

重组大肠杆菌高密度发酵生产类人胶原蛋白 II 条件优化

常海燕^{1,2,3} 范代娣^{2,3*} 骆艳娥^{2,3} 马晓轩^{2,3} 米 钰^{2,3} 朱晨辉^{2,3} 迟 雷^{2,3}

(1. 西北大学生命科学学院 陕西 西安 710069)

(2. 西北大学 陕西省可降解生物医用材料重点实验室 陕西 西安 710069)

(3. 陕西省生物材料与发酵工程技术研究中心 陕西 西安 710069)

摘 要: 通过考察 pH、培养温度、溶解氧浓度和诱导时机对细胞生长和类人胶原蛋白 II 表达的影响, 确定这些因素的最佳控制范围, 优化发酵条件。结果表明: 控制初始 pH 为 6.5, 诱导后 pH 为 6.8, 培养温度 34°C, DO 20%及在对数生长后期进行诱导, 有利于细胞生长和外源基因的表达, 最终细胞密度为 88.4 g/L, 类人胶原蛋白 II 产量达到 14.2 g/L。

关键词: 类人胶原蛋白 II, 高密度发酵, 发酵条件, 诱导时机

Optimization of Recombinant *E. coli* High-density Fermentation for Expressing Human-like Collagen II

CHANG Hai-Yan^{1,2,3} FAN Dai-Di^{2,3*} LUO Yan-E^{2,3} MA Xiao-Xuan^{2,3} MI Yu^{2,3}
ZHU Chen-Hui^{2,3} CHI Lei^{2,3}

(1. College of Life Science, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

(2. Shaanxi Key Laboratory of Degradable Biomedical Materials, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

(3. Shaanxi R&D Center of Biomaterials and Fermentation Engineering, Xi'an, Shaanxi 710069, China)

Abstract: To study and optimize the fermentation parameters for expressing human-like collagen during *E. coli* high-density fermentation. The effects of pH, temperature, dissolved oxygen and induction instant on the cell growth and human-like collagen production were investigated to optimize the fermentation conditions. The results demonstrated that the following conditions were beneficial for cell growth and foreign gene expression, controlling pH in phase induction at 6.8 and initial pH at 6.5, maintaining fermentation temperature and dissolved oxygen concentration was controlled at 34°C and 20% respectively, and implementing induction at the later logarithmic growth phase. Under the optimized condition, the cell density and human-like collagen yield could reach 88.4 g/L and 14.2 g/L, respectively.

Keywords: Human-like collagen, High-density fermentation, Fermentation condition, Induction instant

基金项目: 国家 863 计划资助项目(No. 2006AA02Z246); 国家自然科学基金项目(No. 20476085; 20776619); 陕西省教育厅科研计划项目(No. 07JK417)

* 通讯作者: Tel: 86-29-88541961; 信箱: fandaidi@nwu.edu.cn

收稿日期: 2008-10-23; 接受日期: 2008-12-27

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

高密度发酵在获得较高生物量的同时，还可以显著提高目的基因表达产物的浓度。影响高密度发酵的因素非常多，首先培养温度是影响细菌生长和调控细胞代谢的重要因素之一。柴家前等认为较高的温度有利于细菌的高密度发酵，低温培养能提高重组产物的表达量，而且在不同培养阶段采用不同的培养温度有利于提高细菌的生长密度和重组产物的表达量，并可缩短培养周期^[1]；其次溶解氧的浓度过高或过低都会影响细菌的生理代谢，适当的溶氧水平有利于菌体生长和产物合成，因此有必要考察每一种发酵产物的临界溶氧浓度和最适溶氧浓度，并控制发酵过程在最适的溶氧浓度范围；另外，诱导时机也是必须考虑的问题，一般控制在对数生长期或后期。此外，还有pH、培养基组分、比生长速率等影响因素。

胶原蛋白是一种广泛存在于有机体中的结构蛋白质，是皮肤、软骨、动脉血管壁及结缔组织的主要成分^[2]。胶原蛋白分子大多是由3条 α 链交联成为规整的螺旋结构，在体外可形成较大的有序结构，能聚合成强度良好的纤维，成为细胞外间质的主要功能蛋白，具有良好的生物相容性、生物降解性与吸收性、促新细胞形成及促上皮细胞形成等功能，因而广泛应用于医药工业、食品工业、日用化学品工业、生物合成及修饰等领域。重组类人胶原蛋白是发酵生产的人源型胶原蛋白，具有独特的化学结

