

生物育种与工艺优化

黄杆菌肝素酶 II 重组菌培养条件的优化及高密度发酵

周斌¹, 程咏梅¹, 邓超², 刘卫超¹, 陈潮梁¹, 陈敬华¹, 许正宏¹

1 江南大学药学院, 江苏 无锡 214122

2 江南大学无锡医学院, 江苏 无锡 214122

周斌, 程咏梅, 邓超, 等. 黄杆菌肝素酶 II 重组菌培养条件的优化及高密度发酵. 生物工程学报, 2014, 30(4): 674-678.
Zhou B, Cheng YM, Deng C, et al. Culture conditions optimization and high cell density fermentation of recombinant bacteria producing heparinase II from *Flavobacterium heparinum*. Chin J Biotech, 2014, 30(4): 674-678.

摘要: 黄杆菌肝素酶 II (Hep II) 是一类可特异性切割肝素、硫酸乙酰肝素类分子内连接键的酶。文中对黄杆菌肝素酶 II 重组菌的诱导时机、诱导剂添加量、诱导温度、诱导时间等诱导产酶条件进行优化。经过优化最佳摇瓶发酵产酶条件为: 37 °C 培养重组菌至对数生长前期, 添加诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.3 g/L, 20 °C 下诱导 10 h, 酶活达到最高, 为 570 U/L。在此基础上通过发酵罐高密度培养手段将菌体浓度 OD_{600} 进一步提高到 98, 酶活大幅度提高到 9 436 U/L, 该研究结果为 Hep II 的工业化生产与应用奠定了良好的基础。

关键词: 肝素酶 II, 培养条件优化, 高密度发酵

Culture conditions optimization and high cell density fermentation of recombinant bacteria producing heparinase II from *Flavobacterium heparinum*

Bin Zhou¹, Yongmei Cheng¹, Chao Deng², Weichao Liu¹, Chaoliang Chen¹, Jinghua Chen¹, and Zhenghong Xu¹

1 School of Pharmaceutical Science, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

2 Wuxi Medical School, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: Heparinase II (Hep II) from *Flavobacterium heparinum* is an enzyme that could specifically cleave certain sequence of heparin and heparan sulfate. In this work, fermentation conditions of recombinant heparinase II (His-Hep II) producing bacteria were optimized, including initial induction time, inducer (IPTG) concentration, induction temperature and induction time. The optimum conditions were as follows: cultivating recombinant bacteria to exponential prophase under 37 °C, then adding IPTG to a final concentration of 0.3 g/L, finally cultivating recombinant bacteria under 20 °C for 10 h. The total crude enzyme activity reached 570 U/L. Based on these results, high cell density fermentation of recombinant bacteria was studied. The final OD_{600} could reach 98 and the total crude enzyme activity of His-Hep II increased to 9 436 U/L.

Keywords: heparinase II, culture conditions optimization, high cell density fermentation

肝素酶是指一类作用于肝素或者硫酸乙酰肝素的多糖裂解酶。目前从肝素黄杆菌中提取的肝素酶

主要为肝素酶 I、II、III 三种^[1]。其中肝素酶有较宽的底物选择性, 可以特异性切割肝素、硫酸乙

Received: August 14, 2013; **Accepted:** November 11, 2013

Supported by: Program for New Century Excellent Talents in University (No. NCET-10-0435), Doctoral Fund of Ministry of Education (No. 20110093110008).

Corresponding author: Jinghua Chen. Tel: +86-510-85911900; Fax: +86-510-85329042; E-mail: jhchenwhut@126.com

