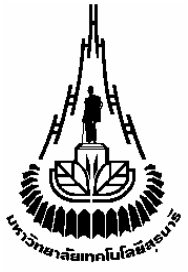
รหัสโครงการ SUT 3-304-53-12-34



รายงานการวิจัย

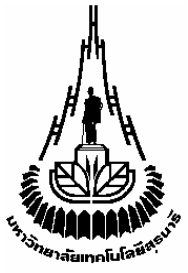
การประยุกต์ใช้ระบบอิเลคโตรดิอิออนไนซ์เซชั่นในการแยกโปรตีนเอ็นเทอโรไคเนสจากน้ำหมัก

(Separation of enterokinase from fermentation broth using electrodeionization)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT 3-304-53-12-34



รายงานการวิจัย

การประยุกต์ใช้ระบบอิเลคโตรดิอิออนไนซ์เซชั่นในการแยกโปรตีนเอ็นเทอโรไคเนสจากน้ำหมัก

(Separation of enterokinase from fermentation broth using electrodeionization)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ บุญทาวัน

ผู้ร่วมวิจัย รองศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ พ.ศ. 2553

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มิถุนายน 2555

กิตติกรรมประกาศ

การประยุกต์ใช้ระบบอิเลคโตรดิอิออนไนซ์เซชั่นในการแยกโปรตีนเอ็นเทอโรไคเนสจากน้ำหมัก ในการศึกษานี้ได้ ทำการวิจัยที่ห้องปฏิบัติการวิศวกรรมกระบวนการทางชีวภาพ อาคารปฏิบัติการ 3 และ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์ สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำส่วนของงานการทำบริสุทธิ์เอนไซม์และเอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทพปัญญา เจริญรัตน์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ได้ให้คำปรึกษาและแนะนำงานในส่วนกระบวนการหมักเพื่อผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอ็นเทอโรไคเนส

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2553

คณะผู้วิจัย

มิถุนายน 2555

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อภาษาไทย

ในปัจจุบัน เอ็นเทอโรไคเนสได้กลายเป็นเครื่องมือที่สำคัญสำหรับการตัดฟิวชั่นรีคอมบิแนนท์โปรตีนในหลอดทดลองเนื่องจากมีความจำเพาะเจาะจงสูงต่อตำแหน่งตัดจำเพาะ ($(Asp)_4$–Lys) และ มีความคงทนต่อสภาวะในการทำปฏิกิริยาที่หลากหลาย ในการทดลองนี้ ได้ทำการผลิตเอ็นไซม์รีคอมบิแนนท์เอ็นเทอร์โรไคเนสสายสั้น (rEK_L) โดยเชื้อ *Pichia pastoris* Y11430 จากการทดลองกระบวนการหมักแบบกึ่งกะอย่างง่าย พบว่าสามารถประสบความสำเร็จในการเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูง โดยมีการควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะคงที่ ที่แตกต่างกันดังนี้คือ 0.006, 0.0075, และ 0.0105 ต่อชั่วโมง ซึ่งค่าเหล่านี้ได้ถูกเลือกนำมาใช้การให้อาหารที่มีเมทานอลเป็นส่วนประกอบ (อาหาร MF) แบบเอ็กโปเนนเชียลในช่วงของการผลิตด้วยเมทานอล ที่อัตราการเจริญจำเพาะคงที่ 0.0075 ต่อชั่วโมง พบว่าความหนาแน่นของเซลล์สูงสุด 128 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นโดยรวมของโปรตีน343.19 มิลลิกรัมต่อลิตร และ กิจกรรมของเอ็นไซม์อยู่ที่ 38,125 หน่วยต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ เมื่อทำการเปรียบเทียบกับค่าอัตราการเจริญจำเพาะคงที่ 0.0105 ต่อชั่วโมง พบว่าเกิดการยับยั้งอย่างรุนแรงต่อการเจริญของเซลล์และมีการผลิตผลิตภัณฑ์ที่ต่ำ เนื่องจากการใช้อัตราการป้อนเมทานอลที่สูงเกิดไป สำหรับการป้อนที่อัตราการเจริญจำเพาะคงที่ 0.006 ต่อชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของเซลล์มีค่าต่ำสุด เนื่องจากอัตราการป้อนที่ต่ำที่สุดนั่นเอง ถึงแม้ว่าอัตราการเจริญจำเพาะคงที่ที่ 0.006 ต่อชั่วโมง จะไม่ทำให้การสะสมของรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอร์โรไคเนส สูงสุด แต่ทำให้การแสดงออกจำเพาะของเอ็นไซม์มีค่าสูงสุดที่ 389,326 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีน เมื่อเปรียบเทียบกับ 122,975 หน่วยต่อมิลลิกรัมโปรตีนที่อัตราการเจริญจำเพาะคงที่ 0.0075 ต่อชั่วโมง หลังจากผ่านชั่วโมงที่ 117 ของเวลาชักนำให้เกิดการแสดงออกของเอ็นไซม์ นอกจากนี้ การเพิ่มขึ้นของเวลาชักนำจนถึงชั่วโมงที่ 117 สำหรับค่าอัตราการเจริญจำเพาะคงที่ของทั้ง 0.006 และ 0.0075 ต่อชั่วโมง ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นโดยรวมของโปรตีน การสะสมของเอ็นไซม์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการแสดงออกจำเพาะของเอ็นไซม์ รีคอมบิแนนท์เอ็นเทอร์โรไคเนสสายสั้น ซึ่งเป็นค่าที่สูงกว่ารายงานการวิจัยก่อนหน้า เป็นอย่างมาก

ได้มีการทำบริสุทธิ์เอ็นไซม์รีคอมบิแนนท์เอ็นเทอร์โรไคเนสสายสั้น โดยใช้เทคนิคอิเลคโตรดิไอออไนเซชั่น (EDI) แต่จากผลการทดลองไม่สามารถแยกเอ็นไซม์ดังกล่าวออกจากน้ำหมักได้ จึงนำตัวอย่างผ่านโครมาโตกร๊าฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุลบ (SP-FF คอลัมน์) ซึ่งผลการทดลองพบว่า ได้ปริมาณของเอ็นไซม์รีคอมบิแนนท์เอ็นเทอร์โรไคเนสสายสั้นบริสุทธิ์จำนวน 3,542 ไมโครกรัม จาก

ของเหลวใส 330 มิลลิลิตรที่ได้จากอัตราการเจริญจำเพาะที่ 0.0075 ต่อชั่วโมง นอกจากนี้ รีคอมบิแนนท์ฟิวชันโปรตีน Os1BGlu4-Trx จากข้าวได้ถูกตัดจนเกือบสมบูรณ์โดยใช้เอ็นไซม์ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์นี้

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ

Recently, enterokinase has become a useful tool for an *in vitro* digestion of recombinant fusion protein because of its high specificity for the recognition sequences $(Asp)_4$–Lys, and its tolerance to a wide range of reaction conditions. In this work, a high activity recombinant enterokinase light chain (rEK_L) was produced by *Pichia pastoris* Y11430. With a simple fed-batch technique, high cell density cultivation was successfully achieved. Different constant specific growth rates (μ_{set}) at 0.006, 0.0075, and 0.0105 hr^{-1} were chosen to pre-determine the exponential feeding strategy of methanol feed medium (MF medium) during the methanol production phase. At μ_{set} of 0.0075 hr^{-1}, the highest cell density, total protein concentration and accumulation of the rEK_L were obtained at approximately 128 g. L^{-1}, 343.19 mg. L^{-1}, and 38125 U. mL^{-1}; respectively. In comparison, the μ_{set} of 0.0105 hr^{-1} resulted in severe inhibition of cell growth and low product formation due to excessive feeding rate. The feeding rate at μ_{set} 0.006 hr^{-1} resulted in the lowest cell concentration clearly due to the lowest feeding rate.

The μ_{set} of 0.006 hr^{-1} did not result in the highest rEK_L accumulation; however, the highest specific activity reached the maximum value of 389,326 U.mg^{-1}proteins, compared to 122,975 U. mg^{-1}proteins at the μ_{set} of 0.0075 hr^{-1} after 117hr of the induction time. In addition, an increase of the induction time to 117hr for both μ_{set} 0.006 and 0.0075 hr^{-1} resulted in the higher cell density, total protein concentration, rEK_L accumulation, and specially specific activity of rEK_L which was much higher than all previously reported articles.

Purification of the recombinant EK_L was initially performed using electrodionization technique (EDI); however, this technique could not separate the protein from fermentation broth. The protein was further purified by the cation exchange chromatography (SP_FF column). Experimental result showed that 1540 mg.L^{-1} of rEK_L was obtained from 6475.33 mg.L^{-1} of total protein. The recombinant fusion protein, rice Os1BGlu-Trx was almost completely cleaved by using this purified rEK_L.

สารบัญเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ 3
บทคัดย่อภาษาไทย 4
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ 6
สารบัญเรื่อง 7
สารบัญตาราง 10
สารบัญภาพ 11
คำอธิบายสัญลักษณ์ 14
บทที่ 1 บทนำ 15
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย 15
1.2 โครงสร้างและการประยุกต์ใช้รีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้น 16
1.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน Pichia pastoris 17
1.3.1 ข้อได้เปรียบของ *P. pastoris* 19
1.3.2 กระบวนการหมักของ *P. pastoris* 20
1.4 ผลของปัจจัยต่างๆในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน P. pastoris 22
1.5 การผลิตและการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนท์เอนไซม์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้น (rEK_L) 26
1.6 กระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ Downstream processes 29
1.7 กระบวนการแยกโดยใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์ 30
1.7.1 จำแนกตามแรงขับดัน (driving forces) 30
1.8 ระบบอิเลคโตรดิไอออนไนเซชั่น (Electrodeionization, EDI) 32
1.9 การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตรกราฟฟี่ 33
1.10 จุดประสงค์ของโครงการวิจัย 40
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย 41
2.1 อุปกรณ์และสารเคมี 41
2.2 เชื้อจุลินทรีย์ 41
2.3 การเตรียมกล้าเชื้อ 42
2.4 การศึกษากระบวนการหมักแบบกึ่งกะเพื่อผลิต rEK_L โดย P. pastoris ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ 43
2.4.1 ช่วงกระบวนการหมักแบบกะที่มีการเติมกลีเซอรอล (Glycerol batch phase) 43
2.4.2 ช่วงกระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมกลีเซอรอล (Glycerol fed-batch phase) 43

2.4.2 ช่วงเหนี่ยวนำโดยเมทานอล (Methanol induction phase)..... 44
2.4.3 ช่วงการผลิตเอนไซม์โดยการเติมเมทานอลลงในถังหมัก (Methanol production phase)..... 44
2.5 การคำนวณอัตราการป้อนเมทานอล..... 46
2.6 ศึกษาถึงศักยภาพในการทำ Enterokinase protein ให้บริสุทธิ์จากกระบวนการหมัก ด้วยเทคนิคอิเลคโตรดิไอออนไนเซชั่น (EDI)..... 47
2.6.1 การประกอบโมดูลของเยื่อแผ่น..... 47
2.9 การวิเคราะห์..... 50
2.9.1 วิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์..... 50
2.9.2 วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน..... 50
2.9.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Enterokinase..... 50
2.9.4 วิเคราะห์ความเข้มข้นของเมทานอล..... 51
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 52
3.1 การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอนเทอโรไคเนสสายสั้น (rEK_L) โดย P. pastoris..... 52
3.1.1 อัตราการป้อนอาหาร MF และการใช้เมทานอลทั้งหมด..... 56
3.1.2 การเจริญของเซลล์..... 58
3.1.3 ผลผลิตของเซลล์ (Biomass yield)..... 60
3.1.4 ความเข้มข้นของเมทานอล (Residual methanol concentration)..... 61
3.1.5 การสร้างผลผลิต (Product formation)..... 63
3.1.6 ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดและค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะของเอนไซม์ rEK_L..... 66
3.1.7 ค่าผลผลิตของเอนไซม์ (Production yield)..... 69
3.2. การทำบริสุทธิ์ rEK_L ที่ผลิตโดย P. pastoris..... 73
3.2.1 การแยก rEK_L โดยใช้ระบบ Electrodeionization (EDI)..... 73
3.2.2 การทำบริสุทธิ์ rEK_L โดยคอลัมน์โคบอลต์..... 73
3.2.3 การทำบริสุทธิ์ rEK_L โดยเทคนิค ion exchange chromatography..... 75
3.2.4 การตัดฟิวชั่นโปรตีนด้วย rEK_L ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์..... 79
บทที่ 4 บทสรุป..... 81
4.1 สรุปผลการทดลอง..... 81
ภาคผนวก ก..... 82
ภาคผนวก ข..... 84

บรรณานุกรม..... 93

สารบัญตาราง

ตาราง 1 วิธีการมาตรฐานสำหรับกระบวนการหมักด้วย *P. pastoris* โดยจาอิคและคณะ (Jahic *et al.* (2002)) 22

ตาราง 2 สรุปงานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นในเซลล์โฮสต์ที่ต่างกัน……28

ตาราง 3 การจำแนกเยื่อแผ่นโดยอาศัยแรงขับดันเป็นตัวกำหนด (Huang, 2007)..... 31

ตาราง 4 ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร) ที่ช่วงปลายของกระบวนการหมักแบบกะที่มีการเติมกลี.. เซอรอล กระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมกลีเซอรอล เวลาในการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ ที่ 69 ชั่วโมง โดยที่ค่า μ_{set} ได้แก่ 0.006, 0.0075 and 0.0105 ต่อชั่วโมง..... 59

ตาราง 5 การใช้เมทานอล น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด rEK_L ที่ผลิตได้ ผลผลิต.. ของเซลล์ ค่ากิจกรรมจำเพาะของ rEK_L และค่าผลผลิตจำเพาะในกระบวนการทั้งสาม หลังสิ้นสุดกระบวนการหมักและที่ชั่วโมงที่ 117 (*) 72

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

รูปภาพ 1 หลักการทำงานของเครื่อง Electrodeionization (EDI) (Matsuura, 1994) 33
รูปภาพ 2 การแยกสาร 3 ชนิด โดยใช้เทคนิคโครมาโตรกราฟฟี่ 34
รูปภาพ 3 หลักการทำงานของโครมาโตกราฟฟี่แบบดูดซับ 35
รูปภาพ 4 หลักการทำงานของโครมาโตกราฟฟี่แบบแบ่งส่วน (partition chromatography) 36
รูปภาพ 5 หลักการทำงานของโครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) 37
รูปภาพ 6 หลักการทำงานของเจลโครมาโตรกราฟฟี่ (gel chromatography) 38
รูปภาพ 7 หลักการทำงานของโครมาโตรกราฟฟี่แบบจำเพาะ (affinity chromatography) 39
รูปภาพ 8 สายพันธุ์ *P. pastoris* Y11430 ที่มี pPICZαB NH8_EK_L 42
รูปภาพ 9 การจัดชุดการทดลองการผลิต rEK_L ในถังหมักขนาด 2 ลิตร 45
รูปภาพ 10 การจัดการทดลองการแยกเอ็นไซม์เอ็นเทอโรไคเนสออกจากน้ำหมักโดยใช้ระบบ EDI 48
รูปภาพ 11 น้ำหนักเซลล์แห้ง (■) (กรัมต่อลิตร) และ ปริมาณออกซิเจน (DOT) (▲) (%) ระหว่างช่วงการหมักแบบกะที่มีการเติมกลีเซอรอล 53
รูปภาพ 12 น้ำหนักเซลล์แห้ง (■) (กรัมต่อลิตร) และปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำหรือ DOT (▲) (%) ระหว่างช่วงกระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมกลีเซอรอล 54
รูปภาพ 13 น้ำหนักเซลล์แห้ง (■) (กรัมต่อลิตร) และปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำหรือ DOT (▲) (%) ระหว่างช่วงกระบวนการหมักที่มีการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล 55
รูปภาพ 14 น้ำหนักเซลล์แห้ง (■) (กรัมต่อลิตร) และปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำหรือ DOT (▲) (%) ระหว่างสามช่วงแรก (กระบวนการหมักแบบกะที่มีการเติมกลีเซอรอล กระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมกลีเซอรอล และกระบวนการหมักที่มีการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลตามลำดับ) 56
รูปภาพ 15 อัตราการเติมอาหาร MF (กรัมต่อชั่วโมง) ระหว่างช่วงกระบวนการหมักที่มีการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล โดยที่ค่า μ_{set} เป็นดังนี้ 0.006(●), 0.0075 (▲) และ 0.0105 ต่อชั่วโมง (■) 57
รูปภาพ 16 การใช้เมทานอลทั้งหมด (กรัม) ระหว่างกระบวนการหมักที่เมทานอลถูกใช้ในการผลิตเอนไซม์กระบวนการตามค่า μ_{set} ดังนี้คือ 0.006(●), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (■) ต่อชั่วโมง 58

รูปภาพ 17 น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ระหว่างช่วงของการผลิตเอนไซม์โดยมีการใช้เมทานอล .. ในการทดลองที่ค่า μ_{set} ต่างกันดังนี้ 0.006(●), 0.0075 (▲) และ 0.0105 ต่อชั่วโมง (■)..... 60

รูปภาพ 18 ผลผลิตของเซลล์ หรือ $Y_{X/S}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมของเมทานอล) ระหว่างช่วงของการผลิตเอนไซม์โดยมีการใช้เมทานอลในการทดลองที่ค่า μ_{set} ต่างกันดังนี้ 0.006(●), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (■)ต่อชั่วโมง……61

รูปภาพ 19 ความเข้มข้นของเมทานอลในถังหมัก (กรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักที่มีการใช้เมทานอลในการผลิตเอนไซม์ โดยที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.006(■), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (●) (ต่อชั่วโมง)..... 62

รูปภาพ 20 การสร้างผลผลิต (rEK_L (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักที่มีการใช้เมทานอล . ในการผลิตเอนไซม์ โดยที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.006(●), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (■) (ต่อชั่วโมง)..... 63

รูปภาพ 21 SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี with Coomassie blue โดยตัวอย่างเป็นน้ำหมักในกระบวนการที่ ... ค่า μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง (M คือ protein marker; Lane 1-8 คือ ตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะที่มีการเติมกลีเซอรอล.ตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมกลีเซอรอล. ตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการหมักที่ผลตเอนไซม์โดยใช้เมทานอล ที่เวลา 21, 45, 69, 93, 117 และ141 ชั่วโมง ตามลำดับ และตัวอย่างน้ำหมักที่ถูกทำให้เข้มข้นขึ้นที่เวลา 117 ชั่วโมง 65

รูปภาพ 22 SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี Coomassie blue โดยตัวอย่างเป็นน้ำหมักหลังสิ้นสุดกระบวนการที่ μ_{set} 0.0105, 0.0075 และ 0.006 ต่อชั่วโมง 66

รูปภาพ 23 ความเข้มข้นโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักที่มีการใช้เมทานอลในการผลิตเอนไซม์ โดยที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.006(■), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (●) (ต่อชั่วโมง)……67

รูปภาพ 24 ค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะของเอนไซม์ rEK_L (ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ระหว่างกระบวนการ. หมักที่มีการใช้เมทานอลในการผลิตเอนไซม์ โดยที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.006(■), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (●) (ต่อชั่วโมง) 68

รูปภาพ 25 ค่าผลผลิตของเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมของเมทานอล) ระหว่างกระบวนการหมักที่มีการใช้เมทานอลในการผลิตเอนไซม์ โดยที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.006(■), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (●) (ต่อชั่วโมง)..... 70

รูปภาพ 26 ค่าผลผลิตจำเพาะ (specific production yield หน่วยเป็น ยูนิตต่อกรัมของเซลล์) ระหว่างกระบวนการหมักที่มีการใช้เมทานอลในการผลิตเอนไซม์ โดยที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.006(■), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (●) (ต่อชั่วโมง)……..71

รูปภาพ 27 SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี Coomassie blue ในตัวอย่าง rEK_L ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากคอลัมน์โคบอลต์……..74

รูปภาพ 28 โปรไฟล์กระบวนการทำบริสุทธิ์ rEK_L โดยเทคนิค ion exchange chromatography ของตัวอย่างที่เข้มข้นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ได้จากกระบวนการหมักที่ μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง…76

รูปภาพ 29 โปรไฟล์กระบวนการทำบริสุทธิ์ rEK_L โดยเทคนิค ion exchange chromatography ของตัวอย่างที่เข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ได้จากกระบวนการหมักที่ μ_{set} 0.006 ต่อชั่วโมง…..76

รูปภาพ 30 SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Coomassie blue ของ rEKL ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ SP (cation exchanger) โดยที่ใช้ตัวอย่างที่เข้มข้นปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากกระบวนการหมักที่มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0075 ต่อชั่วโมง ในการทดสอบ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ใช้เป็นตัวเทียบ (M); ตัวอย่างที่เข้มข้นด้วยไดอะไลซิส (C); ตัวอย่างที่ผ่านออกมาจาก คอลัมน์ หรือ Flow-through fraction (FT); ตัวอย่างที่ได้จากการล้างคอลัมน์ (W) และตัวอย่างที่ ได้จากการชะคอลัมน์ หมายเลข 52, 55, 58, 60, 61, 63, 65, 67, 78, 80, 82, 85 และ 86……..77

รูปภาพ 31 SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Coomassie blue ของ rEKL ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ SP (cation exchanger) โดยที่ใช้ตัวอย่างที่เข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากกระบวนการหมักที่มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.006 ต่อชั่วโมง ในการทดสอบ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ใช้เป็นตัวเทียบ (M); ตัวอย่างที่เข้มข้นด้วยไดอะไลซิส (C); ตัวอย่างที่ผ่านออกมาจาก คอลัมน์ หรือ Flow-through fraction (FT); ตัวอย่างที่ได้จากการล้างคอลัมน์ (W) และตัวอย่างที่ได้จากการชะคอลัมน์ หมายเลข 44, 47, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 62 และ 64……..78

รูปภาพ 32 การตัดฟิวชั่นโปรตีน recombinant rice Os1BGlu4-Trx ด้วย rEK_L ที่บริสุทธิ์ที่ได้จากจากกระบวนการหมักที่มี μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง เปรียบเทียบกับ rEK_L ทางกาค้าจาก NEB ในสารละลาย Tris-Cl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8 อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในปริมาตรทั้งหมด 22 ไมโครลิตร Protein marker (M); Fusion protein (F) และfusion protein ที่บ่มกับ commercial rEK_L 0.00014 ไมโครกรัม; 0.154; 0.308; 0.462; 0.616; 0.77 และ 0.924 ไมโครกรัมของ rEK_L ที่บริสุทธิ์ (Band 1-7)……..79

คำอธิบายสัญลักษณ์

AOX	Alcohol oxidase enzyme
DOT	Dissolve oxygen tension
EK_L	Enterokinase light chain enzyme
rEK_L	Recombinant enterokinase light chain enzyme
SDS-PAGE	Sodiumdodisyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 1 บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหางานวิจัย

ในปัจจุบันเทคโนโลยีชีวภาพสมัยใหม่ได้มีการใช้เทคนิคใหม่ ๆ เช่น recombinant DNA, gene probes, การประสานเซล, และการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) มาทำการค้นคว้าวิจัยในการพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์ใหม่ ๆ ที่ได้จากจุลินทรีย์ ยกตัวอย่างเช่น การผลิตอินซูลิน, growth hormone หรือ เอ็นไซม์ชนิดต่าง ๆ เป็นต้น ทำให้การพัฒนากระบวนการผลิตโปรตีนรีคอมบิแนนท์นั้นมีความสำคัญเป็นอย่างมากในหลาย ๆ ด้านเช่น ด้านการแพทย์ และอุตสาหกรรมต่าง ๆ อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าการผลิตโปรตีนเหล่านี้จะสามารถพัฒนาการผลิตได้ในห้องปฏิบัติการ แต่การผลิตในเชิงพานิชนั้นจะต้องมีการประยุกต์ใช้ความรู้ทางด้านวิศวกรรมในการออกแบบและพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่มีความบริสุทธิ์

เอ็นเทอโรไคเนสเป็นเอ็นไซม์ที่มีความสำคัญในกระบวนการย่อยอาหารของมนุษย์โดยเป็นเอนไซม์จำพวกซีรีนโปรติเอสซึ่งจะตัดพันธะเปปไทด์ทางด้านปลายคาร์บอกซี่ของตำแหน่งตัดจำเพาะ (Asp4Lys) และเนื่องจากเอ็นไซม์เอ็นเทอโรไคเนสสามารถทำงานได้ในสภาวะที่หลากหลาย จึงทำให้เอ็นเทอโรไคเนสมีความเหมาะสมอย่างยิ่งในการนำมาใช้ตัดฟิวชันโปรตีนที่ตำแหน่งจำเพาะ ในงานวิจัยของ นส.ชนิดา กุประดิษฐ์ และ รศ. ดร.มาริน่า เกตุทัต-คาร์นส์ ได้ประสบความสำเร็จในการโคลนยีนจากลำไส้วัวและผลิตเอ็นไซม์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นในระบบรีคอมบิแนนท์ (rEKL) โดยใช้ *Pichia pastoris* สายพันธุ์ Y11430 และสามารถทำงานได้ โดยตรวจพบกิจกรรมของเอ็นไซม์นี้ในอาหารที่ได้จากการเลี้ยง *Pichia* ในถังหมักโดยการชักนำให้เกิดการแสดงออกของเอ็นไซม์นี้ในระบบรีคอมบิแนนท์ด้วยเมทานอล หลังจากสิ้นสุดกระบวนการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคการแลกเปลี่ยนประจุพบว่า ความเข้มข้นของ rEKL บริสุทธิ์ ที่ได้คือ 433 มิลลิกรัมต่อลิตร ในการผลิตเอ็นไซม์โดยทั่ว ๆ ไปนั้น จะมีขั้นตอนหลายขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ เช่น การแยกเซลออกจากน้ำหมัก การแลกเปลี่ยนประจุ โครมาโตกราฟฟี่ การทำให้เกิดผลึก การ ทำให้แห้งและการ บรรจุ เป็นต้น ในขั้นตอนการแลกเปลี่ยนประจุนั้น เป็นขั้นตอนที่มียุ่งยากและมีต้นทุนในการผลิตสูง ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณของเอ็นไซม์เริ่มต้นในน้ำหมักนั้น มีปริมาณที่ต่ำมาก ต้นทุนต่อหน่วยในการผลิตจึงสูงไปด้วย นอกจากนี้เมื่อระบบเกิดการอิ่มตัว (saturation) จำเป็นที่จะต้องทำการล้างเพื่อเอาเอ็นไซม์ออกไป (elution หรือ regeneration) ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ยุ่งยากและต้องทำเป็นกะ (batch process) ซึ่งเป็นการเสียเวลา

ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้ระบบ Electrodeionization (EDI) เพื่อแยกสารที่สามารถแตกตัวทางไฟฟ้ากันแพร่หลายมากขึ้นนอกเหนือไปจากการผลิตน้ำปราศจากอิออน (deionized water) ยกตัวอย่างเช่น การแยกกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ออกจากน้ำหมัก เป็นต้น ซึ่งระบบ EDI นี้เป็นระบบผสม (Hybrid system) ระหว่างการแลกเปลี่ยนประจุ (ion Exchange) กับ ระบบอิเลคโตรไดอะไลซิส (electrodialysis) ซึ่งจะเป็นการใช้เยื่อแผ่นชนิดที่ยอมให้สารที่มีประจุผ่านได้ โดยจะใช้สนามไฟฟ้ากระแสตรงเป็นตัวขับเคลื่อนให้อิออนเกิดการเคลื่อนที่ภายใต้แรงดันของสนามไฟฟ้า ในปัจจุบันคณะผู้วิจัยได้ประสบความสำเร็จในการศึกษาการแยกกรดแลคติกออกจากน้ำหมัก โดยมีจุดประสงค์เพื่อใช้เป็นพลาสติกชีวภาพ (bioplastic) ซึ่งกำลังเป็นที่สนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากสามารถใช้ทดแทนพลาสติกที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมีเป็นอย่างดีและสามารถย่อยสลายได้ตามธรรมชาติ เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อเป็นการพัฒนากระบวนการผลิตเพื่อให้ได้ผลผลิต (yield) ที่สูงขึ้น จึงมีแนวคิดที่จะใช้ระบบ EDI มาใช้ในการแยกเอ็นไซม์เอ็นเทอโรไคเนสออกจากน้ำหมักแบบต่อเนื่อง โดยในขั้นตอนแรกนั้นจะมีการใช้การแลกเปลี่ยนประจุเพื่อจับโมเลกุลของเอ็นไซม์ก่อน เนื่องจากว่าเอ็นไซม์ชนิดนี้จะมีค่าของประจุรวม (net charge) เปลี่ยนไป ณ ค่าของความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกัน จากนั้นโมเลกุลของเอ็นไซม์จะเคลื่อนที่ผ่านเยื่อแผ่นภายใต้สนามไฟฟ้าไปยังสารละลายที่ใช้เก็บ (receiving solution) ต่อไป โดยความเข้มข้นของเอ็นไซม์ใน receiving solution จะมีความเข้มข้นสูง การนำไปทำให้บริสุทธิ์ก็จะทำได้ง่ายขึ้นและมีต้นทุนในการผลิตที่ถูกลง กระบวนการ EDI นี้เป็นกระบวนการผสมระหว่างการแลกเปลี่ยนประจุและการแยกโดยใช้เยื่อแผ่น จึงเป็นการผลิตแบบต่อเนื่อง ไม่จำเป็นที่จะต้องมีขั้นตอน elution อีก เนื่องจากจะมีการถ่ายเทมวลของเอ็นไซม์ออกไปจาก ion exchange resin อยู่ตลอดเวลา

1.2 โครงสร้างและการประยุกต์ใช้รีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้น

เอ็นเทอโรไคเนส (EK) หรือ เอ็นเทอโรเปปทิเดส (EC 3.4.4.8) ค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Pavlov's laboratory เป็นเอนไซม์ที่สกัดได้จากลำไส้เล็กของวัวที่สามารถกระตุ้นให้เอ็นไซม์จากตับอ่อน (Kunitz, 1938) ซึ่งทำหน้าที่ย่อยสลายทำงานได้ EK พบสูงที่สุดในส่วนดูโอดินัมและเริ่มลดลงเรื่อยๆในส่วนถัดไปจนกระทั่งไม่สามารถตรวจพบในส่วนของเจจูนั่ม EK เป็นโปรติเอสที่จัดอยู่ในจำพวกซีรีนโปรติเอสมีตำแหน่งตัดจำเพาะของลำดับกรดอะมิโนบนโปรตีนเป็น กรด แอสพาร์ติก (Aspartic acid) ที่เรียงต่อกัน 4 ตัว แล้วตามด้วยไลซีน (lysine) ($(Asp)_4Lys$) โดย EK จะตัดหลังตำแหน่งของไลซีนทำหน้าที่ในการเปลี่ยนทริปซิโนเจนให้กลายเป็นทริปซิน (La Vallie *et al*, 1993)

ลักษณะโครงสร้างของเอนไซม์เอ็นเทอโรไคเนสที่พบในวัวมีโครงสร้างเป็นเฮทเทอโรไดเมอร์ (heterodimer)สามารถพบเอนไซม์นี้ได้ในวัว หมูและในมนุษย์ (Song *et al*, 2002) โครงสร้างทางเคมีเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟต์ สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่ทางด้านปลายอะมิโนของโปรตีน (ขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 82-140 kDa) หรือเรียกว่า สายยาว (heavy chain) ทำหน้าที่ในการจดจำสับเสรตที่มีโมเลกุลใหญ่เช่น ทริปซิโนเจน (trypsinogen) และขนาดโมเลกุลเล็กที่อยู่ทางด้านหมู่คาร์บอกซิล หรือเรียกว่าสายสั้น (light chain) (ขนาดโมเลกุลอยู่ระหว่าง 35-62 kDa) ทำหน้าที่ในการย่อยโปรตีนที่ตำแหน่งซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนที่จำเพาะ นอกจากนี้ยังพบว่า แม้ว่า EK จะเหลือส่วนของสายสั้นเพียงส่วนเดียว ก็สามารถเกิดคุณสมบัติในการเป็นโปรติเอสได้โดยไม่มีผลทำให้กิจกรรมและกิจกรรมจำเพาะของเอ็นไซม์ลดลงเมื่อนำไปทำปฏิกิริยากับสับเสรตสังเคราะห์และสับเสรตที่เป็นฟิวชันโปรตีนซึ่งมีบริเวณตัดของ EK เนื่องจากพบว่าที่ส่วนของสายสั้นนี้ปรากฏบริเวณเร่งปฏิกิริยา หรือ แอคทีฟไซท์ (active site) อีกทั้งเอ็นเทอโรไคเนส เป็นโปรติเอสที่มีความจำเพาะที่ตำแหน่งตัดสูง, สามารถทำงานได้ในสภาวะการเกิดปฏิกิริยาที่หลากหลายและสามารถตัดโปรตีนที่ต้องการออกจากฟิวชันโปรตีนโดยไม่เหลือกรดอะมิโนที่ไม่ต้องการอยู่เลย ดังนั้นเอ็นเทอโรไคเนสจึงเป็นเอ็นไซม์ที่น่าสนใจในการนำมาใช้แยกโปรตีนที่ต้องการออกจากฟิวชันโปรตีน โดยวิธีการโคลนเพื่อผลิตเอ็นไซม์ EK ในระบบรีคอมบิแนนท์

สำหรับปัจจุบันนี้เอนไซม์เอ็นเทอโรไคเนสยังเป็นที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในด้านเภสัชกรรมและทางอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องทางเทคโนโลยีชีวภาพในการตัดฟิวชั่นโปรตีน เนื่องจากมีความจำเพาะต่อตำแหน่งที่ตัดสูงและมีความสามารถเกิดปฏิกิริยาการตัดฟิวชั่นได้ในสภาวะที่หลากหลาย (Song *et al*., 2002) เช่น ที่สภาวะกรด-ด่างในช่วงกว้างระหว่าง 4.5-9.5 และที่อุณหภูมิระหว่าง 4-45 องศาเซลเซียส (Yuan and Hua, 2002)

