

# 巴斯德毕赤酵母发酵生产重组人溶菌酶

陈晶晶 陈劲春\*

(北京化工大学 生命科学与技术学院, 北京 100029)

**摘要:** 对巴斯德毕赤酵母 GS115 菌株在工业培养基中发酵和分离条件进行了研究。结果表明:将传统工业培养基中碳源和氮源的质量浓度分别降低至 35 g/L 和 5 g/L 时,酵母生长期的细胞密度与传统培养基的相差不大,但培养时间可减少 4 h,节省了生产成本;维持诱导期间的 pH 值为 4.0 对目标蛋白的表达最有利,目标蛋白的表达量占酵母分泌蛋白总量的 70%,比原来增加了近 30%;分离纯化过程,采用将强阳离子(SPFF)与弱阴离子(DEAE)交换层析柱偶联的分离方法,达到除杂,并浓缩目标蛋白的作用,目标蛋白产量约为 50 mg/L;将目标蛋白酶切后,质量酶活性为  $8.56 \times 10^{-3} \text{ mol/(s} \cdot \text{g)}$ 。

**关键词:** 人溶菌酶; 毕赤酵母; 发酵; 分离纯化

**中图分类号:** Q786

在临床上应用的溶菌酶主要是蛋清溶菌酶,蛋清溶菌酶是一种异源蛋白,在人体内可能会产生免疫原性和副作用。人溶菌酶(HLZ)是人体内的一种蛋白质,和人体具有天然相容性,临床上应用时,比其他溶菌酶更安全,没有刺激性和副作用<sup>[1]</sup>。此外,溶菌酶作为食品防腐剂和婴儿食品添加剂,已在食品工业上得到广泛应用<sup>[2]</sup>。HLZ 的溶菌活性比蛋清溶菌酶高出 3 倍,且热稳定性也高于蛋清溶菌酶的热稳定性<sup>[3]</sup>。

国内利用毕赤酵母发酵生产 HLZ 的研究还比较少,有利用大肠杆菌和真菌表达系统的报道,表达最高水平为 40 mg/L<sup>[4]</sup>。国外有采用毕赤酵母发酵生产蛋清溶菌酶的报道<sup>[5]</sup>,但没有对 HLZ 的表达进行进一步研究。本文针对传统工业培养基中碳源、氮源的质量浓度和诱导期间的 pH 值对重组 HLZ 表达量的影响进行了研究,提高了重组 HLZ 的产量,为今后实现重组人溶菌酶的工业化生产提供了参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种 含人溶菌酶基因的 *Pichia Pastoris*

收稿日期: 2005-12-15

第一作者: 女,1981 年生,硕士生

\*通讯联系人

E-mail: jingchunchen@hotmail.com

GS115,为本实验室保存。

**1.1.2 培养基** 酵母培养基 YPG(质量分数): 1% 酵母提取物,2% 大豆蛋白胨,1% 甘油。工业培养基(g/L): 二水硫酸钙 0.93,硫酸钾 18.2,七水硫酸镁 14.9,甘油 35,硫酸铵 5,柠檬酸三钠 1.47,0.1 mol/L 的 pH 值 6.0 磷酸钾缓冲液。微量元素(PTM)(g/L): 五水硫酸铜 6.0,碘化钾 0.8,一水硫酸锰 3.0,二水钼酸钠 0.2,硼酸 0.2,氯化钴 0.5,氯化锌 20.0,七水硫酸亚铁 65.0,生物素 0.2,浓硫酸 5.0 mL/L。试剂均为国产生化试剂纯或分析纯。

**1.1.3 其他材料** SPFF 强阳/DEAE 弱阴离子交换层析柱和填料均购自 Amersham Biosciences 公司。中空纤维膜购自天津膜公司,酵母型重组肠激酶购自罗氏公司,10 k 透析袋购自北京泽平科技有限公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 培养方法** 将保存的菌种接到 YPG 培养基中,28 和 200 r/min 的条件下振荡培养 12 h,然后以 5% 的接种量转接到工业培养基中,在 28 和 200 r/min 的条件下振荡培养。期间,用氨水调节培养基的 pH 值使之保持在 5.5,待甘油耗尽后,饥饿 1~2 h 开始诱导。诱导期调节 pH 维持在 4.0,每 12 h 补加体积分数 0.5% 的甲醇诱导,诱导 84 h 后停止发酵。

