พีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสโดยรีคอมบิแนนท์ *Pichia pastoris* ด้วยกระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์

Optimum pH for Production of β-glucosidase by Recombinant *Pichia pastoris* Using Fed-batch Fermentation Process

กัญญาลักษณ์ สังข์ประไพ, สมพจน์ อันติมานนท์ และเทพปัญญา เจริญรัตน์*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นิรันดร์ รุ่งสว่าง และสุทิพา ธนพงษ์พิพัฒน์

หน่วยวิจัยทรัพยากรชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

KanyaLak Sangprapai, Sompot Antimanon and Theppanya Charoenrat*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University, Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Niran Roongsawang and Sutipa Tanapongpipat

Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA), Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

บทคัดย่อ

เบต้ากลูโคซิเดส (EC 3.2.1.21) เป็นหนึ่งในสามเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลสที่ทำหน้าที่ในการเร่งการย่อยสลายอัลคิล- และอาริล-เบต้ากลูโคไซด์ ไดกลูโคไซด์ และโอลิโกกลูโคไซด์ ซึ่งมีความสำคัญสำหรับการผลิตน้ำตาล เครื่องดื่ม รวมถึงอาหารสัตว์ ซึ่งการศึกษาการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสในงานวิจัยนี้ดำเนินการโดยใช้รีคอมบิแนนท์ *Pichia pastoris* ที่มียีนเบต้ากลูโคซิ-เดสจากรา *Periconia* sp. BCC2871 ด้วยกระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์ โดยอิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเบต้ากลูโค-ซิเดสทำการศึกษาโดยแปรผันค่าพีเอช (5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5) ภายใต้สภาวะควบคุมอื่น ๆ ที่เหมือนกัน (อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส) และควบคุมอัตราการเติมเมทานอลในระยะผลิตที่ 1.07 กรัมต่อลิตร.ชั่วโมง (3.99 กรัมต่อชั่วโมง) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าในทุกการทดลอง กิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดสมีค่าสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องใน

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** thep@tu.ac.th

ระดับการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญในแต่ละพีเอชที่ทำการศึกษา และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการที่ 120 ชั่วโมง ของระยะการผลิต ค่ากิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดสสูงที่สุดได้จากการดำเนินการผลิตที่พีเอช 6.0 โดยให้ค่ากิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดสเท่ากับ 776.67±32.99 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าที่ได้จากการดำเนินการผลิตที่พีเอช 5.0, 5.5 และ 6.5 ประมาณ 2.4, 1.4 และ 1.3 เท่า ตามลำดับ ดังนั้นพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสจากรา *Periconia* sp. BCC2871 โดยรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ คือ พีเอช 6.0

คำสำคัญ : เบต้ากลูโคซิเดส; *Pichia pastoris*; การหาพีเอชที่เหมาะสม; การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

Abstract

β-glucosidase (EC 3.2.1.21), one of the three main members of cellulolytic enzymes, catalyzes the hydrolysis of alkyl- and aryl-β-glucosides, diglucosides, and oligoglucosides that are important for sugar, brewery as well as animal feed production. The study on β-glucosidase production was carried out using recombinant yeast Pichia pastoris expressing β-glucosidase from the fungal *Periconia* sp. BCC2871 with the fed-batch fermentation. The effect of pH on β-glucosidase production was examined at various pH (5.0, 5.5, 6.0, and 6.5) under the same cultivation conditions (agitation 1000 rpm, aeration 1 vvm, and temperature 30 °C). The methanol feed rate during production stage was controlled at 1.07 g $L^{-1}h^{-1}$ (3.99 g h-1). The results indicated that β-glucosidase activity continuously increased with significantly different values. At the end of the process (120 h of production time), the highest β-glucosidase activity was obtained at pH 6.0 (776.67±32.99 U mL^{-1}) which was higher than that of pH 5.0, 5.5, and 6.5 about 2.4, 1.4, and 1.3 times, respectively. The optimum pH for *Periconia* sp. BCC2871 β-glucosidase production using recombinant yeast *P. pastoris* was therefore pH 6.0.

Keywords: β-glucosidase; *Pichia pastoris*; pH optimization; fed-batch fermentation

1. บทนำ

เบต้ากลูโคซิเดส (β-glucosidase) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มเซลลูเลส (cellulase) ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเบต้าไกลโคซิดิก (β-1,4 glycosidic) ของเซลโลไบโอส (cellobiose) และเซลโลโอลิโกแซคคาไรด์ (cellooligosaccharide) ที่ละลายน้ำได้ ทำให้ได้ผลผลิตเป็นกลูโคส [1] ทั้งนี้พบว่าความต้องการใช้เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสมีแนวโน้มสูงขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการย่อยสลายชีวมวลเป็นกลูโคสสำหรับใช้เป็นสารตั้งต้นในกระบวนการผลิตพลังงานชีวภาพ [2] จากความสำคัญดังกล่าว คณะนักวิจัยจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติจึงทำการโคลนยีนเบต้ากลูโคซิเดสทนร้อนจากรา *Periconia* sp. BCC2871 และตัดต่อให้เกิดการแสดงออกในยีสต์เจ้าบ้านสายพันธุ์ *Pichia pastoris* KM71 ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์แอลกอฮอลออกซิเดส 1 (alcohol oxidase 1, AOX1) [3] ทั้งนี้ เนื่องจาก

ระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนโดยยีสต์ *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ AOX1 เป็นระบบที่มีการรายงานว่าสามารถใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนหลายชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อใช้เมทานอลเป็นสารเหนี่ยวนำ [4] อีกทั้ง *P. pastoris* สามารถเพาะเลี้ยงได้ง่ายและเจริญเติบโตได้ดีในอาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) [5] นอกจากนี้ระบบดังกล่าวยังสามารถเลือกให้มีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนแล้วปลดปล่อยออกสู่น้ำหมักหรือสะสมไว้ในเซลล์โดยการเติมหรือไม่เติมสื่อสัญญาณที่ควบคุมการปลดปล่อยรีคอมบิแนนท์โปรตีนออกสู่น้ำหมัก (secretion signal) [6]

