

重组耐碱性蛋白 A 大肠杆菌工程菌株的发酵优化

黄玲珑¹, 蓝萌萌¹, 倪 辉², 李志朋^{1,3}, 洪菲菲⁴,
洪清林⁴, 姜泽东^{1,3}, 朱艳冰^{1,3}

(1. 集美大学海洋食品与生物工程学院, 福建 厦门 361021; 2. 厦门海洋职业技术学院, 福建 厦门 361102;
3. 福建省食品微生物与酶工程重点实验室, 福建 厦门 361021; 4. 绿新(福建)食品有限公司, 福建 漳州 363199)

[摘要] 对重组耐碱性蛋白 A 的大肠杆菌工程菌株进行发酵优化以提高目标蛋白表达量, 筛选出 TB 培养基作为基础发酵培养基; 通过单因素实验在摇瓶水平上对培养基组分进行优化, 然后在最优培养基的基础上对发酵条件进行优化, 最后通过 30 L 发酵罐进行放大验证。结果表明, 最优培养基组分为蔗糖 8 g/L、大豆蛋白胨 12 g/L、酵母浸粉 24 g/L、 KH_2PO_4 23.1 g/L、 K_2HPO_4 125.4 g/L, pH = 7.0; 最优摇瓶发酵条件为 5% 接种量、40% 装液量、37 °C 培养至工程菌株 A(600) = 0.8 时加入 0.3 mmol/L IPTG、37 °C 诱导 8 h, 优化后的蛋白 A 表达量为优化前的 3.01 倍。30 L 发酵罐放大验证结果表明, 37 °C 诱导 8 h 后, 蛋白 A 表达量达到最高, 与摇瓶水平优化结果一致。

[关键词] 重组耐碱性蛋白 A; 大肠杆菌; 发酵培养基优化; 发酵条件优化

[中图分类号] TQ 925

Fermentation Optimization of Recombinant Alkaline Resistant Protein A Engineering Strain of *Escherichia coli*

HUANG Linglong¹, LAN Mengmeng¹, NI Hui², LI Zhipeng^{1,3}, HONG Feifei⁴,
HONG Qinglin⁴, JIANG Zedong^{1,3}, ZHU Yanbing^{1,3}

(1. College of Ocean Food and Biological Engineering, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Xiamen Ocean Vocational College, Xiamen 361102, China;

3. Fujian Provincial Key Laboratory of Food Microbiology and Enzyme Engineering, Xiamen 361021, China;

4. Greenfresh (Fujian) Foodstuff Co., Ltd., Zhangzhou 363199, China)

Abstract: Fermentation conditions were optimized for the engineered *Escherichia coli* strain expressing of recombinant alkaline resistant protein A in order to enhance the expression level of the target protein. TB medium was identified as the most suitable basal fermentation medium through screening. The composition of the culture medium was optimized at the shaker flask scale through single-factor experiments. Subsequently, fermentation conditions were optimized using the improved medium. Finally, scale-up validation was performed using a 30 L fermenter. The results showed that the optimal medium components were sucrose 8 g/L, soybean peptone 12 g/L, yeast extract 24 g/L, KH_2PO_4 23.1 g/L, K_2HPO_4 125.4 g/L, and pH = 7.0. The optimal shaker flask fermentation conditions were 5% inoculation volume, 40% liquid loading volume, incubation at

[收稿日期] 2024-11-26

[基金项目] 福建省促进海洋与渔业产业高质量发展专项资金项目 (FJHYF-L-2023-25); 国家自然科学基金项目 (22178142)

[通信作者] 朱艳冰 (1976—), 博士, 教授, 从事生物化学与分子生物学方向研究。E-mail: yanbingzhu@jmu.edu.cn

http://xuebaobangong.jmu.edu.cn/zkb

37 ℃ until the the engineered strain A(600) =0.8, then adding 0.3 mmol/L IPTG, and induction at 37 ℃ for 8 h. The expression level of protein A was 3.01 times than that before optimization. The results of 30 L fermenter amplification indicated that the expression of protein A reached the highest level after induction at 37 ℃ for 8 h, which was consistent with the optimization results at the shaker flask level.

Keywords: recombinant alkali-resistant protein A; *Escherichia coli*; optimization of fermentation media; optimization of fermentation conditions

0 引言

随着生物制药行业的发展,抗体药物因其具有高特异性、有效性和安全性等优点,在医学诊断技术和疾病治疗领域备受关注^[1]。抗体纯化是抗体制造的重要环节,亲和层析具有高选择性、高效率和便捷的优点,是抗体纯化的关键步骤^[1-2],层析分离约占抗体纯化总成本的50%^[3]。

金黄色葡萄球菌蛋白A (*Staphylococcus aureus* protein A, SPA),简称蛋白A,是存在于金黄色葡萄球菌中的细胞壁蛋白质。蛋白A能够通过疏水相互作用与多种哺乳动物IgG的Fc片段结合^[4],常被用作配基制备亲和层析介质,用于抗体纯化。在蛋白A亲和层析填料的应用中,原料成本、结合效率和耐碱性等仍有待优化。蛋白A的B结构域相对稳定,与抗体结合能力较强,因此多选择在B结构域进行改造来提高蛋白A的耐碱性。Cedergren等^[5]在B结构域突变了L17D、N28A、I31A、K35A、F30A等5个位点,对突变后的蛋白A与人IgG的相互作用、结合能力进行研究,发现蛋白A与IgG的Fc片段进行结合,并且除F30A外的其余4个突变位点均降低蛋白A与IgG的结合能力,说明这几个氨基酸残基对IgG的结合有重要影响。Linhult等^[6]发现,在B结构域中突变N23T位点可以提高蛋白A的耐碱性能。在前期的研究中,本实验室通过对B结构域进行多个位点改造,构建出耐碱性金黄色葡萄球菌蛋白A工程菌株*E. coli* BL21(DE3)/pET28a-SPA,该重组耐碱蛋白A的理论相对分子质量为35 ku,等电点为4.86。

