

## 脯氨酰内肽酶培养条件的优化及高密度发酵

李 民 修朝阳 陈常庆

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

**摘 要** 基因工程菌 *E. coli* BL21/pGEM-PEP 可以组成型表达重组的点状产气单胞菌脯氨酰内肽酶(PEP),但培养条件极大地影响着酶的产量,为了获得高效表达,首先测定了工程菌表达 PEP 的稳定性并考察了培养温度、pH、发酵时间、碳源、氮源、无机盐等对产酶的影响,得到了优化的发酵条件, $L_9(3^4)$  正交试验进一步明确了摇床转速、培养温度、pH 值、培养时间对产酶量的影响都有高度的统计学意义。在此基础上利用 NBS BioFlo 3000 型 5L 自控发酵罐进行了高密度、高表达发酵,经 20h 培养,最终菌体密度达  $OD_{600}60$ (相当于干菌体 22.5g/L),PEP 表达量为 28%,每升发酵液中含 PEP 酶 3.15g。

**关键词** 脯氨酰内肽酶,高密度发酵,正交实验,条件优化

**中图分类号** Q815 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)01-0183-05

脯氨酰内肽酶(Prolyl Endopeptidase, PEP)[EC 3.4.21.26]是一种能特异性水解小分子量多肽中脯氨酸羧基端肽键的丝氨酸蛋白酶<sup>[1]</sup>。在高等生物体内它能有效地降解多种神经递质和激素多肽,与认知、记忆相关疾病的发生密切相关<sup>[2~5]</sup>。

PEP 在生物体内的含量很低,分离纯化比较困难,我们首次从点状产气单胞菌中成功地克隆和表达了 PEP(另文发表),因此利用高密度发酵技术可以大量制备 PEP 用于理化性质研究、酶动力学、晶体衍射以及应用研究。

众所周知,由于蛋白酶自身降解或破坏宿主细胞的组成蛋白,在大肠杆菌中的表达比较困难,研究较多的是另一类丝氨酸蛋白酶-枯草杆菌蛋白酶(*Bacillus subtilis*)<sup>[6~8]</sup>,与其不同的是脯氨酰内肽酶属于位点专一性蛋白酶,并且只能降解 30 个氨基酸以下的多肽,一个类似“帽子”的  $\beta$ -折叠结构阻碍了大分子蛋白进入疏水的活性中心,这种保护机制是 PEP 在大肠杆菌获得稳定表达的关键基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

**1.1.1 菌株:** 组成型表达 PEP 的工程菌 *E. coli* BL21/pGEM-PEP 为本实验室构建。

**1.1.2 培养基:** LB 培养基参见文献[9];无机盐溶液比例为:  $KH_2PO_4$  2,  $K_2HPO_4$  4,  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$

7,  $(NH_4)_2SO_4$  1.2,  $NH_4Cl$  0.2; 补料基质(g/L): 酵母粉 100, 蛋白胨 50,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  5。

