ C 30 s , 68 $^{\circ}$ C 30 s , 72 $^{\circ}$ C 50 s , 30 个循环 ; 72 $^{\circ}$ C 10 min)。PCR 终产物连接 pMD19-T simple vector 后委托上海生物工程股份有限公司测序。

测序结果正确的质粒 pMD19-T-*AnfaeA*, 经限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Not* I 双酶切后与相同酶切后的载体 pGAP9K 相连, 转化大肠杆菌 JM109, 选取 Amp 平板上阳性转化子提质粒酶切验证, 得到构建成功的重组载体 pGAP9K*AnfaeA*。

表 2 重叠延伸 PCR 引物
Table 2 Primers designed for overlap extension PCR

引物名称 Primer name	序列 Sequence (5'→3')	酶切位点 Restriction site
P1	CCGGAATT <u>CGCCTCCACGCA</u> AGGCATCTC	<i>EcoR</i> I
P2	GCTTACCGTGACAGGCCATA GTCTGGGAGCGTCGATGGCA	None
P3	TGCCATCGACGCTCCAGAC TATGGCCTGTACCGGTAAGC	None
P4	ATAAGAAT <u>GCGGCCGCTTAC</u> CAAGTACAAGCTCCGCTCG	<i>Not</i> I

注 : 下划线部分为限制性酶切位点。

Note: The underlined are restriction enzyme cutting sites.

1.3 重组菌的构建及转化子的筛选

重组载体 pGAP9K*AnfaeA* 经 *Sal* I 线性化后电转化^[12]*P. pastoris* GS115 涂布 MD 平板, 30 $^{\circ}$ C 培养 3–5 d, 挑取单菌落提酵母染色体基因组进行 PCR 验证(引物为 P1 和 P4, PCR 扩增条件 2)。将验证正确的阳性转化子菌落点种至含有 0.5、1.0、1.5、2.0 g/L G418 的 YEPD 平板上逐步筛选, 筛选在高抗平板上菌落明显的阳性转化子, 同时将质粒 pGAP9K 转入 *P. pastoris* GS115 中, 得到空载对照菌 pGAP9K/GS115。

1.4 阿魏酸酯酶酶活测定方法

阿魏酸酯酶酶活定义(U)^[13]: 在 pH 6.0、50 $^{\circ}$ C 条件下, 每分钟水解阿魏酸甲酯生成 1 μ mol 阿魏酸所需要的酶量定义为 1 个酶的活力单位。

阿魏酸酯酶活力测定^[13]: 取 200 μ L 稀释到一定

倍数的发酵上清, 加入 600 μL 1 g/L 阿魏酸甲酯, pH 6.0、50 $^{\circ}\text{C}$ 反应 10 min 后煮沸 10 min 灭活。空白对照为煮沸灭活的酶液。

产物阿魏酸测定方法: 采用 HPLC 方法测定产物阿魏酸的量。反应后样品 12 000 r/min 离心 20 min 后取 200 μL 于内衬管中。HPLC 条件: 反相 C_{18} 柱 (XBridge 5.0 μm \times 250 mm \times 4.6 mm, Waters Co., Ltd), 紫外检测器, 检测波长 320 nm, 柱温为 30 $^{\circ}\text{C}$, 流动相为 pH 7.5 的 20 mmol/L 磷酸钠缓冲液(90%)与甲醇(10%), 流速 0.6 mL/min, 进样量为 10 μL 。

1.5 重组阿魏酸酯酶(reAnfaeA)的分离纯化

离心收集重组菌发酵上清, 即阿魏酸酯酶粗酶液, 加入 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至终浓度为 60% 沉淀蛋白, 20 mmol/L 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液复溶蛋白, 透析袋透析后进行 DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析。

DEAE-Sepharose Fast Flow 离子交换层析: 用 20 mmol/L、pH 6.0 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液(A 液)平衡色谱柱, 将粗酶液上柱, 上样量为 5 mL, 用含 1 mol/L NaCl 的 20 mmol/L、pH 6.0 的 NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 缓冲液(B 液)梯度洗脱, 10% B 液浓度下洗脱液不收集, 只收集 25% B 液浓度下出峰的洗脱液。将收集到的洗脱液透析除去盐分, 测酶活并用 SDS-PAGE 检测蛋白纯度, 采用考马斯亮蓝染色法(Brad-Ford 法)^[14]测定蛋白含量。

1.6 重组菌发酵优化

1.6.1 种子液的制备: 将重组菌划线于 YEPD 平板上, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养至长出单菌落, 挑取单菌落于 YEPD 液体培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 30 h 后甘油法保藏菌株。接种 200 μL 于 YEPD 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至 OD_{600} 约为 13–17 时作为一级种子。2% (体积比)转接量转接一级种子至 50 mL (250 mL 三角瓶) YEPD 培养基中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养至 OD_{600} 约为 13–17 时作为二级种子。

1.6.2 重组菌发酵培养基优化: 通过单因素实验考察碳源、氮源、无机盐对重组菌生长和产酶的

影响。

(1) 碳源对重组菌生长和产酶的影响:

1) 不同碳源对重组菌生长和产酶的影响: 在 YEPD 培养基的基础上, 蛋白胨(20.0 g/L)和酵母粉(10.0 g/L)的添加量不变, 分别以添加量为 20.0 g/L 的甘油、葡萄糖、麦芽糖、可溶性淀粉、蔗糖、乳糖、麸皮以及玉米粉为碳源, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 84 h, 取样测定重组菌 OD_{600} 及发酵上清阿魏酸酯酶活力。

