



研究报告

费希尔曲霉脂肪酶在毕赤酵母中的优化表达及高密度发酵

马红丽^{1,3} 付晓平¹ 郑雯² 徐健勇^{1,2} 郑宏臣^{*1,2,3} 宋诤^{*1,2,3}

1 中国科学院天津工业生物技术研究所 工业酶国家工程实验室 天津 300308

2 中国科学院天津工业生物技术研究所 天津市工业生物系统与过程工程重点实验室 天津 300308

3 中国科学院大学 北京 100049

摘要:【背景】脂肪酶广泛应用于纺织、食品、药品、皮革等工业领域,其在微生物中的异源表达研究进一步促进了脂肪酶产品的生产和应用。【目的】实现来源于费希尔曲霉的脂肪酶在毕赤酵母中的高效异源表达,探究其合适的表达及发酵条件,提高产量,降低成本。【方法】对费希尔曲霉的脂肪酶编码基因进行密码子优化后,应用 pPIC9k 质粒整合到毕赤酵母 GS115 基因组上,构建高产脂肪酶 Lip605 的毕赤酵母工程菌;并通过响应面发酵条件优化、筛选最适伴侣蛋白和高密度发酵相结合的方法,综合提高脂肪酶表达量。【结果】确定高产脂肪酶毕赤酵母工程菌的最优摇瓶发酵产酶条件为:甲醇 3.103% (体积比),生物素 0.4 mg/L,酵母粉 11.5 g/L,酵母基础氮源培养基(yeast nitrogen base, YNB) 13.4 g/L,初始 pH 6.4,装液量 50 mL/250 mL,转速 220 r/min,温度 24 °C,培养时间 40 h。优化后的胞外脂肪酶酶活达到 72.34 U/mL,较优化前提高了 5.8 倍;进一步选择 12 个伴侣蛋白分别与脂肪酶 Lip605 进行共表达,其中共表达伴侣蛋白 Rpl10 (pPICZA-RPL10)效果最佳,可使 Lip605 表达量进一步提高 46.8%;在此基础上,经过 10 L 发酵罐分批补料的高密度发酵,工程菌株发酵 142 h,胞外脂肪酶酶活最高达到 680 U/mL,蛋白浓度为 15.89 g/L。【结论】应用复合策略有效提高了脂肪酶 Lip605 在毕赤酵母中的发酵产量,为其进一步工业化生产奠定了良好的基础。

关键词: 毕赤酵母, 脂肪酶 Lip605, 响应面, 共表达, 伴侣蛋白, 高密度发酵

Foundation items: National Natural Science Foundation of China (31701534); Tianjin Synthetic Biotechnology Innovation Capacity Improvement Project (TSBICIP-KJGG-006)

***Corresponding authors:** Tel: 86-22-84861934

E-mail: ZHENG Hong-Chen: zheng_hc@tib.cas.cn; SONG Hui: song_h@tib.cas.cn

Received: 02-03-2020; **Accepted:** 06-05-2020; **Published online:** 21-05-2020

基金项目: 国家自然科学基金(31701534); 天津市合成生物技术创新能力提升行动计划(TSBICIP-KJGG-006)

***通信作者:** Tel: 022-84861934

E-mail: 郑宏臣: zheng_hc@tib.cas.cn; 宋诤: song_h@tib.cas.cn

收稿日期: 2020-03-02; **接受日期:** 2020-05-06; **网络首发日期:** 2020-05-21

Optimized expression and high-density fermentation of *Aspergillus fischeri* lipase in *Pichia pastoris*

MA Hong-Li^{1,3} FU Xiao-Ping¹ ZHENG Wen² XU Jian-Yong^{1,2}
ZHENG Hong-Chen^{*1,2,3} SONG Hui^{*1,2,3}

1 Industrial Enzymes National Engineering Laboratory, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

2 Tianjin Key Laboratory for Industrial Biological Systems and Bioprocessing Engineering, Tianjin Institute of Industrial Biotechnology, Chinese Academy of Sciences, Tianjin 300308, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: [Background] Lipase is widely used in textile, food, medicine, leather and other industrial fields. The study on the heterologous expression of lipase in microorganisms further promotes the production and application of lipase products. [Objective] To perform the efficient heterologous expression of lipase from *Aspergillus fischeri* in *Pichia pastoris*. Screening suitable strategies for expression and fermentation of the engineering strain to increase yield and reduce production cost of lipase. [Methods] After codon optimization of the lipase coding gene of *Aspergillus fischeri*, plasmid pPIC9k was used to integrate the codon optimized gene (*lip605*) into the genome of *Pichia pastoris* GS115 to construct an engineering strain for high yield of the recombinant lipase. The lipase expression was further increased by optimizing the fermentation conditions, screening the optimal chaperone protein and performing high-density fermentation, successively. [Results] The optimal fermentation conditions for the engineering strain with high lipase production in shake flask were determined as 3.103% (V/V) methanol, 0.4 mg/L biotin, 11.5 g/L yeast powder, and 13.4 g/L YNB; the initial pH was 6.4, the filling volume was 50 mL/250 mL, the speed was 220 r/min, the temperature was 24 °C, and the culture time was 40 h. After optimization, the activity of extracellular lipase reached 72.34 U/mL, which was 5.8 times higher than that of initial fermentation. Furthermore, 12 chaperones were selected for co-expression with Lip605, among which the co-expression of chaperone Rpl10 (pPICZA-*RPL10*) had the best effect, which further increased the expression of Lip605 by 46.8%. On this basis, after 142 h high-density fermentation with batch feeding in a 10 L fermenter, the maximum extracellular lipase activity reached 680 U/mL, with a protein concentration of 15.89 g/L. [Conclusion] In this paper, compound strategies were used to effectively improve the fermentation yield of lipase Lip605 in *Pichia pastoris*, which laid a good foundation for its further industrial production.

Keywords: *Pichia pastoris*, Lipase Lip605, Response surface, Co-expression, Chaperone proteins, High-density fermentation

脂肪酶(EC3.1.1.3)作为最常用的工业酶制剂之一, 其应用十分广泛^[1-3], 在传统的洗涤剂、食品、香料工业、化妆品、皮革制造、纺织生产和生物柴油等领域均具有重要应用^[4-5]。近年来, 脂肪酶在药品、酯类和氨基酸衍生物生产、精细化学品制造、生物传感器、生物修复等新兴领域也显示了很好的应用前景^[6-10]。

微生物脂肪酶来源广泛、性质多样, 但大多野生菌表达水平较低, 需要借助异源表达, 最常用的

异源表达系统包括大肠杆菌、枯草芽胞杆菌和毕赤酵母表达系统。Shao 等^[11]应用大肠杆菌表达重组脂肪酶基因 *lipPNI*, 经过优化包涵体复性, 最大脂肪酶酶活达到 1.662 U/mL; Ma 等^[12]在枯草芽胞杆菌中表达脂肪酶 LipA, 通过优化启动子等方法得到胞外脂肪酶酶活性为 180.3 U/mL 的工程菌株。与原核表达系统相比, 脂肪酶通常在毕赤酵母中的异源表达水平相对较高^[13-14]。2016 年 Sun 等^[15]将费希尔曲霉 P1 来源的脂肪酶 LIP09 在毕赤酵母

