

不同甲醇流加策略对重组毕赤酵母高密度发酵生产水蛭素的影响

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 考察了不同甲醇流加策略对毕赤酵母高密度发酵生产水蛭素的影响。溶氧控制法不能有效地防止甲醇的过量流加。气相色谱离线检测法虽然防止了甲醇流加过量,但甲醇浓度的波动较大。利用甲醇传感器在线检测控制甲醇的流加可维持较恒定的甲醇浓度。在流加甲醇的同时,以限制性速率流加甘油可以增加表达期间的能量供应,提高产物的表达量。经优化后,采用甲醇甘油混合流加时细胞干重达到 162g/L,水蛭素活性达到 2.4×10^4 ATU/mL,即 1.7 g/L。

关键词 毕赤酵母,水蛭素,甲醇,流加,发酵

中图分类号 Q939.9 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)03-0348-04

水蛭素是一种 65 ~ 66 个氨基酸的无糖基化多肽,约 7kD,它能特异性地与凝血酶结合,是迄今为止已发现的对凝血酶抑制作用最强的抗凝药物^[1]。水蛭素能有效地预防和治疗冠状动脉疾病、静脉血栓、弥散性血管内凝血等疾病^[2]。由于水蛭素不与血小板反应,它在治疗肝素诱导的血小板减少症(HIT)方面具有其他抗凝药物无法比拟的效果^[3]。

从医用水蛭中提取天然水蛭素满足不了临床的大量需求。利用大肠杆菌、链霉菌、酿酒酵母、汉逊酵母、转基因烟草等表达重组水蛭素已见报道,但产量较低。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腈水解酶(*Hevea brasiliensis* hydroxynitrile lyase)产量高达 22g/L^[4],胞外表达的组织坏死因子产量超过 7g/L^[5]。但目前国内外关于毕赤酵母的报道集中在基因表达方面,而关于高密度发酵优化的报道较少。本文报道了在 5L 发酵罐中不同甲醇流加策略对重组毕赤酵母高密度发酵生产水蛭素的影响,为大规模工业化生产奠定了基础。

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)^[1]。

1.1.2 培养基:种子培养基为 MGY 培养基,发酵培养基为 BSM 培养基^[6]。

1.2 方法

1.2.1 流加发酵:将保藏菌种接种到 30mL MGY 种子培养基中,在 30℃,250r/min 下培养 20 ~ 25h 后,按 10% 接种量接入装 2L BSM 的 5L 发酵罐中进行发酵,pH5.0,DO 维持 30% 以上。约 20h 后,甘油耗尽(DO 迅速上升),流加甘油(50%,W/V,含 12mL/L PTM^[6])约 5h 后停加甘油,开始以不同方式流加甲醇(100%,含 12mL/L PTM)诱导水蛭素的表达。

1.2.2 分析方法:甘油用甘油试剂盒(Roche 公司)分析。甲醇用岛津 GC-14C 分析。细胞干重测定:10mL 发酵液 10000r/min 离心 10min,去上清,水洗 2 次,80℃ 烘干至恒重。水蛭素活性采用发色底物 chromozym TH(Sigma 公司)测定^[7]。

2 结果与讨论

2.1 根据溶氧控制甲醇流加

微生物发酵过程中,pH、溶氧(DO)等参数可以反应碳源的消耗情况。当碳源消耗完时,DO 会上升,如果再加入碳源,由于微生物利用碳源会消耗氧,使 DO 下降。利用这个原理可根据 DO 的变化控制毕赤酵母发酵过程中甲醇的流加。

如图 1 所示,水蛭素发酵中,在 20h 甘油耗尽,

细胞干重为 27.5g/L。再流加甘油 5h 后细胞干重达到 53.2g/L。从第 25h 开始以 3mL(L/h)的速率流加甲醇。2h 后 ,将流加速率提高到 6mL(L/h)。在最初的几个小时内 ,毕赤酵母还没有完全适应甲醇 ,这时 DO 不稳定 ,不能反应甲醇的消耗情况。从第 29h 开始 ,以 9mL(L/h)的速率流加甲醇。将转速调整为 850r/min ,氧气与空气按 1/3 混合 ,并以 1vvm 的流量通气。由于这时毕赤酵母已完全适应甲醇 ,开始快速利用甲醇 ,DO 开始逐渐上升。这时可以根据 DO 的变化控制甲醇的流加 ,即一旦 DO 上升至 45% ,则将甲醇流加速率增加 20% ,使 DO 缓慢下降至 30%。若 DO 仍高于 30% ,则继续增大甲醇的流加速率。

