

# 基因工程菌培养过程的动力学模型

郑穗平 郭 勇

(华南理工大学生物工程研究所 广州 510641)

基因工程技术是当代生物工程的核心。在实验室中已经应用基因工程菌株得到多种有重要价值的产物<sup>[1]</sup>,但真正能转化为工业化生产的还不多。这主要因为工程菌培养技术是传统发酵工艺的延伸和发展,缺乏完善的理论和成熟的操作准则,使得工艺设计和操作存在较大缺陷。而对基因工程菌培养过程进行控制的关键在于解决这样一个问题<sup>[2]</sup>:宿主的生理遗传特性影响着外源基因的表达,外源基因的表达又影响着宿主的生长特性。研究其培养过程的动力学行为主要就是将二者之间的作用规律和控制因素了解清楚,建立合理的数学模型。因此工程菌培养过程的动力学研究具有重要的指导意义<sup>[3]</sup>,可为从实验室规模转向工业化生产提供放大和优化控制的手段。

## 1 动力学模型的分类

基因工程菌培养体系是一个多相、多组分、非线性的复杂系统。从工程角度出发,有必要首先对该系统进行合理简化,然后建立合理的动力学模型。通常对细胞

群体所进行的简化假设有两方面:(1)是否考虑细胞内部复杂的结构;(2)是否考虑细胞之间的差别。得到以下四种模型<sup>[4]</sup>:

模型 I 为非离散非结构模型,即均衡生长模型,基本依据是“均衡生长”的假设<sup>[5]</sup>。模型回避细胞内外的传递过程以及胞内生理生化过程,忽略胞间差异及不同时期组成及代谢特性的差异,直接对假设为均一的培养体系作宏观描述,研究细胞群体生长代谢规律。对普通微生物培养过程来说,这类模型已经足够,但在分析胞内诱导作用及外源基因表达时是无能为力的。

模型 II 为离散而非结构模型。培养体系中的细胞被区分为多种不同形态、功能的类型,细胞总量为各类型的总和。这种模型对于培养过程中细胞存在明显差异的系统是适合的。例如,工程菌培养过程中由于质粒分配的不稳定性,就会出现带质粒和不带质粒的两种细胞类型,其生理行为存在较大差异。

模型 III 为结构而非离散模型。细胞被分隔为多个

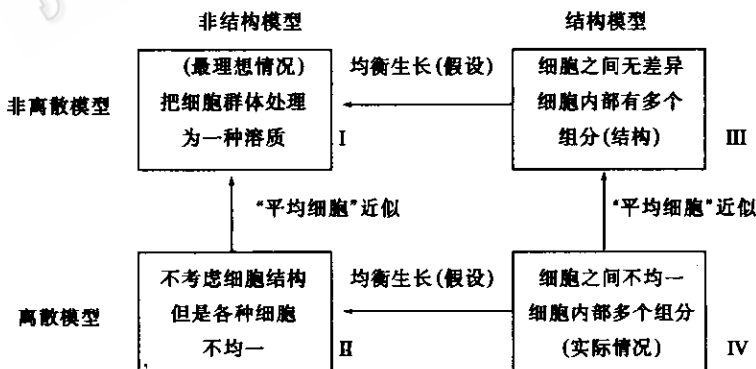


图1 对细胞群体的描述模型

不同功能的部分,各部分相互协调作用,完成细胞的各种生理功能。由于考虑到胞内不同功能部分的代谢和相互作用,这类模型对分析胞内代谢调控很有应用价值。基因工程菌由于携带外源基因,通过分析外源基因与宿主的相互关系,对工程菌培养过程的优化具有指导作用。目前有大量基因工程菌培养过程的结构模型<sup>[9~22]</sup>提

出。

模型 IV 是离散结构模型,是细胞培养过程实际情况。目前这类模型主要是模拟单个细胞内的生化反应体系,进而通过单细胞模型的不同组合来建立高层次的高

散结构模型<sup>[6,7]</sup>,来描述细胞群体的生长过程。

## 2 基因工程菌培养过程的动力学模型

基因工程菌培养过程中,宿主、外源基因以及外界环境之间的相互作用是广泛的,构建一个完整的描述模型相当困难。目前的研究多分散于培养过程的各个方面,随着实验现象和实验数据的积累,提出的动力学模型将越来越完善。

### 2.1 外源基因的表达和控制机制

外源基因在宿主内的表达可以由组成型基因(如 *E. coli* 的 $\beta$ -内酰胺酶等)或构建质粒时加入的 Lac、Trp、Tac 以及  $P_L$ 、 $P_R$  启动子控制<sup>[8]</sup>。对这些表达控制系统的建模,有助于了解他们在工程菌中的调控行为,从而能够合理地构建表达系统,并根据其控制规律在生产中采取相应的控制措施。