2) 碳源浓度对重组菌生长和产酶的影响: 蛋白胨(20.0 g/L)和酵母粉(10.0 g/L)的添加量不变, 分别以 5.0–50.0 g/L 的葡萄糖为碳源, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 84 h, 取样测定重组菌 OD_{600} 及发酵上清阿魏酸酯酶活力。

(2) 氮源对重组菌生长和产酶的影响:

1) 不同氮源对重组菌生长和产酶的影响: 以 30.0 g/L 的葡萄糖为碳源, 以 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 、棉籽粉、玉米浆、蛋白胨、鱼粉蛋白胨、酵母膏、牛肉膏、蛋白胨+酵母膏(2:1)、蛋白胨+牛肉膏(2:1)、鱼粉蛋白胨+玉米浆(2:1)为氮源, 浓度为 30.0 g/L, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 84 h, 取样测定重组菌 OD_{600} 及发酵上清阿魏酸酯酶活力。

2) 蛋白胨与酵母膏的添加比例对重组菌生长和产酶的影响: 以 30.0 g/L 的葡萄糖为碳源, 以不同比例的蛋白胨与酵母膏为氮源, 设计添加比例如下: 1:1、1:2、1:3、2:1、2:2、2:3、3:1、3:2、3:3, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 84 h, 取样测定重组菌 OD_{600} 及发酵上清阿魏酸酯酶活力。

(3) 无机盐对重组菌产酶的影响:

1) 不同无机盐对重组菌产酶的影响: 以 30.0 g/L 的葡萄糖为碳源, 30.0 g/L 蛋白胨与 20.0 g/L 酵母膏为氮源, 选择发酵常用无机盐及相应添加浓度^[15], 30 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 84 h, 取样测定发酵上清阿魏酸酯酶活力。

2) CaCO_3 添加量对重组菌生长和产酶的影响: 以 30.0 g/L 的葡萄糖为碳源, 30.0 g/L 蛋白胨与 20.0 g/L 酵母膏为氮源, 添加 CaCO_3 作为无机盐, 添加量分

别为 0.1–0.8 g/L, 30 °C、200 r/min 培养 84 h, 取样测定重组菌 OD_{600} 及发酵上清阿魏酸酯酶活力。

1.6.3 重组菌发酵条件优化: 通过单因素实验考察种龄、接种量、装液量对重组菌生长和产酶的影响。

(1) 种龄对重组菌生长和产酶的影响: 分别转接种龄为 12–32 h 的种子于发酵培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 84 h, 取样测定重组菌 OD_{600} 及发酵上清阿魏酸酯酶活力。

(2) 接种量对重组菌生长和产酶的影响: 以 1%–5% 的转接量转接培养 28 h 的种子于发酵培养基中, 30 °C、200 r/min 培养 84 h, 取样测定重组菌 OD_{600} 及发酵上清阿魏酸酯酶活力。

(3) 装液量对重组菌生长和产酶的影响: 以 2% 接种量转接培养 28 h 的种子于发酵培养基中, 250 mL 摇瓶的装液量分别为 30–80 mL, 30 °C、200 r/min 培养 84 h, 取样测定重组菌 OD_{600} 及发酵上清阿魏酸酯酶活力。

1.6.4 正交实验: 在发酵培养基优化及发酵条件优化单因素实验的基础上, 选出合适的单因素: 碳源、氮源比例、接种量、装液量进行正交实验, 确定最适发酵培养基及发酵条件。

1.6.5 数据分析: 采用 SPASS 16.0 统计软件进行

ANOVA 单因素方差分析($P < 0.05$), 数值以均值±标准差表示。

2 结果与分析

2.1 阿魏酸酯酶基因 *AnfaeA* 的克隆及重组载体的构建

以 *A. niger* 基因组为模板, 经重叠延伸 PCR 扩增得到阿魏酸酯酶基因 *AnfaeA* (不含信号肽及内含子), 大小为 783 bp (图 1A), 测序后与 NCBI (GenBank :Y09330.2) 中报道序列进行 BLAST 比对, 一致性达到 100%。NCBI (GenBank :Y09330.2) 中报道黑曲霉阿魏酸酯酶的基因总长 903 bp, 含有大小为 57 bp 的内含子区, 编码区总长 846 bp, 信号肽预测软件 SingalP 3.0 分析阿魏酸酯酶基因序列, 基因前端含有大小为 63 bp 编码 21 个氨基酸的信号肽, 基因各组成部分如图 1B 所示。将测序结果正确的序列酶切连接至表达载体 pGAP9K, 得重组载体 pGAP9K*AnfaeA* (图 1C), 酶切验证(图 1A)。

2.2 阿魏酸酯酶基因 *AnfaeA* 在毕赤酵母 GS115 中的表达

Sal I 单酶切重组载体 pGAP9K*AnfaeA*, 电转化至 *P. pastoris* GS115, 提酵母染色体 DNA 进行 PCR 验证(图 2)。将获得的阳性转化子在抗性平板上筛选, 最终在含有 2 g/L G418 平板上(超过该浓度的抗

