

曹家明,许超群,曾宪放. 毕赤酵母发酵过程的染菌分析及预防策略[J]. 江苏农业科学,2020,48(8):265-271.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.08.049

# 毕赤酵母发酵过程的染菌分析及预防策略

曹家明,许超群,曾宪放

(上海泽润生物科技有限公司,上海 201203)

**摘要:**针对毕赤酵母(*Pichia pastoris*)在发酵过程中发生的染菌现象,按照质量控制要素及工艺流程进行全面分析。通过对工作种子库、一级种子、二级种子、滤芯、发酵罐及发酵菌体进行系统排查发现,染菌是由赛多利斯取样阀密封圈磨损及试验人员的不规范操作造成的。因而在试验操作、设备维护、车间管理、文件修订、人员培训等方面实施一系列纠正预防措施,随后进行多批次的发酵生产。结果表明,试验结果与历史数据具有高度的一致性,从而避免了染菌现象的再次发生。

**关键词:**毕赤酵母;发酵;染菌分析;预防策略

**中图分类号:** S182 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)08-0265-07

自从 Cregg 等于 1985 年利用重组毕赤酵母(*Pichia pastoris*)成功表达外源蛋白<sup>[1]</sup>以来,毕赤酵母因高效表达外源蛋白、操作简单、易于培养、生产成本低廉等优点而受到科学家和工业界的青睐,目前已有超过 500 个蛋白在毕赤酵母中表达成功,表达产物包括干扰素、酶制剂、抗体等<sup>[2-4]</sup>。美国食品药品监督管理局(Food and Drug Administration,简称 FDA)认定毕赤酵母是一般公认安全的(generally regarded as safe,简称 GRAS)微生物,为其在医药和食品中的应用铺平了道路<sup>[5]</sup>。目前,人们已经在该系统中成功表达了胰岛素、弹性蛋白酶、S-腺苷基甲硫氨酸、干扰素、白细胞介素、溶菌酶等多种治疗性药物<sup>[6-7]</sup>。随着毕赤酵母表达系统研究的不断推进,会有更多外源蛋白在毕赤酵母中表达,从而在医学、微生物学等相关领域发挥重要作用。

随着发酵技术、生物反应器设计制造的发展更新,生产过程中的染菌率已经明显下降,然而染菌仍是发酵产业的最大“敌人”,染菌轻者会降低产品的产率及质量,严重者会造成发酵失败,不仅会增加发酵的生产成本,打乱生产计划,还会造成环境

污染<sup>[8-9]</sup>。宋磊等从染菌时间、类型、范围 3 个方面探讨透明质酸发酵染菌的原因,提出防止发酵染菌及染菌后的补救措施<sup>[10]</sup>。任石苟等对乳酸生产过程中的染菌原因进行分析,提出了预防和治理措施<sup>[11]</sup>。李素荣等通过加强菌种、无菌用具、环境、人员培训等的管理,使染菌率由 9.64% 降至 1.20%<sup>[12]</sup>。丁玮云等介绍了赖氨酸发酵染菌的危害性及由设备引起的染菌原因,并提出防控措施<sup>[13]</sup>。刘利通过现场跟踪调查,得出设备、空气和员工操作失误引起的染菌概率最大,应该从这 3 个方面入手减少染菌<sup>[14]</sup>。目前的染菌研究多集中于抗生素、谷氨酸等传统产品在发酵过程中的染菌途径、不同发酵阶段染菌对发酵的影响及防治措施等方面<sup>[9,15-16]</sup>,鲜有针对药品生产质量管理规范(good manufacturing practices,简称 GMP)环境下发酵生产中染菌排查的报道<sup>[17]</sup>。本研究以笔者所在生产车间在进行毕赤酵母发酵表达外源蛋白的生产过程中发现的 1 例染菌现象为列,对可能的染菌过程进行分析、排查,并采取相应的预防和整改措施,以期医药企业在重组菌发酵生产中出现染菌现象时进行快速排查及预防提供一些思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验试剂

酵母粉,购自 OXOID 公司;蛋白胨,购自日本制药株式会社;甘油,购自湖南尔康制药股份有限公司;胰蛋白胨大豆琼脂培养基(tryptone soy agar,简称 TSA 培养基)平板,购自上海源培生物科技股份

收稿日期:2019-03-18

基金项目:国家“重大新药创制”科技重大专项(编号:2015ZX09101035、2017ZX09308003);上海市“科技创新行动计划”生物医药领域科技支撑项目(编号:18431905600);上海市科技人才计划(编号:16QB1404200)。

