

Czynniki determinujące ekspresję zrekombinowanych genów *in vitro* u *Escherichia coli*. Część II - Hodowla w bioreaktorze

Włodzimierz Grajek

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności
Akademia Rolnicza
Poznań

Dążenie do obniżenia kosztów biosyntezy różnych cennych metabolitów komórkowych doprowadziło do ogromnego zainteresowania stosowaniem organizmów zrekombinowanych. Odnotowano na tym polu szereg poważnych sukcesów. Przykładem może być doskonalenie produkcji aminokwasów w Japonii, czy enzymów przez firmę Novo Nordisk w Europie.

Uderzające jest to, że mimo ogromnego rozwoju inżynierii genetycznej, w literaturze światowej istnieje bardzo mało opisów ekspresji klonowanych genów w skali pilotowej, a już zupełnie brak jest danych na temat procesów prowadzonych w skali przemysłowej. Wynika to z powiązania ich z pracami nad projektowaniem produktu końcowego, co z oczywistych względów objęte jest tajemnicą produkcyjną firm biotechnologicznych. W literaturze światowej można jednak spotkać kilka prac omawiających warunki efektywnego wykorzystania mikroorganizmów zrekombinowanych w procesach fermentacyjnych (1,9,21).

1. Warunki hodowli *Escherichia coli*

Podstawowym celem procesu hodowli każdego mikroorganizmu o znaczeniu przemysłowym jest uzyskanie wysokiej wydajności produktu, maksymalnej produktywności bioreaktora, wysokiego stężenia produktu i jego odpowiedniej czystości. Większość procesów prowadzonych z udziałem mikroorganizmów zrekombinowanych ma na celu produkcję określonych białek. Są one wytwarzane w fazie szybkiego namnażania biomasy komórkowej.

Dotychczas większość hodowli zrekombinowanych bakterii jest prowadzona za pomocą metody okresowej, która charakteryzuje się dużą prostotą. Należy jednak podkreślić, że najkorzystniejsze warunki do szybkiego wzrostu komórek i syntezy wielu produktów stwarza metoda ciągła. Podstawowym

warunkiem jej realizacji jest utrzymanie równowagi między szybkością rozcieńczenia pożywki (D) i właściwą szybkością wzrostu komórek (μ).

W hodowlach *E. coli* prowadzonych w specjalnych warunkach gęstość komórek waha się w granicach 25 – 45 g s.m./L, jednak możliwe jest uzyskanie stężenia dochodzącego do 100 g s.m./L i właściwej szybkości wzrostu w granicach 0,1 – 0,6 h⁻¹ (14,21). Wydajność biomasy w przeliczeniu na źródło węgla (cukier), jak i przeliczana na inne makroelementy, np. azot lub fosfor, zależy od stosowanego szczepu bakterii, temperatury hodowli oraz natlenienia i pH pożywki.

Podstawowym warunkiem wzrostu komórek jest ich dobre odżywienie. Pojawienie się substratów ograniczających wzrost odbija się na zwolnieniu produkcji biomasy. W hodowlach prowadzonych w warunkach przemysłowych pierwszym czynnikiem ograniczającym jest zwykle tlen. Krytyczny poziom tego gazu w pożywce wynosi ok. 0,008 mmola/L. Przy wysokiej koncentracji komórek zużycie tlenu jest tak duże, że system natleniania jest zwykle niewystarczający. W takich przypadkach stosuje się obniżenie temperatury hodowli, co polepsza rozpuszczalność tlenu i hamuje wzrost komórek.

Duży wpływ na szybkość wzrostu komórek *E. coli* i typ metabolizmu ma stosunek stężenia glukozy do tlenu. Przy wysokiej koncentracji glukozy dochodzi do przejścia z metabolizmu tlenowego na beztlenowy. U *E. coli* objawia się to tworzeniem kwasu octowego. Podobne zjawisko znane jest u drożdży *S. cerevisiae* pod nazwą efektu Crabtree. Pojawienie się metabolizmu beztlenowego następuje przy właściwej szybkości wzrostu 0,35 h⁻¹ (15).

