

研究报告

豆血红蛋白在毕赤酵母中的表达条件优化

陈林杰¹, 薛常鲁¹, 苏悦², 肖功年¹, 徐志南², 魏培莲^{*1}

1 浙江科技学院生物与化学工程学院, 浙江 杭州 310023

2 浙江大学化学工程与生物工程学院, 浙江 杭州 310027

陈林杰, 薛常鲁, 苏悦, 肖功年, 徐志南, 魏培莲. 豆血红蛋白在毕赤酵母中的表达条件优化[J]. 微生物学通报, 2022, 49(6): 2050-2061

Chen Linjie, Xue Changlu, Su Yue, Xiao Gongnian, Xu Zhinan, Wei Peilian. Optimization of leghemoglobin expression conditions in *Pichia pastoris*[J]. Microbiology China, 2022, 49(6): 2050-2061

摘 要: 【背景】豆血红蛋白可赋予素肉制品类似牛肉的红褐色质地, 已被美国食品药品监督管理局批准作为人造素肉的着色剂, 近年来受到广泛关注。【目的】优化毕赤酵母产豆血红蛋白的培养条件, 提高毕赤酵母产豆血红蛋白的产量。【方法】首先通过单因素试验研究蛋白胨种类、大豆蛋白胨浓度、铁盐种类及血红素浓度在诱导阶段对毕赤酵母产豆血红蛋白的影响; 然后通过 Plackett-Burman 试验设计筛选出对豆血红蛋白产量影响最大的 3 个因素, 再通过最陡爬坡法确定 3 个因素的变化范围, 对 3 个因素进行响应面分析; 最后根据响应面结果进行摇瓶发酵和发酵罐高密度发酵。【结果】单因素试验发现: 用 4%大豆蛋白胨作为主要氮源、甲醇诱导浓度为 1.5%、血红素浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时发酵效果较好, 经过响应面优化后得到蛋白胨浓度为 51.48 g/L、pH 5.66、培养基装液量 35.84 mL/250 mL 是最优发酵条件。在此优化条件下, LegH 摇瓶发酵产量为 0.191 mg/mL, 与预测值(0.183 mg/mL)比较接近。采用 5 L 发酵罐进行高密度发酵, LegH 产量最高达到 0.384 mg/mL。【结论】优化了毕赤酵母表达豆血红蛋白的发酵条件, 获得了较高产量, 通过罐上发酵的进一步优化, 具有一定的工业化前景。

关键词: 豆血红蛋白; 毕赤酵母; 响应面法; 培养基优化; 高密度发酵

基金项目: 浙江省重点研发计划(2020C02041)

Supported by: Key Research and Development Program of Zhejiang Province (2020C02041)

*Corresponding author: E-mail: weipeilian@126.com

Received: 2021-10-11; Accepted: 2021-12-19; Published online: 2022-02-07

Optimization of leghemoglobin expression conditions in *Pichia pastoris*

CHEN Linjie¹, XUE Changlu¹, SU Yue², XIAO Gongnian¹, XU Zhinan², WEI Peilian^{*1}

¹ School of Biological and Chemical Engineering, Zhejiang University of Science and Technology, Hangzhou 310023, Zhejiang, China

² College of Chemical and Biological Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, Zhejiang, China

Abstract: [Background] Leghemoglobin (LegH) can endow vegetarian meat products with beef-like reddish-brown color and meat texture, which has been approved by Food and Drug Administration as a colorant for vegetarian meat and has attracted extensive attention in recent years. [Objective] To optimize the expression conditions and increase the yield of LegH in *P. pastoris*. [Methods] Firstly, single-factor experiments were conducted to study the effects of peptones, peptone concentration, iron salts and hematin concentration on LegH production during the induction stage. Secondly, the three factors that have the greatest impact on LegH production were screened out through the Plackett-Burman design. Thirdly, the variation ranges and the optimum levels of the three factors were determined via the steepest ascent design and the response surface methodology (RSM), respectively. Finally, according to the RSM results, shake flask fermentation and high-density fermentation in a 5-L tank were carried out. [Results] The single-factor experiments demonstrated that with 4% soybean peptone as the main nitrogen source, the methanol concentration of 1.5%, and the hematin concentration of 5 $\mu\text{mol/L}$, the yield of LegH was higher. The RSM-optimized fermentation conditions were peptone concentration of 51.48 g/L, pH 5.66, and medium volume of 35.84 mL/250 mL. Under the optimized conditions, the yield of LegH in the shake flask was 0.191 mg/mL, close to the predicted value (0.183 mg/mL), and that in the 5-L tank reached 0.384 mg/mL. [Conclusion] Through optimization of the fermentation conditions for *P. pastoris*, higher yields of LegH were obtained, which had certain prospects for industrialization after further improvement in the tank fermentation.

Keywords: leghemoglobin; *Pichia pastoris*; response surface methodology; medium optimization; high-density fermentation

豆血红蛋白(leghemoglobin, LegH)是根瘤菌感染大豆后共同产生的植物来源的血红蛋白^[1]。虽然豆血红蛋白在氨基酸序列上与动物血红蛋白差异较大,但其三级结构高度相似^[2]。豆血红蛋白在烹饪过程中会释放血红素辅因子来催化一些生物分子的反应而产生具有肉香风味的化合物,已有悠久的历史使用历史^[3]。在植物蛋白素肉的生产中添加豆血红蛋白可以很大程度上提高植物肉风味,使其与动物肉更为接近^[4]。目前 LegH 的主要来源还是从大豆中

提取,但是大豆种植周期长,而且天然 LegH 在大豆中产量比较低,提取工艺复杂,大规模生产成本过高。因此,利用微生物发酵技术生产 LegH 受到人们的广泛关注且具有很大的市场前景^[5]。

巴斯德毕赤酵母作为目前比较常见的工程菌株之一,与大肠杆菌一样^[6],被普遍应用于生产外源蛋白,已经有上千种外源蛋白成功地在毕赤酵母中表达^[7-10]。2018 年,美国的 Impossible Foods 公司成功利用毕赤酵母商业

