รหัสโครงการ SUT3-304-44-24-16

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การแสดงออกและการผลิตเบต้ากลูโคสิเดส โดย *Pichia pastoris*

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

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาริน่า เกตุทัต-คาร์นส์

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000

ผู้ร่วมวิจัย

นายเทพปัญญา เจริญรัตน์

นายเดชสิทธิ์ ชำนาญศิลป์

นายอนันตศักดิ์ อุนจันทา

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2544-2545

ตุลาคม 2548

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจมส์ เกตุทัต-คาร์นส์ ที่ได้ให้คำปรึกษา และแนะนำการทำงานในเกือบทุกขั้นตอน ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์ และดร. ประทานพร ทูนกุล ที่ได้อนุเคราะห์ข้อมูลและคำปรึกษา

ผู้วิจัยขอขอบคุณ The Royal Institute Stockholm Sweden (KTH) ที่ได้อนุเคราะห์ห้องปฏิบัติการในการทำการผลิตเอนไซม์ และบริษัท GE Healthcare (Uppsola, Sweden) ที่อนุเคราะห์ resin ในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

โครงการนี้นับเป็นส่วนหนึ่งของโครงการ Isolation and Characterization of Glycosyl Hydrolases from Thai Plants

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ 2544-2545

คณะผู้วิจัย

ตุลาคม 2548

บทคัดย่อ

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

Abstract

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

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	I
บทคัดย่อ	II
Abstract	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญรูปภาพ	VI
สารบัญคำย่อ	VII
บทที่ 1: บทนำ	1
บทที่ 2: งานวิจัยส่วนที่ 1 การโคลนเบต้ากลูโคสิเดสจากพืชสู่ยีสต์	6
บทที่ 3: งานวิจัยส่วนที่ 2 การผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสด้วยกระบวนการหมักแบบเติมสารอาหาร	8
บทที่ 4: งานวิจัยส่วนที่ 3 การทำเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสให้บริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบ expanded bed	14
บทที่ 5: บทสรุปและข้อเสนอแนะ	22
บรรณานุกรม	23
ภาคผนวก	26
ภาคผนวก ก โปสเตอร์เสนอผลงาน การประชุม International conference on fermentation technology for value added gricultural products, March 22-25, 2005, Khon Kaen University, Thailand	27
ภาคผนวก ข โปสเตอร์เสนอผลงานการประชุมวิชาการ International conference Biopartitioning and Puification (BPP 2005) June 20-24, 2005, The Netherlands	29
ภาคผนวก ค ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ J. Biotechnology	31
ประวัตินักวิจัย	45

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนโคลนที่สามารถเติบโตบนอาหารที่มี zeocin หลังจากทำการทรานส์ฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่เซลล์	7
2	ระยะเวลาในการหมัก, ปริมาณเซลล์แห้ง, การสะสมเบต้ากลูโคสิเดส, โปรตีนทั้งหมด และปริมาณการเติมเมธานอล	11
3	การแยกเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสจากน้ำหมักด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ expanded bed	21

สารบัญภาพ

รูปภาพที่		หน้า
1	การแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสใน *P. pastoris* สายพันธุ์เจ้าบ้าน (Y11430; host strain), สายพันธุ์ที่มีการทรานฟอร์มพลาสมิด pPICzαB (B) และสายพันธุ์ที่มีการทรานฟอร์มพลาสมิด pPICzαB ที่มี β-glucosidase cDNA (G)	7
2	ระบบควบคุมการเติมเมธานอลแบบ DOT stat	9
3	ผลของการควบคุมการเติมเมธานอลแบบ DOT stat ส่งผลให้ a) DOT ในช่วง production phase มีค่าคงที่เท่ากับ 25% (set point) b) ความเข้มข้นของเมธานอลในน้ำหมักลดลงจนต่ำกว่าความสามารถของเครื่องวิเคราะห์	10
4	ความสัมพันธ์ของการเติบโต, การผลิตเบต้ากลูโคสิเดส, โปรตีนทั้งหมด และปริมาณการเติมเมธานอลกับระยะเวลาในการหมัก	11
5	การวิเคราะห์โปรตีนในตัวอย่างน้ำหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย Coomassie blue	12
6	การศึกษาการดูดซับเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสในรูปของ equilibrium capacity (Q_{eq}) โดย Streamline SP, a)อิทธิพลของพีเอชภายใต้สภาวะ C_0 = 2.687 หน่วยต่อมิลลิลิตร และค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย 15.0 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และ b)อิทธิพลของค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายภายใต้สภาวะ C_0 = 1.219 หน่วยต่อมิลลิลิตรและพีเอช 4.0	17
7	การศึกษาการปลดปล่อยเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสจาก Streamline SP, a) อิทธิพลของพีเอชภายใต้สภาวะค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย 0.8 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และ b)อิทธิพลของค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายภายใต้พีเอช 4.0	18
8	a) การศึกษาการทำให้เอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสบริสุทธิ์ โดยโครมาโทกราฟีแบบ expanded bed อาศัย Streamline SP, b)การวิเคราะห์โปรตีนในผลผลิตที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ที่ fraction no. 10-19 (lane 2-10) โดยวิธี SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย Coomassie blue	20

คำอธิบายสัญลักษณ์

AOX	Alcohol oxidase enzyme
aox	Alcohol oxidase gene
ATCG	Nucleotide containing the base adenine, thymine, cytisine and guanine, respectively
BMGY	Buffered glycerol complex medium
BMMY	Buffered methanol complex medium
cDNA	Complementary DNA
Ceq	Protein concentration under equilibrium condition
C_0	Initial protein concentration
DOT	Dissolved oxygen tension
GBS	Glycerol basal salt medium
pPICzαB	Expression plasmid which used in this research
Qeq	Equilibrium capacity
rpm	Revolution per minute
SDS-PAGE	Sodiumdodisyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
Vads	Resin volume
Vl	Total reaction volume
vvm	Volume per volume per minute

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

เบต้ากลูโคสิเดส (EC 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ ในกลุ่มไกลโคสิลไฮโดรเลส ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกริยาไฮโดรไลสิสอัลคิล- และอาริล-เบต้ากลูโคไซด์ รวมทั้งไดกลูโคไซด์ และโอลิโกแซคคาไรด์ เพื่อปลดปล่อยกลูโคสและอะไกลโคน (Reese, 1977) เอนไซม์เหล่านี้พบได้ทั้งในจุลินทรีย์สัตว์และพืช แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของเอนไซม์นี้ต่อการดำรงชีพของสิ่งมีชีวิต

กลูโคสเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) พื้นฐาน ที่สามารถพบในสิ่งมีชีวิต ทั้งนี้กลูโคสสามารถทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการเกิดสารประกอบที่หลากหลาย เช่น อัลคิล- และอาริล- กลูโคไซด์ รวมถึงโพลีแซคคาไรด์ สำหรับเบต้ากลูโคสิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีความสามารถในการสลายพันธะเบต้าไกลโคสิดิกระหว่างกลูโคสและโมเลกุลอื่นๆ ในพืชเอนไซม์นี้มีความเกี่ยวข้องกับหลายกระบวนการ กล่าวคือ glycoprotein processing, การป้องกันการเข้าทำลายโดยสัตว์กินพืช, การควบคุมการเติบโตของพืช, การตอบสนองต่อสภาวะเครียด (stress responses), และอื่นๆ (Srisomsup et al., 1996)

สำหรับพืชหลายชนิดเป็นที่เข้าใจกันดีว่าการสร้างสารประกอบประเภท cyanogenic β-glucosides และเก็บรักษาในส่วนที่จำเพาะ ซึ่งแยกจากส่วนที่ใช้ในการเก็บรักษาเบต้ากลูโคสิเดส เมื่อมีสิ่งมีชีวิตมากัดกินพืชจะทำให้ทั้งส่วนที่เก็บรักษา cyanogenic β-glucosides และเบต้ากลูโคสิเดสแตกออก เกิดการสัมผัสกันของ cyanogenic β-glucosides และเบต้ากลูโคสิเดส ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของปฏิกิริยาการปลดปล่อยกรด hydrocyanic (Conn,1980) สำหรับพืชอีกกลุ่มหนึ่งซึ่งมีความสามารถในการสร้างสารประกอบประเภท thiocyanogenic glucoside ก็ใช้กลไกที่คล้ายกันในการปลดปล่อย thiocyanate โดยเอนไซม์ thioglucosidase พบว่าทั้งกรด hydrocyanic และ thiocyanate ล้วนเป็นสารที่มีพิษซึ่งพืชใช้ในการป้องกันการเข้าทำลายของสัตว์กินพืช และเชื้อรา (Tsao et al., 2002)

การแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสบางชนิดในพืช เป็นอีกกลไกหนึ่งในกระบวนการควบคุมการเติบโตของพืช ทั้งนี้ฮอร์โมนพืช (phytohormones) หลายชนิดจะถูกสร้างและเก็บรักษาในรูปของ gluco-conjugated form ซึ่งขาดความสามารถทางชีวภาพ (biological inactive) จากการศึกษาผลกระทบของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสต่อการเติบโตในรากข้าวโพด แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสสามารถเร่งการเติบโตโดยการเปลี่ยน glucose conjugated cytokinin ให้อยู่ในรูปอิสระของ cytokinin ซึ่งมีความสามารถในการเร่งการเติบโตได้ นอกเหนือจากการควบคุมการทำงานของ cytokinin แล้ว การควบคุมการทำงานของ auxin ในพืชก็อาศัยกลไกที่คล้ายกัน (Martin et al., 2001)

นอกจากนี้ เบต้ากลูโคสิเดสยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการตอบสนองต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อม โดยในสภาวะจำกัดฟอสเฟตของ *Brassica* sp. จะมีการแสดงออกของยีน *psr3.2* (เบต้ากลูโคสิเดสยีน) ในปริมาณที่สูง (Malboobi and Lefebvre, 1997)

เนื่องจากสารตั้งต้นสำหรับเอนไซม์ในกลุ่มไกลโคสิลไฮโดรเลสเป็นสารที่มีราคาค่อนข้างถูก ส่งผลให้การใช้เอนไซม์กลุ่มนี้ในอุตสาหกรรมเป็นกระบวนการที่มีศักยภาพสูง ซึ่งเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการเพิ่มความคุมทุนในการผลิตโอลิโกแซคคาไรด์ ในปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์กลุ่มดังกล่าวในการสังเคราะห์โอลิโกแซคคาไรด์ที่มีคุณสมบัติต่างๆ กัน เพื่อใช้ในกระบวนการทางอาหารและวัสดุศาสตร์ (Nilsson, 1988)

Pichia pastoris เป็นยีสต์ที่สามารถใช้เมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอน (methylotrophic yeast) ในสภาวะที่ปราศจาก repressor ของ *aox* promoter เช่น กลีเซอรอล และกลูโคส *P. pastoris* จะสามารถใช้เมธานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน โดย *aox* promoter ทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีน *aox* ในการสร้างเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกสิเดส (alcohol oxidase, AOX) เอนไซม์นี้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาชนิดแรกในกระบวนการเมตาบอลิซึมของเมธานอล (Duoma et al., 1985)

ตามปกติแล้วเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกสิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีอัตราการเกิดปฏิกิริยาต่ำ ซึ่งยีสต์ *P. pastoris* มีการปรับตัวเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าวโดยเพิ่มปริมาณการผลิตเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกสิเดส โดยพบว่าในสภาวะเพาะเลี้ยงที่มีเมธานอล ปริมาณโปรตีนที่ละลายในเซลล์มากกว่า 30% คือเอนไซม์แอลกอฮอร์ออกสิเดส จากคุณสมบัติที่ยีน *aox* จะแสดงออกเป็นปริมาณมากเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีเมธานอล ยีสต์ *P. pastoris* จึงถูกพัฒนามาใช้ในการแสดงออกของ

รีคอมบิแนนท์ยีนภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ *aox1* promoter (Couderc and Baretti, 1980)

ระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนใน *P. pastoris* เป็นระบบที่มีเอกลักษณ์เฉพาะตัว ทั้งนี้ข้อดีหลายอย่างของระบบนี้คล้ายกับระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนใน *E. coli* กล่าวคือ ง่ายต่อการสร้างรีคอมบิแนนท์เซลล์, มีการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนในระดับสูง, ง่ายต่อการเพิ่มปริมาณการผลิต, อาหารเลี้ยงเชื้อมีราคาถูกเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ยิ่งไปกว่านี้ระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนใน *P. pastoris* ยังเป็นระบบที่มีการรายงานถึงการแสดงออกของโปรตีนที่สมบูรณ์ (active protein) จากสิ่งมีชีวิตในกลุ่ม eukaryote เนื่องจากสามารถเกิด protein processing, protein folding และ post translation modification ซึ่งเป็นข้อจำกัดของระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนใน *E. coli* จากข้อดีของระบบการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีนใน *P. pastoris* ทำให้ระบบนี้ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในระดับงานวิจัย อย่างไรก็ตามปัญหาทางด้านของสิทธิบัตรทำให้ระบบนี้ยังจำกัดสำหรับการใช้ในระดับอุตสาหกรรม (Lin Cereghino et al., 2001)

โครมาโทกราฟีแบบ expanded bed เป็นเทคนิคที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการแยกโปรตีนออกจากน้ำหมักที่มีเซลล์เป็นองค์ประกอบ โดยเทคนิคนี้สามารถแยกเซลล์, ทำให้โปรตีนเข้มข้นขึ้น และทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ขึ้นในขั้นตอนเดียว ทั้งนี้ประสิทธิภาพของกระบวนการขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ ได้แก่ คุณสมบัติของน้ำหมัก, ชนิดของ resin และวิธีดำเนินการ

พบว่าน้ำหมักที่มีเซลล์เป็นองค์ประกอบอยู่มากจะส่งผลให้มีความหนืดสูง จึงจำเป็นต้องละลายน้ำหมักเพื่อลดความหนืดก่อนที่จะทำการปั๊มเข้าสู่คอลัมน์ ทำให้ระยะเวลาในการดำเนินการนานขึ้น (Chang & Chase 1996) นอกจากนี้ ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายยังมีอิทธิพลต่อความสามารถในการดูดซับโปรตีนของ ion exchange resin โดยพบว่าเมื่อเพิ่มค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายจะทำให้ความสามารถในการดูดซับโปรตีนของ resin ลดลง (Thommees et al., 2001; Sandgathe et al., 2003)

สำหรับอิทธิพลของ resin พบว่าในการใช้ resin ที่มีความหนาแน่นสูงจะทำให้สามารถเพิ่มอัตราเร็วในการปั๊มน้ำหมักเข้าสู่คอลัมน์ได้สูงขึ้น ส่งผลให้ระยะเวลาในการดำเนินการลดลง (Lei et al., 2003; Anspuch, 1999) ในทางตรงกันข้ามอัตราเร็วในการดูดซับโปรตีนของ resin ที่ต่ำทำให้ต้องลดอัตราเร็วในการปั๊มน้ำหมักเข้าสู่คอลัมน์เพื่อเพิ่มระยะเวลาในการสัมผัสกันระหว่างโปรตีนและ resin ให้นานขึ้น ทำให้โปรตีนถูกดูดซับได้สูงขึ้น

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อให้ได้โปรตีน เบต้ากลูโคสิเดส เป็นจำนวนมากสำหรับการทำ Crystallography และใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

2. พัฒนากำลังคน (บัณฑิตศึกษา) ด้านเทคโนโลยีชีวภาพ, ชีววิทยาระดับโมเลกุล, ชีวเคมี และวิศวกรรมกระบวนการทางชีวภาพ

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาวิจัยเฉพาะการผลิตเบต้ากลูโคสิเดสที่ได้จาก cDNA จากต้นพยูง (*Dalbergia cochichinensis* Pierre) โดยให้มีการแสดงออกในเซลล์ *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมของ *aox1* promoter เฉพาะในถังหมัก โดยเลี้ยงแบบเติมสารอาหาร และทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์ โดยโครมาโทกราฟี แบบ expanded Bed

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ได้ทำการโคลนยีนเบต้ากลูโคสิเดสของต้นพยูง ใส่ลงในพลาสมิด pPICzαB แล้วนำเข้า (integrate) เข้าสู่จีโนมของยีสต์ *P. pastoris* ทำการคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสได้สูงสุด เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

2. ได้ทำการเลี้ยงเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสได้สูงสุดด้วยกระบวนการหมักแบบ เติมสารอาหาร โดยใช้เมธานอลเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดส

3. ได้ทำการแยกเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสให้บริสุทธิ์ด้วยกระบวนการโครมาโตรกราฟีแบบ expanded bed

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ปริมาณเบต้ากลูโคสิเดสเป็นจำนวนมาก เพื่อใช้ในการทำผลึกโปรตีนและสำหรับใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และอาหารสัตว์ต่อไป

2. ได้เทคนิคและวิธีการในการเลี้ยง *P. pastoris* แบบเติมสารอาหาร

3. ได้เทคนิคและวิธีการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์แบบ expanded bed

4. ได้นักวิจัยที่มีความรู้ ความสามารถ ซึ่งเป็นกำลังสำคัญในการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีของประเทศไทยต่อไปในอนาคต

5. ได้ผลงานที่สามารถตีพิมพ์ในวารสารวิชาการที่เป็นที่ยอมรับ จากการทำวิจัยนี้ได้มีการนำเสนอผลงานในประเทศ 1 ครั้ง ในต่างประเทศ 1 ครั้ง และตีพิมพ์ผลงานในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ 1 ครั้ง ดังแสดงในภาคผนวก ก-ค ยิ่งไปกว่านั้นผลของงานวิจัยนี้ยังเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง ซึ่งมีการนำเสนอผลงานในที่ประชุมทั้งภายในและต่างประเทศ รวมถึงวารสารวิชาการอีกหลายฉบับ

บทที่ 2

งานวิจัยส่วนที่ 1

การโคลนเบต้ากลูโคสิเดสจากพืชสู่ยีสต์

2.1 อุปกรณ์และวิธีการ

พลาสมิด ที่มียีนเบต้ากลูโคสิเดสจากต้นพยุงได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ. ดร. มรว. ชิษณุสรร สวัสดิวัฒน์ (Ketudat-Cairns et al., 2000) ถูกใช้เป็นต้นแบบในการเพิ่มจำนวน DNA ด้วยไพรเมอร์ β-glu F1 PstI (CTGCAGGCATTTGACTTTGCAAAAGAAGTC) และ β-glu R1 SacII (CCGCGGAAAGCCTTCAATGCCCCTCTTGGG) ผลที่ได้จากการเพิ่มจำนวน DNA ถูกทำให้บริสุทธิ์และโคลนเข้าสู่พลาสมิด pPICzαB (Invitrogen, CA, USA) ที่จุด PstI และ SacII จากนั้นทำการเพิ่มจำนวนพลาสมิดแล้วตัดด้วยเอนไซม์ SacI แล้วทำการทรานฟอร์มเข้าสู่จีโนมของ *P. pastoris* สายพันธุ์ Y- 11430 ตามวิธีการมาตรฐานที่แนะนำใน Invitrogen manual และตรวจสอบหาเชื้อที่มีพลาสมิดโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่มี zeocin

จากนั้นทำการคัดเลือกโคลนยีสต์ที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสสูงที่สุด การคัดเลือกโคลนทำโดยการเลี้ยงเชื้อใน BMGY medium ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการล้างเซลแล้วเลี้ยงต่ออีก 18 ชั่วโมงในอาหาร BMMY medium ที่เติมเมธานอล 2% จากนั้นนำน้ำหมักมาหากิจกรรมของเอนไซม์ตามวิธีการของ Evans (1985)

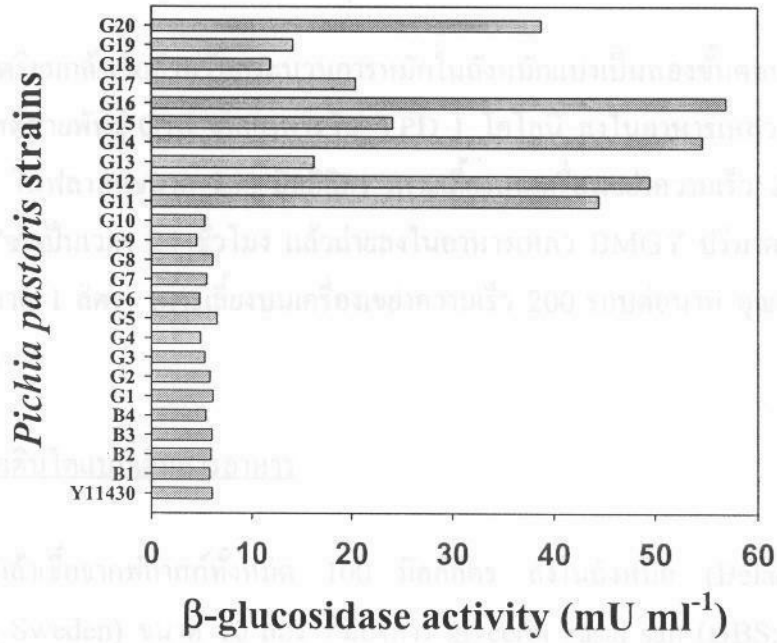
2.2 ผลการทดลอง และวิจารณ์

หลังจากทำการทรานฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่เซลล์ พบว่ามีจำนวนโคลนที่สามารถเติบโตบนอาหารที่มี zeocin แสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1.จำนวนโคลนที่สามารถเติบโตบนอาหารที่มี zeocin

พลาสมิด	จำนวนโคลน
pPICzαB	4
pPICzαB + β-glucosidase cDNA	20

จากนั้นนำโคลนยีสต์ที่ได้ทั้งหมดมาทำการคัดเลือกโคลนยีสต์ที่ให้กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสสูงที่สุด ผลการทดลองที่ได้แสดงดังภาพที่ 1.



ภาพที่ 1. การแสดงออกของกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสใน *P. pastoris* สายพันธุ์เจ้าบ้าน (Y11430; host strain), สายพันธุ์ที่มีการทรานฟอร์มพลาสมิด pPICzαB (B) และสายพันธุ์ที่มีการทรานฟอร์มพลาสมิด pPICzαB ที่มี β-glucosidase cDNA (G)

2.3 วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลอง (ภาพที่ 1) พบว่าสายพันธุ์ยีสต์ G16 เป็นสายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสสูงที่สุด จึงได้เลือกใช้สายพันธุ์ดังกล่าวในกระบวนการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสในถังหมักต่อไป

บทที่ 3

งานวิจัยส่วนที่ 2

การผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสด้วยกระบวนการหมักแบบ เติมสารอาหาร

3.1 อุปกรณ์และวิธีการ

<u>การเตรียมกล้าเชื้อในฟลาสก์</u>

การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับกระบวนการหมักในถังหมักแบ่งเป็นสองขั้นตอน ขั้นตอนแรกทำการเขี่ยเชื้อยีสต์สายพันธุ์ G16 จากอาหารวุ้น YPD 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายลงในอาหารเหลว BMGY ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 1 ลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

<u>การศึกษาการเติบโตแบบเติมสารอาหาร</u>

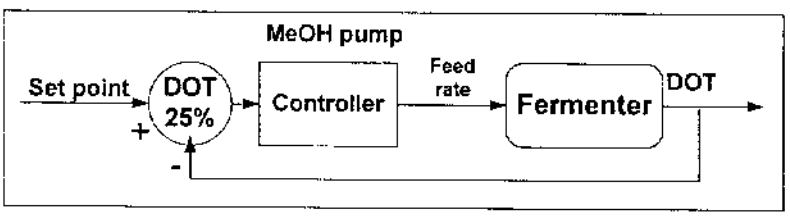
ถ่ายกล้าเชื้อจากฟลาสก์ทั้งหมด 100 มิลลิลิตร ลงในถังหมัก (Belach Bioteknik, Stockholm, Sweden) ขนาด 10 ลิตร ที่มีอาหาร glycerol basal salt (GBS: glycerol 40.0 กรัมต่อลิตร, 85% H_3PO_4 26.7 มิลลิลิตรต่อลิตร, $CaSO_4$ 0.93 กรัมต่อลิตร, K_2SO_4 18.2 กรัมต่อลิตร, $MgSO_4.7H_2O$ 14.9 กรัมต่อลิตร, KOH 4.13 กรัมต่อลิตร, และ PTM1 trace salts 4.35 มิลลิลิตรต่อลิตร) สำหรับ PTM1 trace salts ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย $CuSO_4.5H_2O$ 6.0 กรัม, KI 0.08 กรัม, $MnSO_4.H_2O$ 3.0 กรัม, $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0.2 กรัม, H_3BO_3 0.02 กรัม, $ZnCl_2$ 20.0 กรัม, $FeCl_3$ 13.7 กรัม, $CoCl_2.6H_2O$ 0.9 กรัม, H_2SO_4 5.0 มิลลิลิตร และ biotin 0.2 กรัม ในกระบวนการหมักนี้ อุณหภูมิ, พีเอช, DOT (ค่าการละลายของออกซิเจน), อัตราการให้อากาศ, ความดัน, อัตราการกวน และการควบคุมระดับของการเกิดฟอง จะใช้ระบบควบคุมแบบอัตโนมัติ โดยกระบวนการหมักจะแบ่งเป็น 4 ช่วง คือ

1. Glycerol batch phase: เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบ Batch กระบวนการในช่วงนี้จะสิ้นสุดเมื่อเชื้อยีสต์ใช้กลีเซอรอลจนหมด สังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วของ DOT โดยจะใช้เวลาประมาณ 18-24 ชั่วโมง

2. Glycerol fed-batch phase: เป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบเติมสารอาหาร กระบวนการในช่วงนี้จะมีการเติมกลีเซอรอล 500 กรัมต่อลิตร ที่มี 12 มิลลิลิตรต่อลิตร ของ PTM1 trace salt อัตราการเติมอาหารจะเป็นการเติมแบบ exponential กระบวนการในช่วงนี้จะสิ้นสุดเมื่อความหนาแน่นของเซลล์มีค่าประมาณ 40 กรัมต่อลิตร น้ำหนักเซลล์แห้งในช่วงนี้จะใช้เวลาประมาณ 3.5 ชั่วโมง

3. Methanol induction phase: เป็นกระบวนการกระตุ้นการผลิตโปรตีนโดยอาศัยกระบวนการหมักแบบ เติมสารอาหาร กระบวนการในขั้นนี้จะเติมเมธานอล 99.5% ที่มี PTM1 trace salt 12 มิลลิลิตรต่อลิตร เข้าสู่ถังหมักด้วยอัตราการเติมที่ต่ำมาก (ประมาณ 2 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง) เพื่อให้ยีสต์มีเวลาในการปรับตัวที่จะใช้เมธานอลเป็นสารกระตุ้น เป็นแหล่งคาร์บอน และเป็นแหล่งพลังงาน กระบวนการในช่วงนี้จะใช้เวลาประมาณ 3 ชั่วโมง

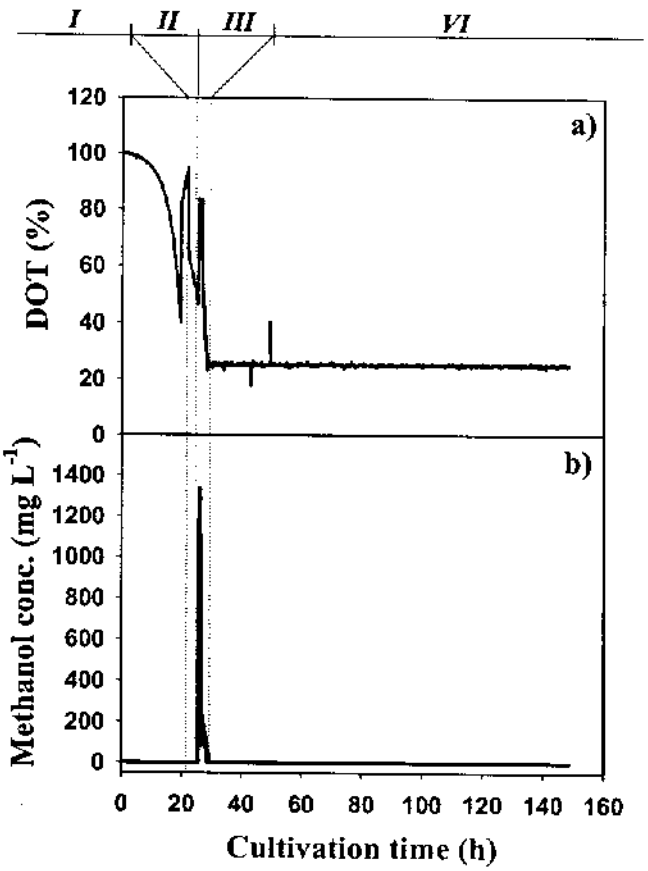
4. Production phase: เป็นกระบวนการควบคุมการผลิตโปรตีนแบบเติมสารอาหาร โดยอาศัยระบบควบคุมการเติมเมธานอลแบบ DOT stat แสดงดังภาพที่ 2.



ภาพที่ 2.ระบบควบคุมการเติมเมธานอลแบบ DOT stat

กระบวนการในขั้นนี้จะเติมเมธานอล 99.5% ที่มี PTM1 trace salt 12 มิลลิลิตรต่อลิตร เข้าสู่ถังหมักเมื่อ DOT มีค่าสูงกว่า 25% และหยุดเติมเมื่อ DOT เท่ากับหรือต่ำกว่า 25% กระบวนการหมักดำเนินการภายใต้ อุณหภูมิ 30°ซ, อัตราการให้อากาศ 6 ลิตรต่อลิตรต่อชั่งโมง, อัตราการกวน 1,000 รอบต่อนาที และพีเอช 5.0

2.2 ผลการทดลอง และวิจารณ์



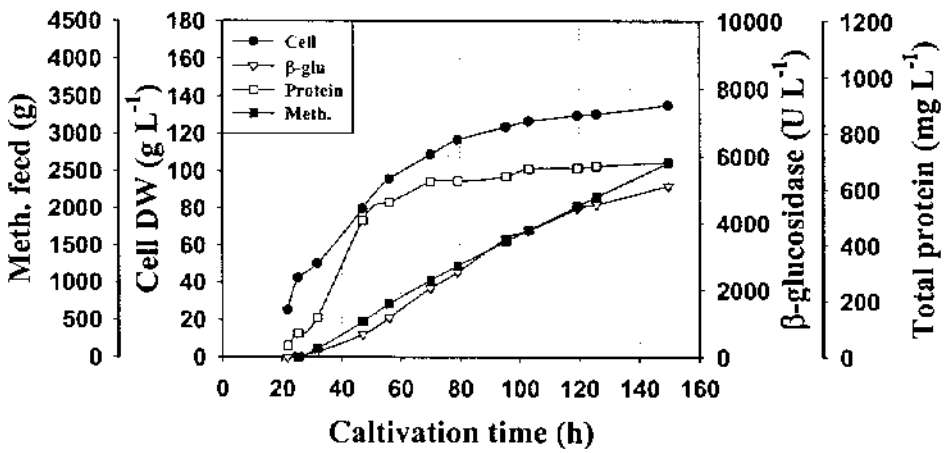
ภาพที่ 3. ผลของการควบคุมการเติมเมธานอลแบบ DOT stat ส่งผลให้ a) DOT ในช่วง production phase (VI) มีค่าคงที่เท่ากับ 25% (set point) b) ความเข้มข้นของเมธานอลในช่วง production phase (VI) ในน้ำหมักลดลงจนต่ำกว่าความสามารถในการวิเคราะห์ของเครื่องวิเคราะห์

จากภาพที่ 3a ที่เวลาประมาณ 22 ชั่วโมง DOT เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเป็นการบ่งชี้ถึงการสิ้นสุด Glycerol batch phase ต่อจากนั้นจึงดำเนินการหมักในขั้นตอนที่สอง (Glycerol fed-batch phase) โดยทำการเติมกลีเซอรอล 500 กรัมต่อลิตร ที่มี PTM1 trace salt 12 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยอัตราการเติมสารอาหารในขั้นนี้จะเป็นการเติมแบบ exponential เมื่อน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นถึง 40 กรัมต่อลิตร (25.5 ชั่วโมง) จึงทำการปรับกระบวนการหมักจะเข้าสู่ Methanol induction phase โดยเติมเมธานอล 99.5% ที่มี PTM1 trace salt 12 มิลลิลิตรต่อลิตร เข้าสู่ถังหมักด้วยอัตราการเติมที่ต่ำมาก (ประมาณ 2 กรัมต่อลิตรต่อชั่งโมง) เพื่อให้ยีสต์มีเวลาในการปรับตัวที่จะใช้เมธานอลเป็นสารกระตุ้น, เป็นแหล่งคาร์บอน และเป็นแหล่งพลังงาน อย่างไรก็ตามความเข้มข้น