作者简介:曹家明(1985—),男,江苏常州人,硕士,工程师,主要从事生物药物开发、基因工程菌发酵、蛋白药物纯化等方面的研究。  
E-mail:caojiaming@walvax.com。

有限公司。

1.2 酵母浸出粉胨葡萄糖培养基 (yeast extract peptone dextrose medium, 简称 YPG 培养基)

YPG 培养基配方如下:20 g/L 蛋白胨、10 g/L 酵母粉、20 g/L 甘油。用 2 L 锥形瓶分装 1 L 培养基,在 30 L 发酵罐中装入 8 L 培养基,在 210 L 发酵罐中装入 120 L 培养基,于 121 °C 灭菌 20 min。

1.3 仪器与设备

NLF22 30 L 发酵罐,购自瑞士比欧生物工程公司;BIOSTAT® C-plus 30 L 发酵罐,购自赛多利斯公司;P 210 L 发酵罐,购自瑞士比欧生物工程公司;立式压力蒸汽灭菌器,购自上海博迅实业有限公司;全温振荡培养箱,购自哈尔滨东联电子技术开发有限公司;显微镜,购自重庆光学仪器厂。

1.4 试验方法

(1)人员操作排查。相应批次的试验人员回顾相关操作,分析可能的风险环节。(2)工作种子库排查。领取 1 支工作种子,吸取 100  $\mu$ L,稀释一定倍数后涂布 TSA 平板,培养 2~3 d 后观察菌落形态,并挑取单菌落进行镜检。(3)一级种子排查。领取 1 支工作种子,接种于 YPG 培养基中,于 30 °C、200 r/min 培养 24 h,取 1 mL 发酵液稀释至一定倍数后涂布平板,培养 2~3 d 后观察菌落形态,并挑取单菌落进行镜检。(4)滤芯检查。拆下压缩空气管路及发酵罐上的滤芯,检查外观,并进行完整性测试。(5)空培试验。30L 发酵罐设置搅拌转速 300 r/min、培养温度 30 °C、通气量 10 L/min,不进行接种,空培 72 h 后,观察是否有杂菌生长现象。210 L 发酵罐设置搅拌转速 300 r/min、培养温度 30 °C、通气量 100 L/min,不进行接种,观察是否有杂菌生长现象;空培 48 h 后,若 210 L 发酵罐未染菌,则进行甘油、甲醇补料操作,观察是否有杂菌生长现象;空培 72 h 后,若 210 L 发酵罐未染菌,则模拟移种操作,将 30L 发酵罐中未染菌的培养基按正常移种操作移入 210 L 发酵罐中继续空培 48 h,观察是否有杂菌生长现象。(6)接种培养。对空培正常的 30 L 发酵罐进行接种,按照“(5)空培试验”中的培养条件进行二级种子培养,培养 6 h 后无菌取样镜检,涂布平板培养,检查是否有染菌。(7)菌体检查。在超净工作台中无菌刮取最近批次的发酵菌体,适当稀释后涂布于平板上,37 °C 培养 2~3d,观察是否有杂菌生长。(8)染菌判断。在培养过程中观察 pH 值是否有明显变化

(波动大于 1 表示变化明显),溶氧量(由发酵罐自带电极测量)有无明显下降(波动大于 20% 表示变化明显),发酵液颜色是否澄清,是否有异常气味,镜检观察是否有杂菌等,若有其中 1 项发生明显变化,则认为发生染菌。

## 2 结果与分析

### 2.1 染菌分析

2.1.1 染菌现象 笔者在上海泽润生物科技有限公司中试车间进行毕赤酵母发酵表达外源蛋白的放大生产过程中取样镜检,发现视野中存在一些不同于正常毕赤酵母形态的细小杆状形态细胞,取样放料桶中也有不同于毕赤酵母的氨味和特殊臭味。对发酵液进行稀释涂平板培养后,发现了异常菌落,对异常菌落进行镜检后发现了大量杆菌(图 1)。后续纯化试验结果表明,目的蛋白的表达量和收率低于正常水平,检测结果显示,目的蛋白的纯度也有所下降。发现这一情况后,笔者所在公司立刻暂停所有试验,检查和回顾设定的工艺条件与设备的运行日志,确定无差错后,对发酵过程中可能染菌的方面进行逐项分析,并结合发酵过程中可能存在的风险和染菌环节进行一系列排查,随后采取了多项预防和整改措施。

