

大肠杆菌 BL21(DE3)磷酸转乙酰基酶缺陷变株的发酵研究

张惟材* 邓兵兵 彭清忠 黄培堂 朱厚础

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 研究了 *E. coli* BL21(DE3)及其磷酸转乙酰基酶(PTA)缺陷变株 FR55 发酵过程中菌体生长和有机酸产生情况 ,并以肿瘤坏死因子(TNF)为外源蛋白表达的模型考察了 *pta* 基因缺陷对外源蛋白表达的影响。在摇瓶培养条件下 ,*pta* 变株 TNF 的表达水平比亲株提高了 23%。在 5L 发酵罐中进行了补料分批培养试验 ,在不限比生长速率的条件下 *pta* 变株能够以较长时间和较高比生长速率保持对数生长 ,最终达到 32.5g(DCW)/L 的菌密度 ,TNF 的总表达量达 2.8g/L ,而在相同条件下 ,以 BL21(DE3)为受体菌的对照组最高菌密度为 19.5g(DCW)/L ,TNF 总表达量只有 0.84g/L。表明 *pta* 变株对于提高工程菌外源蛋白的表达和实现高密度培养具有一定应用价值。分析了补料分批培养过程中发酵液有机酸组成和含量的动态变化情况 ,发现 *pta* 变株乙酸累积水平明显降低(为亲株乙酸累积水平的 42%)的同时 ,其他几种有机酸(丙酮酸、乳酸、琥珀酸)的累积有显著增加的趋势 ,使发酵液中总有机酸浓度增加了 123% ,其中乳酸的累积是影响菌体进一步生长的主要因素。

关键词 磷酸转乙酰基酶缺陷变株 , 高密度培养 , 有机酸

中图分类号 Q933 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2001)01-0059-05

在工程菌发酵过程中 ,乙酸的大量累积不利于菌体的高密度培养和外源蛋白的高表达。利用代谢工程对工程菌进行改良 ,可望从根本上解决毒副代谢产物累积的问题 ,具有良好的应用前景^[1]。磷酸转乙酰基酶(Phosphotransacetylase ,PTA)是大肠杆菌同化乙酸以及产生乙酸主要途径上的一个关键酶 ,*pta* 基因的缺陷能够阻断大肠杆菌乙酸产生的主要通路 ,直接降低乙酸的累积水平。关于 *pta* 变株在工程菌发酵中的优劣 ,在一些报道中的结论不尽一致^[2~4]。我们以 BL21(DE3)为出发菌 ,筛选得到了 5 株 *pta* 缺陷变株 ,并对 *pta* 变株的特性进行了考察^[5]。本文我们选择了其中一株 *pta* 变株 FR55 进行了发酵和外源蛋白表达的研究 ,现将结果报道于下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒 *Escherichia coli* BL21(DE3)为本室保藏的基因工程受体菌 ,FR55 系本课题组自 BL21(DE3)选育得到的一株磷酸转乙酰基酶缺陷

变株^[5] ,pMGZ001 为表达人 TNF- α 的重组质粒 ,由本所周晓巍博士构建。

1.1.2 主要仪器和试剂 Biostat B 型发酵罐和 Cer-tomat H 型恒温振荡器均系德国贝朗国际生物工程公司产品 ,CS-9301PC 型薄层扫描仪系日本岛津公司产品 ,气相色谱仪 HP4890D 和 HP-FFAP 毛细管分析柱均系惠普(Hewlett Packard)公司生产。人 TNF- α 由本室吴军博士惠赠 ,蛋白胨和酵母提取物系英国 Unipath 公司产品 ,其余均系国产分析纯化学试剂。

1.1.3 培养基 LB 培养基见文献[6] ,LBG 培养基见文献[5]。

FIM 培养基(发酵初始培养基 ,1L) : 蛋白胨 30g ,酵母提取物 30g , $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 10.63g , $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 4.45g , $MgSO_4$ 0.5g , $CaCl_2$ 30mg ,灭菌后每升培养液中加 10% 泡敌 0.5mL ,50% 葡萄糖溶液 30mL。

