

· 生物育种与工艺优化 ·

重组枯草芽孢杆菌发酵生产乳铁蛋白 N 叶工艺优化

金亮, 李利宏, 张荣珍, 徐岩

江南大学 生物工程学院 酿酒与应用酶学实验室, 江苏 无锡 214122

金亮, 李利宏, 张荣珍, 徐岩. 重组枯草芽孢杆菌发酵生产乳铁蛋白 N 叶工艺优化. 生物工程学报, 2022, 38(7): 2628-2638.
JIN L, LI LH, ZHANG RZ, XU Y. Fermentation optimization for production of lactoferrin N-lobe by recombinant *Bacillus subtilis*. Chin J Biotech, 2022, 38(7): 2628-2638.

摘要: 为实现乳铁蛋白 N 叶的大规模制备, 本研究对表达乳铁蛋白 N 叶的工程菌枯草芽孢杆菌 pMA0911-D60Y/Y92D 进行了发酵工艺的优化。确定了最佳的培养条件: 以葡萄糖为最佳碳源, 以胰蛋白胨为最佳氮源, 在 pH 7.0、温度 28 °C、发酵 25.5 h 条件下诱导表达目的蛋白, 目的蛋白的 IOD 值高达 68.03%。在 10 L 发酵罐上对重组菌株的发酵条件进行优化, 获得如下的最佳发酵工艺, 即采用 300 r/min 转速, 0-7 h 时, 在 pH 7.5、30 °C 条件下培养菌体; 7-25 h 时, 在 pH 7.0、28 °C 条件下诱导表达目的蛋白。发酵结束后, 收集细胞并破碎后取上清液用 HisTrap HP 亲和层析及 Superdex™ 200 (10/300 GL) 亲和层析法对细胞上清液进行纯化至均一条带, 获得了纯度>94%的重组乳铁蛋白 N 叶, 1 L 菌体能制备 23.5 mg 纯蛋白。本研究为重组牛乳铁蛋白 N-叶的高效制备奠定了基础。

关键词: 牛乳铁蛋白 N 叶; 枯草芽孢杆菌; 蛋白表达与纯化; 发酵工艺优化; 响应面分析

Fermentation optimization for production of lactoferrin N-lobe by recombinant *Bacillus subtilis*

JIN Liang, LI Lihong, ZHANG Rongzhen, XU Yan

Laboratory of Brewing Microbiology and Applied Enzymology, School of Biotechnology, Jiangnan University, Wuxi 214122, Jiangsu, China

Abstract: To achieve an efficient preparation of lactoferrin N-lobe, we optimized the fermentation process for a recombinant *Bacillus subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D producing lactoferrin N-lobe. The

Received: September 13, 2021; Accepted: March 7, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31970045)

Corresponding author: ZHANG Rongzhen. E-mail: rzzhang@jiangnan.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (31970045)

IOD of the lactoferrin N-lobe reached 68.03% under the optimized cultural conditions, that is using glucose and tryptone as the best carbon and nitrogen source, respectively, and conduct the fermentation under pH 7.0, 28 °C, for 25.5 h. An optimized fermentation process was obtained through fermentation optimization on a 10 L fermenter. That is, culturing the recombinant strain at 30 °C, pH 7.5 within 0–7 h, and switching to induction at 28 °C, pH 7.5 within 7–25 h for production of lactoferrin N-lobe, using an agitation speed of 300 r/min throughout the fermentation. After the fermentation, the cells were collected and disrupted, followed by purification of the lactoferrin N-lobe to homogeneity by using HisTrap HP-affinity and a Superdex™ 200 (10/300 GL)-affinity chromatography. The purified lactoferrin N-lobe proteins with over 94% purity were obtained. One liter culture of recombinant *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D produced 23.5 mg of pure protein. This study may facilitate the fermentative production of the recombinant lactoferrin N-lobe.

Keywords: bovine lactoferrin N-lobe; *Bacillus subtilis*; protein expression and purification; fermentation process optimization; response surface analysis

乳铁蛋白 (lactoferrin, LF) 是转铁蛋白家族中的一种铁结合蛋白, 主要存在于乳汁中的乳清蛋白部分^[1-2], 乳铁蛋白主要由乳腺上皮细胞表达和分泌, 它主要存在于乳汁中, 同时也存在于一些分泌物中, 例如汗液、泪液、唾液等^[3]。根据来源的不同, 可分为人乳铁蛋白 (human lactoferrin, HLF)、牛乳铁蛋白 (bovine lactoferrin, BLF), 猪乳铁蛋白 (porcine lactoferrin, PLF)、羊乳铁蛋白 (ovine lactoferrin, OLF) 等^[4]。其中 BLF 和 HLF 在相应的乳汁中的含量较高, 母乳中的乳铁蛋白含量约为 2–3 g/L, 牛乳中的乳铁蛋白含量约为 0.8 g/L^[5]。

BLF 是牛体内一种重要的非免疫防御系统的生物活性蛋白, 可以促进人体对铁的吸收^[6], 具有广谱的抗菌、抗病毒^[7-8]、抗氧化、抗肿瘤^[9]、抗癌^[10-11]以及调节机体免疫反应的作用^[12]。同时在饲料添加剂、食品添加剂、医药和化妆品行业中也具有广泛的应用前景^[13]。

BLF 包含两个叶状结构, 即 N 叶和 C 叶, 每个叶包含两个区域, 每个域有一个 Fe³⁺结合位点, 两个铁的结合位点所配位形成的几何形状都

是扭曲了的八面体, 在 N 叶中, 蛋白质配体由 Asp60、Tyr92、Tyr192、His253 提供, 在 C 叶中由 Asp395、Tyr433、Tyr526、His595 提供。N-叶包括发挥杀菌作用和肝素结合的结构域, 而 C-叶包含执行肝细胞结合和内化功能的结构域^[14-15]。