Przedmiotem pracy jest przedstawienie stanu wiedzy na temat relacji między warunkami prowadzenia fermentacji w bioreaktorze a ekspresją genów kodujących zrekombinowane białko.

2. Uwarunkowania ekspresji genów

Komórki, do których wprowadzono zrekombinowane geny za pomocą wektorów plazmidowych zawierają dwa współzawodniczące ze sobą systemy regulacji replikacji, segregacji oraz ekspresji genów: chromosomu gospodarza i wprowadzonego plazmidu.

Z uwagi na wielkość obu typów DNA liczba sekwencji regulujących ekspresję genów znajdujących się w genomie gospodarza jest zwykle znacznie większa od liczby sekwencji regulujących ekspresję genów znajdujących się w wektorze ekspresyjnym dla zrekombinowanego białka. Ekspresja genów chromosomu gospodarza jest nakierowana na syntezę składników komórkowych, a zatem na wzrost biomasy komórkowej, podczas gdy ekspresja genów plazmidu prowadzi głównie do produkcji zrekombinowanego białka. Między tymi procesami występuje konkurencja. Zrekombinowane białka mogą być dla komórki gospodarza korzystne, gdy wspomagają lub rozszerzają jego potencjał metaboliczny. Zwykle jednak mają charakter konkurencyjny. Teoretycznie można zakładać, że w przypadku znaczącej przewagi ekspresji plazmidu

część energii metabolicznej komórki musi być zużyta na produkcję zrekombinowanego białka, co może prowadzić do śmierci komórki. Utrzymanie dobrego wzrostu oraz wydajnej syntezy zrekombinowanego produktu zależy od osiągnięcia właściwej regulacji obu współzawodniczących systemów. Decydującym elementem w regulacji plazmidu jest wprowadzenie do niego sekwencji kontrolujących jego replikację i ekspresję genów.

Drugim poważnym problemem w hodowlach zrekombinowanych szczepów może być brak stabilności plazmidów, wynikający głównie z braku stabilności segregacyjnej plazmidów przy rozdziale między potomne komórki. Prowadzi to do wytworzenia się populacji mieszanej, w której — w wyniku podziałów komórkowych — pojawiają się, obok komórek zawierających plazmidy, komórki całkowicie ich pozbawione. Szybkość wzrostu obu populacji można zapisać następująco (14):

$$\frac{dX^+}{dt} = \mu^+_{\max} X^+ \frac{S}{K+S} (1-P)$$

$$\frac{dX^-}{dt} = \mu^-_{\max} X^- \frac{S}{K+S} + \mu^+_{\max} X^+ \frac{S}{K+S} P,$$

gdzie poszczególne parametry oznaczają:

X — stężenie biomasy, t — czas, μ — właściwa szybkość wzrostu,

+/- — komórki z i bez plazmidu, S — stężenie substratu, K — stała Monoda,

P — stężenie produktu.

Kinetyka syntezy produktów związanych z procesami, w których komórka wytwarza energię jest opisana za pomocą równania Luedekinga-Pireta (11):

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX^+}{dt} + \beta X^+,$$

gdzie:

α — współczynnik tworzenia produktu związanego ze wzrostem komórki;

β — współczynnik tworzenia produktu nie jest związany ze wzrostem komórek.

Imanaka i Aiba (8) przeprowadzili teoretyczne obliczenia kinetyki wzrostu heterogennej populacji zrekombinowanych komórek. Założyli oni wystąpienie różnicy we właściwych szybkościach wzrostu między komórkami zawierającymi plazmidy i pozbawionymi ich, a także przyjęli niskie prawdopodobieństwo prawidłowej segregacji plazmidów między potomne. Stwierdzili oni, że przy takich założeniach po 25 podziałach komórkowych w populacji pozostanie tylko 10% komórek posiadających wprowadzone plazmidy. Wybór 25 generacji odpowiada przeciętnej liczbie generacji, jakie mają miejsce w czasie procesu produkcyjnego prowadzonego od „skosu agarowego” do dużego bioreaktora.

