



引用格式:杜少平,胡海艳,甘祥武,等. 重组毕赤酵母产 β -甘露聚糖酶的高密度发酵研究[J]. 轻工学报,2020,35(4):1-7.

中图分类号:TS201.3 文献标识码:A

DOI:10.12187/2020.04.001

文章编号:2096-1553(2020)04-0001-07

重组毕赤酵母产 β -甘露聚糖酶的高密度发酵研究

Study on high-density fermentation of β -mannanase produced by constitutive *Pichia pastoris*

杜少平,胡海艳,甘祥武,黄秀敏,叶俊豪

DU Shaoping, HU Haiyan, GAN Xiangwu, HUANG Xiumin, YE Junhao

广州市微生物研究所,广东 广州 510663

Guangzhou Institute of Microbiology, Guangzhou 510663, China

关键词:

β -甘露聚糖酶;毕赤酵母;高密度发酵;发酵调控

Key words:

β -mannanase;
Pichia pastoris;
high-density
fermentation;
fermentation control

摘要:通过摇瓶实验,对重组毕赤酵母 X-33/pGAPZ α A-Man26A-39 发酵培养基的碳源、氮源进行筛选,并在 50 L 发酵罐中采用间歇流加策略,对其发酵条件进行调控,以实现重组毕赤酵母高密度发酵产 β -甘露聚糖酶.结果表明:葡萄糖为发酵培养基的最适碳源,其初始添加质量浓度为 30 g/L;初始质量分数为 6% 的玉米浆作为发酵培养基的氮源较为适宜;在间歇补料发酵调控中,通过间歇流加体积分数为 25% 的氨水、质量分数为 50% 的葡萄糖溶液和质量分数为 20% 的玉米浆,可使发酵液 pH 值维持在 5.0~5.5 之间,且保证发酵培养基的碳源、氮源充足;发酵 60 h 时采取放罐措施,此时酶活力可达 2 685.5 U/mL,菌体质量浓度达 331.1 g/L,OD₆₀₀达 302.8,实现了 β -甘露聚糖酶的高效表达.

收稿日期:2020-05-21

基金项目:广州市科技计划项目(201710010154)

作者简介:杜少平(1974—),男,广东省丰顺县人,广州市微生物研究所高级工程师,主要研究方向为微生物技术与相关检测.

通信作者:胡海艳(1985—),女,湖南省株洲市人,广州市微生物研究所工程师,主要研究方向为微生物代谢产品利用与微生物防控.

Abstract: The carbon and nitrogen sources of the constitutive *Pichia pastoris* X-33/pGAPZ α A-Man26A-39 fermentation medium were optimized by shake flask experiment, and the fermentation conditions were regulated in a 50 L fermentor by using intermittent feeding strategy, in order to realize high-density fermentation of constitutive *Pichia pastoris* to produce β -mannanase. The results showed that glucose was the most suitable carbon source for fermentation medium, and its initial concentration was 30 g/L; corn syrup was the most suitable nitrogen source, and its initial mass fraction was 6%; during the regulation of intermittent fed fermentation, the pH value of bacteria could be maintained between 5.0 ~ 5.5 by intermittent flow adding 25% ammonia hydroxide, 50% glucose solution and 20% corn syrup, and make sure the carbon and nitrogen sources of the fermentation medium were sufficient; after 60 h fermentation, took measures to put the fermenter tank, at this time, the maximum enzyme activity was 2 685.5 U/mL, the mass concentration of bacteria reached 331.1 g/L, and the OD_{600} reached 302.8, which achieved the high expression of β -mannanase.