#### 1.2 条件优化

培养条件的优化设计是按单因子顺次进行,每项优化的结果都用于以后的实验,共进行 10 个项目的优化。

**1.2.1 BL21/pGEM-PEP 表达稳定性测定:** 将质粒转化获得第一代菌株在 LB 试管中按 3% 接种, 30℃, 每 12h 传代 1 次, 每 4 次测定表达量。

**1.2.2 培养时间优化:** 按 1% 接种量接入含 100mL LB 的三角瓶中, 30℃, 250r/min, 培养 4h 后每隔 2h 测定菌体密度和酶的表达量。

**1.2.3 培养温度优化:** 按上述条件 22~38℃ 培养 16h。

**1.2.4 pH 值优化:** 以 35mol/L 的  $Na_2HPO_4-NaH_2PO_4$  为缓冲液, 将培养基分别调至 pH6.0~8.5。

**1.2.5 摇床转速优化:** 在 100~300r/min 不同转速下培养 16h。

**1.2.6 碳源种类及浓度优化:** 以 0.5~20g/L 的葡萄糖和甘油为碳源, 32℃, 260r/min, 培养 16h。

**1.2.7 氮源浓度优化:** 固定蛋白胨和酵母粉重量比为 2:1, 蛋白胨浓度分别为 2~25g/L。

**1.2.8 无机盐浓度优化:** 无机盐见 1.1.2, 将培养基中磷酸盐的浓度分别调至 5.6~420mmol/L。

**1.2.9 条件优化的正交试验:** 按照 4 因素, 培养时间(h),  $A_1 = 12, A_2 = 16, A_3 = 20$ ; 培养温度( $^{\circ}\text{C}$ ),  $B_1 = 26, B_2 = 32, B_3 = 38$ ; 培养基 pH 值  $C_1 = 6.0, C_2 = 7.0, C_3 = 8.0$ ; 摇床转速(r/min)  $D_1 = 100, D_2 = 200, D_3 = 300$ , 3 水平安排正交表  $L_9(3^4)$ , 以 PEP 的表达量乘以菌体密度为指标, 每组实验重复 3 次。

**1.2.10 LB21/pGEM-PEP 工程菌的高密度发酵:** 工程菌的发酵在 NBS BioFio 3000 型 5L 自控罐中进行。发酵条件按照优化的结果并参照文献[10], 5% 接种,  $32^{\circ}\text{C}$  培养 20h, 培养过程中流加补料, 控制 pH 在 7.0 左右, 通气量 1vvm, 调节搅拌转速和通入纯氧使溶解氧维持在 50% 左右。

### 1.3 测定方法

PEP 酶活性测定参照文献[4]; 重组蛋白的表达量测定参照文献[10]。

## 2 结果与讨论

### 2.1 培养条件对 BL21/pGEM-PEP 生长和产酶量的影响

**2.1.1 表达稳定性:** 结果见图 1。随着传代次数的增加 PEP 表达水平逐渐降低, 超过 20 次以后保持在 10% 左右。表达量的差异可能与重组质粒在大肠杆菌中的稳定性有关, 因此, 生产时最好采用第一代高表达菌种。

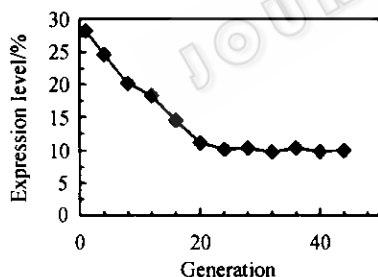


图 1 BL21/pGEM-PEP 的表达稳定性

Fig.1 Stability of expression of PEP in BL21/pGEM-PEP

**2.1.2 产酶时间的优化:** 不同培养时间的结果见图 2。14~20h 酶的表达量达到最高, 之后开始下降, PEP 的积累主要集中在指数生长后期, 说明此时细菌的能量不再用于大量繁殖, 而是消耗在外源蛋白的表达上, 因此细菌的收获应在稳定期之前。

**2.1.3 培养温度的优化:** 和诱导型工程菌不同的是, 温度对外源蛋白表达影响很大, 在  $22 \sim 38^{\circ}\text{C}$  范围内菌体生长量随温度的升高而增大, 这符合大肠杆菌的生长特征, 但酶表达量在  $30 \sim 34^{\circ}\text{C}$  左右最高, 见图 3。也就是说最适产酶温度和最适生长温

