

## 重组毕赤酵母发酵甘油制备 $\alpha$ -葡聚糖酶的研究\*

# Study on the Fermentation Conditions for $\alpha$ -Glucanase Production by Recombinant *Pichia pastoris* Using Glycerol as Carbon Source

吴兆鹏<sup>1</sup>,曾练强<sup>1</sup>,黄曾慰<sup>1</sup>,常国炜<sup>1</sup>,梁达奉<sup>1,2\*\*</sup>,李雨虹<sup>1</sup>

WU Zhao-peng<sup>1</sup>, ZENG Lian-qiang<sup>1</sup>, HUANG Zeng-wei<sup>1</sup>, CHANG Guo-wei<sup>1</sup>, LI-ANG Da-feng<sup>1,2</sup>, LI Yu-hong<sup>1</sup>

(1. 广州甘蔗糖业研究所,广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室,广东广州 510316;2. 广西农垦糖业集团股份有限公司,广西糖业研发中心,广西南宁 530002)

(1. Guangdong Key Lab of Sugarcane Improvement & Biorefinery, Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangzhou, Guangdong, 510316, China; 2. Guangxi State Farms Sugar Industrial Group Company Limited, Guangxi Sugarcane Industry R&D Center, Nanning, Guangxi, 530002, China)

**摘要:**【目的】考察甘油对组成型毕赤酵母(*Pichia pastoris*)生长和 $\alpha$ -葡聚糖酶表达量的影响。【方法】采用单因素实验法考察初始发酵培养基中甘油浓度、补料阶段甘油残留和通气量等对 $\alpha$ -葡聚糖酶表达量的影响。【结果】发酵培养基中初始甘油浓度从50 g/L提高到150 g/L,菌体生长和 $\alpha$ -葡聚糖酶表达量均未受到影响,继续提高到200 g/L时, $\alpha$ -葡聚糖酶表达量明显下降。补料过程甘油残留在0~5 g/L,菌体生长和 $\alpha$ -葡聚糖酶表达量最佳,当甘油残留较多时,菌体生长和 $\alpha$ -葡聚糖酶的表达量均受到影响。提高通气量有利于增加 $\alpha$ -葡聚糖酶的表达量,发酵78 h为宜,在此条件下 $\alpha$ -葡聚糖酶酶活力达1763 U。【结论】该工艺优化了以甘油作为碳源制备 $\alpha$ -葡聚糖酶的发酵条件,提高了 $\alpha$ -葡聚糖酶酶活力,为大规模生产 $\alpha$ -葡聚糖酶奠定了基础。

**关键词:**毕赤酵母  $\alpha$ -葡聚糖酶 甘油 发酵条件

中图分类号:TQ925 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2014)06-0624-05

**Abstract:**【Objective】The aim of this paper is mainly to investigate the effects of glycerol on *Pichia pastoris* growth and constitutive expression of  $\alpha$ -glucanase. 【Methods】The initial concentration of glycerol in fermentation medium, glycerin concentration in fed-batch, ventilation and other effects on constitutive expression of  $\alpha$ -glucanase were examined by means of single factor experiment. 【Results】When the initial concentration of glycerol ranged from 50 g/L to 150 g/L, the growth and  $\alpha$ -glucanase expression were not affected, while the growth and  $\alpha$ -glucanase expression appeared to be markedly reduced when the glycerol increase to 200 g/L. Glycerol concentration between 0 to 5 g/L in fed-batch lead to the best growth and  $\alpha$ -glucanase expression. When glycerin concentration became higher, the growth of *Pichia pastoris* and  $\alpha$ -glucanase expression were restrained. Meanwhile, improving the ventilation was helpful to the expression of  $\alpha$ -glucanase, and suitable fermentation time was 78 h. Under this condition,  $\alpha$ -glucanase activity reached about 1763 U. 【Conclusion】The process optimized the fermentation conditions for  $\alpha$ -glucanase preparation with glycerol as carbon source, which greatly improved  $\alpha$ -glucanase activity and laid a solid foundation for  $\alpha$ -glucanase large-scale production.

pression of  $\alpha$ -glucanase, and suitable fermentation time was 78 h. Under this condition,  $\alpha$ -glucanase activity reached about 1763 U. 【Conclusion】The process optimized the fermentation conditions for  $\alpha$ -glucanase preparation with glycerol as carbon source, which greatly improved  $\alpha$ -glucanase activity and laid a solid foundation for  $\alpha$ -glucanase large-scale production.

