

甲醇抑制时重组毕赤酵母发酵的特性研究

周祥山 范卫民 张元兴*

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室,上海 200237)

摘 要 本文对毕赤酵母进行了恒化培养研究。以甲醇为唯一碳源时,在稀释率较低时($D < 0.048 \text{ h}^{-1}$),连续培养系统操作很稳定。但在稀释率高时($D > 0.048 \text{ h}^{-1}$),连续培养系统的定态点不止一个,实验不能维持,故采用比生长速率恒定的分批流加培养进行研究。结果表明,毕赤酵母的生长符合 Andrew 普遍化底物抑制模型。综合考虑水蛭素的生成、底物的消耗,在生产中维持甲醇浓度为限制性浓度(0.5 g/L),且维持比生长速率为 0.02 h^{-1} 时,水蛭素 Hir65 的比生成速率达到最大值 $0.2 \text{ mg/(g} \cdot \text{h)}$ 且甲醇的比消耗速率为 $0.04 \text{ g/(g} \cdot \text{h)}$ 。

关键词 毕赤酵母,恒化培养,底物抑制,比生长速率

中图分类号 Q939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2003)05-0618-05

甲醇营养型毕赤酵母(*Pichia pastoris*)表达系统是近年飞快发展的一个优秀的真核表达系统,2000 年报道已有 220 多种外源蛋白在毕赤酵母中表达,其中胞内表达的巴西三叶胶羟腈裂解酶(*Hevea brasiliensis* hydroxynitrile lyase)产量高达 22 g/L ^[1],胞外分泌表达的鼠明胶蛋白(Mouse gelatin)达到 14.8 g/L ^[2]。重组毕赤酵母表达外源蛋白时一般以甲醇为碳源,但甲醇是一种抑制性底物,不能简单地采用常规的连续培养方法进行研究。

目前文献中关于以甲醇为碳源连续培养基因工程毕赤酵母的报道很少。Zhang 等 2000 年^[3]报道了 *Pichia pastoris* Mut⁺ 菌株胞内表达肉毒杆菌神经毒素 c (BoNT/A(He))的研究; d'Anjou 等 2001 年^[4]报道了 *P. pastoris* Mut^S 菌株胞外分泌表达抗冻蛋白(srAFP)的连续培养研究。但对于 *P. pastoris* Mut⁺ 菌株胞外分泌表达的连续培养研究还未见报道。本文用连续培养和比生长速率恒定的流加培养相结合的方法,对重组毕赤酵母分泌表达水蛭素进行了恒化培养研究,为发酵优化控制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 重组毕赤酵母(*Pichia pastoris*) Mut⁺ 基因工程菌,分泌表达水蛭素(rHV2-Lys⁴⁷)^[5]。

1.1.2 培养基 种子培养基为 MGY 培养基,恒化培

养用培养基为 FM21 培养基^[5]。

1.2 方法

1.2.1 连续培养 5L 发酵罐中装 FM21(添加 5% 甘油)培养基 3L。菌体先在 FM21 培养基中以甘油为碳源进行分批发酵,当甘油耗尽后,开始连续流加 FM21-甲醇(15%, V/V)培养基进行连续培养,通过流加氨水使 pH 恒定在 5.0。使用虹吸管使培养基的体积维持 3L。每隔 8 h 取样检测细胞、甲醇及水蛭素浓度。当三者浓度至少维持 24 h 不变时可视为已达定态。

1.2.2 甲醇过量流加培养 菌体先以甘油为碳源进行分批、流加阶段的培养,然后以低的速率流加甲醇维持 3~6 h 的过渡阶段。当过渡阶段结束后,通过甲醇传感器控制甲醇(100%)的流加速度,使发酵液中的甲醇浓度维持在设定值($3 \sim 10 \text{ g/L}$)进行发酵^[5,6]。当细胞干重达到 110 g/L (湿重 450 g/L)时终止发酵。

