THỬ NGHIỆM SẢN XUẤT rhPDGF-BB TRÊN THỂ TÍCH 7,5 L VÀ 25 L TỪ CHỦNG *Pichia pastoris*

Trần Đình Quang Lộc, Lê Trung Nghĩa, Trần Hà Lạc, Lê Mai Hương Xuân, Nguyễn Trí Nhân*

Trường Đại học Khoa học Tự nhiên, Đại học Quốc gia Thành phố Hồ Chí Minh

TÓM TẮT

Hiện nay, các sản phẩm chứa nhân tố tăng trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu người dạng BB tái tổ hợp (recombinant human platelet-derived growth factor type BB, viết tắt là rhPDGF-BB) được FDA thông qua trong việc điều trị loét chân do đái tháo đường, có giá thành khá cao so với thu nhập của người dân Việt Nam. Ở Việt Nam, rhPDGF-BB hiện chỉ được thử nghiệm sản xuất từ chủng *Pichia pastoris* tái tổ hợp ở thể tích lớn nhất là 0,5 L. Quy mô sàn xuất này vẫn chưa đáp ứng được nhu cầu thương mại hóa sản phẩm. Do đó, chúng tôi tiến hành thử nghiệm sản xuất rhPDGF-BB ở thể tích 7,5 L và 25 L dựa trên quy trình đã tối ưu ở thể tích 0,5 L, nhằm thu được sản lượng protein rhPDGF-BB cao hơn. Kết quả cho thấy sản lượng rhPDGGF-BB thu được ở thể tích 7,5 L và 25 L (sau khi cải thiện) lần lươt là 1595,98 ± 165,20 mg và 3699,71 ± 694,30 mg cao gấp 6,76 lần và 15,62 lần so với sản lượng thu được ở thể tích 0,5 L. Tuy nhiên, việc nâng quy mô đã làm giảm năng suất sản xuất protein rhPDGF-BB ở thể tích 7,5 L và 25 L xuống thấp hơn so với năng xuất sản xuất protein này ở thể tích 0,5 L tương ứng là 2,23 lần và 3,20 lần.

Từ khóa: Lên men mẻ-bổ sung, *Pichia pastoris*, rhPDGF-BB, thể tích 7,5 L, thể tích 25 L.

MỞ ĐẦU

Protein hPDGF-BB được sử dụng để điều trị chứng loét chân do đái tháo đường do tham gia thúc đẩy quá trình làm lành vết thương, nhờ khả năng kiểm soát sự tăng trưởng của các tế bào mô liên kết như nguyên bào sợi và các tế bào cơ trơn, kích thích nguyên bào sợi và các tế bào cơ trơn tăng sinh, kích thích sự tổng hợp các hormone quan trọng, những phân tử fibronectin, collagen, proteoglycan và hyaluronic acid (Chen *et al*., 2013). REGRANEX® là sản phẩm thuốc chứa protein rhPDGF-BB sản xuất từ *Saccharomyces cerevisiae* được FDA công nhận điều trị bệnh này nhưng giá thành vẫn còn quá cao, khoảng $586 cho 1 tuýp 15 g (Jarvis 2008). Do đó, việc nghiên cứu sản xuất protein rhPDGF-BB ở quy mô lớn nhằm phát triển sản phẩm thuốc điều trị hiệu quả với giá thành hợp lý là nhu cầu cần thiết.

Trên thế giới hiện nay vẫn chưa có các công bố về quy trình sản xuất rhPDGF-BB ở thể tích lớn. Ở Việt Nam, Vương Cát Khánh và đồng tác giả đã tạo được chủng nấm men *P. pastoris* X33::*pdgf-b* mang 16 bản sao mã hóa protein rhPDGF-BB (Khánh *et al*., 2014). Từ chủng nấm men đó, Dương Long Duy đã sản xuất rhPDGF-BB trong hệ thống lên men có kiểm soát và cảm ứng bằng methanol ở quy mô 0,5 L (Duy *et al*., 2015). Trong nghiên cứu trên, nấm men sản xuất rhPDGF-BB với hiệu quả tiết protein mục tiêu cao nhất đạt 686,69 mg/L, chiếm 57,02% tổng lượng protein tiết. 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 (Choi *et al*., 2011; Babavalian *et al*., 2016). Tuy nhiên, với quy mô 0,5 L, Duy và đồng tác giả chỉ thu được 236,9 mg rhPDGF-BB, vẫn còn rất ít so với nhu cầu thực tế (Duy *et al*., 2015). Do vậy, từ chủng *P. pastoris* tái tổ hợp tiềm năng trên, nghiên cứu này thử nghiệm sản xuất protein rhPDGF-BB ở các thể tích lớn hơn (7,5 L và 25 L). Hiệu quả sản xuất được đánh giá thông qua tốc độ tăng trưởng, năng suất sản xuất và tổng sản lượng protein rhPDGF-BB thu được.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng, môi trường, hệ thống lên men

