DOI:10.3969/j.issn. 1673-1689.2018.08.011

共表达 N-乙酰转移酶和磷脂酶重组菌的构建及发酵优化

吉得宁[1,2]，宿玲恰[1,2]，吴 敬[1,2]，吴 丹[*1,2]

(1. 食品科学与技术国家重点实验室,江南大学,江苏 无锡 214122;2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室,江苏 无锡 214122)

摘要：为了提高磷脂酶在毕赤酵母中的表达量,构建了 N-乙酰转移酶(Mpr1)和磷脂酶共表达的重组毕赤酵母。Mpr1 是一类能催化乙酰基团在乙酰辅酶 A 和胺之间转移的胞内酶,能够降低酵母细胞内的 ROS 水平,具有抗活性氧(ROS)氧化胁迫生理功能。来源于尖孢镰刀菌的磷脂酶(phospholipase)是一类可以将磷脂水解为小分子脂肪酸、甘二酯和磷酸胆碱的胞外酶。研究了 Mpr1 对重组菌的生长和磷脂酶表达量的影响。为了获得在 3.6 L 发酵罐中表达磷脂酶的最佳发酵条件,分别从诱导温度、起始诱导菌体浓度和甲醇诱导浓度 3 个方面研究了重组菌的高密度发酵,以恒溶氧反馈调节补加甘油和甲醇流加仪在线监测流加甲醇。结果表明:当诱导温度、起始诱导菌体质量浓度和甲醇诱导体积分数分别为 28 ℃,40 g/L 和 1.0%,诱导 120 h 后磷脂酶活达到最高,为 8 100 U/mL,总蛋白含量为 8.3 mg/mL,为前期工作中磷脂酶单独表达时的 1.33倍。

关键词：N-乙酰转移酶;毕赤酵母;尖孢镰刀菌;磷脂酶;高密度发酵

中图分类号:Q 815　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1673—1689(2018)08—0853—08

Construction of Co-Expressed N-Acetyltransferase and Phospholipase Gene in Recombinant Strain and Optimization of Fermentation Conditions

JI Dening[1,2]，*SU Lingqia*[1,2]，*WU Jing*[1,2]，*WU Dan*[*1,2]

(1. State Key Laboratory of Food Science and Technology, Jiangnan University, Wuxi 214122, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China)

Abstract: To increase the production of phospholipase, a strain of *P. pastoris* KM71 containing the gene co-expressing the N-cetyltransferase (Mpr1) and phospholipase was constructed. Mpr1 is an intracellular enzyme that catalyzes the transfer of acetyl groups between acetyl CoA and amines. Mpr1 has significant physiological functions in ROS oxidative stress resistance ability. Phospholipase, which come from *Fusarium oxysporum* is a group of hydrolases that hydrolyze phospholipids, releasing a variety of products, such as lysophospholipids, free fatty acids.

收稿日期：2015-12-14

基金项目：国家杰出青年基金项目(31425020)。

*通信作者：吴 丹(1976—),男,湖北黄冈人,工学博士,副教授,硕士研究生导师,主要从事微生物发酵过程优化与控制的研究。E-mail:wudan@jiangnan.edu.cn

引用本文：吉得宁,宿玲恰,吴敬,等. 共表达 N-乙酰转移酶和磷脂酶重组菌的构建及发酵优化[J]. 食品与生物技术学报,2018,37(08):853-860.

Constructing the recombinant *P. pastoris* KM71/pPIC9K-phospholipase/pPICZA-Mpr1, the impact of Mpr1 on yeast cell growth and production of phospholipase from *Fusarium oxysporum* was investigated. In order to obtain the optimal condition of phospholipase fermentation, we observed the influence of temperature, initial induction cell density and methanol concentration on the high density fermentation process in 3.6 L fermentor of *P. pastoris* KM71/pPIC9K-phospholipase/pPICZA-MPR1. By using glycerol feeding strategy with DO control in high-density fermentation and maintained the residual methanol concentration constantly with a methanol sensor. The result showed that the optimum condition were listed as follows: the temperature was 28 ℃, the initial induction cell density was 40 g/L, the methanol concentration was 1.0%. Under the condition, the phospholipase activity reached 8 100 U/mL and the protein concentration (8.3 mg/mL) at cultivation of 120 h, which was 1.33 times than before.