BLF 作为一种营养添加剂, 主要以从牛乳中天然提取进行制备, 用于动物和人类营养品, 包括婴幼儿配方食品^[16]。由于目前商用 BLF 的生产受限于奶源, 设备投入大、生产成本低、提取工艺复杂, 成为制约 BLF 大量制备的瓶颈因素。因此发展安全有效的大规模生产 BLF 研究具有重要意义。

随着转基因技术的迅猛发展, 利用基因工程菌在反应器中大量生产乳铁蛋白已经成为研究热点, 也为国产化乳铁蛋白提供一个新思路^[17-18]。实验室前期已经成功将乳铁蛋白 N 叶构建在枯草芽孢杆菌 (*Bacillus subtilis*) 168 中, 实现了其高效可溶性表达^[19], 本研究在此基础上构建了提高热敏性的重组菌株 *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D, 并以表达优化后的重组工程菌 *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D 为研究对象,

采用摇瓶和 10 L 发酵罐,通过对发酵培养基及发酵条件进行优化研究,同时对发酵工艺开展了响应面优化设计,最终获得枯草芽孢杆菌发酵表达牛乳铁蛋白 N 叶的最佳培养基配方与发酵条件,可为该蛋白的工业化发酵生产提供理论指导。

1 材料与amp;方法

1.1 菌株

重组枯草芽孢杆菌 *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D 组成型诱导表达工程菌为实验室构建。

1.2 试剂

种子培养基:LB 培养基,胰蛋白胨 10.00 g/L、酵母粉 5.00 g/L、NaCl 10.00 g/L。

发酵培养基:TB 培养基,胰蛋白胨 12.00 g/L、酵母浸粉 24.00 g/L、甘油 4.00 mL/L、磷酸二氢钾 2.31 g/L、磷酸氢二钾 12.54 g/L。

1.3 发酵培养方法

种子活化方法:从-80 °C 冰箱中取出保存的 *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D,划线 LB 含有卡拉霉素抗性的平板,37 °C 倒置过夜培养。

摇瓶种子培养:挑取单克隆于 LB 试管中,37 °C 恒温培养 8 h 左右,作为发酵种子液。

重组菌株发酵研究:将发酵种子液按照 1% 接种量,接种到 200 mL TB 培养基中,37 °C 培养 2-3 h,30 °C 发酵培养 48 h。

1.4 乳铁蛋白表达量等测定

菌体浓度测定:将发酵菌液进行适当稀释后,用分光光度计测定波长 600 nm 处吸光度 (OD_{600}),用超纯水作为空白对照。

菌体预处理与 SDS-PAGE 分析目的蛋白的表达量:将发酵菌液重悬于 0.1 mol/L 磷酸钾缓冲液中,加入 1 mg/mL 溶菌酶处理 60 min,于冰浴中超声破碎细胞 (工作 2 s,间隔 3 s,工作时间 10 min),4 °C、12 000×g 离心 30 min,收

集上清液。取 15 μL 上清液与 5 μL 4×上样缓冲液混匀后,煮沸 10 min,SDS-PAGE 凝胶电泳分析,然后利用分析软件 Image Master VDS software 对电泳条带的积分光密度 (integrated optical density, IOD) 值进行分析,比较不同试验设计组之间目的蛋白表达量的差异,并作为试验设计筛选的依据。

1.5 蛋白纯化 Ni 柱的亲 and 层析

将离心收集的重组菌细胞悬浮于 MCAC-0 (20 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.5) 中超声破碎。破碎条件:功率 300 W,工作 4 s,间隔 6 s,工作时间 10 min。超声破碎后 10 000×g 离心 30 min,取上清液微孔滤膜 (0.22 μm) 过滤,然后上样至预先用 MCAC-0 缓冲液平衡好的 HisTrap HP 亲和柱,用 AKTA purifier 10 纯化系统,用不同浓度梯度咪唑洗脱杂蛋白和目的蛋白,将收集的目的蛋白超滤浓缩用于 Superdex-200 柱凝胶过滤层析,其柱平衡和洗脱缓冲液为:50 mmol/L Tris-HCl, 150 mmol/L NaCl, pH 8.2。所有蛋白纯化操作在 4 °C 进行。

1.6 重组菌株 *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D 摇瓶发酵工艺研究

(1) 不同碳、氮源对重组菌株生长和目的蛋白表达的影响

以 TB 培养基为基础培养基,以胰蛋白胨为氮源,分别以可溶性淀粉、玉米糊精、葡萄糖、麦芽糖、海藻糖、蔗糖作为碳源进行碳源优化;以 TB 培养基为基础培养基,以葡萄糖为碳源,分别以大豆蛋白胨、酪蛋白胨、玉米浆、豆粕粉和胰蛋白胨作为氮源进行氮源优化,37 °C、200 r/min 发酵 30 h 后按 1.4 所述方法进行蛋白量的评定,从而确定最佳碳、氮源。

(2) 不同初始 pH、培养温度、诱导表达时间对重组菌株生长和目的蛋白表达的影响

调节培养基的初始 pH 值为 6.0、6.5、7.0、

7.5、8.0、8.5；设置温度为28、25、20和17；设置最长发酵表达时间为30 h，每隔5 h进行取样，摇瓶发酵培养，按1.4所述方法进行绩效评价评定，从而确定蛋白表达的最适pH、温度和诱导表达时间。

(3) 重组菌株发酵工艺响应面优化设计

根据单因素试验结果，以A、B、C为考察因素，以Y(integrated optical density, IOD)为评价指标，使用Design-Expert 8.0软件进行Box-Behnken中心组合试验设计，试验因素与水平如表1所示。

1.7 重组菌株 *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D 10 L 罐的发酵工艺研究

(1) 不同转速、pH、温度对重组菌的生长和目的蛋白表达的影响

以优化后的摇瓶发酵条件进行发酵罐发酵，10 L发酵罐装液量7 L。设置转速为200、250、300、350 r/min；调节培养基的初始pH值为6.5、7.0、7.5、8.0；调节温度为26 °C、28 °C和30 °C，发酵罐发酵30 h。按1.4所述方法进行蛋白量评定，从而确定最适转速、pH、温度。

