

文章编号: 1000-5862(2013)06-0607-04

重组烟曲霉壳聚糖酶在毕赤酵母中 高密度发酵表达及性质研究

裘 梁¹, 杨 萍², 董德刚¹, 阳 历², 王曼莹^{1,2*}

(1. 江西中医药大学生物技术研发中心, 江西 南昌 330096;

2. 江西师范大学生命科学学院, 江西省食品与生物技术产学研合作示范基地, 江西 南昌 330022)

摘要: 采用高密度发酵法在 5 L 发酵罐中对 pPIC9-csn/GS115 重组毕赤酵母 *Pichia pastoris* 菌株进行发酵, 壳聚糖酶的产量达到 $4\,200\text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$, 发酵液经乙醇浓缩、透析和阳离子交换色谱等步骤进行分离纯化, 获得了纯度较高的重组壳聚糖酶。该重组壳聚糖酶与野生型壳聚糖酶对壳聚糖作用模式相同, 其最终产物均为壳三糖, 且其最适作用温度为 $60\text{ }^{\circ}\text{C}$, 最适 pH 值为 6.0。

关键词: 重组壳聚糖酶; 毕赤酵母; 高密度发酵

中图分类号: Q 786

文献标志码: A

0 引言

壳聚糖(chitosan)是由自然界广泛存在的几丁质(chitin)经过脱乙酰作用得到的,化学名称为聚葡萄糖胺[(1-4)- α -氨基- β -D 葡萄糖],它只能溶于一些稀的无机酸或有机酸中,不能直接溶于水中,因此在很大程度上限制了它的应用^[1]。长期以来,人们采用化学法、物理法和非专一性复合酶降解法达到水溶的目的,但因化学法的降解产品或壳聚糖改性产品^[2]存在大量的不明衍生物,而物理降解或非专一性复合酶降解壳聚糖的工艺无法获得分散度低的、相对分子质量(即聚合成寡糖的单糖数量)可控的水溶性壳聚糖或壳寡糖^[3-6],使壳聚糖的应用受到极大的限制。壳聚糖酶(Chitosanase, EC. 3. 2. 1. 132) (csn) 是酶法制备壳寡聚糖的专一性酶,可特异性的水解壳聚糖,得到特异相对分子质量范围的壳寡聚糖。在降解壳聚糖多聚物和壳寡糖生产中有重要作用。壳寡糖可提高人体免疫力,抑制肿瘤细胞生长,促进肝脾抗体形成,促进钙及矿物质的吸收,增殖乳酸菌、双歧杆菌等有益菌群,还有降血压、降血糖、降血脂、调节胆固醇等功能,在医药、食品领域有广泛的应用前景。因此,研制无外切酶活性的专一性内切壳聚糖酶生产经济、安全的壳寡糖应用于食

品工业,就显得尤为重要,也吸引了各国研究机构与研究人员的注意^[7-9]。

目前,壳聚糖酶主要来源于自然界中产壳聚糖酶的微生物,但生产能力低,生产成本低,且该酶在热稳定性等方面还不能满足工业化生产壳寡糖的需求。为提高壳聚糖酶的产量,人们对壳聚糖内切酶基因表达做了一些研究^[10-13],但表达量不高,且大多是在大肠杆菌表达系统中进行的。本文在实验室完成壳聚糖酶基因克隆^[14]、密码子优化该基因及优化后的基因在毕赤酵母菌株(pPIC9K-csn/GS115)中摇瓶表达的基础上^[15],进一步试验 pPIC9-csn/GS115 的高密度发酵表达、纯化工艺和方法,并对产物的性质和酶解产物进行了鉴定分析。

1 材料和方法

1.1 材料和试剂

毕赤酵母工种菌 GS115(GS115, CSN),由本实验室构建并保存;酵母提取物(Oxiod 公司,英国),蛋白胨(Oxiod 公司,英国);丙烯酰胺(Amersco 公司,美国);SP Sepharose Fast Flow 填料(GE Healthcare 公司,美国);其他试剂均为国产分析纯。

YPD 活化培养基/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$):葡萄糖 20 g,蛋白胨 20 g,酵母膏 10 g。

收稿日期: 2013-07-27

基金项目: 国家自然科学基金(81260604)和江西省教育厅青年科学基金(GJJ11195)资助项目。

通信作者: 王曼莹(1944-),女,江西南昌人,教授,主要从事新资源开发与利用方面的研究。

种子培养基(BMGY) 1 L 含: YNB 13.4 g, 甘油 10 mL, 生物素 0.4 mg, $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 值为 6.0 的磷酸缓冲溶液 100 mL, 酵母抽提物(Oxid) 10 g, 蛋白胨(Solarbio) 20 g.

