

# 毕赤酵母高密度表达重组猪胰岛素前体的研究

刘玉伟 黄明志 庄英萍 储 炬 张嗣良

(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)

**摘要:** 对摇瓶和 50L 罐上的重组菌毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达猪胰岛素前体 (PIP) 的发酵过程进行了研究。摇瓶发酵中, 最佳诱导周期为 60 h 左右, 诱导期甲醇的最佳加入量为每日 2.0% ~ 2.5%。50L 发酵过程分为批发酵、补料和诱导表达 3 个阶段。生长期 (批发酵和补料阶段) 细胞干重与培养时间的关系可用模型  $y = 0.6525e^{0.1907t}$  来描述。在批发酵阶段和补料阶段, 流加的氨水和甘油几乎全部用来合成菌体和维持, 没有其他副产物产生。诱导表达阶段流加的氨水和甲醇分别约有 80% 和 70% 被菌体利用。将摇瓶与发酵罐的实验结果进行了比较, 发现摇瓶发酵的限制因子很可能是溶氧, 而罐发酵的限制因子为碳源, 因此, 将摇瓶实验的结果放大到发酵罐时调整了控制策略, 加大了甲醇的补料速率, 最终 PIP 浓度达到 1.72 g/L。

**关键词:** 巴斯德毕赤酵母, 高密度, 重组猪胰岛素前体

**中图分类号:** Q93 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2007) 01-0075-05

## High-density Expression of Recombinant Porcine Insulin Precursor by *Pichia pastoris*

LIU Yu-Wei HUANG Ming-Zhi ZHUANG Ying-Ping CHU Ju ZHANG Si-Liang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering ECUST, National Engineering Research Center for Biotechnology (Shanghai), Shanghai 200237)

**Abstract:** The recombinant porcine insulin precursor (PIP) produced by *Pichia pastoris* in shake-flask and 50L fermenter was investigated respectively. The results indicated that 60h induction time length and 2.0% ~ 2.5% methanol addition every day was optimum in shake-flask. The process in 50L fermenter was consisted of batch, feed-batch and induction phases. The relationship between dry cell weight ( $y$ ) and culture time ( $t$ ) in growth phase (batch and feed-batch phase) could be described by model  $y = 0.6525e^{0.1907t}$ . Glycerol and ammonia were almost used for cell growth and maintain, and no by-product was observed in batch and feed-batch phase. Only 80% ammonia and 70% methanol were used by cell in induction phase. By comparison the results of shake-flask and 50L fermenter, it was concluded that the limiting factor in the fermentation of shake-flask and 50L fermenter was dissolved oxygen (DO) and carbon source, respectively. When scaling the result of shake-flask to 50L fermenter, the control strategy was adapted for 50L fermenter by increasing the feed rate of methanol and the maximum PIP concentration reached 1.72 g/L.

**Key words:** *Pichia pastoris*, High-density fermentation, Recombinant porcine insulin precursor

基因工程菌大规模发酵生产重组人胰岛素目前被广泛采用<sup>[1]</sup>。在胰岛素表达系统中甲醇营养型毕赤酵母 (Methylotrophic *Pichia pastoris*) 具有日益成熟的高密度发酵工艺、表达量高、外源蛋白分泌性好、外源基因遗传性稳定、不会形成过糖基化等优点, 成为目前研究和应用最为广泛的表达系统之一<sup>[2]</sup>。对于 PIP 的生产, 目前文献上报道较多的是表达菌株的构造, 很少有从工艺角度进行优化。有报道<sup>[3]</sup>用毕赤酵母生产 PIP, 最终

PIP 的浓度达到 1.5g/L 的水平。本文对基因工程菌毕赤酵母高密度发酵表达 PIP 的工艺优化进行了研究, 在 50L 多参数全自动发酵罐上高密度发酵, 连续 3 批细胞光密度 (OD) 达 550 以上, PIP 的表达浓度达到 1.72 g/L 左右。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 菌种: 毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) GS115

