

# 重组巴斯德毕赤酵母发酵生产几丁质酶的条件优化研究\*

阎瑞香<sup>1,2</sup> 吴仲<sup>3</sup> 侯建华<sup>1</sup> 李明刚<sup>1\*\*</sup>

(南开大学分子生物学研究所生物活性材料教育部重点实验室 天津 300071)<sup>1</sup>

(国家农产品保鲜工程技术研究中心 天津 300384)<sup>2</sup> (西北农林科技大学食品学院 杨凌 712100)<sup>3</sup>

**摘要:**研究了利用重组巴斯德毕赤酵母诱导表达重组几丁质酶的条件。在摇瓶水平上研究了诱导时间、pH、甲醇流加量、油酸等因素对重组几丁质酶表达的影响。结果发现诱导 108 h 蛋白表达量最高;偏酸性环境不利于蛋白表达,维持在 pH5.5~6.0 最佳;甲醇最佳诱导浓度为 1%;添加 0.05% 的油酸有助于提高蛋白表达量。在此基础上通过正交试验设计优化了培养基配方,在优化条件下,蛋白表达量达 171.99mg/L,酶活达 49.58U/mL。

**关键词:**毕赤酵母,重组几丁质酶,发酵,优化

中图分类号:TQ92 文献标识码:A 文章编号:0253-2654(2007)03-0468-04

## The Research on Optimal Culture Condition of Recombinant Chitinase Production in *Pichia pastoris* \*

YAN Rui-Xiang<sup>1,2</sup> WU Zhong<sup>3</sup> HOU Jian-Hua<sup>1</sup> LI Ming-Gang<sup>1\*\*</sup>

(The Key Laboratory for Bioactivematerial of Ministry of Education, Institute for Molecular Biology, College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071)<sup>1</sup>

(National Engineering and Technology Research Center of Agriculture Products Freshness Protection, Tianjin 300384)<sup>2</sup>

(College of Food Science and Engineering, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling 712100)<sup>3</sup>

**Abstract:** The fermentation condition of a recombinant strain to produce chitinase in *Pichia pastoris* was studied in this paper. By the shaking flask, the influences of inducing time, pH, methanol, oleic acid on the expression of chitinase were investigated. Results showed that the highest productivity of chitinase was obtained when induced for 108 hours. The expression of chitinase was repressed when pH was lower than 5.5 and the optimum condition was pH 5.5~6.0. The optimum concentration of methanol was 1%. The protein expression can be improved greatly when added 0.05% oleic acid. On the basis of these, the recipe of fermentation medium was optimized through orthogonal experimental design. The optimal conditions were found and the amount of protein expression reached 171.99mg/L, chitinase activity 49.58U/mL under the conditions.

**Key words:** *P. pastoris*, Recombinant chitinase, Fermentation, Optimization

几丁质是自然界中含量仅次于纤维素的生物高聚物,年生物合成量将近 100 亿吨,由 N-乙酰氨基葡萄糖通过  $\beta$ -1,4 糖苷键连接而成,由于其在农业、食品、化工、医疗等领域被发现有多种功能而日益受到重视<sup>[1]</sup>,是一种不可多得的可再生资源。但由于其分子量过大,晶体结构紧密,不易溶于水和其它普通溶剂,而限制了它的应用,在生产上一般将其降解为低聚糖应用,低聚糖有更好的生物相容性,并具有抗菌、抗肿瘤等多种生理功能<sup>[2]</sup>。几丁

质酶可通过水解糖苷键来降解几丁质,并且广泛分布于多种生物体内<sup>[3,4]</sup>;从生态学的角度来看,几丁质酶在几丁质的自然循环中扮演了重要的角色。国内外对不同来源的几丁质酶作了广泛的研究。由于得到的几丁质酶太少,而限制了对其进行系统的分子生物学研究,尤其是碱性几丁质酶,国内基本还停留在起步阶段<sup>[5]</sup>。作为一种诱导酶,很多微生物只有在含几丁质的培养基中产几丁质酶,使得操作麻烦且产量不高<sup>[6]</sup>。

