



表达牛肉风味强化肽 *P.pastoris* GS115(pGAP9-16BMP) 摇瓶发酵条件的优化

孟琦, 张宝持, 王金菊, 王艳萍

(食品营养与安全教育部重点实验室, 天津科技大学食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 从碳源种类及质量浓度、氮源质量浓度、温度、pH 等方面对构建的工程菌 *P.pastoris* GS115(pGAP9-16BMP) 摇瓶发酵条件进行了优化。结果表明, 最佳表达条件为: 甘油 30 g/L, 蛋白胨 40 g/L, 酵母粉 20 g/L, 挡板三角瓶装液量为 30%, 菌体生长阶段控制温度 32 °C, 初始 pH 6.0, 培养 96 h。在此条件下, 牛肉风味强化肽 BMP (Beefy Meaty Peptide) 表达量最高为 41.9 mg/L。

关键词: 牛肉风味强化肽; 组成型表达; 毕赤酵母; 发酵

中图分类号: Q936 文献标志码: A 文章编号: 1672-6510(2010)04-0001-05

Optimization of Fermentation Conditions for Constitutive Production of Beefy Meaty Peptide by *P.pastoris* GS115 (pGAP9-16BMP)

MENG Qi, ZHANG Bao-chi, WANG Jin-ju, WANG Yan-ping

(Key Laboratory of Food Nutrition and Safety, Ministry of Education, College of Food Engineering and Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

Abstract: The fermentation conditions for production of BMP (Beefy Meaty Peptide) by engineered *P.pastoris* GS115 (pGAP9-16BMP) was optimized in shake-flask. The results show that the best expression conditions are 30 g/L glycerol, 40 g/L peptone, 20 g/L yeast powder, 30% volume of medium, temperature 32 °C, initial pH 6.0, fermented 96 h. In this condition, BMP expression reaches its peak with a yield of 41.9 mg/L.

Keywords: beefy meaty peptide; constitutive expression; *P.pastoris*; fermentation

牛肉风味强化肽 (Beefy Meaty Peptide, BMP) 是一种可以增强肉味感觉的八肽, 其一级结构为: Lys-Gly-Asp-Glu-Glu-Ser-Leu-Ala (KGDE ESLA)。最初是由 Yamasaki 等^[1] 于 1978 年用木瓜蛋白酶水解牛肉, 再将水解液经凝胶过滤层析和离子交换层析纯化获得。该肽为牛肉的一个组成成分, 可以提高牛肉肉汤风味, 相比单独的牛肉浸出物有着更强烈的风味属性。此外, 其与食盐、谷氨酸单钠盐 (MSG) 有较好的协同呈味作用, 可增强鲜味, 且较 MSG 有更强的风味感觉与口感^[2]。Wang 等^[3] 报道化学合成的 BMP 在 pH 6.5 的条件下经过 121 °C、20 min 的热处理具有很好的热稳定性, 仅有 10% 变性, 适合于食品工业

生产中的热处理要求。因此, BMP 有望成为新一代风味强化剂, 具有广阔的市场前景。

目前, 牛肉风味强化肽的生产仍采用蛋白酶水解蛋白的方法, 得到的产物是多种成分的混合物, 含有苦味成分^[4]。为了改进风味, 有人采用化学法制备, 但工艺复杂, 投资大, 至今未能采用化学合成法进行大规模的工业化生产^[5]。利用微生物表达, 可克服以上缺点, 得到大量高纯度的目的肽产品。

巴斯德毕赤酵母 (*P.pastoris*) 表达系统是一类最近发展十分迅速的外源蛋白表达系统^[6]。在其表达系统中, 多利用甲醇诱导的 AOX1 强启动子表达^[7], 但其存在诸多不利因素, 如甲醇易挥发、有毒、易造成环

收稿日期: 2009-11-28; 修回日期: 2010-03-13

基金项目: 天津市科技发展计划资助项目 (05YFGHHZ00200)

作者简介: 孟琦 (1984—), 女, 辽宁朝阳人, 硕士研究生; 通信作者: 王艳萍, 教授, ypwang@tust.edu.cn.

