

基于组合优化策略在毕赤酵母中高效表达 杜邦嗜热菌脂肪酶

汪步青¹, 陈洲¹, 王亚森¹, 许向阳², 高晓冬¹, 藤田盛久¹, 李子杰¹

(1. 江南大学生物工程学院, 江苏无锡 214122; 2. 枣庄市杰诺生物酶有限公司, 山东枣庄 277100)

摘要:杜邦嗜热菌脂肪酶(LIP1)是一种在洗涤行业、生物柴油制备、油脂改性等领域具有良好应用潜力的碱性脂肪酶,然而其天然产量极低,难以满足产业化需求。采用组合优化策略筛选出高效表达LIP1的毕赤酵母重组菌株。首先,构建毕赤酵母密码子偏好性优化的LIP1基因,通过高浓度G418抗性平板和BMMY-罗丹明B定性平板筛选出脂肪酶活性较高的重组菌株;其次,利用信号肽优化和分子伴侣共表达优化筛选得到一株高效表达的重组毕赤酵母菌株GS115/pPIC9K-Mss-SSA4-LIP1,采用碱滴定法测定其酶活,采用比色法测定其底物特异性。结果表明,经组合优化策略筛选出的菌株在摇瓶和5 L发酵罐中发酵最高分泌酶活分别达到1 136 U/mL和12 150 U/mL。底物特异性结果显示重组脂肪酶LIP1最适底物为C8链长的对硝基苯酚酯。综上所述,基于组合优化策略实现了LIP1在毕赤酵母中的高效表达,为未来LIP1的产业化奠定基础。

关键词:杜邦嗜热菌脂肪酶(LIP1);组合优化策略;毕赤酵母;高密度表达;底物特异性

中图分类号:Q812;Q819

文献标识码:A

文章编号:1003-7969(2022)07-0125-07

High-efficient expression of *Thermomyces dupontii* lipase in *Pichia pastoris* based on combinatorial optimization strategy

WANG Buqing¹, CHEN Zhou¹, WANG Yasen¹, XU Xiangyang²,
GAO Xiaodong¹, FUJITA Morihisa¹, LI Zijie¹

(1. School of Bioengineering, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China; 2. Zaozhuang Jienuo Biological Enzyme Co., Ltd., Zaozhuang 277100, Shandong, China)

Abstract: *Thermomyces dupontii* lipase (LIP1) is an alkaline lipase, which possesses good application potential in washing industry, biodiesel preparation, oil modification, etc. However, the natural productivity of LIP1 is extremely too low to meet the requirements of industrial application. A combinatorial optimization strategy was applied for the screening of *Pichia pastoris* strain highly expressing LIP1. Firstly, a *Pichia pastoris* preferred codon optimized LIP1 gene was constructed, and the recombinant strain with higher LIP1 gene copy numbers was screened through high-concentration G418 plates and BMMY-rhodamine B qualitative plates. Moreover, through signal peptides optimization and chaperone co-expression optimization, a high-productivity recombinant *Pichia pastoris* strain GS115/pPIC9K-Mss-SSA4-LIP1 was obtained. The enzyme activity was determined by alkali titration, and the substrate specificity

was determined by colorimetric assay. The results showed that the highest secretive activity of the strain after combinatorial optimization strategy could reach 1 136 U/mL in flask fermentation and 12 150 U/mL in 5 L fermenter. The substrate specificity result showed that the most suitable substrate for *Pichia pastoris* recombinant LIP1 was *p*-nitrophenol ester with eight carbons. In

收稿日期:2021-08-20;修回日期:2022-02-22

基金项目:山东省重点研发计划重大科技创新工程(2019 JZZY011006)

作者简介:汪步青(1995),男,在读博士,研究方向为毕赤酵母高效表达系统的开发和应用(E-mail)wbq199522@126.com。

通信作者:藤田盛久,教授(E-mail)fujita@jiangnan.edu.cn;李子杰,副教授(E-mail)lizijie@jiangnan.edu.cn。

conclusion, the high - efficient expression of LIP1 in *Pichia pastoris* can be realized based on the combinatorial optimization strategy, which will lay the foundation for the future industrialization of LIP1.

