

甲醇指數進料策略對於重組 *Pichia pastoris* 生產豬表皮生長因子之影響

洪玉祥¹ 余秉樺¹ 張永鍾² 陳博彥³ 李德南^{1*}

1. 國立宜蘭大學動物科技系
2. 國立宜蘭大學食品科學系
3. 國立宜蘭大學化學與材料工程學系

摘要

以生長相後接基因表達生產相之二相式饋料批次培養系統，以甘油當作生長相之碳源基質，而於生產相則以甲醇作為碳源及生產重組蛋白質之誘發劑，評估不同甲醇進料速率對甲醇快速利用型 *Pichia pastoris* 菌株(GS115)之過程，以比較不同甲醇指數饋料速率(μ_{MeOH})對細胞生長動力學及豬表皮生長因子(pEGF)生產量之影響。發酵過程先經歷 24 h 以上之甘油饋料期，甘油之饋料速率設定為 29.3 ml h⁻¹，當濕細胞約重達 150 g l⁻¹，即進行甲醇指數饋料期。甲醇指數饋料期間除甲醇取代甘油外，其餘發酵條件皆與甘油饋料期相同。 μ_{MeOH} 設定為 0.010、0.026、0.030、0.035 和 0.050 h⁻¹，發酵期間每隔 1-12 h 收集樣品進行記錄發酵液總量、細胞重、pEGF 濃度及甲醇濃度。結果顯示，不同 μ_{MeOH} 處理之濕細胞重與 pEGF 濃度皆隨發酵時間增加而提高，當 $\mu_{\text{MeOH}}=0.030$ h⁻¹ 時在進行甲醇饋料後 48 h 有較高的濕細胞重，而 $\mu_{\text{MeOH}}=0.030-0.035$ h⁻¹ 在進行甲醇饋料後 36 h 即有較高的 pEGF 濃度，而 $\mu_{\text{MeOH}}=0.050$ h⁻¹ 時，其在甲醇饋料 36 h 後即會開始累積甲醇。由以上試驗結果發現細胞生長與 pEGF 生產量間呈現正相關性，當 $\mu_{\text{MeOH}}=0.028-0.029$ h⁻¹ 時有最佳 pEGF 生產量，當與 0.010 h⁻¹ 比較時，其 pEGF 生產速率約可從 5.8 增加到 12.4 mg/l · h。

關鍵詞： 甲醇指數饋料速率、*Pichia pastoris*、豬表皮生長因子

Effect of Methanol Exponential Feeding Strategy on Production of Recombinant Porcine Epidermal Growth Factor from *Pichia pastoris*

Yu-Shiang Hung¹ Bing-Hua Yu¹ Yung-chung Chang²

Bor-Yann Chen³ Der-Nan Lee^{1*}

1. Department of Animal Science, National Ilan University

2. Department of Food Science, National Ilan University

3. Department of Chemical and Material Engineering, National Ilan University

Abstract

This study provided an exponential feeding strategy in two-phase fed-batch cultivation of a methanol-utilizing plus (Mut^+) *Pichia pastoris* strain. To optimize foreign gene expression and decrease the metabolic burden to cell growth, glycerol and methanol were used as sole carbon sources in the first and second phase to genetically enhance the growth phase and production phase, respectively. In particular, methanol not only played a role as a carbon substrate, but also an inducer for target protein expression. Prior to genetic induction, glycerol-containing cultures were firstly carried out for approximately 24 hours (feeding rate set at 29.3 ml h^{-1}). Once the wet cell concentration was achieved to 150 g l^{-1} , the feeding substrate was switched to methanol in an exponential feeding strategy to induce pEGF production (all other conditions remained identical). The optimal exponential rate for methanol feeding was determined (μ_{MeOH}) to maximize the production of porcine epidermal growth factor (pEGF) using a Mut^+ *Pichia pastoris* strain (GS115) a model system. The growth behavior and production characteristics at μ_{MeOH} of 0.010, 0.026, 0.030, 0.035, and 0.050 h^{-1} clearly revealed a significant correlation between cell growth and pEGF production, indicating the nature of growth-associated production. In addition, the optimal pEGF production approximately occurred at $0.028 - 0.029 \text{ h}^{-1}$. Compared to the μ_{MeOH} at 0.010 h^{-1} , this optimal pEGF productivity increased from 5.8 to $12.4 \text{ mg/l} \cdot \text{h}$.

