

共表达 *HAC1* 基因对重组毕赤酵母分泌表达葡萄糖氧化酶的影响

顾磊^{1,3}, 张娟^{1,3}, 堵国成^{1,3}, 陈坚^{*2,3}

(1. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122; 2. 粮食发酵工艺与技术国家工程实验室, 江南大学, 江苏 无锡 214122; 3. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122)

摘要: 通过增强不可折叠蛋白质响应(UPR)信号途径以及研究不同培养温度下的影响, 来提高重组葡萄糖氧化酶在毕赤酵母中的分泌表达。影响毕赤酵母外源蛋白表达的因素, 主要为内质网中的折叠速率以及不可折叠蛋白积累造成的胞内胁迫压力。通过共表达 *HAC1* 基因对不可折叠蛋白信号通路进行调控, 摇瓶中改造菌株 PP-G-HAC1 胞外酶活达到 161 U/mL, 相比于原始重组葡萄糖氧化酶菌株提高了 34%。进一步研究不同温度下过量表达 *HAC1* 基因对菌株的生长和分泌外源蛋白的影响, 菌株 PP-G-HAC1 在 3 L 发酵罐中 28 °C 培养, 酶活达到 1 008 U/mL, 胞外重组蛋白质达到 14.43 g/L, 相比原始菌株在相同条件下提高了 3.12 倍。

关键词: 重组毕赤酵母; 葡萄糖氧化酶; 不可折叠蛋白响应; *HAC1* 基因

中图分类号: Q 555 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)02—0113—10

Effects of Co-Expression of *HAC1* on Glucose Oxidase Production in Recombinant *Pichia pastoris*

GU Lei^{1,3}, ZHANG Juan^{1,3}, DU Guocheng^{1,3}, CHEN Jian^{*2,3}

(1. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. National Engineering Laboratory for Cereal Fermentation Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 3. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this work, the enhancement of unfolded protein response transcription pathway at different cultivation temperatures were integrated as a novel protein secretion strategy to improve extracellular enzyme concentration and specific productivity of heterologous glucose oxidase (GOD) in *Pichia pastoris*. Efficient production of heterologous proteins in *P. pastoris* was often limited by metabolic and intrinsic stresses such as folding rate and ER stress by accumulation of unfolded protein. The results showed that enzymatic activity of engineered secretion strain PP-G-HAC1, co-expression of UPR activating transcription factor Hac1p from *P. pastoris*, was up 161 U/mL in shake flasks, 34% higher compared to control strain. Furthermore, the effects of different cultivation

收稿日期: 2014-08-29

基金项目: 国家自然科学基金重大项目(31470160); 国家 863 计划项目(2011AA100905); 国家 973 计划项目(2013CB733902); 博士后科学基金项目(114957, 2013M540538); 江苏省自然科学基金项目(BK2012553)。

* 通信作者: 陈坚(1962—), 男, 江苏无锡人, 工学博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵工程和食品生物技术方面的研究。

E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

temperatures (22, 28 °C) were also investigated. The highest GOD activity and extracellular concentration at 28 °C in PP-G-HAC1 were 1,008 U/mL and 14.43 g/L, respectively, 3.12-fold increase than that of control strain.

Keywords: *Pichia pastoris*, glucose oxidase, unfolded protein response, *HAC1*

葡萄糖氧化酶(EC 1.1.3.4, 简称 GOD)是生物领域中重要的工具酶。它是一种黄素蛋白, 可以将 β -D-葡萄糖通过分子氧传递电子转化为葡萄糖酸和过氧化氢。葡萄糖氧化酶被广泛应用于食品、饲料、医药等行业^[1]。其中在医药和食品领域中的作用尤为重要。在医药领域中, 可制成试剂盒及电极, 用于血浆、尿液及脑脊液中葡萄糖的定量检测^[2]。在食品领域中, 可用于去除食品和饮料中残留的葡萄糖和氧, 从而提高货架期和保质期, 同时也是生产葡萄糖酸及其衍生物的重要转化用酶^[3]。葡萄糖氧化酶及其产物和产物衍生物均具有广泛的市场和应用前景。大规模生产菌株常采用黑曲霉或者青霉, 然而采用霉菌生产有其弊端, 大量的杂蛋白质和伴生产物造成下游提取的困难, 同时产酶量不高也成为大规模生产的主要瓶颈^[4-6]。为了解决这些问题, 近年来使用基因工程改造方法进行异源表达受到关注。其中酵母表达系统相较于大肠杆菌等原核表达系统能够较好地异源表达葡萄糖氧化酶^[7-11]。酿酒酵母表达系统由于过糖基化修饰, 使得重组葡萄糖氧化酶过糖基化情况严重, 限制了葡萄糖氧化酶的应用^[12]。毕赤酵母表达系统在这方面展现出优势, 但国内外相关报导中, 黑曲霉来源基因重组葡萄糖氧化酶在毕赤酵母中的最高产率为 40 U/mL, 仍然不能满足大规模生产的要求^[11]。因此, 如何提高重组葡萄糖氧化酶的产量成为十分重要的研究方向。

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是一种广泛应用于分泌表达外源蛋白的真核系统。尽管已有多种外源蛋白质在该系统中成功表达, 但不意味着所有的案例都达到预期的效果, 毕赤酵母系统中表达外源蛋白存在着很大的差异。最近的研究发现, 在毕赤酵母表达系统中, 内质网中未折叠蛋白或错误折叠蛋白的积聚对于外源蛋白的分泌表达量有很大的影响^[13-14]。经常采用的更换强启动子或者增加外源蛋白基因拷贝数的策略, 使得大量属于外源蛋白质的初生肽链在内质网中滞留, 不能成功分泌表达, 甚至影响了宿主菌株的生长^[15-17]。*HAC1* 基因编码的

