

过氧化物酶 A4-Prx 在毕赤酵母中的优化表达

陈艺¹, 朱珍², 吴晖¹, 钟凤¹, 唐语谦¹, 赖富饶¹

(1. 华南理工大学轻工与食品学院, 广东广州 510640) (2. 广州市轻工职业学校, 广东广州 510650)

摘要: 以来源于不动杆菌 *Acinetobacter sp.* SM04 的过氧化物酶 A4-Prx 的毕赤酵母工程表达菌株 GS115/pPIC9K-A4-Prx 为研究对象, 优化其表达培养条件以提高该菌株对于目的蛋白 A4-Prx 的表达量。本论文首先研究了培养基成分与诱导条件对表达量的影响, 结果表明培养基的 pH、甘氨酸浓度和诱导温度对外源蛋白的产量均有显著影响。采用 Box-Behnken 设计, 利用 Design Expert 软件进行二次回归分析得到了目的蛋白的最优表达条件为: 诱导培养基 pH 7.0、甘氨酸浓度为 0.11% 及诱导温度 30 °C。在此优化条件下重组蛋白的理论表达量达 129.87 mg/L, 约为未优化下的 2 倍, 实验验证实际表达量达 128.94 mg/L, 且重组表达的过氧化物酶 A4-Prx 对酒糟蛋白饲料 (DDGS) 和食品中的玉米赤霉烯酮毒素 (Zearalenone, ZEA) 具有高效降解能力。本研究为过氧化物酶的工业化高密度发酵奠定了基础, 推动生物降解 ZEA 研究的进展。

关键词: 过氧化物酶; 毕赤酵母; 玉米赤霉烯酮; 响应面分析; 生物降解

文章编号: 1673-9078(2014)5-209-217

Fermentation Optimization of a Novel Recombinant Peroxiredoxin in *Pichia pastoris* for Zearalenone Detoxification

CHEN Yi¹, ZHU Zhen², WU Hui¹, ZHONG Feng¹, TANG Yu-qian¹, LAI Fu-rao¹

(1. School of Light Industry and Food Sciences, South China University of Technology, Guangzhou 510640, China)

(2. Guangzhou Vocational School of Light Industry, Guangzhou 510650, China)

Abstract: In order to maximize the expression of a novel peroxiredoxin purified from *Acinetobacter sp.* SM04 in recombinant *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-A4-Prx, a single-factor test coupled with response surface methodology (RSM) was used to adjust the induction condition. The results showed that pH value, temperature and glycine concentration were significant influencing factors for A4-Prx expression, and the optimized induction conditions were as follows: pH 7, 0.11% glycine at 30 °C, and the theoretic yield of A4-Prx could reach to 129.873 mg/L. Then further experiments under the optimized induction conditions illustrated that the concentration of the novel peroxiredoxin synthesized by *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-A4-Prx was 128.941 mg/L and had a significantly ZEA-degrading effect on DDGS and some food materials. This study laid the foundation for the high-density industrial fermentation of peroxiredoxin as well as the development of ZEA degradation.

Key words: peroxiredoxin; *Pichia pastoris*; zearalenone; response surface methodology

玉米赤霉烯酮 (Zearalenone, ZEA) 是一类具有二羟基苯甲酸内酯结构、非甾体雌激素类活性的霉菌毒素 (图 1), 人和动物长期摄入 ZEA 污染的食物可引发雌激素过多综合症^[1]。ZEA 的污染每年对世界各地的种植业与畜牧业带来了重大的经济损失, 也对

收稿日期: 2014-01-17

基金项目: 国家自然科学基金 (31201330); 广州市科技攻关项目 (201300000202); 中央高校基本科研业务费项目 (2013ZZ0077; 2013ZM0065); 粮食公益性行业科研专项 (201313005)

作者简介: 陈艺 (1989-), 女, 在读硕士生, 研究方向: 食品质量与安全, 食品微生物

通讯作者: 唐语谦 (1979-), 女, 博士, 讲师, 研究方向: 食品质量与安全, 分子生物学, 工业微生物

人类健康带来了严重的隐患。因此, 研究和开发可以有效降解乃至消除 ZEA 毒性的方法至关重要。筛选 ZEA 降解微生物, 通过基因工程技术手段, 获取对应的降解酶基因并在大肠杆菌、酵母内高效表达, 用于谷物和饲料中的 ZEA 毒素降解已成为一大研究热点。目前, 除了刘海燕等人构建了粉红黏帚霉 ZEA 降解酶基因 *zthy-6* 的毕赤酵母表达载体^[2]、谭强来等人构建了粉红螺旋聚孢霉 ZEA 降解酶基因 *zhd101* 类似基因 *ZEN-jjm* 毕赤酵母表达载体^[3]外, 鲜有关于 ZEA 降解的毕赤酵母工程菌及其优化表达的国内外报道。

酵母是一类简单的单细胞真核生物, 具有生长繁殖率高、培养成本低等生物学特性。毕赤酵母是一类能以甲醇作为唯一碳源的微生物。毕赤酵母 *Pichia*

pastoris 表达系统是 20 世纪 80 年代发展起来的一种高效的外源蛋白表达系统^[4], 是目前运用最为广泛的基因工程酵母表达系统。毕赤酵母表达系统既具有原核表达系统的易培养、繁殖快、表达量高等优点, 又具有真核表达系统的外源蛋白翻译后再加工修饰等特点。与酿酒酵母表达系统相比, 毕赤酵母表达系统质粒遗传稳定, 表达效率高, 可在胞内合成过氧化酶的微体, 稳定表达量, 适合高密度发酵^[5]。因此, 截止至 2006 年, 超过 500 种、来源于细菌、真菌、病毒、植物、动物以及人类的外源蛋白在毕赤酵母中获得成功表达。例如细菌性的蛋白有大肠杆菌的肌醇六磷酸酶^[6]、热带念珠菌 *Candida tropicalis* squalene synthase 的鲨烯合酶^[7]等; 真菌性的蛋白有南极假丝酵母 *Candida antarctica* 脂肪酶 A^[8]、克鲁维酵母 *Pichia guilliermondii* 外切菊粉酶^[9]等; 病毒性的蛋白有风疹病毒 E1-374 糖蛋白^[10]、噬菌体 T7 RNA 聚合酶^[11]等; 植物性的蛋白有草菇碱性乙酰酯酶^[12]、马铃薯三磷酸腺苷酶^[13]等; 动物性蛋白有抗菌肽 Ch-penaeidin^[14]、猪乳铁蛋白 (PLF)^[15]、人碱性成纤维细胞生长因子^[16]等。

