

## 利用 pH 电极流加葡萄糖培养重组大肠杆菌 生产人 $\alpha$ -肿瘤坏死因子的研究

丛春水<sup>1</sup> 邓继先<sup>1</sup> 苏志国<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

<sup>2</sup>(中国科学院化工冶金所 北京 100081)

**摘 要** 应用一种新型的 pH 电极流加葡萄糖方法,用于培养重组大肠杆菌生产人  $\alpha$ -肿瘤坏死因子。流加后培养液中菌体  $OD_{600}$  达到 9.0,而  $\alpha$ -肿瘤坏死因子的比活保持  $1.05 \pm 0.11 \times 10^5$  u/mg。与指数流加方法比较,二者能达到的最大菌体密度相近,而利用 pH 电极流加葡萄糖更具有设备简单,操作方便的特点。

**关键词** 人  $\alpha$ -肿瘤坏死因子,重组大肠杆菌,流加,pH

**分类号** Q273 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(1999)01-0087-92

随着基因工程技术的发展,人们成功地在 $\text{E. coli}$ 内表达了人胰岛素、多种干扰素、白介素和生长因子等,取得了巨大的社会效益和经济效益。但是,由于产生的外源蛋白,尤其是高疏水性蛋白对菌体的毒害作用,以及基因工程菌在培养过程中的质粒不稳定,容易丢失,造成工程菌的比生长速率常常远远小于宿主菌<sup>[1,2]</sup>。因此,如何采用合适的方法提高重组蛋白的体积产量,引起了广泛的重视<sup>[3,4]</sup>。

重组人肿瘤坏死因子(rh-TNF)是一种抗肿瘤、抗病毒的活性蛋白<sup>[5]</sup>,具有较高的疏水性,对宿主菌的毒害作用很大。采用一般的培养技术,重组菌菌体的产率很低,单位发酵液中目标蛋白产量难以提高。指数流加法被认为是目前最适合工程菌流加培养的方法之一。本文报道了一种新型的流加方法—利用 pH 电极流加葡萄糖方法培养重组大肠杆菌生产人  $\alpha$ -肿瘤坏死因子,并与指数流加方法作了比较。

### 1 材料与方 法

#### 1.1 菌株及质粒

$\text{E. coli}$  宿主菌为 JM103 [ $\Delta(lac pro)$ ,  $thi$ ,  $strA$ ,  $supE$ ,  $endA$ ,  $sbcB$ ,  $hsdR^-$ ,  $F'$   $traD36$ ,  $proAB$ ,  $lacI^Q$ ,  $Z\Delta M15$ ], 质粒为 pAT153, 由中国预防医学科学院病毒研究所基因工程国家重点实验室惠赠,含有四环素抗性基因,表达的 rhTNF- $\alpha$  在菌体内不形成包涵体。

#### 1.2 培养基

LB 培养基:胰蛋白胨 1.0g, 酵母粉 0.5g, 氯化钠 0.5g, 加脱离子水至 100mL、pH7.5;  
固体培养基:同 LB 培养基,加琼脂 2g; LBG 培养基:胰蛋白胨 1.5g, 酵母粉 1.3g, 氯化钠

0.25g, 葡萄糖 0.2g, 加脱离子水至 100mL, pH7.5。

### 1.3 培养方法

1.3.1 摇瓶培养: 250mL 锥形瓶装 50~100mL 培养基, 接种量 2%~3%, 37℃ 摇床(转速 150r/min)培养 10h。

1.3.2 发酵培养: 在 7L 发酵罐(美国 New Brunswick Scientific 公司)上培养, 有效容积 5L, 接种量 2%, 37℃, 用 NaOH 或 HCl 使 pH 保持为 7.5, 通气量 5~10L/min, 改变转速 200—500r/min 使溶氧不低于 20%, 流加操作时葡萄糖液浓度为 40%。

