

# GL-7ACA 酰化酶基因工程菌 (*Escherichia coli* MMR204/pZC1) 批式补糖发酵条件优化

龚 巍 陈 军 杨 蕴 刘\*

(中国科学院上海植物生理生态研究所, 上海 200032)

**摘 要** 戊二酰-7-氨基头孢烷酸 (GL-7-ACA) 酰化酶 (3.1.5.11) 可有效催化 GL-7ACA 分子中戊二酰基侧链水解, 形成 7-氨基头孢烷酸 (7-ACA) 而成为两步酶法生产 7-ACA 的重要工业用酶之一。在已构建的 GL-7ACA 酰化酶基因 (*acy*) 重组质粒 pZC1 基础上, 进一步对酰化酶基因工程菌 *Escherichia coli* MMR204/pZC1 的产酶发酵条件进行了考察。研究表明, 工程菌的最佳发酵温度为 33℃, pH7.5~8.5 的微碱条件有利于酶的生成。LB 培养基补加适量葡萄糖 (1~5 g/L), 可提高发酵生物量和产酶水平, 但葡萄糖的过量补加 (6 g/L 以上), 则导致发酵液偏酸 (低至 pH4.0) 而完全抑制酰化酶生成, 并证明工程菌生长和产酶对乙酸的抑制效应较为敏感。同时通过 5L 自控发酵罐的批式补糖试验, 对恒速流加、pH 反馈控制和指数流加等三种补糖模式的发酵产酶进程进行了比较。结果发现, 三种方式的补糖条件下, *acy* 基因在 *tac* 启动子控制下, 呈组成型表达, 细胞生长与产酶同步, 无需诱导; 其中, 以指数流加方式得到的生物量和产酶水平最高。而从 *acy* 基因的表达效率, 即比酶活看, pH 反馈的补料方法略高于恒速或指数流加模式。

**关键词** GL-7ACA 酰化酶, 基因工程菌, 批式补料发酵

**中图分类号** TQ92 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0953-05

长期的临床实践证明, 半合成头孢菌素类抗生素具有选择性强、毒副作用小、疗效明显等优点, 已成为控制细菌性感染的重要临床用药。近年来, 国内外头孢类抗生素工业的发展很快。作为该类药物生产的主要起始原料, 7-氨基头孢烷酸 (7-ACA) 的市场需求也随之日益增长。工业上, 以头孢菌素 C (CPC) 为原料, 去除 CPC 分子中 7 位侧链生产 7-ACA 的传统方法, 均采用化学裂解技术<sup>[1]</sup>。然而, 由于化学法苛刻的反应条件和环境污染, 促使人们致力于转化 CPC 为 7-ACA 的两步酶法工艺研究<sup>[2,3]</sup>。本实验室从一株假单胞菌中克隆得到 GL-7-ACA 酰化酶基因 (*acy*)<sup>[4,5]</sup>, 构建了受 *tac* 启动子控制的 *acy* 重组质粒 pZC1, 并在 *Escherichia coli* MMR204 中实现组成型表达。与其他种类的微生物相比较, 大肠杆菌的生理学和遗传学研究较为详尽, 已被广泛用作基因克隆和表达的宿主菌<sup>[6]</sup>。但是, 该类菌在发酵培养时, 容易产生对生长具有抑制作用的副产物, 特别是乙酸的形成和积累会导致细胞生物量和外源基因表达水平下降<sup>[7]</sup>。对此, 已有一些研究者提出了旨在减少乙酸生成的技术<sup>[8-10]</sup>和突变宿主菌构建<sup>[11-13]</sup>的策略, 并进行了实验研究。本项工作之目的是以 GL-7-ACA 酰化酶基因工程菌, *E. coli* MMR204/pZC1 为材料, 确定影响细胞生长和 GL-7-ACA 酰化酶表达的因素, 考察

了乙酸对产酶的抑制作用, 并在 5 升罐中进行了工程菌发酵补糖模式的比较, 以获得批式补料发酵的较佳产酶条件。

## 1 材料和方法

### 1.1 菌种和质粒

基因工程菌宿主菌为 *Escherichia coli* MMR204 (*kan<sup>r</sup> rec<sup>-</sup> amp<sup>C</sup>*), *acy* 基因重组质粒 pZC1 (*str<sup>r</sup>, acy, P<sub>lac</sub>*) 均由本实验室构建。