**1.2.2 分析方法** 将菌液稀释后于波长 600 nm 处以去离子水为参比,用比色法测定溶液吸光度;测定所取发酵液中的细胞干质量,再除以所取发酵液体

积即得细胞质量浓度;甘油浓度用高碘酸钠氧化法测定<sup>[6]</sup>;发酵液中总蛋白浓度测定参考考马斯亮蓝染色法<sup>[7]</sup>;发酵液中目标蛋白(重组人溶菌酶原)浓度的测定法是取发酵液离心后的上清走 SDS-PAGE,将凝胶进行计算机扫描分析,用 BIO-PRINT 凝胶成像与分析系统分析目标蛋白的含量,根据考马斯亮蓝染色法测定的发酵液中总蛋白的量推算出目标蛋白浓度<sup>[8]</sup>。

**1.2.3 分离方法** 将发酵液离心,收集上清液,用 6 k~30 k 的中空纤维膜截留。让收集的蛋白溶液先流过 SPFF 强阳离子交换层析柱,洗脱收集的蛋白液再流过 DEAE 弱阴离子交换层析柱,收集洗脱峰。强阳离子交换步骤,采用磷酸缓冲体系,pH 值为 7.0;弱阴离子交换步骤,采用 Tris-HCl 缓冲体系,pH 值为 8.0。最后将经两步离子交换层析柱得到的蛋白液用 10 k 透析袋除盐 12 h,收集备用。

**1.2.4 酶切方法** 将 10 倍酶切缓冲液与目标蛋白溶液按体积比 1:9(按 1 μL 酶可以切 15 mg 目标蛋白计算加酶量)混和均匀,20 ℃下,酶切 8~12 h。10 倍酶切缓冲体系参见商品化酵母型肠激酶使用说明书。

**1.2.5 酶活力测定方法** 采用热激法(煮沸裂解法)<sup>[9]</sup>和溶壁微球菌比浊法<sup>[10]</sup>测定酶活。

2 结果与讨论

2.1 发酵条件的优化

因为细胞吸光度与细胞质量浓度成直线关系,故在实际应用中就用细胞吸光度来反映发酵液中细胞质量浓度的大小。

**2.1.1 工业培养基中碳源和氮源的优化** 在传统工业培养基基础上,对甘油和硫酸铵质量浓度分别进行优化。结果如表 1 和表 2 所示。

表 1 甘油质量浓度对细胞吸光度 A<sub>600</sub> 的影响

Table 1 Effect of glycerol concentration on cell absorbency A<sub>600</sub>

(甘油)/(g/L)	A <sub>600</sub>	培养时间/h
20	28.8	28
25	37.3	33
30	44.5	34
35	51.2	36
40	52.0	40

由表 1 可见,将甘油质量浓度由 35 g/L 增加到 40 g/L 时,菌体吸光度的增长不大,而适当的降低甘油添加量有助于缩短培养时间,进而降低发酵成本。

故将工业培养基中甘油质量浓度降低至 35 g/L。

表 2 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 质量浓度对细胞吸光度 A<sub>600</sub> 的影响

Table 2 Effect of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentration on cell absorbency A<sub>600</sub>

((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )/(g/L)	A <sub>600</sub>
4	39.8
5	49.8
7	43.8
8	40.7
10	43.3

由表 2 可见,当 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 质量浓度为 5 g/L 时,菌体吸光度较大,且相关的实验表明,适当的减少氮源添加量可以减少酵母对杂蛋白的分泌量。故将工业培养基中 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 质量浓度降低至 5 g/L。

