

洋葱伯克霍尔德氏菌 Lu10-1 脂肪酶的异源表达

张 瑶^{1,2}, 路国兵², 崔为正², 陈 强³, 牟志美^{*2}

(1. 山东理工大学 农业工程与食品科学学院, 山东 淄博 255000; 2. 山东农业大学 林学院, 山东 泰安 271018;

3. 滕州市农业局, 山东 滕州 277500)

摘要: 通过 PCR 扩增出洋葱伯克霍尔德氏菌 Lu10-1 脂肪酶基因, 将基因片段分别克隆到大肠杆菌、毕赤酵母和枯草杆菌的表达载体, 转入表达菌株中。结果表明, 重组脂肪酶在大肠杆菌中主要以包涵体形式表达, 在毕赤酵母中未有表达, 而在枯草杆菌中实现了胞外分泌表达, 测得发酵上清液酶活为 13.8 U/mL。对重组枯草杆菌发酵条件进行了摇瓶初步优化和 3 L 的反应器分批培养。当以 TB 为出发培养基, 初始 pH 6.5, 温度为 37℃ 时, 在 3 L 的发酵罐上最终酶活达到 34.5 U/mL, 是野生菌表达量的 4.2 倍。

关键词: 脂肪酶; 异源表达; 大肠杆菌; 毕赤酵母; 枯草杆菌

中图分类号: Q 78 文献标志码: A 文章编号: 1673—1689(2016)06—0640—08

Study on Heterologous Expression of *Burkholderia cepacia* Lu10-1 Lipase

ZHANG Yao^{1,2}, LU Guobing², CUI Weizheng², CHEN Qiang³, MU Zhimei^{*2}

(1. School of Agricultural Engineering and Food Science, Shandong University of Technology, Zibo 255000, China; 2. College of Forestry, Shandong Agricultural University, Taian 271018, China; 3. Tengzhou Agricultural Department, Tengzhou 277500, China)

Abstract: The lipase gene was isolated from *Burkholderia cepacia* Lu10-1 by PCR amplification and separately inserted into different vectors, which was then transformed to *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Bacillus subtilis*, respectively. The recombinant lipase was expressed as inclusion bodies in *E. coli*, while no expression of lipase was detected in *P. pastoris*. In *B. subtilis*, the lipase was extracellular expressed with an enzyme activity of 13.8 U/mL in the supernatant after fermentation. In addition, the optimization of culture condition for the recombinant *B. subtilis* was investigated in flask and 3 L stirred tank fermentor, respectively. After cultivation at 37 °C with the initial pH of 6.5 and TB used as the starting medium, the lipase activity in 3 L fermentor reached to 34.5 U/mL, a 4.2-fold to that of the original strain.

Keywords: lipase, heterologous expression, *Escherichia coli*, *Pichia pastoris*, *Bacillus subtilis*

收稿日期: 2014-12-02

基金项目: 中国博士后科学研究基金项目(2015T80735, 2013M531641)。

作者简介: 张 瑶(1982—), 女, 山东德州人, 工学博士, 讲师, 主要从事微生物学、酶工程等方面的研究。E-mail: zhangyao@sdut.edu.cn

* 通信作者: 牟志美(1950—), 女, 山东栖霞人, 教授, 主要从事家蚕病理和蚕病防治研究。E-mail: lz20011022@126.com

脂肪酶(lipase, EC3.1.1.3)又称甘油三酰酯水解酶(Triacylglycerol acylhydrolase),它不仅可以催化甘油酯水解为甘油、二酰甘油酯、单酰甘油酯和脂肪酸,还能催化甘油酯及水不溶性酯类的水解、酯合成、酸解、转酯化、醇解以及氨解等反应。因而,脂肪酶作为一种多功能水解酶,已被广泛应用于食品加工、生物能源及化工等诸多领域^[1-3]。来源于洋葱伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia cepacia*)的脂肪酶由于具有稳定性好、有机溶剂耐受性强等优良特性,在酶法制备生物柴油工艺中应用前景较大^[4-5]。目前,虽有小批量商业化生产 *B. cepacia* 脂肪酶,但价格昂贵,限制了国内大规模工业化推广使用。

为了大幅提高酶的产量和生产强度,将脂肪酶基因采用基因工程方法过量表达被认为是最有效的途径之一。常用的基因工程宿主菌有大肠杆菌、酵母以及枯草杆菌。大肠杆菌具有生长迅速、发酵周期短、营养要求低等优点,是基因工程宿主菌的首选^[6-7]。酵母表达系统在表达外源蛋白质时稳定性较好,分泌表达量高^[8]。枯草杆菌具有强大的蛋白质分泌能力,也常作为工业中应用较广泛的分泌表达宿主^[9]。作者所在实验室在前期分离鉴定了能产脂肪酶的洋葱伯克霍尔德氏菌 Lu10-1^[10]。为了提高酶的表达量,研究尝试分别选用大肠杆菌、毕赤酵母和枯草杆菌分泌表达系统表达 *B. cepacia* Lu10-1 脂肪酶,初步研究了温度、pH 和培养基对重组枯草杆菌产酶的影响,并实现了 Lu10-1 脂肪酶在 3 L 容积发酵罐的放大培养。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

