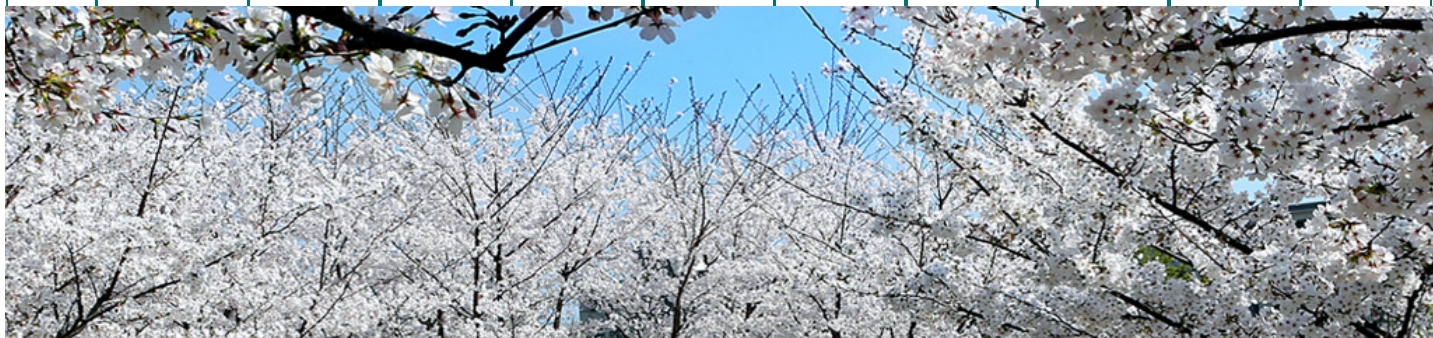




首页	实验室概况	研究方向	承担项目	科研成果	人才培养	学术交流	开放基金	规章制度	测试平台	下载中心
----	-------	------	------	------	------	------	------	------	------	------



人才培养

优秀学位论文

当前位置: 首页 > 人才培养 > 优秀学位论文 > 2011年

毕业生

2015年

2014年

2013年

2012年

2011年

2010年

优秀学位论文

硕士研究生：汪志浩（2011年江苏省优秀硕士论文）

在读研究生

导师：堵国成 教授

专业：发酵工程

论文题目：重组毕赤酵母生产碱性果胶酶的流加策略及工业化放大

碱性果胶酶是一类在碱性环境中仍能起作用的酶，它可作为一种天然助剂应用于纺织品，纤维制品等的精炼处理工艺中，对作物表面的纤维质和果胶质等杂质有一定的去除效果，同时对纤维素的损伤效果也不如碱法明显。因此，若将以碱性果胶酶为主的精练工艺替代传统的高温高碱的化学工艺，不仅可减少环境污染严重和能耗较高等问题，也可提高棉织物和纺织品的质地。

本课题在前期的研究中已经取得一定的成果：从自然环境中分离筛选得到了一株高产碱性果胶酶的枯草芽孢杆菌 *Bacillus sp.* WSHB04-02。之后利用分子克隆技术，将PGL的基因成功地表达于毕赤酵母GS115中；随后又通过高密度发酵和低温诱导发酵等策略，使PGL的产量有了大幅度的提高。在此基础上，本论文通过详尽分析了在菌体诱导期，利用混合碳源流加对重组 *Pichia. pastoris* GS115 高效表达的影响，发现山梨醇与甲醇的混合流加对PGL产量的提高作用较为明显；通过对细胞死亡率，胞内醇氧化酶和蛋白酶降解作用等研究进一步分析了山梨醇在提高PGL的产量时所起的作用。在此基础上，本研究又完成了碱性果胶酶发酵生产的初步放大和中试研究，即从3 L, 30 L, 1000 L, 到5000 L的逐级放大过程。主要研究结果如下：

1 为提高重组毕赤酵母生产碱性果胶酶(PGL)的产量和生产强度，在诱导期采用多种碳源与甲醇混合添加的模式。实验结果发现：甘油、山梨醇、乳酸与甲醇的混合添加均可以提高PGL的产量，其中山梨醇与甲醇的混合流加效果最为显著。研究表明，当以一个合适的流速添加山梨醇，甘油和乳酸等碳源时，碱性果胶酶的产量可以明显得到提高。而由于胞内启动子并没有被抑制，即其对应的醇氧化酶的活力没有被削弱，进而使毕赤酵母表达外源蛋白效率提高，且山梨醇对碱性果胶酶产量的提高较为明显。当山梨醇的流速为3.6 g/(h·L)时，PGL酶活可达1593 U/mL，生产强度为16.7 U/(mL·h)，比对照分别提高了84.6%和45.2%，实现了碱性果胶酶的高效生产。