Hac1p 是酵母内质网中不可折叠蛋白响应(UPR)机制的激活调控因子, 能够调控分泌表达途径中的下游靶基因, 这些基因包含了各种分子伴侣, 折叠因子, 内质网中参与糖基化控制, 以及其他胞内胁迫条件下调控因子的编码基因^[18-19]。在作者所在研究室前期的研究中, 筛选得到的高产葡萄糖氧化酶黑曲霉菌株 *Aspergillus niger* BBE11721, 扩增其葡萄糖氧化酶基因, 构建了毕赤酵母基因工程菌株 *Pichia pastoris* GS115-pPIC9K-GOD (保藏编号为 CCTCC NO:M 2012266)。作者在此基础上, 共表达了 *HAC1* 基因, 并且进一步研究不同培养温度下共表达 *HAC1* 基因对菌株的生长和分泌外源蛋白质的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒 菌株与质粒: 均为作者所在实验室购买及保存。研究中使用及构建所得菌株和质粒见表 1。

1.1.2 试剂 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、T4 连接酶、PCR 产物纯化试剂盒、限制性内切酶等: 大连宝生物公司; SDS-PAGE 凝胶试剂盒、蛋白质电泳 marker: 购自碧云天公司; 培养基所用酵母膏、蛋白胨: Oxoid 公司; 引物及测序: 均由上海生工有限公司完成。其他常规试剂为国产分析纯。

1.2 培养基

1.2.1 LB 培养基 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母膏 10 g/L。

1.2.2 毕赤酵母培养基 毕赤酵母培养用的培养基(YPD、MD、BMGY 和 BMMY)配方参照 Invitrogen 公司操作手册。

1.2.3 分批发酵 BSM 培养基 85%磷酸 26.7 mL/L, $\text{CaSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.93 g/L, K_2SO_4 18.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14.9 g/L, KOH 4.13 g/L, 甘油 40.0 g/L, PTM1 4.35 mL/L(PTM1 配方参照 Invitrogen 公司操作手册)。

1.2.4 补料培养基 50%甘油(含 12 mL/L PTM₁)。

表 1 本研究中所使用的菌株和质粒
Table 1 Strains and plasmids used in this study

菌株/质粒	基因型	备注
菌株		
<i>E. coli</i> DH5 α	<i>F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG</i> Φ 80 Δ lacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, <i>hsdR17(rK- mK+)</i> , λ^-	Invitrogen 购买
<i>P. pastoris</i> GS115	<i>his4</i>	Invitrogen 购买
<i>A. niger</i> BBE11721	Wild type	作者所在实验室保藏
PP-GOD	<i>P. pastoris</i> GS115 包含 pPIC9k/ <i>GOD</i> 质粒	
PP-HAC1	<i>P. pastoris</i> GS115 包含 pGAPZ/ <i>HAC1</i> 质粒	
PP-G-HAC1	<i>P. pastoris</i> GS115 包含 pPIC9k/ <i>GOD</i> 和 pGAPZ/ <i>HAC1</i> 质粒	
质粒		
pPIC9k/ <i>GOD</i>	pPIC9k 衍生质粒, 包含 <i>GOD</i> 基因	
pGAPZ/ <i>HAC1</i>	pGAPZ α A 衍生质粒, 包含 <i>HAC1</i> 基因	

1.2.5 诱导培养基 100% 甲醇 (含 12 mL/L PTM1)。

1.3 培养方法

1.3.1 摇瓶发酵 大肠杆菌采用 LB 培养基培养。毕赤酵母采用 YPD、BMGY 和 BMMY 等培养。其中毕赤酵母诱导培养, 在 BMGY 中培养至 OD 值为 1.2~1.5 时, 将酵母细胞转入 BMMY 培养基中诱导, 每 12 小时加入总体积 1% 的甲醇进行持续诱导。

1.3.2 3 L 发酵罐高密度发酵 将 YPD 中菌液按 10% 接种体积分数接入 3 L 全自动发酵罐 (LiFlus GM BioTRON, Korea) 中。以 50% 氨水和磷酸溶液控制 pH 5.5, 温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 调节搅拌转速 (500~1 000 r/min) 和通气量 (2~5 L/min) 维持溶氧 30% 以上。当甘油耗尽 (DO 迅速上升, 且 DO>60% 时) 开始流加补料培养基。当菌体达到一定质量浓度后 (60、80、100 g/L), 停止补料。待甘油再次耗尽, 继续保持基质匮乏状态 1 h, DO>60% 后, 开始流加诱导培养基, 并把诱导温度降低至 22 $^{\circ}\text{C}$ 或者 28 $^{\circ}\text{C}$ 诱导表达外源蛋白质。甲醇浓度控制在 2%, 使用 FC2002 华东理工大学在线甲醇在线检测与控制器控制。

1.4 方法

1.4.1 基因 PCR 扩增 葡萄糖氧化酶 *GOD* 基因通过 GeneBank 登录号 ACB30370.1 设计引物: GOD-F: TCCTACGTAAATGGCATTGAAGCCAGCCT; GOD-R: TTGCGGCCGCTCACTGCATGGAA GCATAATCTTC (下划线处碱基为酶切位点)。以黑曲霉 *A. niger* BBE11721 的 cDNA 为模版。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 57 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延

伸 2 min (30 个循环); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

HAC1 基因以 GeneBank 公布的基因编号 8196642 设计引物: HAC1-F: GGGTTCGAAATGCCCGTAGATTCTTCTC; HAC1-R: TTGCGGCCGCC TATTCCTGGAAGAATACAAAGTC (下划线处碱基为酶切位点)。以毕赤酵母 *P. pastoris* GS115 的 cDNA 为模版。PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 98 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min (30 个循环); 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 扩增产物纯化参照试剂盒说明书。

