

重组巴氏毕赤酵母恒化培养动力学及代谢迁移特性研究*

郭美锦^{1,2} 吴康华¹ 庄英萍¹ 储炬¹ 张嗣良^{1**}

(¹ 华东理工大学生物反应器工程国家重点实验室 上海 200237)

(² 江西农业大学生物技术研究开发中心 南昌 330045)

摘 要:通过对甲醇营养型毕赤酵母基因工程菌以碳源甘油为限制性基质进行恒化培养动力学试验,结果认为:(1)细胞光密度与其干、湿重呈线性关系,当细胞光密度(OD_{600})为 100 时细胞湿重(WCW)为 128.3g/L,细胞干重(WDW)则为 22.9g/L;(2)基因工程菌 *P. pastoris* 的生长与限制性基质甘油残留浓度的关系符合 Monod 关系式,通过 $1/\mu$ 对 $1/S$ 进行线性回归得 $\mu_{max} = 0.366h^{-1}$, $K_s = 0.1823g/L$,经参数推导甘油最大菌体得率系数 $Y_c = 0.54g/g$,菌体维持生长消耗底物系数 $m = 0.0069g/(g \cdot h)$;氧最大菌体系数 $Y_{x/O_2} = 30.96g/mol$,菌体维持生长时消耗氧系数 $m_{O_2} = 0.0008mol/(g \cdot h)$,最适理论稀释速率 $D_m = 0.341h^{-1}$;(3)从氨水的消耗速率和呼吸商(RQ)的变化认为随着比生长速率(μ)的增大,甘油代谢流从糖原异生和磷酸戊糖途径线性地向糖酵解和三羧酸循环途径进行代谢迁移,即糖酵解和三羧酸循环途径的代谢流量在线性地增大。

关键词: 甲醇营养型毕赤酵母, 恒化培养, 代谢迁移, 动力学, 重组人血清白蛋白

中图分类号: Q939.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 05-0617-08

甲醇营养型毕赤酵母 (*Methylotrophic Pichia pastoris*) 近年来已被公认为外源分泌蛋白和胞内蛋白表达的优秀表达系统^[1]之一,该酵母起初是非利普石油公司 (Phillips Petroleum Company) 为了生产家畜饲料单细胞蛋白 (SCP) 而开发的。自从 1987 年 Cregg 等^[2]首次用巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) 作为宿主菌表达外源蛋白乙型肝炎表面抗原 (HBsAg) 以来已有 40 多种外源蛋白在该宿主系统中获得了表达,如鼠表皮生长因子 (EGF)、p53 蛋白^[3]等。

甲醇营养型毕赤酵母具有分泌外源蛋白效率高,外源蛋白基因遗传稳定,表达量高等特点。尤其是甲醇营养型毕赤酵母能够生长在以甲醇作为唯一碳源和能源的培养基上,具有一条高效诱导的甲醇利用途径,该途径中的第一个酶即为醇氧化酶 (Alcohol Oxidase, AOX),在甲醇为唯一碳源时该酶约占细胞内总蛋白的 35%,但在葡萄糖、乙醇或甘油等碳源时几乎测不出该酶。醇氧化酶 (AOX) 有二种,即 AOX1 和 AOX2,二者基因序列有 92% 的同源性,其蛋白产物则有 97% 的同源性,但 AOX1 的转录水平大大高于 AOX2,且 AOX1 的转录受到严格的双重调控^[4],因此在以甲醇营养型毕赤酵母表达外源蛋白,构建表达载体时就采用了高效诱导、严紧调控的醇氧化酶启动子 (P_{AOX1})。最近也有研究认为 3-磷酸