\*天津市应用基础研究计划面上项目(No. 06YFJC1200)

\*\*通讯作者 Tel: 022-27944603, E-mail: wzrenwz@sohu.com

收稿日期: 2006-07-20, 修回日期: 2006-09-20

本试验所采用的 *P. pastoris* GS115 已被鉴定成功转入了水稻碱性几丁质酶基因。一种酶要被大规模应用,其价格将是首先要考虑的因素之一。通过优化培养基及其发酵条件来提高产量而降低成本是工业上常用的方法。重组 *P. pastoris* 表达外源基因受营养物质和环境条件的影响。*P. pastoris* 表达外源基因有其独特的机制:其被甲醇诱导,但浓度太低不能充分诱导外源蛋白表达,太高又会使细胞中毒;对于分泌型表达的工程菌,在发酵过程中,酵母自身分泌的蛋白酶对外源蛋白的表达量影响很大。本实验考察了重组 *P. pastoris* 生产几丁质酶的几个条件。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

*P. pastoris* GS115 菌株,遗传表型 Mut<sup>+</sup>,醇氧化酶启动子 AOX1,载体 pPIC9,由阎瑞香构建。

### 1.2 培养基和培养方法

**1.2.1 培养基:** YPD(1.0% 酵母抽提物,2.0% 蛋白胨,1.0% 葡萄糖),斜面培养基则为上述成分再加入 1.5% 的琼脂制得。BMGY(1.0% 酵母抽提物,1.0% 甘油,2.0% 蛋白胨,0.1mol/L 磷酸缓冲液,1.34% YNB(4 × 10<sup>-5</sup>)% 生物素)。BMMY(1.0% 酵母抽提物,0.5% 甲醇,2.0% 蛋白胨,0.1mol/L 磷酸缓冲液,1.34% YNB,(4 × 10<sup>-5</sup>)% 生物素)。上述浓度均为培养基终浓度。

**1.2.2 培养方法:** 于 30℃ 生长 2d 的新鲜平板上取两环单菌落接到种子培养基中摇瓶培养约 18h,再以 10% 的接种量转接到 BMGY 中培养 24h 左右,离心弃上清液,菌体转接到 BMMY 开始诱导,每隔 12h 补加甲醇至预设浓度。摇床温度为 30℃,转速 200r/min,装液量为 30mL/150mL(每批次装液量有微小差异)。

### 1.3 外源蛋白表达条件试验

**1.3.1 不同 pH 对表达外源蛋白的影响:** 用 0.1mol/L 的磷酸缓冲液配出 pH 值分别为 3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5 的 BMMY,培养 72h 后测定蛋白表达量和酶活。

**1.3.2 诱导阶段甲醇浓度对蛋白表达量的影响:** 在 BMMY 培养基中分别添加 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0% 的甲醇,pH 为 6.0,其它成分不变,培养 72h 后测定蛋白表达量和酶活。

**1.3.3 油酸对蛋白表达的影响:** 在诱导阶段分别添加 0.05%、0.10%、0.15%、0.20% 的油酸,观察其对蛋白表达的影响。

**1.3.4 发酵时间的影响:** 在 BMMY 中开始诱导后,从第 24h 起每隔 12h 取样测定蛋白表达量和酶活。

### 1.4 正交设计法优化培养基配方试验

选用正交设计法的 L<sub>3</sub><sup>4</sup> 表,以甲醇为 A 因素(处理水平为 0.5%、1.0%、1.5%)、YNB 为 B 因素(处理水平为 0.67%、1.34%、2.01%)、BMGY 与 BMMY 的体积比为 C 因素(1:2、1:1、2:1)、酵母抽提物为 D 因素(处理水平为 0.5%、1.0%、1.5%),按设计方案表配制培养基,并根据最适 pH、培养时间、添加油酸量进行摇瓶发酵试验,以几丁质酶酶活力为指标。结果通过分析软件 SPSS(11.5)分析。

