

微量元素对大肠杆菌生长和乙酸生成的影响研究

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 DA19 的代谢特性与培养基中添加微量元素有较大的关系。在基本培养基中,当氮源限制时,添加微量元素可以在一定程度上改善 DA19 菌体的生长,提高菌体得率 $Y_{X/G}$,大大减少乙酸的生成,当氮源充分时,与不添加微量元素相比,DA19 在添加微量元素后,菌体浓度大大增加,虽然葡萄糖消耗速率加快,但产乙酸仍然很少,只有不添加时的 13%, $Y_{X/G}$ 提高至少 60%。基本培养基中添加 0.1~1 mL/L 的微量元素混合溶液对 DA19 菌体生长、乙酸生成及葡萄糖消耗没有显著影响。在单独添加不同种类的微量元素时, BO_3^{3-} 、 Zn^{2+} 、 MoO_4^{2-} 、 Cu^{2+} 没有特别明显的影响, Al^{3+} 会抑制菌体生长和葡萄糖利用,而 Co^{2+} 、 Mn^{2+} 、 Fe^{2+} 可以改善细胞生长,特别是添加 Fe^{2+} 时,细胞生长及乙酸生成等培养结果与添加微量元素混合溶液几乎相同。

关键词 大肠杆菌,菌体生长,乙酸,微量元素

中图分类号:Q935 文献标识码:A 文章编号 0001-6209(2004)02-0230-05

大肠杆菌(*Escherichia coli*)是表达外源基因应用最广泛的宿主菌之一,已应用于许多具有重要药用价值蛋白的生产。然而大肠杆菌表达系统存在一个较大的问题就是在培养过程中会分泌一些代谢副产物,主要是乙酸。乙酸的积累不仅抑制菌体的生长,而且降低其外源基因的表达效率^[1]。一般认为乙酸的生成与大肠杆菌的高比生长速率^[2]、高葡萄糖摄取速率^[3]、在 TCA 循环中存在瓶颈^[4,5]和有限的呼吸容量^[6]等有关。

本实验室应用⁶⁰Co 辐射诱变和以乙酸为选择性压力的连续培养相结合的方法,以 *E. coli* DH5 α 为出发菌,选育到其耐乙酸突变株 DA19^[7]。与出发菌 DH5 α 相比,突变株 DA19 生长改善,对乙酸的耐受力增加,而产乙酸的量与培养基中微量元素存在密切的关系,本文描述了有关微量元素对大肠杆菌 DA19 生长与乙酸生成的影响。

1 材料和方法

1.1 菌株

E. coli DA19 是 *E. coli* DH5 α 的突变菌株,由本实验室选育得到^[7]。

1.2 培养基组成

YPS 培养基: Tryptone (Oxoid) 10g, 酵母抽提物

(Oxoid) 5g, NaCl 10g, 加去离子水至 1L, pH 7.2。M 培养基: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 15.12 g, KH_2PO_4 3g, NaCl 0.5g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, CaCl_2 0.011g, 1% 维生素 B₁ 0.2 mL, 加去离子水至 1L, pH 7.0; NH_4Cl 和葡萄糖用量见结果部分。微量元素混合溶液(g/L): $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 40, $\text{MnSO}_4 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ 10, $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10, CoCl_2 4, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1, H_3BO_4 0.5, 溶解于 5mol/L HCl 溶液当中;此配比参考文献[8],但是不加 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 。除非特别说明,培养基中添加微量元素混合溶液的量都为 0.4mL/L。

1.3 培养方法

种子培养:挑取斜面菌种一环,接入 250mL 锥形瓶里的 30mL YPS 培养基中,30°C,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。摇瓶培养 250mL 锥形瓶装培养基 30mL,30°C,250r/min 摇床培养,除不同种类微量元素的影响实验接种量为 0.5mL 之外,接种量都为 1mL。实验结果为两个平行试验的平均值。

1.4 分析方法

菌体浓度采用比色法测定 600nm 光密度 (OD_{600}),每个 OD_{600} 相当于细胞干重 0.359g/L。葡

基金项目:国家 863 计划(2002AA217021);上海市重点学科项目

* 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,江西人,博士研究生,研究方向为微生物发酵与代谢调控。E-mail: zhucqing@sohu.com

