

重组人血清白蛋白发酵过程生长期的代谢计算

黄明志 郭美锦 储 炬 杭海峰 庄英萍 张嗣良*

(华东理工大学生物反应器国家重点实验室 上海 200237)

摘 要 结合元素平衡和代谢平衡,建立了重组人血清白蛋白发酵过程生长期的数学模型,并按单纯形多变量最优化方法估算了模型的未知参数。该模型能较好地描述重组人血清白蛋白发酵过程生长期中各宏观反应速率之间的关系,为重组人血清白蛋白宿主菌—*Pichia pastoris* 的高密度培养提供了依据。

关键词 重组人血清白蛋白(rHSA),代谢平衡,元素平衡,*Pichia pastoris*

中图分类号 Q939.97 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2000)05-0631-05

人血清白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)大量应用于临床,全世界年销售量 600 吨左右。目前 HSA 主要靠收集人的血液通过分级过滤获得,但人血来源极其复杂,容易受到肝炎、艾滋病等传染病的污染。为了缓解这些矛盾,通过基因工程技术把 HSA 基因克隆到微生物上进行高效表达是一种较有前途的方法。重组人血清白蛋白(rHSA)的众多表达系统中,甲醇酵母(尤其是 *Pichia pastoris*)表达系统以其表达稳定、表达效率高及产物分泌到胞外等优点而得到了广泛重视^[1]。

以 *Pichia pastoris* 为宿主菌的 rHSA 发酵过程可分为生长期和表达期两个阶段。在生长期, *Pichia pastoris* 以甘油作为碳源和能源;在表达期,甲醇既是碳源和能源,同时又是诱导物。高密度培养是提高 rHSA 产量的重要途径,但高浓度甘油对 *Pichia pastoris* 生长有抑制作用。因此,控制甘油流加速率,维持发酵液中甘油浓度在某一范围内,使其既能满足菌体需要又不致对菌体生长产生抑制作用,对 rHSA 发酵过程有着重要意义,但国内外有关这方面的研究报道得很少。我们利用自行研制的生物过程在线监控系统所取得的现场数据,结合元素平衡和代谢平衡方法对 rHSA 发酵过程生长期进行了研究,取得了相当满意的结果。

1 材料方法

1.1 供试菌株

Pichia pastoris GS115 菌株,遗传表型 aox⁺ his⁺,醇氧化酶启动子 P_{AOX1},载体 pPIC9K,蛋白引

导序列来自酿酒酵母的 α -杂交因子 AMF,外源基因为 HSA,载体呈线型整合在染色体上。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 按文献 2 配制。

1.2.2 基础培养基 按文献 3 配制。

1.3 分析方法

1.3.1 酵母细胞密度分析:菌液稀释后于波长 600nm 处以去离子水为对照比色测定。

$$OD_{600} = OD \text{ 读数} \times \text{稀释倍数}$$

1.3.2 甘油测定方法:高碘酸钠氧化滴定法^[4]。

1.3.3 NH₂-N 测定:甲醛滴定法^[5]。

1.3.4 蛋白质测定:考马斯亮蓝显色法^[6]。

1.4 发酵过程与数据采集

以 10% 的接种量接种到装料 150L 的 500L 试验罐,维持温度在 30℃ 左右,依次调节搅拌转速、空气流量和罐压以维持 DO 在 20% 以上,并且用氨水调节 pH 在 5~6 之间。当甘油耗尽时开始流加甘油,流加速率按经验或利用本文结果设定。

在 500L 试验罐上,设计了一套生物过程在线监控系统软件,以 1 次/min 的频率在线检测温度、溶氧、pH、转速、空气流量、发酵液体积、罐压、补甘油总量、补甲醇总量、补氨水总量、补甘油速率、补甲醇速率、补氨水速率、尾气中氧和二氧化碳的百分含量等 15 个参数,计算 OUR、CER、K_La、RQ 等间接参数,同时提供了离线参数输入界面,供用户实时输入产物 rHSA 浓度、甘油浓度、甲醇浓度和菌体浓度等离线参数值。