2 在之前的研究中发现了山梨醇和甲醇混合添加的方式可以显著提高PGL的产量，当山梨醇的流速为3.6 g/(h·L)时，PGL酶活可达1593 U/mL。为了从机理上研究PGL产量提高的原因，本实验主要考察了以下几个参数指标的变化：首先山梨醇的添加显著降低了细胞死亡率，在诱导90 h以后，细胞死亡率从25%降低为9%左右；其次，3.6 g/(h·L)的山梨醇流速不但不会抑制启动子的表达，甚至有一定的促进作用，胞内醇氧化酶AOX的酶活为6.9 U/g(对照为5.7 U/g)；第三，由于细胞死亡率的降低，一定程度上削弱了由于细胞死亡而向胞外释放蛋白酶的过程，进而降低了蛋白酶对PGL的分解作用。所以我们认为在毕赤酵母表达体系中，山梨醇和甲醇的混合流加对于提高外源蛋白的产量有着明显的促进作用。

3 为实现碱性果胶酶的工业化生产，进行了不同反应器规模的放大研究，完成了从3L、30 L、1000 L至5000 L发酵罐的逐级放大。在克服了溶氧，传质等限制性问题的以后，产量得到了一定的提高，且发酵过程的可重复性得到了明显的改

善。30 L发酵罐的产量最大可达1425 U/ml, 而5000 L发酵罐的产量最大也可达到503 U/ml。由于在中试规模的发酵过程中无法控制较低的诱导温度, 使产量无法进一步提升, 所以如何提高反应器的传热能力, 降低发酵过程产生的高热量以确保较低的诱导温度是我们以后研究工作的一个方向。

关键词: 碱性果胶酶(PGL), 毕赤酵母, 双碳源, 流加策略, 山梨醇, 放大研究

(2) 博士研究生: 周景文 (2011年全国优秀博士论文)

导师: 陈坚教授

专业: 发酵工程

论文题目: 光滑球拟酵母中ATP的生理功能与作用机制

本文以一株能在胞外大量积累丙酮酸的光滑球拟酵母的(*Torulopsis glabrata*)四重维生素(硫氨酸、生物素、吡哆醇和烟酸)营养缺陷型菌株CCTCC M202019为研究对象, 以阐明能量代谢对酵母生理过程的影响为目标, 在初步了解*T. glabrata*中能量代谢途径的基础上, 运用代谢工程和微生物生理学的理论和方法, 就ATP代谢途径如何调控酵母胞内微环境, 并影响细胞生长与产物积累的机制展开研究。主要研究结果如下:

(1) 有机整合融合PCR、酵母高效电转化、制霉菌素富集和限制性培养基筛选等技术手段, 建立了一种针对酵母的无抗性标记并可重复使用的大片段缺失营养缺陷型菌株构建方法, 并成功构建了尿嘧啶缺陷型(Dura3)、精氨酸缺陷型(Darg8)和尿嘧啶精氨酸双缺陷型(Dura3Darg8)等三株*T. glabrata*营养缺陷型菌株。在此基础上, 验证了含有2mm片段的酵母载体在*T. glabrata*中的稳定性, 并实现了增强型绿色荧光蛋白的可诱导表达;

(2) ATP8、ATP6和ATP9基因分别编码F0F1-ATP合成酶的三个重要亚基, 均位于线粒体基因组上(mtDNA)。以一个线粒体重新编码的ARG8m基因作为筛选标记, 利用同源重组策略敲除ATP8、ATP6和ATP9基因。在这一过程中发现, 野生型和转化的mtDNA能同时存在于转化子中, 且随着培养条件的改变, 两种mtDNA所占的比例会发生规律性变化。作者将这一现象命名为单细胞线粒体基因组多态性(Single cell mitochondrial genome polymorphism, SCMGP)。研究表明, mtDNA不稳定性、线粒体融合/分裂过程和mtDNA的选择性丢失是形成SCMGP现象的主要因素。在理解SCMGP现象形成机制的基础上, 建立了利用厌氧培养消除SCMGP现象的策略, 获得了三株仅含有目标mtDNA的同质体ATP8、ATP6和ATP9缺失菌株, 并分别命名为ATP8、ATP6和ATP9;

