

# 碱性果胶酶在重组毕赤酵母中高效表达的关键因素研究

王 芸<sup>1</sup> 华兆哲<sup>1\*</sup> 刘立明<sup>1</sup> 堵国成<sup>1</sup> 陈 坚<sup>1,2\*</sup>

(1. 江南大学工业生物技术教育部重点实验室 无锡 214122)

(2. 江南大学食品科学技术国家重点实验室 无锡 214122)

**摘 要:** 为提高重组毕赤酵母生产碱性果胶酶的产量和生产强度, 在摇瓶条件下优化了重组毕赤酵母生产碱性果胶酶的关键因素。结果表明, 以下条件: 初始甘油浓度 40 g/L、初始甲醇浓度 3.1 g 甲醇/g DCW、每 24 h 添加 0.51 g 甲醇/g DCW、诱导表达周期 72 h、250 mL 三角瓶诱导培养基装液量 30 mL、初始 pH 6.0, 最适于菌体生长与产物表达。在此基础上, 7 L 罐上通过恒速流加甘油进一步提高细胞密度, 诱导阶段甲醇采取前期恒速流加和后期 DO-stat, 发酵结束菌体干重达 80 g/L, 酶活为 217 U/mL, 比摇瓶结果提高了 66.2%。

**关键词:** 碱性果胶酶, 重组毕赤酵母, 高效表达, 甲醇诱导

## Key Factors of High-level Production of Polygalacturonate Lyase in Recombinant *Pichia pastoris*

WANG Yun<sup>1</sup> HUA Zhao-Zhe<sup>1\*</sup> LIU Li-Ming<sup>1</sup> DU Guo-Cheng<sup>1</sup> CHEN Jian<sup>1,2\*</sup>

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

(2. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122)

**Abstract:** The key factors on high-level polygalacturonate lyase (PGL) production in recombinant *Pichia pastoris* were investigated. In 250 mL shake flask, the optimal glycerol concentration, initial methanol concentration, methanol supplementation quantity, duration of induction, initial pH, medium volume were 40 g/L, 3.1 g Methanol/g DCW, 0.51 g Methanol/g DCW (in every 24 h), 72 h, pH6.0 and 30 mL, respectively. In 7 L fermentor, constant glycerol feeding, constant and DO-stat methanol feeding strategies were applied to enhance cell density and PGL production. Finally, the dry cell weight was 80 g/L, and the maximum yield of PGL was achieved to 217 U/mL, increased by 66.2% than that of flask level.

**Keywords:** Polygalacturonate lyase, Recombinant *Pichia pastoris*, High-level expression, Methanol induction

碱性果胶酶作为果胶酶系的一种, 在碱性范围内具有较高的活性, 一般多指聚半乳糖醛酸裂解酶 (Polygalacturonate lyase, PGL)<sup>[1]</sup>, 多应用于植物

毒的纯化、纸浆漂白、医药原料提取等方面。近年来, 随着绿色纺织环保工艺的盛行, 碱性果胶酶以其环境友好、低能耗及高效等优点广泛用于棉织物

的提炼中<sup>[2, 3]</sup>, 其良好的应用前景已受到人们的广泛关注。

目前我国对PGL的研究工作主要集中在菌种筛选、发酵过程优化<sup>[4, 5]</sup>; 而国外的研究工作主要集中在PGL基因工程菌构建及酶学性质上<sup>[6, 7]</sup>。毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是近年来发展迅速的真核表达系统, 以其外源基因稳定、目的蛋白表达量高、分泌效率高特性而备受关注。外源蛋白在*P. pastoris*的高效表达可通过合理的甲醇诱导得以实现<sup>[8, 9]</sup>。本研究室前期从一株具有自主知识产权的芽孢杆菌WSHB04-02<sup>[4]</sup>中扩增出PGL基因, 成功导入*P. pastoris* GS115并获得表达(诸葛斌, 碱性果胶酯裂解酶基因工程菌的构建、高表达及酶学性质研究。江南大学 2007 博士学位论文)。然而大幅度提高PGL的产量并降低生产成本仍需依赖于发酵条件优化。因此, 本文针对重组*P. pastoris* GS115 表达PGL进行了详细的摇瓶发酵条件研究, 并在 7 L 发酵罐上进行补料分批发酵实验, 获得了PGL的高效表达。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 菌种:** *P. pastoris* GS115 为宿主, 整合来自 *Bacillus* sp. WSHB04-02 菌株中的碱性果胶酶编码基因, 具有His<sup>+</sup>和Mut<sup>+</sup>表型, 拷贝数为 2~3 个。由本实验室构建并保存。

