# 周期操作对重组大肠杆菌高密度发酵表达类人胶原蛋白的影响

马晓轩[1],范代娣[1],刘树文[2],骆艳娥[1]
(1 西北大学 化工学院,陕西 西安 710069;2 西北农林科技大学 葡萄酒学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 采用补料-分批式发酵,研究了4种不同间歇周期补氮操作对细胞生长和类人胶原蛋白表达的影响,以及发酵过程中细胞质粒稳定性、细胞菌落形成能力和乙酸生成量的变化。结果表明,在每隔10 min连续补加36 mL补料氮溶液(22 s完成补加操作)的周期操作下,细胞质粒稳定性明显提高,细胞菌落形成能力下降较小,乙酸生成量低,仅0.7 g/L,最终细胞密度为84 g/L,类人胶原蛋白表达量可达到14 g/L,在4种操作方式中最高。

[关键词] 重组大肠杆菌;高密度发酵;类人胶原蛋白;周期操作;质粒稳定性;细胞活性
[中图分类号] Q939 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2006)03-0006-05

胶原蛋白是一种广泛存在于骨、腱、软骨、皮肤及其他结缔组织中的生物高分子蛋白。由于其具有生物降解性、弱抗原性、生物相容性、促上皮细胞形成等特性,已广泛应用于医学、美容、化妆品和保健品等行业[1]。

传统的胶原蛋白生产方法为动物提取法,但由于胶原蛋白具有非水溶性、病毒传染性、异体免疫排异性及结构的弱加工赋型性等缺点[2],限制了其许多潜在用途的开发。因此,对胶原蛋白进行改性研究就显得尤为重要。近年来,利用基因工程系统表达目的基因产物已经成为一个重要的研究课题,国际上已有利用重组酵母、重组哺乳动物细胞、重组烟草、重组昆虫、重组蚕等生产人源型胶原蛋白的报道。该类重组蛋白克服了动物源胶原蛋白的缺点,但存在蛋白表达量低、生产周期长、成本高等缺点,难以大规模工业化生产[3]。

大肠杆菌因其生长周期短,培养成本低廉,代谢调控较为成熟,在重组蛋白外源基因表达系统中占主导地位。米钰等[4]曾报道将一段已知序列的人源胶原蛋白基因的mRNA经逆转录生成cDNA,并修饰后转化于*Escherichia coli*内,经发酵、分离纯化后所得的重组蛋白命名为"类人胶原蛋白",其水溶性、免疫排异性、成胶性等特性均优于天然胶原蛋白。

在基因工程菌的发酵中,外源基因高表达条件下的高密度发酵,对于提高生产效率、降低生产成本及简化产品纯化工艺等均具有非常重要的意义,但高密度发酵过程中易出现菌体过早衰老、质粒丢失、自溶和外源基因不能充分表达等现象[5]。因此,优化过程控制参数对提高外源蛋白的产量至关重要。本研究采用含有人源型胶原蛋白cDNA的重组大肠杆菌进行补料-分批式发酵,研究了4种不同间歇周期的补氮操作对细胞生长和类人胶原蛋白表达的影响,以为提高发酵产率、降低生产成本提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株与质粒

基因工程菌*Escherichia coli* BL 21、质粒pNWCP由本实验室构建并保存,卡那抗性、温度诱导、目标蛋白在细胞内以可溶性蛋白形式存在[6]。

### 1.2 培养基

种子培养基:LB培养基。

发酵培养基:葡萄糖10 g/L,酵母粉10 g/L,$(NH_4)_2SO_4$ 5.6 g/L,$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 8.5 g/L,$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 3.2 g/L,$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3.3 g/L,EDTA 1 g/L,Kanamycin 5 mg/L及微量元素1 g/L[7]。

[收稿日期] 2005-09-27
[基金项目] 国家自然科学基金项目(20176085);国家科技攻关重大专项(2003DA901A32)
[作者简介] 马晓轩(1976-),男,陕西西安人,在读博士,主要从事生物材料与发酵工程研究。
[通讯作者] 范代娣(1966-),女,陕西蒲城人,教授,博士,主要从事重组蛋白质工程及生物材料研究。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

补料糖溶液：葡萄糖 600 g/L，$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 20 g/L，Kanamycin 15 mg/L。