Keywords: N-acetyl transferase, *P. pastoris*, *Fusarium oxysporum*, phospholipase, high density fermentation

磷脂酶 (phospholipase, NCBI, EGU84973.1) 是可以将磷脂水解为小分子脂肪酸、甘二酯和磷酸胆碱的一类酶的简称[1]。目前磷脂酶被应用在很多方面, 例如制作面包、蛋黄[2]、植物油的精炼等方面, 特别突出的是在油脂脱胶方面[3]。与传统的物理脱胶方法相比, 酶法脱胶可以大大减少化学品的消耗和几乎不产生任何废水, 形成了一种经济, 高效, 稳定的绿色油脱胶工艺。过去的几十年中, 由于磷脂酶具有的巨大商业价值, 吸引了大量的研究。国内外关于磷脂酶制备的研究主要集中于磷脂酶基因在异源宿主系统进行表达, 来源于米曲霉[4]、酿酒酵母[5]、粗糙脉孢菌[6]的磷脂酶基因, 已经成功克隆表达。据报道, 磷脂酶基因异源表达的宿主包括大肠杆菌[7]、米曲霉、酿酒酵母[4]、黑曲霉[8]等, 主要通过发酵优化提高磷脂酶的表达水平。

来源于尖孢镰刀菌的磷脂酶基因, 目前并未有报道该基因在 *P.pastoris* 中克隆表达和优化, 为了提高磷脂酶的表达量, 本文选择高表达量的毕赤酵母表达系统[9-10]。甲醇利用型巴斯德毕赤酵母具有高表达、高稳定、高分泌、容易放大、成本低等优点, 同时可对表达的蛋白进行翻译后的加工与修饰, 已被广泛用于表达多种蛋白[11]。近年来研究在重组毕赤酵母中, 表达另外一种酶可以提高目标蛋白的表达量。在酵母、霉菌、植物等生物体中发现一种 N-乙酰转移酶 (Mpr1)[12]。Mpr1 是一类能催化乙酰基团在乙酰辅酶 A 和胺之间转移的酶。Mpr1 具有显著的抗 ROS 氧化胁迫生理功能, 增加温度耐受度[13], 以及冻干耐受度[14]等, 从而显著提高细胞活性, 提高磷脂酶在毕赤酵母中的表达量。

前期工作发现来源于尖孢镰刀菌的磷脂酶基因, 具有很好的稳定性和应用性, 构建磷脂酶在毕赤酵母中克隆表达的重组菌。在前期工作的基础上, 为了进一步提高磷脂酶在毕赤酵母中的表达量, 本研究构建了 N-乙酰转移酶在 *P.pastoris* KM71/pPIC9K-phospholipase 中表达的重组毕赤酵母菌株, 并探究其在 3.6 L 发酵罐中诱导表达磷脂酶的最佳条件, 为工业化应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 重组 *P. pastoris* KM71/pPIC9K-phospholipase 菌株和重组质粒 pPICZA-Mpr1 由本实验室构建并保存。*P. pastoris* 表达质粒 pPICZA 购于美国 Invitrogen 公司。

1.1.2 培养基 YPD 培养基: 10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 蛋白胨, 20 g/L 葡萄糖。

BMMY 培养基: 蛋白胨 20 g/L, 酵母膏 10 g/L, YNB 13.4 g/L, 生物素 4×10^{-4} g/L, 甲醇 40 g/L。

BMGY 培养基: 蛋白胨 20 g/L, 酵母膏 10 g/L, YNB 13.4 g/L, 甘油 10 g/L, 生物素 4×10^{-4} g/L。

种子培养基: 10 g/L 酵母提取物, 20 g/L 蛋白胨, YNB 13.4 g/L, 甘油 30 g/L。

BSM 培养基: 85%磷酸 26.7 ml/L, 二水硫酸钙 0.93 g/L, 硫酸钾 18.2 g/L。

七水硫酸镁 14.9 g/L,氢氧化钾 4.13 g/L,甘油 30 g/L,PTM1 4.35 ml/L。

PTM1 低盐溶液:硫酸铜 6 g/L,碘化钾 0.08 g/L,一水硫酸锰 3.0 g/L。

钼酸钠 0.2 g/L,硼酸 0.2 g/L,氯化钴 0.5 g/L,氯化锌 20.0 g/L,七水硫酸亚铁 65.0 g/L,生物素 0.2 g/L,浓硫酸 5.0 ml/L。

补料生长培养基:质量浓度为 500 g/L 的甘油(含 12 ml/L PTM1)。

甲醇诱导培养基:100%甲醇(含 12 ml/L PTM1)。

1.1.3 试剂 蛋白胨、酵母抽提物购自 Oxiod,酵母无氨基基本氮源培养基(YNB)、遗传霉素 G418 购自上海生工生物工程公司。其他均为国产分析纯试剂。

1.1.4 主要仪器 超净工作台购自苏州科盛有限制造公司;恒温水浴摇床购自江苏金坛亿通电子有限公司;凝胶成像仪、蛋白电泳仪购自美国 Bio-Rad 公司;3.6 L Infors 全自动发酵罐购自伊孚森生物技术有限公司(中国);FC-2002 型甲醇浓度检测流加仪购自上海苏波信息技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 重组 *P. pastoris* KM71/pPIC9K-phospholipase/pPICZA-MPR1 的构建与筛选 载体的线性化通过使用限制性内切酶 *Sac* I 进行,酶切体系(60 μL)如表 1 所示。

