

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2018年1月25日 (25.01.2018)



(10) 国际公布号  
**WO 2018/014452 A1**

- (51) 国际专利分类号:  
C12P 21/02 (2006.01) C07K 1/34 (2006.01)  
C07K 14/78 (2006.01) C12R 1/84 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/102430
- (22) 国际申请日: 2016年10月18日 (18.10.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:  
201610587122.4 2016年7月22日 (22.07.2016) CN
- (71) 申请人: 江苏江山聚源生物技术有限公司 (JIANGSU JLAND BIOTECH CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省靖江市东郊村纺织路18号, Jiangsu 214500 (CN)。
- (72) 发明人: 杨树林 (YANG, Shulin); 中国江苏省南京市孝陵卫200号, Jiangsu 210094 (CN)。 赵健烽

(ZHAO, Jianfeng); 中国江苏省靖江市东郊村纺织路18号, Jiangsu 214500 (CN)。 黄建民 (HUANG, Jianmin); 中国江苏省靖江市东郊村纺织路18号, Jiangsu 214500 (CN)。 高力虎 (GAO, Lihu); 中国江苏省靖江市东郊村纺织路18号, Jiangsu 214500 (CN)。 杜尔凤 (DU, Erfeng); 中国江苏省靖江市东郊村纺织路18号, Jiangsu 214500 (CN)。 陶海 (TAO, Hai); 中国江苏省靖江市东郊村纺织路18号, Jiangsu 214500 (CN)。 冯丽萍 (FENG, Liping); 中国江苏省靖江市东郊村纺织路18号, Jiangsu 214500 (CN)。 季乐 (JI, Le); 中国江苏省靖江市东郊村纺织路18号, Jiangsu 214500 (CN)。 周爱梅 (ZHOU, Aimei); 中国江苏省靖江市东郊村纺织路18号, Jiangsu 214500 (CN)。

(74) 代理人: 江苏圣典律师事务所 (JIANGSU SHENGDIAN LAW FIRM); 中国江苏省南京市

(54) Title: FERMENTATION TECHNIQUE WITH *PICHA* YEAST EXPRESSING RECOMBINANT PROTEIN

(54) 发明名称: 一种毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺

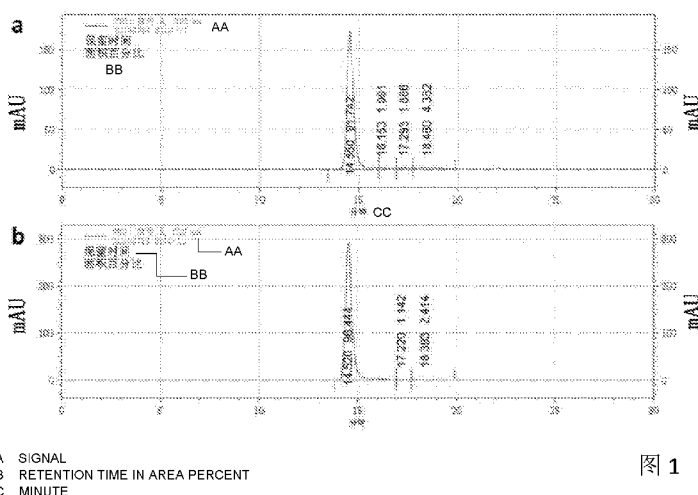


图 1

(57) Abstract: Provided is a fermentation technique with a *Pichia* yeast expressing a recombinant protein. The fermentation technique uses *Pichia pastoris* as the fungal strain. The method comprises: performing primary seed culturing to reach a fungal concentration of  $20 \pm 2$  g/L, then switching to secondary seed culturing to reach a concentration of  $120 \pm 2$  g/L, then switching to a glycerol culturing phase, wherein the amount of glycerol added for the glycerol culturing phase is 60-70 g/L, then waiting for dissolved oxygen to reach a relatively stable state to initiate a methanol induction phase, and performing induction for  $120 \pm 8$  h to complete the fermentation process.

