

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2018.09.02

# 表达重组猪 $\alpha$ 干扰素的大肠埃希工程菌 分批发酵动力学模型的建立

朱亚召<sup>1,2</sup>, 王明丽<sup>1,2</sup>, 俞海洋<sup>1</sup>, 高耀辉<sup>2,3</sup>, 赵俊<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 安徽医科大学微生物学教研室, 合肥 230032; 2. 安徽九川生物科技有限公司, 安徽芜湖 241000; 3. 芜湖留学人员创业园, 安徽芜湖 241000)

[收稿日期] 2018-06-07 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2018) 09-0009-07 [中图分类号] TQ920.1

**[摘要]** 为探究表达重组猪  $\alpha$  干扰素的大肠埃希工程菌的分批发酵动力学基本规律, 以表达猪  $\alpha$  干扰素的基因工程重组大肠埃希菌 BL21 (DE3) 为实验对象, 观察并研究重组大肠埃希工程菌在 30 L 发酵罐分批发酵过程中菌体生长、重组猪  $\alpha$  干扰素生成和基质消耗的变化规律, 根据经典的 Logistic 方程、Luedeking-Piret 方程和类似 Luedeking-Piret 方程对其实验结果进行非线性回归分析。结果表明: 菌体生长呈典型的 S 型曲线, 蛋白生成和菌体生长无明显的相关性, 属于非生长偶联型; 重组猪  $\alpha$  干扰素的产生和重组大肠埃希工程菌的生长速率及菌体积累量相关, 菌体生长、基质消耗和产物形成模型的拟合度  $R^2$  分别为 0.99030、0.91095 和 0.96683, 能较好地描述发酵中的动力学特征; 重组猪  $\alpha$  干扰素蛋白得率提高了 40%, 由此建立的模型将为后续连续补料、高密度发酵和工业化放大生产奠定基础。

**[关键词]** 大肠埃希工程菌; 重组猪  $\alpha$  干扰素; 分批发酵; 发酵动力学模型

## Building a Fermentation Kinetic Model for the Expression of Recombinant Porcine Interferon- $\alpha$ in Bioengineered *Escherichia coli*

ZHU Ya-zhao<sup>1,2,3</sup>, WANG Ming-li<sup>1,3</sup>, YU Hai-yang<sup>1</sup>, GAO Yao-hui<sup>3,4</sup>, ZHAO Jun<sup>1,3,4,5\*</sup>

(1. Department of Microbiology, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 2. School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032, China; 3. Anhui JiuChuan Biotech Co., Ltd., Wuhu, Anhui, 241007, China; 4. Wuhu Interferon Bio-products Industry Research Institute Co., Ltd., Wuhu, Anhui, 241000, China; 5. Wuhu Overseas Students Pioneer Park, Wuhu, Anhui, 241000, China)

Corresponding author: ZHAO Jun, E-mail: 510192280@qq.com

**Abstract:** To explore the *E. coli* expressing recombinant pig interferon alpha ( $\alpha$ ) batch fermentation kinetics of the basic law of engineering bacteria, as a token of pig interferon  $\alpha$  genetic engineering recombinant *E. coli* BL21 (DE3) as the experimental object, observe and study the recombinant *E. coli* and engineering bacteria in 30 L fermentor batch fermentation process of bacteria growth, restructuring the pig interferon  $\alpha$  generation and the change rule. According to the classical Logistic equation, luedeking-piret equation and similar luedeking-piret

基金项目: 2017 国家重点研发计划 (2017YFD0501000); 2017 年安徽省博士后研究人员科研活动经费资助项目 (2017B194)

作者简介: 朱亚召, 从事发酵工程研究。

通讯作者: 赵俊。E-mail: 510192280@qq.com

equation, nonlinear regression analysis was carried out on the test results. The results showed that the growth of bacteria showed a typical s-shaped curve, and there was no obvious correlation between protein production and growth of bacteria. Restructuring pig interferon  $\alpha$  production and the growth rate of *E.coli* and engineering bacteria and bacteria accumulation, bacteria growth, substrate consumption and product form model fitting  $R^2$  is 0.99030, 0.91095 and 0.96683 respectively, which can well describe the dynamics characteristic in the fermentation; Restructuring the pig interferon  $\alpha$  protein yield increased by 40%. Therefore, the established model will lay a foundation for the subsequent high-density fermentation and industrial amplification.

