

共表达分子伴侣提高漆酶在毕赤酵母中的分泌

王晨蕾^{1,2}, 刘松^{1,2}, 堵国成^{1,2}, 陈坚^{*1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院, 江苏 无锡 214122)

摘要: 通过共表达分子伴侣的策略提高漆酶在毕赤酵母中的产量。前期基于 *Pichia pastoris* 密码子偏好性, 合成了来源于 *Cerrena* sp. WR1 的漆酶基因, 克隆至 pPIC9K, 转化 *Pichia pastoris* GS115, 得到重组菌株 PP-L。在 PP-L 中, 分别过量表达蛋白质折叠(BIP、ERO1)、囊泡运输(SEC53、SEC1)、胁迫应激(HAC1、GCN4)相关的 6 种分子伴侣。结果显示, 共表达这 6 种分子伴侣对分泌表达漆酶的菌株 PP-L 的正常生长没有影响; 共表达 BIP 使重组菌株胞外酶活提高 359%, 共表达 ERO1 胞外酶活反而降低 22%; 共表达其它 4 种分子伴侣对胞外酶活提高 18%~53%。组合共表达 BIP 和 HAC1 的重组菌 P1 较 PP-L 胞外酶活提高了 602%, 酶活达到 3 896 U/L。推测由于强化内质网中 BIP 水平进而提高了蛋白质折叠能力, 从而提高其分泌效率。该研究结果将有助于发酵法生产漆酶的工业化。

关键词: 漆酶; 毕赤酵母; 分子伴侣; 共表达; 分泌表达; 蛋白质折叠

中图分类号: Q 815 文章编号: 1673-1689(2019)11-0001-08 DOI: 10.3969/j.issn. 1673-1689.2019.11.001

Improving the Secretory Expression of Laccase in *Pichia pastoris* by Co-Expressing Chaperones

WANG Chenlei^{1,2}, LIU Song^{1,2}, DU Guocheng^{1,2}, CHEN Jian^{*1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: In this study, the co-expression of chaperones was used to improve the production of laccase in *Pichia pastoris*. According to the codon bias of *Pichia pastoris*, the gene of laccase from *Cerrena* sp. WR1 was optimized and cloned into pPIC9K. The resulted plasmid was transformed into *Pichia pastoris* GS115, yielding the strain PP-L. In the PP-L, we co-expressed six chaperones, relating to protein folding (BIP and ERO1), transportation (SEC53 and SEC1) and stress response (HAC1 and GCN4). The results indicated that the co-expressions of chaperones had no effect on the cell growth of strain PP-L. Expression of BIP increased the extracellular enzyme activities by 359% while ERO1 decreased that by 22%. The other four chaperones increased the extracellular activities

收稿日期: 2017-01-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31401638); 江苏省重点研发计划社会发展项目(BE2016629)。

* 通信作者: 陈坚(1962—), 男, 博士, 教授, 博士研究生导师, 主要从事发酵过程优化与控制、酶技术、食品生物技术等领域的研究。

E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

引用本文: 王晨蕾, 刘松, 堵国成, 等. 共表达分子伴侣提高漆酶在毕赤酵母中的分泌[J]. 食品与生物技术学报, 2019, 38(11): 1-8.

by 18%~53%. In contrast to strain PP-L, simultaneous co-expression of BIP and HAC1 (strain P1) increased 602% of the extracellular activities, reaching 3 896 U/L. It was suggested that the overexpression of BIP in endoplasmic reticulum improved the ability of protein folding, thus improving the secretion efficiency of laccase. The results obtained here may improve the industrialization of laccase.

Keywords: laccase, *Pichia pastoris*, chaperone, co-expression, secretary expression, protein folding

漆酶是含多个铜原子的一种多酚氧化酶,广泛分布于真菌、高等植物、细菌和昆虫等生物中^[1]。漆酶可以高效地催化作用于各种酚类及非酚类化合物^[2],伴随着将氧分子还原为水分子。漆酶作为化合物合成或结构修饰的催化剂被广泛应用于环境的生物修复^[3]、生物燃料生产^[4]和生物制浆、纺织工业^[5]等。尤其在造纸工业中,采用传统的强酸强碱高温蒸煮制浆和化学法漂白,使废液中含有多种有毒有害的有机化合物^[6]。漆酶作为生物制浆和生物漂白的催化剂在造纸工业中得到应用^[7],与其它木素分解酶相比,漆酶催化效能高、反应条件温和、对反应设备的要求低^[8]。随着漆酶用途的不断发现,对该酶的需求越来越大,因此提高漆酶的产量备受关注。

