

การควบคุมการเกิด overflow metabolism ระหว่างการแสดงออกของ รีคอมบิแนนท์โปรตีนแบบต่อเนื่องตลอดเวลาโดย *Pichia pastoris*

เทพปัญญา เจริญรัตน์¹, นิภารัตน์ ประมวล¹, วศิมณ เรืองเล็ก², มารินา เกตุทัต-คาร์นส์³

¹ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต), ปทุมธานี, 12120

²หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC), ปทุมธานี, 12120

³สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา 30000

บทคัดย่อ

การแสดงออกอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาของ *Pichia pastoris* โดยใช้โปรโมเตอร์ GAP เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการหลีกเลี่ยงการใช้เมทานอลเป็นตัวเหนี่ยวนำในกรณีที่ใช้โปรโมเตอร์ AOX1 ทั้งนี้ โปรโมเตอร์ GAP สามารถแสดงออกได้สูงเมื่อเชื้อเจริญโดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตเปรียบเทียบกับกลีเซอ-รอลหรือเมทานอล อย่างไรก็ตาม มีการรายงานว่าการใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็นน้ำตาลที่ไม่สามารถเกิดการหมักได้ในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* จะสามารถตรวจพบการสร้าง by-product ในรูปเอทานอลได้ โดยเอทานอลที่เกิดขึ้นสามารถกีดกันการแสดงออกของโปรโมเตอร์ AOX1 ทำให้การแสดงออกของโปรโมเตอร์ AOX1 ต่ำลง ทั้งนี้ ในปัจจุบันยังไม่พบการรายงานถึงการผลิต by-product ในรูปเอทานอล เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* โดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรต หรืออิทธิพลของเอทานอลต่อการการแสดงออกของโปรโมเตอร์ GAP ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาในประเด็นดังกล่าว โดยใช้เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเป็นโปรตีนติดตาม เพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรโมเตอร์ GAP ซึ่งจากการทดลองพบว่าการเติมเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ อัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และกิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดสลดลง จากผลที่ได้แสดงว่าเอทานอลสามารถยับยั้งการเติบโตและแสดงออกของโปรโมเตอร์ GAP จากนั้นจึงทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นในกระบวนการหมักแบบแบตช์ภายใต้สภาวะไม่จำกัดออกซิเจน ($\text{DOT} > 25\%$) พบว่าความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสม คือ 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ได้ค่า $\mu = 0.20 \text{ ชม}^{-1}$ และระยะเวลาที่ใช้ในช่วงการปรับตัวเท่ากับ 3.99 ชั่วโมง ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 60 และ 80 กรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดการสร้างเอทานอล ส่งผลให้ค่า μ ลดลง และระยะเวลาที่ใช้ในช่วงการปรับตัวนานขึ้น ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าเอทานอลที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะไม่จำกัดออกซิเจนเกิดขึ้นโดยวิถี over-flow ในส่วนสุดท้ายของ

งานวิจัยนี้ ได้ทำการออกแบบระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ 4 ระบบ เพื่อหาสภาวะควบคุมที่เหมาะสมโดยมุ่งเน้นการศึกษาปัจจัยของความเข้มข้นของกลูโคสและค่าออกซิเจนละลายเป็นหลัก คือ ระบบที่ 1 กลูโคสและออกซิเจนจำกัด ระบบที่ 2 กลูโคสจำกัดแต่ออกซิเจนไม่จำกัด ($DOT > 25\%$) ระบบที่ 3 กลูโคสไม่จำกัด ($[กลูโคส] \approx 10$ กรัมต่อลิตร) และออกซิเจนจำกัด และระบบที่ 4 กลูโคสและออกซิเจนไม่จำกัด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สภาวะจำกัดออกซิเจนเป็นปัจจัยหลัก ที่ทำให้การเติบโตและการแสดงออกของโปรโมเตอร์ *GAP* ลดลง รวมถึงพบการสร้างเอทานอลปริมาณมาก (13.5-14.0 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจนเปรียบเทียบกับสภาวะไม่จำกัดออกซิเจน (0.6 กรัมต่อลิตร) เอทานอลที่ความเข้มข้นสูงส่งผลให้ค่า μ ลดลงประมาณ 35% และ 63% เมื่อเปรียบเทียบกับระบบที่ 1 กับระบบที่ 2 และระบบที่ 3 กับระบบที่ 4 ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น พบว่าอัตราการสร้างผลผลิตจำเพาะในระบบที่ไม่จำกัดออกซิเจน จะสูงกว่าในระบบที่จำกัดออกซิเจน ประมาณ 7 เท่า โดยพบว่าระบบที่เหมาะสมที่สุด คือ ระบบที่ 4 อย่างไรก็ตาม ระบบที่ 4 จะควบคุมได้ยากภายใต้สภาวะที่ความหนาแน่นของเซลล์สูง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงแนะนำระบบที่ 2 คือ กลูโคสจำกัดและออกซิเจนไม่จำกัด สำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *P. pastoris* ที่ใช้โปรโมเตอร์ *GAP* เป็นตัวควบคุมการแสดงออกแบบต่อเนื่องตลอดเวลา

