

## D-氨基酸氧化酶在不同毕赤酵母宿主菌中的表达比较

冯美卿<sup>1,3</sup> 黄 海<sup>1</sup> 史训龙<sup>1</sup> 余志良<sup>2</sup> 袁中<sup>1,2\*</sup> 周 珮<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(复旦大学药学院,上海 200032)

<sup>2</sup>(中国科学院上海生命科学院生物化学与细胞生物学研究所 上海 200031)

<sup>3</sup>(河北科技大学 石家庄 050018)

**摘 要** D-氨基酸氧化酶(DAAO)在转化头孢菌素 C 生产 7-ACA 和转化 DL-氨基酸制备  $\alpha$ -酮酸和 L-氨基酸上起着重要的作用。采用 DNA 操作技术,将来源于三角酵母的 DAAO 基因连接至表达载体 pPIC3.5K 上,再将表达质粒 pPIC3.5K-DAAO 分别整合 *P. pastoris* 的宿主细胞 KM71 和 GS115,经筛选获得阳性重组菌 PDK13(*Mut<sup>S</sup>*)和 PD27(*Mut<sup>+</sup>*)。重点对两种突变菌的表达条件进行了比较。结果显示:PDK13(*Mut<sup>S</sup>*)株比 PD27(*Mut<sup>+</sup>*)株消耗甲醇慢、诱导时间长,但对通气量要求低、表达水平高,摇瓶活力分别达到 2700 和 2500 IU/L,14L 发酵罐内活力分别达到 10140 和 8463 IU/L。初步探索了 DAAO 对 DL-苯丙氨酸的拆分,结果显示基因工程菌表达的 DAAO 具有良好的转化 DL-苯丙氨酸制备苯丙酮酸和 L-苯丙氨酸的能力。

**关键词** D-氨基酸氧化酶,甲醇酵母,不同宿主菌,表达比较,DL-苯丙氨酸,拆分  
中图分类号 Q814 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2004)04-0572-06

D-氨基酸氧化酶(D-Amino Acid Oxidase, EC1.1.3.3,简称 DAAO)是一种以黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)为辅基的典型黄素酶。此酶特异性催化 D-氨基酸生成相应  $\alpha$ -酮酸、氨和  $H_2O_2$ 。已广泛应用于 D-氨基酸的定量分析、生物传感器、L-氨基酸和  $\alpha$ -酮酸<sup>[1]</sup>的生产。DAAO 更重要的应用是参与两步酶法转化头孢菌素 C(CPC)生产 7-氨基头孢烷酸(7ACA)<sup>[2]</sup>。

此酶最早是从动物肾脏提取<sup>[3]</sup>,后来通过微生物途径获得<sup>[4]</sup>,近几年随着基因工程技术的发展,利用基因重组技术获得 DAAO 将成为大量获得酶的途径。目前在我国此酶主要依赖进口,国外主要是利用野生三角酵母菌培养添加 D-丙氨酸诱导生产。

虽然 DAAO 已在大肠杆菌<sup>[5]</sup>、酿酒酵母<sup>[6]</sup>中进行了表达,但表达水平不高。近年来,*P. pastoris* 用作基因工程菌的高表达系统,已显示出了诸多优势,如含醇氧化酶(AOX1)基因的强启动子,用甲醇可严格地调控表达外源基因,有完备的操作方法,可达到高密度培养等<sup>[7]</sup>。

鉴于甲醇酵母表达系统的诸多优势,3 年前我

们首先尝试在 *P. pastoris* 系统内表达 DAAO<sup>[8]</sup>,即将编码 DAAO 的基因装入 *P. pastoris* 的表达载体 pPIC3.5k 获得表达质粒 pPIC3.5k-DAAO,线性化后再转化 *P. pastoris* 的 GS115 经筛选获得 *Mut<sup>+</sup>* 表型的表达菌株 PD27。*P. pastoris* 甲醇酵母表达系统常用的宿主菌还有 KM71, KM71 为 AOX1 缺陷型,转化子表型均为 *Mut<sup>S</sup>*,有人认为 *Mut<sup>S</sup>* 表型比 *Mut<sup>+</sup>* 表型表达水平高<sup>[7]</sup>。为了寻找更高表达 DAAO 的工程菌,我们进一步构建了 DAAO/Km71 重组菌(PDK13),与以前构建的重组菌 PD27 进行了摇瓶发酵条件比较,还在摇瓶培养基基础上在 14L 自动发酵罐内培养工程菌表达 DAAO。此外,我们还初步探索了 DAAO 催化 DL-苯丙氨酸拆分生产苯丙酮酸和 L-苯丙氨酸的工艺。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌株**:DAAO 表达质粒 pPIC3.5k-DAAO 由本实验室克隆和构建,大肠杆菌 TG1 由本实验室保存,*P. pastoris* GS115, Km71 表达宿主细胞购自 Invitrogen 公司。*Sal I* 及其他限制酶购自 GIBCO BRL

