



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การควบคุมการเกิด **overflow metabolism** ระหว่างการแสดงออกของ
รีคอมบิแนนท์โปรตีนแบบต่อเนื่องตลอดเวลาโดย *Pichia pastoris*

โดย นายเทพปัญญา เจริญรัตน์ และคณะ

พฤษภาคม 2552

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การควบคุมการเกิด **overflow metabolism** ระหว่างการแสดงออกของ
รีคอมบิแนนท์โปรตีนแบบต่อเนื่องตลอดเวลาโดย *Pichia pastoris*

คณะผู้วิจัย

1. นายเทพปัญญา เจริญรัตน์
2. นางมารินา เกตุทัต-คาร์นส์
3. นางสาวตีมิน เรืองเล็ก
4. นางสาวนิภารัตน์ ประมวล

สังกัด

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและ
เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และสกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

การควบคุมการเกิด overflow metabolism ระหว่างการแสดงออกของ รีคอมบิแนนท์โปรตีนแบบต่อเนื่องตลอดเวลาโดย *Pichia pastoris*

เทพปัญญา เจริญรัตน์¹, นิภารัตน์ ประมวล¹, วศิมณ เรืองเล็ก², มารินา เกตุทัต-คาร์นส์³

¹ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต), ปทุมธานี, 12120

²หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (BIOTEC), ปทุมธานี, 12120

³สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ, สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี, นครราชสีมา 30000

บทคัดย่อ

การแสดงออกอย่างต่อเนื่องตลอดเวลาของ *Pichia pastoris* โดยใช้โปรโมเตอร์ GAP เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการหลีกเลี่ยงการใช้เมทานอลเป็นตัวเหนี่ยวนำในกรณีที่ใช้โปรโมเตอร์ AOX1 ทั้งนี้ โปรโมเตอร์ GAP สามารถแสดงออกได้สูงเมื่อเชื้อเจริญโดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตเปรียบเทียบกับกลีเซอรอลหรือเมทานอล อย่างไรก็ตาม มีการรายงานว่าการใช้กลีเซอรอลซึ่งเป็นน้ำตาลที่ไม่สามารถเกิดการหมักได้ในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* จะสามารถตรวจพบการสร้าง by-product ในรูปเอทานอลได้ โดยเอทานอลที่เกิดขึ้นสามารถกีดกันการแสดงออกของโปรโมเตอร์ AOX1 ทำให้การแสดงออกของโปรโมเตอร์ AOX1 ต่ำลง ทั้งนี้ ในปัจจุบันยังไม่พบการรายงานถึงการผลิต by-product ในรูปเอทานอล เมื่อทำการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* โดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรต หรืออิทธิพลของเอทานอลต่อการการแสดงออกของโปรโมเตอร์ GAP ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาในประเด็นดังกล่าว โดยใช้เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเป็นโปรตีนติดตามเพื่อศึกษาการแสดงออกของโปรโมเตอร์ GAP ซึ่งจากการทดลองพบว่าการเติมเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้ความหนาแน่นของเซลล์ อัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และกิจกรรมของเบต้ากลูโคซิเดสลดลง จากผลที่ได้แสดงว่าเอทานอลสามารถยับยั้งการเติบโตและแสดงออกของโปรโมเตอร์ GAP จากนั้นจึงทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นในกระบวนการหมักแบบแบตช์ภายใต้สภาวะไม่จำกัดออกซิเจน ($\text{DOT} > 25\%$) พบว่าความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งทำให้ได้ค่า $\mu = 0.20 \text{ ชม}^{-1}$ และระยะเวลาที่ใช้ในช่วงการปรับตัวเท่ากับ 3.99 ชั่วโมง ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 60 และ 80 กรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดการสร้างเอทานอล ส่งผลให้ค่า μ ลดลง และระยะเวลาที่ใช้ในช่วงการปรับตัวนานขึ้น ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าเอทานอลที่เกิดขึ้นภายใต้สภาวะไม่จำกัดออกซิเจนเกิดขึ้นโดยวิถี over-flow ในส่วนสุดท้ายของ

งานวิจัยนี้ ได้ทำการออกแบบระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ 4 ระบบ เพื่อหาสภาวะควบคุมที่เหมาะสมโดยมุ่งเน้นการศึกษาปัจจัยของความเข้มข้นของกลูโคสและค่าออกซิเจนละลายเป็นหลัก คือ ระบบที่ 1 กลูโคสและออกซิเจนจำกัด ระบบที่ 2 กลูโคสจำกัดแต่ออกซิเจนไม่จำกัด ($DOT > 25\%$) ระบบที่ 3 กลูโคสไม่จำกัด ($[กลูโคส] \approx 10$ กรัมต่อลิตร) และออกซิเจนจำกัด และระบบที่ 4 กลูโคสและออกซิเจนไม่จำกัด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สภาวะจำกัดออกซิเจนเป็นปัจจัยหลัก ที่ทำให้การเติบโตและการแสดงออกของโปรโมเตอร์ *GAP* ลดลง รวมถึงพบการสร้างเอทานอลปริมาณมาก (13.5-14.0 กรัมต่อลิตร) ภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจนเปรียบเทียบกับสภาวะไม่จำกัดออกซิเจน (0.6 กรัมต่อลิตร) เอทานอลที่ความเข้มข้นสูงส่งผลให้ค่า μ ลดลงประมาณ 35% และ 63% เมื่อเปรียบเทียบกับระบบที่ 1 กับระบบที่ 2 และระบบที่ 3 กับระบบที่ 4 ตามลำดับ ยิ่งไปกว่านั้น พบว่าอัตราการสร้างผลผลิตจำเพาะในระบบที่ไม่จำกัดออกซิเจน จะสูงกว่าในระบบที่จำกัดออกซิเจน ประมาณ 7 เท่า โดยพบว่าระบบที่เหมาะสมที่สุด คือ ระบบที่ 4 อย่างไรก็ตาม ระบบที่ 4 จะควบคุมได้ยากภายใต้สภาวะที่ความหนาแน่นของเซลล์สูง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงแนะนำระบบที่ 2 คือ กลูโคสจำกัดและออกซิเจนไม่จำกัด สำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *P. pastoris* ที่ใช้โปรโมเตอร์ *GAP* เป็นตัวควบคุมการแสดงออกแบบต่อเนื่องตลอดเวลา

คำสำคัญ: พิเชีย พาสทอริส, การยับยั้งเนื่องจากเอทานอล, การกีดกันเนื่องจากเอทานอล, overflow metabolism, โปรโมเตอร์ *GAP*

Control of Overflow Metabolism During Constitutive Recombinant Protein Expression by *Pichia pastoris*

Theppanya Charoenrat^{1*}, Niparat Pramal¹, Vasimon Ruanglek², Mariena Ketudat-Cairns³

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University (Rangsit center),
Pathumthani, 12120

²National Center for Genetic Engineering for Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, 12120

³School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon
Ratchasima, 30000,

Abstract

Constitutive protein expression in *Pichia pastoris* using the *GAP* promoter to avoid the use of methanol is an effective alternative to the inducible *AOX1* promoter. *GAP* promoter is a strong constitutive promoter that shows high expression when cells are grown on glucose. When *P. pastoris* are grown on glycerol, the non-fermentable sugar, small amount of ethanol can be detected. Ethanol has been reported to repress the *AOX1* promoter resulting in lower expression level of recombinant protein. However, no literature has reported on the production of ethanol by-product when *P. pastoris* are grown on glucose or the effect of ethanol on the expression of *GAP* promoter. In this work, first, the effect of ethanol on the growth and expression of *GAP* promoter were investigated using β -glucosidase as a reporter protein. The present of ethanol in culture medium decreased the cell concentration, specific growth rate (μ) and β -glucosidase activity. These results indicated that ethanol inhibit the cell growth and also the expression of the *GAP* promoter. Then, the influence of initial glucose concentration was studied under oxygen non-limit condition (DOT > 25 %). The optimum initial glucose concentration of 20 g/L provides $\mu = 0.20 \text{ h}^{-1}$ and lag time of 3.99 h. The increase of initial glucose concentration to 60 and 80 g/L resulted in the accumulation of ethanol, which decrease μ and increased the lag time. These results indicated that under oxygen non-limit condition, the ethanol was produced *via* overflow metabolism. Finally, 4 fed-batch systems were

designed base on the effect of glucose concentration and DOT to find the optimum fed-batch control (system I: glucose and oxygen limit, system II: glucose limit and oxygen non-limit (DOT > 25%), system III: glucose non-limit ($[glu] \approx 10$ g/L) and oxygen limit), and system IV: glucose and oxygen non-limit). The results showed that the oxygen limitation had a major drawback effect to both cell growth and expression of the *GAP* promoter. More ethanol by product was accumulated under the oxygen limited condition (13.5-14.0 g/L) compare to the oxygen non-limited condition (0.6 g/L). The higher ethanol concentration results in the decrease of μ about 35% and 63% when compared system I with system II and system III with system IV, respectively. Furthermore, about 7 times higher specific production rate was observed under non-oxygen limit condition compared with oxygen limitation. The best results were obtained when system IV was used, however, the system IV is very difficult to control under high cell density culture. Therefore, we recommended system II of glucose limit and oxygen non-limit for the constitutive expression process of *P. pastoris* using glucose as substrate.

Keywords: *Pichia pastoris*, ethanol inhibition, ethanol repression, overflow metabolism, GAP promoter

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) และสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา (สกอ.) ที่สนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัยโครงการนี้ ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ รวมถึงสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการดำเนินการวิจัย และส่งเสริมให้บุคลากรภายในสังกัดได้ทำงานวิจัย และขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีการหมัก หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้เครื่องมือ และสถานที่ในการดำเนินการวิจัยส่วนหนึ่งของโครงการนี้

คณะผู้วิจัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ.....	ก
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพประกอบ.....	ณ
บทสรุปโครงการวิจัยสำหรับผู้บริหาร.....	ท
 บทที่	
1. บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	3
2. การเตรียมสายพันธุ์จุลินทรีย์.....	4
2.1 วัตถุประสงค์.....	4
2.2 วิธีการวิจัย.....	4
2.3 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	4
2.4 สรุปผลการทดลอง.....	6
3. การศึกษาอิทธิพลของเอทานอลต่อการเติบโตและการแสดงออกของเบต้ากลูโคซิเดส โดย <i>P. pastoris</i> ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter	7
3.1 วัตถุประสงค์	7

3.2 วิธีการวิจัย	7
3.3 ผลการทดลองและวิจารณ์	9
3.4 สรุปผลการทดลอง	22
4. การศึกษาผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อการสร้าง by-product ในรูป เอทานอลของ <i>P. pastoris</i> ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์	24
4.1 วัตถุประสงค์	24
4.2 วิธีการวิจัย	24
4.3 ผลการทดลองและวิจารณ์	26
4.4 สรุปผลการทดลอง	43
5. การพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย <i>P. pastoris</i> ภายใต้การ ควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter โดยการควบคุมการเกิด by-product ในรูป เอทานอล	46
5.1 วัตถุประสงค์	46
5.2 วิธีการวิจัย	46
5.3 ผลการทดลองและวิจารณ์	48
5.4 สรุปผลการทดลอง	61
บรรณานุกรม.....	64
ภาคผนวก.....	69

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3-1	ปริมาณเอทานอลที่ต้องเติมเพื่อให้ได้อาหารที่มีความเข้มข้นของเอทานอล ต่างๆ สำหรับศึกษาอิทธิพลของเอทานอล	8
5-1	ระบบควบคุมกระบวนการหมักในระหว่างการผลิตแบบเฟด-แบตช์ เพื่อศึกษาการเกิด by-product ในรูปเอทานอล	48
5-2	ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของเอทานอล และกิจกรรมของ เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส สูงสุดที่ได้จากแต่ละระบบควบคุม	55
5-3	ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์ เบต้ากลูโคซิเดส ที่ได้จากแต่ละระบบควบคุม	55

สารบัญภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
2-1	ความสามารถในการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในแต่ละโคลนที่สามารถเจริญบนอาหารที่มี zeocin	5
3-1	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร BMGluY ที่ไม่มีการเติมเอทานอล (ชุดควบคุม) ในฟลาสก์เขย่า	9
3-2	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร BMGluY ที่มีการเติมเอทานอล 1 กรัมต่อลิตร	10
3-3	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร BMGluY ที่มีการเติมเอทานอล 2 กรัมต่อลิตร	10
3-4	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร BMGluY ที่มีการเติมเอทานอล 3 กรัมต่อลิตร	11
3-5	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร BMGluY ที่มีการเติมเอทานอล 4 กรัมต่อลิตร	11
3-6	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร BMGluY ที่มีการเติมเอทานอล 5 กรัมต่อลิตร	12
3-7	การเติบโตของ <i>P. pastoris</i> ในอาหารที่มีเอทานอลที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 1 2 3 4 และ 5 กรัม/ลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า	13
3-8	อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่ออัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า	13
3-9	อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่ออัตราการเติบโต (Qx) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า	14
3-10	การใช้สับสเทรต (กลูโคส) ของ <i>P. pastoris</i> ในอาหารที่มีเอทานอลที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 1 2 3 4 และ 5 กรัม/ลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า	15

3-11	อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่ออัตราการใช้กลูโคส (Qs) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า	16
3-12	อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่ออัตราการใช้กลูโคส จำเพาะ (q_s) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า	16
3-13	การผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของ <i>P. pastoris</i> ในอาหารที่มีเอทานอลที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 1 2 3 4 และ 5 กรัม/ลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า	17
3-14	อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่ออัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (Qp) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า	18
3-15	อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่ออัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (q_p) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า	18
3-16	การผลิต by-product ในรูปเอทานอลของ <i>P. pastoris</i> ในอาหารที่มีเอทานอลที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 1 2 3 4 และ 5 กรัม/ลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า	20
3-17	อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่อผลได้ของเซลล์จากกลูโคส (Yx/s) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า	21
3-18	อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่อผลได้ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (Yp/s) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า	21
4-1	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	27
4-2	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	27
4-3	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	28

4-4	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคสิดของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	28
4-5	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคสิดของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	29
4-6	การเติบโตของ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 10 20 40 และ 80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	30
4-7	การประมาณค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและระยะเวลาในช่วงการปรับตัวของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	31
4-8	การประมาณค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและระยะเวลาในช่วงการปรับตัวของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	31
4-9	การประมาณค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและระยะเวลาในช่วงการปรับตัวของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	32
4-10	การประมาณค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและระยะเวลาในช่วงการปรับตัวของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	32
4-11	การประมาณค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและระยะเวลาในช่วงการปรับตัวของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	33
4-12	อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	33
4-13	อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อระยะเวลาในช่วงการปรับตัว (t_L) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	34
4-14	อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการเติบโต (Q_x) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	34

4-15	อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อผลได้ของเซลล์จากสับสเตรต (Y _{x/s}) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	35
4-16	อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อการให้สับสเตรตของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	36
4-17	อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการให้สับสเตรตจำเพาะ (q _s) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	37
4-18	อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการให้สับสเตรต (Q _s) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	37
4-19	อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	38
4-20	อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการสร้างผลผลิตจำเพาะ (q _p) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	39
4-21	อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการสร้างผลผลิต (Q _p) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	39
4-22	อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อผลได้ของเบต้ากลูโคซิเดสจากสับสเตรต (Y _{p/s}) ของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	40
4-23	อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิต by-product ในรูปเอทานอลของ <i>P. pastoris</i> เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก	42
5-1	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (ช่วงเวลาที่ 0-19) และกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ (ช่วงเวลาที่ 19-37) เมื่อทำการควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ภายใต้สภาวะจำกัดกลูโคสและออกซิเจน (ระบบควบคุมแบบที่ 1)	51
5-2	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (ช่วงเวลาที่ 0-19) และกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ (ช่วงเวลาที่ 19-39) เมื่อทำการควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ภายใต้สภาวะจำกัดกลูโคส แต่ไม่จำกัดออกซิเจน (DOT > 25 เปอร์เซ็นต์) (ระบบควบคุมแบบที่ 2)	52

5-3	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคสิดเอสของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (ชั่วโมงที่ 0–13) และกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ (ชั่วโมงที่ 13–37) เมื่อทำการควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ภายใต้สภาวะไม่จำกัดกลูโคส (กลูโคส $\approx$ 10 กรัมต่อลิตร) แต่จำกัดออกซิเจน (DOT > 25 เปอร์เซ็นต์) (ระบบควบคุมแบบที่ 3)	53
5-4	รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคสิดเอสของยีสต์ <i>P. pastoris</i> ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (ชั่วโมงที่ 0–13) และกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ (ชั่วโมงที่ 13–37) เมื่อทำการควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ภายใต้สภาวะไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจน (กลูโคส $\approx$ 10 กรัมต่อลิตร และ DOT > 25 เปอร์เซ็นต์) (ระบบควบคุมแบบที่ 4)	54
5-5	อิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการเติบโตของเซลล์ในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ (ชั่วโมงที่ 13 จนถึงสิ้นสุดสำหรับกระบวนการที่ไม่จำกัดกลูโคส และชั่วโมงที่ 19 จนถึงสิ้นสุดสำหรับกระบวนการที่จำกัดกลูโคส) เมื่อสภาวะไม่จำกัดกลูโคสจะควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสประมาณ 10 กรัมต่อลิตร และสภาวะไม่จำกัดออกซิเจนจะควบคุมค่า DOT ให้มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์	56
5-6	อิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคส	57
5-7	อิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการใช้กลูโคส	58
5-8	อิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิดเอส	59
5-9	อิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการสร้าง by-product ในรูปเอทานอล	60

บทสรุปโครงการวิจัยสำหรับผู้บริหาร (Executive summary)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในปัจจุบันมีความต้องการใช้โปรตีนในหลายหน่วยงาน เช่น ใช้ในการศึกษาวิจัย ใช้ในการแพทย์ ใช้ในการเกษตร ใช้ในอุตสาหกรรม และใช้ในงานด้านสิ่งแวดล้อม โดยโปรตีนที่ใช้อาจอยู่ในรูปแบบต่างๆ เช่น เอนไซม์ แอนติเจน (antigen) และแอนติบอดี (antibody) เป็นต้น ทั้งนี้แนวโน้มความต้องการใช้โปรตีนทั้งในแง่ปริมาณและชนิดของโปรตีนมีค่าสูงขึ้น ทำให้นักวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้รับความสนใจมากขึ้น ได้มีการรายงานว่าเมื่อใช้ระบบการแสดงออกของยีนโดยยีสต์ *Pichia pastoris* ร่วมกับกระบวนการเพาะเลี้ยงในถังหมัก ส่งผลให้กระบวนการผลิตมีประสิทธิภาพและรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ได้มีคุณภาพสูง (Macauley-Patrick *et al.*, 2005; Higgins and Cregg, 1998)

ระยะแรกของการใช้ *P. pastoris* สำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เริ่มจากการใช้ *alcohol oxidase 1* promoter (AOX1 promoter) เป็นโปรโมเตอร์สำหรับควบคุมการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีน โดยโปรโมเตอร์นี้สามารถเหนี่ยวนำ (induce) โดยใช้เมทานอลเป็นตัวเหนี่ยวนำ (inducer) (Egli *et al.*, 1980) ถึงแม้ว่าโปรโมเตอร์ดังกล่าวจะมีประสิทธิภาพสูงและมีข้อดีหลายประการในขณะเดียวกันยังแสดงข้อเสียด้วยเช่นกัน ได้แก่ การวัดความเข้มข้นของเมทานอลในระหว่างกระบวนการหมักทำได้ยากทำให้ยากต่อการควบคุมกระบวนการหมัก เมทานอลเป็นสารที่ติดไฟง่ายและมีความเป็นพิษทำให้ต้องระมัดระวังอย่างมากในการทำงานจึงไม่เหมาะสมต่อการทำงานในระดับใหญ่ (large scale) นอกจากนี้ความเป็นพิษของเมทานอลทำให้ระบบการแสดงออกของยีนภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ AOX1 promoter ไม่เหมาะสำหรับการผลิตโปรตีนเพื่อใช้ในอาหาร จากข้อเสียต่างๆ เหล่านี้ทำให้มีการพัฒนา *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* promoter (GAP promoter) ขึ้นมาเพื่อใช้เป็นโปรโมเตอร์ทางเลือกสำหรับควบคุมการแสดงออกของยีนแบบต่อเนื่องตลอดเวลา (constitutive expression) (Waterham *et al.*, 1997)

มีการรายงานถึงการแสดงออกของโปรตีน *exo-levanase* (LsdB) โดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter ว่ามีระดับการแสดงออกใกล้เคียงกับการใช้ AOX1 promoter ทั้งนี้ข้อดีอย่างหนึ่งของ GAP promoter คือ ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสั้นกว่าถึง 3 เท่า (Mennendez *et al.*, 2004) โดย GAP promoter จะมีการแสดงออกสูงที่สุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นสับสเตรทในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* (Waterham *et al.*, 1997) โดยกลูโคสเป็นน้ำตาลที่ยีสต์สามารถใช้ในกระบวนการหมัก และสามารถทำให้เกิด Crabtree effect ในยีสต์ที่เป็น Crabtree-positive yeast เช่น

Saccharomyces cerevisiae ผลของการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศยังสามารถทำให้เกิดการหมัก (Fermentative metabolism) เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของกลูโคสสูง (100-200 มก./ล.) (Verduyn *et al.*, 1984; Woehrer and Roehr, 1981) เอทานอลที่เกิดขึ้นจัดเป็นผลิตภัณฑ์รอง (By-product) ที่ไม่ต้องการเนื่องจากมีผลในการยับยั้งการเติบโตและทำให้ผลผลิตหลักของเซลล์ที่ได้จากสับสเตรลดลง (Kalina, 1993) สำหรับ Crabtree-negative yeast เป็นยีสต์ที่มีการใช้กลูโคสผ่านเมตาบอลิซึมการหมักน้อย หรือสามารถใช้กลูโคสเพื่อการสร้างเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะที่มีอากาศ โดยมีรายงานว่ายีสต์ในจีนัส (genus) *Pichia* บางสายพันธุ์ เช่น *Pichia stipitis* ก็จัดเป็น Crabtree-negative yeast (Weusthuis *et al.*, 1994) ดังนั้น *P. pastoris* ซึ่งจัดอยู่ในจีนัสเดียวกันก็อาจจัดเป็น Crabtree-negative yeast ด้วย ซึ่งยังไม่พบรายงานการศึกษาแต่อย่างใด

ความแตกต่างที่สำคัญระหว่าง Crabtree-positive Yeast และ Crabtree-negative Yeast คือ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศการเปลี่ยนแปลงจากสภาวะจำกัดกลูโคสเป็นสภาวะที่มีกลูโคสเกินพอ Crabtree-positive Yeast จะมีการแสดงออกของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซีเลส (pyruvate decarboxylase) เพิ่มขึ้นอย่างเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของกลูโคส ในขณะที่ระดับของการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าว ใน Crabtree negative Yeast จะไม่เปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของกลูโคส (van Urk, *et al.*, 1990)

ในการศึกษาเชิงเมตาบอลิซึมมีรายงานว่า *P. pastoris* สามารถสร้าง by-product ในรูปเอทานอลเมื่อเจริญในอาหารที่ใช้กลีเซอรอล (glycerol) (Inan and Meagher, 2001) เป็นสับสเตรต ถึงแม้ว่ากลีเซอรอลจะจัดเป็น non-fermentable sugar ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงว่าอาจจะเกิดการสร้างเอทานอลเมื่อเพาะเลี้ยง *P. pastoris* โดยใช้กลูโคสซึ่งมีคุณสมบัติเป็น fermentable sugar เป็นสับสเตรต โดยเอทานอลที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิเตท (acetate) ซึ่งทั้งเอทานอลและอะซิเตทมีคุณสมบัติที่ทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ AOX1 promoter ได้ (Inan and Meagher, 2001)

มีการให้คำจำกัดความของการตอบสนองต่อกลูโคสที่ความเข้มข้นสูงของยีสต์ภายใต้สภาวะที่มีอากาศโดยการสร้างเอทานอลทันทีหลังจากที่ความเข้มข้นของกลูโคสเปลี่ยนแปลงว่า short-term glucose effect หรือ short-term Crabtree effect (Petrik, *et al.*, 1983) หรือ overflow metabolism (Enfors and Haggstrom, 2000) ซึ่งต่างจาก Crabtree effect โดยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับ catabolite repression โดยในงานวิจัยนี้จะใช้คำว่า overflow metabolism เป็นหลัก ตามปกติ by-product จะเกิดขึ้นเนื่องจากเกิดปรากฏการณ์ overflow metabolism ส่งผลให้ผลผลิตเซลล์ (biomass yield) ที่ได้จากสับสเตรลดลง เนื่องจากสับสเตรทส่วนหนึ่งถูกใช้ไปในการสร้าง by-product และยัง

ส่งผลให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ รวมถึงการผลิตรีคอมบิแนนท์ β -1,4-galactosyltransferase โดย *S. cerevisiae* (Zigova et al., 1999) และพบ overflow metabolism ที่เกิดการสังเคราะห์เอทานอลและอะซิเตทในยีสต์กลุ่ม methylotrophic คือ *Hansenula polymorpha* เมื่อใช้กลูโคสเป็นสับสเตรท (Jeude et al., 2006) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการรายงานถึงอิทธิพลของเอทานอลต่อกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกโดย GAP promoter รวมถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดสร้างเอทานอลของ *P. pastoris* โดยวิธี overflow metabolism ดังนั้น งานวิจัยที่จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาวิจัยผลของเอทานอลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกโดย GAP promoter รวมถึงศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด overflow metabolism ของ *P. pastoris* เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการออกแบบกระบวนการผลิตผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ (fed-batch culture) โดยใช้เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเป็นโปรตีนต้นแบบ

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อศึกษาอิทธิพลของเอทานอลต่อการเติบโตและการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีน (เบต้ากลูโคซิเดส) โดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter

2.2 เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้าง by-product ในรูปเอทานอลของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรท โดยมุ่งเน้นที่อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเป็นหลัก

2.3 เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (เบต้ากลูโคซิเดส) โดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter โดยการควบคุมการเกิด overflow metabolism ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์

2.4 เพื่อส่งเสริมให้อาจารย์/นักวิจัยได้พัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัย เพื่อก้าวไปสู่การทำงานวิจัยในระดับสูงขึ้น

2.5 เพื่อผลิตอาจารย์/นักวิจัยที่มีเชี่ยวชาญในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากยีสต์ *P. pastoris* เพื่อสร้างความแข็งแกร่งให้กับระบบการวิจัยด้านการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของประเทศ

3. ผลการวิจัยโดยสรุป

3.1 การเตรียมสายพันธุ์จุลินทรีย์

ในขั้นตอนการเตรียมสายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับใช้ในงานวิจัยนี้ ได้สายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงสุด 1 โคลน จากทั้งหมด 33 โคลน ซึ่งให้ค่า OD_{400}/OD_{600} (ค่าที่ใช้ในการแสดงถึงปริมาณเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่สร้างขึ้นจากเซลล์ปริมาณ 1 หน่วย OD_{600}) สูงกว่าตัวควบคุมประมาณ 20 เท่า

3.2 การศึกษาอิทธิพลของเอทานอลต่อการเติบโตและการแสดงออกของเบต้ากลูโคซิเดสโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter

งานวิจัยในส่วนนี้เป็นการศึกษาอิทธิพลของเอทานอลต่อการเติบโตและการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นของเอทานอล 0 (ชุดควบคุม) 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร

พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สูงขึ้นส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้อลดลง รวมทั้งส่งผลให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และค่าอัตราการเติบโต (Q_x) มีแนวโน้มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Bai *et al.*, (2008) ที่พบว่าเอทานอลมีผลยับยั้งการเติบโตในยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้งนี้ ความต้านทานต่อเอทานอลเป็นลักษณะเฉพาะสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ซึ่งความเข้มข้นของเอทานอลสูงที่สุดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ 5 กรัมต่อลิตร โดยมีผลทำให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ และอัตราการเติบโตลดลงถึง 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งความเข้มข้นของเอทานอลในระดับเดียวกันไม่มีผลต่อการเติบโตของ *S. cerevisiae*

นอกจากนี้ เอทานอลยังมีผลทำให้อัตราการใช้กลูโคสลดลง โดยในระบบที่มีการเติมเอทานอลลงไป ในอาหารที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้อัตราการใช้ซับสเตรต (Q_s) และอัตราการใช้ซับสเตรตจำเพาะ (q_s) ลดลง ประมาณ 50 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่าเอทานอลมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีไกลโคไลซิสของยีสต์ เช่น hexokinase และ alcoholdehydrogenase (ADH) รวมถึงยังส่งผลต่อการใช้สารอาหาร และ membrane potential ATPase (Casey and Ingledew, 1986; Larue *et al.*, 1984) ดังนั้น ในการทดลองนี้การที่อัตราการเติบโตของ *P. pastoris* มีค่าน้อยลงเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้น น่าจะเป็นผลมาจากอัตราการใช้ซับสเตรตที่น้อยลงมากกว่าการที่เอทานอลจะส่งผลโดยตรงต่อการเติบโตของ *P. pastoris*

เมื่อทำการพิจารณาอิทธิพลของเอทานอลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส พบว่าเมื่อมีการเติมเอทานอลลงไปในการทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ได้มีค่าลดลง และพบว่าอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (Q_p) มีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจำเพาะ (q_p) พบว่าจะมีค่าลดลงเล็กน้อย ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกับอัตราการเติบโตจำเพาะ ในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าผลผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ยีสต์ *P. pastoris* ผลิตขึ้นในระบบนี้เป็นผลผลิตที่เกิดควบคู่กับการสร้างพลังงาน (coupled with energy metabolism) ซึ่งเมื่อเซลล์มีการสร้างพลังงานเพื่อใช้ในการเติบโตหรือบำรุงรักษาเซลล์ (maintenance) จะมีการสร้างผลผลิตเกิดขึ้นด้วย โดยจะแตกต่างจากรูปแบบการสร้างผลผลิตพร้อมกับการเติบโต (growth associated product) คือ จะยังคงมีการการสร้างผลผลิตถึงแม้ว่าเซลล์จะไม่ได้มีการเติบโตแล้วก็ตาม เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตจะมีการสร้างพลังงานตลอดเวลาถึงแม้ว่าเซลล์จะหยุดการเติบโตแล้วก็ตาม ซึ่งพลังงานที่สร้างขึ้นจะใช้เพื่อการบำรุงรักษาเซลล์ (Doran, 2003 หน้า 284; Groot et al., 1992)

