

大肠杆菌 DH5 α 耐乙酸突变株的选育及其代谢特性研究

朱才庆 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 大肠杆菌 DH5 α 是基因工程常用的宿主菌之一,但由于对代谢副产物乙酸十分敏感,影响外源基因的表达效率。为了提高 *E. coli* DH5 α 乙酸耐受力,采用⁶⁰Co 诱变结合连续培养,逐步提高稀释率和乙酸钠选择压力,于含乙酸钠平板进一步筛选,得到 5 株对乙酸耐受力显著增强的突变菌株,具有良好的遗传稳定性,其中 DA19 显示最强的耐受性能。DA19 与 DH5 α 相比,在复合培养基 YPS 和 YPS2G 中菌体浓度分别提高 17% 和 5%,最大比生长速率分别提高 8% 和 27%,产乙酸分别减少为 6% 和 59%;在基本培养基中的细胞浓度提高 2.4 倍,在含 10g/L 乙酸钠培养基中达到的细胞浓度与不加乙酸钠 DH5 α 的细胞浓度相当。

关键词 大肠杆菌, 菌种选育, 连续培养, 乙酸耐受性

中图分类号: Q933.3 文献标识码: A 文章编号: 0001-6209(2003)04-0460-06

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是表达重组蛋白最常用的宿主菌,已应用于许多具有重要药用价值蛋白的生产。大肠杆菌表达系统具有许多优点,如生长快、培养成本低廉、遗传背景清楚和易实现高密度培养等。然而在培养过程中易发生副产物乙酸的生成和积累,不但造成碳源浪费,而且抑制菌体生长及外源基因的表达,影响了大肠杆菌的生产能力^[1]。

为了解决乙酸抑制问题,目前的研究主要集中在(1)培养基优化及发酵过程控制,如采用一些产乙酸少的碳源^[2]、补料分批培养^[3]、计算机控制流加碳源^[4]、发酵过程与乙酸分离耦合等^[5,6](2)选育磷酸转乙酰酶(PTA)或乙酸激酶(ACK)缺失突变株^[7](3)代谢工程方法,将代谢流引向一些无毒性或毒性较小的代谢产物,如糖原^[8]、乙酰乳酸^[9]和乙醇^[10]等。本实验室应用诱变和以乙酸为选择性压力连续培养相结合方法,由 *E. coli* JM101 选育到耐乙酸突变株 JL3,不仅对乙酸有较强耐受性,而且减少了培养过程中乙酸生成^[11]。由于 *E. coli* DH5 α 的转化率高而在基因工程中常作为宿主菌,对乙酸相当敏感,在基本培养基中生长缓慢,限制了它在高密度培养中的应用。本研究以 DH5 α 耐乙酸突变株选育及其代谢特性为目标。

1 材料和方法

1.1 菌株

大肠杆菌 DH5 α [*sup*E44 Δ *lac*U169(ϕ 80*lacZ* Δ M15)*hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*]由本校鲁华生物技术研究所魏东芝教授惠赠。

基金项目:上海市重点学科项目部分资助

* 通讯作者。Tel: 86-21-64252095; Fax: 86-21-64252250; E-mail: qye@ecust.edu.cn

作者简介:朱才庆(1973-)男,江西信丰人,生物化工专业博士研究生,研究方向为生物过程控制与代谢调控。

收稿日期:2002-10-14,修回日期:2002-12-11

1.2 培养基

YPS 培养基:每升含 Tryptone(英国 Oxoid 公司)10g,酵母抽提物(英国 Oxoid 公司)5g, NaCl 10g, pH 7.2。YPS2G 培养基:YPS 培养基中加入 2g/L 的葡萄糖。M 培养基:每升含 Na₂HPO₄·12H₂O 15.12g, KH₂PO₄ 3g, NaCl 0.5g, NH₄Cl 1g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, CaCl₂ 0.011g, 1% 维生素 B₁ 0.2mL, pH 7.0, 葡萄糖或其它碳源用量见结果部分。MA 培养基:M 培养基中加入乙酸钠,用量见结果部分。MA 平板是在 MA 培养基中加入 2% 的琼脂。连续培养培养基 A:每升含葡萄糖 1.8g, 乙酸钠 5g, Polypepton(日本大五营养)5g; B:葡萄糖 1.6g, 乙酸钠 10g, Polypepton 2.5g; A 与 B 二者所含无机盐与 M 培养基相同。

