

一种适合自动化操作的从发酵液中收集菌体的方法

(1)技术领域

5 本发明属于生化工程后处理技术领域，具体涉及一种适合自动化操作的从细菌和真菌的发酵液中回收菌体的方法。

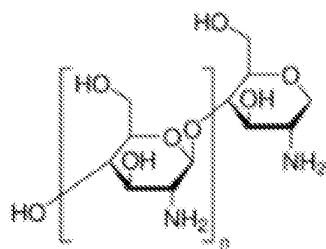
(2)背景技术

2021 年全球前 30 大畅销药中有 24 款是生物药。生物药研发的速度和成功与否，与能否快速获得相应的蛋白样品以用于蛋白结构，体外和体内活性研究密切相关。目前，哺乳动物细胞瞬时表达工艺是获取研究用蛋白的主要方式。该工艺需要的质粒 DNA 量一般在毫克至克级别，且根据前期候选分子库的大小，需要生产的蛋白样品个数一般从几十到上千不等，对应的所需要质粒 DNA 的数量也将在几十到上千数量级。在生物药加速研发的过程中，如何快速获得用于蛋白生产所需的大量质粒 DNA 是目前急需解决的问题。

15 以细菌为例，大肠杆菌是现代生物技术中一种重要的基因工程宿主菌，具有遗传背景清晰，生长速度快，遗传操作简单，易于生产工艺放大等优势，广泛用于实验室级别或工业规模的质粒 DNA，重组蛋白，酶等生物制品的生产。以大肠杆菌作为宿主细胞生产质粒 DNA 时，需要从培养基中回收大肠杆菌细胞，然后从大肠杆菌细胞中提取所需的质粒 DNA。从发酵液中回收大肠杆菌细胞的常规方法有  
20 两种：高速离心法和膜过滤法。高速离心法通常用于实验室微克至毫克级别质粒 DNA 的制备，批次处理样品的数量有限，且需要人工操作较多，通量和规模难以放大；膜过滤法单次处理样品的规模较大，适合同种样品的大量处理，但存在膜堵塞，破损，污染等风险，耗材成本偏高，且难以实现多样品、高通量处理。此外，无论离心法还是膜过滤法都依赖较多的人工操作，在需要批次处理样品的数量增加  
25 时需要相应地倍增设备和人员投入。因此，迫切需要建立一种适用于高通量、自动化处理的大肠杆菌菌体收集方法。

化学絮凝作用可用于从培养基中分离细菌细胞，是一种可替代离心和膜过滤的低成本方法。已公开的中国专利(CN109439584A) 表明壳聚糖和海藻酸钠可通过絮凝作用浓缩大肠杆菌发酵液，达到菌体富集效果。然而，该方法仅对于大肠杆菌  
30 菌体的回收进行了研究，并未研究沉降效果对于菌体完整性、产物和更重要的后续质粒回收的效果。

壳聚糖是一种线性氨基多糖，由甲壳素在热碱液中脱乙酰制备而成，化学名称为  $\beta$ -(1, 4)-2-氨基-2-脱氧-D-葡聚糖，分子式为  $(C_6H_{11}NO_4)_n$ ，结构式如下：



壳聚糖不溶于水和有机溶剂，可溶于稀酸溶液。壳聚糖不溶于水的特性，使其使用过程复杂，因此在絮凝收集菌体方面的应用尚未广泛实现。

- 因此，本领域仍然需要开发一种操作简单，对后续质粒生产得率没有影响，  
5 且不依赖离心机或膜过滤、可自动化实现的菌体收集方法，这对质粒 DNA 的高通量自动化制备和后期生物药研发所需蛋白的快速生产意义重大。

### (3)发明内容

- 因此，本发明的发明目的是提供一种改进的回收细菌和真菌细胞发酵培养的  
10 菌体，且保持其质粒 DNA、RNA 完整以及蛋白和核酸产物提取的高效率的方法。

因此，本发明提供了一种从细菌或真菌发酵培养液中收集菌体的方法，其特征在于，该方法包括步骤：

- a) 混合细菌或真菌发酵培养所得的发酵培养液和羧化壳聚糖，得到混合物；
- b) 在混合物中加入海藻酸钠溶液，混合均匀；和
- 15 c) 沉淀，获得菌体沉淀物。

在本发明的另一个方面，上述方法中的 b)步骤被省略，因此在该方面提供了一种从细菌或真菌发酵培养液中收集菌体沉淀物或发酵培养液上清的方法，该方法包括步骤：

- a) 混合细菌或真菌发酵培养所得的发酵培养液和羧化壳聚糖，得到混合物；
- 20 和 c) 沉淀，获得菌体沉淀物或发酵培养液上清。

该方面的一个优选实施方式还包括在步骤 c) 后回收菌体的步骤 d)。

在一个具体实施方式中，细菌选自芽孢杆菌、大肠杆菌、乳杆菌、乳球菌，优选为大肠杆菌或枯草芽孢杆菌；所述真菌选自酵母，优选面包酵母、饲料酵母、

酿酒酵母、毕赤酵母；假丝酵母；霉菌，更优选根霉、曲霉，最优选为酿酒酵母和毕赤酵母。

在一个最优选的实施方式中，所述细菌是大肠杆菌，和/或所述真菌为毕赤酵母。

- 5 在一个具体实施方式中，步骤 a) 中混合的羧化壳聚糖量为发酵培养液的 1%-32% 重量，优选 1-16% 重量，更优选 4%-8% 重量，最优选 8% 重量。

