

比生长速率和氮源对毕赤酵母生产重组 鲈鱼生长激素的影响

魏 春 周祥山* 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: 对毕赤酵母胞内表达重组鲈鱼生长激素(rljGH)的发酵罐上生产进行了研究。建立了指数流加甲醇的策略并考察了不同比生长速率对 rljGH 生产的影响。结果表明,随着比生长速率的增加,平均比生产速率相应增加,但是胞内持续积累 rljGH 的时间减少。最大比 rljGH 产量(0.58 mg/g WCW)在比生长速率为 0.029/h 时获得。进一步考察了在诱导阶段添加硫酸铵、蛋白胨和酵母抽提物的影响。结果表明,添加硫酸铵和蛋白胨对于 rljGH 生产没有显著影响;添加 2.5 g/L 酵母抽提物有助于胞内 rljGH 的积累,并使胞内积累持续时间由 17 h 增加到 23 h,提高了发酵稳定性。

关键词: 巴斯德毕赤酵母, 胞内生产, 指数流加, 比生长速率

Effect of Specific Growth Rate and Nitrogen Source on the Production of Recombinant *Lateolabrax japonicus* Growth Hormone by *Pichia pastoris*

WEI Chun ZHOU Xiang-Shan* ZHANG Yuan-Xing

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

Abstract: The bioreactor production of recombinant *Lateolabrax japonicus* growth hormone (rljGH) expressed intracellularly by *Pichia pastoris* was investigated. A strategy of feeding methanol at the exponential rate was established and the effect of specific growth rate on the rljGH production was examined. The results indicated that the average specific production rate increased and the rljGH production duration decreased as the specific growth rate increased. The maximum specific rljGH production (0.58 mg/g WCW) was achieved at a specific growth rate of 0.029/h. The effect of supplementing ammonium sulfate, peptone and yeast extract on the rljGH production was further investigated. The results indicated that the effects of ammonium sulfate and peptone were not significant. Supplementing yeast extract of 2.5 g/L was advantageous for the rljGH production. The duration of the rljGH production was increased to 23 h from 17 h and the fermentation stability of run-to-run could be improved.

Keywords: *Pichia pastoris*, Intracellular production, Exponential feeding, Specific growth rate

鱼生长激素是由 190 个左右的氨基酸残基组成的一种蛋白质, 在鱼的脑垂体前叶合成。它在鱼的生长、发育、代谢、摄食和渗透调节方面起着关键作用。已有报道表明胞内表达鱼生长激素的重组酵母能大大促进鱼的生长^[1]。由于酵母本身就是一种良好的蛋白补充剂, 再加上对人体无副作用的重组鱼生长激素的促生长作用, 这种具备双重功效的重组酵母作为绿色饲料添加剂在水产养殖业具有良好的应用前景。工业化生产这种重组酵母是实现其应用价值的前提。因此, 本文对毕赤酵母胞内表达重组鲈鱼生长激素(recombinant growth hormone of *Lateolabrax japonicus*, rljGH)的发酵工艺进行了研究。相对于分泌表达而言, 对毕赤酵母胞内表达体系的发酵研究较少。而毕赤酵母胞内表达具有分泌表达不可代替的一些优点, 比如能够表达一些不需要糖基化或较少糖基化的蛋白和疏水性的膜相关蛋白等^[2]。因此, 对 rljGH 表达菌株的发酵研究也有助于增加对毕赤酵母胞内生产重组蛋白的认识。指数流加甲醇策略是应用于毕赤酵母高密度发酵中的一种有效的甲醇流加策略^[3]。本文建立了一套能应用于发酵罐生产重组鲈鱼生长激素的指数流加甲醇策略, 优化了诱导阶段比生长速率, 揭示了比生长速率对胞内积累 rljGH 的影响, 并进一步考察了氮源添加物在诱导阶段对生产的影响。