### 1.5 正交试验的验证

根据正交试验设计法所得出的最佳组合设计培养基配方,接种后摇床培养,测定蛋白表达量和酶活,进行 3 次重复试验。

### 1.6 粗酶液制备

离心发酵液(4℃,1500r/min,15min),上清液即为粗酶液。

### 1.7 检测方法

蛋白表达量测定方法:Bradford 检测法<sup>[7]</sup>。

几丁质酶酶活测定方法:参考檀建新等的方法,酶活以每小时分解胶体几丁质产生 1μg 的 N-乙酰氨基葡萄糖的酶量为一个酶活力单位(U)<sup>[8]</sup>。

甲醇检测方法:气相色谱法<sup>[9]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同 pH 对表达外源蛋白的影响

不同 pH 值对外源蛋白表达的影响较大,酸性环境明显不利于几丁质酶的表达。随着 pH 值升高,蛋白表达量逐渐增加。在 pH6.0 时(121.20mg/L)产量最高。故在后续发酵生产重组几丁质酶时,需要用酸或碱不断地调整发酵液的 pH 值,使其保持在 6.0 左右,保证几丁质酶的高效表达(图 1)。

### 2.2 诱导阶段甲醇浓度对蛋白表达量的影响

*P. pastoris* 在诱导表达阶段,甲醇作为诱导物的同时又是碳源和能源。由于本菌种为 Mut<sup>+</sup> 型,对甲醇的消耗能力较强。由图 2 可以看出,在甲醇浓度为 1.0% 时,蛋白表达量最高,相对于甲醇浓度为 0.5% 时,其表达量提高了 13% 多,但甲醇浓度不宜过高。

随着浓度的进一步提高,表达量有所下降,表明过多的甲醇抑制了外源蛋白的表达。

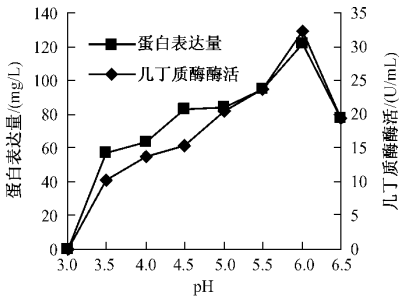


图1 pH对蛋白表达的影响

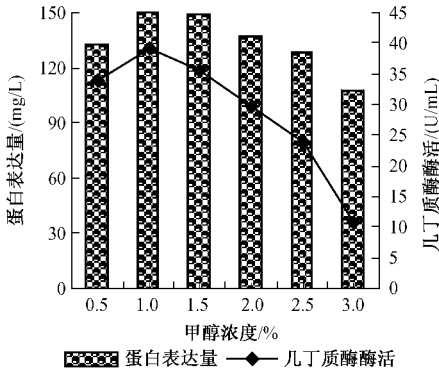


图2 甲醇浓度对蛋白表达的影响

### 2.3 油酸对蛋白表达的影响

油酸是一种能诱导过氧化物酶体产生的碳源<sup>[10]</sup>对 *P. pastoris* 而言可能是产生的过氧化物酶体协助氧化了 AOX1 氧化甲醇而产生的过氧化物,以减轻对细胞的伤害,进而提高了 AOX1 的稳定性和活力。Kaoru Kobayashi 等报道在发酵液中添加油酸能提高表达量<sup>[11]</sup>。由图 3 可看出,以添加 0.05% 的油酸为好,相对于不添加油酸的对照,其蛋白表达量大约提高了 5.7%,而随着浓度的提高,表达量反而下降,可能是因为过多的过氧化物酶体影响了酵母的代谢途径,抑制了甲醇的诱导作用。由于油酸在发酵罐中还具有消泡剂的作用,故以此浓度为参考在后续发酵罐生产中添加。

