

重组人血清白蛋白发酵过程表达期的定量研究

黄明志* 郭美锦 储 炬 杭海峰 庄英萍 张嗣良

(华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 国家生化工程技术研究中心 生物工程学院 上海 200237)

摘 要 结合元素平衡和代谢平衡,建立了重组人血清白蛋白发酵过程表达期的数学模型,按单纯形多变量最优化方法估算了模型的未知参数,并探讨了导致表达期不同阶段产物形成速率存在差异的可能原因。该模型能较好地描述重组人血清白蛋白发酵过程表达期中各宏观反应速率之间的关系,为重组人血清白蛋白的高效表达提供了线索。

关键词 重组人血清白蛋白(rHSA),代谢平衡,元素平衡,*Pichia pastoris*

中图分类号 Q939.97 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2003)01-0081-06

近年来,各国政府和科研机构都投入了大量的人力物力进行“人类基因组计划”研究,试图破译人类染色体基因,了解各个人类基因的组成及其功能。人血清白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)基因是了解得较早较清楚的人类基因之一,已被克隆到众多的表达系统(*E. coli*, *Bacillus subtilis*, *Pichia pastoris*等)中进行表达。其中,甲醇酵母(尤其是 *Pichia pastoris*)表达系统以其表达效率高、表达产物稳定和产物分泌到胞外等一系列优点而得到了广泛应用^[1],但由于缺乏足够的参数检测 and 数据处理技术,众多的研究工作主要是在摇瓶规模的表达系统构建、培养基成分和培养条件的简单优化等方面展开,一直没有进行 rHSA 表达系统的定量研究。

近二三十年来,描述发酵过程中微生物生长和产物形成的定量方法已有了长足的进步,而且随着各种分析技术,如酶分析和质谱技术的发展,发酵过程的定量方法也在不断地取得新的进展^[2-5]。元素平衡方法^[6-8]和代谢平衡方法^[9-11]分别是发酵过程定量研究的两种主要方法。元素平衡方法从宏观角度研究发酵过程,所得到的大多是经验方程,未能充分利用已有的菌体代谢途径知识,方程参数没有明显的物化或生物学意义,结果往往难以令人信服。而代谢平衡方法尽管是以菌体内部的代谢途径为基础,各种参数有其物化或生物学意义,但由于菌体内部的中间代谢物往往难以检测,使得代谢平衡方法所建立的方程的未知参数难以估计,很难在实际中

应用,可操作性不强。

因此,综合利用元素平衡和代谢平衡,从宏观和微观角度综合地研究发酵过程,一直是定量研究的一个重要方向。在多位前人研究工作的基础上, J. A. de Hollander 提出了集元素平衡和代谢平衡两种方法之长于一身的研究方法(以下简称综合方法),并推导出了应用该方法的前提条件^[12]。

以 *Pichia pastoris* 为宿主菌的 rHSA 发酵过程可分为生长期和表达期两个阶段。在生长期, *Pichia pastoris* 以甘油为碳源和能源;在表达期,甲醇既是碳源和能源,同时又是诱导物。前文^[13]对生长期进行了定量研究,实现了菌体的高密度培养,为 HSA 的高效表达打下了良好的基础。在生长期研究的基础上,利用综合方法对 rHSA 发酵过程表达期进行了定量研究,试图解释发酵过程呈现出的代谢行为和特征,为工艺优化提供线索。

1 材料与方法

1.1 供试菌株

Pichia pastoris GS115 菌株,遗传表型 aox⁺ his⁺, 醇氧化酶启动子 P_{AOXI}, 载体 pPIC9K, 蛋白引导序列来自酿酒酵母的 α -杂交因子 AMF, 外源基因为 HSA cDNA, 载体呈线型整合在染色体上。

