

文章编号:1673-1689(2005)05-0080-06

阿片肽酿酒酵母工程菌摇瓶发酵工艺

陈义勇¹, 施用晖², 乐国伟²

(1. 常熟理工学院 生物科学与工程系, 江苏 常熟 215500; 2. 江南大学 食品学院, 江苏 无锡 214036)

摘要: 研究了发酵培养基成分、补加方式及外源氨基酸对酿酒酵母发酵和表达的影响。结果表明, 发酵前在液体发酵培养基中一次性补加酵母抽提物(YE)有利于目的产物的表达, 发酵过程中补加 YE 不利于目的产物的表达, 发酵中后期补加适量的葡萄糖有利于阿片肽的表达。添加外源氨基酸对酿酒酵母工程菌的生长有一定的促进作用, 而且可以明显地影响阿片肽的表达。通过正交实验对酿酒酵母生长和表达条件进行优化, 确定最优工艺参数为: 培养基中酵母抽提物质量浓度为 25 g/L, C : N 比 2.8, 培养基初始 pH 5.0, 摇床转速 220 r/min。在最优条件下研究了酿酒酵母表达目的产物的情况, 总蛋白质质量浓度为 614.50 mg/L。SDS-PAGE 电泳和双波长凝胶扫描结果表明: 目的阿片肽约占总分泌蛋白质的 5%, 其表达量为 30.7 mg/L, 是优化前的 1.49 倍。

关键词: 阿片肽; 酿酒酵母; 发酵

中图分类号: TQ 920

文献标识码: A

Expressing Foreign Opium Peptide by Fermentation of Recombinant *Saccharomyces cerevisiae* in Shake Flask

CHEN Yi-yong¹, SHI Yong-hui², LE Guo-wei²

(1. Department of Biological Science and Engineering, Changshu Institute of Technology, Changshu 215500, China; 2. School of Food Science and Technology, Southern Yangze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The effects of medium and foreign amino acid addition manners on fermentation and expression of *Saccharomyces cerevisiae* were studied. The results showed that addition of yeast extract at the beginning of the fermentation was favorable to the foreign opium expression, while addition of yeast extract during the fermentation did the opposite effect. The addition of appropriate glucose to keep a low glucose concentration in later fermentation phase, also help to the target opium peptide expression. Adding foreign amino acid could promote the *Saccharomyces cerevisiae* growth in a degree. It also obviously enhance the expression of the target opium peptide. Some factors influencing the growth and expression of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* were investigated through single factor experiment, and the optimized parameters were obtained as follows: yeast extract, 25 g/L; C : N, 2.8; initial pH, 5.0; speed of shaking incubator, 220 r/min. Expression of the target opium peptide in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* under the optimized conditions was investigated. The amount of the total excreting proteins was 614.50 mg/L. SDS-PAGE and double-wave gel scanning showed that the target

收稿日期: 2004-07-09; 修回日期: 2004-10-28.

作者简介: 陈义勇(1974-), 男, 河南西平人, 讲师, 工学硕士.

万方数据

opium peptide concentration of 30.7 mg/L accounted for 5% of the total excreting proteins, the expression amount was 49% higher than that of un-optimized fermentation.