Key words: methanol exponential feeding rate, *Pichia pastoris*, porcine epidermal growth factor

*Corresponding author E-mail: dnlee@niu.edu.tw

前 言

*Pichia pastoris*表現系統因具有利用簡單培養基達到高密度細胞生長、外源蛋白質轉譯後有適度之修飾、酵母之內源性蛋白質濃度低及可以甲醇當作誘發分泌之啟動子等特性，而可用於生產外來基因蛋白質。一般以兩相式饋料批次方式培養甲醇快速利用型 *Pichia* 菌株，培養過程於菌體生長相後加以基因刺激表達以接生產相，生長相以甘油當作單一碳源基質，於生產期則以甲醇作為碳源及生產重組蛋白質之誘發劑。策略上，甲醇供應不足或過量皆將導致外源蛋白質量分泌不佳(Coudere and Baratti, 1980; Shioya, 1992; Van der Klei et al., 1990)，因此甲醇的供應速率可依其生產酵母比生長速率(specific growth rate)對甲醇指數饋料速率(μ_{MeOH})的生長相關

性來決定(Bailey and Ollis, 1998)，其原理為而依據酵母之生長依指數饋料策略為維持低量累積甲醇濃度之供應甲醇最適量，若操作狀況維持策略需求，可較監測發酵槽內甲醇濃度或溶氧量之發酵系統生產更高量之外源蛋白質(Trinh et al., 2003)。先前已經有報告利用此種方法分別改善 *P. pastoris* 生產臘腸神經毒素型重鏈C片段(heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin)之生產效率(Zhang et al., 2003)，其發酵菌株同樣為利用快速利用甲醇之 *P. pastoris* 菌株，供應基礎鹽類培養液以生產重組臘腸神經毒素重鏈C片段之最佳甲醇指數饋料速率為 0.015 h^{-1} ，但以此重組酵母菌株利用單一碳源基質生產外源蛋白質之報告並不多。

表皮生長因子(Epidermal growth factor, EGF)為含 53 個胺基酸所組成之多肽，並存在許多哺乳動物組織中(Gregory, 1975)。EGF對於細胞和表皮組織具有促進蛋白質和DNA合成之生理功能(Carpenter and Cohen, 1979)。先前已有許多研究報告

指出添加EGF可刺激豬之消化道發育和其酵素活性 (Jaeger et al., 1990; James et al., 1987; Lee et al., 2006; Zijlstra et al., 1994)。豬之 EGF (pEGF)基因已被選殖並利用電破法轉殖進入*P. pastoris*菌株 (郭等., 2005)。但此菌株利用甲醇以生產pEGF重組蛋白質之最佳發酵條件仍不清楚。因此本研究之目的在於使用快速利用甲醇型重組*P. pastoris* 菌株，比較不同 μ_{MeOH} 對細胞生長動力學和pEGF表現量之影響。

材料與方法

一、菌種與配方

發酵菌株利用反轉錄聚合酶鏈鎖反應 (reverse-transcription polymerase chain reaction)程序選殖pEGF基因，經由電破法嵌入*P. pastoris*之GS115 品系菌株中表現，其選殖過程和重組蛋白質驗證如先前之描述(郭等., 2005)。利用基礎鹽類培養液(basal salts medium; 每公升含 26.7 ml 85%磷酸、0.93 g 硫酸鈣、18.2 g 硫酸鉀、14.9 g 硫酸鎂、4.13 g 氫氧化鉀及 40 ml 甘油)；微量元素培養液(每升含 6 g 硫酸銅、0.08 g 碘化鈉、3 g 硫酸鎂、0.2 g 鉬酸鈉、0.02 g 硼酸、0.5 g 氯化鈷、20 g 氯化鋅、65 g 硫酸鐵、0.2 g 生物素及 5 ml 硫酸)；甘油-複雜緩衝培養液(buffer glycerol-complex medium; 每公升含 10 g 酵母抽出物、20 g 蛋白脛、44.19 g 磷酸鉀溶液(3.01 g $K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$ 和 1.18 g KH_2PO_4)、13.4 g 酵母氮鹼基(yeast nitrogen base)、1.0 g 酪胺基酸(casamino acids)、0.0004 g 生物素、10 ml 甘油)。

二、發酵條件

以 250 ml 三角培養搖瓶盛 1 ml 經轉型菌液(G 27 轉形株)培養於 50 ml 甘油-複雜緩衝培養液進行細胞增殖，經培養 16-24 h 至細胞濃度達吸光值(OD_{600})為 2-3 時，再接種至盛 1 公升之基礎鹽類添加微量元素培養液之小型發酵槽中(FB-6S，一升科技股份有限公司，臺灣)。起始發酵條件設定為 30°C、pH 5、轉速 500 rpm 及通氣量(vvm) 1 l/min。歷經 20-24 h 以耗盡發酵槽中甘油基質，即進入甘油批次饋料期，發酵條件設定為 30°C、pH 5、轉速增加為 800 rpm

