

NGHIÊN CỨU ĐIỀU KIỆN THÍCH HỢP LÊN MEN SINH TỔNG HỢP LACTOFERRIN TỪ CHỦNG *PICHIA PASTORIS* KM71H-3 TÁI TỔ HỢP

Trịnh Thị Thu Thủy^{1,2}, Nguyễn Thị Thủy¹, Trương Quốc Phong^{1*}

¹ Viện Công nghệ Sinh học và Công nghệ Thực phẩm, Trường Đại học Bách khoa Hà Nội,

² Khoa Công nghệ Sinh học, Học viện Nông nghiệp Việt Nam

TÓM TẮT

Lactoferrin (LF) là một protein liên kết với sắt không chứa nhân hem, một thành phần trong họ protein transferrin với chức năng chung là vận chuyển sắt. Là một protein đa chức năng sinh học, LF có khả năng điều hòa hấp thụ sắt trong ruột, đáp ứng miễn dịch, chống oxy hóa, chống phòng ngừa ung thư, và chống viêm... Gen mã hóa LF có nguồn gốc từ bò đã được biểu hiện thành công trong chủng *P. pastoris* KM71H-3 tái tổ hợp trên môi trường BMMY. Nghiên cứu này đã khảo sát 3 môi trường khoáng thay thế môi trường BMMY là BMM, 2x-MMP, F22 và đã lựa chọn được môi trường 2x-MMP phù hợp biểu hiện LF ở *P. pastoris* KM71H-3. Nghiên cứu cũng đã khảo sát ảnh hưởng của nguồn nitơ vô cơ (NH_4^+ từ 0,5 - 3,0%), nguồn nitơ hữu cơ là pepton (1,0%); cao nấm men (0,5%); cao ngô (0,25%) và nồng độ chất cảm ứng MeOH (0,5 - 2,0%) đến khả năng biểu hiện LF trong môi trường 2x-MMP. Kết quả cho thấy môi trường 2x-MMP với 1,5% NH_4^+ và 0,25% cao ngô, cảm ứng 0,5% methanol mỗi 24 giờ là môi trường phù hợp để biểu hiện LF. Thành phần môi trường được lựa chọn là phù hợp để có thể lên men sinh tổng hợp lactoferrin ở quy mô lớn.

Từ khóa: Cao ngô, lactoferrin, *Pichia pastoris*, tái tổ hợp.

MỞ ĐẦU

Lactoferrin (LF) là một protein liên kết với sắt không chứa nhân hem (Embleton *et al.*, 2013), một thành phần trong họ protein transferrin với chức năng chung là vận chuyển sắt trong máu (Gonzalez-Chavez *et al.*, 2009). LF là một thành phần protein chiếm hàm lượng cao thứ 2 trong sữa sau casein (Nakamura *et al.*, 2001). Hàm lượng LF cũng có sự thay đổi lớn, với nồng độ cao nhất là 7 g/L đối với sữa non của người, 1 g/L đối với sữa người bình thường và tăng lên 5000 lần khi có sự nhiễm khuẩn. LF có hàm lượng cao trong sữa của động vật có vú như bò, lợn, dê, lạc đà... (Chahardooli *et al.*, 2016; Chen *et al.*, 2004). Nồng độ LF có trong sữa bò thay đổi tùy theo giai đoạn tiết sữa dao động từ 0,02 - 0,2 mg/mL đối với sữa trưởng thành chiếm khoảng 2,4 mg/mL đối với sữa non của bò mới sinh (Sharma *et al.*, 2015).

LF là một protein đa chức năng. Chức năng sinh học đầu tiên của LF thể hiện ở 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. LF liên quan đến nhiều chức năng sinh lý khác nhau như điều hòa hấp thụ sắt trong ruột, tăng cường đáp ứng miễn dịch, kháng khuẩn, chống oxy hóa, chống phòng ngừa ung thư, và chống viêm (Adlerova *et al.*, 2008); LF giúp bảo vệ đối với sự nhiễm khuẩn và đặc tính này được nghiên cứu nhiều nhất cho đến nay.

