

共表达伴侣蛋白对重组毕赤酵母产米根霉 (*Rhizopus oryzae*)脂肪酶发酵过程的影响

卢鑫 喻晓蔚 沙冲 范文来 徐岩*

(工业生物技术教育部重点实验室 江南大学 酿酒微生物与酶技术研究室 江苏 无锡 214122)

摘要: 【目的】通过共表达伴侣蛋白 Ero1p 和 PDI 获得米根霉(*Rhizopus oryzae*)脂肪酶在毕赤酵母中的高效表达。【方法】利用毕赤酵母基因重组菌高密度发酵的方法,在 7 L 发酵罐水平上分析共表达伴侣蛋白菌株(BH128)与非共表达伴侣蛋白菌株(H238)对脂肪酶表达的差异。【结果】在相同条件下,BH128 发酵产酶能力高于 H238,最高酶活可达到 2 338.7 U/mL,最大比生长速率达到 0.02 h^{-1} ,最大产物比形成速率达到 $944.5\text{ U}/(\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h})$,最大底物比消耗速率也能达到 $0.15\text{ g}_{\text{methanol}}/(\text{g}_{\text{DCW}}\cdot\text{h})$,分别是 H238 的 1.7、0.5、4.1 和 1.3 倍,且发酵周期缩短了 20 h。【结论】毕赤酵母基因重组菌 BH128 通过共表达伴侣蛋白 Ero1p 和 PDI,提高了米根霉脂肪酶的产量,而且缩短了发酵周期,为工业化生产奠定了基础。

关键词: 米根霉脂肪酶, 高效表达, 毕赤酵母, 高密度发酵, 共表达伴侣蛋白

Effect of co-expression of chaperones on *Rhizopus oryzae* recombinant lipase production in *Pichia pastoris*

LU Xin YU Xiao-Wei SHA Chong FAN Wen-Lai XU Yan*

(Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, School of Biotechnology, Jiangnan University, Center for Brewing Science and Enzyme Technology, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: [Objective] The aim of this study is to improve the yield of *Rhizopus oryzae* lipase

基金项目: 国家 973 计划项目(No. 2011CB710800); 国家 863 计划项目(No. 2012AA022207, 2010AA101501); 中央高校基本科研业务费专项资金(No. JUSRP11014); 国家自然科学基金项目(No. 20802027)

*通讯作者: Tel: 86-510-85918201; 邮箱: yxu@jiangnan.edu.cn

收稿日期: 2012-05-12; 接受日期: 2012-09-04

in *Pichia pastoris* by co-expression of chaperones. **[Methods]** By high-density fermentation in 7 L bioreactor, the expression of lipase in strain BH128 co-expressed with two chaperones Ero1p and PDI was compared with that of H238 co-expressed without any chaperone. **[Results]** The results showed that the highest lipase activity, the specific growth rate, the specific production rate and the specific consumption rate in BH128 reached 2 388.7 U/mL, 0.02 h^{-1} , 944.5 U/(g_{DCW}·h) and 0.15 g_{methanol}/(g_{DCW}·h), which is 1.7, 0.5, 4.1 and 1.3 fold higher than those in H238, respectively. Moreover, the fermentation period in BH128 was 20 hours shorter than in H238. **[Conclusion]** The high-level expression of *Rhizopus oryzae* lipase could be achieved by co-expression of chaperones Ero1p and PDI, which provided the potential application of *Rhizopus oryzae* lipase in industry.

