

# 透明颤菌血红蛋白基因表达对金色链霉菌 生长代谢的影响\*

孟 春<sup>1,2</sup> 叶 勤<sup>2</sup> 邱 荔<sup>1</sup> 石贤爱<sup>1</sup> 苏文金<sup>3</sup> 郭养浩<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup>福州大学生物与食品科学工程系 福州 350002)

(<sup>2</sup>华东理工大学生物反应器国家重点实验室 上海 200237)

(<sup>3</sup>厦门大学生命科学学院 厦门 361005)

**摘 要** 利用四环素抗性基因启动子在金色链霉菌中表达透明颤菌血红蛋白基因。在 1m<sup>3</sup> 发酵罐中研究了工程菌株的生长代谢特性。在溶解氧充足的条件下,透明颤菌血红蛋白表达,对金色链霉菌生长代谢未产生明显影响,工程菌株与参比菌株的生长代谢特性基本一致,工程菌株和参比菌株金霉素最终浓度分别为 22905u/mL、22896u/mL。在低溶解氧条件下,透明颤菌血红蛋白的表达,可促进金色链霉菌菌体生长、菌丝活力保持和金霉素的合成;工程菌菌体浓度比参比菌株高 5%~10%,产物合成提高 11.4%。

**关键词** 透明颤菌血红蛋白基因,金色链霉菌,溶解氧浓度,金霉素

中图分类号:Q786 文献标识码:A 文章编号:0001-6209(2002)04-0418-07

氧是好气性微生物进行能量代谢的重要物质,在正常状态下,空气中的氧在培养基中的溶解度大约只有 0.25mol/m<sup>3</sup> 左右,而培养液中的氧还须经过气膜、液膜、细胞团块、细胞膜等一系列传递过程最后进入细胞内到达呼吸链,此过程需要克服相当大的阻力<sup>[1]</sup>。传统的抗生素工业以及近年来发展的基因工程菌高密度培养,都遇到发酵设备的供氧能力与生产菌株对氧的需求量之间的矛盾。供氧已成为微生物工业中提高产品产量的主要限制因素之一。提高供氧水平,通常从设备和操作角度考虑,例如,改进发酵罐设计、通气搅拌优化配置、输入富氧或纯氧或加入化学物质增加液相中氧气的溶解度等<sup>[2]</sup>。这些方法都着眼于提高溶氧(DO)水平或气液传质系数,虽然有一定效果,但都不同程度地受到设备、能源或操作条件的制约,同时使发酵工业成为一个高能耗的工业。具有提高胞内氧传递效率的透明颤菌血红蛋白的研究为解决供氧限制提供了一条新的思路<sup>[2-4]</sup>。

透明颤菌血红蛋白基因(*Vitreoscilla* hemoglobin gene, *vhb*)的表达,能促进微生物细胞内氧的传输,提高氧的利用效率<sup>[3]</sup>。本研究在金色链霉菌中利用四环素抗性基因启动子(*Ptet*)表达透明颤菌血红蛋白基因,研究透明颤菌血红蛋白(*Vitreoscilla* Hemoglobin, *VHb*)表达对金色链霉菌生长代谢特性的影响。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

金色链霉菌菌株(*Streptomyces aureofaciens*)为本教研室保存,利用大肠杆菌—链霉菌穿

\* 福建省科委资助项目(99-H-46) \*\* 通讯联系人

作者简介 孟 春(1972-) 山东蒙阴县人,福州大学生物工程系讲师,华东理工大学在职博士研究生,主要从事生物化工及分子生物学方向的研究。

梭质粒为载体,采用四环素抗性基因启子表达 *vhb*(*vhb* 由中国科学院上海生物工程中心杨胜利院士馈赠)构建可表达 Vhb 的金色链霉菌工程菌<sup>[5]</sup>。

## 1.2 培养基

金色链霉菌斜面培养基:麸皮 25g,琼脂 20g,  $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$  0.5g,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2g,葡萄糖 10g,用水定容到 1L。

金色链霉菌种子培养基:玉米淀粉 40g,玉米浆 10g,黄豆饼粉 20g,蛋白胨 6g,酵母粉 3g,  $\text{CaCO}_3$  6g,  $\text{NaCl}$  2g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1g,  $\text{MgSO}_4$  0.1g,  $\alpha$  固体淀粉酶 0.01,用水定容到 1L。