0 引言

甘露聚糖作为半纤维素的第二大组分^[1-2],广泛存在于各种植物组织中^[3].甘露聚糖是籽实类植物细胞壁的主要组成成分,在豆粕、芝麻粕、油菜籽粕等常用饲料原料中含量丰富.甘露聚糖在单胃动物的消化道内会呈凝胶状,使消化道内容物具有较强的黏性,从而影响单胃动物对营养物质的消化吸收,最终影响单胃动物的生长和饲料的利用率^[4]. β -甘露聚糖酶能够水解甘露聚糖类有机物,将广泛存在于豆类籽实中的甘露聚糖等多糖降解为甘露寡糖等低聚糖,消除甘露聚糖对单胃动物消化道内各种营养物质的抗营养作用.同时,生成的甘露低聚糖不仅对促进单胃动物的生长起着重要作用,而且具有促进单胃动物肠道内以双歧杆菌为代表的有益菌群的增殖、改善肠道内菌群结构、排除体内毒素、增强机体免疫防御能力等多种功能,已被广泛应用于饲料、医药、食品、精细化工等领域^[5-6].

由于单胃动物摄食和饲料加工的特殊需求,业界要求应用于饲料生产的工业用 β -甘露聚糖酶具有耐热、耐酸和高酶活力的特性,因此,如何获得产耐热、耐酸且酶活力较高的 β -甘露聚糖酶的菌株成为研究热点^[7-8].由于大多数 β -甘露聚糖酶在原始菌株中表达较低,

利用基因工程菌毕赤酵母进行表达以提高 β -甘露聚糖酶的产量是目前普遍采用的方法.本研究团队前期以 β -甘露聚糖酶的成熟肽序列为对象,根据毕赤酵母密码子偏爱性,人工设计合成了该酶的基因,以毕赤酵母 X-33 为宿主菌,选用 GAP 启动子,构建了能高效表达的重组工程菌株,再通过易错 PCR 对 β -甘露聚糖酶进行定向突变和筛选,获得产耐热、耐酸且酶活力较高的 β -甘露聚糖酶的突变菌株,即含有 β -甘露聚糖酶基因的重组毕赤酵母 X-33/pGAPZ α A-Man26A-39.鉴于目前鲜见具有耐热、耐酸和高酶活力的 β -甘露聚糖酶工业化量产的相关报道^[9],本文在前期实验的基础上,拟通过摇瓶实验进一步筛选重组毕赤酵母 X-33/pGAPZ α A-Man26A-39的碳源、氮源,确定 50 L 发酵罐中的发酵调控策略,以获得 β -甘露聚糖酶的高密度发酵工业化量产工艺,实现重组毕赤酵母高密度发酵表达 β -甘露聚糖酶,为 β -甘露聚糖酶的工业化生产提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 菌种与试剂 菌种:重组毕赤酵母 X-33/pGAPZ α A-Man26A-39 (*Pichia pastoris* 26A-39),由广州市微生物研究所实验室保存.

主要试剂: β -甘露聚糖酶,美国 Sigma 公

司产;酵母提取物、蛋白胨,湖北安琪酵母股份有限公司产;玉米浆,山东康源生物科技有限公司产;博莱霉素(Zeocin),美国 Intitrogen 公司产;其他试剂,均为国产分析纯或生化试剂。

1.1.2 培养基 斜面培养基(YPD 培养基):葡萄糖 20 g,蛋白胨 20 g,酵母提取物 10 g,琼脂粉 20 g,去离子水定容至 1000 mL。

YPDS 培养基:在 YPD 培养基中添加质量浓度为 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 Zeocin。

PTM1 溶液: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 6.0 g, NaI 0.08 g, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.0 g, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, H_3BO_3 0.02 g, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, ZnCl_2 20.0 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 65.0 g, 体积分数为 98% 的 H_2SO_4 5.0 mL, 去离子水定容至 1000 mL。

BSM 培养基^[8]:葡萄糖 20 g, 质量分数为 85% 的 H_3PO_4 26.7 mL, KOH 4.13 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g, CaCl_2 0.38 g, K_2SO_4 18.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 14.9 g, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.93 g, PTM1 溶液 4 mL, 去离子水定容至 1000 mL。

种子培养基(改良的 BSM 培养基):葡萄糖 20 g, 酵母提取物 3 g, 蛋白胨 3 g, 质量分数为 85% 的 H_3PO_4 27 mL, CaSO_4 4 g, K_2SO_4 20 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 15 g, KOH 4 g, PTM1 溶液 0.45 mL, 调 pH 值为 5.0, 去离子水定容至 1000 mL。

