

重组巴氏毕赤酵母高密度发酵表达 rHSA^{*}

郭美锦¹ 庄英萍¹ 储 炬¹ 张嗣良^{1**} 刘志敏²

(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 军事医学科学院生物工程研究所 北京 100071)

摘 要:对基因工程菌 *Pichia pastoris* 的摇瓶发酵条件进行了试验,并根据摇瓶发酵的优化结果进行了补料分批高密度发酵。在摇瓶发酵时,甲醇诱导基因工程菌 *P. pastoris* 表达重组人血清白蛋白的发酵周期为 96h;甲醇的最佳诱导浓度为 10g/L;发酵 pH 范围为 5.72 ~ 6.59;在摇瓶培养时,随着接种量的增加,虽然目的蛋白表达量缓慢增加,但单位细胞光密度的蛋白产率却明显下降,符合 $y = 12.941x^{-0.5059}$ 方程(线性相关系数 $r = 0.9789$),其限制性因子很可能为溶氧。在分批发酵,接种量为 10% 且种子细胞光密度(OD_{600})为 20 左右时,细胞生长的延迟期为 2.11h 左右,细胞生长光密度与培养时间的关系模型为: $y = 0.7841e^{0.2319x}$ (线性相关系数 $r = 0.9936$);在补料发酵时细胞干重浓度可达到 115g/L—160g/L,在 120h 重组人血清白蛋白表达量最大达到 3.6g/L。

关键词: 重组巴斯德毕赤酵母, 高密度发酵, 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 (2002) 01-0062-07

人血清白蛋白(Human Serum Albumin, HSA)是血浆中含量最高的蛋白质,含 17 对二硫键,由 585 个氨基酸组成分子量为 67kD 的蛋白质,主要起维持血液的正常渗透压和输送亲水分子的作用,用于治疗大量失血、烧伤、休克、水肿及低蛋白血症等^[1]。临床上人血清白蛋白主要是从血液中通过分级过滤得到,这样得到的人血清白蛋白十分昂贵;同时,血液本身也有问题,例如,其中可能携带肝炎病毒、爱兹病毒等。为了解决这个问题,随着基因重组技术的发展和完善,许多科学家已把人血清白蛋白 cDNA 克隆到各种宿主细胞,如 *B. subtilis*^[2]、*S. cerevisiae*^[3]、动物细胞^[4] 和植物细胞^[5] 等,但由于细菌的后加工,如糖基化、外源蛋白分泌表达等不够理想等^[6] 和转基因动、植物细胞的表达水平和技术对工业化仍存在很多问题^[7],因此很多研究者较主张采用真核细胞如酵母来表达重组人血清白蛋白(rHSA)。在酵母宿主菌中甲醇营养型毕赤酵母(Methylotrophic *Pichia pastoris*)具有表达量高、外源蛋白分泌性好、外源基因遗传性稳定等优点。RCTech 公司用 *P. pastoris* 发酵单罐最高表达 rHSA 水平达 3.39g/L^[8],最近杨晟等报道 rHSA 发酵水平为 1.0g/L^[9]。我们根据人血清白蛋白的基因组成和毕赤酵母的偏爱密码子合成了 HSA cDNA 并重组到毕赤酵母染色体上(另文报道),同时对基因工程菌毕赤酵母高密度发酵表达重组人血清白蛋白的工艺优化进行了研究,在 15L 多参数全自动发酵上高密度发酵,连续四批细胞光密度(OD_{600})达 500 以上,重组人血清白蛋白表达量达 3.6g/L 左右,现报道试验结果。

^{*} 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,博士研究生,江西省吉安市青源区人,研究方向为发酵过程参数检测与控制。

收稿日期:2001-01-02,修回日期:2001-05-18

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_{AOX1}, 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构建。