B. cepacia Lu10-1, 由作者所在实验室保藏;克隆宿主菌 *Escherichia coli* JM109, 表达宿主菌 *E. coli* BL21 (DE3), *Pichia pastoris* KM71, *Bacillus subtilis* WB600 (*his⁻ nprB⁻ nprE18⁻ aprE⁻ epr⁻ bpf⁻ mpr*), 表达质粒 pET-20b(+), pPIC9K 和 pMA5, 均为作者所在实验室保藏。pMD18-T simple, 购自大连宝生物工程公司。

1.2 培养基

LB 培养基, 氨苄青霉素终质量浓度 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。MD、YPD、BMGY、BMMY 培养基, 重组酵母常用培养基^[11]。TB: 甘油 0.5 g/dL, 蛋白胨 1.2 g/dL, 酵母粉 2.4 g/dL, K_2HPO_4 1.64 g/dL, KH_2PO_4 0.23 g/dL。

M9: 葡萄糖 1 g/dL, VB_1 (单独灭菌) 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Na_2HPO_4 1.28 g/dL, KH_2PO_4 0.3 g/dL, NaCl 0.05 g/dL, NH_4Cl 0.5 g/dL。TSB (胰蛋白胨大豆肉汤培养基): 胰蛋白胨 1.5 g/dL, 大豆蛋白胨 0.5 g/dL, NaCl 0.5 g/dL。以上用于摇瓶培养。

种子培养基: 工业级蛋白胨 10 g/L, 工业级酵母粉 5 g/L, NaCl 10 g/L, 卡那霉素 0.02 g/L; pH 7.0。TB 发酵培养基: 甘油 6 g/L, 工业级蛋白胨 12 g/L, 工业级酵母粉 24 g/L, KH_2PO_4 2.31 g/L, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 16.43 g/L, 卡那霉素 0.02 g/L; pH 7.0。补料液: 甘油 500 g/L。以上用于发酵罐放大培养。

1.3 试剂

工具酶, PCR 扩增试剂盒, DNA 胶回收试剂盒, 均购自大连宝生物公司; 细菌基因组 DNA 提取试剂盒, 购自北京博大泰克公司; 异丙基硫代- β -D 半乳糖苷 (IPTG), 营养琼脂, 蛋白胨, 酵母抽提物, 购自 Oxoid (英国) 公司; 质粒提取试剂盒, PCR 引物, 酵母无氨基基本氮源培养基 (YNB), 遗传霉素 G418, 卡那霉素, 购自上海生工生物工程公司; 工业级酵母粉, 购于宜昌安琪酵母有限公司; 工业级蛋白胨, 购于上海西王淀粉糖有限公司; 其他试剂均为国产分析纯。

1.4 重组质粒 pET20b (+)/lipase、pPIC9K/lipase 和 pMA5/lipase 的构建

提取 *B. cepacia* 的基因组 DNA, 并以此为模板用 PCR 扩增试剂盒分离脂肪酶基因。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}\text{C}$, 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 扩增 120 s, 循环 32 次; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 引物设计如下: P1: GGAATACCATATGTCCATGGCCGCTGGCTACGCGGCGA (正向引物, 含有 *Nco*I 限制性酶切位点); P2: CATCTCGAGAGAATTCGGTTACACGCCCCGCCAGCTTCAGCCG (反向引物, 含有 *Eco*R1 限制性酶切位点); P3: GGAATACCATATGTGAATTCGCCGCTGGCTACGCGGCGA (正向引物, 含有 *Eco*R1 限制性酶切位点); P4: CATCTCGAGAGCGGCCGCTATTACACGCCCCGCCAGCTTCAGCCG (反向引物, 含有 *Not*I 限制性酶切位点)。P5: GGAATACCATATGTGAATTCGCCGCTGGCTACGCGGCGA (正向引物, 含有 *Eco*R1 限制性酶切位点); P6: CATCTCGAGAGGATCCCTATTACACGCCCCGCCAGCTTCAGCCG (反向引物, 含有 *Bam*H1 限制性酶切位点)。以 P1、P2 为引物扩增得到成熟的脂肪酶基

因片段,将其克隆、纯化回收后插入大肠杆菌表达载体 pET20b(+),构建重组质粒 pET20b(+)/lipase;以 P3、P4 为引物扩增得到成熟的脂肪酶基因片段,将其克隆、纯化回收后插入毕赤酵母表达载体 pPIC9K,构建重组质粒 pPIC9K/lipase;以 P5、P6 为引物扩增得到脂肪酶基因,将其插入 *E. coli*-*B. subtilis* 穿梭载体 pMA5,构建重组质粒 pMA5/lipase。

1.5 工程菌构建及培养

1.5.1 大肠杆菌转化及培养 将重组质粒 pET20b(+)/lipase 和 pET20b(+)转化到 *E. coli* BL21(DE3)感受态细胞,37℃培养 8 h,挑选单菌落接入 LB/Amp 培养至对数生长期,按体积分数 5%接种量转接到 TB/Amp 发酵培养基中,37℃培养至 OD₆₀₀ 约为 1.0 时,加入 0.4 mmol/L IPTG 进行诱导,并至 25℃培养 48 h。培养液 12 000 r/min 离心 2 min,分别收集菌体和上清液。用磷酸盐缓冲液(pH 7.0)悬浮菌体沉淀,超声波破碎,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。

