



## 卡氏德巴利酵母植酸酶在毕赤酵母中的异源表达及优化

望松柏<sup>1,2</sup> 盖园明<sup>2</sup> 龚大春<sup>1</sup> 涂璇<sup>\*1</sup> 张大伟<sup>\*2</sup>

1 三峡大学生物与制药学院 湖北 宜昌 443002

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津 300308

**摘要:**【背景】植酸是一种能螯合金属离子和蛋白质的有机磷类化合物,广泛存在于植物组织中,影响动物对营养元素的吸收。在饲料中加入植酸酶可有效降解植酸。【目的】构建毕赤酵母异源表达卡氏德巴利酵母(*Debaryomyces castellii*, *D. castellii*)植酸酶的菌株,促进卡氏德巴利酵母植酸酶的研究及工业应用。【方法】将卡氏德巴利酵母植酸酶基因进行密码子优化后转入毕赤酵母 GS115 中,通过筛选多拷贝、敲除蛋白酶、过表达分子伴侣及转运蛋白的方法获取优势菌株。【结果】所得重组菌株 GS115/DCphy( $\Delta$ Pep4)(BFR2)的产酶酶活是低拷贝菌株的 7 倍。【结论】研究结果为卡氏德巴利酵母植酸酶的异源表达及潜在工业应用提供了一定的指导。

关键词: 植酸酶, 毕赤酵母, 卡氏德巴利酵母

## Heterologous expression and optimization of *Debaryomyces castellii* phytase gene in *Pichia pastoris*

WANG Songbai<sup>1,2</sup> GAI Yuanming<sup>2</sup> GONG Dachun<sup>1</sup> TU Xuan<sup>\*1</sup> ZHANG Dawei<sup>\*2</sup>

1 College of Biological & Pharmaceutical Sciences of China Three Gorges University, Yichang, Hubei 443002, China

2 Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

**Abstract:** [Background] Phytic acid is an organophosphorus compound which are widespread in plant tissues. It can chelate nutrient elements such as metal ions and protein in plant tissues, making them unable to be absorbed and utilized by herbivorous monogastric animals. The phytase can effectively catalyze the hydrolysis of phytic acid. [Objective] In order to promote the research and industrial application of *Debaryomyces castellii* phytase, we constructed a recombinant strain that heterologously expressed *Debaryomyces castellii* phytase in *Pichia pastoris*. [Methods] The phytase gene from *Debaryomyces castellii* was optimized and transformed into *Pichia pastoris* GS115. The high expression strain was obtained by screening copy number, knocking out proteases, and co-expressing molecular chaperones and transporters. [Results] The enzyme activity in the fermentation supernatant of the recombinant strain GS115/DCphy( $\Delta$ Pep4)(BFR2) is 7 times that of the low-copy strain. [Conclusion] The results can provide

**Foundation items:** National Key Research and Development Program of China (2018YFD0901001); National Natural Science Foundation of China (31800086, 31900052)

**\*Corresponding authors:** E-mail: TU Xuan: tuxuan7@126.com; ZHANG Dawei: zhang\_dw@tib.cas.cn

**Received:** 29-12-2020; **Accepted:** 11-03-2021; **Published online:** 27-03-2021

**基金项目:** 国家重点研发计划(2018YFD0901001); 国家自然科学基金(31800086, 31900052)

**\*通信作者:** E-mail: 涂璇: tuxuan7@126.com; 张大伟: zhang\_dw@tib.cas.cn

**收稿日期:** 2020-12-29; **接受日期:** 2021-03-11; **网络首发日期:** 2021-03-27

some guidance for the heterologous expression and potential industrial application of *Debaryomyces castellii* phytase.

**Keywords:** phytase, *Pichia pastoris*, *Debaryomyces castellii*

植酸(Phytic Acid), 又名肌醇六磷酸, 常存在于多种植物组织中。植酸是一种具有强螯合能力的酸, 其 6 个带负电的磷酸基团能与铜、铁、锌、锰等微量元素形成不溶螯合物, 使得金属离子不能被动物吸收利用<sup>[1]</sup>。在植物性饲料中, 大量的磷同肌醇结合后形成植酸, 继而形成稳定的植酸盐复合物。有研究报道, 植酸还可同饲料中的蛋白质发生络合作用, 降低其活性, 从而影响动物对蛋白质、碳水化合物的消化和吸收<sup>[2]</sup>, 是影响动物营养元素摄入的主要因素之一。

植酸酶(Phytase), 又称肌醇六磷酸水解酶, 是一类能够催化植酸及其盐类物质水解生成肌醇和磷酸的酶的总称, 其广泛存在于反刍动物、植物及微生物体内<sup>[3]</sup>。植酸酶可以有效降低植酸的抗营养作用, 增加动物对磷元素、矿质元素、蛋白质等营养物质的吸收和利用, 降低无机磷排泄物对环境造成的负面影响<sup>[4]</sup>。畜牧单胃动物在进食植物性饲料的过程中会有大量植酸生成, 然而其消化系统内部缺乏能够有效分解植酸的酶类<sup>[5]</sup>, 使得单胃动物对食物中营养元素的吸收减少, 同时也形成了高磷粪便, 继而污染环境。因此, 植酸酶常作为饲料添加剂用于单胃动物饲料中, 以期提高动物饲料的营养成分利用率, 促进动物的营养摄入均衡, 减小动物粪便对环境的污染<sup>[6]</sup>。

依据来源的不同, 植酸酶分为动物来源、植物来源及微生物来源。其中微生物来源的植酸酶因具有活性高、生产较容易等优点, 其研究和开发最为深入。然而微生物植酸酶的原菌株产酶效率较低, 不适合进行规模化的发酵培养。利用基因工程方法将植酸酶基因转入适当的宿主使其高效表达已经成为一种趋势。目前, 植酸酶基因已经成功地在多种系统中实现异源表达, 如以大肠杆

菌<sup>[7]</sup>和芽孢杆菌<sup>[8]</sup>为代表的原核表达系统, 以毕赤酵母<sup>[9]</sup>和丝状真菌<sup>[10]</sup>为代表的真核表达系统。巴斯德毕赤酵母表达系统作为一种广泛运用的外源蛋白表达系统, 其作为异源表达宿主具有表达水平高、外源蛋白基因遗传稳定、能够严格调控外源基因表达等优点<sup>[11]</sup>。近年来, 大肠杆菌来源植酸酶、黑曲霉来源植酸酶等均已实现了在毕赤酵母中的异源表达<sup>[12-13]</sup>。