Keywords: *Rhizopus oryzae* lipase, High level expression, *Pichia pastoris*, High density fermentation, Co-expression of chaperones

脂肪酶(Triacylglycerol acylhydrolase, Lipase EC3.1.1.30), 又称甘油三酯水解酶, 可催化酯化反应、醇解反应、氨解反应等^[1-2]。在有机溶剂中稳定性好, 具有高度的位置选择性和异构体选择性^[3], 且米根霉脂肪酶已广泛应用于食品加工、新型生物材料、生物医学、手性药物拆分等领域^[4-5]。但野生型菌株米根霉脂肪酶产量低下、酶活力不高, 应用成本偏高、工业化生产困难。

毕赤酵母是目前应用最为广泛的一种真核表达系统, 已有超过 500 种外源蛋白在其中获得表达^[6]。毕赤酵母为单细胞真核生物, 生长快, 易于分子遗传学操作; 包含强启动子醇氧化酶 1 (AOX1), 适于外源基因的高水平诱导表达, 蛋白可翻译后修饰, 产物可分泌, 利于进行大规模液态发酵^[7]。

不同外源蛋白的表达需要不同的发酵工艺条件, 可以从基础培养基、补料、溶氧、温度、甲醇浓度、初始诱导菌体浓度等多个方面进行优化。Minning 等^[8-9]首先实现了成熟脂肪酶在毕赤酵母中的表达, 并且测定了脂肪酶的酶学性质, 通过优化发酵条件, 使脂肪酶活力可达到 1 334.0 U/mL, 达到了米根霉脂肪酶活力的国际

领先水平。但与此同时, 一些关键问题应运而生, 如高耗氧、高产热、后期传质效率低、发酵周期长等。针对这些问题, 国内外学者多通过优化发酵工艺等手段进行改进, 如改变培养基配方、调节菌体生长方式、添加双碳源流加等^[10-11]。这些方法虽然能在一定程度上提高外源蛋白的分泌, 但却只是利用被动的手段进行调节, 对工程菌内部的变化未加以主动的干预, 导致其应用范围较窄, 使用效果较差。

分子伴侣的概念早在 1978 年被 Laskey 等^[12]提出, 它能够帮助蛋白质正确折叠, 提高外源蛋白表达量, 从而逐渐被众多学者所关注。Smith 等^[13]利用基因工程手段增加内质网内分子伴侣 Kar2p (结合蛋白)和蛋白质二硫键异构酶(Protein disulfide isomerase, PDI)的量, 使得 β -葡萄糖苷酶在酿酒酵母中的表达量提高了 60%; Damasceno 等^[14]在毕赤酵母中表达 A33 单链抗体 (A33scFv)的同时, 高效共表达免疫球蛋白重链结合蛋白 Bip, 结果使得 A33scFv 表达分泌量提高了 2 倍左右。

本文以期利用毕赤酵母高密度发酵、共表达伴侣蛋白来实现米根霉脂肪酶的高效表达, 为工

业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株、试剂和培养基

1.1.1 菌种: 表达米根霉脂肪酶的巴斯德毕赤酵母基因工程菌 H238 (非共表达伴侣蛋白)、BH128 (共表达伴侣蛋白: 氧化还原蛋白 1-Ero1p, 蛋白质二硫键异构酶-PDI), 均为实验室保藏。

1.1.2 培养基: 种子培养基(BMGY 培养基, g/L): 蛋白胨 20.0, 酵母提取物 10.0, YNB 13.4, 甘油 10.0, 500×生物素 2.0 mL, pH 6.0 磷酸缓冲液 100.0 mL。用 250 mL 的三角瓶培养, 装液量 20%。

基础盐培养基(BSM, g/L): 85% H_3PO_4 28.70 mL, CaSO_4 0.93, K_2SO_4 18.20, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14.90, KOH 4.13。用 BSM 基础盐配制成含 4% (W/V)甘油和 4 mL 微量元素 PTM₁ 的溶液。

补料生长培养液: 50%甘油(W/V, 含 12 mL/L 的 PTM₁)补料液。

诱导培养液: 100%甲醇(含 12 mL/L 的 PTM₁)诱导液。

PTM₁ (g/L): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6.00, KI 0.08, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.00, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.20, H_3BO_3 0.02, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 42.20, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 65.00, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.50, Biotin 0.20, H_2SO_4 5.00 mL。