在一个具体实施方式中，步骤 b) 中加入的海藻酸钠量为发酵培养液的 1%-16% 重量，优选 1%-8% 重量，更优选 4%-8% 重量，最优选 8% 重量。

- 10 在另一个具体实施方式中，在发酵培养液中加入的羧化壳聚糖和海藻酸钠的量分别为发酵培养液的 8% 重量，或在发酵培养液中加入的羧化壳聚糖的量为发酵培养基的 8% 重量，且不加入海藻酸钠。在一个更优选的实施方式中，发酵培养液优选自大肠杆菌发酵培养液和毕赤酵母发酵培养液。

在还有一个优选实施方式中，加入的羧化壳聚糖与海藻酸钠的质量比为 1:4-4:1，优选 1:2-2:1，更优选 1:1。

15

在一个具体实施方式中，羧化壳聚糖选自氨基 (-NH<sub>2</sub>)，或羟基 (-OH)，或氨基 (-NH<sub>2</sub>) 和羟基 (-OH) 被羧化基团修饰后的壳聚糖，其中所述羧化基团是含 1-3 个羧基取代的 C1-C6 的直链或支链烃基，优选含 3 个羧基，更优选 2 个羧基，最优选为 1 个羧基；所述直链或支链烃基优选具有 1-6 个碳原子。

- 20 在还有一个具体实施方式中，大肠杆菌的菌株包括 *E. coli* TOP10, *E. coli* JM109, *E. coli* HB101, *E. coli* DH5 $\alpha$ , *E. coli* BL21(DE3), 以及其它大肠杆菌 K 菌株和 B 菌株的衍生菌株。在一个优选实施方式中，酵母的菌株包括 *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*。

- 25 在另一个具体实施方式中，步骤 d) 的回收选自倾倒培养基或自动化机械臂倾倒培养基获得菌体，采用物理或化学方法破碎菌体释放菌体内 DNA 或 RNA，磁珠吸附 DNA 或 RNA，清洗液清洗纯化 DNA 或 RNA，，优选倾倒，更优选手动倾倒培养基或自动化机械臂倾倒培养基。

在该方面的一个具体实施方式中，获得菌体后还可从菌体中提取蛋白质。

在还有一个优选实施方式中，步骤 d) 的回收培养基上清通过倾倒培养基或自

动化机械臂倾倒培养基，获得培养基上清，进而纯化上清中 DNA 或蛋白质，或小分子代谢物。

在还有一个方面，大肠杆菌发酵培养基选自 LB 肉汤培养基，酵母发酵培养基  
5 选自 YPD 培养基。

因此，本发明的回收细菌和真菌发酵培养的菌体的方法的优点如下：

1. 采用可溶于水的羧化壳聚糖和海藻酸钠有效实现了发酵液中的菌体沉降，操作简便，成本低廉，避免离心或膜过滤。
- 10 2. 发酵液经羧化壳聚糖和海藻酸钠处理后，可通过倾倒方法去除发酵上清，得到沉降菌体。该过程可通过机械臂实现自动化。

(3) 沉降得到的菌体沉淀较为分散，不结团形成絮状，有利于菌体裂解和后续胞内质粒 DNA，RNA 和蛋白的提取。

- (4) 发酵液经羧化壳聚糖和海藻酸钠处理后，也可直接通过倾倒方法分离得  
15 到发酵上清，用该上清可进行后续的生化分离过程得到目标产品(包括但不限于蛋白，醇，酸，酯，酮等生物代谢物)。

各种实施方式的其它特征和优势将在下面的说明书中进行部分阐述，并且部分地根据说明书其将是显而易见的，或者可以通过各种实施方式的实践得到了解。各种实施方式的目标和其它优势将通过特别是在说明书和所附权利要求书中所指  
20 出的要素及组合得以实现和达到。