菌株, Mut<sup>+</sup>, 载体 pFIC9K, 蛋白引导序列来自酿酒酵母  $\alpha$ -杂交因子 ( $\alpha$ -Mating Factor,  $\alpha$ -MF), 猪胰岛素原基因根据毕赤酵母偏爱密码子人工合成, 按 Multi-copy *Pichia* expression Kit (Version B) 经 *Sa*I 酶切、电转化至 GS115 细胞的染色体上, 含目的基因 6~8 个拷贝, 由本实验室保存。

**1.1.2 培养基:** YPG 平板培养基 (1L): Yeast extract 10g, Peptone 20g, Glycerol 10g, Agar 15g; YPG 种子培养基 (1L): Yeast extract 10g, Peptone 20g, YNB 7.5g, Glycerol 10g, 2mL 0.02 % Biotin; BSMG 摇瓶诱导培养基 (1L):  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  5g,  $\text{CaSO}_4$  0.465g,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  9g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  7.45g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  6.8g, 用 KOH 将 pH 调为 5.5; 罐基基础培养基 (1L):  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85 %) 26.7 mL,  $\text{CaSO}_4$  0.894g,  $\text{K}_2\text{SO}_4$  15.2g,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  14.9g, KOH 4.13g, Glycerol 40g, PTM1 4mL, 消泡剂 0.5mL; 补料生长培养基: 630.5g/L 甘油 (含 12mL/L PTM1); 补料诱导培养基: 791.0g/L 甲醇 (含 12mL/L PTM1); PTM1<sup>[4]</sup>。

## 1.2 方法

**1.2.1 摇瓶优化培养方法:** 采用 250 mL 三角瓶装液 25 mL 进行摇瓶培养, 接种量为 10%。培养所用的培养基为 BSMG。接种时同时补入 PTM1, 加入量为 12 mL/L。接种后 48 h 用 15 % 的 NaOH 调节 pH 至 5.5, 并每日补加适量体积比的甲醇进行诱导。此后每 24 h 重复以上调节 pH、补加甲醇的操作, 直至放瓶进行分析测定。

**1.2.2 补料高密度发酵方法:** 从新鲜 YPG 平板上挑一单菌落到种子培养基中, 30℃, 220 r/min 培养 20 h 左右, 按 5 % 接种量接入到装 20L 分批发酵培养基的 50L 发酵罐中进行分批培养 (用氨水调 pH 至 5.0), 当碳源甘油耗尽后, 溶氧 (Dissolved oxygen, DO) 陡然上升, 开始流加补料生长培养基 (控制流加速率维持溶氧大于 20 %)。当细胞光密度为 350 时停止甘油补料, 甘油耗尽后补入发酵诱导培养基进行诱导表达培养 (pH 用 28 % 的氨水控制为 5.0), 通过调节转速、罐压、空气流量和流加甲醇速度使溶氧大于 20 %, 并使发酵液中甲醇浓度小于 0.5 %, 诱导发酵 100 h 左右。50L 全自动发酵罐为华东理工大学国家生化工程技术研究中心 (上海) 提供。

**1.2.3 pH:** pH 电极在线检测并采用 PID 闭环控

制方式控制。

**1.2.4 溶氧:** 溶氧电极在线检测 (瑞士 Ingold 公司产品 CD951206)。

**1.2.5 尾气分析:** 排气  $\text{O}_2$  为热磁氧分析仪 (Magnos 4G) 在线检测; 排气  $\text{CO}_2$  采用不分光红外仪 (Uras3G) 在线检测; 单位发酵液体积细胞耗氧速率 (Oxygen Uptake Rate, OUR, mmol/(L/h)) 和单位发酵液体积细胞二氧化碳释放速率 ( $\text{CO}_2$  Evolution Rate, CER, mmol/(L/h)) 按文献[5]计算。