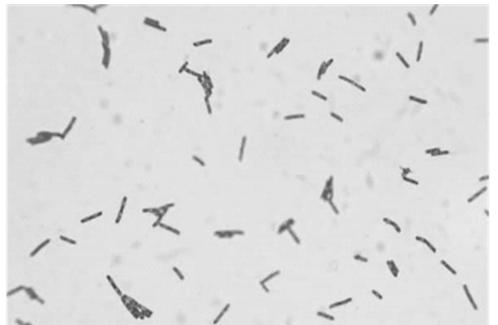


图1 异常菌落的镜检结果

2.1.2 按照质量控制要素进行排查分析 对发酵过程中的人、机、料、法、环等方面进行了分析,从表 1 可以看出,物料和环境方面的风险较低,而人员、设备及法规方面则存在一定风险。

2.1.3 按照工艺流程进行排查分析 中试阶段(210 L)的发酵规模为研发阶段的 8 倍,工艺流程如下:(1)工作种子→(2)一级种子(摇瓶)→(3)二级种子(30 L 发酵罐)→(4)发酵(210 L 发酵罐)。

以上流程中,步骤(1)涉及种子制备和领用过程;步骤(2)涉及接种、YPG 灭菌、培养、转入接种瓶过程;步骤(3)涉及设备清洁与灭菌、压缩空气、接

表1 发酵过程中的影响因素分析

因素	研发阶段 (30 L 规模)	中试阶段 (210 L 规模)	风险
人员	中试发酵人员	中试发酵人员和子公司发酵人员	中,可能存在操作不规范和不熟练的问题
设备	超净台、摇瓶、30 L 发酵罐,定期清洁和灭菌	超净台、摇瓶、30L 发酵罐、210L 发酵罐,定期清洁和灭菌	中,发酵级数增加,衔接过程存在一定的风险
物料	培养基成分多为单一组分的化合物,仅酵母粉和蛋白胨为成分复杂的有机氮源	物料同30L 规模的,无变更,但用量增加	低,物料用量增加,但是灭菌或除菌操作基本保持一致
法规	按照工艺和设备标准操作规程(standard operation procedure,简称 SOP)操作	放大工艺还处于研究过程,部分 SOP 尚未生效	中,所有操作需要尽早确定规范并形成正式文件
环境	已进行相关验证	已进行相关验证	低

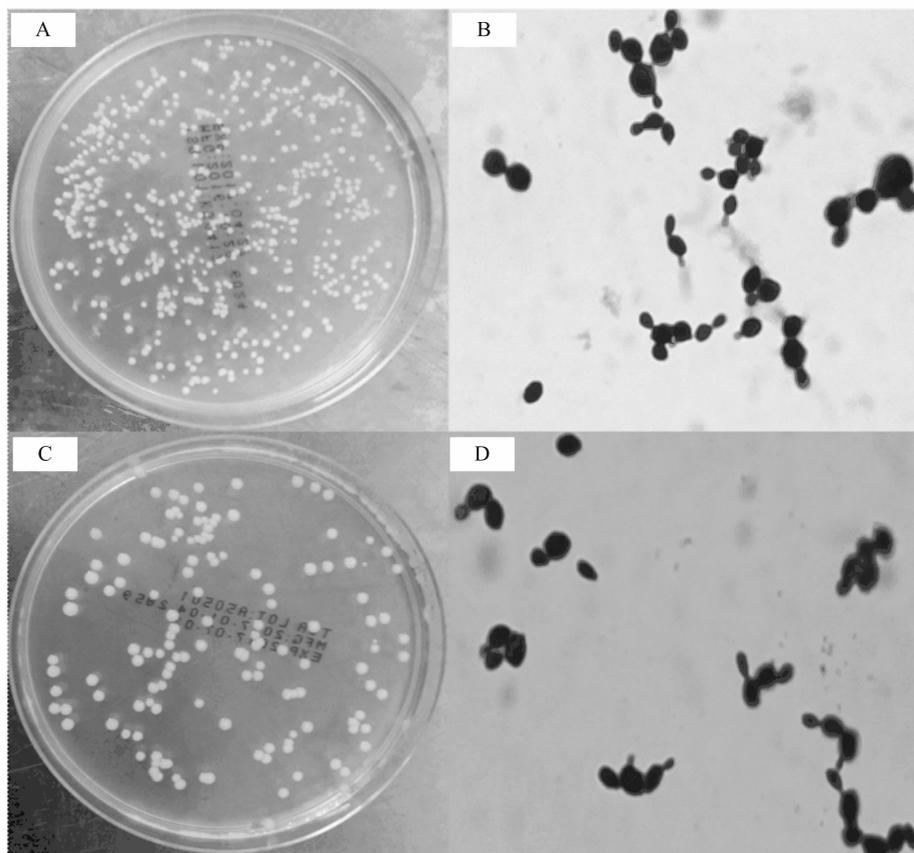
种、取样过程;步骤(4)涉及设备清洁与灭菌、压缩空气、移种、补料培养基的灭菌与管路分消、取样操作。步骤(1)、步骤(2)与30 L 发酵罐一样,风险较低,而步骤(3)和步骤(4)属于放大工艺部分,存在一定的风险。