### 1.2 试剂

胰蛋白酶, 酵母浸出粉为 Oxoid 产品, Acetic Acid Test-Combination 购自 Boehringer Mannheim 公司, 其余均为国产试剂。

### 1.3 培养基

种子培养基和发酵培养基均为 LB 培养基 (1% 胰蛋白酶、0.5% 酵母浸出粉、1% 氯化钠)。

发酵培养基为 LB 增补葡萄糖 2g/L。

种子和转化子选择培养基含链霉素 (Sm) 20 μg/mL。固体培养基系在 LB 培养液中加 1.5% 琼脂制得。

### 1.4 发酵设备

美国 NBS 公司的 BioFlo III 型 5L 自控发酵罐, AFS 软件。

收稿日期: 2004-04-02, 修回日期: 2004-07-30。

基金项目: 九五国家攻关项目 (No. 96-102-02-01) 和上海市生物与新药产业发展基金项目 (No. 98-4319135)。

\* 通讯作者。 Tel: 86-21-54924222; Fax: 86-21-54924015; E-mail: ylyang@iris.sipp.ac.cn

## 1.5 培养条件

**1.5.1 摇瓶培养:**菌种在平板上 37℃ 培养 12h 后,接入种子培养基(30mL/250mL 锥形瓶),33℃ 振荡培养 8h 后,以 1% 接种量接入发酵培养基(60mL/500mL 锥形瓶),33℃ 振荡培养 40h。

**1.5.2 补料分批培养:**5L 发酵罐中装液量 3L,接种量 2%,发酵温度 33℃,搅拌速度 600r/min。在培养 12h 后,按下述三种不同方式,以 20% 葡萄糖溶液进行流加补料培养,并在 40h 终止发酵。

恒速流加:以恒定的速度将葡萄糖补加到发酵罐中。

pH 反馈流加:当发酵液 pH 达到 8.5 时开始补糖。

指数流加:按流加模式<sup>[14]</sup>  $F_i = (1/S) \times (\mu/Y_{XS} + m) \times X_0 \times e^{-\mu t}$  计算得出流加方程式,利用 AFS 软件每 30 秒改变 1 次流加速率。

$F_i$ :流加速率(L/h)

$S$ :流加糖浓度(g/L)

$\mu$ :比生长速率( $h^{-1}$ )

$Y_{XS}$ :转化率(g/g)

$m$ :比维持系数[g substrate(g cell, h)<sup>-1</sup>]

$X_0$ :补料初始发酵罐中细胞浓度(g)

$t$ :补料时间(h)

## 1.6 分析方法

GL-7ACA 酰化酶酶活测定见参考文献[15]。

葡萄糖浓度:3,5-二硝基水杨酸分析法<sup>[16]</sup>。

乙酸浓度测定:参见 Acetic Acid Test-Combination 产品说明书。

## 2 结果和讨论

### 2.1 GL-7ACA 酰化酶基因工程菌的构建

为使 *acy* 基因在大肠杆菌宿主中进行组成型表达,在本实验室所构建的重组质粒 pZC1 中, *acy* 基因片段处于载体质粒 pDR540 的 *tac* 启动子( $P_{tac}$ )下游,并以链霉素抗性基因 *str'* 置换了原来的氨苄青霉素抗性选择标记(*amp'*)。当重组质粒 pZC1 DNA 转化 *Escherichia coli* MMR204 感受态细胞后,即可从含链霉素的选择平板上获得基因工程菌 *E. coli* MMR204/pZC1。

