

MM 工程菌的大规模发酵培养工艺研究

方宏清 王叙甫 陈 明 王焕金 阎明凡

(军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要 首先在 50L 发酵罐上研究了 MM 工程菌的发酵培养工艺。确定了接种量 4%, 搅拌转速 300~500r/min, pH7.2 和糖补加速率 $0.066 \text{ g} \cdot (\text{L} \cdot \text{min})^{-1}$ 等参数, 活菌数可达每毫升 211 亿。以氧传递系数为放大准则可成功地将该工艺在 200L 国产发酵罐上再现, 说明该工艺具有可放大性。

关键词 疫苗, 大肠杆菌, 发酵, 放大

由毒素源性大肠杆菌引起的新生仔猪腹泻是一种常见传染病, 其发病率和死亡率都很高, 给养猪业带来严重的损失。过去主要采用灭活疫苗进行预防, 效果不够理想。为了能够提供有效的预防措施, 我们所构建了 K88-LTB 双价基因工程菌(简称 MM 工程菌)活疫苗^[1], 经实验室和实地观察证明对预防仔猪大肠杆菌性腹泻有显著效果。为了使这项基因工程成果产业化, 在筛选了廉价高产培养基的基础上^[2], 研究了 MM 工程菌的大规模发酵培养工艺。

1 材料和方法

1.1 菌种

MM 工程菌由陈添弥等构建^[1], 保存于 -20°C , 30% 甘油中。

1.2 培养基

LB 培养基含酵母抽提物 5 g/L, 蛋白胨 10 g/L, NaCl 5 g/L, pH7.0。固体 LB 培养基含琼脂粉 12 g/L, 其余同 LB 培养基。发酵培养基基本组成由摇瓶试验确定^[2]。

1.3 培养条件

1.3.1 种子制备: 取甘油种子接于 LB 培养基中, 37°C 活化 24h。然后转接于种子摇瓶中, 37°C 振荡培养 18h, 作为发酵培养种子。

1.3.2 发酵培养: 在 50L 发酵罐(B. E Marubishi 公司产品)和自己组装的带有 pH 和溶氧控制的 200L 发酵罐上进行。培养基装量为 70%, 接种量为 4%, 37°C 恒温培养, 通气量为 $1\text{V}/\text{V} \cdot \text{min}$, 溶氧由搅拌转速控制, pH 由酸碱控制。

1.4 菌体生长的测定

获国家“七五”科技重点攻关项目经费和中国人民解放军总后勤部专项基金资助。

参加本工作的人员还有谢 妍、张群伟、冯尔玲、于公义。

本文于 1996 年 4 月 22 日收到。

菌体生长以吸光度和活菌数表示。发酵液稀释后,以培养为对照,于波长 650nm 处测定 OD 值(724 型可见分光光度计,上海第三分析仪器厂产品),线性范围 0.1~0.8。同时将发酵液稀释后涂布固体 LB 平板,置 37℃ 温箱培养 15h,计数菌落数(以每皿 30~300 个为宜),再换算成每毫升含活菌数。

1.5 重组质粒稳定性测定

每隔一定时间取样,稀释后涂 LB 平板。培养 24h 后,从中随机挑 100 个菌落做 K88 抗血清凝集试验,计算 K88 抗血清凝集百分率,以此表示重组质粒稳定性。

2 结果和讨论

2.1 接种量的确定

接种量是指移入的种子液体和培养液体积的比例。接种量的大小决定了菌种在发酵罐中的生长速度。采用大接种量,由于种子液中含有大量体外水解酶类,有利于对基质的利用,缩短生长延迟期,并使生产菌迅速占领整个培养环境,减少污染机会。但过高的接种量往往会使菌体生长过快,消耗大量营养物质,反而影响后期菌体的生长。图 1 表明,随接种量(在 4%~10% 范围内)的增加,MM 工程菌的生长延迟期缩短,到达最高活菌数的时间也缩短,但最高活菌数下降。根据实验结果,确定量佳接种量为 4%。

2.2 搅拌速度的确定

溶氧是工程菌发酵培养过程中影响菌体生长的一个重要参数。在常速搅拌下增加通气量对提高氧传递速率的作用是一种递减性的,即当气流速度过大时,再增加其速度对氧传递速率的提高作用变小,同时会使泡沫增多,罐的有效利用率减小。因此我们采用控制搅拌转速的方法来改善培养过程中的氧供给,提高活菌产量。