1.5.2 毕赤酵母转化,筛选及培养 将重组质粒 pPIC9K/lipase,经 *Bgl* II 酶切线性化后回收含有目的基因的条带,电击转入 *P. pastoris* KM71 感受态细胞中,在 MD 平板长出单克隆,再经 YPD/G418 平板筛选多拷贝转化子,G418 浓度筛选,梯度依次为 0.5、1、2 mg/mL,高拷贝转化子经 PCR 鉴定。pPIC9K 空质粒处理同上,转化菌作为阴性对照。将鉴定正确的单菌落接种至 10 mL YPD 培养基,180 r/min,30℃培养 16 h,以体积分数 10%的接种量接入 BMGY 培养基,28℃培养 24 h,离心收集全部菌体,转入 BMMY 培养基,28℃培养 120 h,每 24 h 按体积分数补加 0.5%的甲醇。

1.5.3 枯草杆菌转化及培养 枯草杆菌转化参照 Spizizen 的方法^[12]。挑取转入表达宿主 *B. subtilis* 的单克隆于 LB 培养基生长 9 h,按体积分数 5%接种量将种子发酵液接入 50 mL TB 发酵培养基,在 37℃摇床培养 48 h,将发酵液于 12 000 r/min 离心 2 min 除菌体,收集上清液。用磷酸盐缓冲液(pH 7.0)悬浮菌体沉淀,超声波破碎,12 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。

1.6 分析方法

采用分光光度计检测菌液在 600 nm 波长处的吸光度值 OD₆₀₀,以此测定菌体的生物量。

脂肪酶活力测定采用以橄榄油为反应底物的碱式滴定法^[13]。酶活单位(U)定义为:在 pH 7.0、50℃条件下,1 min 内水解产生 1 μmol 游离脂肪酸所需的酶量。

甘油浓度测定采用安捷伦高效液相色谱(HPLC)。色谱条件为色谱柱 Shodex Sugar SH1011,流动相 0.01 mol/L H₂SO₄,体积流量 0.8 mL/min,柱温 50℃,进样量 5 μL,检测器为示差折光检测器,检测器温度 30℃。

1.7 重组枯草杆菌脂肪酶表达条件优化

1.7.1 培养温度对产酶的影响 分别采用 25、30、37、40℃培养,24 h 后测定 OD₆₀₀ 和酶活。

1.7.2 初始 pH 对产酶的影响 在最适温度下调节初始 pH 分别为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0,24 h 后测定 OD₆₀₀ 和酶活。

1.7.3 发酵罐放大培养

1) 分批培养:将培养好的种子液按体积分数 5%接种量接入 3 L 的全自动发酵罐(瑞士 INFORS)中进行发酵培养(装液量 1 L)。通气量 1.5 L/min,控制搅拌转速维持溶氧在 20~30 g/dL 左右,流加质量分数为 100% 的氨水控制发酵培养 pH 在 6.8~7.0。

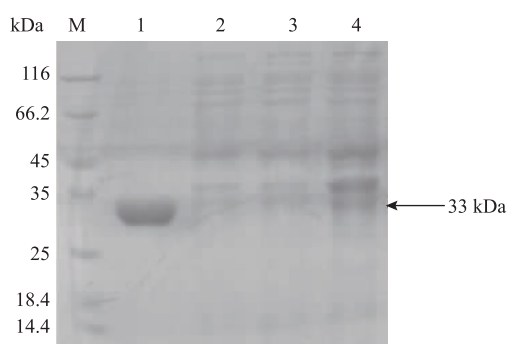
2) 补料分批培养:1 L TB 培养基中以体积分数 10%接种量接入种子液后进行分批培养,甘油耗尽后(溶氧陡然上升)流加补料液,并维持甘油质量浓度 2~3 g/L 左右,发酵温度为 37℃。整个发酵过程由发酵罐控制系统软件进行在线控制和数据采集。

2 结果与分析

2.1 重组 *E. coli* BL21 (DE3)/pET20b (+)/lipase 的构建与表达

以提取的 *B. cepacia* 基因组 DNA 为模板,PCR 扩增得到成熟的脂肪酶片段(去除信号肽),其长度大小经凝胶电泳验证为 963 bp。将脂肪酶基因插入 pMD18-T simple 质粒中,测序后发现脂肪酶基因所编码的氨基酸序列与网上氨基酸序列(NCBI 登录号:P22088)完全一致。纯化回收目的基因后分别与同样酶切纯化回收的 *E. coli* 表达载体 pET20b (+)连接,转化大肠杆菌 JM109,挑选阳性克隆,提质粒,双酶切鉴定,获得重组质粒,命名为 pET20b (+)/lipase。重组质粒经相应酶切位点双酶切,显示两条明显的条带,条带大小与预期相符,证明脂肪酶基因已成功连接到 pET20b(+). 将 pET20b(+)/lipase

