



引用格式:许丹云,王维,马爱民.融合疏水蛋白在毕赤酵母中的表达及其性质研究[J].轻工学报,2018,33(6):71-81.

中图分类号:TS201;S646.1 文献标识码:A

DOI:10.3969/j.issn.2096-1553.2018.06.009

文章编号:2096-1553(2018)06-0071-11

融合疏水蛋白在毕赤酵母中的表达及其性质研究

Study on expression of fusion hydrophobin in *Pichia pastoris* and its properties

许丹云,王维,马爱民

XU Danyun, WANG Wei, MA Aimin

华中农业大学 食品科学技术学院,湖北 武汉 430070

College of Food Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

关键词:

融合疏水蛋白;毕赤酵母;转化子;响应面分析;乳化性;起泡性

Key words:

fusion hydrophobin;
Pichia pastoris;
transformant;
response surface
optimization;
emulsibility; foamability

摘要:运用基因改造方法,将不同来源的 I 型疏水蛋白基因(平菇的 *Po. hyd1* 和香菇的 *Le. hyd*) 拼接后,构建融合表达载体 pPIC9k-*Po. hyd1-Le. hyd*,并将其电转化到毕赤酵母 GS115 感受态细胞中,经 PCR 验证和遗传霉素 G418 的抗性筛选,得到 3 个高效表达的毕赤酵母转化子;运用三氟乙酸方法分离纯化发酵上清液中的融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd*,经检测其单体分子量约为 26 kD。运用单因素试验和响应面分析试验优化,得到毕赤酵母转化子的最佳诱导表达条件为碳源(甲醇)质量分数为 0.62%,氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨)=1:2)质量浓度为 8.39 g/L,发酵培养基的初始 pH 值为 6.05,YNB 质量浓度为 100 mg/L,装液量为 50 mL,初始 OD_{600} 值为 1.2。此时融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 的产量最高可达 30 mg/L。对融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 起泡性和乳化性的研究发现,其蛋白性质均优于从平菇菌丝中提取的疏水融合蛋白。

收稿日期:2018-07-24

基金项目:国家自然科学基金项目(30771502)

作者简介:许丹云(1990—),女,广东省汕头市人,华中农业大学博士研究生,主要研究方向为食品生物技术。

通信作者:马爱民(1965—),男,湖北省天门市人,华中农业大学教授,主要研究方向为食品生物技术。

Abstract: Two hydrophobin genes, *Po. hyd1* of *Pleurotus ostreatus* and *Le. hyd* of *Lentinula edodes* were ligated to construct the expression vector pPIC9k-*Po. hyd1-Le. hyd*, and then it was transferred into the *Pichia pastoris* GS115 competent cells by electroporation. After PCR validation and geneticin G418 resistance screening, three highly expressed *Pichia pastoris* transformants were obtained. After separation and purification of fusion hydrophobin *Po. hyd1-Le. hyd* from fermentation supernatant by the trifluoroacetic acid method, it showed that its monomer was about 26 kD. The fermentation conditions of *P. pastoris* were optimized by single factor and response surface analysis and the best fermentation conditions were showed as followed: the mass fraction of carbon source (methanol) was 0.62%, the mass concentration of nitrogen source (m (yeast extract) : m (peptone) = 1 : 2) was 8.39 g/L, the initial pH value of the fermentation medium was 6.05, the mass concentration of YNB was 100 mg/L, the fluid amount was 50 mL and the initial OD₆₀₀ value was 1.2. Under the above conditions, the maximum yield of the fusion hydrophobin *Po. hyd1-Le. hyd* could be up to 30 mg/L. The foaming and emulsifying properties of the fusion hydrophobin *Po. hyd1-Le. hyd* were investigated and they were all better than that of fusion hydrophobin extracted from the *Pleurotus ostreatus* mycelium.

0 引言

疏水蛋白是由丝状真菌分泌所产生的一类具有特殊理化性质的小分子量两性蛋白,这类蛋白约含有 100 个氨基酸,分子量约为 10 kD^[1]. 根据氨基酸排列方式和性质的不同,疏水蛋白被分为 I 型疏水蛋白和 II 型疏水蛋白两种^[2]. I 型疏水蛋白聚合物具有高度的不溶解性,只解离于强酸(如甲酸和三氟乙酸等); II 型疏水蛋白形成的蛋白膜稳定性较差,可溶于特定质量分数或体积分数的 SDS 溶液或乙醇溶液^[3-4]. 两种疏水蛋白的氨基酸序列保守性都很低,但在结构上存在共性,即都含有由 8 个半胱氨酸残基形成的 4 个二硫键. 这一特殊的结构使疏水蛋白能在亲水和疏水界面自组装形成纳米级蛋白薄膜,使疏水性表面具有可湿性、亲水性表面具有疏水性^[5-6],因此,疏水蛋白是一种天然的表面活性剂.

疏水蛋白特殊的结构与性质使它具有广阔的应用前景:在食品方面,可作为食品的稳定剂,也可用于充气食品生产^[7]和食品保鲜^[8]等;在医学方面,可作为生物医学材料^[9-10];在蛋白质分离应用^[11]、蛋白(酶)固定化^[12]和生物传感器电极修饰^[13]等方面,也都具有潜在的应用价值. 然而,从天然丝状真菌提取疏水蛋白产

量较低,且真菌的生长周期长,因此限制了疏水蛋白的推广与应用. 为了提高疏水蛋白的产量,已有研究通过原核和真核表达系统分离纯化疏水蛋白^[14]. 例如,在大肠杆菌表达系统中, I 型疏水蛋白的产量仅为毕赤酵母中的 1/100 ~ 1/10^[15-17],且外源蛋白只有部分活性^[14];而毕赤酵母作为另一种常见的异源表达系统,具有生长速度快、培养成本低、适合表达真核生物蛋白等优势^[18].