**1.1.2 培养基:** YEPD活化培养基: 葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母膏 10 g/L; BMGY生长培养基: YNB 13.4 g/L, 甘油 10 g/L, 生物素 0.4 mg/L, pH6.0 磷酸钾缓冲溶液 0.1 mol/L; BMMY诱导培养基: YNB 13.4 g/L, 甲醇 10 g/L, 生物素 0.4 mg/L, pH6.0 磷酸钾缓冲溶液 0.1 mol/L; 分批发酵培养基(BSM): 85%磷酸 26.7 mL/L, CaSO<sub>4</sub> 0.93 g/L, K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18.2 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 14.9 g/L, KOH 4.13 g/L, 甘油 40.0 g/L, PTM<sup>[10]</sup> 4.35 mL/L, 28%氨水调pH5.5; 补料生长培养基: 50%(W/V)甘油(含 12 mL/L PTM1); 补料诱导培养基: 100%甲醇(含 12 mL/L PTM1)。

### 1.2 方法

**1.2.1 摇瓶培养:** 从甘油管中接 400  $\mu$ L 菌液于 25 mL 活化培养基中, 培养 14 h 后按 10%的接种量接种到 BMGY 中(50 mL 培养基/500 mL 三角瓶), 于 30 、200 r/min 摇床上培养 24 h, 离心收集全部菌体, 转入 BMMY 中(25 mL 培养基/250 mL 三角瓶),

30 、200 r/min 培养, 每 24 h 补加 1%甲醇。

**1.2.2 补料高密度发酵:** 7 L 全自动发酵罐 KBT (KoBio Tech Co, Ltd, 韩国)中装液量 3 L, 接种量 10%, 控制搅拌转速和通气量维持溶氧(DO)在 30%以上, 25%氨水控制 pH5.5。甘油耗尽后(DO 陡然上升), 以 10 mL/h 流加补料生长培养基 12 h。当甘油再次耗尽后, 开始补料流加诱导培养基, 前 25 h 采用恒速流加, 之后采用溶氧反馈控制(DO-stat)法流加, 整个发酵过程由发酵罐控制系统软件进行在线控制和数据采集。

**1.2.3 菌体浓度测定:** 取 10 mL 发酵液置于离心管中, 10000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 将离心菌体置于 105  $^{\circ}$ C 烘至恒重, 称量并计算菌体干重(DCW, dry cell weight, 单位为 g/L)。

**1.2.4 碱性果胶酶活性测定:** 参见文献[4]。

**1.2.5 甲醇测定:** 岛津GC2010 型气相色谱仪, 色谱柱PEG20M, 30 m $\times$ 0.32 mm $\times$ 0.50  $\mu$ m, 毛细管柱, 气化室 200  $^{\circ}$ C, 检测器(FID)220  $^{\circ}$ C, 柱箱 170  $^{\circ}$ C, 流速: N<sub>2</sub> 40 mL/min, 空气 450 mL/min, H<sub>2</sub> 40 mL/min。

**1.2.6 甘油测定:** 安捷伦高效液相色谱(HPLC), 色谱条件为C<sub>18</sub>反相柱, 5  $\mu$ m, 4.6 mm $\times$ 250 mm, 流动相: 70% 乙腈, 30% 水, 流速: 0.6 mL/min, 柱温: 30  $^{\circ}$ C, 进样量: 10  $\mu$ L, 检测器: 示差折光检测器。

