การเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ไฟเตสของยีสต์ *Ogataea thermomethanolica*

Growth and recombinant phytase production of *Ogataea thermomethanolica*

สมพจน์ อันติมานนท์ และเทพปัญญา เจริญรัตน์*

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

กนกกาญจน์ คชรินทร์, สุทิพา ธนพงศ์พิพัฒน์ และนิรันดร์ รุ่งสว่าง

หน่วยวิจัยทรัพยากรเทคโนโลยีชีวภาพ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

Sompot Antimanon and Theppanya Charoenrat*

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Kanokarn Kocharin, Sutipa Tanapongpipat and Niran Roongsawang

Bioresources Technology Unit, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

(BIOTEC), National Science and Technology Development Agency (NSTDA),

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

บทคัดย่อ

ระบบการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนต์ในยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia pastoris* เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพสูง อย่างไรก็ตาม หากมีการนำระบบดังกล่าวมาใช้ในการผลิตโปรตีนรีคอม-บิแนนต์ในระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศไทยจะมีค่าใช้จ่ายที่สูงมาก เนื่องจากต้องขอรับสิทธิจากต่างประเทศ (license) ดังนั้นการพัฒนายีสต์ *Ogataea thermomethanolica* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้เองภายในประเทศมาประยุกต์เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์จึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจ ซึ่งในงานวิจัยนี้ได้ศึกษาอิทธิพลของพีเอชที่มีผลต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสในการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์และศึกษาการผลิตเอนไซม์ไฟเตสด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์และความเข้มข้นของเอนไซม์ไฟเตส ผลการศึกษาพบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตส คือ พีเอช 6.0

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** thepcharoen4@gmail.com

เนื่องจากให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงสุดเท่ากับ 14.00±0.21 กรัมต่อลิตร และ 7.83±0.04 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สำหรับการผลิตเอนไซม์ไฟเตสด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ อาศัยการเติมสับสเทรตด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียล ตามด้วยการเติมด้วยอัตราคงที่เพื่อรักษาระดับของค่าออกซิเจนละลายให้สูงกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งในระหว่างการเพาะเลี้ยงไม่พบการสร้างผลิตภัณฑ์รองในรูปของเอทานอลและกรดอะซิติก โดยพบว่าสามารถเพิ่มความเข้มข้นเซลล์และผลผลิตเอนไซม์ไฟเตสเป็น 96.24±2.37กรัมต่อลิตร และ 98.61±1.67 หน่วยต่อมิลลิลิตร และให้อัตราการผลิตเอนไซม์ไฟเตสเชิงปริมาตรสูงถึง 2701.63±45.72 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง ซึ่งเพิ่มขึ้นประมาณ 3.5 เท่า เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าระบบการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนต์ในยีสต์ *O. thermomethanolica* เป็นระบบที่มีศักยภาพในการพัฒนาต่อไป

คำสำคัญ : *Ogataea thermomethanolica*; เอนไซม์ไฟเตส; พีเอชที่เหมาะสม; การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

Abstract

Saccharomyces cerevisiae and *Pichia pastoris*as are known as a well-established and commercially available host for heterologous protein expression systems in yeast. However, high license fees discourage the use of these expression systems for recombinant protein production in Thailand. Therefore, developing a new yeast strain, *Ogataea thermomethanolica* isolated in Thailand with the suitable properties as a recombinant host would be an alternative solution especially for domestic recombinant protein production. In this study, the impact of pH on growth and recombinant phytase production was investigated in batch cultivation. In addition, fed-batch fermentation was applied to increase cell density as well as phytase concentration. The results showed that pH 6.0 was the optimal pH for both growth and phytase production, since it provided the highest cell concentration and phytase activity of 14.00±0.21 g/L and 7.83±0.04 U/mL, respectively. In fed-batch fermentation, the substrate was initially fed using exponential feed rate and followed by constant feed rate to maintain dissolved oxygen tension (DOT) above 20 % air saturation. The undesired by-products such as ethanol and acetic acid were undetectable during the fermentation period. With this feeding strategy, cell concentration and phytase activity were improved to 96.24±2.37 g/L and98.61±1.67 U/mL, respectively. The volumetric productivity was increased to 2701.63±45.72 U/L.h which was about 3.5 times higher than batch cultivation. This study has revealed the potential of developing *O. thermomethanolica* expression system as an alternative system for recombinant protein production.

Keywords: *Ogataea thermomethanolica*; phytase; optimum pH; fed-batch fermentation

1. บทนำ

ปัจจุบันงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์และการพัฒนากระบวนการผลิตได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากความต้องการในการใช้โปรตีนเพิ่มสูงขึ้นทั้งในแง่ของปริมาณและชนิดของโปรตีน ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าระบบการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนต์ในยีสต์ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* และ *Pichia pastoris* เป็นระบบที่มีประสิทธิภาพสูง และสามารถดำเนินการได้ง่าย [1,2] อย่างไรก็ตาม ยีสต์สายพันธุ์ดังกล่าวอาจไม่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้จริงในระดับอุตสาหกรรมภายในประเทศ เนื่องจากการนำยีสต์สายพันธุ์การค้าดังกล่าวมาใช้ในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์จะต้องเสียค่าใช้จ่ายที่สูงมากในการรับสิทธิจากต่างประเทศ (license) ดังนั้น การพัฒนายีสต์สายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้ภายในประเทศ และนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์จึงเป็นทางเลือกในการแก้ปัญหาข้างต้น

งานวิจัยที่ผ่านมา พบว่ายีสต์ *Ogataea thermomethanolica* มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ กล่าวคือ สามารถผลิตเอนไซม์ไฟเตสลูกผสมในระดับฟลาสก์ด้วยโปรโมเตอร์ *OthGAP* ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกตลอดเวลา [3] ทั้งนี้เนื่องจากระบบการแสดงออกของยีนโดยยีสต์ *O. thermomethanolica* เป็นระบบที่เริ่มมีการพัฒนาเมื่อ ค.ศ. 2012 [4] ดังนั้นข้อมูลที่เกี่ยวข้องในปัจจุบันจึงมีอยู่อย่างจำกัด ประกอบกับยีสต์ *O. thermomethanolica* มีลักษณะทางสรีระวิทยาใกล้เคียงกับยีสต์ *P. pastoris* การอ้างอิงวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องในงานวิจัยนี้บางส่วนจึงอ้างจากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนโดยยีสต์ *P. pastoris* โดยการแสดงออกของยีนภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ของยีน *GAP* ในยีสต์ *P. pastoris* จะเกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยงและสามารถแสดงออกในระดับสูง [5] นอกจากนี้ การควบคุมกระบวนการเพาะเลี้ยงเมื่อใช้โปรโมเตอร์ของยีน *GAP* ทำได้ง่ายเนื่องจากแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการเติบโตและการผลิตส่วนใหญ่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดเดียว รวมถึงระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงจะสั้นกว่าระบบที่มีการเหนี่ยวนำประมาณ 2.7 เท่า [6]

พีเอชเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีอิทธิพลต่อการเติบโตและการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ทั้งในด้านอัตราการผลิต คุณภาพ และกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส ตัวอย่าง เช่น ยีสต์ *P. pastoris* สามารถเติบโตได้ในช่วงพีเอช 3-7 โดยการเพาะเลี้ยงในช่วงดังกล่าวทำให้อัตราการเติบโตต่างกันเล็กน้อย [7] นอกจากนี้ การเปลี่ยนพีเอชจากพีเอชที่เหมาะสมต่อการเติบโตในระยะการเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์เป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนเป้าหมายในระยะการผลิตเป็นเทคนิคที่นิยมใช้เพื่อควบคุมกระบวนการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ [7-9] โดย Jahic และคณะ (2003) รายงานว่าการเปลี่ยนพีเอชจากพีเอช 5.0 เป็นพีเอช 4.0 ทำให้การผลิตและความเสถียรของฟิวชันโปรตีน CBM-CALB (cellulose-binding module *Candida antarctica* lipase B) เพิ่มขึ้น 90 เปอร์เซ็นต์ [10] ในขณะที่การเปลี่ยนพีเอช 6.0 เป็นพีเอช 5.0 ในระยะการผลิตส่งผลให้ความเสถียรของเอนไซม์เอนโดกลูแคเนสที่ได้จากยีสต์รีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* KM71 มีค่าสูงขึ้น [11]

โดยงานวิจัยนี้เลือกใช้ยีนที่ผลิตเอนไซม์ไฟเตสเป็นยีนต้นแบบ เอนไซม์ดังกล่าวทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายพันธะฟอสโฟโมโนเอสเตอร์ของกรดไฟติก (phytic acid) และปลดปล่อยหมู่ฟอสเฟตอนินทรีย์รวมถึงไอออนของโลหะต่าง ๆ ที่ยึดจับอยู่กับกรดไฟติกออกมา [12] จากสมบัติของเอนไซม์ไฟเตสที่สามารถย่อยสับสเทรตในรูปกรดไฟติกได้เป็นอย่างดี

และกรดไฟติกเป็นองค์ประกอบที่พบในธัญพืชต่าง ๆ ดังนั้นจึงมีการนำเอนไซม์ไฟเตสมาประยุกต์ในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารสัตว์ปีกและสุกร เนื่องจากสัตว์เหล่านี้ไม่มีเอนไซม์ไฟเตสเพื่อใช้ในการย่อยกรดไฟติกให้ได้ฟอสเฟตอิสระ ทำให้ไม่สามารถดูดซึมฟอสเฟตเหล่านี้ไปใช้ประโยชน์ และยังช่วยลดต้นทุนการผลิตโดยเป็นการลดการเติมธาตุอาหารกลุ่มฟอสเฟตในอาหาร [13]

ข้อมูลข้างต้นแสดงให้เห็นว่ายีสต์ *O. thermomethanolica* มีศักยภาพในการนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังขาดองค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์โดยยีสต์สายพันธุ์นี้ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ รวมถึงการผลิตในระดับฟลาสก์มีข้อจำกัดหลายประการประกอบกับการให้ผลผลิตในระดับต่ำ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นศึกษาปัจจัยพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับการเติบโตและการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ในการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ด้วยระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

2. วัสดุและวิธีการทดลอง

2.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ ยีสต์รีคอมบิแนนต์ *Ogataea thermomethanolica* ที่มีการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากรา *Aspergillus niger* BCC18081 [14] โดยการแสดงออกของยีนนี้อยู่ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ *OthGAP* [3]

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารสำหรับเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 คือ อาหารสูตร YPD ซึ่งใน 1 ลิตรประกอบด้วยยีสต์สกัด 10 กรัม เปปโตน 20 กรัม และกลูโคส 20 กรัม

อาหารสำหรับเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 2 และอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ คือ อาหารสังเคราะห์สูตร Syn6 [15] ซึ่งใน 1 ลิตร ประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัม $NH_4H_2PO_4$ 13.3 กรัม KCl 3.3 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 3 กรัม และ NaCl 0.33 กรัม พร้อมเติมธาตุอาหารรอง 5 มิลลิลิตรต่อลิตร

ธาตุอาหารรอง ใน 1 ลิตรประกอบด้วย $CaCl_2$ 264.84 กรัม $Fe(NH_4)_3(C_6H_5O_7)_2$ 16.54 กรัม $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.1กรัม $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 4 กรัม $MnSO_4 \cdot H_2O$ 4.52 กรัม EDTA (Titriplex III) 13.3 กรัม D-biotin 0.08 กรัม thiamin-hydrochloride 26.7 กรัม $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ 0.13 กรัม $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.13 กรัม H_3BO_3 0.13 กรัม KI 0.13 กรัม และ $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.13 กรัม

อาหารสำหรับเติมในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ใน 1 ลิตร ประกอบด้วยกลูโคส 500 กรัม $NH_4H_2PO_4$ 40 กรัม KCl 10 กรัม $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 9 กรัม และ NaCl 1 กรัม พร้อมเติมธาตุอาหารรอง 15 มิลลิลิตรต่อลิตร

2.3 การเตรียมกล้าเชื้อ

การเตรียมกล้าเชื้อแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

2.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 : นำสารแขวนลอยเชื้อที่เก็บในกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 2 มิลลิลิตร เติมลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว YPD ปริมาตร 20 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส บนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 250 รอบต่อนาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง

2.3.2 การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 2 : ถ่ายกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ปริมาตรประมาณ 4 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารสำหรับเตรียมกล้าเชื้อ

ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเดียวกับการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.4 การเพาะเลี้ยงยีสต์ *O. thermomethanolica* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์