Chủng *Pichia pastoris* X33::*pdgf-b* mang 16 bản sao gene *pdgf-b* biểu hiện rhPDGF-BB ngoại bào, dòng hoá từ chủng hoang dại Mut$^+$ 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 Minh. 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%, 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}%, YNB 1,34%. Khoáng vi lượng PTM1 (trong 1 lít), chứa 6,0 g $CuSO_4.5H_2O$, 0,08 g NaI, 3,0 g $MnSO_4.H_2O$, 0,2 g $NaMoO_4.2H_2O$, 0,02 g H_3BO_3, 0,5 g $CoCl_2$, 20,0 g $ZnCl_2$, 65,0 g $FeSO_4.7H_2O$, 0,2 biotin và 5,0 mL H_2SO_4. Môi trường lên men BSM (trong 1 lít) chứa 26,7 mL H_3PO_4 85%, 0,93 g $CaSO_4$, 18,2 g K_2SO_4, 14,9 g $MgSO_4.7H_2O$, 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 NH_4OH 25% và H_3PO_4 85%. Phá bọt bằng polyglycols 1%. Hệ thống lên men FERMENTOR 15 L (MITECOM, Việt Nam) dùng cho thể tích lên men 7,5 L, hệ thống VA-FER-50 L (Vĩnh An, Việt Nam) dùng cho thể tích lên men 25 L.

Quy trình lên men ở thể tích 7,5 L và 25 L

Chủng nấm men *P. pastoris* tái tổ hợp từ tủ đông -80°C được hoạt hoá trong 20 mL YPD ở 30°C, 250 rpm. Sau 2 ngày, cấy chuyền 5 mL sinh khối sang 100 mL môi trường YPD mới, tiếp tục nuôi cấy lắc thêm 1 ngày thì cấy chuyền sang 750 mL (đối với thể tích lên men 7,5 L) hoặc 1500 mL (đối với thể tích lên men 25 L) môi trường BMGY và nuôi cấy lắc ở 30°C, 250 rpm trong 20 - 24 giờ, OD_{600} đạt 3 - 10. Chủng lúc này sẽ được sử dụng làm giống cho quá trình lên men mẻ-bổ sung.

Tỉ lệ nạp giống đối với thể tích lên men 7,5 L và 25 L lần lượt là 10% và 6%. Giai đoạn mẻ glycerol, nấm men tăng trưởng trong môi trường BSM đã bổ sung 4,35 mL/L PTM1, sinh khối tươi đạt 120 - 150 g/L sau 20 - 24 giờ. Lên men ở điều kiện 30°C, pH 5,0, DO được giữ trên 10% bằng việc phối trộn giữa không khí và oxy nguyên chất. Nếu nhu cầu sử dụng oxy của nấm men vượt quá tốc độ truyền tải oxy (OTR) của hệ thống, oxy sẽ được bơm với tốc độ tối đa 10 L/phút (đối với FERMENTOR 15 L), 5 L/phút (đối với VA-FER-50 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 được nấm men sử dụng vừa là chất cảm ứng tạo protein vừa là cơ chất giúp nấm men tăng trưởng 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 còn lại. Trong giai đoạn này, pH được điều chỉnh đạt 6,5, các điều kiện còn lại vẫn như cũ. Mẫu dịch nuôi cấy mỗi 4 giờ được ly tâm 13000 rpm 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.

Cải thiện hiệu quả sản xuất rhPDGF-BB ở thể tích 25 L

Các bước từ hoạt hóa chủng đến giai đoạn bổ sung glycerol được thực hiện theo quy trình trên. Sau đó, tiến hành ngưng bổ sung glycerol và kéo dài thời gian nuôi cấy thêm 4 giờ trước khi bắt đầu giai đoạn cảm ứng. Lúc này, tốc độ bổ sung methanol được giảm 1 nửa so với quy trình cũ, cụ thể là 1,6 mL/L/h trong 5 giờ đầu, 3,2 mL/L/h trong 3 giờ tiếp theo và duy trì ở 5,5 mL/L/h đến hết quá trình cảm ứng. Các điều kiện lên men và phương pháp thu mẫu thực hiện tương tự như trên.

