基因组学与应用生物学，2021 年，第 40 卷，第 3 期，第 1101-1109 页

研究报告
Research Report

通过非甲醇诱导游离型表达载体改善毕赤酵母中 β- 半乳糖苷酶表达

胡梦凯 [1,2,3] 夏伟 [1,2,3] 吴敬 [1,2,3] 高鑫 [1,2,3] 吴丹 [1,2,3*]

1 江南大学, 食品科学与技术国家重点实验室, 无锡, 214122; 2 江南大学生物工程学院, 工业生物技术教育部重点实验室, 无锡, 214122; 3 江南大学, 教育部食品安全国际合作联合实验室, 无锡, 214122

* 通信作者, wudan@jiangnan.edu.cn

摘　要　β- 半乳糖苷酶是一种重要的食品工业用酶，目前主要通过毕赤酵母甲醇诱导型表达系统进行生产，但甲醇的使用存在火灾、残留毒性等安全隐患，已逐渐成为食品工业用酶生产中备受关注的问题之一。为满足 β- 半乳糖苷酶安全生产的需要，本研究利用强组成型启动子 P_{GCW14} 和源自酵母的自我复制序列 PARS 构建了一种新型非甲醇诱导游离型表达载体 pGCW14ZαA-PARS，并且在此基础上分别构建了非甲醇诱导游离型重组表达菌株 KM71/pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL，用以改善米曲霉 *Aspergillus Oryzae* RIB40(ATCC42149)来源的 β- 半乳糖苷酶基因(*Aoβ-GAL*)在毕赤酵母中的表达。实验结果表明，该非甲醇诱导游离型表达载体在毕赤酵母中传代培养 90 代后仍保持 83.22%的遗传稳定性，完全能够满足工业上大规模生产的需要。在 10%流速补充碳源的条件下，非甲醇诱导游离表达菌株 KM71/pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 经高密度发酵的最高酶活性和比活性分别为 126.4 U/mL 和 26.2 U/mg，分别是传统甲醇诱导型表达菌株 KM71/pPIC9k-Aoβ-GAL 的 1.94 倍和 3.12 倍，且发酵周期缩短了 36 h。可见，本研究构建的非甲醇诱导游离型表达载体可有效改善 β- 半乳糖苷酶在毕赤酵母中的表达，且在食品工业用酶的安全、高效工业化生产中具有一定的应用前景。

关键词　组成型启动子 P_{GCW14}; 游离型表达载体; 重组毕赤酵母; β- 半乳糖苷酶; 高密度发酵

Expression of Beta-galactosidase Gene in *Pichia pastoris* Improved by Non-methanol Induced Episomal Expression Vector

Hu Meng kai [1,2,3] Xia Wei [1,2,3] Wu Jing [1,2,3] Gao Xin [1,2,3] Wu Dan [1,2,3,*]

1 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi, 214122; 2 Key Lab of Ministry of Education for Industrial Biotechnology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi, 214122; 3 International Joint Laboratory on Food Safety, Jiangnan University, Wuxi, 214122

* Corresponding author, wudan@jiangnan.edu.cn

DOI: 10.13417/j.gab.040.001101

Abstract　β-galactosidase is an important enzyme for the food industry, and it is usually produced by *Pichia pastoris* methanol-induced expression system. However, the use of methanol has several safety hazards such as causing fire and residual toxicity, which has gradually become one of the most concerned issues in industrial production of food-grade enzymes. In order to meet the needs of safe production of β-galactosidase, this study constructed a novel methanol-free episomal expression vector, pGCW14ZαA-PARS, using strong constitutive promoter P_{GCW14} and the yeast-derived self-replicating sequence PARS. Then the recombinant expression strain KM71/pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL was constructed to improve the expression of the β-galactosidase gene (*Aoβ-GAL*) derived from *Aspergillus oryzae* RIB40 (ATCC42149). Results showed that the methanol-free episomal expression

基金项目：本研究由国家杰出青年基金(31425020)、国家自然科学基金(31801472; 31571776)、江苏省自然科学基金(BK20171261; SBK2018041713)和江苏省重点研发计划(BE2017319)共同资助

引用格式：Hu M.K., Xia W., Wu J., Gao X., and Wu D., 2021, Expression of beta-galactosidase gene in *Pichia Pastoris* improved by non-methanol induced episomal expression vector, Jiyinzuxue yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology), 40(3): 1101-1109. (胡梦凯, 夏伟, 吴敬, 高鑫, 吴丹, 2021, 通过非甲醇诱导游离型表达载体改善毕赤酵母中 β- 半乳糖苷酶表达, 基因组学与应用生物学, 40(3): 1101-1109.)

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

vector maintained 83.22% genetic stability after subculture in *Pichia pastoris* for 90 generations, which could fully meet the needs of industrial large-scale production. After high-density fermentation under a 10% flow rate fed-batch of carbon source, the highest enzyme activity and specific activity of the strain KM71/pGCW14ZαA-PA-RS-Aoβ-GAL were 126.4 U/mL and 26.2 U/mg, which were 1.94 times and 3.12 times of those of the traditional methanol-inducible expression strain KM71/pPIC9k-Aoβ-GAL, respectively. Besides, the fermentation cycle was shortened by 36 h. It indicated that the novel methanol-free episomal expression vector constructed in this study could effectively improve the expression of β-galactosidase in *Pichia pastoris*, and has great application prospects in the safe and efficient industrial production of food enzymes.