教育部新世纪优秀人才支持计划 (No. NCET-10-0435), 教育部博士点基金 (No. 20110093110008) 资助。

网络出版时间: 2013-12-17

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20131217.1059.001.html>

酰肝素类分子内的连接键,主要应用于阐明肝素的结构^[2]、研究抗凝血机制^[3]、制备抗肿瘤药物^[4]及低分子量肝素^[5]等。传统生产肝素酶的方法是肝素黄杆菌发酵法。Gallier 等^[6]采用合成培养基代替天然培养基,以肝素作诱导剂,将肝素酶总酶活提高了4倍。此后他们研究了不同碳氮源、诱导剂对酶活的影响,并采用流加补料方式发酵,将总酶活提高近60倍^[7],此方法得到的肝素酶为肝素酶 I、II、III的混合物,且并未单独对肝素酶 II 的生产进行研究。Lohse 等^[8]从肝素黄杆菌发酵的混合肝素酶液中经多步纯化制备出肝素酶 II,但回收率仅有 1.02%。此外研究人员主要通过改变融合策略来简化肝素酶 II 的纯化步骤以期达成肝素酶 II 的可溶性表达,提高酶活和收率。Su 等^[9]将肝素酶 II 基因 *Hep B* 克隆,并在大肠杆菌中重组表达,结果表明肝素酶 II 易形成包涵体,且包涵体所占的比例在 37–25 °C 随着温度的降低而下降。傅文彬等^[10]将 *Hep B* 插入质粒 pET24a 中构建重组菌,低温 20 °C 成功诱导表达了带有组氨酸标签的融合肝素酶 II,但该过程中也易形成包涵体,可溶性表达量不高,酶活仅为 50 U/L。Blain 等^[11]将肝素酶 II 的基因插入到肝素酶 I 调节区的下游,整合得到全新的转化子菌株,结果表明,在新的表达体系中肝素酶 II 的表达量提高了 5 倍。邢新会等^[12]将 *Hep II* 与 MBP 融合并在宿主 TB1 实现了可溶性表达,SDS-PAGE 凝胶电泳中融合蛋白呈单一条带,但酶活仍不高,仅为 118.4 IU/L。总体而言,目前对肝素酶 II 的生产研究仍较少,且据文献报道产量仍偏低。

本实验室构建了重组基因工程菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET19b-Hep II,该菌株能可溶性表达带有组氨酸标签的 *Hep II* (His-Hep II),酶活可达 180 U/L。为进一步提高肝素酶的可溶性表达,实现肝素酶 II 产量和酶活的提高,现以此工程菌为出发点,对其诱导条件进行优化,并将该条件应用到高密度发酵中,以实现 His-Hep II 产量和酶活的大幅提高,为 *Hep II* 的工业化生产与应用奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

重组工程菌 *E. coli* BL21(DE3)-pET19b-Hep II

由本实验室自行构建;利用基因工程手段 PCR 扩增出肝素酶 II 基因 *Hep B*,再将其插入 pET19b 质粒,构建重组质粒,然后将重组质粒导入感受态 *E. coli* BL21(DE3),构建重组工程菌。

蛋白胨和酵母提取物购自 OXOID 公司;肝素钠、氨苄青霉素等试剂均购自上海生工生物工程有限公司。

实验中确定诱导条件所用培养基为 LB 培养基^[13],高密度发酵培养基为 R 培养基^[13]。

R 培养基:磷酸氢二钾 13.5 g/L,柠檬酸 1.7 g/L,微量金属离子溶液 10 mL/L,七水硫酸镁 1.4 g/L,赖氨酸 2 mg/L,加合适的碳源与氮源,调节 pH 值至 7.0。

微量金属离子溶液(g/L):七水硫酸铁 10,二水氯化钙 2,七水硫酸锌 2.2,四水硫酸锰 0.5,五水硫酸铜 1,四水合钼酸铵 0.1,四硼酸钠 0.02,用 5 mol/L HCl 溶解。

1.2 方法

1.2.1 种子活化

将保存菌种按 1% 的量接种至 10 mL 的 LB 液体培养基中,加氨苄青霉素至终浓度为 50 μg/mL,37 °C、200 r/min 条件下培养 12 h。

1.2.2 摇瓶发酵

将活化后菌种按 1% 的接种量接种至 100 mL 的 LB 液体培养基中,加氨苄青霉素至终浓度为 50 μg/mL,37 °C、200 r/min 条件下培养,取不同时间段培养液测定菌体浓度 OD_{600} ,确定生长曲线。在对数期间内加入 IPTG 低温诱导培养一定时间,取菌液测定 OD_{600} ,离心破碎测定酶活。

1.2.3 发酵罐发酵

5 L 发酵罐(上海保兴生物设备工程有限公司)中装入 2.0 L 培养基,接种 100 mL 培养过夜的摇瓶培养液,加氨苄青霉素至终浓度为 50 μg/mL,37 °C 发酵,初始转速 600 r/min,初始通气流量为 3 L/min,随着菌体 OD_{600} 值而增加转速与通气流量,以维持溶氧值达 20% 以上。采用 DO-Start 模式^[14]来流加 500 g/L 的葡萄糖与 20 g/L 的 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 混合液,用 28% 氨水、1 mol/L 的 HCl 调节 pH 值使其稳定在 7.0。

