การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอนเทอโรไคเนสสายสั้น โดย *Pichia pastoris*

Production of Recombinant Enterokinase Light Chain by *Pichia pastoris*

ศจิกาญจน์ พึ่งบัว

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

ชนิดา กุประดิษฐ์ และมารินา เกตุทัต-คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ตำบลสุรนารี อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000

เทพปัญญา เจริญรัตน์*

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

[2]ห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมักและวิศวกรรมชีวเคมี หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีทรัพยากรชีวภาพ
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ประเทศไทย
ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

บทคัดย่อ

เอนเทอโรไคเนส (EC 3.4.21.9) เป็นเอนไซม์จำพวกเซอรีนโปรติเอสซึ่งทำหน้าที่ตัดพันธะเปปไทด์ทางด้านปลายคาร์บอกซี่ที่ตำแหน่งตัดจำเพาะ $(Asp)_4Lys$ ของโปรตีน จากสมบัติของเอนไซม์ชนิดนี้ที่มีความจำเพาะและมีความเสถียรสูง รวมถึงความสามารถทำงานได้ในช่วงอุณหภูมิและพีเอชที่กว้าง ทำให้มีการนำเอนไซม์ชนิดนี้มาใช้ในงานทางด้านวิศวกรรมโปรตีน ในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อมุ่งเน้นการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอนเทอโรไคเนสสายสั้น (rEK_L) ในรูปที่ผลิตแล้วถูกปลดปล่อยออกนอกเซลล์เจ้าบ้าน โดยใช้เชื้อยีสต์ *Pichia pastoris* สายพันธุ์ Y11430 (pPICZαB_NH8_EK_L) ที่มียีน EK_L แทรกอยู่ในโครโมโซม ซึ่งผู้วิจัยได้ศึกษาอิทธิพลของพีเอช อุณหภูมิ และอัตราการเติมอาหารเมทานอล ที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L ซึ่งพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ rEK_L คือ พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเติมอาหารเมทานอล 16.94 กรัมต่อชั่วโมง โดยหลังจาก 195 ชั่วโมง ของการเพาะเลี้ยง พบว่ามีค่า

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** thep_4@hotmail.com

กิจกรรมของ rEK_L สูงถึง 123.33 หน่วยต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 421.23 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน และสามารถตรวจพบแถบโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 41 ถึง 44 กิโลดาลตันที่คาดว่าเป็นเอนไซม์ rEK_L ในน้ำหมัก

คำสำคัญ : เอนเทอโรไคเนส รีคอมบิแนนท์โปรตีน ฟิวชันโปรตีน *Pichia pastoris*

Abstract

Enterokinase (EC 3.4.21.9) is a serine proteinase that cleaves at the C-terminal of specific sequence $(Asp)_4$Lys of protein. Its high specificity of the recognition site and high stability with a wide range of catalytic pH and temperatures make enterokinase with broad utilities in molecular protein engineering. This work aimed to increase the efficiency of recombinant enterokinase light chain (rEK_L) production in the secretory form by a recombinant strain of the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* Y11430 (pPICZαB_NH8_EKL). The influences of pH, temperature, and methanol medium feed rate in rEK_L production were studied. The results showed that high level of rEK_L production was obtained at pH 6.0 and temperature 30 ºC when 16.94 g/h methanol medium feed rate were applied. After 195 h of the cultivation, 123.33 U/ml rEK_L activity and 421.23 U/$mg_{protein}$ rEK_L specific activity were achieved. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) analysis resulted in protein bands with molecular weight of 41 to 44 kDa that may represent rEK_L.

Keywords: enterokinase, recombinant protein, fusion protein, *Pichia pastoris*

1. บทนำ

เอนไซม์เอนเทอโรไคเนส (Enterokinase; EK) (EC 3.4.21.9) เป็นเอนไซม์ชนิดเซอรีนโปรติเอส มีคุณสมบัติตัดจำเพาะที่ด้านปลายคาร์บอกซี่ภายในโมเลกุลของโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโน $(Asp)_4$Lys เอนไซม์ชนิดนี้มีคุณสมบัติทนต่อความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิในช่วงกว้าง ทำให้เอนไซม์ EK สามารถทำงานได้ในสภาวะที่หลากหลาย ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวจึงมีการนำบางส่วนของเอนไซม์ EK มาใช้ในการตัดฟิวชันโปรตีนที่มีลำดับกรดอะมิโน $(Asp)_4$Lys ในส่วนเชื่อมต่อ (linker) ทำให้เอนไซม์ EK มีบทบาทสำคัญในงานวิจัยด้านวิศวกรรมโปรตีนเป็นอย่างมาก อย่างไรก็ตาม เอนไซม์ EK ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดส่วนใหญ่ผลิตจากลำไส้สุกรและโค ซึ่งแหล่งวัตถุดิบดังกล่าวมีเอนไซม์โปรติเอสชนิดอื่นปนเปื้อนอยู่ด้วยจึงยากต่อการทำให้บริสุทธิ์ ส่งผลให้เอนไซม์ EK มีราคาแพง [1] จากปัญหาที่เกิดขึ้นจึงมีความพยายามที่จะผลิตเอนไซม์ EK ในรูปรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยอาศัยเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการโคลนยีนเฉพาะส่วนที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ ซึ่งคือส่วนของเอนเทอโรไคเนสสายสั้น (EK_L) และทำการถ่ายยีนเฉพาะส่วนของ EK_L เข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีน EK_L ในเซลล์เจ้าบ้านนั้นๆ [1-5] อย่างไรก็ตามการผลิตเอนไซม์ EK_L ในระบบรีคอมบิแนนท์ยังประสบปัญหาเนื่องจากมีการแสดงออกของรีคอม-

บิแนนท์เอนไซม์ในระดับต่ำและต้นทุนในการผลิตสูง ดังนั้น จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนากระบวนการผลิตให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น

จากการที่ประเทศไทยมีการนำเข้าเอนไซม์ EK เพื่อใช้ในงานวิจัยด้านวิศวกรรมโปรตีน กลุ่มนักวิจัยของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีจึงริเริ่มทำการศึกษาการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ EK_L (recombinant enterokinase light chain; rEK_L) โดยมีเป้าหมายเพื่อลดการนำเข้าของเอนไซม์ EK ซึ่งในขั้นต้นได้ทำการโคลนยีนที่ควบคุมการแสดงออกของเอนไซม์ EK_L และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนนี้ในเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสม ทั้งนี้ผู้วิจัยพบว่า *Pichia pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่สามารถผลิตเอนไซม์ rEK_L ที่มีกิจกรรมใกล้เคียงกับเอนไซม์ทางการค้า ในขณะที่เมื่อใช้ *Escherichia coli* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตเอนไซม์ rEK_L พบว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้ส่วนใหญ่ไม่มีกิจกรรมจึงไม่สามารถนำมาใช้งานได้ [5]

