

溶氧反馈-分批补料高密度培养 枯草杆菌谷氨酰胺合成酶工程菌

张 锋, 王 期, 李桂兰, 徐健红, 洪素丽, 岳 玲, 冯志勇, 殷志敏

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210046)

[摘要] 为了建立枯草杆菌谷氨酰胺合成酶基因重组工程菌 BL21/pET28b-glnA 的高密度培养工艺, 首先以摇瓶培养为基础, 对影响工程菌生长及目的蛋白表达的因素如培养基、pH 值、诱导剂浓度及时间等进行优化, 再扩大至 BIOTECH-5BG (5 L) 自动玻璃发酵罐培养, 利用溶氧反馈补料策略进行分批补料, 并在培养过程中保持 20% ~ 50% 的溶解氧, 7.0 ~ 7.5 的 pH, 以及 1.0 g/L 乳糖诱导 12 h 成功地进行了工程菌的高密度培养, 最终细菌干重达到 48.1 g/L, 目的蛋白的表达量占菌体蛋白总量的 53%, 粗提物酶比活为 10.35 U/mg 整个补料过程细菌比生长率稳定的控制在 0.1 h^{-1} 左右。

[关键词] 谷氨酰胺合成酶, 重组大肠杆菌, 分批补料培养, 高密度培养

[中图分类号] Q93-335 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2010)02-0096-08

High Density Fed-Batch Culture of *Escherichia coli* BL21/pET28b-glnA With DO Feed-back Control of Nutrient Feeding

Zhang Feng Wang Qi Li Guilan Xu Jianhong Hong Sulij Yue Ling Feng Zhiyong Yin Zhimin

(School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210046, China)

Abstract To investigate the optimal high cell density culture conditions of recombinant BL21/pET28b-glnA to produce recombinant Glutamine Synthetase (GS) of *Bacillus Subtilis* based on the experimental results obtained in shake flask cultivation, the effects of the composition of the culture medium, the range of pH, inducer concentration and induced time on the growth of bacteria and the expression level of GS were analyzed. Then the bacteria were transferred to BIOTECH-5BG (5 L) DO feed-back fed-batch culture system. By keeping dissolved oxygen at 20% ~ 50%, pH at 7.0 ~ 7.5, culturing in Optimized M9 Medium and inducing for 12 h in the presence of 1 g/L lactose at 37°C during fed-batch cultivation, we performed a three time repeated culture. Cell density of recombinant *E. coli* was reached to 48.1 g/L under constant (0.10 h^{-1}) specific growth rates. The expression level of recombinant protein GS was over 53% of the total protein in *E. coli*. Specific activity of crude extract enzyme was 10.35 U/mg. A high expression and stabilized culture process of recombinant Glutamine Synthetase of *Bacillus Subtilis* has been established which founds the basis for further large scale production of Glutamine Synthetase.

Key words Glutamine synthetase, recombinant *E. coli*, fed-batch culture, high cell density culture

谷氨酰胺合成酶 (L-谷氨酸: 氨连接酶, Glutamine Synthetase, 简称 GS) 存在于各种原核生物和真核生物中, 是生物体中最古老也是最广泛存在的酶。它参与了生物体碳和氮的代谢, 在多种氨基酸合成时作为氮源的供体, 是生物体不可缺少的重要酶类^[1]。谷氨酰胺合成酶和谷氨酸合成酶联合作用催化氨的同化, 最终转变成 L-谷氨酰胺 (L-glutamine, L-Gln)^[2]。L-谷氨酰胺是 L-谷氨酸的 γ -羧基酰胺化的一种条件性必需氨基酸, 是人体血液中浓度最高的游离氨基酸^[3]。L-Gln 已广泛应用于胃肠道功能修复、缓解运动疲劳、调节人体免疫和增强脑神经机能等方面^[4-8], 其市场需求量日渐增长。

目前, 酶促合成法生产 L-Gln 是以 ATP、 NH_4^+ 及谷氨酸作原料, 经谷氨酰胺合成酶 (GS) 催化而成^[9]。

收稿日期: 2009-09-30

通讯联系人: 殷志敏, 博士, 教授, 研究方向: 生物化学及细胞生物学。E-mail: yinzhimin@njnu.edu.cn

GS作为谷氨酰胺的工业性催化剂, 是极有价值的物质, 但是目前高效率、低成本、大规模制造稳定性优良的 GS的方法尚未见报道, 因此, 研究谷氨酰胺合成酶的生产方法具有重要意义。