* 国家自然科学基金资助项目 (29976013) 和教育部高等学校骨干教师资助计划资助项目

** 联系人 E-mail: siliangz@163.net

作者简介: 郭美锦 (1969 -), 男 (汉), 江西吉安, 华东理工大学博士研究生, 主要从事生化工程研究。

收稿日期: 2000-07-31, 修回日期: 2000-11-16

甘油醛脱氢酶启动子(P_{GAP})因不需要甲醇诱导、发酵工艺应该更为简单、且产量高有可能成为代替 P_{AOXI} 最有潜力的启动子^[5]。

高密度培养是现代生物技术提高基因工程菌表达外源蛋白效率的一重要策略。要实现这一目标必需对菌株进行动力学研究,同时由于同一宿主菌株插入的外源蛋白基因不同(大小、组成等),其生长动力学行为可能不一致,为此我们对重组人血清白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)外源基因的甲醇营养型毕赤酵母菌进行高密度培养生长动力学和甘油底物代谢流迁移特性研究,国内外在这方面报道极少。本文报道研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种:巴氏毕赤酵母(*Pichia pastoris*) GS115 HSA-1 菌株($Mut^+ his^+$, P_{AOXI} , 载体 pPIC9K, 蛋白信号肽序列为来自酿酒酵母的 α -杂交因子 AMF, 外源基因为人血清白蛋白 cDNA, 载体呈线型整合在染色体上), 由上海贸基生物技术研究中心提供。

1.1.2 培养基:平板培养基 YPD 培养基^[6]; 种子培养基 MGY 非诱导培养基^[6]; 分批发酵培养基:用 FM21 基础盐配成含甘油 6% 和 4ml/L PTM1 微量元素溶液^[6]; 恒化培养补料培养基:FM21 基础盐含甘油 4.03% 和 12ml/L PTM1 的微量元素溶液。

1.2 方法

1.2.1 培养方法:从新鲜平板菌种上接一单菌落到装 50mL 种子培养基的 500mL 灭菌种子瓶中, 30℃, 220r/min 培养 20~26h(种子液稀释 100 倍后细胞光密度 OD_{600} 约为 0.15~0.20), 按接种量 10% 接入装 3L 分批发酵培养基的 5L 发酵罐中进行分批培养(用 25% 氨水调 pH 至 5.5), 培养温度 30℃, 通过调节通气量、搅拌转速和罐压使溶氧(DO)大于 20%。当底物甘油耗尽后即 DO 陡然上升时开始进行连续恒化培养。实验装置如图 1。

1.2.2 分析方法:pH, GIO80 型 pH 电极在线检测与闭环控制, (华东理工大学国家生化技术工程中心研制); 溶氧, (DO)溶氧电极在线检测(瑞典 Ingold 公司产品 CD951-06); 尾气分析, 排气 O_2 为热磁氧分析仪(Magnos 4G)在线检测; 排气 CO_2 采用不分光红外仪(Uras 3G)在线检测(德国 H&B 公司生产); 甘油分析, 化学滴定法^[7]; 细胞湿重分析法, 取 10mL 发酵液于 4℃, 3000r/min 离心 10min 后弃上清液称细胞湿重; 细胞干重分析法^[8], 取 10mL 发酵液于恒重滤纸上过滤, 过滤后于 105℃ 烘至恒重, 称量细胞干重; 细胞光密度(OD_{600})分析, 细胞培养液用去离子水稀释后于波长

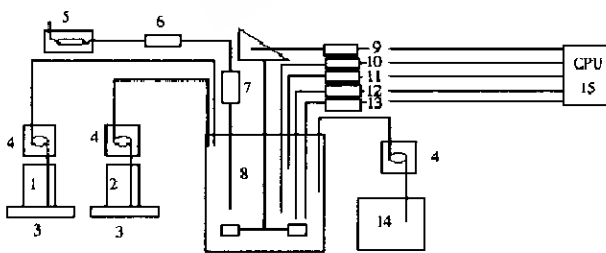


图 1 *P. pastoris* 基因工程菌恒化培养装置图
Fig.1 Chemostat cultivation setup for recombinant *P. pastoris*
1. Fed-bottle; 2. Ammonia bottle; 3. Electronic scale;
4. Auto-pump; 5. Air compressor; 6. Air filter; 7. Air meter;
8. Automatic fermenter with multi-parameter sensors;
9. Agitation speed sensor; 10. pH electrode;
11. Exhausted air analyzer; 12. Dissolved oxygen sensor;
13. Temperature sensor; 14. Sample bottle; 15. Computer with data sampling and controlling system.