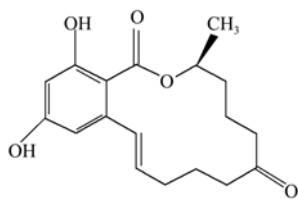


图 1 ZEA 分子结构

Fig.1 The chemical structure of ZEA

Yu 等人从土壤中分离出了一株可将 ZEA 完全降解成极低雌激素活性代谢物的不动杆菌 *Acinetobacter sp.* SM04, 并从该菌株中分离纯化出 ZEA 降解酶—过氧化物酶及其编码基因 A4-Prx^[17], 成功构建了毕赤酵母 GS115/pPIC9K-A4-Prx 表达系统。与此同时, 国内外研究发现重组毕赤酵母发酵液中水解蛋白酶的活性对目的蛋白表达量有显著的影响, 控制培养基中氮源、pH、温度水平均能抑制蛋白酶的活性而保护目的蛋白不被降解^[18]。因此, 为进一步提高毕赤酵母工程菌株 GS115/pPIC9K-A4-Prx 的外源蛋白表达量, 本实验研究了诱导培养基添加的氨基酸种类和浓度、培养基 pH、甲醇浓度及温度这 4 大因素对毕赤酵母工程菌株 GS115/pPIC9K-A4-Prx 表达量的影响。选取最显著的影响因素, 应用响应面法 (Response Surface Methodology, RSM) 研究和评价关键影响因素及其交互作用, 同时通过建立数学模型对最佳表达条件进行预测, 以确定毕赤酵母工程菌株 GS115/pPIC9K-

A4-Prx 的最优表达条件, 为其工业化高密度发酵奠定基础, 推动生物降解 ZEA 研究的进展。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试剂

ZEA 购于美国 sigma 公司, 溶解于色谱纯甲醇中 (1 mg/mL) 作为标准储备液; 色谱纯甲醇和乙腈购自天津启轮化学科技有限公司; Leu、Ile、Thr、Glu、Val、Lys、Phe、Ala、Gly、Asp、酵母粉、无氨基氮基(YNB)、K₂HPO₄、葡萄糖、KH₂PO₄、CH₃OH、HCl、CH₃CH₂OH、生物素和甘油均购自广州健阳生物科技有限公司; Folin-酚试剂购于广州齐云公司; 其他化学试剂为国产分析纯。

1.1.2 菌株与培养基

携带来源于 *Acinetobacter sp.* SM04 降解 ZEA 的过氧化物酶 A4-Prx 的基因片段的重组毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-A4-Prx 由本实验室保存。

YPD 培养基成分: 2%蛋白胨, 1%酵母粉, 2%葡萄糖。固体培养基添加 1.5%琼脂。

BMMY 培养基成分: 1%酵母提取物, 2%蛋白胨, 100 mmol/L 磷酸钾 (pH 6.0), 1.34%无氨基酵母氮源 (YNB), 4×10⁻⁵%生物素, 0.5%甲醇。

1.1.3 缓冲液

10×无氨基酵母氮源 (YNB): 取 13.4 g 的无氨基酵母氮源于 50 mL 蒸馏水中, 定容至 100 mL。

10×甘油: 20 mL 甘油, 用无菌蒸馏水定容至 100 mL。

1 mol/L pH 6.0 磷酸钾缓冲液: 称取 15.06 g K₂HPO₄、59.06 g KH₂PO₄, 分别溶解于 66 mL 和 434 mL 的蒸馏水中。待溶解完全, 将 K₂HPO₄ 溶液缓慢加到 KH₂PO₄ 溶液中, 调节 pH 至 6.0。

500×生物素: 称取 20 mg 生物素溶解于 100 mL 超纯水中, 装入棕色瓶中避光保存。

1% (m/V) 甘氨酸: 称取甘氨酸 0.5 g 于蒸馏水中, 定容至 50 mL, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌。

1.1.4 仪器设备

Waters 高效液相色谱配置荧光和紫外检测器; 恒温气浴和水浴摇床购自江苏苏昆仪器有限公司; 721 型紫外-可见分光光度计购自上海棱光科技有限公司; ESCO 微生物操作柜购自浩瀚有限公司; Milli-Q 纯水机购自 Millipore; SPX-250B 立式培养箱、YXQ-LS-18S1 高压蒸汽灭菌锅、THZ-92C 气浴恒温

振荡器购自上海博讯实业有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-A4-Prx 的活化

取甘油保存的毕赤酵母工程菌株 GS115/pPIC9K-A4-Prx 在 YPD 平板上划线, 28 °C 培养 48 h, 挑取单菌落在 YPD 平板上再次划线, 28 °C 培养 24 h。

1.2.2 目的蛋白 A4-Prx 在毕赤酵母中的诱导表达

取 YPD 平板上第二次划线培养的单菌落转接至 25 mL 的 BMMY 液体培养基中, 28 °C 振荡(200 r/min) 培养 18 h 至 OD₆₀₀ 值为 2~6, 将液体培养物 5000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 加入 BMMY 液体培养基悬浮菌体至 OD₆₀₀ 值为 1.0, 每 24 h 加入 0.5% 甲醇, 连续诱导培养(200 r/min, 28 °C, 72 h) 后, 12000 r/min 离心 5 min, 收集上清液。

1.2.3 目的蛋白 A4-Prx 的原始表达量及 ZEA 降解活性检测

目的蛋白的浓度采用 Folin-酚试剂法(Lowry 法) 测定^[19]。

ZEA 降解活性采用 HPLC 外标法测定^[17]。

1.2.4 影响重组蛋白 A4-Prx 表达的单因素实验

氨基酸的添加: 在诱导培养基 BMMY 中分别加入 Leu、Ile、Thr、Glu、Val、Lys、Phe、Ala、Gly、Asp 十种氨基酸, 使其终浓度均为 0.1% (m/V)。28 °C、200 r/min 条件下诱导培养 72 h。选取对重组蛋白表达影响最为显著的两个氨基酸因素, 分别添加到诱导培养基 BMMY 中, 并使其终浓度分别为 0.05% (m/V)、0.1% (m/V)、0.15% (m/V), 在 28 °C、200 r/min 条件下连续诱导培养 72 h。

