

# 乙酸积累对基因工程菌培养的影响 及与培养基 pH 的关系

吴 军 于公义 冯尔玲

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

**摘 要** 在 rIL-2 工程菌 K<sub>802</sub>(pLY-4) 高密度培养中, 发现培养液中有大量代谢副产物乙酸积累, 乙酸的存在对工程菌的生长和产物的表达均有明显的抑制作用, 这种抑制作用是制约工程菌高密度培养的重要因素。为了减小这种抑制作用, 初步研究了培养基 pH 与乙酸抑制作用的关系, 发现适当提高培养基 pH 值, 能减小乙酸的抑制作用; 高密度培养时, 提高培养基的 pH 后, 虽然仍有大量乙酸积累, 但产物的表达水平和菌密度都有提高。

**关键词** 工程菌, rIL-2, 发酵, 乙酸, 培养基 pH

基因工程菌的高密度培养具有提高单位体积设备生产能力、减少设备及运行费用、减轻下游纯化负担等优点, 但是大肠杆菌在生长时往往产生代谢副产物乙酸<sup>[1~3]</sup>, 乙酸的积累对菌体生长和产物表达有明显的抑制作用<sup>[4, 5]</sup>。随着培养菌密度的提高, 乙酸的积累量也增加, 而成为制约高密度培养的重要因素。Macdonald<sup>[5]</sup>研究温敏启动子控制的 rIL-2 工程菌的高密度培养时发现, 随着菌体密度的提高, 热诱导后乙酸积累增加, rIL-2 表达水平下降, 采用透析培养减少乙酸的积累, 能使高密度培养时 rIL-2 表达水平有一些提高。Bauer<sup>[6]</sup>采用磷酸乙酰化酶缺陷株作宿主菌, 来减少乙酸的积累, 也使高密度培养时 rIL-2 表达水平有一些提高。本文比较了在不同 pH 的培养基中乙酸的抑制作用, 发现适当提高培养基的 pH 能减小乙酸的抑制作用, 高密度培养时, 提高培养基的 pH 后, 虽然仍有大量乙酸积累, 但产物的表达水平和菌密度都有一些提高。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌株

K<sub>802</sub>(pLY-4)P<sub>L</sub>P<sub>R</sub>-C<sub>1857</sub> 启动子控制 rIL-2 的表达。中国科学院上海生物化学研究所提供。

### 1.2 培养方法

**1.2.1 种子培养基:** LB 培养基, 按文献[7]配制, 用前加入氨苄青霉素 100mg/L。

**1.2.2 1 号培养基:** 酵母抽提物 10g/L, 胰蛋白胨 5g/L, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 35mmol/L, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 8mmol/L, 121℃ 高压灭菌。用前加 50% 葡萄糖溶液 (8ml/L) 和 50mg/ml 氨苄青霉素溶液 (2ml/L)。

**1.2.3 种子液制备:**  $-20^{\circ}\text{C}$  甘油保存菌种,使用时取 5ml 种子培养基置于 30ml 试管中,接 5 $\mu\text{l}$  甘油保存菌种,于  $30^{\circ}\text{C}$  150r/min 摇床培养活化 12h。300ml 三角瓶装 50ml 种子培养基,按 0.2%接种量接入活化菌种,于  $30^{\circ}\text{C}$  150r/min 摇床培养 8h,作为发酵罐培养和摇瓶试验的种子液。

**1.2.4 摇瓶试验条件:** 300ml 三角瓶,装料量 25ml,150r/min 摇床培养,培养温度  $30^{\circ}\text{C}$ ,诱导温度  $42^{\circ}\text{C}$ 。

**1.2.5 发酵罐培养条件:** 7.5L 发酵罐 (B.E.MARUBISHI CO.LTD),装料 3.5L,接种 2%,培养温度  $30^{\circ}\text{C}$ ,诱导温度  $42^{\circ}\text{C}$ ,溶氧和 pH 由电极在线 (on line) 检测,调节搅拌转速和通气流量,控制溶氧始终大于 30%饱和氧浓度,通过蠕动泵补入 7.5mol/L 氨水或 4mol/L 盐酸控制 pH 值。

**1.2.6 低密度和高密度培养:** 菌密度测定用比浊法<sup>[5]</sup>。发酵罐低密度培养:接种培养 3~4h,菌体生长至  $OD_{600}$  0.25~0.50 (2 倍稀释后) 后升温  $42^{\circ}\text{C}$  诱导 3h。发酵罐高密度培养:接种后  $30^{\circ}\text{C}$  培养,菌体生长至  $OD_{600}$  0.45~0.60 (20 倍稀释后) 和  $OD_{600}$  0.25~0.30 (100 倍稀释后) 时各补葡萄糖 10g/L,并在菌密度为  $OD_{600}$  0.25~0.30 (100 倍稀释后) 时,升温  $42^{\circ}\text{C}$  诱导 3~4h。