表 1 酶切体系

Table 1 Digested system

反应物	加入量/μL
重组质粒	25
Sac I	3
10×L Buffer	6
ddH_2O	26

上述各组分充分混匀,37 ℃水浴约 2 h,然后进行核酸琼脂糖凝胶电泳验证,凝胶成像仪下看目的片段,正确后胶回收。

(1) 将 6 μL 左右的线性化 DNA 加入 80 μL 酵母感受态细胞混合,转至提前预冷的 2 mm 电转杯,设置电压 2 500 V,快速电击,将电击时间控制 4~10 ms。

(2) 结束后将 1 mL 1 mol/L 山梨醇(提前预冷)迅速与菌体充分混匀,然后将其转移至 1.5 mL 无菌 EP 中,30 ℃、50 r/min 温浴约 2 h。

(3) 将上述处理好的菌液均匀涂布在含质量浓度 0.5 mg/mL 遗传霉素(G418)抗性 MD 平板上,于 30 ℃恒温条件下培养,直至长出单菌落。

(4) 牙签挑取 MD 平板上的菌落,点种到 YPD 平板(Zeocin 抗性)上,分别将 Zeocin 质量浓度梯度设为 0.5,1,2 mg/mL。

(5) 挑取 Zeocin 抗性质量浓度为 2 mg/mL 平板上的转化子接种到 YPD 培养基(10 mL)中,30 ℃,200 r/min 培养 24 h 左右,进行表达验证。

1.2.2 摇瓶发酵产磷脂酶 摇瓶发酵:从-80 ℃保藏的甘油管中以 2%的接种量接种至 YPD 液体培养基,培养 24 h。然后取 2.5 mL 转接 BMGY 培养基,培养 24 h,转移至 BMMY,加入甲醇于 30 ℃进行诱导,诱导后 120 h 取样测酶活,诱导 120 h 时,离心取得上清即为粗酶。

1.2.3 种子摇瓶培养 从甘油管中接 200 μL 菌液于 100 mL 发酵种子培养基中(100 mL 培养基/500 mL 三角瓶),于 30 ℃、200 r/min 培养 24 h。

1.2.4 补料高密度共表达发酵 甘油分批发酵阶段:将发酵种子培养基中菌液按 10%接种量接入装有 900 mL BSM 培养基的 3.6 L 全自动发酵罐中分批培养(以 25%氨水控制 pH 5.0,温度 30 ℃),调节搅拌转速和通气量维持溶氧在 30%以上。

甘油补料分批培养阶段:当甘油耗尽(约 18 h)时溶氧(DO)迅速上升,此时通过溶氧反馈调节以 16.3 mL/(L·h)的流速控制流加补料生长培养基。

甲醇诱导发酵阶段:当菌体达到一定质量浓度后停止补料,并让菌体饥饿约 30~60 min,然后通过 FC2002 型甲醇监测流加控制器(华东理工大学,上海)控制流加可维持恒定质量浓度的甲醇诱导培养基,诱导凝乳酶的表达。发酵控制过程由发酵罐控制系统软件进行在线控制和数据采集。

1.2.5 菌体生物量的测定 采用比色法,将菌液稀释到一定倍数后用 Bio-photometer 于波长 600 nm 处以去离子水为对照进行比色测定,以波长 600 nm 吸光度的数值在 0.2~0.8 之间为原则,OD_{600}=OD 读数×稀释倍数,确定 OD_{600} 的数值。称量干燥的 5 mL 离心管,取 4 mL 菌液放于其中,离心去上清,然后在 105 ℃下烘干至恒重,称量并计算菌体质量浓度。

1.2.6 蛋白含量的测定 重组 *P.pastoris* 发酵液中总蛋白含量的测定采用 Bradford 法,以牛血清蛋白为表样制作标准曲线。

1.2.7 *磷脂酶酶活测定方法* 将 200 μL 适当稀释的酶液加入到 10 mL 含有大豆卵磷脂的柠檬酸-磷酸氢二钠缓冲液(50 mmol/L,pH 5.0)中,使大豆卵磷脂的终质量浓度为 40 g/L。振荡混匀后置 55 ℃水浴锅中反应 5 min,加入终止剂 95%的乙醇,振荡,加入 100 μL 的酚酞,然后于自动滴定仪下用 NaOH 标准溶液滴定,观察颜色,确定空白颜色变色临界点为滴定的终点,将样品与空白滴定后的颜色一致,计算标准碱液平均消耗量。磷脂酶酶活力定义为:在特定条件下 1 min 水解磷脂产生 1 μmol 量游离脂肪酸所需的酶量即为一个磷脂酶活力单位(U)。