1.2 培养基

1.2.1 种子培养基 按文献^[14]配制。

1.2.2 基础培养基 按文献^[14]配制。

收稿日期 2002-07-18, 修回日期 2002-10-28。

基金项目 国家自然科学基金(No. 29976013)和上海市重点学科基金资助。

* 通讯作者。 Tel 86-21-64253522 E-mail huangmingzhi@263.net.cn

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

1.3 分析方法

1.3.1 酵母细胞密度分析:菌液稀释后于波长 600nm 处以去离子水为对照比色测定。

$$OD_{600} = OD \text{ 读数} \times \text{稀释倍数}$$

1.3.2 甲醇测定方法:气相色谱法^[15]。

1.3.3 $\text{NH}_2 - \text{N}$ 测定:甲醛滴定法^[16]。

1.3.4 蛋白质测定:考马斯亮蓝显色法^[17]。

1.4 发酵过程与数据采集

以 10% 的接种量接种到装料 150L 的 500L 试验罐,维持温度在 30℃ 左右,依次调节搅拌转速、空气流量和罐压以维持 DO 在 20% 以上,用氨水调节 pH 在 5~6 之间。甘油耗尽时开始流加甘油,流加速率按前文^[14]研究结果设定。当菌体浓度达到一定值后开始流加甲醇,转入 rHSA 诱导表达阶段。在发酵过程中,定时取样分析菌体浓度、底物浓度和产物浓度等难以直接在线测定的参数。

在 500L 试验罐上,自行设计了一套生物过程在线监控系统软件 Bioradar^[18],以 1 次/min 的频率在线检测温度、溶氧、pH、转速、空气流量、发酵液体积、罐压、补甘油总量、补甲醇总量、补氨水总量、补甘油速率、补甲醇速率、补氨水速率、尾气中氧和二氧化碳的百分含量等 15 个参数,计算 OUR、CER、 K_{1a} 、RQ 等间接参数,同时提供了离线参数输入界面,供用户实时输入产物 rHSA 浓度、甘油浓度、甲醇浓度和菌体浓度等离线参数值。

在线测量的数据,不可避免地存在噪声。噪声一般是高频正弦波信号,可以通过滑动平均方法将它们过滤:

$$x(k) = \frac{1}{M} \sum_{m=0}^{M-1} x(k-m)$$

式中, $M = 20$ 。

2 结果与讨论

2.1 元素平衡

rHSA 发酵过程表达期中,理论上 6 个($n = 6$)宏观反应速率可以测定,分别是甲醇消耗速率 r_{moh} 、菌体生长速率 r_x 、产物形成速率 r_p 、氨消耗速率 r_n 、氧消耗速率 r_o 和二氧化碳生成速率 r_c 。考虑碳、氮和氧化还原度三种元素($m = 3$)的平衡,则有如下关系式:

$$BR_E = 0$$

$$B = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & C_{\text{mx}} & C_{\text{np}} & l & 0 & 0 \\ \gamma_{\text{moh}} & \gamma_x & \gamma_p & \gamma_n & \gamma_o & \gamma_c \end{bmatrix},$$

$$R_E = \begin{bmatrix} r_{\text{moh}} \\ r_x \\ r_p \\ r_n \\ r_o \\ r_c \end{bmatrix} \quad (1)$$

式(1)中 C_{mx} 和 C_{np} 分别是菌体和白蛋白中氮的含量。

令 $R_{E1} = [r_{\text{moh}} \ r_x \ r_p]^T$, $R_{E2} = [r_n \ r_o \ r_c]^T$, B_1 取 B 的前三列, B_2 取 B 的后三列($f = 3$)得

$$R_{E2} = -B_2^{-1} B_1 R_{E1} \quad (2)$$

2.2 代谢平衡

根据元素平衡,甲醇消耗速率 r_{moh} 、菌体生长速率 r_x 和产物形成速率 r_p 都可以自由变化,但 rHSA 发酵过程表达期中只有 r_{moh} 可由实验人员控制。因此,必须结合菌体内部的代谢平衡,进一步降低模型的自由度。

