生物工程学报12(增刊):282～285,1996
Chinese Journal of Biotechnology

酵母工程菌株生产 α-淀粉酶培养方法研究

张小里* 赵彬侠 李宝璋
(西北大学化工系 西安 710069)
小林 猛
(名古屋大学工学部,名古屋 464-01,日本国)

酵母 *Saccharomyces cerevisiae* 作为传统酿造微生物及最简单的真核细胞,以其安全、易培养和可进行翻译后加工等优点而被认为是重要的基因工程寄主菌,已有多种真核基因如人胰岛素、生长激素、γ-干扰素等在酵母中表达成功[1～3]。利用酵母系统生产外源蛋白质时,除保持质粒稳定和启动子诱导基因表达外,还需设法使产物分泌,后者对正常生长、产物稳定和分离提纯至关重要。所以,酵母工程菌的培养具有其特殊性,其培养工程成为有意义的研究课题。本文选择一株产 α-淀粉酶基因工程酵母,试图通过其培养条件研究,提出一套简便的大规模培养酵母工程菌生产基因产品的方案。

1 材料和方法

1.1 菌种和质粒

质粒 pNA 3 含 SUC2 启动子、28kd killer 信号序列和 PGK 终止子等基因片段,目的基因为小白鼠 α-淀粉酶基因,质粒同时含酵母色氨酸合成基因 trp1。pNA3 转化 *S. cerevisiae* 的分泌变异株 A258 (MATα, ose-1, can1, his4, leu2, met14, trp1, ura3)构成分泌表达体系[4]。

1.2 培养基

天然成分培养基 YPD(酵母膏 10g/L,蛋白胨 10g/L,葡萄糖 20g/L,pH6),半合成培养基 SSM[6]添加必须氨基酸(His、Leu、Met、Ura),酵母合成完全培养基 CSM[7]。

1.3 培养方法

试管培养:用 1ml 对数增殖期的菌液接种装有 100ml 培养基的 T 型试管后,于 30℃ 水浴往复摇床上培养。罐培养:将 0.2L 对数增殖期的培养液接种到装有 0.8L 培养基的 1L 发酵罐中开始培养,罐温 30℃,pH5.8～6.2,DO2～5mg/L。试管培养用于培养基选择实验。

1.4 分析方法

菌体浓度:培养液适当稀释后测定吸光度 OD_{660}。葡萄糖浓度:用葡萄糖测定仪(Yellow Springs Instrument Co.)测定。乳酸浓度:用乳酸测定仪(ABLE)测定。质粒保持率:用色氨酸生长依赖菌落计数法检查。α-淀粉酶活力:依二硝基水杨酸法[3]在 30℃ 下测定,一个活力单位(u)定义为每分钟由酶催化反应生成 1μmol 葡萄糖的酶活。由于培养基中含酵母膏,蛋白质无法准确定量,故参考有关文献[5,6]定义比活力为单位光密度(OD_{660})菌体的酶活。

2 结果与讨论

2.1 培养基及诱导阶段碳源的选择

该酵母工程菌的选择压力为色氨酸缺陷,故为了保证质粒稳定,应优先选用不含色氨酸的合成培养基。本文首先用 CSM 培养基(含 16 种氨基酸、10 种维生素、5 种无机盐和 7 种微量元素)进行培养,但

陕西省自然科学基金资助项目。
* 现为浙江大学化工系博士生。
本文于 1995 年 7 月 17 日收到。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

未测出酶活。若用天然成分培养基(YPD)或给合成培养基中加入天然成分(酵母膏或酪蛋白氨基酸)则分泌表达可被诱导(表 1)。可见上述组成复杂的天然成分对该菌株分泌表达目的产物是需要的。酵母系统的其它菌株亦有类似结论报道[5,6]。从经验知道,酵母分泌外源蛋白质需要丰富培养基[8]。

SUC2 启动子操纵下的基因表达只有在葡萄糖限制条件下才能解除抑制。因此,如何供给菌增殖和基因表达所需碳源是大规模培养面临的课题之一。文献[6]使用葡萄糖在线监控系统在诱导阶段将葡萄糖浓度控制在 0.15g/L 以下进行诱导生产,但这需要复杂的设备和技术。本文通过选择不致于抑制基因表达的碳源解决此问题。用葡萄糖作碳源供养菌体生长至一定浓度后,分别用几种常见碳源替代葡萄糖诱导表达,结果如表 2 所示,采用乳酸作替代碳源时分泌到培养基中的淀粉酶活力最大。