植酸酶的工业化运用已经非常成熟, 但受限于植酸分子 2 位磷酸基团特殊的空间轴向位置, 绝大部分植酸酶无法完全水解植酸生成肌醇。卡氏德巴利酵母植酸酶是文献报道的一种具有完整水解能力的植酸酶, 其编码序列长度为 1 383 bp, 理论分子量为 51.2 kD, 最适反应温度为 68 °C, 耐受 pH 为 2.5–6.5, 能够水解植酸盐分子全部磷酸基团<sup>[14]</sup>。Ragon 等对 DC Phytase 进行了异源表达<sup>[15]</sup>, 该研究分别以  $P_{GAP}$ 、 $P_{AOX1}$  为启动子, 以毕赤酵母 X33 为宿主菌对其进行了异源表达; 在对发酵条件进行优化后, 发酵罐水平下, 含 GAP 启动子的重组菌产量为 16.5 U/mL, 含 AOX1 启动子的重组菌产量为 467 U/mL。空间结构解析<sup>[16]</sup>认为, 该植酸酶为四聚体蛋白, 含有组氨酸酸性植酸酶家族特有的碱基序列 RHGXRXP, 其空间结构与黑曲霉来源的酸性磷酸酶非常相似, 但该研究并未揭示其水解 2 位磷酸基团的反应机理。

本研究根据毕赤酵母 GS115 的密码子偏好性, 设计并合成了卡氏德巴利酵母植酸酶基因 *DC phytase*, 通过多拷贝的筛选、蛋白酶的敲除、分子伴侣与转运蛋白的过表达等方法构建基因工程重组菌株, 以期实现 *DC phytase* 在毕赤酵母 GS115 中的异源表达, 为卡氏德巴利酵母植酸酶的潜在工业应用奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 康为世纪公司; 巴斯德毕赤酵母 GS115 (His<sup>-</sup>, Mut<sup>+</sup>)和载体 pPIC9K, Invitrogen 公司; 蛋白酶敲除及过表达分子伴侣与转运蛋白质粒为实验室前期构建。

#### 1.1.2 主要培养基及试剂和仪器

培养基 YPD、MD、BMGY、BMMY 均按毕赤酵母表达系统说明书制备。YNB、生物素, Solarbio 公司; 限制性核酸内切酶 *Pme* I、*Kpn* 2I, Thermo Fisher 公司; 2 $\times$ Taq Master Mix, Vazyme 公司; 糖苷内切酶 Endo H, Novoprotein 公司; Gibson 双片段连接试剂盒, NEB 公司; Cycle Pure Kit 和 Gel Extraction Kit, Omega 公司; 质粒提取试剂盒、酵母基因组提取试剂盒, 天根生化科技(北京)有限公司; 氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)、硫酸卡那霉素(Kanamycin Monosulfate, Kana)、遗传霉素 G418、诺尔斯菌素(Nourseothricin, NTC), Solarbio 公司。其他试剂均为国产分析纯或化学纯。PCR 仪, 杭州柏桓科技有限公司; 紫外可见分光光度计, 上海美谱达仪器有限公司; 凝胶成像仪, Bio-Rad 公司; pH 计, 奥豪斯仪器上海有限公司; 电泳仪, 北京市六一生物技术有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 表达载体的构建

根据毕赤酵母密码子偏好性优化 *DC phytase*, 由擎科生物进行化学合成, 并克隆至载体 pUC57。引物信息如表 1 所示。以 DC-F、DC-R 为引物, 以 pUC57-DCphy 质粒为模板 PCR 扩增获取优化后的 *DC phytase* 基因序列; 以 pPIC9K-F、pPIC9K-R 为引物, 以 pPIC9K 质粒为模板 PCR 扩增获取载体 pPIC9K, 1%的琼脂糖凝胶电泳验证并回收 PCR 产物。使用 Gibson 双片段连接试剂盒将 DC Phytase 片段与 pPIC9K 载体进行连接, 连接产物转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 $\alpha$ , 用 LB 平板(含 Amp

表 1 载体构建 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequence for constructing vector

Primers name	Primers sequence (5'→3')
pPIC9K-F	CATCATCATCATCATCATTAAATTCG
pPIC9K-R	AGCTTCAGCCTCTCTTTT
DC-F	ATGGTCTCCGTTTCCAAGTTG
DC-R	AGAGTTAATCAAAGAAGCTGTGT

100  $\mu$ g/mL)进行筛选, 37  $^{\circ}$ C 培养过夜后挑取单菌落接种至 LB 液体培养基进行培养, 培养温度为 37  $^{\circ}$ C, 摇床转速为 220 r/min。菌液送金唯智生物公司进行测序, 提取序列鉴定无误的质粒, 得到重组表达载体 pPIC9K-DCphy。

#### 1.2.2 酵母转化

挑取经 YPD 平板划线活化的毕赤酵母 GS115 单菌落, 接种于 5 mL YPD 液体培养基中, 30  $^{\circ}$ C、220 r/min 培养过夜, 按 1%接种量转接至 30 mL YPD 液体培养基, 30  $^{\circ}$ C 培养至  $OD_{600}$  值为 0.8–1.2。分装 1 mL 菌液至离心管, 8 500 $\times$ g 离心 1 min 收集菌体, 加入 1 mL 电转液(100 mmol/L 醋酸锂, 0.6 mol/L 山梨醇, 10 mmol/L Tris-HCl, 10 mmol/L DTT), 混匀后室温静置 30 min。静置完成后 8 500 $\times$ g 离心 1 min 收集菌体, 并用 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇重悬 3 次, 最终加入 55  $\mu$ L 的 1 mol/L 山梨醇悬浮菌体, 全程冰上操作。感受态细胞制备完成后, 分别加入 1.5  $\mu$ g 经过 *Kpn* 2I 线性化处理的重组质粒 pPIC9K-DCphy 及空载体质粒 pPIC9K, 混匀后冰浴 5 min, 加入至 0.1 cm 无菌电转杯进行电击, 电击电压为 1.5 kV。电击完成后立即加入 1 mL 预冷的 1 mol/L 山梨醇溶液重悬, 吸取重悬液至无菌离心管, 室温静置孵育 2 h, 8 500 $\times$ g 离心 1 min 收集菌体, 取出 800  $\mu$ L 上清后重悬菌体, 涂布于 MD 平板, 30  $^{\circ}$ C 培养 72 h 观察菌落生长情况。