Key words: opium peptide; *Saccharomyces cerevisiae*; fermentation

阿片肽是指一类具有阿片样作用的生物活性肽,其生物活性表现在如下方面:抗腹泻,促进摄食,镇痛,镇静,调节睡眠模式,缓解压力与紧张,抑制胃肠道运动和消化液的分泌,促进电解质的吸收,调节内分泌,抑制细胞分裂和分化,调节免疫,影响生殖与泌乳,调节心血管系统功能。将阿片肽应用于动物生产,可以降低幼龄动物的腹泻率,促进动物摄食,镇静并调节睡眠,以达到促进动物生长的目的^[1]。酿酒酵母是一种单细胞真核生物,与传统的大肠杆菌相比,它除了具有原核生物的生长快,便于遗传操作等优点外,同时对营养要求简便,便于工业化大规模发酵培养,在糖基化、二硫键形成以及蛋白质折叠等翻译后加工方面具有与真核生物相似的分泌系统,表达的外源基因产物可以正确加工,经催化形成正确的二硫键后分泌到细胞外,并且不产生有毒产物,因而在表达外源蛋白质等方面具有明显的优越性^[2],故选择酿酒酵母作为表达外源阿片肽的宿主。由于外源基因在宿主细胞中的表达受很多因素的影响,不仅要考虑工程菌本身的因素,还要顾及工程菌培养过程中的外部条件,因此需要对发酵过程中各种参数进行监测,优化其工艺条件,实现目的产物的高表达。作者研究了影响酿酒酵母工程菌生长和表达外源阿片肽的一些重要因素,通过正交试验确定了影响酿酒酵母生长和分泌表达产物的最优工艺条件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 阿片肽酿酒酵母基因工程菌 BJ1991-CM-pVT102U,由江南大学食品学院营养与生物技术实验室构建。

1.1.2 培养基

1) 斜面培养基: YNB 培养基 + Trp(20 mg/L) + Leu(20 mg/L) + His(20 mg/L)。

2) 液体种子培养基: YEPD 培养基。

3) 液体发酵培养基: 葡萄糖 20 g/L, 硫酸铵 5 g/L, 磷酸二氢钾 1 g/L, 硫酸镁 0.5 g/L, 酵母抽提物 0.2 g/L, 氯化钙 0.1 g/L, 氯化钠 0.1 g/L。

1.1.3 仪器 722 型分光光度计: 上海第三分析仪器厂制造; UV-2602B 紫外可见分光光度计: 上海分

析仪器总厂制造; PHS-2C 型精密酸度计: 上海医用仪器厂制造; GL-16G-II 型高速冷冻离心机: 上海安亭科学仪器厂制造; DL-5 型低速大容量离心机: 上海安亭科学仪器厂制造; HYG-IIa 迴转式恒温调速摇瓶柜: 上海欣蕊自动化设备有限公司制造; LS-B50L 立式园形压力蒸气灭菌器: 上海医用核子仪器厂制造; 隔水式电热恒温培养箱: 上海跃进医疗器械厂制造。

1.2 实验方法

1.2.1 发酵液中生物量的测定 取发酵液摇匀, 用液体发酵培养基作空白, 在 600 nm 处测发酵液的吸光值 OD₆₀₀。

1.2.2 发酵液中总肽含量的定量 取发酵液, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清液稀释一定倍数, 用稀释相同倍数的液体发酵培养基作空白, 在 225 nm 处测稀释液的 OD₂₂₅。

1.2.3 最优条件下发酵液中蛋白质含量的测定 考马斯亮蓝 G250 法^[3]。

1.2.4 最优条件下发酵液的 SDS-PAGE 分析产物 的表达量 双波长凝胶扫描。

2 结果与分析

2.1 培养基初始 pH 值的确定

在发酵过程中, pH 值的变化由酵母细胞代谢特征、培养基配比和发酵环境决定, 细胞自身具有有限的调节 pH 值的能力, 当外界条件变化过于激烈时, 细胞则失去自身调节能力而受到外界的强烈干预, 影响细胞的正常生长及表达。同时, 培养基的 pH 值会影响菌体细胞膜的电荷状况, 引起膜透性发生变化, 进而影响菌体对营养物质的吸收和代谢产物的分泌; 此外, 还可影响培养基中某些营养物质的分解或中间代谢产物的解离, 从而影响微生物对这些物质的利用, 对发酵液产生物理化学影响, 影响产物的稳定性。因此, 保持其他配比不变, 配制具有不同初始 pH 值的酵母工程菌发酵培养基进行摇瓶发酵实验, 找出适于工程菌表达的 pH 值范围, 因此必须研究培养基的初始 pH 值对发酵的影响。

在 250 mL 三角瓶中装入液体发酵培养基 50 mL, 分别调初始 pH 值为 4, 5, 6, 7, 8, 接入液体种子, 于 30 °C、140 r/min 摇床培养, 发酵结束后测