补料氮溶液：酵母粉 300 g/L，$(NH_4)_2SO_4$ 10 g/L，$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 20 g/L，$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 10 g/L，EDTA 2 g/L 及微量元素 2 g/L[7]。

### 1.3　发酵罐

瑞士 Bioengineering 公司 L1523 型自动控制发酵罐，容积为 12.8 L，可在线检测温度、搅拌转速、溶解氧浓度(DO)和 pH 值。

### 1.4　培养方法

1.4.1　*种子培养*　斜面活化 24 h 后，将种子在 32 ℃、装液量为 50 mL/300 mL 的摇瓶中以 200 r/min 振荡培养 8 h，然后按起始 $OD_{600}=0.1$ 接入二级种子瓶中，同样条件下培养 8 h。

1.4.2　*高密度发酵*　将二级种子按体积分数 8 % 接种量接入发酵罐中，初始装液体积为 6 L，培养温度为 32 ℃，pH 值由体积分数 25 %氨水自动调节为 6.80 左右。当发酵进行到约第 9 小时时，发酵罐中葡萄糖基本耗尽，开始流加补料培养基(包括补料糖溶液和补料氮溶液)，通过改变搅拌转速、通气量以及补糖速率，维持比生长速率($\mu$)为 0.2 L/h 左右，DO 为 20%～30%饱和度。当搅拌转速、通气量达到上限后，若 DO 快速上升则提高补糖速率；若 DO 低于设定值则降低补糖速率。补氮采用 4 种不同方式：Ⅰ. 每隔 25 s 连续补加 1.5 mL 补料氮溶液(简称 1.5 mL/25 s，以下同)；Ⅱ. 18 mL/5 min；Ⅲ. 36 mL/10 min；Ⅳ. 72 mL/20 min。其中，补料蠕动泵的补加速率为 100 mL/min 并保持恒定。在细胞对数生长的中后期(约第 16 小时)升温至 42 ℃进行诱导，3 h 后降温至 39 ℃继续诱导 5 h，放罐收集细胞。

### 1.5　分析方法

1.5.1　*葡萄糖浓度*　采用斐林试剂法[8]测定。

1.5.2　*质粒稳定性*　采用复制平板法测定。将发酵液适当稀释后接种于不含卡那霉素的 LB 平板培养基上，于 37 ℃培养 48 h 后，挑取其中 100 个菌落复制到含有卡那霉素的 LB 平板培养基上，再培养 48 h，读取菌落形成个数，计算含质粒细胞所占百分率，用其来表征质粒稳定性。

1.5.3　*细胞活性检测*　将发酵液适当稀释后接种于含卡那霉素的 LB 平板培养基上，于 37 ℃培养 48 h，读取菌落形成数，计算每克干细胞的菌落形成数，用其来表征细胞活性的大小。

1.5.4　*细胞密度*　取 10 mL 发酵液，离心，弃去上清液，将沉淀用重蒸水洗涤 3 次后，60 ℃烘干至恒重，计算细胞对葡萄糖的得率系数。

1.5.5　*乙酸浓度*　采用 RP-HPLC 法[9]测定。

1.5.6　*类人胶原蛋白表达量*　取 10 mL 发酵液，12 000 r/min 离心 10 min，弃去上清液，将沉淀用重蒸水洗涤 3 次后，重悬浮，超声波破碎，用羟脯氨酸测定法[10]测定破碎上清液中类人胶原蛋白含量。

## 2　结果与分析

### 2.1　周期操作对细胞质粒稳定性的影响

高密度发酵过程中，基因工程菌的质粒稳定性是影响其实现规模化生产的一个重要因素，质粒的脱落或结构性突变都会使细胞失去生产能力。本研究中，采用不含卡那霉素的发酵培养基和补料培养基进行细胞培养，每隔 2 h 取样 1 次进行细胞质粒稳定性检测，结果如图 1 所示。

从图 1 可以看出，随着培养时间的延长，含质粒细胞所占百分率逐渐减少，其中，1.5 mL/25 s 方式下的含质粒细胞所占百分率迅速下降，当发酵结束时(培养 24 h 时)降到 75 %以下。与 1.5 mL/25 s 方式相比，18 mL/5 min 和 72 mL/20 min 两种方式下的细胞质粒稳定性有一定提高；而 36 mL/10 min 方式下的细胞质粒稳定性明显提高，即使是诱导后(16～24 h)，含质粒细胞所占百分率也仅是略有下降，当发酵结束时(培养 24 h 时)达到 95 %以上。表明适当间歇周期的补料操作，可以明显提高细胞质粒稳定性。