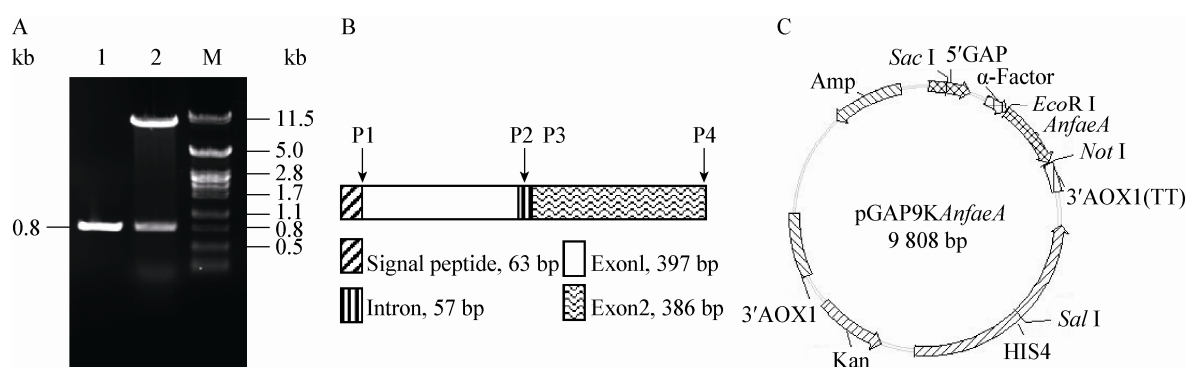


图 1 *AnfaeA* 基因琼脂糖凝胶电泳分析及重组载体 pGAP9K*AnfaeA* 酶切验证(A), 阿魏酸酯酶基因功能域分析(B), 以及重组载体 pGAP9K*AnfaeA* 的构建图谱(C)

Figure 1 Agarose gel electrophoresis of *AnfaeA* and the enzymatic digestion of pGAP9K*AnfaeA* (A) and the domain organization of feruloyl esterase (B) and pGAP9K*AnfaeA* plasmid map (C)

注: A: M: λ /Pst I DNA marker; 1: 基因 *AnfaeA* 的 PCR 产物; 2: *EcoR I* 和 *Not I* 双酶切重组载体 pGAP9K*AnfaeA*.

Note: A: M: λ /Pst I DNA marker; 1: PCR product of *AnfaeA*; 2: Recombinant plasmid pGAP9K*AnfaeA* digested by *EcoR I* and *Not I*.

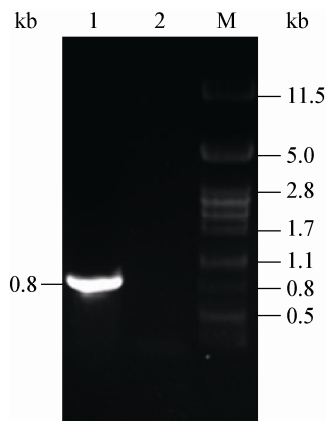


图2 重组酵母的 PCR 验证

Figure 2 The integrated identification of recombinant *Pichia pastoris*

注: M: λ DNA/*Pst* I marker; 1: 重组菌阳性转化子; 2: 空载对照菌株 pGAP9K/GS115.

Note: M: λ DNA/*Pst* I marker; 1: Positive transformant of ReGS115; 2: pGAP9K/GS115.

性平板上转化子难以生长)筛选得到 6 株菌落明显的阳性转化子, 编号为: ReGS115-1-ReGS115-6。

将重组菌 ReGS115-1-ReGS115-6 接种于 YEPD 中(20 mL/50 mL), 30 °C、200 r/min 培养至对数生长期, 2%转接至 50 mL/250 mL 的 YEPD 中, 培养条件不变, 每 12 h 取样按照 1.4 中的方法测定发酵上清中的酶活, 结果如图 3 所示。得到一株酶活最高的重组菌 ReGS115-1, 在发酵 84 h 酶活达到最高为 5.72 ± 0.10 U/mL。

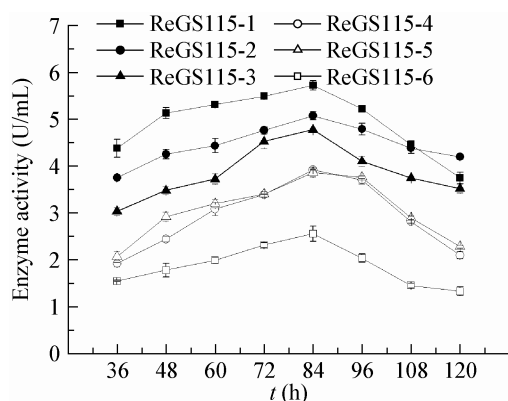


图3 重组毕赤酵母酶活测定

Figure 3 The activity of the recombinant GS115

为了进一步研究重组毕赤酵母蛋白表达情况, 对重组阿魏酸酯酶进行分离纯化。重组酶纯化后比酶活为 59.75 U/mg, 在 SDS-PAGE 中显示单一条带, 大小约为 40 kD (图 4), 与已报道的黑曲霉阿魏酸酯酶蛋白大小一致^[1]。重组蛋白分子量高于氨基酸序列计算的理论蛋白大小(28 kD)。用 NetNGlyc 1.0 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)在线软件对重组蛋白潜在糖基化位点进行预测, 结果表明在氨基酸序列 79-82 位(Asn-Tyr-Thr-Leu)有一个潜在的 N-糖基化位点, 从而可能使得重组蛋白的实际分子量较其理论分子量有所增大。

2.3 重组菌发酵培养基优化

2.3.1 碳源对重组菌生长和产酶的影响: 不同碳源对重组菌生长和产酶的影响结果如图 5 所示。不同碳源对菌体生长和产酶影响差异显著($P < 0.05$)。在以葡萄糖为碳源时, 酶活达到最高且菌体生长得最好。以甘油为碳源时, 虽然菌体能够生长得较好, 但菌体的产酶量并没有随着提高。玉米粉、麸皮由于其成分复杂, 重组菌难以利用, 生长状况和产酶状况都很差。因此选择葡萄糖作为碳源。

