

重组毕赤酵母高密度发酵生产碱性果胶酶的策略

王芸¹, 华兆哲¹, 刘立明¹, 张朝晖³, 堵国成¹, 陈坚^{1,2}

1 江南大学工业生物技术教育部重点实验室, 无锡 214122

2 江南大学食品科学技术国家重点实验室, 无锡 214122

3 浙江工业大学生物与环境工程学院, 杭州 310014

摘要: 重组 *Pichia pastoris* GS115 表达碱性果胶酶的诱导阶段, 最佳初始菌体浓度和甲醇诱导浓度分别为 122 g/L 和 20 g/L, 两者之间最佳比值范围是 0.16~0.20 g/g (甲醇/菌体浓度)。在此基础上通过生长阶段甘油的指数流加, 以及诱导阶段基于甲醇比消耗速率和溶氧等参数进行甲醇流加的方式, 将甲醇与菌体浓度比例控制在 0.171~0.195 g/g 之间。此时, 酶活达到 430 u/mL, 生产强度为 4.34 u/mL/h, 实现了碱性果胶酶高效生产。

关键词: 重组毕赤酵母, 碱性果胶酶, 甲醇与菌体比例, 流加策略

High-level Production of Alkaline Polygalacturonate Lyase in Recombinant *Pichia pastoris*

Yun Wang¹, Zhaozhe Hua¹, Liming Liu¹, Zhaohui Zhang³, Guocheng Du¹, and Jian Chen^{1,2}

1 Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

2 State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China

3 College of Biological & Environmental Engineering, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China

Abstract: In order to increase the production of alkaline polygalacturonate lyase (PGL) by recombinant *Pichia pastoris* GS115, the effect of cell and methanol concentration on the PGL production was carefully investigated by single factor experiment. The optimum conditions were listed as follows: the cell concentration 122 g/L, the methanol concentration 20 g/L, and the ratio of methanol and cell concentration 0.16~0.20 g/g (methanol/cell). With the glycerol and methanol feeding strategies, the ratio of methanol and cell concentration could be controlled at the range of 0.171 to 0.195 g/g. And the highest PGL activity (430 u/mL) and highest PGL productivity (4.34 u/mL/h) were achieved.

Keywords: *Pichia pastoris*, alkaline polygalacturonate lyase, ratio of methanol and cell concentration, feeding strategy

碱性果胶酶(Polygalacturonate lyase, PGL)是一类能在碱性条件下高效分解植物组织中果胶质(由D-半乳糖醛酸以 α -1, 4 糖苷键连接形成的直链状的

聚合物)的酶的总称^[1], 作为一种用于纺织清洁生产的全新温和的生物精练酶制剂而备受关注。在前期研究中, 本研究室在分离筛选得到一株碱性果胶酶

Received: August 20, 2007; **Accepted:** September 29, 2007

Supported by: the National Outstanding Youth Foundation of China (No. 20625619), the Key Project of Chinese National Programs for Fundamental Research and Development (973 program) (Nos. 2007CB714306, 2007CB714303), the Key Project of Science and Technology Planning Project of Zhejiang Province (No. 2006C21117).

Corresponding author: Jian Chen. E-mail: jchen@jiangnan.edu.cn

Zhaozhe Hua. E-mail: huazz@jiangnan.edu.cn

国家杰出青年基金(No. 20625619)、国家自然科学基金 (973 计划) (Nos. 2007CB714306, 2007CB714303)和浙江省重点科技项目(No. 2006C21117)资助。

高产菌株 WSHB04-02 的基础上^[2], 扩增出编码碱性果胶酶的基因, 并成功将其表达于 *Pichia pastoris* GS115 中^[3]。现今, 在一定细胞密度下通过控制甲醇的浓度而实现外源蛋白高效表达成为目前生化工程的研究热点。由于 *P. pastoris* 在以甲醇作为唯一碳源和能源表达外源目的蛋白时, 细胞生长与蛋白表达共同争夺碳源和能源, 导致表达效率低下^[4]。因此, 如何在最佳菌体浓度下控制最适甲醇浓度是实现外源目标蛋白高效表达的首要条件^[5-7]。

