

外源脂肪酶在毕氏酵母表面展示及发酵过程分析

张溪, 韩双艳, 苏国栋, 郑穗平, 林影

(华南理工大学生物科学与工程学院, 广东广州 510006)

摘要: 分别考察基于絮凝素和凝集素2种不同展示系统, 展示有外源脂肪酶CALB (*Candida Antarctica lipase B*) 的重组展示酵母的展示酶活、上清酶活, 发现毕赤酵母作为宿主在外源脂肪酶展示过程会分泌目的蛋白至上清中, 引起“外泄”, 进一步通过重组展示酵母外源蛋白鉴定、外源蛋白去糖基化、发酵过程中蛋白变化趋势观察, 表明基于絮凝素系统的非共价锚定是引起展示过程中蛋白外泄比例过高的主要原因, 研究为实现脂肪酶在毕赤酵母细胞的高效展示进而提高展示酶的催化效率提供了理论指导。

关键词: 巴斯德毕氏酵母; 南极假丝酵母脂肪酶 B; 酵母细胞表面展示

文章编号: 1673-9078(2010)1-9-5

The Surface Display of Lipase on a *Pastoris pichia* and Analysis of Fermentation Process

ZHANG Xi, HAN Shuang-Yan, SU Guo-dong, ZHEG Sui-ping, LIN Ying

(School of Bioscience and Bioengineering, South China university of technology, Guangzhou 510006, China)

Abstract: In this research, the activities of enzyme displaying on the surface of *pastoris pichia* and enzyme in the fermentation supernatant of two recombinant displaying yeast were studied, which were based on two surface yeast display systems with the flocculation functional domain of Flo1p and α -agglutinin functional domain respectively. In the process of displaying the lipase on the yeast cell surface, some secreted lipases were found in supernatants. With the identification of active lipase, the glycosylation assay and the mounts increase of foreign protein, the reason that interest lipase were secreted into the supernatant to the great extent was resulted from unstable non-covalence bond between the flocculation functional domain of Flo1p and mannose in the cell wall. The study provided theoretical guide for efficient display of lipase on a *pastoris pichia* and improve the catalytic activity of displaying enzymes.

Keywords: *pastoris pichia*; *Candida Antarctica lipase B*; yeast surface display

酵母表面展示技术能将外源脂肪酶以融合蛋白的形式展示在酵母的表面, 保持脂肪酶相对独立的空间构象和原有的生物活性, 因而展示有脂肪酶的酵母细胞可以作为全细胞催化剂催化各种反应, 表现出耐温、耐有机溶媒以及热稳定性好等优良特性^[1]。毕赤酵母具有细胞生长快、易于培养、遗传操作简单、可高密度发酵等特点, 在工业上具有很好的应用前景, 国外学者 Tanino 和本实验室都陆续尝试开发基于毕赤酵母的酵母表面展示系统^[2-4]。

本实验室之前已分别利用 Flo1p 的 N 端絮凝功能结构域构建 N 端融合(目的蛋白位于融合蛋白 C 端)、利用 α 凝集素系统构建 C 端融合(目的蛋白位于融

合蛋白 N 端)两套毕赤酵母表面展示系统, 并将南极假丝酵母脂肪酶 B (*Candida Antarctica lipase B*, CALB) 借助上述 2 种系统以不同方式锚定在毕赤酵母表面。研究发现, 利用毕赤酵母作为脂肪酶展示宿主时, 不论采用絮凝素系统还是凝集素系统, 脂肪酶除部分锚定于酵母细胞壁, 还有相当一部分分泌到发酵液中, 这些可能影响了酶在细胞表面的展示及酶活。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

1.1.1 菌株

基于 *Pichia* GS115 构建的两种表面展示有 CALB 的重组毕赤酵母(基于 Flo1p 絮凝素系统的展示酵母为 KFS-CALB, 基于 α 凝集素系统的展示酵母为 KNS-CALB), 本实验室构建。

1.1.2 试剂和仪器

漩涡振荡器、酶标仪、凝胶成像仪、真空冷冻干

收稿日期: 2009-08-28

基金项目: 国家自然科学基金, 酵母外源蛋白表面展示功能基因组分析与调控(30670053)