## 2.2 染菌排查

2.2.1 人员操作排查 经试验人员回顾,部分操作环节可能会带来染菌风险,如(1)紫外照射的时间凭经验操作,而不是定量准确地控制时间;(2)滤膜、硅胶管等未能定期检查;(3)取样操作时的操

作人员取样前后均灭菌,有的操作人员只是在取样前灭菌;(4)灭菌结束后有些操作人员为了节约时间而直接排气。

2.2.2 工作种子库排查 为了排查种子甘油管是否有污染,按照“1.4”节的相关方法进行操作。从图2-A可以看出,菌落形态单一,呈乳白色、油脂或蜡脂状,表面光滑湿润,为典型的酵母菌落形态。从图2-B可以看出,镜检细胞呈椭圆形或近圆形,单个或伴有出芽生殖,为典型的酵母形态。此外,在研究中发现,工作种子库正常、未染菌。



A—工作种子库平板培养; B—工作种子库镜检; C—一级种子平板培养; D—一级种子镜检

图2 平板培养及镜检结果

2.2.3 一级种子排查 为了排查一级种子在培养过程中是否有污染,按照“1.4”节的方法进行操作。从图 2-C 可以看出,菌落形态单一,呈乳白色、油脂或蜡脂状,表面光滑湿润,为典型的酵母菌落形态。从图 2-D 可以看出,镜检细胞呈椭圆形或近圆形,单个或伴有出芽生殖,为典型的酵母形态。此外,在研究中发现,工作种子库正常、未染菌。

2.2.4 滤芯排查 为了排查滤芯是否存在异常而导致压缩空气不洁净,对压缩空气管路及发酵罐上

的滤芯进行外观检查及完整性测试。滤芯的具体参数及检测结果见表 2。

2.2.5 空培试验 为了排查发酵罐在培养过程中是否存在染菌风险,按照“1.4”节的方法进行空培试验,分析 pH 值是否发生明显改变、溶氧量有无明显下降、发酵液颜色是否澄清、是否有异常气味、镜检观察是否有杂菌等。由表 3 可以看出,C-plus 30 L 发酵罐在空培过程中出现了染菌,而比欧发酵罐均未出现染菌现象。

表 2 滤芯参数及检测结果

发酵设备	滤芯品牌	滤芯材质	精度 ( $\mu\text{m}$ )	使用时间 (月)	检查结果
NLF22 30L 发酵罐	比欧	陶瓷		12	无污损
NLF22 30L 发酵罐	比欧	陶瓷		12	无污损
C-plus 30L 发酵罐	赛多利斯	聚四氟乙烯 (poly tetra fluoroethylene, 简称 PTFE)	0.2	6	无污损
C-plus 30L 发酵罐	赛多利斯	PTFE	0.2	6	无污损
P 210L 发酵罐	Millipore	PTFE	0.2	0.5	滤芯完整
比欧发酵罐进气总管路预过滤器	Domnick Hunter	PTFE	0.2	6	滤芯完整
赛多利斯发酵罐进气总管路预过滤器	Domnick Hunter	PTFE	0.2	12	滤芯完整

注:由于 30 L 发酵罐的进气端滤芯尺寸和材质因素,无法进行完整性测试。

表 3 空培试验结果

发酵设备	培养时间 (h)	pH 值的变化	培养基颜色	气味	溶氧量的变化	镜检结果	总结果
NLF22 30L 发酵罐	72	无	澄清	无异味	无	无细胞	未染菌
NLF22 30L 发酵罐	72	无	澄清	无异味	无	无细胞	未染菌
C-plus 30L 发酵罐	45	28~30 h 从 6.5 下降至 5.9	浑浊	有臭味	28~30 h 从 100% 降至 1%	细长杆状菌	染菌
C-plus 30L 发酵罐	72	64~67 h 从 6.5 升高至 7.5	浑浊	有臭味	64~67 h 从 100% 降至 1%	细长杆状菌	染菌
P 210L 比欧发酵罐	160	无	澄清	无异味	无	无细胞	未染菌