中进行了表达,经高密度发酵 7 d 后,采用以橄榄油为底物的碱滴定法测定其胞外脂肪酶酶活可达到 1 900 U/mL,胞外总蛋白为 2 g/L。据报道,费希尔曲霉 P1 为脂肪酶多产菌株,在其基因组中发现有 7 个脂肪酶编码基因,并分别在大肠杆菌中得到了异源表达,其中脂肪酶 LIP09 属于酸性热稳定脂肪酶,具有高度热稳定性,显示了较好的应用前景^[15]。

毕赤酵母表达系统作为最常用的真核表达系统具有诸多优点,如遗传操作简单、具有完善的蛋白加工修饰系统、强有力的醇氧化酶基因启动子保证了外源基因表达的高效性和稳定性等优点^[16-20]。目前,应用毕赤酵母表达系统提高脂肪酶表达量的研究较为广泛^[21-24]。陈飞等^[25]研究发现伴侣蛋白 PDI 与外源脂肪酶 CiP 在毕赤酵母中共表达,可使酶活表达量提高 2.43 倍,另外,伴侣蛋白 EroI 和 PDI 同时与 CiP 共表达可使毕赤酵母工程菌的胞外产酶提高 2.62 倍;卢俊裕等^[26]的实验证明了透明颤菌血血红蛋白 VHb 与外源基因共表达可以改善酵母在发酵过程中的摄氧情况,从而提高外源蛋白的表达量。

本研究通过响应面发酵条件优化和伴侣蛋白共表达相结合的策略逐级提高毕赤酵母工程菌的胞外脂肪酶表达量,并在 10 L 发酵罐中进行工程菌株的高密度发酵,以期进一步提升产酶水平,为脂肪酶 Lip605 的规模化生产奠定良好的基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒

毕赤酵母 GS115 菌株是中国科学院天津工业生物技术研究所以工业酶工程实验室保存。费希尔曲霉脂肪酶编码基因(XM_001261900.1)序列来源于费氏曲霉 NRRL 181,针对该基因进行密码子优化,优化后基因命名为 *lip605*,由武汉金开瑞生物工程有限公司合成质粒 pPIC9k-*lip605*。

1.1.2 主要试剂和仪器

限制性内切酶 *Sac* I, NEB 公司; DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒、酵母基因组提取试剂盒,天根生化科技(北京)有限公司; ProteinRuler® II (12–120 kD)、1 kb Plus DNA Ladder, 北京全式金生物技术有限公司; 引物合成以及 DNA 测序,北京擎科生物科技有限公司。

PCR 仪, Bio-Rad 公司; Eptoth 2TC 微孔板分光光度计,伯腾仪器有限公司; 全自动两联 10 L 发酵系统,上海保兴生物设备工程有限公司。

1.1.3 培养基

LB、YPD、BMGY、BMMY、BSM、MD 培养基均按照 Invitrogen 公司操作手册的推荐方法自行配制。PTM1 基本盐类溶液(g/L): 五水合硫酸铜 6.0, 碘化钠 0.08, 一水硫酸锰 3.0, 钼酸钠 0.2, 硼酸 0.02, 氯化钴 0.5, 硫酸锌 20.0, 七水硫酸亚铁 65.0, 生物素 0.4 mg, 硫酸 5.0 mL, 加蒸馏水定容到 1 L, 0.22 μ m 混合纤维素水相微孔滤膜过滤灭菌, 4 °C 保存; 甘油补料培养基(mL/L): 甘油 500, PTM1 12, 加入蒸馏水定容到 1 L, 1×10^5 Pa 高压蒸汽灭菌 30 min, 现用现配; 甲醇补料培养基: PTM1 12 mL, 用甲醇定容至 1 L, 室温保存。

1.2 方法

1.2.1 毕赤酵母产脂肪酶工程菌的构建

针对毕赤酵母表达系统,通过在线软件 Graphical Codon Usage Analyser (<http://gcua.schoedl.de/>)对不含信号肽的费希尔曲霉脂肪酶基因(XM_001261900.1)进行密码子优化,得到优化后脂肪酶基因 *lip605*。将 *lip605* 基因直接克隆到 pPIC9k 质粒的 α 因子信号肽下游,得到重组质粒 pPIC9k-*lip605*,该质粒由武汉金开瑞生物工程有限公司合成。随后重组质粒经 *Sac* I 线性化、DNA 回收,取 5 μ g 线性化产物电转到毕赤酵母 GS115 感受态细胞中,在 30 °C 培养箱中复苏 2 h,涂布于 MD 平板,在 30 °C 培养箱培养 3 d 后,挑取单克隆转化子,按照酵母基因组提取试剂盒的实验方法提取基因组进行 PCR 验证并测序,PCR 扩增引物和

测序引物均为 lip605-F (5'-GCTCCAGCTAAACCA GCA-3')和 lip605-R (5'-CTAGATGTGGAAGGAGT CGAC-3'), PCR 反应体系和条件按照王亭亭^[27]的方法进行, PCR 验证正确的转化子进行测序, 测序成功的转化子命名为 GS115 (pPIC9k-lip605)。

共表达伴侣蛋白的毕赤酵母工程菌构建: 选取 12 种伴侣蛋白编码基因, 分别为 *PDI*、*ERO1*、*KAR2*、*CPR6*、*RPL10*、*RPL38*、*RPL43*、*FES1*、*HAC1*、*SSA1*、*STL1* 和 *VGB*。其中除 *VGB* 基因为直接合成外, 其余均以毕赤酵母基因组为模板, 经 PCR 获得, PCR 引物序列见表 1, 将各基因分别连接在质粒 pPICZA (或 pPICZαA) 多克隆位点的相同位置。将以上各重组质粒电转到 GS115 (pPIC9k-lip605) 感受态细胞中。挑取单克隆用引物 test-F (5'-AATTGCGACTGGTTCCAATTGAC-3')和 test-R (5'-ATTCAGATCCTCTTCTGAGATGAGT-3') 进行 PCR 验证。验证并测序成功的菌株即为相应共表达伴侣蛋白的脂肪酶毕赤酵母工程菌株, 后续进行脂肪酶的表达检测。

