

# 原核体系大规模发酵的工艺规划与思考

2020年09月

# 目录

1

原核体系基因重组技术

2

原核体系发酵工艺的规划

3

原核体系发酵规模放大

1

# 原核体系基因重组技术

# 发酵的发展历程

自然发生说

17世纪  
之前

1676年  
列文·虎克用自制的显微镜发现微生物，对“自然发生说”提出质疑。

1857年  
巴斯德“曲颈瓶实验”，彻底否定了生命的自然发生说。

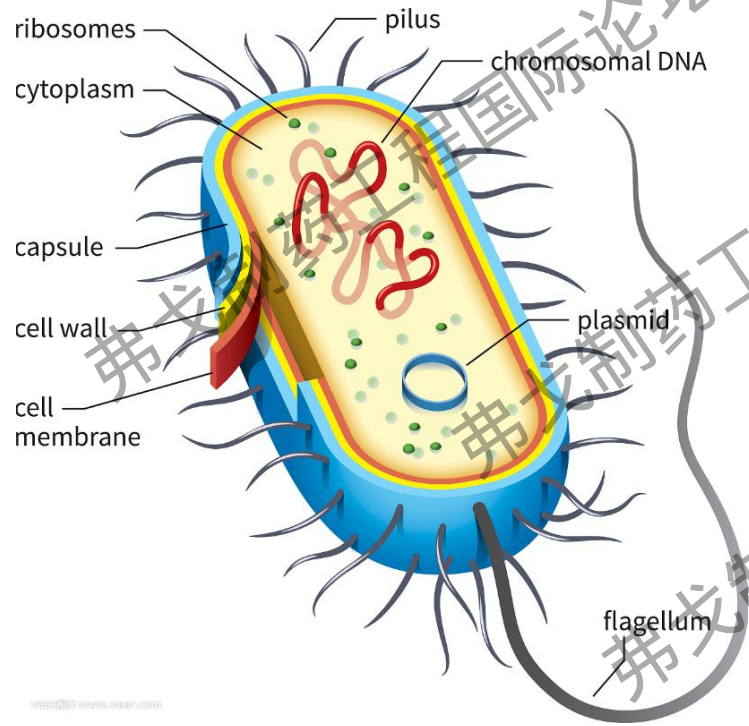
2020年  
发酵设备逐渐实现高度自动化和基因工程技术的不断发展，使发酵工业产生革命性的变化。

1953年  
沃森和克里克发现了DNA双螺旋的结构，开启了分子生物学时代。

1982年  
美国Lilly公司首先将重组胰岛素投放市场，标志着第一个重组蛋白质药物的诞生。

2020年

# 原核表达体系



原核生物细胞示意图

广义的原核表达，是指发生在原核生物内的基因表达。

狭义的原核表达，常出现于生物工程中。是指通过基因克隆技术，将外源目的基因，通过构建表达载体并导入表达菌株的方法，使其在特定原核生物或细胞内表达。

主要包括大肠杆菌表达系统和枯草芽孢杆菌表达系统，其中应用**最为广泛的是大肠杆菌表达系统。**

# 原核表达体系—大肠杆菌表达的优劣势

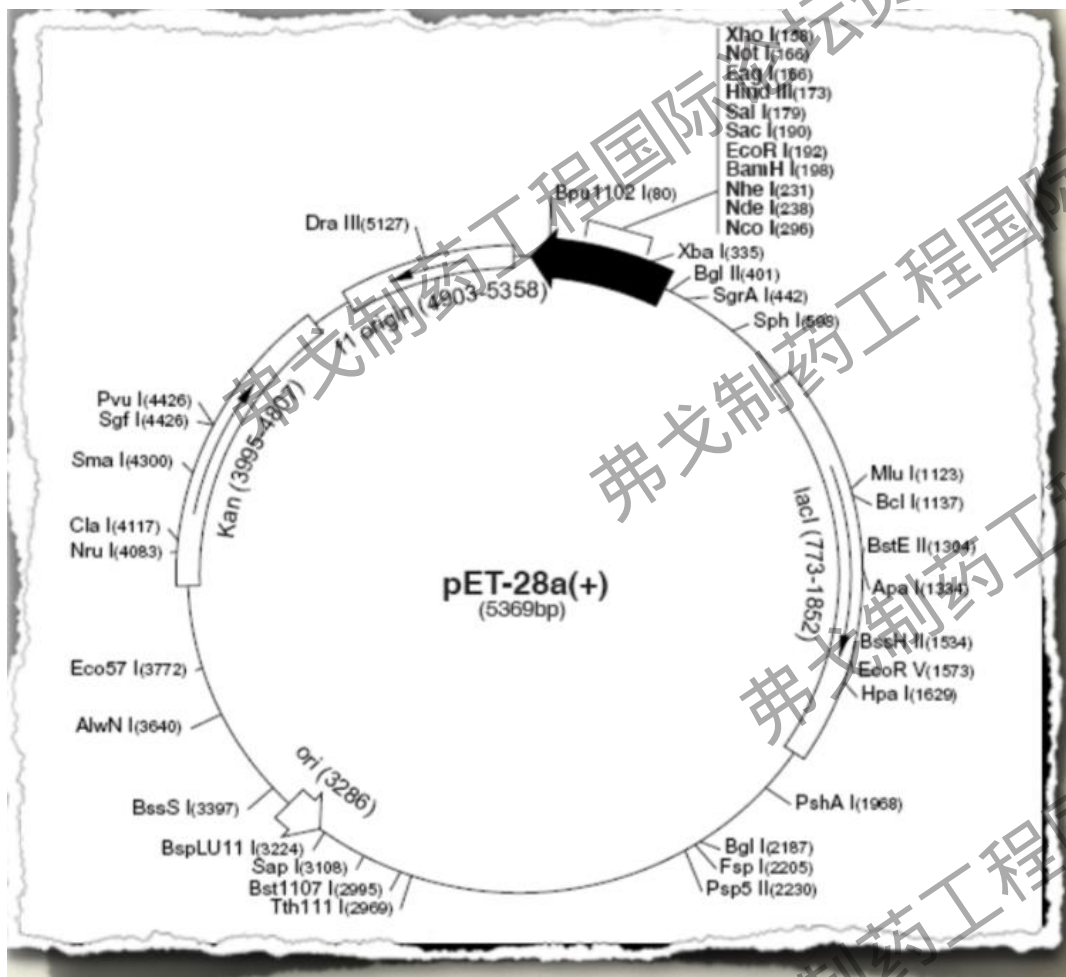
## 优点

大肠杆菌具有**培养条件简单、生长繁殖快、安全性好**可以**高效表达**不同外源基因产物等特点，是许多外源基因表达系统中最好的一种，是目前研究**最深入、发展也最完善**的表达系统，大量的有价值的多肽和蛋白质已在大肠杆菌中获得了超量表达。