对 C-plus 30L 发酵罐可能出现染菌的环节进行分析,结果见表 4。对表 3、表 4 进行综合分析可知,染菌是在空培 28 h 后才发生的,而且 2~3 h 内的溶氧量快速下降,说明杂菌倍增时间短,生长快,基本可以排除早期染菌的可能性。所有发酵罐都进行过取样操作,但是比欧发酵罐正常,而赛多利斯罐均出现染菌,说明由取样操作造成染菌的可能性大。在取样时,发酵液会接触阀芯,如果阀芯残留培养基或发酵液但又不及时清除或蒸汽灭菌,则可能孳生杂菌。Riggs 等也认为,取样阀的设计不合理会对发酵过程产生很大的影响<sup>[18]</sup>。针对赛多利斯发酵罐在空培试验中均出现染菌的情况,将赛多利斯发酵罐取样阀拆卸后进行分析,发现“O”形圈出现磨损,且存在污垢(图 3),随后对赛多利斯发酵罐进行彻底清洁并更换阀芯密封圈,进行第 2 次空培。对 C-plus 30L 发酵罐再次空培 72 h,结果显

示,溶氧量、pH 值维持稳定,24 h 后进行取样操作。最终结果显示,发酵液澄清,镜检未观察到细胞,证明第 2 次空培未出现染菌现象。

表 4 C-plus 30L 发酵罐可能染菌的环节分析

环节	分析与排查内容	风险评估
物料	有机氮源易溶解,无肉眼可见颗粒或不溶物	低
灭菌	发酵罐经过灭菌验证,灭菌过程无异常	低
接种	火焰保护,接种后培养 24 h 内均未染菌	低
培养过程	前 24 h 培养无异常,说明罐体和进气都正常	低
取样	取样操作后 2~3h 内溶氧量快速下降	高

2.2.6 二级种子培养 空培 72 h 后,按照“1.4”节的方法对发酵罐进行接种培养。由图 4 可以看出,培养过程中溶氧量和  $D_{600\text{nm}}$  的变化趋势与历史二级种子培养过程中的相应变化类似。种子一般培养 5~6 h,从溶氧量和  $D_{600\text{nm}}$  的曲线可以看出,培养 0~6 h 时,各批次的溶氧量和  $D_{600\text{nm}}$  的变化趋势高

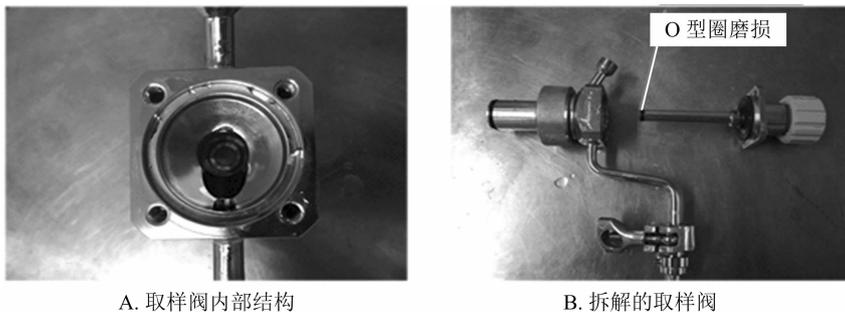
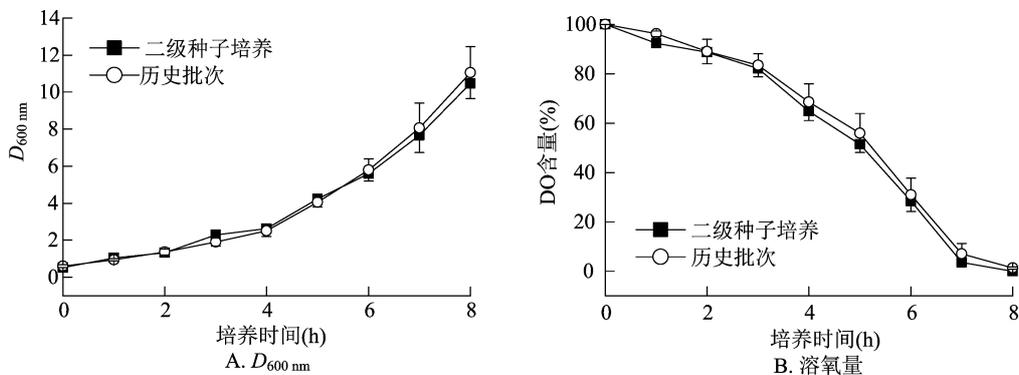


