

文章编号:1673-1689(2005)03-0072-04

重组大肠杆菌产 β -胡萝卜素的发酵条件

邹祥, 廖志华, 周小罡, 刘萍

(西南师范大学生命科学院, 重庆 400715)

摘要:对重组大肠杆菌产 β -胡萝卜素发酵条件进行了研究。在M9培养基中添加Span-20 0.7 g/L有利于细胞生长和 β -胡萝卜素表达,初始pH值6.0、接种体积分数5%、发酵温度28℃、抗生素氨苄青霉素质量浓度80 μ g/mL和氯霉素质量浓度40 μ g/mL为最佳发酵条件,在7 L发酵罐进行发酵动力学试验表明,重组菌最适发酵周期为22 h,细胞干重最高可达1.55 g/L, β -胡萝卜素表达量可达0.75 μ g/mL。

关键词:重组大肠杆菌; β -胡萝卜素;发酵条件

中图分类号:TQ 920

文献标识码:A

Studies on Fermentation Conditions of β -carotene Production by Recombinant *Escherichia coli*

ZOU Xiang, LIAO Zhi-hua, ZHOU Xiao-gang, LIU Ping

(School of Life Science, Southwest China Normal University, Chongqing 400715, China)

Abstract: The fermentation conditions of β -carotene production by recombinant *Escherichia coli* were studied. Addition of 0.7 g/L into M9 medium were favorable to cell growth and β -carotene expression. The optimum fermentation conditions were as follows: initial pH 6.0, inoculation volume 5%, temperature 28℃, Amp concentration 80 μ g/mL and Cm concentration 40 μ g/mL. Under these conditions, the fermentation kinetics test was determined in 7 L fermentor. The results showed that the maximum cell dry weight was 1.55 g/L, the β -carotene concentration was 0.75 μ g/mL, and the optimum fermentation time was 22 hours in the fermentor.

Key words: recombinant *Escherichia coli*; β -carotene; fermentation conditions

β -胡萝卜素(β -carotene)是维生素A的前体,是一种有效的生理抗氧化剂,具有抗衰老、防治心血管疾病的作用,以及抗癌、防治白内障等保健功效,同时也是理想的食品着色剂和营养增补剂。随着国内外对天然 β -胡萝卜素产品市场需求的增加,采用微生物发酵法生产有广阔的应用前景。目前 β -胡萝卜素发酵使用的菌种主要有三孢布拉霉^[1]、红酵

母^[2]、鞘氨醇单胞菌^[3]等。由于 β -胡萝卜素合成途径相关基因已经解释清楚,采用代谢工程手段构建 β -胡萝卜素基因工程高产菌株^[4],并通过高密度培养技术为 β -胡萝卜素产品开发开辟了新的生产途径。作者在成功构建重组 β -胡萝卜素大肠杆菌的基础上,考察重组大肠杆菌发酵条件对 β -胡萝卜素表达的影响,为进一步实现重组菌高密度培养及过量

收稿日期:2004-11-14; 修回日期:2004-12-19.

作者简介:邹祥(1976-),男,湖北仙桃人,工学硕士。

表达奠定基础.

1 材料与 方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种 产 β -胡萝卜素重组大肠杆菌(*E. coli* ZY-2),氨苄青霉素(Amp)和氯霉素(Cm)双重抗性,由西南师范大学生命科学学院廖志华博士构建.

1.1.2 培养基

1) 斜面培养基:LB 培养基,胰化蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 10 g,去离子水定容至 1 L,使用前加入氨苄青霉素 100 $\mu\text{g/mL}$,氯霉素 50 $\mu\text{g/mL}$.

2) 液体种子培养基:LB 培养基,胰化蛋白胨 10 g,酵母提取物 5 g,NaCl 10 g,去离子水定容至 1 L,使用前加入氨苄青霉素 100 $\mu\text{g/mL}$,氯霉素 50 $\mu\text{g/mL}$.

3) 摇瓶发酵基础培养基:M9 培养基, NaH_2PO_4 12.8 g, KH_2PO_4 3 g, NaCl 0.5 g, NH_4Cl 1 g, 葡萄糖 4 g, MgSO_4 0.5 g, CaCl_2 0.01 g, 去离子水定容至 1 L,使用前加入氨苄青霉素 100 $\mu\text{g/mL}$,氯霉素 50 $\mu\text{g/mL}$.