本研究拟通过基因改造,将不同来源的 I 型疏水蛋白基因(平菇的 *Po. hyd1* 和香菇的 *Le. hyd*) 拼接后,构建融合表达载体,并将其电转化到毕赤酵母 GS115 感受态细胞中,再经 PCR 验证和遗传霉素抗性的筛选,获得高效表达的毕赤酵母转化子;运用单因素试验和响应面分析试验,优化毕赤酵母转化子的诱导表达条件,研究融合疏水蛋白的起泡性和乳化性,以期对疏水蛋白的改性和应用提供参考.

1 材料与amp;方法

1.1 菌株与质粒

平菇 P739, 香菇 L54, 毕赤酵母 GS115, pPIC9k 质粒,由华中农业大学食品科学技术学院微生物实验室保存.

1.2 试剂与仪器

主要试剂:大肠杆菌 DH5 α , pMD18-T 克隆载体,限制性内切酶 *Asu* II, *Xho* I, *Not* I, *Sac* I, T₄ DNA Ligase, TaKaRa RNAiso TM plus, TaKaRa 公司产;配制 PCR 体系试剂, DNA 分子量标准, 低分子量蛋白标准, TransScript[®] One-Stepg DNA Removal, cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒, TransGen 公司产;凝胶纯化试剂盒、回收试剂盒、质粒提取试剂盒, Axygen 公司产; SDS-PAGE 试剂盒, 谷歌生物公司产;葡萄糖 (AR)、甲醇 (AR)、酵母提取物 (AR)、蛋白胨 (AR)、考马斯亮蓝 R-250 (BR)、考马斯亮蓝 G-250 (AR)、十二烷基硫酸钠 (SDS)、牛血清白蛋白 (BSA, BR)、国药集团化学试剂有限公司产;遗传霉素 (G418, AR)、酵母无氨基酸氮源 (YNB, AR), Biosharp 公司产;三氟乙酸 (TFA, AR), Sigma 公司产;Bradford 蛋白定量试剂盒, Tiangen 公司产;引物合成, 天一辉远有限公司。

毕赤酵母培养及诱导所用的培养基 YPD, MM, MD, BMGY, BMMY 都参照 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册配制。

主要仪器: LRH - 150B 型生化培养箱, 广东省医疗器械厂产; T100 型 PCR 仪, Bio-Rad 公司产; GEL LOGIC 200 型凝胶成像分析系统, Kodak 公司产; 722 型可见分光光度计, 上海精密科学仪器有限公司; Centrifuge 5417R 型高速冷冻离心机, Eppendorf 公司产; Micro pulser 电

转化仪, Bio-Rad 公司产; LD plus 型冷冻干燥机, 德国 Christ 公司产; JY92 - IIN scientz 超声波细胞破碎仪, 上海京灿实业有限公司产。

1.3 实验方法

1.3.1 基因克隆与载体构建

将平菇 P739 和香菇 L54 接种在 PDA 平板上, 当菌丝长满平板时, 收集菌丝。平菇 P739 和香菇 L54 总 RNA 的提取与 cDNA 的合成参照 TaKaRa RNAiso TM plus, TransScript[®] One-Stepg DNA Removal 和 cDNA Synthesis SuperMix 试剂盒的使用说明书。根据 NCBI 公布的平菇和香菇的疏水蛋白基因序列 (GenBank: AF331452 和 AF217807.1), 并利用软件 Primer 5.0 设计的引物序列见表 1。

以平菇 P739 的 cDNA 为模板, 运用引物 *Po. hyd1*-F/R 扩增平菇 P739 疏水蛋白基因 *Po. hyd1*。扩增条件: 95 °C 5 min, 95 °C 30 s, 61 °C 30 s, 72 °C 30 s, 循环数为 34 个。同理, 以香菇 L54 的 cDNA 为模板, 用引物 *Le. hyd*-F/R 扩增疏水蛋白基因 *Le. hyd*, 除退火温度为 58 °C 外, 其余条件同前。胶回收 PCR 扩增得到的产物, 并将产物与 pMD18-T 克隆载体连接后, 转化到大肠杆菌 DH5 α 细胞中。菌落送往天一辉远有限公司测序。分别提取含有 *Po. hyd1* 和 *Le. hyd* 基因的质粒, 并分别用限制性内切酶 *Asu* II, *Xho* I 和 *Xho* I, *Not* I 双酶切 PCR 纯化产物, 同时用 *Asu* II, *Not* I 双酶切 pPIC9k 质粒, 通过酶连方法构建表达载体 pPIC9k-*Po. hyd1*-*Le. hyd*

表 1 所用引物序列

Table1 Primers used in this study

| 引物名称 | 序列(5' → 3') | 说明 |
|--------------------|---|--------------------------------|
| <i>Po. hyd1</i> -F | <u>CGAGCTCTACCTAGGATGTTCTCCAAGGCCAC</u> | 扩增 <i>Po. hyd1</i> 基因 (去除 TAA) |
| <i>Po. hyd1</i> -R | <u>CCGCTCGAGAAGACTGACGTTGGTGCA</u> | |
| <i>Le. hyd</i> -F | <u>CCGCTCGAGATGCTTTCTTTGCTCTCCA</u> | 扩增 <i>Le. hyd</i> 基因 |
| <i>Le. hyd</i> -R | <u>AAATATGCGCCGCCTAGAGTTGCAAGGGACT</u> | |
| α -factor | TACTATTGCCAGCATTGCTG | 转化子验证引物 |
| Aox1-3 | GCAAATGCCATTCTGACAT | |
| M13F | CGCCAGGGTTTTCCCACTCACGAC | 测序引物 |
| M13R | AGCGGATAACAATTCACACAGGA | |

注: 下划线部分表示酶切位点

如图 1 所示.