(57) 摘要: 提供一种毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺, 该发酵工艺采用巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 为菌种, 先进行一级种子培养, 至菌浓为  $20 \pm 2$  g/L 时转接二级种子培养, 二级种子培养至菌浓为  $120 \pm 10$  g/L 时转接至甘油培养阶段, 甘油培养阶段中甘油的添加量为 60~70 g/L, 待溶氧迅速上升到达相对稳定状态时, 进入甲醇诱导阶段, 诱导  $120 \pm 8$  h 后, 发酵结束。

建邺区南湖路58号南苑大厦10楼/许峰, Jiangsu 210017 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

- 关于申请人有权申请并被授予专利(细则4.17(ii))

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

## 一种毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺

### 技术领域

本发明属于发酵工程技术领域，具体涉及一种毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺。

### 背景技术

巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 表达系统是上世纪 80 年代初期发展起来的一种新型的外源蛋白表达系统，它既具有原核表达系统操作简易、易于培养、生长速度快、表达量高、成本低等优点，还具有原核生物表达系统不具有的对外源蛋白的修饰如糖基化、蛋白磷酸化等特点。巴斯德毕赤酵母表达系统的优点是：(1) 具有醇氧化酶 *aox1* 基因启动子，是目前最强、调控机理最严格的启动子之一；(2) 表达效率高，其表达的外源蛋白可占总表达蛋白的 90% 以上，有利于目的蛋白的分离纯化；(3) 在简单合成培养基中可实现高密度培养；(4) 表达质粒能在基因组的特定位点以单拷贝或多拷贝的形式稳定整合；(5) 该酵母可以甲醇为唯一的碳源，培养基成分无需添加其它有机质，减少污染。

目前常用的表达载体和发酵工艺多是由美国 Invitrogen 公司构建开发，该系统已成功地表达了几百种外源蛋白。Invitrogen 公司开发的巴斯德毕赤酵母发酵工艺，其工业化可分为一级、二级种子培养、甘油培养阶段、甘油流加阶段及甲醇诱导阶段。该工艺是目前巴斯德毕赤酵母表达生产外源蛋白，较为通用的发酵工艺（中国专利

201010602114.5, 201110327865.5)。甘油培养和甘油流加阶段目的在于使菌体快速生长和增殖，达到高密度发酵最佳的菌体浓度范围，该阶段在工业化生产中十分关键，需实时监控，操作复杂并较难掌控，高于或低于该范围，都将造成成本增加、蛋白产量降低的不良后果。

实际的毕赤酵母表达重组蛋白的工业化生产中，主要操作人员以普通工人为主，过于复杂的操作容易导致较高的出错率，发生技术失误事件进而导致发酵工艺的最终失败。因此，简化毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺，尤其是简化现有的发酵工艺中复杂的甘油培养和甘油流加阶段的工艺，不仅可以降低生产成本，同时也减少出错的概率，减少因技术失误而导致的发酵失败，能够为重组蛋白的工业化生产带来便利和极大的经济价值。

## 发明内容

本发明的目的在于简化现有的毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺，提供一种工艺简单，操作方便可行，重组蛋白产收率大、纯度高，适于工业化大规模生产的毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺。

本发明的技术方案如下：

一种毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺，采用巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 为菌种，先进行一级种子培养，至菌浓为  $20 \pm 2 \text{g/L}$  时转接二级种子培养，二级种子培养至菌浓为  $120 \pm 10 \text{g/L}$  时转接至甘油培养阶段，甘油培养阶段中甘油的添加量为  $60 \sim 70 \text{g/L}$ ，待溶氧迅速上升到达相对稳定状态时，进入甲醇诱导阶段，诱导  $120 \pm 8 \text{h}$  后，发酵结束。

本发明所述的巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris*，已于 2011 年 6 月 29 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，保藏编号为 CGMCC No. 5021，并在中国专利 201110327865.5 中充分公开。

本发明所述的一级种子培养采用现有的常规方法，具体为将菌种巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 接种至种子培养基中，30℃摇瓶培养 24 h~36 h，至菌体湿重达到 20±2 g/L。

本发明所述的二级种子培养采用现有的常规方法，具体为将一级种子液全部转接入发酵培养基中，30℃培养，用氨水调节并控制 pH 值为 5.0，溶氧控制在 20%~30%，培养至菌体湿重达到 120±10 g/L。