碳源选择培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g, K_2SO_4 4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 另在其中添加质量浓度分别为 20 g/L, 25 g/L, 30 g/L, 35 g/L, 40 g/L 的葡萄糖或甘油作为碳源, 生物素 1 mg, 消泡剂 0.25 mL, PTM1 溶液 4.3 mL, 消泡后调 pH 值为 5.3 ~ 5.4, 去离子水定容至 1000 mL。

氮源选择培养基: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g, K_2SO_4 4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 另在其中添加质量分数分别为 2%, 4%, 6% 的棉籽粉、豆粉或玉米浆作为氮源, 生物素

1 mg, 消泡剂 0.25 mL, PTM1 溶液 4.3 mL, 消泡后调 pH 值为 5.3 ~ 5.4, 去离子水定容至 1000 mL; BSM 培养基; YPD 培养基。

发酵培养基:葡萄糖 30 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5 g, KH_2PO_4 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 g, K_2SO_4 4 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, 生物素 1 mg, 消泡剂 0.25 mL, PTM1 溶液 0.45 mL, 去离子水定容至 1000 mL。

营养盐溶液: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 100 g, KH_2PO_4 100 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 70 g, 去离子水定容至 1000 mL。

发酵补料流加液配方: V (质量分数为 50% 的葡萄糖溶液) : V (营养盐溶液) = 10 : 1。

以上培养基于 121 $^\circ\text{C}$ 条件下灭菌 20 min, 其中, 葡萄糖、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 单独灭菌, 生物素经过滤膜除菌后添加, PTM1 溶液于添加消泡剂后加入。

1.1.3 仪器与设备 LRH-250 型生化培养箱, 上海一恒科学仪器有限公司产; DHZ-DA 型水平摇床, 江苏太仓市实验设备厂产; PHS-3C 型 pH 计、752N 型紫外分光光度计, 上海仪电科学仪器股份有限公司产; SMART 型显微镜, 重庆奥特光学仪器有限公司产; 5427R 型高速低温离心机, 德国 Eppendorf 公司产。

1.2 实验方法

1.2.1 菌种活化与种子液的制备方法 将毕赤酵母 X-33/pGAPZ α -Man26A-39 菌种转接入 YPDS 培养基平板中, 于 28 $^\circ\text{C}$ 条件下培养 3 d; 挑取平板培养基上较大的单菌落, 接入 YPD 液体培养基装液量为 5 mL 的 50 mL 摇瓶中, 于 30 $^\circ\text{C}$, 180 r/min 条件下振荡培养至 OD_{600} 为 2.0 左右, 再转接至种子培养基中, 于 28 $^\circ\text{C}$, 200 r/min 条件下振荡培养至 OD_{600} 为 4.0 ~ 6.0; 最后进行镜检, 若视野中的毕赤酵母菌饱满、均匀、单个或两个成串, 则此时的种子培养液可以作为发酵种子液备用。

1.2.2 培养基碳源的筛选方法 将种子液分别转接至添加了葡萄糖或甘油的碳源选择培养基中,接种量为2%,装液量为100 mL(500 mL摇瓶),于30 ℃,180 r/min条件下振荡培养72 h,每隔12 h取样,测试其酶活力。

1.2.3 培养基氮源的筛选方法 将种子液分别转接至添加了棉籽粉、豆粉或玉米浆的氮源选择培养基和BSM培养基中,以YPD培养基为对照.接种量为2%,装液量为100 mL(500 mL摇瓶),于30 ℃,180 r/min条件下振荡培养72 h,每隔12 h取样,测试其酶活力。

1.2.4 间歇补料发酵调控方法 发酵条件:将种子液转接至50 L发酵罐中,接种量为10%,通气量为1.1~1.5 vvm,溶氧30%~80%,用体积分数为25%的氨水维持发酵液pH值为5.0~5.5,发酵培养基的初始体积为20 L。