1.3.2 电击转化与转化子筛选

参照 Invitrogen 公司的毕赤酵母表达手册, 将 pPIC9k-Po. *hyd1*-Le. *hyd* 质粒经 *Sac* I 线性化后, 电转化到毕赤酵母 GS115 的感受态细胞中. 将转化子对应接种到以葡萄糖为碳源的 MD 和以甲醇为碳源的 MM 培养基上, 选择在 MM 和 MD 培养基上均能生长的转化子, 并筛选出 His⁺ Mut⁺ 表型转化子. 用 α -factor/*Aox1*-3 引物对转化子进行菌落 PCR 验证, 再将所筛选得到的转化子分别接种在含有不同质量浓度 (0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL, 2.0 mg/mL, 3.0 mg/mL, 4.0 mg/mL 和 5.0 mg/mL) 的遗传霉素的 YPD 培养基上, 筛选出高效表达的毕赤酵母转化子, 并选择在高浓度 G418 中能生长的高效表达的毕赤酵母转化子.

1.3.3 诱导表达条件的优化

1.3.3.1 最佳表达时间的优化 将筛选得到的高效表达的毕赤酵母转化子接种于 25 mL BMGY 培养基中, 以转化 pPIC9k 质粒的毕赤酵母 GS115 菌株作为对照, 于 28 °C 条件下振荡培养 16 ~ 18 h. 进而于 3000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清, 将细胞重悬于适当体积的 BMMY 培养基中, 培养至 OD₆₀₀ 值为 1.0 ~ 2.0,

并于 250 r/min, 30 °C 条件下继续振荡培养. 诱导开始后, 每隔 24 h 补加甲醇至其最终体积分数为 0.5%, 并吸取 1 mL 发酵上清液, 于 12 000 r/min 条件下离心 5 min, 取上清, 用 SDS-PAGE 检测发酵上清液融合疏水蛋白质量浓度, 以确定其最佳收获表达时间.

采用 Bradford 法^[19] 制备牛血清蛋白标准曲线. 从发酵液的上清中取 15 μ L 样品加入到试管中, 用 PBS 缓冲液补足 150 μ L, 再加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250, 充分混合, 静置 5 min 后用分光光度计测定吸光值, 以不含 BSA 的样品作为空白对照, 记录读数, 通过牛血清蛋白的标准曲线方程计算发酵上清液中蛋白的质量浓度, 通过比较上清液中的蛋白含量得到最佳表达时间.

1.3.3.2 单因素试验 选择碳源(甲醇)质量分数, 氮源(*m*(酵母提取物) : *m*(蛋白胨) = 1 : 2)质量浓度, YNB 质量浓度, 发酵培养基的初始 pH 值, 装液量, 初始 OD₆₀₀ 值作为影响毕赤酵母表达的因素. 以 BMMY 为诱导表达的基础营养培养基, 如无特殊说明, 均在初始接种量 OD₆₀₀ 值为 1.0, 装液量为 50 mL (250 mL 三角瓶中), 温度为 28 °C, 转速为 180 r/min 的条件下进行诱导表达. 各因素不同条件设定如下: 碳源(甲醇)质量分数为 0.4%, 0.6%, 0.8%, 1.0% 和 1.2%, 每 24 h 添加 1 次; 氮源(*m*(酵母提取物) : *m*(蛋白胨) = 1 : 2)质量浓度为 4.0 g/L, 6.0 g/L, 8.0 g/L, 10.0 g/L 和 12.0 g/L; YNB 质量浓度为 60 mg/L, 80 mg/L, 100 mg/L, 120 mg/L 和 140 mg/L; 发酵培养基的初始 pH 值为 5.2, 5.6, 6.0, 6.4 和 6.8; 装液量为 30 mL, 40 mL, 50 mL, 60 mL 和 70 mL; 初始 OD₆₀₀ 值为 0.6, 0.8, 1.0, 1.2 和 1.4. 根据不同因素进行诱导表达, 取第 4 d 的发酵上清液, 进行融合疏水蛋白质量浓度的测定与分析.

1.3.3.3 响应面试验 在单因素试验的基础

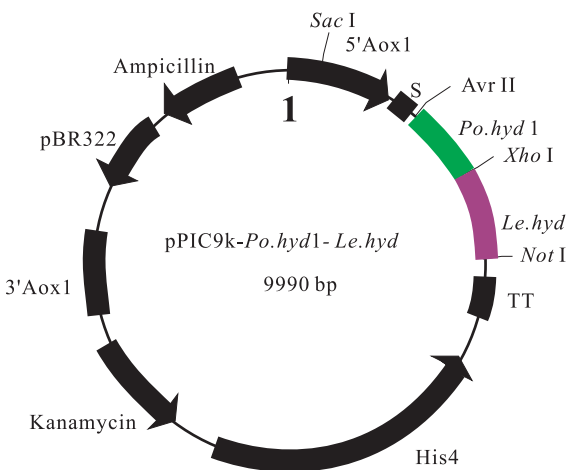


图 1 pPIC9k-Po. *hyd1*-Le. *hyd* 载体图
Fig. 1 pPIC9k-Po. *hyd1*-Le. *hyd* portrait

上,以发酵上清液中融合疏水蛋白质量浓度为响应值,选取对菌体生长影响显著的3个因素,即碳源(甲醇)质量分数(X_1)、发酵培养基的初始pH值(X_2)和氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨)=1:2)质量浓度(X_3),根据Box-Behnken的中心组合设计原理,设计三因素三水平的响应面分析试验。

1.3.4 最佳优化条件下融合疏水蛋白得率的测定 将高效表达的毕赤酵母转化子按照优化后的最佳诱导表达条件培养1L的培养基,按照马爱民等^[20]报道的方法提取发酵上清液融合疏水蛋白,并对沉淀进行称重。

