

重组大肠杆菌表达人源胰岛素的发酵工艺优化及产物纯化效率提升

聂子雨

青岛大学 山东青岛 266071

摘要: 人源胰岛素作为治疗糖尿病的关键药物,其规模化、高效化生产对于临床应用具有重要的意义。目前重组大肠杆菌因繁殖速度快、培养成本低、基因操作便捷等优势,已经成为了表达人源胰岛素的主要宿主菌株。本文主要针对重组大肠杆菌表达人源胰岛素过程中存在的发酵密度低、目的蛋白表达量不足、产物纯化纯度与收率偏低等问题,从发酵工艺参数优化、培养基配方改良、诱导条件调控三个维度系统地探讨了发酵工艺优化策略,并从分离纯化工艺整合、纯化介质筛选、杂质去除技术创新等方面入手提出了产物纯化效率提升路径。相信通过系列优化措施,能够提高重组大肠杆菌的人源胰岛素表达水平,并增强纯化过程的稳定性与高效性,进而为工业化大规模生产提供理论依据与技术支持。

关键词: 重组大肠杆菌;人源胰岛素;发酵工艺优化;产物纯化;表达效率

1. 引言

糖尿病是一种以高血糖为特征的代谢性疾病,现如今随着全球人口老龄化加剧与生活方式的改变,糖尿病患者数量呈逐年递增的趋势。而人源胰岛素作为治疗 I 型糖尿病及部分 II 型糖尿病的核心药物,其市场需求也在持续地扩大。早期的人源胰岛素主要从动物胰腺中提取,此举存在着产量低、纯度差、易引发免疫反应等弊端,已难以满足临床的需求。自 20 世纪 80 年代以来,基因工程技术的突破推动了重组人源胰岛素的产业化发展,其中重组大肠杆菌表达系统凭借宿主菌遗传背景清晰、发酵周期短、可实现高密度培养等优势,成为了当下工业化生产人源胰岛素的主流技术平台。可是重组大肠杆菌表达人源胰岛素的工业化生产仍面临着诸多的技术瓶颈。因此开展重组大肠杆菌表达人源胰岛素的发酵工艺优化与产物纯化效率提升研究,对于降低生产成本、提高产品质量、满足临床用药需求具有非常重要的现实意义。本文则结合国内外研究进展与工业化生产实践,系统地梳理了发酵与纯化过程中的关键技术节点,随之提出了具有针对性的优化策略,以期能够为重组人源胰岛素的高效生产提供一定的参考价值。

2. 重组大肠杆菌表达人源胰岛素的发酵工艺优化

2.1 发酵工艺参数优化

发酵参数直接影响着重组大肠杆菌的代谢状态与目的蛋白表达效率,其主要包括了温度、pH 值、溶氧浓度、搅

拌转速、发酵罐压力等,一般需通过单因素试验与响应面法进行系统地优化^[1]。

2.1.1 温度调控优化

在实践当中,温度对菌体生长速率、酶活性及目的蛋白折叠均具有显著的影响。通常重组大肠杆菌的最适生长温度为 37℃,此温度下菌体的繁殖速度快,可在短时间内达到较高的菌体密度。若处于高温环境,则易导致菌体代谢旺盛,此时会产生大量的乙酸、乳酸等代谢副产物,抑制着目的蛋白表达。现有的研究表明,采用两阶段温度调控策略可有效地平衡菌体生长与蛋白表达,即发酵前期(0-8h)将温度控制在 37℃,旨在促进菌体的快速增殖,使 OD600 值达到 30-40。当进入发酵中期(8-12h),菌体密度达到了对数生长期后期时,便将温度降至 30-32℃,此时菌体生长速率有所减缓,其代谢副产物的积累减少,同时还可降低热休克蛋白的表达,有助于促进胰岛素前体的正确折叠与可溶性表达。

2.1.2 pH 值动态调节

发酵体系的 pH 值影响着细胞膜的通透性与酶的活性,而重组大肠杆菌发酵的适宜 pH 范围为 6.8-7.2。实际发酵的过程中,菌体代谢产生的有机酸会导致 pH 值下降,氮源分解则会使 pH 值升高,所以需通过添加酸碱溶液进行动态地调节。曾经使用的传统 pH 调节多采用手动添加氨水或盐酸,该举动易导致 pH 值的波动过大,影响到菌体生长。经