构，提高了结构灵活性和衍生物多变性。类人胶原蛋白（Human-like collagen）是类人胶原蛋白族的系列衍生物之一，其生物学性能良好。类人胶原蛋白与类人胶原蛋白相比，溶液颜色浅、蛋白纤维长，真空冷冻干燥后质地较硬，室温条件下具成胶性，且胶体性质不易发生改变，适合做人工皮肤、人工血管、手术缝合线等医用材料，为人工骨骼、人造人体器官等提供了可能的支撑物^[3,4]。

本论文以分批-补料发酵形式考察 pH、培养温度、溶解氧浓度和诱导时机对类人胶原蛋白表达的影响，以提高类人胶原蛋白的表达率，从而为进一步扩大生产提供技术支持。

1 材料和方法

1.1 供试菌种

基因工程菌*E. coli* BL21，卡那抗性，温度诱导，质粒pNWCP31^[5]。由本实验室构建并保存。

1.2 培养基

种子培养基：LB 培养基。发酵培养基和补料培养基成分见表 1。

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养：斜面活化 24 h，34℃ 下将种子在装液量为 50 mL 的 300 mL 摇瓶中以 220 r/min，振荡培养 10 h，然后按 25%接种量接入二级种子瓶中，在同样条件下培养 10 h。

表 1 培养基的组成
Table 1 Medium composition

成分 Composition	分批发酵培养基(g/L) Medium of batch fermentaion	补料培养基(g/L) Medium of fed fermentation
葡萄糖 Glucose	40.0	1000.0
酵母粉 Yeast extract	60.0	400.0
K ₂ HPO ₄	5.6	26.0
NaH ₂ PO ₄	3.4	12.6
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.2	16.5
MgSO ₄	1.8	20.0
EDTA	0.8	3.0
微量元素 Oligoelement	0.6	3.0
卡那霉素硫酸盐 Kanamycin sulfate	0.003	0.003

1.3.2 分批-补料培养：将二级种子按 8%接种量接入发酵罐中，温度为设定值。通过调节空气流量、提高搅拌转速和罐压控制 DO 在 10%~40%，pH 由氨水自动调节，初始控制在 6.5。待罐中葡萄糖即将耗尽时，开始流加补料培养基，将比生长速率控制在

0.25/h。分别在对数生长期，中后期及后期，快速升温至 42℃ 进行诱导，3 h 后降温至 39℃，继续诱导 5 h~6 h。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体浓度测定：发酵液经合适倍数的稀释后，

用紫外分光光度计在 $\lambda = 600 \text{ nm}$ 处测吸光值, 其与稀释倍数的乘积即发酵液的菌体浓度(OD_{600})。

1.4.2 细胞干重(DCW)测定: 取 30 mL 发酵液, 离心收集, 弃去上清。菌体于 105°C 烘至恒重, 测定即为细胞干重。

1.4.3 质粒稳定性检测: 将发酵液适当稀释后涂布于不含卡那霉素的 LB 平板上, 于 37°C 培养 48 h 后, 挑取 100 个单菌落复制到含有卡那霉素的 LB 平板上, 37°C 培养 48 h 后, 通过计算含质粒细胞所占的百分率来确定质粒稳定性。

1.4.4 残糖测定: 斐林试剂法^[6]。

1.4.5 $\text{NH}_2\text{-R}$ 测定: 甲醛滴定法。

1.4.6 胶原蛋白含量测定: 羟脯氨酸测定法^[7]。

1.4.7 总蛋白浓度测定: 考马斯亮蓝法。

1.4.8 乙酸含量: RP-HPLC^[8]。

1.5 发酵罐

瑞士 Bioengineering 公司 L523 型 12.8 L 自动控制发酵罐, 可在线检测温度、转速、溶解氧浓度、pH 和补料速度。

2 结果与分析

2.1 pH 优化

培养温度设为 30°C , 初始 pH 为 6.5, 当分批发酵结束后, 进入补料发酵阶段, 采用近指数流加方式^[9], 控制比生长速率在 0.25/h, 培养 12 h 后升温至 42°C 诱导, pH 分别控制在 6.5、6.6、6.7、6.8 和 6.9, 3 h 后降温至 39°C 继续培养 5 h~6 h。结果如图 1 所示。