### 2.4 发酵时间的影响

随着诱导时间的增加,蛋白表达量呈上升趋势,由图 4 可以看出蛋白表达量在第 108h 达到最高(124.29mg/L),但是其表达的增长速率在第 72h 时已放缓。酶活随表达量的增加而增加,呈现很好的正相关性。

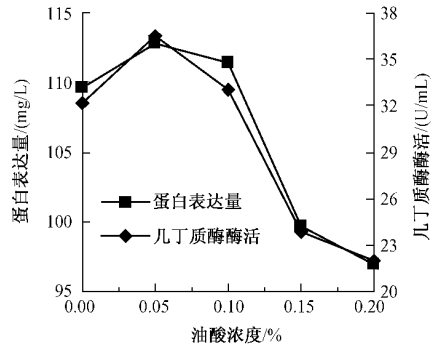


图3 油酸对蛋白表达的影响

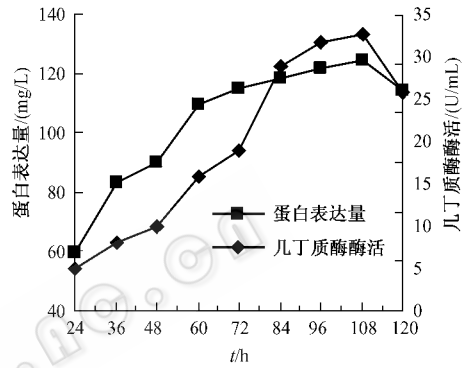


图4 诱导时间对蛋白表达的影响

### 2.5 正交设计法优化培养基配方试验

根据以下正交表的试验结果,以 A 取 A<sub>2</sub> 时最高, B 取 B<sub>1</sub> 时最高, C 取 C<sub>3</sub> 时最高, D 取 D<sub>3</sub> 最高。即以 A<sub>2</sub>B<sub>1</sub>C<sub>3</sub>D<sub>3</sub> 为最优条件。C 的两个水平之间差异最大,依次为 C > D > A > B, C 为主要因素。经 SPSS (11.5) 分析, C、D、A 对蛋白表达量有显著性影响。

表1 四因素三水平正交试验

试验号	A	B	C	D	试验值
M1	1	1	1	1	19.96
M2	1	2	2	2	32.60
M3	1	3	3	3	39.61
M4	2	1	2	3	47.78
M5	2	2	3	1	42.52
M6	2	3	1	2	29.71
M7	3	1	3	2	41.26
M8	3	2	1	3	32.16
M9	3	3	2	1	26.77
I	30.72	36.33	27.28	29.75	
II	40.00	35.76	35.72	34.52	
III	33.40	32.03	41.13	39.85	

表2 正交试验的方差分析

方差来源	平方和	自由度	方差	F 值	显著性
A	410.634	2	205.317	18.905	**
B	98.088	2	49.044	4.516	*
C	877.398	2	438.699	40.393	**
D	459.401	2	229.701	21.150	**
误差	195.492	18	10.861		

注:  $F_{0.95}(2, 18) = 3.55$ ,  $F_{0.99}(2, 18) = 6.01$

## 2.6 正交试验的验证

按正交试验所得的诱导阶段最佳条件,即以甲醇 1.0%, YNB0.67%, 体积比 2:1, 酵母抽提物 1.5% 进行同批次的 3 次试验, 平均表达量达 171.99mg/L, 酶活为 49.58U/mL。符合正交试验的分析结果。

表3 正交试验优化结果验证

试验批次	1	2	3	平均数
蛋白表达量(mg/L)	170.32	174.14	171.52	171.99
酶活(U/mL)	50.86	47.90	49.97	49.58

