

提高重组毕赤酵母表达hIFN β -HSA的碳源控制策略

张宏斌^{1,2}, 奚文芳², 许泓瑜², 金坚^{1,2}, 李华钟¹, 许正宏^{1,2}

(1. 江南大学教育部工业生物技术重点实验室, 江苏 无锡 214122; 2. 江南大学生物工程学院生物制药系, 江苏 无锡 214122)

摘要: 研究了重组毕赤酵母 KM71/IH 菌体生长阶段饥饿培养对其细胞相对活性及人 β 干扰素-血清白蛋白融合蛋白(hIFN β -HSA)表达的影响. 结果表明, 在以甘油为唯一碳源的细胞培养后期进行饥饿培养以耗尽培养基中的甘油会导致重组细胞相对活性的降低, 进而减少 hIFN β -HSA 的表达量. 在此基础上, 提出了菌体培养后期, 即过渡阶段流加甘露醇碳源代替饥饿培养的策略, 不仅可以消除培养液中甘油残留对甲醇诱导表达 hIFN β -HSA 的不利影响, 而且能够保持重组细胞培养物较高的相对活性(>97%), 从而可以提高甲醇诱导表达 hIFN β -HSA 的水平, 表达量可达 37.3 mg/L, 最大生产强度为 0.78 mg/(L·h), 较对照分别提高了 92.3%和 44.4%.

关键词: 巴斯德毕赤酵母; 细胞相对活性; 非抑制表达碳源; 人 β 干扰素-血清白蛋白融合蛋白

中图分类号: Q814.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-606X(2007)06-1181-06

1 前言

人 β 干扰素(Human Interferon β , hIFN β)属于 I 型干扰素, 具有抗病毒、抗细胞分裂及免疫调节等多种生物学活性^[1]. 由于 hIFN β 分子量较小, 易被肾小球过滤, 因而在体内的半衰期较短. 近年来, 利用基因工程手段将 hIFN β 与其他无免疫源性的人源性大分子蛋白融合表达以延长其体内半衰期的方法越来越受到人们的关注. 人血清白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)是一种分子量为 66.5 kDa 的非糖基化蛋白, 肾清除率非常低, 体内半衰期可达 14~20 d, 作为融合蛋白的载体不存在免疫源性和机体毒性问题^[2]. 本研究室利用基因工程技术成功构建了 IFN β 与人血清白蛋白融合蛋白(Human IFN β -HSA fusion protein, hIFN β -HSA)基因并在毕赤酵母(*Pichia pastoris* KM71)中表达, 经检测融合蛋白分子量约为 90 kDa, 具有 HSA 的抗原性, 用细胞病变抑制法测定发酵液上清中融合蛋白的干扰素活性约为 640 IU/mL^[3].

毕赤酵母(*Pichia pastoris*)已被广泛应用于外源蛋白的表达. 用毕赤酵母表达外源蛋白一般分为生长阶段和表达阶段, 生长阶段用甘油作唯一碳源, 表达阶段用甲醇作碳源和诱导底物. 研究表明, 影响外源蛋白在毕赤酵母中表达的因素很多^[4-7], 如溶氧、pH、温度、底物添加方式及诱导时间等. 某些培养条件能够影响毕赤酵母的活性或活力, 进而影响重组蛋白的表达量, 如较低的培养温度^[8]、非抑制表达碳源与甲醇混合底物的流

加^[13], 都能增加毕赤酵母细胞活力, 又可提高重组蛋白的表达量. 一些学者^[11]研究发现, 培养基中残留的甘油会抑制甲醇诱导表达外源蛋白, 因此多采用饥饿培养, 即在生长阶段甘油耗尽再进行甲醇诱导. 然而, 饥饿培养可能会影响毕赤酵母细胞活性和外源蛋白表达, 因此有必要进行深入研究.

本工作在实验室前期研究工作^[3]的基础上, 考察了以甘油为唯一碳源的菌体生长阶段饥饿培养与其细胞相对活性的关系及对人 β 干扰素-血清白蛋白融合蛋白(hIFN β -HSA)表达的影响, 同时研究了生长阶段残余甘油对甲醇诱导表达 hIFN β -HSA 的影响. 在此基础上, 进一步提出了菌体生长后期(甘油流加结束)流加非抑制表达碳源作为过渡碳源代替饥饿培养的策略, 不仅能够消除培养液中甘油的残留对甲醇诱导表达 hIFN β -HSA 的不利影响, 而且使重组毕赤酵母细胞维持高相对活性, 进而提高 hIFN β -HSA 的表达量.