Imanaka 等<sup>[23]</sup>最早提出野生 *E. coli* 中 Lac 启动子控制 $\beta$ -半乳糖苷酶合成的动力学模型。该模型设 $\beta$ -半乳糖苷酶的生成量正比于胞内 mRNA 含量,而 mRNA 含量又与阻遏子含量成反比合成。虽然该模型不是直接描述工程菌的培养过程,但对以后的研究有指导意义。Laffend 等<sup>[9]</sup>由 Cornell 单细胞模型<sup>[10]</sup>出发,给出一个结构化程度很高的控制模型。该模型以野生的和带有 ColEI 质粒的 *E. coli* B / rA 为对象,把启动子控制行为与细胞其它代谢过程紧密关联起来,将结构基因的转录、翻译以及诱导物的吸收、运输等局部过程纳入模型体系中,使模型描述更为精确。

Yap 等<sup>[11]</sup>研究了 trp 操纵单元在阻遏控制过程中的行为。模型包含了辅阻遏物以及活性阻遏物复合体在结合位点上的动力学过程,并分别对带低拷贝数(10)和高拷贝数(100)质粒工程菌的表达控制过程进行模拟。Liu 等<sup>[12]</sup>也研究了 *E. coli* 中 trp 操纵单元对氨基酸合成过程的代谢调控规律,并用于指导 *E. coli* 工程菌生产氨基酸的实际过程。

构建一个好的表达系统并非易事,需要通过多次改变基因结构来提高表达系统的效率,工作量庞大但效果欠佳。故此近年来也有不少研究者利用数学模型来模拟、评估各种构建组合,从而减少构建工作的盲目性。Bailey 等<sup>[13]</sup>分别利用 lac 和  $\lambda P_R$  启动子的结构模型研究了 8 种不同阻遏组合对克隆基因调控的有效性。相信随着外源基因表达控制系统的动力学模型不断完善,构建一个合理的表达系统将不再是一个盲目、随机的过程。

### 2.2 质粒的行为规律

质粒的生理行为与宿主以及质粒本身、外界环境等有紧密关系<sup>[8]</sup>。工程菌培养过程中经常会发现带有变异质粒或缺失质粒的非生产细胞的存在,从而严重降低外源基因产物的产率。其原因主要有:质粒的分配不稳定性、结构不稳定性,质粒不同拷贝状态对宿主细胞生理的影响等。因此对培养过程中质粒行为建立合理的动力学模型描述,将有助于控制质粒的稳定性,确定质粒的复制速率和产物合成的有利条件。

出于控制的目的,目前质粒多构建为温度敏感型,在不同的温度条件下,质粒出现不同的拷贝状态。Nielsen 等人对这种类型质粒的复制机制建立了结构模型<sup>[14,15]</sup>。模型的基本假设是细胞被分为四个部分:细胞活性部分,质粒 DNA,质粒基因产物和细胞结构遗传部分。通过模型的分析可得到一些关于带有这类质粒的工程菌培养过程的基本规律:(1)外源蛋白的合成速率取决于拷贝数和活性部分含量,在高拷贝状态下,基本结构物质如氨基酸的供应成为限制性因素;(2)当质粒由低拷贝向高拷贝状态转移时,宿主的代谢活力会在宿主自身酶系和外源产物合成上进行分配,导致宿主生长速率降低;(3)最佳诱导时机的选择将折衷于获得最大拷贝数的质粒和维持相当程度的活性部分含量。

描述一般质粒的稳定性以及复制机理的模型也有提出。Shuler 等<sup>[16]</sup>提出一个预测模型,预测 *E. coli* 中质粒的分配机理以及不稳定性程度。而 Agrawal 等<sup>[17]</sup>则提出一个用于估计细胞内质粒含量的模型,对控制质粒基因的表达过程有指导作用。而关于环境因素如连续培养过程的稀释速率、pH 值、基质营养成分等对质粒行为的影响的模型<sup>[18]</sup>也有文献报道。

### 2.3 外界环境对工程菌生长及产物表达的综合影响

基因工程菌的培养工艺多采用二阶段培养<sup>[1]</sup>,先在一定时间内提高菌体密度,然后通过改变外界条件促使目的产物的表达。最常见的变化就是添加诱导物。但不同的宿主系统对不同诱导物、不同诱导强度以及诱导时机会有不同的反应。必须综合评价其对工程菌生长以及产物合成的影响来确定最佳条件<sup>[21,22]</sup>。改变温度也是另一种常见手段。建立合理的模型将有利于这些条件的快速、有效评估。