化合成大豆血红蛋白并应用于素肉汉堡中^[1]。

目前,重组微生物生产的豆血红蛋白作为食品添加剂使用的安全性已被验证^[11-12],在美国已经获得了食品药品监督管理局的批准使用,在我国尚无相关法规,国内相关研究也才刚刚起步^[13]。虽然目前毕赤酵母发酵手段比较成熟,Invitrogen 公司提供的巴斯德毕赤酵母发酵手册中的方法可以作为毕赤酵母发酵前期普适性比较高的发酵方案^[14],但是对于不同产物及不同毕赤酵母重组菌株的发酵过程会有一定差异^[15],需要针对不同的菌株、不同的发酵产物进行发酵条件的优化^[16]。本实验室较早开展了利用酵母系统表达 LegH 的研究工作,前期已成功构建了能够表达 LegH 的工程菌株 *Pichia pastoris* GS115-LegH^[17]。本研究将对其发酵表达条件进行系统优化,以期为毕赤酵母规模化生产 LegH 提供基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

Pichia pastoris GS115-LegH 重组菌株,浙江大学实验室构建保存。

1.1.2 主要试剂和仪器及培养基

无氨基酵母氮源, Oxoid 公司; 血红素、生物素、考马斯亮蓝 G-250, BBI 生命科学有限公司; 蛋白胨、酵母粉、葡萄糖、变色酸等试剂均为市售国产分析纯。

荧光成像工作站, 环亚生物科技公司; 多功能酶标仪, 美谷分子仪器有限公司; 小型电泳仪, Bio-Rad 公司; 高速冷冻离心机, 贝克曼库尔特股份有限公司; 离位灭菌玻璃发酵罐, 上海保兴生物设备工程有限公司。

YPD 培养基和 BMGY 培养基: 用于毕赤酵母的生长培养^[17]。

BMMY 培养基: 用于毕赤酵母的诱导表达^[17]。

PTM1 溶液(g/L): 硼酸 0.02, 碘化钾 0.09, 二水钼酸钠 0.20, 一水硫酸锰 3.00, 七水硫酸亚铁 65.00, 氯化钴 0.50, 五水硫酸铜 6.00, 氯化锌 20.00, 生物素 0.20, 浓硫酸 5 mL/L。

甘油补料培养基: 50% (质量体积分数)的甘油, 1.2% (体积分数) PTM1。

甲醇补料培养基: 100%甲醇, 1.2% (体积分数) PTM1, 50 μ mol/L 血红素。

1.2 方法

1.2.1 LegH 诱导表达

种子培养: 将保藏菌种接种到新的 YPD 平板上, 30 $^{\circ}$ C 恒温培养 2-3 d, 挑取生长旺盛的单菌落接种于 5 mL YPD 液体培养基中, 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养过夜。

生长阶段: 取 0.5 mL 种子液转接于 50 mL BMGY 培养基中, 30 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养 16 h 至对数生长中期 OD_{600} 为 10.0-15.0; 5 000 r/min 离心 10 min, 倒去 BMGY 培养基, 补入等体积 BMMY 培养基。

诱导表达阶段: 向 BMMY 培养基中添加经过 0.22 μ m 孔径滤膜过滤除菌的血红素至目标浓度, 并且每隔 24 h 在 BMMY 培养基中补加甲醇至 1%进行诱导表达。诱导 96 h 后, 4 $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液。

1.2.2 LegH 表达量测定

定性和半定量测定: 使用 SDS-PAGE 电泳分析法^[17]。发酵结束, 取样进行电泳, 经凝胶成像系统扫描后观察电泳条带, 并根据条带灰度进行半定量分析。

定量测定: 采用 Bradford 法测定蛋白浓度^[17]。

1.2.3 甲醇浓度测定

变色酸法测定甲醇浓度^[18]。

1.2.4 细胞浓度测定

吸取 1 mL 发酵液至已测定质量的离心管

中, 5 000 r/min 离心 10 min, 倒去发酵液, 用滤纸吸去管壁内残留的液体, 倒扣至无液体残留后, 测定菌体重量。

1.2.5 LegH 表达单因素试验

蛋白胨种类、大豆蛋白胨浓度对 LegH 表达的影响: 以 BMGY 培养基为基础培养基, 诱导阶段分别补入含酵母蛋白胨、大豆蛋白胨、酪蛋白胨、牛肉蛋白胨、鱼蛋白胨的 BMMY 培养基, 确定最佳蛋白胨为大豆蛋白胨后, 分别向 BMMY 培养基加入 2%、4%、6%、8% 大豆蛋白胨, 保持其他条件不变, 发酵结束后测定 LegH 表达量。

铁盐种类对 LegH 表达的影响: 以 BMGY 培养基为基础培养基, 在诱导阶段向 BMMY 培养基中分别加入血红素、氯化铁、硫酸亚铁、柠檬酸铁溶液, 终浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 保持其他条件不变, 发酵结束后测定 LegH 表达量。

血红素浓度对 LegH 表达的影响: 在 BMMY 培养基中加入 2.5 $\mu\text{mol/L}$ 、5 $\mu\text{mol/L}$ 、10 $\mu\text{mol/L}$ 的血红素溶液, 保持其他条件不变, 发酵结束后测定 LegH 表达量。

甲醇浓度对 LegH 表达的影响: 以 BMMY 培养基为基础培养基, 初始甲醇浓度设置为 0.25%、0.50%、1.00%、1.50% 和 2.00%, 每隔 24 h 补加甲醇至初始浓度, 保持其他条件不变, 发酵结束后测定 LegH 表达量。