1.1.2 培养基:平板培养基为 YPD 培养基^[10]; 种子培养基改良 BMGY 非诱导培养基^[11]; 分批发酵培养基是用 FM21 基础盐配成含甘油 6% (w/v) 和 4mL/L PTM1 微量元素溶液^[10]; 补料生长培养基为 50% 甘油 (W/V, 含 12mL/L PTM1) 补料液; 发酵诱导培养基为 100% 甲醇 (含 12mL/L PTM1) 诱导液。

1.2 方法

1.2.1 摇瓶发酵方法:从平板上挑单菌落, 接入到摇瓶生长培养基 (20mL/250mL 三角瓶) 中, 30℃, 220r/min 培养 20~24h, OD₆₀₀ 约 20 左右。离心摇瓶生长培养基, 弃去上清液, 按摇瓶生长培养基体积与摇瓶诱导培养基体积之比为 1:1, 接入摇瓶诱导培养基 (20mL/250mL 三角瓶), 30℃, 220r/min 培养 96~120h。每 24h 补加 100% 甲醇 (A.R) 至一定终浓度。放瓶离心后, 取上清液进行分析。

1.2.2 补料高密度发酵方法:从新鲜 YPD 平板上挑一单菌落到种子培养基中, 30℃, 220r/min 培养 20~25h 后, 按 10% 接种量接入到装 6L 分批发酵培养基的 15L 发酵罐中进行分批培养 (用氨水调 pH 至 5.5 左右), 当碳源甘油耗尽后, 溶氧 (Dissolved oxygen, DO) 陡然上升, 开始流加补料生长培养基 (流加速率维持溶氧大于 20%)。当细胞光密度 (OD₆₀₀) 为 500~700 时停止补料, 甘油耗尽后补入发酵诱导培养基进行诱导表达培养 (pH 用 25% NH₃·H₂O 控制为 5.7~7.0), 通过调节转速、罐压、空气流量和流加甲醇速度使溶氧大于 20%, 并使发酵液中甲醇浓度小于 10g/L, 诱导发酵 100h 左右。FMG-15L 全自动发酵罐为华东理工大学国家生化工程技术研究中心 (上海) 提供。

1.2.3 pH:pH 电极在线检测并采用 PID 闭环控制方式控制 (GIO80pH 电极为华东理工大学国家生化工程技术中心研制)。

1.2.4 溶氧 (Dissolved Oxygen, DO):溶氧电极在线检测 (瑞士 Ingold 公司产品 CD951-06)。

1.2.5 尾气分析:排气 O₂ 为热磁氧分析仪 (Magnos 4G) 在线检测; 排气 CO₂ 采用不分光红外仪 (Uras 3G) 在线检测 (德国 H&B 公司和重庆川仪九厂合资生产, 精度 0.02%); 单位发酵液体积细胞耗氧速率 (Oxygen Uptake Rate, OUR, mmol·L⁻¹·h⁻¹) 和单位发酵液体积细胞二氧化碳释放速率 (CO₂ Evolution Rate, CER, mmol·L⁻¹·h⁻¹) 按文献 [12] 计算。

1.2.6 甘油浓度分析:采用高碘酸钠氧化滴定法^[13]。

1.2.7 细胞光密度 (OD₆₀₀) 分析:菌液稀释后于波长 600nm 处以去离子水为对照进行比色测定 OD₆₀₀ = OD 读数 × 稀释倍数。

1.2.8 甲醇浓度分析:气相色谱 (GC) 分析^[14]。

1.2.9 rHSA 分析:按文献 [15] SDS-PAGE 凝胶电泳, 然后电泳胶经计算机扫描根据电泳带染色强度进行定量分析 (GIS-1000 数码凝胶图像分析系统, 2.0 版本, 按说明书操作, 背景

消除按自动进行,低分子标准蛋白为上海丽珠东风生物技术有限公司产品)。

2 结果

2.1 基因工程菌 *P. pastoris* 甲醇诱导培养表达 rHSA

按摇瓶培养方法对基因工程菌毕赤酵母(*P. pastoris*)用 5g/L 甲醇浓度诱导培养 120h, 每 24h 取二个发酵瓶进行分析,结果见表 1(表中数据为 2 个发酵瓶平均值)。