计算公式为

$$X=(V-V_0)*c*n*50/0.05*t$$

其中,X 为样品的酶活力,U/mL;V为滴定样品时消耗的 NaOH 标准溶液体积,mL;V_0 为滴定空白时消耗的 NaOH 标准溶液体积,mL;c为 NaOH 标准溶液的浓度,mol/L,50~0.05 mol/L NaOH 标准溶液 1.0 mL 相当于脂肪酸 50 μmol;n为酶液样品的稀释倍数;t 为测定酶活时的反应时间。

2 结果和讨论

2.1 重组菌 *P. pastoris* KM71/pPIC9K-phospholipase/pPICZA-Mpr1 的构建和摇瓶发酵

2.1.1 *重组菌株 P. pastoris KM71/pPIC9K-phospholipase/pPICZA-Mpr1 的构建和筛选* 将前期工作构建好的重组质粒 pPICZA-Mpr1 (图 1),用 *Sac* I 线性化[15],然后电转至 *P. pastoris* KM71/pPIC9K-phospholipase 感受态细胞,由于在 *P. pastoris* 染色体中已经有 pPIC9K-phospholipase (图 2),其携带有 G418 抗性基因,可直接涂布 G418 抗性质量浓度为 0.5 mg/mL MD 平板[16]。挑取抗性 MD 板上长出的重组转化子,点接到 Zeocin 抗性质量浓度分别为 0.5、1、2 mg/mL 的抗性 YPD 平板中。表达载体 pPICZA 有 Zeocin 抗性,可以通过筛选重组菌抗 Zeocin 的能力来获得高拷贝数目的基因转化子,最后在 2 mg/mL Zeocin 抗性质量浓度的 YPD 平板上挑选出转化子。

2.1.2 *重组菌株 P. pastoris KM71/pPIC9K-phospholipase/pPICZA-Mpr1 的摇瓶产酶* 将筛选出来的重组毕赤酵母菌株摇瓶发酵,诱导 120 h 后表达磷脂酶胞外酶活达到最大值为 850 U/mL,是前期磷脂酶单独表达胞外上清酶活的 1.3 倍。重组菌株表达的磷脂酶的 SDS-PAGE 电泳(图3)显示,在 30 kDa 处有目的蛋白条带,与理论的磷脂酶分子量相符合。综上所述:Mpr1 在 *P.pastoris* KM71/pPIC9K-phospholipase 中的表达可以提高磷脂酶的表达量。

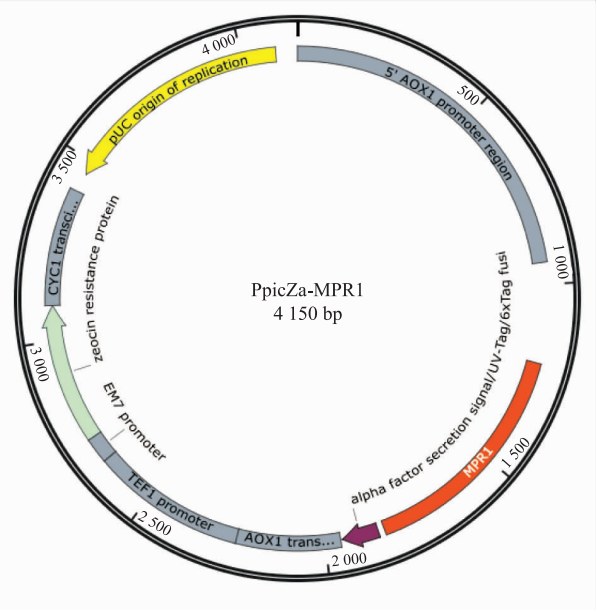


图 1 pPICZA-Mpr1 重组质粒图谱

Fig. 1 pPICZA-Mpr1 recombinant plasmid map

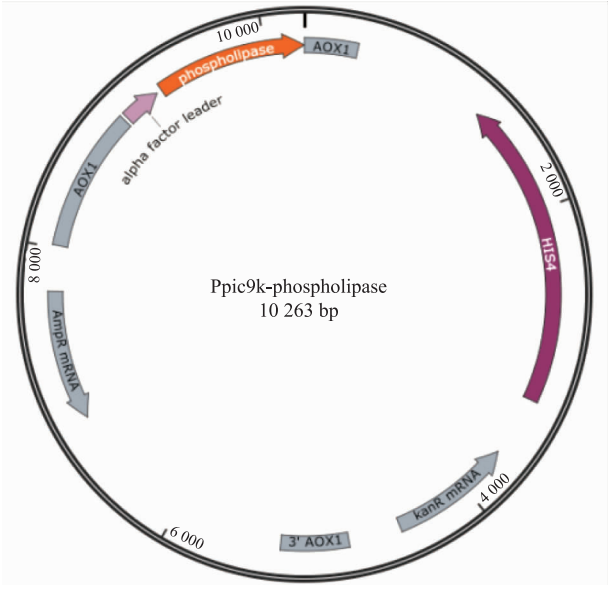
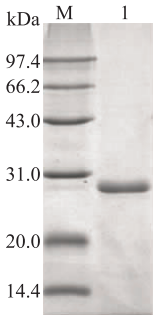


