

NH₄⁺ 离子对重组毕赤酵母产华根霉脂肪酶 发酵过程的影响

赵林水^{1,2}, 喻晓蔚^{*1,2}, 徐 岩^{1,2}

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学 生物工程学院 酿酒科学与酶技术中心, 江苏 无锡 214122)

摘要: 利用重组毕赤酵母在 7 L 的发酵罐中进行分批补料高密度发酵, 考察不同 NH₄⁺ 质量浓度对毕赤酵母基因工程菌表达华根霉脂肪酶的影响。结果表明, 补加 (NH₄)₂SO₄ 溶液维持 NH₄⁺ 质量浓度在 7 g/L 时华根霉脂肪酶酶活最高, 分别是不补加 (NH₄)₂SO₄ 溶液、补加并维持 NH₄⁺ 质量浓度在 5 g/L、10 g/L 条件下的 1.41、1.11、1.08 倍, 而且在该氮源质量浓度条件下, 胞外总蛋白质质量浓度最高, 达到 5.61 g/L。通过分析不同氮源条件下发酵参数比生长速率、产物比形成速率和底物比消耗速率的差异, 发现发酵维持 NH₄⁺ 质量浓度在 7 g/L 时, 产物比形成速率和底物比消耗速率均较高, 这与该条件下产酶水平最高相一致。研究结果表明, 对毕赤酵母基因工程菌发酵过程中的氮源进行优化, 能够明显促进外源蛋白质的表达。

关键词: 华根霉脂肪酶; 毕赤酵母; 高密度发酵; 铵离子浓度

中图分类号: Q 814 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2016)06—0591—06

Impact of NH₄⁺ Nitrogen Source on the Production of *Rhizopus chinensis* Lipase by *Pichia pastoris*

ZHAO Linshui^{1,2}, YU Xiaowei^{*1,2}, XU Yan^{1,2}

(1. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;
2. Center for Brewing Science and Enzyme Technology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: The effect of NH₄⁺ concentration on the expression of *Rhizopus chinensis* lipase by the recombinant *Pichia pastoris* was studied by high-density fed-batch fermentation in a 7 L bioreactor. The maximum activity was obtained when the concentration of NH₄⁺ was maintained at 7 g/L adjusted with (NH₄)₂SO₄ solution, as high as 1.41, 1.11, 1.08 fold of that of the control (without (NH₄)₂SO₄ solution), and of the solution with 5 g/L or 10 g/L NH₄⁺, respectively. The total protein concentration achieved a maximum value of 5.61 g/L under the optimal condition. The specific growth rate, the specific production rate and the specific consumption rate were also investigated under different NH₄⁺ concentrations. A relative high specific production rate and the specific

收稿日期: 2014-12-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(20802027); 国家 863 计划项目(2012AA022207)。

* 通信作者: 喻晓蔚(1978—), 女, 上海人, 理学博士, 教授, 硕士研究生导师, 主要从事脂肪酶的研究。E-mail: bioyuxw@aliyun.com

consumption rate were observed at 7 g/L of NH_4^+ , which resulted in the highest level of enzyme production under the condition. Our research suggested that the optimization of nitrogen source could enhance the expression of heterologous protein significantly in *P. pastoris*.

Keywords: *Rhizopus chinensis* lipase, *Pichia pastoris*, high density fermentation, NH_4^+ concentration

脂肪酶 (全称 Triacylglycerol acylhydrolase, EC3.1.1.3) 即甘油三酯水解酶, 广泛存在于动物、植物和微生物中, 可以催化酯化、醇解、氨解、转酯化和脂类的逆向合成等反应^[1-2]。微生物来源的脂肪酶具有催化温度广、转化效率高、底物专一性强、副产物少等优点, 因而被广泛应用于油脂加工、化学、食品、制药和日化等工业领域^[3]。