及通氣維持為 1 l/min，但其中混合 20%純氧。甘油之饋料速率設定為 29.3 ml h⁻¹，當濕細胞約重達 150 g l⁻¹(約於指數生長相中期)，即進行甲醇指數饋料期。

三、試驗設計

甲醇饋料期間依指數饋料原料調整甲醇指數饋料速率(exponential feeding strategy)，公式為： $F = F_0 \cdot e^{\alpha t}$ ，其 F_0 經計算後設定 7.0 ml h⁻¹，將 μ_{MeOH} 值依序設為 0.010、0.026、0.030、0.035 及 0.050 h⁻¹之五種饋料速率處理，發酵期間間隔 1-12 h 收集樣品，測量發酵液總量、細胞重、pEGF濃度及甲醇濃度。發酵槽培養 60 h 後之發酵液以離心(7500×g、10 mins、4°C)去除細胞後經 -80°C 凍藏。

四、樣品分析

濕細胞重以 OD_{600} 之吸光值利用 1 OD = 0.32 g 濕細胞 L⁻¹之標準換算(Moon et al., 2003)。發酵液中 pEGF濃度以酵素鍵結免疫吸附法(ELISA)分析，利用自行製備之兔抗pEGF抗體血清，配合山羊抗兔 IgG (Sigma Chemical Co., USA)結合鹼性磷酸酶呈色反應，並以人EGF作為標準溶液曲線(Lee et al., 2006)。甲醇濃度分析參考AOAC (1998)之方法，利用氣相層析儀(gas chromatography)進行分析，管柱為內徑 1/8" 長 2 m 的填充式 80/100 Carbopack C/0.2% Carbowax 1500 不銹鋼管柱(Supelco, MO, USA)，以氮氣為載流氣體，流速為 30 ml min⁻¹，管柱溫度維持 120°C 等溫，注入口與檢測器溫度均為 150°C。

五、資料計算

評估細胞生產pEGF之效率分別以操作時程為 60 小時之發酵平均總產量來計算每克濕細胞生產 pEGF量(mg g⁻¹; 縮寫符號為 Y_{pEGF})、每克濕細胞pEGF 生產速率(mg [g · h]⁻¹; 縮寫符號為 π)及pEGF生產速率濃度(mg [l · h]⁻¹; 縮寫符號為 Π)。

結果與討論

發酵過程中，由於設定甲醇為單一生長限制因子，而其他因子為過量條件下，因此可單純使用甲

醇饋料速率來控制細胞生長速率。結果顯示不同 μ_{MeOH} 對各發酵槽內濕細胞重、pEGF濃度及甲醇殘留量分別列於圖 1。不同 μ_{MeOH} 處理之濕細胞重與 pEGF 濃度皆隨發酵時間增加而提高，當 $\mu_{\text{MeOH}} = 0.030 \text{ h}^{-1}$ 時在進行甲醇饋料後 48 h 有較高的濕細胞重，而 $\mu_{\text{MeOH}} = 0.030 \text{ h}^{-1}$ 和 $\mu_{\text{MeOH}} = 0.035 \text{ h}^{-1}$ 在進行甲醇饋料後 36 h 即有較高的 pEGF 濃度，另外對於發酵槽內甲醇濃度的監測則發現，當 $\mu_{\text{MeOH}} = 0.050 \text{ h}^{-1}$ 時，其在甲醇饋料 36 h 後即會開始累積甲醇並在培養 48 h 後即中止發酵。

比較不同 μ_{MeOH} 對 pEGF 生產速率影響結果列於表 1。當 $\mu_{\text{MeOH}} = 0.030\text{-}0.035 \text{ h}^{-1}$ 處理時有最高的 pEGF 濃度，而當 $\mu_{\text{MeOH}} = 0.050 \text{ h}^{-1}$ ，在培養 20 h 後即出現 DO 值低於 20% 之情況，而且在 36 h 以後開始蓄積甲醇因而減低細胞生長速率與 pEGF 產生速率。雖然 μ_{MeOH} 從 0.010 h^{-1} 增加至 0.035 h^{-1} 皆可產生相近的濕細胞重，但對於單位濕細胞重之 pEGF 生產量 ($Y_{p/x}$, mg g^{-1})、每克濕細胞 pEGF 生產速率 ($\text{mg [g} \cdot \text{h]}^{-1}$) 及 pEGF 生產速率濃度 ($\text{mg [l} \cdot \text{h]}^{-1}$) 皆以 $\mu_{\text{MeOH}} = 0.026\text{-}0.035 \text{ h}^{-1}$ 間之饋料速率有較佳表現。

