

基因工程大肠杆菌发酵的研究

巫爱珍 孙玉昆

(中国科学院上海生物工程研究中心 上海 200233)

摘要 基因工程菌的发酵工艺研究在生物高技术产业化的发展中具有重要的意义。研究结果表明,每10L发酵液可得1~2kg湿菌体,发酵时间从一般的24~30h缩短到6~8h,5L、15L、150L发酵罐都可得重复性的结果。这项发酵工艺研究不仅适用于*E. coli*各种不同类型的表达启动子的工程菌,也适用于野生菌株疫苗等的生产,将对我国基因工程产业化起重要作用。

关键词 基因工程菌,高密度发酵,人干扰素 α -2b,鲑鱼降钙素,鱼生长激素,K88K99基因工程疫苗

近年来,不少基因工程药物、疫苗、酶制剂及某些检测试剂,如人(牛、猪)生长激素、 α - $(\beta$ -, γ -)干扰素、链激酶、凝乳酶、葡激酶、白细胞介素、人胰岛素、肿瘤坏死因子、表皮生长因子、心房肽、降钙素、仔猪腹泻疫苗、C-型肝炎检测试剂等都是应用基因工程大肠杆菌进行生产的。基因工程产业化除上游构建工程菌之外,下游必须建立生产规模的发酵工艺、离心、细胞破碎、目的产物的分离、纯化、恢复表达产物的天然结构使之具有生物活性、有的表达产物还需进一步修饰加工,如人胰岛素原的化学切断与酶切断,降钙素C-末端的酰胺化修饰,以及质量控制等,没有这些下游技术的建立就没有基因工程产品。

就基因工程产业化而言,下游技术的研究与建立是十分重要的,又是十分耗时,需要远比上游研究多得多的投资。基因工程菌的发酵是基因工程产业化的重要组成部分,国家在基因工程菌高密度发酵研究方面已连续多年大量投资,这些投资的很大一部分是用于从国外购买新型的发酵设备,但所采用的技术尚未突破传统的发酵工艺^[1~18],顶多是采用这些先进的发酵设备做了一些发酵动力学的分析工作,因而在我国许多工程菌的高密度发酵已成为基因工程产业化的首当其冲的、必须解决的问题。

我们建立的高密度发酵技术,不仅适用于含各种不同启动子的*E. coli*基因工程菌,也适用于许多野生型的*E. coli*菌,该技术具有小型化、高效率的特点,能节省投资,提高生产效率,易投产,它将促进我国基因工程产业化的迅速发展。

1 材料与方 法

1.1 基因工程菌

干扰素 α -2b P_L 启动子氨苄青霉素抗性基因;降钙素/JM103氨苄青霉素抗性基因;鱼生长激素 Trp启动子氨苄青霉素抗性基因。K8899/C600氨苄青霉素抗性基因,由洪

本文于1995年10月22日收到。

孟民教授惠赠。

1.2 设备

发酵罐: B. Braun Biostat 5L、15L、150L, 摇床 NBS 产品。

1.3 试剂

蛋白胨, 酵母抽提粉, 系 Difco, Sigma, Oxoid. 日本产品。葡萄糖, CaCl_2 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaOH , NaCl , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 , CoCl_3 , FeCl_3 , $\text{Ni}(\text{NO}_3)_3$ 及泡敌, 皆系国产品。

1.4 摇瓶种子培养

种子培养液(g/L)含蛋白胨 10, 酵母抽提粉 5, pH7.0、0.2mol/L, 磷酸缓冲液 20ml, 1000ml 三角瓶中含 250ml 种子培养液, 120℃ 灭菌 20min, 冷却后加 20% 葡萄糖液 5ml, 接种低温保存的甘油管种子 1ml, 加氨苄青霉素最后浓度为 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 37℃, 200 r/min 培养 12~14h 作为发酵罐的种子。

1.5 发酵罐

发酵液(g/L)含蛋白胨 20, 酵母抽提粉 10, 0.2mol/L pH7.0 磷酸缓冲液 20ml 及微量元素, CaCl_2 , $\text{Ni}(\text{NO}_3)_3$, CoCl_3 , MgSO_4 , FeCl_3 浓度各为 1mg, 120℃ 灭菌 20min, 冷却至 37℃ 后, 加氨苄青霉素 50mg, 泡敌及种子培养液 20ml, 加 20% 葡萄糖 5ml 以 2mol/L NaOH , 2mol/L HCl 维持 pH 6.8-7.2, 进行发酵, 发酵条件如下:

温度 37℃, P_L 30 \rightarrow 42℃, 搅拌 500 r/min, pH 6.8~7.2, 通气量 V/V min, DO_2 50%。

1.6 细菌浓度测定

间隔一定时间各取 1ml 发酵液置于 2 个塑料离心管中, 8000 r/min 离心 10min, 除去上清液, 称取菌体重量为湿重。也可适当稀释, 测定在 600nm 菌体光密度(O.D.), 但需注意不同波长, 不同公司分光光度计产品光密度测定值难以比较。