2 材料与方法

2.1 材料

2.1.1 菌株

携带 hIFN β -HSA 融合基因的重组毕赤酵母(*Pichia pastoris*)KM71/pPIC9K-IFN β -HSA(简称 KM71/IH)由本研究室构建并保存^[3].

2.1.2 培养基

种子培养基(YPD, g/L): 酵母提取物 10, 蛋白胨 20, 葡萄糖 20. 固体培养基为上述成分再加入 20 g/L 琼脂.

收稿日期: 2007-01-08, 修回日期: 2007-04-10

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863)基金资助项目(编号: 2006AA02Z153); 国家重点基础研究发展规划(973)基金资助项目(编号: 2007CB707804); 上海市科学技术委员会生物医药重大科技攻关基金资助项目(编号: 06DZ19020)

作者简介: 张宏斌(1979-), 男, 内蒙古包头市人, 硕士研究生, 微生物与生化药专业, E-mail: hongbinzhang1979@163.com; 许正宏, 通讯联系人, Tel: 0510-85918206, E-mail: zhenghuxu@jiangnan.edu.cn.

发酵培养基(BSM, g/L): 甘油 20.0, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0, KH_2PO_4 42.9, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0, K_2SO_4 14.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 11.7 及 1 mL/L PTM4 微量元素溶液。

PTM4 微量元素溶液(g/L): $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 2.0, NaI 0.08, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 3.0, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.2, H_3BO_3 0.02, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5, CoCl_2 0.5, ZnCl_2 7.0, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 22.0, 生物素 0.2, H_2SO_4 1.0 mL/L。

诱导培养基(g/L): $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0, KH_2PO_4 42.9, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.0, K_2SO_4 14.3, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 11.7 及甲醇 20 mL/L, PTM4 微量元素溶液 1 mL/L。

甘油补料培养基: 甘油 500 g/L, 4 mL/L PTM4 微量元素溶液。

甲醇补料培养基: 甲醇 100% ϕ , 4 mL/L PTM4 微量元素溶液。

2.2 培养方法

2.2.1 种子培养

将保藏菌株划线于 YPD 平板上, 30℃ 恒温培养 48 h, 得到单菌落, 再从 YPD 平板培养基上挑出单菌落, 接入 250 mL 三角瓶装的 20 mL YPD 培养基中, 旋转式摇床 200 r/min 于 30℃ 下培养 12 h, 将培养所得的一级种子液再按 10%(ϕ)接种量接入 500 mL 三角瓶装的 100 mL YPD 培养基中, 200 r/min 于 30℃ 下培养 12~15 h, 得到二级种子, 即可作为发酵罐种子。

2.2.2 5 L 罐培养重组细胞及甲醇诱导表达 hIFN β -HSA

用 *Pichia pastoris* KM71/IH 表达 hIFN β -HSA, 在整个发酵过程中的初始搅拌转速设定为 600 r/min, 通气量为 3 L/min, 温度 30℃, 流加氨水使 pH 恒定在 6.0, 同时氨水作为氮源而不另外补加氮源。在生长阶段, 初始甘油浓度为 20 g/L, 13 h 后以 7 mL/(L·h) 流加甘油补料培养基至甘油浓度为 80 g/L, 总流加时间为 15 h, 期间控制相对溶氧值为 20%, 待溶氧反弹, 饥饿培养 2 h 后(30 h 时)进行甲醇诱导, 先以 1 mL/(L·h) 流加 2 h, 再以 2 mL/(L·h) 流加 2 h, 然后以 3 mL/(L·h) 流加至诱导结束, 诱导周期为 72 h, 同样控制相对溶氧值为 20%^[9-11]。检测整个发酵过程重组子 KM71/IH 菌体生长情况、细胞相对活性的变化以及溶氧变化与甘油消耗的关系。

