

文章编号:1673-1689(2009)05-0670-05

产胆固醇氧化酶重组大肠杆菌的发酵培养基 和诱导条件的优化

杨海麟¹, 王长城¹, 张玲¹, 孙艳¹, 白洁¹, 王武¹, 杨建勋²

(1. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 无锡市广播电视大学, 江苏 无锡 214011)

摘要: 在摇瓶中对产胆固醇氧化酶重组大肠杆菌的发酵培养基和诱导条件进行了优化, 优化培养基为甘油 10 g/L, 胰蛋白胨 10 g/L, 酵母粉 5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, K_2HPO_4 4 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.2 g/L, NH_4Cl 0.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L; 优化的诱导条件为: 对数生长期诱导, IPTG 浓度为 0.3 mmol/L。在优化的培养基和优化的诱导条件下, 单位菌体产酶量达 745.86 U/g, 菌体产酶水平达 1 625.97 U/L, 为优化前的 700 U/L 的 2.3 倍。

关键词: 重组 *E. coli* JM109/pTrc99a-COD; 胆固醇氧化酶; 培养基优化; 诱导条件优化

中图分类号: TQ 920.1

文献标识码: A

Optimization of Culture Conditions for Production of Cholesterol Oxidase Using Recombinant *E. coli*

YANG Hai-lin¹, WANG Chang-cheng¹, ZHANG Ling¹,

SUN Yan¹, BAI Jie¹, WANG Wu¹, YANG Jian-xun²

(1. Key Laboratory of Industry Biotechnology, Ministry of Education, Jiangnan University, Wuxi 214122, China;

2. Wuxi Radio and Television University, Wuxi 214011, China)

Abstract: The nutrient and inducing conditions of cholesterol oxidase by recombinant strain *E. coli* JM109 were carefully studied in this manuscript and listed as follows: glycerol 10 g/L, tryptone 10 g/L, Yeast power 5 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, K_2HPO_4 4 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 7 g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1.2 g/L, NH_4Cl 0.2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1 g/L and 0.3 mmol/L IPTG added to the fermentation broth at the intermediate cell density. Under the optimum conditions, the cholesterol oxidase achieved at 745.86 U/g cell weight, the enzyme activity reached at 1625.97 U/L, is 2.3 times that of pre-optimization.

Key words: recombination *E. coli* JM109/pTrc99a-COD, cholesterol oxidase, medium optimization, optimal conditions for induction

胆固醇氧化酶(COD)是一类黄素蛋白,属于 GMC 氧化还原酶体系^[1],是胆固醇代谢过程中的

收稿日期:2008-11-17

基金项目:国家 863 计划项目(2006AA10Z305);工业生物技术教育部重点实验室基金项目(KLI-KF200505)

作者简介:杨海麟(1971-),男,江苏无锡人,副教授,工学博士,主要从事发酵工程方面的研究。

Email:19891996@sina.com

一个关键酶。它能够快速准确地检测出血清中胆固醇的浓度,用来诊断动脉硬化和其他脂质紊乱疾病^[2],是目前世界上仅次于葡萄糖氧化酶的第二大检测用酶。它可作为食品添加剂,降低食品中的胆固醇含量^[3];还可作为一种潜在的生物杀虫剂,有效地杀死多种害虫(如双翅目、直翅目和同翅目等)^[4]。

美国和日本对胆固醇氧化酶研究开展较早,日本已经率先实现了基因工程菌产胆固醇氧化酶的商品化,美国主要集中在胆固醇氧化酶结构方面进行研究。目前国内研究产胆固醇氧化酶的微生物主要有短杆菌、马红球菌、节杆菌、桔红诺卡氏菌等,对胆固醇氧化酶工程菌的研究较少。作者所在实验室桑吉等通过复合诱变使短杆菌产酶水平提高到1 210 U/L^[5],原始菌株必须在胆固醇的诱导下产酶,而胆固醇不易溶于水,不利于下游的分离提取;为了解决此问题,王龙刚、张玲等^[6-7]构建了重组大肠杆菌产胆固醇氧化酶,产酶水平可达700 U/L。作者对已构建的产胆固醇氧化酶基因工程菌进行发酵培养基优化,并优化了诱导条件,目的是提高重组大肠杆菌的产酶水平。