1.2.6 Plackett-Burman 试验确定显著影响因素

选用 $n=12$ 的 Plackett-Burman 试验设计, 考察了 9 个因素对 LegH 的影响: X_1 (蛋白胨)、 X_2 (酵母粉)、 X_3 (碳源)、 X_4 (发酵液装量)、 X_5 (生物素)、 X_6 (甲醇添加量)、 X_7 (无氨基酵母氮源)、 X_8 (pH) 和 X_9 (血红素浓度), 每个因素取高、低两个水平, 响应值为每毫升发酵液中 LegH 浓度。

1.2.7 Box-Behnken 响应面试验设计与分析

Plackett-Burman 试验确定 3 个显著影响因

子之后, 通过最陡爬坡法筛选出最佳试验水平进行响应面设计及分析。

1.2.8 模型验证

预测的最佳优化条件为甘油浓度 10 g/L、酵母粉浓度 10 g/L、血红素浓度 5 $\mu\text{mol/L}$ 、无氨基酵母氮源(含硫酸铵) 13.4 g/L、生物素浓度 4×10^{-7} g/L、甲醇浓度 1%、蛋白胨浓度 51.48 g/L、发酵液装量 35.84 mL、pH 5.66, 在此条件下进行 LegH 的诱导表达, 重复进行 3 次, 取平均值。

1.2.9 5 L 发酵罐发酵

挑取 YPD 平板上生长的单菌落接种至 YPD 试管中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养至 OD_{600} 为 6.0–8.0, 取试管中菌液 1 mL 接种至含有 100 mL BMGY 的 500 mL 摇瓶中, 30 $^{\circ}\text{C}$ 、250 r/min 培养至 OD_{600} 为 10.0–15.0。分批甘油补料阶段使用 5 L 发酵罐, 将种子液 200 mL 接种在含有 2 L 优化后 BMGY 培养基的发酵罐中, 温度 30 $^{\circ}\text{C}$, 用氨水调节 pH 至 5.66, 发酵罐溶氧维持在 30% (气体流速和搅拌转速根据需要进行调节)。发酵至甘油耗尽后, 进行甘油补料至合适菌体浓度后饥饿 2 h, 向发酵液中加入 50 $\mu\text{mol/L}$ 血红素, 然后进行甲醇补料(溶氧高于 20% 进行补料), 每隔一定时间取样测定细胞浓度和 LegH 产量。

2 结果与讨论

2.1 LegH 表达条件单因素优化结果

2.1.1 蛋白胨种类对 LegH 表达的影响

筛选了市面上常见的 5 种不同来源的蛋白胨(酵母蛋白胨、大豆蛋白胨、酪蛋白胨、牛肉蛋白胨、鱼蛋白胨)进行实验, 考察其对毕赤酵母产 LegH 的影响, 结果见图 1。由图 1 可知, 大豆蛋白胨最有利于 LegH 的表达, 其次是酵母蛋白胨。可能的原因是: 大豆蛋白胨来源于大豆, 而 LegH 是根瘤菌感染大豆后产生的一类蛋白, 二者有一定的同源性, 大豆蛋白

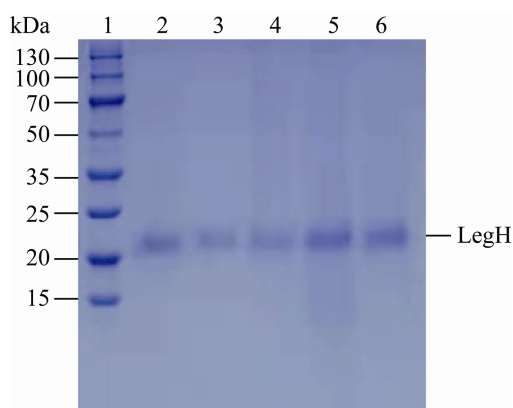


图1 蛋白胨种类对豆血红蛋白表达的影响 1: 标准蛋白分子量; 2: 鱼蛋白胨; 3: 牛肉蛋白胨; 4: 酪蛋白胨; 5: 大豆蛋白胨; 6: 酵母蛋白胨

Figure 1 Effects of peptone type on leghemoglobin expression. 1: Marker; 2: Fish peptone; 3: Beef peptone; 4: Casein peptone; 5: Soybean peptone; 6: Yeast peptone.

胨更能提供 LegH 合成所需的各类氨基酸。目前多数毕赤酵母表达外源蛋白时,在前期培养阶段主要靠种子培养基中提供的有机氮源,而后期主要以无机氮源为主,原因在于酵母摄取有机氮源时可能会分泌蛋白水解酶,不利于目的蛋白的合成^[19]。但从另一个角度讲,蛋白胨作为蛋白质的一种降解产物,可能对防止蛋白酶对蛋白产物的降解也有一定的作用。因此在毕赤酵母的发酵过程中,针对不同的产物,在菌体培养阶段加入一定量的蛋白胨,不仅有利于提高菌体密度,最终也可以提高产物的表达。

2.1.2 大豆蛋白胨浓度对 LegH 表达的影响

大豆蛋白胨浓度对 LegH 产量有着明显的影响,结果见图 2。由图 2 可见,随着大豆蛋白胨浓度的提高,LegH 产量也逐步上升,当浓度达到 4%以后对 LegH 产量的影响不大。而且由电泳条带可见,大豆蛋白胨浓度越高,电泳图中未成团的蛋白条带也随之增多,这对后期使用 Bradford 法测定蛋白浓度和蛋白的提取都会产生一定的影响。

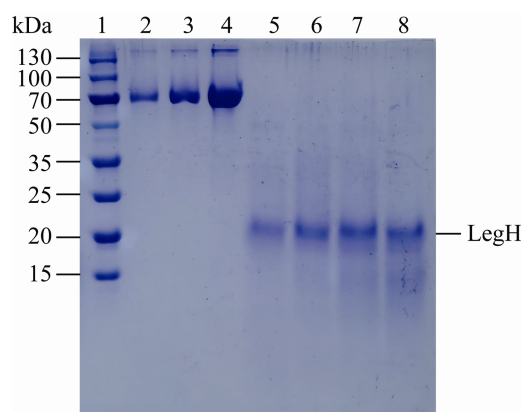


图2 大豆蛋白胨浓度对大豆血红蛋白表达的影响 1: 标准蛋白分子量; 2: 0.1 mg/mL 牛血清蛋白; 3: 0.2 mg/mL 牛血清蛋白; 4: 0.4 mg/mL 牛血清蛋白; 5: 2%大豆蛋白胨; 6: 4%大豆蛋白胨; 7: 6%大豆蛋白胨; 8: 8%大豆蛋白胨

Figure 2 Effects of soybean peptone concentration on leghemoglobin expression. 1: Marker; 2: 0.1 mg/mL BSA; 3: 0.2 mg/mL BSA; 4: 0.4 mg/mL BSA; 5: 2% soybean peptone; 6: 4% soybean peptone; 7: 6% soybean peptone; 8: 8% soybean peptone.