OD₆₀₀和OD₂₂₅,确定最适初始pH值,结果见图1。

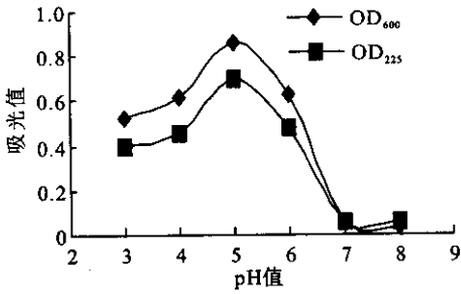


图1 初始pH值对酿酒酵母工程菌生长和表达的影响

Fig. 1 Effect of initial pH on growth and expression of *Saccharomyces cerevisiae*

在发酵过程中,由于细胞分泌代谢产物,培养基中的营养物质的代谢,使得培养基中的pH值会发生较大的变化,因此发酵过程中必须控制培养基的pH值恒定在最适pH值附近。从图1可以看出:培养基初始pH值对酿酒酵母的生长和表达影响较大,pH值在4~6的范围内生长较好。培养基初始pH值为中性或碱性时,酵母细胞几乎停止了生长。培养基初始pH值为5.0时,酿酒酵母的生长最好,目的产物表达量最大。

2.2 摇床转速的确定

溶氧是需氧发酵控制的最重要的参数之一,氧在水中的溶解度很小,所以需要不断地通气和搅拌,才能满足溶氧的要求,而溶氧的大小对菌体的生长和产物的表达量都会产生不同的影响。作者通过改变摇床转速来研究溶氧量对发酵的影响。

在250 mL三角瓶中装入液体发酵培养基50 mL,接入液体种子,分别在不同的摇床转速下培养,发酵结束后测OD₆₀₀和OD₂₂₅,确定最佳的摇床转速,结果见图2。

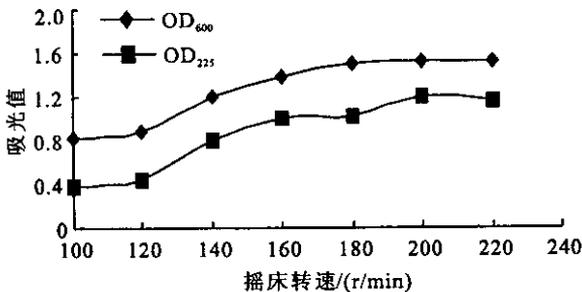


图2 摇床转速对酿酒酵母工程菌生长和表达的影响

Fig. 2 Effect of speed of shaking incubator on growth and expression of *Saccharomyces cerevisiae*

从图2可以看出:随着摇床转速的提高,发酵液中的溶氧量增加,有利于酿酒酵母工程菌的生长

和目的产物的表达,当摇床转速达到200 r/min时,菌体的生长和目的产物的表达都达到理想的状态,随着摇床转速的增加,开始对目的产物的表达产生了一定的抑制作用。

2.3 葡萄糖的补加方式对酿酒酵母发酵的影响

补加葡萄糖方式对酿酒酵母工程菌的表达起重要的作用,为此考察了不同补糖方式对表达的影响。

保持发酵培养基中总葡萄糖质量浓度为20 g/L不变,在3个250 mL三角瓶中各加入50 mL发酵培养基,一种方法是一次性在培养基中加入葡萄糖,使葡萄糖质量浓度达到20 g/L;一种方法(用20+20a表示)是保持初始发酵培养基葡萄糖质量浓度为10 g/L,在发酵12 h后补加葡萄糖,使葡萄糖质量浓度最后达到20 g/L;一种方法(20+20b表示)是保持初始发酵培养基葡萄糖质量浓度为10 g/L,在发酵12 h和24 h分别补加葡萄糖,使最后葡萄糖质量浓度达到20 g/L,发酵36 h后测定发酵液的OD₆₀₀和OD₂₂₅,结果见图3。