表 1 重组毕赤酵母诱导培养过程表达 rHSA 结果

Table 1 rHSA expression in recombinant *P. pastoris* at shake flask cultivation

Time/h	Broth volume/mL	pH	Cell optical density/ <i>OD</i> ₆₀₀	rHSA concentration/(mg/L)
0	20.0	6.07	21.5	0
24	18.0	6.7	27.0	35
48	17.5	6.84	27.74	120
72	17.5	6.68	29.84	175
96	17.0	6.68	34.85	296
120	15.5	6.69	37.98	283

在 120h 的甲醇诱导培养过程中,诱导培养前 48h 时 pH 逐渐上升至 6.84,46h 后 pH 一直较平稳,保持在 6.7 左右。在整个培养过程中,甲醇诱导培养 24h 内,细胞生长较快,此后细胞光密度基本不变(除摇瓶体积风干因素外);当诱导培养至 96h,基因工程菌毕赤酵母的 rHSA 逐渐上升,最大蛋白表达量为 296mg/L,继续培养至 120h 时,则蛋白表达量下降,约为 283mg/L,并体积较少。因此,在甲醇诱导培养基因工程菌(*P. pastoris* 表达重组人血清白蛋白时的最佳放瓶时间为 96h)。

2.2 甲醇浓度对基因工程菌 *P. pastoris* 表达 rHSA 的影响

按摇瓶培养方法每 24h 分别补加甲醇使其在培养基中浓度为 5、10、20、30、40、50g/L, 诱导培养 96h,结果见表 2(表中数据为 2 个发酵瓶平均值)。

表 2 甲醇浓度对重组 *P. pastoris* 表达 rHSA 影响结果

Table 2 Effects of methanol concentration on rHSA expression in recombinant *P. pastoris*

Methanol concentration /(g/L)	pH	Cell optical density / <i>OD</i> ₆₀₀	rHSA concentration /(mg/L)	Residual conc. of methanol /(g/L)
5	6.59	29	295.84	0.5
10	6.45	40	365.46	5.8
20	6.43	37.5	237.95	11.5
30	6.50	32.5	137.02	15.0
40	6.51	28.75	123.29	15.8
50	6.53	23.5	106.33	17.7

在甲醇浓度为 10g/L 时毕赤酵母表达目的蛋白量达到最高,这可能是当甲醇浓度小于 10g/L,甲醇成为限制性底物,限制了蛋白的表达;当浓度高于 20g/L 时,甲醇浓度过高,对目的蛋白的表达也有抑制作用。因此,在摇瓶条件下,甲醇的最佳诱导浓度为 10g/L。

2.3 pH 对基因工程菌 *P. pastoris* 表达 rHSA 的影响

按摇瓶培养方法把菌种接至用 0.2mol/L 的磷酸缓冲液配制好的摇瓶诱导培养基中,

pH 分别为 5.43、5.72、5.84、5.98、6.29、6.59 和 7.05, 每 24h 加甲醇至终浓度 10g/L 进行诱导培养。

由基因工程菌 *P. pastoris* 表达目的蛋白和细胞光密度曲线(图 1)可以看出, pH 为 5.84 时目的蛋白表达量最高。pH 为 5.43 时, 目的蛋白基本没有表达, 但细胞光密度极大, 说明在低 pH 值条件下, 适合细胞生长而不适合目的蛋白表达; 当 pH 值在 5.72—7.00 时, 细胞光密度基本相同, 而目的蛋白表达量基本是呈逐渐下降的趋势, pH 为 7.05 时, 目的蛋白表达量明显下降。因此, 既利于 *P. pastoris* 细胞生长又利于目的蛋白高表达的 pH 范围为 5.72 ~ 6.59。