ZESTAWIENIE
NIEKORZYSTNE ZJAWISKA WYSTĘPUJĄCE W PRZEMYSŁOWYCH HODOWLACH
ZREKOMBINOWANYCH MIKROORGANIZMÓW

- Zwolnienie szybkości wzrostu komórek w miarę zwiększania poziomu ekspresji zrekombinowanego genu
- Utrata plazmidów zawierających geny kodujące rekombinowane białko w miarę podziałów komórkowych, co prowadzi do opanowania bioreaktora przez komórki pozbawione plazmidów
- Zmniejszenie produktywności objętościowej bioreaktora

Biorąc pod uwagę wymienione trudności należy stwierdzić, że utrzymanie stabilności plazmidów i wydajna ekspresja genów w warunkach *in vitro* u bakterii wymagają spełnienia następujących warunków:

- 1) zapewnienie sprawnego przekazywania rekombinowanych genów do komórek potomnych,
- 2) eliminacja komórek pozbawionych systemu ekspresji danego genu (komórek, które straciły plazmid),
- 3) efektywna i regulowana transkrypcja oraz translacja, a także
- 4) odpowiedni system modyfikacji i sekrecji metabolitów.

Wymienione postulaty powinny być uwzględniane przede wszystkim na etapie projektowania i konstrukcji mikroorganizmu rekombinowanego. Pewna część regulacji molekularnych może jednak być przeprowadzona przy wykorzystaniu czynników środowiskowych. Manipulacja tymi czynnikami, w powiązaniu z konstrukcją wektora, jest praktycznie jedynym dostępnym środkiem pozwalającym na regulację ekspresji genów na etapie realizacji procesów przemysłowych. Umiejętne ich wykorzystanie jest nadal niedostatecznie znane przez kadry biotechnologów zajmujących się przemysłowymi procesami mikrobiologicznymi.

3. Strategia prowadzenia ekspresji genów w skali bioreaktora

Zapewnienie wysokiej wydajności ekspresji genów w bioreaktorze wymaga przyjęcia jednej z dwóch wymienionych strategii:

- 1) prowadzenia jednostopniowej fermentacji z ekspresją genu połączoną z ciągłą eliminacją bezplazmidowych segregantów,
- 2) prowadzenia fermentacji dwustopniowej, tj. namnażania biomasy komórkowej w pierwszym etapie przy blokadzie ekspresji sklonowanego genu i jego ekspresja w drugim etapie.

Poniżej omówiono metody hodowli i czynniki środowiskowe wykorzystywane przy realizacji obu tych strategii.

3.1. Stosowanie antybiotyków

Jedną z najszerzej stosowanych metod eliminacji komórek, które utraciły plazmid jest selekcja antybiotykowa. Polega ona na stosowaniu takich plazmidów, które obok sklonowanego genu posiadają również geny oporności na antybiotyki. W ten sposób istnieje możliwość prowadzenia hodowli w obecności antybiotyku i ciągłej eliminacji komórek pozbawionych oporności antybiotykowej, kodowanej w plazmidzie. Strategia ta wymaga stosowania systemu ekspresyjnego, który posiada m. in. sekwencję kodującą oporność antybiotykową, sekwencję kodującą rekombinowane białko oraz sekwencję promotora podlegającego regulacji.