Đánh giá tốc độ tăng trưởng đặc trưng

Tốc độ tăng trưởng đặc trưng μ (h^{-1}) được tính theo công thức (Zhang *et al*., 2000):

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

Trong đó: X_o 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).

Đánh giá mức độ biểu hiện protein hPDGF-BB

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.gelanalyzer.com) dùng để phân tích hình ảnh điện di, xác định tỉ lệ rhPDGF-BB (%rhPDGF-BB) có trong dịch tiết ngoại bào. Nồng độ protein tổng số được định lượng bằng phương pháp đo Bradford (Bradford, 1976).

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

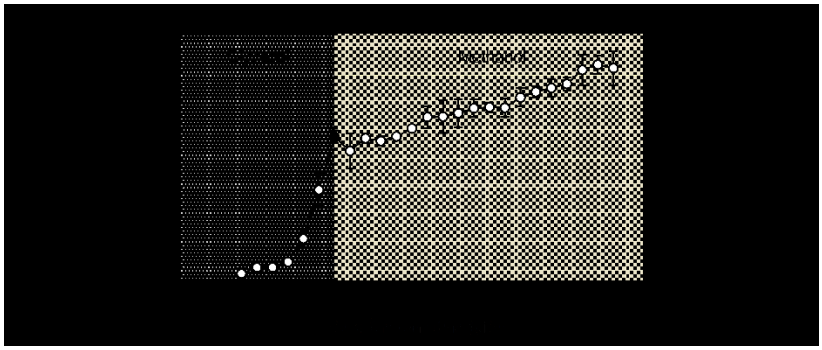
Sản lượng rhPDGF-BB (mg) = Nồng độ rhPDGF-BB (mg/L) * Thể tích dịch lên men thu được (L).

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

KẾT QUẢ

Khả năng tăng trưởng và biểu hiện protein rhPDGF-BB của chủng khi lên men ở thể tích 7,5 L

Với quy trình đã được tối ưu trên thể tích 0,5 L (Duy *et al*., 2015), chủng *P. pastoris* X33:*pdgf-b* được sử dụng để lên men ở thể tích 7,5 L nhằm tăng sản lượng protein rhPDGF-BB sản xuất được trên một mẻ lên men. Sự tăng trưởng của chủng trên 2 cơ chất khác nhau là glycerol và methanol có dạng tăng trưởng kép (Hình 1). Kết thúc giai đoạn tăng trưởng trên glycerol, nấm men đạt mức sinh khối tươi (WCW) 232,0 ± 10,5 g/L. Trong giai đoạn bổ sung methanol, chủng thích nghi với nguồn cơ chất mới nên sự tăng trưởng của chủng hầu như ít thay đổi trong 20 giờ đầu tiên. Sau đó, WCW bắt đầu tăng cho đến cuối giai đoạn cảm ứng, đạt 342,2 ± 27,3 g/L. Khi so sánh với kết quả lên men ở thể tích 0,5 L, tốc độ tăng trưởng của chủng trên glycerol ở thể tích 7,5 L đạt 0,1240 ± 0,0131 h^{-1} thấp hơn 1,12 lần, tốc độ tăng trưởng trên methanol đạt 0,0066 ± 0,0007 h^{-1}, thấp hơn 1,83 lần. Phân tích dịch tiết ngoại bào cho thấy tỷ lệ rhPDGF-BB sau 72 giờ cảm ứng là 53,05 ± 8,22%, thu được 1595,98 ± 165,20 mg rhPDGF-BB, năng suất sản xuất đạt 212,80 ± 22,03 mg/L. Bảng 1 cho thấy việc nâng thể tích sản xuất lên 7,5 L giúp thu được sản lượng rhPDGF-BB cao gấp 6,76 lần so với khi sản xuất ở 0,5 L, nhưng năng suất sản xuất protein đã giảm đi 2,23 lần. Tỷ lệ rhPDGF-BB có trong dịch tiết ngoại bào giảm đi không đáng kể.