发酵培养基(BSM) 1 L 含: 85% 磷酸 26.7 mL, CaSO_4 0.93 g, K_2SO_4 18.20 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14.90 g, KOH 4.13 g, 甘油 40.00 g, PTM1 溶液 4.35 mL, 用 25% 氨水调 pH 值至 5.0.

PTM1 溶液 1 L 含: CuSO_4 6.00 g, NaI 0.08 g, MnSO_4 3.00 g, Na_2MoO_4 0.20 g, H_3BO_3 0.20 g, CoCl_2 0.50 g, ZnCl_2 20.00 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 65.00 g, 生物素 0.20 g, 硫酸 5 mL.

1.2 方法

1.2.1 毕赤酵母工程菌的活化和种子培养 将保存于 -80°C 的工程菌株(pPIC9K-csn/GS115)划线于 YPD 固体培养基上, 于 30°C 恒温培养箱培养 48 h, 得 GS115(csn) 单菌落. 从 YPD 固体培养基上挑单菌落, 接入含 50 mL YPD 液体培养基的 200 mL 三角瓶中, 在 30°C 下于 $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床中培养 18 h. 按体积分数为 10% 的接种量接种, 即接 20 mL 摇瓶种子到含 200 mL BMGY 种子培养基的 1 L 锥形瓶中, 在 30°C 下于 $250 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床中培养至 OD_{600} 为 6.0 左右, 作为高密度发酵的菌种.

1.2.2 重组壳聚糖酶的发酵表达 在含 2 L BSM 的 5 L 发酵罐中, 控制温度为 30°C , pH 值为 5.0, 溶氧为 20%~30%, 转速与溶氧联动. 当甘油消耗完全时(根据溶氧急剧上升判断为甘油消耗完全), 饥饿 0.5 h 后开始流加 50% (质量体积比) 的含 PTM1 $12 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 甘油溶液, 至菌体密度达 $180 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 左右饥饿 0.5 h, 以 $7.2 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ 的补料速率流加 100% 的含 PTM1 $12 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲醇诱导表达约 4 h, 此后按 $20 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1}$ 的流速连续补加 100% 甲醇(PTM1 $12 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$), 发酵过程以质量分数为 25% 的氨水调 pH 值, 每隔 12 h 取 5 mL 培养液离心, 取上清电泳, 共诱导 72 h, 发酵结束离心收集发酵上清.

取不同时间发酵上清进行 12% SDS-PAGE 凝胶电泳, 最后收集的发酵上清用于进一步纯化.

1.2.3 重组壳聚糖酶的分离纯化 乙醇浓缩: 将冷冻至 -20°C 的乙醇加到发酵上清中, 至终浓度为 75%. 在 -20°C 静置 2 h 后, 在 4°C 4000 rpm 下离心 15 min, 并弃去上清液, 收集沉淀. 将沉淀立即溶解在 $0.02 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸钠缓冲液(pH 值为 7.0)中, 再加入预先处理好的截留相对分子质量为 12 kDa 的透析袋中, 在 4°C 下透析, 定时更换缓冲液.

SP-Sepharose FF column 层析柱分离: 将透析样品上样于 SP-Sepharose Fast Flow 层析柱(18 mm \times 200 mm), 然后以 $5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速用 $0.02 \text{ mol} \cdot$

L^{-1} 的磷酸钠缓冲液(pH 值为 7.0)冲洗 3 个柱体, 冲洗未挂柱蛋白, 用含 1.03%~1.18% NaCl 的 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸钠缓冲液(pH 值为 7.0)以 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 流速线性梯度洗脱, 分管收集洗脱样品, 收集样品进行 SDS-PAGE.