漆酶大多来源于丝状真菌,发酵周期长、操作复杂、产生多种漆酶同工酶,阻碍了后续纯化^[9]。异源表达不仅可以克服此障碍,且可采用蛋白质工程手段对酶分子改造,既可以提高产量,又能改善酶学性能^[10],扩大其工业应用。目前漆酶在细菌、植物、酵母中均已实现异源表达。细菌分泌漆酶能力普遍较低^[11-12],且易形成聚合体难以纯化。Paulo等^[12]在 *E. coli* AH3517 中用 5 L 体系发酵漆酶,产量最高为 5 600 U/L。在转基因植物中,漆酶产量更低,只有 50~250 U/L^[13-14]。漆酶在酵母中主要以 *Pichia pastoris* 和 *Saccharomyces cerevisiae* 为宿主,已有较多表达成功的例子,然而普遍产量也不高,表达水平不仅与酵母种类有关,还受漆酶同工酶种类的影响^[15]。

巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)作为一种相对简单的真核表达系统,可以对外源重组蛋白质进行正确的折叠加工、糖基化修饰等,使用 AOX1 强启动子,以甲醇作为碳源,实现了多种外源产物的高效表达而得到广泛应用^[16]。研究报道,不同的蛋白质在毕赤酵母中表达时可能有不同的未折叠蛋白质响应(UPR)效应,可以通过改善蛋白折叠加工、运输、胁迫应激等通路来提高 UPR 因子效应,从而帮

助外源蛋白质更好地分泌表达^[17-19]。Higashio等^[17]的研究结果表明,在 *S. cerevisiae* 表达系统中过量表达 *T. reesei* 来源 UPR 转录因子 HAC1,使 α 淀粉酶分泌量提高了 2.4 倍。陈凤祥^[18]等在 *P. pastoris* 中共表达 PDI 使重组菌 IFN β -HAS 表达量提高了 90%。

为提高漆酶的表达水平,作者拟通过表达蛋白质折叠(BIP、ERO1)、囊泡运输(SEC53、SEC1)、胁迫应激(HAC1、GCN4)等相关 6 种分子伴侣,以期提高 *Cerrena sp.* WR1 漆酶在重组 *P. pastoris* 中的表达水平。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株及质粒 *Cerrena sp.* WR1 来源的漆酶(GeneID:899203):由南京金斯瑞公司按照 *P. pastoris* 密码子偏好性合成;*E. coli* JM109、pMD-19T Simple、pGAPZB 和含重组质粒 pPIC9K-laccase 的 *P. pastoris* 菌株 PP-L:均为作者所在实验室保存。

1.1.2 主要试剂 限制性内切酶 *Pml* I、*Xho* I 和 *Avr* II:均购自 Thermo 公司;胶回收柱回收试剂盒、感受态制备试剂盒、Primer STAR HS DNA 聚合酶、DNA 连接酶:均购自大连宝生物 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒、G418:购自上海生工生物工程股份有限公司;酵母基因组 DNA 抽提试剂盒:购自天根;酵母粉与胰蛋白胨:购自 Oxoid 公司;底物 ABTS:购自 Sigma 公司(美国);博莱霉素 Zeocin(100 mg/mL):购自 Invitrogen 公司;蛋白质 Maker、考马斯亮蓝染色液:均购自碧云天生物技术研究所;NuPAGE[®] Novex[®] Bis-Tris 预制凝胶:购自 Life Technologies 公司;其他常规试剂及药品:为国产或进口分装。

1.1.3 培养基 LB 低盐培养基:0.5 g/dL 酵母提取物,1 g/dL 蛋白胨,0.5 g/dL NaCl,pH 7.0。

YPD 培养基:1 g/dL 酵母提取物,2 g/dL 蛋白胨,2 g/dL D-葡萄糖。

BMGY 培养基:1 g/dL 酵母提取物,2 g/dL 蛋白胨,2 g/dL 甘油,体积分数 10%的 100 mmol/L 的 PB (pH 6.0), 体积分数 10%的 10×YNB 酵母基础氮源母液,4×10⁻⁵ g/dL 生物素。

BMMY 培养基:1 g/dL 酵母提取物,2 g/dL 蛋白胨,2 g/dL 甲醇,体积分数 10%的 100 mmol/L 的 PB (pH 6.0), 体积分数 10%的 10×YNB 酵母基础氮源母液,4×10⁻⁵ g/dL 生物素。

1.2 方法

1.2.1 毕赤酵母分子伴侣共表达质粒的构建

GS115 基因组 DNA 依照天根的酵母基因组 DNA 提取试剂盒说明书进行。配制 0.8 g/dL 的琼脂糖对抽提的基因组 DNA 进行凝胶电泳检测纯度, 使用