1.4.2 重组质粒构建 将上述 PCR 片段纯化后连接到 pMD19-T 克隆载体上, 转化 *E. coli* DH5 α , 提取质粒, 将筛选得到的阳性克隆子进行测序鉴定。葡萄糖氧化酶 *GOD* 克隆载体采用 *Sna*BI 和 *Not*I 进行双酶切, 其产物纯化后与表达载体 pPIC9k 相连接, 筛选阳性克隆验证, 获得重组质粒 pPIC9k/*GOD*。HAC1 基因克隆载体采用 *Asu*II 和 *Not*I 进行双酶切, 其产物纯化后与表达载体 pGAPZ 相连接, 筛选阳性克隆验证, 获得重组质粒 pGAPZ/*HAC1*。

1.4.3 酵母转化和重组子筛选 将构建的表达载体 pPIC9k/*GOD* 使用 *Bgl*II 进行酶切线性化, pGAPZ/*HAC1* 使用 *Sac*I 进行酶切线性化。pPIC9k/*GOD* 线性化质粒电转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 使用电转仪 (Gene Pulser electroporator, Bio-Rad), 电转条件: 2000 V, 200 Ω , 25 μF 。使用 RT-qPCR 方法测定挑选出的阳性克隆中的 *GOD* 拷贝数, 获得 PP-GOD 重组菌株。将 pGAPZ/*HAC1* 线性化质粒电转入毕赤酵母 PP-GOD 感受态细胞, 使用

RT-qPCR 方法测定挑选出的阳性克隆中的 *HAC1* 基因拷贝数, 获得 PP-G-*HAC1* 重组菌株。

1.4.4 TRIzol 法提取 RNA 离心收集菌体并置于液氮终止反应, RNA 的抽提使用 RNA 抽提试剂盒 (Trizol reagent), 参照试剂盒说明书进行。

1.4.5 RT-qPCR 将获得的 RNA 使用 cDNA Synthesis kit (Takara) 进行反转录, 然后将反转录 cDNA 作为模版。荧光定量 PCR 所用试剂盒为 SYBR® Premix Ex Taq™ kit (Takara), 反应仪器为 LightCycler 480 II Real-time PCR instrument (Roche Applied Science, Mannheim, Germany)。反应条件为 95 °C 30 s, 40 个循环。95 °C 5 s, 60 °C 20 s 最后 50 °C 30 s 冷却。基因转录变化计算方法为 $2^{-\Delta\Delta C_T}$, 内参基因为 *GAPDH*。选取 3 个生物学平行样, 取平均值, 所用定量 PCR 引物见表 2。

表 2 本研究中所使用定量引物

Table 2 Oligonucleotides used in this study

名称	序列
RT-qPCR	
GOD-qRT-F	ACAGAGGTCTATCATTG
GOD-qRT-R	CATTCTAGAGTAGAGC
HAC1-qRT-F	GACGACGAAGAAGAGGACGAAGAG
HAC1-qRT-R	ACTGCTTGTGTTGTTGCTGTTGC
GAPDH-qRT-F	ACGGCTTCTGGTAACATC
GAPDH-qRT-R	TCAACAACGGAGACATCG
ERO1-qRT-F	ATGAGGATAGTAAGGAGCGTAGC
ERO1-qRT-R	GTTGACCAGTTCCACCAGTTTG
GCN4-qRT-F	AGGACCACTTAGGTGTTGTTG
GCN4-qRT-R	ACTCATTCTCTTCATCTTCTTAGC
HRD1-qRT-F	CGATGTAGCGGGACCTCTTC
HRD1-qRT-R	AAAGCGTCTCTGGGTATCTGG
KAR2-qRT-F	ACACTGTCAAGAGCAAGAACG
KAR2-qRT-R	ACACTGTCAAGAGCAAGAACG
MSN2-qRT-F	AATACCTTCCTCCTTGGCTACG
MSN2-qRT-R	CTACTTGTTCAGATCGCTCATTCG
SEC18-qRT-F	TGGTGCTTTAGATTTGGAGTTTAC
SEC18-qRT-R	CGATTCTTCTGGCAATAAGTGTC
SEC53-qRT-F	GTCGTGATTGGCTTCGTTGG
SEC53-qRT-R	TCTTACCTTCCTTGTAGGCAGTC
SSA4-qRT-F	AAGGATGAAGACGAGAAGGAAG
SSA4-qRT-R	TGTGGAAGCAGATTGTGACTC
UBC1-qRT-F	AACGAATCAGCAGAGAATTG
UBC1-qRT-R	GAATGTCCACCTTGAATAGC
VPS17-qRT-F	TTAGCGAGCAGGTCATAAAG
VPS17-qRT-R	CGTTGCTAGTGATGTGATAGC

1.4.6 葡萄糖氧化酶活性测定 测定方法参照文献[6]。活力定义单位: 每分钟转化 1 μmol 葡萄糖为葡萄糖酸和过氧化氢所需的酶量为一个单位, 以 U/mL 表示。

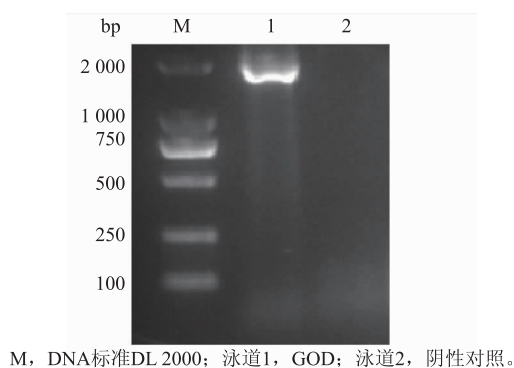
1.4.7 AOX 氧化酶活性测定 测定方法参照文献[20]。活力定义单位: 相同菌浓下, 每分钟产生 1 μmol 过氧化氢所需的酶量为一个单位, 以 U/g_{DCW} 表示。