1 材料与方法

1.1 菌种

E. coli JM109/pTrc99a-COD:作者所在实验室构建并保存,构建方法见文献^[7]。

1.2 培养基

1.2.1 LB培养基(组分 g/L) 蛋白胨 10,酵母提取物 5,氯化钠 10,pH 7.0。加入 20 g/L 琼脂为LB固体培养基。

1.2.2 2-YT培养基(组分 g/L) 蛋白胨 16,酵母粉 10,NaCl 5。

1.2.3 发酵基本培养基(组分 g/L) 胰蛋白胨 5,酵母提取物 5,甘油 5,KH₂PO₄ 2,K₂HPO₄ 4,Na₂HPO₄·12H₂O 7,(NH₄)₂SO₄ 1.2,NH₄Cl 0.2,MgSO₄·7H₂O 1,微量元素^[8]。

在进行发酵培养基优化过程中,将发酵基本培养基中原有的碳源和氮源替换成相应的营养成分进行试验。

以上的培养基均添加过滤除菌的氨苄青霉素 100 mg/L。

1.3 培养方法

1.3.1 一级种子的制备 从平板挑取单菌落接种到LB液体培养基,培养9 h。

1.3.2 二级种子的制备 一级种子以体积分数5%的接种量接到2-YT培养基中,培养9 h。

1.3.3 发酵培养基的摇瓶方法 二级种子以体积分数5%接种量接到发酵培养基中,装液量20%,摇瓶转速200~220 r/min,温度37℃,培养到适合的时间添加IPTG进行诱导。

1.4 分析方法

1.4.1 菌体破碎 4℃,8 000 r/min离心5 min,收集菌体后用0.1 mol/L、pH 7.0的磷酸钾缓冲液洗涤悬浮菌,超声波破碎仪400 W,工作5 s,间歇5 s,,99个循环,超声破碎菌体。4℃,12 000 r/min离心15 min,去除细胞碎片沉淀,取上清液进行酶活分析。

1.4.2 酶活的测定 酶活力单位定义为37℃、1 min转化1 μmol胆固醇生成胆甾-4-烯-3-酮的酶量定义为1个酶活单位(U)。酶活:(U/mL)=0.131 5A₅₀₀×3.2×20÷5=1.683 2×A₅₀₀^[9]。

1.4.3 细胞光密度分析 将菌悬液作适当稀释,用紫外/可见分光光度计于600 nm下测定吸收值(OD₆₀₀)。OD₆₀₀=OD₆₀₀读数×稀释倍数。

1.4.4 菌体生物量的测定 取不同菌体浓度的培养液,在600 nm下测其吸光度,以8 000 r/min下离心10 min,弃上清液后用去离子水清洗菌体,再于8 000 r/min下离心10 min,弃上清液于80℃下烘干至恒重。

发酵液的OD₆₀₀与菌体干重(g/L)呈线性关系,见图1。 $y = 0.4559x - 0.0214$ ($R^2 = 0.9998$), x 为OD₆₀₀, y 为菌体干重(g/L)。

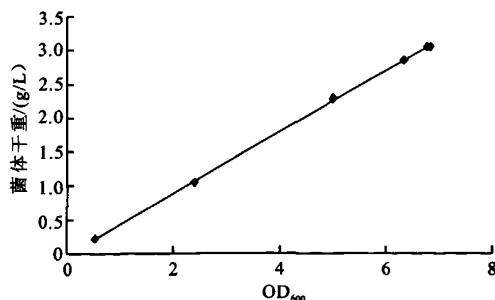


图1 菌体干重与OD₆₀₀的线性关系

Fig. 1 Relation between the dry cell weight and the OD₆₀₀ value

2 结果与讨论

2.1 发酵培养基的优化

2.1.1 碳源对胆固醇氧化酶发酵生产的影响 不同菌种所含的酶系不同,对不同碳源的利用情况也不同,进而会影响到产酶能力。通过改变发酵基础培养基中的碳源,研究不同碳源(甘油、淀粉、葡萄糖、麦芽糖、蔗糖、D-果糖各5 g/L)对重组*E. coli*