Key words: *Thermomyces dupontii* lipase (LIP1); combinatorial optimization strategy; *Pichia pastoris*; high - density expression; substrate specificity

脂肪酶(EC 3.1.1.3)是一类广泛存在于动物、植物和微生物中的蛋白类酰基甘油水解酶,在自然条件下能够在油水混合界面催化油脂生成不同链长的游离脂肪酸、酯类和甘油等物质,而在非水相体系中参与催化酯交换、酯化、酸解和氨解等多种类型反应^[1-2]。脂肪酶具有催化效率高、反应过程温和、对底物的特异性催化活力等特性,被广泛应用于食品、洗涤剂、造纸、生物能源和生物医药等工业领域^[3-5]。

杜邦嗜热菌(*Thermomyces dupontii*)脂肪酶,即 *Talaromyces thermophilus* 脂肪酶(LIP1),是一种碱性脂肪酶,因其极高的热稳定性而广受关注,LIP1的最适催化温度为60℃,并且经70℃水浴处理1 h 依旧保持50%以上的催化活性^[6]。研究表明,LIP1在许多工业生产中具有应用潜力^[6-8]。Romdhane等^[6]研究发现,LIP1在碱性pH和不同的表面活性剂中具有良好的稳定性,有助于其作为添加剂在洗涤剂中的应用。同时,LIP1具有优异的催化酯交换活性,有助于其在生物柴油生产中的应用^[7]。此外,随着对LIP1研究的开展,其显示出具有制备手性药物中间体的潜力^[8]。然而杜邦嗜热菌培养过程复杂,LIP1发酵酶活低,生产成本过高,无法实现产业化。因此,实现LIP1高效表达尤为重要。

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)异源表达系统由于其高效表达水平、强大的分泌能力、完善的诱导表达方法以及成熟的高密度发酵能力被广泛应用于重组蛋白的表达^[9-10]。研究发现,LIP1在毕赤酵母中的摇瓶分泌酶活为156 U/mL,是其在杜邦嗜热菌中的2.6倍^[9]。因而,采用毕赤酵母表达系统是一种有效提高LIP1表达的方法。此外,据以往的研究可知,优化提升毕赤酵母高效表达效率的手段有很多,但大多数文献报道的都是单因素或双因素优化,总体的分泌表达水平提升不明显;而采用组合优化策略包括密码子偏好性优化、外源基因拷贝数的积累、更换分泌作用更强的信号肽、分子伴侣共表达优化用于过表达辅助蛋白从而促进目的蛋白修饰和分泌、强启动子优化以及高密度发酵进一步提高重组

表达效率^[11-14],可获得高水平分泌表达LIP1的重组菌株。

综上,本研究采用组合优化策略提高LIP1在毕赤酵母中的表达水平。首先,将LIP1密码子偏好性优化基因,连接至含醇氧化酶(AOX1)强启动子的质粒载体pPIC9K中,电击转化后成功构建筛选出含多拷贝LIP1基因的异源表达重组酵母菌株;在此基础上,研究了不同信号肽优化以及分子伴侣共表达对LIP1分泌表达的影响;最后,将优化筛选出的重组菌株进行高密度发酵,实现LIP1在重组酵母中高效表达和积累。总之,在本研究中,借助毕赤酵母表达体系,利用基因工程技术提高LIP1的表达量,对促进其实现产业化应用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、毕赤酵母GS115,江南大学糖化学与生物技术教育部重点实验室;表达载体pPIC9K和pPICZA,美国Invitrogen公司;DNA聚合酶、连接酶、限制性内切酶等工具酶,美国Thermo Scientific公司;其他常规试剂,国药集团;不同链长的对硝基苯酚酯(C4、C8、C10、C12、C14和C16),北京索莱宝科技有限公司;引物,无锡天霖生物有限公司。

LB、MD、YPD、BMGY、BMMY和BMMY-罗丹明B等培养基参考Invitrogen公司的毕赤酵母表达手册配制。

压力蒸汽灭菌锅(立式);无菌操作台;台式水平恒温摇床;5 L发酵罐;甲醇检测流加监控器;SDS-PAGE凝胶电泳仪、核酸凝胶电泳仪和Western Blot快速转膜系统,美国Bio-Rad公司。