1.1.3 主要试剂: 考马斯亮蓝 G-250、DTT、 β -巯基乙醇、丙烯酰胺、N,N-亚甲基双丙烯酰胺和牛血清蛋白 BSA, 均从中国医药集团上海化学试剂公司购置。其他所用试剂均为国产分析纯或化学纯。

1.2 实验方法

1.2.1 种子培养: 取生长良好的平板菌种两环, 接种至种子培养基中, 培养约 20 h, 至 OD_{600} 为 2–6 之间结束培养。

1.2.2 发酵培养: 配制 2.5 L 基础盐培养基置于 7 L 发酵罐内, 插入 DO 电极与 pH 电极(已标定), 接入空气过滤器, 包扎好后在蒸汽灭菌锅内

1×10^5 Pa 灭菌 20 min。取出冷却至 30 °C, 通入空气, 闭环控制, 用 25%氨水调节 pH。火焰接种, 调节转速、温度、空气流量、罐压等进行分批发酵。pH 受闭环控制, 自动流加氨水控制其维持在设定值, 并不断加大通气量或混合通纯氧与转速来维持菌体生长所需的 DO。当基础料中的底物甘油耗尽后, 此时 DO 急剧上升, 维持 30 min 后开始流加 50%甘油(W/V, 含 12 mL/L 的 PTM₁), 调节流加速率控制 DO 维持在 30%左右。

当起始菌体浓度达到 36 g/L 左右时, 停止补加甘油, 维持饥饿状态 30 min, 让甘油彻底耗尽。开始进入甲醇诱导阶段, 向发酵液中流加含有一定体积 PTM₁ 溶液的甲醇, 维持甲醇浓度在 $0.1\% \pm 0.02\%$ (V/V)^[15] 左右, 控制 DO 维持在 10%–20%之间, 诱导脂肪酶基因的表达。

1.2.3 甲醇浓度检测: FC-2002 甲醇检测流加控制器(华东理工大学研制)在线显示和控制甲醇浓度。

1.2.4 生物量检测: 采用细胞干重(Dry cell weight, DCW)计算生物量。

1.2.5 脂肪酶水解活力测定方法: 对硝基苯酚棕榈酸酯(pNPP)法, 详见参考文献[16]。酶活定义为: 一定反应条件下每分钟产生 1 μmol 对硝基苯酚的酶量为一个脂肪酶水解酶活国际单位。

1.2.6 总蛋白含量测定: 考马斯亮蓝法, 详见参考文献[17]。

2 结果与讨论

2.1 共表达伴侣蛋白对产酶和菌体生长的影响

对菌株 H238 与 BH128 在 7 L 罐中进行米根霉脂肪酶的发酵调控, 其菌体生长和产酶过程如图 1 所示: BH128 菌体终浓度可达到 152.4 g/L, 最高酶活为 2 338.7 U/mL, 分别为 H238 的 0.8、1.7 倍; 且两者的最高酶活均在最大菌体浓度时出现, 由此说明菌体浓度与酶活存在正相关效

应;但是从图 1 中又可以看出,在相同发酵时间内, H238 的菌体浓度始终略高于 BH128, 而脂肪酶酶活增长的速度与幅度却远低于 BH128, 最高单位菌体酶活仅为其 0.4 倍, 这也说明了并不是菌体浓度越大, 外源蛋白的表达量就越高。

如图 2 所示, 从诱导 8 h 开始到发酵结束, BH128 分泌表达的总蛋白量始终高于 H238, 最高蛋白浓度可达到 2.4 g/L, 比 H238 高出了 0.6 g/L, 这与脂肪酶酶活的高低是相一致的。而且在发酵 40 h 之后, BH128 的比活力明显高于 H238。

