

Thử nghiệm chiến lược đồng bổ sung glycerol-methanol và sorbitol-methanol trong quá trình lên men sản xuất protein hPDGF-BB tái tổ hợp bởi *Pichia pastoris*

Lê Trung Nghĩa, Trần Hà Lạc, Nguyễn Lê Hoài Bảo, Ân Tiến Đạt, Huỳnh Hiến Vinh, Đặng Hoàng Huy, Lê Đình Đông, Nguyễn Trí Nhân*



Use your smartphone to scan this QR code and download this article

TÓM TẮT

Protein hPDGF-BB (human platelet-derived growth factor type BB) tái tổ hợp, gọi tắt là rhPDGF-BB, với khả năng kích thích tăng sinh tế bào và thúc đẩy quá trình làm lành vết thương đã được FDA chấp thuận trong điều trị loét chân do đái tháo đường. Trong nghiên cứu này, chúng tôi thử nghiệm sản xuất protein rhPDGF-BB từ lên men chủng chủ *Pichia pastoris* tái tổ hợp ở quy mô 7,5 L, sử dụng methanol vừa làm chất cảm ứng, vừa làm nguồn carbon trong giai đoạn biểu hiện protein. Kết quả cho thấy tốc độ tăng trưởng của chủng tái tổ hợp trong pha cảm ứng bởi methanol ở quy mô 7,5 L đã giảm 1,833 lần, và năng suất biểu hiện protein rhPDGF-BB cũng đã giảm 2,13 lần so với ở quy mô 0,5 L. Nhằm cải thiện sự tăng trưởng và mức độ biểu hiện protein của chủng chủ trong giai đoạn cảm ứng, chiến lược đồng bổ sung cơ chất được thực hiện bằng cách đồng bổ sung một nguồn carbon thứ hai là glycerol hoặc sorbitol cùng với chất cảm ứng methanol vào môi trường lên men, với ba tỷ lệ mol carbon khác nhau (1:1, 1:2 và 1:3). Kết quả cho thấy, sử dụng hỗn hợp glycerol:methanol ở tỷ lệ 1:2 và sorbitol:methanol ở tỷ lệ 1:3 lại giúp cải thiện hiệu quả sản xuất rhPDGF-BB cao nhất, với năng suất biểu hiện đạt 280,48 mg/L và 264,15 mg/L, tăng 1,32 lần và 1,24 lần tương ứng, so với chiến lược nuôi cấy chỉ cảm ứng bằng methanol.

Từ khoá: đồng bổ sung cơ chất, glycerol-methanol, hPDGF-BB, lên men, *Pichia pastoris*, protein tái tổ hợp, sorbitol-methanol

GIỚI THIỆU

Protein nhân tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu người dạng BB tái tổ hợp (rhPDGF-BB) có hoạt tính kích thích nguyên bào sợi và các tế bào cơ trơn tăng sinh, đồng thời kích thích sự tổng hợp các hormone quan trọng giúp thúc đẩy quá trình làm lành vết thương¹. Sản phẩm REGRANEX[®] Gel 0,01% chứa rhPDGF-BB sản xuất từ *Saccharomyces cerevisiae* đã được Cục quản lý thực phẩm và dược phẩm Mỹ (FDA) công nhận trong điều trị chứng loét chân do đái tháo đường. Tuy nhiên, giá thành của sản phẩm còn khá cao, khoảng \$586 cho một tuýp 15 g². Do đó, việc sản xuất sản phẩm này trong nước ở quy mô lớn, giúp giảm giá thành và phục vụ nhu cầu điều trị loét chi của các bệnh nhân là rất cần thiết.

Ở Việt Nam, Vương Cát Khánh và cộng sự (2014) đã tạo chủng nấm men *Pichia pastoris* X33::pdgf-b mang 16 bản sao của gen mã hóa protein rhPDGF-BB³. Từ chủng nấm men này, Dương Long Duy và cộng sự (2015) đã lên men sản xuất thành công protein rhPDGF-BB ở quy mô 0,5 L, sử dụng methanol vừa làm nguồn carbon, vừa làm chất cảm ứng trong

giai đoạn biểu hiện protein với sản lượng tiết protein mục tiêu đạt 686,69 mg/L, chiếm 57,02% tổng lượng protein tiết⁴. Đây là năng suất sản xuất tiềm năng, cao hơn các công bố sử dụng các chủng chủ khác nhau trước đây trên thế giới^{5,6}.

Tuy nhiên, việc sử dụng hoàn toàn methanol trong giai đoạn cảm ứng, nhất là ở quy mô lớn khi hiệu quả khuấy trộn bị giảm sút, có thể gây ức chế biến dưỡng và sản xuất protein của chủng nấm men tái tổ hợp. Nguyên nhân là do methanol và những sản phẩm sinh ra do biến dưỡng methanol như formaldehyde và hydroperoxide ở một nồng độ nhất định sẽ trở thành độc tố đối với tế bào, từ đó làm giảm khả năng sinh trưởng của nấm men. Ngoài ra, sự tăng cường biến dưỡng methanol cũng làm giảm hoạt động của con đường đường phân và chu trình tricarboxylic acid (TCA) dẫn đến giảm biểu hiện protein⁷. Bên cạnh đó, quá trình biến dưỡng methanol còn tiêu thụ nhiều oxy và sinh lượng nhiệt lớn⁸. Thực tế cho thấy khi áp dụng quy trình của Duy (2015) ở quy mô 0,5 L vào sản xuất rhPDGF-BB ở quy mô 25 L, tốc độ tăng trưởng của chủng giảm 1,48 lần và năng suất sản xuất giảm 8,70 lần⁹.

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Liên hệ

Nguyễn Trí Nhân, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, ĐHQG-HCM, Việt Nam

Email: ntrnhan@hcmus.edu.vn

Lịch sử

- Ngày nhận: 08-6-2021
- Ngày chấp nhận: 08-9-2021
- Ngày đăng: 30-9-2021

DOI : 10.32508/stdjet.v4i3.858



Bản quyền

© ĐHQG Tp.HCM. Đây là bài báo công bố mở được phát hành theo các điều khoản của the Creative Commons Attribution 4.0 International license.