Keywords Constitutive promoter P_{GCW14}; Episomal expression vector; *Pichia pastoris*; Beta-galactosidase; High-density fermentation

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是一种常见的异源蛋白表达宿主(Cregg, 2000; Cos et al., 2006)，其作为宿主既有生物生长迅速、自身蛋白分泌少、操作简单的优点，也具有强大的蛋白修饰折叠的能力，例如形成二硫键、糖基化修饰等功能，是一种适用于工业级生产的表达系统(Cereghino and Cregg, 2000; Cregg, 2000; Antošová and Sychrová, 2016)。目前，已有近千种异源蛋白质在毕赤酵母表达系统中成功表达(Macauley-Patrick et al., 2005)。

根据毕赤酵母表达系统载体上启动子的不同，分为诱导型和组成型。目前常用的诱导型启动子醇氧化酶(PAOX1)启动子是来自甲醇利用途径，通过甲醇诱导能够极大促进蛋白的表达，但在高密度发酵过程中存在许多问题，如发酵过程复杂，需要细胞达到一定浓度才能进行甲醇诱导；甲醇易挥发、有毒、有火灾隐患、不适用于药品和食品级蛋白的生产等(陆永超和蒋琳, 2013)。对于组成型表达载体来说，其蛋白的表达量与酵母自身的生长状态有着紧密的联系，尽管组成型表达的外源蛋白表达水平普遍不如甲醇诱导的，但其高密度发酵过程相对比较简单，且表达的蛋白应用到医药和食品级蛋白中无潜在的安全隐患，在食品和医药行业具有极为广阔的应用前景。

目前常用的组成型启动子是 3- 磷酸甘油醛脱氢酶(P_{GAP})启动子，已有报道利用该启动子进行高效表达蛋白(Waterham et al., 2013)。但 P_{GAP} 启动子外源蛋白表达水平普遍不高，在生产成本上远低于甲醇诱导型启动子 P_{AOX1} (Zhu et al., 2014)。因此，有必要开发新型非甲醇诱导组成型表达载体，以提高食品工业用酶在毕赤酵母中的组成型表达水平。选择强启动子或通过优化转录因子增强启动子强度是提高目的基因的转录和表达水平的有效手段(Juven-Gershon and Kadonaga, 2010)。

目前已报道的强组成型启动子有 P_{GAP}、$P_{TEF1-\alpha}$、P_{PEX8}、P_{PGK1}、P_{PHO89} 等。张轩薇等(2018)发现一种更强的组成型糖基磷脂酰肌醇(GPI)锚定蛋白(GCW14)的启动子 PGCW14，通过该启动子以组成型表达方式表达南极假丝酵母脂肪酶 B (CALB)，发现其表达水平高于常见的 P_{GAP} 和 P_{TEF1} 启动子的。Liang等(2013)利用组成型启动子 P_{GCW14} 表达绿色荧光蛋白(EGFP)，在以甘油和甲醇为碳源的基础上，通过启动子 P_{GCW14} 表达的绿色荧光蛋白(EGFP)荧光强度是启动子 P_{GAP} 的 10 倍左右。由此可见，启动子 P_{GCW14} 在毕赤酵母的异源蛋白表达上具有显著的优势。

大多数情况下，外源蛋白的表达量会随着拷贝数的增加而相应增加(Clare et al., 1991)。由于游离质粒在复制过程中可能会发生缺失、插入或者同源重组，且在细胞分裂期间游离质粒可能发生不均匀分配的现象，导致人们常认为在毕赤酵母中将表达载体整合到染色体上能够消除游离质粒带来的不稳定性的问题(Cereghino and Cregg, 2000; Daly and Hearn, 2005)。但是也有研究报道，通过整合方式的毕赤酵母高拷贝菌株经过一段时间培养，发现其拷贝数降低，发生了不稳定的现象(Zhu et al., 2009)。最近研究发现，通过在毕赤酵母中使用游离型表达载体表达异源蛋白比整合型质粒的胞外蛋白含量高，其中潘阳等 (2018)报道通过游离质粒表达木聚糖酶比整合型表达量提高 45.9%。可见，构建游离型表达载体，提高目的蛋白基因拷贝数，也是提高外源蛋白表达水平的可行方法。

β- 半乳糖苷酶(β-galactosidase, EC 3.2.1.23)，也称乳糖酶，能够水解乳糖产生半乳糖和葡萄糖(Mlichova and Rosenberg, 2006)。β- 半乳糖苷酶广泛存在于常见的细菌、真菌、霉菌、动物细胞以及植物组织等(Alvarez and Sas, 1961; Pressey, 1983; Bisw- as, 1985; Rahim and Lee, 1991)。β- 半乳糖苷酶在食品工业和保健食品领域中具有重要的作用，不仅可以降低乳糖在奶制品中的含量，可以改善乳糖不耐症情况，还

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

可以生产低聚半乳糖(galactooligosaccharides, GOS)，而且 GOS 可以增加婴幼儿对矿物质如 Ca、Fe、Zn 等的吸收，提高婴幼儿的免疫力(Zittermann et al., 2000)，也可以改善人体肠道环境，促进肠道益生菌的生长，改善人体健康(薛雅莺等, 2012)。

本实验室前期研究中以米曲霉(*Aspergillus oryzae*) RIB40 (ATCC42149)的 β- 半乳糖苷酶基因 *Aoβ-GAL* 为模板，经过 N140C/W806F 双突变后，重组表达的 β- 半乳糖苷酶的低聚半乳糖产率达到了 59.8%，是迄今为止报道的最高值(Gao et al., 2019)。经过 N140C/W806F 双突变后的 β- 半乳糖苷酶基因(*Aoβ-GAL*)作为本研究的目的基因。为了避免甲醇诱导给重组 β- 半乳糖苷酶在生产应用中带来的潜在危害，本研究利用强组成型启动子 pGCW14 和自我复制序列(PARS) (Camattari et al., 2016)，以 pGAPZαA 表达载体为骨架，构建了一种非甲醇诱导游离型表达载体 pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 来增强 β- 半乳糖苷酶在毕赤酵母中的表达水平。

1 结果与分析

1.1 表达载体 pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 的构建

对毕赤酵母基因组进行 PCR 获得启动子 P_{GCW14} 片段(图 1A)，通过无缝克隆试剂盒将质粒 pGAPZαA 中的启动子 P_{GAP} 替换为启动子 P_{GCW14}，构建成质粒 pGCW14ZαA。再将 PCR 扩增自我复制序列 PARS 片段通过无缝克隆试剂盒添加到 pGCW14ZαA 中，构建 pGCW14ZαA-PARS 质粒，将构建的质粒 pGCW14ZαA-PARS 进行测序，结果正确。将基因 *Aoβ-GAL* 和质粒 pGCW14ZαA-PARS 经过双酶切后进行连接，得到重组质粒 pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL。将构建好的重组质粒 pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 经限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ和 *Not* Ⅰ双酶切，得到大小约 3 900 bp 和 2 900 bp 为正确质粒(图 1B)，质粒经金唯智有限公司测序，结果正确。