การเพาะเลี้ยงยีสต์ *O. thermomethanolica* ดำเนินการในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 20 ลิตร (BiostatC plus, Sartorius Stedim Biotech, Germany) โดยประกอบถังปฏิกรณ์ชีวภาพและเทียบค่าอิเล็กโทรดต่าง ๆ ตรวจสอบระบบการทำงานของเครื่องและระบบควบคุม จากนั้นจึงเติมอาหาร Syn6 ปริมาตร 3.8 ลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แล้วทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งถังปฏิกรณ์ชีวภาพรุ่นนี้มีระบบการทำให้ปลอดเชื้อในตัว (*in situ* sterile) เมื่ออุณหภูมิลดลงจึงเติมธาตุอาหารรองปริมาตร 5 มิลลิลิตรต่อลิตร ตั้งค่าสภาวะควบคุมต่าง ๆ คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที, อัตราการการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที (vvm) และแปรผันค่าพีเอชในช่วงที่ต้องการศึกษา

2.5 การศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์

การศึกษาอิทธิพลของพีเอชในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ทำโดยแปรผันค่าพีเอชควบคุมในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงเท่ากับ 4.0, 5.0, 6.0, 6.5 และ 7.0 โดยใช้สารละลายแอมโมเนีย 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นด่างในการควบคุมพีเอช และเมื่อได้พีเอชที่เหมาะสมแล้วจึงทดลองซ้ำโดยใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เป็นด่างแทนการใช้สารละลายแอมโมเนียเพื่อยืนยันว่าผลการทดลองที่ได้เกิดจากอิทธิพลของพีเอชไม่ใช่อิทธิพลของความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกันในแต่ละพีเอช

2.6 การผลิตเอนไซม์ไฟเตสด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

งานวิจัยในส่วนนี้เพาะเลี้ยงยีสต์ *O. thermomethanolica* โดยใช้กระบวนการแบบเฟด-แบทช์เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ และเพิ่มความเข้มข้นของเอนไซม์ไฟเตสรวมถึงควบคุมไม่ให้เกิดการจำกัดออกซิเจน และ/หรือ เกิดการสะสมกลูโคสจนเกิดการสร้างผลิตภัณฑ์รองในระหว่างกระบวนการผลิต ซึ่งการเติมสับสเทรตในระยะเฟด-แบทช์อาศัยรูปแบบการเติมทั้งหมด 2 รูปแบบ คือ การเติมด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียล (exponential feed) และการเติมด้วยอัตราคงที่ (constant feed)

เมื่อสับสเทรตในระยะแบทช์ถูกใช้จนหมด (ค่าออกซิเจนละลายเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว) จึงเข้าสู่ระยะเฟด-แบทช์โดยในระยะแรกใช้การเติมอาหารด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียลซึ่งจะทำให้เซลล์มีการเติบโตด้วยอัตราเอกซ์โพเนนเชียล ทั้งนี้ สามารถคำนวณอัตราการเติมสับสเทรตได้โดยอาศัยสมการที่ 1

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

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

μ คือ อัตราการเติบโตจำเพาะ มีค่าเท่ากับ 0.43 ต่อชั่วโมง

X_0 คือ ความเข้มข้นของเซลล์ก่อนการเติม (13 กรัมต่อลิตร)

V_0 คือ ปริมาตรของน้ำหมักก่อนการเติม (4 ลิตร)

$Y_{x/s}$ คือ ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (0.64 กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเทรต)

S_i คือ ความเข้มข้นของกลูโคสในสารละลายที่ใช้เติม (500 กรัมต่อลิตร)

ระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ที่มีการเติมอาหารด้วยอัตราเอกซ์โพเนนเชียลค่าออกซิเจนจะลดลงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งหากยังคงดำเนินการเพาะเลี้ยงโดยการเติมอาหารด้วยอัตราเอกซ์โพเนนเชียลต่อไปจะทำให้เกิดสภาวะจำกัดออกซิเจนได้ ดังนั้นเมื่อค่าออกซิเจนละลายลดลงจนมีค่าประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ จึงเปลี่ยนรูปแบบการเติมอาหารเป็นการเติมด้วยอัตราคงที่เพื่อรักษาระดับค่าออกซิเจนละลายให้มีค่าประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ จนสิ้นสุดกระบวนการ โดยอัตราการเติมอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ด้วยอัตราการเติมคงที่มีค่าประมาณ 73.93 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง

2.7 วิธีวิเคราะห์

2.7.1 การวิเคราะห์การเจริญของเซลล์และความเข้มข้นของเซลล์แห้ง

การเจริญของเซลล์ยีสต์รีคอมบิแนนต์หาโดยการนำตัวอย่างน้ำหมักที่ผ่านการเจือจางมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ความเข้มข้นของเซลล์ยีสต์รีคอมบิแนนต์วิเคราะห์ในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งหาโดยชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่ได้จากการนำตัวอย่างน้ำหมักมาหมุนเหวี่ยงแยกล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลายกรดฟอสฟอริก 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกำจัดเกลือที่ตกตะกอนและล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น [11]

2.7.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด

ความเข้มข้นของโปรตีนที่ละลายทั้งหมดสามารถวิเคราะห์ได้โดยการนำตัวอย่างน้ำหมักส่วนใสมาเจือจางให้เหมาะสมแล้ววิเคราะห์ด้วยวิธีของ Bradford (1976) [16] โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นโปรตีนมาตรฐาน

2.7.3 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส

การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสทำตามวิธีของ Boyce และคณะ (2004) [17] วิธีนี้อาศัยหลักการวัดหมู่ฟอสเฟตอนินทรีย์ที่ปลดปล่อยออกมาจากโมเลกุลของเกลือโซเดียมของกรดไฟติก (phytic acid sodium salt) เนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ไฟเตสโดยหมู่ฟอสเฟตจะเกิดปฏิกิริยาเคมีกับแอมโมเนียมโมลิบเดท (ammonium molybdate) ให้สารประกอบเชิงซ้อนเรียกว่า α-Keggin ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร (OD_{660}) โดยกำหนดให้หนึ่งหน่วยของกิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่ปลดปล่อยหมู่ฟอสเฟต 1 ไมโครโมล ในหนึ่งนาทีที่พีเอช 5.5 อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส [14]

2.7.4 การวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบและคุณภาพของโปรตีนเป้าหมาย

การวิเคราะห์ขนาดของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบและความบริสุทธิ์ของโปรตีนเป้าหมายทำโดยวิธีโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคลิลาไมด์เจลอิเล็กโตรฟอรีซิส (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gelelectrophoresis, SDS-PAGE) [18] เพื่อติดตามเอนไซม์รีคอมบิแนนต์ไฟเตสและการตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนบนแผ่นพอลิอะคลิลาไมด์เจล โดยใช้โปรตีนมาตรฐานในการเปรียบเทียบขนาดโมเลกุลของโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่นเจล

2.7.5 การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล และกรดอะซิติกด้วยวิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง

การวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลและกรดอะซิติกในส่วนใสของน้ำหมักในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (high performance liquid chromatography, HPLC)

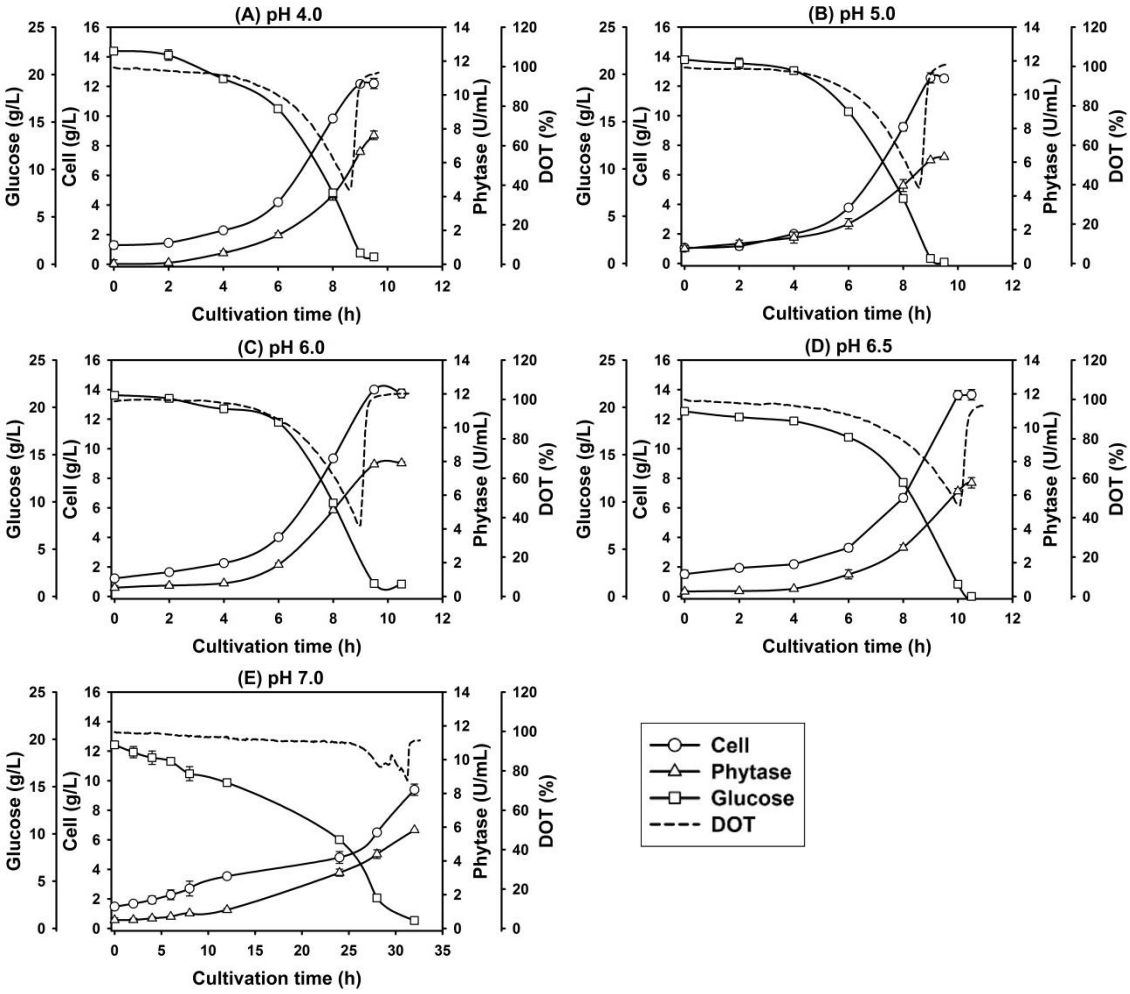
โดยใช้เครื่องโครมาโตกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง SHIMADZU รุ่น NEXERA คอลัมน์ที่ใช้ คือ Supelcogel H (250 x 4.6 มิลลิเมตร) โดยสารละลายเคลื่อนที่ (mobile phase) คือ กรดฟอสฟอริกความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อุณหภูมิของคอลัมน์ควบคุมเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส และปริมาตรของสารตัวอย่างในการฉีด คือ 10 ไมโครลิตร ก่อนการวิเคราะห์ได้นำตัวอย่างมากรองผ่านตัวกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.2 ไมครอน โดยกำหนดสภาวะในการวิเคราะห์ตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิตคอลัมน์ [19]

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

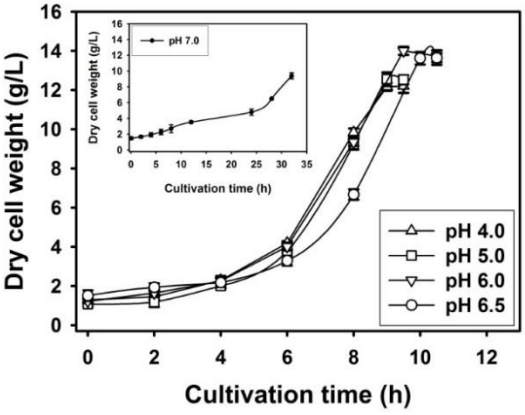
3.1 อิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตของยีสต์รีคอมบิแนนต์ *O. thermomethanolica*

การศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตของยีสต์รีคอมบิแนนต์ *O. thermomethanolica* ศึกษาที่พีเอช 4.0, 5.0, 6.0, 6.5 และ 7.0 โดยควบคุมอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที ผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 1 และตารางที่ 1 โดยพบว่าที่พีเอช 4.0, 5.0, 6.0 และ 6.5 ยีสต์ *O. thermomethanolica* สามารถเติบโตได้อย่างต่อเนื่องหลังจากถ่ายกล้าเชื้อลงสู่ถังหมักโดยมีระยะปรับตัวอยู่ในช่วง 2.41-3.85 ชั่วโมง และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงอยู่ในช่วง 9.5-10.5 ชั่วโมง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่พีเอช 7.0 พบว่ามีระยะการปรับตัวและระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมากกว่าที่พีเอชอื่นประมาณ 3 เท่า (รูปที่ 2) ทั้งนี้ เมื่อเรียงลำดับความหนาแน่นของเซลล์สูงสุดในแต่ละพีเอช พบว่าที่พีเอช 6.0 มีความหนาแน่นเซลล์สูงสุดเท่ากับ 14.00±0.21 กรัมต่อลิตร รองลงมา คือ พีเอช 6.5 (13.62±0.32 กรัมต่อลิตร) พีเอช5.0 (12.86±0.34 กรัมต่อลิตร) พีเอช 4.0 (12.17±0.21 กรัมต่อลิตร) และมีค่าน้อยสุดที่พีเอช 7.0 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 9.39±0.39 กรัมต่อลิตร สำหรับค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ในการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 4.0-6.5 มีค่าในช่วง 0.33-0.37 ต่อชั่วโมง ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่พีเอช 7.0 มีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะน้อยกว่าประมาณ 4.5 เท่า ซึ่งผลการเติบโตที่ได้จากการศึกษานี้คล้ายกับกับการรายงานก่อนหน้าโดย Wegner ในปี ค.ศ. 1983 [20] ที่กล่าวถึงการเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* ว่าที่พีเอชในการเพาะเลี้ยงในช่วงพีเอช 3.0-7.0 ส่งผลให้อัตราการเติบโตต่างกันเล็กน้อยเมื่อไม่มีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้อง อย่างไรก็ตาม สำหรับการศึกษานี้ไม่ได้ศึกษาที่พีเอช 3.0 และการเพิ่มพีเอชในการเพาะเลี้ยงเป็นพีเอช 7.0 ส่งผลให้อัตราการเติบโตจำเพาะลงลงอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่า ยีสต์ *O. thermomethanolica* สามารถเติบโตได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง คือ พีเอช 4.0-6.5 และมีค่าอัตราการการเติบโตจำเพาะที่ใกล้เคียงกันซึ่งส่งผลดีในการนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านเพื่อผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์เมื่อโปรตีนดังกล่าวมีความเสถียรที่พีเอชแตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (Yx/s) พบว่าการเพิ่มค่าพีเอชจาก 4.0 เป็น 6.0 ส่งผลให้ค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจาก 0.51±0.01 กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเทรต เป็น 0.64±0.03 กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเทรต อย่างไรก็ตาม การเพิ่มค่าพีเอชจนถึงค่าพีเอช 7.0 ทำให้ค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตลดลงเหลือ 0.43±0.03 กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเทรต ซึ่งสอดคล้องกับการเกิดตะกอนของอาหาร Syn6 ที่มากขึ้นเมื่อค่าพีเอชของอาหารสูงขึ้น ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ที่พีเอช 7.0 ธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโตของเซลล์ในอาหาร Syn6 อาจเกิดการตกตะกอนและอยู่ในรูปที่เซลล์ไม่สามารถนำไปใช้ได้ ทำให้เซลล์เติบโตได้น้อยและใช้ระยะเวลาในการปรับตัวนาน



รูปที่ 1 รูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสจากการเพาะเลี้ยงยีสต์รีคอมบิแนนต์ *O. thermomethanolica* ระหว่างพีเอช 4.0-7.0



รูปที่ 2 อิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตของยีสต์รีคอมบิแนนต์ *O. thermomethanolica* ที่มีการแสดงออกของยีนไฟเตส

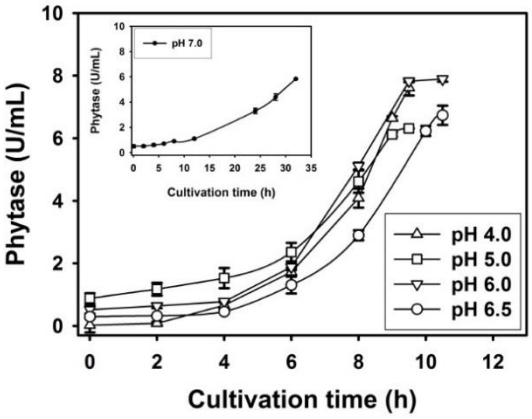
ตารางที่ 1 ข้อมูลและพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่มีการแปรผันค่าพีเอชของยีสต์รีคอมบิแนนต์ *O. thermomethanolica* ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	พีเอชที่ควบคุม				
	พีเอช 4.0	พีเอช 5.0	พีเอช 6.0	พีเอช 6.5	พีเอช 7.0
น้ำหนักเซลล์แห้ง(กรัมต่อลิตร)	12.17±0.21	12.86±0.34	14.00±0.21	13.62±0.32	9.39±0.39
กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	6.64±0.06	6.12±0.06	7.83±0.04	6.23±0.16	5.82±0.03
อัตราการเติบโตจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)	0.33±0.01	0.35±0.03	0.37±0.03	0.36±0.02	0.08±0.01
ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเทรต)	0.51±0.01	0.56±0.06	0.64±0.03	0.62±0.05	0.43±0.03
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต (หน่วยต่อกรัมสับสเทรต)	311.00±2.84	249.13±10.20	366.86±1.84	324.60±5.92	286.62±1.32
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง)	735.00±6.73	582.10±23.83	769.11±3.86	593.75±10.83	166.45±0.76
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	9.50	9.50	10.50	10.50	32.00
ระยะปรับตัว (ชั่วโมง)	2.56	2.52	2.41	3.85	10.08

3.2 อิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยยีสต์รีคอมบิแนนต์ *O. thermomethanolica*

การรายงานก่อนหน้าพบว่าในระบบการแสดงออกของโปรตีนรีคอมบิแนนต์โดยยีสต์ *P. pastoris* พีเอชส่งผลต่อความสำเร็จในการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์ทั้งในด้านอัตราการผลิตคุณภาพของโปรตีนเป้าหมายและกิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอส [11,21] โดยพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์แต่ละชนิดที่มีการรายงานก่อนหน้าว่าขึ้นอยู่กับชนิดของโปรตีนเป้าหมาย [10,11] สำหรับการศึกษานี้เมื่อดำเนินการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่พีเอช 6.0 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงสุดเท่ากับ 7.83±0.04 หน่วยต่อมิลลิลิตร ดังรูปที่ 3 และตารางที่ 1 โดยมีค่ามากกว่าการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 4.0, 5.0, 6.5 และ 7.0 ประมาณ 1.18, 1.28, 1.26 และ 1.35 เท่า ตามลำดับ นอกจากนี้ที่พีเอช 6.0 ยังให้ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับ-สเทรต ($Y_{p/s}$) เท่ากับ 366.86±1.84 หน่วยต่อกรัมสับสเทรต และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (Q_p) เท่ากับ 769.11±3.86 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง ซึ่งเป็นค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่พีเอชอื่น ๆ

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสพบว่าพีเอช 6.0 เป็นพีเอชที่มีความเหมาะสมที่สุด เนื่องจากการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 6.0 ให้ค่าความเข้มข้นของเซลล์ ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส และค่าพารามิเตอร์อื่น ๆ ที่แสดงถึงความสามารถในการเติบโตและการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนต์สูงสุด ดังนั้น ผู้วิจัยจึงเลือกพีเอช6.0 เป็นพีเอชควบคุมเพื่อใช้ในการศึกษาในระบบแบบเฟด-แบทช์ต่อไป