2.1.3 铁盐种类对 LegH 表达的影响

豆血红蛋白由一个血红素辅基和一条肽链组成,血红素是豆血红蛋白表达必需的重要辅因子,血红素掺入不足被认为是重组生产活性血红蛋白的主要障碍因素^[20]。因 LegH 中含有铁卟啉,其合成过程中对铁元素的需求比较高,添加铁元素可能也有助于内源血红素的合成。实验中选取了血红素和 3 种常见铁元素载体,在诱导期添加到毕赤酵母发酵过程中,考察其对 LegH 表达的影响,结果见图 3。图 3 表明不同的铁载体都可以提高 LegH 的产量,其中血红素对毕赤酵母产 LegH 有明显的提高作用,其次为柠檬酸铁。

2.1.4 血红素浓度对 LegH 表达的影响

血红素作为 LegH 的合成前体,在合成过程中至关重要,考察了不同浓度血红素对毕赤酵母产 LegH 的影响,结果见图 4。由图 4 可

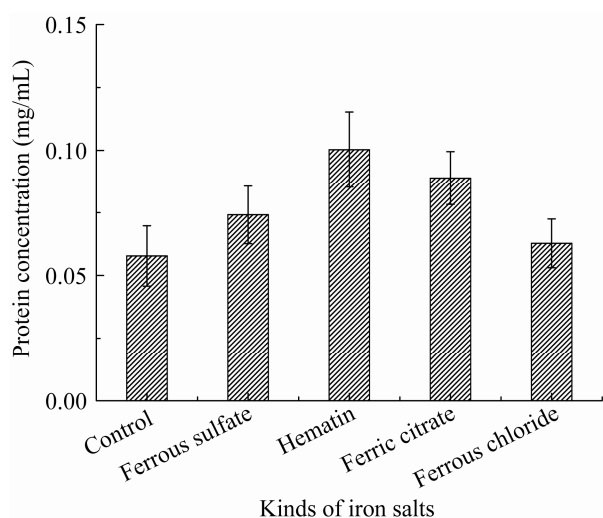


图3 铁盐种类对豆血红蛋白表达的影响

Figure 3 Effects of iron salts on leghemoglobin expression.

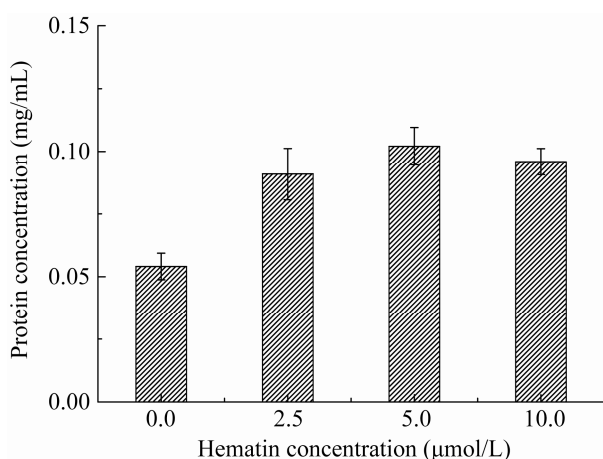


图4 血红素浓度对豆血红蛋白表达的影响

Figure 4 Effects of hematin concentration on leghemoglobin expression.

见, LegH 的分泌表达量随着血红素浓度的增加而提高, 说明毕赤酵母重组菌合成 LegH 过程中血红素的潜在短缺, 通过在培养基中添加血红素能有效解决这一问题。当血红素添加浓度为 5 $\mu\text{mol/L}$ 时 LegH 表达量最高, 继续增加血红素浓度, LegH 产量有一定程度的降低, 说明较高浓度的血红素可能有一定的抑制作

用。除了在培养基中添加外源血红素, 已有研究者在血红蛋白表达菌株中同时导入血红素合成途径, 取得了较好的效果^[21-22]。

2.1.5 甲醇浓度对 LegH 表达的影响

Pichia pastoris GS115 属于甲醇营养型酵母表达系统, 其 AOX1 为甲醇强启动子, 可以利用甲醇作为外源蛋白表达的诱导物及自身生长所需的能源物质, 在摇瓶发酵中适宜浓度范围的甲醇可以有效提高目标蛋白的表达产量, 一般添加量为 0.5%–1.0%。由图 5 可以看出, 在甲醇添加量为 1.5% 时毕赤酵母血红蛋白产量最高, 当甲醇浓度继续提高时其蛋白产量明显减少, 表明甲醇浓度过高则对菌体有一定毒性。有研究表明, 甲醇浓度大于 3.65% 时即可观察到对菌体的抑制作用^[23]。在实验中, 严格控制甲醇浓度是毕赤酵母发酵的一个重要特征。另外, 甲醇诱导的方式、用量和诱导时间均会对外源蛋白的表达水平产生影响。