(2) 两阶段式温度和pH调控对重组菌的生长和目的蛋白表达的影响

以优化后的摇瓶发酵条件为基础条件进行发酵罐发酵，10 L发酵罐装液量7 L，在发酵前7 h将温度和pH分别设置为37 °C和pH 7.5，在发酵7-25 h即重组菌进入对数生长期且大量表达目的蛋白时将温度和pH分别设置为28 °C和pH 7.0。在培养过程7-20 h，增大通气量使

溶氧维持在30%左右，20 h开始以25 mL/h的流速流加补料培养基(100 g/L葡萄糖，200 g/L蛋白胨，5 g/L K₂HPO₄，8 g/L MgSO₄·7H₂O，5 mL微量元素)，防止溶氧急剧上升，整个发酵过程溶氧维持在30%左右。

为了确定最适发酵条件下，重组菌株表达目的蛋白的情况，对其进行蛋白纯化，取一定量发酵液，收菌，超声破碎，4 °C、12 000×g离心30 min，取上清液用0.22 μm水系滤膜过滤，按照Jin等^[19]报道的方法将目的蛋白纯化至均一，用SDS-PAGE测定酶的含量，并用Bradford方法^[19]测定蛋白质的浓度，用牛血清蛋白(bovine serum albumin, BSA)作为标准蛋白质。

2 结果与分析

2.1 重组菌株 *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D 摇瓶发酵工艺优化

2.1.1 不同碳源和氮源对重组菌株生长和目的蛋白表达的影响

在工业发酵生产过程中，碳源^[20]、氮源^[21]是发酵培养基的重要组成。本研究考察了不同种类的碳氮源对重组菌株生长和目的蛋白表达的影响。从图1A可知，重组菌株对葡萄糖的利用效率最高，其OD₆₀₀值最高，其次是麦芽糖、玉米糊精、可溶性淀粉、蔗糖和海藻糖；添加葡萄糖为碳源时蛋白表达量(IOD)最高。从图1B可知，重组菌株以胰蛋白胨作为氮源对菌体的生长最为有利，玉米浆、大豆蛋白胨和酪蛋白胨次之，而豆粕粉生长最为缓慢；且以胰蛋白胨作为氮源对牛乳铁蛋白N叶表达最为有利，因此选取葡萄糖和胰蛋白胨作为最佳碳氮源用于后续发酵。

2.1.2 pH、温度和不同诱导表达时间对重组菌株生长和目的蛋白表达的影响

菌体在发酵过程中适宜的pH、温度及发酵

表1 响应面试验因素与水平

Table 1 The response surface test factors and levels

| Levels | A-pH | B-temperature (°C) | C-time (h) |
|--------|------|--------------------|------------|
| -1 | 6.5 | 25 | 20 |
| 0 | 7.0 | 28 | 25 |
| 1 | 7.5 | 37 | 30 |

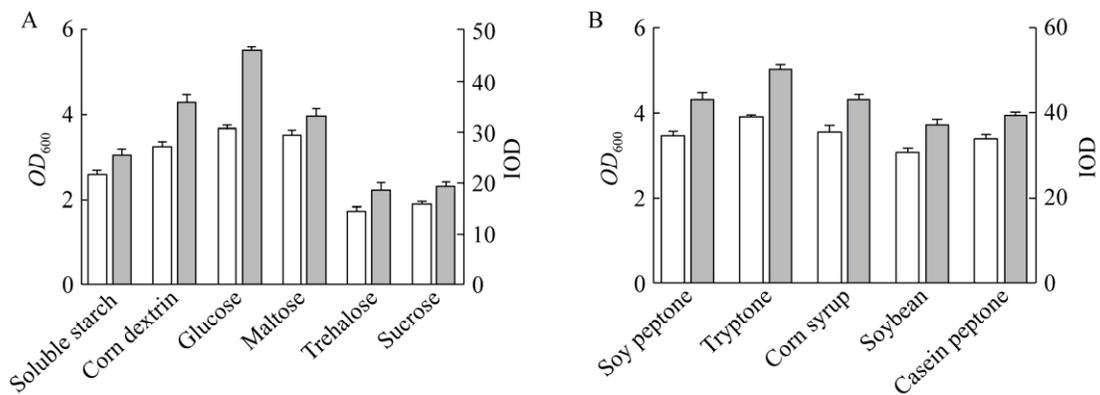


图1 不同碳源 (A) 和氮源 (B) 对重组菌株 *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D 生长和蛋白表达的影响
Figure 1 Effects of carbon (A) and nitrogen (B) sources on cell growth and protein expression of *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D.

时间可以降低发酵成本, 提高发酵效率, 获得较高的蛋白表达量^[22-24]。在最适碳源和氮源条件下, 分别调节培养基的初始 pH 值为 6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 进行摇瓶发酵, 如图 2A 所示, 当 pH 为 7.5 时重组菌株的 OD_{600} 值最高, 生长状态优于其他 pH 条件下的生长状态。当 pH 为 7.0 时对重组菌株表达牛乳铁蛋白 N 叶更为有利。综合菌体的生长和目的蛋白的表达结果, 在发酵前 7 h 内将培养基的 pH 调节至 7.5, 以利于重组菌的生长, 在 7-16 h 时, 即发酵进入后期阶段将 pH 调节至 7.0, 以利于牛乳铁蛋白 N 叶的积累。

大肠杆菌在 37 °C 条件下生长最好, 而在 17、20、25 °C 等低温条件下, 较易实现目的蛋白的可溶性表达, 有研究表明 28 °C 适宜乳铁蛋白的诱导表达^[19]。因此, 选取 17、20、25、28 和 37 °C 表达目的蛋白。从图 2B 中可以看出, 随着温度的升高, 菌体的生长更好, 其中 37 °C 条件下菌体生长最好, 牛乳铁蛋白 N 叶表达量呈上升趋势, 在 28 °C 条件下, 表达量最高, 37 °C 时表达量降低, 这可能是温度过高使得蛋白表达太快, 无法正确折叠, 从而造成可溶表达量下降。综合考虑菌体的生长和蛋白表达量,