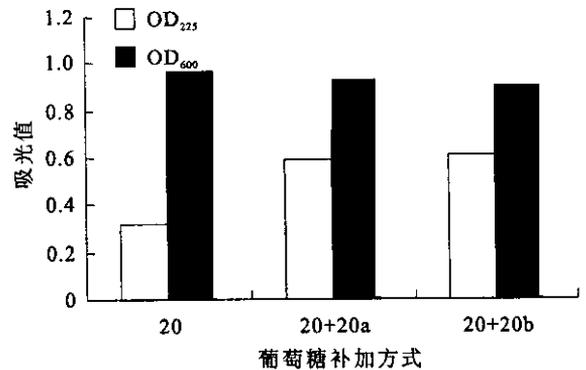


图3 葡萄糖补加方式对酿酒酵母工程菌生长和表达的影响

Fig. 3 Effect of glucose adding methods on growth and expression of *Saccharomyces cerevisiae*

从图3可以看出:葡萄糖的补加方式对酿酒酵母的生长影响不大,但是对阿片肽的表达影响较大。在发酵中后期补加适量的葡萄糖,维持发酵培养基中较低的葡萄糖水平,有利于目的产物阿片肽的表达。

2.4 酵母抽提物的质量浓度及补加方式对酿酒酵母发酵的影响

由于酵母抽提物(YE)的来源及其用量对工程菌发酵及后处理都有较大的影响,为此保持培养基其他成分不变,考察YE质量浓度及补加方式对工程菌生长及表达的影响。

配制发酵培养基,使液体发酵培养基中YE的质量浓度分别为10, 15, 20, 25 g/L,在250 mL三

角瓶中装入 50 mL 上述培养基,再取两个三角瓶分别装入 YE 质量浓度分别为 10, 15 g/L 的发酵培养基 50 mL, 30 °C 摇床发酵, 在发酵 12 h 后, 一种方法(用 10+5a 表示)是在 YE 质量浓度为 10g/L 的培养基中补加 YE, 使培养基中 YE 质量浓度达到 15 g/L; 一种方法(15+5a 表示)是在 YE 质量浓度为 15 g/L 的培养基中补加 YE, 使培养基中最后的 YE 质量浓度达到 20 g/L。发酵 36 h, 测 OD₆₀₀ 和 OD₂₂₅, 确定 YE 的添加量和补加方式, 结果见图 4。

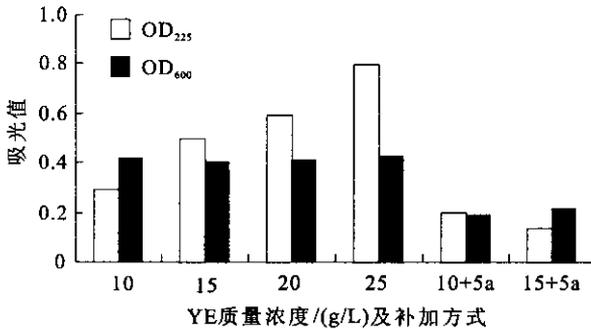


图 4 YE 质量浓度及其补加方式对酿酒酵母工程菌生长和表达的影响

Fig. 4 Effect of YE adding method and its content on growth and expression of *saccharomyces cerevisiae*

从图 4 可以看出, 在液体发酵培养基中一次性添加 YE 有利于阿片肽的表达, 在发酵过程中添加 YE, 不利于目的阿片肽的表达, 确定培养基中 YE 的添加量为 25 g/L。

2.5 培养基中 C : N 比的确定

碳源和氮源对菌体的代谢产生明显的影响, 因此发酵培养基中合适的 C : N 比显得尤为重要。C : N 比采用葡萄糖和硫酸铵的摩尔比, 葡萄糖浓度一定, 通过改变硫酸铵的浓度来改变 C : N 比, 使它在一定的范围内变化, 而发酵培养基中酵母抽提物的量保持不变。