除非另外指出，本发明采用的试剂、细胞、以及仪器装置都是普通的市售和公众可得的。

#### (4) 附图说明

- 25 图 1 显示了离心收集菌体抽提质粒 DNA(泳道 1)和羧化壳聚糖收集菌体抽提质粒 DNA(泳道 2)的琼脂糖凝胶电泳图谱。

#### (5) 具体实施方式

现在将详细地参考本发明的一些实施方式，其在下文实施例部分中被阐述。

但是应当理解，它们并非意图使本发明限于那些实施方式。相反，本发明意图覆盖可以被所附权利要求书限定的本发明包括在内所有替换、修改和等价物。

本文具体实施例中使用的羧化壳聚糖是选自氨基(-NH<sub>2</sub>)，或羟基(-OH)，或氨基(-NH<sub>2</sub>)和羟基(-OH)被羧化基团修饰后的壳聚糖，其中所述羧化基团是含 1-3 个羧基取代的 C1-C6 的直链或支链烃基，优选含 3 个羧基，更优选 2 个羧基，最优选为 1 个羧基；所述直链或支链烃基优选具有 1-6 个碳原子。羧化壳聚糖具有良好的水溶性。羧化壳聚糖目前市售的品种有例如阿拉丁试剂出品的羧化壳聚糖，其可根据“羧化壳聚糖的合成及其从水溶液中吸附镉(II)、铅(II)和铜(II)的性质”(Synthesis of carboxylated chitosan and its adsorption properties for cadmium (II), lead (II) and copper (II) from aqueous solutions )(K. L. Lv, Y. L. Du, C. M. Wang, *Water Sci Technol* 1 July 2009; 60 (2): 467-474. doi: <https://doi.org/10.2166/wst.2009.369>)等文献公开的方法制备。

本文中所描述的细菌和真菌的发酵细胞培养包括本领域中以发酵培养基作为介质，在适当条件下培养细菌和真菌细胞，使其扩增并生产所需目标产物的技术。

15 本文中的发酵培养可以是实验室级别也可以是工业生产级别的规模。

本文中所指的术语“细菌”包括但不限于革兰氏阳性菌和革兰氏阴性菌，特别是常用于发酵培养的细菌，例如芽孢杆菌、大肠杆菌、乳杆菌、乳球菌等，优选为大肠杆菌、枯草芽孢杆菌。本文中所指的术语“真菌”包括但不限于真核产孢的微生物，包括但不限于酵母，优选面包酵母、饲料酵母、酿酒酵母、毕赤酵母等；

20 假丝酵母；霉菌，例如根霉、曲霉等。优选为酿酒酵母和毕赤酵母。

## 实施例 1 大肠杆菌菌体的提取和分析

### 1.试剂

LB 肉汤培养基（生工生物，A507002）：10 g/L 胰蛋白胨，10 g/L NaCl，5 g/L 酵母提取物；壳聚糖溶液：将 1.5 g 壳聚糖（阿拉丁试剂，C105799）溶解至 100 mL 1%乙酸溶液（FISHER，A35-500），得到 1.5%的壳聚糖醋酸溶液。

羧化壳聚糖溶液：将 1.5 g 羧化壳聚糖（阿拉丁试剂，C105800）溶解至 100 mL 超纯水中，得到 1.5%的羧化壳聚糖水溶液。

海藻酸钠溶液：将 1.0 g 海藻酸钠（阿拉丁试剂，S100127）溶解至 100 mL 超纯水中，得到 1%的海藻酸钠水溶液。

菌体重悬液：50 mM 葡萄糖（沪试，10010518），25 mM Tris-HCl (pH8.0)（沪

试, 30188336), 10 mM EDTA (pH8.0) (沪试, 10009717)。

裂解液: 0.2 mol/L NaOH (沪试, 10019718), 1%(m/V) SDS (沪试, 30166428)。

中和液(100 mL): 60 mL 5M 乙酸钾(沪试, 30154518), 11.5 mL 冰醋酸(FISHER, A35-500), 28.5 mL 蒸馏水。

5 RNase A: 10 mg/mL (翌圣生物, 10405ES03)。

pUC19 质粒: Thermo Scientific SD0061

大肠杆菌 Top10 菌株: TIANGEN CB104

pUC19 质粒的序列如下:

1. pUC19 DNA 序列

10 >pUC19 (SEQ ID NO:1)

```
GAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTCCCGAAGGG
AGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCGGAACAGGAGAGCG
CACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCCTGTCCG
GTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGG
15 CGGAGCCTATGGAAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCT
TTTGCTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGG
ATAACCGTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAAC
GACCGAGCGCAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATAC
GCAAACCGCCTCTCCCCGCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGA
20 CAGGTTTCCCGACTGGAAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAG
TTAGCTCACTCATTAGGCACCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTA
TGTGTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATG
ACCATGATTACGCCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTAGAGGATCCCC
GGGTACCGAGCTCGAATTCCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGA
25 AAACCCTGGCGTTACCCAACCTAATCGCCTTGACGACATCCCCCTTTCGCC
AGCTGGCGTAATAGCGAAGAGGCCCGCACCGATCGCCCTTCCCAACAGTTG
CGCAGCCTGAATGGCGAATGGCGCCTGATGCGGTATTTTCTCCTTACGCATC
TGTGCGGTATTTACACCCGCATATGGTGCACTCTCAGTACAATCTGCTCTGA
TGCCGCATAGTTAAGCCAGCCCCGACACCCGCCAACACCCGCTGACGCGCC
30 CTGACGGGCTTGTCTGCTCCCGGCATCCGCTTACAGACAAGCTGTGACCGTC
TCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGA
GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAAT
AATGGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACC
CCTATTTGTTTATTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACA
35 ATAACCCTGATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTAT
TCAACATTTCCGTGTCGCCCTTATTCCTTTTTTGCGGCATTTTGCCTTCCTGT
```

TTTTGCTCACCCAGAAACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTT  
GGGTGCACGAGTGGGTACATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCT  
TGAGAGTTTTTCGCCCCGAAGAACGTTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTT  
CTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGTATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCG  
5 GTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCAGTCAC  
AGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAAGAGAATTATGCAGTGCTGC  
CATAACCATGAGTGATAACACTGCGGCCAACTTACTTCTGACAACGATCGG  
AGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGGGGATCATGTAAC  
TCGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAACGACGA  
10 GCGTGACACCACGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAAACCTATT  
AACTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGGATG  
GAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCT  
GGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCAT  
TGCAGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACG  
15 ACGGGGAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATA  
GGTGCCTCACTGATTAAGCATTGGTAAGTGTGACACCAAGTTTACTCATATA  
TACTTTAGATTGATTTAAACTTCATTTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAA  
GATCCTTTTTTGATAATCTCATGACCAAAAATCCCTTAACGTGAGTTTTTCGTTCC  
ACTGAGCGTCAGACCCCGTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTT  
20 TTTTCTGCGCGTAATCTGCTGCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCG  
GTGGTTTGTTTGCCGGATCAAGAGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGT  
GCTTCAGCAGAGCGCAGATACCAAATACTGTTCTTCTAGTGTAGCCGTAGTT  
AGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCACCGCCTACATACCTCGCTCTGCTA  
ATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTCGTGTCTTACCGGGT  
25 TGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGCAGCGGTCGGGCTGAACGG  
GGGGTTCGTGCACACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGACCTACACCGAACT

## 2. 方法:

### 30 2.1 小体积大肠杆菌发酵液的羧化壳聚糖沉降处理

在 LB 培养基中过夜培养含 pUC19 质粒的大肠杆菌 Top 10 菌株，得到大肠杆菌发酵液，取样测 OD600。取 6 份 1 mL 该发酵液用于羧化壳聚糖的沉降实验。向 1 mL 的发酵液中依次加入不同添加量的羧化壳聚糖溶液，漩涡混匀；之后添加对应不同量的海藻酸钠溶液，漩涡混匀后静置 30 min。另取 1 ml 发酵液做空白对照。  
35 检测对照组和羧化壳聚糖处理组的 OD600。羧化壳聚糖和海藻酸钠的添加量见表 1。根据沉降前后的 OD600 计算沉降率，沉降率 = (原样品 OD600-沉降后样

品 OD600)/原样品 OD600。

## 2.2 羧化壳聚糖沉降处理小体积样品对质粒 DNA 抽提的影响

采用不同的处理方法对使用 2.1 的方法制备得到对照组样品和**实验组 1,2,3** 样品中的大肠杆菌菌体。具体流程如下：(1)对照组：3500 g 离心菌液 1 min，去除发酵上清得到菌体；(2) 实验组：用移液枪吸取沉降后的发酵液上清，得到在离心管底部沉降的菌体。用 250  $\mu$ L 菌体重悬液和 1  $\mu$ L RNase A 重悬菌体，之后加入 250  $\mu$ L 裂解液，轻柔颠倒混匀裂解菌体，之后加入 350  $\mu$ L 中和液，轻柔颠倒混匀。12000 g 离心后收集上清，加入适量磁珠混合均匀，使磁珠吸附上清中的 DNA。之后用 10 磁铁吸附磁珠，去除上清液。之后加入 70%乙醇清洗磁珠两次，晾干乙醇，用 50  $\mu$ L 的超纯水洗脱磁珠得到质粒 DNA，用分光光度计检测质粒 DNA 浓度，计算质粒 DNA 得率。

## 2.3 大体积大肠杆菌发酵液的羧化壳聚糖和壳聚糖沉降效果比较

15 在 2 个 250 mL 锥形摇瓶中分别加入 150 mL LB 培养基中过夜培养含 pUC19 质粒的大肠杆菌 Top 10 菌株，得到大肠杆菌发酵液，取样测 OD600。向羧化壳聚糖沉降组添加小试优选的絮凝剂使用量：8%羧化壳聚糖和 8%的海藻酸钠；向壳聚糖沉降组添加公开专利(CN109439584A)中优选的絮凝剂添加量：4%壳聚糖和 2%的海藻酸钠。两组实验的添加过程和操作如下：

20 羧化壳聚糖组：向摇瓶中添加 12 ml（添加量 8%）羧化壳聚糖溶液，水平手动摇匀 30 s，之后加入相同体积的海藻酸钠溶液（添加量 8%），手动摇匀 30 s。低温静置 4 h，使大肠杆菌菌体充分沉降，之后分别取上清测 OD600，计算沉降率。

壳聚糖组：向摇瓶中添加 6 ml（添加量 4%）壳聚糖溶液，在振荡器器上以 120-150 rpm 的转速快速混匀 2-3 min，之后加入 3 ml 的海藻酸钠溶液（添加量 2%），在 25 振荡器上以 50-60 rpm 的转速缓慢混匀 2-5 min。低温静置 4 h，使大肠杆菌菌体充分沉降，之后分别取上清测 OD600，计算沉降率。