甲醇浓度: 以诱导培养基 BMMY 为基础条件, 将 BMMY 中甲醇浓度分别设为 0.25%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%, 在 28 °C、200 r/min 条件下连续诱导培养 72 h。

pH: 以诱导培养基 BMMY 为基础条件, 将诱导液体培养的初始 pH 分别调成 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0, 在 28 °C、200 r/min 条件下连续诱导培养 72 h。

温度: 以诱导培养基 BMMY 为基础, 设定诱导温度为 15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C, 连续诱导培养(200 r/min, 72 h)。

以上单因素实验均以诱导培养基 BMMY 为空白对照。收获上清液后, 运用 Lowry 法测定蛋白含量。

实验重复 3 次取平均值。

1.2.5 响应面分析法

采用 Box-Behnken 实验方法, 选取对重组蛋白合成影响最大的 3 个因素(pH、甘氨酸浓度、温度) 为自变量, 以重组过氧化物酶的含量为响应值, 进行 RSM 分析验证。实验因素及响应值均在 Design-Expert 8.0 软件中进行处理, 实验结果经软件的多元回归拟合, 得出回归方程, 探讨其拟合程度, 并对各个因素及因素之间的实验显著性进行判断, 同时预测重组蛋白的理论表达量。最后根据回归方程, 利用软件 Design-Expert 8.0 对三个影响因子间的响应面 3D 图及等高线图进行分析, 确定最佳诱导培养条件。

1.2.6 最佳诱导培养条件的验证

为检验所建立的模型的可靠性, 采用上述所得的最佳培养诱导条件进行毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-A4-Prx 的诱导表达。实验进行 3 次, 取平均值, 比较重组蛋白在优化与未优化条件下的表达量差异。

1.2.7 在 DDGS 及食品中降解 ZEA 的应用

2011 年我国卫生部规定了食品中的 ZEA 含量不能超过 60 µg/kg, 饲料中 ZEA 的允许量要低于 500 µg/kg。为了测定日常食品 ZEA 污染情况和验证重组过氧化物酶 A4-Prx 的降解实践作用, 以 DDGS 和几种常见食品为测试对象, 分别将各样品粉碎、过筛, 取 100 g 粉碎样品于 400 mL 乙腈/水(84/16, V/V) 中, 常温振荡 1 h(250 r/min) 后静止放置, 经定性滤纸过滤, 滤液经 PriboFast® M260 柱纯化、浓缩吹干后, 用乙腈/水/甲醇(46/46/8, V/V) 溶解后用于 HPLC 分析检测。HPLC 检测方法与样品 ZEA 降解实验方法见 1.2.3。

1.2.8 统计方法

采用 Excel 和 Design-Expert 8.0 处理软件进行数据分析。

2 结果与讨论

2.1 重组蛋白 A4-Prx 的原始表达量及其 ZEA 降解活性检测

通过 Lowry 法测定的重组蛋白的原始表达量为 75.97 mg/L,

运用 HPLC 方法测定了重组过氧化物酶 A4-Prx 的 ZEA 降解能力。结果如图 2 所示, 与对照组相比(图 2-A), 反应 12 h 时 ZEA 含量显著降低, 此时重组过氧化物酶 A4-Prx 的 ZEA 降解率可达 48%。此外, 图

2-A 说明 ZEA 标准品在本实验条件下的保留时间为 5.1 min, 图 2-B 中的 ZEA 保留时间提前, 该误差由培养液中的营养成分所致。

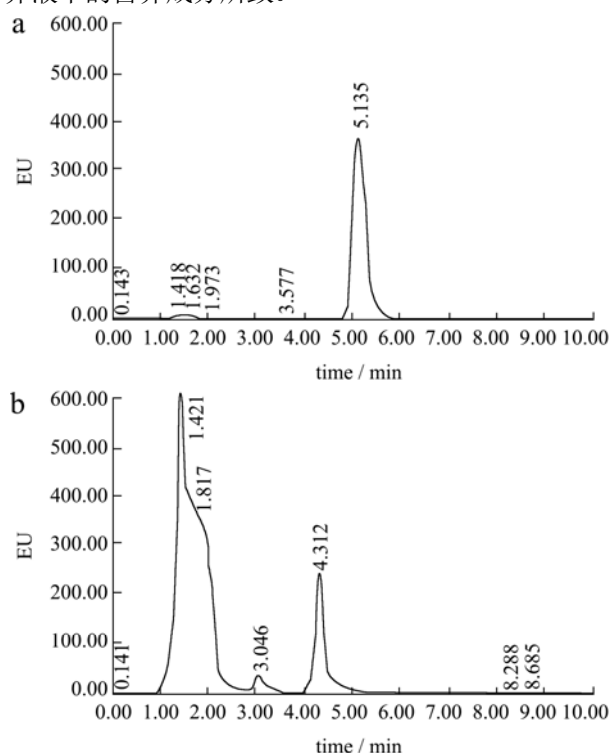


图 2 HPLC 重组蛋白 A4-Prx 的 ZEA 降解效果

Fig.2 ZEA degradation by recombinant A4-Prx

注: a: ZEA 标准品(10 µg/mL); b: 重组蛋白 A4-Prx 降解 ZEA (反应时间 12 h)。

2.2 影响重组蛋白 A4-Prx 表达的单因素实验

2.2.1 氨基酸添加

A4-Prx 蛋白质氨基酸序列如下:

MSLINTEVKPFQATAYHNGQFVEVNETNLKG
KWSVVFYFPADFTFVCPTELGLADNYAEFQKLG
VEIYAVSTDTHFTHKAWHDTSEEIKKIQYPLVGDP
TWTLSKNFDVLIIESEGLADRGTFVIDPEGKIQIVELN
AGGIGRDASELLRKKVAAQYVHAHPGEVCPAKW
KEGEATLAPSIDLVGKI

根据上述氨基酸序列, 选择含量超过 50% 以上的氨基酸, 分别为 Leu、Ile、Thr、Glu、Val、Lys、Phe、Ala、Gly、Asp, 将这十种氨基酸分别添加至诱导培养基 BMMY 中进行目的蛋白的诱导表达。结果如图 3 所示, 不同氨基酸的添加均能增加重组蛋白的表达量, 其中 Gly、Ala 和 Lys 的影响效果最为明显, 分别提高了 46.27%、29.79% 和 35.20%。接着将 Gly、Ala 和 Lys 这三种氨基酸分别添加到诱导培养基 BMMY 中, 并使其终浓度分别为 0.05% (m/V)、0.1% (m/V)、0.15% (m/V), 诱导培养后发现 (图 4), 对于不同浓度的氨