1.3 การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *Pichia pastoris*

ปัจจุบันการผลิตโปรตีนโดยระบบรีคอมบิแนนท์ (Recombinant protein) เป็นที่สนใจกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากการผลิตโปรตีนโดยระบบรีคอมบิแนนท์เป็นการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมซึ่งนำยีนที่มีการแสดง ออกของโปรตีนที่สนใจมาตัดต่อกับดีเอนเอของจุลินทรีย์ซึ่งใช้เป็นเวกเตอร์ (Vector) ซึ่งการอาศัยเชื้อจุลินทรีย์หรือเซลล์ยูคาริโอตเป็นเซลล์เจ้าบ้าน (host) มีข้อได้เปรียบมากกว่าการผลิต

โปรตีนซึ่งสกัดจากแหล่งธรรมชาติหรือเนื้อเยื่อดั้งเดิมคือ สามารถผลิตโปรตีนได้ในปริมาณมากกว่า เนื่องจากจุลินทรีย์หรือเซลล์ยูคาริโอตบางชนิดที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านมีการเจริญรวดเร็ว, สามารถควบคุมการแสดงออกของโปรตีนที่ต้องการได้โดยควบคุมที่ตำแหน่งโปรโมเตอร์ ซึ่งข้อได้เปรียบดังกล่าวนี้ทำให้มีงานวิจัยในห้องปฏิบัติการเป็นจำนวนมากที่มุ่งเน้นการพัฒนาการผลิตโปรตีนโดยระบบรีคอมบิแนนท์ให้มีคุณภาพสูงขึ้น แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจสำหรับการผลิตโปรตีนในระบบรีคอมบิแนนท์คือ การนำยีนของโปรตีนที่เราสนใจ เชื่อมเข้ากับยีนที่มีการแสดงออกของโปรตีนอีกชนิดหนึ่ง หรือที่เรียกว่า ฟิวชันโปรตีน (fusion protein) ซึ่งข้อดีของการทำฟิวชันโปรตีนคือ โปรตีนที่เรานำมาทำฟิวชันโปรตีนนั้น ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีการแสดงออกระดับสูงในเซลล์เจ้าบ้าน ดังนั้นเมื่อโปรตีนดังกล่าวมีการแสดงออก โปรตีนที่เราสนใจซึ่งเชื่อมต่อกับโปรตีนดังกล่าวนั้น ก็จะมีการแสดงออกที่สูงด้วย ซึ่งนอกจากจะเป็นการเพิ่มปริมาณโปรตีนที่เราสนใจแล้ว ยังเป็นการเพิ่มความเสถียรให้กับโปรตีนที่เราสนใจซึ่งผลิตในเซลล์เจ้าบ้านด้วย นอกจากนั้นอาจนำโปรตีนที่เราสนใจเชื่อมต่อกับฟิวชันโปรตีนบางชนิด เพื่อให้สะดวกต่อการแยกโปรตีนที่เราสนใจออกจากโปรตีนอื่น ๆ ที่ผลิตในเซลล์เจ้าบ้าน และง่ายในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ แต่ปัญหาของการนำฟิวชันโปรตีนมาประยุกต์ใช้ก็คือ เมื่อมีการแสดงออกของฟิวชันโปรตีน ผลผลิตที่ได้ในขั้นตอนสุดท้ายจะได้โปรตีนที่เราต้องการซึ่งเชื่อมต่อกับฟิวชันโปรตีน ดังนั้นจึงต้องหาวิธีในการแยกโปรตีนที่เราไม่ต้องการออกไป ซึ่งวิธีการในการตัดโปรตีนทั้งสองออกจากกันนั้นสามารถใช้สารเคมีหรือใช้เอ็นไซม์ แต่การใช้สารเคมีนั้นมีข้อเสียคือ จะทำให้ผลิตภัณฑ์โปรตีนที่ได้เสียสภาพไป ดังนั้นจึงนิยมใช้เอ็นไซม์ในการตัดโปรตีนมากกว่าซึ่งเอ็นไซม์ที่ใช้จะเป็นเอ็นไซม์ในกลุ่มโปรติเอส เช่น ธรอมบิน (Thrombin), แฟกค์เตอร์ สิบเอ (Factor Xa) และ เอ็นเทอโรไคเนส (Enterokinase) เป็นต้น

เอนไซม์เอ็นเทอโรไคเนสที่ผลิตทางการค้าในปัจจุบันได้จากการทำบริสุทธิ์โฮโลเอนไซม์จากวัวหรือลำไส้เล็กของวัวซึ่งผลที่ได้ออกมามีปริมาณน้อย ส่งผลให้มีราคาแพง แต่อย่างไรก็ตามยังคงไม่บริสุทธิ์มากเท่าใด อาจเกิดการปนเปื้อนจากโปรตีนโปรติเอสอื่นๆได้ (Yuan and Hua, 2002) แนวทางในการแก้ปัญหาดังกล่าว คือการใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรม (recombinant DNA technology) เข้ามาช่วยโดยการโคลนยีนที่มีการแสดงออกของ EK ตัดต่อเข้ากับดีเอนเอเวกเตอร์ จากนั้นถ่ายเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมเพื่อให้เกิดการแสดงออกของ EK ในเซลล์เจ้าบ้านนั้น ๆ ซึ่งเป็นการผลิต EK ในระบบรีคอมบิแนนท์ ซึ่งวิธีการนี้มีข้อได้เปรียบคือ เซลล์เจ้าบ้านที่เลือกใช้ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ไม่ว่าจะเป็นโปรคาริโอต เช่น แบคทีเรีย *Escherichia coli* หรือ ยูคาริโอต เช่น รา *Aspergillus niger* และยีสต์ *Pichia*

pastoris ซึ่งเลี้ยงง่าย สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว รวมทั้งสามารถควบคุมการแสดงออกของเอ็นไซม์ได้ตามต้องการ โดยการเลือกใช้โปรโมเตอร์ที่มีการแสดงออกในระดับสูงมาควบคุมการแสดงออกของยีน EK ทำให้มีการปลดปล่อยเอ็นไซม์ EK ทำให้ได้รีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้น (rEK_L) มากขึ้นตามไปด้วย ซึ่งผลผลิตที่ได้สามารถผลิตได้ปริมาณมาก แต่อย่างไรก็ตาม รีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นยังไม่ประสบความสำเร็จมากนัก เนื่องจากมีการแสดงออกของยีนต่ำและยังคงมีราคาการผลิตสูง (Suh *et al*, 2005) ดังนั้นการแสดงออกของยีนรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นเพื่อให้ได้ปริมาณมากและคุณภาพตามที่ต้องการยังต้องศึกษาต่อไป

1.3.1 ข้อได้เปรียบของ *P. pastoris*

เซลล์โฮสต์ที่ใช้เป็นแหล่งผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนมักใช้เป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์ อาทิเช่น *E. coli Lactococcus lactis S. cerevisiae* และ *P. pastoris* เช่นเดียวกับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและเซลล์แมลง โดยปกติแล้ว *E. coli* มักเป็นตัวเลือกแรกเพื่อใช้เป็นโฮสต์ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เนื่องจากมีการศึกษากระบวนการพันธุวิศวกรรมและรู้เกี่ยวกับพันธุกรรมภายในเป็นอย่างดี อีกทั้งยังเหมาะในการเพาะเลี้ยงด้วยวิธีการการหมัก มีการเจริญรวดเร็วและใช้อาหารต้นทุนต่ำ คุ้มทุนทางเศรษฐกิจ (Tan *et al*, 2007) อีกทั้งเซลล์โฮสต์ที่เป็นเซลล์โปรคาริโอตยังสามารถแสดงออกของยีนที่ดีอีกด้วย (Cregg *et al*., 1987)

จากผลงานทดลองหลายโครงการพบว่า *P. pastoris* มีความเหมาะสมที่จะใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิต rEK_L แม้ว่า rEK_L ที่ผลิตจาก *P. pastoris* จะมีกิจกรรมจำเพาะที่ต่ำกว่าเมื่อผลิตโดยใช้ *A. niger* แต่อย่างไรก็ดี เมื่อเปรียบเทียบผลผลิตที่ได้จะเห็นว่าผลผลิตของ rEK_L ที่ได้จากการผลิตโดยใช้ *P. pastoris* จะสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ *A. niger* รวมทั้งในการเลี้ยง *A. niger* จะมีความยุ่งยากกว่าการเลี้ยงยีสต์อีกด้วย สำหรับ *P. pastoris* เป็นยีสต์ที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ซึ่งเรียกว่า methylotrophic yeast ต่อมาได้มีการใช้ *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เนื่องจาก *P. pastoris* เป็นยูคาริโอตซึ่งมีกระบวนการเกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากการสังเคราะห์โปรตีน (post-translation modification) (Holmes *et al*., 2009) ซึ่งไม่มีในสิ่งมีชีวิตที่เป็นโปรคาริโอต ดังนั้น *P. pastoris* จึงเหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มาจากยูคาริโอต ซึ่งโปรตีนบางชนิดจำเป็นต้องมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงหลังจากการสังเคราะห์โปรตีนเพื่อให้โปรตีนที่ผลิตขึ้นสามารถทำงานได้ (Lin Cereghino and Cregg, 2000) นอกจากนั้นโปรโมเตอร์ที่ใช้ควบคุมการแสดงออกของ *P.*

pastoris คือ AOX promoter ซึ่งมีความสำคัญในการย่อยสลายเมทานอล โปรโมเตอร์ดังกล่าวสามารถถูกควบคุมให้มีการแสดงออกได้ในระดับสูงโดยการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลและเป็นโปรโมเตอร์ที่มีประสิทธิภาพสูงมาก (Inan *et. al*., 2001) อีกทั้งหากทำการหมักด้วยวิธีทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ปริมาณมากหือ high cell-density fermentation ยิ่งทำให้ส่งเสริมการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในปริมาณสูงตามไปด้วย (Charoenrat *et al*., 2005) ดังนั้น *P. pastoris* จึงเหมาะที่จะนำมาใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการผลิต rEK_L มากที่สุด

สำหรับในประเทศไทย rEK_L ที่ใช้ในงานวิจัยเกี่ยวกับรีคอมบิแนนท์โปรตีนยังเป็นเอ็นไซม์ที่สั่งนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีราคาสูงถึง $336 หรือ 13,776 บาท ต่อ 0.32 ไมโครกรัมจาก New England biolabs (http://www.neb.com) ดังนั้นเพื่อลดการนำเข้าของ rEK_L จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ประเทศไทยจะต้องมีการผลิต rEK_L ขึ้นใช้เอง ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงต้องการผลิต rEK_L โดยการโคลนยีนที่มีการแสดงออกของยีน EK_L จากลำไส้วัว และนำไปแสดงออกในเซลล์เจ้าบ้านที่เหมาะสมคือ *P. pastoris* เพื่อให้ rEK_L ที่ผลิตขึ้นมีปริมาณมากและมีคุณภาพสูง รองศาสตราจารย์ ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ ได้ประสบความสำเร็จในการโคลนยีน EK_L จากลำไส้วัวและความเองในประเทศไทย และใช้ *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้าน และพบว่าในขั้นตอนของการผลิต rEK_L ในถังหมักและการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์ พบว่า สามารถตรวจพบกิจกรรมของเอ็นไซม์ EK ได้ในน้ำหมักที่มีการปลดปล่อย rEK_L ขนาด 63 kDa หลังจากสิ้นสุดกระบวนการทำเอ็นไซม์ให้บริสุทธิ์โดยเทคนิคการแลกเปลี่ยนประจุพบว่า ความเข้ม ข้นของ rEK_L บริสุทธิ์ที่ได้คือ 433 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ rEK_L ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ส่วนผลการทดสอบความสามารถในการตัดฟิวชันโปรตีน (rice BGlu1-thioredoxin) ซึ่งมีตำแหน่งตัดของ EK ที่บริเวณเชื่อมต่อระหว่างโมเลกุลโปรตีนพบว่า เอ็นไซม์ rEK_L บริสุทธิ์ที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถตัดฟิวชันโปรตีนดังกล่าวได้จริง ซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดฟิวชันโปรตีนโดยใช้ rEK_L ที่ได้จากงานวิจัยนี้ และ rEK_L ที่ผลิตขาย (NEB) นั้น มีรูปแบบของแถบโปรตีนที่ปรากฏบนแผ่นเจล SDS-PAGE ที่คล้ายคลึงกัน

1.3.2 กระบวนการหมักของ *P. pastoris*

มีหลายงานวิจัยที่ได้มีการศึกษาถึงกระบวนการหมักเพื่อการแสดงออกของยีนเพื่อผลิตโปรตีนใน *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมของโปรโมเตอร์ AOX1 อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับ *P. pastoris* มีต้นทุนที่ไม่สูงมากและได้มีการศึกษามาก่อนแล้ว สภาวะต่างๆในกระบวนการหมักต้องมีการควบคุมให้เหมาะสมเพื่อที่จะทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ที่สูง (Higgins and Cregg, 1998; Lin Cereghino et a., 2002) อีพ

ทั้งพบว่าหากสภาวะในถังหมักที่การควบคุมให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำในอาหารที่มีเมทานอลอยู่จะช่วยลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ตัวอื่นๆได้ (Cereghino and Cregg, 2000) ทำให้ง่ายต่อการหมักและง่ายต่อกระบวนการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ จากเหตุผลข้างต้นหากดำเนินการหมักในถังปฏิกรณ์ชีวภาพจะสามารถควบคุมสภาวะต่างๆให้คงที่ได้ดี จึงเหมาะที่จะใช้ผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์ได้ดีกว่าหมักในขวดแก้ว

ในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะนั้น สารอาหารจะถูกป้อนเข้าสู่ระบบเป็นครั้งคราวหรือต่อเนื่องก็ได้ แต่จะไม่มีการถ่ายเอาน้ำหมักกออกจากระบบในระหว่างการหมัก ซึ่งจะเป็นการผสมผสานระหว่างการหมักแบบกะและแบบต่อเนื่อง และเป็นกระบวนการหมักที่มักใช้ในการผลิตความเข้มข้นของเซลล์สูงและมีความสามารถปลดปล่อยโปรตีนออกมาในระหว่างกระบวนการหมักได้ดี (Cereghino *et al*. 2001) กระบวนการหมักด้วย *P. pastoris* ที่มีประสิทธิภาพสูงนั้นได้มีการพัฒนาขึ้นโดยจาอิคและคณะในปี 2545 (Jahic *et al*., 2002) กระบวนการหมักดังกล่าวได้ระบุไว้ว่าแบ่ง 2 ระยะสำหรับการที่เซลล์จะเจริญและ 2 ระยะเป็นช่วงที่ผลิตโปรตีน ระยะเริ่มแรกเป็นกระบวนการหมักแบบกะคือไม่มีการป้อนอาหารลงไปในถังหมักซึ่งระยะนี้จะทำให้เซลล์มีความเข้มข้นมากขึ้น ระยะที่สองเป็นระยะการป้อนกลีเซอรอลเข้าในถังหมักระยะนี้จะทำให้เซลล์มีความเข้มข้นสูงสุดและทำให้โปรโมเตอร์ AOX1 ยังไม่ทำงาน (Chiruvolu *et al*., 1997) ระยะที่สามเป็นระยะที่มีการป้อนเมทานอลที่มีความเข้มข้นต่ำค่อยๆเติมลงไปในถังหมัก ระหว่างระยะนี้ *P. pastoris* จะมีการปรับตัวให้สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ และสำหรับระยะสุดท้ายหรือระยะการผลิตโปรตีน ระยะนี้อัตราการป้อนเมทานอลจะเพิ่มขึ้นเพื่อที่จะเพิ่มการแสดงออกของโปรโมเตอร์ AOX1 (Charoenrat, 2006) ระยะการป้อนเมทานอลถือว่าสำคัญมากเนื่องจากหากมีการป้อนเมทานอลที่มีการควบคุมที่ไม่ดี หรืออัตราที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้ออาจทำให้ได้โปรตีนที่ต้องการหรือไม่ผลิตโปรตีนออกมาก็ได้ เนื่องจากในการป้อนเมทานอลลงในถังหมักควรที่จะมีการควบคุมให้อยู่ในระดับที่เหมาะสมกับการนำไปใช้ในการผลิตโปรตีนที่ต้องการแต่ถ้าหากมีเมทานอลมากเกินไปอาจทำให้เกิดการเป็นพิษต่อเชื้อ *P. pastoris* ได้ (Cino, 1999)

ตาราง 1 วิธีการมาตรฐานสำหรับกระบวนการหมักด้วย *P. pastoris* โดยจาอิคและคณะ (Jahic *et al*. (2002))

ระยะ	เวลา(ชั่วโมง)	รูปแบบการหมัก	สับสเสรต	การป้อนสับสเตรต*
1. ระยะเจริญ	0-24	กะ	กลีเซอรอล	ไม่มี
2. ระยะเจริญ	24-27.5	กึ่งกะ	กลีเซอรอล	50% กลีเซอรอล
3.ระยะเหนี่ยวนำ	27.5-30	กึ่งกะ	เมทานอล	99% เมทานอล
4. ระยะผลิต	30 ชม. เป็นต้นไป	กึ่งกะ	เมทานอล	99% เมทานอล

*ทุกๆการป้อนสารละลายจะมีการเติม PTM1 trace salts 12 มิลลิลิตรต่อลิตร

1.4 ผลของปัจจัยต่างๆในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *P. pastoris*

1.4.1 สายพันธุ์จุลินทรีย์

นอกจากสภาวะปัจจัยในกระบวนการหมักแล้ว ผลผลิตของโปรตีนที่ผลิตได้ยังขึ้นอยู่กับการแสดงออกของยีน การขับโปรตีนออกมานอกเซลล์ และคุณลักษณะของสายพันธุ์ (Sreekrishna *et al*., 1997) ที่เป็นแสมือนโรงงานการผลิตโปรตีน ดังนั้นปัจจัยอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโปรตีนที่สำคัญคือควรเลือกใช้ Mut (methanol utilization) phenotype คือสายพันธุ์ที่สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้

P. pastoris เป็นสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่อยู่ในคลาส Hemiascomycetes *P. pastoris* สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้โปรโมเตอร์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกได้ด้วยเมทานอลคือ alcohol oxidase promoter หรือ AOX ดังนั้นเมื่อดำเนินการหมักโดยใช้ *P. pastoris* กลีเซอรอลจะถูกใช้สำหรับเป็นอาหารให้เชื้อได้มีการเจริญที่ความเข้มข้นสูงและเมทานอลจะเป็นตัวเหนี่ยวนำให้ผลิตโปรตีนที่ต้องการ (Lee *et al*., 2006)

จากรายงานทางวิชาการอื่นๆได้ระบุไว้ว่า *P. pastoris* ที่ใช้เป็นเป็นเซลล์โฮสต์มีอยู่ 3 ชนิด โดยแบ่งตามความสามารถในการใช้เมทานอล สายพันธุ์แรกเป็นสายพันธุ์ตามธรรมชาติ หรือ methanol utilization plus (Mut^+) phenotype เป็นสามารถที่สามารถใช้เมทานอลได้ปกติ ในกระบวนการหมักจำเป็นที่จะต้องป้อนเมทานอลในอัตราที่สูง (Cereghino and Cregg, 2000) สายพันธุ์ที่สองคือ methanol utilization slow (Mut^S) หรือเป็นสายพันธุ์ที่ใช้เมทานอลได้น้อย ทำให้สามารถเจริญได้ช้ากว่าสายพันธุ์

แรก สายพันธุ์ที่สามคือ methanol utilization minus strain เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถใช้เมทานอลได้ (Hartner, 2006) การเลือกสายพันธุ์ที่สามารถใช้เมทานอลได้ หรือ Mut phenotype ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการวิจัยหรือขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ต้องการผลิต

โดยปกติแล้วนักวิจัยส่วนใหญ่มักใช้สายพันธุ์ที่เป็น Mut^{S} phenotype เนื่องจากสามารถเพิ่มผลผลิตของโปรตีนได้ (Sreekrishna *et al*., 1997) อีกทั้งยังสามารถทนต่อเมทานอลที่เหลือในถังหมักไม่ก่อให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเซลล์ ดังนั้นจึงง่ายต่อการผลิตเพื่อขยายขนาดกำลังการผลิต (Stratton *et al*., 1998) แต่อย่างไรก็ตามอัตราการเจริญของเชื้อของสายพันธุ์ Mut^{S} phenotype ต่ำกว่า สายพันธุ์ Mut phenotype อื่นๆ (Kim *et al*., 2009) ดังนั้นสายพันธุ์ Mut^{+} phenotype จึงนิยมนำมาใช้ในการผลิตโปรตีนอย่างแพร่หลายเพื่อใช้สำหรับเป็นเซลล์โฮสต์ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (Peng *et al*., 2004; Chaoenrat *et at*., 2005; Kupradit, 2006) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้*.pastoris* Y-11430 ที่เป็นสายพันธุ์ธรรมชาติใช้เป็นเซลล์โฮสต์ในการผลิตรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนส

1.4.2 อุณหภูมิและความเป็นกรด-ด่าง (pH)ในการเลี้ยงเชื้อ

เพื่อที่จะให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูง การควบคุมสภาวะในถังหมักนั้นเป็นสิ่งสำคัญมาก *P. pastoris* สามารถที่จะเจริญได้ในสภาพความเป็นกรด-ด่างที่กว้างคือระหว่าง 3-7 โดยที่ไม่มีผลต่ออัตราการเจริญ อย่างไรก็ตามการแปรผันของสภาวะต่างๆเหล่านี้อาจจะมีผลกระทบต่อความคงตัวของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้และความสามารถของเอนไซม์โปรติเอส (Jahic et al., 2003) การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเพื่อใช้มีหน้าที่การทำงานตามต้องการนั้นยังขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ อุณหภูมิในการเลี้ยงเชื้อสามารถส่งผลต่อการย่อยสลายรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้อีกด้วย

อุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการสร้างเซลล์และการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนในอาหารกลีเซอรอลของ *P. pastoris* นั้นมีความแตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องแบ่งออกเป็นสองระยะคือกระบวนการหมักแบบกะ และแบบกึ่งกะ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นสภาวะที่เหมาะสมของ *P. pastoris* สำหรับการสร้างเซลล์ในอาหารที่มีกลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน

ปัญหาสำหรับอีกประการหนึ่งในกระบวนการหมักคือจะมีการปลดปล่อยเอนไซม์โปรติเอสซึ่งอาจจะไลซิสหรือย่อยเอนไซม์ที่ต้องการทำให้ผลผลิตที่ได้หลังสิ้นสุดกระบวนการหมักลดลงและทำให้ยากต่อการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ (Jahic *et al*., 2003) การลดอุณหภูมิลงในระหว่างกระบวนการหมักจะช่วยป้องกันการย่อยของเซลล์ ทำให้ผลผลิตโปรตีนที่ต้องการดีขึ้น (Kupsculik and Sevella, 2004) เทคนิคการควบคุมอุณหภูมิในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะหรือtemperature limited fed-batch (TLFB) ด้วย *P. pastoris* ได้รายงานไว้โดยจาอิคในปี 2546 (Jahic, 2003) ผลการทดลองพบว่า ได้ความเข้มข้น

ของเซลล์ที่สูง อัตราการตายของเซลล์ต่ำ ความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์สูงและการย่อยของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้ต่ำอีกด้วย

1.4.3 ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolve oxygen หรือ DO)

P. pastoris เป็นยีสต์สายพันธุ์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Gurramkonda, 2009) เป็นปัจจัยสำคัญในกระบวนการหมักเนื่องจากจะเกี่ยวข้องกับการแสดงอออกของยีนในการผลิตโปรตีน จะผลิตโปรตีนหากมีออกซิเจนที่เพียงพอพร้อมกับมีการกวนผสมเพื่อให้ออกซิเจนละลายทั่วถึงกันในน้ำหมัก นั่นคือมีค่าออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) ที่เหมาะสม (Stratton *et al*., 1998; Lee *et al*., 2003) การป้องกันการขาดออกซิเจนระหว่างกระบวนการหมักที่มีการผลิตเซลล์ความเข้มข้นสูงของยีสต์ *Pichia* นั้นควรคำนึงถึงและป้องกันไม่ให้เกิดขึ้น ให้ออกซิเจนตามต้องการเพื่อประโยชน์ในการเจริญและสร้างผลิตภัณฑ์ แก้ปัญหาการลดการใช้ออกซิเจนได้โดยลดอัตราการป้อนเมทานอลลงในถังหมัก นอกเหนือจากนั้นมีสองวิธีที่ทำให้เกิดความคุ้มทุนในกระบวนการหมักโดย *P. pastoris* คือ ดำเนินการหมักแบบกึ่งกะที่มีการจำกัดออกซิเจน ความดันอากาศในถังหมักอยู่ที่ 1.2 บาร์ อัตราการใช้ออกซิเจนหรือ oxygen transfer rate ที่ 35 เปอร์เซ็นต์ อีกวิธีหนึ่งคือกระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่มีการจำกัดเมทานอล ความดันอากาศในถังหมักอยู่ที่ 1.9 บาร์ อัตราการใช้ออกซิเจน ที่ 59 เปอร์เซ็นต์ จากวิธีการทั้งสองที่กล่าวข้องต้นทำให้ปริมาณเซลล์มีการเพิ่มขึ้นเพียง 7 และ 12 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากการจำกัดออกซิเจนในถังหมักมีผลต่อ *P. pastoris* และการให้ความดันระหว่างการหมักสูงมีผลทำให้ผลผลิตเซลล์มีค่าลดลง จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าการให้ระดับออกซิเจนที่ต่ำจะส่งผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ต้องการได้ (Lee *at al*., 2003, Cereghino and Cregg 2000)

อย่างไรก็ตามการลดการใช้ออกซิเจน หรือลดการใช้เมทานอลเพื่อป้องกันการจำกัดออกซิเจนในระหว่างระยะเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีนอาจทำให้ส่งให้การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดยเชื้อ *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกด้วยระบบโปรโมเตอร์ AOX1 ได้ (Jahic *et al*., 2003; Charoenrat *et al*., 2005; Trentmann, 2004)

1.4.4 ความเข้มข้นของกลีเซอรอล

ความเข้มข้นของเซลล์มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในช่วงระยะเริ่มแรกของระยะที่สองคือระยะที่ดำเนินการหมักที่มีการป้อนกลีเซอรอลลงในถังหมัก ซึ่งเป็นระยะที่พิสูจน์ได้ว่ามีความสำคัญเกี่ยวกับการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน (Chu *et al*., 2007) การแบ่งตัวของเซลล์จะสามารถเกิดขึ้นได้ดี

เมื่ออยู่ในระยะที่มีการป้อนกลีเซอรอล มีการใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ และเพื่อที่จะให้ได้โปรตีนผลผลิตสูง ความเข้มข้นของเซลล์ควรจะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย มีหลายนักวิจัยได้เสนอแนะว่าความเข้มข้นของเซลล์ควรประมาณ 40 กรัมต่อลิตรก่อนที่จะเริ่มเหนี่ยวนำเพื่อให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (Jahic et al., 2002; Chaoenrat, 2005; Kupradit, 2006)

ระยะแรกคือช่วงการหมักแบบกะที่มีการป้อนกลีเซอรอล ปริมาณกลีเซอรอลที่เติมมากที่สุดควรอยู่ที่ 40 กรัมต่อลิตร เพื่อที่จะไม่ก่อให้เกิดยับยั้งจากกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นมากเกินไปในถังหมัก จากนั้นจะเข้าสู่ระยะที่มีการจำกัดการเติมกลีเซอรอล ซึ่งจะดำเนินการต่อไปจนกระทั่งปริมาณเซลล์ที่ได้ตามต้องการ (Gurramkonda, 2009) รูปแบบการป้อนกลีเซอรอลที่ต่างๆนมีการทดลองจากนักวิจัยมากมายเพื่อที่จะพัฒนาให้มีการเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นสูง (Wang *et al*., 2009) การป้อนกลีเซอรอลเข้าสู่ถังหมักแบบเอ๊กซ์โปเนนเชียล พบว่าประสบความสำเร็จในการได้เซลล์ความเข้มข้นสูงมากกว่าการป้อนแบบอัตราคงที่ (Lee *et al*., 2003) การพัฒนารูปแบบการป้อนแบบเอ๊กซ์โปเนนเชียลโดยการลดอัตราการป้อนกลีเซอรอล เพื่อให้เกิดการสร้างเซลล์ในระยะที่เซลล์มีการเจริญ

1.4.5 ความเข้มข้นของเมทานอล

ประสิทธิภาพของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้โดย *P. pastoris* ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้กระบวนการหมักถูกพัฒนาขึ้นด้วยรูปแบบกระบวนการหมักในระยะการผลิตที่มีการป้อนเมทานอลที่แตกต่างกันภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้แล้ว

การสะสมเมทานอลแบบทันทีทันใดอาจเป็นผลให้โปรโมเตอร์ AOX สูญเสียหน้าที่ได้และส่งผลให้เซลล์ยีสต์ *P. pastoris* ตายได้เช่นเดียวกัน (Jahic *et al*., 2006) การป้องกันเมทานอลความเข้มข้นสูงที่เกิดขึ้นในน้ำหมักได้มีการสนับสนุนจากหลายๆนักวิจัยว่ามีความสำคัญ เนื่องจากว่าอาจทำให้มีการสร้างสารตัวอื่นๆ เช่น ฟอร์มาลดีไฮด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อการมีชีวิตของเซลล์และผลผลิตของโปรตีนที่ต้องการ (Rosenfeld, 1999) ซึ่งถือเป็นสิ่งสำคัญที่ควรคำนึงถึงความเข้มข้นของเมทานอลไม่ให้เกิน 3-5 กรัมต่อลิตร ที่ไม่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของยีสต์ตามไคเนติกส์ของโมนอด (Jahic *et al*., 2006; Ayed *et al*., 2008) หากความเข้มข้นของเมทานอลสูงมากกว่าค่าที่ได้กล่าวไปนั้นจะทำให้เกิดการยับยั้งด้วยสับสเตรต โดยเกิดการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (uncompetitive inhibition model) (Kupcsulik and Sevella, 2004; Kobayashi *et al*., 2000; Zhang *et al*., 2000)

ระยะการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลนั้นถือเป็นระยะที่มีความสำคัญ เพราะเนื่องจากกิจกรรมของโปรโมเตอร์ AOX ต่ำ ทำให้เมทานอลในระบบเกิดการสะสมได้ง่าย อีกทั้งอัตราการป้อนเมทานอลระหว่าง

ระยะของการผลิตโปรตีนยังมีความสำคัญอีกเช่นเดียวกัน เพราะว่าเมทานอลไม่เพียงแต่กระตุ้นหรือเหนียวนำการผลิตโปรตีน แต่ยังเป็นแหล่งพลังงานให้กับเซลล์โฮสต์ได้อีกด้วย (Aved, 2008) ปริมาณเมทานอลที่มากเกินไปจะยับยั้งการเจริญของเซลล์โฮสต์ ในขณะที่หากแหล่งพลังงานหรือเมทานอลที่ไม่เพียงพอหรือน้อยเกินไป จะทำให้เซลล์เจริญได้ไม่ดี รวมทั้งการผลิตโปรตีนไม่ดีตามไปด้วย (Katakura, 1998) ดังนั้นอัตราการป้อนเมทานอลในกระบวนการหมักจึงมีความสำคัญที่ต้องศึกษาให้อยู่ในปริมาณที่พอเหมาะ

รูปแบบการป้อนเมทานอล เกี่ยวข้องการอัตราการเจริญจำเพาะของเชื้อ ทั้งยังเป็นปัจจัยสำคัญที่จะทำให้การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้มากที่สุดเท่าที่จะผลิตได้ (Cos *et al*., 2005) อีกทั้งยังเกี่ยวข้องกับการแสดงอกกของโปรตีน การใช้ออกซิเจนและการใช้เมทานอลในระหว่างการหมัก (Kobayashi *et al*., 2000; Hellwig *et al*., 2000) อย่างไรก็ตามการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของรูปแบบกระบวนการหมักแบบกึ่งกะค่อนข้างยาก ในทางตรงกันข้ามการใช้กระบวนการหมักรวมหลายขั้นตอนเข้าด้วยกันคือหมักแบบกะและกึ่งกะดังเช่นในงานวิจัยนี้น่าเป็นที่ได้เปรียบมากกว่า เนื่องจากสามารถควบคุมในแต่ละขั้นตอนแยกกันได้ การป้อนเมทานอลในการผลิตรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนส อัตราของเมทานอลต่อความเข้มข้นของเซลล์ต้องมีความเหมาะสมซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไป

1.5 การผลิตและการทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนท์เอนไซม์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้น (rEK_L)

สำหรับโฮสต์ในระบบรีคอมบิแนนท์ในการผลิตรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นนั้นมีหลากหลาย อาทิเช่นงานวิจัยของ LaVallie และคณะ ได้ใช้สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมถูกนำมาเป็นเซลล์โฮสต์ในการแสดงออกของเอนไซม์ ผลที่ได้คือรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นที่ขับออกมานอกเซลล์ COS-1 มีระดับต่ำมาก ทั้งยังมีการทำงานของเอนไซม์ที่ไม่ดี (LaVallie *et al*., 1993) และรายงานวิจัยอื่นๆก็มีการระบุไว้เช่นเดียวกันว่าการทำงานของเอนไซม์(activity) ของเอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นที่มีการแสดงออกด้วยเซลล์ชนิดโปรคาริโอตนั้นมีประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ต่ำ (Yuan and Hua, 2002 และ Tan *et al*., 2007) นอกจากนี้ได้มีผลิตเอนไซม์เอ็นเทอโรไคเนสใน *Aspergillus niger* และ *Saccharomyces cerevisiae* โดยใช้อาหารที่มีองค์ประกอบหลากหลาย พบว่าได้เอนไซม์ในปริมาณต่ำที่ 1.9 และ 3.8 มิลลิกรัมต่อลิตร (Svetina *et al*., 2000; Kim *et al*., 2005) ถึงแม้ว่าเอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นที่ผลิตจาก *P. pastoris* จะมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่ต่ำกว่าเมื่อผลิตโดย *A. niger* แต่หากเปรียบเทียบผลผลิตพบว่าสูงกว่า รวมทั้งการเลี้ยงยีสต์จะง่ายกว่าการเลี้ยง *A. niger* ที่เป็นรา ดังนั้น *Pichia pastoris* จึงกลายเป็นเซลล์โฮสต์ที่มีชีวิตที่เหมาะสำหรับให้เกิดการแสดงออกของยีนในการผลิตโปรตีน เนื่องจากหลายเหตุผลด้วยกันคือ ให้ผลผลิตสูง มีกระบวนการเปลี่ยนแปลงหลังจากการสังเคราะห์