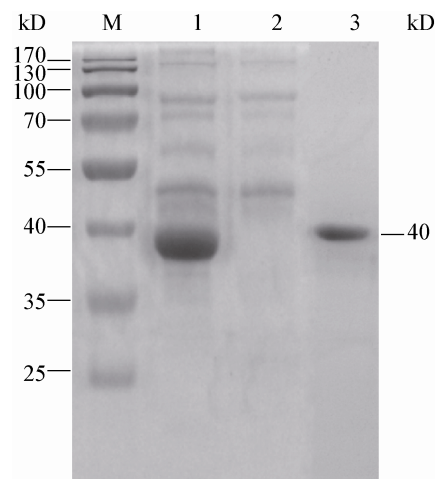


图4 重组菌 ReGS115-1 表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析
Figure 4 The SDS-PAGE analysis of expression product in recombinant strain

注: M: 标准蛋白 Marker; 1: 重组菌发酵上清; 2: 空载对照菌株 pGAP9K/GS115; 3: 纯化后的重组蛋白。

Note: M: Standard protein marker; 1: Fermentation supernatant of recombinant strain; 2: pGAP9K/GS115; 3: Purification of reAnfaeA.

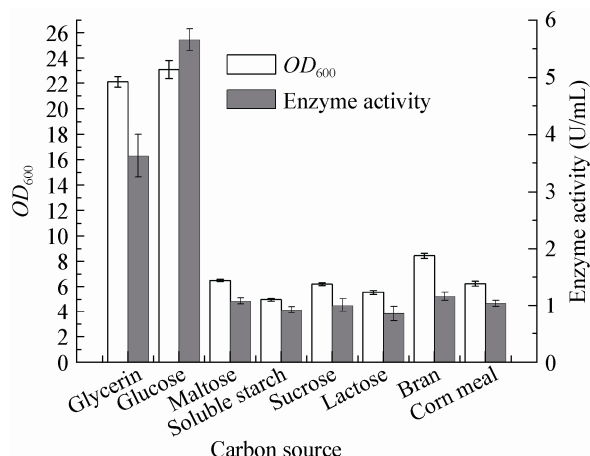


图5 碳源对重组菌生长和产酶的影响

Figure 5 Effect of different carbon sources on recombinant strain activity and growth

为了选择合适的葡萄糖浓度,设计葡萄糖浓度为梯度的发酵实验,相应的发酵实验结果如图6所示。随着葡萄糖浓度的增加,酶活显著增加($P<0.05$),当葡萄糖浓度为30.0 g/L 酶活达到最高且菌体生长最好;再升高葡萄糖浓度,酶活不再发生显著变化($P>0.05$)。因此选择葡萄糖浓度30.0 g/L。

2.3.2 氮源对重组菌生长和产酶的影响:不同氮源对重组菌生长和产酶的影响如图7所示,不同氮源对菌体生长和产酶影响差异显著($P<0.05$)。用无机氮源($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 KNO_3 作为氮源时菌体产酶和生长都很差;在有机氮源中,复合氮源的产酶效果比单

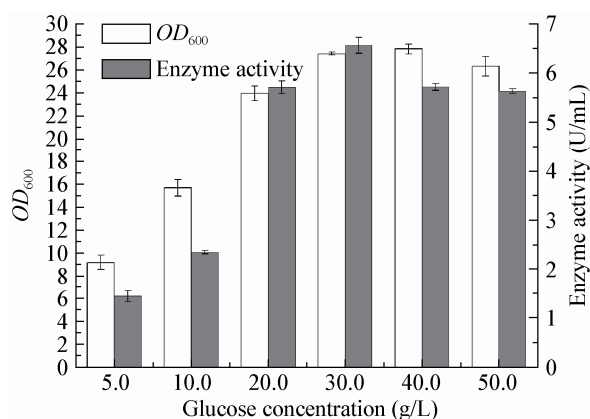


图6 碳源浓度对重组菌生长和产酶的影响

Figure 6 Effect of carbon source concentration on recombinant strain activity and growth

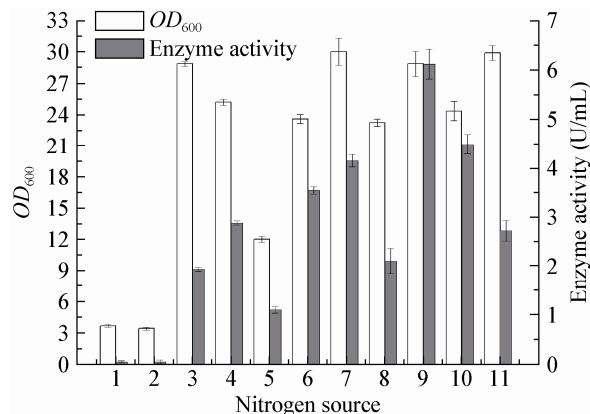


图7 氮源对重组菌生长和产酶的影响

Figure 7 Effect of different nitrogen sources on recombinant strain activity and growth

注:1:硫酸铵;2:硝酸钾;3:棉籽粉;4:玉米浆;5:蛋白胨;6:鱼粉蛋白胨;7:酵母膏;8:牛肉膏;9:蛋白胨+酵母膏(2:1);10:蛋白胨+牛肉膏(2:1);11:鱼粉蛋白胨+玉米浆(2:1).
Note: 1: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 2: KNO_3 ; 3: Cottonseed flour; 4: Corn steep liquor; 5: Tryptone; 6: Fish peptone; 7: Yeast extract; 8: Beef extract; 9: Tryptone+Yeast extract (2:1); 10: Tryptone+Beef extract (2:1); 11: Fish peptone+Corn steep liquor (2:1).