对重组大肠杆菌产耐碱性蛋白A进行发酵优化可以提高目标蛋白的生产效率,控制生产成本。都晓君^[7]通过对重组蛋白A的发酵条件进行优化,确定在菌体培养5 h后加入0.2 mmol/L IPTG,继续诱导5 h能提高耐碱蛋白A的表达量。郭子豪^[8]通过接种量、菌体浓度、IPTG浓度、诱导时间、诱导温度等优化提高高性能蛋白A的表达。本研究对已构建的耐碱性金黄色葡萄球菌蛋白A工程菌株在摇瓶条件下进行发酵培养基和发酵条件的优化实验,并进一步在30 L发酵罐中进行发酵工艺放大验证,为实现蛋白A更大规模、更高效和更经济的生产提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

耐碱性金黄色葡萄球菌蛋白A工程菌株*E. coli* BL21(DE3)/pET28a-SPA为实验室前期构建保存;甘油购于上海麦克林生化科技股份有限公司;胰蛋白胨、大豆蛋白胨、牛肉膏、酵母浸粉均购于广东环凯微生物科技有限公司;重组耐碱蛋白A酶联免疫分析试剂盒购于上海恒远生物科技有限公司;蔗糖、D(+)-无水葡萄糖、磷酸氢二钾、磷酸二氢钾、D(-)-果糖、氯化钠、氯化铵、硝酸钠、磷酸氢二钠、磷酸二氢钠、咪唑等均为国产分析纯产品。

立式压力蒸汽灭菌器(上海博迅生物仪器股份有限公司);超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司);Centrifuge 5810 R型台式离心机(Eppendorf, China);30 L发酵罐(镇江东方生物工程设备技术有限责任公司);高速冷冻离心机(厦门百萌生物科技有限公司);多色荧光凝胶成像仪(美国GE医疗器械公司);2WYC-2932型恒温培养振荡箱(厦门史维斯技术服务有限公司);分析天平(上海佑科仪器仪表有限公司);电子天平(德国赛多利斯公司)。

1.2 培养基的配制

1) LB培养基。胰蛋白胨10 g/L,酵母浸粉5 g/L,氯化钠10 g/L,pH值调至7.0,高温高压灭菌。

2) TB 培养基。胰蛋白胨 12 g/L, 酵母浸粉 24 g/L, 质量分数为 0.4% 的甘油, pH 值调至 7.0, 高温高压灭菌后, 加入体积分数为 10% 已灭菌的磷酸盐缓冲液 (0.17 mol/L KH_2PO_4 , 0.72 mol/L K_2HPO_4)。

3) M9 培养基。取 200 mL 的 $5 \times \text{M9}$ 盐溶液 (64 g/L $\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 15 g/L KH_2PO_4 , 2.5 g/L NaCl , 5 g/L NH_4Cl), 2 mL MgSO_4 (1 mol/L), 0.1 mL CaCl_2 (1 mol/L), 20 mL 质量分数为 20% 的葡萄糖溶液 (0.22 μm 滤膜过滤除菌), 加灭菌双蒸水至 1 L。

4) SB 培养基。胰蛋白胨 32 g/L, 酵母浸粉 20 g/L, 氯化钠 5 g/L, pH 值调至 7.0, 高温高压灭菌。

5) 2YT 培养基。胰蛋白胨 16 g/L, 酵母浸粉 10 g/L, 氯化钠 5 g/L, pH 值调至 7.0, 高温高压灭菌。

1.3 实验方法

1.3.1 蛋白 A 工程菌株的活化

取 1 mL 菌液于 50 mL LB 液体培养基中 (含 0.05 g/L 卡那霉素), 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养 12 h。

1.3.2 蛋白 A 工程菌株的生物量测定

参照劳才文等^[9]的方法。发酵过程中取菌液样品, 稀释一定倍数后, 在 600 nm 波长下测定吸光度值。

1.3.3 蛋白 A 质量浓度的测定

参照 Mou 等^[10]的方法。将发酵液进行 7000g 离心 10 min, 收集菌体, 用缓冲液 (50 mmol/L NaH_2PO_4 , 300 mmol/L NaCl , 20 mmol/L 咪唑, pH = 8.0) 进行菌体重悬, 超声破碎细胞后, 在 4 $^{\circ}\text{C}$ 下 12 000g 离心 20 min, 收集上清液, 得到粗蛋白。利用重组耐碱性蛋白 A 酶联免疫分析试剂盒, 采用双抗体夹心法, 将纯化的重组耐碱蛋白 A 的抗体包埋于微孔中, 然后向微孔中加入待测的蛋白质样品, 再加入酶标抗体, 最后进行底物显色, 用酶标仪测定 A(450), 根据标准曲线计算出提取的粗蛋白中耐碱性蛋白 A 的质量浓度。

1.3.4 基础培养基的筛选

将活化后的菌液按 1% 的接种量接种于 300 mL 含 0.05 g/L 卡那霉素的不同发酵培养基 (LB 培养基、TB 培养基、M9 培养基、SB 培养基、2YT 培养基) 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 培养至 $A(600) = 0.8$, 加入 0.5 mmol/L IPTG, 16 $^{\circ}\text{C}$ 、180 r/min 条件下培养 6 h, 诱导目的蛋白合成。测定工程菌株的生物量和蛋白 A 的质量浓度, 筛选发酵培养基。

