

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

枯草桿菌屬細菌群體計劃-枯草桿菌屬細菌發酵系統之研究

計畫編號：NSC 88-2316-B-009-001-B19

執行期限：87年8月1日至88年7月31日

主持人：曾慶平 執行機構：交通大學生物科技研究所

一、中文摘要

過去的研究得知，*Bacillus subtilis* 有很多的優點，並適合基因重組蛋白質產品生產用。本論文研究目的是為了提高 *Bacillus subtilis* 發酵產物的產量，使達到工業化生產水準。我們同時也進行菌株突變以獲得更適合之菌種，並改造質體使其在菌株內的穩定性上升。從搖瓶式發酵培養枯草桿菌的實驗中得知氮源（酵母抽出物）為百分之一酵母抽出物及最佳的鹽類添加起始濃度為 NaCl 0.3g/l、K₂HPO₄ 0.4g/l、CaCl₂ 0.2g/l、MgSO₄ 0.5g/l、FeSO₄ 30mg/l、MnSO₄ 20mg/l。進一步在發酵槽中用上述之條件進行大量培養，並以電腦控制葡萄糖、酵母抽出物及各種鹽類的進料速率。當 D.O. 值保持在 10~20% 之間，在精密的控制下進行饋料培養，可得到最高的菌體濃度，其 OD₆₀₀ 可達 154，菌體乾重(biomass)可達 54 g/l。另一方面，為了保護重組 DNA 所表現的蛋白質不被破壞，因此構築 *recE* 的突變株。我們取得 Km^r 及 Cm^r 基因並將兩基因分別插入正常 *recE* 基因中使其失活。再把失活 *recE* 送入 DB430 中行 double crossover recombinant，將正常的 *recE* 基因換掉，得到含 Cm^r 的 *recE* 突變株。此外本研究中外來表現蛋白質為口蹄疫病毒之表面蛋白 VP1 及 VP3，分子量均為 25kDa。從蛋白質電泳圖得知 VP1 及 VP3 均有表現，其中 VP3 在 DB430 中經饋料式發酵可得到每公升 1.4 克的蛋白表現。另外已知 Restriction - Modification system 有助質體穩定，我們已從 *E. coli* RY13 取得 EcoRI 之 R-M system 1,2,3,4，並轉殖到質體。

關鍵詞：枯草桿菌、饋料式發酵

Abstract

Bacillus subtilis has many advantages for biotechnology that including nonpathogenic, easy to cultivate, store and secrete proteins. Therefore, it has been used to product the recombinant DNA proteins. The goal of this study is to improve the biomass as well as recombinant proteins production ability in *Bacillus subtilis*. In order to obtain the high cell density, the optimization of fed-batch culture was studied. The experiment was carried out by using glucose as carbon source and yeast extract as nitrogen source. The parameters of control fermentation have been examined which includes how to manipulate carbon and nitrogen sources feeding stratagem, agitation and aerate, as well as trace elements supply. The results showed that the optimal glucose concentration is 0.5%(w/v), and the yeast extract using rate is 1%(w/v) when O.D.₆₀₀ value increased 8 g. When *Bacillus subtilis* DB430 grew in 2.5L fermenter at 37- and 700rpm of stir rate and agitation of 50% of oxygen into culture, the cell density was as high as 154 (O.D.₆₀₀) and the cell dry weight (biomass) achieved to 54g/l. The highest expression of recombinant VP3 protein was 1.4g/l in fed-batch culture at 37- , 700rpm of stir rate. To protect the recombinant proteins, a *recE* mutant was also construct in *Bacillus subtilis* DB430.

Keywords: *Bacillus subtilis*, fermentation

二、緣由與目的

Bacillus spp. 為格蘭氏陽性的桿狀細菌。現今有許多不同的 *Bacillus spp.* 已用於生產多種水解酵素，如 *amylase*, *protease*, *isomerase* 等。因為枯草桿菌具有上述等特性及分泌胞外酵素的能力而且產物回收容易，所以本研究的目標是希望藉由基因工程的方法，發展出生物製劑或優良菌株，並達成以枯草桿菌進行基因重組蛋白質產品之生產。