### 2.2 *E. coli* MMR204/pZC1 发酵产酶条件

考察培养液初始 pH、发酵温度、培养液装瓶量等因素影响 *E. coli* MMR204/pZC1 生长和产酶的实验结果表明,该菌在初始 pH 4~10 之间虽都能生长和产酶,但以 pH 5.5~7.0 较为合适,且在这一范围内的发酵液酶活随 pH 升高而增高。发酵温度的比较显示,在其他条件相同时,37℃ 和 28℃ 的产酶水平相似。然而,在 33℃ 时的发酵单位约为上述两个常用发酵温度的 2 倍。溶氧对菌体生长和产酶量的影响不大,当 500mL 摇瓶中 LB 培养液装量在 20~120mL 之间时,产酶水平并无明显差别。

**2.3 葡萄糖浓度对 *E. coli* MMR204/pZC1 发酵产酶的影响**  
为提高生物量和产酶水平,本实验以 LB 培养基为基础

的摇瓶试验中,测试了初始葡萄糖浓度对 *E. coli* MMR204/pZC1 生长和产酶的影响。结果表明在 1~4 g/L 范围内,细胞量和产酶单位随初糖浓度增大而增加,当初糖浓度达到 6g/L 时,发酵培养液的最终 pH 呈酸性(pH 4.0),且无 GL-7-ACA 酰化酶产生(表 1)。尽管葡萄糖的添加可提高酰化酶的总单位,但是单位细胞的产酶活力,即比酶活,则随初糖浓度增大而有所降低。其中,在添加 1 g/L 葡萄糖的 LB 中的产酶水平是不加葡萄糖对照的 2.2 倍;当添加葡萄糖的浓度为 2~5 g/L 之间时,产酶水平是对照的 2.4 倍,相互间则无明显差异(表 1)。

表 1 LB 培养液中初始葡萄糖浓度对 pH 和 *Escherichia coli* MMR204/pZC1 生长、酰化酶产量的影响

Table 1 The effect of various initial glucose concentrations in LB medium on growth, pH value and acylase yield in 40 hour batch-fermentation with *Escherichia coli* MMR 204/pZC 1

Initial concentration of glucose / (g/L)	OD <sub>600</sub>	The pH of culture broth	Acylase yield		Specific activity / (u/OD <sub>600</sub> )
			/(u/L)	relative/%	
0	2.9	8.8	209	100	71.1
1	4.1	8.5	464	220	113.2
2	5.7	8.5	502	240	88.0
3	6.1	8.5	513	245	84.1
4	6.3	8.0	507	242	80.5
5	6.3	7.5	516	247	82.0
6	6.3	4.0	n d*	—	—

\* not detectible

### 2.4 乙酸对生长和产酶的影响

**2.4.1 *E. coli* MMR204/pZC1 的生长和乙酸的分泌:**基因工程菌 *E. coli* MMR204/pZC1 在含 0.2% 葡萄糖的 LB 培养液中培养,并定时取样测定细胞生长和培养液中的乙酸含量。结果如图 2 所示,随着菌体生长进入对数期,乙酸的分泌增加并在发酵液中积累,这一过程延续数个小时,而且在培养的 4~6h 前后,维持在最高水平(0.37~0.39 g/L),然后逐渐下降至较低(0.08 g/L)的水平(图 1)。

**2.4.2 乙酸对产酶的抑制作用:**为了考察乙酸对基因工程菌产酶的影响,结合上述乙酸分泌的研究结果,在摇瓶发酵的第 6 小时,分别加入 0.3 g/L、0.6 g/L 或 1.2 g/L 乙酸,继续培养,并于不同时间取样检测生长量和酰化酶酶活。图 2 结果显示,低浓度的乙酸(0.3 g/L)可使菌体生长和产酰化酶水平有所提高;当乙酸浓度达到 0.6 g/L,尽管仍对生长有所促进,但 GL-7-ACA 酰化酶的合成受到明显抑制;而加入的乙酸浓度为 1.2 g/L 时,不仅抑制菌体生长,而且不再产酶。

### 2.5 *E. coli* MMR204/pZC1 的摇瓶发酵进程

为了建立 5L 罐发酵补糖模式,首先对摇瓶发酵过程中的相关参数,如:细胞生长量、产酶活性、pH 以及糖的消耗等进行实验分析。如图 4 所示,当 LB 培养液中的初糖浓度为