เมื่อทำการประมาณค่าผลได้ของเซลล์จากกลูโคส ($Y_{x/s}$) และผลได้ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากกลูโคส ($Y_{p/s}$) พบว่าแนวโน้มของค่าทั้งสองมีค่าสูงขึ้นตามความเข้มข้นของเอทานอล ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีการใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับกลูโคส และเมื่อทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอทานอลในระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลมีค่าสูงขึ้นแสดงว่ามีการผลิตเอทานอลเกิดขึ้น โดยความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจากความเข้มข้นเริ่มต้นจนถึงความเข้มข้นสูงสุด พบว่าในทุกการทดลองจะมีการเพิ่มขึ้นในปริมาณที่ใกล้เคียงกันประมาณ 3 กรัมต่อลิตร ซึ่งช่วงเวลาที่เอทานอลมีความเข้มข้นสูงสุดเป็นช่วงเวลาที่กลูโคสถูกใช้จนหมด หลังจากนั้นพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลจะลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากยีสต์ *P. pastoris* มีการใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป ซึ่ง Inan และ Meaher, (2001) ได้รายงานไว้ว่า *P. pastoris* สามารถใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้

ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่าเอทานอลส่งผลให้อัตราการใช้สับสเตรต และอัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะลดลง ส่งผลให้อัตราการการเติบโตจำเพาะ, อัตราการเติบโต และการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ถูกควบคุมการแสดงออกโดย GAP promoter ลดลง

3.3 การศึกษาผลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อการสร้าง by-product ในรูปเอทานอลของ *P. pastoris* ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

ถึงแม้ว่ากระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์จะเป็นกระบวนการหลักที่ใช้ในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนแบบต่อเนื่องตลอดเวลาภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ GAP โดย

P. pastoris อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องเริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการแบบแบตช์เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ก่อนที่จะดำเนินการแบบเฟด-แบตช์ โดยในระบบการเพาะเลี้ยง Crabtree-positive yeast ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (De Deken, 1966; Petrik *et al.*, 1983) หรืออัตราการเติบโตจำเพาะสูง (Van Hoek *et al.*, 1998) จะนำไปสู่วิธีการหมักเอทานอลถึงแม้ว่าออกซิเจนจะไม่จำกัดก็ตาม ทั้งนี้ การเกิดเอทานอลในระหว่างกระบวนการเพิ่มเซลล์ยีสต์เป็นสิ่งที่ไม่ต้องการเนื่องจากจะทำให้ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตลดลง ทำให้การผลิตยีสต์ขมบ่งในระดับอุตสาหกรรมนิยมควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสให้อยู่ในระดับที่ต่ำ ภายใต้สภาวะที่ไม่จำกัดออกซิเจน (Reed and Nagodawithana, 1991) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อสรา้ง by-product โดย *P. pastoris* ดังนั้น การทดลองในส่วนนี้ จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *P. pastoris* ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ในการการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่อไป

จากการทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเติบโตและการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้นจะทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยาวนานขึ้น โดยค่าอัตราการเติบโตจำเพาะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น จนถึงค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นของกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสต่อไปอีกจะส่งผลให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะลดลงอย่างช้าๆ

เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อระยะเวลาในช่วงการปรับตัว พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในช่วงปรับตัวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการที่เชื้อต้องมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีค่าแรงดันออสโมติกที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Nishino *et al.*, (1985) ที่ศึกษาเกี่ยวกับผลของความดันออสโมติกต่ออัตราการเติบโตและกิจกรรมการหมักของไวน์ยีสต์ ซึ่งพบว่าความดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในช่วงปรับตัวสูงขึ้น และความทนต่อเอทานอลสูงขึ้น

เมื่อทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลในแต่ละการทดลอง พบว่าสามารถตรวจพบเอทานอลได้ในการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 40 และ 80 กรัมต่อลิตร ในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และไม่สามารถตรวจพบเอทานอลในการทดลองที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร โดยเมื่อพิจารณาถึงค่า DOT พบว่าทุกการทดลองให้ค่า DOT สูงกว่า 30 เปอร์เซนต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่เกิดสภาวะจำกัดออกซิเจน ดังนั้น การเกิดเอทานอลขึ้น

ในการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 40 และ 80 กรัมต่อลิตร น่าจะเนื่องมาจากการเกิด overflow metabolism ซึ่งสอดคล้องกับคำจำกัดความของการตอบสนองต่อกลูโคสที่ความเข้มข้นสูงของยีสต์ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศโดยการสร้างเอทานอลทันทีหลังจากที่ความเข้มข้นของกลูโคสเปลี่ยนแปลงว่า overflow metabolism นั้นเอง (Enfors and Haggstrom, 2000)

สำหรับอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเตรต พบว่าค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเตรตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นจนถึงค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นของกลูโคส 20-40 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสต่อไปอีกจะส่งผลให้ค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเตรต ลดลงอย่างช้าๆ ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากกลูโคสที่ความเข้มข้นสูงทำให้เกิดการกดดันวิถีการหายใจ หรืออัตราการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์มากกว่าความจุของวิถีการหายใจของยีสต์ ดังนั้น กลูโคสบางส่วนจึงถูกใช้ในวิถีการหมัก ทั้งนี้สอดคล้องกับรายงานที่ว่าภายใต้สภาวะที่สารประกอบคาร์บอนมีปริมาณมาก โพรเวททั้งหมดจะไม่สามารถเปลี่ยนเป็นอะซิติกแอซิดได้ทัน เนื่องจาก NAD^+ จำกัด ทำให้โพรเวทส่วนหนึ่งถูกใช้ในการย้อนสังเคราะห์ (regeneration) NAD^+ กลับมาใช้ในเมตาบอลิซึม จึงทำให้เกิดผลิตภัณฑ์รอง ได้แก่ เอทานอล อะซิติกแอซิด และกรดอะซิติก โดยปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้เป็นส่วนหนึ่งของการเกิด overflow metabolism (Pham *et al.*, 1998) หรือ short-term glucose effect หรือ short-term Crabtree effect (Fiechter และ Seghezzi, 1992; Petric, *et al.*, 1983; De Deken, 1966) ซึ่งมักจะเกี่ยวข้องร่วมกันกับปริมาณออกซิเจนและความเข้มข้นของกลูโคสสับสเตรต อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของกลูโคสในช่วงที่ทำการศึกษา (5-80 กรัมต่อลิตร) พบว่าค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเตรตมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในช่วง 0.50-0.67 กรัม_{เซลล์}/กรัม_{สับสเตรต} ซึ่งอาจเนื่องมาจากกลูโคสเกือบทั้งหมดถูกใช้ผ่านวิถีการหายใจอย่างสมบูรณ์ เมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อค่าผลได้ของเบต้ากลูโคสิดีสจากสับสเตรต พบว่าค่าผลได้ของเบต้ากลูโคสิดีสจากสับสเตรตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น

เมื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการใช้กลูโคสและอัตราการใช้กลูโคส พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้นจะทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยาวนานขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของกลูโคสสูง (100-200 มก./ล.) (Verduyn *et al.*, 1984; Woehrer and Roehr, 1981) มีผลยับยั้งการเติบโต และทำให้ผลผลิตหลักของเซลล์ที่ได้จากสับสเตรตลดลง (Kalina, 1993) ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับรูปแบบอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะ ทั้งนี้ พบว่าค่าอัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นจนถึง

ค่าสูงสุด หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสต่อไปอีกจะส่งผลให้ค่าอัตราการใช้สับสเทรตจำเพาะลดลงอย่างช้าๆ ซึ่งคล้ายกับความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเติบโตจำเพาะกับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น ซึ่งที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการใช้สับสเทรตจำเพาะมากกว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ แต่ต่างจากความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้สับสเทรต (Qs) กับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น โดยพบว่าค่าอัตราการใช้สับสเทรตจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสในรูปความสัมพันธ์แบบเส้นตรง ซึ่งที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการใช้สับสเทรตจำเพาะมากกว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน่าจะเป็นไปตามจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ของ Michaelis-Menten

ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นสูงชันจะส่งผลให้อัตราการเติบโตและอัตราการสร้างเบต้ากลูโคสิดีสสูงชัน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นกลูโคสต่อไปอีก จะส่งผลให้อัตราการเติบโตจำเพาะ และผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตลดลง ซึ่งความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุด คือ 20 กรัมต่อลิตร เนื่องจากมีระยะเวลาปรับตัวที่สูง และอัตราการเติบโตสูง อีกทั้งตลอดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงไม่สามารถตรวจพบเอทานอล

3.4 การพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter โดยการควบคุมการเกิด by-product ในรูปเอทานอล

จากผลการทดลองในการทดลองก่อนหน้า (บทที่ 3 และบทที่ 4) รวมถึงเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้องแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสับสเทรต (กลูโคส) เป็นปัญหาหลักที่ทำให้เกิดการสร้าง by-product ในรูปเอทานอลสำหรับกระบวนการผลิตยีสต์ขนมปัง แต่ไม่ใช่ปัญหาของระบบการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* อย่างไรก็ตาม ในระบบการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* นิยมใช้ระบบการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีความหนาแน่นของเซลล์สูง ปัญหาหลักที่พบในระบบนี้จึงเป็นปัญหาการจำกัดออกซิเจน ซึ่งค่าออกซิเจนละลายเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเกิด by-product ในรูปเอทานอลในยีสต์ ทั้งนี้ ในระบบการเพาะเลี้ยงที่มีการให้อากาศออกซิเจนถือเป็นสับสเทรตชนิดหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการผลิตมวลชีวภาพ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงสับสเทรตชนิดอื่น เช่น กลูโคส และแอมโมเนีย ตามปกติจะมีความเข้มข้นสูงและมีปัญหาเรื่องการถ่ายเทมวลสารน้อยมาก ในทางตรงข้ามออกซิเจนที่ละลายในน้ำบริสุทธิ์ที่ 25 องศาเซลเซียส มีค่าน้อยมาก (0.244 มิลลิโมลต่อลิตร) รวมถึงการให้และการถ่ายเทออกซิเจนยังเป็นปัจจัยจำกัดสำหรับถังหมักอีกด้วย (Zhang *et al.*, 2005)

กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์สามารถใช้ในการแก้ปัญหาสับสเตรตความเข้มข้นสูง และ / หรือ สภาวะจำกัดออกซิเจน ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิด by-product ในรูปเอทานอล โดยการควบคุมอัตราการเติมสับสเตรตให้ความเข้มข้นของสับสเตรตอยู่ในระดับที่เหมาะสม ซึ่งเป้าหมายหลัก คือ ทำให้ได้อัตราการเจริญเติบโตและผลได้ของเซลล์ที่สูงที่สุด ระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์โดยทั่วไป เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงที่อัตราการเติบโตจำเพาะสูงที่สุดที่จะไม่ทำให้เกิด respiro-fermentative หลังจากนั้น จึงลดค่าอัตราการเติบโตจำเพาะลงเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการถ่ายเทออกซิเจนจำกัด และ/หรือ ความสามารถในการถ่ายเทความร้อนของระบบ (Kristiansen, 1994; Trivedi *et al.*, 1986) ตามปกติ การเติมสารอาหารในกระบวนการแบบเฟด-แบตช์จะเริ่มโดยใช้อัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ตามด้วยอัตราการเติมคงที่ และลดอัตราการเติมลงในที่สุด (Enfors *et al.*, 1990) ซึ่งแนวทางในการดำเนินการเพาะเลี้ยงที่กล่าวมาแล้วนั้นต่างมีวัตถุประสงค์เพื่อให้กระบวนการเพาะเลี้ยงเป็นกระบวนการที่ใช้สับสเตรตผ่านวิธีการหายใจอย่างสมบูรณ์ (Postma *et al.*, 1989; Von Meyenburg, 1969; Weusthuis *et al.*, 1994) ซึ่งไม่สามารถดำเนินการได้ในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ เนื่องจากต้องใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นสูงเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สุดท้ายตามที่ต้องการ ดังนั้น จึงทำให้เกิดการหมักเอทานอล ถึงแม้ว่าจะทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่จำกัดออกซิเจนก็ตาม (De Deken, 1966; Petrik *et al.*, 1983; Von Meyenburg, 1969) ดังนั้น ในงานวิจัยส่วนนี้ นี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาอิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจน โดยออกแบบการเพาะเลี้ยงเป็น 4 ระบบควบคุม (ตารางที่ 1) เพื่อหาว่าระบบควบคุมแบบใดมีความเหมาะสมต่อการควบคุมการเกิด by-product ในรูปเอทานอลระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ในกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter

รายละเอียดของแต่ละระบบควบคุมในการควบคุมความเข้มข้นของสับสเตรต (กลูโคส) และปริมาณออกซิเจนละลาย ในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์

- การควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสให้อยู่ในสภาวะจำกัด ทำได้โดยเริ่มเติมอาหาร GluBS ที่มีกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร แบบเอ็กโพเนนเชียล ($\mu_{set} = 0.2$ ต่อชั่วโมง) ทันทีเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (กลูโคสในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ถูกใช้จนหมด)

- การควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสให้อยู่ในสภาวะไม่จำกัด ทำได้โดยเติมอาหาร GluBS ที่มีกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร แบบเอ็กโพเนนเชียล ($\mu_{set} = 0.2$ ต่อชั่วโมง) โดยเริ่มการเติมอาหารเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์เหลือประมาณ 10 กรัมต่อลิตร

- การควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายให้อยู่ในสภาวะจำกัด (DOT = 0.1-0.3%) สามารถดำเนินการโดยใช้สภาวะควบคุมเช่นเดียวกับการหมักแบบแบตช์ โดยไม่มีการผสมก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ในอากาศเติมในถังหมัก
- การควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายไม่จำกัด ให้ดำเนินการโดยควบคุมค่า DOT ให้สูงกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ มีการผสมก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ในอากาศใช้เติมลงไปในถังหมัก

ตารางที่ 1 ระบบควบคุมในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ เพื่อศึกษาการเกิด by-product ในรูปเอทานอล

ระบบควบคุมแบบที่	สับสเทรต (กลูโคส)	ออกซิเจน
1	จำกัด	จำกัด (DOT $\approx$ 0%)
2	จำกัด	ไม่จำกัด (DOT > 25%)
3	ไม่จำกัด ([กลูโคส] $\approx$ 10 กรัมต่อลิตร)	จำกัด (DOT $\approx$ 0%)
4	ไม่จำกัด ([กลูโคส] $\approx$ 10 กรัมต่อลิตร)	ไม่จำกัด (DOT > 25%)

จากการทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการเติบโตและการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter โดยทำการควบคุมแบบที่ 1 จำกัดกลูโคส, จำกัดออกซิเจน พบว่าการเติบโต การผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดส สูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง การใช้กลูโคสและ DOT ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น สำหรับเอทานอลตรวจพบในปริมาณที่มาก คือ มีค่าประมาณ 13.45 กรัมต่อลิตร

การควบคุมแบบที่ 2 จำกัดกลูโคส, ไม่จำกัดออกซิเจน พบว่าการเติบโต การผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดส สูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง การใช้กลูโคสและ DOT ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น สำหรับเอทานอลตรวจพบในปริมาณที่น้อย คือ มีค่าประมาณ 0.484 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ ความเข้มข้นของเอทานอลที่ตรวจพบมีค่าน้อยมากและไม่ทำให้เกิดผลเสียต่อกระบวนการ

การควบคุมแบบที่ 3 ไม่จำกัดกลูโคส, จำกัดออกซิเจน พบว่าการเติบโต การผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดส สูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง การใช้กลูโคสและ DOT ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น สำหรับเอทานอลตรวจพบในปริมาณที่มาก คือ มีค่าประมาณ 13.97 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ ความเข้มข้นของเอทานอลที่ตรวจพบมีค่ามากและทำให้เกิดผลเสียต่อกระบวนการ

การควบคุมแบบที่ 4 ไม่จำกัดกลูโคส, ไม่จำกัดออกซิเจน พบว่าการเติบโต การผลิตรีคอม-
บิแนนท์เบต้ากลูโคสิดีส สูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง การใช้กลูโคสและ DOT ลดลง
ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น สำหรับเอทานอลตรวจพบในปริมาณที่น้อย คือ มีค่าประมาณ 0.591 กรัม
ต่อลิตร

จากการศึกษาอิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการเติบโต
และอัตราการเติบโตของเซลล์ พบว่าความหนาแน่นของเซลล์จะสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการ
เพาะเลี้ยง โดยปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ คือ ออกซิเจน ซึ่งการ
ควบคุมกระบวนการเพาะเลี้ยงในช่วงเฟด-แบตช์ ในสภาวะไม่จำกัดออกซิเจน จะให้ความ
หนาแน่นของเซลล์สูงกว่าในสภาวะจำกัดออกซิเจน ไม่ว่าความเข้มข้นของกลูโคสจะจำกัดหรือไม่ก็
ตาม ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาถึงการสร้าง by-product ในรูปเอทานอล พบว่ามีการสร้างเอทานอล
ปริมาณมากในสภาวะที่จำกัดออกซิเจน ส่งผลให้ความหนาแน่นของเซลล์ที่ได้ลดลง เนื่องจาก
กลูโคสบางส่วนถูกใช้ในการสร้างเอทานอล ผลที่ตามมา คือ ทำให้ผลได้ของเซลล์ และสารชีว
โมเลกุล ได้แก่ รีคอมบิแนนท์โปรตีนรวมถึงปริมาณพลังงานที่ได้ลดลง นอกจากนี้เอทานอลยังมีผล
ยับยั้งกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงอัตราการเติบโตจำเพาะพบว่าสภาวะจำกัด
ออกซิเจนทำให้อัตราการเติบโตจำเพาะลดลง 35 เปอร์เซ็นต์ และ 63 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่ไม่จำกัด
และไม่จำกัดกลูโคส ตามลำดับ โดยผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zigova และคณะ (1999)
และ Kalina (1993)

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการ
เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคสและการใช้กลูโคส พบว่าในระบบที่ 2 และ 4 (ออกซิเจนไม่
จำกัด) จะสามารถรักษาระดับความเข้มข้นกลูโคสได้ตามสภาวะควบคุมที่ดำเนินการได้เป็นอย่างดี
อย่างไรก็ตาม สำหรับระบบที่ 1 และ 3 (ออกซิเจนจำกัด) ความเข้มข้นของกลูโคสจะสูงกว่าใน
สภาวะที่ไม่จำกัดออกซิเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถใช้กลูโคสในสภาวะจำกัดออกซิเจนได้ช้า
กว่าสภาวะไม่จำกัดออกซิเจน จนส่งผลให้เกิดการสะสมกลูโคสมากขึ้น

เมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการผลิต
เอนไซม์เบต้ากลูโคสิดีส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิดีสจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้
และจะเพิ่มสูงขึ้นในระยะที่มีการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ โดยในระบบควบคุมที่มีการจำกัด
ออกซิเจน (ระบบที่ 1 และ 3) จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิดีสต่ำมาก เมื่อเทียบกับ
ผลที่ได้จากระบบควบคุมที่ไม่จำกัดออกซิเจน (ระบบที่ 2 และ 4) แสดงให้เห็นว่าสภาวะจำกัด
ออกซิเจนส่งผลให้การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออก

ของ GAP promoter ลดลง โดยพบว่าภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจนจะให้กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงสุดลดลง 80 เปอร์เซ็นต์ และ 84 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่จำกัด และไม่จำกัดกลูโคส ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ที่หาได้จากระบบควบคุมแบบที่ 1 2 3 และ 4 มีค่าประมาณ 2.885 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง, 20.248 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง, 2.885 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 19.379 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งในระบบที่จำกัดออกซิเจน (ระบบที่ 1 และ 3) จะมีค่าต่ำกว่าระบบที่ไม่จำกัดออกซิเจน (ระบบที่ 2 และ 4) ประมาณ 7 เท่า

เมื่อทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล การควบคุมแบบที่ 1 จำกัดกลูโคส, จำกัดออกซิเจนและการควบคุมแบบที่ 3 ไม่จำกัดกลูโคส, จำกัดออกซิเจน พบว่าสภาวะจำกัดออกซิเจนส่งเสริมการผลิตเอทานอล โดยความเข้มข้นของเอทานอลที่วัดได้มีค่าประมาณ 13.45 และ 13.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงค่า DOT พบว่ามีค่าประมาณ 0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงว่าเกิดสภาวะจำกัดออกซิเจน ดังนั้นเอทานอลที่เกิดขึ้นจึงเกิดผ่านวิธีการหมัก ส่วนการควบคุมแบบที่ 2 จำกัดกลูโคส, ไม่จำกัดออกซิเจนและการควบคุมแบบที่ 4 ไม่จำกัดกลูโคส, ไม่จำกัดออกซิเจน เมื่อทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลน้อยมาก โดยมีค่าประมาณ 0.591 และ 0.484 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในสภาวะไม่จำกัดออกซิเจนยีสต์ *P. pastoris* จะมีการใช้กลูโคสผ่านวิธีการหายใจเป็นหลัก (Enfors and Haggstrom, 2000)

ดังนั้น สามารถสรุปได้ว่าสภาวะจำกัดออกซิเจนเป็นสาเหตุหลักในการเกิด by-product ในรูปเอทานอลของระบบการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* โดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรต ซึ่งการออกแบบกระบวนการควบคุมการเกิด overflow metabolism สามารถลดการเกิด by-product ในรูปของเอทานอล และสามารถเพิ่มการเติบโต การผลิต ผลได้ของเซลล์ รวมถึงผลได้ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งพบว่าระบบที่เหมาะสมที่สุด คือ ระบบที่ 4 ไม่จำกัดกลูโคส, ไม่จำกัดออกซิเจน อย่างไรก็ตามระบบที่ 4 ไม่จำกัดกลูโคส, ไม่จำกัดออกซิเจน จะควบคุมได้ยากภายใต้สภาวะที่ความหนาแน่นของเซลล์สูง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงแนะนำระบบที่ 2 คือ กลูโคสจำกัดและออกซิเจนไม่จำกัด สำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *P. pastoris* ที่ใช้โปรโมเตอร์ GAP เป็นตัวควบคุมแบบต่อเนื่องตลอดเวลา

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ในปัจจุบันมีความต้องการใช้โปรตีนในหลายหน่วยงาน เช่น ใช้ในการวิจัย การแพทย์ การเกษตร อุตสาหกรรม และงานด้านสิ่งแวดล้อม โดยโปรตีนที่ใช้อาจอยู่ในรูปแบบต่างๆ เช่น เอนไซม์ แอนติเจน และแอนติบอดี เป็นต้น ทั้งนี้แนวโน้มความต้องการใช้โปรตีนทั้งในแง่ปริมาณ และชนิดของโปรตีนมีค่าสูงขึ้น ทำให้งานวิจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนได้รับความสนใจมากขึ้นตามไปด้วย โดยมีการรายงานว่ามีแนวโน้มการใช้ระบบการแสดงออกของยีนโดยยีสต์ *P. pastoris* ร่วมกับกระบวนการเพาะเลี้ยงในถังหมัก ส่งผลให้กระบวนการผลิตมีประสิทธิภาพและรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ผลิตได้มีคุณภาพสูง (Macauuley-Patrick *et al.*, 2005; Higgins and Cregg, 1998)

ระยะแรกของการใช้ *P. pastoris* สำหรับการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน เริ่มจากการใช้ *alcohol oxidase 1* promoter (AOX1 promoter) เป็นโปรโมเตอร์สำหรับควบคุมการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีน โดยโปรโมเตอร์นี้สามารถเหนี่ยวนำด้วยเมทานอล (Egli *et al.*, 1980) อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่าโปรโมเตอร์นี้จะมีประสิทธิภาพสูงและข้อดีหลายประการ ในขณะเดียวกันก็มีข้อเสียด้วยเช่นกัน ได้แก่ การวัดความเข้มข้นของ เมทานอลในระหว่างกระบวนการหมักทำได้ยาก ทำให้ยากต่อการควบคุมกระบวนการหมัก เมทานอลเป็นสารที่ติดไฟง่ายและมีความเป็นพิษสูง จึงไม่เหมาะต่อการทำงานในระดับใหญ่ (large scale) นอกจากนี้ ความเป็นพิษของเมทานอลทำให้ระบบการแสดงออกของยีนภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ AOX1 promoter ไม่เหมาะสำหรับการผลิตโปรตีนเพื่อใช้ในอาหาร จากข้อเสียเหล่านี้ทำให้มีการพัฒนา *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase* promoter (GAP promoter) ขึ้นมาเพื่อใช้เป็นโปรโมเตอร์สำหรับควบคุมการแสดงออกของยีนแบบต่อเนื่องตลอดเวลา (constitutive expression) (Waterham *et al.*, 1997)

มีการรายงานว่าการแสดงออกของโปรตีน *exo-levanase* (LasdB) โดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมของ GAP promoter มีระดับการแสดงออกใกล้เคียงกับการใช้ AOX1 promoter ข้อดีอย่างหนึ่งของ GAP promoter คือ ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นกว่าถึง 3 เท่า (Mennendez *et al.*, 2004) โดย GAP promoter จะมีการแสดงออกสูงที่สุดเมื่อใช้กลูโคสเป็นสับสเตรตในการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* (Waterham *et al.*, 1997) อย่างไรก็ตาม กลูโคสเป็น

น้ำตาลที่ยีสต์สามารถใช้ในกระบวนการหมัก และสามารถทำให้เกิด Crabtree effect ในยีสต์ที่เป็น Crabtree positive yeast เช่น *Saccharomyces cerevisiae* ผลของการเพาะเลี้ยงยีสต์ในกลุ่มดังกล่าวภายใต้สภาวะที่มีอากาศยังสามารถทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่น เช่น เอทานอล เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของกลูโคสสูง (100-200 มก./ล.) (Verduyn *et al.*, 1984; Woehrer and Roehr, 1981) เอทานอลที่เกิดขึ้นจัดเป็น by-product ที่ไม่ต้องการเนื่องจากมีผลยับยั้งการเติบโตและทำให้ผลผลิตหลักของเซลล์ที่ได้จากสับสเตรตลดลง (Kalina, 1993) สำหรับ Crabtree negative yeast เป็นยีสต์ที่ใช้กลูโคสเพื่อสร้าง by-product หรือสามารถใช้กลูโคสเพื่อการสร้างเซลล์ได้อย่างมีประสิทธิภาพภายใต้สภาวะที่มีอากาศ โดยมีรายงานว่ายีสต์จีนัส (genus) *Pichia stipitis* ก็จัดเป็น Crabtree-negative yeast (Weusthuis *et al.*, 1994) ดังนั้น *P. pastoris* ซึ่งอยู่ในจีนัสเดียวกัน ก็อาจจัดเป็น Crabtree-negative yeast ซึ่งยังไม่พบรายงานการศึกษาแต่อย่างใด

ความแตกต่างที่สำคัญระหว่าง Crabtree positive yeast และ Crabtree-negative yeast คือ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศการเปลี่ยนแปลงสภาวะจากการจำกัดกลูโคสเป็นสภาวะที่มีกลูโคสเกินพอ Crabtree positive yeast จะมีการแสดงออกของเอนไซม์ไพรูเวตดีคาร์บอกซีเลส (pyruvate decarboxylase) เพิ่มขึ้นอย่างเป็นสัดส่วนกับความเข้มข้นของกลูโคส ในขณะที่ระดับของการแสดงออกของเอนไซม์ดังกล่าว ใน Crabtree-negative yeast จะไม่เปลี่ยนแปลงตามความเข้มข้นของกลูโคส (van Ulk *et al.*, 1990) ในการศึกษาเชิงเมตาบอลิซึมมีรายงานว่า *P. pastoris* สามารถสร้างผลิตภัณฑ์รอง ในรูปเอทานอลเมื่อเจริญในอาหารที่ใช้กลีเซอรอลเป็นสับสเตรต (Inan and Meagher, 2001) ถึงแม้ว่ากลีเซอรอลจะจัดเป็น non-fermentable sugar ดังนั้น จึงมีความเป็นไปได้สูงว่าอาจจะเกิดการสร้างเอทานอลเมื่อเพาะเลี้ยง *P. pastoris* โดยใช้กลูโคสซึ่งมีคุณสมบัติเป็น fermentable sugar เป็นสับสเตรต โดยมีการรายงานว่าเอทานอลที่เกิดขึ้นจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซิเตท ซึ่งทั้งเอทานอลและอะซิเตทมีสมบัติทำให้เกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ AOX1 promoter ได้ (Inan and Meagher, 2001)