#### 1.2.3 多拷贝的筛选

在 MD 平板上加入 2 mL 无菌水洗脱单菌落, 收集洗脱菌液, 测定  $OD_{600}$  后将其稀释至  $OD_{600}$  为 1.0 作为筛选母液。将母液稀释 10 倍后分别吸

取 100、200、300、400  $\mu\text{L}$  涂布于不同 G418 浓度的 YPD 平板上, G418 浓度梯度设置为 0.25、0.50、1.0、2.0 mg/mL。30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3–5 d, 观察菌落生长情况。

#### 1.2.4 发酵诱导

挑取不同 G418 浓度的 YPD 平板单菌落, 接种至 5 mL YPD 液体培养基(含 Amp 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 Kana 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  及相应 YPD 平板的 G418 浓度), 按照 G418 浓度分别设置菌株编号为: GS115/DC-0.25-1、-2, GS115/DC-0.5-1、-2、-3, GS115/DC-1.0-1、-2、-3、-4。30  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 48 h 后按 1% 的转接量转接至 30 mL 的 BMGY 培养基(含 Amp 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 Kana 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 30  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 24 h, 再按 1% 的转接量转接至 BMMY (含 Amp 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 Kana 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 培养基, 26  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 低温诱导培养 216 h, 并每隔 24 h 补加 0.5% (体积分数) 纯甲醇。

#### 1.2.5 酶活的测定

收集发酵菌液, 8 000 r/min 离心 30 min, 取上清测定酶活。测定方法以《GB/T18634-2009 饲用植酸酶活性的测定-分光光度法》<sup>[17]</sup> 为准。植酸酶酶活单位定义为: 37  $^{\circ}\text{C}$  和 pH 5.5 条件下, 每分钟从 5 mmol/L 的植酸钠溶液中水解 1  $\mu\text{mol}$  无机磷所需的酶量为 1 个酶活单位, 以 U 表示。

#### 1.2.6 SDS-PAGE 及去糖基化处理

发酵上清与 5 $\times$  Loading Buffer 混匀后沸水浴煮沸 20 min, 12 000 r/min 离心 3 min 后取上清进行 SDS-PAGE 分析。

去糖基化处理方法: 发酵上清在糖蛋白变性缓冲液(含 0.5% SDS, 40 mmol/L DTT) 中煮沸 10 min, 将反应液按照 Novoprotein 说明书配制 Endo H 反应体系, 于 37  $^{\circ}\text{C}$  水浴中孵育 2 h。

#### 1.2.7 蛋白酶的敲除

实验采用 CRISPR/Cas9 对毕赤酵母蛋白酶 A 编码基因 *pep4*、蛋白酶 B 编码基因 *prb1* 进行敲除。敲除质粒为实验室前期构建, 敲除质粒所用 sgRNA 在 E-CRISP (<http://www.e-crisp.org/E-CRISP/>)

界面上进行设计, 本文所设计敲除 *pep4*、*prb1* 的 sgRNA 序列如表 2 所示。所用 Donor DNA 由本次实验所获得。吸取微量野生型毕赤酵母 GS115 保藏菌液划线于 YPD 平板, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养箱培养 2 d 后挑取单菌落接种于 5 mL YPD 液体培养基(含 Amp 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 Kana 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 30  $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 培养 48 h。取 2 mL 试管菌液于 12 000 r/min 离心 1 min, 吸除上清后利用酵母基因组提取试剂盒提取毕赤酵母基因组 DNA; 以提取的毕赤酵母基因组为模板, 以 Pep4-Up-F/Pep4-Up-R、Pep4-Down-F/Pep4-Down-R 为引物扩增 *pep4* 左右臂片段, 以 Prb1-Up-F/Prb1-Up-R、Prb1-Down-F/Prb1-Down-R 为引物扩增 *prb1* 左右臂片段, 所用引物见表 3, 反应体系见表 4。PCR 反应条件: 95  $^{\circ}\text{C}$  10 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  30 s, 55  $^{\circ}\text{C}$  15 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 kb/min, 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  4 min。用 Cycle Pure Kit 回收 PCR 扩增产物后, 分别加入相同量的左右臂片段, 并以 Pep4-Up-F/Pep4-Down-R 为引物对 *pep4* 左右臂片段进行融合, 以 Prb1-Up-F/Prb1-Down-R 为引物对 *prb1* 左右臂片段进行融合, 1% 的琼脂糖凝胶电泳验证并回收反应产物, 获取 *pep4*、*prb1* 的 Donor DNA 片段。将 500 ng 敲除质粒与 1 000 ng Donor DNA 片段通过电转的方式共同转入多拷贝筛选菌, 以 YPD 平板(含 G418 0.5 mg/mL 和 NTC 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 进行筛选。30  $^{\circ}\text{C}$  培养 3 d, 观察菌落生长情况, 挑取单菌落接种至 YPD 液体培养基(含 G418 0.5 mg/mL) 培养, 并通过传代培养对敲除质粒进行丢失。吸取传至第 3 代的菌液进行 YPD 平板(含 G418 0.5 mg/mL) 划线, 30  $^{\circ}\text{C}$  培养至长出单菌落后, 挑取单菌落进行 YPD 平板影印, 以验证质粒是否丢失。在含 NTC 的平板上不生长而在不含 NTC 的平板上生长的菌落即为所得蛋白酶敲除菌株。

表 2 sgRNA 序列

Table 2 Sequence of sgRNA

Sequence name	Sequence (5'→3')
Pep4-sgRNA	GCTGAGGCCACATCGGAGCC
Prb1-sgRNA	GAAGTTGATGCCAGCAGCGA

表 3 Donor DNA 片段获取的 PCR 引物序列

Table 3 PCR primer sequence of getting the donor DNA fragment

Primers name	Primers sequence (5'→3')
Pep4-Up-F	AGAAGCGAGTTTCTCCGTAT
Pep4-Up-R	CTTTAAATTGATTATCAGTAATTGAGAAAT
Pep4-Down-F	ATTTCTCAATTACTGATAATCAATTTAAAGGGAAAGATCACCTGGTTG
Pep4-Down-R	ATTAGTTGATGATTGTCTGAGAC
Prb1-Up-F	AATAACTTCATGACTGCATTTG
Prb1-Up-R	AGTTTAAATAATATGGAGATTGTTTG
Prb1-Down-F	CAAACAAATCTCCATATTATTTAAACTCGCTCCAGGTTTAAACATTC
Prb1-Down-R	GAATGTGAAATTCCAAGAATTG