1.3.5 培养基组分的优化

在筛选发酵培养基的基础上, 以菌体的生长和蛋白 A 的表达量为指标优化培养基成分, 包括优化碳源种类 (甘油、葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖) (添加量为 4 g/L) 和添加量 (2、4、6、8、10 g/L), 氮源种类 (胰蛋白胨、大豆蛋白胨、牛肉膏、 NaNO_3 、 NH_4Cl) (添加量为 12 g/L) 和添加量 (10、12、14、16 和 18 g/L), 以及培养基的 pH 值 (6.0、6.5、7.0、7.5、8.0)。

1.3.6 摇瓶水平发酵条件优化

在优化发酵培养基的基础上, 采用单因素实验考察诱导温度 (16、20、25、30、37 $^{\circ}\text{C}$)、接种量 (1%、3%、5%、7%、10%)、装液量 (20%、30%、40%、50%、60%)、IPTG 终浓度 (0.1、0.3、0.5、0.7、1.0 mmol/L)、诱导时机 (IPTG 添加时菌体的 $A(600) = 0.2$ 、0.4、0.6、0.8、1.0)、诱导时间 (6、8、10、12、14 h) 对菌体生长和蛋白 A 表达的影响, 优化发酵条件。

1.3.7 30 L 发酵罐放大验证

在摇瓶水平培养基和发酵条件优化的基础上, 利用 30 L 发酵罐进行发酵, 装液量为 40% (12 L), pH 值控制在 7.0, 溶氧控制在 30%, 转速控制在 180 r/min, 按体积分数为 5% 接种量在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下培养至 $A(600) = 0.8$, 加入 IPTG 使其终浓度为 0.3 mmol/L 进行诱导。诱导后每隔 2 h 取样 1 次, 测定工程菌株的生物量和蛋白 A 的质量浓度。

1.4 数据处理

利用 Microsoft Excel 2019 进行数据整理; 采用 SPSS 软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 多重

比较采用 Duncan 法 ($P < 0.05$), 组间差异用字母法标记; 利用 Origin 软件进行绘图。

2 实验结果及分析

2.1 发酵培养基及其组分的优化

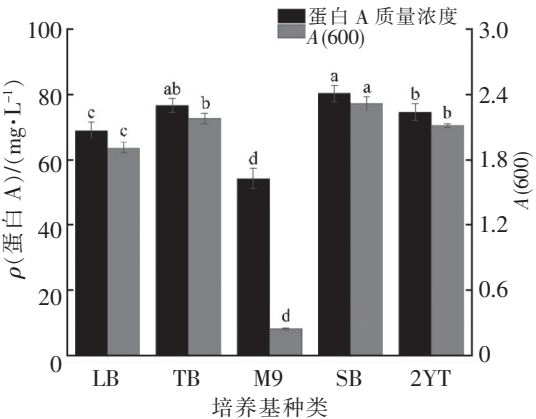
2.1.1 不同基础培养基对蛋白 A 表达的影响

不同的基础培养基组分不同, 各组分的比例也不同, 这对于微生物的生长和代谢具有重要影响。本研究在 5 种不同基础培养基中培养诱导微生物, 观察微生物的 $A(600)$ 值和蛋白 A 的表达量, 结果如图 1 所示。可见, SB 培养基中菌体的 $A(600) = 2.3$, 其蛋白 A 的表达量为 80.33 mg/L ; TB 培养基中菌体的 $A(600) = 2.2$, 蛋白 A 的表达量为 76.65 mg/L 。与 SB 培养基相比, TB 培养基的菌体量和蛋白质表达量均相差不多, 且其成本相对较低, 因此, 综合考虑, 在后续实验中选择 TB 培养基作为初始培养基。姜正日等^[11]认为, TB 培养基中蛋白质的表达量较高是因为 TB 培养基添加了磷酸缓冲液, 能够长期维持稳定的 pH 值, 并且 TB 培养基的营养较为丰富, 为重组菌生长提供了优良条件。

2.1.2 碳源种类和添加量对蛋白 A 表达的影响

碳源是微生物合成有机化合物的重要原料, 碳源能够影响微生物的代谢途径和微生物生长的营养需求, 不同的碳源具有不同的代谢速率和代谢特征^[12]。不同的微生物所产生的酶系不同, 对不同碳源的利用效果也不同。本研究在初始培养基的基础上, 用不同碳源 (葡萄糖、果糖、蔗糖、乳糖) 替换初始培养基中的甘油, 从而确定最佳碳源, 结果如图 2a 所示。可见, 当甘油作为唯一碳源时, 菌体的 $A(600) = 2.4$, 而当碳源为蔗糖时, 菌体的 $A(600) = 3.5$, 此时蛋白 A 的表达量为 84.67 mg/L , 说明蔗糖有助于重组大肠杆菌合成蛋白 A。

以蔗糖为碳源, 对添加量进行优化, 菌体的 $A(600)$ 值和蛋白 A 的表达量情况如图 2b 所示。可见, 随着蔗糖添加量的增加, 菌体 $A(600)$ 和蛋白 A 的表达量均呈现先增加后减少的趋势, 说明过高浓度的蔗糖对微生物的生长有抑制作用^[13]。在蔗糖添加量达到 8 g/L 时, $A(600)$ 达到最大为 4.5 , 蛋白 A 的表达量达 99.04 mg/L 。因此, 确定蔗糖的最优添加量为 8 g/L 。