มีการให้คำจำกัดความของการตอบสนองต่อกลูโคสที่ความเข้มข้นสูงของยีสต์ ภายใต้สภาวะที่มีอากาศโดยการสร้างเอทานอลทันทีหลังจากที่ความเข้มข้นของกลูโคสเปลี่ยนแปลงว่า short-term glucose effect หรือ short-term Crabtree effect (Petrik, *et al.*, 1983) หรือ overflow metabolism (Enfors and Haggstrom, 2000) ซึ่งต่างจาก Crabtree effect โดยทั่วไปที่เกี่ยวข้องกับ catabolite repression โดยในงานวิจัยนี้จะใช้คำว่า overflow metabolism เป็นหลัก ตามปกติภายใต้สภาวะไม่จำกัดออกซิเจน by-product จะเกิดขึ้นเนื่องจากปรากฏการณ์ overflow

metabolism ส่งผลให้ ผลได้ของเซลล์ที่ได้จากสับสเตรตลดลง เนื่องจากสับสเตรตส่วนหนึ่งถูกใช้ไปในการสร้างผลิตภัณฑ์รองและยังส่งผลให้เกิดการยับยั้งกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ รวมถึงการผลิตรีคอมบิแนนท์ β -1,4-galactosyltransferase โดย *S. cerevisiae* (Zigova *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังพบการเกิด overflow metabolism ในรูปการสังเคราะห์เอทานอลและอะซิเตทในยีสต์กลุ่ม methylotrophic คือ *Hansenula polymorpha* เมื่อใช้กลูโคสเป็นสับสเตรต (Jeude *et al.*, 2006) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการรายงานถึงอิทธิพลของเอทานอลต่อกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกโดย GAP promoter รวมถึงปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเอทานอลของ *P. pastoris* โดยวิธี overflow metabolism

ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาวิจัยผลของเอทานอลต่อการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกโดย GAP promoter รวมถึงปัจจัยที่มีผลต่อการเกิด overflow metabolism ของ *P. pastoris* เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้ในการออกแบบกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกโดย GAP promoter ด้วยกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ (fed-batch culture) โดยใช้เอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสเป็นโปรตีนต้นแบบ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาอิทธิพลของเอทานอลต่อการเติบโตและการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีน (เบต้ากลูโคซิเดส) โดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter
2. เพื่อศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้าง by-product ในรูปเอทานอลของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงโดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรต โดยมุ่งเน้นที่อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเป็นหลัก
3. เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (เบต้ากลูโคซิเดส) โดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter โดยการควบคุมการเกิด overflow metabolism ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์
4. เพื่อส่งเสริมให้อาจารย์/นักวิจัยได้พัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัย เพื่อก้าวไปสู่การทำงานวิจัยในระดับสูงขึ้น
5. เพื่อผลิตอาจารย์/นักวิจัยที่มีเชี่ยวชาญในการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนจากยีสต์ *P. pastoris* เพื่อสร้างความแข็งแกร่งให้กับระบบการวิจัยด้านการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนของประเทศ

บทที่ 2

การเตรียมสายพันธุ์จุลินทรีย์

2.1 วัตถุประสงค์

เพื่อเตรียมสายพันธุ์ *Pichia pastoris* ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter สำหรับใช้ในการดำเนินงานขั้นต่อไป

2.2 วิธีการวิจัย

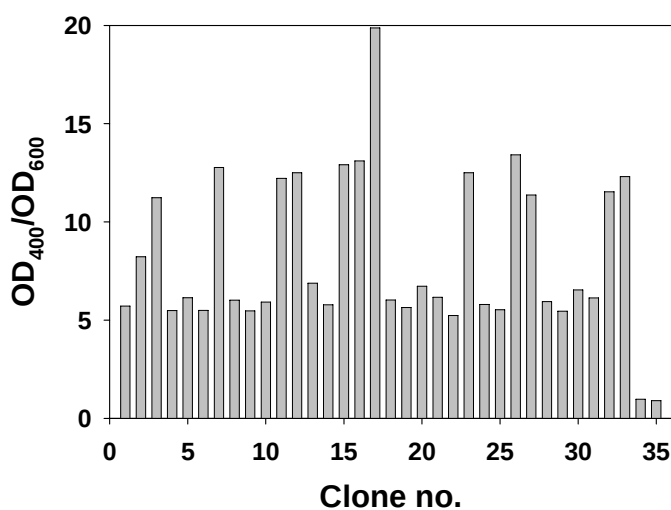
ทำการโคลนเบต้ากลูโคซิเดส cDNA ที่มีการเติมลำดับดีเอ็นเอสำหรับเอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ PstI ที่ปลาย 5' และ 3' ตามลำดับ เข้าสู่พลาสมิด pGAPZαB (Invitrogen) ที่ตัดด้วย เอนไซม์ตัดจำเพาะ EcoRI และ PstI เมื่อได้โคลนที่ต้องการแล้วทำการทรานฟอร์มพลาสมิดเข้าสู่ จีโนมของ *P. pastoris* สายพันธุ์ Y-11430 โดยใช้วิธีการมาตรฐานที่แนะนำใน Invitrogen manual และตรวจสอบหาเชื้อที่มีพลาสมิดโดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารที่มี zeocin สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ได้จะ สร้างผลผลิตเบต้ากลูโคซิเดสแล้วปลดปล่อยสู่อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจะต้องทำการคัดเลือกโคลนที่มีการแสดงออกของเบต้ากลูโคซิเดสสูงสุดต่อไป โดยสายพันธุ์จุลินทรีย์เจ้าบ้านที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ *P. pastoris* สายพันธุ์ Y-11430 (Wildtype Strain) ได้รับความอนุเคราะห์จาก Lin Cereghino (Lin Cereghino และ Cregg, 2000) และยีนเบต้ากลูโคซิเดสจากต้นพยูง (Thai Rosewood; *Dalbergia cochinchinensis* Pierre) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.มร.ชัชณัฐพร สวัสดิ์วัฒน์ (Ketudat-Cairns et al., 2000)

2.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองพบว่าได้จำนวนโคลนที่สามารถเจริญบนอาหารที่มี zeocin ทั้งหมด 33 โคลน ซึ่งหลังจากทำการวิเคราะห์ความสามารถในการแสดงออกของเบต้ากลูโคซิเดสในแต่ละ โคลน ได้ผลดังภาพที่ 2-1 ซึ่งความสามารถในการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในแต่ละ โคลนถูกแสดงในรูป OD_{400}/OD_{600} เนื่องจากค่า OD_{400} เป็นค่าที่แสดงถึงกิจกรรมของเอนไซม์ เบต้ากลูโคซิเดสในรูปของความสามารถในการปลดปล่อย pNP ออกจากโมเลกุลของ pNP-glucose และค่า OD_{600} เป็นค่าที่แสดงถึงปริมาณเซลล์ในรูปของความขุ่น ดังนั้น OD_{400}/OD_{600} จึง เป็นค่าที่สามารถใช้ในการแสดงถึงปริมาณเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่สร้างขึ้นจากเซลล์ปริมาณ 1 หน่วยของ OD_{600} ทั้งนี้ พบว่าทุกโคลนที่ได้จากการทรานฟอร์ม pGAPZαB ที่มีเบต้ากลูโคซิเดส

cDNA จะมีค่าความสามารถในการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงกว่าโคลนที่ได้จากการทรานฟอร์มพลาสมิด pGAPZ α B ที่ไม่มีเบต้ากลูโคซิเดส cDNA ซึ่งใช้เป็นตัวควบคุม

เมื่อพิจารณาความสามารถในการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ในกลุ่มของโคลนที่ได้จากการทรานฟอร์ม pGAPZ α B ที่มีเบต้ากลูโคซิเดส cDNA พบว่าความสามารถในการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจะแตกต่างกันไป ซึ่งจากภาพที่ 2-1 สามารถแบ่งความสามารถของการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้ 3 ระดับ คือ ก) มีค่า OD₄₀₀/OD₆₀₀ ประมาณ 6.5 จำนวน 20 โคลน ข) มีค่า OD₄₀₀/OD₆₀₀ ประมาณ 13 จำนวน 12 โคลน และ ค) มีค่า OD₄₀₀/OD₆₀₀ ประมาณ 19 จำนวน 1 โคลน ซึ่งจากค่า OD₄₀₀/OD₆₀₀ ที่ได้มีค่าประมาณใกล้เคียงกับจำนวนเท่าของ 6.5 ผลที่ได้นี้อาจเนื่องมาจากจำนวนซ้ำของเบต้ากลูโคซิเดส cDNA ที่เติมเข้าไปในจีโนมของ *P. pastoris* ในปริมาณที่ไม่เท่ากัน ซึ่งสัมพันธ์กับรายงานของ Clare และคณะ (1991) ที่สามารถเพิ่มการแสดงออกของ Mouse epidermal growth factor ใน *P. pastoris* ได้ 13 เท่า เมื่อเพิ่มจำนวนซ้ำของ cDNA เป็น 19 ซ้ำ



ภาพที่ 2-1 ความสามารถในการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในแต่ละโคลนที่สามารถเจริญบนอาหารที่มี zeocin (โคลนที่ 1-33 เป็นโคลนที่ได้จากพลาสมิด pGAPZ α B ที่มีเบต้ากลูโคซิเดส cDNA และโคลนที่ 34-35 เป็นโคลนที่ได้จากพลาสมิด pGAPZ α B ที่ไม่มีเบต้ากลูโคซิเดส cDNA)

โดยจากภาพที่ 2-1 โคลนที่ 17 เป็นโคลนที่มีความสามารถในการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสได้สูงสุด โดยให้ค่า OD_{400}/OD_{600} ประมาณ 19 ซึ่งสูงกว่าตัวควบคุม (โคลนที่ 34 และ 35) ประมาณ 20 เท่า ดังนั้น จึงทำการเลือกโคลนที่ 17 เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป

2.4 สรุปผลการทดลอง

จากการเตรียมสายพันธุ์สำหรับการทดลองต่อไป สามารถได้สายพันธุ์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงสุด 1 โคลน จากทั้งหมด 33 โคลน ได้แก่ โคลนที่ 17 ซึ่งให้ค่า OD_{400}/OD_{600} สูงกว่าตัวควบคุม (โคลนที่ 34 และ 35) ประมาณ 20 เท่า

บทที่ 3

การศึกษาอิทธิพลของเอทานอลต่อการเติบโตและการแสดงออกของ เบต้ากลูโคซิเดสโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter

3.1 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาอิทธิพลของเอทานอลต่อการเติบโตและการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์ยีน
(เบต้ากลูโคซิเดส) โดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter

3.2 วิธีวิจัย

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ *P. pastoris* สายพันธุ์ Y-11430 ที่มียีน
เบต้ากลูโคซิเดสจากต้นพุง (*Dalbergia cochichinensis* Pierre) ซึ่งได้จากการเตรียมสายพันธุ์จุลินทรีย์
ในบทที่ 2

2. การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์

การเตรียมกล้าเชื้อแบ่งเป็นสองขั้นตอน

1) การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ทำโดยเชื้อยีสต์ *P. pastoris* จากอาหารร่วน YPD 1
โคโลนี ลงในอาหารเหลว YPD (Yeast extract Peptone Dextrose; ในหนึ่งลิตรประกอบด้วย
Yeast extract 10.0 กรัม, Peptone 20.0 กรัม, Dextrose 20.0 กรัม) ที่มี Zeocin 100 ไมโครกรัม
ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 125 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า
ที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 2 ทำโดยถ่ายกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ทั้งหมด 10 มิลลิลิตร ลงในอาหาร
YPD ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่
ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3. การศึกษาอิทธิพลของเอทานอล

1) เตรียมอาหาร BMGluY (Buffered glucose complex medium; ในหนึ่งลิตรประกอบด้วย
Yeast extract 10.0 กรัม, Peptone 20.0 กรัม, Glucose 10.0 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร
ด้วยโพแทสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ พีเอช 6.0) 145 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ 500
มิลลิลิตร จำนวน 18 ฟลาสก์

2) เติมเอทานอลให้ได้ความเข้มข้น ดังตารางที่ 3-1 โดยแต่ละความเข้มข้นของเอทานอล
ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3) ทำการเติมกล้ำเชื้อ 5 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว BMGluY แต่ละฟลasks ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร ทุก 3 ชั่วโมง

4) นำตัวอย่างที่ได้มาวิเคราะห์น้ำนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของกลูโคส ความเข้มข้นเอทานอล และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลของเอทานอลต่อการเติบโตและการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสต่อไป

ตารางที่ 3-1 ปริมาณเอทานอลที่ต้องเติมเพื่อให้ได้อาหารที่มีความเข้มข้นของเอทานอลต่างๆ สำหรับศึกษาอิทธิพลของเอทานอล

ความเข้มข้นของเอทานอล (กรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้นของเอทานอล (มิลลิลิตรต่อลิตร)*	ปริมาณเอทานอลที่ต้องเติมในอาหาร 150 มิลลิลิตร (มิลลิลิตร)
0	0	0
1	1.27	0.19
2	2.53	0.38
3	3.80	0.57
4	5.06	0.76
5	6.33	0.95

* ความหนาแน่นของเอทานอล = 0.79 กรัมต่อมิลลิลิตร หรือ 1 กรัม มีปริมาตร 1.27 มิลลิลิตร

4. วิธีการวิเคราะห์

1) การวิเคราะห์ความขุ่นและน้ำนักเซลล์แห้ง การวิเคราะห์ความขุ่นทำโดยนำตัวอย่างน้ำหมักไปวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ และการวิเคราะห์น้ำนักเซลล์แห้งทำโดยนำตัวอย่างที่เก็บได้ใส่ลงในหลอดที่อบแห้งและทราบน้ำหนักแน่นอนแล้วนำไปเหวี่ยงแยก ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส ชั่งน้ำหนักและคำนวณหาน้ำนักเซลล์แห้ง

2) การวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้ วิธี DNS ซึ่งเป็นวิธีวิเคราะห์น้ำตาลรีดิวซ์ที่มีความสะดวกและประหยัด (Miller, 1959)

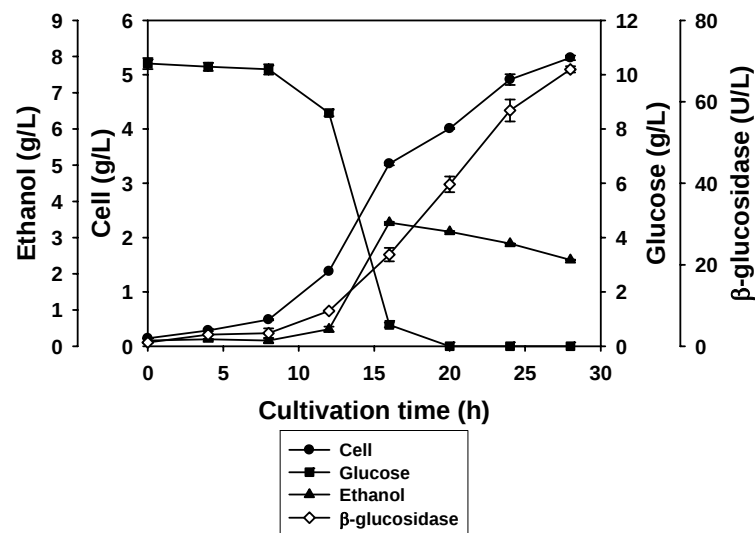
3. การวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสทำตามวิธีที่เสนอโดย Evans (1985)

4. การวิเคราะห์ความเข้มข้นเอทานอล สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (AOAC 1990) โดยให้เอทานอลเป็นสารมาตรฐาน

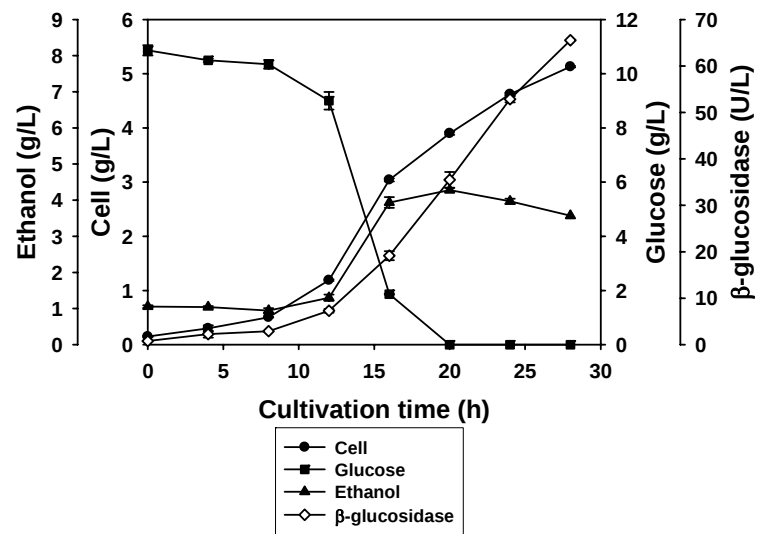
3.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

3.3.1 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดส

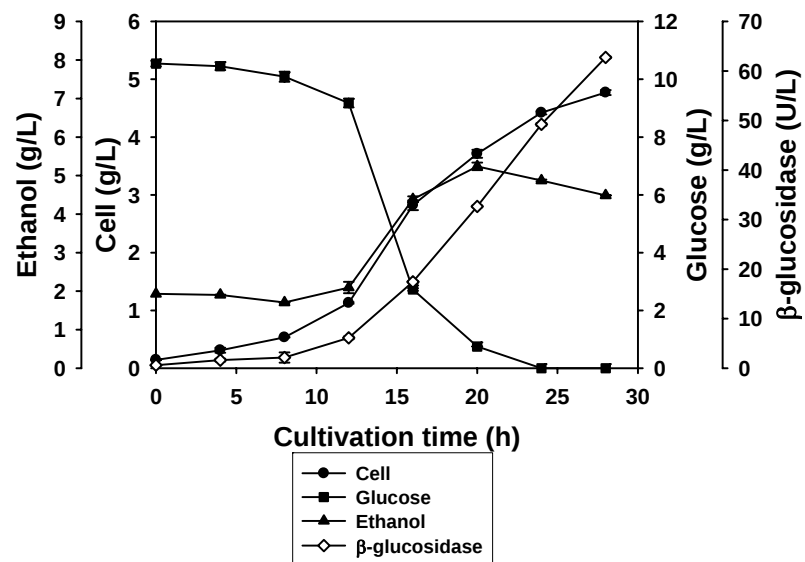
จากการศึกษาอิทธิพลของเอทานอลต่อการเติบโตและการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter โดยทำการศึกษาที่ความเข้มข้นของเอทานอล 0 (ชุดควบคุม) 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร ได้ผลการทดลองดังภาพที่ 3-1 ถึง 3-6 ทั้งนี้ พบว่ารูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* รวมถึงการใช้กลูโคส และการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอทานอลในทุกการทดลองมีลักษณะคล้ายกัน โดยมีความแตกต่างกันที่ความเข้มข้นและอัตราการเปลี่ยนแปลงของสารต่างๆ ในระบบ ซึ่งจะได้กล่าวต่อไป



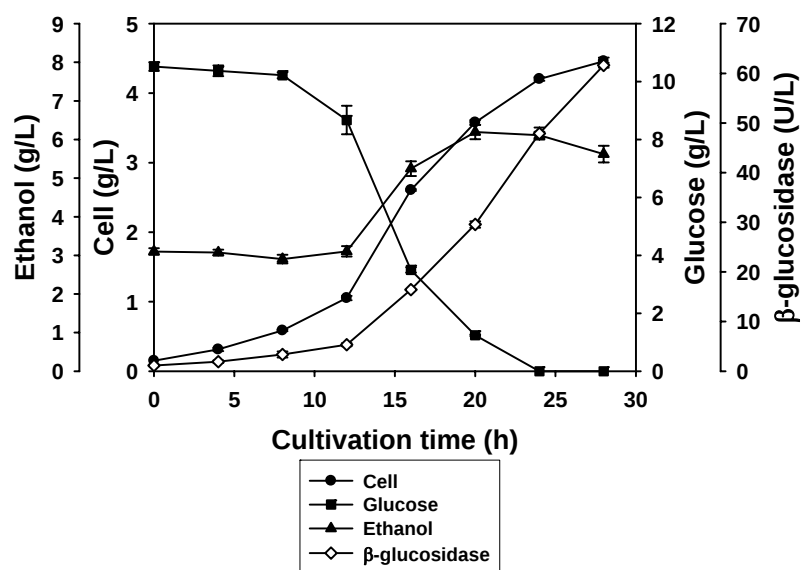
ภาพที่ 3-1 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร BMGluY ที่ไม่มีการเติมเอทานอล (ชุดควบคุม) ในฟลาสก์เขย่า



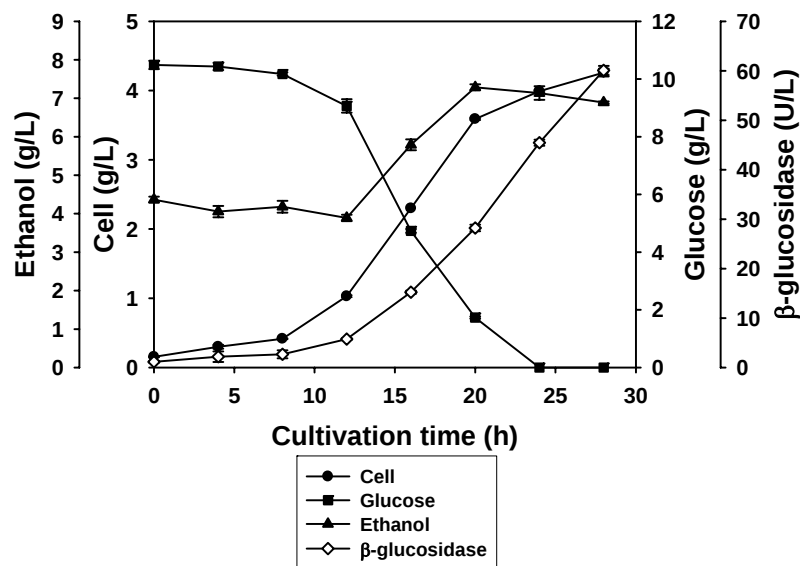
ภาพที่ 3-2 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร BMGluY ที่มีการเติมเอทานอล 1 กรัมต่อลิตร ในฟลask เชย้า



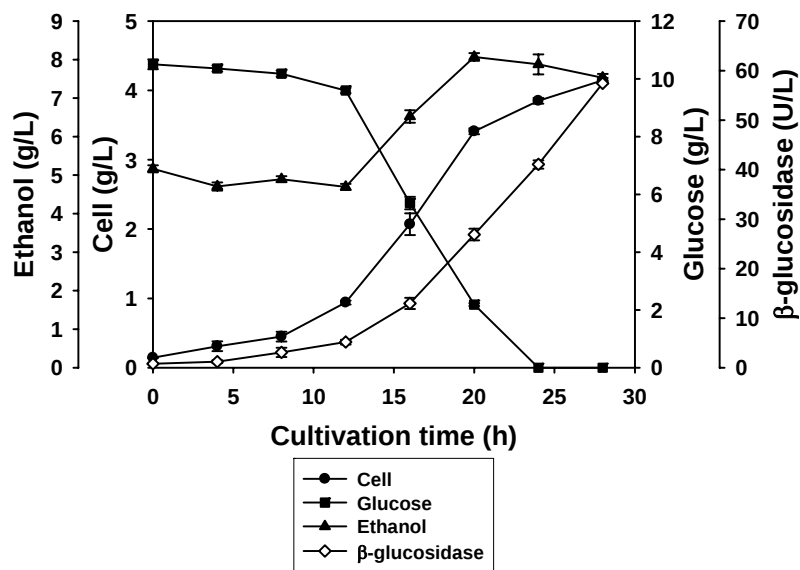
ภาพที่ 3-3 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร BMGluY ที่มีการเติมเอทานอล 2 กรัมต่อลิตร ในฟลask เชย้า



ภาพที่ 3-4 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร BMGluY ที่มีการเติมเอทานอล 3 กรัมต่อลิตร ในฟลasks เชย้า



ภาพที่ 3-5 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนเบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร BMGluY ที่มีการเติมเอทานอล 4 กรัมต่อลิตร ในฟลasks เชย้า



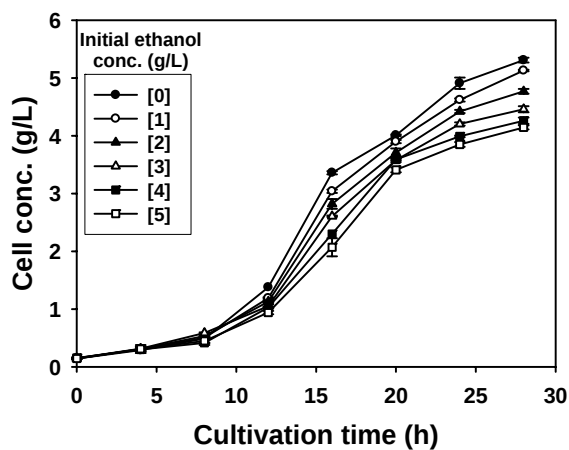
ภาพที่ 3-6 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร BMGluY ที่มีการเติมเอทานอล 5 กรัมต่อลิตร ในพลาสติกเขย่า

3.3.2 อิทธิพลของเอทานอลต่อการเติบโตและอัตราการเติบโตของเซลล์

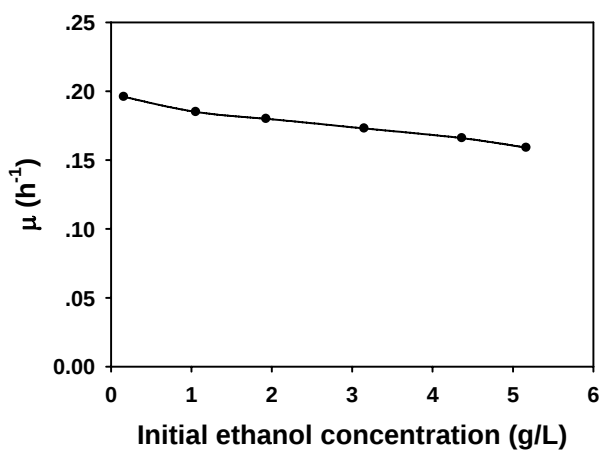
เมื่อนำผลของการเพิ่มขึ้นของเซลล์จากการทดลองที่แต่ละความเข้มข้นของเอทานอลมาทำการเปรียบเทียบบนกราฟเดียวกันจะได้ผลดังภาพที่ 3-7 ซึ่งพบว่าเอทานอลมีผลต่อการเติบโตของเซลล์ โดยเมื่อมีการเติมเอทานอลลงไป ในอาหาร BMGluY ที่ความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงเซลล์จนสิ้นสุดการทดลอง (ชั่วโมงที่ 28) ทำให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ 5.31 5.13 4.77 4.46 4.26 และ 4.15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้จากการเติมเอทานอลลงไป ในอาหาร BMGluY ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีค่าต่ำกว่าความเข้มข้นของเซลล์ที่ได้จากชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเอทานอล) ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำข้อมูลของการเพิ่มขึ้นของเซลล์จากการทดลองที่แต่ละความเข้มข้นของเอทานอล ในช่วงเวลา 4-16 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยง มาทำการประมาณค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) (ในช่วงดังกล่าวกลูโคสยังไม่หมด) พบว่าค่าอัตราการเติบโตจำเพาะมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลที่เติมลงในอาหาร BMGluY มีค่าเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3-8) โดยเมื่อมีการเติมเอทานอลลงไป ในอาหารที่ความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร จะได้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ 0.196 0.185 0.173 0.166 และ 0.159 ชั่วโมง⁻¹ ตามลำดับ ซึ่งค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ เมื่อไม่มี

การเติมเอทานอลลงไปในการอาหาร (ชุดควบคุม) มีค่ามากกว่าในระบบที่มีการเติมเอทานอลลงไปในการอาหารที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ประมาณ 19 เปอร์เซ็นต์



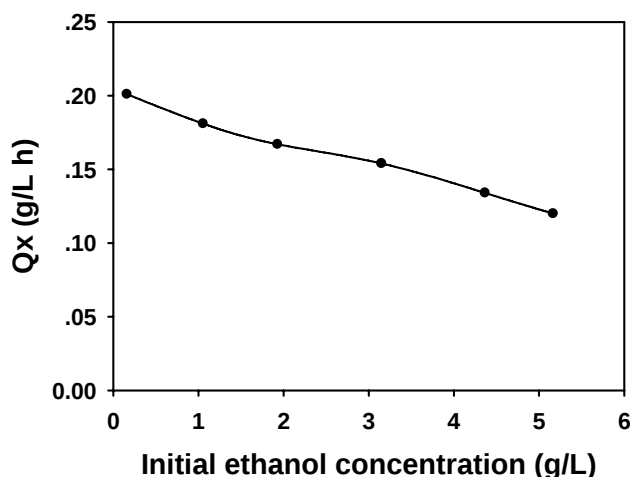
ภาพที่ 3-7 การเติบโตของ *P. pastoris* ในอาหารที่มีเอทานอลที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 1 2 3 4 และ 5 กรัม/ลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลasks เชย้า



ภาพที่ 3-8 อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่ออัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลasks เชย้า

ในทำนองเดียวกัน เมื่อนำข้อมูลมาทำการประมาณค่าอัตราการเติบโต (Q_x) พบว่าค่าอัตราการเติบโตมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลที่เติมลงในอาหาร BMGluY มีค่า

เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3-9) ซึ่งค่าอัตราการเติบโต เมื่อไม่มีการเติมเอทานอลลงไปในการหมักจะสูงกว่าในกรณีที่มีการเติมเอทานอลลงไปในการหมักที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ประมาณ 41 เปอร์เซ็นต์ โดยจากภาพที่ 3-8 และ 3-9 แสดงให้เห็นว่าเอทานอลมีผลทำให้ค่าอัตราการเติบโตลดลงมากกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะ



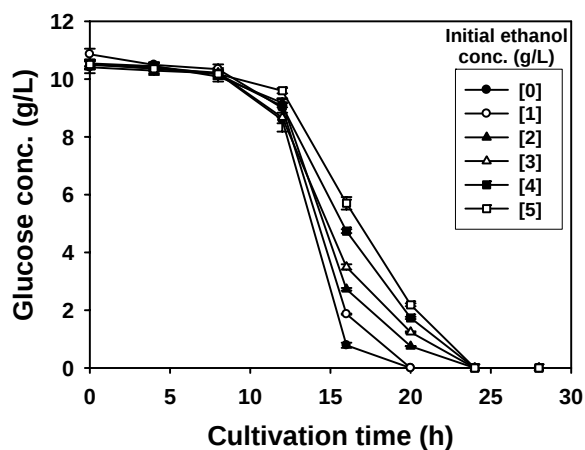
ภาพที่ 3-9 อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่ออัตราการเติบโต (Q_x) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลask เช้า

จากอิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่อความหนาแน่นของเซลล์ (ภาพที่ 3-7), อัตราการเติบโตจำเพาะ (ภาพที่ 3-8) และอัตราการเติบโต (ภาพที่ 3-9) พบว่าค่าต่างๆ มีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลสูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Bai *et al.*, (2008) ที่ทำการศึกษาในยีสต์ *S. cerevisiae* โดยพบว่าเอทานอลมีผลยับยั้งการเติบโต ซึ่ง Luong (1985) ได้รายงานถึงการศึกษาจลนพลศาสตร์ของการยับยั้งการเติบโตเนื่องจากเอทานอลใน *S. cerevisiae* ว่ามีรูปแบบการยับยั้งแบบไม่แข่งขัน (non-competitive Inhibition) ทั้งนี้ ความต้านทานต่อเอทานอลเป็นลักษณะเฉพาะสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Bai *et al.*, 2008) ซึ่งความเข้มข้นของเอทานอลสูงสุดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ 5 กรัมต่อลิตร โดยมีผลทำให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ และอัตราการเติบโตลดลงถึง 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ทั้งนี้ พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลในระดับเดียวกันไม่มีผลต่อการเติบโตของ *S. cerevisiae* โดยการยับยั้งเนื่องจากเอทานอลมีผลกระทบที่ซับซ้อนและหลากหลาย ซึ่งเป็นที่

ยอมรับกันว่าเป้าหมายหลักในการเข้าทำลายของเอทานอล คือ เยื่อหุ้มเซลล์ รวมถึงเยื่อหุ้มองค์ประกอบต่างๆ ในเซลล์ (D'Amore and Stewart, 1987)

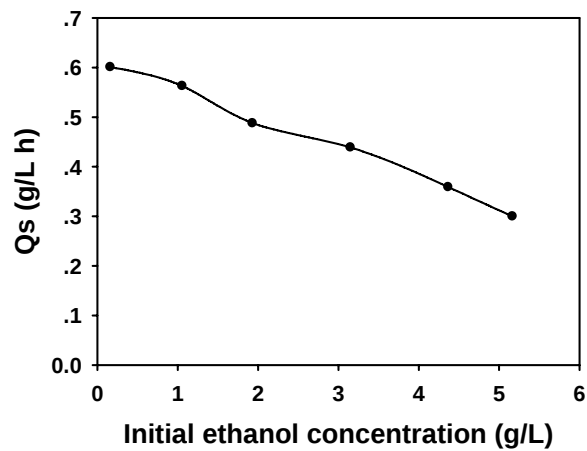
3.3.3 อิทธิพลของเอทานอลต่อการใช้กลูโคส

จากผลการทดลอง เมื่อทำการเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของกลูโคสกับเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงของการทดลองที่แต่ละความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้นที่เติมลงไปในการอาหาร BMGluY ได้ผลดังภาพที่ 3-10 ซึ่งพบว่าเอทานอลมีผลต่อการใช้กลูโคส โดยเมื่อมีการเติมเอทานอลลงไปในการอาหาร BMGluY ที่ความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้อัตราการใช้กลูโคสลดลง (Qs) (ภาพที่ 3-11) ซึ่งอัตราการใช้กลูโคสที่ได้จากการเติมเอทานอลลงไปในการอาหาร BMGluY ที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีค่าต่ำกว่าอัตราการใช้กลูโคสที่ได้จากชุดควบคุม (ไม่มีการเติมเอทานอล) ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์

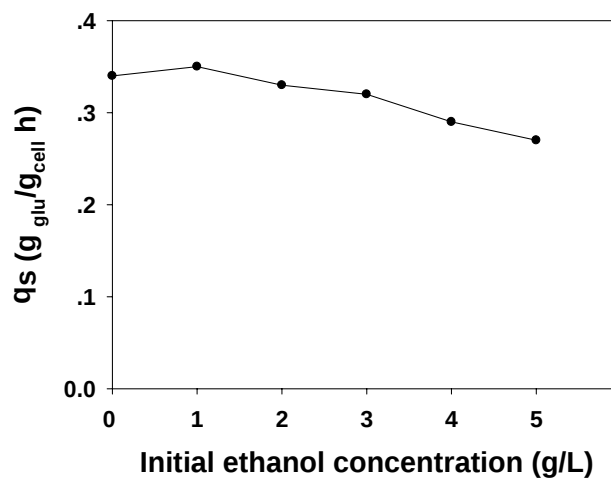


ภาพที่ 3-10 การใช้สับสเทรต (กลูโคส) ของ *P. pastoris* ในอาหารที่มีเอทานอลที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 1 2 3 4 และ 5 กรัม/ลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลasks ขยาย

เมื่อนำผลการทดลองมาแสดงในรูปอิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้นต่ออัตราการใช้สับสเทรตจำเพาะ (q_s) (ภาพที่ 3-12) พบว่าค่าอัตราการใช้สับสเทรตจำเพาะมีแนวโน้มลดลงตามความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งค่าอัตราการใช้สับสเทรตจำเพาะเมื่อไม่มีการเติมเอทานอลลงไปในการอาหาร มีค่ามากกว่าในระบบที่มีการเติมเอทานอลลงไปในการอาหารที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ประมาณ 28 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3-11 อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่ออัตราการใช้กลูโคส (Q_s) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า



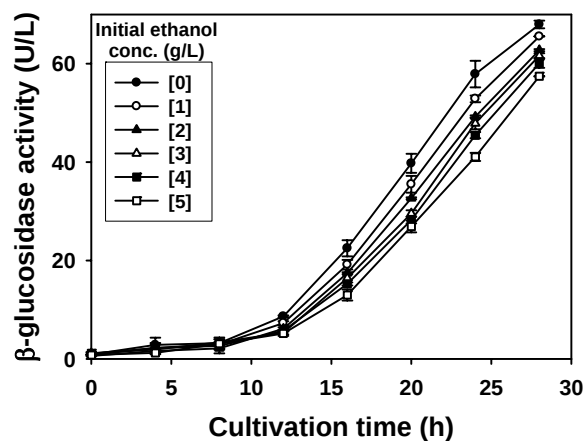
ภาพที่ 3-12 อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่ออัตราการใช้กลูโคสจำเพาะ (q_s) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาสก์เขย่า

จากผลการศึกษาอิทธิพลของเอทานอลต่อการใช้สับสเตรต (กลูโคส) พบว่าเอทานอลสามารถยับยั้งการใช้สับสเตรต โดยในระบบที่มีการเติมเอทานอลลงไปในอาหารที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้อัตราการใช้สับสเตรต และอัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะลดลง ประมาณ

50 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่าเอทานอลมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีไกลโคไลซิสของยีสต์ เช่น hexokinase และ alcoholdehydrogenase (ADH) รวมถึงยังส่งผลต่อการใช้สารอาหาร และ membrane potential ATPase (Casey and Ingledew, 1986; Larue *et al.*, 1984) ดังนั้น ในการทดลองนี้การที่อัตราการเติบโตของ *P. pastoris* มีค่าน้อยลงเมื่อความเข้มข้นเอทานอลสูงขึ้น น่าจะเป็นผลมาจากอัตราการใช้สับสเทรตที่น้อยลงมากกว่าการที่เอทานอลจะส่งผลโดยตรงต่อการเติบโตของ *P. pastoris*

3.3.4 อิทธิพลของเอทานอลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

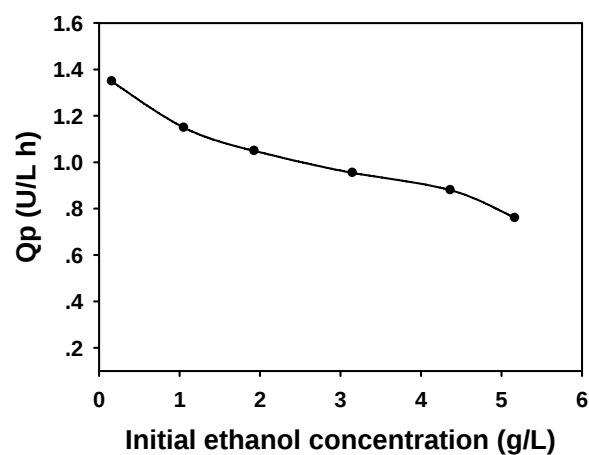
จากการทดลอง เมื่อนำผลของกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากการทดลองที่แต่ละความเข้มข้นของเอทานอลมาทำการเปรียบเทียบบนกราฟเดียวกันได้ผลดังภาพที่ 3-13 ซึ่งพบว่าเอทานอลมีผลยับยั้งการเติบโตของเซลล์ ส่งผลให้การแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสลดลง โดยเมื่อมีการเติมเอทานอลลงไปในการอาหาร BMGluY ที่ความเข้มข้น 0 1 2 3 4 และ 5 กรัมต่อลิตร และเพาะเลี้ยงเซลล์จนสิ้นสุดการทดลอง (ชั่วโมงที่ 28) ทำให้ได้กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส 67.96, 65.53, 62.74, 61.62, 60.08 และ 57.42 หน่วยต่อลิตร ตามลำดับ



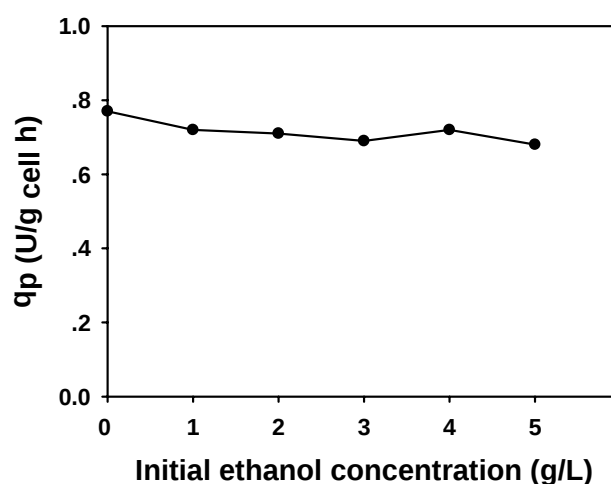
ภาพที่ 3-13 การผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสของ *P. pastoris* ในอาหารที่มีเอทานอลที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 1 2 3 4 และ 5 กรัม/ลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลasks เชย้า

เมื่อนำข้อมูลของการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสในช่วงเวลา 4-16 ชั่วโมง (ในช่วงดังกล่าวกลูโคสยังไม่หมด) จากการทดลองที่แต่ละความเข้มข้นของเอทานอลมาทำการประมาณค่าอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (Qp) พบว่าอัตราการผลิตเอนไซม์

เบต้ากลูโคซิเดสมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลที่เติมลงในอาหาร BMGluY มีค่าเพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3-14) โดยค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ เมื่อไม่มีการเติมเอทานอลลงในอาหาร มีค่ามากกว่าในระบบที่มีการเติมเอทานอลลงในอาหารที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ประมาณ 44 เปอร์เซ็นต์



ภาพที่ 3-14 อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่ออัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (Q_p) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาस्कเขย่า



ภาพที่ 3-15 อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluY ต่ออัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจำเพาะ (q_p) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลาस्कเขย่า

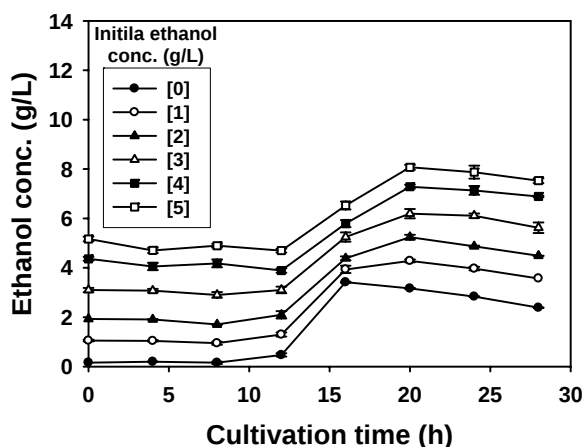
โดยเมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้นต่ออัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (ภาพที่ 3-15) พบว่าค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย ซึ่งค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะเมื่อไม่มีการเติมเอทานอลลงไปในการหมัก มีค่ามากกว่าในระบบที่มีการเติมเอทานอลลงไปในการหมักที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์

ซึ่งเมื่อพิจารณาพบว่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะมีผลเป็นไปในแนวทางเดียวกับค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ได้จากแต่ละการทดลอง (ภาพที่ 3-13) ทั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าการที่เอทานอลยับยั้งการเติบโตของเซลล์ ส่งผลให้ความหนาแน่นของเซลล์ลดลง ซึ่งทำให้ผลผลิตของรีคอมบิแนนท์โปรตีนลดลงด้วย โดยพบว่าเอทานอลส่งผลต่ออัตราการเติบโตและอัตราการสร้างผลผลิตมากกว่าอัตราการเติบโตจำเพาะและอัตราการสร้างผลผลิตจำเพาะ ในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าผลผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ยีสต์ *P. pastoris* ผลิตขึ้นในระบบนี้เป็นผลผลิตที่เกิดควบคู่กับการสร้างพลังงาน (coupled with energy metabolism) ซึ่งเมื่อเซลล์มีการสร้างพลังงานเพื่อใช้ในการเติบโตหรือบำรุงรักษาเซลล์ (maintenance) จะมีการสร้างผลผลิตเกิดขึ้นด้วย โดยจะแตกต่างจากรูปแบบการสร้างผลผลิตพร้อมกับการเติบโต (growth associated product) คือ จะยังคงมีการการสร้างผลผลิตถึงแม้ว่าเซลล์จะไม่มีเติบโตแล้วก็ตาม เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตจะมีการสร้างพลังงานตลอดเวลาถึงแม้ว่าเซลล์จะหยุดการเติบโตแล้วก็ตาม ซึ่งพลังงานที่สร้างขึ้นจะใช้เพื่อการบำรุงรักษาเซลล์ (Doran, 2003 หน้า 284; Groot *et al.*, 1992)

3.3.5 อิทธิพลของความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้นต่อการผลิตเอทานอล

จากการทดลอง เมื่อนำผลของความเข้มข้นของเอทานอลจากการทดลองที่แต่ละความเข้มข้นของเอ-ทานอลเริ่มต้นมาทำการเปรียบเทียบบนกราฟเดียวกันได้ผลดังภาพที่ 3-16 ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลเริ่มต้นในช่วง 0-5 กรัมต่อลิตร มีผลต่อการผลิตเอทานอลน้อยมาก โดยเมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอทานอล พบว่ามีการสร้างเอทานอลอย่างรวดเร็วในช่วงที่ 12-16 ซึ่งอาจเนื่องมาจากออกซิเจนไม่เพียงพอจึงเกิดการสร้างเอทานอลผ่านวิถีการหมัก อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการทดลองนี้ไม่มีการวัดค่าออกซิเจนละลาย ดังนั้น ข้อสรุปดังกล่าวจึงเป็นเพียงสมมุติฐานของผู้ทำการวิจัยเท่านั้น เมื่อทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลที่เพิ่มขึ้นจากความเข้มข้นเริ่มต้นจนถึงความเข้มข้นสูงสุด พบว่าในทุกการทดลองจะมีการเพิ่มขึ้นในปริมาณที่ใกล้เคียงกันประมาณ 3 กรัมต่อลิตร ซึ่งช่วงเวลาที่เอทานอลมีความเข้มข้นสูงสุดเป็น

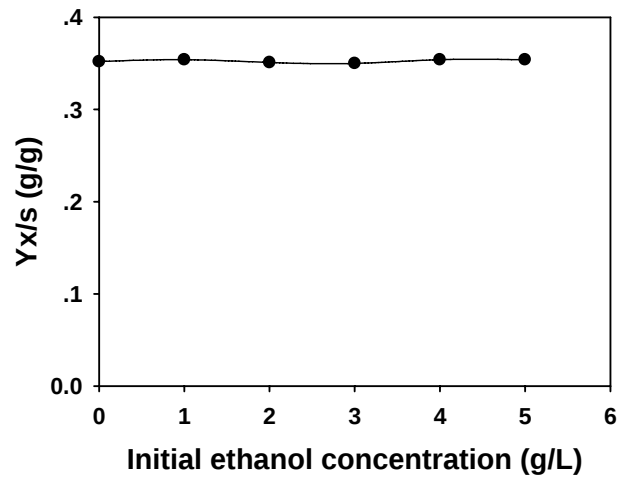
ช่วงเวลาที่กลูโคสถูกใช้จนหมด หลังจากนั้นพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลจะลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนแหล่งที่ 2 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Inan และ Meagher, (2001) ที่รายงานว่า *P. pastoris* สามารถใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้



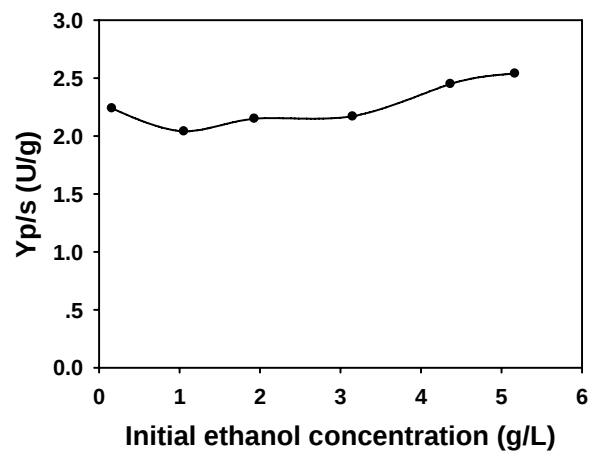
ภาพที่ 3-16 การผลิต by-product ในรูปเอทานอลของ *P. pastoris* ในอาหารที่มีเอทานอลที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 1 2 3 4 และ 5 กรัม/ลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลasks เชย้า

3.3.6 คีทธิพลของเอทานอลต่อผลได้ของเซลล์และเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากกลูโคส

จากการทดลอง เมื่อทำการเขียนกราฟระหว่างผลได้ของเซลล์จากกลูโคส (Y_x/s) กับเวลา (ภาพที่ 3-17) และผลได้ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากกลูโคส (Y_p/s) กับเวลา (ภาพที่ 3-18) ของการทดลองที่แต่ละความเข้มข้นของเอทานอล พบว่าแนวโน้มของค่าทั้งสองมีค่าสูงขึ้นเล็กน้อยตามความเข้มข้นของเอทานอล ซึ่งเมื่อมีการเติมเอทานอลลงไปในการอาหารที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีค่าผลได้ของเซลล์จากกลูโคส และผลได้ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากกลูโคสมากกว่าการเติมเอทานอลลงไปในการอาหารที่ความเข้มข้น 0 กรัมต่อลิตร ประมาณ 1 และ 12 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีการใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับกลูโคส



ภาพที่ 3-17 อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluy ต่อผลได้ของเซลล์จากกลูโคส (Yx/s) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลask ขยะ



ภาพที่ 3-18 อิทธิพลของเอทานอลที่เติมในอาหาร BMGluy ต่อผลได้ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (Yp/s) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงในฟลask ขยะ

3.4 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาอิทธิพลของเอทานอลต่อการเติบโต พบว่าเอทานอลมีผลต่อการเพิ่มขึ้นของเซลล์ โดยความเข้มข้นของเอทานอลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่สูงขึ้นส่งผลให้ความเข้มข้นของเซลล์ที่ลดลง รวมทั้งส่งผลให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) และค่าอัตราการเติบโต (Q_x) มีแนวโน้มลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Bai *et al.*, (2008) ที่พบว่าเอทานอลมีผลยับยั้งการเติบโตในยีสต์ *S. cerevisiae* ทั้งนี้ ความต้านทานต่อเอทานอลเป็นลักษณะเฉพาะสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Bai *et al.*, 2008) ซึ่งความเข้มข้นของเอทานอลสูงที่สุดที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ 5 กรัมต่อลิตร โดยมีผลทำให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะ และอัตราการเติบโตลดลงถึง 20 และ 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งความเข้มข้นของเอทานอลในระดับเดียวกันไม่มีผลต่อการเติบโตของ *S. cerevisiae*

นอกจากนี้ เอทานอลยังมีผลต่อการใช้กลูโคส ของยีสต์ *P. pastoris* โดยเมื่อมีการเติมเอทานอลลงไป ในอาหาร มีผลทำให้อัตราการใช้กลูโคสลดลง โดยในระบบที่มีการเติมเอทานอลลงไป ในอาหารที่ความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้อัตราการใช้สับสเทรต (Q_s) และอัตราการใช้สับสเทรตจำเพาะ (q_s) ลดลง ประมาณ 50 และ 28 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ที่กล่าวว่าเอทานอลมีผลยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ที่สำคัญในวิถีไกลโคไลซิสของยีสต์ เช่น hexokinase และ alcoholdehydrogenase (ADH) รวมถึงยังส่งผลต่อการใช้สารอาหาร และ membrane potential ATPase (Casey and Ingledew, 1986; Larue *et al.*, 1984) ดังนั้น ในการทดลองนี้การที่อัตราการเติบโตของ *P. pastoris* มีค่าน้อยลงเมื่อความเข้มข้นเอทานอลสูงขึ้น น่าจะเป็นผลมาจากอัตราการใช้สับสเทรตที่น้อยลงมากกว่าการที่เอทานอลจะส่งผลโดยตรงต่อการเติบโตของ *P. pastoris*

เมื่อทำการพิจารณาอิทธิพลของเอทานอลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส พบว่าเอทานอลมีผลต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสน้อย โดยเมื่อมีการเติมเอทานอลลงไป ในอาหาร ทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ได้มีค่าลดลง และพบว่าอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (Q_p) มีแนวโน้มลดลง ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาอัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจำเพาะ (q_p) พบว่าจะมีค่าลดลงเล็กน้อยเมื่อความเข้มข้นของเอทานอลเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นไปในแนวทางเดียวกับอัตราการเติบโตจำเพาะ ในส่วนนี้แสดงให้เห็นว่าผลผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนที่ยีสต์ *P. pastoris* ผลิตขึ้นในระบบนี้เป็นผลผลิตที่เกิดควบคู่กับการสร้างพลังงาน (coupled with energy metabolism) ซึ่งเมื่อเซลล์มีการสร้างพลังงานเพื่อใช้ในการเติบโตหรือบำรุงรักษาเซลล์ (maintenance) จะมีการสร้างผลผลิตเกิดขึ้นด้วย โดยจะแตกต่างจากรูปแบบการสร้างผลผลิต

พร้อมกับการเติบโต (growth associated product) คือ จะยังคงมีการการสร้างผลผลิตถึงแม้ว่าเซลล์จะไม่มี การเติบโตแล้วก็ตาม เนื่องจากเซลล์ที่มีชีวิตจะมีการสร้างพลังงานตลอดเวลาถึงแม้ว่าเซลล์จะหยุดการเติบโตแล้วก็ตาม ซึ่งพลังงานที่สร้างขึ้นจะใช้เพื่อการบำรุงรักษาเซลล์ (Doran, 2003 หน้า 284; Groot *et al.*, 1992)

เมื่อทำการประมาณค่าผลได้ของเซลล์จากกลูโคส ($Y_{x/s}$) และผลได้ของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากกลูโคส ($Y_{p/s}$) พบว่าแนวโน้มของค่าทั้งสองมีค่าสูงขึ้นตามความเข้มข้นของเอทานอล ซึ่งอาจเนื่องมาจากการใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนร่วมกับกลูโคส และเมื่อทำการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเอทานอลในระหว่างการเพาะเลี้ยง พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลมีค่าสูงขึ้นแสดงว่ามีการผลิตเอทานอลเกิดขึ้น โดยความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจากความเข้มข้นเริ่มต้นจนถึงความเข้มข้นสูงสุด พบว่าในทุกการทดลองจะมีการเพิ่มขึ้นในปริมาณที่ใกล้เคียงกันประมาณ 3 กรัมต่อลิตร ซึ่งช่วงเวลาที่เอทานอลมีความเข้มข้นสูงสุดเป็นช่วงเวลาที่กลูโคสถูกใช้จนหมด หลังจากนั้นพบว่าความเข้มข้นของเอทานอลจะลดลง ซึ่งอาจเนื่องมาจากยีสต์ *P. pastoris* มีการใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนต่อไป ซึ่ง Inan และ Meaher, (2001) ได้รายงานว่ *P. pastoris* สามารถใช้เอทานอลเป็นแหล่งคาร์บอนได้

จากผลการทดลองในส่วนนี้ ทำให้สามารถสรุปได้ว่าเอทานอลส่งผลให้อัตราการใช้สับสเทรต และอัตราการใช้สับสเทรตจำเพาะลดลง ส่งผลให้อัตราการการเติบโตจำเพาะ, อัตราการเติบโต และการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสที่ถูกควบคุมการแสดงออกโดย GAP promoter ลดลง

บทที่ 4

การศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อการสร้าง by-product ในรูปเอทานอลของ *P. pastoris* ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

4.1 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อการสร้าง by-product ในรูปเอทานอลของ *P. pastoris* ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

4.2 วิธีวิจัย

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ *P. pastoris* สายพันธุ์ Y-11430 ที่มียีนเบต้ากลูโคซิเดสจากต้นพยูง (*Dalbergia cochichinensis* Pierre) ซึ่งได้จากการเตรียมนายพันธุ์จุลินทรีย์ในบทที่ 2

2. การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงในถังหมัก

การเตรียมกล้าเชื้อแบ่งเป็นสองขั้นตอน คือ

1) การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ทำโดยเชื้อยีสต์ *P. pastoris* จากอาหารร่วน YPD 1 โคโลนี ลงในอาหารเหลว YPD (Yeast extract Peptone Dextrose; ในหนึ่งลิตรประกอบด้วย Yeast extract 10.0 กรัม, Peptone 20.0 กรัม, Dextrose 20.0 กรัม) ที่มี Zeocin 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องที่เขย่าความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) การเตรียมกล้าเชื้อขั้นที่ 2 ทำโดยถ่ายกล้าเชื้อขั้นที่ 1 ทั้งหมด 10 มิลลิลิตร ลงในอาหาร YPD ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ในฟลาสก์ขนาด 500 มิลลิลิตร ทำการเพาะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3. การเตรียมถังหมัก

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Glu-BS (Glucose Basal Salt medium; ในหนึ่งลิตรประกอบด้วย กลูโคส xxx กรัม, H_3PO_4 85% 26.7 มิลลิลิตร, $CaSO_4$ 0.93 กรัม, K_2SO_4 18.2 กรัม, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 14.9 กรัม, KOH 4.13 กรัม, PTM1 trace salts 4.35 มิลลิลิตร) (PTM1 ในหนึ่งลิตรประกอบด้วย $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 6.0 กรัม, KI 0.08 กรัม, $MnSO_4 \cdot H_2O$ 3.0 กรัม, $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ 0.2 กรัม, H_3BO_3 0.02 กรัม, $ZnCl_2$ 20.0 กรัม, $FeCl_3$ 13.7 กรัม, $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.9 กรัม, H_2SO_4 5.0 มิลลิลิตร, Biotin 0.2 กรัม) ปริมาตร 3 ลิตร โดยอาหารที่ใช้มีการแปรผันค่าความเข้มข้นของกลูโคส

เริ่มต้นในช่วง 5-80 กรัมต่อลิตร เติมหอาหารลงในถังหมักขนาด 10 ลิตร (Biostat C, B. Braun Biotech, Germany) ตรวจสอบความเรียบร้อยของอิเล็กโทรดต่างๆ (พีเอช DOT และระดับของฟอง) ว่าอยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้องก่อนดำเนินการทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ซึ่งถังหมักรุ่นนี้มีระบบการทำให้ปลอดเชื้อในตัว (*insitu sterile*) (จะต้องเทียบค่าอิเล็กโทรดต่างๆ ก่อนประกอบเข้ากับถังหมัก)

2) หลังจากทำให้ปลอดเชื้อและถังหมักเย็นลงแล้ว ทำการตั้งค่าสภาวะควบคุมต่างๆ คือ อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ อุณหภูมิ พีเอช และตรวจสอบการทำงานของอิเล็กโทรดสำหรับวัดค่าพีเอช และ DOT

4. การศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น

ทำการควบคุมสภาวะต่างๆ ให้เท่ากับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ดังนี้

อุณหภูมิ	30	องศาเซลเซียส
อัตราการกวน	1000	รอบต่อนาที
อัตราการให้อากาศ	1	ลิตรต่อลิตรต่อนาที
พีเอช	5	

ซึ่งระบบควบคุมของถังหมักรุ่นนี้เป็นระบบควบคุมอัตโนมัติ โดยใช้สารละลายแอมโมเนีย 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวในการควบคุมพีเอชและเป็นแหล่งไนโตรเจน

