

文章编号 :1009-038X(2003)01-0012-04

Mut^s 型基因重组巴斯德毕赤酵母高密度 发酵过程中甲醇流加的控制

谢静莉¹, 张励¹, 叶勤¹, 周庆玮², 辛利², 杜鹏², 甘人宝²

(1. 华东理工大学 生物反应器工程国家重点实验室, 上海 200237; 2. 中国科学院 上海生命科学院, 上海 200031)

摘要: 在采用 Mut^s 表型基因重组巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 发酵生产血管生长抑制因子 (angiostatin) 的过程中, 诱导表达阶段甲醇的质量浓度对血管生长抑制因子的表达至关重要。因重组 Mut^s 型巴斯德毕赤酵母利用甲醇极慢, 按文献方法流加甲醇时, 甲醇逐渐积累达 30 g/L, 血管生长抑制素表达水平仅为 4 mg/L。采用甲醇检测与控制系统对甲醇流加进行反馈控制后, 甲醇质量浓度可稳定控制在设定范围。采用此系统控制诱导阶段的甲醇流加, 同时手动流加适量甘油以促进细胞生长, 血管生长抑制因子表达水平量最高可达 89 mg/L。

关键词: 甲醇电极; 巴斯德毕赤酵母; 血管生长抑制因子; 反馈控制

中图分类号: TQ 920.6

文献标识码: A

Methanol Feeding Control in High-Density Cultivation of Mut^s Recombinant *Pichia pastoris*

XIE Jing-li¹, ZHANG Li¹, YE Qin¹, ZHOU Qing-wei², XIN Li², DU Peng², GAN Ren-bao²

(1. State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China; 2. Institute of Biochemistry and Cell Biology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031, China)

Abstract: In the induction phase of fed-batch cultivation of recombinant *Pichia pastoris* with a Mut^s phenotype, methanol concentration is significant for angiostatin expression. Due to the extremely slow methanol utilization by this Mut^s strain, methanol was accumulated to 30 g/L if it was continuously added based on the feeding strategies reported by other reference, and the level of angiostatin was only 4 mg/L. A methanol monitoring and control system was adopted for feedback control of methanol concentration, and the methanol concentration can be controlled at a predetermined level. During the expression phase, methanol concentration was controlled with this feeding system, at the same time glycerol was also added either continuously or manually in order to stimulate the cells' growth. In this way, the highest angiostatin concentration of 89 mg/L was reached.

Key words: methanol monitoring and control system; *Pichia pastoris*; angiostatin; feedback control

收稿日期 2002-06-21; 修回日期 2002-12-20.

基金项目 教育部科学技术研究重点项目(99166).

作者简介 谢静莉(1974-),女,江苏南京人,发酵工程博士研究生。

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 是一种甲醇酵母, 具有醇氧化酶 AOX, 可以在以甲醇为惟一碳源和能源的培养基中生长, 其 AOX 可达细胞可溶性蛋白质的质量分数的 30%^[1]. 巴斯德毕赤酵母的醇氧化酶基因有 *aox1* 和 *aox2*, 其中 *aox1* 启动子为强启动子, 细胞中绝大多数醇氧化酶的活力由 *aox1* 提供. 当作为宿主的巴斯德毕赤酵母的 *aox1* 结构基因被外源基因表达盒所替换, 就失去大部分甲醇利用能力, 具有 Mut^s (methanol utilization slow) 表型; Mut^s 表型的毕赤酵母在甲醇诱导阶段生长缓慢, 但有时外源蛋白的表达反而更高, 更有利于蛋白质的正确折叠^[2].

血管生长抑制素 (angiostatin) 是一个相对分子质量为 38 000 的血浆纤维蛋白溶酶原片段, 通过抑制毛细血管内皮细胞的移行和增殖, 阻断新生毛细血管的形成, 从而达到阻断肿瘤细胞转移通路、萎缩肿瘤的治疗目的^[3]. 已构建的表达血管生长抑制素的重组毕赤酵母^[4]具有 Mut^s 的表型, 在发酵过程的表达阶段, 甲醇质量浓度控制对蛋白质表达起着关键作用. 作者采用甲醇传感器对甲醇质量浓度进行反馈控制, 血管生长抑制素的表达水平有较大提高.

1 材料与方法

1.1 菌种

重组毕赤酵母菌 *Pichia pastoris* (GS115) 由中科院上海生物化学研究所甘人宝课题组构建^[4], 具有 His⁺ Mut^s 表型.

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 (BMGY) YNB 13.4 g/L, 甘油 10 mL/L, 生物素 0.4 mg/L, 1 mol/L pH 6.0 的磷酸缓冲溶液 100 mL/L, 酵母提取物 10 g/L, 水解酶蛋白 20 g/L.