说明:不同小写字母表示差异性显著($P < 0.05$),下同。

图 1 不同培养基对蛋白 A 表达的影响

Fig.1 The influence of different culture media on the expression of protein A

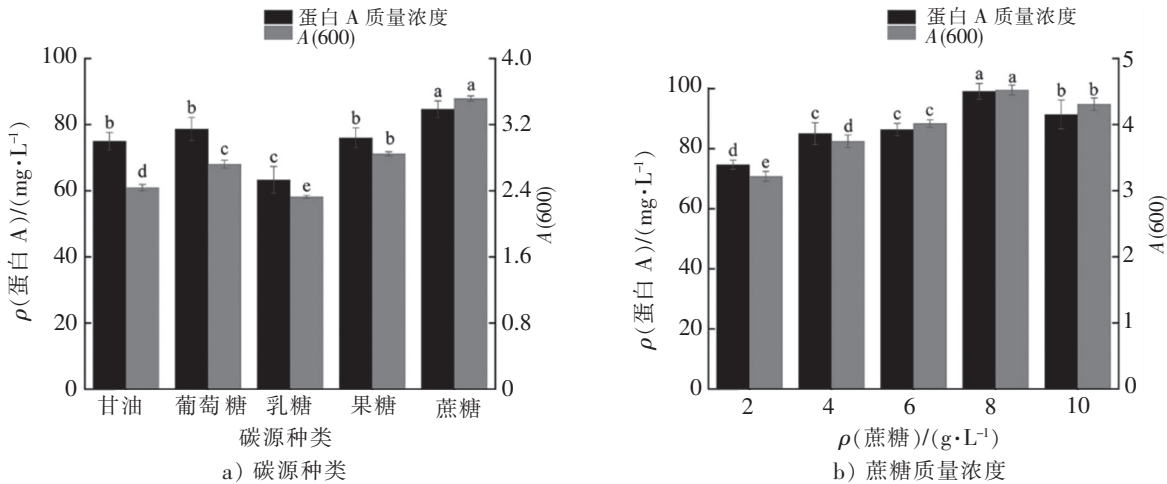


图 2 不同碳源对蛋白 A 表达的影响

Fig.2 The influence of different carbon sources on the expression of protein A

2. 1. 3 氮源种类和添加量对蛋白 A 表达的影响

氮源对微生物蛋白质的合成和细胞增殖至关重要，同时影响含氮化合物的合成和细胞信号传导^[14]。本研究在确定了 8 g/L 蔗糖作为碳源的基础上，用不同氮源（大豆蛋白胨、牛肉膏、硝酸钾、氯化铵）替换初始培养基中的胰蛋白胨，确定最佳氮源，结果如图 3a 所示。可见，当胰蛋白胨作为氮源时，菌体的 $A(600) = 4.8$ ，用大豆蛋白胨替换胰蛋白胨作为氮源时，菌体的 $A(600)$ 值增加到 5.0，此时蛋白 A 的表达量最高，为 121.43 mg/L，最终确定大豆蛋白胨作为氮源。同时由图 3a 还可见，无机氮源的蛋白 A 表达量较低，但是菌体量与有机氮源相比并未减少太多。这是因为有机氮源能够满足微生物中后期生长需要，而无机氮源作为速效氮源，可以满足菌体前期生长需求，但是并不能满足重组菌产目的蛋白的需求^[15]，因此有机氮源在重组菌产蛋白 A 中更具优势。

对氮源大豆蛋白胨添加量进行优化，结果如图 3b 所示。可见，随着大豆蛋白胨添加量的增加，菌体浓度与蛋白质表达量均呈现先增加后减少的趋势，在大豆蛋白胨添加量达到 12 g/L 时，菌体浓度和蛋白质表达量均最高，此时的菌体 $A(600) = 5.1$ ，蛋白 A 的表达量为 125.77 mg/L。因此，选择大豆蛋白胨的最优添加量为 12 g/L。

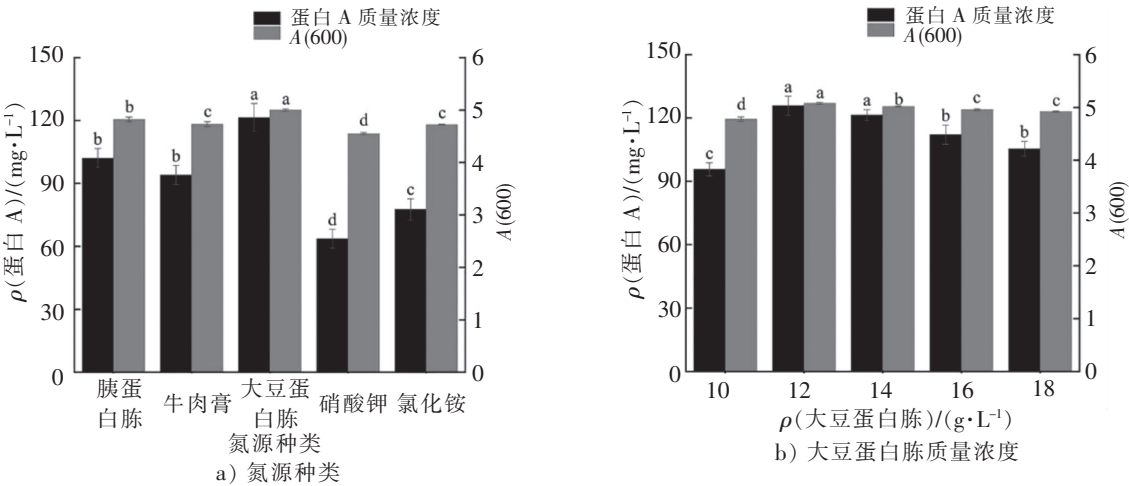


图 3 不同氮源对蛋白 A 表达的影响
Fig.3 The influence of different nitrogen sources on the expression of protein A

