

# 高密度培养基因工程大肠杆菌生产 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶\*

## Produce of $\alpha$ -Acetolactate Decarboxylase in Engineering *Escherichia coli* by High Density Culture

蒙健宗 李晓明\*\* 王青艳\*\*\* 卢福麟\*\*\* 周志强\*\*\*

Mong Jianzong Li Xiaoming Wang Qingyan Lu Fushen Zhou Zhiqiang

李庆业\*\*\* 李丛\*\*\* 韦函忠\*\*\* 黄日波

Li Qingyie Li Cong Wei Hanzhong Huang Ribao

(广西大学发酵与酶工程研究所, 南宁市秀灵路13号 530005)

(Institute of Ferment and Enzyme Engineering, Guangxi University,

13 Xiulinglu, Nanning, Guangxi, 530005, China)

**摘要** 在3 000 L发酵罐中, 利用分批补料培养技术高密度培养含分泌型重组质粒 pETGAU-10的大肠杆菌 TG1, 生产  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶。通过控制发酵条件, 发酵液的细胞密度 ( $OD_{600}$ ) 可达30.5, 且胞外  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶活力最高达  $890 U \cdot mL^{-1}$ , 达到较为理想的工业化生产的要求。

**关键词**  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶 分批补料 高密度培养 基因工程菌 胞外酶

中图分类号 Q939.97

**Abstract** *Escherichia coli* TG1, which contained secreted recombinant plasmid pETGAU-10, was cultured to a high density to produce  $\alpha$ -ALDC by the fed-batch culture in 3 000 L fermentor. In control of the fermentative conditions, the cell density can reach as high as 30.5 of  $OD_{600}$  and the highest extracellular activity of  $\alpha$ -ALDC reached  $890 U \cdot mL^{-1}$ , which meet the demand for the ideal industrial production.

**Key words**  $\alpha$ -ALDC, fed-batch culture, high density culture, engineering bacteria, extracellular enzyme

双乙酰浓度达到其口味阈值以下 ( $0.02 mg/L \sim 0.10 mg/L$ ) 是啤酒成熟的重要标准。双乙酰是在正常发酵过程中由啤酒酵母细胞体内所进行的缬氨酸生物合成的中间产物  $\alpha$ -乙酰乳酸在分泌到细胞体外时, 由非酶促的氧化脱羧反应自发产生的。虽然酵母细胞能产生双乙酰还原酶将双乙酰还原成口味阈值较大 ( $30 mg/L \sim 100 mg/L$ ) 的乙偶姻, 但  $\alpha$ -乙酰乳酸的非酶促氧化脱羧反应速度仅为双乙酰还原反应的  $1/10^{11}$ ; 而  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶可快速地将双乙酰的前驱体  $\alpha$ -乙酰乳酸分解为乙偶姻, 有效缩短啤酒发酵的成熟期, 并能控制啤酒贮存过程中双乙酰的反

弹, 延长啤酒保质期。因而, 在啤酒发酵过程中添加  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的工艺为众多啤酒生产厂家所采用。国外于1990年已成功利用基因工程菌生产  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶<sup>[2]</sup>, 近年来国内已构建了多种能产生  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的基因工程菌并在小型发酵罐中进行培养成功<sup>[3-6]</sup>, 但在大中型发酵罐中进行高密度培养尚未见报道。本文利用分批补料培养技术, 通过控制发酵参数, 在3 000 L发酵罐中进行高密度培养并高效表达  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的试验。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌株和质粒

宿主大肠杆菌 TG1由广西大学发酵与酶工程研究所保存。重组质粒 pETGAU-10由广西大学发酵与酶工程研究所构建, 它带有编码氨基青霉素抗性基因和克雷伯氏土壤菌 (*Klebsiella terrigena*) 编码  $\alpha$ -乙酰

2001-08-29收稿, 2001-10-11修回。

\* 中国高技术研究发展计划(863计划)资助项目(101-06-07-01)

\*\* Department of Animal Science, McGill University, Montreal, Canada.