1.2.2 发酵培养基 (BSM) 85% 磷酸 26.7 mL/L, CaSO₄ 0.93 g/L, K₂SO₄ 18.2 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 14.9 g/L, KOH 4.13 g/L, 甘油 40 g/L, PTM1 溶液 4.35 mL/L.

1.2.3 PTM1 溶液 CuSO₄ 6.0 g/L, KI 0.8 g/L, MnSO₄ 3.0 g/L, Na₂MoO₄ 0.2 g/L, H₃BO₃ 0.2 g/L, CoCl₂ 0.5 g/L, ZnCl₂ 20.0 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 65.0 g/L, 生物素 0.2 g/L, 硫酸 5 mL/L.

以上培养基均参照文献 [2].

1.3 培养方法

5 L 发酵罐装 2.5 L 发酵培养基, 接种量 7%, 温度 30 °C, pH 5.0, 通气量 4 L/min, 溶氧体积分

不低于 20%. 甘油耗尽后 1 h 开始流加质量分数为 50% 的甘油 (每升含 12 mL PTM1 溶液), 菌体密度达一定程度时流加 100% 甲醇 (每升含 12 mL PTM1 溶液^[2]), 开始诱导重组蛋白表达, 流加方法参照文献 [2]. 发酵过程由国家生化工程技术研究中心 (上海) 开发的发酵罐控制系统 Tophawk 软件进行在线控制和数据采集.

1.4 甲醇的在线检测与控制

甲醇的在线检测及流加控制系统包括甲醇采样器、检测器和 FC-180B 型甲醇质量浓度监控仪 3 个部分, 由生物反应器工程国家重点实验室提供.

1.5 测定方法

菌体浓度采用浊度法, 发酵液经稀释后于波长 600 nm 测光密度 (OD₆₀₀). 血管生长抑制素的测定采用 ELISA 方法.

2 结果与讨论

2.1 阶梯恒速流加甲醇发酵

按 Invitrogen 方法^[2]流加甘油, 因流速过高造成甘油和乙醇积累, 调整了甘油的流加速率后, 有效地提高了甘油的利用效率. 在流加甲醇的诱导表达阶段, 按 Invitrogen 方法流加也造成甲醇的积累. 由于重组毕赤酵母利用甲醇极慢, 积累的甲醇质量浓度达 31 g/L (见图 1), 诱导表达阶段菌体没有生长, 表达的血管生长抑制素仅 4 mg/L.

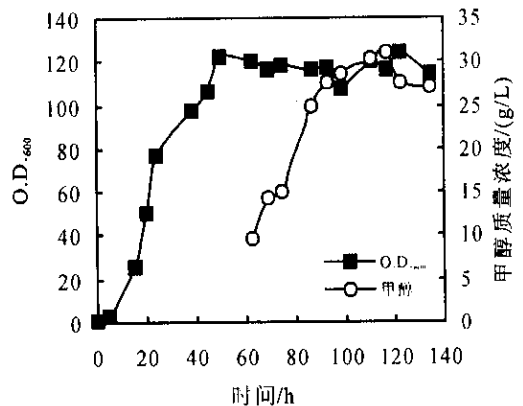


图 1 阶梯恒速流加甲醇的发酵结果

Fig. 1 The cell and methanol concentration profiles in fed-batch fermentation in which feeding of methanol was controlled manually stepwise

2.2 甲醇的在线测量

2.2.1 通过尾气测定 气相中的醇在甲醇检测器中发生反应, 给出电信号. 根据甲醇的液气传递方程, 可知在一定的通气和搅拌速率 (液—气甲醇传递速率) 下, 发酵尾气的甲醇质量浓度与液相甲醇质量浓度相关. 由于尾气带有大量的水蒸气和水

滴,会引起检测器失效,因此将尾气的水滴拦截后检测.但在使用一段时间后,检测器给出信号的灵敏度仍会严重下降.此外,发酵过程中为控制 pH 而加入的氨水挥发的氨气会严重干扰检测器的响应.因此,通过测定尾气中甲醇含量的方法效果不理想.

2.2.2 通过跨膜扩散测定 参考 Wangner^[5]的设计,对样气的采集加以改进,添加采样器.采样器末端为高透性高分子膜,膜内侧为微小体积的扩散室,并有空气载气通过.采样器浸于发酵液中,液相中的甲醇通过高透性高分子膜进入扩散室,由载气带入甲醇检测器.图 2 为发酵诱导阶段的操作条件(温度为 30 °C,搅拌转速为 650 r/min,空气流量为 4 L/min,发酵罐装液量为 2.5 L)下,95 min 后加入甲醇,当罐内甲醇质量浓度为 2 g/L 时,甲醇检测器的响应曲线,在 90% 响应时间时约为 9 min.图 3 为液相甲醇质量浓度与甲醇检测器稳态输出信号的对应关系,根据此标准曲线可以估计发酵罐中甲醇质量浓度.