### 1.4 测定方法

1.4.1 菌体浓度: 将培养液适当稀释, 在 722 分光光度计波长为 600nm 下测定光密度, 使 OD 值在 0.1~0.5。

1.4.2 葡萄糖浓度: 3,5-二硝基水杨酸法。

1.4.3 氨的浓度: 用德国 Centronic 公司的氨试剂盒测定。

1.4.4 乙酸的浓度: 用德国 Boehringer Mannheim 公司的乙酸酶检测试剂盒测定。

1.4.5 TNF 的效价: 将单位培养液样品离心, 弃去上清, 加入 Tris-HCl 维持 pH 为 8.0, 将菌体悬浮, 再加入溶菌酶, 在 5℃ 下作用 30min 后加入 EDTA 终止反应, 冻融一次后离心, 取上清参照 Aggarwal 法<sup>[6]</sup>测定效价。

1.4.6 蛋白质浓度: Branfor 法<sup>[7]</sup>, 以牛血清白蛋白为标准。

## 2 结果与讨论

### 2.1 重组大肠杆菌分批培养过程中 pH 的变化

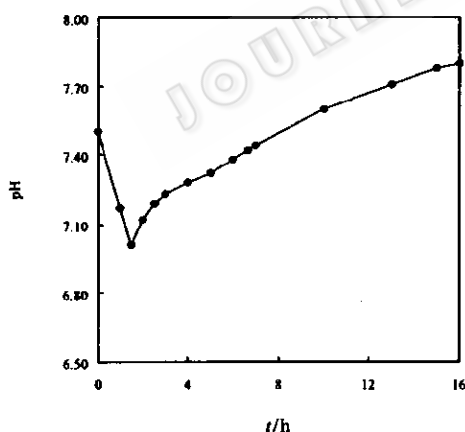


图1 LB培养基分批培养 pH 随时间的变化

Fig.1 pH and time during culture in LB medium

采用 HCl 或 NaOH 维持 LB 培养基 pH 为 7.5, 发现在接种后 2h 内, 培养系统不断泵入 NaOH, 表明培养液中的 pH 在下降, 猜测是产生了酸。2h 后, 不再泵入 NaOH, 稍后开始泵入 HCl, pH 有升高的趋势, 表明培养液中酸性物质减少或产生了碱性物质, 这种现象一直维持至发酵结束。不控制 pH 进行培养, 实验结果与上相符, pH 在起初 2h 急剧下降, 最低降为 7.0, 然后开始上升, 培养结束 pH 为 7.8, 见图 1。Robbins<sup>[8]</sup>认为后期 pH 升高的原因是由于菌体分解 LB 培养基中的蛋白胨, 造成氨这种碱性物质的积累造成。

为进一步研究 pH 变化的原因, 在优化的 LBG 培养基上用 pH 电极控制 HCl 和 NaOH 的滴加, 努力维持 pH 在 7.5 进行分批培养, 同时检测发酵液中的葡萄糖、乙酸和氨的含量, 见图 2。观察到起初 pH 开始降低, 葡萄糖浓度迅速下降, 有乙酸生成, 滴加碱维持 pH。在 4h 葡萄糖降为 3mmol/L, 乙酸升至 18mmol/L, 4h 后 pH 开始升高, 乙酸浓度开始降低, 氨开始大量产生, 滴加 HCl 控制 pH。Helme<sup>[9]</sup>和 Georgiou<sup>[10]</sup>研究也表明, 当

葡萄糖耗尽时,细菌为获得碳源而代谢氨基酸,并以氨的形式释放出相对多余的氮。整个培养过程尤其在 4h 后,氨的浓度都稳定增加,这就给以启发,如果在培养中,以葡萄糖代替 HCl,合理的葡萄糖添加会使菌体的碳氮利用协调,葡萄糖代谢产生的酸对氨会有一定的中和作用,因此利用 pH 电极流加葡萄糖,具有一定的可行性。

2.2 利用 pH 电极流加葡萄糖

利用 pH 电极流加葡萄糖的原理如图 3。pH 控制仪分两部分,一部分控制酸,一部分控制碱。当 pH 超过设定值 7.5 时,蠕动泵泵入葡萄糖。当 pH 低于设定值 7.5 时,蠕动泵泵入 NaOH。根据流加的初始情况不同,把它分为两种:初始无葡萄糖的情况下流加葡萄糖和初始有葡萄糖的情况下流加葡萄糖,下面分别讨论。