Przemysłowa realizacja takiego procesu jest dosyć kosztowna z uwagi na wysoką cenę antybiotyków. Rozwiązanie to wykazuje także inne wady. Wśród najważniejszych należy wymienić możliwość skażenia produktu końcowego przez antybiotyki lub metabolity ich rozkładu oraz skażenie antybiotykami wód ściekowych. Stosowanie antybiotyków stwarza też zagrożenie dla personelu pracującego w zakładzie. Należy zwrócić również uwagę na niebezpieczeństwo pojawienia się takich segregantów, które uzyskują oporność na antybiotyki a utraciły cechę produkcji. Jest to szczególnie prawdopodobne w hodowlach ciągłych prowadzonych przez dłuższy czas. Zastrzeżenia te są na tyle poważne, że stosowanie ochrony antybiotykowej ograniczono głównie do skali laboratoryjnej.

3.2. Stosowanie specjalnych mutantów

Innym rozwiązaniem jest wykorzystanie systemu selekcji komórek bezplazmidowych poprzez stosowanie mutantów odpornych na atak fagów. Przykładem takiego systemu może być plazmid zawierający represor λ (16). Mutanty pozbawione tego represora, co może się wiązać z utratą zrekombinowanego plazmidu lub zmianami w strukturze plazmidowego DNA, podlegają lizogenii.

W literaturze jest również opisany system plazmidowy, w który wprowadzono gen *valS* kodujący jedną z syntetaz RNA, enzym niezbędny dla szlaku syntezy białka. Wymieniony gen jest niezbędny do wzrostu komórek mutantu *valS^{ts}* (18).

Wymienione metody mają jednak poważne wady. Układ wykorzystujący selektywne działanie faga λ , chociaż ułatwia prowadzenie procesu biosyntezy, to może być stosowany głównie w pierwszej fazie produkcji. Lizogenia komórek bakteryjnych (segregantów) w ostatniej fazie hodowli może znacznie utrudnić oczyszczanie białka rekombinowanego z mieszaniny uwolnionych białek bakteryjnych. Z kolei system *valS* wymaga prowadzenia hodowli w niskiej temperaturze (30°C), co niekorzystnie wpływa na produktywność objętościowa bioreaktora.

3.3. Immobilizacja rekombinowanych komórek

Immobilizacja komórek bakteryjnych jest jedną z najskuteczniejszych metod ich efektywnego wykorzystania w ciągłych hodowlach. Od dawna zwracano uwagę na występowanie podwyższonej odporności komórek na warunki stresowe oraz stabilizację ich właściwości produkcyjnych po unieruchomieniu na nośniku.

Sayadi-Nasri i in. (18) wykorzystali tę właściwość do stabilizacji plazmidów w rekombinowanych mikroorganizmach. Stwierdzili oni, że umieszczenie komórki w bryłce hydrożelu pozwoliło na znaczne podwyższenie stabilności liczby kopii plazmidów i aktywności w przeliczeniu na liczbę zrekombinowanych komórek. Autorzy tłumaczą to zjawisko ograniczeniem podziałów komórek w mikrosferze nośnika do liczby generacji, w której nie dochodzi do „wypadania” plazmidów.

TABELA 2

LICZBA KOPII PLAZMIDÓW PTG201 W KOMÓRKACH W HODOWLI ZAWIESINOWEJ I UNIERUCHOMIONEJ (18)

Parametr	Liczba generacji				
	20	40	60	80	100
komórki uwolnione z żelu	85	150	130	160	90
komórki unieruchomione	200	230	260	210	200

Metoda ta ma jednak ograniczone działanie i nie zabezpiecza całkowicie kultury przed pojawieniem się bezplazmidowych mutantów.

Dincbas i in. (4) wykazali, że immobilizacja w żelu alginianowym komórek *E. coli* HB101, zawierających plazmid YEp352, zmniejsza eliminację plazmidów. Efekt ten jest tym wyraźniejszy im mniejsza jest początkowa liczba komórek w żelu.