表 4 Donor DNA 片段获取的 PCR 反应体系

Table 4 PCR reaction system for obtaining donor DNA fragments

Component	Initial concentration	Volume (μL)
Genomic DNA	20 ng/μL	1
Forward primer	10 μmol/L	1
Reverse primer	10 μmol/L	1
Taq Master Mix	2×	10
ddH <sub>2</sub> O	Not applicable	7

### 1.2.8 分子伴侣与转运蛋白的过表达

根据蛋白酶敲除菌株诱导发酵结果, 在菌株 GS115/DCphy(ΔPep4)中, 选取部分对毕赤酵母异源蛋白分泌有促进作用的分子伴侣与转运蛋白 BFR2、CUP5、HAC1、SSE1、PDI、BiP 进行过表达, 构建工程菌株 GS115/DCphy(ΔPep4)(BFR2)、GS115/DCphy(ΔPep4)(CUP5)、GS115/DCphy(ΔPep4)(HAC1)、GS115/DCphy(ΔPep4)(SSE1)、GS115/DCphy(ΔPep4)(PDI)、GS115/DCphy(ΔPep4)(BiP)。所选分子伴侣与转运蛋白重组质粒载体均为 pGAP, 由实验室前期构建。所有重组质粒经 *Pme* I 线性化处理后电转入蛋白酶敲除菌株 GS115/DCphy(ΔPep4)中, 以 YPD 平板(含 Amp 100 μg/mL、Kana 50 μg/mL、G418 0.5 mg/mL 和 NTC 100 μg/mL)进行筛选, 30 °C 培养 3 d 后观察菌落生长情况, 挑取生长状况良好的单菌落进行摇瓶诱导发酵。将所挑取的单菌落接种至 5 mL 的 YPD 液体培养基(含 Amp 100 μg/mL 和 Kana 50 μg/mL), 30 °C、220 r/min 培养 48 h 后, 按 1%的转接量转接至 30 mL 的 BMGY 培养基(含

Amp 100 μg/mL 和 Kana 50 μg/mL), 30 °C、220 r/min 培养 24 h, 再按 1%的转接量转接至 BMMY 培养基(含 Amp 100 μg/mL 和 Kana 50 μg/mL), 26 °C、220 r/min 低温诱导培养 216 h, 并每隔 24 h 补加 0.5% (体积分数)纯甲醇。

## 2 结果与分析

### 2.1 pPIC9K-DCphy 在毕赤酵母 GS115 中的筛选及发酵诱导

实验通过不同 G418 浓度对重组载体 pPIC9K-DCphy 在毕赤酵母中进行筛选, 通过不同强度的抗性压力来筛选拷贝数和抗性不同的重组子, 以期获得表达量和酶活高的菌株。筛选平板在培养 3-5 d 后, 不同浓度(0.25、0.50、1.00 mg/mL)的 G418 平板上均有单菌落生成, 2.00 mg/mL G418 条件下则无生长菌落(表 5), 而且平板菌落生长总数随抗性浓度的增加而减少。挑取部分菌株进行摇瓶发酵, 上清酶活测定(图 1)结果显示菌株 GS115/DC-0.5-1 酶活最高为 7.8 U/mL, 较低拷贝菌株 GS115/DC-0.25 提高约 3 倍。

表 5 不同 G418 浓度下的菌落统计

Table 5 Colony statistics under different G418 concentration

G418 浓度	菌落总数
G418 concentrations (mg/mL)	Total number of colonies
0.25	239
0.50	22
1.00	6
2.00	0

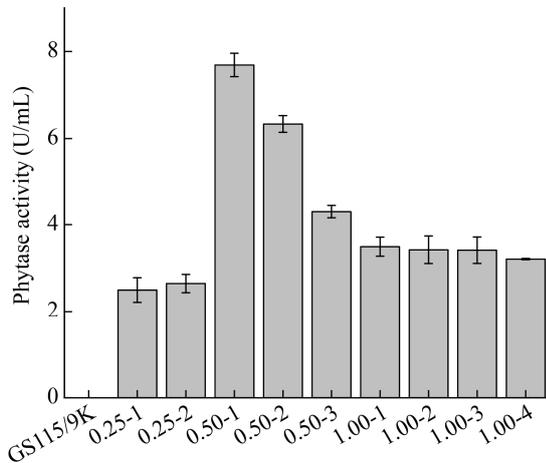


图1 筛选菌株发酵上清的酶活检测

**Figure 1 Detection of fermentation supernatant enzyme activity of screening strains**

注: GS115/9K 为转入空载体 pPIC9K 的出发菌株; 0.25-1、0.25-2 为 0.25 mg/mL G418 条件下的筛选菌株; 0.50-1、0.50-2、0.50-3 为 0.50 mg/mL G418 条件下的筛选菌株; 1.00-1、1.00-2、1.00-3、1.00-4 为 1.00 mg/mL G418 条件下的筛选菌株

Note: GS115/9K is the starting strain transferred into the empty vector pPIC9K; 0.25-1 and 0.25-2 are selected strains under the condition of 0.25 mg/mL G418; 0.50-1, 0.50-2, 0.50-3 are selected strains under the condition of 0.50 mg/mL G418; 1.00-1, 1.00-2, 1.00-3, 1.00-4 are selected strains under the condition of 1.00 mg/mL G418

对发酵液上清进行 SDS-PAGE 分析, 图 2 结果显示蛋白分子量约为 80 kD, 大于 DC Phytase 的理论值 51 kD。由于毕赤酵母 GS115 中存在蛋白糖基化修饰系统, 推测其分子量的变化可能是由于糖基化修饰所致, 对其氨基酸序列进行糖基化位点预测(<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>), 发现其存在 6 个潜在的 N-糖基化位点(图 3)。随后, 利用糖苷内切酶 Endo H 对发酵上清酶液进行去糖基化处理, SDS-PAGE 检测结果(图 4)显示去糖基化后的蛋白分子量仍大于 DC Phytase 理论值(51 kD)。Ragon 等<sup>[15]</sup>在利用毕赤酵母 X33 对 DC Phytase 进行异源表达时, 分泌蛋白经糖苷内切酶 Endo H 消化处理后分子量(55 kD)也大于其理论值, 他们经软件预测发现 DC Phytase 除了 N-糖基化位点外, 还存在 4 个潜在的 O-糖基化位点。我们推测, 在异源表达的过程中, 毕赤酵母可能对 DC Phytase

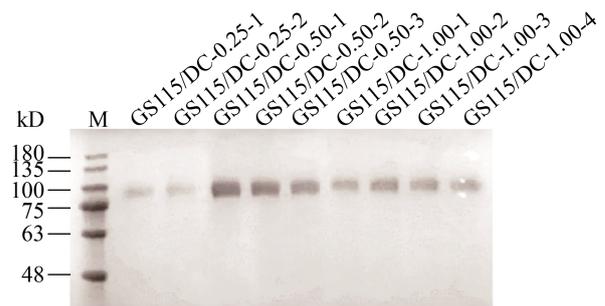


图2 筛选菌株发酵上清的 SDS-PAGE

**Figure 2 SDS-PAGE of fermentation supernatant of multi-copy screening strain**

Note: M: Protein Marker.