采用手工倾倒的方法从摇瓶中缓慢倒出上清液，用量筒量取剩余菌液的体积，计算培养上清去除率。沉降率 = (原样品 OD600-沉降后样品 OD600)/原样品 OD600；培养上清去除率 = (培养体积-沉降后菌液体积)/培养体积。

30

## 2.4 羧化壳聚糖和壳聚糖处理大体积样品对质粒 DNA 抽提的影响

将羧化壳聚糖和壳聚糖沉降后得到的浓缩菌液用于质粒 DNA 提取测试，以 150 mL 过夜培养的大肠杆菌菌液 3500 g 离心 10 min 收集得到的菌体为对照组。由于壳聚糖处理后剩余菌液的体积较大，使用电动移液器小心去除未能倾倒干净的培养基，使最终浓缩菌液的体积与羧化壳聚糖处理组相同(10 ml 左右)。向对照组离心得到的菌体中加入 10 ml 的菌体重悬液，使菌体充分重悬没有结块。之后向对照组

和实验组的菌液中加入 10 μL RNase A，水平摇匀 10 s，之后加入 10 mL 裂解液，水平摇匀 30 s 裂解菌体，之后加入 12 μL 中和液，水平摇匀 30 s。将摇瓶中的中和液转移至 50 ml 离心管，3500 g 离心 10 min 后收集上清，加入适量磁珠混合均匀，使磁珠吸附上清中的 DNA。之后用磁铁吸附磁珠，去除上清液。之后加入 70%乙醇清洗磁珠两次，并使乙醇充分挥发后，用 1000 μL 的超纯水洗脱磁珠得到质粒 DNA。用分光光度计检测质粒 DNA 浓度，计算质粒 DNA 得率。用琼脂糖凝胶电泳方法观察质粒条带和超螺旋情况。琼脂糖凝胶电泳的实验步骤参照《分子克隆实验指南第四版》(Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Fourth Edition), Michael R. Green, Joseph Sambrook, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2012)。

10

2.5 单独使用羧化壳聚糖处理大体积样品对菌体沉降和质粒 DNA 抽提的影响

在 2 个 250 mL 锥形摇瓶中分别加入 150 mL LB 培养基中过夜培养含 pUC19 质粒的大肠杆菌 Top 10 菌株，得到大肠杆菌发酵液，取样测 OD600。向实验组添加小试优选的絮凝剂使用量：8%羧化壳聚糖；向对照组添加等体积的超纯水。两组实验的添加过程和操作如下：

实验组：向摇瓶中添加 12 ml（添加量 8%）羧化壳聚糖溶液，水平手动摇匀 30 s，低温静置，使大肠杆菌菌体充分沉降，在 4 h 和 6 h 时分别取上清测 OD600，计算沉降率。

对照组：向摇瓶中添加 12 ml 超纯水，水平手动摇匀 30 s，低温静置，在 4 h 和 6 h 时分别取上清测 OD600，计算沉降率。

采用手工倾倒的方法从摇瓶中缓慢倒出上清液，用量筒量取剩余菌液的体积，计算培养上清去除率。沉降率 = (原样品 OD600-沉降后样品 OD600)/原样品 OD600；培养上清去除率 = (培养体积-沉降后菌液体积)/培养体积

3. 实验结果与分析

3.1 羧化壳聚糖对小体积大肠杆菌发酵液的沉降效果

如方法部分 2.1 所述使用不同的添加量的羧化壳聚糖和海藻酸钠对 1 mL 过夜培养大肠杆菌菌液的菌体沉降效果的影响，结果如表 1 所示。在一定范围内，随着羧化壳聚糖和海藻酸钠添加量的提高，菌体沉降率呈上升趋势。当羧化壳聚糖和海藻酸钠的添加量分别为 8%和 8%时，菌体沉降效果最好可达到 93.5%。当两种絮凝剂的添加量继续增加时，沉降效果并未进一步提升，反而有下降趋势。因此在后续的研究中采用 8%的羧化壳聚糖添加量和 8%的海藻酸钠添加量作为沉降条件。

表 1 不同添加量的羧化壳聚糖和海藻酸钠对 1 mL 大肠杆菌发酵液中的菌体沉降效果

| 编号 | 羧化壳聚糖 (%) | 海藻酸钠 (%) | OD600(原样品) | OD600(沉降后) | 沉降率(%) |
|----|-----------|----------|------------|------------|--------|
|----|-----------|----------|------------|------------|--------|

|       |    |    |      |      |       |
|-------|----|----|------|------|-------|
| 对照组   | 0  | 0  | 3.39 | 3.39 | 0.00  |
| 实验组 1 | 4  | 2  | 3.39 | 1.24 | 63.42 |
| 实验组 2 | 8  | 4  | 3.39 | 0.94 | 72.27 |
| 实验组 3 | 8  | 8  | 3.39 | 0.22 | 93.51 |
| 实验组 4 | 16 | 8  | 3.39 | 1.94 | 42.77 |
| 实验组 5 | 16 | 16 | 3.39 | 2.43 | 28.32 |
| 实验组 6 | 32 | 16 | 3.39 | 1.97 | 41.89 |

