

## 朱黄青霉 $\alpha$ -葡聚糖酶在毕赤酵母中的高效表达\*

# High Expression of Dextranase from *Penicillium Minioluteum* in *Pichia pastoris*

黄曾慰<sup>1</sup>,梁达奉<sup>1,2\*\*</sup>,曾练强<sup>1</sup>,吴兆鹏<sup>1</sup>,马步<sup>2</sup>,常国炜<sup>1</sup>

HUANG Zeng-wei<sup>1</sup>,LIANG Da-feng<sup>1,2</sup>,ZENG Lian-qiang<sup>1</sup>,WU Zhao-peng<sup>1</sup>,MA Bu<sup>2</sup>,Chang Guo-wei<sup>1</sup>

(1. 广州甘蔗糖业研究所,广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室,广东广州 510316;2. 广西农垦糖业集团股份有限公司,广西糖业研发中心,广西南宁 530002)

(1. Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangdong Key Lab of Sugarcane Improvement & Biorefinery, Guangzhou, Guangdong, 510316, China; 2. Guangxi State Farms Sugar Industrial Group Company Limited, Guangxi Sugarcane Industry R&D Center, Nanning, Guangxi, 530002, China)

**摘要:**【目的】提高朱黄青霉(*Penicillium minioluteum*) $\alpha$ -葡聚糖酶(Dextranase)基因在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)中的表达水平。【方法】根据毕赤酵母的密码子偏爱对酶基因进行优化与合成。优化后的基因片段与载体 pGAPZ $\alpha$ A 连接,转化毕赤酵母 KM71H。【结果】获得组成型分泌表达  $\alpha$ -葡聚糖酶的工程菌 KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-*dex*。发酵工艺试验中,摇瓶培养 144 h,酶活为 153 U/mL。6.8 L 发酵罐补料分批培养 92 h,酶活达到 1218 U/mL。【结论】该工程菌以甘油作为碳源,发酵调控简单,产酶水平较高,具有适用于大规模生产的潜力。

**关键词:**  $\alpha$ -葡聚糖酶 密码子优化 毕赤酵母 重组菌

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2014)06-0614-05

**Abstract:**【Objective】The aim of this paper is to enhance the expression level of a dextranase gene *dex* of *Penicillium minioluteum* in *Pichia pastoris*. 【Methods】Codon optimization was applied and the dextranase gene was synthesized using the preferential codon of *pichia pastoris*. The codon-optimized gene was cloned into the vector pGAPZ $\alpha$ A and transformed into host strain KM71H to achieve constitutive expression and secretion of dextranase. 【Results】The activity of dextranase reached 153 U/mL after 144 h when the engineering strain KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-*dex* was cultured in shake flask. Using glycerol as the sole carbon source, a simple fermentation control strategy has been developed and expression level of 1218 U/mL after 92 h has been demonstrated in 6.8 L scale fed-batch fermentation. 【Conclusion】The high expression level makes the engineering strain a good candidate for industrial production.

**Key words:** dextranase, codon optimization, *Pichia pastoris*, recombinant strain

收稿日期:2014-10-10

修回日期:2014-11-13

作者简介:黄曾慰(1984-),男,工程师,主要从事食品生物技术方面的研究。

\* 现代农业产业技术体系建设专项项目(CARS-20-4-5)和八桂学者建设工程专项经费项目资助。

\*\* 通讯作者:梁达奉(1964-),男,博士,教授级高级工程师,八桂学者,主要从事制糖生物技术研究,E-mail:ldfjt@126.com。

【研究意义】 $\alpha$ -葡聚糖( $\alpha$ -dextran),又称右旋糖酐,是一种由  $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖单体聚合而成的多糖,主链由  $\alpha$ -1,6-糖苷键构成,支链中存在  $\alpha$ -1,2-、 $\alpha$ -1,3-和  $\alpha$ -1,4-糖苷键。自然界中某些微生物如肠膜明串珠菌(*Leuconoto mesenteroides*)可分泌右旋糖酐蔗糖酶(Dextranase, E. C. 2. 4. 1. 5)催化蔗糖水解成葡萄糖和果糖,并聚合葡萄糖生成  $\alpha$ -葡聚糖。 $\alpha$ -葡

