

不同流加发酵方式对重组大肠杆菌细胞外 hEGF 表达水平的影响

徐志南^{1*} 岑沛霖¹ W K R Wong²

¹(浙江大学,化工与生物工程系,杭州 310027)

²(香港科技大学,生物化学系,清水湾,九龙,香港)

关键词 人表皮生长因子, 重组大肠杆菌, 流加发酵

中图分类号 Q812 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)05-0594-04

人表皮生长因子(hEGF)是由 53 个氨基酸组成的单链多肽,内有 3 个二硫键。它具有多种重要的生物学功能,能够促进表皮细胞的生长繁殖,加速皮肤和角膜创伤的修复,加速胃溃疡的治疗和抑制胃酸的分泌,具有广阔的医疗应用前景^[1]。最近又发现 hEGF 在化妆品产业中有潜在的重大应用^[2]。这些都促进了人们试图采用基因工程技术大规模地生产 hEGF。

1982 年 Smith 等人首先在 *E. coli* 中以融合蛋白形式实现了 hEGF 的表达^[3],随后在枯草杆菌和酵母菌中亦相继实现了表达^[4]。由于 hEGF 在酵母菌中表达水平很低,大肠杆菌和枯草杆菌就成了普遍应用的工程菌宿主。其中 W. K. R. Wong 等人构建了细胞外膜蛋白 A 的信号肽基因与 hEGF 基因融合的质粒,首次将 *E. coli* 中表达的 hEGF 分泌到细胞外,大大降低了 hEGF 纯化的难度,提高了纯化收率^[5]。对于这一新型的分泌型重组大肠杆菌表达系统,初步的表达条件的优化工作已在摇瓶阶段完成^[6]。进一步在发酵罐中考察该重组大肠杆菌的发酵行为以及不同的发酵策略的应用是该工程菌产业化的重要研究环节。

在传统发酵和重组菌发酵中,由于流加发酵具有减少底物抑制,解除底物的分解代谢物阻遏作用,减少抑制性副产物的形成,增加细胞浓度和延长产物合成时间等特点,因而被普遍使用^[7]。但对本文采用的分泌型重组表达系统,不但存在一般重组菌的发酵难点,即质粒不稳定和抑制性副产物的形成,而且产物的诱导表达和分泌比较复杂,细胞外产物浓度与菌体浓度并不紧密相关等特点。因而有必要考察不同的流加方式对分泌型重组表达系统的发酵行为的影响,从而采用合理的流加策略提高细胞外 hEGF 的表达水平。

1 材料与方法

1.1 菌种和质粒

宿主菌为野生型 *E. coli* JM101, Amp 敏感型,遗传标记

为 SupE, thi, (LacproAB)^[8]。质粒 pKEGF 含有 Amp^r 基因和 LacUV5 启动子,外膜蛋白 A 导肽基因与下游的 hEGF 基因相连。质粒 pKEGF 转化 *E. coli* JM101 形成重组 *E. coli* K12。

1.2 培养基

种子培养基为 2XYT 培养基^[5],发酵培养基为 MMBL 培养基,MMBL 组成为(g/L):蛋白胨 20,酵母抽提物 10,酪蛋白酸水解物 20, KH₂PO₄ 4.5, K₂HPO₄ 5.0, MgSO₄·7H₂O 3.0, NaCl 3.0,接种前加氨苄青霉素 80mg/mL。

1.3 种子准备

从新鲜的 Amp 平板上挑取转化子菌落,转移到含有 40mL 2XYT 的 250mL 的种瓶中,30℃ 条件下培养约 8h,处于对数生长期的细胞,用于接种 2L B. Braun 发酵罐。