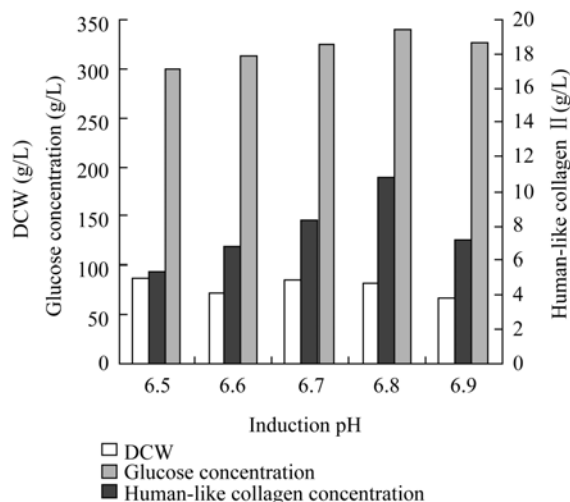


图 1 pH 对细胞生长和类人胶原蛋白 II 表达的影响

Fig. 1 Effect of pH on cell growth and human-like collagen II expression

葡萄糖、氨基酸等亲水性物质不能直接透过脂双层, 而是需要转运蛋白的协助才能进入胞内, 这些转运蛋白活性位点的电离依赖于胞外的 pH。而工程菌的生长和表达是两个截然不同的阶段, 其对培养基中的 pH 就有一定的要求。如刘晓铭和 Erika 等人分别采取 pH 梯度法, 即在不同阶段维持不同的 pH, 可以提高目的蛋白的产量^[10,11]。实验结果发现, 菌体生长和外源蛋白表达所需的最适 pH 是不同的, 阶跃变化式 pH 控制比恒定 pH 控制更有利于类人胶原蛋白 表达。当菌体在 pH 6.5 生长, 诱导后在 pH 6.8 表达产物时, 菌体密度较高, 为 82.3 g/L, 类人胶原蛋白 浓度最高, 为 10.8 g/L。

2.2 培养温度的优化

发酵过程中, 前期培养分别采用 30°C 、 34°C 和 36°C 3 个不同的培养温度和适宜的补料速率, 初始 pH 为 6.5, 12 h 后升温诱导, pH 调节为 6.8, 之后降温继续培养 5 h~6 h。结果如图 2, 图 3 所示。

可以看出, 36°C 下进行培养时, 细菌的比生长速率较高, 糖耗快, 12 h 后 A_{600} 即可达到 63 左右, 此时溶氧显著降低。该条件下最终生物量较高, 达到 89.5 g/L, 类人胶原蛋白 浓度 10.0 g/L, 表达率(即每 g 干细胞中类人胶原蛋白 含量)为 11.2%, 质粒稳定性为 67%。在 30°C 进行培养时, 细菌的比生长速率较低, 糖耗慢, 最终生物量较低, 仅为 67.6 g/L, 类人胶原蛋白 浓度 7.24 g/L, 表达率 10.7%, 质粒稳定性 83%。其原因是大肠杆菌的最适生长温度为

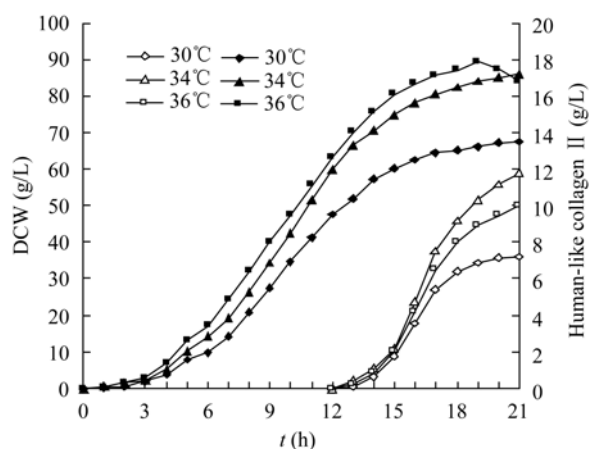


图 2 不同温度对细胞生长和类人胶原蛋白 II 表达的影响

Fig. 2 Effect of different temperature on cell growth and human-like collagen II expression

注: 实心图标为细胞密度; 空心图标为类人胶原蛋白 II 浓度。下同。

Note: Solid icons represent cell density; hollow icons represent human-like collagen II expression. The same below.