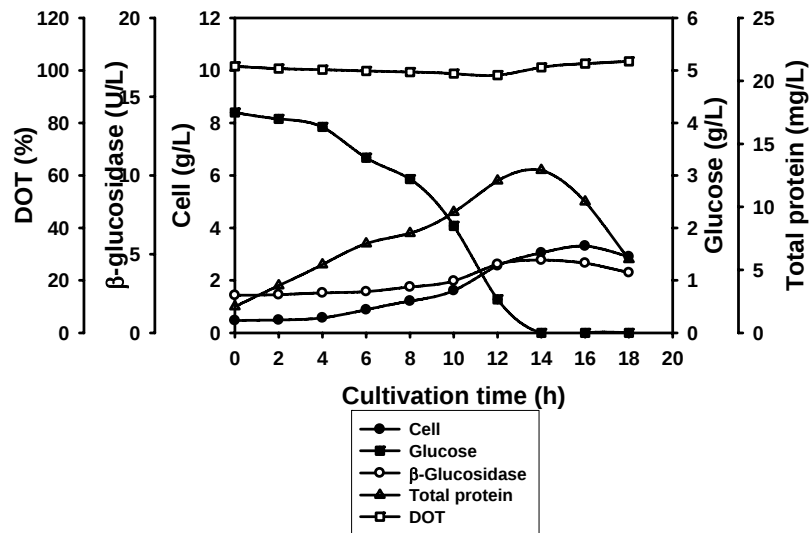
ถ่ายกลัเชื้อจากฟลาสก์ทั้งหมด 100 มิลลิลิตร ลงในถังหมัก ทำการเก็บตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นตัวอย่างเริ่มต้นหลังจากเติมกลัเชื้อลงในถังหมักแล้วประมาณ 5 นาที เพื่อให้เกิดการผสมกันอย่างทั่วถึง และทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 2-4 ชั่วโมง จนกลูโคสในอาหารถูกใช้จนหมดจึงยุติการเพาะเลี้ยง นำตัวอย่างส่วนหนึ่งวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร ทันที และนำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร เติมหอาหารในหลอดที่เตรียมไว้สำหรับวิเคราะห์น้ำตาลกลูโคสในน้ำหนักเซลล์แห้ง นำไปหมนเหวี่ยงและอบแห้งเพื่อนำน้ำหนักเซลล์แห้ง (ทำ 2 ซ้ำ) โดยส่วนที่ได้จากการหมนเหวี่ยงจะใช้สำหรับหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นเอทานอล และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (วิธีการวิเคราะห์ได้กล่าวไว้ในวิธีวิจัยของบทที่ 3) เพื่อนำข้อมูลที่ได้มาใช้อธิบายอิทธิพลของความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นต่อการสร้าง by-product ในรูปเอทานอลของ *P. pastoris* ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

4.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

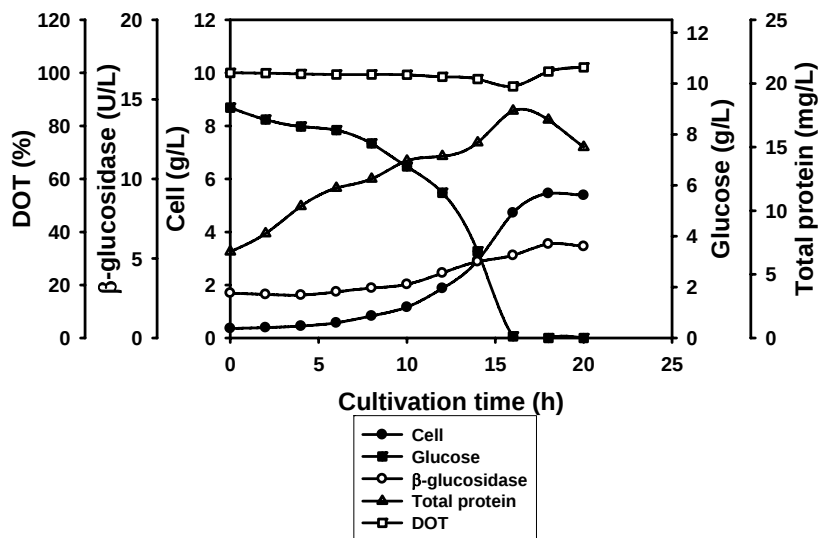
ถึงแม้ว่ากระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์จะเป็นกระบวนการหลักที่ใช้ในการผลิตรีคอม-บิแนนท์โปรตีนแบบต่อเนื่องตลอดเวลาภายใต้การควบคุมการแสดงออกของโปรโมเตอร์ GAP โดย *P. pastoris* อย่างไรก็ตาม จำเป็นต้องเริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยงด้วยกระบวนการแบบแบตช์เพื่อเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ก่อนที่จะดำเนินการแบบเฟด-แบตช์ โดยในระบบการเพาะเลี้ยง Crabtree-positive yeast ภายใต้สภาวะที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง (De Deken, 1966; Petrik *et al.*, 1983) หรืออัตราการเติบโตจำเพาะสูง (Van Hoek *et al.*, 1998) จะนำไปสู่วิธีการหมักเอทานอลถึงแม้ว่าออกซิเจนจะไม่จำกัดก็ตาม ทั้งนี้ การเกิดเอทานอลในระหว่างกระบวนการเพิ่มเซลล์ยีสต์เป็นสิ่งที่ไม่ต้องการเนื่องจากจะทำให้ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตลดลง ทำให้การผลิตยีสต์ขมขื่นในระดับอุตสาหกรรมนิยมควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสให้อยู่ในระดับที่ต่ำ ภายใต้สภาวะที่ไม่จำกัดออกซิเจน (Reed and Nagodawithana, 1991) อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับผลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อสร้าง by-product โดย *P. pastoris* ดังนั้น การทดลองในส่วนนี้ จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ *P. pastoris* ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นสำหรับกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ในการการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนต่อไป

4.3.1 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสในอาหาร BMGIuY ที่ความเข้มข้นของกลูโคสต่างๆ

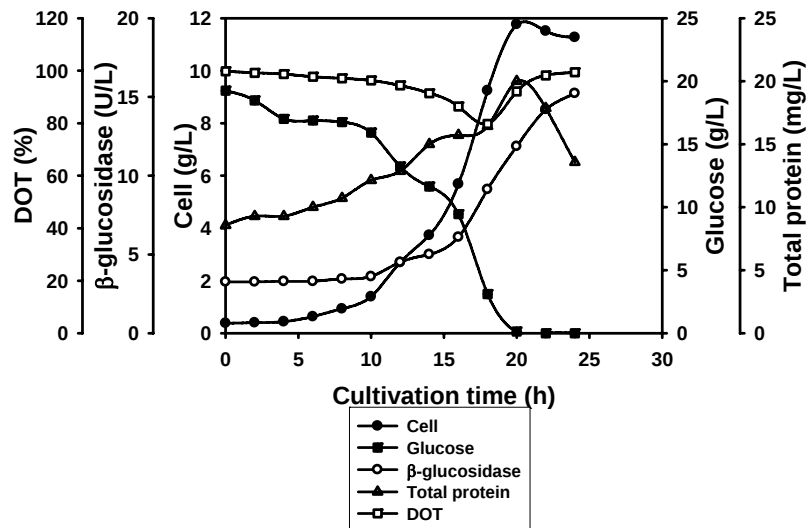
จากการทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเติบโตและการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter โดยทำการศึกษาในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่ความเข้มข้นของกลูโคสในช่วง 5-80 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรต่อนาที และพีเอช 5.0 (ภาพที่ 4-1 ถึง 4-5) พบว่ารูปแบบการเติบโต การใช้กลูโคส การผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดส และค่า DOT ในทุกการทดลองมีลักษณะคล้ายกัน โดยมีความแตกต่างกันที่ความเข้มข้น ระยะเวลาที่ใช้ในแต่ละการทดลอง และอัตราการเปลี่ยนแปลงของสารต่างๆ ในระบบ ซึ่งจะได้กล่าวในหัวข้อถัดไป



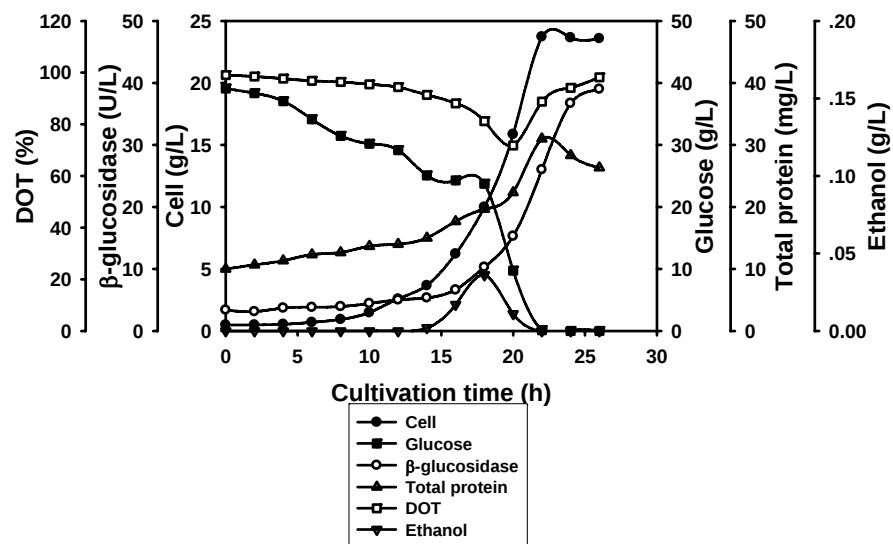
ภาพที่ 4-1 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก



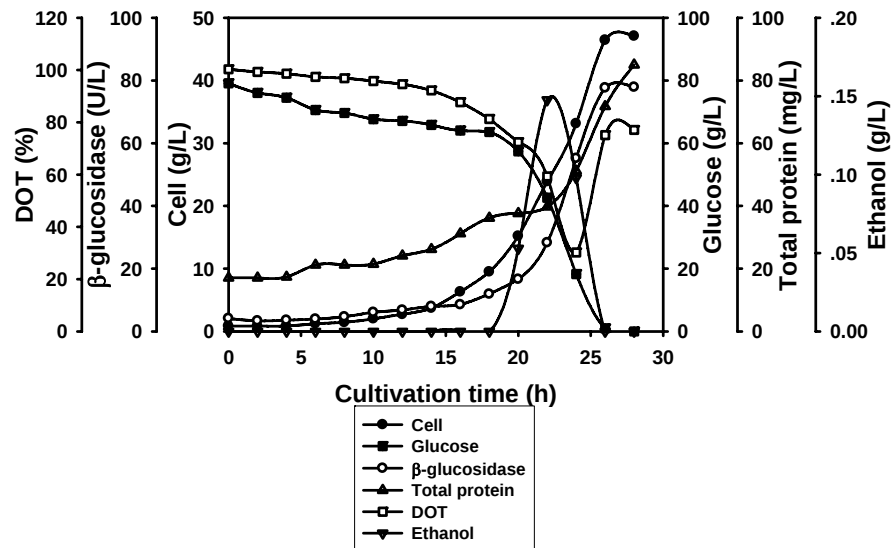
ภาพที่ 4-2 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก



ภาพที่ 4-3 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก



ภาพที่ 4-4 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก

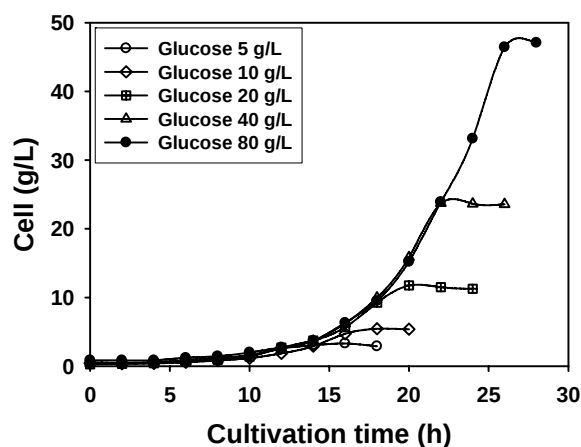


ภาพที่ 4-5 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก

ทั้งนี้ จากผลการศึกษาอิทธิพลของเอทานอลในบทที่ 3 พบว่าเอทานอลมีผลยับยั้งการเติบโตของเชื้อ ส่งผลให้ผลผลิตของรีคอมบิแนนท์โปรตีนลดลง ดังนั้น เอทานอลจึงถือว่าเป็นสารสำคัญที่จะต้องติดตาม ซึ่งสามารถตรวจพบได้ในการทดลองที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 40 และ 80 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าประมาณ 50 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้ เมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของเอทานอลที่ตรวจพบกับผลที่ได้จากการศึกษาอิทธิพลของเอทานอลต่อการเติบโตและการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสในการทดลองตอนที่ 1 ถือว่ามีค่าน้อยมากและไม่ทำให้เกิดผลเสียต่อกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ อย่างไรก็ตาม ในกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* นิยมใช้กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ที่มีการเติมสับสเทรตเข้าไปในถังหมักในระหว่างการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจทำให้เกิดการสะสมเอทานอลสูงขึ้นจนเกิดผลเสียต่อระบบได้

4.3.2 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการเติบโตและอัตราการเติบโตของเซลล์

จากผลการทดลองที่แสดงในภาพที่ 4-1 ถึง 4-5 เมื่อนำผลของความเข้มข้นของเซลล์จากการทดลองที่แต่ละความเข้มข้นของกลูโคสมาทำการเปรียบเทียบบนกราฟเดียวกันจะได้ผลดังภาพที่ 4-6 ซึ่งพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้นจะทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยาวนานขึ้น โดยความเข้มข้นของเซลล์สูงสุดจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นในอาหาร GluBS

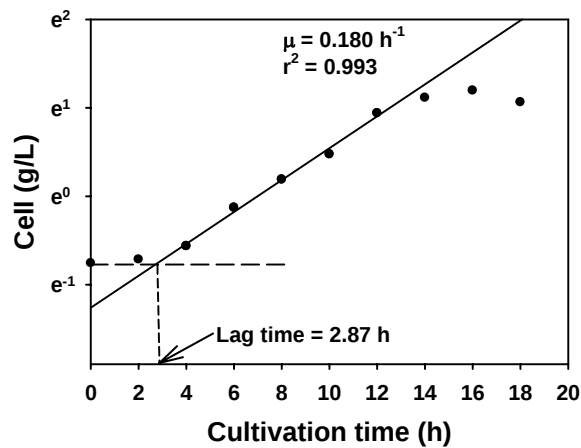


ภาพที่ 4-6 การเติบโตของ *P. pastoris* ในอาหาร GluBS ที่ความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้น 5 10 20 40 และ 80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก

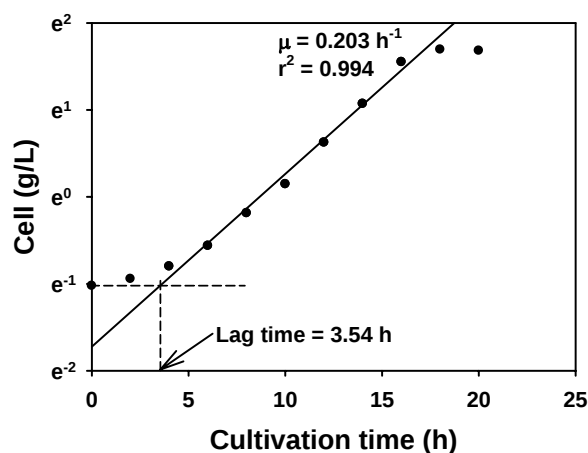
เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากภาพที่ 4-6 มาประมาณค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและระยะเวลาในช่วงการปรับตัวของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 10 20 40 และ 80 กรัมต่อลิตร ได้ผลดังภาพที่ 4-7 ถึง 4-11 ตามลำดับ จากนั้นเมื่อนำค่าอัตราการเติบโตจำเพาะที่แต่ละความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสมาแสดงในรูปอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) (ภาพที่ 4-12) พบว่าค่าอัตราการเติบโตจำเพาะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นจนถึงค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นของกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสต่อไปอีกจะส่งผลให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะลดลงอย่างช้าๆ

เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อระยะเวลาในช่วงการปรับตัวที่แต่ละความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคสแสดงดังภาพที่ 4-13 โดยพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในช่วงปรับตัวมี

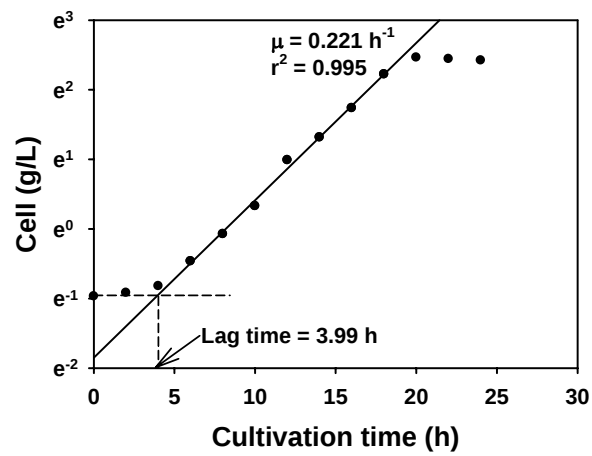
แนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Nishino et al., (1985) ที่ศึกษาเกี่ยวกับผลของความดันออสโมติกต่ออัตราการเติบโตและกิจกรรมการหมักของไวน์ยีสต์ ซึ่งพบว่าความดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในช่วงปรับตัวสูงขึ้น และความทนต่อเอทานอลลดลง



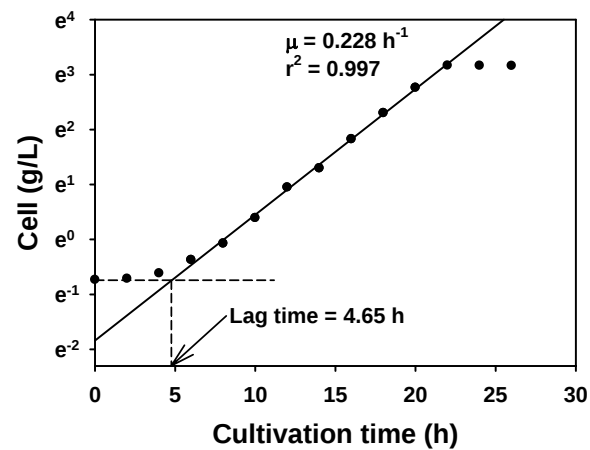
ภาพที่ 4-7 การประมาณค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและระยะเวลาในช่วงการปรับตัวของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก



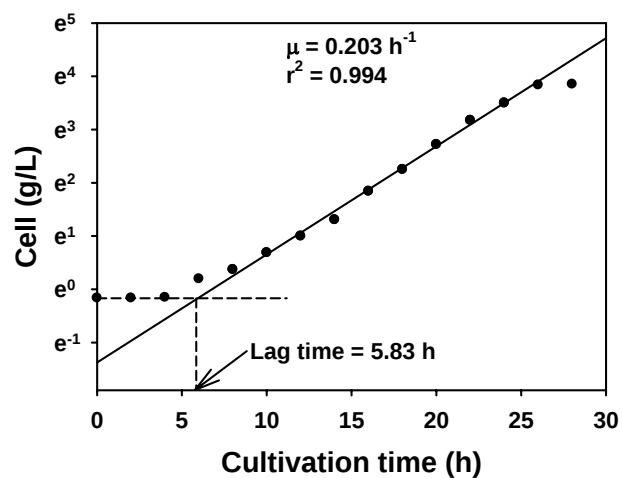
ภาพที่ 4-8 การประมาณค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและระยะเวลาในช่วงการปรับตัวของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 10 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก



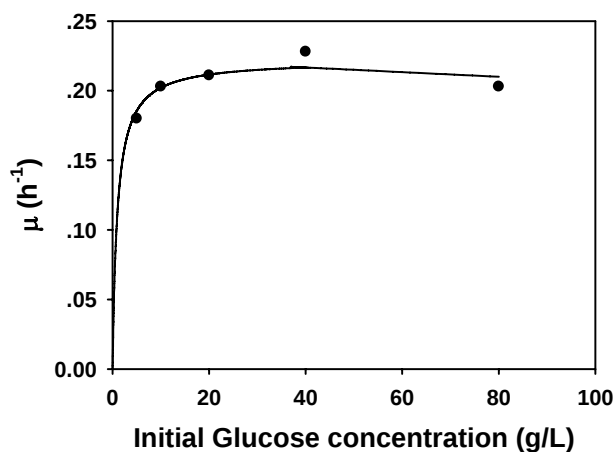
ภาพที่ 4-9 การประมาณค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและระยะเวลาในช่วงการปรับตัวของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก



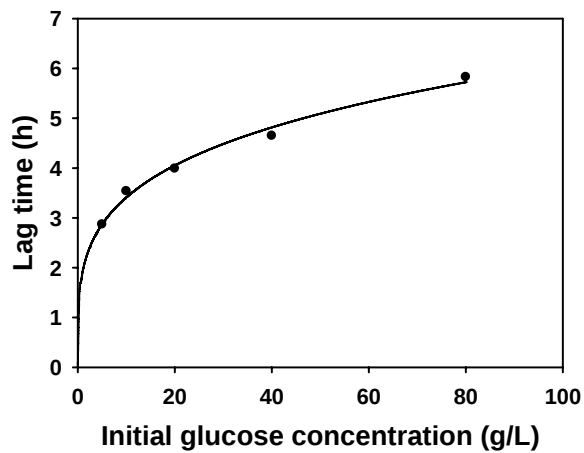
ภาพที่ 4-10 การประมาณค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและระยะเวลาในช่วงการปรับตัวของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 40 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก



ภาพที่ 4-11 การประมาณค่าอัตราการเติบโตจำเพาะและระยะเวลาในช่วงการปรับตัวของยีสต์ *P. pastoris* ในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก

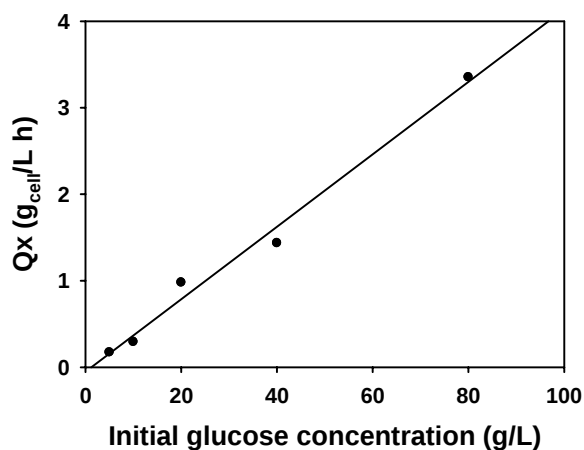


ภาพที่ 4-12 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการเติบโตจำเพาะ (μ) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก

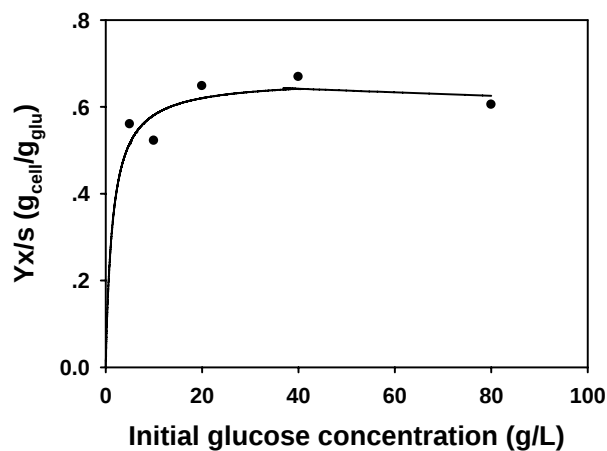


ภาพที่ 4-13 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อระยะเวลาในช่วงการปรับตัว (t_L) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก

สำหรับค่าอัตราการเติบโต (Q_x) สามารถคำนวณได้โดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากภาพที่ 4-6 เช่นเดียวกัน โดยความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเติบโตกับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นแสดงดังภาพที่ 4-14 ทั้งนี้ พบว่าค่าอัตราการเติบโตจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสในรูปความสัมพันธ์แบบเส้นตรง ซึ่งต่างจากความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเติบโตจำเพาะกับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นซึ่งอยู่ในรูปเส้นโค้ง (ภาพที่ 4-12)



ภาพที่ 4-14 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการเติบโต (Q_x) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก



ภาพที่ 4-15 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อผลได้ของเซลล์จากสับสเตรต (Yx/s) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก

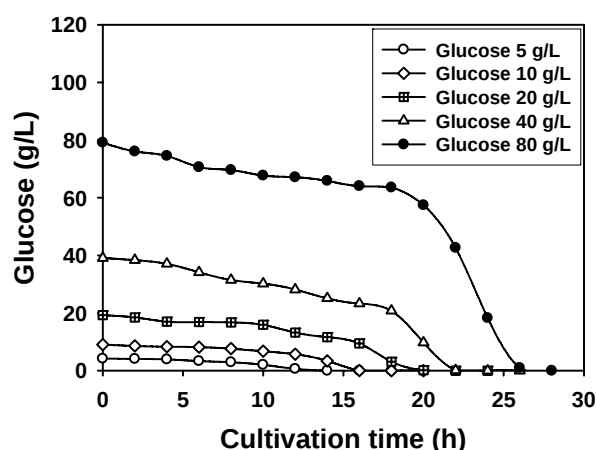
จากการทดลองเมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเตรต (ภาพที่ 4-15) พบว่าค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเตรตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นจนถึงค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นของกลูโคส 20-40 กรัมต่อลิตร ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสมากขึ้นอีก จะส่งผลให้ค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเตรตลดลงอย่างช้าๆ ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากกลูโคสที่ความเข้มข้นสูงทำให้เกิดการกีดกันวิถีการหายใจ หรืออัตราการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์มากกว่าความจุของวิถีการหายใจของยีสต์ ดังนั้น กลูโคสบางส่วนจึงถูกใช้ในวิถีการหมัก อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของกลูโคสในช่วง 5-80 กรัมต่อลิตร ที่ทำการศึกษา พบว่าค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเตรตมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในช่วง 0.50-0.67 กรัม_{เซลล์}/กรัม_{สับสเตรต} ทั้งนี้ อาจเนื่องมาจากกลูโคสเกือบทั้งหมดถูกใช้ผ่านวิถีการหายใจอย่างสมบูรณ์ ซึ่งมีเฉพาะการทดลองที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 40 และ 80 กรัมต่อลิตร ที่มีการใช้กลูโคสผ่านวิถีการหมัก ทำให้ได้ by-product ในรูปเอทานอล อย่างไรก็ตาม เอทานอลที่ตรวจพบถือว่ามีความน้อยมาก ดังนั้น จึงส่งผลกระทบต่อผลได้ของเซลล์ต่อสับสเตรตน้อยมากเช่นกัน

สำหรับกระบวนการเพาะเลี้ยง *S. cerevisiae* แบบแบตช์ ในระบบที่มีความเข้มข้นของสับสเตรตสูงภายใต้สภาวะที่ไม่จำกัดออกซิเจน ในระยะเอ็กโพเนนเชียลยีสต์จะมีการเติบโตอย่างรวดเร็วและมีการสร้าง by-product ในรูปเอทานอล ส่งผลให้ผลได้ของเซลล์จากสับสเตรตลดลง (0.15 กรัมต่อกรัม) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสับสเตรตส่วนใหญ่ถูกใช้ในวิถีการหมัก หลังจากนั้นเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสลดลงจนเหลือต่ำกว่า 50-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ยีสต์จะมีการปรับตัวเข้าสู่

ระยะ lag อีกครั้ง เพื่อให้เอทานอลเป็นสับสเตรตแหล่งที่สอง ซึ่งรูปแบบการเติบโตที่มีระยะ lag อยู่ระหว่างระยะเอ็กโพเนนเชียลนี้เรียกว่า Diauxic phenomenon (Lieveense and Lim, 1982) อย่างไรก็ตาม ไม่สามารถตรวจพบปรากฏการณ์ดังกล่าวในงานวิจัยนี้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณเอทานอลที่ผลิตขึ้นมีปริมาณน้อยมาก

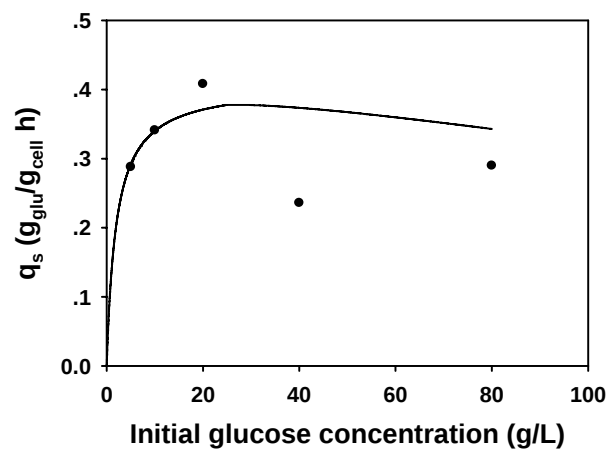
4.3.3 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการใช้กลูโคสและอัตราการใช้กลูโคส

จากผลการทดลองที่แสดงในภาพที่ 4-1 ถึง 4-5 เมื่อนำผลของความเข้มข้นของกลูโคสมาทำการเปรียบเทียบบนกราฟเดียวกันจะได้ผลดังภาพที่ 4-16 ซึ่งพบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้นจะทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยาวนานขึ้น และเมื่อนำข้อมูลที่ได้ มาประมาณค่าอัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะและอัตราการใช้สับสเตรตของยีสต์ *P. pastoris* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 10 20 40 และ 80 กรัมต่อลิตร แล้วนำมาแสดงในรูปอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะ (ภาพที่ 4-17) พบว่าค่าอัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะ (q_s) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นจนถึงค่าสูงสุด หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสต่อไปอีกจะส่งผลให้ค่าอัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะลดลงอย่างช้าๆ ซึ่งคล้ายกับความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเติบโตจำเพาะกับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น ซึ่งที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะมากกว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์

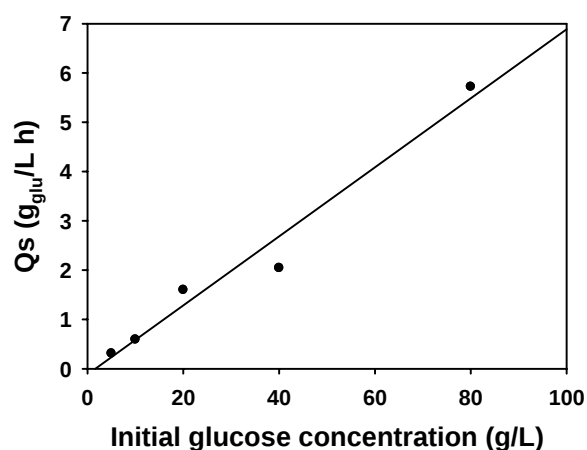


ภาพที่ 4-16 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อการใช้สับสเตรตของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบดชีในถังหมัก

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้สับสเทรตกับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น แสดงดังภาพที่ 4-18 โดยพบว่าค่าอัตราการใช้สับสเทรต (Q_s) จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสในรูปความสัมพันธ์แบบเส้นตรง ซึ่งที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการใช้สับสเทรตจำเพาะมากกว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน่าจะเป็นไปตามจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ของ Michaelis-Menten



