

里氏木霉 306 生物合成组织型纤溶酶原激活剂(t-PA) 5L 罐 分批发酵条件的研究*

江洁^{1,2} 杜连祥¹ 路福平¹ 邹亚杰² 肖琳² 乔玉龙² 张宝涛²

1(天津科技大学生物工程学院,天津,300222) 2(齐齐哈尔大学生命科学与工程学院,齐齐哈尔,161006)

摘要 以摇瓶分批发酵条件为基础,对基因工程菌株里氏木霉(*Trichoderma reesei*)306进行了5L发酵罐分批发酵条件的研究。确定了适宜的发酵条件:温度为28℃,溶氧浓度控制30%饱和度,pH值在自然状态下进行发酵。以5L发酵罐分批发酵试验数据为依据,对里氏木霉306生物合成t-PA分批发酵动力学进行了研究。应用MATLAB工具软件进行非线性规划,建立了菌体生长、底物消耗和产物合成的发酵动力学模型。

关键词 里氏木霉,组织型纤溶酶原激活剂(t-PA),分批发酵,发酵动力学模型

组织型纤溶酶原激活剂(tissue-type plasminogen activator, t-PA)是治疗急性心肌梗塞和急性肺栓塞的基因工程药物,具有高效、特异的溶栓作用^[1]。

1983年,Pennica等克隆出源于Bowes黑色素瘤细胞系的t-PA cDNA并首次在大肠杆菌中表达成功^[2]。目前,临床上使用的t-PA主要来源于CHO(中国仓鼠卵巢细胞)工程细胞株,培养成本高,导致药物价格昂贵^[3]。*Trichoderma reesei*是一种高产纤维素酶的丝状真菌,本研究采用的*Trichoderma reesei* 306是将t-PA cDNA整合到宿主*Trichoderma reesei* RutC-30染色体上而构建的基因工程菌株,在对*Trichoderma reesei* 306产t-PA的摇瓶发酵条件进行深入研究的基础上^[4],对发酵罐分批发酵条件和发酵动力学进行了研究。

1 材料与方法

1.1 菌种

基因工程菌株里氏木霉(*Trichoderma reesei*) 306:天津科技大学应用微生物研究室保藏。

1.2 主要试剂及设备

t-PA标准品购自中国生物药品检验所,血纤维蛋白原购自Sigma公司,凝血酶购自中国医学科学院血液研究所。

5L液态发酵罐:镇江市达森发酵设备有限公司。

1.3 培养基

斜面培养基:马铃薯200g,葡萄糖20g,琼脂15g,加水至1000mL,pH自然。

液体种子培养基:蛋白胨3g/L,葡萄糖20g/L, KH_2PO_4 15g/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0016g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8g/L, Tween80 1g/L。初始pH 5.2。

液体发酵培养基:胰蛋白胨0.2g/L,麸皮31g/L,可溶性纤维素20g/L, KH_2PO_4 15g/L,尿素14.5g/L(单消), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.18g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.0013g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.8g/L, Tween80 1g/L。

1.4 实验方法

菌种活化:将原菌划线接种于活化斜面,在28℃下,培养5d。

液体种子培养:从生长良好的活化斜面刮适量孢子转入装有50mL种子培养基的250mL三角瓶中,200r/min,34℃下振荡培养36h。

5L发酵罐的分批发酵方法:5L发酵罐中装液量3.5L,按10%的接种量将培养好的种子接入,通风量控制在1~2L/(L·min),搅拌速率200~300r/min,溶氧控制在30%饱和度以上,通过流加泡敌消泡,通过流加酸或碱来控制pH。

t-PA酶活的测定方法:溶解圈法^[5]。

菌体核酸量的测定方法:取2mL发酵液加8mL蒸馏水混匀,4000r/min离心15min,弃上清液,于沉淀中加入冷的5%三氯乙酸(TCA)2mL,振荡,在冰水浴中放置2~3min,然后于4000r/min离心15min,弃上清液。沉淀中加入冷的5%TCA 5mL,混匀,于沸水浴中加热回流30min,冷却后于4000r/min离心15min,取上清液1mL,加4mL TCA,混匀后,在紫外分光光度计上测260nm处的吸光值A。以三氯乙酸作为空白。

