

## 重组毕赤酵母表达工程植酸酶发酵过渡相参数相关分析

郭美锦<sup>1,2</sup> 储 炬<sup>1</sup> 庄英萍<sup>1</sup> 杭海峰<sup>1</sup> 张嗣良<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室, 国家生化工程技术研究中心(上海), 上海 200237)

<sup>2</sup>(江西农业大学生物工程系, 南昌 330045)

**摘 要** 微生物发酵是一个涉及不同尺度的互相关联的复杂生物系统的过程, 将重组毕赤酵母表达工程植酸酶过渡相的在线和离线参数进行了相关分析研究。通过对发酵过程的在线细胞代谢生理参数(*OUR*)和环境参数(*DO*)的变化进行相关分析表明: 甘油和葡萄糖碳源对 AOX 合成的阻遏强度不同, 葡萄糖的阻遏性明显强于甘油, 相对于醇氧化酶启动子, 葡萄糖为强阻遏性底物。根据甲醇代谢途径关键酶活性变化, 推测出各代谢途径流量分布的变化, 即甲醇诱导后糖酵解途径和三羧酸循环途径代谢流比例下降, 而磷酸戊糖途径中代谢流通量上升, 甲醇完全氧化代谢流成为主要代谢流, 与过渡相在线参数 *pH*、*OUR*(*CER*)和 *RQ* 等相关分析的甲醇代谢途径的变化结果一致。此外, 建立了生产过程在线控制与分析的标准: 当 *OUR* 和 *CER* 逐渐增大, 则可判断甲醇已被利用和启动子已被甲醇成功诱导, 即工程植酸酶开始启动表达。

**关键词** 重组毕赤酵母, 工程植酸酶, 过渡相, 在线参数, 酶活分析, 相关分析

**中图分类号** Q939.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2004)06-0932-05

随着发酵工业和生物技术的迅速发展, 以及人们环境保护意识的提高, 德国 BASF 与荷兰的 Gist-brocades(DSM 的前身)率先利用基因转化技术, 于 1990 年首次成功地用 *Aspergillus niger* 工业规模生产商品植酸酶, 同年获得欧洲饲料添加剂管理机构的全面批准认可, 陆续在荷兰、德国等欧洲市场以酶他富(Natuphos)为商品名上市。姚斌等<sup>[1]</sup>通过基因工程的方法构建了高效表达植酸酶的基因工程毕赤酵母, 植酸酶的表达量较天然的植酸酶产生菌黑曲霉高 3000 倍以上, 已开始实现植酸酶的产业化生产, 其构建的菌株遗传型为 *Mut*<sup>+</sup> *His*<sup>-</sup>。由于植酸酶分子量较大且糖基化位点多达 10 个, 糖基化后表现分子量为 85kD 左右, 糖基化率达 30% 以上, 翻译后需要较长的加工时间, 因此我们按 Invitrogen 公司 *Pichia* Kit 构建了生长较慢的 GS115 *Mut*<sup>s</sup> *His*<sup>+</sup> 基因工程菌 *Phy*-269<sup>[2]</sup>。目前, 有关基因工程菌毕赤酵母表达外源蛋白的文献较多, 但对其发酵过程优化一般只涉及单一条件或少数几个培养环境条件<sup>[3]</sup>, 由于微生物的发酵过程是一个涉及环境参数、生理参数等不同尺度参数相互关联的复杂系统, 而过渡相

是 *Mut*<sup>s</sup> 型重组毕赤酵母碳源转换和启动外源蛋白表达的关键时期, 为此本论文以发酵过程的过渡相将不同尺度的参数进行相关分析, 为工程植酸酶产业化生产过程控制提供理论基础。

### 1 材料与方法

#### 1.1 菌种

GS115 *phy*-269 菌株, 基因型为 *Mut*<sup>s</sup> *His*<sup>+</sup>, 表达载体为含有植酸酶基因的 *pPIC9K/phy*, 蛋白引导序列来自酿酒酵母的  $\alpha$ -交配因子( $\alpha$ -Mating Factor,  $\alpha$ -MF), 菌株能稳定表达高比活且耐高温的植酸酶(由上海永业农科生物工程有限公司构建)。