一有机氮源好。蛋白胨与酵母膏的比为2:1时酶活最高,鱼粉蛋白胨与玉米浆组合时,菌生长得很好,但是并不利于产酶。分别以棉籽粉、酵母膏为氮源时,能促进菌体生长,然而产酶效果并不好。综上所述,选择蛋白胨与酵母膏的组合作为发酵氮源。

调整蛋白胨与酵母膏的比例进行发酵实验,考察蛋白胨与酵母膏的不同比例对菌生长和产酶的影响,结果如图8所示,蛋白胨与酵母膏的不同

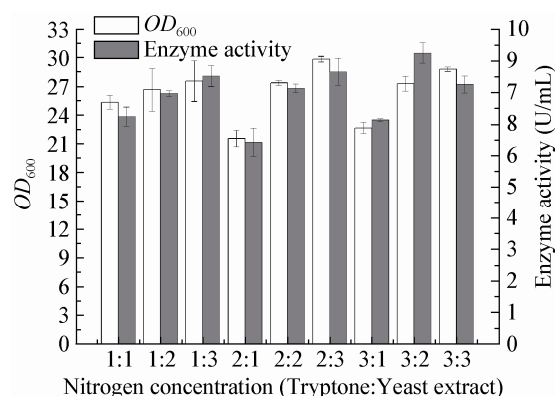


图8 蛋白胨与酵母膏的比例对重组菌生长和产酶的影响

Figure 8 Effect of the proportion of nitrogen source on recombinant strain activity and growth

比例对菌体生长和产酶影响差异显著($P<0.05$)。当蛋白胨与酵母膏的比例为 3:2 时, 菌体产酶达到最高。因此选择蛋白胨与酵母膏的比例为 3:2。

2.3.3 无机盐对重组菌生长和产酶的影响: 无机盐能参与细胞结构物质的组成, 具有调节细胞透性以及作为酶的辅因子等功能^[15]。无机盐对重组菌生长和产酶的影响如图 9 所示。与不添加无机盐的对照组相比, 碳酸钙的添加对菌体产酶有显著的促进作用($P<0.05$), 七水硫酸镁(0.2 g/L, 4.0 g/L)、高浓度的七水硫酸亚铁(0.2 g/L)与磷酸二氢钾(4.0 g/L)对菌体产酶有显著的抑制作用($P<0.05$)。氯化钾、氯化钠、七水硫酸锌、五水硫酸铜对菌体产酶影响不显著($P>0.05$)。因此选择碳酸钙为添加的无机盐。

CaCO_3 添加量对重组菌生长和产酶的影响如图 10 所示。碳酸钙的加入能够提供 Ca^{2+} 以及稳定发酵环境 pH。由图 10 可知, 0.1–0.8 g/L 浓度范围的碳酸钙对菌体产酶影响差异不显著($P>0.05$), 当碳酸钙浓度大于 0.2 g/L 时酶活开始逐渐减少, 但是变化缓慢。因此选择 CaCO_3 的浓度为 0.2 g/L。

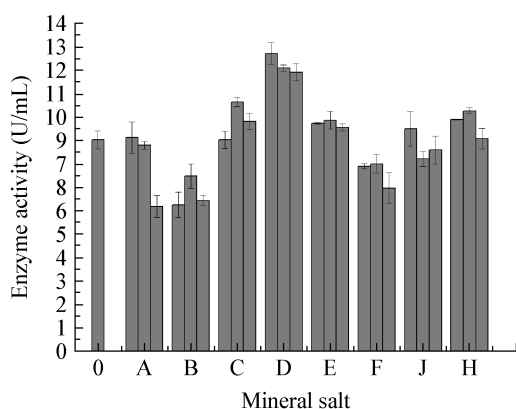


图 9 无机盐对重组菌产酶的影响

Figure 9 Effect of mineral salt on recombinant strain activity
注: 0: 对照组为未添加无机盐发酵组; A: 磷酸二氢钾(g/L) 0.5, 2.0, 4.0; B: 七水硫酸镁(g/L) 0.2, 2.0, 4.0; C: 氯化钾(g/L) 0.5, 5.0, 10.0; D: 碳酸钙(g/L) 0.4, 4.0, 10.0; E: 氯化钠(g/L) 0.5, 5.0, 10.0; F: 七水硫酸亚铁(g/L) 0.01, 0.05, 0.2; J: 七水硫酸锌(g/L) 0.1, 0.5, 1.0; H: 五水硫酸铜(g/L) 0.003, 0.01, 0.2.
Note: 0: Blank control group; A: KH_2PO_4 (g/L) 0.5, 2.0, 4.0; B: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L) 0.2, 2.0, 4.0; C: KCl: (g/L) 0.5, 5.0, 10.0; D: CaCO_3 (g/L) 0.4, 4.0, 10.0; E: NaCl (g/L) 0.5, 5.0, 10.0; F: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L) 0.01, 0.05, 0.2; J: $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L) 0.1, 0.5, 1.0; H: $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (g/L) 0.003, 0.01, 0.2.