1.3.5 融合疏水蛋白的起泡性和乳化性分析方法 取适量融合疏水蛋白沉淀,加入少量三氟乙酸于4℃溶解30min,经氮气吹干后加适量去离子水4℃静置溶解,配制成50μg/mL的新鲜融合疏水蛋白溶液,以用于研究融合疏水蛋白的性质。分别取10mL质量浓度为50μg/mL的新鲜融合疏水蛋白*Po. hyd1*-*Le. hyd*溶液、平菇疏水蛋白*Po. hyd1*溶液、SDS溶液和蛋白质BSA溶液,经超声波细胞破碎仪均质处理30s(振幅70%),量取起始泡沫高度和30min后泡沫高度^[21]。根据以下两个公式分别计算4种样品的起泡性(*FC*)和泡沫稳定性(*FS*):

$$FC = \text{起始泡沫高度} / \text{总的液面高度}$$

$$FS = 30 \text{ min 后泡沫高度} / \text{起始泡沫高度}$$

分别取10mL新鲜融合疏水蛋白*Po. hyd1*-*Le. hyd*,平菇疏水蛋白*Po. hyd1*溶液和SDS溶液,各加入5mL的食用油,同时用经过相同处理后的去离子水作空白对照。将配制好的样品,用超声波细胞破碎仪均质处理30s(振幅60%),制成乳化液。分别在0min和15min时取0.5mL乳化液置于50mL的容量瓶中,加入质量浓度为50μg/mL的SDS溶液定容并摇匀,以质量浓度为50μg/mL的SDS溶液作空

白对照,在500nm处测定其吸光度 A_0 ,15min后再次测定吸光度值 A_1 ^[22]。融合疏水蛋白的乳化活性用*EA*表示,乳化稳定性用*ES*表示,即

$$EA = A_0$$

$$ES = (A_1 / A_0) \times 100 \%$$

式中, A_0 为乳化液在0min时的吸光值, A_1 为乳化液在静置15min后的吸光值。

1.4 数据分析

所有试验均重复3次,结果取平均值。采用Design Expert 8.0和Origin软件对数据进行处理。

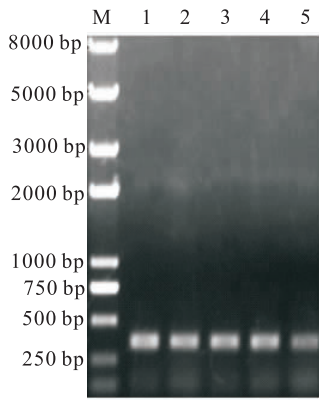
2 结果与分析

2.1 基因克隆与引物序列实验结果

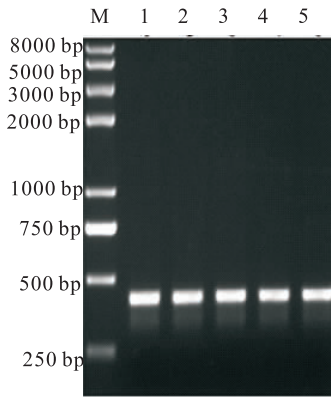
分别以平菇和香菇的cDNA为模板,经PCR扩增平菇P739的疏水蛋白基因*Po. hyd1*和香菇L54的疏水蛋白基因*Le. hyd*,扩增结果如图2a)和b)所示(M表示Trans 2K DNA marker,下同)。再将目的条带切胶回收,连接到pMDT载体上进行测序,测序结果显示:平菇P739的疏水蛋白基因*Po. hyd1*为333bp,香菇L54的疏水蛋白基因*Le. hyd*为384bp,与NCBI公布的序列一致。通过酶切酶连方法,将平菇P739的疏水蛋白基因*Po. hyd1*和香菇L54的疏水蛋白基因*Le. hyd*拼接在一起,构建pPIC9k-*Po. hyd1*-*Le. hyd*表达载体,并将该表达载体电转化到毕赤酵母GS115细胞中,酵母转化子菌落PCR验证结果如图2c)所示,共获得100个转化子。该结果与实验预期相符。

2.2 高效表达酵母转化子的筛选结果

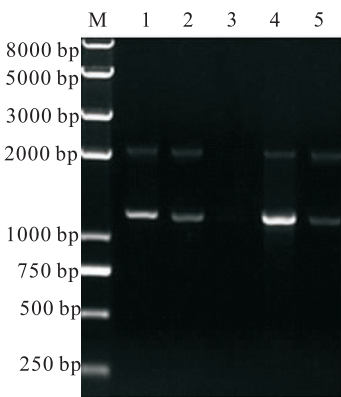
将获得的酵母转化子对应接种于MD和MM培养基上,选择在这两种培养基上生长速度相似的转化子,即为His⁺Mut⁺表型的转化子。再将转化子对应接种于G418抗性平板上进行高效表达酵母转化子的筛选(如图3所示),最终筛选出3个高效表达酵母转化子。



a)平菇P739疏水蛋白基因*Po.hyd1*扩增结果



b)香菇L54疏水蛋白基因*Le.hyd*扩增结果



c)酵母转化子菌落PCR验证结果

图2 疏水蛋白基因扩增与酵母转化子的菌落PCR验证

Fig.2 Gene amplification of hydrophobic protein and colony PCR confirmation of yeast transformants

2.3 酵母转化子的诱导表达

随机挑取一个高效表达酵母转化子进行诱导表达实验,每天收集发酵上清液,并进行 SDS-PAGE 检测,结果如图 4a)所示(M 表示低分子量蛋白质标准,下同;1 表示 96 h 空质粒酵