毕赤酵母是应用十分广泛的真核表达系统, 具有遗传稳定、表达水平高、蛋白质可翻译后加工、产物可分泌、可高密度发酵等许多优点^[4], 已有数百种外源蛋白质在此体系中成功表达^[5], 工业化应用前景广阔。毕赤酵母高效表达外源蛋白质的同时, 也出现了如耗氧高、产热大、发酵周期长、外源蛋白质表达量不高等诸多问题。针对这些问题, 国内外学者通过优化基因拷贝数、共表达伴侣蛋白质、优化培养基配方、调节菌体生长方式、优化诱导菌体浓度、双碳源流加、控制 NH_4^+ 质量浓度等方法来改进^[6-11]。其中, 调节氮源的供给成为一种有效提高外源蛋白质表达量的方法, 但是仅有少量相关的研究报道。Kobayashi 等^[12]采用毕赤酵母表达重组人血清蛋白质时发现, 随着发酵的进行, 发酵液中的 NH_4^+ 质量浓度逐渐降低, 并导致发酵液中的蛋白酶增加, 影响了外源蛋白质的高效表达。因此, 维持发酵液中 NH_4^+ 质量浓度对外源蛋白质的表达至关重要。Yu^[13]等利用毕赤酵母表达米根霉脂肪酶时发现, 发酵阶段控制发酵液中 NH_4^+ 质量浓度为 8 g/L 时, 米根霉脂肪酶酶活、蛋白酶含量、产物比形成速率、底物比消耗速率等都要优于空白对照。

通过本课题的研究, 以期在毕赤酵母高密度发酵过程中控制发酵培养基中的 NH_4^+ 质量浓度, 实现华根霉脂肪酶的高效表达, 为其工业化生产奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌种、试剂和培养基

1.1.1 菌种 表达华根霉脂肪酶的巴斯德毕赤酵

母基因工程菌为作者所在研究室前期构建^[14]。

1.1.2 培养基

1) 平板培养基 (YPD 培养基, g/L): 蛋白胨 20.0, 酵母提取物 10.0, 无水葡萄糖 20.0, 琼脂粉 20.0。

2) 种子培养基 (BMGY 培养基, g/L): 蛋白胨 20.0, 酵母提取物 10.0, YNB 13.4, 甘油 10.0, 生物素 4×10^{-4} , pH 6.0 磷酸缓冲液 100.0 mmol/L。

3) 微量元素 PTM₁ 溶液 (g/L): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6.00, KI 0.08, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.00, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.20, H_3BO_3 0.02, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 42.20, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 65.00, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.50, Biotin 0.20; H_2SO_4 5.00 mL。

4) 基础盐培养基 (BSM 培养基, g/L): CaSO_4 0.93, K_2SO_4 18.20, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14.90, KOH 4.13, 甘油 40; 体积分数 85% H_3PO_4 28.70 mL, 微量元素 PTM₁ 溶液 4 mL/L。

5) 补料生长培养液: 甘油 500 g/L, 微量元素 PTM₁ 溶液 12 mL/L。

6) 诱导培养液: 纯甲醇溶液中加入 12 mL/L 的微量元素 PTM₁ 溶液。

1.1.3 主要试剂 考马斯亮蓝 G-250, DTT, β -巯基乙醇, 丙烯酰胺, N,N-亚甲基双丙烯酰胺和牛血清蛋白质 BSA, 均购自中国医药集团上海化学试剂公司。其他所用试剂均为国产分析纯或化学纯。

1.2 实验方法

1.2.1 种子培养 取平板培养基 YPD 上生长良好的平板菌种两环, 接种至种子培养基中, 用 250 mL 的三角瓶培养, 装液量 20%, 培养 20 h, 至 OD_{600} 2~6 结束培养。

1.2.2 发酵培养 配制 2.5 L 基础盐培养基置于 7 L 的发酵罐内, 插入溶氧 DO 电极与 pH 电极 (已标定), 接入空气过滤器, 包扎好后在蒸汽灭菌锅内 1×10^5 Pa 灭菌 20 min。取出冷却至 30 $^{\circ}\text{C}$, 通入空气, 闭环控制, 用体积分数 25% 氨水调节 pH。火焰接种, 调节转速、温度、空气流量、罐压等进行分批发酵。pH 受闭环控制, 自动流加氨水控制其维持在 pH 5.5, 并不断加大通气量或混合通纯氧与转速来

