

大肠杆菌耦合乙酸分离的过滤培养

杜 鹏 叶 勤* 俞俊棠

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

关键词 发酵分离耦合, 乙酸, 干扰素, 大肠杆菌

中图分类号 TQ92 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)04-0528-03

E. coli 是直接表达重组蛋白的极为有效的微生物。用 *E. coli* 进行重组蛋白生产时乙酸的生成和积累是较普遍的现象。乙酸的积累不仅使细胞的生长受到抑制, 同时也抑制外源基因的表达, 常常严重影响细胞和重组产品的得率^[1-4]。人们为了解除乙酸对以 *E. coli* 为宿主的基因工程产品生产的不良影响, 设计并进行了许多工作^[5-8]。本文采用的是发酵分离耦合的方法, 在培养过程中对培养基进行过滤, 同时补充新鲜的培养基以降低培养基中乙酸浓度, 提高目的产物人 α_A 干扰素的产量。

1 材料和方法

1.1 菌种

实验所用菌种为 *E. coli* W3110(pEC901), 质粒 pEC901 含有 *trp* 启动子控制下的人 α_A 干扰素基因及四环素耐药基因, 由华东理工大学生物工程研究所基因工程研究室王二力教授惠赠。

1.2 培养基

LB 培养基: 酵母抽提物(Oxoid, England) 0.5 g, NaCl 0.5 g, Polypepton(日本大五营养) 1.0 g, 加去离子水至 100 mL pH 7.2;

LB 斜面培养基: 在 LB 培养基中加 2% 琼脂;

发酵培养基: Na_2HPO_4 0.6 g, KH_2PO_4 0.3g, NaCl 0.05 g, NH_4Cl 0.5 g (NH_4)₂SO₄ 0.5 g, MgSO_4 0.2g, CaCl_2 0.0011 g, 葡萄糖 0.03 g, 微量元素储备液^[3] 0.05 mL, 加去离子水至 100 mL pH 7.0;

稀释液: Na_2HPO_4 0.1 g, KH_2PO_4 0.05 g, NaCl 0.05 g, NH_4Cl 0.1g (NH_4)₂SO₄ 0.1g, MgSO_4 0.1g, CaCl_2 0.0011 g, 葡萄糖 0.1 g, 微量元素母液 0.01 mL, 加去离子水至 100 mL pH 7.0。

1.3 培养方法

1.3.1 摇瓶培养: 用 250 mL 三角瓶装 50 mL LB 培养基,

接入一环保存于 LB 斜面的菌种, 于 200 r/min 旋转摇床 37°C 培养 9 h。

1.3.2 发酵培养: 培养在 RIBE-5 型 5L 玻璃发酵罐(华东理工大学生物工程研究所)中进行, 培养基体积为 2.5L, 接种量 10%。培养中通气量 2.5L/min, 通过通纯氧和改变搅拌转速保持溶氧水平不低于 30%, 用氨水调节 pH7.0, 根据需要流加 25% 葡萄糖补料液。

1.3.3 耦合过滤培养的装置: 耦合培养时培养液经过一个中空纤维膜过滤器后用离心泵循环, 滤液用蠕动泵抽出, 管路在使用前用 3% H_2O_2 溶液灭菌。中空纤维膜过滤器为日本旭化成 PSP-103 型, 过滤面积 0.2 m², 对水的过滤通量为 25L/(cm²·h)。

1.4 测定方法

1.4.1 菌体浓度: 采用比色法, 将培养液稀释到一定程度, 在 721 分光光度计上于波长 550 nm 处测定其光密度值, 光程为 1 cm。当 OD 值不高于 0.3 时, 其与菌体浓度 g/L(干重)存在线性关系: 菌浓 g/L(干重) = $OD_{550} \times 0.287$ 。

1.4.2 葡萄糖浓度: 采用葡萄糖氧化酶-过氧化物酶法, 以葡萄糖测定试剂盒(上海生物制品所)测定发酵液中的葡萄糖浓度。

1.4.3 色氨酸浓度测定: 培养液中色氨酸含量的测定采用 DAB 显色法^[9]。

1.4.4 乙酸浓度测定: 乙酸用气相色谱法(固定相 Chromosorb101)测定^[6]。

1.4.5 干扰素活力测定: 采用细胞病变抑制法^[3]。取一定量的发酵液在 14 000 r/min 下离心, 弃去上清, 加裂解液(30 mmol/L NaCl-50 mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH7.8)使菌体悬浮, 加 3 mg 左右的溶菌酶粉末后冻(-25°C)融(37°C) 2 次, 离心后把上清液稀释一定倍数, 与干扰素标准品一起加至培养好的 WISH 细胞上, 加入 VSV 病毒攻击细胞, 培养一段时间后根据细胞的病变程度确定样品的干扰素活力。