聚糖在医药、食品、化工领域有着广泛的应用,在制糖工业中却产生负面影响;甘蔗受到损伤、病虫害、霜冻或长时间放置之后容易受到明串珠菌、链球菌等微生物感染而形成 $\alpha$ -葡聚糖,直接或间接导致糖分损失、糖液粘度增加、旋光度变化、过滤困难、结晶异常以及糖产品质量下降。 $\alpha$ -葡聚糖酶(Dextranase, EC 3. 2. 1. 11)是一类能够专一裂解 $\alpha$ -葡聚糖中 $\alpha$ -1, 6-糖苷键的糖苷水解酶,酶促反应产物视酶的来源和底物的不同而有所差别,主要包括异麦芽糖、异麦芽三糖和葡萄糖<sup>[1]</sup>。 $\alpha$ -葡聚糖酶作为生物催化剂,可减少 $\alpha$ -葡聚糖对制糖工业带来的影响<sup>[2]</sup>,其高效、安全、环保的特性优于其它澄清剂或化学助剂。【前人研究进展】目前商品化的 $\alpha$ -葡聚糖酶主要是从青霉属(*Penicillium*)和毛壳属(*Chaetomium*)的培养物中分离得到。通过基因工程方法异源表达 $\alpha$ -葡聚糖酶的研究主要集中在毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统和大肠杆菌(*Escherichia coli*)表达系统。大肠杆菌表达 $\alpha$ -葡聚糖酶的效果不甚理想,后续纯化有一定难度,并非大规模生产的最佳选择。巴斯德毕赤酵母表达系统是近20年来应用最广泛的真核表达系统之一,已有数百种基因在该系统得到成功表达。该系统因其高效表达外源蛋白,宿主背景蛋白少,培养成本低,分泌表达利于纯化分离等特点受到关注<sup>[3,4]</sup>。Roca等<sup>[5]</sup>使用醇氧化酶(AOX)启动子,构建了产外源 $\alpha$ -葡聚糖酶的甲醇诱导毕赤酵母工程菌,通过5 L发酵罐培养获得了接近3000 U/mL的产酶结果。使用类似的表达策略,Chen等<sup>[6]</sup>获得了83.9 U/mL的酶活,Kang等<sup>[7]</sup>取得了134 U/mL的酶活。然而甲醇作为碳源可能造成一定的生产安全和食品安全隐患,若以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAP)启动子作为外源基因启动子,则可利用葡萄糖或甘油等碳源组成型表达外源蛋白<sup>[8]</sup>。梁达奉等<sup>[9]</sup>在毕赤酵母中组成型表达 $\alpha$ -葡聚糖酶,摇瓶培养酶活达到60.4 U/mL。【本研究切入点】根据毕赤酵母密码子的偏爱性对野生基因进行优化与合成,构建组成型分泌表达 $\alpha$ -葡聚糖酶的工程菌。【拟解决的关键问题】构建高产工程菌,并优化发酵工艺。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种和质粒

毕赤酵母(*Pichia pastoris*) KM71H、质粒pGAPZ $\alpha$ A购自Invitrogen公司; *E. coli* JM109感受态细胞购自Takara公司。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

寡核苷酸引物由Invitrogen公司合成;基因合成委托GenScript公司完成;Taq DNA聚合酶、T4 DNA连接酶、限制性内切酶、菌体裂解液、质粒小提试剂盒、DNA片段纯化试剂盒和DNA凝胶回收试剂盒购自Takara公司;Dextran T2000购自Pharmacia公司;PCR仪购自Biometra公司;Multiporator电转电融合仪为Eppendorf公司产品;6.8 L BIOSTAT Aplus发酵罐为B. BRAUN公司产品。

#### 1.1.3 培养基

LLB、YPD、YPDS培养基按照Invitrogen公司的毕赤酵母表达手册配制;YPG培养基成分为10 g/L酵母粉,20 g/L蛋白胨,50 g/L甘油。基础培养基BSM参照Invitrogen公司手册,经调整后成分为50 g/L glycerol, 0.93 g/L CaSO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 18.2 g/L K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14.9 g/L MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 4.13 g/L KOH, 26.7 mL/L 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>以及12 mL/L PTM<sub>1</sub>微量元素溶液(6.0 g/L CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O, 0.08 g/L KI, 3.0 g/L MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O, 0.2 g/L Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.02 g/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.5 g/L CoCl<sub>2</sub>, 20 g/L ZnCl<sub>2</sub>, 65 g/L FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.2 g/L Biotin, 5 mL/L 98% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)。