从图 1 中可看出 ,利用 DO 控制甲醇流加不能有效控制发酵液中的甲醇浓度。在第 72h ,甲醇浓度高达 7.1g/L。一般甲醇浓度高于 5g/L 会抑制酵母的生长 ,所以虽然这时停止流加甲醇 ,但直到 80h 甲醇浓度才降到 5g/L 以下。在这期间 ,细胞生长一直被抑制 ,水蛭素活性增长速率也显著下降。80h 后虽然降低甲醇流加速率使发酵液中的甲醇浓度维持在较低水平 ,但细胞仍生长不多 ,可能是高浓度甲醇已造成细胞损伤 ,水蛭素表达水平基本没有增加。发酵过程中相对于每升初始培养基共流加甲醇 470mL ,其中 91h 细胞量为最高 ,为 112g/L ,水蛭素活性最高只有 9.5×10^3 ATU/mL。

在甲醇流加过程中 ,如果某时刻甲醇流加过量导致细胞的生长受到抑制 ,则菌体的耗氧速率下降 ,表观上 DO 会上升(如图 1 中 60~72h) ,这反倒会使人误以为是甲醇浓度较低 ,从而增大流加速率 ,结果使甲醇浓度越来越高。因此利用 DO 控制毕赤酵母发酵过程中甲醇的流加不是一种有效的方法。

2.2 通过气相色谱检测控制甲醇流加

开始流加甲醇后 ,每隔 1h 取样 ,用气相色谱离线检测甲醇浓度。若甲醇浓度超过 3g/L ,则降低甲醇的流加速率 ,使甲醇浓度控制在 3g/L 以下。经过 87h 发酵 ,共流加甲醇 620mL/L ,细胞密度达到 135g/L ,比通过 DO 控制流加时细胞量增加了 20.5%。由于整个过程中没有出现过量甲醇的抑制 ,水蛭素活性最高达到 1.4×10^4 ATU/mL。相对于 DO 控制流加 ,通过气相色谱控制流加水蛭素产量提高了 47.4%。

从图 2 可看出 ,整个过程中甲醇浓度虽然在 3g/L 以下 ,但由于离线检测的滞后性 ,很难精确控制甲醇的流加 ,导致甲醇浓度的波动较大 ,时高时低。

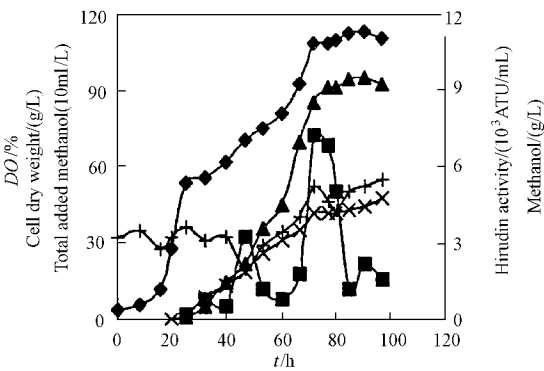


图 1 根据 DO 控制甲醇流加发酵水蛭素过程中的变化
Fig.1 Methanol concentration(■), cell dry weigh(◆), hirudin activity(▲), total methanol of feeding(×) and DO(+) in hirudin fed-batch fermentation with methanol feeding based on DO strategy

文献报道 ,毕赤酵母 Mut⁺ 菌株对瞬间甲醇浓度的变化非常敏感 ,这些变化会使甲醇氧化酶(AOX)失活甚至使细胞死亡^[8]。因此使发酵液中的甲醇浓度维持恒定非常重要。气相色谱检测控制甲醇流加过程中甲醇浓度的不稳定 ,影响了水蛭素表达量的进一步提高。另外 ,离线检测需经常取样分析 ,这也限制了这种方法的实际应用。

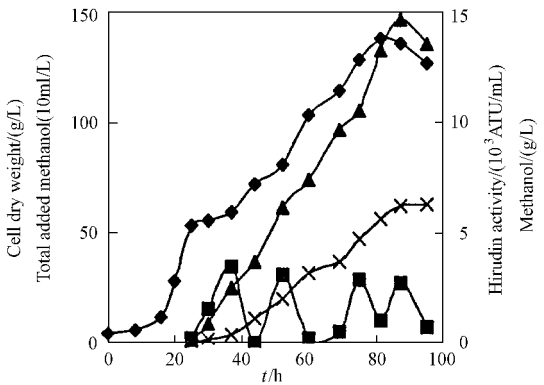


图 2 通过气相色谱检测控制甲醇流加发酵水蛭素过程中的变化

Fig.2 Methanol concentration(■), cell dry weigh(◆) hirudin activity(▲) and total methanol of feeding(×) in hirudin fed-batch fermentation with methanol feeding based on off-line gas chromatography