维持菌体生长所需的 DO。当基础料中的底物甘油耗尽后,此时 DO 急剧上升,维持 30 min 后开始流加补料生长培养液,调节流加速率控制 DO 维持在 40 g/dL 左右。当起始菌体质量浓度达到 36 g/L 左右时,停止补加甘油,维持饥饿状态 30 min,让甘油彻底耗尽。开始进入甲醇诱导阶段,向发酵液流加诱导培养液,维持发酵罐中甲醇体积分数在 (0.1 ± 0.02) % 左右,控制 DO 维持在 10~20 g/dL 之间,诱导脂肪酶基因的表达。

1.2.3 甲醇浓度检测 FC-2002 甲醇检测流加控制器(华东理工大学研制)在线显示和控制甲醇体积分数。

1.2.4 生物量检测 采用细胞干质量(DCW)表示。

1.2.5 脂肪酶水解活力测定方法 对硝基苯酚棕榈酸酯(pNPP)法,详见文献[15]。酶活定义为:一定反应条件下每分钟产生 1 μmol 对硝基苯酚的酶量为一个脂肪酶水解酶酶活国际单位。

1.2.6 总蛋白质含量测定 考马斯亮蓝法,详见文献[16]。

1.2.7 产物 SDS-PAGE 分析 使用 Tris-甘氨酸电泳缓冲液,5 g/dL 浓缩胶,12 g/dL 分离胶,样品中加入 2 $\times$ SDS 凝胶加样缓冲液,混匀,100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 10 min,离心去蛋白沉淀,将处理好的样品 10 μL 加入到凝胶孔中,连接电泳仪,调整初始电压至 80 V,开始电泳,待样品全部进入分离胶后,将电压调至 200 V,待指示剂(溴酚兰)到达距凝胶底部下缘 1 cm 时停止电泳,关闭电源后取出凝胶板,取出凝胶,加入考马斯亮蓝染色液染色 30 min,倒出染色液,加入脱色液轻微振荡 2 h 后置于凝胶成像仪上拍照。

1.2.8 游离氨离子质量浓度的测定 采用苯酚次氯酸盐法^[17]。

1.2.9 甲醇诱导阶段控制氮源质量浓度 当进入甲醇诱导阶段时,以脉冲流加的方式补加 50 g/L 的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液,每隔 4 h 取样测定 NH_4^+ 质量浓度,并及时调节流加速度,控制 NH_4^+ 质量浓度在 5、7、10 g/L。

1.3 仪器与设备

7 L 发酵罐,美国 New Brunswick Scientific 公司产品;DO 电极,pH 电极,Mettler Toledo 仪器有限公司产品;凝胶成像仪,电泳仪,美国 Bio-Rad 公司产品;UV-3102 PC 型分光光度计,尤尼柯仪器有限公司

产品;5S-325 型高压湿热自动灭菌锅,美国 Tomy 公司产品;3K15 型高速冷冻离心机,美国 Sigma-aldrich 公司产品;酶标仪,美国 Thermo 公司产品。

2 结果与分析

2.1 不同 NH_4^+ 质量浓度对菌体生长和发酵产酶的影响

在 7 L 发酵罐中进行了产华根霉脂肪酶的毕赤酵母基因工程菌的发酵调控,考察了 NH_4^+ 质量浓度对菌体生长和发酵产酶的影响(不补加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液以“空白条件”表示),在甲醇诱导阶段不同时间点取样测定生物量、蛋白质质量浓度和脂肪酶活力,结果如图 1—3 所示。

如图 1 所示,在诱导发酵 16~56 h 间,诱导阶段补加并控制 NH_4^+ 离子质量浓度时,菌体生长速度比空白条件高,发酵 64~72 h 菌体质量浓度均达到最高,为 200 g/L 左右。

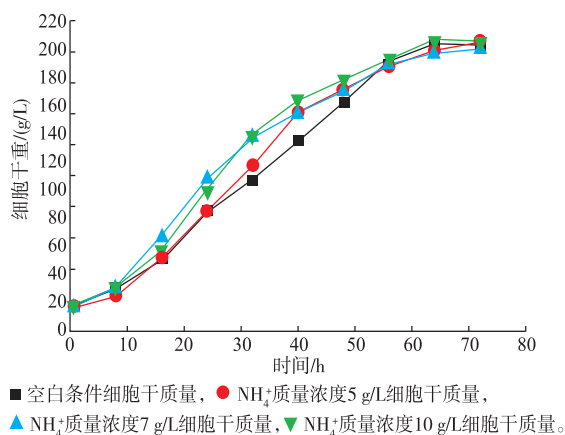


图 1 氮源对菌体生长的影响

Fig. 1 Effects of nitrogen source on cell growth

如图 2 所示,当控制 NH_4^+ 质量浓度为 7 g/L 时,最高酶活达到 2 987 U/mL,分别是空白条件、补加并维持 NH_4^+ 质量浓度在 5、10 g/L 条件下的 1.41、1.11、1.08 倍,而且,发酵达到最高酶活的时间比其他条件缩短了 8 h。

