

大肠杆菌植酸酶 *AppA* 在毕赤酵母中的高效表达

高娇, 郑学云, 林影, 梁书利

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东省发酵与酶工程重点实验室, 广东广州 510006)

摘要: 本研究全基因合成大肠杆菌 B48 来源的植酸酶 *AppA* 基因, 并将它克隆到 PHKA 载体上, 在毕赤酵母 GS115 中进行分泌表达。为了进一步提高毕赤酵母中植酸酶的表达量, 本研究结合信号肽、启动子、基因剂量和蛋白质折叠通量优化的方法, 最终将毕赤酵母中植酸酶的活力从 329.41 U/mL 提高到了 1892.51 U/mL, 是初始菌株的 5.75 倍。初步测定了植酸酶 *AppA* 的基本酶学性质, 其最适温度和 pH 分别为 60 °C 和 4.5; 在 60 °C 处理 60 min 后, 植酸酶活力剩余 40%, 温度稳定性较差; 在 pH 6.0~7.0 处理 6 h 后, 酶活力剩余 87%, 该酶在弱酸环境中较好的稳定性; 同时研究了二价金属离子对植酸酶活力的影响, Fe²⁺ 能够激活植酸酶 *AppA* 的活力, 而 Cu²⁺、Ni²⁺、Mn²⁺ 等离子通过与植酸形成络合物而抑制植酸酶 *AppA* 的活力。该酶在酸性条件下的强稳定性有利于将其应用于食品加工领域。

关键词: 毕赤酵母; 植酸酶; 表达元件; 基因剂量; 调控因子

文章编号: 1673-9078(2019)12-137-144

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2019.12.018

Efficient Expression of *Escherichia coli AppA* Phytase in *Pichia pastoris*

GAO Jiao, ZHENG Xue-yun, LIN Ying, LIANG Shu-li

(Key Laboratory of Fermentation and Enzyme Engineering, School of Bioscience and Bioengineering, South China University of Technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In this study, the phytase gene, *AppA*, derived from *Escherichia coli* B48 was synthesized by whole gene, and cloned into PHKA vector for secretion expression in *Pichia pastoris* GS115. In order to further increase the expression of phytase in *Pichia pastoris*, this study adopted the optimization method based on the combination of signal peptide, promoter, gene dose and protein folding flux, which led to an ultimate increase of the phytase activity in *Pichia pastoris* from 329.41 U/mL to 1892.51 U/mL (5.75 times as high as that of the original strain). The basic enzymatic properties of phytase *AppA* were preliminarily determined, and the optimum temperature and pH were 60 °C and 4.5, respectively. After a 60-min treatment at 60 °C, 40% of the phytase activity was retained, indicating poor thermal stability. After a 6-h treatment at pH 6.0~7.0, 87% of the enzyme activity was retained, indicating good stability in a weak acid environment. The effect of divalent metal ions on phytase activity was also studied. Fe²⁺ could activate phytase *AppA*, while ions such as Cu²⁺, Ni²⁺ and Mn²⁺ may inhibit the activity of phytase *AppA* through forming a complex with phytic acid. The high stability of the enzyme under acidic conditions is advantageous for its application in the field of food processing.

Key words: *Pichia pastoris*; phytase *AppA*; expression element; gene dose; regulatory factor

植酸酶是水解植酸及其盐类生成肌醇和磷酸的一类酶的总称。植酸酶作为食品添加剂在改善人体对矿物质的吸收和提高食品加工技术等方面具有良好的应用前景。谷物和油菜籽中的磷酸盐有 60 多种是以植酸盐的形式存在的, 植酸盐只有在植酸酶的催化下才能释放无机磷^[1], 而单胃动物, 如人, 猪和家禽, 消化道中不能够降解植酸盐, 所以需要添加植酸酶来提高磷的利用率, 降低磷对环境的污染。植酸酶作为食品添加剂可以充分降解植酸酶含量低的玉米、燕麦和大

收稿日期: 2019-03-28

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (31400062)

作者简介: 高娇 (1993-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 酶学与酶工程

通讯作者: 梁书利 (1985-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 酶学与酶工程

豆饼等食品中的植酸, 其特点主要是: ①提高食品加工技术, 如提高玉米浆的品质、改善面包质地等^[2]; ②降低植酸的抗营养作用, 改善人体对铁和锌的利用率^[3]; ③促进日粮中蛋白质和氨基酸的利用率^[4]。

植酸酶可存在于动物、植物和微生物中, 由于动物和植物来源的植酸酶活性低, 所以目前常用的植酸酶主要来源于黑曲霉、大肠杆菌等微生物。由于黑曲霉来源的植酸酶耐热性差, 不利用生产应用。大肠杆菌来源的植酸酶 *AppA* 是一种酸性植酸酶, 其最适 pH 值与动物胃肠道消化环境相似, 是目前已知的分解植酸能力最强的植酸酶^[5]。

巴斯德毕赤酵母是一种甲基营养型酵母, 它能够以甲醇为唯一碳源和能源来提供菌体生长和代谢所需

物质和能量。毕赤酵母具有 P_{AOXI} 启动子活性强、可进行翻译后修饰加工、遗传背景清晰、操作方便、外源基因稳定性好、高密度发酵和产物易于分离纯化等优点, 目前已有 5000 多种蛋白在毕赤酵母中表达。近年来, 毕赤酵母被美国 FDA 认定为 GRAS (Generally recognized as safe) 微生物, 可用于食品和医药领域。

提高毕赤酵母中外源蛋白表达量的主要策略为: 外源蛋白基因表达元件的优化、基因剂量的提高、蛋白折叠通量的提升、蛋白质分泌运输途径改造和蛋白降解途径弱化等方法^[6]。本研究通过优化表达元件中的信号肽和启动子、增加基因剂量以及提升蛋白折叠通量的方法提高植酸酶 AppA 在毕赤酵母中的表达量, 并对其酶学性质进行测定, 为其以后的工业应用提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