**1.2.6 甘油浓度分析:** 采用高碘酸钠氧化滴定法<sup>[6]</sup>。

**1.2.7 细胞光密度分析:** 菌液稀释后于波长 600nm 处以去离子水为对照进行比色测定  $OD = OD_{\text{读数}} \times \text{稀释倍数}$ 。

**1.2.8 细胞干重:** 10 mL 发酵液, 10,000 r/min 离心 10 min, 去上清, 水洗 2 次, 80℃ 烘干至恒重。对于菌株 PIP2.0-1 来说, 一个 OD 大约相当于 0.3 g dcw/L。

**1.2.9 甲醇浓度分析:** 气相色谱 (GC) 分析。

**1.2.10 目的蛋白 PIP 浓度的测定:** 培养结束后检测 PIP 浓度。将发酵液用 1.5 mL eppendorf 管 12,000r/min, 离心 15min, 上清液经 0.45 $\mu\text{m}$  膜过滤后进行 HPLC 分析。用安捷伦公司高效液相色谱仪, 色谱柱为 Phenomenex 公司 C5, 5 $\mu\text{m}$  粒径 (150 mm  $\times$  4.6 mm)。流动相: 溶液 A: 10 % 乙腈, 0.1 % 三氟乙酸; 溶液 B: 80 % 乙腈, 0.08 % 三氟乙酸。洗脱条件: 采用梯度洗脱方式。溶液 A 在 50 min 内由 100 % 降至 45 %, 溶液 B 在 50 min 内由 0 % 增大至 55 %; 流速: 1 mL/min; 柱温: 40℃。

## 2 结果与分析

### 2.1 摇瓶发酵条件优化

**2.1.1 接种量、温度、pH、甲醇添加量对发酵过程的影响:** 分别按种子液 ( $OD = 20$ ) 与发酵液的体积比为 6 %、8 %、10 %、12 %、14 % 接种; pH 按照 4.0、4.5、5.0、5.5、6.0 5 个梯度; 诱导过程温度按照 20℃、22℃、25℃、28℃、30℃; 每天按体积比为 1.0 %、1.5 %、2.0 %、2.5 %、3.0 % 的甲醇进行补加培养。结果 (数据未列出) 是当接种量为 10 %, pH 为 5.0, 温度为 28℃, 甲

醇添加量为每天 2.0 % ~2.5 % 时, PIP 的产率与比产率最高。从诱导过程中甲醇每日添加量及代谢情况看, 当甲醇的代谢消耗速率跟不上所加入的甲醇速率而在发酵液中累积时, 就会造成细胞大量中毒, 从而就限制了 PIP 的表达。因此, 只要甲醇是限制性的, 那么在一定程度上增大甲醇的添加量就是增大了诱导强度, 从而增大了外源蛋白 PIP 的表达量, 这与文献<sup>[7, 8]</sup>描述的相一致。

**2.1.2 发酵诱导过程中各时间点的生长、表达情况:** 按摇瓶培养方法培养细胞, 加入甲醇诱导 24 h 之后每隔 12 h 放瓶进行分析, 结果见表 1。从表 1 可以看出, 随着诱导时间的推移, 菌浓值并没有发生很大的变化, 上升幅度并不大。这是因为在经过一段时间的培养后, 细胞已经处于生长稳定

期, 具体表现为细胞生长速率和凋亡速率大体相等。但对于本实验菌株, 以甲醇作为单一的碳源诱导过程中, 菌体还会保持一定的比生长速率( $\mu$  约为  $0.0063h^{-1}$ ) 生长, 从而使细胞总数量有一定的增大。同时可以看到, 随着发酵过程的进行, PIP 产率在 60 h 这一点处达到最高, 而在 60 h 以后则开始下降, 出现这个现象的原因是发酵终点附近菌体开始自溶, 释放出大量的蛋白酶从而导致目标蛋白降解, 从而使 PIP 的产量下降所致。从这里可以看出, 在诱导 60 h 附近放瓶最佳, 既可以获得最高的目的蛋白产量, 又能够保证比较高的产率。