2 结 果

2.1 人干扰素 α -2b P_L 启动子/DH5 α /菌的发酵

人干扰素 α -2b 是抗病毒的有效药物, 如乙型肝炎, 丙型肝炎, 带状疱疹, 宫颈糜烂等病毒性疾病, 为了提供廉价药物, 我们改进了工艺, (详细参考生物工程学报, 1996, 1 期)。由于采用 P_L 启动子, 30℃ 生长至 8h 然后升温至 42℃ 诱导表达 2h, 15L 发酵罐每次可得 1kg 湿菌体, 满足下游生产工艺要求, 形成一个小、高效的干扰素 α -2b 生产车间, 过程中不采用抗体亲和层析。表达量占细胞蛋白的 20%, 产品效价为 $1 \times 10^8/\text{mg}$ 。

2.2 鱼生长激素, Trp 启动子基因工程菌的发酵

鱼生长激素对鱼苗、虾苗的生长有促进作用, 提高苗期存活率有重要意义, 鱼生长激素也和牛、猪生长激素一样, 为农业提供基因工程产品必须提高生产效率, 降低成本, 否则将无任何意义。本文采用 Trp 启动子氨苄青霉素抗性基因发酵使用酸水解不含色氨酸的蛋白胨, 150L 发酵罐条件如: 材料、方法所述, 从发酵液收集菌体破碎、包涵体的复性等工序, 每 L 发酵液可得鱼生长激素 2g 以上。详细见另文发表。

2.3 鲑鱼降钙素, /JM103, 基因工程菌的发酵

十多年来临床应用证明降钙素是治疗骨质疏松症的有效药物, 由 32 个氨基酸组成,

降钙素分子中含一对二硫键, C-末端为酰胺结构组成的多肽。本文采用合成基因, 以融合蛋白形式, *E. coli* JM103 表达, 发酵在 37℃ 进行, 15L 发酵罐, 一次可得 1kg 以上湿菌体, 作为起始材料进行一系列复杂的下游工艺, 如细胞破碎, 融合蛋白的纯化, 切断以及 C-末端的修饰酰胺化等, 是一个小型、高效的工厂, 具有很高的经济效益与社会效益。

2.4 K88、K99/C600 基因工程菌的发酵

现在国内外都使用 K88K99 伞毛疫苗预防仔猪及牛犊的急性腹泻。使用 150L 发酵罐工作体积 80~100L, 种子量 4×500ml, 按材料与与方法所述进行, 每隔 1 小时取样, 8000r/min 离心 10 分钟, 除去上清液, 称重观察菌体生长情况, 发酵液以连续二倍稀释, 以抗体致敏绵羊红血球凝集反应测定伞毛效价, 2×10¹⁶ 以上, 而一般发酵的效价仅为 2×10⁵⁻⁶。发酵时间由一般发酵的 24-30 小时缩短到 6-8 小时完成, 污水处理量大为减少, 15L 发酵罐的生产能力超过一般发酵时 1000L 发酵罐的效率, 并节省大量人力、物力。

表 1 基因工程 *E. coli* 菌体湿重

Table 1 Wet weight of engineered *E. coli* cell

| Strains | Fermenter/L | Broth/L | Time/h | Wet weight/g·L ⁻¹ |
|---------------------------------|-------------|---------|--------|------------------------------|
| Interferon | 15 | 10 | 8 | 110 |
| Interferon α-2b | | | | |
| fGH α-2b | 150 | 100 | 8 | 130 |
| Calcitonin | 15 | 10 | 7 | 150 |
| K ₈₈ K ₉₉ | 150 | 100 | 6 | 200 |

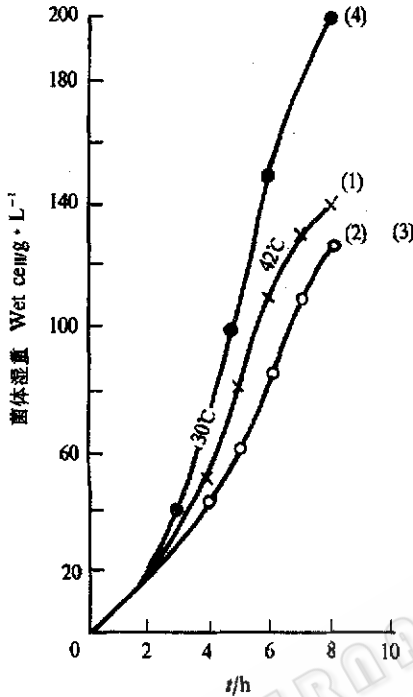


图 1 基因工程大肠杆菌的发酵

Fig. 1 Fermentation of engineered bacteria *E. coli*

- (1) Interferon α-2b, (2) Fish growth hormone
- (3) Salmon calcitonin, (4) K₈₈, K₉₉