1.1.3 培养方法

1) 液体种子培养:将活化的斜面菌种挑取一环接种于液体培养基中,500 mL 三角瓶装培养基 100 mL,于 28 $^{\circ}\text{C}$,170 r/min 培养 24 h.

2) 摇瓶发酵培养:二级摇瓶,250 mL 三角瓶装液量 50 mL,液体菌种接种体积分数 10%,于 28 $^{\circ}\text{C}$,170 r/min 培养 48 h.

3) 7 L 发酵罐培养:7 L 发酵罐(上海保兴 BIOTECH-7BGZ)装液量 5 L,接种体积分数 5%,通气量 4 L/min,于 28 $^{\circ}\text{C}$,600 r/min 闭光培养 48 h.

1.2 分析方法

1.2.1 菌体干重测定 取 20 mL 发酵液,10 000 r/min 冷冻离心 10 min,洗涤后将菌体在 105 $^{\circ}\text{C}$ 烘干至恒重,分析天平称重.

1.2.2 β -胡萝卜素提取及含量测定 参照文献[2]进行测定.

2 结果与 讨论

2.1 重组大肠杆菌发酵培养基的选择

重组大肠杆菌常使用的发酵培养基为 LB、M9 等,这可用于产 β -胡萝卜素重组菌发酵培养基的筛选,而 Span-20 可增加细胞的通透性,以三孢布拉霉

为菌株发酵时添加 Span-20 可提高 β -胡萝卜素的产量^[5,6]. 因此分别在 LB、M9 培养基中添加 0.7 g/L 的 Span-20,考察不同培养基对重组大肠杆菌细胞生长和产物表达的影响,结果见表 1.

表 1 不同培养基对重组大肠杆菌发酵的影响
Tab. 1 Effect of different medium on fermentation of recombinant *E. coli*

培养基组成	细胞干重/ (g/L)	β -胡萝卜素 质量浓度/($\mu\text{g/mL}$)
LB	0.95	0.712
LB+Span-20	0.99	0.891
M9	1.21	1.083
M9+Span-20	1.45	1.115

由表 1 可知,M9 培养基比 LB 培养基有利于细胞生长和 β -胡萝卜素的表达,这可能与 M9 培养基营养物质较为平衡有关,在 M9 培养基和 LB 培养基中添加表面活性剂 Span-20,对细胞生长和 β -胡萝卜素的表达有一定的促进作用,其中在 M9 培养基中添加 Span-20 时, β -胡萝卜素质量浓度最高可达 1.115 $\mu\text{g/mL}$,明显高于其他培养基发酵水平,因此选择添加 0.7 g/L 的 Span-20 的 M9 培养基作为发酵培养基.

2.2 初始 pH 值对重组大肠杆菌发酵的影响

pH 值对重组大肠杆菌生长和产物的表达有显著的影响,由于重组大肠杆菌在发酵过程中会产生有机酸,导致 pH 值逐渐降低,因此发酵过程控制一定 pH 值范围有利于工程菌产物表达.从图 1 可以看出,发酵初始 pH 值为 6.0 时,细胞干重和 β -胡萝卜素的表达量均处于较高水平,而发酵体系呈碱性和强酸环境,细胞生长速率和产物合成速率下降较快,明显不利于细胞生长和产物表达,因此发酵初始 pH 值选择 6.0 为最佳.

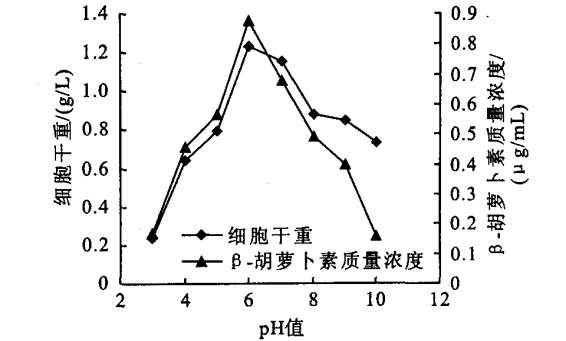


图 1 初始 pH 值对重组大肠杆菌表达的影响
Fig. 1 Effect of initial pH on the expression of recombinant *E. coli*