菌体核酸量 $N.A(g/L) = A_{260} \times \pi / 0.022 / 1000$ (mg/mL)

第一作者:博士,教授。

* 黑龙江省自然科学基金资助项目(No. D0352)

收稿日期:2005-06-20

A 为 TCA 萃取液的吸光度, n 为稀释倍数, 0.022 为总核酸浓度为 $1\mu\text{L}/\text{mL}$ 时的光密度。

总糖的测定方法: 蒽酮比色法^[6]。

pH 值的测定方法: pH 电极在线检测。

2 结果与分析

2.1 适宜溶氧的控制

实验中通过调节搅拌转速和通风量来改变溶氧, 分别考察了溶氧浓度控制在 20% 饱和度、30% 饱和度和 40% 饱和度时里氏木霉 306 在 5L 发酵罐中的生长和产 t-PA 酶活情况, 菌体的生长以菌体的核酸量来表示。发酵温度控制 28°C , 在发酵的过程中不进行 pH 的调节(初始 pH 为 4.8), 实验结果见图 1 和图 2。

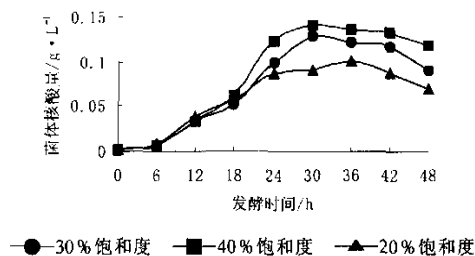


图1 溶氧对菌体量的影响

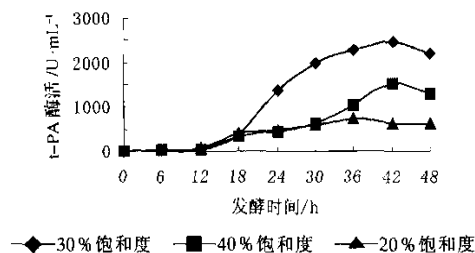


图2 溶氧对 t-PA 酶活力的影响

从图 1 和图 2 中可以看出, 在发酵前 12h, 溶氧控制在 20% 饱和度、30% 饱和度和 40% 饱和度对菌体的生长没有太大的影响, 对产 t-PA 的影响也不大。12 h 后菌体进入对数生长期, 生长旺盛, 耗氧量加大, 溶氧迅速降低。一般认为, 霉菌的临界氧值为 10%~15%^[7]。较高溶氧浓度有利于菌体的生长, 40% 饱和度能充分满足菌体生长的需求, 发酵 30 h 时菌体生长量达最大。但并不是溶氧浓度越高, 越有利于 t-PA 的合成, 从图 2 中可见, 在发酵前 12 h 溶氧浓度控制在 20% 饱和度、30% 饱和度和 40% 饱和度都没有 t-PA 产生。发酵 12 h 以后, 溶氧浓度控制不同的饱和度对 t-PA 的合成产生不同的影响, 以控制在 30% 饱和度为宜。通过调节搅拌转速和通风量来控制溶氧浓度, 本实验发酵前 12h 通风量为 $1\text{ L}/$

$(\text{L}\cdot\text{min})$, 12 h 后通风量增大为 $2\text{ L}/(\text{L}\cdot\text{min})$; 通过调节搅拌转速来达到需要的溶氧浓度, 如需要控制的溶氧浓度较大, 则搅拌转速相应增大。

2.2 适宜温度的控制

根据摇瓶发酵结果, 菌体生长适宜的温度是 34°C , 而发酵的适宜温度是 28°C ^[4], 所以将发酵前 24h 控制在 34°C , 后期控制在 28°C 和在整个发酵过程温度一直控制为 28°C 进行比较, 选择最佳的发酵温度。溶氧浓度控制在 30% 饱和度, pH 在发酵过程中不进行调节(初始 pH 为 4.8), 实验结果如图 3 和图 4 所示。