图 2 可看出,在培养早期 2~6h,不同的搅拌转速 300、500 和 700 r/min 对菌体生长没有影响,此时采用 300 r/min 的转速即能满足菌体生长的要求。在培养 6h 后,不同搅拌转速下的生长曲线不同,低转速 300r/min 培养时的最高活菌数比高转速 500~

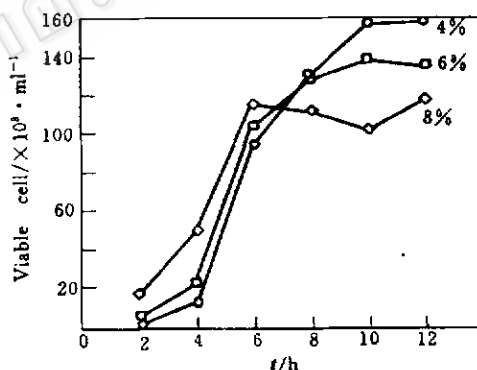


图 1 接种量对 MM 工程菌生长的影响

Fig.1 Effect of inoculum volume on the growth of recombinant *E. coli* MM

700 r/min 培养时的低 30%,说明培养后期应采用高转速才能满足菌体生长的要求。鉴于搅拌转速为 500r/min 和 700r/min 时的最高活菌数之间无明显差异,培养后期采用 500 r/min 的搅拌转速即可满足菌体生长的要求。MM 工程菌培养过程的搅拌转速被确定为,前 6h 采用 300 r/min,后 6h 采用 500 r/min。

2.3 pH 调节方案和补料方案的确定

工程大肠杆菌生长的最适 pH 值在 6.8~7.6 范围。我们筛选的适合 MM 工程菌生长的廉价培养基中含有丰富的生理碱性物质,随其在培养过程中被利用,使培养液变碱

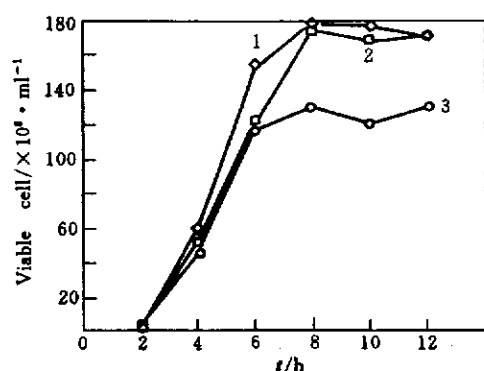


图2 搅拌转速对MM工程菌生长的影响

Fig. 2 Effect of agitation speed on the growth of recombinant *E. coli* MM

Agitation speed/ $r \cdot \min^{-1}$: 1. 700, 2. 500, 3. 300

2.5 在200L发酵罐上的放大培养

为了考察在50L发酵罐中确定的工艺放大可行性,在200L发酵罐上进行了放大研究。溶氧是工程菌培养过程中的一个重要参数,以供氧能力为放大准则进行放大一般是可行的^[4]。首先用充 N_2 赶 O_2 法确定了两台发酵罐的氧传递系数与搅拌转速和通气量的关系式:

$$\text{对日本 50L 发酵罐, } (K_L a)_1 = 0.043 \times n_1^{1.16} \times (v_s)_1^{0.55} \quad (1)$$

$$\text{对国产 200L 发酵罐, } (K_L a)_2 = 0.0395 \times n_2^{1.16} \times (v_s)_2^{0.55} \quad (2)$$

$K_L a$ 为氧传递系数/ h^{-1} ; n 为搅拌转速/ $r \cdot \min^{-1}$; v_s 为罐内空气线性速度/ $m \cdot h^{-1}$ 。

当通气量为 $1V/V \cdot \min$ 时, $(v_s)_1 = 19.8m/h$, $(v_s)_2 = 30.3m/h$, 代入(1)、(2)式中得

$$(K_L a)_1 = 0.222 \times n_1^{1.16} \quad (3)$$

$$(K_L a)_2 = 0.258 \times n_2^{1.16} \quad (4)$$

由 $(K_L a)_1 = (K_L a)_2$, 当 $n_1 = 300 r/\min$ 时, $n_2 = 264 r/\min$; 当 $n_1 = 500 r/\min$ 时, $n_2 = 439 r/\min$ 。因此,MM工程菌在200L发酵罐中培养的搅拌转速,前6h采用264 r/min,后6h采用439 r/min。培养结果表明放大是成功的(图3)。