## 缺点

高效表达易形成包涵体不能进行翻译后的加工修饰,如糖基化、磷酸化及酰基化等。

# 原核表达体系—质粒



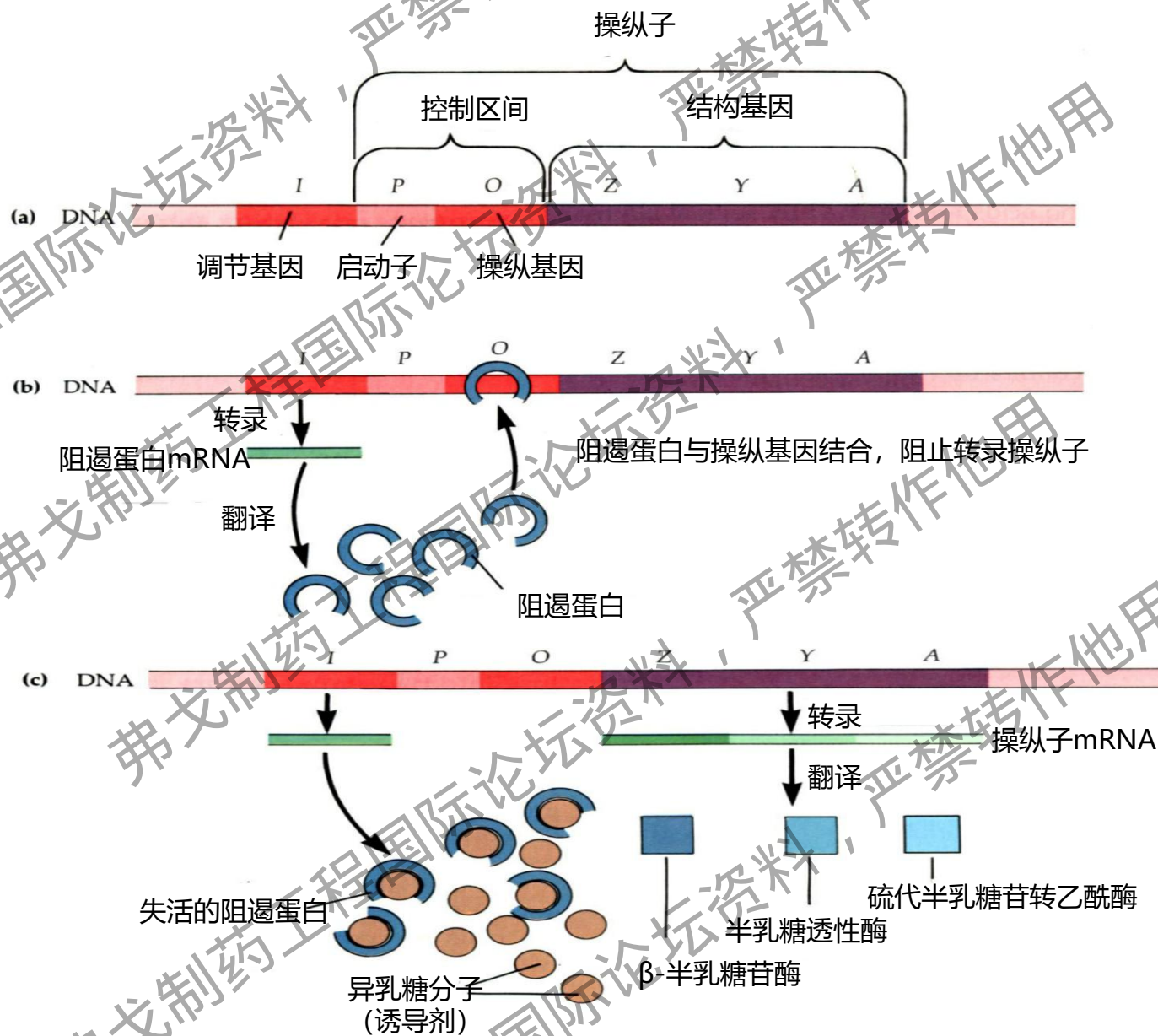
质粒是一种裸露的、结构简单、独立于细菌拟核DNA之外，并具有自我复制能力的很小的双链环状DNA分子。目前，已经开发出许多高效表达外源基因的载体。

质粒携带有能在细菌中高效表达的转录系统。当外源基因克隆在这些载体合适的多克隆位点后，便可实现外源基因在特殊细菌中的大量表达。

结合蛋白纯化技术（例如色谱柱纯化分离技术），便可得到高纯度的目标蛋白。

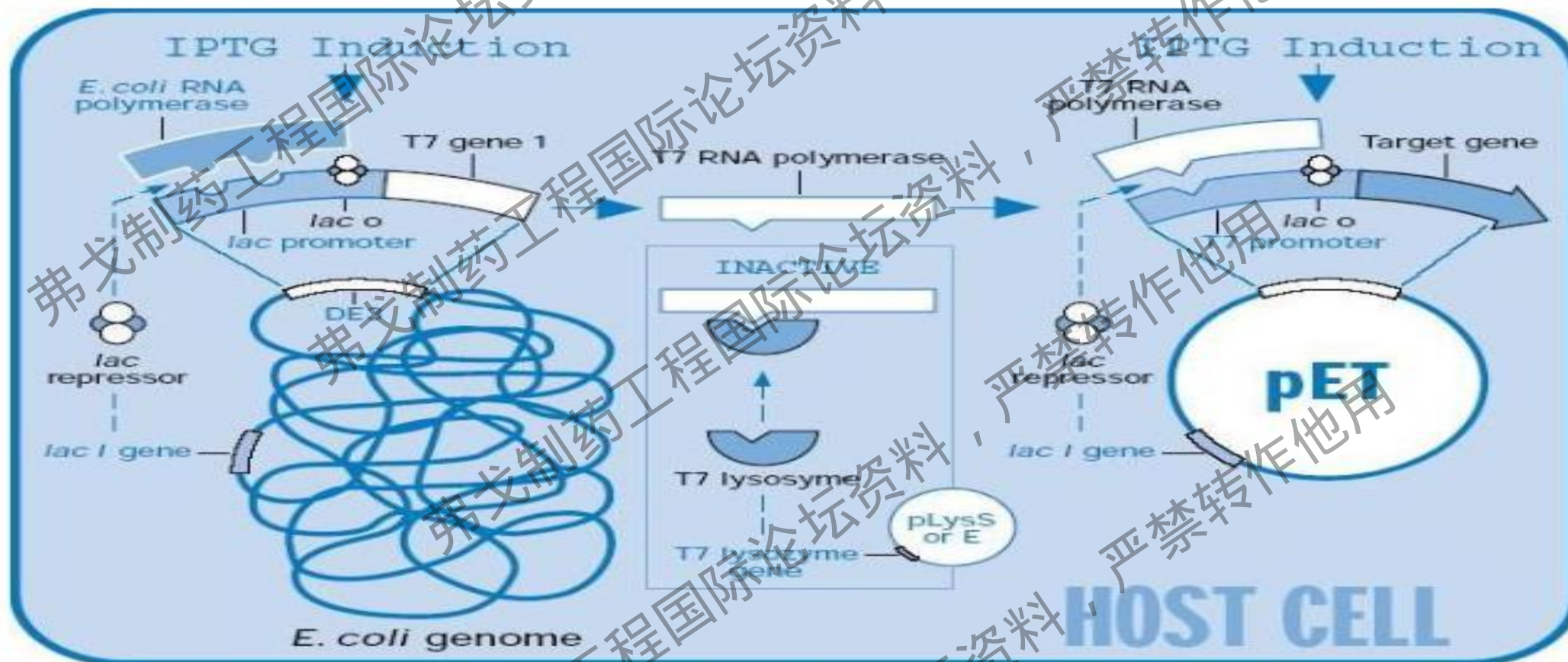


# 原核表达过程





# 原核表达过程



BL21 (DE3) 宿主菌  
pET载体

# 原核体系发酵工艺的规划

2

弗戈制药工程国际论坛资料，严禁转作他用

# 《生物制品》菌种的要求

生物制品的制备方法是控制产品质量的关键因素，生物制品的生产和质量控制应当符合国家的相关规定。《生物制品》（2020年4月23日，2020年第58号公告修订）对菌种管理有明确规定，部分列举如下：

- 第三十六条** 生产和检定用菌毒种应当建立完善的种子批系统（原始种子、主种子批和工作种子批）。菌毒种种子批系统的建立、维护、保存和检定应当符合《中华人民共和国药典》的要求。
- 第三十七条** 应当通过连续批次产品的一致性确认种子批、细胞库的适用性。种子批和细胞库建立、保存和使用的方式，应当能够避免污染或变异的风险。
- 第三十九条** 应当在适当受控环境下建立种子批和细胞库，以保护种子批、细胞库以及操作人员。在建立种子批和细胞库的过程中，操作人员不得在同一区域同时处理不同活性或具有传染性的物料（如病毒、细胞系或细胞株）。
- 第四十二条** 不同种子批或细胞库的贮存方式应当能够防止差错、混淆或交叉污染。生产用种子批、细胞库应当在规定的贮存条件下在不同地点分别保存，避免丢失。
- 第四十三条** 在贮存期间，主种子批和工作种子批储存条件应当一致；主细胞库和工作细胞库的储存条件应当一致；另有批准或规定的按照批准或规定的条件储存。一旦取出使用，不得再返回库内贮存。

# 《生物制品》细胞培养和发酵的法规要求

药品生产质量管理规范 附录《生物制品》

## 第四十八条

培养基/培养液应与批准的一致；用于微生物检查目的培养基应进行适用性检查；培养基中不得添加未经批准的物质。禁止使用来自牛海绵状脑病疫区的牛源性材料，并应符合《中华人民共和国药典》的相关要求

## 第四十九条

向发酵罐或其它容器中加料或从中取样时，应当检查并确保管路连接正确，并在严格控制的条件下进行，确保不发生污染和差错。

## 第五十一条

培养基宜在线灭菌。向发酵罐或反应罐中通气以及添加培养基、酸、碱、消泡剂等成分所使用的过滤器宜在线灭菌。

## 第五十二条

应当采用经过验证的工艺进行病毒去除或灭活处理，操作过程中应当采取措施防止已处理的产品被再次污染。

## 第五十三条

使用二类以上病原体进行生产时，对产生的污物和可疑污染物品应当在原位消毒，完全灭活后方可移出工作区。

## 第五十五条

对用于实验取样、检测或日常监测（如空气采样器）的用具和设备，应当制定严格的清洁和消毒操作规程，避免交叉污染。应当根据生产的风险程度对用具或设备进行评估，必要时做到专物专区专用。