1 材料与方法

1.1 菌种

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)GS115 用作重组表达的宿主(Invitrogen 公司)。鲈鱼生长激素基因被整合到毕赤酵母胞内表达载体质粒 pHIL-D2, 然后转化宿主菌 GS115 获得 Mut⁺型的重组表达菌株。通过甲醇诱导, 鲈鱼生长激素能在毕赤酵母细胞内表达^[4]。

1.2 培养基

种子培养基 (1 L): YNB(Yeast nitrogen base without amino acids, Sigma 公司) 13.4 g, 甘油 10 g, 生物素 0.4 mg; 发酵用 BSM(Basal salt medium)培养基(1 L): 甘油 40 g, 85% H₃PO₄ 26.7 mL, CaSO₄ 0.93 g, K₂SO₄ 18.2 g, MgSO₄·7H₂O 14.9 g, KOH 4.13 g, ANTIFOAM 204 (Sigma) 0.3 mL, PTM1 4.5 mL。

甘油补料培养基: 50% (W/V) 甘油(含 12 mL/L PTM1); 甲醇补料培养基: 含有 12 mL/L PTM1 的甲醇。

PTM1^[3]。

1.3 发酵

1.3.1 诱导阶段指数流加甲醇: 酵母细胞在种子培养基里生长至 OD₆₀₀ 为 6 时, 以 10%的接种量接种到装有 3 L BSM 培养基的 5 L 发酵罐中(华东理工大学阿华生物工程研究所, 型号 EHUA5L-A)开始分批培养。用 28%的氨水控制 pH 在 5.0, 温度控制在 30℃, 溶氧(DO)控制在空气饱和的 40%, 必要时补充纯氧。一旦 DO 迅速回升, 表示培养基里的甘油完全消耗, 分批培养结束, 开始以 15 mL/(L·h) 的流速补加 50% (W/V)甘油。3.5 h 后停止甘油补料, 无菌操作条件下取出 4 份 500 mL 的培养液分别加到 4 个 1 L 发酵罐中作不同条件的培养。在每一个 1 L 发酵罐中, 先加入 2 mL 甲醇以便酵母快速适应甲醇, 1.5 h 后以 2.5 mL/(L·h) 的流速补加甲醇 2 h, 然后按指数流加策略流加甲醇以控制不同的比生长速率。

1.3.2 诱导阶段添加不同的氮源: 甘油分批阶段、甘油补料阶段以及甲醇适应期的操作同上, 甲醇适应后按优化的比生长速率以指数策略流加甲醇。指数流加甲醇 11 h 后把 5 L 罐中的培养液分装至多个 1 L 发酵罐中继续培养, 同时考察添加(NH₄)₂SO₄ (12 g/L)、蛋白胨(Peptone, 2.5 g/L)和酵母抽提物(Yeast extract, 2.5 g/L, 5 g/L 和 15 g/L)的影响。

1.4 分析方法

1.4.1 细胞湿重(WCW)测定: 取 1 mL 发酵液, 以 10000 × g 离心 5 min, 去上清, 称量菌体湿重(WCW)。取至少 3 次测定的平均值。

1.4.2 鲈鱼生长激素的测定: 毕赤酵母细胞以 270 g/L 的浓度悬于裂解缓冲液中(100 mmol/L Tris-Base (Tris(hydroxymethyl) aminomethane), 25 mmol/L EDTA, 1 mmol/L PMSF (phenylmethylsulfonylfluoride), 0.01 mmol/L pepstatin A, 用盐酸调 pH 到 8.0, PMSF 和 pepstatin A 用前现加), 充分混匀。取 1.1 mL 菌悬液装入 1 个 2 mL 的破壁专用管(Biospec Products, Bartlesville, USA)中, 加 1.8 g 玻璃珠, 然后在细胞破碎仪(Mini-BeadBeater-8, Biospec Products)上高速振荡 6 个循环(每循环为 2 min 振荡加 2 min 冰浴)。收集裂解液并用低温冷冻离心机在 4℃ 条件下, 20000 × g 离心 30 min, 以去除细胞碎片, 得到含可溶鲈鱼生长激素的裂解上清。以 Western blot 方法对裂解上清中的鲈鱼生长激素进行测定^[5,6]。