為了利用枯草桿菌作為基因重組蛋白質的生產菌株，因此我們將以研究枯草桿菌宿主醱酵系統為目標，首先將探討宿主醱酵最適條件與質體在生長過程中之穩定性，以及孢子形成的情形，並且構築 *recE* 基因的枯草桿菌突變株以避免外來蛋白質變異(5)。接著以分批式醱酵與饋料式醱酵培養枯草桿菌，最終目的在於獲得高菌量，以利於重組蛋白質的大量表現。此外為了使枯草桿菌 (*Bacillus subtilis*) 的發酵能達到工業化生產水準，可在已知最佳的碳源及氮源搭配下來調控發酵條件。例如不同的發酵方式、攪拌速率、通氣量、添加各種鹽類濃度及碳氮源濃度等，或利用電腦操作來達到自動化控制高密度發酵的目的。本研究的目標是提高 DNA 重組蛋白質所表現的質與量，以能達到生產的水準。

三、結果

1. *B. subtilis* 最適培養基組成之探討

為了瞭解在何種碳源與氮源組合培養下 *B. subtilis* 可以得到最高的菌體濃度，因此在完成將 DB428 培養於以葡萄糖為碳源並搭配不同的氮源，及以 *yeast extract* 做為氮源，再搭配其他碳源所組成

的基本培養基中，進行分批式培養後，得知在碳源的部分，枯草桿菌以葡萄糖、果糖 (*fructose*) 及蔗糖 (*sucrose*) 培養時，產生孢子的情形較不明顯。而不同的氮源中則以 *soytone*、*polypeptone* 及 *yeast extract* 培養 DB428 可以得到較高的菌體濃度，因此以此三種碳源與氮源相互組合，配製培養基再次進行菌體培養。在培養五個小時後可發現不同氮、碳組合所測得菌體之生長曲線差異不大，但其中以 *soytone* 及葡萄糖為碳源與氮源的組合測得的菌體濃度較高。因此在以後的實驗中，都以 *soytone* 及 *yeast extract* 為主要氮源以進行在醱酵槽中的培養實驗。

2. 溶氧量、溫度及 pH 等培養條件對 *B. subtilis* 生長的影響

B. subtilis 為一好氧菌株，因此進行分批式培養時，培養基中的溶氧值將會直接影響其生長，因此在實驗中改變培養菌體時的震盪速率以改變培養基中的溶氧值。當 DB428 分別以 200 rpm 及 100 rpm 兩種轉速進行分批式培養，得知當轉速為 200 rpm 時，DB428 的生長情形較轉速為 100 rpm 時好，因此可得知溶氧值越高，DB428 生長情況越好。

另外培養時的溫度亦會對菌體的生長會造成影響，本實驗將 DB428 分別以 25°C、30°C 及 37°C 三種不同溫度進行分批式培養，結果可以發現在 37°C 培養下 DB428 時，其生長情況較佳，而以 25°C 時則最差，此結果不論在以 *soytone* 及 *yeast extract* 為氮源時都相同。生長在 pH 7 培養基中測得菌體濃度較高，而在 pH 6.5 的培養基中菌體生長最差。

3. 不同碳源與氮源對 *B. subtilis* 質體穩定性 (plasmid stability) 的影響

整體來看，在不同的養分培養下，質體 pUB110 穩定性最高，而 pE194 的穩定性最差。另外氮源中以 tryptone 培養菌體時，質體穩定性普遍偏低，穩定性在 50% 以下，而同樣培養 60 代後，質體 pUB110 及 pC194 穩定存在於宿主 DB430 的比例較培養於 DB428 高。

4. 比較枯草桿菌 DB428 與 DB430 饋料式發酵之生長

DB430 和 DB428 在遲滯期之生長並無差別，但一進入指數期 (log phase) DB430 的生長速率快過於 DB428，而且持續生長的時間也較久。由此實驗可確定 DB430 沒有因為多突變一個蛋白酶基因，而對生長有負面的影響，反而使生長更快。

5. 枯草桿菌之最適化發酵條件探討

我們分別調整一些反應條件，其中包含有攪拌速率、通氣速率、通入氣體的含氧量、碳、氮源的給料方式、時間、及濃度、鈉、鉀等金屬離子的用量。實驗以 O.D.₆₀₀ 與時間的關係作圖，來觀察調整各別條件後之不同。其間所使用的培養基為基礎培養液，碳、氮源的起始濃度分別為 2% (W/V) 及 5% (W/V) 之葡萄糖及酵母抽出物，培養的條件為 37°C、pH7、及接入繼代培養至指數期的種菌，使發酵起始條件由 O.D.₆₀₀ 值為 0.1 開始，其他的條件