\*\*\* 南宁邦尔克生物技术有限责任公司, 南宁, 530005

# 乳酸脱羧酶的基因<sup>[7]</sup>和分泌信号肽 N P470基因。

## 1.1.2 培养基

以 LB培养基用作菌种筛选和一级、二级种子(摇瓶)培养, TY培养基用作三级种子(30 L种子罐)培养, 经30 L发酵罐试验进行优化过的 HD培养基用作分批补料高密度培养。各培养基成分见表1

表1 高密度培养生产 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的基因工程菌培养基

Table 1 Culture for the produce of  $\alpha$ -Acetolactate Decarboxylase in engineering *Escherichia coli* by high density culture

培养基 Culture medium	成分 Composition	g/L
LB	Polypepton (日本制药株式会社 Japan)	10
	Yeast Extract (Merck)	5
	NaCl	5
TY	Polypepton (同 LB)	16
	Yeast Extract (同 LB)	10
	NaCl	5
	Maltose (国产 Homemade)	5
HD	起始培养基 Initial culture medium	
	Polypepton (同 LB)	5
	Yeast Extract (同 LB)	5
	NH <sub>4</sub> Cl	2
	K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4
	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
	CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.07
	Maltose (同 TY)	10
	补料 Feed	
	Polypepton (同 LB)	25
	Yeast Extract (同 LB)	25
	Maltose (同 TY)	50
微量元素 Trace element		
Al <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.04	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.004	
NiCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.004	
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.02	
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.032	
MnCl <sub>2</sub> ·H <sub>2</sub> O	0.08	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0.02	
抗生素 Antibiotic		
Amp	0.1	

## 1.1.3 发酵设备

摇床 (Orbital Shaker, Forma), 用于一、二级种子培养; FJK T/型自控通用式发酵罐 (30 L, 上海医药工业研究院), 用于三级种子培养; FJK T/型通用式发酵罐 (3000 L, 广西大学发酵与酶工程研究所设计制造), 用于分批补料高密度培养

## 1.2 培养方法

### 1.2.1 菌种制备 (一级种子)

选用新近转化并经筛选的高活力菌株。质粒的提取、纯化、转化等操作按 Sambrook 等的方法进行<sup>[8]</sup>。挑取合适的单菌落接种于 LB培养基中, 35°C、220 r/min 培养过夜。

### 1.2.2 摇瓶培养 (二级种子)

广西科学 2001年11月 第8卷第4期

取一级种子接种入含 100 ml LB培养基的 500 ml 三角瓶中, 接种量为 1%, 35°C 220 r/min 培养 6 h

### 1.2.3 30 L发酵罐培养 (三级种子)

取二级种子按 1% 接种量接入含 20 L TY培养基的发酵罐中, 搅拌速度 180 r/min, 通气量 2.0 m<sup>3</sup>/h, 35°C 培养 6 h

### 1.2.4 3000 L发酵罐分批补料高密度培养

取三级种子, 接入含 2000 L HD起始培养基的发酵罐中, 搅拌速度 110 r/min, 通气量 160 m<sup>3</sup>/h, 35°C 培养 6 h; 升温至 37°C, 培养 2 h后开始, 每隔 0.5 h 补加 5% 的补料, 并以 NH<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O 调节发酵液 pH 值保持在 7.0 左右。37°C 培养 6 h后开始, 加入 3.0 mol 半乳糖进行诱导, 并每隔 0.5 h 补加 7.5% 的补料, 以 0.2 mol L<sup>-1</sup> H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 调节发酵液 pH 值保持在 6.0 左右

## 1.3 分析方法

### 1.3.1 细胞密度测定

发酵液经合适倍数的稀释后, 用 752-C 型分光光度计在 600 nm 处测其光吸收值和稀释倍数的乘积即发酵液的细胞密度 (OD<sub>600</sub>)

### 1.3.2 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的提取

发酵液 8000 r/min 离心 10 min, 取上清液测  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶活力

### 1.3.3 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶活力测定

取 20  $\mu$ l 经适当稀释的酶液, 与 80  $\mu$ l  $\alpha$ -乙酰乳酸溶液 (含 0.02 mmol  $\alpha$ -乙酰乳酸) 300  $\mu$ l MES 缓冲液 (含 0.05 mol L<sup>-1</sup> MES 1.0 mmol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub> 0.2% Triton X-100 0.5 mol L<sup>-1</sup> NaCl, pH 值 6.0) 混合, 在 30°C 精确反应 20 min, 加入 4.6 ml 显色剂 (3%  $\alpha$ -萘酚, 0.3% 肌酸 3 mol L<sup>-1</sup> NaOH 按 1:1 混合), 30°C 显色 40 min, 在 522 nm 处测其光吸收值, 在乙偶姻标准曲线上读出其乙偶姻浓度。酶活力定义为: 在 pH 值 6.0, 30°C 条件下, 每分钟水解出 1  $\mu$ mol 乙偶姻的酶量为一个酶活力单位 (U)

