



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103642843 B

(45)授权公告日 2017.03.01

(21)申请号 201310522914.X

(22)申请日 2009.02.05

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103642843 A

(43)申请公布日 2014.03.19

(30)优先权数据

00310/CHE/2008 2008.02.06 IN

00086/CHE/2009 2009.01.12 IN

(62)分案原申请数据

200980112059.7 2009.02.05

(73)专利权人 拜康有限公司

地址 印度卡纳塔克邦

(72)发明人 桑贾伊·蒂瓦里

穆克什·巴布阿帕·帕塔勒

沙鲁巴·加格

马扬克·库马·加格

苏勒克哈·约希

奇特纳利·拉梅高达·那文·库马

比马尔·库马 安努杰·格尔

哈里什·耶尔

(74)专利代理机构 广州华进联合专利商标代理

有限公司 44224

代理人 黎艳

(51)Int.Cl.

C12N 1/00(2006.01)

C12N 1/20(2006.01)

C12N 1/14(2006.01)

C12P 1/02(2006.01)

C12P 1/04(2006.01)

C12N 9/00(2006.01)

C12P 21/00(2006.01)

C12R 1/19(2006.01)

C12R 1/845(2006.01)

(56)对比文件

WO 2007005646 A2, 2007.01.11, 全文.

US 2005112737 A1, 2005.05.26, 全文.

A Pessoa Jr et al..Evaluation of sugar cane hemicellulose hydrolyzate for cultivation of yeasts and filamentous fungi.《Journal of Industrial Microbiology&Biotechnology》.1997,第18卷(第6期),第360-362页.

审查员 段珊

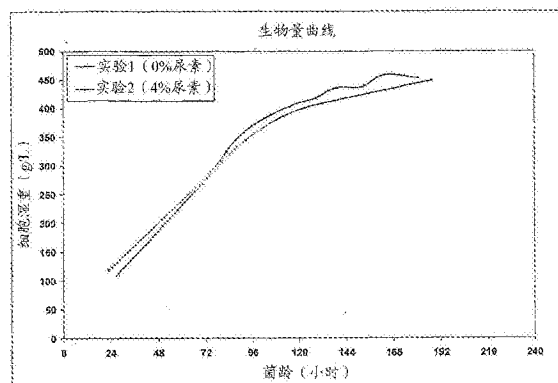
权利要求书1页 说明书17页 附图14页

(54)发明名称

含有尿素类氮源的发酵培养基及其用于生产次级代谢产物、酶和重组蛋白的用途

(57)摘要

本发明涉及含有尿素类氮源的发酵培养基及其用于生产次级代谢产物、酶和重组蛋白的用途。本发明涉及一种通过利用微生物发酵以改善磷酸盐摄取来生产重组蛋白、其衍生物或它们的类似物或者次级代谢产物的发酵培养基,培养基特征在于尿素的残留浓度维持在约0.5g/L至约3g/L的范围内,基础盐和微量元素的浓度在对照培养基的0.1X至5X变化,并且其中甲醇补补率为约6g/L/h至约20g/L/h范围。



1. 一种通过利用微生物发酵来生产重组蛋白或者次级代谢产物的发酵培养基,其中,

所述发酵培养基为在1000ml水中包含37.5g大豆粉、22.5g一水合葡萄糖、3.75g棉籽粉、7.5g玉米浆、7.5gNaCl和0.5g消泡剂SAG,pH调整至 7.0 ± 0.1 ,且其中所述微生物是链霉菌属,所述次级代谢产物是普伐他汀,且在接种时还在所述发酵培养基中加入尿素且尿素浓度维持在0.5,1.0,1.5或2.0g/L;或

所述发酵培养基为在1000ml水中包含11g一水合葡萄糖、2.4g硫酸铵、4.8g硫酸镁、20g酵母提取物、10gK₂HPO₄、40ml Trace盐,pH调至7.0,且所述微生物是大肠杆菌,所述重组蛋白是G-CSF,且还在所述发酵培养基中加入尿素且所述尿素浓度为1.0g/L;或

所述发酵培养基为在1000ml水中包含37.5g大豆粉、22.5g一水合葡萄糖、3.75g棉籽粉、7.5g玉米浆、7.5gNaCl和0.5g消泡剂SAG,pH调整至 7.0 ± 0.1 ,且所述微生物是大肠杆菌,所述重组蛋白是链激酶,且还在所述发酵培养基中加入尿素且尿素浓度为1.0g/L;或

所述发酵培养基为在1000ml水中包含12.5g葡萄糖、37.5g大豆蛋白胨、25g大豆粉、2.5g磷酸钾、0.625g硫酸镁、12.5g大豆油,pH调至6.0,且所述微生物是根毛霉属,所述重组蛋白是酯酶,且还在所述发酵培养基中加入尿素且尿素浓度为0.5g/L。

2. 根据权利要求1所述的发酵培养基,其中,所述尿素是以液体、喷雾、粉末或球粒形式加入。

3. 一种用于生产重组蛋白或者其次级代谢产物的方法,所述方法包括在发酵培养基中通过利用微生物发酵的步骤,其中,

所述发酵培养基为在1000ml水中包含37.5g大豆粉、22.5g一水合葡萄糖、3.75g棉籽粉、7.5g玉米浆、7.5gNaCl和0.5g消泡剂SAG,pH调整至 7.0 ± 0.1 ,且其中所述微生物是链霉菌属,所述次级代谢产物是普伐他汀,且在接种时还在所述发酵培养基中加入尿素且所述尿素浓度维持在0.5,1.0,1.5或2.0g/L;或

所述发酵培养基为在1000ml水中包含11g一水合葡萄糖、2.4g硫酸铵、4.8g硫酸镁、20g酵母提取物、10gK₂HPO₄、40ml Trace盐,pH调至7.0,且所述微生物是大肠杆菌,所述重组蛋白是G-CSF,且还在所述发酵培养基中加入尿素且所述尿素浓度为1.0g/L;或

所述发酵培养基为在1000ml水中包含37.5g大豆粉、22.5g一水合葡萄糖、3.75g棉籽粉、7.5g玉米浆、7.5gNaCl和0.5g消泡剂SAG,pH调整至 7.0 ± 0.1 ,且所述微生物是大肠杆菌,所述重组蛋白是链激酶,且还在所述发酵培养基中加入尿素且尿素浓度为1.0g/L;或

所述发酵培养基为在1000ml水中包含12.5g葡萄糖、37.5g大豆蛋白胨、25g大豆粉、2.5g磷酸钾、0.625g硫酸镁、12.5g大豆油,pH调至6.0,且所述微生物是根毛霉属,所述重组蛋白是酯酶,且还在所述发酵培养基中加入尿素且所述尿素浓度为0.5g/L。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中,所述尿素是以液体、喷雾、粉末或球粒形式加入。

含有尿素类氮源的发酵培养基及其用于生产次级代谢产物、酶和重组蛋白的用途

[0001] 本发明是申请日2009年2月5日、标题为“含有尿素类氮源的发酵培养基及其用于生产次级代谢产物、酶和重组蛋白的用途”申请号200980112059.7的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明描述了碳酸酰胺如尿素或其衍生物、氨基甲酸酯(盐)类、碳二亚胺和硫脲作为发酵培养基中的含氮补充物的用途,该发酵培养基使用甲醇诱导型真菌表达体系如毕赤酵母(*Pichia*)来生产重组蛋白以实现提高的生物转化率和肽(如胰岛素和胰岛素类似物)、醋酸艾塞那肽(exendin)和酶(如脂酶)。具体而言,本发明的重要方面涉及一种具有优化营养培养基参数的简易发酵方法,该方法能够导致在较短的生产周期中得到高产率。本发明的原则也可适用于通过适合表达有机体的发酵来生产各种蛋白和次级代谢产物。

背景技术

[0003] 酵母基表达体系如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)普遍用于表达重组蛋白 Cregg, J.M. et al., in Dev. Ind. Microbiol. 29:33-41; 1988。巴斯德毕赤酵母(*P. pastoris*)表达体系使用甲醇诱导型醇氧化酶(AOX1)启动子,其控制编码醇氧化酶表达的基因,该酶催化甲醇代谢的第一步 Cregg J M. et al. in Bio/Technology 11:905-910; 1993。巴斯德毕赤酵母能够具有高表达水平、有效分泌胞外蛋白、翻译后修饰如糖基化、并且在生物反应器培养下在基本培养基中生长达到高细胞密度。

[0004] Invitrogen Co.(加利福尼亚,圣地亚哥)的“毕赤酵母发酵方法指南(*Pichia* fermentation Process Guidelines)”中描述了使用毕赤酵母进行补料分批发酵(fed batch fermentation)的方法,下文中将其作为对照。为了生产重组蛋白,使转化的巴斯德毕赤酵母在作为碳源的甘油上生长到期望的高细胞密度生物量。通过向培养物中加入甲醇来引发生产阶段,其中甲醇是诱导剂和唯一的碳源。在生物量生成和产生阶段,氨作为氮源用于控制pH。

[0005] 尽管酵母表达体系具有各种优势,但仍然需要优化营养上影响的物理化学环境,从而实现在生物反应器中高效和大量的重组蛋白生产。实现高特异性的生产率是高度期望的。其可以通过优化最初的培养基成分、甲醇加入策略以及工艺的理化参数而实现。已有报道称其中硫酸铵、氨基磷酸、磷酸二铵、硝酸钾、尿素、玉米浆、豆粕、棉籽粕、甘蔗和甜菜糖浆、蛋白胨,谷物的分解物等已被用作细菌、酵母和真菌生长的氮源。在微生物“生长”中使用不同碳源和氮源是现有技术。

[0006] 但是,在现有技术的文献中还未曾披露用于高效生产重组蛋白、肽和酶的具体限定的碳源和氮源的最优组合。例如,WO/2007/005646披露了通过在复合生长培养基上培养重组酵母来生产乙醇,其中复合生长培养基包含复合糖类以及各种较廉价的氮源如玉米浆、玉米提取物、酵母自溶物以及尿素。而且,这种方法不采用甲醇诱导型生长或生产机制,这与本发明所开发的生产重组蛋白的方法不同。同样,美国专利第4,288,554号描述了一种

仅用于非GMO假丝酵母(non GMO Candida)种生长的连续发酵方法,该方法使用尿素与其他氮源和基本盐培养基相结合。现有技术中并没有任何暗示或教导在可使用甲醇诱导GMO巴斯德毕赤酵母来高效生产重组蛋白以及肽(如人胰岛素和其类似物)或酶(如脂酶)的发酵方法(分批、分批补料(fed batch)、连续)过程中在何处可使用尿素。

[0007] 人们出人意料的发现,所定义的发酵培养基的使用的特征在于受控加入特定的丰富和易溶氮源(如尿素),进一步优化尿素以及来自尿素水解产生的氨的残余浓度,从而可以获得更好的产物、更高的生产率以及使生产时间更短。

[0008] 多年以前人们就知道可以利用大肠杆菌来生产重组蛋白,并且其表达系统也已经被清楚地研究和理解。基于大肠杆菌的表达系统被广泛用于分子如GCSF、HGH、链激酶和很多其他相似生物制品的生产。对于重组蛋白的生产,以葡萄糖作为碳源使转化的大肠杆菌生长至期望的高细胞密度生物量。通过使用所需的诱导剂诱导而引发生产阶段,然后仅以最低的营养补料维持培养物直到发酵结束。

[0009] 多年以前人们就已经使用真菌培养物来生产有价值的生物物质(bio-entities),如酶和其他商品化的分子。真菌培养物如根霉(Rhizopus)、曲霉(Aspergillus)、青霉(Penicillium)等已被用于传统发酵来生产各种酶如脂酶、淀粉酶、葡聚糖酶等,这些酶用于食品、纺织、皮革以及其他此类工业中。已知放线菌为用于抗生素生产的工作菌种(主力, work-horses)已被广泛用于一些对人类有益的次级代谢产物的生产。真菌和放线菌的关键特性之一是其“生物转化”的特性,如羟基化、酯化等。其主要优点是生物转化是靶特异性的并且可以得到具有相对高纯度的产物。经典的实例是康帕丁转化成普伐他汀。

[0010] 本领域已知的方法改进包括发酵技术有关的措施,例如搅拌或供氧,或有关营养成分的改良例如改变发酵过程中的糖浓度、下游工艺变化、或与微生物本身的固有特征有关的变化等。

[0011] 人们出人意料地发现,使用特征为受控加入特定丰富且易溶氮源(如尿素)的发酵培养基能够获得更高的生产率和/或更高的生物转化率以及使生产时间更短。

[0012] 发明目的

[0013] 本发明的主要目的是通过使用甲醇诱导型真菌进行发酵以获得用于生产重组蛋白及其衍生物或其类似物的发酵培养基。

[0014] 本发明的另一主要目的是通过使用微生物进行发酵以获得用于生产重组蛋白、其衍生物或其类似物的发酵培养基。

[0015] 本发明的又一主要目的是通过使用微生物进行发酵以获得用于生产次级代谢产物的发酵培养基。

[0016] 本发明的另一主要目的是获得用于生产重组或非重组蛋白产物、其衍生物或其类似物的方法。

[0017] 本发明的又一主要目的是获得用于生产次级代谢产物的方法。

[0018] 本发明的另一主要目的是获得由康帕丁转化为普伐他汀的生物转化方法。

[0019] 本发明的又一主要目的是获得重组蛋白产物。

发明内容

[0020] 因此,本发明涉及一种通过使用甲醇诱导型真菌菌种进行发酵从而生产重组蛋

白、其衍生物或其类似物的发酵培养基,所述培养基的特征在于其包含有效浓度的碳酸酰胺;通过使用微生物进行发酵从而生产重组蛋白、其衍生物或其类似物的发酵培养基,所述培养基的特征在于其包含有效浓度的碳酸酰胺;通过使用微生物进行发酵从而生产次级代谢产物的发酵培养基,所述培养基的特征在于包含有效浓度的碳酸酰胺;用于生产重组蛋白、其衍生物或其类似物的方法,该方法包括在发酵培养基中繁殖甲醇诱导型胰岛素表达真菌菌种,所述培养基的特征在于包含有效浓度的碳酸酰胺;用于生产重组或非重组蛋白产物、其衍生物或其类似物的方法,该方法包括在发酵培养基中繁殖诱导或非诱导蛋白表达微生物,所述培养基的特征在于包含有效浓度的碳酸酰胺;用于生产次级代谢产物的方法,该方法包括在发酵培养基中繁殖微生物,所述培养基的特征在于包含有效浓度的碳酸酰胺;由康帕丁转化为普伐他汀的生物转化方法,所述转化在培养基中完成,特征在于所述培养基包含有效浓度的碳酸酰胺;根据所附权利要求中任一项所获得的重组蛋白产物。

附图说明

- [0021] 图1:添加/未添加尿素的IN-105前体的生物量曲线的比较。
- [0022] 图2:添加/未添加尿素的IN-105前体的产物浓度曲线的比较。
- [0023] 图3:添加/未添加尿素的胰岛素前体的生物量曲线的比较。
- [0024] 图4:添加/未添加尿素的胰岛素前体的产物浓度曲线的比较。
- [0025] 图5:添加/未添加尿素的Glagine前体的生物量曲线的比较。
- [0026] 图6:添加/未添加尿素的Glagine前体的产物浓度曲线的比较。
- [0027] 图7:添加/未添加尿素的Exendin前体的生物量曲线的比较。
- [0028] 图8:添加/未添加尿素的Exendin前体的产物浓度曲线的比较。
- [0029] 图9:添加/未添加尿素的酯酶的产物浓度曲线的比较。
- [0030] 图10:在IN-105前体发酵中,各种尿素浓度获得的生物量曲线。
- [0031] 图11:在IN-105前体发酵中,各种尿素浓度获得的产物浓度变化曲线。
- [0032] 图12:在胰岛素前体发酵中,各种尿素浓度获得的生物量变化曲线。
- [0033] 图13:在胰岛素前体发酵中,各种尿素浓度获得的产物浓度曲线。
- [0034] 图14:对于IN-105生产的残余尿素浓度和最大产物浓度。
- [0035] 图15:对于胰岛素前体生产的残余尿素浓度和最大产物浓度曲线。
- [0036] 图16:甲醇給料速率是 $\sim 20\text{g/L/h}$ 的IN-105前体的生物量变化曲线的比较。
- [0037] 图17:甲醇給料速率是 $\sim 20\text{g/L/h}$ 的IN-105前体的产物浓度曲线的比较。
- [0038] 图18:除尿素之外的化合物的研究,测试其他类似化合物对毕赤酵母发酵的生产率的影响。
- [0039] 图19:尿素对肉汤中磷酸盐离子残余浓度的影响,尿素对菌株的磷酸盐代谢的影响。
- [0040] 图20:关于普伐他汀生产的培养生长曲线。
- [0041] 图21:随尿素加入普伐他汀的效价。
- [0042] 图22:随尿素加入康帕丁至普伐他汀的转化率。
- [0043] 图23:大肠杆菌中G-CSF生产的WCW比较。
- [0044] 图24:尿素对GCSF单位生产率的影响。