度并不一致, 而和酶的最佳反应温度十分接近, 这些特性和天然产酶微生物较相似。

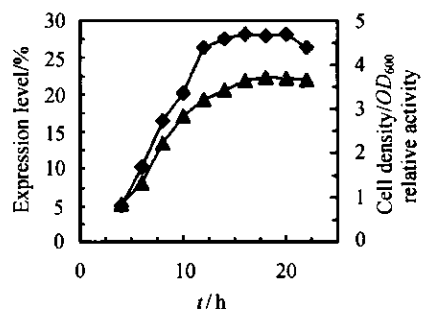


图 2 培养时间对 PEP 产量的影响

Fig.2 Effects of culture time on PEP yields

◆ Expression level/%, ▲ Cell density/OD<sub>600</sub>

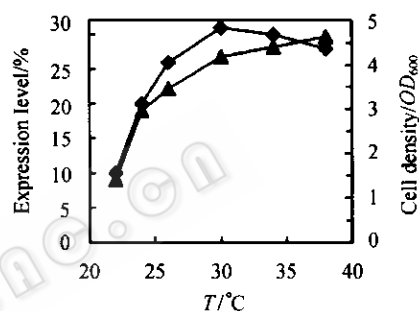


图 3 培养温度对细菌生长和 PEP 表达的影响

Fig.3 Effects of temperature on bacteria growth and PEP expression

◆ Expression level/%, ▲ Cell density/OD<sub>600</sub>

**2.1.4 pH 优化:** 结果见图 4, pH 7.0 左右细菌生长、酶的表达量以及酶的比活性较好。

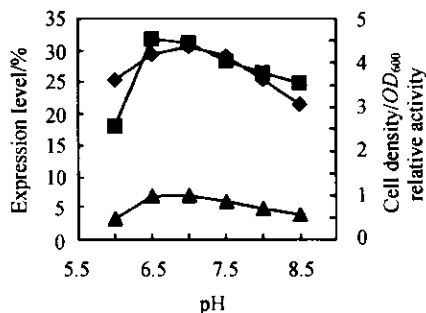


图 4 pH 值对细菌生长和 PEP 表达的影响

Fig.4 Effects of pH on bacteria growth and PEP expression

▲ Relative activity/A<sub>550</sub>; ■ Expression level/%;  
◆ Cell density/OD<sub>600</sub>

**2.1.5 摇床转速的优化:** 结果见图 5。说明随着溶解氧的增大菌体密度和酶的表达量相应提高。曲线还能表明, 外源蛋白的表达比细菌生长对溶解氧的依赖性大, 只有在细胞生长状态较好的前提下才将代谢的能量消耗在外源蛋白的表达上。

### 2.2 发酵培养基对重组菌 BL21/pGEM-PEP 生长和产酶量的影响

2.2.1 碳源的优化: 见图 6, 葡萄糖和甘油对产酶产生了负面影响, 浓度在 10g/L 时表达已经很低, 小于 1g/L 时对酶的产生影响不大, 这是否存在着底物代谢调控还有待于进一步研究。总之在高密度发酵时要限制碳源的补加, 浓度控制在 1g/L 左右。

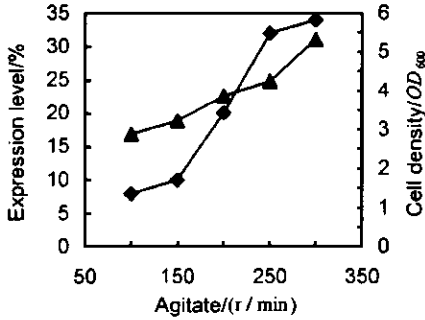


图 5 摇床转速对细菌生长和 PEP 表达的影响

Fig. 5 Effects of shaker speed on bacteria growth and PEP expression  
◆ Expression level/%; ▲ Cell density/OD<sub>600</sub>

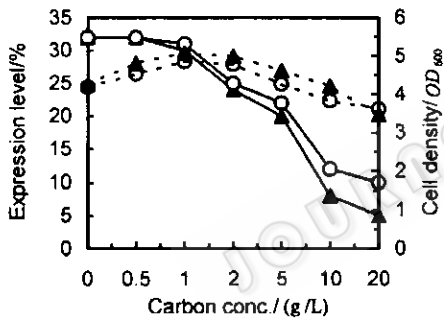


图 6 碳源对细菌生长和 PEP 表达的影响

Fig. 6 Effects of carbon on bacteria growth and PEP expression

▲ Growth with glucose; ○ With glycerol; ... Growth; — Expression

2.2.2 蛋白胨和酵母粉浓度的优化: 见图 7, 10~20g/L 左右的氮源不会造成底物抑制和营养限制。过于丰富的营养不仅减少细菌生物量同时对酶的表达有明显的抑制作用。

2.2.3 无机盐的影响: 磷酸盐不仅是微生物生长和维持溶液渗透压的必需物质而且对质粒的稳定性及表达有利。图 8 结果显示磷酸盐浓度在 28~112mmol/L 时细菌生长最旺盛, 但较高的磷酸盐(如 280mmol/L)对酶的表达有利。

### 2.3 条件优化的正交经验

L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>) 正交实验及方差分析结果见表 1。显然 4 个主效应 F 值都大于 F<sub>0.05(2,18)</sub> = 3.55, 因而都有