**Key words:** *Pichia pastoris*,  $\alpha$ -glucanase, glycerol, fermentation conditions

收稿日期:2014-10-10

修回日期:2014-10-20

作者简介:吴兆鹏(1984-),男,工程师,硕士,主要从事食品生物技术研究。

\* 现代农业产业技术体系建设专项项目(编号 CARS-20-4-5)和八桂学者建设工程专项经费项目资助。

\*\* 通讯作者:梁达奉(1964-),男,博士,教授级高级工程师,八桂学者,主要从事制糖生物技术研究,E-mail:ldfjt@126.com。

**【研究意义】**巴斯德毕赤酵母表达系统因具有表达水平稳定、发酵工艺成熟、表达产物生物活性高等优点而被广泛应用。醇氧化酶1启动子(pAOX1)是目前毕赤酵母表达中应用最多的启动子,pAOX1受甲醇强烈诱导,但甲醇是有毒物质且具有挥发性,易造成环境污染,危及人体健康,且利用pAOX1表达外源蛋白的周期较长<sup>[1]</sup>。而毕赤酵母的组成型表达系统是利用编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAP)基因的启动子来表达外源蛋白,以甘油取代甲醇作为碳源是它的一大优点——安全可靠。因此,该系统更适合大规模发酵生产,且具有连续发酵和降低异源蛋白生产成本的潜能<sup>[2~5]</sup>。**【前人研究进展】**在pGAP组成型表达系统中,有关发酵工艺的研究报道较少,屠发志等<sup>[6]</sup>优化了毕赤酵母组成型表达人血管生成抑制素(human angiostatin,hAS),得出甘油是最佳碳源,并以初始浓度为40 g/L的甘油为碳源,在30 L生物反应器中进行工程菌的高密度发酵,48 h后测得hAS的产量为169 mg/L。曹东艳等<sup>[7]</sup>利用毕赤酵母组成型表达重组猕猴桃果胶甲酯酶抑制剂(kw-PMEI),48 h即达到最大表达水平,表达量约为66 mg/L,并且以甘油为碳源时kwPMEI表达量最高。Waterham等<sup>[8]</sup>和Doring等<sup>[9]</sup>的研究结果都证明,利用甘油和葡萄糖作为pGAP系统的碳源效果较好。在摇瓶发酵中,多以葡萄糖作为唯一的碳源,甘油则较适合作为中大型规模生物反应器中发酵生产重组蛋白的碳源。但他们都没有对碳源作进一步优化,初始甘油浓度都很低,均在50 g/L以下,甚至只有10 g/L,导致后期需要流加大量的甘油来维持发酵。一般情况下,3 L初始培养基后期要流加1 L甚至更多的甘油(多达1.5 L),这样至少有两大大不利因素:(1)大量的流加造成产物浓度降低,后期分离提纯困难;(2)大量流加对发酵设备也提出了更高要求,特别是中大型规模发酵,以3 t发酵为例,须配备2 t的补料罐,这其中还涉及补料甘油的灭菌等,增加了发酵成本。此外,高密度发酵需要消耗大量氧气,尤其在中后期,供氧往往成为限制性因素。若供氧不足,不仅会抑制菌体生长,而且还会影响目的蛋白产量。因此,保证足够的供氧是关键,而影响供氧的一个重要因素是通气量。**【本研究切入点】**针对以上问题,在成功构建组成型表达 $\alpha$ -葡聚糖酶基因工程菌的基础上,进一步研究毕赤酵母组成型以甘油为碳源进行高密度发酵生产 $\alpha$ -葡聚糖酶的发酵条件。**【拟解决的关键问题】**考察初始发酵培养基中甘油浓度、流加阶段甘油残留的控制、发酵过程的通气量等对毕赤酵母组成型生长和 $\alpha$ -葡聚糖酶产量的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株