表 1 获取伴侣蛋白基因的 PCR 引物

Table 1 PCR primers for obtaining chaperone genes

Primers name	Primers sequence (5'→3')
PDI-F	ATGCAATTCAACTGGAATATTAATAACT
PDI-R	TTAAAGCTCGTCGTGAGC
ERO1-F	ATGAGGATAGTAAGGAGCGTA
ERO1-R	TTACAAGTCTACTCTATATGTGGTATC
KAR2-F	ATGCTGTCGTAAAAACCAT
KAR2-R	TATCTACAACCTCATCATGATCATAGT
CPR6-F	ATGACTCCCCGTTCTCATATTTTCT
CPR6-R	GCTGCTTTGTCTAAGTTCTTTGAG
RPL10-F	ATGGCTAGAAGACCAGCT
RPL10-R	CTACGCCGAGGCTAATTAG
RPL38-F	ATGCCTAGACAAATCACTGATA
RPL38-R	ATTGAAGGTTACCAAGTTGTAG
RPL43-F	ATGTCTAAGAGAACTAAGAAGGTAGG
RPL43-R	AGAGATGGCTGAGGCATG
FES1-F	ATGGAGAAGCTACTCAAATGG
FES1-R	GATTTGAATACCATAAAGCAAGTACTT
HAC1-F	ATGCCCGTAGATTCTTCTCATAAGAC
HAC1-R	ACATGCATAGCGATCAGGTGA
SSA1-F	ATGCCAGCTGTCGGTATT
SSA1-R	AACTGTTGAGGAAGTCGATTAG
STL1-F	ATGTCATCTGAAGAATTCAAAGCC
STL1-R	GGTGTCAATCGTACTCGT

1.2.2 发酵培养

将成功构建的工程菌株通过平板划线法接种至 YPD 固体培养基中, 30 °C 恒温培养至单菌落出现, 挑取单克隆至 BMGY 培养基中, 30 °C、220 r/min 条件下培养 40 h 后, 4 °C、4 000 r/min 离心 10 min 菌液去上清, 利用 BMMY 吹悬菌体转移到等体积的 BMMY 培养基中, 加入终浓度为 2% (体积比) 的甲醇, 24 °C、220 r/min 条件下培养。每 24 h 取样 1 mL, 并添加终浓度为 2% (体积比) 的甲醇。将菌液样品离心后, 取 100 μL 上清用于脂肪酶酶活测定, 其余保存于 4 °C 用于 SDS-PAGE 蛋白电泳测定。

1.2.3 响应面发酵优化

(1) Plackett-Burman 试验: 选取蛋白胨含量、酵母粉含量、YNB 含量、甲醇添加量、生物素含量、BMGY 阶段培养时间、甘油含量、pH 和温度 9 个因素进行 Plackett-Burman 试验, 测定各试验组胞外脂肪酶酶活。另外, 补充温度的单因素试验, 温度分别选取 22、24、26、28、30 和 32 °C。

(2) Box-Behnken 设计: 从 Plackett-Burman 试验确定的影响酶活的 3 个重要因素分别为 *A* (酵母粉含量)、*B* (pH)、*C* (甲醇添加量)。利用 Design-Expert 软件进行 Box-Behnken 设计 3 因素 3 水平试验, 其他发酵条件保持一致。

1.2.4 脂肪酶酶活测定

脂肪酶酶活测定采用改良铜皂法, 以侯爱军等^[28]的方法为参考, 以一种新型铜皂法测定脂肪酶酶活, 用商用脂肪酶验证其准确性。具体方法如下:

取 100 μL 稀释到酶活约为 2–8 U/mL 的菌液上清加入 pH 5.0 的醋酸钠-醋酸缓冲溶液 (50 mmol/L) 250 μL, 60 °C 预热 5 min, 再加入 500 μL 同样 60 °C 预热 5 min 的橄榄油底物, 在 60 °C 水浴锅反应 10 min 后, 迅速加入 100 μL 6 mol/L 的 HCl 溶液终止反应, 混匀后加入 400 μL 异辛烷, 在多功能漩涡混合器上充分振荡 90 s, 12 000 r/min 离心 5 min。取上清异辛烷溶液 200 μL 加入 100 μL 异辛烷溶液与 60 μL 显色剂, 振荡 90 s, 12 000 r/min

离心 5 min。取有机相在 714 nm 检测吸光度,以 1 min 内催化橄榄油生成 1 μmol 脂肪酸所需的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1.2.5 高密度发酵

重组毕赤酵母工程菌 GS115 (pPIC9k-*lip605*/pPICZA-*RPL10*)划线于 YPD 平板, 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱静置培养至长出单菌落。挑取单菌落接种于含 400 mL YPD 液体培养基的 1 L 挡板摇瓶中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、220 r/min 条件下培养至 OD_{600} 为 20 左右。将种子液接种至发酵培养基(BSM 培养基+1.2% (体积比) PTM1+4%甘油)中 30 $^{\circ}\text{C}$ 培养, 通气量为 400 L/h, 初始转速为 400 r/min (30%溶氧串联转速), 最大转速为 850 r/min, 用 28%的氨水(未稀释)将培养基的 pH 调整到 6.4 左右。发酵过程中确保溶解氧(dissolved oxygen, DO)超过 20%, 待甘油耗尽(>24 h), 溶氧升高, 加入 50%甘油(质量体积比)进行补料。调整补料速率为 72.6 mL/h, 补料至细胞湿重达到 180–220 g/L 后停止, 饥饿 2 h 后进行甲醇补料培养。用 100%的甲醇溶液(12 mL PTM1/L)进行诱导, 设定补料速率为 10 mL/h, 2–4 h 后逐步增大甲醇流加速率, 直到 26 mL/h。每隔 12 h 取样测定细胞湿重、酶活及胞外蛋白浓度。

2 结果与分析

2.1 毕赤酵母产脂肪酶 Lip605 工程菌的构建及表达

实验获得了产脂肪酶 Lip605 的毕赤酵母基因工程菌 GS115 (pPIC9k-*lip605*), 其基因大小为 1 632 bp (图 1)。使用的验证引物为 *lip605*-F (5'-GC TCCAGCTAAACCAGCA-3')和 *lip605*-R (5'-CTAG ATGTGGAAGGAGTCGAC-3')。从图 2 中工程菌胞外蛋白电泳结果可见, 表达获得重组脂肪酶 Lip605 的蛋白分子量为 60 kD, 目标蛋白的表达条带明显, 含量占比较高, 胞外杂蛋白比例较少, 说明脂肪酶 Lip605 在该系统中获得了较为理想的表达。然后进行脂肪酶酶活测定, 测定结果为该工程菌经 144 h 摇瓶发酵后, 其胞外脂肪酶酶

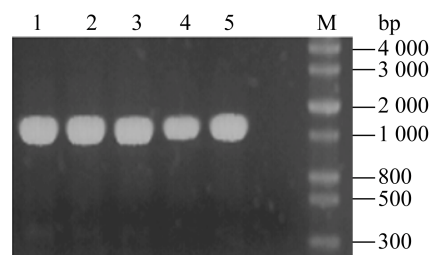


图 1 工程菌 GS115 (pPIC9k-*lip605*)基因组 PCR 扩增 *lip605* 基因的电泳图

Figure 1 Agarose gel electrophoretogram of *lip605* gene amplified from genome of GS115 (pPIC9k-*lip605*) by PCR

注: 1–5: 单克隆 PCR 验证结果; M: 1 kb Plus DNA Ladder.

