

# 培养模式对重组大肠杆菌高密度培养 生产谷胱甘肽的影响

陈 坚 李 寅 毛英鹰 伦世仪 Yoon-Mo Koo<sup>1</sup>

(无锡轻工大学生物工程学院环境生物技术研究室 无锡 214036)

(韩国仁荷大学工学院生物工程系 仁川 402-751 韩国)<sup>1</sup>

利用生物技术方法生产谷胱甘肽(GSH)的研究正方兴未艾。本研究室已对面包酵母生产 GSH 进行了较为深入的研究<sup>[1,2]</sup>,但距工业化生产尚有一段距离,关键在于高 GSH 含量面包酵母的选育较为困难。近来这一方向的研究重点又转向构建重组大肠杆菌来生产 GSH。虽然 Murata 等<sup>[3,4]</sup>通过在细胞中扩增分别编码 GSHI( $\gamma$ -谷氨酰半胱氨酸合成酶)和 GSHII(谷胱甘肽合成酶)的基因 *gsh I* 和 *gsh II*, 获得了具有较强 GSH 生产能力的重组 *E. coli*, 但对其培养技术并没有进行深入研究。由于 GSH 只在重组 *E. coli* 胞内积累,因此,在维持 GSH 合成活性的前提下研究 *E. coli* 的高密度培养技术显得十分必要。本文报道对一株高 GSH 合成活性的重组大肠杆菌进行高密度培养生产 GSH 的研究结果,主要比较了不同流加培养模式的影响。

## 1 材料与方 法

### 1.1 菌种

重组大肠杆菌(*Escherichia coli*) WSH-KE1, *gsh I* 和 *gsh II* 基因的拷贝数为 2:1,由韩国仁荷大学生物工程系提供。

### 1.2 培养基和培养方法

见文献[5,6]。

### 1.3 分析方法

发酵液在 10 000 r/min 下离心 10 min 后,用 3,5-二硝基水杨酸法分析上清液中葡萄糖浓度,用去离子水洗涤菌体 2 次,放置 90℃ 下烘 24h 后称重。胞内 GSH 含量按 Murata<sup>[7]</sup>等报道的方法从大肠杆菌细胞内提取 GSH,然后用 Tietze<sup>[8]</sup>报道的改良 DTNB-GSSG 循环分析法测定提取液中 GSH 含量。

## 2 结果与讨论

### 2.1 初糖浓度对 WSH-KE1 生产 GSH 的影响

*E. coli* 培养基中高浓度糖的存在会导致乙酸的形成,Riesenberg<sup>[9]</sup>曾报道当糖浓度超过  $50\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  后 *E. coli* 的生长受到抑制。如表 1 所示,初糖浓度超过  $20\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  即对 WSH-KE1 细胞生长和 GSH 合成产生抑制作用。 $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  糖浓度下发酵 24h 时细胞干重达到最大( $4.60\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),且各个时刻胞内 GSH 含量和细胞对糖产率也均高于其它糖浓度,表明 WSH-KE1 培养的适宜初糖浓度为  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

### 2.2 WSH-KE1 摇瓶发酵过程分析

摇瓶中  $10\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  初糖浓度下 WSH-KE1 的发酵过程曲线如图 1 所示。8h 时糖已耗尽,此时细胞生

霍英东高等院校青年教师基金和江苏省跨世纪学科带头人科研基金资助项目。

收稿日期:1997-08-05,修回日期:1998-04-06。

表 1 初糖浓度对 GSH 发酵的影响

初糖浓度 /g·L <sup>-1</sup>	残糖浓度/g·L <sup>-1</sup>			细胞干重/g·L <sup>-1</sup>			GSH 含量/mg·g <sup>-1</sup>		
	12h	24h	48h	12h	24h	48h	12h	24h	48h
10	0.27	0.40	0.18	3.87	4.60	4.40	17.90	15.70	9.40
20	0.38	0.29	0.28	3.72	3.90	3.40	8.10	7.75	7.62
30	6.55	3.84	0.68	3.65	4.00	3.70	6.12	4.61	4.27
40	13.00	11.30	3.27	3.95	3.97	3.30	6.92	6.61	5.16
50	23.50	17.10	4.30	4.30	4.00	3.18	7.35	7.72	1.49
60	22.50	18.10	4.40	4.40	4.35	4.10	5.24	6.20	2.41