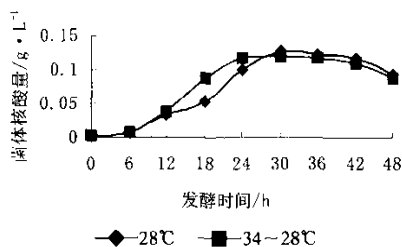


图3 温度对菌体量的影响

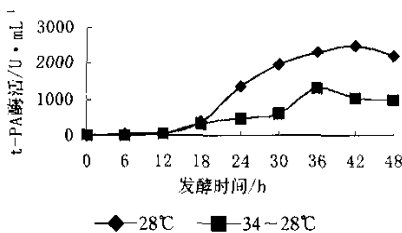


图4 温度对 t-PA 酶活力的影响

从图 3 和图 4 中可以看出在发酵过程中前 24 h 控制在 34°C 可以促进菌体生长, 24 h 时比发酵温度 28°C 菌体核酸量提高 18.81%。但是生长速度快, 菌体易衰老, 不利于 t-PA 的合成。控制在 28°C 更适合产物的合成。

2.3 适宜 pH 值的控制

里氏木霉生长的最适 pH 值为 4.8, t-PA 稳定的 pH 值为 5.8~8.0。通过流加酸或碱分别将发酵过程的 pH 控制在 4.8、6.0 和 pH 自然(指在发酵的过程中不进行 pH 的调节), 分别考察上述 3 种 pH 的控制方式对菌体的生长和 t-PA 合成的影响, 发酵温度为 28°C , 溶氧浓度控制在 30% 饱和度, 实验结果见图 5 和图 6。

从图 5 和图 6 中可以看出, 在 0~24 h, pH 值控制在 4.8 左右, 菌体生长最旺盛; 24 h 时菌体核酸量最大, 但 pH 值一直控制在 4.8 对 t-PA 的产生不利。由于发酵前期菌体的生长量较大, 因此, t-PA 合成高峰提前, 在 30 h 时达最大, 为 $1\,273.30\text{ U}/\text{mL}$, 然后,

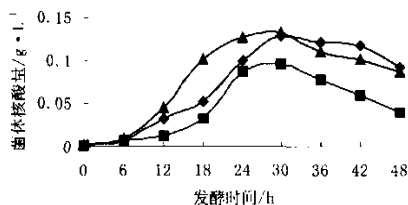


图5 pH值对菌体量的影响

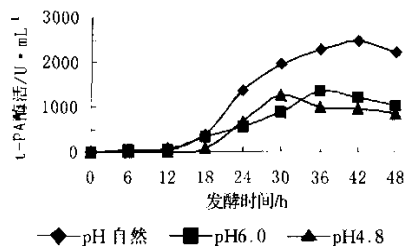


图6 pH值对T-PA酶活性的影响

由于pH值较小,不利于t-PA的稳定而使其逐渐下降。将pH值控制在6.0酶活力也没有太大的提高。而pH在自然的情况下,培养基经实消,尿素单消,按10%接种量接种后发酵初始的pH值为4.8左右,利于菌体生长。随着发酵的进行,尿素逐渐分解,pH值逐渐升高,48h达6.0左右。pH值的逐渐升高有利于t-PA的合成和稳定,酶活力也逐渐升高,42h达最大。所以发酵的最适pH值是在自然状态下。

2.4 发酵过程动力学曲线

发酵温度控制在28℃,溶氧浓度控制为30%饱和度,pH值在自然状态下进行5L发酵罐发酵,在发酵过程中,定时取样,测定了总糖、菌体核酸量和t-PA的酶活力,发酵过程曲线如图7所示。

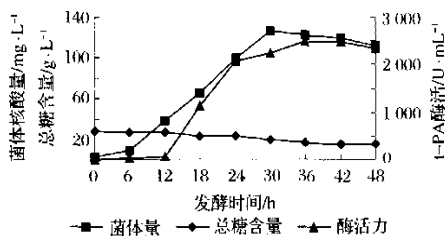


图7 5L发酵罐分批发酵过程曲线

从图7可以看出,菌体经过很短的生长延滞期后很快进入对数生长期,在30h菌体量达到最大,为125.43 mg/L。随着菌体的生长,t-PA逐渐合成,在42h酶活力达到最大,为2474.05 U/mL。总糖随着菌体生长和产物合成的消耗不断下降。