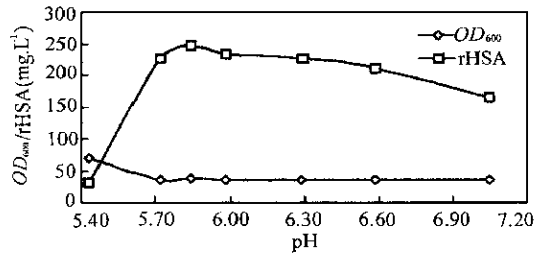


图 1 pH 对细胞生长和蛋白表达的影响

Fig.1 Effects of pH on cell optical density and rHSA concentration

2.4 接种量对基因工程菌 *P. pastoris* 表达 rHSAs 的影响

按摇瓶培养方法培养细胞, 根据摇瓶生长培养基体积与摇瓶诱导培养基体积之比分别为 0.25:1, 0.5:1, 1:1, 1.5:1, 2:1, 2.5:1 离心摇瓶生长培养基中菌体, 弃去上清液, 分别接入摇瓶诱导培养基中, 培养 96h(每 24h 补加甲醇终浓度为 10g/L)。

接种量的增加, 细胞光密度 (OD_{600end}) 呈上升的趋势, 但细胞光密增率 (OD_{600end}/OD_{600ini}) 却呈下降趋势(表 3), 通过对放瓶细胞光密度与接种初始细胞密度的比值 (OD_{600end}/OD_{600ini}) 与接种量进行最小二乘法线性回归, 得到它们的关系为幂函数, 方程为:

$$y = 12.941x^{-0.5059} \quad (\text{线性相关系数 } R = 0.9789) \dots\dots\dots (1)$$

其中: x—接种量 (OD_{600ini}) y—细胞光密度增长倍数 (OD_{600end}/OD_{600ini})

随着接种量的增加, 目的蛋白表达量缓慢增加, 但是单位细胞光密度的蛋白产率却明显下降, 尤其当接种细胞光密度 (OD_{600ini}) 为 5 ~ 30 时, 单位菌体细胞光密度的蛋白表达产率几乎呈直线下降。从甲醇残浓度(表 3)和 NH_2-N 浓度(数据未列)可知: 虽然接种量增加, 但碳、氮源并没有明显受限制, 由此推测摇瓶培养时限制性因子很可能为溶氧, 这是 *P. pastoris* 高密度发酵的主要限制因素之一。

表 3 接种量对基因工程菌 *P. pastoris* 表达 rHSA 影响结果

Table 3 Effects of seed volume on rHSA expression in recombinant *P. pastoris*

Initial cell optical density / OD_{600ini}	pH	Cell optical density after culture / OD_{600end}	rHSA conc. / (mg/L)	Productivity / (mg/ OD_{600})	OD_{600end}/OD_{600ini}	Residual conc. of methanol / (g/L)
5	6.60	31.2	278.1	8.913	6.24	6.33
10	6.61	38.8	299.4	7.716	3.88	6.06
20	6.65	49.7	285.6	5.746	2.48	5.49
30	6.7	65.7	292.6	4.453	2.19	4.09
40	6.63	89.1	338.9	3.804	2.23	3.43
50	6.67	93.2	364.2	3.907	1.86	2.95

Note: Experimental treatment was 2.

2.5 基因工程菌 *P. pastoris* 高密度发酵

以摇瓶表达 rHSA 的优化结果,进行补料分批高密度发酵。

2.5.1 分批发酵基因工程菌 *P. pastoris* 细胞生长模型:在 15L 发酵罐上进行分批培养,通过对细胞光密度的对数($\ln OD_{600}$)与分批发酵时间(t)进行线性回归,得:

$$\ln(OD_{600}) = 0.2489t - 0.5252 \quad \dots\dots\dots (2)$$

当 $\ln(OD_{600}) = 0$ 时, $t = 2.11$, 即接种量为 10% 种子且细胞光密度 (OD_{600}) 为 20 左右时,细胞生长的延迟期为 2.11h 左右。这可能是由于摇瓶种子培养基比发酵罐培养基营养物质更为丰富,引起细胞初接入发酵罐时出现了一段时间的适应期。分批培养 22h 后,细胞光密度 (OD_{600}) 达到 133, 由于 $1 OD_{600} = 0.229g^{DCW}/L^{[16]}$, 经计算分批发酵阶段底物甘油细胞得率系数 ($Y_{w,s}$) 为 $0.50g/g$, 与恒化培养结果相吻合^[16]。