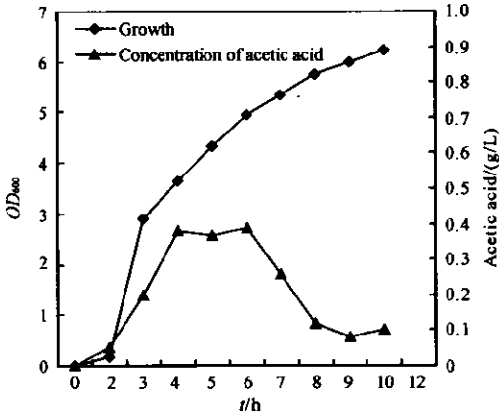


图1 *E. coli* MMR204/pZC1 在含 0.2% 葡萄糖的 LB 培养液中的生长和乙酸累

Fig.1 Growth curves and acetate accumulation of *E. coli* MMR204 harboring pZC1 cultured in LB medium supplemented 0.2% glucose

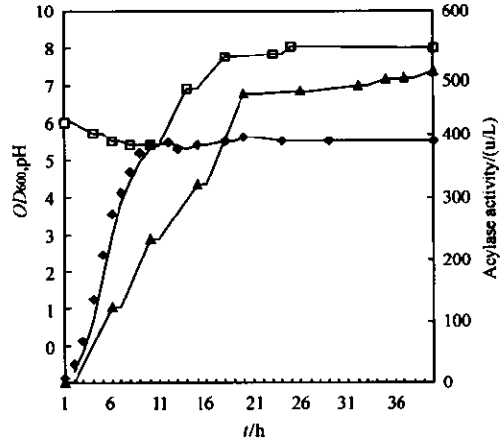


图3 *E. coli* MMR204/pZC1 摇瓶培养的时间进程

Fig.3 The time course of *E. coli* MMR204/pZC1 in flask batch cultivation

—□—pH; —◆—OD<sub>600</sub>; —▲—Activity of GL-7ACA acylase

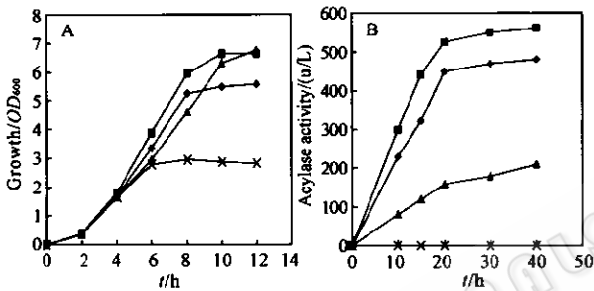


图2 乙酸对 *E. coli* MMR204/pZC1 细胞生长(A)和 GL-7ACA 酰化酶产量(B)的影响

Fig. 2 The influence of acetate on cell growth(A) and production of GL-7ACA acylase (B) in fermentation of *E. coli* MMR204/pZC1

—◆—0g/L; —■—0.3g/L; —▲—0.6g/L; —×—1.2g/L

2 g/L 时, 33 ℃, 振荡培养 10h, 细胞生长已进入对数后期, 生物量达最高值, 酰化酶酶活的增长略滞后于生长。20h 以后, 酰化酶增长缓慢, 趋于稳定。同时, 在发酵初期(前 12h), 培养液 pH 值有所下降, 说明发酵液开始产酸, 但在对数后期 pH 开始回升并保持于 pH8-9 (Fig. 3)。

2.6 摇瓶补糖试验

为提高细胞密度和产酶量, 在摇瓶中进行了补糖试验。工程菌在发酵培养基中 33℃ 生长, 并从 16 h 起, 每隔 2 小时补加 0.05% ~ 0.2% (W/V) 葡萄糖共补糖 5 次, 40 小时后收集菌体、测定酶活。结果发现, 葡萄糖补加量在 0.05% ~ 0.125% 之间时, 葡萄糖补加量与菌体生长和酰化酶产量成正相关, 当每一次的补加量为 0.125% 时, 生长和产酶量达到最高。每次补加量超过 0.15%, 细胞量和产酶单位大幅下跌(图 4A)。比较不同补糖次数对菌体生长和产酶影响的实验表明, 从发酵 16 h 起, 每隔 2 h 补葡萄糖 0.125% 的条件下, 补糖次数以 6 次为最佳。而补加 7~8 次, 酶活稍有下降(图 4B)。