2.2.3 重组子 KM71/IH 细胞相对活性与 hIFN β -HSA 表达的关系

取上述 5 L 罐菌体生长 24 h 的培养物和饥饿培养 2 h 后(30 h 时)的培养物, 于 4℃ 以 5000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 收集菌体重新悬浮于适量诱导培养基中, 调整细胞光密度(OD_{600})使其达到一致并检测细胞相对活性, 于 30℃ 以 200 r/min 摇瓶诱导表达 24 h, 测定 hIFN β -HSA 表达量。甲醇诱导初始浓度为 20 mL/L, 用

5 mol/L KOH 或 HCl 溶液调节诱导培养基 pH 为 6.0。如无特别说明, 每个实验做 3 个平行样品, 下同。

2.2.4 过渡碳源的选择

同 2.2.3 节步骤, 得到发酵 24 h 的菌体重悬于诱导培养基中, 同时按等碳量分别加入甘露醇、葡萄糖、山梨醇和海藻糖 4 种碳源, 甘油加入到诱导培养基中作为对照, 于 30℃ 以 200 r/min 摇瓶诱导表达 24 h, 测定 hIFN β -HSA 表达量, 确定不抑制甲醇诱导的碳源, 即确定非抑制表达碳源。

再取上述实验确定的非抑制表达碳源分别替代甘油, 按等碳量分别加入到 5 L 罐发酵培养基中, 流加 5 mol/L KOH 使 pH 恒定在 6.0, 温度 30℃, 培养 24 h, 确定适合重组子 KM71/IH 生长的非抑制表达碳源, 甘油作对照。

最后取上述适合重组子 KM71/IH 生长的非抑制表达碳源与甘油按等碳量混合加入到 5 L 罐发酵培养基中, 流加 5 mol/L KOH 使 pH 恒定在 6.0, 30℃ 培养 24 h, 考察混合碳源的消耗情况及重组菌利用两种碳源的先后顺序, 以此确定过渡碳源。

2.2.5 采取碳源控制策略前后的对比实验

改进后的方法可分为 3 个阶段, 即生长阶段、过渡阶段和表达阶段。生长阶段仍用甘油作碳源, 过渡阶段流加非抑制表达碳源, 表达阶段用甲醇作碳源。在整个发酵过程中生长阶段和表达阶段过程控制同 2.2.2 节, 在甘油补料结束后(28 h)开始流加非抑制表达碳源, 直至 30 h 甘油耗尽, 停止流加非抑制表达碳源, 开始甲醇诱导, 诱导周期为 72 h。检测整个发酵过程重组子 KM71/IH 细胞相对活性, 测定 hIFN β -HSA 表达量, 与 2.2.2 节方法的结果进行比较。

2.3 分析方法

2.3.1 酵母细胞光密度分析

培养液适当稀释后于波长 600 nm 处以去离子水为对照进行比色测定。

2.3.2 甲醇测定

采用变色酸分光光度法^[12]。

2.3.3 细胞培养物相对活性的测定

取不同时间的发酵液适当稀释, 加入等体积 0.1 g/L 亚甲基蓝, 充分摇匀静置 1 min, 于光学显微镜下观察计数。将亚甲基蓝染色后细胞呈透明计为高活性细胞, 呈浅蓝色或蓝色则计为低活性或死细胞。记录低活性(含死细胞)细胞数及细胞总数, 计算两者比值^[7], 用以表征细胞培养物相对活性的大小。

2.3.4 hIFN β -HSA 的测定

采用微量人白蛋白检测试剂盒(上海名典生物工程

公司产品)检测诱导后发酵上清液中 HSA 含量, hIFN β -HSA 蛋白中 HSA 与 hIFN β 为等摩尔比融合, 因此可按公式 $C_{\text{hIFN}\beta\text{-HSA}}=C_{\text{HSA}}\times 84.7/66.2$ 计算融合蛋白的含量(mg/L), 式中 66.2 为 HSA 分子量, 84.7 为 hIFN β -HSA 分子量(kDa).