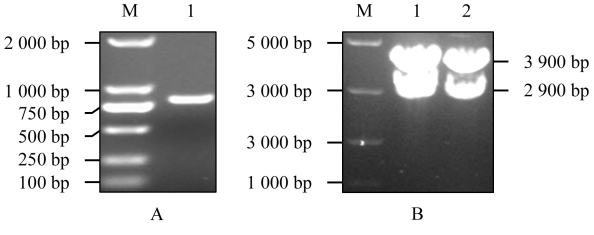

图 1 重组质粒的双酶切验证及获取启动子 P_{GCW14}

注: A: M: DL2000 Marker; 1: pGCW14 启动子; B: M: DL5000 Marker; 1~2: pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 经 *Kpn* Ⅰ/*Not* Ⅰ双酶切后的条带

Figure 1 Double digestion of recombinant plasmid and promoter P_{GCW14}

Note: A: M: DL2000 Marker; 1: pGCW14 promoter; B: M: DL5000 Marker; 1~2: pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL digested with *Kpn* Ⅰ and *Not* Ⅰ

1.2 摇瓶发酵

将重组质粒 pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 转化至毕赤酵母 KM71 感受态细胞，挑取 10 个重组毕赤酵母转化子，在摇瓶发酵培养基培养 84 h 后，经 5 000 r/min 离心 5 min 后取上清测 β- 半乳糖苷酶的酶活力(表 1)，挑取的转化子均能检测出酶活，说明构建的重组质粒成功转化至毕赤酵母中并表达。在接种到摇瓶发酵培养基 84 h 后，所有摇瓶中胞外上清中 β- 半乳糖苷酶的最高酶活为 9.72 U/mL，蛋白含量为 0.42 g/L，比活为 23.14 U/mg。对摇瓶的发酵上清进行 SDS-PAGE 蛋白电泳分析，发现在 116 kD 左右处有一条明显的条带(图 2)。取筛选得到最高酶活

表 1 KM71/pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 不同组成型转化子酶活力

Table 1 Activity of different constitutive recombinant KM71/pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL

序号 Strain number	酶活力(U/mL) Enzyme activity (U/mL)
1	9.23
2	8.33
3	8.78
4	9.21
5	9.72
6	5.21
7	4.53
8	9.14
9	7.69
10	6.82

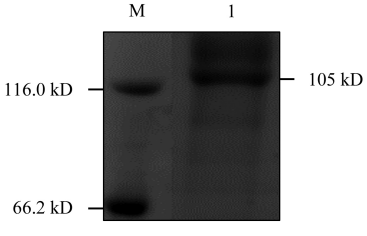

图 2 重组菌株摇瓶的胞外上清 SDS-PAGE 分析

注: M: 分子量标准蛋白; 1: 目的蛋白

Figure 2 SDS-PAGE analysis of extracellular supernatant of recombinant strain shake flask

Note: M: Molecular mass standard protein; 1: Target protein

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的重组菌用于后续高密度发酵水平研究。

1.3 游离型重组质粒 pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 在毕赤酵母 KM71 的稳定性研究

重组菌株中游离型载体的遗传稳定性在工业化生产中至关重要，高遗传稳定性可以避免在整个发酵期间添加抗生素而降低外源蛋白表达水平。在本研究中，通过对含重组质粒的菌株进行连续传代培养，再经过在抗性或非抗性平板上进行筛选后计数，通过比较抗性平板和非抗性平板的菌落数来确定重组质粒在毕赤酵母中遗传稳定性。通过这种方法研究非甲醇诱导游离型表达质粒 pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 在毕赤酵母 KM71 中的遗传稳定性。可见含有游离型表达载体的重组毕赤酵母菌株在培养传代 90 代后仅损失了 16.78%的游离型表达载体，具有 83.22%的高遗传保留率(表 2)。

1.4 重组菌株 KM71/pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 和 KM71/pPIC9K-Aoβ-GAL 高密度发酵比较

甲醇诱导型重组菌株 KM71/pPIC9k-Aoβ-GAL 为实验室前期构建并保存，由甲醇诱导型启动子 PAOX1 进行表达，作为本研究对照。由于高密度发酵水平更加接近工厂化生产的水平，所以本研究对毕赤酵母菌株进行 3.6 L 发酵罐研究，并比较本研究构建的非甲醇诱导游离型重组菌株与传统甲醇诱导型重组菌株在发酵酶活、蛋白含量及菌体生长情况方面的差异。

结果显示，甲醇诱导型重组菌株 KM71/pPIC9K-Aoβ-GAL 在 28 ℃和 1%甲醇诱导浓度的条件下，经过 3.6 L 发酵罐高密度发酵培养 132 h 后，发酵上清 β− 半乳糖苷酶的酶活达到最高为 65.3 U/mL，此时发酵上清的蛋白含量达到 7.73 g/L，但是比活仅有 8.4 U/mg (图 3)。可见，通过甲醇诱导方式进行高密度发酵，β− 半乳糖苷酶的比活低，甲醇诱导方式的高密度发酵对 β− 半乳糖苷酶表达产生了影响。

表 2 重组质粒的遗传稳定性

Table 2 Genetic stability of recombinant plasmid

繁殖代数 Generations	非选择性平板菌落数 Colony on non-selective plate	选择性平板菌落数 Colony on selective plate	基因丢失率(%) Rate of gene loss (%)
30	154	149	3.25
60	159	148	6.92
90	143	119	16.78

对于非甲醇诱导游离型重组菌株 KM71/pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 外源蛋白 β− 半乳糖苷酶的表达受组成型启动子 PGCW14 控制，随菌体生长同时进行。发酵罐中碳源含量与毕赤酵母重组菌的生长状况紧密相关，良好的生长状态也可以缩短高密度发酵时间，这对 β− 半乳糖苷酶的工厂化是有意义的，因此研究碳源补料速率对重组菌产酶的影响是必要的。