600nm 处以去离子水为对照进行比色测定, $OD_{600} = OD \text{ 读数} \times \text{稀释倍数}$ 。

1.2.3 恒化培养拟稳态的确定: 由于本试验采用 FUS-5L 全自动多参数发酵罐(由华东理工大学国家生化技术工程中心研制)进行连续培养, 当在线参数 pH, DO, 转速 (r/min), $NH_3 \cdot H_2O$ 消耗率及间接参数 OUR、CER、RQ 和 $K_L a$ 等在一定时间内维持相对稳定(所有参数几乎不变), 且离线参数细胞光密度 (OD_{600})、甘油残量等连续三次(每 4h 测一次)测定结果一致时, 即确认为恒化培养系统达到拟稳态。

2 结果和讨论

2.1 基因工程菌 *P. pastoris* 细胞光密度 (OD_{600}) 与细胞干重湿重的关系

基因工程菌由于其被插入的外源蛋白基因的不同(如外源蛋白分子大小, 氨基酸组成, 比例等), 外源蛋白基因插入宿主菌的位置不同(如宿主菌的染色体, 质粒等)和载体的构建方式不同(如外源基因拷贝数多少, 引导序列的种类和启动子的不同), 在相同条件下其生长的行为规律并不一定相同, 同样细胞光密度与其干重和湿重的关系也不尽相同。本试验基因工程菌毕赤酵母生长细胞光密度 (OD_{600}) 与细胞干、湿重呈线性关系(见图 2), 线性方程为:

$$y_{WCW} = 1.0881x + 19.487$$

(线性相关系数 $r = 0.9996$)

$$y_{DCW} = 0.2303x - 0.1076$$

(线性相关系数 $r = 0.9997$)

因此 $100 OD_{600} = 128.3 \text{ g/L}$ (湿重)

$100 OD_{600} = 22.9 \text{ g/L}$ (干重)

2.2 恒化培养补料培养基中限制性基质甘油浓度的确定

连续恒化培养达到稳态时, 对限制性基质作物料衡算

$$\frac{F_{in}}{V} S_0 = \frac{F_{out}}{V} S + \frac{\mu}{Y_c} X + mX + \frac{q_p}{Y_p} X \quad (3)$$

与生长相比, 细胞对限制性基质的维持要求往往很低(即 $mX < \mu X / Y_c$), 且此时产物形成极少(可以忽略), 又 $dS/dt = 0, \mu = D$, 因此(3)式可写成:

$$X = Y_c (S_0 - S) \quad (4)$$

在同一比生长速率下 (μ 相同), Y_c 不变, 对于不同 S_0 , 应有

$$X_1 / X_2 = (S_{01} - S_1) / (S_{02} - S_2) \quad (5)$$

因此, 只要符合(5)式中的 S_{0i} ($i = 1, 2$) 即为限制性基质浓度范围。表 1 为采用 $S_{01} = 1.87\%$, $S_{02} = 5.09\%$, 稀释速率 (μ) 相同连续培养的结果。 $X_1 / X_2 = 0.086$ 而 $(S_{01} - S_1) / (S_{01} - S_2) = 0.088$, 因此可认为基因工程菌 *Pichia pastoris* GS115 供试菌株生长培养时底物甘油限制性底物浓度范围为 5.09% 。本试验采用 4.03% 左右甘油浓度进行恒化培养。

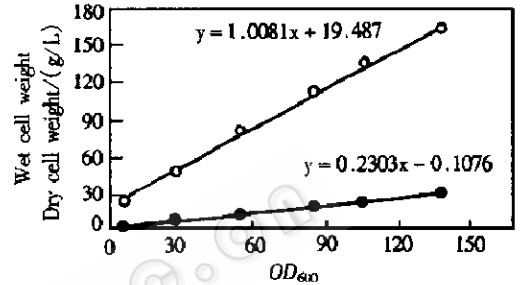


图 2 细胞干、湿重与 OD_{600} 关系

Fig. 2 Relationship between wet/dry cell weight and cell optical density

● Dry cell weight; ○ Wet cell weight.

(1)

(2)

表 1 甘油底物浓度范围试验结果

Table 1 Results of concentration range of substrate glycerol

Fed-glycerol conc. $S_0/(g/L)$	Residual glycerol conc. $S/(g/L)$	Cell optical density OD_{600}	$S_0 - S$
18.7	17.1	6	1.6
50.9	32.9	70	18

2.3 恒化培养试验结果

恒化培养结果见表 2。

表 2 基因工程菌 *Pichia pastoris* 恒化培养试验结果Table 2 Experimental results of recombinant *P. pastoris* in chemostat cultivation