ของเมธานอลในช่วงนี้จะสูงขึ้นดังแสดงในภาพที่ 3b โดยหลังจากที่ความเข้มข้นของเมธานอลลดลง จึงทำการปรับกระบวนการหมักเข้าสู่ระยะสุดท้ายคือ production phase กระบวนการในช่วงนี้จะอาศัยระบบควบคุมการเติมเมธานอลแบบ DOT stat ทำให้ค่า DOT ในช่วงนี้คงที่เท่ากับ 25% (set point) (ภาพที่ 3a)

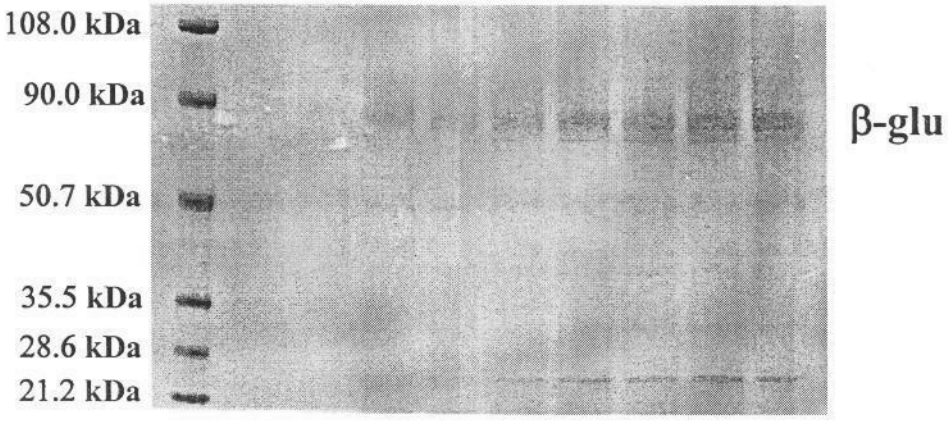
ตารางที่ 2. ระยะเวลาในการหมัก, ปริมาณเซลล์แห้ง, การสะสมเบต้ากลูโคสิเดส, โปรตีนทั้งหมด และ ปริมาณการเติมเมธานอลสะสม

Cultivation time (h)	Cell ($g\ L^{-1}$)	β-glucosidase ($U\ L^{-1}$)	Total protein ($mg\ L^{-1}$)	Methanol feed (g)
21.9	25.2	0	40.824	-
25.4	42.38	42.088	83.972	0
31.9	50.13	147.306	140.396	110.7
47.2	79.78	662.878	409.240	468.8
56.1	95.64	1157.407	555.022	710
70.1	108.86	2041.245	629.958	1026.8
79.2	116.62	2525.251	631.617	1219.8
95.4	123.62	3535.352	648.213	1551.1
103.1	126.52	3777.355	674.765	1703.3
119.4	129.64	4429.711	678.084	2026.6
125.8	130.36	4555.974	684.722	2152.6
149.7	135.05	5113.634	697.999	2609.5



ภาพที่ 4. ความสัมพันธ์ของการเติบโต, การผลิตเบต้ากลูโคสิเดส, โปรตีนทั้งหมด และปริมาณการเติมเมธานอล

ตารางที่ 2 และภาพที่ 4 แสดงให้เห็นถึงผลของการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสแบบเติมสารอาหาร โดยอาศัยระบบควบคุมการเติมเมธานอลแบบ DOT stat ที่เวลาประมาณ 150 ชั่วโมง โดยน้ำหนักเซลล์แห้งมีค่า 135 กรัมต่อลิตร, ความเข้มข้นของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสกับ 5,113 หน่วยต่อลิตร และ total protein มีค่าประมาณ 700 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยปริมาณเมธานอลที่เติมเข้าไปในถังหมักทั้งหมดเท่ากับ 2,600 กรัม



ภาพที่ 5. การวิเคราะห์โปรตีนในตัวอย่างน้ำหมักที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ด้วยวิธี SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย Coomassie blue

ภาพที่ 5 เป็นผลการทดลองที่แสดงให้เห็นว่า *P. pastoris* จะปลดปล่อยโปรตีนอื่นๆ ที่ไม่ใช่รีคอมบิแนนท์โปรตีนเป็นปริมาณน้อยมาก โดยขนาดของรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคสิเดส (88 kDa) มีขนาดใหญ่กว่าเบต้ากลูโคสิเดสที่สกัดจากเมล็ดของต้นพยุง (66 kDa) (Ketudat- Cairns et al., 2000) สิ่งที่เกิดขึ้นนี้น่าจะเป็นผลของกระบวนการ over glycosylation ซึ่งมักพบได้ในกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* (Bretthauer and Castellino, 1999)

3.3 วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

เมื่อสิ้นสุดกระบวนการปริมาตรน้ำหมักมีค่าประมาณ 5.7 ลิตร โดยมีการเติมเมธานอลไปทั้งสิ้น 2,600 กรัม ซึ่งทำให้ได้ผลผลิตของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสในกระบวนการนี้เท่ากับ 29,144 หน่วย โดยเมื่อคิดเป็นผลได้ของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสจากเมธานอลจะมีค่าประมาณ 11.2 หน่วยต่อกรัม โดยพบว่าค่าอัตราจำเพาะของการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสมีค่าประมาณ

0.3 หน่วยต่อกรัมต่อชั่วโมง ซึ่งต่ำมาก อย่างไรก็ตามข้อเสียดังกล่าวสามารถทดแทนได้โดยการเพิ่มความเข้มข้นของเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของรีคอมบิแนนท์โปรตีนในกระบวนการที่ใช้ *P. pastoris* มีค่าสูงขึ้น และข้อดีอีกข้อหนึ่งของกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนโปรตีนโดย *P. pastoris* คืออาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเป็นอาหารที่ปราศจากโปรตีน และ *P. pastoris* จะปลดปล่อยรีคอมบิแนนท์โปรตีนสู่น้ำหมักเป็นหลัก ซึ่งเป็นการลดความยุ่งยากในการแยกรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากน้ำหมัก

บทที่ 4

งานวิจัยส่วนที่ 3

การทำเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสให้บริสุทธิ์ โดยโครมาโทกราฟีแบบ expanded bed

4.1 อุปกรณ์และวิธีการ

การเก็บเกี่ยวผลผลิต

หลังจากสิ้นสุดกระบวนการหมัก น้ำหมักส่วนหนึ่งถูกนำมาแยกเซลล์ออกโดยปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาที (16,915 xg) เป็นเวลา 20 นาที ทั้งน้ำหมักที่มีเซลล์และที่ถูกแยกเซลล์ออกแล้วจะถูกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°ซ เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

Resin

Resin ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ Streamline SP (GE Healtcare, Uppsala, Sweden) ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุบวก (cation exchanger)

การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับเบต้ากลูโคสิเดสของ resin

สภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับเบต้ากลูโคสิเดสของ resin ในการทดลองนี้วิเคราะห์ในรูปของ equilibrium capacity (Qeq) โดยมุ่งเน้นที่อิทธิพลของพีเอชและ ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย

การเตรียม resin ทำโดย equilibrate ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชและ ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย เท่ากับค่าที่ต้องการศึกษาเป็นจำนวน 10 ครั้ง ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ จากนั้นเป็นจำนวน 5 ครั้ง ด้วยบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ โดยบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ Sodium-Acetate บัฟเฟอร์ และปรับค่าค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย โดย NaCl

น้ำหมักที่ใช้สำหรับศึกษาในขั้นนี้เป็นน้ำหมักที่ผ่านขั้นตอนการแยกเซลล์ออก และ dialysis ทำการปรับพีเอชและค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายให้เท่ากับค่าที่ต้องการศึกษา ผสม 0.5 มิลลิลิตร ของ resin ที่เตรียมไว้แล้วกับน้ำหมัก ทำการ incubate แบบ end-over-end เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้ resin นอนก้น ตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสเทียบกับค่าเริ่มต้น และทำการคำนวณค่า Qeq โดยอาศัยสมการที่ 1

$$Q_{eq} = \frac{(C_0 - C_{eq})V_l}{V_{ads}} \qquad (1)$$

เมื่อ Q_{eq} คือ equilibrium capacity (หน่วยต่อมิลลิลิตร ของ resin)

C_0 คือ กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสเริ่มต้น (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

C_{eq} คือ กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสที่ equilibrium condition (หน่วยต่อมิลลิลิตร)

V_l คือ ปริมาตรรวมของปฏิกิริยา (มิลลิลิตร)

V_{ads} คือ ปริมาตรของ resin (มิลลิลิตร)

<u>การหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการปลดปล่อยเบต้ากลูโคสิเดสจาก resin</u>

ใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับเบต้ากลูโคสิเดสของ resin ที่ได้ในการดูดซับเบต้ากลูโคสิเดสโดย resin ทำการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการปลดปล่อยเบต้ากลูโคสิเดสโดยเติมบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชและค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายที่ต้องการศึกษา 1 มิลลิลิตร ลงใน resin ที่มีการดูดซับเบต้ากลูโคสิเดสแล้ว 0.5 มิลลิลิตร ทำการ incubate แบบ end-over-end เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้ resin นอนก้น ตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสและคำนวณร้อยละของการปลดปล่อยเบต้ากลูโคสิเดสที่สภาวะต่างๆ

<u>การทำเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสให้บริสุทธิ์ โดยโครมาโทกราฟีแบบ expanded bed</u>

อาศัยสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับและปลดปล่อยเบต้ากลูโคสิเดสของ resin ในการออกแบบกระบวนการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบ expanded bed

คอลัมน์ที่ใช้ในกระบวนการนี้เป็นคอลัมน์ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 25 mm (Streamline C-25: GE Healtcare, Uppsala, Sweden) ที่ต่อกับ peristaltic pump และ UV detector ภายในบรรจุ resin Streamline SP 100.7 มิลลิลิตร ซึ่งทำให้ชั้นของ resin มีความสูง 20.5 เซนติเมตร

การ equilibration คอลัมน์ทำได้โดยปั๊มบัฟเฟอร์ sodium-acetate พีเอช 4.0 ความเข้มข้น 500 มิลลิโมลาร์ เป็นปริมาตรเท่ากับ 2 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ จากนั้นลดความเข้มข้นของบัฟเฟอร์เป็น 50 มิลลิโมลาร์ เป็นปริมาตรเท่ากับ 4 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ อัตราเร็วในการปั๊มเท่ากับ 300 เซนติเมตรต่อชั่วโมง โดยปั๊มเข้าทางด้านล่างของคอลัมน์

เตรียมน้ำหมักที่ต้องการทำเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสให้บริสุทธิ์โดยปรับพีเอชเป็น 4.0 และ 5.0 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ซึ่งทำให้มีปริมาตรของเซลล์เท่ากับ 80 มิลลิลิตร (105 กรัมต่อลิตรน้ำหนักเปียก) จากนั้นปั๊มเข้าทางด้านล่างของคอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 300 เซนติเมตรต่อชั่วโมง

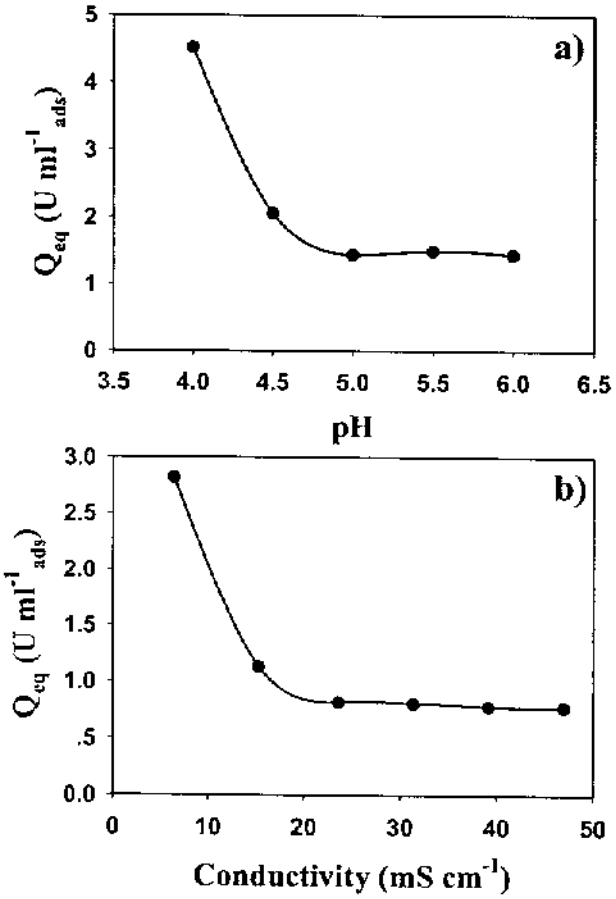
ทำการกำจัดโปรตีนปนเปื้อนที่ไม่สามารถถูกดูดซับโดย resin และเซลล์ออกจากคอลัมน์โดย ปั๊มบัฟเฟอร์ sodium-acetate พีเอช 4.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มี NaCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ เข้าทางด้านล่างของคอลัมน์ด้วยอัตราเร็ว 300 เซนติเมตรต่อชั่วโมง จนค่าการดูดกลืนแสงของ UV detector ลดลงจนคงที่

ทำการปลดปล่อยเบต้ากลูโคสิเดสออกจากคอลัมน์โดย ปั๊มบัฟเฟอร์ sodium-acetate พีเอช 5.0 ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ที่มี NaCl ความเข้มข้น 250 มิลลิโมลาร์ (ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย เท่ากับ 24.7 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร) ด้วยอัตราเร็ว 100 เซนติเมตรต่อชั่วโมง

ทำการเก็บตัวอย่างที่ช่วงต่างๆ ของกระบวนการ วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดส และโปรตีนทั้งหมดคำนวณหาผลได้ของกระบวนการและความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้

4.2 ผลการทดลอง และวิจารณ์

<u>อิทธิพลของพีเอชและค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย ต่อความสามารถในการดูดซับเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสโดย Streamline SP</u>



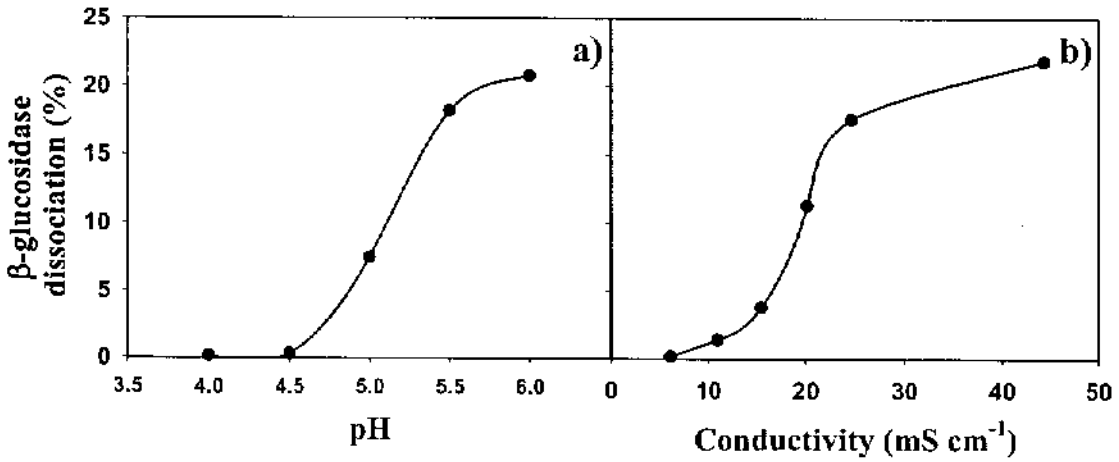
ภาพที่ 6.การศึกษาการดูดซับเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสในรูปของ equilibrium capacity (Q_{eq}) โดย Streamline SP, a) อิทธิพลของพีเอชภายใต้สภาวะ C_0 = 2.687 หน่วยต่อมิลลิลิตร และค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย 15.0 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และ b) อิทธิพลของค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายภายใต้สภาวะ C_0 = 1.219 หน่วยต่อมิลลิลิตรและพีเอช 4.0