Do có nhiều đặc tính bảo vệ tốt đối với cơ thể nên nhu cầu bổ sung dưới dạng thuốc hoặc thực phẩm chức năng ngày càng tăng (Conesa *et al.*, 2010). Hướng sản xuất LF bằng con đường tái tổ hợp đang được quan tâm do có ưu điểm là chủ động nguồn nguyên liệu so với phương pháp tách chiết LF từ sữa động vật có vú. Trong các hệ biểu hiện, *P. pastoris* thường được sử dụng hơn do khả năng tổng hợp protein tái tổ hợp cao. Hệ thống biểu hiện *P. pastoris* đã được sử dụng để biểu hiện LF cho hiệu suất tổng hợp đạt 3,5 g/L (Iglesias-Figueroa *et al.*, 2016). Tuy nhiên, để sản xuất hiệu quả protein LF từ chủng tái tổ hợp cần phải xác định được điều kiện lên men thích hợp để vừa đảm bảo hiệu suất tổng hợp cao nhất vừa có chi phí thấp nhất. Mục tiêu của nghiên cứu này nhằm (i) Lựa chọn môi trường lên men thích hợp để phù hợp sản xuất LF quy mô lớn thay thế môi trường chuẩn BMMY và (ii) Nghiên cứu ảnh hưởng của nguồn nitơ vô cơ NH_4^+ và nitơ hữu cơ đến khả năng biểu hiện LF.

NGUYÊN LIỆU VÀ PHƯƠNG PHÁP

Chủng *P. pastoris* KM71H-3 tái tổ hợp mang gen mã hóa lactoferrin bò từ đề tài ĐT.01.18/CNSHCB.

Các môi trường

Môi trường hoạt hóa:

YPD: 1,0% yeast extract, 2,0% peptone, 2,0% glucose.

Môi trường biểu hiện

BMMY: 1% methanol; 1,34% yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate (YNB), 1% yeast extract, 2% peptone, pha trong đệm phosphate 0,1 M, pH 6,0.

BMM: 1% methanol; 1,34% yeast nitrogen base w/o amino acid and ammonium sulfate (YNB), pha trong đệm phosphate 0,1 M, pH 6,0.

2x-MMP: KH_2PO_4 1,7%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1,5%; pha trong đệm phosphat 0,1 M, pH 6,0.

FM22: KH_2PO_4 4,29%; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,5%, CaSO_4 1%; K_2SO_4 1,43%; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 11,7%.

Dung dịch khoáng: PTM4: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,2%; NaI 0,008%; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,3%; $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,0148%; H_3BO_3 0,002%; CoCl_2 0,05%; ZnCl_2 0,7%; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,2%; Biotin 0,02%; H_2SO_4 0,1%.

Phương pháp lên men sinh tổng hợp lactoferrin trên các môi trường khác nhau

Chủng nấm men *P. pastoris* KM71H-3 được nuôi cấy biểu hiện trên các môi trường: BMM, 2x-MMP, FM22 và BMMY.

(a) Nuôi khởi động: Nuôi lactic một khuẩn lạc trong 2 mL 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 khác nhau: BMM; 2x-MM-P; FM22 bổ sung 0,5 % glycerol; môi trường BMMY được dùng làm đối chứng. Chuyển 1 mL giống khởi động vào các bình 19 mL môi trường sao cho giá trị OD_{600} ban đầu là 0,5, nuôi lactic ở 28°C trong 24 giờ với tốc độ lắc 150 vòng/phút.

Đối với các thí nghiệm thay đổi nồng độ NH_4^+ (0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5%; 3,0%), bổ sung nguồn nitơ hữu cơ peptone (1,0%), cao nấm men (0,5%) và cao ngô (0,25%). Các thành phần bổ sung được đưa vào môi trường 2X-MMP để chuẩn bị môi trường lên men. Đối với thí nghiệm khảo sát nồng độ chất cảm ứng methanol, thay đổi nồng độ cảm ứng mỗi 24 giờ là 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%.

Nuôi biểu hiện: Bổ sung môi trường tiếp dưỡng gồm chất cảm ứng methanol và các chất khoáng vi lượng (PTM 4) vào các bình nuôi cấy. Mẫu sinh khối nấm men được thu nhận theo thời gian (mỗi 24 giờ).

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

Phương pháp điện di SDS - PAGE

Các mẫu protein được tiến hành điện di SDS-PAGE trên gel polyacrylamide 12% theo phương pháp Laemmli (1970).