2.3 甲醇传感器在线检测控制甲醇的流加

利用甲醇传感器在线检测发酵液中的甲醇浓度 ,由于该传感器灵敏度高 ,响应时间小于 2min ,因此能有效地控制甲醇的流加 ,使甲醇的浓度维持恒定^[9]。如图 3 所示 ,在前 5h 的适应期内 ,维持甲醇浓度为 0.5g/L ,之后维持甲醇浓度为 2g/L。发酵 94h 时共流加甲醇 710mL ,细胞干重达到 155g/L ,水蛭素

活性达到最高值 1.9×10^4 ATU/mL,比气相色谱离线检测产量提高了 35.7%。由此可看出,在毕赤酵母发酵过程中,维持稳定的甲醇浓度非常重要。

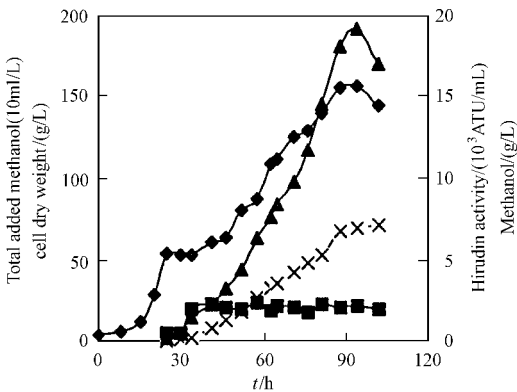


图 3 甲醇传感器在线检测控制甲醇流加发酵水蛭素过程中的变化

Fig.3 Methanol concentration (■), cell dry weigh(◆), hirudin activity(▲)and total methanol of feeding(×) in hirudin fed-batch fermentation with methanol feeding based on on-line sensor monitoring

2.4 甲醇-甘油混合流加

毕赤酵母表达外源蛋白期间,甲醇一方面作为碳源构成细胞骨架,使细胞生长;另一方面又作为能源物质用于菌体的生长、维持代谢及外源蛋白的表达。由于菌体生长需要大量能量,与产物表达竞争能量,导致用于产物表达的能量不足,使产量偏低。提高能量供应的最简单方法是提高发酵液中的碳源浓度。但甲醇浓度的增加会抑制细胞的生长甚至导致细胞的死亡,添加葡萄糖则抑制甲醇氧化酶启动子 P_{AOX} 的启动,使外源基因不能正常表达。添加甘油并使甘油处于限制性状态不会抑制甲醇氧化酶启动子,并可增加能量的供应,从而增加外源蛋白的表达。

甘油-甲醇混合流加实验如图 4 所示。利用甲醇传感器控制甲醇的流加,前 5h 控制甲醇浓度为 0.5g/L,之后控制甲醇浓度为 2g/L。同时在甲醇诱导后 20h,即发酵 45h 时开始以 5mL/L (L/h) 的速率流加甘油,由于诱导阶段甘油流加量少,发酵罐中残余甘油浓度基本为零,不会抑制水蛭素的表达。发酵 90h 时细胞干重达到 162g/L,水蛭素活性达到最高值 2.4×10^4 ATU/mL。

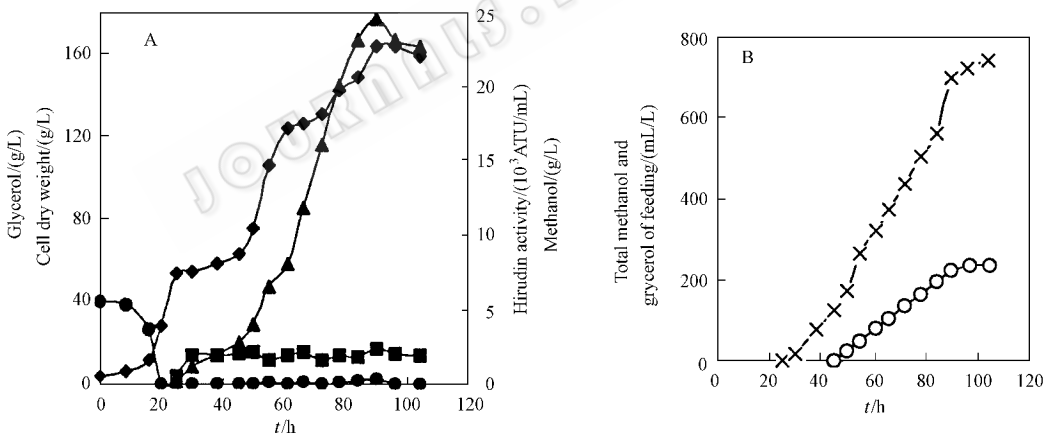


图 4 甘油甲醇混合流加发酵水蛭素过程中的变化

Fig.4 Methanol concentration (■), glycerol concentration(●), cell dry weigh(◆), hirudin activity(▲), total methano(×) and glycerol(O) of feedings in hirudin fed-batch fermentation with glycerol-methanol mixed feeding