1.2.3 分析方法 甲醇浓度用岛津气相色谱 GC-14C 分析。水蛭素浓度分析采用 HPLC 法,各种不同的水蛭素组分的含量由纯化的标准品作对比确定。

2 结果与讨论

2.1 连续培养系统建立

毕赤酵母先以甘油为碳源进行分批培养 20 h,之后通过流加甘油 5 h 使细胞量增大到 53.1 g/L ,然

后将流加培养基换成 15% 甲醇-FM21 培养基,同时,通过虹吸管控制发酵罐的液位,使发酵液的体积维持恒定。图 1 为稀释率为 0.04 h⁻¹ 的连续培养情况,从 25 h 开始连续流加甲醇进行连续培养,由图可看出在最初的几小时内甲醇量有一点积累,达到 3 g/L,这主要是由于刚开始时细胞对甲醇不适应造成的。但之后甲醇浓度开始下降。产物水蛭素诱导表达时,会产生 4 种组分,分别为目的产物 Hir65 及 Hir65 的 C 末端降解 1~3 个氨基酸的 3 种降解组分。到 75 h 时,细胞干重、甲醇浓度、水蛭素总量(即四种水蛭素组分之和) Hir65 的浓度已基本稳定,说明系统已达到定态。

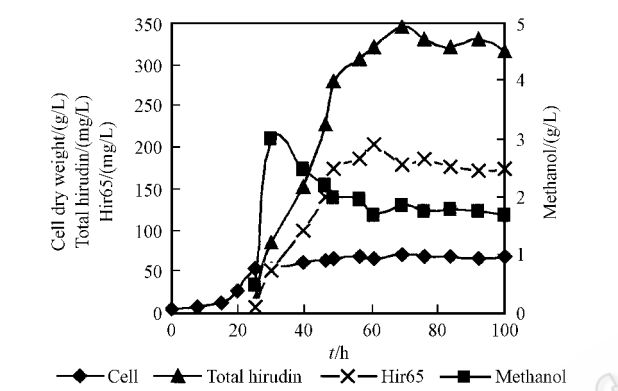


图 1 甲醇稀释率为 0.04 h⁻¹ 的重组毕赤酵母连续培养建立过程

Fig.1 Process of continuous culture of recombinant *Pichia pastoris* at the methanol dilution rate of 0.04 h⁻¹

2.2 高底物浓度下的恒化培养

当稀释率在 0.048 h⁻¹ 达到定态以后,加大补料速率,使稀释率变为 0.06 h⁻¹。图 2 为稀释率变为 0.06 h⁻¹ 后,发酵罐内菌体量 X,底物甲醇浓度 S 的变化情况,其中从 8 h 开始增大稀释率。稀释率变为 0.06 h⁻¹ 后,图中可看出,底物浓度 S 不断增加,18 h 内从 2.9 g/L 增为 18.1 g/L,而菌体量 X 则不断减少,从 53.4 g/L 降到 32.3 g/L,且这种趋势仍在继续,系统不能达到定态。

一般甲醇浓度超过 5 g/L 时对毕赤酵母的生长有抑制作用。图 2 中在 26 h 时甲醇浓度已达 18.1 g/L,而菌体量有递减趋势,说明是由于高甲醇浓度对菌体的生长产生了抑制,导致细胞的比生长速率小于稀释率,系统趋向于洗出状态。由于甲醇的抑制,这时已不能使用底物无抑制的 Monod 方程描述菌体的生长,应考虑用底物抑制的菌体生长模型。

对于毕赤酵母发酵中甲醇的抑制,一般认为使用 Andrew 提出的普遍化底物抑制模型比较合适^[7]:

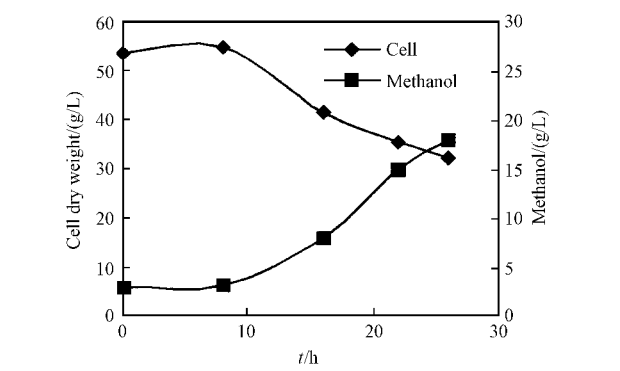


图 2 甲醇稀释率为 0.06 h⁻¹ 时重组毕赤酵母连续培养中细胞和甲醇浓度的变化

Fig.2 Profile of continuous culture of recombinant *Pichia pastoris* at the methanol dilution rate of 0.06 h⁻¹

$$\mu = \mu_{\max} \times \frac{1}{1 + K_s/S + S/K_{is}} \quad (1)$$

式中 K_s 为饱和常数, K_{is} 为抑制常数, μ_{\max} 为无底物抑制的最大比生长速率。

该底物抑制模型如图 3 中曲线 B,这时对同一个生长速率有两个不同的 S 值。图中曲线 A 为 Monod 模型。

对普遍化底物抑制模型,当底物浓度 $S = S_{crit}$ 时,比生长速率 $\mu = \mu_m$ 。当 $S < S_{crit}$ 时, $d\mu/dS > 0$,连续培养系统是一个很稳定的系统,具有很好的抗变量和参数扰动的能力^[7,8]。

但当 $S > S_{crit}$ 时,如在图 3 中 S_2 处,因 $d\mu/dS < 0$,该状态点不符合稳态的要求。若因流加入口处培养基的不均匀引起底物浓度波动,例如 S 增加,则 μ 反而下降,菌体生长变慢,菌体量减少,使得底物的消耗速度减慢,从而使底物浓度 S 积累得更高,直到洗出。反之,若 S 发生波动而减少,则状态点 S_2 沿曲线 B 向左移动,最后到达另一个定态点 S_1 点。

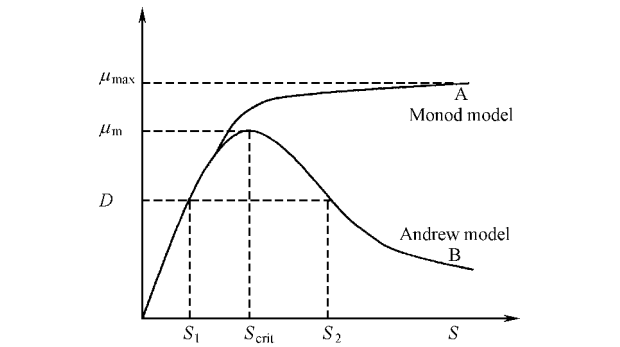


图 3 底物抑制时比生长速率 μ 和底物浓度 S 关系图

Fig.3 Relationship between the specific growth rate μ and the substrate concentration S under substrate inhibition

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 0000-0000/journal.s.m. ac. cn

因此若细胞生长符合普遍化底物抑制模型,若存在底物抑制,即当 $S > S_{\text{crit}}$ 时,要想用连续培养的方式将状态点维持在定态点 S_2 是非常困难的,因为在实际操作中,各操作参数和变量(如稀释率 D 、流加培养基中的甲醇浓度 S_0 等)发生微小波动是不可避免的,这时需采用连续培养以外的其他方式进行研究。

符合 Monod 方程的底物无抑制连续培养系统(CSTR)或比生长速率 μ 恒定的分批流加培养都可看作恒化培养(Chemostat)^[8]。

比生长速率恒定的分批流加培养中,不管菌体生长是符合 Monod 模型或是底物抑制的 Andrew 模型, μ 都是 S 的函数,因此 μ 为定值时 S 也为定值。若在所研究的细胞浓度范围内(如指数生长期)细胞的生理生化活性变化不大,则菌体对底物得率常数 $Y_{X/S}$ 、底物的比消耗速率 q_s 、产物比生成速率 q_p 也恒定,这时流加培养可以看作拟定态(Quasi-steady state)。