利用二次迴歸方程式計算最佳 μ_{MeOH} 值對預期 pEGF 生產量及其速率之結果列於表 2。結果顯示在本試驗設定之發酵條件下，要獲致最大每克濕細胞生產 pEGF 量之 μ_{MeOH} 值為 0.028 h^{-1} ，而預期可獲致之每克濕細胞生產 pEGF 量為 8.796 mg g^{-1} ；要獲致最大每克濕細胞之 pEGF 生產速率之 μ_{MeOH} 值為 0.029 h^{-1} ，而預期可獲致之每克濕細胞之 pEGF 生產速率為 $1.770 \text{ mg [g} \cdot \text{h]}^{-1}$ ；要獲致最大 pEGF 生產速率濃度之 μ_{MeOH} 值為 0.029 h^{-1} ，而預期可獲致之 pEGF 生產速率濃度 $0.031 \text{ mg [l} \cdot \text{h]}^{-1}$ 。因此 μ_{MeOH} 值約為 $0.028\text{-}0.029 \text{ h}^{-1}$ ，將可產生最佳化之操作產能。

重複進行發酵試驗以驗證 $\mu_{\text{MeOH}} = 0.028 \text{ h}^{-1}$ 對濕細胞重、pEGF 量及甲醇殘留量的影響，其結果列於圖 2。試驗結果顯示添加甲醇饋料 60 h 後之細胞重為 398 g l^{-1} 、pEGF 濃度為 690 mg l^{-1} 以及殘留至無法偵測到之甲醇濃度，結果可重複表現出類似先前基於 $\mu_{\text{MeOH}} = 0.026 \text{ h}^{-1}$ 與 $\mu_{\text{MeOH}} = 0.030 \text{ h}^{-1}$ 間之細胞動力學現象。

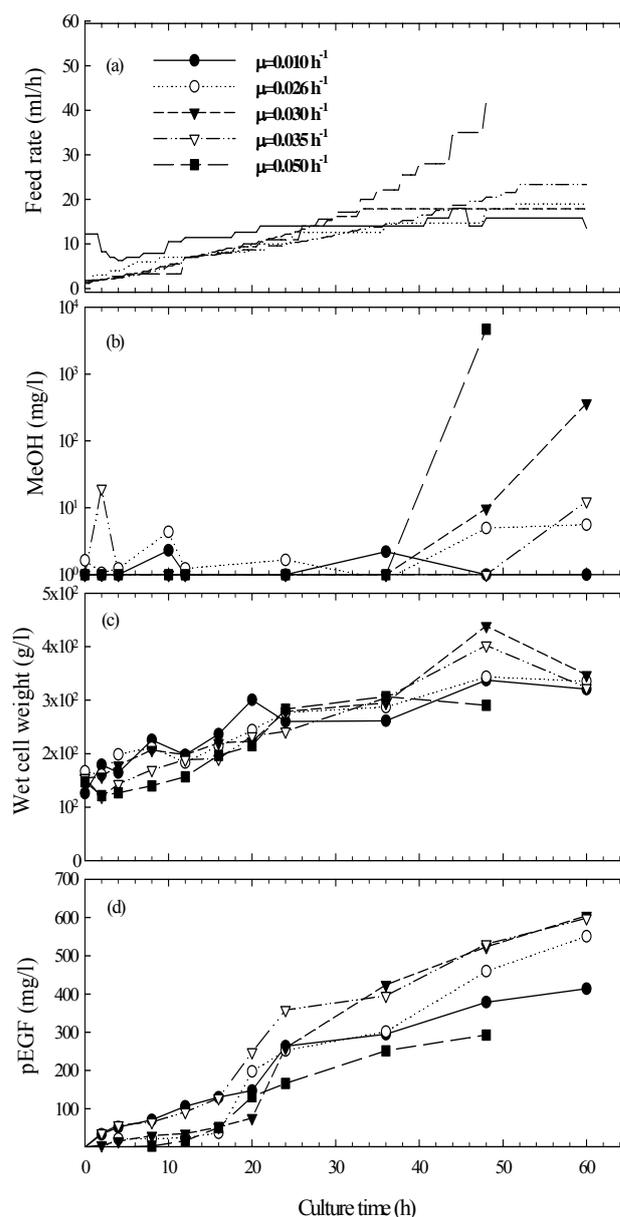


圖 1. 不同甲醇指數饋料速率對 (a) 甲醇饋料量；(b) 甲醇濃度殘留量；(c) 濕細胞重及 (d) pEGF 濃度之影響

Fig. 1. The effect of (a) methanol feeding rate; (b) residual methanol concentration; (c) wet cell weight, and (d) pEGF concentration by different methanol exponential feeding rate.