本研究在该菌株 3.6 L 发酵罐高密度发酵过程中进行了 6%、10%、12%碳源流加速率的发酵优化。在 6%碳源流速条件下，重组菌株发酵培养 101 h 后发酵上清酶活为 92.8 U/mL，蛋白含量为 3.56 g/L，比活为 26.1 U/mg；在 10%碳源流速条件下，重组菌株发酵培养 96 h 后发酵上清酶活为 126.4 U/mL，蛋白含量为 4.83 g/L，比活为 26.2 U/mg；在 12%碳源流速条件下，重组菌株发酵培养 88 h 后发酵上清酶活为 116.8 U/mL，蛋白含量为 4.64 g/L，比活为 25.2 U/mg。可见，该菌株在 3.6 L 发酵罐中高密度发酵最佳碳源流加速率为 10% (图 3)。

在此发酵条件下，高密度发酵酶活是摇瓶水平的 13 倍，其比活和摇瓶的比活保持一致。在 10%碳源流速下的实时 SDS-PAGE 蛋白电泳图分析(图 4)，105 kD 附近有明显的一条带，在发酵的过程中，随着发酵培养时间的增加，蛋白含量先增加后降低。实验结果表明，在不同碳源流速的培养下，重组菌的发酵时间和产酶量都是有相当水平的差异，可见，碳源补料流速的变化对重组菌产酶水平影响显著。

比较甲醇诱导型和非甲醇诱导游离型重组菌株高密度发酵结果发现，非甲醇诱导游离型菌株 KM71/pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 高密度发酵的发酵最高酶活为 126.4 U/mL，比活为 26.2 U/mg，分别是甲醇诱导型菌株 KM71/pPIC9k-Aoβ-GAL 的 1.94 倍和 3.12 倍；而且非甲醇诱导游离型菌株达到最高发酵酶活时间为 96 h，相比甲醇诱导型菌株达到最高酶活的时间 132 h，发酵周期缩短了 36 h。可见，本研究构建组成型的非甲醇诱导游离型表达载体较传统的甲醇诱导型表达载体具有明显的优势。

2 讨论

游离型质粒在宿主中的遗传稳定性是衡量其是否适合作为工业化生产表达载体的主要指标。据研究报道，使用和不使用抗生素培养 10 代后 PARS 载体的外源基因保留率分别为 97.3%和 39.04% (Camattari et al., 2016)。然而，目前没有明确的用于测量游

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

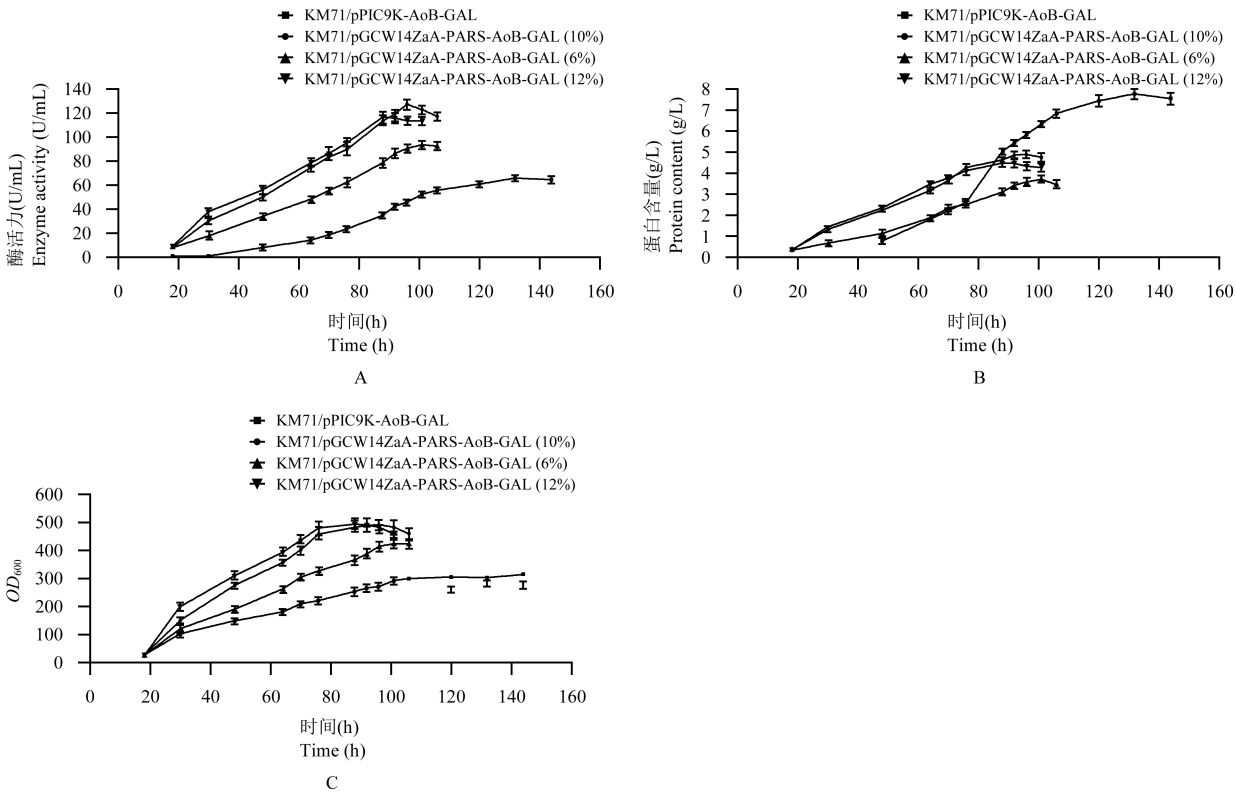

图 3 高密度发酵下的酶活、蛋白含量和生物量

注: A: 不同重组菌中 β- 半乳糖苷酶的酶活力; B: 不同重组菌的蛋白表达水平; C: 不同重组菌实时生物量

Figure 3 Enzyme activity, protein content and biomass under high-density fermentation