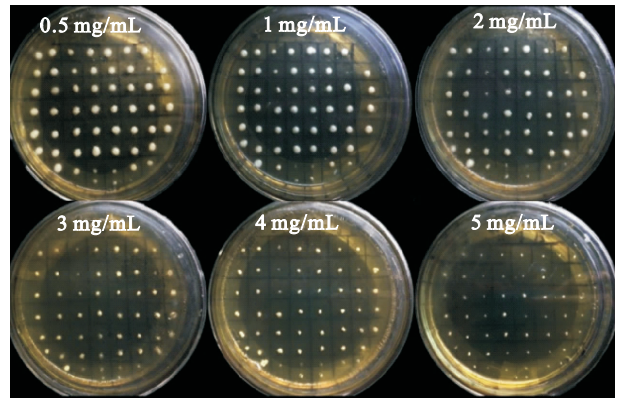


图3 高效表达酵母转化子的筛选

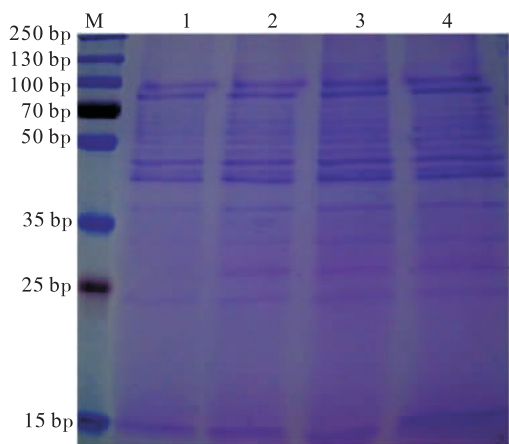
Fig.3 Screening of multicopy transformants

母发酵上清液;2—4 分别表示 48 h,72 h,96 h 重组质粒酵母发酵上清液)。图 4a)显示:含有重组表达质粒的酵母菌在 26 kD 左右有条带,而含空质粒的毕赤酵母则没有.这表明该高效酵母转化子能成功表达目的蛋白.利用三氟乙酸法分离纯化目的蛋白,并进行 SDS-PAGE 分析,结果如图 4b)所示.由图 4b)可知,在 1 号泳道 26 kD 处有明显的条带,与融合疏水蛋白理论值相符合,且没有其他杂带.这表明分离纯化成功.

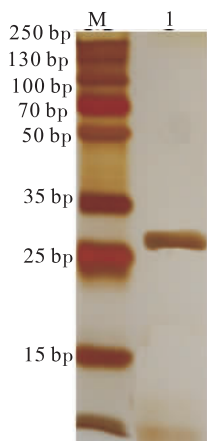
由图 5 所示牛血清蛋白标准曲线可以得到,测定蛋白质量浓度的方程为 $y = 0.0153x$, $R^2 = 0.99876$. 分别测定每天发酵上清液的蛋白质量浓度,结果如图 6 所示.由图 6 可知,酵母菌的最佳诱导表达时间为诱导后第 4 d.

2.4 诱导表达条件的优化结果

2.4.1 单因素试验结果 单因素试验结果如图 7 所示.其中,不同发酵培养基的初始 pH 值、不同碳源(甲醇)质量分数和不同氮源($m(\text{酵母提取物}) : m(\text{蛋白胨}) = 1 : 2$)质量浓度对酵母表达影响较大,因此选取这 3 个因素进行进一步的响应面优化试验.由于其他 3 个因素对酵母表达影响较小,后续试验将 YNB 的质量浓度设定为 100 mg/L,装液量设定为 50 mL,初始 OD_{600} 值设定为 1.2.



a)不同诱导表达时间的发酵上清液蛋白SDS-PAGE分析结果



b)分离纯化后重组蛋白SDS-PAGE分析结果

图4 诱导表达的重组蛋白 SDS-PAGE 分析结果
Fig.4 Results of inducible expression recombinant proteins by SDS-PAGE analysis

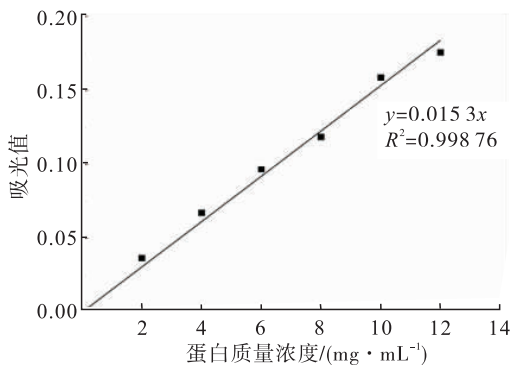


图5 牛血清蛋白标准曲线

Fig.5 The standard curve of bovine seroprotein

2.4.2 响应面试验结果 在单因素试验的基础上设计多因素试验,试验因素与水平选择见表2.

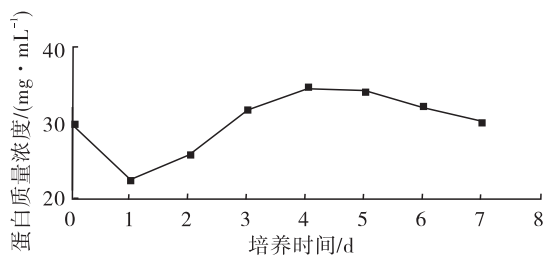


图6 培养时间对发酵液蛋白质量浓度的影响
Fig.6 Effect of induction time on protein content in fermentation broth

表2 试验因素与水平表

Table 2 Test factors and levels table

| 水平 | $X_1/\%$ | X_2 | $X_3/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ |
|----|----------|-------|--------------------------------------|
| -1 | 0.4 | 5.6 | 6.0 |
| 0 | 0.6 | 6.0 | 8.0 |
| 1 | 0.8 | 6.4 | 10.0 |

利用 Design-Expert8.0 软件对响应面的试验数据进行多元回归拟合,得到发酵上清液融合疏水蛋白质量浓度(Y_1)对培养基碳源(甲醇)质量分数(X_1)、氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨) = 1 : 2)质量浓度(X_2)和发酵培养基的初始 pH 值(X_3)的二次多项回归模型方程为

$$Y_1 = -541.1075 + 84.075X_1 + 12.12875X_2 + 165.09375X_3 - 0.875X_1X_2 + 0.625X_1X_3 - 0.09375X_2X_3 - 65.0625X_1^2 - 0.65687X_2^2 - 13.60938X_3^2$$

对该模型的方差分析结果见表3.由表3可知,碳源(甲醇)质量分数(X_1)、氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨) = 1 : 2)质量浓度(X_2)和发酵培养基的初始 pH 值(X_3)对重组毕赤酵母产融合疏水蛋白都比较重要,尤其是氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨) = 1 : 2)质量浓度(X_2)特别显著; X_1X_2 对融合疏水蛋白表达交互影响显著, X_1X_3 和 X_2X_3 交互影响不显著; X_1^2 , X_2^2 和 X_3^2 对融合疏水蛋白表达量有着重要的曲面影响.