1.2 方法

乙酸和非挥发性有机酸的气相色谱分析方法已另文^[7]发表 ,葡萄糖含量测定采用 3,5-二硝基水杨

酸法^[8],蛋白质定量测定采用 Lowry 法^[9],TNF 的表达量测定采用 SDS-PAGE 分离后用考马斯亮蓝染色,再通过凝胶扫描进行分析^[6],以 TNF 标准品为外标对 TNF 进行定量。TNF 的表达水平用 TNF 在菌体总可溶性蛋白中的百分含量表示。

2 结 果

2.1 摇瓶培养下外源蛋白的表达

分别以 BL21(DE3)和 FR55 为宿主考察了外源蛋白的表达情况。用表达 TNF- α 的重组质粒 pMGZ001 分别转化两株受体菌,考察在摇瓶实验条件下工程菌的生长和 TNF 的表达水平。每株菌各设六组试验,分别在菌密度为 0.3~1.8 下开始升温诱导,在不同时间取样分析菌密度和 TNF 的表达水平,测定每组最适诱导时间下菌密度和 TNF 表达水平。结果见表 1。

表 1 摇瓶培养条件下 BL21(DE3)及其 pta 变株的 TNF 表达

Table 1 TNF expression of BL21(DE3) and its pta mutant under shaking conditions				
Cell density before induction (A_{600})	Cell density after induction (A_{600})		TNF expression (%)	
	BL21(DE3)	FR55	BL21(DE3)	FR55
0.3	3.76	1.56	18.8	47.8
0.6	4.56	2.68	32.8	53.7
0.9	5.15	3.64	32.7	48.0
1.2	4.98	3.87	41.2	49.2
1.5	5.14	4.25	43.6	41.2
1.8	5.21	4.29	42.1	32.4

从表 1 结果看到:①在 TNF 的表达中,对于 BL21(DE3)及其 pta 变株 FR55 均有一个最适的诱导菌密度。BL21(DE3)/pMGZ001 过早地升温诱导会导致 TNF 表达水平显著下降,其最适诱导菌密度为 1.5 左右,而 FR55/pMGZ001 宜在较早期开始诱导,菌密度在 0.6~1.2 之间时诱导 TNF 表达水平较高。②一般情况下 pta 变株 FR55 对 TNF 的表达水平高于亲株 BL21(DE3),在最适条件下变株 TNF 的表达量可达 53.7%,比亲株 BL21(DE3)的最高表达水平(43.6%)提高了 23%。

2.2 补料分批培养

将 BL21(DE3)/pMGZ001 和 FR55/pMGZ001 分别在不限比生长速率条件下进行补料分批培养,使菌体以较高的比生长速率生长。发酵条件:发酵初始培养基为 FIM,初糖浓度 16g/L,在培养过程中取样检测发酵液中葡萄糖的残留量,葡萄糖浓度低于 2.5g/L 时开始流加 50% 的葡萄糖进行补料,并使发酵液的葡萄糖浓度不低于 2.5g/L,接种量为

5%,发酵温度 30℃,至菌密度 A_{600} 达到 30 时开始升温诱导,诱导温度 42℃。图 1 为上述分批补料培养的结果。从这一结果看到,在同等条件下进行不限比生长速率的补料分批培养时,最初亲株 BL21(DE3)以较高速率增长,但在菌密度达 20 左右,生长速率减慢,菌密度达到 40 左右时实际已停止生长,进入衰退期。而 pta 变株的生长速率在此时虽然也明显下降,但仍能以一定生长速率增长。发酵 13h 菌密度达到 66.8,比在控制比生长速率条件下达到同等菌密度(结果未显示)缩短了 4h。

从图 1 结果还看到,pta 变株不呈典型的细菌生长曲线增长。FR55 在接种初期生长速率略低,其后比生长速率逐渐增加。这可能是由于发酵初期累积的低浓度乙酸对 pta 变株生长具有刺激作用引起的。尽管在发酵后期 FR55 的比生长速率也有所下降,仍在 0.3 左右,超过了野生型大肠杆菌产生乙酸的阈值。