1.2 试验方法

1.2.1 载体构建和毕赤酵母转化

基因合成:LIP1基因(JF414585.1)由前体肽识别序列和成熟肽编码序列构成,含HA标签,经毕赤酵母密码子偏好性优化后^[15],由无锡天霖生物有限公司合成至质粒载体PUC57中。

重组质粒载体构建:将pPIC9K和PUC57用EcoRI和NotI进行双酶切,采用DNA胶回收试剂盒进行纯

化,并用 T_4 DNA连接酶连接,热激转入*E. coli* DH5 α 中后成功构建表达载体 pPIC9K-LIP1。

毕赤酵母转化:将表达载体 pPIC9K-LIP1 经 Sal I 线性化、回收和浓缩后,电击转化至毕赤酵母 GS115 中,涂板于 MD 平板上。2~3 d 后将 MD 平板中的转化子,依次挑至含不同质量浓度(0.5、1.0、2.0、3.0 mg/mL) G418(遗传霉素)的 YPD 平板,30℃培养 2~3 d 后,筛选出含多拷贝基因的重组菌株。并将获得的重组菌株接种于 BMMY-罗丹明 B 定性筛选平板中,30℃培养 3~4 d 后筛选出透明圈大(脂肪酶水解油脂产生透明圈)的菌株用于进一步的 LIP1 的表达和检测。

1.2.2 脂肪酶在毕赤酵母中的高效表达策略

信号肽优化:根据毕赤酵母密码子偏好性优化设计信号肽 D1 signal sequence (D1ss)、D2 signal sequence (D2ss)、FLD1 signal sequence (Fss)、MFH4 signal sequence (Mss)、W1 signal sequence (Wss)、Glucoamylase signal sequence (Gss) 的基因序列,并根据上述信号肽的基因序列为模板设计引物扩增出信号肽,并经过 BamH I 和 EcoR I 双酶切后用 T_4 DNA 连接酶连接至 pPIC9K-LIP1,替换质粒 pPIC9K 中的 α -factor 信号肽,构建出质粒 pPIC9K-D1ss-LIP1、pPIC9K-D2ss-LIP1、pPIC9K-Fss-LIP1、pPIC9K-Mss-LIP1、pPIC9K-Wss-LIP1 和 pPIC9K-Gss-LIP1。并参考 1.2.1 的方法进行毕赤酵母转化,筛选出酶活高的重组菌株,作为出发菌株。

分子伴侣共表达优化:首先,在 NCBI 网站中获得分子伴侣 BMH2 (XM_002490942.1)、HAC (XP_002490039.1)、KEX2 (XM_002491154.1)、SSA4 (XM_002493814.1)、PDI (CAC33588.1) 和 UBC1 (XM_002492398.1) 的基因序列,并依据基因序列设计引物,以提取的毕赤酵母 GS115 基因组为模板,扩增出相应的分子伴侣片段。并经过 BamH I 和 EcoR I 酶切后用 T_4 DNA 连接酶连接至 pPICZA 中,构建出质粒 pPICZA-BMH2、pPICZA-HAC、pPICZA-KEX2、pPICZA-SSA4、pPICZA-PDI、pPICZA-UBC1。采用 Sal I 线性化 pPICZA-BMH2、pPICZA-KEX2、pPICZA-SSA4 和 pPICZA-UBC1, Sac I 线性化 pPICZA-HAC 和 pPICZA-PDI,回收和浓缩后,电击转化至出发菌株中,并参考 1.2.1 的方法进行毕赤酵母转化,筛选出酶活高的重组菌株。

1.2.3 毕赤酵母摇瓶发酵

将筛选出的重组菌株接种于 5 mL 的 YPD 培养基中,30℃培养 12 h,将菌液按 4% 接种量转接至

50 mL 的 BMGY 培养基中,30℃摇床培养至 OD₆₀₀ 为 20 左右,离心收集菌体,使用 50 mL 无菌水(预冷)洗两遍并离心收集,重悬于 50 mL 的 BMMY 培养基中,28℃发酵培养,每 24 h 加入 1% 的甲醇诱导,同时取上清液,采用 SDS-PAGE 和 Western Blot 检测 LIP1 的蛋白表达,并测定酶活。

