- 2 AUG 2001

LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

PRODUCTION OF HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN BY A RECOMBINANT YEAST

VITTHAWAT SUTTHATHAM

อภินันทนาการ
จาก
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENTS FOR

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE

(BIOTECHNOLOGY)

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

2001

ISBN 974-04-0042-6

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
V851p
2001

Copyright by Mahidol University

3936494 SCBT/M : MAJOR: BIOTECHNOLOGY; M.Sc. (BIOTECHNOLOGY)
KEY WORD : *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* / HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN / PRODUCTION / YEAST

VITTHAWAT SUTTHATHAM: PRODUCTION OF HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN BY A RECOMBINANT YEAST. THESIS ADVISORS: ATTAWUT IMPOOLSUP, Ph.D., CHUENCHIT BOONCHIRD, Ph.D., CORNEL VERDUYN, Ph.D. 154 P. ISBN 974-04-0042-6

Recombinant Hepatitis B surface antigen (HBsAg) production was carried out in 2 strains (BJ5462 and JEL-1) of *Saccharomyces cerevisiae*, which are protease-deficient strains and harbor pEB-G1 plasmid containing *GAL10* promoter and *Pre* S_2+S gene encoding for middle size of HBsAg. Environmental factors, induction conditions, medium composition and cultivation mode of operation were investigated in order to obtain high biomass concentration and HBsAg expression.

With higher HBsAg productivity, cellular productivity and shorter production time, *S. cerevisiae* JEL-1b, a transformant of JEL-1, was selected for further study. In batch shake flask cultivation on Synthetic Defined (SD) medium, optimum conditions for HBsAg production (76.5 ng/mg protein) were obtained as follows : 30°C, pH 3.5 - 4.0, 0.5% w/v galactose and the mid-log growth phase (approx. 18 h after inoculation) induction time. Plackett-Burman design experiments on SD medium indicated uracil, histidine, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ and KH_2PO_4 stimulated cell growth while KI, $MnSO_4 \cdot H_2O$ and nicotinic acid showed an inhibitory effect (P>75%). Addition of 1% yeast extract into modified SD (MSDY-1) could provide lower HBsAg degradation but higher plasmid retention and biomass yield. For batch cultivation on MSDY-1 medium, maximum specific HBsAg was 73 and 65.4 ng/mg protein in shake flask and bioreactor, respectively. For fed-batch cultivation on MSDY-1 medium, biomass with glucose or MSDY-1 feeding strategy was obtained 2 or 3 times higher, respectively, than one in batch culture. However, the maximum specific HBsAg level in glucose fed-batch (67 ng/mg protein) was similar with one in MSDY-1 batch cultivation. While in MSDY-1 fed-batch, unexpected low specific HBsAg level (45.4 ng/mg protein) was obtained due to reduction in galactose and high plasmid instability. In addition, a decrease in HBsAg level in either glucose or MSDY-1 fed-batch (from 67 to 19 or 45.4 to 17.6 ng/mg protein, respectively) in the late phase of cultivation may be due to reduction of galactose concentration (as specific galactose concentration : from 0.48 to 0.1 g/l·OD_{600} or 0.31 to 0.05 g/l·OD_{600} in glucose or MSDY-1 fed-batch, respectively).

Further investigation in fed-batch cultivation are needed for optimum amount of galactose and feeding strategy in order to obtain higher HBsAg production. Specific galactose concentration may be used as a comparative index.

Copyright by Mahidol University

3936494 SCBT/M : สาขาวิชา : เทคโนโลยีชีวภาพ; วท.ม. (เทคโนโลยีชีวภาพ)

วิทวัส ศรัทธาธรรม : การผลิตแอนติเจนส่วนผิวของไวรัสตับอักเสบชนิดบีโดยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ (PRODUCTION OF HEPATITIS B SURFACE ANTIGEN BY A RECOMBINANT YEAST). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : อรรถวุฒิ อิ่มพูลทรัพย์, Ph.D., ชื่นจิตต์ บุญเฉิด, Ph.D., คอเนล เวอร์เดิน, Ph.D., 154 หน้า. ISBN 974-04-0042-6.

