

文章编号:1006-3080(2011)02-0163-04

碳氮源平衡流加策略提高重组大肠杆菌表达 融合型乳酸片球菌素的产率

宋建民^{1,2}, 何凯红², 孙爱友¹, 魏东芝¹

(1. 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237;

2. 合肥学院生物与环境工程系, 合肥 230022)

摘要:设计了基于碳氮源平衡的底物流加策略,研究其对重组大肠杆菌(*Escherichia coli*)生长与表达目的蛋白融合型乳酸片球菌素的影响。在菌体生长的不同时期流加不同碳源与氮源的质量比(m_C/m_N)的营养源,实现碳氮源的实时平衡流加,有效地避免了乙酸的积累,获得了高密度的菌体(最大菌体密度可达 57.6 g/L)和高表达的融合蛋白(产率可达 46.3 mg/L)与可溶性蛋白(产率可达 15.7 mg/L)。

关键词:重组大肠杆菌; 碳氮源平衡流加策略; m_C/m_N ; 高密度发酵; 融合型乳酸片球菌素
中图分类号:TQ920 **文献标志码:**A

Effect of Carbon-Nitrogen Balance Feeding Strategy on Growth of Recombinant *Escherichia coli* and Fusion-Typed Pediocin PA-1 Expression

SONG Jian-min^{1,2}, HE Kai-hong², SUN Ai-you¹, WEI Dong-zhi¹

(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China;

2. Department of Biological and Environmental Engineering, Hefei University, Hefei 230022, China)

Abstract: New feeding strategies based on feeding balance between carbon source and nitrogen source were designed. Using a multistage carbon-nitrogen ratios (m_C/m_N) feeding strategy to achieve real-time feeding balance of carbon and nitrogen during fermentation process, a high density of biomass (maximum biomass density of dry weight of up to 57.6 g/L) and high expression of fusion protein (content of up to 46.3 mg/L) and soluble protein (content of up to 15.7 mg/L) were obtained. The accumulation of acetate, which usually occurs during the process of high-density fermentation of recombinant *Escherichia coli*, was effectively avoided.

Key words: recombinant *Escherichia coli*; carbon-nitrogen balance feeding strategy; carbon-nitrogen ratio; high-density fermentation; fusion-typed pediocin PA-1

碳源和氮源是重组大肠杆菌(*Escherichia coli*)生长和表达目的蛋白的培养基中最重要的两种成

分,实现重组 *Escherichia coli* 高密度培养和高表达目的蛋白必须适宜地流加碳源和氮源。合理的营养

收稿日期:2010-11-22

基金项目:国家自然科学基金项目(200706017)

作者简介:宋建民(1973-),男,河南固始人,讲师,研究方向为发酵工程。

通讯联系人:孙爱友, E-mail:sunaiyou@ecust.edu.cn

源流加方式的采用既满足菌体生长与产物积累的营养所需,且培养基成分又低于抑制浓度。现已开发出了许多营养源流加策略,如指数流加、Stat-DO 补料策略、Stat-pH 补料策略等^[1-2]。不当的葡萄糖流加容易造成发酵过程中乙酸的积累,而乙酸对菌体生长与目的蛋白表达有抑制作用,因此避免乙酸的生成是许多碳源流加策略制定的出发点^[3-5]。同时,碳源和氮源在重组 *Escherichia coli* 菌体生长的不同时期的不同配比关系,即碳源与氮源的平衡流加也已引起研究者们的重视。

本文以表达融合型乳酸片球菌素的重组 *Escherichia coli* 为实验菌株,根据发酵过程中菌体的不同时期对碳氮源的不同需求,进行碳氮平衡流加,实现菌体高密度培养和目的蛋白的高表达,且目的蛋白中可溶性蛋白占了较高比例,并有效避免了乙酸的积累。本文所指的碳源即葡萄糖,氮源即蛋白胨和酵母粉, m_C/m_N 为碳源与氮源的质量比。

1 材料与方法

1.1 菌株

乳酸片球菌素(pediocin PA-1, PED)基因片段与表达载体 pET32c 连接得到表达载体 pET32c-PED,转化至表达宿主 *Escherichia coli* BL21 (DE3) pLysS 得到的重组 *Escherichia coli*。经 IPTG 诱导表达乳酸片球菌素(PED)与硫氧还蛋白(Thioredoxin)相融合生成的融合型乳酸片球菌素(PED-N,相对分子质量约为 21 500),由本实验室构建并保存。

1.2 培养基

发酵初始培养基(g/L)^[6]:蛋白胨 10,酵母粉 5,NaCl 1,葡萄糖 13.2,NaH₂PO₄ · 12H₂O 2,Na₂HPO₄ · 3H₂O 7,K₂HPO₄ · 3H₂O 4,ZnSO₄ · 7H₂O 0.575,MgSO₄ 1。