พีเอชเป็นปัจจัยสำคัญที่มีอิทธิพลต่อผลสำเร็จในการผลิตโปรตีนโดยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* ทั้งอิทธิพลต่อการเจริญเติบโต การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน ความเสถียรของรีคอมบิแนนท์โปรตีน และกิจกรรมของโปรติเอสในน้ำหมัก ซึ่งอิทธิพลที่กล่าวมาทั้งหมดมีความเกี่ยวข้องกับอัตราการผลิตและคุณภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีน [7,8] จากการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสโดยรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มียีนเบต้ากลูโคซิเดสทนร้อนจากรา *Periconia* sp. BCC2871 ในระดับฟลาสก์ในงานวิจัยก่อนหน้า พบว่าผลผลิตที่ได้อยู่ในระดับต่ำและใช้ระยะเวลาในการผลิตนาน [3] ซึ่งการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เป็นระบบที่ยากต่อการควบคุมพีเอช การเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ในระบบที่ไม่มีการควบคุมพีเอชจะส่งผลให้ในระหว่างการเพาะเลี้ยงพีเอชจะลดลงอย่างต่อเนื่อง [9] ประกอบกับมีการรายงานก่อนหน้าว่าพีเอชเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสจากต้นพยุงที่ผลิตโดยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* รวมถึงเอนไซม์ดังกล่าวไม่เสถียรที่พีเอชต่ำกว่า 4.5 [10] การเปลี่ยนพีเอชจากพีเอช 5.0 ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต [11] เป็นพีเอชอื่นที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์ และ/หรือ พีเอชที่ทำให้รีคอมบิแนนท์โปรตีนมีความเสถียร เป็นเทคนิคที่มีการนำมาประยุกต์เพื่อให้ผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมาก และโปรตีนที่ผลิตได้อยู่ในน้ำหมักที่มีค่าพีเอชที่ทำให้โปรตีนมีความเสถียรสูงสุด รวมถึงเพื่อลดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในน้ำหมัก [7,8,10] โดยมีรายงานว่าเอนไซม์โปรติเอสในน้ำหมักของยีสต์ *P. pastoris* มีสองส่วนหลัก คือ เป็นโปรติเอสที่อยู่ที่ผิวด้านนอกของเซลล์ และโปรติเอสจากการสลายตัวของเซลล์ที่ตายแล้วปลดปล่อยออกสู่ภายนอก โดยเอนไซม์โปรติเอสที่ทำปฏิกิริยาได้ดีในสภาวะด่างในกลุ่มเซรีนโปรติเอส (serine protease) เป็นกลุ่มหลักที่ทำลายโปรตีนเป้าหมายที่ผลิต [7] จากความสำคัญของพีเอชต่อการผลิตโปรตีนโดยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสทนร้อนจากรา *Periconia* sp. BCC2871 โดยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยกระบวนการหมักแบบเฟด-แบทช์

2. วัสดุและวิธีการทดลอง

2.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ รีคอมบิแนนท์ยีสต์ *Pichia pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสทนร้อนจากรา *Periconia* sp. BCC2871 โดยใช้ยีสต์ *P. pastoris* KM71 เป็นสายพันธุ์เจ้าบ้าน ซึ่งการแสดงออกของยีนนี้อยู่ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ *AOX1* ซึ่งสายพันธุ์จุลินทรีย์นี้ได้รับจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ [3]

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ คือ อาหารสังเคราะห์สูตร FM22 ซึ่งใน 1 ลิตร ประกอบด้วย KH_2PO_4 42.9 กรัม, $CaSO_4$ 0.93 กรัม, K_2SO_4 14.3 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 11.7 กรัม, $(NH_4)_2SO_4$ 5.0 กรัม,

กลีเซอรอล 20.0 กรัม, ฮีสทิดีน (histidine) 2 กรัม และ *Pichia* trace metal1 (PTM1) 4.35 มิลลิลิตร

อาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ คือ อาหารสังเคราะห์สูตร basal salt (BS) ซึ่งใน 1 ลิตรประกอบด้วย H_3PO_4 85 เปอร์เซ็นต์ 26.7 มิลลิลิตร, $CaSO_4$ 0.93 กรัม, K_2SO_4 18.2 กรัม, $MgSO_4.7H_2O$ 14.9 กรัม, KOH 4.13 กรัม, กลีเซอรอล 40.0 กรัม, ฮีสทิดีน 2 กรัม และ PTM1 4.35 มิลลิลิตร

ธาตุอาหารรอง PTM1 ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย $CuSO_4.5H_2O$ 6.0 กรัม, KI 0.08 กรัม, $MnSO_4.H_2O$ 3.0 กรัม, $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.2 กรัม, H_3BO_3 0.02 กรัม, $ZnCl_2$ 20.0 กรัม, $FeCl_3$ 13.7 กรัม, $CoCl_2.6H_2O$ 0.9 กรัม, H_2SO_4 5.0 มิลลิลิตร และไบโอติน (biotin) 0.2 กรัม

2.3 การเตรียมกล้าเชื้อ

การเตรียมกล้าเชื้อแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

2.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 : นำสารแขวนลอยเชื้อที่เก็บในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสำหรับเตรียมกล้าเชื้อปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 2: ถ่ายกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสำหรับเตรียมกล้าเชื้อปริมาตร 80 มิลลิลิตร และทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเดียวกับการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1

2.4 การเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อผลิตเบต้ากลูโคซิเดส

การเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* ดำเนินการในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 5 ลิตร (Biostat B plus, Sartorius Stedim Biotech, Germany) โดยประกอบถังปฏิกรณ์ชีวภาพและเทียบค่าอิเล็กโทรดต่าง ๆ ตรวจสอบระบบการทำงานของเครื่องและระบบควบคุม จากนั้นจึงเติมอาหาร BS ปริมาตร 1.9 ลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แล้วทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที เมื่ออุณหภูมิลดลงจึงเติมสารละลาย PTM1 ปริมาตร 4.35 มิลลิลิตรต่อลิตร และฮีสทิดีน 2 กรัมต่อลิตร เชื่อมต่อถังปฏิกรณ์ชีวภาพกับชุดควบคุม โดยการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* เพื่อผลิตเบต้ากลูโคซิเดสในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แบ่งออกเป็น 4 ระยะ ตามวิธีที่มีการรายงานก่อนหน้า [12] ดังนี้

ระยะที่ 1 : การเพาะเลี้ยงแบบแบทช์โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน เริ่มโดยถ่ายกล้าเชื้อขั้นที่ 2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพที่มีอาหาร BS ควบคุมกระบวนการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที พีเอช 5.0 โดยใช้สารละลายแอมโมเนีย 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นด่างในการควบคุมพีเอชและใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยในระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 28-32 ชั่วโมง

ระยะที่ 2: การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเติมสารละลายกลีเซอรอล 500 กรัมต่อลิตร ที่มีธาตุอาหารรอง PTM1 12 มิลลิลิตรต่อลิตร และใช้รูปแบบการเติมแบบ อัตราการเติมเพิ่มขึ้นแบบเอ็กโพเนนเชียล ดังสมการที่ 1

$$F_{(t)} = \frac{\mu X_0 V_0 e^{\mu t}}{Y_{x/s} S_i} \quad \text{(สมการที่ 1)}$$

เมื่อ $F_{(t)}$ คือ อัตราการเติมอาหารที่เวลา t ใด ๆ (ลิตรต่อชั่วโมง)

μ คือ อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะของ *P. pastoris* ในการทดลองนี้ใช้ค่า 0.18 ต่อชั่วโมง

ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ในอาหารที่ใช้กลีเซอรอลเป็นสับสเทรต

X_0 คือ ความเข้มข้นของเซลล์ก่อนการเติม (20 กรัมต่อลิตร)

V_0 คือ ปริมาตรของน้ำหมักก่อนการเติม

$Y_{x/s}$ คือ ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (0.7 กรัมเซลล์ต่อกรัม$_{กลีเซอรอล}$)

S_i คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลในสารละลายที่ใช้เติม

ควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ เพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 3.5-4 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มความเข้มข้นเซลล์เป็น 40 กรัมต่อลิตร

ระยะที่ 3 : การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *AOX1* ทำโดยเติมเมทานอลที่มีธาตุอาหารรอง PTM1 ปริมาตร 12 มิลลิลิตรต่อลิตร แบบครั้งคราว (intermittent feed) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเมทานอลในน้ำหมักหลังเติมประมาณ 1 กรัมต่อลิตร โดยทำการเติม 2 ครั้ง คือ ครั้งที่ 1 หลังจากสิ้นสุดระยะที่ 2 และครั้งที่ 2 เติมหลังจากการเติมครั้งที่ 1 เป็นเวลา 1.5 ชั่วโมง ควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ยกเว้นพีเอชจะทำการแปรผันเพื่อศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อไป

ระยะที่ 4 : การผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ทำโดยเติมเมทานอลที่มีธาตุอาหารรอง PTM1 12 มิลลิลิตรต่อลิตร ด้วยอัตราคงที่ 3.99 กรัมต่อชั่วโมง อย่างต่อเนื่อง เป็นเวลา 120 ชั่วโมง ควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ยกเว้นพีเอช โดยจะทำการแปรผันพีเอชเพื่อศึกษาอิทธิพลของพีเอชดังรายละเอียดในหัวข้อ 2.5

ทำการเก็บตัวอย่างในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงเพื่อติดตามการเจริญเติบโตโดยการวิเคราะห์ความขุ่นของเซลล์ และความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ติดตามการสร้างผลิตภัณฑ์ด้วยการวัดค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส และความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด ตลอดจนติดตามการใช้สับสเทรตโดยวิเคราะห์ความเข้มข้นของเมทานอล

2.5 การศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

การศึกษาในส่วนนี้ดำเนินการโดยแปรผันค่าพีเอชในระยะที่ 3 และ 4 ของการเพาะเลี้ยง ที่พีเอช 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 โดยควบคุมสภาวะอื่น ๆ ในการเพาะเลี้ยงให้คงที่ คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที และอัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที

2.6 วิธีวิเคราะห์

2.6.1 การวิเคราะห์ความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของเซลล์แห้ง ความหนาแน่นของเซลล์หาโดยการนำตัวอย่างมาวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ความเข้มข้นของเซลล์วิเคราะห์ในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งหาโดยชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่ได้จากการนำตัวอย่างน้ำหมักมาทำการปั่นเหวี่ยง ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกำจัดเกลือที่ตกตะกอน และล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำตะกอนเซลล์ที่ได้ไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น

2.6.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดหาโดยนำตัวอย่างน้ำหมักส่วนใสมาทำการเจือจางให้เหมาะสมแล้ววิเคราะห์ด้วยวิธีของ Bradford [13] โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน

2.6.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสวิเคราะห์โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงจากวิธีที่เสนอโดย Harnpicharnchai และคณะ [3] และ Charoenrat

และคณะ [14] ซึ่งวัดปริมาณ p-nitrophenol (pNP) ที่เกิดการปลดปล่อยจากโมเลกุลของ p-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (pNP-Glu) โดยใช้เครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร (OD_{400}) โดยกำหนดให้หนึ่งหน่วยของกิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสมีค่าเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อยปริมาณ pNP 1 ไมโครโมลในหนึ่งนาที ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0

