



วิทยานิพนธ์

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์
เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ โดยวิธีทาгуชิ

OPTIMIZATION OF RECOMBINANT MUTANT BETA-
GLUCOSIDASE PRODUCTION BY TAGUCHI APPROACH

นางสาวณฐิดา อารีย์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พ.ศ. ๒๕๕๑



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์โดยวิธีทาคุชิ

Optimization of Recombinant Mutant Beta-glucosidase Production by Taguchi Approach

นามผู้วิจัย นางสาวณธิดา อารีย์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข กระจุกสุขสถิตย์, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์สาโรจน์ ศิริสัมพันธ์กุล, Dr.rer.nat.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์วิรัตน์ วาณิชศรีรัตน, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อรุณี อิงคากุล, Ph.D.)

กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประทุมพร คงเสรี, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ, D.Sc.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ โดยวิธีทาคุชิ

Optimization of Recombinant Mutant Beta-glucosidase Production by Taguchi Approach

โดย

นางสาวณริดา อารีย์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2551

ณธิดา อารีย์ 2551: การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดส กลายพันธุ์ โดยวิธีทางสถิติประยุกต์ (เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข กระกูลสุขสถิตย์, Ph.D. 150 หน้า

การศึกษาผลของเมทานอลต่อการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนต์ *Pichia pastoris* เพื่อการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส กลายพันธุ์ (A454N) พบลักษณะการยับยั้งการเจริญเติบโตแบบสับสเทรตความเข้มข้นสูงที่ความเข้มข้นของเมทานอลมากกว่า 5 กรัม/ลิตร ดังนั้นจึงเลือกเมทานอลความเข้มข้น 4 กรัม/ลิตร เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาลำดับต่อไป

การออกแบบการทดลองด้วยวิธีทางสถิติศึกษา 3 ปัจจัย คือ ค่าออกซิเจนละลาย ค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิ จำนวน 2 ระดับ แบบ $L_4(2^3)$ Orthogonal Array พบว่าสภาวะที่ให้กิจกรรมเอนไซม์และอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์สูงสุด (Q_p) คือ ค่าออกซิเจนละลาย 50 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 28 องศาเซลเซียส ขณะที่สภาวะที่ให้ค่าผลได้ของผลิตภัณฑ์ต่อเมทานอลสูงสุด ($Y_{p/m}$) คือ ค่าออกซิเจนละลาย 25 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรดด่าง 5.5 และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 28 องศาเซลเซียส และพบว่าค่าความเป็นกรดด่างมีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร และค่าผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอลมากที่สุด ส่วนผลของออกซิเจนละลายพบว่าไม่มีอิทธิพลมากกว่าอุณหภูมิต่อกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสและอัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร ขณะที่อุณหภูมิกลับมีอิทธิพลมากกว่าค่าออกซิเจนละลายต่อค่าผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล

การศึกษาวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันไดโดยพิจารณาถึงปริมาณของเซลล์ในขณะที่ทำการหมักภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทางสถิติ พบว่าสามารถให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุด อัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตรและค่าผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล เท่ากับ 2,681 หน่วย/ลิตร 36 หน่วย/ลิตร. ชั่วโมง และ 6 หน่วย/ลิตร.กรัม ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบคงที่ ณ เวลาการหมักที่เท่ากันพบว่า กิจกรรมเอนไซม์สูงสุด อัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร ค่าผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล และอัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะสูงขึ้น 7 เท่า 7 เท่า 3 เท่า และ 3 เท่า ตามลำดับ ดังนั้นวิธีทางสถิติจึงเป็นวิธีการออกแบบการทดลองที่มีประสิทธิภาพเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและเมื่อพัฒนาวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได พบว่าสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส กลายพันธุ์ (A454N) ให้ดียิ่งขึ้น

Nathida Ari 2008: Optimization of Recombinant Mutant Beta-glucosidase Production by Taguchi Approach. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Pramuk Parakulsuksatid, Ph.D. 150 pages.

The cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for mutant (A454N) β -glucosidase expression using a shaking flask was inhibited by high methanol concentration (5 g/l) known as substrate inhibition. The maximum methanol concentration was 4 g/l for further study.

The optimization of conditions to produce recombinant β -glucosidase was investigated in a fermentor and by the Taguchi approach. Dissolved oxygen, pH and temperature were optimized in 2 levels using $L_4 (2^3)$ Orthogonal Array. The results were shown that the condition of 50 % dissolved oxygen, pH 5.5 and 28 °C was the optimum condition for maximum enzyme activity and enzyme productivity (Q_p), whereas the condition of 25 % dissolve oxygen, pH 5.5 and 28 °C was the optimum condition for yield coefficient of product from methanol ($Y_{p/m}$). The study was also indicated that pH was a leading factor in maximizing β -glucosidase activity, enzyme productivity and yield, while dissolved oxygen had higher effect than temperature to maximize β -glucosidase activity and β -glucosidase productivity. Temperature had more effect than dissolved oxygen when optimizing yield.

The study of methanol feeding strategy using stepped intermittent pattern under the optimum condition from the Taguchi approach was shown that the maximum β -glucosidase activity, β -glucosidase productivity and yield coefficient of product from methanol were 2,681 U/l 36 U/l.h and 6 U/l.g, respectively. By comparison to the constant intermittent pattern at the same cultivation time, the stepped intermittent pattern had higher β -glucosidase activity, β -glucosidase productivity, yield and specific productivity by 7, 7, 3 and 3 fold, respectively. Therefore, the Taguchi approach is an effective experimental design for optimization including use of the stepped intermittent feeding strategy which further improves mutant β -glucosidase production.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประมุข ภาระกุล สุขสถิตย์ รองศาสตราจารย์ ดร. ศาโรจน์ ศิริสันตนิยกุล และ รองศาสตราจารย์ ดร. วิรัตน์ วาณิชศรีรัตนกร กรรมการที่ปรึกษา ที่ได้สละเวลาช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ประชุมพร คงเสรี กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ ที่กรุณาอนุเคราะห์เชื้อยีสต์ *Pichia pastoris* เพื่อการศึกษาวิจัย รวมถึงให้คำปรึกษาเพิ่มเติมและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้อง กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรุณี อิงคากุล กรรมการที่ปรึกษาวิชาการ ที่กรุณาให้คำแนะนำด้วยความเมตตาตลอดมา และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ กราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. วรณวิบูลย์ กาญจนกุญชร ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตรที่อนุเคราะห์ให้ใช้เครื่อง HPLC และ GC เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณกลีเซอรอลและเมทานอล ตามลำดับ วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดีโดยทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ 2549 ขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่สาว พี่ชาย ที่คอยให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจเสมอมา ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ ทุกคนในภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำหรับกำลังใจและความช่วยเหลือ รวมถึงขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ห้องธุรการ ที่อำนวยความสะดวกในการติดต่อประสานงานต่าง ๆ

ประโยชน์และคุณความดีที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ คณาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ตลอดจนคุณธรรมและจริยธรรมให้แก่ข้าพเจ้า ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

ณิศา อารีย์

เมษายน 2551

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	29
อุปกรณ์	29
วิธีการ	31
ผลและวิจารณ์	40
สรุปและข้อเสนอแนะ	69
สรุป	69
ข้อเสนอแนะ	70
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	71
ภาคผนวก	85
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	86
ภาคผนวก ข วิธีการวิเคราะห์	90
ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง	101
ภาคผนวก ง การคำนวณค่าพารามิเตอร์	144
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	150

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จำนวนการทดลองโดยวิธีทากูชิในสภาวะการทดลองต่าง ๆ	26
2	ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่กำหนดในการทดลอง	32
3	แผนการทดลอง $L_4 (2^3)$ Orthogonal Array	33
4	แผนการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได ชั่วโมงที่ 21 ถึง 72	36
5	แผนการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได ชั่วโมงที่ 72 ถึง 96	37
6	ผลของเมทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของเชื้อ <i>P. pastoris</i>	42
7	ผลของเมทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ <i>P. pastoris</i>	43
8	ผลของเมทานอลต่อกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสภายหลังการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่าง ๆ	44
9	ค่ากิจกรรมเอนไซม์ อัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล จากการเพาะเลี้ยงที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ	45
10	ค่าอัตราส่วน S/N ของกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล	50
11	อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล	51
12	สภาวะที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุดและอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรสูงสุด (สภาวะ A)	53
13	สภาวะที่ให้ค่าผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอลสูงสุด (สภาวะ B)	53
14	ค่าอัตราส่วน S/N ของกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล (พิจารณาระยะเวลาอินดักชัน 42 ชั่วโมง)	58

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
15	อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส	59
16	สถานะที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุดและ อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรสูงสุด (สถานะ C)	61
17	สถานะที่ให้ค่าผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอลสูงสุด (สถานะ D)	61
18	การเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุด อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร (Q_p) และ ผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล ($Y_{p/m}$) ที่ได้จากการประมาณ ค่าและจากการยืนยันผลการทดลองในการผลิตเอนไซม์เบต้า- กลูโคซิเดสด้วยสถานะที่เหมาะสมโดยวิธีทากูชิ	61
19	ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>P. pastoris</i> โดยวิธีการเติม เมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันไดภายใต้สถานะที่เหมาะสมจากวิธีทากูชิ ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง	66
20	ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง <i>P. pastoris</i> โดยวิธีการเติมเมทานอล เป็นระยะแบบคงที่และเติมเป็นระยะแบบขั้นบันได ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง	67
ตารางผนวกที่		
ข1	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน pNP	93
ข2	การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลีเซอรอล	96
ข3	การเตรียมสารละลายมาตรฐานเมทานอล	98
ข4	ค่าการถ่ายภาพมาตรฐานป้อนสำหรับการเติมเมทานอล	99
ค1	สรุปค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการทดลองหาสถานะที่เหมาะสม โดยวิธีทากูชิ พิจารณาระยะอินดัคชันที่ 51 ชั่วโมง	110

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค2 สรุปค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสม โดยวิธีทาคุชิ พิจารณาระยะอินคักชันที่ 42 ชั่วโมง	110
ค3 ค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง <i>P. pastoris</i> ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ภายใต้สภาวะ T1	111
ค4 ค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง <i>P. pastoris</i> ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ภายใต้สภาวะ T2	116
ค5 ค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง <i>P. pastoris</i> ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ภายใต้สภาวะ T3	121
ค6 ค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง <i>P. pastoris</i> ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ภายใต้สภาวะ T4	125
ค7 ผลยืนยันการเพาะเลี้ยง <i>P. pastoris</i> ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทาคุชิ	130
ค8 ค่าที่ได้จากวิธีการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดส ด้วยการเติม เมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทาคุชิ	134
ค9 ปริมาณเมทานอลที่เติมและการควบคุมปั๊มในการเติมเมทานอลเป็นระยะ แบบขั้นบันได	143

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	คัดโคชินินเบต้า-กลูโคไซด์ สับสเตรคธรรมชาติของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูน	7
2	โครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูน	7
3	การเร่งปฏิกิริยาของการสลายและปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส	8
4	วิธีดิสซิมิเลชันของเมทานอลเมแทบอลิซึมโดยเมทิลโลโทรฟิเคียสต์	11
5	วิธีแอสซิมิเลชันของเมทานอลเมแทบอลิซึมโดยเมทิลโลโทรฟิเคียสต์	12
6	กระบวนการใช้กลีเซอรอลใน <i>P. pastoris</i>	14
7	ลักษณะของเชื้อ <i>P. pastoris</i>	16
8	การทดแทนยีนที่สนใจจากเวกเตอร์เข้าสู่โครโมโซมของ <i>P. pastoris</i> ในตำแหน่งโปรโมเตอร์ <i>AOXI</i>	16
9	แบบแผนการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได	37
10	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์กับความเข้มข้นของเมทานอล	40
11	ผลการเพาะเลี้ยง <i>P. pastoris</i> ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส กลายพันธุ์ (A454N) ในสภาวะการทดลองที่ T1	46
12	ผลการเพาะเลี้ยง <i>P. pastoris</i> ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส กลายพันธุ์ (A454N) ในสภาวะการทดลองที่ T2	46
13	ผลการเพาะเลี้ยง <i>P. pastoris</i> ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส กลายพันธุ์ (A454N) ในสภาวะการทดลองที่ T3	47
14	ผลการเพาะเลี้ยง <i>P. pastoris</i> ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส กลายพันธุ์ (A454N) ในสภาวะการทดลองที่ T4	47
15	ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์	52
16	ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่ออัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร	52
17	ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อค่าผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล	52

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18 ผลการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนต์ <i>P. pastoris</i> ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทาคุชิ	54
19 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์	60
20 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่ออัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร	60
21 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อค่าผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล	60
22 ผลการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนต์ <i>P. pastoris</i> โดยวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันไดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทาคุชิ	65
ภาพผนวกที่	
ข1 กราฟมาตรฐานสารละลาย pNP	94
ข2 กราฟมาตรฐานสารละลายกลีเซอรอล	96
ข3 กราฟมาตรฐานสารละลายเมทานอล	98
ข4 กราฟมาตรฐานปฏิกิริยาสำหรับการเติมเมทานอล	100
ค1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรกับค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (จากการทดลองยืนยันสภาวะที่เหมาะสม)	102
ค2 กราฟควบคุมกระบวนการหมักในสภาวะการทดลอง T1	103
ค3 กราฟควบคุมกระบวนการหมักในสภาวะการทดลอง T2	104
ค4 กราฟควบคุมกระบวนการหมักในสภาวะการทดลอง T2 ซ้ำ	105
ค5 กราฟควบคุมกระบวนการหมักในสภาวะการทดลอง T3	106
ค6 กราฟควบคุมกระบวนการหมักในสภาวะการทดลอง T4	107
ค7 กราฟควบคุมกระบวนการหมักในการทดลองยืนยันสภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทาคุชิ	108
ค8 กราฟควบคุมกระบวนการหมักโดยวิธีเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันไดภายใต้สภาวะที่เหมาะสม	109

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

μ_g	=	อัตราการเจริญจำเพาะต่อกลีเซอรอล (ต่อชั่วโมง)
μ_m	=	อัตราการเจริญจำเพาะต่อเมทานอล (ต่อชั่วโมง)
$Y_{X/g}$	=	ผลได้ของเซลล์ต่อกลีเซอรอล (กรัมเซลล์/กรัมกลีเซอรอล)
$Y_{X/m}$	=	ผลได้ของเซลล์ต่อเมทานอล (กรัมเซลล์/กรัมเมทานอล)
$Y_{P/m}$	=	ผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล (ยูนิต/ลิตร.กรัม)
q_g	=	อัตราการใช้กลีเซอรอลจำเพาะ (กรัม/กรัม.ชั่วโมง)
q_m	=	อัตราการใช้เมทานอลจำเพาะ (กรัม/กรัม.ชั่วโมง)
q_p	=	อัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะ (ยูนิต/ลิตร.กรัม.ชั่วโมง)
Q_p	=	อัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร (ยูนิต/ลิตร.ชั่วโมง)
S_g	=	ปริมาณของกลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)
S_m	=	ปริมาณของเมทานอล (กรัม)
X	=	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร), (กรัม)
$\overline{X}$	=	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัม/ลิตร) (กรัม)
P	=	กิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตขึ้น (ยูนิต/ลิตร) (ยูนิต)
DCW	=	น้ำหนักเซลล์แห้ง
DO	=	ค่าออกซิเจนละลาย (Dissolve Oxygen)
pNP	=	พาราไนโตรฟินอล
pNP-Glu	=	พาราไนโตรฟินิล-เบต้า-ดี-กลูโคไพราโนไซด์
V	=	ปริมาตรน้ำหมัก (ลิตร)
t	=	เวลา (ชั่วโมง)
y	=	ค่าจากการทดลอง
N	=	จำนวนการทดลอง
MSD	=	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Mean Squared Deviation)
$\overline{T}$	=	ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองทั้งหมด
Y_{exp}	=	ค่าผลการทดลองที่คาดไว้ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม
K_i	=	ค่าคงที่ของการยับยั้ง (กรัม/ลิตร)
K_La	=	สัมประสิทธิ์การถ่ายเทออกซิเจนเชิงปริมาตร (ต่อชั่วโมง)

การหาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืช โดยวิธีทาคุชิ

Optimization of Recombinant Mutant Beta-glucosidase Production by Taguchi Approach

คำนำ

ไกลโคซิเดส เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เร่งกระบวนการไฮโดรไลซิสในการย่อยสลาย
พันธะไกลโคซิดิกของคาร์โบไฮเดรตให้ได้เป็น มอนแซ็กคาไรด์ และออลิโกแซ็กคาไรด์และยัง
สามารถเกิดปฏิกิริยาซ้อนการสลายหรือรีเวอร์สไฮโดรไลซิสเพื่อสังเคราะห์ไดแซ็กคาไรด์
ไตรแซ็กคาไรด์หรือออลิโกแซ็กคาไรด์ในสถานะที่เหมาะสมได้ นอกจากนี้ยังมีสมบัติในการเร่ง
ปฏิกิริยาทรานสกลูโคซิเลชันหรือปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส ส่งผลให้เกิดการสังเคราะห์กลูโคไซด์
ชนิดใหม่ ๆ ขึ้น เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางทั้งในยูคาริโอตและโปรคาริ
โอต ซึ่งนอกจากบทบาทที่สำคัญทางชีววิทยาแล้ว เอนไซม์ชนิดนี้ยังมีประสิทธิภาพในการนำไป
ประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่าง ๆ ได้อย่างกว้างขวาง เช่น อุตสาหกรรมเชื้อเพลิง อุตสาหกรรม
อาหารและการแพทย์

งานวิจัยการพัฒนาและประยุกต์ใช้เอนไซม์ไกลโคซิเดสจากพืชในประเทศไทยของ
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ได้พบเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในปริมาณสูงจากพืชตระกูล
Dalbergia โดยเฉพาะจากเมล็ดพะยูง (Surarit, *et al.*, 1995; Svasti, *et al.*, 1996) จึงทำให้เอนไซม์นี้
ได้รับความสนใจในการศึกษา โดยในการสกัดและเตรียมเอนไซม์ให้บริสุทธิ์พบว่าได้เอนไซม์ 1
มิลลิกรัมจากเมล็ด 10 กรัม แต่มีขั้นตอนในการทำให้บริสุทธิ์ยุ่งยากหลายขั้นตอนและได้เอนไซม์
ปริมาณน้อย จึงมีแนวคิดใช้เทคนิคทางพันธุวิศวกรรมในการตัดต่อและเปลี่ยนแปลงลักษณะของ
ยีนการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืช เข้าสู่ *Pichia pastoris* ด้วยข้อดีคือการใช้ยีสต์เป็น
เซลล์เจ้าบ้านสำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีนจากพืช จะสามารถเกิดกระบวนการ
ไกลโคซิเลชันได้ นอกจากนี้ยังสามารถเพาะเลี้ยงเชื้อในถังหมักซึ่งสามารถควบคุมสภาวะต่าง ๆ ใน
การผลิตเอนไซม์ได้ง่ายและสามารถพัฒนากระบวนการหมักให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

จากการศึกษาสมบัติที่แตกต่างกันของปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสระหว่างเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากต้นพะยูนกับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากต้นมันสำปะหลัง กล่าวคือเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากต้นพะยูนไม่สามารถใช้แอลกอฮอล์ดีคิโมมิเป็นตัวรับกลูโคสได้เหมือนเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากต้นมันสำปะหลัง ดังนั้นจึงได้ศึกษาหาตำแหน่งกรดอะมิโนที่มีความสำคัญต่อปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคส โดยทำการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนตำแหน่งอะไกลโคนของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากต้นพะยูน ที่ตำแหน่ง 454 จากอะลานีนเป็นแอสพาราจิน เพื่อเลียนแบบกรดอะมิโนของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากมันสำปะหลัง ซึ่งผลการศึกษาพบว่า การเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนที่ตำแหน่งดังกล่าวไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงกระบวนการย้ายกลูโคสของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากต้นพะยูนแต่อย่างใด แต่ความสามารถในการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกยังคงอยู่ (เพ็ญพร, 2549)

ดังนั้นจึงเกิดความสนใจในการนำรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* มาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ A454N โดยศึกษาผลของเมทานอลต่อการเจริญของเซลล์ และการผลิตเอนไซม์ในระดับฟลasks นอกจากเมทานอลเป็นปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนการผลิตโปรตีนแต่ก็สามารถเกิดภาวะเป็นพิษต่อเซลล์ได้เมื่ออยู่ในเมทานอลความเข้มข้นสูง ดังนั้นจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึง นอกจากนี้การศึกษาค้นคว้าของปัจจัยอื่น ๆ ต่อกระบวนการผลิตเอนไซม์ เช่น ค่าออกซิเจนละลาย ค่าความเป็นกรดด่าง และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง โดยทำการทดลองในระดับถังหมัก เนื่องจากสามารถควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงได้ง่าย การหาสภาวะที่เหมาะสมของแต่ละปัจจัยต้องพิจารณาในแง่ของระยะเวลาในการทดลอง ดังนั้นการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูชิ (Roy, 2001) ซึ่งเป็นวิธีการที่ช่วยลดจำนวนครั้งในการทดลองได้อย่างมาก และสามารถหาปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อผลิตภัณฑ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงได้ถูกนำมาใช้ด้วยข้อดีคือ มีวิธีการคำนวณที่ไม่ยุ่งยาก สามารถใช้หน่วยการทดลองน้อยกว่าเมื่อเทียบกับการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล ดังนั้นจึงช่วยประหยัดแรงงานตลอดจนอุปกรณ์และสารเคมี ซึ่งมีผลโดยตรงต่อต้นทุนการผลิต

นอกจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสแล้ว การพัฒนาวิธีการผลิตเอนไซม์เป็นสิ่งสำคัญเนื่องจากการเพาะเลี้ยงเชื้อรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ต้องอาศัยเมทานอลเป็นตัวชักนำให้ผลิตรีคอมบิแนนต์เอนไซม์ขึ้น ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคการเติมเมทานอลแบบใหม่เพื่อให้เซลล์มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสได้สูงสุด จึงเป็นประโยชน์อย่างมากในการขยายขนาดการผลิตเพื่อนำเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสไปประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของเมทานอลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดส กลายพันธุ์ (A454N) จากเชื้อ *Pichia pastoris* ในระดับฟลasks
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pichia pastoris* เพื่อผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ โดยวิธีทาคุชิ (Taguchi approach)
3. ศึกษาวิธีการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ด้วยการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทาคุชิ

การตรวจเอกสาร

1. เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

1.1 ลักษณะทั่วไปของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (β -D-glucoside glucosylhydrolases; EC 3.2.1.21) เป็นเอนไซม์ที่อยู่ในกลุ่มไกลโคไฮโดรเลส (glycosylhydrolase; EC 3.2) เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะไกลโคซิดิกของอัลคิลและเอริล-เบต้า-กลูโคไซด์ ไดกลูโคไซด์ หรือ ออลิโกแซ็กคาไรด์ เพื่อปล่อยกลูโคสและอะไกลโคน (Reese, 1977) พบได้ทั่วไปในพืช รา สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและจุลินทรีย์ (Woodward and Wiseman, 1982)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสถูกจัดอยู่ในแฟมิลีที่ 1 ของเอนไซม์ไกลโคซิเดส (Henrissat and Romeus, 1995; Henrissat, 1996) ซึ่งแบ่งตามความคล้ายคลึงของลำดับกรดอะมิโนและความจำเพาะต่อสับสเตรต โดยลักษณะเด่นของเอนไซม์ในแฟมิลี 1 สามารถใช้สับสเตรตที่หลากหลาย ถึงแม้จะมีความคล้ายคลึงกันในลำดับกรดอะมิโนค่อนข้างสูงก็ตาม

1.2 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากจุลินทรีย์

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากจุลินทรีย์ได้รับความสนใจศึกษาอย่างกว้างขวาง เช่น เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากแบคทีเรีย *Agrobacterium fecalis* ซึ่งสามารถสกัดได้ง่าย และจากการศึกษาการแสดงออกของยีนใน *Escherichia coli* (Day and Withers, 1986; Wakarchuk *et al.*, 1986) พบว่าเอนไซม์มีลักษณะเป็นไดเมอร์ ที่ประกอบด้วยมอโนเมอร์ขนาด 50 กิโลดาลตัน และมีความจำเพาะสูงต่อเซลโลไบโอส

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากเชื้อรามีการศึกษาโดยนักวิจัยหลายกลุ่ม โดยเอนไซม์ที่ได้ถูกนำมาใช้ในกระบวนการทางชีวภาพหลากหลาย เช่น การพัฒนาอาหารกลุ่มคาร์โบไฮเดรต การผลิตเชื้อเพลิงจากแอลกอฮอล์และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่ได้จากเซลลูโลส โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตกลูโคสจากการย่อยสลายเซลลูโลสที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมกระดาษ ในปี 1993 Fowler ได้พบกลุ่มเอนไซม์เซลลูเลสที่แยกได้จาก *Trichoderma reesei* ซึ่งประกอบด้วยเอนไซม์ 3 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์เอนโดกลูคาเนส (endoglucanases) เอกโซกลูคาเนส (exoglucanase) และเบต้า-กลูโคซิเดส

ที่ทำงานร่วมกันในการย่อยสลายเซลลูโลสให้เป็นอลิโกแซ็กคาไรด์และกลูโคส ต่อมาได้มีการศึกษาโครงสร้างของเอนไซม์โดยการโคลนยีน *bgl 1* ซึ่งเป็นยีนการสร้างเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จาก *Trichoderma reesei* (Barnett *et al.*, 1991)

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่ได้จากจุลินทรีย์ยังมีการนำมาประยุกต์ใช้ในการพัฒนากลีนรส ในระดับอุตสาหกรรม โดยเอนไซม์นี้มีบทบาทสำคัญในการปลดปล่อยสารประกอบอะโรมาติกจากกลูโคไซด์ ซึ่งมีอยู่ในผลไม้และผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมัก (Gueguen *et al.*, 1997) นอกจากนี้เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่ได้จากจุลินทรีย์ยังนำมาใช้ในการพัฒนารสชาติน้ำส้ม เนื่องจากในน้ำส้มคั้นมีสารประกอบกลูโคซิติกนารินจิน (4',5,7-trihydroxyflavanone-7-rhamnoglucoside) ที่ทำให้เกิดรสขม ซึ่งสามารถถูกไฮโดรไลซ์ด้วยแอลฟา-แรมโนซิเดสและเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (Roitner *et al.*, 1984) เช่นเดียวกับในองุ่น เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสใช้เร่งการสลายพันธะระหว่างสารมอลโทสกับไดกลูโคไซด์ ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มรสชาติให้กับน้ำไวน์

1.3 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

จากการศึกษาเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบว่า สามารถแบ่งเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสออกได้เป็น 2 ชนิดคือไซโทโซลิกและไลโซโซมอลเบต้า-กลูโคซิเดส (Beutler, 1992) โดยไซโทโซลิกเบต้า-กลูโคซิเดสส่วนใหญ่พบในตับ ไต และลำไส้เล็ก (Gopalan *et al.*, 1992) มีบทบาทสำคัญในการล้างพิษจากเบต้า-กลูโคไซด์ในพืช ส่วนไลโซโซมอลเบต้า-กลูโคซิเดส พบได้ในเซลล์และเนื้อเยื่อทั่วร่างกาย โดยจะพบว่าเมื่อร่างกายขาดเอนไซม์ไลโซโซมอลเบต้า-กลูโคซิเดส จะส่งผลให้เกิดโรค Gaucher disease ซึ่งเกิดจากความผิดปกติในระดับยีน ทำให้เอนไซม์ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ

1.4 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืช

เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในพืช มีบทบาทสำคัญในการปกป้องเซลล์จากโรคพืช และสัตว์กินพืช โดยการปลดปล่อยสารพิษ เช่น กรดไฮดรอกซามิก คูมาริน ไทโอไซยานेट เทอร์ปีน และไซยาไนด์ ออกจากกลูโคไซด์ (Fenwick *et al.*, 1983; Hruska, 1988; Niemeyer, 1988; Jones, 1988; Poulton, 1990; Oxtoby *et al.*, 1991) นอกจากนี้ยังมีบทบาทในปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ระหว่างกลูโคไซด์กับฮอร์โมนพืช เช่น จิบเบอเรลลิน ออกซิน กรดแอบไซซิกและไซโทไคนิน (Nowacki and Bandurski, 1980; Schliemann, 1984; Wiese and Grambow, 1986; Brzobohaty *et al.*, 1993)

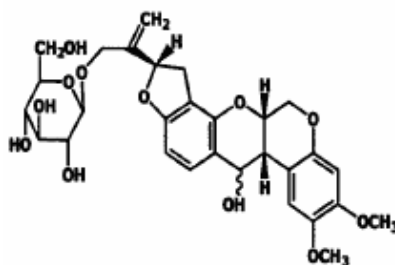
เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างลิกนิน (Dharmawardhana *et al.*, 1995) และการย่อยผนังเซลล์พืชเพื่อการเจริญเติบโต (Simos *et al.*, 1994; Leah *et al.*, 1995)

การศึกษาค้นคว้าความแตกต่างระหว่างเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวและพืชใบเลี้ยงคู่ พบว่าในพืชใบเลี้ยงเดี่ยวตระกูลหญ้า เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ข้าวโอ๊ต จิง คันคราม สามารถแยกเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสได้จากส่วนที่เรียกว่า พลาสติด (Thayer and Conn, 1981; Esen and Stetler, 1993; Inoue *et al.*, 1996) สำหรับผลการศึกษาการแยกเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืชใบเลี้ยงคู่ เช่น ต้นโคลเวอร์ขาว (Kakes, 1985) เซอร์รีดำ (Poulton and Li, 1994) และผักกาดก้านขาว (Thangstad *et al.*, 1991; Hoglund *et al.*, 1992) พบว่าเอนไซม์แยกได้จากส่วนของผนังเซลล์และแวคิวโอล นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืชใบเลี้ยงเดี่ยวไม่เกิดกระบวนการไกลโคซิเลชัน ขณะที่เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืชใบเลี้ยงคู่เป็นไกลโคโปรตีน

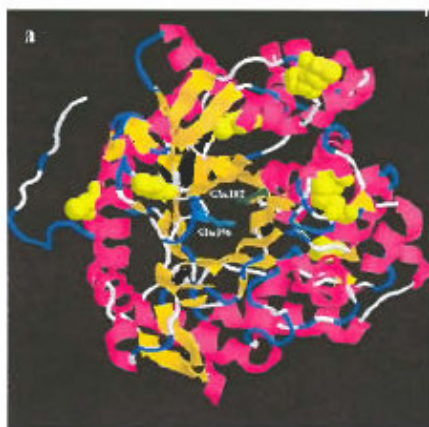
1.5 เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากเมล็ดพะยูน

การตรวจสอบเอนไซม์กลูโคซิเดส 9 ชนิดในพืชกว่า 50 ชนิดในประเทศไทย พบว่าเมล็ดพะยูน (*Dalbergia cochinchinensis* Pierre) หรือ Thai Rosewood มีกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสและเอนไซม์เบต้า-ฟิวโคซิเดสในปริมาณที่สูงมาก (14.4 และ 26.3 หน่วยเอนไซม์ต่อกรัมเมล็ดตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบกับเอนไซม์ไกลโคซิเดสที่พบในเมล็ดพืชหลายชนิด (Srisomsap *et al.*, 1996) ด้วยเหตุนี้จึงนำไปสู่การศึกษาโครงสร้างและสมบัติของเอนไซม์ โดยจากผลการศึกษา cDNA และการวิเคราะห์โครงสร้างปฐมภูมิของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสและเบต้า-ฟิวโคซิเดสที่สกัดได้จากเมล็ดพะยูน พบลำดับกรดอะมิโนที่แสดงว่าเอนไซม์ชนิดนี้อยู่ในตระกูลไกลโคซิลไฮโดรเลส แฟมมิลี่ 1 และเป็นเอนไซม์ที่มีวิวัฒนาการใกล้เคียงกับเอนไซม์จำพวกไซยาโนจินิกเบต้า-กลูโคซิเดสและเบต้า-กลูโคซิเดสชนิดอื่น ๆ (Svasti *et al.*, 1999; Cairns *et al.*, 2000) โดยมีน้ำหนักโมเลกุล 330,000 ดาลตัน ประกอบด้วย 4-6 หน่วยย่อย มีค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมต่อการทำงาน 5.5 (Srisomsap *et al.*, 1996) และพบว่าดัลโคชินินเบต้า-กลูโคไซด์ (dalcochinin 8'-O- β -glucoside) เป็นสับสเตรตตามธรรมชาติของเอนไซม์ (ภาพที่ 1) จึงตั้งชื่อเอนไซม์นี้ว่า dalcochinin 8'-O- β -glucoside β -glucosidase หรือ ดัลโคซินเนส มีผู้วิจัยได้โคลนเพื่อศึกษาโครงสร้างและวิวัฒนาการของเบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูนพบว่า เอนไซม์ประกอบด้วยกรดอะมิโน 547 ตัว แบ่งเป็น โปรเปปไทด์ 23 ตัว และโปรตีน 524 ตัว จึงคาดว่าเอนไซม์นี้น่าจะมีโครงสร้างเป็นแบบ (α/β)₈ barrel (ภาพที่ 2)

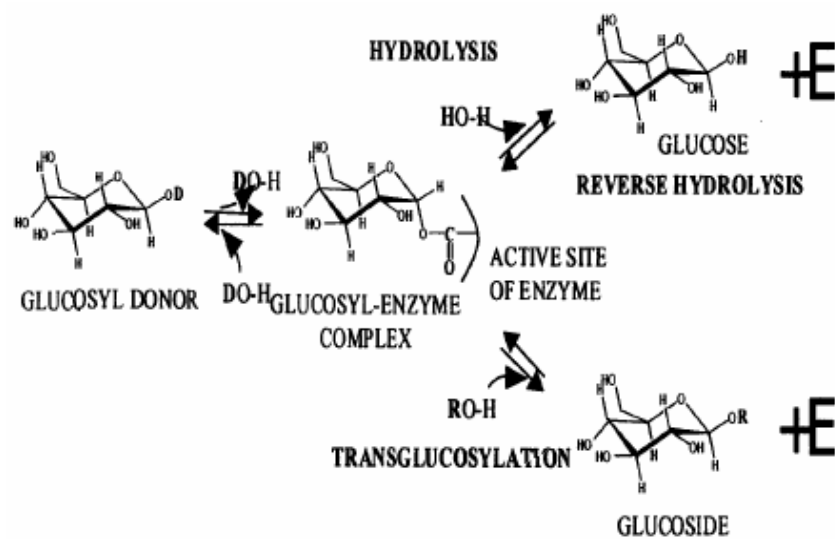
นอกจากสมบัติในการสลายพันธะกลูโคซิดิกแล้ว เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูนยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้อนการสลาย (reverse hydrolysis) ได้ดี (ภาพที่ 3) โดยใช้ 40-70 เปอร์เซ็นต์ (w/w) กลูโคสในการสังเคราะห์ไดแซ็กคาไรด์และไตรแซ็กคาไรด์และสามารถใช้กลูโคสกับฟิวโคสในการสังเคราะห์ ดี-ฟิวโคซิล (เบต้า 1-6)-ดี-กลูโคสได้ดีอีกด้วย (Srisomsap and Subhasitanont, 1999) นอกจากนี้ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสเพื่อสังเคราะห์อัลคิลกลูโคไซด์ (ภาพที่ 3) ซึ่งอัลคิลกลูโคไซด์หลาย ๆ ชนิดมีประโยชน์ที่น่าสนใจ เช่น ช่วยในการทำละลายของเยื่อหุ้มเซลล์ของสิ่งมีชีวิต ใช้เป็นพาหะลำเลียงยา เป็นสับสเตรตในการสังเคราะห์กลิ่นและรส (Hommalai *et al.*, 2005) จากการศึกษาของ Lirdpramongkol and Svasti (2000) พบว่าเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูนสามารถเร่งปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสโดยมีตัวรับเป็นแอลกอฮอล์ปฐมภูมิได้ดีกว่าแอลกอฮอล์ทุติยภูมิ แต่ไม่สามารถรับแอลกอฮอล์ตติยภูมิได้



ภาพที่ 1 คัดโคจีนินเบต้า-กลูโคไซด์ สับสเตรตธรรมชาติของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูน
ที่มา: Svasti *et al.* (2003)



ภาพที่ 2 โครงสร้าง 3 มิติของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูน
ที่มา: Svasti *et al.* (2003)



ภาพที่ 3 การเร่งปฏิกิริยาซ้อนการสลายและปฏิกิริยาย้ายหมู่กลูโคสของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส
ที่มา: Svasti *et al.* (2003)

การแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสใน *Pichia pastoris*

การศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืชพบว่าสามารถแสดงออกได้ในยีสต์ *P. pastoris* เนื่องจากเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพืชเป็นไกลโคโปรตีนที่มีส่วนของคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ ซึ่งการโคลนยีนและแสดงออกในแบคทีเรียจะไม่สามารถเกิดกระบวนการไกลโคซิเลชันได้ และถึงแม้ว่ายีสต์ *P. pastoris* จะมีเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสตามธรรมชาติอยู่ภายในไซโตพลาสซึมแล้วก็ตามแต่มีปริมาณค่อนข้างต่ำ ซึ่งต่างจากเชื้อที่มีการตัดต่อยีนการผลิตเอนไซม์เข้าไปจะเกิดการปลดปล่อยเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสออกนอกเซลล์ในปริมาณสูง

Cairns *et al.* (2000) ได้ศึกษาเปรียบเทียบสมบัติของรีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสที่ได้จากการตัดต่อยีนการสร้างเอนไซม์เข้าสู่ *P. pastoris* กับเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่ได้จากการสกัดจากเมล็ดพะยูน พบว่า ค่า K_m และอัตราส่วนของ V_{max} ต่อสับสเตรตของเอนไซม์ทั้งสองไม่มีความแตกต่างกันแต่ปริมาณของรีคอมบิแนนต์เอนไซม์ที่ผลิตได้ในระดับฟลาสก์ก็ค่อนข้างต่ำคือ 1.6 มิลลิกรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อขั้นต่ำ

2. เมทิลโลโทรฟิเคียส

เมทิลโลโทรฟิเคียส หมายถึง ยีสต์ที่สามารถเจริญเติบโตโดยใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน ซึ่งยีสต์ส่วนใหญ่จะใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานเพื่อการเจริญ จากการศึกษาความสามารถในการเจริญของยีสต์บนอาหารที่มีเมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่ายีสต์ 4 จินัสที่สามารถเจริญเติบโตได้ คือ *Hansenula spp.*, *Pichia spp.*, *Candida spp.* และ *Torulopsis spp.* เมทิลโลโทรฟิเคียสส่วนใหญ่มีการเจริญและเพิ่มจำนวนโดยวิธีแตกหน่อ มีความต้องการวิตามิน ไบโอตินหรือไทอามีนเพื่อการเจริญ (Van Dijken and Harder, 1974)

เมทานอลเป็นสารประกอบคาร์บอนหนึ่งอะตอมที่ได้รับความสนใจอย่างกว้างขวางในการใช้เป็นสับสเตรตสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ เนื่องจากมีราคาถูกและมีสมบัติทางเคมีหลายประการที่เหมาะสมต่อกระบวนการหมัก คือทำให้บริสุทธิ์ได้ง่าย สามารถรวมตัวเข้ากับน้ำได้ดีและในระหว่างการหมักยังเกิดความร้อนปริมาณต่ำอีกด้วย

2.1 เมแทบอลิซึมของเมทานอลในเมทิลโลโทรฟิเคียสต์

นับตั้งแต่มีการแยกเมทิลโลโทรฟิเคียสต์เป็นครั้งแรกในปี 1969 (Ogata *et al.*, 1969) มีการศึกษาเกี่ยวกับเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ทั้งด้านสรีรวิทยาและการนำไปใช้ประโยชน์ ในทศวรรษที่ 1970 วิถีเมแทบอลิซึมของเมทานอลทั้งกระบวนการสร้างและสลายก็ได้รับการศึกษาอย่างละเอียดใน ยีสต์ *H. polymorpha* และ *C. Boidinii* (Anthony, 1982; Veenhuis *et al.*, 1983; Tani *et al.*, 1984; Large and Bamforth, 1988; Murrel and Dalton, 1992) พบว่าเมทิลโลโทรฟิเคียสต์ทุกชนิดมีวิถีการใช้เมทานอลที่เหมือนกัน การเจริญของยีสต์บนเมทานอลมีความสัมพันธ์กับการสร้างเพอร์ออกซิโซมซึ่งเป็น ออร์แกเนลภายในเซลล์ยีสต์ที่ทำหน้าที่จัดเก็บเอนไซม์ที่จำเป็นต่อวิถีการใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อการ เจริญของเซลล์

กระบวนการออกซิเดชันของเมทานอล

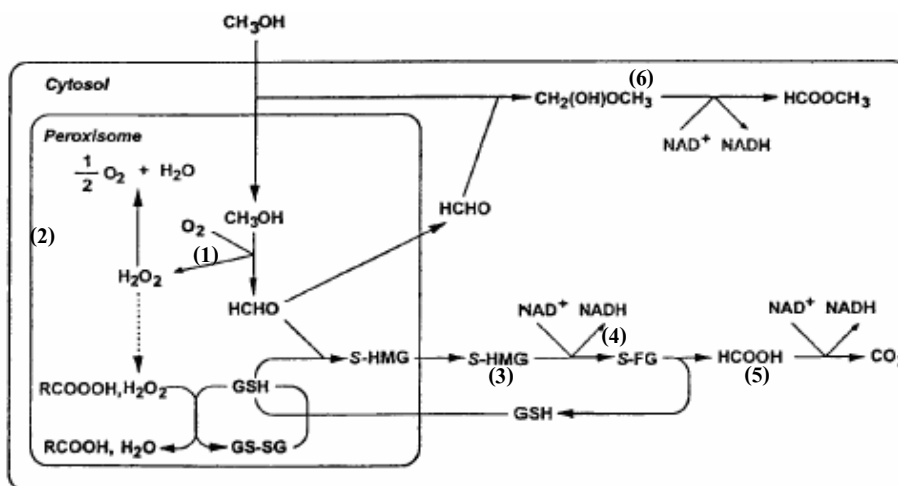
การเปลี่ยนแปลงเมทานอลในยีสต์ (Bruin and Wolf, 2002) เริ่มต้นจากปฏิกิริยา ออกซิเดชันโดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส (AOX) ที่อยู่ในเพอร์ออกซิโซม จะเปลี่ยนเมทานอล ไปเป็นฟอร์มัลดีไฮด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นสารพิษต่อเซลล์ โดยที่ฟอร์มัลดีไฮด์ซึ่งเป็น สารตัวกลางของกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทานอล จะถูกส่งผ่านเยื่อหุ้มเพอร์ออกซิโซมเพื่อ เข้าสู่ทั้งกระบวนการคิตซิมิเลชันและแอสซิมิเลชันในไซโทซอลต่อไป

แอลกอฮอล์ออกซิเดสทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของเมทานอลโดยใช้ออกซิเจน เป็นตัวรับอิเล็กตรอน ผลผลิตที่ได้คือ ฟอร์มัลดีไฮด์ (HCHO) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ตามสมการเคมี



2.2.1 วิถีคัสซิมิเลชันของเมทานอล (Methanol dissimilation pathway)

ในวิถีคัสซิมิเลชันของเมทานอลโดยเชื้อ *P. pastoris* (ภาพที่ 4) ฟอรั่มัลดีไฮด์จะถูกออกซิไดซ์เป็นฟอร์เมตและคาร์บอนไดออกไซด์ โดยมีเอนไซม์ในไซโทพลาสซึมคือ กลูตาไทโอนดีเพนเดนส์ไฮโดรจีเนส (FLD) และฟอร์เมตดีไฮโดรจีเนส (FDH) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาตามลำดับ โดยในขั้นแรก ฟอรั่มัลดีไฮด์จะทำปฏิกิริยากับกลูตาไทโอนในรูปรีดิวซ์ (GSH) ได้เป็น เอส-ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาไทโอน (S-HMG) จากนั้นไฮดรอกซีเมทิลกลูตาไทโอนจะถูกเปลี่ยนไปเป็น เอส-ฟอรั่มิลกลูตาไทโอน (S-FG) โดยเอนไซม์ฟอรั่มิลกลูตาไทโอนไฮโดรเลส ซึ่งฟอรั่มิลกลูตาไทโอนจะถูกสลายไปเป็นกลูตาไทโอนในรูปรีดิวซ์และฟอร์เมต โดยเอนไซม์ฟอรั่มิลกลูตาไทโอนไฮโดรเลส และในที่สุดฟอร์เมตจะถูกออกซิไดซ์ไปเป็นคาร์บอนไดออกไซด์โดยการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ฟอร์เมตดีไฮโดรจีเนส วิธีนี้จะให้พลังงานแก่เซลล์ในรูปของ NADH 2 โมเลกุล



ภาพที่ 4 วิถีคัสซิมิเลชันของเมทานอลเมแทบอลิซึมโดยเมทิลโลโทรฟิซิสต์

เอนไซม์:

- (1) แอลกอฮอล์ออกซิเดส (2) แคลาเลส (3) กลูตาไทโอน-ดีเพนเดนส์ไฮโดรจีเนส
- (4) เอส-ฟอรั่มิลกลูตาไทโอนไฮโดรเลส (5) ฟอรั่มัลดีไฮโดรจีเนส
- (6) เมทิลฟอรั่มัลดีไฮด์ (7) Pmp20

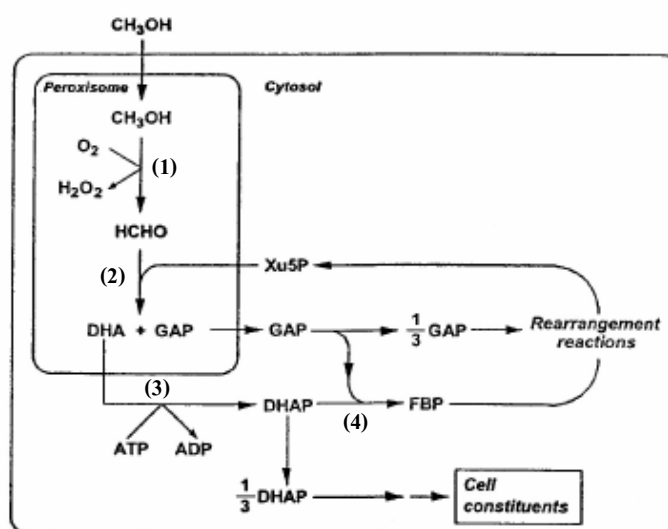
ตัวย่อ: S-HMG เอส-ไฮดรอกซีเมทิลกลูตาไทโอน; S-FG เอส-ฟอรั่มิลกลูตาไทโอน;

GSH รูปรีดิวซ์ของกลูตาไทโอน; GS-SG รูปออกซิไดซ์ของกลูตาไทโอน

ที่มา: Bruin and Wolf (2002)

2.1.2 วิธีเอนไซมิเลชันของเมทานอล (Methanol assimilation pathway)

ในวิธีเอนไซมิเลชันของเชื้อ *P. pastoris* (ภาพที่ 5) เริ่มจากฟอร์มาลดีไฮด์ที่เหลือจากวิถีคีสมิเลชันรวมตัวกับไซลูโลส-5-ฟอสเฟต (Xu5P) ถูกเร่งโดยเอนไซม์ไดไฮดรอกซีแอซิโทนซินเทส (DHAS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในเพอร์ออกซิโซม เกิดเป็น ไดไฮดรอกซีแอซิโทน (DHA) และกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (GAP) ทั้งไดไฮดรอกซีแอซิโทนและกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต จะเข้าสู่กระบวนการเอนไซมิเลชันในไซโทซอลต่อไป ไดไฮดรอกซีแอซิโทนจะเกิดปฏิกิริยาฟอสฟอริเลชันโดยเอนไซม์ไดไฮดรอกซีแอซิโทนไคเนส (DHAK) ได้เป็นไดไฮดรอกซีแอซิโทนฟอสเฟต (DHAP) ซึ่งจะรวมกับกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (GAP) ได้เป็นฟรุคโตส 1, 6-บิสฟอสเฟต (FBP) โดยเอนไซม์ฟรุคโตส 1, 6-บิสฟอสฟาเทส ขณะที่ไซลูโลส-5-ฟอสเฟตเกิดขึ้นจากการเรียงตัวใหม่ในวิถีเพนโทสฟอสเฟต นอกจากนี้พบว่าหนึ่งในสามของโมเลกุลของไดไฮดรอกซีแอซิโทนฟอสเฟต (DHAP) ที่สร้างขึ้น จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการสังเคราะห์กลูโคส



ภาพที่ 5 วิธีเอนไซมิเลชันของเมทานอลเมแทบอลิซึมโดยเมทิลโลโทรฟิกยีสต์
เอนไซม์:

- (1) แอลกอฮอล์ ออกซิเดส (2) ไดไฮดรอกซีแอซิโทนซินเทส
- (3) ไดไฮดรอกซีแอซิโทนไคเนส (4) ฟรุคโตส 1, 6-บิสฟอสฟาเทส

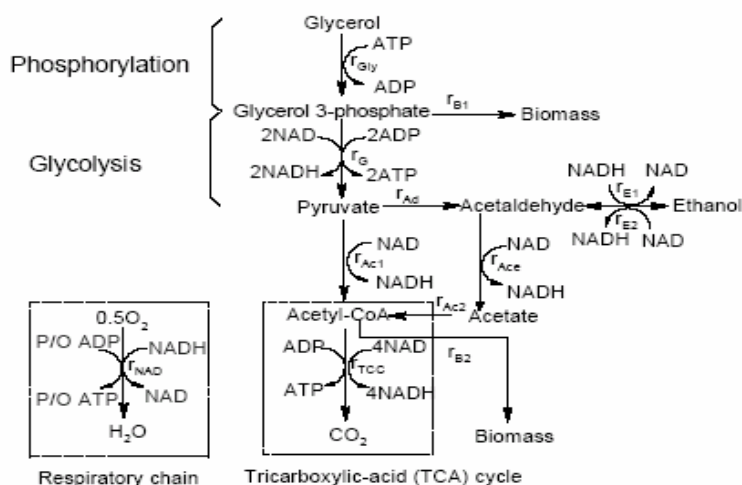
ตัวย่อ: DHA ไดไฮดรอกซีแอซิโทน; GAP กลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต;

DHAP ไดไฮดรอกซีแอซิโทนฟอสเฟต; Xu5P ไซลูโลส-5-ฟอสเฟต

ที่มา: Bruin and Wolf (2002)

2.2 กระบวนการย่อยสลายกลีเซอรอลใน *Pichia pastoris* (Ren *et al.*, 2003)

กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีการใช้อย่างกว้างขวางในการเพาะเลี้ยงเชื้อยีสต์ *P. pastoris* โดยกลไกการใช้กลีเซอรอล เริ่มจากกลีเซอรอลเกิดปฏิกิริยาฟอสโฟริเลชันโดยเอนไซม์ กลีเซอรอลไคเนสไปเป็น กลีเซอรอล-3-ฟอสเฟต (G3P) จากนั้น G3P ถูกออกซิไดซ์โดยเอนไซม์ เอพเอดี-ดีเพนเดนซ์ กลีเซอรอล-3-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส เกิดเป็น ไดไฮดรอกซีแอซีโตนฟอสเฟต (Gancedo *et al.*, 1968; Nevoigt and Stahl, 1997) และเกิดไพรูเวตขึ้นจากปฏิกิริยาไกลโคไลซิส จากนั้นไพรูเวตถูกออกซิไดซ์ต่อไปเป็น แอซีทิล-โคเอ โดยเอนไซม์ไพรูเวตดีไฮโดรจีเนส และเข้าสู่วัฏจักรของกรดไตรคาร์บอกซิลิก (TCA cycle) ที่ซึ่งสารเมแทบอลิต์ต่าง ๆ ถูกผลิตขึ้นสำหรับใช้ในการสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์ เช่น กรดอะมิโน กรดนิวคลีอิก ในขณะที่พลังงานส่วนใหญ่อยู่ในรูป ATP และ NADH (Ratlidge, 2001) ในกรณีที่การย่อยสลายกลีเซอรอลหรือการเจริญเติบโตของเซลล์ถูกจำกัด ไพรูเวตจะถูกเปลี่ยนเป็นแอซีทัลดีไฮด์โดยไพรูเวตดีคาร์บอกซิเลส และแอซีทัลดีไฮด์ถูกออกซิไดซ์ต่อไปโดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนสไปเป็นเอทานอล (Inan and Meagher, 2001) นอกจากนี้เอทานอลยังสามารถเปลี่ยนเป็นสับสเตรตได้เมื่อสภาวะจำกัดการเจริญของเซลล์ถูกขจัดออกไป (Nevoigt and Stahl, 1997; Lei *et al.*, 2001) โดยเอทานอลจะถูกออกซิไดซ์กลับไปเป็นแอซีทัลดีไฮด์โดยเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส จากนั้นเอนไซม์แอซีทัลดีไฮด์ดีไฮโดรจีเนส จะเปลี่ยนแอซีทัลดีไฮด์ให้เป็นแอซีเตตและแอซีเตตจะถูกเอนไซม์แอซีทิล-โคเอซินเทสเปลี่ยนให้เป็นแอซีทิล-โคเอ ต่อไป (Pronk *et al.*, 1996; Vanrolleghem *et al.*, 1996) สรุปกระบวนการใช้กลีเซอรอลดังภาพที่ 6



ภาพที่ 6 กระบวนการใช้กลีเซอรอลใน *P. pastoris*

ที่มา: Ren *et al.* (2003)

3. *Pichai pastoris*

P. pastoris ซึ่งแสดงในภาพที่ 7 เป็นเมทิลโลโทรฟิซิสที่นิยมใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านอย่างกว้างขวางสำหรับการแสดงออกของยีนแปลกปลอม (heterologous gene) เนื่องจากมียีนสำหรับการสร้างแอลกอฮอล์ออกซิเดส (*AOX*) ซึ่งมีความไวต่อการถูกเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล โดยการโคลนยีนที่สนใจเข้าไปในส่วนโครโมโซมของยีสต์แล้วให้แสดงออกภายใต้การทำงานของโปรโมเตอร์ *AOX1* (ภาพที่ 8) โดยการแสดงออกจะอยู่ในระดับการถอดรหัสพันธุกรรม ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกลไกดีเพรสชัน รีดีเพรสชัน และอินดักชัน คือ ในสภาวะที่มีเมทานอล ๆ จะชักนำให้เกิดการแปลรหัสยีน *AOX1* แต่เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะขาดแคลนเมทานอลก็จะไม่เกิดการแปลรหัสของยีน *AOX1* แนวคิดนี้นำไปสู่การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่มีคุณค่าในเชิงพาณิชย์ เช่น เอนไซม์ ฮอร์โมน วัคซีน โปรตีนอาหารเสริม (Kato and Sakai, 1996) จนประสบความสำเร็จในการโคลนโปรตีนกว่า 500 ชนิด

P. pastoris ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน สามารถแบ่งตามลักษณะฟีโนไทป์ได้ 3 สายพันธุ์ ขึ้นกับความสามารถในการใช้เมทานอล คือ สายพันธุ์ Mut^+ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมที่มียีน *AOX1* และ *AOX2* สายพันธุ์ Mut^s มีเพียงยีน *AOX2* จึงเป็นชนิดที่มีการใช้เมทานอลอย่างช้าเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีเมทานอล โดยมีกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดสเพียง 15 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น และสายพันธุ์ Mut^- เป็นสายพันธุ์ที่ยีน *AOX1* และ *AOX2* ไม่แสดงออกเชื้อจึงไม่สามารถใช้เมทานอลได้

3.1 ข้อดีในการเลือก *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน

3.1.1 เนื่องจาก *P. pastoris* เป็นเซลล์ยูคาริโอต ดังนั้นการแสดงออกของโปรตีนต่าง ๆ ภายในเซลล์ สามารถทำได้เช่นเดียวกับสิ่งมีชีวิตชั้นสูง เช่นกระบวนการตัดแปลงโปรตีนหลังจากการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่กระบวนการม้วนพับ การตัดสายโปรตีน การเกิดพันธะไดซัลไฟด์และการเกิดไกลโคซิเลชัน

3.1.2 เมื่อใช้ *P. pastoris* เป็นเซลล์เจ้าบ้านในการโคลนยีน สามารถให้การแสดงออกของโปรตีนในระดับที่สูง ทั้งภายในเซลล์ (intracellular) หรือภายนอกเซลล์ (extracellular) โดยการควบคุมของแอลฟา-แฟกเตอร์ ในการนำโปรตีนออกนอกเซลล์

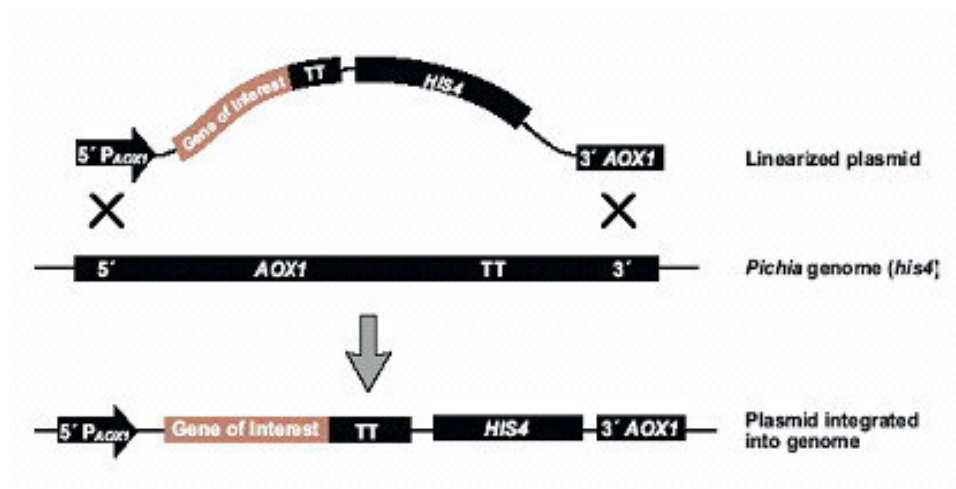
3.1.3 *AOX1* เป็นโปรโมเตอร์ที่แข็งแรงและสามารถควบคุมการสร้างเอนไซม์แอลกอฮอล์ออกซิเดส และโปรตีนที่โคลนเข้าไปได้ง่ายโดยการชักนำด้วยเมทานอล

3.1.4 การเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ต่างจากการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์คือไม่มีปัญหาเกี่ยวกับเอนโดทอกซินที่เกิดจากการปนเปื้อนของแบคทีเรียหรือไวรัสที่มีผลต่อการผลิตโปรตีน



ภาพที่ 7 ลักษณะของเชื้อ *P. pastoris*

ที่มา: Dennis Kunkel Microscopy, Inc.



ภาพที่ 8 การทดแทนยีนที่สนใจจากเวกเตอร์เข้าสู่โครโมโซมของ *P. pastoris* ในตำแหน่งโปรโมเตอร์ *AOX1*

ที่มา: Invitrogen.

3.2 การเพาะเลี้ยงและการผลิตโปรตีนจากรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris*

Boze *et al.* (2001) เพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* สำหรับการผลิต porcine Follicle-Stimulating Hormone (rFSH) โดยการเพาะเลี้ยงแบบ fed-batch และการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องในสภาวะที่มีเซลล์ความหนาแน่นสูง (high cell density) ซึ่งสามารถควบคุมค่าความเป็นกรดต่างและค่าออกซิเจนละลาย พบว่าสามารถผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนได้สูงกว่าเลี้ยงในพลาสติกเขย่าถึง 30 เท่า ดังนั้นการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ที่มุ่งเน้นให้ได้ผลผลิตสูงสามารถกระทำได้ง่ายกว่าในแง่ของการควบคุมสภาวะในระหว่างการเพาะเลี้ยง

กระบวนการที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนในถังหมักของ *P. pastoris* โดยทั่วไป มี 3 ระยะ คือ

3.2.1 Batch phase เป็นระยะการเลี้ยงรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ในระบบการเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ ซึ่งใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตของเชื้อให้ได้เซลล์ปริมาณมาก

3.2.2 Fed-batch transition phase หรือระยะแทรนซิชัน เป็นขั้นตอนของการปรับตัวของเซลล์ในการเปลี่ยนสับสเตรตจากกลีเซอรอลเป็นเมทานอล โดยการเติมกลีเซอรอลความเข้มข้นต่ำสำหรับดีรีเพรสชัน *AOXI* โปรโมเตอร์ในรูปแบบของการเติมแบบคงที่หรือแบบเอกซ์โพเนนเชียล นอกจากนี้ระยะแทรนซิชันยังเป็นขั้นตอนของการกำจัดสารพิษที่เซลล์ผลิตขึ้นในระยะเบ็ดเสร็จ เช่น เอทานอลอีกด้วย

3.2.3 Methanol-fed-batch phase หรือระยะอินดักชัน เป็นระยะที่มีการเติมเมทานอลลงในถังหมักเพื่อชักนำให้โปรโมเตอร์ *AOXI* เกิดการสังเคราะห์รีคอมบิแนนต์โปรตีนขึ้น

3.3 ตัวอย่างเทคนิคในการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris*

Katakura *et al.* (1998) ควบคุมความเข้มข้นของเมทานอลด้วย Semiconductor Gas Sensor เพื่อผลิต Human β -2-Glycoprotein I Domain V จากรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* โดยในขั้นตอนการเพาะเลี้ยงระยะแทรนซิชันได้ออกแบบให้มีการเติมกลีเซอรอลลงในถังหมักในอัตราลดลงขณะเดียวกับเติมเมทานอลในอัตราที่เพิ่มขึ้นก่อนการเพาะเลี้ยงในระยะชักนำด้วยเมทานอล ซึ่ง Zhang *et al.* (2000) พบว่าวิธีนี้ทำให้เซลล์ใช้เวลาเพียง 2 ชั่วโมงในการปรับตัวจากการเพาะเลี้ยงโดยใช้กลีเซอรอลไปเป็นเมทานอล ขณะที่วิธีดั้งเดิมใช้เวลา 4-5 ชั่วโมง (Stratton *et al.*, 1998) นอกจากนี้ Katakura *et al.* (1998) ยังใช้เทคนิคการเติมสับสเตรตผสมระหว่างกลีเซอรอลและเมทานอลในระยะอินดักชันโดยใช้ระบบการเพาะเลี้ยงแบบครั้งคราว ที่มีการควบคุมเมทานอลคงที่เท่ากับ 5.5 กรัม/ลิตร พบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์เพิ่มขึ้น 20 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์จำเพาะเพิ่มขึ้น 2.3 เท่า เมื่อเทียบกับการเติมเมทานอลเพียงอย่างเดียว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติมกลีเซอรอลนอกจากจะเป็นแหล่งพลังงานของเซลล์แล้วยังส่งผลในการเพิ่มอัตราการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนได้อีกด้วย

เทคนิคการเติมกลีเซอรอลถูกนำมาใช้เป็นโค-สับสเตรตสำหรับการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* เพื่อทำให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดีในช่วงการผลิตโปรตีน ส่งผลให้อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์เชิงปริมาณเพิ่มขึ้น แต่อาจจะส่งผลให้อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์จำเพาะลดลงได้ในกรณีที่มิกลีเซอรอลเหลือจนทำให้กีดการทำงานของ AOX1 โปรโมเตอร์ (Xie *et al.*, 2005) ดังนั้นเทคนิคการเติมกลีเซอรอลร่วมกับเมทานอล สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงคือ อัตราส่วนระหว่างความเข้มข้นของกลีเซอรอลและเมทานอลที่เหมาะสม

Zhang *et al.* (2000) ตั้งสมมติฐานว่าการเจริญเติบโตของเซลล์ที่แตกต่างกันส่งผลให้การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนแตกต่างกันในระยะอินดักชัน ดังนั้นจึงออกแบบการเติมเมทานอลแบบเป็นสัดส่วนเพื่อควบคุมให้อัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์คงที่เท่ากับ 0.0297 ต่อชั่วโมง โดยอาศัยการเติมเมทานอลแบบเอกซ์โพเนนเชียล เพื่อจำกัดการเจริญเติบโตและส่งเสริมให้เซลล์ผลิตโปรตีน heavy-chain fragment C of botulinum neurotoxin serotype A (BoNT/A(H_C)) สูงสุด

Minning *et al.* (2001) ศึกษาเทคนิคการเติมเมทานอลเพื่อการผลิตรีคอมบิแนนต์ เอนไซม์ *Rhizopus oryzae* lipase ใน *P. pastoris* สายพันธุ์ (Mut⁺) โดยควบคุมความเข้มข้นของเมทานอลแบบ off-line ตั้งแต่ระยะแทรนซิชันจนถึงชั่วโมงที่ 20-30 ของระยะอินดักชันเทียบกับวิธีการเติมเมทานอลแบบ DO-stat พบว่ากิจกรรมเอนไซม์ไลเปสสูงสุด อัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาณ

และอัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะของการควบคุมเมทานอลแบบ off-line สูงกว่าแบบ DO-stat 11 เท่า 13.6 เท่า และ 10.3 เท่า ตามลำดับ

Toonkool *et al.* (2006) ศึกษาความเข้มข้นของกลีเซอรอล เมทานอล และกรดคาซามิโนที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* สายพันธุ์ GS115 (*his4*) สำหรับการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูนในระดับฟลาสก์ พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้ความเข้มข้นของกลีเซอรอล 0.5 1.0 และ 1.5 เปอร์เซ็นต์ในระยะเวลาเจริญเติบโต ส่งผลต่อความหนาแน่นของเซลล์ไม่แตกต่างกัน แต่ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ในระยะอินดักชันต่างกัน กล่าวคือความเข้มข้นของกลีเซอรอล 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงสุด การศึกษาความเข้มข้นของเมทานอลในระยะอินดักชันพบว่า เมทานอล 0.5 เปอร์เซ็นต์ ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสได้สูงสุด และพบว่า การเติมกรดคาซามิโนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถเพิ่มกิจกรรมเอนไซม์ได้ 3-5 เท่า เมื่อเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่ไม่ได้เติม

ปัญหาที่พบระหว่างการเพาะเลี้ยง เนื่องจากเซลล์ความหนาแน่นสูงทำให้เกิดภาวะจำกัดของออกซิเจน การศึกษาของ Trentmann *et al.* (2005) ได้เปรียบเทียบวิธีการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* 2 วิธีคือ การเพาะเลี้ยงในสภาวะจำกัดเมทานอล (methanol-limited) และสภาวะเมทานอลอิ่มตัว (methanol-saturated) ภายใต้การเพาะเลี้ยงที่มีออกซิเจนจำกัด พบว่าวิธีการเพาะเลี้ยงในสภาวะเมทานอลอิ่มตัวให้อัตราการผลิตรีคอมบิแนนต์ Single Chain Variable Fragment (scFv) สูงกว่าการเพาะเลี้ยงในสภาวะจำกัดเมทานอล แต่การศึกษาของ Trinh *et al.* (2003) พบว่าวิธีทั้งสองให้การผลิตรีคอมบิแนนต์ mouse endostatin ไม่แตกต่างกัน

Charoenrat *et al.* (2005b) ศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ในสภาวะจำกัดออกซิเจน (Oxygen-limited fed-batch) และสภาวะจำกัดเมทานอล (Methanol-limited fed-batch) เพื่อผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูน พบว่าวิธีการเพาะเลี้ยงแบบจำกัดออกซิเจน เซลล์สามารถใช้เมทานอลได้ดีกว่าและผลิตเป็นมวลเซลล์ได้สูงกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับวิธีการเพาะเลี้ยงในสภาวะจำกัดเมทานอล และพบว่าเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักซึ่งมีระยะอินดักชัน 120 ชั่วโมง ให้กิจกรรมเอนไซม์ 6,000 ยูนิต/ลิตร และ 5,200 ยูนิต/ลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้ยังเปรียบเทียบวิธีการเพาะเลี้ยงในสภาวะจำกัดออกซิเจน (Oxygen-limited fed-batch) กับวิธีการเพิ่มความดันรวม (High pressure fed-batch) โดยทั้งสองวิธีมีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจนให้แก่เซลล์ ผลการศึกษาพบว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในระยะอินดักชันเป็นเวลา 80 ชั่วโมง กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก เท่ากับ 4,750 ยูนิต/ลิตร และ 5,200 ยูนิต/ลิตร ตามลำดับ (Charoenrat *et al.*, 2005a)

4. ปัจจัยที่มีผลต่อกระบวนการผลิตโปรตีนจากรีคอมบิแนนต์ *Pichia pastoris*

ปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนให้ได้ปริมาณสูงสุด ได้แก่ สภาพการเพาะเลี้ยง สารอาหาร สายพันธุ์ของเชื้อ *P. pastoris* ตลอดจนสมบัติของรีคอมบิแนนต์โปรตีนชนิดนั้น ๆ ก็ส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของการเจริญเติบโตของเชื้อและการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนได้แตกต่างกัน โดยในที่นี้จะกล่าวถึงสภาพในการเพาะเลี้ยงที่มีผลต่อกระบวนการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนต์โปรตีนจากเชื้อ *P. pastoris* เท่านั้น

4.1 ความเข้มข้นของกลีเซอรอล

กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานหลักต่อการเจริญเติบโตของ *P. pastoris* ในระยะเพาะเลี้ยงแบบเบ็ดเสร็จ การเพาะเลี้ยงในกลีเซอรอลความเข้มข้นสูงจะส่งผลให้ได้เซลล์ความหนาแน่นสูงในถังหมักและส่งผลดีต่อการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน เนื่องจากการผลิตโปรตีนเป็นสัดส่วนกับปริมาณเซลล์ที่ผลิตขึ้น (Romanos *et al.*, 1992) ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้กลีเซอรอลความเข้มข้น 40 กรัม/ลิตร เนื่องจากความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่มากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (Cos *et al.*, 2006)

Inan *et al.* (1999) ศึกษาอัตราการเติมกลีเซอรอลต่อการผลิตรีคอมบิแนนต์ hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (rAcAP-5) พบว่าการเติมกลีเซอรอลในระยะแทรนซิชันด้วยอัตราการเติมปริมาณสูง จะทำให้เกิดการสะสมของเอทานอลและแอสिटेट ซึ่งเป็นสารเมแทบอลิต์ของกลีเซอรอลและเป็นรีเพรสเซอร์ของโปรโมเตอร์ *AOXI* ส่งผลให้การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนลดลง ดังนั้นการศึกษาต่อ ๆ มาจึงได้ใช้เทคนิคการเติมกลีเซอรอลอย่างจำกัด เพื่อให้เซลล์สามารถใช้สารเมแทบอลิต์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักในระยะเบ็ดเสร็จให้หมดไปก่อนระยะการชักนำด้วยเมทานอล

4.2 ความเข้มข้นของเมทานอล

เมทานอลเป็นสารชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนแอลกอฮอล์ออกซิเดสและยีนแปลกปลอมซึ่งติดต่อเข้าสู่การควบคุมโดยโปรโมเตอร์ *AOXI* ของเซลล์ *P. pastoris* การหาความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมในการผลิตเซลล์และรีคอมบิแนนต์โปรตีนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของ *P. pastoris* (Mut⁺, Mut^s และ Mut⁻) ที่ใช้เป็นเซลล์เจ้าบ้าน ซึ่งทั้ง 3 สายพันธุ์มีความสามารถในการใช้เมทานอลได้มากน้อยแตกต่างกัน นอกจากนี้ชนิดของรีคอมบิแนนต์โปรตีนที่ผลิตต่างชนิดกันก็จะ

ส่งผลให้ความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมต่อการชักนำให้เกิดการแสดงออกของยีนต่างกัน อย่างไรก็ตาม Mayson *et al.* (2003) ได้สังเกตว่าความเข้มข้นของเมทานอลที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับความเข้มข้นของเมทานอลต่อการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนในช่วงการชักนำให้เกิดการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน

ผลการศึกษาของ Katagura *et al.* (1998); Zhang *et al.* (2000); Kobayashi *et al.* (2000b) พบว่าความเข้มข้นของเมทานอลที่มากเกินไป หรือมากกว่าค่าวิกฤตคือ 3-4 กรัมต่อลิตร จะส่งผลยับยั้งต่อการเจริญของเซลล์แบบ substrate inhibition (uncompetition inhibition) เนื่องจากจะเกิดการสะสมของฟอร์มัลดีไฮด์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ (Couderc and Baratti, 1980; Van der Klei *et al.*, 1998)

ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงจึงต้องตรวจสอบและควบคุมความเข้มข้นของเมทานอล โดยใช้วิธีต่าง ๆ เช่น ออนไลน์ เซ็นเซอร์ ซึ่งจะวัดปริมาณเมทานอลด้วยวิธี High performance liquid chromatography (HPLC) และ Gas chromatography (GC) การใช้แอลกอฮอล์เซนเซอร์ซึ่งมีระบบออนไลน์เป็นตัวตรวจสอบและควบคุมอย่างมีประสิทธิภาพ หรือการใช้เทคนิคการเติมสับสเตรตด้วยวิธี DO stat fermentation ซึ่งเป็นวิธีที่ง่ายและราคาถูก โดยมีหลักการคือ เมื่อเซลล์เจริญเติบโตในแหล่งคาร์บอนที่เพียงพอจะต้องการออกซิเจนปริมาณมาก จึงส่งผลให้ค่าออกซิเจนละลายต่ำลงจนกระทั่งเมื่อเซลล์ใช้สารอาหารหมดลง ค่าออกซิเจนละลายจะเพิ่มสูงขึ้นจนเห็นการเปลี่ยนแปลงได้อย่างชัดเจน เทคนิคนี้ได้ถูกนำมาใช้ในการเติมปริมาณกลีเซอรอลและเมทานอลแบบครั้งคราว ในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน (Chen *et al.*, 1997; Loewen *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003)