## 2 结果与讨论

### 2.1 生长阶段甘油浓度对菌体生长的影响

在以甘油作为唯一碳源的基础上, 考察了不同浓度的甘油对菌体生长的影响, 结果如图 1 所示。

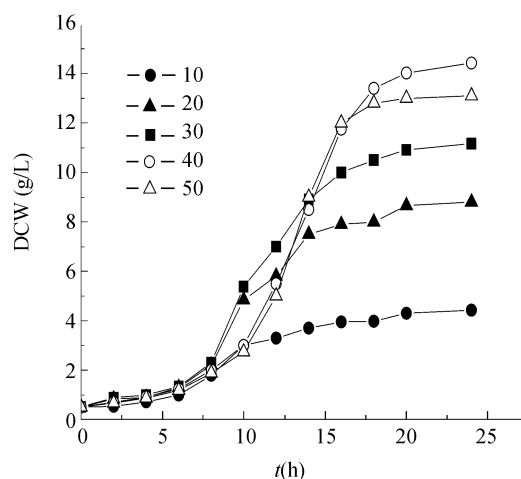


图 1 不同初始甘油浓度下细胞生长曲线

Fig. 1 Time courses of cell growth under various initial glycerol concentration

当甘油浓度为 40 g/L 时, 菌体生长 24 h, 干重达 14.3 g/L。甘油消耗情况如图 2 所示。经计算细胞对甘油的得率( $Y_{X/Gly}$ )为 0.397 g/g。

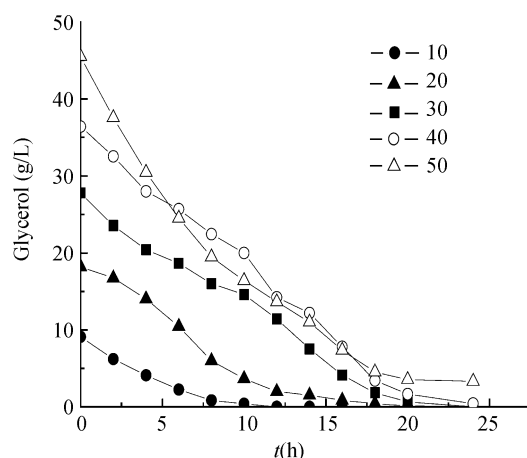


图 2 不同初始甘油浓度的消耗曲线

Fig. 2 Time courses of glycerol consumption under various initial glycerol concentration

## 2.2 诱导阶段甲醇对 PGL 表达的影响

**2.2.1 甲醇初始浓度对 PGL 表达的影响:** 离心收集初始甘油浓度 40 g/L 的 BMGY 中所有菌体, 转入 BMM 培养基进行甲醇诱导。作者以单位菌体所需的初始甲醇量(g 甲醇/g DCW)为指标考察甲醇对 PGL 表达的影响, 使初始甲醇浓度(g 甲醇/g DCW)分别为 1.7、2.1、2.4、2.8、3.1 和 3.5, 每 24 h 补加 1% 甲醇, 菌体的产酶情况见图 3。当初始甲醇浓度超过

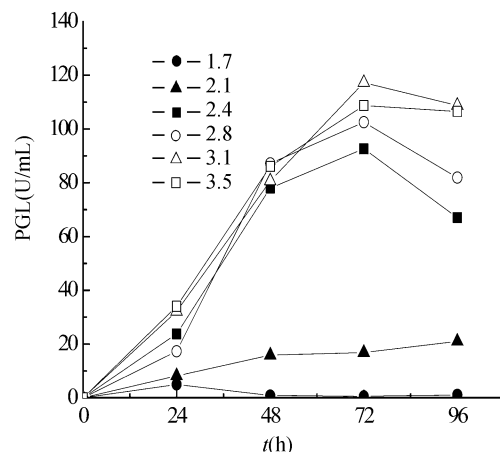


图 3 初始甲醇诱导强度对 PGL 生产的影响

Fig. 3 Effect of initial methanol concentration per biomass on PGL production

2.1 g 甲醇/g DCW 时, PGL 表达量急剧上升, 初始甲醇浓度为 3.1 g 甲醇/g DCW 时, PGL 的表达量最高, 72 h 达到 117.2 U/mL。

**2.2.2 过程补加甲醇对 PGL 诱导表达的影响:** 控制初始甲醇浓度为 3.1 g 甲醇/g DCW, 每 24 h 补加 1 次甲醇, 补加量(g 甲醇/g DCW)分别为 0.34、0.51、0.68、0.85 和 1.02, 结果见图 4。当甲醇补加量为 0.51 g 甲醇/g DCW 时酶活最高, 达 121 U/mL。对体系中残余的甲醇浓度进行测定, 结果见图 5。当甲醇补加量为 0.51 g 甲醇/g DCW 时, 残余甲醇浓度为 0.2 g 甲醇/g DCW ~1.0 g 甲醇/g DCW; 而当甲醇补