# 发酵定义

## 发酵 (Fermentation)

现代发酵工程主要是通过对微生物（或动植物细胞）的进行大规模的生长培养，使之发生化学变化和生理变化，从而产生和积累大量人们发酵所需要的代谢产物的过程。

- 微生物种类：好氧性发酵和厌氧性发酵。
- 培养基状态：固体发酵和液体发酵。
- 发酵设备：敞口发酵、密闭发酵、浅盘发酵、深层发酵。
- 发酵操作方式：分批发酵、连续发酵、补料分批发酵。
- 微生物发酵产物：微生物菌体发酵、微生物酶发酵、微生物代谢产物发酵、微生物的转化发酵、生物工程细胞发酵。

# 发酵类型

## 连续发酵 Continue fermentation

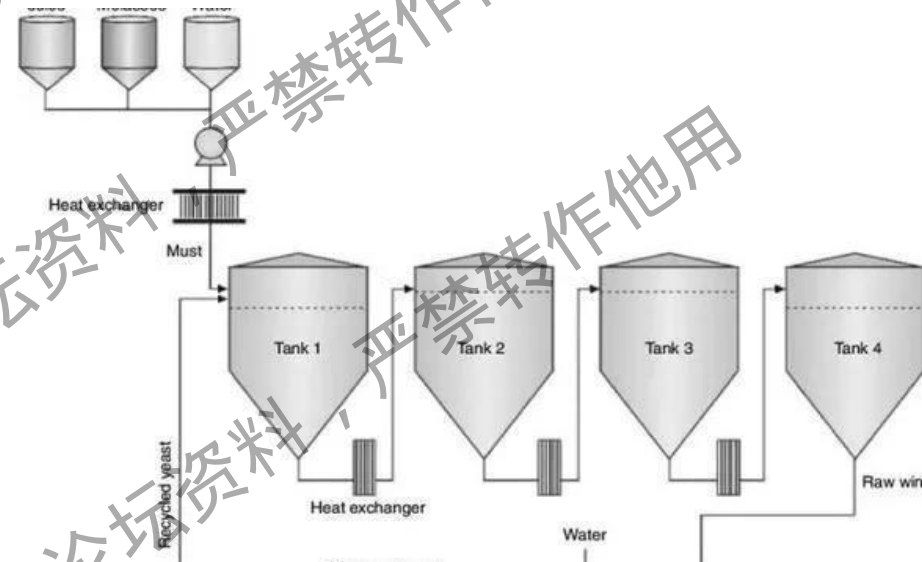
连续发酵法是20世纪70年代诞生的一种技术，最早是为了更加高效率地生产乙醇，不同于单桶发酵，能最大限度避免酵母的生长期，迟缓期和成熟期，而是直接进入发酵阶段，以一定的速度向培养系统内添加新鲜的培养基，同时以相同的速度流出培养液，使培养系统内培养液的液量维持恒定的微生物培养方式。

可提高设备利用率和年产量，生产效率高；

增加了染菌机会；

生产周期长，产品均一性差；

菌种发生变异的可能性较大。



# 发酵类型

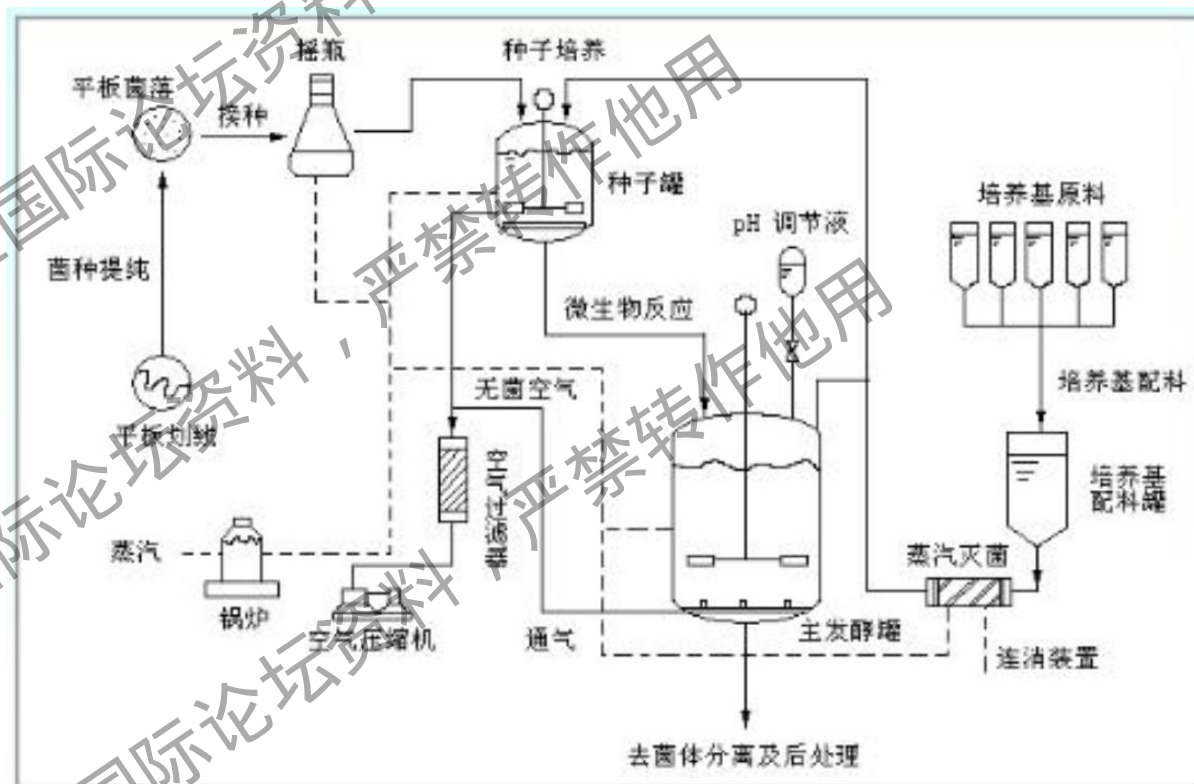
## 分批发酵 Batch Fermentation

是指在一个密闭系统内投入有限数量的营养物质后，接入少量的微生物菌种进行培养，使微生物生长繁殖，在特定的条件下只完成一个生长周期的微生物培养方法。

**特点：一次投料，一次接种，一次收获**

分批发酵过程一般可粗分为四期

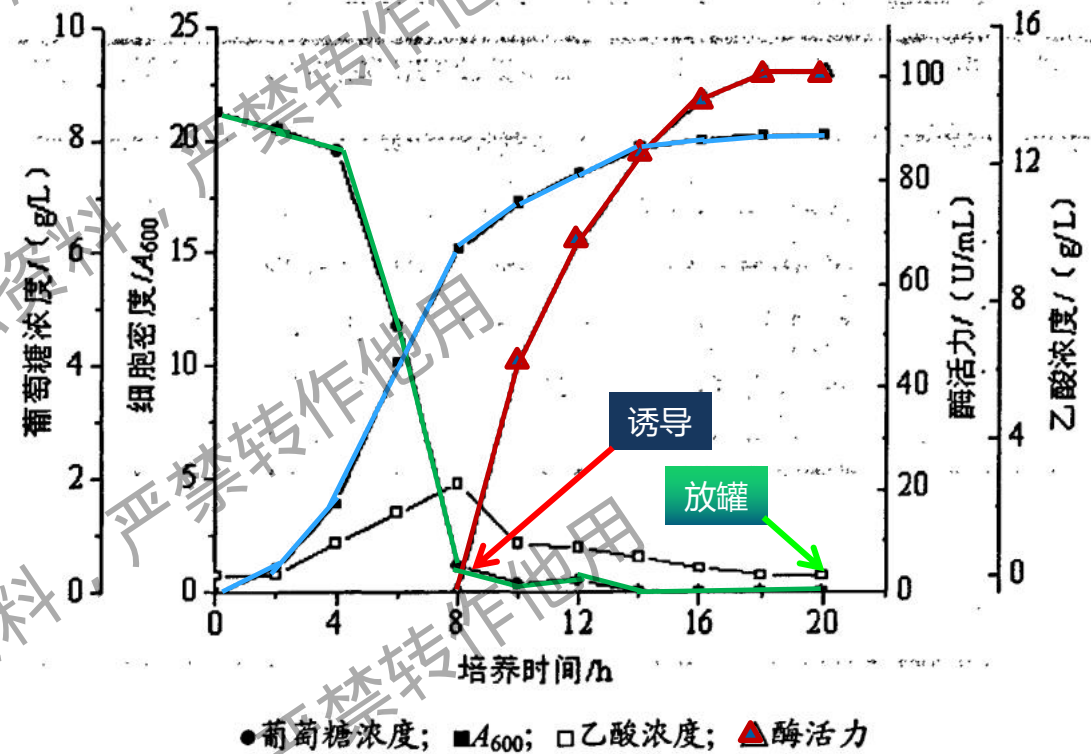
- I 适应（停滞）期
- II 对数生长期
- III 稳定期
- IV 衰亡期