长出现一个短暂的停滞,然后继续增长。发酵液 pH 随着葡萄糖的消耗而降低,表明发酵过程中产生较多的酸性物质。葡萄糖耗尽后细胞量仍能增加,很可能是细胞利用所产生的酸性物质作为碳源,故 8h 后随着细胞量的增长 pH 有所回升,细胞处于平衡期时 pH 也相对稳定。胞内 GSH 含量在 14h 时其值达到最大,24h 后随细胞自溶胞内 GSH 含量也开始降低。由图 1 可确定若要补糖,应从第 8h 左右开始。

### 2.3 重组 *E. coli* 高密度培养的研究

由于 GSH 只在重组 *E. coli* 胞内积累,若要获得较高的生产率,就必须在提高细胞密度的同时保证胞内目的产物也以较高水平积累(以利于后提取和纯化的进行)。作者在 2 L 台式罐上考察了不同流加方式对 WSH-KE1 菌株获得高细胞密度和合成 GSH 的影响。

**2.3.1 恒速流加:**恒速流加是指浓缩营养物以恒定的速率加入发酵罐的流加操作方式。这种流加策略比较简单,便于操作和控制,Markl 等<sup>[10]</sup>采用这种流加方式已将 *E. coli* 培养到高细胞密度,故作者首先考察了恒速流加方式下 WSH-KE1 细胞生长和合成 GSH 的情况(图 2)。

如图 2 所示,菌体浓度在 41.5h 时达到 77.5 g·L<sup>-1</sup>,随后开始下降。胞内 GSH 含量在整个过程中表现出一种振荡的现象。采用恒速流加方式,不用添加 ATP 和 GSH 的 3 种组成氨基酸(添加 ATP 和 GSH 的组成氨基酸对 GSH 发酵的影响另文报道),发酵液中 GSH 总量即可达到 780 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3.2 人工反馈控制流加:**在 *E. coli* 高密度培养中,若葡萄糖浓度超过某一阈值,氧充足条件下 *E. coli* 也会发生 Crabtree 效应而产生乙酸。将流加速率与不同的物理参数(如溶氧、pH、CO<sub>2</sub> 释放速率等)相耦合组成的间接反馈控制系统,虽然都能将底物浓度成功地控制在设定范围内,但对仪器性能要求高,实用价值小。作者在 WSH-KE1 培养过程中间隔 0.5h 取样测定葡萄糖浓度,根据罐内残糖浓度改变浓缩糖液的流加速率。结果表明(图 3),采用这种人工反馈控制流加策略,菌体浓度在 30.5h 达到 64 g·L<sup>-1</sup>。但开始流加葡萄糖后胞内 GSH 含量却一直下降,发酵液中 GSH 总量最高仅为 450 mg·L<sup>-1</sup>。

**2.3.3 指数流加:**指数流加方式可以将比生长速率控制在在不产生副产物(如乙酸)的范围之内,国外已有采用指数流加策略获得超过 100g(DCW)·L<sup>-1</sup> 的报道<sup>[7]</sup>,由于这一流加策略极为简单,不需要任何特殊的设备,因而颇受研究者的重视。