2 结果与讨论

2.1 葡萄糖氧化酶重组菌株及 *HAC1* 共表达重组菌株的构建

分别以 *A. niger* BBE11721 为模版, 配合以 GOD-F/GOD-R 为引物; 以毕赤酵母 *P. pastoris* GS115 的 cDNA 为模版, 配合以 HAC1-F/HAC1-R 和为引物, 按照方法 1.4.1 进行基因克隆, 分别 PCR 扩增得到 1 800 左右和 1 000 左右的特异性条带, 见图 1。测序结果表明, PCR 扩增所得 *GOD* 基因全长 1 749 bp, 编码 583 个氨基酸; PCR 扩增所得 *HAC1* 基因全长 996 bp, 编码 332 个氨基酸, 两段基因大小和序列均与预期相符。

为在毕赤酵母表达体系中顺利将 GOD 表达并分泌至胞外, 采用毕赤酵母表达载体上的信号肽 α -factor 以实现在毕赤酵母表达体系中的分泌。并使用带有 *AOX1* 强启动子的 pPIC9k 表达载体, 按照方法 1.4.2 构建得到 pPIC9k/*GOD* 重组载体。同时, 为在毕赤酵母表达体系中胞内表达调控子 Hac1p, 作者采用了带有 *GAP* 启动子的表达载体 pGAPZ α , 并通过使用 *AsuII* 和 *NotI* 双酶切方式去除了质粒上的信号肽 α -factor, 按照方法 1.4.2 构建得到了 pGAPZ/*HAC1* 重组载体。此后, 将 pPIC9k/*GOD* 线性化质粒电转入毕赤酵母 GS115 感受态细胞, 获得 PP-GOD 重组菌株。将 pGAPZ/*HAC1* 线性化质粒电转入毕赤酵母 PP-GOD 感受态细胞, 获得 PP-G-*HAC1* 重组菌株。重组菌中的葡萄糖氧化酶基因 *GOD* 和 *HAC1* 基因拷贝数使用 RT-qPCR 的方法测定, 参照文献[21]。本研究中所使用菌株中基因拷贝数见表 3。因为 *AOX1* 与 *GAP* 基因同时存在于转化的质粒和毕赤酵母的基因组中, 因此表中所示拷贝数为测得拷贝数减去基因组中已存在的一个拷贝数。



M, DNA标准DL 2000; 泳道1, GOD; 泳道2, 阴性对照。
(a)

M, DNA标准DL 2000; 泳道1、2、3, HAC1; 泳道4, 阴性对照。
(b)

图1 PCR扩增产物核酸电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of PCR products

表3 本研究中重组菌中 *GOD* 和 *HAC1* 基因拷贝数

Table 3 Recombinant strains with different copy numbers of *GOD* and *HAC1*

菌株	<i>GOD</i> 拷贝数	<i>HAC1</i> 拷贝数
PP-GOD	5	0
PP-HAC1	0	1
PP-G-HAC1	5	1

2.2 共表达 *HAC1* 基因对葡萄糖氧化酶 *GOD* 表达的影响

在毕赤酵母中过量表达外源蛋白质会带给分泌途径负担,大量的未折叠肽链或错误折叠蛋白质是影响外源分泌表达的主要原因^[22]。在本研究中,作为UPR效应的激活因子Hac1p的编码基因*HAC1*,通过过量共表达*HAC1*基因考察了该基因对葡萄糖氧化酶GOD在*P. pastoris*中表达的影响。如图2所示,改造重组菌株PP-G-HAC1在摇瓶中能够分泌更多的胞外GOD,培养120 h后胞外GOD活性达到161 U/mL,相比于原始菌株PP-GOD提高了37%。同时通过过量共表达*HAC1*基因,使得GOD的单位生产率从PP-GOD菌株的0.42 mg/(g·h)提高到PP-G-HAC1菌株的0.52 mg/(g·h)。如表4所示,改造重组菌PP-G-HAC1在胞外GOD蛋白质质

量浓度和GOD酶得率(重组酶量/细胞干质量DCW)均有所提高,分别从原始菌株的1 059 mg/L与60.2 mg/g提高到1 439 mg/L与74.2 mg/g。结果表明,共表达调控因子编码*HAC1*基因能够有效的改善GOD在毕赤酵母中的分泌表达。

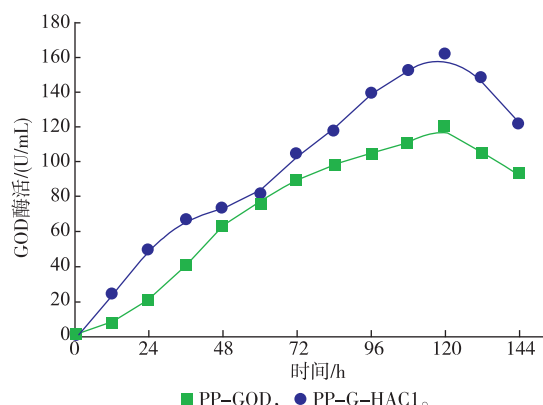


图2 摇瓶中过量表达 *HAC1* 对发酵生产葡萄糖氧化酶的发酵过程曲线

Fig. 2 Effects of Co-Expression of *HAC1* on the *GOD* secretion in *P. pastoris* in shake flasks

2.3 3 L 发酵罐中不同培养温度下共表达 *HAC1* 基因对发酵产 *GOD* 的影响

外源蛋白质表达分泌的过程中,环境因素对宿主的生理和蛋白质的生产率有重要影响。在毕赤酵母表达体系中,温度被认为直接影响蛋白质生产能力和宿主代谢功能。不同的培养温度能够改变蛋白质的合成、折叠和分泌速率,同时对宿主内部蛋白质分泌途径中造成胁迫应激反应也有重要的影响。温度对蛋白质分泌的影响是基于宿主生长情况,蛋白质合成和蛋白质在胞内积聚造成的胁迫压力等各因素的综合体现^[23]。毕赤酵母的最适生长温度为28~30℃,而研究表明,降低培养温度有利于提高部分外源蛋白质的分泌^[24]。虽然温度的降低使得毕赤酵母细胞的生长代谢速率降低,但能够减少由于蛋白质过量合成分泌过程引起的细胞衰亡,见表4。作者采用3 L发酵罐进行培养,进一步对不同改造菌株在不同培养温度下的发酵情况进行研究。目的在于研究共表达*HAC1*基因在不同温度下对外源分泌蛋白质的影响,以及在改进培养温度的发酵条件下进一步提高葡萄糖氧化酶GOD的酶活。