Trích dẫn bài báo này: Nghĩa L T, Lạc T H, Bảo N L H, Đạt A T, Vinh H H, Huy D H, Đông L D, Nhân N T. Thử nghiệm chiến lược đồng bổ sung glycerol-methanol và sorbitol-methanol trong quá trình lên men sản xuất protein hPDGF-BB tái tổ hợp bởi *Pichia pastoris*. *Sci. Tech. Dev. J. - Eng. Tech.*; 4(3):1148-1156.

Để khắc phục các vấn đề liên quan khuấy trộn và cung cấp oxy, bên cạnh việc thay đổi thiết kế kỹ thuật của hệ thống lên men, nhiều nghiên cứu sản xuất protein tái tổ hợp trên *P. pastoris* đã sử dụng chiến lược phối trộn một cơ chất khác cùng methanol trong giai đoạn cảm ứng, nhằm làm giảm lượng methanol cần sử dụng, từ đó giảm các ảnh hưởng tiêu cực của methanol và giúp chúng tăng sinh mạnh mẽ¹⁰⁻¹³. Hai cơ chất thường được bổ sung cùng với methanol là glycerol và sorbitol, do quá trình biến dưỡng của chúng có trải qua con đường đường phân và chu trình TCA vốn không có khi biến dưỡng methanol, từ đó giúp tạo nhiều năng lượng ATP cho tế bào. Quá trình biến dưỡng bởi glycerol và sorbitol cũng tạo ra ít chất độc hơn, tiêu thụ ít oxy và tỏa lượng nhiệt ít hơn so với biến dưỡng methanol⁸. Chính vì vậy, nhiều nghiên cứu trước đây cho thấy việc phối trộn glycerol với methanol hoặc sorbitol với methanol làm tăng đáng kể năng suất biểu hiện protein mục tiêu ở *P. pastoris*^{11,13-21}. Tuy nhiên, cũng cần lưu ý việc sử dụng glycerol và sorbitol nồng độ cao sẽ gây ức chế hoạt động của promoter *pAOX* do tế bào ưu tiên sử dụng glycerol và sorbitol hơn methanol^{8,22}.

Trong khả năng tìm hiểu của chúng tôi, cho đến nay chưa có nghiên cứu nào sử dụng chiến lược đồng bổ sung cơ chất cho sản xuất protein rhPDGF-BB trên chủng *P. pastoris* tái tổ hợp được công bố. Vì vậy, nghiên cứu này hướng đến thử nghiệm chiến lược đồng bổ sung một cơ chất khác cùng với methanol trong giai đoạn cảm ứng biểu hiện, nhằm cung cấp dữ liệu tham khảo phục vụ cho các thử nghiệm nâng quy mô sản xuất protein rhPDGF-BB về sau. Quy mô pilot 7,5 L và hai chất đồng bổ sung glycerol và sorbitol được sử dụng trong nghiên cứu này. Ba tỷ lệ mol carbon giữa glycerol:methanol và sorbitol:methanol được thử nghiệm là 1:1, 1:2 và 1:3, là các tỷ lệ vốn đã được đề xuất có hiệu quả trong các nghiên cứu trước^{11,13-21}. Kết quả quá trình lên men được đánh giá qua khả năng tăng trưởng và hiệu quả biểu hiện protein mục tiêu của chủng.

VẬT LIỆU – PHƯƠNG PHÁP

Chủng, môi trường, hệ thống lên men

Chủng *Pichia pastoris* X33::*pdgf-b* mang 16 bản sao gene *pdgf-b* biểu hiện protein rhPDGF-BB ngoại bào được cung cấp bởi Bộ môn Công nghệ Sinh học Phân tử và Môi trường, Khoa Sinh học - Công nghệ Sinh học, Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia thành phố Hồ Chí Minh³. Chủng nấm men được lưu giữ ở -80°C trong môi trường MD-zeo chứa 20% glycerol. Môi trường MD-zeo chứa YNB 1,34%, biotin 4.10⁻⁵%, D-glucose 1% và zeocine 0,1 mg/mL.

Môi trường hoạt hoá sơ cấp YPD chứa cao nấm men 1%, peptone 2% và D-glucose 2%. Môi trường hoạt hoá thứ cấp BMGY chứa cao nấm men 1%, peptone 2%, glycerol 1%, 100 mM phosphate buffer pH 6,0, biotin 4.10⁻⁵% và YNB 1,34%. Khoáng vi lượng PTM1 (trong 1 lít) chứa 6,0 g CuSO₄.5H₂O, 0,08 g NaI, 3,0 g MnSO₄.H₂O, 0,2 g NaMoO₄.2H₂O, 0,02 g H₃BO₃, 0,5 g CoCl₂, 20,0 g ZnCl₂, 65,0 g FeSO₄.7H₂O, 0,2 biotin và 5,0 mL H₂SO₄. Môi trường lên men BSM (trong 1 lít) chứa 26,7 mL H₃PO₄ 85%, 0,93 g CaSO₄, 18,2 g K₂SO₄, 14,9 g MgSO₄.7H₂O, 4,13 KOH và 40 g glycerol, có bổ sung 4,35 mL/L PTM1. Dung dịch glycerol 50%, có bổ sung 12 mL/L PTM1. Dung dịch methanol 100% có bổ sung 12 mL/L PTM1. Điều chỉnh pH bằng NH₄OH 25% và H₃PO₄ 85%. Phá bọt bằng polyglycols 1%. Hệ thống lên men FERMENTOR 15 L (MITECOM, Việt Nam).