則逐次改變，以達到最高菌體密度的目的。

以 DB428 為例，將它培養在 600 rpm 及 700 rpm 下，可以看到明顯的生長差異。在兩種轉速下 O.D.₆₀₀ 最高值都是出現在第十三個小時，但在菌量方面 700 rpm 比 600 rpm 約高出了 20% 左右，最終總量數方面 700 rpm 為每公升 22 克比 600 rpm 為每公升 16 克多了 30% 左右，由此可見攪拌速率對細菌的生長有很大的影響。

由此原則來做為進行饋料發酵時氮源添加的依據。結果顯示 O.D.₆₀₀ 值從原來只在第六個及第十個小時分別加入 1% (W/V) 的酵母抽出物的 100 左右，提高到了 150 左右，乾重也從 28 克上升到 54 克，而菌數也上升了 30% 倍。

6. 構築 *recE* 突變株

在本實驗室過去的研究中，已成功的取得含 Cm^r 與 Km^r 基因為 marker 的 *recE* 突變基因，並已將其轉殖到 pUB110 上。本實驗中則以 double cross-over recombinant 方法成功的將含 Cm^r 基因的 *recE* 突變基因交換至野生 DB430 菌株的染色體上。

7. 葡萄糖濃度對 DB430 發酵之影響

我們利用葡萄糖線上測定儀來控制發酵，使發酵過程中葡萄糖濃度保持一定，觀察高低葡萄糖濃度下對細菌生長的影響。實驗以 1.5 公升的發酵槽進行。從結果中觀察到葡萄糖濃度維持在每公升 5 克

的操作下所得O.D.₆₀₀ 為140、菌體乾重為每公升42克，葡萄糖濃度維持在每公升10克的O.D.₆₀₀ 為118、菌體乾重為每公升29克，依D.O.值變化饋料加入葡萄糖發酵的結果O.D.₆₀₀為133、菌體乾重為每公升43克。

8. 不同發酵條件對 DB430 發酵之影響

不同發酵條件與方式對菌體密度有著很大的差異。批次式發酵所能得到的菌體濃度比饋料式發酵少了百分之二十，雖然兩者所使用的葡萄糖及酵母抽出物之總量是一樣的。這情況也出現在使用百分之五十的氧氣上，同樣是以饋料式發酵但最後的菌體濃度當使用百分之五十的氧氣時比用空氣高出了百分之三十菌體濃度。

9. 蛋白質(VP1 及 VP3)的表現

本實驗使用的質體有兩個來源，一是 pUB110 帶有可表現口蹄疫表面蛋白(VP3)的基因，另一個是 pQE30/VP1 及 pDH87-VP1-R，兩者都帶有可表現口蹄疫表面蛋白(VP1)的基因。將不同培養方式及不同質體進行培養後，將收集的菌體以 lysozym 將枯草桿菌溶破以 12000 xg 離心，取得粗抽蛋白質。以蛋白質測定法定出每個樣品的總蛋白量，並取等量的粗抽蛋白質進行 SDS-PAGE 之電泳分析，由於 VP3 蛋白質分子量約 25 kDa，而 VP1 蛋白質分子量也大約是約 25 kDa。從電泳分析結果可以得知，DB430 和 DB428 在不同培養方式下搭配不同質體都可產生質量約 25 kDa 之 VP1 與 VP3 蛋白質。

四、討論

1. 不同氮源及碳源對 *B. subtilis* 生長的影響

將 DB428 培養於不同氮碳源的組合下，可發現以 soytone、yeast extract 配合其他碳源所得到的菌體濃度較高。所以在分批式與饋料式培養中，決定分別以 yeast extract、soytone 及葡萄糖為最適培養基組成用來培養 *B. subtilis*，以得到最高之菌體濃度。

2. 溶氧量、溫度及 pH 等培養條件對 *B. subtilis* 生長的影響

首先溶氧量部分，在震盪培養箱中以 200 rpm 的震盪速度培養 DB428 時，其生長情形較 100 rpm 下為佳。在培養溫度方面，則以 37°C 為 *B. subtilis* 之最適生長溫度，此外在不同 pH 值培養下，雖然緩衝培養液的 pH 值在滅菌後可能有些許變化，但大致上仍以 pH 7.0 左右為最佳培養條件。

