

# pH和溶解氧浓度对重组酵母表达乙型肝炎 表面抗原的影响

施 源 沈绿萍\* 唐孝宣 李载平\* 袁渭康 陈敏恒

(华东化工学院, 上海)

观察酵母基因工程菌生产目的基因表达产物——乙型肝炎表面抗原的发酵, 细胞生长和乙型肝炎表面抗原表达是两个相互影响的过程, 因此, 存在着 pH 的调节序列。溶解氧浓度的控制对重组质粒稳定性以及目的基因的高表达具有较大影响, 实验获得控制溶解氧浓度为 70% 饱和度的条件, 可使重组质粒保持 73% 以上的稳定性, 并且, 乙型肝炎表面抗原达到 98.6 的相对浓度。

**关键词** 酵母基因工程菌发酵; 乙型肝炎表面抗原; 重组质粒稳定性

运用基因工程手段, 使含有乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 基因 (S 基因) 的重组质粒 pYGH<sub>3</sub>-16-S 进入酵母细胞 DBY-745<sup>[1]</sup>, 经发酵实现重组酵母表达 HBsAg。经实验观察, 改变发酵操作条件, 能使 HBsAg 的浓度逐步提高<sup>[2]</sup>。由于此过程包含着受体细胞生长和重组质粒表达竞争利用共同的蛋白质表达系统, 代谢能量等, 它们之间存在着相互影响。又由于此发酵过程属于混合生长-偶联合成产物型, 异源基因表达的产物非受体细胞代谢环节中的某一物质。因此, 发酵中细胞生长代谢规律和 HBsAg 表达、积累规律之间存在着差异。在不同的发酵时间区域内根据操作的控制目标利用并扩大这种差异, 有利于获得较优的工艺条件。例如, 通过培养基组成的筛选, 流加式操作控制培养液中低浓度的葡萄糖含量, 建立发酵温度的实时变化顺序等, 使重组质粒稳定性有较大的改善。

本文以基因工程酵母发酵操作中的常规参数——pH 值和溶解氧浓度为实验对

象, 以确定为获得 HBsAg 高表达的发酵操作参数变化范围。

## 结果和讨论

### (一) 基因工程酵母菌生长最适 pH 的选择

发酵过程中, pH 的变化由酵母细胞代谢特征、培养基配比和发酵环境条件所决定。其中, 细胞自身具有有限的调节 pH 能力, 当外界条件变化过于激烈时, 细胞则失去自身调节能力而受到外界的强制干预, 影响细胞的正常生长。图 1 至图 6 分别为 pH 值逐步变化时, 工程酵母细胞的代谢情况, 其中包括细胞生长 ( $OD_{600nm}$ )、葡萄糖碳源的消耗 (GU)、HBsAg 相对浓度的变化 (相对浓度指相对于受体细胞在具有选择性压力的培养基 YNB<sub>1</sub> 发酵中 HBsAg 浓度)、以及重组质粒稳定性值 (ST%)。

本文于 1988 年 10 月 18 日收到。

\* 中国科学院上海生物化学研究所。

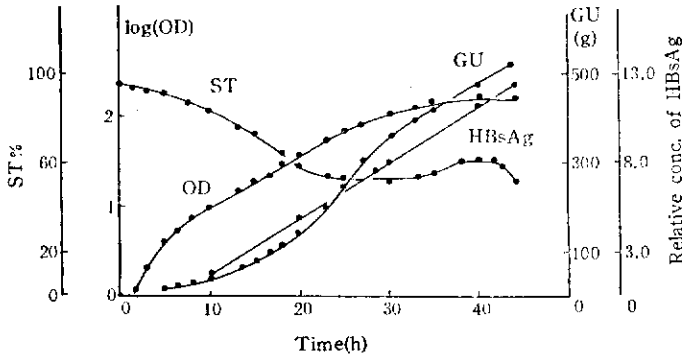


图 1 基因工程酵母细胞代谢曲线 (pH4.00)

Fig.1 Metabolic curve of genetically engineered yeast in pH 4.0

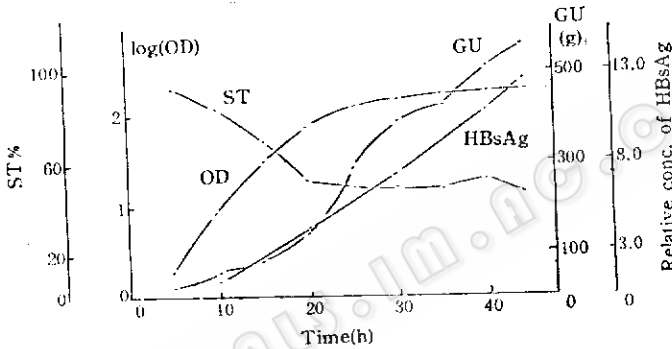


图 2 基因工程酵母细胞代谢曲线 (pH4.50)