菌株: 毕赤酵母 GS115 和 *E.coli* TOP10; 载体: PHKA, pPICZaA, pPICZMFA, pPICZaAm, pPICBA 和 pGAPB。菌株和载体都由华南理工大学生物科学与工程学院微生物酶学实验室保存。

1.1.2 培养基

(1) BMGY 液体培养基: 1% (W/V) 酵母提取物, 2% (W/V) 胰蛋白胨, 1.34% (W/V) YNB, 1% (W/V) 甘油, 10% (V/V) 1 M pH 6.0 的磷酸缓冲液, 115 °C 灭菌 20 min;

(2) BMMY 液体培养基: BMGY 培养基中 1% (W/V) 甘油替换为 1% (V/V) 甲醇, 其余不变;

(3) YPDZ 平板: 1% (W/V) 酵母提取物, 2%

(W/V) 蛋白胨, 2% (W/V) 葡萄糖, 2% (W/V) 琼脂粉。115 °C 灭菌 20 min 后在超净台倒平板, 4 °C 保存备用;

(4) MD 固体培养基: 1.34% (W/V) YNB, 2% (W/V) 葡萄糖, 2% (W/V) 琼脂粉。115 °C 灭菌 20 min 后在超净台倒平板, 4 °C 保存备用;

(5) 0.25 mol/L 乙酸钠缓冲液: 20.51 g 无水乙酸钠加入 900 mL 水溶解, 用冰醋酸调 pH 至 5.5, 定容至 1 L;

(6) 7.5 mmol/L 植酸钠溶液: 0.693 g 植酸钠用 0.25 mol/L 乙酸钠缓冲液定容至 100 mL, 并用冰醋酸调 pH 至 5.5, 4 °C 冰箱保存;

(7) 硝酸溶液: 76 mL 硝酸加入 124 mL 水中, 避光保存;

(8) 100 g/L 钼酸铵: 10 g 钼酸铵溶解于 80 mL 水中, 加入 10 mL 氨水, 定容至 100 mL;

(9) 2.35 g/L 钒酸铵: 0.235 g 钒酸铵溶于 90 mL 水中, 加 2 mL 硝酸溶解, 定容至 100 mL, 避光保存;

(10) 终止液: 钒酸铵: 钼酸铵: 硝酸=1:1:2, 现用现配, 从左到右依次添加。

1.1.3 试剂及其它

KOD FX 高保真聚合酶购买于日本东洋纺公司; T4DNA 连接酶购买于 TaKaRa 公司; PCR 产物回收试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购买于美吉生物公司; 酵母提取物和胰蛋白胨购买于英国 Oxoid 公司; 蛋白胨和 YNB 无氨基酵母氮源购买于美国 BD-Difco 公司; MultiskanAscen 仪器购买于 Thermo Electron Corporation; 其它试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 基因的扩增和重组质粒的构建

表 1 基因引物及其构建的载体

Table 1 Gene amplification primer and its constructed vector

| 引物名称 | 引物序列 | 构建载体 |
|--------|--|------------------------|
| Phy-F | 5'-CGCGGAATTCAGAGTGAGCCTGAGTTGAAAC-3' | PHKA- α -phy |
| Phy-R | 5'-ATTTGCGGCCGCTTACTACAAGGAACAAGCTGGGATTC-3' | pPICZAm- α -phy |
| MF-F | 5'-GGGCTTCGAAACGATGGCTATTCCATTCCATCTATCTTC-3' | PHKA-MF-phy |
| MF-R | 5'-CCGGAATTCAGCCTCAGCCTCTCTCTTTTCG-3' | pPICZAm-MF-phy |
| AOXm-F | 5'-GGAAGATCTAACATCCAAAGACGAAAGG-3' | PHKAm-MF-phy |
| AOXm-R | 5'-GGCTTCGAATAATTAGTTGTTTTTGGATCTTCTCAAG-3' | |
| HAC1-F | 5'-CGCGGAATTCATGCCCGTAGATTCTTCTCATAAG-3' | pPICBA-Hac1 |
| HAC1-R | 5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCTCACCTGATCGCTATGCATGTC-3' | |
| P180-F | 5'-CGCGGAATTCGATGGACATCTATGACACACAGAC-3' | pGAPB-P180 |
| P180-R | 5'-AAGGAAAAAAGCGGCCGCCCCGCGTTATGGGTCTCC-3' | |

注: 横线部分为酶切位点序列。

根据 GenBank 中 *E.coli* B84 植酸酶 AppA 的蛋白序列 (ABF60232.1), 由上海捷瑞公司合成全基因序列; 根据 NCBI 查找的毕赤酵母 GS115 基因组上 *HacI* 和 *P180* 基因序列, 用 Snapgene 软件设计引物, 以 GS115 基因组为模板, 扩增得到 *HacI* 和 *P180* 序列, 以 pPICZMFA 为模板扩增得到 MF 信号肽; 以 pPICZαAm 为模板扩增得到 AOXm 启动子。PCR 扩增体系为 0.5 μL KOD FX 高保真聚合酶, 10 μL dNTPs, 1.5 μL 上下游引物, 50 ng DNA 模板, 无菌水定容至 50 μL。扩增体系为 94 °C 预变性 5 min, 98 °C 变性 10 s, 55 °C 退火 30 s, 68 °C 延伸 (1 kb/min), 30 个循环, 68 °C 延伸 10 min。通过 1% 琼脂糖凝胶鉴定和回收扩增片段, 并用相应的限制性内切酶酶切载体得到载体片段。用 T4 DNA 连接酶将载体与基因片段连接构建重组载体。基因引物及其构建的载体如表 1 所示。