性,pH值逐渐升高达8.0以上。这样高的pH值会抑制菌体生长,并可致菌体裂解。因此有必要控制培养过程的pH值。我们单纯2mol/L的磷酸来控制培养过程pH值在7.2,发现10h时活菌数下跌幅度较大。经分析还原糖含量的变化,认为培养基中还原糖含量太低,不能满足培养全过程的需要。所以在4h开始液加葡萄糖,通过恒速流加比较两种不同流加速率确定了较好的流加方案。通过流加葡萄糖可提高活菌数到1.78倍,达每毫升210亿(表1)。

2.4 培养过程中的质粒稳定性检测结果

采用K88抗血清玻片凝集法检测培养过程中不同时间的质粒稳定性,结果均为100%,证明在大规模培养时该工程菌非常稳定。

表2 补料对MM工程菌活菌数的影响

Table 1 Effect of feeding glucose on number of viable cell of recombinant *E. coli* MM

Feeding rate of glucose /g. (L. min) ⁻¹	Viable cell/ × 10 ⁸ · ml ⁻¹			Increment /%
	8h	10h	12h	
0	158.3	119.3	113.3	0
0.033	187.8	173.4	171.2	51.0
0.066	210.7	212.8	201.3	77.7

通过在 50L 发酵罐上对接种量、搅拌转速、pH 和补料等参数的研究,确定了 MM3 工程菌的发酵培养工艺,活菌数可达每毫升 211 亿(9 次实验结果平均值)。以氧传递系数为放大准则可成功地将该工艺在 200L 国产发酵罐上再现,活菌数达每毫升 218 亿(12 次实验结查平均值)。说明本工艺具有可放大性,可在全国各药厂推广应用。

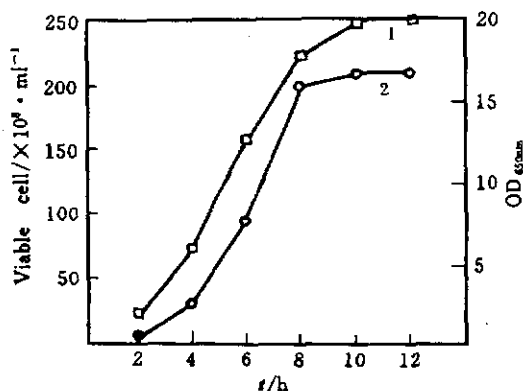


图3 MM 工程菌在 200L 发酵罐上的放大培养结果

Fig.3 Scale-up culture of recombinant *E. coli* MM in 200L fermentor

1. OD₆₅₀, 2. Number of viable cell

致 谢 本研究工作得到黄翠芬、陈添弥两位研究员以及李继祚所长的指导和帮助,特致谢忱。

参 考 文 献

- [1]陈添弥,李丰生,黄培堂等. 中国科学 B 辑, 1989, 12: 281~1284.
- [2]张群伟,王叙甫,于公义. 军事医学科学院院刊, 1994, 18(4): 276~278.
- [3]张群伟,王叙甫,于公义等. 中国兽医杂志, 1995, 21(3): 44~46.
- [4]Reiman H B. Critic Rev Biotechnol, 1993, 13(3): 195~247.

Fermentation Studies of Recombinant *Escherichia coli* MM in Large Scale

Fang Hongqing Wang Xupu Cheng Ming Wang Huanjin Yan Mingfan

(Institute of Biotechnology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100071)

Abstract Fermentation studies of recombinant *E. Coli* MM as a live vaccine were first performed in a 50L fermentor. After determining inoculum volume (4%), agitation speed 300~500r/min, pH 7.2 and feeding rate of glucose 0.066g·L⁻¹·min⁻¹, the colony forming unit in ferment broth was reached at 211×10⁸/ml. This culture process could be successfully scaled up to a 200L fermentor based on oxygen transfer coefficient.

Key words Vaccine, *E. coli*, fermentation, scale up