组成型表达 $\alpha$ -葡聚糖酶的毕赤酵母工程菌由本实验室构建并保藏。

#### 1.1.2 主要试剂和仪器

DextranT2000 购自 Pharmacia 公司;其他试剂为国产分析纯;高速离心机购自美国 Therm;T6 新世纪紫外可见分光光度计为北京普析通用仪器有限责任公司产品;全温度培养振荡器为上海苏坤实业有限公司产品;LDZS 型立式压力蒸汽灭菌器为上海申安医疗器械厂产品;全自动 6.8 L 发酵罐为德国贝朗公司产品。

### 1.2 培养基

YPG 培养基:10 g/L 酵母粉,20 g/L 蛋白胨,20 g/L 甘油。

斜面培养基:含 20 g/L 琼脂的 YPG。

基础培养基 BSM 参照 Invitrogen 公司手册:初始甘油浓度 50~200 g/L,0.93 g/L  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 18.2 g/L  $\text{K}_2\text{SO}_4$ ,14.9 g/L  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,10 mL/L 85%  $\text{H}_3\text{PO}_4$  以及 4 mL/L PTM1 微量元素溶液(6.0 g/L  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,0.08 g/L KI,3.0 g/L  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ,0.2 g/L  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,0.02 g/L  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,0.5 g/L  $\text{CoCl}_2$ ,20 g/L  $\text{ZnCl}_2$ ,65 g/L  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,0.2g/L Biotin,5 mL/L 98%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ )

流加甘油:在 100% 甘油中加入 PTM1,使其终浓度为 12ml/L。

### 1.3 培养方法

将甘油管保存的工程菌转接到 YPG 琼脂斜面上,30℃ 培养约 2 d;用无菌水将斜面菌体洗脱,转接到 300 mL 种子培养基中,30℃,260 r/min 摇床中培养至  $OD_{600}$  值为 15~20;将 300 mL 种子液转接到装有 2.7 L BSM 培养基的 6.8 L 发酵罐中,培养条件为 30℃,pH=5.5,待培养基中甘油浓度低于 5.0 g/L 时,通过流加补料保持甘油浓度为 0~5.0 g/L。

### 1.4 初始甘油浓度的影响

调整培养基中的初始甘油浓度,使其浓度分别为 50 g/L、100 g/L、150 g/L、200 g/L,培养方法与 1.3 节相同,发酵至 84 h,定时测定并比较不同甘油浓度对菌体湿重和酶活的影响。

### 1.5 流加阶段甘油残留的影响

初始甘油浓度为 150 g/L,培养方法及其他培养条件同 1.3 节,当初始甘油浓度分别下降到 0~5

g/L、5~10 g/L、10~15 g/L 时开始流加甘油, 定时测定流加阶段甘油残留量, 使甘油残留分别控制在流加前各自相应的浓度范围, 比较甘油残留量对菌体湿重和酶活的影响。

### 1.6 通气量的影响

选择 1.4 节中确定的最适甘油浓度 150 g/L, 在流加阶段使甘油残留控制在 0~5 g/L, 将通气量从 3 L/min 提高至 7 L/min (即 3 L/min、5 L/min、7 L/min) 进行发酵, 其他实验条件与 1.3 节相同, 定时测定并比较通气量对菌体湿重和酶活的影响。

### 1.7 分析方法

#### 1.7.1 湿重测定

在已称量的离心管 ( $G_1$ ) 加入 1 mL 发酵液, 12000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 称量 ( $G_2$ ), 菌体湿重即为  $1000 \times (G_2 - G_1)$  g/L。