2.5 分批发酵动力学模型的建立

发酵动力学模型的研究有助于系统、有效地控制发酵过程,为小罐试验数据的放大以及由分批发酵过

渡到补料分批发酵提供理论依据。通过建模寻找最佳的操作条件,实现发酵过程的最优化控制^[8]。

发酵动力学模型一般由3部分组成:(1)菌体生长动力学模型;(2)底物消耗动力学模型;(3)产物形成动力学模型。本文基于图7分批发酵实验数据,应用MATLAB软件对*Trichoderma reesei* 306产t-PA的分批发酵动力学模型进行参数优化估计和拟合,并对其可靠性进行分析。

2.5.1 动力学模型的选择

菌体生长动力学是发酵动力学的核心。本文采用Logistic方程来描述菌体的生长规律,即:

$$\frac{dX}{dt} = \mu_{\max} \left(1 - \frac{X}{X_{\max}}\right) X$$

式中: μ_{\max} 最大比生长速率; X_{\max} 菌体生长上限。

Logistic模型能很好地反映分批发酵过程中因菌体浓度的增加对自身生长的抑制作用,是典型的S形曲线,用于拟合分批发酵的菌体生长过程有广泛的适用性。微生物的产物形成过程非常复杂,其中Gaden从产物形成与能量代谢的内在联系出发将产物的生成分为3类:产物形成与菌体生长偶联型、产物形成与菌体生长部分偶联型、产物形成与菌体生长非偶联型^[9]。由图7可知*Trichoderma reesei* 306产t-PA属于部分生长偶联型,其通用模型可用Luedeking-piret方程式表示:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta x$$

式中: α 表示与菌体生长率相关的产物合成常数; β 表示与菌体量关联的产物合成常数。

基质包括细胞生长所需的各种营养成分,其消耗主要有3个方面:1是细胞消耗,用以合成新的细胞;2是细胞维持基本生命活动消耗;3是用于合成代谢产物。因此建立基质消耗的动力学模型:

$$\frac{dS}{dt} = -\frac{dX}{dt} \times \frac{1}{y_{x/s}} - m_x x - \frac{1}{y_{p/s}} \times \frac{dP}{dt}$$

$Y_{x/s}$ 表示用于菌体生长的得率常数; $Y_{p/s}$ 表示用于产物积累的得率常数; m_x 表示以基质消耗为基准的维持常数。

为了建模简化起见,将分批发酵过程的限制性基质消耗可以分为菌体生长消耗和产物生成消耗。虽然菌体呼吸也要消耗一些基质,但其所消耗和菌体生长相比微乎其微可以将其归结在菌体生长消耗之内。则基质消耗的模型方程可以简单地用下述方程描述:

$$-\frac{dS}{dt} = k_1 \frac{dX}{dt} + k_2 \frac{dP}{dt}$$

2.5.2 模型拟合分析

应用 MATLAB 软件编程进行非线性规划,采用的算法为全局收敛的 Levenberg-Marquardt 修正的高斯-牛顿法,以误差平方和最小为目标,获得待估参数。根据发酵实验数据和经验获得模型参数的初估值,经高斯-牛顿法逐步叠代进行拟合处理,不断修正模型参数的初估值,直到获得全局收敛性的最优参数估计值,应用 nlpredci 函数还可得到参数的置信区间,结果见表 1。

表 1 分批发酵动力学模型参数估计值

参数	μ_{\max}/h^{-1}	$X_{\max}/\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	$a/\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	$\beta/\text{U}(\text{mg}\cdot\text{h})^{-1}$	$k_1/\text{mg}\cdot\text{mg}^{-1}$	$k_2/\text{mg}\cdot\text{U}^{-1}$
估计值	0.2144	0.1221	20114	39	38.44	0.1787
95% 置信区间	(0.2037 0.2251)	(0.1160 0.1282)	(19108 21120)	(37.05 40.95)	(36.52 40.36)	(0.1698 0.1876)