重组菌的高密度培养 (High cell density culture, H CDC) 技术能够减少培养体积, 缩短生长周期, 提高目标产物的浓度, 减少设备投资并简化下游分离提取, 为工业化生产降低成本, 因此是基因工程技术走向产业化的关键环节。高密度培养技术采用增加工程菌对数期的生长时间、相对缩短衰亡时间来提高菌体的密度, 极大地提高产物的比生产率。利用基因重组技术构建的生物工程菌的培养工艺以获得大量的外源基因表达产物, 要充分考虑宿主、载体和外源基因三者之间相互关系以及工程菌的生长状态^[10-11], 需要对影响外源基因表达的多种因素进行分析, 即对培养基、补料方式和诱导条件等因素进行优化, 探索出一套适合于外源基因高效表达的培养工艺。本研究通过高密度培养技术大量培养工程菌 BL21/pET28b-glnA, 乳糖诱导谷氨酰胺合成酶合成, 提高比生产率, 降低生产成本, 以满足酶法合成谷氨酰胺的基础研究及工业生产的需求。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和质粒

含 pET28b/glnA 的重组大肠杆菌 BL21 (BL21/pET28b-glnA) 由本实验室构建并冻存。

1.1.2 设备和试剂

BDTECH-5BG 自动玻璃培养罐购自上海保兴生物设备工程有限公司; 胰蛋白胨和酵母提取物购自英国 OXO D 公司; 丙烯酰胺及甲叉双丙烯酰胺购自 Promega 公司; 四甲基乙二胺购自 BioRad 公司; IPTG 购自 Merck 公司; 蛋白胨购自北京双旋微生物培养基制品厂; 乳糖购自广东西陇化工厂; 其他试剂均为国产分析纯。

1.1.3 培养基

LB 培养基^[12]作为种子培养基。改良 M9 培养基用于发酵罐补料分批培养, 每升含: 甘油 10 mL, 蛋白胨 5 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 12.8 g, KH_2PO_4 3.0 g, NaCl 10.5 g, NH_4Cl 1.0 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, CaCl_2 0.01 g。每升补料培养基含: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2 g, 甘油 120 mL, 蛋白胨 50 g。除特殊说明, 培养基的 pH 值全部调为 7.0。培养基和补料高压灭菌后使用, 各种培养基使用前加入卡那霉素至终浓度 50 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.2 实验方法

1.2.1 重组枯草杆菌谷氨酰胺合成酶工程菌菌株的活化与筛选

将 -20℃甘油冻存菌复苏后铺 LB 平板培养, 37℃培养 24 h 挑选数个单菌落, 接种于 4 mL LB 培养基中, 37℃, 220 r/min 振荡过夜培养后, 按 1:100 比例转接至 50 mL LB 培养基中, 振荡培养至 A_{600} 值为 1.0~1.5 时加入 IPTG 至终浓度为 0.1 mmol/L, 诱导表达 4 h, 全菌 SDS-PAGE 检测表达情况。根据电泳结果, 选用 1 个单克隆菌株为实验菌株。

1.2.2 培养基碳源浓度优化

选用甘油作为碳源, 在装有 50 mL 基础 M9 培养基 (去除碳源) 的 250 mL 摇瓶中分别加入 0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0 mL/L 甘油, 按 3% 接入活化的种子液, 37℃, 220 r/min 振荡培养, A_{600} 值达 1.0~1.5 时加入终浓度为 1 g/L 的诱导剂乳糖, 诱导 6 h, 取 1 mL 菌液作全菌 SDS-PAGE 电泳。

1.2.3 培养基氮源浓度优化

选用蛋白胨做为有机氮源。分别向含有最适浓度甘油的 50 mL M9 培养基中加入 0.5、1.0、1.5、2.0、4.0、6.0 g/L 蛋白胨。3% 接种量, 37℃, 220 r/min 振荡培养, A_{600} 值达 1.0~1.5 时加入终浓度为 1 g/L 的乳糖, 诱导 6 h, 取 1 mL 菌液作全菌 SDS-PAGE 电泳。

1.2.4 培养基酸碱度 (pH) 的优化

(1) pH 对工程菌生长的影响: 将改良 M9 培养基 (在基础 M9 培养基中添加了甘油和蛋白胨) 的 pH 分别调成 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0。3% 接种, 37℃, 220 r/min 培养, 2 h 调整 1 次 pH, 测定工程菌在不同 pH 值下的生长曲线。

(2) pH 对 GS 表达的影响: 3% 接种, 37℃, 220 r/min 振荡培养, A_{600} 值达 1.0~1.5 时将 pH 分别调整

为 6.0 6.5 7.0 7.5 8.0, 终浓度 1 g/L 乳糖诱导表达 6 h, 其间每小时调整 1 次 pH, 测最终细菌密度, 取 1 mL 菌液作全菌 SDS-PAGE 电泳.

1.2.5 诱导剂乳糖浓度的优化

诱导剂乳糖的终浓度分别为 0.25 0.50 1.0 2.0 4.0 6.0 g/L 3% 接种, 37°C, 220 r/min 振荡培养, A_{600} 值达 1.0~1.5 时加入各浓度的乳糖, 诱导 6 h 取 1 mL 菌液作全菌 SDS-PAGE 电泳.