在线测量的数据,不可避免地存在着噪声。噪

收稿日期 2000-01-25,修回日期 2000-06-05。

基金项目 国家自然科学基金资助项目(29976013)。

* 联系人。

声一般是高频正弦波信号,可以通过滑动平均方法将它们过滤^[7]:

$$x(k) = \frac{1}{M} \sum_{m=0}^{M-1} x(k-m)$$

本文中, $M=20$ 。

2 元素平衡和代谢平衡

元素平衡和代谢平衡方法的基本理论见文献[8]。

2.1 元素平衡

rHSA 发酵过程生长期中,理论上 5 个 ($n=5$) 宏观反应速率可以测定,分别是甘油消耗速率 r_{gly} 、菌体生长速率 r_x 、氨消耗速率 r_n 、氧消耗速率 r_o 和二氧化碳生成速率 r_c 。考虑碳、氮和氧化还原度(氧和氢元素的综合表达)^[9] 3 种元素 ($m=3$) 的平衡,则有如下关系式:

$$BR_E = 0$$

$$B = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & C_{nx} & 1 & 0 & 0 \\ \gamma_{\text{gly}} & \gamma_x & \gamma_n & \gamma_o & \gamma_c \end{bmatrix} \quad (1)$$

$R_E = [r_{\text{gly}} \ r_x \ r_n \ r_o \ r_c]^T$ 。式(1)中 C_{nx} 是菌体中氮的含量。

R_E 有 5 个分量,式(1)中有 3 个线性方程,根据线性代数理论,模型自由度 $f=5-3=2$,故 R_E 中只有 2 个分量可自由变化,其他 3 个分量可由式(1)求出。令 $R_{E1} = [r_{\text{gly}} \ r_x]^T$, $R_{E2} = [r_n \ r_o \ r_c]^T$, B_1 取 B 的前两列, B_2 取 B 的后三列,式(1)可改写为:

$$[B_1 \ B_2] \begin{bmatrix} R_{E1} \\ R_{E2} \end{bmatrix} = 0$$

则

$$R_{E2} = -B_2^{-1} B_1 R_{E1} \quad (2)$$

2.2 代谢平衡

根据元素平衡,甘油消耗速率 r_{gly} 和菌体生长速率 r_x 可以自由变化,但 rHSA 发酵过程生长期中只有 r_{gly} 可由实验人员通过调节甘油流加速率来控制(甘油为限制性基质)。因此,必须结合菌体内部的代谢平衡,进一步降低模型的自由度。

为了便于生长期 *Pichia pastoris* 菌体内部的代谢平衡研究,根据甘油在酵母细胞内的代谢情况^[10]

和代谢平衡研究的需要,我们将生长期 *Pichia pastoris* 菌体内部的代谢途径简化为图 1,它主要由下述 4 个总反应组成。

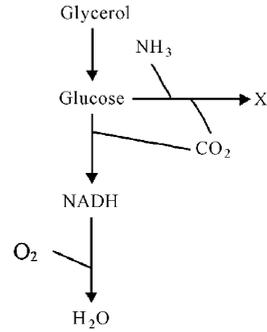
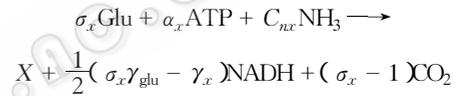


图 1 *Pichia pastoris* 生长期代谢途径简图

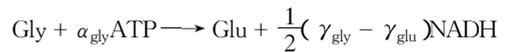
Fig. 1 Simplified metabolic scheme for *Pichia pastoris* growth phase

2.2.1 菌体生长:



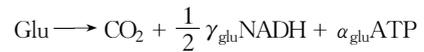
菌体通过 EMP、TCA 和 HMP 等途径利用甘油转化而来的葡萄糖,以氨水作氮源,ATP 为能量,经过一系列生化反应合成菌体。在生物合成过程中,由于脱羧等作用,会有一部分碳源转化为二氧化碳。

2.2.2 甘油转化为葡萄糖:



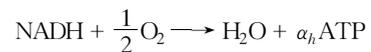
引入葡萄糖的目的是为了能将研究结果与相关文献的结果相比较。

2.2.3 葡萄糖分解:



产生的 ATP 是底物磷酸化的结果。

2.2.4 氧化磷酸化:



氧化磷酸化所产生的 ATP 为菌体生长和维持提供了能量。

令 $E = [\text{Gly} \ \text{X} \ \text{Glu} \ \text{ATP} \ \text{NADH} \ \text{NH}_3 \ \text{O}_2 \ \text{CO}_2 \ \text{H}_2\text{O}]^T$, 上述 4 个反应可表示为: $ZE = 0$

$$Z = \begin{bmatrix} 0 & 1 & -\sigma_x & \alpha_x & \frac{1}{2} (\sigma_x \gamma_{\text{glu}} - \gamma_x) & -C_{nx} & 0 & \sigma_x - 1 & 0 \\ -1 & 0 & 1 & -\alpha_{\text{gly}} & \frac{1}{2} (\gamma_{\text{gly}} - \gamma_{\text{glu}}) & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \alpha_{\text{glu}} & \frac{1}{2} \gamma_{\text{glu}} & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & \alpha_h & -1 & 0 & -\frac{1}{2} & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

根据文献 [8] 所介绍的方法处理上式, 得到 r_x 和 r_{gly} 的关系:

$$\gamma_x = \frac{\alpha_{gly} - \alpha_{glu} - \frac{1}{2}\alpha_h\gamma_{gly}}{\alpha_x + \sigma_x\alpha_{glu} + \frac{1}{2}\alpha_h\gamma_x} \gamma_{gly} \triangleq Y_{x/s}\gamma_{gly} \quad (3)$$

应用了代谢平衡之后模型的自由度降为 1, 即 R_E 中只有 γ_{gly} 一个分量可自由变化, 其他分量受其控制。结合元素平衡结果式 (2), 得 r_x 、 r_n 、 r_o 、 r_c 与 r_{gly} 之间的关系为

$$\begin{bmatrix} r_x \\ r_n \\ r_o \\ r_c \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} Y_{x/s} \\ -c_{nx}Y_{x/s} \\ \frac{1}{4}(\gamma_{gly} - \gamma_x Y_{x/s}) \\ -(1 + Y_{x/s}) \end{bmatrix} r_{gly} \quad (4)$$

3 结果与讨论

$$\begin{bmatrix} \mu \\ q_o \\ q_c \\ q_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} \frac{\alpha}{\beta} \\ \frac{1}{4}(\gamma_{gly} + \frac{\alpha}{\beta}\gamma_x) \\ -(1 + \frac{\alpha}{\beta}) \\ -C_{nx}\frac{\alpha}{\beta} \end{bmatrix} q_{gly} + \begin{bmatrix} -\frac{\lambda}{\beta} \\ -\frac{\lambda\gamma_x}{4\beta} \\ \frac{\lambda}{\beta} \\ c_{nx}\frac{\lambda}{\beta} \end{bmatrix} \triangleq Cq_{gly} + D \quad (6)$$

上式两边同乘以 X 并在时间 (t_1 t_2) 内积分, 得

$$\begin{bmatrix} X(t_2) - X(t_1) \\ \int_{t_1}^{t_2} r_o dt \\ \int_{t_1}^{t_2} r_c dt \\ \int_{t_1}^{t_2} r_n dt \end{bmatrix} = C \int_{t_1}^{t_2} r_{gly} dt + D \int_{t_1}^{t_2} X dt \quad (7)$$

rHSA 发酵过程生长期模型式 (4) 及其相关子式的模型参数中, 各物质的氧化还原度 γ_i 可由该物质的元素组成确定, $C_{nx} = 0.14$; 根据文献 [10], 取 $\sigma_x = 1.1$, $\alpha_x = M_x/Y'_{ATP} = 30.17/10.5 = 2.87$; 根据有关代谢途径, $\alpha_{gly} = 2/6 = 1/3$, $\alpha_{glu} = 4/6 = 2/3$; 模型中还有两个参数 m_x 和 α_h 未知。