Note: 1–5: PCR result of each clone; M: 1 kb Plus DNA Ladder.

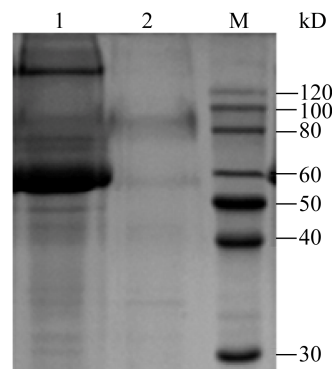


图 2 产脂肪酶工程菌 GS115 (pPIC9k-*lip605*)的胞外蛋白电泳图

Figure 2 SDS-PAGE of extracellular proteins of lipase-producing engineering strain GS115 (pPIC9k-*lip605*)

注: 1: GS115 (pPIC9k-*lip605*)的胞外蛋白; 2: GS115 (pPIC9k)的胞外蛋白(阴性对照); M: ProteinRuler[®] II (12–120 kD).

Note: 1: Extracellular proteins of GS115 (pPIC9k-*lip605*); 2: Extracellular proteins of GS115 (pPIC9k) (negative control); M: ProteinRuler[®] II (12–120 kD).

活为 12.47 U/mL, 仍然较低, 距离产业化生产有很大差距, 需要进一步提高该工程菌的脂肪酶发酵产量。

2.2 重组毕赤酵母菌株发酵产酶的 Plackett-Burman 试验

依据 Plackett-Burman 试验设计, 对发酵过程中的 9 个影响因素进行考察, 每个因素取高和低两个水平, 试验结果如表 2 所示。各因素所代表的参数水平和方差分析结果见表 3。结果显示, 研究的 9 个因素中, 酵母粉含量(B)、甲醇添加量(D)、

表 2 Plackett-Burman 试验设计及结果

Table 2 Design and results of Plackett-Burman experiment

Test No.	A Peptone (g/L)	B Yeast (g/L)	C YNB (g/L)	D Methanol (%)	E Biotin (mg/L)	F Fermentation time (h)	G Glycerin (mL)	H pH	I Temperature (°C)	Enzyme activity (U/mL)
1	20	30	40	0.5	8	42	30	5.5	28	10.09
2	20	10	15	3.0	4	42	30	5.5	30	37.93
3	60	10	40	3.0	4	42	30	8.0	28	20.71
4	20	30	40	3.0	4	36	10	8.0	28	33.49
5	20	10	15	0.5	4	36	10	5.5	28	13.14
6	60	30	15	3.0	8	42	10	5.5	28	27.32
7	60	30	40	0.5	4	36	30	5.5	30	8.35
8	20	10	40	0.5	8	42	10	8.0	30	4.00
9	60	30	15	0.5	4	42	10	8.0	30	1.12
10	60	10	40	3.0	8	36	10	5.5	30	47.81
11	20	30	15	3.0	8	36	30	8.0	30	28.06
12	60	10	15	0.5	8	36	30	8.0	28	2.39

pH (*H*) 3 个因素对工程菌产胞外脂肪酶酶活具有显著影响(表 3), 而其他 6 个非显著性因素在后续试验过程中的取值由 Plackett-Burman 试验结果确定, 各因素对产酶影响可用以下方程表示(*A-I* 的含义见表 1):

酶活=21.57-1.03*A*-3.50*B*+0.32*C*+14.19*D*-0.7*E*-1.57*F*-0.41*G*-4.97*H*+2.91*I*。

方程的决定系数 $R^2=0.989\ 8$, 拟合性较好, 在后续的实验过程中蛋白胨取 20 g/L, YNB 取 13.4 g/L, 生物素取 0.4 mg/L, BMGY 培养时间 36 h, 具体拟合数据见表 3。

此外, 据 Plackett-Burman 试验结果显示, 培养温度对于工程菌产脂肪酶不属于显著影响因素。

表 3 偏回归系数及因素的显著性分析

Table 3 Partial regression coefficients and analyses of their significance

Source	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square	F value	P value
Model	3 011.37	9	334.6	21.66	0.044 9
A	12.81	1	12.81	0.83	0.458 5
B	147.28	1	147.28	9.54	0.090 8
C	1.25	1	1.25	0.081	0.802 5
D	2 414.57	1	2 414.57	156.32	0.006 3
E	5.94	1	5.94	0.38	0.598 5
F	29.77	1	29.77	1.93	0.299 5
G	2.00	1	2.00	0.13	0.753 4
H	296.01	1	296.01	19.16	0.048 4
I	101.73	1	101.73	6.59	0.124 3
Residual	30.89	2	15.45		

但 Lan 等^[21]的研究发现, 低温诱导可显著提高毕赤酵母工程菌发酵产脂肪酶的产量。因此, 分析本 Plackett-Burman 试验中设置的两个培养温度相差较小, 导致试验结果显示该因素的影响不显著。为了进一步确认培养温度对工程菌产酶的实际影响, 本研究在以上结果基础上, 补充了一个温度的单因素试验, 在 22-32 °C 之间设置了 6 个均一间隔的水平, 以诱导温度 24 °C 的胞外酶活为 100%, 其余结果如图 3 所示。除 Plackett-Burman 试验中选

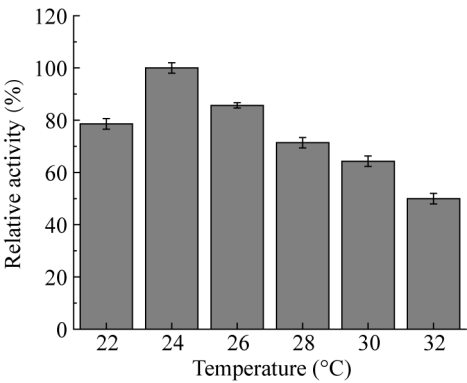


图 3 不同培养温度对毕赤酵母工程菌产胞外脂肪酶酶活的影响

Figure 3 Effect of different cultivate temperatures on the extracellular lipase activity of GS1115 (pPIC9k-*lip605*)

注: 250 mL 摇瓶发酵 144 h 后的胞外酶活; 每组实验设 3 个平行; 以最高酶活为 100%。

Note: Extracellular activity after 144 h fermentation in 250 mL shake flask; Data are presented as mean±SD (n=3); The maximal lipase activity was defined as 100%.