### 2.2　周期操作对细胞生长的影响

采用含卡那霉素的发酵培养基进行高密度发酵，在第 9 小时进行补料操作，第 16 小时升温至 42 ℃进行诱导。每隔 1 h 取样 1 次分析细胞密度，计算细胞对葡萄糖的得率系数，结果如图 2 和图 3 所示。

从图 2 可以看出，补料操作后，各操作方式下的细胞得率系数均开始下降，其中，1.5 mL/25 s 及 18 mL/5 min 两种方式下的细胞得率系数下降较快；而 36 mL/10 min 方式下的细胞得率系数下降最慢。当发酵结束时(培养 24 h 时)，36 mL/10 min 方式下的细胞密度最高，达到 84 g/L；18 mL/5 min 和 72 mL/20 min 两种方式下的细胞密度略低；而 1.5 mL/25 s 方式下的细胞密度最低，仅有 73 g/L(图 3)。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

### 2.3 周期操作对细胞活性的影响

基因工程菌高密度发酵过程中,由于代谢副产物的积累以及外源基因的表达,细胞逐渐失去分化能力,生理活性降低。本研究中,每隔2 h取样1次,检测细胞在选择压力下的菌落形成能力,考察细胞活性的变化,结果如图4所示。

从图4可以看出,当发酵结束时(培养24 h时),1.5 mL/25 s方式下细胞的菌落形成数较发酵开始时下降了51.4%左右,诱导以后其细胞活性较低;18 mL/5 min和72 mL/20 min两种方式下的菌落形成能力较1.5 mL/25 s方式有一定幅度的提高,发酵结束时其细胞菌落形成数较发酵开始时分别下降了27.8%和21.6%;而36 mL/10 min方式下的菌落形成能力下降很小,仅有13 %左右,说明适当间歇周期的补料操作可以明显提高细胞活性。