3 结果与讨论

3.1 以甘油为唯一碳源培养重组子 KM71/IH 的发酵过程

以甘油为唯一碳源, 5 L 全自动发酵罐培养重组子 KM71/IH, 每 3 h 取样测定菌体浓度、甘油残留浓度及细胞相对活性, 并记录相对溶氧. 图 1 为菌株 KM71/IH 的生长曲线、溶氧、甘油浓度和细胞相对活性随时间的变化曲线. 可以看出, 以甘油为唯一碳源的菌体生长阶段, 28 h 前控制甘油流速可维持发酵液中甘油浓度不低于 2 g/L, 细胞可以维持较高的相对活性(>98%), 甘油补加结束后饥饿培养 2 h (28~30 h), 甘油快速消耗至基本耗尽, 细胞相对活性快速下降(<95%), 镜检发现部分细胞死亡裂解.

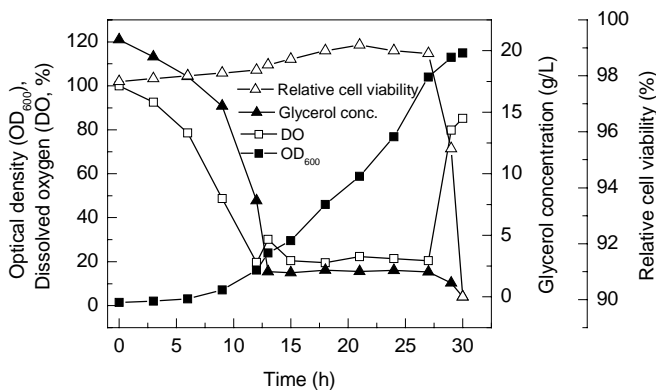


图 1 重组子 KM71/IH 菌体生长、溶氧、甘油浓度和细胞相对活性随时间的变化曲线

Fig.1 The growth curves and time curves of glycerol concentration, dissolved oxygen and relative cell viability of *Pichia pastoris* KM71/IH

图 2 是甲醇诱导不同相对细胞活性的重组子 KM71/IH 表达 hIFN β -HSA 的差异, 结果表明, 培养 24 h 的菌体细胞表达 hIFN β -HSA 量约为培养 30 h 的菌体细胞表达量的 2 倍, 这说明重组细胞相对活性与融合蛋白表达密切相关. 甘油补加结束后饥饿培养可导致 KM71/IH 重组子细胞相对活性降低, 进而大幅降低融合蛋白表达. 因此, 选择甘油流加阶段细胞相对活性较高的 KM71/IH 重组子进行甲醇诱导有利于融合蛋白的表达. 但实验表明, 菌体培养阶段培养液中残余的甘油会抑制甲醇诱导融合蛋白的表达^[14]; 而在菌体培养阶段进行饥饿培养以耗尽残余甘油则会导致细胞相对活性的

降低, 进而影响融合蛋白的表达. 因此, 需要寻找既能维持菌体高细胞活性, 又不对后期甲醇诱导表达产生抑制的过渡碳源.

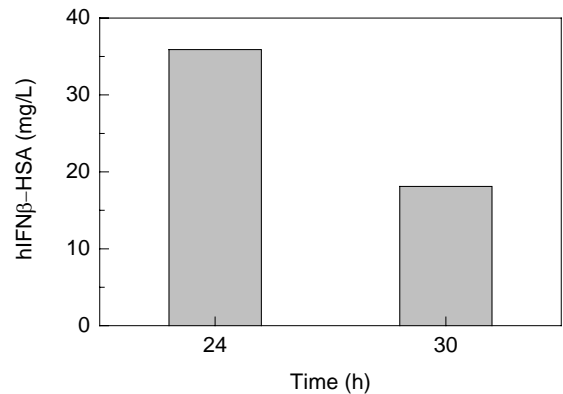


图 2 培养 24 h 和 30 h 的重组子 KM71/IH 菌体表达 IFN β -HSA 的差异

Fig.2 The difference of hIFN β -HSA expression in the growth of 24 and 30 h of *Pichia pastoris* KM71/IH

3.2 非抑制表达碳源作为过渡碳源的控制策略

国内外学者在设计以甘油为唯一碳源过渡到以甲醇为唯一碳源的实验时多采用饥饿培养, 待甘油耗尽后再进行甲醇诱导^[16]. 但上述实验结果说明, 这会导致重组子细胞相对活性下降, 进而影响外源蛋白的高效表达. 因此, 可选择一种既利于菌体生长又不会抑制甲醇诱导的非抑制表达碳源作为过渡碳源.