收稿日期 2003-12-02,修回日期 2004-02-07。

\* 通讯作者。周珮 Tel: 86-21-54237071; E-mail: hstkfq2222@sina.com.cn

袁中 Tel: 86-21-54921246; E-mail: ZYYuan@sibs.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

公司。

**1.1.2 培养基**:MD、YDP、BMGY、YNB 等培养基配方见 Invitrogen *Pichia pastoris* Expression Kit。

Basal salts (BS)<sup>[8]</sup>:每升含 26.7mL 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>, 0.93g CaSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 18.2g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 14.9g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 4.13g KOH, 100mL 20×YNB。4mL/L 微量元素 PTM1。每升加甘油 40g 为生长培养基;用 5mL 甲醇代替甘油则为诱导培养基。

PTM1 (1L): 5.0g CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O, 0.08g NaI, 3.0g MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2g Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.02g H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 0.5g CaSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.5g CoCl<sub>2</sub>, 20g ZnCl<sub>2</sub>, 65.0g FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.2g 生物素, 5mL 浓硫酸。

## 1.2 方法

**1.2.1 有关 *P. pastoris* 的实验方法**:参照 Invitrogen *Pichia pastoris* Expression Kit 进行,发酵参照 *Pichia* Fermentation Guideline 进行。其它根据分子克隆试验指南进行。

**1.2.2 DAAO/KM71 工程菌的构建**:用限制酶 *Sal* I 将表达质粒 pPIC3.5k/DAAO 酶切线性化,电转化法转化 *P. pastoris* Km71,将转化处理后的菌液涂于 MD 平板,30℃ 培养箱培养 2~3d,筛选转化子。同时转化空质粒 pPIC3.5k 作对照菌。

**1.2.3 阳性转化子的鉴定和高表达菌株的筛选**:按酵母质粒抽提试剂盒操作抽提重组菌和对照菌的质粒,以抽提的质粒为模板,根据 GenBank 登记号 (Z50019)来自三角酵母的基因序列设计如下引物:5'引物:5'-GGATCCATGGCTAAAATCGTTGT-3',3'引物:5'-GAATTCGTTGATGGGAG GTAA-3',进行 PCR 以鉴定酵母转化子。筛选得到的阳性菌株用甲醇诱导,筛选高表达菌株。

**1.2.4 SDS-PAGE 鉴定**:采用 5% 浓缩胶、10% 分离胶。样品制备:阳性转化株用甲醇诱导,发酵结束后取少量菌体悬于适量水中,从中取 100μL 与 100μL 样品缓冲液混合,沸水浴处理 5min。取 20μL 加入上样,进行蛋白凝胶电泳。

**1.2.5 DAAO 活力测定**<sup>[9]</sup>:诱导后的菌体用化学或超声波方法破壁后,取 100μL 与 5mL D-甲硫氨酸混合,37℃ 水浴振荡 30min,用三氯乙酸终止反应,稀释 10 倍,取 1mL,加 0.4mL 2,4-二硝基苯肼,静置 10min,加 1.5mL 3mol/L NaOH,静置 15min,离心。上清测 A<sub>550</sub>。酶活定义:每分钟生成 1μmol 酮酸所需的酶量定义为 1 单位的 DAAO。

**1.2.6 工程菌摇瓶发酵**:将筛选得到的高表达菌和

PD27 分别涂于 YDP 平板,30℃ 培养 2d。挑单菌落分别接入含 30mL BMGY 的 250mL 摇瓶,30℃,220r/min 培养 24h,以 5% 的接种量接入含 40mL BS 生长培养基,同样条件下培养 36h,离心,菌体用 40mL 诱导培养基悬浮,同样条件下诱导。每 24h 补甲醇至其终浓度为 0.5%。