Dilute rate $\mu/(h^{-1})$	Residual glycerol conc. $S(g/L)$	Consump. rate of ammonia $I(g/h \cdot L)$	X $/OD_{600}$	DX $I(g/L \cdot h)$	$Y_{x/s}$ $I(g/g)$	Q_s $I(g/g \cdot h)$	OUR $I(mmol/h \cdot L)$	CER $I(mmol/h \cdot L)$	RQ	q_{O_2} $I(mol/g \cdot h)$
0.064	0.04	4.69	70	1.026	0.40	0.11	56.26	23.14	0.41	0.0035
0.091	0.06	8.7	86	1.729	0.50	0.13	68.25	32.23	0.47	0.0035
0.104	0.08	9.3	105	2.501	0.61	0.17	97.96	48.63	0.50	0.0041
0.169	0.105	10.1	98	3.793	0.57	0.30	141.1	77.93	0.55	0.0063
0.199	0.15	11.1	95	4.329	0.56	0.35	140.2	80.26	0.57	0.0064
0.213	0.45	14.5	86	4.195	0.55	0.39	142	88.61	0.62	0.0072
0.257	0.96	19.9	66	3.884	0.49	0.52	152	103.4	0.68	0.0101

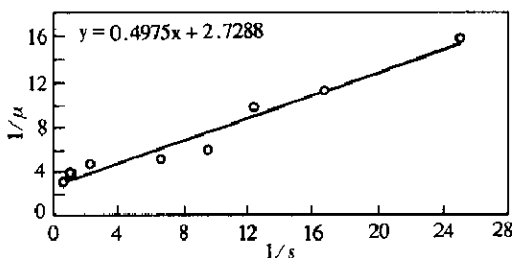
Note: $Y_{x/s} = X/(S_0 - S)$, g/g; $Q_s = D(S_0 - S)/S$, g/g·h; $q_{O_2} = OUR/X$, mol/g·h; RQ = CER/OUR

2.3.1 基因工程菌 *P. pastoris* 生长模型建立:

$$\text{由 Monod 方程 } \mu = \mu_{\max} S/(K_s + S) \quad (6)$$

$$\text{变形为 } 1/\mu = 1/\mu_{\max} + K_s/\mu_{\max} * 1/S \quad (7)$$

由图 3 可见 $1/\mu$ 与 $1/S$ 成直线关系(相关系数 $r = 0.98$), 表明基因工程菌 *P. pastoris* 的生长与限制性基质甘油残留浓度的关系符合 Monod 关系式。通过 $1/\mu$ 对 $1/S$ 进行线性回归得 $\mu_{\max} = 0.366h^{-1}$, $K_s = 0.1823g/L$ 。

图 3 $1/\mu$ 与 $1/S$ 的关系曲线Fig. 3 Curve for relation between $1/\mu$ and $1/S$

2.3.2 发酵动力学参数推导: 在微生物生长阶段恒化培养碳源的消耗主要用于生长和维持(可忽略产物合成所消耗的底物), 用于维持的碳源消耗量大致恒定, 且与生长无关。通过对甘油碳源进行物料衡算可以得到基质的比消耗速率(q_s)与菌体细胞的比生长速率(μ)、底物最大生长得率系数(Y_c)和维持系数(m)的关系如下:

$$q_s = \mu/Y_c + m \quad (8)$$

通过 q_s 对 μ 进行最小二乘法线性回归(线性方程如图 4),得理论最大甘油菌体得率 $Y_c = 0.54\text{g/g}$ 和 $m = 0.0069\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。从表 2 可知,实测甘油底物的菌体得率系数($Y_{X/S}$)随比生长速率的增大是呈先升后降的趋势,甚至大于理论最大得率系数(Y_c),但甘油底物得率系数($Y_{X/S}$)与稀释速率 $D(\text{h}^{-1})$ 的关系与啤酒酵母(*S. cerevisiae*)利用葡萄糖时的关系^[9]相类似。本实验中细胞生长维持系数(m)较小,说明菌体细胞利用甘油主要是用来生长,具有高密度培养潜力;从经济学观点来看,由于维持生长的碳源是非生产碳源,即维持系数的大小可作为评价菌株优劣的一个指标,因此本菌株对于生产菌体细胞即高密度培养来说是一优良菌株。