1.2.6 乳糖诱导时间优化

在上述试验的基础上, 37°C 持续诱导 14 h 每隔 2 h 取 1 mL 菌液作全菌 SDS-PAGE 电泳.

1.2.7 5 L 发酵罐高密度培养

参考摇瓶培养的优化条件, 采用 BDTECH-5BG 自动玻璃发酵罐进行高密度培养实验. 发酵罐初始工作体积为 2.5 L, 初始搅拌速度 200 r/min 通气量 3 L/min 罐压保持在 0.08 MPa 培养温度 37°C, 3% 接种量接入种子液. 每小时取样 1 次, 测定 A_{600} 和残余甘油浓度等参数, 计算细胞干重以及比生长率 $U(h^{-1})$. 培养分为 3 个阶段. 第一阶段为分批培养阶段, 溶氧逐步下降, 逐步提高转速, 控制溶氧在 20%~40%. 当溶氧持续上升时, 表明培养基中甘油含量不足, 随即进入分批补料阶段. 采用溶氧反馈流加策略进行补料, 即通过实验摸索, 溶氧反馈 DO 的上限值设为 50%, 当 DO 值高于设定的 DO 上限值时即开始流加补料培养基, 直到 DO 值达到下限停止流加, DO 的下限值最初设为 40%, 随后根据每小时工程菌比生长率的变化在 20%~40% 范围内进行调整, 以确保工程菌比生长率稳定在 $0.1 h^{-1}$ 左右. 诱导阶段, 加终浓度 1 g/L 的乳糖诱导 12 h 后, 放罐. 整个培养过程中, 流加分析纯氨水和 15% 盐酸维持 pH 在 7.0~7.5 之间.

1.3 检测和分析

1.3.1 细胞干重和目的蛋白表达量的测定方法

菌体密度的测定采用读取菌液 A_{600} 的值. 细胞干重的测定依照 Korz DJ^[13] 等人的方法, 根据实验数据拟合细胞干重和菌液 A_{600} 值的回归方程为: $DCW(g/L) = 0.54 \times A_{600}$. 将诱导后菌体的总蛋白经 SDS-PAGE 电泳后, 考马斯亮蓝 R-250 染色, 通过江苏捷达科技发展有限公司捷达 801 系列凝胶电泳图像分析系统 Bandscan 测定重组产物占菌体总蛋白百分含量.

1.3.2 甘油浓度的测定

培养液残留甘油浓度用普利莱基因工程有限公司的甘油含量 GPO-POD 酶法测定试剂盒测定.

1.3.3 粗酶的制备

将 50 mL 培养物 10 000 r/min, 4°C 离心 10 min, 弃上清. 用 5 mL 的 1×谷氨酰胺合成酶裂解缓冲液重悬菌体, 冰浴超声破碎. 超声破碎的设置和工作 5 s 间歇 25 s 功率 100 W, 全程时间 45 min 超声破碎产物 12 000 r/min, 4°C 离心 20 min, 转移上清至另一离心管中, 即为粗酶.

1.3.4 GS 粗酶活性的测定

GS 通常具有两种活性, 即合成酶活性和 γ -谷氨酰转移酶活性. ①合成酶活性: $Glu + ATP + NH_4^+ \rightarrow Gln + ADP + P_i$ 参照 Bender 等方法^[14], 测定无机磷; ②转移酶活性: $Gln + NH_2OH \rightarrow \gamma\text{-glutamyl hydroxamate} + NH_4^+$, 测定 $\gamma\text{-glutamyl hydroxamate}$, 用南京建成公司的谷氨酰胺合成酶试剂盒测定活性.

1.3.5 培养过程中工程菌的稳定性分析

在培养的最后阶段取菌液进行 10^6 稀释, 取 100 μ L 铺于未添加卡那霉素的 LB 平板, 37°C 培养 24 h 后, 从生长的克隆中随机挑取 100 个克隆转接到含 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 平板上, 37°C 培养 24 h, 计算阳性克隆的比例; 随机挑取 8 个克隆接种到 LB 培养基中, 转接诱导测定 GS 的表达量.

2 结果

2.1 甘油浓度对 GS 表达的影响

甘油可以作为大肠杆菌生长所需要的碳源, 而且不会因屏蔽乳糖启动子而影响目的蛋白的表达. 实验结果表明, 甘油浓度小于 15 mL/L 时, GS 量随甘油浓度的增加而增加, 而当甘油浓度大于 15 mL/L 时, GS 量增加幅度变小, 基本相当, 同时, 除了甘油浓度为 0 不同浓度的甘油对 GS 在总蛋白中所占的比例略有影响, 均在 50% 左右 (图 1), 所以高密度培养基的甘油浓度定为 15 mL/L.