收稿日期:2003-06-27,修回日期:2003-10-27

葡萄糖的测定用葡萄糖试剂盒(上海生物制品研究所)按照说明方法进行测定。乙酸浓度测定应用气相色谱法。铵离子采用 Berthelot 比色法测定。

2 结果

2.1 低初始铵浓度时微量元素的影响

在初始 NH_4^+ 为 17.4mmol/L 的 M 培养基中添加微量元素混合溶液对 DA19 摇瓶培养(20h)的影响

表 1 铵浓度为 17.4mmol/L 时微量元素对 DA19 生长和乙酸生成的影响

Table 1 Effects of trace elements on growth and acetate production of DA19 in the minimal medium

with an initial NH_4^+ concentration of 17.4 mmol/L

Glucose ¹ (g/L)	TE ² (mL/L)	Cell (g/L)	Acetate (mmol/L)	NH_4^{+3} (mmol/L)	Glucose ³ (g/L)	Final pH	$Y_{\text{X/N}}$ (g/mmol)	$Y_{\text{X/G}}$ (g/g)
2.05	0	0.798 ± 0.01	0	9.96 ± 0.04	0	6.78 ± 0.01	0.104	0.374
	0.4	0.833 ± 0.03	0	9.58 ± 0.12	0	6.70 ± 0.01	0.103	0.391
3.75	0	1.37 ± 0.00	0	3.22 ± 0.13	0	6.60 ± 0.00	0.095	0.358
	0.4	1.63 ± 0.12	0	0.758 ± 0.26	0	6.51 ± 0.00	0.096	0.426
5.45	0	1.69 ± 0.01	11.7 ± 1.87	0	0	5.96 ± 0.07	0.095	0.304
	0.4	1.80 ± 0.08	0	0	0	6.45 ± 0.01	0.102	0.326
7.36	0	1.65 ± 0.01	21.4 ± 0.83	0	0	5.05 ± 0.01	0.094	0.220
	0.4	2.02 ± 0.12	2.76 ± 0.35	0	0.615 ± 0.19	5.78 ± 0.10	0.115	0.296
9.41	0	1.68 ± 0.09	22.2 ± 1.09	0	1.77 ± 0.08	4.94 ± 0.03	0.095	0.216
	0.4	2.14 ± 0.00	2.90 ± 0.39	0	2.71 ± 0.54	5.71 ± 0.02	0.121	0.315

1. Initial concentration ; 2. Trace elements solution as described in materials and methods ; 3. Residual concentration at 20h.

2.2 高初始铵浓度时微量元素的影响

从表 1 可知,葡萄糖浓度较高时,培养液中没有 NH_4^+ 残余,表明氮源缺乏,为此考察了氮源充分时微量元素对 DA19 生长及乙酸生成的影响。图 1 和图 2 是 DA19 在初始 NH_4^+ 为 57.5mmol/L 的 M 培养基中摇瓶培养 14h 的结果。不添加微量元素时,随葡萄糖浓度增加,细胞浓度基本没有增加,残留葡萄糖浓度直线上升,积累的乙酸稍有增加,pH 下降至 5.17 后不再继续明显下降; NH_4^+ 残余在 38mmol/L 左右(数据未显示), $Y_{\text{X/G}}$ 和 $Y_{\text{X/N}}$ 变化不大。在添加微量元素后,葡萄糖消耗增加,残糖减少,随着葡萄糖浓度增加,细胞浓度大为增加,但达 3.68g/L 后因 pH 迅速下降不再增加;在葡萄糖浓度为 10.2g/L 时开始有乙酸积累,但是大大低于不添加微量元素时的量; $Y_{\text{X/G}}$ 比不添加微量元素时至少提高了 60%; NH_4^+ 消耗比不添加微量元素时增加,但至少要有 24mmol/L 残余(数据未显示), $Y_{\text{X/N}}$ 与不添加微量元素时的相近。

如表 1 所示,其中 $Y_{\text{X/G}}$ 和 $Y_{\text{X/N}}$ 分别是以消耗的葡萄糖和 NH_4^+ 为基准的菌体得率。从表 1 可以看出,初始葡萄糖为 2.05g/L 时,培养基中添加微量元素与否对 DA19 的培养结果没有明显的影响;葡萄糖浓度增加时,不添加微量元素时 DA19 的菌体浓度低于添加微量元素时的浓度,残留葡萄糖和乙酸的生成高,培养液 pH 低;添加了微量元素后,在高葡萄糖下产生的乙酸只有不添加时的 13%。