通过 SDS-PAGE 检测了外源蛋白 TNF 的表达情况,结果见图 2 和表 2。从这些结果看到,在不限比生长速率的补料分批培养条件下,pta 变株 TNF 的总表达量可达 2.8g/L,而亲株只有 0.81g/L。

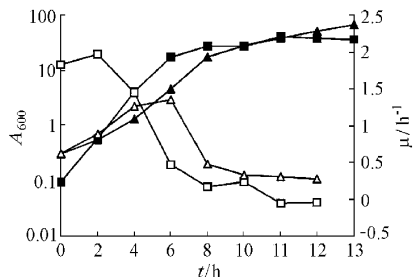


图 1 不限比生长速率的补料分批培养时, BL21(DE3)/pMGZ001 和 FR55/pMGZ001 的生长
Fig. 1 Growth of BL21(DE3)/pMGZ001 and FR55/pMGZ001 under fed-batch culture conditions without specific growth rate limitation
■ or ▲ Optical density with BL21(DE3)/pMGZ001 or FR55/pMGZ001
□ or △ Specific growth rate with BL21(DE3)/pMGZ001 or FR55/pMGZ001

表 2 BL21(DE3)及其 pta 变株补料分批培养结果
Table 2 Results of fed-batch culture of BL21(DE3) and its pta mutant

	BL21(DE3)/pMGZ001	FR55/pMGZ001
Cell density(A_{600})	40.0	66.8
Dry cell weight	19.5 g/L	32.5 g/L
Percentage of TNF on total protein	37.0%	59.6%
Concentration of TNF	0.84 g/L	2.8 g/L

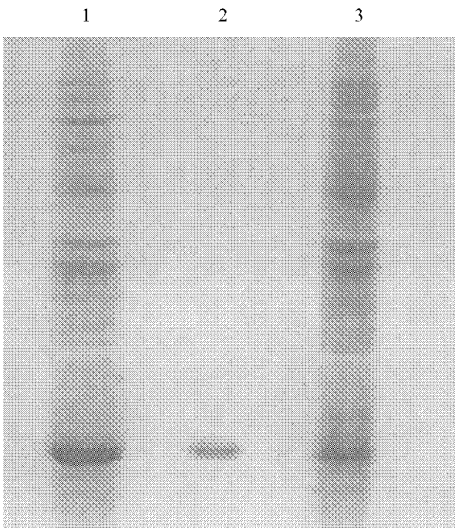


图 2 BL21(DE3)及其 pta 变株对 TNF 的表达
Fig.2 TNF expression of BL21(DE3) and its pta mutant
1. FR55/pMGZ001 2. Standard TNF 3. BL21(DE3)pMGZ001

2.3 补料分批发酵过程中有机酸的累积

用气相色谱法分析了发酵过程中有机酸的产生情况,发现 BL21(DE3)在发酵过程中产生的有机酸以乙酸为主,其他有机酸含量都较低,而变株 FR55 在乙酸累积水平显著降低的同时其他几种有机酸累积水平明显升高。这几种有机酸主要为乳酸、丙酮酸和琥珀酸。分析了两株菌在不限比生长速率的

补料分批发酵过程中各种有机酸累积浓度的变化情况,结果见图 3。

从图 3 结果看到:①在不限比生长速率的补料分批发酵过程中,pta 变株的乙酸累积低于其亲株 BL21(DE3),尤其在发酵后期两者差异更加显著。在发酵终期乙酸的累积浓度分别为 4.22g/L (70.3mmol/L)和 9.79g/L (163mmol/L),前者为后者的 43 %。②在 BL21(DE3)的发酵过程中,乳酸、丙酮酸和琥珀酸的累积很低,只是在发酵后期(发酵 10h 后,菌密度达到 $A_{600} = 30$ 左右)才开始有较明显的累积,而且累积浓度都不太高。pta 变株 FR55 对这些有机酸的累积则明显高于其亲株。③pta 变株 FR55 乳酸的累积在发酵 12h 时一度达到 11g/L (123mmol/L),但很快又迅速下降,而此时丙酮酸累积浓度突然急剧增加。从这个现象来看,似乎有一部分乳酸转变为丙酮酸。可见在发酵过程中各种有机酸可能发生相互转化。④在发酵结束时 BL21 (DE3)和 FR55 产生的 4 种有机酸的摩尔浓度总和分别约为 0.22mol/L 和 0.48mol/L,这与发酵过程中补加碱液(4mol/L 的氨水)的总量大致吻合,说明 4 种有机酸摩尔浓度的总和基本上反映了发酵液中有机酸的总浓度。这个结果表明,尽管 pta 变株 FR55 在乙酸累积方面明显低于亲株 BL21(DE3),但由于其它有机酸的大量分泌,使其分泌的有机酸