### 1.2 基因密码子优化和表达载体的构建

根据朱黄青霉(*Penicillium minioluteum*)的 $\alpha$ -葡聚糖酶氨基酸序列(GenBank GI:37927147),综合考虑毕赤酵母密码子的使用偏爱性,基因的GC含量以及mRNA的二级结构,经密码子优化后合成 $\alpha$ -葡聚糖酶基因 $dex$ ,全长1722bp,对应574aa。合成基因连接pUC57得到克隆载体pUC57- $dex$ 。DNA及对应的氨基酸序列如图1所示。设计上游引物P1(5'-CGC GAATTCCATGGTACTACAGCTAACAC)和下游引物P2(5'-TGAAT GCGGC-CGCAGAAATTTGCCACTCTCC),下划线所示分别为EcoRI和NotI酶切位点。以克隆载体pUC57- $dex$ 为模板,P1、P2为引物,进行PCR扩增,条件为95℃,5 min;(94℃,1 min;53℃,1 min;72℃,2 min)共32个循环;72℃,10 min。PCR产物经胶回收得到目的基因片段。目的片段和质粒pGAPZ $\alpha$ A分别用EcoRI和NotI进行双酶切。酶切产物经T4 DNA连接酶连接过夜,转化感受态大肠杆菌JM109,于LLB抗性平板(含25  $\mu$ g/mL Zeocin)上筛选阳性克隆。挑取若干克隆进行菌落PCR鉴定,双酶切鉴定。送交测序,得到序列和读码框正确的重组表达载体pGAPZ $\alpha$ A- $dex$ 。

```

1 H G T T A N T H C G A D F C T W W H D S G E I N T Q T P V Q
1 CATGGTACTACAGTAAACACACACTGTGGAGCTGATTCTGTACTTGGTGGCATGACTCTGGTGAATAAACACTCAAACACCAGTTCAG
31 P G N V R Q S H K Y S V Q V S L A G T D N F H D S F V Y E S
31 CCTGGAAATGTTAGACAATCACATAAGTACTGTTCAGGTTTCCTTGGCTGGTACTAAACAATCCACGATTCTTTCGTTTACGAGTCC
61 I P R N G N G R I Y A P T D P P N S N T L D S S V D D G I S
181 ATTCTAGAAACGGAAATGGTAGAATCTACGCTCCAACAGATCCACCTAACCTAATACTTTGGACTCTTCGGTTGATGACGGTATTCTI
91 I E P S I G L N M A W S Q F E Y S H D V D V K I L A T D G S
271 ATCGAACCTTCTATTGGATTGAACATGGCTTGGTCACAATTTGAGTATTCTCAGGATGTGACGTTAAAAATTTGGCTACTGATGGTTCA
121 S L G S P S D V Y I R P V S I S Y A I S Q S D D G G I V I R
361 TCTTTGGGATCTCCATCCGACGTTGTTATCAGACCTGTTCAATTTCTTACGCTATCTCCAGTCAGATGACGGTGGAAATGTTATCAGA
151 V P A D A N G R K F S V E F K T D L Y T F L S D G N E Y V T
451 GTTCTGCTGATGCTAACGGTAGAAAGTTCACGTTGAATTTAAGACAGATTGTACACTTCTTGCTGACGGTAAACGAATACGTTACA
181 S G G S V V G V E P T N A L V I F A S P F L P S G M I P H M
541 TCCGGTGGATCGTGTGGAGTTGAGCCAATAAGCTTTGGTTATTTTCGCTTCCCAATTTTGGCTTGGTATGATCCACATG
211 T P D N T Q T M T P G P I N N G D W G A K S I L Y F P P G V