JM109 生长和产酶的影响,结果见表 1。

表 1 不同碳源对菌体生长和产酶的影响

Tab. 1 Effect of carbon source on cell growth and cholesterol oxidase production

碳源 (5 g/L)	菌体量/ (g/L)	单位菌体产酶量/ (U/g)	产酶水平/ (U/L)
甘油	1.83	527.03	964.47
淀粉	1.57	71.83	112.77
葡萄糖	2.05	193.78	397.24
麦芽糖	1.70	125.75	213.77
蔗糖	1.46	78.40	114.46
D-果糖	1.87	201.63	377.04

结果表明:所测试的碳源对重组 *E. coli* JM109 的生长和产酶各有不同的影响。其中,葡萄糖和麦芽糖虽可以明显地促进菌体的生长,增加细胞生物量,但不利于酶的合成。重组 *E. coli* JM109 以甘油为碳源生长良好,且单位细胞产酶量高,易于酶的合成,因而选取甘油为最适碳源。通过单因子实验,确定了甘油的最佳添加质量浓度,结果见图 2。

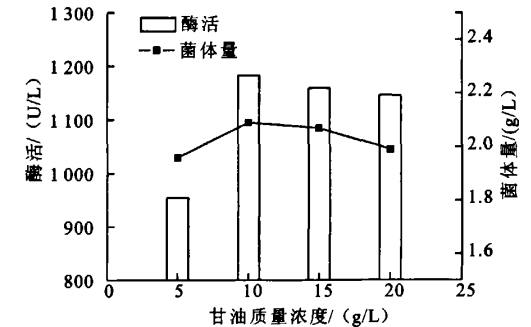


图 2 不同质量浓度甘油对菌体生长和产酶的影响

Fig. 2 Effect of different glycerine concentration on cell growth and cholesterol oxidase production

图 2 表明,当甘油质量浓度为 10 g/L 时,菌体量和酶活均较大,酶活达 1 183.29 U/L,因此选取 10 g/L 作为甘油的最佳添加量。

2.1.2 氮源对胆固醇氧化酶发酵生产的影响 氮源主要用于供给菌体合成细胞结构的原料和含氮代谢物(氨基酸、蛋白质、核酸等)。不同微生物代谢合成酶的过程中对不同种类氮源的需求是不相同的。以上述碳源研究为基础,选定甘油(10 g/L)为碳源,通过改变发酵基本培养基中的氮源,来研究不同氮源对重组 *E. coli* JM109 生长和产酶的影响,结果见表 2。

表 2 表明,酵母粉能很好地促进菌体的生长,胰蛋白胨的单位菌体产酶量最高,为 550.78 U/g。由于重组 *E. coli* JM109 产胆固醇氧化酶为胞内酶,在单位菌体产酶量不降低的前提下,获得高的酶活

菌体量是必须的,所以作者考虑复合使用酵母粉和胰蛋白胨来提高酶活。首先单因素实验确定胰蛋白胨与酵母粉的最佳质量浓度,结果见图 3~4。

表 2 不同氮源对菌体生长和产酶的影响

Tab. 2 Effect of nitrogen source on cell growth and cholesterol oxidase production

氮源 (5 g/L)	菌体量/ (g/L)	单位菌体产酶量/ (U/g)	产酶水平/ (U/L)
酵母粉	1.96	213.84	419.12
胰蛋白胨	1.80	550.78	991.40
玉米粉	1.77	197.31	349.23
硫酸铵	1.10	342.76	377.04
柠檬酸氢二铵	0.71	298.70	212.08
乙酸铵	1.09	61.77	67.33

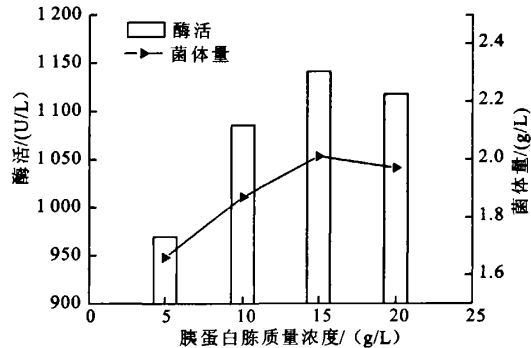


图 3 不同胰蛋白胨质量分数对菌体生长和产酶的影响

Fig. 3 Effect of different tryptone concentration on cell growth and cholesterol oxidase production