在 Ramirez 的模型中<sup>[19]</sup>,基因工程菌在添加诱导物后的反应分为三类:1) $\mu$ 基本不变;2) $\mu$ 受到冲击,适应一段时期后恢复到适当水平;3) $\mu$ 单调下降。模型主要描述第二种影响,包括诱导物冲击(shock)和宿主恢复(recovery)两个过程。研究对象为 *E. coli* 工程菌,外源

目的产物为 $\beta$ -半乳糖苷酶。在不同的底物(葡萄糖)和诱导物添加的情况下,模型均能很好地描述诱导物对于细胞生长的影响。细胞在添加诱导物后,代谢活力将在宿主蛋白和外源蛋白的合成酶系之间作一分配,从而表现一个适应过程,而过程的长短与诱导物的强度、浓度有关。改变冲击和恢复过程的机制可以解释不同的生长速率抑制机理。利用模型可以确定最优的诱导物添加时间和添加量,并可进一步用作最优添加方式的研究来降低诱导物作用对受体细胞的毒害作用。

Kompla的模型<sup>[20]</sup>结果同上吻合。而且由于在模型中引入了诱导物的运动过程(吸收、胞内运输等),在外源产物合成过程中还考虑到RNA和阻遏物作用的影响,模型得出的细胞变化曲线与实际情况更接近。

### 3 发展前景

基因工程菌上游构建工作的成果日新月异,而目前的培养过程动力学模型却大多只能描述一些成熟、经典的工程菌株。因此如何把握各种外源基因与宿主细胞关系的共性,来建立应用范围广泛的动力学模型,以适应快速壮大的工程菌株队伍,将是以后研究的重点。另外动力学模型中包含了很多反应细胞代谢过程的特性参数,今后应当系统地整理这些实验数据,更好地为建模研究服务。

基因工程技术产业化仍旧是基因工程技术今后发展的核心,下游技术尤其是培养工艺的完善将是促进产业化进程的关键。就目前为止,基因工程菌培养过程动力学的研究还不够深入。在我国,很多基础性研究尚未开展,应当在今后大力加强。

### 参 考 文 献

[1] 赵震,叶勤,俞俊棠. 工业微生物, 1995, 25(2): 26~32.  
 [2] 施源,袁渭康. 生物工程学报, 1989, 5(4): 255~260.  
 [3] 巫玉珍,孙玉昆. 生物工程学报(增刊), 1996, 12: 53~57.  
 [4] 刘国拴,陈因良,苏天升著. 生物工程下游技术-细胞培养、分离纯化和分析检测, 北京: 化学工业出版社, 1995, 2~4.

[5] L拉皮德斯, N R阿蒙特森主编. 化学反应器理论, 北京: 石油工业出版社, 1984, 278~292.  
 [6] 安东·莫泽尔著, 曲音波等译. 生物工艺技术学, 长沙: 湖南科学技术出版社, 1993, 60~81.  
 [7] 王渭池, 欧阳藩. 生物工程进展, 1995, 15(3): 25~29.  
 [8] Zabrniskie D W, Arcuri E J. 1986, *Enz Microb Technol*, 8: 706.  
 [9] Laffend L, Shuler M L. 1994, *Biotechnol Bioeng*, 43: 399~410.  
 [10] Shu J, Shuler M L. 1989, *Biotechnol Bioeng*, 33: 1117~1126.  
 [11] Koh B T, Yap M G S. 1993, *Biotechnol Bioeng*, 41: 707~714.  
 [12] Sen A K, Liu W M. 1990, *Biotechnol Bioeng*, 35: 185~194.  
 [13] Chen W, Bailey J E, Lee S B. 1991, *Biotechnol Bioeng*, 38: 679~687.  
 [14] Nielsen J, Strudsholm K. 1991, *Biotechnol Bioeng*, 37: 802~808.  
 [15] Nielsen J, Emborg C, Halberg K. 1989, *Biotechnol Bioeng*, 34: 478~486.  
 [16] Kim B G, Shuler M L. 1990, *Biotechnol Bioeng*, 36: 581~592.  
 [17] Satyagal V N, Agrawal P. 1990, *Biotechnol Bioeng*, 35: 23~30.  
 [18] Bentley W E, Kompala D S. 1990, *Biotechnol Lett*, 12: 329~334.  
 [19] Lee J, Ramirez W F. 1992, *Biotechnol Bioeng*, 39: 635~646.  
 [20] Kompala D S, Bentley W E, Davis R H. 1991, *Biotechnol Bioeng*, 38: 749~760.  
 [21] Axe D D, Bailey J E. 1994, *Biotechnol Bioeng*, 43: 242~257.  
 [22] Georgiou G. 1988, *AIChE J*, 34: 1233.  
 [23] Imanaka T, Aiba S. 1977, *Biotechnol Bioeng*, 19: 757~764.