Quy trình lên men ở thể tích 7.5 L

Quy trình lên men mẻ bổ sung chủng *P. pastoris* tái tổ hợp để sản xuất protein rhPDGF-BB ở quy mô 7,5 L được áp dụng từ quy trình do tác giả Dương Long Duy và cộng sự (2015) công bố⁴. Chủng nấm men *P. pastoris* tái tổ hợp từ tủ đông -80°C được hoạt hoá trong 20 mL YPD ở 30°C, lắc 250 vòng/phút trong 2 ngày. Sau đó, 5 mL sinh khối được chuyển sang 100 mL môi trường YPD, tiếp tục được nuôi cấy thêm 1 ngày thì cấy chuyển sang 750 mL môi trường BMGY và nuôi cấy lắc ở 30°C, 250 vòng/phút trong 20 – 24 giờ. Khi OD₆₀₀ đạt 3 – 10, chủng được sử dụng làm giống cho quá trình lên men mẻ - bổ sung với tỷ lệ thể tích giống/thể tích môi trường là 10%. Giai đoạn mẻ glycerol, nấm men tăng trưởng trong môi trường BSM đã bổ sung 4,35 mL/L PTM1, ở 30°C, pH 5,0, nồng độ oxy hòa tan (DO) được giữ trên 10% đến khi sinh khối tươi đạt 120 – 150 g/L. Khi nguồn glycerol trong môi trường BSM cạn kiệt (thể hiện qua sự tăng đột biến DO), glycerol 50% được bổ sung với tốc độ 18,15 mL/L/h trong 4 giờ để gia tăng thêm lượng sinh khối, điều kiện lên men vẫn giữ như cũ. Sau đó, methanol được bổ sung vào môi trường với tốc độ 3,6 mL/L/h trong 5 giờ đầu, 7,2 mL/L/h trong 3 giờ tiếp theo và 10,9 mL/L/h trong 64 giờ với pH được điều chỉnh đạt 6.5. Mẫu dịch nuôi cấy mỗi 4 giờ được ly tâm 13000 vòng/phút trong 15 phút để xác định sinh khối tươi, thu dịch tiết ngoại bào mỗi 12 giờ sau khi cảm ứng để phân tích mức độ biểu hiện protein.

Thử nghiệm chiến lược đồng bổ sung cơ chất glycerol-methanol và sorbitol-methanol trong giai đoạn cảm ứng biểu hiện protein rhPDGF-BB

Quy trình lên men được thực hiện tương tự như trên ở thể tích 7,5 L. Tuy nhiên, trong giai đoạn cảm ứng,

glycerol hoặc sorbitol được bổ sung đồng thời với methanol theo các tỷ lệ số mol carbon là 1:1, 1:2 và 1:3 (ký hiệu GM11, GM12, GM13, SM11, SM12 và SM13, với G là glycerol, S là sorbitol và M là methanol) và được bổ sung với tốc độ tương tự như quy trình trên (3,6 mL/L/h trong 5 giờ đầu, 7,2 mL/L/h trong 3 giờ tiếp theo và 10,9 mL/L/h trong 64 giờ), trong đó đảm bảo tổng số mol carbon của các hỗn hợp GM và SM tương đương với tổng số mol carbon của dung dịch bổ sung chỉ chứa methanol.

Đánh giá hiệu quả lên men

Đường cong tăng trưởng

Đường cong tăng trưởng được xây dựng dựa trên thời gian cảm ứng và logarit tự nhiên mật độ sinh khối tươi tương ứng (\ln WCW). Trong đó thời điểm bắt đầu giai đoạn bổ sung methanol có giá trị là 0 giờ. Trước giai đoạn cảm ứng methanol, thời gian được tính bằng các con số âm.

Tốc độ tăng trưởng đặc trưng

Tốc độ tăng trưởng đặc trưng μ (h^{-1}) được tính theo công thức²³:

$$\ln(X) = \mu t + \ln(X_0)$$

Trong đó: X_0 là sinh khối tươi ban đầu (g/L), t là thời gian nuôi cấy (h), X là sinh khối tươi tại thời điểm t (g/L).

Sản lượng protein mục tiêu

Mức độ biểu hiện rhPDGF-BB được phân tích bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và hiện vạch protein bằng phương pháp nhuộm bạc. Phần mềm GelAnalyzer (<http://www.gelalyzer.com>) được dùng để phân tích hình ảnh điện di, từ đó xác định tỷ lệ rhPDGF-BB (%rhPDGF-BB) có trong dịch tiết ngoại bào. Nồng độ protein tổng số được định lượng bằng phương pháp đo Bradford.

Nồng độ rhPDGF-BB (mg/L) = Nồng độ protein tổng số (mg/L) * Tỷ lệ rhPDGF-BB (%).

Sản lượng rhPDGF-BB (mg) = Nồng độ rhPDGF-BB (mg/L) * Thể tích dịch lên men thu được (L).

Năng suất sản xuất rhPDGF-BB (mg/L) = Sản lượng rhPDGF-BB (mg) / Thể tích môi trường ban đầu (L).

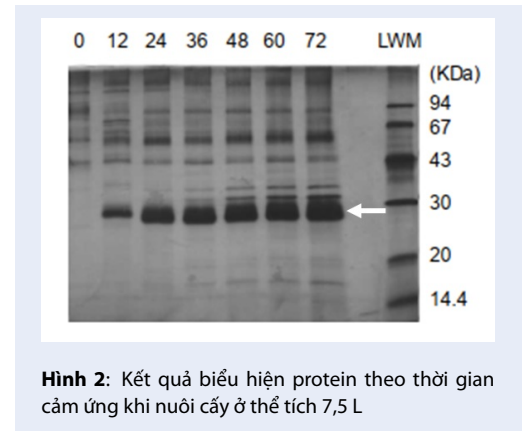
KẾT QUẢ

Đánh giá hiệu quả lên men ở thể tích 7,5 L

Chủng *P. pastoris* mang gen mã hóa cho protein rhPDGF-BB được thử nghiệm lên men ở thể tích 7,5 L bằng quy trình lên men mẻ-bổ sung đã được tối ưu cho thể tích 0,5 L⁴. Hiệu quả được đánh giá thông qua sự tăng trưởng của chủng và mức độ biểu hiện protein mục tiêu.

Sự tăng trưởng của chủng có dạng tăng trưởng kép (Hình 1) thể hiện 2 giai đoạn tăng trưởng trên 2 nguồn cơ chất khác nhau là glycerol (trước giờ 0 – giờ bổ sung methanol) và trên methanol (sau giờ 0). Điều này cho thấy chủng đã đáp ứng được với glycerol và methanol, có thể biểu hiện protein mục tiêu. Tốc độ tăng trưởng đặc trưng trên glycerol (trước cảm ứng) và methanol (giai đoạn cảm ứng) lần lượt là $0,1240 \pm 0,0131 h^{-1}$ và $0,0066 \pm 0,0007 h^{-1}$.