2.6.4 การวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบและคุณภาพของโปรตีนเป้าหมาย การวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำหมัก และความบริสุทธิ์ของโปรตีนเป้าหมายทำโดยวิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคลิลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอรีซิส (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) [15] เพื่อติดตามเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสและการตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนบนแผ่นพอลิอะคลิลาไมด์เจล โดยใช้โปรตีนมาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่นเจล

2.6.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเมทานอลด้วยวิธีแก๊สโครมาโทกราฟฟี (gas chromatography, GC) การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเมทานอลในส่วนใสของน้ำหมักในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีแก๊สโครมาโทกราฟฟี โดยใช้เครื่องแก๊สโครมาโทกราฟฟี (SHIMADZU รุ่น GCMS-QP2010 Ultra) คอลัมน์ที่ใช้รุ่น HP-5MS (Agilent J & W GC Columns) ก่อนการวิเคราะห์ได้นำตัวอย่างมากรองผ่านเซลลูโลสอะซิเตทที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน โดยกำหนดสภาวะในการวิเคราะห์ตามวิธีการของ AOAC [16]

2.6.6 การวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสจากการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* เพื่อผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้เลือกใช้วิธี skim milk agar diffusion ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Larsen และคณะ [17] โดยทำการเติมตัวอย่างที่ต้องการทำการทดสอบปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมบน skim milk agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสทุกชั่วโมง

3. ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

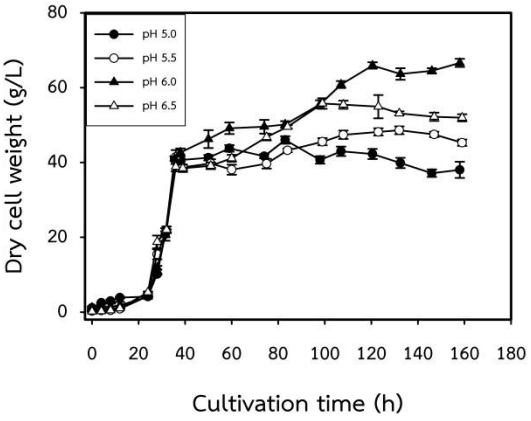
กระบวนการเพาะเลี้ยงในงานวิจัยนี้เลือกใช้กระบวนการมาตรฐานแบบเฟด-แบทช์ในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* เพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน [12] ดังที่กล่าวในหัวข้อที่ 2.4 จากการทดลองพบว่าข้อมูลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงใน 3 ระยะแรก (ประมาณ 38 ชั่วโมง) ของแต่ละชุดการทดลองมีความคล้ายคลึงกัน ยกเว้นข้อมูลในระยะสุดท้าย คือ ระยะการผลิตโปรตีนมีความแตกต่างกันตามพีเอชที่แปรผัน ดังนั้น ในบทความวิจัยนี้จึงเน้นการรายงานผลเนื่องจากอิทธิพลของพีเอชต่อการเจริญเติบโตและการผลิตโปรตีนของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* เป็นหลัก

3.1 อิทธิพลของพีเอชต่อการเจริญเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*

การศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเจริญเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสได้ทำการศึกษาในระยะที่พีเอช 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ตามลำดับ (รูปที่ 1) โดยที่แต่ละพีเอชทำการควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการให้อากาศ 1 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหาร.นาที อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที และอัตราการเติมเมทานอล 3.99 กรัมต่อชั่วโมง คิดเป็นปริมาณเมทานอลทั้งหมด ประมาณ 458.27± 10.23 กรัม ซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตรเริ่มต้น 2 ลิตร โดยผลการทดลองในรูปที่ 1 และตารางที่ 1 แสดงให้เห็นว่าพีเอชมีผลต่อการเจริญเติบโตและผลได้

ของเซลล์ในระยะการเพาะเลี้ยงที่ใช้เมทานอลเป็นสับสเทรต โดยการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.0 ในระยะการผลิตโปรตีนส่งเสริมการเจริญเติบโตได้สูงที่สุด โดยให้ความเข้มข้นเซลล์สุดท้ายสูงสุดเท่ากับ 66.61±1.10 กรัมต่อลิตร และจากตารางที่ 1 จะเห็นว่าอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะมีค่าเท่ากับ $6.64x10^{-3}$ ต่อชั่วโมง ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต ($Y_{X/S}$) มีค่าเท่ากับ 0.240±0.003 กรัม$_{เซลล์}$ต่อกรัม$_{เมทานอล}$ และอัตราการเจริญเติบโตเชิงปริมาตร (Q_X) มีค่าเท่ากับ 0.305± 0.004 กรัม$_{เซลล์}$ต่อลิตร.ชั่วโมง และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยง พบว่ามีปริมาณเมทานอลสะสมเหลือน้อยที่สุด คือ 14.21±0.57 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับที่ พีเอช 5.0, 6.5 และ 5.5 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ซึ่งต่างจากรายงานก่อนหน้าโดย Wegner [11] ที่ทำการศึกษาพบว่าพีเอช 5.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ *P. pastoris* อย่างไรก็ตาม สับสเทรตที่ Wegner ใช้ในการศึกษา คือ กลีเซอรอล ซึ่งต่างจากงานวิจัยนี้ที่เลือกศึกษาอิทธิพลของพีเอชในช่วงที่ใช้เมทานอลเป็นสับสเทรต จึงมีความเป็นไปได้ว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตของยีสต์ *P. pastoris* ขึ้นกับชนิดของสับสเทรตที่ใช้ด้วย