以下摇瓶数据均为 3 个发酵瓶的平均值。

表 1 发酵过程中生长表达规律

诱导时间 (h)	菌浓(摇瓶) (g DCW/L)	产率(摇瓶) (mg PIP/g DCW)	菌浓(罐) (g DCW/L)	产率(罐) (mg PIP/g DCW)
24	6.9	4.37	126.0	5.03
36	7.2	4.63	141.0	5.87
48	7.5	4.97	151.5	7.43
60	8.4	5.03	159.0	8.50
72	9.3	3.33	165.0	8.43

2.2 基因工程菌的发酵罐高密度发酵

**2.2.1 发酵过程的生长曲线 (图 1):** 分批发酵基因工程菌 *Pichia pastoris* 表达 PIP 的过程中细胞生长

模型: 在 50L 发酵罐上进行分批培养, 通过对细胞干重的对数 ( $\ln(xv)$ ) 与分批发酵时间 ( $t$ ) 进行线性回归, 得:  $\ln(xv) = 0.8393t - 1.3516$  (1)

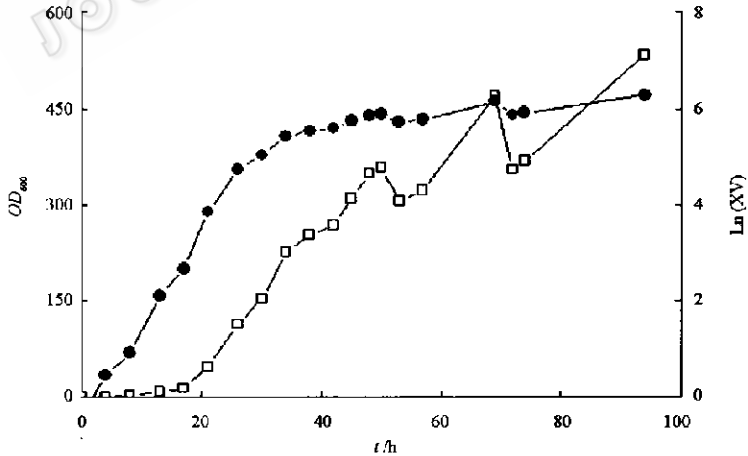


图 1 PIP 发酵过程的生长曲线

—□— Total cell, —●— Ln (Xv)

当  $\ln(xv) = 0$  时,  $t = 1.61h$ , 也就是说在接种量为 5%、接种 OD 值为 20 左右时该菌生长的迟

滞期为 1.61h。这可能是由于摇瓶种子培养基比发酵罐培养基营养物质更为丰富, 引起细胞初接入

发酵罐时出现了一段时间的适应期。分批发酵结束时发酵液中的 *OD* 达到 77.5, 对于该菌株来说, 一个 *OD* 大约相当于 0.3 g DCW/L, 菌体干重可达到 23.25g DCW/L。

假设在接种后到停止甘油补料时细胞干重 *y* 与时间 *t* 的关系符合指数生长模型:

$$y = ae^{bt} \tag{2}$$

式 2 两边取对数, 得:  $\ln y = \ln a + bt \tag{3}$

将  $\ln y$  对 *t* 进行线性回归, 得到  $a = 0.6525$ ,  $b = 0.1907$ , 线性相关系数  $R = 0.995$ , 即

$$y = 0.6525e^{0.1907t} \tag{4}$$

因此, 当碳、氮、氧源供应充足时, 可以按指数方程 (4) 来进行指数流加模式补料, 使之按照最大比生长速率 (0.1907/h) 下生长, 尽快达到高密度的诱导浓度, 但在实际实验中, 往往供氧是一个限制性因子, 尤其是高密度发酵。在细

