

氨离子浓度对重组毕赤酵母的生长 和血管生长抑制素表达的影响*

张 励¹ 叶 勤^{1*} 辛 利² 杜 鹏² 甘人宝²

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)¹

(中国科学院生物化学研究所 上海 200031)²

摘 要:本研究采用流加补料培养方式培养重组巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*), 表达血管生长抑制素 (Angiostatin)。整个培养过程分为以甘油为碳源的生长阶段和以甲醇为碳源的诱导阶段。全过程用氨水调节 pH 时, 诱导阶段菌体生长受到抑制, 蛋白的最大表达量为 9.08 mg/L。进行不同氨离子浓度的摇瓶培养, 证实在以甲醇为碳源时, 氨离子浓度对菌体的生长有明显的抑制影响。高密度培养中改用 2 mol/L 的 KOH 溶液调节 pH, 诱导阶段菌体有缓慢的生长, 蛋白最大表达量增为 20 mg/L。

关键词: *Pichia pastoris*, 发酵, 氨离子浓度, 血管生长抑制素

中图分类号: TQ920.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654 (2002) 01-0023-04

EFFECT OF AMMONIUM CONCENTRATION ON THE GROWTH OF RECOMBINANT *PICHIA PASTORIS* AND EXPRESSION OF ANGIOSTATIN

ZHANG Li¹ YE Qin¹ XIN Li² DU Peng² GAN Ren-Bao²

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

(Shanghai Institute of Biochemistry, Chinese Academy of Sciences 200031)²

Abstract: Fed-batch cultures of recombinant *Pichia pastoris* were conducted for production of angiostatin. The whole fermentation included a growth phase on glycerol and an expression phase on methanol. When ammonium hydroxide solution was used to adjust pH, the cell growth during the expression phase was inhibited and the highest angiostatin concentration was 9.08 mg/L. Shake-flask cultures were carried out in media containing different quantities of ammonia. The results showed that ammonia had an obvious inhibition effect on the cell growth during the expression phase. Therefore KOH solution was used to adjust pH, and during the expression phase cells were able to grow and the highest angiostatin concentration reached 20 mg/L.

Key words: Recombinant *Pichia pastoris*, Fermentation, Ammonium Concentration, Angiostatin

血管生长抑制素 (Angiostatin) 是纤溶酶原的一部分。人纤溶酶原分子量 92kD, 广泛分布在体液和组织, 主要合成于肝脏, 并在血浆中以约 24mol/L 的浓度存在^[1]。这是一种新发现的抑制血管生成的因子, 特异作用于内皮细胞, 可抑制内皮细胞的生长。小鼠实验已证明它也能抑制肿瘤的生长。它的好处在于: 正常的内皮细胞的转化率 (turn over rate) 很低^[2], 有几百天, 而处于增殖状态中的内皮细胞的转化率为 4 天。这样对于生长缓慢的正常细胞, 药物的生理毒性就很小。此外, 内皮细胞的突变率很低,

* 教育部科学技术研究重点项目 (No. 99166)

* * 联系人

收稿日期: 2000-11-24, 修回日期: 2001-02-28

因而不会产生抗药性,具有很大的优越性。动物实验已得到很好的实验结果,是目前较为看好的抑癌新药。巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 是一种能以甲醇为唯一碳源诱导表达外源基因的宿主细胞,编码醇氧化酶的启动子作用很强,已成功地用于表达多种重组蛋白^[3,4]。在 *Pichia pastoris* 的高密度培养过程中,影响外源基因表达的因素很多,本文报道 *Pichia pastoris* 基因工程菌培养过程中氨离子浓度的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种

本研究采用的菌种是重组 *Pichia pastoris* GS115 (Mut⁺His⁺), 由中国科学院生物化学研究所甘人宝教授课题组构建,是一株整合血管生长抑素基因的重组 *Pichia pastoris*。

1.2 培养基

种子培养基: YNB 13.4 g, 甘油 10 mL, 生物素 0.4mg, 1 mol/L pH6.0 磷酸缓冲液 100 mL, 定容 1L。

发酵培养基: K₂SO₄ 18.2 g, MgSO₄·7H₂O 14.9 g, CaSO₄ 0.93 g, H₃PO₄ (85%) 26.7 mL, KOH 4.13 g, 甘油 40 g, 用 28% 氨水调节 pH 至 5.0, 加入 4.35 mL PTM1 溶液 (1 L: FeSO₄·7H₂O 65.0 g, CuSO₄·5H₂O 6.0 g, ZnSO₄·7H₂O 20g, MnSO₄ 3.0 g, H₂SO₄ 5.0 mL, H₃BO₃ 0.2 g, Na₂MoO₄ 2 g, KI 0.8 g, 生物素 0.2 g), 定容 1L。