3. 不同碳源與氮源對 *B. subtilis* 產孢 (Sporulation) 的影響

由結果發現當以葡萄糖為碳源時，在添加不同的氮源培養 *B. subtilis* 時，其產孢的情形都不明顯，可能是因為葡萄糖存在時會抑制孢子的形成 (catabolic repression) (6)。而以 yeast extract 為氮源時，加入不同碳源培養下，僅以 maltose 與 澱粉 (starch) 為碳源培養時，生成孢子的情形較為明顯，但與總菌數比較，孢

子生成所佔的比例仍相當低。

4. 不同碳源與氮源對 *B. subtilis* 質體穩定性 (plasmid stability) 的影響

從實驗結果可知質體 pUB110 無論在培養 30 或 60 代後，其質體的存在比例皆在 50% 以上，甚至大部分均在 80-100% 之間，除了以 tryptone 為氮源測得之穩定性較低以外，在其餘的培養基組成中測得的穩定性皆很高，此結果不論是以 DB428 或 DB430 為宿主時皆相同。事實上，由文獻可知質體 pUB110 無論有無抗生素存在，培養 80 代後，在菌體中仍可含有 50 個 copy number (7)，因此為一相當穩定存在於 *B. subtilis* 菌體中之質體。

5. 饋料方式對枯草桿菌 DB430 發酵之影響

葡萄糖的饋料是以 D.O. 值及 pH 值的變化來控制，當細菌進行呼吸作用時代謝最快的就是葡萄糖，而且會產醋酸。當葡萄糖不足時呼吸作用停止，D.O. 值就會快速上升，pH 值也隨即上升。所以在 D.O. 值快速上升之際必須馬上補充葡萄糖，如補充過慢將導致細菌停止生長。根據結果我們知道在饋料式發酵中，葡萄糖的最低濃度為百分之 0.3 到百分之 0.5 (w/v) 之間。因此利用線上葡萄糖測定儀，將葡萄糖的濃度控制在 5 g/L 及 10 g/L 上下進行發酵，此外低濃度葡萄糖的發酵成果比高濃度葡萄糖好的發酵成果。當低濃度葡萄糖發酵所得的 O.D.₆₀₀ 值為 118、菌體乾重為 29 克，以高濃度葡萄糖發酵所得的 O.D.₆₀₀ 值為 140、菌體乾重為 41 克，D.O.

控制加入葡萄糖之酵所得的 O.D.₆₀₀ 值為 133，菌體乾重為 43 克。比較之間的差異可得知高濃度葡萄糖會影響菌體的生長，使最終的產量下降。因此推論高濃度葡萄糖會導致枯草桿菌產生抑制生長的物質，菌體濃度越高所產生的量越多，這種抑制效應是在 O.D.₆₀₀ 值為 70 左右才出現。但在進行高濃度葡萄糖 1% (w/v) 發酵時，細菌的生長遲滯期比較短，較早進入指數期，這表示可在饋料式發酵初期供以 1%~2% (w/v) 的葡萄糖，在 O.D.₆₀₀ 值升至 50 左右時將葡萄糖濃度降至 0.5% (w/v) 以下，以得到比現在更高的產量。

6. VP3 及 VP1 蛋白質的表現

在 VP3 及 VP1 蛋白質的表現方面，由結果可知以饋料式培養在不同的培養條件下所得之菌體皆有此二分子量之蛋白質表現。但我們需要 VP3 及 VP1 的抗體作進一步 western blotting 來證實及計算產量，以分子量 25kDa 之蛋白質電泳圖約略估計每一公升發酵液可得 1.4 克 VP3 蛋白質。

五、參考文獻

- [1] Kulakauskas, S., A. Lubys, and S.D. Ehtlich., J. Bacteriol., 177(12):3451-3454, 1995.
- [2] Lubys, A., A. Janulaitis, Gene. 157:25-29, 1995.
- [3] Naito, T., K. Kusano, and I. Kobayashi, Science, 267(10):897-899, 1995.
- [4] Yarmolinsky, M.B., Science, 267(10):836-837, 1995.
- [5] Ceglowski, P., G. Luder, and J. C. Alonso.

1990. Genetic analysis of *rec E* activities in *Bacillus subtilis*. *Mol. Gen. Genet.* 222:411-445.
- [6] Kobayashi, Y. 1989. Sporulation of *B. subtilis*. *Bacillus subtilis: Molecular Biology and Industrial Application*. p.43-54.
- [7] Lovett, L. M., JR., P. E. Love, and R. E. Yasbin. 1989. Competence-specific induction of the *Bacillus subtilis* *recA* protein analog: evidence for dual regulation of a recombination protein. *J. Bacteriol.* 171:2318-2322.