4.3 ผลของค่าออกซิเจนละลาย

จากการที่เชื้อ *P. pastoris* ใช้วิธีการสลายเมทานอลเพื่อการเจริญเติบโตจึงทำให้มีความต้องการออกซิเจนปริมาณมาก ซึ่งมากกว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน 3-4 เท่า (Mateles, 1971) ด้วยเหตุนี้จึงต้องเพิ่มอัตราการกวนและอัตราการให้อากาศให้เพียงพอ เพื่อป้องกันภาวะการขาดแคลนออกซิเจนซึ่งจะส่งผลในการลดการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนและการเจริญเติบโตของเซลล์ (Cereghino and Cregg, 2000)

Jahic *et al.* (2002) ได้รายงานการเพาะเลี้ยงโดยวิธีจำกัดเมทานอล (limited fed-batch) เปรียบเทียบทั้งในสถานะที่มีและไม่มีการเติมออกซิเจน เมื่อกำหนดค่าออกซิเจนละลายที่ 30 เปอร์เซ็นต์ DOT set point พบว่าอัตราการเติมเมทานอลเมื่อเพาะเลี้ยงในสถานะที่เติมออกซิเจนเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของการเพาะเลี้ยงที่ไม่มีการเติมออกซิเจน นอกจากนี้ยังให้ความหนาแน่นของเซลล์และผลิตภัณฑ์คอมบิแนนต์โปรตีนได้สูงขึ้นอีกด้วย

4.4 ผลของอุณหภูมิ

การเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ส่วนใหญ่จะทำในอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 30 องศาเซลเซียส (Wegner, 1983) โดยอุณหภูมิที่สูงกว่า 32 องศาเซลเซียส จะมีผลต่อการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีนและทำให้เซลล์ตายได้ (Invitrogen) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Inan *et al.* (1999) พบว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงกว่า 30 องศาเซลเซียส ไม่เหมาะสมต่อการผลิตรีคอมบิแนนต์ hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (rAcAP-5) เนื่องจากทำให้เซลล์ตาย ส่งผลต่อการหลั่งเอนไซม์โปรติเอสในน้ำหมัก นอกจากนี้อุณหภูมียังมีผลต่อการสลายตัวและการม้วนพับของโปรตีนอีกด้วย

จากผลการศึกษาของ Li *et al.* (2001) เปรียบเทียบอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ระหว่าง 23 องศาเซลเซียสกับ 30 องศาเซลเซียสในการผลิตรีคอมบิแนนต์ herring antifreeze protein พบว่า ผลได้ของรีคอมบิแนนต์โปรตีนภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 วัน ภายใต้อุณหภูมิ 23 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่า เทียบกับการเพาะเลี้ยงภายใต้อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการผลิตรีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสจาก *P. pastoris* สายพันธุ์ Y-11430 โดยเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตเอนไซม์ระหว่างอุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียสกับ 30 องศาเซลเซียส พบว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ในขณะที่การเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส ส่งผลต่อการผลิตเป็นมวลเซลล์มากกว่าการผลิตเอนไซม์ (Charoenrat *et al.*, 2004a)

4.5 ผลของค่าความเป็นกรดต่าง

P. pastoris สามารถเจริญเติบโตได้ในช่วงพีเอชค่อนข้างกว้างคือ พีเอช 3-7 โดยพบว่าความเป็นกรดต่างมีผลกระทบน้อยต่ออัตราการเจริญเติบโต แต่จะมีผลกระทบต่อกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (protease) ในระหว่างที่เซลล์ผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน (Sreekrishna *et al.*, 1997; Inan *et al.*, 1999; Files *et al.*, 2001)

จากการศึกษาของ Sreekrishna *et al.* (1990) พบว่าผลผลิตของ human serum albumin (HAS) เพิ่มขึ้นมากกว่า 3 เท่า เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 5.85 เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 5 ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงโดยทั่วไป ขณะที่กรณีของการผลิต V_1 ซึ่งเป็นโคเมนของ CD4 สามารถผลิตได้ที่พีเอช 2.5-3.5 (Buckholz *et al.*, 1991) และผลการศึกษาของ Siegel *et al.* (1990); Brierley *et al.* (1994) พบว่าสามารถเพิ่มการผลิต human epidermal growth factor และ human insulin-like growth factor-1 เป็น 2-4 เท่าเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่พีเอช 3.0

Larentis *et al.*, (2004) ศึกษาการแสดงออกของ *Psd 1* ยีนในรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* โดยควบคุมค่าพีเอชที่ 4 และ 6 เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงโดยไม่ควบคุมค่าพีเอช พบว่าการควบคุมค่าพีเอชทำให้อัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ลดลง แต่ให้ปริมาณการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนต่อเซลล์สูงขึ้น โดยเฉพาะเมื่อเพาะเลี้ยงที่พีเอช 4

การศึกษาของ Zhu *et al.* (1995) เพื่อหาค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสมในการผลิตแอลฟา-กลูโคซิเดสของเชื้อ *P. pastoris* พบว่าค่าพีเอชที่เหมาะสมในระดับฟลask แตกต่างจากในถังหมัก โดยค่าพีเอชที่เหมาะสมในระดับฟลask เท่ากับ 4.5 ขณะที่ในถังหมักเท่ากับ 6.5 ดังนั้นในบางกรณีค่าพีเอชที่ทำให้การผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนสูงสุดในระดับฟลask ก็ไม่สามารถใช้ได้กับการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมัก ดังนั้นจึงต้องมีการหาค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตโปรตีนนั้น ๆ ในสภาวะการเพาะเลี้ยงดังกล่าว

Charoenrat *et al.* (2004b) ขยายขนาดการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* สำหรับการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส จากระดับฟลask ลงในถังหมักขนาด 2 ลิตร ได้ค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ คือ พีเอช 5-5.25

4.6 ผลกระทบจากกระบวนการโปรตีโอไลซิส (proteolysis)

กระบวนการโปรตีโอไลซิสเป็นปัญหาสำคัญในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนเมื่อใช้ยีสต์เป็นเซลล์เจ้าบ้าน (Gimenez *et al.*, 2000; Kobayashi *et al.*, 2000b) โดยภายในแวคิวโอลประกอบด้วยเอนไซม์โปรตีเอสหลายชนิดขึ้นกับสภาวะของสารอาหาร (Hansen *et al.*, 1977)

เอนไซม์โปรทีเอสใน *P. pastoris* ยังไม่มีการศึกษามากนัก แม้จะมีรายงานการย่อยสลายโปรตีนในระหว่างกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนจากเชื้อชนิดนี้แล้วก็ตาม (Werten *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 2000b; Zhou and Zhang, 2002; Sinha *et al.*, 2003) สาเหตุที่อาจเป็นไปได้ในการเพิ่มการผลิตเอนไซม์โปรทีเอสของเซลล์ คือ เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะการหมักที่มีความหนาแน่นของเซลล์สูง การขาดแคลนอาหาร การเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอน ความร้อน การเปลี่ยนแปลงพีเอช สารเคมีที่เป็นพิษต่อเซลล์หรือโปรตีนอาจเกิดความเสียหายจากสภาวะออกซิเดชันเนื่องจากวิถีการย่อยสลายเมทานอลที่ต้องการออกซิเจนในปริมาณสูงและปลดปล่อยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เป็นพิษต่อเซลล์

จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการลดกระบวนการย่อยสลายโปรตีนด้วยวิธีต่าง ๆ เช่น การใช้เซลล์เจ้าบ้านที่เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์โปรทีเอส (Gleeson *et al.*, 1998) การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน (Gustavsson *et al.*, 2001) การเติมตัวยับยั้งเอนไซม์โปรทีเอส (Holmquist *et al.*, 1997) การเปลี่ยนพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Kang *et al.*, 2000) การเติมกรดคาซามิโนและเปปโตโนในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Clare *et al.*, 1991) และการเพิ่มความเข้มข้นของแอมโมเนียมในระหว่างกระบวนการหมัก (Yang *et al.*, 2004)

จากการศึกษาของ Kobayashi *et al.* (2000b) ได้แสดงความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์โปรทีเอสกับความเข้มข้นของส่วนประกอบต่าง ๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรทีเอสจะต่ำเมื่อมีแอมโมเนียมความเข้มข้นสูง จึงทำให้เชื่อว่าสภาวะที่เซลล์ขาดแคลนแหล่งไนโตรเจนจะกระตุ้นให้เซลล์หลั่งเอนไซม์โปรทีเอสออกนอกเซลล์ นอกจากนี้ Zhou and Zhang (2002) ได้ศึกษาการลดกระบวนการย่อยสลายรีคอมบิแนนต์ไฮรูดีนโดยการควบคุมอัตราการเจริญจำเพาะของ *P. pastoris* ในระยะอินดักชันในถังที่ และควบคุมอัตราการเติมเมทานอลอย่างจำกัด พบว่าผลได้ของไฮรูดีนมีปริมาณสูงกว่าแบบที่ไม่ได้ควบคุมอัตราการเจริญถึง 2.5 เท่า นอกจากนี้จากการศึกษาของ Sinha *et al.* (2003) ในการผลิต ovine interferon- γ (oIFN- γ) จากรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* ปรากฏว่าไม่พบเอนไซม์โปรทีเอสในระยะการเพาะเลี้ยงด้วยกลีเซอรอลแต่พบเอนไซม์โปรทีเอสเพิ่มขึ้นหลังจากระยะอินดักชันแล้ว 48 ชั่วโมงจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 72 ชั่วโมง จึงทำให้เชื่อว่าเอนไซม์โปรทีเอสถูกผลิตขึ้นอย่างมากภายหลังจากการเติมเมทานอล

5. การออกแบบการทดลองแบบทาคุชิ (Taguchi approach)

การออกแบบการทดลองแบบทาคุชิ เป็นวิธีที่พัฒนาโดย Dr. Genichi Taguchi วิศวกรชาวญี่ปุ่น เมื่อปี ค.ศ.1980 (ติยะภรณ์, 2549) เพื่อการปรับปรุงคุณภาพสำหรับการหาสภาวะของกระบวนการผลิตลดความแปรผันต่าง ๆ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ดีที่สุดในภาคอุตสาหกรรม วิธีทาคุชิเกิดจากการออกแบบการทดลองโดยอาศัยหลักการออกแบบการทดลองแบบ fractional factorial ร่วมกับ Orthogonal Array (Box *et al.*, 1988) และได้เครื่องมือที่เรียกว่า Orthogonal Array ซึ่งเป็นแผนการทดลองที่ทาคุชิทำขึ้นเพื่อสะดวกในการวางแผนการทดลองเพื่อหาผลกระทบของปัจจัยและกำหนดค่าในการทดลองว่าปัจจัยใดและระดับใดมีผลต่อการทดลองมากที่สุด โดยแบ่งเป็น inner array และ outer array ซึ่งเป็นเมตริกซ์การออกแบบของปัจจัยที่ควบคุมได้ (Signal variable) และปัจจัยที่ควบคุมไม่ได้ (Noise variable) ตามลำดับ จากนั้นจะนำเมตริกซ์ทั้งสองมาไขว้กันเพื่อคำนวณหาค่าผลตอบแทนที่เรียกว่า อัตราส่วนสัญญาณต่อสิ่งรบกวน (S/N ratio) ซึ่งแบ่งลักษณะทางคุณภาพได้เป็น 3 ลักษณะคือ

1. กรณีมากกว่าดีกว่า (QC = B) Bigger is better

$$\text{S/N ratio} = -10 \log \left(\frac{\sum \left(\frac{1}{y} \right)^2}{N} \right) \quad (2)$$

2. กรณีน้อยกว่าดีกว่า (QC = S) Smaller is better

$$\text{S/N ratio} = -10 \log \left(\sum \frac{y^2}{N} \right) \quad (3)$$

3. กรณีเป้าหมายดีที่สุด (QC = N) Norminal is best

$$\text{S/N ratio} = -10 \log \left(\frac{\sum (y - y_0)^2}{N} \right) \quad (4)$$

ข้อดีของวิธีทาคุชิมีหลายประการ เช่น สามารถศึกษาหลายปัจจัยได้พร้อมกันโดยมีวิธีการคำนวณที่ไม่ยุ่งยาก และมีการใช้หน่วยการทดลองที่น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการทดลองแบบแฟคทอเรียล ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนการทดลองโดยวิธีทากูชิในสภาวะการทดลองต่าง ๆ

สภาวะการทดลอง	จำนวนการทดลองแบบแฟคทอเรียล	จำนวนการทดลองวิธีทากูชิ
3 ปัจจัย 2 ระดับ	8	4
7 ปัจจัย 2 ระดับ	128	8
11 ปัจจัย 2 ระดับ	2,048	12
15 ปัจจัย 2 ระดับ	32,768	16
4 ปัจจัย 3 ระดับ	81	9
7 ปัจจัย 3 ระดับ	2,187	18

ที่มา: Roy (2001)

ขั้นตอนการออกแบบการทดลองด้วยวิธีทากูชิ ประกอบด้วย 5 ขั้นตอน (Roy, 2001)

1. การวางแผนการทดลอง (planning experiment) เป็นขั้นตอนกำหนดจุดประสงค์ที่ต้องการรวมทั้งพิจารณาปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบ

2. การออกแบบการทดลอง (designing experiment) เป็นขั้นตอนของการกำหนดหรือเลือก Orthogonal Array ที่เหมาะสมกับระบบรวมทั้งกำหนดปัจจัยและระดับของปัจจัย

3. การทำการทดลอง (conducting experiment) เป็นขั้นตอนของการทำการทดลองตามสภาวะของปัจจัยและระดับของปัจจัยที่กำหนดใน Orthogonal Array

4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง (analyzing experiment) เป็นขั้นตอนของการพิจารณาผลของปัจจัยและระดับของปัจจัยว่าปัจจัยใดมีผลกระทบกับระบบ รวมทั้งหาสภาวะที่เหมาะสมของระบบที่ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สูงสุด

5. การทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลอง (confirming or predicted) เป็นขั้นตอนของการพิสูจน์ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อระบบที่หาได้นั้นมีความเหมาะสม และได้ผลิตภัณฑ์ตามที่คาดการณ์จริงหรือไม่ รวมทั้งใช้สภาวะนั้นศึกษาผลที่เกิดขึ้นต่อระบบ

ขั้นตอนการออกแบบการทดลองของวิธีทาคุชิเป็นขั้นตอนที่สำคัญ โดยการกำหนดค่าระดับต่าง ๆ ของปัจจัยของชุดการทดลองต้องอยู่ในช่วงที่เหมาะสม เพื่อหาผลกระทบของปัจจัยที่มีต่อกระบวนการหรือผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะแสดงออกมาในรูปของอัตราส่วน S/N โดยชุดการทดลองที่ให้ค่าอัตราส่วน S/N สูงที่สุดจะถูกเลือกเป็นสถานะที่ดีที่สุด แต่หากในการกำหนดค่าระดับของปัจจัยเป็นช่วงที่ไม่เหมาะสมแล้ว จะทำให้การเลือกชุดการทดลองตามวิธีทาคุชิไม่ใช่ระดับที่เหมาะสมที่สุดของกระบวนการที่ทำให้ได้ค่าผลตอบแทนที่ดีที่สุดได้ เนื่องจากการกำหนดค่าระดับของปัจจัยตามวิธีทาคุชิจะเป็นเพียงการเลือกจากระดับของปัจจัยที่กำหนดไว้ในแผนการทดลองที่ออกแบบมาเท่านั้น

ในปี 2000 Dr. Taguchi และคณะได้รวบรวมกรณีศึกษาจากบริษัทที่มีชื่อเสียงต่าง ๆ ทั่วโลก ที่ได้นำวิธีการทาคุชิเข้ามาใช้ในบริษัท เพื่อนำมาจัดการและควบคุมทางด้านคุณภาพ เช่นบริษัทฟอร์ดมอเตอร์ บริษัทนิสสันมอเตอร์ บริษัท 3 M องค์การนาซ่า (NASA) และสถาบันเทคโนโลยีแคลิฟอร์เนีย บริษัทซีรอกซ์ และบริษัทโกลด์สตาร์ เป็นต้น ซึ่งทำให้เห็นถึงบทบาทของวิธีทาคุชิในการออกแบบผลิตภัณฑ์และกระบวนการเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีใหม่ ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ชลวศา, 2544)

Nagarjun *et al.* (2005) ศึกษาสถานะที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลกติกด้วย *Lactobacillus amyfovorus* NRRL B-4542 โดยอาศัยวิธีทาคุชิในการออกแบบการทดลองซึ่งประกอบด้วย 8 ปัจจัย คือ อุณหภูมิ พีเอช ปริมาณกลูโคส ปริมาณความชื้น ปริมาณยีสต์สกัด ปริมาณแมกนีเซียมซัลเฟต ปริมาณ Tween 80 และปริมาณ corn steep liquor อาศัย $L_{18} (2^1 \times 3^7)$ Orthogonal Array พบว่าการผลิตกรดแลกติกภายใต้สถานะที่เหมาะสมได้ผลได้กรดแลกติกสูงขึ้นเท่ากับ 93.50 เปอร์เซ็นต์

Prasad *et al.* (2005) ศึกษาสถานะที่เหมาะสมด้วยวิธีทาคุชิ ในการผลิตเอนไซม์แลกเลสจาก *Pleurotus ostreatus* 1804 ออกแบบการทดลองซึ่งประกอบด้วย 8 ปัจจัย คือ พีเอช ปริมาณกลูโคส ปริมาณ wheat bran ปริมาณยูเรีย ปริมาณกลูตาเมต ปริมาณยีสต์สกัด ปริมาณของตัวเหนียวนาและ ปริมาณ KH_2PO_4 โดยอาศัย $L_{18} (2^1 \times 3^7)$ Orthogonal Array พบว่าการผลิตเอนไซม์แลกเลสภายใต้สถานะที่เหมาะสมจะได้กิจกรรมของเอนไซม์แลกเลสเพิ่มขึ้น 32.9 เปอร์เซ็นต์ จาก 538.8 เป็น 803.3 หน่วย

Dasu *et al.* (2003) ศึกษาผลของปัจจัยที่มีต่อการผลิต griseofulvin แบบเบ็ดเสร็จ ด้วย *Penicillium griseofulvum* MTCC 1898 ในถังหมัก โดยอาศัยวิธีทาคุชิในการออกแบบการทดลองซึ่งประกอบด้วย 7 ปัจจัย คือ ปริมาณซูโครส ปริมาณ KH_2PO_4 ปริมาณ $NaNO_3$ ปริมาณ $FeSO_4$ พีเอช

อัตราารกวนและอัตราารให้อากาศ โดยอาศัย $L_8(2^7)$ Orthogonal Array พบว่า ปัจจัยทางกายภาพ ซึ่งประกอบด้วย พีเอช อัตราการกวนและอัตราารให้อากาศมีอิทธิพลต่อการผลิต griseofulvin อย่าง มีนัยสำคัญ

Hao *et al.* (2006) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีน Cytochrome P450 2C9 จากเชื้อ *Escherichia coli* DH5a ในระดับพลาสติกเหลวโดยอาศัยวิธีทางสถิติเพื่อศึกษาปริมาณ ส่วนประกอบของอาหารทั้งหมด 11 ปัจจัย จำนวน 2 ระดับ ได้แก่ ALA ไทอะมีน trace element แอมพิซิลิน คลอแรมฟินิคอล ปริมาณกลูต้าไมน์ IPTG $MgSO_4$ เปปโตน กลีเซอรอล และ NH_4Cl โดยใช้ $L_{12}(2^{11})$ Orthogonal Array พบว่าวิธีทางสถิติสามารถลดจำนวนปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตโปรตีนจาก 11 ปัจจัย ให้เหลือเพียง 4 ปัจจัย คือ แอมพิซิลิน คลอแรมฟินิคอล IPTG และ เปปโตนได้อย่างมีประสิทธิภาพก่อนนำไปวิธีวิเคราะห์พื้นผิวดตอบสนอง (Response Surface Methodology) เพื่อหา สภาวะที่เหมาะสมยิ่งขึ้น

Teng and Xu (2008) ทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต whole-cell lipase production ในการเพาะเลี้ยงแบบ submerged fermentation จาก *Rhizopus chinensis* ระดับพลาสติก เขย่า อาศัยวิธีทางสถิติเพื่อหาสภาวะเบื้องต้นโดยศึกษาปัจจัยต่าง ๆ 8 ปัจจัย ได้แก่ อัตราการกวน ปริมาณกลูต้าไมน์ ปริมาณมอลโตส ปริมาณน้ำมันมะกอก ปริมาณเปปโตน พีเอช K_2HPO_4 และ ปริมาตรในการหมัก โดยใช้ $L_{18}(2^1 \times 3^7)$ เพื่อจำกัดปัจจัยที่มีผลกระทบน้อยออกไป จากนั้นนำปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการผลิตไลเปสมากที่สุดมาหาสภาวะใหม่โดยวิธีวิเคราะห์พื้นผิวดตอบสนอง (Response Surface Methodology) พบว่าการหาสภาวะเบื้องต้นด้วยวิธีทางสถิติสามารถทำให้ผลได้ กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส เพิ่มขึ้นมากกว่าการผลิตเอนไซม์ไลเปสที่ไม่ได้ผ่านขั้นตอนการหา สภาวะที่เหมาะสมถึง 2 เท่า และสามารถหาปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการกระบวนการผลิตเอนไซม์ไลเปส เพื่อนำไปหาสภาวะที่เหมาะสมยิ่งขึ้นได้อย่างมีประสิทธิภาพ

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. จุลินทรีย์

ยีสต์รีคอมบิแนนต์ *Pichia pastoris* สายพันธุ์ Y-11430 (Mut⁺, His⁺) ซึ่งมีการโคลนยีนการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจากต้นพะยูน (*Dalbergia Cochinchinensis* Pierre หรือ Thai Rosewood) และได้ทำการกลายพันธุ์โดยเปลี่ยนกรดอะมิโนที่ตำแหน่ง 454 ของเอนไซม์จากอะลานีนไปเป็นแอสพาราจีน ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์เชื้อจาก ผศ.ดร.ประชุมพร คงเสรี ภาควิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2. อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

- 2.1 YPD agar (Yeast extract Peptone Dextrose) agar
- 2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD medium
- 2.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ BMGY (Buffered Glycerol-complex Medium)
- 2.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ BSM (Fermentation Basal Salt Medium)
- 2.5 *Pichai* trace metal 1 (PTM1 trace salts solution)
- 2.6 Methanol feed medium

3. สารเคมี

- 3.1 เมทานอล (methanol, CH₃OH; Ajax)
- 3.2 กลีเซอรอล (99.5-101 % glycerol, CH₂OHCHOHCH₂OH; Carlo erba)
- 3.3 พาราไนโตรฟีนอล-เบต้า-D-กลูโคไพราโนไซด์ (*para*-nitrophenol β-D-glucopyranoside (*p*NP-Glu); Sigma)
- 3.4 พาราไนโตรฟีนอล (*para*-nitrophenol, O₂NC₆H₄OH; BDH)
- 3.5 โซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na₂CO₃; Merck)
- 3.6 แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ (28-30% ammonium hydroxide, NH₄OH; J.T. Baker)
- 3.7 กรดฟอสฟอริก (85 % Orthophosphoric acid, H₃PO₄; Ajax)

3.8 สารต้านฟอง (Antifoam 1614 Dow Corning (R); APS Ajax)

4. อุปกรณ์

4.1 ถังหมัก; (BIOSTAT B; B.Braun Biotech International) ขนาด 2 ลิตร พร้อมระบบควบคุมการกวน การให้อากาศ พีเอชและอุณหภูมิ

4.2 ปีม; (Swan DR-213; Taiwan)

4.3 เครื่องควบคุมความเย็น (cooling; Bosstect)

4.4 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer, Shimadzu UV-120; Japan)

4.5 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge, B. Braun International SIGMA 203; Germany)

4.6 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Microcentrifuge, Spectrafuge; USA)

4.7 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Sigma 3K18; Germany)

4.8 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator, Memmert; Germany)

4.9 เครื่องกวนผสมสาร (hot plate and stirrer, SCHOTT; Germany)

4.10 เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter, Horiba M-11; Japan)

4.11 เครื่องเขย่าควบคุมอุณหภูมิ (New Brunswick Scientific G-25; USA)

4.12 หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave, Sanyo Labo Autoclave; Japan)

4.13 เครื่องชั่ง (Analytical Balance, Sartorius CP3235; Germany)

4.14 เครื่องชั่งอย่างละเอียด (Adventurer OHAUS; USA)

4.15 สายยางซิลิโคน (Dura ขนาด 3×5 มิลลิเมตร และ 4×7 มิลลิเมตร)

4.16 หม้อแปลงไฟฟ้า (Tron AUTO-03)

4.17 ตู้เชื้อเชื้อ (Microflow biological safety cabinet)

4.18 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 105° องศาเซลเซียส (Mettler; Germany)

4.19 โถทำแห้ง (Desiccator)

4.20 เครื่อง HPLC (Shimadzu LC-3A; Japan), คอลัมน์ Lichrocart-C18 ขนาด 250 × 40 มิลลิเมตร (Merck), RI detector (LDC Refracto Monitor IV; USA)

4.21 เครื่อง GC (HP6890; USA) คอลัมน์ FactorFour Capillary Column (Varian รุ่น VF-1ms; USA) ขนาด 30 มิลลิเมตร × 0.25 มิลลิเมตร × 0.25 ไมโครเมตร

4.22 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) (Precision 280 series; USA)

4.23 เครื่องแก้วและอุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์อื่น ๆ

4.24 เครื่องไมโครคอมพิวเตอร์ (Belta: PPIIX) และโปรแกรม MFCS/win 2.0 สำหรับควบคุมกระบวนการหมัก

วิธีการ

1. ศึกษาผลของเมทานอลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดส กลายพันธุ์ (A454N) จากเชื้อ *Pichia pastoris* ในระดับฟลาस्क

1.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เชื้อเชื้อจาก stock culture ลงในอาหารยูน yeast peptone dextrose (YPD) ที่ผสม zeocin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร แล้วเพาะเลี้ยงในตู้บ่ม 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้น เชื้อเชื้อยีสต์ *P. pastoris* จำนวน 1 ลูบ ลงในอาหารเหลว BMGY ปริมาตร 300 มิลลิลิตร บรรจุใน ฟลาस्कขนาด 1,000 มิลลิลิตร บ่มบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 การเพาะเลี้ยงในฟลาस्क

เพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* แบบเปิดเสร็จ โดยแบ่งการเพาะเลี้ยงออกเป็น 2 ระยะ คือระยะการเพาะเลี้ยงเพื่อผลิตเซลล์ในกลีเซอรอลและระยะอินดักชันเพื่อให้เซลล์ผลิต เอนไซม์ภายใต้สภาวะที่มีเมทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ โดยถ่ายกล้าเชื้อที่ได้เตรียมไว้ในอาหารเหลว BMGY ลงในอาหารเหลว Basal Salts Medium (BSM) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร ที่ผสม PTM1 (trace salts medium) ปริมาตร 4.35 มิลลิลิตร/ลิตร ซึ่งบรรจุในฟลาस्कขนาด 1,000 มิลลิลิตร จำนวน 7 ฟลาस्क ฟลาस्कละ 30 มิลลิลิตร (10 เปอร์เซ็นต์) จากนั้นนำไปบ่มบนเครื่องเขย่าความเร็ว 250 รอบ/ นาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงจนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 5.2 หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วถ่ายเซลล์ทั้งหมด ลงในอาหารเหลว Basal Salts Medium (ปราศจากกลีเซอรอล) จำนวน 7 ฟลาस्क ซึ่งมีความเข้มข้นของเมทานอลเท่ากับ 0 1 2 3 4 5 และ 6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เก็บตัวอย่างทุก 3 ชั่วโมงเพื่อประเมินการเจริญเติบโตของเซลล์ภายใต้สภาวะที่มีเมทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 36 ชั่วโมง และวิเคราะห์ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่ชั่วโมงที่ 24 36 และ 86 ชั่วโมง

2. ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pichia pastoris* เพื่อผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ โดยวิธีทาคุชิ (Taguchi approach)

2.1 การออกแบบการทดลองโดยวิธีทาคุชิ

ค่าออกซิเจนละลาย พีเอช และอุณหภูมิในการหมัก เป็นปัจจัยที่ได้เลือกนำมาศึกษาถึงผลกระทบต่อกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร) อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร (Q_p) และผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล ($Y_{p/m}$) เนื่องจากปัจจัยทั้ง 3 น่าจะเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อกระบวนการผลิต กล่าวคือ ค่าออกซิเจนละลาย มีความสำคัญต่อวิธีการใช้เมทานอลของเซลล์เพื่อการแสดงออกของรีคอมบิแนนต์โปรตีน พีเอช มีความสำคัญในแง่ความคงตัวของโปรตีน (stability) ในน้ำหมัก และอุณหภูมิ เป็นปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในแง่การเจริญเติบโต เมแทบอลิซึมภายในเซลล์รวมถึงความคงตัวของเอนไซม์ภายหลังการหลั่งออกนอกเซลล์ โดยออกแบบการทดลองด้วยวิธีทาคุชิเพื่อศึกษาปัจจัย 3 ปัจจัย จำนวน 2 ระดับ ได้แผนการทดลองแบบ $L_4(2^3)$ Orthogonal Array แสดงดังตารางที่ 2 และตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่กำหนดในการทดลอง

ปัจจัย	ระดับ	
	1	2
1. ค่าออกซิเจนละลาย (เปอร์เซ็นต์): (A)	25	50
2. ค่าความเป็นกรดด่าง: (B)	5	5.5
3. อุณหภูมิ: (องศาเซลเซียส): (C)	30	28

ตารางที่ 3 แผนการทดลอง $L_4(2^3)$ Orthogonal Array

การทดลอง	ปัจจัย		
	ค่าออกซิเจนละลาย (%)	พีเอช	อุณหภูมิ ($^{\circ}\text{C}$)
T1	25	5.0	30
T2	25	5.5	28
T3	50	5.0	28
T4	50	5.5	30

ที่มา: ดัดแปลงจาก Roy (2001)

2.2 การทำการทดลองตามสภาวะที่กำหนด

2.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อจาก stock culture ในอาหารยูน yeast peptone dextrose (YPD) ที่ผสม zeocin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการบ่มในตู้บ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นเชื้อจำนวน 1 ลูบ ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่ผสม zeocin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นถ่ายลงในอาหาร BMGY ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ที่ผสม zeocin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงต่อบนเครื่องเขย่า ความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งเซลล์เจริญจนสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรได้ประมาณ 11

2.2.2 การเพาะเลี้ยงในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

ถ่ายเชื้อจากข้อ 2.2.1 ลงในถังหมัก (BIOSTAT B, B. Braun Biotech International) ขนาด 2 ลิตรในภาวะปลอดเชื้อ ซึ่งบรรจุอาหาร BSM ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ที่ผสม PTM1 (trace salts medium) ปริมาตร 4.35 มิลลิลิตรต่อลิตร กำหนดสภาวะการเพาะเลี้ยงในแต่ละการทดลองดังตารางที่ 3 ควบคุมการให้อากาศโดยกำหนดค่าออกซิเจนละลายเป็นแบบ cascade ระหว่างอัตราการให้อากาศกับอัตราการกวน ควบคุมค่าพีเอชโดยใช้กรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 โมลาร์ และ

20 เปอร์เซนต์แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ควบคุมฟองโดยใช้สารต้านฟอง (Antifoam 1614 Dow Corning (R))

การเพาะเลี้ยงแบ่งเป็น 3 ระยะดังนี้

ระยะที่ 1 ระยะการเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (glycerol batch phase) โดยทำการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งกลีเซอรอลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนของเซลล์หมดไป สังเกตได้จาก อัตราการกวนที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง (ชั่วโมงที่ 15-20)

ระยะที่ 2 ระยะแทรนซิชัน หรือระยะอดอาหาร (transition phase) เป็นระยะที่ปล่อยให้เซลล์ใช้กลีเซอรอลและสารเมแทบอลิต์จนหมด

ระยะที่ 3 ระยะอินดัคชัน หรือระยะการผลิตเอนไซม์ (induction phase) เป็นระยะที่มีการเติมเมทานอลลงไปเพื่อชักนำให้เซลล์ผลิตรีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดส โดยการเติมเมทานอลแบบเป็นระยะ (intermittent) ที่ความเข้มข้นของเมทานอล 4 กรัม/ลิตร ความถี่ในการเติมกำหนดจากอัตราการกวนที่ลดลงซึ่งบ่งชี้ถึงภาวะที่เมทานอลถูกใช้หมดไป โดยกำหนดระยะเวลาในการผลิตเอนไซม์ (ระยะอินดัคชัน) เท่ากันทุกการทดลองคือ 51 ชั่วโมง

เก็บตัวอย่างในระหว่างการเพาะเลี้ยงทุก 3 ชั่วโมง เพื่อประเมินการเจริญของจุลินทรีย์ ปริมาณกลีเซอรอล กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และเก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมทานอลในน้ำหมักตลอดระยะอินดัคชัน

3. ศึกษาวิธีการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ด้วยการเติมเมทานอลเป็นระบบขับเคลื่อนได้ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทาง

3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อจาก stock culture โดยใช้อาหารวุ้น yeast peptone dextrose (YPD) ที่ผสม zeocin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งผ่านการบ่มในตู้บ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกเชื้อจำนวน 1 ลูบ ลงในอาหารเหลว YPD ปริมาตร 20 มิลลิลิตรที่ผสม zeocin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตรในฟลasks ขนาด 125 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และถ่ายลงในอาหาร BMGY ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ที่ผสม zeocin 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในฟลasks ขนาด 500 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงต่อบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 250 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อีกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จนกระทั่งเซลล์เจริญจนสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรได้ประมาณ 11

3.2 การเพาะเลี้ยงในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

ถ่ายเชื้อจากข้อ 3.1 ลงในถังหมัก (BIOSTAT B, B.Braun Biotech International) ขนาด 2 ลิตรในภาวะปลอดเชื้อ ซึ่งบรรจุอาหาร BSM ปริมาตร 900 มิลลิลิตร ที่ผสม PTM1 (trace salts medium) ปริมาตร 4.35 มิลลิลิตรต่อลิตร โดยกำหนดสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทางจุลชีววิทยาควบคุมค่าพีเอชโดยใช้ 2 โมลาร์กรดไฮโดรคลอริก และ 20 เปอร์เซ็นต์แอมโมเนียมไฮดรอกไซด์ ควบคุมฟองโดยใช้ Antifoam 1614 Dow Corning (R) เก็บตัวอย่างในระหว่างการเพาะเลี้ยงทุก 3 ชั่วโมง เพื่อประเมินการเจริญของจุลินทรีย์ ปริมาณกลีเซอรอล กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และเก็บตัวอย่างทุก 1 ชั่วโมง ในระยะอินดักชันเพื่อวิเคราะห์ปริมาณเมทานอลในน้ำหมัก

การเพาะเลี้ยงแบ่งเป็น 3 ระยะ

ระยะที่ 1 ระยะการเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือการหมักแบบเบ็ดเสร็จ (glycerol batch phase) โดยทำการเพาะเลี้ยงจนกระทั่งกลีเซอรอลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนของเซลล์หมดไป สังเกตได้จากอัตราการกวนที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง

ระยะที่ 2 ระยะแทรนซิชัน หรือระยะอดอาหาร (transition phase) เป็นระยะที่ปล่อยให้เซลล์ใช้กลีเซอรอลและสารเมแทบอลิซึมทั้งหมด

ระยะที่ 3 ระยะอินดัคชัน หรือระยะการฟลิตเอนไทม์ (induction phase) เป็นระยะที่มีการเติมเมทานอลลงไปเพื่อชักนำให้เซลล์ผลิตรีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดส โดยเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได ดังแสดงในภาพที่ 9 ซึ่งแบ่งลักษณะการเติมออกเป็น 2 กลุ่ม ตามวิธีการคำนวณอัตราการเติมเมทานอล

กลุ่มที่ 1 เป็นการเติมเมทานอล โดยอาศัยการคำนวณอัตราการเติมเมทานอลจากน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยของแต่ละช่วงในการทดลองครั้งขึ้นต้นผลทางกฏ โดยกำหนดให้ค่าอัตราการใช้เมทานอลจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 0.14 กรัมเมทานอล/กรัมเซลล์.ชั่วโมง แสดงลักษณะการเติมดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แผนการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได ชั่วโมงที่ 21 ถึง 72