过优化的策略为采用自动 pH 控制系统, 此系统可根据发酵液 pH 值变化实时地添加氨水(10%–25%)和磷酸(1mol/L)。

2.1.3 溶氧浓度精准控制

溶氧浓度在重组大肠杆菌高密度发酵时是最为关键的限制因素, 当溶氧浓度低于 20% 饱和度时, 便会导致菌体呼吸链受阻, 此时代谢途径将转向无氧发酵, 会产生大量的乙酸, 抑制着目的蛋白的表达。为了维持充足的溶氧, 就需从供氧与耗氧两方面进行优化。其中在供氧方面, 可以通过提高搅拌转速(从 300r/min 逐步提升至 600r/min)、增加通气量(从 1vvm 提升至 2.5vvm)、提高发酵罐压力(0.05–0.1MPa)等方式增强氧传递效率。在耗氧方面则可采用分批补料发酵的模式, 该模式可避免一次性添加大量碳源导致菌体耗氧出现骤增。

2.1.4 搅拌转速与发酵罐压力协同优化

搅拌的转速不仅影响着溶氧传递, 还会产生一定的剪切力, 因此过高的搅拌转速会导致菌体破碎, 影响到细胞的活性。实践中建议采用阶段性搅拌转速调控: 发酵前期(0–6h)的菌体密度低, 此时搅拌转速控制在 300–400r/min, 目的是减少剪切力对菌体的损伤; 发酵中期(6–12h)菌体的密度增加, 便需提高转速至 500–600r/min, 进而增强溶氧传递; 发酵后期(12h 后)的菌体生长趋于稳定, 可将转速降至 450–500r/min, 以避免过度地剪切^[2]。

2.2 培养基配方改良

培养基是重组大肠杆菌生长与目的蛋白表达的物质基础, 因为传统 LB 培养基、TB 培养基的营养成分简单, 其难以满足高密度发酵的需求。所以需要通过优化碳源、氮源、无机盐、生长因子等组分的种类与浓度, 来提升菌体密度与目的蛋白表达量。本节以无机盐与微量元素的添加优化为例进行阐述, 无机盐(如磷酸盐、钾盐、镁盐)与微量元素(如铁、锌、锰)参与着菌体代谢酶的组成与活性调节, 其对目的蛋白表达具有重要的影响。当磷酸盐浓度过高时会抑制菌体生长, 且过低会影响能量代谢, 所以需要采用磷酸二氢钾(2–3g/L)与磷酸氢二钾(4–5g/L)进行组合, 将维持磷酸盐浓度在 6–8g/L。而添加硫酸镁(0.5–1g/L)主要时提供镁离子, 目的是激活与糖代谢相关的酶。同时还需与添加微量元素混合液($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1g/L、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02g/L、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/L), 并通过螯合剂 EDTA(0.2g/L)防止微量元素发生沉淀, 进而提高其生物利用度。

2.3 诱导条件调控

诱导条件主要影响的是重组大肠杆菌目的蛋白表达, 其主要涵盖了诱导时机、诱导剂浓度、诱导持续时间等因素, 在实践中需根据菌体生长状态进行精准地调控, 以减少包涵体的形成, 进而提高可溶性目的蛋白表达量。

2.3.1 诱导时机选择

若过早进行诱导会导致菌体生长不足, 致使目的蛋白的表达量低, 但过晚诱导还会因菌体衰老导致表达能力下降。对此优化策略为: 当发酵液 OD600 值达到 30–40(对数生长期后期)时启动诱导, 因为此时菌体代谢活性强, 蛋白的合成能力旺盛, 所以可实现目的蛋白的高效表达。

2.3.2 诱导剂浓度梯度优化

诱导剂浓度过高会导致目的蛋白出现过量表达, 随后形成包涵体。若浓度过低则诱导不足, 致使表达量过低。实践中对于乳糖诱导体系, 可以采用梯度浓度诱导策略, 即诱导初期(0–2h)将乳糖浓度控制在 0.5g/L, 旨在以低浓度诱导启动目的基因表达; 诱导中期(2–4h)需将乳糖浓度提升至 1g/L, 进而促进目的蛋白大量合成; 诱导后期(4h 后)则将乳糖浓度降至 0.3g/L, 以减缓表达的速率, 从而促进蛋白的正确折叠。而对于 IPTG 诱导体系, 建议将 IPTG 浓度优化为 0.5mmol/L, 此时既可保证诱导效率, 又能减少对菌体的毒性。