把上述已知的模型参数代入式 (7), 利用生物过程在线监控系统所取得的现场数据 r_o 、 r_c 、 r_{gly} 和 X , 按单纯形多变量最优化方法估算出 m_x 和 α_h 及其 95% 可信区间为:

$$m_x = 0.2685 \pm 0.1544 \quad \alpha_h = 1.845 \pm 0.8769$$

3.2 模型验证

酵母的氧化磷酸化水平 α_h 在 1.5~2.5 之间, 维持系数 m_x 比较小^[11], 这和本文结果相一致。

3.1 模型参数估算

rHSA 发酵过程生长期模型式 (4) 中并没有考虑到菌体维持, 令 $\alpha_x = \alpha_x + m_x/\mu$, 其中 m_x 为菌体维持系数 (molATP/C - mol h), 代入式 (3) 中 $Y_{x/s}$ 的表达式:

$$Y_{x/s} = \frac{\alpha_{gly} - \alpha_{glu} - \frac{1}{2}\alpha_h\gamma_{gly}}{(\alpha_x + \sigma_x\alpha_{glu} + \frac{1}{2}\alpha_h\gamma_x) + m_x/\mu}$$

$$\triangleq \frac{\alpha}{\beta + \lambda/\mu} = \frac{\alpha\mu}{\beta\mu + \lambda}$$

式 (3) 两边同除以 X 并代入 $Y_{x/s}$ 的表达式, 整理后得

$$Y_{x/s} = \frac{\alpha}{\beta} - \frac{\lambda}{\beta q_{gly}} \quad (5)$$

式 (4) 两边除以 X 并将式 (5) 代入, 得

把模型参数代入式 (6) 得

$$C = \begin{bmatrix} -0.6586 \\ 0.5534 \\ -0.3414 \\ 0.0922 \end{bmatrix}, D = \begin{bmatrix} -0.0381 \\ -0.0355 \\ 0.0381 \\ -0.0053 \end{bmatrix}$$

根据在线测定的 r_{gly} , 利用式 (7) 对各时间间隔内的 r_c 、 r_o 和 r_n 进行预报, 在线测定结果与模型预报结果如表 1 所示。

从表 1 可以看出, 式 (7) 能较好地预报出 r_o 和 r_c 、 r_o 和 r_c 的最大预报偏差分别为 5% 和 15% 左右, 但两者的预报偏差都是呈随机分布。预报的氨消耗速率 r_n 与实际流加的氨水总量之间有相当大的差别, 这可能是由于流加的氨水有一部分挥发而被空气带走了, 同时也可能是氨水主要起维持 pH 的作用, 仅有一部分用于菌体的生长。

从式 (6) 提取出第一项, 得

$$\mu = -0.6586q_{gly} - 0.0381 \quad (8)$$

令 $\mu = 0$, 解式 (8), 得 $q_{gly} = -0.05785$, 这是菌体维持所需要的甘油比流加速率。在实验过程中, 甘油比流加速率的绝对值必须大于 0.05785 以满足菌体生长需要。对式 (8) 进行变换, 得

$$\mu = -0.6586q_{gly} - 0.0381 \quad (9)$$

式(9)即为甘油的比流加速率方程。在 rHSA 发酵过程中,我们利用该方法控制甘油的流加速率,

在生长期 *Pichia pastoris* 的 OD_{600} 达到 700 左右 表达期 rHSA 浓度达到相当高水平。

表 1 在线测定结果与模型预报结果比较(单位 C-mol 或 mol)

Table 1 Comparison of the data of online measured and the results of model predicted(Unit C-mol or mol)