作者简介: 张溪, 女, 硕士生, 主要研究方向为酶工程与酶应用

通讯作者: 林影, 女, 教授, 博导, 主要研究方向为酶工程

燥机、电泳槽 (Bio-Rad)、湿法转膜仪 (Bio-Rad)、半干转膜仪 (Bio-Rad)、Endo Hf (NEB)、PMSF (sigma)、laminarinase (sigma, 作葡聚糖酶)、4-Nitrophenol butyrate (C4底物)。

1.1.3 培养基

BMGY: 1%酵母浸出物, 2%蛋白胨, 100 mM磷酸钾 (pH 6.0), 1.34%YNB, 4×10^{-5} %生物素, 1%甘油。

BMMY: 1%酵母浸出物, 2%蛋白胨, 100 mM磷酸钾 (pH 6.0), 1.34% YNB, 4×10^{-5} %生物素, 0.5%甲醇。

1.2 方法

1.2.1 表面展示外源蛋白的毕氏酵母培养

将构建的表面展示毕氏酵母接种于 BMGY 的 500 mL 摇瓶中, 装液量为 10%, 28 °C 下 250 r/min 培养 16~18 h 至 $OD_{600}=2\sim6$ 。用灭菌离心管, 室温 1500-3000 g 离心 5 min, 收集细胞, 用 BMMY 重悬细胞至 $OD_{600}=1.0$ 进行诱导, 培养温度和转速不变。每 24 h 加甲醇 1% 浓度, 直至最佳诱导时间。

1.2.2 脂肪酶酶活测定

取 1 mL 发酵液, 14000 r/min 离心 2 min, 分开上清和菌体, 加入 pH 8.0 磷酸盐缓冲液清洗菌体后, 加 500 μ L 缓冲液混匀菌体, 另向上清中加入 500 μ L 缓冲液, 分别向上清和菌体中立即加入 500 μ L C4 底物, 45 °C 水浴 5 min, 4 °C 离心取上清 200 μ L 点于 96 孔板上, 405 nm 波长下测定吸光度。500 μ L 缓冲液加入 500 μ L C4 底物, 45 °C 水浴 5 min, 4 °C 离心作为空白对照。

酶活公式 (IU/mL) = (OD - 空白 OD) \times 稀释倍数 \times 0.3597 / 反应时间 (min)

脂肪酶活力单位定义: 在一定条件下, 脂肪酶水解三丁酸甘油酯每分钟产生 1 微摩尔 (μ mol) 的脂肪酸所需的酶量即为一个脂肪酶活力单位。

1.2.3 菌体胞壁蛋白提取

取等量发酵液, 4 °C 下 3000 g 离心 5 min, 分离上清和菌体, 冰缓冲液 (10 mM Tris-HCl [pH 7.8], 1 mM PMSF) 清洗菌体 3 次, 细胞、缓冲液和玻璃珠 (0.5 mm 直径) 以 1:2:1 (w/v/w) 混合, 振荡 5 次, 每次 1 min, 1 min 冰浴间隔。4 °C 下 1000 g 离心 5 min, 收集菌体, 用缓冲液清洗 3 次, 对于 KFS-CALB, 采用报道方法进行 SDS 提取^[5]。对于 KNS-CALB 采用 laminarinase 作为 β -1,3 葡聚糖酶提取^[5]。