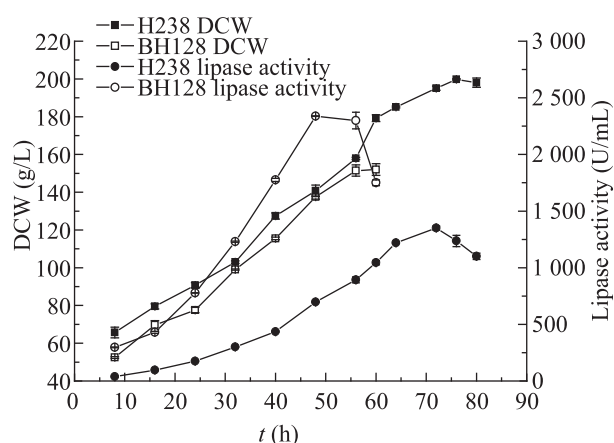


图 1 共表达伴侣蛋白对发酵产酶和菌体生长的影响
Fig. 1 Effects of co-expression of chaperones on the enzyme production and the cell growth

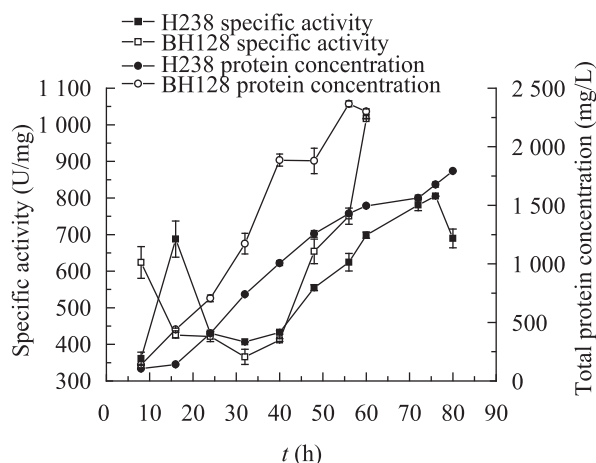


图 2 共表达伴侣蛋白对比活力和总蛋白浓度的影响
Fig. 2 Effects of co-expression of chaperones on the specific activity and total protein concentration

2.2 共表达伴侣蛋白对发酵过程的影响分析

如图 3 所示, 两者的菌体比生长速率均随着发酵的进行而急剧下降。分析其原因, 是由于当发酵进入诱导相之后, 维持菌体生长的碳源由甘油转变为甲醇, 而甘油较甲醇更利于细胞的生长。结合图 1、图 3 发现, 在相同的发酵周期内, 两者的菌体浓度与菌体比生长速率均维持在同一水平, 表明共表达伴侣蛋白对细胞生长影响较小。

虽然两者的菌体比生长速率很接近, 但为什么从图 4 中我们看到 BH128 的最高产物比生成速率(944.5 U/g_{DCW}·h)却远高于 H238 (232.1 U/g_{DCW}·h)呢? 这是由于共表达伴侣蛋白能够促进蛋白质的快速正确折叠, 减少重排或错误配对所引起的蛋白降解^[18], 使得外源蛋白可在短时间内达到较高的表达量。正如图 1 所示, 当发酵进行到 24 h 时, 米根霉脂肪酶酶活出现指数上升(BH128), 在 56 h 时达到最高, 与图 2 中的总蛋白浓度和比增长是相一致的, 同时也缩短了发酵周期。此结果表明添加了共表达伴侣蛋白 Ero1p 和 PDI 之后, 可以显著提高产物的时空表达率。

在整个发酵过程中, BH128 的底物比消耗速率较 H238 高(图 4), 这是因为影响它的关键因素是底物消耗量、菌体浓度以及发酵时间; 而在相

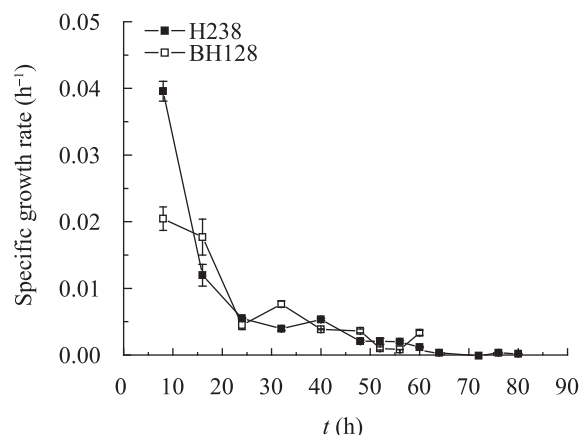


图 3 共表达伴侣蛋白对菌体比生长速率的影响
Fig. 3 Effects of co-expression of chaperones on the specific growth rate

