

# RP-HPLC 法测定工程菌发酵液中的乙酸含量

冯尔玲 吴 军 于公义

(军事医学科学院生物工程研究所, 北京 100071)

**摘要** 采用了 RP-HPLC 法, 选用简便的样品预处理方法, 测定了温度诱导型 rhIL-2 工程菌发酵液中的乙酸量, 得到了较好的分离结果。并测出 rhIL-2 在培养过程中确有代谢副产物乙酸的积累, 在升温诱导后乙酸量急剧增加。

**关键词** 工程菌, 发酵, 乙酸, rhIL-2

随着基因工程日新月异的发展, 工程菌的高密度发酵研究越来越受到重视, 但是大肠杆菌在培养过程中, 往往有乙酸产生和积累, 随着培养菌密度的提高, 乙酸的积累量也增加, 成为制约工程菌高密度培养的重要因素<sup>[1-3]</sup>。本文采用 RP-HPLC 法, 选用简便的样品预处理方法, 测定了温度诱导型 rhIL-2 工程菌发酵液中的乙酸量, 得到了较好的分离效果。并测出该菌在培养过程中确有乙酸积累, 在升温诱导后乙酸量急剧增加。

## 1 材料和方法

### 1.1 试剂

**1.1.1 乙酸标准溶液:** 称取乙酸钠 2.78g, 定容 100ml, 即 2% 乙酸溶液。

**1.1.2 样品预处理液:** 0.1mol/L NaOH, 2.3mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH2.6。

**1.1.3 流动相的配制:** 0.04 mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH2.6。以上试剂均为 AR 级, 0.22μm 滤膜过滤。

### 1.2 色谱条件

HP1050 高效液相色谱仪, 色谱柱 μBondpark™C<sub>18</sub>(Waters), 3.9×300mm, 紫外检测器波长 210nm, 流速 1ml/min, 进量 5μl, 乙酸的保留时间为 4.43min。

### 1.3 样品的预处理

取 1ml 发酵液 10000r/min 离心 5min, 取上

清 0.5ml, 加入 0.3g NaCl, 0.1ml 2.3mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 2.5ml 乙醚, 在振荡器上混合 1min, 2000r/min 离心 1min, 取乙醚相 1ml, 加 0.2ml 0.1mol/L NaOH 混合 1min, 2000r/min 离心 1min。吸去上层乙醚, 用试纸测试 pH>9。若不足可继续加 0.1mol/L NaOH 直到 pH>9, 开盖挥发乙醚相后, 置干燥器内干燥, 使溶液中的水分和乙醚挥发完全, 再加入 0.4ml 0.05mol/L (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (pH2.6) 溶解, 10000r/min 离心 10min, 取 5μl 进样分析测定。

### 1.4 标准曲线的绘制

外标法, 取 2% 乙酸溶液, 配制成不同浓度 0、0.2、0.4、0.6、0.8、1.0g/L 的标准溶液, 与样品用同一预处理方法, 进样量 5μl。

### 1.5 发酵条件

菌种为产重组人白细胞介素 2 (rhIL-2) 工程菌 K802 (pLY-4), (由中国科学院上海生化研究所提供)。MD400-7.5L 发酵罐 (B. E. MARUBISHI CO. LTD)。将菌种接种于发酵培养基中, 于 30℃ 培养 14h 后, 升温到 42℃ 诱导 5h, 收集每 2h 的发酵样品用于乙酸分析。

## 2 结果和讨论

### 2.1 样品预处理改进

用 RP-HPLC 进行分析后, 发现发酵液样

品的预处理是乙酸测定的重要环节,最初我们采用文献<sup>[4]</sup>方法进行样品预处理,采用两次萃取的方法,即在 pH 小于 2 的条件下,将有机酸以酸根离子的形式从培养液中萃取乙醚相,再在 pH 大于 9 的条件下,将有机酸以酸根离子的形式萃取到水相,从而将有机酸从培养液中提出来,用 RP-HPLC 分析和定量,但是在乙酸出峰处并未出现乙酸峰,而是出现了一个宽大的拖尾峰,掩盖了后面的待测组分。这可能是由于水相的乙醚没有挥发完全,在文献报道的基础上对最初的方法进行了改进:对两步萃取得到的水溶液进行干燥,以彻底除去乙醚干扰,干燥后的样品用缓冲液溶解后进样,流动相用磷酸盐缓冲液。最终样品分离效果较好,见图 1。

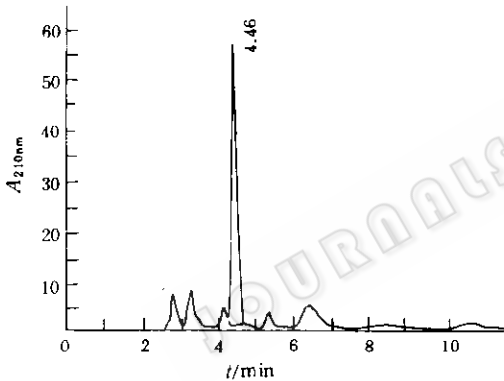


图 1 发酵液样品色谱图

## 2.2 流动相的选择依据

决定流动相的 pH 值的主要因素是被分离的有机酸的 pKa 值,乙酸的解离常数是 4.76, C<sub>18</sub> 柱的 pH 值最小下限是 2,在流动相是酸性环境中,如果允许乙酸有 1% 以离子态存在,则可预测流动相的 pH 值

$$\begin{aligned} \text{pH} &= \text{pKa} + \text{Log} \frac{[\text{Ac}^-]}{[\text{HAc}]} = 4.76 + \text{Log} 1\% \\ &= 2.76 \end{aligned}$$

即流动相的 pH 值应是 pH2~2.76 之间,我们选定 pH 值为 2.6。

## 2.3 保留时间的确定

选取发酵液中可能产生的有机酸如乳酸、酒石酸、顺丁烯二酸、乙酸、柠檬酸、丙酮酸,各取其 2% 标准溶液进样分析,测定各有机酸的保留时间分别是:酒石酸 3.12min、丙酮酸 3.45min、乳酸 4.18min、乙酸 4.42min、顺丁烯二酸 5.40min、柠檬酸 5.43min。

## 2.4 乙酸的标准曲线

以标准液中乙酸量与峰面积作乙酸的标准曲线:

$$\text{回归方程: } y = 28.56x - 9.11, r = 0.995.$$

y: 峰面积 (mav), x: 乙酸含量 (g/L), 线性关系良好。

## 2.5 发酵液样品的乙酸分析结果

以保留时间定性,峰面积定量,用 RP-HPLC 法测定了 rhIL-2 工程菌发酵液中的乙酸量。由结果可以看到:该工程菌在培养过程中确有乙酸积累,在 14h 时,乙酸量为 3.2g/L,升温诱导后急剧上升,至诱导 5h 时乙酸的积累已达到 25.7g/L。这一结果可为 rhIL-2 工程菌高密度发酵的条件优化提供实验依据。

## 参 考 文 献

- [1] Meyer H P, Christian L, Armin F *et al.* J Biotech, 1984, 1: 355~358.
- [2] Jensen E B and Carlsen S. Biotech Bioeng, 1990 36: 1~11.
- [3] Norio Shimizu, Shinichi Fukuzono, Yoshinori Harada *et al.* Biotech Bioeng, 1991, 38: 37~42.
- [4] Gregory W L, William R S. Appl Environ Microbiol, 1990, 56(4): 1004~1011.