

重组大肠杆菌高密度发酵研究进展

李 民 陈常庆

(中国科学院上海生物工程研究中心, 上海 200233)

摘要 重组大肠杆菌的高密度发酵是提高基因工程产品产量的一个非常有效的手段,是现代发酵工程研究的一个热点。本文就高密度发酵中影响重组大肠杆菌发酵产率的几个因素,包括宿主菌、培养基、培养条件、补料方法以及高密度发酵过程中存在的问题和对策加以讨论,着重探讨了高密度下大肠杆菌产生的有害代谢副产物——乙酸的产生机制、抑制作用机理,以及控制乙酸积累的技术方法。

关键词 重组大肠杆菌 高密度发酵 补料分批培养 比生产率 乙酸

重组 DNA 技术和大规模培养技术的有机结合,使得原来无法大量获得的天然蛋白特别是基因工程药物能够大量生产,应用于临床的基因工程药物的市场正以每年 5 - 15 % 的速度增长^[1],预测到 2003 年世界药品市场的总销售额约为 2500 亿美元,基因工程重组蛋白类药品的总销售额至少可占 10 %^[2]。

大肠杆菌在重组蛋白质生产的过程中占主导地位。采用高密度培养技术(High cell-density culture, HCDC),也就是高密度发酵技术,提高菌体的发酵密度,最终提高产物的比生产率(单位体积单位时间内产物的产量)不仅可减少培养体积、强化下游分离提取,还可以缩短生产周期、减少设备投资从而降低生产成本,能极大地提高在市场上的竞争力。

这一目的的实现,除了重组菌本身的表达性质外,还必须赋予重组菌生长和产物表达的最适环境条件,包括适宜的培养基组成、合适的培养温度、pH、稳定的比生长速率、适宜的溶解氧以及营养物的合理流加等。我们实验室采用该技术,大大推动了重组人肿瘤坏死因子(TNF),白细胞介素-3(IL-3),骨形成蛋白-2A(BMP-2A),降钙素的下游研究。

1 影响高密度发酵的几个表现因素

1.1 高密度发酵培养基

培养基的组成成分可分为合成培养基、半合成培养基和复合培养基。其组成元素包括 C、H、O、N、S、P、Fe、Mg、K 等,根据在基本培养基中的菌体生长量可以推导出每种元素获得 1g/L 的大肠杆菌菌体所需的无机盐(L^{-1}): 0.77g NH_4Cl , 0.125g KH_2PO_4 , 17.5mg $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 7.5mg K_2SO_4 , 0.64mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.4mg $CaCl_2$ ^[3]。

大肠杆菌高密度发酵使用的培养基一般为半合成培养基,培养基各组分的浓度和比例要恰当,过量的营养物质反而会抑制菌体的生长,特别是碳源和氮源的比例,如果碳氮比偏小,会导致菌体生长旺盛,造成菌体提前衰老自溶;碳氮比过大,菌体繁殖数量少,细菌代谢不平衡不利于产物的积累;碳氮比较合适,但碳源、氮源浓度高,虽然发酵起始导致菌体的大量繁殖,但发酵后期菌体生长缓慢,代谢废物过多,增大发酵黏度,影响溶解氧浓度,容易引起菌体的代谢异常,影响产物合成;碳氮比较合适,但浓度过低,会影响菌体的繁殖。这就能解释为什么单纯靠增加营养物质并不能实现高密度。一般而言,大肠杆菌培养时营养的抑制浓度为:葡萄糖(50g/L)、氨(3g/L)、 Fe^{2+} (1.15g/L)、 Mg^{2+} (8.7g/L)、 PO_4^{3-} (10g/L)、 Zn^{2+} (0.038g/L)^[4]。