1.4.3 平均比生产速率的计算方法: 参见文献[7]。

2 结果与讨论

2.1 指数流加甲醇模型的建立

由物料平衡可知, 在毕赤酵母发酵的甲醇诱导阶段, 甲醇比消耗速率 v_M (g/g WCW/h) 满足以下关系:

$$v_M = \frac{\mu_M}{Y_{X/M}} = \frac{\mu_M}{Y_{X/M,M}} + m \quad (1)$$

其中, μ_M 是菌体以甲醇为碳源的比生长速率(1/h), $Y_{X/M}$ 是菌体关于甲醇的得率(g WCW/g), $Y_{X/M,M}$ 是菌体关于甲醇的最大得率(g WCW/g), m 是菌体以甲醇为碳源的维持系数(g/g WCW/h)。 $Y_{X/M,M}$ 和 m 可认为恒定, 但是很难直接得到其数值, 而 v_M 和 μ_M 可以由发酵数据直接计算出。因此通过先前的多批发酵得到多组 v_M 和 μ_M 的数据, 回归出两者之间的线性关系, 由所得直线的斜率和截距就可得到 $Y_{X/M,M}$ 和 m , 结果见图 1。

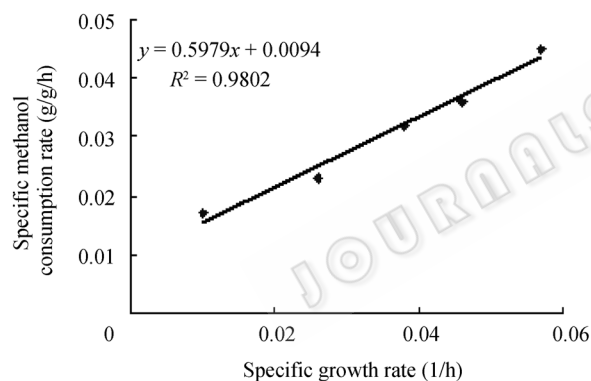


图 1 甲醇比消耗速率与比生长速率的关系

Fig. 1 Relationship between specific methanol consumption rate and specific growth rate

图 1 表明了甲醇比消耗速率与比生长速率呈线性关系($R^2=0.98$), 因此得下述方程:

$$v_M = 0.6\mu_M + 0.0094 \quad (2)$$

在甲醇限制性补料的条件下, 若要保持恒定的比生长速率, 在指数流加时间为 t 时的甲醇补料速率 $F_{M,t}$ (mL/h) 应当满足下述方程^[8,9]:

$$F_{M,t} = v_M X_t V_t / 0.792 = v_M X_0 V_0 e^{\mu_M t} / 0.792 \quad (3)$$

其中, X_t (g WCW/L) 和 V_t (L) 分别为指数流加时间 t 时的湿细胞密度和发酵液体积, X_0 (g WCW/L) 和 V_0 (L) 分别为指数流加开始点的湿细胞密度和发酵液体积,

0.792(g/mL) 是甲醇的密度。把方程(2)代入方程(3)即得到指数流加甲醇方程:

$$F_{M,t} = (0.6\mu_M + 0.0094) X_0 V_0 e^{\mu_M t} / 0.792 \quad (4)$$

2.2 比生长速率对 rljGH 胞内积累的影响

设定 4 个不同的比生长速率 0.015/h, 0.035/h, 0.05/h, 0.065/h, 应用方程(4)进行指数流加。通过指数流加甲醇, 酵母能保持较恒定的比生长速率。由于系统误差, 实际得到的比生长速率比设定的要小, 分别为 0.011/h, 0.029/h, 0.043/h, 0.058/h。