กรณีของการศึกษาการสะสมของเมทานอลที่พีเอช 5.0, 5.5 และ 6.5 พบว่ามีการสะสมเมทานอลในปริมาณมาก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าที่พีเอชดังกล่าวมีอัตราการใช้เมทานอลต่ำกว่าพีเอช 6.0 (ตารางที่ 1) ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเซลล์และความเข้มข้นของเซลล์เมื่อสิ้นสุดลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Mayson และคณะ ที่กล่าวว่าการสะสมของ เมทานอลจนถึงระดับที่เป็นพิษต่อเซลล์จะทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์ลดลง และอาจทำให้เซลล์ตายในที่สุด [18] ในทำนองเดียวกันกับรายงานของ Katakura และคณะ ที่กล่าวว่าเมื่อความเข้มข้นของเมทานอลสูงขึ้นจนเกินกว่าค่าวิกฤติที่ความเข้มข้นประมาณ 30 กรัมต่อลิตร จะทำให้อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะลดลง [19] รวมถึงการรายงานของ Zhang และคณะ ที่รายงานว่าอัตราการใช้เมทานอลจำเพาะแปรผันโดยตรงกับอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ [20] ดังนั้น พีเอช 6.0 จึงเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดสเมื่อเทียบกับที่พีเอช 6.5, 5.5 และ 5.0 ตามลำดับ



รูปที่ 1 อิทธิพลของพีเอชต่อการเจริญเติบโตของรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของยีนเบต้ากลูโคซิเดส

3.2 อิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสโดยรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris*

จากรายงานก่อนหน้าเกี่ยวกับอิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตโปรตีนโดยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* ในหลาย ๆ งานวิจัยพบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีน [21] เช่น พีเอช 3.0 เหมาะสมต่อการผลิต cytokine growth-blocking peptide [22] ในขณะที่พีเอช 6.0 เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ไลเปสจากรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ KM71 [23] ในงานวิจัยนี้พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P.*

ตารางที่ 1 ข้อมูลและพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากกระบวนการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* เพื่อผลิตเบต้ากลูโคซิเดสภายใต้สภาวะที่มีการแปรผันพีเอชในระยะการผลิต

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	พีเอชที่ควบคุมในระยะการผลิต			
	พีเอช 5.0	พีเอช 5.5	พีเอช 6.0	พีเอช 6.5
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)[1]	38.02±2.16	45.27±0.86	66.61±1.10	51.96±0.94
กิจกรรมเบต้ากลูโคซิเดส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)[2]	326.05±0.88	546.67±9.43	776.67±32.99	586.67±9.43
ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)[3]	130.91±2.41	339.76±0.79	1061.66±32.04	440.87±0.79
เมทานอลที่เติมทั้งหมด (กรัม)	469.81±5.93	459.35±13.33	463.00±10.75	440.75±10.92
ความเข้มข้นเมทานอลสะสม (กรัมต่อลิตร)[4]	37.48±1.50	28.01±1.12	14.21±0.57	33.58±1.34
อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ x 10^{-3} (ชั่วโมง$^{-1}$)[5]	2.36±0.55	4.23±0.01	6.63±0.10	5.45±0.10
กิจกรรมจำเพาะ (หน่วยต่อมิลลิกรัม$_{โปรตีน}$)	2490.64	1608.99	731.56	1330.71
ผลได้ของเซลล์ต่อสับสเทรต (กรัม$_{เซลล์}$ต่อกรัม$_{เมทานอล}$)	0.072±0.02	0.131±0.00	0.240±0.00	0.187±0.00
อัตราการเติบโตเชิงปริมาตร (กรัมต่อลิตร.ชั่วโมง)	0.079±0.02	0.150±0.00	0.305±0.00	0.208±0.00
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต (หน่วยต่อกรัม$_{เมทานอล}$)	1880.6±51.37	3291.62±78.79	4636.03±274.72	3511.39±79.80
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง)	2629.13±1.16	4538.89±107.77	6441.39±379.44	4880.65±110.92
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (หน่วยต่อกรัม$_{เซลล์}$.ชั่วโมง)	70.06±4.59	100.41±2.94	96.86±5.03	94.02±2.62
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (หน่วยต่อกรัม$_{เซลล์}$)	84071.17 ±551.29	12049.74 ±353.14	11623.83 ±604.28	11281.89 ±314.70

[1]ความเข้มข้นเซลล์สุดท้ายเมื่อสิ้นสุดระยะการผลิต

[2]กิจกรรมเบต้ากลูโคซิเดสเมื่อสิ้นสุดระยะการผลิต

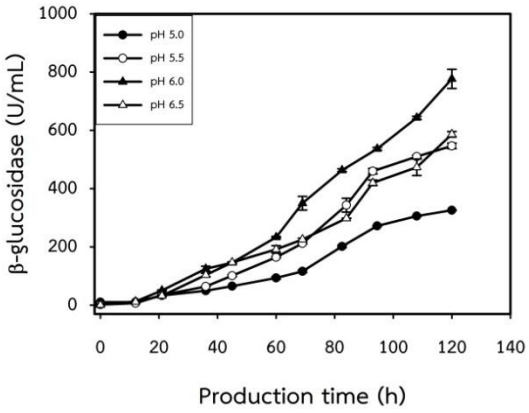
[3]ปริมาณโปรตีนทั้งหมดเมื่อสิ้นสุดระยะการผลิต