根据Box-Behnken原理,各因素响应面交

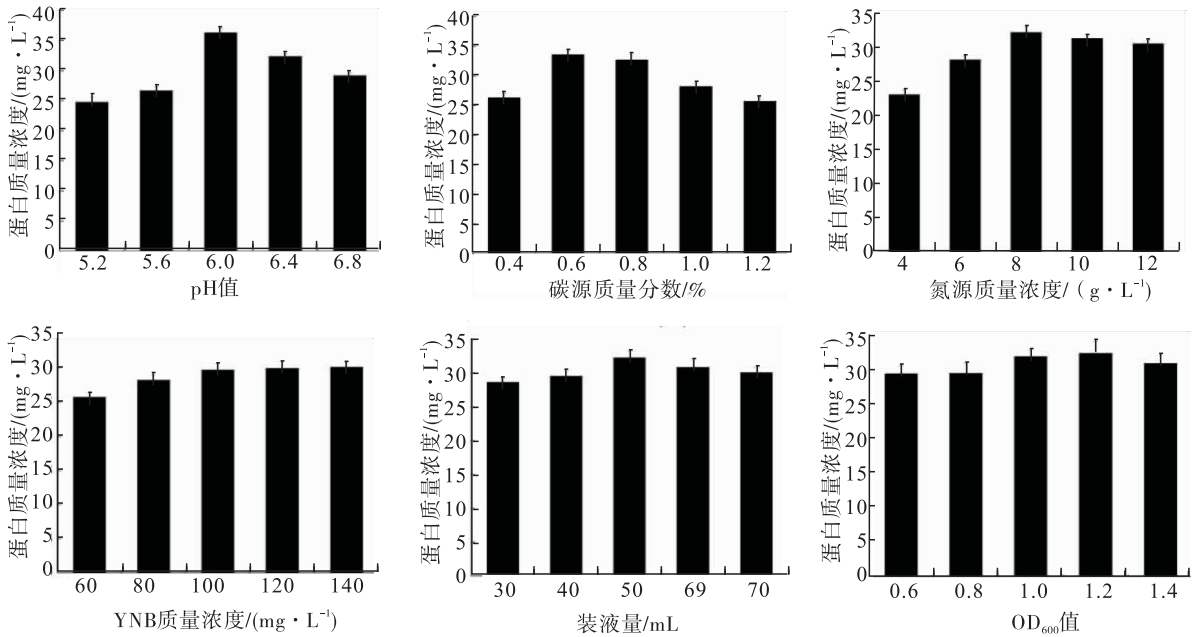


图7 单因素试验结果

Fig. 7 Results of single factor experiments

表3 方差分析结果

Table 3 Results of variance analysis

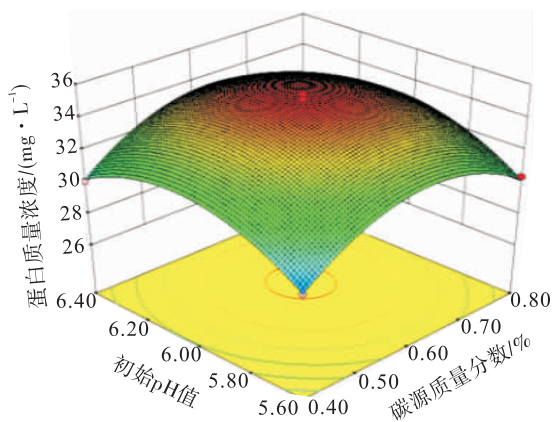
| 方差来源 | F 值 | P 值 |
|----------|--------|-----------|
| 模型 | 101.09 | < 0.000 1 |
| X_1 | 2.42 | 0.007 4 |
| X_2 | 9.03 | 0.000 2 |
| X_3 | 2.53 | 0.006 6 |
| X_1X_2 | 0.49 | 0.137 6 |
| X_1X_3 | 0.01 | 0.817 6 |
| X_2X_3 | 0.02 | 0.730 0 |
| X_1^2 | 28.52 | < 0.000 1 |
| X_2^2 | 29.07 | < 0.000 1 |
| X_3^2 | 19.96 | < 0.000 1 |

互作用的分析结果如图8所示. 理论的最佳培养条件为:碳源(甲醇)质量分数为0.62%,氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨)=1:2)质量浓度为8.39 g/L,发酵培养基的初始pH值为6.05, YNB质量浓度为100 mg/L,装液量为50 mL,初始 OD_{600} 值为1.2,此时融合疏水蛋白的表达量可达最高值35.244 6 mg/L. 根据理论的最佳培养条件对毕赤酵母转化子进行诱导培养,可从1 L的发酵液中分离纯化融合疏水蛋白粉末30 mg.