1.2.4 5 L 发酵罐高密度发酵

将采用组合优化策略筛选出的重组菌株接种于 10 mL 的 YPD 培养基中,30℃培养 12 h,取菌液按 4% 接种量转接至 200 mL 的 BMGY 培养基中,30℃培养 24 h,作为发酵种子液。将发酵种子液接种于含 2 L BSM 无机盐培养基的 5 L 发酵罐中,采用 50% 磷酸和氨水自动流加调节 pH,保持 pH 为 5.5,温度为 30℃。待 BSM 无机盐培养基中甘油消耗完全,溶氧反弹后,保持发酵 pH 和温度不变进入流加甘油培养阶段,采用 DO-Star 方式流加甘油,待湿重达到 220 g/L 以上时,停止甘油流加并饥饿处理 30 min 后,进入流加甲醇诱导阶段。此时,调节 pH 至 6.0,温度至 27℃,将甲醇缓慢流加至培养液中,通过甲醇检测器检测发酵液中的甲醇含量,每隔 24 h 取样检测 OD₆₀₀、细胞干质量、脂肪酶的蛋白表达水平及上清 LIP1 酶活,甲醇诱导 7 d 后,停止流加甲醇,发酵结束。

1.2.5 重组脂肪酶的活性检测

LIP1 活性检测采用碱滴定法^[16]。在 50 mL 三角瓶中,依次加入 5 mL Tris-HCl (50 mmol/L, pH 10.0) 和 4 mL 高速匀浆机处理的橄榄油与聚乙烯醇乳化液(橄榄油与聚乙烯醇比例 1:3),在 60℃水浴中预热 5 min。加入 1 mL 60℃预热稀释的发酵上清液(空白组加入 60℃预热的 1 mL Tris-HCl),在 60℃水浴中反应 10 min 后,立即加入 15 mL 95% 乙醇溶液终止反应。向三角瓶中滴入 2 滴酚酞指示剂,采用 0.05 mol/L NaOH 标准溶液进行滴定,直至液体呈微红色并保持 30 s 内不褪色,记录消耗的 NaOH 标准溶液的体积。单位 LIP1 酶活力以每分钟产生 1 μ mol 游离脂肪酸的所需酶量表示。

1.2.6 重组脂肪酶的底物特异性检测

重组脂肪酶 LIP1 的底物特异性采用比色法^[17]测定。在 1.5 mL EP 管中加入 80 μ L Tris-HCl (50 mmol/L, pH 7.5),依次加入 10 μ L 稀释至 200 U/mL 的 1.2.3 发酵上清液和 10 μ L 不同链长的对硝基苯酚酯(C4、C8、C10、C12、C14 和 C16),35℃反应 5 min,最后加入 100 μ L 1% 的 SDS 溶液终止反应,在 405 nm 下测定吸光值,以测定酶活最高时底物下的酶活为 100%,计算其他底物下的相对酶活。

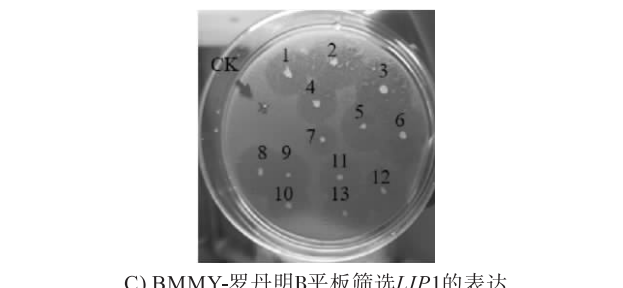
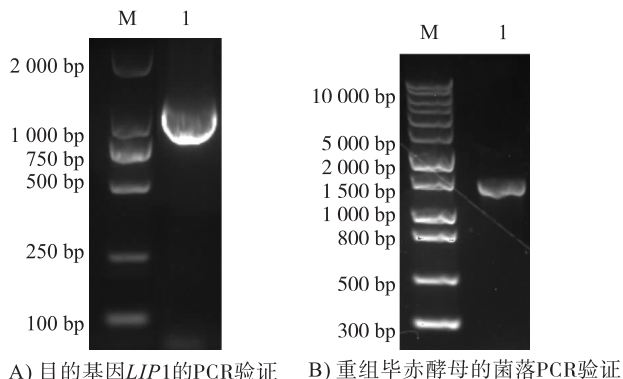
1.2.7 数据处理