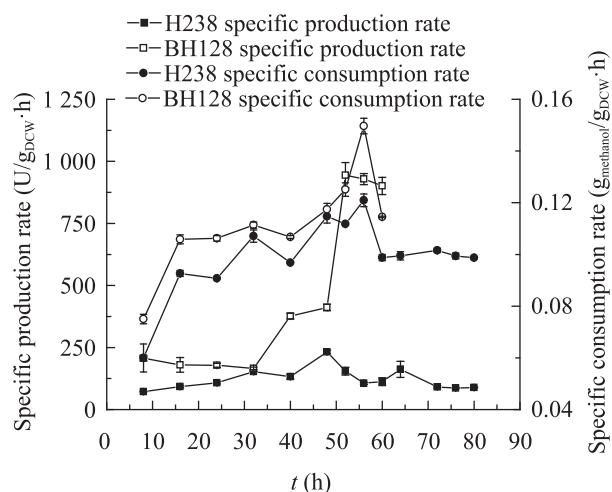


图4 共表达伴侣蛋白对发酵过程参数的影响

Fig. 4 Effects of co-expression of chaperones on the fermentation parameters

同时空内, 由于两者的菌体浓度较接近, 所以底物的消耗量成为其决定因素。同时, 酶活与底物的消耗量存在正比关系, 因此, 高酶活是通过底物的高效利用来实现的, 这也就说明了BH128在维持菌体正常生长的同时, 会利用更多的底物来合成外源蛋白, 最终获得米根霉脂肪酶的高效表达。

3 讨论

综上所述, 毕赤酵母基因重组菌通过添加共表达伴侣蛋白 Ero1p 和 PDI, 提高了外源蛋白的时空产率, 使得米根霉脂肪酶酶活获得较大提升。那么造成这一现象的机理是什么呢?

在真核细胞中, 大部分分泌和跨膜蛋白以未折叠的肽段形式进入内质网, 并在其腔内折叠和成熟, 同时被主动运出, 这就形成了一种动态平衡; 但如果未折叠蛋白在内质网中过量积累, 将会超出细胞的处理能力, 从而打破这种平衡, 激发胞内 UPR 效应^[19-20]。这种效应会激活胞内转录因子 *HAC1* mRNA 的非常规剪接反应, 翻译形成 Hac1p, 而 Hac1p 又会激活相关伴侣蛋白、折叠因子等基因的转录翻译。如果这种内稳态不能

重新恢复, 那么细胞死亡就会被激活, 进而导致外源蛋白表达量或酶活下降。

在酵母细胞内部, 伴侣蛋白能够促进内质网中蛋白的折叠效率^[21], 加强细胞处理未折叠蛋白的能力, 减缓胞内 UPR 效应, 增强新生肽段在内质网中的折叠能力(主要是二硫键的形成)。目前国际上普遍认同的内质网折叠机制如图5所示^[20]。首先, 氧化型的 Ero1p 将还原型的 PDI 氧化形成二硫键, 氧化型的 PDI 随后又将二硫键传递给未折叠的新生肽链, 最后在异构酶的作用下形成蛋白质的自然构象。其主要是通过 PDI 来介导氧化平衡物从 Ero1p 传递到折叠底物, 这种氧化平衡物的动态穿梭能促进内质网内二硫键的快速形成, 进而促使外源蛋白能够在较短的发酵周期内获得高效表达^[18]。