表达期的 *Pichia pastoris* 菌体内部的代谢途径可简化为图 1,代谢过程的中间代谢物有 HCHO、GAP、NADH 和 ATP 4 种($i = 4$),它主要由 6 个反应组成($k = 6$)。

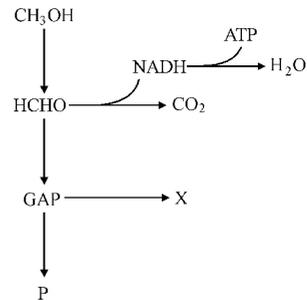
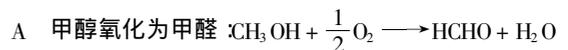


图 1 *Pichia pastoris* 表达期代谢途径简图

Fig.1 Simplified metabolic scheme for *Pichia pastoris* production phase



甲醇氧化为甲醛涉及到甲醇的输送、甲醇氧化和过氧化氢的分解三个过程。甲醇的输送是指甲醇透过细胞壁进入到细胞质,再从细胞质输送到过氧化物酶体。现在还不能确定这些输送过程是否要消耗能量。这里假设输送过程没有能量消耗。催化甲醇氧化为甲醛的是醇氧化酶(AOX),AOX 有两种基因,分别是 AOX1 和 AOX2,两者编码有 92% 的同源性。AOX1 在转录水平受到严格的双重调控:在碳源饥饿状态下,只有甲醇才能诱导 AOX 合成后启动

PAOX 进行转录(一般碳源如甘油、葡萄糖等的分解代谢物阻遏抑制其产生)和翻译,在非甲醇碳源条件下,通过基因重组插入在 PAOX 启动子和终止子之间的外源基因维持在表达关闭状态。氧将甲醇氧化为甲醛的同时也产生过氧化氢。细胞内的过氧化氢浓度不能过高,否则会对菌体有毒,因此, *Pichia pastoris* 体内存在过氧化氢酶,会将过氧化氢分解为氧和水。上述两个反应都是在过氧化物酶体内发生的。

B 甲醛异化: $\text{HCHO} \rightarrow 2\text{NADH} + \text{CO}_2$

甲醛异化包括以下几个过程:甲醛从过氧化物酶体输送到细胞质,再在细胞质内进行两步氧化反应,即甲醛氧化为甲酸,甲酸再进一步氧化为二氧化碳。在氧化过程中,可以产生两分子 NADH。

C 甲醛同化(木酮糖循环): $\text{HCHO} + \text{ATP} \rightarrow \text{GAP}$

木酮糖循环的详细过程如图 2 所示。

三分子的甲醛经 3 次木酮糖循环,消耗三分子 ATP 后,可生成一分子 GAP,为菌体生长和产物合成提供了原材料。

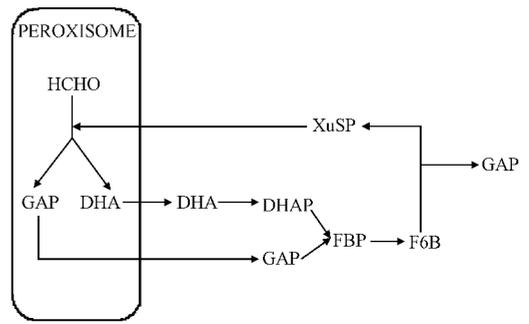


图 2 木酮糖循环

Fig.2 Xylulose cycle

GAP: glyceraldehyde-3-phosphate, DHA: dihydroxyacetone, DHAP: dihydroxyacetone-3-phosphate, F6B: fructose-6-phosphate, FBP: fructose-1,6-biphosphate, XuSP: xylulose monophosphate

D 菌体生长: $\sigma_x \text{GAP} + \alpha_x \text{ATP} + C_{nx} \text{NH}_3 \rightarrow \text{X} + \frac{1}{2}$

$(\sigma_x \gamma_{gap} - \gamma_x) \text{NADH} + (\sigma_x - 1) \text{CO}_2$

E 产物形成: $\sigma_p \text{GAP} + \alpha_p \text{ATP} + C_{np} \text{NH}_3 \rightarrow \text{P} + \frac{1}{2}$