所有试验进行3次平行,结果以平均值表示。采用 Origin 8.1 软件对数据进行作图,同时进行单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 载体构建和毕赤酵母转化

按 1.2.1 方法进行载体的构建和毕赤酵母转化,菌落 PCR 验证和 BMMY - 罗丹明 B 平板筛选结果见图 1。



注:M. DNA Marker;1. 特异性引物 PCR 验证产物(图 A); 1. 毕赤酵母阳性转化子菌落 PCR(图 B);CK. GS115/pPIC9K(图 C);1~13. GS115/pPIC9K - LIP1(图 C)

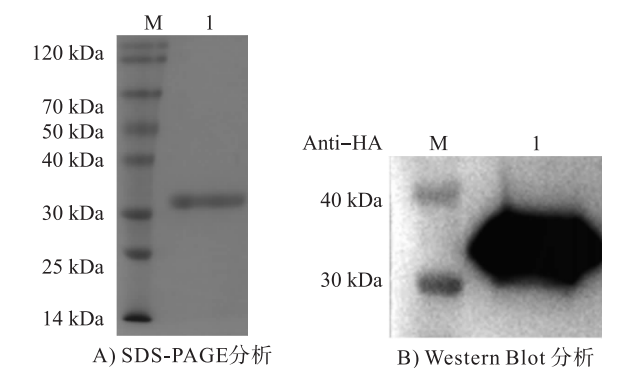
图 1 菌落 PCR 验证和 BMMY - 罗丹明 B 平板筛选结果

由图 1A 可看出, LIP1(含 HA 标签)全长为 870 bp,与重组质粒经 LIP1 上下游特异性引物 PCR 获得的条带大小一致,说明重组质粒载体 pPIC9K -

LIP1 构建成功。由图 1B 可看出,经 G418 的 YPD 平板梯度筛选出的含多拷贝基因重组菌株,采用 pPIC9K 通用引物进行菌落 PCR 验证发现,结果与预期相符。由图 1C 可看出,重组菌株经 BMMY - 罗丹明 B 平板培养,平板上出现大小不一的透明圈,筛选存在最大透明圈的菌株用于 LIP1 的表达。

2.2 脂肪酶在毕赤酵母中的表达

将 1.2.1 经 BMMY - 罗丹明 B 平板筛选的透明圈最大的重组酵母菌株 GS115/pPIC9K - LIP1 按 1.2.3 方法发酵,发酵上清液进行 SDS - PAGE 分析,并以 HA 为标签,进行 Western Blot 分析,结果如图 2 所示。由图 2A 可看出,重组菌株在约 32 kDa 处出现条带,与目的蛋白大小相符,通过碱滴定法测定 LIP1 的酶活达到 576 U/mL。由图 2B 可看出,在 32 kDa 位置确实存在条带。因此,结合 SDS - PAGE 和 Western Blot 分析结果表明 LIP1 在毕赤酵母中成功表达。