631 ACTCCTGACAACACTCAAACAATGACTCCAGGACCTATTAACAATGGAGATTGGGGTGCTAAGTCTATCTGTACTTCCACCTGGTGT
241 Y W M N Q D Q S G N S G K L G S N H I R L N S N T Y W V Y L
721 TATTGGATGAACCAAGACTCAGTCTGGAATTCGGAAATTCGGGATCTAACCCATCAGATTGACCTCCAACTACTGCTGTTTATTG
271 A P G A Y V K G A I E Y F T K Q N F Y A T G H G I L S G E N
811 GCTCTGGTGTACTAGTTAAGGGAGCTATCGAATACTTCACAAAGCAAAACTTCTACGCTACTGGACATGGTATCTGTCTGGAGAGAAT
301 Y V Y Q A N A G D N Y I A V K S D S T S L R M W W H N N L G
901 TACGTTTATCAGGCTAACGCTGGAGATAATTATATTGCTGTTAAGTCTGACTCCACTTCATTGAGAAATGGTGGCACAACAATTTGGGT
331 G G Q T W Y C V G P T I N A P P F N I M D F N G N S G I S S
991 GGAGTCAAACATGGTACTGTGTGGTCCAACATTAACGCTCCACTTCAATACTATGGACTTTAACGGTAAATTCAGGAATCTCCTCA
361 Q I S D Y K Q V G A F F Q L T D G P E I Y P N S V V H D V F
1081 CAAATCTCTGATTACAAGCAGTTGGTGTCTTTTCCAAACTGACGGACCAGAAATTTACCCTAACTCTGTGTTCATGATGTTTC
391 W H V N D D A I K I Y Y S G A S V S R A T I W K C H N D P I
1171 TGGCAGTTAACGATGACGCTATCAAGATTTACTACTCTGGTGTCTGTTTCCAGAGCTACAATCTGGAAGTGTCATAACGATCCAATC
421 I Q M G W T S R D I T S G V T I D T L N V I H T Y I K S E T
1261 ATCCAAATGGTGGTGGACTTCCAGATAATTCAGGAGTTACAATCGACCTTTGAACGTTATCCACACAAGATACATCAAGTCTGAAACT
451 V V P S A I I G A S P F Y A S G M S P D S R K S I S M T V S
1351 GTTGTCCATCCGCTATTATCGGTGCTTACCTTCTACGCTTCAGGAATGCTCCAGACTCCAGAAAGTCAATCTCTATGACAGTTCTI
481 N V V C E G L C P S L F R I T P L Q N Y K N F V V K N V A F
1441 AACGTTGTTTGAGGGTTTGTTGCCATCTGTTTAGAATCACTCTTTGCAAAACTACAAGAATTCGTTGTTAAGAACGTTGCTTTT
511 P D G L Q T N S I G T G E S I P A S G L A T M G L A I S A
1531 CCTGATGGATTGCAGACAAATCTATTGGAACGAGAGTCCATTATCCAGCTGCTTACGGTTTGACTATGGGATTGGCTATTTCCGCT
541 W T I G G Q K V T M E N F Q A N S L G Q F N I D G S Y W G E
1621 TGGACAATCGGAGGTCAAAGGTTACTATGAAAACCTCCAAGCTAATCTTTGGGACAGTTAATATTGATGGTTCTACTGGGGAGAG
571 W Q I S
1711 TGGCAAATTTCT