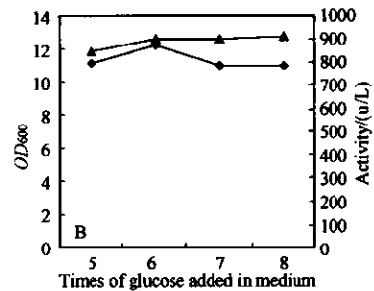
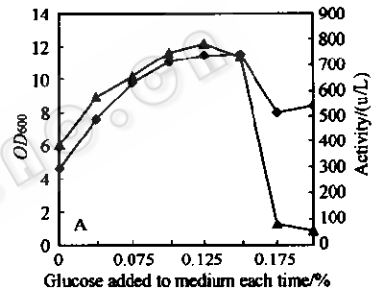


图4 *E. coli* MMR204/pZC1 摇瓶发酵的补糖策略

Fig.4 The glucose feeding strategy of *E. coli* MMR204/pZC1 fermentation in shaking flask

—◆—OD<sub>600</sub>; —▲—Activity of GL-7ACA acylase

2.7 5L 发酵罐中补糖模式的比较

本研究中乙酸对 *E. coli* MMR204/pZC1 生长和产酶的影响以及摇瓶补糖试验结果与国外报道<sup>[8,17,18]</sup> 相一致, 即大肠杆菌及其工程菌发酵时, 葡萄糖的缓慢补加, 有助于所产生乙酸的重新利用和被消耗; 补糖速度过快, 因乙酸积累, 不仅抑制细胞的代谢活力, 而且积累的乙酸不能被重新利用, 最终影响重组蛋白表达<sup>[8,17,18]</sup>。为建立一种有利于菌体生长和重组蛋白表达而又简便可行的发酵罐补糖方法, 进一步对恒速、pH 反馈控制和指数流加等三种补糖模式作了实验比较。从图 5 结果可以看出, 在所有三种情况下, GL-7-ACA 酰化酶基因工程菌 *E. coli* MMR204/pZC1 的细胞生长和发酵产酶曲线基本上相互平行, 即菌浓的增加伴随酰化酶酶活的提

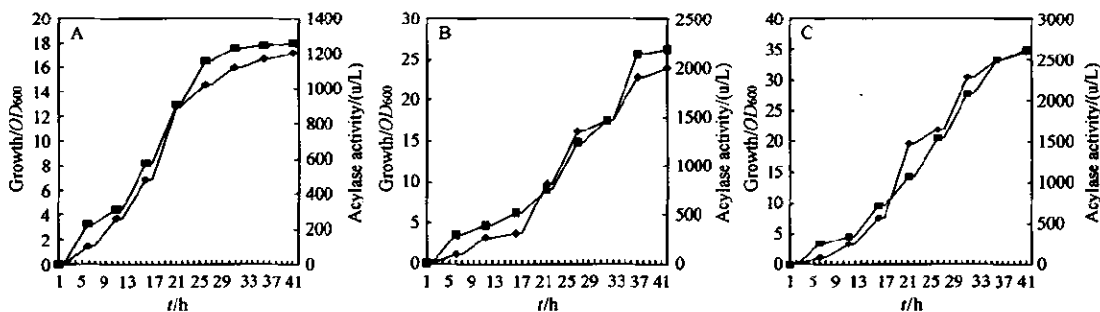


图5 不同补糖模型批次发酵中 *E. coli* MMR204/pZC1 的生长和产酶

Fig. 5 Time-course of MMR204/pZC1 in different glucose feeding strategy

A: constant rate-feeding model; B: pH 8.5 -control model; C: exponential-feeding model