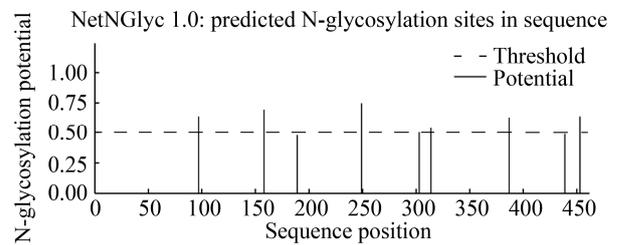


图3 DC Phytase N-糖基化位点预测

**Figure 3 Predict the N-glycosylation site of DC Phytase**

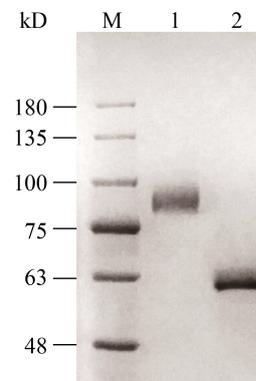


图4 DCphytase 经 Endo H 处理后的 SDS-PAGE

**Figure 4 SDS-PAGE of DC Phytase supernatant after Endo H treatment**

注: M: 蛋白 Marker; 1: DC Phytase; 2: 经 Endo H 处理的 DC Phytase

Note: M: Protein Marker; 1: DC Phytase; 2: Endo H-treated DC Phytase

进行了 N-糖基化和 O-糖基化 2 种糖基化, 而 Endo H 仅能在 N-糖基化位点进行切割, 不能对 O-糖基化进行处理, 因此分子量偏大的原因可能与未被消化的 O-糖基化有关。

实验结果表明重组 DC Phytase 在毕赤酵母 GS115 中成功表达, 并在细胞内有一定程度的糖基化修饰, 将筛选所得优势菌株命名为 GS115/DCphy。

## 2.2 蛋白酶敲除菌株的诱导发酵

选择敲除筛选菌株 GS115/DCphy 的蛋白酶 A、B 的编码基因 *pep4*、*prb1*, 构建蛋白酶敲除菌株 GS115/DCphy( $\Delta$ Pep4)和 GS115/DCphy( $\Delta$ Prb1), 摇瓶发酵诱导实验酶活检测结果(图 5)显示, 相较于出发菌株, 敲除蛋白酶 A 后酶活提升约 97%, 敲除蛋白酶 B 后酶活提升约 12%。本研究结果表明, 敲除蛋白酶 A 有利于优化 DC Phytase 在毕赤酵母中的异源表达。本实验将所得优势菌株命名为 GS115/DCphy( $\Delta$ Pep4)。

## 2.3 过表达分子伴侣与转运蛋白菌株的诱导发酵

通过查找部分对毕赤酵母异源蛋白质分泌有促进作用的分子伴侣与转运蛋白(BFR2、CUP5、HAC1、SSE1、PDI、BiP)<sup>[18]</sup>, 在菌株 GS115/DCphy( $\Delta$ Pep4)中分别进行过表达。将构建完成的 6 株重组菌

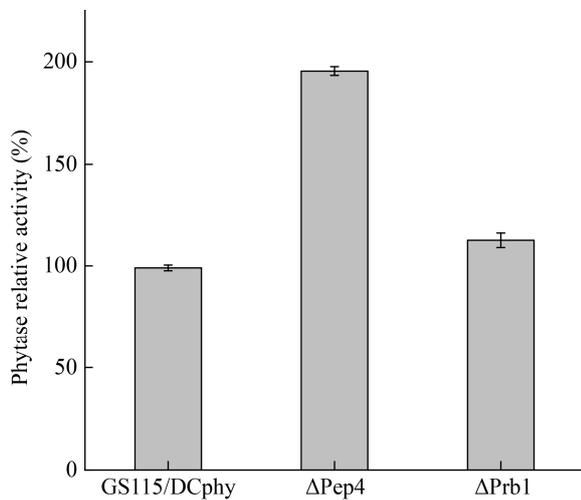


图 5 蛋白酶敲除菌株发酵上清的酶活检测

### Figure 5 Detection of enzyme activity in fermentation supernatant of protease knockout strain

注: GS115/DCphy 为所筛选的优势多拷贝菌株;  $\Delta$ Pep4、 $\Delta$ Prb1 为所构建的蛋白酶缺失菌株

Note: GS115/DCphy is the dominant multi-copy strain selected;  $\Delta$ Pep4 and  $\Delta$ Prb1 are constructed protease-deficient strains

株, 以 YPD 培养基为种子培养基、以 BMMY 培养基为发酵培养基进行诱导发酵, 连续培养 216 h 后取发酵上清进行酶活测定及 SDS-PAGE 分析。重组菌株发酵上清液的酶活检测(图 6)及 SDS-PAGE 分析(图 7)结果显示, 仅过表达 BFR2 的菌株上清液酶活及蛋白表达量有进一步提升, 上清液酶活提高 24%, 至 15 U/mL; 而过表达 CUP5、HAC1、SSE1 的菌株上清液酶活及蛋白表达量较对照菌株基本无明显变化; 过表达 BiP、PDI 的菌株上清液酶活及蛋白表达量出现了较大幅度的降低。实验结果表明, BFR2 在促进毕赤酵母 GS115 异源表达分泌 DC Phytase 方面具有更好的效果。

## 3 讨论与结论

目前植酸酶在饲料添加剂领域的应用已经非常广泛, 大肠杆菌植酸酶和黑曲霉植酸酶已经实现了商业化的生产应用, 但绝大部分市场在售的植酸酶不具备水解植酸分子 2 位磷酸基团的能力, 不能