1.2.4 Endo Hf 处理外源蛋白

Endo Hf 可以断裂糖蛋白中的高甘露糖结构和 N-聚糖混合结构, 除去糖蛋白中的 N-糖基化位点。具体实验操作见文献^[6]。

1.2.5 脂肪酶的 SDS-PAGE 和 western blot 分析

采用 flag 标签技术进行抗体识别, 分子量大于 100 kD 的目的蛋白采用湿转转移法, 分子量小于 100 kD 蛋白采用半干转移法, 具体见^[7]。

2 结果

2.1 展示酵母的产酶分析

表面展示有 CALB 的重组毕赤酵母 (简称展示酵母) KFS-CALB、KNS-CALB 接种于摇瓶中培养, 偶然发现两种重组菌的上清均存在酶活, 并且在不同诱导时间时都存在, 其酶活随着菌体量增加而增加 (图 1)。当诱导至 72 h 时, KFS-CALB、KNS-CALB 的发酵液上清中酶活均达到最高, 之后出现轻微下降趋势; 诱导 84 h 时, 在酵母细胞表面锚定的展示酶活到达顶峰, 并维持较长一段时间。值得一提的是, 同一种外源脂肪酶, 同一种毕赤酵母作为宿主, 展示系统不同, 酶在酵母表面展示效果也有很大差别, 这表现在 KFS-CALB 和 KNS-CALB 两种重组展示酵母在细胞表面展示量相差不大 (培养过程中 OD 相同, 菌体酶活接近), 但 KFS-CALB 的发酵上清出现酶活远高于 KNS-CALB (图 1)。

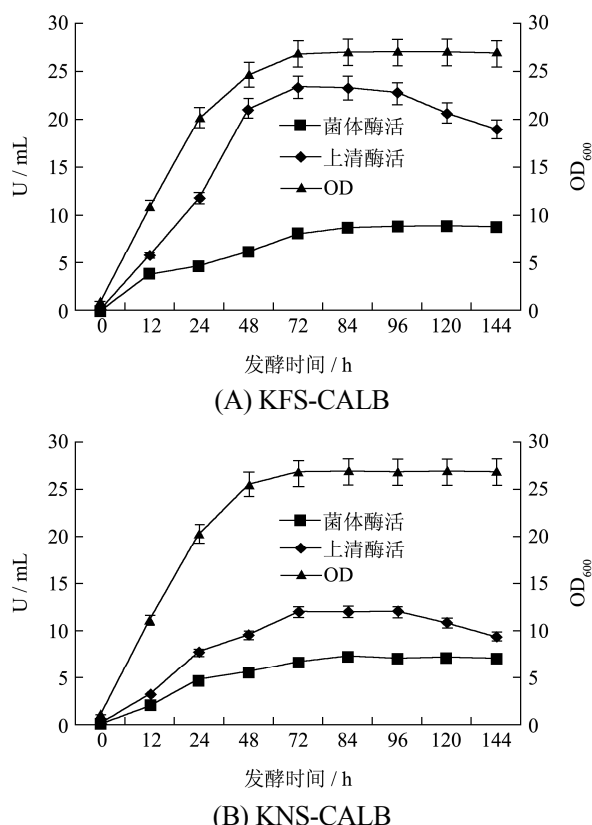


图1 表面展示CALB的重组展示酵母的发酵及酶活曲线

Fig.1 Fermentation and activity of the lipase displayed on the surface of recombinant *pastoris pichia*

2.2 展示酵母外源蛋白分析

为解释重组展示酵母培养上清中的酶活存在的原

因,同时提取2种展示酵母的发酵液上清蛋白和胞壁蛋白进行SDS-PAGE。SDS-PAGE提示,展示酵母与对照(未携带CALB基因和展示系统的宿主菌GS115)相比,无论上清和胞壁蛋白在大于200 kD处均有条带。由于蛋白分子量大小不同,蛋白膜转移的方式也不同。因此进行western blot分析时,以100 kD为界,将大分子量蛋白同小分子量蛋白分开转印。结果如图2A所示,2种展示酵母除在细胞壁中出现符合预期的目的蛋白(2种展示系统产生的融合锚定蛋白理论分子量接近),上清中确实存在与锚定于细胞壁的融合CALB大小相似的蛋白,而在未携带CALB基因或展示系统的宿主菌中未发现。在Takanori等人的研究中,将ROL采用絮凝素系统非共价展示在毕氏酵母细胞壁的过程中,在培养基中发现了连接絮凝素片段的ROL^[3]。Pieter P等人采用 α -凝集素展示系统将mIF- γ 展示在毕氏酵母细胞壁上的过程中,在发酵液上清的电泳图中也发现了Aga2-mIF- γ 的特殊条带^[8],可见毕赤酵母展示外源蛋白过程中除部分锚定于酵母细胞壁,蛋白“外泄”分泌到发酵上清中较为常见。在KFS-CALB系统中,上清和胞壁蛋白的分子量大小基本一致,有可能是通过非共价结合在细胞壁的融合蛋白锚定不牢固掉落至发酵上清;而KNS-CALB系统中上清的分子量大小明显低于胞壁蛋白,在Marc W等人的关于毕氏酵母分泌表达明胶剂研究中提到毕氏酵母发酵液中存在可以识别并断裂[Leu-Ile-Val-Met]-Xaa-Yaa-Arg位点的Kex2或Kex2相似蛋白酶^[9],KNS-CALB系统展示的CALB融合蛋白可能存在着类似的酵母蛋白酶的识别位点,导致上清中融合片段小于细胞壁中的融合蛋白。