发酵培养基:可溶性淀粉 70g,玉米浆 10g,黄豆饼粉 20g,蛋白胨 6g,酵母粉 3g,  $\text{CaO}_3$  6g,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.1g,  $\text{MgSO}_4$  0.1g,  $\text{NaCl}$  3g,植物油 2g,  $\alpha$  固体淀粉酶 0.05g,用水定容到 1L。

补料料液组成:玉米淀粉 350g,  $\text{NaCl}$  4g,  $\text{CaCO}_3$  4g,蛋白胨 3g,玉米浆 2g,  $\alpha$  固体淀粉酶 0.03g,用水定容到 1L。

## 1.3 培养方法

斜面培养:取 20 $\mu\text{L}$  甘油保存的金色链霉菌孢子悬液,接到斜面均匀划线后,32 $^\circ\text{C}$  培养 5d 后取出,放入 4 $^\circ\text{C}$  冰箱保存待用。

种子发酵:用无菌水洗涤斜面,制备孢子悬液,接入种子罐(150L 罐,消后培养基 100L),32 $^\circ\text{C}$  培养 22h 后接种至发酵罐。

金色链霉菌连续补料培养:发酵过程在 1 吨发酵罐中进行,装液量 550L,接种量 15% 左右。31 $^\circ\text{C}$  培养,发酵过程根据总糖浓度进行连续补料,总糖浓度控制在 2% ~ 3%。通过补 20% 的氨水,控制发酵液 pH 在  $5.9 \pm 0.1$ 。通过控制曝气速率和搅拌转速,进行培养过程溶解氧的调节。

## 1.4 分析测定方法

菌体浓度:采用离心法计量,取一定量发酵液,加入泡敌消泡后,350/min 离心 5min,计算固形物体积占总发酵液的比例

菌体粘度:玻璃毛细管粘度计测量(浙江宁波玻璃仪器制造厂)。

pH 及溶解氧(DO)在线监测采用耐高温消毒 pH 电极、溶氧电极(Mettler-Toledo)。

溶解氧电极的标定:纯水中通空气,氧达到饱和为 100%;用  $\text{N}_2$  排除纯水中氧,此时溶解氧浓度计为 0。

总糖及金霉素(CTC)、四环素测定参见参考文献<sup>[6,7]</sup>;透明颤菌血红蛋白表达测定:CO 吸收差光度法<sup>[8]</sup>;摄氧率测定:根据动态法测量<sup>[11]</sup>。

# 2 实验结果

## 2.1 金色链霉菌氧的利用特性

在发酵过程中,溶解氧的高低对金色链霉菌生长代谢特性有明显的影响<sup>[9]</sup>。在保证发酵过程溶解氧充足的条件下,研究了金色链霉菌发酵过程的摄氧率变化。

研究结果表明(图 1),在对数生长期(20h 左右),菌体的摄氧率达到最大即,3.5mmol/( $\text{m}^3 \cdot \text{s}$ ),发酵进入产物合成期,摄氧率显著降低。工程菌株与参比菌株相比,摄氧率的最大值基本一致,但工程菌株摄氧率最大值出现略迟于参比菌株。与参比菌株相

比,工程菌的生长延迟期有所延长。

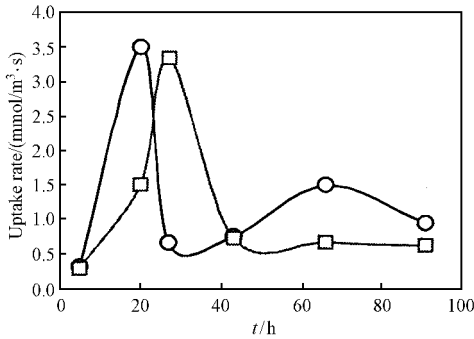


图1 高溶解氧条件下发酵过程金色链霉菌摄氧率

Fig.1 Uptake rate of oxygen in continuously feeding culture of *S. aureofaciens* in high dissolved oxygen concentrations

○ *S. aureofaciens* □ *S. aureofaciens* :Vhb.