如果培养基仅仅适合宿主菌的生长对工程菌高密度发酵而言远远不够,利用合成培养基可以很容易使菌体达到高密度,但往往会发生外源基因不表达的现象。Allen 和 Luli^[5]曾用合成培养基培养重组大肠杆菌,菌体在很短时间(13h)达到了 79g(DCW)/L,但外源基因没有表达。Jung^[6]等改变生长阶段的 C/N 比例,对 INF- 表达影响不大,而改变诱导后补料中 C/N 比,则会显著影响外源基因的表达效率。Tsai 等^[7]还发现,在 IL-2 发酵时,在合成培养基中加入亮氨酸会使甲硫氨酸被亮氨酸错误取代的几率从 19 % 降至 2 %。

1.2 表达基因的调控

重组菌的表达调控方式对发酵过程有重要的影响,高密度发酵也必须据此而采取相应的控制,遵循外源基因的表达规律和诱导后细菌的生长规律才有

可能达到高密度、高表达发酵。适合作为 *E. coli* 外源基因表达的启动子有 噬菌体启动子 P_L 、 P_R 、 tac 、 trp 、 lpp 、 lac 启动子,还有一种表达方式,就是组成型表达,无任何诱导剂。从简化发酵过程操作的观点看,组成型表达系统最为简便和经济,但过早的表达产物往往会对细胞有毒害作用,使宿主菌特有的比生长速率下降,甚至会使细胞死亡,因而工程菌发酵大多还是采用可诱导的启动子,对于这种工程菌一般采用两阶段培养法,即菌体积累阶段和产物表达阶段。BMP-2A^[8]、IL-2^[9]采用温度诱导型表达体系,重组蛋白在 3—4h 内达到最大表达量(BMP, 2.78g/L;IL-2, 1.02g/L),菌体也基本停止生长,而利用 tac 启动子在 IPTG 诱导 8—10h 菌体还在生长^[10],故化学诱导的重组菌高密度发酵比温度诱导型的要容易一些。

1.3 宿主菌

大肠杆菌的不同种和亚种对外源基因的表达产物会产生一定的影响。表达产物在大肠杆菌体内有三条路径可走,第一,形成稳定的天然构象,可溶且有活性,不易被降解;第二,蛋白也是可溶性的,但构象为非天然状态,易被胞内的各种蛋白酶识别降解;第三,多肽链间彼此聚集形成不可溶的包涵体,并且有蛋白酶抗性。因此不同的菌种所含有的宿主蛋白酶种类和数量不同,对表达的产物会有降解作用。相同培养条件下选用 *E. coli* DH1 比利用 YK537 和 KS476 表达 proapo A-I 的水平高出 2—3 倍,发酵密度也高 20%—100%^[10]。Luli 等^[11]研究了不同宿主菌在补料分批培养中生物量的积累,*E. coli* JM105 和 *E. coli* B 具有产酸少(2g/L),发酵密度高(30g/L)的特点,而 MC1060 发酵密度仅有 10g(DCW)/L。Walle 等^[28]对两种常用商业宿主菌 *E.*

coli BL21(DE3)和 JM109 进行了乙酸代谢研究,发现前者的乙酸积累仅是后者的 1/4,发酵密度也提高 25%。因此在高密度发酵优化时要考虑宿主菌的因素,选取最合适的表达宿主菌。

1.4 质粒的拷贝数及稳定性

质粒的拷贝数首先取决于自身的遗传特性^[12],同时还受到宿主菌生理状况及生长环境的影响。一般外源基因的表达量随拷贝数的增加而提高,但拷贝数足够大时这种关系就不明显了^[13]。细胞的生理条件会影响质粒的拷贝数,Engberg 和 Nordstorm^[14]发现生长速率增大,质粒的拷贝数下降,认为高比生长速率下,质粒的复制速率跟不上细胞的分裂的速率;Jones^[15]研究了营养限制连续培养中营养对拷贝数的影响,连续培养 8 天,质粒(pBR322 和 pMB9)没有丢失,但拷贝数下降了 4—5 倍,说明营养的限制和缺乏会引起质粒的拷贝数下降。工程菌的质粒分配不稳定和结构不稳定都将导致高密度发酵的失败。