So với kết quả sản xuất rhPDGF-BB ở thể tích 0,5 L của Duy và cộng sự⁴, ở thể tích 7,5 L, tốc độ tăng trưởng đặc trưng của chủng tăng 0,1250 lần trong pha bổ sung glycerol, nhưng giảm 1,8333 lần trong pha bổ sung methanol (Bảng 1). Điều này có thể do sự thiếu hụt oxy khi được nuôi cấy ở mật độ cao và thể tích lớn, thể hiện thông qua giá trị DO giảm về 0,5 – 2% trong suốt quá trình cảm ứng mặc dù chủng được cung cấp oxy nguyên chất với tốc độ bơm tối đa mà hệ thống lên men có thể đáp ứng.

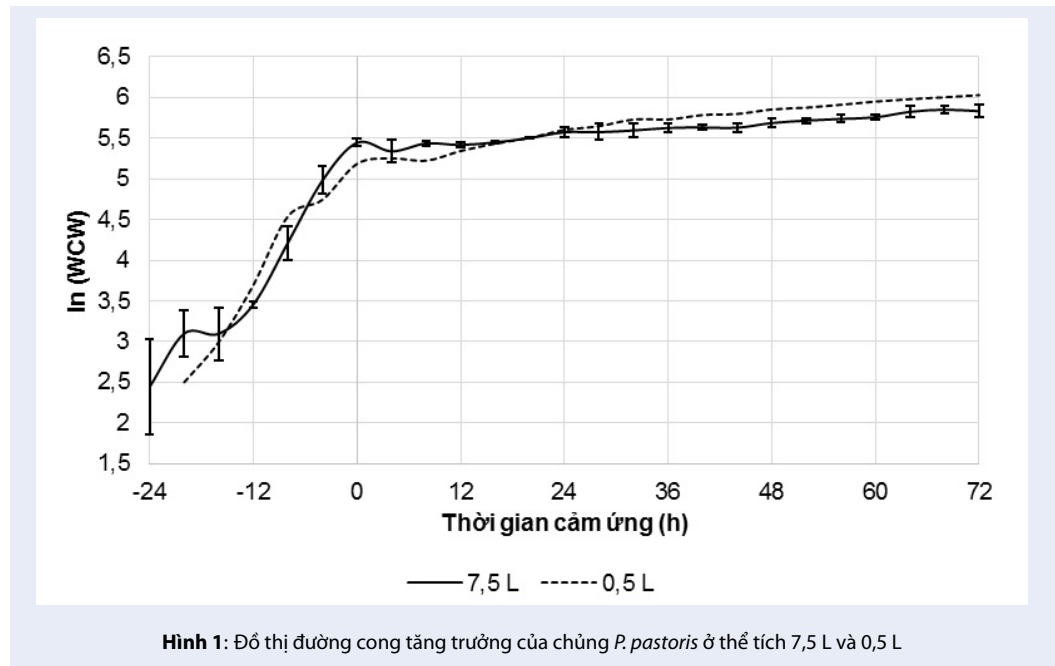


Hình 2: Kết quả biểu hiện protein theo thời gian cảm ứng khi nuôi cấy ở thể tích 7,5 L

Mức độ biểu hiện protein theo thời gian sau 72 giờ cảm ứng ở thể tích lên men 7,5 L được trình bày trong Hình 2. Protein mục tiêu có trong dịch tiết ngoại bào chiếm $53,05\% \pm 8,23\%$, năng suất biểu hiện đạt $212,80 \pm 22,03$ mg/L thấp hơn 2,13 lần so với nuôi cấy trên thể tích 0,5 L (Bảng 2).

Thử nghiệm chiến lược đồng bổ sung cơ chất glycerol-methanol và sorbitol-methanol trong giai đoạn cảm ứng biểu hiện protein rhPDGF-BB

Để cải thiện kết quả biểu hiện protein khi tăng quy mô lên men, hai chiến lược đồng bổ sung cơ chất glycerol-methanol và sorbitol-methanol được tiến hành với ba tỷ lệ số mol carbon từ glycerol và sorbitol so với từ methanol là 1:1, 1:2 và 1:3. Bằng việc kết hợp methanol-glycerol và methanol-sorbitol trong giai đoạn cảm ứng, tất cả nghiệm thức đều cho thấy



Bảng 1: So sánh tốc độ tăng trưởng đặc trưng của chủng khi nuôi cấy ở thể tích 7,5 L và 0,5 L

Tốc độ tăng trưởng đặc trưng (μ)	7,5 L	0,5 L
$\mu_{glycerol}$	0,1240 ± 0,0131	0,1394
$\mu_{methanol}$	0,0066 ± 0,0007	0,0121

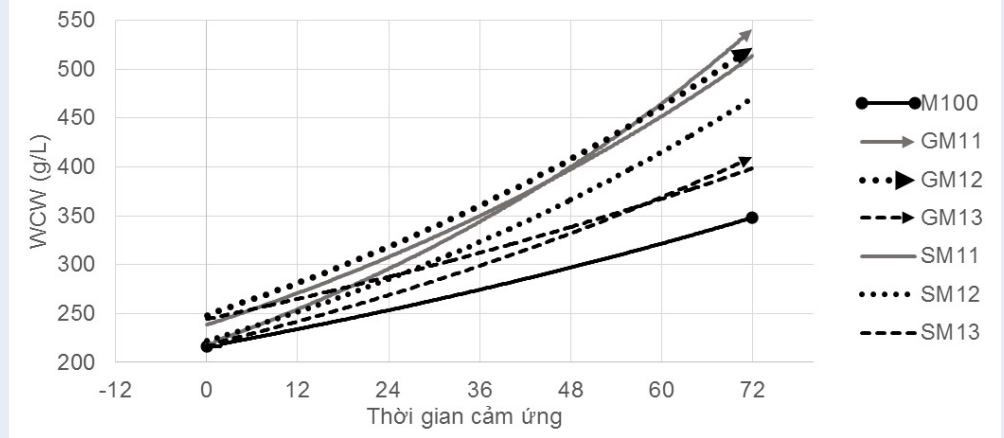
Bảng 2: So sánh mức độ biểu hiện protein rhPDGF-BB sau 72 giờ nuôi cấy ở thể tích 7,5 L và 0,5 L

	7,5 L	0,5 L
Tỷ lệ rhPDGF-BB sau 72 giờ cảm ứng (%)	53,05 ± 8,22	57,02
Nồng độ protein tổng (mg/L)	593,1 ± 49,9	1174,7
Sản lượng rhPDGF-BB (mg)	1595,98 ± 165,20	236,90
Năng suất biểu hiện (mg/L)	212,80 ± 22,03	473,80

sự cải thiện về mật độ sinh khối và tốc độ tăng trưởng (Hình 3 và Hình 4).