Hình 1. Lượng sinh khối tươi (WCW) theo giờ của chủng *P. pastoris* khi lên men ở thể tích 7,5 L

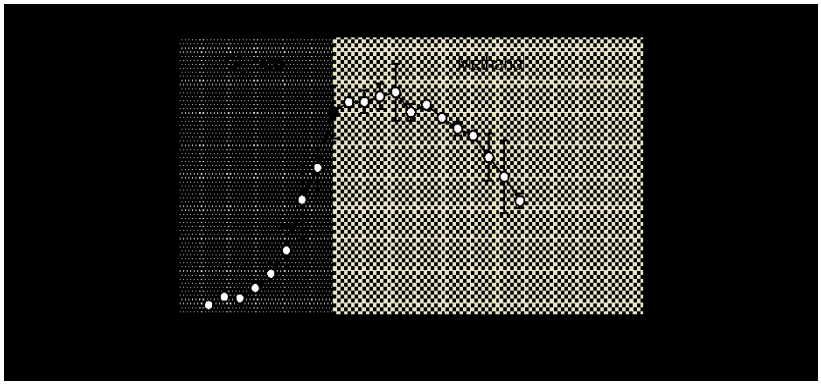
Sinh khối tươi (o) thể hiện cùng giá trị độ lệch chuẩn (SD) giữa 3 lần lặp lại. Chấm tròn đen (●) chỉ lượng sinh khối tươi ngay trước khi chủng bước vào giai đoạn cảm ứng. Giờ 0: giờ bắt đầu cảm ứng bằng methanol. Giá trị âm thể hiện thời điểm trước cảm ứng, là giai đoạn mẻ glycerol và bổ sung glycerol.

Bảng 1. Đánh giá mức độ biểu hiện rhPDGF-BB của chủng khi lên men ở thể tích 7,5 L

	0,5 L (Duy *et al.*, 2015)	7,5 L	So sánh 7,5 L với 0,5 L
Tỉ lệ rhPDGF-BB (%)	57,02	53,05 ± 8,22	Giảm 1,07 lần
Sản lượng rhPDGF-BB (mg)	236,90	1595,98 ± 165,20	Tăng 6,76 lần
Năng suất sản xuất (mg/L)	473,80	212,80 ± 22,03	Giảm 2,23 lần

Khả năng tăng trưởng và biểu hiện protein rhPDGF-BB của chủng khi lên men ở thể tích 25 L

Với mục đích gia tăng sản lượng protein rhPDGF-BB trên một mẻ, chúng tôi tiếp tục thử nghiệm lên men ở thể tích 25 L sử dụng cùng quy trình với thể tích lên men 7,5 L. Sau 2 lần thực hiện, sự tăng trưởng của chủng suy giảm rõ rệt khi nuôi cấy trên cả 2 cơ chất glycerol và methanol (Hình 2). Giai đoạn mẻ glycerol và bổ sung glycerol kéo dài đến 28 giờ nhưng WCW cuối giai đoạn này chỉ đạt 145,4 ± 19,0 g/L tương ứng với 66,09 - 80,78% so với khuyến nghị của Invitrogen (180 - 220 g/L) (Invitrogen 2002). Tốc độ tăng trưởng đặc trưng trên glycerol là 0,0941 ± 0,0173 h^{-1}, thấp hơn 1,14 lần so với ở thể tích 7,5 L, và 1,48 lần so với ở thể tích 0,5 L. Đáng chú ý hơn, chủng có dấu hiệu suy thoái trong khi cảm ứng bằng methanol, tăng trưởng với tốc độ - 0,0108 ± 0,0022 h^{-1} (dấu "-" thể hiện sự suy giảm). Vì sự suy thoái đó, thí nghiệm chỉ kéo dài đến 48 giờ cảm ứng. Mức độ biểu hiện protein cũng bị ảnh hưởng đáng kể (Bảng 2). Tỷ lệ protein rhPDGF-BB trong dịch tiết ngoại bào chỉ đạt 34,49 ± 10,49%, sản lượng protein mục tiêu thu được là 1361,71 ± 24,16 mg, năng suất sản xuất protein đạt 54,47 ± 0,97 mg/L. Dù đã tăng thể tích lên men hơn 3 lần so với thử nghiệm trước nhưng sản lượng protein thu được lại giảm đi 1,17 lần. Tỷ lệ rhPDGF-BB cũng giảm 1,34 lần so với 7,5 L. Đặc biệt, năng suất sản xuất protein của chủng đã giảm đi đáng kể, 3,91 lần so với thể tích 7,5 L và đến 8,70 lần so với thể tích 0,5 L. Sự sụt giảm này rất có thể do lượng sinh khối tươi trước giai đoạn cảm ứng không đạt yêu cầu và nấm men có thể bị kìm hãm tăng trưởng bởi methanol khi sinh khối chưa đủ lớn, do vậy quy trình lên men ở thể tích 25 L cần được điều chỉnh để cải thiện hiệu quả sản xuất rhPDGF-BB.