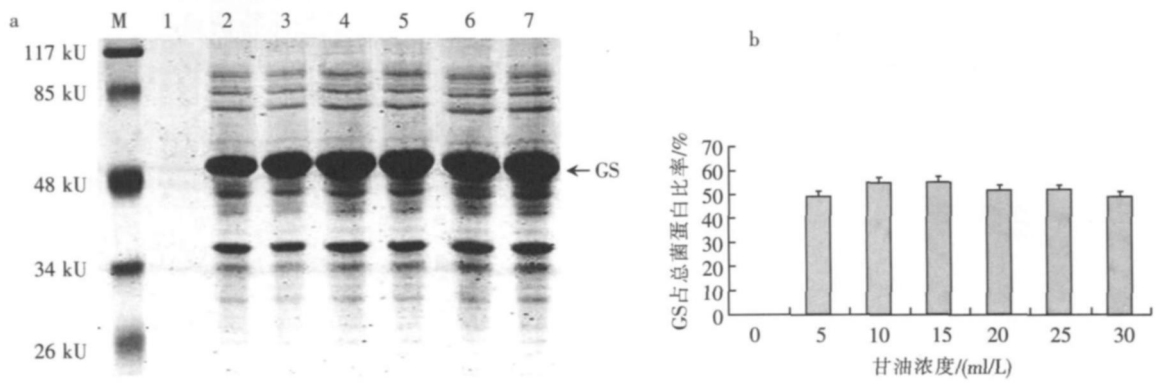


图 1 甘油浓度对 GS 表达的影响

Fig 1 Effect of various initial glycerin concentration on the expression of GS

M. 预染蛋白分子质量标准化; 1~ 7 为甘油含量, 依次为: 0, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ml/L; 箭头所示为目的蛋白;
所有试验数据均经过 3 次以上重复得到平均值, 下同

2.2 蛋白胨浓度对 GS 表达的影响

氮源蛋白胨对 GS 表达的影响实验结果显示, 添加蛋白胨显著提高 GS 的表达量, 而且随着蛋白胨浓度的增加, 细菌密度 (数据未给出) 和蛋白量表达量都有所增高 (图 2a), 提示高密度培养时提供适量的氮源对细菌生长和目的蛋白表达的重要性. 因为考虑到蛋白胨浓度大于 40 g/L 时培养基灭菌后会产生沉淀, 以及蛋白胨浓度在 5~ 20 g/L 之间时 GS 表达量基本相当, 所以培养基的氮源浓度选用 5 g/L 蛋白胨. 由图 2b 可知, 蛋白胨浓度对 GS 在总蛋白中所占的比例影响依然不大, 结合碳源浓度实验结果推断, 培养基的营养成分可能不是影响 GS 占总蛋白比率的主要因素, 而只是影响工程菌整体的生长.

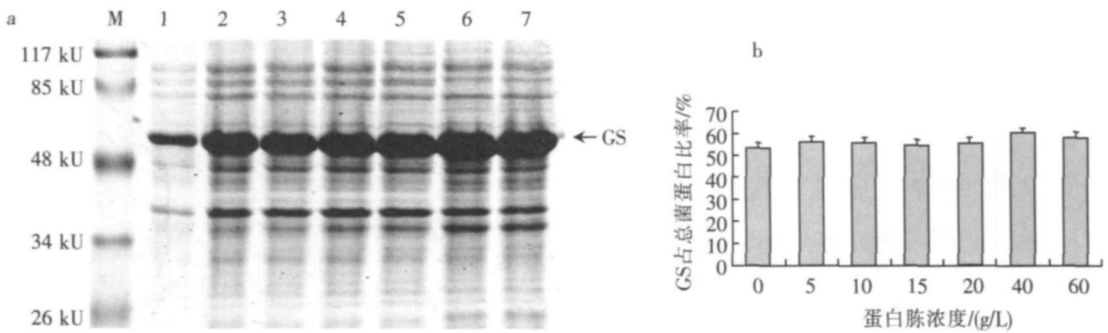


图 2 蛋白胨浓度对 GS 表达的影响

Fig 2 Effect of various initial peptone concentration on the expression of GS

M. 预染蛋白分子质量标准化; 1~ 7 为蛋白胨含量, 依次为: 0, 5, 10, 15, 20, 40, 60 g/L 蛋白胨; 箭头所示为目的蛋白

2.3 培养基 pH 值对 GS 表达的影响

培养基的 pH 对工程菌生长和表达目的蛋白的影响实验结果显示, 中性以及偏碱性环境 (pH 7.0~ 7.5) 不但适宜重组工程菌 BL21 的生长, 也是工程菌高效表达目的蛋白的最佳酸碱度 (表 1, 表 2 图 3). 同时由图 3 可知, 培养基的 pH 对 GS 在总蛋白中所占的比例虽有影响, 但是不显著, 所以 pH 对目的蛋白表达的影响可能还是在影响工程菌整体的生长上.