图 2 pPIC9K-phospholipase 重组质粒图谱

Fig. 2 pPIC9K-phospholipase recombinant plasmid map

2.2 3.6 L 发酵罐中高密度发酵生产磷脂酶

2.2.1 *不同的诱导温度对菌体生长及产磷脂酶的影响* *P. pastoris* 高密度发酵是工业化生产外源重



M-protein molecular markers; 1-the extracellular supernatant after inducing 120 h

图 3 Mpr1 和磷脂酶重组菌胞外上清液聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the extracellular supernatant in the recombinant strain

组蛋白的一个重要途径。温度是影响菌体生长和目的蛋白表达的很重要的因素[17-18]。升高温度,有利于菌体的生长,过高的温度将会影响菌体正常的生长和目的蛋白的表达。本次实验研究了在 3.6 L 发酵罐中菌体质量浓度为 40 g/L 开始诱导,诱导甲醇体积分数为 1.0%, 诱导温度分别为 28,30,32 ℃三个条件,进行诱导温度的优化。

如图 4 所示,当诱导温度为 28、30 ℃时,菌体的生长是随着时间的增加而逐渐递增的, 在诱导 110 h 后菌体浓度趋于稳定, 分别为 201、199 g/L。当诱导温度为 32 ℃时,诱导 0~90 h 菌体的生物量随着诱导时间的增加而增加, 但是当诱导时间在 90~120 h 时,发酵后期菌体的浓度开始逐渐降低,最后诱导 120 h 的菌体生物量为 182 g/L。当诱导温度超过 30 ℃,可能由于温度过高,影响菌体的生长,菌体开始裂解,所以应将诱导温度控制在 30 ℃以下。

如图 5 所示,磷脂酶的表达量随着诱导温度的降低, 表达量越高。诱导温度从 28 ℃增加到 30 ℃时,诱导 120 h 后,磷脂酶的酶活由 8 100 U/mL 降为 6 050 U/mL。当诱导温度从 30 ℃增加到 32 ℃时,磷脂酶的酶活由 6 050 U/mL 降为 5 100 U/mL。当诱导温度为 28 ℃时,诱导 120 h 的蛋白表达量分别为 8.3 mg/mL, 分别是诱导温度为 30、32 ℃的 1.32、1.56 倍。由此得知,诱导温度越低,酶的蛋白表达量越高。较低的温度诱导,可以稳定细胞膜和更加有效地降低蛋白酶的水解率,从而提高酶的表达量[19]。工业生产上诱导温度低于 28 ℃,具有生产成本高、制冷设备的承受能力要求高和工艺的可放大性可能性小的缺点,所以重组菌最优的发酵条件为 28 ℃。

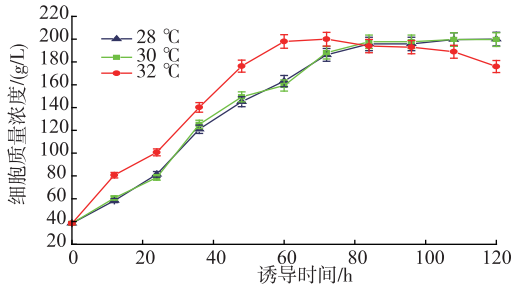


图 4 不同诱导温度菌体生长的影响

Fig. 4 Effect of different temperatures on cell growth during the induction phase

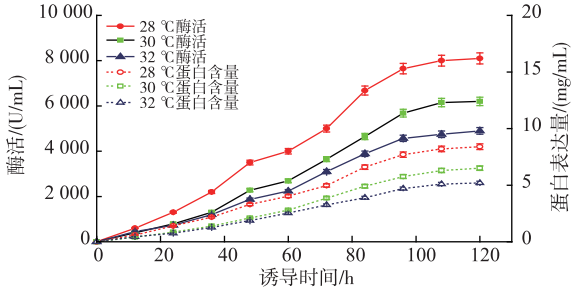


图 5 不同诱导温度对磷脂酶表达的影响

Fig. 5 Effect of different temperatures on the phospholipase expression during the induction phase