取的 28 °C 和 30 °C 的产酶差异仍然不显著外,其余的温度条件下发酵产脂肪酶显示了显著差异,其中,确实在低温 24 °C 时显示了最高的胞外酶活。因此,通过补充的单因素试验可以修正该工程菌的最佳发酵温度为 24 °C,并进行下一步实验。

2.3 Box-Behnken 设计优化发酵条件

根据 2.2 的实验结果,用 Box-Behnken 软件设计 3 因素 3 水平试验,结果如表 4 所示,使用 Design-Expert 软件进行方差分析和二次回归拟合试验数据,回归方程变量分析结果见表 5。

以脂肪酶酶活(R_1)为响应面值,以酵母粉含量(A)、pH (B)、甲醇添加量(C)为自变量,拟合得到多元二次回归方程:

$$R_1=62.32-3.24A-6.65B-8.67C+5.8AB+1.51BC-8.31A^2-17.72B^2-21.57C^2。$$

由回归方程系数显著性检验及方差分析可知,模型试验拟合良好, $P=0.0001<0.05$,说明该试验模型设计合理。决定系数 $R^2=0.9795$,说明回归方程的拟合程度较好。

响应面回归分析和回归方程拟合绘制响应面图形如图 4 所示,酵母粉含量(A)、pH (B)、甲醇

表 5 回归方程变量分析

Table 5 Variance analysis of regression equation

Source	Sum of square	Degrees of freedom	Mean square	F value	P value
Model	5 258.77	9	584.31	37.19	<0.000 1
A Yeast	84.05	1	84.05	5.35	0.054 0
B pH	354.31	1	354.31	22.55	0.002 1
C Methanol	601.18	1	601.18	38.27	0.000 5
AB	134.79	1	134.79	8.58	0.022 1
AC	149.45	1	149.45	9.51	0.017 7
BC	9.12	1	9.12	0.58	0.471 0
A ²	291.03	1	291.03	18.52	0.003 5
B ²	1 321.54	1	1 321.54	84.12	<0.000 1
C ²	1 958.78	1	1 958.78	124.68	<0.000 1
Residual	109.97	7	15.71		
Lack of fit	106.87	3	35.62	45.85	0.001 5
Pure error	3.11	4	0.78		
Cor total	5 368.74	16			

添加量(C) 3 个影响因素之间存在极值点。进而对方程求导,得到模型的极值点,3 个因子的最优试验点分别为酵母粉含量 11.157 g/L、pH 6.423、甲醇添加量 3.103%,此时模型预测的理论极大值为 69.960 U/mL。

在其余培养基成分和培养条件不变的情况下,对模型预测的最优条件,即:酵母粉含量为 11.5 g/L、pH 为 6.4、甲醇添加量为 3.1% (体积比)进行 3 组平行摇瓶发酵试验,测得最终脂肪酶平均酶活为 72.34 U/mL,比预测酶活值 69.96 U/mL 高 3.4%,并且优化后胞外脂肪酶表达水平较优化前提高了 5.8 倍,取得了理想的优化效果。

2.4 共表达伴侣蛋白初筛

将 12 种伴侣蛋白编码基因分别通过质粒 pPICZA 和 pPICZαA 整合到毕赤酵母工程菌 GS115 (pPIC9k-*lip605*)的基因组中,获得了 24 个共表达伴侣蛋白的重组工程菌。将这些重组工程菌进行摇瓶(20 mL/250 mL)发酵,以未共表达伴侣蛋白的工程菌 GS115 (pPIC9k-*lip605*)的胞外脂肪酶酶活为 100%,结果如图 5 所示。其中,重组工程菌 GS115 (pPIC9k-*lip605*/pPICZA-*RPL10*)、GS115 (pPIC9k-*lip605*/pPICZA-*HAC1*)、GS115 (pPIC9k-*lip605*/pPICZA-*VGB*)、GS115 (pPIC9k-*lip605*/pPICZαA-

表 4 Box-Behnken 试验设计及结果

Table 4 Design and results of Box-Behnken experiment

Test No.	A Yeast (g/L)	B pH	C Methanol (%)	Enzyme activity (U/mL)
1	5	6.75	2.0	48.30
2	15	6.75	3.5	62.20
3	25	6.75	5.0	28.80
4	5	8.00	3.5	32.02
5	25	5.50	3.5	28.95
6	15	8.00	2.0	20.75
7	15	5.50	2.0	43.42
8	5	5.50	3.5	50.60
9	25	6.75	2.0	33.15
10	15	5.50	5.0	22.30
11	15	6.75	3.5	61.30
12	25	8.00	3.5	33.59
13	15	6.75	3.5	63.60
14	15	6.75	3.5	62.70
15	5	6.75	5.0	19.50
16	15	6.75	3.5	61.80
17	15	8.00	5.0	5.670

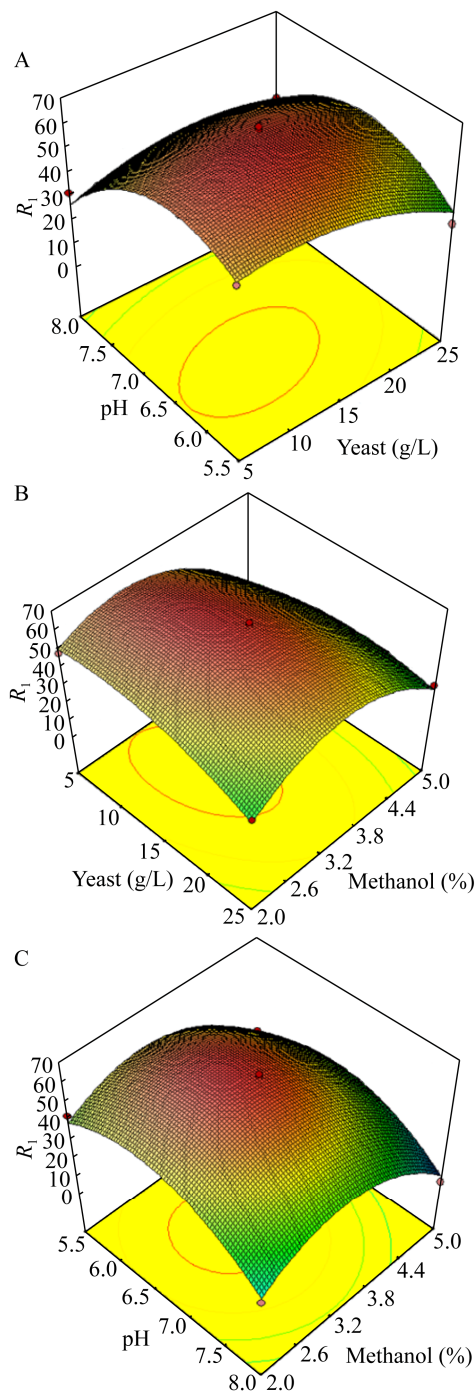


图 4 3 个显著性因素之间的响应面试验结果

Figure 4 The response surface diagrams for the three significant factors

注: A: 酵母粉含量和 pH 对产酶的影响; B: 酵母粉含量和甲醇添加量对产酶的影响; C: pH 和甲醇添加量对产酶的影响。

Note: A: The effect of yeast powder content and pH on enzyme production; B: The effect of yeast powder content and methanol addition on enzyme production; C: The effect of pH and methanol addition on enzyme production.