Note: A: The activity of β-galactosidase produced by recombinant strain; B: The expression level of protein in strains: C: Time course of biomass of recombinant strain

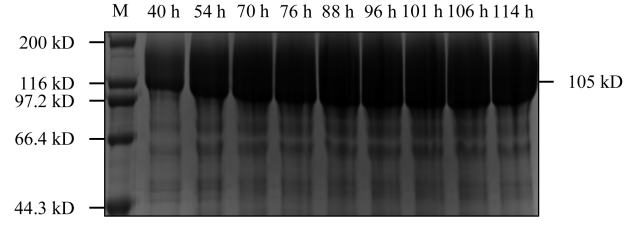

图 4 KM71/pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 菌株高密度发酵在 10%的碳源流加速度的条件下发酵上清中 β- 半乳糖苷酶的 SDS-PAGE 分析

注: M: 分子量标准蛋白

Figure 4 SDS-PAGE analysis of β-galactosidase from KM71/pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL strain under the condition that the 10% flow rate is supplemented with carbon source

Note: M: Molecular mass standard protein

离型质粒遗传稳定性的方法。本研究通过对含重组质粒的菌株进行连续传代培养，再经过在抗性或非抗性平板上进行筛选后计数，通过比较抗性平板和非抗性平板的菌落数来确定重组质粒在毕赤酵母中的遗传稳定性的方法，研究了新型非甲醇诱导游离型菌株 KM71/pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 的遗传稳定性，结果表明，在传代 90 代后，该游离型表达载体在毕赤酵母 KM71 中丢失率仅为 16.78%。毕赤酵母通常被认为每 48 h 繁殖 29 代，90 代的繁殖时间足以支持宿主细胞生长超过 144 h，这表明游离型表达载体在毕赤酵母中具有较高的遗传稳定性，完全能够满足巴斯德毕赤酵母工业大规模发酵的生长要求。所以，当在整个发酵期间使用游离型表达载体时，没有丢失重组蛋白编码基因的风险。

目前，β- 半乳糖苷酶在毕赤酵母中大多数采用甲醇诱导的方式进行表达(Sun et al., 2014; Bankefa et al., 2018)，在甲醇诱导表达过程中，甲醇易挥发且具有毒性，这对工业化生产和食品、医药领域内的应用是不利的，所以组成型表达更适合 β- 半乳糖苷酶的工业化生产。本研究 3.6 L 发酵罐高密度发酵结果显示，非甲醇诱导游离型组成型重组菌株 KM71/pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 的 β- 半乳糖苷酶发酵酶活和比活分别是传统甲醇诱导型重组菌株 KM71/pPIC9k-Aoβ-GAL 的 1.94 倍和 3.12 倍；而蛋白含量最高只有 4.83 g/L，低于甲醇诱导型重组菌株的蛋白含量 7.73 g/L。

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

其原因可能是由于毕赤酵母胞外分泌蛋白的途径为翻译后转移途径，会对外源蛋白进行分泌修饰，会影响其表达速率(Taxis et al., 2003; Bernales et al., 2006)。对于甲醇诱导方式，由于过快的表达 β- 半乳糖苷酶，可能导致其蛋白在表达分泌修饰过程出现错误，从而导致其蛋白结构发生改变，酶蛋白比活降低。而通过组成型载体表达 β- 半乳糖苷酶，其蛋白表达速率没有甲醇诱导方式的快，保证了 β- 半乳糖苷酶在表达分泌修饰过程中的正常进行。

此外，由于组成型表达方式的特征是随着重组菌的生长而进行异源蛋白的表达，当重组菌处于良好生长环境的条件下，重组菌株生长至最高生物量的时间会缩短，从而使发酵时间也会缩短。本研究构建的新型非甲醇诱导游离型菌株 KM71/pGCW14-ZαA-PARS-Aoβ-GAL 进行高密度发酵生产周期为 96 h，相比传统甲醇诱导型重组菌株的高密度发酵生产周期(132 h)缩短了 36 h，可大大促进 β- 半乳糖苷酶的工业化生产效率，降低了生产成本。可见，相较于传统的甲醇诱导型载体，本研究构建的新型非甲醇游离组成型表达载体在发酵酶活、比活和生产周期、成本等方面均具有明显优势，在食品、医药用酶的工业化生产中具有广阔的应用前景。

3 材料与方法

3.1材料

3.1.1 菌株和质粒

本实验所用到的菌株 *E. coli* JM109 和毕赤酵母 KM71 均由本实验室保存；本研究所用载体 pMD-18T-Simple 购于 TaKaRa 公司，另外载体 pGAPZαA 购买自 Invitorgen 公司；重组质粒 pPIC9k-Aoβ-GAL 由本实验室前期构建并保存。

3.1.2 发酵培养基

毕赤酵母的摇瓶发酵培养基：酵母粉 5.0 g/L，甘油 40 g/L，胰蛋白胨 10.0 g/L，葡萄糖 10.0 g/L。YPD 摇瓶培养基：胰蛋白胨 1 g/L，酵母粉 0.5 g/L，葡萄糖 1 g/L。YPD 固体培养基：胰蛋白胨 10.0 g/L，酵母粉 5 g/L，葡萄糖 10.0 g/L，1.5%~2% (*W*/*V*)琼脂。发酵种子培养基：酵母粉 10.0 g/L，胰蛋白胨 20.0 g/L，YNB 13.4 g/L，甘油 30.0 g/L。BSM 培养基：85%磷酸 26.7 mL/L，$CaSO_4$ 0.93 g/L，K_2SO_4 18.2 g/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 14.9 g/L，KOH 4.13 g/L，甘油 40.0 g/L，微量元素盐溶液 4.35 mL/L，组氨酸 2.0 g/L。碳源补料培养基：80%甘油，2 g/L 组氨酸，4.92 mL/L 微量元素盐溶液。在高密度发酵过程中用 100%氨水和 20%磷酸来调节发酵罐中的 pH。