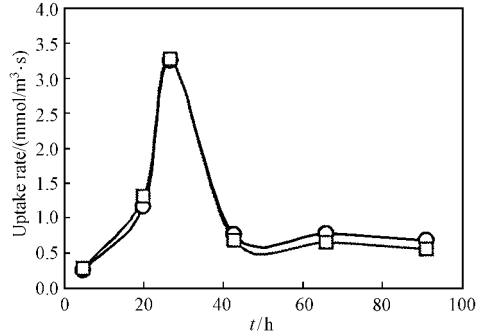


图2 低溶解氧条件下发酵过程金色链霉菌摄氧率

Fig.2 Uptake rate of oxygen in continuously feeding culture of *S. aureofaciens* in low dissolved oxygen concentrations

○ *S. aureofaciens* □ *S. aureofaciens* :Vhb.

在发酵中后期,工程菌株的摄氧率明显低于参比菌株。VHb的表达,提高了氧的传递速率,氧利用效率增加,可能致使工程菌的摄氧率低于参比菌株。在发酵中后期(65h左右)与工程菌株相比,参比菌株出现一小的摄氧率高峰(1.5mmol/(m<sup>3</sup>·s))。表明参比菌株可能出现二次生长现象。而工程菌的摄氧率在整个发酵中后期较平稳,维持在0.65mmol/(m<sup>3</sup>·s)左右。

在低溶解氧条件下(15%),工程菌株的摄氧率与参比菌株基本一致(图2)。发酵前期(对数生长期)与正常溶解氧条件的参比菌株相比,低溶解氧条件下的参比菌株延迟期有所增长;工程菌株与正常溶解氧条件的耗氧特性相比,未出现明显差异,这表明参比菌株呼吸代谢特性受溶解氧变化影响的程度更大。

## 2.2 VHb的表达对正常发酵过程金色链霉菌的影响

在金霉素发酵过程中,控制溶解氧浓度高于30%,研究在高溶解氧的条件下,VHb的表达对金色链霉菌生长代谢特性的影响。

2.2.1 菌体生长特性:实验结果表明,在溶解氧较高的条件下,VHb可以正常的表达(CO<sub>2</sub>吸收差光数据未列出)。VHb的表达,未对金色链霉菌的生长产生明显的影响(图3)。但中后期,工程菌的菌浓略低于参比菌株。

在链霉菌发酵过程中,菌丝粘度是衡量菌体活力的一个重要指标。当菌丝活力较高时,金色链霉菌菌丝相互交织在一起,呈网状结构,发酵液的粘度较高。当菌丝出现老化或其他异常现象,导致菌丝断裂变短,交织能力降低,则发酵液粘度变小。图3表明,发酵中后期工程菌菌量虽略低于参比菌株,但菌丝粘度在发酵中期明显高于参比菌株,说明工程菌的菌丝在发酵中期仍可保持较好的形态及活力。

2.2.2 糖的消耗及产物合成:金霉素发酵过程中,淀粉是主要的碳源物质。在溶解氧充足的发酵过程中,工程菌株与对照菌株的淀粉消耗速度基本一致(图4)。在中后期(71~89h),工程菌株对淀粉消耗的速度略高于对照菌株,工程菌株的活力高于对比菌株,可能

是其底物消耗速度略同的主要原因。

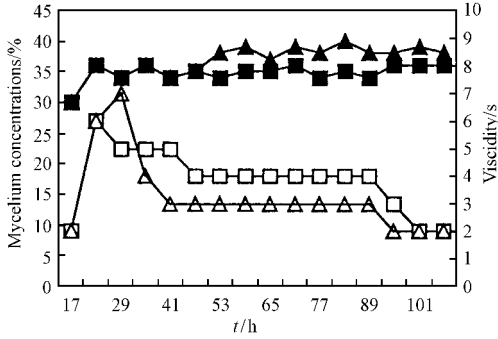


图 3 正常发酵过程菌体生长对比

Fig.3 Comparison of mycelium growth in fermentation of *S. aureofaciens*

Mycelium concentrations :▲ *S. aureofaciens* ;■ *S. aureofaciens* ;Viscosity :△ *S. aureofaciens* □ *S. aureofaciens* :vhb .

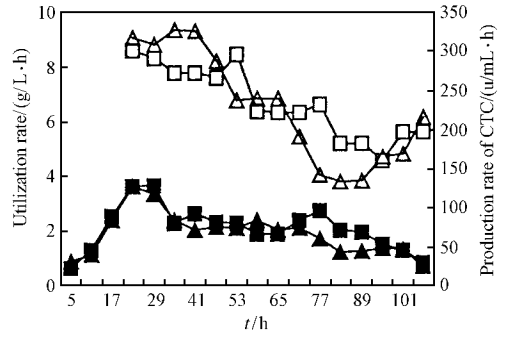


图 4 在正常溶解氧状态下底物消耗和产物合成

Fig.4 Utilization rate of starch and production rate of CTC in high dissolved oxygen concentrations

Absorption rate of starch :△ *S. Aureofaciens* □ *S. aureofaciens* :vhb ;Production rate :▲ *S. Aureofaciens* ;■ *S. aureofaciens* :vhb .