**Key words:** *Escherichia coli* engineering bacterium; recombinant porcine interferon- $\alpha$ ; batch fermentation; fermentation kinetic model

干扰素是人和动物细胞在受到一定刺激时产生的一种微量、具有高度生物学活性的蛋白质,除了自身具有抗病毒作用,还有免疫调节和抗肿瘤等生物学功能<sup>[1]</sup>。重组猪  $\alpha$  干扰素是将长白猪  $\alpha$  干扰素型基因重组质粒导入大肠埃希菌构建表达的原核系统。猪  $\alpha$  干扰素 (PoIFN- $\alpha$ ) 对猪的流行性腹泻、轮状病毒腹泻、传染性胃肠炎等多种病毒性病有较好的疗效,因此,其作为广谱抗病毒药可用于猪病毒性疾病的防治。但传统的干扰素提取方法产量较低,难得到推广应用<sup>[2-3]</sup>。基因工程表达重组猪  $\alpha$  干扰素蛋白的方法是通过基因工程技术合成和高密度发酵技术扩大生产,可以有力地提高重组猪  $\alpha$  干扰素蛋白的产量,同时缩短生产周期,减少设备投资,并降低生产成本<sup>[4]</sup>。但目前国内外少有关于重组猪  $\alpha$  干扰素发酵动力学的报道,同时实验室高密度发酵技术还不够成熟,常受到微生物发酵过程中的变性和不确定性等因素影响,因此有必要深入地探索大肠埃希工程菌发酵生产重组猪  $\alpha$  干扰素的发酵条件和动力学特征,这对提高重组猪  $\alpha$  干扰素的产量具有重要意义。为建立大肠埃希工程菌分批发酵动力学模型,在 30 L 发酵罐中进行了重组猪  $\alpha$  干扰素的分批发酵研究,以期实现对重组猪  $\alpha$  干扰素生成过程的优化和控制,降低成本,为后续放大实验和连续发酵提供参考。

## 1 材料与方法

1.1 材料、试剂和仪器 重组大肠埃希工程菌 (BL21 (DE3)/pET-32a-rPoIFN $\alpha$ ) 由安徽医科大学微生物学教研室提供。培养基种类及组成见表 1。

蛋白胨 (OXOID, 英国, 批号: 1765365, 500 g); 酵母粉 (OXOID, 英国, 批号: 1378102, 500 g); 氯化钠 (国药集团化学试剂有限公司, 批号: 20160310, 500 g)。30 L 发酵罐 (比欧, 瑞士); 紫外分光光度计 (Varian 公司, 美国); 高压蒸汽灭菌锅 (HIRAYAMA 公司, 日本); 重悬仪 (IKA 公司, 德国); 恒温摇床 (上海智诚分析仪器制造有限公司); 高速冷冻离心机 (上海安亭科学仪器厂); 超声破碎仪 (宁波新芝生物科技有限公司)。

表 1 培养基组成

Tab 1 Medium components

成分	LB 培养基 /(g · L <sup>-1</sup> )	发酵培养基 /(g · L <sup>-1</sup> )	补料培养基 /(g · L <sup>-1</sup> )
胰蛋白胨	10	19.5	0
酵母浸粉	5	11.5	0
氯化钠	10	0	0
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0	4.0	0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0	5.0	0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0	20.0	0
MgSO <sub>4</sub>	0	0	1.2
无水葡萄糖	0	0	10

培养基 pH 7.0~7.2, 补料培养基和 LB 培养基 121 °C 20 min 高压灭菌

## 1.2 实验方法

1.2.1 种子液培养 一级菌种: 固体 LB 氨苄平板上挑取饱满的单菌落接种到终浓度为 100 mg/mL 氨苄青霉素 LB 培养液中, 37 °C 220 r/min 培养 12~16 h。二级菌液: 将一级菌液以 0.1% 量接种于终浓

度为 100 mg/mL 氨苄青霉素 200 mL LB 培养基中, 37 °C 220 r/min 扩大培养 12 h。

1.2.2 分批发酵过程 在 30 L 发酵罐中加入发酵培养基 12 L, 同时添加 0.05% 的消泡剂, 121 °C 20 min 原位灭菌。冷却后火圈接种 200 mL 种子培养基和补料培养基至发酵罐中, pH 控制范围: 7.0 ± 0.1, 溶氧控制 20% 以上, 前期发酵温度 37 ± 0.5 °C, 菌体生长阶段每 1 h 取样检测相关参数, 3 h 后准备诱导; 诱导阶段, 加入终浓度 0.1 mmol/L IPTG 诱导表达, 温度为 32 ± 0.5 °C, 每 1 h 取样 1 次检测相关参数, 直至发酵结束。共重复 6 次实验, 每次实验条件相同, 检测手段相同。