表 1. 不同甲醇指數饋料速率對 pEGF 生產速率之影響

Table 1. Effects of different methanol exponential feeding rate on pEGF production

μ_{MeOH} (h^{-1})	X_{max} (g/l)	P_{max} (mg/l)	$Y_{\text{p/X}}$ (mg/g)	π (mg/[g · h])	Π (mg/[l · h])	t_c (h)
0.010	320.6	413.8	1.29	0.022	5.845	60
0.026	335.3	550.6	1.64	0.027	7.980	60
0.030	347.1	604.2	1.74	0.029	9.324	60
0.035	322.9	598.1	1.85	0.031	8.448	60
0.050	290.5	292.7	1.01	0.021	3.630	48

μ_{MeOH} : The value of practical methanol exponential feeding rate; X_{max} : Wet cell weight; P_{max} : The pEGF concentration at the end of fermentation; $Y_{\text{p/X}}$: The pEGF production per gram of wet cell weight; π : The pEGF producing rate per gram wet cell weight; Π : The pEGF producing rate per liter; t_c : The culture time.

本試驗結果所訂出之最佳比進料速率 $\mu_{\text{MeOH}} = 0.028 \text{ h}^{-1}$ 較同樣利用甲醇快速型之 *P. pastoris* 菌株利用基礎鹽類培養液生產臘腸神經毒素重鏈C片段之研究, 發現最佳甲醇指數饋料速率為 0.015 h^{-1} (Zhang et al., 2003), 但若使用甘油-複雜緩衝培養液供應

Hansenula polymorpha 生產hEGF之效率, 則其最佳比進料速率 0.10 h^{-1} (Moon et al., 2003), 推論不同試驗之重組菌種與發酵條件差異皆會影響最佳甲醇指數饋料速率。

表 2. 最佳甲醇指數饋料速率理論值之計算

Table 2. The optimal methanol exponential feeding rate by calculation

pEGF production	Regressive equation [†]	Optimal μ_{MeOH}	Efficiency of pEGF production
pEGF production per gram of wet cell weight ($Y_{\text{p/X}}$)	$y = -0.4345 + 650.6544 \times \chi - 11464 \times \chi^2$	$\mu_{\text{MeOH, m}} = 0.028 \text{ h}^{-1}$	8.796 mg/g
pEGF producing rate per gram wet cell weight (π)	$y = 0.3076 + 99.7604 \times \chi - 1702.7271 \times \chi^2$	$\mu_{\text{MeOH, m}} = 0.029 \text{ h}^{-1}$	1.770 mg/[g · h]
pEGF producing rate per liter (Π)	$y = 0.0085 + 1.3426 \times \chi - 21.6905 \times \chi^2$	$\mu_{\text{MeOH, m}} = 0.029 \text{ h}^{-1}$	0.029 mg/[l · h]

[†]y: The efficiency of pEGF production ; χ : The optimal of methanol exponential feeding rate.

結 論

本試驗利用不同甲醇指數饋料速率對重組 *P. pastoris* 之細胞動力學研究發現, 可在無需碳源含量

偵測器之協助下, 以前饋料速率來探討工業化發酵供應甲醇速率對外源蛋白質表現量之影響, 而試驗所測得之最佳之甲醇指數饋料速率為 0.028 h^{-1} , 此結果並可作為利用此重組 *P. pastoris* 生產pEGF之依據。