1.4 发酵研究

1.4.1 发酵罐: B. Braun B 型 2L 标准发酵罐,与计算机相连,可以调控温度、pH、DO、搅拌速度、通风量和流加速度等。

1.4.2 间歇发酵: 发酵温度 32℃, 1.2L 含 5.0g/L 葡萄糖的 MMBL,自动补加 4.0mol/L H₂SO₄ 和 2.0mol/L NaOH 控制 pH 为 6.8,通过调节搅拌转速,通风量和补充纯氧等方法控制发酵过程中 DO 在 20% 以上。当培养液 OD₅₅₀ 约为 8.0 左右,加入 0.1mmol/L IPTG(异丙基-β-D-硫代半乳糖苷)进行诱导。

1.4.3 分批补料发酵: 最初葡萄糖浓度为 2.0g/L,当糖浓度下降接近零时,分批补加。其它操作同间歇发酵。

1.4.4 在线识别流加发酵: 当初糖耗尽之前,自动加入碱液控制 pH 6.8,当初糖耗尽后,每当 pH 升高,不加酸调 pH,而是加入少量的葡萄糖液使得 pH 下降。这样通过在线的 pH 升高来识别流加糖的时机,其它条件类似分批补料操作。

1.4.5 恒速流加发酵: 当初糖耗尽时,以某一恒定速度流加 200g/L 的葡萄糖溶液,其余操作同分批补料操作。

1.5 测定方法

葡萄糖浓度测定采用临床使用的葡萄糖自动分析仪(YSI 2300 STAT PLUS; YSI Instruments Inc., OH.)。细胞浓度

收稿日期:2001-03-26,修回日期:2001-07-04。

* 通讯作者, Tel: 86-571-87951220; Fax: 86-571-87951358; E-mail: xuzn@mail.hz.zj.cn

测定采用平板稀释法,含质粒细胞比例测定采用在含 Amp 平板上测定的 P⁺ 菌浓度和不含 Amp 平板上测定的总细胞浓度之比,细胞干重测定见方法[6]。hEGF 浓度测定采用放射免疫测定法(RIA)^[9]。发酵液在 5000r/min 下离心 10min,取上清液按照 Amersham 公司的 hEGF RIA 试剂盒(code IM. 1961)规定的方法进行。

2 结果与讨论

2.1 间歇发酵

当考察各种流加方式对重组菌发酵的影响时,首先有必要研究间歇发酵在较优条件下的发酵条件和实验结果。通过多次实验,表明该工程菌较优的间歇发酵条件为:温度 32℃,整个发酵过程中 DO 大于 20%,pH6.8,初糖浓度为 5g/L,在培养液 OD₅₃₀ 为 8.0 左右时加入 0.1mmol/L IPTG 进行诱导。在此较优条件下,工程菌 *E. coli* K12 的发酵过程见图 1,从图可见:(1)至诱导后 10h 可得到最大的 hEGF 浓度 27.74mg/L;(2)葡萄糖浓度快速下降,在诱导时已接近耗尽;(3)诱导后质粒显得不稳定,含质粒细胞的比例不断下降,P⁺ 细胞浓度亦不断下降;(4)菌体量不高,最大的细胞干重为 13.8g/L。从以上结果看,诱导后的碳源缺乏严重限制了细胞生长,导致含质粒细胞浓度下降,hEGF 合成难以长期增长,因而通过流加碳源应能提高重组菌的发酵水平。图 1 显示诱导后 12h 含质粒细胞的比例从 97% 不断下降到 63%,一方面与细胞分裂中质粒分配不均相关;另一方面,与不含质粒细胞相比,诱导后含质粒细胞不仅要维持细胞生长,而且要提供更多的能量用于 hEGF 的合成,因而诱导后间歇发酵条件下碳源的缺乏可能加剧工程菌的质粒不稳定。