2.3.1 重组菌 PP-GOD 在 3 L 发酵罐中不同培养温度下对发酵产 *GOD* 的影响

考察了3 L发酵罐

表 4 摇瓶中过量表达 *HAC1* 对工程菌发酵参数的影响Table 4 Effects of co-expression of *HAC1* on heterologous protein production of GOD in shake flasks

菌株	平均 q_p / (mg/g)	平均比生长速率 μ/h^{-1}	DCW/(g/L)	胞外 GOD 量/ (mg/L)	GOD 酶活/(U/mL)	GOD 得率/ (mg/g)
PP-GOD	0.42±0.01	0.002 2±0.000 09	17.6±0.5	1 059±42	120±3	60.2±2.4
PP-G-HAC1	0.52±0.02	0.002 9±0.000 12	19.4±0.6	1 439±58	161±5	74.2±2.8

中不同培养温度(22 ℃和 28 ℃)、不同重组菌发酵产 GOD 的影响。如图 3 所示, 重组菌 PP-GOD 在 22 ℃时 DCW 最高达到 179 g/L, 然而在 28 ℃ DCW 最高仅能达到 134 g/L。同时, 重组菌 PP-GOD 在 22 ℃最高 GOD 活性达到 427.6 U/mL, 相较于 28 ℃培养条件 GOD 活性 323 U/mL 提高了 25%。这些结果表明, 甲醇诱导期的低温诱导能够有效提高重组菌 PP-GOD 的 GOD 产量。

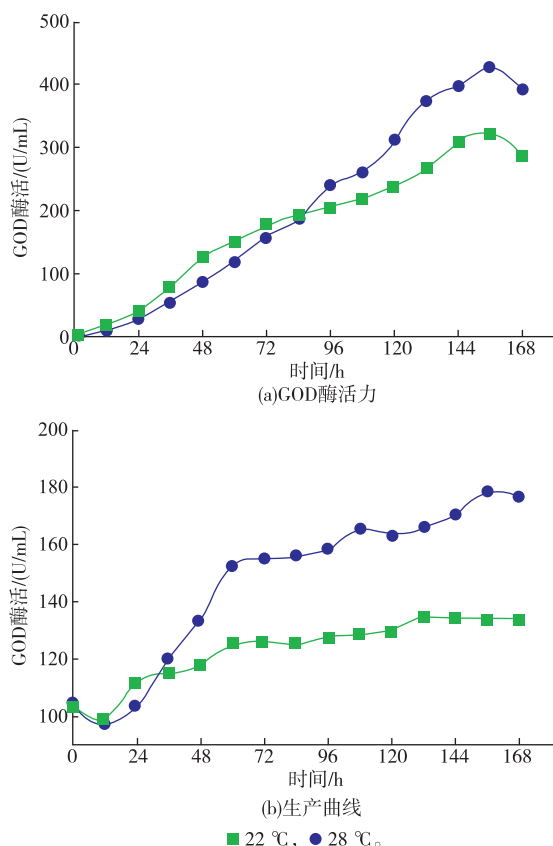


图 3 3 L 发酵罐中不同培养温度下重组菌 PP-GOD 产 GOD 的发酵曲线

Fig. 3 Fermentation properties of the GOD over-expressing strain PP-GOD in 3 L fermentor

2.3.2 重组菌 PP-G-HAC1 在 3 L 发酵罐中不同培养温度下对发酵产 GOD 的影响 考察 3 L 发酵罐中改造重组菌 PP-G-HAC1 菌株在过量共表达 *HAC1* 基因发酵产 GOD 的影响, 在 22 ℃培养条件

下, 产 GOD 的能力并没有因为降低温度而有所提高。如图 4 所示, 经过 156 h 的诱导, 改造重组菌 PP-G-HAC1 在 28 ℃时胞外 GOD 酶活能够达到 1 008 U/mL, 同时比酶活 70 kU/g, 菌体干重 DCW 最高达到 300 g/L。而在 3 L 发酵罐中, 22 ℃下 GOD 酶活最高达到 699 U/mL, 胞外 GOD 酶量 12.02 g/L, 比 28 ℃培养条件下有所降低。

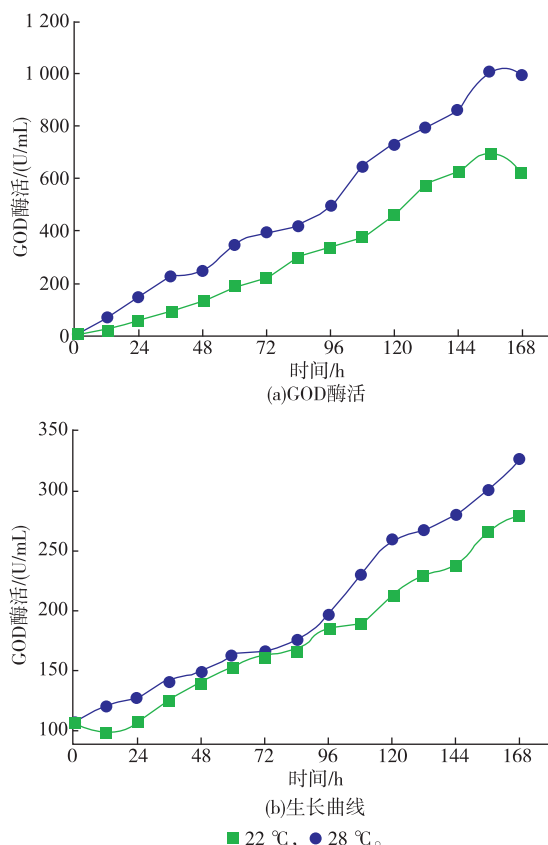


图 4 3 L 发酵罐中不同温度下重组菌 PP-G-HAC1 产 GOD 的发酵曲线

Fig. 4 Effect of different cultivation temperatures on GOD secretion in engineered secretion strain PP-G-HAC1 in 3 L fermentor