后续选取 28 °C 作为最适诱导温度。

从图 2C 中可以看出, 随着时间的延长, 菌体的 OD_{600} 逐渐增加, 25 h 时达到最高, 随后菌体的生长略有下降, 且随着时间的延长, 牛乳铁蛋白 N 叶的表达量逐渐增加, 在 25 h 达到最大值, 随后目的蛋白表达量呈下降趋势。综合考虑菌体的生长和目的蛋白的表达情况, 选择 25 h 作为最佳发酵时间。

2.1.3 响应面优化重组菌株发酵工艺试验

根据单因素试验结果, 选择三因素三水平来进行响应面的优化, 即 (A) pH (6.5、7.0、7.5); (B) 温度 (25、28、37 °C); (C) 时间 (20、25、30 h), 以 IOD (Y) 为响应值, 建立 17 个试验点, 进行响应面优化设计, 试验条件和结果如表 2 所示。对响应面优化试验用 Design Expert 8.0 软件进行方差分析 (表 2), 得到响应值 IOD (Y) 与发酵 pH (A)、发酵温度 (B)、发酵时间 (C) 这 3 个因素的多元回归方程: $Y = -2\ 089.69 + 441.33A + 18.22B + 25.34C + 0.005AB - 0.711AC + 0.039BC - 30.11A^2 - 0.31B^2 - 0.42C^2$ 。由响应面实验结果方差分析表 3 可知, 由于 $P < 0.000\ 1$, 重组菌株 IOD 的回归方程和响应面试验结果的关系模型是极其显著的, 说明可以依靠分析结果来说明实验

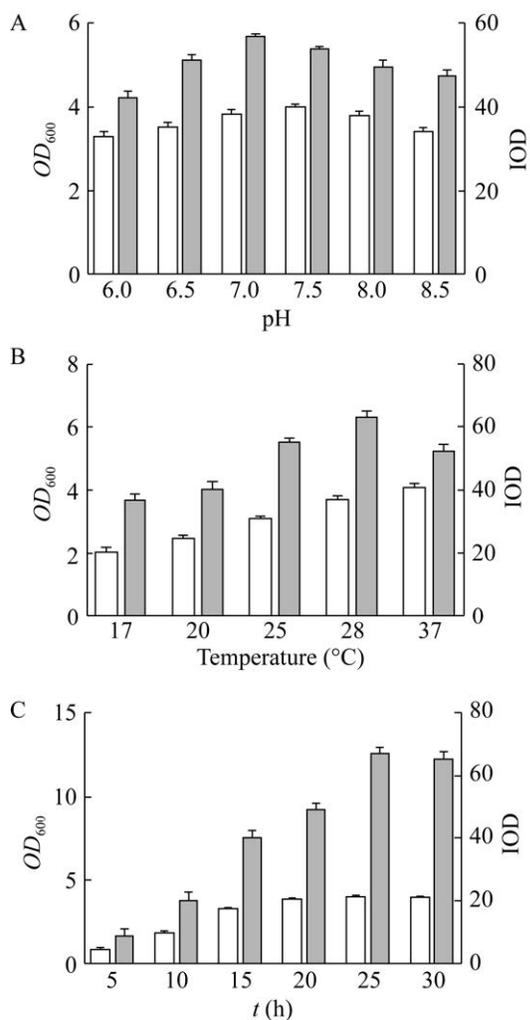


图 2 不同 pH (A)、温度 (B) 和诱导表达时间 (C) 对重组菌株 *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D 生长和蛋白表达的影响

Figure 2 Effect of pH (A), temperature (B) and induction duration (C) on cell growth and protein expression of *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D.

结果。分析多元回归方程可知，一次项 B 和交互项 AB 、 BC 由于 $P>0.05$ ，无显著影响，一次项 A 、 C 和交互项 AC 由于 $P<0.05$ ，分别对重组菌株 IOD 影响显著，二次项 A^2 、 B^2 、 C^2 由于 $P<0.0001$ ，对重组菌株 IOD 有极显著的影响，由此可以看出此次试验的 3 个因素与 IOD 的关系，它们不是简单的线性关系， F 值可以反映不

表 2 发酵工艺条件优化响应面试验设计及结果
Table 2 Design and results of response surface test for fermentation optimization

| No. | A-pH | B-temperature (°C) | C-time (h) | IOD |
|-----|------|--------------------|------------|-------|
| 1 | -1 | 0 | 1 | 51.33 |
| 2 | 0 | 1 | 1 | 48.78 |
| 3 | -1 | 0 | -1 | 43.11 |
| 4 | -1 | 1 | 0 | 49.36 |
| 5 | -1 | -1 | 0 | 48.32 |
| 6 | 0 | 0 | 0 | 67.23 |
| 7 | 0 | 0 | 0 | 67.80 |
| 8 | 0 | 0 | 0 | 67.51 |
| 9 | 1 | 0 | 1 | 52.14 |
| 10 | 1 | 1 | 0 | 49.33 |
| 11 | 1 | 0 | -1 | 51.03 |
| 12 | 0 | 0 | 0 | 67.49 |
| 13 | 1 | -1 | 0 | 48.22 |
| 14 | 0 | -1 | -1 | 45.11 |
| 15 | 0 | -1 | 1 | 47.11 |
| 16 | 0 | 1 | -1 | 42.09 |
| 17 | 0 | 0 | 0 | 67.44 |

同试验因素对响应值的影响程度， F 值越大即对响应值 IOD 的影响越显著，由表 3 可知，对 IOD 的影响程度大小依次是 C 因素 $>$ A 因素 $>$ B 因素 (发酵时间 $>$ 发酵 pH $>$ 发酵温度)。