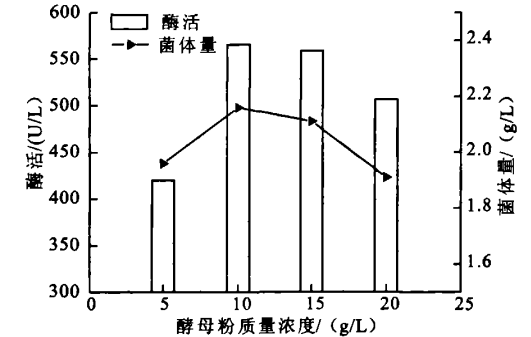


图 4 不同酵母粉质量浓度对菌体生长和产酶的影响

Fig. 4 Effect of different yeast extract concentration on cell growth and cholesterol oxidase production

图 3、4 表明,胰蛋白胨的优化质量浓度为 15 g/L,酵母粉为 10 g/L,最高酶活分别为 1 141.21 U/L 与 558.82 U/L,均比碳源优化结果的 1 183.29 U/L 低。

碳源优化时,培养基中含有胰蛋白胨和酵母粉两种氮源,所以考虑复合使用胰蛋白胨和酵母粉提高酶活。

2.1.3 复合氮源对菌体产酶水平的影响 在 2.1.2 中已经确定了胰蛋白胨和酵母粉的最佳质量浓度,复合使用氮源时,考虑到菌体总氮量需求在摇瓶中有上限,所以把氮源的最佳质量浓度定为发酵培养基的最高浓度,进行两种氮源不同比例的实验。胰蛋白胨和酵母粉的添加量与实验结果见表 3。

表 3 复合氮源的使用对菌体生长和产酶的影响

Tab.3 Effect of nitrogen compound on cell growth and cholesterol oxidase production

胰蛋白胨 质量浓度/ (g/L)	酵母粉 质量浓度/ (g/L)	菌体 量/ (g/L)	单位菌体 产酶量/ (U/g)	产酶 水平/ (U/L)
5	5	1.86	584.60	1 087.35
5	10	2.04	575.92	1 174.87
10	5	2.25	617.92	1 390.32
10	10	2.24	583.11	1 306.16
15	5	2.20	583.76	1 284.28
15	10	2.18	582.94	1 270.82

表 3 表明,在胰蛋白胨 10 g/L、酵母粉 5 g/L 时,菌体量为 2.25 g/L,单位菌体产酶量最高,为 617.92 U/g,最高酶活达到 1 390.32 U/L。

2.2 培养基优化后的生长曲线

基因工程菌发酵产酶不仅与培养基有关,还与诱导条件密切相关,首先研究菌体在优化后的培养基中的生长曲线,然后再确定最佳的诱导条件。生长曲线见图 5。

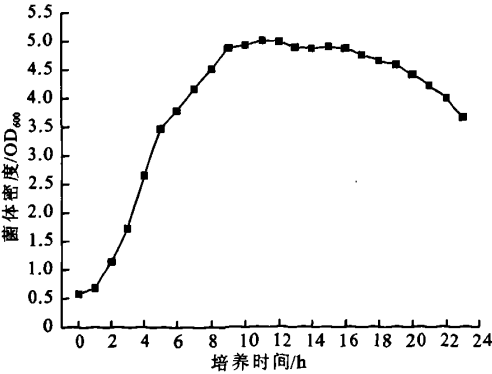


图 5 菌体生长曲线

Fig.5 The growth curve of *E. coli*

图 5 表明,菌体在经历了 1 h 的延迟期就进入了长达 7 h(2~9 h)的对数生长期,根据此生长曲线作者进行了诱导条件的优化。

2.3 诱导条件的优化

2.3.1 诱导时机对胆固醇氧化酶发酵的影响 诱导时机对菌体产酶有很大影响。大肠杆菌在摇瓶中的诱导时机的研究比较多,大多数在菌体生长对数期的中后期,这些大多都是关于 LB 培养基的报