2.2 基于响应面分析的 LegH 表达优化结果

2.2.1 显著影响因素筛选与结果分析

借助 Minitab 19 软件对筛选因素进行设计并对结果进行了统计分析, 结果见表 1 和表 2。

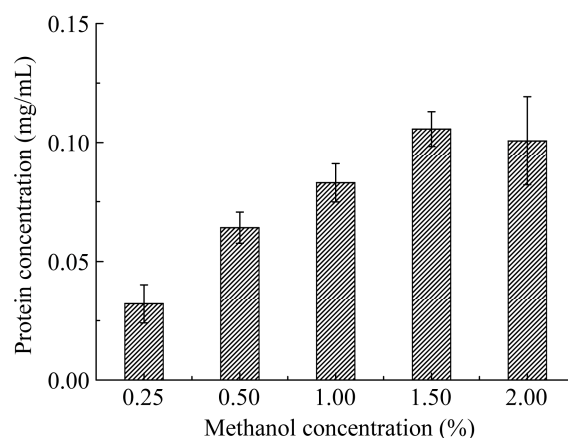


图5 甲醇浓度对产豆血红蛋白的影响

Figure 5 Effects of methanol concentration on leghemoglobin expression.

表 1 Plackett-Burman 试验设计及响应值

Table 1 Plackett-Burman experiment design and its response

No.	Peptone (X_1 , g/L)	Yeast extract (X_2 , g/L)	Carbon source (X_3 , g/L)	Medium volume (X_4 , mL)	Biotin (X_5 , $\times 10^{-7}$, g/L)	Methanol (X_6 , %)	YNB (X_7 , g/L)	pH (X_8)	Hematin (X_9 , $\mu\text{mol/L}$)	LegH concentration (mg/mL)
1	60	30	10	60	8	0.5	15	5.0	2.5	0.145 0
2	20	30	30	60	4	2.5	30	5.0	7.5	0.059 9
3	60	30	30	30	8	2.5	15	8.0	2.5	0.168 0
4	20	10	30	60	8	0.5	30	8.0	2.5	0.110 0
5	60	10	30	30	4	0.5	30	8.0	7.5	0.152 7
6	20	10	10	60	8	2.5	30	8.0	7.5	0.089 1
7	60	30	10	60	4	0.5	15	8.0	7.5	0.153 6
8	20	10	10	30	4	0.5	15	5.0	2.5	0.088 5
9	60	10	10	30	8	2.5	15	5.0	7.5	0.144 2
10	20	30	30	30	8	0.5	15	5.0	7.5	0.104 2
11	60	10	30	60	4	2.5	30	5.0	2.5	0.115 1
12	20	30	10	30	4	2.5	30	8.0	2.5	0.114 7

该模型(model 项)的 F 值为 20.45, P 值为 0.047, 并且当“Prob> F ”的值小于 0.050 时, 表明对应的因素为显著影响因子。表示模型的拟合显著性好, 具有统计学意义; 各因素对产 LegH 影响方程如下:

产量=0.035 6+0.001 301 X_1 (g/L)+0.000 381 X_2 (g/L)-0.000 209 X_3 (g/L)-0.000 554 X_4 (mL)+0.003 17 X_5 (mg/L)-0.005 25 X_6 (%) +0.000 090 X_7 (g/L)+0.007 30 X_8 -0.001 256 X_9 ($\mu\text{mol/L}$)

表 2 Plackett-Burman 试验结果

Table 2 Results of Plackett-Burman experiment design

Factors	Stdized effects	P value Prob> F	Ranking
X_1	0.052 03	0.008	1
X_2	0.007 63	0.237	6
X_3	-0.004 19	0.456	8
X_4	-0.016 63	0.068	3
X_5	0.012 67	0.109	4
X_6	-0.010 50	0.149	7
X_7	-0.001 35	0.795	9
X_8	0.021 89	0.041	2
X_9	-0.006 28	0.303	5

($R^2=0.989\ 3$, 调整后 $R^2=0.940\ 9$ 表明拟合性良好)。由此可以确定对 LegH 产量影响较大的 3 个因素分别是: 蛋白胨(X_1)、发酵液装量(X_4)和 pH (X_7)。从该试验结果中 Stdized effects 的值可以确定接下来 3 个因素变化方向。对该 3 个元素变化范围筛选后进行响应面分析。

2.2.2 响应面优化分析

根据 2.2.1 的结果, 用 Box-Behnken 软件设计 3 因素 3 水平试验, 使用 Design-Expert 软件进行方差分析和二次回归拟合实验数据, 结果见表 3 和表 4。

以 LegH 浓度为响应面值, 以蛋白胨浓度(A)、发酵液装量(B)、pH (C)为自变量, 拟合得到多元二次回归方程:

Protein=0.18-0.001 592 A -0.001 72 B +0.002 055 C -0.003 241 AB -0.005 632 AC +0.003 317 BC -0.005 67 A^2 -0.006 341 B^2 -0.007 012 C^2 。

由回归方程系数显著性检验及方差分析可知, 模型拟合良好, $P=0.000\ 1<0.05$, 说明该模型设计合理。决定系数 $R^2=0.981\ 4$, 说明回归方程的拟合程度较好。

表 3 Box-Behnken 试验设计和结果

Table 3 Design and results of Box-Behnken experiment

No.	Peptone (A, g/L)	Medium volume (B, mL)	pH (C)	LegH concentration (mg/mL)
1	52	33	5.3	0.169 7
2	52	33	5.9	0.166 8
3	48	33	5.6	0.169 8
4	52	36	5.6	0.183 0
5	52	36	5.6	0.180 1
6	56	36	5.3	0.169 7
7	56	39	5.6	0.161 6
8	56	36	5.9	0.163 1
9	52	39	5.9	0.172 1
10	48	36	5.3	0.162 3
11	52	36	5.6	0.180 9
12	52	36	5.6	0.180 8
13	48	36	5.9	0.178 1
14	52	39	5.3	0.161 8
15	56	32	5.6	0.173 7
16	48	39	5.6	0.170 7
17	52	36	5.6	0.180 0