#### 1.7.2 $OD_{600}$ 的测定

发酵液经适当稀释至  $OD_{600} = 0.2 \sim 0.6$ , 置紫外可见分光光度计于波长 600 nm 处以去离子水为空白对照进行比色测定,  $OD_{600} = \text{读数} \times \text{稀释倍数}$ 。

#### 1.7.3 甘油浓度的测定 (高碘酸法)

甘油被过量高碘酸氧化后, 过剩的高碘酸及产物碘酸与 KI 反应析出  $I_2$ , 再用  $Na_2S_2O_3$  反滴定  $I_2$ , 经计算可求得甘油含量。

#### 1.7.4 $\alpha$ -葡聚糖酶酶活测定 (DNS 法)

取 900  $\mu$ L 20.0 g/L 的 DextranT2000 溶液, 置于 45 $^{\circ}$ C 水浴中恒温 5 min, 加入 100  $\mu$ L 酶液 (经 12000 r/min 离心 5 min 所得的上清液, 可以适当稀释), 精确反应 10 min, 立即加入 2 mL DNS 终止反应, 于沸水浴 5 min, 迅速将其冷却, 用蒸馏水定容至 25 mL, 于 540 nm 下测定吸光值。从标准曲线的回归方程求得相对应的葡萄糖量, 并折算出酶活。

酶活力定义: 在上述条件下, 每分钟从  $\alpha$ -葡聚糖底物中释放出 1  $\mu$ mol 还原糖所需的酶量为 1 个酶活单位, 以 U 表示。

## 2 结果与分析

### 2.1 初始甘油浓度对菌体生长及酶活的影响

甘油是毕赤酵母基因工程菌培养时普遍采用的碳源, 其浓度会限制或抑制菌体生长, 因此, 需要优化初始甘油浓度。由图 1~图 4 可以看出, 发酵至 72 h 和 84 h 时, 图 1、图 2 和图 3 的酶活和菌体湿重差别不大, 都明显比图 4 高; 图 1~图 4 批次实验甘油消耗依次减少, 分别为 503 g/L, 442 g/L, 423 g/L 和 354 g/L。综合考虑, 图 3 的培养条件甘油消耗少, 流加量也相对较少, 所以, 初始甘油浓度以 150 g/L 为

宜。实验还表明, 一定浓度甘油对酵母生长无毒害作用, 但会抑制其生长, 初始甘油浓度从 50 g/L 提高至 150 g/L, 虽然酵母在前期需要更长时间来适应甘油, 但一旦进入快速生长期, 即能不受影响大量产生目标蛋白。初始甘油继续增加到 200 g/L, 酶的产量即受到影响, 从消耗甘油总量也可以看出, 初始甘油浓度越高, 甘油总量消耗越少, 可能是甘油的渗透压对酵母利用甘油能力有影响, 从而影响了酶的产量。此外, 发酵至 78 h 后, 酶活力增长缓慢, 考虑到发酵时间及成本, 发酵时间以 78 h 为宜。这样不仅缩短了发酵时间, 降低了成本, 而且也有利于后期纯化。综上所述, 毕赤酵母组成型表达  $\alpha$ -葡聚糖酶的初始甘油浓度 150 g/L、发酵时间 78 h 为宜。

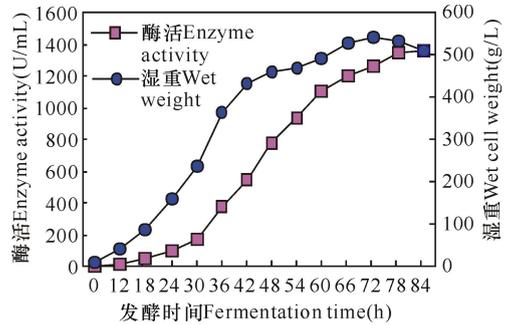


图 1 初始甘油浓度 50 g/L 对菌体湿重和酶活的影响  
Fig. 1 Effect of glycerol concentration of 50 g/L on wet weight and enzyme activity