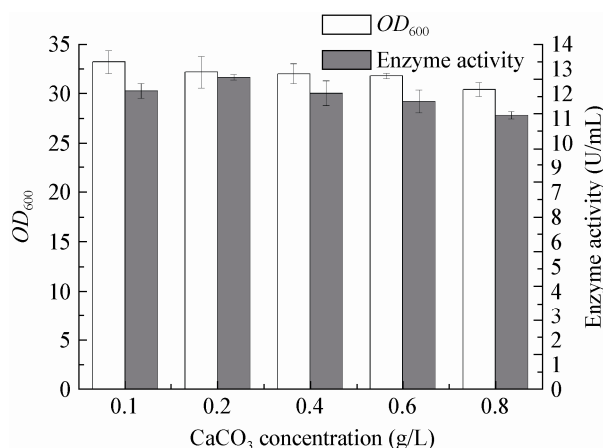


图 10 碳酸钙浓度对重组菌生长和产酶的影响

Figure 10 Effect of CaCO_3 concentration on recombinant strain activity and growth

2.4 重组菌发酵条件优化

2.4.1 种龄对重组菌生长和产酶的影响: 如图 11 所示, 随着种龄的增加, 菌体量和酶活逐渐增大, 但变化并不显著($P>0.05$), 在种龄为 28 h 时酶活最高, 超过 28 h 后酶活减小, 因此选 28 h 作为发酵种龄。

2.4.2 接种量对重组菌生长和产酶的影响: 如图 12 所示, 不同接种量对菌体产酶的影响差异显著($P<0.05$), 对发酵终点菌体量影响差异不显著($P>0.05$)。当接种量为 2% 时菌体产酶量最高, 超过 2% 接种量后菌体产酶能力下降, 因此选择发酵接种量为 2%。

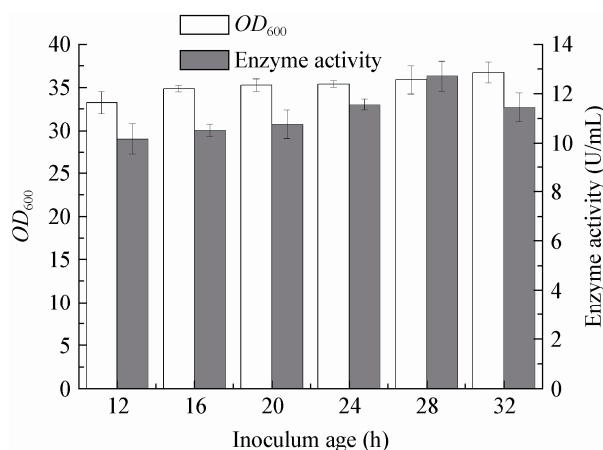


图 11 种龄对重组菌生长和产酶的影响

Figure 11 Effect of inoculum age on recombinant strain activity and growth

2.4.3 装液量对重组菌生长和产酶的影响: 摇瓶中装液量影响菌体发酵过程的耗氧量,如图 13 所示,装液量在 40 mL 时菌体量和产酶达到最大,在超过 40 mL 后菌体量及酶活都逐渐减小,但变化缓慢 ($P>0.05$),因此选择发酵装液量为 40 mL/250 mL。

2.5 正交实验

根据上述发酵培养基和发酵条件的单因素实验结果进行正交设计,采用了 $L_9(3^4)$ 进行四因素三水平的正交实验,因素水平表见表 3,实验结果与极差分析见表 4。

由表 4 极差分析可知,所选的 4 个因素对重组菌酶活的影响大小为:葡萄糖>氮源配比(蛋白胨:酵母膏)>接种量>装液量,比较各因素不同水平,得最佳组合为 $A_3B_1C_2D_2$,即添加葡萄糖为 40.0 g/L、蛋白胨为 10.0 g/L、酵母粉为 30.0 g/L、接种量为 3% (体积比)、装液量为 50 mL/250 mL。在该条件

下进行验证实验,并在不同时间段取样测定重组菌 OD_{600} 及发酵上清阿魏酸酯酶活力,所得结果如图 14 所示。由图 14 可知:菌体量随着发酵的进行呈上升趋势,48 h 进入稳定生长期,经过一段时间稳定期后开始缓慢下降。阿魏酸酯酶酶活的变化趋势与菌体生长情况相似,酶活在 84 h 达到最大值 15.60 ± 0.23 U/mL,约是优化前 (5.72 ± 0.10 U/mL) 的 2.7 倍。

3 讨论

阿魏酸酯酶能断开植物细胞壁中酚类物质与多糖之间的共价交联的结构,使得木质纤维素原料变得疏松,在生物质降解过程有着重要的作用,在食品、造纸、化妆品等行业有广泛的应用前景。但阿魏酸酯酶低产量限制了其在工业上的发展。通过基因工程操作实现阿魏酸酯酶的异源表达可以解

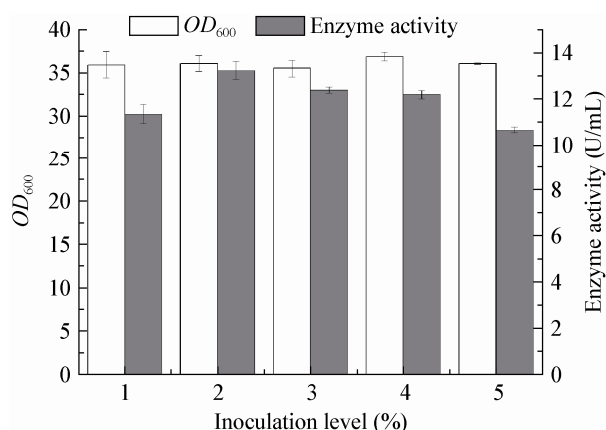


图 12 接种量对重组菌生长和产酶的影响
Figure 12 Effect of inoculation level on recombinant strain activity and growth

