

DOI:10.13656/j.cnki.gxkx.20180612.002

潘勤春,刘兴胥,吕军,等.重组脂肪酶自诱导发酵培养基优化[J].广西科学,2018,25(3):299-303.

PAN Q C,LIU X X,LV J,et al. Optimization of auto-induction fermentation medium for recombined lipase[J]. Guangxi Sciences, 2018,25(3):299-303.

重组脂肪酶自诱导发酵培养基优化*

Optimization of Auto-induction Fermentation Medium for Recombined Lipase

潘勤春¹,刘兴胥¹,吕军¹,朱婧²,王青艳^{2**},周礼芹^{1,2**}

PAN Qinchun¹,LIU Xingxu¹,LV Jun¹,ZHU Jing²,WANG Qingyan²,
ZHOU Liqin^{1,2}

(1.南宁市新科健生物技术有限责任公司,广西南宁 530003;2.广西科学院,广西南宁 530007)

(1. Nanning Newkergen Biotechnology Sciences Co. Ltd., Nanning, Guangxi, 530003, China;
2. Guangxi Academy of Sciences, Nanning, Guangxi, 530007, China)

摘要:【目的】优化自动诱导发酵培养基,提高脂肪酶产量。【方法】通过对构建的一株转座子整合型脂肪酶重组菌株,采用自动诱导发酵表达方法,并结合 CCD 响应面实验设计方法,对自动诱导培养基中的碳源进行优化,获得了 1 个二次模型用于描述发酵培养基中碳源对产脂肪酶的影响。【结果】优化后的最适自动诱导培养基(W/V)组成为 glycerol 2.596, glucose 0.035, lactose 1.289, tryptone 1.0, yeast extract 0.5, Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.79, KH₂PO₄ 0.68, NH₄Cl 0.267 5, Na₂SO₄ 0.071, MgSO₄ · 7H₂O 0.05。【结论】发酵试验表明,最优碳源培养基的比活力为 R₁ = 6.35 U/mg,比初始发酵培养基提高近 3 倍。

关键词:脂肪酶 自动诱导 响应面 培养基优化

中图分类号:Q815 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-9164(2018)03-0299-05

Abstract:【Objective】Optimizing the auto-induction of the fermentation medium to increase lipase enzyme production. 【Methods】In this research, through the construction of a transposon-integrated lipase recombinant bacterial strain, using automatic induction fermentation expression method combined with CCD response surface experimental design method, the carbon source in the auto-induction medium was optimized, and a quadratic model was obtained, which was used to describe the effect of the carbon source in the fermentation medium on lipase production. 【Results】The optimized fermentation medium (W/V) contained glycerol 2.596, glucose 0.035, lactose 1.289, tryptone 1.0, yeast extract 0.5, Na₂HPO₄ · 12H₂O 1.79, KH₂PO₄

0.68, NH₄Cl 0.267 5, Na₂SO₄ 0.071, MgSO₄ · 7H₂O 0.05. 【Conclusion】The results of the fermentation test confirmed that the lipase enzyme specific activity in the optimized fermentation medium was 6.35 U/mg, which was nearly three times higher than that in the initial fermentation medium.

Key words: lipase, auto-induction, response surface method, medium optimization

收稿日期:2018-04-28

作者简介:潘勤春(1985—),女,中级工程师,主要从事微生物与生物发酵研究,E-mail:cisu12@163.com。

* 广西科学研究与技术开发计划项目(桂科合 15104001-18)资助。

** 通信作者:王青艳(1973—),女,研究员,主要从事微生物与酶工程研究,E-mail:799610223@qq.com;周礼芹(1969—),女,研究员,主要从事分子生物学研究,E-mail:zhouliqin@hotmail.com。