- [0045] 图25:大肠杆菌中链激酶生产的WCW比较。
- [0046] 图26:尿素对链激酶单位生产率的影响。
- [0047] 图27:尿素对使用根毛霉属(*Rhizomucor* sp.)生产酯酶的影响。

具体实施方式

- [0048] 本发明涉及一种通过使用甲醇诱导型真菌菌种发酵来生产重组蛋白及其衍生物或类似物的发酵培养基,所述培养基的特征在于其包含有效浓度的碳酸酰胺。
- [0049] 本发明的另一种实施方式中,碳酸酰胺选自由包括尿素或其衍生物如二甲基脲、二乙基脲、N-乙酰苯基脲、异丙基吡啶脲、苯基脲或它们的组合组成的组。
- [0050] 本发明的另一实施方式中,碳酸酰胺是尿素。
- [0051] 本发明的另一实施方式中,碳酸酰胺以液体、喷雾、粉末或球粒形式添加。
- [0052] 本发明的另一实施方式中,碳酸酰胺的残余浓度达到1M。
- [0053] 本发明的另一实施方式中,基础盐和微量元素的浓度按照对照培养基的0.1X到5X变化,使碳酸酰胺的残余浓度保持在1M。
- [0054] 本发明的另一实施方式中,磷酸盐的摄取得到了改善。
- [0055] 本发明的另一实施方式中,表达重组胰岛素产物的甲醇诱导型真菌菌种选自由包括巴斯德毕赤酵母属(*Pichia pastoris*)、毕赤酵母菌属(*Pichia* sp.)、酿酒酵母菌属(*Saccharomyces* sp.)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、克鲁维酵母菌属(*Kluyveromyces* sp.)或多形汉森酵母(*Hansenula polymorpha*)组成的组。
- [0056] 本发明涉及一种通过使用微生物进行发酵来生产重组蛋白、其衍生物或其类似物的发酵培养基,所述培养基特征在于其包含有效浓度的碳酸酰胺。
- [0057] 本发明涉及一种通过利用微生物发酵生产次级代谢产物的发酵培养基,所述培养基特征在于其包含有效浓度的碳酸酰胺。
- [0058] 本发明的另一实施方式中,碳酸酰胺选自由包括尿素或其衍生物如二甲基脲、二乙基脲、N-乙酰苯基脲、异丙基吡啶脲、苯基脲或它们的组合组成的组。
- [0059] 本发明的另一实施方式中,碳酸酰胺是尿素。
- [0060] 本发明的另一实施方式中,碳酸酰胺以液体、喷雾、粉末或球粒形式添加。
- [0061] 本发明的另一实施方式中,碳酸酰胺的残余浓度达到10g/L。
- [0062] 本发明的另一实施方式中,微生物选自由包括大肠杆菌(*E.coli*)、链霉菌属(*Streptomyces* sp.)、曲霉菌属(*Aspergillus* sp.)、根霉菌属(*Rhizopus* sp.)、青霉菌属(*Penillium* sp.)和根毛霉属(*Rhizomucor* sp.)组成的组。
- [0063] 本发明涉及一种用于生产重组蛋白、其衍生物或其类似物的方法,该方法包括在发酵培养基中繁殖甲醇诱导型胰岛素表达真菌菌种,所述培养基特征在于包含有效浓度的碳酸酰胺。
- [0064] 本发明的另一实施方式中,碳酸酰胺选自由包括尿素或其衍生物物如二甲基脲、二乙基脲、N-乙酰苯基脲、异丙基吡啶脲、苯基脲或它们的组合组成的组。
- [0065] 本发明的另一实施方式中,碳酸酰胺是尿素。
- [0066] 本发明的另一实施方式中,所生产的重组胰岛素产物是IN-105。
- [0067] 本发明的另一实施方式中,所生产的重组胰岛素产物是尿素前体物、尿素或其类

似物或其衍生物。

[0068] 本发明的另一实施方式中,重组胰岛素产物是甘精胰岛素(insulin glargine)。

[0069] 本发明的另一实施方式中,所生产的重组蛋白是一种环状或非环状肽。

[0070] 本发明的另一实施方式中,重组多肽是醋酸艾塞那肽(exendin)。

[0071] 本发明的另一实施方式中,所生产的重组蛋白是酶。

[0072] 本发明的另一实施方式中,所生产的重组酶产物是脂酶。

[0073] 本发明的另一实施方式中,所生产的重组蛋白选自包括胰岛素前体物、胰岛素或其类似物或其衍生物、甘精胰岛素(glargine)、醋酸艾塞那肽、羧肽酶和脂酶。

[0074] 本发明的另一实施方式中,表达重组胰岛素产物的甲醇诱导型真菌菌种选自自由包括巴斯德毕赤酵母、毕赤酵母菌属、酿酒酵母菌属、酿酒酵母、克鲁维酵母菌属或多形汉森酵母组成的组。

[0075] 本发明的另一实施方式中,甲醇诱导型真菌菌种是巴斯德毕赤酵母。

[0076] 本发明的另一实施方式中,甲醇给料速率达到每小时20g/L肉汤。

[0077] 本发明的另一实施方式中,所获得的最大产物效价高于0.1g/L。

[0078] 本发明涉及一种用于生产重组或非重组蛋白产物、其衍生物或类似物的方法,包括在发酵培养基中繁殖诱导型或非诱导型蛋白表达微生物,所述培养基的特征在于其包含有效浓度的碳酸酰胺。

[0079] 本发明的另一实施方式中,碳酸酰胺选自自由包括尿素或其衍生物如二甲基脲、二乙基脲、N-乙酰苯基脲、异丙基吡啶脲、苯基脲或它们的组合组成的组。

[0080] 本发明的另一实施方式中,碳酸酰胺是尿素。

[0081] 本发明的另一实施方式中,所生产的重组蛋白产物是G-CSF。

[0082] 本发明的另一实施方式中,所生产的重组蛋白是链激酶。

[0083] 本发明的另一实施方式中,蛋白产物是脂酶。

[0084] 本发明涉及一种用于生产次级代谢产物的方法,该方法包括在发酵培养基中繁殖微生物,所述培养基特征在于其包含有效浓度的碳酸酰胺。

[0085] 本发明的另一实施方式中,次级代谢产物是普伐他汀。

[0086] 本发明涉及一种康帕丁转化为普伐他汀的生物转化方法,所述转化在培养基中完成,其特征在于所述培养基包含有效浓度的碳酸酰胺。

[0087] 本发明的另一实施方式中,碳酸酰胺选自自由包括尿素或其衍生物如二甲基脲、二乙基脲、N-乙酰苯基脲、异丙基吡啶脲、苯基脲或它们的组合组成的组。

[0088] 本发明的另一实施方式中,康帕丁转化为普伐他汀的生物转化为至少35%。

[0089] 本发明涉及一种如上文所述获得的重组蛋白。

[0090] 本发明的另一实施方式中,所获得的重组蛋白产物选自包括胰岛素前体、胰岛素或其类似物或其衍生物、甘精胰岛素、醋酸艾塞那肽、羧肽酶和脂酶组成的组。

[0091] 本发明提供了一种用于配制发酵培养基的营养组合物,该组合物包含氮源如碳酸酰胺(如尿素)及前文中提到的相关形式或衍生物,连同一种或多种其他发酵培养基成分,这些成分被特别地优化从而能够在短时间内得到高产量的胰岛素或相关的类似物或衍生物产物。

[0092] 出人意料地发现使用补充有在特定浓度下的特定氮化来源如碳酸酰胺(如尿素)

以及相关形式或衍生物的特殊发酵培养基不会影响酵母细胞的生长,反而能够提高生产率。

[0093] 其他的含氮成分(如尿素)可以以液体、喷雾、粉末或球粒形式添加。

[0094] 实际上,本发明的关键在于以下事实:毕赤酵母的胰岛素或胰岛素类似物发酵工艺的生产率受培养基中尿素含量的巨大影响。因此通过向培养基中添加含氮成分(如尿素)可以以缩短的发酵时间并显著提高产物的产量。

[0095] 根据本发明最优选的实施方式,将尿素加入发酵培养基会提高关键成分“磷酸盐”的消耗速率,从而提高生产率。已经发现磷酸盐消耗得越快,发酵周期越短,因此生产率越高。因此,最近发现尿素与磷酸代谢使蛋白或肽表达的速率提高而对生长曲线没有影响并且缩短了发酵时间。

[0096] 根据本发明另一方面,发酵结束时,在任何pH下添加尿素都能够使产物回收率提高。

[0097] 因而本发明使得能够获得更高产量的蛋白产物、更短的生产周期、更好地利用给料至发酵过程中的营养,并且总体上减少了资金和产物成本。

[0098] 一种适合用于工业发酵过程的使用化学成分确定的培养基的微生物菌株,可以是生产感兴趣的有用化合物的任何野生型菌株,条件是所述野生型菌株具有良好的生长性能。

[0099] 用作生产生物(production organism)的优选酵母包括如巴斯德毕赤酵母、毕赤酵母菌属、酿酒酵母菌属、酿酒酵母、克鲁维酵母菌属、或多形汉森酵母。

[0100] 除此之外,适合于使用化学成分确定的培养基来实施工业发酵过程的微生物菌株可以通过使感兴趣的亲本菌株进行经典诱变处理或重组DNA转化而获得和/或改进的菌株,条件仍然是所获得的突变或转化微生物菌株在化学成分确定的培养基上具有良好的生长性能。因此,所获得的突变或转化菌株是否应在化学成分确定的培养基上相比于亲本菌株具有改善或相似的生长性能,将取决于亲本菌株在化学成分确定的培养基上的生长性能。

[0101] 正如本领域技术人员所知晓的,尽管在所有的情况下最终结果是在较少的时间得到较高的效价,但是不同克隆之间的碳酸酰胺补料的最优浓度不同。

[0102] “发酵介质”或“发酵培养基”是指在其中进行发酵的环境,其包括发酵基质以及其他的原料,发酵微生物利用它产生特定的治疗产物。

[0103] “含氮成分”是在发酵培养基中作为可吸收氮的来源的基质、原料或成分。

[0104] 根据本发明的一个重要方面,发酵培养基中优选的含氮成分是碳酸酰胺(如尿素)。其应包括含有N-CO-N或相关基团的化合物。本发明也涉及使用尿素衍生物如二甲基脲、二乙基脲、N-乙酰基-N-苯基脲、异丙基吡啶脲、N-苯基脲等或它们的组合。

[0105] 所使用的“有效量”是指根据本发明当被引入发酵培养基时产生明显(appreciable)数量/产量的蛋白的尿素的量,进一步地是在更短的时间段内产生明显数量/产量的蛋白的尿素的量且不影响酵母细胞的生长的量。

[0106] “发酵生物”是指适用于期望的发酵工艺的任何微生物。发酵生物的实例包括真菌生物如酵母。本发明上下文中的发酵生物的实例是巴斯德毕赤酵母、毕赤酵母属、酿酒酵母菌属、酿酒酵母、克鲁维酵母菌属或多形汉森酵母。

[0107] 本发明适用于任何使用甲醇诱导型真菌菌种的重组肽的表达,其并不限于重组表达的肽、蛋白、胰岛素、胰岛素前体、胰岛素衍生物或胰岛素类似物。

[0108] 在本文中用于描述蛋白或多肽的术语“重组”,意指通过重组多核苷酸表达产生的多肽。本文中使用的术语“重组体”与细胞有关,意指可以或已经用作重组载体或其他转移DNA受体(recipient)的细胞,并且包括已被转染的原代细胞的子代。应当理解,单个亲代细胞的子代可以由于偶然突变或故意突变(deliberate mutation)可以在形态或基因组上与原始亲本不完全相同或并非全部的DNA与原始亲本互补。术语“多肽”、“蛋白”、“肽”是指氨基酸聚合体,而不涉及产物的具体长度;因此,多肽的定义包括肽、寡肽和蛋白。虽然这些寡肽的化学或表达后修饰可以作为具体实施方式包括在内或排除在外,但是该术语并不是指或者排除多肽的表达后修饰。在一种实施方式中,分子是多肽或其相关类似物或其衍生物。优选地,多肽是环状肽。根据另一优选的实施方式,多肽是非环状肽。在另一实施方式中,多肽选自自由醋酸艾塞那肽、依替巴肽、阿托西班、酶如脂酶、羧肽酶等组成的组。

[0109] 胰岛素是51个氨基酸的多肽,这些氨基酸分布在两条氨基酸链之间:A链有21个氨基酸,B链有30个氨基酸。两条链通过2个二硫桥彼此连接。胰岛素的应用不仅包括天然存在的胰岛素的应用而且也包括胰岛素衍生物及类似物的应用。例如,胰岛素化合物可以是哺乳动物胰岛素化合物(如人类胰岛素)、或胰岛素化合物衍生物或类似物。

[0110] 胰岛素衍生物是天然存在的胰岛素即人类或动物胰岛素的衍生物,其通过取代至少一个天然存在的氨基酸残基和/或加入至少一个氨基酸残基和/或有机残基而区别于相应的在其他方面一致的天然存在的胰岛素。应当理解,术语胰岛素定义了一种由B-和A-链组成的多肽。胰岛素衍生物与天然存在的胰岛素有至少60%的同源性。胰岛素衍生物可以甚至更同源,如至少约75%或至少约90%同源于天然存在的胰岛素。通常而言,胰岛素衍生物与人胰岛素相比具有少许修饰作用。

[0111] 当通过基因工程生产胰岛素和胰岛素衍生物时,一种包含B、C和A三条链的胰岛素前体“胰岛素原”经常被表达。所述胰岛素原可以在正确折叠和形成二硫桥之后通过酶促或化学移除C链而转换成胰岛素或胰岛素衍生物。胰岛素原衍生物与天然存在的胰岛素原的B-和A-链可以至少60%同源。然而,连接的C-肽可以选择为完全不同于任何已知的天然存在的C-肽。胰岛素原衍生物可以甚至更加同源,例如至少约75%或至少约90%与天然存在的胰岛素原同源。

[0112] 根据本发明的某些实施方式,重组胰岛素产物是IN-105。由此产生的治疗产物具体涉及分子IN-105。IN-105是一种胰岛素分子,其在胰岛素B-链的B29位置的ε-氨基酸赖氨酸处与结构式 $\text{CH}_3\text{O}-(\text{C}_4\text{H}_2\text{O})_3-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{COOH}$ 的两亲低聚物结合。该分子可在A1、B1和B29处单独结合,在A1、B1和B29的各种组合处双重结合,或在A1、B1和B29的各种组合处三重结合。

[0113] 根据本发明的另一方面,利用本发明的发酵培养基通过发酵生产的重组蛋白是环状或非环状肽。

[0114] 根据本发明的另一方面,利用本发明的发酵培养基通过发酵生产的重组蛋白是酶。

[0115] 在本发明一方面中,发酵过程可包括三个阶段:分批(Batch)、分批补料(可选)以及甲醇诱导发酵阶段。

[0116] 根据本发明最重要的方面,在本发明的上下文中使用的发酵培养基包含以下成

分。还包含制备培养基的方法。

[0117] 培养基成分：

[0118]

成分	含量(g/L)
$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.93
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	29.8
K_2SO_4	36.4
KOH	4.13
甘油	40
H_3PO_4 (密度=1.7)	22.95
尿素	6.0

[0119] 每种成分按上述的顺序溶于最少量的水中,于121℃灭菌1小时。将微量盐溶液和D-生物素(通过过滤预先灭菌)无菌地加入到培养基中,它们各自在培养基中的比率是4.35ml/L(微量盐溶液的密度是1.05,D-生物素的密度是1.0)。

[0120] 微量盐溶液的成分：

成分(盐)	含量(g/L)
硫酸铜, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	6.0
碘化钠, NaI	0.08
硫酸锰, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	3.0
钼酸钠, [0121] $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.20
硼酸, H_3BO_3	0.02
氯化钴, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.50
氯化锌, ZnCl_2	20.0
硫酸铁, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	65.0
硫酸, H_2SO_4	5.0 mL

[0122] 将所有的盐一一溶于饮用水中,通过无菌级过滤器过滤灭菌。

[0123] 生物素溶液准备：

[0124] D-生物素0.2g/L

[0125] 将生物素溶于饮用水,通过无菌级过滤器过滤灭菌。

[0126] 酵母提取物和大豆蛋白胨给料：

[0127] 此外,在发酵过程中还加入酵母提取物和大豆蛋白胨(YEP)。其将按照以下制备：

[0128]

成分	浓度(g/L)
大豆蛋白胨	100
酵母提取物	50

[0129] 这些成分按照需要溶解并且体积由饮用水补足。在121℃-123℃灭菌溶液90分钟。

YEP给料的密度为约1.05。

[0130] 甲醇给料:

[0131] 给料之前,每升甲醇中加微量盐溶液12.0mL、D-生物素溶液12.0mL以及尿素40g。

[0132] 发酵过程:

[0133] 发酵过程包括一个分批细胞生长阶段、可选的甘油补料分批阶段以及甲醇诱导阶段。

[0134] 分批细胞生长阶段

[0135] 分批监控

[0136] 生产发酵参数最初设定并控制如下:

[0137] 温度:30℃±2℃

[0138] pH:5±0.2

[0139] DO:>10%

[0140] 发酵时间(Run Time):22-24小时

[0141] 甲醇诱导阶段(MIP)

[0142] 在分批阶段结束之后立即开始甲醇给料。甲醇通过使用可商购的无菌级过滤器进行过滤灭菌(在线)。

[0143] 在MIP开始时,根据培养基中蛋白的表达将pH调整为4.0±0.1或6.0±0.1或6.3±0.1(不同产物以及不同克隆有所不同),并将温度调整为约18-24℃(不同产物以及不同克隆有所不同)。

[0144] 同时,基于最初体积以0.4g/L/h速率开始在发酵罐中进行另一种给料、酵母提取物和大豆蛋白胨给料(YEP)。

[0145] MIP监控

[0146] 温度:18℃至30℃(不同产物以及不同克隆有所不同)

[0147] pH:3.0至7.0

[0148] DO:>1%(用于控制肉汤中的甲醇浓度)

[0149] 发酵时间:5-8天(不同克隆有所不同)

[0150] 分析pH:1-9.5(根据蛋白类型)

[0151] 根据本发明的另一方面,通过培养冻干的甘油存贮培养至最少甘油培养基来制备接种物。基础发酵培养基源于“对照毕赤酵母方法指南(Control Pichia process guidelines)”,包括正磷酸、无水硫酸钙、硫酸钾、七水合硫酸镁、氢氧化钾、甘油、微量盐和D-生物素。营养培养基也必须包含发酵培养基中常常引入的少量或微量的已知化合物,例如Ca、Mg、Mn、Fe、K、Co、Cu、Zn、B、Mo、Br和I的水溶性化合物。也可以存在其他的微量盐。本发明的微量盐溶液具体包括五水合硫酸铜、碘化钠、一水合硫酸锰、二水合钼酸钠、硼酸、六水合氯化钴、氯化锌、七水合硫酸亚铁。尽管已针对每种产物对每种培养基成分的浓度进行具体优化,以下给出对照培养基:

[0152] 对照培养基

[0153] 发酵基本盐培养基:

[0154] 体积为1升,将以下成分混合在一起:

[0155] 磷酸:85%(26.7ml)

- [0156] 硫酸钙:0.93g
- [0157] 硫酸钾:18.2g
- [0158] 硫酸镁 • 7H₂O:14.9g
- [0159] 氢氧化钾:4.13g
- [0160] 甘油:40.0g
- [0161] 加水至1升
- [0162] 向发酵罐中加水至合适的体积并灭菌。
- [0163] PTM1微量盐:
- [0164] 将以下成分混合在一起:
- [0165] 硫酸铜 • 5H₂O:6.0g
- [0166] 碘化钠:0.08g
- [0167] 硫酸镁 • H₂O:3.0g
- [0168] 钼酸钠 • 2H₂O:0.2g
- [0169] 硼酸:0.02g
- [0170] 氯化钴:0.5g
- [0171] 氯化锌:20.0g
- [0172] 硫酸亚铁 • 7H₂O:65.0g
- [0173] 生物素:0.2g
- [0174] 硫酸:5.0ml
- [0175] 加水至最终体积为1升
- [0176] 过滤、灭菌并于室温下储存。
- [0177] 这些成分混合后可能会有混浊的沉淀。该培养基可进行过滤、灭菌并使用。
- [0178] 除了上述对照培养基之外,以不同浓度包含尿素。
- [0179] 根据本发明的另一个方面,在分批阶段生物量产生(biomass generation)直到初始培养基中存在甘油。此外,生物量产生并不是关键的,其仅在很少情况下进行。
- [0180] 根据本发明的又一方面,在达到所需的生物量之后,通过连续给料甲醇和尿素诱导培养基。在甲醇给料过程中,同时补料酵母提取物和蛋白胨溶液。
- [0181] 根据另一方面,甲醇给料速率达到20g/L/h。正如任何技术人员所知晓的,本发明也考虑优化给料速率以进一步提高生产水平。
- [0182] 现在将结合以下实施例中的某些优选实施方式来描述本发明,以便能够更详尽地理解和评价本发明的各个方面。这些实施例不是为了将本发明局限于这些具体的实施方式。相反,而是要将所附权利要求限定的可包括在本发明范围内的所有可选方案、修改和等同替换涵盖在内。因此,包括优选实施方式的以下实施例将用于说明本发明的实践,其应理解为示出的详细内容是以举例方式并且其目的仅是示例性讨论本发明的优选实施方式并且其是为了提供被认为是发酵程序以及本发明的原理和概念方面最有用且最易于理解的描述而列出的。
- [0183] 本发明提供了用于配制发酵培养基的营养组合物,该组合物包含含氮成分如脲类(如尿素)及相关形式或衍生物如氨基甲酸酯(盐)、碳二亚胺、硫代氨基甲酸盐连同一种或多种其他发酵培养基成分,其已被特别优化以在更短的生产时间内获得更高的产物产量。

[0184] 因此,本发明能够在发酵过程(分批、分批补料、连续)中利用甲醇诱导型GMO巴斯德毕赤酵母通过添加尿素来获得较高产量的重组蛋白产物如胰岛素、甘精胰岛素、IN105、醋酸艾塞那肽、脂酶以及羧肽酶,但不影响酵母细胞的生长。

[0185] 根据本发明的一个方面,具体影响生产产量和时间的含氮成分是碳酸酰胺(如尿素)或其衍生物和上述相关的化合物。

[0186] 根据本发明的另一方面,用作生产生物的优选酵母包括例如巴斯德毕赤酵母、毕赤酵母菌属、酿酒酵母菌属、酿酒酵母、克鲁维酵母菌属、或多形汉森酵母。

[0187] 本发明说明了碳酸酰胺的应用,该碳酸酰胺例如是尿素或其衍生物、氨基甲酸酯(盐)、碳二亚胺&硫代氨基甲酸盐在发酵培养基中作为含氮补充物用于生产蛋白以利用大肠杆菌、放线菌、真菌培养物实现提高的生物转化率。本发明的重要方面具体涉及针对更高生产率具有优化营养培养基参数的快速发酵方法。本发明的原理适用于通过发酵适合的表达生物来生产大量的蛋白和次级代谢产物。

[0188] 本发明提供一种用于配制发酵培养基的营养组合物,在该组合物中包含含氮成分如脲类(如尿素)以及相关形式或衍生物如氨基甲酸盐、碳二亚胺以及硫代氨基甲酸盐连同一种或多种其他发酵培养基成分,其已被特别优化以在更短的生产时间内获得更高的产量。

[0189] 因此,本发明能够在发酵过程(分批、分批补料、连续)中利用可通过添加尿素诱导的大肠杆菌获得较高产量的蛋白产物如GCSF、链激酶、HGH等,却不影响酵母细胞的生长。

[0190] 本发明还可以使用放线菌和/或真菌培养物来提高生物转化率、获得产物如普伐他汀发酵工艺(分批、补料、连续)的更高产量。

[0191] 本发明还提高了酶(如脂酶、淀粉酶、纤维素酶)在利用真菌培养物的分批或分批补料工艺中的生产率。

[0192] 根据本发明的一方面,尤其影响生产产量和时间的含氮成分是碳酸酰胺(如尿素)或其衍生物及上述的相关化合物。

[0193] 根据本发明的另一方面,优选的微生物是肠杆菌家族菌株,优选用作生产生物,包括但不限于大肠杆菌。

[0194] 根据本发明的另一方面,优选的微生物是放线菌和/或真菌家族的菌株,包括但不限于链霉菌属、曲霉菌属、放线菌属、根霉菌属及青霉属。

[0195] 通过以下的描述,本领域技术人员将明了本发明的其他目的、特点、优点和方面。然而,应当理解,以下描述和具体实施例虽然示出了本发明的优选实施方式,但仅仅是以示例性方式而给出。对于本领域内的技术人员来说,通过阅读以下说明和阅读本披露内容的其他部分,落在所披露本发明的精神和范围内的各种变化和修改是显而易见的。

[0196] 本发明提供了一种用于配制发酵培养基的营养组合物,在该组合物中包含含氮成分如碳酸酰胺(如尿素)和相关形式或上文中提到的衍生物,连同一种或多种其他发酵培养基成分,其已被具体优化以获得所需的蛋白产物或次级代谢产物。

[0197] 我们已经出人意料地发现了一种具体的发酵培养基,其中补充有不会影响发酵生物体的生长反而会帮助提高产量的特定浓度的某些氮源如碳酸酰胺(如尿素)和相关形式或衍生物。

[0198] 其他的含氮成分(如尿素)可以液体、喷雾、粉末或球粒形式加入。

[0199] 用于工业发酵的合适的微生物菌株可以是任何产生感兴趣的有价值化合物的野生型菌株,只要所述野生型菌株具有良好的生长性能即可。

[0200] 除此之外,用于工业发酵过程的合适的微生物菌株可以通过将感兴趣的亲本菌株进行经典的诱变处理或重组DNA转化而获得和/或改进的菌株,条件也是所获得的突变或转化微生物菌株应具有良好的生长性能。因而,突变或转化菌株与亲本菌株相比是否具有改善或类似的生长性能取决于亲代菌株的生长性能。

[0201] 关于一个或多个参数,应用本发明的发酵培养基的发酵方法得到了改进,上述参数选自产物浓度(每单位体积的产物)、产物产量(每单位碳源消耗形成的产物)以及产物形成(每单位体积和时间形成的产物)、或其他工艺参数及其组合构成的组。

[0202] 本领域技术人员将明了,尽管所有情况的最终结果都是以更少的时间得到最高的效价,但不同克隆的碳酸酰胺补料最优的浓度是不同的。

[0203] “发酵介质”或“发酵培养基”是指进行发酵的环境,其包括发酵基质及其他原料,发酵微生物利用其生产特定的医疗产物。

[0204] 本发明的发酵培养基必须包含适合的碳基质。适合的基质可以包含但不限于单糖(例如葡萄糖和果糖)、寡糖(例如乳糖或蔗糖)、多糖(例如淀粉或纤维素)或它们的混合物以及其他成分玉米浆(cornsteep liquor)、甜菜糖浆、甘油和大麦芽。其他的碳基质也可以是一碳基质如二氧化碳或甲醇,其代谢转化成重要生化中间产物已经被验证。因此,可以认为本发明所使用的碳源可包含各种含碳基质,其仅受到有机体的选择的限制。除了合适的碳源,发酵培养基还必须包含适合于培养物的生长和促进所需蛋白或最终产物的表达的合适矿物质、盐、缓冲液和其他组分,这些是本领域技术人员已知的。

[0205] “含氮成分”是底物、原料或组分,其在发酵培养基中是可同化的氮来源。

[0206] 适合的含氮成分包括但不限于大豆粉、棉籽粉、蛋白胨、酵母提取物、酪蛋白、酪蛋白水解物、玉米浆和铵离子的无机盐、硝酸盐及亚硝酸盐。

[0207] 根据本发明的一个重要方面,发酵培养基中优选的补充物是碳酸酰胺(例如尿素)。其包括含N-CO-N的化合物或相关组。本发明也涉及使用尿素衍生物例如二甲基脲、二乙基脲、N-乙酰基-N-苯基脲、异丙基吡啶脲、N-苯基脲等或它们的组合。

[0208] 所采用的“有效量”是根据本发明,当其被引入发酵培养基中时,产生明显数量/产量的产物且需时较少,且不影响发酵生物的生长的尿素或其衍生物的量。

[0209] “发酵生物”是指任何适用于所需发酵过程的微生物。根据本发明的另一方面,优选的微生物是细菌、放线菌和/或真菌,其优选用作生产生物,包括但不限于大肠杆菌、链霉菌属、放线菌属、曲霉属、根霉属、青霉属等。

[0210] 术语“重组”在本文中用于描述一种蛋白或多肽,是指通过重组多聚核苷酸的表达而产生的多肽。术语“重组”在本文中的使用与细胞有关,是指能够或已用作重组载体或其他转移DNA的细胞的受体并且包括已被转染的原代细胞的子代。应当理解,单个亲代细胞的子代可以由于偶然或故意突变而在形态或基因组上与原始亲本不完全相同或并非全部的DNA与原始亲本互补。

[0211] 术语“多肽”、“蛋白”、“肽”指的是氨基酸的聚合体,而不涉及产物的具体长度;因此,多肽的定义包括肽、寡肽和蛋白。并且尽管这些多肽的化学物或表达后修饰可能作为具体实施方式被包括或排除,但该术语并不是指或者排除多肽的表达后修饰。在一种实施方式

中,分子是多肽或其相关的类似物或其衍生物。优选地,多肽是环状肽。根据另一优选的实施方式,多肽是非环状多肽。根据本发明的另一方面,重组蛋白是利用本发明的发酵培养基通过发酵而产生的。

[0212] 本发明的实施方式之一涉及GCSF(粒细胞集落刺激因子)的产生。粒细胞集落刺激因子(GCSF)是一种药用活性蛋白,其调节嗜中性粒细胞的增殖、分化以及功能活化(Metcalf,Blood 67:257(1986);Yan,et al.Blood84(3):795-799(1994);Bensinger,et al.Blood81(11):3158-3163(1993);Roberts,et al.,Expt'l Hematology 22:1156-1163(1994);Neben,et al.Blood81(7):1960-1967(1993))。GCSF是指天然或重组蛋白,优选人,获自任何常规来源如组织、蛋白合成、具有天然或重组细胞的细胞培养物。包括任何具有GCSF活性的蛋白,例如突变蛋白或其他修饰的蛋白。

[0213] “次级代谢产物”是一种由生物体产生的源自初级代谢产物的化合物,其不是初级代谢产物,在标准条件下微生物生长并不需要次级代谢产物。次级代谢化合物可以通过后续化学转化或后续生物转化而转化为有用的化合物。因此,提供利用率提高的这些中间化合物将导致最终有用化合物的生产得以提高,在本文中这些中间化合物本身被称作次级代谢产物。

[0214] 本发明的一方面,发酵过程可以包括两个阶段:分批或补料分批发酵(可选)。

[0215] 本发明在以下实施例中进一步限定。应当理解,当指明为本发明优选的实施方式时,这些实施例仅以举例说明的方式给出。根据以上讨论和这些实施例,本领域技术人员能够确定本发明的本质特征,并且在不背离其精神和范围前提下,对本发明进行各种改变和修改,以使其适用于不同的用途和条件。这些实施例不应解释为限制本发明的范围。以下实施例代表本发明的优选实施方式。

[0216] 实施例1

[0217] 两个发酵罐分批运行,使用巴斯德毕赤酵母表达IN-105前体。在一个批次(实验#1)中,一半浓度(strength)的不含甘油的对照培养基用作初始培养基。在分批运行后,甲醇以约8g/L/h的给料速率补料。发酵持续~8天。最大产物浓度在7天达到3.0g/L并且稳定化。在另一批次(实验#2)中,使用相同的培养基组合物并另外将0.1M尿素加到发酵罐中。在分批运行后,补料甲醇连同4%w/v尿素。发酵持续8天。最大产物浓度在7天达到3.5。没有观察到细胞生长曲线的显著变化。上述实验获得的生物量和产物浓度曲线分别示于图1和图2中。

[0218] 实施例2

[0219] 使用巴斯德毕赤酵母发酵研究通过尿素的胰岛素前体的表达以确定产物表达的速率。在这个实验中,使用对照培养基组合物,并以20g/L/h的较高速率补料甲醇和4%尿素。在这个实验中,最大产物浓度在137小时达到4.21g/L,相比之下,当发酵罐中不加入尿素时最大产物浓度在182小时达到4.26g/L。没有观察到细胞生长曲线的差异,这表明向发酵罐加入尿素在不影响生长曲线的情况下提高了产物表达的速率并减少了发酵时间。上述实验获得的生物量和产物浓度曲线分别示于图3和图4中。

[0220] 实施例3

[0221] 两个发酵罐分批运行,其使用巴斯德毕赤酵母表达甘精胰岛素(Glargine)前体。在一个批次(实验#1)中,一半浓度的不含甘油的对照培养基用作初始培养基。在分批运行

后,甲醇以8g/L/h的给料速率补料。发酵持续10天。最大产物浓度在10天达到1.03g/L并稳定化。在另一批次(实验#2)中,使用相同培养基组合物并另外向初始发酵培养基中加入0.1M尿素。在分批运行后,甲醇连同4%尿素一起补料。发酵持续9天。最大产物浓度在9天达到1.75。没有观察到细胞生长曲线的显著差异。上述实验获得的生物量和产物浓度曲线分别示于图5和图6中。