—■—  $OD_{600}$ , —◆— Activity of GL-7ACA acylase

高,说明 *acy* 基因呈组成型表达。

在恒速补糖模式(图5A)中,当发酵液溶氧开始上升,预示初始葡萄糖(2g/L)消耗完时,开始补加葡萄糖。参考摇瓶试验结果将葡萄糖的补加速度控制在0.625 g/(L·h),恒速连续补糖16h,每升发酵液补葡萄糖10g的条件下可得到最大的菌浓(18  $OD_{600}$ )和产酶量(1200 u/L),进一步的补糖并不能使产酶和生物量继续升高。另一方面,加快补糖速度,发酵液会很快发生酸化并抑制产酶;如若减缓补糖速度,虽不影响生长和酶量,但导致发酵时间的延长。

pH反馈补糖试验(图5B)则采用AFS软件,设定pH7.0~8.5这一阈值,通过pH探头反馈控制补糖。随着工程菌的生长,培养基中2g/L初糖的耗完,发酵液的溶氧和pH值开始升高,当pH值达到8.5时,自动开始流加补糖,接着pH值逐渐下降,低至7.0时,补糖自动停止。之后,由于发酵液中葡萄糖及其代谢产物乙酸等被同化和消耗完,pH重新回升,当再次达到8.5时,补糖再次启动。这一补糖模式下,整个发酵过程中所补加的葡萄糖为15g/L发酵液,最终菌浓是26  $OD_{600}$ ,酶产量为2000u/L。

以指数模式补糖(图5C)时,将比生长速率设定为0.1  $h^{-1}$ ,维持系数设定为0,根据摇瓶实验添加特定葡萄糖而产生的细胞浓度,将转化率设定为0.4 g/g。当初始2g/L葡萄糖消耗完,溶氧显著上升后,开始指数补糖。使用AFS软件,每30s改变1次流加速度,在这种模式下,补糖总量控制在18g/L,所获得的生物量和酰化酶活力分别为35  $OD_{600}$ 和2600u/L,继续补糖发酵液很快变酸,酰化酶活力急剧下降。

从上述结果可知,三种补糖方式中,指数补糖可得到最大酶产量。如以单位菌体的产酶活力作为衡量基因表达效率的指标时,则以pH反馈补糖发酵的 *acy* 基因表达效率略高。

#### REFERENCES(参考文献)

[1] Parmar A, Kurmar H, Marwaha S *et al.* Recent trends in enzymatic conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA). *Crit Rev Biotechnol*, 1998, 18(1):1-12

[2] Conlon HD, Baqai J, Baker K *et al.* Two-step immobilized enzyme conversion of cephalosporin C to 7-aminocephalosporanic acid. *Biotechnol Bioeng*, 1995, 46(6):510-513

[3] Nikolov A, Danielsson B. Enzymatic transformation of cephalosporin C to 7-amino-cephalosporanic acid. *Enzyme Microb Technol*, 1994, 16(12):1031-1046

[4] Yang YL(杨蕴刘), Yun DF(郗廷芳), Guan YQ(关颖谦) *et al.* Cloning of GL-7-ACA acylase gene from *Pseudomonas* sp. 130 and its expression in *Escherichia coli*. *Chinese J Biotechnol(生物工程学报)*, 1991, 7(2):99-107

[5] Yang YL(杨蕴刘), Yun DF(郗廷芳), Peng HL(彭惠林) *et al.* Restriction mapping of GL-7-ACA acylase gene fragment and its localization. *Chinese J Biotechnol(生物工程学报)*, 1992, 8(1):15-22

[6] Hannig G, Makrides SC. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnol*, 1998, 16(2):54-60

[7] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Trends in Biotechnol*, 1996, 14(2):98-105

[8] Lee YL, Chang HN. High cell density culture of a recombinant *Escherichia coli* producing penicillin acylase in a membrane cell recycle fermenter. *Biotechnol Bioeng*, 1990, 36(3):330-337

[9] Shiloach J, Kaufman J, Guillard A *et al.* Effect of glucose supply strategy on accumulation, growth, and recombinant protein production by *Escherichia coli* BL21(DE3) and *Escherichia coli* JM109. *Biotechnol Bioeng*, 1996, 49(4):421-428

[10] Bhattacharya SK, Duben AK. High level expression of a heterologous gene in *Escherichia coli* in response to carbon-nitrogen source and C/N ratio in a batch reactor. *Biotechnol Prog*, 1997, 13(2):151-155