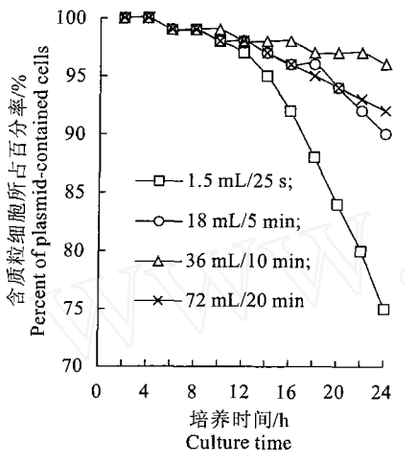


图1 周期操作对细胞质粒稳定性的影响

Fig. 1 Effects of oscillations on plasmid stability

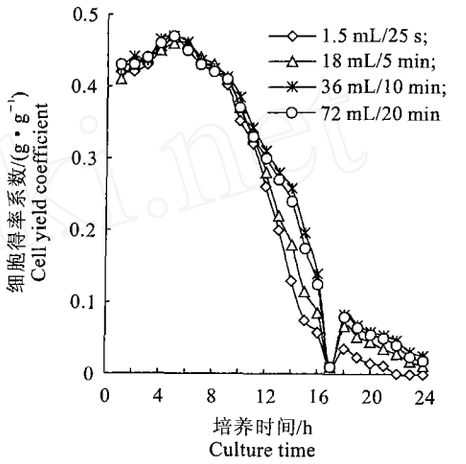


图2 周期操作对细胞得率的影响

Fig. 2 Effects of oscillations on cell yield

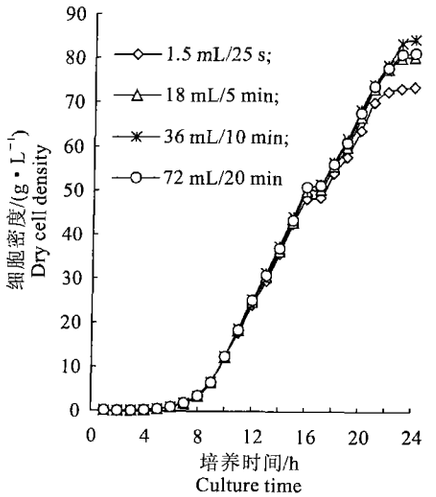


图3 周期操作对细胞密度的影响

Fig. 3 Effects of oscillations on cell growth

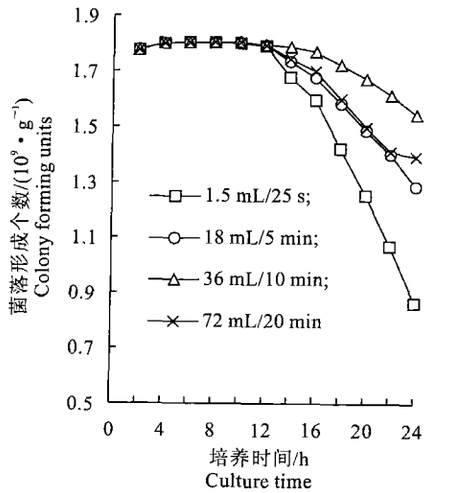


图4 周期操作对细胞活性的影响

Fig. 4 Effects of oscillations on cell viability

### 2.4 周期操作对类人胶原蛋白表达的影响

高密度发酵过程中易生成乙酸等代谢副产物,抑制细胞的生长和外源基因的表达[11]。本研究中,每隔1 h取样1次分析乙酸的生成量,并于诱导后每小时测定类人胶原蛋白表达量,考察周期操作对乙酸代谢的影响以及由此所引起的目标蛋白表达量的变化,结果如图5、图6所示。

从图5可以看出,补料操作前,由于葡萄糖浓度

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

较高，乙酸大量生成；补料操作以后，由于葡萄糖浓度一直维持在较低水平，乙酸的生成速率逐渐降低。当发酵结束时（培养 24 h 时），36 mL/10 min 方式下的乙酸生成量最低，仅有 0.7 g/L；18 mL/5 min 和 72 mL/20 min 两种方式下的乙酸生成量次之，分别为 1.4 g/L 和 1.25 g/L；而 1.5 mL/25 s 方式下的乙酸生成量最高，达到了 1.7 g/L。从图 6 可以看出，当发酵结束时（培养 24 h 时），1.5 mL/25 s 方式下的类人胶原蛋白表达量最低，仅有 10 g/L；而 36 mL/10 min 方式下的类人胶原蛋白表达量最高，达到了 14 g/L。

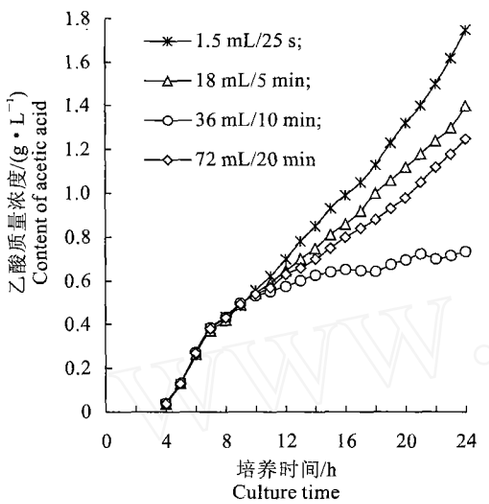


图 5　周期操作对乙酸生成量的影响
Fig. 5　Effects of oscillations on production of acetic acid

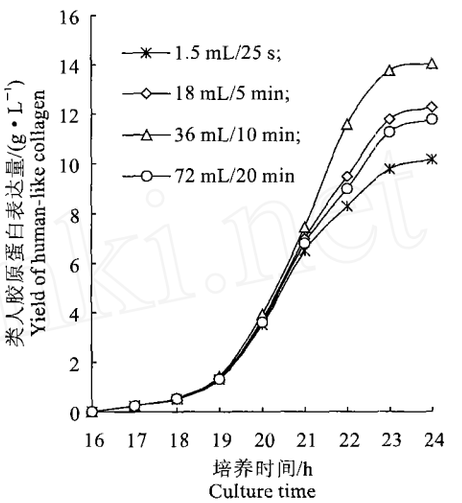


图 6　周期操作对类人胶原蛋白表达的影响
Fig. 6　Effects of oscillations on production of humanlike collagen