[0222] 实施例4

[0223] 两个发酵罐分批运行,其使用巴斯德毕赤酵母表达醋酸艾塞那肽前体。在一个批次(实验#1)中,一半浓度的不含甘油的对照培养基用作初始培养基,且具有甘油补料批次。在甘油补料分批运行后,甲醇以11g/L/h的给料速率补料。发酵持续6天。最大产物浓度在6天达到0.74g/L并且稳定化。在另一批次(实验#2)中,使用相同的培养基组合物并另外将0.1M尿素加到发酵罐中。在分批运行后,甲醇连同4%尿素一起补料。发酵持续5天。最大产物浓度在5天内达到0.78。没有观察到细胞生长曲线的显著差异。上述实验获得的生物量和产物浓度曲线分别示于图7和图8中。

[0224] 实施例5

[0225] 两个发酵罐分批运行,其使用巴斯德毕赤酵母表达酶,脂酶。在一个批次(实验#1)中,一半浓度的不含甘油的对照培养基用作初始培养基。在分批运行后,甲醇以6g/L/h的给料速率补料。发酵持续~8天。最大产物在7天内达到大约 1650×10^6 脂酶单位并稳定化。在另一批次(实验#2)中,使用相同的培养基组合物并另外向发酵罐中加入0.1M尿素。在分批运行后,甲醇连同4%w/v尿素一起补料。发酵持续8天。最大产物浓度在7天达到约 2500×10^6 脂酶单位并然后稳定化。没有观察到细胞生长曲线的显著差异。上述实验获得的总产物曲线示于图9中。

[0226] 实施例6

[0227] 研究用于生产IN105前体的甲醇批次中尿素浓度的影响,其中在甲醇补料批次中甲醇中含有1、2、3和5%的尿素。其他参数和实施例1中保持相同。在各个批次中,甲醇中的尿素分别是0、1、2、3、4和5%,最大的产物浓度在~7天分别达到3.0、3.2、2.5、3.3、3.5和2.8g/L。在甲醇诱导阶段期间,当甲醇中使用4%尿素时观察到较好的产量。生物量和产物浓度曲线分别示于图10和图11中。

[0228] 实施例7

[0229] 在另一个实验中,甲醇给料速率是20g/L/h,尿素浓度变化以确定可以得到最大胰岛素前体浓度的最有效尿素浓度。甲醇补料有0、1、2、3、4和5%尿素浓度时,各个批次中最大产物浓度分别在182、166、140、164、137和170小时达到4.26、4.03、3.39、4.16、4.21及5.31g/L。生物量和产物浓度曲线分别示于图12和图13中。这个实验表明添加尿素使胰岛素前体生产的速率提高,当甲醇补料有5%尿素时表达速率为最高。

[0230] 实施例8

[0231] 研究甲醇诱导阶段期间无细胞上清中残余尿素浓度保持在0.1、0.3、0.5、0.7、1.2及1.5M的不同水平的实验批次。所有的批次都与实施例1中取相似的参数以及培养基组合物。残余尿素通过分开补料尿素原液而维持。结果表明,在该批次的整个发酵过程中,当无细胞上清中的尿素维持在1M范围时获得最大产物。当残余尿素维持为约0.5M时,获得最大产物浓度4.46g/L。

[0232] 在这个试验中,总尿素补料相当于0、0.2、0.5、0.9、1.2、1.8、2.3和2.9M的最终肉汤体积,在这些实验中,残余尿素分别维持在0、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、1.2及1.5M。其结果示于图14中。

[0233] 实施例9

[0234] 还进行了胰岛素前体发酵的实验。在本实验中,甲醇给料速率是20g/L/h。在胰岛素前体发酵中,观察到当残余浓度维持在0.7M时产物浓度最高。在本试验中,总尿素补料相当于0.0、1.6、2.7、3.5、7.0、8.8、11.7和13.3M的最终肉汤体积,在该试验中,残余尿素分别维持在0、0.1、0.3、0.5、0.7、1.0、1.2及1.5M。如图15中所示,结果表明培养会消耗显著量的尿素。

[0235] 实施例10

[0236] IN105的另一个批次以标准对照培养基并以~20g/L/h甲醇(其中含4%尿素)进行。在本次试验中,在113小时获得产物浓度3.71g/L,相比之下,当发酵罐中不补料尿素时,在183小时实现3.76g/L的产率。本研究的结果示于图16和图17中。

[0237] 实施例11

[0238] 进一步实验中,以各种其他化合物替代尿素来观测它们对发酵产率的影响。因此,在各个的批次中,以1%的浓度对硫脲、二酰亚胺、碳二亚胺、硫脲进行测试。如图18所示,观察到它们全部相对于对照提高了产量。

[0239] 实施例12

[0240] 在实验中,观察到在发酵过程中尿素补料增加了酵母对磷酸盐的摄取,导致培养基中磷酸盐的消耗早于尿素补料尚未完成的批次。因此,更快的磷酸盐消耗和更高的产量(g/L/h)是代谢转换(metabolic shift)的结果,其中代谢转换是由于将尿素引入用于生产肽和蛋白的标准或改良的毕赤酵母发酵方案中而实现的。

[0241] 实施例13

[0242] 制备生长培养基,其中在1000ml水包含5.0g大豆粉、20.0g一水合葡萄糖、5.0g大豆蛋白胨、1.0g CaCO_3 、0.1g K_2HPO_4 。用NaOH溶液将种子培养基的pH调整至 6.8 ± 0.1 。用培养物(链霉菌属(BICC 6826))的孢子瓶悬浮液接种灭菌的种子培养基,并在培养 $28 \pm 1^\circ\text{C}$ 。在有氧条件下培养48小时。然后将生长的种子转移至发酵培养基中,发酵培养基中1000ml水包含37.5g大豆粉、22.5g一水合葡萄糖、3.75g棉籽粉、7.5g玉米浆、7.5g NaCl和0.5g消泡剂SAG(pH调整至 7.0 ± 0.1)。培养48小时以后,加入无菌康帕丁溶液连同少量的葡萄糖。每24小时从几个相似的烧瓶中取其中的一个烧瓶来检测康帕丁生物向普伐他汀的生物转化。此过程每24小时重复直到总共补料3.0g/L康帕丁。

[0243] 在使用改良的发酵培养基的实验开始之前,将不同浓度的尿素加入发酵培养基中以确立生物体的毒性水平。如上文中所讨论的,以0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5和4.0g/L的浓度加入含有发酵培养基的烧瓶中然后培养。培养48小时之后,监控每个烧瓶中的生长情况。数据示于图20中。

[0244] 浓度大于3.0g/L的尿素表现为抑制培养物的生长。重复本实验得到相似的结果。因此,采用低于3.0g/L的浓度用于检测尿素对生物转化的影响。

[0245] 如前所述,使用含有尿素作为附加成分的生产培养基进行类似的实验。生产培养基中尿素的浓度维持在0.0、0.5、1.0、1.5、2.0、2.5和3.0g/L并且是在接种的时候加入。

[0246] 培养48小时后,灭菌的康帕丁溶液连同葡萄糖一起补料。24小时后通过收集在相似情况下培养的多个烧瓶之一来评价生物转化。这一过程每24小时重复一次直到康帕丁的累计补料达3g/l。利用用于形成普伐他汀所消耗的总康帕丁来评估生物转化。本实验的效价和转化百分率的结果分别示于图21和图22中。

[0247] 尿素浓度为1.5g/L的烧瓶表现出康帕丁向普伐他汀的最大转化率85.4%,相比之下,对照烧瓶的转化率为59.5%。

[0248] 实施例14

[0249] 使用大肠杆菌发酵研究利用尿素的粒细胞集落刺激因子(GCSF)的表达以确定产物表达的速率。本实验使用的培养基包括接种前培养基、种子培养基和生产培养基。接种前培养基为1000ml水中包含10.0g大豆蛋白胨、10.0gNaCl、10.0g酵母提取物。种子培养基为1000ml水中包含1.2g硫酸铵、2.4g硫酸镁、10g酵母提取物、11g DMH、5g K₂HPO₄、40ml Trace盐。生产培养基为1000ml水中包含11g一水合葡萄糖、2.4g硫酸铵、4.8g硫酸镁、20g酵母提取物、10g K₂HPO₄、40ml Trace盐。用氨水将pH调至7.0。分批阶段完成之后,通过连续补料葡萄糖和酵母提取物增加发酵罐中的生物量。为了产生所关注的产物,然后引导细胞生物量并再运行8小时。

[0250] 三个发酵罐分批运行,以确立大肠杆菌发酵过程中尿素的影响。第一批次(实验#1)是对照批次未添加任何尿素。使用的培养基如上所述。在~180g/L WCW诱导批次。诱导以后发酵持续达8小时。获得的最大产物是6.6g/L,比活是0.028g/wcw。第二批次(实验#2)中,除上述培养基之外,将1g/L尿素加入到发酵罐中。分批补料具有相似尿素量(1g/L)的补料。在~180g/L WCW下诱导批次并且诱导以后发酵持续8小时,获得的产物是7.4g/L,比活是0.033g/wcw。第三批次(实验#3)类似于实验#2进行但是含有2g/L的尿素。获得的最终产物是6.58g/L,比活是0.032g/wcw。

[0251] 如结果所示,没有观察到细胞生长曲线有明显不同,这表明尿素添加到发酵罐中使产物的形成增加但对生长曲线没有影响。获得的单位生产率总共增加约18%。上面实验得到的WCW曲线示于图23中,单位生产率曲线示于图24中。

[0252] 实施例15

[0253] 使用大肠杆菌作为表达体系进行类似的实验以用于生产链激酶。使用的培养基与实施例13中提及的相同并且测试的尿素浓度也相同。如实施例14中所描述的,类似的三个批次均采用0g/L、1g/L、2g/L的尿素。不含尿素的对照批次(实验#1)在诱导8小时后得到最终生产率为7.06g/L,其中单位生产率为0.026g/wcw。在1g/L尿素批次(实验#2)中得到最大效价,生产率是10.5g/L且单位生产率是0.041g/wcw。出人意料的是,2g/L尿素的批次(实验#3)仅得到6.56g/L的产物且单位生产率是0.022g/wcw。对于该产物,尿素浓度升高至大于1g/L导致单位生产率和效价急剧下降。

[0254] 如在实施例中,三个实验的WCW没有明显变化,这清楚地表明生产率的提高是产物形成增加的结果并且与生物量的变化无关。获得的单位生产率总共提高约57%。由上述实验得到的WCW曲线示于图25中。效价曲线示于图26中。

[0255] 实施例16

[0256] 已知根毛菌属(*Rhizomucor* sp)(BICC 362)可产生脂酶,其也表现出通过在培养基中添加尿素可提高生产率。由此培养产生的脂酶可以广泛地用于生物转化反应如酯化和

水解。该工艺采用两个发酵批次(10L体积),一个批次未添加尿素而另一个批次添加0.5g/L尿素。具有较高浓度尿素(1g/l)的实验获得的结果是生产率较低,并且为了维持pH苛性碱的消耗非常高。根毛菌属(BICC 362)的生长培养基包括41.4g梅达(Maida)、10g蔗糖、3.06g蛋白胨、2g硫酸铵、2g酵母提取物、0.85g磷酸钾、以及氯化钙、硫酸镁和氯化钠各1g。整体的培养基用水补至1L。将生长的种子(10%v/v)转到生产培养基中,该培养基为1000ml水中包含12.5g葡萄糖、37.5g大豆蛋白胨、25g大豆粉、2.5g磷酸钾、0.625g硫酸镁、12.5g大豆油。将培养基的pH调至6.0并在整个批次中通过添加苛性碱将pH维持在6.0。

[0257] 添加尿素(0.5g/L)表现出与对照批次相比提高脂酶生产速率。较高浓度的尿素表现为生产率降低。其数据示于图27中。

[0258] 应当理解本发明并不限于所描述的具体方法、方案、细胞系、种或属、以及培养基成分,这些都可以改变。还应当理解本文使用的术语仅是为了描述具体实施方式的目的,并不是要限制本发明的范围,本发明的范围将仅由所附权利要求进行限制。上述说明是为了教导本领域普通技术人员如何实践本发明的目的,并不是要穷尽所有那些明显的修改和变化,技术人员在阅读本发明之后,明显的修改和变化将是显而易见的。