```

图1  $\alpha$ -葡聚糖酶的氨基酸序列与优化的基因序列

Fig. 1 Amino acid sequence of dextransase and nucleotide sequence of the optimized gene

### 1.3 毕赤酵母工程菌 KM71H/pGAPZaA-dex 的构建

表达载体 pGAPZaA-dex 经 *Avr*II 于 37°C 酶切过夜,酶切产物使用 DNA 片段纯化试剂盒纯化后得到线性化载体。感受态毕赤酵母按照 Invitrogen 公司产品手册所述制备。线性化质粒与约 80  $\mu$ L 感受态毕赤酵母 KM71H 混合,放入 1 mm 电击转化杯中冰浴 5 min 后电击转化。电击参数为 1600 V、25  $\mu$ F、200  $\Omega$ 。酵母细胞转化之后涂布于 YPDS 抗性平板(含 100  $\mu$ g/mL Zeocin),30°C 培养 3~4 d。挑取若干单菌落,使用菌体裂解液处理以释放出基因组 DNA,所得裂解液直接用作 PCR 反应中的模板。采用前述基因上下游引物 P1 和 P2 进行菌落 PCR 鉴定,挑选阳性转化子,获得毕赤酵母工程菌 KM71H/pGAPZaA-dex。

### 1.4 工程菌的摇瓶培养

从抗性平板上挑选阳性克隆子,接入装有 50 mL

YPG 培养基的 250 mL 三角瓶中,30°C、250 r/min 培养 48 h。取 100  $\mu$ L 作为种子液接入新鲜的 50 mL YPG 培养基中,相同条件培养 144 h。每隔 24 h 取样 1 mL 测定发酵液中的菌体湿重和上清酶活。

### 1.5 工程菌的补料分批培养

挑取菌种接入 30 mL YPD 培养基中活化,30°C、250 r/min 摇瓶培养过夜后转接入 300 mL YPD 培养基中,培养至  $OD_{600}$  达到 12~15,即为种子液。300 mL 种子液接入装有 2.7 L BSM 培养基的 6.8 L 发酵罐中,起始培养基体积为 3 L。培养条件为 30°C,pH 值为 5.5。通气与转速控制:0~6 h,通气量为 3 L/min,转速 400 r/min;6~12 h,通气量为 4 L/min,转速 600 r/min;12 h 之后,通气量为 5 L/min,转速 800 r/min。补料培养基成分为 100% 甘油,12 mL/L PTM<sub>1</sub> 微量元素溶液。发酵培养至 38 h,待培养基中甘油浓度低于 0.3% 时,加入补料培养基。此后通过流加补料保持甘油浓度为 0.2%~

1%。

### 1.6 酶活测定

发酵液经 12000 r/min 离心 5 min 后取上清液，经稀释适当倍数后即为本实验所用酶液。取 900  $\mu\text{L}$ ，浓度为 0.02 g/mL 的 Dextran T2000 溶液作为反应底物，置于 45 $^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中保温 5 min，然后加入 100  $\mu\text{L}$  酶液。反应 10 min，加入 2 mL 3,5-二硝基水杨酸钠试剂(DNS)以终止反应，沸水浴 5 min，然后迅速将其冷却，用蒸馏水定容至 25 mL，于 540 nm 下测定吸光值。从标准曲线的回归方程求得相对应的葡萄糖的量，并计算出酶活。

酶活定义：采用 DNS 法，在 45 $^{\circ}\text{C}$ 、pH 值为 5.5 的条件下，每分钟催化底物水解产生 1  $\mu\text{mol}$  葡萄糖所需的酶量为 1 个酶活单位，以 U 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因密码子优化和表达载体的构建

图 1 为  $\alpha$ -葡聚糖酶的氨基酸序列(GenBank GI: 37927147)与相对应的优化合成基因序列。表 1 统计了合成基因 *dex* 的密码子使用情况，与表达宿主毕赤酵母的密码子使用频率进行对比。优化后的基因根据毕赤酵母的密码子偏爱，均采用了宿主的高频率密码子，没有出现稀有密码子。合成基因与组成型分泌表达载体 pGAPZ $\alpha$ A 连接，得到重组质粒 pGAPZ $\alpha$ A-*dex*。GAP 启动子作为外源基因启动子，基因的上游为  $\alpha$  因子信号肽编码序列，下游为 c-myc epitope 和 6 $\times$ His 标签编码序列(图 2)。

表 1 合成基因 *dex* 的密码子使用情况与宿主毕赤酵母密码子使用频率

Table 1 Codon usage of synthetic *dex* gene and fraction of codon usage in *Pichia pastoris*

AA	密码子 Codon	宿主使用频率 Host fraction	<i>dex</i>	AA	密码子 Codon	宿主使用频率 Host fraction	<i>dex</i>	AA	密码子 Codon	宿主使用频率 Host fraction	<i>dex</i>
Gly	GGG	0.1	0	Asn	AAT	0.49	14	Ser	AGT	0.15	0
	GGA	0.32	29		AAC	0.51	29		AGC	0.09	0
	GGT	0.44	27		Ile	ATA	0.19		0	TCG	0.09
Glu	GGC	0.14	0		ATT	0.5	20	TCA	0.19	15	
	GAG	0.43	7		ATC	0.3	24	TCT	0.29	29	
	GAA	0.57	8	Thr	ACG	0.11	0	TCC	0.2	19	
Val	GTG	0.19	0		ACA	0.24	15	Lys	AAG	0.53	16
	GTA	0.15	0		ACT	0.4	24	AAA	0.47	1	
	GTT	0.42	42		ACC	0.25	0	Leu	TTG	0.33	24
Ala	GTC	0.23	0	Trp	TGG	1	15	TTA	0.16	0	
	GCG	0.06	0	Cys	TGT	0.65	6	CTG	0.16	0	
	GCA	0.23	0		TGC	0.35	0	CTA	0.11	0	
Arg	GCT	0.45	33	Tyr	TAT	0.46	5	CTT	0.16	0	
	GCC	0.26	0		TAC	0.55	21	CTC	0.08	0	
	AGG	0.16	0	Phe	TTT	0.54	9	His	CAT	0.57	7
Met	AGA	0.48	13		TTC	0.46	15	CAC	0.43	7	
	CGG	0.05	0	Gln	CAG	0.39	8	Pro	CCG	0.08	0
	CGA	0.1	0		CAA	0.61	14	CCA	0.42	17	
	CGT	0.16	0	Asp	GAT	0.58	19	CCT	0.35	16	
	CGC	0.05	0		GAC	0.42	14	CCC	0.15	0	
	ATG	1	12								