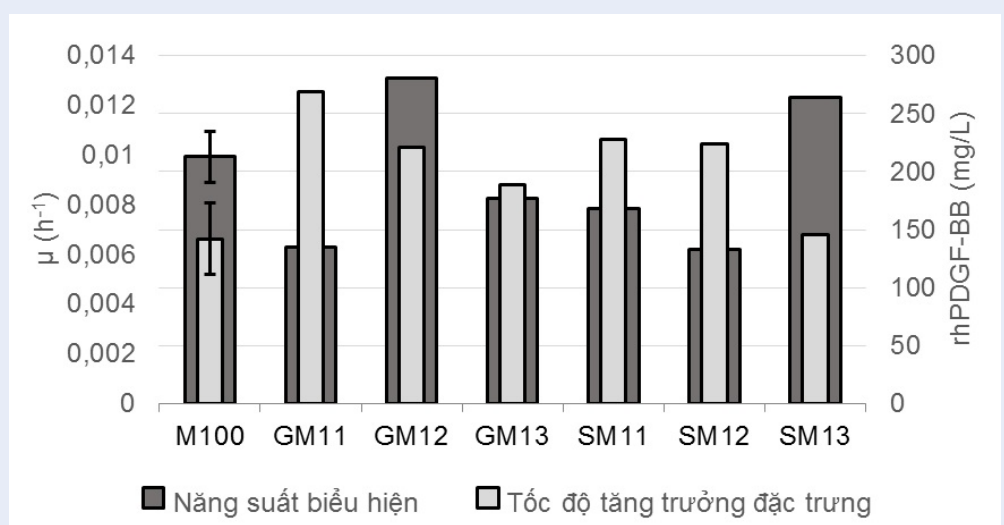
Về mật độ sinh khối, theo tỷ lệ tăng dần của đồng cơ chất, mật độ sinh khối đạt được sau 72 giờ cảm ứng của các nghiệm thức SM13, SM12, SM11, GM13, GM12 và GM11 cao hơn nghiệm thức chỉ bổ sung methanol lần lượt 1,06; 1,22; 1,38; 1,15; 1,43 và 1,48 lần (Hình 3). Tốc độ tăng trưởng đặc trưng nhìn chung có xu hướng tăng dần khi phối trộn methanol với glycerol hoặc với sorbitol (Hình 4). Trong đó, sự tăng trưởng của chủng nhanh nhất khi sử dụng hỗn hợp 1 mol carbon từ glycerol và 1 mol carbon từ methanol (GM11, $\mu_{GM11} = 0,0126$), cao gấp 1,9 lần so với chỉ sử dụng methanol ($\mu_{M100} = 0,0066$). Sử dụng hỗn hợp sorbitol-methanol với tỷ lệ sorbitol thấp nhất

(SM13) không cho thấy sự khác biệt rõ rệt trong tốc độ tăng trưởng so với các tỷ lệ phối hợp khác. Nhìn chung, phối trộn methanol với glycerol có hiệu quả hơn sorbitol trong cải thiện sự tăng trưởng của chủng. Mức độ biểu hiện protein mục tiêu không cùng xu hướng với sự tăng trưởng của chủng (Hình 4). Năng suất sản xuất protein rhPDGF-BB ở các nghiệm thức GM11, GM13, SM11 và SM12 giảm, mặc dù tốc độ tăng trưởng đặc trưng của chủng tăng. Ngược lại, nghiệm thức SM13 không cho thấy sự cải thiện về mật độ tăng trưởng của chủng, nhưng hiệu quả biểu hiện protein gia tăng 1,24 lần, đạt hiệu quả cải thiện cả sự tăng trưởng của chủng và mức độ biểu hiện protein mục tiêu là nghiệm thức GM12, với năng suất sản xuất protein tăng 1,31 lần so với chỉ bổ sung methanol trong



Hình 3: Đường hồi quy hàm số mũ sinh khối tươi ($X=X_0e^{\mu t}$) giữa các nghiệm thức phối trộn cơ chất cảm ứng trên thể tích 7,5 L^a

^a Chú thích: R2 lần lượt cho M100, GM11, GM12, GM13, SM11, SM12, SM13 là 0,96, 0,94, 0,96, 0,96, 0,90, 0,94, 0,70. X: Sinh khối tại thời điểm t, X₀: Sinh khối tại thời điểm ban đầu



Hình 4: Tốc độ tăng trưởng đặc trưng trong giai đoạn cảm ứng và năng suất biểu hiện protein mục tiêu giữa các nghiệm thức phối trộn cơ chất cảm ứng trên thể tích nuôi cấy 7,5 L

giai đoạn cảm ứng (nghiệm thức M100).