0 引言

【研究意义】脂肪酶(Lipase, EC 3. 1. 1. 3)是一类典型的羧酸水解酶,在油水界面处发挥催化活性,将甘油酯水解为甘油和游离脂肪酸,是重要工业生物技术用酶之一。绝大多数脂肪酶来源于微生物,不同微生物产生的脂肪酶酶学性质(包括底物选择性、最适温度及温度耐受性、最适 pH 值及 pH 耐受性、有机溶剂耐受性、金属离子等激活或抑制效果等)往往存在差异^[1]。这些酶学性质决定了该种脂肪酶是否具有广泛的生物催化应用性。脂肪酶催化是绿色催化的重要组成部分。从自然界筛选分离到的野生型脂肪酶菌株产酶较低,因此,克隆其脂肪酶基因,构建高效脂肪酶基因工程菌,获得自主生产的脂肪酶酶源或全新的脂肪酶催化剂,是推广脂肪酶催化应用的有效措施。**【前人研究进展】**国内对微生物脂肪酶的研究与开发较晚,有关产脂肪酶基因工程菌的研究报道甚少。本实验室前期构建的基因工程菌株在 IPTG 诱导下可实现目的蛋白的可溶性表达,但表达量较低,且大部分目的蛋白以包涵体形式存在。自动诱导是一种基于分解代谢阻遏效应原理的诱导方法,即当培养基中同时存在葡萄糖和乳糖时,大肠杆菌优先利用葡萄糖(速效碳源),当葡萄糖耗完后才开始利用乳糖(迟效碳源),通常能观察到菌体的二次生长现象^[2-3]。该方法是 Studier^[2]于 2005 年提出的一种获取高产蛋白及高密度细胞的诱导方法,主要针对含 T7lac 启动子的 pET 表达系统,解决传统方法中重组菌外源蛋白本底水平表达所产生的不利影响等问题;尤其是在利用重组菌表达一些毒性蛋白时,本底表达对宿主菌生长是致死的。目前,该方法在许多于大肠杆菌中表达的外源蛋白的研究中得到广泛应用,同时其简便的操作、高效的表达和高菌体密度的优点也被不断证实。如 Nie 等^[3]利用自动诱导培养基培养 BL21 (DE3)/pET-22b(+)-*pul* 重组菌株,最终收获的发醇液中普鲁兰酶的总酶活高达 580 U/mL,是 IPTG 诱导方法获得的总酶活力的 41.2 倍,并通过优化添加剂甘氨酸的浓度,使胞外酶活达到 502 U/mL; Rad-Malekshahi 等^[4]为获得 SA2 基因在大肠杆菌的高效表达,采用了自动诱导培养基进行诱导表达,与 IPTG 诱导相比较,菌体密度和蛋白表达量分别提高了 3.5 倍和 4 倍;EL-Baky 等^[5]采用自动诱导培养基并结合诱导温度优化诱导达量胞外 cIFN- α 蛋白的表达,胞外蛋白占细胞裂解液总蛋白的 70%,经 DEAE-Sephrose 层析柱单步分离纯化后,蛋白产量达 270

mg/L,远远高于文献报道的数值。**【本研究切入点】**虽然基因工程技术使得脂肪酶的异源表达研究取得了一些成绩,但对于整合型脂肪酶重组菌的自动诱导发酵表达,目前国内鲜有报道。**【拟解决的关键问题】**本研究以整合型脂肪酶重组菌为研究对象,优化自动诱导发酵培养基碳源组分,使蛋白表达量增加的同时,提高单位菌体蛋白产量,探索高效表达可溶蛋白的工艺条件。

1 材料与方法

1.1 菌种

本实验室利用 Tn7 启动子构建了一株转座子整合型的脂肪酶重组菌株。

1.2 培养基

LB 培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,NaCl 5 g/L,pH 值为 7.0。

TYM-5052 培养基:蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,甘油 5 g/L,葡萄糖 0.5 g/L(过滤除菌),乳糖 2 g/L(过滤除菌),Na₂HPO₄ · 12H₂O 17.9 g/L,KHPO₄ 6.8 g/L,NH₄Cl 2.675 g/L,Na₂SO₄ 0.71 g/L,MgSO₄ · 7H₂O 0.5 g/L(单独灭菌)。

说明:TY 为蛋白胨和酵母粉的英文首字母简写;M 代表自动诱导培养基中的盐离子成分;5052 为自动诱导培养基中的甘油、葡萄糖和乳糖的百分比浓度组合简写,即甘油 5 g/L,葡萄糖 0.5 g/L,乳糖 2 g/L。

1.3 种子培养

将活化后的菌种接种至种子培养基于 28℃、220 r/min 培养至对数期。

1.4 摇瓶发酵

按 1% 的接种量将种子液接种至装有 50 mL 发酵培养基的 250 mL 三角瓶中,28℃、220 r/min 培养 48 h。测定菌体浓度 OD₆₀₀。发酵液经 10 000 r/min 离心 5 min,收集菌体,重悬后超声破碎,取上清液测酶活性。