Korzystny wpływ immobilizacji zrekombinowanych bakterii w żelu κ -kara genu został potwierdzony przez Berry'ego i in. (2). Wykorzystali oni *E. coli* W3110 z plazmidem pTG205 do produkcji dioksygenazy katecholowej w procesie dwustopniowym. Transkrypcja genu była kodowana przez promotor *trp*, znajdujący się pod kontrolą tryptofanu jako represora i kwasu 3- β -akrylowego jako derepresora. W pierwszym etapie hodowli, prowadzonej z dodatkiem tryptofanu, obserwowano dobrą stabilność plazmidu. Uwalniające się komórki przepływały do drugiego bioreaktora, gdzie następowała ekspresja genu indukowana przez dodatek kwasu indolilo-akrylowego.

3.4. Bioreaktory z selektywną recykulacją komórek

Rozwój inżynierii bioprosesowej otworzył nowe możliwości segregacji mutantów bezplazmidowych poprzez ich selektywne, fizyczne oddzielanie od komórek rekombinowanych. Korzyść jest w tym przypadku podwójna: jedno-

częśnie z eliminacją segregantów uzyskuje się w bioreaktorze duże zagęszczenie biomasy komórkowej, co umożliwi znaczne zwiększenie syntezy produktu.

Henry i in. (5) zastosowali efektywny układ fermentacyjny obejmujący bioreaktor połączony ze stożkowym osadnikiem oraz zrekombinowane bakterie zawierające plazmid posiadający m.in. gen kodujący syntezę enzymu β -laktamazy oraz gen kodujący syntezę białkowych wyrostków zbudowanych z białka piliny typu 1. Białko to, posiadające właściwości hydrofobowe i adhezyjne, wykazywało zdolności do agregowania komórek (flokulacja). W przypadku wypadnięcia plazmidu komórki traciły zdolności flokulacyjne i rosły w formie zawiesiny. Różnica w szybkości sedymentacji tych dwóch form komórkowych została wykorzystana do ich rozdziału i umożliwiła efektywną recyrkulację komórek agregujących do bioreaktora.

TABELA 3
PRODUKCJA ZREKOMBINOWANYCH BIAŁEK W BIOREAKTORZE
Z RECYRKULACJĄ I BEZ RECYRKULACJI KOMÓREK (13)

Czas hodowli (h)	Aktywność wyprodukowanej β -laktamazy (U/ml)	
	bez recyrkulacji	z recyrkulacją
0	3	3
25	3	20
50	2	37
75	1	45
100	0	52

Model ten został następnie udoskonalony. Wprowadzono inny plazmid, pKLH3 z odpowiednią lokalizacją genu *amp^R*, genu kodującego β -laktamazę oraz genu *pil*, pozbawionego własnego operatora i promotora, a umieszczonego za operonem *tac*. W ten sposób komórka mogła produkować białko β -laktamazę, natomiast synteza piliny, a w konsekwencji zdolności flokulujące organizmu, znalazły się pod kontrolą laktozy lub IPTG (13). Wzrost komórek i produkcja białka zachodziły w bioreaktorze, natomiast separację segregantów prowadzono oddzielnie w osadniku. Wprowadzano do niego IPTG, indukując w ten sposób syntezę piliny, co umożliwiała eliminację segregantów. Dzięki takiemu rozwiązaniu oszczędzano energię metaboliczną komórek na ciągłą produkcję piliny, a także możliwe było ograniczenie szybkiego mieszania pożywki powodującego rozbicie agregatów komórkowych. Jest to jeden z przykładów udanej strategii fermentacyjnej, umiejętnie łączącej czynniki środowiskowe i genetyczne do ekspresji zrekombinowanego białka.

3.5. Czynniki chemiczne

Regulacja ekspresji genów poprzez dodatek efektorów chemicznych należy do najlepiej poznanych systemów regulacyjnych. W przypadku stosowania

promotorów znajdujących się pod negatywną kontrolą białka represorowego, jak to ma miejsce, np. w operonie *lac*, należy wprowadzić do pożywki induktor, w tym przypadku laktozę lub jej analog. Przy negatywnej kontroli promotora przez aktywator (białko regulatorowe) konieczne jest usunięcie nadmiaru produkowanego metabolitu (np. aminokwasu), aby nie nastąpiło przekształcenie struktury represora w formę zdolną do przyłączenia się z operatorem i zablokowanie promotora.