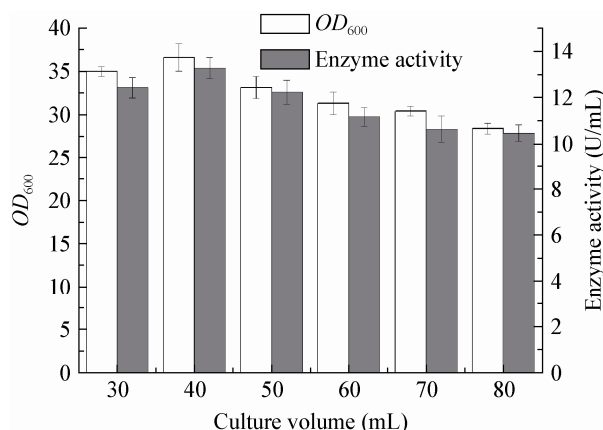


图 13 装液量对重组菌生长和产酶的影响
Figure 13 Effect of culture volume on recombinant strain activity and growth

表 3 正交实验因素与水平设计
Table 3 Factors and levels of orthogonal test

因素 Factor	A 葡萄糖浓度 Glucose (g/L)	B 蛋白胨:酵母膏 Tryptone:Yeast extract (g/L)	C 接种量 Inoculation level (%)	D 装液量 Culture volume (mL)
1	20.0	10:30	2	30
2	30.0	20:30	3	50
3	40.0	30:20	4	70

表 4 正交实验结果与极差分析
Table 4 Results and Range analysis of orthogonal test

实验 Test	A	B	C	D	酶活 Enzyme activity (U/mL)
1	1	1	1	1	7.70
2	1	2	2	2	7.27
3	1	3	3	3	6.75
4	2	1	2	3	13.92
5	2	2	3	1	12.54
6	2	3	1	2	13.28
7	3	1	3	2	15.24
8	3	2	1	3	14.03
9	3	3	2	1	15.04
k_1	7.240	12.287	11.670	11.760	
k_2	13.247	11.280	12.077	11.930	
k_3	14.770	11.690	11.510	11.567	
R	7.530	1.007	0.567	0.363	

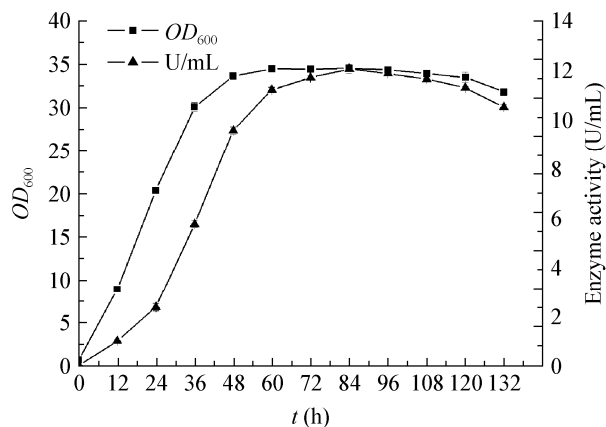


图 14 重组菌在最优培养条件下的发酵结果
Figure 14 Fermentation results of recombinant strain in optimal conditions

决原始菌发酵产量低的问题。目前,阿魏酸酯酶已在大肠杆菌、酿酒酵母以及毕赤酵母中成功表达。大肠杆菌发酵过程产内毒素,易染噬菌体。酿酒酵母自身分泌蛋白水平低,不适合高密度发酵。与它们相比,毕赤酵母具有很大的优势。美国 FDA 认定毕赤酵母为 GRAS (Generally recognized as safe) 微生物,已在医药、工业酶制剂等领域得到广泛的应用^[16],其表达杂蛋白少、适合高密度发酵等优点受到研究者的青睐。

近几年来,国内外相继报道了不同来源阿魏酸酯酶在毕赤酵母中表达的相关研究。但都是 AOX1 启动子介导的甲醇诱导型表达。该表达方式在发酵过程中需要对碳源进行转化,此外,有毒性的诱导剂甲醇的添加给发酵过程及发酵产物带来安全隐患。对此本文对阿魏酸酯酶在毕赤酵母中组成型表达进行了相关研究。以 GAP 启动子代替甲醇诱导型 AOX1 启动子,实现了阿魏酸酯酶在毕赤酵母中的组成型表达,重组菌经发酵优化后酶活在 84 h 达到最高 15.60 ± 0.23 U/mL,约为原始菌株黑曲霉阿魏酸酯酶酶活的 1 271 倍(原始菌株酶活为 12.27 U/L),高于米曲霉(2.11 U/mL)^[17]、宇佐美曲霉(10.76 U/mL)^[18]、黄曲霉(0.5 U/mL)^[8]来源阿魏酸酯酶在毕赤酵母中的表达。2015 年,Zhou 等^[19]构建一株高产黑曲霉阿魏酸酯酶双拷贝毕赤酵母工程菌株,对甲醇添加量、发酵时间等进行优化后,发酵 7 d 酶活达 15.49 U/mL (在单拷贝毕赤酵母工程菌株中表达阿魏酸酯酶酶活为 2.4 U/mL),与本研究组成型表达阿魏酸酯酶酶活相近。AOX1 启动子为强启动子且在发酵过程对菌体进行富集,因此诱导型表达水平一般高于组成型表达水平。但针对特定蛋白的表达还需要进行比较验证,有报道表明某些蛋白组成型表达效果优于诱导型表达^[20-21]。