和 pET20b(+) 转化到 *E. coli* BL21(DE3) 感受态细胞,37 ℃ 培养 8 h,挑选单菌落接入 LB/Amp 培养至对数生长期,按体积分数 5% 接种量转接到 TB/Amp 发酵培养基中,37 ℃ 培养至 OD₆₀₀ 约为 1.0 时加入 0.4 mmol/L IPTG 进行诱导,并至 25 ℃ 培养 48 h。发酵液经 12 000 r/min 离心 2 min,取上清液测得酶活为 1.4 U/mL(未携带基因对照菌发酵上清液酶活为 0.2 U/mL)。收集菌体经细胞破碎、离心,取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 分析,发现(图 1)脂肪酶基本集中在细胞沉淀部分(条带大小在 33 kDa 左右),说明脂肪酶主要以包涵体形式存在,这与大多数脂肪酶在大肠杆菌中表达的结果一致^[6-7]。



M: 蛋白质标准品;1: *B. cepacia* 脂肪酶标准品;2: BL21(DE3)/pET20b(+)/lipase 培养上清液;3: BL21(DE3)/pET20b(+)/lipase 培养液可溶组分;4: BL21(DE3)/pET20b(+)/lipase 不溶组分。

图 1 SDS-PAGE 分析结果

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of the expression of lipase in *E. coli*

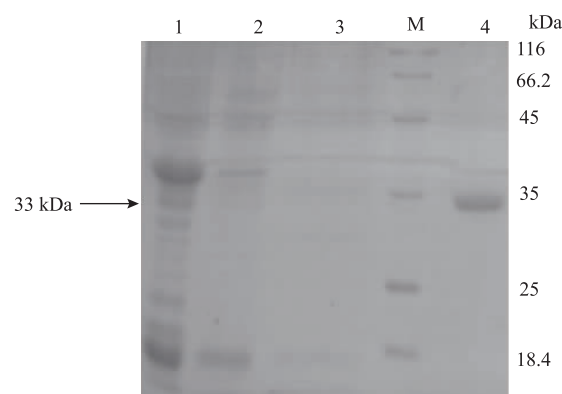
2.2 重组 *P. pastoris* KM 71/pPIC9K/lipase 的构建与表达

重组质粒 pPIC9K/lipase 的构建过程同 2.1 类似。将测序正确的 pPIC9K/lipase 经 Bgl II 线性化、纯化回收后,电转 *P. pastoris* KM 71 感受态细胞,涂布 MD 平板,转化子转接到不同质量浓度 G418 的 YPD/G418 平板上筛选具有高拷贝的脂肪酶基因的菌株,从 G418 质量浓度为 1 mg/mL 的 YPD/G418 平板上挑取单菌落,PCR 鉴定正确。将鉴定正确的重组 *P. pastoris* KM 71/pPIC9K/lipase 接入 BMMY 培养后测得胞外酶活 0.2 U/mL,SDS-PAGE 未检测到目的蛋白质条带。

2.3 重组 *B. subtilis* WB600/pMA5/lipase 的构建与表达

重组质粒 pMA5/lipase 的构建过程同 2.1 类似。

将成熟脂肪酶基因克隆到表达质粒 pMA5 上,并转化枯草芽孢杆菌 WB600,获得重组 *B. subtilis* WB600/pMA5/lipase。pMA5 空质粒处理同上,转化宿主菌作为阴性对照。将重组 *B. subtilis* WB600/pMA5/lipase 和 WB600/pMA5 分别接入 LB 培养基表达,于 37 ℃ 培养 48 h。经测定重组 *B. subtilis* WB600/pMA5/lipase 发酵上清液酶活力为 13.8 U/mL,而阴性对照 WB600/pMA5 检测不到酶活。利用 SDS-PAGE 对重组枯草杆菌发酵上清液、破壁上清液和破壁后沉淀物进行检测,在发酵上清液中发现与脂肪酶相对分子质量相对应的 33 kDa 处有条带(图 2),而阴性对照中没有相应条带,并且破壁上清液和破壁后沉淀物也无相应条带,表明脂肪酶成功分泌到胞外。



M: 蛋白质标准品,1: WB600/pMA5/lipase 培养上清液,2: WB600/pMA5/lipase 培养液可溶组分,3: WB600/pMA5/lipase 不溶组分,4: *B. cepacia* 脂肪酶标准品

图 2 枯草杆菌中表达脂肪酶的蛋白电泳分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression of lipase in *B. subtilis*

2.3 重组枯草杆菌脂肪酶表达条件优化

2.3.1 培养温度对产酶的影响 培养温度是影响工程菌生长及产物合成的重要因素。图 3 为不同温度下菌体生长和产酶的情况。温度过低,使菌体生长缓慢;随温度升高,菌体生长产酶速度加快;在 37 ℃ 下酶活力达到最大值,但温度过高会导致酶活降低。因此,37 ℃ 为菌体生长和产酶的最适温度。

2.3.2 初始 pH 对产酶的影响 pH 值是影响微生物代谢和产物合成的另一重要因素。图 4 结果显示,控制初始 pH 在 6.5~7.5 有利于菌株生长和产酶,初始 pH 在 7.0 时菌体生长最快,在 pH 6.5 时酶