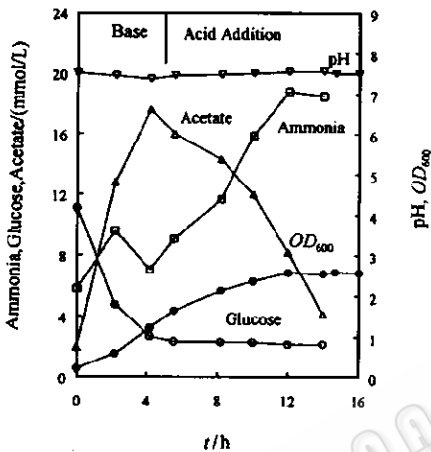


图 2 控制 pH 培养大肠杆菌的过程

Fig.2 Culture of *E. coli* by controlling pH

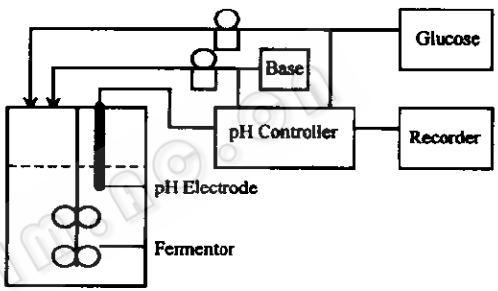


图 3 利用 pH 电极流加葡萄糖示意图

Fig.3 Control schematic for fed-batch of glucose by pH electrode

2.2.1 利用 pH 电极在初始无葡萄糖的情况下流加葡萄糖:以 LBG 培养基为基础,但初始不加入葡萄糖。以 pH7.5 为设定值,pH 电极作探头,用 40% 的葡萄糖代替 HCl 调节培养液的 pH 进行培养。从图 4 中可以看出,葡萄糖的浓度缓慢上升,但在培养液中的浓度一直较低,在 2mmol/L 左右,而葡萄糖在一直流加,这说明葡萄糖的加入量与菌体的需求基本适应。菌体的最终浓度是无流加 LBG 培养基的 3 倍。而且在培养中发现,用葡萄糖代替 HCl 并未造成严重的 pH 失控,培养液最高 pH 只有 7.7。但用这种方法的培养,菌体的最大比生长速率只有  $0.28\text{h}^{-1}$ ,培养时间比较长,达 24h。这可能是因为在初始的培养基中没有可直接利用的单糖,对

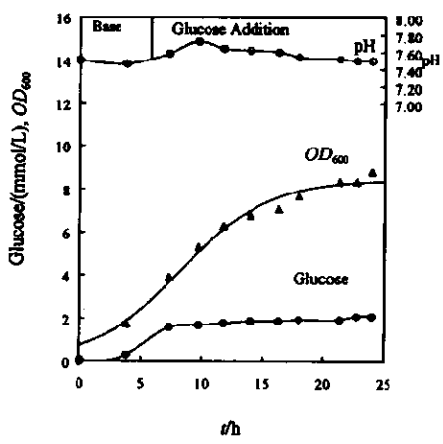


图 4 利用 pH 电极流加葡萄糖培养 (初始无葡萄糖)

Fig.4 Fed-batch culture using pH eletrode (without glucose initially)

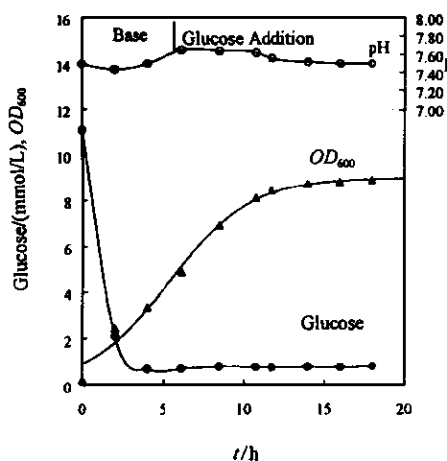


图5 利用pH电极流加葡萄糖培养  
(初始有葡萄糖)

Fig. 5 Fed-batch culture using pH  
electrode (with glucose initially)