不同碳源对重组子 KM71/IH 菌体表达 IFN β -HSA 的影响见图 3, 0~6 h 甘油和葡萄糖的大量存在抑制甲醇诱导, 9 h 后甘油和葡萄糖基本耗尽(图 4), 重组子 KM71/IH 开始表达 IFN β -HSA. 甘露醇、山梨醇和海藻糖则不会抑制甲醇诱导, 这与文献报道^[13-15]一致. 因此, 甘露醇、山梨醇和海藻糖 3 种碳源可以作为非抑制表达碳源.

图 5 为 3 种非抑制表达碳源作为唯一碳源时对重组子 KM71/IH 菌体生长的影响, 以甘油作对照. 可以看出, 重组子 KM71/IH 利用甘油情况最好, 13 h 后菌体 OD₆₀₀ 达到 25, 甘露醇次之, 13 h 后菌体 OD₆₀₀ 仅为 7, 山梨醇和海藻糖利用情况相对较差. 上述数据说明山梨醇和海藻糖不适合作为唯一碳源来培养重组子 KM71/IH, 故不能替代甘油作过渡碳源. 相比而言甘露醇较为适合作为过渡碳源.

图 6 为甘油-甘露醇混合碳源对重组子 KM71/IH 菌体生长的影响, 可以看出, 重组子 KM71/IH 生长初始阶段优先利用甘油, 甘露醇消耗很少, 菌体生长至 12 h 甘油基本耗尽, 继续利用甘露醇供菌体生长. 同时, 镜检观察重组子细胞可以保持较高的相对活性(>97%). 说

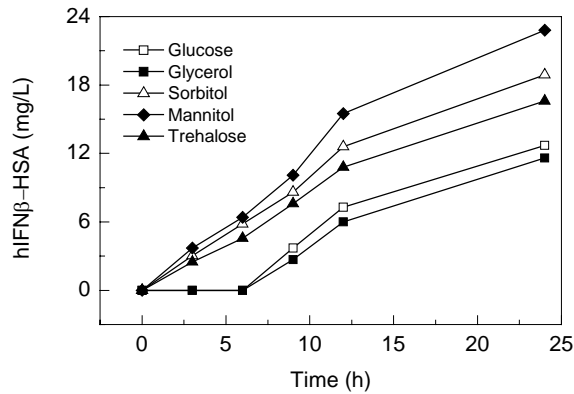


图3 甲醇诱导阶段不同碳源对甲醇诱导重组子 KM71/IH 表达 IFN β -HSA 的影响
Fig.3 Effect of different carbon resources on hIFN β -HSA expression in methanol induction phase of *Pichia pastoris* KM71/IH

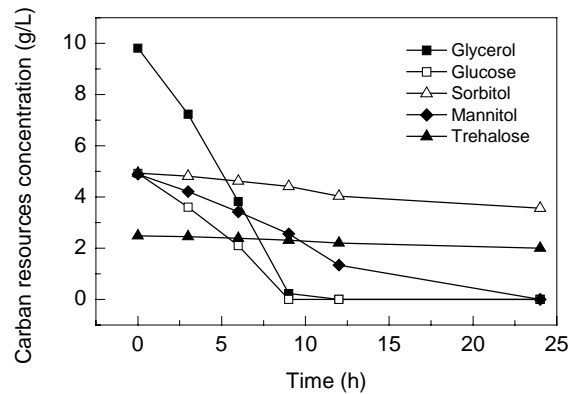


图4 不同碳源的消耗过程
Fig.4 Consumption of different carbon resources

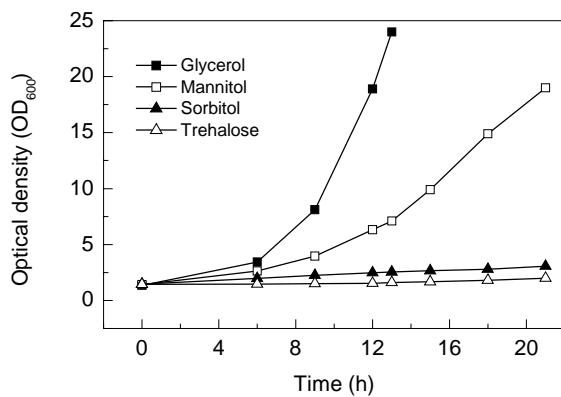


图5 不同碳源对重组子 KM71/IH 菌体生长的影响
Fig.5 Effect of different carbon resources on cell growth of *Pichia pastoris* KM71/IH