**2.1.2 诱导期间 pH 值的优化** 诱导期间考察 pH 值在 3.5~7.0 范围内对诱导的影响。如图 1 所示,pH 4.0 处目标蛋白条带最清晰,因此维持诱导期间的 pH 值为 4.0 对目标蛋白的表达最有利。此结果表明,在酸性环境中更有利于酵母对碱性蛋白的表达。

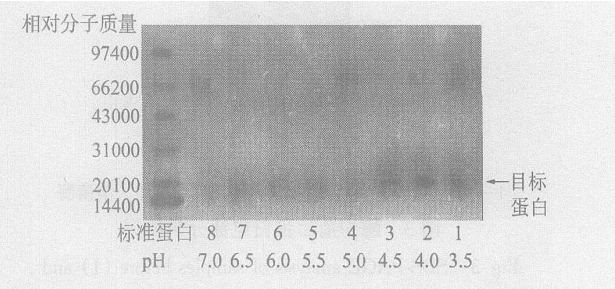


图 1 诱导期间不同 pH 值对目标蛋白表达的 SDS-PAGE 电泳图谱分析

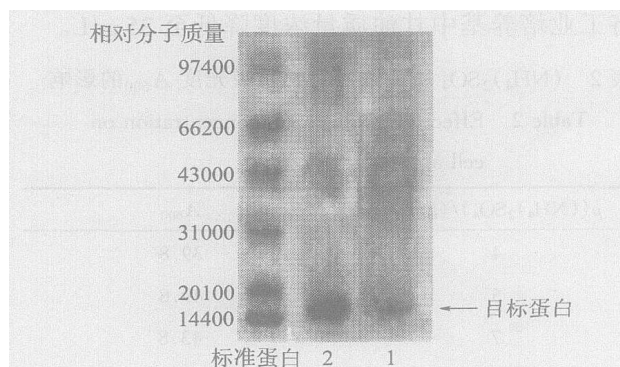
Fig. 1 SDS-PAGE analysis of effect of pH on expression of target protein during the induction period

2.2 分离纯化结果

如图 2 所示,洗脱峰 1 中目标蛋白(16 k 附近)电泳条带较浅,杂蛋白(43 k 附近)条带较深,说明只用 SPFF 强阳离子交换层析柱分离得到的目标蛋白含量不高;洗脱峰 2 中目标蛋白(16 k 附近)条带较深,杂蛋白(43 k 附近)条带较浅,说明再用一步 DEAE 弱阴离子交换层析柱可以进一步除去杂蛋白,并将目标蛋白浓缩。

2.3 酶切结果

如图 3 所示,目标蛋白条带在 16 k 附近,而经重组肠激酶酶切后的重组人溶菌酶条带在 14.4 k

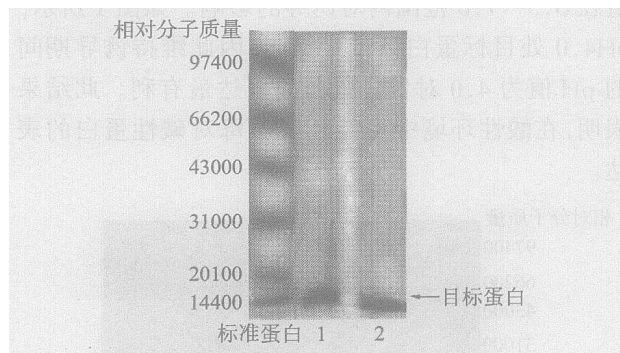


1—超滤后的上清液经 SPFF 强阳离子交换层析后的洗脱峰 1;  
2—洗脱峰 1 中的收集液经 DEAE 弱阴离子交换层析后的洗脱峰 2

图 2 SP-Sephacrose FF 洗脱峰 1 和 DEAE-Sephacrose FF 洗脱峰 2 蛋白组分的 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of elution peak 1 and elution peak 2