细菌而言,培养基中的氮源相对菌体需要过剩,而碳源相对不足,限制了工程菌的生长。

**2.2.2 利用pH电极在初始有葡萄糖的情况下流加葡萄糖:**在初始有葡萄糖的情况下流加葡萄糖浓度以优化的 LBG 培养基为参考,初始葡萄糖的浓度为 0.2%,其他同上。从图 5 可见,开始葡萄糖浓度急剧下降,pH 下降比较明显,说明酸的产生较多,pH 降至最低点。随后 pH 逐步升高,需要向培养液中不断泵入葡萄糖以维持 pH 恒定。这种流加培养中维持的葡萄糖浓度较低,3h 后基本维持在 1mmol/L。初始有葡萄糖的流加的最大比生长速率比初始无葡萄糖的流加明显增大,达到  $0.4\text{h}^{-1}$ ,培养周期缩短 8h。二者比较初始有葡萄糖的流加法较优。

大肠杆菌中的葡萄糖代谢已被深入研究。即使在供氧充分的情况下,Keehyun Han<sup>[11]</sup>认为由

于菌体呼吸能力饱和或营养限制(比如痕量金属)等原因仍能造成氧化磷酸化速度和糖酵解速度不平衡产生乙酸。从碳氮平衡的角度上讲,蛋白胨酵母粉培养基富含氨基酸,氮的含量相对过高(以酵母粉为例,约为 7.5%~10.5)。利用 pH 电极流加葡萄糖实际上是增加培养基中能直接利用的碳源,避免菌体为获得碳源分解蛋白胨等,这样以氨的形式释放的氮减少,使碳氮尽量达到一种平衡,所以会促进菌体的生长。究竟调节 pH 的这两种原因哪一个影响较大,还需进一步研究。

### 2.3 指数流加法和利用 pH 流加法的比较

为了获得合理的指数流加方法中的参数,进行了 32 次流加实验,发现菌体的平均比生长速率在  $0.12\sim 0.22\text{h}^{-1}$ 。对葡萄糖的得率系数在  $0.76\sim 0.87$ 。选取了不同的参数,进行指数流加实验,并选取结果较好的一次与利用 pH 电极流加方法进行比较,见图 6。这里,取菌体对葡萄糖的得率系数为 0.8,菌体的比生长速率为 0.18,其它参数依培养而定。最后对菌体生长动力学进行拟合,得菌体的比生长速率为 0.15,所以参数的设定是较为理想的。

培养中发现,在 16h 之前,葡萄糖的浓度维持在一个低的水平,菌体浓度也在迅速增加,但在 17h,OD 值不再明显上升,这时停止了流加,但葡萄糖的浓度仍然有一峰值,随后,由于不再流加,葡萄糖的浓度再度降低(图 6)。葡萄糖浓

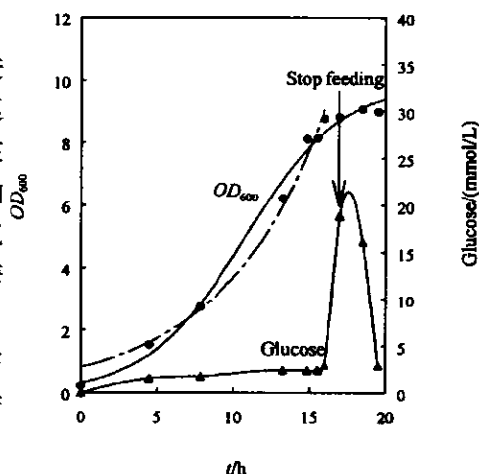


图6 指数流加法培养过程

Fig. 6 Exponential fed-batch culture  
The arrow indicated the time  
of stopping feeding

度下降较快。在 16h 前,葡萄糖动态维持在约 3mmol/L 这样一个较低的浓度,说明在 16h 之前的流加是很成功的。16h 后菌体进入静止期,对葡萄糖的需求大大降低,而这时葡萄糖的流加量指数增大到较大流加量,葡萄糖的消耗低于加入,所以造成葡萄糖累积。停止流加后葡萄糖浓度在 2h 内从 20mmol/L 降到 3mmol/L,菌体(干重)的耗糖速率在约 0.36g/(g·h)。