**1.2.7 14L 发酵罐发酵培养**:

1)参数设置:温度为 30℃,pH6.0,溶氧(DO)35%,搅拌速度 200~800 r/min。

一级种子液:单菌落接入含 40mL BMGY 摇瓶培养 24h。二级种子液:一级种子液以 5% 的接种量接入 12 个含 40mL BMGY 摇瓶,培养 12~13h,为发酵罐种子液。

2)发酵罐培养:发酵罐(NBS BIO F110 14L 全自动发酵罐)装入 6L 培养基,灭菌后 pH 为 1.0~1.5,待温度降至 30℃,用 30% 氨水调 pH 至 6.0,种子液以 8%~10% 的接种量接入发酵罐培养。发酵过程中罐内 pH 用 10% 氨水自动调节,溶氧与搅拌关联,待搅拌速度达到 800r/min 解除关联。约 20~22h 甘油耗尽,以 25~30mL/h 速度流加 50% 甘油 4~5h,待菌体密度上升达到平稳后流加甲醇转入诱导期,甲醇流加速度以维持溶氧(DO)35% 左右和 pH 为 6 为宜。定时取样监测酶活力,适时放罐。离心,弃上清,菌体用作提取 DAAO。

**1.2.8 DAAO 催化 DL-苯丙氨酸拆分制备苯丙酮酸和 L-苯丙氨酸**:取一定量菌体,加 3 倍体积 0.2mol/L 磷酸缓冲液,冰浴中超声破壁,4℃ 离心,取上清 2mL 与 50mL 50mmol/L 的 DL-苯丙氨酸(溶于 50mmol/L pH 8.5 的焦磷酸缓冲液)混和,于 37℃,280r/min 反应,每隔 1h 取样,过滤,滤液中生成的苯丙酮酸用 2,4-二硝基苯肼和 HPLC 检测,标准 L-苯丙氨酸和反应液用旋光计测旋光度。

**1.2.9 HPLC 测定**<sup>[1]</sup>:

Water HPLC 系统:反相柱(Hamilton,15cm×4.5mm)流动相:醋酸铵(20mmol/L pH 4):甲醇=3:1;流速:1.0mL/min;检测波长:214nm。

旋光度测定:标准品 L-苯丙氨酸和苯丙酮酸溶于 50mmol/L pH 8.5 的焦磷酸缓冲液(1mg/mL)与反应液于 20℃ 用 JASCO P-1020 Polarimeter 测旋光度。

## 2 实验结果

### 2.1 DAAO/KM71 工程菌的构建

线性化的表达质粒 pPIC3.5k/DAAO 电转化 KM71 感受态细胞,转化子均为 *Mut*<sup>S</sup>,经 PCR 检测

获得 60 个阳性 KM71/DAAO 转化菌。通过甲醇诱导表达进行筛选, 得高产菌株 PDK13。

## 2.2 PCR 验证

将抽提的重组阳性菌质粒和对照菌质粒进行 PCR, PCR 产物经 1% DNA 凝胶电泳检测。从图 1 可见 1.3kb 左右有明显的 DNA 条带, 与编码 DAAO 的 DNA 基因片段 1.26kb 大小相符。

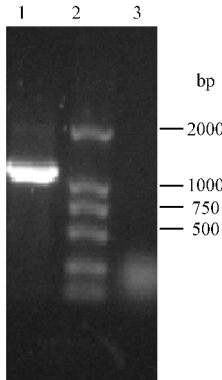


图 1 重组菌及质粒的 PCR 检测

Fig.1 PCR analysis of recombinant strain

1: PCR product of positive recombinants;

2: DNA ladder (DL-2000) 3: PCR product of control strain

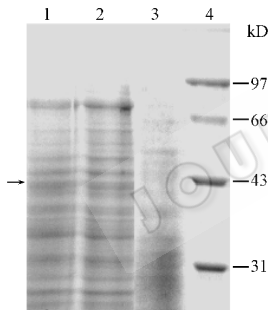


图 2 SDS-PAGE 分析重组菌

Fig.2 SDS-PAGE analysis of recombinant DAAO

1: PD27 2: PDK13 3: protein from pPIC3.5k/KM71;