Często systemy regulacyjne są bardziej skomplikowane. Przykładowo regulacja operonu *lac* podlega jeszcze dodatkowej kontroli przez białko receptorowe represji katabolicznej (CRP), które po połączeniu się z cyklicznym AMP przyłącza się do promotora i ułatwia dołączenie się polimerazy RNA (kontrola pozytywna). W regulacji syntezy enzymów szlaku laktozowego, tj. β -galaktozydazy, permeazy i transacetylazy, można zatem manipulować dwoma czynnikami środowiskowymi: stężeniem glukozy (dla cAMP i pośrednio dla kompleksu cAMP – CRP) i laktozy (dla białka represora).

3.6. Temperatura

Temperatura, jako czynnik regulowany z zewnątrz, może być skutecznie wykorzystana do uruchomienia ekspresji genów. Do najlepiej opisanych systemów ekspresyjnych kontrolowanych przez temperaturę należy kombinacja promotorów fagowych z termowrażliwym represorem. Przykładem takiego rozwiązania jest wektor ekspresyjny zbudowany na bazie silnego promotora p_L lub p_R i represora $cI857^{ts}$ (3). Wektory tego typu są indukowane przez skok temperatury z 30 do 42°C. Dzięki inaktywacji wrażliwego na wysoką temperaturę represora możliwa jest transkrypcja genu występującego po silnym promotorze fagowym. Wymieniony system jest łatwy w sterowaniu, choć jego minusem są zmiany w ścianach komórkowych, niewłaściwe fałdowanie białek i tworzenie inkluzji wewnątrzkomórkowych. Ogólnie należy jednak podkreślić, że system ten jest niezwykle przydatny do regulacji ekspresji w skali przemysłowej.

Villaverde i in. (20) poprawili wydajność tego systemu poprzez połączenie w jednym wektorze $pJLACZ$ represora $cI857$ z tandemem dwóch silnych promotorów p_R i p_L oraz genem *lacZ*, kodującym nietoksyczne dla *E. coli* białko β -galaktozydazę. Plazmid $pJLACZ$ został umieszczony w *E. coli* K-12 MC1061. Hodowlę prowadzono w sposób ciągły przy $D = 0,1 \text{ h}^{-1}$, podnosząc skokowo temperaturę hodowli od 28 do 42°C. Stwierdzono, że poniżej 32°C nie występuje ekspresja genu. Pojawiła się ona w wyższej temperaturze i była widoczna dopiero po dwudziestu godzinach hodowli. Maksimum produkcji enzymu uzyskano w temperaturze 42°C. Użycie tandemu silnych promotorów doprowadziło do ogromnej nadprodukcji enzymu, co okazało się zabójcze dla komórki. Jest to przykład sprawnie działającego systemu ekspresyjnego znajdującego się pod kontrolą temperatury.

Temperatura wywiera także duży wpływ na systemy regulowane przez inne

bodźce środowiskowe. Imanaka i Aiba (8) stwierdzili, że temperatura w dużym stopniu determinuje stabilność plazmidów. W badaniach nad segregacją DNA, prowadzonych na szczepie zawierającym wrażliwy na temperaturę plazmid pKN402, wykazano, że ze wzrostem temperatury hodowli rośnie co prawda liczba kopii, lecz jednocześnie maleje wyraźnie ich stabilność segregacyjna.

