

表达血管生长抑制素的重组毕赤酵母 在诱导阶段混合碳源的流加

谢静莉¹ 周庆玮² 张 励¹ 叶 勤^{1*} 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生物化学与细胞生物学研究所,上海 200031)

摘 要 为进行高密度发酵并实现外源基因的高表达,在表型为 Mut^S 的重组毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达人血管生长抑制素的诱导阶段,采用了甘油-甲醇混合补料的培养方式。以溶氧水平作为甘油代谢指针来控制甘油限制性流加既可维持一定菌体生长,又不会发生发酵液中残余甘油及有害代谢产物(乙醇)阻遏蛋白表达。当表达阶段的菌体平均比生长速率控制于 0.012 h⁻¹,菌体浓度达 150 g/L,血管生长抑制素浓度最高达到 108 mg/L,血管生长抑制素的平均比生产速率为 0.02 mg/(g·h),菌体关于甘油的表现得率为 0.69 g/g,菌体关于甲醇的表现得率为 0.93 g/g,较没有采用甘油限制性流加时都有所提高。

关键词 血管生长抑制素,甘油流加,溶氧,巴斯德毕赤酵母

中图分类号 TQ920.6 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)04-0467-04

巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)是一种甲醇营养型酵母,具有醇氧化酶(AOX),其醇氧化酶基因有 *aox1* 和 *aox2*,其中 *aox1* 启动子为强启动子,细胞中绝大部分醇氧化酶的活力由 *aox1* 提供^[1]。当作为宿主的巴斯德毕赤酵母的 *aox1* 结构基因被外源基因所替换,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,更有利于蛋白的正确折叠^[2]。

血管生长抑制素(Angiostatin)是一个 38 kD 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而达到阻断肿瘤细胞转移通路、萎缩肿瘤的治疗目的^[3]。由于内皮细胞的突变率很低,不会产生抗药性,因而血管生长抑制素具有较大的优越性,且动物试验结果良好,是目前较为看好的抗癌新药。采用 Mut⁺ 表型毕赤酵母表达人血管生长抑制素的产量为 18 mg/L(全发酵液)^[4]。本研究所采用的表达血管生长抑制素的重组毕赤酵母^[5]具有 Mut^S 表型。该菌株在表达阶段以甲醇为唯一碳源时生长缓慢,菌体浓度低于 50 g/L,血管生长抑制素的表达量仅为 9~20

mg/L。为实现菌体的高密度培养和提高血管生长抑制素的表达量,在发酵过程中的表达阶段,采用甲醇浓度检测与控制系统对甲醇流加进行自动控制的同时,流加甘油维持菌体的生长。由于甘油对 *aox1* 启动子的阻遏作用,发酵液中的残余甘油浓度的控制对提高血管生长抑制素的表达至关重要。甘油浓度的离线检测需要花费一定时间,这样必然会造成甘油流加控制的滞后,也难以随时跟踪甘油浓度,因此,寻求简易且可靠的方法是本研究的目的。

发酵罐中的溶氧水平是一个反映细胞呼吸代谢的状态变量,发酵液中碳源的水平可以由溶氧的变化直观地反映^[6]。同时,反应器的供氧能力对碳源的流加速率也有限定作用,高细胞密度下碳源流加过量会导致摄氧率超过反应器的传氧速率,从而引起氧限制和代谢溢流^[7]。由于溶氧对碳源浓度变化十分敏感,因此本研究中采用溶氧水平作为甘油流加控制的指针。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:重组毕赤酵母是以 *Pichia pastoris*

收稿日期 2003-01-09,修回日期 2003-04-10。

基金项目 教育部科学技术研究重点项目(No.99166)资助及上海市重点学科基金部分资助。

* 通讯作者。 Tel 86-21-64252095; Fax: 86-21-64253904; E-mail: yq@cust.edu.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

GS115 为宿主,整合血管生长抑制素 cDNA 和 *his4*, 具有 His⁺ 和 Mut^s 表型,由中科院上海生物化学与细胞生物学研究所甘人宝课题组构建^[5]。