4: molecular-mass marker

## 2.3 DAAO 蛋白的 SDS-PAGE 鉴定

将甲醇诱导所得的菌体进行 SDS-PAGE 检测。由图 2 可见, 两个阳性重组菌均在 43kD 处有明显的蛋白条带, 与文献报道的 DAAO 蛋白分子量相符<sup>[8]</sup>。PDK13 表达的目的蛋白占可溶性蛋白比例约 33 IU/mg, PD27 表达的目的蛋白占可溶性蛋白约 32 IU/mg。

## 2.4 重组菌株的摇瓶发酵

250mL 摇瓶内, 培养温度为 30℃, 转速 220r/min 条件下, 比较了 PDK13 和 PD27 菌株在不同甘油浓度、起始 pH、装液量、接种量、培养时间、诱导时间、

菌体密度及相应甲醇浓度对 DAAO 表达的影响。结果两株菌株最佳接种量均为 4%、培养基起始 pH 为 6、甘油浓度为 4% 和生长时间为 36h。但在诱导时间、通气量、菌体密度及相应甲醇浓度上不同。

**2.4.1 诱导时间对重组菌 PDK13 和 PD27 表达 DAAO 的影响:** PDK13 和 PD27 种子液接入培养基, 30℃, 220r/min 培养 36h。进入甲醇诱导阶段后, 于不同时间取样测活力。由图 3 可见, PDK13 (*Mut<sup>S</sup>*) 表达 DAAO 较慢, 24h 时为 1500 IU/L 左右, 之后 DAAO 表达迅速加快, 至 30h 增长减缓, 36h 活力达最高。PDG27 (*Mut<sup>+</sup>*) 诱导 DAAO 较快, 6h 达 1600 IU/L, 之后 DAAO 活力缓慢上升, 至 24h 活力达峰值。

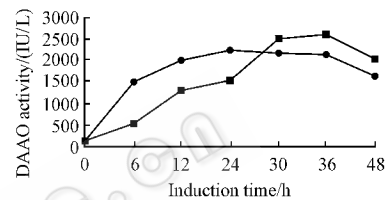


图 3 诱导时间对 DAAO 表达的影响

Fig.3 Effect of induction time on DAAO expression

■ PDK12 ● PD27

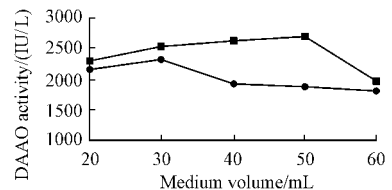


图 4 装液量对 DAAO 表达的影响

Fig.4 Effect of volume on DAAO expression

■ PDK13 ● PD27

**2.4.2 装液量对重组菌 PDK13 和 PD27 表达 DAAO 的影响:** 250mL 摇瓶中装入不同体积的诱导培养基, 进行培养和诱导。由图 4 可见, PDK13 重组菌的装液量从 20mL 到 50mL, DAAO 活力逐渐增加, 但增势不明显, 50mL 时, DAAO 表达水平最高, 超过 50mL 活力明显下降。PD27 重组菌的装液量为 30mL 时, 最有利于 DAAO 的表达, 装液量再增加, DAAO 活力明显下降。说明重组菌 PD27 对通气的要求比 PDK13 要高。

**2.4.3 菌体密度及相应甲醇浓度对 DAAO 活力的影响:** 生长阶段结束时菌体密度  $A_{600}$  为 20, 以不同的菌体密度(菌体密度以  $A_{600}$  表示)和不同的甲醇浓度转入诱导阶段, PDK13 诱导 36h, PD27 诱导 24h, 结果见表 1。

表 1 不同菌体密度及相应甲醇浓度对 DAAO 活力的影响的比较 (IU/mL)

Table 1 Effect of the cell densities and methanol concentration on DAAO activity (IU/mL)

$A_{600}$	PD27				PDK13			
	Methanol concentration( mL/L )				Methanol concentration( mL/L )			
	0.25	0.5	1.0	1.5	0.25	0.5	1.0	1.5
10	1514.8	1414.3	1370.1	1010.2	nd	nd	nd	nd
20	1641.6	2362.1	2040.5	1944.7	1758.4	2413.0	2011.1	1963.6
40	1629.0	1666.9	1951.0	1509.0	1891.0	2017.3	2755.0	2528.7
60	nd	nd	nd	nd	1430.1	1928.9	1998.4	1546.9