1.3 培养方法

种子培养:用接种针挑取斜面保藏菌种,接入 250mL 锥形瓶的 30mL YPS 培养基中, 30℃ 250r/min 摇床培养过夜,转接 1mL 于 250mL 锥形瓶里 30mL YPS 培养基相同条件培养 10h 作为二级种子。连续培养选育菌株:接 10mL ⁶⁰Co 辐射诱变后的菌悬液于 500mL 玻璃微型反应器中(装液量为 250mL, 通气 500mL/min, 30℃),分批培养一段时间后,开始连续培养,先流加培养基 A(约 7L),用完后换为培养基 B。在培养过程中根据细胞浓度逐渐调整稀释率。摇瓶培养:250mL 锥形瓶装培养基 30mL,除非特别说明,接种量都为 1mL,在 30℃ 250r/min 摇床培养。发酵罐培养:5L 发酵罐(日本 Marubishi MD-3 型),装液量 3L,接种量 200mL,搅拌 500r/min, 30℃, 通气量 4L/min。用 2mol/L NaOH 和 H₂SO₄ 控制 pH 6.9~7.0。

1.4 分析方法

菌体浓度采用比色法,测定 OD₆₀₀,每个光密度单位相当于干细胞浓度 0.359g/L。葡萄糖测定采用葡萄糖试剂盒(上海生物制品研究所),按说明书进行。甘油采用高碘酸氧化法测定^[12]。乙酸测定采用气相色谱法,取 1mL 上清液,加入 0.2mL 偏磷酸酸化,0.5h 后加入 4.08g/L 异戊醇 0.4mL 作内标,15000r/min 离心,取上清液 0.5 μ L 进样分析。

2 结果

2.1 耐乙酸菌株的选育

2.1.1 连续培养选育耐乙酸 *E. coli*:由于连续培养可使具有生长优势的细胞逐步富集,而生长无竞争力的细胞逐步被淘汰,维持一定选择压力可选育具有一定代谢特性的菌株。

用剂量 700Gy 的 ⁶⁰Co 辐射处理 *E. coli* DH5 α 悬浮液,在 500mL 反应器中连续培养。DH5 α 在基本培养基中生长非常缓慢,为了防止在乙酸选择性压力下连续培养过程中被洗光,培养基中加入了一定量蛋白胨。连续培养开始时,以较低的稀释率(0.068/h)流加含乙酸钠 5g/L 的培养基 A,逐步提高稀释率,最终达到 0.351/h(OD₆₀₀ = 0.393)。180h 切换为培养基 B,由于乙酸钠浓度增加了 1 倍,而 Polypepton 的浓度又降为一半,稀释率降到 0.1/h,再逐步提高,310h 达到 0.263/h(OD₆₀₀ = 0.361)。在培养过程中培养液始终存在葡萄糖。

2.1.2 耐乙酸突变株的分离:取连续培养的最终培养液,适当稀释涂 MA 平板(含有 5g/L 乙酸钠),得到 5 株突变株 DA19、DA42、DA50、DA52 和 DA53,具有明显耐乙酸性能(表 1),其中 Y_{X/G} 是菌体关于葡萄糖的得率。经过 6 次在 YPS 斜面传代,再在含有 5g/L 乙酸钠的 MA 培养基培养,仍然保持耐乙酸能力(数据未显示),表现了良好的遗传稳定性。其中突