1.5 响应面设计优化自动诱导发酵培养基

采用 3 因素 3 水平的 CCD 响应面设计方法,选择甘油浓度、葡萄糖浓度、乳糖浓度这 3 个对自动诱导发酵影响较大的碳源因素进行响应面实验设计,以脂肪酶的比活力为优化指标,并进行 3 次重复实验。对于 3 因素 3 水平的中心组合实验共需要 17 次实验。拟合出一个二次多项式方程。该方程为描述响应变量(因变量)与自变量的经验模型。实验设计、数据分析及模型建立主要采用统计分析软件 Design

Expert 7.0 来完成。

1.6 验证试验

利用优化后的发酵培养基配方进行脂肪酶重组菌的发酵试验,重复 3 次。以初始发酵培养基作为对照。

1.7 脂肪酶酶活测定

酶活定义:在 40℃ 和 pH 值为 6.0 条件下,1 min 内催化对硝基苯棕榈酸酯生成 1 μmol 对硝基苯酚(p-NP)所需要的酶量为 1 个酶活单位(U)。

以对硝基苯棕榈酸酯(p-NPP)为底物,利用多功能酶标仪在 96 孔板上测定脂肪酶的活性。加入 50 μL 酶液到 400 μL 0.05 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 值为 6.0)中,40℃ 保温,预热 5 min,加入 50 μL 10 mmol/L p-NPP 异丙醇溶液反应 5 min 后,加入 500 μL 10% 三氯乙酸终止反应,在加入 1 mL 1 mol/L Na₂CO₃,取 200 μL 反应液测定在 405 nm 的 OD 值。

2 结果与分析

2.1 自动诱导发酵培养基碳源成分优化

自动诱导发酵培养方法中,乳糖既作为碳源,用于菌体生长及维持机能,又作为诱导剂,诱发蛋白表达。葡萄糖作为一种快速利用碳源,对于菌体快速生长至对数期,起着重要的作用,同时葡萄糖又抑制乳糖的诱导,影响蛋白的表达。甘油是常用的一种碳源,在自动诱导发酵过程中,弥补乳糖利用不足于菌体的生长需要。三者有着至关重要的作用。如何调整乳糖、葡萄糖和甘油的浓度,使之在自动诱导发酵过程,兼顾菌体生长量,又保证蛋白的表达。采用 TYM-5052 培养基为基础培养基,通过改变甘油浓度、葡萄糖浓度、乳糖浓度,探究这 3 个因素对脂肪酶重组菌自动诱导发酵产酶的影响。

2.1.1 甘油浓度优化

保持培养基中其他成分浓度不变,改变培养基中的甘油浓度,探究重组菌表达脂肪酶基因所需的最适甘油浓度。图 1 结果表明,甘油浓度在 5~100 g/L 之间时,菌体密度随着甘油浓度增加而增加;甘油浓度在 5~40 g/L 范围内时,脂肪酶活力呈明显上升趋势,说明适当提高培养基中的甘油浓度有利于重组菌的菌体密度和酶活力的提高;当甘油含量为 40 g/L 时,酶活达到最大值 84.6 U/mL,比活力达到最大值 6.42 U/mg,较初始培养基提高了约 1 倍。

