ẢNH HƯỞNG CỦA MẬT ĐỘ GIỐNG BAN ĐẦU, NHIỆT ĐỘ VÀ pH ĐẾN KHẢ NĂNG BIỂU HIỆN LACTOFERRIN TỪ CHỦNG *Pichia pastoris* KM71H - 3 TÁI TỔ HỢP

Trịnh Thị Thu Thủy[1*], Nguyễn Thị Thủy[2], Trương Quốc Phong[2]

[1]Khoa Công nghệ sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam
[2]Viện Công nghệ sinh học và Công nghệ thực phẩm, Đại học Bách khoa Hà Nội

[*]Tác giả liên hệ:ttthuy@vnua.edu.vn

Ngày nhận bài: 18.05.2020 Ngày chấp nhận đăng: 23.12.2020

TÓM TẮT

Lactoferrin (LF) là một loại glycoprotein thuộc họ protein trasferrin với chức năng chung là vận chuyển sắt trong máu. Lactoferrin có khả năng giúp tăng cường hệ miễn dịch, có khả năng kháng khuẩn, chống oxy hóa, kháng u và kháng virus. Gen mã hóa lactoferrin có nguồn gốc từ bò sau khi tối ưu mã di truyền đã được biểu hiện thành công ở chủng *P. pastoris* KM71H - 3 trên môi trường 2xMMP. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm khảo sát ảnh hưởng của một số điều kiện lên men: nồng độ giống cấp ban đầu (tương đương giá trị OD_{600} từ 0,5-2,0), nhiệt độ nuôi (20°C, 24°C, 28°C), pH môi trường (5,5-7,5) đến khả năng biểu hiện LF. Mức độ biểu hiện protein LF được đánh giá bằng phương pháp điện di SDS-PAGE và Dot – blot. Kết quả điện di SDS - PAGE và Dot-blot cho thấy LF được biểu hiện tốt trong môi trường 2xMMP ở nhiệt độ 28°C, pH 6,0 và mật độ giống cấp ban đầu tương đương giá trị OD_{600} 0,5.

Từ khóa: Lactoferrin, *Pichia pastoris*, KM71H-3, tái tổ hợp.

The Effects of Cell Density, Temperature and pH on Lactoferrin Production from Recombinant *Pichia Pastoris* KM71H-3 Strain

ABSTRACT

Lactoferrin (LF) is a glycoprotein of the transferrin family whose general function is to transport iron. LF is capable of enhancing the immune system, antibacterial, antioxidant, anti-tumor, and antiviral activities. The gene encoding LF derived from bovine has been successfully expressed in recombinant *P. pastoris* KM71H-3 strain on 2xMMP medium. This study aims at investigating the effects of culture conditions including initial biomass cell density (equivalent to OD600 value from 0.5-2.0), temperature (20°C, 24°C, 28°C), and initial pH of the medium (5.5-7.5). The LF expression level was evaluated by SDS – PAGE and Dot bloting methods. The SDS - PAGE and Dot - blot results showed that LF was expressed in 2xMMP medium well with the optimal conditions were at 28°C, pH 6.0 and the initial biomass cell density (OD_{600}) 0.5.

Keywords: Lactoferrin, Pichia pastoris, KM71H-3, recombinant.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

Lactoferrin (LF) là một glycoprotein gồm 703 axit amin với kích thước khoảng 80kDa và có độ tương đồng cao ở các loài khác nhau (Rajan & cs., 2015). LF có mặt nhiều trong sữa của các động vật có vú như bò, lợn, dê, lạc đà… (Adlerova & cs., 2008; Chahardooli & cs., 2016) và trong một số dịch tiết của cơ thể như nước mắt (Deepak, 2015). LF là thành phần protein chiếm hàm lượng cao thứ 2 trong sữa sau casein (Nakamura & cs., 2001). Hàm lượng LF cũng có sự thay đổi lớn, với nồng độ cao nhất là 7 g/l sữa non của người, 1 g/l đối với sữa người trong giai đoạn tiết sữa và 0,4 mg/l trong huyết thanh của người bình thường và tăng lên 5000 lần khi có sự nhiễm khuẩn) (Thomassen & cs., 2005).