非线性规划获得到的 3 个发酵动力学数学模型如下:

$$\begin{aligned}\frac{dX}{dt} &= 0.2144(1 - X/0.1221)X \\ \frac{dP}{dt} &= 39X + 20114 \frac{dX}{dt} \\ -\frac{dS}{dt} &= 38.44 \frac{dX}{dt} + 0.1787 \frac{dP}{dt}\end{aligned}$$

为了进一步衡量所建数学模型的可靠性,根据所建立的发酵动力学模型数学表达及其模型参数值,应用函数得到分批发酵过程中菌体量、残糖量和酶活力随发酵时间变化的拟合值,结果表明拟合值和实验值比较接近,偏差基本小于 10%,说明所建数学模型能较好地反映 t-PA 分批发酵过程。

3 结 论

里氏木霉 306 生物合成 t-PA 5 L 发酵罐分批发酵适宜的温度为 28℃,溶氧浓度控制 30% 饱和度,在发酵过程中不进行 pH 值的调节,在自然状态下进行发酵利于菌体生长、t-PA 的合成和稳定。

以 5 L 发酵罐分批发酵试验数据为依据,对分批发酵动力学进行了研究。应用 MATLAB 工具软件

进行非线性规划,建立的菌体生长动力学模型、产物形成动力学模型和底物消耗动力学模型能较好地反映 t-PA 分批发酵过程。

参 考 文 献

1 马大龙主编. 生物技术药物[M]. 北京:科学出版社, 2001.29~41
2 Pennica D,Holmes E W, Kohr J W, et al .Cloning and expression of human t-PA cDNA in *E. coli*[J]. Nature,1983, 301:214~221
3 欧阳应斌,黄培堂,徐秀英,等. t-PA cDNA 在 CHO 细胞中的高效表达[J]. 生物技术通讯,1995(6):11~15
4 江 洁,杜连祥,路福平,等. 里氏木霉 306 产组织型纤溶酶原激活剂(t-PA)液体发酵条件的优化[J]. 食品与发酵工业,2004,30(1):29~33
5 韩素文,俞炜源,李秀珍,等. 培养细胞分泌的血纤维蛋白溶酶原激活物的研究[J]. 军事医学科学院院刊,1987 (11):101~105
6 大连轻工业学院,华南理工学院,郑州轻工业学院,等. 食品分析[M]. 北京:中国轻工业出版社,1994.178~181
7 储 炬,李友荣. 现代工业发酵调控学[M]. 北京:化学工业出版社,2002.266~268
8 石 坚,孙君社,苏东海,等. 黑曲霉液态发酵生产植酸酶的动力学研究[J]. 中国农业大学学报,2003,8(2):45~48
9 陈 坚,李 寅. 发酵过程优化原理与实践[M]. 北京:化学工业出版社,2002.28~39

Study on the Batch Fermentation Conditions of Tissue-type Plasminogen Activator (t-PA) Producing by *Trichoderma reesei* 306

Gang Jie^{1,2} Du Lianxiang¹ Lu Fuping¹ Zou Yajie²
Xiao Lin² Qiao Yulong² Zhang Baotao²

1 (College of Bioengineering, Tianjing University of Science and Technology, Tianjing, 300222, China)

2 (College of Life Science and Technology, Qiqihar University, Qiqihar, 161006, China)

ABSTRACT In the paper, we studied the fermentation conditions and the batch fermentation kinetics of tissue-type plasminogen activator producing by recombinant *Trichoderma reesei* 306. Based on the optimal conditions obtained in shake-flask, the batch fermentation was performed in 5 L fermentor. The optimized fermentation conditions are: temperature 28℃, dissolved oxygen 30% saturated concentration, pH natural. The batch fermentation kinetics of t-PA producing by *Trichoderma reesei* 306 were studied based on the experimental data from the fermentation in 5 L fermentor. The kinetic models of fermentation were established by using MATLAB software.

Key words *Trichoderma reesei*, tissue-type plasminogen activator(t-PA), batch fermentation, fermentation kinetic model