#### 1.2 培养基及种子制备

培养基及种子制备方法按文献[4]。

#### 1.3 发酵方法

按 Invitrogen 公司 *Pichia* Expression Kit 发酵方法, 采用 FUS-50L(A)全自动发酵罐(华东理工大学国家生化工程技术研究中心(上海)研制), 发酵过程数据采集与分析软件为 Bioradar 2.0。FUS-50L(A)发酵罐装 20L 基础料, 以 10% 接种量接种, 30℃ 培

收稿日期: 2004-04-19, 修回日期: 2004-07-23。

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863 计划)(No. 2002AA217021)项目资助。

\* 通讯作者。 Tel: 86-21-64252234; Fax: 86-21-64253702; E-mail: SiliangZ@163.net

养,调节搅拌、空气流量维持溶氧(Dissolved Oxygen, DO)在20%以上,用氨水维持pH在5.5。DO、pH采用METTLER TOLEDO电极在线检测。接种后培养约20h,甘油(或葡萄糖)耗尽,开始流加甘油(或葡萄糖)。待菌浓度达到一定值后(细胞光密度 $OD_{600}$ 为400左右),停补甘油(或葡萄糖),当甘油(或葡萄糖)耗尽后,开始以 $1.0\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ 速率恒速补入甲醇进行工程植酸酶表达。

## 1.4 分析方法

**1.4.1 无细胞酶液制备方法:**将发酵液离心,用含有2mmol/L EDTA的10mmol/L磷酸缓冲液(pH7.5)洗涤2次,然后悬浮在预冷过的含1mmol/L二硫苏糖醇(dithiothreitol)和2mmol/L  $\text{MgCl}_2$ 的0.1mol/L磷酸缓冲液(pH7.5)中。在溶液中加入0.1mm直径的玻璃珠,0℃下,以2min间隔0.5min超声波破碎10次,再在4℃离心(20min,7000r/min),上清液即为无细胞酶液。

### 1.4.2 酶活分析方法:

(1)乙醇氧化酶(Alcohol oxidase, EC1.1.3.13, AOX)活性测定<sup>[5]</sup>。酶活单位定义:1L无细胞液在30℃1min产生的过氧化氢与苯酚和4-氨基安替比林形成 $1\mu\text{mol}$ 醌的酶量。(2)甲醛脱氢酶(Formaldehyde dehydrogenase, EC1.2.1.1, FAD)酶活测定<sup>[6]</sup>。酶活单位定义:1L无细胞液在30℃1min形成 $1\mu\text{mol}$  NADH的酶量,即为1单位(u)。(3)丙酮酸脱氢酶复合体(Pyruvate dehydrogenase complex, PDC)活性测定<sup>[7]</sup>。酶活单位定义:1L无细胞液在30℃1min形成 $1\mu\text{mol}$  NADH的酶量,即为1单位(u)。(4)葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, EC1.1.1.49, G-6-P)活性测定<sup>[8]</sup>。酶活单位定义:1L无细胞液在30℃1min形成 $1\mu\text{mol}$  NADPH所需酶量,即为1单位(u)。(5)异柠檬酸脱氢酶(Isocitrate dehydrogenase, EC1.1.1.42, IDE)活性测定<sup>[8]</sup>。酶活单位定义:1L无细胞液在30℃1min形成 $1\mu\text{mol}$  NADH所需的酶量,即为1单位(u)。(6) $\alpha$ -酮戊二酸脱氢酶( $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase, EC1.2.4.2,  $\alpha$ -KD)活性测定<sup>[8]</sup>。酶活单位定义:1L无细胞液在30℃1min形成 $1\mu\text{mol}$  NADH所需酶量,即为1单位(u)。(7)琥珀酸脱氢酶(Succinic dehydrogenase EC1.2.1.16, SDE)活性测定<sup>[8]</sup>。酶活单位定义:1L无细胞液在30℃1min还原 $1\mu\text{mol}$ 铁氰化钾的酶量为1个酶活单位(u)。(8)植酸酶(phytase, EC.3.1.3.8)分析方法:按文献[9]。酶活定义:在30℃,pH 5.0时,每分钟从0.0051mol的植酸钠