Nanodrop 检测其浓度,作为扩增分子伴侣基因的模板。

结合参考文献,作者分别选取蛋白折叠(BIP、ERO1)、囊泡运输(SEC53、SEC1)、胁迫应激反应(HAC1、GCN4)模块中的 6 个基因,设计引物扩增 *P. pastoris* GS115 分子伴侣基因,见表 1。取 0.5 μL 的 GS115 基因组 DNA 为扩增模板,分别加入表 1 中的 6 组分子伴侣基因扩增引物,用 Primer Star HS 高保真酶扩增。扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测确认大小正确后,胶回收,用 *Pml* I 和 *Xho* I 酶切;质粒 pGAPZB 同样用 *Pml* I 和 *Xho* I 酶切,柱回收;连接,构建成功 6 个分子伴侣的组成型表达质粒,并将对分泌表达量有提高的分子伴侣进行组合共表达,构建一系列质粒及菌株,见表 2。

表 1 扩增分子伴侣所用引物

Table 1 Primers used for amplification of chaperones

基因	引物名称	引物序列	GeneID	大小/bp	酶切位点
ERO1	ERO1-F	CACGTGACCATGAGGATAGTAAGGAGCGTAGC	8 197 528	1 584	<i>Pmi</i> I
	ERO1-R	CTCGAGTTACAAGTCTACTCTATATGTGGTAT			<i>Xho</i> I
HAC1	HAC1-F	CACGTGACCATGCCCGTAGATTCTTCTCATAA	8 196 642	996	<i>Pmi</i> I
	HAC1-R	CTCGAGTCACCTGATCGCTATGCATGTCAACT			<i>Xho</i> I
GCN4	GCN4-F	CACGTGACCATGTCTGCAAGTACTTACAGTTT	8 197 788	792	<i>Pmi</i> I
	GCN4-R	CTCGAGTCACTGATGTTTCACTAAACTCTTTA			<i>Xho</i> I
SEC1	SEC1-F	CACGTGACCATGGCTTCTGATCTGATTAACCT	8 201 046	2 061	<i>Pmi</i> I
	SEC1-R	GCGGCCGCCTATTTCCAAAATTTCTTCAGCTT			
SEC53	SEC53-F	CACGTGACCATGCTGTTTTCTAATAAAGAAGA	8 199 158	756	<i>Pmi</i> I
	SEC53-R	CTCGAGTTACAGGGAAAAGAGCTCCTTTAAG			<i>Xho</i> I
BIP	BIP-F	CACGTGACCATGCTGTGTTAAAACCATCTTG	8 198 455	2 037	<i>Pmi</i> I
	BIP-R	CTCGAGCTACAACATCATGATCATATGTCAT			<i>Xho</i> I

表 2 本研究使用的菌株和共表达质粒

Table 2 Strains and plasmids used in this study

菌株	特征	来源
<i>E. coli</i> JM109		作者所在实验室保存
<i>P. pastoris</i> GS115	His 缺陷型	作者所在实验室保存
PP-L	GS115 中转入质粒 pPIC9K-Laccase	本研究构建
A 类菌株	单个辅助因子共表达	
PP-L-HAC1	PP-L 中转入质粒 pGAPZB-HAC1	本研究构建
PP-L-GCN4	PP-L 中转入质粒 pGAPZB-GCN4	本研究构建
PP-L-SEC1	PP-L 中转入质粒 pGAPZB-SEC1	本研究构建
PP-L-SEC53	PP-L 中转入质粒 pGAPZB-SEC53	本研究构建
PP-L-BIP	PP-L 转入质粒 pGAPZB-BIP	本研究构建
PP-L-ERO1	PP-L 中转入质粒 pGAPZB-ERO1	本研究构建
B 类菌株	两个辅助因子组合共表达	
P1	PP-L-BIP 中转入质粒 pGAPZB-HAC1	本研究构建
P2	PP-L-HAC1 中转入质粒 pGAPZB-SEC53	本研究构建
P3	PP-L-BIP 中转入质粒 pGAPZB-SEC53	本研究构建
P4	PP-L-GCN4 中转入质粒 pGAPZB-HAC1	本研究构建
P5	PP-L-BIP 中转入质粒 pGAPZB-GCN4	本研究构建
P6	PP-L-GCN4 中转入质粒 pGAPZB-SEC53	本研究构建

1.2.2 毕赤酵母转化与筛选 漆酶表达质粒:将 pPIC9K-Laccase 质粒用 *Sal* I 单酶切线性化,柱回收后转化 *P. pastoris* GS115 感受态,涂布 MD 平板,长出单菌落后,用含 G418 抗生素的 YPD 平板进行拷贝数筛选。