1.2.2 重组毕赤酵母菌株的构建

用电转的方法将被 *KpnI* 线性化的 PHKA-α-Phy, PHKA-MF-Phy 和 PHKA_m-MF-Phy 载体分别转入到毕赤酵母感受态中, 在 MD 平板上进行筛选。用 *MssI* 线性化 pPICZAm-MF-phy 载体将其电转到 AOXm-MF-Phy 酵母感受态中, 在 YPDZ 平板上进行筛选。分别用 *MssI* 和 *XmaI* 线性化 pPICBA-HacI 和 pGAPB-P180 载体将其分别电转到 AOXm-MF-Phy-2C 感受态中, 在 YPDB 平板上进行筛选。用 *XmaI* 线性化 pPICBA-HacI-GAP-P180 载体电转到 AOXm-MF-Phy-2C 感受态中, 在 YPDB 平板上进行筛选。电击条件为电压 1.5 kV, 时间 5 ms。平板 30 °C 培养 72 h, 挑选单菌落进行酵母菌落 PCR, 鉴定出阳性转化子进行发酵。

1.2.3 重组菌株的诱导表达

挑选鉴定的阳性转化子接种到含有 10 mL BMGY 的 50 mL 的三角瓶中, 30 °C, 250 r/min 过夜培养。以 OD₆₀₀=1 的起始菌体浓度转接到含有 25 mL BMMY 的 250 mL 的三角瓶中, 30 °C, 250 r/min 培养 120 h, 每隔 24 h 取样、补加 1% 甲醇。

1.2.4 植酸酶酶活测定

①将每 24 h 取的发酵液离心, 取上清, 并用乙酸钠缓冲液稀释至合适的倍数 (酶活吸光值 1~2); ②振荡摇匀, 在 10 mL 玻璃试管中加入 990 μL 乙酸钠, 加入 10 μL ①中稀释的样品, 空白对照为 1 mL 乙酸钠缓冲液; ③37 °C 预热 5 min; ④依次往试管中加入 2 mL 植酸钠, 37 °C 反应 30 min, 每 15 min 摇一次; ⑤取出, 加入 2 mL 终止液, 静置 10 min; ⑥取 200 μL 样品加入到 96 孔板中, 每个样品做两个平行; ⑦在酶标

仪中测定反应液在 405 nm 处的吸光值; ⑧计算酶活, 如公式 1。

$$\text{酶活} = \frac{OD+0.025}{8.234} \times \text{稀释倍数} \quad (1)$$

注: 酶活的定义为样品在 5.0 mmol/L 植酸钠, 37 °C, pH 5.5 条件下每分钟从植酸钠中释放 1 μmol 无机磷所需要的酶量, 即一个酶活单位, 用 U 表示。

1.2.5 SDS-PAGE 分析

以 PHKA-MF-Phy 为对照菌, 发酵 AOXm-MF-Phy-2C 菌株, 取前 96 h 发酵液, 离心, 留上清, 在 100 °C 沸水中, 用巯基乙醇缓冲液对上清进行变性预处理 5 min, 通过浓度分别为 6% 的浓缩胶和 12% 的分离胶进行 SDS-PAGE, 考马斯亮蓝染色, 观察蛋白条带的大小和宽度。

1.2.6 植酸酶的基本酶学特性分析

植酸酶最适温度的测定。将稀释好的酶液在不同温度 (30、40、50、55、60、65、70、80 °C), pH 5.5 下测酶活, 每个反应设 3 个平行。以最高酶活为 100%, 计算其它条件下植酸酶的相对活力。

植酸酶温度稳定性的测定。将稀释好的酶液在 60、70、80、90 °C 下保温 60 min, 分别于 0、5、20、60 min 时取样测酶活, 每个反应设 3 个平行。以最高酶活为 100%, 计算其它条件下植酸酶的相对活力。

植酸酶最适 pH 的测定。将稀释好的酶液在 37 °C, 不同 pH 值条件下 (pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、8.0) 测定植酸酶的活性, 每个反应设 3 个平行, 植酸钠用不同 pH 值的缓冲液配制, 其中 pH 4.0~5.5 用乙酸钠-乙酸缓冲液; pH 6.0~6.5 用咪唑-盐酸缓冲液; pH 7.0~8.0 用 Tris-HCl 缓冲液。以最高酶活为 100%, 计算其它条件下植酸酶的相对活力。

植酸酶的 pH 稳定性的测定。将稀释好的酶液在 37 °C, 不同 pH (pH 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0) 缓冲液条件下保温 6 h。然后在 37 °C, pH 5.5 下测定酶活, 每个反应设 3 个平行。以最高酶活为 100%, 计算其它条件下植酸酶的相对活力。

二价金属离子对植酸酶活性影响: 用 pH 5.5, 0.25 mol/L 乙酸钠缓冲液配制浓度为 0.5 mM 的金属离子溶液, 在 37 °C, pH 5.5 条件下测定不同二价金属离子对植酸酶活力的影响。以不加金属离子的酶活为 100%, 计算其它条件下植酸酶的相对活力。

1.2.7 数据分析

每个样品重复发酵三次, 每次测酶活设置三个平行, 数据值为平行样品的平均值, 用误差线表示标准偏差。

2 结果与讨论

2.1 重组载体和重组工程菌株的构建

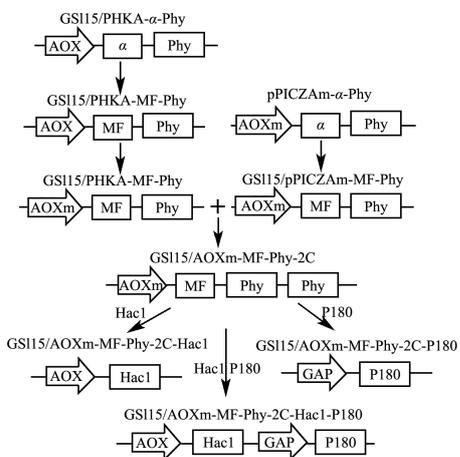


图1 本研究载体构建图

Fig.1 Vector construction diagram of the study

通过 1.2.1 中的方法用酶切连接的方式在 *E.coli* TOP10 中构建载体, 根据图 1 所示的载体构建流程, 得到 PHKA- α -Phy, PHKA-MF-Phy, PHKA-MF-Phy, pPICZAm-MF-Phy, pPICZAm- α -Phy, pPICBA-Hac1, pGAPB-P180 和 pPICBA-Hac1-GAP-P180 载体。所有载体均通过基因测序确认构建成功。