混合流加发酵 90h 表达量最高时,共流加甲醇 695mL(图 4B),和图 3 只流加甲醇差不多。甘油共流加 225mL,一般甘油对菌体的得率系数为 0.42,理论上细胞量应增加 59g/L(甘油密度为 1.26,浓度为 50%,W/V)。但从图 4A 中可看出,相对于图 3 中只添加甲醇,虽然混合流加发酵 45h 时添加甘油后细胞量增长迅速,但最终的细胞量增加很少。这说明添加的甘油主要是用于异化供能了。由于增加了能量的供应,水蛭素产量提高,总活性增加了 26.3%。

3 结 论

在基因工程重组毕赤酵母发酵生产外源蛋白时,由于过高浓度的甲醇抑制细胞的生长和产物的表达,因此通过合适的策略控制甲醇的流加是提高外源蛋白表达量的关键。

通过溶氧(DO)控制甲醇的流加时不能有效地防止甲醇流加过量。通过气相色谱离线检测控制甲醇的流加虽然防止了甲醇流加过量,但甲醇浓度的

波动较大,影响了毕赤酵母 *Mut⁺* 菌株产物的表达。利用甲醇传感器在线检测控制甲醇的流加可维持平稳的甲醇浓度,提高产物的表达。另外,在流加甲醇的同时,以限制性速度流加甘油可以增加表达期间的能量供应,提高产物的表达量。

在水蛭素发酵方面,目前国内报道的最高产量低于 100 ATU/mL,仅相当于 7.5 mg/L;国外已报道的最高产量为美国杜邦公司,他们在 5 L 发酵罐中发酵 95 h 后细胞干重约 110 g/L,水蛭素产量为 1.5 g/L^[10]。本文经过优化,利用甲醇传感器控制甲醇的流加,同时混合流加甘油,水蛭素的最高产量达到 2.4×10^4 ATU/mL。一般重组水蛭素的比活为 1.35×10^4 ATU/mg,则水蛭素的产量已达到 1.7 g/L。

REFERENCES (参考文献)

[1] ZHOU W R (周卫斌), ZHOU X S (周祥山), ZHANG Y X (张元兴). Decolorization and isolation of recombinant hirudin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2001, **17** (6): 683 ~ 687

[2] Rydel T J, Ravichandran K G, Tulinsky A. The structure of a complex of recombinant hirudin and alpha-thrombin. *Science*, 1990,

249: 277 ~ 280

[3] Adkins J C, Wilde M I. Lepirudin: a review of its potential place in the management of thrombotic disorders. *Biodrugs*, 1998, **10**: 227 ~ 255

[4] 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

[5] Dale C, Allen A, Fogerty S. *Pichia pastoris*: a eukaryotic system for the large-scale production of biopharmaceuticals. *BioPharm*. 1999, **12** (11): 36 ~ 42

[6] Sreekrishna K, Kropp K E. *Pichia pastoris*. In: Wolf K, eds. Non-conventional yeast in biotechnology: A handbook. Berlin: Springer-Verlag Press, 1996, pp. 203 ~ 253

[7] Spannagl M, Bichler H, Lill H, Schramm W. A fast photometric assay for the determination of hirudin. *Haemostasis*, 1991, **21** (suppl 1): 36 ~ 40

[8] Couderc R, Baratti J. Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*, purification and properties of the alcohol oxidase. *Agric Biol Chem*, 1980, **44**: 2279 ~ 2289

[9] ZHANG Y X (张元兴), ZHOU X S (周祥山), LU J (陆健), FAN W M (范卫民). A novel methanol sensor for on-line determination methanol in liquid. China Patent, Application No. 01132168.7

[10] Rosenfeld S A, Nadeau D, Tirado J *et al.* Production and purification of recombinant hirudin expressed in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *Protein Expr Purif*, 1996, **8**: 476-482

Effects of Different Methanol Feeding Strategy on Hirudin Production in High-density Fermentation by Recombinant *Pichia pastoris*

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 Four different methanol feeding modes were evaluated in the hirudin production in high-density fermentation by *Pichia pastoris*. It was difficult to avoid methanol excessive in the broth with the feeding strategy only based on *DO* level. On the other hand, the fluctuation in methanol concentration was observed with methanol feeding strategy by off-line gas chromatography. However, the stable methanol concentration was perfectly achieved by the on-line monitoring with methanol sensor. The supply of energy was improved by feeding glycerol at a limited rate as well as methanol in the induction phase. Therefore, the high cell dry weight (162 g/L) and high hirudin activity (2.4×10^4 ATU/mL or 1.7 g/L) was obtained in the fed-batch fermentation of recombinant *Pichia pastoris* by methanol-glycerol mixed feeding.

Key words hirudin, *Pichia pastoris*, methanol, fed-batch, fermentation