本发明所述的甘油培养阶段的具体步骤为将二级种子液转入发酵培养基中，添加量 60~70 g/L 的甘油，30℃培养，用氨水调节并控制 pH 值为 5.0，通气量为 30 m<sup>3</sup>/h，搅拌速率为 300~500rpm，当溶氧陡然上升时，饥饿 1 h 使甘油耗尽。

本发明所述的甲醇诱导阶段采用现有的常规方法，具体为控制诱导阶段温度为 30℃，pH 值为 5.0，设定甲醇补料与溶氧联动，当溶氧高于 20%时开始流加甲醇，溶氧低于 20%停止流加甲醇，诱导 120±8 h 后，发酵结束，对发酵液进行离心，收集离心后的上清液依次进行浓缩、超滤和纳滤脱色脱盐，得到重组人源胶原蛋白。

与现有技术相比，本发明具有以下优点：

(1) 本发明的毕赤酵母的发酵工艺，不再需要准备流加用无菌甘油，精简了甘油灭菌罐，减少了能源、资源的损耗以及甘油的浪费；

(2) 本发明甘油消耗完即可进入下一工艺流程，有效解决了毕

赤酵母发酵工艺复杂，蛋白产量不稳定的问题，同时缩短了甘油培养阶段的时间；

(3) 本发明的毕赤酵母的发酵工艺，简便易行，无需再监控菌体浓度，减少了出错几率，便于生产人员实施，更适合大规模工业化生产。

与原工艺相比，本发明工艺简单，目的蛋白产率相当，并且回收率提高至 70%左右，纯度达 95%以上，更适用于工业化大规模生产重组人源胶原蛋白。

## 附图说明

图 1 为对比例 1 (a) 和实施例 2 (b) 得到的发酵液经分离纯化后的 HPLC 检测图。

## 具体实施方式

本发明的毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺，包括四个阶段：一级种子培养，二级种子培养，甘油培养阶段，甲醇流加阶段。

现有的毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺，包括五个阶段：一级种子培养，二级种子培养，甘油培养阶段，甘油流加阶段，甲醇流加阶段。

除特殊说明外，本发明的实施例和对比例中使用的菌种及各培养基基本如下：

1、菌种：巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris*，保藏编号：CGMCCNo. 5021，已于 2011 年 6 月 29 日保藏于中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心，并在中国专利 201110327865.5 中充分公开。

## 2、培养基：

(1) 一级种子培养基为 **BMGY** 培养基，组成为：

酵母浸出粉	10 g/L	胰蛋白胨	20 g/L
pH6.0 磷酸钾缓冲溶液	100mmol/L	酵母基础氮源	13.4 g/L
生物素	0.2 mg/L	甘油	10 g/L

(2) 二级种子培养基组成为：

甘油	40g/L	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18.2g/L
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	26.7mL/L	CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.93g/L
MgSO <sub>4</sub>	14.9g/L	KOH	4.13g/L
PTM1	4.35mL/L		

(3) 发酵培养基包括以下组分：

K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	18.2 g/L	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	26.7 mL/L
CaSO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.93 g/L	MgSO <sub>4</sub>	14.9 g/L
KOH	4.13 g/L	PTM1	4.35 mL/L

对比例中的甘油浓度为 40 g/L，流加质量浓度为 50%的甘油水溶液。实施例中的甘油浓度为 55~75 g/L，甘油阶段结束后进入甲醇流加阶段，不再更换培养基。

其中 PTM1 组成为：

CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	6.0 g/L	NaI	0.08 g/L
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3.0 g/L	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.2 g/L
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.02 g/L	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.5 g/L
ZnCl <sub>2</sub>	20.0 g/L	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	65.0 g/L
生物素	0.2 g/L	浓 H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	5.0 mL/L