使用 Design-Expert 软件，绘制响应面三维图及等高线。由图 3A 和 3B 可知，在 pH 6.5–7.5、发酵温度 25–37 °C 条件下，IOD 表现出先升高后降低的趋势。由等高线的弯曲程度可以看出，对于温度和 pH 对 IOD 的影响是显著的，温度和 pH 这两个因素之间的影响不显著。由图 3C 和 3D 可知，在 pH 6.5–7.5、发酵时间 20–30 h 条件下，IOD 表现出先升高后降低的趋势，由等高线的弯曲程度可以看出，发酵 pH 和发酵时间这两个因素均对 IOD 影响显著，发酵 pH 和发酵时间这两个因素之间的影响显著。由图 3E 和 3F 可知，在发酵温度 25–37 °C、发酵时间 20–30 h 条件下，IOD 表现出先升高后降低的趋

表 3 响应面试验结果方差分析

Table 3 Variance analysis of response surface test results

| Source of variance | Sum of square | Degrees of freedom | Mean square | <i>F</i> value | <i>P</i> value | Salience |
|-----------------------|---------------|--------------------|-------------|----------------|----------------|-------------|
| Model | 1 440.41 | 9 | 160.05 | 96.90 | <0.000 1 | Significant |
| <i>A</i> -pH | 9.24 | 1 | 9.24 | 5.60 | 0.049 9 | * |
| <i>B</i> -temperature | 0.08 | 1 | 0.08 | 0.048 4 | 0.832 1 | |
| <i>C</i> -time | 40.59 | 1 | 40.59 | 24.58 | 0.001 6 | ** |
| <i>AB</i> | 0.001 2 | 1 | 0.001 2 | 0.000 7 | 0.979 0 | |
| <i>AC</i> | 12.64 | 1 | 12.64 | 7.65 | 0.027 8 | * |
| <i>BC</i> | 5.50 | 1 | 5.50 | 3.33 | 0.110 8 | |
| <i>A</i> ² | 238.63 | 1 | 238.63 | 144.48 | <0.000 1 | *** |
| <i>B</i> ² | 524.24 | 1 | 524.24 | 317.41 | <0.000 1 | *** |
| <i>C</i> ² | 469.82 | 1 | 469.82 | 284.46 | <0.000 1 | *** |
| Residual | 11.56 | 7 | 1.65 | | | |
| Pure error | 0.166 5 | 4 | 0.041 6 | | | |
| Total dispersion | 1 451.97 | 16 | | | | |

* means significant, ** means very significant, *** means extremely significant.

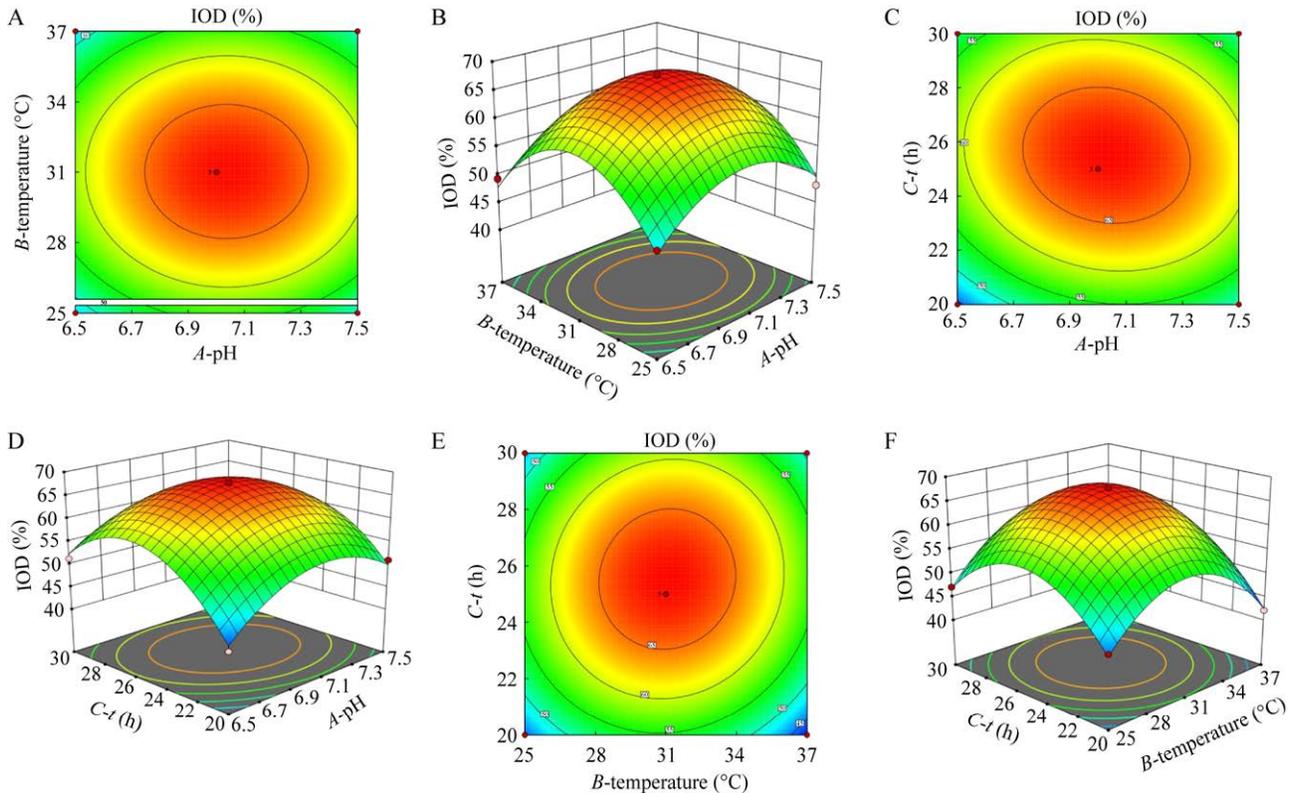


图 3 pH、温度、时间对 IOD 影响的响应面三维图与等高线分析

Figure 3 Response surface 3D map and contour analysis of the effect of pH, temperature and time on IOD.