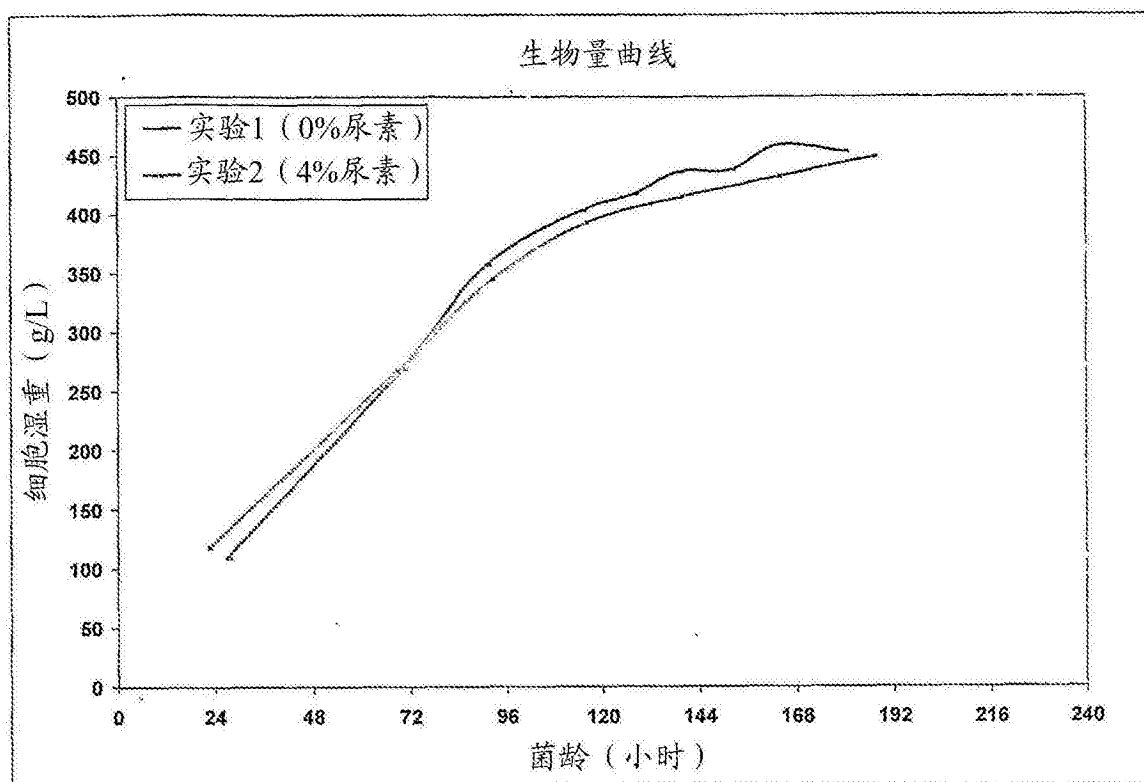


图1

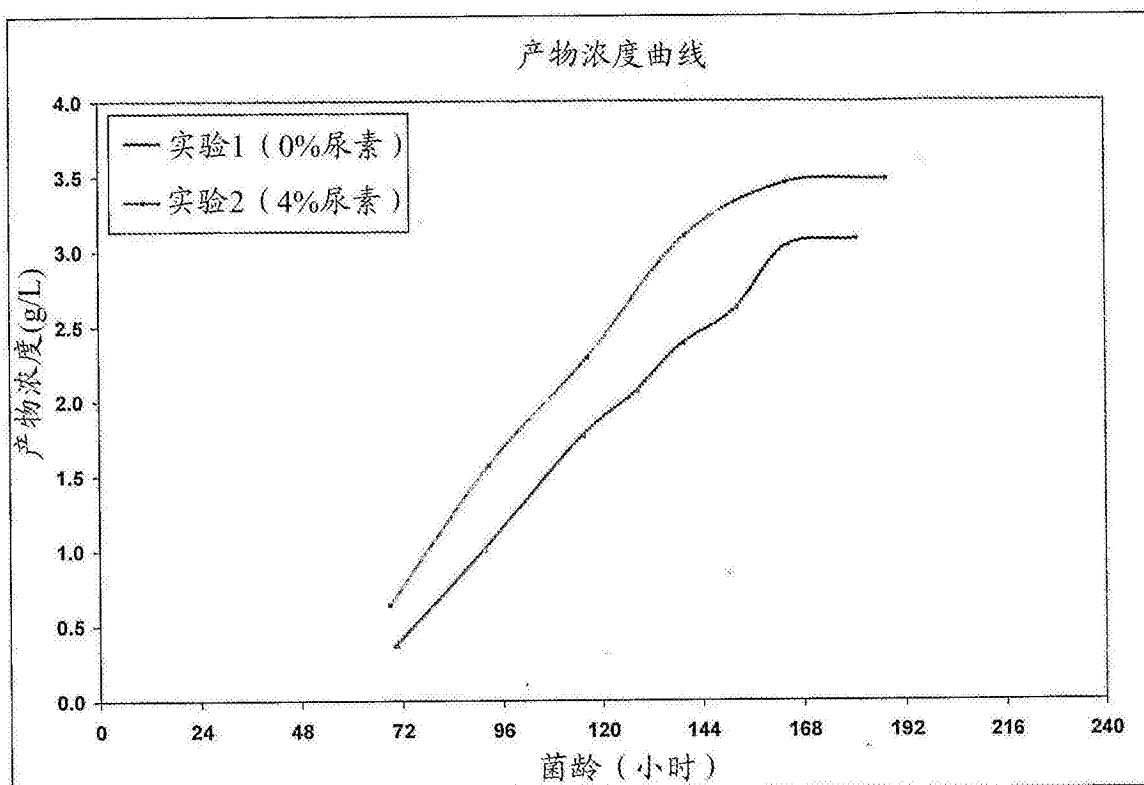


图2

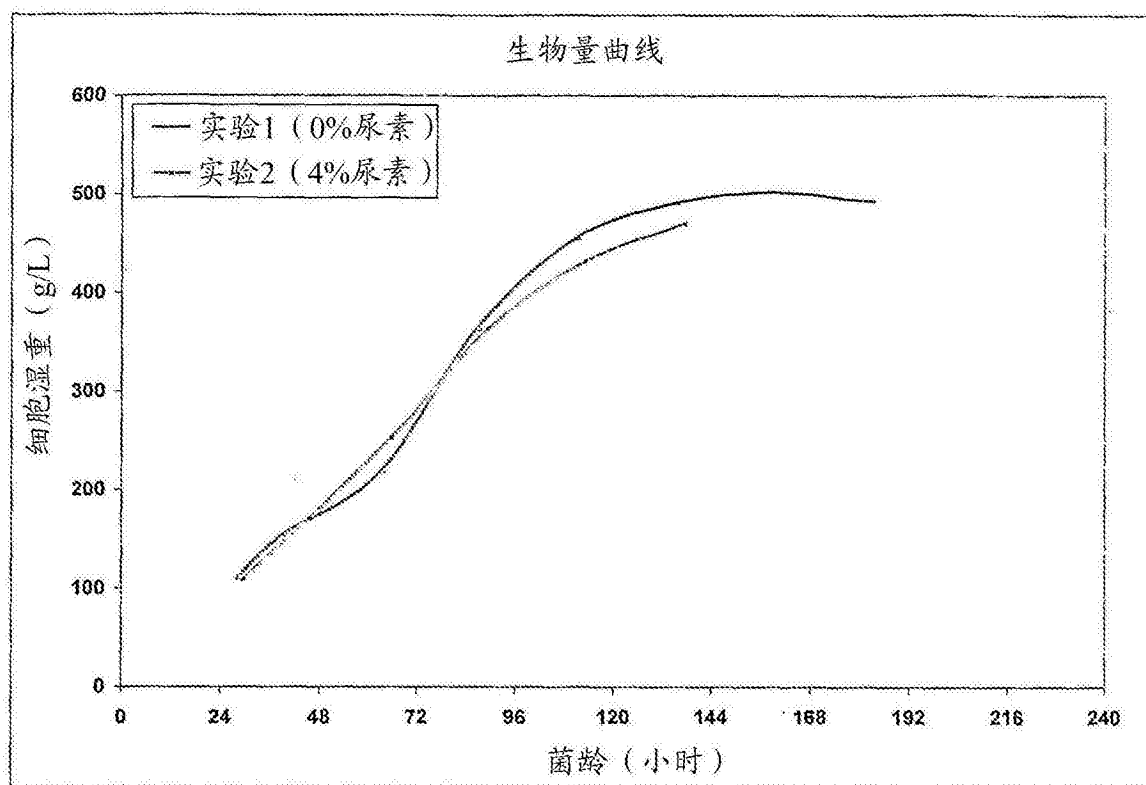


图3

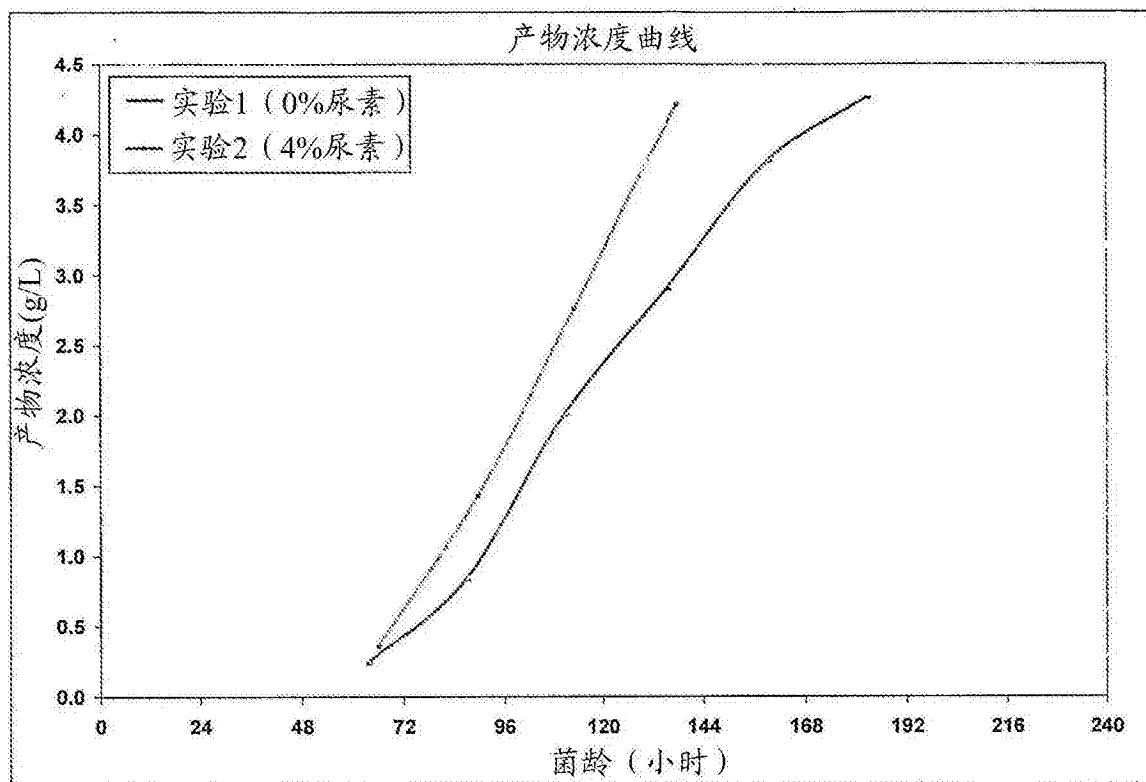


图4

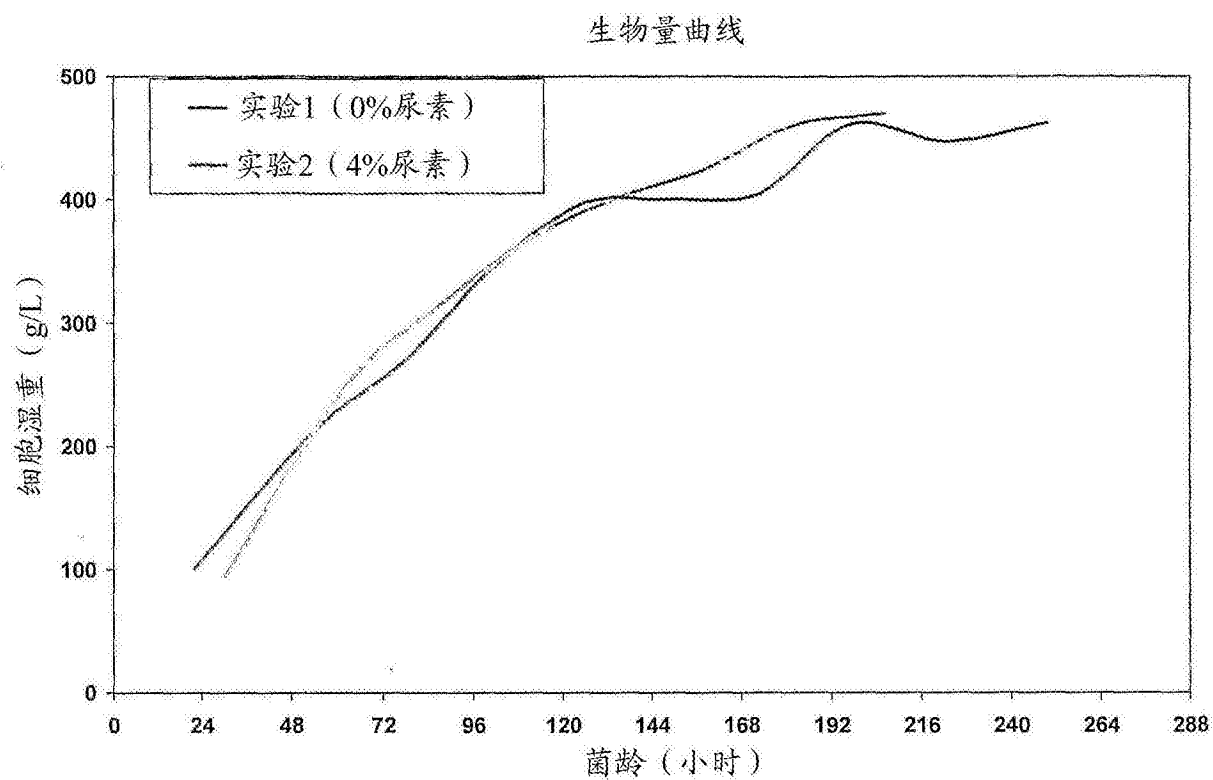


图5

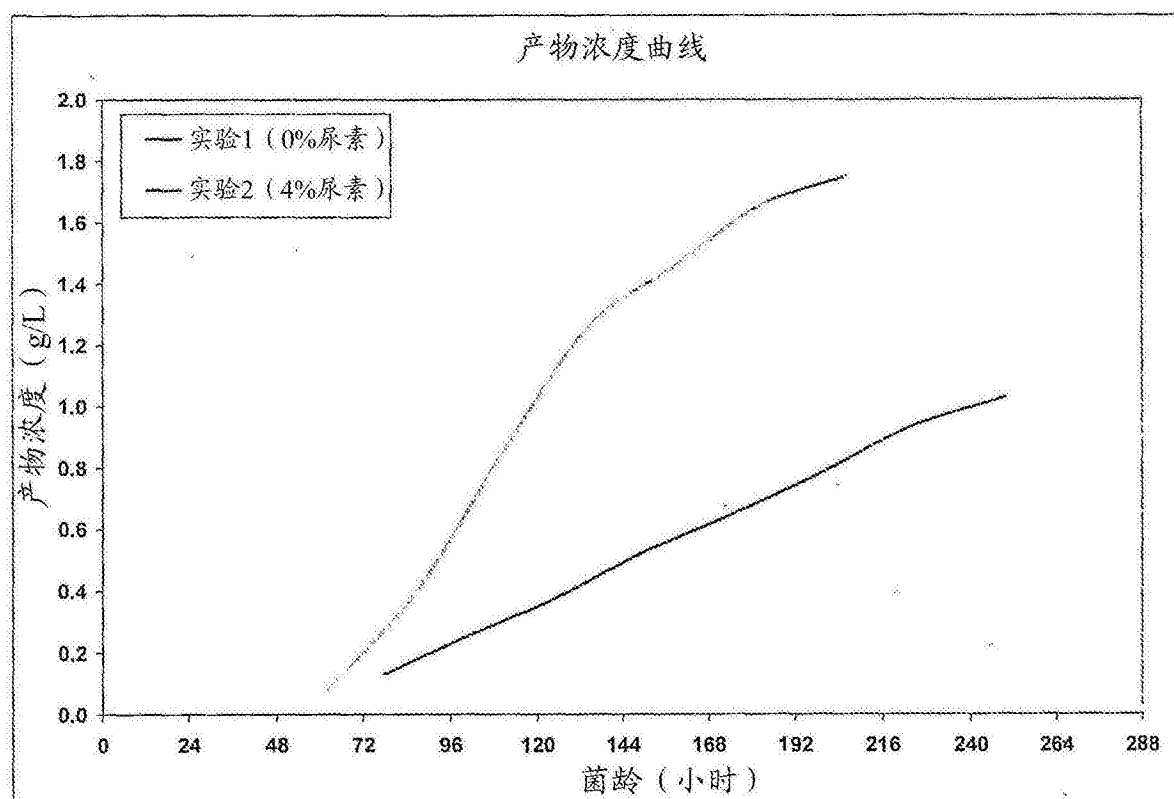


图6

生物量曲线

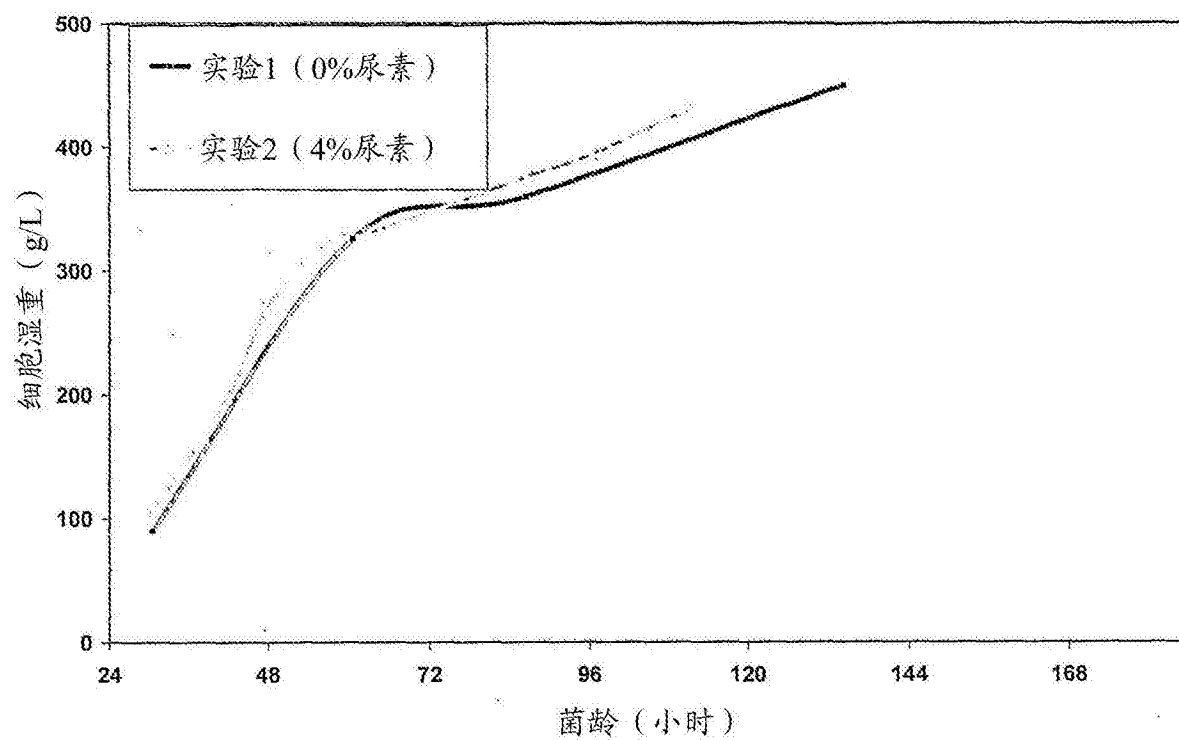


图7