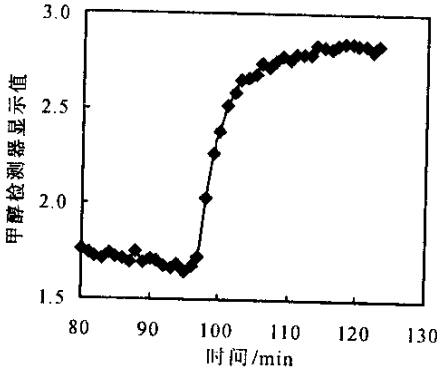


图 2 甲醇检测器对发酵罐中甲醇质量浓度的响应
Fig.2 Response of the methanol detector to a change in methanol concentration

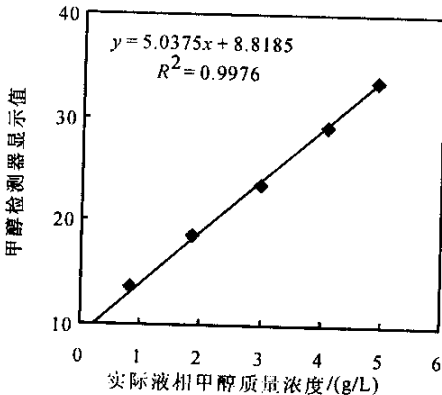


图 3 甲醇电极显示与实际液相甲醇质量浓度关系
Fig.3 The relationship between the displayed value of methanol detector and the liquid-phase methanol concentration

2.2.3 影响甲醇检测的因素 搅拌转速可能影响甲醇跨膜扩散,因此考察了搅拌转速的影响.图 4 表明,发酵罐中甲醇质量浓度为 10 g/L,转速从 650 r/min 升至 750 r/min,由于甲醇的挥发,甲醇电极响应总的来说呈下降趋势,可见转速影响不大.发酵温度对甲醇电极的影响则较为显著(见图 5),当温度从 29 °C 升至 35 °C 时,甲醇电极的显示值相应增大,温度再降至 27 °C 时,甲醇电极的显示值相应下降.可以看到,检测器的响应与温度的波动一致,这是由于温度变化引起高分子膜通透性发生明显变化而造成的.

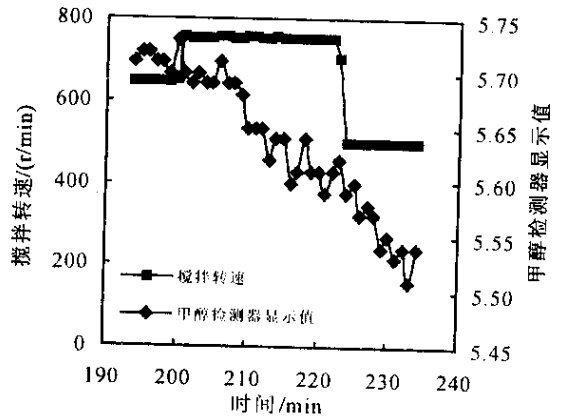


图 4 发酵罐搅拌转速对甲醇电极测定的影响
Fig.4 The effect of agitation of fermentor on the response of the methanol detector

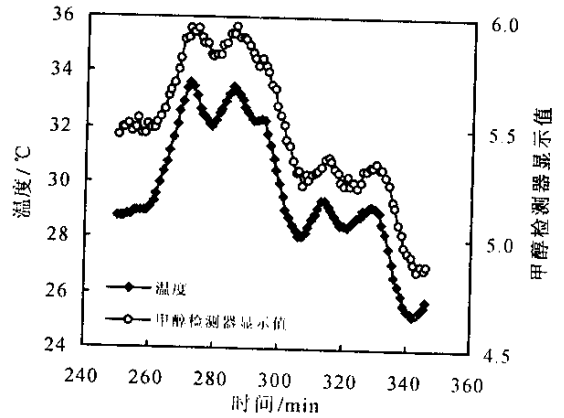


图 5 温度对甲醇电极测定的影响
Fig.5 The effect of temperature on the response of the methanol detector

由于甲醇检测器对乙醇也有响应,考察了乙醇对甲醇检测器的影响,发现检测器对乙醇的响应更快(数据未显示).在发酵诱导阶段的操作条件(温度为 30 °C,搅拌转速为 650 r/min,空气体积流量为 4 L/min,发酵罐装液量 2.5 L)下,加入质量浓度为 2 g/L 的乙醇 5 min 后即可达到对应的 100% 响应值,且 100% 响应值大于甲醇.在分批发酵阶段,甘油的初始质量浓度较高(40 g/L),为提高菌体密度,

甘油耗尽后需流加甘油. 当甘油被不完全代谢时会产生乙醇, 积累的乙醇会阻遏外源基因的表达. 通过甲醇检测器的响应信号可判断有无乙醇的产生, 并以此调节甘油流加速率.