$(\sigma_p \gamma_{gap} - \gamma_p) \text{NADH} + (\sigma_p - 1) \text{CO}_2$

F 氧化磷酸化: $\text{NADH} + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{O} + \alpha_q \text{ATP}$

氧化磷酸化为菌体生长、维持和产物合成提供能量,同时,木酮糖循环也需要消耗能量。因此,氧化磷酸化的效率是影响产物合成的重要因素之一。

令 $E = [\text{MOH X P ATP NADH HCHO GAP NH}_3 \text{O}_2 \text{CO}_2 \text{H}_2\text{O}]^T$, 上述 6 个反应可表示为:

$$ZE = 0$$

$$Z = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 & 0 & -\frac{1}{2} & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 0 & 0 & 2 & -1 & 0 & 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 & 0 & -1 & 1 & 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & -a_x & \frac{1}{2}(\sigma_x \gamma_{gap} - \gamma_x) & 0 & -\sigma_x & -C_{nx} & 0 & \sigma_x - 1 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & -a_p & \frac{1}{2}(\sigma_p \gamma_{gap} - \gamma_p) & 0 & -\sigma_p & -C_{np} & 0 & \sigma_p - 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & a_h & -1 & 0 & 0 & 0 & -\frac{1}{2} & 0 & 1 \end{bmatrix}$$

首先检验代谢方程组是否有解: $g = f - k + i = 3 - 6 + 4 = 1$, 满足代谢方程组有解的第二充分条件^[12]。处理上式,得到 R_{E1} 中各分量之间的关系式:

$$Z_3 R_{E1} = 0$$

$$Z_3 = \left[2a_h a_x + \sigma_x (2a_h + 1) - \frac{1}{2} a_h (\sigma_x \gamma_{gap} - \gamma_x) a_p + \sigma_p (2a_h + 1) - \frac{1}{2} a_h (\sigma_p \gamma_{gap} - \gamma_p) \right]$$

$$\hat{=} [a_1 \quad a_2 \quad a_3]$$

应用了代谢平衡之后模型的自由度降为 2,即 R_{E1} 中有两个分量可自由变化。但在 rHSA 发酵过程表达期中,菌体生长和产物形成的速率是不可直接

控制的,只有 r_{moh} 一个分量可自由变化。所以,必须引入其他限制条件来进一步降低系统的自由度。

在微生物发酵过程中,产物形成和菌体生长之

间往往存在着某种联系,因此,将其作为一种限制条件引入到系统方程,令

$$r_p = \beta r_x$$

与代谢方程联解,得

$$\begin{bmatrix} r_x \\ r_p \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} -\frac{a_1}{a_2 + \beta a_3} \\ -\frac{\beta a_1}{a_2 + \beta a_3} \end{bmatrix} \quad (3)$$

$$r_{moh} \hat{=} \begin{bmatrix} Y_{xs} \\ Y_{ps} \end{bmatrix} r_{moh}$$

引入了产物合成与菌体生长之间的关系后,模型的自由度降为 1,即 rHSA 发酵过程表达期只有 r_{moh} 一个分量可自由变化,这已与实际发酵过程相吻合。

联合式(2)和式(3),得到 rHSA 发酵过程表达期的定量描述方程:

$$\begin{bmatrix} r_x \\ r_p \\ r_n \\ r_o \\ r_c \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} Y_{xs} \\ Y_{ps} \\ -(C_{nx}Y_{xs} + Y_{np}Y_{ps}) \\ \frac{1}{4}(\gamma_x Y_{xs} + \gamma_p Y_{ps}) \\ -(Y_{xs} + Y_{ps}) \end{bmatrix} r_{moh} + \begin{bmatrix} 0 \\ 0 \\ 0 \\ \frac{1}{4}\gamma_{moh} \\ -1 \end{bmatrix} r_{moh} \quad (4)$$