活最高,说明中性偏酸环境有利于菌体生长和外源基因的表达。

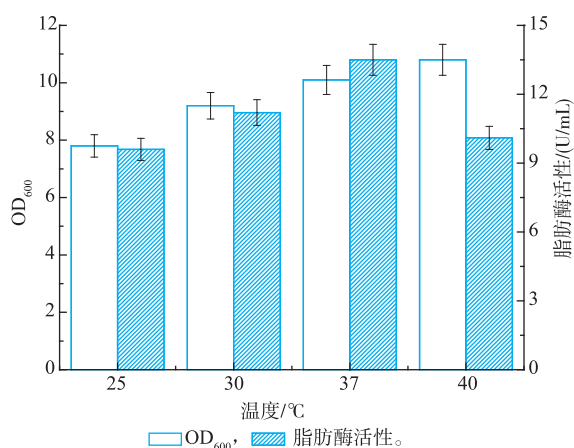


图3 温度对重组枯草杆菌菌体生长和产脂肪酶的影响
Fig. 3 Effect of temperature on cell growth and production of lipase in *B. subtilis*

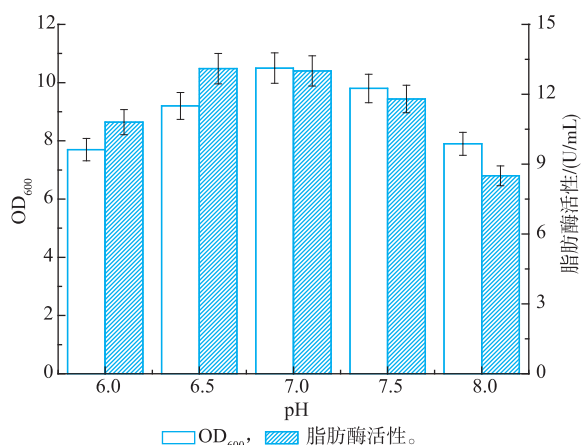
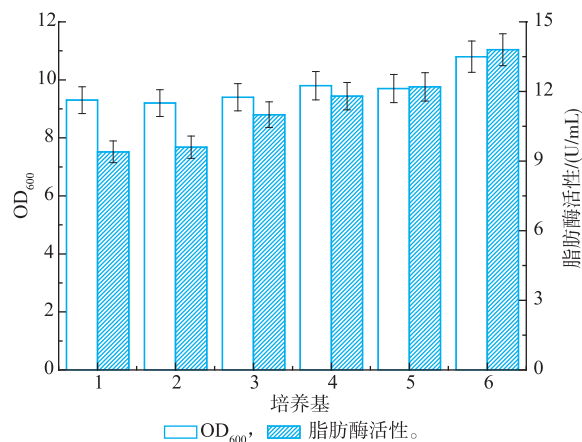


图4 初始 pH 对重组枯草杆菌菌体生长和产脂肪酶的影响
Fig. 4 Effect of initial solution pH on cell growth and production of lipase in *B. subtilis*

2.3.3 初始培养基对产酶的影响 为选择适合重组枯草杆菌 WB600 表达脂肪酶最优的初始培养基,比较了重组菌株在 6 种较典型的枯草杆菌培养基中的生长和产酶情况,如图 5 所示。在这些培养基中,TB 培养基具有丰富的营养成分和较高的 pH 缓冲能力,适合菌体生长和外源基因的表达,为最适的初始培养基。在最优培养基下,发酵 24 h 后胞外酶活达到 13.8 U/mL,是野生菌产酶量的 1.7 倍。



1. LB, 2. LB+1 g/dL 葡萄糖, 3. TSB, 4. 肉汁+1 g/dL 淀粉, 5. M9, 6. TB。

图5 培养基对重组枯草杆菌菌体生长和产脂肪酶的影响
Fig. 5 Effect of media on cell growth and production of lipase in *B. subtilis*

2.3.4 分批发酵培养 在优化摇瓶培养条件的基础上,采用工业级 TB 培养基,进一步对重组枯草杆菌 WB600/pMA5/lipase 在 3 L 容积发酵罐的分批培养和产酶情况进行研究,结果见图 6。与摇瓶培养相比,工程菌 WB600/pMA5/lipase 在分批培养中具有较明显的延迟期。待延迟期过后至发酵 8 h 培养基中的甘油几乎消耗殆尽,此时菌体呼吸旺盛,溶氧开始反弹。发酵 10 h 后,酶活快速增长,至发酵 16 h 时达到最大值,为 18 U/mL。此后,溶氧开始增加,菌体密度下降,表明菌体开始出现自溶。

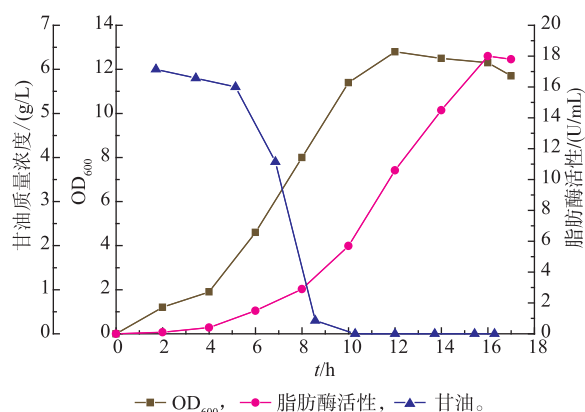


图6 分批发酵培养重组枯草杆菌的生物量及脂肪酶产量
Fig. 6 Cell growth and lipase production of *B. subtilis* in batch culture