### 实施例 1

一种毕赤酵母表达蛋白的发酵工艺，步骤如下：

(1) 一级种子培养

将甘油保存的菌种接种至含有 200mL 种子培养基的摇瓶中，30℃，250rpm 培养 24 h~36 h，培养至菌体湿重达到 20±2 g/L；

## (2) 二级种子培养

将一级种子液全部转接入含有 60 L 发酵培养基的 100 L 发酵罐中，30℃ 培养，用氨水调节并控制 pH 值为 5.0，溶氧控制在 20%~30%，培养至菌体湿重达到 120±10 g/L；

## (3) 发酵罐培养和诱导表达

将二级种子液转入含有 60L 发酵培养基的 1000 L 发酵罐中，添加 60g/L 的甘油，30℃ 培养，用氨水调节并控制 pH 值为 5.0，通气量为 30 m<sup>3</sup>/h，搅拌速率为 300~500rpm，当溶氧陡然上升时，饥饿 1 h 使甘油耗尽；

然后开始甲醇诱导，诱导阶段温度为 30℃，pH 值控制在 5.0，设定甲醇补料与溶氧联动，当溶氧高于 20% 开始流加甲醇，溶氧低于 20% 停止流加甲醇，诱导 112 后达到平台期，诱导 120h 后出罐，对诱导表达后的发酵液进行离心，收集离心后的上清液依次进行浓缩、超滤和纳滤脱色脱盐，得到重组人源胶原蛋白。

## 实施例 2

本实施例与实施例 1 不同的是甘油添加量为 65 g/L，其他步骤与实施例 1 相同。

## 实施例 3

本实施例与实施例 1 不同的是甘油添加量为 70 g/L，其他步骤与实施例 1 相同。

## 对比例 1

本对比例与实施例 1 不同的是甘油添加量为 55 g/L，其他步骤与

实施例 1 相同。

#### 对比例 2

本实施例与实施例 1 不同的是甘油添加量为 75 g/L，其他步骤与实施例 1 相同。

#### 对比例 3

##### (1) 一级种子培养

将甘油保存的菌种接种至含有 200mL 种子培养基的摇瓶中，30℃，250rpm 培养 24 h~36 h，培养至菌体湿重达到  $20 \pm 2$  g/L；

##### (2) 二级种子培养

将一级种子液全部转接入含有 60 L 发酵培养基的 100 L 发酵罐中，30℃培养，用氨水调节并控制 pH 值为 5.0，溶氧控制在 20%~30%，培养至菌体湿重达到  $120 \pm 10$  g/L；

##### (3) 发酵罐培养和诱导表达

将二级种子液转入含有 60L 发酵培养基的 1000 L 发酵罐中，添加 40 g/L 的甘油，30℃培养，用氨水调节并控制 pH 值为 5.0，通气量为  $30 \text{ m}^3/\text{h}$ ，搅拌速率为 300~500rpm，当溶氧陡然上升时，开始流加补甘油，pH 值控制为 5.0，溶氧控制在 20%以上，当菌体浓度达到  $160 \pm 10$  g/L 时停止流加甘油，饥饿 1 h 使甘油耗尽；

然后开始甲醇诱导，诱导阶段温度为 30℃，pH 值控制在 5.0，设定甲醇补料与溶氧联动，当溶氧高于 20%开始流加甲醇，溶氧低于 20%停止流加甲醇，诱导 112 h 后达到平台期，诱导 120h 后出罐；对诱导表达后的发酵液进行离心，收集离心后的上清液依次进行浓缩、

超滤和纳滤脱色脱盐，得到重组人源胶原蛋白。

图 1 为对比例 1 和实施例 2 得到的发酵液经分离纯化后的 HPLC 检测图，图中峰为重组人源胶原蛋白，其中 a 为对比例 1，b 为实施例 2。从图中可知，对比例 1 的发酵液经分离纯化后，蛋白纯度为 91.7%，实施例 2 的发酵液经分离纯化后，蛋白纯度为 96.4%，本发明的发酵工艺得到的重组人源胶原蛋白的纯度优于对比例。