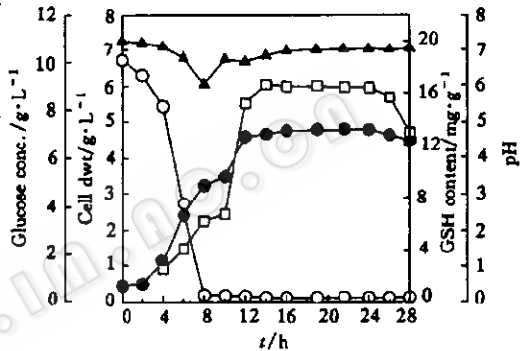


图 1 WSH-KE1 摇瓶发酵过程曲线

●细胞干重;○葡萄糖浓度;□胞内 GSH 含量;▲pH

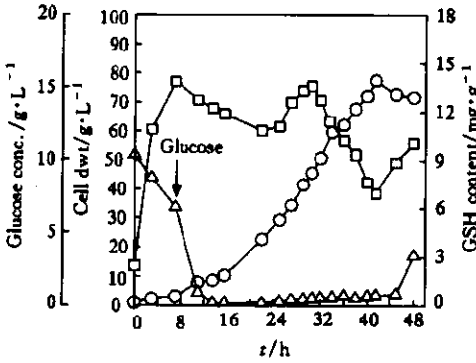


图2 恒速流加培养过程曲线

○ 细胞干重; □ 胞内 GSH 含量; △ 葡萄糖浓度

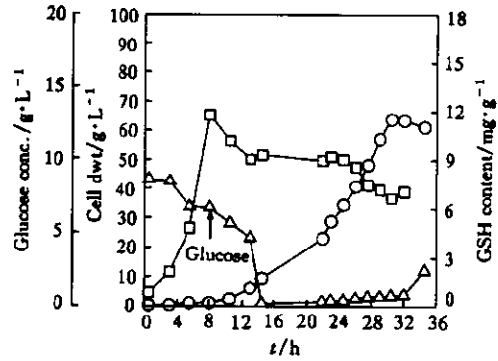


图3 葡萄糖反馈控制流加培养过程曲线

○ 细胞干重; □ 胞内 GSH 含量; △ 葡萄糖浓度

指数流加的进料方式按下式决定<sup>[11]</sup>:  $F_i = \mu * V_0 X_0 \exp(\mu * t) / Y_{x/s} (S_F - S)$

作者设  $\mu^* = 0.2 \text{h}^{-1}$ ;  $Y_{x/s} = 0.4 \text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ;  $S_F = 600 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $V_0 = 1.18 \text{L}$ ;  $X_0 = 3.0 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ; 按所计算出的流量变化数据进行流加培养实验。在指数流加培养方式的控制下, WSH-KE1 的细胞干重在 25h 就达到了  $80 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ , 发酵液内 GSH 总量最高为  $880 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (图 4)。

2.3.4 3种流加方式的比较: 表 2 给出了作者所采用的 3种流加培养方式中各参数的比较, 不同流加培养方式对过程生产强度的影响见图 5。

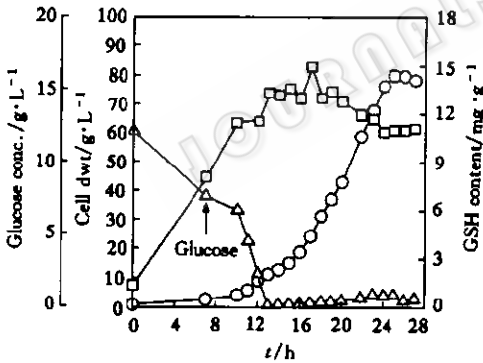


图4 指数流加培养过程曲线

○ 细胞干重; □ 胞内 GSH 含量; △ 葡萄糖浓度

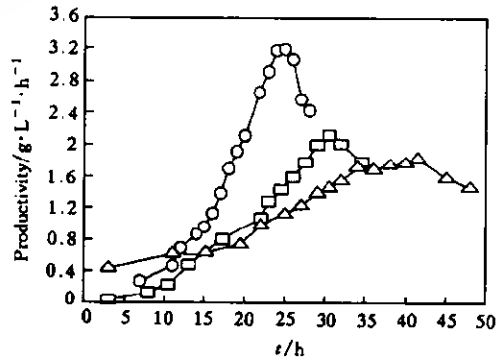


图5 不同流加方式对细胞生产强度的影响

○ 指数流加; □ 人工反馈控制流加; △ 恒速流加

表 2 3种流加方式下各参数的比较

流加模式	最大细胞干重/ $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$	达到最大细胞干重时间/h	最大生产强度/ $\text{g} \cdot [\text{L} \cdot \text{h}]^{-1}$	平均产率/ $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$	平均 $\mu$ / $\text{h}^{-1}$	GSH 总量/ $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
恒速流加	77.5	41.5	1.84	0.314	0.090	780
人工反馈控制流加	64.0	30.5	2.22	0.290	0.196	450
指数流加	80.0	25.0	3.20	0.367	0.199	880