2. 1. 4 pH 值对蛋白 A 表达的影响

pH 值会影响培养基中物质和代谢物的解离，从而影响微生物对这些物质的利用。同时细胞外的 pH 值会改变菌体细胞内部的 pH 值，影响菌体细胞的代谢反应^[16]。本研究设置 5 个不同的 pH 值，研究 pH 值对蛋白 A 表达的影响，结果如图 4 所示。可见，当 pH 值介于 6.0~7.0 时，菌体浓度和蛋白 A 表达量均逐渐上升，当 pH = 7.0 时，菌体浓度及蛋白质表达量均达到最高，此时菌体 $A(600) = 5.2$ ，蛋白 A 表达量为 143.81 mg/L；而当 pH 值超过 7.0 时，菌体浓度和蛋白 A 表达量有所下降，可能是酸性和碱性的环境对菌体生长和蛋白 A 的表达有抑制作用^[17]。因此，本文选择 pH = 7.0 为最佳 pH 值。Shahzadi 等^[18]在研究大肠杆菌产纤维素酶的发酵优化中也发现，当 pH 值大于或小于 7.0 时，纤维素酶的表达量都会降低。

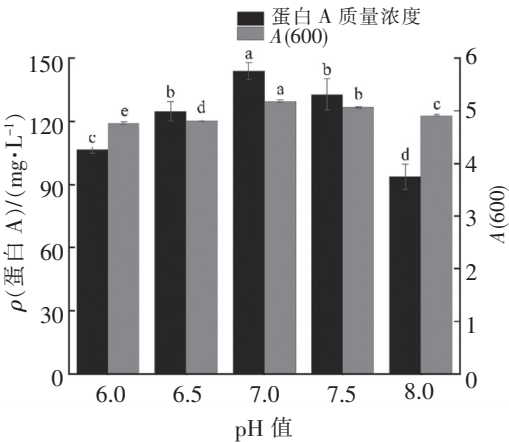


图 4 不同 pH 值对菌体浓度和蛋白 A 表达的影响
Fig.4 The influence of different pH on bacterial concentration and the expression of protein A

2.2 发酵条件的优化

2.2.1 诱导温度对蛋白 A 表达的影响

大肠杆菌需要合适的诱导温度, 较低的温度通常可以减少蛋白质的错误折叠, 但是菌体的生长速度会受到限制; 较高的温度虽然可以加快菌体的代谢速度, 缩短发酵周期, 但是蛋白质容易出现错误折叠, 产生大量的不溶性蛋白质^[19]。诱导温度对蛋白 A 表达的影响结果如图 5 所示。可见, 当温度达到 37 ℃ 时, 菌体浓度达到最高 ($A(600) = 6.9$), 蛋白 A 的表达量也达到最高, 为 202.62 mg/L。因此, 后续实验选择诱导温度为 37 ℃。

2.2.2 接种量对蛋白 A 表达的影响

接种量对生物发酵也有一定的影响, 提高接种量能够缩短发酵周期, 降低发酵中染菌的概率。但是接种量过大, 代谢会向生物量转变, 不利于目的蛋白的合成与积累^[20]。本研究分别按不同接种量进行接种, 结果如图 6 所示。可见, 随着接种量的增加, 菌体浓度与蛋白质表达量均先增加后减少, 当接种量为 5% 时, 菌体 $A(600)$ 达到最大为 7.0, 蛋白 A 的表达量也最大为 204.96 mg/L。因此, 后续实验选择接种量为 5%。

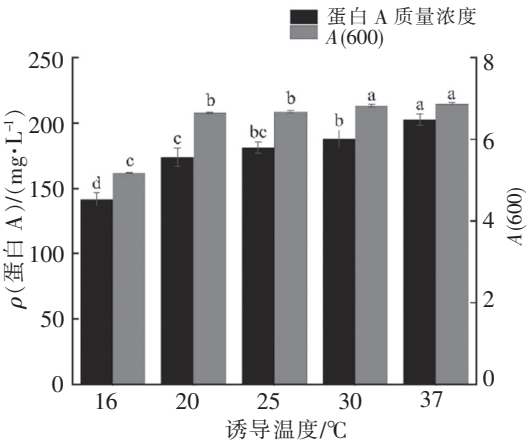


图 5 诱导温度对蛋白 A 表达的影响

Fig.5 The influence of induction temperature on the expression of protein A

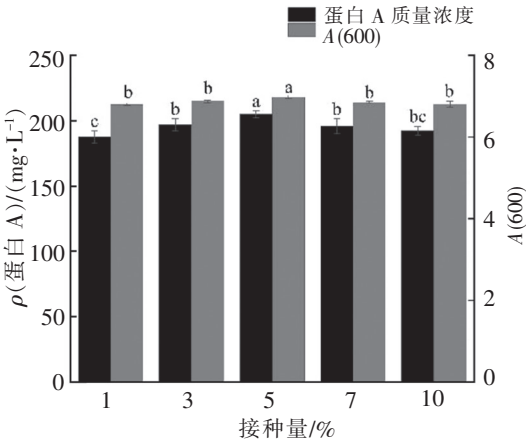


图 6 接种量对蛋白 A 表达的影响

Fig.6 The influence of inoculation amount on the expression of protein A

2.2.3 装液量对蛋白 A 表达的影响

大肠杆菌是兼性厌氧菌, 其生长受到培养基中溶氧量的影响, 目的蛋白的表达跟菌体的生长也有一定的关系。在摇瓶发酵中, 培养基的装液量直接影响培养基的溶氧量^[21]。因此, 合适的装液量有助于菌体的生长及蛋白质的表达。本研究分别按不同装液量进行大肠杆菌的发酵培养, 结果如图 7 所示。可见, 蛋白 A 的表达量随着装液量的增加呈现先升高后降低的趋势, 当装液量为 40% 时, 蛋白 A 的表达量达到最高为 208.30 mg/L。因此, 后续实验选择 40% 为最适装液量。