对各实施例和对比例中的发酵结果进行检测，分别测定甲醇流加前菌体湿重、胶原蛋白产量、蛋白回收率和蛋白纯度，具体检测结果如表 1 所示。

表 1 各实施例和对比例的发酵结果

	甲醇流加前菌体湿重	胶原蛋白产量	蛋白回收率	蛋白纯度
对比例 1	147.8 g/L	14.51 g/L	67.2%	91.7%
对比例 2	186.2 g/L	15.43 g/L	67.9%	93.4%
对比例 3	166.7 g/L	16.82 g/L	62.8%	92.1%
实施例 1	163.3 g/L	16.93 g/L	70.7%	95.3%
实施例 2	169.4 g/L	17.02 g/L	73.3%	96.4%
实施例 3	177.8 g/L	16.87 g/L	72.8%	95.9%

从表中可以看出，采用本发明发酵工艺，重组人源胶原蛋白的回收率达到 70% 以上，纯度达到 95% 以上，优于对比例。利用 HPLC 测定纯化之后胶原蛋白浓度和纯度，蛋白表达量与对比例相当，蛋白收率和纯度均高于对比例。综上所述，本发明工艺简单，更适合于工业化大规模生产重组人源胶原蛋白。

## 权利要求书

---

1. 一种毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺，其特征在于，采用巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 为菌种，先进行一级种子培养，至菌浓为  $20 \pm 2$  g/L 时转接二级种子培养，二级种子培养至菌浓为  $120 \pm 10$  g/L 时转接至甘油培养阶段，甘油培养阶段中甘油的添加量为  $60 \sim 70$  g/L，待溶氧迅速上升到达相对稳定状态时，进入甲醇诱导阶段，诱导  $120 \pm 8$  h 后，发酵结束。

2. 根据权利要求 1 所述的毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺，其特征在于，所述的巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris*，保藏编号为 CGMCC No. 5021。

3. 根据权利要求 1 所述的毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺，其特征在于，所述的一级种子培养为将菌种巴斯德毕赤酵母 *Pichia pastoris* 接种至种子培养基中， $30^\circ\text{C}$  摇瓶培养  $24 \text{ h} \sim 36 \text{ h}$ ，至菌体湿重达到  $20 \pm 2$  g/L。

4. 根据权利要求 1 所述的毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺，其特征在于，所述的二级种子培养为将一级种子液全部转接入发酵培养基中， $30^\circ\text{C}$  培养，用氨水调节并控制 pH 值为 5.0，溶氧控制在  $20\% \sim 30\%$ ，培养至菌体湿重达到  $120 \pm 10$  g/L。

5. 根据权利要求 1 所述的毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺，其特征在于，所述的甘油培养阶段为将二级种子液转入发酵培养基中，添加  $60 \sim 70$  g/L 的甘油， $30^\circ\text{C}$  培养，用氨水调节并控制 pH 值为 5.0，通气量为  $30 \text{ m}^3/\text{h}$ ，搅拌速率为  $300 \sim 500 \text{ rpm}$ ，当溶氧陡然上升时，饥

饿 1 h 使甘油耗尽。

6. 根据权利要求 1 所述的毕赤酵母表达重组蛋白的发酵工艺，其特征在于，所述的甲醇诱导阶段为控制诱导阶段温度为 30℃，pH 值为 5.0，设定甲醇补料与溶氧联动，当溶氧高于 20% 时开始流加甲醇，溶氧低于 20% 停止流加甲醇，诱导 120±8 h 后，发酵结束，对发酵液进行离心，收集离心后的上清液依次进行浓缩、超滤和纳滤脱色脱盐，得到重组人源胶原蛋白。