补料培养基:碳氮源平衡流加策略(F1)补料培养基为分别配制葡萄糖 300 g/L、蛋白胨 80 g/L、酵母粉 80 g/L,再进行平衡流加; m_C/m_N 为 1.0 的底物流加策略(F2)的补料培养基为混合培养基(g/L):葡萄糖 300、蛋白胨 150、酵母粉 150; m_C/m_N 为 4.0 的底物流加策略(F3)的补料培养基为混合培养基(g/L):葡萄糖 300、蛋白胨 45、酵母粉 30。

1.3 培养方法与补料流加策略

取甘油管冻存菌过夜培养活化后,按体积分数为 3% 的接种量向装有 3.0 L 发酵培养基的 5.0 L 发酵罐中接入种子培养物,通气量 200 L/h,30 °C,

300 r/min。接种前培养基中加入氨苄青霉素终质量浓度为 100 μg/mL。溶氧电极、pH 电极自动采集发酵液中溶氧、pH 的变化。诱导剂 IPTG 在发酵开始 2 h 加入,在 OD₆₀₀ 达 2.0 以后开始以 2.5 mL/min 的流速流加补料液。碳氮平衡流加策略(F1),以溶氧为参数,当发酵进入补料时期,培养液中营养(碳源或氮源)缺乏,菌体生长受抑制、溶氧上升;开始流加葡萄糖,溶氧下降;若溶氧不下降,则改为流加蛋白胨与酵母粉,即实时交替流加碳氮源。每 1.0 h 计算一次所流加的碳源、氮源质量,因此可以得出重组 *Escherichia coli* 发酵过程对 m_C/m_N 的实际需求。 m_C/m_N 为 1.0 的流加策略(F2)和 m_C/m_N 为 4.0 的流加策略(F3),补料速率与碳氮平衡流加策略一样,但需要保持补料培养基的 m_C/m_N 不变。

1.4 碳氮源流加策略对重组 *Escherichia coli* 生长的影响

培养方法与补料流加策略见 1.3,接种后每 2 h 取样 1 次,每次取 30 mL 发酵液离心收集菌体,烘干至无水恒重称量,作菌体生长曲线。

1.5 碳氮源流加策略对 PED-N 表达的影响

分别取 3 种流加策略得到的发酵液 3 mL,离心收集菌体,加入 5×样品缓冲液 40 μL,补加水至 200 μL,沸水浴煮 10 min。12 000 g(g 为重力加速度)离心 10 min,分上清液和沉淀进行 12% SDS-PAGE 电泳,染色使用考马斯亮蓝 R-250。脱色后用凝胶成像处理系统进行蛋白条带灰度扫描,全泳道扫描测定表达目的蛋白与总蛋白之比,目的蛋白条带扫描比较目的蛋白条带间的相对含量。PED-N 蛋白质量浓度为菌体总蛋白质量浓度乘以 PED-N 蛋白占菌体总蛋白的比例。菌体总蛋白质量浓度测定采用 Lowry 法^[7],750 nm 处测定吸光值来确定。

1.6 葡萄糖残糖和乙酸积累浓度测定

转接培养后每 2 h 取发酵液 1 mL,离心取上清检测葡萄糖和乙酸浓度,葡萄糖浓度用葡萄糖分析试剂盒测定,乙酸含量测定采用毛细管柱气相色谱定量分析法^[8]。FFAP 毛细管柱(Φ0.53 mm×30 m,粒径 0.25 μm,大连中汇达科学仪器有限公司),氢火焰离子化检测器(FID);柱温 140 °C,保持 6 min;汽化室温度 220 °C;检测器温度 240 °C;柱流速 3.1 mL/min;尾吹气流速 3 mL/min;进样量 1 μL;进样方式为不分流进样。载气为 N₂ 气(纯度≥99.999%),H₂ 流速 30 mL/min,空气流速 300 mL/min。将色谱纯乙酸用蒸馏水配制成质量浓度为 1,

5,10,15 g/L 的乙酸标样溶液,各精密吸取 1 μ L,注入气相色谱仪测定。每种乙酸标样溶液进样 3 次,取其峰面积的平均值,以乙酸标样浓度为横坐标,以峰面积为纵坐标,绘制线性回归曲线。求得回归方程为 $Y=44.76X+19.05$,相关系数 $r=0.9963$,表明乙酸质量浓度在 1~15 g/L 范围内线性关系良好。所测样品乙酸峰面积值代入回归方程,得出样品乙酸的质量浓度。