# 分批发酵

摇瓶培养通常用于小规模制备菌体和发酵条件的初步研究，因为pH值、溶氧等因素的原因，摇瓶实验的培养环境往往和实际发酵罐的培养环境相差很大，因此发酵罐培养不能简单套用摇瓶的实验结果。

本图中，8小时开始诱导时葡萄糖基本消耗完毕，微生物将代谢产物乙酸作为碳源供给开始二次生长。在营养物质缺乏时，进行流加补充，才能提高菌体密度和重组蛋白的表达量。



PH=7.1, 溶氧控制在20%, 15L规模发酵



# 补料分批发酵 Fed Batch Fermentation

进行分批培养的过程中，向反应器内加入培养基的一种或多种成分，以达到延长生产期和控制培养过程的目的，是当前大肠杆菌表达最为常用的发酵方式。

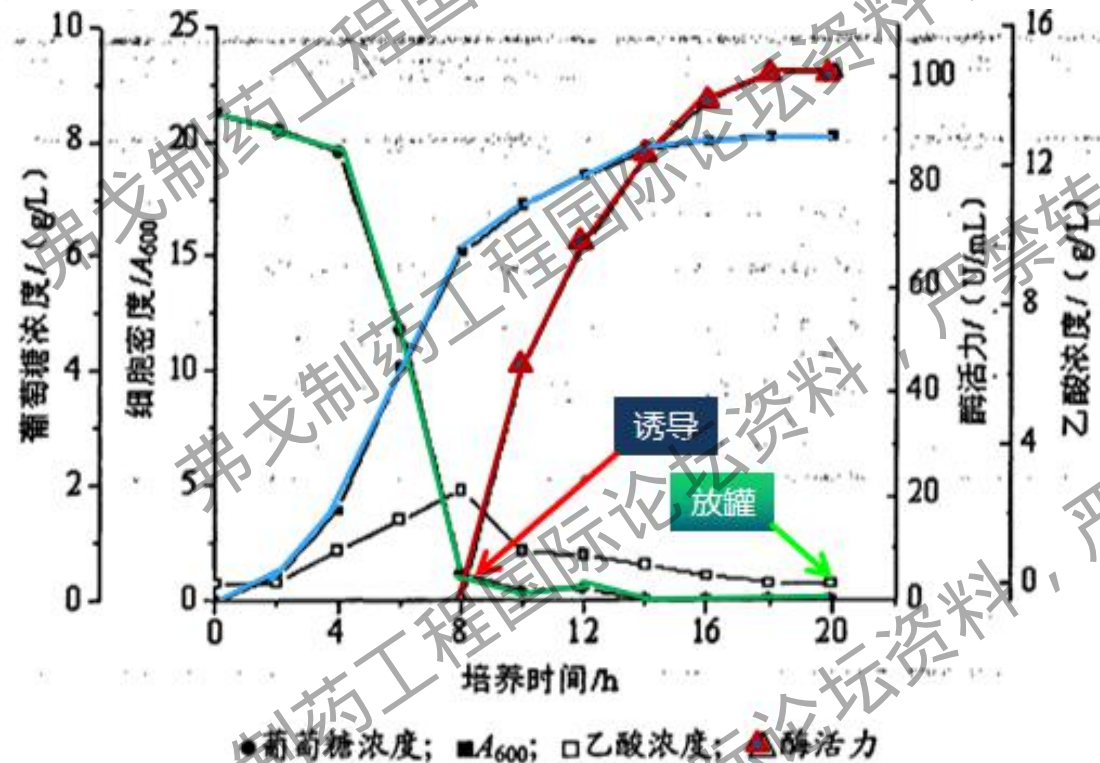
## 特点：

延长对数生长期，降低培养基的黏度和菌体密度；  
降低一些有害次级代谢物对微生物生长的抑制作用  
从而收获更多的目标蛋白；

# 补料分批发酵 Fed Batch Fermentation

非反馈补料法：恒速流加补料法，变速流加补料法，指数流加法

反馈补料法：残糖浓度反馈法，pH-stat流加，恒溶氧流加法，比生长速率法



# 基于微生物反应动力学原则优化发酵工艺



微生物反应动力学是研究各种环境与微生物代谢活动而变化的规律，原核体系发酵也不例外

# 发酵工艺控制—大肠杆菌补料分批发酵培养基策略 (Meida)

1. 使用**最稀培养基**以便精确设计营养成分之间的定量关系，同时避免任何不利于细菌生长的营养限制性因素
2. 利用**碳源限制**的方法阻断细菌对数生长期抑制性代谢产物合成，
3. 依据细菌细胞的元素组成确定培养基各成分的**精确配比**。

# 发酵工艺控制—大肠杆菌分批发酵培养基选择 (Media)

种类: C、H、O、N、S、P、Fe、Mg、K等

获得1g / L的大肠杆菌所需的无机盐(L<sup>-1</sup>)

NH <sub>4</sub> Cl	0.77 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.125 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	17.5 mg
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	7.5 mg
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.64 mg
CaCl <sub>2</sub>	0.4 mg

培养基的基质抑制浓度(L<sup>-1</sup>)

葡萄糖	50 g
铵	3 g
Fe <sup>2+</sup>	1.15 g
Mg <sup>2+</sup>	8.7 g
PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	10 g
Zn <sup>2+</sup>	38 mg

# 发酵工艺控制—抗生素的使用

**抗生素的使用—针对生物制品，可以降低摇瓶阶段和一级种子培养的染菌风险，利用宿主菌的抗生素抗性特征，提高产量。**

1. 除另有规定外，不得使用青霉素或其他 $\beta$ -内酰胺类抗生素；
2. 生产过程中，应尽可能避免使用抗生素；

必须使用时：

1. 选择安全性风险相对较低的抗生素，例如卡那霉素；
2. 使用抗生素的种类不得超过1种；
- 3. 只能在种子液培养阶段加入抗生素；**
4. 产品的后续工艺应保证可有效去除制品中的抗生素，去除工艺应经过验证；
5. 成品检定中应检测抗生素残留量，并规定残留量限值。