将酿酒酵母工程菌接种于不同 C : N 比的发酵液中进行发酵, 发酵结束后测 OD₆₀₀ 和 OD₂₂₅, 确定最适 C : N 比, 结果见图 5。

由图 5 可以看出, 在 C : N 比为 1~1.9 的范围内, 菌体量增加较为明显, 但随着 C : N 比的进一步增加, 其对菌体的生长影响不大。随着 C : N 比的增加, 目的产物表达量逐步提高, C : N 比达到 2.8 后, 再增加 C : N 比, 目的产物表达量减少, 这可能是因为葡萄糖大部分代谢为乙酸及其他一些次生代谢产物, 对目的产物的生成有抑制作用, 减少了葡萄糖的利用率, 造成葡萄糖的相对缺乏, 对

菌体的生长有所影响, 进而使得目的产物表达量降低, 确定的最佳 C : N 比为 2.8。

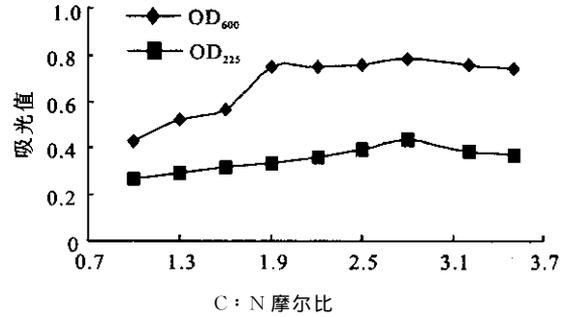


图 5 C : N 比对酿酒酵母工程菌生长和表达的影响

Fig. 5 Effect of C : N on growth and expression of *saccharomyces cerevisiae*

2.6 外源氨基酸对酿酒酵母工程菌表达的影响

氨基酸作为阿片肽的前体物质, 适量添加可以缓解工程菌本身合成各种氨基酸的压力。在所设计的阿片肽序列中, 有 Phe、Arg、Gly、Pro、Glu、Thr、Tyr、Ser、Ile、Lys、Met 这 11 种氨基酸, 考察添加这些外源氨基酸对酿酒酵母工程菌生长和表达的影响。

参照 Loewen 等^[4]的添加量, 添加质量浓度分别为 0.5, 1.0 g/L, 同时与不添加外源氨基酸的培养基进行对照, 发酵 24 h 后, 测 OD₆₀₀ 和 OD₂₂₅, 结果见表 1。

由表 1 可以看出, 添加外源氨基酸作为氮源的补充对酿酒酵母工程菌有一定的促进生长的作用, 但影响不是很大, 却可以明显地影响阿片肽的表达, 其中添加 Phe、Arg、Thr、Tyr、Ser、Lys、Met 可以有效地促进阿片肽的表达, 添加 Gly 和 Ile 对阿片肽的表达具有一定的负作用, 通过分析微生物中氨基酸的合成与代谢途径, 可知 Ile 的合成前体是 Thr, Gly 的合成前体是 Ser^[8]。当 Ile 的添加量过多时, 便会抑制 Thr 的合成, 进而影响阿片肽的表达。Gly 添加量过多, 对 Ser 的合成有所抑制, 造成 Ser 的相对缺乏, 进而使阿片肽的表达量有所下降。添加 Glu, 可以使表达量提高约 1.7~2.3 倍, 这可能是因为 Glu 是氨基酸中心代谢环节的关键中间产物, 与其相对应的 α -酮戊二酸的可逆反应维持平衡, 从而 Glu 的生物合成不受最终代谢产物的抑制, 有利于 Glu 量的增加, 有利于阿片肽的表达。添加 Pro 可以较为明显地提高目的产物的表达量。

2.7 工程菌发酵条件的优化

2.7.1 因素与水平的安排 将酵母抽提物、C : N 比、摇床转速及培养基的初始 pH 值四个因素各取四水平, 按正交表 L₁₆(4⁴) 安排试验, 结果见表 2。

表1 外源氨基酸对酿酒酵母工程菌生长和表达的影响

Tab.1 Effect of the foreign amino acid on growth and expression of *Saccharomyces cerevisiae*