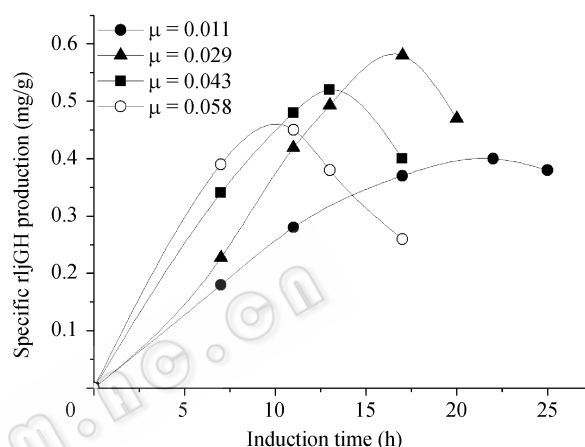


图 2 不同比生长速率下的比 rljGH 产量时间曲线

Fig. 2 Time course of specific rljGH production at different specific growth rates

图 2 表明, 在这 4 个比生长速率下, 比 rljGH 产量(每克湿细胞重对应的 rljGH 产量)的时间变化趋势是类似的, 即都是先增加而后下降。但是, 所能达到的最大比 rljGH 产量及其相对应的诱导时间是不同的。当比生长速率维持在相对较高的 0.058/h 时, 比 rljGH 产量在诱导 11 h 后就达到最大值; 相反, 在 0.011/h 时, 比 rljGH 产量在诱导 23 h 后才达到最大值。当比生长速率维持在 0.029/h 时, 诱导 17 h 后比 rljGH 产量达最大, 而且其最大比 rljGH 产量是 4 个比生长速率里最高的。过高或过低的比生长速率均不利于 rljGH 的胞内积累。

除了影响收获时间和比 rljGH 产量以外, 比生长速率还影响细胞密度、体积产量和平均比生产速率(表 1)。随着比生长速率的增加, 平均比生产速率明显增加。特别是在比生长速率为 0.058/h 时, 平均比生产速率达到 0.071 mg/g WCW/h。但是考虑到其比 rljGH 产量比 0.029/h 时明显减少, 我们选择比生长速率 0.029/h 为最优的诱导阶段比生长速率。

表 1 比生长速率对发酵结果的影响					
Table 1 Effect of specific growth rate on fermentation performance					
比生长速率 Specific growth rate (1/h)	收获时间 Harvest time (h)	细胞密度 Cell density (g WCW/L)	rIjGH 体积产量 Volumetric rIjGH production (mg/L)	比 rIjGH 产量 Specific rIjGH production (mg/g WCW)	平均比生产速率 Average specific production rate (mg/g WCW/h)
0.011	22	182	72.8	0.4	0.025
0.029	17	217	125.9	0.58	0.051
0.043	13	223	116.0	0.52	0.064
0.058	11	229	103.1	0.45	0.071

鲈鱼生长激素在毕赤酵母胞内积累到一定量就减少，这一现象在其他毕赤酵母胞内蛋白生产过程中也存在^[10]。其机理可能和毕赤酵母生理状态的变化以及重组蛋白合成与降解的动态平衡相关^[11, 12]。而比生长速率有可能影响毕赤酵母的生理状态以及细胞生长与重组蛋白生产之间的能量平衡。