变株 DA19 生长优势及菌体得率最高,进一步对其代谢特性进行研究。

表 1 大肠杆菌 DH5 α 及突变菌在 MA 培养基摇瓶培养的生长情况

Table 1 Growth of *E. coli* DH5 α and the mutants in shake flask cultures in MA medium

Strain	DA19	DA42	DA50	DA52	DA53	DH5 α
Cell/(g/L)	0.517	0.499	0.492	0.466	0.481	0.178
$Y_{X/C}$ /(g/g)	0.216	0.207	0.204	0.191	0.199	0.063

2.2 在 YPS 培养基中的生长

DA19 和 DH5 α 在 YPS 培养基摇瓶培养结果见图 1, DA19 生长比 DH5 α 快。DH5 α 最大细胞浓度为 1.25 g/L, 而 DA19 比其提高了 17%, 达到 1.43 g/L; DH5 α 最高产乙酸浓度 4.16 mmol/L, 是 DA19 的 18 倍; DA19 和 DH5 α 在 YPS 培养基中生长达到稳定期的时间基本相同, 最大比生长速率分别为 0.461/h 和 0.427/h, DA19 提高了 8%。

2.3 在 YPS2G 培养基中的生长

5L 发酵罐中 DH5 α 和 DA19 在 YPS2G 培养基中的生长见图 2。DA19 比 DH5 α 生长快, 提前 3h 达到稳定期, 更快消耗完培养基中的葡萄糖; 菌体浓度比 DH5 α 增加了 5%, 达 2.69 g/L; 乙酸最大浓度为 8.48 mmol/L, 比 DH5 α 减少了 41%; 最大比生长速率为 0.556/h, 比 DH5 α 增加了 27%。

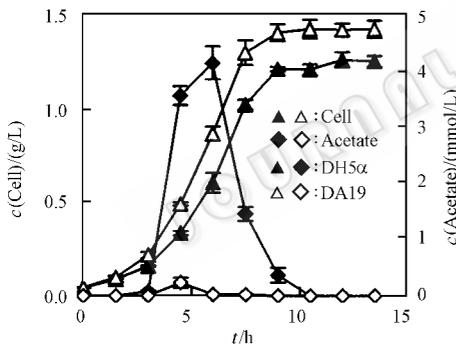


图 1 DH5 α 和 DA19 在 YPS 培养基中的生长及乙酸生成

Fig.1 Growth and acetate production profiles when *E. coli* DH5 α and DA19 were respectively cultured in YPS medium

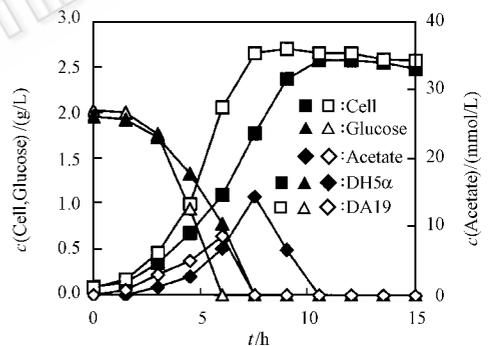


图 2 在 YPS2G 培养基中 DH5 α 和 DA19 的生长, 葡萄糖消耗及乙酸生成

Fig.2 Cell growth, glucose consumption and acetate production in cultures of *E. coli* DH5 α and DA19 in medium YPS2G

2.4 MA 培养基中乙酸钠的影响

DA19 和 DH5 α 在含不同乙酸钠的 MA 培养基中摇瓶培养 16h (图 3)。DA19 比 DH5 α 有明显生长优势, 在含 10 g/L 乙酸钠的 MA 培养基中 DA19 达到的菌体浓度与 DH5 α 在不含乙酸钠的培养基达到的菌体浓度相当。随着乙酸钠浓度增加, DH5 α 的细胞浓度逐渐下降, 而 DA19 的细胞浓度先呈上升的趋势, 然后再降低。DA19 在含有 2 g/L 乙酸钠时细胞浓度高于在不含乙酸钠的培养时的细胞浓度, 这是由于葡萄糖消耗完后开始利用乙酸钠的结果。随着乙酸钠浓度的进一步增加, 菌体生长受到抑制, 细胞浓度逐渐下降, 存在乙酸钠时 DA19 利用葡萄糖的速率大大高于 DH5 α 。