### 1.3 分析方法

**1.3.1 rIL-2 表达水平测定:** SDS-PAGE:电泳方法参考文献[7],用 LKB 激光扫描仪对电泳条带扫描,波长 633nm,扫描光束长 7.2mm,宽 0.4mm。测定 rIL-2 条带的吸光度占全菌总蛋白吸光度的百分含量。

**1.3.2 培养液中乙酸测定:** 反相液相色谱法。色谱条件:HP1050 液相色谱仪,UV 检测器,波长 210nm, Waters  $\mu\text{BandPak}^{\text{TM}}$  C18 柱,  $3.9 \times 300\text{mm}$ ,流动相 0.5%  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ , pH2.6,流速 1ml/min。

样品预处理:1.0ml 培养液 8000g 离心,取 0.5ml 上清液于 5ml 离心管中,加 0.1ml 2.3mol/L  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0.3g NaCl, 2.5ml 乙醚,在振荡器上混合 1min, 2000g 离心 1min,取上层乙醚相 1ml,加入 0.2ml 0.1mol/L NaOH,混合 1min, 2000g 离心 1min,吸去上层乙醚,开盖挥发残余乙醚,放入干燥器中干燥 24h,使溶液中水份和乙醚挥发完全,用 0.4ml 0.05mol/L 磷酸二氢氨溶液溶解, 10000g 离心 10min,取 5 $\mu\text{l}$  上清液进样。

标准曲线:取不同浓度的乙酸溶液用相同的预处理方法处理后进样。用峰面积对乙酸浓度作标准曲线:

$$Y = 28.56 * X - 9.11, r = 0.995$$

## 2 结果和讨论

### 2.1 高密度培养时乙酸的积累

分析高密度培养时不同培养时间培养基中乙酸的含量 (图 1),发现在培养基中乙酸积累量随培养时间的延长而不断增加,培养 11h 开始诱导,诱导后乙酸积累更加迅速,16h 乙酸浓度上升到 21.2g/L,菌体生长很快停滞,rIL-2 表达只有 15.5%,明显低于低密度培养时的表达水平。可见在培养过程中积累的乙酸对该工程菌的生长和外源基因的

表达可能有较大的抑制作用。

为了研究乙酸的存在对菌体生长和 rIL-2 的表达的影响, 寻找减小乙酸抑制作用的方法, 进行 pH 对乙酸抑制作用影响的研究。在高密度培养时除乙酸外的其余因素, 如营养成分不足和供氧不足等也会对菌体生长和产物表达产生影响, 因而采用摇瓶低密度培养, 以排除乙酸外的其它因素的干扰, 此时培养过程中菌体本身分泌的乙酸可以忽略。

## 2.2 不同 pH 的培养基中乙酸对菌体生长的影响

改变 1 号培养基中  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  与  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  的配比, 使培养基的 pH 分别为 6.0、6.4、6.8、7.2、7.6、8.0、8.4 和 8.8, 在每个 pH 值做一组四只摇瓶, 分别加入 0、4、8、16 g/L 的乙酸, 乙酸在加入前用 NaOH 调至 pH 与待加入的摇瓶培养基 pH 值相同。接种后, 30℃ 培养, 每小时取样测菌密度, 连续测 4h。以  $\ln OD_{600}$  对培养时间按方程  $\ln OD_{600} = \mu \cdot t - c$  作直线回归, 计算比生长速率, 观察不同 pH 的培养基中乙酸对菌体生长的影响(图 2)。在不加乙酸的培养基中, 菌体比生长速率随 pH 变化不大, 都在  $0.8\text{h}^{-1}$  左右, 但随着乙酸浓度的增加, 菌体比生长速率都有不同程度的下降, 高 pH 培养基中菌体比生长速率下降较小, 低 pH 培养基中菌体比生长速率下降较大, 如同样是在含 4 g/L 乙酸的培养基中, 在 pH 6.0 时, 菌体比生长速率为  $0.021\text{h}^{-1}$ , 即基本抑制了菌体的生长, 而在 pH 8.4 时, 比生长速率为  $0.78\text{h}^{-1}$ , 保持了不加乙酸时比生长速率的 90%。