1.1.2 培养基:种子培养基(BMGY) 1 L 含:YNB 13.4 g,甘油 10 mL,生物素 0.4 mg,1 mol/L pH 6.0 磷酸缓冲溶液 100 mL,酵母抽提物(英国,Oxoid) 10 g,水解酪蛋白(日本,日本制药株式会社) 20 g。

发酵培养基(BSM) 1 L 含:85%磷酸 26.7 mL, CaSO₄ 0.93 g, K₂SO₄ 18.2 g, MgSO₄·7H₂O 14.9 g, KOH 4.13 g,甘油 40 g, PTM1 溶液 4.35 mL, 28% 氨水调 pH 至 5.0。

PTM1 溶液 1 L 含:CuSO₄ 6.0 g, KI 0.8 g, MnSO₄ 3.0 g, Na₂MoO₄ 0.2 g, H₃BO₃ 0.2 g, CoCl₂ 0.5 g, ZnCl₂ 20.0 g, FeSO₄·7H₂O 65.0 g, 生物素 0.2 g, 硫酸 5 mL。

1.2 方法

1.2.1 培养:一级种子:将菌种冷冻甘油悬液融化后,接 0.7 mL 于装有 25 mL 种子培养基的 250 mL 摇瓶中,30℃ 旋转摇床 250 r/min 培养 14 h。

二级种子:将一级种子接种于 3 个分别装有 50 mL 种子培养基的 500 mL 摇瓶中,30℃ 旋转摇床 250 r/min 培养 7 h。

发酵:5 L 发酵罐装 2.5 L 发酵培养基,接种量 7%,温度 30℃,pH 5.0,通气量 4 L/min,DO 不低于 20%。甘油耗尽后,饥饿 0.5 h 开始流加 50% (W/W) 甘油溶液(加 PTM1 12 mL/L),至菌体密度达 64 g/L 左右饥饿 0.5 h,开始诱导重组蛋白表达,流加甲醇(加 PTM1 12 mL/L),同时流加 50% (W/W) 甘油溶液(加 PTM1 12 mL/L)。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。

1.2.2 甲醇的在线检测与控制:发酵液中甲醇的在线检测及甲醇流加控制系统包括甲醇采样器、检测器和 FC-180B 型甲醇浓度监控仪三个部分,由生物反应器工程国家重点实验室李凡超研制提供。甲醇采样器插入发酵液中,液相中的甲醇通过采样器的薄膜扩散进入采样器的空气流中,带入检测器中测定甲醇含量,在一定的空气流量和温度下,检测器输出的电信号与发酵液甲醇浓度有线性关系。发酵过程中的甲醇浓度控制在 5 g/L。

1.2.3 测定方法:菌体浓度测定采用浊度法,发酵液经稀释后于波长 600 nm 测光密度(*OD*₆₀₀),根据在线性范围内由菌体浓度(干重)和对应的 *OD*₆₀₀ 绘制的标准曲线计算干重。血管生长抑制素的测定采

用 ELISA 方法^[5]。氨离子浓度采用 Berthelot 比色法^[8],发酵过程中甲醇和乙醇浓度的离线检测采用气相色谱法^[9](GC112A 型气相色谱仪,上海分析仪器厂),填充柱填料为苯乙烯-二乙烯苯(Chromosorb 101 美国 Dikma),甘油浓度的测定采用甘油三脂酶试剂盒(上海捷门生物技术公司)。

2 结果与讨论

2.1 混合碳源补料

发酵过程中表达阶段采用混合碳源,菌体生长和血管生长抑制素的表达都有所提高,菌体浓度达到 120 g/L,血管生长抑制素浓度达到 39 mg/L,如图 1 所示。表达阶段甘油流加速率由 2.5 mL/h 逐渐增加到 10 mL/h,菌体平均比生长速率为 0.01 h⁻¹,血管生长抑制素的平均比生产速率为 0.006 mg/(g·h),表达阶段菌体关于甘油的表观得率为 0.62 g/g,菌体关于甲醇的表观得率系数为 0.72 g/g。