### 1.3 发酵中参数测定

1.3.1 生物量(wet weight, g/L)测定 取发酵液 30 mL 于已知质量的离心管中, 12000 r/min 离心 20 min 弃去上清, 菌体沉淀经蒸馏水洗涤离心两次, 收集沉淀。称重, 计算所得菌体湿重。

1.3.2 葡萄糖残余含量(Amount of residual sugar, g/L)测定 取发酵液 1 mL, 12000 r/min 离心 5 min,

收集上清后使用 DNS 法测得<sup>[5]</sup>。

1.3.3 全菌目的蛋白检测 分别在诱导前 1 h、诱导后 1 h、2 h、3 h 和 4 h 取样 1 mL 进行 SDS-PAGE 鉴定发酵液中全菌蛋白的表达<sup>[6]</sup>。

1.3.4 目的蛋白生物学活性(Protein titer, IU/mL)测定 采用细胞病变抑制法, 使用成熟的 ST 细胞/VSV 系统<sup>[7]</sup>对获得重组猪 α 干扰素蛋白效价检测。

1.4 数据分析和建模 每间隔 1h 取样, 对相关参数进行检测, 为建立较为准确的动力学模型, 相同条件下, 重复 6 次实验, 取实验平均值作为结果进行数据分析, 以减少实验误差, 同时通过 SPSS 软件对数据进行统计学分析, 并使用 Origin 8.0 绘图软件对数据进行非线性拟合, 绘制动力方程曲线, 同时获得最佳动力学参数。

## 2 结果

2.1 重组大肠埃希菌分批发酵过程的代谢特征 重组大肠埃希菌产重组猪 α 干扰素分批发酵过程见图 1, 显示了菌体湿重、残糖浓度及重组猪 α 干扰素效价随时间(t)的变化趋势。

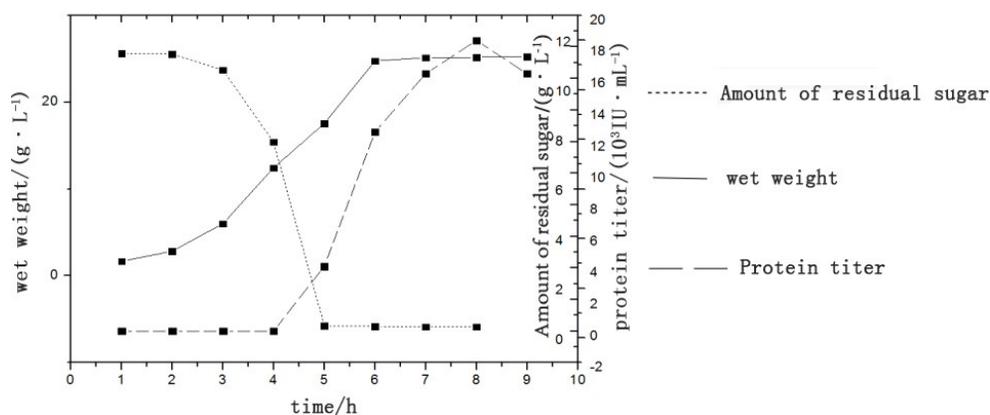


图 1 重组大肠埃希菌分批发酵进程曲线

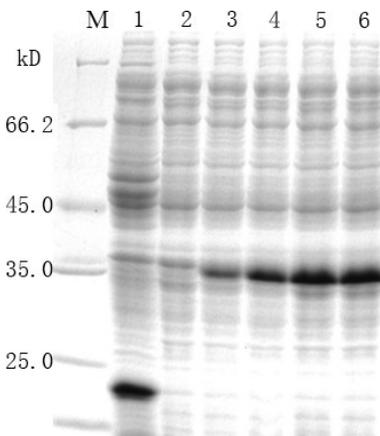
Fig 1 Recombinant *E. coli* batch fermentation process curve