Hình 2. Lượng sinh khối tươi (WCW) theo giờ của chủng *P. pastoris* khi lên men ở thể tích 25 L

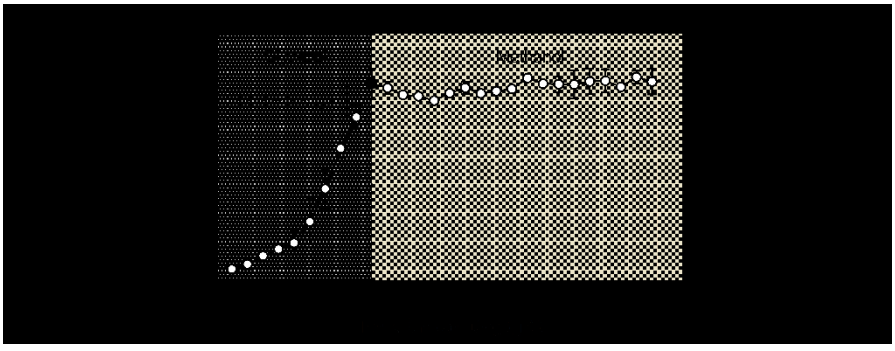
Sinh khối tươi (o) thể hiện cùng giá trị độ lệch chuẩn (SD) giữa 2 lần lặp lại. Chấm tròn đen (●) chỉ lượng sinh khối tươi ngay trước khi chủng bước vào giai đoạn cảm ứng. Giờ 0: giờ bắt đầu cảm ứng bằng methanol. Giá trị âm thể hiện thời điểm trước cảm ứng, là giai đoạn mẻ glycerol và bổ sung glycerol.

Bảng 2. Đánh giá mức độ biểu hiện rhPDGF-BB của chủng khi lên men ở thể tích 25 L

	25 L	So sánh 25 L với 7,5 L	So sánh 25 L với 0,5 L
Tỉ lệ hPDGF-BB (%)	34,49 ± 10,49	Giảm 1,34 lần	Giảm 1,65 lần
Sản lượng rhPDGF-BB (mg)	1361,71 ± 24,16	Giảm 1,17 lần	Tăng 5,75 lần
Năng suất sản xuất (mg/L)	54,47 ± 0,97	Giảm 3,91 lần	Giảm 8,70 lần

Cải thiện khả năng tăng trưởng và biểu hiện protein rhPDGF-BB của chủng khi lên men ở thể tích 25 L

Ở thử nghiệm này, sau khi bổ sung glycerol với tốc độ 18,15 mL/L/h trong 4 giờ như quy trình ban đầu, chúng tôi ngưng bổ sung và kéo dài thời gian nuôi cấy thêm 4 giờ nữa giúp gia tăng thêm lượng sinh khối thay vì bắt đầu giai đoạn cảm ứng ngay lập tức. Sau đó, để giáp áp lực methanol lên tế bào nấm men, tốc độ bổ sung cơ chất này vào môi trường cũng được giảm đi một nửa. Kết quả cho thấy, sự tăng trưởng của chủng thể hiện được dạng tăng trưởng kép trên cả hai cơ chất là glycerol và methanol, tương tự như lên men ở 7,5 L (Hình 3). Sau giai đoạn mẻ và 4 giờ bổ sung glycerol (từ giờ -36 đến giờ -4), sinh khối tươi đạt được 164,8 ± 11,6 g/L, 4 giờ tiếp theo, tương ứng với thời gian kéo dài giai đoạn bổ sung glycerol, sinh khối tươi đạt 198,1 + 15,1 g/L, tăng thêm 33,3 ± 3,5 g/L so với trước đó. Tốc độ tăng trưởng đặc trưng trên glycerol là 0,0799 ± 0,0006 h^{-1}. Trong pha bổ sung methanol, sinh khối tươi giảm nhẹ trong 20 giờ đầu tiên, sau đó duy trì ở khoảng 190 - 210 g/L đến hết quá trình lên men. Tốc độ tăng trưởng đặc trưng trên methanol là 0,0010 ± 0,0010 h^{-1}. Mức độ biểu hiện protein mục tiêu cũng được cải thiện rõ rệt (Bảng 3). Trong dịch tiết ngoại bào, tỷ lệ protein rhPDGF-BB chiếm 60,93 ± 3,15%, sản lượng protein thu được là 3699,71 ± 694,30 mg, cao hơn 2,72 lần so với trước cải thiện. Tuy nhiên, năng suất sản xuất protein đạt 147,99 ± 27,77 mg/L, vẫn thấp hơn 1,44 lần so với thể tích 7,5 L và thấp hơn 3,20 lần so với thể tích 0,5 L.