การผลิตรีคอมบิแนนท์แอนติเจนส่วนผิวของไวรัสตับอักเสบชนิดบี (HBsAg) โดยใช้ *Saccharomyces cerevisiae* 2 สายพันธุ์ คือ BJ5462 และ JEL-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีความบกพร่องต่อการสร้างเอนไซม์โปรตีเอส และได้รับพลาสมิด pEB-G1 อันประกอบด้วย *GAL10* promoter และยีน *Pre* S_2+S ซึ่งถอดรหัสได้เป็นแอนติเจนขนาดกลางของ HBsAg โดยได้ศึกษาถึงปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม สภาวะการเหนี่ยวนำ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และวิธีการเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของชีวมวล และการแสดงออก HBsAg สูง

จากมีการผลิต HBsAg ที่สูงกว่า, อัตราการผลิตเซลล์ที่สูงกว่า รวมทั้งเวลาในการผลิตที่สั้นกว่า ทำให้ *S. cerevisiae* สายพันธุ์ JEL-1b ซึ่งเป็น transformant ของ JEL-1 ถูกเลือกในการศึกษาขั้นต่อไป การเลี้ยงเชื้อแบบไม่ต่อเนื่องใน shake flask ด้วย Synthetic Defined (SD) medium นั้น สภาวะที่เหมาะสมของการผลิต HBsAg (76.5 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน) คือที่ 30 องศาเซลเซียส, pH 3.5-4.0, เหนี่ยวนำด้วยน้ำตาลกาแลกโตสที่ 0.5% น้ำหนักต่อปริมาตร และเวลาในการเหนี่ยวนำการแสดงออกของ HBsAg เป็นช่วง mid-log ของการเจริญเติบโต (ประมาณ 18 ชั่วโมงหลังการเติมหัวเชื้อ) ในการศึกษาถึงองค์ประกอบของ SD medium ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตโดยวิธี Plackett-Burman พบว่า uracil, histidine, $FeCl_3.6H_2O$ และ KH_2PO_4 ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์ ในขณะที่ KI, $MnSO_4H_2O$ และกรด nicotinic นั้น มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตที่ระดับความเชื่อมั่นมากกว่า 75% การเติม 1% yeast extract ลงใน modified SD (MSDY-1) ช่วยลดการเสียสภาพของ HBsAg ลง, ยังคงสามารถรักษาพลาสมิดไว้ได้สูง และให้ปริมาณชีวมวลสูง สำหรับการผลิตแบบไม่ต่อเนื่องใน MSDY-1 medium นั้น ให้ค่าจำเพาะของHBsAg สูงสุดเป็น 73 และ 65.4 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน ใน shake flask และถังชีวปฏิกร ตามลำดับ สำหรับการเลี้ยงเชื้อแบบกึ่งต่อเนื่องใน MSDY-1 medium นั้น เมื่อมีการป้อนน้ำตาลกลูโคส หรือ MSDY-1 มีผลทำให้มีชีวมวลเพิ่มขึ้น 2 หรือ 3 เท่าของการเลี้ยงแบบไม่ต่อเนื่องตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ปริมาณสูงสุดของ HBsAg ในการผลิตแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการป้อนด้วยกลูโคส (67 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน) นั้น ใกล้เคียงกับปริมาณสูงสุดที่พบในการผลิตแบบไม่ต่อเนื่องด้วย MSDY-1 ส่วนในการผลิตแบบกึ่งต่อเนื่องด้วย MSDY-1 นั้น พบว่ามีปริมาณ HBsAg น้อยมาก (45.4 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน) ซึ่งอาจเป็นเพราะการลดลงของกาแลกโตส และการไม่เสถียรอย่างมากของพลาสมิด นอกจากนี้ ปริมาณ HBsAgในการผลิตแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการป้อนกลูโคสและ MSDY-1 ลดลงในช่วงหลังของการผลิต (จาก 67 เป็น 19 และ 45.4 เป็น 17.6 นาโนกรัมต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ) อาจมีสาเหตุมาจากการลดลงของความเข้มข้นของกาแลกโตส (ที่ความเข้มข้นจำเพาะของกาแลกโตส: จาก 0.48 เป็น 0.1 กรัมต่อลิตรต่อOD_{600} หรือ 0.31 เป็น 0.05 กรัมต่อลิตรต่อOD_{600} ในการผลิตแบบกึ่งต่อเนื่องที่มีการเติมกลูโคส หรือ MSDY-1 ตามลำดับ

ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการผลิตแบบกึ่งต่อเนื่อง เพื่อหาปริมาณกาแลกโตสและวิธีการป้อนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม เพื่อให้มีการผลิต HBsAg ที่สูงขึ้น ความเข้มข้นจำเพาะของกาแลกโตสอาจจะใช้เป็นดรรชนีหนึ่งที่นำมาใช้ประโยชน์ ในการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการผลิต HBsAg โดยใช้ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณกาแลกโตส และปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในขณะนั้น ๆ

Copyright by Mahidol University