假设接种后细胞生长密度与时间的关系符合指数生长模型:

$$y = ae^{bx} \quad \dots\dots\dots (3)$$

通过对式 3 变形得: $\ln y = \ln a + bx \quad \dots\dots\dots (4)$

再把 $\ln y$ 对 x 进行线性回归,得到式 3 的参数,即细胞生长光密度与培养时间的关系模型为: $y = 0.7841e^{0.2319x} \quad \dots\dots\dots (5)$

其中: y 为细胞光密度, t 为培养时间,线性相关系数 $r = 0.9936$ 。

重组 *P. pastoris* 分批发酵时细胞生长及其指数模拟曲线如图 2 所示。

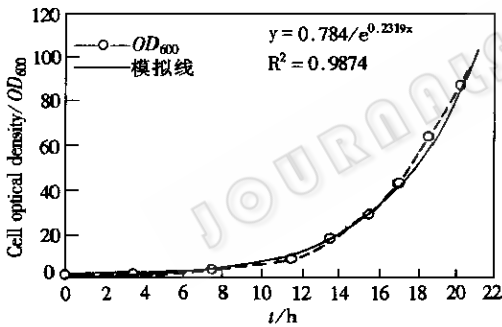


图 2 重组 *P. pastoris* 分批发酵时细胞生长及其指数模拟曲线

Fig.2 Curves for cell optical density and its simulative line during recombinant *P. pastoris* batch fermentation

因此,当碳、氮、氧源供应充足时,可以按指数方程(5)来进行指数流加模式补料,达到高密度发酵的目的,这也是细菌、酵母高密度发酵的三大策略之一^[17,18]。但在实际实验中,往往供氧是一个限制性因子,尤其是高密度发酵。在细胞生长的高密度发酵后期,补料需根据发酵罐的供氧能力(如氧传递速率(OTR))和细胞的耗氧能力(如氧耗速率(OUR))等来进行操作。

2.5.2 补料高密度发酵表达 rHSA 结果:22h 分批发酵结束后,开始流加补料发酵培养基,通过控制流加速率,以控制溶氧浓度(DO)在 20% 以上,在较短时间内获得最大细胞光密度。

在 46h 左右细胞光密度 (OD_{600}) 达到 600,基本达到高密度发酵的目的,停止流加补料发酵培养基,当溶氧陡然上升达到 70% 以上时(1min 左右),开始流加诱导表达培养基以启动 P_{AOX1} 表达目的蛋白。在表达外源蛋白阶段,控制诱导表达培养基的补料速率,以维持溶氧浓度在 20% 以上。在补加甲醇之前(46h 之前),重组人血清白蛋白含量几乎为零,开始补加后,重组人血清白蛋白浓度迅速升高,在发酵 120h rHSA 表达量最大达到 3.6g/L,以后目的蛋白量基本保持不变(图 3,4)。

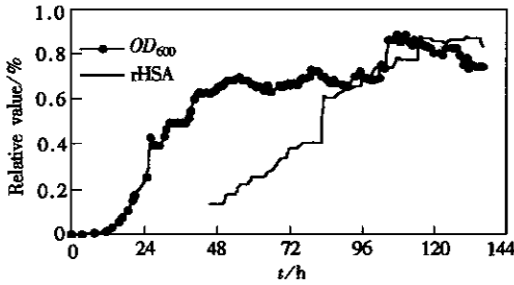


图3 重组 *P. pastoris* 补料分批发酵时细胞生长及蛋白表达曲线图

Fig.3 Curves for cell optical density and rHSA expression in recombinant *P. pastoris* cultivation