表 1　几种培养基的培养结果

Media	Cell density (OD_{660})	α-Amylase activity (u/ml)
CSM + Yeast extract	10.5	11.81
CSM + Casamino acid	4.25	3.88
SSM + Yeast extract	5.75	10.83
SSM + Casamino acid	5.75	1.48
YPD	6.35	6.88

表 2　几种碳源情况下的培养结果

Carbon sources*	Cell density (OD_{660})	α-Amylase activity (u/ml)
Fructose	17.8	1.8
Galactose	15.7	0
Sucrose	15.4	0.61
Lactic acid	17.2	12.5

* Concentrations were 10g/L respectively

为了与碳源缺乏状况下分泌表达被诱导的情形(表 1)相比较,对诱导阶段添加与不添加乳酸进行对比实验(图 1),显然,添加乳酸时菌体浓度和酶活力均得到持续增长,说明诱导阶段用乳酸作替代碳源是有效的。

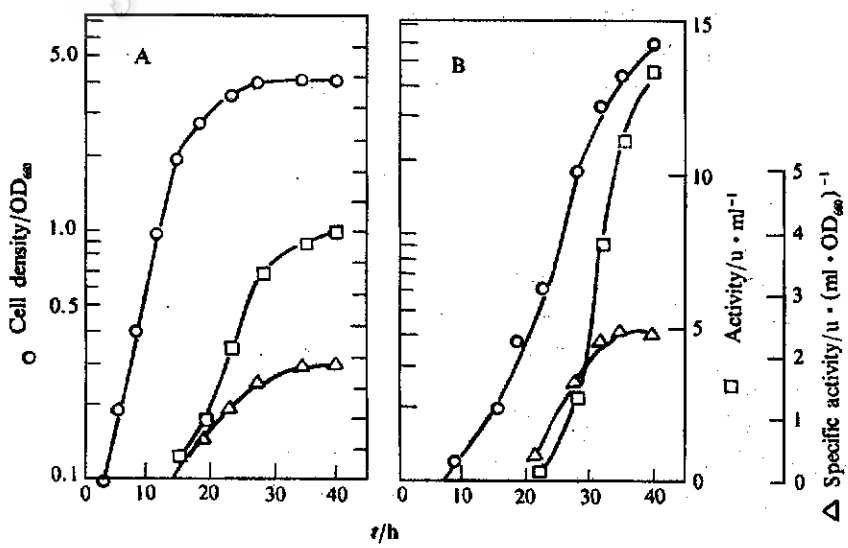

图 1　添加与不添加乳酸的对比实验

A:Non lactic acid;　B:10g/L lactic acid

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn

2.2 发酵罐放大实验

由上可见，用价格较低的SSM培养基，在诱导阶段添加酵母膏并用乳酸作替代碳源可满足菌生长和基因表达的要求，据此设计了流加培养工艺。培养分二个阶段，第一阶段以增殖为目的，给培养基中同时加入葡萄糖和乳酸，预调pH6开始培养，培养基缺乏色氨酸限制质粒脱落株增殖；葡萄糖优先被利用使菌生长较快。当葡萄糖消耗完后，转入分泌表达的第二阶段培养，加入酵母膏，碳源被自然切换为乳酸，培养过程中通过pH测控流加乳酸使其浓度一定。结果示于图2。菌的增殖在碳源切换后虽经过了一个转折期，但后期仍达到 $OD_{660}=70$（17.5mg-dry cells/ml，实测换算系数 $1OD_{660}=0.25$mg-dry cells/ml）的高浓度；基因表达方面，诱导后α-淀粉酶活力迅速升高，分泌到培养液中的酶活力最高值达79.2u/ml。最大比活力为2.08u/ml·OD_{660}（8.32 u/mg-dry cells），高于文献报道的将葡萄糖浓度控制在0.15g/L时的值7u/mg-dry cells[6]。培养过程中质粒保持率稳定在70%以上。