氮源能够影响菌体生长和发酵产酶的酶活力,同时也影响了菌体胞外分泌蛋白质的总质量浓度。从图 3 可以看出,诱导阶段补加并控制 NH_4^+ 质量浓度时,菌体表达的总蛋白量都高于空白条件。在各组脂肪酶酶活最高的时间点,补加并控制 NH_4^+ 质量浓度为 7 g/L 条件下,总蛋白质质量浓度为 5.61 g/L,比空白条件提高了 1.1 g/L,分别是空白条件、补加

并维持 NH_4^+ 质量浓度在 5、10 g/L 条件下的 1.24、1.08、1.07 倍。

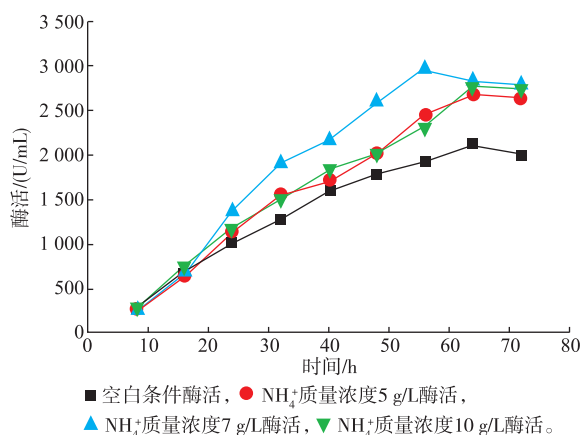


图 2 氮源对发酵产酶的影响

Fig. 2 Effects of nitrogen source on enzyme production

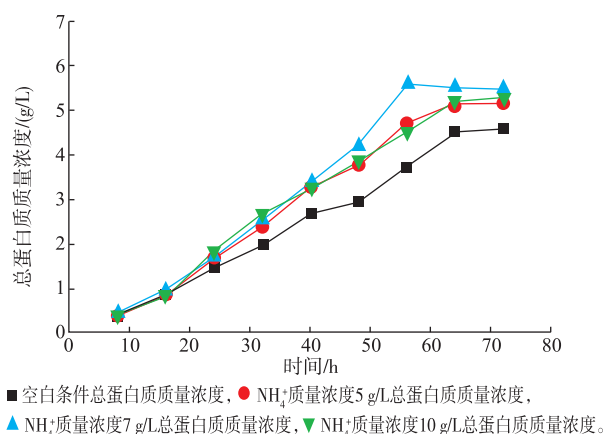


图 3 氮源对总蛋白质浓度的影响

Fig. 3 Effects of nitrogen source on total protein concentration

以上研究结果说明,在诱导阶段补加并控制 NH_4^+ 质量浓度能够促进菌体生长,有利于外源蛋白质的表达,但同时也可以看出,在一定的范围内,随着 NH_4^+ 质量浓度的升高,发酵产酶得到了促进,而超过一定的范围,发酵产酶反而会受到一定程度的抑制。

总蛋白质质量浓度并不能完全反映出脂肪酶含量,可以从 SDS-PAGE 图中看出在基因表达过程中脂肪酶表达量在发酵液中的变化规律。图 4—5 所示的为控制 NH_4^+ 质量浓度 7 g/L 和 10 g/L 时诱导表达不同阶段发酵液上清液的 SDS-PAGE 图,在 37 kDa 处的条带是目的蛋白质。从图中可以看出,随着发酵进行,发酵液中目的蛋白质的质量浓度越