2.2 分批补料发酵

分批补料是一常见的流加发酵方式,实验结果见图 2。从图可见,分批流加发酵与间歇培养相比,诱导后含质粒细胞浓度有很大的提高,基本上能保持诱导前 10.0 × 10⁹ 个/mL 的水平。可见补料改善了细胞的生长环境,使得细胞的生长速率与诱导导致的死亡速率相当,发酵过程中含质粒细胞的浓度保持稳定。hEGF 的合成期延长到诱导后 15h 左右,最大 hEGF 浓度可达到 35.48mg/L,与间歇发酵相比提高 28.1%。诱导后 8h 内 hEGF 产率约为 3.96mg/(L·h),8~15h 产率约为 0.43mg/(L·h)。由此可见,分批补糖虽然能够保持含质粒细胞基本不变,但未能保持工程菌长期有效地表达 hEGF,诱导后 8~15h 内 hEGF 的浓度提高幅度很小。其主要原因是,分批添加葡萄糖固然大大改善了重组菌的碳源供应,但一次性添加葡萄糖浓度可能较高,使得短时间内葡萄糖在发酵液中积累,从而导致副产物(如乙酸)的积累,影响

工程菌 hEGF 表达水平的进一步提高。因此有必要应用其它的补料方式来提高 hEGF 的表达水平。

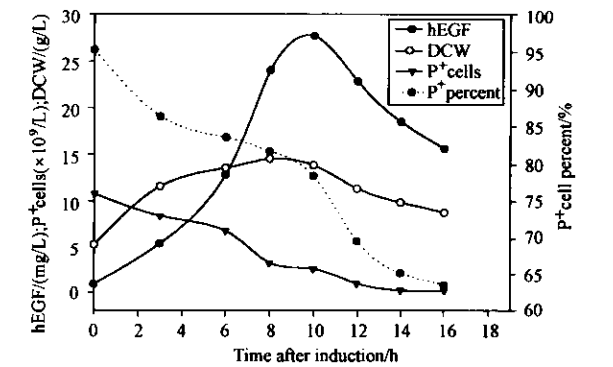


图 1 重组大肠杆菌的间歇发酵
Fig.1 Profiles of hEGF batch fermentation

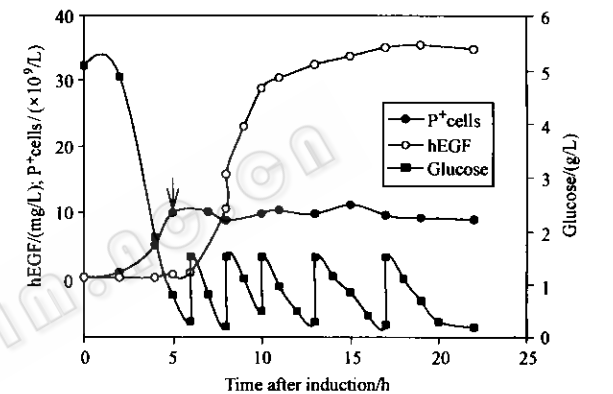


图 2 重组大肠杆菌的分批补料发酵
Fig.2 Profiles of hEGF fermentation process with intermittent glucose feeding

2.3 在线识别流加发酵

多种发酵参数都能反映发酵过程中碳源的消耗情况,如培养基中的 pH 和 DO,尾气中的 CO₂ 浓度等^[10,11]。在重组大肠杆菌发酵过程中,一旦葡萄糖耗尽,发酵液中 pH 和 DO 就会上升。因此可以根据在线的 DO 和 pH 的变化,控制葡萄糖的添加量^[12]。在实验过程中,诱导前 pH 降低时用碱液调节回 pH6.8 左右,当 pH 升高时,不再加酸调 pH,而是加入葡萄糖加以调节。实验结果如表 1 所示。从表可见,在线识别补料方式与分批补料方式一样能有效地保持质粒的稳定性,与间歇发酵相比 hEGF 浓度提高了 25.5%,提高幅度稍低于分批补料方式。由于在线识别流加仍然是间断式的补糖方式,而且有一定的滞后,无法从根本上避免发酵液中糖浓度的波动,依然会导致代谢副产物的积累,影响重组菌的 hEGF 的表达。