响应面优化分析和回归方程拟合绘制响应面结果如图 6 所示, 蛋白胨含量(A)、发酵液装量(B)、pH (C)这 3 个影响因素之间存在极值点。通过对生物量回归方程求导得出 3 个因子的最优试验点为: 蛋白胨 51.48 g/L, 发酵液装量 35.84 mL/250 mL, pH 5.66, LegH 的理论预测值为 0.183 mg/mL。

2.2.3 模型验证

为了证实模型预测结果的可靠性, 在模型预测的最优条件, 即蛋白胨 51.48 g/L、发酵液装量 35.84 mL/250 mL、pH 5.66 和其他培养基成分和发酵条件不变时进行重复摇瓶实验, 设立 3 组平行, 结果如图 7 所示。实际通过 Bradford 法检测到的蛋白浓度的平均值为 0.191 mg/mL, 与预测值 0.183 mg/mL 比较接近(为预测值的 104.2%), 二者的良好拟合性也再次证实了模型的有效性。并且优化后的表达水平为优化前的 189%, 获得了理想的优化效果。

表 4 回归方程的方差分析

Table 4 Variance analysis of regression equation

Parameters	Sum of squares	df	Mean square	F value	P value Prob>F	Significance
Model	0.000 862	9	0.000 957	40.94	0.000 1	**
A	0.000 020	1	0.000 020	8.670	0.021 6	—
B	0.000 023	1	0.000 023	10.12	0.015 5	—
C	0.000 033	1	0.000 033	14.45	0.006 7	—
AB	0.000 042	1	0.000 042	17.97	0.003 8	*
AC	0.000 127	1	0.000 127	54.25	0.000 2	**
BC	0.000 040	1	0.000 040	18.82	0.003 4	*
A ²	0.000 135	1	0.000 135	57.87	0.000 1	**
B ²	0.000 169	1	0.000 169	72.38	0.000 1	**
C ²	0.000 207	1	0.000 207	88.51	0.000 1	**
Residual	0.000 017	7	0.000 016			
Lack of Fit	0.000 011	3	0.000 010	2.44	0.204 5	—
Pure error	0.000 006	4	0.000 001			
Cor total	0.006 200	16				

Note: **: $P < 0.01$; *: $P < 0.05$; —: $P > 0.05$.

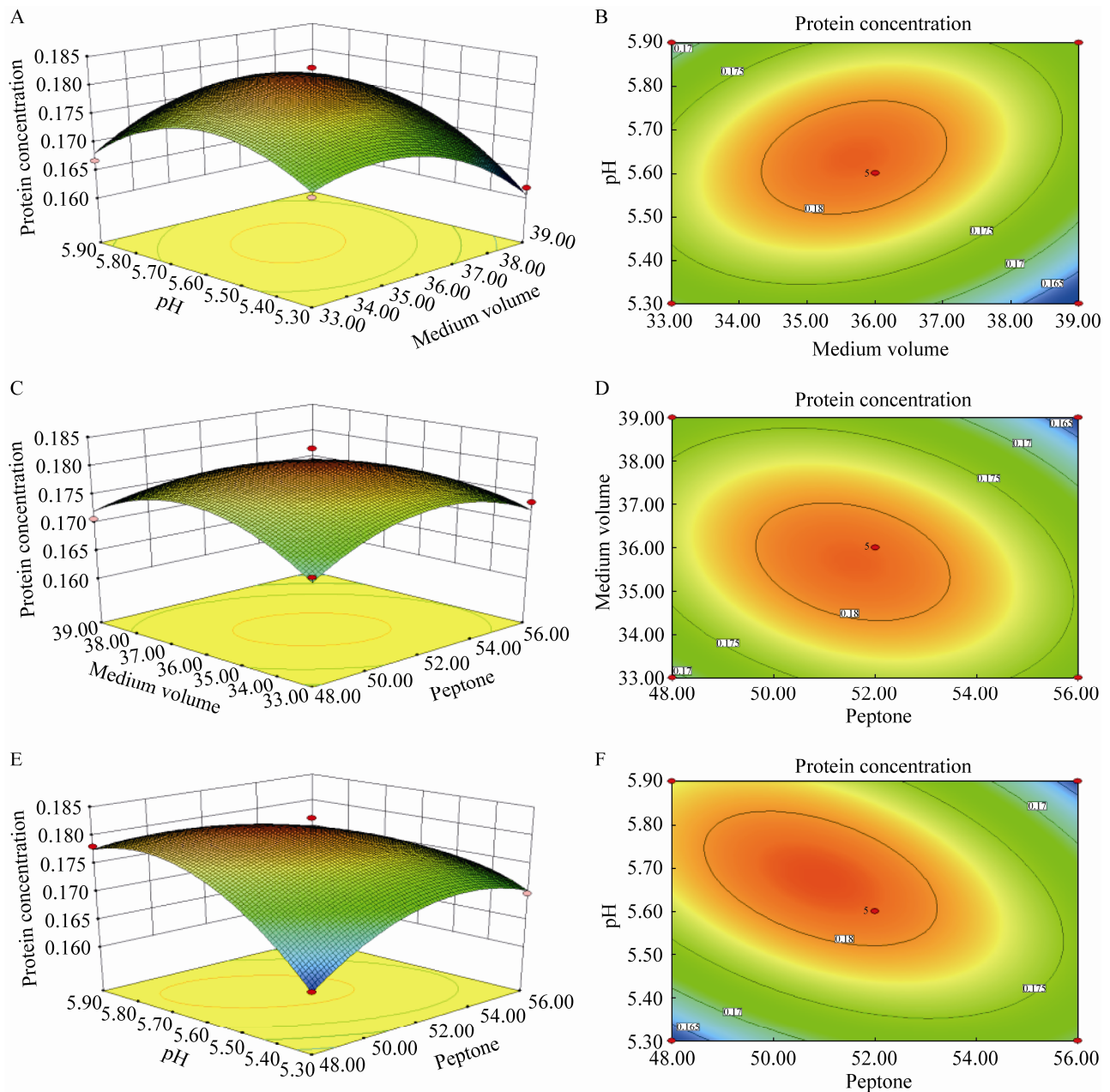


图 6 各因素对豆血红蛋白产量交互影响的三维曲线图及等高线图 A: pH 与培养基体积交互影响的响应面图; B: pH 与培养基体积交互影响的等高线图; C: 培养基体积与蛋白胨交互影响的响应面图; D: 培养基体积与蛋白胨交互影响的等高线图; E: pH 与蛋白胨交互影响的响应面图; F: pH 与蛋白胨交互影响的等高线图