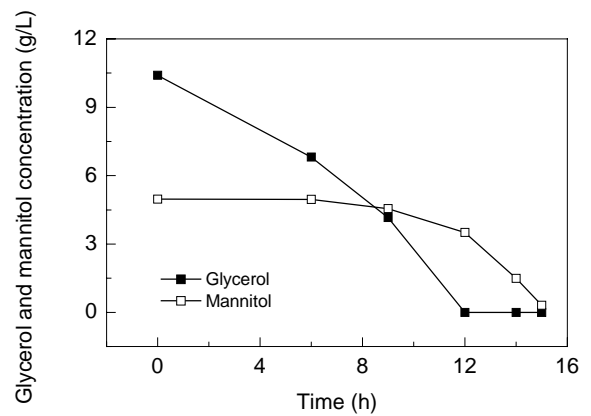


图6 混合碳源(甘油-甘露醇)下重组子 KM71/IH 菌体的生长
Fig.6 Cell growth of *Pichia pastoris* KM71/IH on mixed carbon source (glycerol-mannitol)

明甘油-甘露醇混合碳源的使用既满足了重组子 KM71/IH 在菌体生长阶段所需的能量, 维持较高的细胞相对活性, 同时甘油的优先利用和甘露醇的非抑制表达为甲醇诱导阶段的顺利过渡提供了保证。

3.3 采用过渡碳源培养重组子 KM71/IH 的发酵过程

改进后的方法采用甘露醇作为过渡碳源, 生长阶段仍用甘油作唯一碳源, 表达阶段用甲醇作唯一碳源. 结果如图 7 所示, 其中对照为不添加过渡碳源, 仅在 30 h 时开始流加甲醇。

由图 7(a)可以看出, 改进后的方法更利于重组细胞的生长, 诱导结束时, 细胞光密度值可达到 225, 是对照的 1.3 倍. 从图 7(b)可以看出, 在过渡阶段, 流加甘露醇非抑制表达碳源可以维持较高的细胞相对活性 (>97%), 对照实验细胞相对活性(95%)下降明显. 诱导初始阶段, 重组子不适应甲醇碳源, 细胞相对活性都有下降趋势, 改进后的方法培养的高活性细胞能很快适应甲醇作为诱导碳源, 仍能维持较高的相对活性(95%), 诱

导后 48 h(发酵 78 h)时, hIFN β -HSA 表达量达到最高, 为 37.3 mg/L, 最大生产强度为 0.78 mg/(L·h); 对照实验培养的细胞相对活性较低, 适应甲醇碳源能力差, 诱导后 36 h(发酵 66 h)时, hIFN β -HSA 表达量达到最高为 19.4 mg/L, 最大生产强度为 0.54 mg/(L·h)(表 1). 改进后的方法较对照分别提高了 92.3%和 44.4%。

本工作同时发现 2 种发酵法在甲醇诱导后期相对溶氧值不降反升[图 7(a)], 反映在细胞相对活性明显下降, 利用甲醇能力减弱, 导致不同程度的甲醇积累(数据未列出), 使 hIFN β -HSA 表达水平降低. 因此, 诱导阶段甲醇浓度的控制是非常必要的, 因为高浓度甲醇会对细胞产生毒害作用, 细胞生长就要受到底物抑制^[17], 甲醇的流加速率需要不断调整以适应其消耗的速率, 从而避免甲醇积累达到抑制水平. 针对甲醇诱导表达 hIFN β -HSA 阶段甲醇诱导浓度对细胞相对活性及融合蛋白表达之间的关系及优化策略的研究正在进行中。