2 重组大肠杆菌高密度培养

在排除所有发酵条件限制的情况下,Riesenberg^[4]从理论上计算大肠杆菌发酵所能达到的最高菌体密度为 400g(DCW)/L,而 Markl 等^[16]则认为最高的发酵密度为 200g(DCW)/L,此时发酵液的 25%充满了长 3μm,宽 1μm 的大肠杆菌;发酵液黏度很高,几乎丧失流动性。迄今为止,非重组 *E. coli* W3110^[16]和生产聚-3-羟基丁酸^[17]的重组菌为最高密度的两例,密度分别为:174g(DCW)/L 和 175.4g(DCW)/L。表 1 收集了部分重组菌的高密度发酵。

表 1 重组大肠杆菌的高密度发酵^[1]

产物/产品	宿主菌	菌体密度[gDCW/L]	培养基	产物产量
人生长激素	MC1061	OD ₅₂₅ = 120	复合	1.08g/L
人胰岛素样生长因子-1	K12	20	半合成	600mg/L
人生长激素	MC1061	11	复合	1.75g/L
人白介素-1	AM-7	68	合成	5.6g/L
人白细胞介素-2	M5248	59.5	半合成	1.2g/L
人干扰素	JE5505	26	半合成	1 × 10 ⁹ U/L
人干扰素-1	TGI	60	合成	5.5 × 10 ⁸ U/L
人干扰素-1	TGI	95.5	合成	2.85 × 10 ⁶ U/L
人白介素-2	M5248	59.5	半合成	1.2g/L
人干扰素-2	HW22-2	OD ₆₈₀ = 90	合成	-
人干扰素-2	MM294	OD ₆₈₀ = 75	合成	3.3g/L
人甲状旁腺素	JM103	40	半合成	338mg/L
牛促生长激素	W3110	OD ₆₀₀ = 100	半合成	2.9g/L
青霉素酰化酶	HB101	145	半合成	6.0U/mg
胰蛋白酶	X90	92	合成	56mg/L

产物/产品	宿主菌	菌体密度[gDCW/L]	培养基	产物产量
-半乳糖苷酶	JM103	84	合成	4600U/ OD
人 -干扰素	AM-7	68	合成	5.6g/L
蛋白 A -半乳糖苷酶	KA197	77	合成	19.2g/L
Mini- 抗体	RV308	50	合成	1.04g/L
蛋白 A -半乳糖苷酶	TGI	95.5	合成	2.85 ×10 ⁶ U/L
-异丙基苹果酸脱氢酶	C600	63	合成	16.00U/ g
聚羟基丁酸	XL1-Blue	101.4	复合	81.2g/L
聚羟基丁酸	XL1-Blue	175.4	半合成	65.5g/L
聚羟基丁酸	W	124.6	合成	34.3g/L
苯基丙氨酸	AT2471	36	合成	46g/L
大肠杆菌氨基酸合成酶	LFO3301	102	合成	1.6 ×10 ⁵ U/ g
人骨形成蛋白-2A ^[8]	YK537	OD ₆₀₀ = 53	半合成	2.78g/L
人白介素-3 ^[21]	YK537	OD ₆₀₀ = 53	半合成	3.3g/L
人肿瘤坏死因子 ^[25]	YK537	OD ₆₀₀ = 120	半合成	6g/L
人肿瘤坏死因子 ^[36]	YK537	OD ₆₀₀ = 60	半合成	5.12g/L
-干扰素 ^[37]	DH5	10	合成	1.1 ×10 ¹⁰ IU/L