附近,且 16 k 附近无条带,说明酵母型重组肠激酶对目标蛋白进行了比较彻底的酶切作用。



1—目标蛋白;2—经重组肠激酶酶切后的重组人溶菌酶

图 3 酶切前后蛋白电泳分析图谱

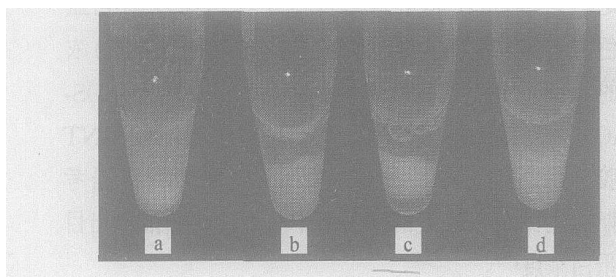
Fig. 3 SDS-PAGE analysis of samples before (1) and after (2) digestion by enterokinase

## 2.4 酶活鉴定

**2.4.1 热激法** 溶菌酶能直接水解革兰氏阳性菌,还能水解部分革兰氏阴性菌,如大肠杆菌等,热激法就是利用溶菌酶的这种特性而定性检测溶菌酶活性的常规方法。取适量去离子水、人溶菌酶标准品、酶切后的重组人溶菌酶、目标蛋白分别添加至培养好、并混合均匀的大肠杆菌菌悬液中,静置片刻。结果如图 4 所示。

从图 4 可以看出:a 和 d 管内的菌悬液加热前后没有变化,仍为悬浮液,用手轻晃后可见菌体均匀分布;而 b 和 c 管内的菌悬液则明显地分为两层,用手轻晃后可见菌体粘稠成鼻涕状,这是 *E. coli* 细胞壁被溶解后细胞内含物释放出来所致。热激法结果显示,目标蛋白经过酵母型重组肠激酶酶切后可

能得到了有活性的人溶菌酶。

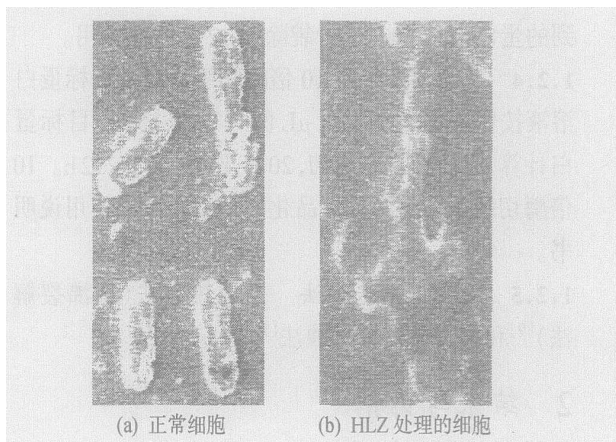


(a) 去离子水;(b) 人溶菌酶标准品;(c) 经重组肠激酶酶切后的重组人溶菌酶;(d) 目标蛋白

图 4 热激法破大肠杆菌结果

Fig. 4 Results of heat shock experiments on target protein on *E. coli*

**2.4.2 电镜照片** 用电镜观察热激法处理前后的大肠杆菌超微结构,结果如图 5 所示。



(a) 正常细胞 (b) HLZ 处理的细胞

图 5 大肠杆菌细胞的超微结构

Fig. 5 The ultrastructure of *E. coli* cells viewed by SEM

由图 5(a)可见,加入溶菌酶前大肠杆菌的形态完整,细胞壁四周清晰,图片有很强的立体感效果。由图 5(b)可见,加入溶菌酶后大肠杆菌的形态不完整,细胞壁四周模糊,这是由于溶菌酶对 *E. coli* 细胞的破坏作用使得菌液粘稠度增加,图片立体感较差。这表明,经酵母型重组肠激酶酶切后得到了有杀菌活性的人溶菌酶。

**2.4.3 酶活单位的测定**<sup>[10]</sup> 溶壁微球菌比活法测得酶活性如表 3 所示。

## 3 结论

本实验通过对传统工业培养基中碳源和氮源质量浓度的改良,提高了此菌株的生长能力;并且通过对诱导期间 pH 值的选择,找到了对人溶菌酶表达最有利的 pH 值,使人溶菌酶在较短的发酵周期内

表 3 溶壁微球菌比浊法测酶活(每次加入酶量均为 150μL)