来越高。然而,随着发酵液中营养成分的不断消耗以及代谢物的不断积累,部分菌体开始死亡裂解,发酵液中杂蛋白质含量明显增加。而且在控制 NH_4^+ 质量浓度处较高水平时(10 g/L),有可能高质量浓度的 NH_4^+ 对菌体产酶产生了较大的负面作用,杂蛋白质含量更高。

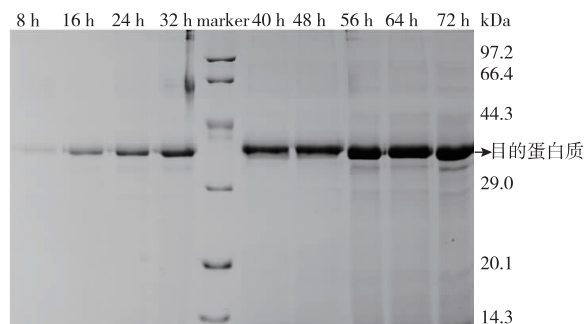


图 4 控制 NH_4^+ 质量浓度 7 g/L 诱导表达不同阶段发酵液 SDS-PAGE 图

Fig. 4 SDS-PAGE of the supernatant under NH_4^+ concentration of 7 g/L

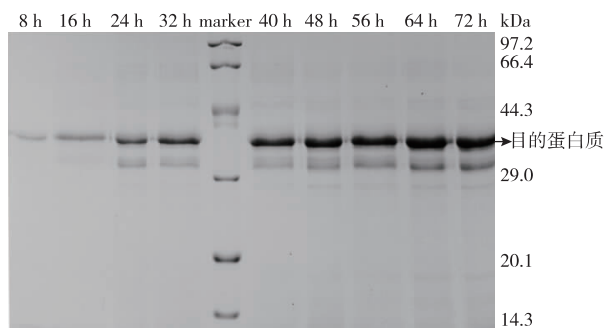


图 5 控制 NH_4^+ 质量浓度 10 g/L 诱导表达不同阶段发酵液 SDS-PAGE 图

Fig. 5 SDS-PAGE of the supernatant under NH_4^+ concentration of 10 g/L

2.2 不同 NH_4^+ 质量浓度对发酵过程的影响分析

菌体比生长速率是表征菌体生长速率的一个重要参数,从图 6 可以看出,随着发酵进行,菌体比生长速率呈现出先升高后下降的趋势,优化氮源条件与空白条件相差不大。

从图 7 可以看出,诱导阶段补加并控制 NH_4^+ 质量浓度为 7 g/L 时,底物比消耗速率(以碳源甲醇作为底物计算)高于其他条件,这与其更高的脂肪酶表达量相一致。然而,诱导阶段补加并控制 NH_4^+ 质量浓度为 5 g/L 与 10 g/L 时,底物比消耗速率较低,

说明较低质量浓度下的 NH_4^+ 不能满足发酵的氮源需求,而较高质量浓度的 NH_4^+ 也不利于菌体快速利用碳源,因而效果不明显;在空白条件下,发酵 40 h 后,由于氮源匮乏,底物比消耗速率快速下降。底物比消耗速率与底物消耗量成正比,与菌体浓度以及发酵时间成反比。诱导阶段补加并控制 NH_4^+ 质量浓度为 7 g/L 时,在相同时间内,其菌体浓度高于空白条件,底物的消耗量更加成为底物比消耗速率的决定因素,而且酶活与底物的消耗存在正相关性,所以此条件下的高酶活是通过快速利用底物实现的。

