

大肠杆菌乙酸代谢突变株的选育和特性研究

李志敏 叶 勤*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

摘 要:在大肠杆菌高密度培养中,因代谢副产物乙酸积累,导致抑制菌体的生长和产物表达的下降。为减小乙酸的抑制作用,采用⁶⁰Co 诱变处理大肠杆菌 JM101,结合连续培养(含乙酸钠选择压力)定向富集方法,选育到一株乙酸耐受性增强的菌株 JL3。该菌株表现出明显的乙酸耐受性的提高,在含有 10g/L 乙酸钠的 MA 培养基中,菌体生长和葡萄糖消耗速率都有较大程度提高,并且具有良好的遗传稳定性。

关键词:大肠杆菌, 诱变选育, 连续培养, 乙酸

中图分类号:Q933.3 **文献标识码:**A **文章编号:**0001-6209 (2001) 02-0223-06

大肠杆菌是表达重组蛋白的重要宿主菌,已成功用于多种重组蛋白的生产。但在采用葡萄糖为碳源进行大肠杆菌高密度培养过程中往往积累大量有害副产物,尤其乙酸的积累,不仅抑制菌体生长,而且抑制重组蛋白的表达^[1,2]。为减少乙酸的积累,除利用复杂的过程控制方法,还可以进行菌株改造。一是利用基因工程手段使流向乙酸的碳流转到其它抑制较小的代谢物,如乙醇^[3]、羟基丁酮^[4]和糖原^[5];或者通过改造葡萄糖的吸收途径,减小其吸收速率,降低糖酵解途径代谢流,以匹配 TCA 循环的流量限制。二是通过表达透明颤菌血红蛋白 VHb 基因,改变能量代谢效率^[7];或者通过补给途径的加强,也可以减少乙酸,增加菌体合成^[8]。三是由于乙酸的形成是通过磷酸转乙酰酶(PTA)和乙酸激酶(ACK),可以利用诱变选育 PTA、ACK 缺失菌株^[9,10]。但方法一使微生物代谢负荷增加,而方法三造成丙酮酸积累,并影响生长,而且这些菌株仍受到外源乙酸的抑制。

由于乙酸代谢是中央碳代谢的一部分,涉及 EMP 途径、TCA 循环和乙醛酸补给反应,还与能量代谢相关^[11],单一改造某一步骤难以解决问题,而改造过多易对代谢形成负作用。诱变是一种简便有效的方法,结合合适的筛选模型,易于得到目的菌株^[12]。连续培养可以选择性地定向富集某一类微生物^[13]。本研究采用诱变和连续培养相结合的方法,选育乙酸耐受性提高的大肠杆菌突变株。

1 材料和方法

1.1 菌种

大肠杆菌 JM101 $\{\Delta(\text{lac-pro}), [\text{F}', \text{lacI}^q, \text{lacZ}, \Delta\text{M15}]\}$ 。

1.2 培养基

* 为通讯联系人

作者简介:李志敏(1970-),女,河北涿鹿人,华东理工大学生物反应器国家重点实验室在读博士生。

收稿日期:2000-05-08, **修回日期:**2000-10-13

YPS 培养基:蛋白胨(日本大五营养)10g,酵母抽提物(英国 Oxoid)5g,NaCl 10g,pH7.2,定容至 1L。M 培养基: Na_2HPO_4 6g, KH_2PO_4 3g;NaCl 0.5g; NH_4Cl 1g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g; CaCl_2 0.011g,葡萄糖 2~10g,pH7.0,定容至 1L。MA 培养基:M 培养基中加入不同浓度的乙酸钠。

1.3 培养方法

1.3.1 种子培养:取 10 μL 甘油保藏菌种,接入装在 15mL 试管的 5mLYPS 培养基中,30 $^\circ\text{C}$,150r/min 水浴摇床培养过夜,转接 0.5mL 于 250mL 锥形瓶(装 25mL YPS 培养基),37 $^\circ\text{C}$,250r/min,旋转摇床培养 4h。

1.3.2 摇瓶培养:250mL 锥形瓶装培养基 30mL,接种量 0.5~1mL,37 $^\circ\text{C}$,250r/min,旋转摇床培养。

1.3.3 分批培养:采用磁力搅拌的微型玻璃反应器(500mL),装液 300mL,接种量 5mL,通气 2vvm,37 $^\circ\text{C}$ 。

1.3.4 连续培养:在上述微型玻璃反应器中进行,装液 250mL,接种量 5mL,通气 2vvm,37 $^\circ\text{C}$ 。蠕动泵控制进出反应器的培养基流速。每隔 4h 取样测定菌体、残糖浓度及 pH,连续三次基本不变时,认为达到稳态。