ช่วงเวลาเติมเมทานอล (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	อัตราการเติมเมทานอล (กรัม/ชั่วโมง)
21-36	23.82	3.33
36-48	33.44	4.68
48-60	39.64	5.55
60-72	46.06	6.45

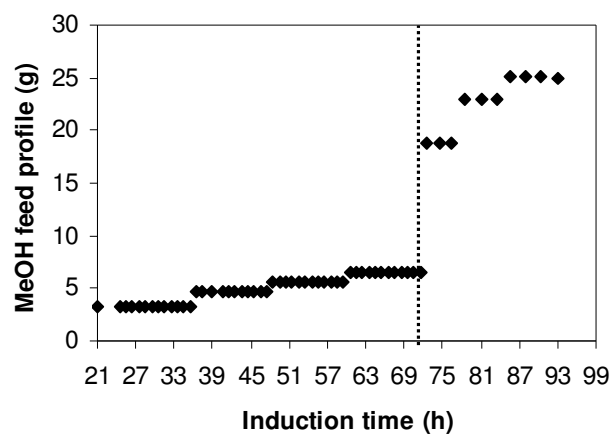
หมายเหตุ วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ค

กลุ่มที่ 2 เป็นการเติมเมทานอล โดยอาศัยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเฉลี่ยในช่วงก่อนการเติมเมทานอล แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยโดยใช้ความชันจากกราฟมาตรฐานซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรกับค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (ภาพผนวกที่ ค1) กำหนดค่าอัตราการใช้เมทานอลจำเพาะของเซลล์เท่ากับ 0.14 กรัมเมทานอล/กรัมเซลล์.ชั่วโมง ลักษณะการเติมเมทานอลแสดงดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แผนการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได ชั่วโมงที่ 72 ถึง 96

ช่วงเวลาเติม เมทานอล (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ 600 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัม)	อัตราการเติมเมทานอล (กรัม/ชั่วโมง)
72-78	130.33	134.36	18.81
78-84	158.83	163.75	22.93
84-93	173.48	178.84	25.04
93-96	172.35	177.68	24.88

หมายเหตุ วิธีการคำนวณแสดงในภาคผนวก ค



ภาพที่ 9 แบบแผนการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได

4. การวิเคราะห์

4.1 การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (Charoenrat *et al.*, 2005a)

บ่มสารละลายสับสเตรต 3.3 มิลลิโมลาร์ *p*NP-Glu ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงไปบ่มเป็นเวลา 45 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร คำนวณหากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร) จากกราฟมาตรฐานสารละลายพาราไนโตรฟีนอล แสดงดังภาพผนวกที่ ข1

4.2 การวิเคราะห์ความเข้มข้นกลีเซอรอล

วิเคราะห์ความเข้มข้นกลีเซอรอลในน้ำหมักโดยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) (ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-3A, Japan) ซึ่งใช้คอลัมน์ Lichrocart-C18 ขนาด 250×4.0 มิลลิเมตร (Merck) วิเคราะห์โดย RI detector (ยี่ห้อ LDC รุ่น Refracto Monitor IV, USA) โดยมี 0.1 เปอร์เซ็นต์กรดฟอสฟอริก เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ (mobile phase) อัตราการไหล 0.9 มิลลิลิตร/นาที เริ่มจากการปั่นตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที แล้วนำส่วนใสกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครลิตร ก่อนฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตร เข้าไปในคอลัมน์ที่มีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกลีเซอรอล แสดงดังภาพผนวกที่ ข2

4.3 การวิเคราะห์ความเข้มข้นเมทานอล

วิเคราะห์ความเข้มข้นเมทานอลในน้ำหมักโดยวิธี Gas Chromatography (GC) (ยี่ห้อ GC, HP6890) ใช้คอลัมน์ FactorFour Capillary Column (ยี่ห้อ Varian, รุ่น VF-1ms) ขนาด $30 \text{ มิลลิเมตร} \times 0.25 \text{ มิลลิเมตร} \times 0.25 \text{ ไมโครเมตร}$ วิเคราะห์โดยเครื่อง Flame Ionized Detector กำหนดอุณหภูมิในการฉีด 160 องศาเซลเซียส อุณหภูมิในโอเวน 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ดีเทคเตอร์ 250 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของแก๊ส 1.5 มิลลิลิตร/นาที และกำหนดเวลาในการวิเคราะห์ 5 นาที การเตรียมตัวอย่างเริ่มจากปั่นตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที แล้วนำส่วนใสกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครลิตร ก่อนฉีดตัวอย่างปริมาตร 10 ไมโครลิตรเข้าไปในคอลัมน์ แล้วนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายเมทานอล แสดงดังภาพผนวกที่ ข3

4.4 การคำนวณค่าพารามิเตอร์

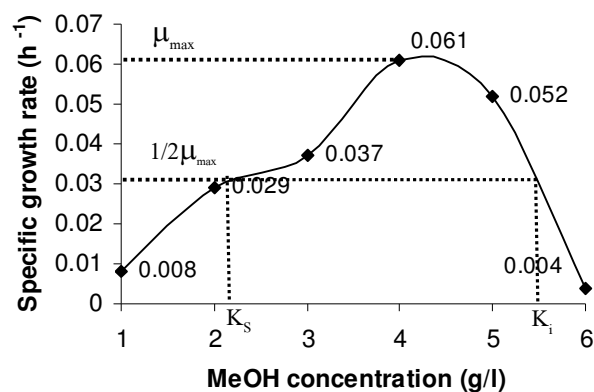
วิธีคำนวณพารามิเตอร์ต่าง ๆ ทางจลนพลศาสตร์ แสดงในภาคผนวก ง

ผลและวิจารณ์

1. ผลของเมทานอลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดส กลายพันธุ์ (A454N) จากเชื้อ *P. pastoris* ในระดับฟลาสก์

จากการศึกษาผลกระทบของเมทานอลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. pastoris* และการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีเมทานอลเป็นสารชักนำความเข้มข้น 0-6 กรัม/ลิตร เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และน้ำหนักรวมของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นเล็กน้อยระหว่างการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีเมทานอล แสดงว่าเซลล์สามารถใช้เมทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโตได้ เมื่อเทียบกับฟลาสก์ควบคุม (ความเข้มข้นเมทานอล 0 กรัม/ลิตร) ที่มีค่าการดูดกลืนแสงและน้ำหนักรวมของเซลล์ก่อนข้างคงที่และมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน แสดงค่าการทดลองดังตารางที่ 6 และตารางที่ 7 ตามลำดับ

เมื่อทำการคำนวณอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ (μ) ในระยะ log phase ของแต่ละฟลาสก์ (การคำนวณค่า μ แสดงดังภาคผนวก ง) แล้วนำค่ามาเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจำเพาะกับความเข้มข้นของเมทานอล แสดงได้ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 10 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์กับความเข้มข้นของเมทานอล

จากภาพสังเกตได้ว่าอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์จะเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเมทานอลเพิ่มขึ้น และสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของเมทานอล 4 กรัม/ลิตร ซึ่งเท่ากับ 0.061 ต่อชั่วโมง ($\mu_{\max}$) และเมื่อเพาะเลี้ยงที่ความเข้มข้นของเมทานอลเพิ่มขึ้นเป็น 5 กรัม/ลิตร และ 6 กรัม/ลิตร ส่งผลให้อัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ลดลง ลักษณะดังกล่าวเป็นรูปแบบของการยับยั้งด้วยสับสเตรตความเข้มข้นสูง (substrate inhibition) ตามสมการของ Monod ได้ค่า K_i เท่ากับ 5.5 กรัม/ลิตร สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Curvers *et al.* (2002) ซึ่งได้ศึกษาผลของ เมทานอลต่อเชื้อ *P. pastoris* เพื่อการผลิตรีคอมบิแนนต์ chymotrypsinogen B ได้ค่า $\mu_{\max}$ เท่ากับ 0.084 ± 0.005 ต่อชั่วโมง เมทานอลที่จุดวิกฤตเท่ากับ 4 กรัม/ลิตร และผลการศึกษาของ Kobayashi *et al.* (2000a) ศึกษาเทคนิคการเติมเมทานอลสำหรับการผลิตรีคอมบิแนนต์ human serum albumin ได้ค่า $\mu_{\max}$ เท่ากับ 0.16 ต่อชั่วโมง เมทานอลที่จุดวิกฤตเท่ากับ 5.5 กรัม/ลิตร นอกจากนี้ Zhang *et al.* (2000) ศึกษาสมการแบบจำลองการเจริญเติบโตของเซลล์ในเมทานอล ผลการศึกษาได้ค่าอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.08 ต่อชั่วโมง ค่าจากการทดลองได้ 0.0709 ต่อชั่วโมง และความเข้มข้นของเมทานอลวิกฤตเท่ากับ 3.65 กรัม/ลิตร

พิจารณาผลการศึกษาความเข้มข้นของเมทานอลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 8) พบว่าพลาสติกที่มีการเติมเมทานอลสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูงกว่าพลาสติกควบคุมที่ไม่มีการเติมเมทานอลเฉลี่ยประมาณ 2 เท่า และพลาสติกที่มีความเข้มข้นของเมทานอล 1 กรัม/ลิตร ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าพลาสติกที่เพาะเลี้ยงด้วยเมทานอลความเข้มข้นอื่น ๆ แต่เมื่อพิจารณาระยะเวลาการเพาะเลี้ยงชั่วโมงที่ 36 พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ของทุกพลาสติกเพิ่มขึ้นจากการเพาะเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง และสูงสุดในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีเมทานอลความเข้มข้น 2 กรัม/ลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงจนกระทั่งชั่วโมงที่ 86 พบว่า ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงสุดในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่มีเมทานอลความเข้มข้น 6 กรัม/ลิตร จากผลการทดลองดังกล่าวพิจารณาให้เห็นว่าความเข้มข้นของเมทานอล 1 กรัม/ลิตร เพียงพอต่อการชักนำให้เซลล์ผลิตรีคอมบิแนนต์เอนไซม์ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง แต่หลังจากเพาะเลี้ยงนานจนถึงชั่วโมงที่ 86 แล้วเมทานอลขาดแคลน ทำให้เกิดการผลิตเอนไซม์ได้อย่างจำกัด ตรงกันข้ามกับเมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยเมทานอลความเข้มข้น 6 กรัม/ลิตร พบว่าภายหลังชักนำด้วยเมทานอล 36 ชั่วโมง กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสยังไม่สูงมากนัก ซึ่งเกิดจากผลการยับยั้งเซลล์ด้วยสับสเตรตความเข้มข้นสูง แต่เมื่อทำการเพาะเลี้ยงจนถึงชั่วโมงที่ 86 พบว่าเซลล์ใช้เมทานอลที่สะสมไว้ในช่วงแรกจนสามารถผลิตกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสได้สูงสุด 27.14 ยูนิต/ลิตร

ตารางที่ 6 ผลของเมทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อ *P. pastoris*

อินดิคชัน (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นเมทานอล (กรัม/ลิตร)						
	0	1	2	3	4	5	6
0	6.544	6.376	5.496	6.176	5.656	5.152	4.976
3	6.128	6.952	6.400	6.056	5.648	5.304	5.504
6	6.457	6.352	5.808	5.544	5.728	5.256	4.984
9	6.704	6.336	6.512	6.040	5.352	6.112	5.240
12	6.920	6.320	6.672	6.368	5.784	6.088	5.200
15	6.400	6.648	6.544	6.080	5.760	5.624	5.040
18	6.416	6.824	6.540	5.560	5.640	6.136	5.832
21	5.864	6.548	6.528	6.384	5.984	5.800	5.904
24	6.704	6.776	6.288	6.216	6.080	6.028	5.640
27	6.280	6.520	6.600	6.288	5.792	6.016	5.856
30	6.280	6.136	6.496	6.504	6.208	5.752	6.072
33	6.296	6.592	6.760	6.568	6.648	6.832	6.176
36	6.648	6.704	6.520	7.040	6.496	6.400	6.080

ตารางที่ 7 ผลของเมทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อ *P. pastoris*

อินดิคชัน (ชั่วโมง)	ความเข้มข้นเมทานอล (กรัม/ลิตร)						
	0	1	2	3	4	5	6
0	4.52	4.14	3.74	4.08	3.20	3.50	3.60
3	4.78	4.15	4.08	4.56	3.64	4.10	3.66
6	4.82	4.18	4.04	5.51	4.62	3.78	3.69
9	4.92	4.48	4.00	4.57	3.46	3.58	3.74
12	4.30	4.26	3.88	4.38	3.76	3.66	3.64
15	4.22	4.28	3.96	4.10	3.60	3.52	3.74
18	4.90	4.54	4.06	4.42	3.92	4.84	3.62
21	4.24	4.84	4.38	4.76	3.72	3.94	3.72
24	4.82	4.72	4.06	4.28	3.64	3.84	3.88
27	4.12	4.22	3.92	4.60	3.70	3.78	3.82
30	4.20	3.90	4.00	4.56	4.16	4.02	3.80
33	4.36	4.38	4.06	4.84	4.12	3.90	3.80
36	4.14	4.04	3.98	5.00	4.28	3.96	3.80

ตารางที่ 8 ผลของเมทานอลต่อกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสภายหลังการเพาะเลี้ยงที่เวลาต่าง ๆ

ความเข้มข้นของเมทานอล (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)		
	24 ชม.	36 ชม.	86 ชม.
0	2.54	3.10	8.68
1	6.37	9.83	17.48
2	5.05	10.38	20.10
3	4.86	8.68	18.38
4	5.08	7.12	18.53
5	5.27	7.47	16.56
6	5.10	6.44	27.14

เมื่อคำนวณค่าอัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร (Q_p) ของพลาสติกที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุดในแต่ละช่วงเวลา พบว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้เมทานอลความเข้มข้น 1 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ค่า Q_p เท่ากับ 0.26 ยูนิต/ลิตร. ชั่วโมง การเพาะเลี้ยงภายใต้เมทานอลความเข้มข้น 2 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ได้ค่า Q_p เท่ากับ 0.29 ยูนิต/ลิตร. ชั่วโมง และการเพาะเลี้ยงภายใต้เมทานอลความเข้มข้น 6 กรัม/ลิตร เป็นเวลา 86 ชั่วโมง ได้ค่า Q_p เท่ากับ 0.32 ยูนิต/ลิตร. ชั่วโมง จะเห็นได้ว่าอัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตรให้ค่าสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีเมทานอลความเข้มข้น 6 กรัม/ลิตร แต่เพื่อป้องกันการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ด้วยสภาวะความเข้มข้นสูง เนื่องจากลักษณะการผลิตเอนไซม์ของเซลล์ *P. pastoris* เป็นแบบ growth-linked product คือการผลิตเอนไซม์ไปพร้อมกับการเจริญเติบโตของเซลล์ ดังนั้นการทดลองต่อไปจึงกำหนดความเข้มข้นในการเติมเมทานอลเท่ากับ 4 กรัม/ลิตร เพื่อป้องกันปัญหาการยับยั้งการเจริญของเซลล์ดังกล่าว

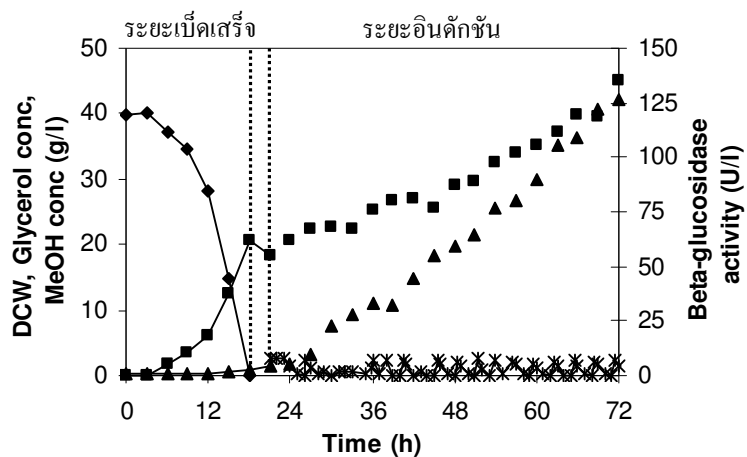
การเตรียมอาหาร Basal salt medium (BSM) พีเอช 5.0 การปรับพีเอชทำได้ยากเนื่องจากอาหารจะเกิดการตกตะกอนเมื่อพีเอชสูงเกินกว่า 5.0 โดยในระหว่างการเพาะเลี้ยงไม่ได้ควบคุมพีเอช แต่ภายหลังเสร็จสิ้นกระบวนการหมักที่ 86 ชั่วโมงแล้วได้วัดพีเอชในแต่ละพลาสติกพบว่าได้ค่าพีเอชเท่ากับ 5.5 5.4 5.5 5.4 5.5 5.25 และ 5.5 ตามลำดับ ผลดังกล่าวจึงทำให้สรุปว่า การผลิตเอนไซม์ที่แตกต่างกันในแต่ละพลาสติกเกิดจากผลของความเข้มข้นของเมทานอลที่แตกต่างกันจริง มิได้เกิดจากผลของพีเอชที่แตกต่างกัน

2. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* เพื่อผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์ เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ โดยวิธีทางสถิติ

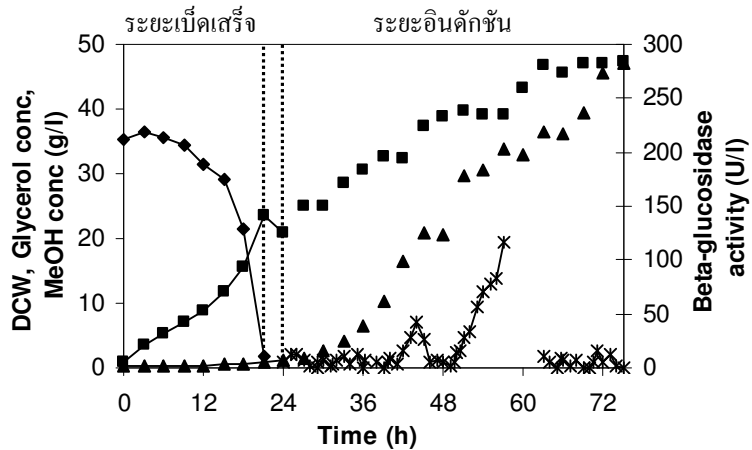
เมื่อเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* กลายพันธุ์ (A454N) ในถังหมักภายใต้สภาวะที่ได้ ออกแบบโดยอาศัย L_4 Orthogonal Array และพิจารณาถึงลักษณะคุณภาพจากพารามิเตอร์ 3 ชนิด ได้แก่ กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร (Q_p) และผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล ($Y_{p/m}$) เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมตามแนวทางวิธีทางสถิติ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 9 และภาพที่ 11-14

ตารางที่ 9 ค่ากิจกรรมเอนไซม์ อัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร และผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล จากการเพาะเลี้ยงที่สภาวะการทดลองต่าง ๆ

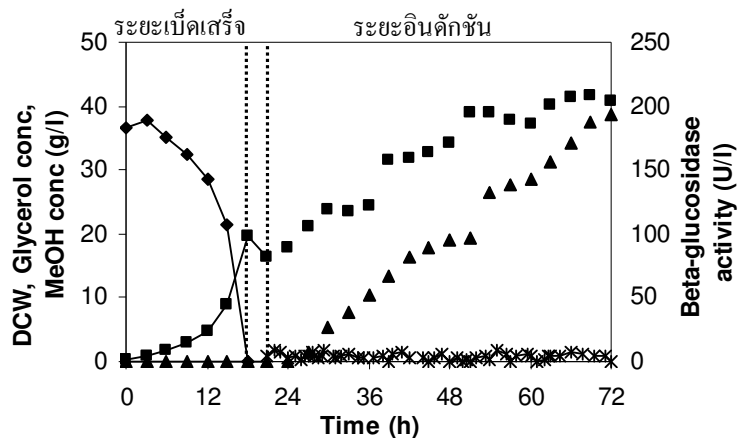
การทดลอง	สภาวะการทดลอง			กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต/ลิตร)	Q_p (ยูนิต/ลิตร.ชั่วโมง)	$Y_{p/m}$ (ยูนิต/ลิตร.กรัม)
	DO (%)	pH	T (°C)			
T1	25	5.0	30	126.34	2.40	1.75
T2	25	5.5	28	283.19	5.42	3.04
T3	50	5.0	28	193.63	3.80	1.51
T4	50	5.5	30	232.10	4.42	2.57



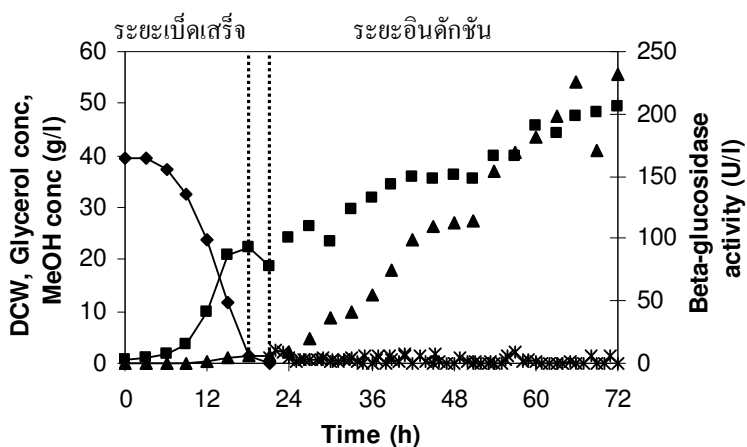
ภาพที่ 11 ผลการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ในสภาวะการทดลองที่ T1 (สัญลักษณ์ ♦ ■ ▲ และ * ความเข้มข้นกลีเซอรอล น้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และปริมาณเมทานอลที่สะสม)



ภาพที่ 12 ผลการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ในสภาวะการทดลองที่ T2 (สัญลักษณ์ ♦ ■ ▲ และ * ความเข้มข้นกลีเซอรอล น้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และปริมาณเมทานอลที่สะสม)



ภาพที่ 13 ผลการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ในสภาวะการทดลองที่ T3 (สัญลักษณ์ ♦ ■ ▲ และ * ความเข้มข้นกลีเซอรอล น้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และปริมาณเมทานอลที่สะสม)



ภาพที่ 14 ผลการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ในสภาวะการทดลองที่ T4 (สัญลักษณ์ ♦ ■ ▲ และ * ความเข้มข้นกลีเซอรอล น้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และปริมาณเมทานอลที่สะสม)

ภาพที่ 11-14 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของกลีเซอรอล ความเข้มข้นของเมทานอลและกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในระหว่างการทดลองภายใต้สภาวะ T1-T4 รายละเอียดของผลข้อมูลและค่าพารามิเตอร์জনপদসত্রকারমকীন ๆ ได้แก่ อัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ต่อกลีเซอรอล (μ_g) อัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์ต่อเมทานอล (μ_m) ผลได้ของเซลล์ต่อกลีเซอรอล ($Y_{x/g}$) ผลได้ของเซลล์ต่อเมทานอล ($Y_{x/m}$) อัตราจำเพาะการใช้กลีเซอรอล (q_g) อัตราจำเพาะการใช้เมทานอล (q_m) และอัตราจำเพาะการผลิตเอนไซม์ (q_p) แสดงในตารางผนวกที่ ค1 และตารางผนวกที่ ค3-ค6

พิจารณาความสัมพันธ์ของพารามิเตอร์อื่น ๆ ทางজনপদসত্রকারমকীনที่ได้จากการทดลอง (ตารางผนวกที่ ค1) จะสังเกตได้ว่าอุณหภูมิการเพาะเลี้ยงที่ 28 องศาเซลเซียสทำให้อัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์จากกลีเซอรอล (μ_g) มีค่าน้อยกว่าการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และพบว่าอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เซลล์สามารถใช้เมทานอลในระยะอินดิคชันได้ดีกว่า เมื่อพิจารณาผลของค่าพีเอชพบว่าที่พีเอช 5.5 ส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงกว่าการเพาะเลี้ยงที่พีเอช 5 นอกจากนี้สังเกตได้ว่าอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์จากเมทานอล (μ_m) มีความสัมพันธ์กับค่าออกซิเจนละลาย กล่าวคือ เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ภายใต้ค่าออกซิเจนละลายสูงขึ้นพบว่าอัตราการเจริญจำเพาะของเซลล์จากเมทานอล (μ_m) มีค่าเพิ่มขึ้นเล็กน้อย

เมื่อพิจารณาผลของกิจกรรมเอนไซม์ อัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร (Q_p) และผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล ($Y_{p/m}$) เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักกำหนดให้ระยะเวลาอินดิคชันเท่ากับ 51 ชั่วโมง แล้วคำนวณค่าอัตราส่วน S/N (S/N ratio) โดยอาศัยแบบการคำนวณตามลักษณะของผลิตภัณฑ์ คือ $QC = B$ (bigger is better) แสดงผลการคำนวณดังตารางที่ 10 จากนั้นนำค่าอัตราส่วน S/N มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยของปัจจัยในแต่ละระดับ เพื่อหาอิทธิพลของปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล แสดงดังตารางที่ 11 และหาระดับของปัจจัยที่เหมาะสมโดยการเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วน S/N กับระดับของปัจจัยต่าง ๆ ดังภาพที่ 15-17

ผลการทดลองในตารางที่ 10 จะเห็นได้ว่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอยู่ระหว่าง 126.34-283.19 ยูนิต/ลิตร อัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตรอยู่ระหว่าง 2.40-5.42 ยูนิต/ลิตร.ชั่วโมง และพบว่าสภาวะการทดลองที่ T2 คือ สภาวะที่เพาะเลี้ยงภายใต้ค่าออกซิเจนละลาย 25 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.5 และอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ให้ค่าอัตราส่วน S/N สูงสุดต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล เมื่อพิจารณาผลการวิเคราะห์อิทธิพลของแต่ละปัจจัยในตารางที่ 11 พบว่าปัจจัยที่มี

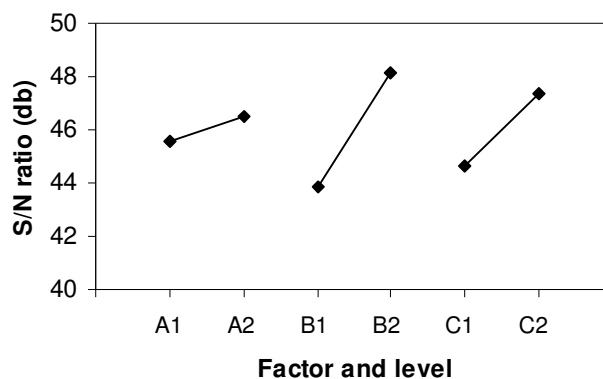
อิทธิพลต่อพารามิเตอร์ทั้ง 3 สูงสุดคือ พีเอช ซึ่งมีอิทธิพลต่อกิจกรรมเอนไซม์ อัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล เท่ากับ 53.648 เปอร์เซ็นต์ 51.239 เปอร์เซ็นต์ และ 76.340 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Inan *et al.* (1999) ซึ่งพบว่าพีเอชเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรีคอมบิแนนต์ anticoagulant peptide สูงสุด เมื่อพิจารณาผลกระทบของอุณหภูมิพบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยรองที่มีผลกระทบต่อกิจกรรมเอนไซม์และอัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร แต่กลับให้ผลกระทบน้อยต่อผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล และเมื่อพิจารณาค่าออกซิเจนละลายพบว่าปัจจัยที่มีอิทธิพลน้อยที่สุดต่อกิจกรรมเอนไซม์และอัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร แต่กลับเป็นปัจจัยรองที่มีอิทธิพลต่อผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอลเท่ากับ 22.21 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 10 ค่าอัตราส่วน S/N ของกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาณและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล

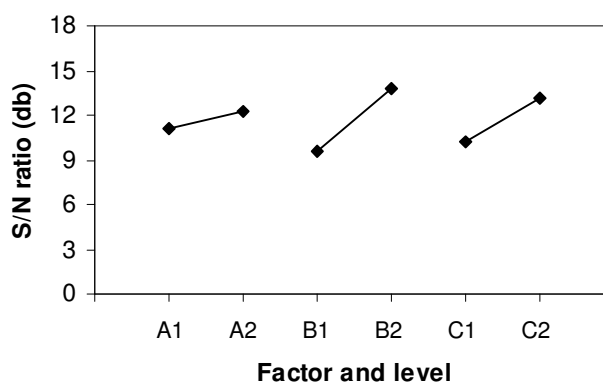
ชุดการทดลอง	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส			อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาณ			ผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล		
	Y	1/Y ²	S/N ratio	Y	1/Y ²	S/N ratio	Y	1/Y ²	S/N ratio
T1	126.34	6.26 x 10 ⁻⁵	42.031	2.40	0.174	7.604	1.75	0.326	4.861
T2	283.19	1.25 x 10 ⁻⁵	49.042	5.42	0.034	14.680	3.04	0.108	9.657
T3	193.63	2.67 x 10 ⁻⁵	45.739	3.80	0.069	11.596	1.51	0.439	3.579
T4	232.10	1.86 x 10 ⁻⁵	47.313	4.42	0.051	12.908	2.57	0.151	8.199

ตารางที่ 11 อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร และผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล

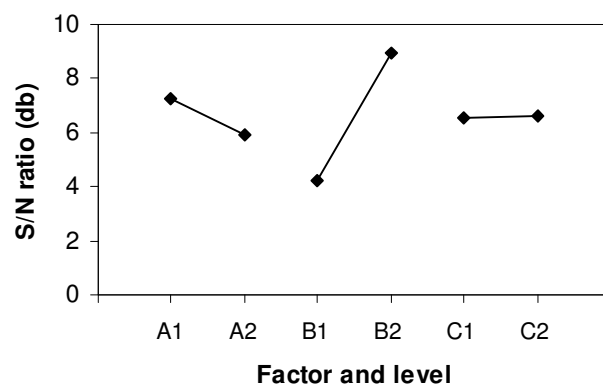
กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส				
ปัจจัย/ระดับ	1	2	Main effect	% Main effect
% DO	45.536	46.526	0.990	12.377
พีเอช	43.885	48.178	4.292	53.648
อุณหภูมิ	44.672	47.391	2.718	33.975
อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร (Q_p)				
ปัจจัย/ระดับ	1	2	Main effect	% Main effect
% DO	11.142	12.252	1.110	13.560
พีเอช	9.600	13.794	4.194	51.239
อุณหภูมิ	10.256	13.138	2.881	35.201
ผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล ($Y_{p/m}$)				
ปัจจัย/ระดับ	1	2	Main effect	%Main effect
% DO	7.259	5.889	1.370	22.216
พีเอช	4.220	8.928	4.708	76.340
อุณหภูมิ	6.530	6.619	0.089	1.443



ภาพที่ 15 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์



ภาพที่ 16 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่ออัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร



ภาพที่ 17 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อค่าผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล

จากภาพที่ 15-17 สามารถพิจารณาระดับของแต่ละปัจจัยที่ให้อัตราส่วน S/N สูงสุด ซึ่งสรุปเป็นสถานะที่เหมาะสม 2 สถานะที่ระยะเวลาการผลิตเอนไซม์ 51 ชั่วโมง คือ สถานะที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุดและอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรสูงสุด และสถานะที่ให้ค่าผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอลสูงสุด แสดงดังตารางที่ 12 และ 13 ตามลำดับ

ตารางที่ 12 สถานะที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุดและอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรสูงสุด (สถานะ A)

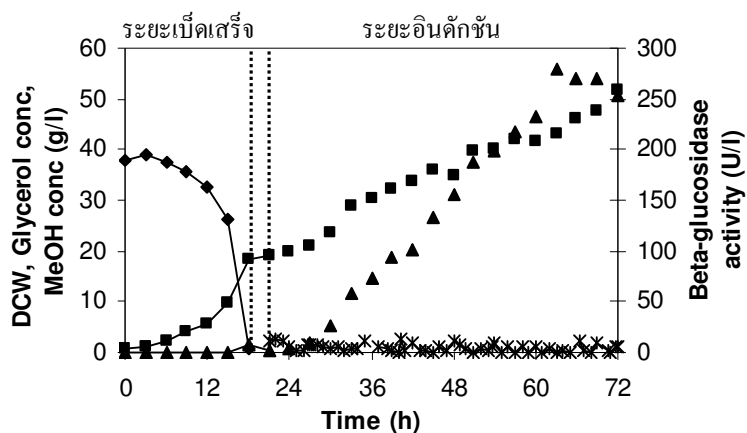
ปัจจัย	ระดับ	ค่า
A: ค่าออกซิเจนละลาย (%DO)	2	50
B: ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)	2	5.5
C: อุณหภูมิ (°C)	2	28

ตารางที่ 13 สถานะที่ให้ค่าผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอลสูงสุด (สถานะ B)

ปัจจัย	ระดับ	ค่า
A: ค่าออกซิเจนละลาย (%DO)	1	25
B: ค่าความเป็นกรดด่าง (pH)	2	5.5
C: อุณหภูมิ (°C)	2	28

พิจารณาสถานะ A เป็นสถานะที่ไม่ได้อยู่ในการทดลองขณะที่สถานะ B เป็นสถานะเดียวกับการทดลอง T2 ซึ่งจุดแตกต่างของสถานะทั้งสองคือ ค่าออกซิเจนละลาย โดยสถานะ A มีค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสถานะ B มีค่าออกซิเจนละลายเท่ากับ 25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาผลกระทบของค่าออกซิเจนละลายต่อผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอลซึ่งเท่ากับ 22 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นหากเลือกสถานะที่เหมาะสม A น่าจะส่งผลกระทบต่อค่าผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอลไม่มากนัก จึงเลือกสถานะ A ในการประมาณค่าและยืนยันผลการทดลองโดยพิจารณากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสและอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรเป็นสำคัญ

การคาดหมายค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล จากสถานะที่เหมาะสม A ด้วยวิธีทางสถิติ แสดงในรูป Y_{exp} ผลการคำนวณได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส เท่ากับ 317.39 หน่วย/ลิตร อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร เท่ากับ 6.16 หน่วย/ลิตร.ชั่วโมง และผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล เท่ากับ 2.6 หน่วย/ลิตร.กรัม ซึ่งผลการทดลองยืนยันสถานะที่เหมาะสม A ให้ค่าเท่ากับ 252.29 หน่วย/ลิตร 4.91 หน่วย/ลิตร.ชั่วโมง และ 2.07 กรัม/ลิตร.กรัม ตามลำดับ โดยค่าพารามิเตอร์ทั้งสามมีความคลาดเคลื่อนไปจากค่าคาดหมาย 20 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 18 ผลการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ภายใต้สถานะที่เหมาะสมจากวิธีทางสถิติ (สัญลักษณ์ ◆ ■ ▲ และ ✱ ความเข้มข้นกลีเซอรอล น้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และปริมาณเมทานอลที่สะสม)

ผลการยืนยันสภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทากูชิ แสดงดังภาพที่ 18 ส่วนรายละเอียดข้อมูลแสดงในตารางผนวกที่ ค7 จากภาพจะเห็นได้ว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุด ณ ชั่วโมงที่ 63 หรือภายหลังเข้าสู่ระยะอินคักชันเป็นเวลา 42 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อย ๆ ลดลง จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก จากผลดังกล่าวจึงหาสภาวะที่เหมาะสมใหม่โดยเปลี่ยนการพิจารณาค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร และผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล ที่เวลาระยะอินคักชันจาก 51 ชั่วโมง เป็น 42 ชั่วโมง เพื่อยืนยันถึงประสิทธิภาพการทำการนายผลการทดลองโดยวิธีทากูชิ แสดงผลการคำนวณอัตราส่วน S/N ผลกระทบของปัจจัยต่อกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร ผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล และผลการหาสภาวะที่เหมาะสมได้ดังตาราง 14, 15 และภาพที่ 19-21 ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาตารางที่ 14 พบว่า สภาวะการเพาะเลี้ยงที่ T2 ยังคงให้ค่าอัตราส่วน S/N สูงสุด และเมื่อพิจารณาปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอลอีกครั้งพบว่า พีเอช ยังคงเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบสูงสุดคือ มากกว่า 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิพบว่ายังเป็นปัจจัยรองที่ส่งผลกระทบต่อกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร ซึ่งมีค่าประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ แต่มีอิทธิพลน้อยต่อค่าผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล ส่วนค่าออกซิเจนละลายมีผลกระทบประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ ต่อพารามิเตอร์ทั้ง 3 (ตารางที่ 15)

จากภาพที่ 19-21 แสดงค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล ทำให้ได้สภาวะที่เหมาะสม 2 สภาวะ (C, D) คือ สภาวะที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรสูงสุด และสภาวะที่ให้ค่าผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอลสูงสุด ดังตารางที่ 16 และ 17