高度统计意义。结果也进一步证实了在实验范围内

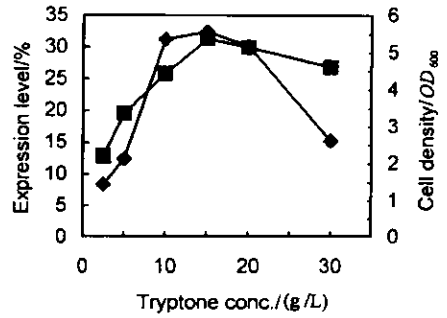


图 7 氮源对细菌生长和 PEP 表达的影响

Fig. 7 Effects of tryptone on bacteria growth and PEP expression

◆ Expression level/%; ■ Cell density/OD<sub>600</sub>

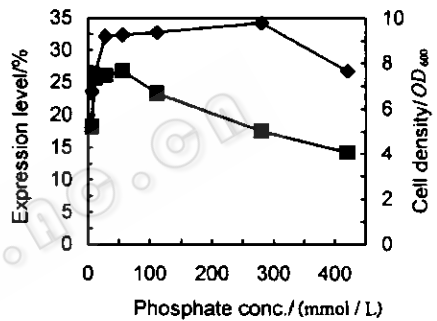


图 8 磷酸盐对细菌生长和 PEP 表达的影响

Fig. 8 Effects of phosphate concentration on bacteria growth and PEP expression

◆ Expression level/%; ■ Cell density/OD<sub>600</sub>

培养条件对产酶的显著性影响, 次序为摇床转速、pH 值、温度和培养时间, 最优的发酵条件为 A<sub>2</sub>B<sub>2</sub>C<sub>2</sub>D<sub>2</sub>。结合单因子实验结果和实际情况确定培养条件为: 转速 250r/min, 培养温度为 32℃, pH 为 7.0, 培养时间为 16h。

### 2.4 组成型表达菌 E. coli BL21/pGEM-PEP 的高密度发酵

2.4.1 高密度发酵溶解氧的确定: 摇瓶实验显示溶解氧极大地影响着酶的产生, 因此在发酵罐中必须确定溶解氧的数值。由于采取补料分批培养, 故发酵时间延长至 20h。结果表明当溶解氧超过 50% 时, 菌体量和酶的表达量基本不再升高, 考虑到纯氧的消耗, 将溶解氧控制在 50% 比较合适。

2.4.2 重组菌 BL21/pGEM-PEP 分批补料高密度发酵: 在发酵过程中细菌的生长具有较明显的延迟期、复苏期、指数生长期和稳定期但衰亡期还没有到达(图 9)。在 14~18h 是 PEP 的积累期。在 8h 时, 开始补加纯氧, 使溶解氧维持在 50%。

表1 正交实验结果及方差分析  
Table 1 Results of orthogonal experiment and analysis of variance

Subtotal	A	B	C	D	Expressionlevel multiply cell density			
	No.	1	2	3	4	/% × OD <sub>600</sub>		
1	1	1	1	1	0.1548	0.1276	0.2428	0.5252
2	1	2	2	2	1.1685	1.2553	1.0573	3.4811
3	1	3	3	3	1.3755	1.4621	1.3948	4.2324
4	2	1	2	3	1.8395	1.7206	1.7600	5.3201
5	2	2	3	1	0.3200	0.3546	0.3684	1.0430
6	2	3	1	2	1.0525	1.1070	1.0937	3.2532
7	3	1	3	2	0.4924	0.4924	0.5053	1.4878
8	3	2	1	3	1.9388	1.9046	1.8816	5.7610
9	3	3	2	1	0.7502	0.8300	0.6190	2.1992
I	8.2387	7.3331	9.5394	3.7674				27.3026
II	9.6163	12.258	11.000	8.2221	<i>c</i> = 27.6086			
III	9.4480	9.6848	6.7632	15.314	<i>I</i> <sub>Total</sub> = 9.3003			
(I <sup>2</sup> + II <sup>2</sup> + III <sup>2</sup> )/9	27.735	28.150	28.658	35.106				
I	0.1263	0.5415	1.0293	7.5375	<i>I</i> <sub>Error</sub> = 0.0657			
V	2	2	2	2	<i>V</i> <sub>Error</sub> = 18			
MS	0.0632	0.2708	0.5146	3.7687	<i>MS</i> <sub>Error</sub> = 0.00365			
F <sub>j</sub>	17.301	74.179	140.99	1032.5				
Significant	highly	highly	highly	highly				