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสโดย resin พบว่าที่พีเอช 4.0 มีความเหมาะสมต่อการดูดซับซับเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสและค่า Qeq จะลดลงเมื่อพีเอชสูงขึ้น อย่างไรก็ตามในการทดลองนี้ไม่สามารถศึกษาค่า Qeq ที่พีเอชต่ำกว่า 4.0 ได้ เนื่องจากสภาวะดังกล่าว จะทำให้เอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสเสียสภาพ (denature)

สำหรับอิทธิพลของค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย พบว่าการเพิ่มค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย จาก 6.4 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร เป็น 15.3 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ทำให้ค่า Qeq ลดลงถึง 40% นี้เป็นการบ่งชี้ว่าค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายมีอิทธิพลอย่างมากต่อความสามารถในการดูดซับโปรตีนของ resin

จากทั้งอิทธิพลของพีเอชและค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายต่อความสามารถในการดูดซับโปรตีนของ resin จึงสามารถสรุปได้ว่า เบต้ากลูโคสิเดสจะถูกดูดซับได้ดีที่พีเอช 4.0 และที่ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายต่ำกว่า 10 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร โดยในการทดลองหลังจากนี้จะใช้พีเอช 4.0 และค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย 5.0 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ในการดูดซับเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดส โดย Streamline SP

<u>อิทธิพลของพีเอชและค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย ต่อความสามารถในการปลดปล่อยเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดส จาก Streamline SP</u>



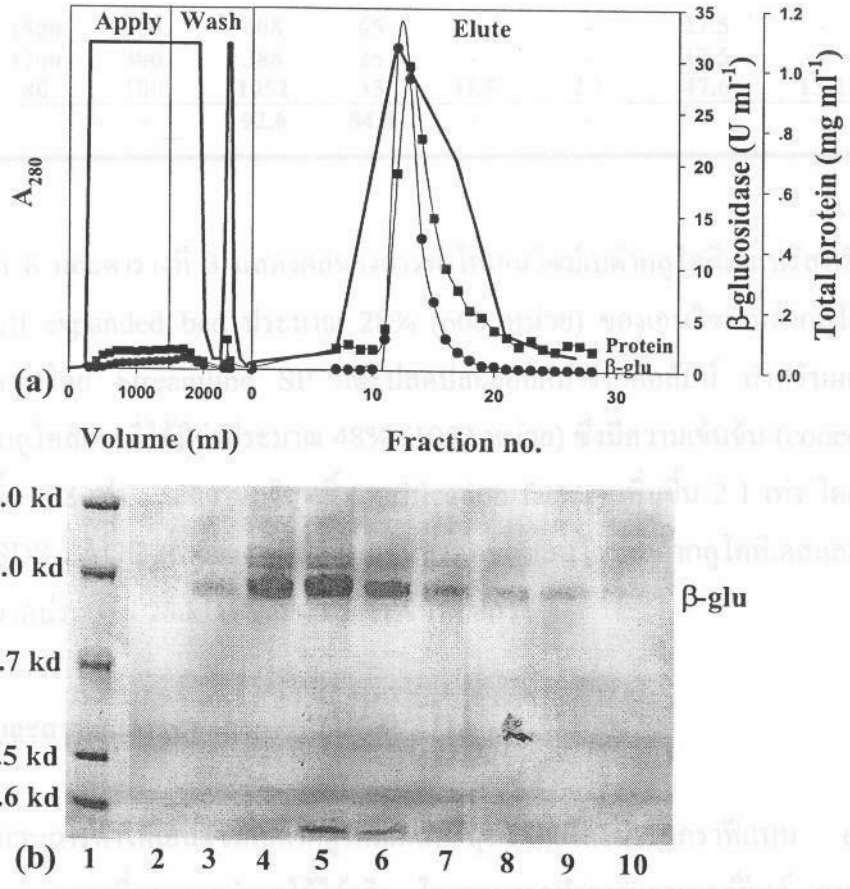
ภาพที่ 7. การศึกษาการปลดปล่อยเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสจาก Streamline SP, a) อิทธิพลของพีเอชภายใต้สภาวะค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย 0.8 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร และ b) อิทธิพลของค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายภายใต้สภาวะพีเอช 4.0

พบว่าทั้งพีเอชและค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายมีอิทธิพลอย่างมากต่อการปลดปล่อยเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสจาก Streamline SP โดยพบว่าอาศัยอิทธิพลของพีเอชเพียงอย่างเดียว (ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายต่ำมาก; 0.8 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร) การเพิ่มพีเอชจาก 4.0 เป็น 5.0 ส่งผลให้เอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสถูกปลดปล่อยออกจาก Streamline SP ถึง 8% (ภาพที่ 7a)

การศึกษาอิทธิพลของค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายเพียงอย่างเดียวโดยใช้บัฟเฟอร์ที่มีพีเอชเท่ากับพีเอชของสภาวะที่เหมาะสมต่อการดูดซับ (พีเอช 4.0) (ภาพที่ 7b) การเพิ่มค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายจาก 5.0 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร เป็น 20.0 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร ส่งผลให้เอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสถูกปลดปล่อยออกจาก Streamline SP ถึง 12%

อาศัยข้อมูลพื้นฐานอิทธิพลของพีเอชและค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย ในการออกแบบบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการปลดปล่อยเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสจาก Streamline SP คือ บัฟเฟอร์ Sodium acetate พีเอช 5.0 ที่มี NaCl 250 มิลลิโมลาร์ (บัฟเฟอร์นี้มีค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายเท่ากับ 24.7 มิลลิซีเมนส์ต่อเซนติเมตร)

การทำเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสให้บริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบ expanded bed



ภาพที่ 8. a) การศึกษาการทำให้เอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสบริสุทธิ์ โดยโคมาโทรกราฟีแบบ expanded bed อาศัย Streamline SP, b)การวิเคราะห์โปรตีนในผลผลิตที่ถูกชะออกมาจากคอลัมน์ที่ fraction no. 10-19 (lane 2-10)โดยวิธี SDS-PAGE และย้อมเจลด้วย Coomassie blue

ตารางที่ 3.การแยกเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสจากน้ำหมักด้วยวิธีโครมาโทกราฟีแบบ expanded bed

Purification step	Vol. (ml)	Flow velocity (cm h^{-1})	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U mg^{-1})	Purification factor	Recovery of β-glu (%)	β-glu conc. (U ml^{-1})	Conc. factor
Feed prepared	1500	-	2212	145	15.3	(1)	(100)	1.5	(1)
Flow-through	1500	300	608	65	-	-	27.5	-	-
Wash	1200	300	388	25	-	-	17.5	-	-
Elute	80	100	1052	33	31.8	2.1	47.6	13.2	8.8
Total recovery (%)	-	-	92.6	84.8	-	-	-	-	-

ภาพที่ 8 และตารางที่ 3 แสดงผลของการทำให้เอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสบริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบ expanded bed ประมาณ 28% (608 หน่วย) ของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสไม่สามารถถูกดูดซับโดย Streamline SP และปลดปล่อยออกมาจากคอลัมน์ สำหรับผลผลิตของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสที่ได้มีค่าประมาณ 48% (1052 หน่วย) ซึ่งมีความเข้มข้น (concentration factor) เพิ่มขึ้น 8.8 เท่า และความบริสุทธิ์ (purification factor) เพิ่มขึ้น 2.1 เท่า โดยแถบของโปรตีนจาก SDS-PAGE แสดงแถบที่มีความเข้มสูงสุดของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสและแถบของโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 28 kDa ซึ่งมีความเข้มข้นน้อยกว่า

4.3 วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง

กระบวนการทำให้เอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสบริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบ expanded bed เป็นกระบวนการที่สามารถนำมาใช้ได้จริง โดยสามารถทำการแยกเซลล์ยีสต์ การเพิ่มความเข้มข้น (8.8 เท่า) และการเพิ่มความบริสุทธิ์ (2.1 เท่า) ได้ในขั้นตอนเดียว ทั้งนี้คาดว่าน่าจะสามารถประยุกต์ใช้ระบบนี้กับโปรตีนชนิดอื่นๆ ได้ในอนาคต

การเพิ่มความบริสุทธิ์ขึ้น 2.1 เท่า เป็นค่าที่ต่ำเมื่อเทียบกับกระบวนการอื่นๆ อย่างไรก็ตาม ความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่ได้ก็อยู่ในระดับที่สูง ทั้งนี้เนื่องมาจากอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง *P. pastoris* เป็นอาหารที่ปราศจากโปรตีน และเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสที่ผลิตจะถูกปลดปล่อยออกนอกเซลล์โดย *P. pastoris* จะปลดปล่อยโปรตีนอื่นๆ ออกนอกเซลล์น้อยมาก ดังนั้นโปรตีนปนเปื้อนเริ่มต้นจึงน้อยมาก ทำให้ความบริสุทธิ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้เพิ่มขึ้นไม่มากนัก

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

จากงานวิจัยส่วนที่ 1 พบว่าสามารถโคลนยีนเบต้ากลูโคสิเดสจากต้นพยุงเข้าสู่จีโนมของยีสต์ *P. pastoris* ได้ โดยประมาณ 50% ของโคลนที่ได้มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดส โดยคณะผู้วิจัยได้คัดเลือกโคลนที่มีการแสดงออกสูงที่สุด (G16) เพื่อใช้ในการวิจัยขั้นต่อๆ ไป

จากงานวิจัยในส่วนที่ 2 กระบวนการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสในยีสต์ *P. pastoris* โดยอาศัยกระบวนการหมักแบบ เติมสารอาหาร ที่มีการควบคุมการเติมอาหารในช่วง production phase แบบ DOT stat เป็นกระบวนการที่มีศักยภาพในการผลิตเอนไซม์นี้

สำหรับงานวิจัยในส่วนที่ 3 พบว่าการพัฒนากระบวนการทำให้เอนไซม์นี้บริสุทธิ์เป็นสิ่งจำเป็น เนื่องจากผลได้ของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสจากกระบวนการนี้ยังมีค่าต่ำ (48%) โดยในกระบวนการทำให้เอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสบริสุทธิ์โดยโครมาโทกราฟีแบบ expanded bed ซึ่งใช้ Streamline SP เป็น resin พบว่า ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย มีอิทธิพลต่อความสามารถในการดูดซับเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสของ resin เป็นเหตุให้ต้องละลายน้ำหมักประมาณ 5 เท่า เพื่อลด ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย จากปัญหาดังกล่าวถ้ากระบวนการหมักสามารถดำเนินการได้ในอาหารที่มี ค่าการนำไฟฟ้าของสารละลาย ต่ำจะเป็นการลดการละลายน้ำหมัก

อย่างไรก็ตามระบบนี้ก็ได้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการทำให้เอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสให้บริสุทธิ์โดยทำให้ผลผลิตที่ได้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 8.8 เท่า และความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 2.1 เท่า โดยแถบของโปรตีนจาก SDS-PAGE (ภาพที่ 8b) แสดงแถบโปรตีนที่มีความเข้มสูงสุดของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิเดสและแถบของโปรตีนที่มีขนาดประมาณ 28 kDa ซึ่งมีความเข้มข้นน้อยกว่าส่วนแถบที่มีขนาดประมาณ 28-80 kDa ที่สามารถพบได้ในน้ำหมัก (ภาพที่ 5) นั้นถูกกำจัดออกไปหลังจากผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์

บรรณานุกรม

Anspach, F.B., Curbelo, D., Hartmann, R., Garke, G. and Deckwer, W.-D. (1999). Expanded-bed chromatography in Primary protein purification. J. Chromatogr. A. 865: 129-144.

Bretthauer, R.K. and Castellino, F.J. (1999). Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. Biotechnol. Appl. Biochem. 30: 193-200.

Chang, Y.K. and Chase, H.A. (1996). Development of operating conditions for protein purification using expanded bed techniques: The effect of the degree of bed expansion on adsorption performance. Biotech. Bioeng. 49: 512-526.

Conn, E.E. (1980). Cyanogenic glucosides. Annu. Rev. Plant Physiol. 31: 433-451.

Couderc, R. and Baratti, J. (1980). Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. Agric. Biol. Chem. 44: 2279-2289.

Douma, A.C., Veenhuis, M., de Koning, W., Evers, M. and Harder, W. (1985). Dihydroxyacetone syntase is localized in the peroxisomal matrix of methanol-grown *Hensenula polymorpha*. Arch Microbiol. 143: 237-243.

Evans, C.S. (1985). Properties of the β-glucosidase (cellobiase) from the wood-rotting fungus *Coriolus versicolor*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22: 128-131.

Ketudat-Cairns, J.R., Champattanachai, V., Srisomsap, C., Wittman-Liebold, B., Thiede, B. and Svasti, J. (2000). Sequence and expression of Thai Rosewood β-glucosidase/β-fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein. J. Biochem. 128: 999-1008.

Lei, Y.-L., Lin, D.Q., Yao, S.-J. and Zhu Z.-Q. (2003). Preparation and characterization of titanium oxide-densified cellulose beads for expanded bed adsorption. J. Appl. Polymer Sci. 90: 2848-2854.

Lin Cereghino, G.P., Sunga, A.J., Lin Cereghino, J. and Cregg, J.M. (2001). Expression of foreign genes in the yeast *Pichia pastoris*. *Quoted in* Genetic Engineering . Principles and Methods. Kluwer Academic. London. 23: 157-169.

Malboobi, M.A. and Lefebvre, D.D. (1997). A phosphate-starvation inducible β-glucosidase gene (psr3.2) isolated from *Arabidopsis thaliana* is a member of a distinct subfamily of the BGA family. Plant Mol. Biol. 34(1): 57-68.

Martin, R.C., Mok, M.C., Habben, J.E. and Mok, D.W.S. (2001). A maize cytokinin gene encoding an O-glucosyltransferase specific to cis-zeatin. Plant Biology 98(10): 5922-5926.

Nilsson, K. (1988). Enzymatic synthesis of oligosaccharides. Trends Biotechnol. 6: 256-264.

Reese, E.T. (1997). Degradation of polymetric carbohydrates by microbial enzymes. Rec. Adv. Phytochem. 11: 311-364. *Quoted in* Cicek, M. and Esen., A. (1998). Structure and expression of dhurrinase (β-glucosidase) from sorghum. Plant Physiol. 166: 1469-1478.

Sandgathe, A., Tippe, D., Dilsen, S., Meens, J., Halfar M., Weyster-Botz, D., Freudl, R., Thömmes, J. and Kula, M.-R. (2003). Production of a human calcitonin precursor with *Staphylococcus carnosus*: secretory expression and single-step recovery by expanded bed adsorption. Process Biochem. 38: 1351-1363.

Thömmes, J., Halfar, M., Gieren, H., Curvers, S. and Takors, R. (2001). Human Chymotrypsinogen B production form *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 2. Protein recovery. Biotechnol. Prog. 17: 503-512.

Tsao, R., Peterson, C.J. and Coats, J.R. (2002). Glucosinolate breakdown products as insect fumigants and their effect on carbon dioxide emission of insects. BMC Ecology 2002 2:5 http://www.biomedcentral.com/content/pdf/1472-6785-2-5.pdf

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

โปสเตอร์เสนอผลงาน การประชุม International conference on fermentation technology for value added gricultural products, March 22-25, 2005, Khon Kaen University, Thailand

pastoris and Recovery by Expanded Bed Adsorption

Theppanya Charoenrat[1,2], Sven-Olof Enfors[1], Mehmedalija Jahic[1], Mariena Ketudat-Cairns[2] and Andres Veide[1]
[1]Department of Biotechnology, AlbaNova University center, Royal Institute of Technology, Roslagstullsbacken 21, SE-106 91 Stockholm, SWEDEN.
[2]School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 3000 THAILAND.
charoenrat@biotech.kth.se, enfors@biotech.kth.se, bato@biotech.kth.se, ketudat@ccs.sut.ac.th and andres@biotech.kth.se

Introduction

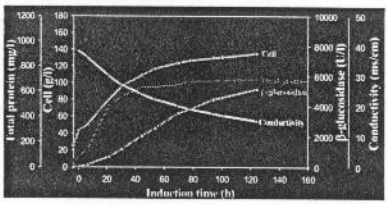
osidase (EC 3.2.1.21) catalyze the hydrolysis of β-glucosides to e glucose and an aglycone [1]. *P. pastoris* expression of binant gene can be induced by methanol by the use of *alcohol el* (*AOX1*) promoter [2]. The recombinant *P.pastoris* was eered by cloning *β-glucosidase* cDNA from *Dalbergia achinensis* Pierre [3] into *pPICzaB* under the control of *AOXI* oter, then integrated to *P. pastoris* Y-11430 genome. The nol limited fed-batch (MLFB) process was designed to obtain cell density, improve productivity and avoid methanol cation [4].

panded bed adsorption (EBA) is a single step for recovery of oducts from crude particulate-containing feedstock [5]. The us types of adsorbents have some disadvantages such as low y and salt sensitive that make them not suitable for recovery of binant proteins from *P. pastoris* culture broth because it has ell density and high salt concentration. The Streamline Direct (GE Health care) is a new type of adsorbent with increased y (1.8 g/l) salt tolerant.

e present work, we integrated the high performance of *P. is* fed-batch fermentation for high-level expression of binant β-glucosidase with the EBA recovery processes using nline Direct CST1.