คำสำคัญ: พิเชีย พาสทอริส, การยับยั้งเนื่องจากเอทานอล, การกีดกันเนื่องจากเอทานอล, overflow metabolism, โปรโมเตอร์ *GAP*

Control of Overflow Metabolism During Constitutive Recombinant Protein Expression by *Pichia pastoris*

Theppanya Charoenrat^{1*}, Niparat Pramal¹, Vasimon Ruanglek², Mariena Ketudat-Cairns³

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University (Rangsit center),
Pathumthani, 12120

²National Center for Genetic Engineering for Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, 12120

³School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon
Ratchasima, 30000,

Abstract

Constitutive protein expression in *Pichia pastoris* using the *GAP* promoter to avoid the use of methanol is an effective alternative to the inducible *AOX1* promoter. *GAP* promoter is a strong constitutive promoter that shows high expression when cells are grown on glucose. When *P. pastoris* are grown on glycerol, the non-fermentable sugar, small amount of ethanol can be detected. Ethanol has been reported to repress the *AOX1* promoter resulting in lower expression level of recombinant protein. However, no literature has reported on the production of ethanol by-product when *P. pastoris* are grown on glucose or the effect of ethanol on the expression of *GAP* promoter. In this work, first, the effect of ethanol on the growth and expression of *GAP* promoter were investigated using β -glucosidase as a reporter protein. The present of ethanol in culture medium decreased the cell concentration, specific growth rate (μ) and β -glucosidase activity. These results indicated that ethanol inhibit the cell growth and also the expression of the *GAP* promoter. Then, the influence of initial glucose concentration was studied under oxygen non-limit condition (DOT > 25 %). The optimum initial glucose concentration of 20 g/L provides $\mu = 0.20 \text{ h}^{-1}$ and lag time of 3.99 h. The increase of initial glucose concentration to 60 and 80 g/L resulted in the accumulation of ethanol, which decrease μ and increased the lag time. These results indicated that under oxygen non-limit condition, the ethanol was produced *via* overflow metabolism. Finally, 4 fed-batch systems were

designed base on the effect of glucose concentration and DOT to find the optimum fed-batch control (system I: glucose and oxygen limit, system II: glucose limit and oxygen non-limit (DOT > 25%), system III: glucose non-limit ($[glu] \approx 10$ g/L) and oxygen limit), and system IV: glucose and oxygen non-limit). The results showed that the oxygen limitation had a major drawback effect to both cell growth and expression of the *GAP* promoter. More ethanol by product was accumulated under the oxygen limited condition (13.5-14.0 g/L) compare to the oxygen non-limited condition (0.6 g/L). The higher ethanol concentration results in the decrease of μ about 35% and 63% when compared system I with system II and system III with system IV, respectively. Furthermore, about 7 times higher specific production rate was observed under non-oxygen limit condition compared with oxygen limitation. The best results were obtained when system IV was used, however, the system IV is very difficult to control under high cell density culture. Therefore, we recommended system II of glucose limit and oxygen non-limit for the constitutive expression process of *P. pastoris* using glucose as substrate.

Keywords: *Pichia pastoris*, ethanol inhibition, ethanol repression, overflow metabolism, GAP promoter