2 结果与讨论

2.1 碳氮源平衡流加过程中的多阶段 m_C/m_N

采用平衡流加策略,如图 1 所示,重组 *Escherichia coli* 在高密度发酵的过程中,对碳源和氮源的需求是变化的,即各阶段对 m_C/m_N 的需求不同。在发酵初期(3~5 h),*Escherichia coli* 由于生长繁殖需要较多的氮源, m_C/m_N 较低,过量的碳源会产生大量的乙酸而抑制菌体的生长。发酵中期(5~8 h),由于菌体代谢旺盛,体内需要较多的碳源(葡萄糖),以维持菌体的生长和能量的代谢需要。因此,在发酵过程的菌体生长阶段,随着菌体浓度的增长,菌体所需的 m_C/m_N 呈现越来越高的趋势。而在稳定期(9~12 h),由于要产生目的蛋白,菌体需要较多的氮源, m_C/m_N 又变得较低。

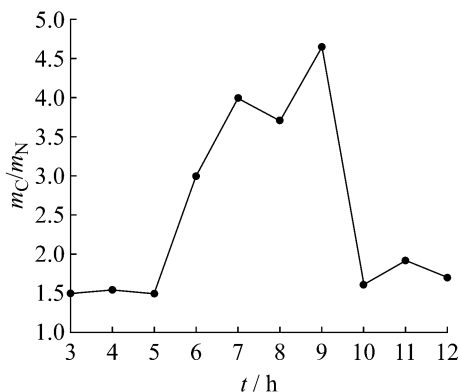


图1 碳氮源平衡流加过程中的 m_C/m_N 变化曲线
Fig.1 Curve of real-time carbon-nitrogen ratios in balance feeding process

2.2 碳氮源流加策略对重组 *Escherichia coli* 生长的影响

采用 3 种补料流加策略,对重组菌生长影响差别很大,如图 2。采用低(F2)或高(F3)的 m_C/m_N 流加策略,菌体生长速率较低,最大菌体密度较低,且 F3 的 m_C/m_N 得到的菌体密度最小;采用碳氮平衡(F1)流加时,菌体生长速率高,最大菌体密度也较

高,干重可达 57.6 g/L。

2.3 碳氮源流加策略对残糖和乙酸积累的影响

如图 3 所示,采用 F3 流加策略时,发酵液中葡萄糖残糖质量浓度较高,乙酸积累量也较高,最高可达 4.45 g/L。而采用 F2 流加策略,葡萄糖残糖质量浓度维持较低水平,得到的乙酸积累量较低(最高 1.65 g/L)。采用 F1 流加策略时,葡萄糖残糖质量浓度维持较低水平,乙酸积累量在菌体生长阶段先降后升,总体保持在较低水平(最高 1.78 g/L),在 10~12 h 残糖含量与乙酸积累量均下降至零。因此,F1 能够使得重组 *Escherichia coli* 较高生长速率的同时,有效地避免发酵液中乙酸的积累。

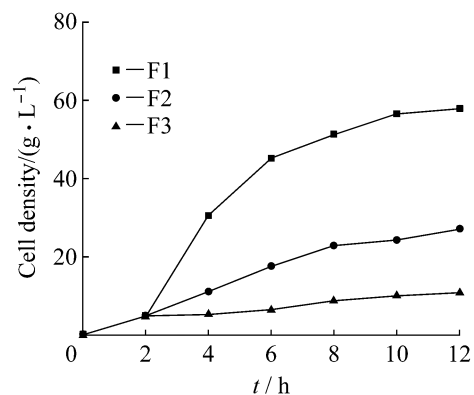


图2 碳氮源流加策略对重组 *Escherichia coli* 生长的影响
Fig.2 Effect of carbon-nitrogen feeding strategy on growth of recombinant *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS

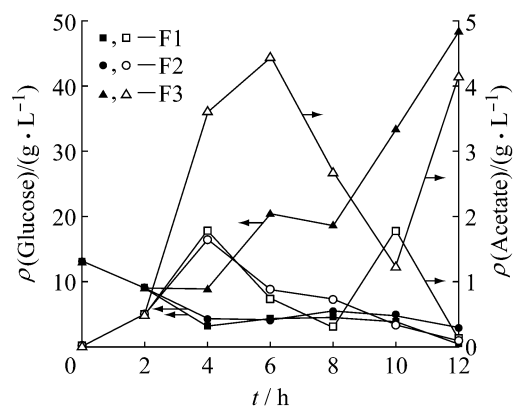
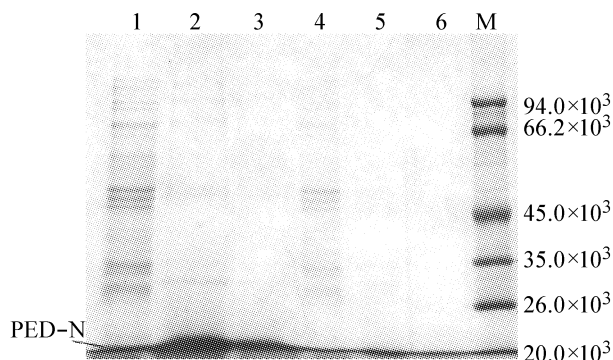