## 2.3 不同 pH 的培养基中乙酸对 rIL-2 表达的影响

在 1 号培养基中先不加磷酸盐缓冲液, 接种培养 3h 后, 分成 8 组, 每组 4 只摇瓶, 各组分别加入 pH 为 6.0、6.4、6.8、7.2、7.6、8.0、8.4 和 8.8 的磷酸盐缓冲液, 使终浓度为  $50\text{mmol/L}$ , 每组的四个摇瓶分别加入与本组磷酸盐缓冲液 pH 相同的乙酸 0、2、4 和 8 g/L。移至 42℃ 摇床诱导 3h, 测 rIL-2 表达水平。观察不同 pH 的培养基中乙酸对 rIL-2 表达的影响(图 3)。在不加乙酸的培养基中, pH 值对 rIL-2 表达的影响与对菌体生长的影响不同, 对菌体的比生长速率无明显影响(图 2), 而对 rIL-2 的表达却有显著作用。pH 为 6.0~6.4 时, rIL-2 表达最高, 达到 60% 以上, 而随 pH 的提高 rIL-2 表达水平下降, pH 为 8.8 时, rIL-2 的表达只有 15.6%。因而选择合适的 pH 是提高 rIL-2 表达的重要措施。在含乙酸的培养基中, pH 为 6.0~7.2 时随着乙酸浓度的增高, rIL-2 表达水平下降, pH 为 7.6~8.0 时 rIL-2 表达水平则随乙酸浓度的增高基本不变或略有提高, pH 大于 8.4 后 rIL-2 表达水平与乙酸浓度无关, 但表达水平都较低, 并且随 pH 提高而继续下降。有趣的是乙酸浓度提高到 8 g/L 时, 在 pH 7.6~7.8 的培养基中 rIL-2 的

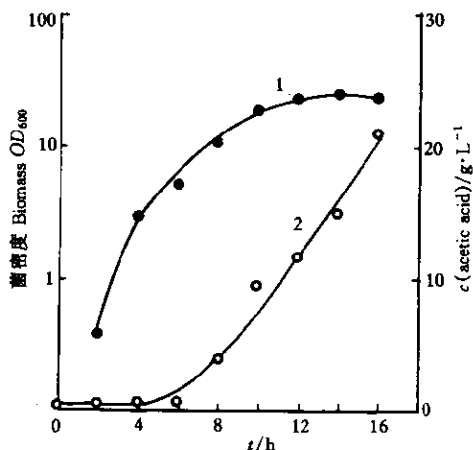


图 1 高密度培养时乙酸的积累

Fig.1 Accumulation of acetic acid in high-cell-density fermentation.

1. Biomass; 2. Acetic acid.

(Biomass = determination value  $\times$  dilution time)

表达比 pH6.0~6.8 时高,可见随乙酸浓度的提高,pH 对乙酸抑制作用的影响也变得更明显了。

2.4 高密度和低密度培养时 pH 对 rIL-2 表达的影响

两个罐批低密度培养,分别控制 pH 为 6.4 和 7.6,另两个罐批高密度培养,也分别控制 pH6.4 和 7.6,对比四个罐批的培养结果(表 1)发现:pH6.4 时,高密度培养时 rIL-2 的表达只有低密度培养时的三分之一。而 pH7.6 时,两者的 rIL-2 表达水平相近。使 rIL-2 的表达水平较高的 pH 值在低密度时为 6.4,在高密度时为 7.6,乙酸测定表明在高密度培养时所控制的这两种 pH 都有较高浓度的乙酸积累。

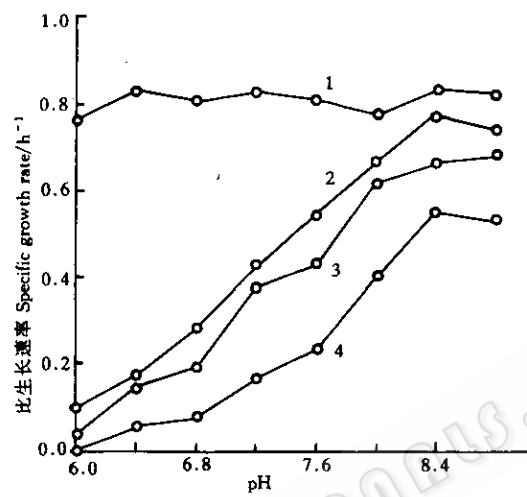


图 2 不同 pH 的培养基中乙酸对菌体生长的影响

Fig.2 Influence of media pH on growth inhibition of acetic acid

Acetic acid conc.:

1. 0g / L; 2. 4g / L; 3. 8g / L; 4. 16g / L.