Fig.2 Metabolic curve of genetically engineered yeast in pH 4.50

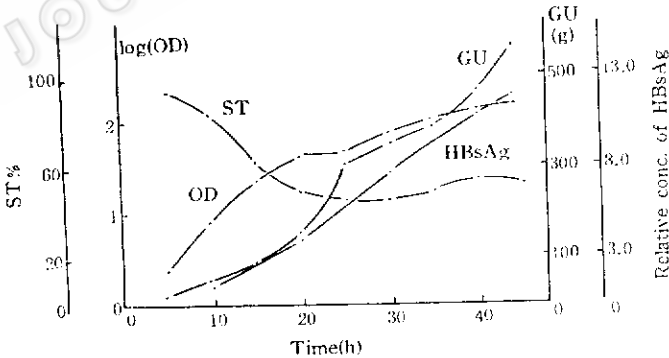


图 3 基因工程酵母细胞代谢曲线 (pH 5.00)

Fig.3 Metabolic curve of genetically engineered yeast in pH 5.00

细胞生长的最适pH为4.50, 随 pH 的上升, 细胞生长受阻。同时, 葡萄糖消耗以及氮源的消耗明显增加, 细胞为在 pH 6.50条件下能正常代谢, 它的总糖耗达最适pH时的1.12倍, 总氨基酸耗为1.07倍, 而细胞的密度则下降了1.4倍。可以认为,

细胞在恶化的环境中生存而增加其自身的维持能耗所至。

### (二) HBsAg表达的最适 pH 的选择

将图 1 至图 6 不同 pH 条件的发酵最终重组质粒稳定性值 (ST<sub>t</sub>%) 和单位 Leu<sup>+</sup>表型细胞表达 HBsAg 的浓度 (Max

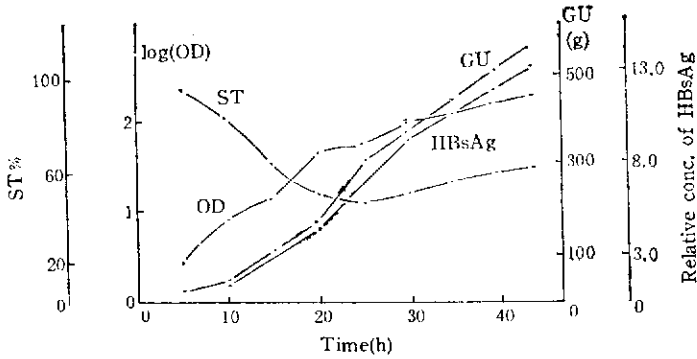


图4 基因工程酵母细胞代谢曲线 (pH 5.50)

Fig.4 Metabolic curve of genetically engineered yeast in pH 5.50

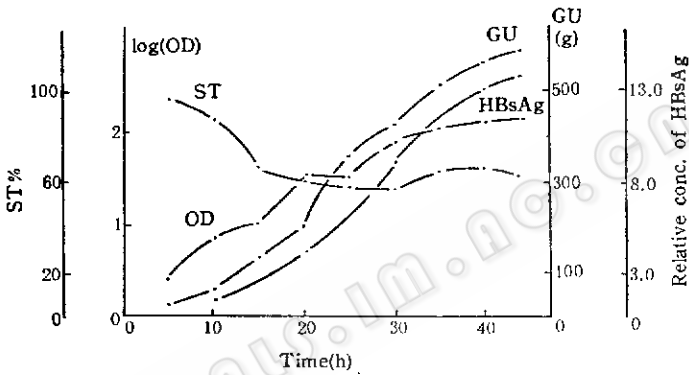


图5 基因工程酵母细胞代谢曲线 (pH 6.00)