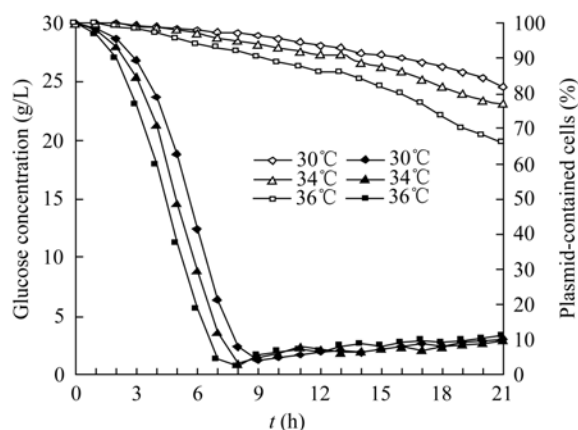


图3 不同温度对质粒稳定性和葡萄糖消耗的影响

Fig. 3 Effect of different temperature on plasmid stability and glucose consumption

37°C, 而质粒稳定温度大多为 30°C^[12]。36°C下, 菌体生理代谢活性较强, 比生长速率较快, 但由于质粒复制速度赶不上菌体生长速度^[13], 质粒拷贝数减少, 造成质粒稳定性降低, 易丢失, 影响蛋白产量。且菌体过早自溶, 19 h后细菌密度开始下降。30°C培养条件下, 虽然质粒稳定性较强, 但细菌代谢水平比较缓慢, 繁殖速度慢, 生物量低, 影响蛋白最终产量。34°C时, 菌体密度、质粒稳定性都较高, 类人胶原蛋白产量是三者中最高的, 达到 11.8 g/L, 表达率提高到 14.2%。由此可见, 在菌体生长阶段培养温度控制在 34°C较为适宜。

2.3 溶氧(DO)的优化

本实验中, 温度控制在 34°C, 采用近指数流加方式控制比生长速率在 0.25/h, 通过调整搅拌转速及空气流量, 将 DO 分别控制为 10%、20%、30%和 40%饱和度。结果见图 4, 图 5 所示。

好氧发酵过程中, 一味追求溶氧水平未必能得到高表达效果。如Meyer和 Fiechter发现, 用枯草杆菌生产A干扰素时, 溶氧限制在较低水平对产物形成有利^[14]。研究认为, 氧含量充分, 菌体繁殖速度过快, 容易导致质粒丢失。另外, 过高的溶解氧浓度也不会提高细胞的比耗氧速率, 反而增加成本; 反之, 溶氧水平过低会弱化TCA循环, 改变转录水平的相关基因与葡萄糖和乙酸代谢^[15], 导致乙酸大量积累, 抑制菌体生长, 降低生物量和蛋白产量。另外还有研究发现, 氧浓度太高时, 乙酸也会生成, 当溶氧相对较低时, 生成的细胞膜中不饱和脂肪的含量高, 流动性大, 易于吸收基质^[16]。实验结果发现, DO为 20%时, 细菌密度和类人胶原蛋白 II 浓度

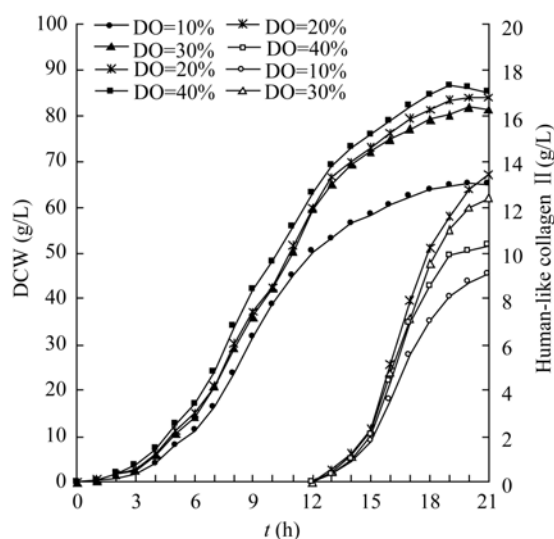


图4 不同溶氧水平对细胞生长和类人胶原蛋白 II 表达的影响

Fig. 4 Effect of different dissolved oxygen level on cell growth and human-like collagen II expression