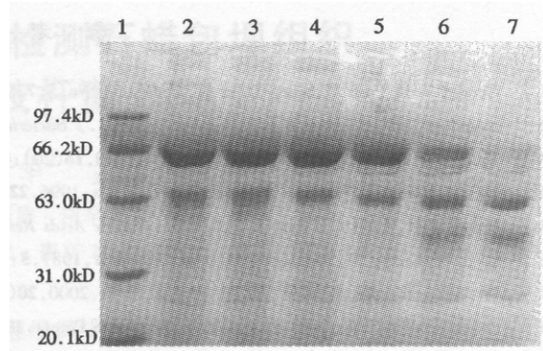


图4 rHSA 电泳分析

Fig.4 rHSA SDS-PAGE analysis

1. Marker; 2. 120h sampler; 3. 104h sampler;
4. 88h sampler; 5. 72h sampler; 6. 56h sampler;
7. 46h sampler (20 μ L per well).

3 讨论

高密度发酵是基因工程菌提高外源蛋白表达量的重要策略之一。山根恒夫^[18]认为酵母细胞在发酵液中理论最大的密度为 280g^{DCW}/L (Dry Cell Weight, DCW), 在工业发酵时细胞浓度达到 30g/L 则认为是高密度发酵, 目前发酵过程中一般认为酵母细胞密度为 100 ~ 200g^{DCW}/L 则为高密度发酵。在 15L 多参数全自动发酵罐上进行了连续四批发酵毕赤酵母的细胞光密度均可达到 500—700, 即细胞干重浓度可达到 115 ~ 160g/L, 达到了高密度发酵的目的, 并且重组人血清白蛋白的表达量达到 3.6g/L, 而 PCTech 公司用 *P. pastoris* 发酵单罐最高表达 rHSA 水平达 3.39g/L^[8], Kaoru 等报道 rHSA 的稳定表达水平为 1.4g/L^[20], 其诱导表达周期很长, 一般均达到 8 ~ 10d, 蛋白产率并不高。杨晟等报道 rHSA 发酵水平为 1.0g/L^[9], 其主要是基因构建水平通过改变分泌信号肽, 采用酿酒酵母 AMF 前导肽比人血清白蛋白自身的天然前导肽按 Invitrogen fermentation guideline 进行发酵表达量要提高 10%。通过对在 15L 多参数全自动发酵罐的发酵过程参数相关分析, 我们观察到在分批发酵阶段, 当细胞的比生长速率(μ) 逐渐增大时, 细胞代谢的呼吸商(RQ) 由 0.5 到 0.75 逐渐增大, 经过恒化培养试验证实这是细胞代谢甘油基质时随着细胞比生长速率的增大代谢流发生了迁移变化所致, 而当甘油基质耗尽后, 氧消耗速率(OUR) 和二氧化碳释放速率(CER) 立刻下降, RQ 则迅速上升至 0.8 以上, 氨水的消耗速率立即为零。在甲醇诱导基因工程菌 *P. pastoris* 表达 rHSA 阶段, OUR 和 CER 通常较平稳, 约为 120 ~ 160mmol/(L·h), RQ 维持在 0.6 ~ 0.7, 当甲醇浓度不足时, RQ 明显大于 0.8, 此阶段的蛋白表达调控机理正在进一步研究, 有关 *Pichia pastoris* 发酵时最大 OUR 和 CER 的变化范围和呼吸商(RQ) 的变化规律未见报道。

致谢 98 级生化工程专业硕士生吴康华同学, 96 级生物工程专业本科生胡光星同学参与部分试验工作, 特此致谢!