3 高密度发酵补料调控

重组大肠杆菌高密度发酵成功的关键技术是补料策略,也就是根据重组菌的生长特点及产物的表达方式采取合理的营养物流加方式。碳源和氮源是两种常用的限制性基质,葡萄糖因细菌利用快且价廉易得,已广泛用作重组菌高密度发酵的限制性基质。大肠杆菌在过量葡萄糖或缺氧的条件下会发生“葡萄糖效应”,积累大量有机酸而影响重组菌的生长和外源蛋白的有效表达^[8,11,18]。因此大肠杆菌高密度发酵中,合理流加碳源使葡萄糖效应降低,是成功的关键。常用的流加模式有三种:即恒速流加补料^[6,19]、变速补料^[8,20,21]和指数流加补料^[6,22,23]。

在恒速流加培养中,作为限制性基质的葡萄糖是以恒定的速率流加,相对于发酵罐中的菌体来说,营养浓度是逐渐降低的,菌体的比生长速率也慢慢下降,总的菌体量在培养过程中是线性增加的。Pan 等^[9]通过恒速流加培养,生产人生长激素,菌体浓度达到 120OD₅₂₅;Jung 等^[6]采用该技术生产干扰素,菌体浓度达到 46g (DCW)/L,干扰素比生产率 为 17mg/ g 菌体。

变流速或梯度增加流加速度^[8,21]可以在菌体密度较高的情况下通过加入更多的营养物质促进细胞的生长,并对产物的表达有利。李民等^[8]采用三阶段式流加葡萄糖的方式,高密度培养重组菌 YK537/pDH-B2m 生产骨形成蛋白(BMP-2A),发酵密度达 53OD₆₀₀,BMP-2A 产量为 2.78g/L 发酵液。

指数流加技术是一个简单而又有效的补料技术,它能够使反应器中基质的浓度控制在较低的水

平,这可以大大减少乙酸等有害代谢物的生成,菌体以一定的比生长速率呈指数形式增加,还可以通过控制流加的速率控制细菌的生长速率,使菌体稳定生长的同时有利于外源蛋白的充分表达,该技术已广泛地应用于重组大肠杆菌的高密度培养中生产外源蛋白。

另外,为了拟合细菌在发酵罐中的实际生长情况,进一步减少有害代谢物的生成,根据细胞代谢反馈出的信息,配合在线或离线的检测手段又发展了许多可行的补料技术,见表 2。

表 2 大肠杆菌高密度发酵中补料分配
培养的流加技术

补料技术	注 解
恒速补料	预先设定的恒定的营养流加速率,细菌的比生长速率逐渐下降,菌体密度呈线性增加。
变速补料	在培养过程中流加速率不断增加(梯度、阶段、线性等),细菌比生长速率在不断改变
指数补料	流加速度呈指数增加,比生长速率为恒定值,菌体密度呈指数增加
恒 pH 值法	在线检测葡萄糖或甘油浓度控制碳源的浓度。通过 pH 值的变化,推测细菌的生长状态,调节流加葡萄糖速度,调节 pH 为恒定值
恒溶解氧法	以溶解氧为反馈指标,根据溶解氧的变化曲线调整碳源的流加量。
菌体浓度反馈	通过检测菌体的浓度,拟合营养的利用情况,调整碳源的加入量。
CER 法	通过检测二氧化碳的释放率(CER),估计碳源的利用情况,控制营养的流加。
DO-stat 法	通过控制溶解氧、搅拌和补料速率,维持恒定的溶解氧,控制减少有机酸的生成。

4 乙酸对生长和表达的影响

重组大肠杆菌的高密度发酵技术在生产实践中得到了广泛应用,并且取得了令人惊喜的成果。但是在该技术实际应用中还存在许多需要解决的问题。其中最为严重的就是培养过程中菌体过早地衰老、自溶和外源基因不能充分表达、比活性较低,这主要是细菌产生的有害的代谢废物对重组菌的抑制作用。乙酸是大肠杆菌的主要副产物,它对细菌生长和产物的表达都有抑制作用^[1,5,8,11,18,24]。