[11] Zhang WC(张惟材), Deng BB(邓兵兵), Peng QZ(彭清忠) *et al.* High cell density culture of phosphotransacetylase mutants of *Escherichia coli* BL21(DE3). *Chinese J Biotechnol(生物工程学报)*, 2001, 17(1):59-63

[12] Zhu TB(朱彤波), Yang YL(杨蕴刘), Jiao RS(焦瑞身). The selection of fluoroacetate-resistant mutant from *E. coli* MMR204 and its influence on the expression of heterologous GL-7ACA acylase. *Chinese J Biotechnol(生物工程学报)*, 2000, 40(1):100-104

- [13] Chou CH, Bennet GN, San K Y. Effect of modified glucose uptake using genetic engineering techniques on higher level recombinant protein production in *Escherichia coli* dense cultures. *Biotechnol Bioeng*, 1994, 44(10):952 - 960
- [14] Strandberg L, Andersson L, Enfors S. The use of fed batch cultivation for achieving high cell densities in the production of a recombinant protein in *Escherichia coli*. *FEMS Microb Rev*, 1994, 14(1):53 - 58
- [15] Shibuya Y, Matsumoto K, Fuji T. Isolation and properties of 7 $\beta$ -(4-Carboxybutanamido) cephalosporanic acid acylase-producing bacteria. *Agric Biol Chem*, 1980, 45(7):1561
- [16] Cai WC (蔡武城) Chemical Analytical Methods for Biological Materials. Beijing: Science Press. 1982, pp.56 - 58
- [17] Luli GW, Strohl W. Comparison of growth, acetate production and acetate inhibition of *Escherichia coli* strains in batch and fed-batch fermentations. *Appl Environ Microb*, 1990, 56(4):1004 - 1011
- [18] Kleman GL, Strohl WR. Acetate metabolism by *Escherichia coli* in High-cell-density fermentation. *Appl Environ Microb*, 1994, 60(11):3952 - 3958

## Optimization of Glucose Fed-batch Culture for GL-7-ACA Acylase Production by *Escherichia coli* MMR204/pZC1

GONG Wei CHEN Jun YANG Yun-Liu\*

(Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, The Chinese Academy of Science, Shanghai 200032, China)

**Abstract** Gluteryl-7-aminocephalosporanic acid (GL-7-ACA) acylase (EC 3.1.5.11), one of the important industrial enzyme used in the manufacture of 7-aminocephalosporanic acid (7-ACA) through the two-step enzymatic process, catalyses efficient bioconversion of GL-7-ACA to 7-ACA. The objective of this work was to study the production of GL-7-ACA acylase using genetic engineering strain, *Escherichia coli* MMR204 harboring recombinant plasmid pZC1 grown in batch and fed-batch culture on LB medium supplemented with glucose. It was found that the optimal temperature and pH in the fermentation for enzyme production were 33°C and 7.5 ~ 8.5, respectively. The initial concentration of glucose ranging between 1 and 5 g/L facilitate the increase of both biomass and enzyme productivity. When the concentration of glucose added reached to 6g/L, culture broth in the end of fermentation was acidic (pH 4.0) without GL-7-ACA acylase formation. In the comparison of three kinds of feeding mode for glucose fed-batch operation in 5L fermentor, it was demonstrated that the acy gene was constitutively expressed under the control of the tac-promoter without induction and the exponential feeding gave the highest yield of both the biomass and enzyme activity, but the expression efficiency of acy gene with pH8.5-constant control mode in the fed-batch culture was slightly higher than exponential or steady rate mode.

**Key words** GL-7-ACA acylase, expression in *E. coli*, fed batch fermentation

Received: 04-02-2004

This work was supported by the 9<sup>th</sup> Five-year Key Program of the State Science and Technology (No.96-102-02-01) and Shanghai Fund for Biotechnology and Pharmaceutics Development(No.98-4319135).

\* Corresponding author. Tel:86-21-54924222; Fax:86-21-54924015; E-mail:ylyang@iris.sipp.ac.cn