Phương pháp lai phân tử Dot Blot

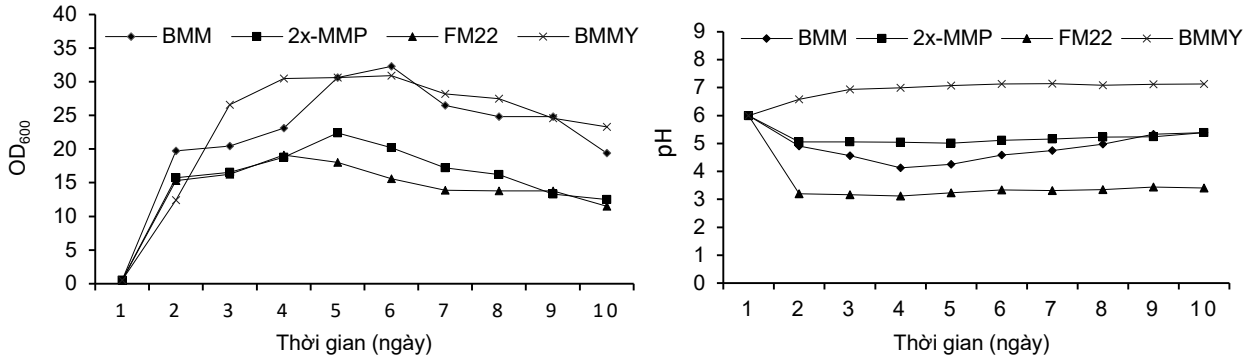
Để đánh giá sự có mặt của LF, mẫu protein được chấm lên màng nitrocellulose. Màng sau đó được khóa bằng sữa gầy 1% trong 1 giờ. Sau 3 lần rửa bằng đệm PBS, mẫu trên màng được ủ với kháng thể bậc 1 là babbit Anti Histag (1:5000) trong đệm PBS 1X, sau đó rửa 3 lần bằng đệm PBS-T và ủ với kháng thể bậc 2 (Anti Rabbit IgG + AP) tỉ lệ 1:30.000 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).

KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

Lựa chọn môi trường lên men thay thế môi trường chuẩn BMMY

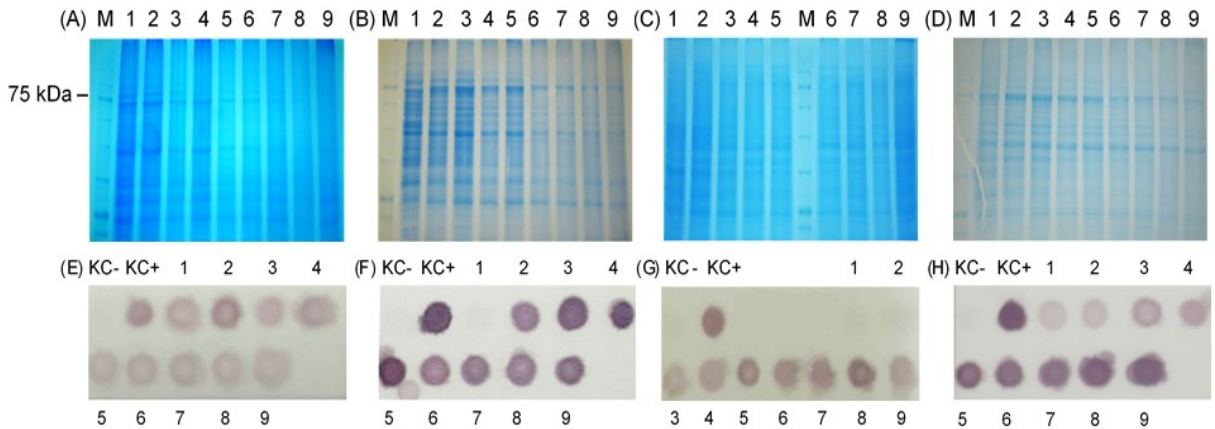
Khi nuôi cấy sàng lọc để xác định khả năng biểu hiện của protein tái tổ hợp trên *P. pastoris*, hầu hết các công bố đều sử dụng môi trường BMMY của Invitrogen (Alamdari *et al.*, 2016; Iglesias-Figueroa *et al.*, 2016). Tuy nhiên đây là môi trường tổng hợp có giá thành cao, mật độ tế bào sau khi nuôi cấy thường ở mức OD_{600} 30 - 40. Mặt khác, khi lên men ở quy mô lớn, lượng môi trường cần nhiều nên việc tìm môi trường thay thế rẻ tiền là cần thiết. Để thực hiện được mục tiêu trên, chúng tôi tiến hành xác định môi trường thay thế cho BMMY. Các môi trường thay thế cho môi trường BMMY được sử dụng là: BMM; 2x-MMP; FM22. Đây là các môi trường khá cân đối về khoáng chất cho việc tạo sinh khối trên nguồn carbon là glycerol đã được sử dụng cho việc biểu hiện protein từ *P. pastoris* (Liu *et al.*, 2016). Đây là các môi trường khoáng phù hợp cho sự phát triển của *P. pastoris*.

Kết quả nghiên cứu cho thấy *P. pastoris* KM71H-3 phát triển trong môi trường BMM mạnh hơn trong FM22 và 2x-MMP (Hình 1A). Tuy nhiên, pH của môi trường 2x-MMP ổn định hơn so với hai môi trường còn lại (pH giảm từ 6,0 giảm xuống khoảng 5,1 ÷ 5,4, trong khi đó môi trường BMM có pH giảm từ 6,0 xuống còn 4,1 - 4,9 và FM22 có pH giảm từ 6,0 xuống còn 3,1 ÷ 3,4 (Hình 1B).