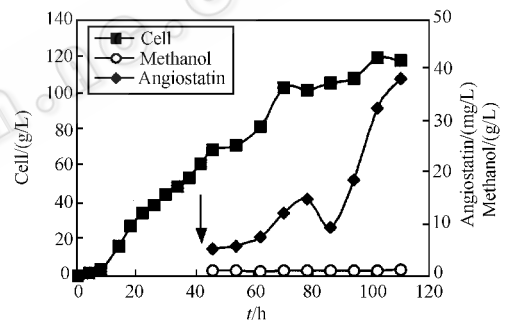


图 1 重组巴斯德毕赤酵母的发酵曲线,诱导表达阶段流加甘油-甲醇混合碳源。箭头表示诱导表达开始

Fig.1 Fermentation course for production of recombinant angiotensin in cultivation of *Pichia pastoris* fed with glycerol-methanol mixed-carbon-source during the expression phase. The arrow indicates the start of induction

2.2 甘油限制性流加的重要性

表达阶段采用不同甘油流加速率的数批发酵实验结果表明,表达阶段平均比生长速率达到 0.012 h⁻¹时,血管生长抑制素的平均比生产速率可达 0.02 mg/(g·h),比生长速过高或过低,血管生长抑制素的比生产速率都较低(数据未显示)。图 1 中 86 h 血管生长抑制素浓度的下降就是因为 78 h 至 94 h 之间菌体的比生长速率过低,蛋白的降解速率高于生产速率造成的。Pais 在采用 Mut^s 表型毕赤酵母表达胰岛短肽时建立的模型中,表达阶段比生长速率也为 0.012 h⁻¹^[10],与本研究得出的结果一致。采

用混合碳源补料策略时,使用甲醇浓度检测与控制
系统反馈控制发酵罐中的甲醇浓度,甲醇浓度波动
很小,菌体的比生长速率主要决定于甘油的流加速
率。甘油的流加速度较低时,菌体的生长和蛋白的
产量较低,发酵时间较长;甘油的流加速度过高时,
菌体的生长较快,可能发生氧限制,残余在发酵液
中的甘油会阻遏 *aox1* 启动子,影响蛋白的表达。此
外,过量甘油会导致溢流代谢物乙醇产生,阻遏
aox1 启动子。因此,甘油过量的不良影响可能是多
重的。由此可见,表达阶段甘油的流加对血管生长
抑制素的表达是至关重要的。

2.3 以溶氧振荡作为甘油限制性流加的指针

Jiménez 提出根据溶氧调节毕赤酵母发酵过程
中的甲醇流加^[6],Loewen 也曾提出在毕赤酵母混
合碳源培养过程中可将溶氧作为一个代谢标志,以反
映混合碳源的利用情况^[11]。本研究的诱导阶段混
合碳源培养中,在甲醇浓度被甲醇检测与控制系
统稳定地控制的情况下,当发酵液中甘油耗尽,溶
氧会迅速上升,加入少量甘油后,溶氧即迅速下降,
因此,调节甘油流加速度可维持发酵液中溶氧振
荡的状态,从而保证甘油供应处于限制的状态,避
免甘油过剩造成阻遏或溢流代谢物的积累。当培
养 46.15 h 菌体浓度达到 64 g/L 时,在经历 0.5 h
的碳源饥饿后,进入表达阶段,开始流加甘油-甲
醇混合碳源。流加甘油的蠕动泵动作时间为 1 s,
流速通过改变动作周期调节。在流加甘油过程中,
发酵液的溶氧呈现振荡的状态(图 2),反映了发酵
液中无残余甘油;溶氧总的下降趋势反映了菌体维
持一定的生长。此外,直至发酵结束,溶氧水平保
持于 20% 以上,没有发生氧限制。Chen 在高密
度发酵具有 *Mut^S* 表型的毕赤酵母表达一个 86
氨基酸的凝血调节蛋白时,向发酵罐中通入纯氧
以缓解氧限制^[12]。而本研究中由于甘油系限制
性流加,菌体浓度达到 180 g/L 时也未发生氧限
制,无须补加纯氧,也减少了发酵罐的降温负
荷。