间歇补料发酵调控:当菌株开始生长后,溶氧会降低,此时间段为10~14 h.待葡萄糖质量分数降至1%后,开始流加质量分数为50%的葡萄糖溶液(含PTM1溶液),并保持葡萄糖在1%~3%之间,且每次补料葡萄糖后可保持残糖质量浓度为2 g/L;待玉米浆质量分数降至4%后,开始流加质量分数为20%的玉米浆(含PTM1溶液),并保持玉米浆在4%~8%之间.保持溶氧在20%以上,当溶氧低于20%时,可通过加大转速、降低温度、降低菌株的比生长速率等,待溶氧恢复后继续进行发酵补料流加。

1.2.5 测试方法 菌体质量浓度测定:采用湿重法,取10 mL发酵液,于9000 r/min条件下离心5 min,弃去上清液,称菌体湿重。

酶活力测定^[7]:将45 ℃,pH值为5.0的条件下,每min水解底物产生1 μmol甘露聚糖所需的酶量定义为1个酶活力单位(U/mL).取直径为15 mm的15 mL的洁净刻度试管,分别标记空白组、对照组、测试组,分别加入1.5 mL质量分数为0.5%的甘露聚糖溶液(pH值为

5.0)作为底物,于45 ℃水浴预热5 min;仅在测试组中加入稀释适当倍数的0.5 mL β-甘露聚糖酶液(已预热),在45 ℃水浴下反应10 min,反应期间需间歇轻轻摇晃均匀,10 min后立即分别加入2 mL DNS溶液终止反应;仅在对照组中加入0.5 mL β-甘露聚糖酶液,立即置于沸水中煮沸15 min进行显色反应后,迅速用冰水或者流水冷却至室温,再用蒸馏水定容至15 mL,颠倒混匀;以空白组为基准调零,在分光光度计540 nm波长处测定其吸光度值。

还原糖测定^[10]:采用DNS法,DO值、pH值等由探头直接读取。

2 结果与分析

2.1 培养基碳源的筛选结果分析

与乙醇氧化酶AOX1启动子仅能靠甲醇诱导表达不同,pGAP(三磷酸甘油醛脱氢酶启动子)重组表达选用GAP启动子可以利用甘油、葡萄糖、甲醇为碳源.本实验在摇瓶中重点比较了不同碳源(甘油和葡萄糖)对β-甘露聚糖酶表达的影响,结果如图1所示.由图1可以看出,重组毕赤酵母在利用甘油与葡萄糖高密度发酵产β-甘露聚糖酶的差异不明显,但在达到酶活力峰值时,葡萄糖的质量浓度为25 g/L,甘

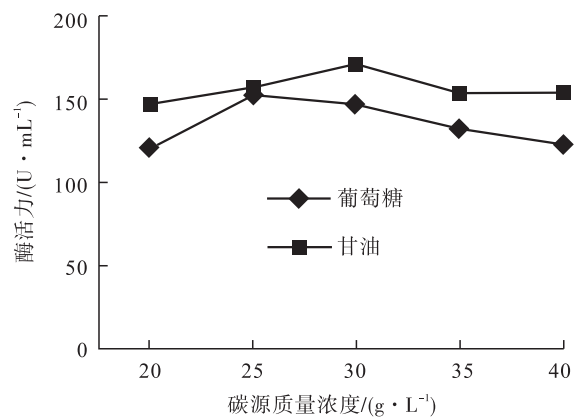


图1 不同碳源对β-甘露聚糖酶表达的影响

Fig. 1 The influence of different carbon sources on β-mannanase expression

油质量浓度为 30 g/L. 虽然葡萄糖对 β -甘露聚糖酶表达的影响稍低于甘油,但性价比却优于甘油. 综合考虑,选择葡萄糖作为培养基的碳源较为适宜.