2.4 最佳乳糖浓度的确定

乳糖可以对 lac 操纵子控制的基因产生诱导作用, 相比 IPTG, 乳糖无毒、价格低廉^[15]. 然而, 由于乳糖本身是一种碳源, 可以被菌体代谢所利用, 引起菌体及生长特性的变化, 同时因乳糖只有借助于乳糖透性酶的作用进入到菌体细胞内, 并经过 β -半乳糖苷酶的作用转化为异乳糖才会起到诱导作用, 所以, 需要对乳糖诱导下菌体的生长及诱导条件进行更为精细的研究及优化. 由图 4a 可以看出, 在一定范围内, 乳糖终浓度愈高, GS 的表达量也愈高, 当乳糖终浓度大于 1 g/L 时, GS 的表达量趋于稳定. 同时, 由图 4b 可见, 诱导剂乳糖浓度对 GS 表达量在总蛋白中所占的比例影响颇大, 乳糖浓度小于 1 g/L 时, GS 占比率随乳糖浓

度的增加而显著增加,而当乳糖大于 1 g/L 时,增加变缓. 所以选用 1 g/L 乳糖进行诱导.

表 1 pH 值对工程菌生长的影响

Table 1 Effect of media pH on the growth of the recombinant bacteria

<i>A</i> ₆₀₀	pH				
	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0
0 h	0.09	0.09	0.09	0.09	0.09
2 h	0.65	0.72	0.83	0.81	0.75
4 h	1.33	1.66	1.95	1.88	1.74
6 h	2.86	3.06	3.36	3.27	3.22
8 h	3.24	3.46	3.77	3.65	3.59
10 h	3.55	3.94	4.31	4.12	4.08

表 2 pH 值对 GS 表达的影响

Table 2 Effect of media pH on the expression of GS

pH	<i>A</i> ₆₀₀	The expression of GS %
6.0	2.24	51.8
6.5	2.36	53.9
7.0	2.65	56.2
7.5	2.58	54.7
8.0	2.43	53.2

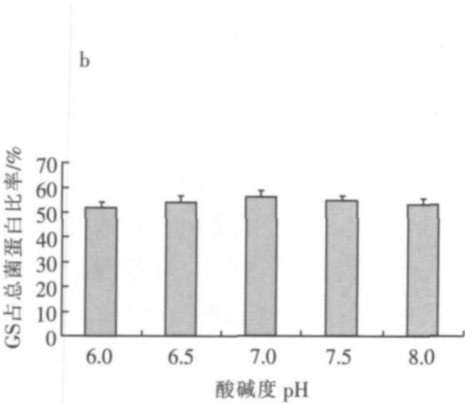
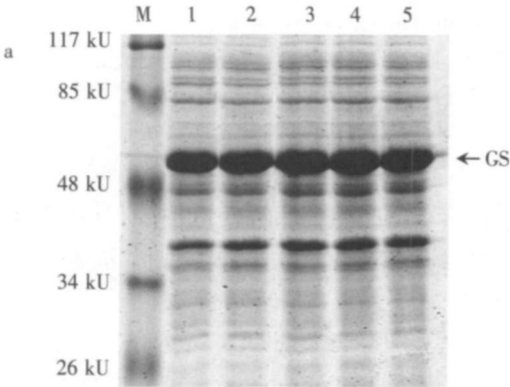


图 3 培养基的 pH 对 GS 表达的影响

Fig. 3 Effect of various media pH on the expression of GS

M. 预染蛋白分子质量标准化;1~5 为 pH 值,依次为:6.0、6.5、7.0、7.5、8.0;箭头所示为目的蛋白

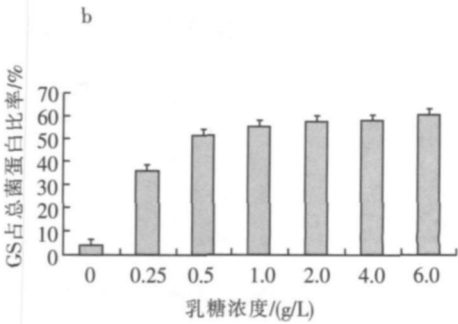
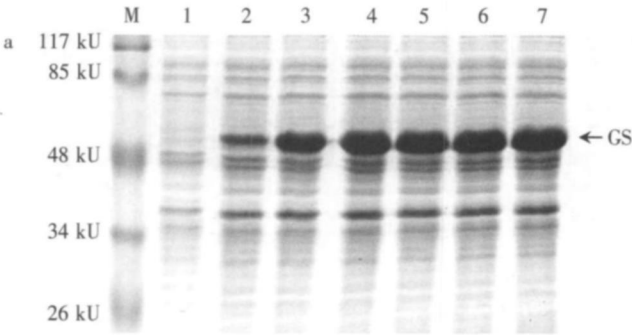