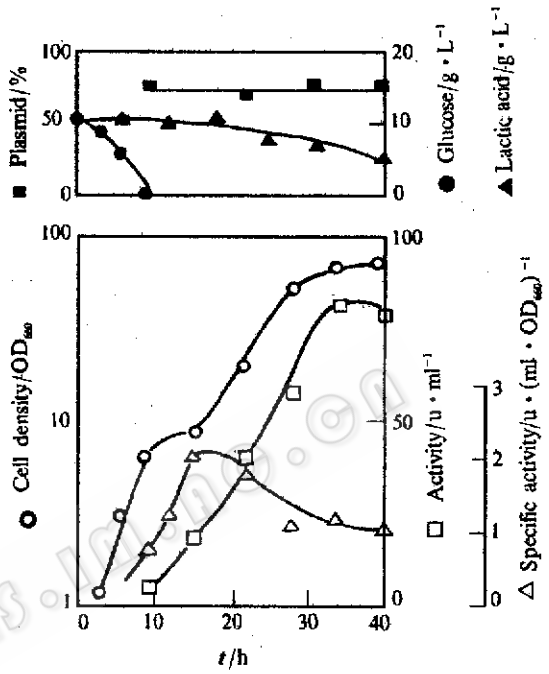

图2 流加乳酸的培养结果

2.3 结论

为了获得目的基因产物的高产率生产，必须在追求细胞表达水平的同时，实现菌体的高浓度增殖。通过上述实验发现：(1)丰富的天然成分如酵母膏或酪蛋白氨基酸对该菌株分泌表达外源蛋白质是需要的；(2)葡萄糖消耗完后，用乳酸作替代碳源可保证菌的高浓度增殖及高水平基因表达；(3)采用SSM培养基及增殖和诱导生产分开的两段培养法，在诱导阶段添加酵母膏、通过pH测控流加乳酸的发酵培养工艺既经济又简单易行，可实现 *S. cerevisiae* A258(pNA3)的高浓度生长、同时可获得较高的α-淀粉酶表达活力。由于SUC2启动子是酵母工程菌常用的强力启动子，本文所提出的培养方案对于类似的酵母工程菌放大培养亦有借鉴意义[9]。

参 考 文 献

[1] Tokunaga M, Iwai S, Gomi H. Gene, 6 1985, **39**: 117.
[2] Stepien P P, Brousseau R, Wu R *et al*. Gene, 1983, **24**: 289.
[3] Nishizawa M, Ozawa F, Hishinuma F *et al*. Agric Biol Chem, 1987, **52**: 515.
[4] 大岛孝之，张小里，饭岛信司等．化学工学论文集，1992，**18**：693.
[5] 林孔华，饭岛信司，黄世佑等．化学工学论文集，1991，**17**：680.
[6] Lin K H, Iijima S, Shimizu K *et al*. Appl Microbiol Biotechnol, 1989, **32**: 313.
[7] Anthony H R. In: Methods in Cell Biology, New York, Academic Press, 1975, **12**: 1.
[8] 李育阳等，生物工程学报，1987，**3**(2)：81.
[9] Shiba S, Nishida Y, Park Y S *et al*. Biotechnol Bioeng, 1994, **44**: 996.

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

Culture Methods for Effective Production of α-amylase by Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*

Zhang Xiaoli　Zhao Binxia　Li Baozhang
(Department of Chemical Engineering, Northwest university, Xi'an 710069)
Takeshi Kobayashi
(*Department of Biotechnology, Nagoya University, Nagoya* 464-01, *Japan*)

Abstract　The culture methods of oversecretion mutant *Saccharomyces cerevisiae* Strain which harbors a recombinant plasmid pNA3 were investigated. The main results were as follows: (1) Natural sources of nitrogen such as yeast extract and casamino acid, were necessary for secreting and expressing mouse α-amylase. (2) Effective gene expression from SUC2 promoter could be produced by replacing glucose with lactic acid as carbon source in the inducible stage. (3) A simple method and easy fed-batch culture process was proposed for culturing the yeast strain by feeding lactic acid with pH contorol. In a 1 liter jar fermenter, a cell density of 70 OD_{660} and α-amylase activity of 79.2 u/ml were attained respectively.

Key words　*Saccharomyces cerevisiae*, α-amylase, gene expression, fermentation

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部　http://journals.im.ac.cn