参 考 文 献

- [1] Goodey A R, Park M, Sleep D, et al. US Patent, No. 5,728,553.
- [2] Saunders C W, Schmidt B J, Richard L M, et al. *J Bacteriol*, 1987, **269**(7):2917 ~ 2925.
- [3] Kalman M, Imre C. *Nucleic Acids Research*, 1990, **18**(20):6075 ~ 6081.
- [4] Ilan N, Barash I, Faerman A, et al. *Exp Cell Res*, 1996, **224**(1):28 ~ 38.
- [5] Pieper F R, Wit I C, Pronk A C J, et al. *Nucleic Acids Res*, 1992, **20**(6):1259 ~ 1264.
- [6] Latta M, Knapp M, Sarmientos P, et al. *Bio/tech*, 1987, **5**:1309 ~ 1313.
- [7] 郭美锦, 储 炬, 张嗣良, 等. 生物工程进展, 2000, **20**(5):39 ~ 42
- [8] Sreekrishna K, Tschopp J F, Thill G P, et al. US Patent, 1998, No. 5,707,828.
- [9] 杨 晟, 黄 鹤, 袁中一, 等. 生物工程学报, 2000, **16**(6):675 ~ 678.
- [10] 郭美锦, 吴康华, 张嗣良, 等. 微生物学通报, 2001, **28**(3):6 ~ 11.
- [11] 俞俊堂, 唐孝宣. 生物工艺学第二版. 上海: 华东理工大学出版社, 1997. 146 ~ 147.
- [12] 傅伍尧(译). 化学世界, 1953, **8**(10):366 ~ 367.
- [13] 赵 霞. 重组大肠杆菌高密度发酵培养特性研究. 上海: 华东理工大学, 1995. 37 ~ 40.
- [14] 雅克布鲁克等著(金冬雁, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南. 第二版. 北京: 科学出版社, 1998. 780 ~ 889.
- [15] 郭美锦, 储 炬, 张嗣良, 等. 微生物学报, 2001, **41**(5):617 ~ 624.
- [16] Yee L, Chang B H. *Biotechnol Lett*, 1993, **15**:971 ~ 974.
- [17] Lee J H, Choi Y H, Kang S K. *Biotechnol Lett*, 1999, **11**:695 ~ 698.
- [18] 山根恒夫著(周斌编译). 生化反应工程. 西安: 西北大学出版社, 1992. 241 ~ 242.
- [19] Kaoru K, Shinobu K, Takao O, et al., *Journal of Bioscience & Bioengineer*, 2000, **89**(1):55 ~ 61.

Expression of Recombinant Human Serum Albumin in Genetically Engineered *Pichia pastoris* in High-density Fermentation*

Guo Meijin¹ Zhuang Yingping¹ Chu Ju¹ Zhang Siliang^{1**} Liu Zhimin²

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

(² Institute of Biotechnolog, Academy of Military Medical Science, Beijing 100071, China)

Abstract: The optimum culture conditions of genetically engineered *Pichia pastoris* in shake-flask cultivation and in fed-batch fermentation were investigated respectively in this paper. It showed that the cultural period induced with 5g/L methanol is 96h, optimum methanol concentration is 10g/L, and pH range is 5.72 ~ 6.59 in shake-flask culture. Although the seed inoculum amount increased, the target protein productivity per cell optical density was decreased. Their relationship fit the equation $Y = 12.941x^{-0.5059}$ ($r = 0.9789$, where x is inoculating OD_{600} , Y is protein productivity per cell optical density), we postulated that the restricting factor may be dissolved oxygen (DO) at shake-flask culture. With the 10% inoculum and 20 OD_{600} of seed, the lag phase of cell growth is 2.11h in batch cultivation, and the relationship between cell optical density (Y) and culture time (t) is $Y = 0.7841e^{0.2319t}$ ($r = 0.9936$); The cell dry weight of broth reached 115 ~ 160g/L and the maximum rHSA concentration was 3.6g/L at the 120th at the fed-batch fermentation phase.

Key words: Genetically engineered *Pichia pastoris*, High-density fermentation, rHSA

* Granted by national natural science foundation (29970163) and by college backbone teacher plan of Education ministry

** Corresponding author