不同初始葡萄糖质量浓度对菌体生长的影响如图 2 所示. 由图 2 可以看出,菌体在前 36 h 基本都以指数形式快速增长,36 h 后增长较为平缓. 不同初始葡萄糖质量浓度下菌体的生长动力学参数见表 1. 由表 1 可知,当添加质量浓度为 25~30 g/L 的葡萄糖时,最大细胞生产强度较高,能够以较快的速度产生菌体. 而在重组毕赤酵母发酵生产中,补料流加前需要进行一段分批发酵,使菌体生长达到后续补料流加工

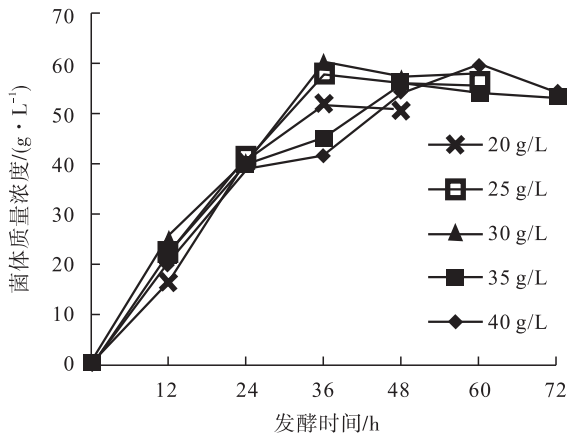


图 2 不同初始葡萄糖质量浓度对菌体生长的影响

Fig. 2 The influence of different initial glucose concentration on the growth of bacteria

表 1 不同初始葡萄糖质量浓度下菌体的生长动力学参数

Table 1 The bacteria kinetic parameters of different initial glucose concentration

初糖质量浓度/ (g·L ⁻¹)	残糖质量浓度/ (g·L ⁻¹)	最大菌体质量浓度/ (g·L ⁻¹)	达到最大生物量的 时间/h	最大细胞生产强度/ (g·L ⁻¹ ·h ⁻¹)	细胞平均产率/ (g·g ⁻¹)
20	1.59	52.01	36	1.44	2.83
25	1.77	57.56	36	1.60	2.48
30	2.05	60.21	36	1.67	2.15
35	2.30	55.97	48	1.17	1.71
40	2.51	59.38	60	0.99	1.58

艺所需的菌体质量浓度. 综合考虑,选择初始葡萄糖质量浓度为 30 g/L.

2.2 培养基氮源的筛选结果分析

不同氮源对 β -甘露聚糖酶表达的影响如图 3 所示. 由图 3 可以看出,因 YPD 培养基中有蛋白胨和酵母提取粉作为氮源,故其对重组毕赤酵母高密度发酵产 β -甘露聚糖酶的影响最显著,酶活力可达 420 U/mL;BSM 培养基由于缺乏氮源,酶活力仅为 60 U/mL;添加不同质量分数的棉籽粉、豆粉或玉米浆均能促进细胞产酶,但酶活力均低于 YPD 培养基,其中,当添加质量分数为 6% 的玉米浆时,可以较好地促进 β -甘露聚糖酶的表达,此时酶活力可达 352 U/mL,是 YPD 培养基酶活力的 84%. 考虑到玉米浆相对于蛋白胨和酵母提取粉作为氮源更为廉价,故在下一步的间歇补料发酵调控中,选择初始质量分数为 6% 的玉米浆作为培养基的氮源.

2.3 间歇补料发酵调控结果分析

基于现有生产设备条件,间歇补料发酵仍是业界经常采用的补料策略. 重组毕赤酵母间歇补料发酵曲线如图 4 所示. 由图 4 可以看出,发酵过程中,酶活力由 5.0 U/mL 一直增至 2 685.5 U/mL,在发酵的前 12 h,酶活力基本保

