รหัสโครงการ SUT3-304-44-24-16

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแสดงออกและการผลิตเบต้ากลูโคสิเดส โดย *Pichia pastoris*

Expression and Purification of β-Glucosidase in *Pichia pastoris*

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาริน่า เกตุทัต-คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000

ผู้ร่วมวิจัย

นายเทพปัญญา เจริญรัตน์

นายเดชสิทธิ์ ชำนาญศิลป์

นายอนันตศักดิ์ อุนจันทา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2544-2545

ตุลาคม 2548

บทคัดย่อ

เบต้ากลูโคสิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญซึ่งสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตต่างๆ เอนไซม์นี้มีความสามารถในการย่อยหมู่อัลคิล และอาลิล ของเบต้ากลูโคไซด์ ไดกลูโคไซด์ และโอลิโกกลูโค-ไซด์ เป็นต้น จากคุณสมบัติดังกล่าว เอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสจึงได้รับการพัฒนามาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมต่างๆ หลายประเภท เช่น อุตสาหกรรมการผลิตน้ำตาล การผลิตเครื่องดื่ม และอุตสาหกรรมอาหารสัตว์ อย่างไรก็ตามในกระบวนการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสปริมาณมากยังคงมีอุปสรรคหลายประการที่ส่งผลให้กระบวนการดังกล่าวยังคงต้องการการพัฒนา ในการทดลองนี้คณะผู้วิจัยมุ่งเน้นการพัฒนาการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสจากพืชโดยใช้ยีสต์ *Piachia pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านและทำหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ดังกล่าว เนื่องจากยีสต์ *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านที่มีความสามารถสูงในการแสดงออกของยีนที่ถูกถ่ายฝาก โดยในการทดลองนี้ ขั้นต้นทำการตัดต่อ *β-glucosidase* cDNA จากต้นพยุง (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) ลงในพลาสมิด pPICzαB ณ ตำแหน่งที่ถูกควบคุมการแสดงออกโดย *aox1* promoter จากนั้นจึงทำการส่งถ่ายพลาสมิดที่ได้เข้าสู่จีโนมของ *P. pastoris* Y-11430 รีคอมบิแนนท์เซลล์ *P. pastoris* ที่ได้ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสสูงที่สุดถูกนำมาใช้สำหรับการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดส ด้วยกระบวนการหมักแบบเติมสารอาหาร (Fed-batch fermentation) ที่มีการควบคุมอัตราการเติมเมทานอลแบบ DOT stat เมื่อสิ้นสุดการหมัก (150 ชั่วโมง) สามารถเก็บเกี่ยวน้ำหมักได้ 5.7 ลิตร โดยน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า135 กรัมต่อลิตร, ความเข้มข้นของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสเท่ากับ 5113 หน่วยต่อลิตร และปริมาณโปรตีนทั้งหมดมีค่าประมาณ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปริมาณเมธานอลที่เติมเข้าไปในถังหมักทั้งหมดเท่ากับ 2600 กรัม จากกระบวนการหมักนี้ทำให้ได้ผลผลิตของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสทั้งหมดเท่ากับ 29,144 หน่วย จากนั้นน้ำหมักที่ได้ถูกนำมาใช้ในการศึกษาการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการโคร-มาโทกราฟีแบบ expanded bed พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับเบต้ากลูโคสิเดส โดย Streamline SP resin คือพีเอช 4.0 และค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย (conductivity) ประมาณ 5.0 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อการปลดปล่อยเบต้ากลูโคสิเดสจาก Streamline SP resin คือ พีเอช 5.0 และค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายประมาณ 24.7 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ข้อมูลที่ได้ถูกนำมาใช้ในการออกแบบกระบวนการทำให้เอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสบริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบ expanded bed สำหรับผลผลิตของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสที่ได้มีค่าประมาณ 48% ซึ่งมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 8.8 เท่า และความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.1 เท่า

Abstract

β-glucosidase is an important enzyme produce in most organisms. β-glucosidase catalyzes the hydrolysis of alkyl- and aryl-β-glucosides, diglucosides and oligoglucosides. These functions have important applications in industrial production such as sugar, brewery and feed respectively. However, high level of protein production is still not simple. In this research, we expressed plant β-glucosidase in *Pichia pastoris* which is an excellent system for recombimamt protein production. *P. pastoris* is an excellent host for high level heterologous gene expression. The recombinant *P. pastoris* was engineered by cloning *β-glucosidase* cDNA from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre (Thai Rosewood) into plasmid pPICzaB thrombin under the control of *AOX1* promoter then integrate to *P. pastoris* Y-11430 genome. The highest β-glucosidase expression clone was used in fed-batch fermentation with DOT stat control. At the end of the process (150 h), about 5.7 L of culture broth was recovered with 135 g L^{-1} DW, 5,113 U L^{-1} of β-glucosidase and 700 mg L^{-1} of total protein. About 2,600 g of methanol was used and 29,144 U of β-glucosidase accumulated. Then, the culture broth was used to study the purification process of β-glucosidase by expanded bed chromatography. At pH 4.0 and conductivity about 5.0 mS cm^{-1} is an optimum binding condition and at pH 5.0 and conductivity 24.7 mS cm^{-1} is an optimum elution condition of β-glucosidase by Streamline SP resin. Based on these optimum conditions, the expanded bed process was designed to purify β-glucosidase from *P. pastoris* culture broth. About 48% of β-glucosidase was recovered with 8.8 times concentrated and 2.1 times purified.