4.1 乙酸的分析方法

分析乙酸的方法很多,有比色法、荧光法、薄层层析法、气相色谱法、分光法和酶法等,此外近红外法也应用于乙酸的测定,但这些方法都要经过预分离、衍生化等繁琐的前处理,能达到同时分离的有机酸种类也较少,远不如 HPLC 分析简便、快捷且选择性好,准确度高。杨如燕等^[24,25]采用 RP-HPLC 法,分析了生产突变型人肿瘤坏死因子的工程菌 YK537/pSB-TK 高密度发酵过程中有机酸的种类和含量,证实了乙酸是发酵中的主要有害产物,并且在乙酸积累少时,更易实现工程菌的高表达、高密度发酵。

4.2 乙酸的产生及抑制作用机理

当葡萄糖加入量超过菌体生长和二氧化碳生产所需量或在缺氧的条件下便会产生大量的乙酸,特别是在培养时间较长的高密度发酵过程中,问题更为严重。

乙酸的产生与细胞中的电子传递链和三羧酸循环有关。Han^[26]认为细菌在低比生长速率条件下通过氧化代谢作用产生的能量足以满足合成和异化作用的需求,不会产生乙酸,而在高比生长速率时,大肠杆菌仅靠氧化代谢不能提供足够的能量,必须通过乙酸生成途径储备 ATP 和 NADH_2 。乙酸的生成需要两个关键性的酶,磷酸转乙酰酶(Pta)和乙酰激酶(Ack),它们催化葡萄糖代谢中从乙酰辅酶 A 生成乙酸的两步酶促反应。

EL-Mansi^[27]和 Luli^[11]假设的乙酸抑制机理为:乙酸在中性 pH 环境中以离子化(CH_3COO^-)和质子化(CH_3COOH)两种形式存在,质子化的乙酸具有弱的亲脂性可以穿过细胞质膜进入胞内,在胞内(pH 7.5)解离成 CH_3COO^- 和 H^+ ,这样就降低了膜内的 pH 值,使膜内外的 pH 差 - pH 减小,减弱了质子推动力,产生的能量就被大大减少了,扰乱了细胞的正常代谢和生理活性。

4.3 减少乙酸积累的对策

(1) 宿主菌

影响乙酸产生的因素较多。宿主菌的影响因素较大,Luli 和 Strohl^[11]发现在相同培养条件下,不同的宿主菌产生的乙酸量相差 3 倍。*E. coli* B 菌株比 *E. coli* K 菌株产生的乙酸少^[28],发现 *E. coli* B 和 JM105 产酸少,而 MC1060 产酸较高,并且随着乙酸量的增加,菌体的生长呈指数下降,这是因为 *E. coli* B 乙酸生成途径中的两个关键酶(Pta 和 Ack)有一个酶突变了或活性降低了使乙酸的合成受阻。Neway 等^[29]采用氟乙酸抗性突变体 *E. coli* MM-294(磷酸转乙酰酶缺陷株)进行 IL-2 高密度发酵研究,结果该菌株比野生菌产酸少,发酵密度高,IL-2 比生产率高。

(2) 培养基

培养基组成能影响乙酸的产生,特别是碳源的含量影响最大。在基本培养基中大肠杆菌产生的乙酸比在复合培养基中产生的少^[26]。Kleman 等^[30]研究了培养基 pH 值对产生乙酸的影响,发现重组大肠杆菌 W3100 在葡萄糖浓度为 0.5g/L、pH 6.0 的培养基中,乙酸生成量为 6g/L,而 pH 7.5 为 12g/L。另外用甘油取代葡萄糖作为碳源^[24]可以降低乙酸的生成。Han 等^[26]在培养基中加入某些氨基酸(甘氨酸、甲硫氨酸),减轻了乙酸的抑制作用,提高了重组菌的生长速率和重组蛋白的产率。