LF có khả năng kết hợp với ái lực cao với sắt và tồn tại bền vững trong một phổ rộng pH, thậm chí cả ở pH rất thấp (Adlerova & cs.,

2008). LF cũng khó bị phân hủy bởi các protease. LF liên quan đến nhiều chức năng sinh lý khác nhau như điều hòa hấp thụ sắt trong dạ dày, ruột, đáp ứng miễn dịch, chống oxy hóa, phòng ngừa ung thư, và chống viêm (Barber & cs., 2016). LF giúp bảo vệ đối với sự nhiễm khuẩn và đặc tính này được nghiên cứu nhiều nhất cho đến nay (Chen & cs., 2004; Parkar & cs., 2015).

Do có nhiều đặc tính có lợi cho con người như duy trì cân bằng sắt, kháng khuẩn, kháng nấm, kháng virus, kháng ký sinh trùng, kháng ung thư, điều hòa miễn dịch… nên nhu cầu về LF ngày càng cao. Hiện nay, việc sản xuất Lactoferrin được thực hiện theo hai phương thức: (1) tách chiết từ sữa và (2) sản xuất protein lactoferrin tái tổ hợp. Do hàm lượng LF trong sữa bò (nguồn nguyên liệu chính để tách chiết LF) là thấp (khoảng 30-100 mg/lít) nên hiện nay LF đang được tập trung nghiên cứu sản xuất bằng con đường tái tổ hợp vì hiệu suất tổng hợp cao.

Trong các hệ biểu hiện protein tái tổ hợp *P. pastoris* thường được sử dụng do có nhiều ưu điểm như: khả năng tổng hợp LF cao nhất trong số các vi sinh vật được nghiên cứu sử dụng làm vật chủ biểu hiện, khả năng lên men với hiệu suất cao, phù hợp lên men quy mô lớn và đặc biệt LF sau khi được tổng hợp được đường hóa và biến đổi tạo thành protein có hoạt tính tương tự như LF tự nhiên (Gonzalez-Chavez & cs., 2009; Alamdari & cs., 2016; Iglesias-Figueroa & cs., 2016). Năm 2018, nhóm tác giả đã xây dựng thành công cấu trúc tái tổ hợp *pPICZαA::blf*$_{opt}$ mang gen mã hóa lactoferrin đã được tối ưu trình tự mã di truyền phù hợp biểu hiện ở *P. pastoris* (Trịnh Thị Thu Thủy & cs., 2018) và đã biểu hiện thành công ở *P. pastoris* KM71H. Để sản xuất hiệu quả protein LF từ chủng tái tổ hợp, cần phải xác định được môi trường và điều kiện lên men thích hợp để vừa đảm bảo hiệu suất tổng hợp cao nhất vừa có chi phí thấp nhất. Trong nghiên cứu trước, chúng tôi đã xác định được môi trường 2xMMP thay thế môi trường chuẩn BMMY cho hiệu quả biểu hiện LF tương tương. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm nghiên cứu ảnh hưởng của một số điều kiện lên men: nồng độ giống cấp ban đầu, nhiệt độ nuôi, pH môi trường đến khả năng biểu hiện LF.

2. PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Vật liệu và môi trường

Chủng *Pichia pastoris* KM71-3 tái tổ hợp mang gen mã hóa lactoferrin bò từ đề tài ĐT.01.18/CNSHCB.

Môi trường:

- Môi trường hoạt hóa nấm men (Chahardooli & cs., 2016): (a) YPD: 1% yeast extract, 2% bacto peptone, 2% glucose.

- Môi trường biểu hiện (Invitrogen): (b) 2xMMP: KH_2PO_4 1,7%; $MgSO_4.7H_2O$ 0,2%; $(NH4)_2SO_4$ 1,5%; pha trong đệm phosphat 0,1M, pH 6,0.

Dung dịch khoáng: PTM4: $CuSO_4.5H_2O$ 0,2%; NaI 0,008%; $MnSO_4.H_2O$ 0,3%; $(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O$ 0,0148%; H_3BO_3 0,002%; $CoCl_2$ 0,05%; $ZnCl_2$ 0,7%; $FeSO_4.7H_2O$ 2,2%; Biotin 0,02%; H_2SO_4 0,1%.