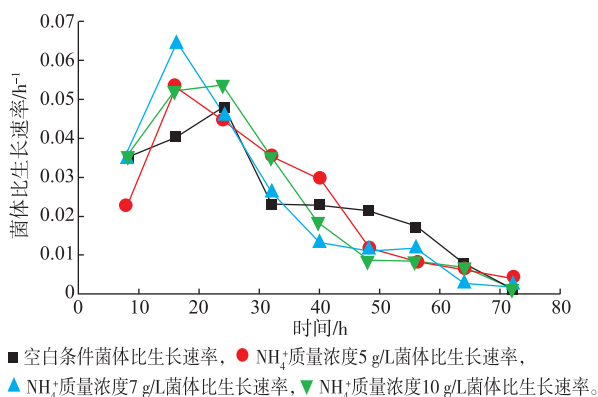


图 6 氮源对菌体比生长速率的影响

Fig. 6 Effects of nitrogen source on the specific growth rate

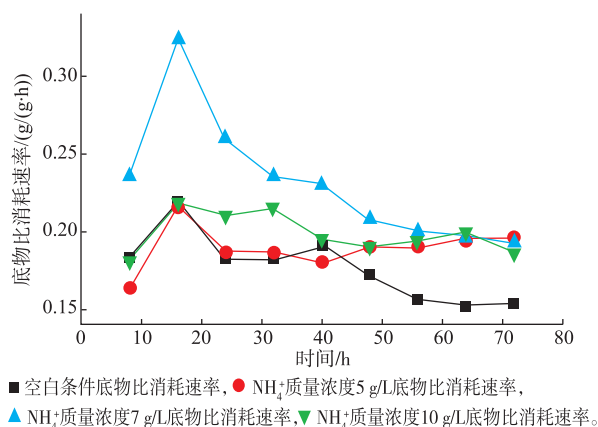


图 7 氮源对底物比消耗速率的影响

Fig. 7 Effects of nitrogen source on the specific consumption rate

从图 8 可以看出,在发酵 24 h 之后,诱导阶段补加并控制 NH_4^+ 质量浓度为 7 g/L 时产物比形成速率高于其他条件,说明此条件下的 NH_4^+ 质量浓度更

加适合外源蛋白质的表达。以上研究结果表明,诱导阶段补加并控制适宜的 NH_4^+ 质量浓度对于发酵产酶是非常重要的。

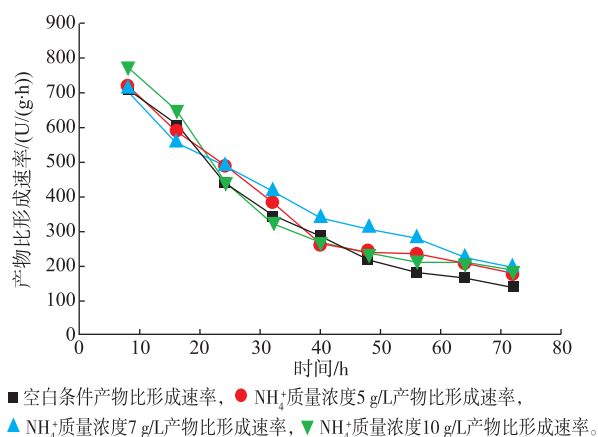


图 8 氮源对产物比形成速率的影响

Fig. 8 Effects of nitrogen source on the specific production rate

3 结 语

甲醇营养型毕赤酵母表达外源蛋白质时, NH_4^+ 对发酵过程的影响是多方面的。例如, Yang^[18] 等通过研究不同 NH_4^+ 质量浓度对菌体生长、外源蛋白质(水蛭素)表达、蛋白酶降解的影响时发现:当 NH_4^+ 质量浓度在 7.2 g/L 时, 外源蛋白质表达量最高;在 10.8 g/L 时, 外源蛋白质降解率最低, 但菌体生长受到抑制。因此, 选择合适的 NH_4^+ 质量浓度显得尤为重要。

研究中主要比较了不同 NH_4^+ 质量浓度对毕赤酵母基因工程菌表达华根霉脂肪酶的影响, 结果表明, 在补加了氮源之后, 菌体生长和外源蛋白质表达都有了一定程度的提高, 说明氮源对外源蛋白质的高效表达具有非常重要的作用。同时也发现, 一定质量浓度 NH_4^+ 尤其是 7 g/L 时, 对诱导阶段毕赤酵母的生长和外源蛋白质的表达具有最好的促进作用; 而 NH_4^+ 质量浓度为 5 g/L 时, 对菌体生长和外源蛋白质表达的促进作用不明显; NH_4^+ 质量浓度达到 10 g/L 时, 反而在一定程度上抑制了外源蛋白质的表达。这说明 NH_4^+ 质量浓度过高或者过低, 都不利于华根霉脂肪酶的表达, 本课题研究对华根霉脂肪酶的工业化生产有一定的借鉴意义。

参考文献:

- [1] Davis B G, Boyer V. Biocatalysis and enzymes in organic synthesis[J]. **Natural Product Reports**, 2001, 18(6): 618-640.
- [2] Pandey A, Benjamin S, Soccol C R, et al. The realm of microbial lipases in biotechnology [J]. **Biotechnology and Applied Biochemistry**, 1999, 29(2): 119-131.
- [3] Sharma R, Chisti Y, Banerjee U C. Production, purification, characterization, and applications of lipase [J]. **Biotechnology Advances**, 2001, 19(8): 627-662.
- [4] 隋少飞, 陈松林. 巴氏毕赤酵母表达系统的特点及其研究进展[J]. 生物技术通报, 2004(3): 1-4.
SUI Shaofei, CHEN Songlin. Recent advances and character of methylotrophic yeast *Pichia pastoris* expression system [J]. **Biotechnology Bulletin**, 2004(3): 1-4. (in Chinese)
- [5] Cregg J, Cereghino J, Shi J Y, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* [J]. **Molecular Biotechnology**, 2000, 16(1): 23-52.
- [6] 李飞, 喻晓蔚, 沙冲, 等. 基因拷贝数和甲醇浓度对重组毕赤酵母产华根霉脂肪酶的影响[J]. 微生物学通报, 2011, 38(3): 301-309.
LI Fei, YU Xiaowei, SHA Chong, et al. Impact of gene dosage and methanol concentration on *Rhizopus chinensis* recombinant lipase production in *Pichia pastoris* [J]. **Microbiology China**, 2011, 38(3): 301-309. (in Chinese)
- [7] 卢鑫, 喻晓蔚, 沙冲, 等. 共表达伴侣蛋白质对重组毕赤酵母产米根霉脂肪酶(*Rhizopus oryzae*)发酵过程的影响[J]. 微生物学通报, 2013, 40(3): 407-413.
LU Xin, YU Xiaowei, SHA Chong, et al. Effect of co-expression of chaperones on *Rhizopus oryzae* recombinant lipase production in *pichia pastoris* [J]. **Microbiology China**, 2013, 40(3): 407-413. (in Chinese)
- [8] Solà A, Jouhten P, Maaheimo H, et al. Metabolic flux profiling of *Pichia pastoris* grown on glycerol/methanol mixtures in chemostat cultures at low and high dilution rates[J]. **Microbiology**, 2007, 153(1): 281-290.
- [9] HU X Q, CHU J, ZHANG S L, et al. A novel feeding strategy during the production phase for enhancing the enzymatic synthesis of S-adenosyl-L-methionine by methylotrophic *Pichia pastoris* [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 2007, 40(4): 669-674.
- [10] XIE J L, ZHANG L, YE Q, et al. Angiostatin production in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* fed with mixed carbon sources [J]. **Biotechnology Letters**, 2003, 25(2): 173-177.
- [11] ZHANG J G, WANG X D, ZHENG Y, et al. Enhancing yield of S-adenosylmethionine in *Pichia pastoris* by controlling NH_4^+ concentration [J]. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, 2008, 31(2): 63-67.
- [12] Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, et al. High-level expression of recombinant human serumalbumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation [J]. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 2000, 89(1): 55-61.
- [13] YU X W, LU X, ZHAO L S, et al. Impact of NH_4^+ nitrogen source on the production of *Rhizopusoryzae* lipase in *Pichia pastoris* [J]. **Process Biochemistry**, 2013, 48(10): 1462-1468.
- [14] YU X W, WANG R, ZHANG M, et al. Enhanced thermostability of a *Rhizopus chinensis* lipase by *in vivo* recombination in *Pichia pastoris* [J]. **Microbial Cell Factories**, 2012(11): 102-112.
- [15] Pencreac'h G, Baratti J C. Hydrolysis of p-nitrophenylpalmitate in n-heptane by the *Pseudomonas cepacia* lipase: A simple test for the determination of lipase activity in organic media [J]. **Enzyme and Microbial Technology**, 1996, 18(6): 417-422.
- [16] 汪家正, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 47-64.
- [17] Weatherburn M. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia [J]. **Analytical Chemistry**, 1967, 39(8): 971-974.
- [18] YANG J, ZHOU X, ZHANG Y. Improvement of recombinant hirudin production by controlling NH_4^+ concentration in *Pichia pastoris* fermentation [J]. **Biotechnology Letters**, 2004, 26: 1013-1017.