2.5 葡萄糖浓度的影响

许多研究表明,当葡萄糖的供应超过菌体生长所需时,乙酸就会产生。为此考察了 DH5 α 与 DA19 在不同初始葡萄糖浓度下 M 培养基中菌体生长和产酸特点,摇瓶培养 16h 结果如图 4 所示。随着葡萄糖浓度增加, DH5 α 菌体浓度都很低,没有明显变化,产生乙酸基本在 2.25mmol/L 上下波动,残留葡萄糖呈直线上升。DA19 菌体浓度随葡萄糖浓度增加而增加,当葡萄糖浓度增加至 6.46g/L 时,虽然累积乙酸达到 16.7mmol/L,但是菌体浓度比初始葡萄糖浓度 4.58g/L 时仍有较大幅度的增加,葡萄糖含量为 8.72g/L 时 DA19 菌体浓度不再增加,而乙酸产量继续上升,达到 22.9mmol/L,此时培养基中开始残留葡萄糖;当葡萄糖浓度再增加时菌体浓度和产乙酸量不再增加。在各种葡萄糖浓度下, DA19 菌体浓度和 $Y_{X/G}$ 都比 DH5 α 有很大提高,即使在葡萄糖浓度为 11.3g/L, $Y_{X/G}$ 仍然是 DH5 α 的近 2 倍。同时, DA19 耗糖速率大大高于 DH5 α , 产生乙酸也较 DH5 α 多。

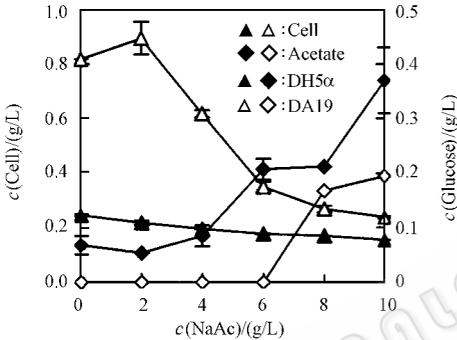


图 3 外源 NaAc 对 DH5 α 和 DA19 生长和葡萄糖利用的影响

Fig.3 Effect of added NaAc on cell growth and glucose utilization in shake flask cultures of *E. coli* DH5 α and DA19

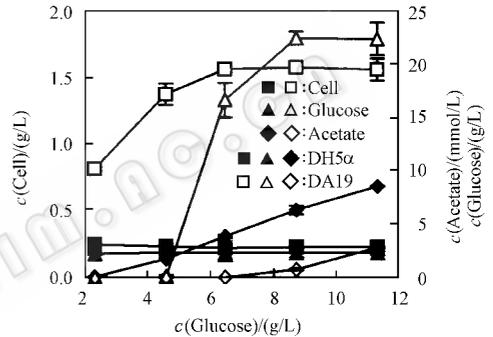


图 4 初始葡萄糖浓度对 DH5 α 和 DA19 的生长, 乙酸生成及耗糖的影响

Fig.4 Influence of initial glucose concentration on cell growth, acetate production and glucose consumption when *E. coli* DH5 α and DA19 were respectively cultured in M medium

2.6 碳源种类的影响

DH5 α 和 DA19 在含不同碳源的 M 培养基摇瓶培养 16h 的结果如表 2 所示。以葡萄糖或甘油为碳源时, DA19 培养液中均没有测出乙酸, 而 DH5 α 培养液分别含有 2.18mmol/L 和 1.50mmol/L 乙酸。乙酸钠为碳源时 DA19 的细胞浓度及菌体得率分别是 DH5 α 的 2 倍和 2.8 倍。DA19 及 DH5 α 均不能利用蔗糖作为碳源, 也不能在以乳糖为唯一碳源的培养基中生长。