氨基酸	添加质量浓度/(g/L)	OD ₆₀₀	OD ₂₂₅
Phe	0.5	0.692	0.742
	1.0	0.716	0.950
Arg	0.5	0.640	0.694
	1.0	0.691	0.853
Gly	0.5	0.696	1.040
	1.0	0.715	0.924
Pro	0.5	0.724	0.861
	1.0	0.727	1.449
Glu	0.5	0.661	1.110
	1.0	0.701	1.550
Thr	0.5	0.647	0.870
	1.0	0.670	0.991
Tyr	0.5	0.687	0.932
	1.0	0.703	1.013
Ser	0.5	0.657	0.850
	1.0	0.669	1.081
Ile	0.5	0.680	0.671
	1.0	0.695	0.652
Lys	0.5	0.650	0.741
	1.0	0.681	0.857
Met	0.5	0.670	0.746
	1.0	0.691	0.876
对照	0	0.631	0.664

表2 正交实验设计表

Tab.2 Design of single factor experiment

水平	A 酵母抽提物质量浓度/(g/L)	B C:N 比	C 摇床转速/(r/min)	D 初始 pH 值
1	10	2.2	160	4
2	15	2.5	180	5
3	20	2.8	200	6
4	25	3.1	220	7

2.7.2 实验结果与分析 实验结果见表3~5。按极差大小决定影响酿酒酵母生长因素的主次顺序： $B>D>A>C$ ，各因素取菌体生长的最高水平，从而组成酿酒酵母工程菌生长的最优工艺条件 $B_3D_2A_4C_3$ ，即：C/N 比 2.8，培养基初始 pH 5.0，酵母

抽提物质量浓度 25 g/L，摇床转速 200 r/min。

表3 实验方案和实验结果

Tab.3 Design and result of experiment

试验号	A	B	C	D	OD ₆₀₀	OD ₂₂₅
1	1	1	1	1	1.231	0.52
2	1	2	2	2	1.320	0.63
3	1	3	3	3	1.974	1.07
4	1	4	4	4	1.257	1.19
5	2	1	2	3	1.226	0.71
6	2	2	1	4	1.136	0.51
7	2	3	4	1	1.520	1.13
8	2	4	3	2	1.391	0.82
9	3	1	3	4	1.221	0.57
10	3	2	4	3	1.197	0.78
11	3	3	1	2	1.617	1.28
12	3	4	2	1	1.745	0.91
13	4	1	4	2	1.579	1.36
14	4	2	3	1	1.378	1.27
15	4	3	2	4	1.313	1.19
16	4	4	1	3	1.536	1.07

表4 酿酒酵母生长条件结果分析

Tab.4 Analysis of growth of *Saccharomyces cerevisiae*

极差	OD ₆₀₀			
	A	B	C	D
K_1	5.782	5.257	5.520	5.874
K_2	5.273	5.031	5.604	5.907
K_3	5.780	6.424	5.964	5.833
K_4	5.806	5.929	5.553	4.927
R	0.533	1.393	0.444	0.980

表5 酿酒酵母分泌表达目的产物工艺条件结果分析

Tab.5 Analysis of Expression of the target opium peptide in *Saccharomyces cerevisiae*

极差	OD ₆₀₀			
	A	B	C	D
K_1	3.41	3.16	3.38	3.83
K_2	3.17	3.19	3.44	4.09
K_3	3.54	4.67	3.73	3.63
K_4	4.89	3.99	4.46	3.46
R	1.72	1.51	1.08	0.63

按极差大小决定影响酿酒酵母分泌表达产物

的因素的主次顺序: $A>B>C>D$,各因素取酿酒酵母分泌表达产物的最高水平,从而组成酿酒酵母分泌表达的最优工艺条件 $A_4B_3C_4D_2$,即酵母抽提物质量浓度 25 g/L, C : N 比 2.8, 摇床转速 220 r/min, 培养基初始 pH 值 5.0.

由于实验的目的主要是关注表达的目的产物的分泌,最终确定酿酒酵母生长和表达分泌目的阿片肽的条件为:培养基中酵母抽提物质量浓度为 25 g/L, C : N 比 2.8, 培养基初始 pH 5.0, 摇床转速 220 r/min, 其余培养基成分的浓度同液体发酵培养基.