2.2.4 诱导剂浓度对蛋白 A 表达的影响

实验中蛋白 A 工程菌所使用的表达载体为 pET-28a(+), 该载体中带有 T7 启动子和乳糖 (lac) 操纵子^[22]。IPTG 是有效的乳糖操纵子的诱导剂, IPTG 浓度过低会导致诱导剂的量不足以与阻遏蛋白结合, 从而降低表达水平。但是过高浓度的 IPTG 对菌体有一定毒性, 会使菌体的生长和蛋白质的表达受阻^[23]。因此, IPTG 的使用有一定的浓度范围, 一般在 0.1 ~ 1.0 mmol/L 浓度范围内进行实验。IPTG 浓度对蛋白 A 表达的影响结果如图 8 所示。可见, 蛋白 A 的表达量在 IPTG 浓度为 0.3 mmol/L 时达到最高, 为 216.32 mg/L, 而后随着 IPTG 浓度的增加, 菌体生长和蛋白 A 的表达均受到抑制。这也说明, 合适的诱导剂浓度能够有利于目的蛋白的合成^[9]。因此, 本文选择的最优 IPTG 浓度为 0.3 mmol/L。

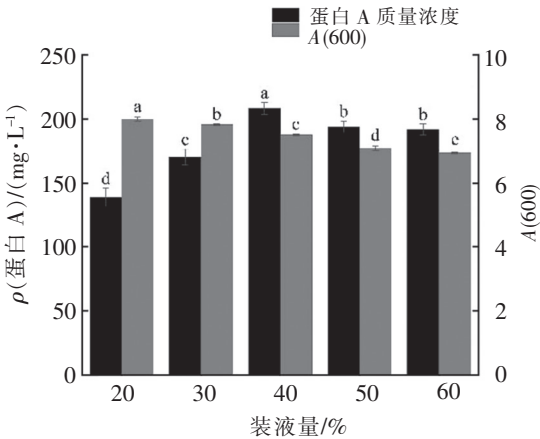


图 7 装液量对蛋白 A 表达的影响

Fig.7 The influence of liquid loading volume on the expression of protein A

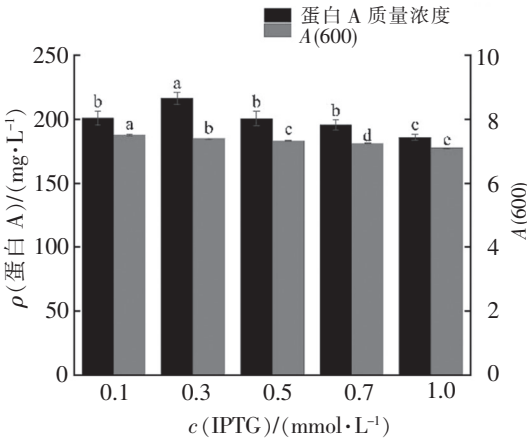


图 8 IPTG 浓度对蛋白 A 表达的影响

Fig.8 The influence of IPTG concentration on the expression of protein A

2. 2. 5 不同菌体浓度诱导对蛋白 A 表达的影响

目标蛋白的表达可能会受到诱导时菌体浓度的影响。过早诱导，菌体浓度太低，没有足够的菌体来表达蛋白质，所获得的目的蛋白就较少；菌体浓度越高，所获得的目的蛋白更多。但是由于菌体会出现老化现象，蛋白质表达能力减弱，导致蛋白质表达量与诱导时的菌体浓度并不成正比，所以蛋白质的表达通常要使菌体处于一定的生长水平^[24]。因此，诱导剂应该在菌体的对数生长期添加最为合适，此时菌体活力旺盛，合成蛋白质的能力最强。不同菌体浓度诱导对蛋白 A 表达的影响结果如图 9 所示。可见，当 $A(600) = 0.8$ 时添加诱导剂，诱导 6 h 后菌体 $A(600)$ 达到 7.5，蛋白 A 的表达量达到最大，为 212.31 mg/L。因此，本文选择菌体 $A(600) = 0.8$ 时为诱导剂添加的最优时间点。

2. 2. 6 诱导时间对蛋白 A 表达的影响

诱导时间与蛋白质的表达量有一定的关系。一般来说，诱导时间越长，越有利于目的蛋白的积累。但是时间过长可能会产生一些酶和毒蛋白，使部分蛋白质发生降解^[25]。本研究分别诱导 6、8、10、12、14 h，菌体浓度与蛋白 A 的表达量结果如图 10 所示。可见，随着诱导时间的增加，菌体浓度与蛋白质表达量均呈现先升高后降低的趋势，当诱导至 8 h 时，菌体 $A(600) = 8.0$ ，蛋白 A 的表达量为 226.68 mg/L。因此，本文确定最优诱导时间为 8 h。