3.1.3 试剂

高保真 DNA 聚合酶 2×Phanta Max Master Mix P515-01、无缝克隆试剂盒(南京诺唯赞生物科技有限公司) ClonExpress Ⅱ One Step Cloning Kit C112-01。中分子量标准蛋白、牛血清标准蛋白、聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)试剂盒均购于碧云天生物技术有限公司(上海)；限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ和 *Not* Ⅰ、T4 DNA 连接酶、DL 5 000/10 000 DNA Maker 购于宝生物工程(大连)有限公司。分子级的胰蛋白胨和酵母粉购自英国 Oxoid 公司；Zeocin (博来霉素)、YNB (分子级)、酵母基因组提取试剂盒购自上海生工生物工程(上海)股份有限公司；所有质粒测序均由金唯智中国(苏州)提供支持；其他试剂均属于国产分析纯。

3.2 方法

3.2.1 表达载体的构建

自主复制序列 PARS 来源于乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*) (Camattari et al., 2016)并且由本实验前期人工合成，启动子 P_{GCW14} 通过对毕赤酵母 KM71 基因组进行 PCR 获得。设计引物 F1 和 R1 扩增毕赤酵母 KM71 基因组获得启动子 P_{GCW14} 片段，设计引物 F2 和 R2 扩增商业化载体 pGAPZαA，使用诺唯赞的无缝克隆试剂盒将上述两条片段连接以产生质粒 pGCW14ZαA。使用引物 F3 和 R3 扩增载体 pMD18-T-PARS，使用引物 F4 和 R4 扩增质粒 pGCW14ZαA，使用诺唯赞的无缝克隆试剂盒将两条片段连接以产生游离型表达载体 pGCW14ZαA-PARS。含有米曲霉的 β- 半乳糖苷酶基因(*Aoβ-GAL*)的质粒 pPIC9K-Aoβ-GAL 由本实验室前期构建并保存，设计上游引物 F5 和下游引物 R5 扩增质粒 pPIC9K-Aoβ-GAL，分别为基因 *Aoβ-GAL* 引入 *Kpn* Ⅰ和 *Not* Ⅰ限制性酶切位点(表 3)。扩增 *Aoβ-GAL* 基因后，使用限制性内切酶 *Kpn* Ⅰ和 *Not* Ⅰ对游离型表达载体 pGCW14ZαA-PARS 和目的基因 *Aoβ-GAL* 片段进行双酶切，通过 T4 DNA 连接酶将 pGCW14ZαA-PARS 片段和 *Aoβ-GAL* 基因片段进行连接获得重组质粒 pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL，将构建的重组质粒 pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 进行酶切验证成功并且测序正确后转化到毕赤酵母 KM71 中。

3.2.2 游离型表达载体 pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 转化毕赤酵母 KM71

将双酶切验证正确并且测序正确的重组质粒

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 3 引物序列

Table 3 Primer sequence

引物名称 Primer name	引物序列(5'−3') Primer sequence (5'−3')
F1	CAATTGAACAACTATCAGGTGAACCCACCTAACTATT
R1	TCTCATCGTTTCGAATTTGTTGTTTGAGTGAAGCGAG
F2	TTCGAAACGATGAGATTTCCTTC
R2	ATAGTTGTTCAATTGATTGAAATAGGGAC
F3	AAGGCTTTAATTTGCAAGCTTAGTGCTGATTATGATTTGACGTTTATAT
R3	TGGCCTTTTGCTCACATGGCAACATCTTTGGATAATATCAGAATG
F4	ATGTGAGCAAAAGGCCAGCA
R4	AGCTTGCAAATTAAAGCCTTCG
F5	CGGGGTACCTCCATCAAGCATCGTCTCA
R5	ATAAGAATGCGGCCGCTTAGTATGCTCCCTTCCGC

注: 下划线: 酶切位点序列

Note: The underlined: The restriction sites

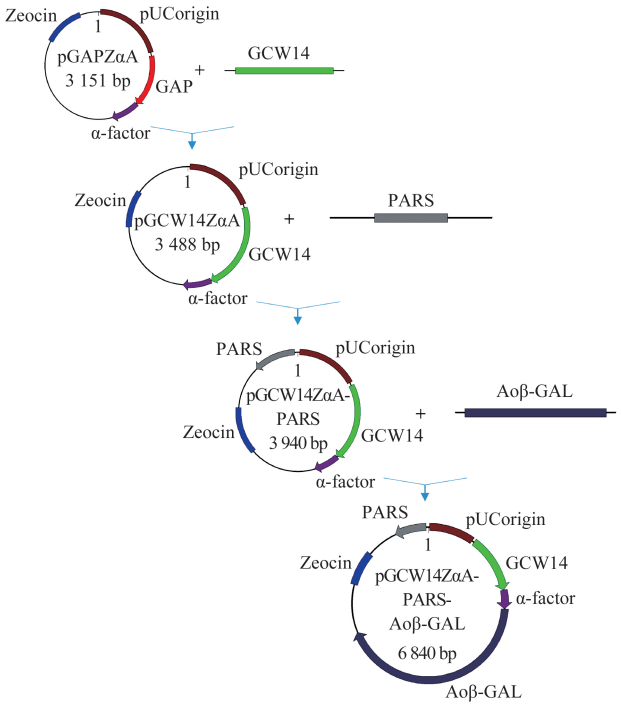

图 5 质粒 pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 的构建过程

Figure 5 Construction process of pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL plasmid

pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 不用经过线性化而直接将其电转化至毕赤酵母 KM71 感受态中，使用仪器 Gene Pulser electroporator (Eppendorf, Hamburg, Germany)在 1 500 V 电压下进行电击，电击完成后加入 1 mL 在冰上预冷的 1 mol/L 山梨醇并且温和地吹吸均匀，再将其转入到 1.5 mL 灭菌的 EP 管中，在 30 ℃、200 r/min 摇床的条件下培养 2 h，然后吸取 200~300 A 涂布于含有 Zeocin (100 μg/mL)遗传霉素抗性的 YPD 平板上，在 30 ℃的恒温培养箱中培养至长出单菌落。