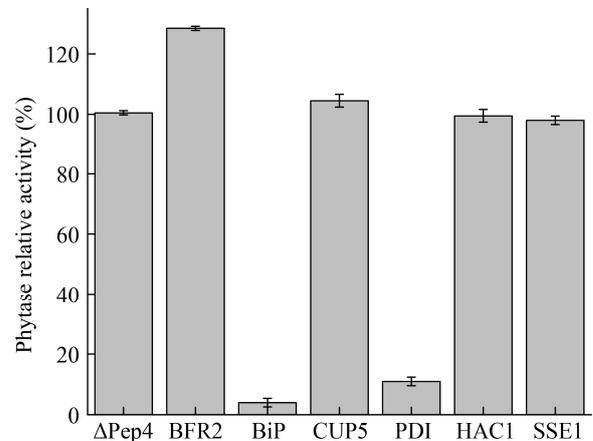


图 6 过表达分子伴侣与转运蛋白菌株发酵上清的酶活检测

### Figure 6 Detection of enzyme activity in fermentation supernatant of strains co-expressing molecular chaperone and transporter

注:  $\Delta$ Pep4 为所构建的蛋白酶缺失菌株; BFR2、BiP、CUP5、PDI、HAC1、SSE1 为所构建的过表达分子伴侣及转运蛋白菌株

Note:  $\Delta$ Pep4 is the constructed protease-deficient strain; BFR2, BiP, CUP5, PDI, HAC1, SSE1 are constructed overexpression molecular chaperone and transporter strains

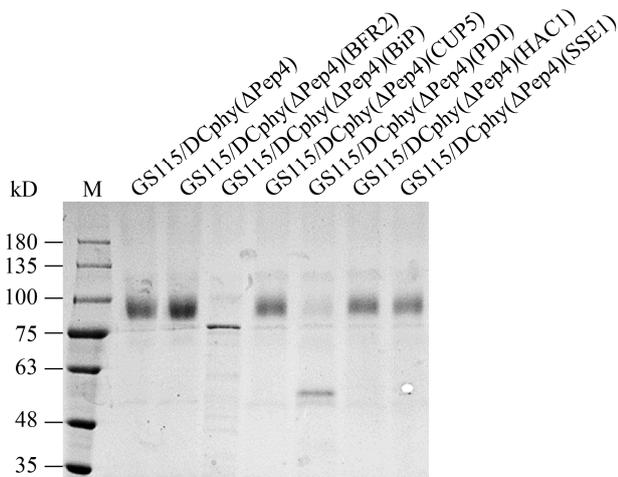


图 7 过表达分子伴侣与转运蛋白菌株发酵上清液的 SDS-PAGE

Figure 7 SDS-PAGE of fermentation supernatant of strains overexpressing molecular chaperone and transporter

Note: M: Protein Marker

将植酸完全水解成肌醇,进而影响动物对营养元素的进一步吸收和利用。卡氏德巴利酵母植酸酶是文献报道的一种既具有完整水解能力且空间结构已经解析的植酸酶,能够有效水解植酸分子 2 位磷酸基团并形成肌醇,从而能进一步提升磷酸水解率,促进动物对磷元素、肌醇及其他营养元素的摄入,减轻环境污染,提高饲料的营养利用率。然而该酶的原产菌株产酶能力较低,并且菌株培养过程复杂,不利于进行工业化生产。因此,通过毕赤酵母 GS115 异源表达系统构建能高效产酶的工程菌株,将有助于卡氏德巴利酵母植酸酶的进一步研究和开发利用。

基因的拷贝数是影响外源蛋白在毕赤酵母中表达水平的主要因素之一。一般而言,较多的基因拷贝数会增加异源蛋白的表达量,但外源基因过多也会对异源蛋白的表达效果产生不利影响。本文在进行不同浓度 G418 筛选多拷贝重组菌株的过程中,发现转化子在 G418 浓度为 2.00 mg/mL 条件下无法生长。Aw 等<sup>[19]</sup>的研究也出现了高浓度 G418 条件下无菌落生长的现象,这是由于初始抗性压力过大所致。本文进一步的研究也表明,高抗性

条件下筛选的重组菌株其蛋白表达水平可能会有所降低。在 Jiao 等<sup>[20]</sup>通过构建不同拷贝数的基因盒以提高脂肪酶在毕赤酵母中表达水平的研究中,拷贝数超过 5 个之后其表达水平也出现明显降低的现象。造成这种现象的原因是菌体内基因拷贝数过多时蛋白转录和翻译过程持续增加,超出菌体代谢承受范围,蛋白表达量与拷贝数不再匹配<sup>[21]</sup>。

毕赤酵母在进行异源蛋白表达的过程中,细胞内会产生大量蛋白酶,进而出现严重的蛋白水解现象。研究表明,毕赤酵母细胞内的特异性蛋白酶能对基因重组蛋白进行特异性水解,是影响异源蛋白表达水平的主要因素之一<sup>[22]</sup>。通过对宿主菌进行遗传改造,破坏其蛋白酶表达系统,被认为是减少重组蛋白水解的有效方法<sup>[23]</sup>。Marques 等<sup>[24]</sup>通过研究发现,在缺乏蛋白酶的细胞中,蛋白的水解度有所降低;Wu 等<sup>[25]</sup>在对毕赤酵母主要蛋白酶进行敲除处理后,发现改造菌株中 80% 的分泌异源蛋白仍完好无损,而野生型菌株仅只有 30%。蛋白酶 A 是毕赤酵母的主要液泡蛋白水解酶,由基因 *pep4* 编码,可以将其他蛋白酶由无活性的酶原状态激活成活性肽,对其他蛋白酶行使功能具有重要作用,敲除蛋白酶 A 可以有效阻断所有其他蛋白酶变为活性肽<sup>[26]</sup>。Helian 等<sup>[27]</sup>通过敲除毕赤酵母蛋白酶 A,发酵上清液的酶活提升 26%。本文的研究结果也证实敲除毕赤酵母蛋白酶 A 可以有效提高发酵上清液中 DC Phytase 的酶活。