从表 1 可见, PD27 菌株,  $A_{600} = 20$ , 甲醇浓度 0.5%, DAAO 活力最高,  $A_{600}$  为 10 和 40, 活力均较低。对于 PDK13 菌株, 则  $A_{600} = 40$ , 甲醇浓度为 1%, DAAO 活力最高。

理论上菌体密度愈高, 愈有利于目标产物的表达。但表 1 结果显示, PD27 菌体密度从 10 增加到 20, DAAO 活力增加, 而单位菌体密度表达量降低 ( $150/A_{600}$  降至  $118/A_{600}$ );  $A_{600}$  从 40 增到 60, DAAO 活力反而下降。对于 PDK13,  $A_{600}$  从 20 增到 40, DAAO 最高活力增加 14%, 但单位菌体密度表达量降低 50 IU 左右。 $A_{600}$  从 40 增到 60, 活力反而下降。以上实验说明 DAAO 活力与菌体密度、甲醇浓度等有关, 单纯增加菌体密度, DAAO 活力不能相应提高。因此, 菌体密度增加, 其他条件应相应提高, 如通气量, 菌体密度愈高, 耗氧量愈高, 若供氧不足, 整体表达能力下降。相对来讲, PDK13 ( $Mut^S$  表型) 比 PD27 ( $Mut^+$  表型) 消耗甲醇慢, 耗氧能力低, 更适于高密度培养。

从表 1 还可看出, 诱导阶段甲醇作为诱导剂和唯一碳源, 其浓度直接影响 DAAO 的表达水平。甲醇浓度低, 不能满足菌体需要, 甲醇浓度高, 残余的甲醇被氧化为甲醛, 对菌体有毒害作用。实验结果说明, 甲醇浓度应根据菌体密度来确定。

以优化的条件培养 PDK13 和 PD27 工程菌, 结果活力分别达到 2700 IU/L 和 2500 IU/L。

## 2.5 发酵罐中甲醇分别诱导重组菌 PDK13 和 PD27 表达 DAAO

种子液接入发酵罐, 开始溶氧 ( $DO$ ) 约 90%, 随着菌体的生长,  $DO$  缓慢下降, 最终维持在 35% 左右, 约生长 22h 甘油耗尽, 开始补加 50% 甘油  $A \sim 5h$  后, 停止流加甘油, 1h 后开始流加甲醇, 进入甲醇诱导期, 通过调节搅拌速度、进气量、控制甲醇流加速度, 使  $DO$  维持 35% 左右。定时取样测 DAAO 活力。活力曲线见图 5, 由图 5 可知 PD27 比 PDK13 到达峰

值的时间短 10h 左右, 但表达水平低。PD27 在 11h 活力最高达 8463 IU/L, 菌体重量达 178g/L (湿重), PDK13 则在 21h 最高活力达 10140 IU/L, 菌体重量达 182g/L (湿重)。表达水平高于大肠杆菌 ( $3000IU/L$ )<sup>[10]</sup> 和酿酒酵母 ( $110 IU/g$ )<sup>[5]</sup> 表达系统。同样的培养基及发酵条件, 发酵罐内表达量高于摇瓶约 4 倍。可能是发酵罐培养过程中 pH 可自动控制, 通气量、补料速度可根据情况随时调整, 因此发酵罐表达水平比摇瓶高。有些重组菌发酵罐表达比摇瓶表达高 10 倍左右, 因此进一步优化发酵罐培养条件, 表达水平还有进一步提高的潜力, 促使早日工业化是可行的。