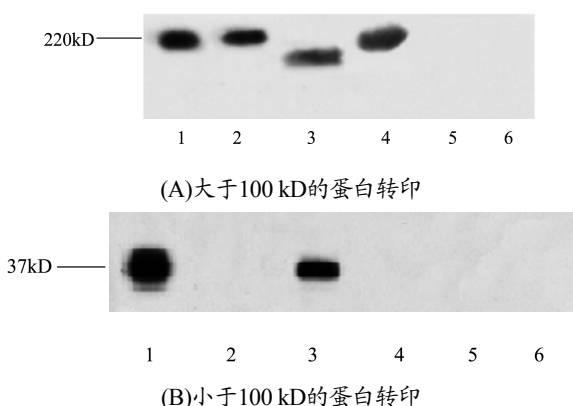


图2 展示酵母发酵上清和胞壁蛋白western blot

Fig.2 SDS-PAGE analysis of the proteins of yeast in its cell wall and the supernatants of fermentation broth

注: 1为KFS-CALB上清, 2为KFS-CALB胞壁蛋白, 3为KNS-CALB上清, 4为KNS-CALB胞壁蛋白, 5为GS115上清, 6为GS115胞壁蛋白。

同时,小分子蛋白的转印结果(图2B)发现,基于不同展示系统的2种展示酵母发酵上清中还存在着小分子量非融合CALB或“断裂”的融合CALB,同游离CALB大小相近。当目的蛋白同锚定系统的载体蛋白连接断裂时,则会出现单体CALB的现象。两种系统的检测标签设计时,均把FLAG放在了外源蛋白CALB和载体蛋白之间,目的蛋白上连有FLAG时依然可以用western blot检测出来,根据目的蛋白的分子量推算,转印膜(图2B)上出现的小片段很可能是分泌到发酵上清中的游离CALB。

2.3 展示酵母外源蛋白糖基化

众多的文献报道毕赤酵母表达外源蛋白的加工过程中存在糖基化^[1,3,7]。糖基化往往引起表达的外源蛋白分子量较实际偏大,糖基化程度不同也反映了蛋白结构不同。本实验在对展示蛋白进行去N-糖基化同时,也对上清分泌进行了去N-糖基化分析,结果如图3所示,同已报道文献相似,去N-糖基化后,2种展示酵母细胞壁上锚定的融合蛋白分子量均有下降,提示存在少量糖基化;分泌到上清中的融合蛋白在去N-糖基化后其分子量也有少量下降,表明也存在着一定的糖基化现象。其中KFS-CALB分泌融合蛋白去N-糖基化后分子量减少程度与细胞壁蛋白类似,辅助验证了“外泄”到上清的融合蛋白可能是因为非共价锚定不牢引起的。而KNS-CALB的上清蛋白N糖基化程度较低则可能是由于被蛋白酶切断后,其糖基化位点减少的缘故。