2.3.5 分批补料发酵培养 分批发酵培养由于甘油不能满足生长需求,所以菌体生物量和产酶量都不高。为进一步提高菌体生长密度和产酶量,进行

了补料发酵培养生产脂肪酶的研究。发酵条件为:接种体积分数 10%, 温度 37 °C, 溶氧与转速偶联, 溶氧控制在 20~30 g/dL。实验中发酵培养约 8 h 后, 待溶氧反弹, 开始以 1.5 g/h 的速率补加甘油补料液, 随着生物量的增长, 逐步提高补料速率。发酵培养且自补料开始, 每隔 1 h, 对发酵液中甘油质量浓度进行一次测定, 使发酵液中甘油质量浓度维持在 2~3 g/L。进入对数生长期后, 随着代谢产物的增多, 发酵液 pH 会下降, 需加入氨水以维持 pH 在 7 左右。此时, 也需通入纯氧将溶氧维持在 20~30 g/dL, 为菌体生长提供足够的氧气, 整个发酵过程在 24 h 内完成。由图 7 所示, 重组菌的指数生长期明显延长。随着限制性碳源甘油的加入, 重组菌在 6~16 h 内生长迅速, 菌体浓度呈线性增加, 同时也是重组脂肪酶大量表达的时期, 酶活不断升高。至发酵 20 h 后, 菌体生长及产酶量平稳甚至略有下降。整个发酵过程中, 酶活增加与菌体密度基本呈对应关系。经 24 h 的培养, 最终菌体密度 OD_{600} 达到 18, 酶活达到 34.5 U/mL, 比分批发酵培养提高了近 1 倍, 比初始摇瓶条件下提高了 2.5 倍。

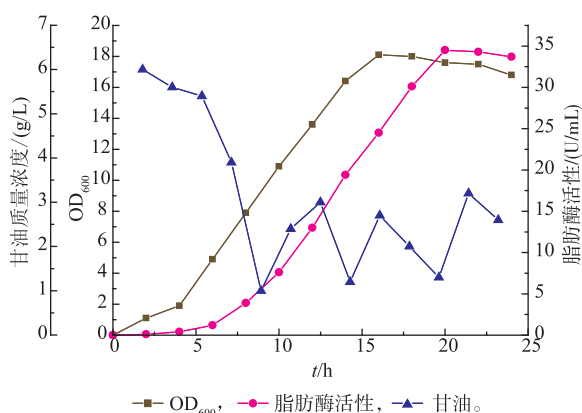


图 7 分批补料发酵培养重组枯草杆菌的生物量及脂肪酶产量
Fig. 7 Cell growth and lipase production of *B. subtilis* in fed-batch culture

3 讨论

来源于 *B. cepacia* 的脂肪酶由于其较强的稳定性及有机溶剂耐受性, 特别在酶法生产生物柴油工艺中极具应用前景, 因而越来越受到人们的广泛关注。然而, 天然酶普遍含量低, 酶的市场价格昂贵, 因而采用成熟的蛋白质表达系统对脂肪酶进行异源表达是实现脂肪酶工业化生产的首选。

大肠杆菌 pET 表达系统是细菌表达系统的代表, 它具有 T7 启动子强转录活性而使脂肪酶过量表达。本课题研究中过量表达的脂肪酶均以包涵体形式存在, 这也与多数脂肪酶表达的研究报道一致^[6-7]。不溶性包涵体提取时需要破碎细胞, 进行变性、复性处理, 从而增加了成本。导致脂肪酶难以实现胞外表达的主要原因: 一是脂肪酶自身的折叠不仅需要其特异的折叠酶或前导肽的帮助, 可能还与细胞内多种蛋白因子相关, 大肠杆菌中缺少这些帮助脂肪酶折叠相应的辅助蛋白质; 二是大肠杆菌分泌表达外源重组蛋白质是一个涉及到多种伴侣蛋白协助跨膜转运的复杂过程, 其自身的蛋白质分泌能力相对薄弱, 直接导致脂肪酶在细胞内大量聚集。为实现脂肪酶的分泌表达, 研究者们采用了多种方法, 主要包括以下几个方面: ① 选择各种不同信号肽、启动子或蛋白酶位点突变型宿主菌^[14-16]; ② 降低培养温度, 优化培养条件^[17]; ③ 共表达脂肪酶的特异折叠因子(如折叠酶、前导肽)^[18-20]; ④ 将脂肪酶融合到一些天然胞外分泌型蛋白质(如溶血素 A)^[15,21], 或在脂肪酶的 N 端/C 端融合一段氨基酸标签(如 18A、ELK16)^[22-23]; ⑤ 共表达一些与周质折叠或外膜转运相关的分子伴侣(如 Dsb 家族蛋白质、Xcp 外膜蛋白质等)^[24-26]以及蛋白释放因子(如细菌素释放蛋白质 BRP)^[27]; ⑥ 物理化学方法改变细胞膜透性(如高盐、 Ca^{2+} 等)^[28-29]。今后可以采用基因改造的方法或优化生产工艺, 进一步提高 *B. cepacia* 脂肪酶在大肠杆菌中的胞外分泌表达。