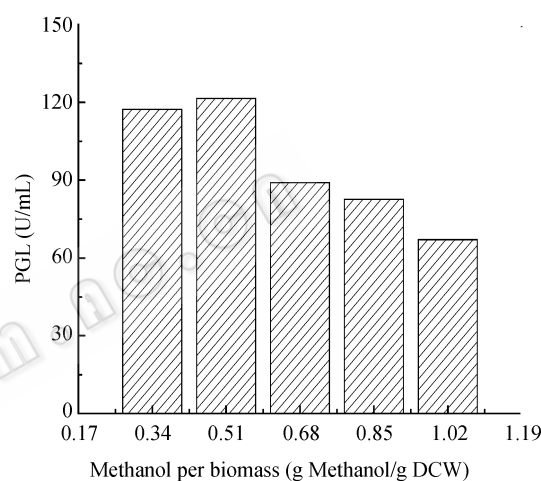


图 4 单位菌体的甲醇过程补加量对 PGL 表达的影响

Fig. 4 Effect of methanol supplementation amount per biomass on PGL production

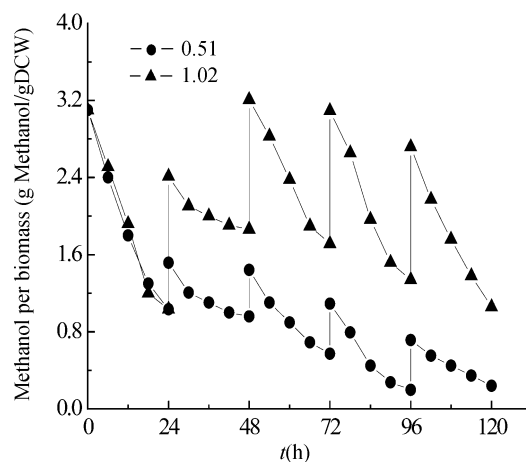


图 5 不同甲醇补加浓度下的过程消耗曲线

Fig. 5 Time courses of methanol consumption of different supplementation amount per biomass

加量为 1.02 g 甲醇/g DCW 时, 甲醇残余量过高, 严重抑制了 PGL 的高效表达。

**2.2.3 甲醇诱导时间对菌体生长和 PGL 表达的影响:** 控制单位菌体所需初始甲醇浓度为 3.1 g 甲醇/g DCW, 每 24 h 添加 0.51 g 甲醇/g DCW, 结果见图 6。甲醇诱导 12 h 内, PGL 的表达量增加较缓慢, 随后迅速增长, 72 h 表达量达到最高, 为 125 U/mL; 诱导延长至 120 h, PGL 表达量下降明显。整个诱导过程中, 菌体生长缓慢, 平均比生长速率仅为  $0.004 \text{ h}^{-1}$ 。

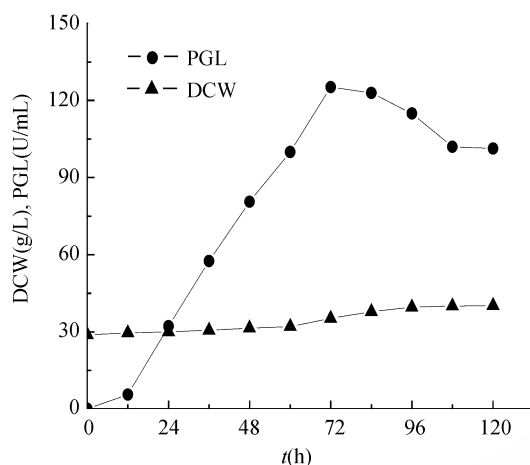


图 6 诱导过程中细胞生长和 PGL 生产曲线

Fig. 6 Time courses of cell growth and PGL production in induction phase

## 2.3 环境条件对 PGL 表达的影响

**2.3.1 初始 pH 对 PGL 表达的影响:** 控制体系起始 pH 值分别为 3.0、4.0、5.0、6.0、7.0 和 8.0, 初始甲醇浓度 3.1 g 甲醇/g DCW、每 24 h 添加 0.51 g 甲醇/g DCW、诱导表达周期 72 h, 结果见表 1。当初始 pH 值 6.0 时, PGL 表达量最高; 随着起始 pH 值的继