境污染,诱导物的添加给发酵过程带来很大的不便,而组成型启动子的应用可解决这些问题.三磷酸甘油醛脱氢酶(GAP)是糖酵解途径的组成型关键酶,其启动子可在以葡萄糖、甘油、甲醇、油酸为碳源的培养基上组成型表达基因^[8]. P_{GAP} 组成表达系统不仅消除了甲醇大量贮藏和运输带来的危险和耗费,而且 P_{GAP} 载体使产物连续表达,避免了甲醇的补加,更方便、安全,更适合大规模生产外源蛋白,在食品工业应用前景广阔.本实验室构建出带有16拷贝的BMP的高效表达载体pPIC9-16BMP^[9],并将其整合到*P.pastoris*进行诱导表达^[10].为了解决诱导物的污染问题,本文采用GAP启动子取代AOX1启动子,构建了GAP启动子组成型表达BMP的工程菌GS115(pGAP9-16BMP),并以GS115(pGAP9-16BMP)为基础,利用 P_{GAP} 组成型表达BMP,优化其摇瓶培养基及培养条件.

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌体和质粒

P.pastoris GS115(pGAP9-16BMP),带有GAP组成型强启动子及16拷贝牛肉风味强化肽基因,由本实验室构建保存.

1.1.2 培养基

种子培养基为YPG培养基(g/L):酵母粉10,蛋白胨20,甘油20.

发酵培养基为YPD培养基,基础成分为(g/L):酵母粉10,蛋白胨20,葡萄糖20.通过单因素实验优化其成分及质量浓度.

1.1.3 试剂与仪器

丙烯酰胺、*N,N*-甲叉双丙烯酰胺、YNB及SDS,美国BBI公司;其余试剂均为国产分析纯试剂.

DYY-68型稳压稳流电泳仪,北京六一仪器厂;5415D离心机,德国Eppendorf公司;JA2003型电子分析天平、HZQ-C空气浴振荡器,哈尔滨市东联医疗仪器厂;Smartsoec TM3000型分光光度计,美国Biorad公司;60 ku和6 ku中空纤维超滤膜,天津膜天膜科技公司.

1.2 培养方法

工程菌种子培养:挑取单菌落于装有2 mL种子培养基的试管,30 ℃、180 r/min摇床培养18~20 h.

工程菌组成型发酵:将工程菌种子液以2%的接种量接入装有25 mL发酵培养基的250 mL三角瓶

中,30 ℃、180 r/min摇床培养96 h.

1.3 分析方法

1.3.1 发酵液中蛋白的抽提

取500 μL发酵液于1.5 mL离心管中,12 000 r/min离心1 min;将上清液转移到新的离心管中,加入400 μL甲醇,充分混匀,再加入140 μL氯仿,混匀,冰浴5 min;12 000 r/min离心5 min,弃上清液,保留蛋白层以下;加入800 μL甲醇洗涤沉淀,12 000 r/min离心5 min;弃上清液,放入55 ℃烘箱中干燥.

1.3.2 重组蛋白表达量检测

SDS-PAGE凝胶电泳检测^[11].用电泳图片分析软件Quantity One分析SDS-PAGE胶板上的蛋白条带,获得BMP占发酵液中总蛋白的质量浓度.发酵液总蛋白质量浓度测定应用Bradford法^[12].目标蛋白质量浓度按照式(1)计算:

$$\rho_{BMP} = \varphi \times \rho_{总蛋白} \quad (1)$$

式中: ρ_{BMP} 为表达产物中的BMP质量浓度; φ 为目标蛋白条带(BMP)的体积分数; $\rho_{总蛋白}$ 为发酵液总蛋白质量浓度.

1.3.3 牛肉汤的制备

取10 g新鲜牛肉,绞碎后置于含100 mL蒸馏水的三角瓶中,并在灭菌锅中100 ℃煮沸30 min,自然pH.

1.3.4 美拉德反应

称取发酵浓缩液25 g、还原糖5 g、混合氨基酸1.1 g、硫酸素0.5 g、牛脂1 g、NaCl 1 g于三角瓶中,补水至50 mL;对照组1[#]以水替代发酵浓缩液,对照组2[#]以牛肉汤代替.调节pH为5.0,100 ℃反应2 h,将产物移出,冷却并密封保存.用45 ℃的温水,将热反应产物稀释到3%,进行品尝实验.

2 结果与讨论

2.1 GS115(pGAP9-16BMP)摇瓶发酵培养基的优化

2.1.1 不同碳源及其质量浓度对BMP表达的影响

将GS115(pGAP9-16BMP)种子液分别转种于葡萄糖和甘油质量浓度分别为5、10、20、30、40、50、60 g/L,以及山梨醇和油酸质量浓度分别为5、10、20、30 g/L的培养基,30 ℃、180 r/min摇床培养4 d,测定BMP的表达量,结果如图1所示.GS115(pGAP9-16BMP)对碳源的利用相当广泛,葡萄糖、甘油、山梨醇和油酸均可利用.培养基中添加葡萄糖、甘油、山梨醇或油酸均有利于BMP的表达,并且表达量与质量浓度有关.对于葡萄糖,质量浓度以50 g/L为宜,

甘油则为 30 g/L 最好,山梨醇或油酸质量浓度对表达量的影响不大. 综上,以甘油为碳源时表达量最高,因此选择的最佳碳源为 30 g/L 的甘油.

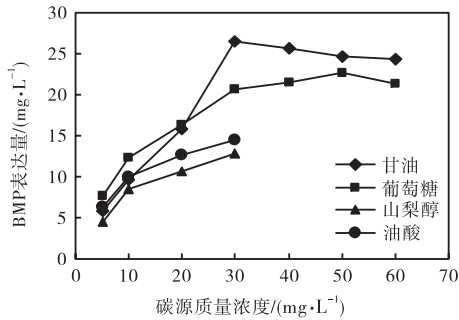


图1 不同碳源及其质量浓度对 BMP 表达的影响

Fig.1 Effect of different carbon sources with different concentration on expression of BMP

2.1.2 氮源质量浓度对 BMP 表达的影响

本实验以碳源 30 g/L 甘油为基础,将发酵培养基中混合氮源蛋白胨-酵母粉 (YP) 的质量浓度调节为 15、30、45、60、90 g/L,将 GS115 (pGAP9-16BMP) 种子液分别转接于其中,30 °C 摇床培养 96 h 后取样进行 SDS-PAGE. 由图 2 可见,不同质量浓度 YP 对应的 BMP 的表达量依次为 60 g/L > 45 g/L > 30 g/L > 15 g/L. 90 g/L 培养基中杂蛋白量过高,电泳图中已不易观察 BMP 的含量. 实验结果说明较丰富的氮源有利于 BMP 的表达,这 5 种 YP 质量浓度中以 60 g/L 为宜.

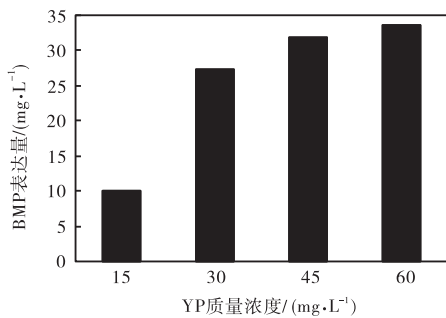
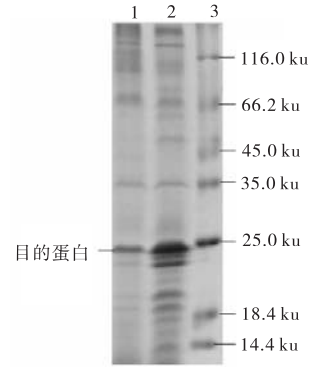


图2 YP 质量浓度对 BMP 表达的影响

Fig.2 Effect of YP concentration on expression of BMP

2.1.3 最佳培养基工程菌生长及 BMP 表达量的验证

毕赤酵母 GS115 (pGAP9-16BMP) 在最佳培养基条件下表达 BMP 的量与优化前的比较如图 3 所示. 由图 3 可知,优化后 BMP 的表达量明显提高. 最佳培养基条件下生物量和 BMP 表达量的变化如图 4 所示. 由图 4 可知菌体生长到 24 h 时已达高峰,之后随时间变化不大;而 BMP 表达在 96 h 达高峰 34.1 mg/L,之后随时间延长稍有下降.



1. 优化前 GS115 (pGAP9-16BMP) 表达 BMP 情况; 2. 优化后 GS115 (pGAP9-16BMP) 表达 BMP 情况; 3. 蛋白质 marker

图3 培养基优化前后 BMP 的表达

Fig.3 Expression of BMP before and after medium optimization

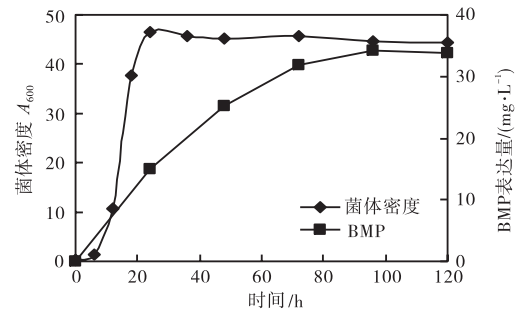


图4 培养过程中生物量和 BMP 表达量的变化

Fig.4 Effect of different time on cell growth and expression of BMP

2.2 工程菌 GS115 (pGAP9-16BMP) 发酵条件的优化

2.2.1 装液量对组成型表达 BMP 的影响

毕赤酵母是好氧生物,其生长代谢过程需要氧气参与,溶氧量对菌体的生长和产物生成的影响很大. 实验中使用挡板摇瓶进行培养,液体培养基在摇动的过程中被挡板反复打散,能够使氧气充分溶入培养基中,为菌体提供必要的氧气. 选取 500 mL 带挡板三角瓶,装液量为 10%、20%、30% 液体培养基.

结果发现,装液量为 30% 时发酵液中 BMP 表达量达 37.84 mg/L,高于 10% 和 20% 的水平,所以在带挡板的三角瓶中选用 30% 的装液量. 若装液量再高,振荡培养中发酵液会溅至瓶口.

2.2.2 初始 pH 对组成型表达 BMP 的影响

培养基的 pH 对菌体生长和蛋白的分泌表达都很重要. 由于外界的 pH 变化会改变菌体细胞内的 pH,从而影响其代谢反应,进而影响细胞的生物量和基因产物的表达,因此须调节 pH 使之处于适宜的范围内. 尽管 *P.pastoris* 在 pH 3.0 ~ 7.0 的范围内均可生长,但具体到不同的重组宿主菌则各有不同的最佳 pH. 实验考察了发酵培养基初始 pH 分别为 2.0、3.0、

4.0、5.0、6.0、7.0 时对组成表达 BMP 的影响,结果如图 5 所示.

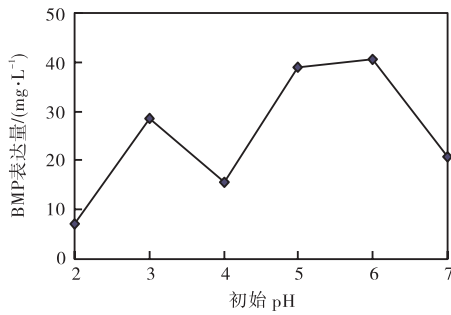


图 5 不同初始 pH 对 BMP 表达的影响

Fig.5 Effect of different initial pH of on expression of BMP

由图 5 可知,发酵培养基初始 pH 为 6.0 时,GS115(pGAP9-16BMP)表达 BMP 的量最多,因此选择 pH 6.0 作为发酵培养基的初始 pH.

2.2.3 培养温度对组成型表达 BMP 的影响

毕赤酵母的温度生长范围为 26~32℃,当温度超过 32℃ 较高时,不适于菌体生长. 本实验选取 26、28、30、32℃ 四个水平,考察其对 BMP 表达的影响,结果如图 6 所示.

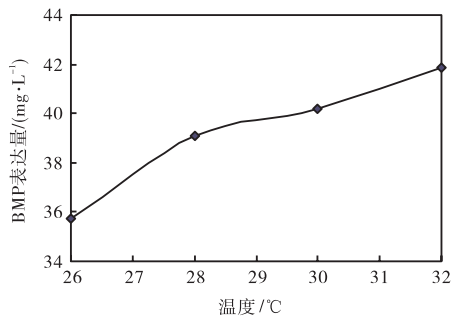


图 6 培养温度对组成表达 BMP 的影响

Fig.6 Effect of temperature on expression of BMP

由图 6 可知,在 26~32℃ 范围内,毕赤酵母工程菌 GS115(pGAP9-16BMP)表达 BMP 的量都比较高,在 32℃ 时表达量最高. 因此,在摇瓶培养过程中将培养温度控制在 32℃.

2.2.4 培养时间对组成型表达 BMP 的影响

将 GS115(pGAP9-16BMP)接于优化后的培养基中,32℃ 连续培养 6 d,每 24 h 取样,考察时间对 BMP 表达的影响.

由图 7 可知,GS115(pGAP9-16BMP)表达 BMP 在发酵 96 h 后达到峰值,其后随着发酵进行,产量不再增加. 因此,确定 GS115(pGAP9-16BMP)摇瓶最佳发酵周期为 96 h.

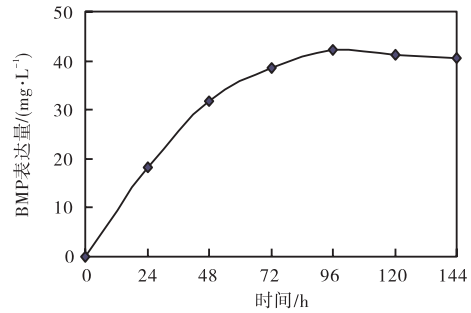
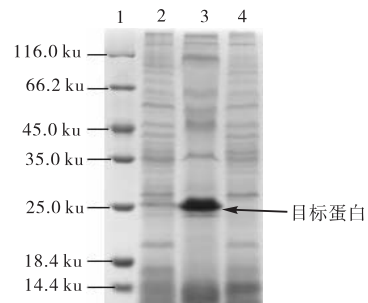


图 7 培养时间对组成表达 BMP 的影响

Fig.7 Effect of time on expression of BMP

2.3 最佳培养基、最适条件下工程菌生物量及表达产物的验证

毕赤酵母 GS115(pGAP9-16BMP)在最佳培养基及最佳培养条件下表达 BMP 的量与优化前的比较如图 8 所示,从图中可看出优化后 BMP 的表达量明显提高,达到了优化的目的. 最优条件下培养过程中生物量和 BMP 表达量的变化如图 9 所示. 由图 9 可见,菌体生长到 24 h 时已达高峰,之后随时间变化不大;而 BMP 表达在 96 h 达高峰 41.9 mg/L 后稍有下降.



1. 蛋白质 marker; 2. 优化前 GS115(pGAP9-16BMP)表达 BMP 情况; 3. 优化后 GS115(pGAP9-16BMP)表达 BMP 情况; 4. GS115 表达蛋白情况

图 8 最优条件下 BMP 的表达

Fig.8 Expression of BMP on optimal condition

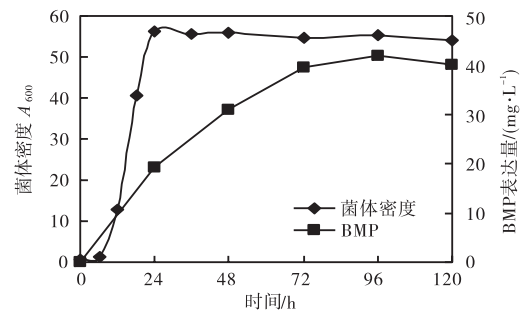


图 9 培养过程中生物量和 BMP 表达量的变化

Fig.9 Effect of different time on cell growth and expression of BMP

2.4 牛肉风味肽的美拉德呈味反应

利用孔径 60 ku 和 6 ku 中空纤维超滤膜,将发酵液经二级超滤浓缩至 20 倍,得到中空纤维浓缩的发酵液浓缩液,以其为基料的实验组的味道最优,其次为添加牛肉汤的对照 2[#],对照 1[#]味道最淡. 发酵浓缩液的反应稀释液香气更浓厚圆润,没有直冲感,留香时间长,口感更丰富、肉味更逼真、而且回味鲜香绵长,符合人们的习惯,说明 BMP 有一定提升牛肉风味的作用.

3 结 论

通过单因素实验设计,对工程菌 GS115(pGAP9-16BMP)摇瓶发酵培养条件进行优化. 实验结果表明,在 GAP 基因启动子调控下,最佳表达条件为:甘油 30 g/L,蛋白胨 40 g/L,酵母粉 20 g/L,挡板三角瓶装液量 30%;最佳菌体培养温度 32 °C,初始 pH 6.0,发酵周期 96 h. 在最佳培养基和最适培养条件下 BMP 表达量最高可达 41.9 mg/L.

参考文献:

- [1] Yamasaki Y, Maekawa K. A peptide with delicious taste[J]. *Agric Biol Chem*, 1978, 42(9):1761-1765.
- [2] Spanier A M. Current approaches to the study of meat flavor quality[J]. *Food Science and Human Nutrition*, 1992, 29:695-709.
- [3] Wang K, Maga J A, Bechtel P J. Stability of beefy meaty peptide to pasteurization and sterilization temperature[J]. *Research Note*, 1995, 28(5):539-542.
- [4] Gauthier S F, Pouliot Y. Functional and biological properties of peptides obtained by enzymatic hydrolysis of whey proteins[J]. *Dairy Sci*, 2003, 86:78-87.
- [5] Alsina J, Albericio F. Solid-phase synthesis of C-terminal modified peptides[J]. *Biopolymers Peptide Science Section*, 2003, 71(4):454-477.
- [6] Bretthauer R K, Castellino F J. Glycosylation of *Pichia pastoris* derived proteins[J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999, 30(3):193-200.
- [7] Tschopp J F, Brust P F, Cregg J M, et al. Expression of the lac Z gene from two methanol regulated promoters in *Pichia pastoris*[J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15(9):3859-3876.
- [8] Waterham H R, Digan M E, Koutz P J, et al. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter[J]. *Gene*, 1997, 186(1):37-44.
- [9] 王艳萍, 高文, 侯建华, 等. 牛肉风味强化肽(BMP)表达载体的构建[J]. *天津科技大学学报*, 2008, 23(3):16-20.
- [10] 王艳萍, 杨明, 高文, 等. 毕赤酵母 16B2 菌株表达牛肉风味肽发酵条件的优化[J]. *中国调味品*, 2008, 33(5):35-38.
- [11] Guo Y J. Protein Electrophoretic Technique[M]. Beijing: Science Press, 1998:54-58.
- [12] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. *Analytical Biochemistry*, 1979, 72:248-254.