收稿日期: 1999-04-29, 修回日期: 2000-03-28。

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(29236140)。

* 通讯联系人。

2 结果和分析

2.1 耦合过滤培养时稀释率的确定

对过滤培养时的乙酸进行物料平衡,得到以下关系:

$$\frac{d(AV)}{dt} = Q_A XV - AF_f \quad (1)$$

上式中 A 为培养液中的乙酸浓度, V 为培养液的体积, Q_A 为乙酸的比生成速率, X 为菌体浓度, F_f 为过滤速率。若忽略通气造成的液体蒸发和取样造成的体积减少并在过滤培养中维持培养液的体积 V 不变,且 $\frac{dA}{dt} = 0$ 则:

$$D_f = \frac{Q_A X}{A} \quad (2)$$

式中 D_f 为稀释率, $D_f = \frac{F_f}{V}$ 。由式(2)可见随着培养时间的延续,菌体浓度 X 不断增大,需要不断地提高稀释率 D_f ,以使培养液中的乙酸浓度维持在较低水平。

2.2 菌体量、乙酸浓度和干扰素活力随发酵时间的变化

培养分为3个阶段,第一阶段为初始葡萄糖浓度为0.3 g/L的分批培养,待培养基中的葡萄糖耗尽时进入第二阶段,此时向培养液中流加25%的补料葡萄糖溶液,控制加糖

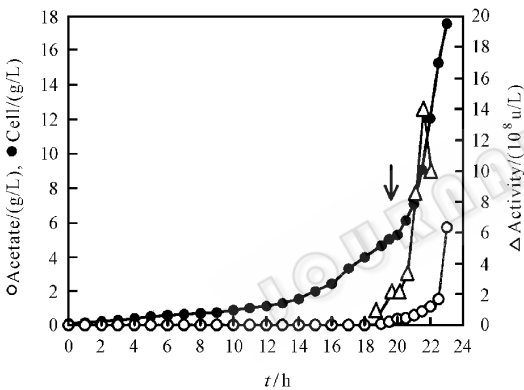


图1 中空纤维过滤器耦合发酵(全合成培养基)

速率,使比生长速率低于 0.3 h^{-1} 以限制乙酸的生成并得到较多菌体。待菌体到达一定浓度时,进入第三阶段的过滤培养,这时以较高速率补加葡萄糖,以提高菌体的比生长速率,同时将培养液通过中空纤维膜过滤器进行循环,过滤去除培

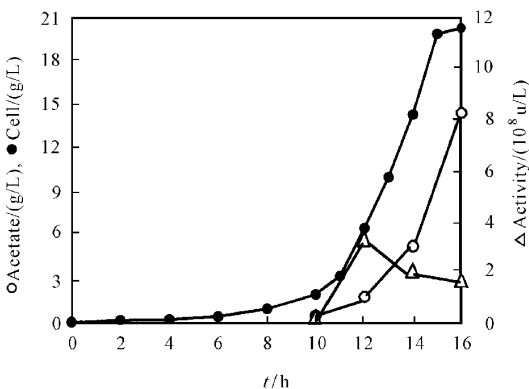


图2 普通补料分批培养

养液中积累的乙酸,并流加稀释液以维持一定的培养液体积。培养至19.5 h菌体浓度达到5.02 g/L,开始耦合过滤操作(图1中箭头)稀释率维持在 0.8 h^{-1} 左右。过滤时按菌体比生长速率 0.5 h^{-1} 的需要流加葡萄糖溶液。菌体浓度随着过滤过程的进行迅速增大,发酵结束时菌体浓度达到17.6 g/L。干扰素最大活力出现在22.5 h,为 $1.4 \times 10^9 \text{ u/L}$,是图2中未采用耦合过滤发酵的补料分批培养中干扰素最大活力 ($3.3 \times 10^8 \text{ u/L}$) 的4.2倍,提高320%。

2.3 乙酸浓度、比生长速率 μ 和干扰素比生产速率 Q_{INF} 的关系

从图3可以明显看出我们使用的菌种 *E. coli* W3110 (pEC901) 具有产物表达与生长相关的特性。从20.5 h开始计算干扰素的比生产速率 Q_{INF} 起,随着过滤后菌体比生长速率 μ 的提高,干扰素的比生产速率 Q_{INF} 迅速增大,同步达到最大值后又同时下降。这一结果与连续培养的结果一致^[3]。22.5 h时乙酸浓度达到了1.52 g/L,菌体的生长和干扰素的表达都受到抑制。