3.2.3 重组毕赤酵母转化子的摇瓶表达

经过含有 Zeocin 遗传霉素抗性 YPD 平板筛选后，随机挑取 10 个转化子进行摇瓶发酵表达，通过检测不同转化子摇瓶的胞外上清酶活高低，对毕赤酵母重组菌进行筛选。将在抗性平板生长的转化子接种至 10 mL 的 YPD 培养基中，在 30 ℃、200 r/min 的恒温摇床中培养 24 h 后，从上述发酵培养基中移取 2.5~50 mL 的无菌摇瓶发酵培养基中，在 200 r/min、30 ℃的恒温摇床条件下进行培养，在恒温摇床中培养 84 h 后离心取发酵上清测酶活。所用到的各种培养基配方参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

3.2.4 游离型表达载体 pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 在毕赤酵母 KM71 中的遗传稳定性

将构建含有游离型表达载体 pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 的单菌落挑取到 2 mL YPD 液体培养基中，并在 30 ℃、200 r/min 恒温摇床条件下中培养过夜。然后，将上述培养基 1 %发酵液接种到新鲜的2 mL YPD 液体培养基中，并在 30 ℃、200 r/min 恒温摇床条件下培养 2 d。每 2 d 转移 YPD 培养基一次并取样，然后将样品适当稀释，涂布于非选择性 YPD 平板上，并在 30 ℃恒温培养箱条件下培养，待菌落生长后随机挑取单菌落并接种在非选择性 YPD 平板和选择性 YPD 平板(含有 100 μg/mL Zeocin)上。由于毕赤酵母代时约为 100 min，即每 48 h 繁殖约 29 代，参照此标准，通过比较两者的生长菌落数来判断外源基因在重组菌株中的稳定性(刘庆慧等, 2008)。

3.2.5 酶活力的测定

将 oNPG 溶于50 mmol/L 的醋酸盐缓冲液(pH 4.5)，充分混匀后获得反应底物。取 100 μL 稀释一定倍数的酶液，再加入 1.8 mL 的醋酸盐缓冲液(pH 4.5)，在 60 ℃恒温水浴锅预热 5 min 后，加入 100 μL 的反应底物，反应 10 min 后加入 1 mL 1 mol/L 预冷的 Na_2CO_3 溶液灭酶，在 420 nm 条件下测定反应体系的吸光度(以灭活的酶液为反应物并进行同样操作作为空白对照)。

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

在上述实验条件下，将每分钟分解 oNPG 生成 1 μmol 的 oNP 所需酶量定义为 β- 半乳糖苷酶一个单位的酶活力(U)。

3.2.6 组成型菌株发酵罐上罐发酵

从保藏 KM71/pGCW14ZαA-PARS-Aoβ-GAL 菌株的甘油管中移取 200 μL 菌液到 100 mL 的种子培养基中，在 30 ℃、200 r/min 条件下的恒温摇床中发酵培养 24 h 后，再将上述培养后的种子培养液接入到 3.6 L 发酵罐中进行高密度发酵。高密度发酵的培养过程分为两个阶段，第一个阶段为甘油生长阶段，第二个阶段为甘油补料阶段。通过转速和通入纯氧两种方式将发酵罐内的 DO 控制在 30%，温度恒定在 30 ℃，通过 100%氨水和 20%磷酸将发酵罐内的 pH 控制在 5.0 左右，接种至发酵罐培养 18 h 左右时溶氧反弹，进行甘油碳源补料阶段，此时流加碳源补料培养基进行补料，根据不同的碳源补加速度进行补加碳源。具体方法参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。10 %的流加速度是每小时流加碳源补料培养基 17.3 g。

3.2.7 甲醇诱导型菌株发酵罐上罐发酵

从实验室保藏经 N140C/W806F 双突变体的KM-71/pPIC9K-Aoβ-GAL 菌株的甘油管中移取 200 μL菌液接种到 100 mL 种子培养基中，在 30 ℃、200 r/min 条件下的恒温摇床中发酵培养 24 h 后，再将上述培养后的种子培养液接入到 3.6 L 发酵罐中进行高密度发酵。高密度发酵的培养过程分为三个阶段，第一个阶段为甘油生长阶段，第二个阶段为甘油补料阶段，第三个阶段为甲醇诱导阶段。通过转速和通入纯氧两种方式将发酵罐内的 DO 控制在 30%，温度恒定在 30 ℃，通过 100%氨水和 20%磷酸将发酵罐内的 pH 控制在 5.0 左右，接种至发酵罐培养 18 h 左右时溶氧反弹，进行甘油碳源补料阶段，当 OD_{600} 生物量生长至 100 时停止甘油补料，通过甲醇流加仪对菌株在 28 ℃进行 1.0 %甲醇浓度条件下诱导。具体方法参照 Invitrogen 公司毕赤酵母操作手册。

作者贡献

胡梦凯负责本研究的部分实验设计，是本研究的执行人，负责整体的实验操作及结果整理，同时负责论文撰写；高鑫负责部分的实验操作；吴丹负责本研究的整体实验设计；吴敬是项目的构思者及负责人，负责本研究的全局指导；夏伟负责论文的最后修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家杰出青年基金(31425020)、国家自然科学基金(31801472; 31571776)、江苏省自然科学基金(BK20171261; SBK2018041713)和江苏省重点研发计划(BE2017319)共同资助。

参考文献

Alvarez A., and Sas J., 1961, Beta-galactosidase changes in the developing intestinal tract of the rat, Nature, 190 (4778): 826-827.

Antošová Z., and Sychrová H., 2016, Yeast hosts for the production of recombinant laccases: a review, Mol. Biotechnol., 58(2): 93-116.

Bankefa O.E., Wang M.Y., Zhu J.L., and Li Y., 2018, Hac1p homologues from higher eukaryotes can improve the secretion of heterologous proteins in the yeast *Pichia pastoris*, Biotechnol. Lett., 40(7): 1149-1156.

Bernales S., Papa F.R., and Walter P., 2006, Intracellular signaling by the unfolded protein response, Ann. Rev. Cell Dev. Biol., 22(1): 487-508.

Biswas T.K., 1985, β-galactosidase activity in the germinating seeds of vigna sinensis, Phytochemistry, 23(12): 2831-2833.