胞生长的高密度发酵后期, 补料需根据发酵罐的供氧能力 (如氧传递速率) 和细胞的耗氧能力 (如氧耗速率) 等来进行操作。

**2.2.2 高密度发酵过程中氨水、碳源消耗与菌体生长、产物表达的定量关系:** 微生物发酵过程中 C、N、P、S 以及微量元素等在发酵过程中用来合成细胞结构材料、维持微生物生存的消耗能及用来生成产物。要达到高密度细胞, 合适的碳氮源比例非常重要。对于每一个发酵过程, 对过程中的主要基质做元素平衡, 分析发酵过程中基质的分配情况, 了解某一阶段是否有其他副产物产生, 有利于更好的指导发酵的进行。在氧源供应充足 (*DO* > 20%) 时 PIP 发酵过程中甘油、甲醇和氨水与菌体生长和表达的关系如图 2, 对碳、氮源进行物料衡算, 结果如表 2 所示。

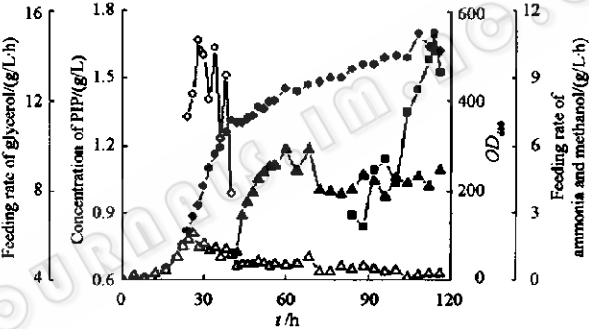


图 2 高密度发酵过程中碳、氮源消耗与菌体生长和表达的关系

■ PIP, ● *OD*<sub>600</sub>, △ Feeding rate of ammonia,  
▲ Feeding rate of methanol, ○ Feeding rate of glycerol

表 2 发酵各阶段消耗的碳氮及其分配

	消耗的 N (mol)	菌体中 N (mol)	产物中 N (mol)	消耗的 C (mol)	菌体中 C (mol)	产物中 C (mol)	CO <sub>2</sub> (mol)
批发酵阶段	7.56	5.23	0.00	27.90	22.39	0.00	4.82
甘油补料阶段	22.20	23.70	0.00	108.76	101.63	0.00	15.64
诱导阶段	45.67	36.08	0.77	410.89	154.63	3.02	88.00

批发酵阶段, 发酵液中甘油的碳原子数与生成的菌体中碳原子数、CO<sub>2</sub> 中的碳原子数之和几乎相等, 说明基础培养基中 4 % 的甘油全部用来菌体生长和菌体维持。此阶段补入的氨水只有 22.39/4.28 = 5.23mol (菌体的分子式为 C<sub>6</sub>H<sub>10.24</sub>N<sub>1.4</sub>O<sub>3.07</sub>) 用来作为菌体中的氮组分, 其他部分是用来中和生长时产生的酸性物质以维持菌体的生

长环境。甘油批发酵阶段和甘油补料阶段, 甘油的转化率 (*Y<sub>x</sub>/gly*) 为 72.47%, 接近于理论转化率 (82.6%)。氨水也全部用来构成菌体。没有副产物产生。诱导阶段消耗的甲醇只有约 70% 被转化到菌体、产物及作为维持能, 其他大约 30% 的甲醇可能由于通气量大而被挥发损耗了。补入的氨水中有 80% 的 N 原子转化到菌体及产物中, 其