สำหรับระบบการแสดงออกของยีนโดยยีสต์ *P. pastoris* ที่เลือกใช้เป็นระบบที่มีการควบคุมการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนโดยโปรโมเตอร์ *AOX1* ซึ่งเป็นโปรโมเตอร์ที่มีการรายงานว่ามีประสิทธิภาพสูงเมื่อใช้เมทานอลเป็นสารเหนี่ยวนำ [6] โดยยีสต์ *P. pastoris* ยังสามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งอาหารและพลังงานได้โดยผ่านวิถีการใช้เมทานอล (methanol pathway) [7] ซึ่งระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* นั้น สามารถเลือกให้เกิดการสะสมรีคอมบิแนนท์โปรตีนไว้ในเซลล์หรือปลดปล่อยออกสู่อาหารเลี้ยงเชื้อโดยอาศัยการทำงานของ α-factor [6] นอกจากนี้ยีสต์ *P. pastoris* ยังเพาะเลี้ยงได้ง่าย และสามารถเจริญได้ในอาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) [8]

จากข้อดีของระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* เมื่อนำมาประยุกต์ร่วมกับกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวที่ผ่านการพัฒนาขึ้นเพื่อให้เหมาะสมกับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยโปรโมเตอร์ *AOX1* ทำให้ได้ระบบการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มีประสิทธิภาพสูง [9] อย่างไรก็ตามสภาวะควบคุมในกระบวนการผลิตยังเป็นปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพและปริมาณของรีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นอย่างมาก โดยพบว่าพีเอชและอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความเสถียรของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้ [10] ในขณะที่ปริมาณเมทานอลมีผลต่อการเจริญของยีสต์ *P. pastoris* และการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน [11,12] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* แบบเฟดแบทช์ที่ผ่านการพัฒนาขึ้นโดย Jahic และคณะ (2002) [9] เพื่อศึกษาอิทธิพลของพีเอช อุณหภูมิ และอัตราการเติมเมทานอลต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L เพื่อให้ได้กระบวนการที่เหมาะสมต่อการผลิต

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ *P. pastoris* Y-11430 ที่มียีน EK_L ซึ่งโคลนจากลำไส้โคแทรกอยู่ในโครโมโซม โดยการแสดงออกของยีน EK_L นี้อยู่ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *AOX1* และเมื่อมีการแสดงออกของยีน โปรตีน EK_L ที่ได้จะถูกส่งออกนอกเซลล์โดยการทำงานของ α-factor [5] ซึ่งเชื้อดังกล่าวได้จากโครงการวิจัยร่วมระหว่างมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

2.2 การเตรียมกล้าเชื้อ

การเตรียมกล้าเชื้อแบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ

(1) การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 เริ่มโดยเขี่ยเชื้อรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* Y-11430 จากอาหารวุ้น YPD (yeast extract peptone dextrose; ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 10 กรัม เปปโตน 20 กรัม กลูโคส 20 กรัม และผงวุ้น 15 กรัม) ซึ่งมีสารปฏิชีวนะซีโอซิน (zeocin) เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 1 ลูป ลงในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว YPD ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และสารปฏิชีวนะซีโอซิน ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์ ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโม

(2) การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 2 ทำโดยถ่ายกล้าเชื้อขั้นที่ 1 20 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเหลว BMGY (buffered minimal glycerol medium; ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย ยีสต์สกัด 10 กรัม เปปโตน 20 กรัม และกลีเซอรอล 10 กรัม โดยละลายส่วนประกอบทั้งหมดในสารละลายโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จำนวน 2 ฟลาสก์ ทำการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะเดียวกันกับการเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1

2.3 การเพาะเลี้ยง *P. pastoris* Y-11430 ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน

การเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนท์ *P. pastoris* Y-11430 ดำเนินการในถังปฏิกรณ์ชีวภาพขนาด 10 ลิตร (Biostat C, Sartorius Stedim Biotech, Germany) ที่มีระบบการทำให้ปลอดเชื้อในตัว (*insitu* sterile) โดยทำการประกอบถังปฏิกรณ์ชีวภาพ และเทียบค่าอิเล็กโทรดต่างๆ ตรวจสอบระบบการทำงานของระบบควบคุม จากนั้นเติมอาหาร GBS (glycerol basal salt medium; ใน 1 ลิตร ประกอบด้วยกลีเซอรอล 40 กรัม H_3PO_4 85 เปอร์เซ็นต์ 26.7 มิลลิลิตร $CaSO_4$ 0.93 กรัม K_2SO_4 18.2 กรัม $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 14.9 กรัม และ KOH 4.13 กรัม) ปริมาตร 4 ลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ แล้วทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่ออุณหภูมิลดลง เติมสารละลาย PTM1 (*Pichia* trace metals 1; ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ 6.0 กรัม KI 0.08 กรัม $MnSO_4{\cdot}H_2O$ 3.0 กรัม $Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$ 0.2 กรัม H_3BO_3 0.02 กรัม $ZnCl_2$ 20.0 กรัม $FeCl_3$ 13.7 กรัม $CoCl_2{\cdot}6H_2O$ 0.9 กรัม H_2SO_4 5.0 มิลลิลิตร และ biotin 0.2 กรัม) ปริมาตร 4.35 มิลลิลิตรต่อลิตร

เริ่มดำเนินการเพาะเลี้ยงโดยถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 200 มิลลิลิตร ลงในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้ระบบการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ของ Jahic และคณะ (2002) [9] ซึ่งแบ่งการเพาะเลี้ยงออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้

<u>ระยะที่ 1</u> : การเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จโดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ในระยะนี้ควบคุมอัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 โดยใช้สารละลายแอมโมเนีย 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นด่างในการควบคุมพีเอชและใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งใช้เวลาประมาณ 20-24 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างทุก 4-6 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และน้ำหนักเซลล์แห้ง

<u>ระยะที่ 2</u> : การเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวโดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเติมอาหาร GF (glycerol feed medium: ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย

กลีเซอรอล 500 กรัม และ PTM1 12 มิลลิลิตร) ด้วยอัตราการเติมเพิ่มขึ้นแบบเอ็กโพเนนเชียล ดังสมการที่ 1

$$F_{(t)} = \frac{\mu x_0 V_0 e^{\mu t}}{(s_i - s) Y_{\frac{x}{s}}} \qquad \text{(สมการที่ 1)}$$

เมื่อ F(t) คือ อัตราการเติมอาหารที่เวลา t ใดๆ (ลิตรต่อชั่วโมง)