指数流加法最终的菌体浓度与初始有葡萄糖时利用 pH 电极流加相近,表明利用 pH 流加在提高菌体浓度方面是成功的。另外,它克服了指数流加法所确定的参数复杂,对反应终止时间不好控制的缺点。

2.4 培养结果比较

比较了 5 种发酵的结果,见表 1,初始有葡萄糖的利用 pH 电极流加葡萄糖,能达到的最大菌体浓度与指数流加培养的相近,而用时却较少,效果较好。

表 1 5 种培养方式的比较  
Table 1 Comparison of five modes of culture

Culture No.	Medium	Initial glucose conc. / %	Controlled glucose addition	Cell density ( $OD_{600}$ )	Culture time/h
1	LB	0	no	0.6	12
2	LBG	0.2	no	2.56	12
3	LBG	0	yes	8.9	24
4	LBG	0.2	yes	8.83	16
5	LBG	0	yes	8.93	20

1. Batch culture in LB medium, 2. Batch culture in LBG medium, 3. Fed-batch culture using pH electrode without glucose present in the medium, 4. Fed-batch culture using pH electrode with glucose present in the medium, 5. Exponential fed-batch culture

要实现重组大肠杆菌的高密度培养,最常用和最有效的方法是流加法。常见较好的流加方法有控制溶氧流加和指数流加等<sup>[12]</sup>。但这些流加方法需要提前算出培养参数,并配备必要的设备,操作也相对复杂,阻碍了它们的进一步应用。提高产量主要是通过提高菌体的生物量。通过比较证明,在初始有葡萄糖的情况下利用 pH 电极流加葡萄糖是一种简单有效的流加培养方法,如果在用葡萄糖控制 pH 时 pH 滞后严重,结合具体的生产过程,在这时可以辅加 HCl。同样的道理,可以用氨水代替 NaOH,既调节了 pH,又增加了氮源。这种方法简单易行,尤其适合于大规模培养,可有良好的应用前景。

参 考 文 献

[1] E. Padan, T. Arbel, A. Rimon *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1983, **258**:5666~5673.  
[2] E. Remaut., O. Stanssens, W. Fiers. *Nucl. Acid res.*, 1983, **1**:4677~4688.  
[3] P. Peter., K. Marian., S. Volker *et al.* *Biotechnol.*, 1993, **11**:1271~1277.  
[4] C. Hung-Chang., H. Chin, M. Duen. *Enzyme Microb. Technol.*, 1992, **14**:321~326.  
[5] M. Janice, A. Michael, N. Kirby *et al.* *Biochem.*, 1987, **26**:1322.  
[6] B. B. Aggarwal, G. E. Kobr, D. V. Goeddel *et al.* *J. Biol. Chem.*, 1985, **260**(4):2345.

- [7] M. M. Bradford. *Anal. Biochem.*, 1976, 72:248.
- [8] J. W. Jr Robbins, K. B. Tayler. *Biotechnol. Bioengr.*, 1989, 34:1289-1294.
- [9] T. Holme, S. Arvidson. *Proc Biochem.*, 1997, 5(9), 62.
- [10] G. Georgiou, T. Palumbo. *Biotechnol. Lett.*, 1987, 2:181.
- [11] Han Keehyun, *Biotechnol. and Bioengr.*, 1992, 39:663~671.
- [12] L. Yee., H. W. Blanch. *Biotechnol. Bioengr.*, 1993, 41:781~790.

## Study on Fed-batch Culture of Recombinant *Escherichia coli* for Human Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ Using pH Electrode

Cong Chunshui<sup>1</sup> Deng Jixian<sup>1</sup> Su Zhiguo<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

<sup>2</sup>(Institute of Chemical Metallurgy, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** A novel fed-batch culture using pH electrode was studied here and applied in culture in *Escherichia coli* for human tumor necrosis factor  $\alpha$ . The cell density reached 9.0  $OD_{600}$  while specific activity maintained  $1.05 \pm 0.11 \times 10^5$  u/mg protein. Compared with exponential fed-batch this novel fed-batch method had the advantages of less instruments and easy-to-operate, while maintained similar cell density.

**Key words** Human tumor necrosis factor- $\alpha$ , recombinant *Escherichia coli*, fed-batch, pH