Figure 6 Response surface plot and contour plot of mutual-influence for different factors on the yield of leghemoglobin. A: Response surface plot of mutual-influence for pH and medium volume; B: Contour plot of mutual-influence for pH and medium volume; C: Response surface plot of mutual-influence for medium volume and peptone; D: Contour plot of mutual-influence for medium volume and peptone; E: Response surface plot of mutual-influence for pH and peptone; F: Contour plot of mutual-influence for pH and peptone.

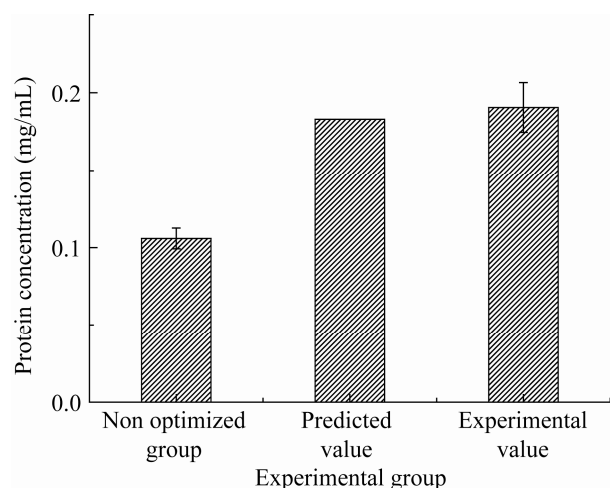


图 7 响应面结果验证

Figure 7 Response surface result verification.

2.3 5 L 发酵罐发酵结果

以 Invitrogen 公司的毕赤酵母高密度发酵方案为基础, 结合响应面优化的结果, 使用 BMGY 培养基、蛋白胨 51.48 g/L、pH 5.66 和其他培养基成分不变的情况下, 考察构建菌株在 5 L 发酵罐上的发酵性能, 结果见图 8。

由图 8 可见, 毕赤酵母在发酵 156 h 后菌体

湿重达到了 356 g/L, 发酵过程中 LegH 产量最高达到了 0.384 mg/mL, 约为摇瓶发酵的 2 倍。目前本研究仅对发酵罐的发酵工艺进行了初步研究, 后续通过培养基成分的改进和补料工艺的控制等, 有望进一步提高血红蛋白的表达水平。

3 结论

首先对毕赤酵母工程菌株 GS115-LegH 发酵表达 LegH 的条件进行了单因素试验, 然后通过 Plackett-Burman 试验设计进行因子筛选试验, 确定了对产 LegH 影响最大的 3 个因子, 即蛋白胨、pH 和发酵液装量。通过最陡爬坡法确定 3 个因子的变化范围, 然后根据 Box-Behnken 的中心组合试验设计原理进行 3 因素 3 水平的响应面分析, 得到了拟合度较好的回归模型。通过回归模型进行因素间交互作用的分析并预测最佳优化条件为: 蛋白胨浓度 51.48 g/L, pH 5.66, 培养基装液量 35.84 mL/250 mL。最后在优化后的条件下进行发酵试验, 产量为

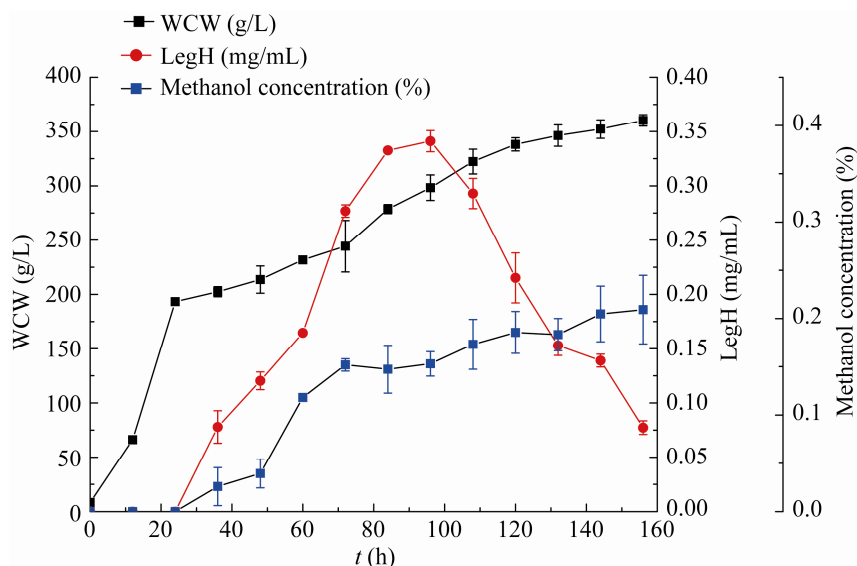


图 8 5 L 发酵罐发酵结果

Figure 8 Fermentation results of 5 L tank.