2.3 利用甲醇电极优化发酵过程中甲醇质量浓度的控制

对用毕赤酵母表达生产重组蛋白来说, 无论重组菌的甲醇利用表型如何, 甲醇质量浓度都是一个决定性的因素^[6-10]. 作者采用的菌株为 Mut^s 型, 在单纯流加甲醇时菌体几乎不能生长, 甲醇的利用率极低. 根据摇瓶实验结果, 当甲醇质量浓度低于 2 g/L 时, 细胞几乎不合成重组蛋白, 而过高的甲醇质量浓度会对蛋白的表达产生抑制^[8, 11], 因此初步确定将蛋白诱导表达阶段的甲醇质量浓度控制在 3 ~ 5 g/L^[6]. 采用甲醇检测控制系统对甲醇的流加进行控制后, 甲醇的质量浓度可被稳定地控制(图 6). 为了满足血管生长抑制素表达的需要, 在对甲醇流加进行反馈控制的同时, 流加适量的甘油, 血管生长抑制素的表达水平提高到 89 mg/L.

3 结 论

采用甲醇检测控制系统对血管生长抑制因子的诱导表达阶段的甲醇流加进行反馈控制, 这是一

参考文献:

- [1] Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris* [J]. *Bio/Technology*, 1993, 11: 905-910.
- [2] 章如安, 杨晟. 巴斯德毕赤酵母表达体系研究及进展 [J]. *微生物学通报*, 2000, 27: 371-373.
- [3] Sim BKL, O'Reilly MS, Liang H, et al. A recombinant human angiostatin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer [J]. *Cancer Res*, 1997, 57: 1329-1344.
- [4] 辛利, 张励. 人血管生长抑制素在毕赤酵母中的表达及活性测定 [J]. *生物化学与生物物理学报*, 2001, 33: 291-295.
- [5] Wangner LW, Matheson NH, Heisey RF, et al. Use a silicone tubing sensor to control methanol concentration during fed batch fermentation of *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnol Techniques*, 1997, 11: 791-795.
- [6] Lin J, Panigraphy D, Trinh LB, et al. Production process for recombinant human angiostatin in *Pichia pastoris* [J]. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2000, 24: 31-35.
- [7] Kobayashi K, Kuwae S, Ohya T, et al. High level secretion of the recombinant human serum albumin by fed-batch of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy [J]. *J Biosci Bioeng*, 2000, 90: 280-288.
- [8] Guarna MM, Ilesnicki GJ, Tam BM, et al. On-line monitoring and control of methanol concentration in shake-flask cultures of *Pichia pastoris* [J]. *Biotechnol Bioeng*, 1997, 56: 279-286.
- [9] Katakura Y, Zhang W, Zhuang G, et al. Effect of methanol concentration on the production of human β_2 -glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: a simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor [J]. *J Biosci Bioeng*, 1998, 86: 482-487.
- [10] Zhang W, Bevins MA, Plantz BA, et al. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2000, 70: 1-8.
- [11] D'Anjou MC, Daugulis AJ. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation [J]. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 72: 1-11.

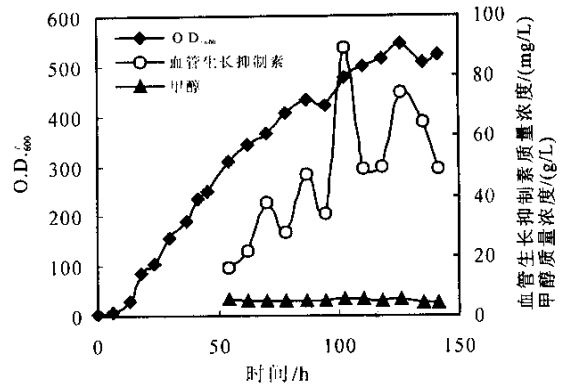


图 6 甲醇电极反馈控制甲醇流加时的菌体质量浓度、甲醇质量浓度及血管生长抑制素质量浓度

Fig. 6 Cell, methanol and angiostatin concentrations when using methanol monitoring and feedback control system for methanol feeding

个有效且可行的方法. 研究表明, 该系统能有效地将甲醇质量浓度控制在设定的范围. 采用甲醇检测控制系统对发酵过程中的甲醇质量浓度进行反馈控制, 对推动各种基因重组甲醇酵母(如 *Pichia pastoris*, *Hansenula polymorpha* 等)的广泛应用有实用意义.