中释放出 $1\mu\text{mol}$ 无机磷所需要的酶量为1单位(u)。

## 1.5 甲醇浓度分析方法

气相色谱分析发酵上清液甲醇浓度。仪器:GC920气相色谱仪(上海海欣色谱仪器有限公司);填料为chromosorb101型,色谱柱长1m,内径2mm,载气为氮气, $\text{N}_2$ 流量为15mL/min, $\text{H}_2$ 和空气的流量分别为30mL/min和300mL/min(1:10)。柱温135℃,汽化室温度135℃,检测器温度170℃。色谱工作站采用上海计算所CDMC-21 V3.0版。

## 1.6 发酵尾气分析

排气 $\text{O}_2$ 采用顺磁氧分析仪(Magnos 4G)在线检测;排气 $\text{CO}_2$ 采用不分光红外仪(Uras 3G,德国H&B制造)。代谢生理参数氧气消耗速率(Oxygen Uptake Rate, OUR)和二氧化碳释放速率(Carbon Dioxide Evolution Rate, CER)计算按文献[10],呼吸商(Respiratory Quotient, RQ) =  $\text{CER}/\text{OUR}$ 。

# 2 结果与分析

## 2.1 利用不同碳源细胞生长后过渡相过程参数分析

重组毕赤酵母表达外源蛋白存在一明显的由碳源(甘油或葡萄糖)转换为甲醇并诱导启动子完全启动的阶段,称为过渡相(Transition phase),尤其是Mut<sup>s</sup>型菌株。按发酵方法,重组毕赤酵母GS115 phy-269过渡相的在线参数变化如图1。由图1可知:以甘油为碳源生长时,当甘油58.5h耗尽后,于59.8h开始补入甲醇诱导,当甲醇补入后发酵过程的在线OUR立刻上升和DO曲线与此同时下降,呈现反峰(图1-a),此时甲醇是发酵体系唯一加入的碳源,OUR的增大和DO曲线下降是重组毕赤酵母细胞代谢甲醇同时消耗氧气的结果,说明甲醇的加入迅速诱导乙醇氧化酶(AOX)合成;当葡萄糖为重组毕赤酵母细胞生长唯一碳源和能源,58.5h葡萄糖耗尽后,于60.4h开始补入甲醇,约30min DO参数开始逐渐下降,而OUR则在甲醇补入0.9h左右(61.3h)才呈现上升趋势,有一明显的甲醇代谢停滞期,即AOX合成阻遏期,其原因主要是由于葡萄糖对甲醇诱导 $aox$ 基因转录为mRNA的强阻遏作用<sup>[11]</sup>。因此,通过对发酵过程的在线细胞代谢生理参数(OUR)和环境参数(DO)的变化进行相关分析可知,重组毕赤酵母利用不同碳源(甘油或葡萄糖)进行生长时,在过渡相有不同的发酵过程特征。

## 2.2 过渡相发酵过程参数相关分析

以葡萄糖为碳源,重组GS115 phy-269发酵过渡相的主要在线参数曲线如图2。50.5h停止葡萄糖,

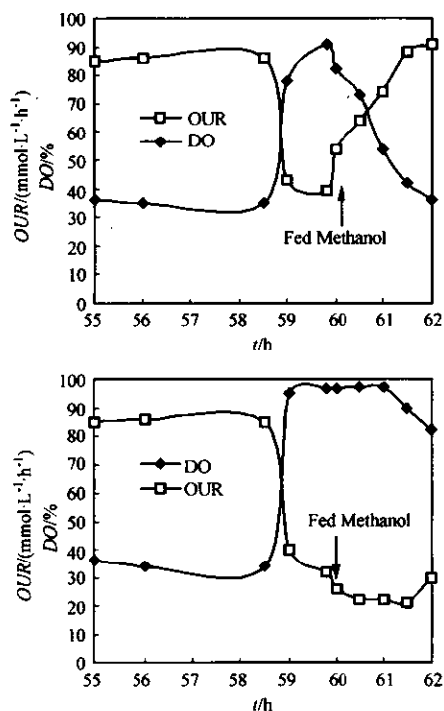


图1 重组毕赤酵母表达阶段在线 DO 和 OUR 参数变化

Fig.1 On-line parameters of OUR and DO at transition phase with different carbon sources

a: glycerol as the sole carbon source at growth phase; b: glucose as the sole carbon source at growth phase