## 3　结　论

本试验主要研究了不同间歇周期的补氮操作对细胞生长和类人胶原蛋白表达的影响，结果表明：短的间歇周期（1.5 mL/25 s）下，细胞质粒稳定性和菌落形成能力均有较大幅度下降，发酵结束时（培养 24 h 时）其乙酸生成量在 4 种补氮方式中最高，为 1.7 g/L，细胞密度只有 73 g/L，类人胶原蛋白表达量为 10 g/L，在 4 种补氮方式中最低。而 36 mL/10 min 方式下，细胞质粒稳定性明显提高，菌落形成能力下降很小，当发酵结束时（培养 24 h 时），其乙酸生成量在 4 种补氮方式中最低，仅有 0.7 g/L，细胞密度为 84 g/L，类人胶原蛋白表达量可达到 14 g/L，在 4 种补氮方式中最高。以上结果表明，发酵过程中采取适当的周期操作可以有效提高发酵收率，降低生产成本，简化后分离以及纯化工艺。

高密度发酵中，适当间歇周期的补氮操作可以提高细胞质粒稳定性和细胞活性，减少乙酸生成量，有利于细胞生长和外源蛋白的表达，其机制目前尚不完全清楚，还需要经过进一步的分子水平研究和代谢流分析，以确定细胞生理状态和代谢通量的改变。

## [参考文献]

[1] 蒋挺大，张春萍. 胶原蛋白[M]. 北京：化学工业出版社，2001：123-137.

[2] Cooperman L，Michaeli D. The immunogenicity of injectable collagen：Ⅰ. A 1-year propective study[J]. J Am Acad Dermatol，1984，10：638-646.

[3] Olsen D，Yang C L，Bodo M，et al. Recombinant collagen and gelatin for drug delivery[J]. Advanced Drug Delivery Reviews，2003，55：1547-1567.

[4] 米　钰，惠俊锋，范代娣，等. 类人胶原蛋白生物相容性研究[J]. 西北大学学报：自然科学版，2004，34(1)：66-68.

[5] 张嗣良，储　炬. 多尺度微生物过程优化[M]. 北京：化学工业出版社，2003：240-244.

[6] 范代娣，段明瑞，米　钰，等. 重组 *E. coli* 工程菌高密度培养生产人源型胶原蛋白[J]. 化工学报，2002，53(7)：752-754.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

[7] Cheng L C, Wu J Y, Chen T L. A pseudo-exponential feeding method for control of specific growth rate in fed-batch culture[J]. Biochem Engineer J, 2002, 10: 227-232.

[8] 张龙翔. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1981: 253-254.

[9] Suarez D C, Kilikian B V. Acetic acid accumulation in aerobic growth of recombinant *Escherichia coli*[J]. Process Biochemistry, 2000, 35: 1051-1055.

[10] 张玉娥. 肺组织胶原蛋白测定方法的探讨[J]. 中兽医医药杂志, 1997(4): 13-14.

[11] 沈林南, 魏东芝, 周宇荀, 等. 乙酸对重组大肠杆菌生长及外源基因表达的影响[J]. 微生物学通报, 2000, 27(4): 254-256.

# Studies on effects of oscillations on cell growth and human-like collagen production of recombinant *Escherichia coli*

**MA Xiao-xuan[1], FAN Dai-di[1], LIU Shu-wen[2], LUO Yan-e[1]**

(1 *Department of Chemical Engineering, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069, China*;
2 *College of Enology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China*)

**Abstract**: By adopting fed-batch fermentation, the effects of nitrogen oscillations on cell growth and target protein formation of recombinant *Escherichia coli* producing human-like collagen were studied. Four different feeding protocols of nitrogen solution (25 s cycle, 5 min cycle, 10 min cycle and 20 min cycle) were applied. The total nitrogen fed to the cultivation was equal in each mode. The cell plasmid stability, the cell viability and acetic acid production during the cultivation were investigated. When the feeding nitrogen solution was added in a way of 10 min cycle (36 mL feeding nitrogen solution was added to fermentor continuously during 22 s and after 10 min, the second cycle began), the cell plasmid stability increased. Meanwhile, the production of acetic acid was small. The final cell density reached 84 g/L and the human-like collagen yield was 14 g/L, the highest in 4 operations.

**Key words**: recombinant *Escherichia coli*; high cell-density fermentation; human-like collagen; oscillations; plasmid stability; cell viability

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net