(3) 降低比生长速率

细菌比生长速率(μ)高乙酸的比生成率就高,一般说来,在合成培养基中,当重组菌的生长速率超过某个临界值便产生乙酸,在连续培养中^[26],当稀释率超过 0.2h^{-1} 才能检测到乙酸的存在。Riesenberg 等^[31]控制细菌的比生长速率在 0.11h^{-1} ,降低乙酸产率,使菌体密度达到 110g DCW/L。较低的 μ 虽然产酸少但同时又对产物表达不利,因此选取合适的 μ 才能达到高密度、高表达发酵。

(4) 降低培养温度

将温度从 37 降低到 26—30 可以降低菌体对营养物的吸收率,从而减少有机酸的形成^[32],重组 *E. coli* KS467^[32]诱导产生 Proapo A-I 的温度从 37 降低到 30,可将乙酸的浓度从 10g/L 降到 5g/L。

(5) 透析培养^[33]

在重组菌的培养过程中可以利用透析技术除去发酵液中有害物质,降低乙酸的含量从而实现重组菌的高密度发酵。Lee 等^[33]用中空纤维膜过滤装置除去乙酸,可以在较高的葡萄糖浓度下培养重组

菌而得到较高的密度。

(6) 限制性流加葡萄糖

利用葡萄糖为碳源培养重组大肠杆菌时要控制其浓度在较低的范围内,减少乙酸的生成。目前大多数高密度发酵均采取了限制性流加葡萄糖的方法。利用发酵反馈的参数,如 pH, DO, μ , OUR, CER 作为控制对象,和葡萄糖流加相关联,控制流加量,使培养基中葡萄糖浓度限定在较低的水平。除直接检测控制葡萄糖浓度外,还有以下几种方法。

A, 恒 pH 值法^[6,30]

大肠杆菌代谢葡萄糖产生的有机酸将导致 pH 的降低,因此 pH 的下降在一定程度上反映了菌体消耗葡萄糖的快慢,故可以通过 pH 变化控制、调节补糖速率。该方法的缺点是 pH 变化不完全是葡萄糖代谢的结果,容易造成补料体系的错误。

B, 恒溶解氧法^[27,30]

在菌体利用营养物生长代谢时,会消耗氧气,反应出溶液中溶解氧的下降,并且溶解氧下降的快慢间接反映了细菌生长的旺盛程度。当葡萄糖浓度降低到一定程度使菌体代谢强度下降,消耗氧气的能力降低,反映出溶解氧的上升,因此根据溶解氧曲线补加葡萄糖,保持溶解氧恒定,可以使葡萄糖浓度控制在较低的水平。

C, 平衡 DO-stat 法^[8,34]

发酵过程溶解氧水平和糖流加速率对重组菌的糖酵解过程和代谢物氧化过程之间的平衡有很大的影响。缺氧将迫使糖代谢进入酵解途径,补糖速率过快也会使糖酵解速度和代谢氧化速率之间的平衡破坏,当碳源的供给超过其氧化容量时,将迫使葡萄糖酵解产生部分中间产物,在有氧情况下产生有机酸。DO-stat 通过控制溶解氧防止氧气缺乏下产生有机酸,但是 DO-stat 无法阻止有氧情况下的“葡萄糖效应”。平衡 DO-stat 是在恒定 DO 法的基础上,通过溶解氧、搅拌转速、通气和补糖速率的综合控制,使葡萄糖浓度和乙酸浓度维持在低水平,实现高密度发酵。

5 影响高密度发酵的其它因素

除了以上这些方面外,在重组大肠杆菌高密度培养过程中,要达到重组产物的最大比生产率,还要考虑合适的诱导时间和诱导强度。李民等^[8]在利用温度诱导型的重组质粒生产 BMP-2A 时,细菌对数中期诱导比后期诱导产率提高 32%。Shimizu 等^[35]同样认为在细菌生长对数中期加入诱导物