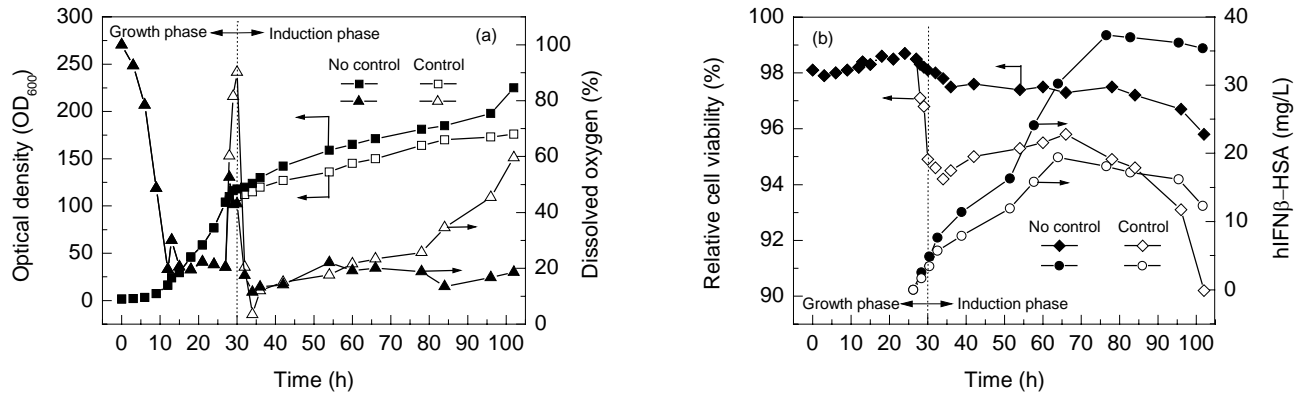


图 7 重组子 KM71/IH 菌体生长、溶氧、细胞相对活性和 IFN β -HSA 的表达随时间的变化曲线
Fig.7 Growth curves, dissolved oxygen, relative cell viability and hIFN β -HSA expression of *Pichia pastoris* KM71/IH

表 1 对比实验发酵过程参数比较

Table 1 Parameter comparison of contrast experiments in 5 L fermentor

Parameter	Fermentation result	Control
Growth period (h)	30	30
Induction period (h)	72	72
Relative cell viability (% , transition stage)	>97	<95
Maximum cell concentration (g/L)	60.5	47.3
Maximum biomass productivity [g/(L·h)]	0.59	0.46
Maximum hIFN β -HSA production (mg/L)	37.3	19.4
Maximum hIFN β -HSA productivity [mg/(L·h)]	0.78	0.54

4 结论

考察了以甘油为唯一碳源的菌体生长阶段饥饿培养与其细胞相对活性的关系及对人 β 干扰素-血清白蛋白融合蛋白(hIFN β -HSA)表达的影响. 结论如下:

(1) 在重组毕赤酵母 KM71/IH 菌体生长阶段, 细胞饥饿培养导致细胞相对活性大幅降低, 进而降低了 hIFN β -HSA 表达量. 生长阶段残留甘油会抑制甲醇诱导表达融合蛋白.

(2) 采用甘露醇作为过渡碳源代替饥饿培养的控制策略, 既可以维持较高的细胞相对活性(>97%), 又可以解除甘油对表达的抑制, 从而可以提高甲醇诱导表达 hIFN β -HSA 的水平, 表达量可达 37.3 mg/L, 最大生产强度为 0.78 mg/(L·h), 较对照分别提高了 92.3%和 44.4%.

参考文献:

[1] 张振龙. 重组人干扰素 β Ser¹⁷的制备及其对 SARS 病毒的抑制作用 [J]. 中国生物制品学杂志, 2005, 18(6): 501-503.
 [2] 唱韶红. 人血清白蛋白和人干扰素 α 2b 的融合蛋白在毕赤酵母中的表达 [J]. 生物工程学报, 2006, 22(2): 173-179.
 [3] 雷榭勇. 人 β 干扰素-血清白蛋白融合蛋白在毕赤酵母中的分泌表达 [J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(7): 13-18.
 [4] Curvers S, Brixius P, Klauser T, et al. Human Chymotrypsinogen B Production with *Pichia pastoris* by Integrated Development of Fermentation and Downstream Processing [J]. Biotechnol. Progr., 2001, 17: 495-502.
 [5] 谢静莉, 周庆玮, 张励. 表达血管生长抑制素的重组毕赤酵母在

诱导阶段混合碳源的流加 [J]. 生物工程学报, 2003, 19(4): 467-470.