2.2 重组毕赤酵母的诱导表达

按照 1.2.2 方法将 PHKA- α -Phy, PHKA-MF-Phy, PHKA-MF-Phy, pPICZAm-MF-Phy, pPICBA-Hac1, pGAPB-P180 和 pPICBA-Hac1-GAP-P180 载体电转到相应的毕赤酵母感受态中, 通过酵母菌落 PCR 鉴定出阳性转化子, 按照 1.2.3 的方法对重组菌株进行诱导发酵。

2.2.1 外源蛋白表达元件优化对毕赤酵母分泌表达植酸酶的影响

外源蛋白 N 端的分泌信号肽序列是外源蛋白分泌表达的必要元件, 其可以引导肽链进入内质网完成糖基化和折叠, 并转运到高尔基体和胞外, 选择合适的信号肽序列能够实现外源蛋白高效的分泌表达。来源于酿酒酵母的 α -factor 是目前在毕赤酵母中广泛使用的信号肽^[7], MF-factor 是在 α -factor 与外源蛋白序列之间增加可被信号肽酶识别切割的 10 个氨基酸 (EEAEAEAEPK) 序列^[8]。从图 2 中可以看出, 信号肽由 α -factor 更换为 MF-factor 后菌体的生长下降了 4.7%, AOX-MF-Phy 的植酸酶表达量较 AOX- α -Phy 提高了 33.7%, 说明 MF-factor 对植酸酶的分泌能力高于 α -factor, 这之前对 MF-factor 研究中植酸酶表达

量升高的结果相同^[8]。

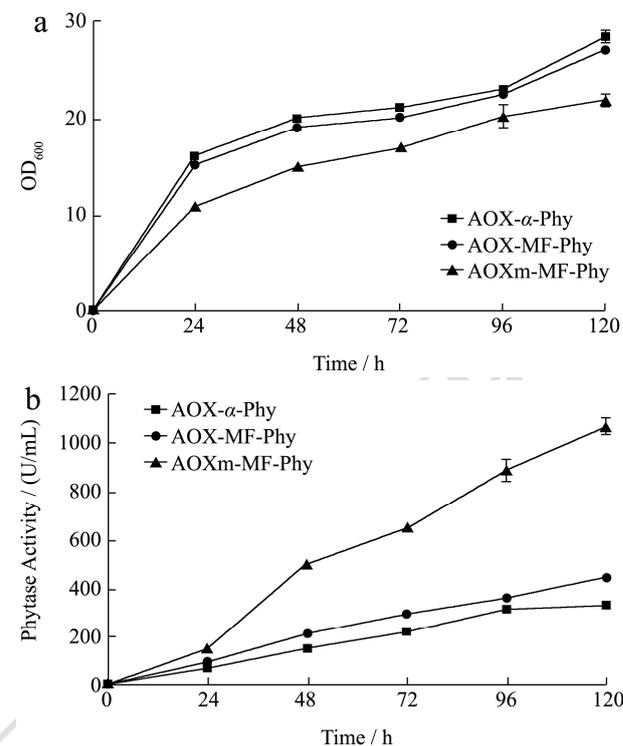


图2 重组毕赤酵母生长曲线(a)和植酸酶表达量(b)

Fig.2 Growth curve (a) and phytase expression (b) of recombinant *P. pastoris*

启动子是基因表达的重要元件, 其强度直接和基因的 mRNA 转录水平和蛋白表达量相关, 选择转录能力强的启动子能够提高外源蛋白的表达量。研究发现将 P_{AOX1} 的 -230~190 序列增加为两拷贝并且将 -777~712 序列删除后得到 AOXm 序列, AOXm 启动子的强度比 P_{AOX1} 的要高^[9]。在 AOX-MF-Phy 菌株的基础上将 AOX1 启动子更换为突变的 AOXm 启动子, 得到 AOXm-MF-Phy 毕赤酵母重组菌株。从图 2 中可以看出, 菌体诱导发酵 120 h 后, AOXm-MF-Phy 菌株的生长下降 18.7%, 而植酸酶表达量比 AOX-MF-Phy 菌株提高了 2.42 倍, 达到 1068.67 U/mL, 说明 AOXm 启动子有利于植酸酶的表达。

由此可以说明 MF-factor 和 AOXm 启动子都有利于提高植酸酶 AppA 在毕赤酵母中的分泌表达, 外源蛋白在合成与分泌时需要消耗大量的 ATP^[10], 会和菌体的生长进行能量竞争^[11], 所以菌体可能通过减缓菌株的生长速度来使更多的能量和物质用于蛋白合成。

2.2.2 增加基因剂量对植酸酶表达的影响

增加外源基因表达盒在毕赤酵母基因组上的拷贝数对提高外源蛋白的表达量具有显著的作用。目前增加外源蛋白拷贝数的方法有体外构建法 (多基因表达盒载体) 和体内构建法 (抗生素压力筛选)^[12]。我们通过体外构建法, 在单拷贝 *AppA* 基因基础上, 再增