图 4 最佳诱导物浓度的确定

Fig. 4 Definition of the optimal inducer concentration

M. 预染蛋白分子质量标准化;1~7 为乳糖浓度,分别为:0、0.25、0.5、1、2、4、6 g/L 乳糖;箭头所示为目的蛋白

2.5 乳糖最佳诱导时间的确定

了解合理的诱导表达时间对于掌握特定外源基因的诱导表达规律也很关键. 比较不同的诱导时间后 GS 表达情况发现, GS 蛋白在诱导 4 h 后即有相当的表达, 诱导 8 h 之后表达量以及在总蛋白中所占比例均趋于稳定(图 5), 所以诱导表达的时间 8 h 最佳.

2.6 高密度培养

培养基中营养物质消耗殆尽时, 细菌的有氧代谢活动下降, 导致环境中溶氧的持续上升, 加入营养物质后溶氧又会迅速下降. 利用以上原理, 通过溶氧反馈控制限制性营养物质的补加速率, 使限制性营养物质保持在一定的浓度, 同时也避免了溶氧的抑制. 但是溶氧反馈流加策略也有它的局限性, 主要是不能直接控制工程菌以适当的比生长率生长, 过高的比生长率会造成细菌有害代谢产物的积累从而严重影响细菌状态, 而过低的比生长率又会延长培养时间. 针对以上问题, 本研究在溶氧反馈的基础上, 引入比生长率

作为调节溶氧反馈临界值的指标,即经过实验摸索,溶氧反馈 DO 的上限值设为 50%,高于设定的 DO 值即开始流加补料培养基,直到 DO 值达到下限停止流加,DO 的下限值最初设为 40%,随后根据每小时工程菌比生长率的变化在 20% ~ 40% 范围内进行调整,确保工程菌比生长率稳定在适宜的 0.1 h^{-1} 左右.

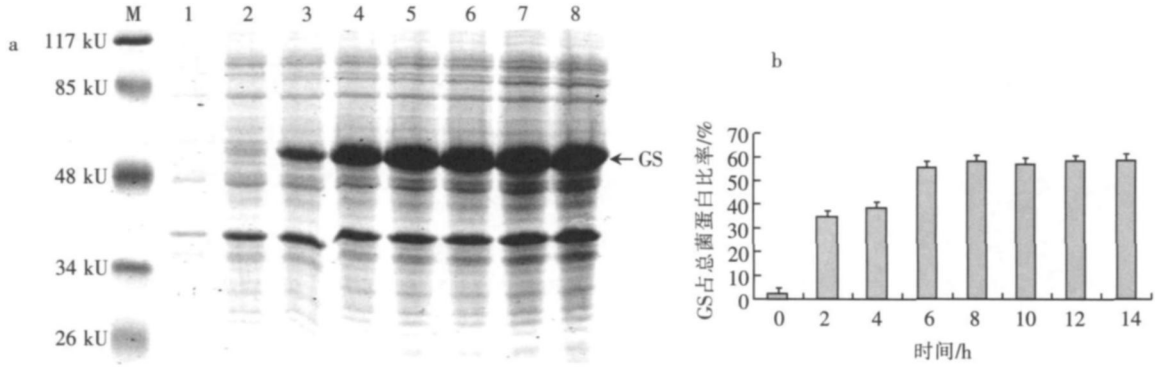


图 5 乳糖最佳诱导时间的确定

Fig 5 The detemination on optimum inducing time for lactose

M. 预染蛋白分子质量标准化; 1~ 8为诱导时间, 分别为: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 h 箭头所示为目的蛋白

工程菌 BL21 /pET28b-g hA 的高密度培养按照前面的试验方法控制整个培养流程, 得到如下实验结果, 细胞干重达到 48.1 g/L, 是摇瓶培养的 24倍, GS蛋白在诱导 4 h后即有相当的表达, 诱导 8 h之后表达量趋于稳定, 占细菌总蛋白的 59% (图 6和图 7); 诱导后细菌的生长状态明显受到影响 (图 6), 使本处于分裂旺盛期的细胞不再快速生长, 而呈现为对数生长末期状态, 可能是因为能量转向目的蛋白的表达. 在补料过程中, 甘油的浓度控制在 1.0 g/L左右 (图 6), 比生长率稳定在 0.1 h^{-1} 左右.