(3) ATP6缺失可以导致*T. glabrata*在基本培养基和精氨酸补充培养基中培养24代后的mtDNA丢失率分别达到42%和63%。胞内ATP水平、活性氧(Reactive oxygen species, ROS)浓度、线粒体膜间腔(Mitochondrial intermembrane space, MIMS)中的pH值、跨膜电势(DYm)及乌头酸酶的表达水平与酶活性均表明, MIMS中H⁺的过量积累是导致ATP6缺失突变株mtDNA不稳定的关键因素。当细胞缺失ATP6基因后, 发挥离子通道作用的 α 亚基丢失, 导致MIMS中积累的H⁺无法通过F0F1-ATP合成酶得到释放, 导致ROS水平升高, 干扰线粒体基质蛋白的定位, 系统性的影响mtDNA的稳定性。为了提高ATP6敲除突变菌株mtDNA在不同培养条件下的稳定性, 将来源于荚膜组织胞浆菌(*Histoplasma capsulatum*)的交替氧化酶基因AOX1和来源于乳酸乳球菌(*Lactobacillus lactis*)的NADH氧化酶基因noxE表达于ATP6缺失突变株中, 显著提高了mtDNA稳定性, 两株菌分别命名为AOX和NOX;

(4) 以前面得到的一系列ATP合成酶缺失突变株为对象, 研究了胞内ATP水平变化对细胞生理过程的影响。ATP8、ATP6和ATP9三个基因的敲除显著降低了ATP水平, 强烈的抑制了细胞的生长, 48 h时的菌体干重分别降低了46.9%、44.2%和59.8%。在发酵初期, 由于F0F1-ATP合成酶活性缺失导致的胞内ATP水平下降, ATP8、ATP6、ATP9和NOX的胞内ATP水平分别为出发菌株的65.5%、62.0%、48.4%和73.0%。ATP水平的降低显著解除了ATP对糖酵解途径关键酶活性的抑制, 加速了糖酵解速率。但随着发酵继续进行至28 h后, ATP合成酶缺失菌株的糖酵解速率显著下降。研究表明, ATP合成酶缺失菌株中ATP水平的显著下降和ROS水平的显著提高, 导致细胞抵御酸胁迫和渗透压胁迫的能力显著下降。在胞质中表达NADH氧化酶基因noxE可以促进NADH代谢, 降低胞内ROS水平, 改善胞内微环境, 从而促进细胞生长和丙酮酸的积累。代谢网络通量、中心代谢途径关键酶表达水平和酶活性分析表明, F0F1-ATP合成酶缺失对胞质中的糖酵解途径具有显著影响, 而对位于线粒体基质中的三羧酸循环影响较小, 表明线粒体的亚细胞区隔可以有效保护其中进行的物质合成和产能代谢途径;

(5) 真核微生物细胞依靠一系列ATP酶, 利用水解ATP产生的能量, 进行H⁺和其它离子的转运, 以维持各亚细胞区隔间的pH梯度。当胞外pH较低时, 细胞需要消耗更多的ATP维持更高的pH梯度。为了研究胞内ATP水平在细胞应对胁迫过程中的作用, 通过在培养基中添加柠檬酸盐促进ATP供给, 研究低pH条件下*T. glabrata*的细胞生长和丙酮酸生产。结果表明, ATP供给的增强显著促进了依赖于ATP的胞内pH平衡过程, 使培养基、胞质和液泡之间的pH梯度得到显著提高。pH梯度与胞内ATP浓度之间的量化关系表明胞内ATP浓度的上升可以显著的促进相关的pH平衡过程。此外, *T. glabrata* CCTCC M202019的pH平衡能力显著弱于其它常见的酵母菌株, 可能也是其可以快速积累丙酮酸的一个重要原因。

关键词: 光滑球拟酵母, 有机酸, 线粒体, F0F1-ATP合成酶, 电子传递链, 能量代谢, 胞内微环境。



技术支持：信息化建设与管理中心
校内备案号：JW备170139

地址：江苏省无锡市蠡湖大道1800号
邮编：214122
联系电话：0510-85912032
服务邮箱：klib@jiangnan.edu.cn



微信服务号



微信订阅号



e江南APP