Table 3 Turbidimetry detection of lysozyme activity using *Micrococcus lysodeikticus* ( *V* = 150μL)

酶质量浓度 / (mg/ mL)	<i>A</i> <sub>450</sub>		差值 <i>A</i> <sub>450</sub>	质量酶活性 ×10 <sup>3</sup> / (mol/ (s ·g))	平均质量酶活性 ×10 <sup>3</sup> / (mol/ (s ·g))
	初始	60 s			
0.5	0.805	0.767	0.038	8.45	8.56
0.25	0.798	0.778	0.020	8.89	
0.125	0.793	0.784	0.009	8.00	
0.0625	0.790	0.785	0.005	8.89	

有较高水平的表达。此外,初步确立了较为简单和可行的分离纯化方法。将目标蛋白酶切后,目标蛋白产量约为 50 mg/L,杀菌质量酶活性为 8.56 ×10<sup>-3</sup> mol/ (s ·g)。

参 考 文 献

[1] Shigeru M, Masato K, Masanori N, *et al.* Secretion of active human lysozyme by *Acre monium chrysogenumum* using a *Fusarium* alkaline protease promoter system[J]. *Journal of Biotechnology*, 1995, 29(2):1 - 8.

[2] 刘仲敏,何伯安. 溶菌酶及其在食品工业中的应用[J]. *食品与发酵工业*,1995,26(5):80 - 82.

[3] 叶军,钱世钧. 工程菌人溶菌酶的纯化和性质[J]. *微生物学报*,1999,39(1):55 - 59.

[4] 王佃亮. 重组人溶菌酶研究进展[J]. *中国生物工程杂志*,2003,23(9):59 - 60.

[5] Masuda T, Ueno Y, Kitabatake N. High yield secretion of the sweet-tasting protein lysozyme from the yeast *Pichia pastoris* [J]. *Protein Expression & Purification*, 2005, 39(3):35 - 38.

[6] 陈宇,刘晓. 高碘酸氧化法检测冰冻红细胞中甘油残余量[J]. *临床输血与检验*,2003,5(4):283 - 284.

[7] 李娟,张耀庭,曾伟,等. 应用考马斯亮蓝法测定总蛋白含量[J]. *中国生物制品学杂志*,2000,13(2):118 - 120.

[8] 张思祥,杨国胜,刘玉良,等. 凝胶电泳图像计算机分析系统的研制[J]. *分析仪器*,2002,32(2):1 - 2.

[9] 曼尼阿蒂斯 T,弗里奇 E F,萨姆布鲁克 J. 分子克隆操作指南[M]. 余茂勋,译. 北京:科学出版社,1987:64 - 65.

[10] 冯惠勇,徐亲民,孙国志. 溶菌酶的生物测定方法研究[J]. *食品与发酵工业*,2002,28(4):61 - 64.

Fermentation of recombinant human lysozyme in *Pichia pastoris*

CHEN Jing-jing CHEN Jin-chun

(College of Life Science and Technology, Beijing University of Chemical Technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** Human lysozyme, sourced from human body fluids, has fewer side effects when injected into the human body and is therefore safer in practice. Here we report a study of fermentation conditions and purification of recombinant human lysozyme in *Pichia pastoris* GS115. (1) When the carbon and nitrogen sources were simultaneously reduced from 40 g/L to 35 g/L and from 10 g/L to 5 g/L respectively, the cell density was not significantly reduced compared with that in the traditional medium. However, the culture time could be shortened by about 4 hours. (2) During the induction period of the yeast cells, it was found that the target protein yield could be increased by about 30 % by maintaining the medium at pH 4.0. (3) For chromatographic purification of the target protein, a coupled column of SP-Sepharose FF strong cation-exchange resin and DEAE Sepharose FF weak anion-exchange resin was employed to obtain the purified target protein with a concentration of about 50 mg/L. (4) After digestion with enterokinase, the target protein showed bioactivity of about 8.56 ×10<sup>-3</sup> mol/ (s ·g).

**Key words:** human lysozyme; *Pichia pastoris*; fermentation; purification