如表 2 和图 5 所示,比起其它两种流加方式,指数流加不仅在提高菌体浓度、生产强度和 GSH 总量方面具有显著优势,而且可以使实际过程的比生产速率平均值与设定值非常接近。与指数流加相比,恒速流加虽然也可获得较高的细胞密度和 GSH 总量,但由于培养时间延长,生产强度明显下降,因而在实际生产过程中是不可取的。此外,以控制葡萄糖浓度为目标的工反馈流加策略,实用价值也不大,因为采用指数流加方式亦可以将葡萄糖浓度控制在很低的范围内。尽管利用指数流加培养方式可获得  $80 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  的细胞密度,但在培养后期,胞内 GSH 含量均呈现出下降趋势,这可能是因为 *gsh I* 和 *gsh II* 基因的表达式减少,造成合成 GSH 的关键酶活性下降。故今后应对流加培养过程中 WSH-KEI 细胞的稳定性和影响 GSH 合成的因素进行考察,确定更佳的培养策略以促进谷胱甘肽的合成。

### 参 考 文 献

- 1 李 寅,陈 坚,周楠迪等. 生物工程学报, 1998, 14(2): 149~154
- 2 周楠迪,李 寅,陈 坚等. 生物技术, 1997, 7(4): 30~33
- 3 Murata K, Kimura A. Appl Environ Microbiol, 1982, 44: 1444~1448
- 4 Murata K, Miya T, Gushima H *et al.* Agric Biol Chem, 1983, 47: 1381~1383
- 5 Korz D J, Rinas U, Hellmuth K *et al.* J Biotechnol, 1995, 39: 59~65
- 6 Li Y, Chen J, Mao Y Y *et al.* In: Shen Z Y *et al.* Biochemical Engineering: Marching Toward the Century of Biotechnology, Proceeding of 4th Asia-Pacific Biochemistry Engineering Conference, Published by Tsinghua University, 1997, 1: 431~434
- 7 Murata K, Kimura A. J Gen Microbiol, 1982, 128: 1047~1052
- 8 Tietze F. Anal Biochem, 1969, 29: 502~522
- 9 Riesenber D. Curr Opin Biotechnol, 1991, 2: 380~384
- 10 Markl H, Zenneck C, Dubach A *et al.* Appl Microbiol Biotechnol, 1993, 39: 48~52
- 11 李 寅,陈 坚,宋 祺等. 生物工程学报, 1997, 13(2): 160~167

## Effect of Feeding Method on the Production of Glutathione by High Cell Density Cultivation of Recombinant *Escherichia coli*

Chen Jian Li Yin Mao Yingying Lun Shiyi Yoon-Mo Koo<sup>1</sup>

(Lab. of Environmental Biotechnology, School of Biotechnology, Wuzi University of Light Industry, Wuzi 214036)

(Department of Biotechnology, Inha University, Inha 402-751 Korea)<sup>1</sup>

**Abstract** The effect of initial glucose concentration on the production of GSH by recombinant *E. coli* in shaking flask culture were investigated and the fermentation process was analyzed thoroughly. Obviously inhibition occurred when the initial glucose concentration exceeded  $20 \text{ g/L}^{-1}$ , suitable glucose feeding time was 8 hours. The effect of three kinds of feeding strategies on the production of GSH in 2L jar fermenter were compared, exponential feeding method was confirmed to have remarkable predominance in both enhancing cell density, productivity and promoting the yield of cell to glucose. The cell density, total GSH and productivity reached  $80 \text{ g/L}^{-1}$ ,  $880 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  and  $3.2 \text{ g}/(\text{L} \cdot \text{h})^{-1}$  at 25h by using exponential glucose feeding strategy, respectively.

**Key words** Glutathione, recombinant *Escherichia coli*, high cell density culture