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ ในการทดลองนี้ใช้ค่า 0.18 ต่อชั่วโมง ซึ่งเป็นค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ

X_0 คือ ความเข้มข้นของเซลล์เมื่อเริ่มต้นการเติม (24 กรัมเซลล์ต่อลิตร)

V_0 คือ ปริมาตรของน้ำหมักเมื่อเริ่มต้นการเติม (4.0 ลิตร)

S_i คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหาร GF (500 กรัมต่อลิตร)

S คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลในน้ำหมักเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จและเริ่มต้นการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว ซึ่งที่เวลาดังกล่าวกลีเซอรอลในน้ำหมักถูกใช้จนหมดไป ดังนั้น ค่า S จึงมีค่าเท่ากับ 0 กรัมต่อลิตร

$Y_{X/S}$ คือ ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรต (0.7 กรัมเซลล์ต่อกรัมกลีเซอรอล)

ซึ่งสภาวะเพาะเลี้ยงที่ใช้ในระยะนี้ คือ ใช้อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อลิตรต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พีเอช 5.0 เพาะเลี้ยงเป็นเวลาประมาณ 3.5 ชั่วโมง และทำการเก็บตัวอย่างเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดระยะ เพื่อวิเคราะห์ความขุ่นของเซลล์ และน้ำหนักเซลล์แห้ง

<u>ระยะที่ 3</u> : การเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *AOX1* โดยใช้ความเข้มข้นของเมทานอลในระดับต่ำ ทำการเติมอาหาร MF (methanol feed medium; PTM1 12 มิลลิลิตร ในเมทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ 1 ลิตร) แบบเป็นครั้งคราว (intermittent feed) เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเมทานอลในน้ำหมักประมาณ 1 กรัมต่อลิตร เป็นเวลาประมาณ 3 ชั่วโมง ดังตารางที่ 1 ควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงโดยใช้อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อลิตรต่อนาที และแปรผันค่าพีเอชและอุณหภูมิ ดังรายละเอียดตามหัวข้อ 2.4 และ 2.5 ตามลำดับ ในระยะนี้ทำการเก็บตัวอย่างเมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดระยะ เพื่อวิเคราะห์ความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของเมทานอลและกิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L

ตารางที่ 1 ระยะเวลาและปริมาตรในการเติมอาหาร MF (methanol feed) ในระยะที่ 3 ของการเพาะเลี้ยง

ระยะเวลาการเหนี่ยวนำ (ชั่วโมง)	ปริมาณอาหาร MF (กรัม)	ปริมาตรอาหาร MF (มิลลิลิตร)
0	4.0	4.8
1.5	4.0	4.8
2.5	4.0	4.8
3.0	4.0	4.8

หมายเหตุ : ความหนาแน่นของเมทานอล 99.9 เปอร์เซ็นต์ คือ 0.79 กรัมต่อมิลลิลิตร

<u>ระยะที่ 4</u> : การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและเป็นตัวเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของยีนภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ *AOX1* โดยใช้รูปแบบการ

เติมอาหาร MF แบบต่อเนื่อง (continuous feed) ด้วยอัตราการเติมคงที่ เพื่อให้เชื้อผลิตและปลดปล่อยเอนไซม์ rEK_L ออกสู่น้ำหมัก สภาวะการเพาะเลี้ยงในระยะนี้ควบคุมโดยใช้อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อลิตรต่อนาที ซึ่งการเพาะเลี้ยงในระยะนี้ ผู้วิจัยทำการแปรผันค่าพีเอช อุณหภูมิ และอัตราการเติมอาหาร MF ที่ใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์ rEK_L ดังรายละเอียดตามหัวข้อ 2.4 2.5 และ 2.6 ตามลำดับ ในระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 72-120 ชั่วโมง โดยระหว่างการเพาะเลี้ยงได้ทำการเก็บตัวอย่างทุก 8-12 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ความขุ่นของเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของเมทานอล ความเข้มข้นของโปรตีน และกิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L

2.4 การศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L

การศึกษาในส่วนนี้ดำเนินการโดยแปรผันค่าพีเอชที่ใช้ในระยะการผลิตเอนไซม์ rEK_L (ระยะที่ 3 และ 4) ให้เท่ากับ 5.0 6.0 และ 7.0 เพื่อศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L เป็นหลัก โดยควบคุมสภาวะอื่นๆ ให้คงที่ คือ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อลิตรต่อนาที และอัตราการเติมอาหาร MF ประมาณ 7.8 กรัมต่อชั่วโมง

2.5 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L

การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L ทำการศึกษาที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส ในระยะที่ 3 และ 4 ของการเพาะเลี้ยง ซึ่งควบคุมสภาวะอื่นๆ ในการเพาะเลี้ยงให้คงที่ คือ อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อลิตรต่อนาที และอัตราการเติมอาหาร MF ประมาณ 7.8 กรัมต่อชั่วโมง และควบคุมค่าพีเอชให้เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L ซึ่งอาศัยข้อมูลที่ได้จากผลของการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L ดังที่กล่าวในหัวข้อ 2.4

2.6 การศึกษาอิทธิพลของอัตราการเติมอาหารเมทานอลต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L

เมื่อทราบค่าพีเอชและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L แล้ว จึงทำการศึกษาอิทธิพลของอัตราการเติมอาหาร MF ต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L โดยแปรผันอัตราการเติมอาหาร MF ในระยะที่ 4 ของการเพาะเลี้ยงให้มีค่าลดลงและเพิ่มขึ้นจากค่าที่ใช้ในการศึกษาอิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิ ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.87, 10.32, 16.94 และ 27.32 กรัมต่อชั่วโมง ในขณะที่ควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงอื่นๆ ให้คงที่ คือ อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1.0 ลิตรต่อลิตรต่อนาที และควบคุมค่าพีเอชและอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงให้เหมาะสมต่อการผลิต rEK_L โดยอาศัยผลจากข้อมูลที่ได้จากการศึกษาอิทธิพลของพีเอชและอุณหภูมิต่อการผลิต rEK_L ดังที่กล่าวในหัวข้อ 2.4 และ 2.5 ตามลำดับ

2.7 วิธีการวิเคราะห์

2.7.1 ความหนาแน่นของเซลล์และน้ำหนักเซลล์แห้ง

ความหนาแน่นของเซลล์หาโดยนำตัวอย่างมาวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร น้ำหนักเซลล์แห้งหาโดยชั่งน้ำหนักแห้งของเซลล์ที่ได้จากการนำตัวอย่างน้ำหมักมาทำการเหวี่ยงแยก ล้างตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย H_3PO_4 ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ เพื่อกำจัดเกลือ และล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง จากนั้นนำไป

อบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นในตู้ดูดความชื้น

2.7.2 ความเข้มข้นของเมทานอล

นำน้ำหมักส่วนใสมาทำการเจือจางให้เหมาะสมแล้ววิเคราะห์ความเข้มข้นของเมทานอลด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตรกราฟี (gas chromatography, PerkinElmer, USA) โดยใช้เมทานอลเป็นสารมาตรฐานและใช้ไอโซโพรพานอลเป็น internal standard [18]

2.7.3 กิจกรรมของ rEK_L

นำน้ำหมักส่วนใสมาเจือจางให้เหมาะสม จากนั้นวิเคราะห์กิจกรรมของ rEK_L โดยวัดอัตราการเร่งปฏิกิริยาการปลดปล่อย β-napthylamide จากโมเลกุลของ Gly-$(Asp)_4$-Lys-β-napthylamide ด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (spectrofluorometer, FP6200, JASCO, Japan) ที่ค่า excitation 337 นาโนเมตรและ emission 420 นาโนเมตร โดยใช้ β-napthylamide เป็นสารมาตรฐาน [5] โดยกำหนดให้ 1 หน่วย ของ rEK_L มีค่าเท่ากับปริมาณเอนไซม์ที่สามารถปลดปล่อย β-naphthylamide 1 นาโนโมล ภายในเวลา 1 นาที

2.7.4 ปริมาณโปรตีนละลายทั้งหมด

นำน้ำหมักส่วนใสมาทำการเจือจางให้เหมาะสม จากนั้นวิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีนละลายทั้งหมดโดยวิธีของ Bradford [6] โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็นสารมาตรฐาน

2.7.5 น้ำหนักโมเลกุลและความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์โปรตีนในน้ำหมัก

ประมาณค่าด้วยการแยกโปรตีนในโซเดียมโดดีซิลซัลเฟตพอลิอะคริลาไมด์เจลอิเล็กโทรฟอรีซีส (sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis; SDS-PAGE) ด้วยเครื่องพอลิอะคริลาไมด์ มินิโปรตีน III (polyacrylamide, Mini-Protein III, Biorad, USA) (Leammli, 1970) [19] โดยใช้โปรตีนมาตรฐานที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 11 ถึง 170 กิโลดาลตัน (protein marker, #SMO671, Fermentas, Life science) ในการเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุล

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

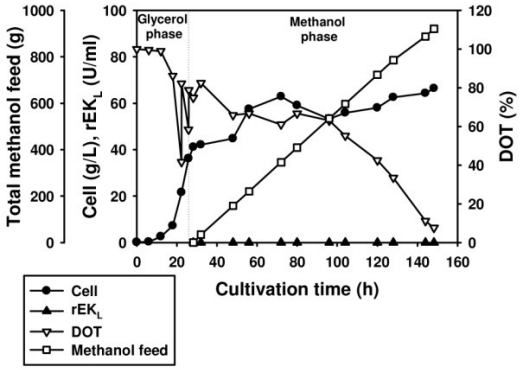
3.1 การเจริญของ *P. pastoris* ในระยะที่เพาะเลี้ยงโดยใช้กลีเซอรอลเป็นสับสเทรต

ระบบการเพาะเลี้ยงที่ใช้ในงานวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังได้อธิบายในหัวข้อที่ 2.3 ทั้งนี้เนื่องจากงานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L ในระยะที่ใช้เมทานอลเป็นสับสเทรต (methanol phase; ระยะที่ 3 และระยะที่ 4) ดังนั้น การดำเนินการเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์โดยใช้กลีเซอรอลเป็นสับสเทรตในระยะที่ 1 และระยะที่ 2 (glycerol phase) ของการหมักทุกครั้งจึงควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงให้อยู่ภายใต้สภาวะเดียวกัน คือ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรต่อนาที และควบคุมค่าพีเอชที่ 5.0 โดยระยะที่ 1 : มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ โดยยีสต์จะใช้กลีเซอรอลที่มีในอาหารจนหมดเพื่อการเจริญ เมื่อกลีเซอรอลหมดค่าออกซิเจนละลาย (DOT; dissolved oxygen tension) ในน้ำหมักจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเนื่องจากเชื้อไม่ใช้ออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึม เมื่อสิ้นสุดระยะนี้จะได้ ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 24 กรัมต่อลิตร และระยะที่ 2 : มีวัตถุประสงค์เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์และลดสภาวะยับยั้งการแสดงออกของยีน (derepression)

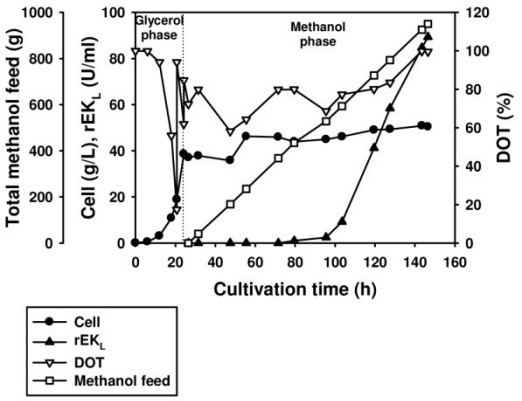
จากโปรโมเตอร์ *AOX1* โดยเติมกลีเซอรอลอย่างต่อเนื่องด้วยอัตราการเติมเพิ่มขึ้นแบบเอ็กโพเนนเชียล จากสภาวะการเพาะเลี้ยงในระยะนี้ เชื้อจะได้รับสับสเทรตอย่างต่อเนื่อง อย่างไรก็ตาม ความเข้มข้นของสับสเทรตในน้ำหมักจะมีค่าต่ำมาก ซึ่งการศึกษาก่อนหน้าโดย Jahic และคณะ (2002) [9] พบว่าในสภาวะที่ความเข้มข้นของสับสเทรตต่ำ (กลีเซอรอล) จะลดสภาวะยับยั้งการแสดงออกของยีนของโปรโมเตอร์ *AOX1* ซึ่งผลการทดลองพบว่าปริมาณเซลล์ที่ได้อยู่ในช่วง 36-39 กรัมต่อลิตร และระยะเวลาที่ใช้ในระยะนี้ ประมาณ 3.5 ชั่วโมง ซึ่งเป็นค่าที่ใกล้เคียงกันในการหมักทุกครั้ง ดังแสดงในระยะที่ใช้กลีเซอรอลเป็นสับสเทรตของรูปที่ 1 ถึง รูปที่ 3 ซึ่งค่าที่ได้ดังกล่าวนี้ เป็นค่าที่ใกล้เคียงกับค่าที่ใช้ในระยะเริ่มการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลในงานวิจัยของ Jahic และคณะ (2002) [9]