THẢO LUẬN

Nguyên nhân sụt giảm hiệu quả lên men ở quy mô 7,5 L

Sự suy giảm 1,833 lần về tốc độ tăng trưởng trong giai đoạn cảm ứng và 2,13 lần về năng suất sản xuất protein mục tiêu của chủng *P. pastoris* khi nâng quy mô lên men từ 0,5 L lên 7,5 L tương đồng với các nghiên cứu khác về tăng quy mô sản xuất trong lên men công

nh nghiệp²⁴⁻²⁶. Nhiều nghiên cứu chỉ ra các thách thức khi tăng quy mô sản xuất như thể tích của hệ thống lên men càng lớn thì hiệu quả khuấy trộn, tốc độ truyền khối khí và chất lỏng càng giảm, trong khi áp lực thủy tĩnh lên tế bào lại gia tăng. Hiệu quả khuấy trộn và tốc độ truyền khối giảm dẫn đến các tế bào ở gần bề mặt môi trường nuôi cấy sẽ dư thừa cơ chất được bổ sung vào từ phía trên bồn men, nhưng lại bị giới hạn nguồn oxy vốn được sục vào từ phía dưới đáy bồn, và ngược lại đối với các tế bào ở phần đáy, dư oxy nhưng thiếu cơ chất²⁷. Trong khi đó, sự biến dưỡng methanol

vấn đòi hỏi nhiều oxy, sinh lượng nhiệt lớn và tạo ra nhiều chất độc đối với tế bào như formaldehyde và hydroperoxide⁷. Việc vận chuyển và loại bỏ CO₂ kém hiệu quả kết hợp với sự tích tụ những chất chuyển hóa có hại và nhiệt lượng cục bộ do tốc độ truyền khối thấp dẫn đến hình thành các khu vực gây căng thẳng (stress) cho tế bào. Điều này dẫn đến kích hoạt một số gen phản kháng với điều kiện khắc nghiệt²⁸, thay đổi các con đường chuyển hóa bên trong tế bào và gây hư hại quá trình tổng hợp và vận chuyển protein²⁹. Hơn nữa, các khu vực stress cục bộ này còn luân phiên thay đổi bên trong hệ thống bốn lên men, làm cho các tế bào thường xuyên rơi vào trạng thái tắt – mở các gen phản kháng nói trên, dẫn đến sự thay đổi về sinh lý tế bào và hệ quả là gây ra sự giảm sút tăng trưởng và sản xuất protein mục tiêu của chủng tái tổ hợp³⁰.

Hiệu quả tăng cường sự biểu hiện protein mục tiêu thông qua chiến lược đồng bổ sung cơ chất trong giai đoạn cảm ứng

Trong quá trình sản xuất protein tái tổ hợp từ chủng chủ *P. pastoris*, methanol đóng vai trò vừa là nguồn carbon cho chủng tăng trưởng, vừa là chất cảm ứng để biểu hiện protein. Tuy nhiên, việc biến dưỡng methanol không thông qua con đường đường phân và chu trình TCA vốn sản sinh lượng lớn ATP cho tế bào, sinh ra nhiều chất độc đối với tế bào và tiêu tốn nhiều oxy hơn so với một số cơ chất khác⁷. Việc đồng bổ sung glycerol hoặc sorbitol với methanol trong giai đoạn cảm ứng giúp khắc phục các nhược điểm trên của methanol, từ đó cải thiện hiệu quả biểu hiện protein^{7,11,31}. Các tỷ lệ phối trộn giữa glycerol và sorbitol với methanol được công bố có hiệu quả trước đây là tỷ lệ mol carbon 1:1, 1:2 và 1:3, tức 1 mol carbon glycerol hoặc sorbitol sử dụng với 1, 2 hoặc 3 mol carbon của methanol^{11,13-21}.

Trong nghiên cứu này, các tỷ lệ phối trộn khác nhau giữa glycerol:methanol và sorbitol:methanol đã cho các kết quả cải thiện sản xuất protein rhPDGF-BB khác nhau. Sự biểu hiện protein mục tiêu giảm khi sử dụng glycerol ở mức cao (thí nghiệm GM11, tỷ lệ mol carbon của glycerol tương đương với methanol) hoặc mức thấp (thí nghiệm GM13, tỷ lệ mol carbon của glycerol chỉ bằng 1/3 của methanol). Do glycerol ngoài vai trò tăng sinh nấm men, còn được biết đến về khả năng ức chế promoter *pAOX*³². Vì vậy, sử dụng với nồng độ glycerol cao (GM11) dẫn đến nấm men tăng sinh mạnh nhưng cũng giảm biểu hiện protein mục tiêu. Điều này trùng khớp với nghiên cứu của Hellwig²⁰. Ngược lại, ở nồng độ thấp (GM13), do nấm men ưu tiên sử dụng glycerol hơn methanol⁸, nhưng lượng cơ chất này lại không đủ để đáp ứng nhu

cầu của tế bào nên tế bào phải chuyển đổi liên tục giữa trạng thái tiêu thụ glycerol và tiêu thụ methanol. Điều này dẫn đến sự không ổn định và suy giảm biểu hiện protein mục tiêu. Tuy nhiên, nhận định này cần các nghiên cứu sâu hơn để làm sáng tỏ.

Hiệu quả tốt của chiến lược lên men đồng bổ sung cơ chất với tỷ lệ mol carbon của glycerol bằng 1/2 của methanol (thí nghiệm GM12), giúp cải thiện năng suất sản xuất protein mục tiêu lên 1,31 lần so với chỉ bổ sung methanol, cho thấy có sự tương đồng với các công bố trước đây của Canales (2015)¹⁷, Jungo (2007)¹⁶, Woo (2004)¹⁸, Hellwig (2001)²⁰ và Zhang (2003)¹⁹.

Không giống như glycerol, sorbitol tỏ ra hiệu quả khi bổ sung với tỷ lệ mol carbon thấp hơn nhiều so với methanol. Thí nghiệm SM13 với tỷ lệ mol carbon của sorbitol chỉ bằng 1/3 tỷ lệ mol carbon của methanol cho hiệu quả cải thiện khả năng biểu hiện protein rhPDGF-BB lên 1,24 lần. Điều này cũng trùng khớp với các công bố của T. Zhu²¹, C. Arnau¹⁴ và Azadi¹⁵, khi sử dụng phối hợp sorbitol và methanol thì chiếm tỷ lệ lớn trong hỗn hợp cơ chất là methanol. Nguyên nhân do nấm men sử dụng sorbitol tương đối mạnh và khả năng ức chế promoter *pAOX* của sorbitol mạnh hơn glycerol²² nên trong điều kiện sorbitol nồng độ cao, nấm men sẽ có xu hướng tăng sinh khối nhiều hơn là sản xuất protein tái tổ hợp.