1.2.4 酶活测定

酶活检测采用 UV₂₃₂ 法^[15]。在 1 mL 缓冲液

(50 mmol/L 醋酸钠, 5 mg/mL 的肝素, pH 7.3)中加入 50 μ L 粗酶液,于 30 $^{\circ}$ C 水浴中反应 10 min。反应结束后立即置 100 $^{\circ}$ C 水浴中终止反应,12 000 r/min 离心 10 min,取上清液测 232 nm 处吸光值。计算公式:

$$\text{Enzyme (units/mL)} = (A_{232} \times V_1) / (5.5 \times t \times V_2)$$

A_{232} 为 232 nm 处测定的紫外吸收值, V_1 为反应液的总体积; V_2 为加入酶液的体积; t 为反应时间 (min) 根据酶活力定义: 一个酶活力单位是指 30 $^{\circ}$ C、pH 7.0 的条件下, 在 1 min 内产生 1 μ mol 具有 Δ 4,5 不饱和糖醛酸键的寡糖片段的酶量, 该 Δ 4,5 不饱和糖醛酸寡糖片段的摩尔消光系数为 5 500, 生成物为 1 μ mol 不饱和糖醛酸所需要的酶量为一个活力单位, 所以吸光系数经过换算为 5.5 (μ mol/mL)。

2 结果与分析

2.1 诱导条件优化

2.1.1 诱导时机对重组菌产酶的影响

前期实验结果表明该重组菌对数期 OD_{600} 在

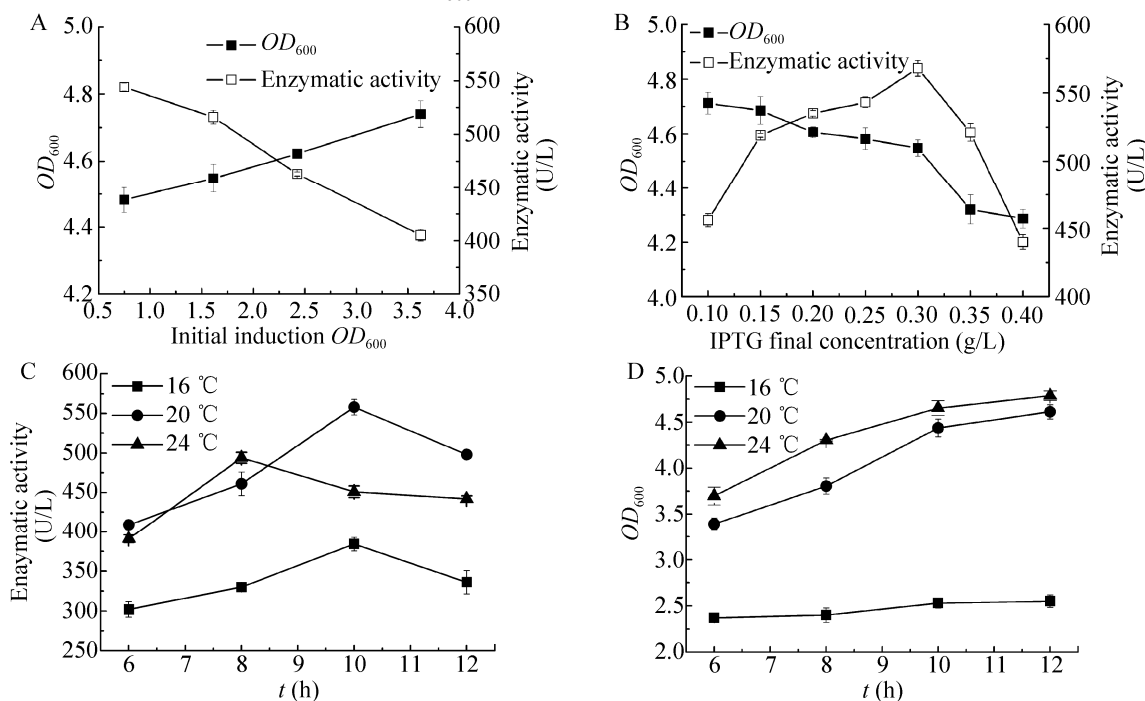


图 1 不同诱导条件下重组菌株摇瓶产酶的酶活及菌体浓度变化

Fig. 1 Enzymatic activity of His-Hep II and cell growth in flask culture of recombinant *E. coli* under different induction conditions. (A) Enzymatic activity and cell growth under different initial induction OD_{600} . (B) Enzymatic activity and cell growth under different IPTG final concentration. (C) Enzymatic activity under different induction temperature. (D) Cell growth under different induction temperature.