为了进一步促进重组 *P. pastoris* 高密度发酵生产碱性果胶酶, 本研究在详尽分析菌体和甲醇浓度对重组 *P. pastoris* 高效表达的基础上, 总结出诱导阶段甲醇浓度和菌体浓度的最佳比值, 并通过指数流加甘油和根据甲醇比消耗速率、溶氧等参数进行甲醇流加, 控制甲醇浓度和菌体浓度的最佳比值, 实现碱性果胶酶高效表达和生产。

1 材料与方法

1.1 菌株

以 *P. pastoris* GS115 为宿主, 整合来自 *Bacillus* sp. WSHB04-02 菌株中的碱性果胶酶的编码基因, 具有 His⁺和 Mut⁺表型, 拷贝数为 2~3 个, 由本实验室构建并保存。

1.2 培养基

1.2.1 YEPD 活化培养基

葡萄糖 20 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 酵母膏 10 g/L。

1.2.2 BMGY 种子培养基

YNB 13.4 g/L, 甘油 10 g/L, 生物素 0.4 mg/L, 0.1 mol/L pH 6.0 磷酸钾缓冲溶液 25 mL。

1.2.3 分批发酵培养基(BSM)

85%磷酸 26.7 mL/L, CaSO₄ 0.93 g/L, K₂SO₄ 18.2 g/L, MgSO₄·7H₂O 14.9 g/L, KOH 4.13 g/L, 甘油 40.0 g/L, PTM1^[8] 4.35 mL/L, 25%氨水调至 pH5.5。

1.2.4 补料生长培养基

50 % (W/V) 甘油 (含 12 mL/L PTM1)。

1.2.5 发酵诱导培养基

100 % 甲醇 (含 12 mL/L PTM1)。

1.3 培养方法

1.3.1 种子摇瓶培养

从甘油管中接 400 μ L 菌液于 25 mL YEPD 中, 培养 14 h 后按 1% 的接种量接种到 BMGY 中 (50 mL

培养基/ 500 mL 三角瓶), 于 30°C、200 r/min 培养 24 h。

1.3.2 补料高密度发酵培养

将 BMGY 中菌液按 10% 接种量接入 3 L 全自动发酵罐 (LiFlus GM BioTRON, Korea), 以 25% 氨水控制 pH 5.5, 温度 30°C, 调节搅拌转速和通气量维持溶氧 30% 以上。当甘油耗尽 (DO 迅速上升) 时, 开始流加补料生长培养基。当菌体达到一定浓度后, 停止补料。待甘油再次耗尽, 继续保持基质匮乏状态约 1 h 后, 开始流加诱导培养基, 诱导 PGL 表达。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。

1.4 测定方法

1.4.1 菌体干重的测定

取 10 mL 发酵液置于离心管中, 10 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 将离心菌体置于 105°C, 烘至恒重, 称量并计算菌体干重 (DCW, dry cell weight, 单位为 g/L)。

1.4.2 碱性果胶酶活性的测定

参见文献[2]。

1.4.3 甲醇浓度的测定

气相色谱法。岛津 GC2010 型气相色谱仪, 色谱柱 PEG20M, 30 m×0.32 mm×0.50 μ m, 毛细管柱, 气化室 200°C, 检测器 (FID) 220°C, 柱箱 170°C, 流速: N₂ 40 mL/min, 空气 450 mL/min, H₂ 40 mL/min。

1.4.4 甘油浓度的测定

高效液相色谱 (HPLC) 法。Agilent 1100 液相色谱仪, C₁₈ 反相柱, 5 μ m, 4.6 mm×250 mm, 流动相: 70% 乙腈, 30% 水。流速: 0.6 mL/min, 柱温: 30°C, 进样量: 10 μ L, 检测器: 示差折光检测器。