Fig.5 Metabolic curve of genetically engineered yeast in pH 6.00

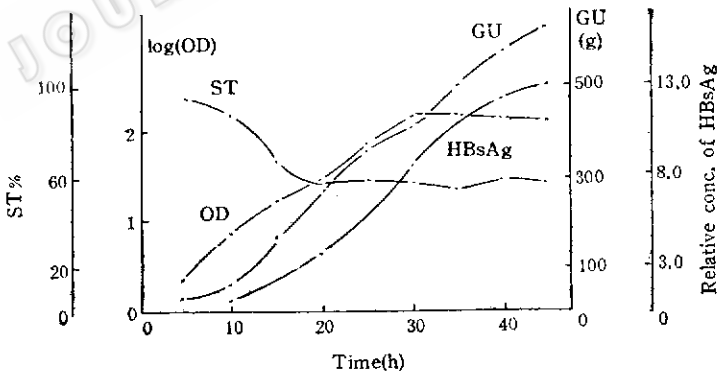


图6 基因工程酵母细胞代谢曲线 (pH 6.50)

Fig.6 Metabolic curve of genetically engineered yeast in pH 6.50

比活) 绘于图7。从中获得最适HBsAg表达量和重组质粒较高稳定性值都对应于pH6.0。细胞生长过程和HBsAg合成过程存在着两个pH值操作范围, 后者偏向中性的发酵环境。其原因需对重组质粒转录转译的工作环境做进一步研究。

根据实验结果, 我们选择了pH值的变化顺序, 以pH为4.5开始发酵, 在25h处改变操作状态。采用pH值陡直上升至pH为6.0, 如图8所示。如果采用pH值逐步上升序列, 可使HBsAg表达量达到33.15相对浓度, 见图9。前者可能是细胞对于

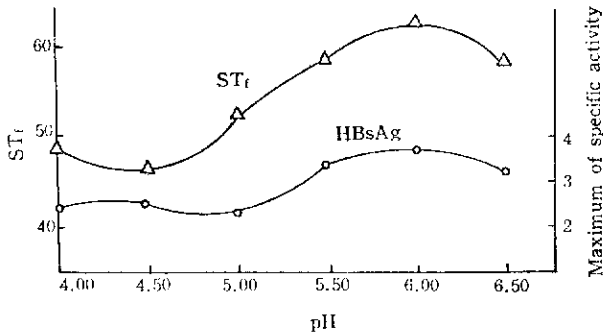


图 7 发酵pH对HBsAg表达的影响

Fig.7 Effect of pH values to expression on HBsAg in fermentation processes

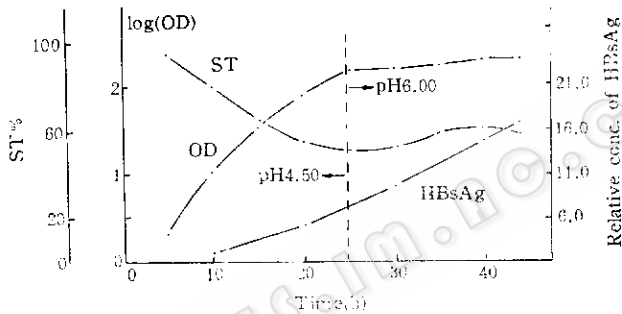


图 8 pH值调节顺序对细胞代谢的影响

Fig.8 Effect of sequence of pH values to metabolism on genetically engineered yeast in fermentation processes

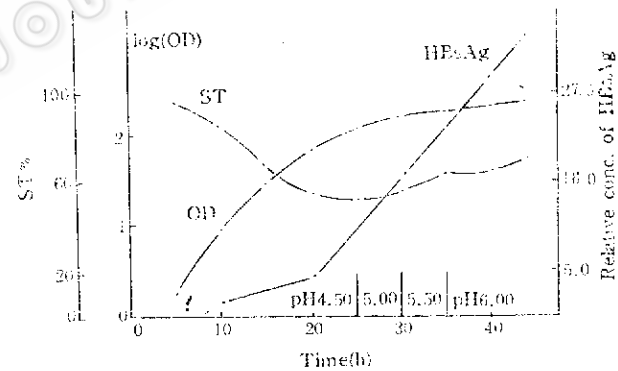


图 9 pH值调节顺序对细胞代谢的影响

Fig.9 Effect of sequence of pH values to metabolism on genetically engineered yeast in fermentation processes

环境激烈振荡的承受能力较差所至。

### (三) 溶解氧浓度对发酵中重组质粒稳定性的影响

图 10 指出, 当溶解氧 (DO%) 维持在 20% 饱和度时, ST% 值下降至 32%, 说

明在 DO% 成为限制性基质时, 除了总的细胞量处于较低浓度外, 而且 Leu<sup>-</sup>表型细胞代谢能量消耗少于携带此重组质粒的受体细胞。因此, 产生了 Leu<sup>-</sup>表型细胞的生长优势。观察持续地降低 DO% 或瞬时下降