分子伴侣表达质粒:将上述构建好的分子伴侣共表达质粒,分别进行单酶切(Avr II)线性化,柱回收后转化 PP-L 感受态,筛选平板选用含博莱霉素 Zeocin 的 YPD 平板,并进行菌落 PCR 验证,获得单一目标分子伴侣 DNA 条带的菌株即为阳性转化子;B 类菌株构建基于 A 类菌株制作的感受态,同样电击转化相应线性化质粒后,用含博莱霉素 Zeocin 的 YPD 平板筛选,菌落 PCR 验证,同时获得两条目标分子伴侣 DNA 条带的菌株即为阳性转化子。

1.2.3 重组菌发酵 种子培养:取重组菌单菌落接种于 YPD 培养基中,30 °C、220 r/min 培养 14 h 左右活化种子。

生长培养:上述活化的种子液以体积分数 10% 转接于 BMGY 生长培养基中,30 °C、220 r/min 培养 24 h。

发酵培养:将上述培养液以 5 000 r/min、4 °C 离心 5 min,菌体沉淀用无菌水洗涤 1~2 次后,全部转接与 BMMY 发酵培养基中,220 r/min、25 °C 摇瓶培养,每 24 小时补加 2% 甲醇诱导培养,取样进行 SDS-PAGE 鉴定。

1.2.4 重组菌发酵生物量的测定 菌体从 BMGY 生长培养基转接到 BMMY 发酵培养基后,每 24 小时取发酵液,稀释,测定 OD₆₀₀,计算菌体密度。

1.2.5 漆酶酶活测定 漆酶酶活力检测:取一定的发酵液,8 000 r/min 离心 10 min,取上清液作为粗酶液。漆酶反应体系为:0.1 mL 酶稀释液,1 mmol/L 的 ABTS 0.5 mL,100 mmol/L (pH 3.4) 的柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液 2.4 mL,失活的酶液为空白对照。漆酶反应条件为:30 °C 将 ABTS 和柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液分别保温 5 min,加入酶液,于 420 nm 处测定 3 min 内吸光值的变化。

1.2.6 SDS-PAGE 凝胶电泳分析 样品与 4× Loading buffer 混匀后,72 °C 加热 10 min,蛋白质预制胶购自 Life Technologies 公司,150 V 电泳 30 min,具体操作方法参考说明书。

1.2.7 漆酶的纯化及酶学性质测定 发酵液 8 000 r/min,4 °C 低温离心 10 min,得含漆酶的上清液。将上清液放在冰中保持低温,在磁力搅拌器上边搅拌

边加入硫酸铵粉末使其终质量浓度为 75 g/dL,离心后将沉淀用 A 液(10 mmol/L 的 PB,pH 6.0)复溶后放入透析袋中,磁力搅拌器搅拌 24 h,用 0.25 μmol/L 的微孔滤膜过滤,所得样品用 5 mL 阴离子柱 Q 柱进行纯化。柱纯化条件如下:用 5~10 倍柱体积的 A 液对 Q 柱进行平衡,待电导稳定后,流速设置为 1 mL/min 从进样管道进样;流速设置为 3 mL/min,用 5 倍柱体积的 A 液淋洗柱子;以 0、20%、40%、60%、80%、100% 的 B 液(10 mmol/L 的 PB,pH 6.0,1 mol/L NaCl)进行梯度洗脱;取测到漆酶酶活的洗脱液在 A 液中过夜透析,4 °C 保存。

漆酶蛋白质质量浓度测定按照 Bradford 蛋白质质量浓度测定试剂盒操作说明书进行;适当稀释纯化后的漆酶测定酶活力及蛋白质质量浓度后,计算比酶活;

按照 1.2.5 方法在不同温度下(20~70 °C,以 5 °C 为间隔)测定酶活力,得到最适温度;在最适条件下,分别以不同浓度 ABTS(柠檬酸-柠檬酸钠溶液)为底物,测定不同 ABTS 浓度下漆酶的酶活力, K_m 和 V_{max} 用 GraphPad Prism5 拟合得到;分别测定酶液在 50、60、70 °C 保温 0~220 min 残留酶活,计算 $t_{1/2}$ 。

2 结果与讨论

2.1 共表达质粒的构建

按照图 1 构建各共表达质粒,以 1.2.1 所述方法 PCR 扩增这 6 种分子伴侣基因片段,得到与理论值大小一致的条带,见图 2 (a)。将各扩增基因的 PCR 产物回收后,以表 1 所列的相应酶切位点双酶切,pGAPZB 用相同酶切位点双酶切后连接、转化,提取重组质粒进行双酶切鉴定,见图 2(b)。各重组表达质粒的命名见表 2。用于转化的各表达质粒均测序验证,测序结果与理论值一致。