2.2. Lên men sinh tổng hợp lactoferrin

Chủng nấm men *P. pastoris* KM71H-3 được nuôi cấy biểu hiện trên môi trường: 2xMMP:

(a) Nuôi khởi động: Nuôi lắc một khuẩn lạc trong 2ml YPD ở 28°C trong 24 giờ, tốc độ lắc 150 vòng/phút

(b) Nuôi biểu hiện:

Pha tăng sinh khối: Sử dụng các môi trường 2xMMP với 1,5% NH_4^+ bổ sung 0,5% glycerol và 0,25% cao ngô; môi trường BMMY được dùng làm đối chứng. Chuyển 1ml giống khởi động vào các bình chứa 19ml môi trường sao cho giá trị OD_{600} ban đầu là 0,5, nuôi lắc ở 28°C trong 24 giờ với tốc độ lắc 150 vòng/phút.

Đối với các thí nghiệm thay đổi nồng độ giống cấp ban đầu, lượng sinh khối được tính để mật độ OD ban đầu là 0,5; 1,0; 1,5 và 2,0. Thí nghiệm về pH ban đầu, môi trường được chuẩn bị ở pH trong dải thí nghiệm từ 5,0; 5,5; 6,0; 6,5 và 7,0. Thí nghiệm về nhiệt độ nuôi được thực hiện ở các mức nhiệt độ 20, 24 và 28°C.

Pha biểu hiện: Bổ sung môi trường tiếp dưỡng gồm chất cảm ứng methanol 0,5% và các chất khoáng vi lượng (PTM4) vào các bình nuôi cấy mỗi 24 giờ. Mẫu sinh khối nấm men được thu nhận theo thời gian (mỗi 24 giờ).

2.3. Tách chiết protein bằng phương pháp siêu âm

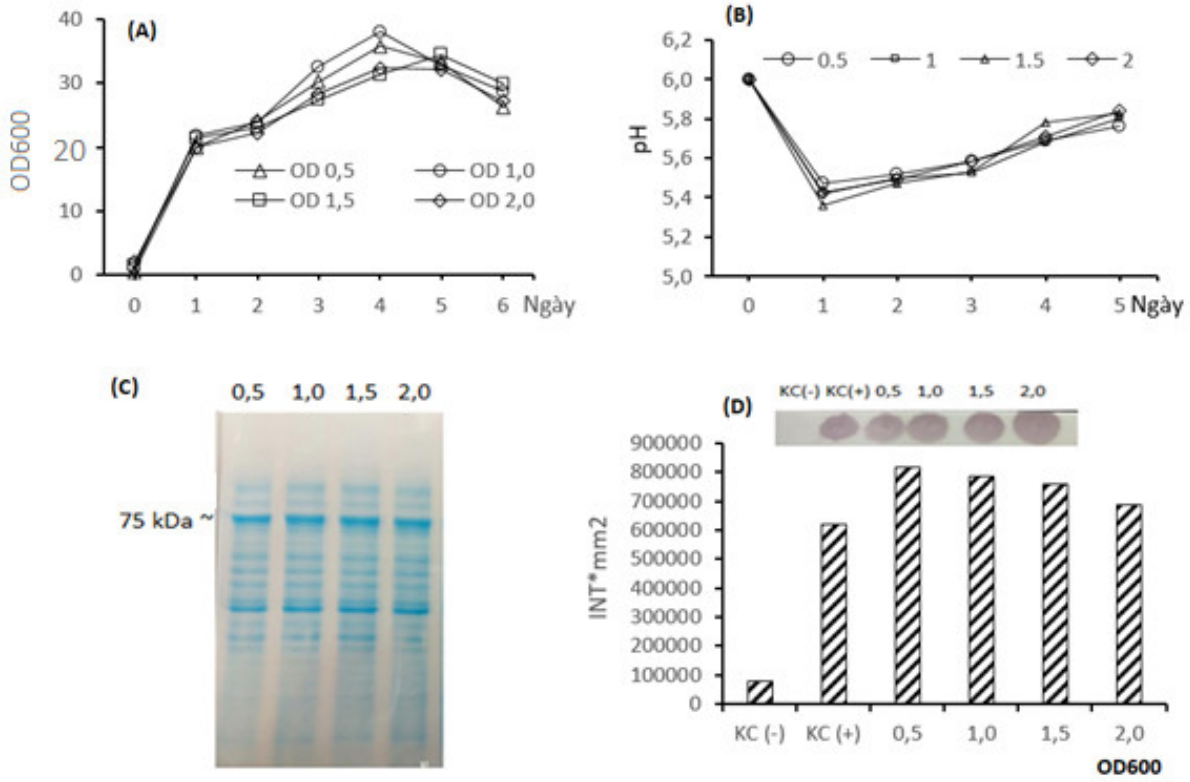
Sinh khối tế bào nấm men được thu nhận bằng ly tâm và bổ sung đệm 50mM Tris-HCl; 2% SDS và đảo trộn đều. Mẫu được tiến hành phá tế bào bằng phương pháp siêu âm trong 2 phút với mức năng lượng 60%, 10 giây hoạt động, 10 giây nghỉ. Sau đó mẫu được tiến hành ly tâm 9000 vòng/phút ở 4°C trong 20 phút để loại bỏ cặn tế bào. Phần dịch được giữ lại để tiến hành phân tích SDS-PAGE. Mẫu protein sau khi tách chiết được xác định nồng độ bằng phương pháp Bradford.