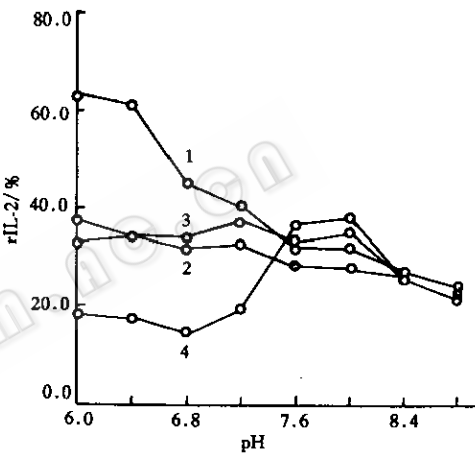


图 3 不同 pH 的培养基中乙酸对 rIL-2 表达的影响

Fig.3 Influence of media pH on rIL-2 expression inhibition of acetic acid

Acetic acid conc.:

1. 0g / L; 2. 4g / L; 3. 8g / L; 4. 16g / L.

表 1 高密度和低密度培养时 pH 对 rIL-2 表达的影响

Table 1 RIL-2 expression responded to the media pH in high-cell-density culture and low-cell-density culture

罐批号 No.	pH	诱导前菌密度 Biomass before induction OD <sub>600</sub>	诱导后菌密度 Biomass after induction OD <sub>600</sub>	乙酸 Acetic acid c / g · L <sup>-1</sup>	rIL-2 / %
I	6.4	0.227 × 2	0.290 × 10	—	44.1
II	7.6	0.387 × 2	0.321 × 20	—	26.7
III	6.4	0.247 × 100	0.261 × 100	21.2	15.5
IV	7.6	0.260 × 100	0.152 × 200	25.3	24.5

乙酸抑制作用的机理还不完全清楚,一般认为是因为分子态乙酸能作为  $H^+$  / ATP 泵的去偶合剂而使质子驱动力下降,影响 ATP 的合成。提高培养基 pH 可能是通过减少分子态乙酸的含量,从而减小乙酸的抑制作用。

实验结果初步表明,工程菌  $K_{802}$  (pLY-4) 在培养过程中有乙酸积累,乙酸的存在对菌体的生长和 rIL-2 的表达有抑制作用,这种抑制作用随培养基 pH 的改变而有所不同,适当提高培养基 pH 能减小乙酸的抑制作用。这些结果提示在这类工程菌高密度培养时,有时由于有高浓度的乙酸积累,菌体生长和产物表达的合适 pH 可能与低密度培养和摇瓶试验有所不同。

### 参 考 文 献

- [1] Meyer H P, Leist C, Fiechter A *et al.* *J Biotech*, 1984, 1:355~358.
- [2] Jensen E B, Carlsen S. *Biotech Bioeng*, 1990, 36(1): 1~11.
- [3] Shimimizu N, Fukuzono S, Harada Y *et al.* *Biotech Bioeng*, 1991, 38(1): 37~42.
- [4] Konstantinov K, Kishimoto M, Seki T *et al.* *Biotech Bioeng*, 1990, 36(7): 750~758.
- [5] Macdonald H L, Neway J O. *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(3): 640~645.
- [6] Bauer K A, Ben-Bassat A and Dawson M *et al.* *Appl Environ Microbiol*, 1990, 56(5): 1296~1302.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 18.47~18.56.

## THE RESPONSIVITY OF RECOMBINANT *ESCHERICHIA COLI* GROWTH AND PRODUCTION ON THE ACETIC ACID ACCUMULATION IN CULTURE MEDIA

Wu Jun Yu Gongyi Feng Erling

(*Biotechnology Institute, Academy of Medical Military Science, Beijing 100071*)

**Abstract** Fermentation studies were performed on an *Escherichia coli* culture that carries a recombinant plasmid composed of an ampicillin-resistant gene, a temperature-regulated  $P_{LPR}$  promoter, and an interleukin-2 (IL-2) gene. The objective was to find the way to decrease the inhibition of acetic acid which was found accumulating in the media in high-cell-density culture. The responsivity of the inhibition on the media pH was studied. The results suggested the inhibition could be decreased by regulation the media pH appropriately. In high-cell-density culture, the specific expression level and cell density was increased by raise the media pH, although there was much acetic acid accumulation too.

**Key words** Recombinant *E. coli*, rIL-2, Fermentation, Acetic acid, Media pH