进一步考察了 3 L 发酵罐中不同培养温度对不同重组菌 PP-GOD 与 PP-G-HAC1 发酵产 GOD 的影响。综合各情况下发酵参数的比较, 如表 5 所示, 重组菌 PP-G-HAC1 在 28 ℃下对产 GOD 更有利,

比酶活 69 854 U/g, GOD 生产率 6.46 U/(mL·h), 胞外 GOD 酶量 14.43 g/L, 均相较于 22 ℃ 培养条件下有明显的提高 (比酶活 58 153 U/g, GOD 生产率 4.48 U/(mL·h), 胞外 GOD 酶量 12.02 g/L)。如图 5 所示,

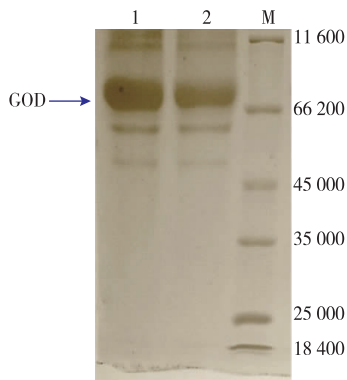
PP-G-HAC1 菌株在不同温度下, 诱导 156 h 胞外蛋白 SDS-PAGE 图, 显示 28 ℃ 条件下的 GOD 条带要较 22 ℃ 更为明显。

同时, 从表 5 中发酵参数发现, 重组菌 PP-GOD

表 5 不同重组菌在不同培养温度下发酵产 GOD 的参数

Table 5 Comparison of parameters for GOD production under different cultivation temperatures

参数	PP-GOD		PP-G-HAC1	
	22 ℃	28 ℃	22 ℃	28 ℃
诱导时间/h	156	156	156	156
初始 DCW/(g/L)	107.7±4.6	103.8±4.8	107.3±3.9	109.2±4.9
最高 DCW/(g/L)	179.2±7.5	134±4.7	279.7±8.9	327±12.1
最高 GOD 酶活/(U/mL)	428±18	323±12	699±31	1 008±47
GOD 比酶活/(U/g)	54 845±2 422	48 225±2 025	58 153±2 035	69 854±2 364
GOD 生产率/(U/(mL·h))	2.74±0.08	2.07±0.08	4.48±0.16	6.46±0.21
胞外 GOD 酶量/(g/L)	7.79±0.25	6.70±0.18	12.02±0.48	14.43±0.46
平均比生长速率/h ⁻¹	0.004 2±0.000 13	0.001 9±0.000 06	0.009 6±0.000 28	0.011 9±0.000 48



Lane 1: 156 h at 28 ℃, Lane 2: 156 h at 22 ℃

图 5 不同培养温度下 PP-G-HAC1 菌株 156 h 时胞外蛋白 SDS-PAGE 图

Fig. 5 SDS-PAGE of fermentation supernatant of the engineered secretion strain PP-G-HAC1 in 3 L fermentor at different temperatures.

在 28 ℃ 下的发酵参数要明显低于重组菌 PP-G-HAC1 的发酵参数。通过对 AOX 醇氧化酶活性的检测, 发现在相同条件下不同的改造菌株中差异较大。*P. pastoris* 对外源蛋白质的表达受到 *AOX1* 启动子调控, AOX 醇氧化酶是甲醇代谢途径中第一个关键酶, 受甲醇的诱导启动^[25]。如图 6 所示, PP-G-HAC1 菌株中的 AOX 活性曲线高于 PP-GOD 菌株, 并且最大 AOX 活性达到 8.8 U/g, 相较于 PP-GOD 菌株中的 5.1 U/g 有明显提高。

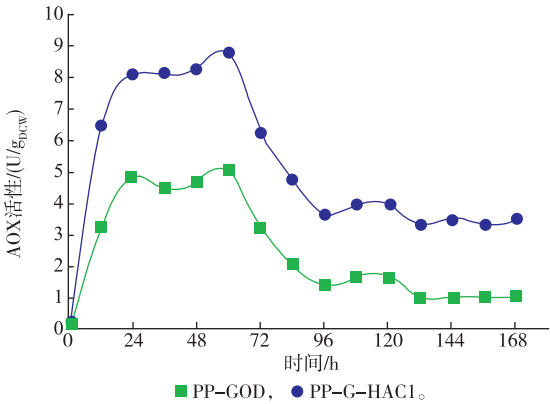


图 6 3 L 发酵罐中 28 ℃ 下重组菌 PP-G-HAC1 与 PP-GOD 产 GOD 的 AOX 活性曲线

Fig. 6 Effects of co-expression of *HAC1* on AOX activity in 3 L fermentor at 28 ℃

通过在不同温度下不同重组菌株发酵 GOD 影响的研究, 发现在原始菌株 PP-GOD 中, 降低诱导期培养温度至 22 ℃ 能够有效地提高 GOD 的产量, 菌体生长较 28 ℃ 时有明显提高, 说明较高的培养温度使得蛋白质过量合成分泌过程引起的胁迫反应影响了细胞的生长, 导致 GOD 产量的降低。而在共表达 *HAC1* 基因的菌株 PP-G-HAC1 中, 28 ℃ 培养条件较 22 ℃ 培养条件下 GOD 的产量有进一步的提高, 两种菌株在 22、28 ℃ 下的产外源蛋白质差异, 说明了共表达 *HAC1* 基因能够有效减缓蛋白质过量表达情况下胞内的胁迫压力, 增强宿主细胞的生长情况, 在毕赤酵母最适生长温度 28 ℃ 下进一