Hình 1. Động học sinh trưởng (A) và sự thay đổi pH canh trường lên men (B) chủng *P. pastoris* KM71H-3 tái tổ hợp trên các môi trường khác nhau: BMM, 2x-MMP, FM22 và BMMY

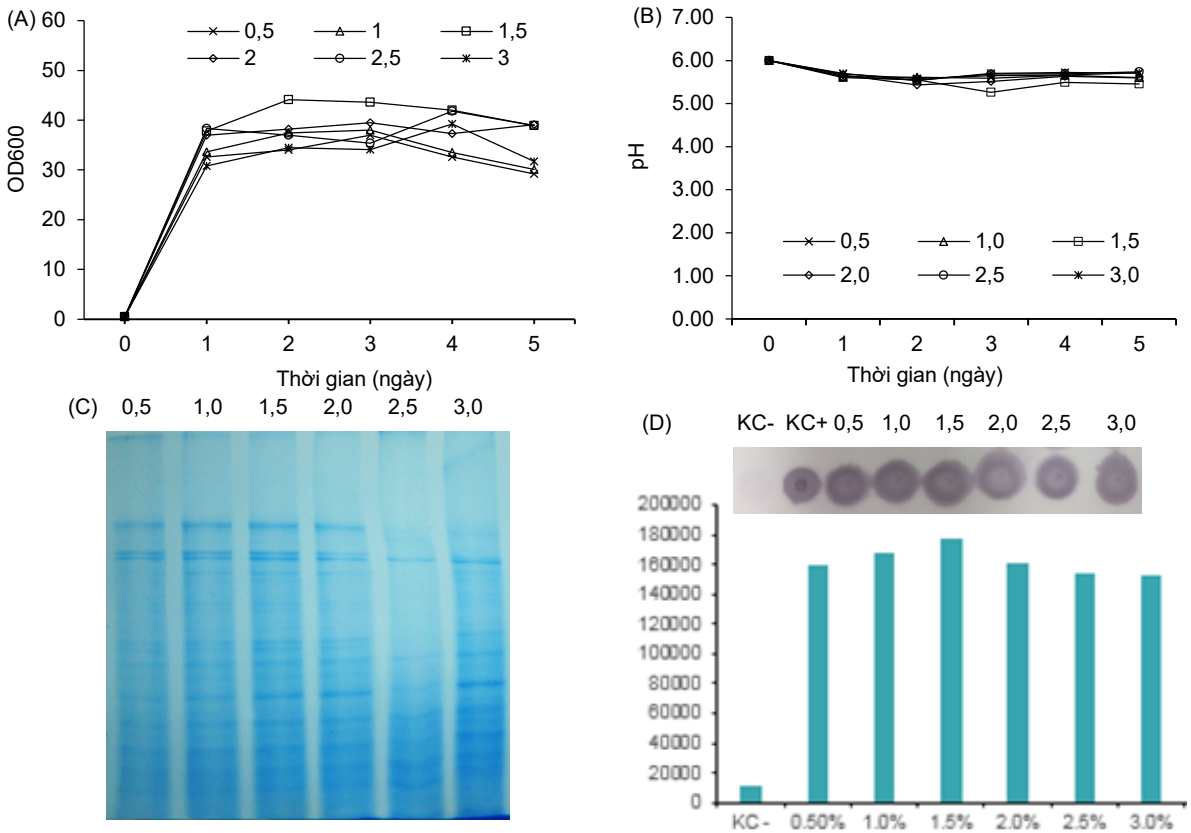
Để xác định khả năng biểu hiện lactoferrin ở các môi trường khảo sát, dịch chiết protein được phân tích bằng điện di SDS-PAGE và dot blot. Kết quả cho thấy ở tất cả các môi trường đều xuất hiện band protein kích thước khoảng 75 kDa tương ứng với lactoferrin tái tổ hợp (Hình 2A-D). Phân tích dot blot cho thấy mức độ biểu hiện protein lactoferrin cao nhất ở môi trường 2x-MMP (Hình 2F) so với hai môi trường BMM (Hình 2E) và FM22 (Hình 2G). Mức độ biểu hiện trong môi trường 2x-MMP là tương đương so với môi trường tiêu chuẩn BMMY (Hình 2H). Từ kết quả thu được, môi trường 2x-MMP đã được lựa chọn cho các nghiên cứu tiếp theo về lên men sinh tổng hợp lactoferrin.