Hình 3. Lượng sinh khối tươi (WCW) theo giờ của chủng *P. pastoris* khi cải thiện lên men ở thể tích 25 L

Sinh khối tươi (o) thể hiện cùng giá trị độ lệch chuẩn (SD) giữa 2 lần lặp lại. Chấm tròn đen (●) chỉ lượng sinh khối tươi trước giai đoạn cảm ứng. Ngoặc vuông chỉ lượng sinh khối tươi tăng thêm khi kéo dài giai đoạn bổ sung glycerol. Giờ 0: giờ bắt đầu cảm ứng bằng methanol. Giá trị âm thể hiện thời điểm trước cảm ứng, là giai đoạn mẻ glycerol và bổ sung glycerol.

Bảng 3. Đánh giá mức độ biểu hiện rhPDGF-BB của chủng sau cải thiện lên men ở thể tích 25 L

	25 L cải thiện	So sánh 25 L sau với trước cải thiện	So sánh 25 L cải thiện với 7,5 L	So sánh 25 L cải thiện với 0,5 L
Tỉ lệ rhPDGF-BB (%)	60,93 ± 3,15	Tăng 1,77 lần	Tăng 1,15 lần	Tăng 1,07 lần
Sản lượng rhPDGF-BB (mg)	3699,71 ± 694,30	Tăng 2,72 lần	Tăng 2,32 lần	Tăng 15,62 lần
Năng suất sản xuất (mg/L)	147,99 ± 27,77	Tăng 2,72 lần	Giảm 1,44 lần	Giảm 3,20 lần

THẢO LUẬN

Nhằm mục đích cung cấp đủ lượng dược liệu đáp ứng nhu cầu sản xuất thuốc điều trị bệnh viêm loét mạn tính do đái tháo đường, nghiên cứu này thử nghiệm sản xuất protein rhPDGF-BB trên chủng *P. pastoris* X33:*pdgf-b* ở 2 thể tích là 7,5 L và 25 L. Kết quả cho thấy, mặc dù tổng sản lượng protein rhPDGF-BB thu được có sự gia tăng, nhưng khả năng tăng trưởng và mức độ biểu hiện protein mục tiêu của chủng nấm men *P. pastoris* tái tổ hợp bị suy giảm khi so sánh với kết quả lên men 0,5 L (Duy ***et al***., 2015).

Với cùng quy trình lên men, khi tăng thể tích từ 0,5 L lên 7,5 L, sự tăng trưởng của chủng không bị ảnh hưởng quá nhiều ở giai đoạn nuôi cấy trên glycerol, tốc độ tăng trưởng đặc trưng trên glycerol chỉ giảm đi 1,12 lần, nhưng tốc độ tăng trưởng đặc trưng trên methanol giảm đến 1,83 lần so với trước đó. Ở thể tích 25 L, tốc độ