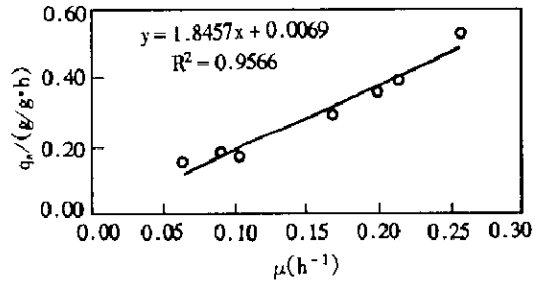


图 4 底物比消耗速率(q_s)与比生长速率(μ)关系

Fig.4 Curve for relation between specific consumption rate of substrate and specific cell growth rate

同理,由 Monod 方程也得到氧化消耗速率(q_{O_2})与菌体比生长速率(μ),氧气的菌体得率系数(Y_{X/O_2})和细胞维持生长氧系数(m_{O_2})方程:

$$q_{O_2} = \mu/Y_{X/O_2} + m_{O_2} \tag{9}$$

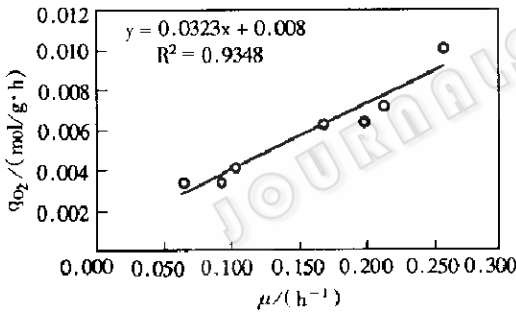


图 5 氧气比消耗速率(q_{O_2})与比生长速率(μ)的关系

Fig.5 Curve for relation between specific oxygen consumption rate (q_{O_2}) and specific growth rate (μ)

通过 q_{O_2} 对 μ 进行线性回归(图 5)(线性相关系数 $r = 0.9669$)得: $Y_{X/O_2} = 30.96\text{g}/\text{molL}$, $m_{O_2} = 0.0008\text{molL}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。基因工程菌 *P. pastoris* 生长时维持所需氧量较小(几乎为零),但菌体生长时氧得率系数($Y_{X/O}$)并不大,因此在进行高密度培养表达外源蛋白时有些研究者^[10]补充了一部分纯氧来维持菌体对氧的需要。

2.4 *P. pastoris* 比生长速率(μ)对菌体产率(DX)的影响

由 Monod 方程(3)和稀释速率 $D = \mu$

$$\text{得 } S = DK_s/(\mu_{\max} - D) \tag{10}$$

$$(10)\text{式代入}(4)\text{式得 } X = Y_{X/S} [S_0 - DK_s/(\mu_{\max} - D)] \tag{11}$$

$$\text{所以 } DX = DY_{X/S} [S_0 - DK_s/(\mu_{\max} - D)] \tag{12}$$

当 $d(DX)/dD = 0$ 时可求出 DX 最大时的 D 值,

由(12)式并假定 $Y_{X/S}$ 不受 D 的影响,则:

$$D = Dm = \mu_{\max} [1 - (K_s/(K_s + S_0))^{1/2}] \tag{13}$$

将 $\mu_{\max} = 0.366\text{h}^{-1}$, $K_s = 0.1823\text{g/L}$, $S_0 = 40.3\text{g/L}$ 代入(11)式得最适理论稀释速率 $Dm = 0.341\text{h}^{-1}$ 。

从表 2 可知,随比生长速率逐渐增大,单位时间菌体产率(DX)是呈先升后降趋势,DX

为最大时比生长速率为 0.199h^{-1} ，这与最适理论稀释速率偏小，可能是当稀释速率(D)小时，一部分细胞的生长与死亡，物料混合不完全等引起简单恒化器理论结果的偏差；当稀释速率大时，溶氧有可能影响菌体充分利用限制性底物生长，因而也引起结果的偏差。