图 1 中菌体湿重呈典型的 S 型曲线变化。重组大肠埃希菌种子液接入发酵罐后生长分为 4 个阶段: 第一阶段为延滞期, 即重组大肠埃希菌接种到发酵罐的适应期, 图 1 显示重组大肠埃希菌适应期很短, 很快进入繁殖期。第二阶段为对数生长

期, 最大比生长速率出现在此阶段。同时, 该阶段菌体相关酶活性达到最佳。为了达到较高的细胞密度和提高重组猪 α 干扰素蛋白产量, 选择在对数生长中期, 即在接种后第 4 h 加入终浓度为 0.1 mmol/L 的 IPTG 诱导同时降温至 32 °C, 此时发酵

进入到第三阶段为产物生成期。此时菌体比生长速率降低,产物开始积累,但培养基中葡萄糖浓度已经较低,菌体比生长速率在下降,重组猪  $\alpha$  干扰素生成,说明菌体生长和产物生成不存在偶联关系。重组猪  $\alpha$  干扰素是随着添加诱导剂才生成的,故为非自发性诱导。随着诱导进行,重组猪  $\alpha$  干扰素蛋白生物学升高,说明重组猪  $\alpha$  干扰素表达量在增加,但在诱导后第 5 h 出现生物学活性降低,说明此时菌体开始进入稳定期。由于葡萄糖早已消耗殆尽,不能提供足够的碳源。此时重组大肠埃希工程菌已到达平台期,代谢废物不断积累,无法维持菌体正常的生长环境,大部分菌体不再继续分裂生长,此时结束发酵。

2.2 分批发酵诱导后产重组猪  $\alpha$  干扰素的 SDS-PAGE 鉴定分析 重组大肠埃希菌分批发酵诱导前及诱导后取样进行 SDS-PAGE 鉴定。未使用 IPTG 诱导,重组猪  $\alpha$  干扰素未表达,使用 IPTG 诱导后在 35.0 kD 附近泳道 3、4、5 和 6 有相对应条带,对应蛋白表达量上升,最终蛋白表达在 25.4% 左右(图 2)。



M: 蛋白 Marker; 1: pET-32a(+) 空质粒转化菌;

2: 重组猪  $\alpha$  干扰素诱导前 1 h 取样全菌;

3-6: 重组猪  $\alpha$  干扰素诱导后 1 h、2 h、3 h 和 4 h 取样全菌

图 2 重组猪  $\alpha$  干扰素诱导后发酵取样蛋白鉴定结果

Fig 2 Results of the identification of the fermentative sample protein after induction of the recombinant pig  $\alpha$  interferon

2.3 发酵动力学模型的建立 使用基于菌体生长动力学的 Logistic<sup>[8-9]</sup>、Luedeking-Piret<sup>[10]</sup> 和类似

Luedeking-Piret 等方程研究分批发酵中菌体生长、基质消耗及产物生成间的动力学关系,通过对实验数据的分析,做出以下假设:(1) 发酵过程中菌体生长受自身浓度增加的抑制作用;(2) 葡萄糖的消耗仅用于菌体生长和维持菌体代谢。

2.3.1 菌体生长动力学模型 在微生物生长过程中,Monod 动力学模型、逻辑方程和 haldane 模型<sup>[11]</sup>等非结构化模型广泛用于描述细胞生长,而 Logistic 方程的应用却最为广泛,它能较好地描述分批发酵过程中因菌体浓度增加对菌体自身产生的抑制效应<sup>[12]</sup>,能够清楚地描绘菌体生长与营养间的关系曲线。有学者利用 Logistic 方程研究大肠埃希菌产青霉素酰化酶<sup>[13]</sup>、桑葚果酒发酵<sup>[14]</sup>、1,3-丙二醇分批发酵动力学<sup>[15]</sup>和仙人掌果酒发酵动力学及其氧化性<sup>[16]</sup>,结合测得并计算过后整理的相关数据,大肠埃希菌的菌体生长曲线为较标准的 S 型曲线,能够表示出菌体生长和营养物间的关系。因此,采用 Logistic 方程研究重组大肠埃希菌的菌体生长动力学模型,得式(1):

$$\frac{dX}{dt} = \mu_m \left(1 - \frac{X}{X_m}\right) X \quad (1)$$

$X$  为发酵过程中菌体生物量, g/L;  $\mu_m$  为微生物的最大比生长速率, h;  $X_m$  为发酵过程中最大菌体质量浓度, g/L;  $t$  为发酵过程需要的时间, h。