在实际的流加培养操作中,为获得拟定态,可使用甲醇传感器控制甲醇的流加,使发酵罐中底物甲

醇浓度维持恒定,从而维持恒定的比生长速率,这时系统可与 CSTR 一样看作定态,从而可研究高底物浓度抑制下的动力学特征。

实验中菌体先在甘油中进行分批培养,之后采用甲醇传感器控制甲醇流加使发酵罐中甲醇浓度维持恒定,当细胞干重达到 110 g/L(湿重 450 g/L)后停止实验,因为此时细胞生长已进入稳定期,系统已不能维持拟定态。

恒定比生长速率的整个流加实验中维持甲醇浓度恒定在 3~10 g/L 内的某一值,这时对细胞生长来说甲醇浓度是过量的,即 $S > S_{\text{crit}}$ (图 3)。这种培养方式也称为甲醇过量流加培养。

图 4 为甲醇浓度维持在 5 g/L 时的流加培养过程。从图中可看出在经历甲醇适应期后,甲醇浓度较好的维持在 5 g/L。从图 4B 可看出,在 25 h 到 50 h 之间,菌体量 X 和培养液体积 V 的乘积 $\ln(XV)$ 与时间 t 基本成直线,该直线的斜率即比生长速率,为 0.044 h^{-1} ,说明用维持恒定底物浓度的方法维持恒定的比生长速率是可行的。

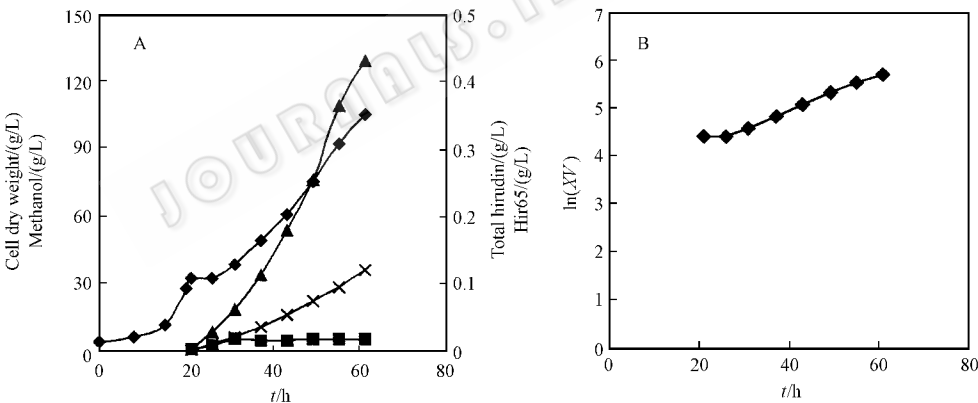


图 4 (A)甲醇浓度恒定为 5 g/L 时重组毕赤酵母流加培养过程中细胞干重、甲醇浓度、水蛭素总产量及 Hir65 的浓度变化;(B) $\ln(XV)$ 的变化

Fig.4 (A) Cell dry weigh(◆), methanol(■), total amount of hirudin(▲) and Hir65 concentration(×) in the Fed-batch culture of recombinant *Pichia pastoris* at methanol concentration of 5 g/L;(B) Time course of $\ln(XV)$

2.3 底物浓度对比生长速率的影响

将底物无抑制连续培养和底物过量流加培养所得的比生长速率、甲醇浓度得数据集中表示在图 5 中,并用 Andrew 普遍化底物抑制模型进行非线性拟合,得到以下方程:

$$\mu = \frac{0.087 S}{1.4 + S + S^2/7.1} \tag{2}$$

该方程的饱和常数 K_s 为 1.4 g/L,抑制常数 K_{IS} 为 7.1 g/L,无底物抑制的最大比生长速率 μ_{max} 为

0.087 h^{-1} 。

从该方程可以计算出,当临界甲醇浓度 S_{crit} 为 3.1 g/L 时,比生长速率达到存在底物抑制时的最大值 μ_m ,为 0.0464 h^{-1} 。

图 5 中,在临界点 S_{crit} 左侧的 A 区域($S < S_{\text{crit}}$),生长特征为甲醇浓度无抑制生长,随甲醇浓度的增加,比生长速率增加。在临界点 S_{crit} 右侧的 B 区域($S > S_{\text{crit}}$),生长特征为甲醇浓度抑制性(过量)生长,随甲醇浓度的增加,比生长速率降低。