### 2.2 工程菌的摇瓶培养

从抗性平板上挑取 300 个阳性克隆，通过摇瓶培养初步筛选出酶活较高的工程菌。对筛选出的工程菌摇瓶培养复筛，记录其生长和产酶曲线(图 3)。组成型表达工程菌的生长曲线主要显示出对数期和稳定期两个阶段，菌体湿重在 120 h 达到最大值 70 g/L，酶活则在 144 h 达到 153 U/mL。

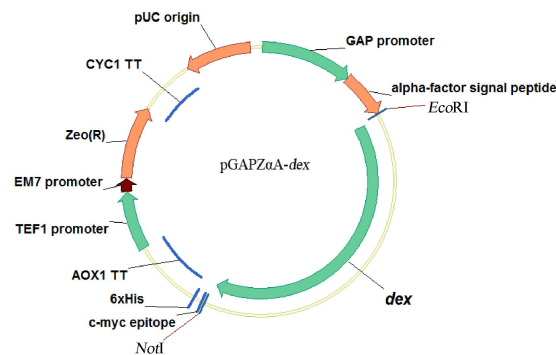


图 2 重组质粒 pGAPZ $\alpha$ A-*dex* 的结构示意图

Fig. 2 Structure of recombinant plasmid pGAPZ $\alpha$ A-*dex*

### 2.3 工程菌的补料分批培养

根据 GAP 启动子的特性，组成型毕赤酵母工程菌利用单一碳源生长，发酵过程无需加入诱导物即可稳定表达目标蛋白。发酵调控无需碳源的转换操作，没有生长期和诱导期两个阶段的区分，发酵过程中控制通气量、搅拌、补料使菌体处于适宜生长条件，达到较高的密度。如图 4 所示，一级种子以 10% 的接种量接入发酵罐，前 28 h 处于生长调整期，菌体增长较慢。28 h 进入对数期，湿重快速增长，83 h 湿重达到

570 g/L。此后进入稳定期,至 92 h 发酵结束,湿重达到 581 g/L。酶活曲线和生长曲线走向基本一致,菌体和表达产物的积累表现出较强的正相关性,92 h 酶活达到峰值 1218 U/mL。

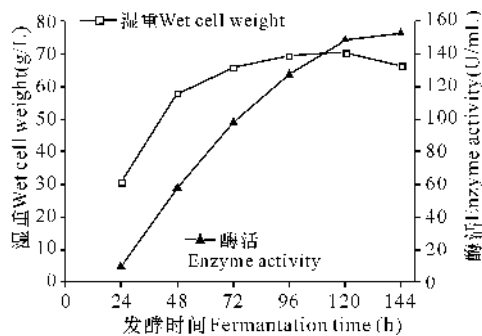


图3 摇瓶培养酶活和生长曲线

Fig. 3 The dextranase activity and cell growth curve in shake flask cultures

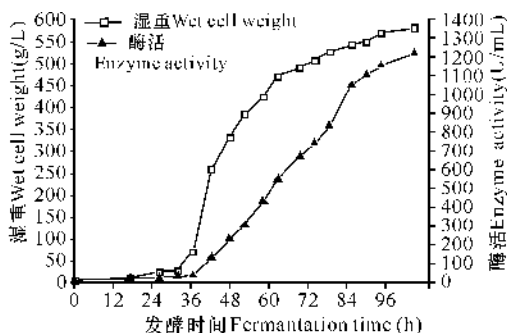


图4 发酵罐补料分批培养条件下的生长曲线和酶活曲线

Fig. 4 Cell growth curve and dextranase activity profile in fed-batch fermentation