3.7. Tlen

Regulacja działania operonu za pomocą zmiany stężenia tlenu w pożywce jest przykładem najnowszych trendów w poszukiwaniu promotorów przydatnych do procesów produkcyjnych. Ciekawą konstrukcję przedstawili Khosla i in. (10). Wyizolowali oni z *Vitreoscilla* gen hemoglobiny (VHb) oraz promotor dla ekspresji tego genu. Stwierdzili, że system ten działał w *E. coli* i był regulowany przez trzy czynniki: 1) stężenie rozpuszczonego tlenu w pożywce, 2) obecność kompleksu cAMP – CRP dla katabolicznej represji oraz 3) obecność w pożywce kompleksowego źródła azotu (np. ekstraktu drożdżowego). Promotor ten objawiał swoją maksymalną aktywność w warunkach mikroaeracji przy 5% nasyceniu tlenem, natomiast był hamowany zarówno w warunkach beztlenowych, jak i przy silnym natlenianiu.

Regulowany tlenem element promotora (ORE) może być wbudowany w znane plazmidy, np. z rodziny pBR322, co pozwala na ekspresję β -galaktozydazy lub acetylotransferazy chloramfenikolowej (CAT). Udział β -galaktozydazy może w tych warunkach dochodzić do 10% ogółu białek produkowanych przez komórkę.

Hopkins i in. (7) badali stabilność segregacyjną plazmidu pKN401 w warunkach zróżnicowanego natlenienia pożywki. Zastosowanie 5% stopnia nasycenia pożywki tlenem spowodowało gwałtowny spadek udziału komórek rekombinowanych w całej populacji bakterii. Redukcja liczebności populacji komórek rekombinowanych była bardzo znaczna; w populacji początkowej udział komórek rekombinowanych wynosił ok. 80%, a po zadziałaniu szoku tlenowego poniżej 1%. Autorzy stwierdzili, że stosowany system ekspresyjny mógł być wykorzystany w hodowlach okresowych zarówno pod kontrolą, jak i bez kontroli ampicyliny. Wyniki te wskazują na konieczność bliższego poznania zachowania się komórek w różnych warunkach środowiskowych.

Ciekawych informacji dostarczyły badania opublikowane przez Namdeva i in. (12). Prowadzili oni hodowle *E. coli* DH5 α , które zawierały plazmid pUC19 dla syntezy β -galaktozydazy i posiadały oporność ampicylinową, w warunkach natleniania ciągłego oraz przerywanego (wg algorytmu Monte Carlo). Autorzy stwierdzili, że szybkie zmiany w natlenianiu prowadzą do ograniczenia pobierania tlenu oraz do zmniejszenia stabilności plazmidu. W warunkach stałego natleniania obserwowano zwiększanie liczby kopii plazmidu.

Znaczący wpływ koncentracji rozpuszczalnego tlenu na ekspresję genu kodującego syntezę β -laktamazy został też potwierdzony przez Ryana i in. (17). Stosując 3 poziomy napowietrzania, obserwowali oni zróżnicowaną reakcję

zrekombinowanej komórki, co znalazło wyraz w zróżnicowanej liczbie kopii i zróżnicowanej wydajności syntezy enzymu. Najwyższą wydajność β -laktamazy, kodowanej we wprowadzonym plazmidzie, uzyskano przy napowietrzaniu z szybkością 3 l/min, przy czym zarówno szybsze, jak i wolniejsze napowietrzanie powodowało zmniejszenie się produkcji enzymu. Zdaniem autorów mogło to wynikać bądź ze zmniejszenia zawartości plazmidu, bądź ze zwolnienia transkrypcji genów plazmidowych.

4. Wnioski

Podsumowując dane dotyczące metod stosowanych do kontroli procesu ekspresji rekombinowanych genów w warunkach bioreaktora należy stwierdzić, że poszukiwania zmierzają w kierunku rozwiązań prostych, łatwych do sterowania poprzez zmianę typowych parametrów hodowli. Wśród tych metod należy zwrócić uwagę na techniki separacji segregantów oraz wykorzystanie do inicjacji ekspresji genów, takich czynników jak: zmiana temperatury, pH i natlenienia pożywki. Wydaje się, że malejące znaczenie będą miały metody wymagające stosowania drogich dodatków do pożywek, takich jak antybiotyki lub induktory.