2.1.2 葡萄糖浓度优化

图 2 显示,随着培养基中的葡萄糖含量增加,脂肪酶表达的酶活呈下降趋势,葡萄糖浓度越高,菌体密度越大,蛋白表达越低。可能是在快速利用碳

源——葡萄糖存在条件下,菌体生长速率快,乳糖来不及诱发蛋白表达而导致蛋白表达率低。

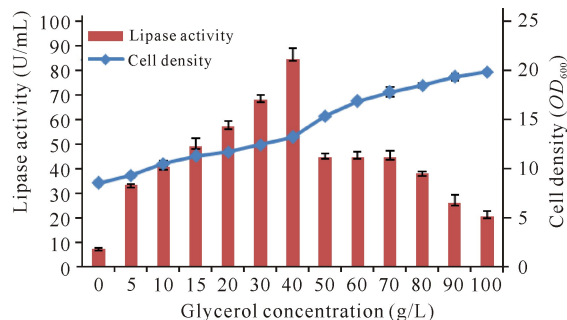


图 1 甘油浓度对脂肪酶表达量的影响

Fig. 1 Effect of glycerol at different concentrations on yield of lipase

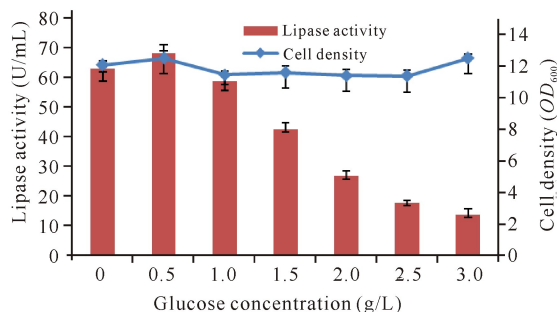


图 2 葡萄糖浓度对脂肪酶表达量的影响

Fig. 2 Effect of glucose at different concentrations on yield of lipase

2.1.3 乳糖浓度优化

图 3 显示,适当地提高培养基中的乳糖含量,有利于重组菌的菌体密度和脂肪酶基因表达量的提高。当乳糖浓度为 12 g/L 时,酶活最高达 80 U/mL,比活力值最高,为 6.42 U/mg,是初始培养基中脂肪酶比活力的 1.8 倍。

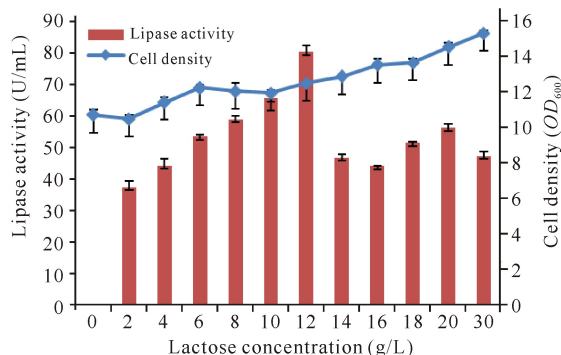


图 3 乳糖浓度对脂肪酶表达量的影响

Fig. 3 Effect of lactose at different concentrations on yield of lipase

2.1.4 碳源成分的响应面实验设计优化

在单因素优化实验结果的基础上,利用响应面中心组合设计方法对培养基中的碳源如甘油、葡萄糖和乳糖浓度作进一步优化。实验结果及 RSM 法预测

的结果见表 1。

表 1 中心组合实验设计方案及实验结果

Table 1 Coded values and corresponding real values of the fermentation conditions tested in CCD experimental design

序号 No.	Glycerol		Glucose		Lactose		比活力 Specific activity (U/mg)	
	X_1 (g/L)	编码 Code	X_2 (g/L)	编码 Code	X_3 (g/L)	编码 Code	实验值 Actual	预测值 predicted
1	40.00	1	1.00	1	11.00	0	2.92	2.29
2	5.00	-1	0.50	0	2.00	-1	1.55	1.54
3	22.50	0	0.50	0	11.00	0	6.51	6.04
4	22.50	0	1.00	1	20.00	1	2.13	2.75
5	22.50	0	0.00	-1	2.00	-1	3.83	3.20
6	22.50	0	1.00	1	2.00	-1	1.80	1.87
7	22.50	0	0.50	0	11.00	0	6.29	6.04
8	5.00	-1	0.00	-1	11.00	0	2.39	3.02
9	40.00	1	0.00	-1	11.00	0	5.11	5.17
10	22.50	0	0.50	0	11.00	0	6.40	6.04
11	22.50	0	0.50	0	11.00	0	6.58	6.04
12	5.00	-1	1.00	1	11.00	0	2.49	2.43
13	40.00	1	0.50	0	20.00	1	3.81	3.82
14	5.00	-1	0.50	0	20.00	1	5.62	5.05
15	22.50	0	0.50	0	11.00	0	4.43	6.04
16	22.50	0	0.00	-	20.00	1	4.96	4.89
17	40.00	1	0.50	0	2.00	-1	4.20	4.76

利用 Design Expert 软件对表 1 的试验结果进行回归拟合,建立二次响应面回归模型,3 个因素对发酵液脂肪酶比活力的影响可用回归方程式表示为

$$R_1 = -2.495 + 0.3X_1 + 0.709X_2 + 0.564X_3 - 0.065X_1X_2 - 0.007X_1X_3 - 0.045X_2X_3 - 0.004X_1^2 - 6.857X_2^2 - 0.014X_3^2$$