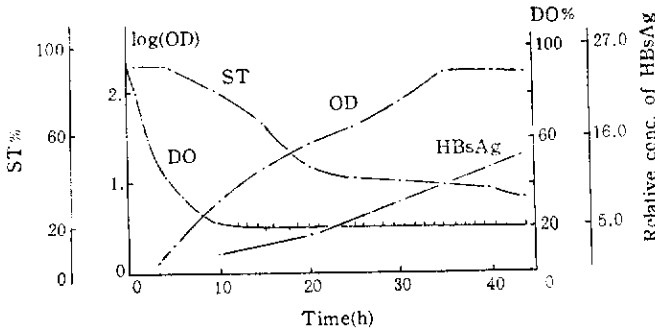


图10 溶解氧浓度和细胞代谢的关系  
Fig. 10 Relationship between DO and metabolism of genetically engineered yeast in fermentation processes

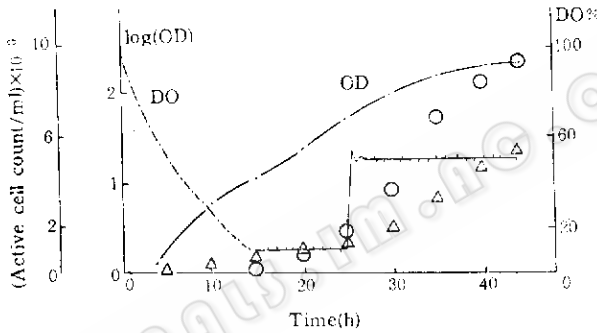


图11 溶解氧维持低浓度时细胞生长过程  
Fig. 11 Cell growth of genetically engineered yeast in fermentation of maintenance DO at low level  
△ Leu<sup>+</sup> cell, ○ Leu<sup>-</sup> cell

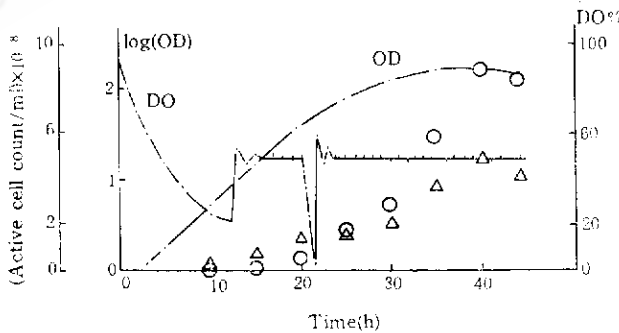


图12 溶解氧瞬时下降对细胞生长的影响  
Fig. 12 Effect of a instantaneous drop in DO concentration to cell growth of genetically engineered yeast  
△ Leu<sup>+</sup> cell, ○ Leu<sup>-</sup> cell

DO%的发酵实验, 发现对 HBsAg 的表达都会产生不利影响, 如图11和图12所示。

(四) 溶解氧浓度对HBsAg积累的影响

图13把各种发酵 DO% 与重组质粒的 ST% 集中标绘, 当 DO% 被控制在 70% 饱和度, HBsAg 合成能力发现产生了大幅度提高。其原因可能为 (1) Leu<sup>+</sup> 表型细胞

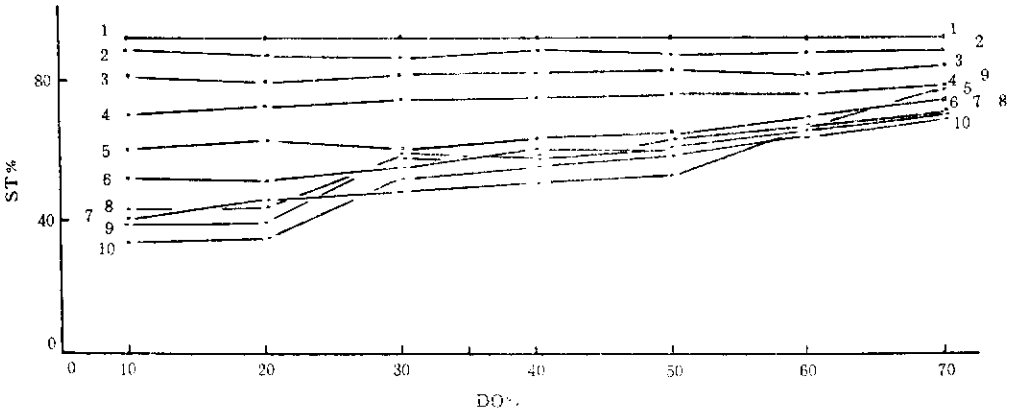


图13 溶解氧浓度和重组质粒稳定性关系

Fig.13 Relationship between DO concentration and stability of recombinant plasmid