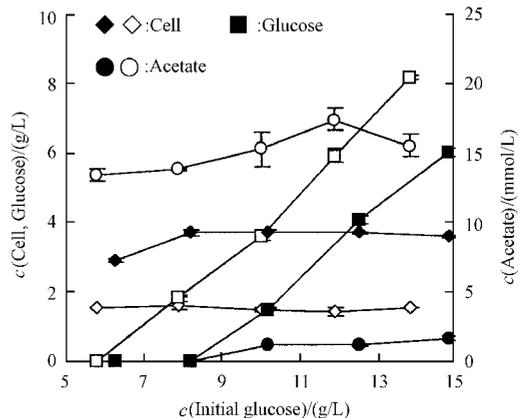


图 1 氮源充分时 DA19 在不添加(空心符号)和添加(实心符号)微量元素时 M 培养基初始葡萄糖浓度对生长和乙酸生成的影响

Fig. 1 Effects of initial glucose concentration on the growth and acetate production when DA19 was cultured in M medium supplied with 57.5mmol/L NH_4Cl with (filled symbols) or without addition of trace elements (open symbols) respectively

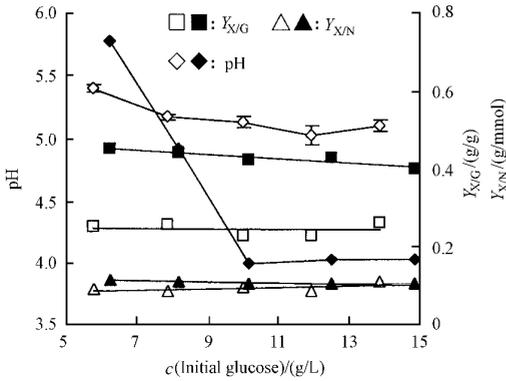


图2 氮源充分时 DA19 在不添加(空心符号)和添加(实心符号)微量元素时 M 培养基初始葡萄糖浓度对 pH 和 $Y_{X/G}$ 及 $Y_{X/N}$ 的影响

Fig. 2 Effects of initial glucose concentration on pH, $Y_{X/G}$ and $Y_{X/N}$ when DA19 was cultured in M medium supplied with 57.5 mmol/L NH_4Cl with (filled symbols) or without addition of trace elements (open symbols) respectively

2.3 微量元素混合液用量的影响

在葡萄糖浓度为 10 g/L, NH_4^+ 为 57.5 mmol/L 的 M 培养基中添加不同量的微量元素混合液时 DA19 摇瓶培养 14h 的结果如图 3 所示。在基本培养基中是否添加微量元素对 DA19 的生长有重大的影响, 而每升 M 培养基中添加 0.1 ~ 1 mL 微量元素混合液时 DA19 的生长没有很大的差异。当培养基中添加微量元素后, DA19 生长大大改善, 细胞浓度约是不添加微量元素时的 2.47 倍, 消耗葡萄糖速率增加, 残留葡萄糖减少, 而产乙酸大大减少, 平均只有不添加微量元素时的 13%。

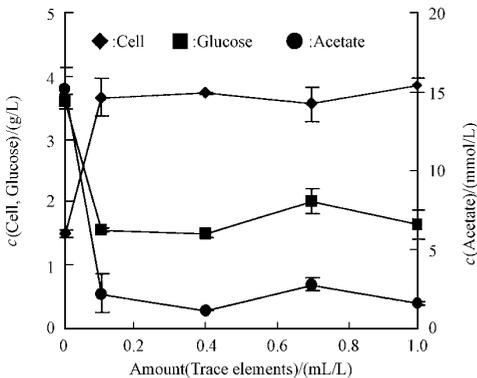


图3 微量元素用量对 DA19 在 M 培养基中的生长、葡萄糖消耗及乙酸生成的影响

Fig. 3 Effects of the amount of added trace elements on growth, glucose consumption and acetate production when DA19 was cultured in M medium