พิจารณาสภาวะที่เหมาะสมต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสและอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร (C) พบว่าเป็นสภาวะเดียวกับสภาวะ A ส่วนสภาวะ D มีความแตกต่างจากสภาวะ B ตรงค่าของอุณหภูมิของสภาวะ D เท่ากับ 30 องศาเซลเซียส ในขณะที่สภาวะ B เท่ากับ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งเมื่อพิจารณาผลกระทบของอุณหภูมิต่อผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอลพบว่าไม่มีอิทธิพลเพียง 10 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า การวิเคราะห์ผลที่

ระยะอินคักชันเท่ากับ 42 ชั่วโมง และ 51 ชั่วโมง ให้ผลสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสไม่แตกต่างกันนัก

พิจารณาค่าคาดหมายของกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล โดยใช้สภาวะที่เหมาะสม C (หรือ A) พบว่า ค่า Y_{exp} ของกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล ที่ระยะอินคักชัน 42 ชั่วโมง เท่ากับ 252.45 ยูนิต/ลิตร 5.94 ยูนิต/ลิตร.ชั่วโมง และ 2.34 ยูนิต/ลิตร.กรัม ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองครั้งยืนยันสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าว พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล มีความคลาดเคลื่อนจากค่าคาดหมายเท่ากับ 10.48 เปอร์เซ็นต์ 11.78 เปอร์เซ็นต์ และ 13.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 18 จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพในการทำนายผลการทดลองจากสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีทาทุชิได้แม่นยำขึ้น

จากการทดลองได้สภาวะที่เหมาะสม คือ ค่าออกซิเจนละลาย 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.5 และอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 28 องศาเซลเซียส (สภาวะ A, C) พิจารณาค่าออกซิเจนละลาย 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์และอัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตรสูงกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้ค่าออกซิเจนละลาย 25 เปอร์เซ็นต์ พิจารณาได้ว่าเมทานอลถูกใช้ในกระบวนการผลิตเป็นเอนไซม์และมวลเซลล์โดยอาศัยออกซิเจนในกระบวนการสลายของเมทานอล โดยออกซิเจนปริมาณมากจะส่งเสริมให้การผลิตเอนไซม์มากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Lee *et al.* (2003) พบว่าอัตราการผลิตรีคอมบิแนนต์โปรตีนเพิ่มขึ้นที่ DO-set point สูงขึ้น แต่เมื่อพิจารณาค่าออกซิเจนละลาย 50 เปอร์เซ็นต์พบว่า กลับส่งผลให้ค่าผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอลต่ำกว่าการเพาะเลี้ยงภายใต้ค่าออกซิเจนละลาย 25 เปอร์เซ็นต์ พิจารณาได้ว่า ค่าผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอลเป็นประสิทธิภาพของการใช้เมทานอล 1 กรัมในการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเอนไซม์ แต่เนื่องจากออกซิเจนประมาณมากเกินไป (50 เปอร์เซ็นต์) ส่งเสริมการผลิตเป็นมวลเซลล์ในวิถีแอสซิมิลชันเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงส่งผลให้ประสิทธิภาพของเมทานอลถูกแบ่งไปใช้เป็นพลังงานในการผลิตเป็นมวลเซลล์เพิ่มขึ้น ขณะที่ค่าออกซิเจนละลาย 25 เปอร์เซ็นต์ ให้ประสิทธิภาพในการเปลี่ยนเมทานอลไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้สูงกว่า พิจารณาค่าพีเอช 5.5 ซึ่งส่งผลในการเพิ่มค่ากิจกรรมเอนไซม์ อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ต่อเมทานอล พิจารณาว่าพีเอช 5.5 น่าจะส่งผลต่อการพับม้วนและความเสถียรของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสในน้ำหมักมากกว่าเมื่อเพาะเลี้ยงภายใต้พีเอช 5 และเมื่อพิจารณาอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งส่งผลใน

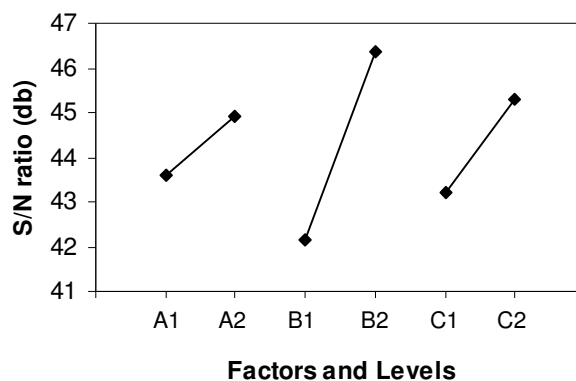
การเพิ่มค่ากิจกรรมเอนไซม์ อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอลเมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยพบว่าความต้องการของเซลล์ในการใช้เมทานอลมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (ตารางผนวกที่ ค1) ดังนั้นจึงทำให้เซลล์สามารถผลิตเป็นเอนไซม์ได้มากขึ้นตามปริมาณของเมทานอลที่ใช้ด้วย

ตารางที่ 14 ค่าอัตราส่วน S/N ของกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร และผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล (ระยะเวลาอินดิคชัน 42 ชั่วโมง)

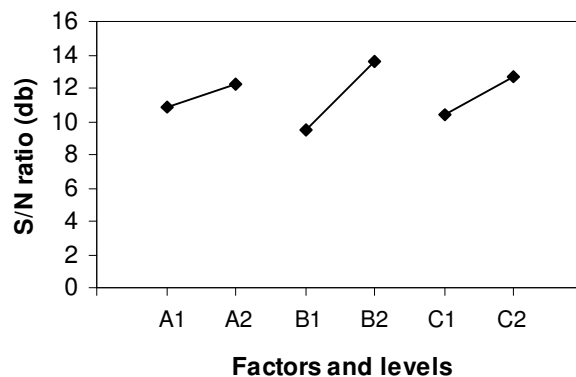
ชุดการทดลอง	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส			อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร			ผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล		
	Y	1/Y ²	S/N ratio	Y	1/Y ²	S/N ratio	Y	1/Y ²	S/N ratio
T1	105.47	8.99 x10 ⁻⁵	40.463	2.41	0.172	7.640	1.77	0.319	4.959
T2	217.49	2.11 x10 ⁻⁵	46.749	5.02	0.040	14.014	2.69	0.138	8.595
T3	155.77	4.12 x10 ⁻⁵	43.850	3.71	0.073	11.387	1.43	0.489	3.107
T4	198.41	2.54 x10 ⁻⁵	45.951	4.56	0.048	13.179	2.53	0.156	8.062

ตารางที่ 15 อิทธิพลหลักของแต่ละปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส

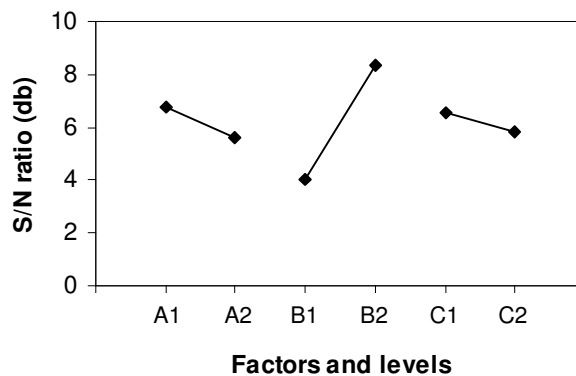
กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสที่ภายหลังระยะอินคิวชัน 42 ชั่วโมง				
ปัจจัย/ระดับ	1	2	Main effect	% Main effect
% DO	43.606	44.900	1.295	17.079
พีเอช	42.156	46.350	4.194	55.321
อุณหภูมิ	43.207	45.299	2.092	27.599
อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร (Q_p)				
ปัจจัย/ระดับ	1	2	Main effect	% Main effect
% DO	10.827	12.283	1.456	18.598
พีเอช	9.514	13.597	4.083	52.143
อุณหภูมิ	10.410	12.701	2.291	29.259
ผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล ($Y_{p/m}$)				
ปัจจัย/ระดับ	1	2	Main effect	%Main effect
% DO	6.777	5.585	1.193	19.398
พีเอช	4.033	8.329	4.296	69.866
อุณหภูมิ	6.511	5.851	0.660	10.735



ภาพที่ 19 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์



ภาพที่ 20 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่ออัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร



ภาพที่ 21 ค่าอัตราส่วน S/N ของปัจจัยต่าง ๆ ในแต่ละระดับที่มีผลต่อค่าผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล

ตารางที่ 16 สภาวะที่ให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุดและอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตรสูงสุด (สภาวะ C)

ปัจจัย	ระดับ	ค่า
A: ค่าออกซิเจนละลาย (%DO)	2	50
B: ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)	2	5.5
C: อุณหภูมิ (°C)	2	28

ตารางที่ 17 สภาวะที่ให้ค่าผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอลสูงสุด (สภาวะ D)

ปัจจัย	ระดับ	ค่า
A: ค่าออกซิเจนละลาย (%DO)	1	25
B: ค่าความเป็นกรดต่าง (pH)	2	5.5
C: อุณหภูมิ (°C)	1	30

ตารางที่ 18 การเปรียบเทียบค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุด อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร (Q_p) และผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล ($Y_{p/m}$) ที่ได้จากการประมาณค่าและจากการยืนยันผลการทดลองในการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสด้วยสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีทางสถิติ

พารามิเตอร์	Y_{exp}	ยืนยันผลการทดลอง
1) กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุด	252.45 ยูนิต/ลิตร	278.90 ยูนิต/ลิตร
2) อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร (Q_p)	5.94 ยูนิต/ลิตร.ชม.	6.64 ยูนิต/ลิตร.ชม.
3) ผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล ($Y_{p/m}$)	2.34 ยูนิต/ลิตร.กรัม	2.66 ยูนิต/ลิตร.กรัม

การหาสภาวะที่เหมาะสมด้วยวิธีทากุชิโดยอาศัย L_4 Orthogonal Array ศึกษาปัจจัย 3 ปัจจัย จำนวน 2 ระดับ จะต้องศึกษาข้อมูลและสังเกตลักษณะของเชื้อเบื้องต้นในการผลิตเอนไซม์โดยการทดลองในระดับฟลasks เพื่อเป็นแนวทางสำหรับการเลือกระดับและปัจจัยที่เหมาะสม นอกจากนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลที่น่าเชื่อถือขึ้น ควรทำการทดลองซ้ำภายใต้สภาวะการเพาะเลี้ยงต่าง ๆ เพื่อหาค่าความแปรปรวนระหว่างการทดลอง และสามารถคำนวณค่าทางสถิติโดยอาศัยตาราง ANOVA สำหรับปัจจัยที่มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้สามารถกำจัดปัจจัยที่มีผลกระทบน้อยออกไปเพื่อลดจำนวนและขั้นตอนในการทดลอง

สำหรับการทดลองเพื่อหาสภาวะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตรีคอมบิแนนต์เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ได้แบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์โดยใช้กลีเซอรอลเป็นแหล่งคาร์บอน ระยะอดอาหารและระยะอินดักชัน โดยทำการทดลองที่ T1 T3 และ T4 กลีเซอรอลถูกใช้หมดไปภายหลังการหมัก 18 ชั่วโมง ส่วนการทดลอง T2 กลีเซอรอลถูกใช้หมดไปภายหลังชั่วโมงที่ 21 ดังนั้นจึงออกแบบให้มีระยะอดอาหาร (starvation phase) เพื่อให้เซลล์เตรียมพร้อมในการเปลี่ยนสับสเตรตตัวใหม่ นอกจากนี้เพื่อเป็นการกำหนดจุดเริ่มต้นในระยะการเติมเมทานอล (ระยะอินดักชัน) โดยทำการทดลอง T1 T3 และ T4 ทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีระยะอินดักชันเริ่มตั้งแต่เวลาการเพาะเลี้ยงที่ 21-72 ชั่วโมง ยกเว้นการทดลอง T2 ซึ่งกลีเซอรอลถูกใช้หมดช้ากว่าการทดลองอื่น ๆ จึงเริ่มต้นเติมเมทานอลที่เวลาการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมงและสิ้นสุดที่ 75 ชั่วโมง ดังนั้นระยะเวลาการผลิตเอนไซม์ในระยะอินดักชันจึงเท่ากันทุกการทดลองคือ 51 ชั่วโมง สำหรับเทคนิคการเติมเมทานอลนั้นใช้วิธีการเติมแบบเป็นระยะ (intermittent) ที่เมทานอลความเข้มข้น 4 กรัม/ลิตร โดยสังเกตจากการเปลี่ยนแปลงอัตราการกวนและค่าออกซิเจนละลาย กล่าวคือ เซลล์อาศัยออกซิเจนในกระบวนการเมแทบอลิซึมของเมทานอลเพื่อเปลี่ยนไปเป็นพลังงานและส่วนประกอบของเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงต้องการใช้ออกซิเจนปริมาณมากภายหลังการเติมเมทานอล จึงทำให้อากาศในถังหมักลดลงอย่างรวดเร็ว แต่เนื่องจากการควบคุมการให้อากาศโดยกำหนดค่าออกซิเจนละลาย cascade ระหว่างอัตราการให้อากาศและอัตราการกวน จึงส่งผลให้ระบบปรับเพื่อรักษาค่าออกซิเจนละลายให้คงที่ โดยการเพิ่มอัตราการกวนอย่างรวดเร็ว ในทางกลับกันเมื่อไม่มีเมทานอลในระบบ อากาศที่ให้อาจเพียงพอกับค่าออกซิเจนละลายที่กำหนด ดังนั้นระบบจึงปรับให้อัตราการกวนลดลง ลักษณะเช่นนี้เป็นตัวบ่งชี้ในการเติมเมทานอลได้เป็นอย่างดีโดยไม่ต้องรอผลการวิเคราะห์จากวิธี Gas Chromatography เทคนิคนี้อาศัยหลักการเช่นเดียวกับเทคนิค DO-stat หรือวิธี DO spike ต่างกันตรงที่เทคนิคทั้งสองอาศัยการสังเกตจากค่าออกซิเจนละลายที่เพิ่มขึ้นแทนอัตราการกวน เมื่อเกิดภาวะที่สับสเตรตถูกใช้หมดไป โดยไม่ได้ควบคุมค่าออกซิเจนละลายให้คงที่ ลักษณะการควบคุมการเพาะเลี้ยงของ T1-T4 และการทดลองยืนยันสภาวะที่เหมาะสม แสดงดังภาพผนวกที่ ค2-ค7

ปัญหาการสะสมของเมทานอลในการทดลองที่ T2 จากภาพที่ 12 ซึ่งแสดงผลการเพาะเลี้ยง ภายใต้สภาวะที่มีค่าออกซิเจนละลาย 25 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.5 และอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส พบว่า ระหว่างการเพาะเลี้ยงเกิดการสะสมของเมทานอล 2 ช่วง คือที่เวลา 43-45 ชั่วโมง และ 51-62 ชั่วโมง เนื่องจากในขณะที่ทำการทดลองอัตราการกวนของไบโพลลดลง จึงเติมเมทานอลเข้าสู่ระบบ แต่พบว่า ภายหลังจากเติมเมทานอล อัตราการกวนก็ยังไม่เพิ่มขึ้น ซึ่งเข้าใจว่าเซลล์อาจใช้เมทานอลจนหมดอย่างรวดเร็ว จึงทำการเติมเมทานอล 4 กรัม/ลิตร ลงไปทุกชั่วโมงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 50.5-57 อัตราการกวนก็ยังไม่เพิ่มขึ้น มีค่าอยู่ที่ 14 รอบ/นาที จึงหยุดการเติมเมทานอลลง จนกระทั่งชั่วโมงการเพาะเลี้ยงที่ 61 อัตราการกวนกลับหมุนเร็วขึ้นและสามารถทำการเพาะเลี้ยงจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก เมื่อวัดความเข้มข้นของเมทานอลภายหลังจากการทดลองพบว่า ช่วงเวลาที่ไบโพลหมุนช้าลง ส่งผลต่อการสะสมของเมทานอลสูงถึง 19.33 กรัม/ลิตร เมื่อพิจารณาค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง ระหว่างช่วงเวลาดังกล่าวพบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งคงที่ เนื่องจากเกิดการสะสมของเมทานอลความเข้มข้นสูง ดังได้กล่าวแล้วจากผลการทดลองข้างต้น และเมื่อพิจารณาถึงผลต่อการผลิตเอโนไซม์ พบว่าเซลล์สามารถผลิตเอโนไซม์ได้อย่างต่อเนื่องไม่เห็นผลการยับยั้งจากเมทานอลความเข้มข้นสูง

จากปัญหาที่เกิดขึ้นจึงทำการทดลองซ้ำภายใต้สภาวะเดิม พบว่าเกิดเหตุการณ์ดังกล่าวอีกครั้ง คืออัตราการกวนไม่เพิ่มขึ้นภายหลังจากเติมเมทานอล ผู้ทำการทดลองเกรงว่าจะเกิดการสะสมของเมทานอล จึงหยุดการเติมและสังเกตการทดลองต่อไป พบว่าอัตราการกวนก็ไม่เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด จนกระทั่งชั่วโมงที่ 52 ได้ลองเติมเมทานอลต่อ โดยปรับอัตราการกวนขึ้นและทำการเติมเมทานอลโดยไม่เว้นระยะให้อัตราการกวนลดต่ำลงมาก ลักษณะการควบคุมการเพาะเลี้ยงแสดงผลดังภาพผนวกที่ ค3 และภาพผนวกที่ ค4

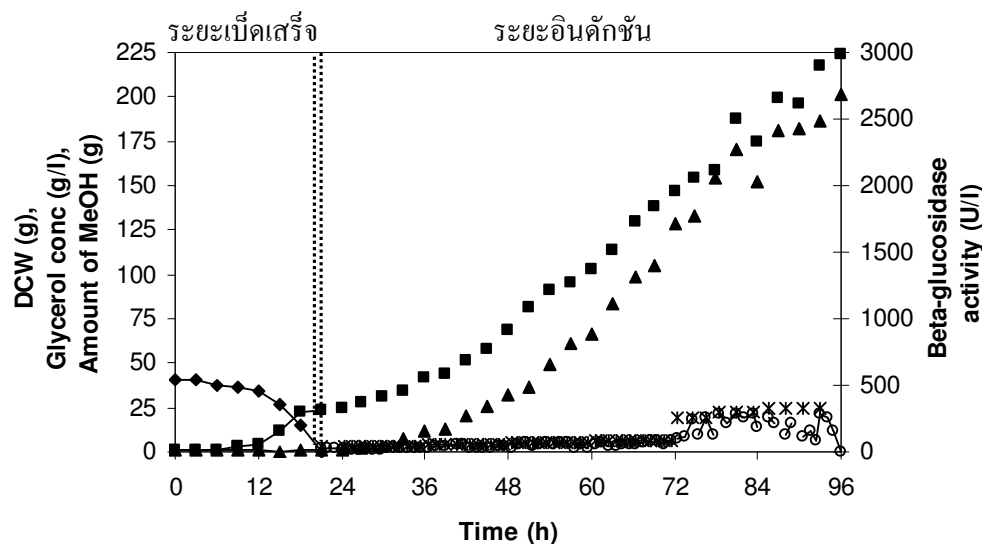
จากผลการทดลองทั้งสองครั้งดังกล่าวสามารถตั้งข้อสังเกตได้ว่า เมื่ออัตราการกวนลดลงในขณะที่มีการเติมเมทานอลเข้าสู่ระบบ อัตราการกวนอาจลดต่ำลงจนมีผลต่อการกวนผสมระหว่างเมทานอลกับน้ำหมัก ทำให้เซลล์ไม่สามารถนำเมทานอลไปใช้ได้ โดยการทดลองครั้ง T2 ได้ทำการเติมเมทานอลอย่างต่อเนื่องถึงแม้อัตราการกวนจะไม่เพิ่มขึ้นก็ตาม จนกระทั่งเมทานอลเกิดการสะสมมากเกินไปที่เซลล์รับรู้ถึงการมีเมทานอลในระบบ ดังนั้นจึงส่งผลให้ออกซิเจนในถังหมักถูกใช้อย่างรวดเร็วจนทำให้ระบบการควบคุมค่าออกซิเจนละลายปรับอัตราการกวนขึ้นเพื่อรักษาปริมาณออกซิเจนละลายให้เท่ากับค่าที่กำหนด

จากการทดลองดังกล่าวทำให้เห็นถึงความสำคัญของการกวนผสม (mixing) ซึ่งมีผลต่อการนำสับสเตรตไปใช้เพื่อการผลิตเซลล์และเอนไซม์ ดังนั้นในการทดลองจึงต้องคำนึงถึงระยะการเติมเมทานอล กล่าวคือ ไม่ควรทิ้งระยะการเติมเมทานอลจนอัตราการกวนลดลงต่ำลงมาก หรือหากอัตราการกวนลดลงอย่างรวดเร็วในขณะเติมควรปรับอัตราการกวนขึ้นเพื่อช่วยการกวนผสมในระยะแรก

เมื่อพิจารณาผลของการทดลอง T2 เปรียบเทียบกับผลการทดลองยืนยันสถานะที่เหมาะสม (A, C) ที่ได้จากวิธีทางจุล โดยพิจารณาระยะอินคูกชันที่ 51 ชั่วโมง พบว่า สถานะการทดลองที่ T2 กลับให้การผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงกว่าสถานะที่เหมาะสม (A, C) แต่เมื่อพิจารณาที่ระยะอินคูกชัน 42 ชั่วโมง พบว่า สถานะที่เหมาะสม (A, C) ให้การผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงกว่าสถานะการทดลอง T2 จากผลดังกล่าวเมื่อพิจารณาที่สถานะการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม (A, C) พบว่า ภายหลังชั่วโมงที่ 63 ของการเพาะเลี้ยงกิจกรรมเอนไซม์ลดลง ซึ่งสันนิษฐานว่าไม่น่าเกิดจากภาวะการจำกัดของออกซิเจน เนื่องจากทำการเพาะเลี้ยงภายใต้ค่าออกซิเจนละลาย 50 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่การทดลอง T2 เพาะเลี้ยงที่ค่าออกซิเจนละลาย 25 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เมื่อพิจารณามวลเซลล์ที่ระยะเวลาดังกล่าวของทั้งสองการทดลองก็พบว่ามีปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่ากิจกรรมเอนไซม์ที่ลดลงในช่วงเวลาดังกล่าวไม่น่าเกิดจากปัญหาการขาดแคลนออกซิเจน ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่าปัญหาดังกล่าวน่าจะเกิดขึ้นภายหลังการเก็บตัวอย่างหรือการเก็บรักษาก่อนทำการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์ ที่อาจส่งผลให้เอนไซม์เกิด denature บางส่วน

3. ผลการศึกษาวิธีการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสจากยีส (A454N) ด้วยการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทางจุลินทรีย์

ผลการศึกษาการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดส ด้วยการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทางจุลินทรีย์ แสดงดังภาพที่ 22 และ ตารางที่ 19 ส่วนข้อมูลการทดลองและการควบคุมกระบวนการหมักแสดงดังตารางผนวกที่ 8 และภาพผนวกที่ 8 เมื่อพิจารณาน้ำหนักเซลล์แห้งพบว่าได้เซลล์สูงถึง 109 กรัม/ลิตร ซึ่งเป็นภาวะเซลล์ความหนาแน่นสูง (high cell density) ผลการวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร ผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล และอัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะเท่ากับ 2,681 หน่วย/ลิตร 35.64 หน่วย/ลิตร.ชั่วโมง 5.76 หน่วย/ลิตร.กรัม และ 0.33 หน่วย/ลิตร.กรัม.ชั่วโมง ตามลำดับ



ภาพที่ 22 ผลการเพาะเลี้ยงรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* โดยวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันไดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทางจุลินทรีย์ (สัญลักษณ์ ◆ ■ ▲ * และ ○ ความเข้มข้นกลีเซอรอล น้ำหนักเซลล์แห้ง (DCW) กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส ปริมาณเมทานอลที่เติม และปริมาณเมทานอลที่สะสม)

ตารางที่ 19 ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* โดยวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันไดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทางสถิติ ระยะเวลาการหมัก 96 ชั่วโมง

พารามิเตอร์	ค่า
อัตราการเจริญจำเพาะต่อกลีเซอรอล; μ_g (ต่อชั่วโมง)	0.206
อัตราการเจริญจำเพาะต่อเมทานอล; μ_m (ต่อชั่วโมง)	0.032
ผลได้ของเซลล์ต่อกลีเซอรอล; $Y_{x/g}$ (กรัม/กรัม)	0.64
ผลได้ของเซลล์ต่อเมทานอล; $Y_{x/m}$ (กรัม/กรัม)	0.43
ปริมาณเมทานอลที่ใช้; (กรัม)	463.78
อัตราการใช้กลีเซอรอลจำเพาะ; q_g (กรัม/กรัม.ชั่วโมง)	0.22
อัตราการใช้เมทานอลจำเพาะ; q_m (กรัม/กรัม.ชั่วโมง)	0.06
กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุด (ยูนิต/ลิตร)	2,681.05
กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุด (ยูนิต)	5,525.64
อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร; Q_p (ยูนิต/ลิตร.ชั่วโมง)	35.64
ผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล; $Y_{p/m}$ (ยูนิต/ลิตร.กรัม)	5.76
อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจำเพาะ; q_p (ยูนิต/ลิตร.กรัม.ชั่วโมง)	0.33

เมื่อเปรียบเทียบผลการเพาะเลี้ยงวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบคงที่ (การทดลองขั้นต้นผลทางสถิติ) กับวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได โดยพิจารณาระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมงเท่ากัน พบว่าวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันไดให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร ผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล และอัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะสูงกว่าวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบคงที่ 7 เท่า 7 เท่า 3 เท่าและ 3 เท่า ตามลำดับ แสดงค่าเปรียบเทียบดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 ค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* โดยวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบคงที่และเติมเป็นระยะแบบขั้นบันได ระยะเวลาการหมัก 72 ชั่วโมง

พารามิเตอร์	เติมเป็นระยะ แบบคงที่	เติมเป็นระยะ แบบขั้นบันได
อัตราการเจริญจำเพาะต่อกลีเซอรอล; μ_g (ต่อชั่วโมง)	0.174	0.206
อัตราการเจริญจำเพาะต่อเมทานอล; μ_m (ต่อชั่วโมง)	0.019	0.039
ผลได้ของเซลล์ต่อกลีเซอรอล; $Y_{X/g}$ (กรัม/กรัม)	0.45	0.64
ผลได้ของเซลล์ต่อเมทานอล; $Y_{X/m}$ (กรัม/กรัม)	0.27	0.51
ปริมาณเมทานอลที่ใช้; (กรัม)	120.69	238.77
อัตราการใช้กลีเซอรอลจำเพาะ; q_g (กรัม/กรัม.ชั่วโมง)	0.35	0.22
อัตราการใช้เมทานอลจำเพาะ; q_m (กรัม/กรัม.ชั่วโมง)	0.07	0.06
กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุด (ยูนิต/ลิตร)	252.29	1,716.40
อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร; Q_p (ยูนิต/ลิตร.ชั่วโมง)	4.91	33.49
ผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล; $Y_{p/m}$ (ยูนิต/ลิตร.กรัม)	2.07	7.15
อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจำเพาะ; q_p (ยูนิต/ลิตร.กรัม.ชั่วโมง)	0.14	0.46

จากผลการทดลองการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. pastoris* กลายพันธุ์ (A454N) โดยวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได ให้กิจกรรมเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงขึ้นมากกว่าวิธีการเติมแบบเดิม เมื่อพิจารณาระยะเวลาการหมักที่เท่ากัน (72 ชั่วโมง) เนื่องจากวิธีการเติมเมทานอลแบบขั้นบันไดนั้นคำนึงถึงปริมาณเซลล์ที่มีอยู่จริงในขณะทำการหมัก รวมถึงลักษณะการเกิดผลิตภัณฑ์ของรีคอมบิแนนต์ *P. pastoris* มีการเจริญเติบโตไปพร้อมกับการผลิตเอนไซม์ (growth linked product) ดังนั้นการเติมสับสเตรตให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์จึงส่งเสริมให้การผลิตเอนไซม์มากขึ้น

การเติมเมทานอลได้แบ่งลักษณะการเติมออกเป็น 2 ระยะคือ ระยะแรก (21-72 ชั่วโมง) อาศัยข้อมูลน้ำหนักรเซลล์แห้งจากการทดลองยืนยันผลทางทฤษฎีแล้วนำค่าไปคำนวณปริมาณเมทานอลที่เติม โดยกำหนดอัตราการใช้เมทานอลจำเพาะ (q_m) เท่ากับ 0.14 กรัม/กรัม.ชั่วโมง ซึ่งเป็น 2 เท่าของการทดลองครั้งยืนยันผลทางทฤษฎี ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำหนักรเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า กิจกรรมเอนไซม์เพิ่มขึ้น 7 เท่า และไม่มีผลการสะสมของเมทานอลเกิน 5 กรัม/ลิตรในช่วงเวลาการเพาะเลี้ยงดังกล่าว เมื่อพิจารณาการเติมเมทานอลระยะที่ 2 (72-86 ชั่วโมง) ซึ่งอาศัยการประมาณค่าน้ำหนักรเซลล์แห้งจากการดูคลื่นแสงของเชื้อที่ 600 นาโนเมตรในระหว่างการเพาะเลี้ยง โดยใช้กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์กับความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรกับน้ำหนักรเซลล์แห้ง (ภาพผนวกที่ ค1) ผลการทดลองพบว่าการประมาณค่ามีความคลาดเคลื่อนเฉลี่ยไปทางน้อยกว่าค่าจริง 11 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งส่งผลต่อการคำนวณปริมาณ เมทานอลที่ต่ำกว่าค่าความเป็นจริงเพียงเล็กน้อย แต่เมื่อพิจารณาปริมาณเมทานอลในช่วงหลัง 72 ชั่วโมงกลับพบว่าเกิดการสะสมของเมทานอลเกิน 5 กรัม/ลิตร ขึ้นในระยะนี้ สาเหตุเนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่ให้กับระบบไม่เพียงพอกับปริมาณเมทานอลที่เติมเข้าไป ความต้องการในการใช้ออกซิเจนมากขึ้นจนไม่สามารถควบคุมค่าออกซิเจนละลายให้เท่ากับ 50 เปอร์เซ็นต์ได้ซึ่งเป็นสถานะที่ได้จากวิธีทางทฤษฎี ดังนั้นจึงปรับค่าออกซิเจนละลายสูงสุดที่ 100 เปอร์เซ็นต์ในระหว่างการเพาะเลี้ยง และถึงแม้จะเพิ่มการให้ออกซิเจนเต็มที่แล้วก็ตาม ค่าออกซิเจนละลายที่มีอยู่ในถังหมักก็ยังมีค่าเป็นศูนย์หลังจากเติมเมทานอล แต่จะเพิ่มขึ้นเมื่อเมทานอลถูกใช้หมดลง ซึ่งเป็นจุดบ่งชี้สำหรับการเติมเมทานอลครั้งต่อไป ได้ จนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก

จากสถานะการเพาะเลี้ยงดังกล่าวมีลักษณะการจำกัดของออกซิเจนเป็นระยะตลอดช่วงการผลิตเอนไซม์ เมื่อเปรียบเทียบกับเทคนิคการเพาะเลี้ยงแบบออกซิเจนจำกัดของ Charoenrat *et al.* (2005a) ในการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสายพันธุ์ดั้งเดิม (wild type) พบว่าอัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตรสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบจำกัดออกซิเจน เท่ากับ 59 ยูนิต/ลิตร.ชั่วโมง ขณะที่การเพาะเลี้ยงโดยวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได เท่ากับ 36 ยูนิต/ลิตร.ชั่วโมง แต่เมื่อพิจารณาค่าผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล พบว่าวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันไดให้ค่าสูงกว่าวิธีการเพาะเลี้ยงแบบจำกัดออกซิเจนประมาณ 2 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันไดมีประสิทธิภาพในการที่เซลล์สามารถเปลี่ยนเมทานอลไปเป็นผลิตภัณฑ์ได้สูงกว่าวิธีการจำกัดของออกซิเจนซึ่งใช้เมทานอลปริมาณมากกว่า

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาผลของเมทานอลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์และการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ พบว่าความเข้มข้นเมทานอลเกิน 5 กรัม/ลิตร จะมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ (substrate inhibition) ได้ค่า K_i เท่ากับ 5.5 กรัม/ลิตร ซึ่งตรงข้ามกับผลของเมทานอลต่อการผลิตเอนไซม์พบว่าเมทานอลความเข้มข้นสูงส่งผลต่อการผลิตเอนไซม์ได้ดีกว่า

ผลการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) โดยวิธีทางสถิติ พบว่า สถานะที่เหมาะสมคือ ค่าออกซิเจนละลาย 50 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 5.5 และอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส โดยพบว่าพีเอชเป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาณและผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอลสูงสุด ขณะที่อุณหภูมิเป็นปัจจัยรองที่มีผลกระทบต่อกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสและอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาณ แต่ให้ผลกระทบน้อยต่อผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล และเมื่อพิจารณาค่าออกซิเจนละลายพบว่า เป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลน้อยที่สุดต่อกิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส และอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาณ แต่มีอิทธิพลต่อผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอล 22.22 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการประมาณค่าคาดหวังจากสถานะที่เหมาะสมโดยวิธีทางสถิตินั้นพบว่ามีความคลาดเคลื่อนจากค่าที่ได้จากการทดลองประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการวิเคราะห์หาสถานะที่เหมาะสมใหม่โดยเลือกจุดที่ให้การผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสสูงสุดในผลการทดลองครั้งยืนยันสถานะที่เหมาะสม (ชั่วโมงที่ 63) หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งคือพิจารณาที่ระยะอินดัคชันเท่ากับ 42 ชั่วโมงแทน 51 ชั่วโมง ผลการประมาณค่าจากวิธีทางสถิติพบว่า ค่าคาดหวังที่ได้แม่นยำขึ้น โดยมีค่าความคลาดเคลื่อนเท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์

การพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนต์เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสโดยการออกแบบวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขึ้นบันไดภายใต้สถานะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทางสถิติด้วยข้อดีของวิธีการเติมแบบเป็นระยะ (intermittent) คือ เป็นวิธีที่ง่าย ไม่จำกัดเวลาและปริมาตรสุดท้าย สามารถเพาะเลี้ยงได้เป็นเวลานาน ส่วนการเติมแบบขึ้นบันไดซึ่งคำนึงถึงปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื่องจากลักษณะการผลิตเอนไซม์เป็นแบบ growth-linked product ดังนั้นการคำนึงถึงปริมาณเซลล์ในขณะที่ทำการหมักจึงเป็นวิธีเพิ่มผลผลิตได้อีกทางหนึ่ง จากผลการเพาะเลี้ยงเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ 96 ชั่วโมงพบว่าได้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาณ

ผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอลและอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจำเพาะเท่ากับ 2,681 หน่วย/ลิตร 35.64 หน่วย/ลิตร. ชั่วโมง 5.76 หน่วย/ลิตร. กรัมเมทานอล และ 0.33 หน่วย/ลิตร. กรัม. ชั่วโมง ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบที่ระยะเวลาการหมักที่เท่ากันกับการทดลองครั้งยืนยันผลทางสถิติซึ่งเป็นวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบคงที่ ความเข้มข้น 4 กรัม/ลิตร พบว่าวิธีการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันไดให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส อัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสเชิงปริมาตร ผลได้ของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสต่อเมทานอลและอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสจำเพาะสูงขึ้นกว่าวิธีเดิม 7 เท่า 7 เท่า 3 เท่า และ 3 เท่า ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

ในการพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนต์เอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสโดยวิธีการออกแบบการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได เกิดสภาวะการจำกัดของออกซิเจนขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักเนื่องจากเมทานอลความเข้มข้นสูงและความหนาแน่นของเซลล์สูง (high cell density) มีผลทำให้อัตราการถ่ายเทออกซิเจนของเซลล์ลดลง เนื่องจากความหนืดของน้ำหมักทำให้ค่า K_La ลดลง วิธีการปรับปรุงอาจใช้ออกซิเจนบริสุทธิ์แทนการให้อากาศโดยปั๊มลมซึ่งอาจเพิ่มประสิทธิภาพได้ นอกจากนี้การดัดแปลงหัวพ่นอากาศ (air sparger) โดยเลือกใช้หัวพ่นอากาศที่สามารถจ่ายฟองอากาศขนาดเล็กลง หรือชนิดที่สามารถหมุนได้โดยรอบน่าจะทำให้อากาศกระจายตัวได้ดีมากขึ้น หรืออาจดัดแปลงวิธีการเติมเมทานอลโดยใช้เมทานอลเจือจาง ซึ่งสารละลายเมทานอลจะช่วยทำให้เซลล์เจือจางลง การถ่ายเทออกซิเจนดีขึ้นซึ่งอาจช่วยลดสภาวะการขาดแคลนออกซิเจนดังกล่าวลงได้ แต่จะต้องขยายการผลิตโดยใช้ถังหมักขนาดใหญ่ขึ้น จากการศึกษาของ Trentmann *et al.* (2004) Charoenrat *et al.* (2005a) และ Charoenrat *et al.* (2005b) อธิบายว่าสภาวะจำกัดออกซิเจนไม่ส่งผลยับยั้งการสะสมของรีคอมบิแนนต์โปรตีนและเป็นทางเลือกในการเพิ่มอัตราการถ่ายเทออกซิเจนได้อีกวิธีหนึ่ง แต่กลไกของกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ในสภาวะขาดแคลนออกซิเจนยังไม่ชัดเจนนัก

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ชลวศา หาญวิวัฒน์วงศ์. 2544. การวิเคราะห์การออกแบบแผนการทดลองโดยการรวมวิธีการทางสถิติและวิธีไอวูลูชันนารีโอเปอเรชันเพื่อปรับปรุงการกำหนดค่าปัจจัยที่ดีที่สุดของกระบวนการ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ดิยะภรณ์ เหลืองพิพัฒน์. 2549. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกด้วยเซลล์ตรึงของ *Lactococcus lactis* IO-1 โดยวิธี Taguchi. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เพ็ญพร สุจิตตนารัตน์. 2549. การผลิตและการกลายพันธุ์ที่ตำแหน่งจำเพาะของรีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดสจากพะยูน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Anthony, C. 1982. The commercial exploitation of methylotrophs, pp. 269-295. In C. Anthony, ed. **The Biochemistry of Methylotrophs**. Academic Press, London.
- Barnett, C.B., R. Berka and T. Fowler. 1991. Cloning and amplification of the gene encoding an extracellular β -glucosidase from *Trichoderma reesei*: evidence for improved rates of saccharification of cellulosic substrates. **Biotechnology**. 9: 562-567.
- Beutler, E. 1992. Gaucher disease: new molecular approaches to diagnosis and treatment. **Science**. 256: 794-798.
- Box, G., S. Bisgaard and C. Fung. 1988. An explanation and critique of Taguchi's contributions to quality engineering. **Quality and Reliability Engineering International**. 4: 123-131.
- Boze, H., L. Celine, C. Patrick, R. Fabien, V. Christine, C. Yves and M. Guy. 2001. High-level secretory production of recombinant porcine follicle-stimulating hormone by *Pichia pastoris*. **Process Biochem**. 36: 907-913.
- Brierley, A.R., R.G. Davis and C.G. Holtz. 1994. **Production of insulin-like growth factor-1 in methylotrophic yeast cells**. United States Patent: 5,324,639, 0-100.