Camattari A., Goh A., Yip L.Y., Tan A.H.M., Ng S.W., Tran A., Liu G.W., Liachko I., Dunham M.J., and Rancati G., 2016, Characterization of a panars-based episomal vector in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* for recombinant protein production and synthetic biology applications, Microb. Cell Fact., 15(1): 139.

Cereghino J.L., and Cregg J.M., 2000, Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, FEMS Microbiol. Rev., 24(1): 45-66.

Clare J.J., Rayment F.B., Ballantine S.P., Sreekrishna K., and Romanos M.A., 1991, High-level expression of tetanus toxin fragment c in *Pichia pastoris* strains containing multiple tandem integrations of the gene, Biotechnology, 9 (5): 455-460.

Cos O., Ramón R., Montesinos J.L., and Valero F., 2006, Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review, Microb. Cell Fact., 5(1): 17.

Cregg J.M., 2000, Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*, Mol. Biotechnol., 16(1): 23-52.

Daly R., and Hearn M.T.W., 2005, Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: A useful experimental tool in protein engineering and production, J. Mol. Recognit., 18

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(2): 119-138.

Gao X., Jing W., and Dan W., 2019, Rational design of the beta-galactosidase from *Aspergillus oryzae* to improve galactooligosaccharide production, Food Chem., 286(2): 362-367.

Juven-Gershon T., and Kadonaga J.T., 2010, Regulation of gene expression via the core promoter and the basal transcriptional machinery, Dev. Biol., 339(2): 225-229.

Liang S.L., Zou C.J., Lin Y., Zhang X.W., and Ye Y.R., 2013, Identification and characterization of pgcw14: a novel, strong constitutive promoter of *Pichia pastoris*, Biotechnol. Lett., 35(11): 1865-1871.

Liu Q.H., Chen T., and Huang J., 2008, Stability of recombinant SMD1168/pGAPZαA-VAP1 and its expression of WSSV-VAP1 by fermentation, Haiyang Shuichan Yanjiu (Progress in Fishery Sciences), 29(5): 95-99. (刘庆慧, 陈婷, 黄倢, 2008, 重组毕赤酵母 smd1168/pgapzαa-vap1 稳定性及发酵表达 wssv-vap1, 海洋水产研究, 29(5): 95-99.)

Lu Y.C., and Jiang L., 2013, The strategies for efficient expression of recombinant protein in *Pichia pastoris*, Weishengwu Mianyixsue Jinzhan (Prog Microbiol Immunol), 41(1): 70-76. (陆永超, 蒋琳, 2013, 毕赤酵母高效表达策略概述, 微生物学免疫学进展, 41(1): 70-76.)

Macauley-Patrick S., Fazenda M.L., Mcneil B., and Harvey L. M., 2005, Heterologous protein production using the pichia pastoris expression system, Yeast, 22(4): 249-270.

Mlichova Z., and Rosenberg M., 2006, Current trends of β-galactosidase application in food technology, J. Food Nutr. Res., 45(2): 47-54.

Pan Y., Wu D., and Wu J., 2018, Improving the expression of recombinant xylanase in *Pichia pastoris* with episomal expression plasmid, Shengwu Gongcheng Xuebao (Chinese Journal of Biotechnology), 34(5): 88-97. (潘阳, 吴丹, 吴敬, 2018, 利用游离型表达质粒强化毕赤酵母表达木聚糖酶, 生物工程学报, 34(5): 88-97.)

Pressey R., 1983, Beta-galactosidases in ripening tomatoes, Plant Physiol., 71(1): 132-135.

Rahim K.A.A., and Lee B.H., 1991, Specificity, inhibitory studies, and oligosaccharide formation by β-galactosidase from psychrotrophic *Bacillus subtilis kl88*, J. Dairy Sci., 74(6): 1773-1778.

Sun X.J., Duan X.G., Wu D., Chen J., and Wu J., 2014, Characterization of sulfolobus solfataricus β-galactosidase mutant f441y expressed in *Pichia pastoris*, J. Sci. Food Agric., 94(7): 1359-1365.

Taxis C., Hitt R., Park S.H., Deak P.M., Kostova Z., and Wolf D. H., 2003, Use of modular substrates demonstrates mechanistic diversity and reveals differences in chaperone requirement of erad, J. Biol. Chem., 278(38): 35903-35913.

Waterham H.R., Digan M.E., Koutz P.J., Lair S.V., and Cregg J. M., 1997, Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter, Gene (Amsterdam), 186(1): 33-44.

Xue Y.Y., Zhang Y.P., and Jia H.H., 2012, Advances in the synthesis and application of galactooligosacharides, Fajiao Keji Tongxun (Bulletin of Fermentation Science and Technology), 41(4): 50-52. (薛雅莺,张翼鹏, 贾慧慧, 2012, 低聚半乳糖的制备和应用进展, 发酵科技通讯, 41(4): 50-52.)

Zhang X.W., Ye Y.Y., Liu X.X., Lu L.L., and Lin Y., 2013, Application of *Pichia pastoris* original constitutive strong promoter gcw14 in candidn antarctic lipase b yeast surface display, Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin), (4): 129-135. (张轩薇, 叶燕锐, 刘晓肖, 鲁柳柳, 林影, 2013, 毕赤酵母新启动子 gcw14 在细胞表面展示 calb 中的应用, 生物技术通报, (4): 129-135.)

Zhu T.C., Guo M.J., Sun C., Qian J.C., Zhuang Y.P., Chu J., and Zhang S.L., 2009, A systematical investigation on the genetic stability of multi-copypichia, Biotechnol. Lett., 31(5): 679-684.

Zhu T.C., Sun H.B., Li P.F., Xue Y.F., Li Y., and Ma Y.H., 2014, Constitutive expression of alkaline beta-mannanase in recombinant *Pichia pastoris*, Process Biochem., 49(12): 2025-2029.

Zittermann A., Bock P., Drummer C., Scheld K., Heer M., and Stehle P., 2000, Lactose does not enhance calcium bioavailability in lactose-tolerant, healthy adults, Am. J. Clin. Nutr., 71(4): 931-936.

(C)1994-2024 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net