注:M. Marker; 1. 发酵上清液中的 LIP1

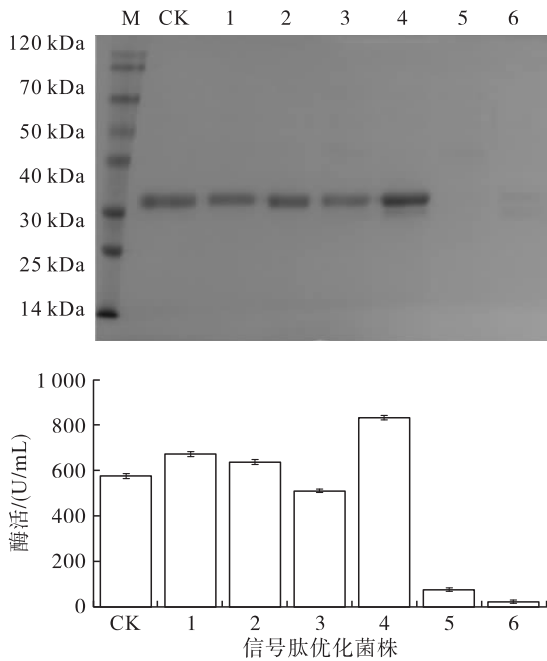
图 2 脂肪酶的 SDS - PAGE 和 Western Blot 分析

2.3 信号肽对脂肪酶在毕赤酵母中表达水平的影响
为提高 LIP1 在毕赤酵母中的分泌效率,本研究优化了 LIP1 的分泌型信号肽,如表 1 所示。

表 1 本研究所用的信号肽

信号肽	来源	氨基酸序列
D1ss	α 信号肽中去 57 ~ 70 位氨基酸的序列	MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDE TAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSASI AAKEEGVSLEKREAEA
D2ss	α 信号肽中去 57 ~ 74 位氨基酸的序列	MRFPSIFTAVLFAASSALAAPVNTTTEDE TAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFSAK EEGVSLEKREAEA
Fss	铁还原酶	MRNHLNDLVVLFLLLTVAQA
Mss	α 信号肽中增加部分氨基酸的序列	MAIPRFPSIFIAVLFAASSALAAPVNTTTE DETAQIPAEAVIGYSDLEGDFDVAVLPFS NSTNGLLEEAEEAEPKFINTTASIAAK EEGVSLEKREAEAYV
Wss	-	MRRRAIPLLLLLLLLLLLGSSALA
Gss	葡萄糖苷酶	MSFRSLLALSGLVCTGLA

由表1可知,选取6种毕赤酵母同源的分泌型信号肽,成功构建出6株不同信号肽替换优化的重组毕赤酵母菌株 GS115/pPIC9K - *D1ss* - *LIP1*、GS115/pPIC9K - *D2ss* - *LIP1*、GS115/pPIC9K - *Fss* - *LIP1*、GS115/pPIC9K - *Mss* - *LIP1*、GS115/pPIC9K - *Wss* - *LIP1* 和 GS115/pPIC9K - *Gss* - *LIP1*。采用 BMMY - 罗丹明 B 平板进行筛选,挑选透明圈最大的转化子按 1.2.3 方法进行摇瓶发酵。发酵上清液中 *LIP1* 的蛋白表达水平和酶活测定结果如图 3 所示。



注: M. Marker; CK. GS115/pPIC9K - *LIP1*; 1. GS115/pPIC9K - *D1ss* - *LIP1*; 2. GS115/pPIC9K - *D2ss* - *LIP1*; 3. GS115/pPIC9K - *Fss* - *LIP1*; 4. GS115/pPIC9K - *Mss* - *LIP1*; 5. GS115/pPIC9K - *Wss* - *LIP1*; 6. GS115/pPIC9K - *Gss* - *LIP1*

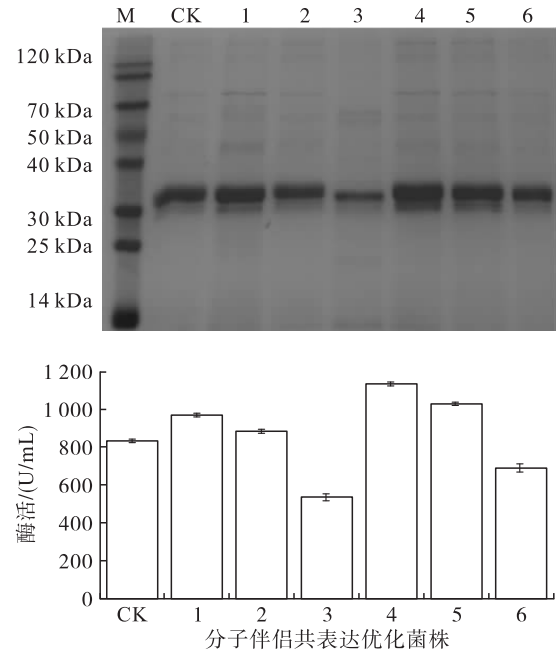
图3 不同信号肽对脂肪酶分泌表达的影响

由图3可看出,信号肽 *D1ss*、*D2ss*、*Fss*、*Mss* 优化菌株均在 32 kDa 处有条带,且信号肽 *D1ss*、*D2ss* 及 *Mss* 均可促进 *LIP1* 的分泌表达,对应的发酵上清液中 *LIP1* 酶活分别达到 674、640、835 U/mL,是出发菌株 GS115/pPIC9K - *LIP1* (CK) 酶活的 1.17、1.11 倍及 1.45 倍,其中信号肽 *Mss* 的分泌效果最强。因此,筛选菌株 GS115/pPIC9K - *Mss* - *LIP1* 进行下一步的优化试验。