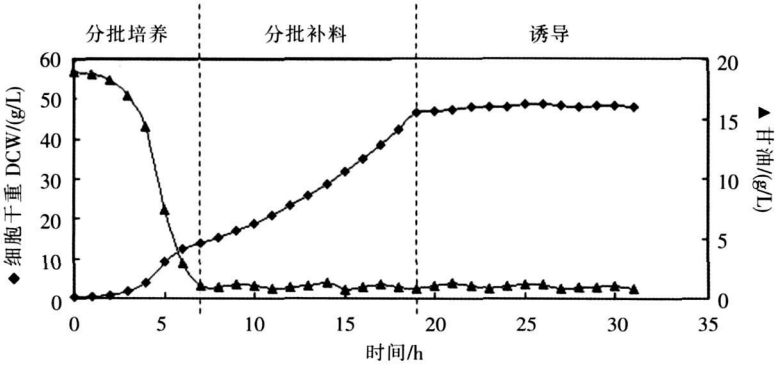


图 6 高密度培养过程中工程菌的生长和甘油浓度的时间曲线

Fig 6 The time curve of the growth of the recombinant bacteria and the concentration of glycerol during the high cell density culture

▲ 甘油浓度; ◆ 细胞干重

2.7 目的蛋白活性的检测

因为本研究面向工业生产, 考虑到实际成本问题而采用粗酶. 将高密度培养诱导 8 h的菌液制成粗酶, 利用谷氨酰胺合成酶试剂盒测定粗酶活性. 由于 GS合成酶活性和转移酶活性的一致性以及转移酶活性的易操作性, 采用测定重组 GS的转移酶活性来进行酶活性测定. 结果表明含重组蛋白的粗提物酶比活为 $10.35\text{ U} / \text{mg}$ 而空宿主菌的粗提物 GS酶比活为 $0.15\text{ U} / \text{mg}$ ^[9], 经高密度培养表达后酶活性提高了69倍.

2.8 工程菌稳定性检测

培养过程中工程菌的稳定性是高密度培养能否成功的关键因素. 在高密度培养结束后, 取培养液稀释 10^9 倍后铺 LB平板, 37℃培养 24 h 大约长出 500个克隆, 从该平板上随机挑 100个克隆分别转接到含卡那霉素的 LB平板上培养, 所有克隆全部长出; 随机挑出 8个进行诱导表达, SDS-PAGE电泳结果显示这 8个克隆都高表达重组蛋白 (图 8). 由此可见研究所用的工程菌 BL21 /pET28b-g hA 不受高密度培养的培养基和补料策略的负面影响.

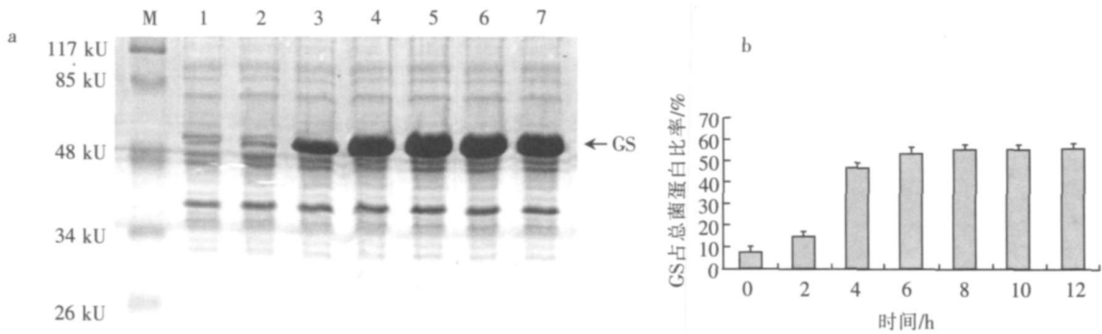


图 7 高密度培养过程中的 GS 诱导表达

Fig 7 The expression of GS after the recombinant bacteria been induced during the high cell density culture

M. 预染蛋白分子质量标准化; 1~ 7 为诱导时间, 分别为 0 2 4 6 8 10 12 h 箭头所示为目的蛋白

3 讨论

工程菌高密度培养使得工程菌以低成本实现规模生产成为可能. 这是基因工程技术走向产业化的关键环节. 重组大肠杆菌的高密度培养工艺不同于传统的培养工艺, 为了获得尽可能高的细菌密度和外源目的蛋白表达量, 除了要为重组大肠杆菌生长和产物表达提供最佳环境条件, 包括成分配比合理的培养基、最佳的生长温度、pH 和溶解氧浓度, 还要根据重组菌的生长及产物的表达特性采取合理的营养物流加策略, 以解决限制性营养物对细菌生长的抑制, 也弥补了低浓度底物不利于细胞生长的缺陷. 同时, 还要确保这些条件有利于工程菌的稳定性即每个细菌都有较高的正确的表达载体的拷贝数.