2.3.3 诱导持续时间与温度协同调控

诱导持续时间通常为 4–6h, 过长会导致菌体自溶, 致使目的蛋白进行降解。结合温度地调控, 可以在诱导阶段采用 30℃ 进行低温诱导, 同时将诱导持续时间延长至 6–8h, 如此便能显著地提高目的蛋白的可溶性。

3. 重组人源胰岛素产物纯化效率提升路径

发酵结束后胰岛素前体主要存在于菌体胞内(或部分分泌至胞外), 此时需通过分离纯化工艺去除杂质, 才能获得高纯度的人源胰岛素。但传统的纯化工艺步骤多、效率低, 需要通过优化纯化工艺路线、筛选高效纯化介质、创新杂质去除技术, 显著地提升纯化效率与产物质量。

3.1 分离纯化工艺整合优化

传统的纯化工艺通常采用“菌体破碎→离心分离→离子交换层析→凝胶过滤层析→反相高效液相层析”的多步骤流程, 此举步骤繁琐、损失率高。只有通过工艺整合与优化, 才得以缩短流程长度, 达到提高纯化效率的目的^[3]。

3.1.1 预处理工艺优化

预处理是纯化的第一步，其目的是去除发酵液中的菌体碎片、核酸、胶体等杂质。对于胞内表达的胰岛素前体，建议采用高压均质破碎法（压力 80–100MPa，循环 2–3 次）将破碎率达到 95%，然后即刻添加聚乙烯亚胺（PEI，浓度 0.1%–0.2%），通过电荷吸附去除核酸，并添加氯化钙（1–2g/L）促进蛋白质沉淀，然后采用碟式离心（转速 8000r/min）与微滤（孔径 0.22 μm ）组合进行固液分离，最终可去除 90% 以上的菌体碎片与核酸，此时澄清度可以达到 95% 以上，为后续的分层纯化奠定了基础。而对于分泌至胞外的胰岛素前体，可以直接采用深层过滤（滤饼厚度 5–10mm）与超滤（截留分子量 10kDa）组合去除大分子杂质与部分杂蛋白，该方法的超滤浓缩倍数应控制在 5–10 倍，以减少后续处理体积。

3.1.2 层析工艺顺序优化

传统“离子交换→凝胶过滤→反相 HPLC”的顺序存在分辨率低、损失率高的问题。经优化后的工艺顺序为“阳离子交换层析→反相高效液相层析→凝胶过滤层析”。其中第一步采用阳离子交换层析（如 SP Sepharose FF 介质），旨在利用胰岛素前体的等电点（ $\text{pI}=5.5\text{--}6.0$ ）在 $\text{pH}=4.5$ 的缓冲液条件下吸附目的蛋白，进而去除大部分的酸性杂蛋白；第二步通过反相高效液相层析（C18 色谱柱），主要利用疏水作用分离目的蛋白与中性杂蛋白，由于流动相采用乙腈–水–三氟乙酸体系（梯度洗脱），可将纯度提升至 95% 以上；第三步采用凝胶过滤层析（如 Superdex75 介质），目的是去除微量高分子杂质与 aggregates，最终产品纯度可达到 99.5% 以上。

3.1.3 连续层析工艺应用

当前传统的批次层析存在着处理量小、介质利用率低、操作繁琐等问题，若采用连续层析工艺（如模拟移动床层析 SMB、连续环形层析 CCC）则可显著地提升纯化效率。即阳离子交换层析阶段应用模拟移动床层析，将色谱柱分为吸附区、洗脱区、再生区和清洗区四个功能区，接着通过程序控制物料与洗脱液的流向，进而实现目的蛋白的连续吸附与洗脱。

3.2 高效纯化介质筛选与改性

由于纯化介质的性能直接决定着层析效率，因而需要通过筛选高吸附容量、高分辨率的新型介质，并对传统介质

进行改性处理，来有效地提升纯化效率。

3.2.1 离子交换层析介质筛选

传统的 SP Sepharose FF 介质虽稳定性较好，但其吸附容量有限。而新型多孔硅胶基阳离子交换介质（如 SP-silica）具有比表面积大、孔径分布均匀的特点，它对胰岛素前体的静态吸附容量可达 80–100mg/g，相较于 SP Sepharose FF 提升了 30%–50%，且硅胶基质的刚性较强，已然能够耐受较高的流速（3–5mL/min），该特点将层析时间缩短了 40%。