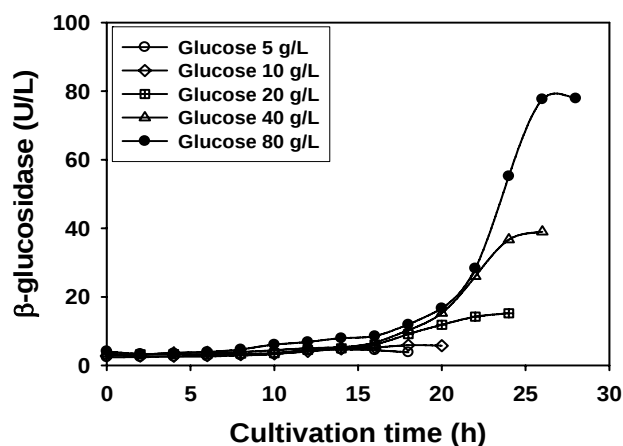
ภาพที่ 4-17 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการใช้สับสเทรตจำเพาะ (q_s) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก



ภาพที่ 4-18 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการใช้สับสเทรต (Q_s) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก

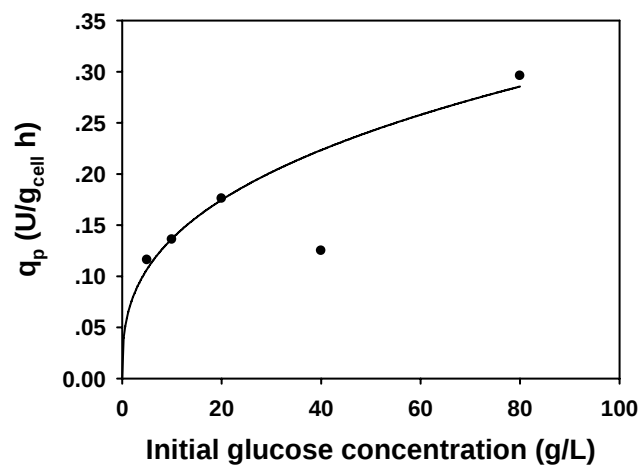
4.3.4 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

เมื่อนำผลของกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจากการทดลองที่แต่ละความเข้มข้นของกลูโคสมาทำการเปรียบเทียบบนกราฟเดียวกันได้ผลดังภาพที่ 4-19 ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของเบต้ากลูโคซิเดสสูงสุดจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นในอาหาร GluBS โดยเมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (ภาพที่ 4-20) พบว่าค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ (q_p) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น โดยอัตราการเพิ่มขึ้นจะมีค่ามากในช่วงแรกและลดลงเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสมีค่าสูงขึ้น ซึ่งที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการใช้สับสเทรตจำเพาะมากกว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 และ 20 กรัมต่อลิตร ประมาณ 60 และ 40 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ

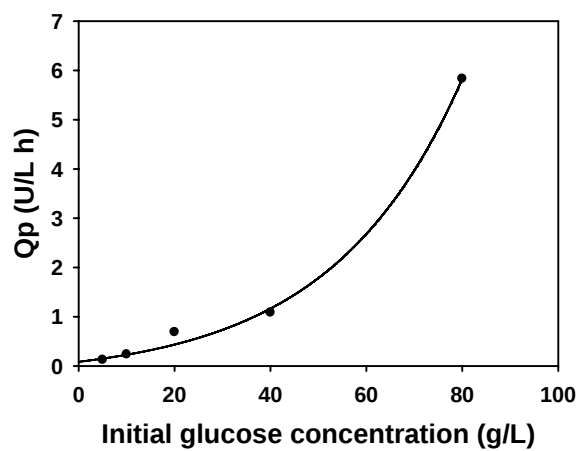


ภาพที่ 4-19 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิตเบต้ากลูโคซิเดสของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก

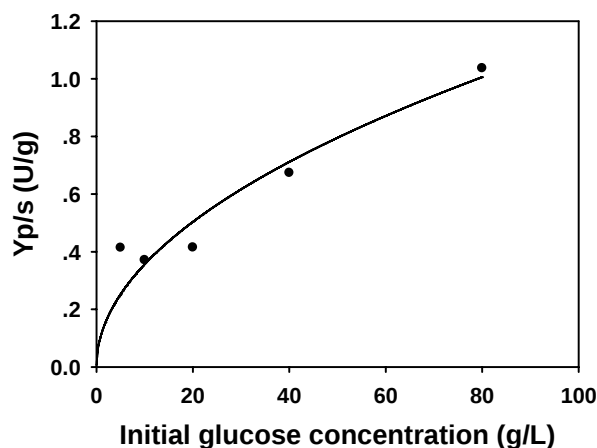
สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์กับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นแสดงดังภาพที่ 4-21 พบว่าค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ (Q_p) จะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเช่นกัน ซึ่งที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการใช้สับสเทรตมากกว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 และ 20 กรัมต่อลิตร ประมาณ 98 และ 88 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ลักษณะของการเพิ่มขึ้นจะต่างจากอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์จำเพาะ กล่าวคือ อัตราการเพิ่มขึ้นจะช้าในช่วงแรกและเร็วขึ้นเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสมีค่าสูงขึ้น



ภาพที่ 4-20 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการสร้างผลผลิตจำเพาะ (q_p) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก



ภาพที่ 4-21 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการสร้างผลผลิต (Q_p) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก



ภาพที่ 4-22 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อผลได้ของเบต้ากลูโคสิดีสจากสับสเตรต (Yp/s) ของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก

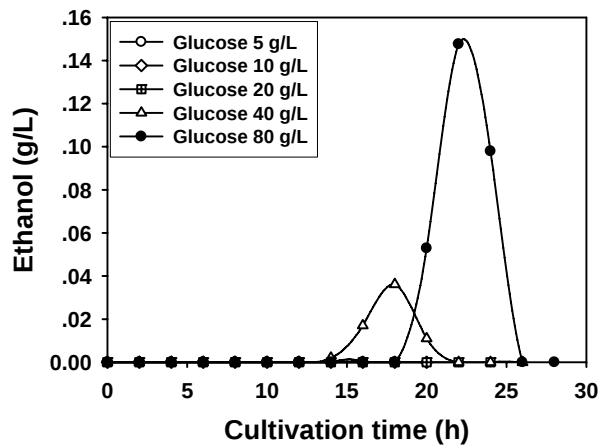
เมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อค่าผลได้ของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิดีสจากสับสเตรต (Yp/s) (ภาพที่ 4-22) พบว่าค่าผลได้ของเบต้ากลูโคสิดีสจากสับสเตรตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น ซึ่งที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร มีค่าผลได้ของเอนไซม์เบต้ากลูโคสิดีสจากสับสเตรต มากกว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 และ 20 กรัมต่อลิตร ประมาณ 9 และ 12 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

4.3.5 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการผลิตเอทานอล

จากการทดลอง เมื่อนำผลของความเข้มข้นของเอทานอลจากการทดลองที่แต่ละความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นมาทำการเปรียบเทียบบนกราฟเดียวกันจะได้ผลดังภาพที่ 4-23 ซึ่งพบว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นมีผลต่อการผลิตเอทานอลน้อยมาก โดยเมื่อทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลในแต่ละการทดลอง พบว่าสามารถตรวจพบเอทานอลได้ในการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 40 และ 80 กรัมต่อลิตร ในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และไม่สามารถตรวจพบเอทานอลในการทดลองที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร ซึ่งผลที่ได้ต่างจากการทดลองในบทที่ 3 ซึ่งทำการทดลองในอาหาร BMGIuY ในฟลask บนเครื่องเขย่าที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ที่สามารถตรวจพบว่ามีเอทานอลเพิ่มขึ้นประมาณ 3 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม ในฟลask เขย่าไม่มีการตรวจวัดค่า DOT ซึ่งโดยปกติอัตราการถ่ายเทออกซิเจนในฟลask เขย่าจะมีค่าต่ำกว่าในถังหมัก และเมื่อพิจารณาถึงค่า DOT จาก

การเพาะเลี้ยงในถังหมัก พบว่าทุกการทดลองให้ค่า DOT สูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่เกิดสภาวะจำกัดออกซิเจน

ตามปกติแล้วยีสต์จะทำการออกซิเดชันสับสเตรตผ่านวิถีการหายใจเพื่อให้ได้พลังงานสูงสุด อย่างไรก็ตาม ในบางครั้งพบว่าสับสเตรตบางส่วนถูกใช้ในการสร้าง by-product โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอทานอลถึงแม้ว่าจะทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะไม่จำกัดออกซิเจนก็ตาม ปรากฏการณ์ดังกล่าวเรียกว่า overflow metabolism หรือ metabolic overflow (Ringbom, *et al.*, 1996) ดังนั้น การเกิดเอทานอลในการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 40 และ 80 กรัมต่อลิตร น่าจะเนื่องมาจากการเกิด overflow metabolism ซึ่งในระบบของยีสต์ overflow metabolism เกิดจาก 2 สาเหตุที่ต่างกันแต่ให้ผลที่เหมือนกัน คือ ทำให้เกิด by-product ในรูปเอทานอล สาเหตุที่ 1 คือ เกิดการกดดันวิถีการหายใจ (respiratory capacity repression) ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับ catabolite repression ซึ่ง Käppeli (1986) อธิบายไว้ว่า ถึงแม้ว่าการเกิดออกซิเดชันอย่างสมบูรณ์จะให้พลังงานมากที่สุด แต่เมื่อวิถีการหายใจถูกกดดันยีสต์จะใช้สับสเตรตผ่านกระบวนการ respiro-fermentative ซึ่งจะทำให้เกิดการสร้าง by-product ในรูปเอทานอล สาเหตุที่ 2 คือ เกิดการจำกัดของความจุของวิถีการหายใจ (respiratory capacity limitation) ซึ่งสามารถอธิบายโดยทฤษฎี kinetic bottleneck ซึ่งเสนอโดย Lidén (1993) ที่เกี่ยวข้องกับการจำกัดของวิถีการหายใจของยีสต์ในสภาวะที่วิถีการหายใจไม่ถูกกดดัน โดยเมื่อฟลักซ์ของสับสเตรตในวิถีไกลโคไลซิสมีค่ามากจะทำให้เกิดการสะสมของไพรูเวทสูงขึ้นจนเกินความสามารถของวิถีการหายใจในการเกิดเมตาบอลิซึมของไพรูเวท ซึ่งในกระบวนการดังกล่าวจะมีการใช้โคเอนไซม์ $\text{NAD}^+ / \text{NADP}^+$ ปริมาณมาก ซึ่งตามปกติเซลล์จะไม่ผลิตโคเอนไซม์ $\text{NAD}^+ / \text{NADP}^+$ เพิ่มขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความต้องการที่สูงขึ้น ดังนั้น เพื่อนำโคเอนไซม์ $\text{NAD}^+ / \text{NADP}^+$ กลับมาใช้และเป็นการลดการสะสมของไพรูเวท เซลล์ยีสต์จึงใช้ไพรูเวทผ่านวิถีการหมักเพื่อให้ได้โคเอนไซม์ $\text{NAD}^+ / \text{NADP}^+$ กลับมาใช้ และได้เอทานอลเป็น by-product



ภาพที่ 4-23 อิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อการผลิต by-product ในรูปเอทานอลของ *P. pastoris* เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในถังหมัก

จากผลการทดลองที่ได้ถึงแม้ว่าจะพบการผลิต by-product ในรูปเอทานอล แต่มีความแตกต่างกันกับระบบของยีสต์ที่เป็น Crabtree positive yeast เช่น *S. cerevisiae* ที่มีการผลิต by-product ในรูปเอทานอลได้ในสถานะที่ไม่จำกัดออกซิเจนเมื่อในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของกลูโคสสูงกว่า 100-200 มิลลิกรัมต่อลิตร (Verduyn *et al.*, 1984; Woehrler and Roehr, 1981) ซึ่งถือว่าน้อยมากเมื่อเทียบกับผลการทดลองที่ได้ในงานวิจัยนี้ซึ่งจะไม่สามารถตรวจพบเอทานอลได้เลยในสถานะที่ไม่จำกัดออกซิเจนที่ความเข้มข้นของกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และตรวจพบได้เพียง 150 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อในอาหารมีกลูโคสเข้มข้น 80 กรัมต่อลิตร ซึ่งจากผลการทดลองที่น่าจะเป็นการยืนยันขั้นต้นได้ว่า *P. pastoris* น่าจะเป็น Crabtree negative yeast เช่นเดียวกับ *Pichia stipitis* ที่มีการยืนยันก่อนหน้านี้ว่าเป็น Crabtree-negative yeast (Weusthuis *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังมีการรายงานไว้ในระบบของ Crabtree-negative yeast จะไม่มีการผลิตเอทานอลภายใต้สถานะที่ไม่จำกัดออกซิเจน และกระบวนการหายใจไม่จำกัดถึงแม้ว่าจะอยู่ในสถานะที่มีความเข้มข้นของสับสเตรตสูงก็ตาม (Alexander and Jeffries, 1990; Fiechter and Seghezzi, 1992) ซึ่งจากผลการทดลองน่าจะสรุปได้ว่า *P. pastoris* เป็น Crabtree-negative yeast

4.4 สรุปผลการทดลอง

จากการทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสต่อการเติบโตและการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter โดยทำการศึกษาในถังหมักขนาด 10 ลิตร ที่ความเข้มข้นของกลูโคสในช่วง 5-80 กรัมต่อลิตร ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 1000 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรต่อนาที และพีเอช 5.0 พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้น จะทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยาวนานขึ้น โดยค่าอัตราการเติบโตจำเพาะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นจนถึงค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นของกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสต่อไปอีกจะส่งผลให้ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะลดลงอย่างช้าๆ

เมื่อพิจารณาผลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อระยะเวลาในช่วงการปรับตัวที่แต่ละความเข้มข้นเริ่มต้นของกลูโคส พบว่าระยะเวลาที่ใช้ในช่วงปรับตัวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการที่เชื้อต้องมีการปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมที่มีค่าแรงดันออสโมติกที่สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Nishino *et al.*, (1985) ที่ศึกษาเกี่ยวกับผลของความดันออสโมติกต่ออัตราการเติบโตและกิจกรรมการหมักของไวน์ยีสต์ ซึ่งพบว่าความดันออสโมติกที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในช่วงปรับตัวสูงขึ้น และความทนต่อเอทานอลน้อยลง

เมื่อทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอลในแต่ละการทดลอง พบว่าสามารถตรวจพบเอทานอลได้ในการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 40 และ 80 กรัมต่อลิตร ในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น และไม่สามารถตรวจพบเอทานอลในการทดลองที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 10 และ 20 กรัมต่อลิตร โดยเมื่อพิจารณาถึงค่า DOT พบว่าทุกการทดลองให้ค่า DOT สูงกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไม่เกิดสภาวะจำกัดออกซิเจน ดังนั้น การเกิดเอทานอลขึ้นในการทดลองที่ใช้ความเข้มข้นของกลูโคส 40 และ 80 กรัมต่อลิตร น่าจะเนื่องมาจากการเกิด overflow metabolism ซึ่งปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับคำจำกัดความของการเกิด overflow metabolism (Enfors and Haggstrom, 2000)

สำหรับอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเตรต พบว่าค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเตรตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นจนถึงค่าสูงสุดที่ความเข้มข้นของกลูโคส 20-40 กรัมต่อลิตร หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสต่อไปอีกจะส่งผลให้ค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเตรต ลดลงอย่างช้าๆ ซึ่งอาจเป็นผลเนื่องจากกลูโคสที่

ความเข้มข้นสูงทำให้เกิดการกีดกันวิถีการหายใจ หรืออัตราการนำกลูโคสเข้าสู่เซลล์มากกว่าความจุของวิถีการหายใจของยีสต์ ดังนั้น กลูโคสบางส่วนจึงถูกใช้ในวิถีการหมัก ทั้งนี้สอดคล้องกับรายงานที่ว่าภายใต้สภาวะที่สารประกอบคาร์บอนมีปริมาณมาก ไพรูเวททั้งหมดจะไม่สามารถเปลี่ยนเป็นอะซีติลโคเอได้ทัน เนื่องจาก NAD^+ จำกัด ทำให้ไพรูเวทส่วนหนึ่งถูกใช้ในการย้อนสังเคราะห์ (regeneration) NAD^+ กลับมาใช้ในเมตาบอลิซึม จึงทำให้เกิดผลิตภัณฑ์รอง ได้แก่ เอทานอล อะซีตัลดีไฮด์ และกรดอะซิติก โดยปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นนี้เป็นส่วนหนึ่งของการเกิด overflow metabolism (Pham *et al.*, 1998) หรือ short-term glucose effect หรือ short-term Crabtree effect (Fiechter และ Seghezzi, 1992; Petrik, *et al.*, 1983; De Deken, 1966) ซึ่งมักจะเกี่ยวข้องร่วมกันกับปริมาณออกซิเจนและความเข้มข้นของกลูโคสสับสเตรต อย่างไรก็ตาม ที่ความเข้มข้นของกลูโคสในช่วงที่ทำการศึกษา (5-80 กรัมต่อลิตร) พบว่าค่าผลได้ของเซลล์จากสับสเตรตมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากในช่วง 0.50-0.67 กรัม_{เซลล์}/กรัม_{สับสเตรต} ซึ่งอาจเนื่องมาจากกลูโคสเกือบทั้งหมดถูกใช้ผ่านวิถีการหายใจอย่างสมบูรณ์ เมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อค่าผลได้ของเบต้ากลูโคสิเดสจากสับสเตรต พบว่าค่าผลได้ของเบต้ากลูโคสิเดสจากสับสเตรตมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น

เมื่อศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการใช้กลูโคสและอัตราการใช้กลูโคส พบว่าเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้นจะทำให้ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงยาวนานขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานที่ว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงยีสต์ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นของกลูโคสสูง (100-200 มก./ล.) (Verduyn *et al.*, 1984; Woehrer and Roehr, 1981) มีผลยับยั้งการเติบโต และทำให้ผลผลิตหลักของเซลล์ที่ได้จากสับสเตรตลดลง (Kalina, 1993) ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับรูปแบบอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ออัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะ ทั้งนี้ พบว่าค่าอัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะ มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นจนถึงค่าสูงสุด หลังจากนั้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสต่อไปอีกจะส่งผลให้ค่าอัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะลดลงอย่างช้าๆ ซึ่งคล้ายกับความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเติบโตจำเพาะกับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น ซึ่งที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะมากกว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร ประมาณ 30 เปอร์เซ็นต์ แต่ต่างจากความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการใช้สับสเตรต (Q_s) กับความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น โดยพบค่าอัตราการใช้สับสเตรตจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของกลูโคสในรูปแบบความสัมพันธ์แบบเส้นตรง ซึ่งที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 80 กรัมต่อลิตร มีค่าอัตราการใช้สับสเตรตจำเพาะ

มากกว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 5 กรัมต่อลิตร ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งน่าจะเป็นไปตามจลนพลศาสตร์ของเอนไซม์ของ Michaelis-Menten

จากผลการทดลองในส่วนนี้ ทำให้สามารถสรุปได้ว่าความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นสูงขึ้น จะส่งผลให้อัตราการเติบโต และอัตราการสร้างเบต้ากลูโคสิดสูงขึ้น แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสต่อไปอีก จะส่งผลให้อัตราการเติบโตจำเพาะ และผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตลดลง ซึ่งความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นที่เหมาะสมที่สุด คือ 20 กรัมต่อลิตร เนื่องจากมีระยะเวลาปรับตัวที่สั้น และอัตราการเติบโตสูง อีกทั้งตลอดระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงไม่สามารถตรวจพบเอทานอล

บทที่ 5

การพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุม
การแสดงออกของ GAP promoter โดยการควบคุมการเกิด by-product ในรูปเอทานอล

5.1 วัตถุประสงค์

เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน (เบต้ากลูโคซิเดส) โดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter โดยการควบคุมการเกิด overflow metabolism ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์

5.2 วิธีวิจัย

1. สายพันธุ์จุลินทรีย์

สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ *P. pastoris* สายพันธุ์ Y-11430 ที่มียีนเบต้ากลูโคซิเดสจากต้นพยูง (*Dalbergia cochichinensis* Pierre) ซึ่งได้จากการเตรียมสายพันธุ์จุลินทรีย์ในบทที่ 2

2. การเตรียมกล้าเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงในถังหมัก

การเตรียมกล้าเชื้อแบ่งเป็นสองขั้นตอน ดังที่ได้กล่าวแล้วในวิธีวิจัยของบทที่ 4

3. การเตรียมถังหมัก

1) เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Glu-BS (กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร) ปริมาตร 1.5 ลิตร เติมน้ำในถังหมักขนาด 5 ลิตร (Biostat B DCU, B. Braun Biotech International) ตรวจสอบความเรียบร้อยของอิเล็กทรอนิกส์ต่างๆ (พีเอช DOT และระดับของฟอง) ว่าอยู่ในตำแหน่งที่ถูกต้องก่อนนำไปทำให้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (จะต้องเทียบค่าอิเล็กทรอนิกส์ต่างๆ ก่อนประกอบเข้ากับถังหมัก)

2) หลังจากทำให้ปลอดเชื้อและถังหมักเย็นลงแล้ว นำถังหมักมาต่อเข้ากับระบบควบคุมเปิดสวิตช์ให้ระบบน้ำและไฟทำงาน ทำการตั้งค่าสภาวะควบคุมต่างๆ คือ อัตราการกวน อัตราการให้อากาศ อุณหภูมิ พีเอช และตรวจสอบการทำงานของอิเล็กทรอนิกส์สำหรับวัดค่าพีเอช และ DOT

4. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้าง by-product ในรูปเอทานอลระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์

กระบวนการเพาะเลี้ยงในการทดลองนี้แบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (ใช้เวลา 13 -19 ชั่วโมง) และช่วงการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ (ใช้เวลา 18 - 24 ชั่วโมง) ซึ่งจะดำเนินการต่อจากการเลี้ยงแบบแบตช์ ดังนี้

1) การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์

ทำการควบคุมสภาวะต่างๆ ให้เท่ากับสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง ดังนี้

อุณหภูมิ	30	องศาเซลเซียส
อัตราการกวน	1000	รอบต่อนาที
อัตราการให้อากาศ	1	ลิตรต่อลิตรต่อนาที
พีเอช	5	

ซึ่งระบบควบคุมของถังหมักรุ่นนี้เป็นระบบควบคุมอัตโนมัติ โดยใช้สารละลายแอมโมเนีย 25 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวในการควบคุมพีเอชและเป็นแหล่งไนโตรเจน

ถ่ายกลัเชื้อจากฟลาสก์ทั้งหมด 100 มิลลิลิตร ลงในถังหมัก ทำการเก็บตัวอย่าง 20 มิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นตัวอย่างเริ่มต้นหลังจากเติมกลัเชื้อลงในถังหมักแล้วประมาณ 5 นาที เพื่อให้เกิดการผสมกันอย่างทั่วถึง โดยทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 2-4 ชั่วโมง จนเริ่มกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ นำตัวอย่างส่วนหนึ่งมาวัดค่าความขุ่นที่ 600 นาโนเมตร ทันที และนำตัวอย่าง 5 มิลลิลิตร เติมนลงในหลอดที่เตรียมไว้สำหรับวิเคราะห์น้ำนักเซลล์แห้ง นำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อหาน้ำนักเซลล์แห้ง (ทำ 2 ซ้ำ) โดยส่วนไลต์ที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงจะใช้สำหรับหาความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส ความเข้มข้นเอทานอล และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส (วิธีการวิเคราะห์ได้กล่าวแล้วในวิธีวิจัยของบทที่ 3)

2) การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์

เริ่มทำการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์โดยเติมอาหาร Glu-BS ที่มีกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร (ปริมาตรที่เติมทั้งหมดประมาณ 2 ลิตร) ด้วยอัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล โดยอาศัยค่าอัตราการเติบโตจำเพาะที่ได้จากกระบวนการหมักแบบแบตช์ในการคำนวณอัตราการเติม เก็บตัวอย่างปริมาตรประมาณ 20 มิลลิลิตร ทุก 2-4 ชั่วโมง เพื่อวัดค่าความขุ่น น้ำนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของกลูโคส โปรตีนทั้งหมด และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส ทำการเพาะเลี้ยงจนปริมาตรของน้ำหมักเท่ากับ 3.5 ลิตร จึงยุติกระบวนการเพาะเลี้ยง

ดังที่ได้กล่าวไปแล้วในบทที่ 1 ว่าการสร้าง by-product ในรูปเอทานอลของยีสต์ในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยง มีความสัมพันธ์กับ 2 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของสับสเตรต (กลูโคส) และปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำหมัก ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ออกแบบการเพาะเลี้ยงเป็น 4 ระบบควบคุม (ตารางที่ 5-1) เพื่อหาว่าระบบควบคุมแบบใดมีความเหมาะสมต่อการควบคุมการเกิด by-product ในรูปเอทานอลระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ในกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter

รายละเอียดของแต่ละระบบควบคุมในการควบคุมความเข้มข้นของสับสเตรต (กลูโคส) และปริมาณออกซิเจนละลาย ในระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์

- การควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสให้อยู่ในสภาวะจำกัด ทำได้โดยเริ่มเติมอาหาร GluBS ที่มีกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร แบบเอ็กโพเนนเชียล ($\mu_{set} = 0.2$ ต่อชั่วโมง) ทันทีเมื่อสิ้นสุดกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (กลูโคสในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ถูกใช้จนหมด)

- การควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสให้อยู่ในสภาวะไม่จำกัด ทำได้โดยเติมอาหาร GluBS ที่มีกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร แบบเอ็กโพเนนเชียล ($\mu_{set} = 0.2$ ต่อชั่วโมง) โดยเริ่มการเติมอาหารเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์เหลือประมาณ 10 กรัมต่อลิตร

- การควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายให้อยู่ในสภาวะจำกัด ($DOT = 0.1-0.3\%$) สามารถดำเนินการโดยใช้สภาวะควบคุมเช่นเดียวกับการหมักแบบแบตช์ โดยไม่มีการผสมก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ในอากาศเติมในถังหมัก

- การควบคุมปริมาณออกซิเจนละลายไม่จำกัด ให้ดำเนินการโดยควบคุมค่า DOT ให้สูงกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ มีการผสมก๊าซออกซิเจนบริสุทธิ์ในอากาศใช้เติมลงไปในถังหมัก

ตารางที่ 5-1 ระบบควบคุมในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ เพื่อศึกษาการเกิด by-product ในรูปเอทานอล

ระบบควบคุมแบบที่	สับสเตรต (กลูโคส)	ออกซิเจน
1	จำกัด	จำกัด ($DOT \approx 0\%$)
2	จำกัด	ไม่จำกัด ($DOT > 25\%$)
3	ไม่จำกัด ([กลูโคส] ≈ 10 กรัมต่อลิตร)	จำกัด ($DOT \approx 0\%$)
4	ไม่จำกัด ([กลูโคส] ≈ 10 กรัมต่อลิตร)	ไม่จำกัด ($DOT > 25\%$)

5.3 ผลการทดลองและวิจารณ์

จากผลการทดลองในการทดลองก่อนหน้า (บทที่ 3 และบทที่ 4) รวมถึงเอกสารอ้างอิงที่เกี่ยวข้องแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสับสเตรต (กลูโคส) เป็นปัญหาหลักที่ทำให้เกิดการสร้าง by-product ในรูปเอทานอลสำหรับกระบวนการผลิตยีสต์ขนมปัง แต่ไม่ใช่ปัญหาของระบบการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* อย่างไรก็ตาม ในระบบการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* นิยมใช้ระบบการเพาะเลี้ยงภายใต้สภาวะที่มีความหนาแน่นของเซลล์สูง ปัญหาหลักที่พบในระบบนี้จึงเป็นปัญหาการจำกัดออกซิเจน ซึ่งค่าออกซิเจนละลายเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเกิด by-product ในรูปเอทานอลในยีสต์ ทั้งนี้ ในระบบการเพาะเลี้ยงที่มีการให้อากาศออกซิเจนถือเป็นสับสเตรตชนิด

หนึ่งที่มีผลต่ออัตราการผลิตมวลชีวภาพ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงสับสเตรตชนิดอื่น เช่น กลูโคส และ แอมโมเนีย ตามปกติจะมีความเข้มข้นสูงและมีปัญหาเรื่องการถ่ายเทมวลสารน้อยมาก ในทางตรงข้ามออกซิเจนที่ละลายในน้ำบริสุทธิ์ที่ 25 องศาเซลเซียส มีค่าน้อยมาก (0.244 มิลลิโมลต่อลิตร) รวมถึงการให้และการถ่ายเทออกซิเจนยังเป็นปัจจัยจำกัดสำหรับถังหมักอีกด้วย (Zhang *et al.*, 2005)

กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์สามารถใช้ในการแก้ปัญหาสับสเตรตความเข้มข้นสูง และ / หรือ สภาวะจำกัดออกซิเจน ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิด by-product ในรูปเอทานอล โดยการควบคุมอัตราการเติมสับสเตรตให้ความเข้มข้นของสับสเตรตอยู่ในระดับที่เหมาะสม ซึ่งเป้าหมายหลัก คือ ทำให้ได้อัตราการเจริญเติบโตและผลได้ของเซลล์สูงสุด ระบบการเพาะเลี้ยงแบบเฟดแบตช์โดยทั่วไป เริ่มต้นจากการเพาะเลี้ยงที่อัตราการเติบโตจำเพาะสูงที่สุดที่จะไม่ทำให้เกิด respiro-fermentative หลังจากนั้น จึงลดค่าอัตราการเติบโตจำเพาะลงเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาการถ่ายเทออกซิเจนจำกัด และ/หรือ ความสามารถในการถ่ายเทความร้อนของระบบ (Kristiansen, 1994; Trivedi *et al.*, 1986) ตามปกติ การเติมสารอาหารในกระบวนการแบบเฟด-แบตช์จะเริ่มโดยใช้อัตราการเติมแบบเอ็กโปเนนเชียล ตามด้วยอัตราการเติมคงที่ และลดอัตราการเติมลงในที่สุด (Enfors *et al.*, 1990) ซึ่งแนวทางในการดำเนินการเพาะเลี้ยงที่กล่าวมาแล้วนั้นต่างมีวัตถุประสงค์เพื่อทำให้กระบวนการเพาะเลี้ยงเป็นกระบวนการที่ใช้สับสเตรตผ่านวิธีการหายใจอย่างสมบูรณ์ (Postma *et al.*, 1989; Von Meyenburg, 1969; Weusthuis *et al.*, 1994) ซึ่งไม่สามารถดำเนินการได้ในการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ เนื่องจากต้องใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นสูงเพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์สุดท้ายตามที่ต้องการ ดังนั้น จึงทำให้เกิดการหมักเอทานอล ถึงแม้ว่าจะทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ไม่จำกัดออกซิเจนก็ตาม (De Deken, 1966; Petrik *et al.*, 1983; Von Meyenburg, 1969) ดังนั้น ในงานวิจัยส่วนนี้ นี้จึงมุ่งเน้นการศึกษาอิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจน

5.1 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์

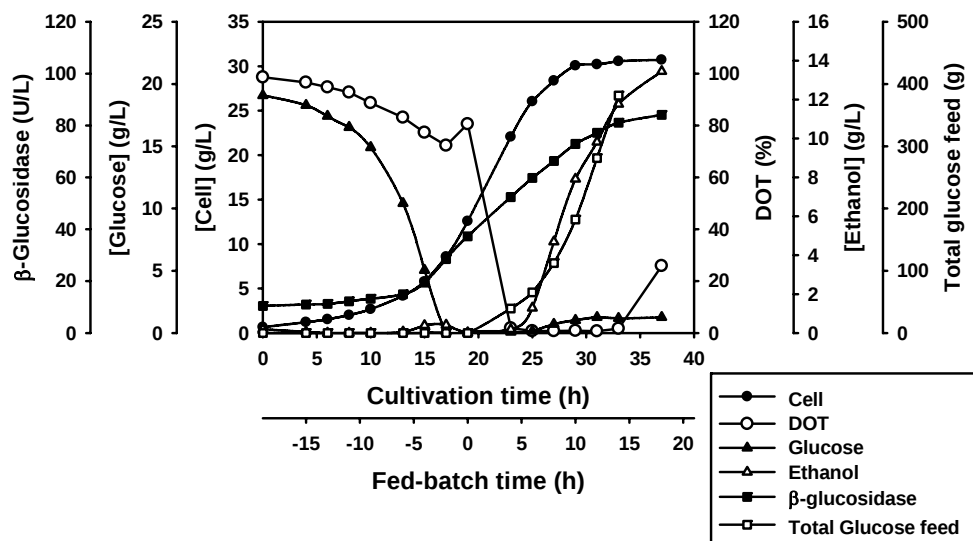
กระบวนการเพาะเลี้ยงในงานวิจัยส่วนนี้แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ การเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ และการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ โดยมีรายละเอียด ดังนี้

กระบวนการหมักจะเริ่มจากกระบวนการแบบแบตช์โดยอาศัยผลจากการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่อการเติบโตและการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

โดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ในการทดลองตอนที่ 2 ซึ่งพบว่าที่ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ให้ค่า $\mu = 0.221$ ต่อชั่วโมง และระยะเวลาในช่วงปรับตัว (lag time) 3.99 ชั่วโมง โดยพบการสร้าง by-product ในรูปเอทานอลน้อยมาก ทั้งนี้ เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสสูงขึ้น ค่า μ มีแนวโน้มลดลง ระยะเวลาในช่วงปรับตัวยาวนานขึ้น และตรวจพบเอทานอลที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ในขณะที่เมื่อใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นต่ำกว่า 20 กรัมต่อลิตร จะให้ค่า μ ต่ำกว่า ถึงแม้ว่าช่วงเวลาในระหว่างปรับตัวจะสั้นกว่าก็ตาม ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของกลูโคสเริ่มต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์เท่ากับ 20 กรัมต่อลิตร

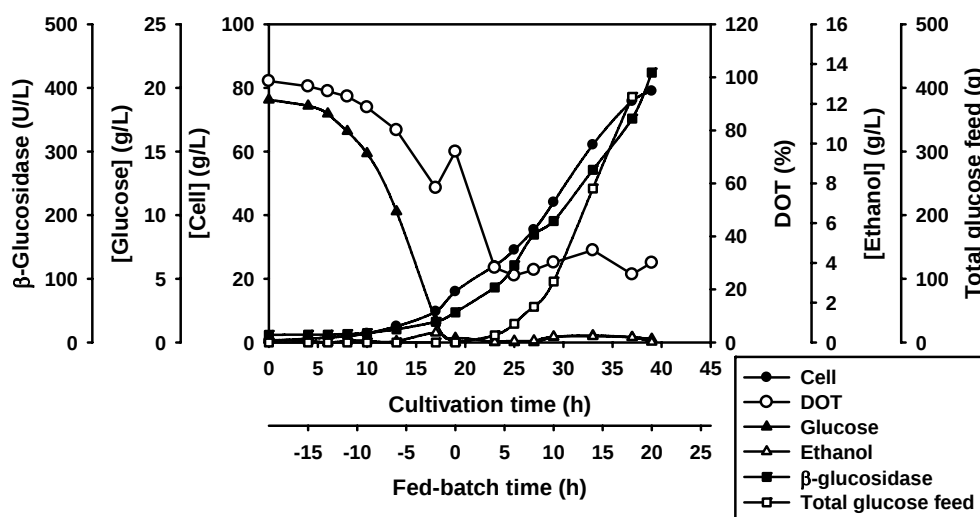
กระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์จะดำเนินการต่อจากการหมักแบบแบตช์โดยมีการเติมอาหาร GluBS ที่มีความเข้มข้นกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร แบบเอ็กโพเนนเชียล ($\mu_{\text{set}} = 0.2$ ต่อชั่วโมง) ภายใต้สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 700 รอบต่อนาที อัตราการให้อากาศ 1 ลิตรต่อลิตรต่อนาที และพีเอช 5 โดยควบคุมกระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์ใน 4 รูปแบบ ดังตารางที่ 5-2 เพื่อศึกษาอิทธิพลของกลูโคสและออกซิเจนต่อการเกิด by-product ในรูปเอทานอล ในระหว่างกระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์ ซึ่งแต่ละระบบออกแบบโดยอาศัยข้อมูลที่ได้จากการทดลองก่อนหน้า (บทที่ 3 และบทที่ 4) รวมถึงข้อมูลจากเอกสารอ้างอิงต่างๆ ซึ่งพบว่าการเกิด by-product ในรูปเอทานอลระหว่างที่มีการเพาะเลี้ยงยีสต์ในสภาวะที่มีการให้อากาศเนื่องมาจาก 2 ปรากฏการณ์สำคัญ คือ 1. การเกิด overflow metabolism ในสภาวะที่ออกซิเจนไม่จำกัด เมื่อความเข้มข้นของสับสเตรตสูงกว่าความเข้มข้นวิกฤติ ซึ่งได้พิสูจน์แล้วในบทที่ 4 และ 2. การเกิดสภาวะจำกัดออกซิเจน ซึ่งจะทำให้ยีสต์มีการใช้สับสเตรตผ่านวิถีเมตาบอลิซึม 2 วิธี ในเวลาเดียวกัน คือ วิถีการหายใจโดยใช้ออกซิเจน (aerobic respiration) และวิถีการหมัก ซึ่งการเกิดเอทานอลในกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีน จะทำให้อัตราการเติบโตและการสร้างผลผลิตลดลง ดังที่ได้พิสูจน์แล้วในบทที่ 3 ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงได้ออกแบบการเพาะเลี้ยงเป็น 4 ระบบควบคุม (ตารางที่ 5-1) ที่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสับสเตรตและค่าออกซิเจนละลายซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการเกิด by-product ในรูปเอทานอล เพื่อหาว่าระบบควบคุมแบบใดมีความเหมาะสมต่อการควบคุมการเกิด by-product ในรูปเอทานอลระหว่างการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ในกระบวนการผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter

ระบบควบคุมแบบที่ 1: (GLOL; กลูโคสจำกัดและออกซิเจนจำกัด) ในระยะเฟด-แบตช์มี การควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสอยู่ในสภาวะจำกัด โดยเริ่มกระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักแบบแบตช์ (กลูโคสถูกใช้จนหมด) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 19 ชั่วโมง โดย เติมอาหาร GluBS ที่มีกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร (ปริมาตรที่เติมทั้งหมดประมาณ 2 ลิตร) โดยใช้ อัตราการเติมแบบเอกซ์โพเนนเชียล ($\mu_{set} = 0.2$ ต่อชั่วโมง) โดยไม่มีการควบคุมค่าออกซิเจน ละลาย (ภาพที่ 5-1) ดังนั้น เมื่อความหนาแน่นของเซลล์สูงขึ้น ค่าความต้องการออกซิเจนจึงมีค่า สูงกว่าค่าการถ่ายเทออกซิเจนทำให้ค่า DOT ลดลงจนเป็นศูนย์ ซึ่งพบว่าความหนาแน่นของเซลล์ และกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดส สูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก ความเข้มข้น ของกลูโคสจะต่ำมากตลอดเวลาในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ และค่า DOT จะค่อยๆ ลดลง จนเท่ากับศูนย์จนสิ้นสุดกระบวนการหมัก สำหรับเอทานอลตรวจพบในปริมาณที่มาก โดยมี ค่าประมาณ 13.45 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ ความเข้มข้นของเอทานอลที่ตรวจพบมีค่าสูงจนอยู่ในระดับที่ ทำให้เกิดการยับยั้งการเติบโตและการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดส (ผลจาก งานวิจัยในบทที่ 3)



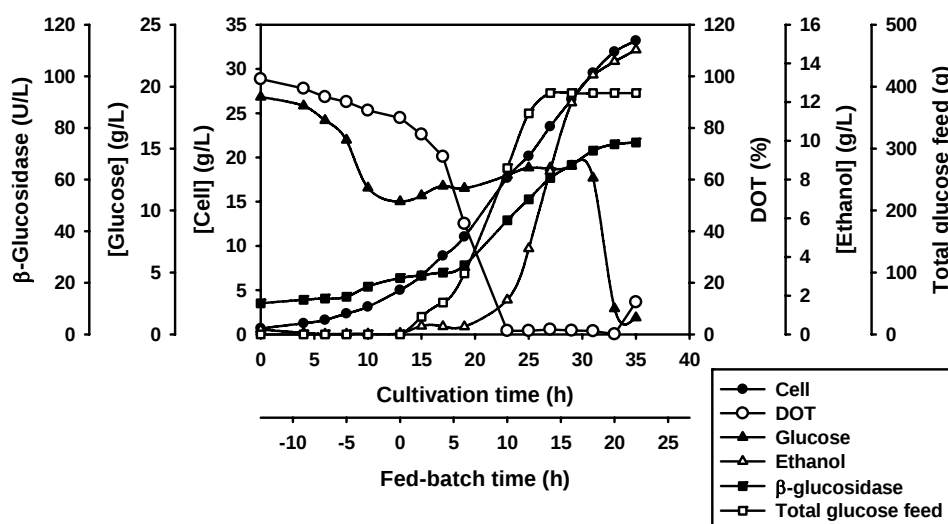
ภาพที่ 5-1 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ใน กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (ชั่วโมงที่ 0–19) และกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบ เฟด-แบตช์ (ชั่วโมงที่ 19–37) เมื่อทำการควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ภายใต้สภาวะจำกัดกลูโคสและออกซิเจน (ระบบควบคุมแบบที่ 1)

ระบบควบคุมแบบที่ 2: (GLON; กลูโคสจำกัด แต่ไม่จำกัดออกซิเจน) ในระยะเฟด-แบตช์ มีการควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสอยู่ในสภาวะจำกัด โดยเริ่มกระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์ เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักแบบแบตช์ (กลูโคสถูกใช้จนหมด) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 19 ชั่วโมง โดยเติมอาหาร GluBS ที่มีกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร (ปริมาตรที่เติมทั้งหมดประมาณ 2 ลิตร) โดยใช้ อัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ($\mu_{set} = 0.2$ ต่อชั่วโมง) และมีการควบคุมค่าออกซิเจนละลาย ไม่ให้ต่ำกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ โดยเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนในอากาศที่เติมเข้าไปในถังหมัก (ภาพที่ 5-2) ซึ่งพบว่าความหนาแน่นของเซลล์ กิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดส โปรตีน ทั้งหมด สูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก ความเข้มข้นของกลูโคสจะต่ำมากตลอดเวลาในช่วง การเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ และสามารถควบคุมค่า DOT ให้มีค่ามากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์จน สิ้นสุดกระบวนการหมัก สำหรับเอทานอลตรวจพบในปริมาณที่น้อยมาก โดยค่าสูงสุดที่ตรวจพบมี ค่าประมาณ 0.30 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ ความเข้มข้นของเอทานอลที่ตรวจพบมีค่าต่ำมากจนอยู่ใน ระดับที่ไม่ทำให้เกิดการยับยั้งการเติบโตและแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดส (ผล จากงานวิจัยในบทที่ 3)



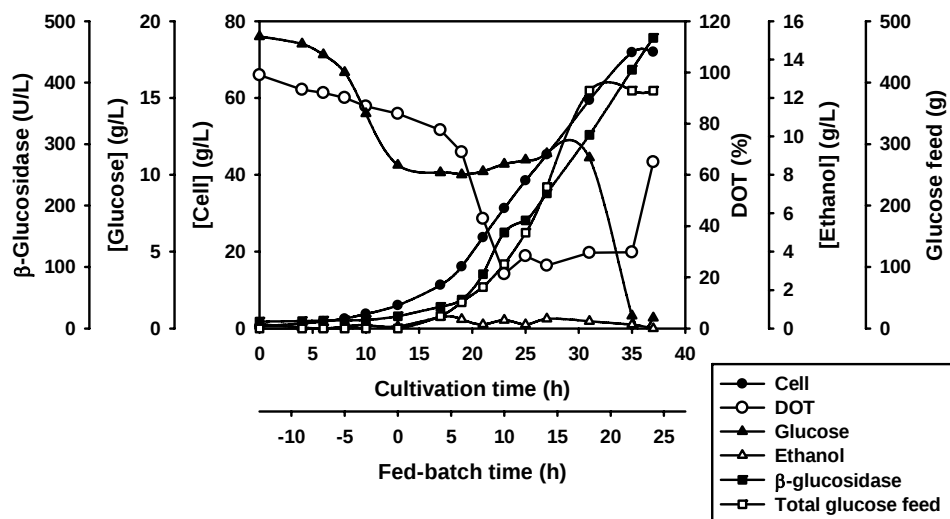
ภาพที่ 5-2 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ใน กระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (ชั่วโมงที่ 0-19) และกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบ เฟด-แบตช์ (ชั่วโมงที่ 19-39) เมื่อทำการควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ภายใต้สภาวะจำกัดกลูโคส แต่ไม่จำกัดออกซิเจน ($DOT > 25$ เปอร์เซ็นต์) (ระบบควบคุมแบบที่ 2)

ระบบควบคุมแบบที่ 3: (GNOL; กลูโคสไม่จำกัด แต่ออกซิเจนจำกัด) ในระยะเฟด-แบตช์ มีการควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสประมาณ 10 กรัมต่อลิตร โดยเริ่มกระบวนการหมักแบบเฟด-แบตช์เมื่อความเข้มข้นของกลูโคสจากกระบวนการหมักแบบแบตช์เหลือประมาณ 10 กรัมต่อลิตร (ชั่วโมงที่ 13 ของการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์) โดยเติมอาหาร GluBS ที่มีกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร (ปริมาตรที่เติมทั้งหมดประมาณ 2 ลิตร) โดยใช้อัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ($\mu_{set} = 0.2$ ต่อ ชั่วโมง) โดยไม่มีการควบคุมค่าออกซิเจนละลาย ดังนั้น เมื่อความหนาแน่นของเซลล์สูงขึ้น ค่าความต้องการออกซิเจนจึงมีค่าสูงกว่าค่าการถ่ายเทออกซิเจนทำให้ค่า DOT ลดลงจนเป็นศูนย์ (ภาพที่ 5-3) ซึ่งพบว่าความหนาแน่นของเซลล์ และกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดส สูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก ความเข้มข้นของกลูโคสสามารถควบคุมให้มีค่าประมาณ 10-13 กรัมต่อลิตร ตลอดเวลาในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ และค่า DOT จะค่อยๆ ลดลงจนเท่ากับ ศูนย์จนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมัก สำหรับเอทานอลตรวจพบในปริมาณที่มาก โดยมีค่าประมาณ 14.71 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ ความเข้มข้นของเอทานอลที่ตรวจพบมีค่าสูงจนอยู่ในระดับที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเติบโตและแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดส (ผลจากงานวิจัยในบทที่ 3)



ภาพที่ 5-3 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ (ชั่วโมงที่ 0-13) และกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ (ชั่วโมงที่ 13-37) เมื่อทำการควบคุมสภาวะในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ภายใต้สภาวะไม่จำกัดกลูโคส (กลูโคส $\approx$ 10 กรัมต่อลิตร) แต่จำกัดออกซิเจน ($DOT > 25$ เปอร์เซ็นต์) (ระบบควบคุมแบบที่ 3)

ระบบควบคุมแบบที่ 4: (GNON; กลูโคสและออกซิเจนไม่จำกัด) ในระยะเฟด-แบคทีเรียมีการควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสประมาณ 10 กรัมต่อลิตร โดยเริ่มกระบวนการหมักแบบเฟด-แบคทีเรียเมื่อความเข้มข้นของกลูโคสจากกระบวนการหมักแบบแบคทีเรียเหลือประมาณ 10 กรัมต่อลิตร (ชั่วโมงที่ 13 ของการเพาะเลี้ยงแบบแบคทีเรีย) โดยเติมอาหารที่มีกลูโคส 200 กรัมต่อลิตร (ปริมาตรที่เติมทั้งหมดประมาณ 2 ลิตร) โดยใช้อัตราการเติมแบบเอ็กโพเนนเชียล ($\mu_{set} = 0.2$ ต่อชั่วโมง) และมีการควบคุมค่าออกซิเจนละลายไม่ให้อยู่ต่ำกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ โดยเพิ่มความเข้มข้นของออกซิเจนในอากาศที่เติมเข้าไปในถังหมัก (ภาพที่ 5-4) ซึ่งพบว่าความหนาแน่นของเซลล์ และกิจกรรมของรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดส สูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการหมัก ความเข้มข้นของกลูโคสสามารถควบคุมให้มีค่าประมาณ 10-11 กรัมต่อลิตร ตลอดเวลาในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบคทีเรีย และสามารถควบคุมค่า DOT ให้มีค่ามากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์จนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมัก สำหรับเอทานอลตรวจพบในปริมาณที่น้อยมาก โดยค่าสูงสุดที่ตรวจพบมีค่าประมาณ 0.60 กรัมต่อลิตร ทั้งนี้ ความเข้มข้นของเอทานอลที่ตรวจพบมีค่าต่ำมากจนอยู่ในระดับที่ไม่ทำให้เกิดการยับยั้งการเติบโตและแสดงออกของรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดส (ผลจากงานวิจัยในบทที่ 3)



ภาพที่ 5-4 รูปแบบการเติบโตและการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสของยีสต์ *P. pastoris* ในกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบแบคทีเรีย (ชั่วโมงที่ 0-13) และกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบคทีเรีย (ชั่วโมงที่ 13-37) เมื่อทำการควบคุมสถานะในการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบคทีเรียภายใต้สภาวะไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจน (กลูโคส $\approx$ 10 กรัมต่อลิตร และ DOT > 25 เปอร์เซ็นต์) (ระบบควบคุมแบบที่ 4)

5.2 อิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการเติบโตและอัตราการเติบโตของเซลล์

จากผลการทดลองพบว่าความหนาแน่นของเซลล์จะสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ คือ ออกซิเจน ซึ่งการควบคุมกระบวนการเพาะเลี้ยงในช่วงเฟด-แบตช์ ในสภาวะไม่จำกัดออกซิเจน จะให้ความหนาแน่นของเซลล์สูงกว่าในสภาวะจำกัดออกซิเจน ไม่ว่าความเข้มข้นของกลูโคสจะจำกัดหรือไม่ก็ตาม (ภาพที่ 5-5 และตารางที่ 5-2) แสดงให้เห็นว่าสภาวะจำกัดออกซิเจนส่งผลให้ความหนาแน่นของเซลล์ที่ได้น้อยลง นอกจากนี้ เมื่อพิจารณาถึงอัตราการเติบโตจำเพาะพบว่าสภาวะจำกัดออกซิเจนทำให้อัตราการเติบโตจำเพาะลดลง 35 เปอร์เซ็นต์ และ 63 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่ไม่จำกัดกลูโคส และไม่จำกัดกลูโคส (ตารางที่ 5-3) ตามลำดับ โดยผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kalina (1993)

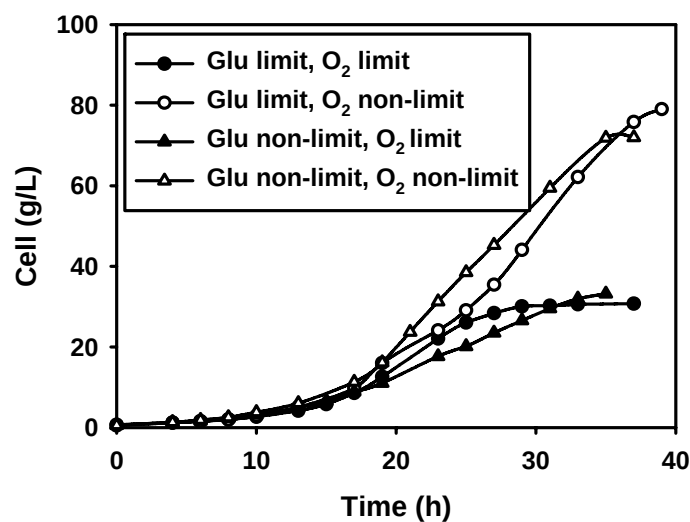
ตารางที่ 5-2 ความหนาแน่นของเซลล์ ความเข้มข้นของเอทานอล และกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงสุดที่ได้จากแต่ละระบบควบคุม

ระบบควบคุมแบบที่	เซลล์ (กรัมต่อลิตร)	เอทานอล (กรัมต่อลิตร)	เบต้ากลูโคซิเดส (หน่วยต่อลิตร)
1 (GLOL)	30.717	13.451	84.091
2 (GLON)	79.017	0.484	424.138
3 (GNOL)	33.192	14.711	74.394
4 (GNON)	71.992	0.592	472.989

ตารางที่ 5-3 ค่าพารามิเตอร์จากการศึกษาการเติบโต และการผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดสที่ได้จากแต่ละระบบควบคุม

ระบบควบคุมแบบที่	(μ) ต่อ ชม.	Yx/s ก./ก.	Ye/s ก./ก.	Yp/s หน่วย/ก.	q _p หน่วย/ก. ชม.	Q _p หน่วย/ล. ชม.
1 (GLOL)	0.105	0.20	0.11	0.49	0.149	2.885
2 (GLON)	0.163	0.58	2.21×10^{-3}	2.59	0.275	20.248
3 (GNOL)	0.063	0.24	0.29	0.54	0.095	2.885
4 (GNON)	0.173	0.53	1.61×10^{-3}	2.64	0.279	19.379

อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคส พบว่าการรักษาระดับความเข้มข้นของกลูโคสประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ในกระบวนการที่ไม่จำกัดกลูโคส ไม่สามารถพบความแตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกระบวนการที่มีการจำกัดกลูโคส ไม่ว่าจะดำเนินการวิจัยภายใต้สภาวะจำกัดหรือไม่จำกัดออกซิเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ในระหว่างกระบวนการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ ไม่ใช่เหตุผลที่ก่อให้เกิดการสร้าง by-product ในรูปเอทานอลผ่านปรากฏการณ์ overflow metabolism ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในบทที่ 4

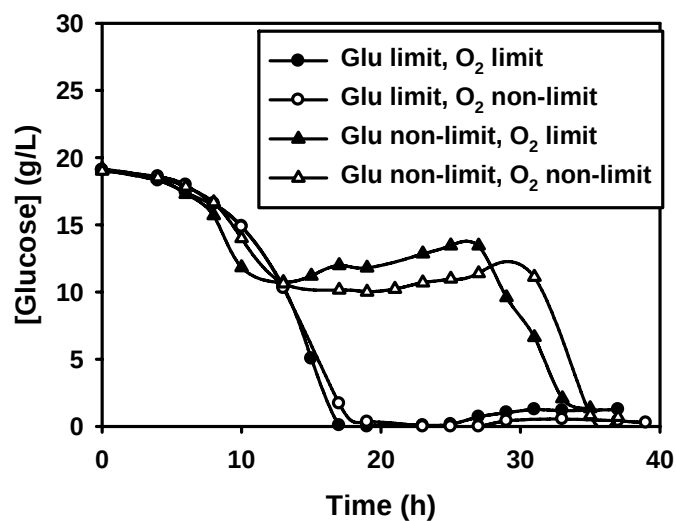


ภาพที่ 5-5 อิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการเติบโตของเซลล์ ในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ (ชั่วโมงที่ 13 จนถึงสิ้นสุด สำหรับกระบวนการที่ไม่จำกัดกลูโคสและชั่วโมงที่ 19 จนถึงสิ้นสุด สำหรับกระบวนการที่จำกัดกลูโคส) เมื่อสภาวะไม่จำกัดกลูโคสจะควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสประมาณ 10 กรัมต่อลิตร และสภาวะไม่จำกัดออกซิเจนจะควบคุมค่า DOT ให้มากกว่า 25 เปอร์เซ็นต์

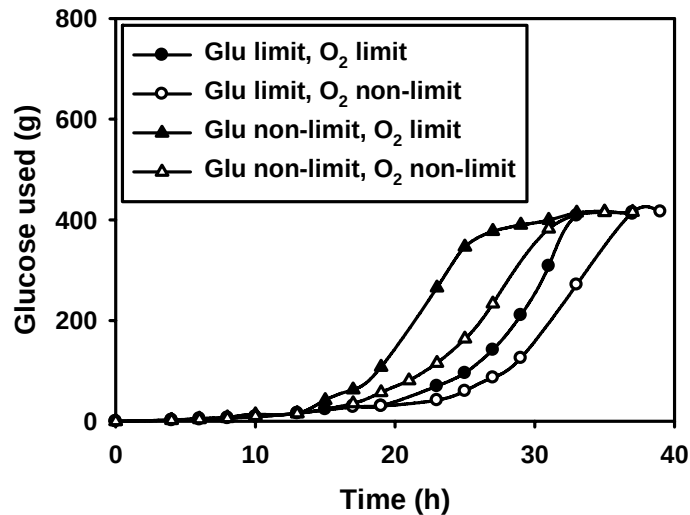
จากผลการทดลองที่ได้พบว่าในระบบที่ออกซิเจนจำกัดจะเกิดการสะสมเอทานอลในปริมาณที่มาก (ตารางที่ 5-2) ซึ่งทำให้ผลได้ของเซลล์จากสับสเทรตลดลง (ตารางที่ 5-3) ทั้งนี้ ผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kalina (1993)

5.3 อิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคสและการใช้กลูโคส

จากผลการทดลองพบว่าในช่วงแรกซึ่งเป็นการเพาะเลี้ยงแบบแบตช์ความเข้มข้นของกลูโคสลดลงอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นเมื่อดำเนินการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ โดยควบคุมสภาวะไม่ให้เกิดการจำกัดกลูโคส (ระบบควบคุมแบบที่ 1 และ 2) และควบคุมสภาวะให้เกิดการจำกัดกลูโคส (ระบบควบคุมแบบที่ 3 และ 4) พบว่าในระบบที่ 2 และ 4 (ออกซิเจนไม่จำกัด) จะสามารถรักษาระดับความเข้มข้นกลูโคสได้ตามสภาวะควบคุมที่ดำเนินการได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม สำหรับระบบที่ 1 และ 3 (ออกซิเจนจำกัด) ความเข้มข้นของกลูโคสจะสูงกว่าในสภาวะที่ไม่จำกัดออกซิเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถใช้กลูโคสในสภาวะจำกัดออกซิเจนได้ช้ากว่าสภาวะไม่จำกัดออกซิเจน จนส่งผลให้เกิดการสะสมกลูโคสมากขึ้น ดังภาพที่ 5-6 และ 5-7



ภาพที่ 5-6 อิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคส

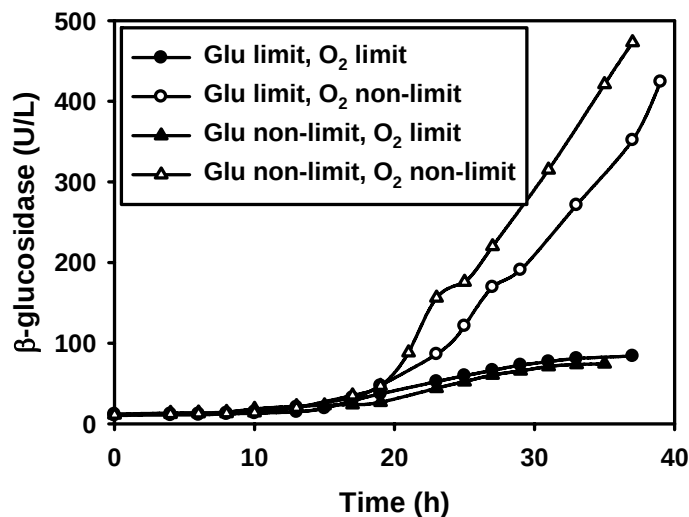


ภาพที่ 5-7 อิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการใช้กลูโคส

5.4 อิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

จากการทดลอง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ และจะเพิ่มสูงขึ้นในระยະที่มีการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ (ภาพที่ 5-8) โดยในระบบควบคุมที่มีการจำกัดออกซิเจน (ระบบที่ 1 และ 3) จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสต่ำมาก เมื่อเทียบกับผลที่ได้จากระบบควบคุมที่ไม่จำกัดออกซิเจน (ระบบที่ 2 และ 4) แสดงให้เห็นว่าสภาวะจำกัดออกซิเจนส่งผลให้การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter ลดลง โดยพบว่าภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจนจะให้กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงสุดลดลง 80 เปอร์เซ็นต์ และ 84 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่จำกัด และไม่จำกัดกลูโคส ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Zigova และคณะ (1999)