2.3 诱导阶段添加氮源对胞内 rIjGH 积累的影响

有研究表明添加氮源能够促进毕赤酵母表达重组蛋白^[13,14]。因此，我们进一步研究了在诱导阶段添加硫酸铵、蛋白胨和酵母抽提物对胞内 rIjGH 积累的影响。

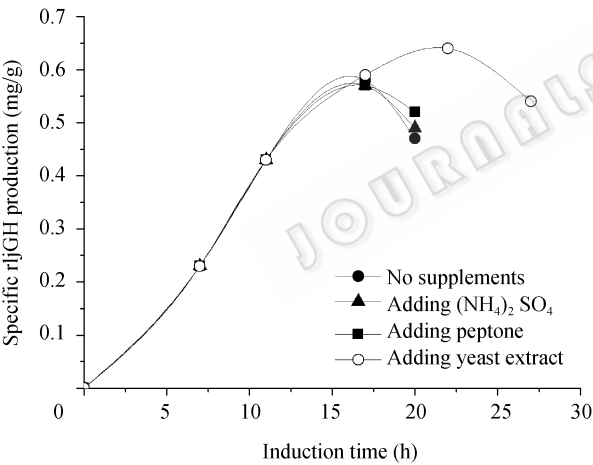


图 3 甲醇诱导阶段添加硫酸铵、蛋白胨和酵母抽提物对比 rIjGH 产量的影响
Fig. 3 Effect of adding ammonium sulfate, peptone and yeast extract on specific rIjGH production during methanol induction

图 3 表明诱导阶段添加 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 和蛋白胨对胞内 rIjGH 的表达没有显著影响。添加更高浓度(如 15 g/L 以上)的蛋白胨反而使 rIjGH 产量减少(数据未列出)。添加 2.5 g/L 的酵母抽提物使比 rIjGH 产量提高 10%，诱导时间从 17 h 延长到 23 h(图 3)。虽然添加酵母抽提物没有大幅度提高胞内 rIjGH 积累量，

但是显著地延长了诱导时间、缓和了胞内产量在高峰后下降的趋势，有利于提高发酵稳定性。蛋白胨的主要成分是短肽和游离氨基酸，而图 3 的结果说明添加单一的短肽和氨基酸并不能提高 rIjGH 表达量。同样，只添加 NH_4^+ 也不能提高产量。酵母抽提物主要成分是游离氨基酸、短肽、核苷酸、维生素(特别是 B 族维生素)、微量元素、谷胱甘肽等。核苷酸、维生素、微量元素和谷胱甘肽等成分有可能是提高 rIjGH 产量的有效因子。另外也有可能是营养成分的组合效应所致。由于甲醇代谢的毒性，部分毕赤酵母的代谢活力不断下降^[12]，而酵母抽提物中的多种生长因子有可能恢复其代谢活力从而提高重组蛋白表达量。有研究表明添加酵母抽提物能够提高毕赤酵母甲醇代谢关键酶 AOX(Alcohol oxidase)的比活以及 AOX 的稳定性^[15]。酵母抽提物的作用机制尚需进行专门的研究。

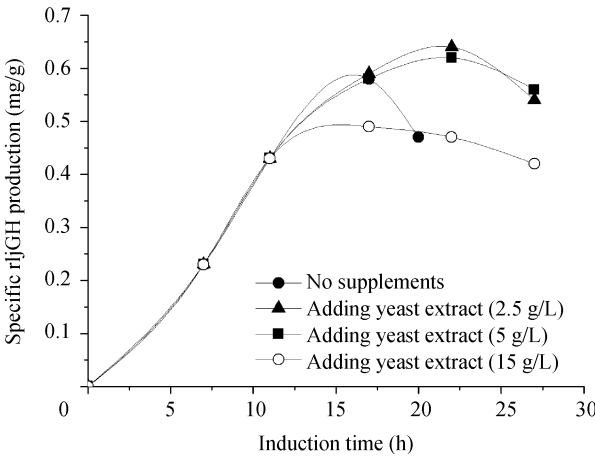


图 4 甲醇诱导阶段添加不同浓度酵母抽提物对比 rIjGH 产量的影响
Fig. 4 Effect of supplements of different concentration yeast extract on specific rIjGH production during methanol induction

进一步考察了添加更高浓度酵母抽提物对 rIjGH 表达的影响(图 4)。结果表明，添加 5 g/L 酵母

抽题物和添加 2.5 g/L 酵母抽题物的结果没有显著不同。添加 15 g/L 酵母抽题物导致了胞内 rIjGH 积累量的减少,在这种情况下,毕赤酵母可能优先把酵母抽提物用作了碳源,导致重组蛋白表达减少;也有可能是过于丰富的营养导致蛋白过量表达引发重组蛋白误折叠响应所致。所以,2.5 g/L 酵母抽提物的添加量比较合适。