道。但是不同菌在不同的培养基中诱导时机是有区别的,作者选取不同时期进行诱导,以确定菌体产酶的最佳的诱导时机,结果见表 4。

表 4 IPTG 添加时间对 COD 表达的影响

Tab.4 The effect of adding time of IPTG on the cholesterol oxidase expression

IPTG 添加 时间/h	诱导时 菌体密度/ OD ₆₀₀	发酵终点 菌体量/ (g/L)	单位菌体 产酶量/ (U/g)	产酶 水平/ (U/L)
1	0.901(延迟期)	1.48	801.80	1 186.66
3	2.400(对数前期)	2.04	671.63	1 370.12
5	3.280(对数中期)	2.22	294.18	653.08
7	3.860(对数末期)	2.33	40.45	94.26

表 4 表明,在延迟期添加 IPTG 进行诱导,单位菌体产酶量最高为 801.80 U/g,但是菌体量较低,可能是进行过早添加 IPTG 对菌体有毒害作用;在对数前期添加 IPTG 菌体量较大,单位菌体产酶量也高达 671.63 U/g,综合考虑单位菌体产酶量和菌体量,认为在对数生长前期诱导为佳,此时的产酶水平最高,为 1 370.12 U/L。

2.3.2 诱导时间对胆固醇氧化酶表达的影响 添加诱导剂对菌体诱导产酶时,诱导时间的确定对发酵的重大意义,因为诱导时间的长短直接关系到产酶水平,同时还与生产强度等工业发酵的相关指标相关。作者选取不同的诱导时间来考察最佳的诱导时间,结果见图 6。

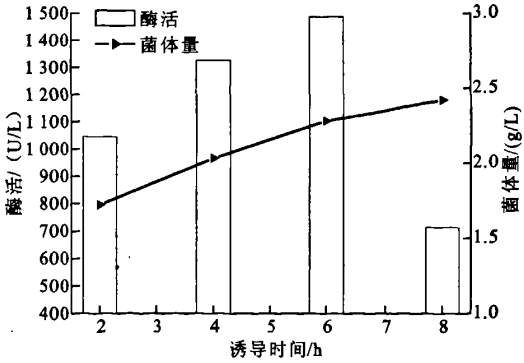


图 6 诱导时间对菌体量与产酶的影响

Fig.6 The effect of induction time on the cell growth and cholesterol oxidase expression

图 6 表明,在 6 h 前菌体产酶水平随着时间的增加而增大,但在 6 h 后菌体产酶水平迅速下降,整个过程中,菌体量都在上升。原因可能是在诱导过程中,发酵液里存在着一些使表达的重组蛋白发生降解的因素,例如蛋白酶的水解作用、pH 值变化的影响等。因此确定最佳的诱导时间不超过 6 h,此时的酶活达 1 487.95 U/L,单位菌体产酶量为 652.61 g/L。

2.3.3 诱导剂浓度对胆固醇氧化酶发酵的影响

IPTG 的添加浓度对菌体的产酶有一定的影响,由于 IPTG 的有毒,价格昂贵,所以采取低浓度的 IPTG 进行诱导是发酵中希望出现的结果。作者选择不同浓度的 IPTG 进行诱导以确定最佳的 IPTG 诱导,结果见图 7。

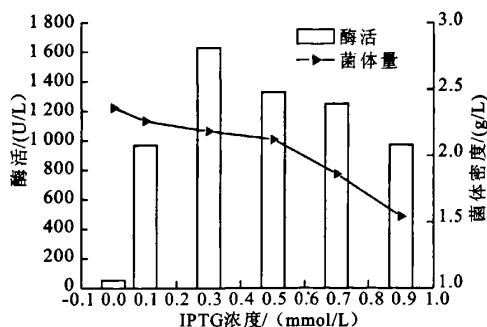


图 7 IPTG 浓度对菌体量与产酶的影响

Fig. 7 The effect of IPTG final concentration on the cell growth and cholesterol oxidase expression

图 7 的结果表明,当 IPTG 添加浓度为 0.3 mmol/L 时,菌体产酶水平最高,为 1 625.97 U/L,单位菌体产酶量达 745.86 U/g;随着浓度的增高,

菌体量和酶活均有所降低,从发酵成本和产酶水平双重考虑,选择 0.3 mmol/L 为最佳的诱导浓度。

3 结 语

发酵培养基对工程菌 *E. coli* JM109 /pTrc99a-COD 产酶水平有显著的影响,经过发酵培养基的优化,确定了最佳的培养基为:甘油 10 g/L,胰蛋白胨 10 g/L,酵母粉 5 g/L,其他同发酵的基本培养基。