加一个拷贝的 *AppA* 基因, 通过抗性筛选得到 AOXm-MF-Phy-2C 菌株, 它与单拷贝菌株生长和产酶能力比较结果如图 3 所示。

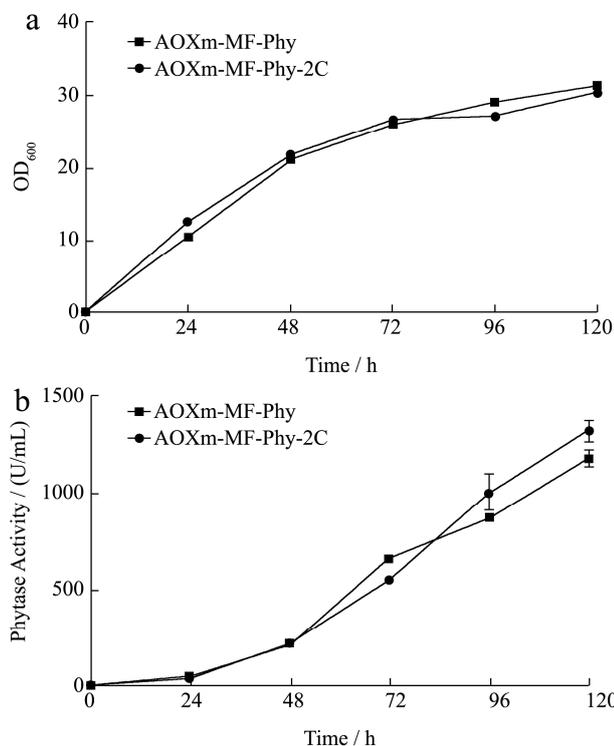


图 3 两拷贝植酸酶重组毕赤酵母生长曲线(a)和植酸酶表达量(b)

Fig.3 Growth curve (a) and phytase expression (b) of two-copy phytase recombinant *P. pastoris*

从图 3 中可以看出, 在产酶能力方面, 将基因增加为两拷贝后, 植酸酶的表达量仅提高了 11%, 猜测可能是因为基因拷贝数的增加, 外源蛋白表达量增加导致内质网折叠通量不足, 对内质网造成压力, 破坏内质网的稳态, 激活内质网的未折叠蛋白响应 (UPR) 途径, 上调内质网降解 (ERAD) 途径相关基因, 加快未折叠蛋白和错误折叠蛋白的降解速度^[13,14], 从而限制了植酸酶产量的增加。

2.2.3 蛋白质折叠通量优化对植酸酶分泌表达影响

过表达内质网中的分子伴侣、折叠相关酶或相关转录因子可以促进蛋白质的折叠, 有效的增加蛋白的分泌表达量^[15]。与内质网稳态相关的转录因子中 *Hac1* 是未折叠蛋白响应 (UPR) 途径的一个激活性调控因子, 它能够调控分泌途径中的各种分子伴侣, 折叠因子等的表达, 从而促进外源蛋白的正确折叠, 提高细胞外源蛋白的分泌能力^[16]。*P180* 是一种核糖体受体蛋白, 它能够增加粗面内质网的面积, 通过上调与胞吐相关基因的转录和翻译, 来提高细胞外源蛋白的分泌能力^[17]。因此在两拷贝植酸酶菌株的基础上过表达

Hac1 和 *P180*, 这两个调控因子对植酸酶表达影响的结果如图 4 所示。

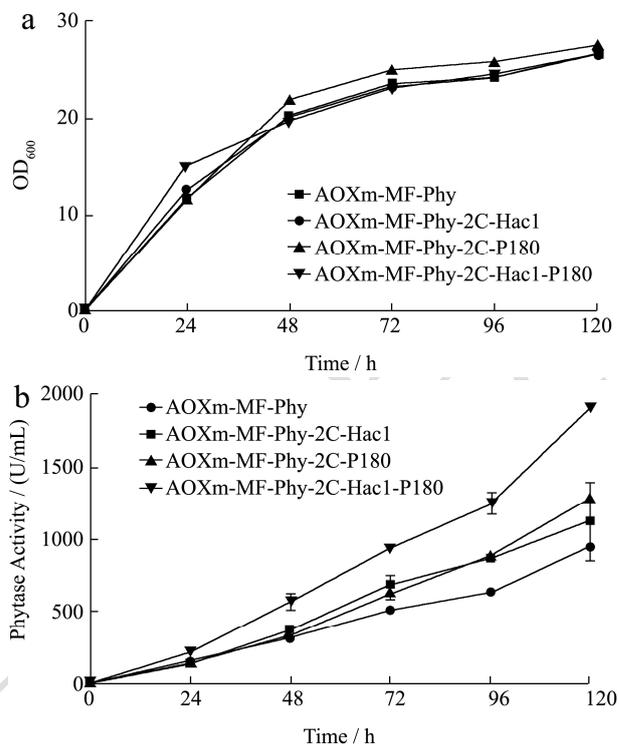


图 4 过表达 *Hac1* 和 *P180* 的重组毕赤酵母生长曲线(a)和植酸酶表达量(b)

Fig.4 Growth curve (a) and phytase expression (b) of overexpress *Hac1* and *P180* in two-copy phytase recombinant *P. pastoris*

从图 4 中可以看出, 过表达 *Hac1* 和 *P180* 后植酸酶表达量比 AOXm-MF-Phy 菌株分别提高了 19%和 37%, 增加量高于仅通过增加基因拷贝数增加的植酸酶表达量。说明增加基因拷贝数后, 基因表达量升高, 对内质网产生压力, 而过表达 *Hac1* 或 *P180* 后能够缓解内质网的压力, 提高外源蛋白表达量。进一步将 *Hac1* 和 *P180* 这两个调控因子同时过表达, 结果显示植酸酶的表达量比 AOXm-MF-Phy 菌株提高了 55.6%, 达到 1892.51 U/mL, 说明 *Hac1* 和 *P180* 的协同表达能够进一步缓解由基因表达量增加对内质网产生的压力, 促进蛋白质的正确折叠, 增加植酸酶的分泌表达量。

2.3 表达产物的 SDS-PAGE 分析

对发酵前 96 h 的上清用巯基乙醇进行预处理, 以 10 μ L 的上样量进行 SDS-PAGE, 结果如图 5 所示, 蛋白条带大小为 55 ku 左右, 与理论值相符。并且在 96 h 时, 菌体蛋白得到大量的累积, 并且可以看出 AOXm-MF-Phy-2C-Hac1-P180 蛋白量高于 AOXm-MF-Phy 的, 这与植酸酶 *AppA* 酶活结果相符。