2.2 共表达菌株产漆酶验证

将测序验证正确的各个共表达质粒分别用 Avr II 单酶切线性化后,电击转化 PP-L 菌株,使用含博莱霉素 Zeocin 的 YPD 平板筛选后,挑取 A 类菌株使用 pGAPZB 通用引物进行菌落 PCR 验证。将 A 类菌株的阳性转化子进行发酵,测定漆酶产量。

为了考察组成型共表达各分子伴侣是否对亲本菌株生长产生不利影响,将构建的各共表达菌株在 BMMY 培养基上的生长曲线进行测定,结果见图 3。各共表达菌株的生长与对照菌株(PP-L)没有显

著差异,说明共表达质粒的整合没有影响菌株生长。

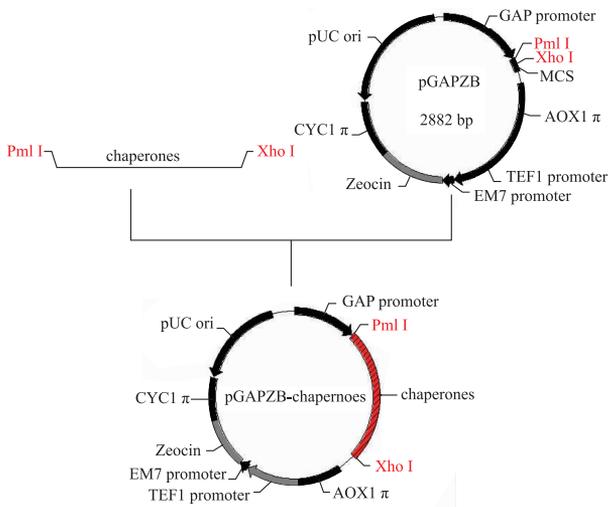


图 1 共表达质粒构建流程图

Fig. 1 Construction of co-expression plasmid of chaperones

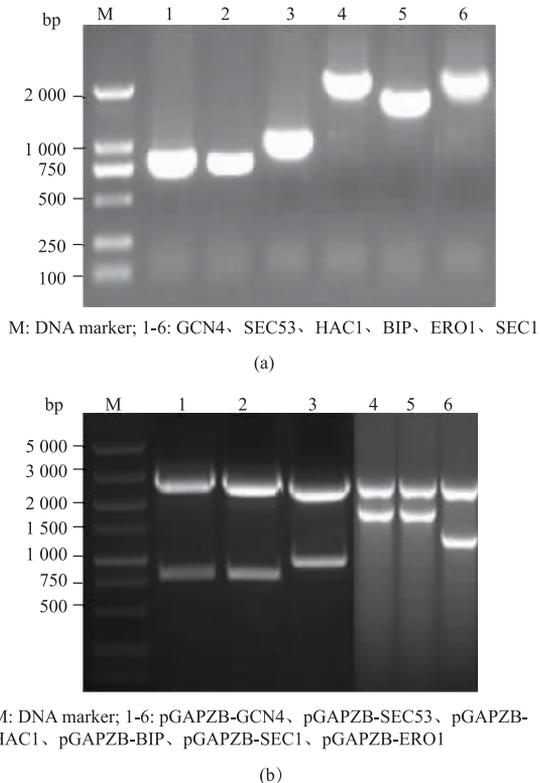


图 2 GS115 来源的分子伴侣编码基因的克隆和重组共表达质粒的双酶切鉴定

Fig. 2 Cloning of chaperones coding genes from GS115 and identification of recombinant plasmids for chaperones

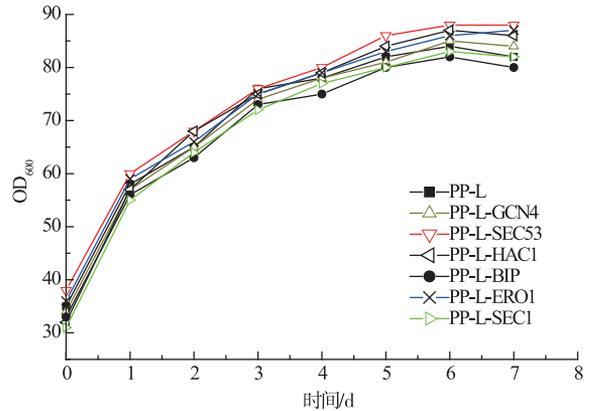
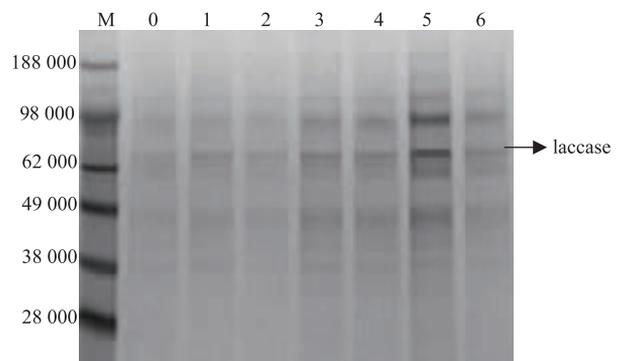