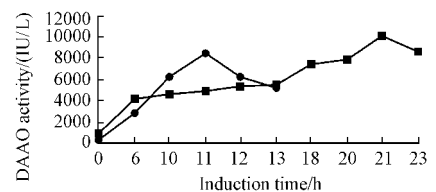


图 5 诱导时间对 DAAO 表达影响的比较

Fig. 5 Effect of induction time on DAAO expression in 14L fermentor

■ PD27 ● PDK13

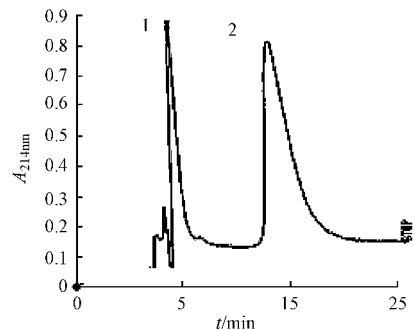


图 6 DAAO 与 DL-苯丙氨酸反应液的 HPLC 分析

Fig. 6 HPLC analysis of reaction products catalysed by DAAO

Peak1: phenylalanine; Peak2: phenylpyruvate

## 2.6 利用 DAAO 拆分 DL-苯丙氨酸

按照 1.2.8 的方法, DAAO 与 DL-苯丙氨酸反应, 用化学方法测定苯丙酮酸浓度反应 3h, 苯丙酮酸浓度不再增加, 停止反应, 将反应液进行 HPLC 检测和旋光度测定, 同时根据苯丙酮酸浓度和测得的旋光度计算比旋光度, 结果见表 2 和图 6。

表 2 氨基酸与 DAAO 反应后的旋光度

Table 2 Optical rotation of amino acid solution incubated with crude DAAO

Sample	Special rotation( $^{\circ}$ )
Standard amino acid solution	
L-Phenylalanine	-31.9
DL-Phenylalanine	0
After incubation with crude DAAO	
reaction solution	-31.5

由表 2 可见, DL-苯丙氨酸溶液无旋光性, 经 DAAO 催化后, 反应液呈现左旋光性, 与 L-苯丙氨酸旋光性一致。HPLC 检测有两个吸收峰: 1 为 L (DL)-苯丙氨酸, 2 为苯丙酮酸, 出峰时间与标准品一致。化学方法检测有苯丙酮酸生成, 进一步证明了 DAAO 催化氧化 D-苯丙氨酸生成苯丙酮酸。故产物溶液由苯丙酮酸和 L-苯丙氨酸组成。

## 3 讨论

KM71 和 GS115 为甲醇酵母表达系统常用的宿主菌。不同的宿主菌, 构建的重组菌表型不一样, KM71 本身为 AOX1 缺陷型, 重组菌表型均为 *Mut<sup>S</sup>*。GS115 作为宿主菌, 在 His4 DNA 片段的单酶切位点将表达质粒酶切线性化, 通过单交换整合进染色体, AOX1 未被破坏, 转化子表型绝大多数呈 *Mut<sup>+</sup>*。据文献报道, 因为 *Mut<sup>S</sup>* 表型翻译后修饰能力强, 比 *Mut<sup>+</sup>* 表型表达水平高, 本文的实验结果显示与文献报道一致: *Mut<sup>S</sup>* 株摇瓶和发酵罐均比同样条件下的 *Mut<sup>+</sup>* 株表达水平高。

同样的阳性重组菌表达能力并不一致, 高低差异很大。60 个阳性重组菌种, 约 90% 有表达能力, 但高表达菌比低表达菌高约 3~4 倍, 因此需要对阳性重组菌进行筛选, 以挑选最高表达菌。

工程菌在表达 DAAO 过程中, 同时产生的还有过氧化氢酶。DAAO 催化 D-氨基酸氧化生成相应的  $\alpha$ -酮酸、氨和过氧化氢, 在过氧化氢酶存在时, 过氧

化氢被进一步降解, 酮酸为终产物。无过氧化氢酶存在下, 酮酸与过氧化氢继续反应生成相应羧酸, 羧酸为终产物。因此 DAAO 在用于转化 DL-氨基酸制备  $\alpha$ -酮酸重要的医药化工中间体 (和 L-氨基酸时), 过氧化氢酶是必需的, 在我们的实验中显示了较粗的 DAAO 酶制剂便可用于此目的。但在转化 CPC 时, 过氧化氢酶必须被除去, 否则产物为酮酸而不是 GL-7ACA。我们曾尝试利用离子交换层析和凝胶过滤纯化 DAAO, 发现过氧化氢酶很难被除去。设法除去过氧化氢酶获得更纯的 DAAO 是我们目前正在进行的工作。