### 1.3.4 质粒稳定性测定

在发酵过程中定时取样, 用灭菌的生理盐水作适当稀释, 分别取相同体积涂布于含 Amp 和不含 Amp 的 LB 平板, 37°C 培养 16 h, 分别计数平板上的菌落数

## 2 结果与讨论

### 2.1 分批补料培养

在 3000 L 发酵罐中, 通过控制发酵参数和补料培养, 结果 (图 1) 显示, 细菌生长在 37°C 培养的第 8 h 达到高峰, 细胞密度 (OD<sub>600</sub>) 达 30.5 在 37°C 培养

的对数后期加入半乳糖进行诱导培养,可表达出 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶,诱导第4h时,细胞密度已开始下降, $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶活力在诱导第6h达最高值 $890\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,完全满足工业化生产的需要

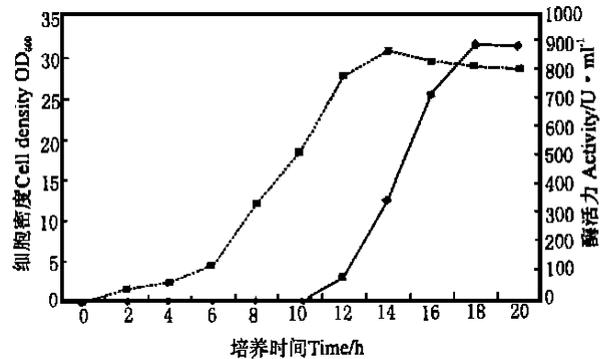


图1 3000 L发酵罐中大肠杆菌生长曲线和 $\alpha$ -ALDC诱导表达曲线

Fig. 1 *Escherichia coli* growth and  $\alpha$ -ALDC expression in 3000 L fermentor  
—■—时间- $\text{OD}_{600}$  Time- $\text{OD}_{600}$ ; —◆—时间-酶活力 Time-Enzyme activity.

在前期小型发酵罐发酵研究中已确证用半乳糖诱导产生 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的活力与细胞密度呈正相关,因此采用高密度培养的方法进行发酵.为了实现高密度培养,必须给菌体提供生长的最适环境条件,包括pH值、适宜的营养成分、溶氧、适宜的温度等.许多研究表明<sup>[9,10]</sup>,细菌在生长代谢过程中产生的主要抑制因子是乙酸.在碳源过量时,大肠杆菌的氧化磷酸化和三羧酸循环能力有限,造成碳代谢流在糖酵解途径中过量,大肠杆菌即通过分泌部分氧化的副产物(主要是乙酸)使碳代谢流得到平衡,于是造成大肠杆菌体内乙酸的积累,抑制细菌的生长,并导致表达效率的降低<sup>[11,12]</sup>.因此在培养基中设计适宜的碳氮比和补料方式是高密度培养成功的关键.我们在前期优化培养基的工作中曾证实,在初始培养基中加入大量碳源时,细胞生长密度不够理想,维持pH值7.0左右时耗碱量大增,诱导产生 $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶的活力也较低(图2).

采用流加碳源的补料方式后,培养基中碳源浓度较低,降低了乙酸的比生成率,大大缓解了抑制效应,实现了高密度培养.在多批重复实验中均获得稳定的结果,一般可得 $\text{OD}_{600}$ 在25左右,酶活力 $600\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}\sim 700\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,达到了较理想的工业化生产的要求.