Bruin, E. de and F. de Wolf. 2002. Methanol Metabolism, pp. 61-75. *In* G. Gellissen, ed.

***Hansenula polymorpha* Biology and Application.** Willay-VCH, Germany.

Brzobohaty, B., I. Moore, P. Kristoffersen, L. Bako, N. Campos, J. Schell and K. Palme. 1993.

Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem.

Science. 262: 1051-1054.

Buckholz, R.G., R.E. Brierley, M.S. Odiorne, R.S. Siegel and L.M. Wondrack. 1991. **CD₄**

production in *Pichia pastoris*. International Patent Application, No. WO 91/05057.

Cairns, J.R.K., V. Champattanachai, C. Srisomsap, B. W. Liebold, B. Thiede and J. Svasti.

2000. Sequence and Expression of Thai Rosewood β -Glucosidase/ β -Fucosidase, a Family 1 Glycosyl Hydrolase Glycoprotein. **J. Biochem.** 128(6): 999-1008.

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

Charoenrat, T. 2005a. **Fermentation process development for recombinant protein production by *Pichia pastoris*.** Ph.D. thesis, Suranaree University.

_____, T., M. Jahic, H.S. Andersen, S.O. Enfors and M.K. Cairns. 2004a. **Recombinant β -glucosidase production by *Pichia pastoris*: The effect of temperature.** Proceeding of the 15th Thai Society for Biotechnology Annual meeting. 4th-6th Feb, 2004. Chiang Mai, Thailand.

_____, _____, _____, _____, _____. 2005b. Oxygen-limited fed-batch process: an Alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. **Bioprocess Biosystem Engineering.** 27 (6): 399-406.

_____, W. Vanichsrirattana, and M.K. Cairns. 2004b. Recombinant β -glucosidase production by *Pichia pastoris*: The influence of pH. **Thai J. Biotechnol.** 5(1): 51-55.

- Chen, Y., J. Cino, G. Hart, D. Freedman, C. White and E. Knowles. 1997. High protein expression in fermentation of recombinant *Pichia pastoris* by fed batch process. **Proc. Biochem.** 32: 107-111.
- Clare, J.J., M.A. Romanos, F.B. Rayment, J.E. Rowedder, M.A. Smith, M.M. Payne, K. Sreekrishna and C.A. Henwood. 1991. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. **Gene.** 105: 205-212.
- Cos, O., R. Ramon, J.L. Montesinos and F. Valero. 2006. Operational strategies, monitoring and control of heterologous protein production in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* under different promoters: A review. **Microbial Cell Factories.** 5:17.
- Couderc, R. and J. Baratti. 1980. Oxidation of methanol by the yeast *Pichia pastoris*: purification and properties of alcohol oxidase. **Agric. Biol. Chem.** 44: 2279-2289.
- Curvers, S., J. Linnemann, T. Klauser, C. Wandrey, R. Takors. 2002. Recombinant protein production with *Pichia pastoris* in continuous fermentation-kinetic analysis of growth and product formation. **Eng Life Sci** 2. 8: 229-235.
- Dasu, V.V., T. Panda and M. Chidambaram. 2003. Determination of significant parameters for improved griseofulvin production in a batch bioreactor by Taguchi's method. **Process Biochem.** 38: 877-880.
- Day, A.G. and S.G. Withers. 1986. The purification and characterization of a β -glucosidase from *Alcaligenes faecalis*. **Can. J. Biochem. Cell Biol.** 64: 914-922.
- Dennis Kunkel Microscopy, Inc. Available Source: http://www.denniskunkel.com/DK/DK/Fungi_and_Slime_Molds/23710A.html, April 16, 2006.
- Dharmawardhana, D.P., B.E. Ellis and J.E. Carlson. 1995. A β -glucosidase from lodgepole pine xylem specific for the lignin precursor coniferin. **Plant Physiol.** 107: 331-339.

- Esen, A. and D.A. Stetler. 1993. Subcellular localization of maize β -glucosidase. **Maize Genet. Coop. News lett.** 67: 19-20.
- Fenwick, G.R., R.K. Heaney and W.J. Mullin. 1983. Glucosinolates and their breakdown products in food and food plants. **CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 18: 123-201.
- Files, D., M. Ogawa, C.H. Scaman and S.A. Baldwin. 2001. A *Pichia pastoris* fermentation process for producing high-levels of recombinant human cystatin-C. **Enzyme Microb. Technol.** 29: 335-340.
- Fowler, T. 1993. Deletion of the *Tricoderma reesei* β -glucosidase gene *bgl1*, 56-65. In A. Esen, ed. **β -glucosidases: Biochemistry and Molecular Biology**. ACS Symp. Ser. 533, Washington D.C.
- Gancedo, G., J.M. Gancedo and A. Sols. 1968. Glycerol metabolism in yeast pathways of utilization and production. **Eur. J. Biochem.** 5: 165-172.
- Gimenez, J.A., D.D. Monkovic and M.L. Dekleva. 2000. Identification and monitoring of protease activity in recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. **Biotechnol. Bioeng.** 67: 245-251.
- Gleeson, M.A., C.E. White, D.P. Meininger and E.A. Komives. 1998. Generation of protease-deficient strains and their use in heterologous protein expression. **Methods Mol. Biol.** 103: 81-84.
- Gopalan, V., A. Pastuszyn, W.R. Galey and R.H. Glew. 1992. Exolytic hydrolysis of toxic plant glucosides by guinea pig liver cytosolic beta glucosidase. **J. Biol. Chem.** 267: 14027-14032.
- Gueguen, Y., P. Chemardin, S. Pien, A. Arnaud and P. Galzy. 1997. Enhancement of aromatic quality of Muscat wine by the use of immobilized β -glucosidase. **J. Biotechnol.** 55: 151-156.

- Gustavsson, M., J. Lehtio, S. Denman, T.T. Teeri, K. Hult and M. Martinelle. 2001. Stable linker peptides for a cellulosebinding domain-lipase fusion protein expressed in *Pichia pastoris*. **Protein Eng.** 14: 711-715.
- Hansen R.J., R.L. Switzer, H. Hinze and H. Holzer. 1977. Effects of glucose and nitrogen source on the levels of proteinases, peptidases, and proteinase inhibitors in yeast. **Biochim. Biophys. Acta.** 496: 103-114.
- Hao, D.C., P.H. Zhu, S.L. Yang, L. Yang. 2006. Optimization of recombinant Cytochrome P450 2C9 protein production in *Escherichia coli* DH5a by statistically-based experimental design. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 22: 1169-1176.
- Henrissat, B. 1996. Updating the sequence-based classification of glycosyl hydrolases. **J. Biochem.** 316: 695-696.
- _____ and A. Romeus. 1995. Families, superfamilies and subfamilies of glycosylhydrolases. **J. Biochem.** 311: 350-351.
- Hoglund, A.S., M. Lenman and L. Rask. 1992. Myrosinase is localized to the interior of myrosin grains and is not associated to the surrounding tonoplast membrane. **Plant Sci.** 85: 165-170.
- Holmquist, M., D.C. Tessier and M. Cygler. 1997. High-level production of recombinant *Geotrichum candidum* lipases in yeast *Pichia pastoris*. **Protein Express. Purif.** 11: 35-40.
- Hommalai, G., P. Chaiyen and J. Svasti. 2005. Studies on the transglucosylation reactions of cassava and Thai rosewood β -glucosidases using 2-deoxy-2-fluoro-glycosyl-enzyme intermediates. **Arch Biochem Biophys.** 442: 11-20.
- Hruska, A.J. 1988. Cyanogenic glucosides as defense compounds. A review of the evidence. **J. Chem Eco.** 14: 2213-2217.

- Inan, M., V. Chiruvolu, K.M. Eskridge, G.P. Vlasuk, K. Dickerson and S. Brown and M.M. Meagher. 1999. Optimization of temperature-glycerol-pH conditions for a fed-batch fermentation process for recombinant hookworm (*Ancylostoma caninum*) anticoagulant peptide (AcAP-5) production by *Pichia pastoris*. **Enzyme Microb. Technol.** 24: 438-45.
- _____ and M.M. Meagher. 2001. The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*. **J. Biosci. Bioeng.** 92: 337-341.
- Inoue, K., M. Shibuya, K. Yamamoto and Y. Ebizuka. 1996. Molecular cloning and 28 bacterial expression of a cDNA encoding furostanol glycoside 26-O- β -glucosidase of *Costus speciosus*. **FEBS Lett.** 389: 273-277.
- Invitrogen. ***Pichia* Expression Kit: A Manual of Methods for Expression of Recombinant Proteins in *Pichia pastoris***. Catalog no. K1710-01.
- Jahic, M., J.C. Rotticci-Mulder, M. Martinelle, K. Hult and S.O.Enfors. 2002. Modeling of growth and energy metabolism of *Pichia pastoris* producing a fusion protein. **Bioprocess Biosyst. Eng.** 24: 385-393.
- Jones, D.A. 1988. Cyanogenesis in animal-plant interactions, pp. 151-170. *In* D. Evered and S. Harnett, eds. **Cyanide Compounds in Biology**. Ciba Found. Symp., NY.
- Kakes, P. 1985. Linamarase and other β -glucosidases are present in the cell walls of *Trifolium repens* L. leaves. **Planta.** 166: 156-160.
- Kang, H.A., E.S. Choi, W.K. Hong, J.Y. Kim, S.M. Ko, J.H. Sohn and S.K. Rhee. 2000. Proteolytic stability of recombinant human serum albumin secreted in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 53: 575- 582.

- Katakura, Y., W.H. Zhang, G.Q. Zhuang, T. Omasa, M. Kishimoto, W. Goto, K.I. Suga. 1998. Effect of methanol concentration on the production of human beta (2)-glycoprotein I domain V by a recombinant *Pichia pastoris*: A simple system for the control of methanol concentration using a semiconductor Gas Sensor. **Journal of Fermentation and Bioengineering**. 86: 482-487.
- Kato, N. and Y. Sakai. 1996. Heterologous gene expression system developed in the methylotrophic yeast, *Candida boidinii*, for useful enzyme production.
- Kobayashi, K., S. Kuwae, T. Ohya, T. Ohda, M. Ohyama, K. Tomomitsu. 2000a. High level secretion of recombinant human serum albumin by fed-batch fermentation of the methylotrophic yeast, *Pichia pastoris*, based on optimal methanol feeding strategy. **J. Biosci. Bioeng.** 90: 280-288.
- _____, _____, _____, _____, _____, _____ H. Ohi and T. Ohmura. 2000b. High-level expression of recombinant human serum albumin from the methylotrophic yeast *Pichia pastoris* with minimal protease production and activation. **J. Biosci. Bioeng.** 89: 55-61.
- Larentis, A.L., M.S. Almeida, K.M.S. Cabral, L.N. Medeiros, E. Kurtenbach and M.A.Z. Coelho. 2004. Expression of *Pisum sativum* defensin1 (*Psd1*) in shaking flasks and bioreactor cultivations of recombinant *Pichia pastoris* at different pHs. **Braz. J. Chem. Eng.** 12: 155-164.
- Large, P.J. and C.W. Bamforth. 1988. **Methylotrophy and Biotechnology**. Longman Scientific and Technical, Harlow.
- Leah, R., J. Kigel, I. Svendsen and J. Mundy. 1995. Biochemical and molecular characterization of barley seed β -glucosidase. **J. Biol. Chem.** 270: 15789-15797.

- Lee, C.Y., A. Nakano, N. Shiomi, E.K. Lee and S. Koatoh. 2003. Effects of substrate feed rates on heterologous protein expression by *Pichia pastoris* in DO-stat fed-batch fermentation. **Enzyme Microb. Tech.** 33: 358-365.
- Lei, F., M. Rotboll and S.B. Jorgensen. 2001. A biochemically structured model for *Saccharomyces cerevisiae*. **J. Biotechnol.** 88: 205-221.
- Li, Z., F. Xiong, Q. Lin, M. Anjou, A.J. Daugulis, D.S.C. Yang and C.L. Hew. 2001. Low-temperature increases the yield of biologically active herring antifreeze protein in *Pichia pastoris*. **Protein Expr. Purif.** 21: 438-445.
- Lirdprapamongkok, K. and J. Svasti. 2000. Alkyl glucoside synthesis using Thai Rosewood β -glucosidase. **Biotechnology Letters.** 22: 1889-1894.
- Loewen, M.C., X. Liu, P.L. Davis and A.J. Daugulis. 1997. Biosynthetic production of type II fish antifreeze protein: fermentation by *Pichia pastoris*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48: 480-486.
- Mayson, B.E., D.G. Kilburn and B.L. Zamost. 2003. Effects of methanol concentration on expression levels of recombinant protein in fed-batch cultures of *Pichia pastoris*. **Biotech. Bioeng.** 81 (3): 291-298.
- Mateles, R.I. 1971. Calculation of the oxygen required for cell production. **Biotechnol. Bioeng.** 13: 581-582.
- Minning, S., A. Serrano, P. Ferrer, C. Sola, R.D. Schmid, F. Valero. 2001. Optimization of the high-level production of *Rhizopus oryzae* lipase in *Pichia pastoris*. **J. Biotechnol.** 86: 59-70.
- Murrell, J.C. and H. Dalton. 1992. **Methane and methanol utilizers.** Plenum Press, NY.

- Nagarjun, P.A., R.S. Rao, S. Rajesham and L.V. Rao. 2005. Optimization of lactic acid production in SSF by *Lactobacillus amylovorus* NRRL B-4542 using Taguchi methodology. **J. Microbiol.** 43 (1): 38-43.
- Nevoigt, E. and U. Stahl. 1997. Osmoregulation and glycerol metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol. Rev.** 21: 231-241.
- Niemeyer, H.M. 1988. Hydroxamic acid (4-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-ones), defence chemicals in the gramineae. **Phytochemistry.** 27: 3349-3358.
- Nowacki, J., R.S. Bandurski. 1980. Myo-inositol esters of indole-3-acetic acid as seed in precursors of *Zea mays* L. (maize). **Plant Physiol.** 65: 422-427.
- Ogata, K., H. Nishikawa and M. Obsugi. 1969. A yeast capable of utilizing methanol. **Agric. Biol. Chem.** 33: 1519.
- Oxtoby, E., M.A. Dunn, A. Pancoro and M.A. Hughes. 1991. Nucleotide and derived amino acid sequence of the cyanogenic β -glucosidase (Linamarase) from white clover (*Trifolium repens* L.). **Plant Mol. Bio.** 17: 209-219.
- Poulton, J.E. 1990. Cyanogenesis in Plants. **Plant Physiol.** 94: 401-405.
- _____ and C.P. Li. 1994. Tissue level compartmentation of (R)-amygdalin hydrolase prevent large-scale cyanogenesis in undamaged *Prunus* seeds. **Plant Physiol.** 104: 29-35.
- Prasad, K.K., S.V. Mohan, R.S. Rao, B.R. Pati and P.N. Sarma. 2005. Laccase production by *Pleurotus ostreatus* 1804: Optimization of submerged culture conditions by Taguchi DOE methodology. **J. Biochem. Eng.** 24: 17-26.
- Pronk, J.T., H.Y. Steensma and J.P. van Dijken. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. **Yeast.** 12: 1607-1633.

- Ratledge, C. 2001. Biochemistry and physiology of growth and metabolism, pp. 17-45. *In* C. Ratledge, B. Kristiansen, eds. **Basic Biotechnology**. Cambridge University Press, UK.
- Reese E.T. 1977. Degradation of polymeric carbohydrates by microbial enzymes. **Rec. Adv. Phytochem.** 11: 311-364.
- Ren, H.T., J.Q. Yuan and K.H. Bellgardt. 2003. Macrokinetic model for methylotrophic *Pichia pastoris* based on stoichiometric balance. **J. Biotechnol.** 106: 53-68.
- Roitner, M., T. Shalkhammer and F. Pittner. 1984. Characterization of naringinase from *Aspergillus niger*. **Monatsch. Chem.** 15: 1255-1267.
- Romanos, A.M., C.A. Scorer and J.J. Clare. 1992. Foreign gene expression in yeast: a review. **Yeast.** 8: 423-488.
- Roy, R.K. 2001. **Design of experiments using the Taguchi approach**. John Wiley and Sons, Inc.
- Schliemann, W. 1984. Hydrolysis of conjugated giberellins by β -glucosidases from Dwarf Rice (*Oryza sativa* L. cv. Tan-ginbozu). **Plant Physiol.** 116: 123-132.
- Siegel, R.S., R.G. Buckholz, G.P. Thill and L.M. Wondrack. 1990. Production of epidermal growth factor in methylotrophic yeasts. **International Patent Application**, No. WO 90/10697.
- Simos, G., C.A. Panagiotidis, A. Skoumbas, D. Choli, C. Ouzounis, J.G. Georgatsos. 1994. Barley β -glucosidase: Expression during seed germination and maturation and partial amino acid sequences. **Biochim. Biophys. Acta.** 1199: 52-58.
- Sinha, J., B.A. Plantz, W. Zhang, M. Gouthro, V. Schlegel, C.P. Liu and M. Meagher. 2003. Improved production of recombinant ovine interferon-H by Mut⁺ strain of *Pichia pastoris* using an optimized methanol feedprofile. **Biotechnol. Prog.** 19: 794-802.

Sreekrishna, K., K.A. Barr, S.A. Hoard, W.D. Prevatt, R.E. Torregrosa, R.E. Levingston, J.A.

Cruze and G.H. Wegner. 1990. **Expression of human serum albumin in *Pichia pastoris***. 15th Int. Congr. on yeast Genetics and Molecular Biology, Hague, The Netherlands, Topic No. 09-37B.

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

Srisomsap, C. and P. Subhasitanont. 1999. Synthesis of homo- and hetero- oligosaccharides by Thai Rosewood β -glucosidase. **Biotechnol. Lett.** 21: 947-951.

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

Stratton, J., V. Chiruvolu and M.M. Meagher. 1998. High cell-density fermentation, pp. 107-121. In D.R. Higgins, J.M. Cregg, eds. ***Pichia protocols***. Humana Press, Totawa, NJ.

Surarit, R., J. Svasti, C. Srisomsap, W. Suginta, S. Khunyoshyeng, S. Nilwarangkoon, P. Harnsakul and E. Benjavongkulchai. 1995. Screening of Glycohydrolase Enzymes in Thai Plant Seeds for Potential Use in Oligosaccharide Synthesis. **J. Sci. Coc. Thailand**. 21: 293-303.

Svasti, J., J.K. Cairns, C. Srisomsap, R. Surarit, S. Techasakul and P. Toonkool. 2003. **Structure and properties of Beta-glucosidases from Thai plants**, pp. 221-240. Proceeding of the 7th International Symposium on Protein Structure-Function Relationship. 20-24th January 2003. Karachi, Pakistan.

- _____, C. Srisomsap, S. Techasakul and R. Surarit. 1999. Dalcochinin-8'-O-D-glucoside and its β -glucosidase enzyme from *Dalbergia cochinchinensis*. **Phytochemistry**. 50: 739-743.
- _____, R. Surarit, E. Benjavongkulchai, C. Srisomsap and C. Bucke. 1996. Synthesis of Oligosaccharides Using Glycosidase Enzymes Indigenous to Thailand. **Report submitted to the National Research Council of Thailand**.
- Tani, Y., Y. Mitani and H. Tamada. 1984. Utilization of C1-compounds: Phosphorylation of adenylate by oxidative phosphorylation in *C. boidinii*. (*Kloeckera sp.*) No. 2201. **Agric. Biol. Chem.** 46: 1097.
- Teng, Y., and Y. Xu. 2008. Culture condition improvement for whole-cell lipase production in submerged fermentation by *Rhizopus chinensis* using statistical method. **Bioresource Technology**. 99: 3900-3907.
- Thangstad, O.P., K. Evjen and A. Bones. 1991. Immunogold-EM localization of myrosinase in Brassicaceae. **Protoplasma**. 161: 84-93.
- Thayer, S.S. and E.E. Conn. 1981. Subcellular localization of dhurrin β -glucosidases and hydroxynitrile lyase in the mesophyll cells of sorghum leaf blades. **Plant Physiol.** 67: 617-622.
- Toonkool, P., P. Metheenukul, P. Suriwattanasat, P. Paiboon, N. Tongtubtim, M.K. Cairns, J.K. Cairns, J. Svasti. 2006. Expression and purification of dalcochinase, a β -glucosidases from *Dalbergia cochinchinensis* Pierre, in yeast and bacterial hosts. **Protein Expression and Purification**. 48:195-204.
- Trentmann, O., N.K. Khatri, F. Hoffmann. 2004. Reduced oxygen supply increases process stability and product yield with recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnol Prog.** 20:1766-1775.

- Trinh, L.B., J.N. Phue, J. Shiloach. 2003. Effect of methanol feeding strategies on production and yield of recombinant mouse endostatin from *Pichia pastoris*. **Botechnol Bioeng.** 82:438-444.
- Van der Klei, I.J., M. Van der Heid, R.J. Baerends, K.B. Rechinger, K. Nicolay, J.A. Kiel and M. Veenhuis. 1998. The *Hansenula polymorpha* per6 mutant is affected in two adjacent genes which encode protein, Pak1p, involved in peroxisome integrity. **Curr. Genet.** 34: 1-11.
- Van Dijken J.P. and W. Harder. 1974. Optimal condition for the enrichment and isolation of methanol-assimilating yeast. **J. Gen. Microbiol.** 84: 409-411.
- Vanrolleghem, P.A., P. de Jong-Gubbels, W.M. van Gulik, J.T. Pronkvan, J.P. Dijken and J.J. Heijnen. 1996. Validation of a metabolic network for *Saccharomyces cerevisiae* using mixed substrate studies. **Biotechnol. Prog.** 12: 434-448.
- Veenhuis, M., J.P. van Diken and W. Harder. 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast. **Adv. Microbiol. Physiol.** 24: 1-82.
- Wakarchuk, W.W., D.G. Kilburn, R.C.Jr. Miller, R.A.J. Warren. 1986. The molecular cloning and expression of a cellobiase gene from an agrobacterium in *Escherichia coli*. **Mol. Gen. Genet.** 205: 146-152.
- Wegner, E.H. 1983. **Biochemical conversions by yeast fermentation at high-cell densities.** U.S. Patent 4,414,329.
- Werten, M.W., T.J. van den Bosch, R.D. Wind, H. Mooibroek, F.A. de Wolf. 1999. High-yield secretion of recombinant gelatins by *Pichia pastoris*. **Yeast.** 15: 1087-1096.
- Wiese, G. and H. Grambow. 1986. Indole-3-methanol- β -D-glucoside and Indole-3-carboxylic acid- β -D-glucoside are products of indole-3-acetic acid degradation in wheat leaf segments. **Phytochemistry.** 25: 2451.

- Woodward, J. and A. Wiseman. 1982. Fungal and other β -D-glucosidases, their properties and applications. **Enzyme Microb. Technol.** 4: 73-93.
- Xie, J.L., Q.W. Zhou, D. Pen, R.B. Gan, Y. Qin. 2005. Use of different carbon sources in cultivation of recombinant *Pichia pastoris* for angiostatin production. **Enzyme Microb. Technol.** 36: 210-216.
- Yang, J., X. Zhou and Y. Zhang. 2004. Improvement of recombinant hirudin production by controlling NH_4^+ concentration in *Pichia pastoris* fermentation. **Biotechnol. Lett.** 26: 1013-1017.
- Zhang, W.H., M.A. Bevins, B.A. Plantz, L.A. Smith, M.M. Meagher. 2000. Modeling *Pichia pastoris* growth on methanol and optimizing the production of a recombinant protein, the heavy-chain fragment C of Botulinum neurotoxin, Serotype A. **Biotechnol. Bioeng.** 70: 1-8.
- Zhou, X.S. and Y.X. Zhang. 2002. Decrease of proteolytic degradation of recombinant hirudin produced by *Pichia pastoris* by controlling the specific growth rate. **Biotechnol. Lett.** 24: 1449-1453.
- Zhu, A., C. Monahan and J. Goldstein. 1995. High-Level expression and purification of coffee bean alpha-galactosidase produced in the yeast *Pichia pastoris*. **Arch. Biochem. Biophys.** 324: 65-58.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. YPD agar (Yeast extract Peptone Dextrose agar) (ต่อ 1 ลิตร) ประกอบด้วย

1) yeast extract (Scharlau Chemie)	10	กรัม
2) peptone from casein (Scharlau Chemie)	20	กรัม
3) D-glucose anhydrous ($C_6H_{12}O_6$; Ajax)	20	กรัม
4) agar (PAC เกรด 310)	15	กรัม

นำไปฆ่าเชื้อที่ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อหายร้อนแล้วจึงเติม

5) zeocin (Invitrogen)	100	ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
------------------------	-----	---------------------

2. YPD medium (Yeast extract Peptone Dextrose medium) (ต่อ 1 ลิตร) ประกอบด้วย

1) yeast extract (Scharlau Chemie)	10	กรัม
2) peptone (Scharlau Chemie)	20	กรัม
3) D-glucose anhydrous ($C_6H_{12}O_6$; Ajax)	20	กรัม

นำไปฆ่าเชื้อที่ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อหายร้อนแล้วจึงเติม

4) zeocin (Invitrogen)	100	ไมโครกรัม/มิลลิลิตร
------------------------	-----	---------------------

3. BMGY medium (ต่อ 1 ลิตร) ประกอบด้วย

1) yeast extract (Scharlau Chemie)	10	กรัม
2) peptone (Scharlau Chemie)	20	กรัม
3) 0.1 M KH_2PO_4 (Ajax) K_2HPO_4 (Ajax) buffer pH6	100	มิลลิลิตร
4) yeast nitrogen base without amino acid (Difco)	13.4	กรัม
5) 0.00004 % biotin ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$; Merck)	2	มิลลิลิตร
6) 99.5-101 % glycerol (Carlo erba)	10	มิลลิลิตร

นำไปฆ่าเชื้อที่ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. BSM fermentation medium (ต่อ 1 ลิตร) ประกอบด้วย

1) 99.5-101 % glycerol ($\text{CH}_2\text{OHCHOHCH}_2\text{OH}$; Carlo erba)	40	กรัม
2) 85 % Orthophosphoric acid (H_3PO_4 ; Ajax)	27	มิลลิลิตร
3) Calcium sulphate dehydrate ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Riedel-de Haen)	0.9	กรัม
4) Potassium sulphate (K_2SO_4 ; Ajax)	18	กรัม
5) Magnesium sulphate hydrated ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; Ajax)	14.9	กรัม
6) Potassium hydroxide (KOH; Ajax)	4.13	กรัม

นำไปฆ่าเชื้อที่ 120 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที แล้วเติม trace salts solution (PTM1) ลงไปปริมาตร 4.35 มิลลิลิตรและปรับค่าพีเอชให้เท่ากับ 5 ด้วย 28-30 % ammonium hydroxide (NH_4OH ; J.T. Baker)

5. *Pichia* trace metal 1 (PTM1 trace salts solution) (ต่อลิตร) ประกอบด้วย

1) Copper (II) sulphate ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; Ajax)	6.0	กรัม
2) Potassium Iodide (KI; Ajax)	0.08	กรัม
3) Manganese (II) sulphate monohydrate ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$; Ajax)	3.0	กรัม
4) Sodium molybdate ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; Ajax)	0.2	กรัม
5) Boric acid (H_3BO_3 ; Scharlau)	0.02	กรัม
6) Cobalt (II) Chloride ($\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; APS)	0.9	กรัม
7) Zinc chloride (ZnCl_2 ; APS)	20	กรัม
8) Iron (III) chloride hexahydrate ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$; POCH)	13.7	กรัม
9) Biotin ($\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$; Merck)	0.2	กรัม
10) 98% (w/w) (H_2SO_4 ; Lab Scan)	5	มิลลิลิตร

ทำการฆ่าเชื้อโดยการกรองแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

6. Methanol feed medium

ผสม PTM1 trace salts solution 12 มิลลิลิตร ลงใน 99.99 เปอร์เซ็นต์เมทานอล (CH_3OH ; Ajax) ปริมาตร 1 ลิตร

หมายเหตุ yeast nitrogen base, biotin และ trace salts solution (PTM1) ฆ่าเชื้อโดยผ่านการกรองด้วย sterile filter ขนาด $0.22\ \mu\text{m}$ (Millex® -GV)

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. การประเมินการเจริญของจุลินทรีย์

1.1 การวัดความขุ่นด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

นำตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน Eppendorf tube หมุนเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร 1 ครั้ง หมุนเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้งเติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมเซลล์ให้เข้ากัน วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วย สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ 600 นาโนเมตร

1.2 การหาน้ำหนักเซลล์แห้ง

เก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองที่ผ่านการอบแห้ง และชั่งน้ำหนักที่แน่นอนแล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร และนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง รินส่วนใสทิ้ง นำเซลล์ที่ได้ไปอบในตู้อบควบคุมอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักเซลล์คงที่ หลังจากนั้นนำไปใส่โถดูดความชื้นอีกเป็นเวลา 30 นาทีแล้วชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของหลอดทดลองที่มีเซลล์และคำนวณหาน้ำหนัก (นน.) เซลล์แห้งจากสมการ

$$\text{นน.เซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)} = \frac{\text{นน.หลอดทดลองและ นน.เซลล์แห้ง (กรัม)} - \text{นน.หลอดทดลอง (กรัม)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง (มิลลิลิตร)} \times 10^{-3}}$$

2. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (Charoenrat *et al.*, 2005a)

2.1 สารเคมี

2.1.1 *p*-nitrophenol- β -D glucopyranoside (*p*NP-Glu)

2.1.2 Sodium acetate anhydrous (CH_3COONa ; Scharlau)

2.1.3 99.7 % acetic acid (CH_3COOH ; Lab Scan)

2.1.4 Sodium carbonate (Na_2CO_3 ; Merck)

2.1.5 4-nitrophenol (*p*NP) ($\text{O}_2\text{NC}_6\text{H}_4\text{OH}$; BDH)

2.2 การเตรียมสารเคมี

2.2.1 0.5 โมลาร์ โซเดียมแอซีเตต: ละลายโซเดียมแอซีเตต 68.02 กรัม ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร

2.2.2 0.5 โมลาร์ กรดแอซิติค: ละลายกรดแอซิติค 28.65 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น ปริมาตร 1 ลิตร

2.2.3 0.1 โมลาร์ โซเดียมแอซีเตต บัฟเฟอร์ พีเอช 5.0: ผสมสารละลายในข้อ 2.2.1 และสารละลายในข้อ 2.2.2 ปริมาตร 14.1 มิลลิลิตรและ 5.9 มิลลิลิตร ตามลำดับแล้วปรับ ปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร

2.2.4 3.3 มิลลิโมลาร์ *p*NP-Glu: ละลาย *p*NP-Glu 0.10 กรัม ด้วย สารละลายในข้อ 2.2.3

2.2.5 2 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต: ละลายโซเดียมคาร์บอเนต 211.98 กรัม ในน้ำ กลั่น 1 ลิตร

2.2.6 0.1927 มิลลิโมลาร์ *p*NP: ละลาย *p*NP 0.0134 กรัม ใน 0.1 โมลาร์ โซเดียม แอซีเตต บัฟเฟอร์ ให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

2.3 วิธีการ

บ่มสารละลายสับสเตรต 3.3 มิลลิโมลาร์ *p*NP-Glu ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากนั้นบีบตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงไปบ่มเป็นเวลา 45 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต แล้วนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 นาโนเมตร คำนวณหาค่ากิจกรรมเอนไซม์จากสมการ

$$\text{กิจกรรมเอนไซม์ (ยูนิต/ลิตร)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสง 400 นาโนเมตร} \times \text{อัตราเจือจาง} \times 1000}{\text{ค่าความชันจากกราฟมาตรฐาน } p\text{NP} \times 45 \times 0.1}$$

2.4 การสร้างกราฟมาตรฐาน *p*NP

2.4.1 เตรียมสารละลาย *p*NP ความเข้มข้น 0.1927 มิลลิโมลาร์

2.4.2 เตรียมสารละลาย *p*NP ปริมาณต่าง ๆ จากสารละลาย *p*NP ความเข้มข้น 0.1927 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในตารางผนวก ข1

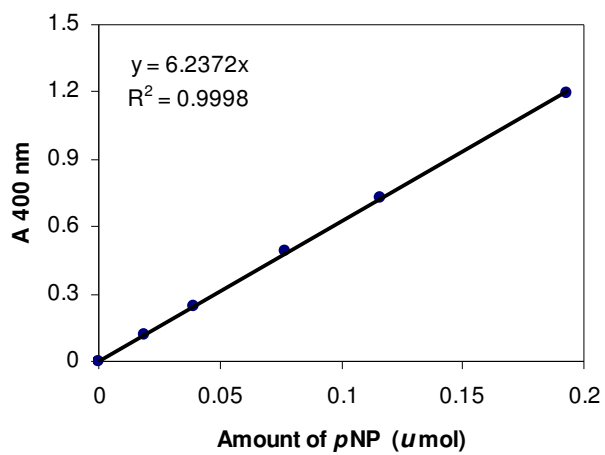
ตารางผนวกที่ ข1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน *p*NP

ปริมาณของสารละลาย <i>p</i> NP (ไมโครโมล)	สารละลาย <i>p</i> NP ความเข้มข้น 0.1927 มิลลิโมลาร์ (มิลลิลิตร)	0.1 โมลาร์ โซเดียมแอซิเตต บัฟเฟอร์ (มิลลิลิตร)
0.000	0.0	1.0
0.019	0.1	0.9
0.039	0.2	0.8
0.077	0.4	0.6
0.116	0.6	0.4
0.193	1.0	0.0

2.4.3 เติม 2 โมลาร์ โซเดียมคาร์บอเนต 2 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาภายหลังบ่มเป็นเวลา 45 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์

2.4.4 เขียนกราฟมาตรฐานของสารละลาย *p*NP ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณ *p*NP (ไมโครโมล) พร้อมหาค่าความชันจากกราฟเส้นตรง ดังภาพผนวกที่ ข1

2.4.5 กรณีของตัวควบคุมค่าเนินขั้นตอนเช่นเดียวกับตัวอย่าง โดยใช้ น้ำกลั่นแทน
ตัวอย่าง



ภาพผนวกที่ ข1 กราฟมาตรฐานสารละลาย pNP

3. การวิเคราะห์ความเข้มข้นกลีเซอรอล

3.1 สารเคมีและอุปกรณ์

3.1.1 100 เปอร์เซนต์ กลีเซอรอล

3.1.2 0.1 เปอร์เซนต์กรดฟอสฟอริก

3.1.3 99.9 เปอร์เซนต์เมทานอล สำหรับล้างคอลัมน์ (HPLC grade)