谷氨酰胺合成酶的获得是谷氨酰胺酶法合成的一个关节环节. 虽然已有研究利用基因工程的方法, 通过基因重组, 在大肠杆菌中获得重组 GS 但是这些研究还主要停留在实验室摇瓶的水平上, 成为酶法合成谷氨酰胺实现产业化的瓶颈. 而本研究将基因重组技术和重组大肠杆菌高密度培养技术有机结合, 实现谷氨酰胺合成酶的大量生产. 对于重组的工程菌 BL21/pET28b-glnA, 我们首先通过对摇瓶培养条件的摸索, 确定了有利于高密度培养的培养基, 和获得目的蛋白的诱导条件. 控制培养过程中 pH、温度、溶解氧和碳源物质的浓度, 并创造性地采用兼顾比生长率的溶氧反馈补料策略, 确保工程菌以合适的比生长率生长, 降低了有害废物 (主要是乙酸) 的积累, 始终保持细菌较高的活性状态, 保证了工程菌的稳定性. 最终细胞干重达到 48.1 g/L, GS 蛋白占细菌总蛋白的 55%, 粗提物酶比活为 10.35 μ/mg 培养结果的稳定性和重复性均达到要求, 为 GS 的进一步规模化生产和应用奠定了基础.

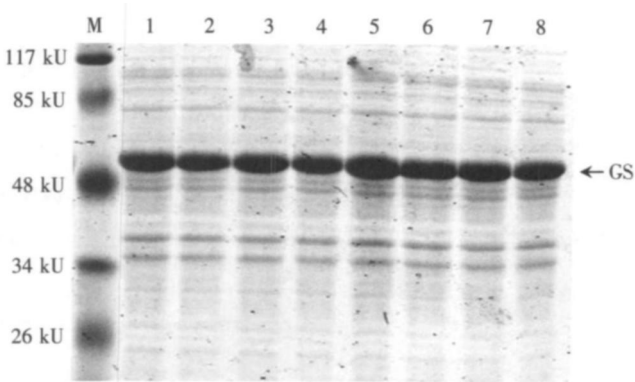


图 8 高密度培养过程中工程菌质粒稳定性检验

Fig 8 The stability of E. coli BL21/pET28b-glnA during the high cell density culture

M. 预染蛋白分子质量标准化; 1~ 8 为 8 个随机挑选的单克隆; 箭头所示为目的蛋白

[参考文献]

[1] 殷志敏, 陈群英, 司马健, 等. 耐热嗜酸古细菌 *Sulfolobus acidocaldarius* 谷氨酰胺合成酶的表达调控和性质研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30 (5): 767-771

[2] 韩娜, 葛荣朝, 赵宝存, 等. 植物谷氨酰胺合成酶研究进展 [J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2004, 28 (4): 407-410

[3] Labow B I, Souba W W, Abcouwer S F, et al Mechanisms governing the expression of the enzyme of glutamine metabolism- glutamine synthetase [J]. J Nutr, 2001, 131: 2467-2474

- [4] Reeds P J, Burrin D G. Glutamine and the bowel[J]. J Nutr, 2001, 131: 2505-2508.
- [5] Rennie M J, Ahmed A, Ehogali S E, et al. Glutamine metabolism and transport in skeletal muscle and heart and their clinical relevance[J]. J Nutr, 1996, 126: 142-149.
- [6] Karin A M, Pan M, Lin C M, et al. Glutamine metabolism in sepsis and infection[J]. J Nutr, 2001, 131: 2535-2538.
- [7] Newsholme P. Why is L-glutamine metabolism important to cells of the immune system in health, post injury, surgery or infection[J]. J Nutr, 2001, 131: 2515-2522.
- [8] Neu J. Glutamine in the fetus and critically ill low birth weight neonate: metabolism and mechanism of action[J]. J Nutr, 2001, 131: 2585-2589.
- [9] 陈群英, 陈国安, 薛彬, 等. 基因工程酶法结合酵母能量耦联高效合成 L-谷氨酰胺的研究[J]. 生物工程学报, 2004, 20(3): 456-460.
- [10] Corchero J L, Vilaverde A. Plasmid maintenance in *Escherichia coli* recombinant culture is dramatically, steadily and specifically influenced by features of the encoded proteins[J]. Biotechnol Bioeng, 1998, 58(60): 625-632.
- [11] Jacques N, Guilerez J, Dreyfus M, et al. Culture conditions differentially affect the translation of individual *Escherichia coli* mRNAs[J]. J Mol Biol, 1992, 226: 597-608.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T, et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001: 1595.
- [13] Korz D J, Rinas U, Hellmuth K, et al. Simple fed-batch technique for high cell density cultivation of *Escherichia coli*[J]. Journal of Biotechnology, 1995, 39: 59-65.
- [14] Bender R, Janseen K, Resnick, et al. Biochemical parameters of glutamine synthetase from *Klebsiella aerogenes*[J]. J Bacteriol, 1977, 129: 1001-1009.
- [15] 吴一凡, 张双全, 高秀玉, 等. 乳糖诱导 pET载体表达重组蛋白的研究[J]. 南京师大学报: 自然科学版, 2002, 25(1): 89-93.

[责任编辑: 孙德泉]