3.2 อิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L

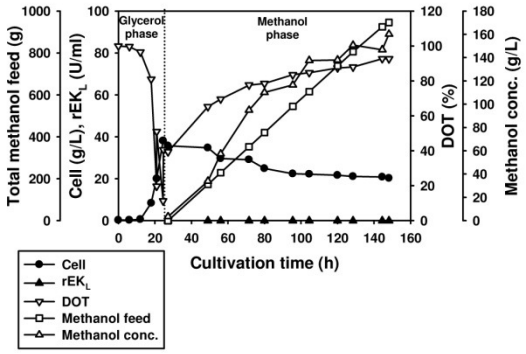
มีงานวิจัยซึ่งศึกษาและรายงานก่อนหน้านี้ว่าพีเอชเป็นตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อความเสถียรของผลผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนและกิจกรรมของโปรติเอสในน้ำหมักเป็นอย่างมาก [10,13,14] การเปลี่ยนค่าพีเอชจาก 5.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อยีสต์ [15] มาเป็นค่าพีเอชอื่นที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนชนิดนั้นๆ เป็นเทคนิคที่มีการใช้กันมากเพื่อหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน [14,16, 17] ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L ที่พีเอช 5.0, 6.0 และ 7.0 ในระยะการผลิตเอนไซม์ rEK_L ซึ่งปริมาณเมทานอลทั้งหมดที่เติมและอัตราการเติมเมทานอลที่ใช้ในทุกการทดลองมีการควบคุมให้มีค่าใกล้เคียงกัน คือ ประมาณ 940 กรัม และ 7.8 กรัมต่อชั่วโมง ตามลำดับ ดังแสดงในช่วงที่ใช้เมทานอลเป็นสับสเทรตของรูปที่ 1-3 และเมื่อพิจารณาค่า DOT พบว่าการทดลองที่พีเอช 5.0 ค่า DOT ลดลงอย่างต่อเนื่องจนสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง (148 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง) ซึ่งมีค่าต่ำกว่า 20 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การทดลองที่พีเอช 6.0 ค่า DOT มีค่าขึ้นลงในช่วง 60-95 เปอร์เซ็นต์ และการทดลองที่พีเอช 7.0 ค่า DOT เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีค่าสูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์



รูปที่ 1 การเพาะเลี้ยง *P. pastoris* เพื่อผลิตเอนไซม์ rEK_L ที่พีเอช 5.0 (ไม่พบการสะสมเมทานอลในน้ำหมัก)



รูปที่ 2 การเพาะเลี้ยง *P. pastoris* เพื่อผลิตเอนไซม์ rEK_L ที่พีเอช 6.0 (ไม่พบการสะสมเมทานอลในน้ำหมัก)



รูปที่ 3 การเพาะเลี้ยง *P. pastoris* เพื่อผลิตเอนไซม์ rEK_L ที่พีเอช 7.0 (พบการสะสมของเมทานอลในน้ำหมัก)

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อ พบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจากการทดลองผลิตเอนไซม์ rEK_L ที่พีเอช 5.0 และ 6.0 เพิ่มขึ้นจากประมาณ 40 กรัมต่อลิตร เป็นประมาณ 70 และ 55 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การทดลองที่พีเอช 7.0 มีค่าลดลงเหลือเพียงประมาณ 20 กรัมต่อลิตร โดยเมื่อพิจารณาปริมาณเมทานอลที่สะสมในน้ำหมัก พบว่าการทดลองปรับสภาวะในการผลิตเอนไซม์ rEK_L ที่พีเอช 5.0 และ 6.0 ไม่พบเมทานอลสะสมในน้ำหมักในระยะที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ในขณะที่การทดลองที่พีเอช 7.0 พบการสะสมเมทานอลเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนมีค่าสูงถึง 160.23 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าอัตราการใช้เมทานอลที่พีเอช 7.0 มีค่าน้อยกว่าที่พีเอช 5.0 และ 6.0 จึงเกิดการสะสมจนเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Katakura และคณะ (1998) ซึ่งรายงานว่า เมื่อความเข้มข้นของเมทานอลสูงขึ้นจะทำให้อัตราการเจริญจำเพาะลดลง [12] และรายงานของ Zhang และคณะ (2000) ซึ่งรายงานว่าอัตราการใช้เมทานอลจำเพาะแปรผันโดยตรงกับอัตราการเจริญจำเพาะ [20]

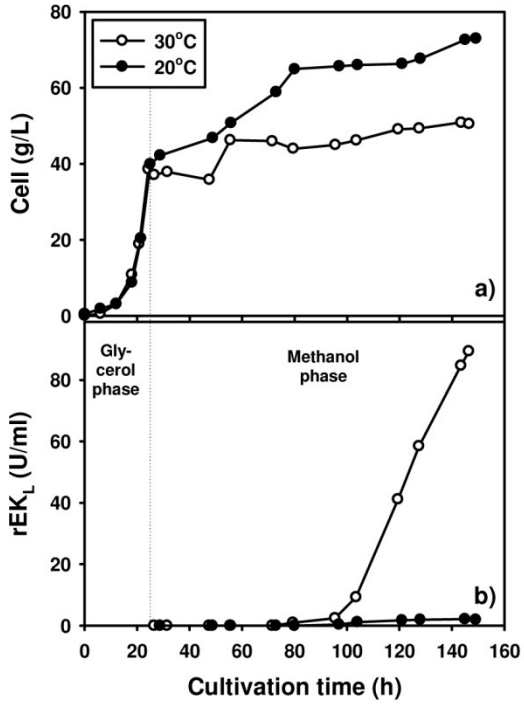
สำหรับผลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L พบว่าการปรับสภาวะในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นพีเอช 7.0 ซึ่งการเจริญของเชื้อลดลง และเป็นพีเอช 5.0 ซึ่งเชื้อเจริญได้ดีที่สุด ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L ได้ในทั้งสองสภาวะ (รูปที่ 1 และ 3) ในขณะที่การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่พีเอช 6.0 ซึ่งเชื้อเจริญน้อยกว่าที่พีเอช 5.0 สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L ได้ ทั้งนี้รูปแบบการเพิ่มขึ้นของกิจกรรม rEK_L ในการทดลองนี้เป็นรูปแบบที่แตกต่างจากการผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ชนิดอื่น ซึ่งโดยทั่วไปจะมีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่เริ่มการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล แต่ในการทดลองนี้เริ่มตรวจพบโปรตีนเป้าหมาย (เอนไซม์ rEK_L) หลังจากที่มีการเติมอาหาร MF ในระยะที่ 4 เป็นเวลาประมาณ 50 ชั่วโมง ในขณะที่ระยะที่ 3 และช่วงเริ่มต้นของระยะที่ 4 ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิต พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L สูงถึง 89.33 หน่วยต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็น 168.4 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน ดังนั้นจากผลการศึกษาอิทธิพลของพีเอชต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L พบว่าพีเอช 6.0 เป็นพีเอชที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L