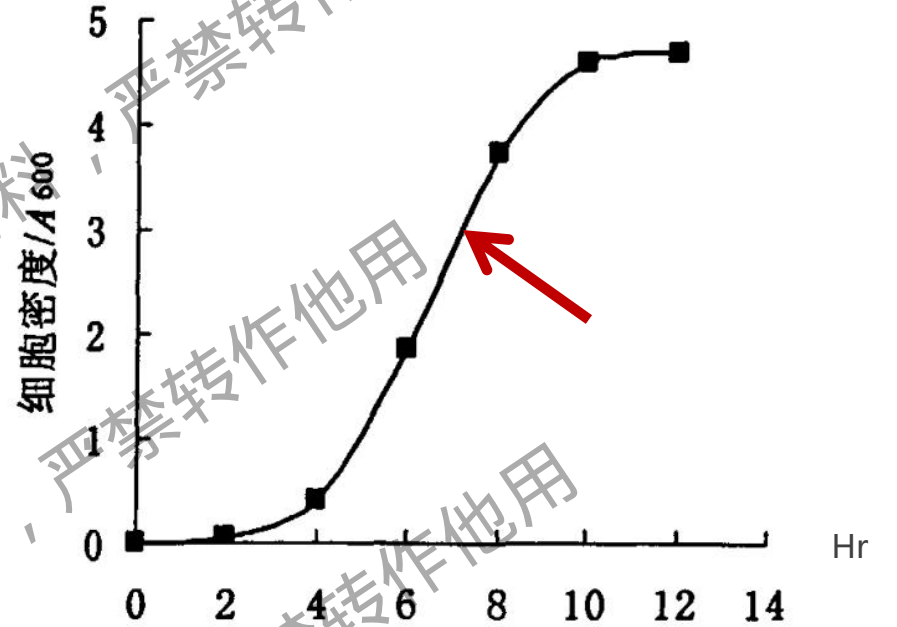
# 发酵工艺控制—接种 inoculation

## 菌种

宜选择在**对数生长中后期**的菌种，缩短在发酵罐中的适应期，保证菌体活力

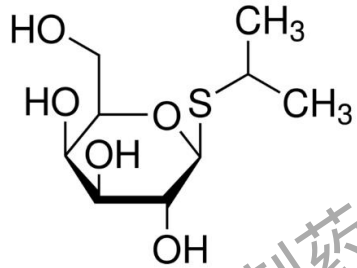
## 接种量：

一般选择发酵体积的1%~10%之间



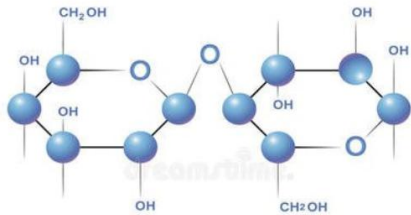
摇瓶培养的种子生长曲线

# 发酵工艺控制—大肠杆菌发酵的诱导剂 (gratuitous inducer)



**IPTG:** 最常用于诱导大肠杆菌表达异源蛋白的诱导剂是异丙基-D硫代半乳糖苷

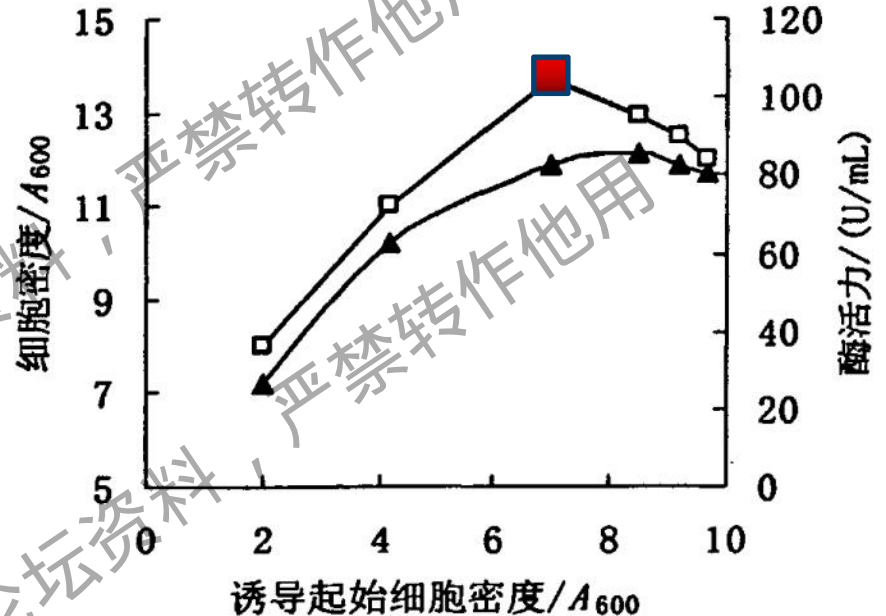
缺点: 价格昂贵, 对人体具有毒性



Lactose

## 乳糖

诱导效果不及IPTG,  
但价廉无毒, 前景广阔





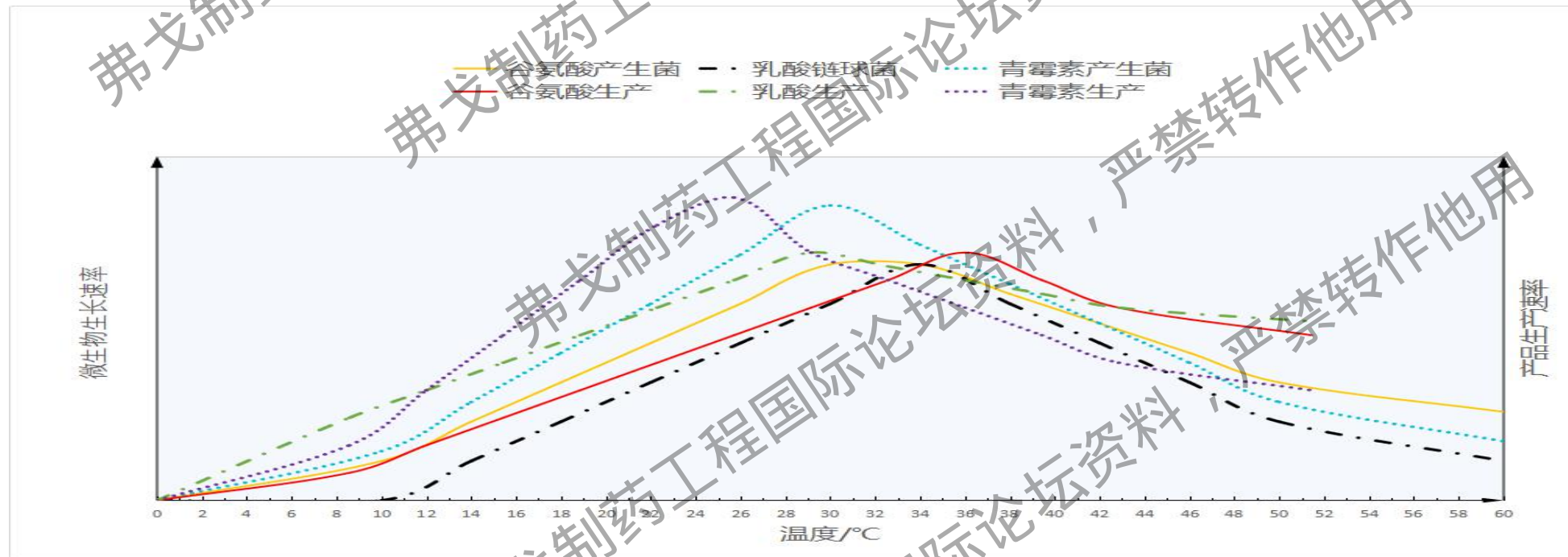
# 发酵工艺控制—乳糖诱导剂流加碳源和氮源讨论

由于发酵液中葡萄糖的存在会抑制乳糖的诱导作用，因此葡萄糖流加速率收到很大限制，加上高密度发酵导致培养基营养成分消耗很大，以至于诱导后重组酶的酶活力很低，可能是因为发酵液中氮源的缺乏引起的。据报道，添加酵母粉能够更有利于外源蛋白的表达，流加甘油代替葡萄糖，从而降低对乳糖诱导的抑制作用。

# 发酵工艺控制—温度 (temp.)

发酵过程中，温度是重要的控制参数，每一种微生物都有一个最适的生长温度，在发酵过程中需要控制罐温在工程菌最适生长温度范围内，温度越稳定，越适合工程菌的生长。

最适生长温度与最适生产温度往往是不一致。整个发酵过程中不应只选一个培养温度，应根据发酵的不同时期，选择不同的培养温度，这个过程称之为变温控制。



# 发酵工艺控制—pH值

1. pH是发酵培养过程中重要的控制参数，每一种微生物都有最适的生理pH值，不同种类的微生物的最适生长pH差异很大。
2. pH对发酵的影响有以下几个因素影响：
  1. 影响酶的活性；
  2. 菌体的形态；
  3. 细胞膜的电荷状态；
  4. 产物的稳定性；
  5. 对某些生物合成途径有显著影响。

# 发酵工艺控制—发酵周期中pH变化的原因

发酵过程中，由于菌种在一定温度及通气条件下对培养基中碳、氮源等的利用，随着有机酸或氨基氮的积累，会使pH值产生变化。这种变化的根源是**培养基的成分和微生物的代谢特性**。