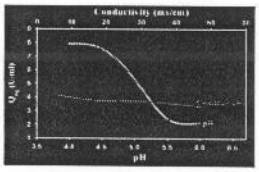
Results

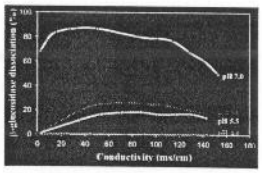
Fed-batch fermentation profile of -glucosidase production by *P. pastoris*



final cell density, total protein concentration, β- sidase activity and conductivity at 124.3 h of induction were 135 g/l, 698 mg/l, 5114 U/l and 15 ms/cm, ectively.

Equilibrium capacity (Qeq) and Dissociation condition studies

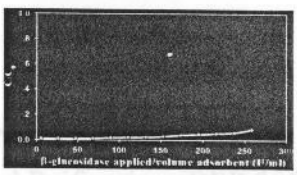




The Q_{eq} was studied by using clarified supernatant at different pH values with C0 = 2.687 U/ml and conductivity 15.0 ms/cm, and at different conductivities with C0 = 1.219 U/ml and pH 4.0. The Q_{eq} was high at pH 4.0 and decreased when pH increased. However, the conductivity in the range of 6.4-47.0 ms/cm at pH 4.0 have no significant effect (Fig a).

The β-glucosidase did not dissociate well at low pH even at very high conductivity. However, it is easy to dissociate at pH 7.0. The good condition for dissociation was pH 7.0 and conductivity below 100 ms/cm (Fig b).

Dynamic binding capacity (Q_B)



Q_B was studied by using unclarified *P. pastoris* culture broth with 60.0 g/l of dry weight, 220 ml/l wet cell volume (sedimented bed hight 20.5 cm, flow velocity 600 cm/min, C0 =4.3 U/ml, pH4.0 and conductivity 15.0 ms/cm). The 5% dynamic binding capacity ($Q_{B5\%}$) was estimated as the amount of β-glucosidase applied to the column when the concentration at the column outlet was 5% of inlet concentration. $Q_{B5\%}$ of the adsorbent for β-glucosidase was 210.0 U/ml$_{ads}$.

Purification of β-glucosidase from *P. pastoris* unclarified culture broth

Purification step	Volume (ml)	Flow velocity (cm/h)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Purifica -tion factor	Yield of β-glu (%)	β-glu conc. (U/ml)	Conc. factor
Feed prepared	4600	-	16630	1236	13.45	(1)	(100)	3.6	(1)
Flow-through	4600	600	353	756	-	-	4.5	-	-
Wash	1400	600	121	270	-	-	0.7	-	-
Elute	200	100	12383	224	55.28	4.1	74.4	61.9	17.2
(%) Total recovery	-	-	77.3	101.1	-	-	-	-	-

Purification of recombinant β-glucosidase by EBA was performed using fermentation culture of *P. pastoris* with 59.3 g/l of dry weight, 246.4 g/l wet weight and 219.0 ml/l wet cell volume. A low amount of β-glucosidase was lost in the loading step (4.5%). About 74% of β-glucosidase loaded was eluted from the column.

Reference

.T. (1997). Rec. Adv. Phytochem. 11:311-364.
ghino J. and J.M. Cregg. (2000). FEMS Microb. Rev. 24: 45-66.
Cairns J.R., Champattanachai V., Srisomsap C., Wittman-Liebold B., Thiede B. and Svasti J. (2000). J 28: 999-1008.
Rotticci-Mulder J.C., Martinelle M., Hult K. and Enfors S-O. (2002). Bioprocess Biosyst Eng.
A. (1994). Trends Biotechnol. 12: 296-303.

Conclusion

MLFB fermentation is a process which can be used for production of β-glucosidase in *P. pastoris*. The mline Direct CST1 was proven to be a more salt tolerant ligand compared to previous bead type. this es it a more suitable adsorbent for recombinant protein recovery from *P. pastoris* fermentation broth ng relatively high conductivity (15 ms/cm). The process with Streamline Direct CST1 resulted in a good very (74%), concentration (2 folds) and purification of β-glucosidase (2 folds).

ภาคผนวก ข

โปสเตอร์เสนอผลงานการประชุมวิชาการ

International conference Biopartitioning and Puification (BPP 2005)
June 20-24, 2005, The Netherlands

Comparison of novel type Streamline Direct CST1 adsorbent with Streamline SP for recovery of recombinant β-glucosidase from *Pichia pastoris* high cell density culture broth

Theppanya Charoenrat[1,2*], Maricna Ketudat-Cairns[2], Mehmedalija Jahic[1], Sven-Olof Enfors[1], and Andres Veide[1]

[1]School of Biotechnology, AlbaNova University center, Royal Institute of Technology, Roslagstullsbacken 21,SE-106 91 Stockholm, SWEDEN.
[2]School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000 THAILAND.

Introduction

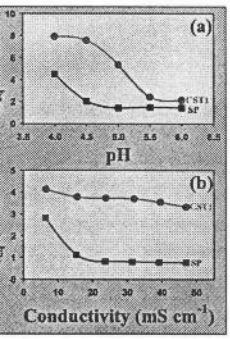
led bed adsorption (EBA) is a technique for single step y of bioproducts from crude particulate-containing feedstock. fficiency of novel type Streamline Direct CST1 (CST1) ent for recovery of β-glucosidase from *P. pastoris* high cell and high conductivity culture broth has been examined and red to Streamline SP (SP).

Comparison of CST1 and SP properties

	CST1	SP
Polymer	4% agarose	6% agarose
Densifier	Steel alloy	Quartz
ean density	1.8 g/ml	1.2 g/ml
ean particle	140 mm	200 mm
and structure		

Initial screening

Binding condition



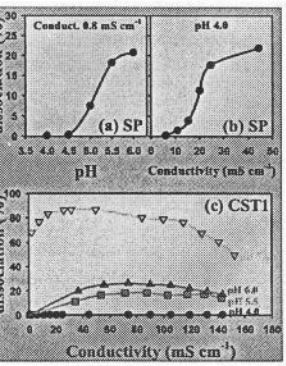
Equilibrium capacity (Q_{eq}) for adsorption of β-glucosidase,

a) at various pH with constant C_0 = 2.687 U ml^{-1} and cond. 15.0 mS cm^{-1} and

b) at various cond. values with constant C_0 = 1.219 U ml^{-1} and pH 4.0

best binding condition on SP is pH 4.0 and cond. lower than nS cm^{-1} and CST1 is pH 4.0 and cond. in the range of 6.4-47.0 cm^{-1}.

Dissociation condition



Dissociation of β-glucosidase from

a) SP at various pH with constant cond. 0.8 mS cm^{-1},

b) SP at various cond. with constant pH 4.0,

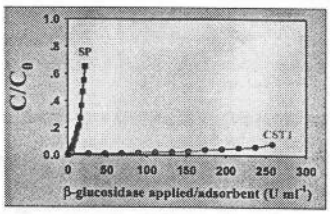
c) CST1 at various pH and cond.

dissociation of β-glucosidase from SP could be done under 5.0 and cond. 24.7 mS cm^{-1}. For CST1, pH 7.0 and cond. w 100 mS cm^{-1} was good dissociation condition. At cond. e 100 mS cm^{-1}, the hydrophobic interaction of aromatic side n in CST1 ligand reduced β-glucosidase dissociation from l.

Selected operating condition

Conditions	SP	CST1
Feed cell dry weight (g L^{-1})	24	60
Feed wet cell volume (ml L^{-1})	80	217
β-glucosidase (C_0) (U ml^{-1})	1.6	4.3
Conductivity (mS cm^{-1})	5	15
pH	4.0	4.0
Liquid velocity (cm h^{-1})	300	600
Bed expansion	3.9	3.3

Breakthrough capacity



Breakthrough curve of β-glucosidase of SP and CST1

The 5% dynamic binding capacity ($Q_{B5\%}$) on EBA of SP was 160 times lower than that of CST1.

Recovery processes

Recovery of β-glucosidase by using SP

Step	Vol. (ml)	Total β-glu (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U mg^{-1})	Purification factor	Yield (%)	Conc. (U ml^{-1})	Conc. factor
Feed	1500	2212	145	15.3	(1)	(100)	1.5	(1)
Flow-through	1500	608	65	-	-	27.5	-	-
Wash	1200	388	25	-	-	17.5	-	-
Elute	80	1052	33	31.8	2.1	47.6	13.2	8.8
Total recovery (%)	-	92.6	84.8	-	-	-	-	-

Recovery of β-glucosidase by using CST1

Step	Vol. (ml)	Total β-glu (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U mg^{-1})	Purification factor	Yield (%)	Conc. (U ml^{-1})	Conc. factor
Feed	4600	16630	1236	13.5	(1)	(100)	3.6	(1)
Flow-through	4600	353	756	-	-	4.5	-	-
Wash	1400	121	270	-	-	0.7	-	-
Elute	200	12383	224	55.3	4.1	74.4	61.9	17.2
Total recovery (%)	-	77.3	101.1	-	-	-	-	-

Conclusion

The high-cell-density and high conductivity of *P. pastoris* culture broth resulted in limitation in the primary recovery of target protein. Low process efficiency was first obtained with the SP due to low bead density and salt sensitive ligand. By using the new CST1 adsorbent which has a higher bead density and a more salt tolerant ligand, the EBA process became much more suitable for direct recovery of β-glucosidase from the *P. pastoris* culture broth.

Acknowledgements

We would like to thanks GE health care AB, Uppsala, Sweden for providing the Streamline SP and Streamline Direct CST1.

ภาคผนวก ค

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ J. Biotechnology

ARTICLE IN PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE DIRECT®

Journal of Biotechnology xxx (2005) xxx–xxx

Journal of BIOTECHNOLOGY

www.elsevier.com/locate/jbiotec

Recovery of recombinant β-glucosidase by expanded bed adsorption from *Pichia pastoris* high-cell-density culture broth

Theppanya Charoenrat [a,b], Mariena Ketudat-Cairns [b], Mehmedalija Jahic [a], Sven-Olof Enfors [a], Andres Veide [a,*]

[a] *School of Biotechnology, AlbaNova University Center, Royal Institute of Technology, Roslagstullsbacken 21, SE-106 91 Stockholm, Sweden*

[b] *School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima 30000, Thailand*

Received 24 March 2005; received in revised form 15 July 2005; accepted 25 August 2005

Abstract

Methanol limited fed-batch cultivation was applied for production of a plant derived β-glucosidase by *Pichia pastoris*. The β-glucosidase was recovered by expanded bed adsorption chromatography applied to the whole culture broth. The new Streamline Direct HST1 adsorbent was compared with Streamline SP. Higher bead density made it possible to operate at two times higher feedstock concentration and at two times higher flow velocity. The higher binding capacity in the conductivity range 0–48 mS cm^{-1} of Streamline Direct HST1 might be caused by the more complex interaction of multi-modal ligand in Streamline Direct HST1 compared to the single sulphonyl group in Streamline SP. Harsher elution condition had to be applied for dissociation of β-glucosidase from Streamline Direct HST1 due to stronger binding interaction. The 5% dynamic binding capacity was 160 times higher for Streamline Direct HST1 compared to Streamline SP. The yield of β-glucosidase on Streamline Direct HST1 (74%) was significantly higher than on Streamline SP (48%). Furthermore, β-glucosidase was purified with a factor of 4.1 and concentrated with a factor of 17 on Streamline Direct HST1 while corresponding parameters were half of these values for Streamline SP. Thus, for all investigated parameters Streamline Direct HST1 was a more suitable adsorbent for recovery of recombinant β-glucosidase from unclarified *P. pastoris* high-cell-density cultivation broth.
© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: β-Glucosidase; *Pichia pastoris*; Methanol limited fed-batch; Expanded bed adsorption; Multi-modal ligand

Abbreviations: AOX, enzyme alcohol oxidase; *aox*, alcohol oxidase gene; EBA, expanded bed adsorption; PI, propidium iodide

* Corresponding author. Tel.: +46 8 5537 8314; fax: +46 8 5537 8323.
E-mail address: andres@biotech.kth.se (A. Veide).

0168-1656/$ – see front matter © 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.jbiotec.2005.08.016

DTD 5 ARTICLE IN PRESS

Nomenclature

C	β-glucosidase activity in effluent ($U\,ml^{-1}$)
C_{eq}	β-glucosidase activity at equilibrium condition ($U\,ml^{-1}$)
C_0	β-glucosidase activity at initial condition ($U\,ml^{-1}$)
DOT	dissolved oxygen tension (%)
Q_B	binding capacity ($U\,ml_{ads}^{-1}$)
Q_{eq}	equilibrium capacity ($U\,ml_{ads}^{-1}$)
V_{ads}	volume of adsorbent (ml)
V_{eff}	volume of effluence (ml)
V_t	total reaction volume (ml)
V_0	system dead volume (ml)
V_x	breakthrough volume when $100C/C_0$ is X% (ml)

1. Introduction

β-Glucosidase (β-glucoside glucohydrolase; EC 3.2.1.21) catalyzes the hydrolysis of alkyl- and aryl-β-glucosides, as well as diglucosides and oligosacharides, to release glucose and an aglycone (Reese, 1977). These enzymes are found wildly in microorganisms, animals and plants, indicating their general importance to life. β-Glucosidases have been widely studied because of their important roles in medical, agricultural, biotechnological and industrial applications (Gueguen et al., 1997; Ducret et al., 2002). Seeds of Thai rosewood, *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, were found to contain high levels of β-fucosidase and β-glucosidase activities (Surarit et al., 1995). The pure enzyme has β-glucosidase as well as β-fucosidase activities, an apparent subunit molecular weight of 66 kDa by SDS-PAGE and an apparent native M_r of approximately 330 kDa (Srisomsap et al., 1996).

Pichia pastoris (*P. pastoris*) is frequently applied for production of recombinant proteins, mostly under control of the *aox1* promoter (Cregg et al., 1987). It offers several advantages as production host compared to *Escherichia coli* because it does not carry endotoxin, the product can be secreted to a mineral-salts medium, and it is capable to glycosylate proteins (Cregg et al., 1987; Lin Cereghino and Cregg, 2000). Furthermore, it can be cultured to very high-cell-densities (>130 g l^{-1} cell cell dry weight) (Wegner, 1990; Jahic et al., 2002) which improves the volumetric productivity.

Expanded bed adsorption (EBA) is a technique for single step recovery of bioproducts from crude particulate containing feedstock. Feedstock properties are important parameters to consider during the design and development of adsorbents and EBA process operations, especially the high-cell-density often achieved in *P. pastoris* cultures combined with often rather high conductivity.

Feedstock with high particulate concentration displays high viscosity. It was demonstrated that the variety of feedstock viscosities resulted in different degrees of bed expansion. It was possible to stabilize the bed expansion by adjusting the feedstock viscosity and/or liquid flow velocity, which however resulted in a longer process cycle and lower productivity (Chang and Chase, 1996).

The feedstock conductivity significantly affects the equilibrium binding constant (Q_{eq}) on an ion exchanger. In the recovery of human chymotrypsinogen B from *P. pastoris* fermentation broth by the cation exchanger Streamline SP it was shown that Q_{eq} was reduced more than 90% when conductivity was increased from 8.9 to 26.8 mS cm^{-1} (Thömmes et al., 2001). Similar results were also presented in human calcitonin precursor recovery by Streamline SP. The Q_{eq} was reduced from 28 to 16 mg ml^{-1} when conductivity was increased from 7.0 to 11.0 mS cm^{-1} (Sandgathe et al., 2003). The need to dilute high conductivity feedstock will also result in longer process cycles and reduced productivity.