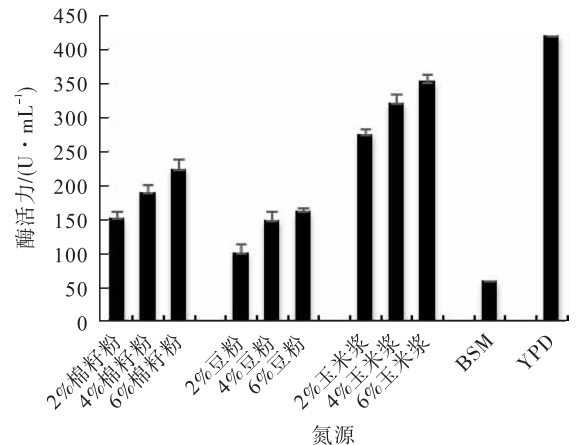


图 3 不同氮源对 β -甘露聚糖酶表达的影响

Fig. 3 The influence of different nitrogen sources on β -mannanase expression

持稳定,12 h 后开始急速增加,54 h 后增长趋缓;菌体质量浓度由 11.2 g/L 一直增至 331.1 g/L,在发酵的前 14 h,菌体质量浓度基本保持稳定,14 h 后迅速增加,40 h 后基本保持稳定; OD_{600} 由初始的 2.1 增加到 302.8,在发酵的前 12 h, OD_{600} 基本保持不变,随后一直保持增加的趋势.间歇补料发酵罐上的监测指标如图 5 所示.由图 5 可以看出,溶氧由开始发酵时的 86% 一直减少到 13%,在发酵的前 22 h,溶氧均控制在 30% 以上,而在发酵的 24~48 h 内基本能控制在 20% 左右,此时发酵罐的通气量达到最大值 2500 L/min,转速达到 350 r/min.开始发酵时,葡萄糖质量分数约为 3%,10 h 时降到 1%,到 18 h 时,葡萄糖消耗过快,开始流

加质量分数为 50% 的葡萄糖溶液,使其基本维持在 1%~3%,同时,间歇补加 20% 的玉米浆,以保证发酵培养基的碳源、氮源充足.通过流加体积分数为 25% 的氨水,可使 pH 值维持在 5.0~5.5,但发酵末期 pH 值有上升的趋势,最终升至 5.7.由于发酵过程中溶氧降低,且发酵体积近 35 L,体积较大,不利于继续高密度发酵和间歇流加营养物质,故在发酵 60 h 时采取了放罐措施,此时酶活力达 2 685.5 U/mL,菌体质量浓度达 331.1 g/L, OD_{600} 达 302.8.