Hình 2. Phổ điện di protein trên gel SDS-PAGE (A-D) và Dot blot (E-H) dịch chiết protein từ chủng *P. pastoris* KM71H-3 tái tổ hợp biểu hiện trong các môi trường khác nhau: BMM, 2x-MMP, FM22 và BMMY, tương ứng. KC-, dịch chiết protein từ chủng *P. pastoris* KM71H-3 đối chứng; KC+, dịch chiết protein Lactoferrin tái tổ hợp; M, thang protein chuẩn (iNtRON, Hàn Quốc). Protein lactoferrin tái tổ hợp khoảng 75 kDa. Mẫu 1-9, dịch chiết protein từ ngày 1-9 sau cảm ứng methanol tương ứng

Nghiên cứu ảnh hưởng của nồng độ NH₄⁺

Khi sử dụng môi trường 2x-MMP thay thế môi trường BMMY, thành phần nitơ trong môi trường có sự thay đổi từ YPD, Pepton sang NH₄⁺. Để đánh giá ảnh hưởng của NH₄⁺ đến khả năng sinh trưởng, phát triển và tổng hợp lactoferrin tái tổ hợp ở *P. pastoris*, một dải nồng độ 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0%; 2,5%; 3,0% (w/v) NH₄⁺ đã được khảo sát. Kết quả cho thấy mật độ sinh khối và giá trị pH môi trường nuôi không có sự khác biệt nhiều ở các nồng độ NH₄⁺ khác nhau. Giá trị OD₆₀₀ cao nhất dao động từ 36 - 44 (Hình 3A); giá trị pH giao động trong khoảng 5,5 - 5,7 (Hình 3B). Kết quả điện di SDS-PAGE (hình 3C) chỉ ra rằng ở môi trường có nồng độ NH₄⁺ 1,5%, protein mục tiêu ở vị trí khoảng 75 kDa là cao nhất. Để đánh giá so sánh hàm lượng LF trong dịch chiết protein, dot blot đã được thực hiện và kết quả phân tích cường độ mẫu Dot blot bằng phần mềm Quantity One cũng cho thấy tại nồng độ NH₄⁺ 1,5% thì cường độ màu trên màng nitrocellulose là cao nhất tương ứng với lượng LF tái tổ hợp thu được là nhiều nhất. Vì vậy, nồng độ NH₄⁺ thích hợp nhất được lựa chọn để lên men *P. pastoris* KM71H-3 sinh tổng hợp LF trong môi trường 2x-MMP là 1,5%.