图3 三种碳氮源流加策略对葡萄糖和乙酸积累的影响
Fig.3 Profiles of glucose concentration and acetate accumulation using three carbon-nitrogen feeding strategies

2.4 碳氮源流加策略对 PED-N 表达的影响

采用 F1,F2,F3 流加策略时,菌体总蛋白质质量浓度测定结果分别是 185,40,26 mg/L。如图 4 所示,3 种碳氮流加策略对重组 *Escherichia coli* 表达可溶性 PED-N 和包涵体 PED-N 的影响很大,相对于 F2 和 F3,F1 包涵体明显得到了抑制。通过灰度

扫描 1~6 泳道融合蛋白与总蛋白之比、包涵体与可溶性目的蛋白所占比率(表 1),得出采用 F1,F2,F3 流加策略时融合蛋白的表达水平分别为 25%, 30%,27%。F1 可溶性蛋白表达量占目的蛋白的比率最大,达到 34%,F3 可溶性目的蛋白比率最小,仅占 10%。结合菌体总蛋白含量,得出 3 种流加策略中 F1 融合蛋白和可溶性目的蛋白的产率均最高,分别达到 46.3,15.7 mg/L。



1—PED-N inclusion bodies using F1; 2—PED-N inclusion bodies using F3; 3—PED-N inclusion bodies using F2; 4—Soluble PED-N using F1; 5—Soluble PED-N using F3; 6—Soluble PED-N using F2; M—Protein marker

图 4 3 种碳氮源流加策略对重组 *Escherichia coli* 表达可溶性 PED-N 和包涵体 PED-N 的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Analysis of PED-N expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS using three carbon-nitrogen feeding strategies in fed-batch cultures by 12% SDS-PAGE

表 1 3 种碳氮源流加策略对重组 *Escherichia coli* 表达可溶性 PED-N 和包涵体 PED-N 的 SDS-PAGE 灰度扫描结果

Table 1 Densitometric scanning results of PED-N expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)pLysS using three carbon-nitrogen feeding strategies in fed-batch cultures by 12% SDS-PAGE

Lane	$w(\text{Fusion protein})/(\%)$	$w(\text{Inclusion})/(\%)$
1	20	66
2	42	90
3	39	81
4	49	34
5	6	10
6	15	19

3 结 论

重组 *Escherichia coli* 在高密度发酵的过程中,对营养源 m_C/m_N 的需求随发酵阶段而变化。在菌体生长的不同时期流加不同 m_C/m_N 的营养源,实现碳氮源的实时流加平衡。采用碳氮源平衡流加与恒 m_C/m_N (较低或较高比例)流加相比,碳氮源平衡流加能够使重组 *Escherichia coli* 较高生长速率的同时,有效地避免乙酸的积累;葡萄糖残糖含量维持较低水平,重组 *Escherichia coli* 菌体最大密度高,目的蛋白产率和可溶性蛋白所占比例也较高。

参考文献:

- [1] Li Yin, Chen Jian, Mao Yingying, *et al.* Effect of additives and fed-batch culture strategies on the production of glutathione by recombinant *Escherichia coli* [J]. *Proc Biochem*, 1998, **33**: 709-714.
- [2] Castan A, Enfors S O. Characteristics of a DO-controlled fed-batch culture of *Escherichia coli* [J]. *Bioproc Eng*, 2000, **22**: 509-515.
- [3] Luli G W, Strohl W R. Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations [J]. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 1004-1011.
- [4] Suárez D C, Kilikian B V. Acetic acid accumulation in aerobic growth of recombinant *Escherichia coli* [J]. *Process Biochem*, 2000, **35**: 1051-1055.
- [5] Jana S, Deb J K. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2005, **67**: 289-298.
- [6] 章越, 沈亚领, 夏小霞, 等. 可溶性 TRAIL 蛋白的高密度培养及补料策略研究 [J]. *生物工程学报*, 2004, **20** (3): 408-413.
- [7] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2000: 47-50.
- [8] 潘春梅, 孙西玉, 樊耀亭. 气相色谱法测定秸秆水解液中的糠醛和乙酸含量 [J]. *酿酒科技*, 2008, **5**: 108-110.