2.5 比生长速率(μ)对细胞生长 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 消耗速率的影响

由表 2 可知，在恒化培养时随着比生长速率(μ)的增加， $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 消耗速率与菌体产率(DX)均增大，但 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 消耗速率在比生长速率(μ)为 0.257h^{-1} 时为最大，而 DX 在比生长速率为 0.199h^{-1} 为最大， $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 消耗速率与 DX 随比生长速率(μ)增大时的变化不一致，可能是因为 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 一是用作为氮源，二是被用来调节细胞生长环境的 pH 与细胞代谢产生的有机酸的多少有关(即代谢的途径有关)。当甘油被甘油激酶作用生成 3-磷酸甘油，接着 3-磷酸甘油被磷酸甘油脱氢酶脱氢生成磷酸二羟丙酮进入糖酵解途径，随后进入三羧酸循环(TCA)时则产有机酸较多，即需要 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 量较大；如果磷酸二羟丙酮经糖原异生途径生成 6-磷酸葡萄糖而进入磷酸戊糖途径(HMP)或以 3-磷酸甘油醛与糖原异生生成的 6-磷酸果糖相结合进入磷酸戊糖途径生成戊糖供细胞生长的组成原料物质，细胞生长环境 pH 调节则需要 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 量较少。由此可推论随比生长速率(μ)变化，在一定条件下细胞代谢底物甘油的途径的强弱关系发生变化，即发生了代谢流迁移变化。

2.6 比生长速率(μ)对细胞代谢呼吸商(RQ)的影响

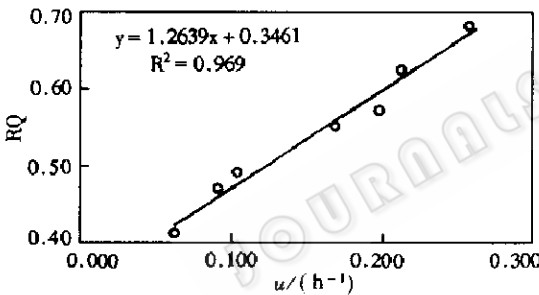


图 6 呼吸商 RQ 与比生长速率(μ)关系曲线

Fig.6 Curve for relation between respiratory quotient and cell specific growth rate

细胞的呼吸商(RQ)是表征微生物生理状态和代谢途径的一重要参数^[11]，试验结果表明随着比生长速率(μ)的增加，细胞代谢的呼吸商(RQ)呈线性的增加(如图 6)(线性相关系数 $r = 0.97$)，由此认为细胞随比生长速率变化时其内在的生理代谢也在发生深刻的变化。当甘油被磷酸甘油激酶催化成磷酸二羟丙酮后进入糖酵解途径和三羧酸循环途径则释放 3 个 CO_2 分子，同时三羧酸循环时有 3 对电子经 NADH 传递给线粒体的膜上的电子传递链上，最后递给 3 分子 O_2 生成

H_2O ，另 1 对电子经 FADH_2 传递给电子传递链，与 1 分子 O_2 反应生成 1 分子 H_2O ，因此甘油完全氧化时 RQ 约为 $3/4(0.75)$ ；当甘油被氧化为磷酸二羧丙酮后进入糖原异生和磷酸戊糖途径时或以 3-磷酸甘油醛直接进入磷酸戊糖途径，根据 1 分子葡萄糖经磷酸戊糖途径产生 6 分子 CO_2 而消耗 12 分子 O_2 ，故其呼吸商(RQ)为 0.5。从在理论上考虑，当呼吸商(RQ)小于 $0.625[(0.75 + 0.50)/2]$ 时，甘油代谢主要是进行糖原异生和磷酸戊糖途径；当呼吸商(RQ)大于 0.625 时，甘油代谢主要是进行糖酵解途径和三羧酸循环途径。在实际培养细胞生长时所测的 RQ 值一般都明显低于理论值，其偏离程度决定于每单位菌体利用基质所形成的产物量^[12]。因此，随着比生长速率(μ)的增大，甘油代谢流从糖原异生和磷酸戊糖途径线性地向糖酵解和三羧酸循环途径迁移，即糖酵解和三羧酸循环途径的代谢流量在线性地增大。