2.2.2 不同的初始诱导生物量对菌体生长及产磷脂酶的影响 不同的初始诱导菌体质量浓度对于产酶的影响是很关键的[20]。通常情况下外源蛋白的最终表达量与初始诱导菌体质量浓度成正比,菌体质量浓度越高,蛋白的表达量就越高[21]。但是当生物量达到过高水平时,培养条件容易受到制约,外源蛋白的产量和稳定性也会受到影响。为考察初始菌体质量浓度对菌体生长和产磷脂酶的影响,本研究在 3.6 L 罐中初始发酵培养基中的甘油耗尽, 开始指数流加不同体积的甘油,至菌体质量浓度分别达到 20、40、60 g/L 三个不同菌质量浓度时开始诱导;诱导阶段通过甲醇电极维持1.0%的甲醇体积分数,诱导温度 28 ℃,诱导 120 h 后,观察菌体生长和发酵产酶的情况。

由图 6 可知,在诱导前 100 h,初始诱导菌体质量浓度对菌体生长的影响较明显,但是达到稳定期后菌体质量浓度基本保持稳定。在初始诱导菌体生物量为60 g/L 时,诱导 120 h 后生物量达到最高,同时结合图 7 可知, 当初始诱导菌质量浓度由 20 g/L 增加到 40 g/L 时, 诱导 120 h 后磷脂酶酶活由 6

230 U/mL 增加到 8 100 U/mL，当初始诱导菌质量浓度从 40 g/L 增加到 60 g/L 时，磷脂酶酶活则由 8 100 U/mL 下降到 7 250 U/mL，因此初始诱导菌质量浓度为 40 g/L 时磷脂酶的表达量最高，最终细胞质量浓度维持在 201 g/L 左右，此时磷脂酶的生长情况和产酶情况最优。本次研究 Mpr1 和磷脂酶在 *P. pastoris* 中共表达中发现，磷脂酶的表达量并不是一直和初始诱导菌质量浓度成正比，而是在合适的生物量时诱导能较明显地提高重组酶表达量，这样既能维持细胞平稳生长，又能提高磷脂酶的表达量。因此本实验最优的初始诱导生物量为 40 g/L。

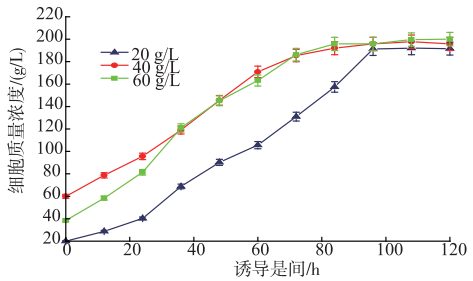


图 6　不同起始诱导菌体质量浓度对菌体生长的影响

Fig. 6　Effect of different initial induction cell density on cell growth and the phospholipase expression during the induction phase

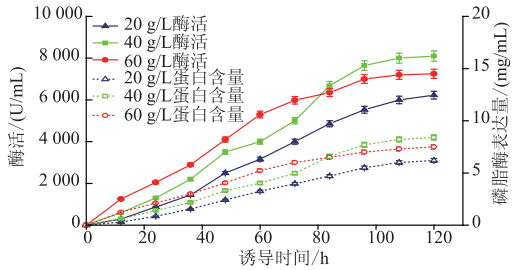


图 7　不同起始诱导菌体质量浓度对磷脂酶表达的影响

Fig. 7　Effect of different initial induction cell density on the phospholipase expression during the induction phase

2.2.3　不同的甲醇诱导体积分数对菌体生长及产磷脂酶的影响　*P. pastoris* 表达外源蛋白的过程中，诱导阶段甲醇体积分数不仅会影响细胞生长，与外源蛋白的表达产量也存在很大关系。甲醇作为诱导阶段唯一碳源和诱导剂，通过诱导细胞产生甲醇代谢所需醇氧化酶后消耗甲醇为细胞生长产酶提供能量，同时诱导外源蛋白表达，但在代谢甲醇过程中产生的甲醛和，等小分子过氧化物会对细胞产生毒害作用，因此如何控制合适的甲醇体积分数是高密度诱导发酵关键因素之一。本次研究中，初始诱导菌体质量浓度控制在 40 g/L、诱导温度为 28 ℃，探究了不同甲醇体积分数对菌体生长及产磷脂酶的影响。

菌体的生长情况如图 8 所示，甲醇体积分数维持分别在 0.5%、1.0%、1.5%，诱导 120 h 后菌体质量浓度分别为 199、200、195 g/L。菌体质量浓度大体一致，但是从整个诱导过程中可以看出甲醇体积分数为 0.5%、1.0%比 1.5%生长得好，说明在 1.5%体积分数甲醇条件下，细胞生长受到抑制，维持较高体积分数甲醇不利于细胞生长。