由于碳源缺乏, OUR 和 CER 逐渐下降,同时 pH 上升。在 51.78h 开始补甲醇后耗氧速率(OUR)和二氧化碳释放速率(CER)曲线下降,然后基本平稳,同时, pH 曲线上升减缓,20min 后 pH 曲线基本平稳,至甲醇诱导 1h(52.75h)开始下降,此时 OUR 和 CER 为最低值,分别为 27 和 17mmol/L·h 左右。当甲醇诱导至 2h 左右(53.73h) OUR 和 CER 则开始逐渐上升,说明重组毕赤酵母细胞开始明显代谢甲醇。

重组毕赤酵母发酵过程中生理参数呼吸商(RQ)在以葡萄糖为碳源时其值在 0.9 左右,当葡萄糖停止补入后,由于葡萄糖浓度的限制 RQ 值也逐渐下降至 0.58 左右,而当补加甲醇(51.78h)后由于甲醇诱导从 0.58 快速上升至 0.66(52.5h);随着 OUR 和 CER 的明显增大, RQ 值则从 0.66 几乎直线下降至 0.56 左右(图 2)。由于 RQ 值与细胞利用碳源种类(如不饱和程度和还原性)和细胞代谢途径(有或无氧代谢和代谢流大小)密切相关<sup>[17]</sup>,而在本试验中是由细胞的生长相(碳源为葡萄糖)转变为工程植酸酶的过渡相(碳源为甲醇),因此 RQ 的变化在甲醇加入前是属于葡萄糖不足后细胞以其它碳源作为能源而引起 RQ 的下降。当甲醇补入后由于甲

醇诱导 AOX 酶形成使细胞代谢甲醇, RQ 逐渐增大(理论最大值为 0.75),另外 RQ 值变化也与甲醇代谢途径各代谢流大小密切相关。为了进一步说明甲醇的各代谢途径流量分布变化,下文进行了酶学分析,以说明这些在线曲线的变化规律。

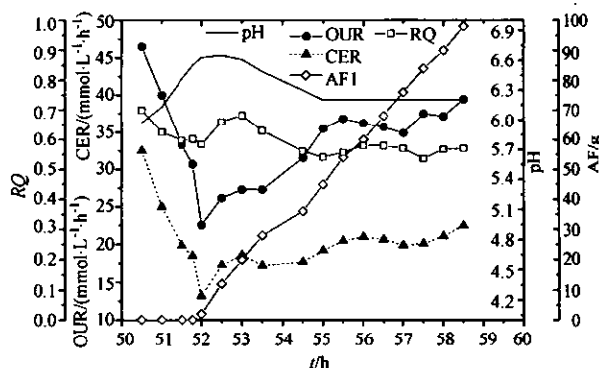


图2 过渡相主要在线参数曲线变化图

Fig.2 Main on-line parameters at transition phase

### 2.3 过渡相甲醇主要代谢途径关键酶分析

重组毕赤酵母代谢甲醇时有 5 条主要代谢途径,对过渡相各主要代谢途径的关键酶进行酶活分析,包括甲醛脱氢酶(FAD)、丙酮酸脱氢酶复合体(PDC)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(G-6-P)、异柠檬酸脱氢酶(IDH)、琥珀酸脱氢酶(SDH)等。在甲醇补入 0h(即葡萄糖消耗尽)、3h、4h、6h 和 10h 分别取样进行酶单位测定,结果如图 3。从图 3 可知:从细胞生长利用葡萄糖代谢转为甲醇代谢时,糖酵解途径中关键酶之一丙酮酸脱氢酶复合体(PDC)的活性呈下降趋势,与此相对应的三羧酸循环中的关键酶异柠檬酸脱氢酶(IDH)活性也呈下降变化,而 HMP 途径中的关键酶 6-P-葡萄糖脱氢酶(G-6-P)和甲醇完全氧化代谢的甲醛脱氢酶(FAD)的活性呈上升趋势(图 3),说明 *Pichia* 酵母从利用葡萄糖的生长阶段向利用甲醇进行外源蛋白表达的转变过程存在代谢流重新分配的过程。根据酶活变化大小,甲醛脱氢酶(FAD)和 6-P-葡萄糖脱氢酶(G-6-P)在甲醇诱导 10h 时比 0h 分别增加了 6.1 倍、2.5 倍,而糖酵解途径关键酶之一丙酮酸脱氢酶复合体(PDC)和三羧酸循环途径异柠檬酸脱氢酶则分别下降了 2.4 倍和 5.1 倍,由此表明甲醇诱导后三羧酸循环途径代谢流比例下降,而磷酸戊糖途径中代谢流通量上升,甲醇完全氧化代谢流成为主要代谢流。作者根据代谢物流分析(Metabolic Flux Analysis, MFA)方法,对其代谢流分布进行定量计算,结果与此基本相吻合(另文发表)。