2.4 不同种类微量元素的影响

以上结果表明微量元素对 DA19 的代谢有重要影响, 为了确定具体微量元素的影响, 对单独添加不同种类微量元素(浓度分别对应于它们在微量元素混合溶液中的浓度)的影响分别进行了研究。DA19 在葡萄糖浓度为 12.3 g/L, NH_4^+ 为 34.9 mmol/L 的 M 培养基中摇瓶培养 20h 结果如表 2 所示, 其中 $Y_{X/G}$ 和 $Y_{X/N}$ 分别是以消耗的葡萄糖和生长的细胞为基准的乙酸得率。由表 2 可知, 添加 HBO_3 、 ZnSO_4 、 NaMoO_4 、 CuCl_2 时对细胞生长和乙酸生成没有特别明显的影响, 添加 AlCl_3 时菌体浓度下降了近 20%, $Y_{X/G}$ 降低, 而 $Y_{X/N}$ 相近, 导致 $Y_{A/X}$ 增加; 添加 CoCl_2 、 MnSO_4 、 FeSO_4 时细胞浓度分别增加了 23%、88%、169%, 而乙酸的生成分别减少了 22%、45%、93%。

2.5 Fe^{2+} 对不同大肠杆菌菌株的影响

为了考察 Fe^{2+} 对其他大肠杆菌菌株生长和乙酸生成的影响, 在添加 28 mg/L 和不添加 FeSO_4 的 M 培养基中进行了大肠杆菌 DH5 α 、DA19、DB15、JM109、MC4100 和 BL21(λ DE3) 的培养, 结果(图 4)显示 FeSO_4 的添加对所有试验的大肠杆菌生长都有促进作用。除了 JM109 和 BL21(λ DE3) 在添加 FeSO_4 后乙酸生成增加外, 其余菌株的乙酸生成都明显降低。

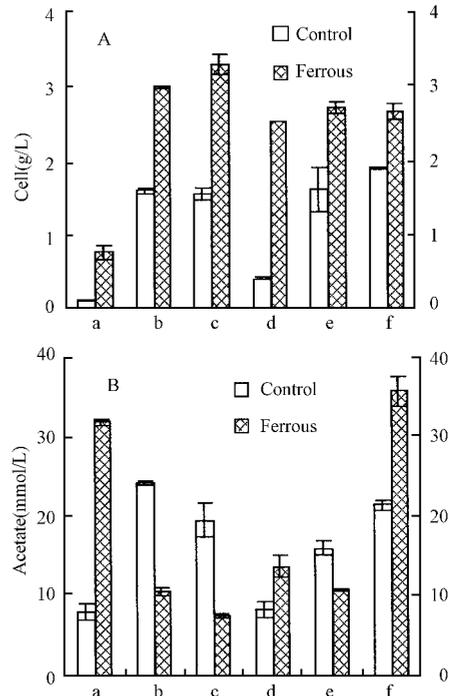


图4 在 M 培养基中 Fe^{2+} 对不同大肠杆菌菌株生长 (A) 与乙酸生成 (B) 的影响

Fig. 4 Effects of ferrous iron addition on cell growth (A) and acetate production (B) of different *E. coli* strains in M medium

表 2 不同种类微量元素对 DA19 生长和乙酸生成的影响

Table 2 Effects of Different Salts on Growth and Acetate Production of DA19

Trace salts	Cell (g/L)	Acetate (mmol/L)	Final pH	$Y_{X/G}$ (g/g)	$Y_{A/G}$ (mmol/g)	$Y_{A/X}$ (mmol/g)	$Y_{X/N}$ (g/mmol)
No addition	1.41 ± 0.03	16.33 ± 0.37	5.28 ± 0.01	0.199	2.35	11.8	0.086
ZnSO ₄	1.45 ± 0.02	18.27 ± 1.19	4.97 ± 0.06	0.196	2.53	12.9	0.091
HBO ₃	1.42 ± 0.01	17.15 ± 0.71	5.05 ± 0.01	0.197	2.44	12.4	0.093
Na ₂ MoO ₄	1.40 ± 0.03	18.05 ± 1.19	5.08 ± 0.09	0.195	2.58	13.2	0.091
CuCl ₂	1.51 ± 0.07	19.13 ± 1.87	5.00 ± 0.08	0.208	2.69	12.9	0.093
AlCl ₃	1.14 ± 0.07	15.37 ± 0.52	5.05 ± 0.03	0.175	2.43	13.9	0.087
CoCl ₂	1.74 ± 0.04	12.79 ± 0.47	4.82 ± 0.05	0.221	1.66	7.49	0.081
MnSO ₄	2.65 ± 0.03	8.93 ± 0.33	4.76 ± 0.06	0.311	1.06	3.41	0.109
FeSO ₄	3.79 ± 0.04	1.15 ± 0.39	4.13 ± 0.03	0.356	0.109	0.305	0.108
TE*	3.77 ± 0.03	1.20 ± 0.21	4.22 ± 0.03	0.335	0.108	0.320	0.108

* Trace elements solution as described in materials and methods.

