

## 第三章 基因工程制药

### 2.8 高密度发酵

#### 一、课程目标

掌握基因工程菌高密度发酵的主要程序过程。

#### 二、课程组织

同学们大家好，上节课我们一起学习了重组工程菌的培养，今天我们一起学习高密度发酵。

外源基因表达量与单位体积产量呈正相关；单位体积产量与细胞浓度和单个细胞平均表达量呈正相关。高密度发酵是在单个细胞平均表达量不变的前提下，通过单位体积的菌体数量的增加，实现产物总表达量的提高。

##### 2.8.1 高密度发酵的概念

高密度发酵是指基因工程菌在发酵过程中，培养液中工程菌的菌体浓度在每升干重 50 克以上的发酵方式，最高可达 200g 以上，通过提高单位体积的菌体浓度来提高发酵产量。

高密度发酵特点是菌体高密度，总表达量高、生物反应器体积小、单位体积生产能力高、生产周期短，分离成本小。

##### 2.8.2 影响高密度发酵的因素

影响高密度发酵的因素有以下几个方面。

1. 培养基的成分在培养基中，氮源、碳源和无机盐的含量，对菌体的生长繁殖和外源蛋白的表达有很大的影响，为了达到理想的培养效果，需要对基质中营养物质的配比进行优化，以满足细菌大量繁殖和外源基因的表达需要。

**2. 溶氧浓度：**在菌体增值过程中，需要大量氧参与氧化分解代谢，氧的及时供给非常重要，因此溶氧浓度是影响高密度发酵的一个重要因素，在实际发酵中，通过调整发酵罐的通气量和搅拌速度，以保持适宜的溶氧浓度。

**3. pH 值：**稳定的 pH 是菌体保持最佳生长状态的必要条件。特别是在高密度发酵过程中，pH 的改变会影响细胞的生长和基因产物的表达。因此，在发酵条件的控制上，一定要考虑菌体生长的最适 pH。

**4. 温度：**培养温度是影响菌体生长和调控细胞代谢的重要因素，在一定范围内，较高的温度有利于菌体的生长，提高菌体的生物量。

**5. 代谢副产物:** 在菌体发酵过程中, 会产生一些有害的代谢副产物, 如乙酸、二氧化碳等. 这些物质的积累会抑制菌体的生长和蛋白质的表达. 采取流加式补料法, 或加入甘氨酸、甲硫氨酸可以抑制这些有害物质的产生, 提高发酵的产率。

刚才我们学习了影响高密度发酵的因素, 那么**如何实现高密度发酵**呢? 下面我们就学习一下实现高密度发酵的方法。

### 2.8.3 实现高密度发酵的方法

#### 1. 发酵条件的改进

(1) 培养基的选择: 培养基采用 6g/L 的甘油作碳源, 可以缩短工程菌的发酵时间, 各组分浓度较发酵前提高 2~3 倍。

(2) 建立流加式培养方式:

流加式补料培养可以使菌体维持高的生长速率。补料的方式有两种: 反馈补料包括恒速补料、变速补料、指数补料; 非反馈补料包括恒溶氧法、pH 法、菌体浓度反馈法。

(3) 提高供氧能力:

采用的方法加压、纯氧、添加过氧化氢、提高氧传质能力等。

#### 2. 构建产乙酸能力低的工程化宿主菌

高密度发酵后期由于菌体的生长密度较高, 培养基中的溶氧浓度往往比较低, 氧气的不足导致生长速率降低和乙酸的累积, 乙酸的存在对目标基因的高效表达有明显的阻抑作用。

因此发酵工艺研究中最迫切需要解决的问题构建产乙酸能力低的工程化宿主菌, 常采用以下方法。

(1) 阻断乙酸生产的主要途径: 用基因敲除技术或基因突变技术使大肠杆菌的磷酸转乙酰酶基因和乙酸激酶基因失活, 使丙酮酸到乙酸的合成途径被中断。

(2) 对碳代谢流进行分流: 其方法是丙酮酸脱羧酶和乙醇脱氢酶 II 可将丙酮酸转成乙醇, 毒性小于乙酸。

(3) 限制进入糖酵解途径的碳代谢流: 其方法是用基因敲除技术将磷酸转移酶系统酶 II 的基因破坏, 降低葡萄糖的摄取速率。

(4) 引入血红蛋白基因: 其方法是将透明颤菌血红蛋白基因导入大肠杆菌, 可以提高氧传质能力, 使菌体耐缺氧环境。

#### 3. 构建蛋白水解酶活力低的工程化宿主菌

对于以可溶性或分泌形式表达的目标蛋白而言, 随着发酵后期各种蛋白水解酶的累积, 且目标蛋白会遭到蛋白水解酶的作用而被降解, 为了使对蛋白水解酶比较敏感的目标蛋白也能获

得较高水平的表达，需要构建蛋白水解酶活力低的工程化宿主菌。

同学们大家好，这节课我们学习了高密度发酵的概念、影响高密度发酵的因素、实现高密度发酵的方法这节课就学到这里，我们下节课再见。