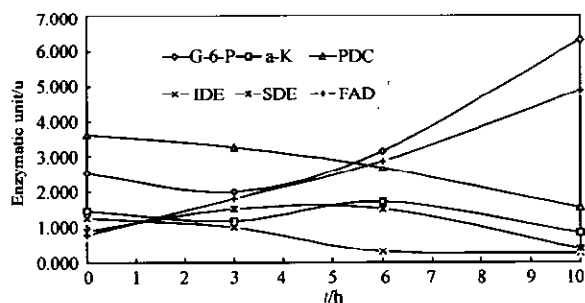


图3 过渡相甲醇代谢主要途径关键酶活性分析  
Fig. 3 Activities of key enzymes of methanol metabolism pathways at transition phase

## 2.4 过渡相工程植酸酶表达启动与离线和在线参数综合相关分析

根据重组毕赤酵母过渡相的在线参数图2和离线参数图4,相关分析可知GS115 phy-269以葡萄糖为碳源生长时,AOX酶活单位测定为零,说明葡萄糖对AOX的合成有阻遏作用,这与Ohi等<sup>[11]</sup>结果相一致。当底物葡萄糖转换为甲醇后,甲醇诱导3h时AOX酶活仍然检测不出,说明AOX1酶活极低,同时工程植酸酶表达速率( $R_{phy}$ )也极小(几乎测不出),而在甲醇诱导4h(55.78h)时检测出工程植酸酶活为205u,同时AOX酶活突然增大至 $6.89 \times 10^{-5} u$ ,此后重组植酸酶表达速率(参数R6)呈线性增加,速率为31.8u/h,由此说明 $P_{AOX1}$ 启动需要甲醇一定时间的诱导才能启动,但是一旦启动后,AOX1酶活单位与工程植酸酶表达速率( $R_{phy}$ )呈线性相关关系,相关系数( $r$ )达0.91,说明两参数之间存在一定的相关性;结合在线参数OUR和CER曲线分析,在线OUR、CER也明显增大,尤其是诱导0~4h阶段,与AOX酶活单位变化和工程植酸酶表达速率变化( $R_{phy}$ )呈相同的变化趋势。因此,可以从OUR和CER的变化来判断甲醇是否利用和启动子是否启动,即工程植酸酶是否启动表达,以此作为生产过程在线控制与分析的标准。

## 3 讨论

相关分析(Association analysis)方法是生物复杂系统近年来使用较多的分析方法,尤其是人的疾病与基因表型之间的关系<sup>[12]</sup>,从而推测不同性状特征与疾病之间的因果关系,但是基于数据(参数)的相关分析方法在微生物发酵过程复杂系统的过程优化研究中应用极少。张嗣良等<sup>[13]</sup>根据微生物发酵过程特点提出了微生物过程多尺度优化方法,其方法实质是采用发酵过程表征不同尺度的参数进行相