0.5–3.8 之间。选择对数生长期内的几个不同时期 (OD_{600} 分别为 0.747、1.612、2.426、3.624), 降温至 20 $^{\circ}$ C, 分别加入诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.25 g/L, 诱导培养 10 h, 检测菌体浓度并测定酶活。结果如图 1A 所示, 对数生长前期诱导后酶活最高, 此时菌体生长代谢旺盛, 蛋白大量合成表达, 外源蛋白也易于诱导表达, 若诱导太晚, 则菌体代谢开始降低, 不利于外源蛋白的表达^[16]。

2.1.2 诱导剂 IPTG 浓度对重组菌产酶的影响

此重组菌表达系统上带有乳糖基因 (*lac*) 启动子, 需要 IPTG 作为诱导剂诱导外源蛋白的表达。当菌体浓度 OD_{600} 为 0.74 时, 分别加入不同量的诱导剂 IPTG, 20 $^{\circ}$ C 诱导培养 10 h, 检测菌体浓度并测定酶活。如图 1B 所示, 随着 IPTG 浓度的增加, 诱导结束后菌体的浓度 OD_{600} 有略微的下降, 表明 IPTG 对菌体的生长有一定的抑制作用。此外, IPTG 浓度较低时, 外源蛋白的表达水平随

着诱导剂浓度的升高而不断升高；当浓度超过一定限度时，蛋白表达水平又会受到影响。

2.1.3 诱导温度与诱导时间对重组菌产酶的影响

重组菌的诱导温度与诱导时间相关联，本实验对诱导温度与诱导时间对重组菌产酶的影响进行了综合考察。培养菌体浓度 OD_{600} 为 0.6–0.8，添加诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.3 g/L，分别于 16 °C、20 °C、24 °C 诱导培养 6–12 h，检测菌体浓度并测酶活。由图 1C 与 1D 可见，16 °C 下诱导不利于菌体生长，酶活也较低；20 °C 下诱导 10 h 酶活最高，为 570 U/L；24 °C 下诱导 8 h 酶活较高，但酶活仍低于 20 °C 下诱导的最高酶活。可见升高温度有利于菌体的生长代谢，而适度的低温有利于外源蛋白的可溶性表达，针对不同的目标采用不同的培养手段，有利于发酵水平的提高和发酵周期的缩短。

通过诱导条件的优化，发现 37 °C 培养重组菌至对数生长前期，降温至 20 °C，添加诱导剂 IPTG 至终浓度为 0.3 g/L，诱导培养 10 h，酶活可达 570 U/L，相比未优化前提高 2 倍多。

2.2 R 培养基最佳碳氮源优化

高密度发酵是一种通过提高单位体积菌体密度从而提高重组酶的产量与酶活，降低生产成本的发酵方式^[16]。本实验拟在前期研究基础上，选用 R 培养基作为高密度发酵的基础培养基，以高菌体浓度与高酶活为目标，考察 R 培养基中不同碳源和氮源对菌体生长量及酶活的影响。

2.2.1 碳源优化

分别以 5–15 g/L 的葡萄糖、蔗糖、甘油作为碳源，其他成分与 R 发酵培养基相同，采用以上优化的诱导条件进行诱导发酵产酶。其中以 15 g/L 的葡萄糖、10 g/L 的甘油、15 g/L 的蔗糖作为碳源时菌体生长最好（图 2A），且上述 3 种碳源培养菌体诱导发酵产酶的酶活分别为 984 U/L、754 U/L 和 467 U/L。由此可见，葡萄糖组具有生长时间短，菌体浓度高，酶活表达量高等优点，故选取葡萄糖为后续发酵罐培养碳源。