3.1.4 99.9 เปอร์เซนต์แอซีโทไนไท์ สำหรับรักษาคอลัมน์ (HPLC grade)

3.1.5 เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)
(ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น LC-3A, Japan)

3.1.6 คอลัมน์ Lichrocart-C18 ขนาด 250×4.0 มิลลิเมตร (Merck)

3.1.7 Refractive Index detector (ยี่ห้อ LDC รุ่น Refracto Monitor IV, USA)

3.1.8 ตัวกรอง 13 mm Syring Filtler Nylon, 0.2 μm (Vertical; Thailand)

3.1.9 Syringe 3 ml (Nipro; Thailand)

3.2 สภาพะในการวิเคราะห์

3.2.1 0.1 เปอร์เซนต์กรดฟอสฟอริก เป็นวัฏภาคเคลื่อนที่ กำหนดอัตราการไหล
0.9 มิลลิลิตร/นาที

3.2.2 ปริมาตรในการวิเคราะห์ 10 ไมโครลิตร

3.2.3 อุณหภูมิภายในคอลัมน์ 25 องศาเซลเซียส

3.3 วิธีการ

3.3.1 ปั่นตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตรที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบ/นาที นาน 5
นาที

3.3.2 กรองตัวอย่างผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครลิตร

3.3.3 นำสารมาตรฐานหรือตัวอย่างเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์

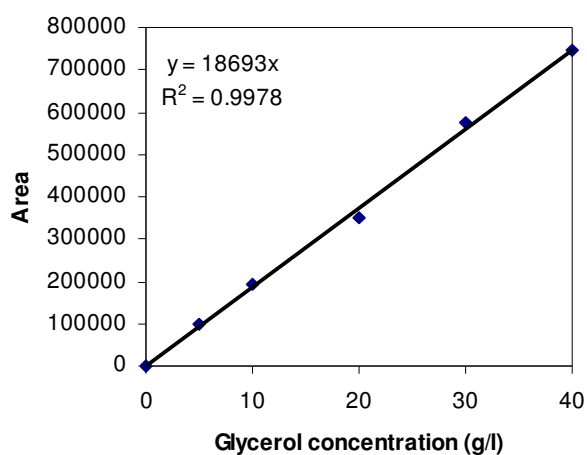
3.4 การสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายกลีเซอรอล

3.4.1 เตรียมสารละลายกลีเซอรอลความเข้มข้นต่าง ๆ ในขวดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางผนวกที่ ข2

ตารางผนวกที่ ข2 การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลีเซอรอล

ความเข้มข้นของสารละลาย กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	100 เปอร์เซนต์กลีเซอรอล (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่นปราศจากไอออน (มิลลิลิตร)
0	0.0	25.0
5	0.1	24.9
10	0.2	24.8
20	0.4	24.6
30	0.6	24.4
40	0.8	24.2

3.4.2 เขียนกราฟสารละลายมาตรฐานกลีเซอรอล ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเครื่อง HPLC กับความเข้มข้นของสารละลายกลีเซอรอล (กรัม/ลิตร) พร้อมหาค่าความชันจากกราฟเส้นตรงดังภาพผนวกที่ ข2



ภาพผนวกที่ ข2 กราฟมาตรฐานสารละลายกลีเซอรอล

4. การวิเคราะห์ความเข้มข้นเมทานอล

4.1 สารเคมีและอุปกรณ์

4.1.1 99.9 เปอร์เซนต์ เมทานอล (HPLC grade)

4.1.2 Gas Chromatography (GC) (ยี่ห้อ HP 6890)

4.1.3 คอลัมน์ FactorFour Capillary Column (ยี่ห้อ Varian, รุ่น VF-1ms)

ขนาด 30 มิลลิเมตร $\times$ 0.25 มิลลิเมตร $\times$ 0.25 ไมโครเมตร

4.1.4 Flame Ionized Detector

4.1.5 เข็มฉีดยา (microsyringes, Borosilicate glass 3.3; Germany)

4.1.6 ตัวกรอง 13 mm Syringe Filter Nylon, 0.2 μ m (Vertical; Thailand)

4.1.7 ถังแก๊สฮีเลียม ไนโตรเจน ออกซิเจน และไฮโดรเจน

4.2 สภาพะในการวิเคราะห์

4.2.1 อุณหภูมิในการฉีด 160 องศาเซลเซียส

4.2.2 อุณหภูมิภายในโอเวน 45 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที

4.2.3 อุณหภูมิที่ detector 250 องศาเซลเซียส

4.2.4 อุณหภูมิในการ post run 250 องศาเซลเซียส เพื่อไล่สารปนเปื้อนออกจากคอลัมน์เป็นเวลา 1 นาที

4.2.5 อัตราการไหลของแก๊ส 1.5 มิลลิตร/นาที

4.2.6 ปริมาตรในการฉีดตัวอย่าง 10 ไมโครลิตร

4.3 วิธีการ

ป้อนตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิตรที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที กรองตัวอย่างผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครลิตร ฉีดสารมาตรฐานเมทานอลหรือตัวอย่างเข้าเครื่องเพื่อทำการวิเคราะห์

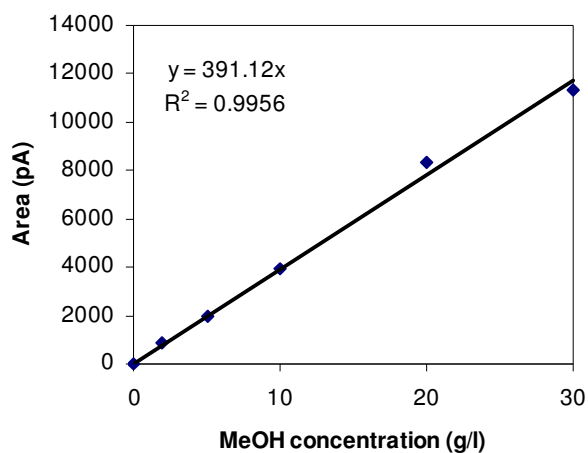
4.4 การสร้างกราฟมาตรฐานสารละลายเมทานอล

4.4.1 เตรียมสารละลายเมทานอลความเข้มข้นต่าง ๆ ในขวดปริมาตร ขนาด 25 มิลลิลิตรดังแสดงในตารางผนวกที่ ข3

ตารางผนวกที่ ข3 การเตรียมสารละลายมาตรฐานเมทานอล

ความเข้มข้นของสารละลาย เมทานอล (กรัม/ลิตร)	100 เปอร์เซนต์เมทานอล (มิลลิลิตร)	น้ำกลั่นปราศจากไอออน (มิลลิลิตร)
0	0.00	25.00
2	0.06	24.94
5	0.16	24.84
10	0.32	24.68
20	0.63	24.37
30	0.95	24.05

4.4.2 เขียนกราฟสารละลายมาตรฐานเมทานอล ระหว่างพื้นที่ใต้กราฟที่ได้จากการวิเคราะห์โดยเครื่อง GC กับความเข้มข้นของสารละลายเมทานอล (กรัม/ลิตร) พร้อมหาค่าความชันจากกราฟเส้นตรงดังภาพผนวกที่ ข3



ภาพผนวกที่ ข3 กราฟมาตรฐานสารละลายเมทานอล

5. การทำกราฟมาตรฐานปั๊มสำหรับการเติมเมทานอล

5.1 อุปกรณ์

5.1.1 สายยางซิลิโคน ขนาด 3×5 มม. (Dura)

5.1.2 น้ำกลั่น

5.1.3 กระบอกตวง

5.1.4 นาฬิกาจับเวลา

5.2 วิธีการ

5.2.1 ต่อด้านข้างกับขวดเติมเมทานอลที่บรรจุน้ำกลั่นอยู่ โดยปล่อยปลายข้างหนึ่ง
อิสระ

5.2.2 ต่อด้านข้างเข้ากับปั๊มที่ต้องการ calibrate และปั๊มน้ำกลั่นให้เต็มสายยางเพื่อ
เตรียมความพร้อม

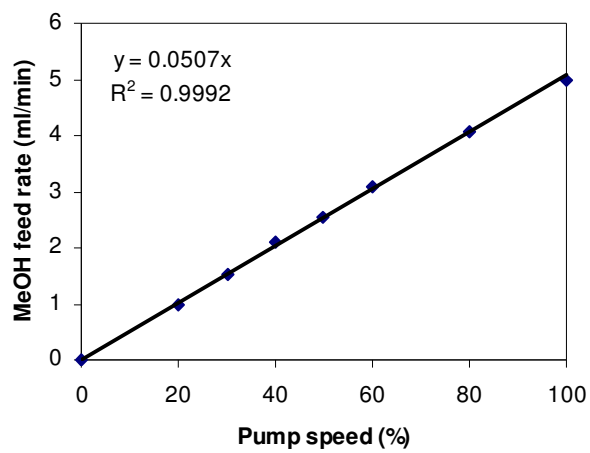
5.2.3 กำหนดอัตราการหมุนของปั๊ม (เปอร์เซ็นต์) ต่าง ๆ ที่เครื่องควบคุมปั๊ม

5.2.4 จับเวลาเมื่อน้ำกลั่นไหลออกจากสายยางและหยุดเมื่อถึงปริมาตรที่กำหนด

5.2.5 คำนวณอัตราการไหลในหน่วย มิลลิลิตร/นาที

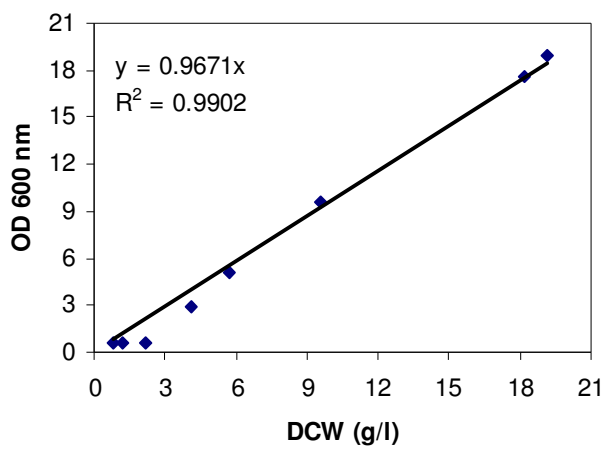
ตารางผนวกที่ ข4 ค่าการทำกราฟมาตรฐานปั๊มสำหรับการเติมเมทานอล

อัตราหมุนของปั๊ม (เปอร์เซ็นต์)	ปริมาตรน้ำกลั่นต่อเวลา (มิลลิลิตร/นาที)
0	0.00
20	1.00
30	1.54
40	2.10
50	2.54
60	3.10
80	4.07
100	5.00

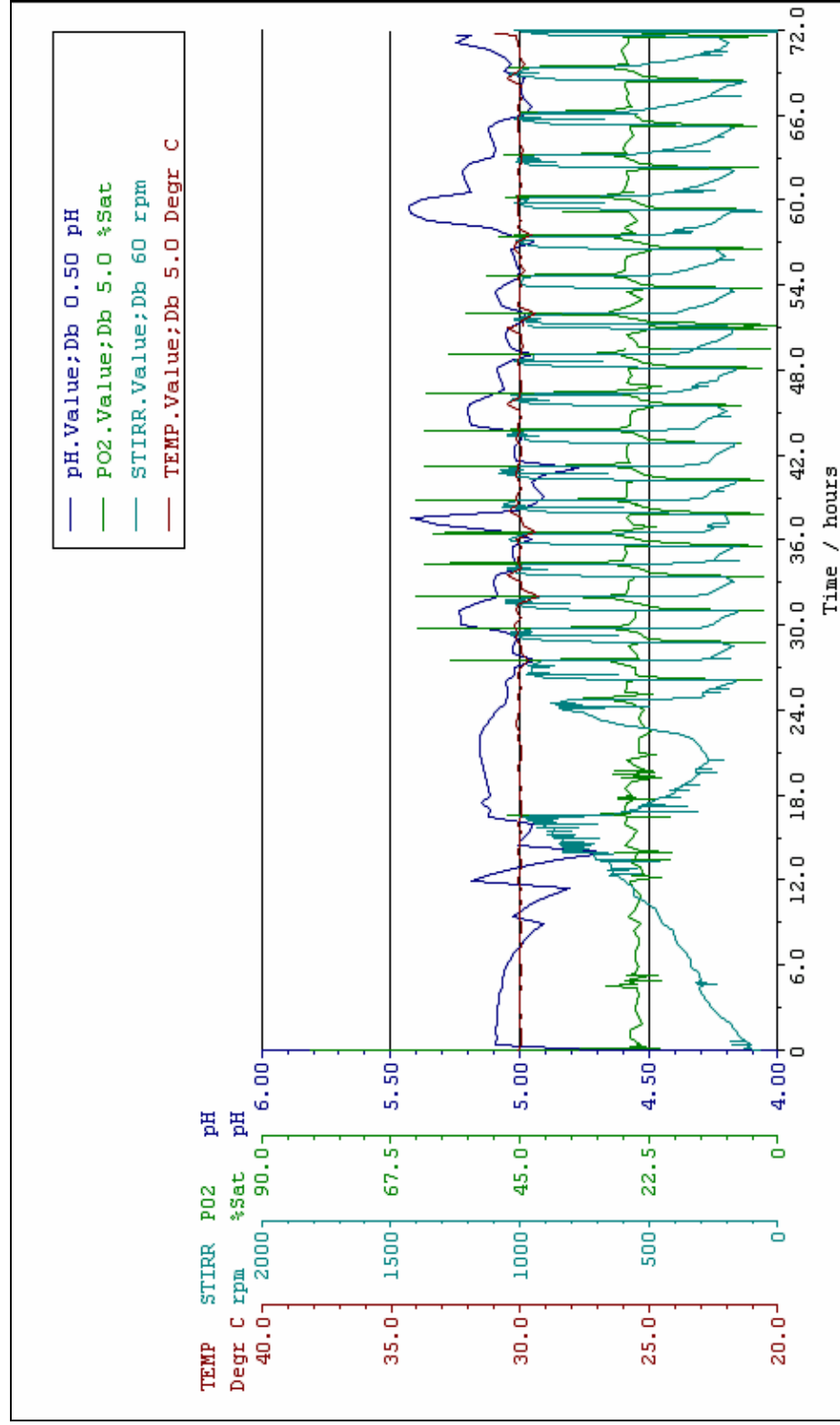


ภาพผนวกที่ ข4 กราฟมาตรฐานปั๊มสำหรับการเติมเมทานอล

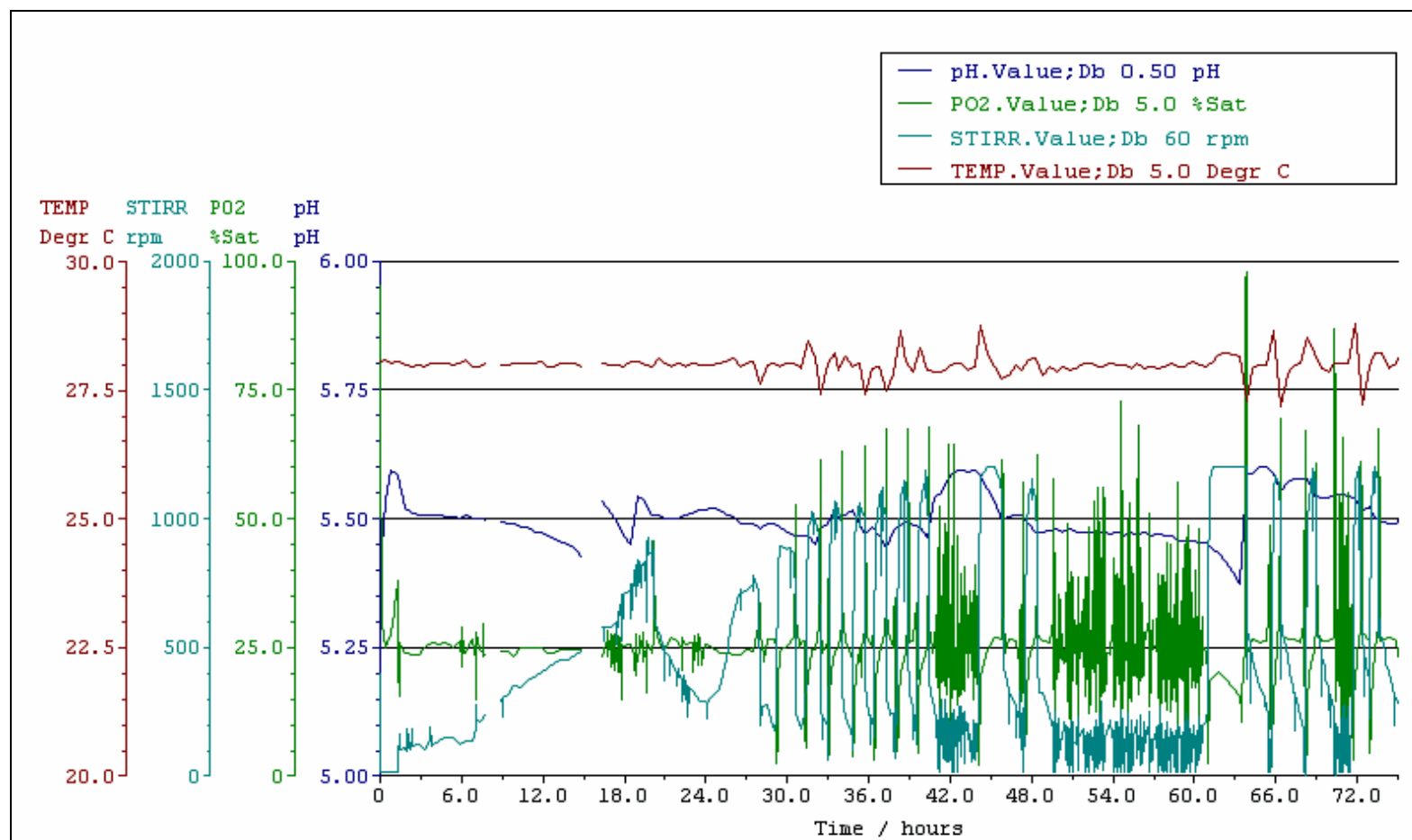
ภาคผนวก ค
ข้อมูลการทดลอง



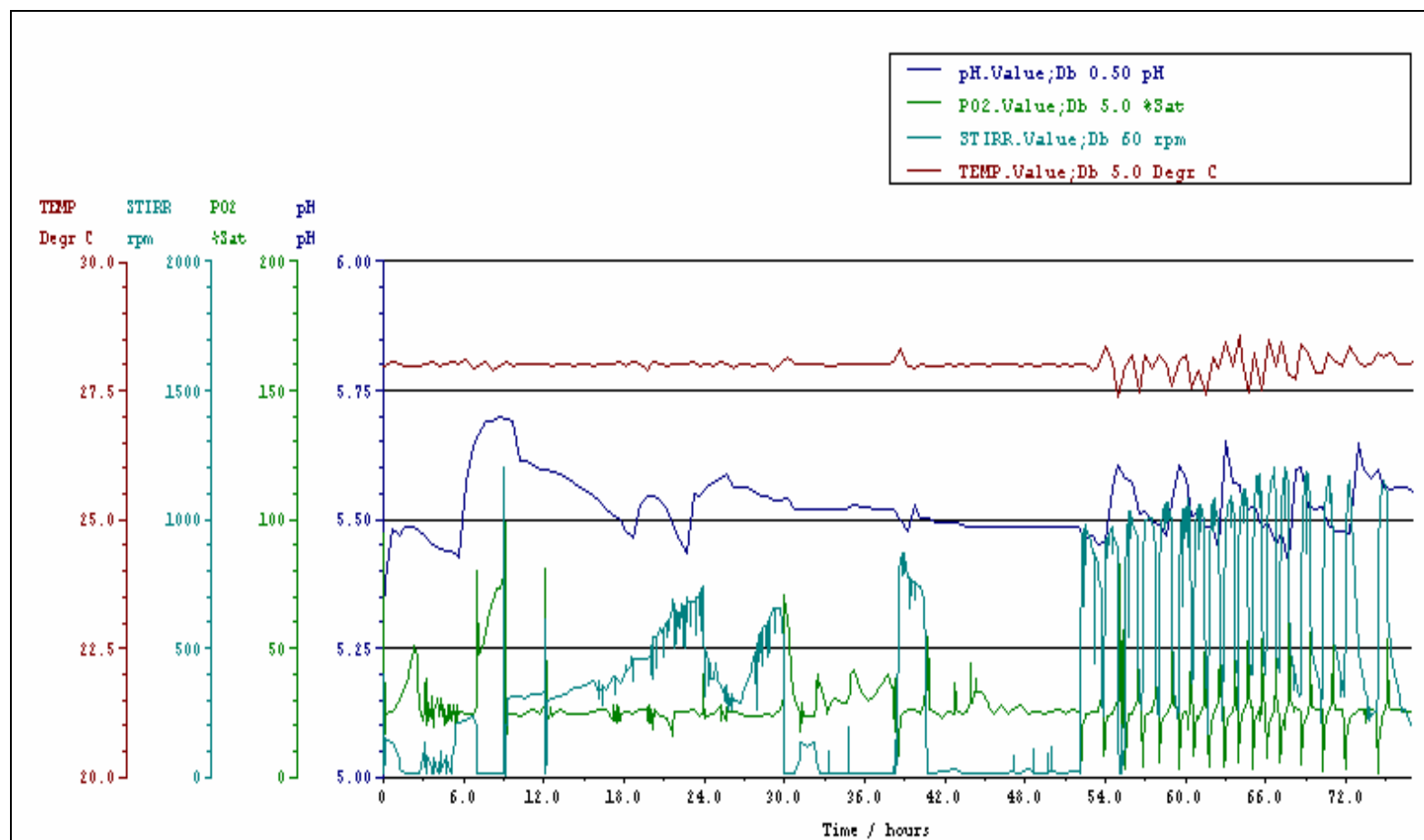
ภาพผนวกที่ ค1 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรกับค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง (จากการทดลองยืนยันสภาวะที่เหมาะสม)



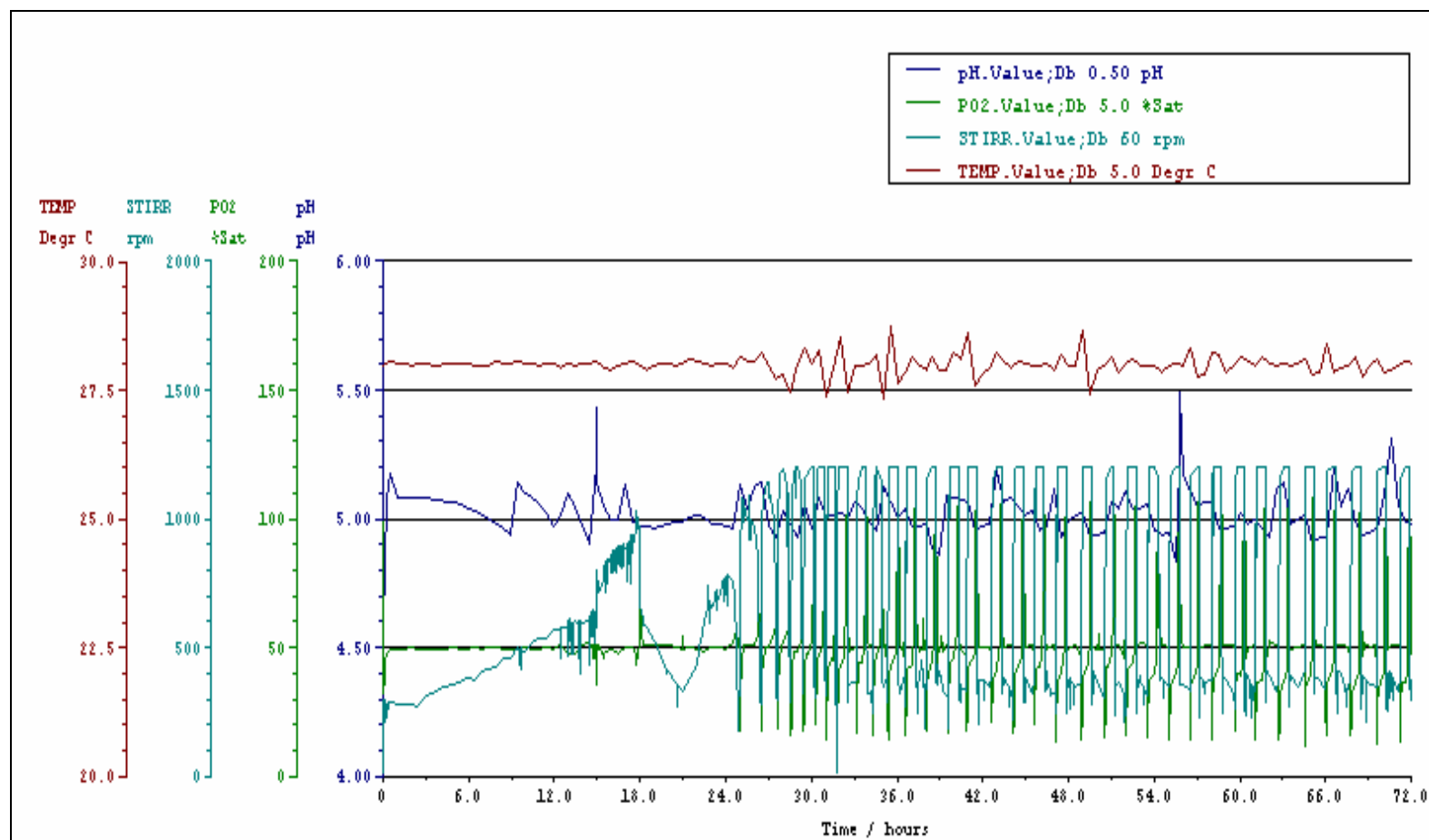
ภาพผนวกที่ ค2 กราฟควบคุมกระบวนการหมักในสภาวะการทดลอง T1



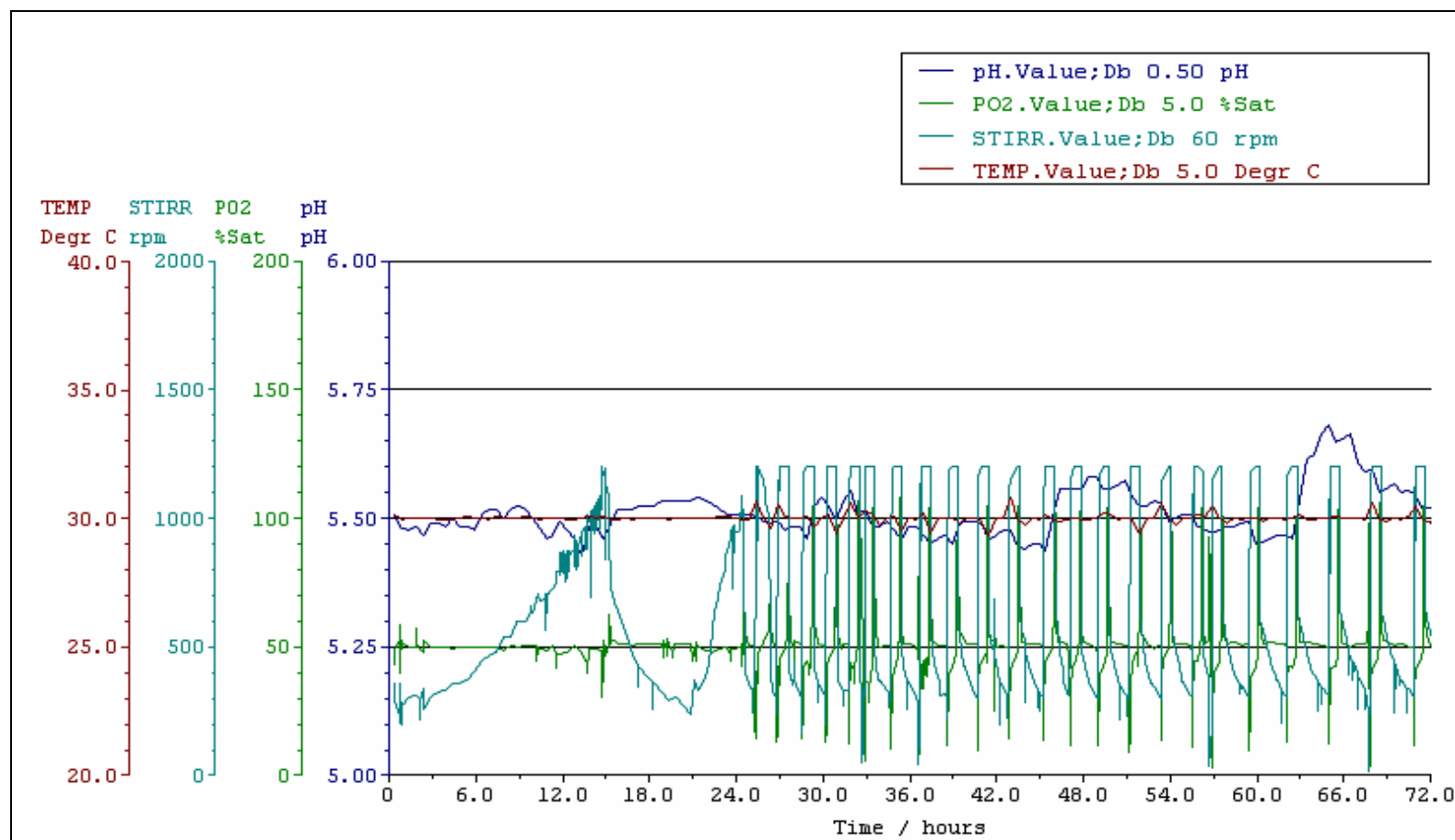
ภาพผนวกที่ 3 กราฟควบคุมกระบวนการหมักในสภาวะการทดลอง T2



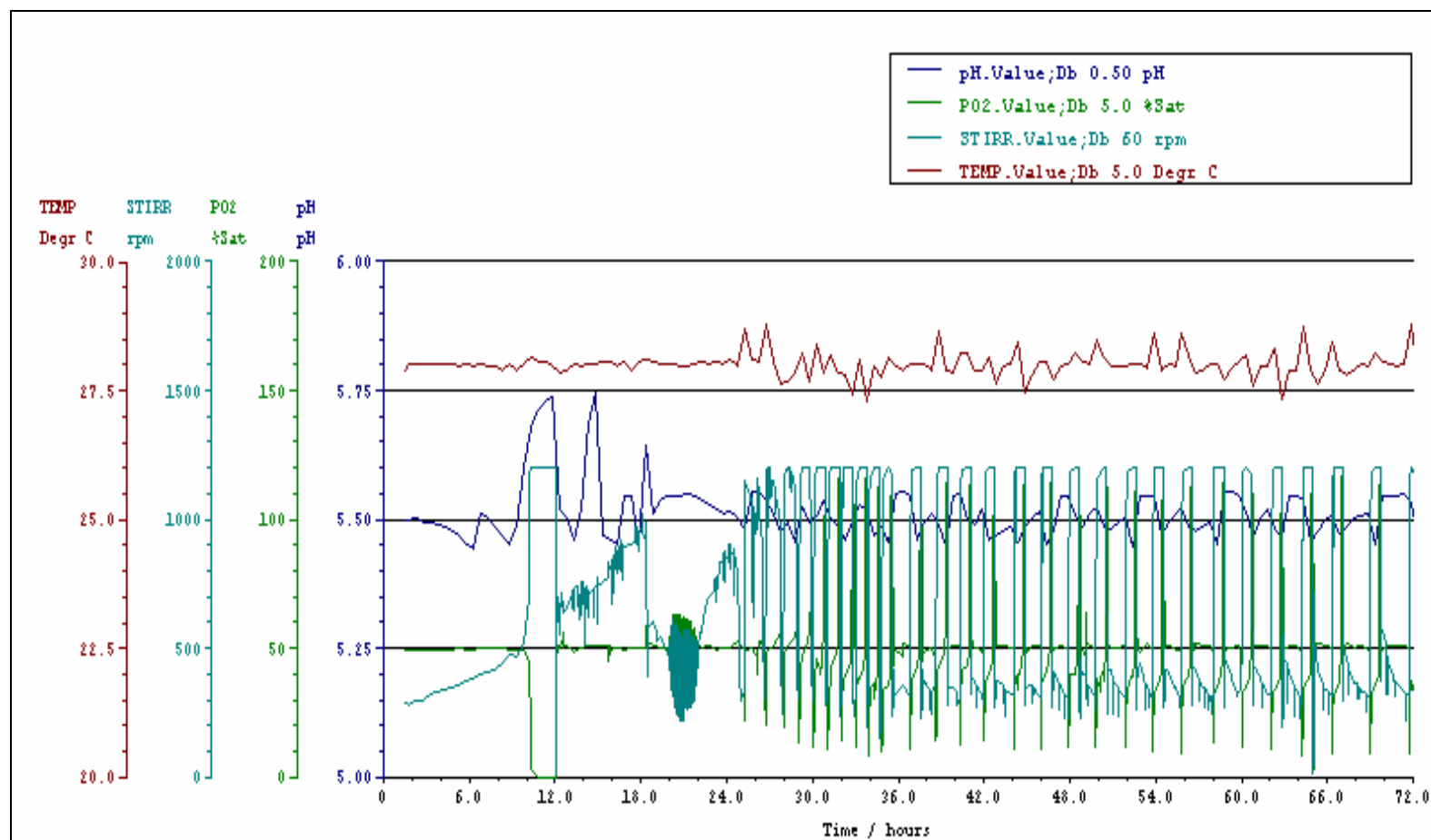
ภาพผนวกที่ ๔ กราฟควบคุมกระบวนการหมักในสภาวะการทดลอง T2 ซ้ำ



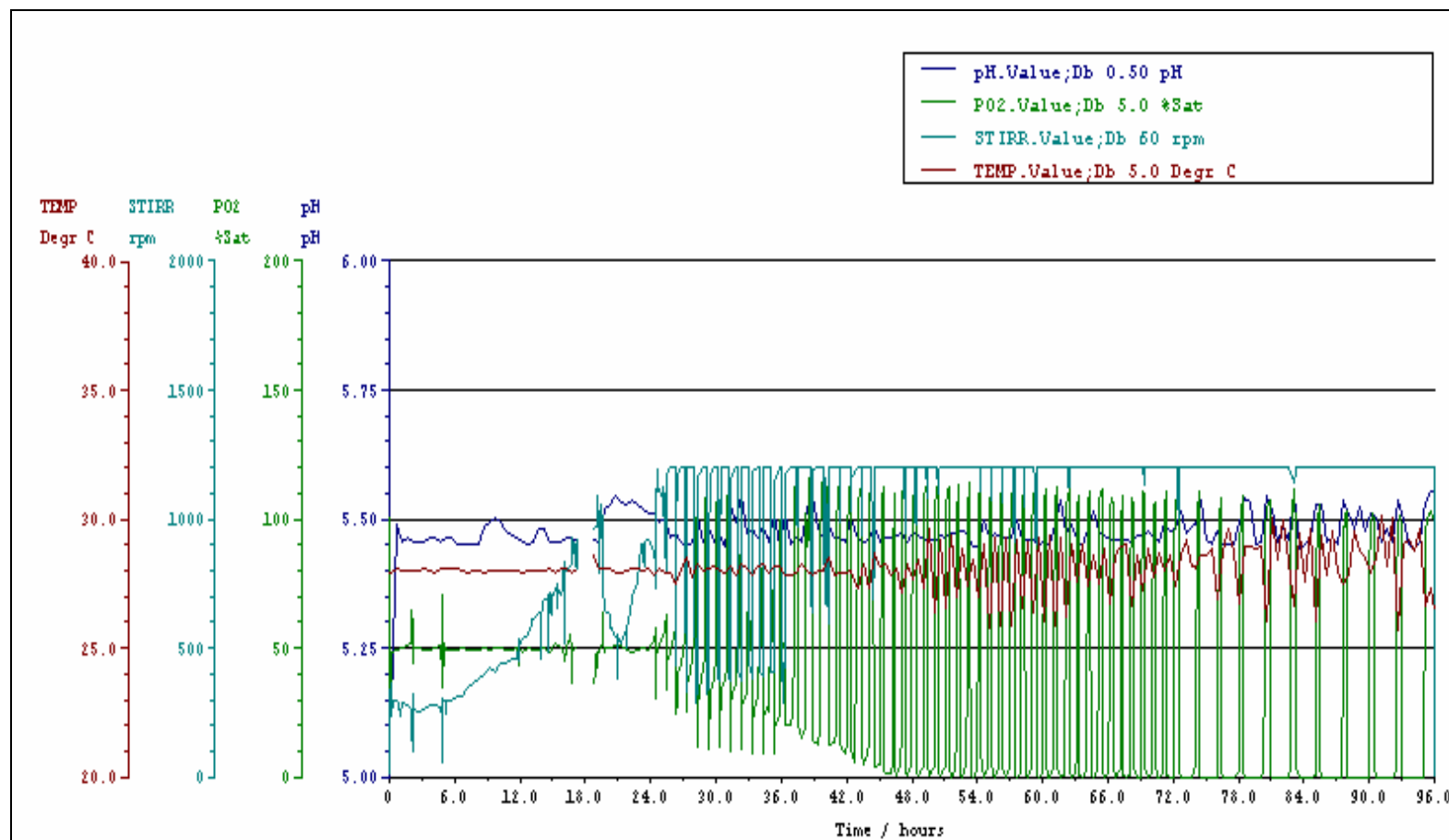
ภาพผนวกที่ 5 กราฟควบคุมกระบวนกรหมักในสภาวะการทดลอง T3