其中数字依次代表发酵时间 0, 5, 10, ..., 45h Arabic numerals showing fermentation time 0, 5, 10, ..., 45 hours

在总细胞群中占有大部分, 最终 ST<sub>T</sub>% 达到73%以上, 绝对Leu<sup>+</sup>表型细胞浓度为  $8.8 \times 10^8$ /ml。(2) 总细胞生长速率的提高。如, 最终的 OD<sub>600nm</sub> 为 251.4, 相当于干细胞浓度 43.2g/L。(3) 高浓度的溶解氧能增加携带重组质粒的受体细胞代谢活力。从图14可见, 细胞内 GAPase 活

力随 DO% 的提高而增加。虽然, 高浓度的 DO% 对酵母细胞生长和代谢是有害的。但是, Leu<sup>+</sup>表型细胞它需要的能量提供比溶解氧对细胞阻遏更重要, 而 Leu<sup>-</sup>表型细胞却在高 DO% 的阻遏下, 抑制了其糖酵解酶系的活力, 减慢了它的生长速率。

在 DO% 为 70% 饱和度时, 受体细胞

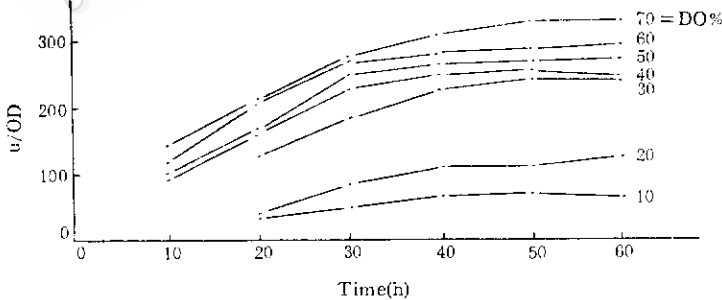


图14 GAPase活力和溶解氧浓度的关系

Fig.14 Relationship between DO% and GAPase activity

糖耗率  $Y_G$  为 0.26。一般酵母发酵, 可保持  $Y_G$  在 0.48 至 0.50<sup>[3]</sup>。基因工程酵母由于额外负担着目的基因表达物质的合成和积累, 造成细胞能耗增加, 细胞糖耗率低下。经计算, 这额外能耗占总能耗的 48.4%。

采用丰富培养基 YPD-s, 保持 DO% 为 70% 饱和度, 经发酵温度和 pH 调节顺序的操作, 通过控制碳、氮源流加速率造成发酵罐中葡萄糖浓度为 0.1g% 以下等条件, 实验获得 HBsAg 达到 98.6 相对浓度。

## 参 考 文 献

- [1] 沈绿萍等: 生物化学与生物物理学报, 19:433, 1987。  
[2] 施 源等: 生物工程学报, 5(3):207—213, 1989。  
[3] 施 源等: 生物工程学报, 2(4):61—66, 1986。

## EFFECT OF pH VALUE AND DISSOLVED OXYGEN CONCENTRATION FOR EXPRESSION OF HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN BY GENETICALLY ENGINEERED YEAST IN FERMENTATION PROCESSES

Shi Yuan Tang Xiaoxuan Yuan Weikang Chen Minheng  
(East China University of Chemical Technology, Shanghai)

Shen Luping Li Zaiping  
(Shanghai Institute of Biochemistry, Academia Sinica, Shanghai)

Cell growth and expression of hepatitis B surface antigen (HBsAg) interact on each other in fermentation to produce exogenous protein HBsAg by genetically engineered yeast *S. cerevisiae* containing the HBsAg gene. Then there are adjustable sequences of pH values together with the metabolic phenomenon of the two processes. It is important that dissolved oxygen concentration in fermentation should be controlled to maintain the stability of recombinant plasmid and obtain the high expression of HBsAg. Under the condition to control the dissolved oxygen concentration to 70% saturation. The stability of the recombinant plasmid should be maintained at 73% and expressed amount of HBsAg gene achieved 98.6 in relative concentration.

### Key words

Fermentation by genetically engineered yeast; hepatitis B surface antigen; stability of recombinant plasmid