国内外已有学者通过添加伴侣蛋白的方法提高外源蛋白的表达量^[13-14], 但主要是共表达单个伴侣蛋白, 没有考虑氧化折叠途径中各个伴侣蛋白之间的系统联系。而本研究正是在系统分析内质网中 Ero1p 介导的氧化折叠模型的基础上, 首次将内质网中氧化折叠途径中的两种关键伴侣蛋白 Ero1p 和 PDI 共表达, 从而在 7 L 发酵罐水平上实现了米根霉脂肪酶的高效表达。

共表达伴侣蛋白 Ero1p 和 PDI 的添加, 加速了内质网中脂肪酶的折叠效率, 削弱了胞内 UPR 效应, 促进未成熟脂肪酶二硫键的快速形成, 最终在异构酶的作用下, 实现了成熟脂肪酶的快速生成。正如图1所示, 从 24 h 开始, 共表达伴侣蛋白基因工程菌 BH128 脂肪酶酶活的增长呈现急剧上升的趋势, 在 56 h 时达到最高(2 338.7 U/mL), 相比于 H238 不仅酶活获得了提高(1 350.0 U/mL), 而且发酵周期也缩短了 20 h; 同时产物的比形成速率、底物的比消耗速率也都有相应的提升(图4), 充分体现了共表达伴侣蛋白在提高米根霉脂肪酶时空产率上的优势。

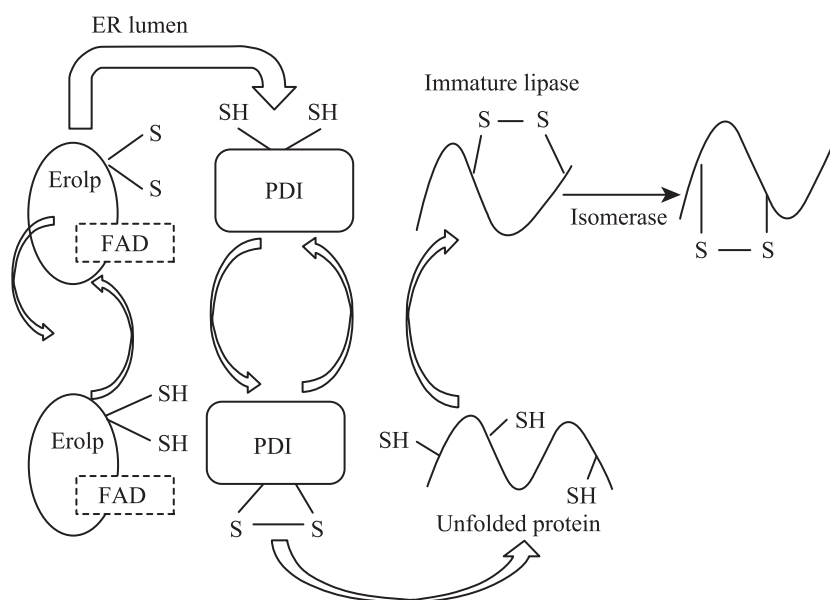


图5 内质网中 Ero1p 介导的氧化折叠模型
Fig. 5 The oxidative folding model of Ero1p in ER

本研究主要分析了共表达伴侣蛋白对米根霉脂肪酶表达的影响。首次在毕赤酵母中成功添加了两种对二硫键形成有促进作用的伴侣蛋白 Ero1p 和 PDI, 并在 7 L 发酵罐水平上实现了米根霉脂肪酶的高效表达, 不仅极大缩短了发酵周期, 而且最高酶活可达到 2 338.7 U/mL, 为米根霉脂肪酶的工业化奠定了基础。