## 1. 引起pH下降的因素：

- a) 培养基中碳、氮比例不当，碳源过多，特别是葡萄糖过量，或者中间补糖过多加之溶解氧不足，致使有机酸大量积累；
- b) 消泡剂加得过多；

## 2. 引起pH上升的因素：

- a) 氮源过多；
- b) 加入的能量物质，例如葡萄糖不足；
- c) 中间补料中氨水等碱性物质加入过多。

# 发酵工艺控制—pH的控制方式

在微生物发酵过程中，微生物的代谢会改变发酵液pH值，过程中pH的控制尤为重要，控制方式有以下3种：

1. 培养基控制
2. 补料控制
3. 酸碱控制

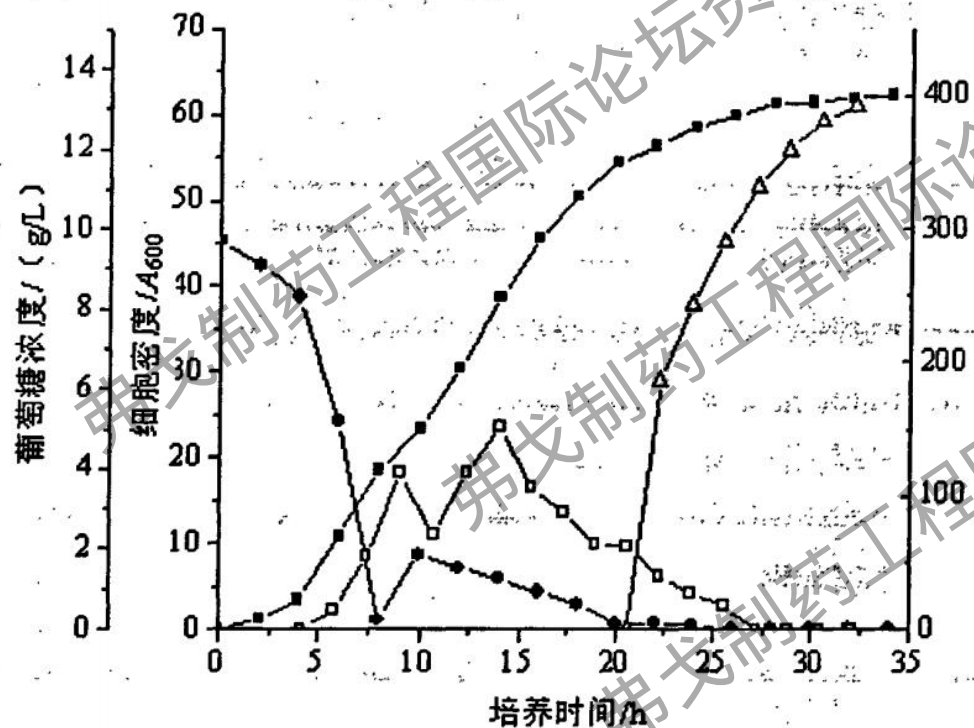
# 发酵工艺控制—溶氧 (Dissolved Oxygen)

溶氧是发酵工艺控制过程中的一个关键工艺参数，如果溶解氧浓度低于临界值，细胞的比耗氧速率就会大大下降，或者是微生物的呼吸速率随溶解氧浓度降低而显著下降，细胞处于半厌气状态，代谢活动受到阻碍。

**微生物的临界氧值：**不影响呼吸所允许的最低溶氧浓度，如对产物而言，便是不影响产物合成所允许的最低浓度。

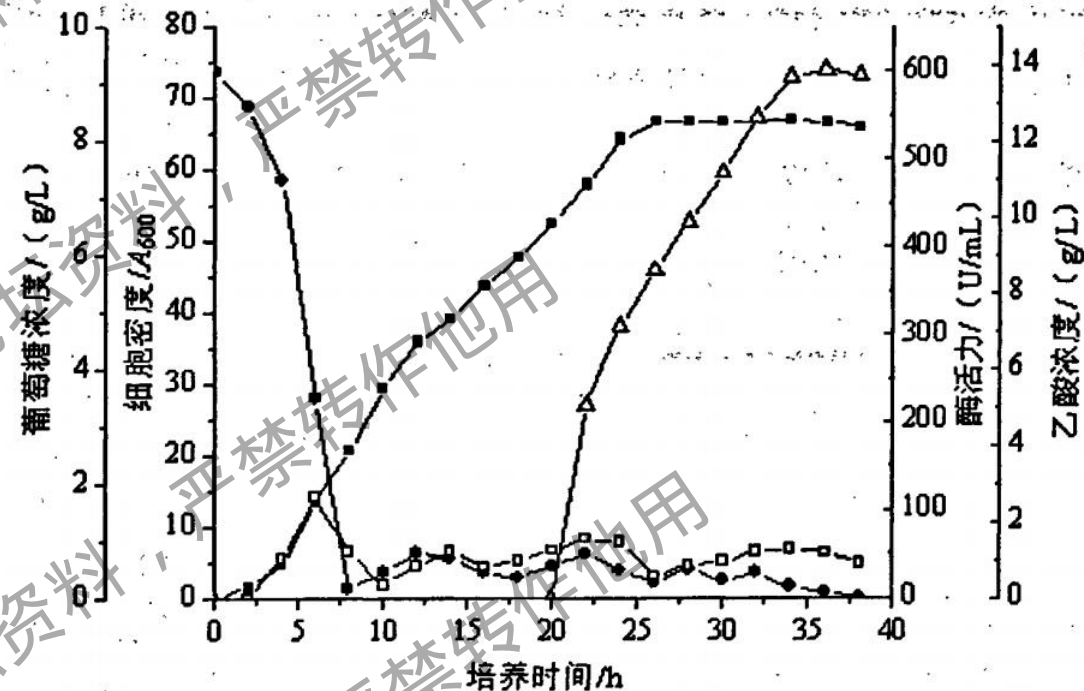
1. 细菌和酵母：3~10%
2. 放线菌：5~30%
3. 霉菌：10~15%