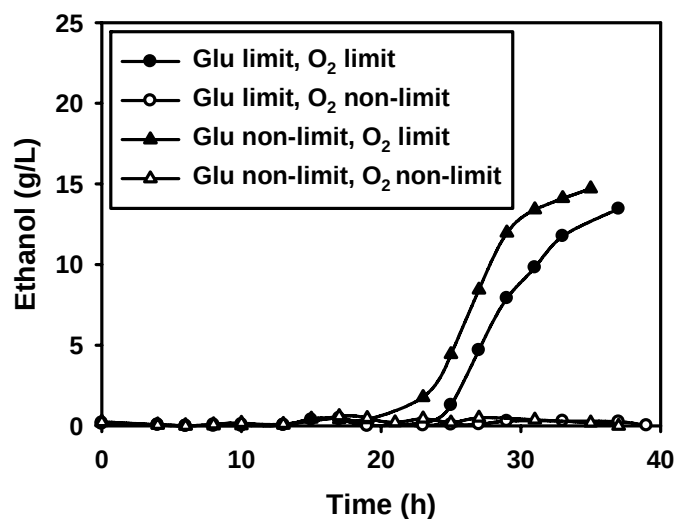
เมื่อพิจารณาถึงอิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่ออัตราการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส พบว่าค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ที่หาได้จากระบบควบคุมแบบที่ 1 2 3 และ 4 มีค่าประมาณ 2.885 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง, 20.248 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง, 2.885 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 19.379 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งในระบบที่จำกัดออกซิเจน (ระบบที่ 1 และ 3) จะมีค่าต่ำกว่าระบบที่ไม่จำกัดออกซิเจน (ระบบที่ 2 และ 4) ประมาณ 7 เท่า (ภาพที่ 5-8)



ภาพที่ 5-8 อิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อกิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส

5.5 อิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการสร้าง by-product ในรูปเอทานอล

จากผลการทดลองที่ได้จากระบบควบคุมที่ไม่จำกัดออกซิเจน คือ ระบบควบคุมแบบที่ 2 (จำกัดกลูโคส แต่ไม่จำกัดออกซิเจน) และระบบควบคุมแบบที่ 4 (ไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจน) พบว่าการควบคุมความเข้มข้นของกลูโคสในช่วงการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ที่ประมาณ 10 กรัมต่อลิตร ในระบบควบคุมแบบที่ 4 ไม่ส่งผลให้เกิด by-product ในรูปเอทานอลผ่านวิธี overflow metabolism (Enfors and Haggstrom, 2000) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นสูงสุดของเอทานอลที่ตรวจพบระหว่างระบบควบคุมแบบที่ 2 และ 4 พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 0.59 และ 0.48 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งผลที่ได้ต่างจากการทดลองในบทที่ 3 ซึ่งทำการทดลองในฟลาสก์เขย่าโดยใช้อาหาร BMGluY ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 10 กรัมต่อลิตร ที่สามารถพบว่ามีเอทานอลเพิ่มขึ้นประมาณ 3 กรัมต่อลิตร อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาถึงค่า DOT พบว่าในระบบควบคุมแบบที่ 2 และ 4 มีการควบคุมให้ค่า DOT สูงกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่การเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์เขย่าไม่มีการตรวจวัดค่า DOT ซึ่งอาจจะอยู่ในสภาวะจำกัดออกซิเจนก็เป็นไปได้



ภาพที่ 5-9 อิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการสร้าง by-product ในรูปเอทานอล

เมื่อพิจารณาผลการทดลองที่ได้จากระบบควบคุมจำกัดออกซิเจน คือ ระบบควบคุมแบบที่ 1 (จำกัดกลูโคส แต่จำกัดออกซิเจน) และ 3 (ไม่จำกัดกลูโคส แต่จำกัดออกซิเจน) พบว่าเกิดการผลิตเอทานอลในปริมาณที่สูงมาก โดยมีค่าประมาณ 13.45 และ 13.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ (ภาพที่ 5-9) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสภาวะจำกัดออกซิเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเกิด by-product ในรูปเอทานอล ซึ่งมีผลเสียต่อการเติบโตและการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกโดย GAP promoter

5.4 สรุปผลการทดลอง

จากการทำการศึกษาอิทธิพลของความเข้มข้นของกลูโคสต่อการเติบโตและการแสดงออกของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter โดยทำการควบคุมแบบที่ 1 จำกัดกลูโคส, จำกัดออกซิเจน พบว่าการเติบโต การผลิตรีคอมบิแนนท์เบต้ากลูโคซิเดส สูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง การใช้กลูโคสและ DOT ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น สำหรับเอทานอลตรวจพบในปริมาณที่มาก คือ มีค่าประมาณ 13.45 กรัมต่อลิตร

การควบคุมแบบที่ 2 จำกัดกลูโคส, ไม่จำกัดออกซิเจน พบว่าการเติบโต การผลิตรีคอม-
บิแนนท์เบต้ากลูโคสิดีส สูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง การใช้กลูโคสและ DOT ลดลง
ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น สำหรับเอทานอลตรวจพบในปริมาณที่น้อย คือ มีค่าประมาณ 0.484 กรัม
ต่อลิตร ทั้งนี้ ความเข้มข้นของเอทานอลที่ตรวจพบมีค่าน้อยมากและไม่ทำให้เกิดผลเสียต่อ
กระบวนการ

การควบคุมแบบที่ 3 ไม่จำกัดกลูโคส, จำกัดออกซิเจน พบว่าการเติบโต การผลิตรีคอม-
บิแนนท์เบต้ากลูโคสิดีส สูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง การใช้กลูโคสและ DOT ลดลง
ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น สำหรับเอทานอลตรวจพบในปริมาณที่มาก คือ มีค่าประมาณ 13.97 กรัม
ต่อลิตร ทั้งนี้ ความเข้มข้นของเอทานอลที่ตรวจพบมีค่ามากและทำให้เกิดผลเสียต่อกระบวนการ

การควบคุมแบบที่ 4 ไม่จำกัดกลูโคส, ไม่จำกัดออกซิเจน พบว่าการเติบโต การผลิตรีคอม-
บิแนนท์เบต้ากลูโคสิดีส สูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการทดลอง การใช้กลูโคสและ DOT ลดลง
ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น สำหรับเอทานอลตรวจพบในปริมาณที่น้อย คือ มีค่าประมาณ 0.591 กรัม
ต่อลิตร

จากการศึกษาอิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการเติบโต
และอัตราการเติบโตของเซลล์ พบว่าความหนาแน่นของเซลล์จะสูงขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้ในการ
เพาะเลี้ยง โดยปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มความหนาแน่นของเซลล์ คือ ออกซิเจน ซึ่งการ
ควบคุมกระบวนการเพาะเลี้ยงในช่วงเฟด-แบตช์ ในสภาวะไม่จำกัดออกซิเจน จะให้ความ
หนาแน่นของเซลล์สูงกว่าในสภาวะจำกัดออกซิเจน ไม่ว่าความเข้มข้นของกลูโคสจะจำกัดหรือไม่ก็
ตาม ทั้งนี้ เมื่อพิจารณาถึงการสร้าง by-product ในรูปเอทานอล พบว่ามีการสร้างเอทานอล
ปริมาณมากในสภาวะที่จำกัดออกซิเจน ส่งผลให้ความหนาแน่นของเซลล์ที่ได้ลดลง เนื่องจาก
กลูโคสบางส่วนถูกใช้ในการสร้างเอทานอล ผลที่ตามมา คือ ทำให้ผลได้ของเซลล์ และสารชีว
โมเลกุล ได้แก่ รีคอมบิแนนท์โปรตีนรวมถึงปริมาณพลังงานที่ได้ลดลง นอกจากนี้เอทานอลยังมีผล
ยับยั้งกิจกรรมต่างๆ ภายในเซลล์ ซึ่งเมื่อพิจารณาถึงอัตราการเติบโตจำเพาะพบว่าสภาวะจำกัด
ออกซิเจนทำให้อัตราการเติบโตจำเพาะลดลง 35 เปอร์เซ็นต์ และ 63 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่จำกัด
และไม่จำกัดกลูโคส ตามลำดับ โดยผลที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zigova และคณะ (1999)
และ Kalina (1993)

เมื่อพิจารณาอิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการ
เปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของกลูโคสและการใช้กลูโคส พบว่าในระบบที่ 2 และ 4 (ออกซิเจนไม่
จำกัด) จะสามารถรักษาระดับความเข้มข้นกลูโคสได้ตามสภาวะควบคุมที่ดำเนินการได้เป็นอย่างดี

อย่างไรก็ตาม สำหรับระบบที่ 1 และ 3 (ออกซิเจนจำกัด) ความเข้มข้นของกลูโคสจะสูงกว่าในสภาวะที่ไม่จำกัดออกซิเจน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเชื้อสามารถใช้กลูโคสในสภาวะจำกัดออกซิเจนได้ต่ำกว่าสภาวะไม่จำกัดออกซิเจน จนส่งผลให้เกิดการสะสมกลูโคสมากขึ้น

เมื่อทำการศึกษาอิทธิพลของสภาวะจำกัดและไม่จำกัดกลูโคสและออกซิเจนต่อการผลิตเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดส พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ใช้และจะเพิ่มสูงขึ้นในระยะที่มีการเพาะเลี้ยงแบบเฟด-แบตช์ โดยในระบบควบคุมที่มีการจำกัดออกซิเจน (ระบบที่ 1 และ 3) จะให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสต่ำมาก เมื่อเทียบกับผลที่ได้จากระบบควบคุมที่ไม่จำกัดออกซิเจน (ระบบที่ 2 และ 4) แสดงให้เห็นว่าสภาวะจำกัดออกซิเจนส่งผลให้การผลิตรีคอมบิแนนท์โปรตีนโดย *P. pastoris* ภายใต้การควบคุมการแสดงออกของ GAP promoter ลดลง โดยพบว่าภายใต้สภาวะจำกัดออกซิเจนจะให้กิจกรรมของเอนไซม์เบต้ากลูโคซิเดสสูงสุดลดลง 80 เปอร์เซ็นต์ และ 84 เปอร์เซ็นต์ ในกรณีที่ไม่จำกัดและไม่จำกัดกลูโคส ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงค่าอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากระบบควบคุมแบบที่ 1 2 3 และ 4 มีค่าประมาณ 2.885 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง, 20.248 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง, 2.885 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง และ 19.379 หน่วยต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งในระบบที่จำกัดออกซิเจน (ระบบที่ 1 และ 3) จะมีค่าต่ำกว่าระบบที่ไม่จำกัดออกซิเจน (ระบบที่ 2 และ 4) ประมาณ 7 เท่า

เมื่อทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล การควบคุมแบบที่ 1 จำกัดกลูโคส, จำกัดออกซิเจนและการควบคุมแบบที่ 3 ไม่จำกัดกลูโคส, จำกัดออกซิเจน พบว่าสภาวะจำกัดออกซิเจนส่งเสริมการผลิตเอทานอล โดยความเข้มข้นของเอทานอลที่วัดได้มีค่าประมาณ 13.45 และ 13.97 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาถึงค่า DOT พบว่ามีค่าประมาณ 0 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งแสดงว่าเกิดสภาวะจำกัดออกซิเจน ดังนั้นเอทานอลที่เกิดขึ้นจึงเกิดผ่านวิธีการหมัก ส่วนการควบคุมแบบที่ 2 จำกัดกลูโคส, ไม่จำกัดออกซิเจนและการควบคุมแบบที่ 4 ไม่จำกัดกลูโคส, ไม่จำกัดออกซิเจน เมื่อทำการวิเคราะห์ความเข้มข้นของเอทานอล พบว่าความเข้มข้นของเอทานอลน้อยมาก โดยมีค่าประมาณ 0.591 และ 0.484 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าในสภาวะไม่จำกัดออกซิเจนยีสต์ *P. pastoris* จะมีการใช้กลูโคสผ่านวิธีการหายใจเป็นหลัก (Enfors and Haggstrom, 2000)

จากผลการทดลองตอนที่ 3 สามารถสรุปได้ว่าสภาวะจำกัดออกซิเจนเป็นสาเหตุหลักในการเกิด by-product ในรูปเอทานอลของระบบการเพาะเลี้ยง *P. pastoris* โดยใช้กลูโคสเป็นสับสเตรต การออกแบบกระบวนการควบคุมการเกิด overflow metabolism สามารถลด by-product

ในรูปของเอทานอล และสามารถเพิ่มการเติบโต การผลิต ผลได้ของเซลล์ รวมถึงผลได้ของผลิตภัณฑ์ ซึ่งพบว่าระบบที่เหมาะสมที่สุด คือ ระบบที่ 4 ไม่จำกัดกลูโคส, ไม่จำกัดออกซิเจน อย่างไรก็ตาม ระบบที่ 4 ไม่จำกัดกลูโคส, ไม่จำกัดออกซิเจน จะควบคุมได้ยากภายใต้สภาวะที่ความหนาแน่นของเซลล์สูง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงแนะนำระบบที่ 2 คือ กลูโคสจำกัดและออกซิเจนไม่จำกัด สำหรับการแสดงออกของรีคอมบิแนนท์โปรตีนใน *P. pastoris* ที่ใช้โปรโมเตอร์ GAP เป็นตัวควบคุมแบบต่อเนื่องตลอดเวลา

บรรณานุกรม

- Alexander, M.A. and Jeffreis, T.W. 1990. Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 12: 2-19.
- Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1990. Official Method of Analysis. Vol. 2. 15th ed., The Association of Official Agricultural Chemists, Virginia. 613 p.
- Bai, F.W., Anderson, W.A., and Moo-Young, M. 2008. Ethanol fermentation technologies from sugar and starch feedstocks. *Biotechnol. Adv.* 26: 89-105.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Casey, G.P. and Ingledew, W.M. 1986. Ethanol tolerance in yeast. *Crit. Rev. Microbiol.* 13: 19-280.
- Chiruvolu, V., Cregg, J.M., and Meagher, M.M. 1997. Recombinant protein production in an alcohol oxidase-defective strain of *Pichia pastoris* in fed-batch fermentations. *Enzyme Microb. Technol.* 21: 227-283.
- Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Jahic, M., Veide, A. and Enfors, S.-O. 2006. Increased total air pressure *versus* oxygen limitation for enhanced oxygen transfer and product formation in a *Pichia pastoris* recombinant protein process. *Biochemical Engineering Journal.* 30: 205-211.
- Charoenrat, T., Ketudat-Cairns, M., Stendahl-Andersen, H., Jahic, M. and Enfors, S.-O. 2005. Oxygen-limited fed-batch process: an alternative control for *Pichia pastoris* recombinant protein processes. *Bioprocess and Biosystem Engineering.* 27(6): 399-406.
- Clare, J.J., Romanos, M.A., Rayment, F.B., Rowedder, J.E., Smith, M.A., Payne, M.M., Sreekrishna, K. and Henwood, C.A. 1991. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. *Gene* 105: 205-212.

- D' Amore, T. and Stewart, G.C. 1987. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb. Technol.* 9: 322-330.
- De Deken, R.H. 1966. Crebtree effect: a regulatory system in yeast. *J. Gen. Microbiol.* 44: 149-156.
- Doran, P.M. 2003. *Bioprocess Engineering Principles*. Academic Press, London, UK. 439 p.
- Enfors, S-O. and Haggstrom, L. 2000. *Bioprocess Technology: Fundamentals and Applications*. Royal Institute of technology, Stockholm. 356 p.
- Enfors, S.-O., Hedenberg J., and Olsson, K. 1990. Simulation of the dynamics in the baker's yeast process. *Bioprocess Eng.* 5:191-198.
- Evan, C.S. 1985. Properties of the b-glucosidase (cellobiase) from the wood-rotting fungus *Coriolus versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 128-131.
- Egli, T., van Dijken, J.P., Veenuis, M., Harder, W., and Fiechter, A. 1980. Methanol Metabolism in yeast: regulation of synthesis of catabolic enzymes. *Arch. Miceobiol.* 124: 115-121.
- Fiechter, A. and Seghezzi, W. 1992. Regulation of glucose metabolism in growing yeast cells. *J. Biptechol.* 27: 27-45.
- Groot, W.J., Kraayenbrink, M.R., Waldram, R.H., van der Lans, R.G.J.M., Luyben Kch.A.M. 1992. Ethanol production in an integrated process of fermentation and ethanol recovery by pervaporation. *Bioprocess. Eng.* 8:99-111.
- Higgins, D.R., and Cregg, J.M. 1998. *Methods in molecular biology: Pichia pastoris*. Humana: Totowa, NJ.
- Inan, M. and Meagher, M.M. 2001. The effect of ethanol and acetate on protein expression in *Pichia pastoris*. *J. Bioscience Bioeng.* 92(4): 337-341.
- Jeude, M., Dittrich, B., Niederschulte, H., Anderlei, T., Knocke, C., Klee, D., and Buchs, J. 2006. Fed-batch mode in shake flasks by slow-release technique. *Biotech. Bioeng.* 95(3): 433-445.
- Käppeli, O. 1986. Regulation of carbon metabolism in *Saccharomyces Cerevisiae* and related yeast. *Adv. Microbiol. Physiol.* 28: 181-209.

- Kalina, V. 1993. Dynamics of microbial growth and metabolic activity and their control by aeration. *Antonie van Leeuwenhoek Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 63: 353-373.
- Ketudat-Cairns, J.R., Champattanachai, V., Srisomsap, C., Wittman-Liebold, B., Thiede B., and Svasti J. 2000. Sequence and expression of Thai Rosewood β -glucosidase / β -fucosidase, a family 1 glycosyl hydrolase glycoprotein. *J. Biochem.* 128: 999-1008.
- Kristiansen, B. 1994. Integrated design of fermentation plant. The production of baker's yeast, p. 1-83. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, Germany.
- Larue, F., Lafon-Lafourcade, S., Ribereau-Gayon, P. 1984. Relationship between the inhibition of alcoholic fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae* and the activities of hexokinase and alcohol dehydrogenase. *Biotechnol Lett.* 1984. 6: 687-692.
- Lidén, G. 1993. On-line monitoring techniques for the study of yeast physiology. Dissertation, Department of Chemical Reaction Engineering, Chalmers University of Technology, Sweden.
- Loung, J.H.T. 1985. Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 17: 280-285.
- Macauuley-Patrick, S., Fazenda, M.L., McNeil, B., and Harvey, L.M. 2005. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast.* 22: 249- 270.
- Menendez, J., Hernandez, L., Banguela, A., and Pais, J. 2004. Functional production and secretion of the *Gluconoacetobacter diazotrophicus* fructose-releasing exo-levanase (LsdB) in *Pichia pastoris*. *Enz. Microb. Technol.* 34(5): 446-452.
- Miller, L.G. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31: 426-438.
- Nishino, H., Miyazaki, S., and Tohjo, K. 1985. Effect of osmotic pressure on the growth rate and fermentation activity of wine yeast. *Am. J. Enol. Vitic.* 36(2): 170-174.
- Petrik, M., Kappeli, O. and Fiechter, A. 1983. An expanded concept for the glucose effect in the yeast *Saccharomyces uvarum*: involvement of short- and long-term regulation. *J. Gen. Microbiol.* 129: 43-49.

- Pham, T.B.H., Larson G. and Enfors S.-O. 1998. Growth and energy metabolism in aerobic fed-batch culture of *Saccharomyces cerevisiae*: Simulation and model verification. *Curr. Opin. Biotechnol.* 6: 527-533.
- Postma, E., W. A. Scheffers, and J. P. van Dijken. 1989. Enzymatic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 468-477.
- Reed, G., and Nagodawithana. T. W. 1991. Van Nostrand Reinhold, New York, N.Y. Yeast technology, 2nd ed., p.261-313 and 315-368.
- Reese, E.T. 1997. Degradation of polymetric carbohydrates by microbial enzyme. *Rec. Adv. Phytochem.* 11: 311-364.
- Ringbom, K., Rothberg, A., and Saxén, B. 1996. Model-based automation of baker's yeast production. *J. Biotechnology.* 51: 73-82.
- Trivedi, N.B., Jacobson, G.K., and Tesch, W. 1986. Baker's yeast. *Crit. Rev. Biotechnol.* 24: 75-109.
- Van Hoek, W.P.M., Van Dijken, J.P., and Pronk, J.T. 1998. Ethanol of specific growth rate on fermentative capacity of baker's yeast. *Appl Environ Microbiol.* 64:4226-4233.
- Van Ulk, H., Voll, W.S.L., Scheffers, W.A., and van Dijken, J.P. 1990. Transient-state analysis of metabolic fluxes in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(1): 281-287.
- Veenhuis M., van Dijken J.P., and Harder W. 1983. The significance of peroxisomes in the metabolism of one-carbon compounds in yeast. *Adv. Microb. Physiol.* 24: 1-82.
- Verduyn, C., Zomerdijk, T.P.L., van Dijken, J.P. and Scheffers, W.A. 1984. Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 181-185.
- Von Meyenburg, H. K. 1969. Energetics of the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae* during glucose-limited aerobic growth. *Arch. Mikrobiol.* 66:289-303.
- Waterham H.R., Digan M.E., Koutz P.J., Lair S.V. and Cregg J.M. 1997. Isolation of the *Pichia pastoris* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene and regulation and use of its promoter. *Gene.* 186: 37-44..

- Weusthuis, R.A., Pronk, J.T. and van den Broek, P.J.A. 1994. Chemostat cultivation as a tool for studies on sugar transport in yeasts. *Microbiol. Rev.* 58(4): 616-630.
- Woehrer, W. and Roehr, M. 1981. Regulatory aspects of baker's yeast metabolism in aerobic fed-batch culture. *Biotechnol. Bioeng.* 23: 567-581.
- Zhang, W., Li, Z.J., and Agblevor, F.A. 2005. Microbubble fermentation of recombinant *Pichia pastoris* for human serum albumin production. *Process Biochem.* 40: 2073-2078.
- Zigova J., Mahle M., Paschold H., Malissard M., Berger E.G., and Weuster-Botz, D. 1999. Fed-batch production of a soluble β -1,4-galactosyltransferase with *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 201-207.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการ

การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 8

วันที่ 16-18 ตุลาคม 255

โรงแรมฮอติเดียนน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

Effect of Ethanol on *Pichia pastoris*'s Growth and Recombinant Protein Expression Using GAP Promoter

Charoenrat, T.^{1*}, Pramal, N.¹, Ruanglek, V.², Ketudat-Cairns, M.³

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University (Rangsit center), Pathumthani, 12120, Thailand

²Fermentation and Biochemical Engineering Laboratory, National Center for Genetic Engineering for Biotechnology (BIOTEC) Pathumthani, 12120, Thailand

³School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

Abstract

Constitutive protein expression in *Pichia pastoris* using the GAP promoter is an effective alternative to the inducible AOX1 promoter. GAP promoter is a strong constitutive promoter that shows higher expression when the cells are grown on glucose than glycerol or methanol. When *P. pastoris* are grown on glycerol, the non-fermentable sugar, small amount of ethanol can be detected. Ethanol has been reported to repress the AOX1 promoter resulting in lower expression level of recombinant protein. However, no literature has reported on the production of ethanol by-product when *P. pastoris* are grown on glucose or the effect of ethanol on the expression of GAP promoter. This present work, the effect of ethanol on growth and expression of GAP promoter were investigated in shake flask experiments using β -glucosidase as a model protein. The results showed that the increase of ethanol concentration decreased both final cell and β -glucosidase concentration. Furthermore, the volumetric glucose consumption rate, specific growth rate, volumetric growth rate and volumetric production rate were also decreased when ethanol concentration increases. During the cultivation, the ethanol concentration was relatively constant at the beginning of the process and then increased in same level of about 3 g/L in all experiments. The ethanol concentration was highest at the point that glucose is depleted. Then, the ethanol concentration continuously decreased. These results indicated that ethanol inhibiting the growth of the cell and also the expression of the GAP promoter.

Keywords: *Pichia pastoris*, ethanol inhibition, ethanol repression, overflow metabolism, GAP promoter

ภาคผนวก ข

การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการ

การประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่ พบ เมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 7

วันที่ 15-17 ตุลาคม 2552

โรงแรมฮอติเดียนน์ รีสอร์ท รีเจนท์ บีช ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี

Analysis and Control of Ethanol By-Product Formation in Constitutive expression of *Pichia pastoris* Fed-Batch Process

Charoenrat, T.^{1*}, Pramal, N.¹, Ruanglek, V.², Ketudat-Cairns, M.³

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology,
Thammasat University (Rangsit center), Pathumthani, 12120, Thailand

²Fermentation and Biochemical Engineering Laboratory, National Center for
Genetic Engineering for Biotechnology (BIOTEC), Pathumthani, 12120, Thailand

³School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

Abstract

Constitutive expression of *Pichia pastoris* using the *GAP* promoter to avoid the use of methanol is an effective alternative to the inducible *AOX1* promoter. *GAP* promoter shows higher expression level when the cells are grown on glucose. However, yeast often produce ethanol by-product when grown on glucose. But, the production of ethanol by-product when *P. pastoris* are grown on glucose or the effect of ethanol on the expression of *GAP* promoter has yet been reported. In this work, first, the effect of ethanol on the growth and expression of *GAP* promoter were investigated using β -glucosidase as a reporter protein. The present of ethanol in culture medium decreased the cell concentration, specific growth rate (μ) and β -glucosidase activity. These results indicated that ethanol inhibit the cell growth and also the expression of the *GAP* promoter. Then, the influence of initial glucose concentration was studied under oxygen non-limit condition (DOT > 25 %). The optimum initial glucose concentration of 20 g/L provides $\mu = 0.20 \text{ h}^{-1}$ and lag time of 3.99 h. The increase of initial glucose concentration to 60 and 80 g/L resulted in the accumulation of ethanol, which decrease μ and increased the lag time. These results indicated that ethanol was produced *via* overflow metabolism. Finally, 4 fed-batch systems were designed base on the effect of glucose concentration and DOT to find the optimum fed-batch control (system I: glucose and oxygen limit, system II: glucose limit and oxygen non-limit (DOT > 25%), system III: glucose non-limit ([glu] $\approx$ 10 g/L) and oxygen limit), and system IV: glucose and oxygen non-limit). The results showed that the oxygen limitation had a major drawback effect to both cell growth and expression of the *GAP* promoter. More ethanol by product was accumulated under the oxygen limited condition (13.5-14.0 g/L) compare to the oxygen non-limited condition (0.6 g/L). The higher ethanol concentration results in the decrease of μ about 35 and 63% when compared system I with system II and system III with system IV, respectively. Furthermore, about 7 times higher specific production rate was observed under oxygen limitation compared with oxygen non-limit condition. The best results were obtained when system IV was used, however, the system IV is very difficult to control under high cell density culture. Therefore, we recommended system II of glucose limit and oxygen non-limit for the constitutive expression process of *P. pastoris* using glucose as substrate.

Keywords: *Pichia pastoris*, ethanol inhibition, ethanol repression, overflow metabolism, *GAP* promoter

ภาคผนวก ค

การเสนอผลงานแบบโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการ

The 20th Annual Meeting and

International Conference of the Thai Society for Biotechnology (TSB 2008)

Oct 14-17th, 2008

Taksila Hotel, Maha Sarakham, Thailand

THE INFLUENCE OF ETHANOL ON GROWTH AND PROTEIN EXPRESSION BY *Pichia pastoris* USING GAP PROMOTER

Charoenrat, T.^{1*}, Pramal, N.¹, Ruanglek, V.², Ketudat-Cairns, M.³

¹Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University
(Rangsit center), Pathumthani, 12120, Thailand

²Fermentation and Biochemical Engineering Laboratory, National Center for Genetic Engineering for
Biotechnology (BIOTEC) Pathumthani, 12120, Thailand

³School of Biotechnology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology,
Nakhon Ratchasima, 30000, Thailand

Abstract

Constitutive GAP expression system is an alternative promoter in *Pichia pastoris* which is as effective to the inducible AOX1 promoter. The GAP expression is a strong constitutive promoter that shows higher expression when cells are grown on cheap carbon source like glucose than glycerol or methanol. When *P. pastoris* are grown on glycerol, the non-fermentable sugar, small amount of ethanol can be detected. Ethanol has been reported to repress the AOX1 promoter resulting in lower expression level of recombinant protein. However, no literature has reported on the production of ethanol by-product when *P. pastoris* are grown on glucose or the effect of ethanol on the expression of GAP promoter. This work presents the effect of ethanol on growth and expression of GAP promoter, investigated in shake flask experiments using β -glucosidase (β -glu) as a model protein. The results show that the increasing ethanol concentration could decrease both final cell and β -glu production. Furthermore, specific growth rate and the three volumetric rates namely glucose consumption, growth rate and β -glu production were also decreased with the ethanol concentrations. During the cultivation, the added ethanol concentrations were relatively constant at the beginning of the process and then after 12 hours or at the beginning of exponential phase they increased in same level of about 3 g/L along with β -glu expression in all experiments. The ethanol concentration was highest at the point that glucose was depleted and it continuously decreased afterwards. These results strongly indicate that ethanol could inhibit both cell growth and β -glu expression of the GAP promoter in *Pichia pastoris*.

Keywords: *Pichia pastoris*, ethanol inhibition, GAP promoter