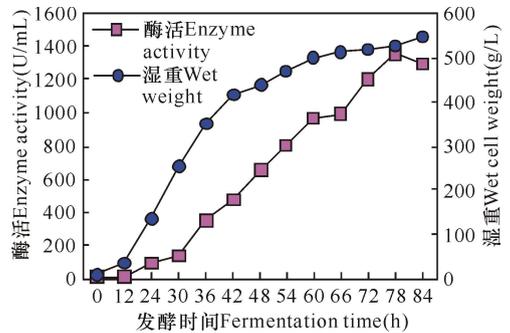


图 2 初始甘油浓度 100 g/L 对菌体湿重和酶活的影响  
Fig. 2 Effect of glycerol concentration of 100 g/L on wet weight and enzyme activity

### 2.2 流加阶段甘油残留对菌体生长及酶活的影响

从图 5~图 7 可以看出, 甘油残留高明显不利于菌体的生长和酶的生产, 虽然甘油本身对菌体无毒害作用, 但过高、过低残留会对菌体有抑制或者限制作用, 虽然在初始培养基中甘油浓度可以很高, 但在后期产酶阶段, 甘油残留过高就会影响  $\alpha$ -葡聚糖酶的产量, 因此, 控制好培养基中的甘油残留很重要。由实验结果可知产酶阶段甘油残留控制在 0~5 g/L 为宜。

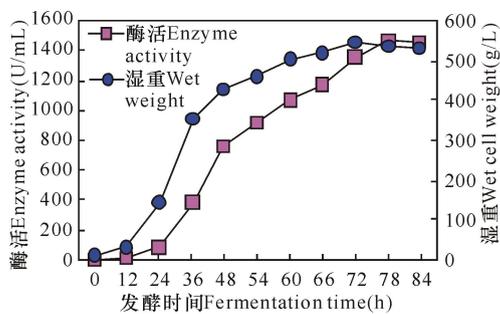


图3 初始甘油浓度 150 g/L 对菌体湿重和酶活的影响  
Fig. 3 Effect of glycerol concentration of 150 g/L on wet weight and enzyme activity

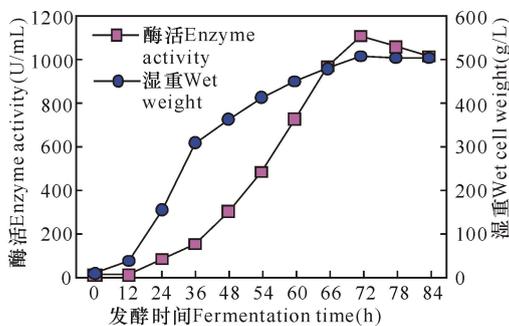


图7 流加阶段甘油残留控制在 10~15 g/L 对菌体湿重和酶活的影响

Fig. 7 Effect of glycerol residual of 10~15 g/L in fed-batch on wet weight and enzyme activity

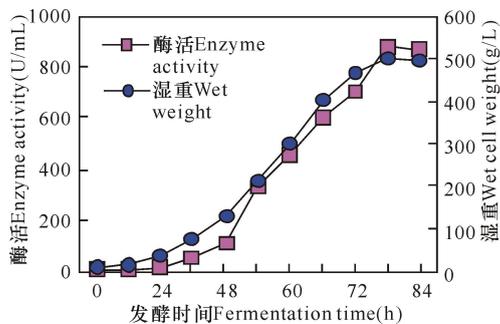


图4 初始甘油浓度 200 g/L 对菌体湿重和酶活的影响  
Fig. 4 Effect of glycerol concentration of 200 g/L on wet weight and enzyme activity