在金色链霉菌生长对数期的后期,胞内金霉素开始大量合成。在 23h 左右,金霉素达到最大合成速率,随着发酵进行,金霉素的合成速率缓慢下降,到发酵末期,金霉素合成速率略有回升。从发酵过程产物合成的对比表明,在发酵中前期工程菌株的产物合成速率略低于参比菌株,发酵中后期,工程菌株保持较为稳定的产物合成速率,金霉素合成速度高于参比菌株。在发酵结束时,工程菌和参比菌株的金霉浓度分别为 22905u/mL、2289u/mL(表 1),基本一致,未产生明显差别;工程菌的副产物四环素浓度略高于参比菌株。

表 1 金色链霉菌发酵终产物浓度

Table 1 Product concentration of *S. aureofaciens* fermentation process

Strains	Chlortetracycline( u/mL )	Tetracycline( u/mL )
<i>S. aureofaciens</i>	22896	1896
<i>S. aureofaciens</i> :vhb	22905	2115

2.3 在低溶解氧条件下金色链霉菌生长代谢特性的研究

在发酵过程中,通过调节搅拌转速和曝气速率,将溶解氧浓度控制在 15% 左右。在低溶解氧条件下,研究 Vhb 表达对金色链霉菌生长代谢特性的影响。

2.3.1 菌体生长特性:实验结果表明(图 5),在整个发酵过程中,工程菌的菌体浓度高于对照菌株。在低溶解氧的条件下,Vhb 的表达对菌体生长有着明显的促进作用。在整个发酵过程,工程菌株的菌体浓度比参比菌株的菌体浓度高 5% ~ 10%。

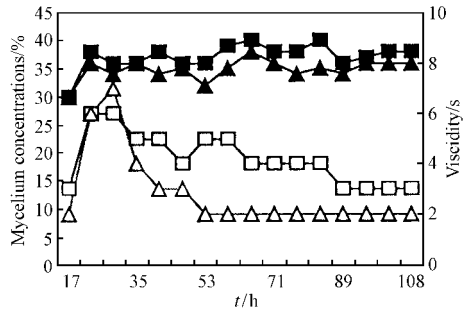


图 5 低溶解氧下发酵过程菌体生长对比

Fig.5 Comparison of mycelium growth in fermentation in lower dissolved oxygen concentrations

Mycelium concentrations :▲ *S. aureofaciens* ;■ *S. aureofaciens* :vhb ;Viscosity :△ *S. aureofaciens* ;□ *S. aureofaciens* :vhb .

从发酵过程菌体的粘度变化结果(图 5)可以看出,发酵中后期,对照菌株的粘度迅速

降低至 2s,而工程菌株在发酵中后期可保持较高的粘度,表明菌体可保持一定的活力。发酵中期菌丝形态的对比表明(图 6,7),工程菌株的菌丝粗壮,菌丝长,交联状态较好,参比菌株的菌丝内空泡比工程菌株多,菌丝偏短,断裂菌丝多,交联度低于工程菌株。

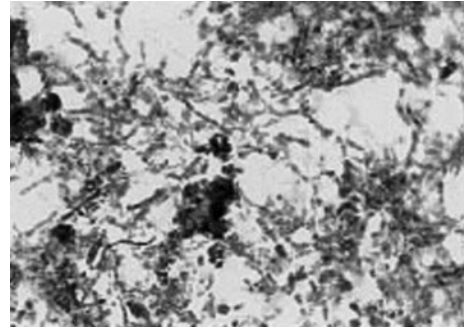
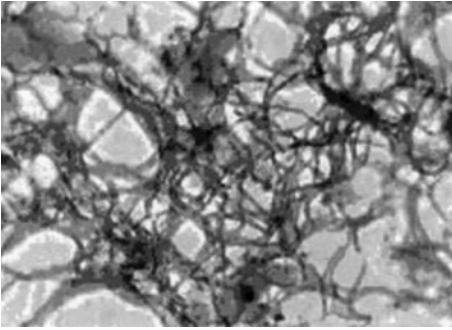