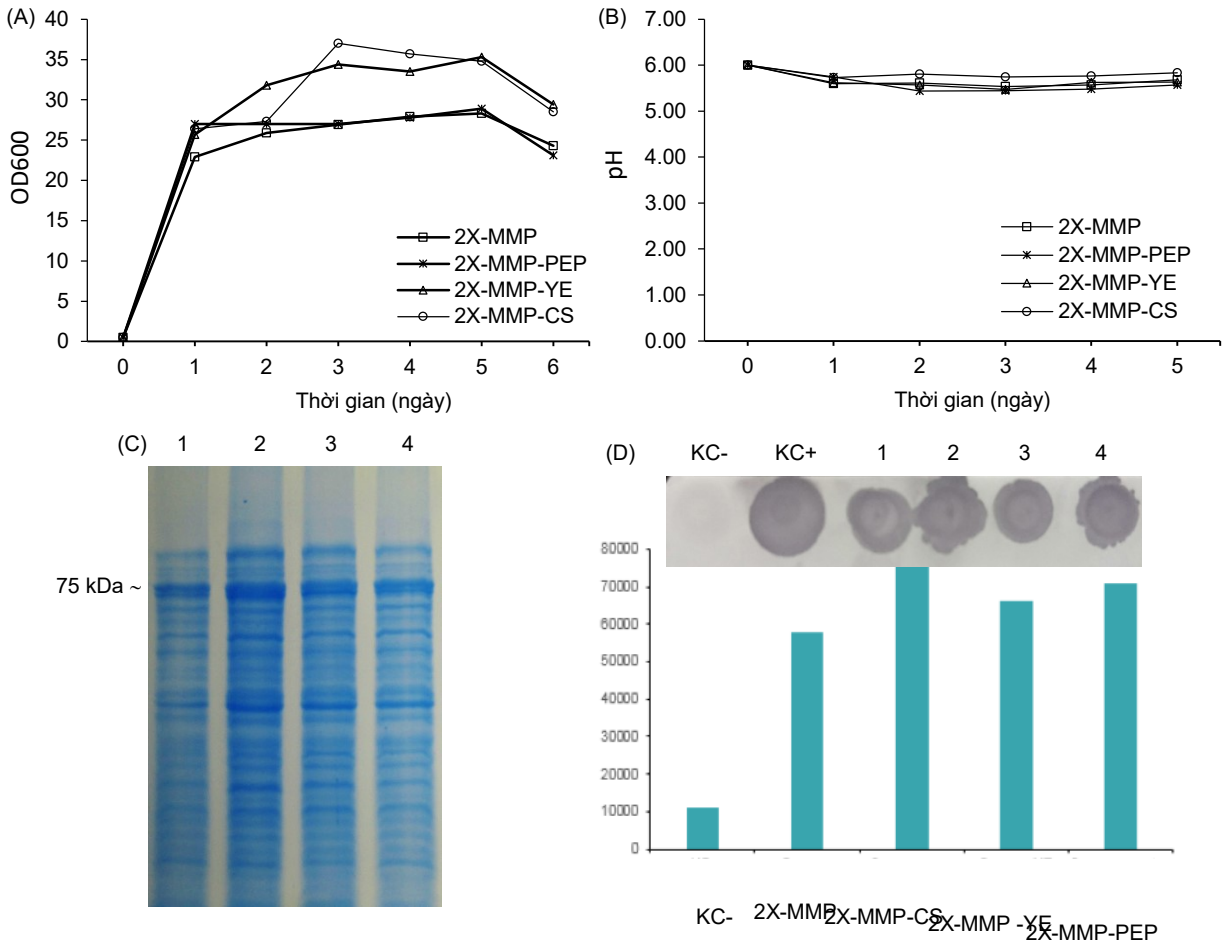


Hình 3. Ảnh hưởng của nồng độ NH_4^+ đến khả năng sinh trưởng (A), sự thay đổi pH môi trường lên men (B), mức độ tổng hợp protein lactoferrin (C-D) của chủng *P. pastoris* KM71H-3 trên môi trường 2x-MMP

Ảnh hưởng của nguồn Nitơ hữu cơ

Nitơ là một trong các yếu tố ảnh hưởng đến quá trình tổng hợp protein tái tổ hợp. Chính vì vậy ngoài nguồn nitơ là NH_4^+ , chúng tôi khảo sát bổ sung thêm nguồn nitơ hữu cơ là Pepton (1,0%); cao nấm men (0,5%); cao ngô 0,25% và đánh giá ảnh hưởng đến khả năng sinh trưởng và tổng hợp lactoferrin tái tổ hợp. Sau 5 ngày cảm ứng, kết quả cho thấy môi trường bổ sung dịch chiết cao ngô và dịch chiết nấm men thì *P. pastoris* KM71H-3 phát triển tốt hơn so với môi trường đối chứng (2x-MMP) trong khi môi trường bổ sung pepton không có sự khác biệt về mật độ sinh khối (Hình 4A). Sự thay đổi pH ở môi trường 2x-MMP cao ngô (2x-MMP-CS) là ít biến động nhất so với 2 môi trường còn lại (Hình 4B).

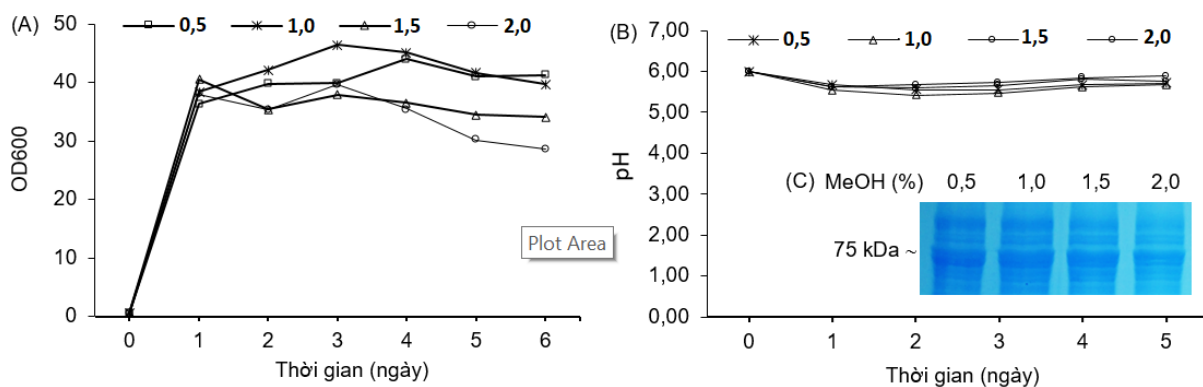
Kết quả phân tích protein bằng điện di SDS-PAGE cho thấy băng protein ở vị trí khoảng 75 kDa rõ nét nhất ở môi trường 2x-MMP-CS bổ sung cao ngô. Kết quả phân tích protein đích lactoferrin bằng dot blot cũng cho thấy mức độ tổng hợp protein lactoferrin tăng lên khi bổ sung nguồn nitơ hữu cơ và cao nhất đạt được trong môi trường 2x-MMP bổ sung cao ngô. Theo công bố của Taiwo và đồng tác giả (2018) cho thấy cao ngô là nguồn nitơ hữu cơ phù hợp để lên men *Saccharomyces cerevisiae* type 1 và Anchor Instant Yeast thay thế dịch chiết nấm men trong môi trường cho hiệu quả tương đương (Taiwo *et al.*, 2018). Cao ngô là nguồn cơ chất rẻ tiền hơn so với cao nấm men do đó nguồn nitơ hữu cơ bổ sung này sẽ cho hiệu quả kinh tế cao hơn và phù hợp hơn khi sử dụng ở quy mô công nghiệp. Như vậy môi trường 2x-MMP bổ sung 0,25% cao ngô được lựa chọn cho các thí nghiệm tiếp theo.