# 发酵工艺控制—补料分批流加方式的比较



●葡萄糖浓度; ■ $A_{600}$ ; □乙酸浓度; △酶活力

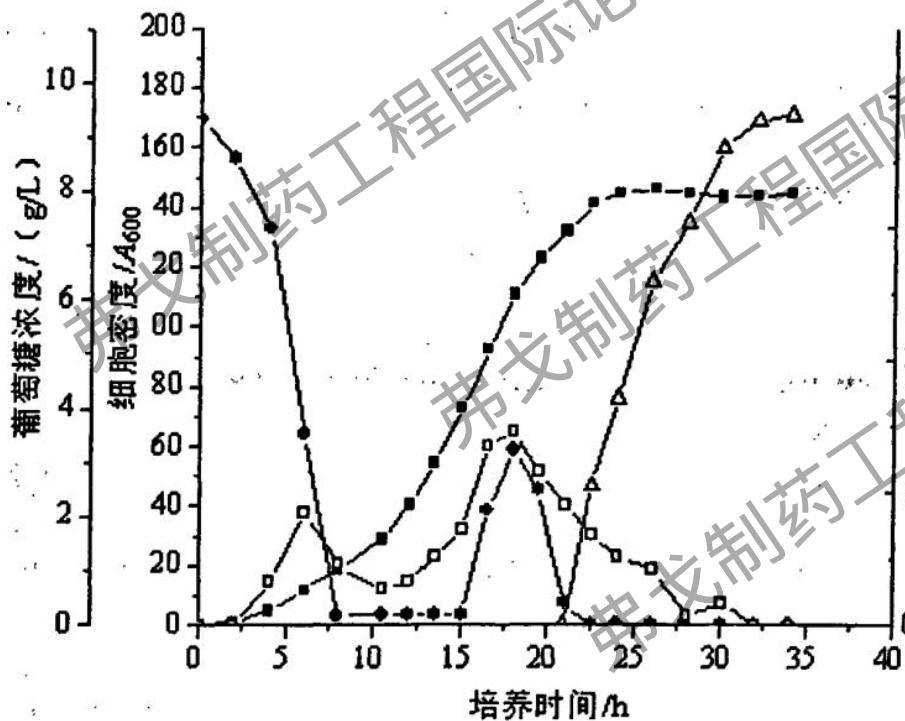
1 大肠杆菌恒速补料分批发酵培养曲线



●葡萄糖浓度; ■ $A_{600}$ ; □乙酸浓度; △酶活力

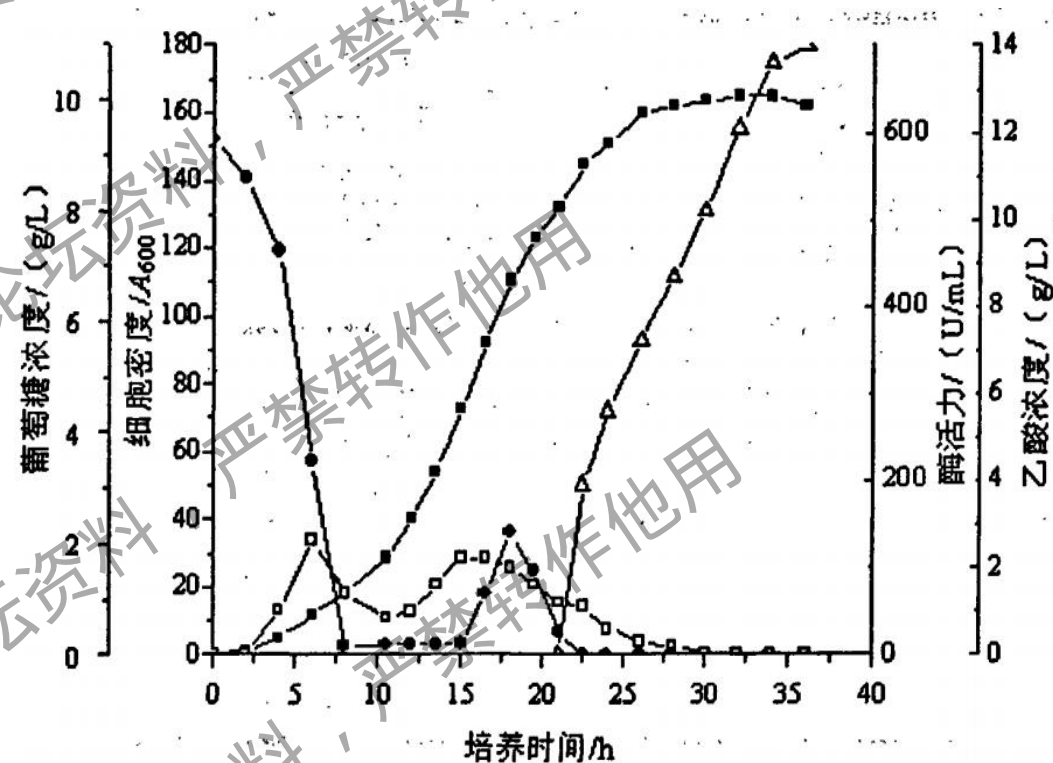
2 大肠杆菌pH-stat补料分批发酵培养曲线

# 发酵工艺控制—补料分批流加方式的比较



●葡萄糖浓度; ■ $A_{600}$ ; □乙酸浓度; △酶活力

3 大肠杆菌指数流加补料分批发酵培养曲线



●葡萄糖浓度; ■ $A_{600}$ ; □乙酸浓度; △酶活力

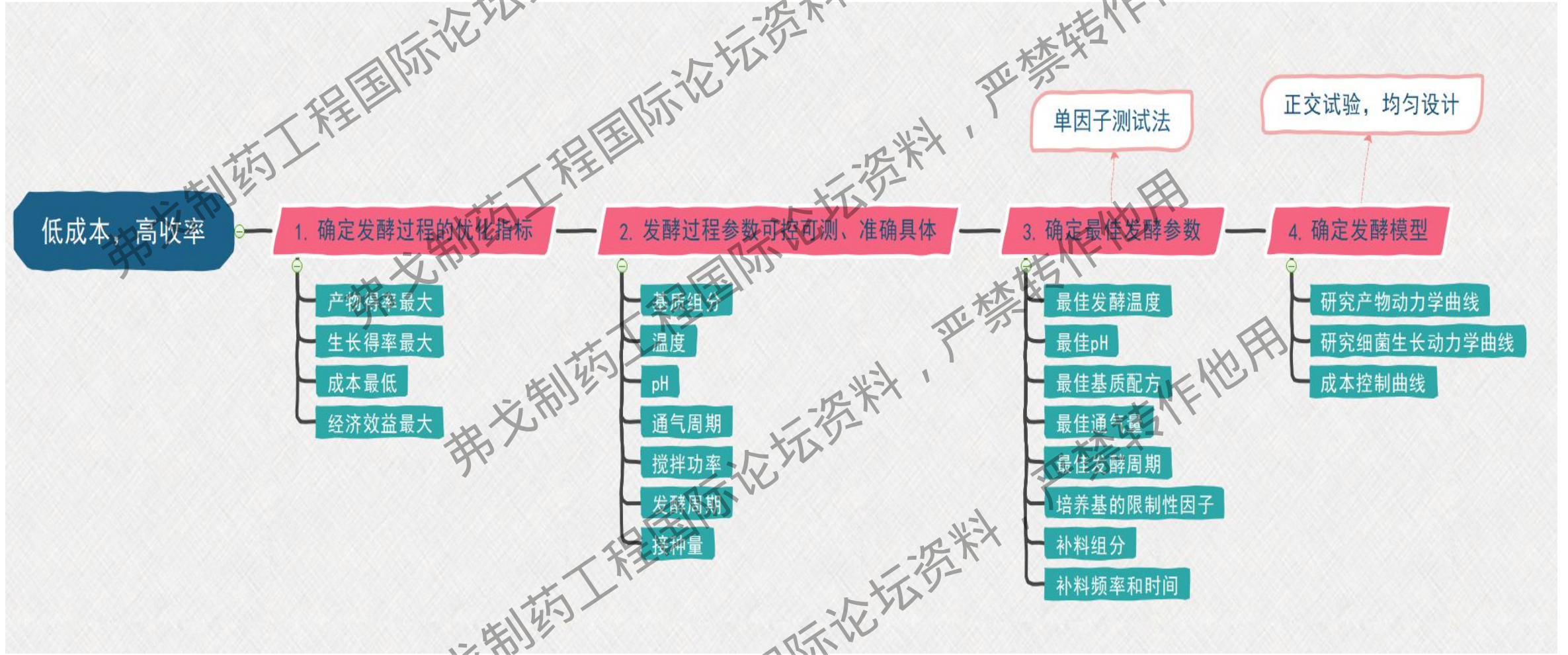
4 大肠杆菌指数-恒定pH补料分批发酵培养曲线



# 发酵工艺控制—补料分批发酵模式不同流加模式的比较

	恒速	pH-stat	指数流加	变指数-恒pH流加
pH	7.1	7.1	7.1	7.1
溶氧 (%)	20%	20%	20%	20%
诱导期乙酸浓度		1.8g/L	3.5g/L	
菌浓度 A600	63	67	55	140
酶活力U/ml	380	601	380	700

# 借助发酵动力学的研究实现补料分批发酵过程的优化流程



弗戈制药工程国际论坛资料，严禁转作他用

弗戈制药工程国际论坛资料，严禁转作他用

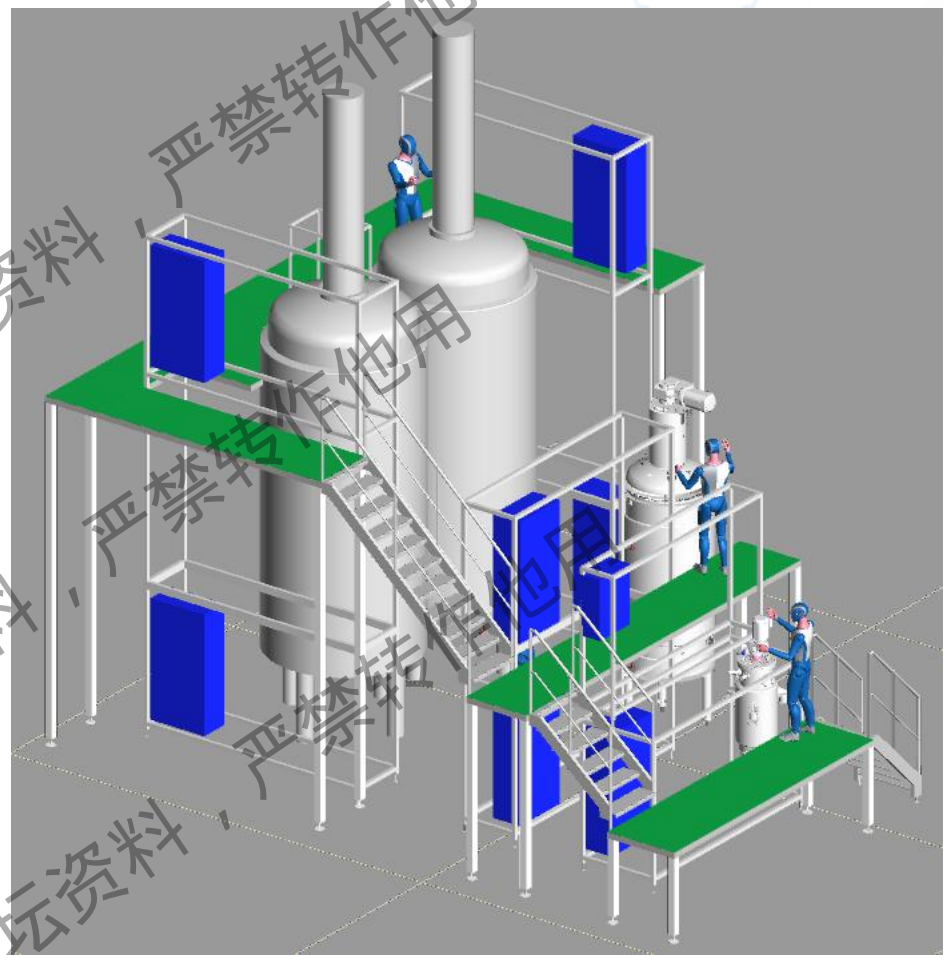
## 原核体系发酵规模放大

弗戈制药工程国际论坛资料，严禁转作他用

# 工艺放大

一个成功的发酵系统工艺放大需要考虑：

1. 能够维持稳定的溶解氧浓度；
2. 搅拌转速和搅拌桨叶的设计；
3. 罐体的设计（高径比）；
4. 传质效率和传氧效率；
5. 发酵热的去除；
6. 足够的加热和冷却时间；
7. 确保灭菌工艺和技术；
8. 确保清洁工艺和技术；
9. 确保系统设计洁净卫生。