对式(1)进行积分,化为代数式如下:

$$X = \frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} \quad (2)$$

$X_0$  表示菌体初始浓度, g/L。

图 1 中菌体湿重数据代入式(2)得生长动力学参数  $X_0$ 、 $X_m$  和  $\mu_m$  值分别为 0.35259、27.46236 和 1.01385,获得菌体生长动力学方程,见式(3),同时拟合得曲线方程  $R^2 = 0.99030$ ,拟合效果很好,故可选用 Logistic 方程作为菌体生长阶段的动力学方程,见图 3。

$$X = \frac{9.6829e^{1.01385t}}{27.10977 + 0.35259e^{1.01385t}} \quad (3)$$

$X$  表示菌体浓度, g/L;  $t$  表示时间, h;  $R^2 = 0.9903$ 。

图 3 中菌体生长拟合曲线符合“S”型曲线,菌体在进入对数生长期 4h 时到达最大比生长速率,此时菌体酶活力达到最佳。故此时进行诱导更有利于提高重组猪  $\alpha$  干扰素的产量。

2.3.2 产物生成动力学模型 产物生成与菌体生长关系可分为产物生成与细胞生长偶联、部分偶联或者不相关。在此基础上,通过 Luedeking 等构建的动力学方程中产物生成与细胞生长关系通过 Luedeking-Piret 方程进行描述如下:

$$\frac{dP}{dt} = \alpha \frac{dX}{dt} + \beta X \quad (4)$$

$P$  表示蛋白产量,  $X$  为菌体对应的生物量(g/L),  $\alpha$  为生长偶联系数,  $\beta$  则是非生长偶联系数。方程中与菌体生长相关的产物生成用  $\alpha$  表示,而与菌体量相关的产物生成用  $\beta$  表示,  $\alpha, \beta$  均为常数。当  $\alpha=0, \beta \neq 0$ , 表示产物生成与细胞无关; 当  $\alpha \neq 0$ , 对应  $\beta=0$  或者  $\neq 0$ , 表示部分偶联和偶联关系。

根据重组猪  $\alpha$  干扰素的分批进程曲线,  $\alpha$  和  $\beta$  非偶联关系, 即  $\alpha=0, \beta \neq 0$ , 结合式(2)化简公式

$$P = \beta \frac{X_m}{\mu_m} \ln \frac{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}}{X_m} \quad (5)$$

对图 1 中重组猪  $\alpha$  干扰素生物学活性拟合, 得  $\beta$  值为 0.01276, 见式(6)。拟合得曲线见图 4, 此时  $R^2=0.91095$ , 证明产物的生成可用该模型表示。

$$P = 0.34563 \ln \frac{27.10977 + 0.35259 e^{1.01385t}}{27.46236} \quad (6)$$

图 4 中第 5 h, 取样检测到重组猪  $\alpha$  干扰素, 且随着诱导发生, 蛋白生物学活性提高, 但在诱导后第 9 h, 效价有所下降, 说明此时可以结束发酵过程。

2.3.3 基质消耗动力学模型 发酵过程中基质(葡萄糖)的消耗一方面用于菌体的生长, 一方面用于产物的生成代谢和菌体细胞的维持, 因此, 基质消耗可以由类似的 Luedeking Piret 方程式(4)来表示:

$$-\frac{dS}{dt} = \frac{dX}{Y_{X/S}} + \frac{dP}{Y_{P/S}} + \gamma X \quad (7)$$

$S$  为葡萄糖质量浓度, g/L;  $X$  为菌体生物量;  $Y_{X/S}$  为碳源用于生长的得率常数, g/g;  $Y_{P/S}$  为碳源用于产物积累的得率常数, g/g;  $\gamma$  为菌体维持系数, g/g。

