

重组毕赤酵母生产耐高温 α -淀粉酶 发酵条件的优化

秦亚楠^{1,2}, 孟宪梅^{1,*}, 潘风光^{2,*}, 孙肖明¹, 李凤祥¹, 石彦忠¹

(1. 吉林工商学院 粮油食品深加工重点实验室, 吉林 长春 130062; 2. 吉林大学军需科技学院, 吉林 长春 130062)

摘要: 利用重组毕赤酵母诱导表达可产生耐高温 α -淀粉酶, 在摇瓶发酵基础上, 从诱导时间、甲醇添加量、pH 值、接种量 4 个因素考察发酵条件对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响, 结合四元线性回归正交试验设计研究方法构建出甲醇诱导重组毕赤酵母生产耐高温 α -淀粉酶的回归模型; 优化最佳工艺参数为: 诱导时间 96h、甲醇添加量 0.5%、接种量 150mL/100mL、摇床转速 200r/min。确定最优工艺条件下, 耐高温 α -淀粉酶酶活为 217.2U/mL。

关键词: 毕赤酵母; 耐高温 α -淀粉酶; 发酵; 优化

Optimization of Fermentation Conditions for Thermostable α -Amylase Production by Recombinant *Pichia pastoris*

QIN Ya-nan^{1,2}, MENG Xian-mei^{1,*}, PAN Feng-guang^{2,*}, SUN Xiao-ming¹, LI Feng-xiang¹, SHI Yan-zhong¹

(1. Key Laboratory of Oil and Foodstuffs Processing, Jilin Business and Technology College, Changchun 130062, China;

2. College of Quartermaster Technology, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: The methanol-induced expression of thermostable α -amylase in a recombinant *Pichia pastoris* strain with the thermostable α -amylase gene of *Bacillus licheniformis* that had been constructed in our previous work was investigated during shake flask cultivation. A 4-variable linear regression design was used to explore the effects of 4 main cultivation conditions such as induction time, methanol amount, pH and inoculation amount on the expressed activity of thermostable α -amylase. A regression model describing the relationship between them was established. It was found that the optimal fermentation conditions were 96 h cultivation at an inoculation amount of 150 mL/100mL and a shake speed of 200 r/min in the presence of 0.5% methanol, resulting in a thermostable α -amylase activity of 217.2 U/mL.

Key words: *Pichia pastoris*; thermostable α -amylase; fermentation; optimization

中图分类号: TS201.3

文献标识码: A

文章编号: 1002-6630(2011)23-0266-04

耐高温 α -淀粉酶属于水解酶类, 能随机水解淀粉、糖原及降解物内部的 α -D-1,4 糖苷键^[1-2]。它能使淀粉溶液的黏度迅速下降, 产生可溶性糊精、低聚糖及少量麦芽糖、葡萄糖^[3]。如今以 α -淀粉酶为代表的工业酶制剂类已占据 25% 的市场份额, 其已经被广泛的用于淀粉水解生成葡萄糖浆的液化过程, 酿造业、改性淀粉以及改善面粉的烘焙过程^[4-5]。微生物中有数百种嗜热真菌和上千种细菌可以产生淀粉酶, 仅芽孢杆菌属 (*Bacillus*) 就有 48 种能产生淀粉酶, 但是产生耐高温淀

粉酶的微生物较少^[6]。地衣芽孢杆菌 (*Bacillus licheniformis*) 是公认的产耐高温 α -淀粉酶的优良菌种, 但菌种本身是通过多代诱变而得到的高产菌株, 存在着产酶条件不稳定、易发生回复突变、发酵条件难控制、酶生产易污染等不足^[7]。早在 20 世纪 70 年代就开始了基因工程表达耐高温 α -淀粉酶的研究。巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统是目前最优秀、应用最广泛的外源基因表达系统之一, 它操作简单, 表达量高, 有着大肠杆菌表达系统和其他酵母表达系统无法比拟的优

收稿日期: 2011-03-30

基金项目: 吉林省科技发展计划项目(20090589); 吉林省教育厅科研(自筹)项目(2009516)

作者简介: 秦亚楠(1988—), 女, 硕士研究生, 研究方向为食品生物技术。E-mail: qinyanan0706@163.com

* 通信作者: 孟宪梅(1964—), 女, 教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: mengxm222@sina.com

潘风光(1973—), 男, 副教授, 博士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: panfengguang415@163.com

越之处^[8]。目前,我国生产的耐高温 α -淀粉酶均是引进国外工艺设备,菌种多是采用对国外引进的原始菌株进行诱变方式获得的突变株,生产操作复杂,发酵过程易受污染。如今国外已使用重组基因工程菌来生产耐高温 α -淀粉酶,发酵过程可控性更高,操作简便安全。而国内针对重组耐高温 α -淀粉酶基因工程菌的研究还主要集中于菌种改良和酶学性质等方面^[9]。由此,为寻求适于工业生产的耐高温 α -淀粉酶产生菌及其发酵条件,有必要经过一系列的技术方法改造获得真正意义的用于工业生产的高产菌株,生物技术便是手段之一。本实验利用自主构建的拥有自主知识产权的地衣芽孢杆菌耐高温 α -淀粉酶的重组毕赤酵母(*P.pastoris* GS115)基因工程菌,通过发酵条件优化来提高酶产量和酶活性,降低生产成本,加快工业化发酵生产。

1 材料与方 法

1.1 菌种与试剂

地衣芽孢杆菌 mAn-612、*E.coli* DH5 α 实验室保存;宿主菌 *P.pastoris* GS115(His⁻, Mut⁺)、耐高温 α -淀粉酶重组 *P.pastoris* GS115 课题组前期构建;表达载体 pPIC9 美国 Invitrogen 公司;蛋白质标准品(相对分子质量 90000) 上海生工生物工程技术有限公司;酵母培养基 北京鼎国生物技术公司。

1.2 培养基

YPD 培养基: 10g/L 酵母提取物、20g/L 胰蛋白胨、20g/L 葡萄糖; BMGY 培养基: 10g/L 酵母提取物、20g/L 胰蛋白胨、0.1mol/L 磷酸缓冲液(pH6.0)、13.4g/L YNB、 4×10^{-5} g/L 生物素、1% 甘油; BMMY 培养基: 除以 0.5% 甲醇代替甘油外,其余成分均与 BMGY 相同。

1.3 方法

取冻存于 -20°C 的地衣芽孢杆菌耐高温 α -淀粉酶的重组毕赤酵母(*P.pastoris* GS115)基因工程菌将其接种到新鲜的 YPD 培养基中 30°C 、200r/min 摇瓶培养约 18h,观察菌液出现浑浊时再以 5% 的接种量转接到 BMGY 培养基中 30°C 、200r/min 培养 24h,当菌液 OD_{600nm} 达到 6.0 后,离心弃上清,菌体沉淀转接到 BMMY 中,

30°C 、220r/min 发酵,每隔 24h 补加甲醇使其终体积分数为 0.5%(每瓶均为 100mL 培养基装于 500mL 锥形瓶中)。培养 72h 后于 4°C 、12000r/min 离心发酵液 20min,上清即为粗酶液,然后参照文献^[10]测定酶活力。酶活力单位定义为:取 1mL 酶液于 70°C , pH6.0 条件下,1min 液化可溶性淀粉的毫克数表示酶的一个活力单位。

1.3.1 接种量对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响

分别将 25、50、100、200、250mL BMGY 培养基上生长的菌体 3000r/min,离心 15min,菌体沉淀依次接种到 100mL 含有 0.5% 甲醇的 BMMY 培养基上,每隔 24h 补加甲醇使其终体积分数为 0.5%,培养 72h,检测耐高温 α -淀粉酶的酶活力。

1.3.2 甲醇添加量对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响

将 100mL BMGY 培养基中的菌体沉淀分别转接到 100mL 含有甲醇体积分数为 0.25%、0.5%、0.75%、1.0%、1.5%、2% 的诱导培养基上进行培养,24h 后分别补加相同体积分数的甲醇,诱导培养 72h 后收获发酵液,检测耐高温 α -淀粉酶的酶活力。

1.3.3 pH 值对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响

以 0.1mol/L 的 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 为缓冲液,将 100mL 生长培养基中的菌体沉淀分别接入 100mL, pH 值为 4.0、5.0、6.0、7.0、8.0,含甲醇 0.5% 的诱导培养基上进行培养。诱导培养 72h 后收获发酵液,检测耐高温 α -淀粉酶的酶活力。

1.3.4 诱导时间对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响

将 100mL BMGY 培养基中的基菌体 3000r/min 离心 15min,菌体沉淀接入 100mL, pH 值为 6.0,含 0.75% 甲醇的 BMMY 培养基中诱导培养 108h,诱导 24h 后每隔 12h 取样一次,检测耐高温 α -淀粉酶的酶活力。

1.3.5 四元线性回归正交试验设计

根据摇瓶发酵生产耐高温 α -淀粉酶单因素试验结果,采用多元线性回归试验设计,进一步探讨诱导时间、接种量、甲醇添加量、摇床转速 4 个因素对重组毕赤酵母发酵生产耐高温 α -淀粉酶的影响。其因素水平设计见表 1。

表 1 试验因素水平设计方案

Table 1 Coded values and corresponding actual values of the fermentation conditions tested in linear regression design

$Z_i(X_i)$	Z_1 诱导时间/h	Z_2 摇床转速/(r/min)	Z_3 甲醇添加量/%	Z_4 接种量/(mL/100mL)
$Z_{1j}(-1)$	72	200	0.5	150
$Z_{2j}(1)$	96	240	1	100
$Z_{3j}(0)$	84	220	0.75	125
Δ_j	12	20	0.25	25
编码公式	$X_1 = (Z_1 - 84)/12$	$X_2 = (Z_2 - 220)/20$	$X_3 = (Z_3 - 0.75)/0.25$	$X_4 = (Z_4 - 125)/25$

2 结果与分析

2.1 接种量对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响

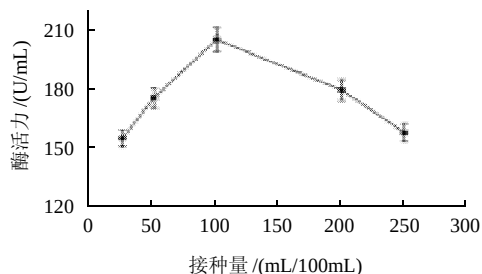


图1 接种量对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响

Fig.1 Effect of inoculation amount on the activity of thermostable α -amylase

如图1所示,在较低接种量25 mL/100 mL和50 mL/100 mL时,由于菌体数量过低,减少了蛋白的分泌总量,因此酶活力较低。当以100 mL/100 mL的接种量进行诱导培养,菌体蛋白分泌较高,酶活力显著提高。当接种量继续提高至200 mL/100 mL时,由于培养基中菌体相对密度增大,导致菌体生长时所需营养成分不足同时溶氧不足,菌体生长状态不良,反而使酶活力降低。当接种量为250 mL/100 mL时酶活力继续降低。这表明在菌体生长初期提高其生长量可以提高目的蛋白产量从而提高酶活力,但菌体浓度过高反而会因为营养消耗太快或通氧量不足等问题导致酶活力降低。

2.2 甲醇添加量对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响

甲醇可以严格地控制AOX1基因的转录,当其作为培养基中的唯一碳源时,其体积分数有效地影响了外源蛋白的表达量和酶的活性。不同添加体积分数的甲醇对酶活力的影响结果如图2所示。在摇瓶培养过程中当甲醇添加量由0.25%提高到0.75%时,耐高温 α -淀粉酶酶活力呈现上升趋势;而在甲醇体积分数由1%提高到2%的过程中酶活力迅速下降。这可能是由于过高的甲醇体积分数对细胞产生了毒害作用,使菌体生长和蛋白分泌均受到了抑制。

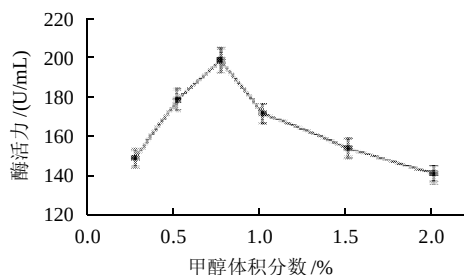


图2 甲醇添加量对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响

Fig.2 Effect of methanol amount on the activity of thermostable α -amylase

2.3 pH值对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响

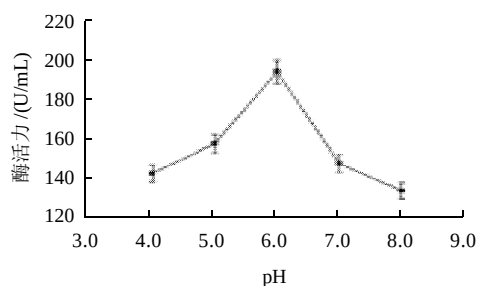


图3 pH值对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响

Fig.3 Effect of pH on the activity of thermostable α -amylase

如图3所示,当诱导培养基pH值为4.0时酶活力较低,随着pH值由4.0提高到5.0酶活力逐渐提高,pH值为6.0时酶活力达到最高,随着pH值的继续提高酶活力呈显著下降趋势。由此可以看出pH值为6.0时最有利于菌体的生长,酶活力最高。而在过高和过低的pH值水平下,菌体生长,密度降低,酶活力也有所下降。

2.4 诱导时间对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响

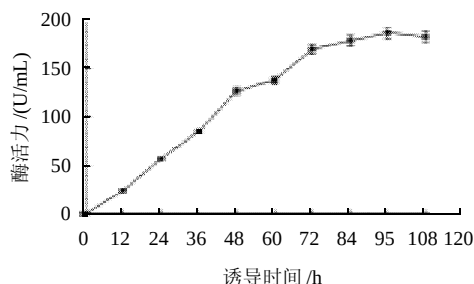


图4 诱导时间对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响

Fig.4 Effect of induction time on the activity of thermostable α -amylase

如图4所示,在甲醇诱导12h后发酵液中就有耐高温 α -淀粉酶的出现,但酶活力很低,随着诱导时间的增长,耐高温 α -淀粉酶酶活力显著提高,96h时达到最高峰,产量约为190 U/mL,延长诱导时间至108h,耐高温 α -淀粉酶酶活力反而有所下降,这可能是部分蛋白被重组酵母分泌的蛋白酶降解所造成的。菌体在96h之后基本不再生长,因为这时培养基中的营养已基本耗尽,发酵过程中产生的一些代谢物质也会抑制基因工程菌的生长。

2.5 多元线性回归试验结果与分析

2.5.1 回归模型和最优工艺的确定

从表2、3可以看出,优化获得的重组毕赤酵母摇瓶发酵生产耐高温 α -淀粉酶的工艺回归模型为:

$Y = 13.782 + 0.638X_1 + 0.213X_2 + 0.813X_3 + 1.388X_4 - 2.113X_1X_2$ 。通过对耐高温 α -淀粉酶的工艺回归模型进行相关分析,得到重组毕赤酵母在诱导时间 96h,摇床转速 200r/min,甲醇添加体积分数 0.5%,接种量 150mL/100mL 的培养工艺下,耐高温 α -淀粉酶的酶活力达到 217U/mL。在此时工艺条件下,平行实验 3 次,测定耐高温 α -淀粉酶酶活力平均值为 217.2U/mL。从表 3 还可以看出,接种量、诱导时间、甲醇添加量、摇床转速 4 个因素的显著性分别为:0.01、0.05、0.05、0.25,可见摇床转速对于发酵过程的影响是最不显著的。

表 2 多元线性回归正交试验设计结果
Table 2 Linear regression design matrix and results

试验号	X_1 诱导时间/h	X_2 摇床转速/(r/min)	X_3 甲醇添加量/%	X_4 接种量/(mL/100mL)	Y 耐高温 α -淀粉酶酶活力/(U/mL)
1	1	1	1	1	214.50
2	1	1	-1	-1	210.60
3	1	-1	1	-1	215.70
4	1	-1	-1	1	217.00
5	-1	1	1	-1	215.00
6	-1	1	-1	1	216.00
7	-1	-1	1	1	213.30
8	-1	-1	-1	-1	208.40
9	0	0	0	0	213.60
10	0	0	0	0	214.10
11	0	0	0	0	213.40

表 3 回归模型的显著性检验及分析
Table 3 Significance analysis for each regression coefficient in the established regression model

项目	X_1	X_2	X_3	X_4
实验次数	8	8	8	8
常数项	5.1	1.7	6.5	11.1
偏回归系数	0.638	0.231	0.813	1.388
偏差平方和	3.251	0.361	5.281	15.401
检验统计量	25.010	2.779	40.625	118.471
显著性	0.05	0.25	0.05	0.01

3 讨论与结论

毕赤酵母表达体系具有多种优势,使各种食品工业用酶相继运用基因工程在毕赤酵母表达体系中进行表达,表达的酶蛋白不仅产量大、活性高,而且具有较高的稳定性和安全性,为食品加工的安全高效提供了有力保证,但是如何使构建的基因工程菌应用于工业化生产还需要深入研究。重组 *P. pastoris* 表达外源基因受营养物质和环境条件的影响,并且有其特有的作用机制:表达受甲醇诱导,但甲醇的体积分数太高会使细胞中毒死亡,太低则不能充分诱导外源蛋白表达;并

且 *P. pastoris* GS115 属于分泌型表达的工程菌,在发酵过程中酵母自身分泌的蛋白酶也会对外源蛋白的表达量产生一定的影响。本实验着重考察了重组 *P. pastoris* 生产耐高温 α -淀粉酶发酵过程中的 4 个条件,在此基础上进行了优化。优化发酵条件可以提高耐温 α -淀粉酶在毕赤酵母中的表达量,从而达到提高酶产量和酶活性的目的。通过四元线性回归正交试验,得到了回归模型,4 个因素对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响程度由大到小依次为接种量、甲醇添加量、诱导时间、摇床转速。由此可以确定摇床转速对耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响不是很显著,而接种量和甲醇添加量是摇瓶发酵工艺中的关键影响因素,在发酵过程中需要严格控制。通过对发酵工艺的优化得出最佳工艺参数为:诱导时间 96h、甲醇添加量 0.5%、接种量 150mL/100mL、摇床转速 200r/min。此时耐高温 α -淀粉酶酶活力为 217.2U/mL,这高于相关研究报道结果^[11]。下一步一方面将利用发酵罐扩大生产地衣芽孢杆菌耐高温 α -淀粉酶,深入研究发酵条件等对外源蛋白表达量及耐高温 α -淀粉酶酶活力的影响,由于发酵罐的参数容易在线控制,并且巴斯德毕赤酵母的发酵方法比较成熟,在发酵罐中的酶活力有望比摇瓶发酵高 10 倍以上^[12];另一方面,通过基因改造改变耐高温 α -淀粉酶结构关键基因,进一步提高产酶量和酶活性,进而获得适合工业化生产的高效生产菌株和发酵工艺条件,为规模化生产奠定基础。

参考文献:

- [1] KE Tao, MA Xiangdong, HE Guangyuan, et al. A mutant α -amylase with only part of the catalytic domain and its structural implication[J]. Biotechnol Lett, 2007, 29(1): 117-122.
- [2] NIELSEN J E, BORCHERT T V. Protein engineering of bacterial α -amylases[J]. Biochim Biophys Acta, 2000, 1543(2): 253-274.
- [3] SVENSSON B, JENSEN M T, MON H, et al. Fascinating facets of function and structure of amylolytic enzymes of glycosidehydrolase family 13[J]. Biologia, 2002, 57(11): 5-19.
- [4] CHI Mengchun, CHEN Yanhung, WU Taijung, et al. Engineering of a truncated α -amylase of *Bacillus* sp. strain TS-23 for the simultaneous improvement of thermal and oxidative stabilities[J]. J Biosci Bioeng, 2010, 109(6): 531-538.
- [5] KUBRAK O I, LUSHCHAK V I. Microbe amylases: characteristics, properties and practical use[J]. Mikrobiol Z, 2007, 69(6): 56-76.
- [6] 蒋若天, 宋航, 陈松, 等. 一株产 α -高温淀粉酶的地衣芽孢杆菌的分离和筛选[J]. 工业微生物, 2007, 37(6): 37-41.
- [7] 潘风光, 柳增善, 刘海学, 等. 地衣芽孢杆菌耐高温 α -淀粉酶基因工程菌的研究进展[J]. 内蒙古民族大学学报, 2005, 20(2): 160-163.
- [8] 彭毅, 步威, 康良仪, 等. 甲醇酵母表达系统[J]. 生物技术通报, 2000, 82(1): 38-41.
- [9] 王富荣, 唐景春. 耐高温 α -淀粉酶活力测定法的研究[J]. 食品与发酵工业, 1995, 5(2): 27-30.
- [10] LIU Yang, SHEN Wei, SHI Guiyang, et al. Role of the calcium-binding residues Asp231, Asp233, and Asp438 in α -amylase of *Bacillus amyloliquefaciens* as revealed by mutational analysis[J]. Curr Microbiol, 2010, 60(3): 162-166.
- [11] NIU Dandan, ZUO Zhirui, SHI Guiyang, et al. High yield recombinant thermostable α -amylase production using an improved *Bacillus licheniformis* system[J]. Microb Cell Fact, 2009, 58(8): 58-63.
- [12] 韦宇拓, 汪嵘, 杜丽琴, 等. 合成耐高温 α -淀粉酶基因在巴斯德毕赤酵母中的分泌表达[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(1): 65-69.