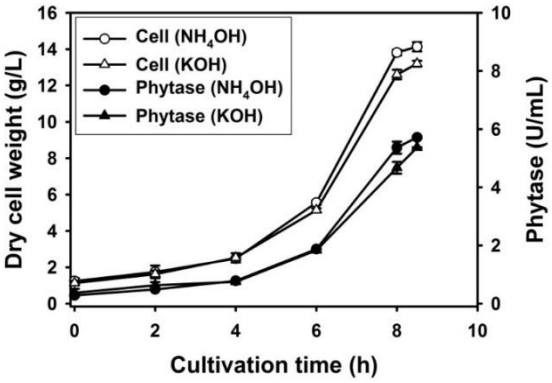


รูปที่ 3 อิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยยีสต์รีคอมบิแนนต์ *O. thermomethanolica*

นอกจากที่ได้กล่าวไปแล้ว ผู้วิจัยได้ออกแบบการทดลองเพื่อเป็นการยืนยันว่าความแตกต่างของรูปแบบการเติบโตและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่พีเอชต่าง ๆ เกิดจากอิทธิพลของพีเอชไม่ใช่เกิดจากความแตกต่างของปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่ไม่เท่ากันในแต่ละพีเอช ซึ่งการทดลองเปรียบเทียบนี้ได้ศึกษารูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยการใช้สารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ในการปรับพีเอชแทนการใช้สารละลายแอมโมเนีย 25 เปอร์เซ็นต์ ในการควบคุมพีเอชที่ 6.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมที่สุดต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ ผลการทดลองพบว่ารูปแบบการเติบโต ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตส รวมถึงระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีค่าใกล้เคียงกับการใช้สารละลายแอมโมเนีย 25 เปอร์เซ็นต์ ในการควบคุมพีเอช จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถยืนยันได้ว่ารูปแบบการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสที่แตกต่างกันเป็นอิทธิพลเนื่องจากพีเอชไม่ใช่ปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน (รูปที่ 4)

3.3 การผลิตเอนไซม์ไฟเตสด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

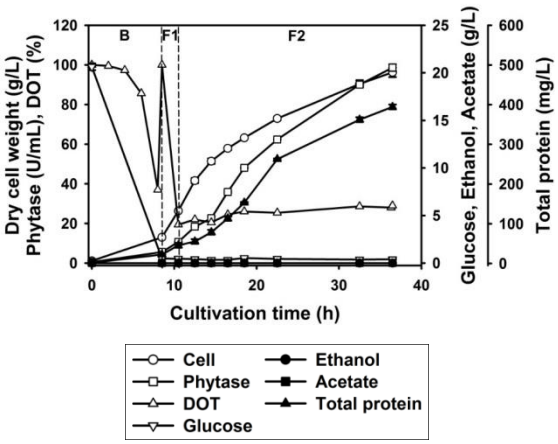
การรายงานก่อนหน้าเกี่ยวกับการเติมสับสเทรตในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ พบว่ารูปแบบการเติมสับ-สเทรตมีผลต่ออัตราการเติบโต อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ และผลิตภัณฑ์รองที่เกิดขึ้น เช่น การเติมสับสเทรตด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียลส่งผลให้อัตราการเติบโตจำเพาะมีค่าใกล้เคียงกับอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด ($\mu \approx \mu_{max}$) เมื่อระบบการเพาะเลี้ยงไม่ถูกจำกัดด้วยค่าออกซิเจนละลาย [22] อย่างไรก็ตาม ระบบการเพาะเลี้ยงที่มีการเติมสับสเทรตด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียลสามารถตรวจพบการสร้างผลิตภัณฑ์รองในรูปของอะซิเตทแม้ระบบจะอยู่ในสภาวะที่ไม่จำกัดออกซิเจน [23] ดังนั้นรูปแบบหรือวิธีการเติมสับสเทรตจึงมีผลโดยตรงต่อการเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์แต่ละชนิด



รูปที่ 4 การเพาะเลี้ยงยีสต์รีคอมบิแนนต์ *O. thermomethanolica* เพื่อผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยใช้สารละลายแอมโมเนียและโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ในการปรับพีเอช

งานวิจัยนี้การผลิตเอนไซม์ไฟเตสรีคอมบิแนนต์เริ่มจากการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่ควบคุมอุณหภูมิเท่ากับ 34 องศาเซลเซียส พีเอช 6.0 อัตรา

การกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตร.นาที จากนั้นเมื่อสับสเทรตถูกใช้จนหมดจึงเริ่มระยะเฟด-แบทช์โดยเติมกลูโคสความเข้มข้น 500 กรัมต่อลิตร ที่มีธาตุอาหารรอง 15 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งผลการทดลองแสดงดังรูปที่ 5 และตารางที่ 2 พบว่าการเพาะเลี้ยงในระยะแบทช์ใช้ระยะเวลา 8.5 ชั่วโมง โดยมีความเข้มข้นเซลล์เมื่อสิ้นสุดระยะการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์เท่ากับ 13.02±0.46 กรัมต่อลิตร และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสเท่ากับ 5.60±0.32 หน่วยต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงเริ่มดำเนินการเพาะเลี้ยงในระยะเฟด-แบทช์ ซึ่งเริ่มจากการเติมอาหารด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียลในช่วงดังกล่าวเซลล์สามารถเติบโตและสร้างผลผลิตได้อย่างรวดเร็วโดยความเข้มข้นของเซลล์เพิ่มขึ้นด้วยอัตราเอกซ์โพเนนเชียลและค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 2 เท่าจากระยะแบทช์ และหลังจากเติมสับสเทรตด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียลเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าค่าออกซิเจนละลายมีแนวโน้มลดลงต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการเติมอาหารด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียลต่อไปอาจส่งผลให้เกิดสภาวะจำกัดออกซิเจนจนเกิดผลิตภัณฑ์รองที่ไม่ต้องการ คือ เอทานอลและอะซิเตต ทั้งนี้มีรายงานก่อนหน้าว่าเอทานอลและอะซิเตตส่งผลให้การแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนโดย *P. pastoris* ลดลง [24] ดังนั้นจึงเปลี่ยนรูปแบบการเติมอาหารจากการเติมด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียลเป็นการเติมด้วยอัตราคงที่ โดยใช้อัตราการเติมเท่ากับ 73.93 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง หรือเท่ากับ 36.97 กรัมกลูโคสต่อชั่วโมง การเติมอาหารด้วยอัตราคงที่ใช้ระยะเวลา 26.5 ชั่วโมง ซึ่งเซลล์สามารถเติบโตและสร้างผลผลิตได้อย่างต่อเนื่องโดยค่าออกซิเจนละลายมีค่าสูงกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ตลอดระยะเวลาที่มีการเติมสับสเทรตนอกจากนี้ระหว่างที่มีการเติมสับสเทรตพบว่าความเข้มข้นของกลูโคสอยู่ในระดับต่ำ และไม่สามารถตรวจพบการสร้าง