基酸而言, 当 Gly、Ala 和 Lys 的浓度为 0.1% 时, 重组蛋白 A4-Prx 的含量均达到最大值, 此浓度下氨基酸对毕赤酵母工程菌株表达外源蛋白的影响最为显著。对于不同种类的氨基酸而言, 当浓度均为 0.1% 时, 添加 Gly 的培养基中重组蛋白的含量最高, 为 114.23 mg/L。因此, 甘氨酸 Gly 对重组蛋白 A4-Prx 的表达量具有显著的促进作用, 是影响重组过氧化物酶 A4-Prx 表达的关键因素之一。

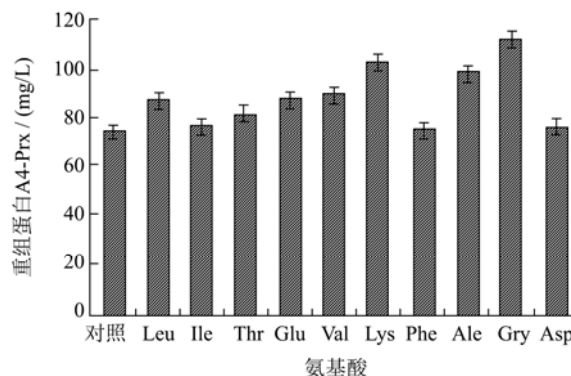


图 3 氨基酸的添加对重组蛋白 A4-Prx 表达量的影响

Fig.3 Effect of amino acid on recombinant A4-Prx expression

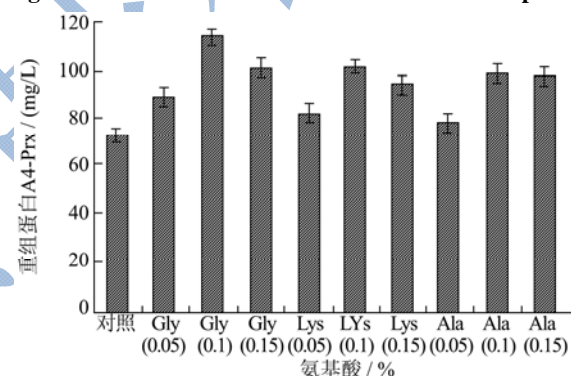


图 4 不同浓度的 Gly、Lys 和 Ala 对重组蛋白 A4-Prx 表达量的影响

Fig.4 Effects of different concentrations of Gly, Lys and Ala on recombinant A4-Prx expression

培养基中的氮源除了能提供酵母所需的营养外, 还对毕赤酵母的外源蛋白表达具有显著的影响。KAORU 等人研究发现, 发酵培养基中的初始氨基酸含量的增加, 抑制了蛋白酶的合成, 大幅度提高了重组人血清蛋白的产量^[20]。Chuahan 等人通过在培养基中添加酪蛋白水解物和丙氨酸, 使乙肝病毒表面抗原蛋白表达产量增加为未添加前的 2 倍^[21]。可见, 培养基中氮源含量的增大, 在一定程度上有促进目的蛋白诱导表达的作用。本实验在 BMMY 基础培养基中添加了 0.1% 甘氨酸来诱导培养, 与对照组相比, 重组蛋白 A4-Prx 的含量为原始的 1.5 倍, 原因主要为: 一是在培养基中加入小分子氨基酸, 保证了诱导培养各阶段有充足的氮源, 从而稳定毕赤酵母菌体正常的新陈

代谢, 保证外源蛋白的正常表达, 减少水解蛋白酶的合成, 提高目的蛋白的产量。二是培养基中加入的甘氨酸可作为水解蛋白酶的酶解底物, 从而大大减少目的蛋白被蛋白酶水解的几率, 使重组蛋白获得高产量表达。

2.2.2 甲醇浓度

毕赤酵母工程菌株 GS115/pPIC9K-A4-Prx 需要甲醇作为诱导剂。以诱导培养基 BMMY 为基础条件, 将 BMMY 中甲醇浓度分别设为 0.25%、0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%, 在 28 °C、200 r/min 条件下诱导培养 72 h 后测定目的蛋白表达量。结果(图 5)表明, 甲醇的变化会影响重组蛋白 A4-Prx 的产量。当甲醇浓度为 0.25% 时, 重组蛋白 A4-Prx 的表达量仅为 24.61 mg/L。甲醇浓度增加至 0.5% 和 1% 时, 目的蛋白的表达量也随之上升并达到最大值, 均为 76.71 mg/L。随着甲醇添加量的继续增大, 重组蛋白的含量略有下降但趋于稳定, 说明外源蛋白 A4-Prx 的最佳甲醇诱导条件为 0.5% 或 1%。

本实验所采用的巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 属于甲醇营养型酵母表达菌株, 甲醇作为异源蛋白表达诱导物, 甲醇浓度增加有利于目的蛋白的产量。但当甲醇浓度升高至 0.5% 乃至 1.0% 时, 重组蛋白 A4-Prx 的增加量并不显著, 而氨基酸含量的增加显著地增加了重组蛋白的表达, 说明本实验室构建的毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-A4-Prx 对营养物质的依赖性远强于对诱导物甲醇浓度的依赖性。且当甲醇浓度继续增加时, 过高的甲醇浓度会抑制毕赤酵母菌体的生长, 从而降低外源蛋白 A4-Prx 的表达量。因此, 甲醇浓度并不是毕赤酵母工程菌株 GS115/pPIC9K-A4-Prx 外源蛋白表达的显著影响因素。