产物浓度曲线

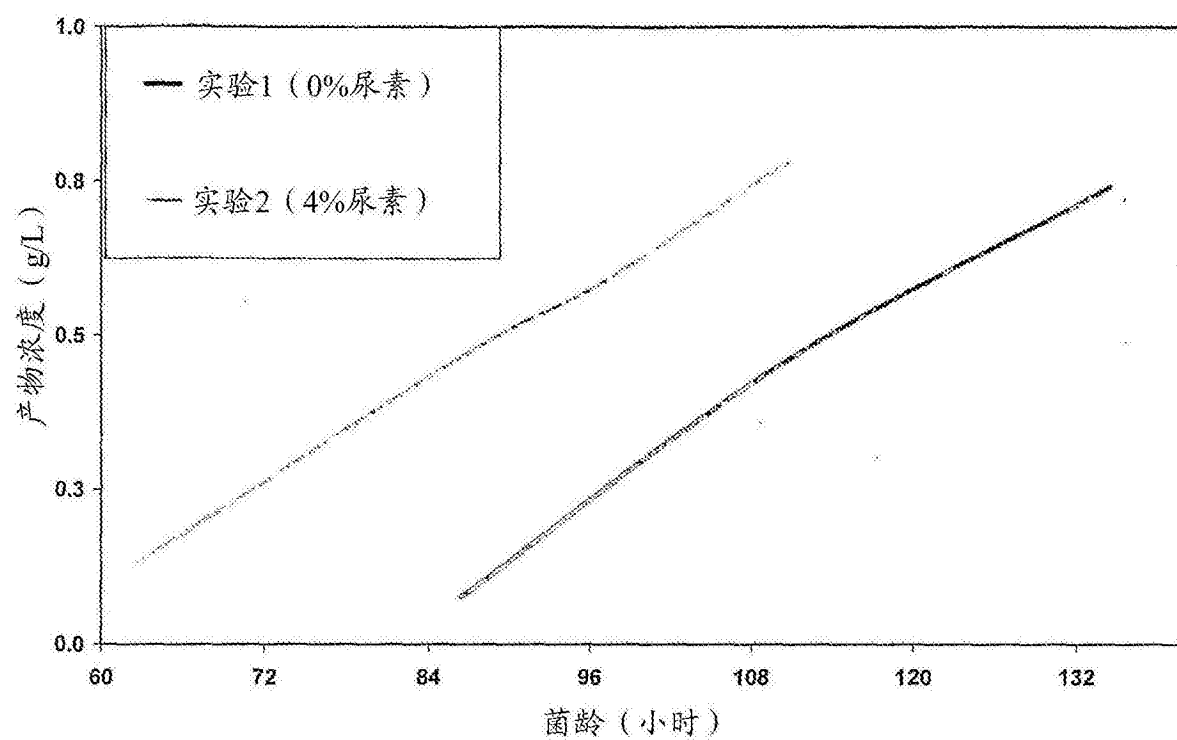


图8

总产物曲线

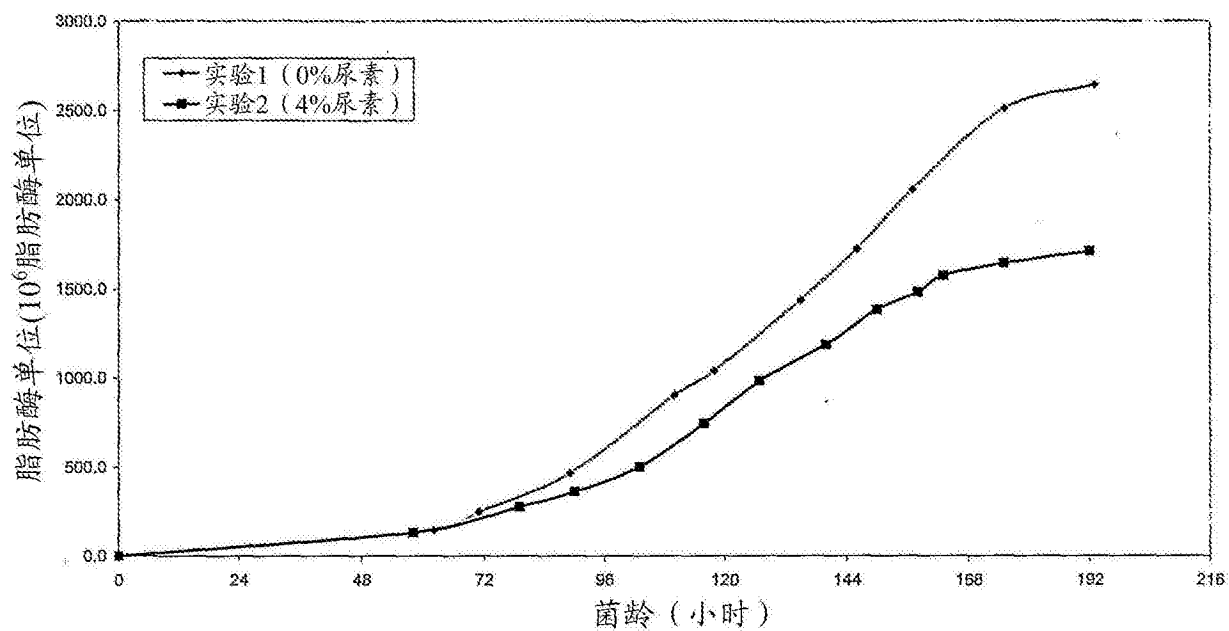


图9

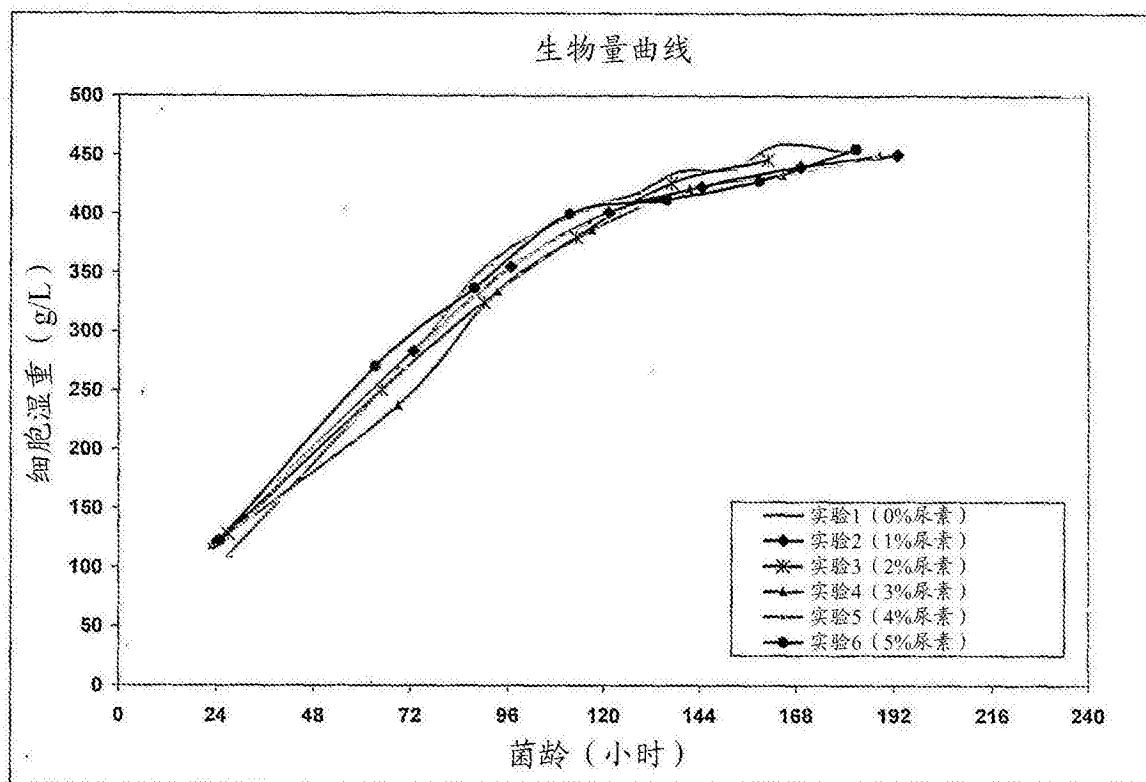


图10

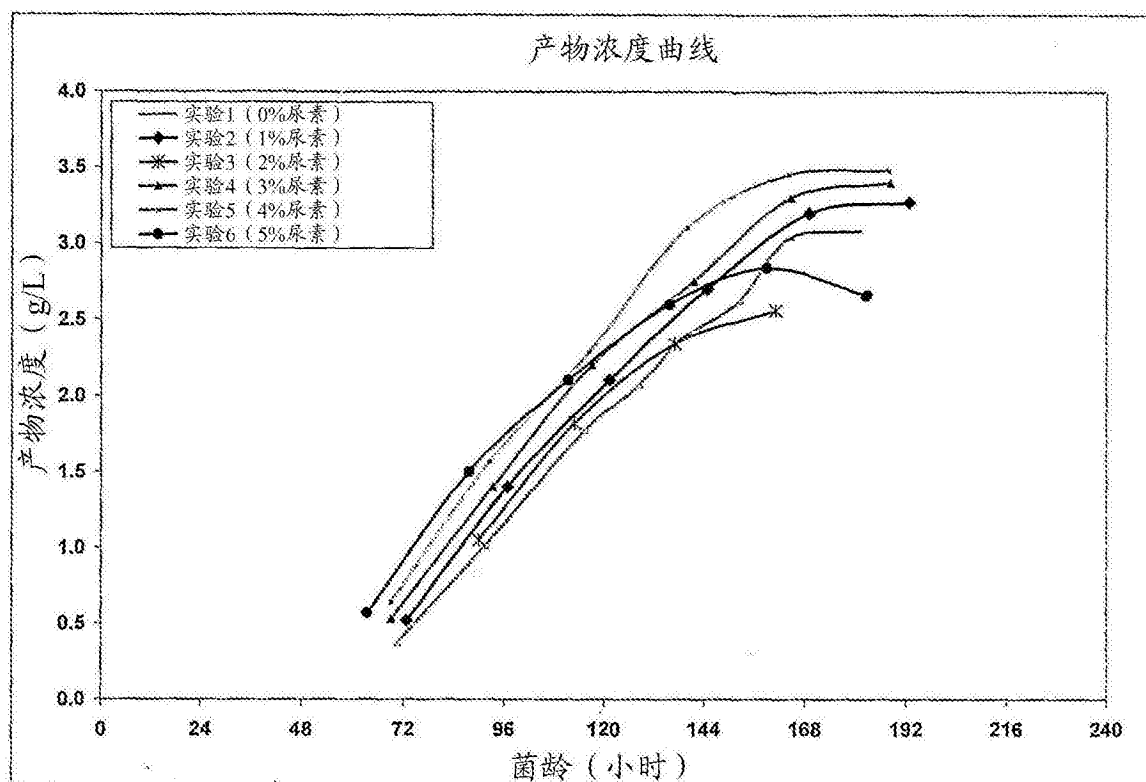


图11

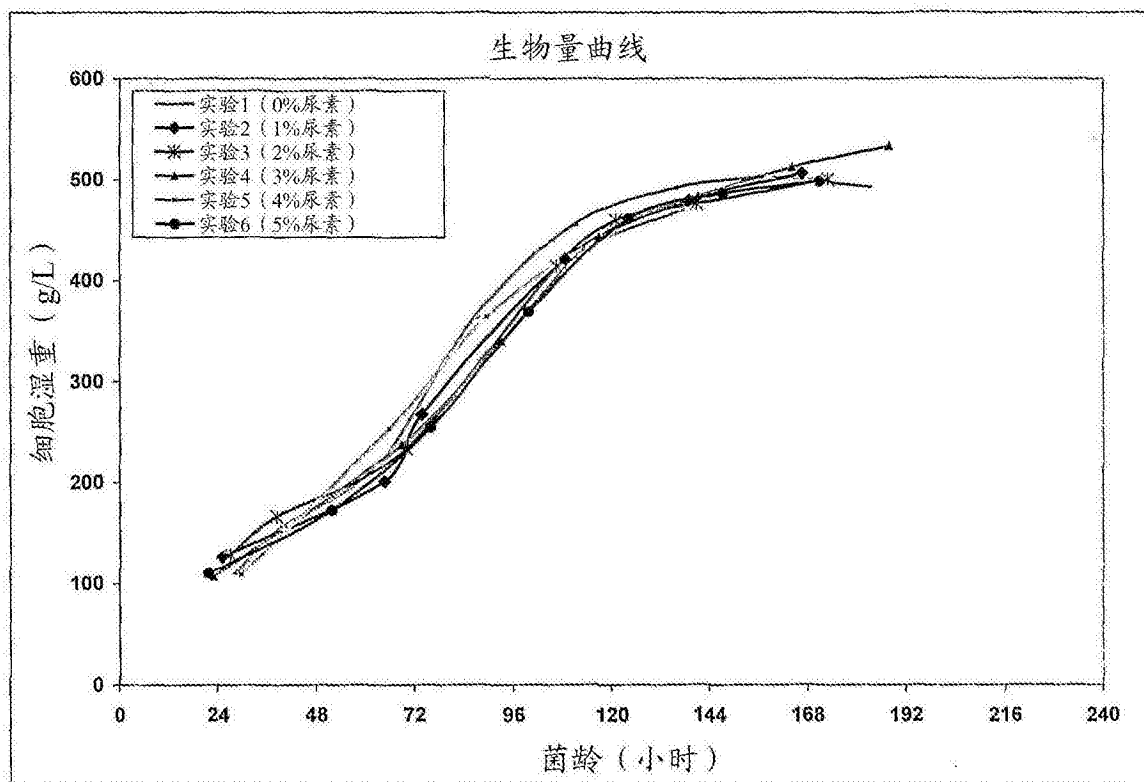


图12

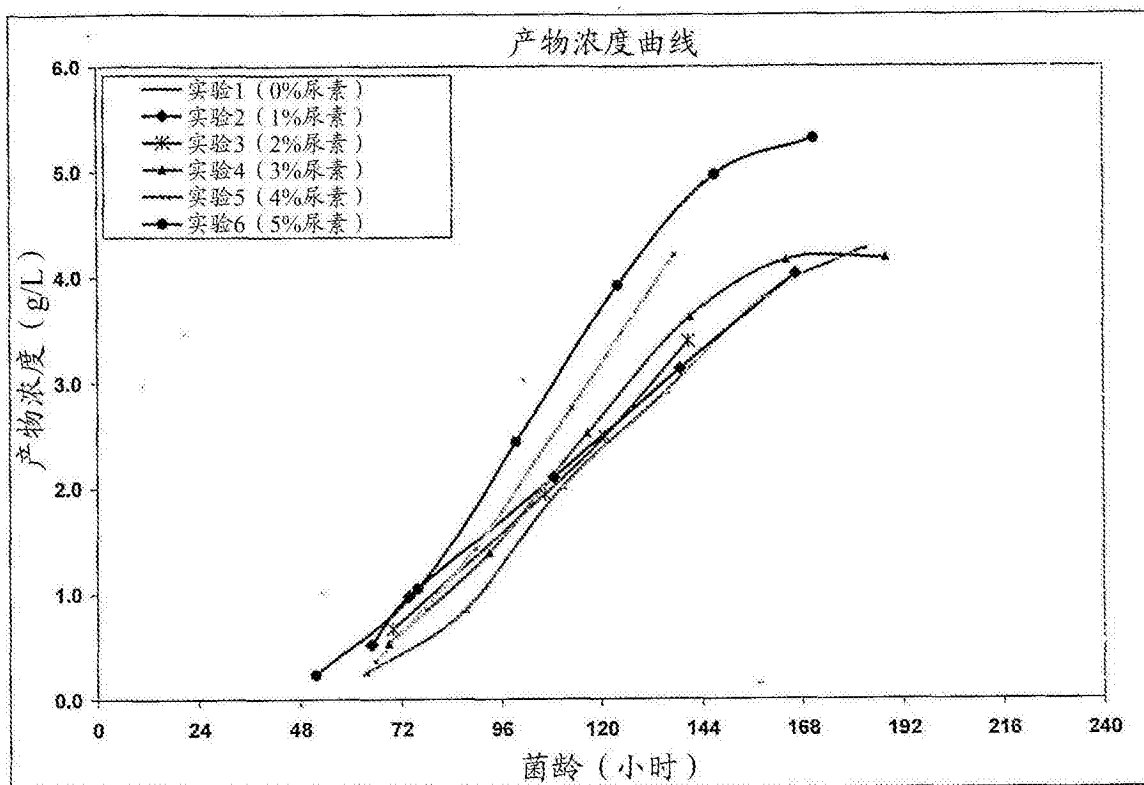


图13

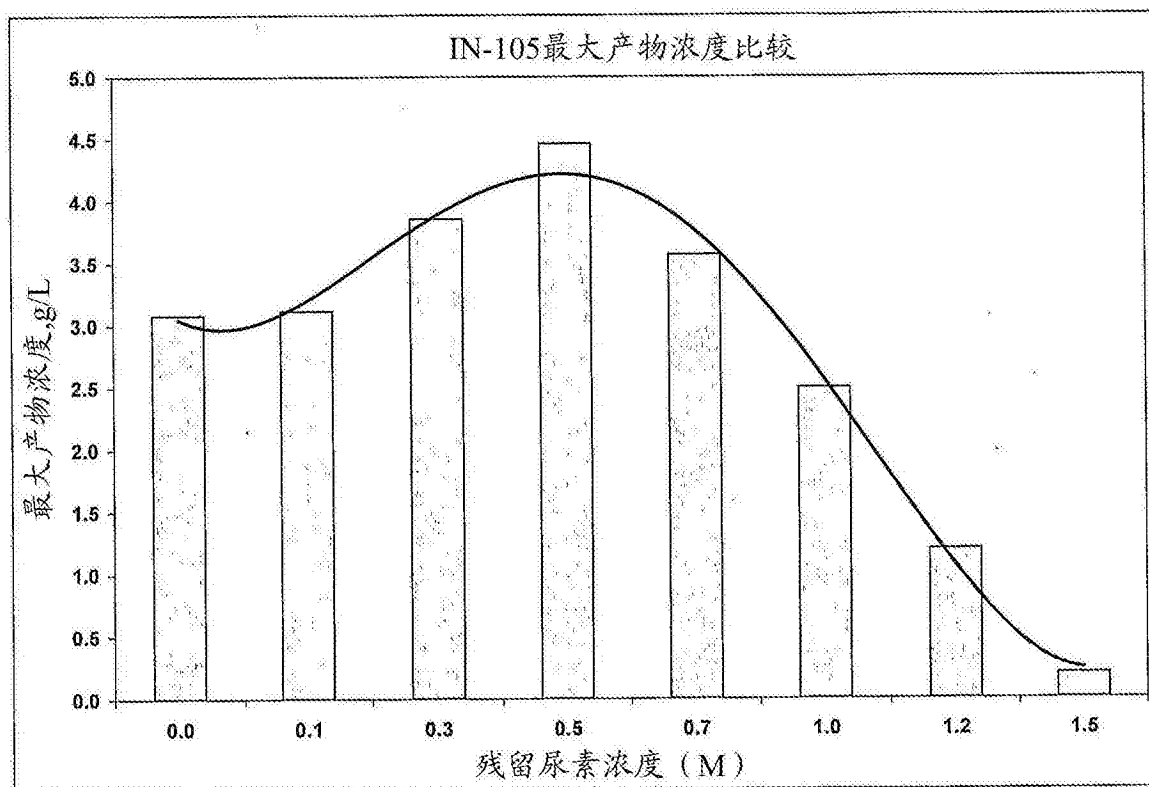