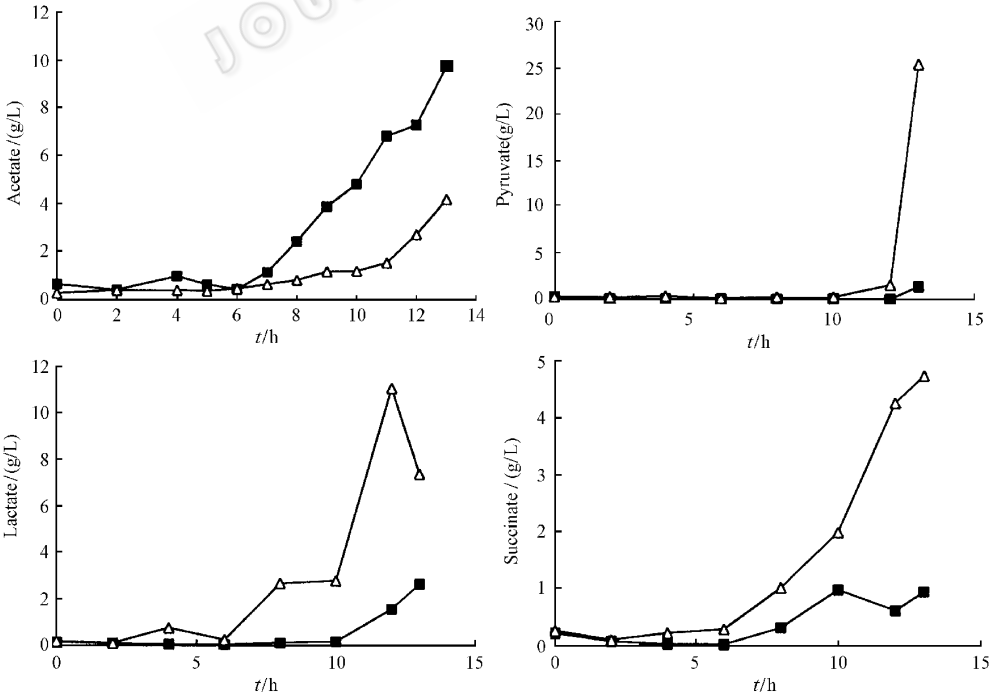


图 3 BL21(DE3)及其 pta 变株在补料分批发酵过程中有机酸的累积
Fig.3 Accumulation of organic acids during fed-batch culture of BL21(DE3) and its pta mutant