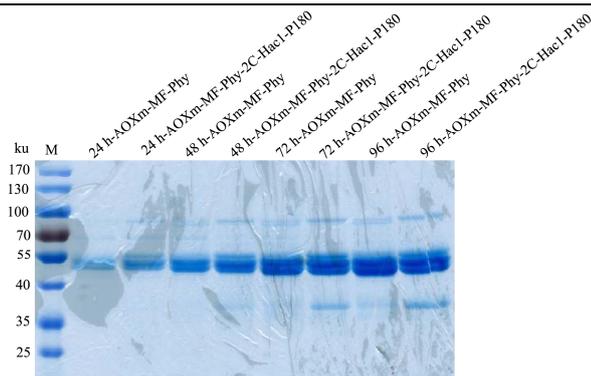


图5 植酸酶 AppA SDS-PAGE 分析

Fig.5 SDS-PAGE analysis of recombinant phytase AppA

2.4 植酸酶 AppA 酶学性质分析

2.4.1 植酸酶 AppA 最适温度和温度稳定性的测定

在 pH 5.5 条件下测定了不同温度下植酸酶 AppA 的酶活力, 结果如图 6 所示, 在 60 °C 条件下, 植酸酶 AppA 具有最高的酶活力, 在温度小于 60 °C 时, 酶活力随着温度的升高逐渐升高, 在 60 °C 酶活力达到最高, 温度继续升高, 酶活力快速下降, 当温度升高到 70 °C 后植酸酶 AppA 活力基本丧失。

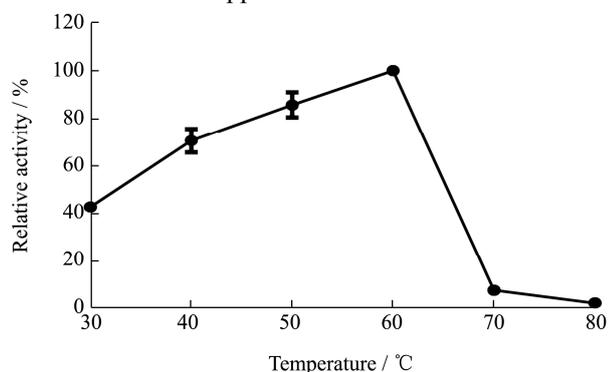


图6 植酸酶 AppA 最适温度的测定

Fig.6 Determination of optimum temperature of phytase AppA

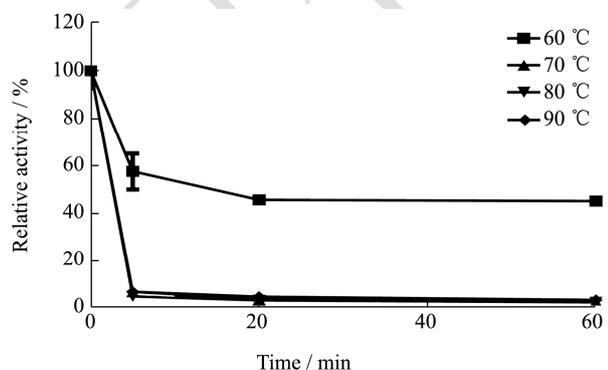


图7 植酸酶 AppA 温度稳定性的测定

Fig.7 Determination of temperature stability of phytase AppA

将植酸酶 AppA 分别在 60 °C、70 °C、80 °C、90 °C 下保温 60min, 酶活力随加热时间变化结果如图

7 所示, 植酸酶 AppA 在 70 °C~90 °C 中处理, 酶活力迅速丧失, 而在 60 °C 中, 酶活力一直维持在 40% 以上, 与图 6 显示的结果相同。

2.4.2 植酸酶 AppA 最适 pH 值和 pH 稳定性的测定

在 37 °C 条件下测定不同 pH 值缓冲液中植酸酶 AppA 的酶活力, 结果如图 8 所示。植酸酶 AppA 的酶活力在 pH 4.5 时达到最大活力, 这与其它来源的植酸酶在不同 pH 条件下的酶活力变化趋势是相同的^[18], 并且低于柠檬酸杆菌来源的植酸酶最适 pH 值^[6]。该酶在弱酸性条件下有较好的酶活力, 所以在生产的过程中, 应该尽量将 pH 条件控制在 4.0~5.5 之间, 使植酸酶保持较好的活性。

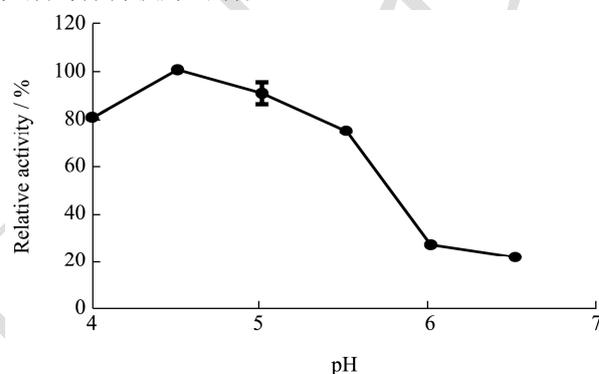


图8 植酸酶 AppA 最适 pH 值的测定

Fig.8 Determination of the optimum pH value of phytase AppA

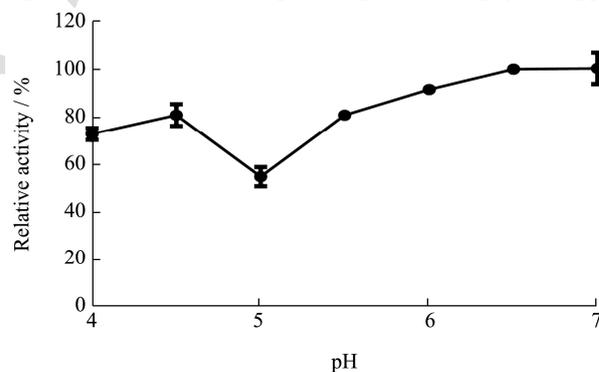


图9 植酸酶 AppA pH 稳定性的测定

Fig.9 Determination of pH stability of phytase AppA

将植酸酶 AppA 在不同 pH 缓冲液中处理 6 h 后, 测得的 pH 耐受性结果如图 9 所示, 该酶在 pH 6.0~7.0 条件下处理 6 h 后酶活力仍保持在 90% 以上, 说明该酶具有较强的 pH 耐受性。