图14

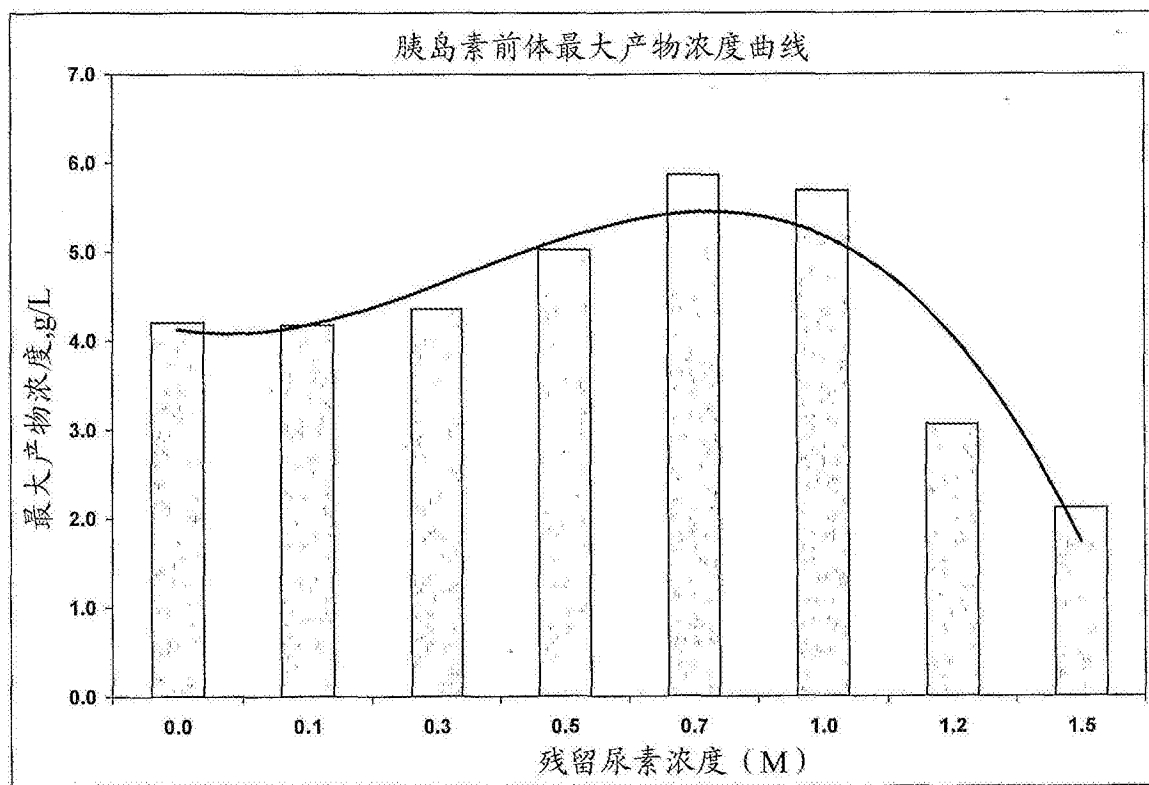


图15

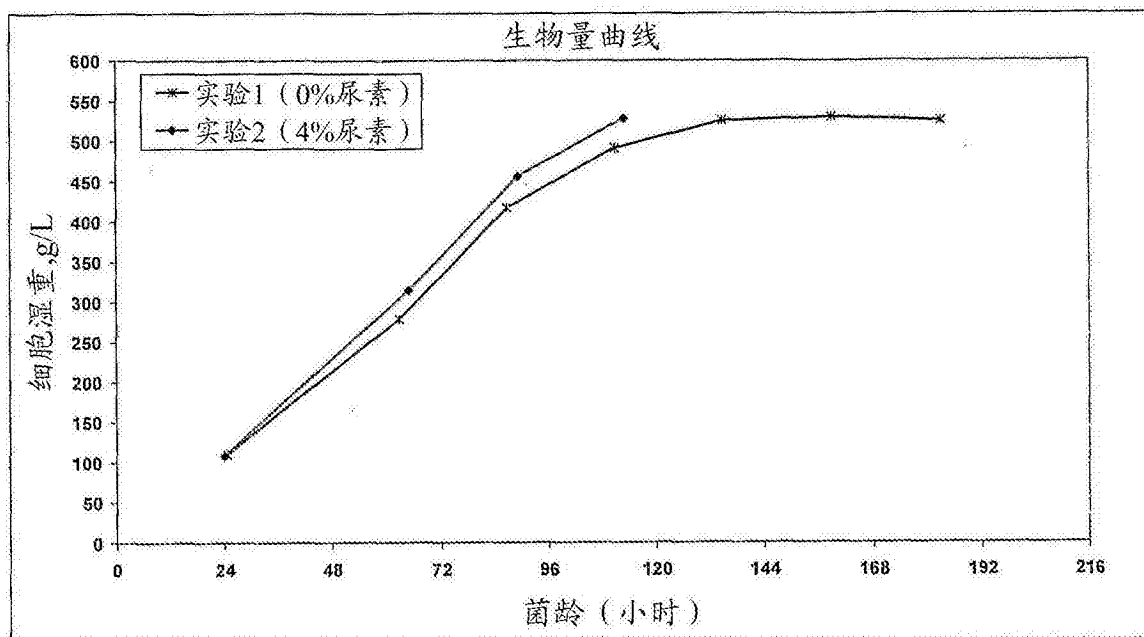


图16

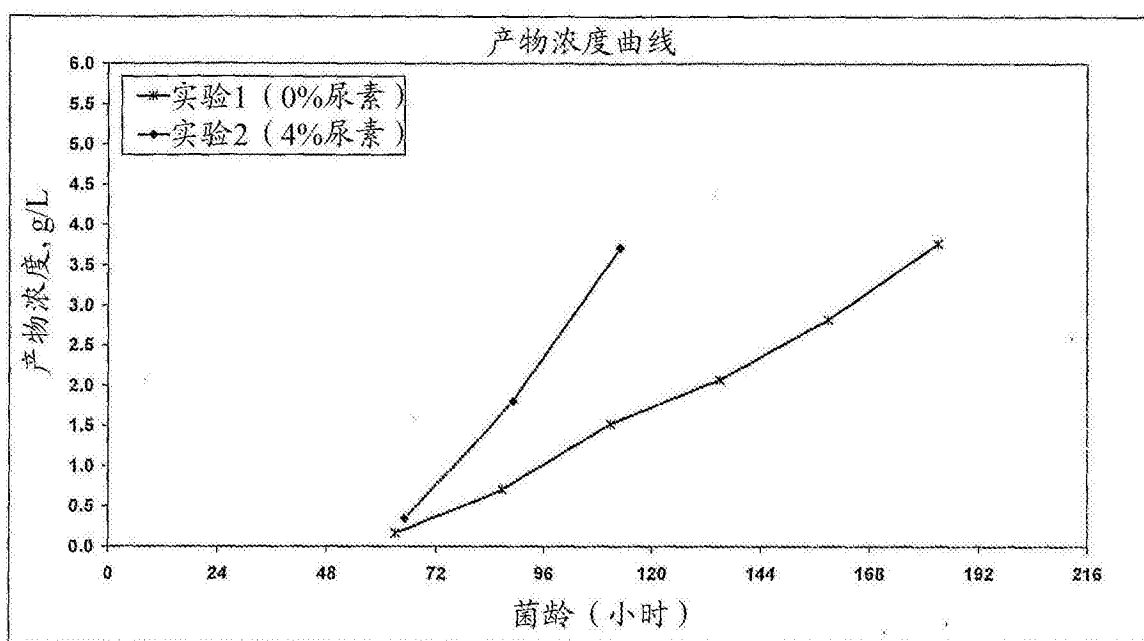


图17

图表：生产力

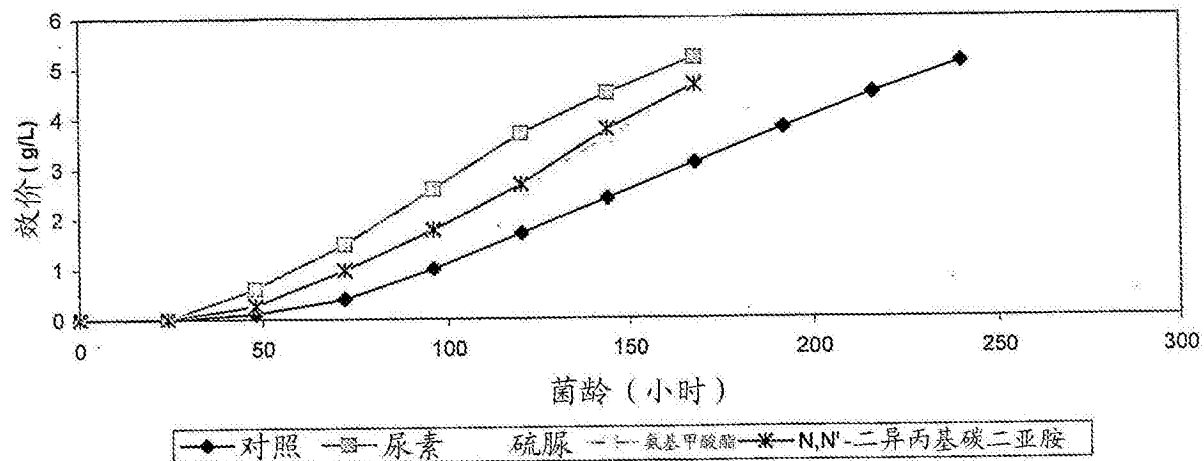


图18

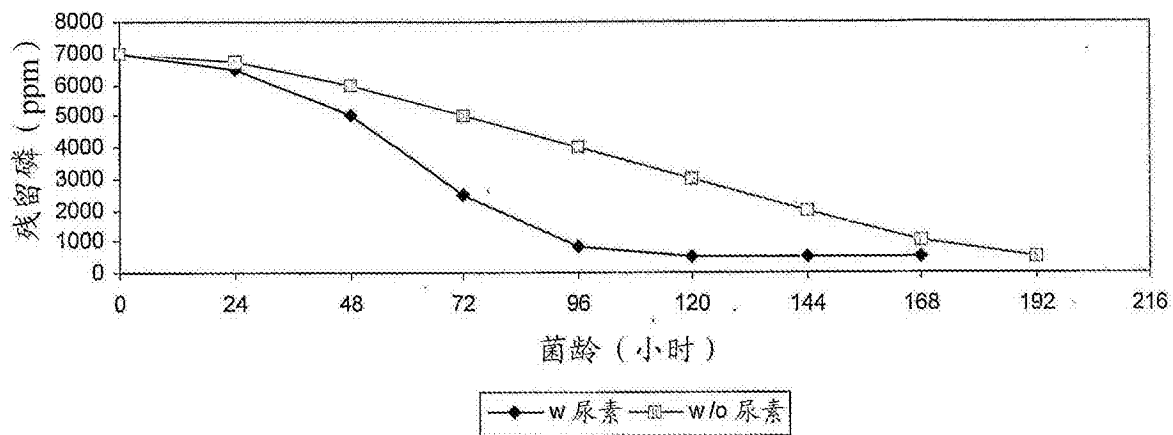
图表：w型和w/o型尿素分批
发酵的磷酸盐消耗

图19

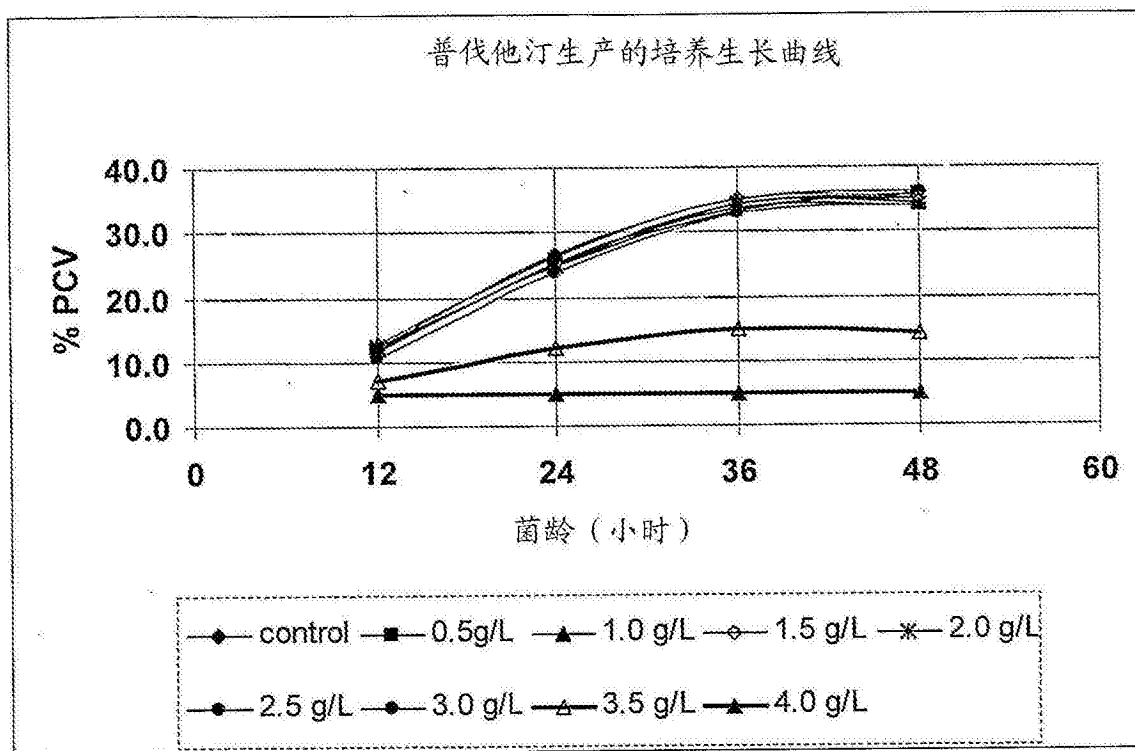


图20