2.3 接种量对重组大肠杆菌发酵的影响

接种量可影响重组菌发酵过程的生长繁殖速度。接种量过大,重组菌生长旺盛,会导致重组质粒丢失和其他副产物的生成。从图2可以看出,接种体积分数为5%,细胞生长和 β -胡萝卜素表达量最高。接种量增加,反而对细胞生长和产物 β -胡萝卜素的表达不利。原因可能由于接种量大,导致细胞比生长速率和产物比合成速率不一致,质粒丢失率较高,从而影响产物表达。而接种体积分数超过10%以上时, β -胡萝卜素的表达量略有上升,有可能是单位体积接种细胞量增加引起。

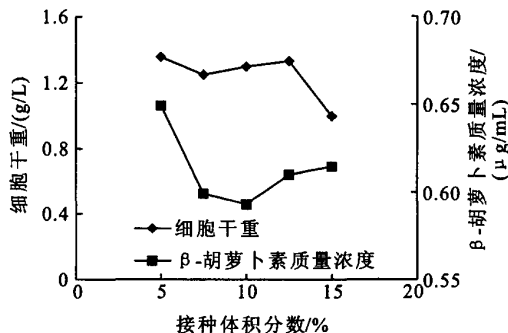


图2 接种量对重组大肠杆菌表达的影响

Fig. 2 Effect of inoculation volume on the expression of recombinant *E. coli*

2.4 温度对重组大肠杆菌发酵的影响

温度是影响重组大肠杆菌细胞生长和产物表达的重要因素,从图3可知,重组大肠杆菌培养温度为28℃时,细胞干重和产物 β -胡萝卜素表达量均同时达到最大值,随着培养温度的升高,细胞生长量和产物表达量逐渐降低,可见重组*E. coli* ZY-2的最佳培养温度为28℃。

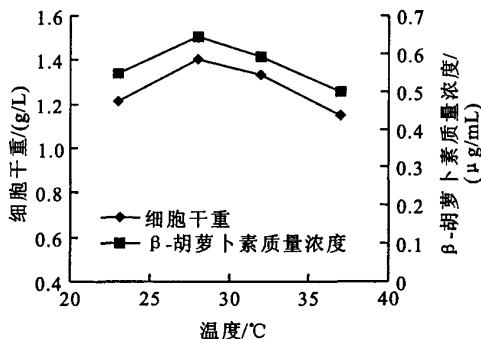


图3 温度对重组大肠杆菌表达的影响

Fig. 3 Effect of temperature on the expression of recombinant *E. coli*

2.5 抗生素质量浓度对重组大肠杆菌发酵的影响

重组*E. coli* ZY-2生长过程需加入氨苄青霉素和氯霉素双重抗性,作为外加选择压力来保证重组质粒的遗传稳定性,因此两种抗生素添加质量浓度

是重组菌遗传稳定性首先要考虑的因素。从表2可以看出,添加Amp 80 μ g/mL和Cm 40 μ g/mL时,可获得细胞干重最高可达1.52 g/L和 β -胡萝卜素最大表达量0.698 μ g/mL,两者添加质量浓度过高或过低均不利于细胞生长和 β -胡萝卜素的表达。

表2 抗生素质量浓度对重组菌发酵的影响

Tab. 2 Effect of Antibiotics concentration on the fermentation of recombinant *E. coli*

(Amp+Cm)质量浓度/ (μ g/mL)	细胞干重/ (g/L)	β -胡萝卜素质量浓度/ (μ g/mL)
20+10	1.34	0.442
40+20	1.44	0.678
60+30	1.36	0.488
80+40	1.52	0.698
100+50	1.45	0.645

2.6 7 L发酵罐动力学试验

上述优化后的培养基和发酵条件,在7 L发酵罐进行重组菌发酵动力学试验,结果见图4。

结果表明,重组大肠杆菌自发酵开始时,菌体和产物 β -胡萝卜素均大量繁殖和表达,细胞生长至10 h后趋于缓慢,细胞干重在22 h达最大值1.55 g/L;产物 β -胡萝卜素表达量14 h后缓慢上升,22 h后稳定在0.75 μ g/mL左右,26 h后表达量开始下降,表明发酵后期由于底物营养的限制,产物被细胞自身所利用;重组大肠杆菌对还原糖利用速率较快,主要用于细胞生长和产物的合成,22 h后趋于稳定;pH值在整个发酵过程呈下降趋势,发酵前22 h pH值由6.04下降至4.45,之后趋于稳定,此时产物 β -胡萝卜素表达量和细胞生长量均达到最大值,表明pH值的变化与细胞生长、产物表达、底物利用三者变化均呈相关性,考虑重组大肠杆菌生长变化和产物表达量,最适发酵周期为22 h。