1.4 诱变

培养过夜的大肠杆菌菌液 5mL,3000r/min 离心 10min,加无菌生理盐水,离心洗涤两次,均匀重悬,以不同剂量进行 ^{60}Co 辐射处理。

1.5 分析方法

菌体浓度采用比浊法测 OD_{600} ,按标准曲线计算。葡萄糖浓度利用葡萄糖试剂盒(上海生物制品所)按说明书方法进行测定。乙酸浓度用气相色谱分析,取 1mL 上清液,加入 0.5mL 偏磷酸酸化后,于 15000r/min 离心,取上清液进行分析,进样量 0.5 μL

2 结果

2.1 耐乙酸株筛选

2.1.1 诱变剂量选择:过夜培养的大肠杆菌 JM101,经洗涤后进行 ^{60}Co 辐射诱变,剂量

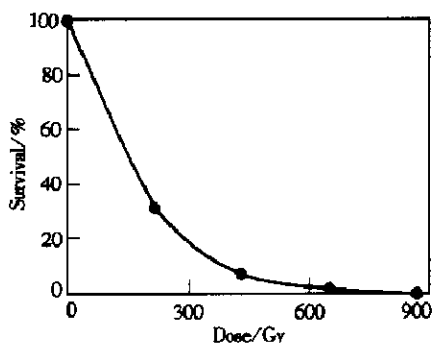


图 1 ^{60}Co 辐射 JM101 存活率

Fig.1 Effect of radiation dose on survival of JM101 cells

为 218,435,652,870Gy。辐照处理后,系列稀释涂布平板进行活菌计数,得到细胞存活率与剂量关系见图 1。诱变剂量的选择一般是依据正变率确定,但本研究中难以直接判断。考虑致死率较高时,菌株受到的损伤大,变异的程度较高,选择了致死率较高的剂量。

2.1.2 突变株选育:可能由于辐射处理后菌体 DNA 受损伤严重,处理后的菌液直接涂布 MA 平板,生长反而更慢,难以直接根据平板上的生长差异有效地筛出突变株。经辐射处理的菌液,是变异株和出发株组成的混合物,将其在同一反应器中连续培养时,各种微生物竞争利用限制性基质,从而具有生长优势的微生物得以保留,不具优势者被洗掉而淘汰,可实现富

集的目的。

图 2 为以 MA 为培养基分别对 JM101 和辐射处理细胞进行连续培养时,不同稳态下菌体比生长速率与葡萄糖浓度的关系。辐射处理后菌液在抑制培养基中比生长速率高于出发株,显示出生长优势,导致比生长速率低的出发株随着稀释率的增加被洗掉,实现耐受乙酸的菌株的富集。经辐射处理的菌液的连续培养,在稀释率由 0.365/h 上升至 0.414/h 时,残糖浓度基本不变,即显示耐性菌的富集。

经初筛和复筛,得到 5 株突变株,在含 10g/L 葡萄糖和 10g/L 乙酸钠的 MA 培养基中培养 20h,细胞量平均比 JM101 提高 20%,表现出明显的生长优势。经多次在不含乙酸钠的 YPS 斜面上代,再在含 10g/L 乙酸钠的 MA 培养基中摇瓶培养,仍能保持其耐乙酸的特性(图 3),具有良好的表型稳定性,其中 JL3 一直保持最高的菌体浓度,因此对它进行了进一步的代谢特性研究。

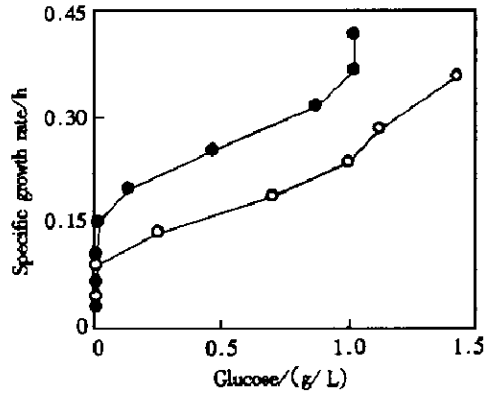


图 2 不同葡萄糖浓度下 JM101 和辐照处理细胞在培养基 MA 中的比生长速率

Fig.2 The specific growth rate of JM101 (open symbols) and the irradiated cells (filled symbols) at different glucose concentrations in MA medium

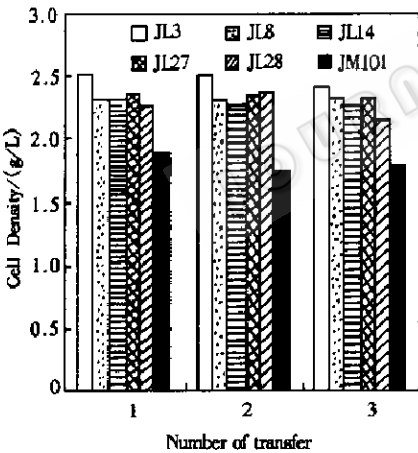


图 3 YPS 斜面生长的突变株和 JM101 在抑制培养基中的菌量

Fig.3 Growth of the non-acetate grown mutants and JM101 in MA medium

此外进行了以乙酸为唯一碳源的连续培养,但该方法富集的菌株不能在 MA 平板上生长,说明这一方法不能富集乙酸存在时较快代谢葡萄糖的菌株,乙酸代谢的加快,不能解决乙酸对菌体利用葡萄糖生长的抑制。