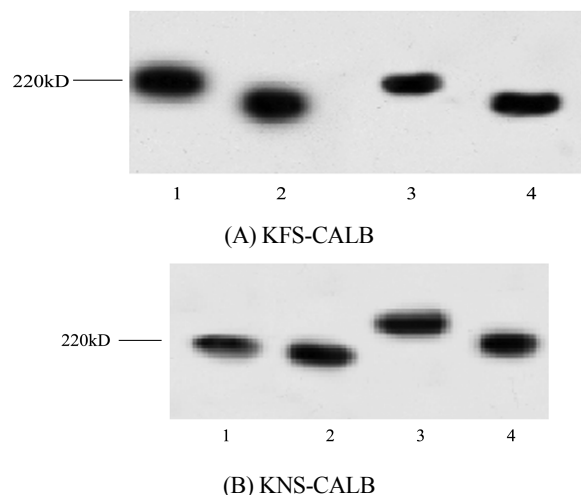


图3 展示酵母发酵上清和菌体的去N-糖基化Western bolt

Fig.3 SDS-PAGE analysis of de-glycoproteins of the yeast and the supernatants of fermentation broth

注: 1为上清, 2为上清去糖基化, 3为细胞壁蛋白, 4为细胞壁蛋白去糖基化。

2.4 展示酵母蛋白展示过程分析

2种展示酵母的上清蛋白均可通过简单的发酵液

离心提取，而胞壁蛋白的提取方式则不同。实验中证实，KFS-CALB采用絮凝素锚定系统与细胞壁上的甘露糖残基非共价结合锚定于细胞壁上，可以采用SDS煮沸法提取，而KNS-CALB通过C端GPI（糖基化磷脂酰肌醇）与细胞壁中葡聚糖共价结合，只能用 β -1,3葡聚糖酶提取。锚定方式的牢固与否可能是KNS-CALB外泄到上清中的酶活远小于KFS-CALB的主要原因，这一点也在展示酵母的发酵过程中蛋白量变化情况中证实。

如图4、图5，无论是KFS-CALB还是KNS-CALB，随着菌体发酵时间延长，胞壁上的锚定CALB量（椭圆圈出）不断增加，在发酵前3 d蛋白量增加较为明显，之后基本稳定，这和上述酶活曲线的变化趋势相一致，表明蛋白产量的增加引起酶活的增加。

对比KFS-CALB与KNS-CALB的上清SDS-PAGE图发现，KFS-CALB其发酵过程中，上清的融合CALB和游离CALB（以方框圈出）随发酵时间延长积累效应明显，与其上清中的酶活曲线变化一致，而KNS-CALB的酶活曲线虽然显示其有累积，但在SDS-PAGE中多以弥散带出现，这可能与存在蛋白酶切位点有一定关系，但更重要原因可能在于其外泄到上清中的CALB蛋白没有KFS-CALB多，而外泄的主要原因应与CALB在细胞壁表面的展示方式密切相关，与细胞壁上甘露糖非共价的不稳定结合可能是基于絮凝素展示系统的外源蛋白展示过程中外泄到上清中最大原因。

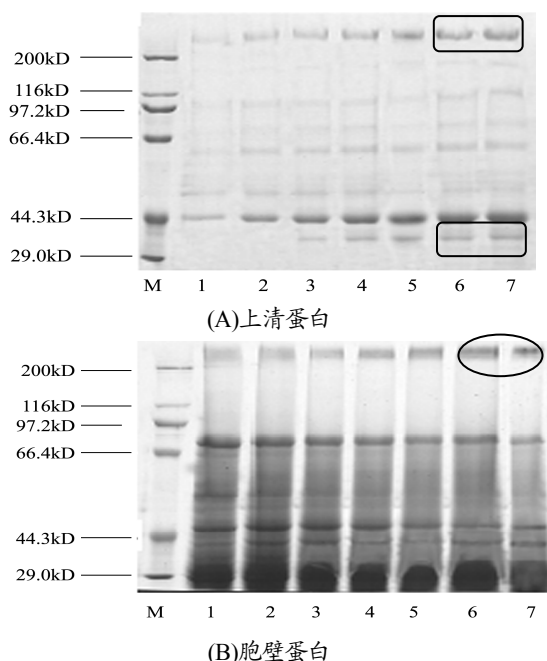


图4 KFS-CALB不同诱导时间发酵上清和菌体胞壁蛋白电泳图
Fig.4 SDS-PAGE analysis of proteins of KFS-CALB and the supernatants of fermentation broth with different fermentation time