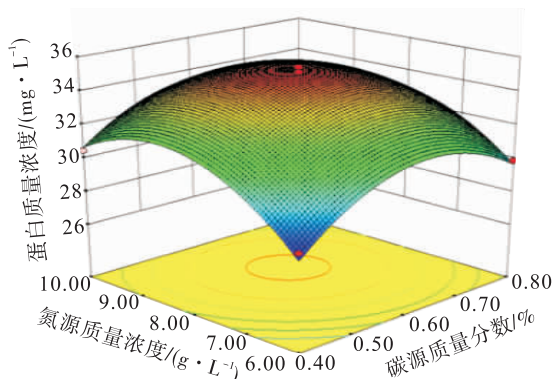
2.5 融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 的性质分析

2.5.1 融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 的起泡性和泡沫稳定性

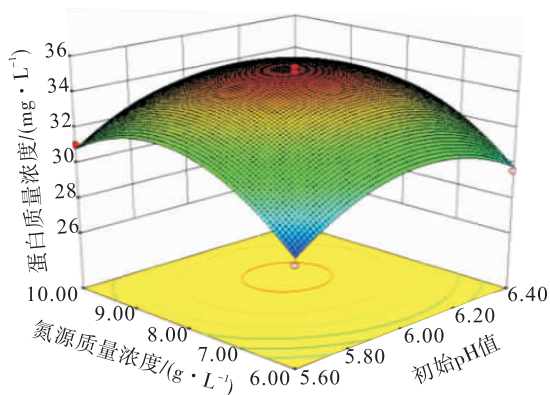
样品的起泡性和泡沫稳定性实验结果见表4. 由表4可知,4种样品的起泡性(FC)大小排序为:融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 溶液 > 平菇疏水蛋白 *Po. hyd1* 溶液 > 表面活性剂 SDS 溶液 > 蛋白质 BSA 溶液. 其中,融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 溶液的起泡性能分别是平菇疏水蛋白 *Po. hyd1* 溶液、表面活性剂 SDS 溶液和蛋白质 BSA 溶液的1.21倍、1.53倍和2.76倍. 另外,4种样品的泡沫稳定性(FS)大小排序为:融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* > 平菇疏水蛋白 *Po. hyd1* 溶液 > 蛋白质 BSA 溶液 > 表面活性剂 SDS 溶液. 其中,融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 溶液的泡沫稳定性分别是平菇疏水蛋白 *Po. hyd1* 溶液、表面活性剂 SDS 溶液和蛋白质 BSA 溶液的1.16倍、2.99倍和2.01倍. 由此可见,融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 的起泡性和泡沫稳定性都优于平菇疏水蛋白、传统



a)初始pH值和碳源质量分数对发酵液上清液蛋白质质量浓度的影响



b)氮源质量浓度和碳源质量分数对发酵液上清液蛋白质质量浓度的影响



c)氮源质量浓度和初始pH值对发酵液上清液蛋白质质量浓度的影响

图8 各因素响应面交互作用的分析结果

Fig. 8 Response surface analysis of interaction of various factors

的表面活性剂 SDS 和蛋白质 BSA.

2.5.2 融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 的乳化性和乳化稳定性 样品的乳化性和乳化稳定性实验结果见表5. 由表5可知,4种样品的乳化指数(EA)大小排序为:融合疏水蛋白 *Po. hyd1-*

Le. hyd 溶液 > 平菇疏水蛋白 *Po. hyd1* 溶液 > 表面活性剂 SDS 溶液 > 去离子水. 另外,4种样品的乳化稳定性指数(ES)大小排序为:融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 溶液 > 平菇疏水蛋白 *Po. hyd1* 溶液 > 表面活性剂 SDS 溶液 > 去离子水. 由此可见,融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 的乳化性和乳化稳定性都优于平菇疏水蛋白、传统的表面活性剂 SDS 和去离子水.

表4 样品的起泡性和泡沫稳定性

Table 4 Formability and foam stability of samples

| 样品 | 初始泡沫高度/mm | 30 min 泡沫高度/mm | 总液体高度/mm | FC/% | FS/% |
|-----------------------------------|-----------|----------------|----------|------|-------|
| 融合疏水蛋白 <i>Po. hyd1-Le. hyd</i> 溶液 | 34.2 | 28.4 | 50 | 68.4 | 83.04 |
| 平菇疏水蛋白 <i>Po. hyd1</i> 溶液 | 28.2 | 20.1 | 50 | 56.4 | 71.28 |
| 表面活性剂 SDS 溶液 | 22.3 | 6.2 | 50 | 44.6 | 27.80 |
| 蛋白质 BSA 溶液 | 12.4 | 5.1 | 50 | 24.8 | 41.29 |

表5 样品的乳化性和乳化稳定性

Table 5 Emulsifying and emulsifying stability of samples

| 样品 | 吸光度值 A | 15 min 后吸光度值 A ₁ | EA | ES |
|-----------------------------------|--------|-----------------------------|------|-------|
| 融合疏水蛋白 <i>Po. hyd1-Le. hyd</i> 溶液 | 0.841 | 0.835 | 84.1 | 14.89 |
| 平菇疏水蛋白 <i>Po. hyd1</i> 溶液 | 0.717 | 0.692 | 71.2 | 14.48 |
| 表面活性剂 SDS 溶液 | 0.535 | 0.486 | 53.5 | 13.63 |
| 去离子水 | 0.228 | 0.192 | 22.8 | 12.63 |

3 结语

本研究通过基因改造方法,将不同来源的 I 型疏水蛋白基因(平菇的 *Po. hyd1* 和香菇的 *Le. hyd*) 经拼接后构建融合表达载体 pPIC9k-*Po. hyd1-Le. hyd*, 并将其电转化到毕赤酵母 GS115 感受态细胞中,经 PCR 扩增和遗传霉素抗性筛选,得到 3 个高效表达的毕赤酵母转化子;通过三氟乙酸方法分离纯化发酵上清液中的融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd*, 经检测其单

体分子量约为 26 kD. 应用单因素试验和响应面分析试验进行优化, 得到毕赤酵母转化子的最佳诱导表达条件为: 碳源(甲醇)质量分数为 0.62%, 氮源(m (酵母提取物): m (蛋白胨) = 1:2)质量浓度为 8.39 g/L, 发酵培养基的初始 pH 值为 6.05, YNB 质量浓度为 100 mg/L, 装液量为 50 mL, 初始 OD₆₀₀ 值为 1.2. 此时融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 可达最高产量 30 mg/L. 对融合疏水蛋白 *Po. hyd1-Le. hyd* 的起泡性和乳化性研究发现, 其蛋白性质均优于从平菇菌丝中提取的疏水融合蛋白.