毕赤酵母分泌表达蛋白质含量高, 稳定性好, 且可进行高密度培养。但是, 外源基因在酵母中表达易受密码子偏爱性、基因 GC 含量等诸多因素的影响。同时细菌来源的基因在真菌中表达可能由于各种原因而不表达。本课题研究中通过日本 Kazusa DNA 研究所提供的网站(<http://www.kazusa.or.jp/>)以及赵翔等^[30]对毕赤酵母密码子的用法分析, 确定毕赤酵母中的极低使用密码子有 CCG、CGA、CGC、GCG、CCG, 利用 DNAMAN 软件分析 *B. cepacia* 脂肪酶基因密码子组成及分布, 计算出毕赤酵母极低频率使用密码子在该基因中所占比率为 14%, 表明密码子偏爱性较差, 这可能是造成 *B. cepacia* 脂肪酶在毕赤酵母中不表达的主要原因。贾彬等^[9]通过对 *B. cepacia* 脂肪酶进行基因改造, 获得适于在毕赤酵母中表达的优化基因, 才得以实现其在毕赤酵

母中的活性分泌表达。因此,有必要对 Lu10-1 脂肪酶基因进行优化改造,以便实现在毕赤酵母中的表达,这需要进一步研究论证。

枯草杆菌具有非致病性,无明显密码子偏爱性,并且具有单层细胞膜组成的较简单的细胞外壳,分泌蛋白质可直接释放到培养基中,因而成为原核表达系统中进行分泌表达外源蛋白质较理想的宿主菌。

4 结 语

本课题研究中构建了 *B. cepacia* 脂肪酶的枯草

杆菌表达系统,获得了胞外产脂肪酶的基因工程菌株。摇瓶初步优化条件为:以 TB 为培养基,初始 pH 6.5, 37 °C 恒温培养。在 3 L 的发酵罐进一步放大培养,最终最高酶活达到 34.5 U/mL,是野生菌产酶量的 4.2 倍。

今后,可以通过分阶段控制策略,以及调控补料流加方法,对重组菌的发酵条件进一步优化,以期提高脂肪酶产量。此外,可以尝试采用枯草杆菌诱导型表达系统来构建重组菌生产 *B. cepacia* 脂肪酶,对影响脂肪酶基因诱导表达的各种因素进行深入研究。

参考文献:

- [1] Hasan F, Shah A A, Hameed A. Industrial applications of microbial lipase[J]. **Enzyme Microb Technol**, 2006(9):235-251.
- [2] Jaeger K E, Reetz M T. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology[J]. **Trends Biotechnol**, 1998, 16(9):396-403.
- [3] Jaeger K E, Eggert T. Lipases for biotechnology[J]. **Curr Opin Biotech**, 2002, 13(4):390-397.
- [4] YANG J, GUO D, YAN Y. Cloning, expression and characterization of a novel thermal stable and short-chain alcohol tolerant lipase from *Burkholderia cepacia* strain G63[J]. **J Mol Catal B-Enzym**, 2007, 45(3-4):91-96.
- [5] 贾彬, 刘文山, 杨江科, 等. 洋葱伯克霍尔德菌脂肪酶的基因改造及其在毕赤酵母中组成型和诱导型的表达[J]. **微生物学报**, 2010, 50(9):1194-1201.
- JIA Bing, LIU Wenshan, YANG Jiangke, et al. *Burkholderia cepacia* lipase gene modification and its constitutive and inducible expression in *Pichia pastoris*[J]. **Acta Microbiologica Sinica**, 2010, 50(9):1194-1201. (in Chinese)
- [6] Jung S Y, Park S S. Improving the expression yield of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli* by mutagenesis[J]. **Biotechnol Lett**, 2008, 30(4):717-722.
- [7] Traub P C, Schmidt-Dannert C, Schmitt J, et al. Gene synthesis, expression in *E. coli*, and *in vitro* refolding of *Pseudomonas* sp. KWI56 and *Chromobacterium viscosum* lipases and their chaperones[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2001, 55:198-204.
- [8] Cereghino J L, Cregg J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. **FEMS Microbiol Rev**, 2000, 24(1):45-66.
- [9] Lidia W, Helga W, Wim J Q. *Bacillus subtilis* as cell factory for pharmaceutical proteins: a biotechnological approach to optimize the host organism[J]. **Biochim Biophys Acta**, 2004, 1694(1-3):299-310.
- [10] JI X, LU G, GAI Y, et al. Colonization of *Morus alba* L. by the plant growth-promoting and antagonistic bacterium *Burkholderia cepacia* strain Lu10-1[J]. **BMC Microbiol**, 2010(10):243-254.
- [11] 王芸, 华兆哲, 刘立明. 重组毕赤酵母高密度发酵生产碱性果胶酶的策略[J]. **生物工程学报**, 2008, 24(4):635-639.
- WANG Yun, HUA Zhaoze, LIU Liming. High-level production of alkaline polygalacturonate lyase in recombinant *Pichia pastoris* [J]. **Chin J Biotech**, 2008, 24(4):635-639. (in Chinese)
- [12] Spizizen J. Transformation of biochemically deficient strain of *B. subtilis* by deoxyribonucleate [J]. **Proc N A S**, 1958, 44(10):1072-1078.
- [13] Van H E, Lithauer D, Verger R. Biochemical characterisation and kinetic properties of a purified lipase from *Aspergillus niger* in bulk phase and monomolecular films[J]. **Enzyme Microb Technol**, 2002, 30(7):902-909.
- [14] Jung S, Park S. Improving the expression yield of *Candida antarctica* lipase B in *Escherichia coli* by mutagenesis [J]. **Biotechnol Lett**, 2008, 30:717-722.
- [15] Narayanan N, Khan M, Chou P. Enhancing functional expression of heterologous *Burkholderia* lipase in *Escherichia coli* [J]. **Mol Biotechnol**, 2011, 47:130-143.
- [16] Narayanan N, Chou C P. Alleviation of proteolytic sensitivity to enhance recombinant lipase production in *Escherichia coli*[J]. **Appl Environ Microb**, 2009, 75(16):5424-5427.