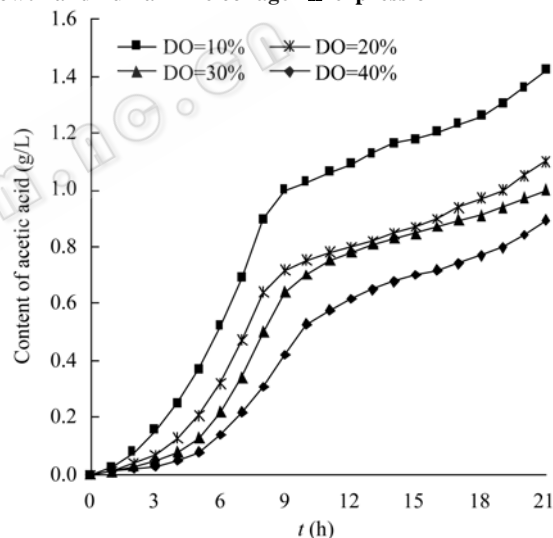


图5 不同溶氧水平对乙酸生成的影响

Fig. 5 Effect of different dissolved oxygen level on production of acetic acid

很高, 分别达到 83.9 g/L 和 13.4 g/L, 且代谢副产物乙酸浓度也较低, 为 1.1 g/L。

2.4 诱导时机的选择

温度控制在 34°C, DO控制在 20%, pH为 6.5 的条件下, 分别在 $OD_{600}=80$, 即细胞密度为 40 g/L(对数生长中期), $OD_{600}=95$, 即细胞密度为 48 g/L(对数生长中后期)和 $OD_{600}=120$, 即细胞密度为 56 g/L(对数生长后期), 升温至 42°C开始诱导, 同时调节pH为 6.8, 3 h后降温培养。每小时取样测定细胞密度和类人胶原蛋白 II 的表达量。结果如图 6 所示。

可以看出, 当 $OD_{600}=80$, 即细胞密度为 40 g/L

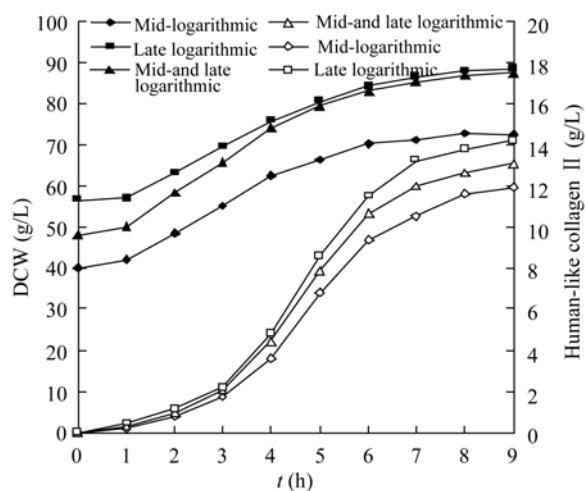


图6 诱导时机对细胞生长和类人胶原蛋白II表达的影响
Fig. 6 Effect of induction opportunity on cell growth and human-like collagen II expression

时,细菌处于对数生长中期,细胞生长旺盛,代谢活跃,菌体的比生长速率较高,但是诱导后菌体繁殖速度降低,大量的宿主细胞资源被消耗,最终细胞密度是三者中最低的。在对数生长后期诱导时,细菌密度高,对营养和氧的需求量大,菌体旺盛的代谢受到抑制,主要进行外源蛋白的表达,最终细胞密度达到 88.4 g/L,类人胶原蛋白的产量达到 14.2 g/L。