### 3.2 羧化壳聚糖和海藻酸钠沉降菌体对质粒小体积样品提取的影响

选择上述获得的羧化壳聚糖和海藻酸钠实验组 1,2,3 得到的沉降菌体做质粒小量制备测试,以离心法收集得到的菌体做对照(如方法部分 2.2),结果见表 2。对照组的质粒得率为 9.4  $\mu\text{g}$ ,实验组 3 使用 8%的羧化壳聚糖和海藻酸钠沉降菌体得到了最高的质粒得率 14.5  $\mu\text{g}$ ,为对照组的 1.5 倍;且随着菌体沉降率的提高,质粒得率呈线性增长趋势。对照组和实验组小规模提取得到的质粒 DNA A260/A280 均在 1.8-2.0 之间,没有 RNA 和蛋白污染,可用于下一步研究。值得注意的是,在小体积条件下采用沉降收集菌体得到的质粒得率明显高于离心收集菌体的质粒得率,羧化壳聚糖或海藻酸钠对质粒的得率可能有一定促进作用。

表 2 羧化壳聚糖和海藻酸钠沉降菌体对质粒小规模提取的影响

| 编号    | 羧化壳聚糖(%) | 海藻酸钠 (%) | DNA 得率 ( $\mu\text{g}$ ) | A260/A280 |
|-------|----------|----------|--------------------------|-----------|
| 对照组   | 0        | 0        | 9.4                      | 1.90      |
| 实验组 1 | 4        | 2        | 9.7                      | 1.91      |
| 实验组 2 | 8        | 4        | 12.2                     | 1.91      |
| 实验组 3 | 8        | 8        | 14.5                     | 1.89      |

### 3.3 羧化壳聚糖和壳聚糖对大体积大肠杆菌发酵液的沉降效果

采用本研究中如方法 2.1 部分的小规模提取得到的适合羧化壳聚糖沉降菌体的最佳条件:8%添加量的羧化壳聚糖和海藻酸钠和已公开专利申请(CN109439584A)中报道的适合壳聚糖和海藻酸钠沉降菌体的最佳条件:4%添加量的壳聚糖和 2%添加量的海藻酸钠,对 150 mL 过夜培养的大肠杆菌菌液进行沉降实验,结果如表 3 所示。从表 3 可以看出,在原始发酵液的 OD600 相近的情况下,壳聚糖对菌体的沉降率略高于羧化壳聚糖,分别为 98.4%和 92.7%。然而通过直接倾倒去除的培养基上清时,羧化壳聚糖组的培养基去除率远高于壳聚糖组,分别为 93%和 62%。采用直接倾倒的方法去除培养基上清后,羧化壳聚糖处理组的剩余菌液体积仅为 10.5 ml。沉降后培养基去除率高的特性,使羧化壳聚糖沉降后的样品可以通过自

动化机械臂的方式实现批量自动样品处理,有利于菌体沉降后下游整个自动化操作的系统整合。

表 3 羧化壳聚糖和壳聚糖对大体积大肠杆菌的沉降结果

| 编号    | 菌体收集方法      | 发酵液体<br>积(mL) | 发酵液<br>OD600 | 沉降后发酵<br>液上清<br>OD600 | 沉降率   | 沉降后的<br>菌液体积<br>(ml) | 培养基<br>去除率 |
|-------|-------------|---------------|--------------|-----------------------|-------|----------------------|------------|
| 实验组 1 | 壳聚糖沉降       | 150           | 3.65         | 0.06                  | 98.4% | 57.5                 | 62%        |
| 实验组 2 | 羧化壳聚糖沉<br>降 | 150           | 3.61         | 0.27                  | 92.7% | 10.5                 | 93%        |

5

3.4 羧化壳聚糖和壳聚糖处理大体积样品对质粒 DNA 抽提的影响

考察了 3.3 中得到的沉降后大肠杆菌菌液通过碱裂解方法制备质粒 DNA 的得率。以离心收集得到的菌体制备质粒 DNA 做对照。由于壳聚糖组沉降处理后的菌液体积较大,因此使用移液枪手动去除剩余的培养基,使最终菌液体积减少至 10 mL 左右。随后向菌液中加入 10 μL RNase A,水平摇动混合均匀后加入碱裂解液裂解菌体。随后按照 2.4 中所述方法提取质粒 DNA。抽提得到的质粒 DNA 得率见表 4。

10

表 4 羧化壳聚糖和壳聚糖沉降大肠杆菌的质粒得率

| No.   | 菌体收集方法  | 质粒 DNA 得率 (μg) |
|-------|---------|----------------|
| 对照组   | 离心收集菌体  | 324.5          |
| 实验组 1 | 壳聚糖沉降   | 37.2           |
| 实验组 2 | 羧化壳聚糖沉降 | 330.5          |