### 2.3 通气量对菌体生长及酶活的影响

由图 8~图 10 可知,通气量从 3 L/min 提高至 7 L/min, 初始培养基中 150 g/L 甘油消耗时间从 37 h 降为 33 h, 减少 4 h, 说明提高通气量有利于酵母消耗甘油。从酶活曲线和菌体湿重曲线来看, 二者不仅具有较强的趋势一致性, 而且还具有正相关性, 说明发酵液中菌体湿重越高, 目标产物的浓度越大, 这是组成型产量的一个显著特点。另外, 发酵至 72 h 和 84 h 时, 图 8~图 10 的酶活和菌体湿重都依次有所提高。通气量小, 发酵初期由于菌量少, 三者比较一致; 到发酵中后期, 菌体进入对数生长期, 需要消耗大量氧气, 这时如果供氧不足就会导致菌体生长缓慢, 酶的产量也会受到影响(图 8)。因此, 应尽可能提高供氧量以增大  $\alpha$ -葡聚糖酶的产量, 必要时采用纯氧与空气混合通气或富氧通气, 甚至通入纯氧, 还可采取其它措施, 如在培养基中加入过氧化氢或血红蛋白, 提高含氧量。结合能耗和人力成本等因素, 本实验的通气量以 7 L/min 为宜。

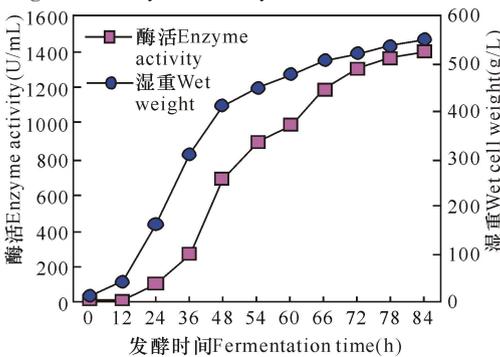


图5 流加阶段甘油残留控制在 0~5 g/L 对菌体湿重和酶活的影响

Fig. 5 Effect of glycerol residual of 0~5 g/L in fed-batch on wet weight and enzyme activity

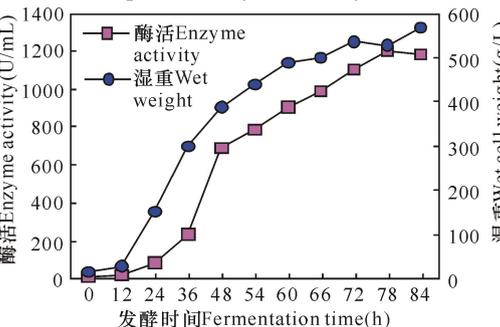


图6 流加阶段甘油残留控制在 5~10 g/L 对菌体湿重和酶活的影响

Fig. 6 Effect of glycerol residual of 5~10 g/L in fed-batch on wet weight and enzyme activity