[4]ปริมาณเมทานอลสะสมเมื่อสิ้นสุดระยะการผลิต

[5]คำนวณโดยใช้ข้อมูลความเข้มข้นของเซลล์ในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งในระยะการผลิตเมื่อมีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอน

pastoris ในระยะการผลิตที่พีเอช 6.0 จะทำให้ได้ค่ากิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดสสูงสุดเท่ากับ 776.67±32.99 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปที่ 2 ซึ่งผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต ($Y_{P/S}$) สูงสุดเท่ากับ 4636.03±274.72 หน่วยต่อกรัม$_{เมทานอล}$ นอกจากนี้ยังพบว่าการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.0 ให้ค่าอัตราการผลิตเชิงปริมาตรสูงถึง 6441.39±379.45 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง ซึ่งมีค่ามากกว่าการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.0, 5.5 และ 6.5 ประมาณ 2.5, 1.4 และ 1.3 เท่า ตามลำดับ จากตารางที่ 1 จะเห็นว่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (q_P) และผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ ($Y_{P/X}$) เมื่อทำการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.5, 6.0 และ 6.5 นั้นให้ค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.0 ประมาณ 1.4 เท่า ซึ่งสนับสนุนงานวิจัยของ Harnpicharnchai และคณะ [3] ที่รายงานว่าความคงตัวของเบต้ากลูโคซิเดสที่คัดแยกจากรา *Periconia* sp. นั้นลดต่ำลงที่พีเอช 5.0 จากข้อมูลนี้จึงสามารถกล่าวได้ว่านอกจากพีเอช 6.0 จะเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของยีสต์ *P. pastoris* ยังเป็นพีเอชที่เบต้ากลูโคซิเดสมีความเสถียร ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นถึงความเหมาะสมของพีเอช 6.0 ต่อการเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* เพื่อผลิตเบต้ากลูโคซิเดสจากรา *Periconia* sp.

เมื่อทำการตรวจสอบคุณภาพของเบต้ากลูโคซิเดสในน้ำหมักที่ได้จากทำการเพาะเลี้ยงในระยะการผลิตที่พีเอช 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 ด้วยวิธี SDS-PAGE (รูปที่ 3) พบแถบโปรตีนเป้าหมายขนาดประมาณ 120 กิโลดาลตัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Harnpicharnchai และคณะ [3] โดยจากรูปที่ 3 จะเห็นได้ว่าความเข้มของแถบโปรตีนจากการศึกษาที่พีเอช 6.0 ให้ความเข้มของแถบเป้าหมายสูงกว่าผลจากการศึกษาที่พีเอช 5.0, 5.5 และ 6.5 ซึ่งสอดคล้องกับค่ากิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดส และความเข้มข้นของโปรตีนละลายที่ให้ค่าสูงสุดที่พีเอช 6.0 โดยให้ค่าเท่ากับ 776.67±32.99 หน่วยต่อมิลลิลิตร และ 1061.66±32.04 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ รองลงมา คือ ที่พีเอช 5.5, 6.5 และ 5.0 ตามลำดับ โดยที่ทุกค่าพีเอชความเข้มของแถบโปรตีนจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการเพาะเลี้ยงที่เพิ่มขึ้น

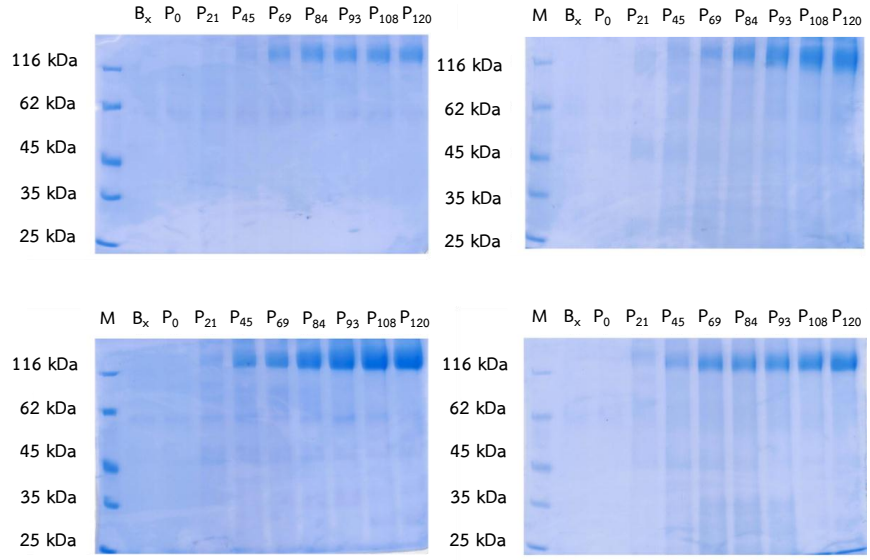


รูปที่ 2 อิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสโดยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris*

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ออกแบบการทดลองเพื่อยืนยันว่าความแตกต่างของค่ากิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดสที่ได้จากกระบวนการผลิตที่พีเอชต่าง ๆ เป็นผลจากอิทธิพลของพีเอชไม่ใช่อิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจน ทั้งนี้ เนื่องจากการใช้สารละลายแอมโมเนีย 25 เปอร์เซ็นต์ ในการควบคุมพีเอชที่แต่ละพีเอชใช้ในปริมาณที่ไม่เท่ากัน โดยการทดลองในส่วนนี้เลือกใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ ในการควบคุมพีเอชในระยะการผลิต จากผลการทดสอบพบว่าค่ากิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดสที่ได้จากกระบวนการเพาะเลี้ยงในระยะการผลิตที่พีเอช 6.0 มีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.0 (ไม่แสดงข้อมูล) ดังนั้น จึงเป็นการยืนยันได้ว่าผลผลิตเบต้ากลูโคซิเดสที่แตกต่างกันที่แต่ละพีเอชเป็นอิทธิพลเนื่องจากค่าของพีเอชและไม่ใช่อิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่เติม