2.2 突变株生长特性

2.2.1 平板培养基上的生长:表 1 为出发菌 JM101 和突变菌 JL3 在 MA 平板上的生长情况。JL3 表现出乙酸耐受性明显的提高,在含高浓度乙酸的平板上菌落出现时间较出发株提前。同时,在乙酸浓度为 1~5g/L 时其菌落直径远大于无乙酸平板上的菌落。

2.2.2 分批培养:突变株 JL3 和出发株 JM101 在微型玻璃反应器中的生长情况见表 2。在 M 培养基中,两菌生长和葡萄糖消耗基本相同,但产乙酸有明显不同,JL3 最大产酸量只有 JM101 的三分之一(4h 值,表中未列出)。当加入 10g/L 乙酸钠后,代谢发生明显变化。突变株的最大比生长速率(μ_m)是出发株的 2.1 倍。同时在发酵 11h 到 12h 间,JL3 表现出同时代谢葡萄糖和乙酸的特性(约耗掉乙酸 2g/L)。这可能是由于此时葡萄糖浓度已较低,乙酸作为碳源被利用,而 JM101 葡萄糖消耗被严重抑制,生长缓慢,乙酸更不能消耗。JL3 和 JM101 比较,

在乙酸对葡萄糖代谢的抑制上发生了明显的差异。

表 1 JM101 和 JL3 在含不同乙酸钠浓度的 MA 平板上的生长

Table 1 Growth of JL3 and JM101 on MA plate containing different quantities of acetate

Strain	Time/h	Sodium acetate concentration /(g/L)					
		0	1	5	10	15	20
JL3	24	+	++	- ^b	-	-	-
	48	+++ ^c	++++ ^d	+	-	-	-
	60	++	+++	++	+	-	-
	72	+++	++++ ^e	+++	++	+	-
JM101	24	+	+	-	-	-	-
	48	++	++	+	-	-	-
	60	++	+++	++	-	-	-
	72	+++	+++	++	+	+-	-

a. + Small colonies; b. - No growth; c. ++ Medium colonies; d. +++ Large colonies; e. ++++ Very large colonies.

表 2 JM101 和 JL3 在不同培养基中批培养特性

Table 2 The growth characteristics of JM101 and JL3 in batch cultures in different media

Strain	Medium	Cell/(g/L)	Acetate ^c /(g/L)	Glucose/(g/L)	Yield/(g/g)
JM101	M ^a	1.25	0.28	0.008	0.56
	MA ^b	0.44	7.79	1.40	0.48
JL3	M ^a	1.29	0.00	0.00	0.56
	MA ^b	1.05	5.15	0.37	0.57

a. measured at 5h; b. measured at 12h; c. in concentration of acetic acid.

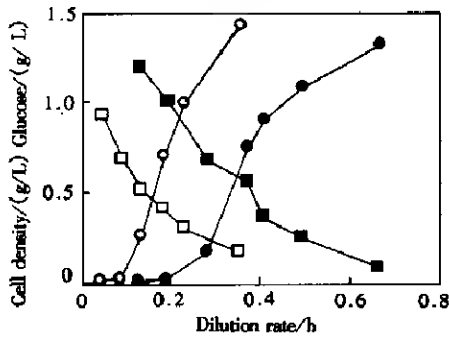


图 4 JL3 和 JM101 在 MA 培养基中连续培养时细胞密度和残糖的变化
Fig. 4 Steady-state cell density (squares) and glucose concentration (circles) of JL3 (filled symbols) and JM101 (open symbols) in chemostat cultures fed with MA medium

2.2.3 连续培养:图 2 反映了 JM101 和诱变培养物在连续培养中显示的差别。为了比较 JM101 和 JL3 的差别,用 MA 培养基进行了 JL3 的连续培养(图 4)。随着稀释率的增加,稳态菌体浓度逐渐下降,而残糖浓度上升。但是在同样稀释率下,JL3 可以保持较高细胞浓度和较低残糖,表现出在抑制环境中代谢活力的提高。如在稀释率 0.135h⁻¹时,JL3 关于葡萄糖的细胞得率约为 JM101 的 2 倍,而比耗糖速率只有 JM101 的一半,就是由于突变株此时糖和乙酸同时代谢的结果。JL3 在乙酸存在时对葡萄糖的亲合力增大(饱和常数 K_s 值仅为 JM101 的 35%),因而在 MA 中培养时可以较快代谢葡萄糖。