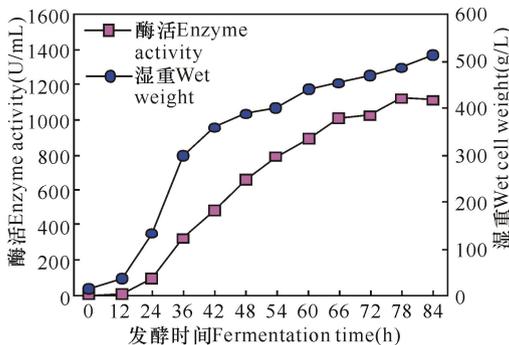


图8 通气量为 3 L/min 对菌体湿重和酶活的影响

Fig. 8 Effect of ventilation for 3 L/min on wet weight and enzyme activity

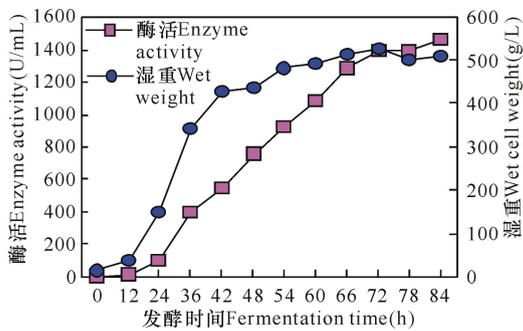


图9 通气量为 5 L/min 对菌体湿重和酶活的影响

Fig. 9 Effect of ventilation for 5 L/min on wet weight and enzyme activity

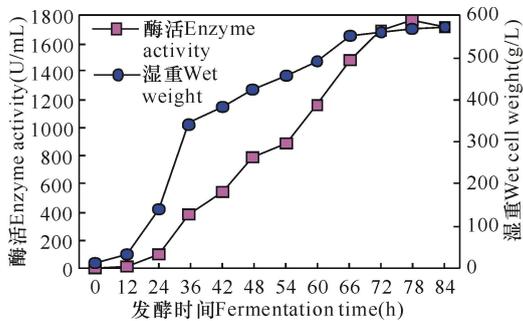


图10 通气量为 7 L/min 对菌体湿重和酶活的影响

Fig. 10 Effect of ventilation for 7 L/min on wet weight and enzyme activity

### 3 结论

本文主要研究甘油对毕赤酵母组成型生长和  $\alpha$ -葡聚糖酶产量的影响,结果表明:培养基中初始甘油浓度为 150 g/L,流加阶段甘油残留控制在 0~5 g/L,提高通气量,发酵时间 78 h 为宜,在此条件下,  $\alpha$ -葡聚糖酶酶活力达 1763 U,为未来大规模生产  $\alpha$ -葡聚糖酶奠定基础。

#### 参考文献:

[1] Ahmad M, Hirz M, Pichler H, et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: Recent achievements and perspectives for heterologous protein production[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2014, 98(12): 5301-5317.

[2] 梁达奉, 黄曾慰, 曾练强, 等.  $\alpha$ -葡聚糖酶在毕赤酵母中的组成型产量[J]. 华南理工大学学报: 自然科学版, 2012(5): 96-100.

Liang D F, Huang Z W, Zeng L Q, et al. Constitutive expression of dextranase in *Pichia pastoris* [J]. Journal of

South China University of Technology: Natural Science Edition, 2012(5): 96-100.

[3] 张永正, 温俊柳, 王燕, 等. 毕赤酵母组成型产量载体的构建及报告蛋白产量评价[J]. 中国生物制品学杂志, 2013, 26(10): 1379-1383.

Zhang Y Z, Wen J L, Wang Y, et al. Assessment of construction of a constitutive expression vector in *Pichia pastoris* using an NucA reporter gene[J]. Chin J Biologics, 2013, 26(10): 1379-1383.

[4] Wang X F, Sun Y C, Ke F, et al. Constitutive expression of *Yarrowia lipolytica* lipase LIP2 in *Pichia pastoris* using GAP as promoter[J]. Appl Biochem Biotechnol, 2012, 166(5): 1355-1367.

[5] Zhao W, Wang J, Deng R, et al. Scale-up fermentation of recombinant *Candida rugosa* lipase expressed in *Pichia pastoris* using the GAP promoter[J]. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 2008, 35(3): 189-195.

[6] 屠发志, 符策奕, 张添元, 等. 以甘油为碳源发酵 *Pichia pastoris* 组成型表达人血管生成抑制素[J]. 生物工程学报, 2007, 23(5): 902-906.

Tu F Z, Fu C Y, Zhang T Y, et al. Constitutive expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* using glycerol as only carbon source[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2007, 23(5): 902-906.

[7] 曹东艳, 韩诗雯, 陈董鑫, 等. 用 GAP 启动子在毕赤酵母中组成型表达重组猕猴桃果胶甲酯酶抑制剂[J]. 食品安全质量检测学报, 2014, 5(3): 964-969.

Cao D Y, Han S W, Chen D X, et al. Constitutive expression of *Kiwi pectin* methylsterase inhibitor in *Pichia pastoris* using the GAP promoter[J]. Journal of Food Safety and Quality, 2014, 5(3): 964-969.

[8] Waterham H R, Digan M E, Koutz P J, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter[J]. Gene, 1997, 186(1): 37-44.

[9] Dring F, Klapper M, Theis S, et al. Use of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter for production of functional mammalian membrane transport proteins in the yeast *pichia pastoris* [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1998, 50(2): 531-535.

(责任编辑: 陆 雁)