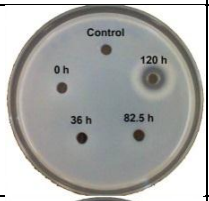
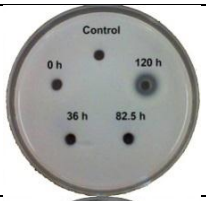
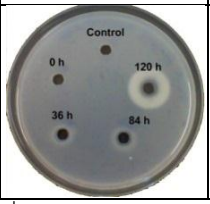
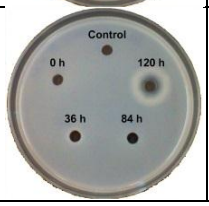
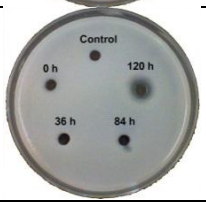
3.3 ผลของพีเอชต่อการผลิตโปรติเอส

พีเอชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเกิดโปรติโอไลซิสของโปรตีนเป้าหมาย โดยจากงานวิจัยของ Jahic และคณะ (2003) [7] ซึ่งทำการผลิตฟิวชันโปรตีนพบว่ามีการเกิดโปรติโอไลซิสในสายของ full-length protein ที่ผลิตจาก *P. pastoris* ผู้วิจัยจึงลดพีเอชในการเพาะเลี้ยงแล้วพบว่าการเกิดโปรติเอสนั้นลดลงและรายงานว่าโปรติเอสที่พบในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของอัลคาไลด์โปรติเอส กล่าวคือ เมื่อสภาวะที่ทดสอบมีพีเอชสูงขึ้น จะทำให้กิจกรรมของโปรติเอสสูงขึ้นด้วย นอกจากนี้ Salamin และคณะ รายงานว่าเอนไซม์โปรติเอสจากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* ที่พีเอช 7.0 มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 4.0 [24] ผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษากิจกรรมของโปรติเอสในงานวิจัยนี้ (ตารางที่ 2) ซึ่งผลจากการทดสอบด้วยวิธีนี้พบกิจกรรมโปรติเอสในตัวอย่างของการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.0 และ 6.5 ที่ 120 ชั่วโมงของการผลิต สังเกตได้จากบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของโปรติเอสบน skim milk agar ทั้งนี้ ไม่พบบริเวณใสในตัวอย่างที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.0 และ 5.5 (ไม่ได้แสดงผล) ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับการรายงานของ Charoenrat และคณะ ที่ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในน้ำหมักที่ได้จากกระบวนการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* ที่พีเอช 6.0 แต่ไม่พบการเกิดโปรติโอไลซิสในกระบวนการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5.0 [25] อย่างไรก็ตาม เนื่องจากตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.0 ให้ค่ากิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดส สูง (776.67±32.99 หน่วยต่อมิลลิลิตร) อีกทั้งผลการทดลองที่ได้จาก SDS-PAGE (รูปที่ 3) ไม่พบแถบโปรตีนที่เกิดจากโปรติโอไลซิส ดังนั้น จึงเป็นเครื่องบ่งชี้ได้ว่าเบต้ากลูโคซิเดสที่ได้จากการศึกษานี้มีความต้านทานต่อการเกิดโปรติโอไลซิส



รูปที่ 3 การติดตามการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสโดยรีคอมบิแนนท์ยีสต์ *P. pastoris* ด้วยเทคนิค SDS-PAGE เมื่อ M คือ โปรตีนมาตรฐาน (กิโลดาลตัน), B_X คือ ตัวอย่างก่อนระยะการผลิต, P_0-P_{120} คือ ตัวอย่างที่เวลา 0-120 ชั่วโมงของระยะการผลิต : (ก) พีเอช 5.0 (ข) พีเอช 5.5 (ค) พีเอช 6.0 และ (ง) พีเอช 6.5

ตารางที่ 2 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสด้วยวิธี skim milk agar diffusion

พีเอชที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง	พีเอชของ skim milk agar			
	พีเอช 5.0	พีเอช 5.5	พีเอช 6.0	พีเอช 6.5
พีเอช 6.0				
พีเอช 6.5				

หมายเหตุ : control คือ น้ำกลั่น (negative control); 0 h, 36 h, 84 h และ 120 h คือตัวอย่างจากระยะการผลิตที่ 0, 36, 84 และ 120 ชั่วโมง ตามลำดับ; เส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมเท่ากับ 5.25 มิลลิเมตร

4. สรุป

การศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสจากเชื้อรา *Periconia* sp. BCC2871 โดยรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ *AOX1* พบว่าพีเอชเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อทั้งการใช้เมทานอล การเจริญเติบโต การผลิตเบต้ากลูโคซิเดส และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส โดยพีเอช 6.0 เป็นพีเอชที่ให้อัตราการใช้เมทานอล อัตราการเติบโต และอัตราการสร้างผลผลิตสูงสุด ถึงแม้ว่าจะพบกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสในน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.0 แต่จากการติดตามการเกิดโปรติโอไลซิสของโปรตีนเป้าหมายโดยวิธี SDS-PAGE ไม่พบการเกิดโปรติโอไลซีสของเบต้ากลูโคซิเดส ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าพีเอช 6.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสจากรา *Periconia* sp. BCC2871 โดยรีคอม-บิแนนท์ *P. pastoris* ซึ่งเอนไซม์ที่ผลิตได้มีความต้านทานต่อเอนไซม์โปรติเอสที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง ทั้งนี้จากการที่รีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสที่ผลิตขึ้นในงานวิจัยนี้มีสมบัติทำงานได้ดีที่อุณหภูมิสูง ซึ่งมีความเหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการย่อยสลายชีวมวลเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสร่วมกับเอนไซม์อื่น ๆ ในกลุ่มเซลลูเลสให้ได้ผลิตภัณฑ์ในรูปน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ ต่อไป งานวิจัยนี้จึงถือเป็นพื้นฐานที่สำคัญสำหรับการพัฒนากระบวนการใช้ประโยชน์จากชีวมวลเซลลูโลสและเฮมิเซลลูโลสในอนาคต

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้สนับสนุนทุนวิจัย (P-11-0063) และอนุเคราะห์สายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับทำงานวิจัย ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานและเครื่องมือการทำงานวิจัย และขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ส่งเสริมบุคลากรในสังกัดให้ได้ทำงานวิจัย

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Ketudat Cairns, J.R. and Esen, A., 2010, β-Glucosidase, Cell. Mol. Life Sci. 67: 3389-3405.