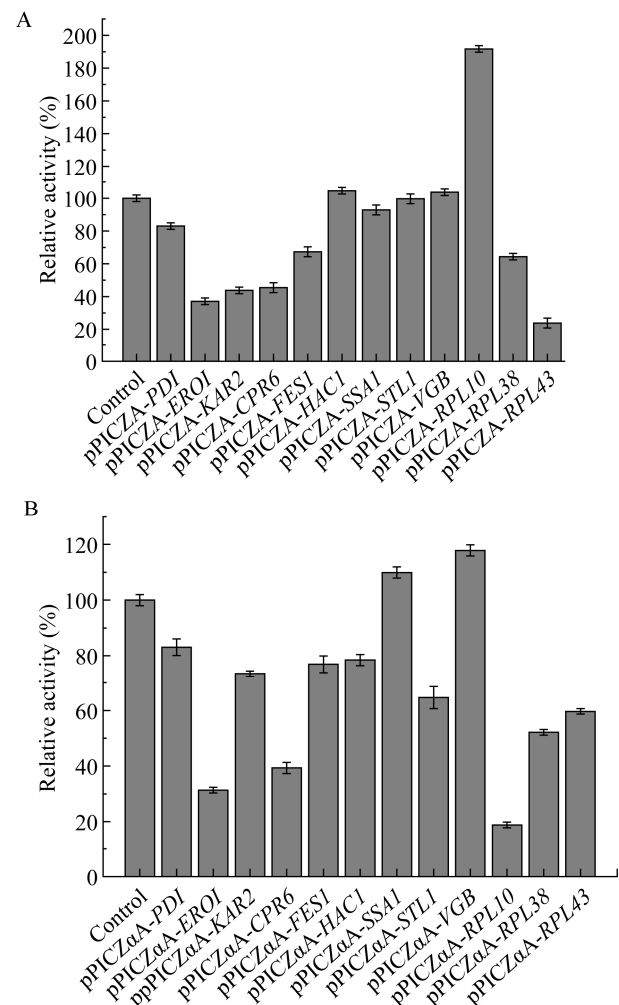


图 5 共表达伴侣蛋白对发酵产酶的酶活影响(250 mL 摇瓶发酵)

Figure 5 Effect of co-expressing chaperones on enzyme activity by fermentation (250 mL-shake flask fermentation)

注: A: pPICZA-伴侣蛋白(胞内表达); B: pPICZaA-伴侣蛋白(胞外表达); 250 mL 摇瓶发酵 144 h 后的胞外酶活; 每组实验设 3 个平行; 工程菌株 GS115 (pPIC9k-*lip605*) 的胞外酶活为 100%。

Note: A: pPICZA-chaperone proteins (intracellular expression); B: pPICZaA-chaperone proteins (extracellular expression); Extracellular activity after 144 h fermentation in 250 mL shake flask; Data are presented as mean±SD (n=3); The extracellular lipase activity of GS115 (pPIC9k-*lip605*) was defined as 100%.

SSA1) 和 GS115 (pPIC9k-*lip605*/pPICZaA-*VGB*) 的胞外脂肪酶酶活分别提高了 91.7%、4.6%、3.7%、9.9% 和 17.9%。从结果可知, 无论是在胞内还是胞外共表达 Vgb 蛋白均对脂肪酶 Lip605 的表达有提高作用, 并且胞外共表达的效果更明显, 而在胞内

共表达 Rpl10 蛋白对于脂肪酶 Lip605 的表达提升最为明显。

2.5 共表达伴侣蛋白复筛

毕赤酵母的摇瓶发酵及产酶受溶氧条件的影响非常大,摇瓶体积越大其溶氧越充分,发酵及产酶水平检测的误差波动越小。因此,针对筛选到的 5 个产酶显著提高的工程菌株,应用 1 L 摇瓶 (100 mL/L) 进行放大的发酵复筛,以在此基础上确定最佳生产菌株。复筛结果如图 6 所示,5 个菌株的产酶水平和趋势较初筛确有一定差别,其中胞内共表达 Hac1 和 Vgb 伴侣蛋白的重组工程菌产酶量甚至低于对照菌株,但胞内共表达 Rpl10 的重组工程菌株显示了与初筛一致的结果,即该菌株仍然是脂肪酶表达量最高的重组工程菌,此次与对照菌株相比,脂肪酶酶活仍提高了 46.8%,说明在胞内共表达 Rpl10 蛋白确实对脂肪酶 Lip605 的表达具有显著促进作用。

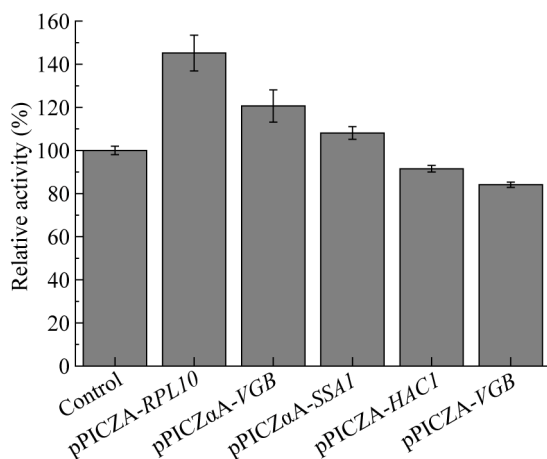


图 6 共表达伴侣蛋白对发酵产酶的酶活影响(1 L 摇瓶发酵)

Figure 6 Effect of co-expressing chaperones on enzyme activity by fermentation (1 L-shake flask fermentation)

注: 1 L 摇瓶发酵 144 h 后的胞外酶活; 每组实验设 3 个平行; 工程菌株 GS115 (pPIC9k-lip605) 的胞外酶活为 100%。

Note: Extracellular activity after 144 h fermentation in 1 L shake flask; Data are presented as mean \pm SD (n=3); The extracellular lipase activity of GS115 (pPIC9k-lip605) was defined as 100%.

2.6 10 L 发酵罐的高密度发酵

实验构建的脂肪酶高产菌株 GS115 (pPIC9k-lip605/pPICZA-RPL10), 其摇瓶发酵的胞外脂肪酶酶活可达 105.62–138.17 U/mL。为进一步确定其发酵产酶能力, 进行了 10 L 发酵罐的发酵产酶实验, 并以初始工程菌株 GS115 (pPIC9k-lip605) 作对照, 发酵初始体积为 4 L, 发酵期间严格控制溶氧和补料等关键参数, 总发酵检测时间为 190 h, 结果如图 7 所示。