图3 C-plus 30L 发酵罐的取样阀

图4 二级种子培养过程中  $D_{600\text{ nm}}$  与溶氧量的变化

度相似,具有较好的一致性。综合分析可知,二级种子的培养过程正常。

培养结束后无菌取样镜检并稀释涂平板,检查是否有染菌情况。由图 5 - A 可以看出,二级种子菌落形态单一,呈乳白色、油脂或蜡脂状,表面光滑

湿润,为典型的酵母菌落形态,无其他异常形态。由图 5 - B 可以看出,镜检细胞呈圆形或椭圆形,伴有出芽生殖,为典型的酵母形态。由二级种子培养过程曲线、培养结束后镜检及平板培养结果可以看出,二级种子在培养过程中未发生染菌。

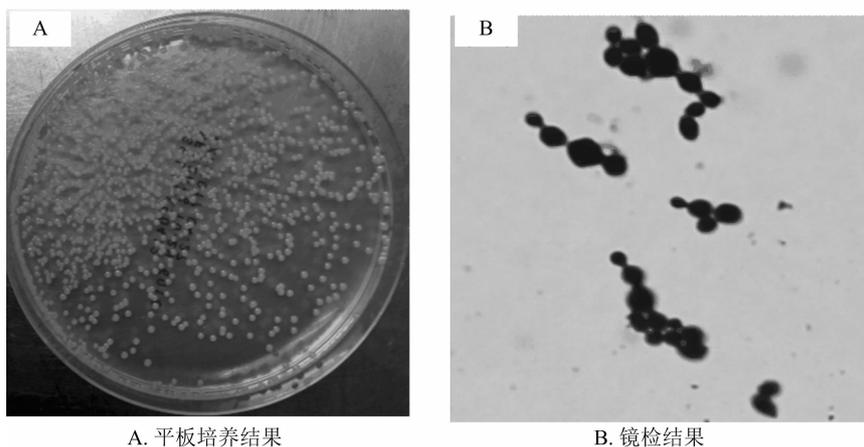


图5 二级种子平板培养及镜检结果

**2.2.7 菌体染菌分析** 取各发酵罐最近发酵批次的菌体,在无菌条件下加入无菌水进行溶解,将菌悬液稀释  $10^9$  倍,在 TSA 平板上涂布稀释液,于  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  培养 2 ~ 3 d。由表 5 可以看出,不同发酵罐

最新发酵批次的平板培养结果与镜检结果均正常,未出现染菌,而已染菌的为笔者所在公司第 1 次发现染菌的批次。

**2.2.8 染菌调查试验小结** (1) 经过试验人员的

表 5 菌体染菌分析

发酵设备	发酵批号	平板培养结果	镜检结果
NLF22 30L 发酵罐	R311(16)170213F-2 R311(18)170102F-1 R311(18)161205F-1	菌落形态单一,呈乳白色、油脂状,表面光滑湿润,为典型酵母菌落形态,无杂菌	镜检细胞呈圆形或椭圆形,伴有出芽生殖,为典型酵母形态,无杂菌
C-plus 30 L 发酵罐	R311(16)170213F-4 R311(18)170116F-3 R311(18)170116F-4	同上	同上
P 210 L 发酵罐	R311(18)170320F R311(18)170330F	同上	同上

回忆与分析,存在一些不规范操作;(2)NLF22 30L 发酵罐在进行空培、取样操作、接种操作、二级种子培养的过程中,通过取样镜检并稀释涂平板,未发现染菌现象;(3)C-plus 30 L 发酵罐在空培过程中发生染菌,经过对取样阀进行严格处理和更换密封圈后进行空培及二级种子培养,未发现染菌现象;(4)P 210 L 发酵罐进行了空培、取样、移种、补料等操作,共进行 160h 的试验,未发现染菌现象;(5)不同发酵罐最近发酵的菌体均未出现染菌;(6)分析染菌原因,可能是存在不规范的试验操作现象。C-plus 30 L 发酵罐取样阀的设计造成密封圈极易磨损。

### 2.3 预防及纠正措施

笔者所在公司的车间环境为 GMP 条件,发酵罐均为进口的全自动发酵系统,且发酵规模远小于大宗产品,因此环境和设备所带来的影响较小。然而,由于在研发阶段一些操作未被写入相关文件中,并且一些员工入职时间短,因此笔者从生产流程和人员入手,对可能造成染菌的环节采取预防及纠正措施,并以文件的形式固定下来,并对相关人员进行了系统培训,具体措施如下。