过多的蛋白表达会对内质网的折叠和分泌能力造成负担,进而造成未折叠的肽链和错误折叠的蛋白在内质网中大量积累,这可能会影响蛋白的分泌<sup>[28]</sup>。BFR2 (BreFeldin A Resistance 2)为核糖体核仁蛋白的一种,是核糖体小亚基组成成分之一<sup>[29]</sup>,对酵母代谢产物蛋白酶抑制剂 BreFeldin A 具有抗性<sup>[30]</sup>。该蛋白酶抑制剂能够阻断蛋白质从内质网转运至高尔基体,进而影响蛋白转运及分泌<sup>[31]</sup>。有研究表明,BFR2 是涉及蛋白转运过程的影响因

素之一,而且 BFR2 的过表达有利于蛋白分泌量的增加<sup>[32]</sup>,但尚无文献对其影响机制进行报道。我们推测在毕赤酵母中进行 BFR2 的过表达可以减弱 BreFeldin A 对蛋白转运过程的抑制作用,增加内质网至高尔基体间的蛋白转运通量,从而进一步提升蛋白折叠速率,增加蛋白的分泌量。

在胞内过表达 BiP 和 PDI 后,重组菌株的蛋白表达量却出现大幅降低。这可能与二者作为毕赤酵母未折叠蛋白反应(Unfolded Protein Response, UPR)的调控蛋白对异源蛋白的分泌进行了调节有关<sup>[33]</sup>。BiP 为重链结合蛋白,主要作用为防止蛋白质分子间相互作用形成错误折叠,并与错误折叠或未折叠的蛋白质结合,阻止它们离开内质网<sup>[34]</sup>。PDI 为蛋白质二硫键异构酶,主要作用为促进内质网腔内蛋白质分子间二硫键的形成<sup>[35]</sup>。BiP 和 PDI 均属于分子伴侣,理论功能均可以有效地促进蛋白的加工合成,部分研究也都表明胞内过表达 BiP 或者 PDI 会增加蛋白的表达量,而本文的研究却显示内质网分子伴侣并非都能辅助蛋白的正确折叠和表达分泌,不同的蛋白可能会出现不同的结果。目前分子伴侣对分泌蛋白的影响机制尚不明确,但分泌蛋白在内质网进行折叠加工时,其停留时间会因为蛋白的不同而有所差异<sup>[36]</sup>。通常认为,在内质网中的停留时间越短,蛋白的分泌也就越快。重组菌株蛋白表达量降低的原因可能是由于 BiP 和 PDI 对内质网腔内蛋白折叠的介导作用,使得蛋白在内质网中的停留时间延长,从而在内质网上大量聚集,无法进行快速转运,进而影响蛋白的表达分泌。因此,分子伴侣对异源蛋白表达分泌的影响仍有待进一步研究。后续我们改造 DC 植酸酶毕赤酵母表达系统时,也将综合考虑异源蛋白的折叠、转运及分泌等多种因素,以期构建更高效的植酸酶表达菌株。

目前对 DC Phytase 进行异源表达的研究仅限于以毕赤酵母 X33 为宿主菌<sup>[15]</sup>,并且该研究主要侧重于发酵过程条件的优化,而本文则侧重于工

程菌株的构建。本研究通过菌株改造,找到了 2 个能够提高 DC Phytase 在毕赤酵母中表达的关键元件 *pep4* 和 BFR2,对其他菌株的改造同样具有参考意义和借鉴价值。本研究通过构建重组载体 pPIC9K-DCphy,实现了卡氏德巴利酵母植酸酶基因在毕赤酵母中的异源表达,并通过多拷贝筛选、蛋白酶 A 敲除、过表达 BFR2,获得优势菌株 GS115/DCphy( $\Delta$ Pep4)(BFR2),其摇瓶产酶酶活是低拷贝菌株的 7 倍。实验结果表明,毕赤酵母异源表达 DC Phytase 具有可行性,可通过发酵条件优化、尝试不同信号肽及启动子等方法进一步提升表达水平。实验结果为卡氏德巴利酵母植酸酶在毕赤酵母中的后续研究提供了可能,奠定了其工业化应用的基础。

## REFERENCES

- [1] Cominelli E, Pilu R, Sparvoli F. Phytic acid and transporters: what can we learn from low phytic acid mutants?[J]. *Plants*, 2020, 9(1): 69
- [2] Rosa-Sibakov N, Re M, Karsma A, Laitila A, Nordlund E. Phytic acid reduction by bioprocessing as a tool to improve the *in vitro* digestibility of *Faba bean* protein[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2018, 66(40): 10394-10399
- [3] Lei XG, Weaver JD, Mullaney E, Ullah AH, Azain MJ. Phytase, a new life for an "old" enzyme[J]. *Annual Review of Animal Biosciences*, 2013, 1(1): 283-309
- [4] Dersjant-Li Y, Awati A, Schulze H, Partridge G. Phytase in non-ruminant animal nutrition: a critical review on phytase activities in the gastrointestinal tract and influencing factors[J]. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2015, 95(5): 878-896
- [5] Gupta RK, Gangoliya SS, Singh NK. Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains[J]. *Journal of Food Science and Technology*, 2015, 52(2): 676-684
- [6] Rebello S, Jose L, Sindhu R, Aneesh EM. Molecular advancements in the development of thermostable phytases[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2017, 101(7): 2677-2689
- [7] Mirzaei M, Saffar B, Shareghi B. Cloning, Codon optimization, and expression of *Yersinia intermedia* phytase gene in *E. coli*[J]. *Iranian Journal of Biotechnology*, 2016, 14(2): 63-69
- [8] Tsuji S, Tanaka K, Takenaka S, Yoshida KI. Enhanced secretion of natto phytase by *Bacillus subtilis*[J]. *Bioscience*,