表 1 pH 在线识别葡萄糖流加对工程菌质粒稳定性和 hEGF 表达的影响

Table 1 Effects of pH-stat glucose feeding on P⁺ cell maintaining and hEGF production

Time after induction/h	0.0	5.0	10	13	16	19	21
P ⁺ cell/(10 ⁹ /mL)	10.03	9.84	10.35	9.35	9.24	8.95	8.36
hEGF conc./ (mg/L)	0.50	5.34	26.78	31.58	33.21	34.75	31.12

表 2 比较不同葡萄糖恒速流加速率下的发酵结果

Table 2 Effects of different glucose feeding rates on hEGF fermentation

Glucose feeding rate (mL/min)	hEGF concentration (mg/L)	P ⁺ cell (10 ¹⁰ /mL)	P ⁺ cell percent(%)	Final glucose conc. (g/L)	End pH
0.07	38.32	1.21	86.35	0.10	7.5
0.11	69.36	1.54	89.10	0.15	6.7
0.14	48.32	1.65	88.56	0.85	6.5
0.18	37.32	1.67	86.53	1.31	6.3

Note: The initial glucose concentration in MBL is 2g/L. The consumption of glucose in the medium increased pH, which was used as an index to determine the timing of glucose feeding. The glucose solution containing 200g/L glucose was pumped into the fermentor at predetermined feeding rate.

2.4 恒速流加发酵

2.4.1 不同流加速率的影响:不同流加速率下的发酵结果列于表 2。结果表明,当流加速率为 0.11mL/min 时效果最好,hEGF 浓度可达到 69.36mg/L,比间歇发酵提高了约 150%,从质粒的稳定性来看,也比前面两种流加方式的效果要好。在恒速流加发酵过程中,流加开始后,pH 就不再控制。在高的流加速度下,发酵后期 pH 会下降;在低的流加速率下(0.07mL/min),发酵后期 pH 则会上升。当流加速率为 0.11mL/min 时,pH 波动很小,说明发酵液中的糖浓度处于拟稳态,在此状态下有利于 hEGF 的积累。流加速率为 0.11mL/min 的发酵过程示于图 3 和图 4。

由图 3 可知,流加开始后,发酵液中糖浓度始终在低水平波动,说明 0.11mL/min 的补糖速率是合适的。图 4 表明,在流加发酵过程中,IPTG 诱导后 3h 内 P⁺ 菌百分率从约 95% 下降到约 90%,其后在 85%~90% 之间波动,而间歇发酵过程中诱导后 P⁺ 菌比例会下降到 70% 以下,可见流加发酵明显地提高了质粒稳定性。在图 4 中,细胞数量的变化情况与细胞干重变化不尽相同,其主要原因是测细胞干重时不能有

效排除诱导后细胞大量死亡的干扰。

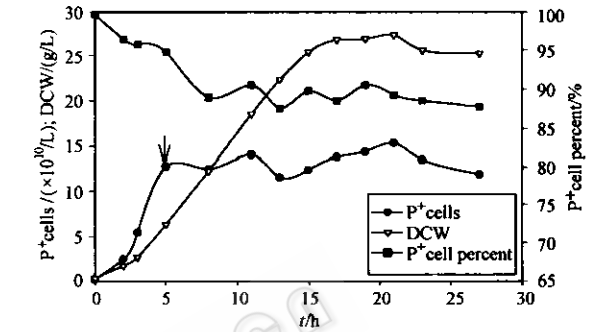


图 4 在 0.11mL/min 速率流加条件下发酵液中细胞生长和质粒稳定性的变化曲线

Fig.4 The profiles of cell growth and plasmid ability in the broth with 0.11mL/min glucose feeding