图 9 显示不同甲醇体积分数下细胞产酶水平变化，甲醇诱导体积分数为 1.0%时，磷脂酶的酶活单位是甲醇诱导体积分数分别为 0.5%、1.5%的 1.14、1.3 倍。诱导甲醇体积分数为 0.5%的蛋白表达量高于甲醇体积分数为1.5%，所以过高的甲醇体积分数不利于酶的表达。在适合的甲醇体积分数条件下，磷脂酶的酶活和蛋白表达量达到最高。但是较高的甲醇体积分数可能会产生毒素，影响细胞中的代谢途径，导致酶的表达量降低[22]。所以重组菌发酵产生磷脂酶最优的甲醇诱导体积分数为1.0%。

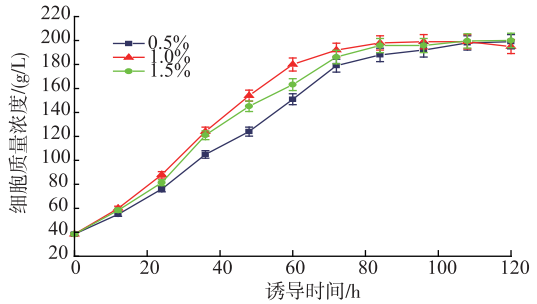


图 8　不同体积分数甲醇诱导对菌体生长的影响

Fig. 8　Effect of different methanol concentration on cell growth during the induction phase

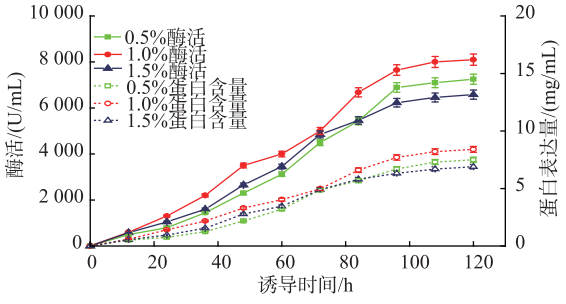


图 9　不同体积分数甲醇诱导对磷脂酶表达的影响

Fig. 9　Effect of different methanol concentration on the phospholipase expression during the induction phase

3 结 语

本研究中构建重组菌株 *P. pastoris* KM71/pPIC9K-phospholipase/pPICZA-Mpr1 和重组菌在 3.6 L 发酵罐中发酵工艺进行优化。摇瓶发酵初步研究得到胞外上清酶活 850 U/mL,是前期磷脂酶单独表达的 1.3 倍。重组 *P. pastoris* KM71/pPIC9K-phospholipase/pPICZA-Mpr1 菌株进行最佳发酵条件的探究,通过考察不同的诱导温度、起始诱导生物量和甲醇诱导体积分数,确定其最佳发酵条件。结果表明,在温度为 28 ℃,初始诱导菌体质量浓度为40 g/L,1.0%甲醇诱导体积分数时高密度发酵得到发酵上清的最大酶活可达到 8 100 U/mL。这为后续磷脂酶进一步工业化生产奠定了基础。

参考文献:

[1] DE MARIA L,VIND J,OXENBOLL K M,et al. Phospholipases and their industrial applications[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2007,74(2):290-300.

[2] DUTILH C,GROGER W. Improvement of product attributes of mayonnaise by enzymic hydrolysis of egg yolk with phospholipase A2[J]. **J Sci Food Agric**,1981,32:451-458.

[3] CLAUSEN K. Enzymatic oil-degumming by a novel microbial phospholipase[J]. **Eur J Lipid Sci Tech**,2001,103(6):333-340.

[4] SHIBA Y,ONO C,FUKUI F,et al. High-level secretory production of phospholipase A1 by Saccharomyces cerevisiae and *Aspergillus oryzae*[J]. **Bioscience,Biotechnology,and Biochemistry**,2001,65(1):94-101.

[5] LEE K S,PATTON J L,FIDO M,et al. The Saccharomyces cerevisiae PLB1 gene encodes a protein required for lysophospholipase and phospholipase B activity[J]. **The Journal of Biological Chemistry**,1994,269(31):19725-19730.

[6] TAKAYANAGI A,MIYAKAWA T,ASANO A,et al. Expression,purification,refolding,and enzymatic characterization of two secretory phospholipases A(2) from Neurospora crassa[J]. **Protein Expression and Purification**,2015,115:69-75.

[7] SONG J K,KIM M K,RHEE J S. Cloning and expression of the gene encoding phospholipase A1 from *Serratia* sp. MK1 in *Escherichia coli*[J]. **Journal of biotechnology**,1999,72(1-2):103-114.