2 结果与讨论

2.1 诱导初始菌体浓度对 PGL 表达的影响

维持诱导阶段甲醇浓度为 6 g/L, 不同菌体浓度对 PGL 表达的影响如图 1 所示。PGL 酶活随着诱导时菌体浓度的增加而增加。当菌体浓度为 62.5 g/L 时, 诱导 89.5 h 酶活仅为 102 u/mL (Fig. 1A), 可能是由于甲醇作为碳源供微生物继续生长, 导致不能高效诱导外源基因的表达; 增加菌体浓度到 122 g/L 时诱导 86.5 h 酶活达 207 u/mL (Fig. 1C), 比菌体浓度为 62.5 g/L 和 90 g/L (Fig. 1B) 时分别提高了 102% 和 23%。

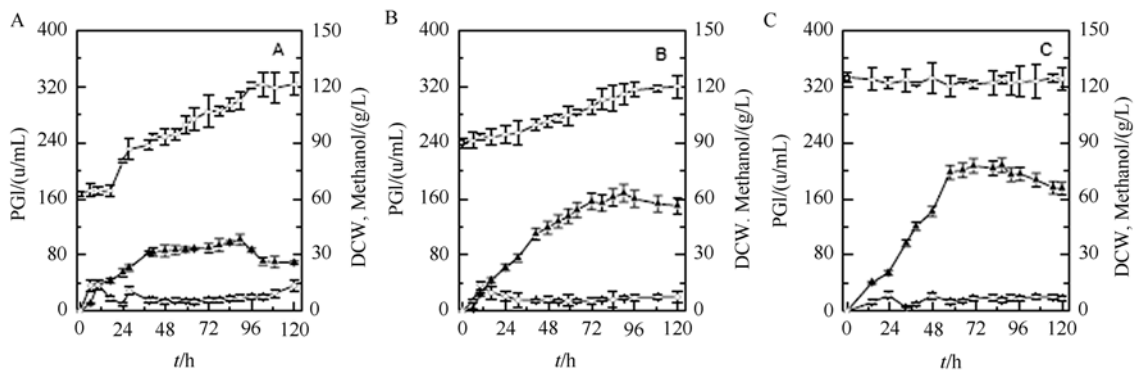


图 1 诱导初始菌体浓度对 PGL 表达的影响

Fig. 1 Effect of initial cell concentration on PGL production in the induction phase

DCW ▲ PGL ◇ Methanol

Initial cell concentrations were 62.5 g/L (A), 90 g/L (B) and 122 g/L (C), respectively

2.2 甲醇浓度对 PGL 表达的影响

维持诱导阶段菌体浓度为 122 g/L, 不同甲醇浓度(6、20 和 35 g/L)对 PGL 表达的影响如图 2 所示。在一定甲醇浓度范围内(6~20 g/L), 增加甲醇的浓度能有效增强 PGL 诱导表达。当甲醇浓度为 20 g/L 时, PGL 酶活(376 u/mL)和单位细胞产酶速度(0.025 u/mL/g/L/h)均达到最大值, 比甲醇浓度为 6 g/L 时分别提高了 81.6%和 108.3%(Fig. 2B)。甲醇浓度过高则导致 PGL 酶活和单位细胞产酶速度下降 (Fig. 2C)。这一结果表明, 在一定的菌体浓度下过高或过低的甲醇浓度均不利于 PGL 的生产。

综合图 1 和图 2 的数据, 列于表 1 中。分析表 1 得: (1)诱导时较低的菌体浓度导致细胞利用甲醇生长, 使得 PGL 生产能力受到限制; (2)在一定菌体浓度范围内, 过低或过高的甲醇浓度均不利于 PGL 的

生产; (3)在一定菌体浓度下, 一定范围内增加甲醇浓度对菌体浓度的比值有利于提高 PGL 酶活和生产强度。上述分析表明, 通过调控 PGL 发酵过程中底物甘油的浓度和诱导物甲醇的浓度可实现 PGL 的高产量和高生产强度。