2.4 分子伴侣对脂肪酶在毕赤酵母中表达水平的影响

以 GS115/pPIC9K - *Mss* - *LIP1* 作为出发菌株,按 1.2.2 分子伴侣共表达优化方法成功构建 6 株共表达不同分子伴侣的重组毕赤酵母菌株 GS115/pPIC9K - *Mss* - *BMH2* - *LIP1*、GS115/pPIC9K - *Mss* -

HAC - *LIP1*、GS115/pPIC9K - *Mss* - *KEX2* - *LIP1*、GS115/pPIC9K - *Mss* - *SSA4* - *LIP1*、GS115/pPIC9K - *Mss* - *PDI* - *LIP1* 和 GS115/pPIC9K - *Mss* - *UBC1* - *LIP1*, 并采用 BMMY - 罗丹明 B 平板进行筛选,挑选透明圈最大的转化子按 1.2.3 方法进行摇瓶发酵。以 GS115/pPIC9K - *Mss* - *LIP1* 菌株作为对照,测定发酵上清液中 *LIP1* 的蛋白表达水平及酶活,结果如图 4 所示。



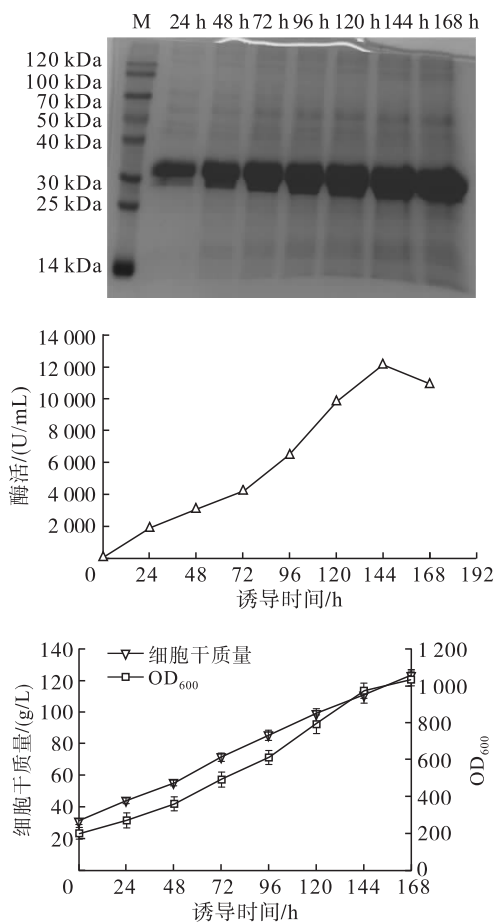
注: M. Marker; CK. GS115/pPIC9K - *Mss* - *LIP1*; 1. GS115/pPIC9K - *Mss* - *BMH2* - *LIP1*; 2. GS115/pPIC9K - *Mss* - *HAC* - *LIP1*; 3. GS115/pPIC9K - *Mss* - *KEX2* - *LIP1*; 4. GS115/pPIC9K - *Mss* - *SSA4* - *LIP1*; 5. GS115/pPIC9K - *Mss* - *PDI* - *LIP1*; 6. GS115/pPIC9K - *Mss* - *UBC1* - *LIP1*

图4 *LIP1* 的分子伴侣共表达优化

由图4可看出:6种分子伴侣共表达菌株均在 32 kDa 处有条带,其中分子伴侣 *SSA4*、*BMH2*、*HAC* 以及 *PDI* 均可促进 *LIP1* 的分泌表达,对应发酵上清液中 *LIP1* 酶活分别达到 1136、970、885 U/mL 和 1030 U/mL,分别为出发菌株的 1.36、1.16、1.05 倍和 1.23 倍,分子伴侣 *SSA4* 效果最好;而 *KEX2* 和 *UBC1* 的共表达抑制了 *LIP1* 的分泌,降低了 *LIP1* 的酶活。总之,基于组合优化策略,依次经过密码子偏好性优化、目的基因多拷贝、信号肽优化以及分子伴侣共表达优化,最终筛选出一株脂肪酶活性最高的菌株 GS115/pPIC9K - *Mss* - *SSA4* - *LIP1*,其酶活达到 1136 U/mL,是已报道的未经过组合策略优化的 *LIP1* 表达于毕赤酵母中酶活^[9]的 7.28 倍。说明本研究采用的组合优化策略能显著提高 *LIP1* 在毕赤酵母中的表达水平。