[8] ROBERTS I N,JEENES D J,MACKENZIE D A,et al. Heterologous gene expression in Aspergillus niger:a glucoamylase-porcine pancreatic prophospholipase A2 fusion protein is secreted and processed to yield mature enzyme[J]. **Gene**,1992,122:155-161.

[9] CEREGHINO J L,CREGG J M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*[J]. **Fems Microbiol Rev**,2000,24(1):45-66.

[10] LIU X,WU D,WU J,et al. Optimization of the production of *Aspergillus niger* alpha-glucosidase expressed in *Pichia pastoris*[J]. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**,2013,29(3):533-540.

[11] MACAULEY P S,FAZENDA M L,MCNEIL B,et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system[J]. **Yeast**,2005,22(4):249-270.

[12] TAKAGI H,SHICHIRI M,TAKEMURA M,et al. Saccharomyces cerevisiae Sigma 1278b has novel genes of the N-acetyltransferase gene superfamily required for L-proline analogue resistance[J]. **J Bacteriol**,2000,182(15):4249-4256.

[13] DU X,TAKAGI H. N-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on Saccharomyces cerevisiae by reducing reactive oxygen species[J]. **Applied Microbiology and Biotechnology**,2007,75(6):1343-1351.

[14] DU X,TAKAGI H. N-acetyltransferase Mpr1 confers freeze tolerance on Saccharomyces cerevisiae by reducing reactive oxygen species[J]. **Journal of Biochemistry**,2005,138(4):391-397.

[15] 朱海峰. N-乙酰转移酶性质研究、在 *Picha pastoris* KM71/pPIC9K-αglu 中共表达及重组菌株发酵过程优化研究[D]. 无锡:江南大学, 2015.

[16] LIU Hujun,LUO Wei,FAN Xinlei,et al. Cloning and heterologous expression of glucose oxidase gene from *Aspergillus niger* PCTC in *Pichia pastoris*[J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2013,32(6):1673-1689.(in Chinese)

[17] CURVERS S,BRIXIUS P,KLAUSER T,et al. Human chymotrypsin B production with *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 1. Fermentation[J]. **Biotechnology Progress**,2001,17:495-502.

[18] JAHIC M,GUSTAVSSON M,JANSEN A K,et al. Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris*

fed-batch processes[J]. **Journal of Biotechnology**, 2003, 102(1): 45-53.

[19] DALY R, HEARN M T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production[J]. **Journal of Molecular Recognition**, 2005, 18(2): 119-138.

[20] LI P, ANUMANTHAN A, GAO X G, et al. Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*[J]. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 2007, 142(2): 105-124.

[21] ZHANG J H, WU D, CHEN J, et al. Enhancing functional expression of β-glucosidase in *Pichia pastoris* by co-expressing protein disulfide isomerase[J]. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, 2011, 16(6): 1196-1200.

[22] CELIK E, CALIK P. Production of recombinant proteins by yeast cells[J]. **Biotechnology Advances**, 2012, 30(5): 1108-1118.

会　议　消　息

第五届食物与环境科学国际会议(ICFES 2019)

(ICFES 2019)第五届食物与环境科学国际会议将于 2019 年 2 月 25-27 日在越南胡志明市隆重召开。

会议时间：2019-02-25 至 2019-02-27

会议地点：越南胡志明市

主办单位：ICFES 2019

会议亮点：

1. 录用文章能发表在 International Proceedings of Chemical, Biological and Environmental Engineering (IPCBEE)，被 EBSCO, Chemical Abstracts Services (CAS), CABI, CNKI, WorldCat, Google Scholar, Ulrich´s Periodicals Directory, Crossref, and Engineering & Technology Digital Library 等数据库检索。或者发表在 International Journal of Food Engineering (IJFE)，收录在 Engineering & Technology Digital Library, 以及被 WorldCat, Google Scholar, Cross ref, ProQuest , CABI 检索。或者发表在 International Journal of Environmental Science and Development (IJESD)，收录在 Chemical Abstracts Services (CAS), CABI, Ulrich Periodicals Directory, Electronic Journals Library, Crossref, ProQuest.

2.ICFES 2019 将在越南胡志明市工业大学隆重召开。

3.一位顶级科学家受邀参加会议并将为会议呈现学术前沿的大会报告和研究成果。她是越南胡志明市生物技术和食品技术研究所的所长 DAM SAO MAI。

会议地址：越南胡志明市工业大学

会议大学网址：http://www.iuh.edu.vn/en

投稿和联系方式：

投稿方式：http://confsys.iconf.org/submission/icfes2019

会议邮箱：icfes@cbees.net

联系电话：+852-3500-0137 (香港)/+1-206-456-6022 (美国)/+86-28-86528465 (中国)

会议专员助理：蔺女士