2.8 最优条件下表达产物的 SDS-PAGE 结果

最优条件下表达产物的 SDS-PAGE 凝胶电泳结果见图 6.

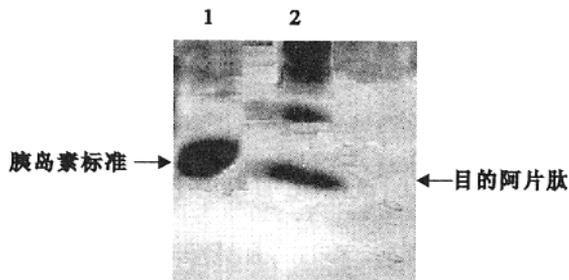


图 6 最优条件下酿酒酵母发酵液 SDS-PAGE 凝胶电泳

Fig. 6 SDS-PAGE of fermentation liquid under the optimized conditions

在正交实验最优化的条件下对酿酒酵母摇床发酵 78 h, 然后 10 000 r/min 离心 10 min, 取发酵上清液, 测总蛋白质质量浓度为 614.50 mg/L, 然

后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳, 双波长凝胶扫描表明, 目的蛋白质约占总分泌蛋白质的 5%, 推算出表达的目的阿片肽质量浓度为 30.7 mg/L, 是优化前的 1.49 倍.

3 结 论

通过对阿片肽酿酒酵母工程菌的发酵条件进行研究, 得出如下结论:

1) 酿酒酵母生长和表达分泌目的阿片肽的条件为: 培养基中酵母抽提物质量浓度为 25 g/L, C : N 比 2.8, 初始培养基 pH 值 5.0, 摇床转速 220 r/min.

2) 在液体发酵培养基中一次性提高 YE 的质量浓度有利于目的产物的表达, 在发酵过程中补加 YE 来提高培养基 YE 的质量浓度不利于目的产物的表达, 培养基中 YE 的添加量为 25 g/L. 葡糖糖的补加方式对酿酒酵母的生长影响不大, 但是对阿片肽的表达影响较大. 在发酵中后期补加适量的葡萄糖, 维持发酵培养基中较低的葡萄糖水平, 有利于阿片肽的表达.

3) 添加外源氨基酸对酿酒酵母工程菌有一定的促进生长作用, 但是明显地影响阿片肽的表达, 添加 Phe、Arg、Thr、Tyr、Ser、Lys、Met 可以有效地促进阿片肽的表达. 添加 Ile 对阿片肽的表达具有一定的负作用; 添加 Glu 和 Pro 可以较为明显地提高阿片肽的表达量.

4) 最优化条件下酿酒酵母表达的目的阿片肽质量浓度为 30.7 mg/L, 是优化前的 1.49 倍.

参考文献:

- [1] 张必武, 乐国伟, 施用晖. 乳蛋白源阿片肽- β -酪啡肽[J]. 饲料研究, 2001, (6): 14-15.
- [2] Parent S A, Fenimore C M, Bostian K A. Vector systems for the expression, analysis and cloning of DNA sequences in *S. cerevisiae* yeast[J]. *J Biol Chem*, 1985, (5): 83-138.
- [3] 陈执中, 章月华. 现代生化药物与基因工程药物分析[M]. 上海: 上海医科大学出版社, 2000. 3-5.
- [4] Loewen M C. Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein fermentation by *Pichia pastoris*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 48(4): 480-486.
- [5] 张友尚, 胡红明, 蔡若蓉, 等. 单链胰岛素前体在酵母中的分泌表达及其转变成人胰岛素[J]. 中国科学(C 辑), 1997, 27(1): 1-6.
- [6] Thierry Vernet, Daniel Dignard, David Y Thomas. A family of yeast expression vector containing the phage f1 intergenic region[J]. *Gene*, 1987, (52): 225-233.
- [7] 石继红, 赵永同. SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析小分子多肽[J]. 第四军医大学学报, 2000, 21(6): 761-763.

(责任编辑: 李春丽)