โปรตีน (post-translational modification) ซึ่งไม่มีในสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต ดังนั้นทำให้โปรตีนที่ผลิตออกมาทำงานได้ดีขึ้น (Peng *et al*., 2004; Zhang *et al*., 2008) จึงถือได้ว่า *Pichia pastoris* เหมาะที่จะนำมาใช้เป็นเซลล์โฮสต์ในการผลิตรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสมากที่สุด

ในปัจจุบันการแสดงออกของยีนใน *Pichia* ประสบผลสำเร็จเป็นอย่างมาก หากเปรียบเทียบกับ *E. coli* เนื่องจาก *Pichia* มีกระบวนการเปลี่ยนแปลงหลังการสังเคราะห์โปรตีน เช่น glycosylation ดังที่ได้กล่าวไปแล้ว (Fang and Huang, 2004) อีกทั้งผลผลิตการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนยังเพิ่มขึ้นหากเทียบกับ *A. niger* และ *S. cerevisiae* การผลิตเอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นที่มีการแสดงออกของยีนใน *P. pastoris* ได้ทำการศึกษาแล้ว พบว่าจากปริมาตรน้ำหมัก 1 ลิตร ทำการทำให้บริสุทธิ์เอนไซม์ที่ได้แล้วนั้น ได้เพียง 6.3 มิลลิกรัม และเพื่อที่จะเพิ่มผลผลิตของเอ็นเทอโรไคเนสสายสั้น เซลล์โฮสต์หรือเซลล์เจ้าบ้านที่เป็นสายพันธุ์เชื้อที่สามารถใช้เมทานอล รวมถึงค่าความเป็นกรด-ด่าง แหล่งคาร์บอนและความเข้มข้นของเซลล์ในกระบวนการหมักจึงจำเป็นที่จะต้องศึกษา

จากการศึกษาการผลิตและการทำบริสุทธิ์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้น ได้มีรายงานว่าผลผลิตที่ได้ที่ไม่ได้ทำบริสุทธิ์ พบว่าสามารถผลิตได้ 350 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังจากที่มีการเหนียวนำไป 120 ชั่วโมง (Peng *et al*., 2004) และ 479.99 มิลลิกรัมต่อลิตรหลังจากเหนี่ยวนำ 97.5 ชั่วโมง (Zhang *et al*., 2008) หากทำบริสุทธิ์รีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นแล้วพบว่า จะได้ผลผลิตสูงสุดอยู่ที่ 150 มิลลิกรัมต่อ 1 ลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Peng *et al*., 2004) ความสามารถในการทำงานของเอนไซม์คือ 2.88×10^{7} ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน (Zhang *et al*., 2008)

การทำบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นสามารถทำได้โดยใช้เทคนิคทางโครมาโทกราฟฟีและในหลายๆวิธีที่รายงานไว้ใน ตาราง 2 สำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นโดย *P. pastoris* ได้มีรายงานเกี่ยวกับการทำบริสุทธิ์ไว้โดยหลายนักวิจัย อาทิเช่น มีการใช้ทั้ง STI resin affinity chromatography (Collin-Racie *et al*., 1995; Fang and Huang., 2004), anion exchange chromatography, Q sepharose fast flow (Peng *et al*., 2004), cation exchange chromatography, SP fast flow (Kupradit, 2006) หรือ Nickel affinity column (Peng *et al*., 2004) สำหรับการบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นที่ผลิตโดย *E. coli* นั้นทำโดย Nickel affinity column และ STI–Sepharose chromatography (Vozza *et al*., 1996) ถือเป็นกระบวนการที่ง่ายและถูกกว่า นอกจากนี้ STI column ได้มีการใช้สำหรับบริสุทธิ์ของรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นจาก *A. niger* (Svetina *et al*., 2000) และใช้เพียงขั้นตอนเดียวสำหรับเทคนิค nickel affinity chromatography ที่ใช้สำหรับโปรตีนที่ผลิตจาก *S. cerevisiae* (Choi *et al*., 2001)

ตาราง 2 สรุปงานวิจัยที่เกี่ยวกับการผลิตรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นในเซลล์โฮสต์ที่ต่างกัน

เซลล์โฮสต์	ความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (มิลลิกรัมต่อลิตร)	กิจกรรมจำเพาะของรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (ยูนิตต่อมิลลิกรัมของโปรตีนที่ทำบริสุทธิ์)	อ้างอิง
Mammalian COS cells	โปรตีนที่ปลดปล่อยออกมาอยู่ในระดับต่ำ	กิจกรรมของเอนไซม์ต่ำมาก	LaVallie, 1993
E. coli	43	720	Yuan and Hua, 2002
	20	ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์	Gasparian, 2003
	106	110 ± 10	Tan, 2007
S. cerevisiae	3.8	เป็นโปรตีนที่มีการทำงานได้สูง protein	Kim, 2005
A. niger	1.9	19.88	Svetina, 2000
P. pastoris	6.3	-	Vozza, 1996
	350*		Peng, 2004
	150	9000	
	5.4	ได้โปรตีนที่มีความจำเพาะในการตัดสูงและสามารถตัดโปรตีนออกจากฟิวชันโปรตีนได้ดี	Fang, 2004
	10.9	2.88×10^{7}	Fang and Huang, 2004
	479.99*	13,619.14**	Zhang, 2008

หมายเหตุ: * คือ ปริมาณโปรตีนทั้งหมด (หน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร)

** หน่วยคือ ยูนิตต่อลิตร

1.6 กระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ Downstream processes

ภายหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการหมักหรือเมื่อปฏิกิริยาของเอนไซม์สิ้นสุดลงแล้ว ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักหรือจากปฏิกิริยาของเอนไซม์จะถูกนำมาแยกและทำให้มีความบริสุทธิ์ กระบวนการแยกดังกล่าวนี้เรียกว่า กระบวนการหลังการหมัก (downstream processing) หรือกระบวนการแยกทางชีวภาพ (bioreparation) จะเห็นได้ว่ากระบวนการทำให้บริสุทธิ์นั้นมีอยู่หลายขั้นตอน จึงมีความเป็นไปได้สูงที่ในระหว่าง ขั้นตอนต่าง ๆ เหล่านี้จะมีการสูญเสียผลิตภัณฑ์ไปเป็นจำนวนมาก ในปัจจุบันได้มีความสนใจในการแยกโดยใช้เยื่อแผ่น (membrane separation process) เข้ามาพัฒนาในการลดขั้นตอนต่าง ๆ ของการทำให้บริสุทธิ์ให้มีขั้นตอนน้อยที่สุดโดยขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์สามารถลดลงให้เหลือภายในขั้นตอนเดียวเป็นการลดต้นทุนในการผลิต นอกจากนี้ ยังทำให้สามารถลดการสูญเสียผลิตภัณฑ์ในระหว่างกระบวนการผลิตอีกด้วย (Lye *et al.*, 1999)

ผลิตภัณฑ์จากการหมักอาจหมายถึงตัวเซลล์เอง หรือเป็นองค์ประกอบที่อยู่ภายในน้ำหมักซึ่งเป็นองค์ประกอบที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นมาและถูกขับออกมานอกเซลล์ (extracellular) เมื่อเซลล์มีการเจริญเติบโตและสร้างผลิตภัณฑ์ หรืออาจจะเป็นองค์ประกอบที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular) ก็ได้ ถ้าผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเป็นตัวเซลล์ต้องทำการแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักก่อนแล้วจึง ล้างเซลล์และทำให้เซลล์แห้ง ในกรณีที่ผลิตภัณฑ์เป็นองค์ประกอบที่อยู่ภายในน้ำหมัก ภายหลังแยก เซลล์ออกจากน้ำหมักแล้ว จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เจือจางในของเหลวหมัก ต่อจากนั้น จึงนำผลิตภัณฑ์ ของเหลวที่ได้ไปทำการแยกและทำให้บริสุทธิ์ และหลังจากนั้นจึงนำส่วนของเหลวที่ได้ไปทำการแยกผลิตภัณฑ์และทำให้ผลิตภัณฑ์มีความบริสุทธิ์ต่อไป

การแยกทางชีวภาพจะมีลักษณะที่แตกต่างจากการแยกทางเคมีทั่วๆไป เนื่องจากคุณลักษณะเฉพาะตัวบางประการของผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ ดังต่อไปนี้คือ 1) ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการทางชีวภาพ มักจะมีความเข้มข้นที่เจือจาง 2) ผลิตภัณฑ์บางชนิดมีความไวต่ออุณหภูมิ 3) มีความหลากหลายของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากกระบวนการทางชีวภาพ 4) ผลิตภัณฑ์ภายในเซลล์ มักจะมีองค์ประกอบของสารเจือปนที่ไม่ละลายรวมอยู่ด้วย 5) คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของผลิตภัณฑ์มักมีความคล้ายคลึงกับสารเจือปน 6) ผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพที่ได้จากการแยกต้องมีความบริสุทธิ์สูง เพื่อความปลอดภัยของผู้ใช้

ด้วยคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพ จึงเป็นข้อจำกัดสำหรับกระบวนการแยกโดยทั่วไป บางวิธีที่ไม่อาจใช้ในกรณีนี้ และในบางครั้งอาจจะจำเป็นต้องพัฒนาวิธีใหม่ที่เหมาะสมขึ้นมาใช้ในการแยก สำหรับการออกแบบกระบวนการหรือการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ นอกจากต้องคำนึงถึงชนิดและคุณภาพของผลิตภัณฑ์แล้ว ยังต้องพิจารณาปัจจัยอื่นๆร่วมด้วย เช่น ตำแหน่งของ

ผลิตภัณฑ์และสารเจือปนในกระบวนการผลิต ประโยชน์ของผลิตภัณฑ์ที่ต้องการรวมทั้งความคุ้มทุนของกระบวนการแยกที่นำมาใช้อีกด้วย

1.7 กระบวนการแยกโดยใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์

การใช้เยื่อแผ่นสังเคราะห์ในการแยกผลิตภัณฑ์ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากในปัจจุบันเพื่อจุดประสงค์ในการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก (Doig *et al.*, 1998) เอนไซม์เป็นโปรตีนซึ่งมีคุณสมบัติที่เป็นประจุ จะสามารถใช้กระบวนการแยกอื่นๆที่มีการแยกตามประจุมาร่วมกับการแยกด้วยเยื่อแผ่นอีกทางหนึ่ง เพื่อพัฒนากระบวนการหรือเทคนิคให้มีประสิทธิภาพที่สุด ทั้งนี้ต้องมีการรวบรวมข้อมูลและทบทวนวรรณกรรมจากวารสารวิชาการอื่นๆที่มีการศึกษาเทคนิคที่ใกล้เคียง เพื่อที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในระบบนี้และเกิดความเป็นไปได้อย่างสูงที่สุด

เยื่อแผ่นสังเคราะห์มีลักษณะเป็นแผ่นบาง ๆ ที่กั้นระหว่างของไหลสองชนิดโดยอาจจะเป็นของเหลวหรือแก๊สก็ได้และมีความสามารถในการคัดเลือกผ่านของสารเข้า-ออกหรือที่เรียกว่า semi-permeable property การศึกษากระบวนการแยกโดยใช้เยื่อแผ่นนั้นได้มีการศึกษาครั้งแรกใน ค.ศ. 1748 (พ.ศ. 2291) โดยนักวิทยาศาสตร์ชาวฝรั่งเศสชื่อ Abbá Nolet จากการสังเกตปรากฏการณ์ออสโมซิสของน้ำจากน้ำเกลือผ่านผนังเนื้อเยื่อของกระเพาะหมู จากนั้นมากระบวนการแยกโดยเยื่อแผ่นก็ได้พัฒนามาเรื่อย ๆ ตามลำดับ การเลือกชนิดของเยื่อแผ่นให้เหมาะสมนั้นจะต้องพิจารณาถึงสมบัติทางกายภาพและเคมีของสารที่ต้องการแยกเป็นสำคัญ โมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเช่นโปรตีน เอ็นไซม์ และอิมัลชั่น (emulsion) สามารถแยกออกจากสารละลายได้โดยใช้กระบวนการอัลตร้าฟิลเตรชั่น (ultrafiltration) เป็นต้น

1.7.1 จำแนกตามแรงขับดัน (driving forces)

แรงขับดัน (driving force) ที่ใช้ในการแยกโดยใช้เยื่อแผ่นทำให้เกิด permeate ผ่านชั้นของเยื่อแผ่น แรงขับดันนี้เกิดขึ้นมาจากผลต่างของค่าศักย์ทางเคมีของสารในด้านของ permeate กับในด้านของสารป้อน (feed) ซึ่งค่าศักย์ทางเคมีนั้นจะบ่งบอกถึงพลังงานภายในของสารเคมีนั้นเนื่องมาจากความต่างกันของความดัน อุณหภูมิ ศักย์ทางไฟฟ้าหรือความเข้มข้นที่อยู่ระหว่างด้านทั้งสองของเยื่อแผ่น ค่าอัตราการถ่ายเทมวลจำเพาะหรือฟลักซ์ของสาร i (J_i) จะเป็นไปตามกฎข้อแรกของฟิค ซึ่งว่าด้วยการแพร่ดังสมการ

$$J_i = -D_i \frac{d\chi_i}{dy} \qquad (1)$$

ซึ่งค่า $d\chi_i/dy$ หมายถึงค่าศักย์ทางเคมีของสารที่เปลี่ยนไปต่อเยื่อแผ่นที่มีความหนาเท่ากับ y ส่วน D_i นั้นจะหมายถึงค่าสัมประสิทธิ์การแพร่ของสาร i เครื่องหมายลบแสดงถึงทิศทางของการถ่ายเทมวลที่จะเคลื่อนที่จากด้านที่มีศักย์สูงไปยังด้านที่มีศักย์ต่ำกว่าเสมอ

ตาราง 3 แสดงถึงการจำแนกชนิดของเยื่อแผ่นออกเป็นกระบวนการต่าง ๆ โดยใช้แรงขับดันเป็นตัวกำหนด นอกจากนี้แล้ว ผลต่างของความเข้มข้นก็เป็นแรงขับดันอีกชนิดหนึ่งที่ใช้ในการจำแนกชนิดของเยื่อแผ่น โดยอาศัยหลักทฤษฎีของการแพร่ของสารซึ่งจะเคลื่อนที่จากแหล่งที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่แหล่งที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าเสมอ และ การถ่ายเทมวลจะหยุดลงเมื่อความเข้มข้นของสารในสองแหล่งนี้เท่ากัน การแพร่นี้เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นได้เอง ทำให้ไม่ต้องการพลังงานจากภายนอกมาขับเคลื่อน การประยุกต์ใช้เยื่อแผ่นโดยใช้ผลต่างของความเข้มข้นเป็นแรงขับดันนั้นมีอยู่หลายอย่างด้วยกัน ตัวอย่างแรกที่จะขอกล่าวในที่นี้คือไตเทียม ซึ่งมีการใช้เยื่อแผ่นไดอะไลซิสทำการแยกยูเรีย กรดยูริก และ ครีเอทินีน (creatinine) ซึ่งเป็นของเสียจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของโปรตีน ในร่างกายคนปกตินั้น สารเหล่านี้จะถูกกำจัดออกทางปัสสาวะโดยหน่วยกรองเล็ก ๆ ที่มีอยู่ภายในไต ถ้าหากไตไม่ทำงานแล้วจะเกิดภาวะเลือดเป็นพิษซึ่งจะเป็นอันตรายต่อผู้ป่วยได้ ในขั้นตอนการฟอกเลือดนั้น เยื่อแผ่นเซลโลเฟนจะถูกใช้ในการสัมผัสกับเลือดผู้ป่วย ส่วนอีกด้านหนึ่งของเยื่อแผ่นจะมีการมีการใช้สารละลายอิเลคโตรไลท์ ซึ่งได้มีการปรับแรงดันออสโมติกให้เท่ากับในเลือด ทำการสกัดเอาของเสียดังที่ได้กล่าวมาแล้วออกจากเลือด ส่วนอิออนต่าง ๆ โดยเฉพาะโซเดียมและโปแตสเซียมจะไม่ผ่านเยื่อแผ่น เพราะว่าความเข้มข้นของสารดังกล่าวมีค่าเท่ากันทั้งสองด้านของเยื่อแผ่นเป็นผลมาการใช้สารละลายอิเลคโตรไลท์นั่นเอง (Cussler, 1997)

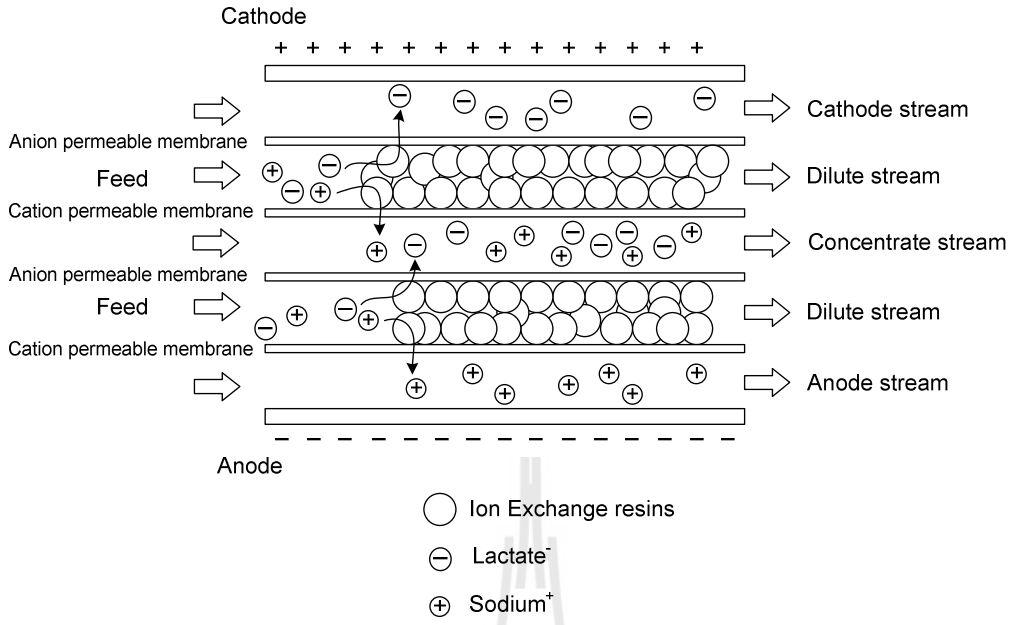
ตาราง 3 การจำแนกเยื่อแผ่นโดยอาศัยแรงขับดันเป็นตัวกำหนด (Huang, 2007)

กระบวนการแยกด้วยเยื่อแผ่น	แรงขับดัน (Driving force)
เพอร์แวปเพอร์เรชั่น (Pervaporation)	ผลต่างความดันไอ (Gradient of vapor pressure)
อัลตร้าฟิลเตรชั่น (Ultrafiltration)	ผลต่างความดัน (Pressure gradient)
การแยกก๊าซ (Gas permeation)	ผลต่างความดัน (Pressure gradient)
ออสโมซิสแบบผันกลับ (Reverse osmosis)	ผลต่างความดัน (Pressure gradient)
ไดอะไลซิส (Dialysis)	ผลต่างความเข้มข้น (Concentration gradient)
เพอร์สแทรกชั่น (Perstraction)	ผลต่างความเข้มข้น (Concentration gradient)
อิเลคโตรไดอะไลซิส (Electrodialysis)	ผลต่างศักย์ไฟฟ้า (Gradient in electrical potential)

1.8 ระบบอิเลคโตรดีไอออนไนเซชั่น (Electrodeionization, EDI)

ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้เยื่อแผ่นในการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากน้ำหมักหลายวิธีด้วยกัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กระบวนการอิเลคโตรไดอะไลซีส หรือ Electrodialysis (ED) ซึ่งมีการใช้เยื่อแผ่นที่มีประจุ (charged membranes) สองชนิดคือ anion และ cation-exchange membraneโดยที่แต่ละชนิดจะยอมให้อิออนประจุลบและประจุบวกผ่านได้ตามลำดับ และจะมีการใช้ไฟฟ้ากระแสตรง เป็นตัวทำให้เกิดความต่างศักย์ของไฟฟ้าระหว่างเยื่อแผ่นทั้งสอง ทำให้ประจุเป็นลบสามารถแพร่ออกจาก anion-exchange membrane ได้ในขณะที่ประจุบวกจะแพร่ออกทาง cation-exchange membrane (Habova *et al.*, 2004;Madzingaidzo *et al.*, 2002a)

นอกจากนี้ ยังมีการปรับปรุงกระบวนการอิเลคโตรไดอะไลซีสให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นโดยเรียกกระบวนการนี้ว่า อิเลคโตรดีไอออนไนเซชั่น หรือ electrodeionization (EDI) ซึ่งกระบวนการนี้เป็นนวัตกรรมสำหรับการประยุกต์ใช้การแลกเปลี่ยนประจุ (Ion Exchange) กับ Electrodialysis ซึ่งเป็นเยื่อแผ่นชนิดที่มีประจุ ซึ่งจะมีความสามารถยอมให้สารที่มีประจุผ่าน ในขณะที่สารอื่น ๆ จะไม่สามารถผ่านเยื่อแผ่นชนิดนี้ได้ ส่วนการแลกเปลี่ยนประจุจะใช้เรซิ่นเพื่อจับสิ่งที่ต้องการในสารป้อนก่อนที่จะแพร่ผ่านเยื่อแผ่นออกไปที่ Anion permeable membrane และ concentrate stream ต่อไป (รูปภาพ 1) แสดงหลักการทำงานของกระบวนการ Electrodialysis ซึ่งเริ่มแรกได้มีการพัฒนาสำหรับการแยกเกลือ NaCl จากน้ำทะเลในการ ผลิตน้ำจืดบริสุทธิ์ซึ่งพบว่าได้ผลการทดลองเป็นอย่างดี (Mulder, 1991) ภายในของเครื่องมือ EDI นี้จะประกอบไปด้วยส่วนต่าง ๆ ที่สำคัญดังนี้คือ ส่วนเจือจาง (dilute stream) ส่วนเข้มข้น (concentrate stream) และ ส่วนที่เป็นขั้วไฟฟ้า (electrode compartment) ในช่องของส่วนเจือจางจะถูกเติมด้วยเรซิ่นสองชนิดที่สามารถจับอิออนที่มีประจุบวกและประจุลบได้ดี ซึ่งเรซินทั้งสองชนิดนี้จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถ่ายเทมวลของประจุจากในส่วนของสารป้อน (feed solution) ไปยังเยื่อแผ่นภายใต้แรงขับเคลื่อนซึ่งเป็นไฟฟ้ากระแสตรง เนื่องจากความเข้มข้นของอิออนจะเข้มข้นและเจือจางในช่องการไหลที่ต่างกัน ดังนั้นกระบวนการ EDI นี้จึงสามารถประยุกต์ใช้ได้ทั้งในการทำให้เจือจางหรือทำให้เข้มข้น ยกตัวอย่างเช่นในการผลิตน้ำปราศจากอิออน (deionized water) เราสามารถที่จะเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ได้ในด้านของส่วนเจือจาง สำหรับการผลิตกรดแล็กติกนั้นสารละลายกรดแล็กติกเข้มข้นจะถูกผลิตขึ้นในด้านของส่วนเข้มข้น



รูปภาพ 1 หลักการทำงานของเครื่อง Electrodeionization (EDI) (Matsuura, 1994)

ปริมาณการถ่ายเทมวลของอิออนที่ผ่านเยื่อแผ่นจะแปรค่าตามปริมาณของกระแสไฟฟ้าที่ใช้ โดยค่ากระแสไฟฟ้า (I)ที่ใช้ในการแยกอิออนจำนวนหนึ่งจะมีค่าเท่ากับ

$$I = \frac{zFQ\Delta C}{\eta} \qquad (2)$$

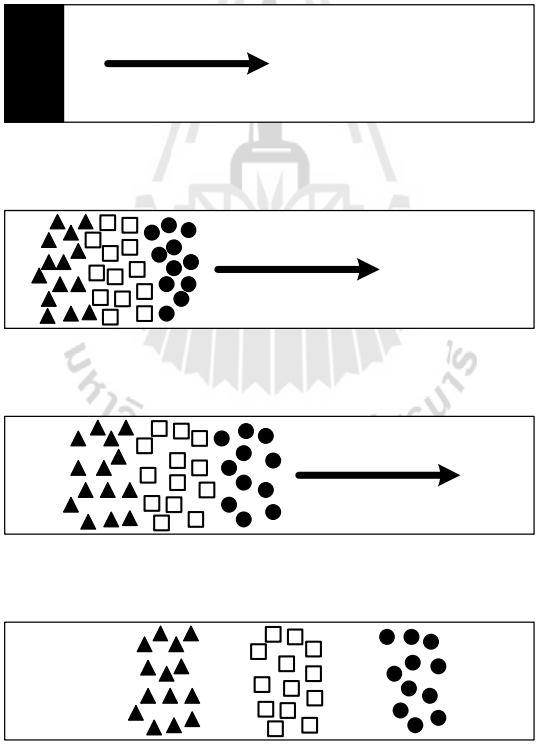
โดยที่ค่า z หมายถึง ค่า valence ของประจุ F คือค่าคงที่ของฟาราเดย์ (1 Faraday = 96,500 A s/equiv.) Q คืออัตราการไหลของสารป้อน ΔC หมายถึงความต่างของความเข้มข้นระหว่างเยื่อแผ่น และ η คือค่าประสิทธิภาพโดยรวมของกระแส (overall current efficiency) ตามลำดับ

1.9 การแยกสารด้วยเทคนิคโครมาโตรกราฟฟี่

โครมาโตรกราฟฟี่ (chromatography) เป็นเทคนิคที่มีการประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายสำหรับการแยกสารในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่นการวิเคราะห์หาปริมาณสารปนเปื้อน polychlorinated biphenyls (PCBs) ในน้ำมัน การตรวจหาสารดีดีทีในน้ำบาดาล เป็นต้น นอกจากนี้โครมาโตกราฟฟี่ยัง

ได้ถูกนำมาใช้ในการทำบริสุทธิ์สารเคมีในทางเภสัชกรรมและในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การทำบริสุทธิ์วิตามิน รวมถึงโปรตีนและกรดอะมิโนชนิดต่าง ๆ อีกด้วย

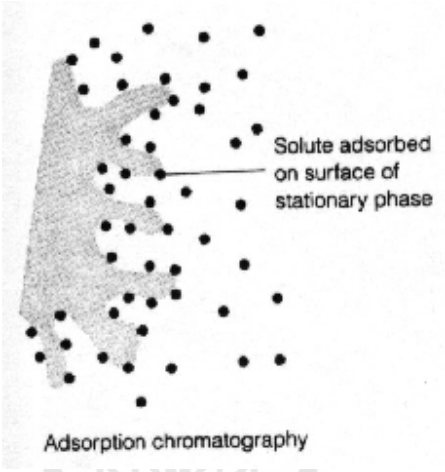
รูปภาพ 2 แสดงการแยกสารโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟี่ ซึ่งเป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดเทคนิคหนึ่งสำหรับการแยกผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมชาติ ซึ่งโดยทั่วไปมักจะอยู่กันในรูปของของผสม (mixture) เมื่อเริ่มทำการบรรจุสารลงในคอลัมน์ จะต้องทำการปั๊มตัวทำละลายซึ่งเป็นสถานะเคลื่อนที่ (mobile phase) เข้าไปในระบบ เพื่อทำให้ตัวอย่างเกิดการเคลื่อนที่ภายในคอลัมน์ สารชนิดต่าง ๆ จะเคลื่อนที่ในอัตราเร็วที่แตกต่างกัน เนื่องจากมีความแตกต่างกันของความสามารถในการดูดซับระหว่างสารและเรซิ่นที่บรรจุในคอลัมน์ ซึ่งเป็นสถานะคงที่ (stationary phase) ส่ง ผลให้เกิดการแยกออกจากกันภายในคอลัมน์และหลุดออกด้วยเวลาที่แตกต่างกัน และหากใช้อุปกรณ์ตรวจวัดที่ปลายของคอลัมน์และทำการสร้างกราฟ จะทำให้ได้ลักษณะของกราฟที่เรียกว่าโครมาโตแกรม (chromatogram)



รูปภาพ 2 การแยกสาร 3 ชนิด โดยใช้เทคนิคโครมาโตรกราฟฟี่

1.9.1 โครมาโตกราฟฟี่แบบดูดซับ (Adsorption chromatography)

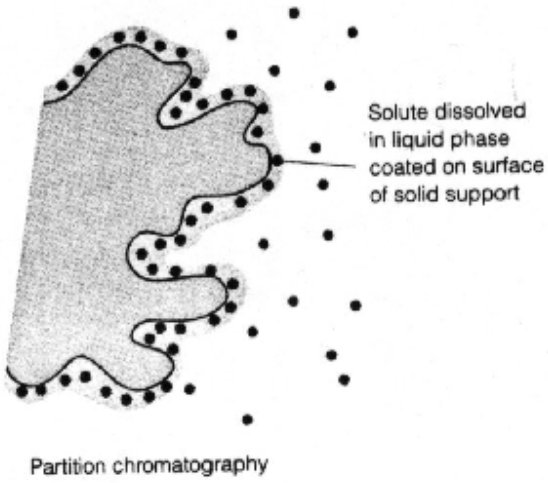
สารชีวโมเลกุลจะมีความสามารถในการดูดซับบนพื้นผิวของตัวดูดซับที่มีขั้วแตกต่างกัน เช่นซิลิกาเจล อะลูมินา หินไดอะตอมไมต์ (diatomaceous earth) และถ่านกัมมันต์ เป็นต้น โดยประสิทธิภาพของการดูดซับจะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของหมู่พันธะทางเคมี (functional group) ที่บริเวณพื้นผิวของตัวดูดซับนั้น ซึ่งอัตราการแยกของสารจะขึ้นกับสมดุลระหว่างสถานะคงที่และสถานะเคลื่อนที่ดังแสดงในรูปภาพ 3



รูปภาพ 3 หลักการทำงานของโครมาโตกราฟฟี่แบบดูดซับ

1.9.2 โครมาโตกราฟฟี่แบบแบ่งส่วน (partition chromatography)

โครมาโตกราฟฟี่แบบแบ่งส่วน (partition chromatography) มีหลักการทำงานโดยอาศัยความสามารถในการกระจายตัวของโมเลกุลของสารที่แตกต่างกัน ระหว่างสถานะเคลื่อนที่และฟิล์มบาง ๆ ที่เคลือบบนสถานะคงที่ (stationary phase) โดยหากฟิล์มที่เคลือบอยู่บนสถานะคงที่มีขั้วมากกว่าสถานะเคลื่อนที่จะเรียกว่า normal-phase chromatography และหากสารที่ต้องการแยกเป็นสารที่ไม่มีขั้วมักจะใช้สถานะคงที่ที่มีความเป็นขั้วน้อยกว่าสถานะคงที่ ซึ่งจะเรียกเทคนิคนี้ว่า reverse phase chromatography โดยสถานะคงที่ที่นิยมนำมาใช้จะเป็นสารประเภทไฮโดรคาร์บอนที่มีจำนวนคาร์บอน 8 หรือ 18 อะตอมเคลือบบนพื้นผิวของซิลิกาเจล ส่วนตัวทำละลายอินทรีย์ที่นิยมใช้มักจะเป็นระบบน้ำและอะซิโตไนไตร (water-acetonitrile) หรือ น้ำและเมทานอล ซึ่งสารจะถูกชะออกจากพื้นผิวของสถานะคงที่ตามการเพิ่มขึ้นของความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ดังรูปภาพ 4



รูปภาพ 4 หลักการทำงานของโครมาโตกราฟฟี่แบบแบ่งส่วน (partition chromatography)

1.9.3 โครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)