为了检验回归模型的显著性,利用方差分析进行了 F 检验,其结果见表 2。由方差分析结果可知,自变量一次项 X_2 、 X_3 ,二次项 X_1X_3 、 X_1^2 、 X_2^2 、 X_3^2 显著 ($P < 0.05$),说明拟合的二次回归方程合适。回归模型的失拟项为 Lack of Fit 值为 0.91,即方程模型失拟不显著,并且该方程的决定系数为 $R^2 = 0.8864$ (> 0.80),表明该方程回归程度良好。Adeq Precision 值为 6.593 (> 4),即该模型可用于预测。

表面响应图能够预测检测变量的响应值和确定变量相互作用的形式。若图 4a、4c 为圆形等高线,说明 glycerol 与 glucose、glucose 与 lactose 变量间的相互作用可忽略;图 4b 为椭圆,则 glycerol 与 lactose 变量间的相互作用对脂肪酶自动诱导发酵时的比活力的影响是非常明显的。

利用 Design Expert 软件对获得的非线性二次回归模型及响应面进行自动诱导发酵,由图可知,在 X_1 、 X_2 、 X_3 分别为 25.98 g/L、0.35 g/L、12.89 g/L 时, R_1 具有最大值 6.287 U/mg。也即脂肪酶自动

诱导发酵液中比活力最高时的培养基组成(W/V)为 glycerol 2.596, glucose 0.035, lactose 1.289, tryptone 1.0, yeast extract 0.5, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.79, KH_2PO_4 0.68, NH_4Cl 0.2675, Na_2SO_4 0.071, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05。结果与对图 4 的直观分析相吻合,其预测的响应值为 $R_1 = 6.287$ U/mg。

表 2 方差分析表

Table 2 ANOVA analysis of coefficient of the regression equation

变异来源 Variance	自由度 df	平方和 SS	F	$P > F$
回归 Regression	9	43.27	6.07	0.0133
剩余 Residue	7	5.54		
总变异 Total variation	16	48.81		

2.2 优化结果验证

为验证二次回归模型的准确性和有效性,根据最优碳源培养基配方对回归模型进行 50 L 发酵罐验证试验。结果表明,最优碳源培养基的比活力为 $R_1 = 6.35$ U/mg,与模型预测值 $R_1 = 6.287$ U/mg 很接近;而初始发酵培养基的比活力为 $R_1 = 1.55$ U/mg。结果证实利用 CCD 响应面实验设计法来优化自动诱导发酵培养基的碳源是可行的、有效的,具有实用