IPTG 比在后期诱导重组蛋白的生产率要高,但诱导物的浓度在 0.02mM - 2mM 之间对产物表达没有影响。

6 发展与展望

随着发酵控制手段的进一步发展,监控的发酵参数越来越详细,就越能对细菌代谢过程真实地了解和掌握。目前所采用的发酵装置一般能够在线检测或控制物理参数(转速、温度、压力、体积、流量等)、物理化学参数(pH 值、溶解氧、CO₂ 尾气分析、氧化还原电位、气相分析)、化学测量(基质/葡萄糖浓度、产物/乙酸等)、生物学和生化测量(呼吸熵、生物量、酶活、细胞形态等),这些测量可提供反映环境变化和细胞生长的许多重要信息,作为研究和控制发酵过程的基础,但这些还远远不能反映细菌的动态代谢过程,因此高密度发酵的发展趋势是重组菌代谢理论更完善;检测和调控手段更完备;发酵设备更加自动化;发酵放大工艺更完善。

总之,基因工程产品在化工、食品、环保、医药等方面越来越表现出极大的潜在能力,重组大肠杆菌高密度发酵技术是基因工程技术从实验室通向市场的桥梁,对工程菌生理、代谢规律和高密度培养的了解和掌握将在这方面有着重要的意义。

参考文献

- [1] Lee, S. Y., TIBTECH, 1996, 14: 98 - 105.
- [2] 吴梧桐, 丁锡申, 刘景晶, 基因工程药物, 人民卫生出版社, 1996
- [3] Reiling H. E., Laurial H., and Fiechter A., J Biotech, 1985, 2 (3): 191 - 206.
- [4] Riesenber D., Curr. Opin. Biotechnol., 1991, 2: 380 - 384.
- [5] Allen B., and Luli G W., Biopharm. Manuf., 1987, 1: 38 - 41.
- [6] Jung G., Deneffe P., Becquart J. et al., Ann. Inst Pasteur Microbio, 1988, 139: 129 - 146.
- [7] Tsai L B., Mann M., Morris F. et al., J Ind Microbio, 1987, 2: 181 - 187.
- [8] 李民, 陈常庆, 朴勤等, 生物工程学报, 1998, 14 (3): 270 - 275.
- [9] Jin S D., Chung B H., Hwang Y B. et al., Journal of Fermen Bioeng, 1992, 74(3): 196 - 198.
- [10] Ohta K., Shibu T., Morimoto Y. et al., Journal of Fermen Bioeng, 1993, 75(2): 155 - 157.
- [11] Luli G W., and Strohl W R., Appl and Envir Microbio, 1990, 56(4): 1004 - 1011.
- [12] Moser D R., and Campbell J L., J Bacteriol, 1983, 154(2): 809 - 818.
- [13] Uhlin, B., and Nordstrom K., Plasmid, 1979, 1: 1 - 8.
- [14] Engberg B., and Nordstrom K., J Bacteriol, 1975, 123(1): 179

- 186.