# 工艺放大

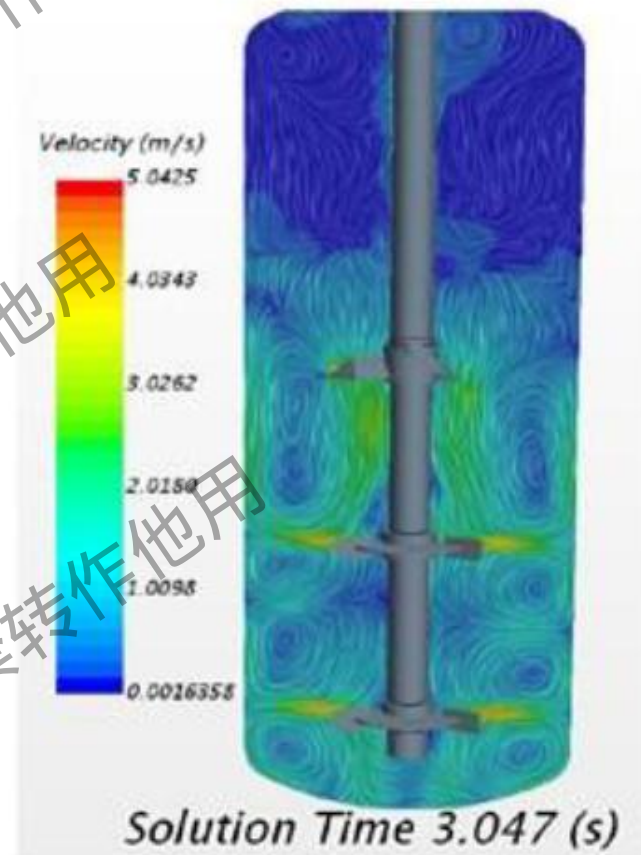
## 维持稳定的溶氧浓度

1. 搅拌器的设计;
2. 在发酵罐放大过程中保持发酵罐的高径比一致;
3. 空气/氧气通量做线性放大;
4. 确保溶氧探头所在位置具有代表性, 大型发酵罐可以考虑使用两个溶氧探头;
5. 设计一个高效的分气器。

# 工艺放大

搅拌器的设计搅拌器放大过程应特别注意避免剪切力对微生物的损伤!

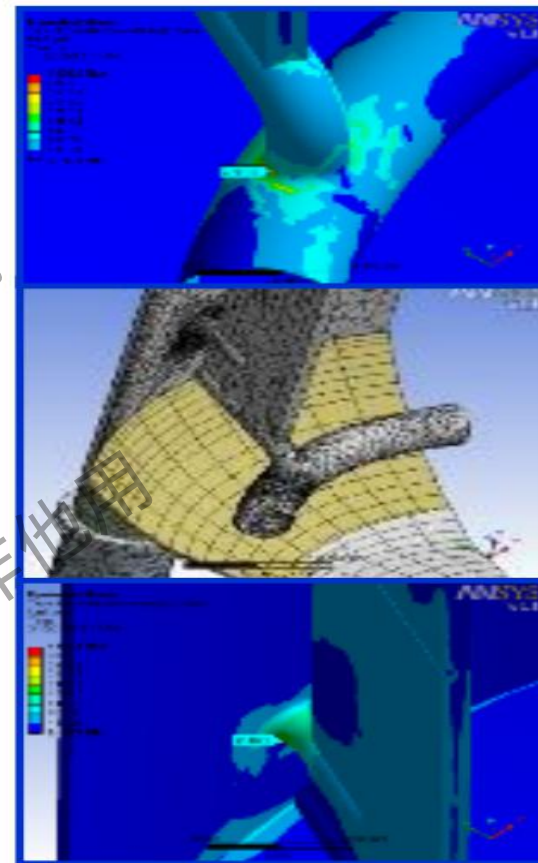
1. 重要的控制点是如何控制线速度 (Tip speed)，在放大过程需要保证线速度一致;
2. 太高的线速度会导致微生物的裂解;
3. 尺寸: 大约1/3罐体直径;
4. 通常使用“直叶式”和“推进式”剪切力大的用于细菌发酵;
5. 在发酵罐放大过程中可以考虑增加搅拌桨的数量。



# 工艺放大

## 罐体设计

1. 超过20ton的发酵罐避免出现完全真空，需要进行特别加固保证罐体的稳定性和刚性，需要安装一个破真空阀门保证罐体的安全；
2. 发酵液的均一性是通过合适的搅拌混匀来达到的，可以增加挡板的方式已达到更好的混匀效果。



# 工艺放大

在大规模细菌发酵过程中，发酵热的移除是必须要重视的一个问题。

1. 罐体的夹套热交换面积是相对限制的，可以通过增加换热挡板等额外的换热方式增加换热面积
2. 不建议增加内部降温盘管，难于清洁。
3. 发酵热的计算

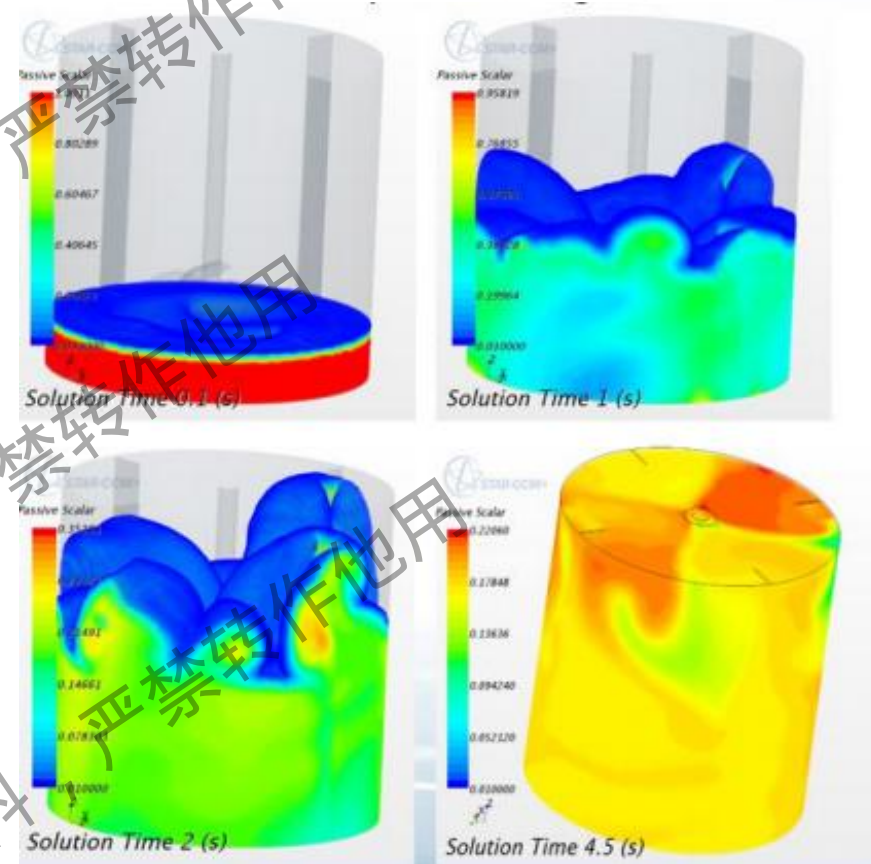
$$Q_{\text{发酵}} = Q_{\text{生物}} + Q_{\text{搅拌}} - Q_{\text{蒸发}} - Q_{\text{辐射}}$$



# 工艺放大

## 充分的冷却和加热时间

1. 一个大的发酵罐可能无法进行培养基的实罐灭菌，因为加热时间过长，长时间的高温会破坏培养基中的营养成分。替代的做法是通过连续灭菌的方式进行培养基灭菌或者用除菌过滤的方式替代湿热灭菌。
2. 对于发酵罐灭菌，放大时需特别关注合理的升温 and 降温时间。



# 重要的

第三十八条：种子批或细胞库和成品之间的传代数目（倍增次数、传代次数）应当与已批准注册资料中的规定一致，不应随生产规模变化而改变。

**保证传代次数一致！**

**提高摇瓶接种量，保证倍增次数一致！**



**感谢聆听**

弗戈制药工程国际论坛资料，严禁转作他用

弗戈制药工程国际论坛资料，严禁转作他用

弗戈制药工程国际论坛资料，严禁转作他用

弗戈制药工程国际论坛资料，严禁转作他用