价值。

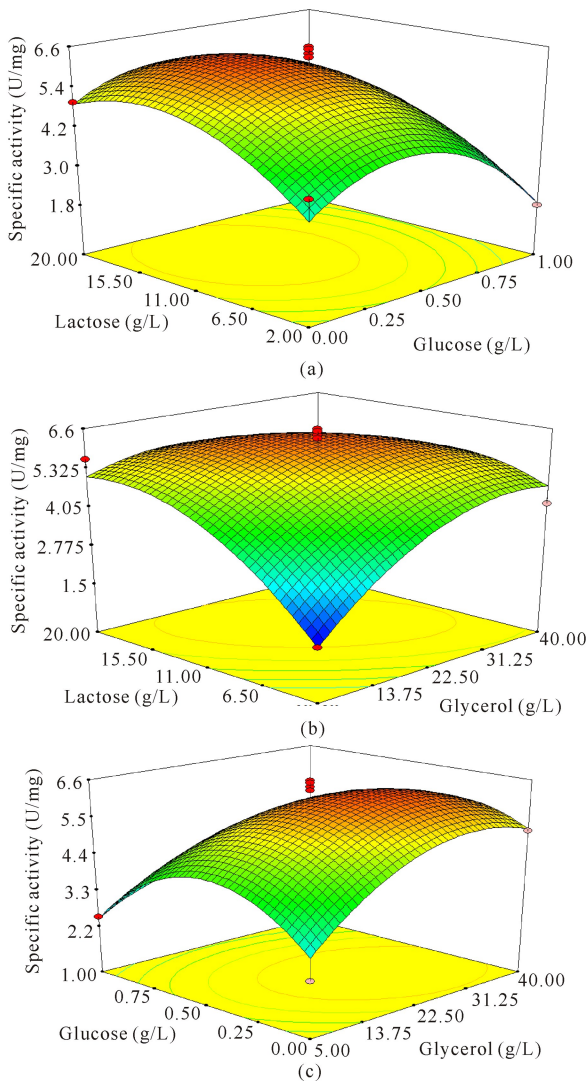


图4 响应面立体分析图和相应的等高线图(a: X_2, X_3 ; b: X_1, X_2 ; c: X_1, X_3)

Fig. 4 Three dimensional surface and contour patterns using response surface method (a: X_2, X_3 ; b: X_1, X_2 ; c: X_1, X_3)

3 讨论

通过对自动诱导发酵培养基中的碳源进行优化发现,甘油对菌体的生长影响比较大,而葡萄糖则对脂肪酶的表达影响比较大,随着葡萄糖浓度的增加,蛋白表达量持续降低。乳糖在自动诱导表达系统中,在速效碳源利用完后,既作为碳源又作为诱导剂,即使在没有速效碳源的情况下,蛋白的表达量也不好受到很大的影响。随着乳糖浓度的增加,蛋白表达量也在不断的增加,当达到一定量后,再增加乳糖的含量也不能改变蛋白表达量。

本实验中自动诱导发酵培养基的甘油、葡萄糖、乳糖三种碳源,甘油和乳糖之间的相互作用对脂肪酶自动诱导表达时的比活力的影响是非常明显的。通

过调整三者的浓度关系,可以提高脂肪酶的可溶性表达。这与龚志飞等^[6]及Blommel等^[7]的研究结果相类似。本实验中只对自动诱导表达的分批发酵工艺进行了初步探索,为了获得更多的蛋白表达,还需进一步完善分批发酵工艺条件,并深入研究自动诱导表达的分批补料发酵工艺,这样才能使自动诱导表达方法应用于工业生产中,对生物产业发挥更大的作用。

4 结论

本研究结果表明,优化后的自动诱导培养基对整合型脂肪酶重组菌的蛋白表达有显著的提高,但微生物发酵复杂多化,不同发酵工艺之间的蛋白表达结果相差较大,相对于毕赤酵母系统和IPTG诱导表达系统具有很大的优势,但是目前自动诱导表达不能在工业生产上应用,因此,在培养基优化的基础上,有待于继续探索更优化的自动诱导表达发酵工艺,使之适用于工业化生产。

参考文献:

- [1] BAJAJ A, LOHAN P, JHA P N, et al. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: An overview[J]. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2010, 62(1): 9-14.
- [2] STUDIER F W. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures[J]. Protein Expr Purif, 2005, 41(1): 207-234.
- [3] NIE Y, YAN W, XU Y, et al. High-level expression of *Bacillus naganensis* pullulanase from recombinant *Escherichia coli* with auto-induction: effect of lac operator[J]. PLOS ONE, 2013, 10(8): e78416.
- [4] RAD-MALEKSHAHI M, FLEMENT M, HENNINK W E, et al. Optimization of the recombinant production and purification of a self-assembling peptide in *Escherichia coli* [J]. Microbial Cell Factories, 2014, 13(1): 1-8.
- [5] EL-BAKY N A, LINJAWI M H, REDWAN E M. Auto-induction expression of human consensus interferon-alpha in *Escherichia coli* [J]. BMC Biotechnology, 2015, 15(1): 14.
- [6] 龚志飞, 杨翔, 颜法宝, 等. 重组人抗血栓蛋白在大肠杆菌中的自动诱导表达及纯化[J]. 生物技术通报, 2011, 12: 192-198.
- [7] GONG Z F, YANG X, YAN F B, et al. Auto-inducing expression and purification of recombinant human anti-coagulant protein in *Escherichia coli* [J]. Biotechnology Bulletin, 2011, 12: 192-198.
- [7] BLOMMEL P G, BECKER K J, DUNVJAK P. Enhanced bacterial protein expression during auto-induction obtained by alteration of lac repressor dosage and medium composition[J]. Biotechnology Progress, 2007, 23(3): 585-598.

(责任编辑:米慧芝 符支宏)