2.4 实现甘油限制性流加后的发酵过程

采用溶氧水平作为甘油利用的指针后,甘油实
现了限制性流加,即在维持一定的生长速率下,发
酵液中无残余甘油,避免了溢流代谢产生乙醇,不
会阻遏蛋白表达。如图 3,在表达阶段采用图 2
所示的以溶氧为指针的甘油限制性流加,表达阶
段维持 0.012 h^{-1} 的平均比生长速率,最终菌体达
到 150 g/L,血管生长抑制素的产量达到 108 mg/L,
血管生长抑制素的平均比生产速率为 $0.02\text{ mg}(\text{g}\cdot\text{h})$ 。表达

阶段甘油关于菌体的表观得率为 0.69 g/g ,菌体关
于甲醇的表观得率系数为 0.93 g/g ,比没有采用甘
油限制性流加时都有所增加,这表明采用甘油限
制性流加可以减少溢流代谢物的流量,提高碳源
的利用率。

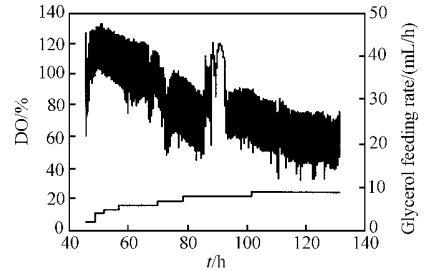


图 2 重组 *Pichia pastoris* 表达阶段溶氧变化曲线,
阶梯状线段表示甘油的流率

Fig. 2 The time courses of dissolved O_2 concentration
and glycerol feeding rates (the staircase line)
in fed-batch cultivation of recombinant *Pichia*
pastoris in the expression phase

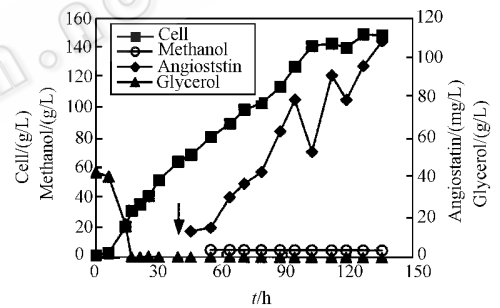


图 3 重组巴斯德毕赤酵母的补料分批发酵曲线

Fig. 3 Time courses of fed-batch fermentation of
recombinant *Pichia pastoris*

During the expression phase, limited glycerol feeding strategy
was adopted to obtain oscillations in DO, based on which
glycerol feeding rate was controlled to maintain
a non-residual-glycerol condition of fermentation broth.
The arrow indicates the start of induction

REFERENCES (参考文献)

- [1] Cregg J M, Vedvick T S, Raschke W C. Recent advances in the expression of foreign genes in *Pichia pastoris*. *Biol Technology*, 1993, 11: 905-910
- [2] ZHANG R A (章如安), YANG X (杨晟), QIU R D (邱荣德) et al. Research and development on *Pichia pastoris* expression system. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2000, 27(5): 371-373
- [3] Sim B K L, O'Reilly M S, Liang H et al. A recombinant human angiotensin protein inhibits experimental primary and metastatic cancer. *Cancer Research*, 1997, 57: 1329-1344