## REFERENCES (参考文献)

- [1] Upadhyaya R, Nagajothi H, Bhat SG *et al*. D-amino acid oxidase and catalase of detergent permeabilized *Rhodotorula gracilis* cells and potential use for the synthesis of  $\alpha$ -keto acids. *Process Biochem*, 1999, **35**(1~2): 7-13
- [2] Conlon HD, Baqal J, Baker K *et al*. Two-step immobilized enzyme conversation of cephalosporin C to 7-aminocephalosporinic acid. *Biotechnol Bioeng*, 1995, **46**(6): 510-513
- [3] Fukui K, Watanabe F, Shibata T *et al*. Molecular cloning and sequence analysis of cDNAs encoding porcine kidney D-amino acid oxidase. *Biochemistry*, 1987, **26**: 3612-3618
- [4] Pilone SM, Vanoni MA, Curti B *et al*. D-amino acid oxidase activity in the yeast *Rhodotorula gracilis*. *Biotechnol Lett*, 1985, **7**: 1-7
- [5] Francisco J, Gonzalez J, Javier M *et al*. Molecular cloning of TvD-AO1, a gene encoding a D-amino acid oxidase from *Trigonopsis variabilis* and its expression in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyvermyces lactis*. *Yeast*, 1997, **13**: 1399-1408
- [6] Lin LL, Chien HR, Chang WC *et al*. Expression of *Trigonopsis variabilis* D-amino acid oxidase in *Escherichia coli* and characterization of its inactive mutants. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, **27**(7): 482-491
- [7] Li (李晶), Zhao XX (赵晓祥), Sha CQ (沙长青) *et al*. Advance in the expression of foreign gene in the Methylophilic. *Process of Biotech* (生物工程进展), 1999, **19**(2): 17-20
- [8] Yu J, Li DY, Zhang YJ *et al*. High expression of *Trigonopsis variabilis* d-amino acid oxidase in *Pichia pastoris*. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, **18**(4~6): 291-297
- [9] Stratton J. In: Higgins DR, Cregg JM (Eds). *Methods in Molecular Biology, Pichia Protocols*, vol. 103, Humana Press, Totowa, NJ. 1997, pp. 107-121
- [10] Fantinato S, Pollegioni L, Pilone S. Engineering, expression and purification of a His-tagged chimeric D-amino acid oxidase from *Rhodotorula gracilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2001, **29**: 407-412

## Compared D-amino Acid Oxidase Expression in Different *Pichia pastoris* Host Strains

FENG Mei-Qing<sup>1,3</sup> HUANG Hai<sup>1</sup> SHI Xun-Long<sup>1</sup> YU Zhi-Liang<sup>2</sup> YUAN Zhong-Yi<sup>2\*</sup> ZHOU Pei<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>( Fudan University ,Shanghai 200032 , China )

<sup>2</sup>( Institute of Biochemistry and Cell Biology , Shanghai Institute for Biological Sciences , Chinese Academy of Sciences , Shanghai 200031 ,China )

<sup>3</sup>( Hebei Science and Technology University , Shijiazhuang 050018 ,China )

**Abstract** To compare the DAAO expression level in different *Pichia pastoris* host strains , the gene encoding DAAO from *Trigonopsis variabilis* was cloned into plasmid pPIC3.5k and then transformed into *P. pastoris* GS115 and KM71 respectively. The positive transformants PDK13( *Mut<sup>S</sup>* ) and PD27( *Mut<sup>+</sup>* ) were obtained by PCR analysis. Their optimal and different expression conditions were investigated. To compare with PD27 , PDK13 was determined to poss a slower consumption of methanol , a longer induction time , a lower oxygen request and apparently higher expression of DAAO . The highest expression levels were reached up to 2700 , 2500 IU/L in shaking flask and 10140 , 8463.5 IU/L in fermentor respectively. The over-expression of DAAO can meet its large demand for production of 7-ACA ,  $\alpha$ -keto acid and L-amino acid . In addition , the phenylpyruvate and L-phenylalanine were obtained by crude DAAO reacting with DL-phenylalanine at 37°C for 3h.

**Key words** D-amino acid oxidation , *Pichia pastoris* , different host strain , expression , bioconversion , DL-phenylalanine

Received : 12-02-2003

\* Corresponding author. ZHOU Pei Tel 86-21-54237071 ; E-mail : hstkfq2222@sina.com.cn

YUAN Zhong-Yi Tel 86-21-54921246 ; E-mail : ZCYuan@sjib.ac.cn  
中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>