ภาพผนวกที่ ค6 กราฟควบคุมกระบวนการหมักในสภาวะการทดลอง T4



ภาพผนวกที่ ๑๗ กราฟควบคุมกระบวนการหมักในการทดลองขึ้นชั้นสภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทากูชิ



ภาพผนวกที่ ๘ กราฟควบคุมกระบวนการหมักโดยวิธีเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม

ตารางผนวกที่ ค1 สรุปค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีทางกษิ พิจารณาระยะอินคักชันที่ 51 ชั่วโมง

การทดลอง	μ_g (h^{-1})	μ_m (h^{-1})	MeOH consump (g)	$Y_{X/g}$ (g/g)	$Y_{X/m}$ (g/g)	q_g (g/g.h)	q_m (g/g.h)	Activity (U/l)	Q_p (U/l.h)	$Y_{p/m}$ (U/l.g)	q_p (U/l.g.h)
T1	0.211	0.016	69.63	0.49	0.38	0.33	0.05	126.34	2.40	1.75	0.08
T2	0.099	0.015	90.84	0.59	0.29	0.18	0.05	283.19	5.42	3.04	0.15
T3	0.193	0.018	127.99	0.51	0.19	0.36	0.08	193.63	3.80	1.51	0.12
T4	0.216	0.017	87.64	0.61	0.35	0.24	0.05	232.10	4.42	2.57	0.12
ยื่นยันผล	0.174	0.019	120.69	0.45	0.27	0.35	0.07	252.29	4.91	2.07	0.14

ตารางผนวกที่ ค2 สรุปค่าพารามิเตอร์ต่าง ๆ ในการทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมโดยวิธีทางกษิ พิจารณาระยะอินคักชันที่ 42 ชั่วโมง

การทดลอง	μ_g (h^{-1})	μ_m (h^{-1})	MeOH consump (g)	$Y_{X/g}$ (g/g)	$Y_{X/m}$ (g/g)	q_g (g/g.h)	q_m (g/g.h)	Activity (U/l)	Q_p (U/l.h)	$Y_{p/m}$ (U/l.g)	q_p (U/l.g.h)
T1	0.211	0.015	57.33	0.49	0.33	0.33	0.05	105.47	2.41	1.77	0.09
T2	0.099	0.033	78.32	0.59	0.32	0.18	0.05	217.49	5.02	2.69	0.14
T3	0.193	0.021	108.95	0.51	0.22	0.36	0.09	155.77	3.71	1.43	0.12
T4	0.216	0.018	75.58	0.61	0.34	0.24	0.05	198.41	4.56	2.53	0.14
ยื่นยันผล	0.174	0.020	104.00	0.45	0.23	0.35	0.08	278.9	6.59	2.66	0.20

ตารางผนวกที่ ค3 ค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ภายใต้สภาวะ T1

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
0	39.86	0.78	0.97		
3	40.15	0.86	0.52		
6	37.14	1.88	1.17		
9	34.69	3.48	1.04		
12	28.14	6.18	0.91		
15	14.78	12.64	2.01		
18	0.00	20.62	2.80		
21		18.40	4.15	4.00	2.75
22					2.70
23					2.67
24		20.52	5.18		1.60
25					0.35
26					0.02
26.25				4.00	2.45
27		22.30	9.33		1.27
28					0.26

ตารางผนวกที่ ๓ (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
29				4.00	0.54
30		22.80	22.35		0.07
31				4.00	0.60
32					0.47
33		22.50	27.60	4.00	0.61
35					0.19
35.75				4.00	1.09
36		25.30	33.37		2.28
37					0.23
38				4.00	2.34
39		26.74	32.59		0.11
40					0.01
40.5				4.00	2.33
41					1.75
42		27.02	44.83		0.07
43				4.00	0.68

ตารางผนวกที่ ๓ (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
44					0.10
45		25.64	55.13		0.00
45.5				4.00	2.20
46					1.86
47					0.33
48		29.04	59.28		0.00
48.33				4.00	1.93
49					1.56
50					0.25
51		29.60	64.27		0.00
51.5				4.00	2.75
52					0.97
53					0.13
54		32.54	76.84	4.00	2.46
55					0.41
56.5				4.00	1.92

ตารางผนวกที่ ๓ (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
57		34.06	80.34		1.68
58					0.34
59					0.02
59.5				4.00	1.88
60		35.06	90.25		1.11
61					0.21
62					0.02
62.5				4.00	2.04
63		37.24	105.47		1.31
64					0.14
65					0.05
65.5				4.00	2.24
66		39.70	109.43		1.51
67					0.20
68					0.01
68.5				4.00	1.92

ตารางผนวกที่ ๓ (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
69		39.48	122.38		1.64
70					0.30
71					0.03
71.5				4.00	2.20
72		44.94	126.34		1.47

ตารางผนวกที่ ค4 ค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ภายใต้สภาวะ T2

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
0	35.39	0.74	1.17		
3	36.34	3.64	1.55		
6	35.62	5.28	1.36		
9	34.49	6.94	1.94		
12	31.52	8.96	1.75		
15	29.09	11.64	2.72		
18	21.61	15.52	3.50		
21	1.63	23.66	5.05		
24	0.00	20.82	6.80	4.00	0.89
25					2.00
26					2.08
27		25.12	7.97		1.31
28					0.40
29					0.05
29.17				4.00	0.99
30		24.90	15.74		1.19

ตารางผนวกที่ ค4 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
31					0.20
31.28				4.00	0.63
32					1.08
33		28.46	23.91	4.00	1.71
34					0.53
35				4.00	2.16
36		30.46	39.07		0.10
36.33				4.00	1.31
37					
38				4.00	0.86
39		32.56	61.03		0.06
39.5				4.00	0.98
40					1.43
41				4.00	0.62
42		32.44	98.35		2.52
43				4.00	4.57

ตารางผนวกที่ ๔ (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
44				4.00	6.92
45		37.45	125.36		4.41
46					0.86
47				4.00	1.10
48		38.88	124.39		0.92
49					0.29
49.5				4.00	0.85
50					2.36
50.5				4.00	2.68
51		39.62	179.01		4.73
52				4.00	5.73
53				4.00	9.45
54		39.00	182.70	4.00	11.72
55				4.00	12.81
56				4.00	13.93
57		39.00	203.11	4.00	19.33

ตารางผนวกที่ ๔ (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
58					-
59					-
60		43.15	197.28		-
61					-
62					-
63		46.70	219.24		1.83
64					0.91
65					0.09
65.5				4.00	1.39
66		45.60	217.49		1.15
67					0.19
68					1.08
69		46.95	236.93		0.11
70					0.02
70.33				4.00	0.92
71					2.54

ตารางผนวกที่ ค4 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
72		47.00	273.47		0.93
73				4.00	2.01
74					0.41
75		47.42	283.19		0.01

ตารางผนวกที่ ค5 ค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ภายใต้สภาวะ T3

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
0	36.58	0.30	0.00		
3	37.89	0.98	0.00		
6	35.13	1.76	0.00		
9	32.58	2.96	0.00		
12	28.58	4.74	0.00		
15	21.43	8.80	0.00		
18	0.00	19.62	0.00		
21		16.28	0.00	4.00	0.99
22					1.69
23					1.51
24		17.76	0.00		0.67
25				4.00	0.76
26					0.42
26.5				4.00	0.82
27		21.00	8.09		0.85
27.67				4.00	1.56

ตารางผนวกที่ ๕ (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
28					1.02
28.58				4.00	0.71
29					0.83
29.5				4.00	1.83
30		23.82	27.46		
30.67				4.00	0.94
31				4.00	0.63
31.83				4.00	0.82
33		23.58	38.73	4.00	1.15
34.33				4.00	0.62
35.33				4.00	0.59
36		24.38	51.44		
36.58				4.00	0.58
38				4.00	0.79
39		31.42	66.76		0.04
39.5				4.00	1.30

ตารางผนวกที่ ค5 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
40.83				4.00	1.59
42		31.88	81.50		0.68
42.58				4.00	
44				4.00	0.49
45		32.60	88.72		0.05
45.67				4.00	0.55
47				4.00	1.17
48		34.28	94.65		0.08
49				4.00	0.52
50					0.09
50.5				4.00	0.38
51		38.84	97.11		0.03
52				4.00	0.53
53.5				4.00	0.93
54		39.00	132.07		0.43
55				4.00	1.84

ตารางผนวกที่ ค5 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
56.5				4.00	1.18
57		37.74	138.14		0.14
58				4.00	0.86
59.5				4.00	1.10
60		37.34	142.19		0.77
61				4.00	0.05
62					0.40
62.75				4.00	0.92
63		40.26	155.77		0.76
64.5				4.00	0.95
66		41.26	171.38	4.00	1.42
67.75				4.00	1.06
69		41.74	186.99		
69.5				4.00	0.97
71.17				4.00	0.93
72		40.78	193.63		0.01

ตารางผนวกที่ ค6 ค่าที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ภายใต้สภาวะ T4

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
0	39.50	0.74	0		
3	39.50	1.20	0.16		
6	37.21	1.94	0.00		
9	32.63	3.82	0.65		
12	23.71	9.86	1.94		
15	11.59	20.82	4.21		
18	1.30	22.42	5.83		
21		18.80	6.80	4.00	1.06
22					2.57
23					2.16
24		24.00	9.23		1.14
25					0.20
25.5				4.00	0.72
26					0.86
27		26.26	20.41	4.00	0.62
28					0.88

ตารางผนวกที่ ๓6 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
28.5				4.00	0.83
29					0.94
30		23.36	37.25		0.21
30.33				4.00	0.66
31					0.46
32				4.00	0.78
32.75				4.00	0.66
33		29.68	41.14		1.21
34					0.25
34.75				4.00	0.05
35					1.47
36		31.72	54.42		0.06
36.67				4.00	0.84
37					1.57
38					0.13
38.67				4.00	1.58

ตารางผนวกที่ ค6 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
39		34.42	74.34		0.82
40					0.21
40.75				4.00	1.43
41					2.00
42		35.76	99.45		0.07
43				4.00	1.38
44					0.23
45		35.64	109.98		0.00
45.33				4.00	1.98
46					0.38
47				4.00	0.03
48		36.10	113.54		0.04
49				4.00	1.24
50					0.20
51		35.36	115.00		0.00
51.15				4.00	0.34

ตารางผนวกที่ ๓๖ (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
52					0.17
53					0.00
53.42				4.00	0.48
54		39.80	154.20		0.14
55					0.00
55.58				4.00	0.85
56					1.37
57		39.98	169.10	4.00	2.30
58					0.51
59				4.00	0.57
60		45.84	181.41		0.54
61					0.04
62				4.00	0.00
63		44.22	198.41		0.10
64				4.00	0.00
65					0.44

ตารางผนวกที่ ๓6 (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
66		47.70	225.30		0.04
67					0.00
68				4.00	1.51
69		48.46	170.23		0.02
70					0.00
71				4.00	1.44
72		49.46	232.10		0.05

ตารางผนวกที่ ๗ ผลยืนยันการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดสกลายพันธุ์ (A454N) ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมจากวิธีทางจุลินทรีย์

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
0	38.05	0.82	0.00		
3	38.93	1.24	0.00		
6	37.62	2.14	0.00		
9	35.70	4.08	0.00		
12	32.58	5.72	0.00		
15	26.10	9.58	0.39		
18	0.83	18.22	7.96		
21		19.12	1.94	4.00	2.27
22					2.47
23					2.09
24		20.02	4.08		0.95
25				4.00	0.47
26					0.50
26.67				4.00	1.48
27		20.94	9.13		1.63
28				4.00	1.36

ตารางผนวกที่ ๗ (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
29				4.00	0.99
30		23.46	26.61	4.00	0.83
31				4.00	1.22
32				4.00	0.30
33		28.86	57.88	4.00	0.75
34				4.00	0.61
35				4.00	2.31
36		30.54	72.25		
37				4.00	1.05
38.5				4.00	0.86
39		32.26	93.23		0.36
40					0.04
40.33				4.00	2.45
41					0.45
42		33.86	101.19	4.00	1.80
43					0.49

ตารางผนวกที่ ๗ (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
44				4.00	0.45
45		35.86	132.26		0.06
46				4.00	1.10
47					0.19
48		34.7	154.99	4.00	2.22
49					1.38
49.75				4.00	0.72
51		39.88	187.42		0.03
52				4.00	0.92
53					0.20
53.75				4.00	1.18
54		39.98	198.49		1.79
55					0.14
55.83				4.00	0.96
57		41.98	217.91		0.17
58				4.00	1.16

ตารางผนวกที่ ๗ (ต่อ)

เวลา (ชั่วโมง)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	น้ำหมักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	กิจกรรมเอนไซม์เบต้า-กลูโคซิเดส (ยูนิต/ลิตร)	เมทานอลที่เติม (กรัม)	เมทานอลที่สะสม (กรัม/ลิตร)
59					0.17
60		41.66	232.87	4.00	0.97
61					0.15
62				4.00	0.61
63		43.00	278.90		0.05
64				4.00	0.52
65					0.09
66		46.16	269.38		
66.33				4.00	2.13
67					0.33
68					0.02
69		47.80	269.19	4.00	1.73
70.5					0.24
71					0.10
71.67				4.00	1.12
72		51.70	252.29		0.97

ตารางผนวกที่ ค8 ค่าที่ได้จากวิธีการผลิตเอนไซม์รีคอมบิแนนต์เบต้า-กลูโคซิเดส ด้วยการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมที่ได้จากวิธีทางุชิ

เวลา (ชม.)	ปริมาตรน้ำ หมัก (มล.)	OD 600 (นาโนเมตร)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	DCW (กรัม/ลิตร)	DCW (กรัม)	กิจกรรม (ยูนิต/ลิตร)	กิจกรรม (ยูนิต)	เมทานอลสะสม (กรัม/ลิตร)	เมทานอล สะสม (กรัม)	เมทานอลที่ เติม (กรัม)
0	1017	0.67	40.39	1.04	1.06	13.90	14.13			
3	1017	1.24	40.67	1.08	1.10	11.76	11.96			
6	1017	2.31	37.34	1.52	1.55	10.69	10.87			
9	1017	5.15	36.73	2.78	2.83	8.91	9.06			
12	1018	8.19	33.77	4.40	4.48	8.02	8.16			
15	1018	26.10	26.74	11.36	11.56	4.99	5.08			
18	1018	41.00	14.79	22.16	22.56	7.84	7.98			
21	1018	54.80	0.00	23.28	23.70	8.37	8.52	1.65	1.68	3.33
22	1020							2.06	2.10	
23	1024							1.75	1.79	
24	1025	48.10		23.92	24.52	9.98	10.23	0.67	0.68	
24.5	1029							1.67	1.72	3.33
25.5	1037							0.99	1.02	3.33
26.5	1045							1.09	1.14	3.33
27	1042	45.30		26.5	27.61	29.22	30.44			

ตารางผนวกที่ ๘ (ต่อ)

เวลา (ชม.)	ปริมาณน้ำ หมัก (มล.)	OD 600 (นาโนเมตร)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	DCW (กรัม/ลิตร)	DCW (กรัม)	กิจกรรม (ยูนิต/ลิตร)	กิจกรรม (ยูนิต)	เมทานอลสะสม (กรัม/ลิตร)	เมทานอล สะสม (กรัม)	เมทานอลที่ เติม (กรัม)
27.5	1046							1.98	2.07	3.33
28.5	1053							1.36	1.44	3.33
29.5	1061							1.50	1.59	3.33
30	1058	54.70		29.18	30.87	47.03	49.76			
30.5	1062							1.70	1.80	3.33
31.5	1071							1.91	2.04	3.33
32.5	1080							2.14	2.31	3.33
33	1079	53.40		31.38	33.86	94.77	102.26			
33.5	1083							1.78	1.93	3.33
34.5	1093							2.06	2.25	3.33
35.5	1102							2.32	2.56	3.33
36	1100	55.90		38.18	42.00	153.20	168.52			
36.5	1106							1.70	1.88	4.68
37.5	1117							2.87	3.21	4.68
39	1127	55.80		39.44	44.45	166.74	187.92	2.82	3.17	4.68
40.5	1140							3.33	3.80	4.68

ตารางผนวกที่ ๘ (ต่อ)

เวลา (ชม.)	ปริมาณน้ำ หมัก (มล.)	OD 600 (นาโนเมตร)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	DCW (กรัม/ลิตร)	DCW (กรัม)	กิจกรรม (ยูนิต/ลิตร)	กิจกรรม (ยูนิต)	เมทานอลสะสม (กรัม/ลิตร)	เมทานอล สะสม (กรัม)	เมทานอลที่ เติม (กรัม)
41.5	1150							4.15	4.77	4.68
42	1148	65.50		44.62	51.22	274.70	315.35			
42.5	1154							1.58	1.82	4.68
43.5	1165							2.03	2.37	4.68
44.5	1176							1.80	2.12	4.68
45	1174	61.10		49.34	57.93	343.46	403.22			
45.5	1180							2.24	2.64	4.68
46.5	1193							3.01	3.60	4.68
47.5	1204							3.00	3.62	4.68
48	1202	63.75		56.72	68.18	421.84	507.05			
48.5	1209							1.53	1.85	5.55
49.5	1221							3.74	4.57	5.55
50.5	1233							4.00	4.93	5.55
51	1233	84.60		66.08	81.48	483.48	596.13			
51.5	1240							2.80	3.47	5.55
52.5	1253							3.49	4.38	5.55

ตารางผนวกที่ ๘ (ต่อ)

เวลา (ชม.)	ปริมาตรน้ำ หมัก (มล.)	OD 600 (นาโนเมตร)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	DCW (กรัม/ลิตร)	DCW (กรัม)	กิจกรรม (ยูนิต/ลิตร)	กิจกรรม (ยูนิต)	เมทานอลสะสม (กรัม/ลิตร)	เมทานอล สะสม (กรัม)	เมทานอลที่ เติม (กรัม)
53.5	1266							3.81	4.83	5.55
54	1266	92.10		71.84	90.95	656.63	831.30			
54.5	1273							3.21	4.09	5.55
55.5	1286							3.79	4.88	5.55
56.5	1299							4.07	5.28	5.55
57	1299	89.25		73.52	95.50	812.33	1055.22			
57.5	1306							1.43	1.87	5.55
58.5	1319							3.53	4.66	5.55
59.5	1332							1.33	1.77	5.55
60	1332	91.05		76.82	102.32	881.81	1174.57			
60.5	1340							3.40	4.55	6.45
61.5	1354							3.92	5.30	6.45
62.5	1369							2.21	3.02	6.45
63	1369	102.00		82.8	113.35	1118.74	1531.55			
63.5	1377							2.54	3.50	6.45
64.5	1391							3.05	4.24	6.45

ตารางผนวกที่ ๘ (ต่อ)

เวลา (ชม.)	ปริมาตรน้ำ หมัก (มล.)	OD 600 (นาโนเมตร)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	DCW (กรัม/ลิตร)	DCW (กรัม)	กิจกรรม (ยูนิต/ลิตร)	กิจกรรม (ยูนิต)	เมทานอลสะสม (กรัม/ลิตร)	เมทานอล สะสม (กรัม)	เมทานอลที่ เติม (กรัม)
65.5	1405							2.90	4.08	6.45
66.5	1414	102.75		92.06	130.17	1314.69	1858.98	3.40	4.81	6.45
67.5	1424							3.88	5.52	6.45
68.5	1438							4.71	6.78	6.45
69	1440	140.25		96.28	138.64	1395.75	2009.88			
69.5	1449							4.69	6.79	6.45
70.5	1464							3.01	4.40	6.45
71.5	1479							4.47	6.62	6.45
72	1481	148.00		98.9	146.47	1716.40	2541.99			
72.5	1505							5.02	7.56	18.81
73.5	1515							5.40	8.18	
74.5	1542							11.76	18.13	18.81
75	1543	157.50		99.7	153.84	1765.39	2724.00			
75.5	1546							6.34	9.80	
76.5	1572							11.99	18.85	18.81
77.5	1577							6.16	9.72	

ตารางผนวกที่ ค8 (ต่อ)

เวลา (ชม.)	ปริมาณน้ำ หมัก (มล.)	OD 600 (นาโนเมตร)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	DCW (กรัม/ลิตร)	DCW (กรัม)	กิจกรรม (ยูนิต/ลิตร)	กิจกรรม (ยูนิต)	เมทานอลสะสม (กรัม/ลิตร)	เมทานอล สะสม (กรัม)	เมทานอลที่ เติม (กรัม)
78	1577	171.00		100.88	159.09	2055.77	3241.94			
78.5	1606							13.58	21.81	22.93
79.5	1614							10.10	16.30	
81	1645	170.10		113.8	187.20	2265.08	3726.06	12.99	21.36	22.93
82	1673							11.80	19.75	
83.5	1729							12.33	21.32	22.93
84	1747	168.00		99.86	174.46	2025.48	3538.52	7.87	13.75	
85	1769	184.80								
85.5	1801							10.60	19.08	25.04
86.5	1834							8.58	15.74	
87	1843	170.40		108.00	199.04	2412.94	4447.05			
88	1897							5.32	10.10	25.04
89	1921							8.30	15.95	
90	1942	169.20		100.90	195.95	2431.65	4722.26			
90.5	1973							4.30	8.48	25.04
91.5	2008							5.89	11.83	

ตารางผนวกที่ ค8 (ต่อ)

เวลา (ชม.)	ปริมาตรน้ำ หมัก (มล.)	OD 600 (นาโนเมตร)	กลีเซอรอล (กรัม/ลิตร)	DCW (กรัม/ลิตร)	DCW (กรัม)	กิจกรรม (ยูนิต/ลิตร)	กิจกรรม (ยูนิต)	เมทานอลสะสม (กรัม/ลิตร)	เมทานอล สะสม (กรัม)	เมทานอลที่ เติม (กรัม)
92.5	2033	165.00						2.99	6.08	
93	2049	164.70		106.40	218.01	2490.43	5102.90	10.28	21.06	24.88
94	2054							9.50	19.51	
95	2060							5.50	11.33	
96	2061	175.00		108.56	223.74	2681.05	5525.64	0.10	0.21	

1. การคำนวณอัตราการเติมเมทานอลเป็นระยะแบบขั้นบันได

ลักษณะการเติมเมทานอลแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

กลุ่มที่ 1 เวลาในการเพาะเลี้ยงที่ 21-72 ชั่วโมง คำนวณอัตราการเติมเมทานอลโดยกำหนดค่า q_m เท่ากับ 0.14 กรัมเมทานอล/กรัมเซลล์.ชั่วโมง และใช้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยของแต่ละช่วงในการทดลองครั้งขึ้นต้นผลทากุชิ แสดงผลการคำนวณได้ดังตาราง

ช่วงเวลาเติมเมทานอล (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย (กรัม/ลิตร)	อัตราการเติมเมทานอล (กรัม/ชั่วโมง)
21-36	23.82	3.33
36-48	33.44	4.68
48-60	39.64	5.55
60-72	46.06	6.45

ตัวอย่างการคำนวณอัตราการเติมเมทานอล กลุ่มที่ 1

พิจารณาช่วงการเติมชั่วโมงที่ 21-36 โดยใช้ข้อมูลน้ำหนักเซลล์แห้งจากตารางผนวกที่ ค7

$$\begin{aligned} \text{จะได้ น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ย} &= \frac{19.12 + 20.02 + 20.94 + 23.46 + 28.86 + 30.54}{6} \\ &= 23.82 \text{ กรัม/ลิตร} \end{aligned}$$

เมื่อกำหนดให้ q_m เท่ากับ 0.14

ดังนั้น

$$\begin{aligned} \text{อัตราการใช้เมทานอลต่อเซลล์ทั้งหมด} &= 0.14 \times 23.82 \\ &= 3.33 \text{ กรัมเมทานอล/ชั่วโมง (ปริมาตร 1 ลิตร)} \end{aligned}$$

กลุ่มที่ 2 เวลาในการเพาะเลี้ยงที่ 72-96 ชั่วโมง คำนวณอัตราการเติมเมทานอลโดยกำหนดค่า q_m เท่ากับ 0.14 กรัมเมทานอล/กรัมเซลล์.ชั่วโมง และอาศัยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรเฉลี่ยในช่วงก่อนการเติมเมทานอล แล้วนำค่าที่ได้มาประมาณหาน้ำหนักเซลล์แห้งขณะนั้นโดยใช้ความชันจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรกับค่าน้ำหนักเซลล์แห้งแสดงดังภาพผนวกที่ ค1 (ความชันเท่ากับ 0.97) ผลการคำนวณอัตราการเติมเมทานอลแสดงดังตาราง

ช่วงเวลาเดิม เมทานอล (ชั่วโมง)	ช่วงเวลาในการคำนวณค่า การดูดกลืนแสงเฉลี่ย (ชั่วโมง)	ค่าการดูดกลืนแสง เฉลี่ยที่ 600 นาโนเมตร	น้ำหนักเซลล์แห้ง เฉลี่ย (กรัม)	อัตราการเดิม เมทานอล (กรัม/ชั่วโมง)
72-78	66-72	130.33	134.36	18.81
78-84	72-78	158.83	163.75	22.93
84-93	78-85	173.48	178.84	25.04
93-96	85-92.5	172.35	177.68	24.88

ตัวอย่างการคำนวณอัตราการเดิมเมทานอล กลุ่มที่ 2

พิจารณาช่วงการเดิมเมทานอลชั่วโมงที่ 72-78 โดยอาศัยข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ระหว่างช่วงเวลาที่เพาะเลี้ยงชั่วโมงที่ 66-72 (แสดงดังตารางผนวกที่ 8)

$$\begin{aligned}
 \text{ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ย} &= \frac{102.75 + 140.25 + 148}{3} \\
 &= 130.33 \\
 \text{ประมาณค่าน้ำหนักเซลล์แห้ง} &= \frac{130.33}{0.97} \\
 &= 134.36 \text{ กรัม}
 \end{aligned}$$

จากนั้นคำนวณอัตราการเดิมเมทานอลโดยกำหนดค่า q_m เท่ากับ 0.14 กรัมเมทานอล/กรัมเซลล์.ชั่วโมง ดังได้แสดงตัวอย่างการคำนวณแล้วในข้างต้น

2. การคำนวณวิธีการควบคุมการทำงานของปั๊มในการเติมเมทานอลเป็นระบบขั้นบันได

ตารางผนวกที่ ค9 ปริมาณเมทานอลที่เติมและการควบคุมปั๊มในการเติมเมทานอลเป็นระบบขั้นบันได

ช่วงเวลาเติม เมทานอล (ชั่วโมง)	ปริมาณเมทานอลที่ เติม (กรัม)	ปริมาตรเมทานอล ที่เติม (มิลลิลิตร)	อัตราการหมุนของปั๊ม (เปอร์เซ็นต์)	เวลาในการเติม (นาที)
21-36	3.33	4.22	84.4	1
36-48	4.68	5.92	59.2	2
48-60	5.55	7.03	70.3	2
60-72	6.45	8.16	81.6	2
72-78	18.81	23.80	95.2	5
78-84	22.93	29.02	96.7	6
84-93	25.04	31.69	90.5	7
93-96	24.88	31.50	90.0	7

ตัวอย่างการคำนวณวิธีการควบคุมการทำงานของปั๊ม

พิจารณาช่วงการเติมเมทานอลชั่วโมงที่ 93-96 จากตารางผนวกที่ ค9 ซึ่งเป็นการเติมเมทานอล ณ ชั่วโมงที่ 93 จากการคำนวณจะต้องเติมเมทานอลลงไปถึงหมัก 24.88 กรัม ซึ่งคิดเป็น 31.50 มิลลิลิตร (คำนวณจากค่าความหนาแน่นของเมทานอลซึ่งเท่ากับ 0.79) ส่วนในการเติมเมทานอลจะควบคุมโดยปั๊มซึ่งผ่านการ calibrate และสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการหมุนของปั๊ม (เปอร์เซ็นต์) กับปริมาตรเมทานอลต่อเวลา (มิลลิลิตร/นาที) แสดงกราฟมาตรฐานดังภาพผนวกที่ ข4 ได้ความชันจากกราฟเท่ากับ 0.05 ดังนั้นจะสามารถหาอัตราการหมุนของปั๊มได้ดังนี้

$$\begin{aligned}
 \text{อัตราการหมุนของปั๊ม (เปอร์เซ็นต์)} &= \frac{31.50}{0.05} \\
 &= 630 \text{ เปอร์เซ็นต์/1 นาที}
 \end{aligned}$$

แต่เนื่องจากการทำงานของปั๊มสูงสุดเท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ดังนั้นจะต้องทำการเติมเป็นเวลา 7 นาทีและควบคุมอัตราการหมุนของปั๊มเท่ากับ 630/7 หรือ 90 เปอร์เซ็นต์

ภาคผนวก ง
การคำนวณค่าพารามิเตอร์

การคำนวณค่าพารามิเตอร์

1. อัตราการเจริญจำเพาะ (μ)

1.1 อัตราการเจริญจำเพาะในการหมักแบบเปิดเสรี

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างเวลา (t) กับ $\ln X$ อัตราการเจริญจำเพาะหาได้จากความชันของกราฟ

1.2 อัตราการเจริญจำเพาะในการหมักแบบครั้งคราว

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง เวลา (t) กับ $\ln (XV)$ อัตราการเจริญจำเพาะหาได้จากความชันของกราฟ

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

μ คือ อัตราการเจริญจำเพาะ (ต่อชั่วโมง)

V คือ ปริมาตรของน้ำหมัก (ลิตร)

X คือ น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)

t คือ เวลา (ชั่วโมง)

2. ผลได้ของเซลล์

2.1 ผลได้ของเซลล์ต่อกลีเซอรอล ($Y_{X/g}$)

สามารถหาผลได้ของเซลล์ต่อกลีเซอรอลได้จากสมการ

$$Y_{X/g} = \frac{\Delta X}{\Delta S_g}$$

$Y_{X/g}$ คือ ผลได้ของเซลล์ต่อกลีเซอรอล (กรัมเซลล์/กรัมกลีเซอรอล)

ΔX คือ น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ในระยะเบ็คเทร็จ (กรัม/ลิตร)

ΔS_g คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ใช้ (กรัม/ลิตร)

หรือ

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) กับความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ใช้ (กรัม/ลิตร) ผลได้ของเซลล์ต่อกลีเซอรอลหาได้จากความชันของกราฟ

2.2 ผลได้ของเซลล์ต่อเมทานอล ($Y_{X/m}$)

สามารถหาผลได้ของเซลล์ต่อเมทานอลได้จากสมการ

$$Y_{X/m} = \frac{\Delta X}{\Delta S_m}$$

เมื่อ $Y_{X/m}$ คือ ผลได้ของเซลล์ต่อเมทานอล (กรัมเซลล์/กรัมเมทานอล)

ΔX คือ น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ในระยะอินดักชัน (กรัม/ลิตร)

ΔS_m คือ ปริมาณของเมทานอลที่ใช้ (กรัม/ลิตร)

หรือ

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร) กับปริมาณเมทานอลที่ใช้ (กรัม/ลิตร) ผลได้ของเซลล์ต่อเมทานอลหาได้จากความชันของกราฟ

3. อัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะ

3.1 อัตราการใช้กลีเซอรอลจำเพาะ (q_g)

$$q_g = \frac{1}{\overline{X}} = \frac{\Delta S_g}{\Delta t}$$

q_g คือ อัตราการใช้กลีเซอรอลจำเพาะ (กรัมกลีเซอรอล/กรัมเซลล์.ชั่วโมง)

ΔS_g คือ ความเข้มข้นของกลีเซอรอลที่ใช้ (กรัม/ลิตร)

$\overline{X}$ คือ น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยในระยะเบ็คเทร็จ (กรัม/ลิตร)

Δt คือ เวลาการเพาะเลี้ยงระยะเบ็คเทร็จ (ชั่วโมง)

3.2 อัตราการใช้เมทานอลจำเพาะ (q_m)

$$q_m = \frac{1}{\overline{X}} = \frac{\Delta S_m}{\Delta t}$$

q_m คือ อัตราการใช้เมทานอลจำเพาะ (กรัมเมทานอล/กรัมเซลล์.ชั่วโมง)

ΔS_m คือ ปริมาณเมทานอลที่ใช้ (กรัม/ลิตร)

$\overline{X}$ คือ น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยในระยะอินดักชัน (กรัม/ลิตร)

Δt คือ เวลาการเพาะเลี้ยงระยะอินดักชัน (ชั่วโมง)

4. อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตร (Q_p)

สามารถหาอัตราการเกิดผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตรได้จากสมการ

$$Q_p = \frac{\Delta P}{\Delta t} = \frac{P_t - P_0}{t_t - t_0}$$

เมื่อ Q_p คือ อัตราการผลิตเอนไซม์เชิงปริมาตร (ยูนิต/ลิตร.ชั่วโมง)

ΔP คือ กิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในระยะอินดักชัน (ยูนิต/ลิตร)

Δt คือ เวลาการผลิตเอนไซม์ในระยะอินดักชัน (ชั่วโมง)

หรือ

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตขึ้น (ยูนิต/ลิตร) ต่อเวลา (ชั่วโมง)

อัตราการเกิดผลิตภัณฑ์เชิงปริมาตรได้จากความชันของกราฟ

5. ผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล ($Y_{p/m}$)

สามารถหาผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอลได้จากสมการ

$$Y_{p/m} = \frac{\Delta P}{\Delta S_m}$$

เมื่อ

$Y_{p/m}$ คือ ผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอล (ยูนิต/ลิตร.กรัม)

ΔP คือ กิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในระยะอินดักชัน (ยูนิต/ลิตร)

ΔS_m คือ ปริมาณเมทานอลที่ใช้ไป (กรัม/ลิตร)

หรือ

เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในระยะอินดักชัน (ยูนิต/ลิตร) กับปริมาณเมทานอลที่ใช้ (กรัม/ลิตร) ผลได้ของเอนไซม์ต่อเมทานอลหาได้จากความชันของกราฟ

6. อัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะ (q_p)

$$q_p = \frac{1}{X} = \frac{\Delta P}{\Delta t}$$

q_p คือ อัตราการผลิตเอนไซม์จำเพาะ (ยูนิต/ลิตร/กรัม.ชั่วโมง)

ΔP คือ กิจกรรมเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในระยะอินดักชัน (ยูนิต/ลิตร)

$\bar{X}$ คือ น้ำหนักเซลล์แห้งเฉลี่ยในระยะอินดักชัน (กรัม/ลิตร)

Δt คือ เวลาการเพาะเลี้ยงระยะอินดักชัน (ชั่วโมง)

การคำนวณในการออกแบบโดยวิธีทางสถิติ (Roy, 2001)

1. การคำนวณค่าอัตราส่วน S/N

$$S/N \text{ ratio} = -10 \log \left(\frac{\sum \left(\frac{1}{y} \right)^2}{N} \right)$$

N คือ จำนวนการทดลอง

y คือ ผลการทดลอง

2. เปอร์เซนต์อิทธิพลหลัก (% main effect)

$$\text{เปอร์เซนต์อิทธิพล} = \frac{(\text{ค่าอิทธิพลสูงสุด} - \text{ค่าอิทธิพลต่ำสุด})}{\text{ค่าอิทธิพลสูงสุด}} \times 100$$

3. การหาค่าผลการทดลองที่คาดไว้ ภายใต้สภาวะที่เหมาะสม (Y_{expected})

3.1 Y_{opt}

$$Y_{\text{opt}} = \bar{T} + (\bar{A}_2 - \bar{T}) + (\bar{B}_2 - \bar{T}) + (\bar{C}_2 - \bar{T})$$

$\bar{T}$ คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองทั้งหมด

$\bar{A}_2$ คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองที่ปัจจัย A ระดับที่สอง
(ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมของปัจจัย A)

$\bar{B}_2$ คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองที่ปัจจัย B ระดับที่สอง
(ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมของปัจจัย B)

$\bar{C}_2$ คือ ค่าเฉลี่ยอัตราส่วน S/N ของผลการทดลองที่ปัจจัย C ระดับที่สอง
(ซึ่งเป็นระดับที่เหมาะสมของปัจจัย C)

$$3.2 \text{ MSD} = 10^{-(Y_{\text{opt}})/10}$$

$$3.3 Y_{\text{expected}} = (\text{MSD})^{1/2}$$

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล

นางสาวณัฏฐา อารีย์

วัน เดือน ปี ที่เกิด

1 กุมภาพันธ์ 2524

สถานที่เกิด

อำเภอเมือง จังหวัดนครราชสีมา

ประวัติการศึกษา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

มหาวิทยาลัยมหิดล

ทุนการศึกษาที่ได้รับ

ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิต

วิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประจำปีงบประมาณ

2549