3 结论

本研究主要考察了pH、培养温度、溶解氧浓度和诱导时机对重组大肠杆菌高密度发酵生产类人胶原蛋白的影响。结果分析表明:菌体生长和外源蛋白表达的最适pH是不同的,采取阶跃变化式pH控制方式,更有利于菌体生物量和外源蛋白表达量的提高;较高的培养温度有利于细菌的高密度发酵,而低温培养能提高重组产物的表达量,可能是适当降低培养温度,菌体生长速度相对较慢,有利于质粒的复制,另外有研究表明,适当降温则氧气溶解性相对较好,高密度培养时,能防止菌体厌氧生长,抑制乙酸的生成^[17],所以对于基因工程菌应该适当降低培养温度。

对于本实验中的基因工程菌 *E. coli* BL21,诱导前 pH 6.5 有利于菌体生长,诱导后 pH 6.8 适于类人胶原蛋白表达。培养温度为 34°C 时,有利于细菌的生长和类人胶原蛋白的表达。当 DO 为 20% 时,可能由于乙酸等代谢副产物积累较少,细菌密度和类人胶原蛋白产量都较高。另外,最佳诱导时机为对数生长后期,最终细胞密度高达 88.4 g/L,类人

胶原蛋白的产量达到 14.2 g/L。

参考文献

- [1] 柴家前,陆庆泉,沈志强,等. 大肠杆菌高密度发酵研究进展. 中国预防兽医学报, 1998, 22(6): 273-275.
- [2] 顾其胜,蒋丽霞. 胶原蛋白与临床医学. 上海: 第二军医大学出版社, 2003, pp.101-292.
- [3] Luo YE, Fan DD, Ma XX, *et al.* Process control for production of human-like collagen in fed-batch culture of *Escherichia coli* BL21. *Chen J Chem Eng*, 2005, 13(2): 276-279.
- [4] 薛文娇,范代娣,尚龙安,等. 离子交换批量层析纯化重组类人胶原蛋白II. 化学工程, 2006, 34(11): 8-11.
- [5] 范代娣,段明瑞,米钰,等. 重组 *E. coli* 基因工程菌高密度培养生产人源型胶原蛋白. 化工学报, 2002, 53(7): 752-754.
- [6] 张龙翔. 生物化学实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1981, pp.253-254.
- [7] 张玉娥. 肺组织胶原蛋白测定方法的研究. 中兽医医药杂志, 1997, 4: 13-14.
- [8] Suare DC, Kilikian BV. Acetic acid accumulation in aerobic growth of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochemistry*, 2000, 35: 1051-1055.
- [9] 段明瑞,米钰,范代娣. 重组人源型胶原蛋白基因工程菌补料分批发酵过程动力学研究. 化学反应工程与工艺, 2002, 18(3): 238-243.
- [10] 刘晓铭,林玉. 基因工程菌发酵中 pH 值对包涵体形成及目的蛋白表达的影响. 生物技术, 1998, 8(5): 16-18.
- [11] Erika Van den Berghe, Tom De Winter, Luc De Vuyst. Enterocin a production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 406 is characterised by a temperature- and pH-dependent switch-off mechanism when growth is limited due to nutrient depletion. *International Journal of Food Microbiology*, 2006, 107: 159-170.
- [12] 尹淑琴,范艳,常泓. 基因工程菌的高密度发酵研究. 安徽农业科学, 2007, 35(11): 3175-3176, 3192.
- [13] 钟根深,石炳兴,吴祖泽. 重组大肠杆菌高密度培养. 中国生物工程杂志, 2005: 27-31.
- [14] Meyer HP, Iechter AF. Production of cloned human leukocyte interferon by *Bacillus subtilis*: Optimal production is connected with restained growth. *Appl Environ Microbiol*, 1985, 50: 503-507.
- [15] Je-Nie Phue, Joseph Shiloach. Impact of dissolved oxygen concentration on acetate accumulation and physiology of *E. coli* BL21, evaluating transcription levels of key genes at different dissolved oxygen conditions. *Metabolic Engineering*, 2005, 7: 353-363.
- [16] 张建勇,王晓港,王水莲,等. 溶氧对重组毕赤酵母高密度发酵生产腺苷蛋氨酸的影响. 齐鲁药事, 2007, 26(7): 428-430.
- [17] 朱红裕,李强. 外源蛋白在大肠杆菌中的可溶性表达策略. 过程工程学报, 2006, 6(1): 150-155.