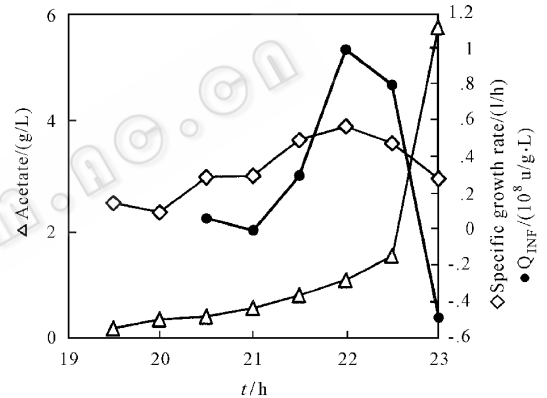


图3 乙酸浓度、 μ 和 Q_{INF} 的关系

2.4 流加酵母抽提物并耦合过滤培养的结果

在利用全合成培养基进行的耦合过滤培养的基础上,如用复合培养基进行培养,那么 *E. coli* 的生长情况将得到改善,我们只在培养的第二阶段的前期,在向培养基中流加25%的葡萄糖溶液的同时向培养基中流加200 g/L的酵母抽提物溶液,13 h时停止流加酵母抽提物溶液,17 h时进行过滤培养。结果如图4所示。发酵过程中色氨酸含量的测

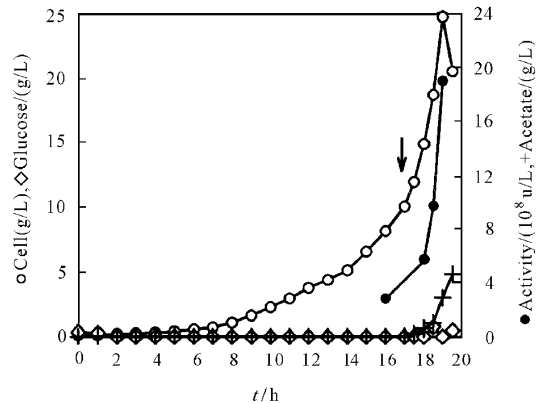


图4 流加Y.E.耦合过滤培养的菌体浓度、葡萄糖浓度、

定结果均为零。

比较图 3 和图 4 可以看出,流加酵母抽提物的培养过程所产生乙酸却要比全合成培养基少,在达到相同的 5 g/L 菌体时,流加酵母抽提物的培养没有产生乙酸,而全合成培养基的培养已经产生了 0.19 g/L 的乙酸,相当于每克菌体产生 0.038 g 乙酸,流加酵母抽提物的培养到了菌体浓度 10 g/L 时产生了 0.04 g/L 的乙酸,相当于每克菌体产生 0.004 g 乙酸,比全合成培养基有明显减少。从过滤前的整个过程来看,流加酵母抽提物的培养中菌体对葡萄糖的得率系数 $Y_{x/s} = 0.66$ g/g,而没有流加 Y. E. 的培养 $Y_{x/s} = 0.28$

g/g,酵母抽提物的加入提高了菌体对葡萄糖的得率,降低了对碳源的需求,因而减少了乙酸的生成。从图 4 的结果可以看出,培养中的最大干扰素活力为 1.9×10^9 u/L,最高菌体浓度为 24.7 g/L,分别比全合成培养基的耦合过滤培养提高了 36% 和 41%,如果与未进行耦合去除乙酸操作的补料分批培养相比,则干扰素的活力提高了近 480%。不仅如此,与用全合成培养基的耦合过滤培养相比,采用流加酵母抽提物的方法平均生产率由 6.2×10^7 u/(h·L) 提高到了 1.0×10^8 u/(h·L),提高了 61%。

参 考 文 献

- [1] Luli G W, Strohl W R. *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56**: 1004~1011
- [2] Keehyun Han, Lim H C, Juan Hong. *Biotech Bioeng*, 1991, **39**: 663~671
- [3] 叶勤. 第七届全国生物化学学术会议论文集, 1996, pp. 135~138
- [4] Shiloach J, Kaufman J, Guillard A S *et al.* *Biotech Bioeng*, 1996, **49**: 421~428
- [5] Konstantin Konstantinov, Michimasa Kishimoto, Tatsuji Seki *et al.* *Biotech Bioeng*, 1990, **36**: 750~758
- [6] Diazricci J C, Regan L, Bailey J E. *Biotech Bioeng*, 1991, **38**: 1318~1324
- [7] Dedhia N N, Thomas Hottiger, Bailey J E. *Biotech Bioeng*, 1994, **44**: 132~139
- [8] Aristidou A A, Kayiu San, Bennett G N. *Biotech Bioeng*, 1994, **44**: 944~951
- [9] 张龙翔. 生化实验方法和技术, 人民教育出版社, 1981, pp. 60~62

Cultivation Integrated with Acetate Acid Filtration on *Escherichia coli*

DU Peng YE Qin YU Jun-Tang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

Abstract A fed-batch fermentation integrated with filtration process was proceeded in a synthetic medium with the use of a hollow-fibre membrane filter. The activity of α_A interferon reached 1.4×10^9 u/L, which was increased 320% over that of a control process. The integrated process was then proceeded in the synthetic medium supplemented with yeast extract during the earlier stage. The addition of yeast extract not only reduced the accumulation of acetate, but also promoted the production of α_A interferon. The maximum activity achieved 1.9×10^9 u/L during the fermentation, which was increased 480% over that of a normal process.

Key words Integrated process, acetate acid, interferon, *Escherichia coli*