3 结论

通过拟和获得甲醇比消耗速率与比生长速率的线性关系,建立了指数流加甲醇的策略,利用该策略对诱导阶段不同比生长速率的影响进行了研究,结果表明比生长速率对于毕赤酵母胞内生产 rIjGH 的各项指标有显著影响。比生长速率越高,rIjGH 的平均比生产速率越高,而收获时间越早。但是过高或过低的比生长速率均不利于胞内 rIjGH 的积累,适度的比生长速率如 0.029/h 最有利于胞内积累 rIjGH。考察了在诱导期间添加硫酸铵、蛋白胨和酵母抽提物的影响。结果表明,添加 2.5 g/L 的酵母抽提物能够提高胞内 rIjGH 积累量 10%,延长诱导时间 6 h。鲈鱼生长激素本身的特点可能限制了它在毕赤酵母胞内的大量积累。

参 考 文 献

- [1] Acosta J, Morales R, Morales A, *et al.* *Pichia pastoris* expressing recombinant tilapia growth hormone accelerates the growth of tilapia. *Biotechnol Lett*, 2007, **29**: 1671–1676.
- [2] Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *J Mol Recognit*, 2005, **18**: 119–138.
- [3] Trinh LB, Phue JN, Shiloah J. Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. *Biotechnol Bioeng*, 2003, **82**(4): 438–444.
- [4] 陈 丹, 杨 丰, 王 玮, 等. 鲈鱼生长激素在甲醇酵母中的胞内表达. *生物化学与生物物理进展*, 1998, **25**(2): 140–143.
- [5] d'Anjou MC, Daugulis AJ. A rational approach to improving productivity in recombinant *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnol Bioeng*, 2001, **72**: 1–11.
- [6] Zhang W, Hywood-Potter KJ, Plantz BA, *et al.* *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 2003, **30**: 210–215.
- [7] Sakai K, Matsunaga T, Hayashi C, *et al.* Effects of phosphatidic acid on recombinant protein production by Chinese hamster ovary cells in serum-free culture. *Biochem Eng J*, 2002, **10**: 85–92.
- [8] d'Anjou MC, Daugulis AJ. Mixed-feed exponential feeding for fedbatch culture of recombinant methylotrophic yeast. *Biotechnol Lett*, 2000, **22**: 341–346.
- [9] Zhou X, Zhang Y. Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by *Pichia pastoris* by controlling the specific growth rate. *Biotechnol Lett*, 2002, **24**: 1449–1453.
- [10] Potter KJ, Zhang W, Smith LA, *et al.* Production and purification of the heavy chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A, expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expression Purif*, 2000, **19**: 393–402.
- [11] Rozkov A, Schweder T, Veide A, *et al.* Dynamics of proteolysis and its influence on the accumulation of intracellular recombinant proteins. *Enzyme Microb Technol*, 2000, **27**: 743–748.
- [12] 肖安风, 周祥山, 周 利, 等. 应用流式细胞术检测毕赤酵母的细胞活性. *微生物学通报*, 2006, **33**(6): 22–26.
- [13] Yang J, Zhou X, Zhang Y. Improvement of recombinant hirudin production by controlling NH_4^+ concentration in *Pichia pastoris* fermentation. *Biotechnology Letters*, 2004, **26**: 1013–1017.
- [14] Chauhan AK, Arora D, Khanna N. A novel feeding strategy for enhanced protein production by fed batch fermentation in recombinant *Pichia pastoris*. *Process Biochem*, 1999, **34**: 139–145.
- [15] Murray WD, Duff SJB, Lanthier PH. Induction and stability of alcohol oxidase in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1989, **32**: 95–100.