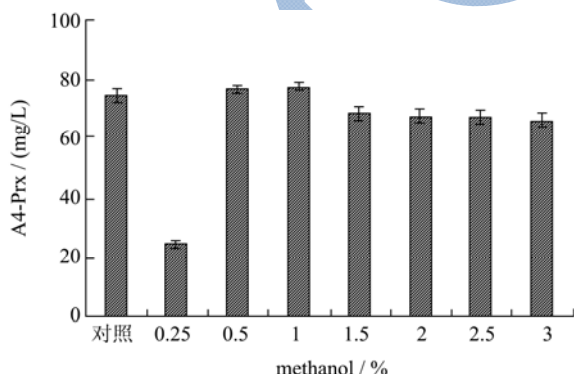


图5 甲醇浓度对重组蛋白 A4-Prx 表达量的影响

Fig.5 Effect of methyl alcohol on recombinant A4-Prx expression

2.2.3 pH

为了研究毕赤酵母表达外源蛋白 A4-Prx 的最佳 pH 条件, 以诱导培养基 BMMY 为基础, 将 BMMY

培养基初始 pH 分别调至 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0, 以初始培养基 BMMY 为对照, 诱导培养后 (200 r/min, 28 °C, 72 h), 测定重组蛋白 A4-Prx 的表达量。结果如图 6 所示, 在酸性条件下, 重组蛋白 A4-Prx 的表达量较低。随着 pH 的升高, 蛋白表达量也随之增加。当 pH 为 7 时表达量达到最高为 151.54 mg/L, 比对照组提高了 44.70%。当 pH 进一步增大时, 目的蛋白的表达量逐渐下降, pH 9 时的表达量与对照组相比降低了 24.75%。因此, pH 的变化极大地影响了重组蛋白的产量。毕赤酵母 GS115/pPIC9K-A4-Prx 表达目的蛋白 A4-Prx 的最佳 pH 条件为 7.0。

KAORU 等人发现将 pH 控制在较低的水平下(低于 6)可有效地降低实验培养液中蛋白酶的水解活性, 防止目的蛋白被水解^[20]。Alimjan 等人报道称当诱导培养基的 pH 为 5.5 至 8.0 时, 蛋白酶受 pH 的抑制, 活性降至最低, 此时外源蛋白的表达量最高^[22]。可见, 通过调节 pH 可抑制目的蛋白被水解, 从而提其表达量。本实验的重组过氧化物酶在 pH 为 7.0 时, 表达量增加了 44.7%, 达到最大值。原因可能为在此 pH 条件下, 毕赤酵母合成目的蛋白的速率要远大于目的蛋白被蛋白酶水解的速率, 且合成的重组过氧化物酶的结构较为稳定, 最终导致培养液中重组蛋白含量的增加。

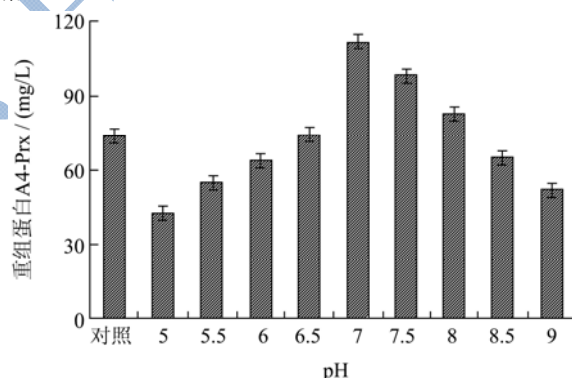


图6 pH 对重组蛋白 A4-Prx 表达量的影响

Fig.6 Effect of pH on recombinant A4-Prx expression

2.2.4 温度

以诱导培养基 BMMY 为基础, 将诱导温度分别设为 15 °C、20 °C、25 °C、30 °C、35 °C、40 °C, 200 r/min 诱导培养 72 h 后, 测定重组蛋白 A4-Prx 的表达量。结果如图 7 所示, 与对照组相比, 当温度只有 15 °C 时, A4-Prx 的表达量极低。随着温度的升高, 蛋白表达量快速增加。当温度为 30 °C, 重组毕赤酵母的 A4-Prx 的表达能力达到最大为 94.73 mg/L。随着温度继续升高, A4-Prx 的表达量开始快速下降, 40 °C 时重组蛋白几乎没有被表达。

温度会影响毕赤酵母的外源蛋白表达能力。Shi

等人将诱导培养基置于 15 °C 和 30 °C 时, 目的抗体的合成量增加^[23]。Li 等人发现, 将培养温度适当降低, 可使重组鲑鱼抗冻蛋白的表达量从 5.3 mg/L 上升至 18.0 mg/L^[24]。说明相对的低温 (如本实验的 25 °C~35 °C) 可以有效提高目的蛋白的产量及活性, 而相对的高温 (如本实验中 40 °C) 会影响重组蛋白的稳定性, 且加速菌体衰老死亡而释放出更多的蛋白酶, 导致表达重组蛋白的降解。因此, 当诱导温度为 40 °C 时, 目的蛋白 A4-Prx 几乎未被合成。

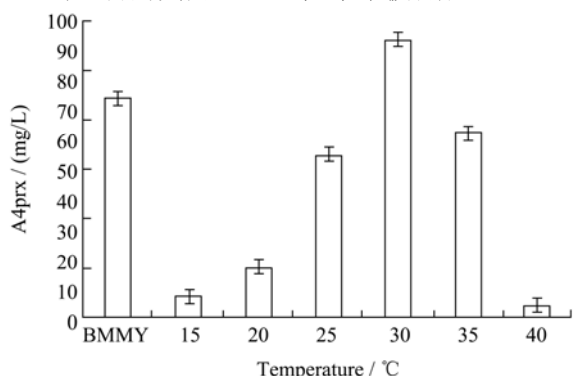


图 7 温度对重组蛋白 A4-Prx 表达量的影响

Fig.7 Effect of temperature on recombinant A4-Prx expression

2.3 响应面法优化表达重组蛋白 A4-Prx

根据以上单因素实验结果, pH、甘氨酸 Gly 浓度与温度均能显著影响目的蛋白 A4-Prx 的表达量。因此采用 Box-Behnke 实验方法, 选择诱导温度、甘氨酸浓度和 pH 值这三个影响因子为自变量, 重组蛋白 A4-Prx 表达量为响应值。根据中心组合设计原理, 设计 3 因素 3 水平的响应面分析实验。实验因子与水平的设计如表 1 所示。分别以 X_1 、 X_2 和 X_3 为自变量, 每一个自变量的低、中、高实验水平分别以 -1、0、1 进行编码, 以三次实验所得的 A4-Prx 表达量为响应值, 进行了 15 组实验, 结果见表 2。