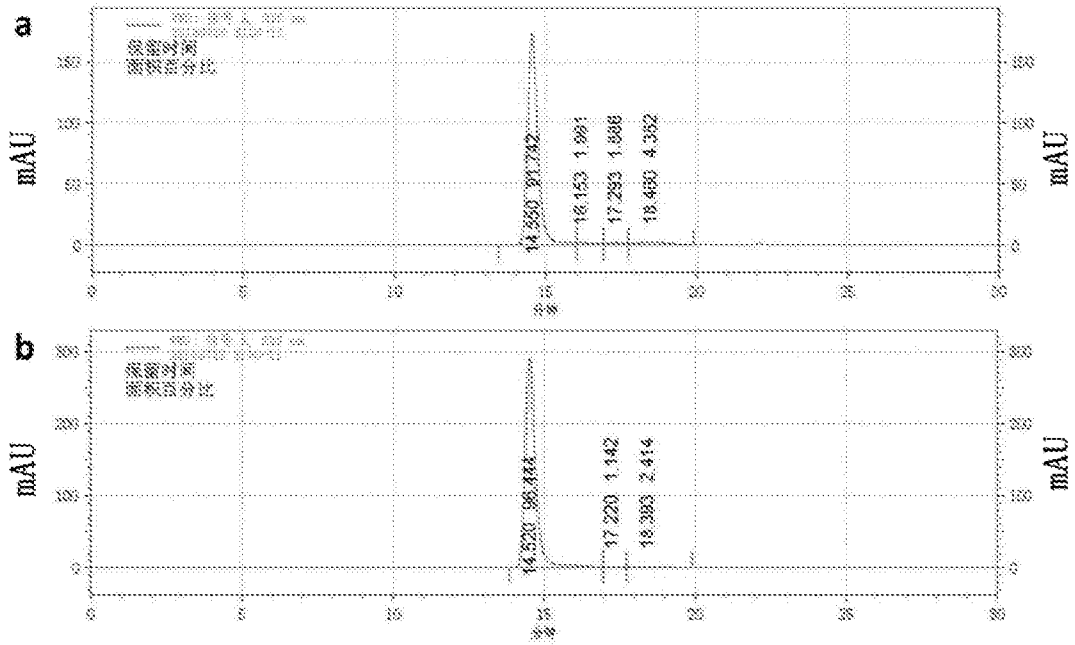


图 1

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2016/102430**

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12P 21/02 (2006.01) i; C07K 14/78 (2006.01) i; C07K 1/34 (2006.01) i; C12R 1/84 (2006.01) n  
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12P; C07K; C12R

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI Web of Science: pichia pastoris, glycerol, glycerin, glycerine, glycerinum, methanol, methyl alcohol, ferment +, express+, recombinant protein, seed culture

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101570771 A (EAST CHINA UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY), 04 November 2009 (04.11.2009), see the abstract, and description, page 3, paragraph 2 to page 6, paragraph 4	1-6
A	WO 9003431 A1 (SALK INST BIOTECH IND), 05 April 1990 (05.04.1990), see the whole document	1-6
A	HU, Xiaoqing et al., "Optimization of S-adenosyl-L-methionine production in recombinant Pichia pastoris methanol-glycerol feeding strategy", INDUSTRIAL MICROBIOLOGY, vol. 42, no. 6, 22 December 2012 (22.12.2012), ISSN: 1001-6678, see pages 63-67	1-6
A	Bahrami, A et al., "Two-stage Glycerol Feeding for Enhancement of Recombinant hG-CSF Production in a Fed-batch Culture of Pichia Pastoris", BIOTECHNOLOGY LETTERS, vol. 30, no.6, 30 June 2008 (30.06.2008), ISSN: 0141-5492, see pages 1081-1085	1-6

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&amp;" document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search  
13 April 2017 (13.04.2017)

Date of mailing of the international search report  
**25 April 2017 (25.04.2017)**

Name and mailing address of the ISA/CN:  
State Intellectual Property Office of the P. R. China  
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao  
Haidian District, Beijing 100088, China  
Facsimile No.: (86-10) 62019451

Authorized officer  
**XU, Yijun**  
Telephone No.: (86-10) **62411083**

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
Information on patent family members

International application No.