2.5 重组毕赤酵母的高密度发酵

重组酵母在发酵罐中高密度发酵,是进一步提高LIP1重组表达效率的有效方法。Xu等^[18]利用3L发酵罐发酵培养皱褶念珠菌脂肪酶的酵母重组菌,在高密度发酵130h后,脂肪酶活性达到13490U/mL,相对于摇瓶培养提高了7.67倍。按1.2.4方法利用5L发酵罐对GS115/pPIC9K-Mss-SSA4-LIP1菌株进行高密度发酵,每隔24h取样,测定重组菌株的OD₆₀₀、细胞干质量、脂肪酶的蛋白表达水平及酶活,结果如图5所示。



注: M. Marker; 24、48、72、96、120、144、168 h 分别为甲醇诱导时间

图5 重组毕赤酵母的高密度发酵

由图5可看出,随着诱导时间延长,重组LIP1的酶活和蛋白表达水平逐渐增加,当诱导时间达到144h时,重组LIP1的酶活最高,达到12150U/mL,是摇瓶发酵酶活的10.7倍,说明高密度发酵实现了LIP1在重组酵母中高效表达和积累。随着诱导时间的延长,重组菌株的OD₆₀₀和细胞干质量也在不断增加,在诱导时间为168h时,细胞干质量达到最大,为120.5g/L。总之,基于组合优化策略的实施,可在发酵上清液中获得大量重组LIP1(见图5A),

有利于重组LIP1进一步在产业化生产中的分离和纯化。

2.6 重组脂肪酶的底物特异性(见图6)

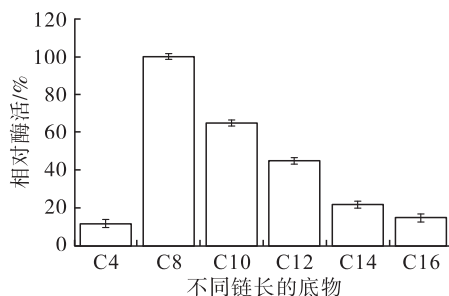


图6 重组LIP1的底物特异性

脂肪酶特殊的底物特异性很大程度上决定了其在工业化中应用的领域^[19]。由图6可看出:重组LIP1对不同链长的对硝基苯酚酯的水解能力差异很大,其中链脂肪酸底物(C8和C10)呈现较高活性,最适底物为C8链长的对硝基苯酚酯;而当底物碳链长度大于12或低于8时,重组LIP1的催化活力显著降低,表明重组LIP1对中链底物具有特异性的亲和力,能够特异地水解生成大量的中链脂肪酸。由于中链脂肪酸独特的生理生化功能,常应用于医药、保健食品及养殖业等领域^[20],因而重组LIP1在中链脂肪酸的工业化生产中具有潜在的应用价值。

3 结论

通过对杜邦嗜热菌来源的脂肪酶密码子的偏好性进行优化,结合G418高浓度抗性筛选和BMMY-罗丹明B平板筛选,获得了一株脂肪酶活性较高的重组酵母菌株GS115/pPIC9K-LIP1,其酶活为576U/mL;然后,通过信号肽优化和分子伴侣共表达优化,获得一株高效表达脂肪酶的毕赤酵母菌株GS115/pPIC9K-Mss-SSA4-LIP1,其酶活达到1136U/mL;采用5L发酵罐进行高密度发酵,诱导144h后,脂肪酶酶活最高,达到12150U/mL,是摇瓶发酵的10.7倍。通过测定重组脂肪酶的底物特异性发现,其中链(C8)底物的对硝基苯酚酯存在特异性的催化活性。后续研究将基于对高密度发酵进行优化,进一步提高LIP1的重组表达水平,为重组LIP1规模化生产和产业化应用奠定基础。

参考文献:

- [1] ROGALSKA E, NURY S, DOUCHET I, et al. Lipase stereo- and regio- selectivity towards tri- and di- acylglycerols [J]. Biochem Soc Trans, 1997, 25 (1): 161-164.