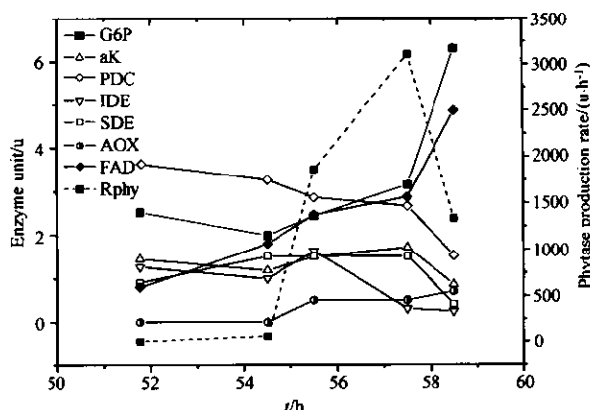


图4 过渡相离线参数图  
Fig. 4 Off-line parameters at transition phase during bioprocess

关分析,从一个尺度参数观察另一尺度现象,即跨尺度观察与控制。这种分析方法克服了以往单一因素优化的缺点,而是从反映不同尺度的生理参数、环境参数和其它状态参数进行综合分析。张明等<sup>[14]</sup>通过测定金霉素发酵过程中油浓度变化与在线参数进行相关分析得出油在发酵过程中至少有5个作用,并建立了在线参数变化标准,为工厂生产提供了操作指导。陈双喜等<sup>[15]</sup>根据测定发酵液中糖、 $NH_2-N$ 及产物鸟苷浓度与在线参数OUR、CER等进行参数相关分析,发现了发酵过程中代谢流的迁移现象,建立了提高产苷水平近一倍的在线参数控制工艺。本试验以重组毕赤酵母( $Mut^S His^+$ )表达工程植酸酶的过渡相参数进行相关分析,由于该表达系统为 $Mut^S$ 型,利用甲醇速率极慢,需要一定的甲醇诱导时间。我们在重组毕赤酵母发酵过程过渡相根据测定甲醇代谢途径关键酶活变化与在线参数OUR、CER、 $R_Q$ 、pH和离线参数产物工程植酸酶表达浓度进行综合参数相关分析,从在线参数(OUR和DO)变化可分析出甘油和葡萄糖碳源对AOX合成的阻遏强度不同。Ohi等<sup>[11]</sup>通过对AOX2启动子功能分析表明,在 $P_{AOX2}$ 中有三个顺式调控元件,AOX2-URS1正顺式调控元件位于 $P_{AOX2}$ 基因的-337至-313之间,相当于 $aox2$ 转录的起始位点,它是 $Mut^S$ 菌株甲醇诱导 $aox2$ 转录的响应区间,与 $Mut^+$ 菌株的 $P_{AOX1}$ 诱导启动转录所需的基因序列一致;另外还有2个负顺调控元件,即AOX2-URS1和AOX2-URS2,对甘油和葡萄糖等阻遏物质存在时阻遏 $aox2$ 转录,即阻遏 $P_{AOX2}$ 启动子转录,这种阻遏性强弱变化可能主要是由于重组毕赤酵母在代谢甘油和葡萄糖时形成的副产物如乙酸、乙醇等的程度不同引起,这在重组大肠杆菌表达系统高密度发酵时尤其突出<sup>[16]</sup>。

此外,根据甲醇代谢途径关键酶活性变化,推出各代谢途径流量分布的变化,即甲醇诱导后糖酵解途径和三羧酸循环途径代谢流比例下降,而磷酸戊糖途径中代谢流通量上升,甲醇完全氧化代谢流成为主要代谢流,同时也证实了在线参数 pH、OUR(CER)和 RQ 等相关分析的过渡相代谢途径的变化(如图 2)。从而,为我们实现跨尺度观察发酵过程变化及其控制提供了数据依据。

由于细胞内酶学分析的非实时性和分析方法的困难,在实际工业化生产时往往采用在线参数(数据)变化进行实时调控,但是要建立在线参数调控标准,由于关键酶活性的大小变化与非与代谢途径流量的大小变化有些呈线性关系,有些未必,因此在各参数间定量相关研究时需要进行筛选。作者认为首先通过 Microarray 技术进行代谢途径全基因变化分析<sup>[17]</sup>,筛选出关联基因,然后进行各基因的酶活分析,再结合在线参数进行综合相关分析,将对发酵过程优化与调控具有更直接的指导作用。