图 3 含分子伴侣菌株的生长曲线

Fig. 3 Growth curves of strains with additional cassette of chaperones

筛选表达量提高最明显的各共表达菌株转化子作进一步的表达分析。以表达菌株 PP-L 作为对照,在相同的培养条件下培养各共表达菌株,发酵 7 d 后离心取上清液,进行 SDS-PAGE 分析,见图 4。结果表明,各共表达菌株均成功表达漆酶,与对照菌株相比,表达量有不同程度的提高。取发酵 7 d 的发酵液离心取上清液作为粗酶液,测定各菌株的漆酶酶活力,见图 5。各共表达菌株的酶活力有不同程度的提高,PP-L-ERO1 除外。尤其是 PP-L-BIP 的酶活力为对照菌株的 4.59 倍。



M: protein marker; 0: PP-L; 1: PP-L-GCN4; 2: PP-L-ERO1; 3: PP-L-SEC53; 4: PP-L-HAC1; 5: PP-L-BIP; 6: PP-L-SEC1

图 4 各共表达菌株发酵上清液 SDS-PAGE 电泳分析
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of additional overexpression cassette of chaperones

为了考察不同模块的分子伴侣对外源蛋白质表达的影响,选取上述各模块中效果好的 A 类菌株进行不同模块间的组合共表达,即对表 2 中的 6 种 B 类菌株进行发酵。

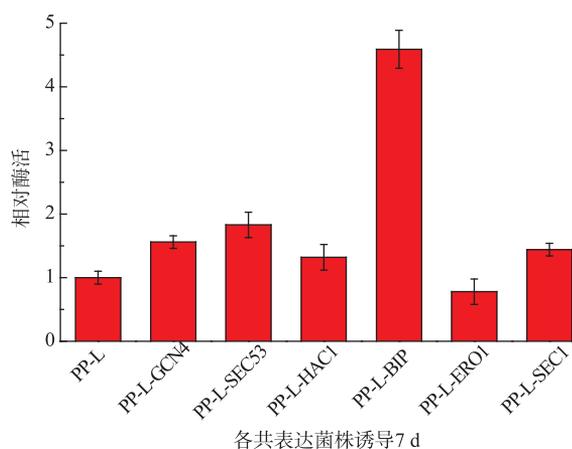


图5 摇瓶发酵各共表达菌株的相对酶活

Fig. 5 Effects of co-expression of chaperones on the laccase in shake flasks

如图6所示,组合共表达菌株的产量基本都有不同程度的提高(6%~53%),部分组合共表达菌株较单个共表达菌株胞外酶活下降,如P4、P2下降26%。

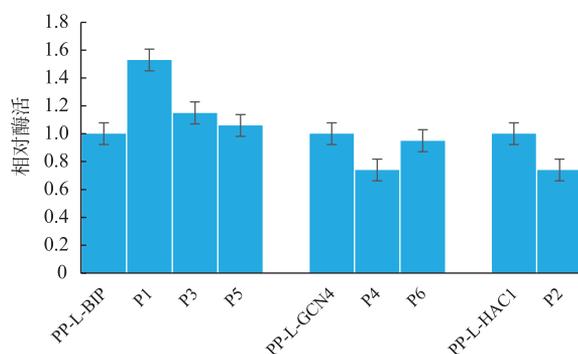


图6 不同共表达基因组合优化对异源表达漆酶的影响

Fig. 6 Optimization of different co-expression chaperones on heterologous protein production of laccase in *P.pastoris*