2.4.3 二价金属离子对植酸酶 AppA 酶活力的影响

植酸酶的活性除了受到温度和 pH 的影响, 还受到许多二价离子的影响。多数金属离子通过与植酸发生强烈的络合作用而抑制植酸酶的活力, 但也有部分金属离子能够提高酶的活力。测定不同二价金属离子

对植酸酶 AppA 活力的影响, 结果如表 2 所示。从表中可以看出加入 Fe^{2+} 后, 植酸酶 AppA 的活力提高为原来的 135%, 这与 Fe^{2+} 在酿酒酵母中对植酸酶表达影响的结果是相同, 主要是通过将 Fe^{2+} 作为电子转移载体来激活酶的活性^[4]。而在本研究中的其它二价金属离子对植酸酶 AppA 都具有抑制作用, 其中 Ni^{2+} 和 Cu^{2+} 对植酸酶的抑制性最强。

表 2 二价金属离子及化学试剂对植酸酶活力的影响

Table 2 Effect of divalent metal ions and chemical reagents on

| phytase enzyme activity | | |
|-------------------------|---------------|---------------------|
| Metal ions | Concentration | Relative activity/% |
| No addition | - | 100 |
| Ba^{2+} | 0.5mM | 82.06±1.72 |
| Ca^{2+} | 0.5mM | 62.45±0.44 |
| Mn^{2+} | 0.5mM | 72.72±0.68 |
| Cu^{2+} | 0.5mM | 10.47±0.21 |
| Fe^{2+} | 0.5mM | 134.91±0.26 |
| Mg^{2+} | 0.5mM | 56.40±0.55 |
| Ni^{2+} | 0.5mM | 7.70 |
| Zn^{2+} | 0.5mM | 53.97±4.28 |

3 结论

本研究将来源于大肠杆菌 B48 的植酸酶 AppA 基因在毕赤酵母中实现分泌表达, 通过对基因表达元件的优化得到 AOXm-MF-Phy 植酸酶表达菌株。将植酸酶的拷贝数增加为两拷贝后, AOXm-MF-Phy-2C 菌株植酸酶的表达量有所提高。为了减缓拷贝数增加给内质网带来的压力, 过表达与内质网扩张和压力相关的 Hac1 和 P180 调控因子, 最终使植酸酶的活力达到 1892.51 U/mL。实验结果表明 Hac1 和 P180 调控因子在两拷贝植酸酶菌株中的协同表达, 比单个调控因子的表达效果更佳, 表明仅通过 Hac1 激活 UPR 途径来缓解未折叠蛋白对内质网产生的压力或者通过 P180 扩增内质网的面积增加蛋白的分泌是不足以让大量合成的多肽链在内质网中进行正确折叠和分泌表达的。Hac1 和 P180 协同表达促进植酸酶表达量进一步提高, 但是仍未达到单拷贝酶活两倍的理论值, 这可能和其它与蛋白折叠分泌相关的转录因子相关, 如蛋白质折叠分子伴侣 KAR2^[19], 促进二硫键形成基因 PDI 和 EROI^[20], 以及增加内质网中蛋白折叠相关酶基因 HSF1^{R206S}^[19]等。重组植酸酶 AppA 在 pH 6.0~7.0 环境中处理 6 h, 酶活力仍保留 87%以上, 高于柠檬酸杆菌来源的植酸酶酶活力 pH 稳定性^[6]。在二价金属离子中, Fe^{2+} 能够通过作为电子转移载体来提高植酸酶 AppA 活性。后续可以通过基因工程手段对该酶温度

稳定性改造后, 进一步扩展该酶在食品加工领域中的应用范围。

参考文献

- [1] Reddy N R, S K Sathe, D K Salunkhe. Phytates in legumes and cereals [J]. Advances in Food Research, 1982, 28(4): 1-92
- [2] 李伟伟, 吕吉祥, 刘均洪. 植酸酶在食品工业中的应用[J]. 食品工程, 2006, 3: 5-8
LI Wei-wei, LYU Ji-xiang, LIU Jun-hong. Application of phytase in food industry [J]. Food Engineering, 2006, 3: 5-8
- [3] Tovar L R, M Olivos, M E Gutierrez. An alcoholic drink from rural Mexico, contains phytase, its *in vitro* effects on corn tortilla [J]. Plant Foods for Human Nutrition, 2008, 63(4): 189-194
- [4] 李路胜, 冯定远, 左建军. 植酸酶的生产及应用研究进展[C]. 酶制剂在饲料工业中的应用, 2005
LI Lu-sheng, FENG Ding-yuan, ZUO Jian-jun. Progress in the production and application of phytase [C]. Application of Enzyme Preparation in Feed Industry, 2005
- [5] 黎其友. 植酸酶 AppA 基因的克隆、表达及酶学性质分析[D]. 重庆: 西南大学, 2011
LI Qi-you. Cloning, Expression and enzymatic properties of phytase AppA gene [D]. Chongqing: Southwest University, 2011
- [6] 李承. 高表达植酸酶毕赤酵母内质网稳态的形成及 Wsc1p 的调控[D]. 广州: 华南理工大学, 2018
LI Cheng. The Formation of the endoplasmic reticulum and the regulation of Wsc1p in the high expressing phytase of *Pichia pastoris* [D]. Guangzhou: South China University of Technology, 2018
- [7] Macauley-Patrick S, Fazenda M L, Mcneil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system [J]. Yeast, 2005, 22(4): 249-270
- [8] 熊爱生, 彭日荷. 信号肽序列对毕赤酵母表达外源蛋白质的影响[J]. 生物化学与生物物理学报, 2003, 35(2): 154-160
XIONG Ai-sheng, PENG Ri-he. Effects of signal peptide sequences on expression of exogenous proteins in *Pichia pastoris* [J]. Journal of Biochemistry and Biophysics, 2003, 35(2): 154-160
- [9] Hartner F S, Ruth C, Langenegger D, et al. Promoter library designed for fine-tuned gene expression in *Pichia pastoris* [J]. Nucleic Acids Research, 2008, 36(12): 76
- [10] Tyo KE, Liu Z, Petranovic D, et al. Imbalance of heterologous protein folding and disulfide bond formation