Generally, adsorbents developed for EBA processes are the result of a compromise between the matrix characteristics (particle size, particle density and pore size), which determine the useful range of flow-rates and adsorption kinetics, especially mass transfer limitations. A well performing adsorbent will prevent bed instability and give high breakthrough capacity (Q_B) comparable to packed bed adsorbents (Lei et al., 2003; Tong and Sun, 2001; Anspach et al., 1999). By using high density adsorbent, the EBA process can be run at high flow velocity or high particulate containing feedstock without losing of adsorbent in flow-through. The increase of bead density can be done by adding of a densifier such as quartz, steel alloy, TiO_2, and more (Lei et al., 2003; Tong and Sun, 2001).

DTD 5 ARTICLE IN PRESS

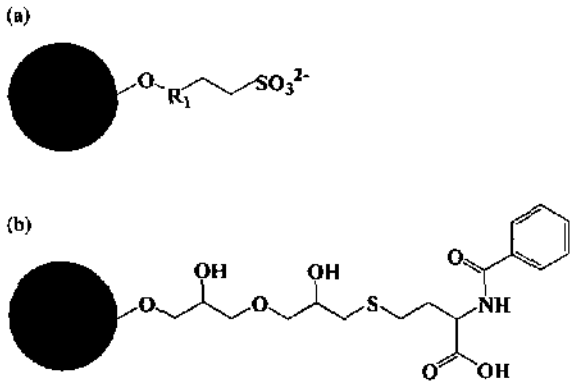


Fig. 1. The structures of ligands in the (a) Streamline SP and (b) Streamline Direct HST1 adsorbent.

Adsorbents developed for use in EBA can be furnished with a wide variety of ligands (Chase, 1998). The Streamline SP bead (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) is based on agarose with quartz as densifier (1.2 g ml^{-1}) and with a sulphonyl group as the ion exchange ligand (Fig. 1a). This type of adsorbent has also been used for recovery of recombinant protein from *P. pastoris* culture broth. However, about 2–5 times dilution of feedstock was required to reduce both cell concentration and conductivity (Sandgathe et al., 2003; Murasugi et al., 2001; Shepard et al., 2000; Trinh et al., 2000). The new Streamline Direct HST1 bead (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) is also based on agarose but with a denser metal alloy as densifier (1.8 g ml^{-1}) and carrying a multi-modal ligand composed of a thioether group, a carboxylic group and an aromatic group (Fig. 1b). A similar ligand has been used in packed bed chromatography functional at both high and low ionic strengths (Burton et al., 1997).

The aim of this work was to investigate the feasibility of designing an EBA process for the recovery of recombinant Thai Rosewood β-glucosidase directly from high-cell-density and high conductivity *P. pastoris* culture broth. To do this the possibility to use Streamline Direct HST1 adsorbent for increasing of EBA process efficiency was studied and the performance was compared with Streamline SP adsorbent. The binding and dissociation conditions, and breakthrough capacities were studied to develop the recovery process.

2. Materials and methods

2.1. Organism

The *P. pastoris* strain Y-11430 (wild-type strain), a kind gift from J. Lin Cereghino (Lin Cereghino and Cregg, 2000), was used in this study. The *β-glucosidase* cDNA gene from Thai Rosewood (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) (Ketudat-Cairns et al., 2000) was cloned into the pPICzαB vector (Invitrogen). The pPICzαB with the *β-glucosidase* gene was then integrated into *P. pastoris* Y-11430 at the *aox1* promoter.

2.2. Cultivation

2.2.1. Inoculum preparation

First inoculum was prepared by adding one colony of *P. pastoris* from yeast extract peptone dextrose agar medium (YPD) (yeast extract 10 g l^{-1}, peptone 20 g l^{-1} and dextrose 20 g l^{-1}) containing 100 μg ml^{-1} zeocin into 20 ml YPD broth. The culture was incubated at 30 °C, 200 rpm for 24 h. A second inoculum was prepared by transferring the entire first inoculum culture into a 1000 ml shake flask containing 80 ml buffered glycerol complex medium (BMGY) (yeast extract 10 g l^{-1}, peptone 20 g l^{-1} and glycerol 10 g l^{-1} in 0.1 M potassium phosphate buffer pH 6.0). The culture was incubated under the same condition as the first inoculum culture.

2.2.2. Fed-batch cultivation

The fed-batch cultivation was carried out in a 10 l fermenter (Belach Bioteknik, Stockholm, Sweden). The fermenter was sterilized in situ and the glycerol basal salt medium, GBS (glycerol 40.0 g l^{-1}, 85% H_3PO_4 26.7 ml l^{-1}, $CaSO_4$ 0.93 g l^{-1}, K_2SO_4 18.2 g l^{-1}, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 14.9 g l^{-1}, KOH 4.13 g l^{-1}, and PTM1 trace salts 4.35 ml l^{-1}) was added using 0.2 μm AcroPak™ 20 Filter (Pall Life Sciences, Ann Arbor, MI, USA). The PTM1 trace salts ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 6.0 g l^{-1}, KI 0.08 g l^{-1}, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 3.0 g l^{-1}, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.2 g l^{-1}, H_3BO_3 0.02 g l^{-1}, $ZnCl_2$ 20.0 g l^{-1}, $FeCl_3$ 13.7 g l^{-1}, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.9 g l^{-1}, H_2SO_4 5.0 ml l^{-1} and biotin 0.2 g l^{-1}) were sterilised using a 0.2 μm syringe filter (Sartorius, Goettingen, Germany) and added separately. The temperature, pH, DOT, aeration rate, pressure, pump speed, agi-

tation rate and antifoam levels were automatically controlled.

The fermentation process was divided into four stages (glycerol batch, glycerol exponential fed-batch, methanol exponential fed-batch and constant methanol fed-batch) as described by Jahic et al. (2002). In the protein production phase, the methanol was fed to keep DOT constant at about 25%. The temperature, aeration, agitation and pH were controlled at 30 °C, 6 l min^{-1}, 1000 rpm and 5.0, respectively. Twenty-five percent NH_4OH was used as the alkaline to control the pH. All feed solutions contained 12 ml l^{-1} of PTM1 trace salts.

2.2.3. Harvest

The unclarified culture broth was collected from the bioreactor at the end of the cultivation. A part of the culture broth was used to prepare clarified culture supernatant by centrifuging at 10,000 rpm (16,915 × *g*) for 20 min. Both preparations were stored at 4 °C until use.

2.3. Adsorbents

Streamline SP (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), is an agarose based cation exchanger with mean particle size 200 μm, density 1.2 kg dm^{-3} and sulphonate groups as ion exchange ligand (Fig. 1a). Streamline Direct HST1 (GE Healthcare, Uppsala, Sweden), is agarose based, with mean particle size 140 μm, density 1.8 kg dm^{-3} and carries multi-modal ligand, as described in Fig. 1b.

2.4. Binding conditions

The binding conditions of β-glucosidase, measured as equilibrium capacity (Q_{eq}), were tested at different pH and conductivity values. The adsorbents were prepared by placing 0.5 ml of adsorbent in test-tubes and equilibrated in steps with buffer at specified pH and conductivity values for about 2 min by mixing end over end. In the first step 5 ml of 500 mM sodium-acetate buffer was used 10 times followed by a second step with 5 ml of 50 mM sodium-acetate buffer for five times. The samples were prepared from clarified *P. pastoris* culture supernatant by dialysis against 50 mM sodium acetate buffer pH 5.0 and then the pH and conductivity were adjusted with 1 M NaOH or 1 M acetic acid and with 1 M NaCl, respectively. One millilitre of prepared sample was then added to the prepared adsorbent and incubated end-over-end mixing for 1 h. The adsorbent was allowed to settle and then the supernatant was assayed for β-glucosidase activity. The initial β-glucosidase activity (C_0) and equilibrium β-glucosidase activity (C_{eq}) were determined and the equilibrium capacity (Q_{eq}) was calculated as:

$$Q_{eq} = \frac{(C_0 - C_{eq})V_l}{V_{ads}} \quad (1)$$

where V_l andd V_{ads} are the total volume in the test-tube (ml) and the volume of adsorbent (ml), respectively.

2.5. Dissociation conditions

Elution buffers (50 mM sodium acetate and 250 mM potassium acetate) with different pH (4–7) and conductivity (1–44 mS cm^{-1}) were prepared. Two molars of NaCl solution was add for adjusting conductivity. One millilitre of a certain elution buffer was added into 0.5 ml of adsorbent previously adsorbed with β-glucosidase as described for the binding condition tests. The samples were mixed for 1 h and then the adsorbent was allowed to settle. The supernatant was assayed for β-glucosidase activity and the percentage of β-glucosidase that had dissociated from the adsorbent was calculated.

2.6. Breakthrough capacity determination

The expanded bed system used in this work consisted of a Streamline C-25 column (25 mm i.d.) (GE Healthcare, Uppsala, Sweden) packed with 100.7 ml (20.5 cm bed height) of Streamline SP or Streamline Direct HST1, connected to a peristaltic pump and a UV detector.

The adsorbent was equilibrated with 500 mM sodium-acetate buffer, pH 4.0, for 2 column volumes and 50 mM sodium-acetate, pH 4.0, for 4 column volumes in expanded mode at flow velocities of 300 and 600 cm h^{-1} for Streamline SP and Streamline Direct HST1, respectively.

The unclarified *P. pastoris* culture broth was adjusted to pH 4.0 and to conductivity 5.0 mS cm^{-1} (920 ml l^{-1} supernatant volume, 105 g l^{-1} cell wet

weight and 24 g l^{-1} cell dry weight), and to pH 4.0 and conductivity 15.0 mS cm^{-1} (783 ml l^{-1} supernatant volume, 248 g l^{-1} cell wet weight and 60 g l^{-1} cell dry weight) for Streamline SP and Streamline Direct HST1, respectively. Acetic acid, 0.5 M, was used as acid for adjusting pH. In the case of conductivity adjustment, 2 M NaCl solution and 50 mM sodium-acetate buffer were used. Then the samples were applied to the column at the same flow velocity as used at equilibration. The breakthrough was monitored by taking out fractions from the effluent and assay for the β-glucosidase activity. In order to determine the breakthrough capacity (Q_B) the normalized effluent concentration (C/C_0) was plotted versus the amount of β-glucosidase loaded per volume of adsorbent [$(V_{eff}C_0)/V_{ads}$]. The breakthrough capacity (Q_B) of the adsorbent was determined as follows:

$$Q_{BX\%} = \frac{C_0(V_x - V_0)}{V_{ads}} \quad (2)$$

where V_{eff} is the volume of effluent (ml), V_0 is the dead volume of the system (ml) and V_x is the effluent volume at which $100C/C_0$ is X% (ml).

2.7. The EBA recovery process

The equilibration, washing and elution buffers used for the recovery of β-glucosidase from unclarified *P. pastoris* culture broth were selected from the above described screening experiments. The equilibration and sample application steps were performed as described for the Q_B experiment above. Then, washing was performed with 50 mM NaCl in 50 mM sodium-acetate buffer, pH 4.0, for Streamline SP and 50 mM sodium-acetate buffer, pH 5.0, for Streamline Direct HST1 until all residual cell and unbound proteins were removed (A_{280} back to base-line). Elution was performed using 250 mM NaCl in 50 mM sodium-acetate buffer, pH 5.0 (conductivity 24.7 mS cm^{-1}) for Streamline SP, and 250 mM potassium-phosphate buffer, pH 7.0, (conductivity 30.5 mS cm^{-1}) for Streamline Direct HST1 at flow velocity of 100 cm h^{-1} in expanded mode. Cleaning-in-place (CIP) of the adsorbents was performed using 1 M NaCl in 0.5 M NaOH, distilled water, 25% acetic acid in 20% ethanol and distilled water again as recommended by the manufacturer.

2.8. Analyses

2.8.1. Cell concentration

Cell concentration was monitored by measuring the optical density at 600 nm (OD_{600}) and cell dry weight. Cell dry weight was determined by centrifugation of 5 ml of culture broth at 4500 rpm (1400 × *g*) for 10 min, and the supernatant was collected for analyzes of β-glucosidase activity, total protein and SDS-PAGE. The pellet was washed with distilled water once and dried at 105 °C, till constant weight.

2.8.2. Total protein concentration

The total protein concentration in the supernatant was analyzed according to Bradford (Bradford, 1976). Bovine serum albumin was used as standard protein.

2.8.3. β-Glucosidase activity

β-Glucosidase activity was assayed by the method of Evans (1985). This method is a spectrophotometric assay that measures the release of *p*-nitrophenol from *p*-nitrophenol-β-D glucopyranoside (3.3 mM) catalysed by β-glucosidase. One unit of enzyme was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol *p*-nitrophenol per minute at 30 °C in 0.1 M sodium acetate buffer at pH 5.0.

2.8.4. SDS-PAGE analysis

The sample, containing 60 μl of supernatant, 25 μl of sample buffer (NuPAGE LDS 4× sample buffer, Invitrogen, CA, USA), 10 μl of 0.5 M dithiothreitol and 5 μl of 3.5% PMSF in ethanol was incubated for 10 min at 95 °C. SDS-PAGE was performed on NuPAGE® Novex 4–2% Bis–Tris Gel (1.0 mm × 10 well) (Invitrogen, CA, USA) using MOPS running buffer. Ten microliters of prepared sample was loaded to the well and run at 200 V for 60 min. The gel was stained with Coomassie Blue R-250 (Merck, Darmstadt, Germany) for 30 min and destained (destain solution: methanol 100 ml l^{-1} and glacial acetic acid 100 ml l^{-1}) for 1–2 h.

2.8.5. Cell viability

A Partec PAS flow cytometer (Partec GmbH, Münster, Germany) equipped with a 488 nm argon laser was used for analysis of the total number of cells and the number of cells stained by propidium iodide (PI) (Sigma-Aldrich, Stockholm, Sweden). Samples taken from the fermenter were diluted with PBS (0.16 M

NaCl, 0.003 M KCl, 0.008 M Na_2HPO_4 and 0.001 M KH_2PO_4, pH 7.3). For staining, 25 μl of stock solution containing 200 μg ml^{-1} of PI dissolved in water was added to 975 μl of diluted sample at room temperature. Samples were analys, without further incubation, at a data rate of about 1500 counts s^{-1}. A total count of 50,000 was collected in each measurement. Measurements were calibrated using 3 μm diameter fluorescent beads (Standard 05-4008, Partec GmbH, Münster, Germany). The viability was expressed as percentage of PI negative cells in the population.

2.8.6. Alcohol oxidase activity

The intracellular alcohol oxidase activity was assayed with the method described recently (Jahic et al., 2002). Alcohol oxidase units were expressed as a μmol of methanol oxidized per minute.

2.8.7. Methanol concentration

The concentrations of methanol was continuously analyzed using Industrial Emissions Monitor Type 1311 (Brüel & Kjær, Innova, Denmark) as described recently (Jahic et al., 2002).

3. Results and discussion

3.1. Fed-batch production of β-glucosidase

A rapid increase of AOX activity was observed after start of the methanol feed (Fig. 2a). From this time the β-glucosidase activity increased steadily in the medium, and reached about 5100 U l^{-1} after 125 h induction time (Fig. 2c). Initially also the biomass concentration increased rapidly, but it levelled off and ended at about 135 g l^{-1}. The high-cell-density in *P. pastoris* processes is important since it compensates for the relatively low specific productivity per cell unit, resulting in production of several grams of product per litre culture broth (Lin Cereghino and Cregg, 2000; Jahic et al., 2002).