势。由等高线的弯曲程度可以看出,发酵温度和发酵时间对 IOD 的影响显著,发酵温度和发酵时间这两个因素之间的影响不显著。用 Design-Expert 8.0 软件对以上试验结果进行分析,通过优化和预测可知,重组菌株的最优发酵工艺为: pH 7.03, 发酵温度 28.12 °C, 发酵时间 25.51 h。在该条件下,重组菌株的 IOD 为 67.80%, 在该条件下平行测定 3 次,进行验证试验,最终得到重组菌株的 IOD 为 68.03%,该预测结果与模型预测值较接近,具有一定参考价值,表明运用响应面分析法优化得到的重组菌株发酵工艺参数可靠。

2.2 重组菌株 *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D 10 L 罐的发酵工艺优化

2.2.1 转速、pH、温度对重组菌在 10 L 罐水平上的生长和目的蛋白表达的影响

从摇瓶水平放大到发酵罐发酵,重组菌的生长及目的蛋白合成都会有差异,其中溶氧是发酵罐发酵的一个重要参数,更是影响重组菌能量代谢的一个关键因素^[25],同时 pH、温度会影响目的蛋白的表达量,因而有必要进行发酵罐发酵工艺的优化研究。

研究发现,在发酵前期,较高的转速对菌体的生长有利,这可能是由于较高转速可提供更充足的氧,但转速提高到 350 r/min,在发酵 20 h 后菌体生长缓慢。300 r/min 条件下牛乳铁蛋白 N 叶的表达量最高(图 4A),综合转速对菌体生长和目的蛋白表达的影响可以考虑采用分段控制转速的方式,在发酵前期主要考虑菌体的生长,而发酵后期主要兼顾目的蛋白的积累量。

从图 4B 中可以看出在 pH 7.5 条件下菌株的生长状态较好,但在 pH 7.0 条件下,牛乳铁蛋白 N 叶的表达量最高。如图 4C 中可以看出,相比于 26 °C 和 28 °C,发酵温度为 30 °C 时更

有利于重组菌的生长,但 28 °C 培养更有利于目的蛋白的表达,该重组菌株的发酵过程主要可以分为菌体生长和目的蛋白表达两个阶段,分别在相对应的阶段维持不同的温度,在发酵前期采用 30 °C 培养,在发酵后期采用 28 °C 表达目的蛋白。

2.2.2 两阶段式温度、pH 对重组菌在 10 L 罐水平上生长和目的蛋白表达的影响

前期研究中发现,最适温度与 pH 对重组菌的生长和目的蛋白的表达不一致,37 °C 和 pH 7.5 有利于菌体的生长,而 28 °C 和 pH 7.0 则有利于蛋白的表达,为了进一步研究温度与 pH 对重组菌的生长以及目的蛋白表达的影响,设计了二段式温度、pH 对菌体生长和蛋白产量的调控实验。10 L 发酵罐装液量 7 L,在发酵前 7 h 即重组菌进入对数生长期前将温度和 pH 分别设置为 37 °C 和 pH 7.5,在发酵 7–25 h 重组菌进入对数生长期,此时目的蛋白开始大量表达,将温度调节为 28 °C,用磷酸和氨水将 pH 值调节为 7.0。

将细胞上清液用 HisTrap HP 亲和层析及 Superdex™ 200 (10/300 GL) 凝胶色谱法进行纯化,目的蛋白纯化至单一条带,如图 5 所示,SDS-PAGE 分析表明纯化的乳铁蛋白 N 叶大小约为 37.0 kDa,蛋白纯度为 94.3%。相应的 A_{280} 值的计算和 SDS-PAGE 分析显示每升重组菌产约 23.5 mg 牛乳铁蛋白 N 叶。前期研究中,*B. subtilis* pMA0911-P_{veg}-BLF-N 中每升培养物约 10 mg 乳铁蛋白 N 叶产量^[19],二段式发酵工艺优化使得牛乳铁蛋白 N 叶表达量提高了 2.35 倍。

3 讨论

牛乳铁蛋白 N 叶已经在大肠杆菌、枯草芽孢杆菌等宿主中进行表达和性质表征,但表达量不高(表 4),并且有些宿主菌如大肠杆菌等

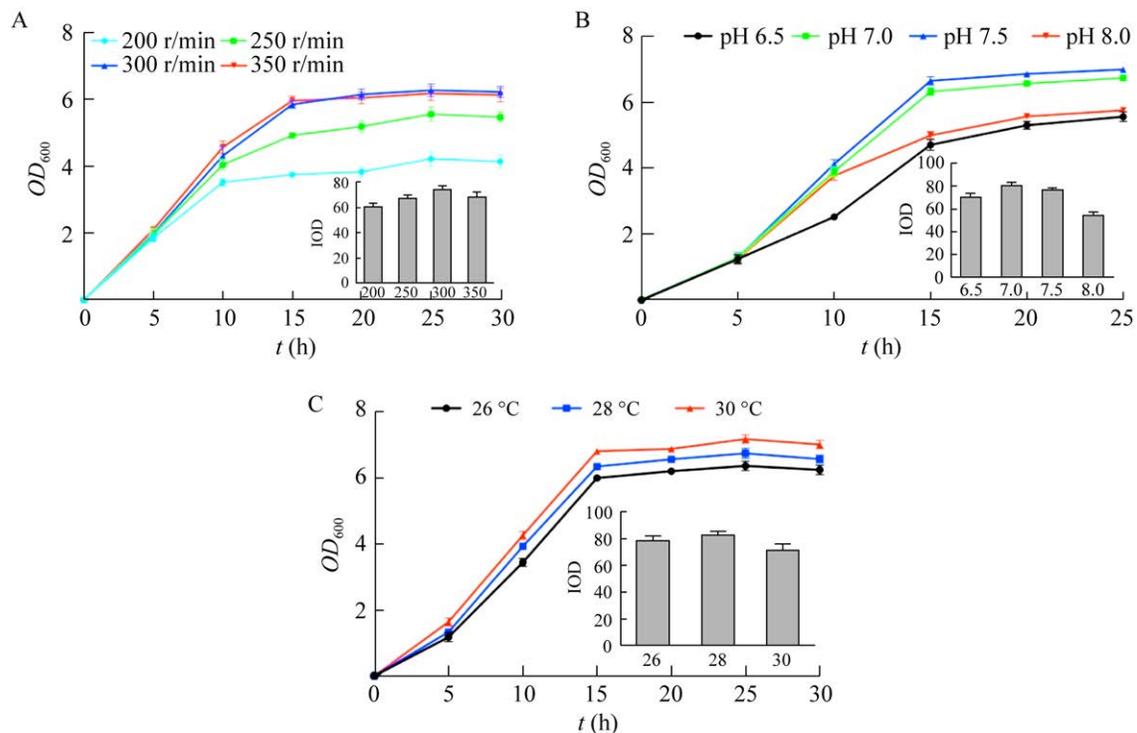


图 4 不同转速 (A)、pH (B) 和温度 (C) 对重组菌株 *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D 生长和蛋白表达的影响

Figure 4 Effect of agitation (A), pH (B), and temperature (C) on cell growth and protein expression of *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D.