Hình 4. Ảnh hưởng của nguồn nitơ hữu cơ 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 2x-MMP (1) bổ sung nguồn nitơ hữu cơ gồm cao ngô (2-CS), cao nấm men (3-YE), pepton (4-PEP)

Khảo sát nồng độ methanol cảm ứng

Trong môi trường lên men, methanol vừa là nguồn cacbon cung cấp cho *P. pastoris* phát triển đồng thời là chất cảm ứng tác động lên promoter AOX1 để cảm ứng biểu hiện protein lactoferrin (Iglesias-Figueroa *et al.*, 2016). Chính vì vậy, việc khảo sát nồng độ methanol cảm ứng là một trong những thí nghiệm giúp tìm ra nồng độ methanol thích hợp cho việc sản xuất lactoferrin ở *P. pastoris* KM71H-3. Dài nồng độ methanol (v/v) từ 0,5%; 1,0%; 1,5%; 2,0% được bổ sung vào các bình lên men mỗi 24 giờ. Kết quả cho thấy trong 2 ngày đầu mức độ sinh trưởng trong các bình lên men khá đồng đều nhau, tăng từ 0,5 (OD₆₀₀ đạt 0,5) lên khoảng 38. Trong các ngày tiếp theo, ở nồng độ methanol cảm ứng 0,5 và 1,0% giá trị OD tiếp tục tăng trong khi ở nồng độ methanol cảm ứng 1,5 và 2,0 giá trị OD₆₀₀ giảm. Giá trị OD₆₀₀ giảm mạnh nhất ở ngày cảm ứng thứ 3, nồng độ 2,0% chỉ còn 28,6 (Hình 5A). Điều này có thể là do mặc dù methanol là chất cảm ứng và nguồn cacbon cho nấm men phát triển, tuy nhiên ở nồng độ methanol cao lại là chất độc với tế bào. Do đó, trong trường hợp này nồng độ cảm ứng trên 1,5% không phù hợp cho sự phát triển của tế bào *P. pastoris* KM71H-3. Giá trị pH môi trường được theo dõi trong quá trình lên men ở cả 4 điều kiện đều không có sự thay đổi đáng kể; giá trị pH được duy trì ở mức 5,5÷5,8 trong suốt quá trình lên men (Hình 5B). Mức độ biểu hiện protein lactoferrin tái tổ hợp cũng đã được kiểm tra bằng điện di SDS-PAGE và cho thấy mức độ biểu hiện lactoferrin cao nhất ở 0,5% và giảm dần khi tăng nồng độ methanol đến 2,0% (Hình 5). Kết quả này cũng phù hợp với nhiều nghiên cứu về biểu hiện protein tái tổ hợp trong nấm men *P. pastoris* (Chen *et al.*, 2004).



Hình 5. Ảnh hưởng của nồng độ methanol đến khả năng sinh trưởng (A), sự thay đổi pH môi trường lên men (B), mức độ tổng hợp protein lactoferrin (C) của chủng *P. pastoris* KM71H-3

KẾT LUẬN

Trong nghiên cứu này, chúng tôi đã lựa chọn được môi trường 2x-MMP thay thế môi trường BMMY để biểu hiện lactoferrin ở chủng *P. pastoris* KM71H-3. Kết quả khảo sát ảnh hưởng của NH_4^+ cho thấy nồng độ NH_4^+ 1,5% và cao ngô 0,25% bổ sung vào môi trường 2x-MMP làm tăng mức độ biểu hiện lactoferrin tái tổ hợp. Nồng độ chất cảm ứng MeOH 0,5% được lựa chọn để cảm ứng biểu hiện lactoferrin tái tổ hợp. Môi trường được nghiên cứu lựa chọn là phù hợp để sử dụng lên men tổng hợp lactoferrin ở quy mô lớn.