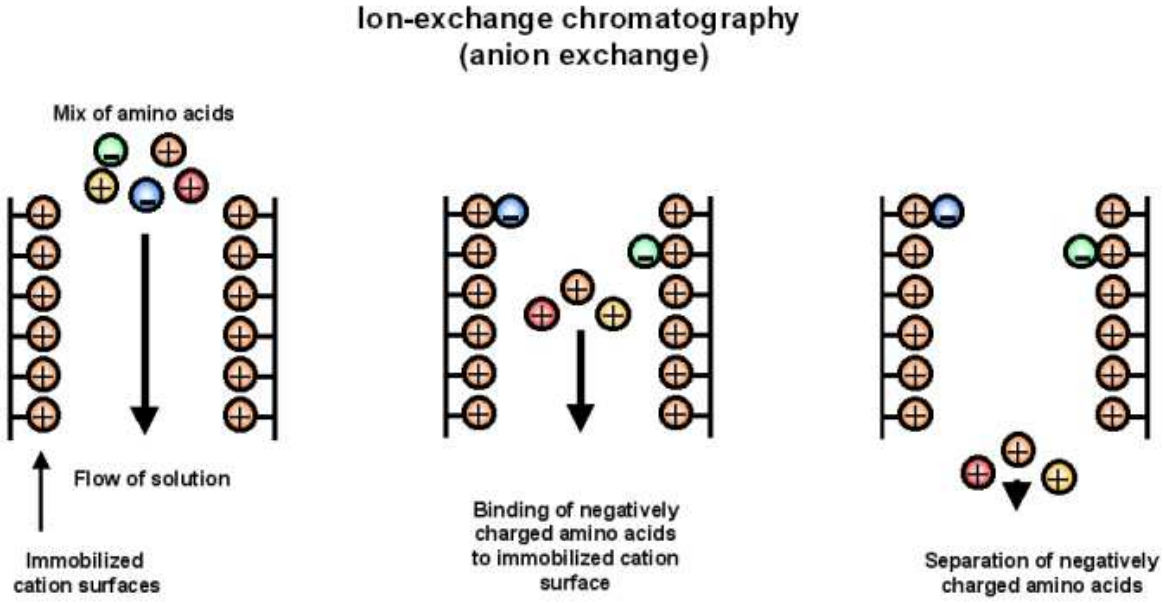
รูปภาพ 5 แสดงหลักการทำงานของโครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography) ซึ่งอาศัยหลักการในความแตกต่างของความสามารถในการดึงดูดสารที่มีประจุในด้านตรงข้ามกับประจุที่อยู่บนสถานะคงที่ โดยโครมาโตกราฟฟี่ชนิดนี้ นิยมนำมาประยุกต์ใช้ในการแยกสารที่มีขนาดใหญ่เช่นโปรตีนและสารแอนติไบโอติกต่าง ๆ ซึ่งเรซิ่นที่ใช้มักจะเป็นสารประเภทเซลลูโลสอะกราโลสหรือเด็กแตรน โดยจะมีการตรึงหมู่พันธะชนิด carboxymethyl หรือ diethylaminoethyl ลงบนเรซิ่นดังกล่าว ในระหว่างที่ทำการแยกสาร ตัวถูกละลายจะถูกชะโดยการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างหรือค่าความแรงของอิออน (ionic strength) ทำให้สารจะถูกชะออกมาในเวลาที่แตกต่างกัน โดยทั่วไปแล้ว โครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิดคือ

- Cation exchanger

เรซินชนิดนี้จะมีหมู่ธาตุที่เป็นกรดอยู่ในอะโรมาติกนิวเคลียส เตรียมได้โดยนำกรดซัลฟูริกทำปฏิกิริยากับโพลีเมอร์ของสไตรีนกับไดไวนิลเบนซีน หมู่ $–SO_3H$ จะเข้าไปอยู่ในโพลีเมอร์ ทำให้ได้เรซินที่สามารถจับกับสารที่มีประจุลบได้เป็นอย่างดี

- Anion exchanger

เรซินชนิดนี้จะมีหมู่ธาตุที่เป็นเบสอยู่ในอะโรมาติกนิวเคลียส โดยความแรงของเรซินจะลดลงจากเบสแก่เป็นเบสอ่อน ตามกลุ่มของเบส คือ quaternary > tertiary > secondary > amine ตามลำดับ



รูปภาพ 5 หลักการทำงานของโครมาโตกราฟฟี่แบบแลกเปลี่ยนประจุ (ion-exchange chromatography)

1.9.4. เจลโครมาโตกราฟฟี่ (Gel chromatography)

เทคนิคเจลโครมาโตกราฟฟี่ มีชื่อเรียกต่าง ๆ เช่น เจลฟิวเตรชั่นโครมาโตกราฟฟี่ (gel filtration chromatography) หรือ Size exclution หรือ Molecular sieve chromatography เป็นเทคนิคการแยกสารโดยอาศัยคุณสมบัติความแตกต่างกันของขนาด มวล และรูปร่างของสารตัวอย่าง โดยอาศัยคุณสมบัติของเม็ดเจลที่มีลักษณะช่องว่างภายในที่เกิดจากการเชื่อมไขว้ของโพลีเมอร์ที่ใช้ในการสร้างเจล (gel matrix) โดยภายในเม็ดเจลแต่ละเม็ดมีขนาดช่องว่างที่จำเพาะ โดยจะยอมให้สารที่มีขนาดโมเลกุลค่าหนึ่งผ่านเข้าไปในเม็ดเจลได้ ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่กว่าจะไม่สามารถผ่านเข้าไปได้ โดยจะถูกชะออกมากับสารละลายที่ใช้ชะก่อน จากหลักการข้างต้นเห็นได้ว่าสามารถแยกสารที่มีขนาดเล็กและใหญ่ออกจากกันได้ โครงสร้างของเม็ดเจลและการแยกสารตามขนาดโมเลกุลในขณะผ่านลงมาตามคอลัมน์แสดงดังรูปภาพ 6 ซึ่งสามารถใช้อธิบายกลไกในการแยกสารโดยเทคนิคเจลโครมาโตกราฟฟี่ ได้ดังนี้

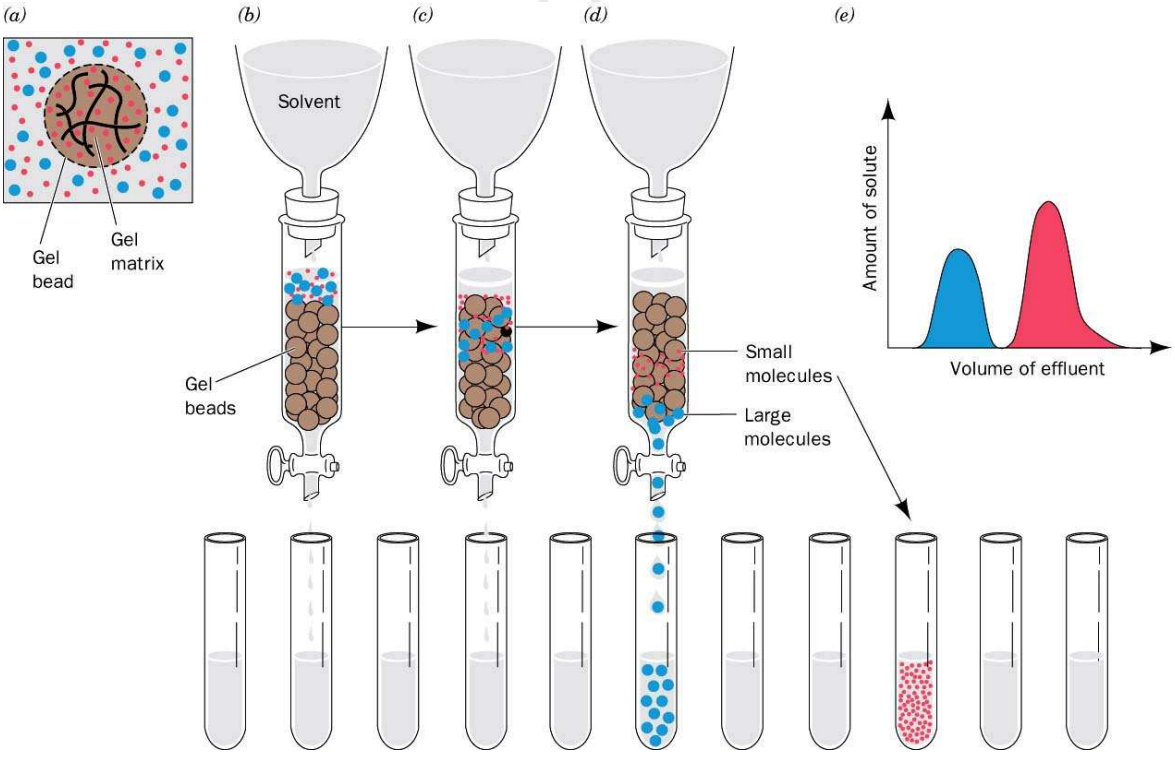
a) แสดงดังลักษณะของเม็ดเจล ประกอบด้วยส่วนเมทริกซ์เกิดจากการเชื่อมไขว้ของโพลีเมอร์สายยาว โดยระหว่างเส้นสายเหล่านี้มีช่องว่างอยู่ จากรูปเห็นได้ว่ามีสารที่มีขนาดโมเลกุลเล็ก ผ่านเข้าไปอยู่ในช่องว่างนี้ ส่วนสารที่มีขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปภายในช่องว่างดังกล่าวได้

b) แสดงการเคลื่อนที่ของสารตัวอย่างขณะเคลื่อนเข้าสู่ชั้นเจล

c) โมเลกุลที่มีขนาดเล็กจะสามารแทรกผ่านเข้าไปในช่องว่างภายในเจล ทำให้วนเวียนอยู่ภายในเม็ดเจลทำ และจะใช้เวลานานกว่าที่จะหลุดออกมาภายนอกเจลได้ ในขณะที่สารที่มีขนาดใหญ่ถูกไม่สามารถเข้าไปในเม็ดเจล และจเคลื่อนที่ผ่านลงมาตามคอลัมน์อย่างรวดเร็ว

d) สารโมเลกุลใหญ่เคลื่อนที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ในขณะที่สารขนาดเล็กกำลังถูกชะให้ไหลผ่านลงมาตามคอลัมน์อย่างช้า ๆ ดังนั้นสารที่มีขนาดเล็กจะหลุดออกมาจากคอลัมน์ในภายหลัง

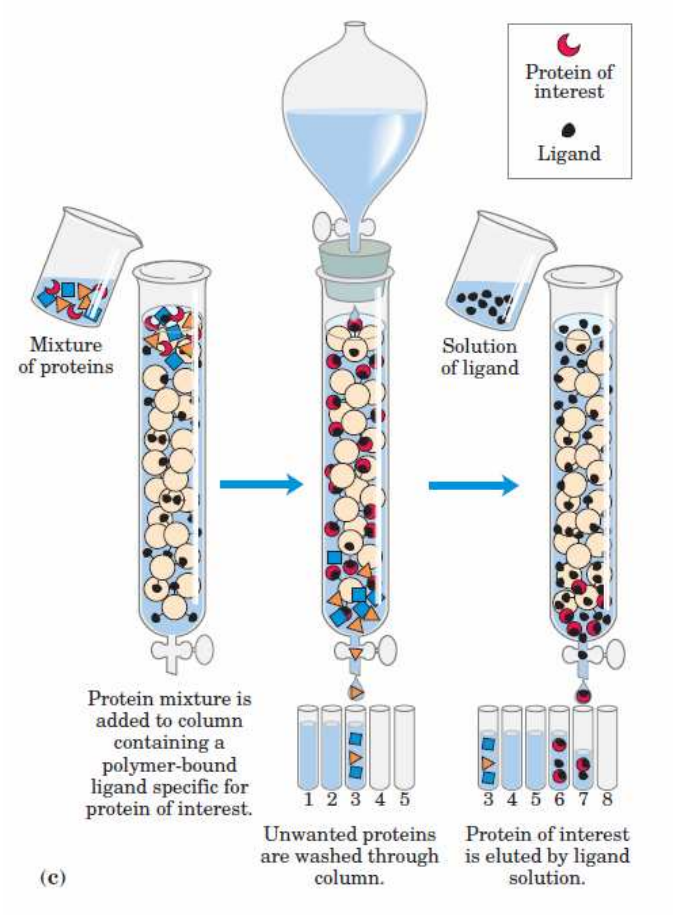
e) แสดงโครมาโตแกรม (chromatogram) ใช้บอกถึงช่วงเวลาของการแยกสารที่มีขนาดต่างกันออกจากกัน โดยการเพิ่มขึ้นของกราฟในช่วงแรกเป็นค่าของสารละลายโปรตีนที่มีขนาดอนุภาคใหญ่ ส่วนเส้นกราฟในช่วงหลังเป็นของโปรตีนที่มีขนาดเล็ก



รูปภาพ 6 หลักการทำงานของเจลโครมาโตรกราฟฟี่ (gel chromatography)

1.9.5. โครมาโตกราฟฟี่แบบจำเพาะ (Affinity chromatography)

โครมาโตกราฟฟี่ชนิดนี้อาศัยหลักการจับกันอย่างเฉพาะเจาะจงของสารชีวโมเลกุลเช่นเอ็นไซม์ ฮอร์โมน แอนติบอดี แอนติเจน กรดนิวคลีอิก วิตามิน หรือเซลจุลินทรีย์ กับพื้นผิวของสถานะคงที่ ซึ่งสารชนิดอื่น ๆ ที่ไม่มีความสามารถในการยึดจับด้วยแรงดังกล่าว จะถูกชะออกจากคอลัมน์อย่างรวดเร็ว คงเหลือแต่สารที่ต้องการแยกอยู่ภายในคอลัมน์ จากนั้นจึงทำการชะสารดังกล่าวออกมาในภายหลัง ซึ่งประสิทธิภาพในการแยกสารชีวโมเลกุลที่ต้องการ จะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของสารจำเพาะที่เรียกว่า ลิแกนด์ (ligand) ซึ่งถูกตรึงให้ติดอยู่บนสถานะคงที่ (stationary phase) ด้วยพันธะโควาเลนท์ โดยกลุ่มลิแกนด์ที่ยึดติดกับสถานะคงที่นี้เรียกว่า ลิแกนด์ตรึง (immobilized ligand) และจะมีความจำเพาะในการจับกับสารที่สนใจเป็นอย่างมาก และหลังจากที่ชะไล่สารอื่นที่ไม่จำเพาะกับลิแกนด์ออกไปจากคอลัมน์แล้ว จึงทำการปรับสภาวะเพื่อให้สารที่สนใจหลุดออกจากการยึดจับโดยลิแกนด์ ซึ่งหลักการที่กล่าวมาทั้งหมดแสดงดังรูปภาพ 7



รูปภาพ 7 หลักการทำงานของโครมาโตรกราฟฟี่แบบจำเพาะ (affinity chromatography)

1.10 จุดประสงค์ของโครงการวิจัย

1. ศึกษาค่าตัวแปรต่าง ๆ ที่มีผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นด้วยกระบวนการหมัก
2. ศึกษาถึงศักยภาพในการทำ Enterokinase protein ให้เข้มข้นขึ้นและบริสุทธิ์จากกระบวนการหมัก ด้วยเทคนิค อิเลคโตรดิไอออนไนเซชั่น
3. พัฒนาและประยุกต์ใช้ระบบอิเลคโตรดิไอออนไนเซชั่น หลังจากการหมัก Enterokinase ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเพื่อเปรียบเทียบกับค่าผลิตผล (production yield) กับกระบวนการหมักปกติ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 อุปกรณ์และสารเคมี

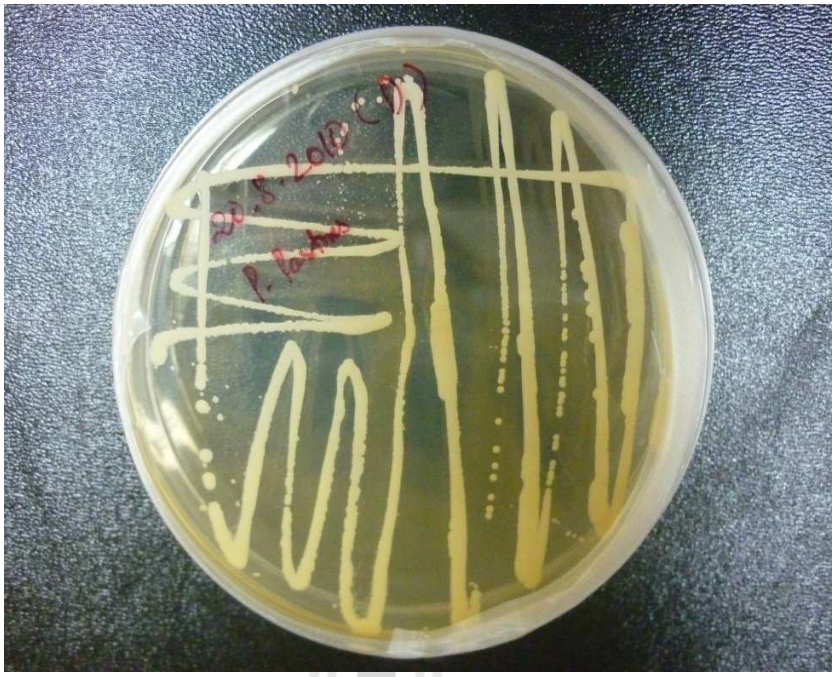
สำหรับอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยนี้ จะเป็นเครื่องมือที่มีอยู่แล้วบางส่วน ณ ห้องปฏิบัติการกระบวนการทางชีวภาพ อาคารปฏิบัติการ 3 และ 10 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ยกตัวอย่างเครื่องมือที่ใช้เช่น

1. Laminar flow
2. Spectrophotometer
3. pH meter
4. Hot plate stirrer
5. Autoclave
6. Incubator shaker
7. Fermenter 2 ลิตร
8. Microcentrifuge
9. เครื่องชั่ง

ทำการกรองเอาเซลล์แบคทีเรียออกโดยใช้ระบบไมโครฟิลเตรชั่น ซึ่งจะทำการไหลเวียนของสารป้อน (Feed) ผ่านเครื่องกรองไมโครฟิลเตรชั่น

2.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อที่ใช้ชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนเอ็นเทอโรไคเนสสายสั้น คือ *P. pastoris* Y11430 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เป็นพันธุ์ดั้งเดิมหรือไม่มีการดัดแปลงพันธุกรรมและสามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ในอัตราปกติ (Mut^+) ซึ่งได้เชื้อนี้มาจากงานวิจัยของ นส.ชนิดา กุประดิษฐ์ และ รศ.ดร. มารินา เกตุทัต-คาร์นส์ เพื่อให้เกิดการแสดงออกของยีนเอ็นเทอโรไคเนสสายสั้นพลาสมิดที่ใช้ในการแสดงออกคือ pPICZαB NH8 ซึ่งมีฮีสติดีน 8 โมเลกุลอยู่ด้านปลายอะมิโน (N-terminal) ของรีคอมบิแนนท์โปรตีน (Kupradit, 2006) และมีโปรโมเตอร์ AOX1 ซึ่งสามารถถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกได้ด้วยเมทานอลและใช้ zeocin resistance geneเป็นselectable marker



รูปภาพ 8 สายพันธุ์ *P. pastoris* Y11430 ที่มี pPICZαB NH8_EK_L

2.3 การเตรียมกล้าเชื้อ

ทำการขีดเชื้อ *P. pastoris* ลงบนอาหารวุ้น YPD (ส่วนประกอบตามภาคผนวก ก โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมเสร็จจะนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆในธรรมชาติ) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ จากนั้นเขี่ยโคโลนีเดี่ยวที่ได้ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และถ่ายเชื้อต่อจากหลอดเดิมลงในอาหารเหลว YPD ในขวดแก้วปริมาตร 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร glycerol BMGY (ส่วนประกอบตามภาคผนวก ก) ปริมาตร 80 มิลลิลิตร จากนั้นทำการบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที และ Zeocin ความเข้มข้น100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรถูกเติมลงไปในทุกๆการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ กล้าเชื้อที่ได้นี้เตรียมไว้สำหรับถ่ายลงอาหารหมักต่อไป

2.4 การศึกษากระบวนการหมักแบบกึ่งกะเพื่อผลิต rEK_L โดย *P. pastoris* ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพ

การผลิตเอนไซม์ rEK_L ในถังหมักขนาด 2 ลิตร(Sartorius, Germany) ที่มีอาหาร GBS (ส่วนประกอบตามภาคผนวก) ปริมาตร 950 มิลลิลิตร ก่อนกระบวนการหมัก ถังหมักต้องมีการเตรียมทั้งการฆ่าเชื้อและการเตรียมตัววัดค่าความเป็นกรด-ด่างให้ค่ามีความแม่นยำ (calibrate) PTM1 trace salts ถูกแยกเติมลงในถังหมักหลังจากการฆ่าเชื้อเสร็จสิ้นแล้ว สารละลายแอมโมเนีย 25 เปอร์เซ็นต์ถูกใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนและยังใช้เป็นตัวปรับค่าความเป็นด่างเพื่อให้ค่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสม สภาวะต่างๆในกระบวนการหมัก อาทิเช่น อุณหภูมิ pH ปริมาณออกซิเจน อัตราการให้อากาศ ความดัน อัตราการกวน อัตราการป้อนกลีเซอรอล และอัตราการป้อนเมทานอลถูกควบคุมโดยอัตโนมัติ สารป้องกันการเกิดฟองถูกเติมลงไปเพื่อยังยั้งไม่ให้ฟองมากเกินไปในระหว่างการหมัก สำหรับกระบวนการหมักทั้งหมดสามารถแบ่งได้เป็น 4 ระยะ ดังนี้ การเลี้ยง *P. pastoris* จะแบ่งเป็นสี่ช่วงคือ ช่วงแรกเป็นการเลี้ยงแบบกะ ด้วยกลีเซอรอลสำหรับใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและเมื่อกลีเซอรอลถูกใช้จนหมด จะเริ่มช่วงที่สองซึ่งเป็นการเลี้ยงแบบกึ่งกะโดยการเติม 50%กลีเซอรอล ลงในถังหมักเป็นเวลา 3.85 ชั่วโมง ช่วงที่สามเป็นช่วงเหนี่ยวนำให้เชื้อมีการสร้างและปลดปล่อยเอ็นไซม์ที่ใช้ในการย่อยสลายเมทานอล เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นจะเข้าสู่ช่วงที่สี่ คือช่วงการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน โดยการเติมเมทานอลลงในถังหมัก

2.4.1 ช่วงกระบวนการหมักแบบกะที่มีการเติมกลีเซอรอล (Glycerol batch phase)

สภาวะการหมักในช่วงนี้ มีการควบคุมอุณหภูมิอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส (Julabo, Germany) อัตราการใช้อากาศ 1 ปริมาตรต่อปริมาตรต่อนาที อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที และค่า pH ที่ 5.5 หัวเชื้อความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (ค่าความขุ่นของเซลล์ประมาณ 3.0) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ถูกเติมลงในถังหมักขนาด 2 ลิตรที่มีอาหาร GBS 950 มิลลิลิตร ที่เติม PTM1 trace salt 4.35 มิลลิลิตรต่อลิตร ในการหมักแบบกะเชื้อจะมีการเจริญจนกระทั่งใช้กลีเซอรอลจนหมด ซึ่งใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง

2.4.2 ช่วงกระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมกลีเซอรอล (Glycerol fed-batch phase)

หลังจากกระบวนการหมักแบบกะที่มีการเตมกลีเซอรอลลงไป อาหาร GF (ประกอบด้วยกลีเซอรอล 500 กรัมต่อลิตรและ PTM1 trace salts 12 มิลลิลิตรต่อลิตร) จะถูกเติมลงไปในถังหมัก

โดยอัตราการเติมเป็น 18.89 กรัมต่อชั่วโมงซึ่งได้ทำตามค่าที่ได้คำนวณไว้ที่ได้รายงานโดย Kupradit ในปี พ.ศ. 2549 โดยที่มีจุดประสงค์เพื่อที่ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 40 กรัมต่อลิตร หลังจากสิ้นสุดช่วงนี้ตามรายงายที่ได้ศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ของจาอิคและคณะในปี พ.ศ. 2546 และเจริญรัตน์ ในปี พ.ศ. 2549 การที่ควบคุมสภาวะการหมักให้ได้ตามที่กล่าวมานี้ก็เพื่อเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ อีกทั้งยังช่วยการส่งเสริมโปรโมเตอร์ AOX (Chiruvolu *et al*., 1998)

2.4.2 ช่วงเหนี่ยวนำโดยเมทานอล (Methanol induction phase)

การเริ่มช่วงเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล โดยการแทนที่อาหาร GF ด้วยอาหาร methanol feed medium (MF) (12 มิลลิลิตร ของ PTM1 trace salts ต่อ 1 ลิตรเมทานอล) ในอาหารการป้อนที่ช้ามาก เพื่อให้เวลาเพียงพอสำหรับการที่ *P. pastoris* ผลิตเอนไซม์ในวิถีกระบวนการเมทานอลเมตาบอลิซึม สภาวะการดำเนินการหมักควบคุมให้ได้เช่นเดียวกับในช่วงการหมักแบบกะที่มีการเติมกลีเซอรอล สำหรับปริมาตรน้ำหมักเริ่มต้นที่ 1 ลิตร ปริมาตรอาหาร MF 0.633 มิลลิลิตรถูกเติมลงในถังหมักจำนวน 5 ครั้ง ในเวลา 3 ชั่วโมง จนกระทั่ง *P. pastoris* สามารถที่จะปรับตัวให้ใช้เมทานอลเป็นสับสเตรตได้อย่างเต็มที่

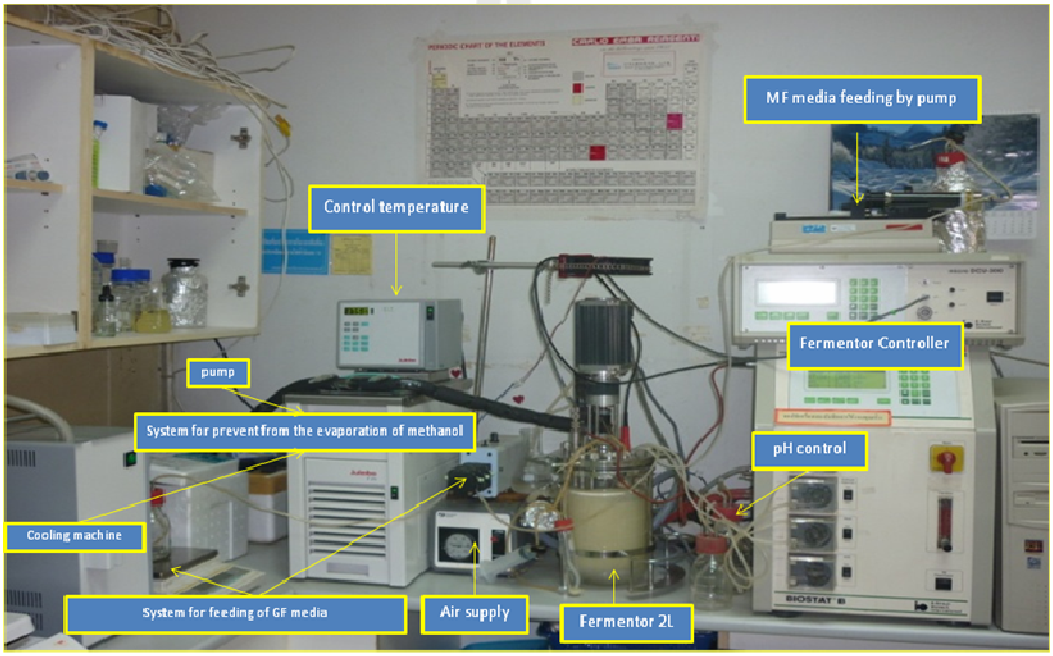
หลังจากการเติมเมทานอล ปริมาณออกซิเจรที่ละลายในน้ำมีการเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆในช่วงระยะเวลาสั้นๆ เนื่องจากกำลังปรับตัวเพื่อให้สามารถเจริญในอาหารที่มีเมทานอลได้ จากนั้นปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำจะเริ่มลดลงอย่างช้าๆเพราะว่าเริ่มมีการสะสมของเมทานอลในน้ำหมัก หลังจาก 1 ชั่วโมงที่มีการใช้เมทานอลอย่างสมบูรณ์แล้ว ปริมาณออกซิเจนจะเพิ่มขั้น และเริ่มทำการเติมเมทานอลครั้งที่ 2 โดยการเติมอาหาร MF 0.633 มิลลิลิตร ปริมาณออกซิเจนจะลดลงอย่างรวดเร็วและเพิ่มขึ้นมากกว่าการเติมครั้งแรก จึงสามารถอธิบายได้ว่าการเพิ่มขึ้นของทุกเอนไซม์ในวิถีเมทานอลเมตาบอลิซึมหรือ *P. pastoris* ได้มีการปรับตัวให้สามารถใช้เมทานอลเพื่อเป็นสับสเตรตได้

2.4.3 ช่วงการผลิตเอนไซม์โดยการเติมเมทานอลลงในถังหมัก (Methanol production phase)

อัตราการป้อนเมทานอลควรที่จะควบคุมให้มีความเข้มข้นที่เพียงพอต่อการสังเคราะห์โปรตีน หากมากเกินไปอาจทำให้เกิดการยับยั้งตัวเซลล์ได้ (Cino, 1999) การป้อนของอาหาร MF ต้องมีการคำนวณเพื่อเกิดการเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์แบบเอ๊กซ์โปเนนเชียลในถังหมัก ถือว่าสามารถป้องกันการเป็นพิษจากเมทานอลที่ระดับความเข้มข้นของเมทานอลมากเกินไปได้ด้วย เมทานอลถูกเติม

ลงในถังหมักโดยอัตโนมัติโดยใช้ไซริงปั๊ม (Cole Parmer, USA) และทำการเติมมากขึ้นทุกๆ 3 ชั่วโมง ตามการคำนวณ

สภาวะในกระบวนการหมักควบคุมเหมือนเช่นในกระบวนการหมักแบบกะที่มีการเติมกลีเซอรอล เพียงแต่ต่างกันที่อุณหภูมิที่ลดลงเป็น 20 องศาเซลเซียส หลังจาก 2-3 ชั่วโมงแรก จากนั้นควบคุมให้คงที่จนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก การเก็บตัวอย่างเพื่อนำมาวิเคราะห์ จะทำการเก็บ 1 ครั้งต่อวัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์การเจริญของเซลล์ (วัดที่ค่าความขุ่น 600 และน้ำหนักแห้งของเซลล์จากการอบแห้ง) ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด และกิจกรรมของเอนไซม์ในน้ำหมักซึ่งทำการทดสอบโดยใช้สับสเตรตที่เป็นfluorogenic สำหรับโปรตีนจะทดสอบโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE แถบของโปรตีนที่ต้องการจะแสดงบนใช้เจล 15 เปอร์เซ็นต์



รูปภาพ 9 การจัดชุดการทดลองการผลิต rEK_L ในถังหมักขนาด 2 ลิตร

2.5 การคำนวณอัตราการป้อนเมทานอล

การสะสมเมทานอลในน้ำหมักส่งผลถึงประสิทธิภาพของการผลิต rEk_L การลดการสะสมเมทานอลเพื่อการใช้ในปริมาณที่พอเพียงในระบบถือเป็นสิ่งสำคัญ อัตราการป้อนคำนวณตามค่าความเข้มข้นของเซลล์ที่มีการเพิ่มขึ้นแบบเอ็กซ์โปเนนเชียลที่อธิบายไว้โดย Korz *et al*, 1994

อัตราการป้อนเมทานอล สัมพันธ์กับอัตราการเจริญจำเพาะ (μ) และความเข้มข้นของเซลล์ ซึ่งแสดงดังนี้

$$m_S(t) = F(t)S_F(t) = \left(\frac{\mu(t)}{Y_{X/S}} + m\right)V(t)X(t) \qquad (3)$$

โดยที่ m_s คืออัตราการไหลของสับสเตรต (หน่วยเป็น กรัมต่อชั่วโมง) F คือ อัตราการป้อนโดยรวม (ลิตรต่อชั่วโมง) S_F คือ ความเข้มข้นของเมทานอล (กรัมต่อลิตร) μ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง) $Y_{X/S}$ ผลผลิตเซลล์ต่อสับสเตรต (กรัมต่อกรัม) m คือ the specific maintenance coefficient (ต่อชั่วโมง) X ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อชั่วโมง) และ V คือปริมาตรการเลี้ยงเชื้อ (ลิตร)

ในกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ

$$\frac{d(XV)}{dt} = \mu XV \qquad (4)$$

อัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{set}) สามารถคำนวณได้ดังสมการข้างล่างนี้

$$m_S(t) = \left(\frac{\mu_{set}}{Y_{X/S}} + m\right)V_{tF}X_{tF}e^{\mu_{set}(t-t_F)} \qquad (5)$$

ในงานวิจัยนี้ค่าผลผลิต ($Y_{X/S}$) คือ 0.27 กรัมต่อกรัม ค่า specific maintenance coefficient, m คือ 0.035 ต่อชั่วโมง โดยค่าที่ได้นี้ได้มาจากงานวิจัยที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ (Charoenrat, 2005, and Kupradit, 2006) และค่าอัตราการเจริญจำเพาะ(μ_{set}) ต่างๆกัน คือ 0.006, 0.0075 และ 0.0105 ต่อชั่วโมง ถูกนำมาใช้เพื่อคำนวณอัตราการเติมอาหาร MF ลงในถังหมัก

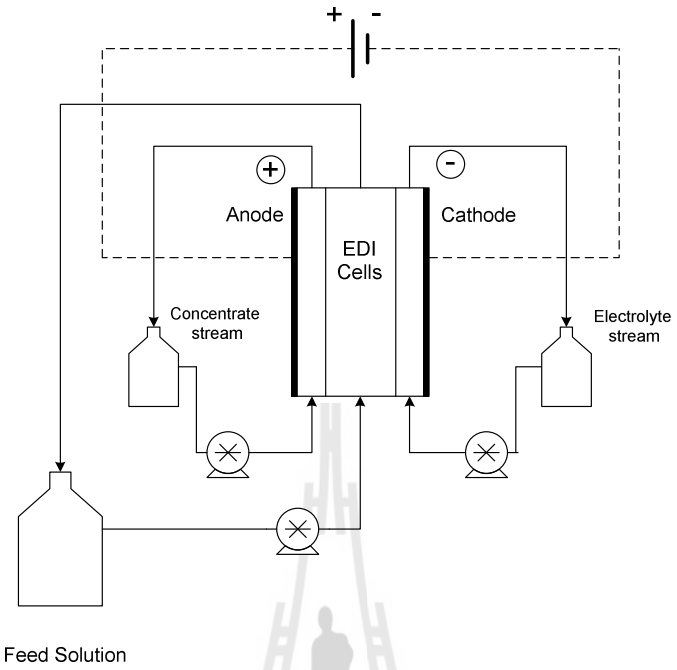
2.6 ศึกษาถึงศักยภาพในการทำ Enterokinase protein ให้บริสุทธิ์จากกระบวนการหมัก ด้วยเทคนิคอิเลคโตรดีไอออนไนเซชั่น (EDI)

หลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก จึงทำการเก็บเกี่ยวรีคอมบิแนนท์เอ็นไซม์ในน้ำหมักโดยการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมัก จากนั้นจึงนำน้ำหมักที่ได้ไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้กระบวนการ EDI และทำการบริสุทธิ์อีกครั้งโดยใช้เทคนิคต่างๆซึ่งจะกล่าวไว้ในหัวข้อต่อไป