3 结论

本文在前期筛选获得产耐热、耐酸且酶活力较高的 β -甘露聚糖酶的突变菌株重组毕赤

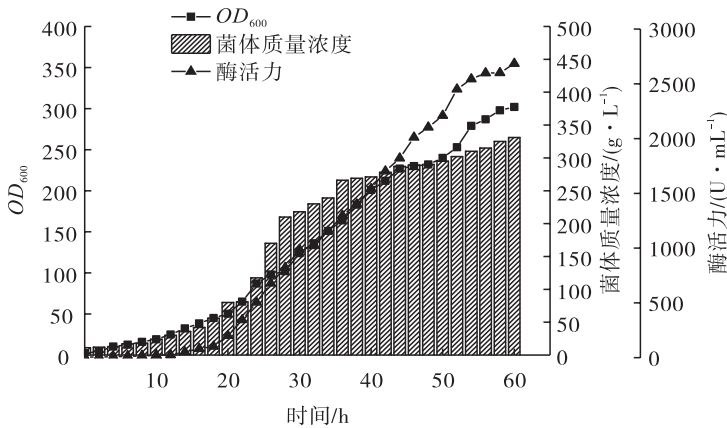


图 4 间歇补料发酵曲线

Fig. 4 The curve of intermission fed-batch fermentation

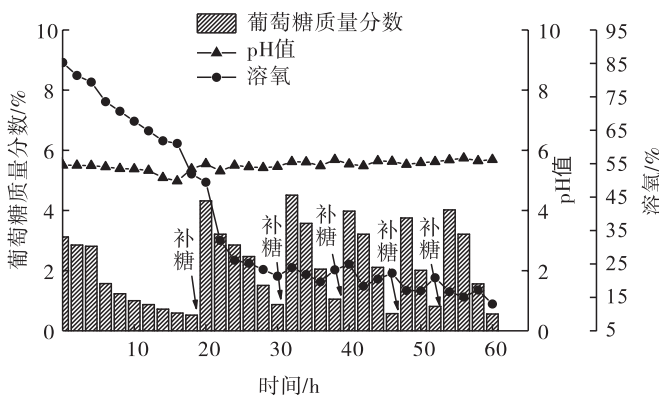


图 5 间歇补料发酵罐上的监测指标

Fig. 5 Monitoring indicators of intermission fed-batch fermentater

酵母 X-33/pGAPZ α A-Man26A-39 基础上,通过摇瓶实验,重点比较了不同碳源、不同氮源对重组毕赤酵母发酵产 β -甘露聚糖酶的影响,并在 50 L 发酵罐中采用间歇流加策略对发酵条件进行调控,结果表明,葡萄糖更适合作为发酵培养基的碳源,且其初始最适质量浓度为 30 g/L;初始质量分数为 6% 的玉米浆作为发酵培养基的氮源较为适宜;在间歇补料发酵调控中,通过间歇流加体积分数为 25% 的氨水、质量分数为 50% 的葡萄糖溶液和质量分数为 20% 的玉米浆,可使发酵液 pH 值维持在 5.0 ~ 5.5,且保证发酵培养基的碳源、氮源充足;在发酵 60 h 时采取放罐措施,此时最大酶活力可达 2 685.5 U/mL,菌体质量浓度达 331.1 g/L, OD_{600} 达 302.8,实现了重组毕赤酵母高密度发酵产 β -甘露聚糖酶.本研究可为 β -甘露聚糖酶工业化生产提供参考,对满足单胃动物摄食和饲料加工的特殊需求,进而推动饲料、食品等领域相关产品的研发具有重要意义.

参考文献:

- [1] SCHELLER H V, ULVSKOV P. Hemicelluloses [J]. Annual Review of Plant Biology, 2010, 61: 263.
- [2] STÅLBRAND H, SIIKAAHO M, TENKANEN M, et al. Purification and characterization of two β -mannanases from *Trichoderma reesei* [J]. Journal of Biotechnology, 1993, 29(3): 229.
- [3] KANSOH A L, NAGIEB Z A. Xylanase and mannanase enzymes from *Streptomyces galbus* NR and their use in biobleaching of softwood kraft pulp [J]. Antonie Van Leeuwenhoek, 2004, 85(2): 103.
- [4] NUNES C S, MALMLÖF K. Effects of guar gum and cellulose on glucose absorption, hormonal release and hepatic metabolism in the pig [J]. British Journal of Nutrition, 1992, 68(3): 693.
- [5] BHAT M K. Cellulases and related enzymes in biotechnology [J]. Biotechnology Advances, 2000, 18(5): 355.
- [6] 熊进, 黄魁英, 夏枫耿, 等. 耐高温 β -甘露聚糖酶 M27-8 菌株发酵条件的优化 [J]. 中国饲料, 2017, 19: 13.
- [7] 吴秀秀, 吕晓慧, 胡亚冬, 等. 耐高温耐酸稳定假密环菌 (*Armillariella tabescens*) MAN47 β -甘露聚糖酶体外分子定向进化 [J]. 中国生物工程杂志, 2012, 32(3): 83.
- [8] ZHAO W, ZHENG J, ZHOU H B, et al. A thermotolerant and cold-active mannan endo-1,4- β -mannosidase from *Aspergillus niger* CBS 513.88: Constitutive overexpression and high-density fermentation in *Pichia pastoris* [J]. Bioresource Technology, 2011, 102: 7538.
- [9] ZHENG J, ZHAO W, GUO N, et al. Development of an industrial medium and a novel fed-batch strategy for high-level expression of recombinant β -mannanase by *Pichia pastoris* [J]. Bioresource Technology, 2012, 118: 257.
- [10] 赵凯, 许鹏举, 谷光桦. 3,5-二硝基水杨酸比色法测定还原糖含量的研究 [J]. 食品科学, 2008, 29(8): 534.