Autor składa podziękowanie prof. dr. hab. Aleksandrowi Chmielowi z Akademii Medycznej w Łodzi za cenne uwagi, które ułatwiły przygotowanie tej publikacji.

Literatura

1. Bailey J. E., (1987), in: *Biochemical Engineering: a Challenge for Interdisciplinary*, Eds. Chmiel H., Hammes W. P., Bailey J. E., Gustav Fischer Verlag, Stuttgart and New York, 1 - 10.
2. Berry F., Sayadi S., Nasri M., Thomas D., Barbotin J. N., (1990), *J. Biotechnol.*, 16, 199 - 210.
3. Casabadian M. J., Chou J., Cohen S. N., (1980), *J. Bacteriol.*, 143, 971 - 980.
4. Dincbas V., Hortacsu A., Camurdan A., (1993), *Biotechnol. Prog.*, 9, 218 - 220.
5. Henry K. L., Davis R. H., Taylor A. L., (1990), *Biotechnol. Prog.*, 6, 7.
6. Hiraga S., (1986), *Adv. Biophys.*, 21, 91.
7. Hopkins D. J., Betenbauch M. J., Dhurjati P., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 29, 85 - 91.
8. Imanaka T., Aiba S., (1981), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 369, 1 - 14.
9. Kobayashi M., Kurusu Y., Yukawa H., (1991), *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 27, 145 - 162.
10. Koshla Ch., Curtis J. E., Bydalek P., Swartz J. R., Bailey J. E., (1990), *Bio/Technology*, 7, 554 - 558.
11. Luedeking R., Piret E. L., (1959), *J. Biochem. Microbiol. Tech. Eng.*, 1, 393.
12. Namdev P. K., Irwin N., Thompson B. G., Gray M. R., (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, 41, 666 - 670.
13. Ogden K. L., Davis R. H., (1991), *Biotechnol. Bioeng.*, 37, 325 - 333.
14. Ollis D. F., Chang H., (1982), *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 2583 - 2586.
15. Riesenberd D., Schulz V., Knorre W. A., Pohl H. - D., Korz D., Sanders E. A., Ross A., Deckwer W. - D., (1991), *J. Biotechnol.*, 20, 17 - 28.

16. Rosteck Jr. P. R., Hershberger C. L., (1983), *Gene*, 25, 29.
17. Ryan W., Parulekar S. J., Stark B. C., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 309 – 319.
18. Sayadi S., Nasri M., Barbotin J. N., Thomas D., (1989), *Biotechnol. Bioeng.*, 33, 801 – 808.
19. Skogman S. G., Nilsson J., (1984), *Gene*, 31, 117.
20. Villaverde A., Benito A., Viaplana E., Cubarsi R., (1993), *Appl. Environm. Microbiol.*, 59, 3485 – 3487.
21. Zabriskie D. W., Arcuri E. J., (1986), *Enzyme Microb. Technol.*, 8, 706 – 717.

Factors influencing expression of recombinant genes *in vitro* in *E. coli*. Part II. Culture conditions in bioreactor

Summary

High expression yield and high volumetric productivity of fermentations employing recombinant *E. coli* need special processing. For recombinant protein production two strategies can be applied. One is to carry out one step fermentation with simultaneous gene expression and elimination of vector-less segregants. The other is to carry out two step fermentation, in which the first step is the cell biomass production without gene expression followed by the induction of gene expression in the second step. In this review different methods of controlling of recombinant gene expression, such as antibiotic pressure, specific mutant application, immobilized cell bioreactors, selective cell recirculation, chemical regulations, the use of temperature and oxygen sensitive promoters are presented.

Key words:

E. coli, expression, recombinant genes.

Adres dla korespondencji:

Włodzimierz Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności,
Akademia Rolnicza, ul. Mazowiecka 48, 60-623 Poznań.