表 1 Box-Behnken 试验因素水平

Table 1 Variables and levels for Box-Behnken

因素	水平		
	-1	0	1
A (pH)	6	7	8
B (Gly/%)	0.05	0.1	0.15
C (温度/°C)	25	30	35

根据 Design Expert 8.0 软件, 对表 2 中的结果进行二次多项回归拟合, 得到的回归方程是: $Y=129.87+1.95X_1+1.89X_2+6.97X_3+0.40X_1X_2-1.73X_1X_3-2.44X_2X_3-19.34X_1^2-14.56X_2^2-27.36X_3^2$ 。该回归方程中的各个变量均影响响应值 Y 的大小, 通过 F 检验确定其影响显著性的高低。概率 P 值越小, 则其对应的变量对响应

值的影响越高。根据方差检验结果 (表 3), 方程模型的 F 值为 97.15, P 值大于 F 值的机率 < 0.0001, 回归方程显著。其中, 一次项 X_3 和二次项 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 对响应值具有极其显著的影响 (P < 0.001)。模型回归显著 (P < 0.01), 而失拟项不显著 (0.95 > 0.05), 说明数据中无异常点。

表 2 Box-Behnken 试验设计及试验结果

Table 2 Design and results of Box-Behnken experiments

实验组别	X_1 (pH)	X_2 (Gly)	X_3 (温度)	蛋白 / (mg/L)
1	-1	-1	0	93.41
2	1	-1	0	94.78
3	-1	1	0	96.36
4	1	1	0	99.31
5	-1	0	-1	70.53
6	1	0	-1	79.62
7	-1	0	1	90.18
8	1	0	1	92.34
9	0	-1	-1	77.76
10	0	1	-1	86.46
11	0	-1	1	94.32
12	0	1	1	93.25
13	0	0	0	127.67
14	0	0	0	132.41
15	0	0	0	129.54

注: $X_1=(A-7)/1$, $X_2=(B-0.1)/0.05$, $X_3=(C-30)/10$ 。

表 3 响应面方差分析结果

Table 3 Results of ANOVA analysis

方差来源	平方和	自由度	均方	F 值	P 值
X_1	30.30	1	30.30	5.49	0.0661
X_2	28.54	1	28.54	5.17	0.0720
X_3	388.09	1	388.09	70.37	0.0004
X_1X_2	0.62	1	0.62	0.11	0.7502
X_1X_3	12.01	1	12.01	2.18	0.2001
X_2X_3	23.86	1	23.86	4.33	0.0921
X_1^2	1381.65	1	1381.65	250.51	<0.0001
X_2^2	783.19	1	783.19	142.00	<0.0001
X_3^2	2764.29	1	2764.29	501.20	<0.0001
模型	4822.25	9	535.81	97.15	<0.0001
残差	27.58	5	5.52		
失拟项	16.18	3	5.39	0.95	0.5507
纯误差	11.40	2	5.70		
总和	4849.82	14			

注: p < 0.01 表示差异极显著, p < 0.05 表示差异显著。

由表 4 可知, 模型的 R^2 为 0.9943, 表示回归方程

的拟合程度好, 响应值的变化有 99.43%来源于所选三个变量, 即 pH、Gly 浓度和温度。此结果说明模型方程可用于确定毕赤酵母工程菌株 GS115/pPIC9K-

A4-Prx 外源蛋白的最佳发酵条件和表达量实验的理论预测。

表 4 模型可信度分析

Table 4 Model reliability analysis

标准偏差	平均值	变异系数	拟合度	校正拟合度	预测拟合度	信噪比
2.35	97.2	2.42	0.9943	0.9841	0.9413	29.908

2.4 影响因子的交互作用

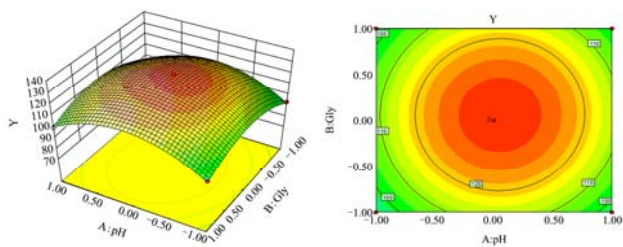


图 8 pH 和 Gly 交互影响 A4-Prx 表达量的响应面及等高线图
Fig.8 Response surface and Contour plot of the effects of pH and Gly concentration on recombinant A4-Prx expression

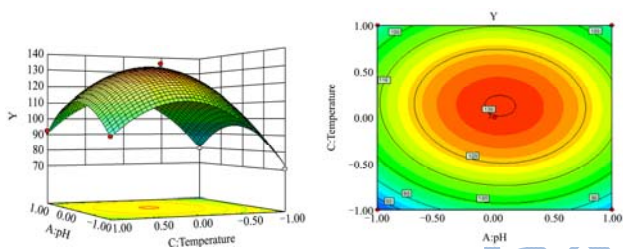


图 9 pH 和温度交互影响 A4-Prx 表达量的响应面及等高线图
Fig.9 Response surface and Contour plot of the effects of pH and temperature on recombinant A4-Prx expression

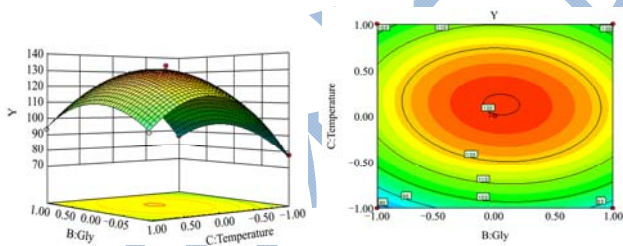


图 10 Gly 和温度交互影响 A4-Prx 表达量的响应面及等高线图
Fig.10 Response surface and Contour plot of the effects of Gly concentration and temperature on recombinant A4-Prx expression

根据回归方程, 利用 Design Expert 8.0 软件作出不同影响因子的响应面分析图与等高线图。pH、甘氨酸 Gly 浓度和温度三个因子及其交互作用对重组蛋白 A4-Prx 表达量的影响结果可由图 8~10 直观地反映出来。pH、Gly 浓度和温度的交互作用对重组蛋白 A4-Prx 的表达具有极为显著的影响。分析曲线面的陡峭程度发现, 温度(X₃)的曲线面最为陡峭, 说明温度对目的蛋白的影响最为显著。pH(X₁)与 Gly(X₂)次之, 两者曲