2.4.2 各种培养基组分和诱导剂流加对恒速流加发酵的影响:在重组大肠杆菌的流加发酵中,以下三种流加培养基曾被研究者使用;(1)在流加培养基中加入氮源;(2)在流加培养基中加入氨苄青霉素(Amp)和诱导剂 IPTG;(3)在流加液中加入硫酸镁等^[13]。本文考察了以上各种培养基组分流加对重组 hEGF 表达的影响,结果列于表 3。

当流加培养基中含有硫酸镁和酵母抽提物时,hEGF 的表达效率有所提高,含有硫酸镁的流加可得到最大的 hEGF 浓度(74.38mg/L)。流加培养基含 Amp 能提高 P⁺ 菌的比例,而流加 IPTG 则降低了 P⁺ 菌比例,但 hEGF 的表达效率都没有显著的提高。尽管在其它的质粒表达系统中,采用流加 Amp 和 IPTG 的方式可以有效地提高工程菌的表达水平,但在本系统中未见显著的作用。本文的表达系统在流加发酵过程中已经具有较好的质粒稳定性,0.2mmol/L 的诱导物加入量已能使本系统具有较高的表达效率,Amp 和 IPTG 进一步补充的意义不大。在本文的表达系统中,流加培养基中含硫酸镁既可以提高 hEGF 的表达效率,又可以解决培养基灭菌过程中的沉淀问题,是较好的流加培养方法。

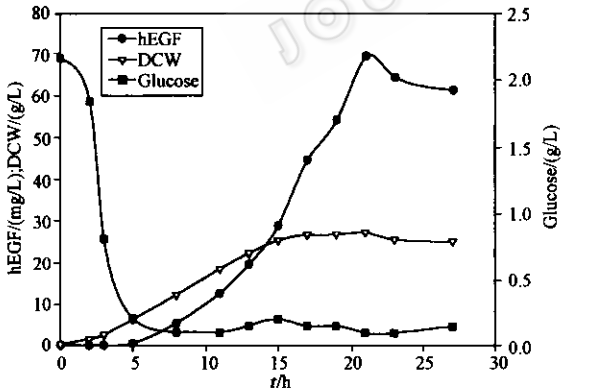


图 3 在 0.11mL/min 速率流加条件下发酵液中葡萄糖细胞干重和 hEGF 的变化曲线

Fig.3 The profiles of glucose,dry cell weight and hEGF in the broth with 0.11mL/min glucose feeding

表 3 各种培养基组分和诱导剂流加对恒速流加发酵的影响

Table 3 The results of glucose feeding fermentation combined with other supplements in feeding solution

Feeding solution	Glucose, 200g/L	Glucose, 200g/L; MgSO ₄ , 20g/L	Glucose, 200g/L; Amp, 200mg/L	Glucose, 200g/L; IPTG, 1.0mmol/L	Glucose, 200g/L; yeast extract, 100 g/L
hEGF/(mg/L)	69.36	71.32	67.89	70.21	71.45
P ⁺ cells/(10 ¹⁰ /mL)	1.54	1.56	1.65	1.35	1.48
P ⁺ cell percent/%	89.10	88.45	90.58	86.45	87.59