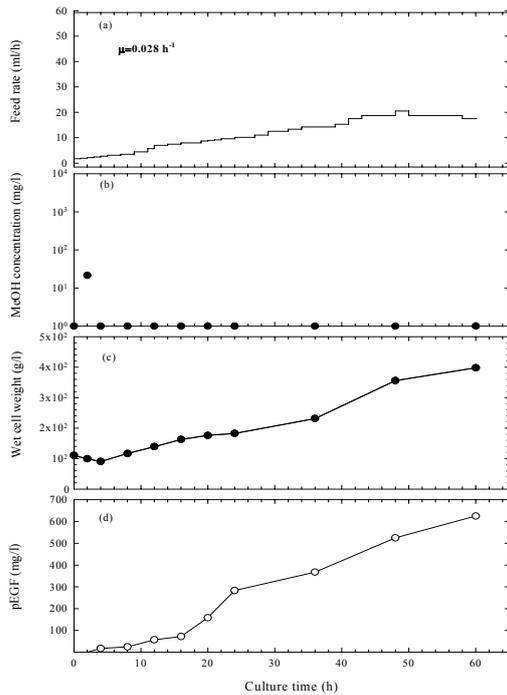


圖 2. $\mu_{\text{MeOH}} = 0.028 \text{ h}^{-1}$ 對 (a) 甲醇饋料量；(b) 甲醇濃度殘留量；(c) 濕細胞重及 (d) pEGF 濃度之影響

Fig.2. The effect of $\mu_{\text{MeOH}} = 0.028 \text{ h}^{-1}$ methanol feeding rate on (a) methanol feeding rate; (b) residual methanol concentration; (c) wet cell weight, and (d) pEGF concentration.

誌 謝

本研究承蒙國科會(NSC 94-2313-B-197-002)和農委會(94 牧-4.1.1-U1)補助經費，謹此致謝。

參考文獻

郭村勇、吳忠晉、李德南、吳輔祐。2005。豬上皮細胞生長因子之基因選殖、表現與生物活性。宜蘭大學生物資源學刊 2: 37-45。

AOAC. 1980. Official Methods of Analysis of the A. O. A. C., 13th ed., Washington, D. C.

Bailey, J. E. and D. F. Ollis. 1998. In: Biochemical Engineering Fundamentals. McGraw-Hill Int. Ed. 2nd ED.

Carpenter, G. and S. Cohen. 1979. Epidermal growth factor. Ann. Rev. Biochem. 48: 193-216.

Coudere, R. and J. Baratti. 1980. Oxidation of methanol by the yeast, *Pichia pastoris*, purification and properties of the alcohol oxidase. Argri. Biol. Chem. 44: 2279-2289.

Gregory, H. 1975. Isolation and structure of urogastrone and its relationship to epidermal growth factor. Nature 257: 325-327.

Jaeger, L. A., C. H. Lamar, T. R. Cline and C. J. Cardona. 1990. Effect of orally administered epidermal growth factor on the jejunal mucosa of weaned pigs. Am. J. Vet. Res. 51: 471-474.

James, P. S., M. W. Smith, D. R. Tivey and T. J. G. Wilson. 1987. Epidermal growth factor selectively increases maltase and sucrase activities in neonatal piglet intestine. J. Physiol. 393: 583-594.

Lee, D. N., T. Y. Kuo, M. C. Chen, T. Y. Tang, F. H. Liu and C. F. Weng. 2006. Expression of porcine epidermal growth factor in *Pichia pastoris* and its biology activity in early-weaned piglets. Life Sci. 78: 649-654.

Moon, H., S. W. Kim, J. Lee, S. K. Rhee, E. S. Choi, H. A. Kang, I. H. Kim and S. I. Hong. 2003. Independent exponential feeding of glycerol and methanol for fed-batch culture of recombinant *Hansenula polymorpha* DL-1. Proc. Biochem. 38: 487-495.

Shioya, S. 1992. Optimization and control in fed-batch bioreactors. In: Fiechter, A., Eds. Advances in biochemical engineering/biotechnology, Vol. 46. pp. 111-142. Springer, Berlin.

Trinh, L. B., J. N. Phue and J. Shiloach. 2003. Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. Biotechnol. Bioeng. 82: 438-444.

- Van der Klei, I. J., L. V. Bystrykh and W. Harder. 1990. Alcohol oxidase from *Hansenula polymorpha* CBS 4732. *Methods Enzymol.* 188: 420-427.
- Zhang, W., K. J. H. Potter, B. A. Plantz, V. L. Schlegel, L. A. Smith and M. M. Meagher. 2003. *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 30: 210-215.
- Zijlstra, R. T., J. Odle, W. F. Hall, B. W. Petschow, H. B. Gelberg and R. E. Litov. 1994. Effect of orally administered epidermal growth factor on intestinal recovery of neonatal pigs infected with rotavirus. *J. Pediat. Gast. Nutr.* 19: 382-390.

95 年 10 月 12 日投稿

95 年 11 月 24 日接受