รูปที่ 5 รูปแบบการเติบโต การใช้สับสเทรต การผลิตเอนไซม์ไฟเตส และผลิตภัณฑ์รองที่เกิดขึ้นในการเพาะเลี้ยงยีสต์รีคอมบิแนนต์ *O. thermomethanolica* ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ (เมื่อ B คือ การเพาะเลี้ยงในระยะแบทช์, F1 คือ การเพาะเลี้ยงในระยะเฟด-แบทช์โดยการเติมสับสเทรตด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียล และ F2 คือ การเพาะเลี้ยงในระยะเฟด-แบทช์โดยการเติมสับสเทรตด้วยอัตราคงที่)

ผลิตภัณฑ์รองในรูปของเอทานอลและกรดอะซิติก จึงกล่าวได้ว่าสับสเทรตที่ถูกเติมเข้าสู่ระบบเซลล์สามารถนำไปใช้ในการสร้างเซลล์และสร้างผลิตภัณฑ์ได้อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตาม พบว่าการเติมอาหารด้วยอัตราคงที่ส่งผลให้อัตราการเติบโตจำเพาะมีค่าลดลงในขณะที่การเติมอาหารด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียลมีค่าอัตราการเติบโตจำเพาะใกล้เคียงกับอัตราการเติบโตจำเพาะสูงสุด ทั้งนี้ เกิดจากการเติมอาหารด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียลมีอัตราการเติมใกล้เคียงกับอัตราการใช้สับสเทรตส่งผลให้เซลล์สามารถเติบโตด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียล แต่การเติมดังกล่าวส่งผลให้ความต้องการออกซิเจนของระบบเพาะเลี้ยงมีค่าสูงกว่า

ความสามารถของถังปฏิกรณ์ชีวภาพในการถ่ายเทมวลของออกซิเจนจากวัฏภาคก๊าซสู่วัฏภาคของเหลวทำให้ค่าออกซิเจนละลายมีค่าลดลงอย่างรวดเร็ว ทั้งนี้ หากยังคงใช้การเติมอาหารด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียลจะเกิดสภาวะจำกัดออกซิเจนซึ่งส่งผลเสียต่อระบบ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเปลี่ยนรูปแบบการเติมอาหารเป็นการเติมด้วยอัตราคงที่เพื่อรักษาระดับของค่าออกซิเจนละลายให้มีค่าสูงกว่า 20 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 2 ข้อมูลและค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์รีคอมบิแนนต์ *O. thermomethanolica* ด้วยการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์

ข้อมูลจากกระบวนการหมัก	การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์
น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	96.24±2.37
กิจกรรมเอนไซม์ไฟเตส (หน่วยต่อมิลลิลิตร)	98.61±1.67
โปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	394.32±5.96
ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (กรัมเซลล์ต่อกรัมสับสเทรต)	0.48±0.04
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากสับสเทรต (หน่วยต่อกรัมสับสเทรต)	491.05±8.34
ผลได้ของผลิตภัณฑ์จากเซลล์ (หน่วยต่อกรัมเซลล์)	1024.57±17.34
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง)	2701.63±45.72
อัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (หน่วยต่อกรัมเซลล์.ชั่วโมง)	28.07±0.48
เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ไม่พบ
กรดอะซิติก (กรัมต่อลิตร)	ไม่พบ
ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง (ชั่วโมง)	36.50

หลังจากการสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงความเข้มข้นของเซลล์มีค่าเท่ากับ 96.24±2.37 กรัมต่อลิตร กิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสมีค่าเท่ากับ 98.61 ±1.67 หน่วยต่อมิลลิลิตร และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (Q_p) 2701.63±45.72 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง และเมื่อทำการตรวจสอบคุณภาพของเอนไซม์ไฟเตสในน้ำหมักด้วยวิธี SDS-PAGE (รูปที่ 6) พบว่าแถบของโปรตีนเป้าหมายมีลักษณะเป็นแถบกว้างที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 65-120 กิโลดาลตัน ซึ่งการเกิดแถบในลักษณะดังกล่าวอาจเกิดจากการเติมหมู่น้ำตาล (glycosylation) ให้กับโมเลกุลของเอนไซม์ไฟเตสในระดับที่ต่างกัน [4] ทั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *O. thermomethanolica* ภายใต้การควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ *OthGAP* ที่ได้จากงานวิจัยนี้กับการเพาะเลี้ยงยีสต์รีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกด้วยโปรโมเตอร์ *AOX1* จากงานวิจัยก่อนหน้าโดย Promdonkoy และคณะ (2009) พบว่ามีค่ากิจกรรมที่ใกล้เคียงกัน แต่ระบบที่ใช้ *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกด้วยโปรโมเตอร์ *AOX1* ใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงมากกว่าประมาณ 3 เท่า [14]

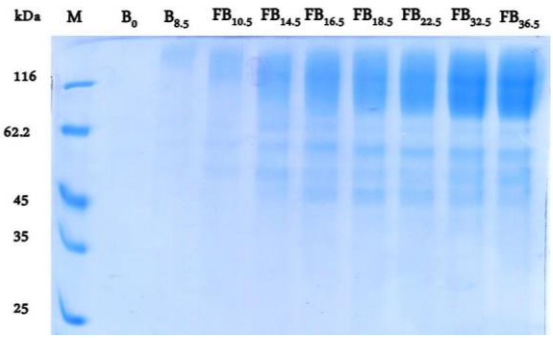
4. สรุป

การศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการเติบโตและการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยยีสต์รีคอมบิแนนต์ *O.*