步提高 GOD 的产量。

2.4 28 °C培养温度下 UPR 下游靶基因转录水平变化

HAC1 基因编码的 Hac1p 作为 UPR 途径的激活调节因子,能够调控 UPR 途径中的许多功能基因。毕赤酵母内的 UPR 典型下游靶基因包含了折叠基因 (*ERO1*,*KAR2*),转运基因 (*SEC18*,*SEC53*,*SSA4*,*VPS17*),*ERAD* 基因 (*HRD1*,*UBC1*)和胁迫调控基因 (*GCN4*,*MSN2*)等典型编码基因。为了进一步考察这些编码基因在 28 °C培养条件下不同菌株中的转录水平变化,作者采用 RT-qPCR 技术对这些基因的表达量进行了进一步分析,结果见图 7。

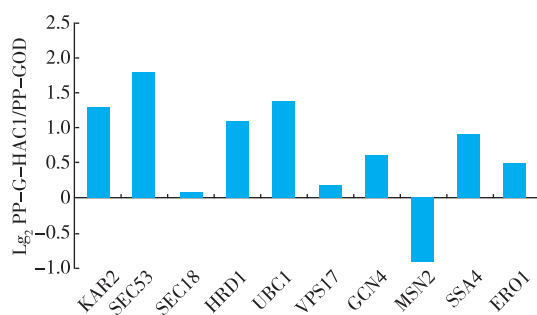


图 7 28 °C培养温度下 UPR 下游靶基因转录水平变化
Fig. 7 Comparison of marker genes transcriptional levels

PP-G-HAC1 菌株相较于 PP-GOD 菌株明显上调的基因包括:内质网折叠基因 *KAR2*,上调 1.3 倍;参与内质网蛋白修饰与糖基化与转运基因 *SEC53*,上调 1.7 倍;参与内质网蛋白降解基因 *HRD1*,上调 1.1 倍;调节选择性降解非正确折叠蛋白基因 *UBC1*,上调 1.4 倍。这些直接参与分泌途径的基因的上调有效地说明了 PP-G-HAC1 菌株在过量共表达 *HAC1* 基因的情况下胞内转运分泌外源蛋白 GOD 的能力更强。然而胁迫调控基因 *MSN2* 有所下调,同样属于胁迫调控基因 *GCN4* 基因却较 PP-GOD 菌种有所上调。*GCN4* 基因编码的调控因子能够调控一些与氨基酸合成相关基因的表达。*GCN4* 编码蛋白由内质网上胁迫环境激活,被认为是由 *HAC1* 基因调控的 UPR 应答机制中关键下游调控蛋白。*GCN4* 的同源基因作为内质网胁迫与氧化胁迫的调控桥梁,能够调节还原型谷胱甘肽的生物合成,用来改善细胞由于内质网和内质网降解蛋白机制中造成的氧化蛋白折叠积累的活性氧形成

的活性降低现象^[26]。PP-G-HAC1 菌株中 *GCN4* 基因的上调说明了胞内由于外源蛋白 GOD 大量分泌表达的情况下,为抵御活性氧(ROS)的形成进行了更有效的抵御。

在前期的实验中,发现 PP-GOD 菌株 28 °C培养 GOD 产量较 22 °C下有明显的降低,造成这一现象的原因是胞内胁迫压力引起宿主细胞生长能力和蛋白质合成速率的下降。胁迫压力由内质网中未折叠和错误折叠蛋白质的大量积累造成,一旦发生这种情况会造成 3 种常见的结果^[27]:1)新生肽链向内质网的转运减少;2)内质网折叠能力的加强;3)当前两者不能解决胁迫压力,就会造成宿主功能性失常,宿主菌体就会死亡。宿主细胞对应过量表达蛋白质的胁迫情况下,自身的 UPR 途径会被激活,作为一种防御机制来抵御胞内的非正常胁迫环境。通过对 UPR 途径下游典型编码基因的转录水平考察,发现在 PP-G-HAC1 中过量共表达 *HAC1* 基因能够显著增强 UPR 信号途径的操纵能力。在相同培养条件下,同原始菌株 PP-GOD 相比,内质网中处理新生肽链折叠的编码基因明显上调,并且内质网降解途径 *ERAD* 等功能基因也显著上调,这些功能基因转录水平的增强减轻了内质网胁迫压力。同时调节胞内 ROS 水平的氧化胁迫调控基因 *GCN4* 的转录水平也明显上调。这说明了在 28 °C培养温度条件下共表达 *HAC1* 基因,能够有效地提高宿主细胞的蛋白质折叠和分泌能力,同时增强胞内胁迫压力的抵御能力,从而提高外源 GOD 的产量。

3 结 语

作者分析了毕赤酵母共表达中 UPR 中关键基因 *HAC1* 对于 GS115 菌株发酵产葡萄糖氧化酶 GOD 的影响,改造菌株 PP-G-HAC1 在 3 L 发酵罐中 28 °C培养,酶活达到 1 008 U/mL,胞外重组蛋白达到 14.43 g/L,相比原始菌株在相同条件下提高了 3.12 倍。为了进一步提高葡萄糖氧化酶在毕赤酵母中的发酵生产,解析毕赤酵母系统中合成分泌外源蛋白质通路的代谢网络,以及通过代谢工程改造增强原生肽链修饰折叠,降低未折叠蛋白质对内质网的胁迫,减少细胞负担的同时增强外源蛋白质分泌,将成为我们日后继续深入研究的重点。

参考文献:

- [1] Bankar S B, Bule M V, Singhal R S, et al. Glucose oxidase-an overview[J]. **Biotechnol Adv**, 2009, 27: 489-501.
- [2] Kim S H, Lee S M, Kim D U, et al. Enzyme-based glucose biosensor using a dye couple system [J]. **Dyes Pigments**, 2001, 49: 103-108.
- [3] Klein J, Rosenberg M, Markoš J, et al. Biotransformation of glucose to gluconic acid by *Aspergillus niger*-study of mass transfer in an airlift bioreactor[J]. **Biochem Eng J**, 2002, 10: 197-205.
- [4] Petruccioli M, Federici F, Bucke C, et al. Enhancement of glucose oxidase production by *Penicillium variable* P16 [J]. **Enzyme Microb Tech**, 1999, 24: 397-401.
- [5] Fiedurek J, Gromada A. Production of catalase and glucose oxidase by *Aspergillus niger* using unconventional oxygenation of culture[J]. **J Appl Microbiol**, 2000, 89: 85-89.
- [6] Bankar S B, Bule M V, Singhal R S, et al. Optimization of *Aspergillus niger* fermentation for the production of glucose oxidase[J]. **Food Bioprocess Technol**, 2009, 2: 344-352.
- [7] Malherbe D, Du Toit M, Otero RC, et al. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2003, 61: 502-511.
- [8] Rocha SN, Abrahão-Neto J, Cerdá n ME, et al. Heterologous expression of glucose oxidase in the yeast *Kluyveromyces marxianus* [J]. **Microb Cell Fact**, 2010, 9: 4-12.
- [9] Yamaguchi M, Tahara Y, Nakano A, et al. Secretory and continuous expression of *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Pichia pastoris*[J]. **Protein Expr Purif**, 2007, 55: 273-278.
- [10] Crognale S, Pulci V, Brozzoli V, et al. Expression of *Penicillium variable* P16 glucose oxidase gene in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme[J]. **Enzyme Microb Tech**, 2006, 39: 1230-1235.
- [11] Guo Y, Lu F, Zhao H, et al. Cloning and heterologous expression of glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* Z-25 in *Pichia pastoris*[J]. **Appl Biochem Biotech**, 2010, 162: 498-509.
- [12] Frederick K, Tung J, Emerick R, et al. Glucose oxidase from *Aspergillus niger*. Cloning, gene sequence, secretion from *Saccharomyces cerevisiae* and kinetic analysis of a yeast-derived enzyme[J]. **J Biol Chem**, 1990, 265: 3793-802.
- [13] Sitia R, Braakman I. Quality control in the endoplasmic reticulum protein factory[J]. **Nature**, 2003, 426: 891-894.
- [14] Damasceno LM, Huang C-J, Batt CA. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2012, 93: 31-39.
- [15] Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2004, 85: 367-375.
- [16] Li Z, Moy A, Gomez SR, et al. An improved method for enhanced production and biological activity of human secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in *Pichia pastoris*[J]. **Biochem Bioph Res Co**, 2010, 402: 519-524.
- [17] Shen Q, Wu M, Wang H-B, et al. The effect of gene copy number and co-expression of chaperone on production of albumin fusion proteins in *Pichia pastoris*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2012, 96: 763-772.
- [18] Valkonen M, Penttilä M, Saloheimo M. Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded-protein response pathway on protein production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Appl Environ Microbiol**, 2003, 69: 2065-2072.
- [19] Guerfal M, Ryckaert S, Jacobs PP, et al. The HAC1 gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins[J]. **Microb Cell Fact**, 2010, 9: 49-12.
- [20] Suye SI, Ogawa A, Yokoyama S, et al. Screening and identification of *Candida methanosorbosa* as alcohol oxidase producing methanol using yeast[J]. **Agric Biol Chem**, 1990, 54: 1297-1298.
- [21] Sha C, Yu X-W, Li F, et al. Impact of gene dosage on the production of lipase from *Rhizopus chinensis* CCTCC M201021 in *Pichia pastoris*[J]. **Appl Biochem Biotech**, 2013, 169: 1160-1172.
- [22] Hohenblum H, Gasser B, Maurer M, et al. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*[J]. **Biotechnol Bioeng**, 2004, 85: 367-375.
- [23] Gasser B, Maurer M, Rautio J, et al. Monitoring of transcriptional regulation in *Pichia pastoris* under protein production conditions[J]. **BMC Genomics**, 2007, 8: 179.
- [24] Wang Y, Wang Z H, Xu Q L, et al. Lowering induction temperature for enhanced production of polygalacturonate lyase in

- recombinant *Pichia pastoris*[J]. **Process Biochem**, 2009, 44:949-954.
- [25] Jungo C, Rerat C, Marison IM, et al. Quantitative characterization of the regulation of the synthesis of alcohol oxidase and of the expression of recombinant avidin in a *Pichia pastoris* Mut⁺ strain[J]. **Enzyme Microb Technol**, 2006, 39:936-944.
- [26] Harding H P, Zhang Y, Zeng, et al. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress[J]. **Mol Cell**, 2003, 11:619-633.
- [27] Ron D, Walter P. Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response[J]. **Nat Rev Mol Cell Bio**, 2007, 8:519-529.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第十届全国微全分析系统学术会议

所属学科: 分析化学, 物理化学, 生物物理学、生物化学及分子生物学

开始日期: 2016-05-06

结束日期: 2016-05-09

所在城市: 甘肃省 兰州市

主办单位: 中国化学会

承办单位: 兰州大学

主题: 微流控芯片与微纳尺度生物分离分析的发展

联系人: 陈兴国

联系电话: 0931-8912763

E-MAIL: chenxg@lzu.edu.cn

通讯地址: 甘肃省兰州市城关区天水南路 222 号

邮政编码: 730000

会议网站: <http://www.chemsoc.org.cn/Meeting/Home/info.asp?id=172>

内容及范围:

1、微流控学与纳流控学(Microfluidics and Nanofluidics); 2、微全分析系统(MicroTAS); 3、毛细管电泳(Capillary Electrophoresis); 4、毛细管电色谱(Capillary Electrochromatography); 5、高效液相色谱或超效液相色谱(HPLC / UPLC); 6、微纳生物分析(Micro/NanoScale Bioanalysis); 7、与上述技术联用的检测技术如光谱、质谱和电化学技术等; 8、上述技术与系统在化学、生物医学、药学、环境和食品安全等领域中的应用。