3 结 论

与间歇发酵相比,分批补料、在线识别流加和恒速流加均能有效地提高工程菌的质粒稳定性和含质粒细胞的浓度,同时 hEGF 体积浓度分别提高了 28.1%,25.5% 和 150%。由于不能有效地减少抑制性副产物的产生,在线识别 pH 流加不适合应用于本文复杂的分泌型重组菌发酵系统,不能有效地提高 hEGF 的表达产率。恒速流加发酵能够选择一个合适的流加速度,使得发酵液中糖浓度处于拟稳态,减少了抑制性代谢副产物的生成,从而大大提高了 hEGF 的表达水平。同时恒速流加又可以避免变速流加时复杂的调节和控制系统。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Goldsmith L A. Physiology, Biotechnology and Molecular Biology of The Skin, 2nd ed., Oxford University Press, N. Y., 1991, pp. 329 ~ 350
- [2] Brown, G. L. Method of decreasing cutaneous senescence, US Patent No. 5,618,544, 1997
- [3] Sumi S I, Hasegawa A, Yagi S *et al.* Overproduction of human epidermal growth factor urogastrone in *Escherichia coli* and demonstration of its full biological activities. *J Biotechnol.* 1985, 2: 59 ~ 74
- [4] Ebisu S Takagi H, Kadowaki K *et al.* Production of human epidermal growth factor by bacillus brevis increased with use of a stable plasmid from *B. brevis* 481. *Biosci Biotech Biochem.* 1992, 56: 812 ~ 813
- [5] Wong W K R, Sutherland M L. Excretion of heterologous proteins from *E. coli*, US Patent No. 5,223,407, 1993
- [6] Zhinan Xu, Peilin Cen, W K R Wong. Factors influencing secretive production of human epidermal growth factor(hEGF) with recombinant *E. coli* K12. *Bioprocess Engineering*, 2000, 23: 669 ~ 674
- [7] Yee L, Blanch H W. Recombinant protein expression in high cell-density fed-batch cultures of *Escherichia coli*. *Biotechnology*, 1992, 10: 1550 ~ 1556
- [8] Tam T L, Wong R S C, Wong W K R. Enhancement of extracellular production of a *Cellulomonas funi* exoglucanase in *Escherichia coli* by the reduction of promoter strength. *Enzyme Microbial Tech.* 1997, 20: 482 ~ 488
- [9] Amersham company. [¹²⁵I] Human Epidermal Growth Factor(hEGF) reagent pack(Code IM 1961).
- [10] Robbins J W, Taylor K B. Optimization of *Escherichia coli* growth by controlled addition of glucose. *Biotechnol Bioeng.* 1989, 34: 1289 ~ 1294
- [11] Konstantinov K, Kishimoto M, Seki T *et al.* A balanced DO-stat and application to the control of acetic acid excretion by recombinant *E. coli*. *Biotechnol Bioeng.* 1990, 36: 750 ~ 758
- [12] Suzuki T, Yamane T, Shimizu S. Mass production of thiostrepton by fed-batch culture of *Streptomyces laurentii* with pH-stat model feeding of multisubstrate. *Appl Microbial Biotechnol.* 1987, 25: 526 ~ 531
- [13] Allen B R, Luli G W. A gradient-feed process for *E. coli* fermentation. *Biopharm.* 1987, 1: 38 ~ 41

The Effects of Different Glucose Feeding Modes on hEGF Production in an Excretory Recombinant *Escherichia coli* K12 System

XU Zhi-Nan¹ CEN Pei-Lin¹ W K R Wong²

¹ (Dept. of Chemical Engineering and Bioengineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

² (Dept. of Biochemistry, The Hong Kong University of Science & Technology, Clear Water Bay, Kowloon, Hong Kong)

Abstract The effects of different glucose feeding modes on hEGF expression were evaluated in an excretory recombinant *E. coli* K12 system. The results showed that, compared with batch cultivation, the plasmid stability and density of plasmid-retaining cells were improved by all three glucose feeding modes (intermittent, pH-stat and constant-rate). It was shown that hEGF yields were improved up to 25.5% and 28.1% by intermittent or pH-stat glucose feeding respectively. Especially, up to 150% improvement of hEGF production was achieved by constant feeding of 200g/L glucose solution at a rate of 0.11 mL/min. The effects of further combined feeding with other medium components (ampicillin, nitrogen sources, and inorganic salts) and inducer on hEGF yield were also examined in the bench-top fermentor.

Key words human epidermal growth factor, recombinant *E. coli*, fed-batch cultivation, glucose feeding

Received: March 26, 2001

* Corresponding author. Tel: 86-571-87951220; Fax: 86-571-87951358; E-mail: xuzn@mail.hz.zj.cn