ในการทำให้น้ำหมักมีความเข้มข้นขึ้นและเป็นการ pre-treatment หรือทำให้บริสุทธิ์ระดับหนึ่งก่อนที่จะนำน้ำหมักที่มีเอนไซม์ rEK_L ไปเข้าสู่กระบวนการอื่นๆในระบบ EDI มีการใช้คอลัมน์แก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม ยาว 40 ซม โดยทำการบรรจุ mixed-bed ion-exchange resins (purolite strong acid cation-exchange, C-100E และ strong base type I anion resins, A-400) ในอัตราส่วน 50:50 จำนวน 55 กรัมลงในคอลัมน์ จากนั้นไหลเวียนน้ำหมักที่ได้เข้าสู่ระบบ โดยใช้อัตราป้อนเท่ากับ 5 มิลลิลิตรต่อนาที

2.6.1 การประกอบโมดูลของเยื่อแผ่น

ระบบ EDI ที่จะพัฒนาขึ้นมานี้ประกอบด้วยคู่เซลล์เป็นคู่ ๆ โดยแต่ละคู่ของเยื่อแผ่นจะถูกกั้นด้วย spacer เพื่อควบคุมการไหลและช่วยให้เกิดการไหลแบบปั่นป่วนภายในโมดูล นอกจากนี้แล้วยังจะมีประเก็นอยู่ด้านในเพื่อป้องกันการรั่วซึมของน้ำหมักอีกด้วย เริ่มจากน้ำหมักที่ผ่านการแยกเซลล์ยีสต์ออกไปแล้ว จะถูกนำมาใส่ไว้ในขวด Feed solution จากนั้นจะถูกปั๊มเข้าไปในโมดูลของเยื่อแผ่น EDI ซึ่งจะมีขั้วไฟฟ้า electrode ที่เป็นขั้วบวกและลบ อยู่คนละด้านของโมดูล โดยมีแหล่งจ่ายไฟฟ้ากระแสตรงที่ทำการปรับค่าความต่างศักย์ทางไฟฟ้าได้ อยู่ระหว่าง 0-100 โวลต์ ทำให้เกิดสนามไฟฟ้าคร่อมระหว่างโมดูลของเยื่อแผ่น ทำให้โปรตีนเคลื่อนที่ไปยัง concentrate stream ได้การจัดชุดการทดลองสามารถแสดงได้จากรูปภาพ 10 และมีเยื่อแผ่นพื้นที่ 50 cm^2 สำหรับทุกส่วนของโมดูลนั้นจะมีการเติมเรซิ่นดังข้างต้น พร้อมกันนี้ได้มีการใช้ Platinum และ stainless steel สำหรับขั้ว anode และ cathode ตามลำดับ ช่องว่างภายในระหว่าง compartment ประมาณ 3 มิลลิเมตร สำหรับแหล่งกำเนิดไฟฟ้าได้มีการติดตั้งขึ้น โดยที่สามารถให้กระแสไฟฟ้าได้ระหว่าง 0–100 Volts และ 0–1.2 Ampere ตามลำดับ ระบบ EDI จะประกอบไปด้วย 2 streams นั่นคือ feed solution stream และ concentrated solution stream ทั้งนี้จะมีการควบคุมระบบให้เป็นไปอย่างต่อเนื่อง และมีอัตราการปั๊มไหลเวียนสารละลายผ่านระบบ EDI ที่ 1–4 ลิตรต่อชั่วโมง



รูปภาพ 10 การจัดการทดลองการแยกเอ็นไซม์เอ็นเทอโรไคเนสออกจากน้ำหมักโดยใช้ระบบ EDI

2.7 การทำบริสุทธิ์ rEK_L โดยคอลัมน์โคบอลต์

หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการหมัก เซลล์จะถูกกรองแยกออกจากน้ำหมักโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที และจากนั้นปั่นต่อที่ 12,000 รอบต่อนาที 15 นาที ส่วนใสจากการปั่นเหวี่ยงจะถูกนำไปกรองด้วยเยื่อแผ่นฟิวเตอร์ขนาด 0.2 ไมครอน จากนั้นเขาสู่ระบบ EDI ดังได้กล่าวไปในหัวข้อก่อนหน้าที่ สารละลายที่ได้จากระบบ EDI จะถูกนำไปผ่านกระบวนการไดอะไลซิสในสารละลาย Tris-Cl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8 ก่อนที่จะเข้าสู่คอลัมน์โคบอลต์ การเตรียมคอลัมน์นั้นจะมีการเติมสารละลาย Tris-Cl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8 และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 150 มิลลิโมลาร์ เพื่อให้ทั้งคอมลัมน์มีสารละลายเท่าๆกัน จากนั้นจึงเติมตัวอย่างที่ได้ลงในคอลัมน์ให้ไหลผ่าน และเก็บตัวอย่างที่ได้ที่ไหลออกมาจากคอลัมน์ การชะล้างโปรตีนที่ติดอยู่ที่คอลัมน์ทำได้โดยใช้สารละลาย Tris-Cl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ และสารละลายอิมมิดาโซล ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ สำหรับรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่มี His-tagged ติดอยู่จะถูกชะล้างด้วยสารละลาย

Tris-Cl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ และสารละลายอิมมิดาโซล ความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ ต่อด้วยสารละลาย Tris-Cl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 300 มิลลิโมลาร์ และสารละลายอิมมิดาโซล ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ จากนั้นจะทำการเก็บส่วนต่าง ๆ เช่น ส่วนที่ออกมาจากคอลัมน์(flow-through) และส่วนที่ถูกชะล้างจะนาไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์และตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ต่อไป

2.8 การทำบริสุทธิ์ rEK_L โดยเทคนิค by ion exchange chromatography

น้ำหมักที่เตรียมไว้สำหรับการทำบริสุทธิ์ถูกนำมาทำให้เข้มข้นและทำไดอะไลซิสในสารละลายโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 5.5 โดยใช้ Amicon Ultra-15 ที่มีขนาด 10 kD cut off จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ก่อนที่จะโหลดตัวอย่างเข้าสู่คอลัมน์ Sulphopropyl Fast Flow Column (SP_FF column) โดยใช้เครื่อง FPLC machines (AKTA purifier, Amersham Pharcacia Biotech) ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการทำบริสุทธิ์ด้วยเทคนิคนี้ คอลัมน์ต้องมีการชะล้างด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 5 แล้วจึงทำการฉีดตัวอย่างโดยใช้เข็มขนาด 1 มิลลิลิตรของเครื่อง FPLC เพื่อที่จะกำจัดโปรตีนหรือสิ่งที่ไม่ต้องการที่เกาะอยู่ที่คอลัมน์ออกทำได้โดยล้างด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 5 ตัวอย่างจะทำการชะออกมาด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 5 ที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1 โมลาร์ เป็นองค์ประกอบ ความเข้มข้นของโปรตีนที่ทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละส่วน จะนำมาวิเคราะห์โดยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร ตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ออกมาและส่วนที่ถูกชะล้างจะนาไปทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์และตรวจสอบคุณภาพของโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS-PAGE ส่วนของ rEk_L ที่ออกจากคอลัมน์ในแต่ละส่วน (fraction) และทำการวิเคราะห์ที่แสดงกิจกรรมของเอนไซม์สูงจะถูกนำมาเทรวมกันและทำให้เข้มข้นขึ้น

2.9 การวิเคราะห์

2.9.1 วิเคราะห์ความเข้มข้นของเซลล์

ความเข้มข้นของเซลล์สามารถหาได้โดยการวัดค่าความขุ่น ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (OD_{600}) และน้ำหนักเซลล์แห้ง น้ำหนักเซลล์แห้งหาได้โดยนำตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง ส่วนตะกอนล้างด้วยน้ำกลั่นเททิ้งและนำไปอบที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียสจนกระทั่งแห้งและนำไปชั่งน้ำหนัก แต่ละตัวอย่างมีการทำซ้ำจำนวน 2 ครั้ง จากนั้นสร้างกราฟมาตรฐาน (standard calibration curve) เพื่อใช้เปรียบเทียบเพื่อให้ได้ค่าความเข้มข้นของเซลล์ในการวิเคราะห์ตัวอย่างครั้งต่อไป

2.9.2 วิเคราะห์ความเข้มข้นของโปรตีน

ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในตัวอย่างน้ำหมักจะนำมาวิเคราะห์ด้วยวิธีของ Bradford, 1979 Bovine serum albumin ถูกนำมาใช้เป็นตัวมาตรฐาน และช่วงของ sensitivity ระหว่าง 50 ถึง 1000 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

2.9.3 การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Enterokinase

การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ Enterokinase ทำตามวิธีของ Hermon – Taylor (1970) การทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์มีการใช้สับเสรตฟลูออเรสเซนส์คือ $Gly(Asp)_4Lys$-β-Napthylamide โดยจะเติมตัวอย่างน้ำหมักที่ได้ปริมาตร 30 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายสับสเตรต (50 ไมโครโมลาร์ของ GD_4K-β–naphthylamide ใน Tris–Cl ความเข้มข้น 70 มิลลิโมลาร์ pH 8 และ 10% Dimethyl Sulfoxide) 200 ไมโครลิตร กิจกรรมของเอนไซม์วัดโดยใช้เครื่อง Spectra Max Gemini EM machine ค่ากิจกรรมของเอนไซม์จะวิเคราะห์จากอัตราเร็วในการปลดปล่อย β–naphthylamide ซึ่งเกิดจากการตัดที่ตำแหน่งจำเพาะโดย rEk_L โดยที่จะสามารถตรวจได้จากการเพิ่มขึ้นของค่าฟลูออเรสเซนต์ที่สภาวะกระตุ้นที่ 337 นาโนเมตร และปลดปล่อยที่ 420 นาโนเมตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดังนั้น 1 หน่วยของเอนไซม์ คือ หน่วยของฟลูออเรสเซนต์ที่เพิ่มขึ้นในเวลา 1 นาที และการวิเคราะห์นี้มีการใช้ rEK_L ที่ขายทางการค้าจากบริษัท New England Biolabs (NEB) เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมที่เป็นบวก (positive control)

สำหรับกิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L สามารถวิเคราะห์ได้โดยความสามารถในการตัดฟิวชั่นโปรตีนซึ่งมีตำแหน่งตัดเอนไซม์เอนเทอโรไคเนสที่ส่วนเชื่อมต่อ คือ rice Os1Bglu4-trioredoxin โดยใช้ EK_L ที่ผลิตได้จากงานวิจัยนี้ตัดฟิวชั่นโปรตีนในสารละลาย Tris-Cl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8 ภายใต้อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจวัดผลจากการตัดฟิวชั่นโปรตีนโดยใช้เทคนิค SDS – PAGE ที่ความเข้มข้นของเจล 15 เปอร์เซ็นต์ และนำไปเปรียบเทียบกับ rEK_L ที่ขายทางการค้าจากบริษัท New England Biolabs (NEB)

2.9.4 วิเคราะห์ความเข้มข้นของเมทานอล

ความเข้มข้นของเมทานอลที่อยู่ในถังหมักสามารถวิเคราะห์ได้โดยเครื่อง gas chromatography (GC) (FID Instrument, USA) แก๊สตัวพาใช้แก๊สฮีเลียม ความบริสุทธิ์ 99 เปอร์เซ็นต์ คอลัมน์ที่ใช้เป็นชนิด capillary column (Carbowax®, Restek, USA) ที่มีขนาด 30 เมตร × 0.32 มิลลิเมตร ตัวฉีด (injector) และตัววัด (detector) เป็นชนิด flame ionization detector อุณหภูมิของ injector detector จะถูกตั้งไว้ที่ 200 และ 300 องศาเซลเซียส ตามลำดับ สำหรับ oven จะมีการตั้งโปรแกรมคือเริ่มจาก 40 เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนถึงที่ 400 องสาเซลเซียส โดยเพิ่มขึ้นในอัตรา 15 องศาเซลเซียสต่อนาที

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

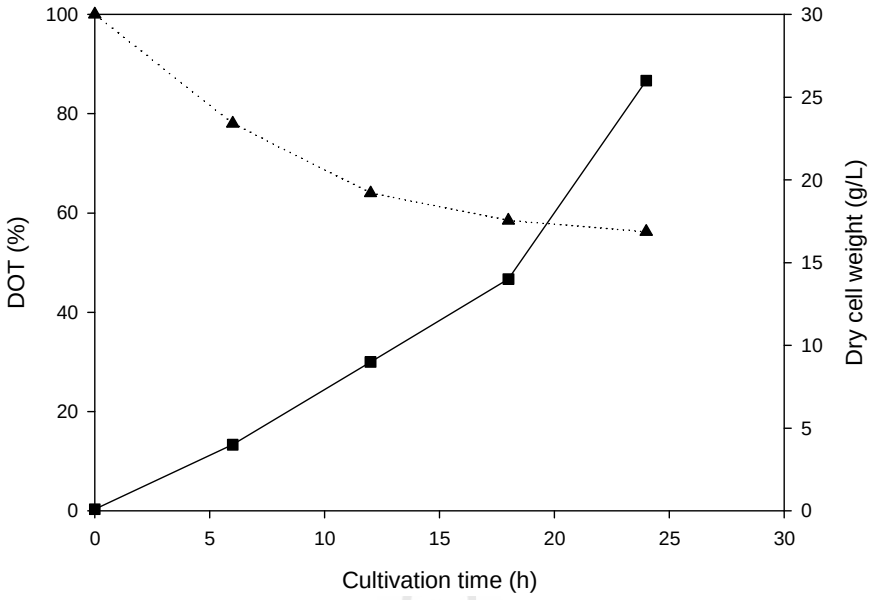
บทที่ 3 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

3.1 การผลิตรีคอมบิแนนท์เอนไซม์เอนเทอโรไคเนสสายสั้น (rEK_L) โดย *P. pastoris*

จากที่ได้อธิบายไว้ข้างต้นเกี่ยวกับการควบคุมการป้อนเมทานอลเข้าสู่ถังหมักระหว่างช่วงการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลนั้นมีความสำคัญสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* อัตราการเติมเมทานอลต้องมีการควบคุมให้เหมาะสมกับการนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน เพราะว่าหากมีเมทานอลมากเกินไป จะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ขึ้นได้ (Cino, 1999) ในงานวิจัยนี้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะ(μ_{set}) ที่ต่างๆกันคือ 0.006, 0.0075 และ 0.0105 ต่อชั่วโมง ถูกนำมาใช้ในการคำนวณการเติมอาหาร MF ในช่วงการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอลสำหรับผลิต rEK_L วิธีการนี้เพื่อที่จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ที่สูง และได้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมการทำงานที่สูงอีกด้วย

กระบวนการหมัก 4 ช่วงของ *P. pastoris* (Charoenrat, 2005; Kupradit, 2006) ดำเนินการโดยเทคนิคแบบกึ่งกะที่ได้อธิบายไว้แล้วในบทของวิธีดำเนินการทดลอง สภาวะในการเลี้ยงเชื้อต้องมีการควบคุมและตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่ pH 5.5 อัตราการให้อากาศ 1vvm และความเร็วรอบที่ 1,000 รอบต่อนาที ใน 3 ช่วงแรกคือ การหมักแบบกะที่มีการเติมกลีเซอรอล การหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมกลีเซอรอลและช่วงการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล ตามลำดับ แต่ช่วงสุดท้ายที่มีการผลิตเอนไซม์โดยการใช้เมทานอลนั้น หลังจาก 3 ชั่วโมงไปแล้วเซลล์จะมีการปรับตัวให้สามารถเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้ อุณหภูมิจะมีการต่ำลงอย่างช้าๆจาก 30 องศาเซลเซียส เป็น 20 องศาเซลเซียส และคงที่เอาไว้ตลอดจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก การผลิตเอนไซม์นี้ที่อุณหภูมิต่ำได้มีรายงานจากนักวิจัยท่านอื่นไว้ว่าจะทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูง เซลล์มีการตายต่ำ ได้ผลผลิตที่ความเข้มข้นสูงและการที่โปรตีนถูกย่อยต่ำ(Jahic et al., 2003; Kupradit, 2006) ทั้งยังส่งเสริมการผลิตเอนไซม์ให้มีการทำงานที่ดีอีก (Kupcsulik and Sevella, 2004)

ช่วงการหมักแบบกะที่มีการเติมกลีเซอรอลนั้น กลีเซอรอลจะถูกนำไปใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ทำให้เซลล์สามารถเจริญได้เร็วและได้ผลผลิตเซลล์ที่สูง (Chiruvolu *et al*., 1998) ในช่วงปลายของช่วงดังกล่าว น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ ประมาณ 27 กรัมต่อลิตรในทุกๆการทดลอง **รูปภาพ 11** แสดงปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำระหว่างการหมัก จะเห็นได้ว่าจากเริ่มต้นที่ 100 เปอร์เซ็นต์จะค่อยๆลดลงเป็น 56 เปอร์เซ็นต์ในช่วง 24 ชั่วโมงแรก อัตราการลดลงที่รวดเร็วดังผลการทดลองดังกล่าวนั้นสามารถแสดงให้เห็นได้ว่า *P. pastoris* มีความต้องการออกซิเจนมากขณะที่เริ่มเข้าสู่ช่วงการเจริญแบบทวีคูณ (log phase)



รูปภาพ 11 น้ำหนักเซลล์แห้ง (■) (กรัมต่อลิตร) และ ปริมาณออกซิเจน (DOT) (▲) (%) ระหว่างช่วงการหมักแบบกะที่มีการเติมกลีเซอรอล

ช่วงที่สองจะมีการเติมอาหารที่มีกลีเซอรอล (GF medium) ลงไปในถังหมัก จุดประสงค์ของช่วงนี้ก็เพื่อควบคุมการทำงานของโปรโมเตอร์ *aox1* และเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ (Chiruvolu et al., 1997) การเติมคำนวณตามข้อมูลของ Jahic *et al* (2002) และ Charoenrat (2005) เพื่อที่จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 40 กรัมต่อลิตร และเพื่อให้ปริมาณกลีเซอรอลในน้ำหมักเหลือน้อยตอนสิ้นสุดของช่วงนี้ช่วง

ความเข้มข้นของเซลล์ทั้งหมดที่ต้องการเพื่อให้เพิ่มขึ้นในช่วงนี้คือ 40 – X_0 กรัมต่อลิตร สำหรับอาหาร GF มีกลีเซอรอลประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และมีความหนาแน่น คือ 1.109 กรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นอาหาร GF ที่ต้องเติมลงในถังหมักสามารถคำนวณได้ดังนี้

อาหาร GF (กรัม) = $\{[(X_t - X_0)/ Y_{X/S}] \times 1109\}/ S_i$

= $\{[(40-27)/ 0.7] \times 1109\}/ 500 = 41.19$ กรัม

โดยที่ค่าผลผลิตของเซลล์ Yx/s = 0.7 กรัมของเซลล์ต่อกรัมของกลีเซอรอล (Charoenrat, 2005) ความเข้มข้นของกลีเซอรอลในอาหาร GF หรือ Si = 500 กรัมของกลีเซอรอลต่อลิตร ความเข้มข้นของเซลล์ในช่วงเริ่มต้นของช่วงนี้ หรือ X_0 = 27 กรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของเซลล์ในช่วงปลายของช่วงนี้

หรือ X_t = 40 กรัมต่อลิตร และปริมาตรของน้ำหมักในช่วงเริ่มต้นของช่วงนี้ V_0 = 1 ลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้เวลาในการเติมอาหาร GF สามารถคำนวณได้โดยเกี่ยวข้องกับค่าอัตราการเจริญจำเพาะ (μ)

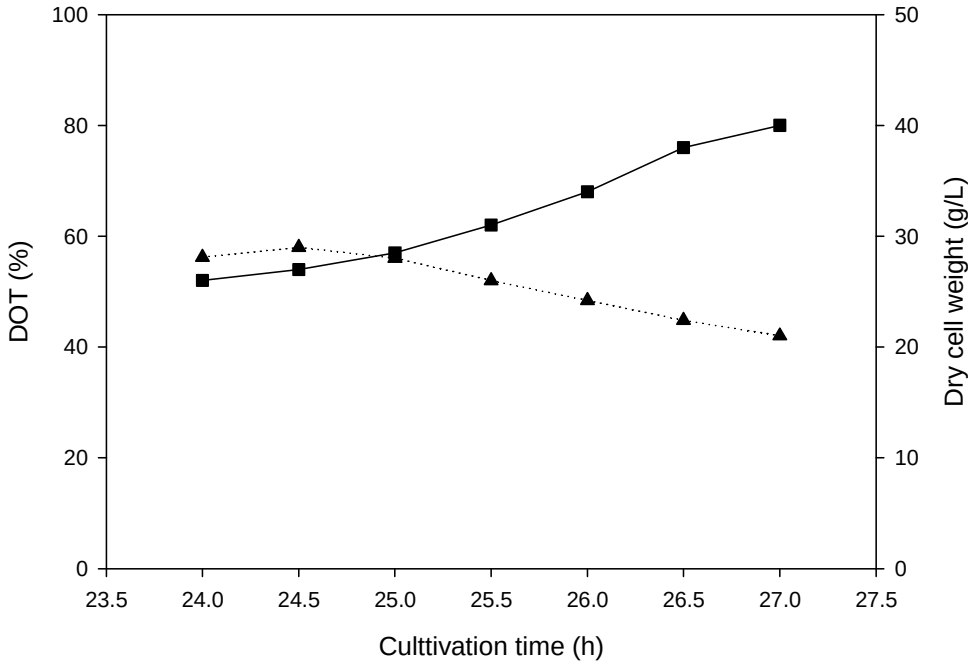
$$\mu = (1/ X) (dX/ dt) \text{ or } \ln (X_t/ X_0) = \mu t$$

โดยที่อัตราการเจริญจำเพาะ (μ) = 0.18 hr^{-1} (Jahic et al., 2002)

ดังนั้น

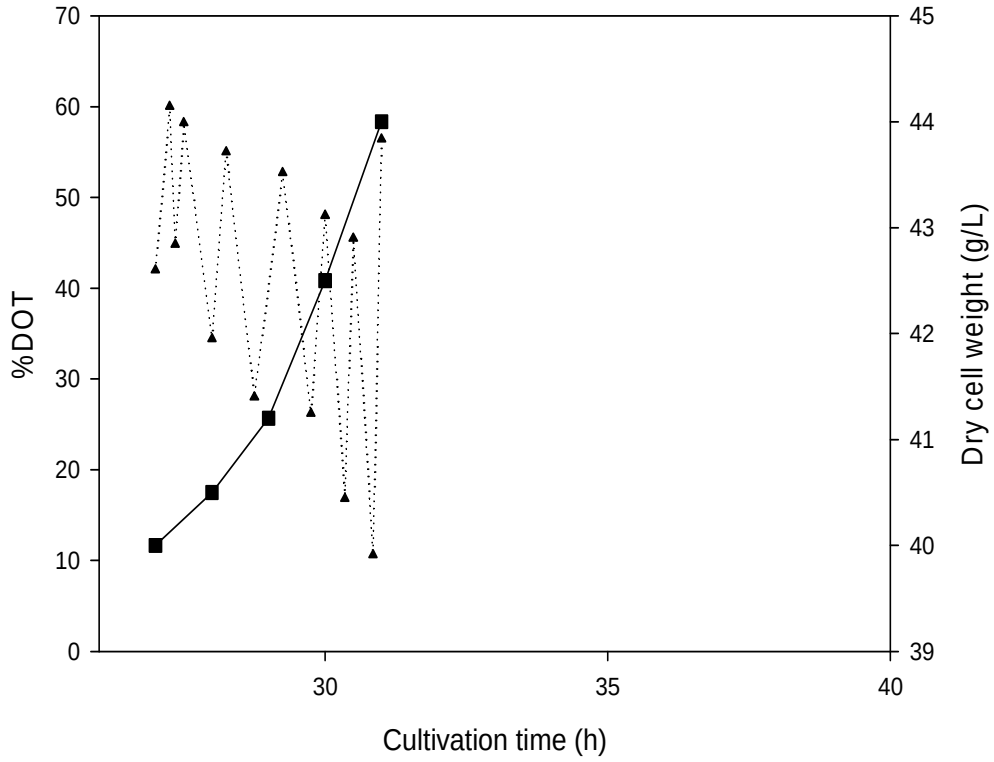
$$t = \ln (X_t/ X_0)/ \mu = (\ln 40/ 27)/ 0.18 = 2.18 \text{ ชั่วโมง}$$

ดังนั้นอาหารGF จะถูกเติมลงไปในถังหมักด้วยอัตรา (41.19 / 2.18) 18.89 กรัมต่อชั่วโมง โดยควบคุมให้อัตราการเติมเท่านี้ จนกระทั่งความเข้มข้นของเซลล์เริ่มได้ประมาณ 40 กรัมต่อลิตร (ใช้เวลาประมาณ 2.5-3 ชั่วโมง ซึ่งแสดงดัง**รูปภาพ 12** และระหว่างช่วงนี้ rEK_L ที่ถูกผลิตขึ้นจะไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เหตุผลเนื่องจากไม่มีเมทาอลที่ทำหน้าที่เหนี่ยวนำการทำงานของโปรโมเตอร์ที่เป็นตัวขับเคลื่อนยีน rEK_L ทำให้ rEK_L ไม่มีกิจกรรมของอนไซม์หรือมีกิจกรรมของเอนไซม์ต่ำ จนไม่สามารถวัดได้ด้วยเครื่อง fluorospectrophotometer

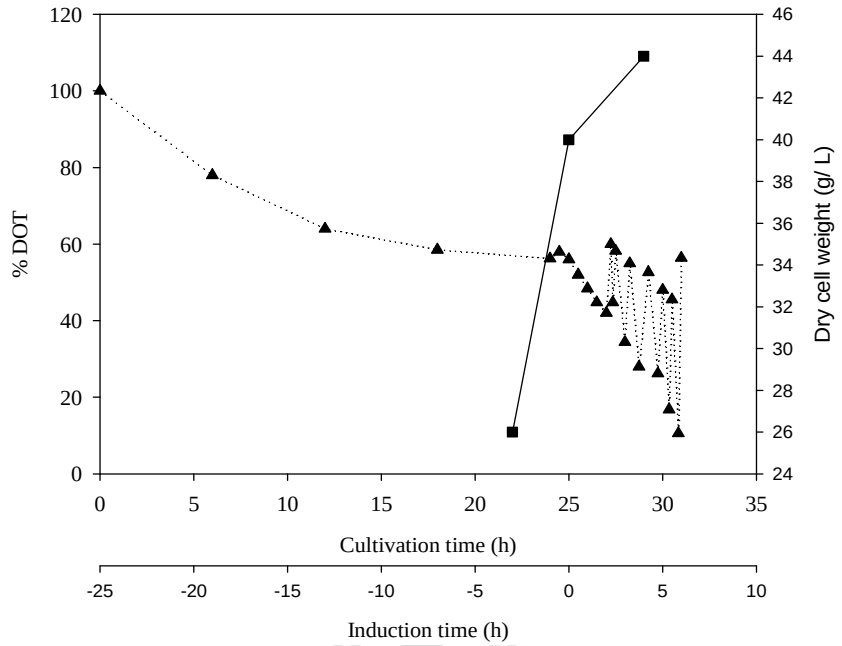


รูปภาพ 12 น้ำหนักเซลล์แห้ง (■) (กรัมต่อลิตร) และปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำหรือ DOT (▲) (%) ระหว่างช่วงกระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมกลีเซอรอล

หลังจากที่เซลล์มีการใช่กลีเซอรอลจนหมดแล้วทำให้ความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้มีปริมาณที่สูง จากนั้นจึงเข้าสู่ช่วงกระบวนการหมักที่เมทานอลเป็นตัวเหนี่ยวนำ โดยมีการเติมอาหาร MF ความเข้มข้นต่ำ ลงในถังหมัก จุดประสงค์เพื่อทำให้ง่ายในการที่เซลล์ค่อยๆทำการกระตุ้นเอนไซม์ในวิถีเมตาบอลิซึมของเมทานอล (Rose and Harrison, 1989) ปริมาณ DOT จะลดลงอย่างรวดเร็ว เมื่ออาหาร MF เริ่มเติมลงไป และเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากเมทานอลได้ถูกใช้หมดไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *P. pastoris* สามารถปรับตัวให้ใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานได้ (**รูปภาพ 13**) การเพิ่มขึ้นของปริมาณเซลล์และการเปลี่ยนของค่า DOT (%) แสดงดังรูปภาพ 14



รูปภาพ 13 น้ำหนักเซลล์แห้ง (■) (กรัมต่อลิตร) และปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำหรือ DOT (▲) (%) ระหว่างช่วงกระบวนการหมักที่มีการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล

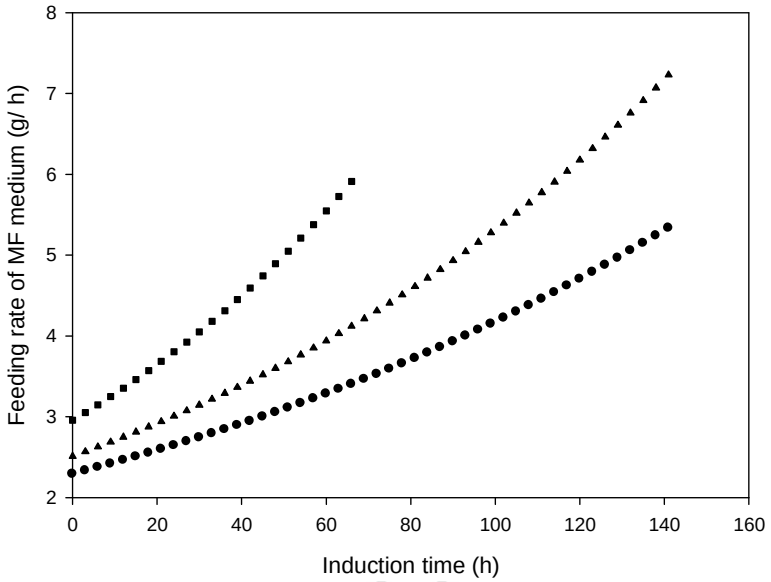


รูปภาพ 14 น้ำหนักเซลล์แห้ง (■) (กรัมต่อลิตร) และปริมาณออกซิเจนที่ละลายได้ในน้ำหรือ DOT (▲) (%) ระหว่างสามช่วงแรก (กระบวนการหมักแบบกะที่มีการเติมกลีเซอรอล กระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมกลีเซอรอล และกระบวนการหมักที่มีการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล ตามลำดับ)

กระบวนการหมักที่มีการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล อาหาร MF ถูกเติมลงในถังหมักด้วยอัตราแบบเอ็กซ์โปเนนเชียล ทั้งนี้มีการควบคุมซึ่งขึ้นอยู่กับค่าคงที่ของอัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{set}) โดยที่ในงานวิจัยนี้ค่า μ_{set} ตั้งไว้ที่ 0.006, 0.0075 และ 0.0105 ต่อชั่วโมงเพื่อใช้ในการหาค่าอัตราการเติมเมทานอลในระบบ

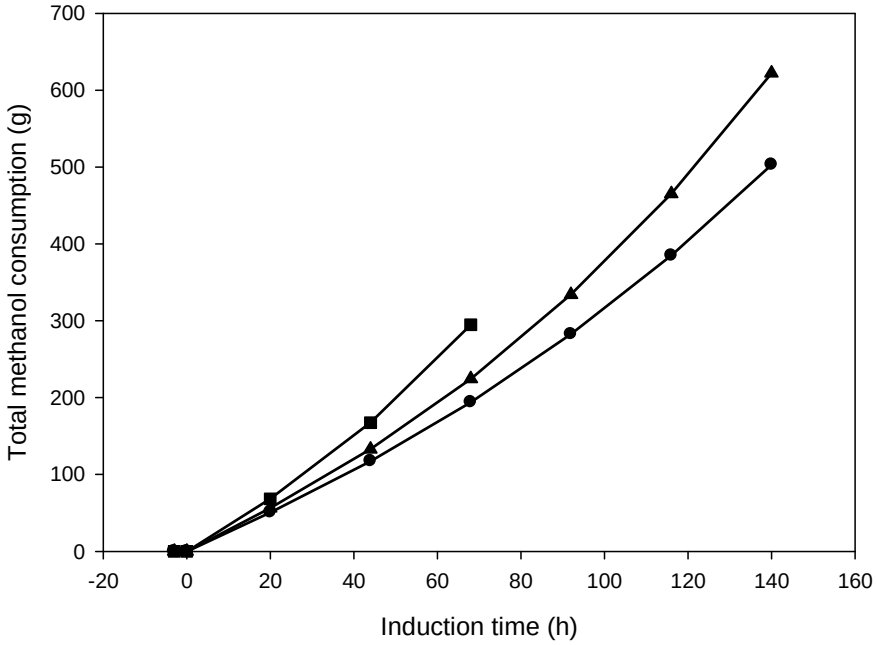
3.1.1 อัตราการป้อนอาหาร MF และการใช้เมทานอลทั้งหมด

ผลจากการคำนวณอัตราการป้อนอาหาร MF ลงในถังหมักที่ค่าคงที่อัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{set}) ต่างๆกันแสดงดัง **รูปภาพ 15** ตอนเริ่มต้นของช่วงนี้ อัตราการป้อนอาหาร MF คือ 2.29, 2.51 และ 2.95 กรัมต่อชั่วโมง โดยที่ค่า μ_{set} ทั้ง 3 คือ 0.006, 0.0075 และ 0.0105 ต่อชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งจะทำการเติมลงในถังหมักเป็นระยะทุกๆ 3 ชั่วโมง จนกระทั่งถึงตอนปลายของช่วงการหมักแบบนี้



รูปภาพ 15 อัตราการเติมอาหาร MF (กรัมต่อชั่วโมง) ระหว่างช่วงกระบวนการหมักที่มีการเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล โดยที่ค่า μ_{set} เป็นดังนี้ 0.006(●), 0.0075 (▲) และ 0.0105 ต่อชั่วโมง (■)