图 6 低溶解氧下工程菌菌丝形态(41h)

图 7 低溶解氧下参比菌株菌丝形态(41h)

Fig.6 Mycelium of *S. aureofaciens* :vhb in lower dissolved oxygen concentrations (41h)

Fig.7 Mycelium of *S. aureofaciens* in lower dissolved oxygen concentration (41h)

**2.3.2 糖的消耗及产物合成** 低溶解氧条件下,在发酵中前期,工程菌株与对照菌株的底物代谢特性保持一致(图 8);进入发酵中期,对照菌株的糖代谢速度略高于工程菌株;发酵后期,对照菌株的活力降低,底物消耗速度低于工程菌株。

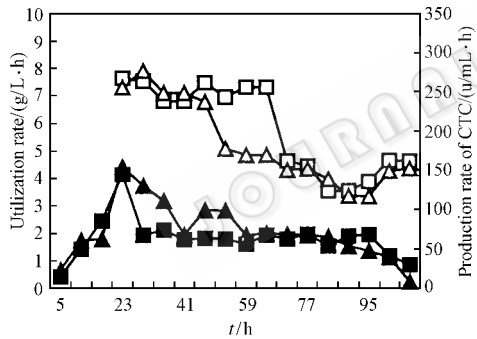


图 8 在低溶解氧状态下底物消耗和产物合成

Fig.8 Utilization rate of starch and production rate of CTC in lower dissolved oxygen concentrations

Absorption rate of starch :△*S. Aureofaciens* □*S. aureofaciens* :vhb ;Production rate :▲*S. Aureofaciens* ;■*S. aureofaciens* :vhb .

与正常溶解氧条件下的发酵过程相比,15%的溶解氧条件下,工程菌株和参比菌株的金霉素合成速度有一定程度地降低(图 8),其中参比菌株的降低幅度更显著。在低溶解氧条件下的整个发酵过程中,工程菌株的金霉素合成速度高于参比菌株。在发酵中期,工程菌株的产物合成速度比对照菌株高约 15%。在发酵前期和后期,工程菌株的产物合成速度虽高于参比菌株,但不显著,说明 vHb 的表达,在一定程度上降低了低溶解氧对金色链霉菌代谢特性的影响,提高了金霉素的合成速度。

发酵结束时,工程菌株的金霉素浓度为 21060u/mL,比对照菌株产量(18905u/mL)提供 11.4%(表 2)。

表 2 不同溶解氧条件下金色链霉菌发酵终产物浓度

Table 2 Product concentrations of *S. aureofaciens* fermentation process in different DO concentrations

Strains	Chlortetracycline( u/mL )		Tetracycline( u/mL )	
	High DO	Low DO	High DO	Low DO
<i>S. aureofaciens</i>	22896	18905	1896	1890
<i>S. aureofaciens</i> :vhb	22905	21060	2115	2067

### 3 讨论

在金色链霉菌中表达 Vhb,可促进氧在胞内的传输,降低溶解氧对代谢过程的影响。实验结果表明(表 2),工程菌株在低溶解氧条件下产物最终浓度比正常溶解氧条件下降低 8%,而参比菌株在低溶解氧条件下产物浓度比正常状态下降 17.4%。

从氧的利用特性(摄氧率)、碳源消耗速度和金霉素合成的对比可以看出,在溶解氧较为充足的条件下,工程菌株在起始阶段的生长代谢速度略低于参比菌株。是否由于 Vhb 的表达影响了金色链霉菌初始阶段的生长代谢,尚待进一步研究。

在溶解氧充足的条件下,发酵中后期工程菌的菌丝量略低于参比菌株。Minas<sup>[4]</sup>在将 *vhb* 转入红霉素产生菌 *Sacchroplysora erythraea* 后,在发酵中后期,也观察到工程菌菌株的蛋白含量低于参比菌株的现象。Minas 认为 Vhb 的表达可能对菌体的生长过程产生了一定程度的影响。但菌丝粘度变化和菌丝形态观察结果表明,Vhb 的表达有助于菌体在中后期保持稳定的活力,保证产物在中后期的合成速度。