2.3 模型求解

rHSA 发酵过程表达期模型式(4)中并没有考虑到菌体维持的能量消耗,令

$$a_x = a_x + m_x/\mu, \quad \beta = \frac{\beta_1}{\mu} + \beta_2 + \beta_3\mu$$

将上述各式代入式(4)及其各个子式中,便得到描述 rHSA 发酵过程表达期的定量模型。在该模型中,有 a_h 、 m_x 、 a_p 、 β_1 、 β_2 和 β_3 共 6 个参数未知,需要在测控系统所提供数据的基础上按照多变量最优化方法来求取。由于引入了菌体维持以及产物形成与菌体生长之间的关系,该模型具有了相当强的非线性特征,只能由计算机通过循环迭代来求数值解。

在 rHSA 发酵过程中,产物的形成可明显地分为两个阶段,如图 3 所示。第一阶段从开始流加甲醇到 120h 左右,此时白蛋白以较快的速率生成。但在 120h 以后,白蛋白形成的量较少,有时浓度甚至会降低。这两个阶段产物形成的速率为什么会有这么大的差别呢?目前还没有这方面的研究报道,下

面试图通过对表达期定量模型的求解来研究这个问题。

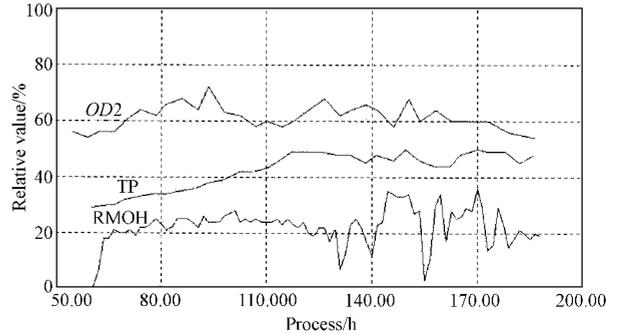


图 3 表达期发酵过程

Fig.3 Fermentation process of production phase

2.3.1 第一阶段 在所推导出的定量模型的未知参数中,前三个与菌体内部的代谢途径直接相关,而后三个则是经验系数。为了降低参数求解过程中各个参数之间相互耦合而造成的干扰,把这两类参数分开来求取。首先求取描述比生产速率与比生长速率之间的关系系数,得 $\beta_1 = -3.7956$, $\beta_2 = 0.0060$, $\beta_3 = 0.0007$,拟合度如图 4 所示。进一步研究图 4 中的二次曲线,可以发现,在 $\mu = 0.0008$ 处曲线有峰值 $Q_p = 0.0007$ 。该二次曲线的形状说明,在 rHSA 发酵过程表达期中,菌体的生长必须得到控制,并不是菌体长得越快越好,这和我们的经验是一致的。另外我们也注意到,当比生长速率为负值时,即菌体有所自溶时,白蛋白的浓度还是有所增加,这可能是菌体自溶时排放出累积于体内的产物所致。

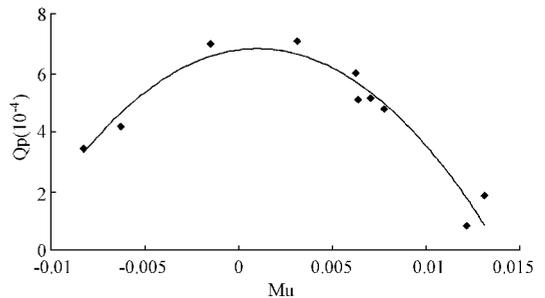


图 4 表达期第一阶段比生产速率与比生长速率的关系

Fig.4 Relationship between Q_p and μ in the first period of production phase

把 $\beta_1 = -3.7956$, $\beta_2 = 0.0060$ 和 $\beta_3 = 0.0007$ 代入式(4)及其子式中,可求得 $a_h = 2.0734 \pm 1.1053$; $m_x = 0.2690 \pm 0.1235$; $a_p = 453.7321 \pm 154.3876$ 。 a_h 和 m_x 的值与有关文献 [12] 的结果相一致, a_p 的值没有文献报道过,但考虑到 rHSA 的复杂性,这样大的数值也不是很高。