线较为平坦。图 8~10 中的图形皆为山丘曲面, 因此该回归拟合方程在这 3 个因素的作用下, 有极大值的存在。即通过对回归方程的求解与响应面等高线图的分析, A4-Prx 表达量达到最大时所需要的参数条件是: 诱导培养基 pH 值为 7.08, 培养基中甘氨酸浓度为 0.11%, 诱导温度为 30.09 °C。预测重组蛋白 A4-Prx 的最大理论产量是 129.87 mg/L。

2.5 最佳诱导培养条件的验证

为了检验响应面法所建立的数学模型的可靠性, 采用上述最优表达条件进行重组蛋白 A4-Prx 的表达实验, 同时考虑到实验操作的便利性, 将毕赤酵母表达的最优条件修正为诱导培养基 pH 值为 7.0, 培养基中甘氨酸浓度为 0.11%, 诱导温度为 30 °C。实验重复 3 次。结果如表 5 所示, 实际测得的重组蛋白 A4-Prx 的平均表达量为 128.94 mg/L, 为未诱导条件下重组蛋白表达量 (75.97 mg/L) 的 1.7 倍。优化重组蛋白表达结果的相对标准偏差为 0.01%, 说明结果准确性好, 可靠性高, 证明了采用响应面方法优化得到的表达条件可信度高, 具有实用价值。

表 5 优化前后重组蛋白 A4-Prx 的表达量

Table 5 Recombinant A4-Prx expression under original and optimal conditions

培养条件	蛋白含量/(mg/L)
BMMY 培养	75.97±0.02
优化培养	128.94±0.01

2.6 在 DDGS 及食品中降解 ZEA 的应用

表 6 样品中 ZEA 含量与 ZEA 降解率

Table 6 ZEA concentration and ZEA degradation in foods and DDGS

样品	ZEA含量/(µg/kg)	ZEA 降解率/%
玉米粉	21.33±0.05	71.49±1.17
燕麦片	32.31±0.15	72.04±2.12
山西陈醋	72.15±1.21	79.58±1.95
黄豆酱油	54.31±0.12	79.62±0.08
白酒	6.01±1.54	70.31±0.68
DDGS	403.55±1.76	83.45±1.87

以从广州超市购买的多种食品样品及某饲料厂购买的 DDGS 为原料,测定样品中 ZEA 的含量,结果见表 6。各个样品均有不同程度的 ZEA 污染,其中 ZEA 在 DDGS 中的含量极高,在陈醋与酱油中的含量也较为显著。

将经优化表达的重组过氧化物酶 A4-Prx 对上述样品分别进行降解实验。结果显示,各样品中的 ZEA 残留量均有显著的降低,说明重组过氧化物酶 A4-Prx 对这 6 种样品中的 ZEA 均有良好的降解效果。6 种样品的 ZEA 平均降解率大于 70%,这为进一步探讨 A4-Prx 在食品领域的实践应用奠定了基础。

3 结论

3.1 国内外学者研究发现,外源蛋白在毕赤酵母中的表达受到培养条件的显著影响^[25]。在毕赤酵母表达优化领域,现有的研究多使用响应面法(RSM)法对诱导表达条件进行优化,以期提高目的蛋白的产量。严慧玲等人运用响应面法得到了南极假丝酵母脂肪酶 A 的最佳发酵条件,将酶活提高了 25.59%^[26]。Bin 等人以甲醇、酪蛋白水解物和 pH 为三因素进行 RSM 分析,将草菇重组碱性乙酰酯酶产量提高了 2.4 倍^[9]。Jiang 等人通过 Plackett-Burman 设计法和 RSM 分析法优化了毕赤酵母表达重组人碱性成纤维细胞生长因子的能力,结果表明重组生长因子的产量为未优化前的 2 倍^[27]。本实验以不动杆菌 *Acinetobacter sp.* SM04 的过氧化物酶基因 A4-Prx 的毕赤酵母 *Pichia pastoris* GS115 表达系统为基础,研究了氨基酸添加、甲醇浓度、pH、温度对目的蛋白 A4-Prx 产量的影响。结果表明 pH、甘氨酸浓度和诱导温度对毕赤酵母 GS115/pPIC9K-A4-Prx 的表达量具有十分显著的影响。在此基础上,我们采用了响应面分析法分析了 pH、甘氨酸浓度、诱导温度的影响及其交互作用,建立了数学模型预测了表达的最佳条件,为诱导培养基中 pH 值为 7.0,甘氨酸浓度为 0.11%,诱导温度为 30℃。采用此优化条件诱导培养所得的重组蛋白 A4-Prx 平均表达量为 128.94 mg/L,约为未优化表达量的 1.5 倍,且优化表达所得的重组过氧化物酶对 DDGS 和 6 种食品样品中的 ZEA 具有高效的降解能力。由此说明,由响应面法优化所得的诱导表达条件对重组蛋白的表达与实际应用具有积极的指导、促进作用。

3.2 目前,ZEA 生物降解的研究绝大多数停留在 ZEA 降解微生物的分离与纯化方面,而对这些微生物产生的与 ZEA 降解相关的关键酶类的研究很少。本实验以 *Acinetobacter sp.* SM04 的过氧化物酶的毕赤酵母工程表达菌株为基础,运用响应面法显著地提高了目的蛋

白 A4-Prx 的产量,为今后进一步研究过氧化物酶的实践应用、作用机理、不动杆菌 *Acinetobacter sp.* SM04 对 ZEA 的降解途径提供了前提与基础。在下一步的实验中,将研究重组过氧化物酶 A4-Prx 在不同反应条件下的 ZEA 降解能力,为增强本实验构建的 *Pichia pastoris* GS115/pPIC9K-A4-Prx 表达系统合成的重组过氧化物酶 A4-Prx 的降解能力提供基础数据。