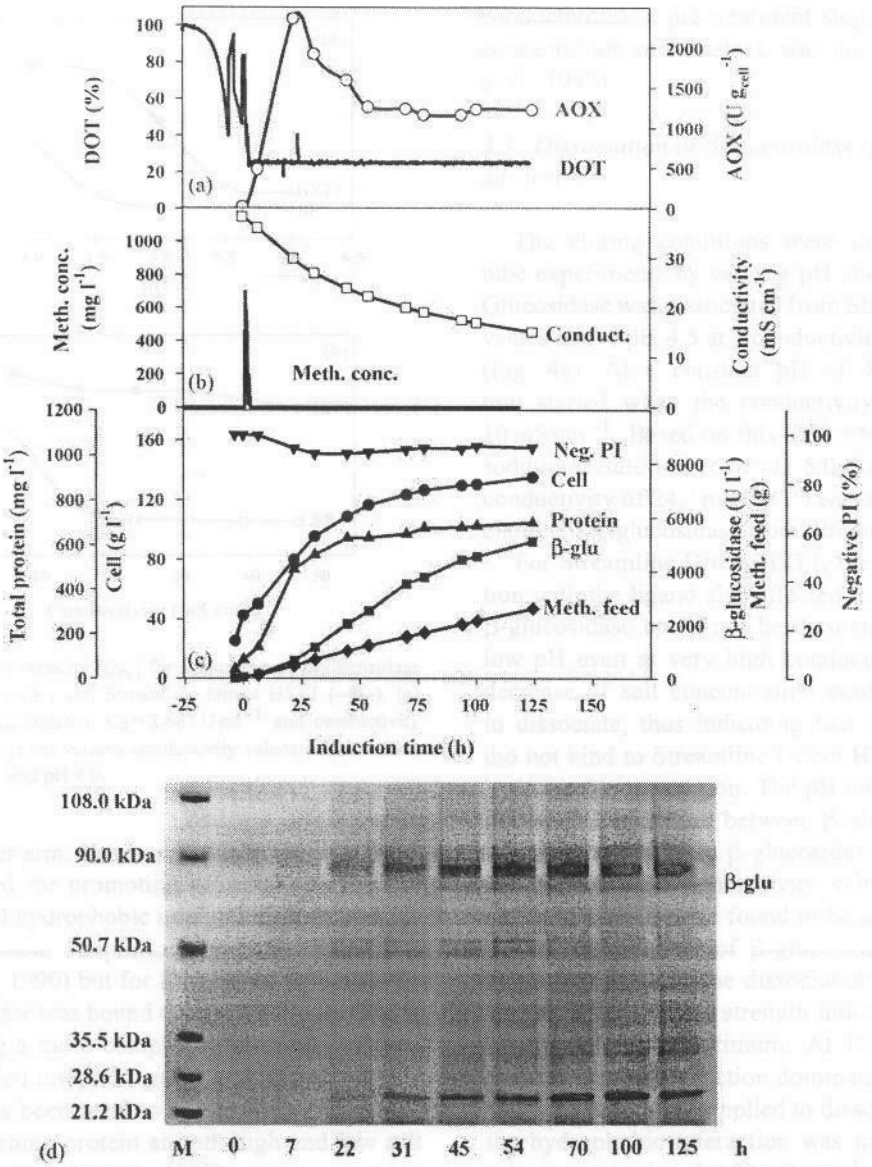
An additional advantage of the *P. pastoris* expression system is that the product often can be secreted to the medium which in many cases can be a mineral salt medium without contaminating proteins. In the present investigation the mass of β-glucosidase could not be measured due to problems to obtain the specific activity of pure recombinant enzyme. However, SDS-PAGE analyses (Fig. 2d) indicate that the β-glucosidase was the dominating protein in the cultivation broth in which the total protein concentration was about 700 mg l^{-1}. The estimated molecular weight of this recombinant β-glucosidase under denaturing condition was approximately 88 kDa, which is larger than the natural enzyme purified from Thai Rosewood (66 kDa) (Ketudat-Cairns et al., 2000). There is a band with increasing density at about 28 kDa (Fig. 2d), which may be either a proteolysis product or a contamination of host cell proteins. Studies on the stability of the product when incubated in broth with and without cells indicated that the product was proteolytically stable (data not shown).

The start of the methanol feed resulted in a short rapid transient accumulation of methanol in the medium. It reached 600 mg l^{-1} within 50 min, but declined below the measurement limit (25 mg l^{-1}) within 5 h (Fig. 2b). The viability dropped from about 99% to about 96%, within 25 h, where it remained throughout the process. The conductivity of the broth declined with increasing biomass from about 45 mS cm^{-1} at the beginning of the process to about 18 mS cm^{-1} at the end (Fig. 2b).

β-Glucosidase was harvested in a culture broth at very high-cell-density (135 g l^{-1} dry cell weight, 450 g l^{-1} wet cell weight, 625 ml l^{-1} supernatant volume) and rather high conductivity (18 mS cm^{-1}) (Fig. 2). Without pre-treatment of the broth these typical properties of a *P. pastoris* process liquid will limit the choice of initial operations for cell removal and product recovery.

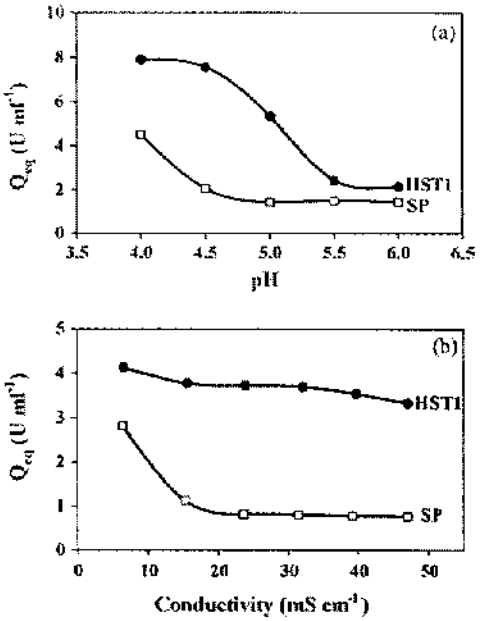
3.2. Binding conditions of β-glucosidase on the adsorbents

The study of binding conditions of β-glucosidase on the two adsorbents was focused on the effect of pH and conductivity by using cell free supernatant. At pH 4.0 Streamline Direct HST1 had about twice as high Q_{eq} as Streamline SP, but for both adsorbents Q_{eq} decreased when pH was increased (Fig. 3a). The conductivity significantly affected the Q_{eq} in Streamline SP. At constant pH 4.0, when the conductivity was changed from 6.4 to 15.3 mS cm^{-1} the Q_{eq} decreased with 40%. However, in the conductivity range of 6.4–47.0 mS cm^{-1} at pH 4.0 the Q_{eq} for Streamline Direct HST1 declined only by about 15% (Fig. 3b).



2. Cultivation profile of recombinant β-glucosidase production with *P. pastoris*. (a) DOT (continuous line), intracellular AOX activity –); (b) the methanol concentration (continuous line) and conductivity (–□–); (c) PI negative (viable) cells (–▼–), biomass (–●–), total in (–▲–), β-glucosidase (–■–), total methanol feed (–♦–). (d) SDS-PAGE of the culture supernatants withdrawn at different times.

The decrease of Q_{eq} for both adsorbents when pH increased indicated that an ion exchange mechm was involved in the interaction between β-cosidase and adsorbent (Fig. 3a). However, the amline Direct HST1 adsorbent was shown to be ch more salt tolerant with respect to binding of lucosidase compared to Streamline SP at pH 4 (Fig. 3b). In fact, the binding was achieved well above the conductivity of the *P. pastoris* culture broth (18 mS^{-1}). Furthermore, the higher Q_{eq} of Streamline Direct HST1 than of Streamline SP at all measured pH and conductivity values is probably due to other interactions, e.g. like hydrophobic interaction from the aromatic ring and thiophilic interaction from the



g. 3. Equilibrium capacity (Q_{eq}) for adsorption of β-glucosidase Streamline SP (–□–) and Streamline Direct HST1 (–●–), (a) various pH with constant $C_0 = 2.687\ U\,ml^{-1}$ and conductivity .0 mS cm^{-1} and (b) at various conductivity values with constant = 1.219 U ml^{-1} and pH 4.0.

ioether spacer arm. However, a high salt concentra-on is required for promoting protein adsorption in oth traditional hydrophobic interaction chromatogra-hy and traditional thiophilic interaction chromatog-phy (Porath, 1990) but for Streamline Direct HST1 e β-glucosidase was bound even at low conductivity, us indicating a more complex interaction. Interest-gly, a modified thiophilic gel containing a thioether pacer arm has been used as salt-independent adsor-ent, i.e. adsorbing protein at both high and low oncentrations (Scholz et al., 1998).

The interaction between β-glucosidase and Stream-ne Direct HST1 very much resemble the interaction escribed to take place in hydrophobic charge induc-on chromatography (Burton and Harding, 1998) and ixed mode chromatography (Burton et al., 1997). Then a ligand similar to Streamline Direct HST1 was udied that contained a thiophilic spacer arm with heterocyclic function the suggested binding mech-nism was described to involve ionic, hydrophobic nd thiophilic interactions. One advantage was that e adsorption could take place at both high and low conductivities; a pre-treatment step to adjust the salt concentration of feedstock was not required (Burton et al., 1997).

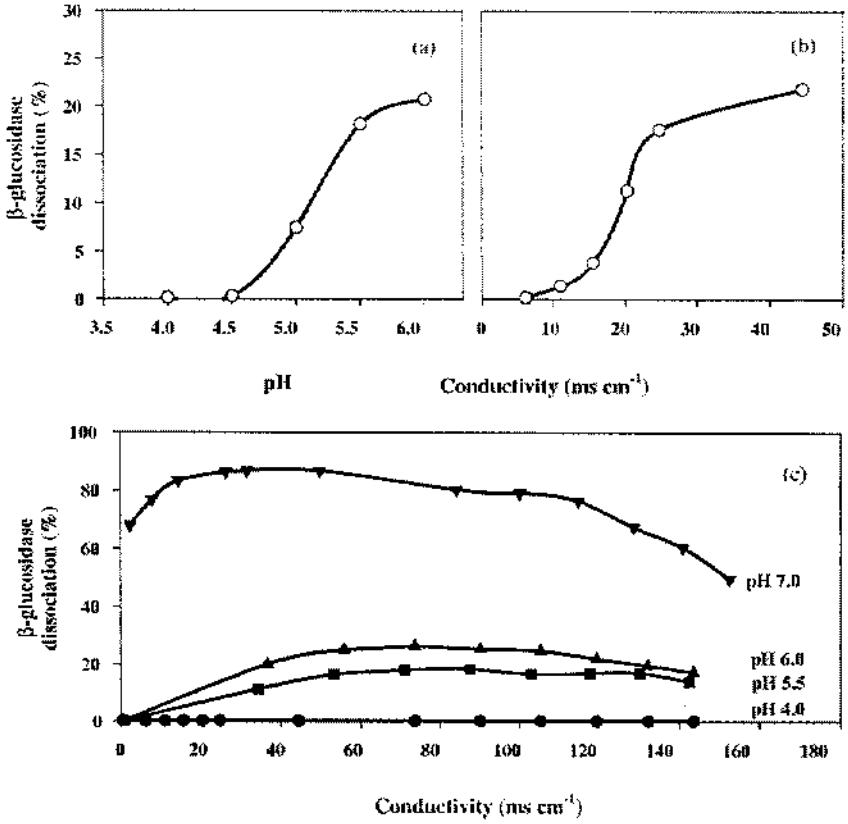
3.3. Dissociation of β-glucosidase from the adsorbents

The eluting conditions were determined in test tube experiments by varying pH and conductivity. β-Glucosidase was dissociated from Streamline SP at pH values above pH 4.5 at a conductivity of 0.8 mS cm^{-1} (Fig. 4a). At a constant pH of 4.0, the dissociation started when the conductivity exceeded about 10 mS cm^{-1}. Based on this, 250 mM NaCl in 50 mM sodium acetate buffer of pH 5.0 (corresponding to a conductivity of 24.7 mS cm^{-1}) was selected for dissociation of β-glucosidase from Streamline SP.

For Streamline Direct HST1, the complex interaction with the ligand also affected the desorption. The β-glucosidase could not be dissociated efficiently at low pH even at very high conductivity. In addition, decrease of salt concentration could not be applied to dissociate, thus indicating that the β-glucosidase did not bind to Streamline Direct HST1 through pure hydrophobic interaction. The pH change resulted in a change of interaction between β-glucosidase and the adsorbent and hence β-glucosidase was dissociated rapidly. At pH 7 conductivity values up to as high as 100 mS cm^{-1} were found to be suitable conditions for the dissociation of β-glucosidase from Streamline Direct HST1. The dissociation pattern observed as a function of ionic strength indicated the existence of a dissociation optimum. At low salt concentration the charge interaction dominates and the electrostatic change can be applied to dissociation. However, the hydrophobic interaction was increased at higher salt concentration (>100 mS cm^{-1}) while the dissociation ratio decreased and β-glucosidase was bound to the adsorbent again (Fig. 4c). This again indicated the similarity of the behaviour of Streamline Direct HST1 ligand with hydrophobic charge induction chromatography (Burton and Harding, 1998) as discussed above.

3.4. Breakthrough capacity in EBA

The breakthrough capacities (Q_B) of Streamline SP and Streamline Direct HST1 were compared in



4. Dissociation of β-glucosidase from (a) Streamline SP at various pH with constant conductivity 0.8 mS cm^{-1}, (b) Streamline SP at various uctivity with constant pH 4.0, (c) Streamline Direct HST1 at various pH (4.0 (–●–), 5.5 (–■–), 6.0 (–▲–), and 7.0 (–▼–)) and conductivity nge of 0.8–152.6 mS cm^{-1}.

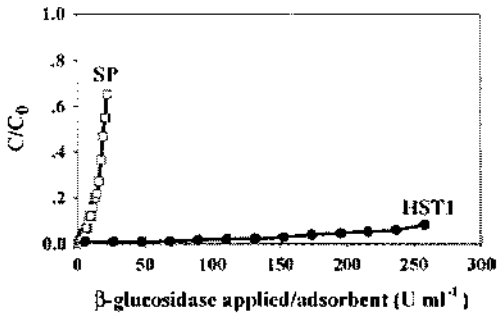
anded bed using cultivation broth. The experi-ıtal conditions are summarised in Table 1. The malized effluent concentration (C/C_0) was plot-versus the β-glucosidase loading per volume of orbent [$(V_{eff}C_0)/V_{ads}$] in order to determine the (Fig. 5). The 5% breakthrough capacity ($Q_{B5\%}$) β-glucosidase was about 160 times higher on the :amline Direct HST1 (210 U ml_{ads}^{-1}) compared to :amline SP (1.3 U ml_{ads}^{-1}).

Recovery of β-glucosidase from unclarified ture broth by EBA

According to the binding and dissociation con-ons, and the breakthrough capacity experiments conditions for EBA process operations have been igned (Table 1). By using the denser Streamline

Table 1
Comparison of binding capacity at 5% breakthrough between Streamline SP and Streamline Direct HST1 for recombinant β-glucosidase recovery from *P. pastoris* unclarified cultivation broth

Conditions	Streamline SP	Streamline Direct HST1
Feed cell dry weight ($g l^{-1}$)	24	60
Feed cell wet weight ($g l^{-1}$)	105	248
Feed wet cell volume ($ml l^{-1}$)	80	217
Feed cell count (cell)	6×10^{12}	4×10^{13}
β-Glucosidase (C_0) (U ml^{-1})	1.6	4.3
Conductivity (mS cm^{-1})	5	15
pH	4.0	4.0
Sedimented bed height (cm)	20.5	20.5
Adsorbent volume (V_{ads}) (ml)	100.7	100.7
Liquid velocity ($cm h^{-1}$)	300	600
Bed expansion	3.9	3.3
$Q_{B5\%}$ (U ml_{ads}^{-1})	1.3	210.0



g. 5. Breakthrough curve of β-glucosidase from unclarified *P. pas-ris* culture broth on expanded bed of Streamline SP (–□–) and reamline Direct HST1 (–●–). Experimental conditions according Table 1.

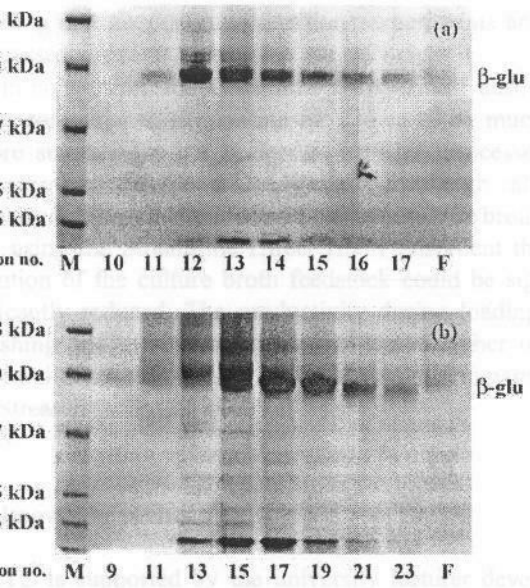
irect HST1 matrix compared to the Streamline SP, it as possible to design an EBA process where one could se a two times higher flow velocity and a two times ore concentrated *P. pastoris* culture broth (246.4 g l^{-1} ell wet weight). Despite the higher concentration and ow velocity still the bed expansion was smaller. The treamline Direct HST1 also showed higher capacity nd the β-glucosidase could be adsorbed at both high nd low salt concentrations. The reduced need of dilut-ng the feedstock with Streamline Direct HST1 makes ne EBA process a more interesting choice for direct ecovery of β-glucosidase from the high-cell-density nd high conductivity broth. In contrast, when Stream-ne SP was applied, a larger dilution of the feedstock as required to decrease both cell density and conduc-vity, in our case to 105 g l^{-1} and 5 mS cm^{-1}, respec-vely (Table 1). A *P. pastoris* culture broth containing 00 g l^{-1} wet cell weight and 10 mS cm^{-1} conductiv-y was suggested for use on a Streamline SP matrix by hömmes et al. (2001). Similar feedstock properties ave also been used by others for *P. pastoris* recovery rocesses (Trinh et al., 2000; Murasugi et al., 2001). oo high a density and viscosity will lead to reduction f the terminal settling velocity of the adsorbent. Fur-ermore, a consequence of this will be an unreasonably igh bed expansion during sample load (Thömmes et l., 2001).