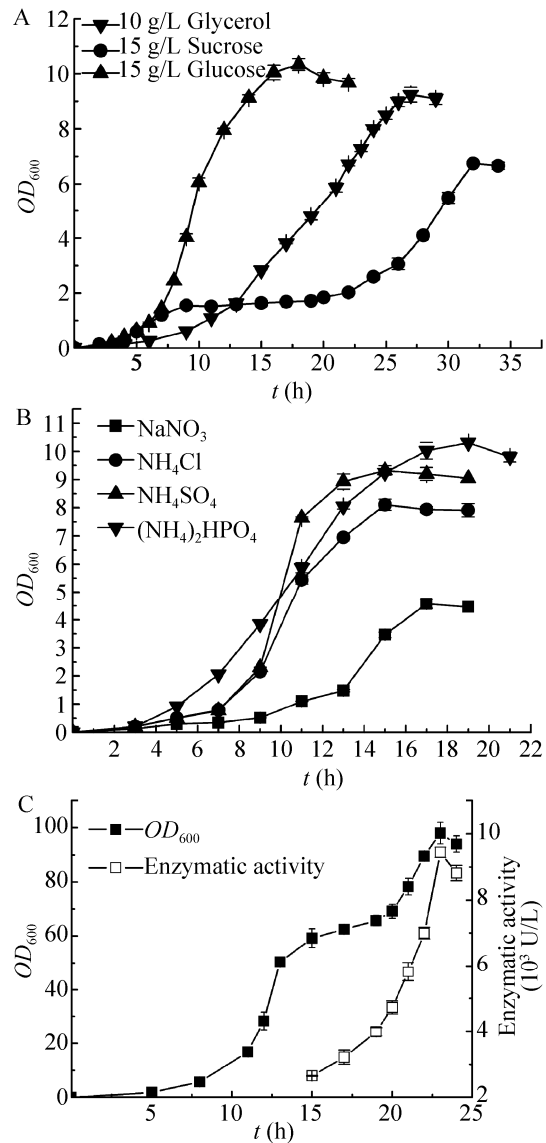


图 2 R 培养基中发酵优化

Fig. 2 Optimization of fermentation in R medium. (A) Carbon source. (B) Nitrogen source. (C) High cell density fermentation.

2.2.2 氮源优化

分别以 7.6 g/L 硝酸钠、5.0 g/L 氯化铵、6.0 g/L 硫酸铵、6.0 g/L 磷酸氢二铵作为培养基氮源（4 种氮源中所含氮量相同，均为 1.25 g/L），采用以上优化的条件进行诱导培养。其中以磷酸氢二铵作为氮源时菌体浓度最高（图 2B），且上述 4 种氮源培养菌体诱导发酵产酶的酶活分别为 336 U/L、774 U/L、825 U/L 和 986 U/L，故取

磷酸氢二铵为后续发酵罐培养碳源。

2.3 优化条件下重组菌的发酵罐高密度发酵

将 LB 培养基中最佳产酶条件与 R 培养基中最佳碳氮源优化结果相结合,进行发酵罐高密度发酵。37 °C 培养菌体 13 h 至对数生长前期,其 OD_{600} 为 50.5 左右时,降低发酵液温度至 20 °C 后,加入 IPTG 至终浓度 0.3 g/L,诱导培养,每隔一段时间测量菌体浓度并测酶活。结果如图 2C 所示:诱导初期,重组菌适应新的生长环境,生长缓慢,但菌体已开始诱导产酶,酶活性有较大的增加;诱导培养 6 h 后,重组菌生长速度加快,酶活性增加的速度也加快;诱导培养 10 h 后,菌体浓度与酶活值均达到最高,菌体浓度 OD_{600} 为 98,比摇瓶发酵菌体浓度提高了近 21 倍,酶活为 9 436 U/L,比摇瓶发酵提高了近 16 倍,酶活得到大幅提高,但相对单位菌体来说酶活有一定的降低。可能原因是高密度发酵过程中积累了一些抑制重组菌外源蛋白表达的有害代谢物,如乙酸^[17-18]。乙酸的产生与细胞中电子传递和三羧酸循环有关,高密度发酵比生长速率高,重组菌通过氧化代谢产生的能量不能满足菌体合成与异化作用的需求,必须通过乙酸生成途径提供能量及相关酶,乙酸的过多积累会影响外源蛋白的表达,从而导致单位菌体酶活降低。