表 2 *E. coli* DH5 α 和 DA19 在不同碳源中的生长及乙酸生成

Table 2 Effects of carbon sources on growth and acetate production of *E. coli* DH5 α and DA19

Strain	DH5 α			DA19		
	Glucose	Glycerol	NaAc	Glucose	Glycerol	NaAc
Initial concentration/(g/L)	2.33	4.13	3.92	2.33	4.13	3.92
α (Cell)(g/L)	0.244	0.262	0.184	0.818	1.10	0.394
α (Acetate)(mmol/L)	2.18	1.50	-	0	0	-
$Y_{X/S}$ (g/g)	0.084	0.052	0.049	0.323	0.250	0.137

3 讨论

由于在连续培养过程中培养液不断稀释,在一定培养条件下具有生长优势的细胞逐渐被富集,无优势的细胞逐渐被淘汰,所以可用于菌种的筛选。Weikert 以甘油为限制性底物,在 0.05h^{-1} 的低稀释率下连续培养 126d,筛选到 *E. coli* MG1655 的自然突变株 CWML1 和 CWML2,在生长及产乙酸等性能上都有改善^[13]。本实验室通过提高稀释率筛选了大肠杆菌 JM101 耐乙酸突变株 JL3^[11]。连续培养筛选菌株的特性与培养条件有很大关系,以乙酸为限制性底物时,可以筛选到快速利用乙酸的菌株,但在葡萄糖培养基中对乙酸没有耐性^[11],而葡萄糖和乙酸同时存在时,乙酸就成为选择性压力,因而耐乙酸菌株得到富集。本研究在连续培养过程中始终保持培养液有葡萄糖存在,经 310h 连续培养,47% 的细胞耐乙酸能力有不同程度的提高,说明以乙酸钠为选择性压力的连续培养方法可以有效富集耐乙酸菌株。

在有外源乙酸存在时 DA19 比 DH5 α 生长优势明显,对自身产生的乙酸也有生长优势。在初始葡萄糖浓度增加至 6.46g/L ,DA19 虽然累积了 16.7mmol/L 的乙酸,但是菌体浓度比初始葡萄糖浓度为 4.58g/L 时仍有增加,就是对乙酸耐受力增强的结果。乙酸的产生与碳源有关,DH5 α 在甘油培养基中产生的乙酸量明显低于葡萄糖培养基。DA19 以葡萄糖和甘油作为碳源时,也都有乙酸的生成(数据未显示),只不过是培养 16h 时产生的乙酸已作为碳源被利用了。

在复合培养基中 DA19 比 DH5 α 生长快,而且产乙酸明显减少。在基本培养基中 DA19 生长也比 DH5 α 有很大改善,消耗葡萄糖速率快,但在较高糖浓度时产乙酸量也比 DH5 α 多。DA19 比 DH5 α 菌体得率高,说明 DA19 能更有效地利用碳源合成菌体。DH5 α 分泌到胞外的乙酸总量并不多,这是因为 DH5 α 在基本培养基中利用葡萄糖的能力有限。基本培养基中葡萄糖浓度较高时 DA19 产乙酸也相应增加的特性,可能与连续培养时培养基加入了蛋白胨的筛选条件有关。另一方面在摇瓶培养结束时培养基 pH 下降至 5,也加剧了乙酸的抑制作用,因为培养基 pH 与乙酸的抑制程度相关^[14]。