■ BL21(DE3)pMGZ001 △ FR55/pMGZ001

总量高于亲株。我们还考察了发酵初始阶段培养液中葡萄糖的残留量,发现尽管 pta 变株的生长速率低于亲株,但对葡萄糖的消耗速率反而有所增加(结果见图 4)。

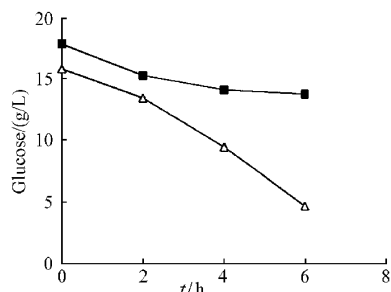


图 4 发酵初始阶段葡萄糖消耗的比较

Fig. 4 Glucose consumption at initial stage of fed-batch culture

■ BL21(DE3) Y_pMGZ001 △ FR55/pMGZ001

3 讨 论

pta 变株在工程菌发酵中具有一定实际应用价值。从前文^[5]及本文取得的结果看到,pta 变株的许多特性与亲株相比发生了较大的变化,其中有些变化对工程菌的发酵是有利的,包括乙酸累积水平下降、对乙酸抑制的抵抗性增强等。本文结果显示,无论在摇瓶还是在补料分批培养条件下 pta 变株对 TNF 的表达与亲株 BL21(DE3)相比有明显提高,这种现象在其他同类研究中也出现过报道^[2],有理由相信 pta 变株会适用于更多外源蛋白的高表达。但我们也发现,pta 变株并非对所有外源蛋白的表达都有增强作用。前文^[5]报道过,pta 变株不但乙酸累积水平下降而且对乙酸抑制作用的抵抗力也有所增强,变株 TNF 表达水平提高与两者都可能存在一定关系。以 pta 变株作为基因工程的宿主菌适合于进行中等水平的高密度培养,可以在不限制比生长速率的条件下在较短时间内获得较高菌密度和外源蛋白表达水平,既可简化高密度培养的工艺,又可缩短培养时间,而且能够获得较高的外源蛋白表达。

pta 变株的碳代谢发生了显著变化。本文研究结果表明,pta 变株乙酸累积水平显著降低的同时其他几种有机酸的累积有大幅度增加。pta 基因缺陷仅仅阻断了大肠杆菌产生乙酸的一条主要通路,没有为进入中心代谢途径大量碳代谢流提供合理的出路,因而过量的碳代谢流生成其他有机酸。本文 pta 变株有机酸总累积量增加以及葡萄糖消耗速率加快的结果还提示,pta 变株对葡萄糖的摄取速率可能还有所提高,而一般认为大肠杆菌对葡萄糖的

过量摄取是有机酸类副产物累积的主要原因。

在发酵过程中 BL21(DE3)及其 pta 变株的生长受到各种有机酸的综合影响。关于各种有机酸对 BL21(DE3)及其 pta 变株 FR55 生长的影响,我们在前文^[5]已经作了考察。根据本项工作对发酵液中各种有机酸累积情况的分析和有机酸对菌株生长的影响可以看出:①在 BL21(DE3)的发酵过程中乙酸累积浓度较高,而其他有机酸浓度较低,BL21(DE3)对乙酸也较敏感,因此乙酸是发酵中生长抑制的主要因素。pta 变株 FR55 的乙酸累积速率较为缓慢,乙酸累积浓度也较低,至发酵 13h 时达到 4.2g/L (70mmol/L)。这个浓度对于 FR55 生长的抑制作用很弱(事实上这个浓度的乙酸对变株的生长反而略有刺激作用)。pta 变株累积的乙酸可能不是抑制菌体生长的主要因素。②FR55 琥珀酸累积最高水平只有 4.7g/L (40mmol/L),此浓度的琥珀酸对菌体生长有一定抑制作用,但还不是造成生长停滞的主要因素。③pta 变株在发酵过程中丙酮酸的累积一般不高,只是在发酵至 13h 突然增加到 289mmol/L,从丙酮酸对各菌株生长影响的考察结果看,丙酮酸对菌体生长的抑制作用不明显,尤其对 pta 变株生长的抑制作用更弱。而且丙酮酸的累积并不是一种浪费,累积的丙酮酸随时可进入三羧酸循环。因此丙酮酸的累积对于菌体的生长可能没有较大的影响。此外,从丙酮酸和琥珀酸的累积反映出,在上述发酵条件下大肠杆菌的三羧酸循环及呼吸链可能处于饱和状态。此时在三羧酸循环上增强碳代谢流的结果可能只是进一步增加琥珀酸的累积,无益于细胞的代谢和生长。④pta 变株的乳酸累积有明显增加,在考察乳酸对各菌株生长的影响时看到,乳酸在低浓度时对菌体生长的影响较弱,而到达一定浓度(75~100mmol/L 左右)时抑制作用突然加强,甚至出现溶菌现象。而 pta 变株的乳酸累积在发酵 12h 时一度达到了 123mmol/L 的浓度,尽管至 13h 乳酸浓度降至 82mmol/L,也说明 pta 变株的乳酸累积可能成为其发酵中的一个不利因素。因此乳酸的累积成为 pta 变株 FR55 达到更高培养密度的主要障碍。

pta 变株的有些变化对工程菌发酵是不利的,需要对菌株进一步进行改良。这些不利变化包括生长速率减缓、其他有机酸尤其是乳酸累积浓度增高等,可以针对乳酸的形成进行改良。另外在不改变总的碳代谢流量的情况下将酸性的副产物转化为低毒的中性副产物,也是一种简便可行的策略。业已