参考文献

- [1] Zinedinea A, Soriano J M, Molto J C, et al. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2007, 45: 1-18
- [2] 刘海燕,孙长坡,伍松陵,等.玉米赤霉烯酮毒素降解酶基因的克隆及在毕赤酵母中的高效表达[J].*中国粮油学报*,2011,26(5):12-16
LIU Hai-yan, SUN Chang-po, WU Song-ling, et al. Cloning, expression of a ZEA-degrading gene in *Pichia pastoris* [J]. *Journal of the Chinese Cereals and Oils Association*, 2011, 26(5): 12-16
- [3] 谭强来,徐锋,黎鹏,等.玉米赤霉烯酮降解酶基因(ZEN-jjm)的克隆、表达及活性分析[J].*农业生物技术学报*,2010,18(2):225-230
TAN Qiang-la, XU Feng, LI-Peng, et al. Construction of an ZEN-jjm expressing vector and its expression in *Pichia pastoris* [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2010, 18(2): 225-230
- [4] Leonardo M Damasceno, Chung-Jr Huang, Carl A Batt. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production [J]. *Applied Microbiol Biotechnol*, 2012, 93: 31-39
- [5] Geoff P Lin Cereghino, Joan Lin Cereghino, Christine Ilgen, et al. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris* [J]. *Protein Technologies and Commercial Enzymes*, 2002, 13(4): 329-332
- [6] Chang-Chih Chen, Pei-Hua Wu, Ching-Tsan Huang, et al. A *Pichia pastoris* fermentation strategy for enhancing the heterologous expression of an *Escherichia coli* phytase [J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, 35: 315-320
- [7] Pey Yee Lee, Voon Chen Yong, Rozita Rosli, et al. Cloning, expression and purification of squalene synthase from *Candida tropicalis* in *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression and Purification*, 2014, 94: 15-21

- [8] 徐同成,李霞,马晓航,等.南极假丝酵母(*Candida antarctica*) 脂肪酶 A 在毕赤酵母中的表达、纯化及性质[J].科技通报,2009,25(3): 255-259
XU Tong-cheng, LI Xia, MA Xiao-hang, et al. Expression of *Candida antarctica* Lipase A in *Pichia pastoris* and its purification and properties [J]. Bulletin of Science and Technology, 2009, 25(3): 255-259
- [9] Tong Zhang, Fang Gong, Zhe Chi, et al. Cloning and characterization of the inulinase gene from a marine yeast *Pichia guilliermondii* and its expression in *Pichia pastoris* [J]. Antonie van Leeuwenhoek, 2009, 95: 13-22
- [10] 李振梅,温红玲,林彬,等.风疹病毒 E1-374 糖蛋白生物活性检测及其初步应用[J].中华实验和临床病毒学杂志, 2013,27(4): 295-297
LI Zhen-mei, WEN Hong-ling, LIN Bin, et al. Expression and bioassay of rubella virus E1-374 glycoprotein in yeast cells [J]. Chinese J. Exp. Clin. Virol., 2013, 27(4): 295-297
- [11] Birgit Hobl, Björn Hock, Sandra Schneck, et al. Bacteriophage T7 RNA polymerase-based expression in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2013, 92: 100-104
- [12] Bin Tian, Yan Chen, Shaojun Ding. A combined approach for improving alkaline acetyl xylan esterase production in *Pichia pastoris*, and effects of glycosylation on enzyme secretion, activity and stability [J]. Protein Expression and Purification, 2012, 85: 44-50
- [13] Tetsuya Masuda, Shinobu Tamaki, Ryosuke Kaneko, et al. Cloning, expression, and characterisation of recombinant sweet-protein thaumatin II using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* [J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 85(7): 761-769
- [14] Lei Li, Jin-Xing Wang, Xiao-Fan, et al. Zhao High level expression, purification, and characterization of the shrimp antimicrobial peptide, Ch-penaeidin, in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2005, 39(2):144-151
- [15] Sue-Hong Wang, Tien-Shuh Yangb, Shiang-Ming, et al. Lin expression, characterization, and purification of recombinant porcine lactoferrin in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2002, 25(1): 41-49
- [16] Xu peng Mu, Ning Kong, Weili Chen, et al. High-level expression, purification, and characterization of recombinant human basic fibroblast growth factor in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2008, 59: 282-288
- [17] Yuanshan Yua, Hui Wu, Yuqian Tang. Cloning, expression of a peroxiredoxin gene from *Acinetobacter* sp. SM04 and characterization of its recombinant protein for zearalenone detoxification [J]. Microbiological Research, 2012, 167(3): 121-126
- [18] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system [J]. Yeast, 2005, 22: 249-270
- [19] 付玉梅,许锦珍,廖群,等.Lowry 法测定寡肽的研究[J].药物分析杂志,2011,31(4):739-741
FU Yu-mei, Xu Jin-zhen, Liao Qun, et al. Research of Lowry Determination of oligopeptides [J]. Chin J. Pharm. Anal., 2011, 31(4): 739-741
- [20] Kaoru Kobayashi, Shinobu Kuwae, Tomoshi Ohya, et al. High-Level Expression of Recombinant Human Serum Albumin from the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris* with Minimal Protease Production and Activation[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 89(1): 55-61
- [21] Chauhan A K, Arora D, Khanna N. A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed-batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris* [J]. Process Biochem., 1999, 34(2): 139-145
- [22] Alimjan Idiris, Hideki Tohda, Hiromichi Kumagai, et al. Engineering of protein secretion in yeast: strategies and impact on protein production [J]. Applied Microbiology and Biotechnology. 2010, 86(2): 403-417
- [23] Xian zong Shi, Tammy Karkut, Mahmood Chamankhah, et al. Conditions for the expression of a single-chain antibody (scFv) gene in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2003, 28(2): 321-330
- [24] Zhengjun Li, Fei Xiong, Qingsong Lin, et al. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *pichia pastoris* [J]. Protein Expression and Purification, 2001, 21(3): 438-445
- [25] Gabriel Potvin, Ayla Ahmad, Zisheng Zhang. Bioprocess engineering aspects of heterologous protein production in *Pichia pastoris*: a review [J]. Biochemical Engineering Journal, 2012, 64: 91-105
- [26] 严慧玲,蓝东明,王永华,等.响应面法优化CALA在毕赤酵母中的组成型表达[J].现代食品科技,2011, 27(8): 972-976
YAN Hui-ling, Lan Dong-ming, Wang Yong-hua, et al. Optimization of the fermentation conditions of candida antarctica lipase a in *pichia pastoris* using response surface methodology [J]. Modern Food Science and Technology, 2011,

27(8): 972-976

[26] Rui Jiang, Liwei Sun, Yu Zhao, et al. Optimization of culture parameters for expression of recombinant human basic fibroblast growth factor in *pichia pastoris* using

response surface methodology combining with plackett-burman design [J]. *Advanced Materials Research*, 2013, 647: 456-461