เวลาในการเหนี่ยวนำของอาหาร MF ของทั้ง 3 อัตราการป้อนนั้นมีความแตกต่างกัน โดยทั่วๆไป แล้วค่ากิจกรรมเอนไซม์ rEK_L activity (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากน้ำหมัก ต้องทำการวิเคราะห์เป็นระยะๆ เพื่อที่จะหยุดการเติมอาหาร MF ลงสู่ถังหมัก ระหว่างช่วงที่เชื้อใช้เมทานอลในการผลิตเอนไซม์ กิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L จะมีค่าเพิ่มขึ้น ตามการเติมอาหาร MF กิจกรรมการทำงานของ rEK_L จะถึงค่าสูงสุดในขณะที่เชื้อเริ่มตาย หลังจากจุดวิกฤติดังกล่าวนี้จะทำการหยุดเติมอาหาร MF ช่วงปลายของระยะการเหนี่ยวนำด้วนเมทานอลนี้ค่าเฉลี่ยของอัตราการป้อนอาหาร MF คือ 5.91, 5.24 และ 7.07 กรัมต่อชั่วโมงสำหรับค่า μ_{set} ที่ 0.0105 ต่อชั่วโมง (69 ชั่วโมง), 0.006 ต่อชั่วโมง(141 ชั่วโมง), and 0.0075 ต่อชั่วโมง(141 ชั่วโมงของเวลาในการเหนี่ยวนำ) ตามลำดับ



รูปภาพ 16 การใช้เมทานอลทั้งหมด (กรัม) ระหว่างกระบวนการหมักที่เมทานอลถูกใช้ในการผลิตเอนไซม์กระบวนการตามค่า μ_{set} ดังนี้คือ 0.006(●), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (■) ต่อชั่วโมง

รูปภาพ 16 แสดงค่าที่ได้จากการคำนวณอัตราการเติมเมทานอลลงสู่ถังหมัก ซึ่งถือว่ามีความสำคัญเป็นอย่างมากสำหรับการผลิต rEK_L โดย *P. pastoris* เนื่องจากหากมีการเติมอาหาร MF มากเกินไปอาจจะทำให้กำจัดออกซิเจนภายในถังหมัก ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ ที่ค่า μ_{set} 0.0105 ต่อชั่วโมง พบว่าปริมาณของอาหาร MF ที่ถูกเติมมีมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับค่า μ_{set} 0.0075 และ 0.006 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

3.1.2 การเจริญของเซลล์

อิทธิพลของค่าอัตราการเจริญจำเพาะต่างกัน ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดและ rEK_L ที่ผลิตได้ ที่มีค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์มีหน่วยเป็นยูนิตต่อมิลลิลิตรนั้นต้องทำการศึกษา เริ่มที่ความเข้มข้นของเซลล์หรือน้ำหนักเซลล์แห้งสามรถใช้เป็นตัวบ่งชี้การผลิตเอนไซม์ได้ การผลิต rEK_L มีความสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์ ถ้าเซลล์มีการเจริญที่ดีกว่าส่งผลถึงการสร้างเอนไซม์ได้สูงกว่า **รูปภาพ 17** แสดงผลของการเจริญของเซลล์ระหว่างช่วงกระบวนการหมักที่เมทานอลถูกใช้เพื่อสร้างเอนไซม์ในอัตราการเติมที่แตกต่างกัน การเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ขึ้นอยู่กับอัตราการใช้เมทานอล

ชั่วโมงที่ 69 ความหนาแน่นของเซลล์ที่ได้คือ 80 ± 1 กรัมต่อลิตร, 91 ± 0.7 กรัมต่อลิตร และ 70 ± 0.7 กรัมต่อลิตร จาก μ_{set} 0.0105, 0.0075 และ 0.006 ต่อชั่วโมงตามลำดับ ความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่ได้คือที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.0075 ต่อชั่วโมง รองลงมาคือที่ μ_{set} 0.0105 ต่อชั่วโมง และต่ำที่สุดคือที่ μ_{set} 0.006 ต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าอัตราการเติมอาหารในช่วงระยะการผลิตเอนไซม์นั้นมีความสำคัญมาก เมทานอลไม่เพียงแต่เหนี่ยวนำการผลิตโปรตีนเท่านั้น แต่ยังสามารถเป็นแหล่งพลังงานให้กับเซลล์โฮสต์ได้อีกด้วย (Ayed, 2008) ปริมาณเมทานอลที่มีมากเกินไปจะไปยับยั้งการเจริญของเซลล์ยีสต์ ในขณะที่ถ้าแหล่งพลังงานไม่เพียงพอ และ/หรือขาดเมทานอลในระบบจะส่งผลถึงเซลล์มีการเจริญที่ไม่ดีและผลิตโปรตีนได้น้อย (Katakura, 1998) สำหรับงานวิจัยนี้อัตราการเจริญจำเพาะที่ In μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง เกี่ยวเนื่องกับอัตราการเติมอาหาร MF ในถังหมักที่ทำให้เซลล์เจริญได้ดี อย่างไรก็ตามที่ μ_{set} ที่ 0.006 ต่อชั่วโมงได้เซลล์ความเข้มข้นต่ำ ซึ่งอัตราการเติมอาหารตามค่า μ_{set} นี้ เป็นแหล่งพลังงานให้กับเซลล์ไม่เพียงพอสำหรับการเจริญของเซลล์

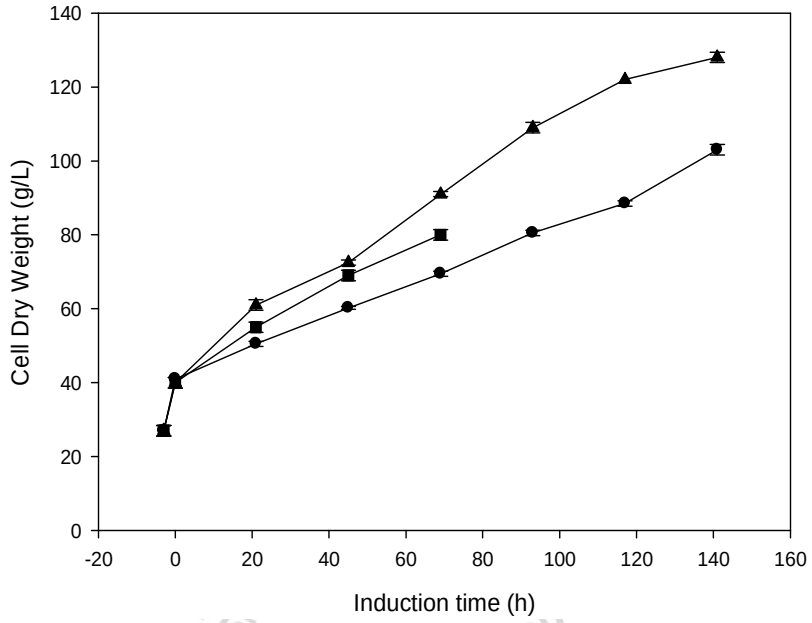
ตาราง 4 ความเข้มข้นของเซลล์ (กรัมต่อลิตร) ที่ช่วงปลายของกระบวนการหมักแบบกะที่มีการเติมกลีเซอรอล กระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมกลีเซอรอล เวลาในการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ ที่ 69 ชั่วโมง โดยที่ค่า μ_{set} ได้แก่ 0.006, 0.0075 and 0.0105 ต่อชั่วโมง

ค่าคงที่อัตราการเจริญจำเพาะ (μ_{set})	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)			
	ช่วงปลายของกระบวนการหมักแบบกะที่มีการเติมกลีเซอรอล	ช่วงปลายของกระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมกลีเซอรอล	กระบวนการหมัก ที่เวลา 69 ชั่วโมง	สิ้นสุดกระบวนการ (141 ชั่วโมง)
0.006 ต่อชั่วโมง	27 ± 1	41	70 ± 0.7	103 ± 1
0.0075 ต่อชั่วโมง	27 ± 1	40 ± 1	91 ± 0.7	128 ± 1
0.0105 ต่อชั่วโมง	27 ± 1	40 ± 1	80 ± 1	-

เวลาในการเหนี่ยวนำการผลิตเอนไซม์ ที่ 69 ชั่วโมง ที่ μ_{set} เท่ากับ 0.0105 ต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของเซลล์ยังคงเพิ่มขึ้น แต่ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร) และการผลิต rEK_L

(ยูนิตต่อมิลลิลิตร) มีการลดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นกระบวนการที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.0105 69 ชั่วโมง จึงหยุดการทดลอง

ความเข้มข้นของเซลล์มีค่าสูงสุดในช่วงตอนปลายของกระบวนการหมัก (ที่ 141 ชั่วโมง) มราค่า μ_{set} เท่ากับ 0.0075 hr^{-1} (128 ± 1 กรัมต่อลิตร) มีค่ามากกว่าค่า μ_{set} เท่ากับ 0.006 hr^{-1} (103 ± 1 กรัมต่อลิตร) ผลที่ได้ออกมาจากงานวิจัยนี้เหมือนกับงานวิจัยของ Charoenrat et al, 2005 และ Kupradit, 2006 ตาราง 4 สรุปความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดที่ได้จากอัตราการเติมอาหารต่างๆกัน

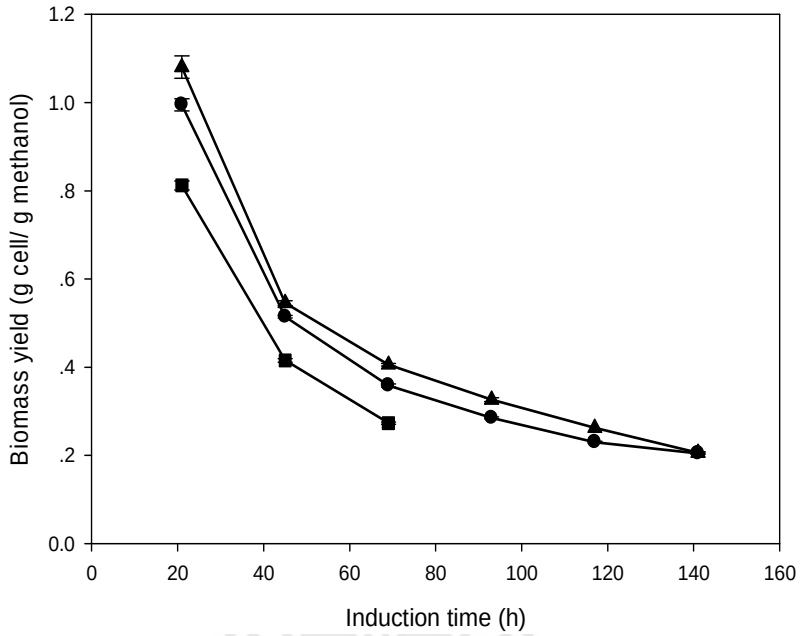


รูปภาพ 17 น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร) ระหว่างช่วงของการผลิตเอนไซม์โดยมีการใช้เมทานอลในการทดลองที่ค่า μ_{set} ต่างกันดังนี้ 0.006(●), 0.0075 (▲) และ 0.0105 ต่อชั่วโมง (■)

3.1.3 ผลผลิตของเซลล์ (Biomass yield)

ค่าผลผลิตของเซลล์ ($Y_{X/S}$) เป็นค่าที่ได้จากอัตราส่วนของเซลล์ต่อสับสเตรตที่ถูกใช้ไป (กรัมเซลล์ต่อกรัมของสับสเตรต) **รูปภาพ 18** แสดงผลผลิตของเซลล์เทียบกับเวลา ที่ค่า μ_{set} ต่างๆกัน จะเห็นได้ว่าในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการหมัก ในทุกๆการทดลอง ค่า $Y_{X/S}$ จะสูงและลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากผ่านไป 21 ชั่วโมง จากนั้นค่า $Y_{X/S}$ จะลดลงเรื่อยๆจนกระทั่งต่ำที่สุดในตอนปลายของกระบวนการหมัก ตรงกับที่อัตราการเติมอาหาร MF หรือปริมาณเมทานอลทั้งหมดในถังหมักสูงสุด

เป็นเช่นนี้เพราะว่าเซลล์มีการใช้เมทานอลในการเจริญ และชั่วโมงที่ 69 ค่า $Y_{X/S}$ ของทั้งสามการทดลอง (ที่ μ_{set} 0.006, 0.0075 และ 0.0105 ต่อชั่วโมง) เท่ากับ 0.36, 0.41 และ 0.27 กรัมเซลล์ต่อกรัมของเมทานอล ตามลำดับ ค่า $Y_{X/S}$ ในชั่วโมงสุดท้ายก่อนสิ้นสุดกระบวนการหมัก (ชั่วโมงที่ 141) การทดลองที่ค่า μ_{set} เป็น 0.006 และ 0.0075 ต่อชั่วโมง ได้ค่า $Y_{X/S}$ เท่ากับ 0.2 และ 0.21 กรัมเซลล์ต่อกรัมของเมทานอล



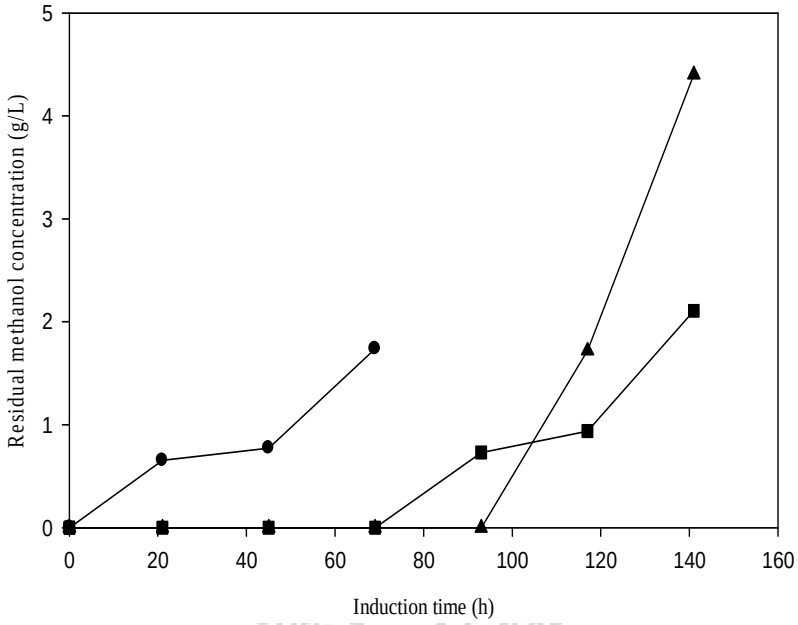
รูปภาพ 18 ผลผลิตของเซลล์ หรือ $Y_{X/S}$ (กรัมเซลล์ต่อกรัมของเมทานอล) ระหว่างช่วงของการผลิตเอนไซม์โดยมีการใช้เมทานอลในการทดลองที่ค่า μ_{set} ต่างกันดังนี้ 0.006(●), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (■)ต่อชั่วโมง

การลดลงของ $Y_{X/S}$ ระหว่างช่วงกระบวนการหมักที่ผลิตโปรตีนได้มีรายงานจากนักวิจัยที่ได้ศึกษามาก่อนหน้านี้ (Zhang et al., 2000) เหตุผลที่เกิดการลดลงของค่า $Y_{X/S}$ ดังกล่าวนี้อาจเป็นเพราะเนื่องจากเซลล์เพิ่มการรักษาตัวเซลล์ไว้ มีการเพิ่มการใช้พลังงานมากขึ้นและไม่มีการสร้างผลพลอยได้อื่นๆจากวิถีเมตาบอลิซึมของเมทานอล (Charoenrat, 2006)

3.1.4 ความเข้มข้นของเมทานอล (Residual methanol concentration)

การสะสมของเมทานอลภายในถังหมักที่อัตราการเติมต่างๆกันทำการวิเคราะห์ได้โดยเครื่อง Gas chromatography (GC) ผลการทดลองแสดงดัง**รูปภาพ 19** สำหรับค่า μ_{set} ที่ 0.0105 ต่อชั่วโมง

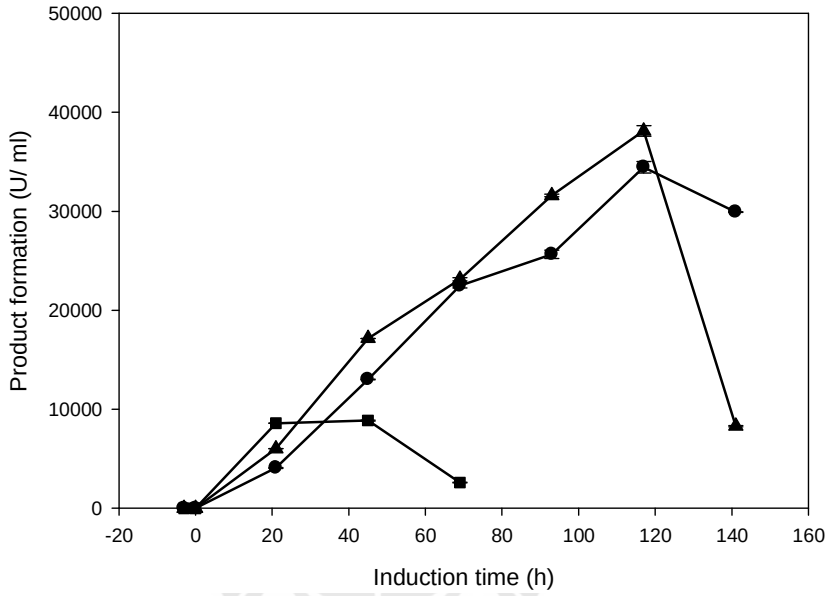
สามารถวัดความเข้มข้นของเมทานอลในน้ำหมักตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการหมัก เริ่มต้นคือที่ 0.65 กรัมต่อลิตร ก่อนที่จะเพิ่มขึ้นเป็น 1.74 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 69 ค่า μ_{set} ที่ 0.006 ต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของเมทานอลสามารถวัดได้ 0.73 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 69 แต่ในตอนปลายของกระบวนการหมักมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างช้าเป็น 2.10 กรัมต่อลิตร และที่ค่า μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง เท่ากับ 4.4 กรัมต่อลิตร จากการที่มีความเข้มข้นของเมทานอลในน้ำหมักสูงนั้นไม่ดี เนื่องจากส่งผลให้ผลกิจกรรมการทำงานของ rEK_L ได้ จึงสามารุสรุปได้ว่าความเข้มข้นของเซลล์มีการเพิ่มขึ้นในทั้งสามการทดลอง (ค่า μ_{set} 3 ค่า) เนื่องจาก *P. pastoris* สามารถใช้เมทานอลสำหรับการเจริญ อีกทั้งความเข้มข้นของเซลล์ยังมีผลต่อความเข้มข้นของเมทานอลที่เหลืออยู่ในน้ำหมักอีกด้วย



รูปภาพ 19 ความเข้มข้นของเมทานอลในถังหมัก (กรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักที่มีการใช้เมทานอลในการผลิตเอนไซม์ โดยที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.006(■), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (●) (ต่อชั่วโมง)

3.1.5 การสร้างผลผลิต (Product formation)

การผลิต rEK_L ถูกควบคุมด้วยโปรโมเตอร์ AOX และมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเซลล์การควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ส่งผลให้ปริมาณเซลล์และการสร้างผลผลิตเพิ่มขึ้น ผลการทดลองในการผลิต rEK_L ในอัตราการเติมอาหารต่างๆกันแสดงดัง **รูปภาพ 20**



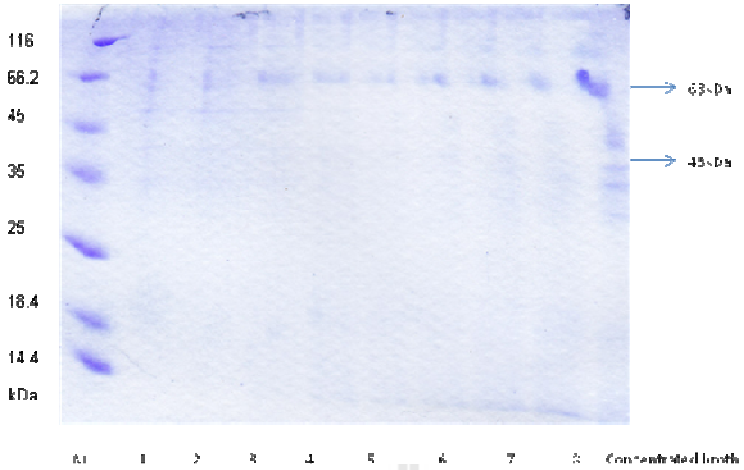
รูปภาพ 20 การสร้างผลผลิต (rEK_L (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักที่มีการใช้เมทานอลในการผลิตเอนไซม์ โดยที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.006(●), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (■) (ต่อชั่วโมง)

ในกระบวนการที่ μ_{set} เท่ากับ 0.0105 ต่อชั่วโมง ผลการทดลองได้ว่าการผลิต rEK_L (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) มีค่าสูงหลังจากผ่านไป 21 ชั่วโมง (8,590 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) แต่มีการเพิ่มขึ้นอย่างช้าหลังจากผ่านไป 50 ชั่วโมง ก่อนที่จะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากชั่วโมงที่ 69 (2,596 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ที่ชั่วโมง 45 ที่ μ_{set} เท่ากับ 0.0105 ต่อชั่วโมง เมทานอลถูกเติมลงในถังหมัก 167.35 กรัม กิจกรรมการทำงานของ rEK_L มีค่าสูงสุดแต่เริ่มลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 21 นั่นหมายความว่าเมทานอลไปยับยั้งการสร้างผลผลิต ซึ่งแสดงดังรูปภาพ 20 ชั่วโมงที่ 21 การผลิต rEK_L ในกระบวนการที่ μ_{set} เท่ากับ 0.0075 และ 0.006 ต่อชั่วโมง สามารถผลิตเอนไซม์ได้ความเข้มข้นต่ำกว่า (6,005 และ 4,066 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ) ที่ค่า μ_{set} สูงสุด (0.0105 ต่อชั่วโมง) อย่างไรก็ตามหลังจากชั่วโมงที่ 21 การผลิต rEK_L ยังคงสูงขึ้นอย่าง

รวดเร็วต่อไปอีก และค่ากิจกรรมการทำงานของ rEK_L ที่ได้สูงสุดคือกระบวนการที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.0075 (38,125 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ในชั่วโมงที่ 117 โดยสูงกว่ากระบวนการที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.006 (34,456 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ที่แสดงดังรูปภาพ 20 นอกจากนี้แล้วกิจกรรมการทำงานของ rEK_L สูงสุดที่เวลา 117 ชั่วโมง โดยที่เมทานอลถูกใช้ไป 384.78 และ 465.10 กรัมที่ μ_{set} เท่ากับ 0.006 และ 0.0075 ต่อชั่วโมงตามลำดับ หลังจากชั่วโมงที่ 177 ในกระบวนการที่μ_{set} เป็น 0.0075 ต่อชั่วโมง rEK_L ที่ถูกผลิตขึ้นจะเริ่มลดลงอย่างช้าๆ (8,288 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) เช่นเดียวกับที่ μ_{set} เป็น 0.006 ต่อชั่วโมง (29,920 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) จากผลการทดลองที่ได้นี้แสดงให้เห็นว่าค่ากิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L ที่ผลิตโดย *P. pastoris* มีค่าสูงกว่ารายงานจากงานวิจัยอื่นๆที่ทำก่อนหน้า

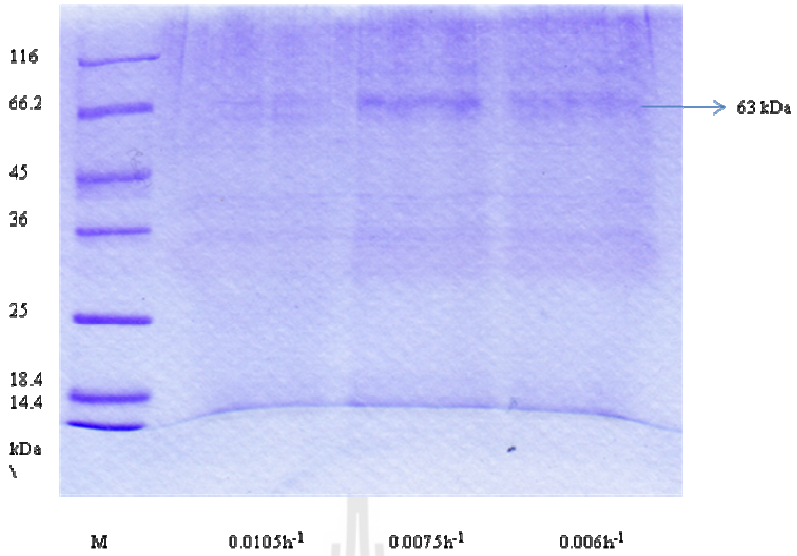
ดังนั้นจึงเป็นที่ชัดเจนว่าเวลาและอัตราการเติมอาหาร MF ลงในถังหมักมีผลต่อการผลิต rEK_L อัตราการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมการทำงานของ rEK_L เริ่มที่จะลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 21 แต่ในกระบวนการที่ค่า μ_{se} 0.0075 ต่อชั่วโมง และ 0.006 ต่อชั่วโมง rEK_L ที่ได้ยังคงเพิ่มขึ้นและมากที่สุดที่ชั่วโมง 117 หลังจากการเติมอาหาร MF ด้วยอัตรา 7.06 และ 5.24 กรัมต่อชั่วโมงตามลำดับ แต่หลังจากนั้นกิจกรรมของเอนไซม์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนและปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้น สิ่งที่เกิดขึ้นดังกล่าวอาจเป็นเพราะอัตราการเติมอาหาร MF เร็วเกินไป ทำให้ยืนยันได้ว่าความเข้มข้นของเมทานอลที่มากเกินไปมีผลต่อ on *P. pastoris* เป็นเหตุให้เซลล์ตายได้ (Jahic *et al*., 2003) ทั้งยังส่งผลต่อการย่อยของเอนไซม์โปรติเอสอีกด้วย

การผลิตเอนไซม์ที่เวลาต่างๆกันสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค SDS-PAGE ผลจาก SDS-PAGE ในน้ำหมักหลังสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง แสดงดัง**รูปภาพ 21** น้ำหนักโมเลกุลของเอนไซม์ rEK_L ภายใต้สภาวะที่สูญเสียสภาพธรรมชาติ ประมาณ 43 กิโลดาลตัน แต่สำหรับแถบของ visible protein แสดงน้ำหนักโมเลกุล 63 กิโลดาลตัน ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าผลจากงานวิจัยอื่นๆ (Kupradit, 2008) อาจเป็นเพราะเนื่องจากเกิดกระบวนการ glycosylation ของรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตโดย *P. pastoris* ที่มากเกินไป ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้จากการผลิตโปรตีนโดยยีสต์ (Bretthauer and Castellino, 1999)



รูปภาพ 21 SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี with Coomassie blue โดยตัวอย่างเป็นน้ำหมักในกระบวนการที่ค่า μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง (M คือ protein marker; Lane 1-8 คือ ตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกะที่มีการเติมกลีเซอรอล.ตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการหมักแบบกึ่งกะที่มีการเติมกลีเซอรอล. ตัวอย่างที่ได้จากกระบวนการหมักที่ผลตเอนไซม์โดยใช้เมทานอล ที่เวลา 21, 45, 69, 93, 117 และ141 ชั่วโมง ตามลำดับ และตัวอย่างน้ำหมักที่ถูกทำให้เข้มข้นขึ้นที่เวลา 117 ชั่วโมง

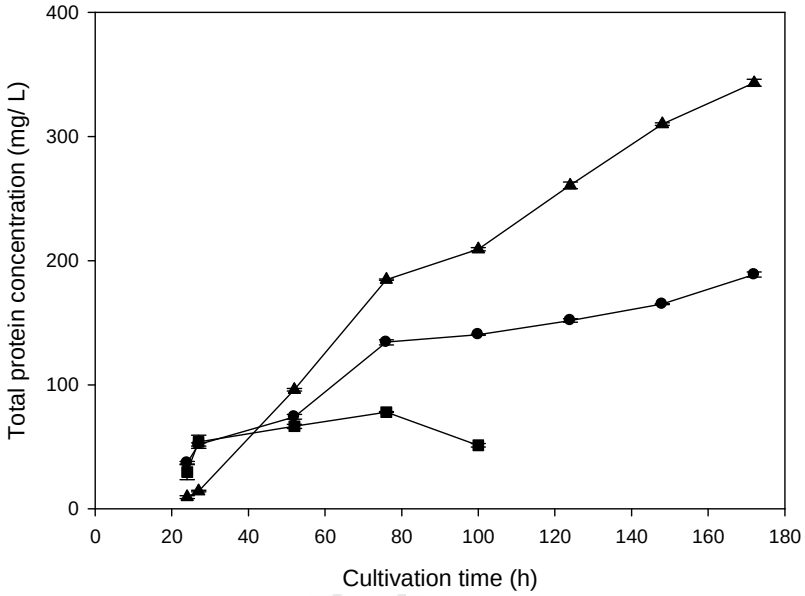
ผลจาก SDS–PAGE จากทั้งสามกระบวนการที่ทำการทดลองแสดงให้เห็นว่า โปรตีนจำนวนเพียงเล็กน้อยเท่านั้นที่ถูกขับออกมาในน้ำหมัก (**รูปภาพ 22**) ดังนั้นถือว่าเป็นข้อได้เปรียบในการทำบริสุทธิ์และง่ายต่อการแยกผลผลิตหลังสิ้นสุดกระบวนการหมัก อย่างไรก็ตามแถบโปรตีนที่คาดไว้ในทั้งสามกระบวนการหมักนั้นมีความแตกต่างกัน อาจมีโปรตีนตัวอื่นๆที่ผลิตโดย *P. pastoris* จากกระบวนการ hyperglycosylated แล้วขับออกมานอกเซลล์ (Cereghino and Cregg, 2000) และสำหรับในงานวิจัยนี้ขนาดของโปรตีนที่ต่างกันอาจเกิดขึ้นได้จากกระบวนการ glycosylation ในการหมักที่มีความเข้มข้นของเมทานอลต่างกัน ดังนั้นเพื่อที่จะยืนยันสิ่งที่เกิดขึ้นนี้กระบวนการทำบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไปจึงต้องมีการศึกษา



รูปภาพ 22 SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี Coomassie blue โดยตัวอย่างเป็นน้ำหมักหลังสิ้นสุดกระบวนการที่ μ_{set} 0.0105, 0.0075 และ 0.006 ต่อชั่วโมง

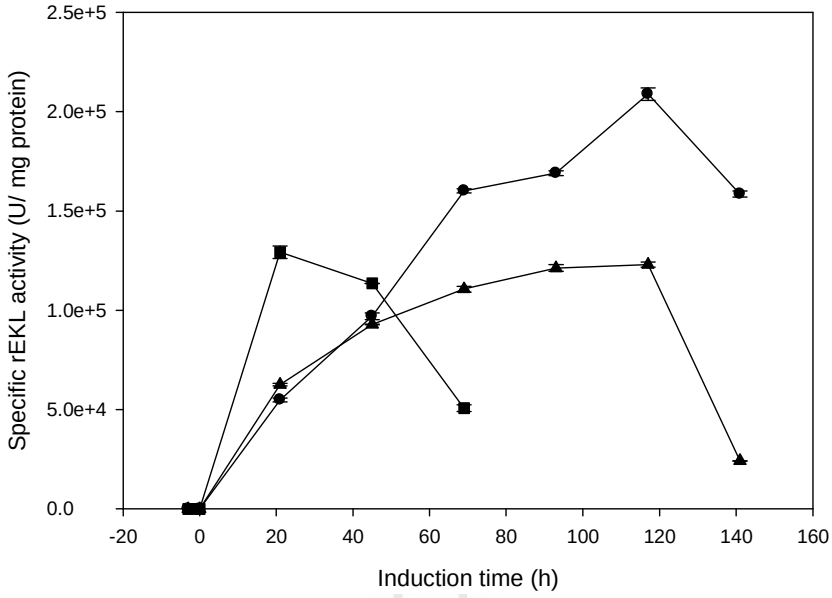
3.1.6 ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดและค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะของเอนไซม์ rEK_L

ค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะของเอนไซม์ rEK_L เป็นค่าที่สามารถบ่งบอกความบริสุทธิ์ของเอนไซม์ ซึ่งมีหน่วยเป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่แสดงในรูปภาพ 20 และความเข้มข้นของโปรตีนแสดงดัง **รูปภาพ 23** ผลของความเข้มข้นโปรตีนที่ผลิตได้และกิจกรรมจำเพาะของ rEK_L แสดงดัง**รูปภาพ 23** และ**รูปภาพ 24**



รูปภาพ 23 ความเข้มข้นโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร) ระหว่างกระบวนการหมักที่มีการใช้เมทานอลในการผลิตเอนไซม์ โดยที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.006(■), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (●) (ต่อชั่วโมง)

หลังจากชั่วโมงที่ 45 กระบวนการหมักที่ μ_{set} 0.0105 ต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของเซลล์มีการเพิ่มขึ้น แต่ความเข้มข้นของโปรตีนลดลงอย่างรวดเร็ว นั่นเป็นเพราะเนื่องจากการสะสมของเมทานอลในน้ำหมักมีระดับที่ก่อให้เกิดการยับยั้งขึ้นได้ ดังนั้นหากมีการยับยั้งการเจริญของเซลล์ ยังทำให้ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดลดลงได้ สำหรับอีกสองกระบวนการหมักความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดเพิ่มขึ้น โดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วห่อนชั่วโมงที่ 69 แต่หลังจากนั้นเริ่มลดลงเพราะเซลล์เริ่มตายลง หลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก ความเข้มข้นของโปรตีนที่ได้สูงสุดอยู่ที่ประมาณ 343.19 มิลลิกรัมต่อลิตร ในกระบวนการที่ค่า μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง และ 188.75 มิลลิกรัมต่อลิตรในกระบวนการที่ค่า μ_{set} 0.006 ต่อชั่วโมง