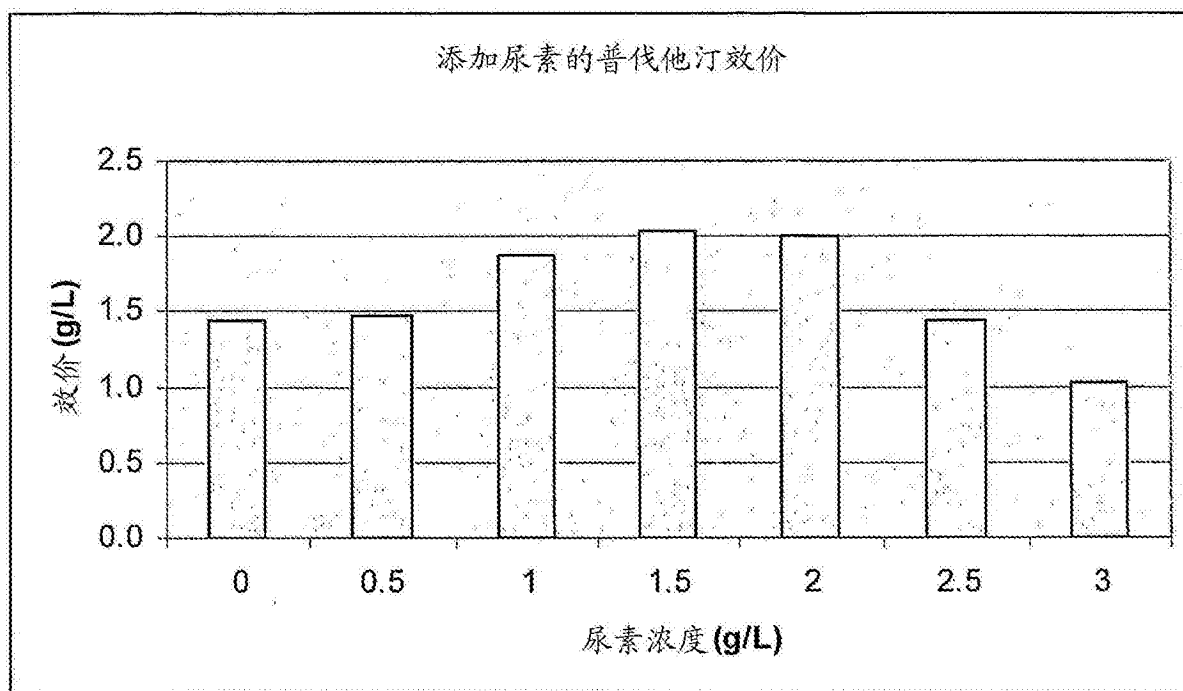


图21

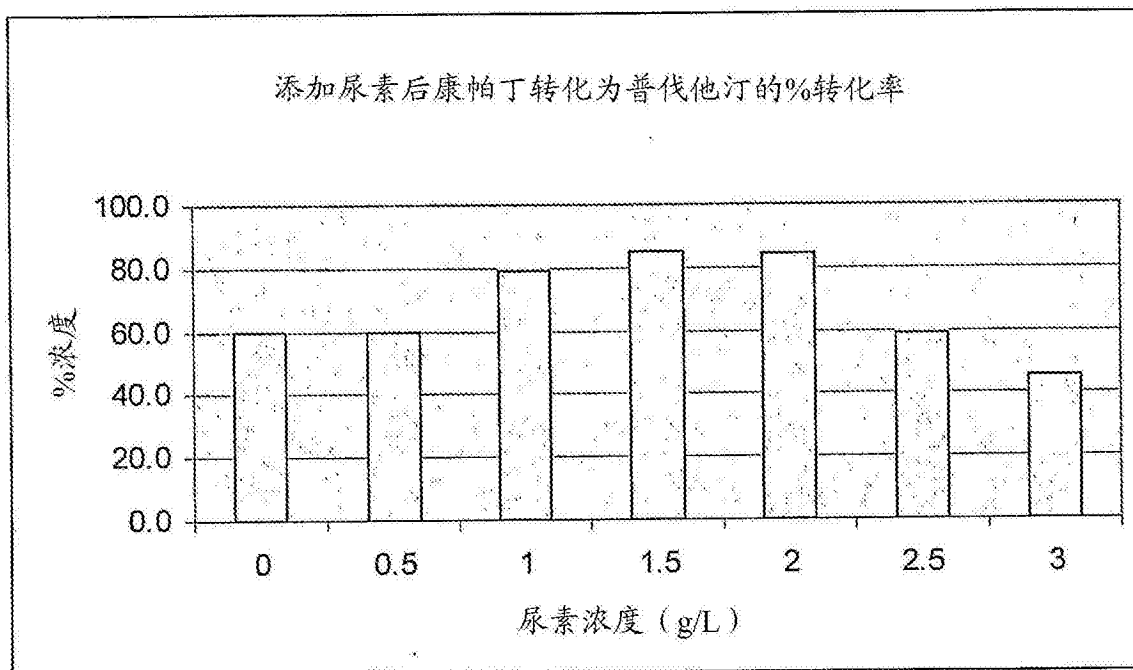


图22

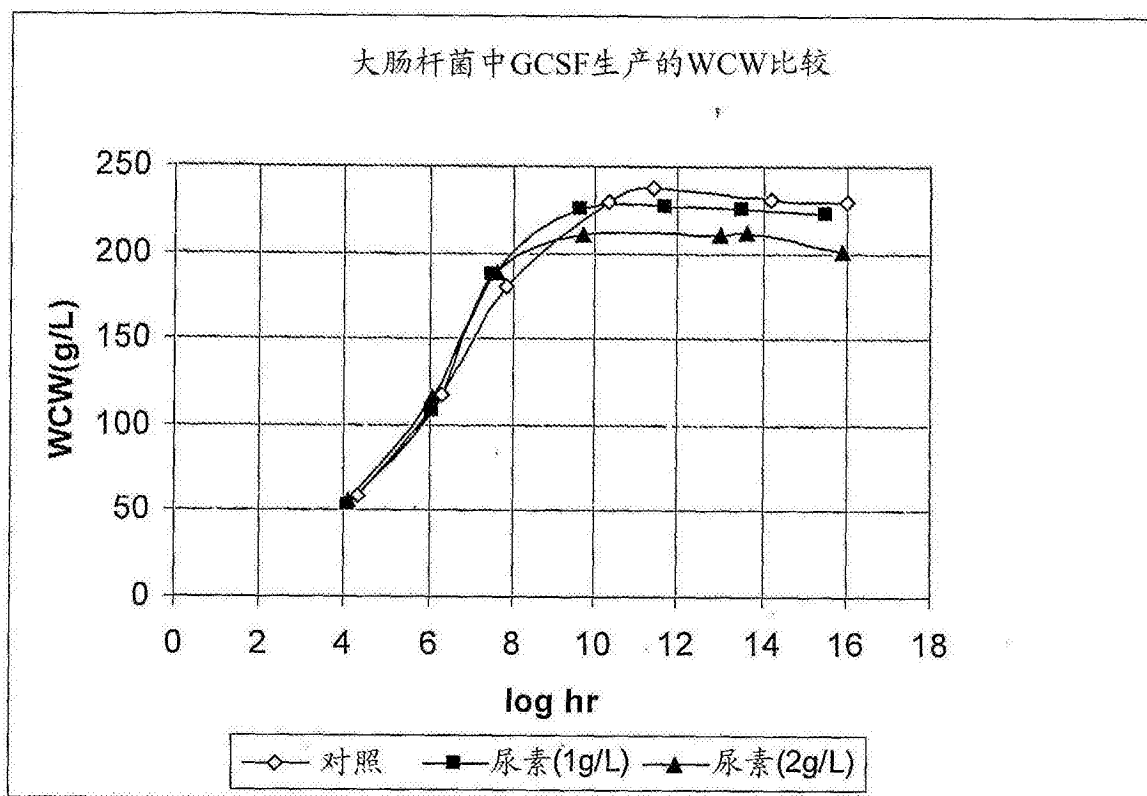


图23

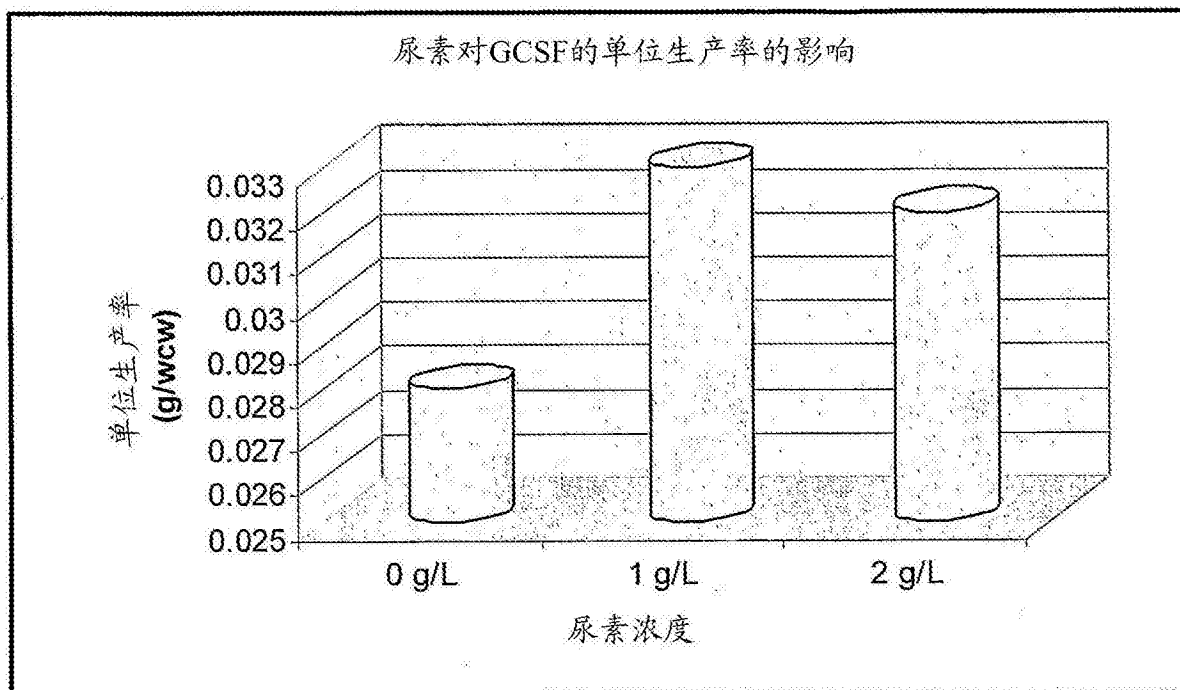


图24

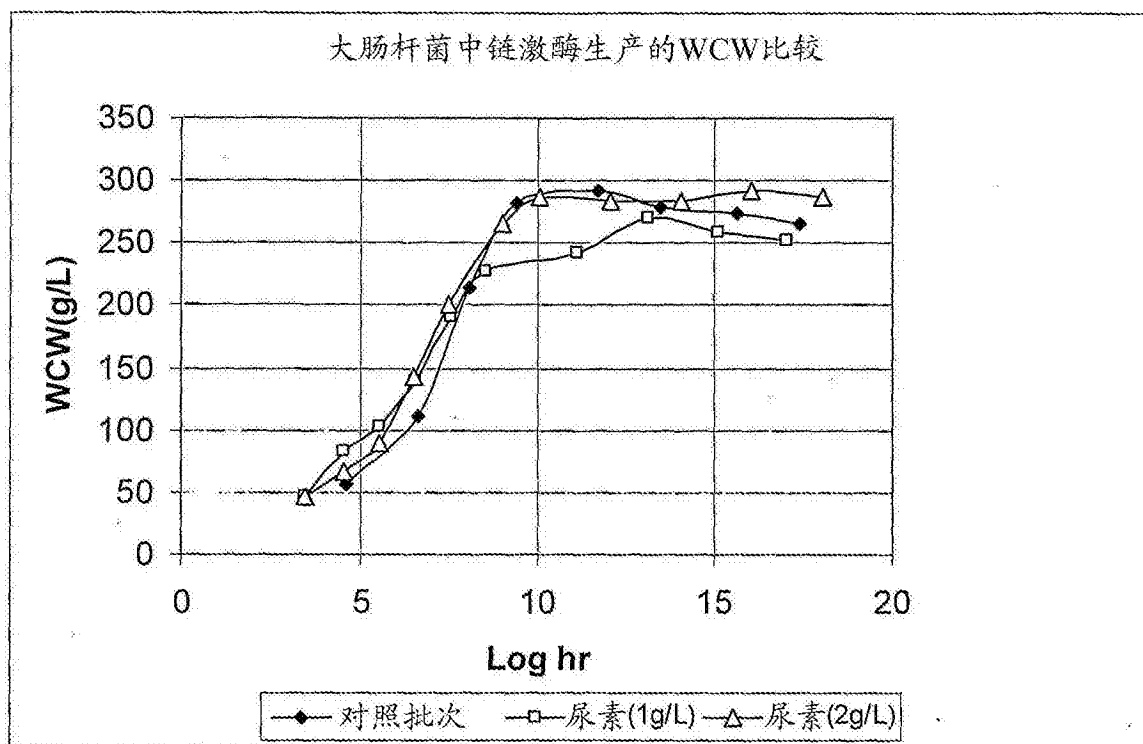


图25

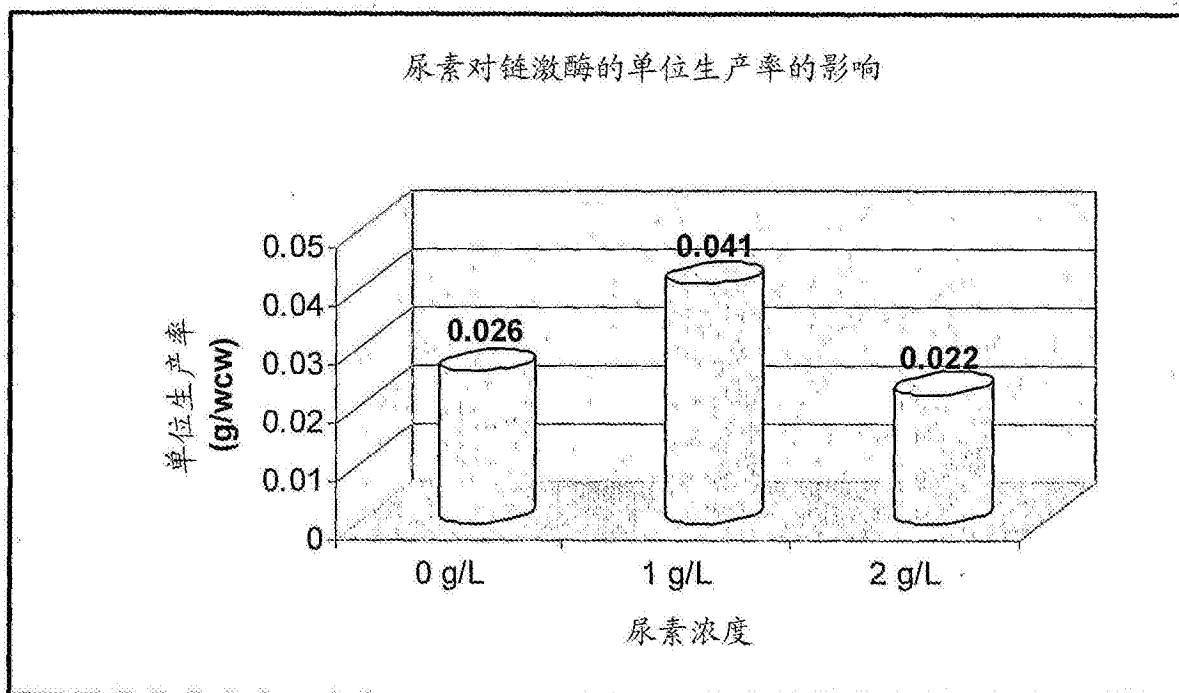


图26

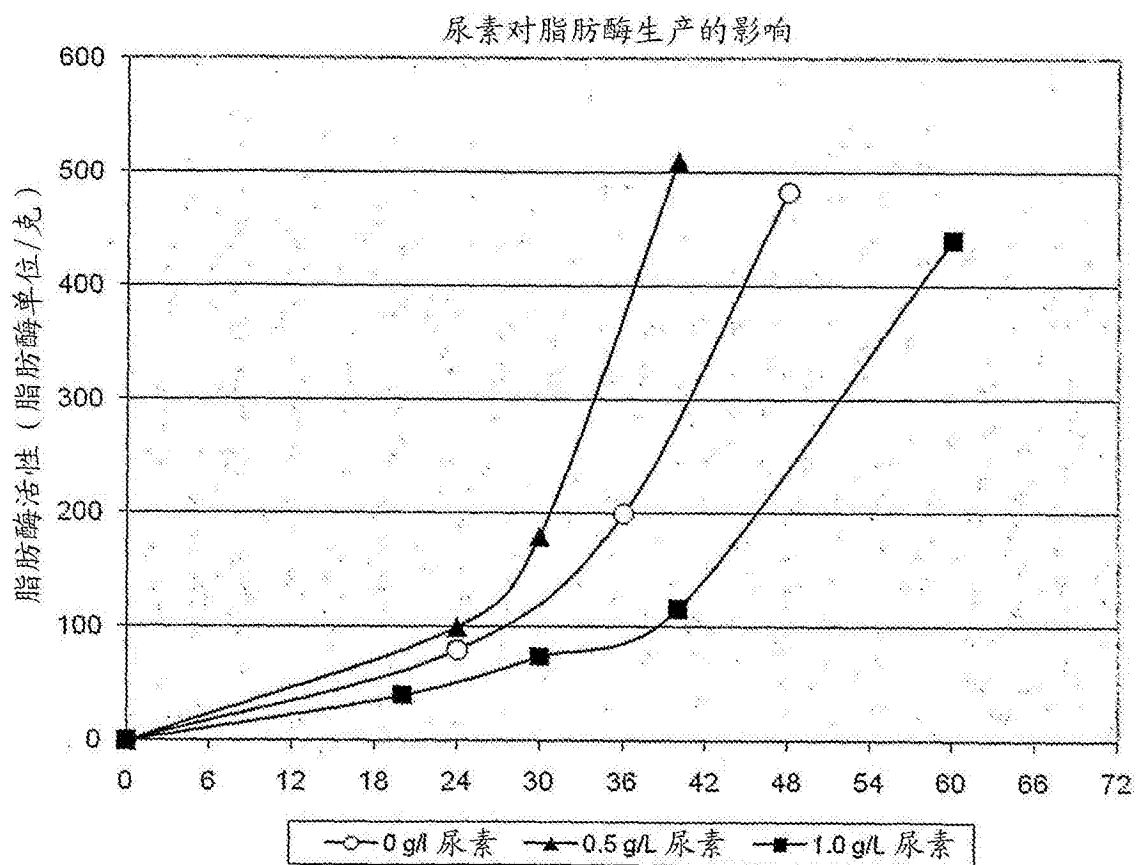


图27