3 讨论

本研究中配制的微量元素混合溶液含有铁、锌、锰、铜、钴等矿物元素,它们或者是一些酶的激活剂;或者是一些酶的组分。在基本培养基中,添加微量元素对 DA19 的代谢产生了重大影响,细胞生长改善,菌体得率增加,乙酸生成减少。特别是添加 FeSO₄ 时的效果与添加微量元素混合液相似,表明 M 培养基中 DA19 生长受到铁的限制。

许多研究表明,铁限制时往往导致许多微生物的酶,特别是与呼吸相关的酶活力下降,如 *Micrococcus denitrificans* 的 NADH-硝酸盐还原酶^[9]、*Mycobacterium smegmatis* 的 NADH-细胞色素 c 还原酶^[10]及 *Corynebacterium diphtheriae* 的琥珀酸脱氢酶等^[11]。在 *Candida utilis* 中,当铁限制时,不仅细胞色素产生的水平降低,而且导致在位点 I 上能量偶联损失^[12]。在 *E. coli* B 等大肠杆菌中,当存在铁限制时,除了生长受到限制、菌体得率降低之外,呼吸控制比(Respiratory control ratio, RCR)、胞内非血红素铁与细胞色素的含量都呈下降趋势,而在添加柠檬酸铁之后, NADH 氧化酶、琥珀酸氧化酶及琥珀酸脱氢酶等酶活上升,胞内细胞色素 b1、非血红素铁含量和比生长速率增加,菌体得率、RCR 恢复至铁不限制时的水平^[13]。呼吸链中的许多组分都是含铁蛋白质,而当培养基中 Fe²⁺ 供应不足时,引起 NADH 脱氢酶和细胞色素等含铁辅基的呼吸链蛋白水平下降,导致整个呼吸链的电子传递通量降低,加剧了 NADH 在细胞积累, NADH 的积累和有限的呼吸容量会导致产生大量的乙酸^[6]。另外由于 NADH

不能被有效氧化可能造成 ATP 供应不足,而大肠杆菌可通过乙酸生成途径产生一定量的 ATP 供菌体所需,这两方面的原因使 DA19 在铁缺乏时产生了大量的乙酸。

当氮源供应充分时,添加微量元素后菌体生长改善,消耗的 NH₄⁺ 和葡萄糖增加,而积累的乙酸却很少,所以 $Y_{X/G}$ 大大提高。随着葡萄糖浓度增加细胞浓度没有进一步增加的主要原因是细胞生长利用了大量的 NH₃, 使 pH 急剧下降,影响了细胞的进一步生长(图 1)。而在低氮源时,不添加微量元素时的 pH 下降一方面是由于 NH₃ 的利用引起的,但是另外一个更主要的原因是代谢副产物乙酸的大量积累,添加了微量元素后,由于积累乙酸大大减少, pH 下降趋势更缓和(表 1), $Y_{X/G}$ 增加,表明微量元素的添加使 DA19 能更有效地利用葡萄糖合成菌体。另外在氮源限制时添加微量元素后 $Y_{X/N}$ 的提高(表 1)表明菌体的含氮量下降,使有限的氮源能合成较多的菌体,但不添加微量元素时则菌体含氮量基本维持不变,具体的原因仍然需进一步研究。

单一微量元素的实验结果表明,添加 Al³⁺ 会对 DA19 菌体的生长和葡萄糖利用产生负面影响; BO₃⁻、Zn²⁺、MoO₄²⁺、Cu²⁺ 在 M 培养基中不限制; Co²⁺、Mn²⁺、Fe²⁺ 在 M 培养基中有不同程度的限制;而混合添加后并没有出现叠加或协同效应(表 2)可能是 Al³⁺ 的抑制效应和 pH 的大幅度下降等多方面原因。

添加 Fe²⁺ 也能改善 DH5 α 和另一株耐乙酸突变株 DB15 以及其它 *E. coli* 的生长,但在乙酸生成上

不同菌株呈现不同的特点,有的产乙酸增加,有的产乙酸减少(图4)。Fe²⁺的缺乏造成大肠杆菌乙酸的积累尚未见文献报道。缺氮源和微量元素都将导致大肠杆菌乙酸生成增加,影响其高密度培养,所以必须注意培养基成分之间的平衡,以避免乙酸的积累,这样才能更好地在实现高密度培养的同时高效表达外源基因。