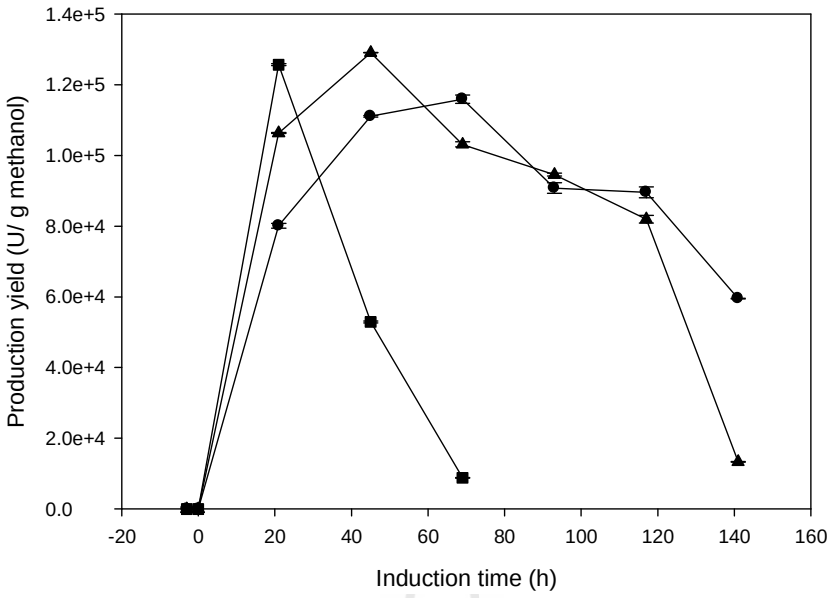
รูปภาพ 24 ค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะของเอนไซม์ rEK_L (ยูนิตต่อมิลลิกรัม) ระหว่างกระบวนการหมักที่มีการใช้เมทานอลในการผลิตเอนไซม์ โดยที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.006(■), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (●) (ต่อชั่วโมง)

ค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะของเอนไซม์ rEK_L มีค่าสูงหลังจากกระบวนการหมักผ่านไปได้ 21 ชั่วโมง ในกระบวนการที่ μ_{set} 0.0105 ต่อชั่วโมง ได้ 129,214 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน) เปรียบเทียบกับที่ μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง ได้ 62,578 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน และ μ_{set} 0.006 ต่อชั่วโมง ได้ 54,875 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน แต่หลังจากชั่วโมงที่ 21 ค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะของเอนไซม์ rEK_L มีการลดลงอย่างรวดเร็ว แต่สำหรับสองกระบวนการ (μ_{set} 0.0075 และ 0.006 ต่อชั่วโมง)นั้น ยังคงมีการสูงขึ้นอย่างรวดเร็วจนกระทั่งชั่วโมงที่ 69 เริ่มเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆและถึงค่าสูงสุดที่ชั่วโมง 117 คือ 208,824 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนที่ μ_{set} 0.006 ต่อชั่วโมง และ 122,975 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนที่ μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง ก่อนที่จะเริ่มลดลงจนกระทั่งได้ค่าเท่ากับ 158,525 และ 24,150 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีนหลังสิ้นสุดกระบวนการที่ μ_{set} 0.006 และ 0.0075 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ อัตราการเติมอาหาร MF สำหรับกระบวนการผลิต rEK_L โดย *P.pastoris* ที่ตั้งค่าควบคุมตามในงานวิจัยนี้ ส่งผลให้สามารถได้ค่าค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะของเอนไซม์ rEK_L ที่มีค่าสูงกว่างานวิจัยอื่นๆที่ได้ศึกษามาก่อน (Peng et al., 2003; Fang and Huang, 2004; Kupradit, 2006; Tan et al, 2007 and Zhang et al., 2008) ตามผลการทดลองที่ได้แสดงไว้ดังรูปภาพ 24

จากผลการทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของเซลล์สัมพันธ์กับความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมกับการสร้างผลผลิตด้วย กระบวนการที่ μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง ความเข้มข้นของเซลล์ ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด และกิจกรรมการทำงานของ rEK_L (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) สูงสุดที่ชั่วโมง 117 แต่สำหรับค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะของ rEK_L สูงสุดได้จากกระบวนการที่ μ_{set} 0.006 ต่อชั่วโมง อาจเป็นเพราะว่ามีความเข้มข้นของโปรตีนที่ผลิตได้ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดในกระบวนการที่ μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากมีอัตราการเติมอาหาร MF ที่ต่ำกว่าเป็นผลให้เซลล์มีความเข้มข้นต่ำเช่นเดียวกัน

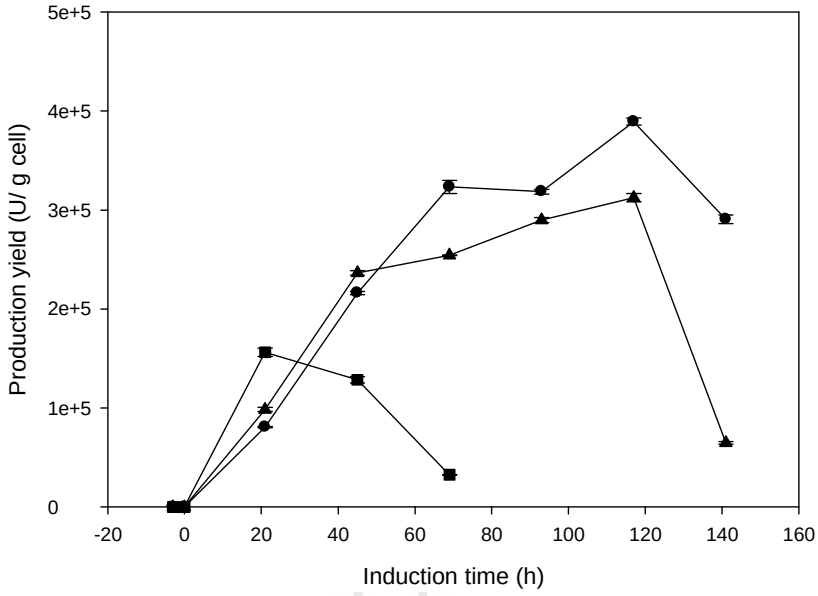
3.1.7 ค่าผลผลิตของเอนไซม์ (Production yield)

โดยปกติแล้วสับสเตรตเป็นต้นทุนหลักของกระบวนการหมัก หากได้ผลผลิต (Yp/s) มากเพียงใดจะทำให้เป็นผลดีมากเท่านั้น ในการทดลองนี้ค่าผลผลิต มีหน่วยเป็นยูนิตต่อกรัมของเมทานอลมีการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นกระบวนการหมัก แต่ลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 21 ในกระบวนการที่ μ_{set} 0.0105 ต่อชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 45 ในกระบวนการที่ μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง และหลังจากชั่วโมงที่ 69 สำหรับกระบวนการที่ μ_{set} 0.006 ต่อชั่วโมง (รูปภาพ 25) ผลที่ได้เกิดจากการที่ rEK_L ถูกผลิตและสะสมอยู่ในน้ำหมักในกระบวนการที่ μ_{set} 0.006 ต่อชั่วโมง น้อยกว่ากระบวนการที่ μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง ในขณะที่การใช้เมทานอลทั้งหมดที่เติมลงไปต่ำกว่ากระบวนการอื่นๆ และหลังจากชั่วโมงที่ 69 ไปแล้ว ค่าผลผลิตเอนไซม์ลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก อีกด้านหนึ่งคือ rEK_L (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) และความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมดยังคงเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มของ rEK_L ต่ำกว่าการใช้เมทานอลของเซลล์ ถึงแม้ว่าการเพิ่มของ Yp/s เป็นสิ่งสำคัญที่ต้องการพัฒนากระบวนการให้ได้ประสิทธิภาพสูง แต่เมื่อเปรียบเทียบกับราคาของ rEK_L กับเมทานอลแล้วนั้น กระบวนการควรที่จะดำเนินการต่อไปจนกระทั่งการผลิต rEK_L ในน้ำหมักมีการลดลง



รูปภาพ 25 ค่าผลผลิตของเอนไซม์ (ยูนิตต่อกรัมของเมทานอล) ระหว่างกระบวนการหมักที่มีการใช้เมทานอลในการผลิตเอนไซม์ โดยที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.006(■), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (●) (ต่อชั่วโมง)

ผลของค่าผลผลิตจำเพาะ (specific production yield หน่วยเป็น ยูนิตต่อกรัมของเซลล์) ของทั้งสามกระบวนการหมักแสดงใน**รูปภาพ 26** ค่าผลผลิตจำเพาะ ในกระบวนการที่ μ_{set} 0.0105 ต่อชั่วโมงมีค่าสูงสุดคือ 156,237 ยูนิตต่อกรัมของเซลล์ ที่ชั่วโมงที่ 21 จากนั้นมีการลดลงอย่างรวดเร็ว ส่วนกระบวนการที่ μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมงและ μ_{set} 0.0006 ต่อชั่วโมง หลังจากชั่วโมงที่ 21 ค่าผลผลิตจำเพาะยังคงมีการเพิ่มขึ้นต่อไป จนถึงชั่วโมงที่ 117 จากนั้นจึงค่อยๆลดลง ค่าผลผลิตจำเพาะที่มากที่สุดอยู่ที่ 389,326 ยูนิตต่อกรัมของเซลล์ ที่ μ_{set} 0.0006 ต่อชั่วโมง แต่สำหรับค่ากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร) นั้นสูงสุดคือที่ μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง ทั้งนี้เนื่องจากที่ μ_{set} 0.0006 ต่อชั่วโมง มีความเข้มข้นของเซลล์ต่ำกว่า



รูปภาพ 26 ค่าผลผลิตจำเพาะ (specific production yield หน่วยเป็น ยูนิตต่อกรัมของเซลล์) ระหว่างกระบวนการหมักที่มีการใช้เมทานอลในการผลิตเอนไซม์ โดยที่ค่า μ_{set} เท่ากับ 0.006(■), 0.0075 (▲) และ 0.0105 (●) (ต่อชั่วโมง)

จากผลการทดลองที่ได้พบว่า หากทำการเพิ่มการเติมเมทานอลจะทำให้เพิ่มการผลิต rEK_L (วัดได้จากการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L mมีหน่วยเป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร)ได้ อย่างไรก็ตามการเติมเมทานอลในระบบต้องขึ้นอยู่กับความสามารถในการใช้เมทานอลของเซลล์ด้วยและต้องแน่ใจว่าไม่ให้เกิดการสะสมของเมทานอลในน้ำหมักมากจนเกินไปที่ได้กล่าวไว้ก่อนหน้านี้ว่าอาจทำให้เกิดความเป็นพิษต่อการเจริญของเซลล์

ตาราง 5 การใช้เมทานอล น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด rEK_L ที่ผลิตได้ ผลผลิตของเซลล์ ค่ากิจกรรมจำเพาะของ rEK_L และค่าผลผลิตจำเพาะในกระบวนการทั้งสาม หลังสิ้นสุดกระบวนการหมักและที่ชั่วโมงที่ 117 (*)

พารามิเตอร์	**กระบวนการหมักที่มีอัตราการเจริญจำเพาะต่างๆกัน**		
	0.006 ต่อชั่วโมง	**0.0075 ต่อชั่วโมง**	**0.0105 ต่อชั่วโมง**
ความสามารถในการใช้เมทานอลทั้งหมด (กรัม)	502.93	622.12	294.72
Cell Dry Weight ($g.L^{-1}$)	103	128	80
ความเข้มข้นของโปรตีนทั้งหมด (มิลลิกรัมต่อลิตร)	189	343	50
rEK_L ที่ผลิตได้ (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	29,920	8,288	2,596
rEK_L ที่ผลิตได้สูงสุด		38,125 (*)	
ค่ากิจกรรมจำเพาะของ rEK_L (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	158,525	24,150	50,689
ค่ากิจกรรมจำเพาะของ rEK_L สูงสุด	208,824 (*)		
ผลผลิตของเซลล์ ($Y_{X/S}$ หน่วยคือ กรัมต่อกรัม)	0.20	0.21	0.27
ค่าผลผลิตจำเพาะ (ยูนิตต่อกรัมเซลล์)	290,515	64,759	32,461

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

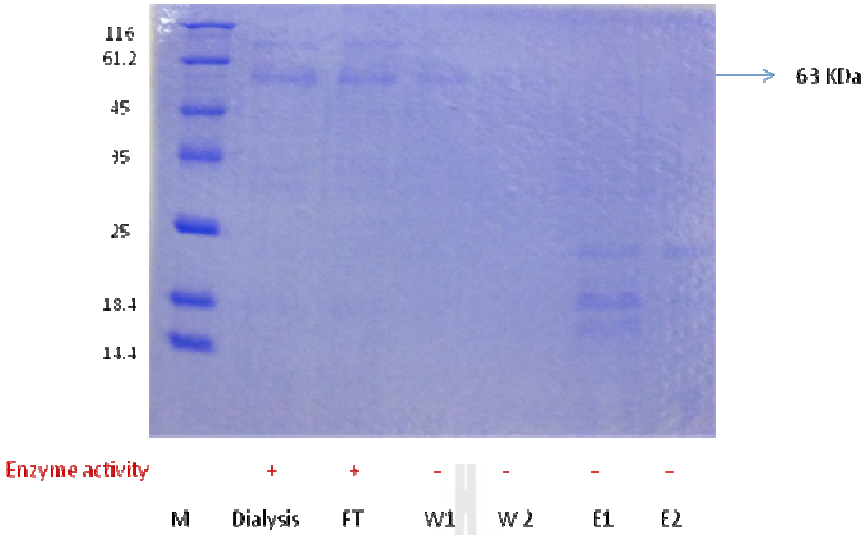
3.2. การทำบริสุทธิ์ rEK_L ที่ผลิตโดย *P. pastoris*

3.2.1 การแยก rEK_L โดยใช้ระบบ Electrodeionization (EDI)

จากข้อสมมุติฐานว่าระบบ EDI สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการแยกเอ็นไซม์ rEK_L ออกจากน้ำหมักได้ โดยอาศัยหลักการเคลื่อนที่ผ่านเยื่อแผ่นชนิดแลกเปลี่ยนประจุภายใต้ไฟฟ้ากระแสตรง โดยการทดลองก่อนหน้านี้ ได้ประสบความสำเร็จในการแยกกรดแล็กติกควบคู่ไปกับกระบวนการหมัก ด้วยระบบ EDI ซึ่งนอกจากจะเป็นการกำจัดสารปนเปื้อนในเบื้องต้นแล้ว ยังสามารถลดความเป็นพิษของกรดแล็กติกที่มีต่อเชื้อแบคทีเรีย ส่งผลให้สามารถเพิ่มผลผลิตของกรดแล็กติกได้มากขึ้น(boontawan *et al*, 2010) แต่อย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองการแยก rEK_L ในงานวิจัยนี้นี้พบว่า หลังจากใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นระยะเวลา 36 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของโปรตีนใน receiving solution คือ 0.9 มิลลิกรัมต่อลิตร จากนี้ยังไม่พบค่ากิจกรรมการทำงานจำเพาะของเอนไซม์ rEK_L อีกด้วย ทำให้สามารถสรุปได้ว่าระบบดังกล่าวไม่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการแยกเอ็นไซม์ rEK_L ออกจากน้ำหมักได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสาเหตุหลักคาดว่าน่าจะเกิดมาจากเยื่อแผ่นที่ใช้เป็นเยื่อแผ่นแบบแน่น ทำให้อัตราการแพร่ของโปรตีนผ่านเยื่อแผ่นมีค่าต่ำมาก โดยเฉพาะโปรตีนที่มีขนาดใหญ่กว่า จะมีความสามารถในการแพร่ผ่านเยื่อแผ่นได้ช้ากว่าโปรตีนหรืออิออนที่มีขนาดเล็ก ดังนั้นกระบวนการทำบริสุทธิ์ rEK_L ในขั้นต่อไปจึงเปลี่ยนเป็นการใช้คอลัมน์โคบอลต์และ โครมาโตกราฟฟี่ชนิดแลกเปลี่ยนประจุหรือที่เรียกว่า (ion exchange chromatography) ต่อไป

3.2.2 การทำบริสุทธิ์ rEK_L โดยคอลัมน์โคบอลต์

หลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมักเซลล์จะตกตะกอนและถูกกำจัดออกหลังจากนำไปปั่นเหวี่ยง จากนั้นนำส่วนใสที่ได้จะนำไปกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.2 ไมครอน หลังจากนั้นทำการเทตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตรลงในคอมลัมน์โคบอลต์ โดยที่คอลัมน์ที่เตรียมไว้พร้อม โดยการชะล้างด้วย 50 มิลลิโมลาร์ของสารละลาย Tris-Cl ที่ pH 8 ที่มีส่วนผสมของ 150 มิลลิโมลาร์ของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ตัวอย่างที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ ตัวอย่างที่ผ่านการชะออกมาจากคอลัมน์และตัวอย่างที่ได้จากการล้างคอลัมน์ จะถูกเก็บไปวิเคราะห์ในแต่ละส่วน หลังจากเสร็จแล้วจะทำการล้างคอลัมน์เพื่อกำจัดสิ่งที่ติดค้างออกตามระเบียบวิธีวิจัยในบทก่อนหน้านี้ และตัวอย่างที่ได้จะนำไปวิเคราะห์เพื่อหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์โดยเทคนิค SDS-PAGE



รูปภาพ 27 SDS-PAGE ที่ย้อมด้วยสี Coomassie blue ในตัวอย่าง rEK_L ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์จากคอลัมน์โคบอลต์

ผลการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L เกือบทั้งหมดพบอยู่ในส่วนที่ผ่านการชะออกมาจากคอลัมน์ (elution fraction) แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ (flow through) และส่วนที่ได้จากการล้างคอลัมน์ (wash fraction) และผลจากรูปที่ได้จาก SDS-PAGE แสดงแถบโปรตีนเพียงขนาดเดียวคือ 63 กิโลดาลตัน (**รูปภาพ 27**)

นอกจากนี้ได้มีความพยายามที่จะมีการศึกษากระบวนการทำบริสุทธิ์ rEK_L ที่ปลายด้าน N-terminal ติด His-tagged โดยได้ทำการเพิ่มระยะเวลาในการบ่มระหว่างกระบวนการไดอะไลซิสตัวอย่างที่ต้องการและนำเม็ดโคบอลต์ (Co^{+2}) แช่ไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และทำการเก็บตัวอย่างเป็นส่วนๆ (fraction) ตามระยะเวลา จากนั้นนำแต่ละ fraction ไปปั่นเหวี่ยงเพื่อกำจัดส่วนที่ไม่ต้องการออกที่ 900 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ส่วนเม็ดโคบอลต์นั้นก็ทำการชะล้างออกด้วยสารละลายดังการทดลองก่อนหน้านี้ ผลการทดลองการวิเคราะห์เอนไซม์ด้วย SDS-PAGE พบว่าไม่มี rEK_L ที่ปลายด้าน N-terminal ติด His-tagged ติดกับโคบอลต์

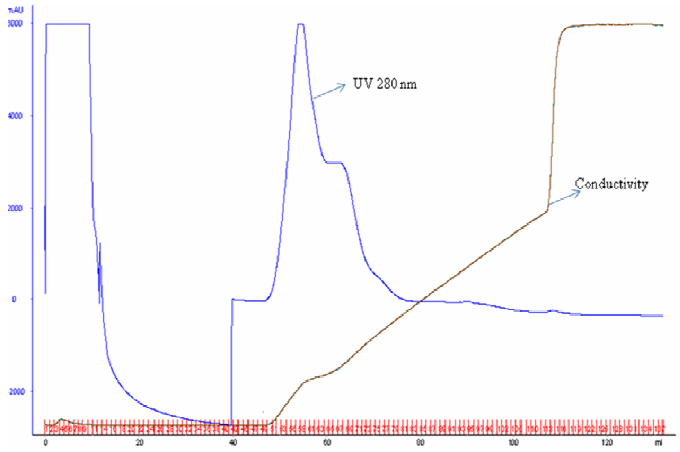
การทำบริสุทธิ์ rEK_L อีกวิธีหนึ่งคือโดยเทคนิค ion exchange chromatography ที่เป็นการกำจัดส่วนประกอบอื่นๆทั้งหมดออกจากเอนไซม์เพื่อความบริสุทธิ์มากขึ้น เริ่มต้นจากการปรับ pH ด้วย by 50 มิลลิโมลาร์ของสารละลาย Tris- Cl ที่ pH 8 และทำการเทตัวอย่างลงในคอลัมน์ ผลการทดลองพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L เกือบทั้งหมดพบอยู่ในส่วนที่ผ่านการชะออกมาจากคอลัมน์ (elution fraction) แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ (flow through) และส่วนที่ได้

จากการล้างคอลัมน์ (wash fraction) อีกครั้ง จึงแสดงได้ว่า His-tagged ใน rEK_L ไม่สามารถติดกับคอลัมน์โคบอลต์ได้ เช่นเดียวกับงานวิจัยอื่นๆ (Choi et al., 2001) เนื่องจาก His-tagged ของ rEK_L มีการติดกับอิออนโลหะอื่นๆที่มีอยู่ในน้ำหมัก ดังนั้นจึงไม่สามารถเชื่อมติดกับอิออนโลหะในคอลัมน์ได้ ดังนั้นการทำบริสุทธิ์ rEK_L ยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร เนื่องจาก His-tagged ที่ N-terminal ของ rEK_L ถูกล้างหรือเอาออกไป

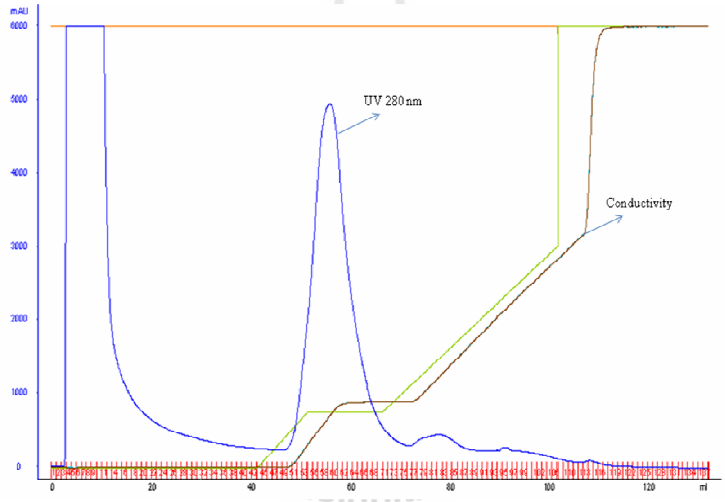
3.2.3 การทำบริสุทธิ์ rEK_L โดยเทคนิค ion exchange chromatography

ตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จากระบบ EDI มาแล้วจะถูกนำมาไดอะไลซิสเพื่อทำให้เข้มข้นขึ้นในสารละลายโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 5 จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ก่อนที่เทลงในคอลัมน์ Sulphopropyl Fast Flow Column (SP_FF คอลัมน์ 6 มิลลิเมตร) ที่ทำการเตรียมคอลัมน์ไว้ด้วย สารละลายโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 5 ก่อนใช้งาน เพื่อเอาส่วนที่ไม่ต้องการออกคอลัมน์จะถูกล้างด้วยสารละลายโซเดียมอะซิเตต ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 5 และมีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นตั้งแต่ 0-1 โมลาร์ เป็นองค์ประกอบ ล้างจำนวน 5 ครั้ง หลังจากผ่านตัวอย่างลงในคอลัมน์ จะเก็บตัวอย่างเป็นระยะๆ ความเข้มข้นของโปรตีนที่ทำการเก็บตัวอย่างในแต่ละส่วน จะนำมาวิเคราะห์โดยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ความยาวคลื่นที่ 280 นาโนเมตร และนำตัวอย่างแต่ละส่วน (fraction) มาวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE สำหรับตัวอย่างที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงของแต่ละ fraction จะถูกนำมาเทรวมกันและทำให้เข้มข้นขึ้นต่อไป

โปรไฟล์ในกระบวนการทำบริสุทธิ์ rEK_L จากการแลกเปลี่ยนประจุหรือ ion exchange โดยการชะล้างด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.1 ถึง 0.2 โมลาร์ (**รูปภาพ 28** และ **รูปภาพ 29**)



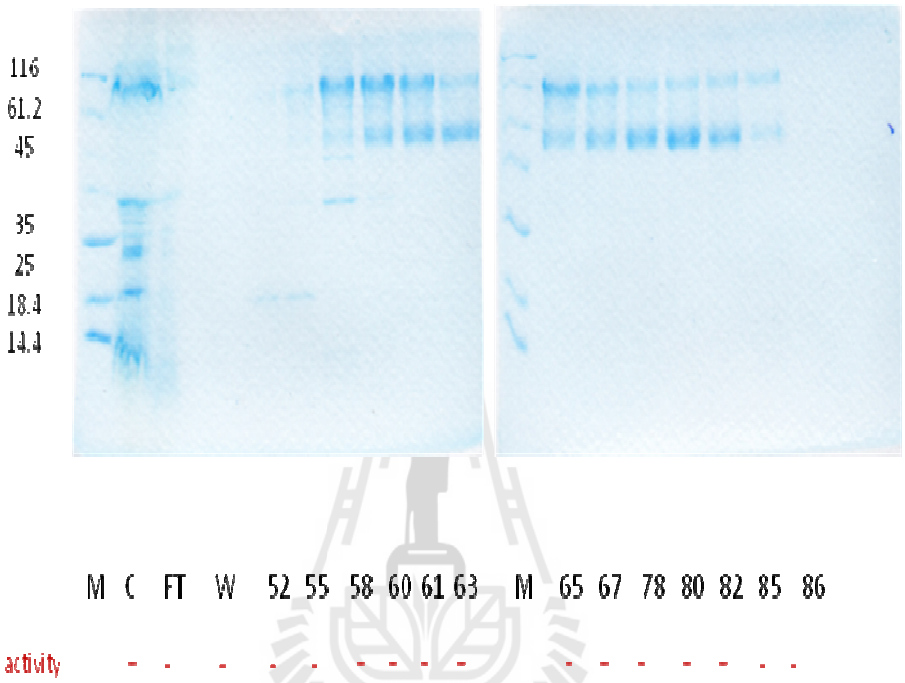
รูปภาพ 28 โปรไฟล์กระบวนการทำบริสุทธิ์ rEK_L โดยเทคนิค ion exchange chromatography ของตัวอย่างที่เข้มข้นปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ได้จากกระบวนการหมักที่ μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง



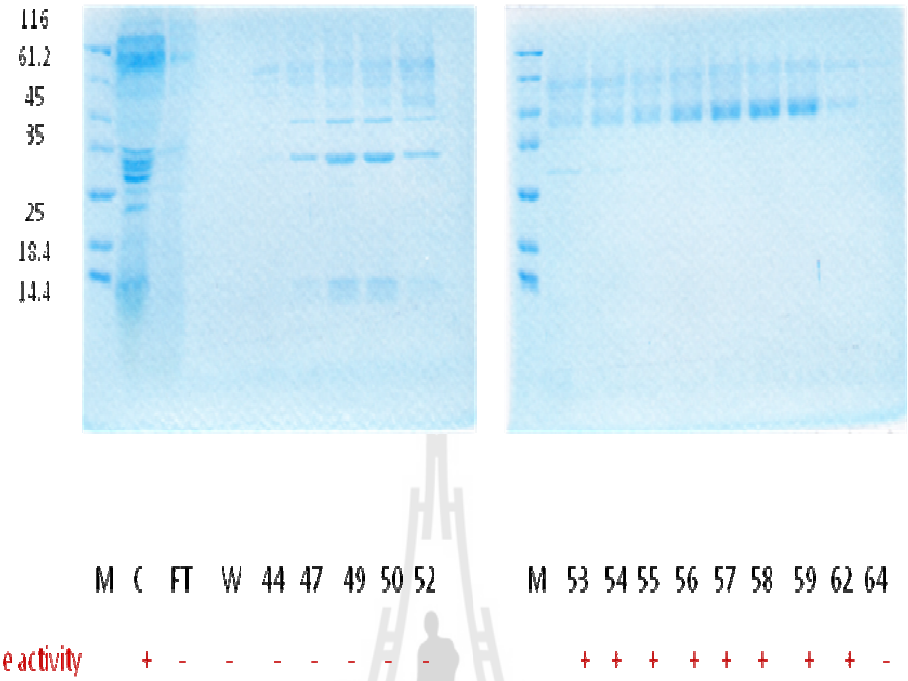
รูปภาพ 29 โปรไฟล์กระบวนการทำบริสุทธิ์ rEK_L โดยเทคนิค ion exchange chromatography ของตัวอย่างที่เข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ที่ได้จากกระบวนการหมักที่ μ_{set} 0.006 ต่อชั่วโมง

ผลการทดลองการวิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์ rEK_L พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์พบเพียงในส่วนที่ตัวอย่างผ่านการชะออกมาจากคอลัมน์ (elution fraction) แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์ในส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ (flow through) และส่วนที่ได้จากการล้างคอลัมน์ (wash fraction) และเมื่อทำการวิเคราะห์หาโปรตีนด้วย SDS-PAGE ยังแสดงให้เห็นว่าตัวอย่างจากส่วนที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ (flow through) และส่วนที่ได้จากการล้างคอลัมน์ (wash fraction) ไม่ปรากฏแถบของโปรตีน จึงสามารถสรุปได้ว่าทุกๆโปรตีนในตัวอย่างมีการเชื่อมติดอยู่กับคอลัมน์ SP column และในตัวอย่างที่

เก็บเป็นส่วนๆ (fraction) นั้นปรากฏแถบของโปรตีนที่มีความเข้มข้นสูงและมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 43 กิโลดาลตัน หากเทแต่ละ fraction รวมกันจะเห็นแถบโปรตีนที่น้ำหนักโมเลกุล 63 กิโลดาลตัน ในตัวอย่างที่ได้จากทั้งสองกระบวนการหมักที่ μ_{set} 0.006 และ 0.0075 ต่อชั่วโมง (**รูปภาพ 30** และ **รูปภาพ 31**)



รูปภาพ 30 SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Coomassie blue ของ rEKL ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ SP (cation exchanger) โดยที่ใช้ตัวอย่างที่เข้มข้นปริมาตร 2 มิลลิลิตร จากกระบวนการหมักที่มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.0075 ต่อชั่วโมง ในการทดสอบ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ใช้เป็นตัวเทียบ (M); ตัวอย่างที่เข้มข้นด้วยไดอะไลซิส (C); ตัวอย่างที่ผ่านออกมาจากคอลัมน์ หรือ Flow-through fraction (FT); ตัวอย่างที่ได้จากการล้างคอลัมน์ (W) และตัวอย่างที่ได้จากการชะคอลัมน์ หมายเลข 52, 55, 58, 60, 61, 63, 65, 67, 78, 80, 82, 85 และ 86



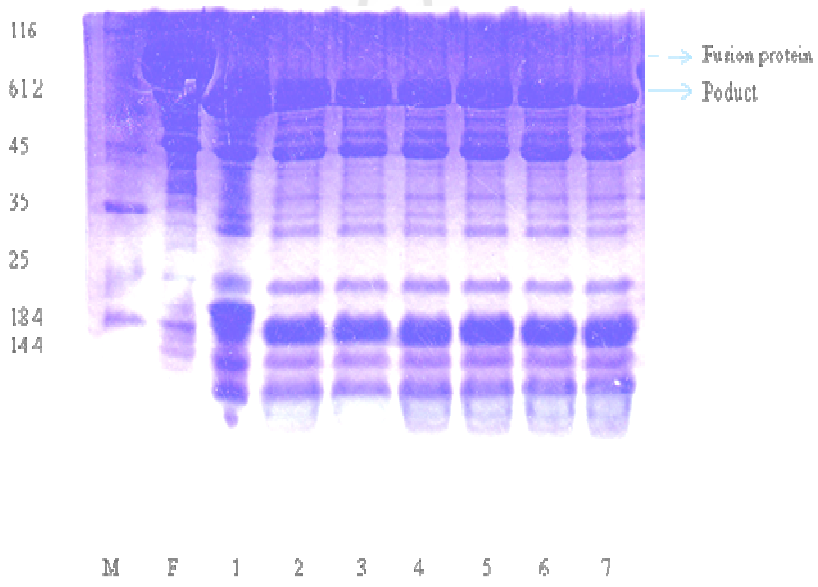
รูปภาพ 31 SDS-PAGE ย้อมด้วยสี Coomassie blue ของ rEKL ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยคอลัมน์ SP (cation exchanger) โดยที่ใช้ตัวอย่างที่เข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากกระบวนการหมักที่มีค่าอัตราการเจริญจำเพาะเท่ากับ 0.006 ต่อชั่วโมง ในการทดสอบ น้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ใช้เป็นตัวเทียบ (M); ตัวอย่างที่เข้มข้นด้วยไดอะไลซิส (C); ตัวอย่างที่ผ่านออกมาจาก คอลัมน์ หรือ Flow-through fraction (FT); ตัวอย่างที่ได้จากการล้างคอลัมน์ (W) และตัวอย่างที่ได้จากการชะคอลัมน์ หมายเลข 44, 47, 49, 50, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 62 และ 64

ตัวอย่างที่ได้จากการชะคอลัมน์ หรือ elution fractions หลังจากการวิเคราะห์พบว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์อยู่ในส่วนนี้ทั้งหมด จากนั้นจึงนำตัวอย่างเทรวมกันและทำให้เข้มข้นขึ้นต่อไป สำหรับกระบวนการทำบริสุทธิ์ของ rEK_L ได้มีการศึกษาโดยใช้เทคนิค ion exchange ซึ่งได้มีรายงานไว้โดย Cregg et al, 1993 และ Kupradit, 2006 แต่มีความแตกต่างกันของขนาดโมเลกุลซึ่งผลิตโดยยีสต์สายพันธุ์ต่างกันคือผลิตด้วย *P. pastoris* GS115 ทำให้เกิดกระบวนการ glycosylation ต่างกันในแต่ละสายพันธุ์ของ *Pichia* ในงานวิจัยนี้หลังจากการตรวจสอบโปรตีนที่ได้แล้วนั้นพบว่าได้ขนาดโมเลกุลคือ 43 และ 63 กิโลดาลตัน ในขณะที่งานวิจัยอื่นได้เพียงขนาดเดียวคือ 63 กิโลดาลตันที่ผลิตโดย *P.pastoris*