Để hiểu rõ hơn về cơ chế tác động của chiến lược đồng bổ sung cơ chất đến sự biểu hiện protein mục tiêu và nhu cầu sử dụng oxy của chủng, những nghiên cứu chuyên sâu hơn cần được tiến hành.

KẾT LUẬN

Khi biểu hiện protein rhPDGF-BB ở thể tích 7,5 L và chỉ bổ sung một loại cơ chất methanol trong giai đoạn cảm ứng, năng suất biểu hiện protein chỉ đạt 221,5 mg/L, giảm 2,11 lần so với khi lên men ở thể tích 0,5 L⁴. Trong khi đó, với chiến lược lên men đồng bổ sung cơ chất glycerol-methanol và sorbitol-methanol năng suất biểu hiện protein đã tăng tương ứng 1,32 và 1,24 lần. Cụ thể, khi sử dụng hỗn hợp glycerol:methanol với tỷ lệ mol carbon 1:2, năng suất biểu hiện protein đạt 280,48 mg rhPDGF-BB/L; còn khi sử dụng hỗn hợp sorbitol:methanol với tỷ lệ mol carbon 1:3 năng suất biểu hiện protein đạt 264,15 mg rhPDGF-BB/L.

LỜI CẢM ƠN

Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Trường Đại học Khoa học Tự Nhiên, Đại học Quốc gia TP. HCM “Thử nghiệm chiến lược đồng bổ sung glycerol-methanol và sorbitol-methanol trong quá trình lên men sản

xuất protein hPDGF-BB tái tổ hợp bởi *Pichia pastoris*^{*} (quyết định số 512/QĐ/KHTN-KH).

XUNG ĐỘT LỢI ÍCH

Các tác giả khẳng định không có xung đột lợi ích đối với các nghiên cứu, tác giả hoặc xuất bản bài báo

ĐÓNG GÓP CỦA CÁC TÁC GIẢ

Lê Trung Nghĩa: thiết kế, thực hiện thí nghiệm, phân tích số liệu

Trần Hà Lạc: phân tích số liệu, biên soạn bản thảo

Nguyễn Lê Hoài Bảo, Ân Tiến Đạt, Huỳnh Hiền Vinh, Đặng Hoàng Huy, Lê Đình Đông: thực hiện thí nghiệm và thu thập dữ liệu

Nguyễn Trí Nhân: tác giả hồi đáp, cố vấn, đánh giá kết quả, góp ý, chỉnh sửa bản thảo

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Chen P-H, Chen X, He X. Platelet-derived growth factors and their receptors: structural and functional perspectives. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*. 2013;1834(10):2176-86;PMID: 23137658. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.10.015>.
2. Jarvis Cl. Becaplermin (Regranex) for diabetic foot ulcers. *AMERICAN FAMILY PHYSICIAN*. 2008;78(2):255-6;.
3. Khanh VC, Trang NTH, Thanh NPP, Thao DTP, Thuoc TL. A study on constructing and screening of multi-copy pdgf recombinant *Pichia pastoris* clones producing high yield of PDGF-BB (platelet derived growth factor BB). *TAP CHI SINH HOC*. 2014;36(1se):77-83;Available from: <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v36n1se.4372>.
4. Duy DL, Vu PM, Nhan NT, Thuoc TL, Thao DTP. Optimization of fermentation conditions for the production of recombinant hpdgf-bb in *Pichia pastoris*. *TAP CHI SINH HOC*. 2015;37(1se):255-60;Available from: <https://doi.org/10.15625/0866-7160/v37n1se.6119>.
5. Babavalian H, Latifi AM, Shokrgozar M, Bonakdar S, Tebyania H, Shakeri F. Cloning and expression of recombinant human platelet-derived growth factor-BB in *Pichia Pink*. *Cellular and Molecular Biology*. 2016;62:45-51;.
6. Wang Y, Xue L, Li Y, Zhu Y, Yang B, Wang X. High-level secretory production of recombinant human platelet-derived growth factor-BB by *Saccharomyces cerevisiae* under the non-selective conditions. *Prikladnaia biokhimiia i mikrobiologiya*. 2009;45:176-80;PMID: 19382704. Available from: <https://doi.org/10.1134/S0003683809020070>.
7. Meyer H, Brass J, Jungo C, Klein J, Wenger J, Mommers R. An emerging star for therapeutic and catalytic protein production. *BioProcess International*. 2008;6:10;.
8. Heyland J, Fu J, Blank LM, Schmid A. Carbon metabolism limits recombinant protein production in *Pichia pastoris*. *Biotechnology and bioengineering*. 2011;108(8):1942-53;PMID: 21351072. Available from: <https://doi.org/10.1002/bit.23114>.
9. Đinh Quang Lộc T, Nghĩa LT, Lạc TH, Xuân LMH, Nhân NT. THỬ NGHIỆM SẢN XUẤT rhPDGF-BB TRÊN THỂ TÍCH 7,5 L VÀ 25 L TỪ CHŨNG *Pichia pastoris*. *Kỷ yếu Hội nghị Công nghệ Sinh học toàn quốc 2020*. 2020:457-62;.
10. Niu H, Jost L, Pirlot N, Sassi H, Daukandt M, Rodriguez C, et al. A quantitative study of methanol/sorbitol co-feeding process of a *Pichia pastoris* Mut+/pAOX1-lacZ strain. *Microbial Cell Factories*. 2013;12(1):33;PMID: 23565774. Available from: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-12-33>.
11. Gao MJ, Li Z, Yu RS, Wu JR, Zheng ZY, Shi ZP, et al. Methanol/sorbitol co-feeding induction enhanced porcine interferon-alpha production by *P. pastoris* associated with energy metabolism shift. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2012;35(7):1125-36;PMID: 22349926. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00449-012-0697-1>.
12. Gao MJ, Zhan XB, Gao P, Zhang X, Dong SJ, Li Z, et al. Improving Performance and Operational Stability of Porcine Interferon-alpha Production by *Pichia pastoris* with Combinational Induction Strategy of Low Temperature and Methanol/Sorbitol Co-feeding. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2015;176(2):493-504;PMID: 25875784. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12010-015-1590-6>.
13. Batra J, Beri D, Mishra S. Response surface methodology based optimization of beta-glucosidase production from *Pichia pastoris*. *Applied biochemistry and biotechnology*. 2014;172(1):380-93;PMID: 24081708. Available from: <https://doi.org/10.1007/s12010-013-0519-1>.
14. Arnau C, Ramon R, Casas C, Valero F. Optimization of the heterologous production of a *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris* system using mixed substrates on controlled fed-batch bioprocess. *Enzyme and microbial technology*. 2010;46(6):494-500;PMID: 25919625. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2010.01.005>.
15. Azadi S, Mahboubi A, Naghdi N, Solaimanian R, Mortazavi SA. Evaluation of Sorbitol-Methanol Co-Feeding Strategy on Production of Recombinant Human Growth Hormone in *Pichia Pastoris*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2017;16(4):555-64;.
16. Jungo C, Marison I, von Stockar U. Mixed feeds of glycerol and methanol can improve the performance of *Pichia pastoris* cultures: A quantitative study based on concentration gradients in transient continuous cultures. *Journal of biotechnology*. 2007;128(4):824-37;PMID: 17303281. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2006.12.024>.
17. Canales C, Altamirano C, Berrios J. Effect of dilution rate and methanol-glycerol mixed feeding on heterologous *Rhizopus oryzae* lipase production with *Pichia pastoris* Mut(+) phenotype in continuous culture. *Biotechnology progress*. 2015;31(3):707-14;Available from: <https://doi.org/10.1002/btpr.2069>PMid:25740724.
18. Woo JH, Liu YY, Stavrou S, Neville DM, Jr. Increasing secretion of a bivalent anti-T-cell immunotoxin by *Pichia pastoris*. *Applied and environmental microbiology*. 2004;70(6):3370-6;PMID: 15184133. Available from: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.6.3370-3376.2004>.
19. Zhang W, Potter KJH, Plantz BA, Schlegel VL, Smith LA, Meagher MM. *Pichia pastoris* fermentation with mixed-feeds of glycerol and methanol: growth kinetics and production improvement. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2003;30(4):210-5;PMID: 12687491. Available from: <https://doi.org/10.1007/s10295-003-0035-3>.
20. Hellwig S, Emde F, Raven NP, Henke M, van Der Logt P, Fischer R. Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using on-line methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. *Biotechnology and bioengineering*. 2001;74(4):344-52;PMID: 11410859. Available from: <https://doi.org/10.1002/bit.1125>.
21. Zhu T, You L, Gong F, Xie M, Xue Y, Li Y, et al. Combinatorial strategy of sorbitol feeding and low-temperature induction leads to high-level production of alkaline beta-mannanase in *Pichia pastoris*. *Enzyme and microbial technology*. 2011;49(4):407-12;PMID: 22112568. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.06.022>.
22. Capone S, Horvat J, Herwig C, Spadiut O. Development of a mixed feed strategy for a recombinant *Pichia pastoris* strain producing with a de-repression promoter. *Microb Cell Fact*. 2015;14:101;PMID: 26156850. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12934-015-0292-7>.
23. Zhang W, Bevins MA, Plantz BA, Smith LA, Meagher MM. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin, serotype A. *Biotechnol Bioeng*. 2000;70(1):1-8;Available from: [https://doi.org/10.1002/1097-0290\(20001005\)70:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1097-0290(20001005)70:1<1::AID-BIT1>3.0.CO;2-Y).