2.3.2 第二阶段 同理可求得

$$\beta_1 = -0.3939; \beta_2 = 0.0113; \beta_3 = 0.0003$$

$$a_h = 1.5013 \pm 0.8017; m_x = 0.2218 \pm 0.1438; a_p = 549.4991 \pm 223.85$$

比较表达期第一阶段和第二阶段的菌体代谢系数 a_h 、 m_x 和 a_p , 可以发现, 尽管两者的菌体维持系数 m_x 相差不大, 但 a_h 和 a_p 却有着显著的差别。 a_h 是菌体内部的氧化磷酸化水平, 它的大小代表了菌体每氧化一分子 NADH 所能产生的 ATP 的量, 反映了菌体内部能量的供应情况。第二阶段的 a_h 比第一阶段的 a_h 少了近 1/3, 说明第二阶段菌体的能量代谢有可能供应不足, 从而影响到产物合成。另外也注意到, 第二阶段每合成 1 C-mol 的 rHSA 所需要的 ATP 比第一阶段多 100 mol 左右, 这也可能是导致产物合成速率降低的原因之一。 a_h 和 a_p 为何有这样的差异, 这种差异如何影响到产物的合成, 以及如何克服这些差异, 尚待以后进一步的研究来阐释。

3 结 论

结合元素平衡和代谢平衡方法, 建立了 rHSA 发酵过程表达期的数学模型, 并探讨了导致表达期不同阶段产物形成速率存在差异的可能原因。该方法克服了传统建模方法中参数意义不明、输入输出关系难以解释等缺点, 充分利用了发酵过程的生物学知识, 模型参数都有着其物化或生物学意义。该方法有很大的通用性和伸缩性, 可应用于不同的发酵过程, 而且随着要平衡的元素数目的增加或对菌体内部代谢过程认识的深入, 已建立的模型可被进一步扩展。

主要符号说明

a_i —— i 物质的能量系数 (mol·C·mol⁻¹) 或 (mol·mol⁻¹)

C_{mi} —— i 物质的氮含量 (g·g⁻¹)

m_x ——菌体维持系数 (mol·C·mol⁻¹·h⁻¹)

q_i —— i 物质比生成或消耗速率 (C·mol·C·mol⁻¹·h⁻¹) 或 (mol·C·mol⁻¹·h⁻¹)

r_i —— i 物质或第 i 个代谢反应的反应速率 (C·mol·h⁻¹) 或 (mol·h⁻¹)