低溶解氧条件下(15%),在发酵前期,溶解氧浓度变化对工程菌株和参比菌株的影响相对较小(图 3~5);进入发酵中后期,金色链霉菌生长代谢受溶解氧的影响变大,Vhb 的表达对菌体的生长和产物代谢有了明显的促进作用,菌体浓度提高 5%,产物浓度提高 11.4%。

上述这种变化可能同金色链霉菌在不同发酵时期胞内的生理状态有关:对数生长期,金色链霉菌胞内负责能量生成的电子传递酶系活力或酶量较高,因此细胞对氧有较高的传递速率和利用效率,Vhb 表达与否,对金色链霉菌生长代谢影响较小;发酵进入产物合成期,胞内的生理状态发生改变,负责氧利用的电子传递链酶系的活力降低,氧的传递速率受到影响,此时氧的传递在很大程度上可能靠胞内外的氧分压差作为动力实现。而氧为一种难溶气体,所提供的分压差较小,因此胞内氧传递速率较低,此时无论在低溶解氧或高溶解氧(30%~50%)条件下,Vhb 表达,都可提高氧的传递效率,有利于增强菌体的生长和产物代谢。

### 参 考 文 献

- [1] 俞俊棠,唐孝宣.生物工艺学(下册).第二版.上海:华东理工大学出版社,1992.
- [2] 吴奕,杨胜利.生物工程学报,1996,12(2):177~182.
- [3] 于慧敏,沈忠耀.微生物学报,1999,39(5):478~482.
- [4] Minas W,Brinker P,Kallio P T. et al. *Biotechnol Prog*,1998,14:561~566.
- [5] 孟春,叶勤,邱荔,等.微生物学报,1998,39(3):305.
- [6] 中华人民共和国卫生部药典委员会.中华人民共和国药典(二部).北京:化学工业出版社,1990.458~460,506~507.
- [7] 袁玉荪,朱婉华,陈钧辉.生物化学试验.北京:高等教育出版社,1990.
- [8] 朱怡非,朱家宝,朱宝泉.中国医药工业杂志,1998,29(6):253~257.
- [9] Liefke E,Kaiser D,Onken U. *Appl Microbi Biotechnol*,1990,32:674~679.

## Study on Effect of *Vitreoscilla* Hemoglobin Gene Expression on Growth and Metabolism of *Streptomyces aureofaciens*\*

Meng Chun<sup>1,2</sup> Ye Qin<sup>2</sup> Qiu Li<sup>1</sup> Shi Xian'ai<sup>1</sup> Su Wenjin<sup>3</sup> Guo Yanghao<sup>1\*\*</sup>

(<sup>1</sup> Department of Biotechnology and Food Science, Fuzhou University, Fuzhou 350002, China)

(<sup>2</sup> State Key Laboratory of Bioreactor, ECUST, Shanghai 200237, China)

(<sup>3</sup> College of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** *Vitreoscilla* hemoglobin Gene was expressed in *S. aureofaciens* through promoter of tetracycline resistance gene. Characteristics of *S. aureofaciens* growth and metabolism were studied in 1m<sup>3</sup> fermenter. In high dissolved oxygen concentrations, expression of hemoglobin gene had little effect on growth and metabolism of *S. aureofaciens*, and there were no obvious differences between engineering strain and control. The chlortetracycline of engineering strain was 22905 u/mL and of control was 22896 u/mL respectively. Under conditions of low dissolved oxygen, expression of hemoglobin enhanced growth, maintenance of energetic mycelium configuration and chlortetracycline yield of *S. aureofaciens*; the mycelium concentrations of engineering strain were more about 5% ~ 10% and yield was more 11.4% than control.

**Key words:** *Vitreoscilla* hemoglobin Gene, *Streptomyces aureofaciens*, Dissolved oxygen concentration, Chlortetracycline

\* Project supported by Fujian Kewei(99-H-46)

\*\* Correspondence author

## 致 读 者

感谢广大作者、读者多年来对《微生物学报》的关心和支持。为了使您的科研成果尽快得到交流,本刊2003年每册增加到144面。全部道林纸印刷,内附进口铜版纸印制的黑白图版和彩色图版。发表周期更短,内容丰富翔实,能及时反映我国微生物学科前沿和最新研究水平。在新的一年里《微生物学报》将更好的为科研工作者服务,为促进科技资源信息化最大限度的共享做出积极贡献。

欢迎投稿!欢迎订阅!欢迎提出宝贵意见!

《微生物学报》编辑部