2.4. Phương pháp điện di SDS – PAGE

Các mẫu protein được tiến hành điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 12% theo phương pháp Laemmli.

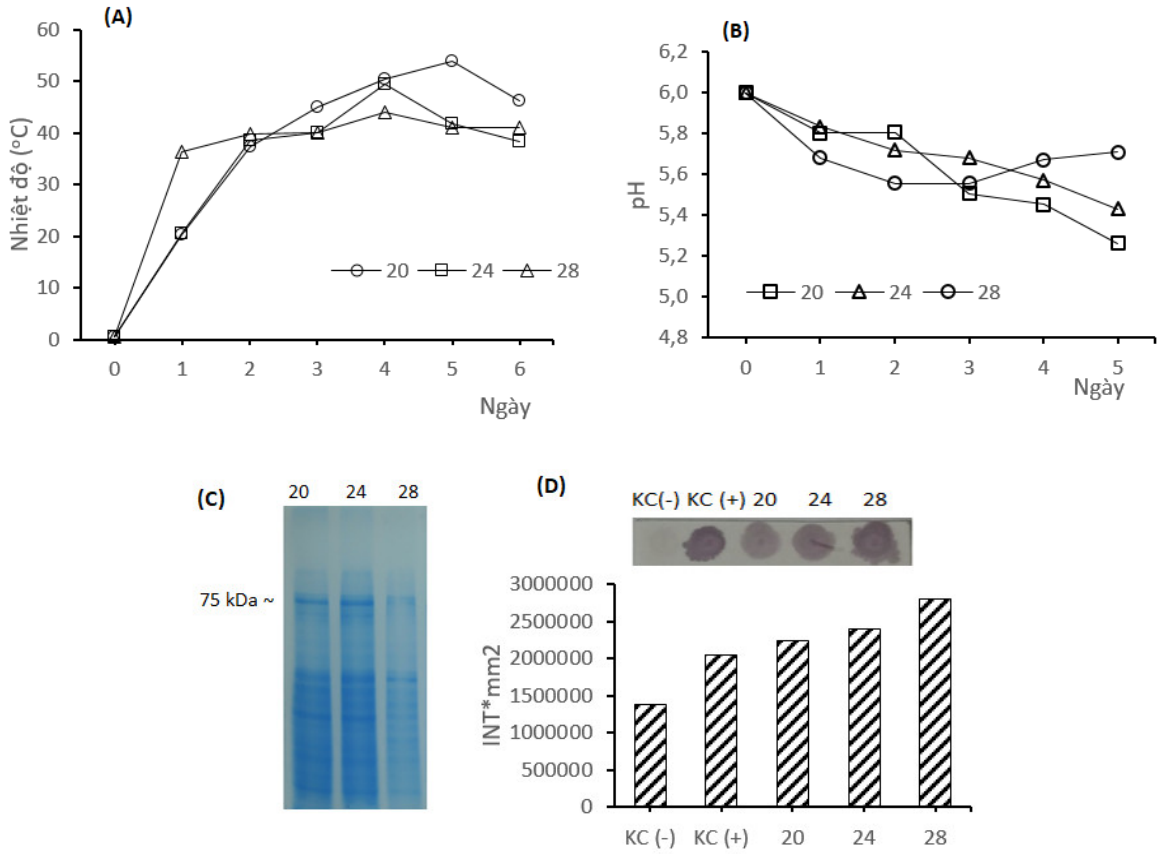
2.5. Phương pháp lai phân tử Dot Blot

Để đánh giá sự có mặt của LF, mẫu protein được chấm lên màng nitrocellulose. Màng sau đó được khóa bằng sữa gầy 1% trong 1 giờ. Sau 3 lần rửa bằng đệm PBS, mẫu trên màng được ủ với kháng thể bậc 1 là rabbit Anti Histag (1:5000) trong đệm PBS 1X, sau đó rửa 3 lần bằng đệm PBS-T và ủ với kháng thể bậc 2 (Anti Rabbit IgG + AP) tỉ lệ 1:30000 và ủ trong 1,5 giờ. Tín hiệu được phát hiện bằng cách ủ với cơ chất NBT và BCIP trong đệm AP. Cường độ tín hiệu thu được được phân tích bằng phần mềm QuantityOne (Bio-rad, Mỹ).



Ghi chú: Mẫu KC (-): mẫu nuôi P. pastoris KM71H chưa biến nạp; KC (+): Mẫu dịch phá TB P. pastoris KM71H-3 trên môi trường BMMY.

Hình 1. Ảnh hưởng của mật độ giống cấp ban đầu đến khả năng sinh trưởng (A), sự thay đổi pH môi trường lên men (B), mức độ tổng hợp protein lactoferrin (C-D) của chủng *P. pastoris* KM71H-3 trên môi trường 2xMMP



Ghi chú: Mẫu KC (-): mẫu nuôi P. pastoris KM71H chưa biến nạp; KC (+): Mẫu dịch phá TB P. pastoris KM71H-3 trên môi trường BMMY.

Hình 2. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi đến khả năng sinh trưởng (A), sự thay đổi pH môi trường lên men (B), mức độ tổng hợp protein lactoferrin (C-D) của chủng *P. pastoris* KM71H-3 trên môi trường 2xMMP

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Ảnh hưởng của mật độ giống ban đầu

Mật độ sinh khối ban đầu bổ sung vào môi trường để bắt đầu lên men biểu hiện thu protein tái tổ hợp là một trong những yếu tố ảnh hưởng đến mức độ biểu hiện protein trong quá trình lên men. Kết quả cho thấy mật độ sinh khối và giá trị pH không có sự khác biệt nhiều ở các mật độ giống cấp ban đầu khác nhau. Giá trị OD cao nhất dao động trong khoảng từ 32,5-38,0 (Hình 1A); giá trị pH dao động trong khoảng từ 5,4-5,8 và sự thay đổi pH giữa các ngày không có sự khác biệt nhiều giữa các nồng độ giống cấp ban đầu (Hình 1B).