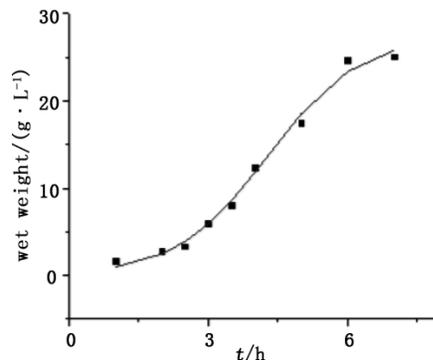


图 3 重组大肠埃希菌菌体生长的模型方程

Fig 3 Model equation of recombinant *Escherichia coli* growth

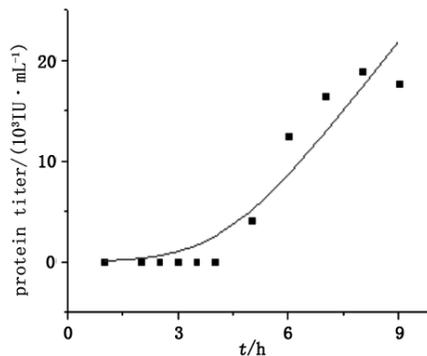


图 4 重组猪  $\alpha$  干扰素生成的模型方程

Fig 4 Recombinant pig interferon  $\alpha$  titer model equation

由于在诱导后的产物生成阶段葡萄糖量很低, 可以忽略不计, 故化简式(7)并结合式(2), 积分后得:

$$S = S_0 + X_0 \lambda - \gamma \frac{X_0 X_m e^{\mu_m t}}{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}} + \gamma \frac{X_m}{\mu_m} \ln \left( \frac{X_m - X_0 + X_0 e^{\mu_m t}}{X_m} \right) \quad (8)$$

$S_0$  为初始葡萄糖浓度, g/L;  $\lambda = 1/Y_{X/S}$

菌体生长的  $X_0, X_m$  和  $\mu_m$  值分别代入式(8), 并利用图 1 中残糖量数据非线性拟合, 得到  $S_0, \lambda$  和  $\gamma$  的值分别为 11.89313、-0.44698 和 -0.6492, 代入式(8)得基质消耗与时间的关系见式(10)。

$$S = 11.73553 + \frac{4.328 e^{1.01385t}}{27.10977 + 0.35259 e^{1.01385t}} - 17.585 \ln \left( \frac{27.10977 + 0.35259 e^{1.01385t}}{27.46236} \right) \quad (10)$$

葡萄糖随着重组大肠埃希菌的生长而消耗, 尤其在进入对数生长期后, 葡萄糖的消耗主要用于维

持细菌的生长。在诱导后第 4 h, 葡萄糖的急剧消耗不仅用于细菌的生长, 还用于产物的生成。依图 1 得出在第 5 h 时, 葡萄糖含量已接近于稳定, 此时菌体比生长速率开始下降, 即将进入平台期, 进行非线性拟合见图 5,  $R^2 = 0.96683$ , 证明该模型可以很好的反应出基质消耗情况。

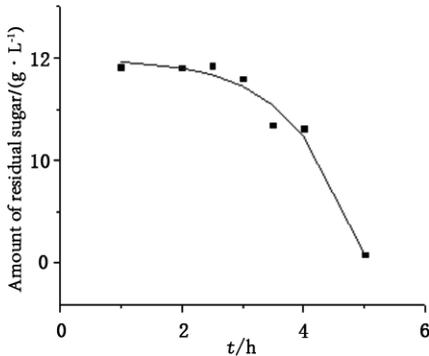


图 5 葡萄糖消耗的动力学模型

Fig 5 Dynamic model of glucose consumption

**2.4 模型验证** 为了验证模型的误差, 在相同实验条件下又进行了重组大肠埃希菌分批发酵 3 次, 所得实验结果取平均值, 并把实验值和模型预测值相比较。经验证, 模型的最大相对误差为 8.9%, 平均相对误差为 7.5%, 故上述模型能较好地描述重组大肠埃希菌分批发酵动力学, 模型的相对误差较小, 能够很好的反映重组大肠埃希菌分批发酵过程, 可为下一步发酵过程优化提供指导。

### 3 结论

研究利用 Logistic 方程、Luedeking-Piret 方程和类似 Luedeking-Piret 方程建立了大肠埃希菌 BL21(DE3)/pET-32a-rPoIFN $\alpha$  分批发酵重组猪  $\alpha$  干扰素的过程, 形成了菌体生长、产物生成和基质消耗动力学模型, 分别为:

$$X = \frac{9.6829e^{1.01385t}}{27.10977 + 0.35259e^{1.01385t}}$$

$$P = 0.34563 \ln \frac{27.10977 + 0.35259e^{1.01385t}}{27.46236}$$

$$S = 11.73553 + \frac{4.328e^{1.01385t}}{27.10977 + 0.35259e^{1.01385t}} - 17.585 \ln \left( \frac{27.10977 + 0.35259e^{1.01385t}}{27.46236} \right)$$