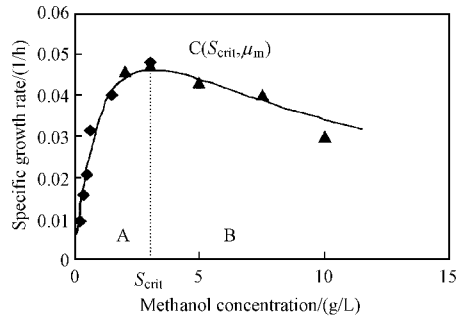


图 5 重组毕赤酵母培养中比生长速率和
甲醇浓度之间的关系

Fig.5 Relationship between specific growth rate and methanol concentration in recombinant *Pichia pastoris* culture
A $S < S_{crit}$, Continuous culture (◆); B : $S > S_{crit}$, methanol-inhibited fed-batch culture (▲)

2.4 比生长速率及甲醇浓度对水蛭素总的比生成速率 q_{PT} 及 Hir65 比生成速率 q_{PS} 的影响

图 6 为水蛭素总的比生成速率 q_{PT} 及 Hir65 比生成速率 q_{PS} 与比生长速率及甲醇浓度之间的关系。从图可以看出 ,对于水蛭素总的比生成速率来说 ,当甲醇处于限制性浓度时($< 3.1\text{ g/L}$),若 $\mu < 0.02\text{ h}^{-1}$,则随比生长速率及甲醇浓度增加 ,水蛭素总的比生成速率增加 ;若 $\mu > 0.02\text{ h}^{-1}$,则随比生长速率及甲醇浓度增加 ,水蛭素总比生成速率降低。

在甲醇处于抑制性浓度($> 3.1\text{ g/L}$)时 ,随甲醇的增加 ,水蛭素总的比生成速率 q_{PT} 增加。这一点与以前的报道一致^[9]。即高甲醇浓度下酵母的生长受到抑制 ,本来用于生长的能量减少 ,使用于产物表达的能量增加 ,产物的表达量提高。在甲醇限制性浓度下 ,比生长速率低时($\mu < 0.02\text{ h}^{-1}$) ,水蛭素总的比生成速率低可能是虽然细胞生长慢用于生长方面的能量少 ,但由于流加的甲醇少 ,总的能量提供也少 ,故表达量低。

对于目的蛋白 Hir65 来说 ,在甲醇浓度小于 0.5g/L (或 $\mu < 0.02\text{ h}^{-1}$)时 ,随甲醇浓度的增加 ,Hir65 的比生成速率 q_{PS} 增加 ;但在甲醇浓度在 $0.5 \sim 3.1\text{g/L}$ 时 ,随甲醇浓度的增加 ,Hir65 的比生成速率减少。在甲醇浓度大于 3.1 g/L 的甲醇抑制性浓度下 ,随甲醇浓度的增加 ,虽然水蛭素总的比生成速率增加 ,但由于水蛭素的降解程度增加 ,导致 Hir65 的比生成速率降低。在比生长速率 μ 为 0.02 h^{-1} (甲醇浓度 S 为 0.5g/L)时 ,Hir65 的比生成速率 q_{PS} 有最大值 $0.2\text{ mg/(g}\cdot\text{h)}$)

综合考虑水蛭素的降解和比生成速率 ,在生产中维持甲醇浓度为限制性(无抑制)浓度(0.5 g/L) ,

且维持比生长速率为 0.02 h^{-1} 比较好 ,这时 ,Hir65 的降解较少 ,而且比生成速率最高。

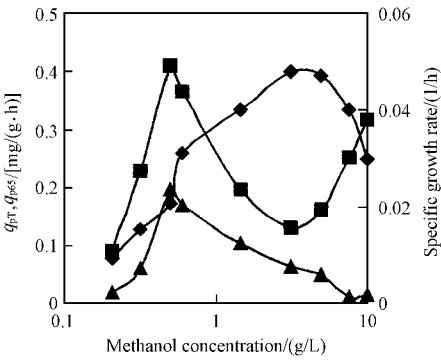


图 6 甲醇浓度及比生长速率对水蛭素总的
比生成速率及 Hir65 比生成速率的影响

Fig.6 Effect of methanol concentration and specific growth rate (◆) on the specific production rate of the total hirudin q_{PT} (■) and the Hir65 q_{PS} (▲)