NO.	$\int r_{gly}dt$ (supplies)	$\int r_i dt$ (measured)	$\int r_i dt$ (predicted)	$\int r_i dt$ (measured)	$\int r_i dt$ (predicted)	$\int r_i dt$ (supplied)	$\int r_i dt$ (predicted)
1	-159.92	90.87	95.86	-138.63	-126.97	-14.96	-8.97
2	-90.14	60.29	62.27	-81.93	-79.25	-10.12	-3.90
3	-217.07	140.72	159.30	-201.04	-199.56	-21.06	-8.09
4	-158.72	108.89	126.42	-152.59	-155.19	-15.20	-4.52
5	-156.96	114.33	127.80	-152.22	-156.06	-20.04	-4.08
6	-157.52	89.74	83.57	-123.05	-114.94	-18.41	-10.35
7	-164.79	101.52	92.61	-124.55	-125.08	-18.01	-10.10
8	-179.46	120.35	110.24	-149.97	-144.97	-17.58	-9.69
9	-154.80	113.13	107.61	-137.78	-136.73	-13.83	-6.61
10	-70.44	58.33	64.53	-71.69	-76.73	-6.64	-0.83
11	-147.61	147.26	138.02	-175.81	-163.39	-13.23	-1.34
12	-136.24	125.11	120.71	-136.40	-144.58	-12.50	-2.17

4 结 论

综上所述,我们认为结合元素平衡和代谢平衡方法来建立 rHSA 发酵过程生长期的数学模型是可行的。该方法克服了传统建模方法中参数意义不明、输入输出关系难以解释等缺点,充分利用了发酵过程的生物学知识,模型参数都有着其物化或生物学意义。该建模方法有很大的通用性和伸缩性,可应用于不同的发酵过程,而且随着要平衡的元素数目的增加或对菌体内部代谢过程认识的深入,已建立的模型可被进一步扩展。

主要符号说明

- α_i —— i 物质的能量系数(mol·C-mol⁻¹或 mol·mol⁻¹)
 C_{ni} —— i 物质的氮含量(g·g⁻¹)
 m_x ——菌体维持系数(mol·C-mol⁻¹·h⁻¹)
 q_i —— i 物质比生成或消耗速率(C-mol·C-mol⁻¹·h⁻¹)或
 (mol·C-mol⁻¹·h⁻¹)
 r_i —— i 物质或第 i 个代谢反应的反应速率(C-mol·h⁻¹)或
 (mol·h⁻¹)
 μ ——比生长速率(h⁻¹)
 γ_i —— i 物质的氧化还原度(mol·mol⁻¹)
 σ_i ——生物合成 i 物质所需的碳源数量(C-mol)

参 考 文 献

- [1] 何 诚,朱运松. 生物工程进展,1998,18(3):7~11
 [2] Multi-copy *Pichia* Expression Kit(Version B),Catalog No :K1750-01
 [3] Wolf K(ed.). Non-convention yeast in Biotechnology, Springer Berlin,1996, pp. 203~252
 [4] 傅伍尧. 化学世界,1953,8(10):366~367
 [5] 朱 俭等. 生物化学实验,上海:上海科学技术出版社,1981, pp. 61~63
 [6] 金冬雁等译. 分子克隆实验指南(第二版),北京:科学出版社,1998, pp. 880~887
 [7] Gonzalo A *et al.* J Ferment Bioeng,1998,85(6):615~623
 [8] Stouthamer A H. Quantitative Aspects of Growth and Metabolism of Microorganisms, Kluwer Academic Publisher Group, London,1992, pp. 257~274
 [9] Minkovich I G. Biotechnology and Bioengineering,1983,25:1267~1271 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

[10] 王正祥 , 诸葛健 . 生物工程进展 , 1999 , 19 (5) 34 ~ 39

[11] Stouthamer A H. Quantitative Aspects of Growth and Metabolism of Microorganisms , Kluwer Academic Publisher Group , London , 1992 , pp. 325 ~ 354

Metabolic Calculation of the Growth Phase in rHSA Fermentation

HUANG Ming-Zhi GUO Mei-Jin CHU Ju HANG Hai-Feng ZHUANG Ying-Ping ZHANG Si-Liang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering ECUST , Shanghai 200237)

Abstract The model equations of the growth phase of rHSA fermentation were derived on the base of both elemental balance and metabolic balance. The unknown parameters of the model were estimated by multivariable optimization. The model can preferably describe the relations between different macroscopic reaction rates of the process and provide the key for the high-density cultivation of *Pichia pastoris*.

Key words Recombinant human serum albumin (rHSA) , metabolic balance , elemental balance , *Pichia pastoris*