0.191 mg/mL, 为预测值的 104%, 再次说明回归模型的可靠性。优化后的产量是优化前的 1.89 倍, 获得了理想的优化结果。在此工作基础上通过 5 L 发酵罐试验, 采取补料措施进行高密度发酵, LegH 最高产量达到 0.384 mg/mL, 表明该菌株有一定的扩大生产潜力。

REFERENCES

- [1] Jin Y, He XY, Andoh-Kumi K, Fraser RZ, Lu M, Goodman RE. Evaluating potential risks of food allergy and toxicity of soy leghemoglobin expressed in *Pichia pastoris*[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2018, 62(1): 1700297
- [2] Hargrove MS, Barry JK, Brucker EA, Berry MB, Phillips GN Jr, Olson JS, Arredondo-Peter R, Dean JM, Klucas RV, Sarath G. Characterization of recombinant soybean leghemoglobin A and apolar distal histidine mutants[J]. Journal of Molecular Biology, 1997, 266(5): 1032-1042
- [3] Carpenter CE, Mahoney AW. Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition[J]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1992, 31(4): 333-367
- [4] 李宏彪, 张国强, 周景文. 合成生物学在食品领域的应用[J]. 生物产业技术, 2019(4): 5-10
Li HB, Zhang GQ, Zhou JW. Applications of synthetic biology in food industry[J]. Biotechnology & Business, 2019(4): 5-10 (in Chinese)
- [5] 赵亚兰, 尉亚辉. 豆血红蛋白的研究进展[J]. 西北植物学报, 2000, 20(4): 684-689
Zhao YL, Wei YH. Progress in the study of leghemoglobin[J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2000, 20(4): 684-689 (in Chinese)
- [6] Cos O, Ramón R, Montesinos JL, Valero F. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: a review[J]. Microbial Cell Factories, 2006, 5: 17
- [7] Kay T. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2006, 72(2): 211-222
- [8] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, Schwab H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2014, 98(12): 5301-5317
- [9] Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2004, 64(6): 763-781
- [10] 于子桐, 廖一波, 叶燕锐. 人对氧磷酶 1 在巴斯德毕赤酵母中的表达与纯化[J]. 现代食品科技, 2017, 33(7): 85-89, 8
Yu ZT, Liao YB, Ye YR. Expression and purification of human paraoxonase 1 in *Pichia pastoris*[J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(7): 85-89, 8 (in Chinese)
- [11] Reyes TF, Chen YM, Fraser RZ, Chan T, Li X. Assessment of the potential allergenicity and toxicity of *Pichia* proteins in a novel leghemoglobin preparation[J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2021, 119: 104817
- [12] Fraser RZ, Shitut M, Agrawal P, Mendes O, Klapholz S. Safety evaluation of soy leghemoglobin protein preparation derived from *Pichia pastoris*, intended for use as a flavor catalyst in plant-based meat[J]. International Journal of Toxicology, 2018, 37(3): 241-262
- [13] Zhao XR, Zhou JW, Du GC, Chen J. Recent advances in the microbial synthesis of hemoglobin[J]. Trends in Biotechnology, 2021, 39(3): 286-297
- [14] 武婕, 张晓雪, 余河水, 李薇, 贾宇平, 郭江玉, 张丽娟, 宋新波. 毕赤酵母工程菌高密度发酵研究与进展[J]. 中国生物工程杂志, 2016, 36(1): 108-114
Wu J, Zhang XX, Yu HS, Li W, Jia YP, Guo JY, Zhang LJ, Song XB. Research progress of high density fermentation process of *Pichia pastoris*[J]. China Biotechnology, 2016, 36(1): 108-114 (in Chinese)
- [15] Li PZ, Anumanthan A, Gao XG, Ilangoan K, Suzara VV, Düzgüneş N, Renugopalakrishnan V. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2007, 142(2): 105-124
- [16] Batra J, Beri D, Mishra S. Response surface methodology based optimization of β -glucosidase production from *Pichia pastoris*[J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014, 172(1): 380-393
- [17] 苏悦. 微生物高效表达异源豆血红蛋白的研究[D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文, 2020
Su Y. Study on efficient expression of heterologous

- leghemoglobin in microorganisms[D]. Hangzhou: Master's Thesis of Zhejiang University, 2020 (in Chinese)
- [18] 余波, 戴小峰, 张社, 陈宇光. 变色酸分光光度法测定毕赤酵母发酵液中的甲醇含量[J]. 上海大学学报(自然科学版), 2006, 12(2): 196-199
Yu B, Dai XF, Zhang S, Chen YG. Determination of methanol during fermentation of *Pichia pastoris* by chromotropic acid spectrophotography[J]. Journal of Shanghai University (Natural Science Edition), 2006, 12(2): 196-199 (in Chinese)
- [19] 权浩严, 王鹏, 位正鹏, 杜春影, 沈照鹏, 张京良, 乔乐克. 产胆固醇酯酶毕赤酵母发酵条件优化及酶学性质研究[J]. 食品工业科技, 2021, 42(17): 94-99
Quan HY, Wang P, Wei ZP, Du CY, Shen ZP, Zhang JL, Qiao LK. Optimization of fermentation conditions and enzymatic characteristics of the cholesterol esterase from *Pichia pastoris*[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(17): 94-99 (in Chinese)
- [20] Krainer FW, Capone S, Jäger M, Vogl T, Gerstmann M, Glieder A, Herwig C, Spadiut O. Optimizing cofactor availability for the production of recombinant heme peroxidase in *Pichia pastoris*[J]. Microbial Cell Factories, 2015, 14: 4
- [21] Zhang BH, Zhao XR, Wang ZW, Wang HZ, Zhou JW, Du GC, Chen J, Li JH. Efficient secretory expression and purification of food-grade porcine myoglobin in *Komagataella phaffii*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2021, 69(35): 10235-10245
- [22] Ishchuk OP, Frost AT, Muñoz-Paredes F, Matsumoto S, Laforge N, Eriksson NL, Martínez JL, Petranovic D. Improved production of human hemoglobin in yeast by engineering hemoglobin degradation[J]. Metabolic Engineering, 2021, 66: 259-267
- [23] 严建, 贾禄强, 丁健, 史仲平. 甲醇周期诱导控制强化毕赤酵母生产猪 α 干扰素[J]. 中国生物工程杂志, 2019, 39(6): 32-40
Yan J, Jia LQ, Ding J, Shi ZP. Enhancing pIFN- α production by *Pichia pastoris* via periodic methanol induction control[J]. China Biotechnology, 2019, 39(6): 32-40 (in Chinese)