1.2.4 重组壳聚糖酶的性质 (i) 壳聚糖酶活性的测定. 在 0.75 mL 1% 胶体壳聚糖(用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 值为 5.0 的醋酸缓冲液配制)中加入 0.25 mL 适当稀释的酶液, 于 50°C 保温 10 min, 沸水浴 5 min 灭活酶, 4000 rpm 离心 15 min, 取上清, 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法测定酶解液中的还原糖(以氨基葡萄糖计), 每分钟催化生成相当于 $1 \mu\text{mol}$ 氨基葡萄糖的还原糖所需的酶量为 1 个酶活单位.

(ii) 温度对壳聚糖酶活性及酶的热稳定性的影响. 取酶液在不同温度下($30, 40, 50, 60, 70, 80^\circ\text{C}$)保温 60 min 后, 按上述方法测定酶活力.

(iii) pH 对壳聚糖酶活性及酶稳定性的影响. 分别以 pH 值为 3~9 的缓冲液配制底物和稀释酶液, 按上述方法测定酶活力; 将酶液与上述不同 pH 值的缓冲液在 30°C 下保温 6 h 后, 按常规法测定其对应的酶活力.

(iv) 酶解产物分析. 将 $750 \mu\text{L}$ 1% 胶体壳聚糖(用 $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 值为 5.0 的醋酸缓冲液配制)和 $250 \mu\text{L}$ 酶液混合均匀, 50°C 水浴反应 6 h. 用硅胶 G 薄层层析分析酶解产物的成分(展开剂体积比为乙酸乙酯: 乙醇: 水: 氨水 = 5.0: 5.0: 4.0: 0.3). 以 0.2% 茚三酮/乙醇溶液作显色剂, 壳寡糖和氨基葡萄糖在该显色剂中显红色或紫色.

2 结果

2.1 壳聚糖酶的表达

用 12% 的 SDS-PAGE 检测发酵过程不同诱导时间样品, 结果表明发酵上清有一条主蛋白, 随着诱导时间的延长, 蛋白表达量逐渐增加, 其相对分子质量约为 25 kDa, 与目的蛋白的相对分子质量相近(见图 1).

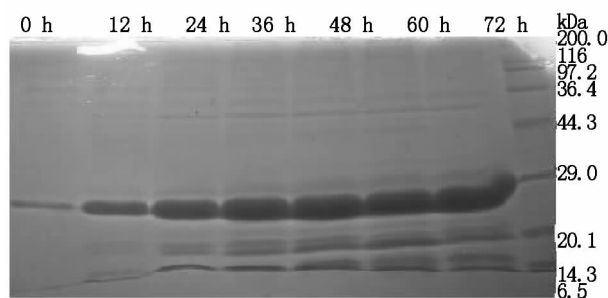


图 1 壳聚糖酶发酵液上清电泳结果

2.2 重组壳聚糖酶的分离纯化

将毕赤酵母产生的粗酶液经过体积分数为75%的乙醇透析后上 SP-Sepharose FF column 层析柱,用 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸钠缓冲液 (pH 值为7.0) 洗脱,大部分杂蛋白不能被吸附,再用含1.03%~1.18% NaCl 的 $0.02 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸钠缓冲液 (pH 值为7.0) 进行线性梯度洗脱,可以很好地分离出酶蛋白峰,经 SDS-PAGE 电泳检验为单带,结果见图2。

分别取发酵液上清和纯化后的酶液按本文1.2.3节所述方法测定酶活,以氨基葡萄糖为标准品作标准曲线,发酵液上清的酶活达到 $4200 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,纯化后重组酶的比活为 $1200 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

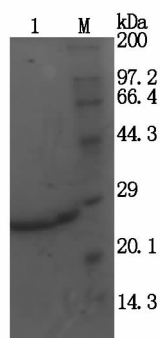
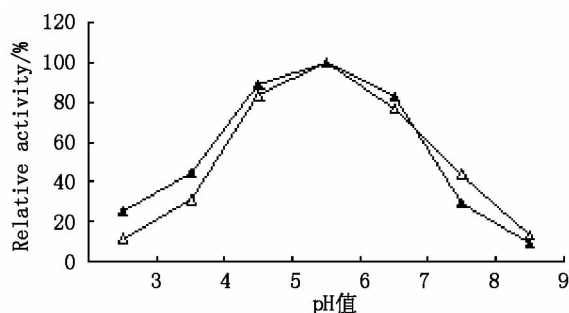