证明,在发酵工艺上通过限制葡萄糖的补料速率控制工程菌的比生长速率来减少乙酸的产生,是实现工程菌高密度培养的一项成功的策略^[10]。因此通过控制工程菌对葡萄糖的摄取速率来限制进入中心代谢途径上的碳代谢流量,从而限制工程菌发酵中有机酸类代谢副产物形成,应当取得与上述工艺手段异曲同工的效果。

REFERENCES(参考文献)

- [1] ZHANG WC(张惟材),ZHU HC(朱厚础). High cell density culture and metabolic engineering, *Microbiology(微生物学通报)*,1999, **26** :289~293
- [2] Bauer K A, Ben-Bassat A, Dawson M *et al.* Improved expression of human interleukin-2 in high-cell-density fermentor cultures of *Escherichia coli* K-12 by a phosphotransacetylase Mutant, *Appl Environ Microbiol*, 1990, **56** :1296~1302
- [3] Diaz-Ricci J C, Regan L, Bailey, J E. Effect of alteration of the acetic acid synthesis pathway on the fermentation pattern of *Escherichia coli*, *Biotechnol Bioeng*, 1991, **38** :1318~1324
- [4] Hahn D H, Pan J, Rhee J S. Characterization and evaluation of a

pta (phosphotransacetylase) negative of *Escherichia coli* HB101 as production host of foreign lipase, *Appl Microbiol Biotechnol*, 1994, **42** :100~107

- [5] ZHANG WC(张惟材),DENB BX(邓兵兵),ZHU HC(朱厚础) *et al.* Screen and Characterization of phosphotransacetylase mutants of *E. coli* BL21(DE3), *Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences(军事医学科学院院刊)*,2000, **24** : To be published
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning :A laboratory Manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N Y. 1989
- [7] ZHANG WC(张惟材),DENB BX(邓兵兵),PENG QZ(彭清忠) *et al.* Determination of acetate in the culture of recombinant *E. coli* by gas chromatography. *Letters in Biotechnology(生物技术通讯)*,2000, **11** :196~198
- [8] Millar G L. Use of dinitrosalicylic acid for the determination of reducing sugar, *Anal Chem*, 1959, **32** :426~428
- [9] Lowry O I, Rosebrough N J, Farr A L *et al.* Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J Biol Chem*, 1951, **193** : 265~276
- [10] Lee S Y. High-cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends Biotechnol*, 1996, **14** :98~105

High Cell Density Culture of Phosphotransacetylase Mutants of *Escherichia coli* BL21(DE3)

ZHANG Wei-Cai* DENG Bing-Bing PENG Qing-Zhong HUANG Pei-Tang ZHU Hou-Chu
(Institute of Beijing Biotechnology, Beijing 100071, China)

Abstract Cell culture, organic acid production and foreign protein(TNF) expression of *E. coli* BL21(DE3) and its pta mutant were investigated. Under shaking conditions, TNF expression in pta mutant increased by 23%. During the fed-batch culture without limitation of specific growth rates, the mutant reached a cell density as high as 32.5g DCW/L and total TNF expression at 2.8g/L, while the parental strain only obtained 19.5g DCW/L and 0.84g/L. The results indicate that utility of pta mutant as a host is advantageous in foreign protein expression and high cell density culture. Meanwhile, the analysis data of organic acids accumulated during fed-batch culture showed that as the decrease of acetate production(42% of the parental strain), the accumulation of other organic acids(mainly pyruvate, lactate and succinate) obviously increased. As a result, the amount of total organic acids increased by 123% over its parent. The lactate production may be the main obstacle in further growth of the cells.

Key words recombinant *E. coli*, acetate, phosphotransacetylase