**PCT/CN2016/102430**

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101570771 A	04 November 2009	None	
WO 9003431 A1	05 April 1990	DK 55191 A	24 May 1991
		JP H04501662 A	26 March 1992
		EP 0436625 A1	17 July 1991
		IL 91765 D0	10 June 1990
		AU 4332589 A	18 April 1990
		EP 0436625 A4	21 August 1991
		DK 55191 D0	26 March 1991

<p>A. 主题的分类</p> <p>C12P 21/02(2006.01)i; C07K 14/78(2006.01)i; C07K 1/34(2006.01)i; C12R 1/84(2006.01)n</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																	
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C12P; C07K; C12R</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CPEA, CNKI, ISI Web of Science: 毕赤酵母, 甘油, 甲醇, 发酵, 表达, 重组蛋白, 种子培养, pichia pastoris, glycerol, glycerin, glycerine, glycerinum, methanol, methyl alcohol, ferment +, express+, recombinant protein, seed culture</p>																	
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 101570771 A (华东理工大学) 2009年 11月 4日 (2009 - 11 - 04) 参见说明书摘要、说明书第3页第2段至第6页第4段</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 9003431 A1 (SALK INST BIOTECH IND) 1990年 4月 5日 (1990 - 04 - 05) 参见全文</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>胡晓清等. "重组毕赤酵母生产S-腺苷甲硫氨酸的甲醇-甘油交替补料发酵的优化" 工业微生物, 第42卷, 第6期, 2012年 12月 22日 (2012 - 12 - 22), ISSN: 1001-6678, 参见第63-67页</td> <td>1-6</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>Bahrami, A等. "Two-stage glycerol feeding for enhancement of recombinant hG-CSF production in a fed-batch culture of Pichia pastoris" BIOTECHNOLOGY LETTERS, 第30卷, 第6期, 2008年 6月 30日 (2008 - 06 - 30), ISSN: 0141-5492, 参见第1081-1085页</td> <td>1-6</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 101570771 A (华东理工大学) 2009年 11月 4日 (2009 - 11 - 04) 参见说明书摘要、说明书第3页第2段至第6页第4段	1-6	A	WO 9003431 A1 (SALK INST BIOTECH IND) 1990年 4月 5日 (1990 - 04 - 05) 参见全文	1-6	A	胡晓清等. "重组毕赤酵母生产S-腺苷甲硫氨酸的甲醇-甘油交替补料发酵的优化" 工业微生物, 第42卷, 第6期, 2012年 12月 22日 (2012 - 12 - 22), ISSN: 1001-6678, 参见第63-67页	1-6	A	Bahrami, A等. "Two-stage glycerol feeding for enhancement of recombinant hG-CSF production in a fed-batch culture of Pichia pastoris" BIOTECHNOLOGY LETTERS, 第30卷, 第6期, 2008年 6月 30日 (2008 - 06 - 30), ISSN: 0141-5492, 参见第1081-1085页	1-6
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求															
A	CN 101570771 A (华东理工大学) 2009年 11月 4日 (2009 - 11 - 04) 参见说明书摘要、说明书第3页第2段至第6页第4段	1-6															
A	WO 9003431 A1 (SALK INST BIOTECH IND) 1990年 4月 5日 (1990 - 04 - 05) 参见全文	1-6															
A	胡晓清等. "重组毕赤酵母生产S-腺苷甲硫氨酸的甲醇-甘油交替补料发酵的优化" 工业微生物, 第42卷, 第6期, 2012年 12月 22日 (2012 - 12 - 22), ISSN: 1001-6678, 参见第63-67页	1-6															
A	Bahrami, A等. "Two-stage glycerol feeding for enhancement of recombinant hG-CSF production in a fed-batch culture of Pichia pastoris" BIOTECHNOLOGY LETTERS, 第30卷, 第6期, 2008年 6月 30日 (2008 - 06 - 30), ISSN: 0141-5492, 参见第1081-1085页	1-6															
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																	
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</p> <p>"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>"X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</p> <p>"Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</p> <p>"&amp;" 同族专利的文件</p>																	
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2017年 4月 13日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2017年 4月 25日</p>															
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>徐益君</p> <p>电话号码 (86-10)62411083</p>															

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/102430

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101570771	A	2009年 11月 4日	无			
WO	9003431	A1	1990年 4月 5日	DK	55191	A	1991年 5月 24日
				JP	H04501662	A	1992年 3月 26日
				EP	0436625	A1	1991年 7月 17日
				IL	91765	D0	1990年 6月 10日
				AU	4332589	A	1990年 4月 18日
				EP	0436625	A4	1991年 8月 21日
				DK	55191	D0	1991年 3月 26日