### 4 讨论

国内外关于干扰素抗病毒的研究开始于 20 世纪 50 年代, 集中在干扰素抗病毒作用。随着近现代基因工程技术的发展, 大批量生产干扰素已变得有可能。研究中针对重组大肠埃希菌 BL21(DE3)/pET-32a-rPoIFN $\alpha$  在 30L 发酵罐中摸索出产重组猪  $\alpha$  干扰素的相关规律, 对影响反应的因素进行了整理, 采用 Logistic 方程、Luedeking-Piret 方程和类 Luedeking-Piret 方程模型描述了菌体发酵过程的特性, 并经过非线性拟合优化得到相关模型参数, 拟合效果较好。这为后续的发醇工艺改进、蛋白活性提高、发酵过程的方法控制以及后续的补料分批模型积累了经验, 并提供了指导。

在建立重组猪干扰素  $\alpha$  的菌体生长动力学方程中, 是基于菌体的湿重测量法建立的菌体生长随时间变化的关系, 拟合得到的菌体生长曲线是符合经典的“S”型曲线, 拟合效果较好。丁雪利用固态发酵料干物质损失量表示菌体生物量, 成功建立了热带假丝酵母固态发酵菌体生长动力学模型<sup>[17]</sup>, 田雪、谢鑫和周晓航等关于地衣芽孢杆菌产  $\beta$ -甘露聚糖酶分批发酵动力学模型的建立<sup>[18]</sup> 使用菌体干重表示菌体生长, 不足之处在于干重法的误差较小, 在这方面还需改进。另一方面重组猪干扰素  $\alpha$  目的蛋白是分泌型表达, 故通过细胞病变抑制法可以准确且稳定地获得其目的蛋白的效价, 且蛋白表达量和生物学活性较高, 这和菌体自身为 pET-32a 载体有关构建的可溶性表达有关, 可以为后续相关重组蛋白的构建提供可行的指导。

目前初步完成了重组工菌的分批补料发酵实验模型建立, 下一步将从工艺优化着手, 尤其是从补料发酵开始做进一步精细的研究, 构建其补料发酵动力学模型, 获得优化后的补料策略, 为 BL21(DE3)/pET-32a-rPoIFN $\alpha$  在后续的高密度发酵甚至扩大到工业化生产上奠定基础。

### 参考文献:

- [1] 赵俊, 张俊玲, 李增, 等. 重组猪干扰素  $\alpha 1$  冻干粉剂对猪的安全性试验研究[J]. 中国畜牧兽医, 2014, 41(1): 195-198.  
Zhao J, Zhang J L, Li Z, et al. Safety valuation of recombinant

pig interferon  $\alpha 1$  freeze-dried powder for injection in pigs [J]. China Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2014, 41(1): 195-198.

[2] 谢萌, 徐鑫, 咸漠, 等. 重组大肠杆菌高密度发酵产甲羟戊酸动力学 [J]. 生物加工过程, 2015, 13(6): 71-74.  
Xie M, Xu X, Xian M, et al. The kinetics of high density fermentation of recombinant *Escherichia coli* to produce hydroxypentanoic acid [J]. Chinese Journal of Bioprocess, 2015, 13(6): 71-74.

[3] 骆艳娥. 重组大肠杆菌高密度发酵生产类人胶原蛋白的过程优化研究 [D]. 西安: 西北大学, 2005.  
Luo Y E. Study on process optimization of human collagen production by high density fermentation of recombinant *Escherichia coli* [D]. Xi'an: Northwest University, 2005.

[4] Song H, Eom M H, Lee S, et al. Modeling of batch experimental kinetics and application to fed-batch fermentation of *Clostridium tyrobutyricum* for enhanced butyric acid production [J]. Biochem Eng J, 2010, 53(1): 71-76. DOI: 10.1016/j.bej.2010.09.010.

[5] 王俊刚, 张树珍, 杨本鹏, 等. 3-5-二硝基水杨酸 (DNS) 法测定甘蔗茎节总糖和还原糖含量 [J]. 甘蔗糖业, 2008, (5): 45-49.  
Wang J G, Zhang S Z, Yang B P, et al. Application of 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method to test the reducing sugar and water-soluble total sugar content in sugarcane internodes [J]. Sugarcane and Canesugar, 2008, (5): 45-49.