## 3 讨论

重组 *P. pastoris* 的外源基因整合在 AOX 基因的下游, 所以重组几丁质酶的表达与 AOX 的表达成正比。在诱导期, AOX 启动子严格受甲醇诱导, 因此提高甲醇浓度可能会提高外源蛋白表达量, 本实验得出甲醇浓度为 1% 时较好, 而随着甲醇浓度的逐渐增大, 蛋白表达量逐渐下降, 这可能是甲醇没有耗尽、有积累, 对细胞产生毒害作用。在实验初期我们每 24h 补加一次甲醇, 后来改为 12h 补加一次甲醇, 发现蛋白表达量有所提高, 并且减少了背景杂蛋白, 由此推测该菌株对甲醇浓度变化敏感, 提高诱导期甲醇浓度的稳定性将是一个关键。

pH 过低会影响细胞膜的通透性, 进而影响细胞对营养物质的吸收和对蛋白的分泌, 但有些外源蛋白的表达需要将 pH 降低, 如王海宽等报道毕赤酵母表达木质素过氧化物酶时, 对产酶影响最大的为 pH 值, 当 pH 值为 3.0 时, 产酶量较高, 可能低 pH 抑制了降解目的蛋白的特异性蛋白酶的活性<sup>[12]</sup>。

本实验发现当 pH 为 6.0 时外源蛋白表达量最高, 可能是在该条件下不仅较有利于酵母生长, 也抑制了蛋白酶的活性。同时培养基中的蛋白胨也起到了蛋白酶底物竞争物的作用。

Mut<sup>+</sup> 型 *P. pastoris* 能迅速启动外源基因的高效表达, 一般在 72h ~ 80h 内即达到产酶高峰。本实验发现在 108h 才达到产酶高峰, 比通常要推迟, 可能是因为采用的 BMGY 和 BMMY 营养成分较其它酵母培养基全面, 体系中的缓冲液减弱了培养基条件的恶化, 也可能该外源蛋白对 *P. pastoris* 的影响较小。

以上初步考察了重组几丁质酶的发酶条件, 由正交试验可以看出细胞密度是影响外源蛋白表达的最主要因素。摇瓶发酵过程中营养物质充足, 故溶氧应该为限制因素。我们下一步将用发酵罐生产重组几丁质酶, 由于发酵罐的参数如 pH、通气量、甲醇流加速度等很容易在线控制, 所以 *P. pastoris* 易于在发酵罐中放大并达到高密度, 保障我们将蛋白表达量进一步提高。另外, 高密度发酵时蛋白酶与外源蛋白表达量的关系也正在进一步的研究中。

## 参考文献

- [1] 蒋挺大. 甲壳素. 北京: 化学工业出版社, 2003, pp. 341 ~ 648.
- [2] 竺国芳, 赵鲁杭. 中国海洋药物, 2000, 1: 43 ~ 46.
- [3] Cottrell M T, Moore J A, Kirchman D L. Applied and Environmental Microbiology, 1999, 65(6): 2553 ~ 2557.
- [4] 张虎, 杜昱光, 虞星炬. 中国生化药物杂志, 1999, 20(2): 99 ~ 101.
- [5] 陈亚成, 陈红歌, 王石磊, 等. 河南农业大学学报, 1998, 32(4): 389 ~ 393.
- [6] Svitil A L, Chadhain S M N, Moore J A, et al. Applied and Environmental Microbiology, 1997, 63(2): 408 ~ 413.
- [7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000, pp. 42 ~ 47.
- [8] 檀建新, 陈忠义, 张杰, 等. 植物保护, 2001, 27(2): 1 ~ 3.
- [9] 邓兵兵, 方宏清, 薛冲, 等. 工业微生物, 2001, 31(2): 26 ~ 29.
- [10] Snyder W B, Faber K N, Wenzel T J, et al. Molecular Biology of the Cell, 1999, 10: 1745 ~ 1761.
- [11] Kaoru K, Shinobu K, Tomoshi O, et al. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2000, 89(5): 479 ~ 484.
- [12] 王海宽, 路福平, 孙亚范, 等. 微生物学杂志, 2005, 25(3): 17 ~ 21.