从图 7A 可知, 实验组与对照组细胞生长大致相同, 均在发酵 166 h 时湿重达到最大, 其中实验组湿重为 404.77 g/L, 对照组湿重为 404.73 g/L, 均大于 200 g/L, 说明两株菌均达到了高密度发酵水平。另外, 在整个发酵过程中, 实验组与对照组的细胞湿重一直保持一致, 可见伴侣蛋白 Rpl10 在胞内共表达对于菌体发酵生长影响不大。然而, 对发酵过程中两株菌的胞外蛋白和胞外酶活进行比较的结果(图 7B、C)发现, 共表达伴侣蛋白 Rpl10 可使菌株在整个发酵过程中的胞外蛋白量和产酶量都有所提高, 其胞外脂肪酶 Lip605 的酶活提高更为明显(图 7C)。两株菌在发酵 142 h 时, 胞外蛋白及胞外酶活均达到最高, 其中实验组的蛋白浓度最高达到 15.89 g/L, 较对照组蛋白浓度(12.87 g/L)提高 23%; 胞外酶活最高达到 680 U/mL, 较对照菌株(426.5 U/mL)提高了 59.44%。可见, 作为核糖体蛋白的 Rpl10 伴侣蛋白在胞内对于脂肪酶 Lip605 的蛋白翻译及折叠具有显著的促进作用。

3 讨论与结论

本文应用费希尔曲霉脂肪酶密码子优化基因 (lip605) 成功构建了毕赤酵母工程菌株 GS115 (pPIC9k-lip605), 综合应用响应面发酵条件优化和共表达伴侣蛋白两种策略, 采用响应面法优化发酵条件使胞外脂肪酶酶活提高 5.8 倍; 通过在摇瓶中表达伴侣蛋白的初筛与复筛, 得到脂肪酶高产菌株 GS115 (pPIC9k-lip605/pPICZA-RPL10), 摇瓶发酵产酶可提高 48%–91%。经过 10 L 发酵罐的

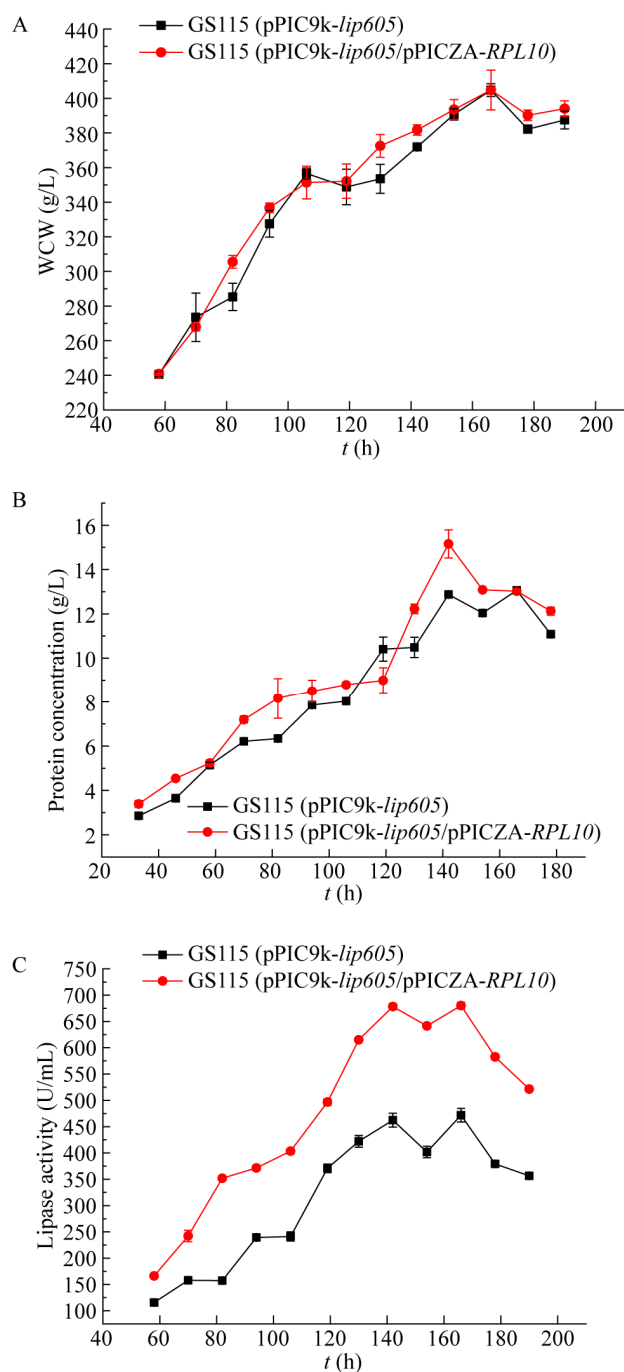


图7 10 L 发酵罐高密度发酵结果

Figure 7 High-density fermentation in a 10 L fermenter

注: A: 发酵过程中的细胞湿重变化曲线; B: 发酵过程中的胞外蛋白浓度变化曲线; C: 发酵过程中的胞外酶活变化曲线; 每株菌做3次平行发酵, 取平均值。

Note: A: Change curve of wet cell weight during fermentation; B: Change curve of extracellular protein concentration during fermentation; C: Change curve of extracellular enzyme activity during fermentation; Data are presented as mean \pm SD (n=3).

高密度发酵培养, 菌株 GS115 (pPIC9k-*lip605*/pPICZA-*RPL10*) 发酵 142 h 胞外酶活最高达到 680 U/mL, 蛋白浓度为 15.89 g/L。另外, 本研究目前报道的脂肪酶 Lip605 在毕赤酵母中达到了相对较高的表达量^[29], 虽然仍然低于重组脂肪酶 Lip09 的胞外酶活产量(1 900 U/mL)^[15], 但本研究的胞外蛋白含量(15.89 g/L)是产脂肪酶 Lip09 工程菌的(2 g/L)^[15]的 7.9 倍, 并且脂肪酶 Lip605 占比在 90%以上, 该现象可能与酶活测定方法的差异有一定关系。然而, 对于工业生产而言, 胞外蛋白产量的指标会更具参考价值, 因为其将决定经过后处理的最终酶制剂产品的产量; 并且, 本研究构建的工程菌发酵 142 h 即可达到最高产酶量, 较产脂肪酶 Lip09 的毕赤酵母工程菌节省了约 24 h 的发酵时间, 在发酵生产成本上也具有显著优势。因此, 本研究构建的毕赤酵母工程菌 GS115 (pPIC9k-*lip605*/pPICZA-*RPL10*)更具有产业化生产潜力。

REFERENCES

- [1] Tan ZF, Wang YP, Chen LH, et al. Study on development and industrial application of microbial lipase[J]. Science and Technology of Food Industry, 2006, 27(7): 193-195 (in Chinese) 谈重芳, 王雁萍, 陈林海, 等. 微生物脂肪酶在工业中的应用及研究进展[J]. 食品工业科技, 2006, 27(7): 193-195
- [2] Zhong L, Feng YX, Wang GY, et al. Production and use of immobilized lipases in/on nanomaterials: a review from the waste to biodiesel production[J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2020, 152: 207-222
- [3] Xu BL, Zhu Q. Recent advances in stability studies of microbial lipase[J]. Microbiology China, 2020, 47(6): 1958-1972 (in Chinese) 徐碧林, 朱庆. 微生物脂肪酶稳定性研究进展[J]. 微生物学通报, 2020, 47(6): 1958-1972
- [4] Sarmah N, Revathi D, Sheelu G, et al. Recent advances on sources and industrial applications of lipases[J]. Biotechnology Progress, 2018, 34(1): 5-28
- [5] Hu XC, Liu JH. Characteristics and industrial applications of microbial lipase[J]. Genomics and Applied Biology, 2019, 38(8): 3572-3579 (in Chinese) 胡兴翠, 刘建华. 微生物脂肪酶特性及工业应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(8): 3572-3579
- [6] Sun YM, Wang CM, Liu LC, et al. Study on producing biodiesel with industrial lipase catalyzed rapeseed oil[J]. Journal of Yunnan Normal University (Natural Sciences Edition), 2017, 37(3): 10-14 (in Chinese) 孙雁明, 王昌梅, 刘丽春, 等. 工业脂肪酶催化菜籽油制备