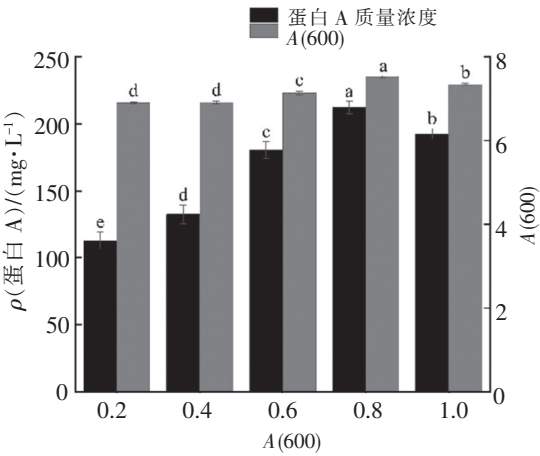


图 9 不同菌体浓度诱导对蛋白 A 表达的影响

Fig.9 The influence of induction on the expression of protein A at different bacterial concentrations

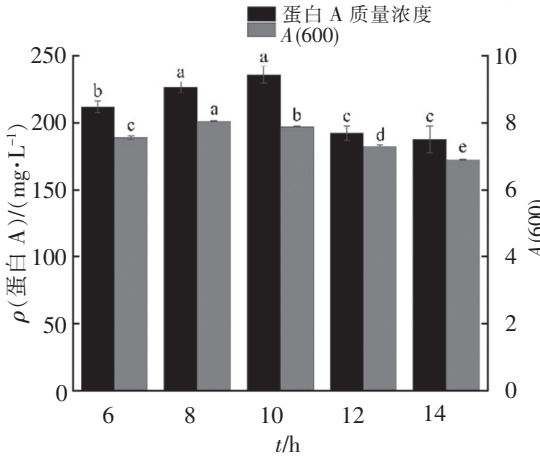


图 10 诱导时间对蛋白 A 表达的影响

Fig.10 The influence of induction time on the expression of protein A

2.3 培养基和发酵条件优化对蛋白 A 表达的影响

通过单因素实验优化培养基组分和培养条件后,蛋白 A 表达量和 A(600)结果如图 11 所示。可见,优化后蛋白 A 的表达量大幅提升,增加到优化前的 3.01 倍,菌体浓度 A(600)也增加到优化前的 3.51 倍。说明对培养基组分和培养条件的优化,既提高了菌体浓度,又提高了蛋白 A 的表达量。

2.4 30 L 发酵罐放大验证

与摇瓶发酵相比,发酵罐能够更好控制发酵条件,而且与实际生产方式更接近,更具有现实意义。因此,本实验最后利用 30 L 发酵罐来进行放大验证。图 12 的实验结果表明,在诱导时间为 0~8 h 时,随着时间的增加,菌体逐渐生长,蛋白 A 表达量也逐渐增加。在 8 h 时,蛋白 A 表达量最高能达到 232.36 mg/L,此时 A(600)=8.7,菌体干质量达 18.6 g/L;超过 8 h 后,菌体逐渐衰退,蛋白 A 表达量也逐渐减少。在 37℃ 诱导 8 h 后,蛋白 A 表达量、A(600)值和菌体干质量均为最高,与摇瓶水平优化结果一致。

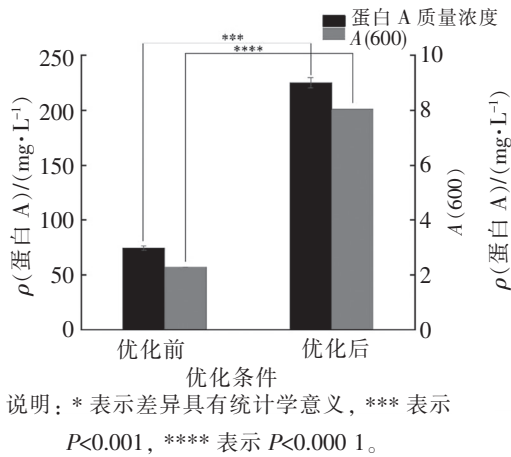


图 11 优化前后蛋白 A 质量浓度和菌体浓度的对比
Fig.11 Comparison of protein A mass concentration and bacterial concentration before and after optimization

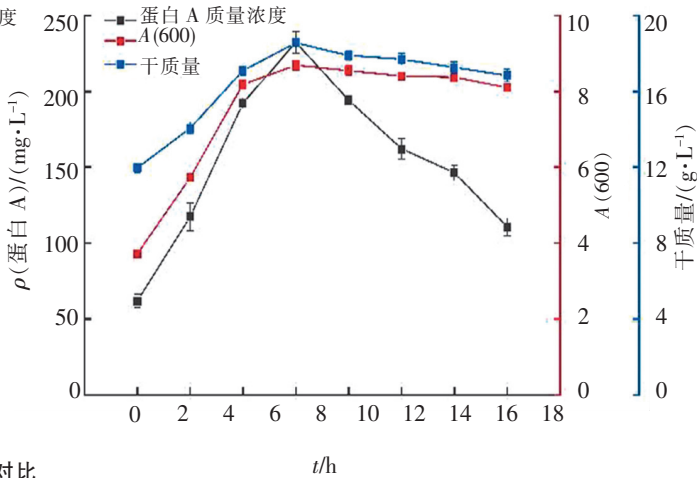


图 12 30 L 发酵罐放大培养结果
Fig.12 Scale-up culture results in a 30 L fermenter

3 结论

本研究通过单因素实验对重组耐碱性蛋白 A 的大肠杆菌工程菌株进行了发酵培养基组分和发酵条件优化,并进行了 30 L 发酵罐的放大实验。结果表明,得到的最优培养基组分为:蔗糖 8 g/L,大豆蛋白胨 12 g/L,酵母浸粉 24 g/L, KH_2PO_4 23.1 g/L, K_2HPO_4 125.4 g/L, $\text{pH}=7.0$;最优摇瓶发酵条件为:5% 接种量,40% 装液量,37℃ 培养至工程菌株 A(600)=0.8 时加入 0.3 mmol/L IPTG,37℃ 诱导 8 h,优化后的蛋白 A 表达量为优化前的 3.01 倍。

[参考文献]

[1] AMRITKAR V, ADAT S, TEJWANI V, et al. Engineering *Staphylococcal* protein A for high-throughput affinity purification of monoclonal antibodies[J]. *Biotechnology Advances*, 2020, 44:107632.