参 考 文 献

- [1] 戴秀玉. 微生物学报, 1997, 37(6): 683 ~ 685.
- [2] Gregg J M., Tschopp J F., Stilman C., et al. *Biol Technology*, 1987, 5: 479 ~ 485.
- [3] 邱荣德, 朱建蓓, 袁中一, 等. 生物工程学报, 1999, 15(4): 477 ~ 481.
- [4] Gregg J M., Madden K R., Barringer K J., et al. *Mol Cell Biol*, 1989, 9: 1316 ~ 1323.
- [5] 欧阳立明, 张惠展, 张嗣良, 等. 生物化学和生物物理进展, 2000, 27(2), 151 ~ 154.
- [6] Invitrogen Corporation (CA, USA), Multi-copy *Pichia expression Kit* (Version B), Catalog no. K1750-01.
- [7] 傅伍尧(译). 化学世界, 1953, 8(10): 366 ~ 367.
- [8] Koti S., Keith E K. *Pichia Pastoris*. In: Klaus W., ed. *Nonconventional yeasts in biotechnology*. Springer Press, 1996. 203 ~ 253.
- [9] 山根恒夫(周 斌译). 生物反应工学. 第一版. 西安: 西北大学出版社, 1982. 108 ~ 123.
- [10] Yinliang C., Julia C. *Process Chem*, 1997, 32(2), 107 ~ 111.
- [11] 伦世仪. 生化工程. 北京: 中国轻工业出版社, 1993. 230 ~ 238.
- [12] 俞俊棠, 唐孝宣. 生物工艺学. 第二版. 上海: 华东理工大学出版社, 1992. 117 ~ 156.

STUDIES ON CHARACTERISTICS OF KINETICS AND METABOLIC SHIFT OF GENETICALLY ENGINEERED YEAST *PICHTIA PASTORIS* IN HIGH-DENSITY CHEMOSTAT CULTIVATION*

Guo Meijin^{1,2} Wu Kanghua¹ Zhuang Yingping¹ Chu Jü¹ Zhang Siliang¹

(¹ State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science & Technology, Shanghai 200237, China)

(² R & D Center for Biotechnology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: Kinetics and metabolic shift of DNA recombinant yeast *Pichia pastoris* was studied in high-density chemostat cultivation in which the glycerol was used as a limited substrate. The experimental results showed that (1) cell optical density (OD_{600}) of *Pichia pastoris* was linear with its dry cell weight (DCW) and wet cell weight (WCW), and reached $100 OD_{600} = 128.3 g^{WCW}/L$ or $100 OD_{600} = 22.9 g^{DCW}/L$; (2) The relationship of specific growth rate (μ) and residual concentration of glycerol is accorded with Monod Equation, to obtain $\mu = \mu_{max} S / (K_s + S)$, where $\mu_{max} = 0.366 h^{-1}$, $K_s = 0.1823 g/L$. The maximum cell yield of glycerol substrate $Y_G = 0.54 g/g$, growth maintaining coefficient $m = 0.0069 g/(g \cdot h)$, The cell yield of oxygen $Y_{X/O_2} = 30.96 g/mol$, and the optimum theoretical dilution rate $D_m = 0.341 h^{-1}$ by parameter inference; (3) With specific growth rate (μ) increasing, glycerol metabolic flux shifts linearly from glycogenesis and hexosephosphate pathways to glycolysis and tricarboxylic acid cycle pathways on basis of variations of consumption rate of $NH_3 \cdot H_2O$ and respiratory quotient value.

Key words: Methylophilic *Pichia pastoris*, Chemostat cultivation, Metabolism shift, Kinetics, Recombinant human serum albumin

符号说明:

CER - 二氧化碳释放率, $\text{mmol CO}_2/(\text{h}\cdot\text{L})$; DCW - 细胞干重, g/L ; DO - 溶解氧百分比浓度, %; D_m - 理论最适稀释速率, h^{-1} ; K_s - 微生物对底物的半饱和常数, g/L ; m - 菌体生长维持系数, $\text{g}/(\text{g}\cdot\text{h})$; OD_{600} - 细胞光密度值; OUR - 耗氧速率, $\text{mmol O}_2/(\text{h}\cdot\text{L})$; q_s - 底物比消耗速率, g/g ; Q_{CO_2} - 二氧化碳比释放率, $\text{mol CO}_2/(\text{g}\cdot\text{h})$; RQ - 呼吸熵; R^2 - 线性相关系数的平方值; R - 线性相关系数; F_{in} - 进料流量, g/h ; F_{out} - 出料流量, g/h ; S_0 - 甘油底物进料浓度 g/L ; S - 甘油底物残留浓度, g/L ; μ - 比生长速率, h^{-1}

μ_{max} - 最大比生长速率, h^{-1} ; WCW - 细胞湿重, g/L ; X - 菌体细胞干重, g/L ; $Y_{X/S}$ - 底物得率系数, g/g ; Y_C - 底物最大得率系数, g/g ; Y_{X/O_2} - 氧气得率系数, g/g .