余的 20% 残留在发酵液中或随通气挥发了。因此, 如何控制甲醇的挥发, 减少甲醇的损失是我们下一步将要解决的问题。

**2.2.3 摇瓶与发酵罐的比较:** 将摇瓶表达的优化结果进行补料分批高密度发酵。摇瓶直接放大到 50L 罐每日需甲醇量远远小于 50L 罐发酵实际每日所补的甲醇量 (数据未列出)。但从甲醇残余浓度看, 摇瓶的碳、氮源并没有受到限制, 由此推测摇瓶培养时限制性因子很可能为溶氧, 这是 *Pichia pastoris* 高密度发酵的主要限制因素之一。而罐发酵过程中通过调节甲醇补料速率来控制溶氧浓度大于 20%, 所以罐发酵的限制是碳源。这也就是造成罐发酵的 PIP 产率明显大于摇瓶的原因 (见表 1)。根据摇瓶与发酵罐限制因素的不同, 将摇瓶表达的优化结果做相应的调整, 比如加大补料速率, 将接种量变成 5%, 其他按照高密度发酵培养方法再进行补料分批高密度发酵。最终摇瓶、发酵罐产物对甲醇的得率 [ $Y_{(PIP/methanol)}$  (mg/g)] 分别为 1.78 和 9.29。

### 3 结论

高密度发酵是基因工程菌提高外源蛋白表达量的重要策略之一。目前发酵过程中一般认为酵母细胞密度为 100~200g DCW/L 则为高密度发酵。本文首先在摇瓶上对 PIP 的表达条件进行了初步优

化, 然后将摇瓶实验结果在 50L 发酵罐上进行实验。经分析可知摇瓶发酵是因为氧限制而不能充分的利用甲醇来进行生长和诱导, 因此也就限制了 PIP 的表达。在 50L 发酵罐上对一些参数进行了调整, 如加大甲醇补料速率, 将接种量由摇瓶的 10% 调整为 5% 等, 连续 3 批发酵, 毕赤酵母的细胞光密度均可达到 550 左右, 即细胞干重浓度可达到 165g DCW/L, 达到了高密度发酵的目的, 并且 PIP 的表达浓度达到 1.72 g/L。物料衡算结果表明, 甘油批发酵阶段和甘油补料阶段, 流加的氨水和甘油几乎全部用来合成菌体和菌体维持, 没有其他副产物产生。诱导表达期氨水、甲醇分别约有 80%、70% 被利用。

### 参考文献

- [1] Shin C S, Hong M S. *Biotechnol Prog*, 1997, 13 (3): 249~257.
- [2] Gellissen G, Hollenberg C P. *Gene*, 1997, 190: 87~97.
- [3] Yan W, You S Z, Feng Y M. *Biotech Bioeng*, 2001, 73 (1): 74~79.
- [4] Trinh L B, Phue J N, Shlnach J. *Biotech Bioeng*, 2003, 82 (4): 438~444.
- [5] 俞俊堂, 唐孝宜. 生物工艺学. 上海: 华东理工大学出版社, 1997. 145~147.
- [6] 傅伍晓. 化学世界, 1953, 8 (10): 366-36.
- [7] 周祥山. 生物工程学报, 2003, 19 (5): 618~622.
- [8] Marc C A, Andrew J. *Biotech Let*, 2000, 22 (5): 341~346.

### • 活动信息 •

## 化学工业出版社乔迁新址暨生物·医药出版分社成立 读者俱乐部金卡会员抢注活动

化学工业出版社是国内生物、医药出版领域的重要机构。为庆祝化工社乔迁新址、及生物·医药出版分社成立, 特举办读者俱乐部金卡会员抢注活动, 活动期间一经注册立即成为金卡会员, 享受化工版图书 85 折购书优惠及多项特别服务。

活动时间: 2006 年 12 月 1 日至 2007 年 2 月 28 日

注册页面: <http://www.cip.com.cn/member/register.jsp>

新社新址: 北京市东城区青年湖南街 13 号 (邮编: 100011)

生物编辑部: 010-64519348

药学编辑部: 010-64519296

农业编辑部: 010-64519352

大众健康编辑部: 010-64519361

《生物技术产业》期刊部: 010-64519292