参考文献:

- [1] WESSELS J G H. Fungal hydrophobins: proteins that function at an interface [J]. *Trends in Plant Science*, 1996, 1(1):9.
- [2] WÖSTEN H A B, de VOCHT M L. Hydrophobins, the fungal coat unraveled [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2000, 1469(2):79.
- [3] LUGONES L G, WÖSTEN H A B, BIRKENKAMP K U, et al. Hydrophobins line air channels in fruiting bodies of *Schizophyllum commune* and *Agaricus bisporus* [J]. *Mycological Research*, 1999, 103(5):735.
- [4] LINDER M B. Hydrophobins: proteins that self assemble at interfaces [J]. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 2009, 14(5):356.
- [5] 丁靖志, 于雷, 王洪辉, 等. 真菌疏水蛋白的结构和功用 [J]. *生物学杂志*, 2004, 21(5):8.
- [6] 林福呈. 真菌疏水蛋白的研究进展 [J]. *微生物学报*, 2001, 41(4):518.
- [7] BLIJDENSTEIN T B J, GROOT P W N, STOYANOV S D. On the link between foam coarsening and surface rheology: Why hydrophobins are so different [J]. *Soft Matter*, 2010, 6(8):1799.
- [8] BURKE J, COX A, PETKOV J, et al. Interfacial rheology and stability of air bubbles stabilized by mixtures of hydrophobin and β -casein [J]. *Food Hydrocolloids*, 2014, 34(1):119.
- [9] WÖSTEN H A, SCHOLTMEIJER K. Applications of hydrophobins: current state and perspectives [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2015, 99(4):1587.
- [10] HEKTOR H J, SCHOLTMEIJER K. Hydrophobins: proteins with potential [J]. *Biotechnology*, 2005, 16(4):434.
- [11] LINDER M, SELBER K, NAKARI-SETÄLÄ T, et al. The hydrophobins HFBI and HFBII from *Trichoderma reesei* showing efficient interactions with nonionic surfactants in aqueous two-phase systems [J]. *Biomacromolecules*, 2001, 2(2):511.
- [12] ZHAO Z X, WANG H C, QIN X, et al. Self-assembled film of hydrophobins on gold surfaces and its application to electrochemical biosensing [J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 71(1):102.
- [13] LAAKSONEN P, KAINLAURI M, LAAKSONEN T, et al. Interfacial engineering by proteins: exfoliation and functionalization of graphene by hydrophobins [J]. *Angewandte Chemie-International Edition*, 2010, 49(29):4946.
- [14] 王泽芳. 疏水蛋白 HGFI 的表达、功能应用及自组装机理研究 [D]. 天津: 南开大学, 2010.
- [15] KIISKINEN L L, KRUIUS K, BAILEY M, et al. Expression of *Melanocarpus albomyces* laccase in *Trichoderma reesei* and characterization of the purified enzyme [J]. *Microbiology*, 2004, 150(9):3065.
- [16] KUDO T, SATO Y, TASAKI Y, et al. Heterogeneous expression and emulsifying activity of class I hydrophobin from *Pholiota nameko* [J]. *Mycoscience*, 2011, 52(4):283.
- [17] MORRIS V K, KWAN A H, MACKAY J P,

- et al. Analysis of the structure and conformational states of DewA gives insight into the assembly of the fungal hydrophobins [J]. *Journal of Molecular Biology*, 2013, 425(2):244.
- [18] ROTHAN H A, TEH S H, Haron K, et al. A comparative study on the expression, purification and functional characterization of human adiponectin in *Pichia pastoris* and *Escherichia coli* [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2012, 13(3):3549.
- [19] BRADFORD M M. Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248.
- [20] 马爱民,单麟军,杜昭平,等. 糙皮侧耳(平菇)疏水蛋白的分离纯化及其界面自组装特性研究 [J]. *菌物学报*, 2007, 26(4):557.
- [21] 沈心好,许时婴,王璋. 番茄籽蛋白的功能和结构 [J]. *食品科学*, 2005, 26(11):42.
- [22] 顾楠,张子沛,吴锦波,等. 不同处理方式对鹰嘴豆分离蛋白乳化性质的影响 [J]. *食品工业科技*, 2011, 32(12):158.
-
- (上接第 54 页)
- [42] ZHU J, CHEN M, HE Q, et al. An overview of the engineered graphene nanostructures and nanocomposites [J]. *Rsc Advances*, 2013, 3(45):22790.
- [43] HUANG J, ZHAO L, WANG T, et al. NIR-Triggered rapid shape memory PAM-GO-Gelatin hydrogels with high mechanical strength [J]. *Acs Applied Materials & Interfaces*, 2016, 8(19):12384.
- [44] PIAO Y, CHEN B. One-pot synthesis and characterization of reduced graphene oxide-gelatin nanocomposite hydrogels [J]. *Rsc Advances*, 2016, 6(8):6171.
- [45] HASSANZADEH P, KAZEMZADEHNARBAT M, ROSENZWEIG R, et al. Ultrastrong and flexible hybrid hydrogels based on solution self-assembly of chitin nanofibers in gelatin methacryloyl (GelMA) [J]. *J Mater Chem B Mater Biol Med*, 2016, 4(15):2539.
- [46] NAN L, WEI C, CHEN G, et al. Rapid shape memory TEMPO-oxidized cellulose nanofibers/polyacrylamide/gelatin hydrogels with enhanced mechanical strength [J]. *Carbohydrate Polymers*, 2017, 171:77.