[6] 朱云飞, 初正云, 李洪江. SDS-PAGE 凝胶电泳法对不同种鹿茸蛋白质差异化研究 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2017, 19(6): 48-51.  
Zhu Y F, Chu Z Y, Li H J. Study of the different kinds pilose another protein differentiation by SDS-PAGE gel [J]. Journal of Liaoning University of Traditional Chinese, 2017, 19(6): 48-51.

[7] 汤仁树, 赵俊, 王明丽. 重组猪  $\alpha$  干扰素理化性状及其体外抗病毒活性研究 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(8): 3928-3930.  
Tang R S, Zhao J, Wang M L. Study on the physicochemical characters of rPolFN- $\alpha$  and its antiviral activity *in vitro* [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010, 38(8): 3928-3930.

[8] 余爱华. Logistic 模型的研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2003.  
Yu A H. Research on the logistic model [D]. Nan Jing: Nanjing Forestry University, 2003.

[9] Luedeking R, Piret E L. A kinetic study of the lactic acid fermentation. Batch process at controlled pH. Reprinted from Journal of Biochemical and Microbiological Technology Engineering Vol. I, No. 4. Pages 393-401 (1959) [J]. Biotechnol Bioeng, 2000, 67(6): 636-644.

[10] 李达, 任洪波. 非线性拟合在发酵动力学中的应用研究 [J]. 食品与发酵科技, 2015, 51(3): 41-43.  
Li D, Ren H B. Application of nonlinear fitting in the fermentation kinetics [J]. Food and Fermentation Tech, 2015, 51(3): 41-43.

[11] Liu J Z, Weng L P, Zhang Q L, et al. A mathematical model for gluconic acid fermentation by *Aspergillus niger* [J]. Biochem Eng J, 2003, 14(2): 137-141.

[12] 吕欣, 董明盛, 张晓娟, 等. 酒精发酵非结构动力学模型及其参数估计 [J]. 西北农林科技大学学报 (自然科学版), 2005, 23(11): 78-82.  
Lv X, Dong M S, Zhang X J, et al. The unstructured kinetics of high ethanol concentration fermentation by a strain of *Saccharomyce cerevisiae* and evaluation of the kinetics parameters [J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition), 2005, 23(11): 78-82.

[13] 韦晓菊, 黎继烈, 朱晓媛, 等. 重组大肠杆菌产青霉素酰化酶的发酵动力学研究 [J]. 中国酿造, 2014, 33(3): 32-35.  
Wei X J, Ni J L, Zhu X Y, et al. The fermentation kinetics of penicillin acylase produced by recombinant *E. coli* [J]. China Brewing, 2014, 33(3): 32-35.

[14] 胡永正, 李明元, 李梅, 等. 桑葚果酒分批发酵动力学研究 [J]. 食品与机械, 2016, 32(12): 7-11.  
Hu Y Z, Li M Y, Li M, et al. The batch fermentation kinetics of mulberry fruit wine [J]. Food & Machinery, 2016, 32(12): 7-11.

[15] 程可可, 刘宏娟, 刘德华. 1,3-丙二醇有氧分批发酵动力学模型 [J]. 现代化工, 2005, 25(S1): 185-188.  
Cheng K K, Liu H J, Liu D H. Kinetic analysis of aerobic batch fermentation of 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* [J]. Modern Chemical Industry, 2005, 25(S1): 185-188.

[16] 李雪, 白新鹏, 曹君, 等. 仙人掌果酒发酵动力学及其氧化性 [J]. 食品科学, 2017, 38(4): 87-92.  
Li X, Bai X P, Cao J, et al. Fermentation kinetics and antioxidant activity of cactus wine [J]. Food Science, 2017, 38(4): 87-92.

[17] 丁雪. 降解游离棉酚的热带假丝酵母菌的筛选及发酵动力学研究 [D]. 保定: 河北农业大学, 2011.  
Ding X. Degradation of free gossypol tropical candida screening and fermentation kinetics study [D]. Bao Ding: Agricultural University of Hebei Province, 2011.

[18] 田雪, 谢鑫, 周晓航, 等. 地衣芽孢杆菌产  $\beta$ -甘露聚糖酶分批发酵动力学模型的建立 [J]. 中国农学通报, 2013, 29(18): 193-199.  
Tian X, Xie X, Zhou X H, et al. Construction of kinetics model for  $\beta$ -mannase fermentation process using *Bacillus licheniformis* HDYM-04 [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2013, 29(18): 193-199.