2.3 漆酶的纯化及酶学性质测定

按照1.2.7所述方法对漆酶进行纯化,在20%梯度洗脱时漆酶被洗脱出来。SDS-PAGE纯化条带

单一,见图7。用Bradford测定蛋白质质量浓度,然后计算比酶活并测定最适温度、 K_m 、 k_{cat} 、温度稳定性(50、60、70℃),见表3。

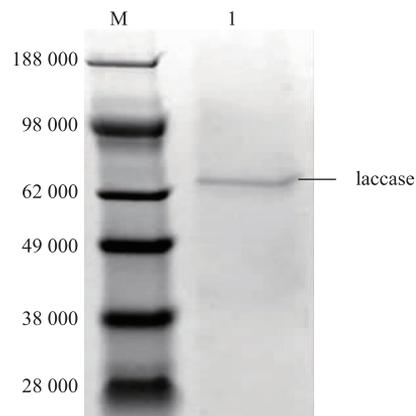


图7 纯化的漆酶的SDS-PAGE蛋白质电泳分析

Fig. 7 SDS-PAGE of purified laccase

2.4 共表达分子伴侣影响漆酶蛋白活力机制解析

外源蛋白质的分泌表达需要多个环节调控,在内质网(ER)中蛋白质折叠成天然构象后被初步修饰,转运到高尔基体中作进一步糖基化等修饰,经囊泡运输等环节最终分泌到胞外,错误折叠或未折叠的蛋白质则被降解。传统提高酶活的方法大都集中在发酵条件的优化、启动子、信号肽、密码子优化等方法上。作者首次通过过表达不同功能模块的分子伴侣来提高漆酶的产量,最终得到一株较出发菌株漆酶酶活力提高602%的菌株。这是因为初生肽链结合在ER中的BIP分子伴侣后稳定性增强,折叠效率提高^[20];大量未折叠或错误折叠蛋白质会使细胞产生未折叠蛋白质响应(UPR),HAC1通过过表达其控制的ERO1、SEC1等分子伴侣以缓解代谢压力,调控UPR信号^[21],促进蛋白质折叠效率。上述结果说明漆酶在*P. pastoris*中的折叠能力和未折叠蛋白质引起的胁迫压力是限制漆酶高效表达的关键因素。

表3 漆酶的动力学特征

Table 3 Kinetic properties of laccase

名称	比酶活/(U/mg)	k_{cat} (1/s)	K_m (μ mol/L)	k_{cat}/K_m (L/(mol·s))	最适温度/°C	$t_{1/2}$ ^[8]
laccase	1047.2±15.6	948.3	3.18±0.14	298.2	55(at pH 3.4)	170.0(at 50 °C) 75.0(at 60 °C) 9.6(at 70 °C)

3 结 语

关于漆酶的异源表达已有大量研究报道,然而从细胞层面对菌株改造鲜有报道。本研究第一次通过共表达分子伴侣提高漆酶在 *P. pastoris* 中的分泌表达。结果显示,过表达酵母中蛋白质折叠(BIP、ERO1)、运输(SEC53、SEC1)、胁迫应激(HAC1、GCN4)通路中的相关分子伴侣,与 PP-L(胞外活力为 555 U/L)相比,胞外漆酶活力提高 18%~359%(ERO1 除外),其中共表达 BIP 酶活力提高了 359%,

250 mL 摇瓶发酵使得胞外酶活达 2 547 U/L;接着组合共表达不同模块中效果较好的共表达元件,漆酶产量进一步提高 6%~53%,重组菌 P1(同时共表达 BIP 与 HAC1)较 PP-L 胞外漆酶酶活力提高 602%,250 mL 摇瓶发酵胞外酶活力最高达 3 896 U/L。本研究首次通过过表达不同功能模块的分子伴侣来提高漆酶的产量,研究结果表明,这一措施有显著效果,这一举措对促进漆酶的产业化进程提供了新的思路。

参考文献:

- [1] THURSTON C F. The structure and function of fungal laccases[J]. **Microbiology-Sgm**, 1994, 140: 19-26.
- [2] SOLOMON E I, SUNDARAM U M, MACHONKIA T E. Multicopper oxidases and oxygenases[J]. **Chemical Reviews**, 1996, 96(7): 2563-2605.
- [3] RUBILAR O, DIEZ M C, GIANFREDA L. Transformation of chlorinated phenolic compounds by white rot fungi[J]. **Critical Reviews in Environmental Science and Technology**, 2008, 38(4): 227-268.
- [4] PISCITELLI A, PEZZELLA C, GIARDINA P, et al. Heterologous laccase production and its role in industrial applications[J]. **Bioengineered Bugs**, 2010, 1(4): 252-262.
- [5] VIRK A P, SHARMA P, CAPALASH N. Use of laccase in pulp and paper industry[J]. **Biotechnology Progress**, 2012, 28(1): 21-32.
- [6] BUGG T D, AHMAD M, HARDIMAN E M, et al. Pathways for degradation of lignin in bacteria and fungi[J]. **Natural Products Reports**, 2011, 28(12): 1883-1896.
- [7] BAJPAI P. Application of enzymes in the pulp and paper industry[J]. **Biotechnology Progress**, 1999, 15(2): 147-157.
- [8] PERALTA-ZAMORA P, PEREIRA C M, TIBURTIUS E R L, et al. Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase[J]. **Applied Catalysis B-Environmental**, 2003, 42(2): 131-144.
- [9] COLAO M C, LUPINO S, GARZILLO A M, et al. Heterologous expression of lcc1 gene from *Trametes trogii* in *Pichia pastoris* and characterization of the recombinant enzyme[J]. **Microbial Cell Factories**, 2006, 5: 31.
- [10] PEZZELLA C, AUTORE F, GIARDINA P, et al. The *Pleurotus ostreatus* laccase multi-gene family: isolation and heterologous expression of new family members[J]. **Current Genetics**, 2009, 55(1): 45-57.
- [11] IHSSSEN J, REISS R, LUCHSINGER R, et al. Biochemical properties and yields of diverse bacterial laccase-like multicopper oxidases expressed in *Escherichia coli*[J]. **Scientific Reports**, 2015, 5: 10465.
- [12] DURAO P, CHEN Z, FERMANDES A T, et al. Copper incorporation into recombinant CotA laccase from *Bacillus subtilis*: characterization of fully copper loaded enzymes[J]. **Journal of Biological Inorganic Chemistry**, 2008, 13(2): 183-193.
- [13] SAKAMOTO Y, NAKADE K, YANO A, et al. Heterologous expression of lcc1 from *Lentinula edodes* in tobacco BY-2 cells results in the production an active, secreted form of fungal laccase[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2008, 79(6): 971-980.
- [14] NAKAGAWA Y, SAKAMOTO Y, KIKUCHI S, et al. A chimeric laccase with hybrid properties of the parental *Lentinula edodes* laccases[J]. **Microbiological Research**, 2010, 165(5): 392-401.
- [15] PISCITELLI A, GIARDINA P, MAZZONI C, et al. Recombinant expression of *Pleurotus ostreatus* laccases in *Kluyveromyces lactis* and *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 2005, 69(4): 428-439.
- [16] CREGG J M, CEREGHINO J L, SHIJ, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*[J]. **Molecular Biotechnology**, 2000, 16(1): 23-52.
- [17] SALOHEIMO M, VALKONEN M, PENTTILA M. Activation mechanisms of the HAC1-mediated unfolded protein response in filamentous fungi[J]. **Molecular Microbiology**, 2003, 47(4): 1149-1161.

- [18] CHEN Fengxiang, GUAN Bo, CHEN Yun, et al. Effect of co-expression of protein folding factor on expression of fusion protein IFN β -HAS in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**, 2014(12): 1246-1250.
- [19] VALKONEN M, PENTTILA M, SALOHEIMO M. Effects of inactivation and constitutive expression of the unfolded- protein response pathway on protein production in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*[J]. **Applied and Environmental Microbiology**, 2003, 69(4): 2065-2072.
- [20] GASSER B, MAURER M, GACH J, et al. Engineering of *Pichia pastoris* for improved production of antibody fragments [J]. **Biotechnology and Bioengineering**, 2006, 94(2): 353-361.
- [21] SCHRODER M, KAUFMAN R J. ER stress and the unfolded protein response[J]. **Mutation Research-Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, 2005, 569(1-2): 29-63.
- [22] GUERFAL M, RYCKAERT S, JACOBS P P, 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]. **Microbial Cell Factories**, 2010, 9: 49.

会 议 消 息

会议名称: 第九届纳米材料国际研讨会

大会官网: <http://www.janconf.org/conference/CN-BT2019/>

大会时间: 2019年12月13-15日

大会地点: 曼谷阿诺玛酒店

投稿系统: <http://www.janconf.org/RegistrationSubmission/default.aspx?ConferenceID=1178>

会议简介: 第九届纳米材料国际研讨会(The 9th Conference on Nanomaterials)定于2019年12月13-15日在泰国曼谷隆重举行。会议旨在为从事纳米材料研究的专家学者、工程技术人员、技术研发人员提供一个共享科研成果和前沿技术,了解学术发展趋势,拓宽研究思路,加强学术研究和探讨的平台。大会诚邀国内外高校、科研机构专家、学者,企业界人士及其他相关人员参会交流。

所有的投稿都必须经过2-3位组委会专家审稿,经过严格的审稿之后,最终所有录用的论文将发表在国际开源期刊上。

联系人: 杨老师

邮箱咨询: vickykongwy@126.com

手机: +86 150 7134 3477

微信: 3025797047

QQ: 1349406763