#### 2.3.1 溶液灭菌

2.3.1.1 摇瓶溶液的灭菌 (1)摇瓶溶液灭菌结束后应让灭菌锅自然降温至 100 ℃ 以下,使压力降至 0 MPa,严禁直接手动卸压,否则会因压力下降过快造成封口膜鼓胀甚至松脱。(2)摇瓶溶液在用灭菌锅灭菌后应及时开盖并取出,放置于桌面或超净工作台内自然冷却,用 75% 乙醇表面消毒后置于超净工作台内,不得放在水池内用纯化水冷却。

2.3.1.2 补料溶液的灭菌 (1)灭菌前应将补料软管插针套筒前端旋开,并检查内部棉塞的状态,如果有变色或异味应立即更换。插针套筒顶端应避免靠近灭菌锅底部,防止灭菌过程中混入不洁净的水。(2)检查补料瓶呼吸过滤器的状态,如发现

破损、变形、进水、变色,应立即更换。在呼吸过滤器上标明开始使用的日期,并在每次灭菌前标记灭菌的次数,重复灭菌满 20 次后立即更换。(3)与四阀组对接的隔膜阀在灭菌时应使其处于开启状态,灭菌结束取出补料瓶时应旋紧隔膜阀。(4)溶液在灭菌前需要确认呼吸器正常、软管已被止血钳夹紧。

2.3.2 摇瓶接种 (1)接种前开启紫外灯照射摇瓶溶液的时间不少于 30 min。(2)摇瓶用 75% 乙醇喷洒消毒后放入超净工作台内,开启风机吹干摇瓶外壁。(3)用带滤芯的吸头进行接种。

2.3.3 将种子液转移至接种瓶中 摇瓶揭开封口膜后,将瓶口立即靠近乙醇灯火焰并旋转瓶身,对瓶口进行烘烤。倒种子液时,接种瓶不应放在双人超净工作台的中间位置。

2.3.4 发酵准备工作 (1)发酵罐检漏。发酵罐定期做保压测试,对于发现泄漏的地方应采取措施解决。(2)30 L 发酵罐的清洗。发酵罐的清洗要全面,将 30 L 发酵罐的可拆卸零部件浸泡于碱液中,包括垫圈、电极堵头、空气过滤器外壳等。30 L 发酵罐的清洗过程包括 3 步:(1)用纯化水清洗干净;(2)用 0.25 mol/L 碱液浸泡 2 h 以上;(3)用纯化水冲洗干净。用碱液浸泡时,需要打开发酵罐底阀和取样阀,确认碱液与阀芯充分接触进行浸泡,在取样阀与底阀出口处连接软管并用止血钳夹紧。

2.3.5 30 L 发酵罐的灭菌 在对 30 L 发酵罐进行灭菌的过程中,对取样阀和底阀进行同步灭菌。

2.3.6 30 L 发酵罐种子的培养 在 30 L 发酵罐的培养过程中,应调节尾气阀门,使罐压维持在 20 kPa。

2.3.7 30~210 L 发酵罐的移种 (1)对移种管路灭菌 30 min,在灭菌过程中注意观察接头部分是否有蒸汽泄露。(2)将移种管路接头部分的垫圈浸泡于碱液中,使用前清洗干净,如有变形或破损,应立即更换。(3)在移种过程中,保持 30 L 发酵罐的进

气和排气处于通路状态,并调节尾气阀,维持罐压在 50 kPa 左右。

**2.3.8 过程取样** (1)取样前后都需要对取样管路进行蒸汽灭菌,时间设为 5~6 min。灭菌时遵循蒸汽流动方向依次打开取样路上的隔膜阀,灭菌结束后则倒序关闭隔膜阀。(2)210 L 发酵罐取样时先打开隔膜阀,后打开取样阀。在发酵过程中,每隔 24 h 通过取样镜检及平板涂布来判断是否染菌。

**2.3.9 210 L 发酵罐灭菌** 在灭菌过程中注意观察阀组、堵头部分是否有泄露;灭菌完成并冷却至设定温度进入保压模式后,注意观察罐压的变化。

**2.3.10 210 L 发酵罐发酵过程的补料** (1)四阀组补料口对接后灭菌 30 min。(2)开启补料阀组时,注意开启对应的四阀组,不要错开未灭菌的补料四阀组。(3)注意推阀的开启和关闭状态,防止在补料过程中软管崩开。

**2.3.11 维护保养** (1)30 L 发酵罐进气端滤芯暂定半年更换 1 次,每批在放罐后拆下并观察有无明显污染、变形或松动。(2)210 L 发酵罐进气端空气过滤器暂定 2 批次更换 1 次,尾气滤芯每批次更换 1 次,如需延长使用次数,则应在使用前进行完整性测试,检测合格后方可继续使用。(3)每个批次均对发酵罐密封圈进行检查。(4)每个季度均对发酵罐进行维护保养。(5)每个月均对超净工作台采用 0.2% 新洁尔灭/75% 乙醇擦拭轮换进行消毒;每个月对灭菌锅内的水进行更换。