2.5 甲醇浓度对甲醇比消耗速率的影响

图 7 为甲醇浓度与甲醇比消耗速率之间的关系。从图可以看出 ,在甲醇浓度小于 5 g/L 时 ,甲醇比消耗速率基本上随甲醇浓度的增加呈线性上升。在甲醇浓度大于 5 g/L 时 ,甲醇比消耗速率随甲醇浓度增加而减小 ,这主要是由于高甲醇浓度下细胞的代谢受到抑制。

从生产考虑 ,甲醇消耗得越少越好 ,即甲醇比消耗速率越低越好。因为生产同样数量的菌体 ,用甲醇作碳源所需的氧气是葡萄糖的 $3 \sim 4$ 倍 ,另外 ,氧化甲醇所释放的热量是葡萄糖的 $2 \sim 3$ 倍 ,可达到 $450\text{ kJ/(L}\cdot\text{h)}$ 。消耗甲醇越多所产的热量也越大 ,所需设备的冷却能力要求越高。因此在实际生产中 ,若能降低甲醇的消耗量 ,将降低能耗 ,节约成本。

在前述的最优的操作条件下(甲醇浓度 S 为 0.5 g/L) ,即比生长速率为 0.02 h^{-1} 时 ,甲醇的比消耗速率为 $0.04\text{ g/(g}\cdot\text{h)}$,这一数值相对于图 7 中的其他点来说是比较低的 ,具有较好的应用价值。

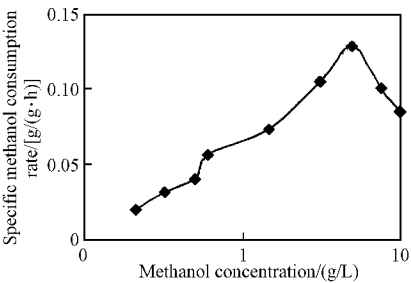


图 7 甲醇浓度对甲醇比消耗速率的影响

Fig.7 Effect of methanol concentration on the

3 结 论

为研究细胞生长、底物消耗和产物生成的动力学规律,对毕赤酵母进行了甲醇恒化培养研究。以甲醇为唯一碳源时,毕赤酵母的生长不符合 Monod 方程,而是符合 Andrew 普遍化底物抑制模型。在稀释率较低时($D < 0.048 \text{ h}^{-1}$),连续培养系统操作很稳定。但在稀释率高时($D > 0.048 \text{ h}^{-1}$),连续培养系统的定态点不止一个,稳定的定态点为洗出点,实验不能维持,故采用比生长速率恒定的分批流加培养进行研究。通过这两种培养方式相结合,得出了产物水蛭素的生成、底物甲醇的消耗规律。研究表明在生产中维持甲醇浓度为限制性浓度(0.5 g/L),且维持比生长速率为 0.02 h^{-1} 比较好,此时水蛭素 Hir65 的比生成速率达到最大值 $0.2 \text{ mg/(g} \cdot \text{h)}$ 。在下一步的研究中可以通过指数流加的方式控制比生长速率恒定为 0.02 h^{-1} ,以减少降解和提高水蛭素的产量。

REFERENCES(参考文献)

[1] Hasslacher M, Schall M, Hayn M *et al.* High-level intracellular

expression of hydroxynitrile lyase from the tropical rubber tree *Hevea brasiliensis* in microbial hosts. *Protein Expr Purif*, 1997, **11**: 61 – 71

[2] Werten M M, van den Bosch T J, Wind R D *et al.* High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. *Yeast*, 1999, **15**: 1087 – 1096