### 3 讨论

毕赤酵母作为宿主表现出一定程度的密码子使用偏爱,外源基因与表达宿主的密码子使用频率的匹配程度对于蛋白表达水平有较大的影响,稀有密码子的存在会严重限制翻译速率。本研究根据毕赤酵母的密码子偏爱对基因序列进行了优化合成,避免了稀有密码子的使用,均采用宿主偏爱的高频率密码子,以期在翻译水平上提高表达量。此外,基因表达盒的拷贝数、信号肽序列、宿主类别、培养条件等因素也和外源蛋白表达量密切相关。

GAP 启动子与 AOX 启动子作为毕赤酵母表达系统中的两类启动子的典型代表,决定了两种不同的表达调控策略。从文献报道来看,两者驱动不同的外源基因表达能力并无绝对的优劣之分,使用 AOX 启动子获得较高表达水平的例子更多一些。GAP 启动子的优势在于组成型表达可以避免有毒易燃易爆品甲醇的使用,利于大规模生产。由于无需切换碳源,发酵调控简单,外源蛋白到达峰值的时间一般更短,如本文中以甘油为碳源时发酵罐补料分批培养周期

一般不超过 96 h。外源基因以整合方式进入毕赤酵母基因组使得工程菌具有良好的遗传稳定性,发酵过程中无需施加选择压力,多次传代后基因组中外源基因未丢失,在数年的发酵工艺试验中,各批次试验产酶水平稳定(数据未显示)。下一步将放大培养规模,优化下游工艺,降低生产成本。

### 4 结论

本研究对源自朱黄青霉的  $\alpha$ -葡聚糖酶基因进行了密码子优化,并实现了在毕赤酵母中的组成型分泌表达。筛选得到高效表达  $\alpha$ -葡聚糖酶的工程菌 KM71H/pGAPZ $\alpha$ A-*dex*, 经 6.8 L 发酵罐高密度发酵 92 h,酶活达到 1218 U/mL。该工程菌产酶水平较高,发酵调控简单,为  $\alpha$ -葡聚糖酶的大规模生产奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] Khalikova E, Susi P, Korpela T. Microbial dextran-hydrolyzing enzymes; Fundamentals and applications [J]. Microbiol Mol Biol Rev, 2005, 69(2): 306-325.
- [2] Eggleston G, Monge A, Montes B, et al. Application of dextranases in sugarcane factory: Overcoming practical problems [J]. Sugar Tech, 2009, 11(2): 135-141.
- [3] Gasser B, Prielhofer R, Marx H, et al. *Pichia pastoris*: Protein production host and model organism for biomedical research [J]. Future Microbiol, 2013, 8(2): 191-208.
- [4] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(12): 5301-5317.
- [5] Roca H, Garcia B, Rodriguez E, et al. Cloning of the *Penicillium minioluteum* gene encoding dextranase and its expression in *Pichia pastoris* [J]. Yeast, 1996, 12(12): 1187-1200.
- [6] Chen L, Zhou X, Fan W, et al. Expression, purification and characterization of a recombinant *Lipomyces starkeyi* dextranase in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expr Purif, 2008, 58(1): 87-93.
- [7] Kang H K, Park J Y, Ahn J S, et al. Cloning of a gene encoding dextranase from *Lipomyces starkeyi* and its expression in *Pichia pastoris* [J]. J Microbiol Biotechnol, 2009, 19(2): 172-177.
- [8] Zhang A, Luo J, Zhang T, et al. Recent advances on the GAP promoter derived expression system of *Pichia pastoris* [J]. Molecular Biology Reports, 2009, 36(6): 1611-1619.
- [9] 梁达奉, 黄曾慰, 曾练强, 等.  $\alpha$ -葡聚糖酶在毕赤酵母中的组成型表达 [J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2012, 40(5): 96-100.

Liang D F, Huang Z W, Zeng L Q, et al. Constitutive expression of dextranase in *Pichia pastoris* [J]. Journal of South China University of Technology: Natural Science Edition, 2012, 40(5): 96-100.

(责任编辑:竺利波)