2.3 甲醇浓度和菌体浓度之间的最佳比例

分析表 1 数据发现, 当甲醇浓度与菌体浓度之间比值为 0.165 g/g 时, PGL 酶活和生产强度达到最大值。进一步研究了不同甲醇浓度与菌体浓度比值(0.056、0.1、0.165 和 0.3 g/g)时 PGL 的发酵生产情况以确证这一发现, 结果如图 3 所示。随着甲醇浓度与菌体浓度之间比值的增加, PGL 产量、生产强度和单位细胞生产 PGL 的能力均不断增加。但过高的比值(≥ 0.165 g/g)导致 PGL 产量等下降。因此, 为了实现发酵法生产 PGL 的高产量和高生产强度, 需在

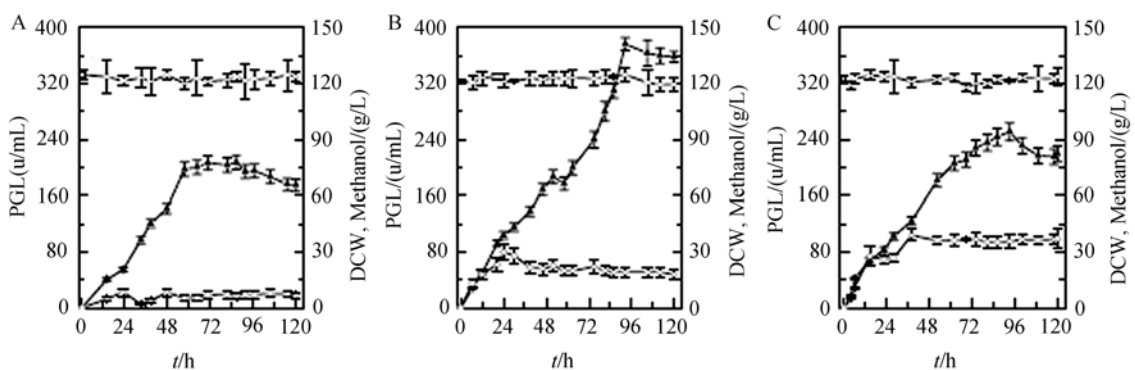


图 2 甲醇浓度对 PGL 表达的影响

Fig. 2 Effect of methanol concentration on PGL production in the induction phase

DCW ▲ PGL ◇ Methanol

methanol concentrations were 6 g/L(A), 20 g/L(B), and 35 g/L(C), respectively

表 1 不同诱导方式下细胞生长和 PGL 合成过程参数比较

Table 1 Comparison of parameters for PGL production under different modes of induction

Parameters	Mode of cultivation ¹⁾				
	A	B	C	D	E
Initial DCW/(g/L)	62.5	90	122	122	122
Average methanol concentration/(g/L)	6.0	6.0	6.0	20.0	35.0
Methanol/ initial DCW/(g/g)	0.096	0.065	0.049	0.16	0.28
Final DCW/(g/L)	121.5	120.7	122	122.6	123.9
Maximum PGL/(u/mL)	102	168	207	376	251.5
Total consumed methanol/(g/L)	276.3	289.2	268	469.3	643.9
Average PGL production rate on cell/(u/mL/g/L/h)	0.015	0.018	0.012	0.025	0.020
Yield of DCW on methanol/(g/g)	0.214	0.102	0	0.001	0.003
Yield of on methanol/(u/mL/g/L)	0.369	0.581	0.772	0.801	0.391
PGL productivity/(u/mL/h)	1.14	1.87	2.39	4.06	2.70

Note: 1) A and B were representative for initial DCW at 62.5 g/L and 90 g/L, respectively; and methanol concentration at 6 g/L; C, D, E were representative for initial DCW at 122 g/L and methanol concentration at 6.0 g/L, 20.0 g/L, and 35.0 g/L, respectively.

生长阶段控制底物甘油浓度使细胞快速生长到最适菌体浓度，然后控制甲醇流加速度使甲醇浓度与菌体浓度比值维持在 0.165 g/g 左右。

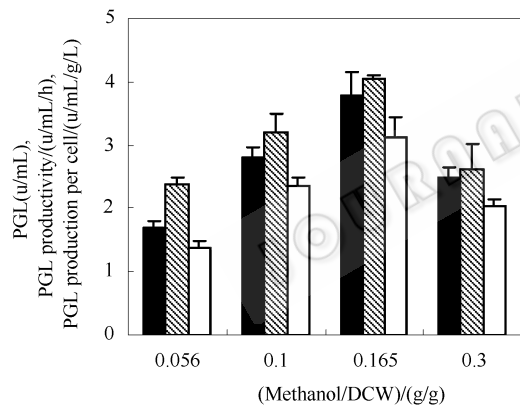


图3 甲醇和菌体浓度的比例对PGL产量、生产强度和单位细胞生产PGL的能力的影响

Fig. 3 Effect of ratio between methanol and cell concentration on PGL production, PGL productivity and PGL production per cell

PGL/100 PGL productivity PGL production per cell

2.4 控制最佳甲醇和菌体比例的底物流加策略

2.4.1 生长阶段甘油流加策略

采用流加速度先递增再递减的甘油流加策略^[9]，根据参考文献[10]计算得到菌体生长阶段甘油指数流加相关参数，列于表 2。菌体生长过程如图 4 所示，通过指数流加策略控制菌体在甘油中的比生长速率，细胞生长维持较高的速度，发酵 33 h，菌体浓度达到 140 g/L。

表 2 指数流加模型中有关参数设定

Table 2 Parameters in exponential fed-batch model

Parameters	μ (h ⁻¹)	$Y_{x/s}$ (g/g)	S_F (g/L)	S (g/L)
Set value	0.176	0.435	500	0.2

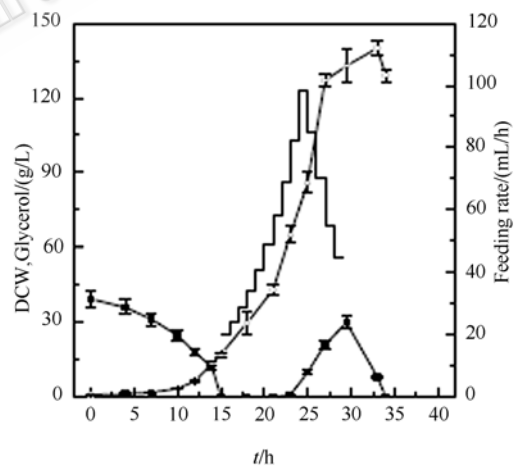


图4 指数流加的补料分批发酵过程

Fig. 4 Time-course of recombinant *P. pastoris* growth phase using exponential feeding strategy

□ DCW ■ Glycerol — Feeding rate

2.4.2 诱导阶段的甲醇流加策略

在诱导初始阶段，细胞处于由甘油代谢向甲醇代谢的过渡适应期，甲醇比消耗速率不断增加^[11,12]，当细胞完全适应甲醇环境后，处于非生长状态下的 *P. pastoris* 甲醇比消耗速率维持恒定^[13]，此时 DO 维持在 20%~30%；诱导 90 h 后，细胞活力下降，DO 上升，甲醇比消耗速率下降。因此，作者提出以下甲醇流加策略：(1)诱导前期(0~8 h)以 2 mL/h 的速度逐步

提高甲醇流加速度, 使培养液中甲醇浓度接近 20 g/L; (2) 诱导中期(8~90 h)将甲醇流加速度控制在 9.7 mL/h 以维持体系中甲醇浓度为 20 g/L; (3) 诱导后期(90 h 以后), DO 上升, 将流速维持在 2 mL/h。采用这一甲醇控制策略, PGL 发酵过程曲线如图 5 所示。此时甲醇与菌体浓度比例控制在 0.171~0.195 g/g 之间。发酵结束时碱性果胶酶酶活达到 430 u/mL, 生产强度达到 4.34 u/mL/h。实现了碱性果胶酶的高产量和高生产强度生产。

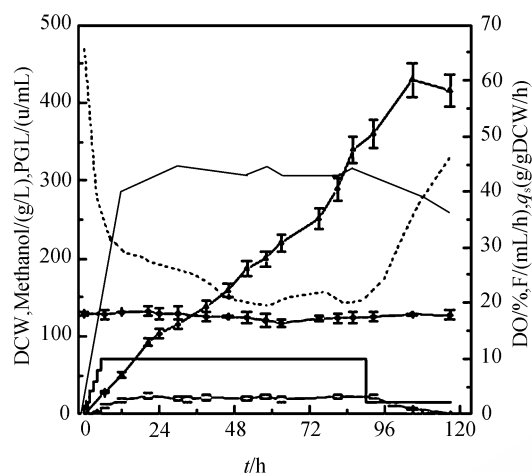


图5 甲醇流加控制下的发酵过程曲线

Fig. 5 Time-course of PGL production under a proposed methanol-fed control profile

DCW ▲ PGL Methanol — Feeding rate - - - q_p ×
1000 DO

3 结论

采用重组毕赤酵母发酵生产 PGL 中发现, 控制诱导阶段甲醇浓度和菌体浓度之间的最佳比例是重组毕赤酵母高效表达外源基因的关键因素。当诱导阶段起始菌体浓度为 122 g/L, 甲醇浓度 20 g/L, 两者之间比值为 0.16~0.20 g/g(甲醇/甘油浓度)时, PGL 酶活和生产强度达到最大值。为此, 发展了菌体生长阶段甘油指数流加策略和诱导阶段甲醇流加策略, 使甲醇与菌体浓度比例维持在 0.171~0.195 g/g 之间, 实现了高密度发酵。碱性果胶酶酶活和生产强度分别为同类文献报道最高水平的 10 倍和 14 倍^[3], 实现了 PGL 发酵生产的高产量(430 u/mL)和高生产强度(4.34 u/mL/h)的统一。

REFERENCES

- [1] Ding FP, ZHANG XZ. The preparation and property of PATE. *Pharmaceutical Biotechnology*, 1994, **1**: 36-39.
- [2] Zhang JH, Li Y, Liu H, *et al.* Isolation, phylogenetic analysis of a bacterium with high yield of alkaline pectate lyase and optimization of its culture conditions. *Chin J Appl Environ Biol*, 2005, **11**: 354-358.
- [3] Zhuge B. Construction of novel recombinant strains capable of overexpression alkaline pectate lyase and properties of recombinant enzyme: [Ph. D dissertation]. Wuxi: Ji-angnan University, 2007.
- [4] Guo MJ, Chu J, Zhuang YP, *et al.* Carbon source metabolism analysis for recombinant *Pichia pastoris* in chemostat based on oxygen and carbon balances. *J Chem Industry and Engineering*, 2003, **54**: 1724-1728.
- [5] Lee J, Lee SY, Park S, *et al.* Control of fed-batch fermentations. *Biotechnol Adv*, 1999, **17**: 29-48.
- [6] Riesenber D, Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1999, **51**: 422-430.
- [7] Sun ZY, Ramsay JA, Martin G. Automated feeding strategies for high-cell-density fed-batch cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2006, **71**: 423-431.
- [8] Lee CY, Lee SJ, Jung KH, *et al.* High dissolved oxygen tension enhances heterologous protein expression by recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem*, 2003, **38**: 1147-1154.
- [9] Yan Q, Du GC, Chen J. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates by *Ralstonia eutropha* with mixed organic acids as carbon source. *J Chem Industry and Engineering*, 2003, **54**: 1580-1585.
- [10] Chen J, Li Y, Song Q, *et al.* Process analysis and fed-batch model in baker's yeast culture. *Pharmaceutical Biotechnology*, 1995, **2**: 37-42.
- [11] Lee CY, Nakana A, Shiomi N, *et al.* Effects of substrate feed rates on heterologous protein expression by *Pichia pastoris* in DO-stat fed-batch fermentation. *Enzyme Microb Technol*, 2003, **33**: 358-365.
- [12] Trinh LB, Phue JN, Shiloach J. Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **82**: 438-444.
- [13] Khatri NK, Hoffmann F. Impact of methanol concentration on secreted protein production in oxygen-limited cultures of recombinant *pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 2006, **93**: 871-879.