参考文献

- [1] Davis BG, Boyer V. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis[J]. Natural Product Reports, 2001, 18(6): 618-640.
- [2] Pandey A, Benjamin S, Soccol CR, et al. The realm of microbial lipases in biotechnology[J]. Biotechnology and Applied Biochemistry, 1999, 29(2): 119-131.
- [3] Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology[J]. Trends in Biotechnology, 1998, 16(9): 396-403.
- [4] Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(4): 390-397.
- [5] Qian Z, Lutz S. Improving the catalytic activity of *Candida antarctica* lipase B by circular permutation[J]. Journal of the American Chemical Society, 2005, 127(39): 13466-13467.
- [6] Damasceno LM, Pla I, Chang HJ, et al. An optimized fermentation process for high-level production of a single-chain Fv antibody fragment in *Pichia pastoris*[J]. Protein Expression and Purification, 2004, 37(1): 18-26.
- [7] Xie JL, Zhang L, Qin Y, et al. Angiostatin production in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* fed with mixed carbon sources[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25(2): 173-177.
- [8] Minning S, Schmidt-Dannert C, Schmid RD. Functional expression of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*: high-level production and some properties[J]. Journal of Biotechnology, 1998, 66(2/3): 147-156.
- [9] Minning S, Serrano A, Ferrer P, et al. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*[J]. Journal of Biotechnology, 2001, 86(1): 59-70.
- [10] Solà A, Jouhten P, Maaheimo H, et al. Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol/methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates[J]. Microbiology, 2007, 153(1): 281-290.

- [11] Hu XQ, Chu J, Zhang SL, et al. A novel feeding strategy during the production phase for enhancing the enzymatic synthesis of *S*-adenosyl-L-methionine by methylotrophic *Pichia pastoris*[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 2007, 40(4): 669–674.
- [12] Laskey RA, Honda BM, Mills AD, et al. Nucleosomes are assembled by an acidic protein which binds histones and transfers them to DNA[J]. *Nature*, 1978, 275(5679): 416–420.
- [13] Smith JD, Tang BC, Robinson AS. Protein disulfide isomerase, but not binding protein, overexpression enhances secretion of a non-disulfide-bonded protein in yeast[J]. *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 85(3): 340–350.
- [14] Damasceno LM, Anderson KA, Ritter G, et al. Cooverexpression of chaperones for enhanced secretion of a single-chain antibody fragment in *Pichia pastoris*[J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2007, 74(2): 381–389.
- [15] 李飞, 喻晓蔚, 沙冲, 等. 基因拷贝数和甲醇浓度对重组毕赤酵母产米根霉脂肪酶的影响[J]. *微生物学通报*, 2011, 38(3): 301–309.
- [16] Pencreac'h G, Baratti JC. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl palmitate in *n*-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: a simple test for the determination of lipase activity in organic media[J]. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18(6): 417–422.
- [17] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [18] Gasser B, Saloheimo M, Rinas U, et al. Protein folding and conformational stress in microbial cells producing recombinant proteins: a host comparative overview[J]. *Microbial Cell Factories*, 2008, 7(1): 11–29.
- [19] Zito E, Chin KT, Blais J, et al. ERO1- β , a pancreas-specific disulfide oxidase, promotes insulin biogenesis and glucose homeostasis[J]. *Journal of Cell Biology*, 2010, 188(6): 821–832.
- [20] Guerfal M, Ryckaert S, Jacobs P P, et al. The *HAC1* gene from *Pichia pastoris*: characterization and effect of its overexpression on the production of secreted, surface displayed and membrane proteins[J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9(1): 49–61.
- [21] Sinha J, Plantz BA, Zhang WH, et al. Improved production of recombinant ovine interferon- τ by Mut⁺ strain of *Pichia pastoris* using an optimized methanol feed profile[J]. *Biotechnology Progress*, 2003, 19(3): 794–802.

编辑部公告**《微生物学通报》英文刊名**

《微生物学通报》之前使用的英文刊名“Microbiology”因在国际上有重名,造成了本刊在被国内外作者引用以及国外数据库收录时英文刊名的混乱,这大大影响了本刊在国际上的传播,也不利于对我刊引用数据的统计。经本届编委会讨论,以及主办单位批准,本刊英文刊名自 2010 年起变更为“Microbiology China”,缩写为“Microbiol. China”,请各位作者、读者和数据库引用时注意使用。