表 1 不同初始 pH 对 PGL 表达的影响  
Table 1 PGL production at various initial pH

Initial pH	Final pH	PGL (U/mL)
3.0	2.96	68.9
4.0	3.81	89.6
5.0	4.48	120.8
6.0	5.82	126.7
7.0	6.38	118.9
8.0	6.22	118.1

续升高, PGL 的表达量降低。当发酵结束时, 体系中的 pH 值均有所下降。

**2.3.2 装液量对 PGL 表达的影响:** 250 mL 三角瓶中分别装入 15 mL、20 mL、25 mL、30 mL、40 mL、50 mL 和 100 mL BMMY 培养基, 控制初始甲醇浓度为 3.1 g 甲醇/g DCW, 每 24 h 补加 0.51 g 甲醇/g DCW, 诱导周期为 72 h, 初始 pH 6.0, 结果见图 7。装液量对 *P. pastoris* GS115 表达 PGL 影响显著。当装液量 30 mL 时 PGL 表达量最高, 为 130.6 U/mL。而当装液量为 100 mL 时, PGL 表达量仅 67.1 U/mL。

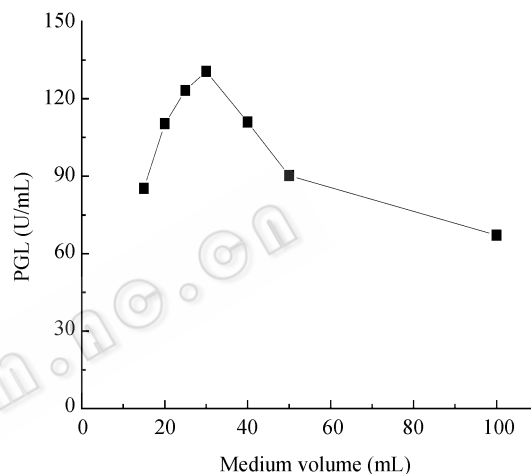


图 7 装液量对 PGL 表达的影响

Fig. 7 Effect of medium volume on PGL expression

## 2.4 7 L 罐高密度发酵生产碱性果胶酶

多数情况下胞外重组蛋白的浓度粗略地正比于细胞浓度<sup>[11]</sup>, 所以高密度发酵是 *P. pastoris* 表达外源蛋白的普遍策略<sup>[12, 13]</sup>。分批发酵结束后, 继续恒速流加(10 mL/h)甘油 12 h, 细胞干重达 60 g/L。诱导前期将甲醇流速由 3 mL/h 逐渐增至 24 mL/h, 体系中残余甲醇浓度逐渐增加, 诱导 25 h, PGL 迅速增加至 135 U/mL(而最佳摇瓶条件下诱导 72 h 仅为 130.6 U/mL), 菌体比生长速率和比产酶速率均迅速增加至  $0.015 \text{ h}^{-1}$  和  $0.175 \text{ U/mL/g/L/h}$ , 如图 8(A, B)。诱导后期为避免甲醇过量而改用 DO-stat 法流加甲醇(如图 8(C)), PGL 继续增加, 而菌体比生长速率和比产酶速率开始下降。发酵结束时, 菌体干重达到 80 g/L, PGL 产量为 217 U/mL。相较于摇瓶水平, PGL 产量提高 66.2%。