thermomethanolica ภายใต้การควบคุมการแสดงออกตลอดเวลาด้วยโปรโมเตอร์ OthGAP พบว่าเซลล์สามารถเติบโตและผลิตเอนไซม์ไฟเตสได้ดีในช่วงพีเอชที่กว้าง (4.0-6.5) โดยพีเอช 6.0 เป็นพีเอชที่เหมาะสมที่สุด โดยเมื่อทำการศึกษาการผลิตเอนไซม์ไฟเตสด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ พบว่าการเติมอาหารด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียลส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์และค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสเพิ่มสูงขึ้นจากระยะแบทช์อย่างรวดเร็วประมาณ 2 เท่า อย่างไรก็ตาม ในช่วงดังกล่าวออกซิเจนละลายมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วเช่นกัน ดังนั้นเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดสภาวะออกซิเจนจำกัดจึงเปลี่ยนการเติมสับสเทรตจากการเติมด้วยอัตราเอ็กซ์โพเนนเชียลเป็นการเติมด้วยอัตราคงที่เพื่อรักษาระดับของค่าออกซิเจนละลายให้มีค่าสูงกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งตลอดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงไม่พบผลิตภัณฑ์รองในรูปของเอทานอลและกรดอะซิติก เมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงที่ 36.5 ชั่วโมง ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ไฟเตสสูงสุด 98.61±1.67 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ประมาณ 13 เท่า ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาถึงอัตราการสร้างผลผลิตเชิงปริมาตรพบว่าค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบทช์ให้ค่าเท่ากับ 2701.63± 45.72 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบแบทช์ที่ให้ค่า 769.11±3.86 หน่วยต่อลิตร.ชั่วโมง

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่สนับสนุนทุนวิจัย (P-13-50136, P-14-50939) ขอขอบคุณ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และเครื่องมือสำหรับการทำงานวิจัย และขอขอบคุณ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ส่งเสริมบุคลากรในสังกัดให้ได้ทำงานวิจัย



รูปที่ 6 การติดตามการผลิตเอนไซม์ไฟเตสโดยยีสต์รีคอมบิแนนต์ *O. thermomethanolica* ด้วยเทคนิค SDS-PAGE [เมื่อ M คือ โปรตีนมาตรฐาน (กิโลดาลตัน), B คือ ตัวอย่างในระยะแบทช์, FB คือ ตัวอย่างในระยะเฟด-แบทช์ และตัวเลข คือระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่ 0, 8.5, 10.5, 14.5, 16.5, 18.5, 22.5, 32.5 และ 36.5 ชั่วโมง]

6. รายการอ้างอิง

[1] Higgins, D.R. and Cregg, J.M., 1998, Method in Molecular Biology: *Pichia* Protocols, Humana Press., Totowa, New Jersey.

[2] Böer, E., Steinborn, G., Kunze, G. and Gellissen, G., 2007, Yeast expression platforms, Appl. Microb. Biotechnol. 77: 513-523.

[3] Harnpicharnchai, P., Promdonkoy, P., Sae-Tang, K., Roongsawang, N. and Tanapongpipat, S., 2014), Use of the glyceral-

hyde-3-phosphate dehydrogenase promoter from a thermotolerant yeast, *Pichia thermomethanolica*, for heterologous gene expression, especially at elevated temperature, Ann. Microbiol. 64: 1457-1462.

[4] Tanapongpipat, S., Promdonkoy, P., Watanabe, T., Tirasophon, W., Roongsawang, N., Chiba, Y. and Eurwilaichitr, L., 2012, Heterologous protein expression in *Pichia thermomethanolica* BCC16875, a thermotolerant methylotrophic yeast and characterization of N-linked glycosylation in secreted protein, FEMS Microbiol. Lett. 334: 127-134.

[5] Waterham, H.R., Digan, M.E., Koutz, P.J., Lair, S.V. and Cregg, J.M., 1997, Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter, Gene 186: 37-44.

[6] Menendez, C., Hernández, L., Banguela, A. and Pais, J., 2004, Functional production and secretion of the *Gluconacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris.* Enz. Microb. Technol. 34: 446-452.

[7] Clare, J.J., Romanos, M., Rayment, F.B., Rovedder, J.E., Smith, M.A., Payne, M.M., Sreekrishna, K. and Henwood, C.A., 1991, Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies, Gene 105: 205-212.

[8] Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kropp, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J.T., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A. and Birkenberger, L.A., 1997, Strategies for optimal synthesis and secretion of heterologous proteins in the methyltrophic yeast *Pichia pastoris*. Gene 190: 55-62.

[9] Inan , M., Chiruvolu, V., Eskridge, K., Vlasuk, G.P., Dickerson, K., Brown, S. and Meagher, M.M., 1999, Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma canium*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*, Enzyme Microb. Technol. 24: 438-450.

[10] 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.

[11] 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.

[12] Yao, M-Z., Zhang, Y-H., Lu, W-L., Hu, M-Q., Wang, W. and Liang, A-H., 2012, Phytases: Crystal structures, protein engineering and potential biotechnological applica-tions, J. Appl. Microbiol. 112: 1-14.

[13] Lei, X.G., Weaver, J.D., Mullaney, E., Ullah, A.H. and Azain M.J., 2013, Phytase, a new life for an "Old" enzyme, Annu. Rev. Anim. Biosci. 1: 283-309.

[14] Promdonkoy, P., Tang, K., Sornlake, W., Harnpicharnchai, P., Kobayashi Sriprang, R., Ruanglek, V., Upathanpreecha, T., Vesaratchavest, M., Eurwilaichitr, L. and Tanapongpipat, S., 2009, Expression and characterization of *Aspergillus* thermo-stable phytases in *Pichia pastoris*, FEMS Microbiol. Lett. 290: 18-24.

[15] Stockmann, C., Maier, U., Anderlei, T., Knocke, C., Gellissen, G., and Biichs, J., 2003, The oxygen transfer rate as key parameter for the characterization of *Hansenula polymorpha* screening cultures, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 30: 613-622.

[16] 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.

[17] Boyce, A., Casey, A. and Walsh, G., 2004, A phytase enzyme-based biochemistry practical particularly suited to students undertaking courses in biotechnology and environmental science, Biochem. Mol. Biol. Educ. 32: 336-340.

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

[19] HPLC Columns for Carbohydrates, 1997, Sigma-Aldrich Co.

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

[21] Chiruvolu, 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.

[22] Li, Z., Xiong, F., Lin, Q., Anojou, M., Daugulis, A.J., Yang, D.S.C. and Hew, C.L., 2001, Low-temperature increase the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*, Protein Expr. Purif. 21: 438-445.

[23] Xu, B., Jahic, M., Blomsten, G., and Enfors, S-O., 1999, Glucose overflow metabolism and mixed-acid fermentation in aerobic large-scale fed-batch process with *Escherichia coli*, Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 564-571.

[24] Inan, M., and Meagher, M.M., 2001, The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*, J. Biosci. Bioeng. 92: 337-341.