3.3 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L

จากรายงานโดย Hong และคณะ (2002) และ Li และคณะ (2001) ซึ่งกล่าวว่าอุณหภูมิจะมีผลต่อการเสื่อมสลาย (degradation) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยการลดอุณหภูมิสามารถทำให้อัตราการเกิดโปรติโอไลซิส (proteolysis) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนลดลง เนื่องจากเป็นการลดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส [21,22] รวมถึงรายงานของ Jahic และคณะ (2003) ที่กล่าวว่าการลดอุณหภูมิระหว่าง

กระบวนการผลิตสามารถเพิ่มผลได้ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้ เนื่องจากอัตราการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์โปรติเอสลดลง [23] นอกจากนี้อุณหภูมิยังสัมพันธ์กับค่าการละลายของออกซิเจนในของเหลว โดยเมื่ออุณหภูมิลดลงความสามารถในการละลายของออกซิเจนจะมีค่าสูงขึ้นและอัตราการถ่ายเทออกซิเจนมีความสัมพันธ์กับค่าการละลายของออกซิเจน ดังนั้น เมื่อลดอุณหภูมิของสารละลายลงจึงทำให้ค่าอัตราการถ่ายเทออกซิเจนสูงขึ้นด้วย จากข้อมูลเบื้องต้นในการศึกษาการผลิตเอนไซม์ rEK_L ของ Kupradit และคณะ (2008) พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตมีผลต่อระดับการผลิตและการแสดงออกของเอนไซม์ rEK_L รวมทั้งอุณหภูมิอาจมีผลต่อความเสถียรของโปรตีนด้วย [5] ดังนั้น อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ rEK_L จึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่งานวิจัยนี้ทำการศึกษาในระยะที่ผลิตเอนไซม์ rEK_L แต่ผลจากการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L มีความขัดแย้งกับรายงานดังกล่าว โดยผลจากการเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อ และการผลิตเอนไซม์ rEK_L ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส แสดงดังรูปที่ 4 พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะต่อการเจริญของเชื้อ คือ 20 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิต rEK_L คือ 30 องศาเซลเซียส

เมื่อพิจารณาการเจริญของเชื้อ พบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อที่ใช้อุณหภูมิในการผลิตเอนไซม์ rEK_L ที่ 20 และ 30 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้นจากประมาณ 40 กรัมต่อลิตร เป็นประมาณ 68.73 และ 50.47 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อพิจารณาปริมาณเมทานอลที่สะสมในน้ำหมัก พบว่าการทดลองผลิตเอนไซม์ rEK_L ที่อุณหภูมิ 20 และ 30 องศาเซลเซียส ไม่พบการสะสมของเมทานอลในน้ำหมักในระยะที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าที่สภาวะศึกษาดังกล่าว เชื้อมีความสามารถในการใช้เมทานอลเป็นสับสเทรตได้อย่างสมบูรณ์ โดยอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส มีค่าสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยมีค่า μ เท่ากับ 0.007 ต่อชั่วโมง ในขณะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีค่า μ เท่ากับ 0.005 ต่อชั่วโมง นอกจากนี้ ยังเป็นไปได้ว่าการลดอุณหภูมิในระยะที่มีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เป็นการลดค่าสัมประสิทธิ์การบำรุงรักษาเซลล์ (m) เมื่อค่า m ต่ำ เชื้อจะมีอัตราการใช้สับสเทรตเพื่อการเจริญมากกว่าที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ rEK_L



รูปที่ 4 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อ (a) การเจริญของเชื้อ และ (b) การผลิตเอนไซม์ rEK_L จากการเพาะเลี้ยงยีสต์ *P. pastoris* ที่พี-เอช 6.0 ภายใต้สภาวะศึกษา

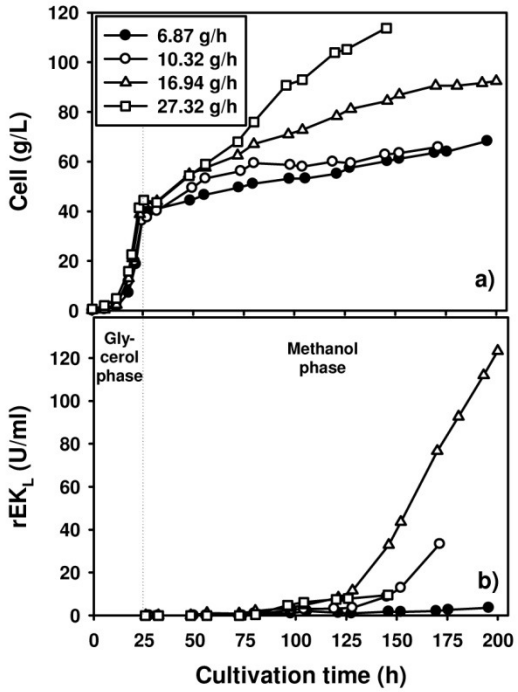
สำหรับผลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L พบว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L ได้เพียง 1.95 หน่วยต่อมิลลิลิตร ในขณะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L สูงถึง 89.33 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งผลการทดลองที่ได้ไม่เป็นไปตามการรายงานเกี่ยวกับอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนดังที่ได้กล่าวไปแล้ว ทั้งนี้ อาจเป็นไปได้ว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อมากกว่าการผลิตเอนไซม์ rEK_L ในขณะที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่ตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L ได้ในระดับที่สูงกว่า จึงเหมาะแก่การนำมาใช้ในการผลิตเอนไซม์ rEK_L ซึ่งอาจอธิบายได้ในแง่ของการแข่งขันกันระหว่างการใช้สับสเทรตเพื่อการเจริญและการใช้สับสเทรตเพื่อการสร้างผลิตผลัณฑ์ นอกจากนี้ การควบคุมกระบวนการผลิตที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ยังสามารถทำได้ง่ายกว่าและสิ้นเปลืองพลังงานในการหล่อเย็นระบบน้อยกว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียสอีกด้วย ดังนั้น จากผลการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L พบว่าอุณหภูมิที่มีความเหมาะสมในการผลิต rEK_L ในระยะเมทานอล (ระยะที่ 3 และระยะที่ 4) คือ 30 องศาเซลเซียส

3.4 อิทธิพลของอัตราการเติมอาหาร MF ต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L