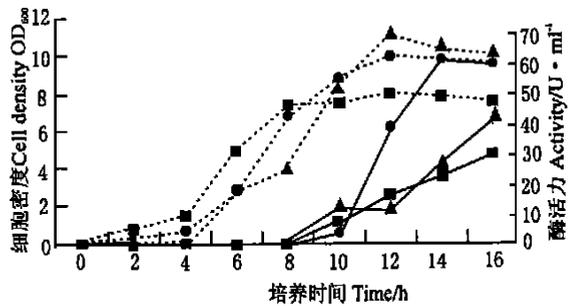


图2 初始培养基中大量碳源对大肠杆菌生长和 $\alpha$ -ALDC表达的影响

Fig. 2 Effect of large quantity carbon source in the initial medium on the growth of *Escherichia coli* and the expression of  $\alpha$ -ALDC

—●—时间-细胞密度 Time-Cell density; —▲—时间-酶活力 Time-Enzyme activity. ● 初始培养基中含20 g/L麦芽糖 20 g/L Maltose in the initial medium; ▲ 初始培养基中含30 g/L麦芽糖 30 g/L Maltose in the initial medium; ■ 初始培养基中含40 g/L麦芽糖 40 g/L Maltose in the initial medium

## 2.2 质粒的稳定性

在3000 L发酵罐中,由于Amp的存在以及在培养初期采用低温培养,在发酵过程中均保持了较高的质粒稳定性,到菌体开始自溶前,仍有94.3%的菌体含有质粒.质粒的稳定性是基因工程菌工业化生产研究中一个重要而又独特的问题<sup>[13]</sup>.带有质粒的细菌的比生长速率较不带有质粒的细菌低,而高密度培养中细菌传代的次数多,如无有效的措施保持质粒在细菌传代中的稳定性,在发酵后期,发酵液中已丢失质粒的菌体的优势会越来越明显,对外源蛋白的表达有显著的影响.低温是保持质粒稳定传代的有利条件,因此在各级菌种的培养及高密度培养的初期均采用 $35^{\circ}\text{C}$ 进行培养.对含Amp抗性的质粒,在发酵液中保持Amp的选择压力是最简单的保持质粒稳定的方法.由于在3000 L发酵罐中 $30.5\text{ OD}_{600}$ 并不算极高的细胞密度,在初始培养基中一次性添加 $100\mu\text{g/ml}$ 的Amp已足以保持质粒的稳定性.

基因工程菌的表达调控方式对高密度培养的外源蛋白表达量也有重要影响,组成型的表达系统对外源蛋白的表达十分方便,但表达产物在细菌体内的过早积累往往使细菌的比生长速率下降,不易实现高密度培养.我们采用诱导分泌型表达系统,采用两阶段培养法,第一阶段积累大量菌体,并保持质粒的稳定传代,第二阶段利用半乳糖诱导lacUV5启动子表达大量外源蛋白并分泌到细胞外,直接离心、超滤浓缩后即得到活力很高的粗酶液,无需进行包涵体处理等繁琐步骤,在工业生产中十分便利.

(下转第29页 Continue on page290)

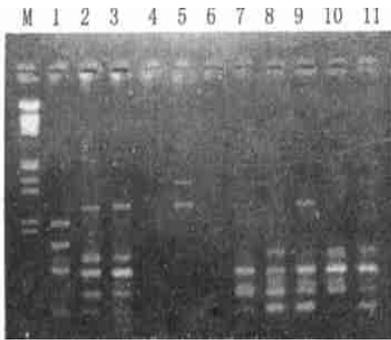


图4 引物 OPM-8对解氏珠母贝群体不同个体的 RAPD 电泳图谱

Fig. 4 Electrophoretogram of RAPD from ten individuals of *Pinctada chemnitzii* using primer OPM-8.

M:  $\lambda$  /EcoRI-HindIII

这两种贝类的遗传变异、遗传多样性及它们各自的群体遗传结构提供了有力的依据。另外，由于本实验的样品数量以及有效扩增的引物数都较少，关于两种贝类的群体特征带（由某特定引物扩增的 RAPD 带谱都具有该种贝类的共同特征，即一个种的不同个体共有的标记带或主带）还不能获得明确的说明，基于各个个体的 RAPD 扩增带谱不同，可以肯定两种贝类具有各自的群体特征带，而群体特征带的确定有待于更进一步的工作。