Lời cảm ơn: Công trình nghiên cứu này được thực hiện với sự hỗ trợ kinh phí từ đề tài mã số ĐT.01.18/CNSHCB của Bộ Công thương.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- Adlerova L, Bartoskova A, Faldyna M (2008). Lactoferrin: a review. *Vet Med* 53: 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. *Biol Forum* 8: 471-478.
- Conesa C, Calvo M, Sanchez L (2010). Recombinant human lactoferrin: a valuable protein for pharmaceutical products and functional foods. *Biotechnol Adv* 28: 831-838.
- Chahardooli M, Niazi A, Aram F, Sohrabi SM (2016). Expression of recombinant Arabian camel lactoferrin-related peptide in *Pichia pastoris* and its antimicrobial identification. *J Sci Food Agric* 96: 569-575.
- Chen HL, Lai YW, Yen CC, Lin YY, Lu CY, Yang SH, Tsai TC, Lin YJ, Lin CW, and Chen CM (2004). Production of recombinant porcine lactoferrin exhibiting antibacterial activity in methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*. *J Mol Microbiol Biotechnol*: 141-149.
- Embleton ND, Berrington JE, McGuire W, Stewart CJ, Cummings SP (2013). Lactoferrin: Antimicrobial activity and therapeutic potential. *Semin Fetal Neonat M*: 1-7.
- Gonzalez-Chavez SA, Arevalo-Gallegos S, Rascon-Cruz Q (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *Int J Antimicrob Agents* 33: 301 e1-8.
- Iglesias-Figueroa B, Valdiviezo-Godina N, Siqueiros-Cendon T, Sinagawa-Garcia S, Arevalo-Gallegos S, and Rascon-Cruz Q (2016). High-Level Expression of Recombinant Bovine Lactoferrin in *Pichia pastoris* with Antimicrobial Activity. *Int J Mol Sci* 17.
- Liu WC, Gong T, Wang QH, Liang X, Chen JJ, Zhu P (2016). Scaling-up Fermentation of *Pichia pastoris* to demonstration scale using new methanol feeding strategy and increased air pressure instead of pure oxygen supplement. *Sci Rep* 6: 18439.
- Nakamura I, Watanabe A, Tsunemitsu H, Lee NY, Kumura H, Shimazaki KI, and Yagi Y (2001). Production of recombinant bovine lactoferrin N-lobe in insect cells and its antimicrobial activity. *Protein Expr Purif* 21: 424-431.
- Sharma R, Chakraborty D, Gupta P (2015). Bovine lactoferrin and its functions in animals - A review. *Agric Rev* 36: 321-326.
- Taiwo EE, Madzimbamuto TN, Ojumu TV (2018). Optimization of Corn Steep Liquor Dosage and Other Fermentation Parameters for Ethanol Production by *Saccharomyces cerevisiae* Type 1 and Anchor Instant Yeast. *Energies* 11, 1740.

STUDY ON SUITABLE CONDITIONS FOR LACTOFERRIN PRODUCTION FROM RECOMBINANT *PICHIA PASTORIS* KM71H-3 STRAIN

Trinh Thi Thu Thuy^{1,2}, Nguyen Thi Thuy¹, Truong Quoc Phong^{1*}

¹ School of Biotechnology and Food Technology, Hanoi University of Science and Technology

² Faculty of Biotechnology, Vietnam National University of Agriculture

SUMMARY

Lactoferrin (LF) is a protein bound to iron that does not contain heme, and a part of the transferrin protein family whose general function is to transport iron. As a biological multi-function protein, LF is capable of regulating iron absorption in the intestine, immune response, antioxidant, anti-cancer prevention, and anti-inflammatory ... The gene encoding LF derived from bovine has been successfully expressed in recombinant *P. pastoris* KM71H-3 strain on BMMY medium. This study investigated 3 mineral media replacing BMMY, namely BMM, 2x-MMP, F22 and 2x-MMP medium suitable for LF expression in *P. pastoris* KM71H-3 was selected. The effect of inorganic nitrogen sources (NH_4^+ with concentrations of 0.5 to 3.0%), the organic nitrogen sources including peptone (1.0%); yeast extract (0.5%); corn steep (0.25%) was investigated. Suitable concentration of methanol for inducing expression of lactoferrin was 0.5% and selected for further experiments. The results showed that a 2x-MMP medium with 1.5% NH_4^+ and 0.25% cornsteep was suitable for LF expression. The selected medium components are suitable for large-scale lactoferrin production.

Keywords: Cornsteep liquor, lactoferrin, *Pichia pastoris*, recombinant.

* Author for correspondence: Tel: +84-988793468; Email: phong.truongquoc@hust.edu.vn