[2] Gusakov, A.V., Salanovich, T.N., Antonov, A.I., Ustinov, B.B., Okunev, O.N., Burlingame, R., Emalfarb, M., Baez, M. and Sinitsyn, A.P., 2007, Design of highly efficient cellulase mixtures for enzymatic hydrolysis of cellulose, Biotechnol. Bioeng. 97: 1028-1038.

[3] Harnpicharnchai, P., Champreda, V., Sornlake, W. and Eurwilaichitr, L., 2009, A thermotolerant β-glucosidase isolated from an endophytic fungi, *Periconia* sp., with a possible use for biomass conversion to sugars, Protein Expr. Purif. 67: 61-69.

[4] Cregg, J.M., Cereghino, L., Shi, J. and Higgins, D.R., 2000, Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*, Mol. Biotech. 16: 23-52.

[5] Inan, M. and Meagher, M.M., 2001, Non-repressing carbon source for alcohol oxidase (*AOX1*) promoter of *Pichia pastoris*, J. Biosci. Bioeng. 92: 585-589.

[6] Cereghino, J.L. and Cregg, J.M., 2000, Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, FEMS Microb. Rev. 24: 45-66.

[7] Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A.K., Martinelle, M. and Enfors, S.O., 2003, Analysis and control of proteolysis of a fusion protein in *Pichia pastoris* fed-batch processes, J. Biotechnol. 102: 45-53.

[8] Chiruvolue, V., Eskridge, K., Cregg, J. and Meagher, M., 1998, Effect of glycerol concentration and pH on growth of recombinant *Pichia pastoris* yeast, Appl. Biochem. Biotechnol. 75: 163-173.

[9] Hong, F., Meinander, N.Q. and Johnsson, L.J., 2002, Fermentation strategies for improved heterologous expression of laccase in *Pichia pastoris*, Biotechnol. Bioeng. 79: 438-449.

[10] Charoenrat, T., Vanichsrirattana, W. and Ketudat-Cairns, M., 2004, Recombinant β-glucosidase production by *Pichia pastoris*: The influence of pH, Thai J. Biotechnol. 5(1): 51-55.

[11] Wegner, E.H., 1983, Biochemical conversions by yeast fermentation at high-cell density, U.S. Patent 4414329.

[12] Jahic, M., Rotticci-Mulder, J.C., Martinelle, M., Hult, K. and Enfors, S.O., 2002, Modelling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein, Bioprocess Biosyst. Eng. 24: 385-393.

[13] Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding, Anal. Biochem. 72: 248-254.

[14] Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Stendahl-Anderson, H., Jahic, M. and Enfors, S.O., 2005, Oxygen-limited fed-

batch process: An alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes, Bioprocess Biosyst. Eng. 27: 399-406.

[15] Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of structure protein during the assembly of the head of bacteriophage T4, Nature 227: 680-685.

[16] Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990, Official Method of Analysis. 5th Ed., The Association of Official Agricultural Chemists, Virginia.

[17] Larsen, P.B., Degenhardt, J., Tai, C.Y., Stenzler, L.M., Howell, S.H. and Kochian, L.V., 1998, *Arabidopsis* mutants with increased aluminum resistance exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic and release roots, Plant Physiol. 117: 9-17.

[18] Mayson, B.E., Kilburn, D.G. and Zamost, B.L., 2003, Effects of methanol concentration on expression levels of recombinant protein in fed-batch cultures of *Pichia pastoris*, Biotech. Bioeng. 81: 291-298.

[19] Katakura, Y., Zhang, W., Zhuang, G. and Omasa, T., 1998, Effect of methanol concentration on the production of Human b2-Glycoprotein *I* Domain *V* by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor gas sensor, J. Ferm. Bioeng. 86: 482-487.

[20] Zhang, W., Bevins, M.A., Plantz, B.A. and Smith, L.A., 2000, Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the Heavy-chain Fragment C of *Botulimun* Neurotoxin, Serotype A, Biotech. Bioeng. 70: 1-8.

[21] Li, P., Anumanthan, A., Gao, X.G., Ilangovan, K., Suzara, VV., Düzgünes, N. and Renugopalakrishnan, V., 2007, Expression of recombinant proteins in *Pichia pastoris*, Appl. Biochem. Biotechnol. 142: 105-124.

[22] Koganesawa, N., Aizava, T., Shimojo, H. Miura, K., Ohnishi, A., Demura, M., Hayakawa, Y., Nitta, K. and Kawano, K., 2002, Expression and purification of a small cytokine growth-blocking peptide from army worm *Pseudaletia separata* by an optimized fermentation method using the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*, Prot. Exp. Pur. 25: 416-425.

[23] Li, X., He, X., Li Z. and Wang, F., 2013, Combined strategies for improving the production of recombinant *Rhizopus oryzae* Lipase in *Pichia pastoris*, Biores. 8: 2867-2880.

[24] Salamin, K., Sriranganadane, D., Le' chenne, B., Jousson, O. and Monod, M., 2010, Secretion of endoglucanase subtilis by *Pichia pastoris* strains GS115 and KM71, Appl. Environ. Microb. 76: 4269-4276.

[25] Charoenrat, T., Khumruaengsri, N., Promdonkoy, P., Rattanaphan, N., Eurwilaichitr, L., Tanapongpipat, S. and Roongsawang, N., 2013, Improvement of recombinant endoglucanase produced in *Pichia pastoris* KM71 through the use of synthetic medium for inoculum and pH control of proteolysis, J. Biosci. Bioeng. 116: 193-198.