图2 分离纯化后重组壳聚糖酶电泳结果

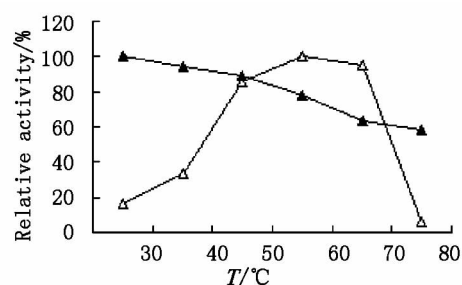
2.3 酶学性质研究

在不同 pH 值和温度下对重组壳聚糖酶活性进行了测定,当 pH 值为6.0时,酶活性最高。然而,随着 pH 值的升高,壳聚糖也会从胶状转为絮状甚至沉淀,这可能也会影响酶活性的测定。随着温度的升高,酶的稳定性下降,当温度达到 70°C 时,酶的半衰期约为1 h。而酶的最适温度为 60°C ,但酶在 60°C 的半衰期约为2.5 h,因此生产中的温度最好不要超过 50°C ,如图3和图4所示。



▲表示稳定性; △表示最适 pH 值。

图3 pH 对壳聚糖酶活性的影响



▲表示热稳定性; △表示最适温度。

图4 温度对壳聚糖酶活性的影响

2.4 壳聚糖水解产物分析

如图5所示,该酶部分水解壳聚糖得到的最终产物为三糖,与野生型壳聚糖酶水解作用模式一致。

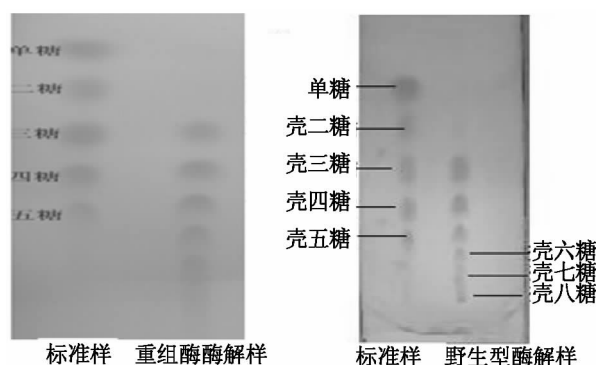


图5 薄层色谱分析壳聚糖的水解产物

3 讨论

毕赤酵母表达系统自1987年以来,已有上百种外源蛋白在该宿主菌上成功表达,如人血清白蛋白、肿瘤坏死因子、鼠表达生成因子和人白细胞介素2等,但它们的表达量基本在克级水平^[16],因此壳聚糖酶的表达量有待于提高。本文采用 Mut⁺ 型高表达克隆,因此,诱导时甲醇含量不宜太高,控制其终体积分数为1%,一般在8 h内逐步加大甲醇的体积分数。本研究实现了重组壳聚糖酶在毕赤酵母中的高效表达。在5 L多参数全自动发酵罐中,菌体细胞湿重达到 362.5 g/L ,诱导72 h后蛋白产量达到 $0.95 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,酶活性达到 $4200 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 并且通过 SDS-PAGE 验证目的蛋白并无明显降解,目的蛋白高效表达。

建立了重组壳聚糖酶纯化方法,总回收率为33.1%。其中乙醇浓缩加透析去除了部分小分子杂质及色素,成本低,可处理大量样品。再经离子交换层析及梯度洗脱,产品纯度达到98%以上,纯化步骤简单、有效,而且可以线性放大,用于大规模工业化生产。

该重组壳聚糖酶虽发生了糖基化,但从薄层层

析来看,糖基化对酶的作用模式和酶解产物没有影响.然而,糖基化是否对壳聚糖酶的活性有影响有待后续试验探索.