3 讨论

连续培养选育菌株,是基于选择性环境下,因不同微生物之间存在生长和代谢的差异,使不具生长优势的细胞被洗掉,具有生长优势的细胞被富集。在乙酸和葡萄糖共存时,大肠杆菌首先利用葡萄糖,但当乙酸含量高时(10~20mmol/L),会抑制葡萄糖代谢,其作用机制尚不明确。本研究利用高浓度乙酸产生的选择压力,富集在此环境中具有生长优势的突变株,即耐受乙酸的菌株。结果表明,该方法可以有效地分离到目的菌株。其中突变株 JL3 在乙酸抑制环境中,可以较快地代谢和生长,细胞对于葡萄糖的得率提高。但是,JL3 仍受到乙酸的抑制,这可能由于乙酸可以通过 ACK 形成乙酰磷酸,对菌体整个代谢网络作用,是一个全局信号,一次诱变处理难以达到理想效果,其代谢特性有待进一步研究。

不同的大肠杆菌菌株在高密度培养时,表现出不同的乙酸代谢特性。目前已报告的不少对大肠杆菌的改造工作集中在减少乙酸的生成,但积累的乙酸仍会对发酵产生影响。本研究选育的 JL3,在葡萄糖培养基中产乙酸低于出发株。JL3 在 MA 中出现葡萄糖和乙酸的共代谢,这种现象与菌株和环境(pH、葡萄糖浓度)及异柠檬酸裂解酶的激活相关。但是乙醛酸循环的激活不能补偿乙酸的抑制,由乙酸为单一碳源连续培养不能选育乙酸耐受型菌株,即证明这一点。同时,在 MA 培养基中连续培养富集突变株时,如果对低稀释率时的培养液进行分离,也难以得到对乙酸具耐受性的菌株,因为此时葡萄糖耗尽,培养基中只剩下乙酸,与以乙酸为单一碳源的连续培养相似。JL3 对于乙酸耐受性的提高,可能是由于菌体合成途径的加强。Delgado^[14]等进行逆代谢流分析碳源代谢,认为磷酸戊糖途径加强,导致糖酵解和 TCA 循环减少,不仅乙酸分泌减少,菌体得率会增加,ATP 转化率提高。JL3 在含有乙酸和葡萄糖的培养基中不但生长改善,而且其转化 pUC19 后表达 β -半乳糖苷酶水平也得到明显提高(数据另文发表),如用于高密度培养时可能降低对过程控制的要求。

参 考 文 献

- [1] Lee S Y. *Trends Biotechnol*, 1996, 14: 98~105.
- [2] Zariskie D W, Arcuri E J. *E Microb Technol*, 1986, 8: 706~717.
- [3] Ingram L O, Conway T. *Appl Environ Microbiol*, 1988, 54: 397~404.
- [4] Aristidou A A, San K-Y, Bennett G N. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44: 944~951.
- [5] Dedhia N N, Hottiger T, Bailey J E, et al. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44: 132~139.
- [6] Chou C-H, Bennett G N, Bailey J E. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44: 952~960.
- [7] Tsai P S, Hatzimanikatis V, Bailey J E. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 49: 139~150.
- [8] Farmer W R, Liao J C. *Appl Environ Microbiol*, 1997, 63: 3205~3210.
- [9] Brown T D K, Jones-Mortimer M M, Konberg H L. *J Gen Microbiol*, 1997, 102: 327~336.
- [10] 朱彤波, 杨蕴刘, 焦瑞身. 微生物学报, 2000, 40: (1): 100~104.
- [11] Holms W H. *Curr Top Cell Regul*, 1986, 28: 69~105.
- [12] 章名春. 工业微生物诱变育种. 北京: 科学出版社, 1984.
- [13] 叶 勤. 化学反应工程与工艺, 1992, 8(4): 429~439.
- [14] Delgado J, Liao J C. *Biotechnol Prog*. 1997, 13: 361~367.

SCREENING AND CHARACTERISTICS OF MUTANTS OF *E. COLI* RESISTANT TO ACETATE INHIBITION

Li Zhimin Ye Qin

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering,

East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Acetate is accumulated in the aerobic high cell density culture of *Escherichia coli*, Which seriously inhibits cell growth and expression of recombinant proteins. To alleviate acetate inhibition, mutants of *E. coli* JM101 were generated by ^{60}Co radiation and then enriched in continuous culture with acetate as the selective pressure. One of the mutants isolated, JL3, showed obvious increased tolerance toward acetate and maintained phenotypic stability on slant without acetate. In MA medium containing 10g/L of sodium acetate, the specific growth rate and the glucose consumption rate of JL3 were higher than those of JM101.

Key words: *Escherichia coli*, Mutagenesis, Continuous culture, Acetate