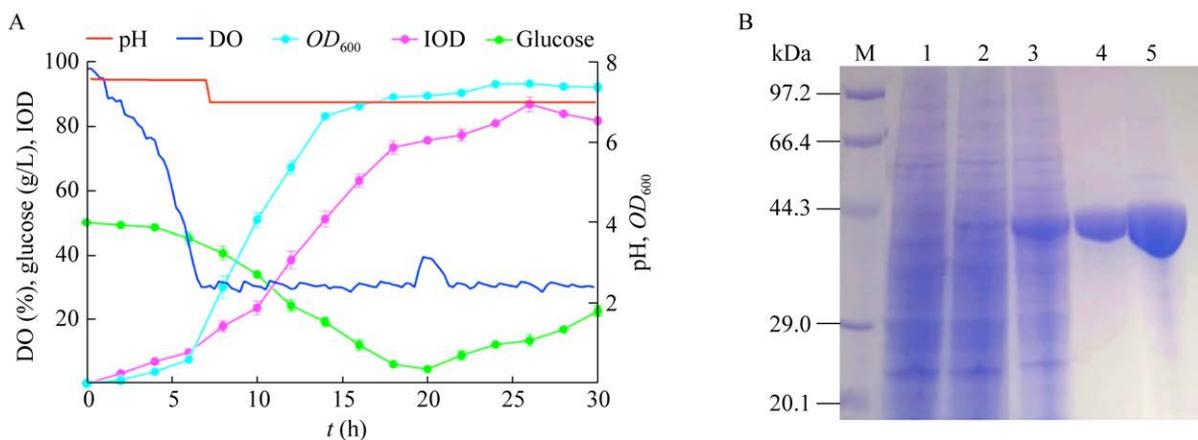


图 5 重组菌株 *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D 的发酵过程参数 (A) 以及重组菌株 *B. subtilis* pMA0911 中目的蛋白表达与纯化的 SDS-PAGE 分析 (B)

Figure 5 Fermentation parameters of *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D (A) and SDS-PAGE analysis of expression and purification of target protein in *B. subtilis* pMA0911 (B). M: marker; lane 1: *B. subtilis* pMA0911; lane 2: cell-free extracts of *B. subtilis* pMA0911-P_{veg}-BLF-N; lane 3: cell-free extracts of *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D; lane 4: purified protein from *B. subtilis* pMA0911-P_{veg}-BLF-N; lane 5: purified protein from *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D.

安全性差。*B. subtilis* 是研究得最为透彻的通常认为是安全的 (generally recognized as safe, GRAS) 菌株, 其遗传背景清晰, 具有完善的基因操作流程并可用于大规模制备。由于 BLF 的来源匮乏, 从牛乳中提取步骤繁琐, 因此利用枯草芽孢杆菌为表达宿主, 高效合成牛乳铁蛋白 N 叶的研究具有重要意义。

本研究在摇瓶水平上对重组菌株 *B. subtilis* pMA0911-D60Y/Y92D 表达牛乳铁蛋白 N 叶的发酵工艺及响应面分析进行了优化, 采用高密度发酵策略对重组菌株进行 10 L 发酵罐的放大培养, 确定了重组菌株最佳的表达条件。由于在菌体生长阶段与目的蛋白表达阶段的最适温度和 pH 有差异, 为了使目的蛋白表达量达到最高, 采用二段式发酵方式, 即温度和 pH 分

阶段调控发酵策略来提高牛乳铁蛋白 N 叶的表达量, 即发酵前期采用适宜菌体生长温度及 pH, 后期采用利于蛋白表达的温度及 pH, 有效地提高了目的蛋白的表达量。与优化前相比, 表达量提高了 2.35 倍^[19]。Wei 等^[26]应用两阶段温度调控策略使得念珠菌中谷胱甘肽的产量提高了 2.5 倍。发酵产物经纯化后, 重组菌每升培养物得到纯度超过 94%、产量约 23.5 mg 的乳铁蛋白。利用枯草芽孢杆菌合成牛乳铁蛋白 N 叶产量远高于 Garcia-Montoya 等^[27]报道的大肠杆菌中表达的乳铁蛋白 N 叶 15.3 mg/L 的产量。后续研究将进一步优化分批补料方式, 更好地提高酶的产量。本研究为高效制备牛乳铁蛋白 N 叶奠定了较坚实的基础, 为后续全长的表达优化提供了科学依据。

表 4 牛乳铁蛋白 N 叶在不同宿主中的表达

Table 4 Expression of bovine lactoferrin N-lobe in different hosts

| Hosts | Yield (mg/L) | Feature | References |
|--------------------------|--------------|--|------------|
| <i>Escherichia coli</i> | 15.3 | Antibacterial activity | [27] |
| Insect cells | 10.0 | Inhibits <i>E. coli</i> | [28] |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 10.0 | Inhibits <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | [19] |
| <i>Bacillus subtilis</i> | 16.5 | Inhibits <i>E. coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | [19] |