摇瓶发酵培养基: 甘油 5g, (NH₄)₂SO₄ 2 g, CaSO₄ 0.06 g, K₂SO₄ 1.2 g, MgSO₄·7H₂O 1 g, 0.02% 生物素 1 mL, 加入 1 mol/L pH6.0 磷酸缓冲液 100 mL, 定容 1L。

1.3 培养方法

一级种子培养: 将菌种冷冻甘油悬液融化后, 接 0.7 mL 于 25 mL 种子培养基 (250 mL 摇瓶), 30℃ 旋转摇床 250 r/min 培养 14 h。二级种子培养: 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, 培养 7.5 h。

发酵: 将二级种子按 7% 的接种量接入 5 L 发酵罐中的 2.5 L 发酵培养基中。发酵过程中, 温度控制在 30℃, pH 为 5.0, 通气量在 1~1.5 vvm, 流加甲醇的方法见结果与讨论。

1.4 测定方法

菌体浓度的测定采用浊度法, 将培养液用去离子水进行适当稀释, 于波长 600 nm 测光密度 (*OD*₆₀₀)。甘油测定采用高碘酸氧化法^[5]。甲醇用气相色谱测定, 填料为 Chromosorb 101, 柱温 150℃。氨基氮的测定采用 Berthelot 比色法, 培养液的离心上清液在碱性条件下经次氯酸氧化, 生成的氯胺与苯酚被亚硝基铁氰钠催化生成兰色的醌酚, 在 550nm 测定光密度, 与标准曲线对照。Angiostatin 的浓度采用 ELISA 测定^[6]。

2 结果与讨论

2.1 用氨水调节 pH 的流加培养

在 5L 发酵罐中先进行 *Pichia pastoris* 的批次培养, 待甘油耗尽后, 饥饿 1 h, 开始流加含 12 mL/L PTM1 的 50% (w/v) 甘油溶液。流加 24 h 后, 饥饿 2 h, 于发酵 45 h 开始流加含 6 mL/L PTM1 的 50% (v/v) 甲醇溶液, 全过程用 14% 的氨水调节 pH。甲醇流加阶段总长 96 h, 共加入甲醇溶液 318 mL, 流加速度由 1 mL/h 逐渐增加到 4 mL/h, 菌体 *OD* 值保持在 120 左右, 没有增长 (图 1), 在 93h 前甲醇维持在 1~3g/L, 但以后

随着甲醇流速的提高, 甲醇逐渐积累, 最终的残余浓度达到 15g/L, 表达的 Angiostatin 最高为 9.08 mg/L。在甘油流加结束时测得氨基氮浓度为 265 mmol/L。由于在 50~90 h 发酵液中甲醇的浓度并不高, 而菌体未见生长, 考虑到在 *E. coli* 培养中氨离子浓度过高会抑制菌体的生长^[7], 因而怀疑是否因过高的氨离子浓度造成 *P. pastoris* 生长的抑制。因此, 进行以下的摇瓶实验。

2.2 不同氨基氮浓度的摇瓶实验

在一组 250mL 三角瓶中的 30 mL 摇瓶发酵培养基中各接入 1 mL 种子液, 甘油耗尽后, 加入甲醇, 使摇瓶中甲醇浓度达到 5g/L, 同时在各瓶中加入不同量 pH 为 5 的硫酸铵溶液, 使摇瓶中的氨离子浓度分别为 15, 99, 181, 262, 342, 420, 497 mmol/L, 继续培养 24h 后测菌体浓度, 计算补加甲醇后菌体的增加量, 见图 2。