**致 谢** 感谢硕士研究生胡光星和叶新喏对酶单位的测定和发酵过程的调控。

## REFERENCES(参考文献)

- [1] Yao B (姚斌), Zhang CY (张春义), Fan YL (范云六). Overexpression of phytase activity gene in *Pichia pastoris*. *Chinese Science (Series C)* (中国科学, C 卷), 1998, 28(3): 237-243
- [2] Peng RH (彭日荷), Yao QH (姚泉洪), Guo MJ (郭美锦). High expression of a heat-stable phytase in *Pichia pastoris*. *Acta Biochimica et Biophysica sinica* (生物化学与生物物理学报), 2002, 34(6): 725-730
- [3] Cereghino J, Cregg JM. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *FEMS Microbiology Reviews*, 2000, 24: 45-66
- [4] Sreekrishna K, Kropp K. *Pichia pastoris*. IN: Wolf K. (ed.), *Non-conventional Yeasts in Biotechnology*. Berlin: Springer, 1996, pp. 203-252
- [5] Shim-ichino SY. Screening and identification of *Candida methanosorbosa* as alcohol oxidase-producing methanol using yeast. *Agric Biol Chem*, 1990, 54(5): 1297-1298
- [6] Allais J. Oxidation of methanol by yeast, *Pichia pastoris*, purification and properties of the formaldehyde dehydrogenase. *Agric Biol Chem*, 1983, 47(7): 1509-1516
- [7] Tadeusz P. The effect of various anions and cations on the regulation of pyruvate dehydrogenase complex activity from pig kidney cortex. *Biochem J*, 1988, 253: 819-825
- [8] Norris JR. *Methods in Microbiology* (Volume 6A), London and New York: Academic Press, 1971, pp. 411-439
- [9] Zhang RH (张若寒). Determination method for phytase. *Chinese Feed* (中国饲料), 1997, 5: 30-32
- [10] Chu J (储炬), Li YR (李友荣). *Modern Industrial Fermentation Monitoring and Controlling*. Beijing: China Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2003, pp. 274-281
- [11] Ohi H, Miura M, Ohmura T. The positive and negative cis-acting elements for methanol regulation in the *Pichia pastoris* AOX2 gene. *Mol Gen Genet*, 1994, 243: 489-499
- [12] Boomsma D, Busjahn A, Peltonen L. Classical twin studies and beyond traits. *Nature Reviews: Genetics*, 2002, 3(11): 872-882
- [13] Zhang SL (张嗣良), Chu J (储炬). *Multi-scale Optimization for Microorganism's Bioprocess*. Beijing: China Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2003, pp. 20-31
- [14] Zhang M (张明), Fan T (樊滔), Zhang SL (张嗣良). The affection of soybean oil in fermentation process with co-relation analysis of parameters. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, 16(6): 750-754
- [15] Chen SX (陈双喜), Cai XP (蔡显鹏), Zhang SL (张嗣良). Parameter co-relation of guanosine fermentation process. *Journal of East China Univ. of Sci & Tech* (华东理工大学学报), 2003, 29(5): 464-466
- [16] Lee SY. High cell-density culture of *Escherichia coli*. *Tibtech*, 1996, 14: 98-105
- [17] Ramon G, Han T, Ingram LO et al. Global gene expression differences associated with changes in glycolytic flux and growth rate in *Escherichia coli* during the fermentation of glucose and xylose. *Biotechnol Prog*, 2002, 18(1): 6-20

## Parameters-based Association Analysis for Recombinant Phytase Expression in Genetically Engineered *Pichia pastoris* at Transition Phase

GUO Mei-Jin<sup>1,2</sup> CHU Ju<sup>1</sup> ZHUANG Ying-Ping<sup>1</sup> HANG Hai-Feng<sup>1</sup> ZHANG Si-Liang<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, National Engineering Center for Biotechnology (Shanghai), East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

<sup>2</sup>(Department of Biotechnology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

**Abstract** Microbial fermentation process is a complex bio-system of multi-scale parameters. This report describes on-line and off-line parameters-based association analysis for recombinant phytase expression in genetically engineered *Pichia pastoris* at transition phase. According to the association analysis of on-line parameters of oxygen uptake rate (OUR) and dissolved oxygen (DO), the *aox* gene (alcohol oxidase) was repressed at transcription level by glycerol and glucose at different degrees, with glucose as a stronger repressor. Based upon the key enzymes' activities, at the transition phase, the recombinant *Pichia pastoris* had lower metabolic fluxes for glycolysis pathway and tricarboxylic acids cycle pathway; higher metabolic flux for HMP pathway, with the oxidation of methanol became a major pathway. These observations were consistent with the data from the association analysis for on-line and indirect parameters such as pH, OUR, CER and RQ. Additionally, this study revealed that gradual increase of OUR and CER signaled the successful induction of the P<sub>AOX1</sub> at the transition phase.

**Key words** Genetically engineered *Pichia pastoris*, recombinant phytase, transition phase, on-line parameter, enzyme activity analysis, parameter-based association analysis

Received: 04-19-2004

This work was supported by Grant from the State 863 High Technology R & D Project of China (No. 2002AA217021).

\* Corresponding author. Tel: 86-21-64252234; Fax: 86-21-64253702; Email: SiliangZ@163.net