Y11430 (Kupradit, 2006) อีกทั้งกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์สูงกว่างานวิจัยอื่นๆและสามารถตัดฟิวชั่นโปรตีนได้เทียบเท่ากับเอนไซม์เอ็นเทอโรไคเนสที่ขายทางการค้า

3.2.4 การตัดฟิวชั่นโปรตีนด้วย rEK_L ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์

เอนไซม์ rEK_L ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์แล้วจะถูกนำมาทดสอบคุณสมบัติในการตัดฟิวชั่นโปรตีน คือ rice Os1BGlu4-Trx ซึ่งจะทำการบ่ม rEK_L ที่ได้จากการทดลองไว้กับ rice Os1BGlu4-Trx 22 ไมโครกรัม ในสารละลาย Tris- Cl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8 อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียสเป็นเวลา116 ชั่วโมง จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลการตัดด้วยเทคนิค 15 % SDS-PAGE ที่ใช้เจล 15% และใช้ rEK_L ที่ขายทางการค้าจากบริษัท NEB ในการเป็นตัวเปรียบเทียบ



รูปภาพ 32 การตัดฟิวชั่นโปรตีน recombinant rice Os1BGlu4-Trx ด้วย rEK_L ที่บริสุทธิ์ที่ได้จากจากกระบวนการหมักที่มี μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง เปรียบเทียบกับ rEK_L ทางกาค้าจาก NEB ในสารละลาย Tris-Cl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่ pH 8 อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมง ปฏิกิริยาเกิดขึ้นในปริมาตรทั้งหมด 22 ไมโครลิตร Protein marker (M); Fusion protein (F) และfusion protein ที่บ่มกับ commercial rEK_L 0.00014 ไมโครกรัม; 0.154; 0.308; 0.462; 0.616; 0.77 และ 0.924 ไมโครกรัมของ rEK_L ที่บริสุทธิ์ (Band 1-7)

รูปภาพ 32 จะเห็นได้ว่าแถบผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัดฟิวชั่นโปรตีนโดยใช้ rEK_L ที่ได้จากงานวิจัยนี้เหมือนกับการตัดด้วย rEK_L ที่ขายทางการค้า ขนาดของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการตัด คือ 55 กิโลดาลตันในทุกๆการทดลองที่ใช้โปรตีน recombinant rice Os1BGlu4-Trx 22 ไมโครกรัม และตัดด้วย commercial rEK_L 0.00014 ไมโครกรัม และ rEK_L ที่ผลิตได้ 0.154 ถึง 0.924 ไมโครกรัมที่ได้จากกระบวนการหมัก μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าเอนไซม์ที่ผลิตได้มีประสิทธิภาพตรงตามเป้าหมายที่ตั้งไว้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4 บทสรุป

4.1 สรุปผลการทดลอง

การผลิตรีคอมบิแนนท์เอ็นเทอโรไคเนสสายสั้น (rEK_L)ใน *P. pastoris* ประสบผลสำเร็จโดยใช้กระบวนการหมักแบบกึ่งกะ อัตราการป้อนอาหาร MF ได้ทดลองตามอัตราการเจริญจำเพาะที่ต่างกัน คือ μ_{set} 0.0105, 0.0075 และ 0.006 ต่อชั่วโมง ผลของความเข้มข้นของเซลล์ ความเข้มข้นของโปรตีนการผลิต เอ็นเทอโรไคเนส และค่ากิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์มีความแตกต่างกันอย่างมีในนัยสำคัญในทั้งสามกระบวนการ การใช้อัตราการป้อนที่ μ_{set} 0.0075 ต่อชั่วโมง ไม่เพียงแต่ได้ความเข้มข้นของเซลล์สูงที่สุดแล้วแต่ยังสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงภายในเวลา 117 ชั่วโมง อีกด้วย อีกทั้งในงานวิจัยนี้ rEK_L ที่ผลิตได้ยังมีกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่สูงเมื่อเทียบกับงานวิจัยอื่นๆ หลังสิ้นสุดกระบวนการหมักตัวอย่างน้ำหมักที่ได้จะถูกนำไปทำบริสุทธิ์ โดยเทคนิคอิเลคโตรดิไอออไนเซชั่น ไม่สามารถแยกเอ็นไซม์ออกจากน้ำหมักได้ จึงเปลี่ยนมาใช้เทคนิคโครมาโตกราฟฟี่ชนิดแลกเปลี่ยนอิออน (ion exchange chromatography) ซึ่งจากเทคนิคที่ได้วิเคราะห์โดย SDS-PAGE พบว่า ได้แถบโปรตีนสองแถบขนาดโมเลกุลคือ 43 และ 63 กิโลดาลตัน เอนไซม์ที่ผลิตได้ยังมีความสามารถในการตัดฟิวชั่นโปรตีนได้ด้วย ดังนั้นถือว่าในงานวิจัยนี้ได้แสดงถึงกระบวนการในการผลิต rEK_L ที่ได้เอนไซม์ที่มีกิจกรรมการทำงานจำเพาะสูง กระบวนการไม่ซับซ้อน และมีต้นทุนไม่สูงมากนัก พร้อมที่จะมีการประยุกต์ใช้ในการกำลังการผลิตขนาดใหญ่ต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร Yeast extracts peptone dextrose (YPD)

ประกอบด้วย (หน่วยต่อลิตร):

Yeast extract	10 กรัมต่อลิตร
Peptone	20 กรัมต่อลิตร
Dextrose	20 กรัมต่อลิตร

ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม zeocin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหลังจากที่อาหารอุณหภูมิลดลงเป็น 55 องศาเซลเซียส

สูตรอาหาร BMGY

ประกอบด้วย (หน่วยต่อลิตร):

Yeast extract	10 กรัมต่อลิตร
Peptone	20 กรัมต่อลิตร
Glycerol	10 กรัมต่อลิตร

ละลายแต่ละส่วนประกอบด้วยสารละลายบัฟเฟอร์โพแทสเซียมฟอสเฟตความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปรับให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร ที่ pH 6.0 ทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีจากนั้นเติม zeocin ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรหลังจากที่อาหารอุณหภูมิลดลงเป็น 55 องศาเซลเซียส

สูตรอาหาร PTM1 trace salts

ประกอบด้วย (หน่วยต่อลิตร):

$CuSO_4.5H_2O$	6.0 กรัมต่อลิตร
KI	0.08 กรัมต่อลิตร
$MnSO_4.H_2O$	3.0 กรัมต่อลิตร
$Na_2MoO_4.H_2O$	0.2 กรัมต่อลิตร
H_3BO_3	0.02 กรัมต่อลิตร

$ZnCl_2$	20 กรัมต่อลิตร
Fe Cl_3	13.7 กรัมต่อลิตร
$CoCl_2$. $6H_2O$	0.9 กรัมต่อลิตร
H_2SO_4	5.0 กรัมต่อลิตร
Biotin	0.2 กรัมต่อลิตร

ส่วนประกอบทั้งหมดละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นนำอาหารไปผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอนและเก็บไว้ในขวดที่ห่อด้วยอะลูมิเนียมฟอยด์ที่อุณหภูมิห้อง

สูตรอาหาร Glycerol basal salt medium (GBS)

ประกอบด้วย (หน่วยต่อลิตร):

H_3BO_4 85%	26.7 มิลลิลิตรต่อลิตร
$CaSO_4$	0.93 กรัมต่อลิตร
K_2SO_4	18.2 กรัมต่อลิตร
$MgSO_4.7H_2O$	14.9 กรัมต่อลิตร
KOH	4.13 กรัมต่อลิตร
Glycerol	40 กรัมต่อลิตร

เตรียมอาหารนี้ลงในถังหมัก ปรับปริมาตรให้ได้ 950 มิลลิลิตร จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาที รอจนกระทั่งอุณหภูมิลดลงได้ 30 องศาเซลเซียส จึงเติม PTM1 trace salt 4.35 มิลลิลิตรลงไป และปรับ pH ให้ได้ 5.5 ด้วยสารละลายแอมโมเนีย 25%

สูตรอาหาร Glycerol feed medium (GF)

Glycerol 99.5% น้ำหมัก 500 กรัมละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร จากนั้นทำการนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (psi) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 35 นาที จึงเติม PTM1 trace salt 12 มิลลิลิตรลงไป

สูตรอาหาร Methanol feed medium (MF)

เติม PTM1 trace salt 12 มิลลิลิตรลงไปเมทานอล 99.99% ที่มีปริมาตร 1 ลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ข

การคำนวณ

1. การหาค่า $Y_{X/S} = \frac{\Delta x}{\Delta s}$

โดยที่ Δx = ผลต่างของ biomass เริ่มต้นกับสุดท้าย (กรัมต่อลิตร)

ΔS = ปริมาณ substrate ที่ใช้ไป (กรัมต่อลิตร)

$$\therefore \quad Y_{X/S} = \frac{\Delta x}{\Delta s}$$

$$= \frac{\text{Biomass (สุดท้าย)} - \text{Biomass (เริ่มต้น)}}{\text{Substrate (เริ่มต้น)} - \text{Substrate (สุดท้าย)}}$$

2. การหาค่า $Y_{p/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$

โดยที่ ΔP = ปริมาณผลิตภัณฑ์ (lactic acid) ที่ผลิตได้ (กรัมต่อลิตร)

ΔS = ปริมาณ substrate (reducing sugar) ที่ใช้ไป

$$\therefore \quad Y_{P/S} = \frac{\Delta P}{\Delta S}$$

$$= \frac{\text{ผลผลิต (สุดท้าย)} - \text{ผลผลิต (เริ่มต้น)}}{\text{Substrate (เริ่มต้น)} - \text{Substrate (สุดท้าย)}}$$

ประวัติผู้วิจัย

1. ชื่อ : นาย อภิชาติ บุญทาวัน

2. ตำแหน่งปัจจุบัน : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

3. ที่อยู่ : สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
111 ถนนมหาวิทยาลัย ตำบลสุรนารี
อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา 30000
โทรศัพท์: (044)-224578
โทรสาร: (044)-224154
อีเมลล์ : apichat@sut.ac.th

4. ประวัติการศึกษา

ปี	ระดับ	สาขา	สถานศึกษา	ประเทศ
2548	ป. เอก	วิศวกรรมเคมี	Imperial college London	อังกฤษ
2543	ป. โท	วิศวกรรมชีวเคมี	The University of Birmingham	อังกฤษ
2537	ป. ตรี	วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร (เกียรตินิยม)	มหาวิทยาลัยเชียงใหม่	ไทย
1990	มัธยมศึกษาตอนปลาย	-	โรงเรียนปรินซ์รอยัลวิทยาลัย เชียงใหม่	ไทย

5. ประสบการณ์การทำงาน

- งานวิจัยหลังปริญญาเอก ASEA-UNINET Post-doc, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีเวียนนา, ประเทศออสเตรีย (พ.ค. 2550- เม.ย. 2551).

- อาจารย์/ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประจำสาขาเทคโนโลยีชีภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (ม.ค. 2548 - ปัจจุบัน)

6. สถานะภาพงานวิจัย

หัวหน้าโครงการ

- การศึกษาการพัฒนาการผลิตเอทานอลแบบต่อเนื่องจากกากน้ำตาลอ้อยโดยใช้เชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ในถังหมักแบบใช้เยื่อแผ่น
  แหล่งเงินทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี 100,000. บาท
  สถานะภาพ เสร็จสิ้นโครงการ (ก.ย. 2548- ส.ค. 2549)

- การเก็บเกี่ยวกรด L-แล็คติคจากน้ำหมักด้วยระบบอิเลคโตรดิอิออนไนเซชั่น
  แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ/มทส สัญญาเลขที่ มทส -3-304-51-12-09
  240,000. บาท (ธ.ค. 2550- พ.ย. 2551) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การสังเคราะห์เมทานอลแบบต่อเนื่องด้วยเชื้อ *Methylosinus trichosporium* OB3b ในถังปฏิกรณ์ชีวภาพเมมเบรนโดยใช้เทคนิคเพอร์แวปเพอเรชั่น
  แหล่งเงินทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
  305,000.- บาท (ต.ค. 2549- พ.ย. 2551) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายกรดไขมันจากสบู่ดำ ในสภาวะ ไร้ออกซิเจน
  แหล่งเงินทุน: สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
  200,000. บาท (ก.ย. 2549- ส.ค. 2550) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การพัฒนาท่อใยกลวงเชิงประกอบสำหรับใช้ในกระบวนการผลิตอะซีโตน-บิวทานอล-เอทานอลจากมันสำปะหลัง
  แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
  351,000. บาท (ธ.ค. 2552- พ.ย. 2553) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การประยุกต์ใช้สเปกโตรสโคปี้ของรังสีใกล้คลื่นใต้แดงในการควบคุมการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์โดยใช้ระบบการแยกไอผ่านเยื่อแผ่นและการดูดซับ
  แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
  301,000. บาท (ธ.ค. 2552- พ.ย. 2553) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การประยุกต์ใช้ระบบอิเลคโตรดิอิออนไนซ์เซชั่นในการแยกโปรตีนเอ็นเทอโรไคเนสจากน้ำ หมัก
  แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
  271,000. บาท (ธ.ค. 2552- พ.ย. 2553) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- Process optimization for motor fuel grade ethanol production using hybrid vapor permeation and pressure swing adsorption technique
  แหล่งเงินทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
  200,000. บาท (30 พ.ย. 2551- 29 พ.ย. 2552) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การวิเคราะห์สมดุลมวลและพลังงานของการผลิตเอทานอลบริสุทธิ์จากน้ำหมักในระดับโรงงาน ต้นแบบด้วยเทคนิคผสมระหว่างการกลั่น การแยกไอผ่านเยื่อแผ่น และการดูดซับ
  แหล่งเงินทุน: สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
  2,500,000. บาท (ส.ค. 2552- ส.ค. 2555) อยู่ในระหว่างการดำเนินการ

- การสร้างโรงงานต้นแบบการผลิตเอทานอลสำหรับใช้เป็นเชื้อเพลิงจากมันสำปะหลังโดยใช้เทคนิคผสมระหว่างการแยกไอผ่านเยื่อแผ่นและการดูดซับ
  แหล่งเงินทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
  2, 143**,** 000. บาท (มี.ค. 2553- มี.ค 2554) อยู่ในระหว่างการดำเนินการ

- การทำบริสุทธิ์กรดซัคซินิคจากน้ำหมักด้วยวิธีตกตะกอน เอสเทอร์ริฟิเคชั่นและการกลั่น
  แหล่งเงินทุน: สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ
  537,200. บาท งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การทำบริสุทธิ์กรด D- และ L-แล็คติกด้วยวิธีเอสเทอร์ริฟิเคชั่นและการกลั่นจากน้ำหมัก
  แหล่งเงินทุน: สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ (B10-52)
  3,272,440. บาท (ธ.ค. 2552- พ.ย. 2553) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การออกแบบถังปฏิกรณ์แบบท่อไหลสำหรับการทำบริสุทธิ์กรด D-แล็คติก
  แหล่งเงินทุน: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
  683,290. บาท (ม.ค. 2554- ธ.ค 2554) อยู่ในระหว่างการดำเนินการ

- การพัฒนาท่อใยกลวงเซรามิคเชิงประกอบสำหรับการผลิตเชื้อเพลิงเอทานอลด้วยระบบการแยกไอผ่านเยื่อแผ่น
  แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
  385,290. บาท (ม.ค. 2554- ธ.ค 2554) อยู่ในระหว่างการดำเนินการ

- ถังปฏิกรณ์ชีวภาพเมมเบรนสำหรับเซลเชื้อเพลิงเอทานอล
  แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
  350,290. บาท (ม.ค. 2554- ธ.ค 2554) อยู่ในระหว่างการดำเนินการ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมโครงการ

- การทดสอบประสิทธิภาพกระบวนการทำบริสุทธ์กรดดีแล็กติกโดยอิงเทคโนโลยีการกลั่นพร้อมการทำเอสเทอร์ริฟิเคชัน (สัญญา สนช-มก-มทส เลขที่ B10-52) จากน้ำหมักของบริษัท มิตรผลวิจัย พัฒนาอ้อยและน้ำตาล จำกัด
  แหล่งเงินทุน: บริษัท มิตรผลวิจัย พัฒนาอ้อยและน้ำตาล จำกัด
  หัวหน้าโครงการ: ผศ.ดร. วีระศักดิ์ เลิศศิริโยธิน
  1,187,220. บาท (1 พ.ย 2553- เม.ย 2554) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

- การพัฒนาเยื่อแผ่นเชิงประกอบจากยางธรรมชาติสำหรับการแยกเอทิลแล็กเทตจากปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชั่นด้วยระบบเพอร์แว็ปพอเรชั่น

แหล่งเงินทุน: สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

หัวหน้าโครงการ: อ.ดร. วิรัช ทวีปรีดา

665,000. บาท (23 ต.ค 2553- 22 ต.ค 2554) งานวิจัยเสร็จสมบูรณ์

7. งานวิจัยตีพิมพ์:

1 **Boontawan, A.**, Stuckey D.C. (2005), Mass Transfer of Terpenes through a Silicone Rubber Membrane in a Liquid-Liquid Contacting System, *Biotechnol Prog*, 21:1680-1687.

2 **Boontawan, A**., Stuckey D.C. (2005), A Membrane Bioreactor for the Biotransformation of α-Pinene Oxide to Isonovalal by Resting Cells of *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671, *Appl Microbiol biotechnol*, 69:643-649.

3 **Boontawan, A**., Schausberger, P., Bösch, P., and Friedl, A. (2008) Dehydration of Ethanol/Water Mixture using Pervaporation and Vapor Permeation Technique, *J Appl Membr Sci Technol*, 5:1-7

4 Boontawan, P., Kanchanatawee, S., and **Boontawan A.** (2011) Extractive Fermentation of L-(+)-lactic acid by *Pediococcus pentosaceus* using Electrodeionization (EDI) Technique, *Biochem Eng J,* 54: 192-199

5 Boontawan, P., and **Boontawan A**. (2011) Isolation and characterization of Jatropha oil-degrading *Enterococcus faecalis* and *Burkholderia cenocepacia* W-1 under anaerobic condition, *Afr J Biotechnol*, 10(63): 13841-13851

6 Khunnonkwao, P., Boontawan, P., Haltrich, D., Maischberger, T., and **Boontawan, A**. (2012) Purification of L-(+)-Lactic Acid from Pre-treated Fermentation Broth using Vapor Permeation–Assisted Esterification, *Process Biochem*, **Submitted.**

7 Pimkaew, S., and **Boontawan, A**. (2011) Process Optimization for Motor Fuel Grade Ethanol Production using Hybrid Vapor Permeation and Pressure Swing Adsorption Technique, *Euro J of Sci Res*, 64(4): 644-657

8 Khunnonkwao, P., Ariyawong, C., Lertsiriyothin, W., and **Boontawan, A**. (2012) Purification of D-(-)-Lactic Acid from Fermentation Broth using Nanofiltration, Esterification, Distillation, and Hydrolysis Technique, *Adv Mater Res*, **Accepted.**

9 **Boontawan, A.** (2012) Purification of Succinic Acid from Synthetic Solution using Vapor Permeation-Assisted Esterification Coupled with Reactive Distillation, *Adv Mater Res*, **Accepted.**

10 Champreda, V., Stuckey, C., and **Boontawan, A.** (2012) Separation of Methanol/Water Mixtures from Dilute Aqueous Solutions using Pervaporation Technique, *Adv Mater Res*, **Accepted.**

11 Taweepreda, W., and **Boontawan, A**. (2012) Direct Sequestration of Ethyl Lactate from Fermentation Broth using Vapor Permeation-Assisted Esterification Coupled with Vacuum Fractionation Technique, Sep Purif Technol, ***In Preparation***

12 Samnaknit, W., Kongkaew, A., and Boontawan, A., (2012) Extractive Fermentation of Ethanol using a Vacuum Fractionation Technique, Bioresource Technol, ***In Preparation***

8. งานนำเสนอในงานประชุมทางวิชาการระดับนานาชาติ:

1. **Boontawan, A**., Schausberger, P., Bösch, P., Brinkmann, T., and Friedl, A. Dehydration of Ethanol/Water Mixture using Pervaporation and Vapor Permeation Technique. *The 6th Regional Symposium on Membrane Science and Technology 2008,* 13rd-15th August 2008, Phuket, Thailand (นำเสนอด้วยวาจา)
2. **Boontawan, A.**, Schausberger, P., Bösch P., Brinkmann, T., and Friedl, A. Dehydration of Ethanol/Water Mixture using Vapor Permeation Technique. *2008 International Congress on Membranes and Membrane Processes*, 12nd-18th July 2008, Hawaii, United State of America. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)
3. Bösch, P., Schausberger, P., **Boontawan, A**., and Friedl, A. Modelling and Process Integration of Membranes for Ethanol Dehydration. *2008 International Congress on*

Membranes and Membrane Processes, 12nd-18th July 2008, Hawaii, United State of America. (นำเสนอด้วยวาจา)

4. Panvichit, P., **Boontawan, A.**, and Kanchanatawee, S. Selection of Lactic Acid Bacteria for L-Lactic Acid Fermentation from Cassava Starch. *The 3rd International Conference on Renewable Resources and Biorefineries 2007*, 4th-6th June 2007, Ghent University, Belgium. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)
5. Panvichit, P., Kanchanatawee, S. and **Boontawan, A**. Mass transfer characteristic of ethanol from diluted aqueous solution through silicone membranes in a liquid-liquid contacting system. *Membrane Science & Technology 2006*, 26th-29th April 2006, Nangyang Technological University, Singapore. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)
6. **Boontawan, A**. and Stuckey, D.C. A Membrane Bioreactor for Biotransformation of Monoterpene. *3rd Regional Symposium on Membrane Science & Technology 2005*, 27th-28th April 2005, Institut Teknologi Bandung, Indonesia. (นำเสนอด้วยวาจา)
7. **Boontawan, A**. Molecular Diffusion in PVA Membrane for Separation Dehydration of EtOH/H2O Mixtures using Vapor Permeation Technique. *Nanotech Insight Conference 2009*, 29th March-2nd April 2009, Barcelona, Spain. (นำเสนอแบบโปสเตอร์)
8. **Boontawan, A**. and Pimkaew, S. Anhydrous ethanol production from fermentation broth using distillation, vapor permeation, and pressure swing adsorption technique. *The 8th International Conference on Membrane Science and Technology 2010*, 29th November-2nd December 2010, Institute Teknologi Bandung, Indonesia. (นำเสนอด้วยวาจา)
9. Molina, S., Lertsiriyothin, W., and **Boontawan, A.** Production and Purification of D-(-)-Lactic Acid from Concentrated Fermentation Broth using Esterification, Distillation and Hydrolysis Technique. The 4th International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultrual Products (FerVAAP) Conferene, 29th -31st August 2011, Khon Kaen, Thailand. (นำเสนอด้วยวาจา)

10. Samnaknit, W., Kongkaew, A., and **Boontawan, A.**, Extractive Fermentation of Bio-Ethanol from Concentrated Sweet Sorghum Juice using Vacuum Fractionation Technique, ISSCT co-product workshop: successful utilization of co-product in the sugar industry, 19th-22nd March 2012, Bangkok

บรรณานุกรม

Ayed, A., Rabhi, I., Dellagi, K., and Kallel, H. (2008). High level production and purification of human interferon [alpha] 2b in high cell density culture of *Pichia pastoris*. **Enzyme and Microbial Technology**. 42: 173-180.

Boontawan, P., Kanchanatawee, S., and Boontawan A. (2011) Extractive Fermentation of L-(+)-lactic acid by *Pediococcus pentosaceus* using Electrodeionization (EDI) Technique, **Biochem Eng J,** 54: 192-199

Cereghino, J. and Cregg. J. (2000). Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiol Rev**. 24: 45-66.

Cereghino, G. P. L., Sunga. A. J., Cereghino, J. L. and Cregg, J.M. (2001). Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. **Genetic Engineering**. 23:157-170.

Charoenrat, T. (2005). Fermentation process development for recombinant protein production. Ph. D. Dissertation, Suranaree University of Technology, Thailand.

Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Jahic, M., Veide, A. and Enfors, S.-O. (2006). Increased total air pressure *versus* oxygen limitation for enhanced oxygen transfer and product formation in a *Pichia pastoris* recombinant protein process. **Biochemical Engineering Journal.** 30: 205-211

Chiruvolu, V., Cregg, J., and Meagher, M. (1997). Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fed-batch fermentations. **Enzyme and Microbial Technology**. 21: 277-283.

Choi, S., Song, H., Moon, J., and Seong, B. (2001). Recombinant enterokinase light chain with affinity tag: expression from *Saccharomyces cerevisiae* and its utilities in fusion protein technology. **Biotechnol Bioeng**. 75: 718-724.

Chu, W., Zhou. X. S., et al. (2007). Improving intracellular production of recombinant protein in *Pichia pastoris* using an optimized preinduction glycerol-feeding scheme. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 78: 257-264.

Cino, J. (1999). High-yield protein production from *Pichia pastoris* yeast: A protocol for benchtop fermentation. **Application Note.** New Brunswick Scientific**.**

Collins-Racie, L. A., McColgan, J. M., Grant, K. L., DiBlasio-Smith, E. A., McCoy, J. M., and LaVallie, E. R. (1995). Production of recombinant bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli* using the novel secretory fusion partner DsbA. **Nat Biotech**. 13: 982-987.

Cos, O., Serrano, A., Montesinos, J. L., Ferrer, P., Cregg, J. M., and Valero, F. (2005). Combined effect of the methanol utilization (Mut) phenotype and gene dosage on recombinant protein production in *Pichia pastoris* fed-batch cultures. **Journal of Biotechnology**. 116: 321-335.

Cregg, J. M., Tschopp. J. F., et al. (1987). High-level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast, *Pichia Pastoris*. **Nat Biotech.** 5: 479-485.

Cussler, E. L. (1997). *Diffusion; Mass Transfer in fluid systems* (second ed.): Cambridge University press, United Kingdom.

Doig, S. D., Boam, A. T., Leak, D. I., Livingston, A. G., and Stuckey, D. C. (1998). A Membrane Bioreactor for Biotransformation of Hydrophobic Molecules. **Biotechnology and bioengineering**. 58: 587-594.

Fang, L., Sun, Q.-M., and Hua, Z.-C. (2004). Expression of recombinant chinese bovine enterokinase catalytic subunit in *P. pastoris* and its purification and characterization. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica** 36: 513-517.

Gasparian, M. E., Ostapchenko, V. G., Schulga, A. A., Dolgikh, D. A., and Kirpichnikov, M. P. (2003). Expression, purification, and characterization of human enteropeptidase catalytic subunit in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**. 31: 133-139.

Gurramkonda, C., Adnan, A., Gäbel, T., Lünsdorf, H., Ross, A., Nemani, S. K., Swaminathan, S., Khanna, N., and Rinas, U. (2009). Research Open Access: Simple high-cell density fed-batch technique for high-level recombinant protein production with *Pichia pastoris*: Application to intracellular production of Hepatitis B surface antigen. **Microbial Cell Factories**. 13: 1-8.

Habova, V., Melzoch, K., Rychtera, M., and Sekavova, B. (2004). Electrodialysis as a useful technique for lactic acid separation from a model solution and a fermentation broth. **Desalination**. 162: 361-372.

Hartner, F. S. and Glieder. A. (2006). Review Open Access: Regulation of methanol utilisation pathway genes in yeasts. **Microbial Cell Factories**. 539: 1-21.

Hellwig, S., Emde, F., Raven, N., Henke, M., ven der Logt, P., and Fisher, R. (2001). Analysis of single-chain antibody production in *Pichia pastoris* using online methanol control in fed-batch and mixed-feed fermentations. **Biotechnol Bioeng**. 74: 344-352.

Higgins, D.R. and Cregg, J.M. (1998) Introduction to *Pichia pastoris*. **Methods Mol Biol**. 103: 1-15

Holmes, W. J., Darby, R. A., Wilk, M. D., Smith, R., and Bill, R. M. (2009). Developing a scalable model of recombinant protein yield from *Pichia pastoris*: the influence of culture conditions, biomass and induction regime. **Microbial Cell Factories**. 8: 1-14.

Huang, C., Xu, T., Zhang, Y., Xue, Y., and Chen, G. (2007). Application of electrodialysis to the production of organic acids: State-of-the-art and recent developments. **J Membr Sci**. 288: 1-12.

Inan, M. and Meagher, M. M. (2001). The effect of ethanol and acetate on protein expression. **J. Biosci. Bioeng.** 92: 337-341.

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.

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. **Journal of Biotechnology**. 102: 45-53.

Katakura, Y., Zhang, W., Zhuang, G., and Omasa, T. (1998). Effect of methanol concentration on the production of Human □2-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.

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 Biochemistry**. 40: 717-722.

Kim, S. J., Lee. J. A., Kim, Y. H. and Song, B. K. (2009). Optimization of the functional expression of *Coprinus cinereus* peroxidase in *Pichia pastoris* by varying the host and promoter. **J. Microbiol. Biotechnol**. 19: 966-971.

Kobayashi, K., Kuwae, S., Ohya, T., Ohda, T., Ohyama, M., Ohi, H., Tomomitsu, K., and Ohmura, T. (2000). High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. **J. Biosci. Bioeng**. 89: 55-61.

Kunitz, M. (1938). Formation of tripsin from crystalline trypsinogen by means of enterokinase. Laboratories of The Rockefeller Institute for Medical Research, Princeton, New Jersey.

Kupradit, C. (2006). Bovine enterokinase light chain cloning and production. Master thesis, Suranaree Unversity of Technology.

Kupsculik, B., and Sevella, B. (2004). Effect of methanol concentration on the recombinant *Pichia pastoris* Muts fermentation. **Periodica Polytechnica Ser. Chem. Eng** 48: 73-87.

LaVallie, E. R., Rehemtulla, A., Racie, L. A., DiBlasio, E. A., Ferenz, C., Grant, K. L., Light, A., and McCoy, J. M. (1993). Cloning and functional expression of a cDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase. **The Journal of Biological Chemistry**. 268: 23311-23317.

Lee, C. Y., Nakana. A., Shiomi, N., Lee, E. K. and Katoh, S. (2003). Effects of substrate feed rates on heterologous protein expression by *Pichia pastoris* in DO-stat fed-batch fermentation. **Enzyme Microbial Technology**. 33: 358-365.

Lee, K., Lim. S. and Kim, D. (2006). Effect of various additives on the production of recombinant HBsAg during methanol induction in *Pichia pastoris*. **Biotechnol. Bioeng.** 21: 260-266.

Lin Cereghino, G. P., Lin Cereghino, J., Ilgen, C., and Cregg, J. M. (2002). Production of recombinant proteins in fermenter cultures of the yeast *Pichia pastoris*. **Curr Opin Biotechnol**. 13: 329-332.

Lye, G. J., and Woodley, J. M. (1999). Application of *in situ* product-removal techniques to biocatalytic process. **Trends Biotechnol**. 17: 395-402.

Madzingaidzo, L., Danner, H., and Braun, R. (2002b). Process development and optimisation of lactic acid purification using electrodialysis. **Journal of Biotechnology** 96: 223-239.

Matsuura, T. (1994). *Synthetic Membrane and Membrane Separation processes*: CRC Press, Florida. Mattiasson, B., and Holst, O. (1991). *Extractive Bioconversions*: Marcel Dekker, New York. Giorno, L., and Drioli, E. (2000). Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives. **Trends Biotechnol**. 18: 339- 349.

Mulder, M. (1991). *Basic Principles of Membrane Technology*: Kluwer academic, Dordrecht.

Cussler, E. L. (1997). *Diffusion; Mass Transfer in fluid systems* (second ed.): Cambridge University press, United Kingdom.

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*. **Journal of Biotechnology**. 108: 185-192.

Rosenfeld, S. (1999). Use of *Pichia pastoris* for expression of recombinant proteins. **Methods Enzymol**. 306: 154-169.

Song, H.-W., Choi, S.-I. and Seong, B. L. (2002). Engineered recombinant enteropeptidase catalytic subunit: effect of N-terminal modification. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. 400: 1-6.

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 methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Gene**. 190: 55-62.

Stratton, J., Chiruvolu. V., and Meagher, M. (1998). High cell-density fermentation. **Methods Mol Biol**. 103: 107-120.

Suh, C. W., Park, S. H., Park, S. G., and Lee, E. K. (2005). Covalent immobilization and solid-phase refolding of enterokinase for fusion protein cleavage. **Process Biochemistry**. 40: 1755-1762.

Svetina, M., Krasevec, N., Gaberc-Porekar, V., and Komel, R. (2000). Expression of catalytic subunit of bovine enterokinase in the filamentous fungus Aspergillus niger. **Journal of Biotechnology**. 76: 245-251.

Tan, H., Wang, J., and Zhao, Z. (2007). Purification and refolding optimization of recombinant bovine enterokinase light chain overexpressed in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**. 56: 40-47.

Trentmann, O., Khatri. N., and Hoffmann, F. (2004). Reduced oxygen supply increases process stability and product yield with recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnol Prog**. 20: 1766-1775.

Wang, Y., Wang. Z., Du, G., Hua, Z., Liu, L., Li, J., and Chen, J. (2009). Enhancement of alkaline polygalacturonate lyase production in recombinant *Pichia pastoris* according to the ratio of methanol to cell concentration. **Bioresource Technology**. 100: 1343-1349.

Yuan, L-D., and Hua, Z- C. (2002). Expression, purification, and characterization of a biologically active bovine enterokinase catalytic subunit in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**. 25: 300-304.

Zhang, W., Inan, M., and Meagher, M. M. (2000). Fermentation strategies for recombinant protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **Biotechnol. Bioprocess Eng**. 5: 275-287.

Zhang, J. G., Wang, X. D., Mao, X. Z., and Wei, D. Z. (2008). High-level production of bovine enterokinase light chain using fed-batches by recombinant *Pichia pastoris*. **Chem. Biochem. Eng. Q**. 23: 219-224.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี