



## 培养条件对甲醇毕赤酵母异源表达木质素过氧化物酶的影响

王海宽, 路福平

(天津市工业微生物重点实验室, 天津科技大学生物工程学院, 天津 300457)

**摘要:** 对含有黄孢原毛平革菌木质素过氧化物酶基因(LipH8)的甲醇毕赤酵母培养基和发酵方法进行了研究. 摇瓶培养条件研究结果表明: 用 11°Bx 麦芽汁培养工程菌, 然后用高温浸提液置换诱导产酶较好. 5 L 发酵罐产酶放大实验结果表明, 木质素过氧化物酶较稳定, 在 72 h 木质素过氧化物酶酶活达到最高 7 568 U/L.

**关键词:** 异源表达; 木质素过氧化物酶; 甲醇毕赤酵母; 黄孢原毛平革菌

**中图分类号:** TQ92      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1672-6510 (2007) 01-0033-04

### Effect of Cultivation Condition on Heterologous Expression of Lignin Peroxidase in *Pichia methanolica*

WANG Hai-kuan, LU Fu-ping

(Tianjin Key Laboratory of Industrial Microbiology, College of Biotechnology, Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

**Abstract:** The medium and fermentation method of *Pichia methanolica* with lignin peroxidase gene (LipH8) of *Phanerochaete chrysosporium* was investigated. The optimum fermentation method of lignin peroxidase was studied by shake-flask culture. It is good that *Pichia methanolica* was cultured in the 11 °Bx wort medium and then induced in the high temperature malt extract medium. In 5 L fermenter the lignin peroxidase activity was stable and reached the highest activity of 7568 U/L.

**Keywords:** heterologous expression; lignin peroxidase; *Pichia methanolica*; *Phanerochaete chrysosporium*

甲醇毕赤酵母 (*Pichia methanolica*) 是一类新的真核表达系统, 它除了具有许多真核表达系统所共有的优点, 如蛋白质的加工和折叠外, 还兼具诸如大肠杆菌和酿酒酵母等微生物的易于操作的特点. 与杆状病毒和动物组织培养等其他真核表达系统相比, 它具有简便、快捷、成本低、表达水平较高等优点. 这些优点使甲醇毕赤酵母作为蛋白表达系统的应用越来越广泛<sup>[1-3]</sup>. 木质素过氧化物酶可以用来进行生物废物处理、催化复杂化学转化, 尤其在生物降解木质素等方面有重要应用. 从自然资源合理利用和持续发展战略的角度考虑, 进行木质素过氧化物酶的研究对农业和环境工程的发展具有重要意义, 但是利用黄孢原毛平革菌生产木质素过氧化物酶发酵周期长, 培养基要求高, 酶活力低, 而且其菌丝在发酵罐中易受高剪切

力的损伤<sup>[4,5]</sup>. 因此, 研究木质素过氧化物酶的异源表达具有重要的现实意义.

目前甲醇毕赤酵母摇瓶培养所采用的培养基是用以葡萄糖为碳源的细胞增殖培养基 (BMDY) 作为甲醇毕赤酵母的生长培养基, 然后用以甲醇为碳源的诱导培养基 (BMMY) 作为甲醇毕赤酵母外源基因的表达, 其成本较高, 不适宜工业化生产. 在用发酵罐培养甲醇毕赤酵母进行外源基因的表达时, 一般采用无机盐发酵培养基, 该培养基成分复杂, 价格昂贵, 混合灭菌容易产生沉淀. 本研究根据甲醇毕赤酵母的营养要求, 利用相对便宜的麦芽汁培养基研究甲醇毕赤酵母的生长、诱导产酶条件和发酵方法, 并且与 MDY、BMMY 培养基对比, 为甲醇毕赤酵母的工业化生产奠定基础.

收稿日期: 2006-09-11

作者简介: 王海宽 (1974—), 男, 内蒙古人, 讲师, 博士.

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与培养基

异源表达的宿主甲醇毕赤酵母为 PMAD16 (ade2-11 pep4 $\Delta$  prb1 $\Delta$ )。重组甲醇毕赤酵母 PMAD16/pMET $\alpha$ A-LipH8 和对照 PMAD16/pMET $\alpha$ A 由天津科技大学应用微生物实验室构建<sup>[6]</sup>。

细胞增殖培养基 (BMDY): 酵母粉 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 磷酸钾 100 mmol/L, pH6.0, YNB 13.4 g/L, 生物素 ( $4 \times 10^{-5}$ ) %, 葡萄糖 20 g/L。

诱导培养基 (BMMY): 酵母粉 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 磷酸钾 100 mmol/L, pH6.0, YNB13.4 g/L, 生物素 ( $4 \times 10^{-5}$ ) %, 甲醇 0.5 %。

YEPD: 酵母粉 10 g/L, 蛋白胨 20 g/L, 葡萄糖 20 g/L。

麦芽汁培养基: 将麦芽粉碎, 称取一定量麦芽粉, 置于 500 mL 烧杯中, 按一定的料水比加入蒸馏水, 混合, 作好体积标记, 放入事先调节好的 65 °C 左右的水浴箱中进行糖化, 适时搅拌, 碘反应检测糖化程度 (遇碘不变蓝则反应完全)。待糖化完全后, 补失水, 纱布过滤, 测定麦芽汁糖度, 121 °C 灭菌 20 min 备用。

麦芽高温浸提液培养基: 称取一定量麦芽粉, 置于烧杯中, 按适量的料水比加入蒸馏水, 混匀, 作好体积标记。电炉加热煮沸 5 ~ 10 min 后, 置于 90 °C 水浴保温, 10 min 搅拌 1 次, 浸提 2 ~ 3 h。然后冷却, 补充失水, 纱布过滤, 121 °C 灭菌 20 min 备用。

### 1.2 菌种的活化

取 PMAD16/pMET $\alpha$ A-LipH8 斜面菌种接种于 25 mL 的 YEPD 培养基中, 30 °C, 200 r/min 振荡培养 18 ~ 20 h。即为 PMAD16/pMET $\alpha$ A-LipH8 工程菌种子。

### 1.3 麦芽汁摇瓶培养工艺

#### 1.3.1 麦芽汁一步法诱导产酶工艺

装有 25 mL 麦芽汁的 250 mL 三角瓶中, 按 1% 的接种量接种 YEPD 活化种子, 于 30 °C, 200 r/min 振荡培养 20 h 后, 加入甲醇使培养液中甲醇终体积分数为 1.1%, 以诱导 Lip H8 的产生。培养过程中每隔 24 h 加 1 次甲醇, 确保甲醇终体积分数为 1.1%。从加入甲醇诱导培养开始计时, 隔一定时间取出 1 mL 的发酵液进行酶活的测定。

#### 1.3.2 麦芽汁二步法诱导产酶工艺

装有 25 mL 细胞增殖培养基的 250 mL 三角瓶中, 按 1% 的接种量接种种子, 于 30 °C, 200 r/min 摇床培养 20 h。静置 3 ~ 4 h, 弃去上清液, 然后根据实验目的加入

一定量的用于诱导的培养基, 同时加入甲醇, 使培养液中甲醇终体积分数为 1.1%, 以诱导 LipH8 的产生。培养过程中每隔 24 h 添加 1 次甲醇, 确保甲醇终体积分数为 1.1%。从加入甲醇诱导培养开始计时, 隔一定时间取出 1 mL 发酵液进行酶活的测定。

#### 1.3.3 不同糖度的麦芽汁对细胞增殖的影响

各取不同糖度的麦芽汁 10 mL 置于 250 mL 三角瓶中, 按 1% 的接种量接种 YEPD 活化的种子, 于 30 °C, 200 r/min 摇床培养 20 h, 测定培养液的  $A_{600}$  值。

#### 1.3.4 不同糖度的麦芽汁对产酶的影响

各取不同糖度的麦芽汁 10 mL 置于 250 mL 三角瓶中, 按 1.3.1 中一步发酵工艺进行产酶实验。分别在 12、24、36、48 h 时取出 1 mL 发酵液进行酶活测定。

#### 1.3.5 不同培养基和发酵方法对产酶的影响

取 25 mL 11 °Bx 麦芽汁作为细胞增殖培养基, 以 25 mL 7 °Bx 的麦芽高温浸提液和麦芽汁为诱导培养基, 按照 1.3.2 中二步发酵工艺进行产酶实验。另取 25 mL BMGY 培养基作为细胞增殖培养基和 25 mL 的 BMMY 为诱导培养基, 以二步发酵工艺进行产酶实验。同时分别取 25 mL 11 °Bx 麦芽汁、11 °Bx 麦芽高温浸提液、BMDY 于 250 mL 三角瓶中, 按 1.3.1 中一步发酵工艺进行产酶实验。

#### 1.3.6 不同糖度的高温浸提液对产酶的影响

分别以 25 mL 11 °Bx 麦芽汁作为细胞增殖培养基和 25 mL 7 °Bx、9 °Bx、14 °Bx 的麦芽高温浸提液为诱导培养基, 按照 1.3.2 中二步发酵工艺进行产酶实验。36 h 后测定酶活, 以后试验均选用最适糖度的高温浸提液作诱导产酶用培养基。

## 1.4 PMAD16/pMET $\alpha$ A-LipH8 工程菌麦芽汁培养产酶放大试验

配制 3L 的 11 °Bx 麦芽汁培养基, 在全自动发酵罐中湿灭, 按 5% 的接种量接种种子, 控制条件保持溶氧在 20% ~ 30%。培养 20 h 后, 开始流加甲醇诱导, 流加量控制在培养液中甲醇终体积分数为 1.1%, 同时开始流加 7 °Bx 的麦芽汁高温浸提液, 始终控制溶氧在 20% ~ 30%, 其间取样检测酶活及  $A_{600}$  值。

## 1.5 木质素过氧化物酶活力测定

测定方法参照文献<sup>[7]</sup>进行。1 mL 50 mmol/L 酒石酸钠缓冲液 (pH=3.0), 500  $\mu$ L 10 mmol/L 藜芦醇, 1 mL 发酵液, 30 °C 温浴 10 min 后, 加入 20  $\mu$ L 20 mmol/L 的  $H_2O_2$  溶液, 测反应最初 3 min 内  $\lambda=310$  nm 处吸光度的变化。以每分钟形成 1  $\mu$ mol 的藜芦醛为一个酶活单位 U ( $\epsilon=9\ 300\ M^{-1}/cm$ )。

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同糖度的麦芽汁对细胞增殖的影响

不同糖度的麦芽汁对细胞增殖的影响见图 1。

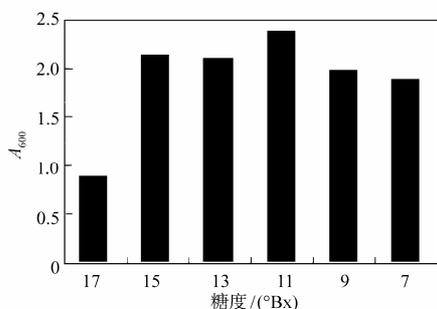


图 1 不同糖度的麦芽汁对细胞增殖的影响

Fig.1 Effect of different wort on the cell growth

由图 1 可知,高糖度的麦芽汁对工程酵母菌的生长具有抑制作用,随着糖度的降低,抑制作用减少,生长量增加,但当糖度过低时,由于缺少营养,造成 A<sub>600</sub> 偏低.以后实验均选用 11 °Bx 麦芽汁作为工程菌生产阶段的培养基.

### 2.2 不同糖度的麦芽汁对产酶的影响

将 17、15、13、11、9、7°Bx 糖度麦芽汁按一步发酵工艺进行产酶实验,结果如表 1。

表 1 不同糖度的麦芽汁对产酶的影响

Tab.1 Effect of wort with different sugar concentration on inducing lignin peroxidase U · L<sup>-1</sup>

糖度/(°Bx)	时 间			
	12 h	24 h	36 h	48 h
17	433	616	716	917
15	550	867	950	1 301
13	716	1 433	1 633	2 150
11	1 433	2 150	2 806	3 103
9	1 433	1 989	2 078	2 704
7	286	430	716	988

由表 1 可知,11 °Bx 的麦芽汁 LipH8 酶活最高,随着糖度升高,酶活降低,说明培养液过高的单糖具有分解阻遏效应,抑制菌体启动甲醇诱导 LipH8 合成.随着糖度的提高,对产酶的抑制作用愈明显,但是糖度过低又不能完全满足菌体生长及产物积累,所以产酶亦下降.

### 2.3 不同培养基和发酵方法对产酶的影响

分别采用一步法、二步法发酵工艺和不同的培养基进行产酶实验,结果如表 2 所示。

由表 2 可知,置换高温浸提液的二步发酵工艺诱导产酶酶活最高,可见高温浸提液由于快速利用的碳源浓度低,对甲醇氧化酶的阻遏效应较小,即对产酶抑制性减小,在短时间内合成酶量增加,同时也说明高温浸提液所含营养成分也满足 LipH8 的合成.同时对于同量的麦芽粉,制备相同糖度的麦芽汁和高温浸提液的料水比相差很大,麦芽汁的加水量比高温浸提液的加水量大,造成相同糖度的麦芽汁所含营养成分比高温浸提液低,进而其酶活也较低.所以采用高温浸提液为诱导产酶培养基有很大的优越性.

表 2 培养基和培养方法对产酶的影响

Tab.2 Effect of medium and culture method on inducing lignin peroxidase U · L<sup>-1</sup>

培养基和培养方法	时 间		
	12h	24h	36h
麦芽汁一步法	1 393	2 125	2 879
高温浸提液一步法	1 521	2 268	2 928
BMDY 一步法	678	1 158	1 295
高温浸提液置换	1 433	2 939	4 869
麦芽汁置换	1 088	2 456	3 215
BMMY 置换	716	1 433	1 548

### 2.4 不同糖度的高温浸提液对产酶的影响

分别以不同糖度的麦芽高温浸提液为诱导培养基,按照二步发酵工艺进行产酶实验,结果如表 3 所示。

表 3 不同糖度高温浸提液对产酶的影响

Tab.3 Effect of high temperature malt extract with different sugar concentration on lignin peroxidase activity

糖度/(°Bx)	14	9	7
48h 酶活/U · L <sup>-1</sup>	3 817	5 584	5 290

结果显示,高温浸提液的糖度较高时,对产酶有抑制作用.同时糖度为 9 °Bx 和 7 °Bx 的高温浸提液酶活相差不大,因此从成本上考虑,糖度为 7 °Bx 的高温浸提液作为诱导培养基.

### 2.5 PMAD16/pMET α A -LipH8 工程菌产酶曲线

分别以 7 °Bx 的麦芽高温浸提液和 BMMY 为诱导培养基二步发酵工艺进行产酶实验,绘制 PMAD16/pMETαA -LipH8 产酶曲线,结果如图 2。

由图 2 可知,用 BMMY 作为诱导培养基产酶 72 h 时,酶活才达到 3 686 U/L,而采用麦芽高温浸提液作

为诱导培养基发酵至 72 h 时,LipH8 酶活即达到最高 6 945 U/L,两者相比,后者不仅酶活力提高了 88%,而且原料成本也大大降低,说明了麦芽汁和麦芽高温浸提液作为甲醇毕赤酵母的培养基比较经济合理.

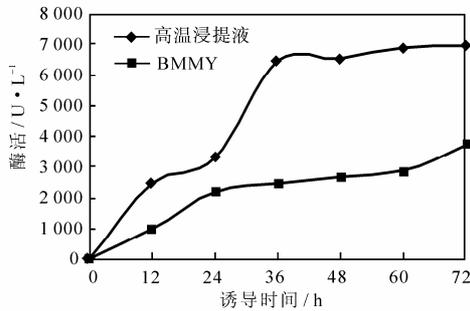


图 2 PMAD16/pMET α A -LipH8产酶曲线

Fig.2 Lip activity curve of PMAD16/pMET α A -LipH8 transformants

### 2.6 麦芽汁培养基发酵罐培养 PMAD16/pMETαA -LipH8

在摇瓶实验的基础上,按照 1.4 的方法进行 5 L 发酵罐实验,考察用麦芽汁作为发酵培养基和高温浸提液作为流加培养基时,发酵罐培养的菌体生长和产酶水平.结果如图 3 和图 4 所示.

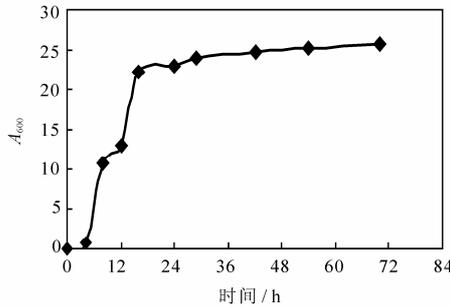


图 3 5 L 发酵罐 PMAD16/pMET α A -LipH8 麦芽汁培养的生长曲线

Fig.3 The curve of A<sub>600</sub> to times in fermenter of malt extract medium

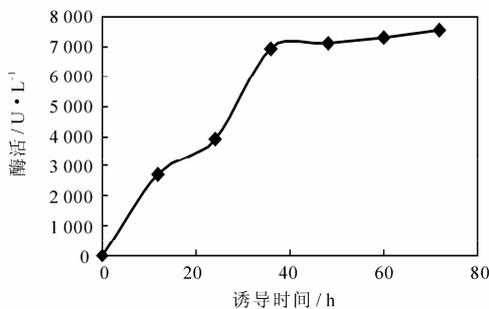


图 4 麦芽汁发酵罐产酶曲线

Fig.4 The curve of lignin peroxidase activity to times in fermenter of malt extract medium

由图 3 可见,菌体接种到发酵罐中停滞期很短,迅速进入对数生长阶段,以后基本保持稳定,A<sub>600</sub> 在 70 h 达到最高 25.87,说明麦芽汁营养丰富,非常适合工程菌的生长.

由图 4 可见,在 72 h LipH8 酶活即达到 7 568 U/L,而且峰值一直保持稳定,进一步说明用麦芽汁作为发酵培养基和高温浸提液作为流加培养基时,其不仅营养丰富,而且对甲醇氧化酶的阻遏效应较小,能同时满足菌体的生长和产酶.

## 3 结 论

摇瓶实验表明,用 11°Bx 麦芽汁培养工程菌,然后用高温浸提液置换诱导的二步发酵工艺产酶较好.5 L 发酵罐产酶放大实验结果表明,用 11°Bx 麦芽汁培养基,培养 20 h 后开始流加甲醇诱导,流加量控制在培养液中甲醇体积分数为 1.1%,同时开始流加 7 °Bx 的麦芽汁高温浸提液,产酶很稳定,在 72 h 木质素过氧化物酶酶活达到最高 7 568 U/L.

## 参 考 文 献:

- [1] Haikuan Wang, Fuping Lu, Yafan Sun, et al. Heterologous expression of lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in *Pichia methanolica* [J]. *Biotechnol Lett*, 2004,26:1569—1573.
- [2] Thomas K, Annette F P, Morten H. Secretory expression and characterization of insulin in *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnol Appl Biochem*, 1999,29:79—86.
- [3] Ludovic O, Eric R, Sonia L, et al. Molecular cloning of the cDNA encoding laccase from *Pycnoporus cinnabarinus* 1-937 and expression in *Pichia pastoris* [J]. *Eur J Biochem*. 2000,267:1619—1625.
- [4] Mohamed S A, Sami S, Ali G. Heterologous expression of lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* in *Aspergillus niger* [J]. *Biotechnol Lett*, 1999,21:849—853.
- [5] Kirk T K, Schultz E, Connors W J, et al. Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Arch Microbiol*, 1978,117:277—285.
- [6] 王海宽, 孙亚范, 杜连祥, 等. 木质素过氧化物酶基因 (LipH8) 的克隆及在甲醇毕赤酵母中的表达 [J]. *微生物学报*, 2004,44(2):258—260.
- [7] Tien M, Kirk T K. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* [J]. *Methods Enzymol*, 1988, 161:238—249.