- [17] SONG J M, AN Y J, KANG M H, et al. Cultivation at 6-10 °C is an effective strategy to overcome the insolubility of recombinant proteins in *Escherichia coli*[J]. **Protein Expres Purif**, 2012, 82: 297-301.
- [18] Madan B, Mishra P. Co-expression of the lipase and foldase of *Pseudomonas aeruginosa* to a functional lipase in *Escherichia coli* [J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2010, 85: 597-604.
- [19] Zelena K, Krugener S, Lunkenbein S, et al. Functional expression of the lipase gene Lip2 of *Pleurotus sapidus* in *Escherichia coli* [J]. **Biotechnol Lett**, 2009, 31: 395-401.
- [20] Beer H D, McCarthy J E G, Bornscheuer U T, et al. Cloning, expression, characterization and role of the leader sequence of a lipase from *Rhizopus oryzae*[J]. **Biochimica Biophysica Acta**, 1998, 139: 173-180.
- [21] Narayanan N, Khan M, Chou P. Enhancing functional expression of heterologous lipase B in *Escherichia coli* by extracellular secretion[J]. **J Ind Microbiol Biotechnol**, 2010, 37: 349-361.
- [22] XING L, WU W, ZHOU B, et al. Streamlined protein expression and purification using cleavable self-aggregating tags[J]. **Microb Cell Fact**, 2011, 42(10): 1-7.
- [23] JUNG H J, KIM S K, MIN W K, et al. Polycationic amino acid tags enhance soluble expression of *Candida antarctica* lipase B in recombinant *Escherichia coli*[J]. **Bioprocess Biosyst Eng**, 2011, 34: 833-839.
- [24] XU Y L, Lewis D, CHOU C P. Effect of folding factors in rescuing unstable heterologous lipase B to enhance its overexpression in the periplasm of *Escherichia coli*[J]. **Appl Microbiol Biotechnol**, 2008, 79: 1035-1044.
- [25] CUI S, LIN X, SHEN J. Effects of co-expression of molecular chaperones on heterologous soluble expression of the cold-active lipase Lip-948[J]. **Protein Expres Purif**, 2011, 77: 166-172.
- [26] Gerritse G, Ure R, Bizoulier F, et al. The phenotype enhancement method identifies the Xcp outer membrane secretion machinery from *Pseudomonas alcaligenes* as a bottleneck for lipase production[J]. **J Biotechnol**, 1998, 64: 23-38.
- [27] Rahman R N Z R A, Leow T C, Basri M, et al. Secretory expression of thermostable T1 lipase through bacteriocin release protein [J]. **Protein Expres Purif**, 2005, 40: 411-416.
- [28] Rosenau F, Jaeger K E. Bacterial lipases from *Pseudomonas*: Regulation of gene expression and mechanisms of secretion[J]. **Biochimie**, 2000, 82: 1023-1032.
- [29] Ascione G, Pascale D, Santi C D, et al. Native expression and purification of hormone-sensitive lipase from *Psychrobacter* sp. TA144 enhances protein stability and activity[J]. **Biochem Bioph Res Co**, 2012, 420: 542-546.
- [30] 赵翔, 霍克克, 李育阳. 毕赤酵母的密码子用法分析[J]. 生物工程学报, 2000, 16(3): 308-311.
ZHAO Xiang, HUO Keke, LI Yuyang. Synonymous codon usage in *Pichia pastoris* [J]. **Chin J Biotech**, 2000, 16(3): 308-311. (in Chinese)

科 技 信 息

韩国拟制定食品标签法

2016年4月4日,韩国食品与药品安全部(MFDS)发布 G/TBT/N/KOR/644 号通报,拟制定食品标签法,以达到:通过对食品卫生法、家畜产品卫生控制法、功能性保健食品法这三个和标签及广告法相关的规定,以及其它相关通知内容进行整合,使企业和消费者能方便得到有关标签的相关规定,从而提高预见性和可行性;废除目前有关婴儿食品、减肥特定食品及保健食品的相关标签与广告规定;满足消费者的知情权,通过厘清相关规定,促进公平贸易,预防虚假和夸大的标签或广告。

该通报的评议截止日期为通报发出后 60 天,批准、发布和生效日期待定。

[信息来源]厦门 WTO 工作站. 韩国拟制定食品标签法 [EB/OL]. (2016-5-5). <http://www.xmtbt-sps.gov.cn/detail.asp?id=51538>