REFERENCES

- [1] Kumar J, Weber W, Münchau S, et al. Crystal structure of human seminal diferric lactoferrin at 3.4 angstrom resolution. *Indian J Biochem Biophys*, 2003, 40(1): 14-21.
- [2] Séverin S, Xia WS. Milk biologically active components as nutraceuticals: review. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2005, 45(7/8): 645-656.
- [3] Jacobsen LC, Sørensen OE, Cowland JB, et al. The secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) and the secondary granule protein lactoferrin are synthesized in myelocytes, colocalize in subcellular fractions of neutrophils, and are coreleased by activated neutrophils. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(5): 1155-1164.
- [4] Li YQ, Guo C. A review on lactoferrin and central nervous system diseases. *Cells*, 2021, 10(7): 1810.
- [5] Kehoe SI, Jayarao BM, Heinrichs AJ. A survey of bovine colostrum composition and colostrum management practices on Pennsylvania dairy farms. *J Dairy Sci*, 2007, 90(9): 4108-4116.
- [6] Paesano R, Berlutti F, Pietropaoli M, et al. Lactoferrin efficacy versus ferrous sulfate in curing iron deficiency and iron deficiency *Anemia* in pregnant women. *Biometals*, 2010, 23(3): 411-417.
- [7] Beljaars L, Van Der Strate BWA, Bakker HI, et al. Inhibition of *Cytomegalovirus* infection by lactoferrin *in vitro* and *in vivo*. *Antiviral Res*, 2004, 63(3): 197-208.
- [8] Ikeda M, Nozaki A, Sugiyama K, et al. Characterization of antiviral activity of lactoferrin against hepatitis C virus infection in human cultured cells. *Virus Res*, 2000, 66(1): 51-63.
- [9] Gibbons JA, Kanwar JR, Kanwar RK. Iron-free and

- iron-saturated bovine lactoferrin inhibit survivin expression and differentially modulate apoptosis in breast cancer. *BMC Cancer*, 2015, 15: 425.
- [10] Perdijk O, Van Neerven RJJ, Van Den Brink E, et al. Bovine lactoferrin modulates dendritic cell differentiation and function. *Nutrients*, 2018, 10(7): 848.
- [11] Ramírez-Sánchez DA, Arredondo-Beltrán IG, Canizalez-Roman A, et al. Bovine lactoferrin and lactoferrin peptides affect endometrial and cervical cancer cell lines. *Biochem Cell Biol*, 2021, 99(1): 149-158.
- [12] Tomita M, Wakabayashi H, Shin K, et al. Twenty-five years of research on bovine lactoferrin applications. *Biochimie*, 2009, 91(1): 52-57.
- [13] Calvani F, Cutone A, Lepanto MS, et al. Efficacy of bovine lactoferrin in the post-surgical treatment of patients suffering from bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaws: an open-label study. *Biometals*, 2018, 31(3): 445-455.
- [14] Moore SA, Anderson BF, Groom CR, et al. Three-dimensional structure of diferric bovine lactoferrin at 2.8 Å resolution. *J Mol Biol*, 1997, 274(2): 222-236.
- [15] Sun CB, Li YY, Cao SS, et al. Antibacterial activity and mechanism of action of bovine lactoferricin derivatives with symmetrical amino acid sequences. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(10): 2951.
- [16] Lönnerdal B, Du XG, Jiang RL. Biological activities of commercial bovine lactoferrin sources. *Biochem Cell Biol*, 2021, 99(1): 35-46.
- [17] Sun J, Jiang J, Zhai XY, et al. Coexpression of Kex2 endoprotease and Hac1 transcription factor to improve the secretory expression of bovine lactoferrin in *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioprocess Eng*, 2019, 24(6): 934-941.
- [18] Wang L, Wang YL, Lv ZL, et al. Design of bovine lactoferricin-derived peptide and its expression and activity in *Pichia pastoris*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 534: 822-829.
- [19] Jin L, Li LH, Zhou LX, et al. Improving expression of bovine lactoferrin N-lobe by promoter optimization and codon engineering in *Bacillus subtilis* and its antibacterial activity. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(35): 9749-9756.
- [20] Leonovich SA, Serkova NN, Rabinovich IM. Toxicity of mercaptoethanol to mutant strains of the yeast *Pichia methanolica* growing on different carbon sources. *Prikl Biokhim Mikrobiol*, 2001, 37(1): 96-99.
- [21] Nagy ZK. Model based control of a yeast fermentation bioreactor using optimally designed artificial neural networks. *Chem Eng J*, 2007, 127(1/2/3): 95-109.
- [22] Wang S, Tian R, Liu BW, et al. Effects of carbon concentration, oxygen, and controlled pH on the engineering strain *Lactiplantibacillus casei* E1 in the production of bioethanol from sugarcane molasses. *AMB Express*, 2021, 11(1): 95.
- [23] Wunschel DS, Hill EA, McLean JS, et al. Effects of varied pH, growth rate and temperature using controlled fermentation and batch culture on matrix assisted laser desorption/ionization whole cell protein fingerprints. *J Microbiol Methods*, 2005, 62(3): 259-271.
- [24] Lin TY, Chien MFC. Exopolysaccharides production as affected by lactic acid bacteria and fermentation time. *Food Chem*, 2007, 100(4): 1419-1423.
- [25] Wang Y, Inoue Y. Effect of dissolved oxygen concentration in the fermentation medium on transformation of the carbon sources during the biosynthesis of poly (3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxypropionate) by *Alcaligenes latus*. *Int J Biol Macromol*, 2001, 28(3): 235-243.
- [26] Wei GY, Li Y, du GC, et al. Application of a two-stage temperature control strategy for enhanced glutathione production in the batch fermentation by *Candida utilis*. *Biotechnol Lett*, 2003, 25(11): 887-890.
- [27] García-Montoya I, González-Chávez SA, Salazar-Martínez J, et al. Expression and characterization of recombinant bovine lactoferrin in *E. coli*. *Biometals*, 2013, 26(1): 113-122.
- [28] Nakamura I, Watanabe A, Tsunemitsu H, et al. Production of recombinant bovine lactoferrin N-lobe in insect cells and its antimicrobial activity. *Protein Expr Purif*, 2001, 21(3): 424-431.

(本文责编 郝丽芳)