[2] ARORA S, SAXENA V, AYYAR B V. Affinity chromatography: a versatile technique for antibody purification[J]. *Methods*, 2017, 116:84-94.

[3] FARID S S. Process economics of industrial monoclonal antibody manufacture[J]. *Journal of Chromatography B*, 2007, 848(1):8-18.

[4] LINDMARK R, THORÉN-TOLLING K, SJÖQUIST J. Binding of immunoglobulins to protein A and immunoglobulin levels in mammalian sera[J]. *Journal of Immunological Methods*, 1983, 62(1):1-13.

[5] CEDERGREN L, ANDERSSON R, JANSOON B, et al. Mutational analysis of the interaction between *Staphylococcal* protein A

- and human IgG₁ [J]. Protein Engineering, Design and Selection, 1993, 6(4): 441-448.
- [6] LINHULT M, GÜLICH S, GRÄSLUND T, et al. Improving the tolerance of a protein analogue to repeated alkaline exposures using a bypass mutagenesis approach [J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2004, 55(2): 407-416.
- [7] 都晓君. 耐碱蛋白 A 的表达及相关蛋白的分离纯化研究 [D]. 大连: 大连理工大学, 2015.
- [8] 郭子豪. 高性能蛋白 A 亲和层析介质的制备、性能与应用研究 [D]. 无锡: 江南大学, 2024.
- [9] 劳才文, 吴金勇, 李忠奎, 等. 大肠杆菌合成 2'-岩藻糖基乳糖基因组整合型菌株构建及发酵优化 [J]. 安徽农业大学学报, 2024, 51(1): 124-131.
- [10] MOU M J, HU Q S, LI H B, et al. Characterization of a thermostable and surfactant-tolerant chondroitinase B from a marine bacterium *Microbulbifer* sp. ALW1 [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(9): 5008.
- [11] 姜正日, 殷仁凯, 王泽建, 等. 大肠杆菌表达高性能融合鲐鱼环齿-类弹性蛋白的发酵优化 [J]. 华东理工大学学报 (自然科学版), 2024, 50(1): 71-79.
- [12] 伊进行, 宗媛, 孙超, 等. 大肠杆菌利用不同碳源生产 N-乙酰神经氨酸的研究 [J]. 食品与发酵工业, 2024, 51(1): 18-25.
- [13] 李淑英, 侯丽真, 高雅鑫, 等. 枯草芽孢杆菌 BSNK-5 合成 γ -聚谷氨酸发酵工艺优化 [J]. 食品与发酵科技, 2023, 59(4): 14-19, 50.
- [14] 齐勇, 陈森林, 芮枝花, 等. 重组大肠杆菌产胍水合酶的发酵工艺研究 [J]. 安徽化工, 2022, 48(3): 81-84.
- [15] AVIGNONE ROSSA C A, YANTORNO O M, ARCAS J A, et al. Organic and inorganic nitrogen source ratio effects on *Bacillus thuringiensis* var. israelensis delta-endotoxin production [J]. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 1990, 6(1): 27-31.
- [16] 孙家凯, 吴晓娇, 史建明, 等. pH 值对大肠杆菌发酵异亮氨酸的影响 [J]. 食品与发酵工业, 2012, 38(3): 12-16.
- [17] 肖云, 陈洁. 重组大肠杆菌生产 *Taq* DNA 聚合酶发酵工艺优化 [J]. 粮油食品科技, 2023, 31(4): 154-161.
- [18] SHAHZADI I, AL-GHAMDI M A, NADEEM M S, et al. Scale-up fermentation of *Escherichia coli* for the production of recombinant endoglucanase from *Clostridium thermocellum* [J]. Scientific Reports, 2021, 11(1): 7145.
- [19] DUAN X G, HU S B, QI X H, et al. Optimal extracellular production of recombinant *Bacillus circulans* β -galactosidase in *Escherichia coli* BL21 (DE3) [J]. Process Biochemistry, 2017, 53: 17-24.
- [20] 名晓东, 郭自涛, 陈剑雄, 等. 重组大肠杆菌产卤代烷脱卤酶的发酵条件优化 [J]. 食品与发酵工业, 2022, 48(13): 16-24.
- [21] 谢颂洋, 顾正华, 郭自涛, 等. 重组表达 D-泛解酸内酯水解酶乳酸克鲁维酵母的发酵工艺优化 [J]. 食品与发酵工业, 2021, 47(23): 38-45.
- [22] 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.
- [23] MÜHLMANN M, FORSTEN E, NOACK S, et al. Optimizing recombinant protein expression via automated induction profiling in microtiter plates at different temperatures [J]. Microbial Cell Factories, 2017, 16(1): 220.
- [24] 张金红, 陈华友, 李萍萍. 基因工程菌发酵研究进展 [J]. 生物学杂志, 2012, 29(5): 72-75.
- [25] 张萍, 施磊, 郭昌明, 等. 绿色荧光蛋白在大肠杆菌中的表达条件优化、纯化及鉴定 [J]. 江苏农业科学, 2012, 40(9): 22-25.

(责任编辑 马建华 英文审校 刘静雯)