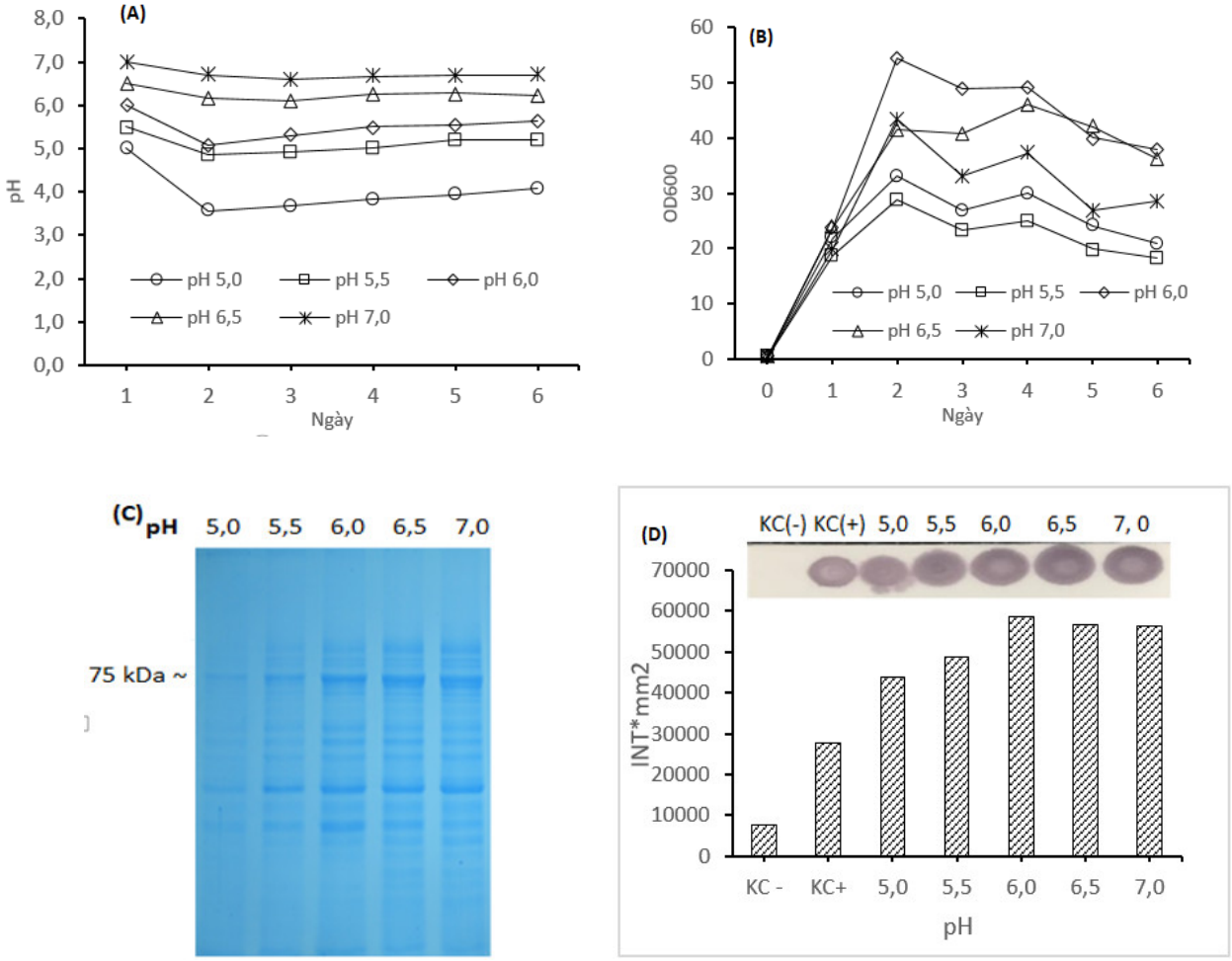
Kết quả điện di SDS-PAGE (Hình 1C) cho thấy ở cả 4 nồng độ cấp giống ban đầu protein mục tiêu ở vị trí khoảng 75kDa đều xuất hiện và không có sự khác biệt nhiều. Để đánh giá so sánh hàm lượng LF trong dịch chiết protein nội bào, dot blot được thực hiện và kết quả phân tích cường độ màu bằng phần mềm Quantity One (BioRad) cho thấy với mật độ giống cấp ban đầu tương ứng giá trị OD_{600} 0,5 thì cường độ màu trên màng nitrocellulose là cao nhất (Hình 1D). Vì vậy, nồng độ giống cấp ban đầu 0,5 được lựa chọn để lên men *P. pastoris* KM71H-3 sinh tổng hợp LF trong môi trường 2xMMP.

3.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ nuôi

Theo nhiều nghiên cứu, *Pichia pastoris* phát triển mạnh ở nhiệt độ từ 20-30°C và nhiệt độ nuôi cấy ảnh hưởng đến quá trình sản xuất protein tái tổ hợp. Để khảo sát ảnh hưởng của

nhiệt độ nuôi đến khả năng sinh tổng hợp LF, chúng tôi tiến hành nuôi cấy *P. pastoris* KM71H-3 ở các nhiệt độ: 20°C, 24°C, 28°C trong môi trường 2xMMP bổ sung 0,25% cao ngô, mật độ giống cấp ban đầu tương ứng OD_{600} đạt 0,5. Kết quả cho thấy sự sinh trưởng và phát triển của *P. pastoris* KM71H - 3 ở nhiệt độ 20°C và 24°C tốt hơn (Hình 2A) tuy nhiên pH môi trường tại nhiệt độ nuôi 28°C lại ít biến động nhất (Hình 2B).