注:1~7泳道分别为诱导12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h的发酵上清和菌体蛋白。

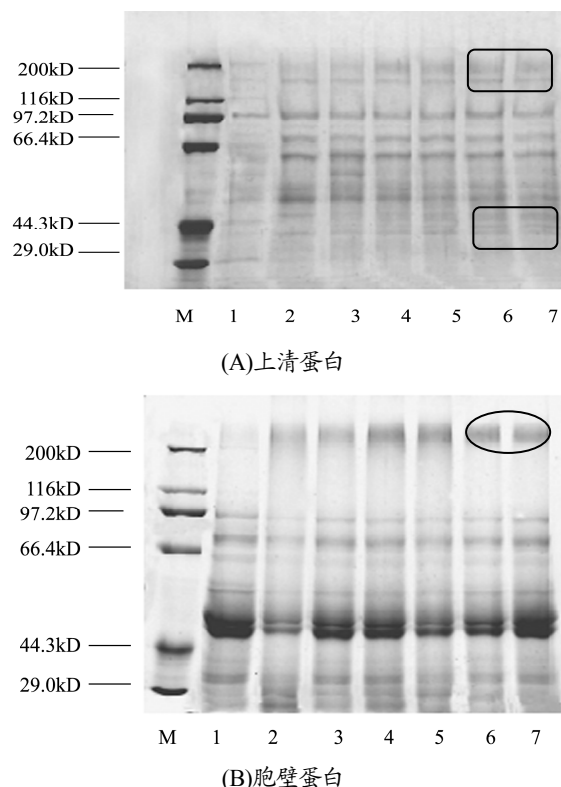


图5 KNS-CALB不同诱导时间发酵上清和菌体胞壁蛋白电泳图
Fig.5 SDS-PAGE analysis of proteins of KNS-CALB and the supernatants of fermentation broth with different fermentation time

注:1~7泳道分别为诱导12 h、24 h、48 h、72 h、96 h、120 h、144 h发酵上清和菌体蛋白。

3 讨论

将酶展示在酵母细胞表面，可赋予酶更多的催化特性，如天然米根霉脂肪酶（*Rhizopusoryzae* lipase, ROL）在有机溶剂中是不能催化对映体拆分的，而展示的ROL却可催化对映体拆分。Shiraga等报道了在酿酒酵母中展示的ROL在正庚烷中水解棕榈酸对硝基苯酯酶活是游离酶的 4.4×10^4 倍；在正庚烷中以棕榈酸和正戊醇为底物时，其酯化活性是游离酶的 3.8×10^4 倍^[10]。

脂肪酶蛋白酵母表面展示技术可以在标准的发酵过程中实现酶在酵母细胞表面的固定（展示），同传统的固定化酶技术相比，不仅保留了回收方便、可重复使用的优点，更省去了酶的分纯化以及固定化等步骤。将脂肪酶展示在酵母表面有望成为酶固定化的替代方法之一，而一个良好的酵母表面展示系统可有效提高酶在细胞表面的展示量、展示酶活，进一步拓展展示酶的应用。因而，国内外学者和我们实验室都开

始尝试开发基于毕赤酵母的酵母表面展示系统^[3,4]。

研究中发现,无论采用Flo1p絮凝素系统,还是 α 凝集素,毕赤酵母在展示外源脂肪酶CALB在细胞壁的同时,均“外泄”一些活性的CALB到发酵上清中,这与在国外仅有的研究报道一致^[3,8]。进一步研究发现,同一种脂肪酶,同一种宿主,展示系统不同,其“外泄”到上清中酶活也有很大差别,这主要是由载体蛋白的在细胞壁上的锚定方式不同引起的。本论文中对比研究的Flo1p絮凝素系统和 α 凝集素系统, Flo1p絮凝素系统借助Flo1p N端絮凝结构功能域与细胞壁中的葡聚糖非共价连接,较 α 凝集素系统采用的GPI共价锚定要不稳定,从而造成了基于絮凝素展示系统的KFS-CALB外泄到发酵上清中的脂肪酶比例远高于KNS-CALB,而如何改进该展示系统以及如何通过发酵调控等控制毕赤酵母展示过程中脂肪酶“外泄”还有待进一步研究。