- rates yields runaway oxidative stress [J]. *Bmc Biology*, 2012, 10(1): 16.
- [11] Huang M, Bao J, Hallström B M, et al. Efficient protein production by yeast requires global tuning of metabolism [J]. *Nature Communications*, 2017, 8(1): 1131
- [12] Zhu T, Guo M, Tang Z, et al. Efficient generation of multi-copy strains for optimizing secretory expression of porcine insulin precursor in yeast *Pichia pastoris* [J]. *Journal of Applied Microbiology*, 2010, 107(3): 954-963
- [13] Wodicka L. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation [J]. *Cell*, 2000, 101(3): 249-258
- [14] Graf A, Gasser B, Dragosits M, et al. Novel insights into the unfolded protein response using *Pichia pastoris* specific DNA microarrays [J]. *Bmc Genomics*, 2008, 9(1): 390
- [15] Damasceno L M, Huang C J, Batt C A. Protein secretion in *Pichia pastoris* and advances in protein production [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2012, 93(1): 31-39
- [16] 房艳华. 染色质免疫共沉淀技术解析转录调控蛋白 *Hac1* 在蛋白分泌调控中的功能[D]. 咸阳:西北农林科技大学, 2017
- FANG Yan-hua. Chromatin Immunoprecipitation technique to analyze the function of transcriptional regulatory protein *Hac1* in protein secretion regulation [D]. Xianyang: Northwest A & F University, 2017
- [17] Becker F, Block-Alper L, Nakamura G, et al. Expression of the 180-kD Ribosome Receptor Induces Membrane Proliferation and Increased Secretory Activity in Yeast [J]. *The Journal of Cell Biology*, 1999, 146(2): 273-284
- [18] 冉瑞法,刘淑娟,肖圣燕,等. 大肠杆菌植酸酶 *AppA* 基因的克隆、表达及性质分析[J]. *江西农业学报*, 2017, 29(11): 1-6, 16
- RAN Rui-fa, LIU Shu-juan, XIAO Sheng-yan, et al. Cloning, expression and characterization of Phytase *AppA* Gene in *Escherichia coli* [J]. *Jiangxi Journal of Agricultural Sciences*, 2017, 29(11): 1-6, 16
- [19] Hou J, Österlund Tobias, Liu Z, et al. Heat shock response improves heterologous protein secretion in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2013, 97(8): 3559-3568
- [20] Tu B P, Weissman, and J S. The FAD- and O-dependent reaction cycle of Ero1-mediated oxidative protein folding in the endoplasmic reticulum [J]. *Molecular Cell*, 2002, 10(5): 983-994

(上接第 231 页)

- [28] 倪德江,陈玉琼,谢笔钧,等. 绿茶、乌龙茶、红茶的茶多糖组成、抗氧化及降血糖作用研究[J]. *营养学报*, 2004, 1: 57-60
- NI De-jiang, CHEN Yu-qiong, XIE Bi-yun, et al. Studies on composition, antioxidation and hypoglycemic effects of polysaccharides from green tea, oolong tea and black tea [J]. *Acta Nutrimenta Sinica*, 2004, 1: 57-60
- [29] 赵雪丰,彭传焱,谷勋刚,等. 普洱茶渥堆过程中茶多糖及果胶变化研究[J]. *安徽农业大学学报*, 2012, 39(4): 580-584
- ZHAO Xue-feng, PENG Chuan-yi, GU Xun-gang, et al. Changes of tea polysaccharide and pectin during fermentation process of Pu-erh tea [J]. *Journal of Anhui Agricultural University*, 2012, 39(4): 580-584
- [30] 张文彦,刘文君,袁文侠,等. 普洱茶发酵过程中茶多糖分子量变化研究[J]. *食品工业科技*, 2010, 31(3): 114-116
- ZHANG Wen-yan, LIU Wen-jun, YUAN Wen-xia, et al. Study on changes of molecular weight of Puer tea polysaccharide during fermentation [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2010, 31(3): 114-116
- [31] 郑晓凤,侯丽然,廉亚楠,等. 桔梗多糖软模板法制备纳米硒及表征[J]. *广东化工*, 2016, 16: 25-26
- ZHENG Xiao-feng, HOU Li-ran, LIAN Ya-nan, et al. Preparation and characterization of nano-selenium using *Platycodon Grandiflorum* polysaccharides as soft template [J]. *Guangdong Chemical Industry*, 2016, 16: 25-26
- [32] Liao Wen-zhen, Yu Zhi-qiang, Lin Ze-hua, et al. Biofunctionalization of selenium nanoparticle with *Dictyophora Indusiata* polysaccharide and its antiproliferative activity through death-receptor and mitochondria-mediated apoptotic pathways [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(18629): 1-13
- [33] Xu Ping, Wu Jing, Zhang Yi, et al. Physicochemical characterization of puerh tea polysaccharides and their antioxidant and alpha-glycosidase inhibition [J]. *Journal of Functional Foods*, 2014, 6: 545-554