**2.3.12 GMP 管理方面** (1)完善操作人员的交接班记录。(2)对相关人员定期进行 GMP 知识、车间管理、发酵操作等方面的培训。(3)将“2.3.1”节至“2.3.11”节中的内容整合进发酵罐的操作规程及工艺规程中。(4)升级工艺规程和发酵罐 SOP。

### 3 结论

针对本试验中出现的染菌现象,分质量控制要素及工艺流程进行全面分析,对工作种子库、一级种子、二级种子、滤芯、发酵罐及最新的发酵菌体进行系统排查。结果表明,染菌是由于发酵罐取样阀密封圈磨损及试验人员的一些不规范操作习惯造成的。对此,笔者所在公司采取了相应的纠正预防措施,在试验操作、设备维护、车间管理、文件修订等方面进行了一系列的整改,并对操作人员进行多次培训。在纠正预防措施实施后,进行了多批次的

发酵试验,结果显示,过程曲线、离线检测参数与历史数据具有高度的一致性,目的蛋白得率与纯度也处于历史较高水平,从而避免了毕赤酵母发酵过程中染菌的发生。

#### 参考文献:

- [1] Cregg J M, Barringer K J, Hessler A Y, et al. *Pichia pastoris* as a host system for transformations[J]. *Molecular & Cellular Biology*, 1985, 5(12): 3376-3385.
- [2] Cregg J M, Cereghino J L, Shi J Y, et al. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris* [J]. *Molecular & Cellular Biology*, 2000, 16(1): 23-52.
- [3] 武 婕, 张晓雪, 余河水, 等. 毕赤酵母工程菌高密度发酵研究与进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2016, 36(1): 108-114.
- [4] 孙玮遥, 王向东, 林 剑. 外源蛋白在毕赤酵母中的高效表达策略[J]. *中国酿造*, 2016, 35(9): 11-15.
- [5] Liu W C, Gong T, Wang Q H, et al. Scaling-up fermentation of *Pichia pastoris* to demonstration-scale using new methanol-feeding strategy and increased air pressure instead of pure oxygen supplement [J]. *Scientific Reports*, 2016, 6: 18439.
- [6] Kastilan R, Boes A, Spiegel H, et al. Improvement of a fermentation process for the production of two PfAMA1-DiCo-based malaria vaccine candidates in *Pichia pastoris* [J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 11991.
- [7] 宋增健, 薛 松, 王向东, 等. 基因重组毕赤酵母产蛋清溶菌酶发酵工艺及表达条件的优化[J]. *中国酿造*, 2018, 37(10): 20-24.
- [8] 刘继方, 徐 虹, 李明丽. 工业生产螺旋霉素发酵染菌罐批处理工艺[J]. *山东化工*, 2018, 47(14): 119-120.
- [9] 韩 佩. 酿酒酵母发酵中乳酸菌染菌的智能化防控[D]. 北京: 北京化工大学, 2014: 4-5.
- [10] 宋 磊, 孟国庆. 透明质酸工业发酵染菌分析与处理[J]. *发酵科技通讯*, 2016, 45(3): 161-164.
- [11] 任石苟, 陈岗庆, 许志芳. 乳酸发酵大生产染菌分析及处理[J]. *农产品加工·学刊*, 2006(1): 58-59.
- [12] 李素荣, 袁晓明. 抗生素菌种制备过程中染菌的防治[J]. *河北化工*, 2009, 32(1): 38-39.
- [13] 丁玮云, 苏宏艺, 俞 俊. 降低赖氨酸发酵染菌率的研究[J]. *粮食与食品工业*, 2017, 24(5): 19-21.
- [14] 刘 利. *L*-赖氨酸发酵过程染菌的途径与分析[J]. *粮食与食品工业*, 2014, 21(4): 66-69.
- [15] 向华平. 阿维菌素发酵染菌问题的探讨[J]. *化工管理*, 2018(36): 99-100.
- [16] 刘华擎, 李 灏. 生物质能源发酵中染菌及防控的研究进展[J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(12): 114-120.
- [17] Virkajärvi I, Vauhkonen T, Storgårds E. Control of microbial contamination in continuous primary fermentation by immobilized yeast[J]. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 2001, 59(2): 63-68.
- [18] Riggs J B, Karim M N. *Chemical and bio-process control* [M]. 3rd ed. Austin: Pearson Education, 2008: 201-234.