从表 4 的抽提结果可以看出,羧化壳聚糖沉降得到的菌体在进行质粒抽提时与离心方法收集得到的菌体进行质粒抽提得到的质粒得率相差不大,分别为 330.5 μg 和 324.5 μg。而壳聚糖沉降会显著降低菌体中的质粒抽提效率,质粒得率仅 37.2 μg,约为羧化壳聚糖处理组的 11%。在对沉降得到的菌体进行裂解处理时目测观察发现,壳聚糖和海藻酸钠使大肠杆菌形成较大的絮状菌块,难以分散均匀,进一步在碱裂解时会产生裂解不充分的现象。而羧化壳聚糖和海藻酸钠沉降得到的大肠杆菌外观细腻,手动摇晃后可以快速分散均匀,对后期的碱裂解不产生影响(结果未显示)。因此,使用壳聚糖和海藻酸钠沉降菌体更适合于去除发酵液中的菌体,收集发酵上清的应用场景;而羧化壳聚糖和海藻酸钠沉降菌体不仅可用于发酵上清的收集,也可用于菌体的后续处理,例如提取菌体内部的生物制品:质粒 DNA, RNA, 胞内蛋白等。

20

25 根据质粒 DNA 的 A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> 测试结果(表 2) 和琼脂糖凝胶电泳图中显示的质粒

超螺旋比例结果(图 1) 也可以看出羧化壳聚糖方法收集菌体对抽提得到的质粒 DNA 的质量无影响。

3.5 单独使用羧化壳聚糖处理大体积样品对菌体沉降和质粒 DNA 抽提的影响

考察了单独使用羧化壳聚糖对大肠杆菌菌体沉降和质粒 DNA 抽提得率的影响。以不加羧化壳聚糖的样品做沉降效率对照和质粒得率对照。结果见表 5。

表 5 单独使用羧化壳聚糖对大体积菌液沉降和质粒 DNA 抽提得率的影响

| No. | 菌体收集方法 | 静置 4 h 的菌体沉降率 | 静置 6 h 的菌体沉降率 | 质粒 DNA 得率 (μg) |
|-----|--------|---------------|---------------|----------------|
| 对照组 | 离心     | 0%            | 0%            | 320.5          |
| 实验组 | 羧化壳聚糖  | 80.5%         | 95.2%         | 328.1          |

从表 5 可以看出, 沉降 4h 后实验组的菌体沉降率达到 80.5%, 低于羧化壳聚糖和海藻酸钠沉降 4h 的菌体沉降率 92.7%(表 3)。然而, 在沉降 6h 后单独使用 8%的羧化壳聚糖能够达到羧化壳聚糖和海藻酸钠联用时沉降 4h 时相当的菌体沉降效果(95.2%)。虽然单独使用羧化壳聚糖的沉降时间比使用两种絮凝剂的沉降时间多了 2h, 但简化了试剂添加流程, 且避免了自动化操作过程中由于海藻酸钠粘度过高造成的加液不准和管路堵塞风险, 具有更大的应用价值。

此外, 当所需要处理的大肠杆菌菌液体积或批次量需要放大时, 离心法和膜过滤法均存在批次处理样品的数量有限, 需要较多人工操作, 难以实现自动化, 且需要增加相应的离心机或膜过滤设备造成成本增加等挑战。而本发明的沉降法仅需要添加 1-2 种絮凝剂, 在低温条件下通过重力沉降即可实现菌体和发酵培养基的分离, 方法简单, 成本较低, 容易实现自动化批量放大处理, 优于离心和膜过滤方法。

4. 结果总结:

如上所述, 发明人出乎意料地发现, 采用可溶于水的羧化壳聚糖和海藻酸钠或单独使用羧化壳聚糖均可以有效实现大肠杆菌发酵液中的菌体沉降, 避免离心或膜过滤, 操作简便。大肠杆菌发酵液经絮凝剂处理后, 可通过倾倒方法去除发酵上清, 得到沉降菌体。该过程可通过机械臂实现自动化。用本发明的沉降方法沉降得到的菌体沉淀较为分散, 不结团形成絮状, 有利于菌体裂解和后续胞内质粒 DNA, RNA 和蛋白的提取。

对于本领域普通技术人员来说显而易见的是, 对本文描述的各种实施方式可以进行各种更改和改变, 而不背离本文教导的精神或范围。因而, 拟使各种实施方式将各种实施方式的其它更改和改变覆盖在本教导的范围之内。

实施例 2 毕赤酵母菌体沉降

1.试剂

YPD 培养基：1% 酵母提取物（Thermo Scientific，LP0021B），2% 蛋白胨（Thermo Scientific，LP0042B），2% 葡聚糖（国药试剂，63005518）。