Để đánh giá mức độ tổng hợp LF, dịch protein nội bào được tiến hành điện di SDS PAGE và dot blot. Kết quả điện di (Hình 2C) cho thấy ở cả 3 mức nhiệt độ nuôi đều xuất hiện băng vạch 75kDa tương ứng với protein mục tiêu. Trong đó ở hai mức nhiệt độ 20°C và 24°C, hai băng này đậm hơn. Tuy nhiên, kết quả dot blot và phân tích cường độ màu trên màng nitrocellulose bằng phần mềm Quantity One cho thấy cường độ màu trên màng nitrocellulose ở nhiệt độ 28°C là đậm nhất. Điều này có thể giải thích là ở băng vạch kích thước 75kDa trên bản điện di ngoài protein đích (LF) còn có các protein khác có cùng kích thước trong khoảng 75kDa được sinh ra trong quá trình sinh trưởng của *P. pastoris*. Kết quả phân tích dot blot cho thấy protein đích được tổng hợp nhiều hơn ở nhiệt độ 28°C. Như vậy, ở nhiệt độ 28°C là nhiệt độ thích hợp nhất để lên men sinh tổng hợp LF.



Ghi chú: Mẫu KC (-): mẫu nuôi P. pastoris KM71H chưa biến nạp; KC (+): Mẫu dịch phá TB P. pastoris KM71H-3 trên môi trường BMMY.

Hình 3. Ảnh hưởng của pH môi trường đến khả năng sinh trưởng (A), sự thay đổi pH môi trường lên men (B), mức độ tổng hợp protein lactoferrin (C-D) của chủng *P. pastoris* KM71H-3 trên môi trường 2xMMP

3.3. Ảnh hưởng của pH môi trường

Giá trị pH của môi trường là yếu tố quan trọng ảnh hưởng lên năng suất tiết protein của *P. pastoris.* Chủng có khả năng tăng trưởng ở dãy pH rộng từ 3,0 đến 7,0 và việc thay đổi pH không ảnh hưởng nhiều đến tốc độ tăng trưởng của chúng, tuy nhiên nhiều nghiên cứu cho thấy việc thay đổi pH môi trường ảnh hưởng lớn đến mức độ sản xuất protein và giảm thiểu tác động của các enzyme protease. Trong nghiên cứu này, quá trình cảm ứng biểu hiện lactoferrin tái tổ hợp đã được khảo sát tại 5 giá trị pH môi trường 5,0; 5,5; 6; 6,5 và 7,0. Đây là các giá trị đã xây dựng dựa trên các khảo sát về dãy pH cho quá trình sinh trưởng của chủng *P. pastoris*. Sau thời gian cảm ứng 5 ngày, tại pH 6,0 chủng *P. pastoris* KM71H - 3 sinh trưởng mạnh nhất (Hình 3A). Ở các pH khác nhau, giá trị pH môi trường đều giảm nhưng không biến động nhiều, trong đó tại pH 5,0 thì pH môi trường giảm mạnh nhất (Hình 3B)

Để khảo sát lượng LF nội bào trong các môi trường có giá trị pH ban đầu khác nhau, chúng tôi tiến hành điện di SDS - PAGE, dot blot và phân tích kết quả bằng phần mềm Quantity One (Bio - Rad). Kết quả cho thấy ở 3 giá trị pH ban đầu 6,0; 6.5; 7,0 có sự xuất hiện của band protein ở vị trí 75 kDa rõ ràng hơn (Hình 3C). Kết quả dot blot và phân tích cường độ màu trên màng nitrocellulose cho thấy cường độ màu ở các mẫu có giá trị pH ban đầu là 6,0; 6.5; 7,0 tương đương nhau và cao hơn so với các pH còn lại. Điều này cho thấy khả năng tổng hợp LF ở chủng *P.pastoris* KM71H - 3 tốt hơn ở môi trường có giá trị pH mang tính axit nhẹ đến trung tính. Và giá trị pH môi trường ban đầu 6,0 phù hợp nhất cho sự tổng hợp LF. Kết quả này phù hợp với khuyến cáo pH môi trường để biểu hiện protein tái tổ hợp trên môi trường chuẩn BMMY (Invitrogen).

4. KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này các thông số: mật độ giống cấp ban đầu, nhiệt độ nuôi, pH ban đầu trên nền môi trường 2xMMP đã được khảo sát. Kết quả cho thấy mật độ cấp giống ban đầu tương ứng OD_{600} 0,5; nhiệt độ nuôi 28°C và pH đầu 6,0 phù hợp để lên men sinh tổng hợp LF từ chùng *P. pastoris* KM71H-3 tái tổ hợp. Trong quá trình lên men, MeOH được cấp mỗi 24h đạt nồng độ cuối cùng trong môi trường 0,5%. Với thành phần môi trường và điều kiện nuôi như vậy phù hợp để tiến hành lên men ở quy mô lớn hơn.

LỜI CẢM ƠN

Đề tài thực hiện được hỗ trợ kinh phí một phần từ dự án Việt Bỉ, Học viện Nông nghiệp Việt Nam.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

Adlerova L., Bartoskova A. & Faldyna M. (2008). Lactoferrin_a review. Veterinarni Medicina. 53(9): 457-468

Alamdari E., Niazi A., Yarizade A., Moghadam A. & Aram F. (2016). Expression of a Recombinant Therapeutic Protein, Lactoferrin, in PichiaPinkTM: a Powerful Antimicrobial Protein Biological Forum - An International Journal. 8(1): 471-478.

Barber M.F., Kronenberg Z., Yandell M. & Elde N.C. (2016). Antimicrobial Functions of Lactoferrin Promote Genetic Conflicts in Ancient Primates and Modern Humans, PLoS Genet. 12(5): e1006063.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 7(72): 248-54.

Chahardooli M., Niazi A., Aram F. & Sohrabi S.M. (2016). Expression of recombinant Arabian camel lactoferricin-related peptide in *Pichia pastoris* and its antimicrobial identification. J Sci Food Agric. 96(2): 569-75.

Chen H.L., Lai Y.W., Yen C.C., Lin Y.Y., Lu C.Y., Yang S.H., Tsai T.C., Lin Y.J., Lin C.W. & Chen C.M. (2004). Production of recombinant porcine lactoferrin exhibiting antibacterial activity in methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. J Mol Microbiol Biotechnol. 8(3): 141-9.

Gonzalez-Chavez S.A., Arevalo-Gallegos S. & Rascon-Cruz Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications, Int J Antimicrob Agents. 33(4): 301 e1-8.

Iglesias-Figueroa B., Valdiviezo-Godina N., Siqueiros-Cendon T., Sinagawa-Garcia S., Arevalo-Gallegos S. & Rascon-Cruz Q. (2016). High-Level Expression of Recombinant Bovine Lactoferrin in

Pichia pastoris with Antimicrobial Activity. Int J Mol Sci. 17(6).

Nakamura I., Watanabe A., Tsunemitsu H., Lee N.Y., Kumura H., Shimazaki K.I. & Yagi Y. (2001). Production of recombinant bovine lactoferrin N-lobe in insect cells and its antimicrobial activity. Protein Expr Purif. 21(3): 424-31.

Parkar D.R., Jadhav R.N. & Pimpliskar M.R. (2015). Antibacterial Activity of Lactoferrin_A Review, Human journals. 4(2): 118-127.

Sharma D. (2015). Lactoferrin and Its Role in Neonatology: A Review Article, Journal of Pediatrics & Neonatal Care. 2(2).

Sharma R., Chakraborty D. & Gupta P. (2015). Bovine lactoferrin and its functions in animals -A review, Agricultural Reviews. 36(4).

Thomassen E.a.J., Veen H.a.V., Berkel P.H.C.V., Nuijens J.H. & Abrahams J.P. (2005). The protein structure of recombinant human lactoferrin produced in the milk of transgenic cows closely matches the structure of human milk-derived lactoferrin, Transgenic Research. 14(4)**:** 397-405.

Trịnh Thị Thu Thủy, Nguyễn Thị Tình & Trương Quốc Phong (2018). Nghiên cứu tạo cấu trúc biểu hiện tái tổ hợp pPICZ αA::blf_{opt} để biểu hiện lactoferrin bò trong Pichia pastoris Kỷ yếu hội nghị công nghệ sinh học toàn quốc. tr. 306-313.