本研究采用的工程菌是由 pTrc99a 质粒构建的表达载体,诱导外源基因表达的诱导剂为 IPTG。研究表明:诱导时机、诱导时间和诱导剂的浓度对菌体的产酶有显著的影响,较早地添加 IPTG 进行诱导有利于外源基因的表达,但是会影响到菌体量。最佳的诱导时机为菌体培养 3 h,处于对数生长前期 ($OD_{600} = 2.4$),这与传统资料报道^[10]的重组大肠杆菌的发酵在对数生长末期诱导有差异与廖美德报道的在对数生长前中期接近。诱导剂 IPTG 添加量影响菌体生长和外源基因的表达,这与 K. R. Babu^[10]的报道相同,当 IPTG 浓度 0.3 mmol/L 诱导效果最好。

本实验单位菌体产酶量达 745.86 U/g,产酶水平达 1 625.97 U/L,为文献[7]的 2.3 倍。

参考文献 (References):

- [1] Loredano Pollegion, Gaby Wels, Mirella, et al. Kinetic mechanisms of cholesterol oxidase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Brevibacterium sterolicum*[J]. *Eur J Biochem*, 1999, 264: 140-151.
- [2] Gaddag, Welsg, Pollegionl, et al. Characterization of cholesterol oxidase from *Streptomyces hygroscopicus* and *Brevibacterium sterolicum*[J]. *Eur J Biochem*, 1997, 250: 369-376.
- [3] Somkutigeorgea, K Y solaiman daniel, Gdennsh stein-ber. Expression of *Streptomyces sp.* cholesterol oxidase in *Lactobacillus casei*[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1992, 37: 330-334.
- [4] 张锐,郭三堆. 植物抗虫基因工程研究进展[J]. 生物技术通报, 2001(2): 8-12.
Zhang Rui, Guo San-dui. Study on plant insect-resistant genetic engineering[J]. *Biotechnology Information*, 2001(2): 8-12. (in Chinese)
- [5] 桑吉,王龙刚,李忠琴. 胆固醇氧化酶高产菌株的复合诱变选育[J]. 食品工业科技, 2006, 27(6): 87-89.
Sang Ji, WANG Long-gang, Li Zhong-qin. Breeding of high cholesterol oxidase producing *Brevibacterium sp.* by combined mutagens[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2006, 27(6): 87-89. (in Chinese)
- [6] 王龙刚,郭敏辰,王武. 胆固醇氧化酶基因的克隆及在 *E. coli* 中的表达[J]. 微生物学通报, 2006, 33(6): 39-42.
WANG Long-Gang, WU Min-Chen, Wang Wu. Cloning and expression of *Brevibacterium sp.* DG CDC-82 cholesterol oxidase gene in *Escherichia coli*[J]. *Microbiology*, 2006, 33(6): 39-42. (in Chinese)
- [7] 张玲,霍惠芝,沈微,等. 菌株短杆菌胆固醇氧化酶基因在大肠杆菌中的表达[J]. 生物加工过程, 2008, 6(1): 21-26.
ZHANG Ling, HUO Hui-zhi, SHEN Wei. Expression of cholesterol oxidase gene from *Brevibacterium sp.* DG CDC282 in *E. coli*[J]. *Chinese Journal of Bioprocess Engineering*, 2008, 6(1): 21-26. (in Chinese)
- [8] Toru Matsui, Hiroaki Sato, Hotaka Yamamuro, et al. High cell density cultivation of recombinant *Escherichia coli* for hirudin variant 1 production[J]. *Journal of Biotechnology*, 2008, 134: 88-92.
- [9] 季文明,陈毅力. 比色法测定胆固醇氧化酶酶活[J]. 无锡轻工大学学报, 2000, 19(3): 251-254.
JI Wen-ming, CHEN Yi-li. Colorimetric determination of the activity of cholesterol oxidase[J]. *Journal of Wuxi University of Light Industry*, 2000, 19(3): 251-254. (in Chinese)
- [10] K R Babu, S Swaminathan, S Mart, et al. Production of interferon-in high cell density cultures of recombinant *Escherichia coli* and its single step purification from refolded inclusion body proteins[J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, 53: 655-660.

(责任编辑:李春雨)