3 结论

文中在摇瓶体系中对黄杆菌肝素酶重组菌的诱导产酶条件进行了优化,并在此基础上进行了重组菌的发酵罐高密度培养,菌体浓度和酶活较摇瓶发酵分别提高了 21 倍和 16 倍,达到了较高的生产水准。该研究为 Hep 的工业化生产与应用进一步奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Ranga G, Ram S. A comparative analysis of the primary sequences and characteristics of Heparinases I, II, and III from *Flavobacterium heparinum*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1996, 229(3): 770-777.
- [2] Garg HG, Cindhuchao N, Quinn DA, et al. Heparin oligo-saccharide sequence and size essential for inhibition of pulmonary artery smooth muscle cell proliferation. *Carbohydr Res*, 2002, 337(21-23): 2359-2364.
- [3] Sasisekharan R, Moses MA, Nugent MA, et al. Heparinase inhibits neovascularization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91(4): 1524-1528.
- [4] Liu DF, Kevin P, Zachary S, et al. Use of heparinase III in cancer treatment and inhibition of tumor cell growth: WO, 2001066772. 2001-09-13.
- [5] Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, et al. Guide to anticoagulant therapy: heparin. *Circulation*, 2001, 103(24): 2994-3018.
- [6] Galliher PM, Cooney CL, Langer R, et al. Heparinase production by *Flavobacterium heparinum*. *Appl Environ Microbiol*, 1981, 41(2): 360-365.
- [7] Galliher PM, Linhardt RJ, Conway LJ, et al. Regulation of heparinase synthesis in *Flavobacterium heparinum*. *Appl Microbiol Biotechnology*, 1982, 15(4): 252-257.
- [8] Lohse DL, Linhardt RJ. Purification and characterization of heparin lyases from *Flavobacterium heparinum*. *J Biol Chem*, 1992, 267(34): 24347-24355.
- [9] Su H, Blain F, Musil RA, et al. Isolation and expression in *Escherichia coli* of *hepB* and *hepC*, genes coding for the glycosaminoglycan-degrading enzymes heparinase II and heparinase III, respectively, from *Flavobacterium heparinum*. *Appl Environ Bacteriol*, 1996, 62(8): 2723-2734.
- [10] Fu WB, Yu X, Zhao J, et al. Cloning and expression of *Flavobacterium heparinum* Heparinase II. *Food Drug*, 2007, 9(3): 1-4 (in Chinese).
傅文彬, 余晓, 赵健, 等. 黄杆菌肝素酶 II 的克隆与表达. *食品与药物*, 2007, 9(3): 1-4.
- [11] Blain F, Tkalec AL, Su H, et al. Expression system for high levels of GAG lyase gene expression and study of the *hepA* upstream region in *Flavobacterium heparinum*. *J Bacteriol*, 2002, 184(12): 3242-3252.
- [12] Xing XH, Li Y, Ye FC, et al. A method of heparinases II fusion protein coding gene and expression: CN, 201010259905. 2010-08-20 (in Chinese).
邢新会, 李晔, 叶逢春, 等. 一种肝素酶 II 融合蛋白及其编码基因与表达方法: CN, 201010259905. 2010-08-20.
- [13] Liu Y, Chen JH, Chen J, et al. Effects of carbon sources and feeding strategies on heparosan production by *Escherichia coli* K5. *Bioprocess Biosyst Eng*, 2012, 35(7): 1209-1218.
- [14] Ram S, Mark B, Kelley WM, et al. Cloning and expression of heparinase I gene from *Flavobacterium heparinum*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90(8): 3660-3664.
- [15] Dae-Hyuk K, Nam SH, Kyung-Moo P, et al. Overproduction of *Phytolacca insularis* protein in batch and fed-batch of recombinant *Escherichia coli*. *Process Biochem*, 2001, 36(1): 537-542.
- [16] Shiloach J, Fass R. Growing *E. coli* to high cell density—a historical perspective on method development. *Biotechnol Adv*, 2005, 23(5): 345-357.
- [17] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 1996, 14(3): 98-105.
- [18] Han K, Lim HC, Hong J. Acetic acid formation in *Escherichia coli* fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 1992, 39(6): 663-671.

(本文责编 郝丽芳)