The results of EBA chromatography with Stream-ne SP adsorbents is shown in Table 2. About 28% f the loaded β-glucosidase was found in the flow hrough. About 48% of the total β-glucosidase loaded n to the column was recovered in the eluted fraction. DS-PAGE analysis under denaturing condition of the

Table 2
Recovery of β-glucosidase from *P. pastoris* unclarified culture broth using Streamline SP

Purification step	Volume (ml)	Flow velocity (cm h^{-1})	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U mg^{-1})	Purification factor	Recovery of β-glu (%)	β-Glu concentration (U ml^{-1})	Concentration factor
Feed prepared	1500	–	2212	145	15.3	(1)	(100)	1.5	(1)
Flow-through	1500	300	608	65	–	–	27.5	–	–
Wash	1200	300	388	25	–	–	17.5	–	–
Elute	80	100	1052	33	31.8	2.1	47.6	13.2	8.8
Total recovery (%)	–	–	92.6	84.8	–	–	–	–	–

Experimental conditions as in Table 1.



. SDS-PAGE analysis of peak fractions from the elution (a) mline SP (b) Streamline Direct HST1 (M: molecular weight er proteins, F: feed applied to the column).

ed fraction of β-glucosidase showed one main band gh intensity at the size (Fig. 6a) corresponding to nain band observed during cultivation (Fig. 2d).

or the EBA on Streamline Direct HST1 media le 3), a small amount of the loaded β-glucosidase lost in the flow through (4.5%). About 74% of β- osidase was recovered in the eluted fraction. SDS- E analysis under denaturing condition of the eluted ion of β-glucosidase showed one band with very intensity (Fig. 6b) at the same size as for samples ng the cultivation (Fig. 2d). Also several bands of h lower intensity and smaller in size were observed . 6b). According to cell counting by flow cytome- small amount of cells were observed in the eluted ucosidase fraction from both Streamline SP and amline Direct HST1 columns. However, still a cell ction of about 10^6 times was achieved compared e feed (data not shown).

The elution recovery of β-glucosidase on Stream- Direct HST1 (74%) was higher than on Streamline 48%). However, the total recovery was lower on Streamline Direct HST1 adsorbent (77%) com- d to the Streamline SP adsorbent (93%). This might explained by complex interaction of the Stream- Direct HST1 ligand that was also observed in the

Table 3
Recovery of β-glucosidase from *P. pastoris* unclarified culture broth using Streamline Direct HST1 expanded bed chromatography

Purification step	Volume (ml)	Flow velocity (cm h^{-1})	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U mg^{-1})	Purification factor	Recovery of β-glu (%)	β-Glu concentration (U ml^{-1})	Concentration factor
Feed prepared	4600	–	16630	1236	13.5	(1)	(100)	3.6	(1)
Flow-through	4600	600	353	756	–	–	4.5	–	–
Wash	1400	600	121	270	–	–	0.7	–	–
Elute	200	100	12383	224	55.3	4.1	74.4	61.9	17.2
Total recovery (%)	–	–	77.3	101.1	–	–	–	–	–

Experimental conditions as in Table 1.

binding and dissociation conditions experiments and discussed above.

In conclusion, the Streamline Direct HST1 adsorbent compared to Streamline SP shown to be much more suitable for the design of an EBA processes for recovery of β-glucosidase directly from high-cell-density and high conductivity *P. pastoris* culture broth. By using the Streamline Direct HST1 adsorbent the dilution of the culture broth feedstock could be significantly reduced. The productivity during loading, washing and eluting was almost 4 times higher on Streamline Direct HST1 ($20.7\,kU\,l^{-1}\,h^{-1}$) compared to Streamline SP ($5.3\,kU\,l^{-1}\,h^{-1}$).

Acknowledgements

TC is supported by the university lecturer development program from the Ministry of Education and Suranaree University, Thailand. This work is part of the BiMaC Enzyme Factory programme financed by the Södra Skogsägarnas Stiftelse för Forskning, Utveckling och Utbildning. GE Healthcare is acknowledged for their support concerning the Streamline Direct HST1 and Streamline SP media.

References

Anspach, F.B., Curbelo, D., Hartmann, R., Garke, G., Deckwer, W.-D., 1999. Expanded-bed chromatography in Primary protein purification. J. Chromatogr. A. 865, 129–144.

Burton, S.C., Haggarty, N.W., Harding, D.R.K., 1997. One step purification of Chymosin by mixed mode chromatography. Biotechnol. Bioeng. 59 (1), 45–55.

Burton, S.C., Harding, D.R.K., 1998. Hydrophobic charge induction chromatography: salt independent protein adsorption and facile elution with aqueous buffers. J. Chromatogr. A. 814, 71–81.

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

Chang, Y.K., Chase, H.A., 1996. Development of operating conditions for protein purification using expanded bed techniques: The effect of the degree of bed expansion on adsorption performance. Biotechnol. Bioeng. 49, 512–526.

Chase, H.A., 1998. The affinity adsorbents in expanded bed adsorption. J. Mol. Recognit. 11, 217–221.

Cregg, J.M., Tschopp, J.F., Stillman, C., Siegel, R., Akong, M., Craig, W.S., Buckholz, R.G., Madden, K.R., Kellaris, P.A., 1987. High level expression and efficient assembly of hepatitis B surface antigen in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. Bio. Technol. 5, 479–485.

Ducret, A., Trani, M., Lortie, R., 2002. Screening of various glycosides for the synthesis of octyl glucoside. Biotechnol. Bioeng. 77, 752–757.

Evans, C.S., 1985. Properties of the β-glucosidase (cellobiase) from the wood-rotting fungus *Coriolus versicolor*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 22, 128–131.

Gueguen, Y., Chemardin, P., Pien, S., Arnaud, A., Galzy, P., 1997. Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized β-glucosidase. J. Biotechnol. 55, 151–156.

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

Ketudat-Cairns, J.R., Champattanachai, V., Srisomsap, C., Wittman-Liebold, B., Thiede, B., Svasti, J., 2000. Sequence and expression of Thai Rosewood β-glucosidase/β-fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein. J. Biochem. 128, 999–1008.

Lei, Y.-L., Lin, D.Q., Yao, S.-J., Zhu, Z.-Q., 2003. Preparation and characterization of titanium oxide-densified cellulose beads for expanded bed adsorption. J. Appl. Polym. Sci. 90, 2848–2854.

Lin Cereghino, J., Cregg, J.M., 2000. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. FEMS Microbiol. Rev. 24, 45–66.

Murasugi, A., Asami, Y., Mera-Kikuchi, Y., 2001. Production of recombinant human bile salt-stimulated lipase in *Pichia pastoris*. Protein Expr. Purif. 23, 282–288.

Porath, J., 1990. Salt-promoted adsorption chromatography. J. Chromatogr. 510, 47–48.

Reese, E.T. (1977). Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes. Rec. Adv. Phytochem. 11, 311–364. In: Cicek, M., Esen, A. (1998). Structure and expression of dhurrinase (β-glucosidase) from sorghum. Plant Physiol. 166, 1469–1478.

Sandgathe, A., Tippe, D., Dilsen, S., Meens, J., Halfar, M., Weyster-Botz, D., Freudl, R., Thömmes, J., Kula, M.-R., 2003. Production of a human calcitonin precursor with *Staphylococcus carnosus*: secretory expression and single-step recovery by expanded bed adsorption. Process Biochem. 38, 1351–1363.

Scholz, G.H., Wippich, P., Leistner, S., Huse, K., 1998. Salt-independent binding of antibodies from human serum to thiophilic heterocyclic ligands. J. Chromatogr. B 709, 189–196.

Shepard, S.C., Boucher, R., Johnston, J., Boerner, R., Koch, G., Madsen, J.W., Grella, D., Sim, B.K.L., Schrimsher, J.L., 2000. Large-scale purification of recombinant human angiostation. Protein Expr. Purif. 20, 216–227.

Srisomsap, C., Svasti, J., Surarit, R., Champattanachai, V., Sawangareetrakul, P., Boonpuan, K., Subhasitanont, P., Chokchaichamnankit, D., 1996. Isolation and characterization of an enzyme with β-glucosidase and β-fucosidase activities from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre. J. Biochem. 119, 585–590.

Surarit, R., Svasti, J., Srisomsap, C., Suginta, W., Khunyoshyeng, S., Nilwarangkoon, S., Harnsakul, P., Benjavongkulchai, E., 1995. Screening of glycohydrolase enzymes in Thai plant seeds for

potential use in oligosaccharide synthesis. J. Sci. Soc. Thailand 21, 293–303.

Tong, X.D., Sun, Y., 2001. Nd-Fe-B alloy-densified agarose gel for expanded bed adsorption of proteins. J. Chromatogr. A 943, 63–75.

Thömmes, J., Halfar, M., Gieren, H., Curvers, S., Takors, R., 2001. Human Chymotrypsinogen B production form *Pichia pastoris* by integrated development of fermentation and downstream processing. Part 2. Protein recovery. Biotechnol. Prog. 17, 503–512.

Trinh, L., Noronha, S.B., Fannon, M., Shiloach, J., 2000. Recovery of mouse endostatin produced by *Pichia pastoris* using expanded bed adsorption. Bioseparation 9, 223–230.

Wegner, G., 1990. Emerging application of methelotrophic yeast. FEMS Microbiol. Rev. 87, 279–284.

ประวัตินักวิจัย

<u>ประวัติหัวหน้าโครงการ</u>

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาง มารินา เคตุทัต-คาร์นส์

(ภาษาอังกฤษ) Mrs. Mariena Ketudat-Cairns

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 1014 01120 08 7

รหัสประจำตัวนักวิจัย 38 40 0999

1. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยศาสตราจารย์

2. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ (044) 224355 โทรสาร (044) 224150

e-mail: ketudat@sut.ac.th

3. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2531 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (ชีววิทยา)

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

พ.ศ. 2538 Ph.D. (Biology)

University of California, San Diego, USA

4. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Molecular Biology
- Genetic Engineering
- Recombinant Protein Production
- Bioinformatics

5. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

7.1 **ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย** : ไม่มี, ผู้ประสานงานชุดโครงการวิจัยโปรตีนแห่งมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

7.2 **หัวหน้าโครงการวิจัย** : มีชื่อโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- Production of Tilapia Transglutaminase
- Expression and Production of β-glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*
- Purification of the Enzyme Taq DNA polymerase

- Tilapia Sex Chromosome Identification Using DNA probe
- Molecular Identification of *Dendrocalamus asper* from SUT farm
- Genetic, Morphology, and Behavior Characterization in Thai Native Fowl

7.3 **ผู้ร่วมวิจัยในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้**

- Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque (NIH, USA) แล้วเสร็จ 2537
- Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses แล้วเสร็จ 2545
- Investigation of Rice Beta-Glycosidase Gene Functions. (National Science and Technology Development Agency National Center for Genetic Engineering and Biotechnology)

7.4 **งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว** :

- Functional Analysis of the Maize bZIP Protein Opaque-2 (NIH, USA), แล้วเสร็จ 2537
- Purification of the Enzyme Taq DNA polymerase, แล้วเสร็จ 2541
- Tilapia Sex Chromosome Identification Using DNA probe, แล้วเสร็จ 2543
- Clonal Selection of Sweet Bamboo for Commercial and Industrial Uses, แล้วเสร็จ 2545
- Molecular Identification of *Dendrocalamus asper* from SUT farm, แล้วเสร็จ 2546
- Genetic, Morphology, and Behavior Characterization in Thai Native Fowl, แล้วเสร็จ 2547
- Expression and Production of β-glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris* **รายงานฉบับนี้**

7.5 **งานวิจัยที่กำลังทำ** :

- Search for new Glycosyl hydrolases and theirs expression in KDML Rice

  สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2548 และได้ดำเนินการไปแล้ว 20%
- Development of biological probes to assure traceability of tilapia from the North East of Thailand

  สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2548 และได้ดำเนินการไปแล้ว 5%
- Enterokinase cloning and production

  สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2549 และได้ดำเนินการไปแล้ว 20%
- Production of Tilapia Transglutaminase

  สถานภาพในการทำวิจัย : เริ่มโครงการในปีงบประมาณ 2546 และได้ดำเนินการไปแล้ว 60 %

ประวัติผู้ร่วมวิจัยที่ 1

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย เทพปัญญา เจริญรัตน์

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Theppanya Charoenrat

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 3 2004 00047 62 7

3. ตำแหน่งปัจจุบัน : ผู้ช่วยวิจัย

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

เลขที่ 111 ถ. มหาวิทยาลัย ต. สุรนารี อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000

โทรศัพท์ (044) 224355 โทรสาร (044) 224150

e-mail: thep_1@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2542 วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2545 วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ม. เกษตรศาสตร์

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Bioprocess/Biochemical Engineering
- Fermentation Process
- Recombinant Protein Production and Purification

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

7.1 **ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย** : -

7.2 **หัวหน้าโครงการวิจัย** : -

7.3 **ผู้ร่วมวิจัย** : ในโครงการวิจัย ดังต่อไปนี้

- Modeling and Control of Pichia Processes for Recombinant Protein Production, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden, 2003-2004
- *Pichia* Processes Technique for Production of Tree Derived Enzymes, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden ,2004-2006
- Expression and Production of β-glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*

รายงานฉบับนี้

7.4 **งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว** :

- Modeling and Control of *Pichia* Processes for Recombinant Protein Production, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden, แล้วเสร็จ 2547
- Expression and Production of β-glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris* รายงานฉบับนี้

7.5 **งานวิจัยที่กำลังทำ** :

- *Pichia* Processes Technique for Production of Tree Derived Enzymes, Royal Institute of Technology (KTH), Stockholm, Sweden ,2004-2006

ประวัติผู้ร่วมวิจัยที่ 2

1. ชื่อ (ภาษาไทย) นาย เศกสิทธิ์ ชำนาญศิลป์

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Sakesit Chumnarnsilpa

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน 5 4099 99040 00 1

3. ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้ช่วยวิจัย

4. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

Institute of Molecular and Cell Biology (IMCB)

61 Biopolis Drive, Proteos, Singapore 138673

โทรศัพท์ (65) 6586 9830 โทรสาร (65) 6779 1117

e-mail: sakesit@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2532 วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

พ.ศ. 2543 วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

พ.ศ. 2547 Master of Science (Medical Science)
Uppsala University, Uppsala, Sweden

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา) ระบุสาขาวิชาการ

- Molecular Biology
- Genetic Engineering
- Recombinant Protein Production
- Bioinformatics
- Protein Crystallization
- Protein X-ray Chystallography

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ : ระบุสถานภาพในการทำการวิจัยว่าเป็นผู้อำนวยการแผนงานวิจัย หัวหน้าโครงการวิจัย หรือผู้ร่วมวิจัยในแต่ละข้อเสนอโครงการวิจัย เป็นต้น

7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย : -

7.2 ผู้ร่วมวิจัย ในโครงการวิจัย :

- Expression of β-glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*
- Protein X-ray Crystallography of Actin Binding Protein (IMCB, Singapore)
- Expression and Production of β-glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*

รายงานฉบับนี้

7.3 **งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว** :

- Expression and Production of β-glucosidase from Thai Plants in *Pichia pastoris*

  รายงานฉบับนี้

7.4 **งานวิจัยที่กำลังทำ** :

- Protein X-ray Crystallography of Actin Binding Protein (IMCB, Singapore)

  สถานภาพในการทำวิจัย : ได้ทำแล้วเสร็จไปแล้ว 20 %