参 考 文 献

- [1] Lee S Y. High cell density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnology*, 1996, **14**: 98 ~ 105.
- [2] Holms W H. The central metabolic pathways of *Escherichia coli*: relationship between flux and control at a branch point, efficiency of conversion to biomass, and excretion of acetate. *Curr Top Cell Regul*, 1986, **28**: 69 ~ 105.
- [3] Shiloach J. Effect of glucose supply strategy on acetate accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21(λ DE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotech Bioeng*, 1996, **49**: 421 ~ 428.
- [4] Kleman G L, Strohl W R. Acetate metabolism by *Escherichia coli* in high cell density fermentation. *Appl Environ Microbiol*, 1994, **60**: 3952 ~ 3958.
- [5] 杜 鹏,叶 勤,俞俊棠. 大肠杆菌偶合乙酸分离的过滤培养. *生物工程学报*, 2000, **16**: 528 ~ 530.
- [6] Nakano K, Rischke M, Sato S, *et al.* Influence of acetic acid on the growth of *Escherichia coli* K12 during high cell density cultivation in a dialysis reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, **48**: 597 ~ 601.
- [7] 朱彤波,杨蕴刘,焦瑞身. 大肠杆菌抗氯乙酸株的选育和应用. *微生物学报*, 2000, **40**: 100 ~ 104.
- [8] Dedhia N N, Hottiger T, Bailey J E. Overproduction of glycogen in *Escherichia coli* blocked in the acetate pathway improves

- cell growth. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **44**: 132 ~ 139.
- [9] Aristidou A A, San K-Y, Bennett G N. Modification of central metabolic pathway in *Escherichia coli* to reduce acetate accumulation by heterologous expression of the *Bacillus subtilis* acetolactate synthase gene. *Biotechnol Bioeng*, 1994, **44**: 944 ~ 951.
- [10] Ingram L O, Conway T. Expression of different levels of ethanologenic enzymes from *Zymomonas mobilis* in recombinant strains of *Escherichia coli*. *Appl Environ Microbiol*, 1988, **54**: 397 ~ 404.
- [11] 李志敏, 叶 勤. 大肠杆菌代谢突变株的选育及特性研究. 微生物学报, 2001, **41**: 223 ~ 228.
- [12] 秦含章. 葡萄酒分析化学. 北京: 中国轻工业出版社, 1991. 638.
- [13] Christian W, Uwe S, Bailey J E. Use of a glycerol-limited, long-term chemostat for isolation of *Escherichia coli* mutants with improved physiological properties. *Microbiology*, 1997, **143**: 1567 ~ 1574.
- [14] 吴 军, 于公义, 冯尔玲. 乙酸的积累对基因工程菌培养的影响及与培养基 pH 的关系. 微生物学报, 1996, **36**: 433 ~ 437.

Selection of Acetate-Tolerant Mutants from *Escherichia coli* DH5 α and the Metabolic Properties of Mutant DA19

Zhu Caiqing Ye Qin*

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

Abstract : *Escherichia coli* DH5 α is one of the widely used host strains in genetic engineering. However, foreign gene expression level in this strain is seriously inhibited due to its great sensitivity to the accumulated metabolite, acetate. This study aimed at improving the tolerance of this strain against acetate. Cells of *E. coli* DH5 α were irradiated with ^{60}Co , and subsequently continuous culture of the irradiated cells was conducted with gradual increase in the dilution rate and the selective pressure, acetate concentration in the medium. The mutants were picked up on MA plates which contained 5g/L sodium acetate. 5 strains with great improvement in acetate tolerance were obtained, among which DA19 was the best. In cultivation of DA19 in complex media YPS and YPS2G, the cell density, maximum specific growth rate and acetate produced were respectively 1.17 and 1.05, 1.08 and 1.27, and 0.06 and 0.59 times of those of DH5 α . In a chemically defined medium, the cell density of DA19 was 3.4-fold of that of DH5 α . The cell density of DA19 in a medium containing 10g/L sodium acetate was comparable to that of DH5 α in the same medium without the addition of acetate.

Key words : *Escherichia coli*, Strain selection, Continuous culture, Acetate tolerance