本研究中构建的阿魏酸酯酶组成型表达菌株,在最适产酶培养基和发酵条件下摇瓶发酵,重组菌在 72–108 h 酶活较高且相对稳定,在工业应用中有一定优势。阿魏酸酯酶与木聚糖酶、纤维素酶、内切葡聚糖酶协同作用时,能大幅度提高酶解率。因而后续实验将对复合酶进行研究,以进一步提高酶活,满足工业化生产的要求。

参 考 文 献

[1] Juge N, Williamson G, Puigserver A, et al. High-level production of recombinant *Aspergillus niger* cinnamoyl esterase (FAEA) in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. FEMS Yeast Research, 2001, 1(2): 127-132

[2] Benoit I, Danchin EGJ, Bleichrodt RJ, et al. Biotechnological applications and potential of fungal feruloyl esterases based on prevalence, classification and biochemical diversity[J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(3): 387-396

[3] Wong DWS. Feruloyl esterase: a key enzyme in biomass degradation[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2006,

- 133(2): 87-112
- [4] Zhang SB, Wu ZL. Identification of amino acid residues responsible for increased thermostability of feruloyl esterase a from *Aspergillus niger* using the PoPMuSiC algorithm[J]. Bioresource Technology, 2011, 102(2): 2093-2096
- [5] Koseki T, Hori A, Seki S, et al. Characterization of two distinct feruloyl esterases, AoFaeB and AoFaeC, from *Aspergillus oryzae*[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83(4): 689-696
- [6] Fazary AE, Hamad HA, Lee JC, et al. Expression of feruloyl esterase from *Aspergillus awamori* in *Escherichia coli*: characterization and crystal studies of the recombinant enzyme[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2010, 46(4): 440-444
- [7] Debeire P, Khoune P, Jeltsch JM, et al. Product patterns of a feruloyl esterase from *Aspergillus nidulans* on large feruloyl-arabino-xylo-oligosaccharides from wheat bran[J]. Bioresource Technology, 2012, 119: 425-428
- [8] Zhang SB, Zhai HC, Wang L, et al. Expression, purification and characterization of a feruloyl esterase a from *Aspergillus flavus*[J]. Protein Expression and Purification, 2013, 92(1): 36-40
- [9] Fazary AE, Ju YH. Feruloyl Esterases as biotechnological tools: current and future perspectives[J]. Acta Biochimica et Biophysica Sinica, 2007, 39(11): 811-828
- [10] Fang W, Zhang L, Gu ZH, et al. Constitutive expression of AMP deaminase from *Streptomyces murinus* in *Pichia pastoris* GS115 using the GAP promoter[J]. Microbiology China, 2014, 41(10): 2022-2028 (in Chinese)
方炜, 张梁, 顾正华, 等. 用 GAP 启动子在 *Pichia pastoris* GS115 中组成型表达鼠灰链霉菌腺苷酸脱氨酶[J]. 微生物学通报, 2014, 41(10): 2022-2028
- [11] Zhang XL, Lyu XL, Shen YN, et al. Four methods of DNA extraction for *Aspergillus niger*[J]. Chinese Journal of Mycology, 2011, 6(3): 145-148 (in Chinese)
张晓利, 吕雪莲, 沈永年, 等. 4 种黑曲霉基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 中国真菌学杂志, 2011, 6(3): 145-148
- [12] Wu SX, Letchworth GJ. High efficiency transformation by electroporation of *Pichia pastoris* pretreated with lithium acetate and dithiothreitol[J]. Biotechniques, 2004, 36(1): 152-154
- [13] Fazary AE, Ju YH. Production, partial purification and characterization of feruloyl esterase by *Aspergillus awamori* in submerged fermentation[J]. Biotechnology Journal, 2008, 3(9/10): 1264-1275
- [14] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1/2): 248-254
- [15] Zhuge J, Li HZ. Microbiology[M]. Beijing: Science Press, 2009: 175-177 (in Chinese)
诸葛健, 李华钟. 微生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 175-177
- [16] Zhu TC, Li Y. Recent development of *Pichia pastoris* system: current status and future perspective[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(6): 929-938 (in Chinese)
朱泰承, 李寅. 毕赤酵母表达系统发展概况及趋势[J]. 生物工程学报, 2015, 31(6): 929-938
- [17] Zeng Y, Gong YY, Wu MC, et al. Gene cloning, expression of a feruloyl esterase a and purification of its hydrolysis products[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(3): 425-434 (in Chinese)
曾妍, 龚燕燕, 邬敏辰, 等. 阿魏酸酯酶 A 的基因克隆与表达及其水解产物的纯化[J]. 生物工程学报, 2014, 30(3): 425-434
- [18] Gong YY, Yin X, Zhang HM, et al. Cloning, expression of a feruloyl esterase from *Aspergillus usamii* E001 and its applicability in generating ferulic acid from wheat bran [J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(12): 1433-1441
- [19] Zhou M, Huang ZQ, Zhou B, et al. Construction and expression of two-copy engineered yeast of feruloyl esterase[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2015, 18(5): 338-342
- [20] Lin JW, Jia J, Zhong M, et al. Inducible and constitutive expression of *fip-fve* from *Flammulina velutipes* in *Pichia pastoris* GS115[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(3): 464-471 (in Chinese)
林景卫, 贾佳, 钟鸣, 等. 金针菇免疫调节蛋白基因 *fip-fve* 在毕赤酵母 GS115 中诱导型和组成型表达[J]. 生物工程学报, 2014, 30(3): 464-471
- [21] Wang XF, Sun YC, Ke F, et al. Constitutive expression of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 in *Pichia pastoris* using GAP as promoter[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 166(5): 1355-1367