参 考 文 献

- [1] Lee S Y. High cell density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 1996, **14**: 98 - 105.
- [2] el-Mansi E M, Holms W H. Control of carbon flux to acetate excretion during growth of *Escherichia coli* in batch and continuous cultures. *J Gen Microbiol*, 1989, **135**: 2875 - 2883.
- [3] Chang D E, Shin S, Rhee J S, *et al*. Acetate metabolism in pta mutant of *Escherichia coli* W3110: importance of maintaining acetyl coenzyme A flux for growth and survival. *J Bacteriol*, 1999, **181**: 6656 - 6663.
- [4] Han K, Lim H C, Hong J. Acetic acid formation in fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 1992, **39**: 663 - 671.
- [5] Majewski R A, Domach M M. Simple constrained-optimization view of acetate overflow in *E. coli*. *Biotechnol Bioeng*, 1990, **35**: 732 - 738.

- [6] Åkesson M, Karlsson E N, Hagander P, *et al*. On-line detection of acetate formation in *Escherichia coli* cultures using dissolved oxygen responses to feed transients. *Biotechnol Bioeng*, 1999, **64**: 590 - 598.
- [7] 朱才庆,叶勤. 大肠杆菌 DH5 α 耐乙酸突变株的选育及其代谢特性研究. *微生物学报*, 2003, **43**(4): 461 - 465.
- [8] Pan J G, Rhee J S, Lebeault J M. Physiological constraints in increasing biomass concentration of *Escherichia coli* B in fed-batch culture. *Biotechnol Lett*, 1987, **9**: 89 - 94.
- [9] Fewson C A, Nicholas D J D. Respiratory enzymes in *Micrococcus denitrificans*. *Biochim Biophys Acta*, 1961, **48**: 208 - 210.
- [10] Fewson C A, Nicholas D J D. Nitrate reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochim Biophys Acta*, 1961, **49**: 335 - 349.
- [11] Righelato R C. The distribution of iron in iron-deficient toxin-synthesizing and in excess-iron non-toxin-synthesizing *Corynebacterium diphtheriae*. *J Gen Microbiol*, 1969, **58**: 411 - 419.
- [12] Clegg R A, Garland P B. Nonhaem iron and the dissociation of piericidin A sensitivity from site I energy conservation in mitochondria from *Torulopsis utilis*. *Biochem J*, 1971, **124**: 135 - 154.
- [13] Rainnie D J, Bragg P D. The effect of iron deficiency on respiration and energy-coupling in *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol*, 1973, **77**: 339 - 349.

Effects of Trace Elements on Growth and Acetate Production of *Escherichia coli*

ZHU Cai-Qing YE Qin*

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

Abstract: The metabolic characteristics of *Escherichia coli* DA19 were affected by the trace elements added in the minimal medium. When cultured in the minimal medium with an initial NH₄⁺ concentration of 17.4 mmol/L, both growth and cell yield based on consumed glucose were improved and less acetate was produced as a mixture of trace elements was added, and NH₄⁺ became a limiting nutrient at glucose concentration higher than 5.45g/L. When cultured in the minimal medium with sufficient nitrogen source (57.5 mmol/L of NH₄⁺), addition of trace elements resulted in a great increase in cell growth and glucose consumption. The cell yield based on consumed glucose increased by at least 60% while produced acetate was only 13% of those obtained in medium without the addition of trace elements. The amount of added trace elements mixture, ranging from 0.1 to 1 mL/L, had almost the same effects on cell growth, acetate production and glucose consumption. Al³⁺ had negative effects on the growth and glucose utilization while Co²⁺, Mn²⁺ or Fe²⁺ respectively improved growth and reduced acetate production. On the other hand, BO₃³⁻, Zn²⁺, MoO₄²⁺, or Cu²⁺ almost had no significant effects on the metabolic activities of DA19. In the medium supplemented with Fe²⁺, the behavior of the culture of DA19 was almost the same as that in medium supplemented with the trace element mixture.

Key words: *Escherichia coli*, Cell growth, Acetate, Trace elements

Foundation item: Supported by the 863 Program (2002AA217021) and the Municipal Foundation for the Key Disciplines of Shanghai

* Corresponding author. Tel 86-21-64252095; Fax-86-21-64252250; E-mail: qye@ecust.edu.cn

Received date: 06-27-2003

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>