4 参考文献

- [1] Yoshihara K, Hosokawa J, Kubo T, et al. Purification and properties of a chitosanase from *Pseudomonas* sp. H-44 [J]. *Biosci Biotech Biochem*, 1992, 56(6): 972-973.
- [2] 王超莉, 李扬忠. 羧乙基壳聚糖硫酸酯的合成与表征 [J]. *江西师范大学学报: 自然科学版*, 2009, 33(3): 272-274.
- [3] Yamasaki Y, Hayashi I, Ohta Y, et al. Purification and mode of action of chitosanolytic enzyme from *Enterobacter* sp. G-1 [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, 57(3): 444-449.
- [4] Omumasaba C A, Yoshida N, Sekiguchi Y, et al. Purification and some properties of a novel chitosanase from *Bacillus subtilis* KH1 [J]. *Appl Microbiol*, 1999, 46(1): 162-271.
- [5] Shimosaka M, Nogawa M, Ohino Y. Chitosanase from the plant pathogenic fungus *Fusarium solanif* sp. phaseoli-purification and some properties [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1993, 57(2): 231-235.
- [6] Somashekar D, Joseph R. Chitosanases: properties and applications: a review [J]. *Bioresource Technology*, 1996, 55(1): 35-45.
- [7] Liu Jing, Xia Wenshui. Purification and characterization of a bifunctional enzyme with chitosanase and cellulase activity from *Commercial cellulose* [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 30(1): 82-87.
- [8] Chen Yaling, Su Chiakai, Chiang Beenhuang. Optimization of reversed micellar extraction of chitosanases produced by *Bacillus cereus* [J]. *Process Biochemistry*, 2006, 41(4): 752-758.
- [9] Chen Xiaoe, Xia Wenshui, Yu Xiaobin. Purification and characterization of two types of chitosanase from *Aspergillus* sp. [J]. *Food Research International*, 2005, 38(3): 315-322.
- [10] Kim P I, Kang T H, Chung K J, et al. Purification of a constitutive chitosanase produced by *Bacillus* sp. MET 1299 with cloning and expression of the gene FEMS [J]. *Microbiology Letters*, 2004, 240(1): 31-39.
- [11] Johnsen M G, Hansen O C, Stougaard P. Isolation, characterization and heterologous expression of a novel chitosanase from *Janthinobacterium* sp. strain 4239 [J]. *Microbial Cell Factories*, 2010, 9(1): 5.
- [12] 梁东春, 左爱军, 郭刚, 等. 烟曲霉菌壳聚糖酶基因的克隆及在大肠杆菌中的表达 [J]. *微生物学报*, 2005, 45(4): 539-542.
- [13] Zhang Jiquan, Sun Yuying. Molecular cloning, expression and characterization of a chitosanase from *Microbacterium* sp. [J]. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(8): 1221-1225.
- [14] 杨萍. 烟曲霉壳聚糖酶基因的克隆与毕赤酵母表达 [D]. 南昌: 江西师范大学, 2007.
- [15] 裘梁, 杨萍, 游清徽, 等. 密码子优化烟曲霉壳聚糖内切酶基因在毕赤酵母中的高效表达 [J]. *安徽农业科学*, 2012, 40(26): 12769-12771.
- [16] Gregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnology*, 1993, 11(8): 905-910.

The Study on High Density Fermentation of Recombinant Chitosanase from *Aspergillus fumigatus* in *Pichia pastoris* and Characterization of Recombinant Chitosanase

QIU Liang¹, YANG Ping², DONG De-gang¹, YANG Li², WANG Man-ying^{1,2*}

(1. Biotechnology Center, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanchang Jiangxi 330096, China;

2. Jiangxi Cooperation Demonstration Base of Food Science and Biotechnology Research, College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang Jiangxi 330022, China)

Abstract: The recombinant *Pichia pastoris* strain infected with pPIC9-csn/GS115 for expression of chitosanase was high cell density cultured in a 5 L fermentor. As a result, the yield of chitosanase was $4\ 200\ \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$, the chitosanase fermentation product was purified to above 95% by ethanol concentration, dialysis and cation exchange chromatography. In addition, the recombinant chitosanase showed the same mode of action as the wild chitosanase, produced the final product chitotriose and were optimal at the temperature of 60 °C and pH of 6.0.

Key words: recombinant chitosanase; *Pichia pastoris*; high density fermentation

(责任编辑: 刘显亮)