[6] Whittaker M M, Whittaker J W. Expression of Recombinant Galactose Oxidase by *Pichia pastoris* [J]. Protein Expr. Purif., 2000, 20: 105-111.
 [7] Jayanta S, Bradley A P, Mehmet I, et al. Causes of Proteolytic Degradation of Secreted Recombinant Proteins Produced in Methylophilic Yeast *Pichia pastoris*: Case Study with Recombinant Ovine Interferon-T [J]. Biotechnol. Bioeng., 2005, 89(1): 103-112.
 [8] Li Z J, Xiong F, Lin Q S, et al. Low-temperature Increases the Yield of Biologically Active Herring Antifreeze Protein in *Pichia pastoris* [J]. Protein Expr. Purif., 2001, 21: 438-455.
 [9] Wang J, Vu N, Jacqueline G, et al. Improved Yield of Recombinant Merozoite Surface Protein 3 (MSP3) from *Pichia pastoris* Using Chemically Defined Media [J]. Biotechnol. Bioeng., 2005, 90(7): 838-847.
 [10] Haitao R, Yuan J Q. Model-based Specific Growth Rate Control for *Pichia pastoris* to Improve Recombinant Protein Production [J]. J. Chem. Technol. Biotechnol., 2005, 80: 1268-1272.
 [11] Chen C C, Wu P H, Huang C T, et al. A *Pichia Pastoris* Fermentation Strategy for Enhancing the Heterologous Expression of an *Escherichia coli* Phytase [J]. Enzyme Microbiol. Technol., 2004, 35: 315-320.
 [12] 余波. 变色酸分光光度法测定毕赤酵母发酵液中的甲醇含量 [J]. 上海大学学报, 2006, 12(2): 196-199.
 [13] Thorpe E D, Anjou M C, Daugulis A J. Sorbitol as a Non-repressing Carbon Source for Fed-batch Fermentation of Recombinant *Pichia pastoris* [J]. Biotechnol. Lett., 1999, 21: 669-672.
 [14] Mehmet I, Michael M M. Non-repressing Carbon Sources for Alcohol Oxidase (*Aox1*) Promoter of *Pichia pastoris* [J]. J. Biosci. Bioeng., 2001, 92(6): 585-589.
 [15] Xie J L, Zhou Q W, Du P, et al. Use of Different Carbon Sources in Cultivation of Recombinant *Pichia pastoris* for Angiostatin Production [J]. Enzyme Microb. Technol., 2005, 36: 210-216.
 [16] Chen C C, Wu P H, Huang C T, et al. A *Pichia pastoris* Fermentation Strategy for Enhancing the Heterologous Expression of an *Escherichia coli* Phytase [J]. Enzyme Microbiol. Technol., 2004, 35: 315-320.
 [17] Zhang W, Bevisn M A, Plantz B A, et al. Modeling *Pichia pastoris* Growth on Methanol and Optimizing the Production of a Recombinant Protein, the Heavy-chain Fragment C of Botulinum, Serotype A [J]. Biotechnol. Bioeng., 2000, 70(1): 1-8.

A Carbon-controlling Strategy to Enhancement of the Expression for Human IFN β -HSA Fusion Protein with *Pichia pastoris*

ZHANG Hong-bin^{1,2}, DOU Wen-fang², XU Hong-yu², JIN Jian^{1,2}, LI Hua-zhong¹, XU Zheng-hong^{1,2}

(1. The Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214122, China;
2. Department of Biopharmaceutics, School of Biotechnology, Southern Yangtze University, Wuxi, Jiangsu 214122, China)

Abstract: The relationship between the starvation culture and relative cell viability in the growth phase and their effects on the expression of recombinant human IFN β -HSA fusion protein in *Pichia pastoris* KM71/IH were observed in 5 L fermentor experiments. The results showed that the starvation culture in which glycerol as the solo carbon source was exhausted resulted in the decrease of relative cell viability and expression of recombinant hIFN β -HSA fusion protein. The strategy of mannitol addition in the transition stage not only eliminated the inhibition effect on methanol induction by residual glycerol, but also kept higher relative cell viability (>97%) and then improved the yield of human IFN β -HSA fusion protein. The maximum yield and maximum hIFN β -HSA productivity reached 37.3 mg/L and 0.78 mg/(L·h) respectively, which were 92.3% and 44.4% higher than those in the control.

Key words: *Pichia pastoris*; relative cell viability; non-repressing carbon source; human IFN β -HSA fusion protein