- 生物柴油的研究[J]. 云南师范大学学报: 自然科学版, 2017, 37(3): 10-14
- [7] Hasan F, Shah AA, Hameed A. Industrial applications of microbial lipases[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, 39(2): 235-251
- [8] Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases[J]. Biotechnology Advances, 2001, 19(8): 627-662
- [9] Borrelli GM, Trono D. Recombinant lipases and phospholipases and their use as biocatalysts for industrial applications[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2015, 16: 20774-20840
- [10] Zhou XJ, Zhou LF, Zhou JM, et al. Progress in preparation of lipase and its application in leather industry[J]. West Leather, 2015, 37(20): 16-20 (in Chinese)
周秀军, 周利芳, 周建民, 等. 脂肪酶的制备及其在皮革工业中的应用[J]. 西部皮革, 2015, 37(20): 16-20
- [11] Shao H, Hu XM, Sun LP, et al. Gene cloning, expression in *E. coli*, and *in vitro* refolding of a lipase from *Proteus* sp. NH 2-2 and its application for biodiesel production[J]. Biotechnology Letters, 2019, 41(1): 159-169
- [12] Ma RJ, Wang YH, Liu L, et al. Production enhancement of the extracellular lipase LipA in *Bacillus subtilis*: effects of expression system and Sec pathway components[J]. Protein Expression and Purification, 2018, 142: 81-87
- [13] Javed S, Azeem F, Hussain S, et al. Bacterial lipases: a review on purification and characterization[J]. Progress in Biophysics and Molecular Biology, 2018, 132: 23-24
- [14] Yu ZQ, Ma QS, Zhao LM et al. Strategies for optimization expression of heterologous protein in *Pichia pastoris*[J]. Microbiology China, 2010, 37(7): 1035-1042 (in Chinese)
余占桥, 马青山, 赵龙妹, 等. 毕赤酵母优化表达外源蛋白策略[J]. 微生物学通报, 2010, 37(7): 1035-1042
- [15] Sun QQ, Wang H, Zhang HT, et al. Heterologous production of an acidic thermostable lipase with broad-range pH activity from thermophilic fungus *Neosartorya fischeri* P1[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 122(5): 539-544
- [16] Gupta R, Gupta N, Rath P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(6): 763-781
- [17] Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production[J]. Journal of Molecular Recognition, 2005, 18(2): 119-138
- [18] Cereghino GPL, Cereghino JL, Ilgen C, et al. Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2002, 13(4): 329-332
- [19] Ouyang LM, Zhang HZ, Zhang SL, et al. Advances in the studies of *Pichia pastoris* as a heterologous gene expression system[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2000, 27(2): 151-154 (in Chinese)
欧阳立明, 张惠展, 张嗣良, 等. 巴斯德毕赤酵母的基因表达系统研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展, 2000, 27(2): 151-154
- [20] Macauley-Patrick S, Fazenda ML, McNeil B, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. Yeast, 2005, 22(4): 249-270
- [21] Lan DM, Qu M, Yang B, et al. Enhancing production of lipase MAS1 from marine *Streptomyces* sp. strain in *Pichia pastoris* by chaperones co-expression[J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2016, 22: 62-67
- [22] Hao YC, Lin Y, Liang SL. Efficient expression of *Candida rugosa* lipase CRL1 in *Pichia pastoris* and its application for synthesis of vitamin E acetate[J]. Modern Food Science and Technology, 2018, 34(10): 126-132, 187 (in Chinese)
郝月焯, 林影, 梁书利. 皱褶假丝酵母脂肪酶 CRL1 在毕赤酵母中的高效表达及其催化合成维生素 E 醋酸酯[J]. 现代食品科技, 2018, 34(10): 126-132, 187
- [23] Yu MR, Lange S, Richter S, et al. High-level expression of extracellular lipase Lip2 from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris* and its purification and characterization[J]. Protein Expression and Purification, 2007, 53(2): 255-263
- [24] Hu J, Wang CG, Lin JG, et al. Study on optimization of culture medium for lipase production by *Pseudomonas* sp. HFE733 using response surface methodology[J]. China Condiment, 2017, 42(12): 12-16 (in Chinese)
胡珺, 王常高, 林建国, 等. 响应面法优化假单胞菌 HFE733 产脂肪酶发酵培养基的研究[J]. 中国调味品, 2017, 42(12): 12-16
- [25] Chen F, Hu MR, Jiang XZ, et al. Enhancement of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris* by co-expression chaperone PDI and Ero1[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2015, 31(12): 1682-1689 (in Chinese)
陈飞, 胡美荣, 江贤章, 等. 共表达分子伴侣 PDI 和 Ero1 对灰盖鬼伞过氧化物酶在毕赤酵母中表达的影响[J]. 生物工程学报, 2015, 31(12): 1682-1689
- [26] Lu JY, Lin Y, Liang SL, et al. Expression of vitreoscilla hemoglobin improves CALB production in *Pichia pastoris*[J]. Modern Food Science and Technology, 2014, 30(6): 110-115 (in Chinese)
卢俊裕, 林影, 梁书利, 等. 共表达透明颤菌血红蛋白提高脂肪酶在毕赤酵母中的表达[J]. 现代食品科技, 2014, 30(6): 110-115
- [27] Wang TT. Xylanase *XynGI-1* expression in *Pichia* and textile applications[D]. Tianjin: Master's Thesis of Tianjin University of Science & Technology, 2017 (in Chinese)
王亭亭. 木聚糖酶 *XynGI-1* 在毕赤酵母中的表达及其纺织应用[D]. 天津: 天津科技大学硕士学位论文, 2017
- [28] Hou AJ, Xu BB, Liang L, et al. A modified colorimetric assay of lipase activity using emulsified olive oil as the substrate[J]. Leather Science and Engineering, 2011, 21(1): 22-27 (in Chinese)
侯爱军, 徐冰斌, 梁亮, 等. 改进铜皂-分光光度法测定脂肪酶活力[J]. 皮革科学与工程, 2011, 21(1): 22-27
- [29] Valero F. Recent advances in *Pichia pastoris* as host for heterologous expression system for lipases: a review[A]// Sandoval G. Lipases and Phospholipases[M]. New York: Humana Press, 2018: 205-216