脂肪酶不仅在油脂加工、皮革、纺织、造纸、洗涤剂等传统行业广泛应用,而且在化妆品、医药、环境修复等高附加值产品领域的应用也日益增多。本研究首次正面讨论了毕赤酵母做为外源脂肪酶展示的宿主,“外泄”脂肪酶到发酵上清中的共性问题。而这可能是改善和开发毕赤酵母展示系统的瓶颈之一。研究结果也提示,一个成功的展示载体系统不但要求稳定,其载体蛋白与外源脂肪酶的融合方式、载体蛋白与细胞壁的锚定方式非常重要,这很大程度决定了脂肪酶在毕赤酵母细胞表面的展示效率。研究为实现脂肪酶在毕赤酵母细胞的高效展示进而提高展示酶的催化效率提供了理论指导。

参考文献

- [1] Jiang Z B, Song H T, Gupta N, et al. Cell surface display of functionally active lipases from *Yarrowia lipolytica* in *Pichia pastoris*. *Protein Express and Purification*, 2007,(56): 35-39
- [2] 韩双艳,林小琼,张溪,林影. 枯草芽孢杆菌B2(*Bacillus*

subtilis B2)木聚糖酶在毕赤酵母中的表达[J].现代食品科技,2009,25(9):872-876

- [3] Takanori Tanino, Hideki Fukuda et al. Construction of a *Pichia pastoris* Cell-Surface Display System Using Flo1p Anchor System[J]. *Biotechnol.* 2006(22): 989-993.
- [4] Han Z L, Han S Y, Zheng S P, Lin Y. Enhancing thermostability of a Rhizomucor miehei lipase by engineering a disulfide bond and displaying on the yeast cell surface. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009,85:117-126,
- [5] M Bony, D Thines-Sempoux, P Barre, B Blondin. Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p[J]. *Bacteriol.* 1997,179: 4929-4936
- [6] Takeshi Matsumoto, 1 Hideki Fukuda, et al. Construction of Yeast Strains with High Cell Surface Lipase Activity by Using Novel Display Systems Based on the Flo1p Flocculation Functional Domain[J]. *Applied and environmental microbiology*, 2002,(9): 4517-4522.
- [7] Qingjie Wang, Lei L, Min Chen, et al. Construction of a novel system for cell surface display of heterologous proteins on *Pichia pastoris*[J]. *Biotechnol let.*, 2007,29:1561-1566.
- [8] Pieter P. Jacobs, Stefan Ryckaert, et al. *Pichia* surface display: display of proteins on the surface of glycoengineered *Pichia pastoris* strains[J]. *Biotechnol Lett.*, 2008, 30:2173-2181.
- [9] Marc W T, Werten, Tanja J. Van Den Bosch, Richele D Wind, et al. High-yield Secretion of Recombinant Gelatins by *Pichia pastoris*[J]. *Yeast*, 1999,15:1087-1096.
- [10] Shiraga S, Kawakami M, Ishiguro M, et al. Enhanced reactivity of *Rhizopus oryzae* lipase displayed on yeast cell surfaces in organic solvents: potential as a whole cell biocatalyst in organic solvents. *Appl Microbiol Biotechnol*[J], 2005,71(8):4335-4338

(上接第4页)

4 结论

食品安全是关系到国民健康,关系广东省可持续发展和社会稳定的重要因素,因此,广东省要抓住机遇大力发展食品产业,提高食品产业在省里的地位;加大力度落实立法、普法、执法,确保食品安全问题有法可依,执法有力;重视培养科技与制度创新意识,保障食品安全生产、安全流通和安全消费;从科学发展的角度重视与各类媒体的合作,确保食品安全事件

客观、真实、全面、科学地报道,从而积极促进我省食品安全领域的发展。

参考文献

- [1] 广东省食品工业 2005-2010 年发展规划.广东省工业九大产业发展规划. 广东省人民政府 2005 年 15 号文件. 2005-2-17
- [2] 广东省统计局. 广东省统计年鉴 1984[M]. 香港: 经济导报出版社, 1984