- [15] Jones I M. ,Primrose S B. ,Robinson A. et al. ,Mol Gen Genet , 1980,180(3) :579 - 584.
- [16] Markl H. ,Zenneck C. ,Dubach A. et al. ,Appl Microbio Biotechnol ,1993 ,39:48 - 52.
- [17] Lee S Y. ,and Chang H N. ,J Environ Polymer Degrad,1994 , 2:169 - 174.
- [18] Doelle H E. ,Ewings K N. ,and Hollywood N W. ,Adv Biochem Eng ,1982 ,23:1 - 35.
- [19] Pan J G. ,Rhee J S. ,and Lebeault J M. ,Biotechnol Lett ,1987 , 9:89 - 94.
- [20] Paalme T. ,Tilma K. ,Kahru A. et al. ,Biotechnol Bioeng , 1990 ,35:312 - 319.
- [21] 李民,杨立宏,任红玉等,生物工程学报,1998,发表中.
- [22] Yee L. ,and Chang B H. ,Biotechnol Lett ,1993 ,15:971 - 974.
- [23] Lee J H. ,Choi Y H. ,Kang S K. ,Biotechnol Lett ,1989 ,11 : 695 - 698.
- [24] 杨如燕,李民,陈常庆,工业微生物,1998 ,28(3) :30 - 32.
- [25] 杨如燕,李民,陈常庆,工业微生物,1999 ,29(1) :25 - 28.
- [26] Han K. ,Lim H C. ,and Hong J. ,Biotechnol Bioeng ,1992 ,39 : 663 - 671.
- [27] EL-Mansi E M T. ,and Holms W H. ,J Gen Microbio ,1989 , 135:2875 - 2883.
- [28] van de Walle M V. ,and Shiloach J. ,Biotechnol Bioeng ,1998 , 57(1) :71 - 78.
- [29] Bauer K A. ,Ben-Bassat A. ,Dawson M. et al. ,Appl Environ Microbio ,1990 ,56:1296 - 1302.
- [30] Kleman G L. ,and Strohl W R. ,Appl Enviro Microbio ,1994 , 60(11) :3952 - 3958.
- [31] Riesenber D. ,Schulz V. ,Knorre M A. ,J Biotechnol ,1991 ,20 (1) :17 - 28.
- [32] Ohta K. ,Shibui T. ,Morimoto Y. et al. ,J Ferment Bioeng , 1993 ,75(2) :155 - 157.
- [33] Lee C W. ,Gu M B. ,and Chang H N. ,Enzyme Microbio Technol ,1989 ,11 :49 - 54.
- [34] Seo D J. ,Chung B H. ,Hwang Y B. et al. ,J Ferment Bioeng , 1992 ,74:196 - 198.
- [35] Shimizu M. ,Hjima S. ,and Kobayashi T. ,J Ferment Bioeng , 1992 ,74(3) :163 - 168.
- [36] 徐皓,李民,陈常庆等,工业微生物,1998 ,28(2) :20 - 25.
- [37] 张涛铸,谢幸株,叶勤等,华东化工学院学报,1993 ,19(2) : 153 - 158.

Progress Studies of High Cell-density Culture of Recombinant *Escherichia coli*

Li Min , Chen Changqing

(Shanghai Research Center of Biotechnology ,Chinese Academy of Sciences ,Shanghai 200233)

Abstract High cell-density fermentation of recombinant *E. coli* was an efficient approach to prove production yield and a hot point in fermentation engineering. This article discussed several factors influencing the productivity including host ,medium ,cultivation conditions ,feeding strategies ,together with the problems and solutions in high cell-density fermentation of recombinant *E. coli*. The mechanism of production ,inhibition ,and techniques of limitation accumulation of acetic acid were emphasized ,which was a major inhibitor of cell growth and reduction of productivity among the bacterial metabolic byproducts in high cell density fermentation.

Key words : Recombinant *E. coli* , high cell-density fermentation , fed batch culture , specific productivity , acetic acid

(接第 19 页)

Development in Pre-clinical Study of RP Therapy

Liu Xiaojun Chao Jianhua

(Human Genome Lab ,Institute of Genetics ,Fudan University ,Shanghai 200433)

Abstract Retinitis pigmentosa (RP) ,a progressive degeneration of the retina characterized by function loss of photoreceptors and retinal pigment epithelia ,is one of the most frequent hereditary causes of blindness. RP therapy is always a difficult problem in the field of ophthalmology. By far there has been few successful report on RP clinical study. The undergoing pathways are mainly : (1) transplantation of retinal cells ; (2) gene therapy ; (3) application of cell growth factors. This review will emphasize on the development in pre-clinical investigation of the three aspects mentioned above and in retinal drug delivery systems.

Key words : RP therapy ,retinal transplantation ,gene therapy ,growth factors.