[3] Zhang W H, Bevins M A, Plantz B A *et al.* Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimization the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnol Bioeng*, 2000, **70**: 1 – 8

[4] d'Anjou M C, Daugulis A. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 2001, **72**: 1 – 11

[5] ZHOU X S(周祥山), FAN W M(范卫民), ZHANG Y X(张元兴). Effects of different methanol feeding strategy on hirudin production in high-density fermentation by recombinant *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)*, 2002, **18**(3): 348 – 351

[6] ZHANG Y X(张元兴), ZHOU X S(周祥山), LU J(陆健) *et al.* A novel methanol sensor for on-line determination methanol in liquid. China Patent, Application No. 01132168.7

[7] QI Y Z(戚以政), WANG S X(汪叔雄). *Biochemical reaction dynamics and reactor(生化反应动力学与反应器)*. Peking: Chemical Engineering Press, 1996

[8] Blanch H W, Clark D S. *Biochemical Engineering*. New York: Marcel Dekker, 1996

[9] Katakura Y, Zhang W H, Zhuang G Q. 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 Ferment Bioeng*, 1998, **86**: 482 – 487

Fermentation Behaviors of Recombinant *Pichia pastoris* under Inhibited Methanol Concentration

ZHOU Xiang-Shan FAN Wei-Min ZHANG Yuan-Xing*

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

Abstract Chemostat culture was performed to characterize the growth, substrate consumption and the hirudin production, and to disclose their interrelations in the fermentation of recombinant *Pichia pastoris*. The Andrew substrate-inhibited growth model is more suitable than Monod model to simulate the growth of *Pichia pastoris* on methanol. Therefore, two stationary states can be obtained in the continuous culture at a certain dilution rate because of the substrate inhibition on cell growth. The stationary state could be obtained if only the dilution rate not more than 0.048 h^{-1} in the continuous fermentation. The concentrations of cell, methanol and hirudin were constant after 50 h continuous culture with dilution rate at 0.04 h^{-1} . However, it could not be obtained when the dilution rate more than 0.048 h^{-1} because the other stationary point at $S > 0.048 \text{ h}^{-1}$ is unstable. Therefore, it was found that the cell concentration declined and the methanol concentration increased from 2.9 g/L to 18.1 g/L within 18 h at dilution rate 0.06 h^{-1} . Thus, the fed-batch culture with a constant specific growth rate was carried out to disclose the fermentation behavior at high and constant methanol concentration in aid of a methanol sensor. The theoretical maximum specific growth rate, $\mu_m = 0.0464 \text{ h}^{-1}$, was found under critical methanol concentration, $S_{\text{crit}} = 3.1 \text{ g/L}$. The growth of *P. pastoris* was typically methanol-limited at the methanol concentration $S < S_{\text{crit}}$. It was, however, inhibited at $S > S_{\text{crit}}$. The maximum specific Hir65 production rate q_p was obtained at $0.2 \text{ mg/(g} \cdot \text{h)}$ when methanol concentration and μ were 0.5 g/L and 0.02 h^{-1} , respectively. The specific Hir65 production rate q_p increased with the increase of μ and S at $\mu < 0.02 \text{ h}^{-1}$, and decreased at $\mu > 0.02 \text{ h}^{-1}$. The specific methanol consumption rate increased with the increase of S when $S < 5 \text{ g/L}$, but decreased when $S > 5 \text{ g/L}$. At last, the high Hir65 production rate $0.2 \text{ mg/(g} \cdot \text{h)}$ was obtained in the fermentation conducted under methanol-limited concentration and μ controlled at 0.5 g/L and 0.02 h^{-1} , respectively, while the specific methanol consumption rate is low only at $0.04 \text{ g/(g} \cdot \text{h)}$, showing the potential for the strategy of getting high Hir65 production rate at the low consumption of methanol.

Key words *Pichia pastoris*, chemostat culture, substrate inhibition, specific growth rate

Received: 04-08-2003

* Corresponding author. Tel 86-10-64253065; Fax 86-21-64253025; E-mail: yxzhang@ecust.edu.cn <http://journals.im.ac.cn>