



b10747047

**PRODUCTION OF HETEROLOGOUS PROTEIN BY
RECOMBINANT *Saccharomyces cerevisiae***

THERAPATT PRASANSARAKIJ

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE
(BIOTECHNOLOGY)**

**With compliments
of**

(Handwritten signature)

IN

**FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

1997

TH
T398p
1997

ชื่อวิทยานิพนธ์	การผลิตเฮเทอโรโกลัสโปรตีนโคอีคอมบีแนนท์ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ผู้วิจัย	ธีรพัชส ประสานสารกิจ
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์	อรรณวดี อิมพลทรัพย์, Ph.D. ชื่นจิตต์ บุญเจ็ด, Ph.D. มานพ สุพรรณธริกา, Ph.D
วันที่สำเร็จการศึกษา	14 พฤษภาคม พ.ศ. 2540
	บทคัดย่อ

จากการศึกษาคุณสมบัติการเจริญเติบโตของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* สายพันธุ์ที่มีความบกพร่องต่อการสร้างเอนไซม์โปรตีนเอส และได้รับพลาสมิด pEB4 อันประกอบด้วย *GAL10* promoter ของยีสต์และ β -galactosidase gene ของ *E. coli* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด non-selective YPD และ selective SD พบว่าเมื่อทำการเลี้ยงรีคอมบีแนนท์ยีสต์แบบเขย่า (shake-flask cultivation) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและมีสภาพความเป็นกรดระดับ 4.5 ในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบ non-selective YPD จะให้ปริมาณชีวมวล (biomass) สูงสุด และปริมาณเอธิลแอลกอฮอล์ต่ำ การศึกษาทดลองโดยอาศัยวิธีทางสถิติ Factorial design ซึ่งให้เห็นว่ารีคอมบีแนนท์ยีสต์เจริญได้ปริมาณชีวมวลสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective SD ที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนและคาร์บอนต่อฟอสเฟสเท่ากับ 18.9 และ 266 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ศึกษาถึงความต้องการวิตามิน กรดอะมิโน และ สารช่วยการเจริญเติบโต (growth factor) ต่อการเจริญเติบโตของรีคอมบีแนนท์ยีสต์ โดยอาศัยวิธีทางสถิติ Plackett-Burman design การศึกษาถึงอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการแสดงออกของยีนเฮเทอโรโกลัส พบว่าน้ำตาลกลูโคสความเข้มข้น 15 จนถึง 40 กรัมต่อลิตรสามารถเหนี่ยวนำให้คอมบีแนนท์ยีสต์สร้างเอนไซม์ β -galactosidase ได้สูงสุดในเวลา 31 ชั่วโมงของการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า การศึกษาถึงระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ (induction time) ให้เกิดการ

แสดงออกของยีนเฮเทอโรโลกัสนั้น ซึ่งให้เห็นว่าการเติมน้ำตาลกลูโคสในช่วงเริ่มต้นของการเลี้ยงเชื้อจะให้ปริมาณเอนไซม์ β -galactosidase สูงสุดทั้งการเลี้ยงใน flask และ bioreactor

การศึกษาถึงการเจริญเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์และการแสดงออกของยีนเฮเทอโรโลกัสใน bioreactor พบว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์เจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด non-selective YPD ที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนด้วยอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ เท่ากับ 0.36 ต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด selective SD (0.19 ต่อชั่วโมง) นอกจากนี้ปริมาณเอนไซม์ β -galactosidase จากการเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์แบบ batch ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด non-selective YPD และ selective SD ได้เท่ากับ 1.112 และ 1.655 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ การเลี้ยงแบบ fed-batch ในสภาวะที่เหมาะสมนั้น พบว่ารีคอมบิแนนท์ยีสต์สามารถสร้างเอนไซม์ได้เท่ากับ 6.5-6.86 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน หรือประมาณ 9.6-9.86 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนที่ละลายในน้ำ และได้อัตราการผลิตเอนไซม์ (enzyme productivity) เท่ากับ 0.111 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนต่อชั่วโมง อีกทั้งปริมาณชีวมวลเข้มข้นสุดท้ายที่ได้จากการเลี้ยงแบบ fed-batch จะได้เท่ากับ 7.4-11.9 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อลิตร หรือประมาณ 3-4.8 เท่าของการเลี้ยงเชื้อแบบ batch (2.5 กรัม/น้ำหนักแห้งต่อลิตร)

Thesis Title	Production of Heterologous Protein by Recombinant <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Name	Therapatt Prasansarakij
Degree	Master of Science (Biotechnology)
Thesis Supervisory Committee	Attawut Impoonsup, Ph.D. Chuenchit Boonchird, Ph.D. Manop Suphantharika, Ph.D.
Date of Graduation	14 May B.E. 2540 (1997)

ABSTRACT

The growth of a protease-deficient recombinant yeast strain, *Saccharomyces cerevisiae* harboring a pEB4 plasmid which contained a yeast *GAL10* promoter and the *E. coli* β -galactosidase gene was characterized in non-selective and selective media. When the yeast cells were grown in non-selective medium buffered with 0.15 M citrate-phosphate in shake-flasks, the highest cell concentration and lower ethanol production were obtained at 30 °C and pH 4.5. Statistic factorial design experiments indicated that C/N and C/P ratios of 18.9 and 266, respectively, were needed for high biomass production in selective medium. Requirements for vitamins, amino acids, and growth factors were investigated by Plackett-Burman design. Expression of heterologous β -galactosidase gene induced by 15-40 g/l galactose resulted in maximum enzyme activity after 30 h of flask cultivation. Furthermore, maximum specific enzyme activity obtained when the induction time of β -galactosidase enzyme was employed at the initial stage of cell growth in either flask or bioreactor.

Growth kinetics and levels of β -galactosidase expression were also investigated in a bioreactor. The maximum specific growth rate of 0.19 h^{-1} in batch cultivation was obtained when glucose was employed as the sole carbon source in synthetic medium. Moreover, higher specific growth rate (0.36 h^{-1}) was achieved in complex media. The expression level of β -galactosidase in batch cultivation either in synthetic or complex medium were 1.112 and 1.655 U/mg protein, respectively. The optimal fed-batch cultivation condition was achieved for the high production of β -galactosidase (6.5 U/mg protein) corresponding to 9.6-9.86 % of total yeast soluble protein, with high productivity ($0.111 \text{ U/mg protein-h}$). The final biomass concentrations achieved were 7.4-11.9 g DCW/l in the fed-batch cultivations which were 3-4.8 times higher than biomass concentration obtained from batch cultivation in synthetic medium (2.5 g DCW/l)