เมื่อทราบค่าพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L แล้ว จึงทำการศึกษาอิทธิพลของอัตราการเติมอาหาร MF ต่อการผลิตเอนไซม์ rEK_L เนื่องจากปริมาณเมทานอลที่เติมลงในระบบมีผลต่อการเจริญของยีสต์ และการผลิตเอนไซม์ rEK_L โดยเมื่อความเข้มข้นของเมทานอลในน้ำหมักมีค่าสูงจะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ปริมาณเมทานอลที่ต่ำเกินไปอาจไม่เพียงพอต่อการเจริญและการเหนี่ยวนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดย งานวิจัยนี้ทำการแปรผันอัตราการเติมอาหาร MF ในระยะที่ 4 ให้มีค่าเท่ากับ 6.87, 10.32, 16.94 และ 27.32 กรัมต่อชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพีเอช 6 พบว่าที่ทุกอัตราการเติม ค่า DOT อยู่ในระดับที่ไม่จำกัด และไม่สามารถตรวจพบเมทานอลในน้ำหมัก (ไม่ได้แสดงผล) ทั้งนี้จากการที่เมทานอลที่เติมลงไปในถังหมักถูกใช้จนหมดในทันที จึงอาจกล่าวได้ว่าอัตราการใช้เมทานอลมีค่าใกล้เคียงกับอัตราการเติมเมทานอล ดังนั้น ที่เวลาเดียวผลการทดลองที่แตกต่างกันที่แต่ละอัตราการเติมจึงเป็นผลเนื่องจากอิทธิพลของอัตราการใช้เมทานอลหรืออัตราการเติมเมทานอลโดยตรง อย่างไรก็ตาม ที่แต่ละอัตราการเติมเมทานอลใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงไม่เท่ากัน โดยที่อัตราการเติมเมทานอล 6. 87 และ 16.94 กรัมต่อชั่วโมง ใช้ระยะเวลาการเพาะเลี้ยงใกล้เคียงกันประมาณ 195 ชั่วโมง แต่ที่อัตราการเติมเมทานอล 10.32 กรัมต่อชั่วโมง เกิดกระแสไฟฟ้าขัดข้องที่เวลา 171 ชั่วโมง จึงต้องหยุดการเพาะเลี้ยง และที่อัตราการเติมเมทานอล 27.32 กรัมต่อชั่วโมง ปริมาตรของน้ำหมักถึงปริมาตรสูงสุดที่ดำเนินการได้ที่เวลา 145 ชั่วโมง จึงต้องหยุดการเพาะเลี้ยง

โดยพบว่าค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยงที่อัตราการเติมอาหาร MF ที่ 6.87, 10.32, 16.94 และ 27.32 กรัมต่อชั่วโมง มีค่าเพิ่มขึ้นจากประมาณ 40 กรัมต่อลิตร เป็น 68.27, 65.87, 92.42 และ 113.8 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ [รูปที่ 5(a)] และเมื่อพิจารณาที่ระยะเวลาเดียวกันพบว่าการเติมอาหาร MF ด้วยอัตราที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้การเจริญของเชื้อ

สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานที่กล่าวว่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้เมทานอลกับอัตราการเจริญเป็นความสัมพันธ์เชิงเส้นตรง โดยอัตราการเจริญจะเพิ่มขึ้นตามอัตราการใช้เมทานอล [20]

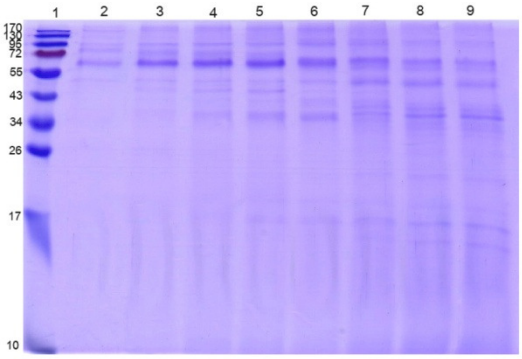


รูปที่ 5 อิทธิพลของอัตราการเติมอาหาร MF ต่อ (a) การเจริญของเชื้อ และ (b) การผลิตเอนไซม์ rEK$_L$

สำหรับผลของอัตราการเติมอาหาร MF ต่อการผลิตเอนไซม์ rEK$_L$ พบว่าเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงของการทดลองที่เติมอาหาร MF ในอัตรา 6.87, 10.32, 16.94 และ 27.32 กรัมต่อชั่วโมง สามารถตรวจพบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ rEK$_L$ ได้ 3.63, 33.33, 123.33 และ 9.53 หน่วยต่อมิลลิตร ตามลำดับ [รูปที่ 5 (b)] ผลจากการศึกษาพบว่าในการเติมอาหาร MF ด้วยอัตราที่เพิ่มขึ้นจะส่งผลให้การผลิตเอนไซม์ rEK$_L$ สูงขึ้น โดยที่อัตราการเติมอาหาร MF 6.87 และ 10.32 กรัมต่อชั่วโมง เป็นอัตราการเติมที่ต่ำมากอาจเกิดการจำกัดเมทานอล ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการเจริญที่น้อยมาก ส่วนที่การทดลองที่อัตราการเติม 27.32 กรัมต่อชั่วโมง เป็นอัตราการเติมที่ส่งเสริมให้เชื้อมีการเติบโตดี อย่างไรก็ตาม พบการผลิต rEK$_L$ ได้ในระดับต่ำ ซึ่งยืนยันได้ถึงการเกิดการแข่งขันกันในการใช้สารอาหารและพลังงานระหว่างการเจริญและการสร้างผลิตภัณฑ์ ดังนั้น จากผลการศึกษาผลของอัตราการเติมอาหาร MF ต่อการผลิตเอนไซม์ rEK$_L$ พบว่าอัตราการเติมอาหาร MF ที่มีความเหมาะสมในระยะเมทานอลเพื่อให้เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ rEK$_L$ คือ 16.94 กรัมต่อชั่วโมง

เมื่อตรวจสอบน้ำหนักโมเลกุลและความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ rEK$_L$ ในน้ำหมัก ที่ได้จากกระบวนการที่มีการควบคุมพีเอช 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และอัตราการเติมอาหาร MF 16.94 กรัมต่อชั่วโมง (สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ rEK$_L$) ดังแสดงผลในรูปที่ 6 พบแถบโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 63 กิโลดาลตัน ปรากฏชัดเจนในช่วงแรกของระยะการผลิต และแถบโปรตีนดังกล่าวมีความเข้มลดลงในช่วงท้ายของระยะการผลิต ซึ่งการปรากฏขึ้นและหายไปของโปรตีนดังกล่าวไม่สัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ rEK$_L$ อย่างไรก็ตาม มีการปรากฏของแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุลประมาณ 41-44 กิโลดาลตัน ตั้งแต่ระยะเวลาการผลิตที่ 54.33 ชั่วโมง (ระยะเวลาที่เริ่มตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์ rEK$_L$ ในน้ำหมัก) และแถบโปรตีนดังกล่าวมีความเข้มมากขึ้นจนสิ้นสุดกระบวนการ ซึ่งสอดคล้องกับการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ rEK$_L$ โดยคาดว่าโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลในช่วง 41 ถึง 44 กิโลดาลตัน ที่