- Biotechnology, and Biochemistry, 2015, 79(11): 1906-1914
- [9] Xie ZM, Fong WP, Tsang PWK. Engineering and optimization of phosphate-responsive phytase expression in *Pichia pastoris* yeast for phytate hydrolysis[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2020, 137: 109533
- [10] Ajith S, Ghosh J, Shet D, ShreeVidhya S, Punith BD, Elangovan AV. Partial purification and characterization of phytase from *Aspergillus foetidus* MTCC 11682[J]. Applied Microbiology and Biotechnology Express, 2019, 9(1): 3
- [11] Karbalaie M, Rezaee SA, Farsiani H. *Pichia pastoris*: a highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins[J]. Journal of Cellular Physiology, 2020, 235(9): 5867-5881
- [12] Li D, Zhang B, Li ST, Zhou J, Cao H, Huang Y, Cui ZL. A novel vector for construction of markerless multicopy overexpression transformants in *Pichia pastoris*[J]. Frontiers in Microbiology, 2017, 8: 1698
- [13] Hesampour A, Siadat SER, Malboobi MA, Mohandesi N, Arab SS, Ghahremanpour MM. Enhancement of thermostability and kinetic efficiency of *Aspergillus niger* PhyA phytase by site-directed mutagenesis[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2015, 175(5): 2528-2541
- [14] Boze H, Omela A, Moulin G. *Debaryomyces castellii* phytase: CN101263226[P]. 2008-09-10 (in Chinese)  
埃莱娜·布兹, 安德烈·奥美拉, 居·穆兰. 卡氏德巴利酵母植酸酶: CN101263226A[P]. 2008-09-10
- [15] Ragon M, Neugnot-Roux V, Chemardin P, Moulin G, Boze H. Molecular gene cloning and overexpression of the phytase from *Debaryomyces castellii* CBS 2923[J]. Protein Expression and Purification, 2008, 58(2): 275-283
- [16] Ragon M, Hoh F, Aumelas A, Chiche L, Moulin G, Boze H. Structure of *Debaryomyces castellii* CBS 2923 phytase[J]. Acta Crystallographica Section F, Structural Biology and Crystallization Communications, 2009, 65(Pt 4): 321-326
- [17] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China, Standardization Administration of the People's Republic of China. National Standard (Recommended) of the People's Republic of China: Determination of feed phytase activity - Spectrophotometric method. GB/T 18634-009[S]. Beijing: Standards Press of China, 2009 (in Chinese)  
中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国推荐性国家标准: 饲用植酸酶活性的测定 分光光度法 GB/T 18634-2009[S]. 北京: 中国标准出版社, 2009
- [18] Marsalek L, Gruber C, Altmann F, Aleschko M, Mattanovich D, Gasser B, Puxbaum V. Disruption of genes involved in CORVET complex leads to enhanced secretion of heterologous carboxylesterase only in protease deficient *Pichia pastoris*[J]. Biotechnology Journal, 2017, 12(5): 1600584
- [19] Aw R, Polizzi KM. Liquid PTVA: a faster and cheaper alternative for generating multi-copy clones in *Pichia pastoris*[J]. Microbial Cell Factories, 2016, 15(1): 1-11
- [20] Jiao LC, Zhou QH, Su ZX, Xu L, Yan YJ. High-level extracellular production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* via a strategy combining optimization of gene-copy number with co-expression of ERAD-related proteins[J]. Protein Expression and Purification, 2018, 147: 1-12
- [21] Li C, Lin Y, Zheng XY, Pang N, Liao XH, Liu XX, Huang YY, Liang SL. Combined strategies for improving expression of *Citrobacter amalonaticus* phytase in *Pichia pastoris*[J]. BioMed Central Biotechnology, 2015, 15(1): 1-11
- [22] Zhou XS, Zhang YX. Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by *Pichia pastoris* by controlling the specific growth rate[J]. Biotechnology Letters, 2002, 24(17): 1449-1453
- [23] Cho EY, Cheon SA, Kim H, Choo J, Lee DJ, Ryu HM, Rhee SK, Chung BH, Kim JY, Kang HA. Multiple-yapsin-deficient mutant strains for high-level production of intact recombinant proteins in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Journal of Biotechnology, 2010, 149(1/2): 1-7
- [24] Marques M, Mojzita D, Amorim MA, Almeida T, Hohmann S, Moradas-Ferreira P, Costa V. The Pep4p vacuolar proteinase contributes to the turnover of oxidized proteins but PEP4 overexpression is not sufficient to increase chronological lifespan in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. Microbiology: Reading, England, 2006, 152(Pt 12): 3595-3605
- [25] Wu M, Shen Q, Yang Y, Zhang S, Qu W, Chen J, Sun HY, Chen SQ. Disruption of YPS1 and PEP4 genes reduces proteolytic degradation of secreted HSA/PTH in *Pichia pastoris* GS115[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2013, 40(6): 589-599
- [26] Ammerer G, Hunter CP, Rothman JH, Saari GC, Valls LA, Stevens TH. PEP4 gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes proteinase A, a vacuolar enzyme required for processing of vacuolar precursors[J]. Molecular and Cellular Biology, 1986, 6(7): 2490-2499
- [27] Helian YK, Gai YM, Fang H, Sun YM, Zhang DW. A multistrategy approach for improving the expression of *E. coli* phytase in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2020, 47(12): 1161-1172
- [28] Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, Borth N, Mattanovich D. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 85(4): 367-375
- [29] Soltanieh S, Lapensée M, Dragon F. Nucleolar proteins Bfr2 and Enp2 interact with DEAD-box RNA helicase Dbp4 in

- two different complexes[J]. *Nucleic Acids Research*, 2014, 42(5): 3194-3206
- [30] Chabane S, Gachet E, Képès F. Over-expression of the yeast BFR2 gene partially suppresses the growth defects induced by Brefeldin A and by four ER-to-Golgi mutations[J]. *Current Genetics*, 1998, 33(1): 21-28
- [31] Chardin P, McCormick F. Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive[J]. *Cell*, 1999, 97(2): 153-155
- [32] Gasser B, Sauer M, Maurer M, Stadlmayr G, Mattanovich D. Transcriptomics-based identification of novel factors enhancing heterologous protein secretion in yeasts[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2007, 73(20): 6499-6507
- [33] Yang J, Lu ZP, Chen JW, Chu PP, Cheng QM, Liu J, Ming FP, Huang CY, Xiao AJ, Cai HM, et al. Effect of cooperation of chaperones and gene dosage on the expression of porcine PGLYRP-1 in *Pichia pastoris*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2016, 100(12): 5453-5465
- [34] Liu YY, Woo JH, Neville DM. Overexpression of an anti-CD3 immunotoxin increases expression and secretion of molecular chaperone BiP/Kar2p by *Pichia pastoris*[J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005, 71(9): 5332-5340
- [35] Onda Y, Kobori Y. Differential activity of rice protein disulfide isomerase family members for disulfide bond formation and reduction[J]. *Federation of European Biochemical Societies Open Biology*, 2014, 4: 730-734
- [36] Rowling PJE, Freedman RB. Folding, assembly, and posttranslational modification of proteins within the lumen of the endoplasmic reticulum[J]. *Sub-Cellular Biochemistry*, 1993, 21: 41-80