3.2.2 反相层析介质优化

筛选新型 C18 键合硅胶介质，再通过优化键合工艺，使 C18 配体的覆盖度可以提高至 80% 以上，进而增强了对胰岛素前体的疏水作用力。同时控制介质孔径为 30nm，即可确保目的蛋白顺利地进入孔内与配体结合，将分辨率较传统 C18 介质提升至 25%。

3.2.3 亲和层析介质开发

亲和层析具有特异性强、纯化步骤简单的优势，若针对胰岛素前体的结构特点开发出特异性亲和介质，便可大幅度地提升纯化效率。具体来说：通过基因工程技术将胰岛素受体的 extracellular 结构域（IR-ECD）固定在琼脂糖凝胶基质上，制备出 IR-ECD 亲和介质。而该介质可通过特异性结合识别胰岛素前体，其静态吸附容量达 50–60mg/g，对目的蛋白的选择性高达 95% 以上，使用该介质一步层析即可将纯度从 60% 提升至 90% 以上。

3.2.4 介质表面改性处理

对传统纯化介质进行表面改性，目的是减少非特异性吸附，以此提高分离选择性。举例如下：采用聚乙二醇（PEG）对硅胶基层析介质进行表面包覆，由于 PEG 的亲水性可有效地抑制杂蛋白与介质表面的疏水相互作用，进而将非特异性吸附率降低 60%–70%。同时 PEG 链的空间位阻效应可减少目的蛋白的聚集，有助于提高产物的可溶性。

3.3 杂质去除技术创新

发酵液中的杂质种类繁多，主要包括了菌体碎片、核酸、杂蛋白、内毒素、重金属离子等。若使用传统的去除方法效率低、成本高，因此通过技术创新实现杂质的高效去除，是提升纯化效率的重要保障。本节主要阐述内毒素去除技术的优化，具体如下。因为内毒素是革兰氏阴性菌细胞壁的重要组成部分，它具有强毒性，所以必须严格地控制其含量。结合

实践来看,传统的内毒素去除方法(如超滤、离子交换)效果有限,因而需要采用亲和层析与吸附法结合的策略。首先使用多粘菌素 B 亲和介质,通过疏水作用与静电作用特异性结合内毒素,达到去除大部分内毒素的效果。然后采用改性活性炭吸附法,将活性炭表面包覆壳聚糖并引入季铵盐基团,以此增强对 residual 内毒素的吸附能力,此举可将内毒素去除率达到 99.9% 以上,远高于传统方法的 80%–90%。

4. 结语

重组大肠杆菌表达人源胰岛素的工业化生产是一个涉及发酵、纯化等多环节的系统工程,发酵工艺的优化与产物纯化效率的提升则是提高生产效益、保障产品质量的核心。本文从发酵工艺参数优化、培养基配方改良、诱导条件调控三个维度提出的发酵优化策略,通过精准调控温度、pH 值、溶氧等关键参数,改良碳源、氮源等培养基组分能够优化诱导时机与方式,进而实现了菌体高密度生长与胰岛素前体高效表达的协同,且显著地提升了目的蛋白的表达量。同时在

产物纯化方面,经由整合纯化工艺、筛选高效介质、创新杂质去除技术,有效地缩短了纯化流程、提高了分离效率与产物纯度且降低了生产的成本。

参考文献:

- [1] 雍彬. 重组人胰岛素原在大肠杆菌中的可溶性表达及分离纯化研究 [D]. 四川省: 四川师范大学, 2007.
- [2] 陈尚文. 重组德谷胰岛素前体蛋白的表达、发酵工艺优化和放大 [D]. 浙江省: 浙江大学, 2019. DOI:10.27461/d.cnki.gzjdx.2019.000733.
- [3] 胡彤. 重组 GIP 融合蛋白的原核表达及发酵工艺优化 [D]. 江苏省: 江南大学, 2024. DOI:10.27169/d.cnki.gwqgu.2024.000993.

作者简介: 聂子雨, 出生年月: 2004 年 2 月, 性别: 女, 民族: 汉族, 籍贯: 山东省潍坊市, 学历: 本科, 从事的研究方向: 生物技术专业