ปรากฏขึ้น เป็นเอนไซม์ rEK_L ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ว่าเอนไซม์ rEK_L ในรูปรีคอมบิแนนท์ที่มีการผลิตขึ้นโดยเซลล์เจ้าบ้านในกลุ่มเซลล์ยูคาริโอตมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 41 ถึง 44 กิโลดาลตัน [2,3]



รูปที่ 6 การผลิตเอนไซม์ rEK_L ของยีสต์ *P. pastoris* ที่อัตราการเติมเมทานอล 16.94 กรัมต่อชั่วโมง ภายใต้สภาวะศึกษา แถวที่ 1 คือ น้ำหนักโปรตีนมาตรฐาน (kDa) แถวที่ 2-9 คือ ตัวอย่างที่ระยะเวลาการผลิต 0, 30.33, 54.33, 78.33, 102.33, 126.33, 150.83 และ 174.92 ชั่วโมง ตามลำดับ

4. สรุป

สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ rEK_L ในระยะที่ 3 และ 4 ของกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราวโดย *P. pastoris* คือ พีเอช 6.0 อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการเติม MF 16.94 กรัมต่อชั่วโมง เมื่อใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงรวม 175 ชั่วโมง เชื้อมีการผลิตเอนไซม์ rEK_L ที่มีค่ากิจกรรมสูงถึง 123.33 หน่วยต่อมิลลิลิตร หรือคิดเป็นค่ากิจกรรมเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 421.23 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน โดยคาดว่าเอนไซม์ rEK_L ที่ผลิตได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 41-44 กิโลดาลตัน

5. กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนวิจัย มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ปี 2553) ที่ให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยโครงการนี้ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ส่งเสริมบุคลากรในสังกัดให้ได้ทำงานวิจัย และห้องปฏิบัติการฟลูออเรสเซนต์และยูวีสเปกโตรมิเตอร์ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ในการอนุเคราะห์ให้ใช้เครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ในการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์

6. เอกสารอ้างอิง

[1] Yuan, L.D. and Hua Z.C., 2002, Expression, Purification, and Characterization of a Biologically Active Bovine Enterokinase Catalytic Subunit in *Escherichia coli*, Protein Expr. Purif. 25: 300-304.

[2] Svetina, M., Krasevec, N., Gaberc-Porekar, V. and Komel, R., 2000, Expression of Catalytic Subunit of Bovine Enterokinase in the Filamentous Fungus *Aspergillus niger*., J. Biotechnol. 76: 245-251.

[3] Peng, L., Zhong, X., Ou, J., Zheng, S., Liao, J., Wang, L. and Xu, A., 2004, High-level Secretory Production of Recombinant Bovine Enterokinase Light Chain by *Pichia pastoris*., J. Biotechnol. 108: 185-192.

[4] Kim, H.J., Kim, Y.H., Roh, Y.H., Seong, B.L. and Shin, C.S., 2005, Optimization of Enterokinase Fermentation Using a Recombinant *Saccharomyces cerevisiae*, Process Biochem. 40: 717-722.

[5] Kupradit, C., Charoenrat, T. and Ketudat-Cairns, M., 2008, Recombinant Bovine Enterokinase Light Chain Production by *Pichia pastoris*: Effect of Induction Temperature, Thai J. Biotechnol. 8: 99-105.

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

[7] Egil, T., van Dijken, J.P., Veenuis, M., Harder, W. and Fiechter, A., 1980, Methanol Metabolism in Yeast: Regulation of Synthesis of Catabolic Enzymes, Arch. Microbiol. 124: 115-121.

[8] 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.

[9] Jahic , M., Rotticci-Mulder, J.C., Martinelle, M., Hult, K. and Enfors, S.-O., 2002, Modeling of Growth and Energy Metabolism of *Pichia pastoris* Producing a Fusion Protein, Bioprocess Biosyst. Eng. 24: 385-393.

[10] Jahic, M., Gustavsson, M., Jansen, A.-K., Martinelle, M. and Enfor, S.-O., 2003, Analysis and Control of Proteolysis of a Fusion Protein in *Pichia pastoris* Fed-Batch Processes, J. Biotechnol. 102: 45-53.

[11] 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.

[12] Katakura, Y., Zhang, W., Zhuang, G. and Omasa, T., 1998, Effect of Methanol Concentration on the Production of Human β2-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.

[13] Chiruvolu, V., Cregg, J.M. and Meagher, M.M., 1998, Recombinant Protein Production in an Alcohol Oxidase-Defective Strain of *Pichia pastoris* in Fedbatch Fermentations, Enzyme Microb. Technol. 21: 227-283.

[14] Sreekrishna, K., Brankamp, R.G., Kropp, K.E., Blankenship, D.T., Tsay, J.I., Smith, P.L., Wierschke, J.D., Subramaniam, A. and Birkenberger, L.A., 1997, Strategies for Optimal Synthesis and Secretion of Heterologous Protein in the Methylotrophic Yeast *Pichia pastoris*, Gene 190: 55-62.

[15] Wang, J., Nguyen, V., Glen, J., Henderson, B., Saul, A. and Miler, L.H., 2005, Improved Yield of Recombinant Merozoite Surface Protein 3 (MSP3) from *Pichia pastoris* Using

Chemically Defined Media, Biotech. Bioeng. 90: 838-847.

[16] Clare, J.J., Romanos, M.A., Rayment, F.B., Rowedder, 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.

[17] Inan, M., Chiruvolu, V., Eskridge, K.M., 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 caninum*) Anticoagulant Peptide (AcAP-5) Production by *Pichia pastoris*, Enzyme Microb. Technol. 24: 438-445.

[18] Association of Official Analytical Chemists (AOAC), 1990, Official Method of Analysis. 5th Ed., The Association of Official Agricultural Chemists, Virginia 2: 613.

[19] Laemmli, U.K., 1970, Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, Nature 227: 680-685.

[20] Zhang, W., Li, Z.J. and Agblevor, F.A., 2005, Microbubble Fermentation of Recombinant *Pichia pastoris* for Human Serum Albumin Production, Process Biochem. 40: 2073-2078.

[21] 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.

[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] Jahic, M., Wallberg, F., Bollok, M., Garcia, P. and Enfor, S.-O., 2003, Temperature Limited Fed-Batch Technique for Control of Proteolysis in *Pichia pastoris* Bioreactor Cultures, Microb. Cell Fact. 2 (6): 1-11.