3 讨 论

含 P_L 启动子的 *E. coli* 工程菌的表达及温度敏感株活菌疫苗的生产。要求细菌在较低的温度(30℃)发酵增殖, 在一定时间内提高菌体密度, 然后迅速提高温度诱导目的产物的表达。这类菌表达产物的表达量取决于二个因素: 一是在 30℃ 发酵过程中尽可能提高菌体密度; 二是快速升温诱导, 要同时解决这二个问题是较困难的, 目前不少基因工程研究室或生产厂对于这类菌的发酵均遇到上述同类的问题, 即菌体密度不高和表达量低, 他们为了得到足量菌体只好采用扩大发酵体积, 显然不是良策, 因为含 P_L 启动子的工程菌在发酵过程中发酵体积越大(500~1000L), 其表达效率愈低, 并大大增加了抽提分离表达产物的工作量、设备投资、运转费及污水处理量。而本文报道的高密度发酵技术能同时解决以上的问题, 发酵时间短(约 8h), 菌体密度及表达效率高, 生产车间小型化, 能节省

大量后处理的设备投资、人力、能源、废物废水处理量少,符合发展现代化生产的要求。

对于不需温度诱导表达,在 30℃ 发酵的工程菌或野生菌应用我们的工艺技术发酵,当发酵持续 6 小时,菌体仍在直线增殖的情况下;如果延长发酵时间,菌体将继续增加。

E. coli 的不同工程菌或野生菌具有不同的特性,在发酵过程中我们随之对发酵条件作了相应的改变,均取得高密度的发酵结果。

应用新型的发酵设备及电脑监控来测定发酵过程的碳源、氮源消耗、产酸量、产酸种类、pH、溶氧等等参数,并从中研究这些参数之间可能发生的相互之间的影响或作用等,对于发酵技术和工艺的改进是必要的,但菌体在发酵过程中的增殖周期是较短暂的,例如大肠杆菌每 20min 即增殖一代,要将上述这些参数变化规律反馈于控制菌体在发酵过程中的快速增殖,尚难在发酵过程仅 6-8h 内完成,因而为了快速、直接的监控是以菌体在发酵过程中的生长情况如菌体浓度或菌体湿重等为依据,控制必要的参数才能奏效。

基因工程菌的发酵是在传统发酵基础上建立起来的,但它却不是以传统发酵模式加现代化设备的简单组合来实现的,必须有新的调控概念突破传统概念的束缚,才能获得工程菌高密度及高效表达的结果。

参 考 文 献

- [1] 凌明圣、邹民吉、马贤凯等. 生物工程学报, 1995, 11: 217~221.
- [2] 刘新垣、虞建良、郑宏大等. 生物工程学报, 1991, 7: 18~23.
- [3] 黎孟枫、曾庆、侯云德等. 病毒学报, 1992, 8: 184~186.
- [4] 张智清、姚立红、侯云德等. 病毒学报, 1990, 6: 111~116.
- [5] 智刚、周园、侯云德. 病毒学报, 1991, 7: 142~147.
- [6] 张德震、吴淑华、侯云德等. 病毒学报, 1989, 5: 37~40.
- [7] 同园、金冬燕、张智清. 病毒学报, 1993, 9: 37~42.
- [8] 张智清、侯云德、李玉英等. 病毒学报, 1988, 4: 97~101.
- [9] 丁皓、朱运松、宋后燕. 生物工程学报, 1994, 10: 56~60.
- [10] 周园、金冬燕、曾庆等. 生物工程学报, 1994, 10: 61~65.
- [11] 吕兆海、王子轩、刘新垣. 生物工程学报, 1995, 11: 27~32.
- [12] 王嘉玺、邹民吉、黄碧莲等. 生物工程学报, 1995, 11: 33~38.
- [13] 马忠、华子春、朱德熙. 生物化学及生物物理学报, 1995, 27: 17~22.
- [14] 杨立宏、陈常庆、周斌等. 生物化学及生物物理学报, 1994, 26: 477~483.
- [15] 李伯良、梁镇和、杨新颖等. 生物化学及生物物理学报, 1994, 26: 505~512.
- [16] 徐荻、蒋春雷、石颖等. 生物化学及生物物理学报, 1994, 26: 1~5.
- [17] 瞿成奎、贺福初、陆德如等. 生物化学及生物物理学报, 1993, 25: 623~629.
- [18] 张彤、吴淑华、侯云德. 病毒学报, 1995, 11: 131~137.

Study on the Fermentation Technology of the Engineered Bacteria *Escherichia coli*

Wu Aizhen Sun Yukun

(Shanghai center of Biotechnology of Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200233)

Abstract Fermentation of the engineered bacteria *E. coli* is an important part of the production of the recombinant products, because most of the recombinant proteins, peptides and vaccines were produced by using *E. coli*. The high cell density fermentation technology was developed in this laboratory. In general, 1~2kg wet cell could be obtained per 10L broth by using 15L and 150L fermenter in 6~8 hours. This fermentation technology was used in the engineered bacteria harboring different promoters such as P_L, Trp, Lac, and Tac Promoters, to express INF α -2b calcitonin fish growth hormone, and engineered *E. coli* K88K99. The results showed that when this fermentation technology was adapted by the manufacturing the workshop will be a small type with high efficiency, so it will save a lot of investment, space, labour and operation cost.

Key word Fermentation, calcitonin, fGH, INF α -2b, K₈₈ K₉₉