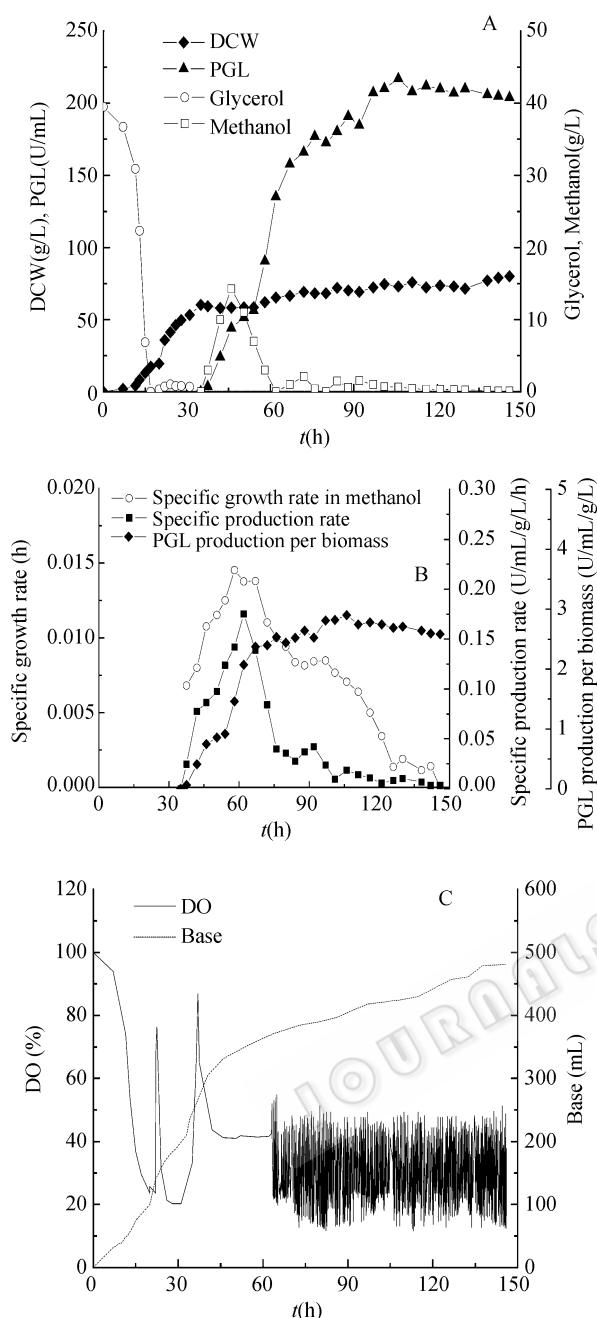


图 8 7 L 罐高密度生产 PGL 发酵过程曲线与相关参数变化曲线

Fig. 8 Time courses of PGL production in 7 L fermentor and profiles of fermentation parameters

## 参 考 文 献

- [1] 丁凤平, 张秀芝. 碱性果胶酶 PATE 及其测定方法. 中国生化药物杂志, 1993, **64**: 42–43.
- [2] Hoondal GS, Tiwari RP, Tewari R, *et al.* Microbial alkaline pectinases and their industrial applications: a review. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2002, **59**: 409–418.
- [3] Jing Z, Gunnar H, Gunnar J. Polygalacturonase is the key component in enzymatic retting of flax. *J Biotechnol*, 2000, **81**: 85–89.
- [4] 张健红, 李 寅, 刘 和, 等. 一株碱性果胶酶高产细菌的分离、系统发育分析和产酶条件的初步优化. 应用与环境生物学报, 2005, **11**: 354–358.
- [5] 钟卫鸿, 王启军, 岑沛霖. 螺孢菌 ZG9901 的筛选及其产碱性果胶酶发酵条件研究. 应用与环境生物学报, 2005, **6**: 468–472.
- [6] Matsumoto T, Katsura D, Kondo A, *et al.* Efficient secretory overexpression of *Bacillus subtilis* pectate lyase in *Escherichia coli* and single-step purification. *Biochem Eng J*, 2002, **12**: 175–179.
- [7] Bekri MA, Desair J, Keijers V, *et al.* *Azospirillum irakense* produces a novel type of pectate lyase. *J Bacteriol*, 1999, **181**: 2440–2447.
- [8] Jungo C, Marison I, von Stockar U. Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. *J Biotechnol*, 2007, **128**: 824–837.
- [9] Pal Y, Khushoo A, Mukherjee KJ. Process optimization of constitutive human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (hGM-CSF) expression in *Pichia pastoris* fed-batch culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **69**: 650–657.
- [10] Lee CY, Lee SJ, Jung KH, *et al.* High dissolved oxygen tension enhances heterologous protein expression by recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem*, 2003, **38**: 1147–1154.
- [11] Stratton J, Chiruvolu V, Meagher M. High cell-density fermentation. *Methods in Molecular Biology*, 1998, **103**: 107–120.
- [12] Khatri NK, Hoffmann F. Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **93**: 871–879.
- [13] Lim HK, Choi SJ, Kim KY. Dissolved-oxygen-stat controlling two variables for methanol induction of rGuamirin in *Pichia pastoris* and its application to repeated fed-batch. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2003, **62**: 342–348.