5        羧化壳聚糖溶液：将 1.5 g 羧化壳聚糖（阿拉丁试剂，C105800）溶解至 100 mL 超纯水中，得到 1.5%的羧化壳聚糖水溶液。

2. 方法

      在 4 ml YPD 培养基中培养毕赤酵母 GS115 菌株,得到毕赤酵母 GS115 发酵液，取样测 OD600。在发酵液中加入不同添加量的羧化壳聚糖溶液，漩涡混匀后 4℃  
10        静置。取不添加羧化壳聚糖的发酵液做空白对照。每小时检测对照组和羧化壳聚糖处理组的 OD600。根据沉降前后的 OD600 计算沉降率，沉降率 = (原样品 OD600-沉降后样品 OD600)/原样品 OD600。

3. 结果

      如方法部分所述使用不同的添加量的羧化壳聚糖对 4 mL 毕赤酵母菌液的菌体  
15        沉降效果的影响，结果如表 6 所示。

表 6 不同添加量的羧化壳聚糖对毕赤酵母发酵液中的菌体沉降效果

| 编号    | 羧化壳聚糖(%) | 静置 1h 的沉降率(%) | 静置 2h 沉降率(%) |
|-------|----------|---------------|--------------|
| 对照组   | 0        | 9.1%          | 60.5%        |
| 实验组 1 | 4        | 32.3%         | 63.7%        |
| 实验组 2 | 8        | 50.5%         | 94.2%        |
| 实验组 3 | 16       | 52.9%         | 92.5%        |

      在一定范围内，随着羧化壳聚糖添加量的提高，菌体沉降率呈上升趋势。当羧化壳聚糖添加量分别为 8%时，菌体沉降效果最好可达到 94.2%。进一步增加羧化  
20        壳聚糖的添加量，沉降效果未进一步提升。

      该实施例说明，羧化壳聚糖对毕赤酵母的细胞沉降有较好作用，可以用于毕赤酵母菌体收集或沉降后的培养基上清收集，用于后续的蛋白提纯等应用。

## 权利要求书

1. 一种从细菌或真菌发酵培养液中收集菌体的方法，其特征在于，该方法包括步骤：
- a) 混合细菌或真菌发酵培养所得的发酵培养液和羧化壳聚糖，得到混合物；
- b) 在混合物中加入海藻酸钠溶液，混合均匀；
- 5 和 c) 沉淀，获得菌体沉淀物或发酵培养液上清。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中 b) 步骤被省略。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，还包括在步骤 c) 后回收菌体或回收发酵培养液上清的步骤 d)。
- 10 4. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中所述细菌选自芽孢杆菌、大肠杆菌、乳杆菌、乳球菌，优选为大肠杆菌或枯草芽孢杆菌；所述真菌选自酵母，优选面包酵母、饲料酵母、酿酒酵母、毕赤酵母；假丝酵母；霉菌，更优选根霉、曲霉，最优选为酿酒酵母和毕赤酵母。
5. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中加入的羧化壳聚糖量为发酵培养液的
- 15 1%-32%重量，优选 1-16%重量，更优选 4%-8%重量，最优选 8%重量。
5. 如权利要求 1 所述的方法，其中步骤 b) 中混合的海藻酸钠量为发酵培养液的 0%-16%重量，优选 0%-8%重量，更优选 0%或 8%重量。
6. 如权利要求 1 所述的方法，其中在发酵培养液中加入的羧化壳聚糖海藻酸钠分别为发酵培养液的 8%重量，优选发酵培养液是大肠杆菌和毕赤酵母发酵培养
- 20 液。
7. 如权利要求 2 所述的方法，其中在发酵培养液中加入的羧化壳聚糖是发酵培养液的 8%重量，优选发酵培养液是大肠杆菌和毕赤酵母发酵培养液。
8. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其中所述羧化壳聚糖选自氨基 (-NH<sub>2</sub>)，或羟基 (-OH)，或氨基 (-NH<sub>2</sub>) 和羟基 (-OH) 被羧化基团修饰后的壳聚糖，其中所述羧化基团是含 1-3 个羧基取代的 C1-C6 的直链或支链烃基，优选含 3 个羧基，更优选
- 25 2 个羧基，最优选为 1 个羧基；所述直链或支链烃基优选具有 1-6 个碳原子。
9. 如权利要求 4 所述的方法，其中大肠杆菌的菌株包括 *E. coli* TOP10, *E. coli* JM109, *E. coli* HB101, *E. coli* DH5α, *E. coli* BL21(DE3), 以及其它大肠杆菌 K 菌株和 B 菌株的衍生菌株，包括 *E. coli* DH10B, *E. coli* JM110, *E. coli* MC1061, *E. coli*

MG1655, *E. coli* Stbl2, *E. coli* Stbl3, *E. coli* T-Fast, *E. coli* XL1 Blue, *E. coli* Rosetta 2(DE3) 等, 或其中酵母的菌株包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*), 毕赤酵母(*Pichia pastoris*).

10. 如权利要求 3 所述的方法, 其中所述步骤 d) 中的回收选自倾倒培养基或自  
5 自动化机械臂倾倒培养基获得菌体或培养基上清, 磁珠吸附 DNA/RNA 或蛋白质, 清洗 DNA/RNA 或蛋白质, 优选倾倒, 更优选手动倾倒培养基上清或自动化机械臂倾倒培养基上清。