### 参考文献

1 Williams J G K, Kubelik A R, Liavk K J et al. DNA poly-

- morphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531-6535.
- 2 Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *PCR methods Appl*, 1993, 3: 85-87.
- 3 Garcia D K, Faggart M A, Rhoades L et al. Genetic diversity of cultured *Penaeus monodon* shrimp using three molecular genetic techniques. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 1994, 3 (5): 270-274.
- 4 Garcia D K, Benzie J A H. RAPD markers of potential use of in penaeus prawn (*Penaeus monodon*) breeding programs. *Aquaculture*, 1995, 130 (2): 137-144.
- 5 邱涛, 陆仁后, 项超美等. RAPD方法对中华绒螯蟹长江、黄河、瓯江三群体的遗传多样性分析. *淡水渔业*, 1997, 27 (5): 3-6.
- 6 Li Gang, Jin Qizeng, Jiang Weiguo. Biochemical Genetic Variation in the Pearl Oyster *Pinctada fucata* and *P. chemnitzii*. *Acta Genetica Sinica*, 1985, 12 (3): 204-212 (Ch).
- 7 Patwary M U. The Use of Random Amplified Polymorphic DNA Markers in Genetic Studies the Sea Scallop *Placopecten Magellanicus*. *Shellfish Res*, 1994, 13 (2): 547-553.
- 8 刘必谦, 戴继勋. 巨扇属 (*Crassostrea*) 牡蛎遗传多样性研究. *水产学报*, 1998, 22 (3): 193-197.

(责任编辑: 蒋汉明)

(上接第 28 页 Continue from page 286)

### 3 小结

本文通过分批补料培养、保持质粒的稳定性来进行 3 000 L 发酵罐中的高密度培养，获得了稳定的结果，一般可得  $OD_{600}$  在 25 左右，酶活力  $600 U \cdot mL^{-1} \sim 700 U \cdot mL^{-1}$ 。但与其它大肠杆菌在小型发酵罐中高密度培养常获得  $OD_{600}$  在 100 左右相比，还有相当大的潜力，有待于进一步研究。

### 参考文献

- 1 秦玉静, 高东, 刘巍峰. 啤酒生产中双乙酰形成的分子遗传学及其控制. *工业微生物*, 1999, 29 (2): 38-42.
- 2 Diderichsen B, Wedsted U, Hedegaard L et al. Cloning of ald B, which encodes  $\alpha$ -acetolactate decarboxylase, an exoenzyme from *Bacillus brevis*. *J Bacteriol*, 1990, 172 (8): 4315-4321.
- 3 陈炜, 何秉旺, 张建华等. 短芽孢杆菌  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因在大肠杆菌中的克隆和表达. *微生物学报*, 1997, 37 (4): 270-275.
- 4 高健, 铁翠娟, 王忠彦等. 枯草芽孢杆菌  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因的克隆及表达. *微生物学通报*, 1998, 25 (6): 336-338.
- 5 尹东, 卢大宁, 曾庆华等. 醋酸杆菌  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因克隆、表达及在啤酒发酵中的作用. *中国生物化学与分*

子生物学报. 1999, 15 (1): 24-26

- 6 尹东, 曾庆华, 卢大宁等. 产气肠杆菌  $\alpha$ -乙酰乳酸脱羧酶基因的克隆和表达及影响重组酶活性的因素. *生物工程学报*. 1999, 15 (4): 501-506.
- 7 Blomqvist K, Nikkola M, Lehtovaara P et al. Characterization of the genes of the 2, 3-butanediol operons from *Klebsiella terrigena* and *Enterobacter aerogenes*. *J Bacteriology*. 1993, 175 (5): 1392-1404.
- 8 Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual* 2nd ed. New York: Cold Spring Laboratory Press, 1989. 121-1105.
- 9 L and wall P, Holme T. Removal of inhibitors of bacterial growth by dialysis culture. *J Gen Microbiol*, 1997, (103): 345-352.
- 10 Seo D J, Bong H C. Glucose-limited fed-batch culture of *Escherichia coli* for production of recombinant human interleukin-2 with the DO-stat method. *J Ferment*, 1992, 74 (3): 196-198.
- 11 Han K, Lim H C, Hong J. Acetic acid formation in *Escherichia coli*. *J Biotechnol Bioeng*, 1992, 39 (6): 663-671.
- 12 Sam K Y, Bennett G N, Aristidou A A et al. Strategies in high-level expression of recombinant protein in *Escherichia coli*. *Ann NY Acad Sci*, 1994, 721: 257-267.
- 13 刘如林. *微生物工程概论*. 天津: 南开大学出版社, 1995. 166-174.

(责任编辑: 蒋汉明)