3 结论

对重组大肠杆菌表达 β -胡萝卜素的发酵条件研究表明,在工程菌发酵常用的M9培养基基础上添加Span-20有利于细胞生长和 β -胡萝卜素表达,初始pH值为6.0、接种体积分数5%、发酵温度28℃、抗生素氨苄青霉素质量浓度80 μ g/mL和氯霉素质量浓度40 μ g/mL是重组菌最佳的发酵条件。通过7 L发酵罐对重组大肠杆菌发酵动力学试验发现,优化条件下发酵细胞干重最高可达1.55 g/L, β -胡萝卜素最大表达量为0.75 μ g/mL,细胞量和产物表达量与产业化要求还有一段距离,因此要实现

重组菌高密度培养和产物 β 胡萝卜素的高表达,单一的分批发酵不可能实现,而从动力学分析发现,

pH 值的变化与细胞生长、产物表达、底物利用三者变化呈良好的相关性。

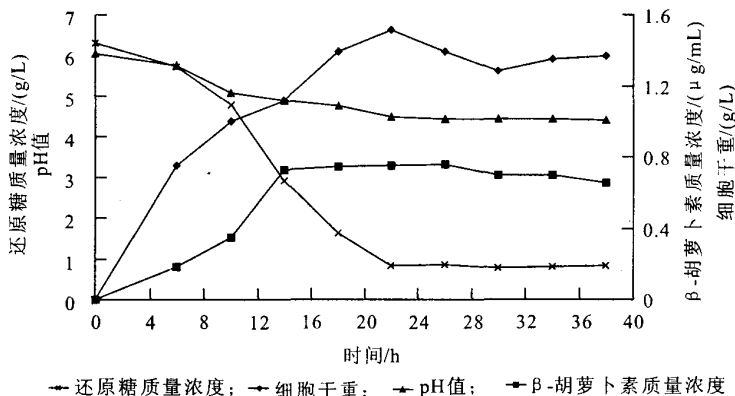


图 4 7 L 发酵罐重组大肠杆菌发酵过程曲线

Fig. 4 The fermentation time course of recombinant *E. coli* in 7 L fermentor

参考文献:

- [1] 曾强松,童海宝,徐静安. 三孢布拉霉发酵生产 β 胡萝卜素工艺研究[J]. 工业微生物, 2002, 32(4): 7-9.
- [2] 卫军,马歌丽,陈春涛,等. 红酵母产 β 胡萝卜素发酵条件研究[J]. 中国食品学报, 2003, 3(2): 6-12.
- [3] Silva, C., Cabral J., Keulen M. Isolation of a β -carotene over-producing soil bacterium, *Sphingomonas sp*[J]. *Biotechnology Letters*. 2004, 26: 257-262.
- [4] Misawa N, Hiroshi S. Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts[J]. *Journal of Biotechnology*. 1998, 59: 169-181.
- [5] Kerrl S, Cal C, M S J, *et al*. Factors enhancing lycopene production by a new *Mycobacterium aurum* mutant[J]. *Biotechnology Letters*. 2004, 26: 103-108.
- [6] Kim S W, Seo W T, Park Y H. Enhanced production of β -carotene from *Blakeslea trispora* with Span-20[J]. *Biotechnology Letters*. 1997, 19(6): 561-562.

(责任编辑:李春丽)

江南大学工业生物技术教育部重点实验室 2005 年开放课题申请指南

符合以下研究领域的基础和应用基础研究课题均可申报 2005 年度工业生物技术教育部重点实验室开放课题。

- (1) 分子生物学与生物信息学
- (2) 工业微生物、工业微生物基因组学与代谢调控
- (3) 生物化学与生物催化
- (4) 发酵工程与过程控制
- (5) 药物学与生物制药
- (6) 环境科学与环境生物技术