μ ——比生长速率 h⁻¹

γ_i —— i 物质的氧化还原度, mol·mol⁻¹

σ_i ——生物合成 i 物质所需的碳源数量, C·mol

methanol yeast. *Progress in Biotechnology*(生物工程进展), 1998, **18**(3): 7 - 11

- [2] Yun-fei K, William E, Bentley *et al.* An integrated metabolic modeling approach to describe the energy efficiency of *Escherichia coli* fermentation under oxygen - limited conditions: cellular energetics, carbon flux, and acetate production. *Biotechnol. Bioengineering*, 1993, **42**(7): 843 - 853
- [3] Sonia C, Juan C A, Miguel A *et al.* Fluxes of carbon, phosphorylation, and redox intermediates during growth of *Saccharomyces cerevisiae* on different carbon sources. *Biotechnol Bioengineering*, 1995, **47**(2): 193 - 208
- [4] Maria I K, Sung M P, Anthony J S *et al.* Metabolite and isotopomer balancing in the analysis of metabolic cycle: I theory. *Biotechnol Bioengineering*, 1999, **62**(4): 375 - 391
- [5] Maria I K, Sung M P, Anthony J S *et al.* Metabolite and isotopomer balancing in the analysis of metabolic cycle: II Applications. *Biotechnol Bioengineering*, 1999, **62**(4): 392 - 401
- [6] I. G. Minkevich. Mass-energy balance for microbial product synthesis-biochemical and cultural aspects. *Biotechnol Bioengineering*, 1983, **25**(5): 1267 - 1293
- [7] Nam S W, Gregory S. Application of macroscopic balances to the identification of gross measurement error. *Biotechnol Bioengineering*, 1983, **25**(9): 2177 - 2208
- [8] Charles L C, Henry Y W, Daniel I C. Computer-aided material balancing for prediction of fermentation parameters. *Biotechnol Bioengineering*, 1977, **19**(1): 55 - 67
- [9] Stouthamer AH and Van Verseveld HW. Stoichiometry of microbial growth. *Comprehensive Biotechnology*, 1985, **1**(2): 215 - 238
- [10] Gulik W M, Heijnen J J. A metabolic network stoichiometry analysis of microbial growth and production. *Biotechnol Bioengineering*, 1995, **48**(6): 681 - 698
- [11] Somchai C, Chairat S, Tatsuji S *et al.* Metabolism analysis and on-line physiological state diagnosis of acetone-butanol fermentation. *Biotechnol Bioengineering*, 1998, **58**(6): 561 - 571
- [12] A H Stouthamer. *Quantitative aspects of growth and metabolism of microorganisms*. London: Kluwer Academic Publisher Group, 1992
- [13] HUANG M Z(黄明志), GUO M J(郭美锦), CHU J(储炬) *et al.* Metabolic calculation of the growth Phase in rHSA fermentation. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2000, **16**(5): 631 - 635
- [14] Wolf K. *Non-convention yeast in Biotechnology*. Berlin: Springer Press, 1996
- [15] Analytical Chemistry Teaching and Research Group of East China University of Science and Technology(华东理工大学分析化学教研组), Analytical Chemistry Teaching and Research Group of Cheng Tu University of Science and Technology(成都科学技术大学分析化学教研组). *Analytical Chemistry*(分析化学). 3rd, Beijing: Higher Education Press, 1989
- [16] ZHU J(朱俭). *Biochemical Laboratory*(生物化学实验). Shanghai: Science and Technology Press of Shanghai, 1981
- [17] JIN D Y(金冬雁). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*(分子克隆实验指南). 2nd Edition. Beijing: Science Press, 1998

REFERENCES(参考文献)

- [1] HE C(何诚), ZHU Y S(朱运松). Advances in expression system of

- [18] HUANG M Z(黄明志), HANG H F(杭海峰), CHU J(储炬) *et al.*. Develop of real-time monitor and control system of bioprocess

based on multi-thread technology. *Chinese Microcomputer and Application*(微型机与应用), 2000 , 19(7) : 47 - 50

Quantitative Studies of the Production Phase in rHSA Fermentation

HUANG Ming-Zhi* GUO Mei-Jin CHU Ju HANG Hai-Feng ZHUANG Ying-Ping ZHANG Si-Liang

(State Key Laboratory of Bioreactor Engineering , National Center of Biotechnology , Bioengineering College ,
East China University of Science and Technology , Shanghai 200237 , China)

Abstract The model equations of the production phase of rHSA fermentation were derived on the base of both elemental balance and metabolic balance , then the unknown parameters of the model were estimated by multivariable optimization. The possible reasons of discrepancy of production rate between different period of fermentation were discussed. The model could preferably described the relations between different macroscopic reaction rates of the process and keys for the high-efficiency expression of HAS were deduced.

Key words recombinant human serum albumin(rHSA) , metabolic balance , elemental balance , *Pichia pastoris*

Received : 07-18-2002

This work was supported by grant from the Fund of National Natural Science(No 29976013) and the Key Subject of Shanghai City.

* Corresponding author. Tel 86-21-64253522 ; E-mail huangmingzhi@263.net.cn