tăng trưởng đặc trưng trên glycerol tiếp tục giảm hơn nữa, đến 1,38 lần, và chủng không thể tăng trưởng khi bổ sung methanol. Sự suy giảm tốc độ tăng trưởng này có khả năng đã ảnh hưởng đến hiệu quả sản xuất protein mục tiêu của quá trình lên men. Mặc dù, khi so sánh với kết quả lên men 0,5 L, sản lượng protein thu được ở thể tích 7,5 L cao hơn 6,76 lần, nhưng năng suất sản xuất đã giảm đi hơn 2,33 lần và tiếp tục giảm đến 8,70 lần ở thể tích 25 L. Sự suy giảm tốc độ tăng trưởng này có thể do sự thiếu hụt oxy cũng như tính đồng nhất bên trong hệ thống lên men, bắt nguồn từ sự giới hạn của tốc độ truyền tải oxy (OTR) và hiệu quả khuấy trộn của hệ thống (Nienow 2009; Kastilan *et al*., 2017). Trong khi đó, quá trình biến dưỡng methanol của nấm men *P. pastoris* tiêu thụ lượng lớn oxy bên cạnh việc tăng trưởng ở mật độ sinh khối cao làm cho hệ thống khó đáp ứng đủ lượng oxy cần dùng (Jungo *et al*., 2007). Phần tế bào ở mặt trên môi trường nuôi cấy dư thừa cơ chất nhưng thiếu oxy còn các tế bào ở dưới đáy hệ thống thì ngược lại. Ngoài ra, sự gia tăng áp suất thủy tĩnh tác dụng lên tế bào khi lên men ở thể tích lớn, được chỉ ra ở nấm men *S. cerevisiae*, là làm tích lũy các gốc tự do (ROS) gây hư hại tế bào, gián tiếp ảnh hưởng quá trình tăng trưởng và biểu hiện protein mục tiêu của nấm men (Bravim *et al*., 2016). Khi tốc độ tăng trưởng của chủng giảm sút mà lượng methanol bổ sung không được điều chỉnh dễ dẫn đến tích lũy methanol trong môi trường cùng với các độc chất trong quá trình biến dưỡng của cơ chất này, như formaldehyde, hydrogen peroxide, kết quả làm tế bào nấm men suy yếu dần (Zhang *et al*., 2000). Có thể thấy, ở thể tích càng lớn, mức độ ảnh hưởng của những yếu tố này càng nghiêm trọng, thể hiện qua sự khác biệt rõ rệt về tốc độ tăng trưởng và mức độ biểu hiện protein mục tiêu của chủng ở 3 thể tích khác nhau.

Để khắc phục tình trạng không cung cấp đủ oxy cũng như giảm thiểu sự ảnh hưởng của những yếu tố khách quan khác, bên cạnh việc tối ưu kết cấu hệ thống lên men vốn khó khăn và tốn nhiều chi phí, việc điều chỉnh quy trình lên men là giải pháp khả dĩ trước tiên. Cụ thể, để cải thiện hiệu quả lên men ở thể tích 25 L, giai đoạn bổ sung glycerol được kéo dài thêm 4 giờ giúp nấm men tích luỹ thêm lượng sinh khối, đồng thời ở giai đoạn cảm ứng, tốc độ bổ sung methanol được giảm đi một nửa để hạn chế áp lực methanol lên tế bào nấm men, tránh gây tích lũy các chất độc ảnh hưởng đến quá trình tăng trưởng cũng như biểu hiện của chủng. Những điều chỉnh trên khi thực hiện ở thể tích 25 L bước đầu đã cho thấy hiệu quả khi chủng không còn bị suy vong trong giai đoạn cảm ứng (μ_{met} = 0,0010 ± 0,0010 h^{-1}), năng suất sản xuất protein rhPDGF-BB (147,99 mg/L) cao gấp 2,72 lần so với trước khi cải thiện, sản lượng protein (147,99 ± 27,77 mg) thu được cao gấp 2,32 khi so với thể tích 7,5 L và cao gấp 15,62 lần khi so với thể tích 0,5 L. Tuy nhiên, chủng vẫn chưa đạt được tốc độ tăng trưởng và năng suất sản xuất protein rhPDGF-BB như khi sản xuất ở thể tích 0,5 L (Duy *et al*., 2015). Vì vậy, các kết quả và quy trình lên men đưa ra trong công bố này sẽ là tiền đề cho các nghiên cứu tiếp theo nhằm tối ưu các thông số sản xuất (ví dụ: tốc độ truyền tải oxy và nồng độ bổ sung methanol trong môi trường) để đạt năng suất và sản lượng cao hơn nữa.

KẾT LUẬN

Khi tăng quy mô sản xuất từ 0,5 L lên 7,5 L và 25 L, nếu không có sự điều chỉnh, cải tiến, mặc dù sản lượng protein rhPDGF-BB có thể tăng tương ứng là 6,76 và 5,75 lần, nhưng năng suất sản xuất đã giảm tương ứng 2,23 và 8,70 lần. Ở đây, quy mô càng lớn, mức độ sụt giảm của hiệu quả lên men càng cao, nghĩa là nếu tính trên cùng một thể tích môi trường, lượng protein mục tiêu tạo ra đã bị sụt giảm. Sau khi có sự điều chỉnh về việc kéo dài pha tăng trưởng trên glycerol và giảm nồng độ methanol bổ sung trong quá trình lên men sản xuất protein rhPDGF-BB ở thể tích 25 L, năng suất sản xuất đã được cải thiện tăng 2,72 lần so với quy trình cũ, và tổng sản lượng rhPDGF-BB thu được là 3699,71 ± 694,30, cao hơn quy mô 0,5 L đến 15,62 lần.