24. Nienow AW. Scale-Up Considerations Based on Studies at the Bench Scale in Stirred Bioreactors. *JOURNAL OF CHEMICAL ENGINEERING OF JAPAN*. 2009;42(11):789-96; Available from: <https://doi.org/10.1252/jcej.08we317>.
25. Schweder T, Kruger E, Xu B, Jurgen B, Blomsten G, Enfors SO, et al. Monitoring of genes that respond to process-related stress in large-scale bioprocesses. *Biotechnology and bioengineering*. 1999;65(2):151-9; Available from: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0290\(19991020\)65:2<151::AID-BIT4>3.0.CO;2-V](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0290(19991020)65:2<151::AID-BIT4>3.0.CO;2-V).
26. Liu W-C, Gong T, Wang Q-H, Liang X, Chen J-J, Zhu P. Scaling-up Fermentation of *Pichia pastoris* to demonstration-scale using new methanol-feeding strategy and increased air pressure instead of pure oxygen supplement. *Scientific Reports*. 2016;6(1):18439; PMID: 26790977. Available from: <https://doi.org/10.1038/srep18439>.
27. Xia J, Wang G, Fan M, Chen M, Wang Z, Zhuang Y. Understanding the scale-up of fermentation processes from the viewpoint of the flow field in bioreactors and the physiological response of strains. *Chinese Journal of Chemical Engineering*. 2021;30:178-84; Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cjche.2020.12.004>.
28. Kvint K, Nachin L, Diez A, Nystrom T. The bacterial universal stress protein: function and regulation. *Current opinion in microbiology*. 2003;6(2):140-5; Available from: [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(03\)00025-0](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(03)00025-0).
29. Umakoshi H, Kuboi R, Komasaawa I, Tsuchido T, Matsumura Y. Heat-induced translocation of cytoplasmic beta-galactosidase across inner membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnology progress*. 1998;14(2):210-7; PMID: 9548771. Available from: <https://doi.org/10.1021/bp970111a>.
30. Enfors SO, Jahic M, Rozkov A, Xu B, Hecker M, Jurgen B, et al. Physiological responses to mixing in large scale bioreactors. *Journal of biotechnology*. 2001;85(2):175-85; Available from: [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00365-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00365-5).
31. Jordà J, Jouhten P, Cámara E, Maaheimo H, Albiol J, Ferrer P. Metabolic flux profiling of recombinant protein secreting *Pichia pastoris* growing on glucose:methanol mixtures. *Microbial Cell Factories*. 2012;11(1):57; PMID: 22569166. Available from: <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-57>.
32. Inan M, Meagher MM. Non-repressing carbon sources for alcohol oxidase (AOX1) promoter of *Pichia pastoris*. *Journal of bio-science and bioengineering*. 2001;92(6):585-9; Available from: [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80321-2](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80321-2).