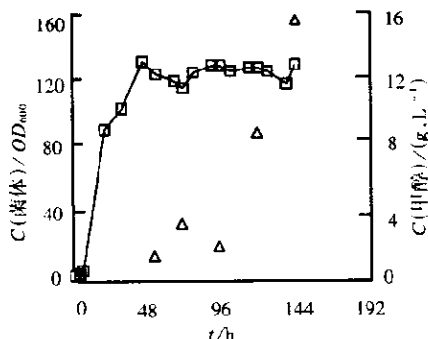


图 1 用 14% 氨水调节 pH 的流加培养
—□—菌体浓度, —△—甲醇浓度

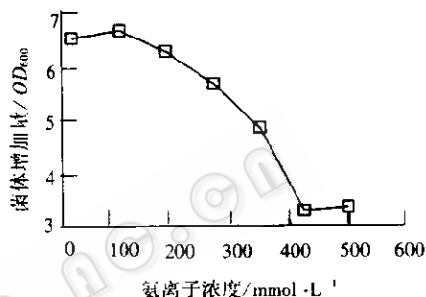


图 2 摇瓶中氨离子浓度对菌体生长的影响

当初初始氨离子浓度为 99 mmol/L 时菌体增加量最大, 但随氨离子浓度继续增高, 菌体增加量逐渐减少。由于最终 pH 值相差不大, 在 4.3~4.6 范围内, 故 pH 的影响可以忽略。由此可判断氨离子浓度对菌体的生长的确有影响

2.3 用 KOH 溶液调节 pH 的流加培养

根据摇瓶实验的结果, 为避免发酵过程氨离子浓度过高, 流加培养改用 2mol/L KOH 溶液调节 pH。甘油为碳源培养阶段的操作同 2.1, 43h 开始流加甲醇, 甲醇流加阶段为 101h, 共加入甲醇溶液 362mL, 甲醇流量由 1mL/h 逐渐增加至 4.16mL/h。从图 3 中可以看出, 在流加甲醇阶段, 菌体有了缓慢的增长, 甲醇消耗量相应增加, 残甲醇一直维持在 1g/L, 蛋白表达量的最高值为 20mg/L, 有了明显的提高。在甘油流加结束时测得氨基氮浓度为 174mmol/L。在发酵 96 h 时, 菌体浓度最高, 此时氨基氮浓度为 92.8 mmol/L。

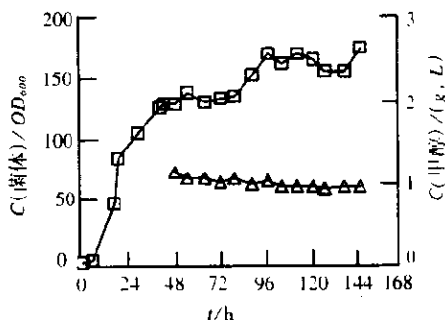


图 3 KOH 溶液调节 pH 的流加培养
—□—菌体浓度, —△—甲醇浓度

用 14% 氨水调节 pH 时, 共加入 14% 的氨水 303mL, 相当于增加了约 100mmol/L 的氨离子浓度, 在改用 2mol/L KOH 溶液调节 pH 后, 培养液中氨离子浓度较低, 在甲醇流加阶段的前 48h 内, 图 1 与图 3 中的残甲醇浓度相近, 但是, 图 1 中菌体没有生长而图 3 中菌体以 0.0047h^{-1} 的平均比生长速率缓慢地增长, 在甲醇诱导 48h 后, 图 1 中的

残甲醇逐渐积累, 而图 3 中的甲醇消耗较快, 没有造成甲醇过度的积累, 菌体的生长没有受到抑制, 而且单位菌体 Angiostatin 的最大生产量也从图 1 的 0.204mg/g 干菌体增加为 0.326mg/g 干菌体。因此, 控制氨离子浓度可使重组 *Pichia pastoris* 发酵生产血管生长抑制素水平有明显的提高。

参 考 文 献

- [1] Wonde G F V. *Advances in Cancer Research*, 1999, **69**: 101 ~ 124.
- [2] Boehem T. *Nature* 1997, **390**: 404 ~ 407.
- [3] 张博润, 何秀萍, 陈玉梅. 微生物学通报, 1998, **25** (1): 42 ~ 48.
- [4] Cregg J M. *Bio/Technology* 1993, **11**: 905 ~ 910.
- [5] I M 柯尔蜀夫等著. 容量分析 (卷三). 北京: 科学出版社, 1963: 436 ~ 447.
- [6] 李永明, 赵玉琪等编著. 实用分子生物学方法手册. 李电东等译. 北京: 科学出版社, 1998, **6**: 360 ~ 363.
- [7] Thompson B G, Kole M, Gerson D F. *Biotechn Bioeng*. 1985, **27**: 818 ~ 824.