Lời cảm ơn: *Nghiên cứu được thực hiện từ nguồn kinh phí của đề tài nghiên cứu khoa học cấp Sở Khoa học và Công nghệ Thành phố Hồ Chí Minh "Nghiên cứu phát triển dạng bào chế cho thuốc điều trị vết thương mạn tính dựa trên protein PDGF-BB tái tổ hợp" (số hợp đồng: 199/2017/HĐ-SKHCN).*

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Babavalian H, Latifi AM, Shokrgozar MA, Bonakdar S, Tebyanian H, Shakeri F (2016). Cloning and expression of recombinant human platelet-derived growth factor-BB in *Pichia Pink*. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 62(8): 45-51.

Bravim F, Mota MM, Fernandes AA, Fernandes PM (2016). High hydrostatic pressure leads to free radicals accumulation in yeast cells triggering oxidative stress. *FEMS Yeast Res* 16(5).

Chen PH, Chen X, He X (2013). Platelet-derived growth factors and their receptors: Structural and functional perspectives. *Biochim Biophys Acta* 1834(10): 2176-2186.

Choi JH, Kim S, Sapkota K, Park SE, Kim SJ (2011). Expression and Production of Therapeutic Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor-BB in *Pleurotus eryngii*. *Appl Biochem Biotechnol* 165: 611-623.

Duy DL, Vũ PM, Nhân NT, Thước TL, Thảo ĐTP (2015). Optimization of fermentation conditions for the production of recombinant hpdgf-bb in *Pichia pastoris*. *Tạp chí Sinh học* 37(1se): 238-244.

Invitrogen (2002). *Pichia Fermentation Process Guidelines*.

Jarvis CI (2008). Becaplermin (Regranex) for diabetic foot ulcers. *Am Fam Physician* 78(2): 255-256.

Jungo C, Marison I, von Stockar U (2007). 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. *J Biotechnol* 128(4): 824-837.

Kastilan R, Boes A, Spiegel H, Voepel N, Chudobova I, Hellwig S, Buyel JF, Reimann A, Fischer R (2017). Improvement of a fermentation process for the production of two PfAMA1-DiCo-based malaria vaccine candidates in *Pichia pastoris*. *Sci Rep* 7(1): 11991.

Khánh VC, Trang NTH, Thanh NPP, Thảo ĐTP, Thước TL (2014). 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). *Tạp chí sinh học* 36(1se): 77-83.

Nienow AW (2009). Scale-up considerations based on studies at the bench scale in stirred bioreactors. *J Chem Eng Japan* 42(11): 789-796.

Zhang W, Bevins MA, Plantz BA, Smith LA, Meagher MM (2000). 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* 70(1): 1-8.

PRODUCTION OF rhPDGF-BB FROM *Pichia pastoris* IN 7.5-L AND 25-L FERMENTATION SCALES

Tran Đinh Quang Loc, Le Trung Nghia, Tran Ha Lac, Le Mai Huong Xuan, Nguyen Tri Nhan*

Vietnam National University Ho Chi Minh - University of Science

SUMMARY

The recombinant human platelet-derived growth factor type BB (rhPDGF-BB) has been approved by FDA for diabetic foot ulcer treatment. However, the drug containing rhPDGF-BB is not affordable for the low-income Vietnamese patients. In Vietnam, the largest fermentation scale for rhPDGF-BB production was 0.5 L, which is not sufficient for the commercialization of the drug. Therefore, this study was conducted on the production of rhPDGF-BB in 7.5-L and 25-L working volume fermenters. The total yields of rhPDGF-BB in the 7.5-L and 25-L fermentation were 1595.98 ± 165.20 mg and 3699.71 ± 694.30 mg respectively, which were 6.7-fold and 15.6-fold higher than that in 0.5-L scale. However, the productivity of rhPDGF-BB in the 7.5-L and 25-L fermentation scales decreased by 2.23-fold and 3.20-fold, respectively as comparing to that in 0.5-L.

Keywords: Fed-batch fermentation, *Pichia pastoris*, rhPDGF-BB, 7.5 L, 25 L.

* Author for correspondence: Tel: +84-913119183; Email: ntrnhan@hcmus.edu.vn