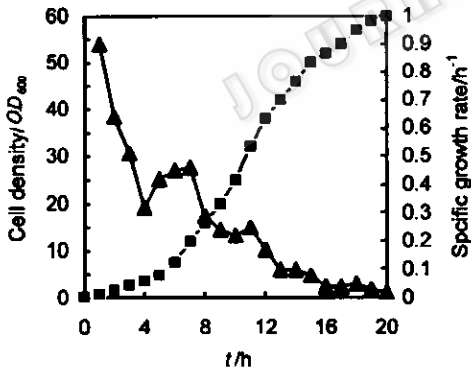


图9 BL21/pGEM-PEP 生长曲线  
Fig.9 BL21/pGEM-PEP growth curve  
■ Cell density/OD<sub>600</sub>; ▲ Specific growth rate/h<sup>-1</sup>

经 20h 的培养、菌体密度达 OD<sub>600</sub> 60, 获得干菌体 103.5g, 相当于干菌体 22.5g/L, 酶表达量为 28% (稍低于摇瓶中的表达量), 每升发酵液中含 PEP 酶

3.15g, 完全满足实验室规模的分离纯化。图 10 为 BL21/pGEM-PEP 表达后的 SDS-PAGE 结果。

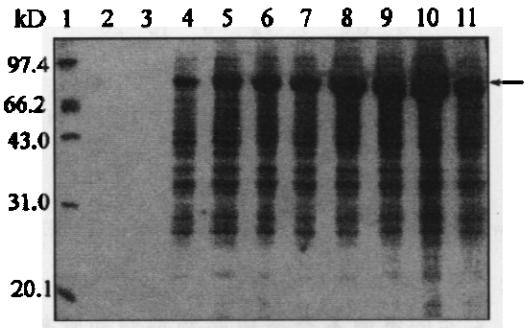


图 10 *E. coli* BL21/pGEM-PEP 发酵过程 SDS-PAGE 图  
Fig.10 SDS-PAGE of *E. coli* BL21/pGEM-PEP during the fermentation  
1. Marker; 2~11. Fermentation after 2~20h;  
→ Indicates the expressed PEP

参 考 文 献

[ 1 ] Walter R, Simmons W H, Yoshimoto T. *Mol Biochem*, 1980, 30(2):111~127  
[ 2 ] Andrews P C, Hines C M, Dixon J E. *Biochemistry*, 1980, 19:5494~5500  
[ 3 ] Kalwant S, Porter A G. *Biochem J*, 1991, 276:237~244

- [ 4 ] Yoshimoto T, Abdus Satter A K M, Hirose W *et al.* *Biochem*, 1988, **104**:622~627
- [ 5 ] Harwood V J, Denson J D, Robinson-Bidel K A *et al.* *J Bacteriol*, 1997, **179**(11):3613~3617
- [ 6 ] Rufo G A, Sullivan B J, Slorna A *et al.* *Bacterial*, 1990, **172**:1019~1023
- [ 7 ] Wong S L, Price C W, Doldfab D S *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, **81**:1184~1188
- [ 8 ] Ikemura H, Takagi H, Inouye M. *J Bio Chem*, 1987, **262**:7859~7864
- [ 9 ] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T *et al.* *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.
- [ 10 ] 李 民, 朴 勤, 陈常庆等. *生物工程学报*, 1998, **14**(3):270~275

## Cultivation Optimization of Prolyl Endopeptidase and High Cell Density Fermentation

LI Min XIU Zhao-Yang CHEN Chang-Qing

(Shanghai Research Center of Biotechnology, The Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

**Abstract** Engineered *E. coli* BL21/pGEM-PEP could constitutively express recombinant prolyl endopeptidase from *Aeromonas punctata*, which was extremely effected by culture conditions, so fermentation conditions were optimized to obtain it's high expression level. Firstly, the stability of BL21/pGEM-PEP was investigated, then, culture temperature, pH, time, medium were optimized in shake flaskd. The  $L_9(3^4)$  orthogonal experiment confirmed that shaker speed, pH, culture temperature, culture time had high degree statistical meaning. Based on these data, high cell density fermentation of *E. coli* BL21/pGEM-PEP on NBS BioFlo 3000 5L fermentor was achieved, after 20h cultivation, the final density(dwt) was 60  $OD_{600}$  (22.5g/L), the expressed PEP was about 28% of total cellular protein, the yield was 3.15g per litter broth.

**Key words** Prolyl endopeptidase, high cell density fermentation, orthogonal experiment, condition optimization