- binant human angiostatin in *Pichia pastoris*. *Journal Industrial Microbiological Biotechnology*, 2000, **24**(1): 31 – 35
- [5] XIN L(辛利), ZHANG L(张励), XU H(徐韧) *et al.*. Expression of human angiostatin in *Pichia pastoris* and the detection of its anti-angiogenic activity. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*(生物化学与生物物理学报), 2001, **33**(3): 291 – 295
- [6] Jiménez E R, Sánchez K, Roca H *et al.*. Different methanol feeding strategies to recombinant *Pichia pastoris* cultures producing high level of dextranase. *Biotechnology Techniques*, 1997, **11**(7): 461 – 466
- [7] Åkesson M, Hagander P, Axelsson J P. Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding. *Biotechnology Bioengineering*, 2001, **73**(3): 223 – 230
- [8] XU C D(徐晨东), YI Y Y(易蕴玉), QUAN W H(全文海) *et al.*. Approach of phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia. *Journal of Wuxi University of Light Industry*(无锡轻工大学学报), 1998, **17**(1): 34 – 38
- [9] DENG B H(邓兵兵), FANG H Q(方宏清), XUE Q(薛冲) *et al.*. GC rapid analysis of methanol and ethanol during high cell density culture of recombinant methylotrophic yeast. *Industrial Microbiology*(工业微生物), 2001, **31**(2): 26 – 29
- [10] País J M, Varas L, Valdés J *et al.*. Modeling of mini-proinsulin production in *Pichia pastoris* using the AOX promoter. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**: 251 – 255
- [11] Loewen M C, Liu X, Davies P L *et al.*. Biosynthesis production of type II fish antifreeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*. *Applied Microbiological Biotechnology*, 1997, **48**: 480 – 486
- [12] Chen Y, Cino J, Hart G *et al.*. High protein expression in fermentation of recombinant *Pichia pastoris* by a fed-batch process. *Process Biochemistry*, 1997, **32**(2): 107 – 111

Feeding of Mixed-carbon-resource During the Expression Phase in Cultivation of Recombinant *Pichia pastoris* Expressing Angiostatin

XIE Jing-Li¹ ZHOU Qing-Wei² ZHANG Li¹ YE Qin^{1*} XIN Li² DU Peng² GAN Ren-Bao²

¹(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237)

²(Institute of Biochemistry and Cell Biology, Shanghai Institute of Biological Science, the Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200031)

Abstract A recombinant strain of *Pichia pastoris* with a phenotype of Mut^S was used to produce angiostatin in a 5-L fermentor. The methanol utilization ability of the present strain was weak, which resulted in extremely low growth rate and angiostatin productivity during the expression phase with methanol as the sole carbon source. To enhance the cell density and angiostatin expression level, mixed-carbon-source of glycerol-methanol was used in the expression phase. The methanol concentration was well controlled at 5 g/L by a methanol sensor and control system, and glycerol was continuously fed into the fermentor to achieve a higher cell density. 120 g/L of cells and 39 mg/L of angiostatin were reached at the end of fermentation which lasted 110 h. The mean specific cell growth rate in the expression phase was 0.01 h⁻¹, and the mean specific angiostatin productivity was 0.006 mg/(g·h). According to the data obtained in several runs of fermentation in which glycerol was fed at different rates, a higher mean specific angiostatin productivity was reached at the mean specific cell growth rate of 0.012 h⁻¹. To avoid the repression of angiostatin expression caused by residual glycerol and ethanol accumulation due to overfeeding of glycerol, glycerol addition was controlled to produce continuous oscillations in dissolved oxygen, because the change of dissolved oxygen concentration could deliver the information of available carbon source in the fermentation broth. Controlled glycerol feeding also avoided the problem of oxygen limitation brought by high cell density, and thus decreased the cooling requirement of the fermentor. Cell density reached 150 g/L at the end of fermentation, and angiostatin level reached 108 mg/L after an expression period of 96 h when the mean specific growth rate was maintained at 0.012 h⁻¹ by using the glycerol feeding strategy to result in the oscillations in dissolved oxygen. The mean specific angiostatin productivity was improved to 0.02 mg/(g·h). The apparent cell yield on glycerol and methanol were respectively 0.69 g/g and 0.93 g/g, higher than those in the fermentation without using the feeding strategy with dissolved oxygen as the indicator of metabolism.

Key words angiostatin, glycerol feeding, dissolved oxygen, *Pichia pastoris*

Received: 01-09-2003

This work was supported by Grant from the Ministry of Education, China(No. 99166) and partly from the Municipal Fund for the Key Academic Disciplines, Shanghai, China.

* Corresponding author. Tel: 86-21-64252095; Fax: 86-21-64253904; E-mail: qye@ccsbi.edu.cn

中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>